

II. 芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果と ペオニフロリン含有外用薬の開発

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）

応用薬理学 安東 嗣 修

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）

産婦人科学 齋藤 滋

抗がん薬投与による生じる非常に耐えがたく、投薬中止あるいは終了後も引き続き症状が継続する副作用に末梢神経障害【痛みやしびれなど耐え難い不快感覚など】がある。この末梢神経障害をコントロールできる予防・治療薬が無いのが現状である。これまでに漢方方剤 芍薬甘草湯が、臨床及び動物実験において抗がん薬の末梢神経障害のコントロールへの有用性が見出されてきた。抗がん薬による末梢神経障害は、「手袋一靴下型」の形成分布を示す。つまり、四肢末端で認められることを特徴とする。漢方方剤は、毎日の服用に難色を示す患者や嚥下困難な患者もいることから、その継続使用は患者本人や介助者にとって負担が大きい。そこで、末梢神経障害が、四肢末端で起こることに着目し、外用薬開発を目指している。その中で、芍薬成分のペオニフロリンに着目し、本研究では、その外用効果を検討してきた。また、臨床においては、芍薬成分の外用を目指し、がん患者における抗がん薬による末梢神経障害への芍薬甘草湯の効果の評価法の確立を含め検証してきた。

【各班のまとめ】

1. 動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果の検討と ペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験（応用薬理学：安東嗣修）

マウスを用いて抗がん薬パクリタキセル投与により機械的アロディニア（健常状態において非侵害性である刺激に対して、過敏に反応する状態）を形成する動物モデルを作製した。これまでに、芍薬成分のペオニフロリンをパクリタキセル投与翌日より繰り返し塗布することで、機械的アロディニアの形成を抑制することを見出した。そこで、既に機械的アロディニアが形成された状態でのペオニフロリンの単回外用の効果を検討したところ、アロディニアの抑制効果は認められなかった。このことは、ペオニフロリンの外用の急性効果は期待できないことが分かった。次に、ペオニフロリンの繰り返し外用の局所効果を検討した。パクリタキセル誘発の機械的アロディニアは、アロディニアの評価部位である両後肢足蹠で観察される。ペオニフロリン塗布側では、パクリタキセルによる機械的アロ

ディニアの形成は抑制されたが、反対側では抑制効果が認められなかった。このことは、ペオニフロリンの効果が塗布部局所のみ認められることを示唆する。更に本研究では、臨床で用いられる芍薬甘草湯の甘草の役割に関しても検討した。甘草成分のグリチルリチン酸は、単独の繰り返し塗布ではパクリタキセル誘発機械的アロディニアを抑制しなかったが、ペオニフロリンの効果を増強することを見出した。従って、甘草との構成は疼痛抑制に意義あると考えられる。

今回の研究では、ペオニフロリンの含有量の多い富山県産芍薬を用いて、これまで用いてきた他県産の芍薬との比較研究を行った。それぞれのエタノール抽出エキスの繰り返し塗布により、パクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成は抑制されたが、富山県産の方がより効果が大きかった。

以上本研究により、ペオニフロリンの外用は、塗布局所で効果を発揮することが明らかにし、甘草成分のグリチルリチン酸との併用によりその効果が増大することを見出した。この成果は今後製剤開発にとって重要な情報となると考えられる。また、ペオニフロリン含有量の多い富山県産芍薬は、これまで使用してきた市販の他県産の芍薬より有用であることが明らかとなった。

2. 抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯並びに芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験（産婦人科学：齋藤 滋）

富山大学臨床研究倫理審査に筋電計による神経伝達速度測定およびサーモグラフィーによる末梢温度測定を症例患者に対して行う研究承認を得ることができ、測定を開始した。本年度は症例9名に対して、神経伝達速度ならびに手の末梢温度測定を行い、運動神経伝導速度と手の末梢温度に正の相関が認められた。タキソール投与により、投与前後（投与前と投与後7日目）で、運動神経伝導速度にはタキソールの影響は認められなかったが、末梢温度の低下が認められた。芍薬甘草湯の評価ができた症例5名では、投与前後（投与前と投与後7日目）、運動神経伝導速度には芍薬甘草湯は影響しなかったが、末梢温度のタキソール投与による低下は芍薬甘草湯の投与により改善された。現在、症例数をさらに増やすべく、測定を行っているが、今回の結果らは芍薬甘草湯がタキソールの副作用に由来する末梢温度低下を改善することを見出した。

3. その他（応用薬理学：安東嗣修）

本製剤開発に向け、

- ①富山県くすり政策課職員（担当：藤岡）、本学リエゾンオフィス職員（担当：金田、今川）と共に富山県内製薬関連企業と面談を行った。
- ②日本薬理学会年会にて「創薬オープンイノベーション企画」にて、製薬企業との個別面談を行った。
- ③富山県くすり政策課、富山県薬事研究所、富山大学薬学部（応用薬理学）・医学部（産婦人科学）、和漢薬研究所（生物資源科学）、富山大学リエゾンオフィスの合同会議を行った。

Ⅱ－１ 動物モデルを用いた芍薬成分ペオニフロリンによる末梢神経障害改善効果の検討とペオニフロリン含有外用薬の開発の前臨床試験

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学） 応用薬理学
准教授 安 東 嗣 修

【研究目的】

抗がん薬は、がん患者の治療にとって必要不可欠なものである。しかし、抗がん薬の副作用は、がん患者の闘病に対する意識の減弱につながる。特に、QOL（生活の質）に関わる重大な副作用の代表に嘔吐や末梢神経障害があげられる。嘔吐に関しては、セロトニン 5-HT₃ 受容体やニューロキニン 1 受容体の拮抗薬が顕著な予防・治療効果を示す。一方、末梢神経障害【異常感覚(痛みや痺れなど)】は、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬ではそのコントロールが難しく、抗がん薬投与中止後も 1 年以上その症状が続く。従って、新規治療薬および予防薬の開発が必要となっている。

芍薬甘草湯は、芍薬と甘草から構成された漢方方剤であり、筋肉痛等様々な疼痛に用いられている。近年では、糖尿病性末梢神経障害にも有効であることが報告されている。また、抗がん薬投与患者の末梢神経障害にもその有用性が認められてきている。抗がん薬誘発の末梢神経障害は、「手袋一靴下型」の発症分布を示し、つまり、四肢末端でその障害が認められる。我々は、これまでに、抗がん薬誘発末梢神経障害性疼痛のマウスモデルを作出し、芍薬甘草湯の抗がん薬投与翌日からの 1 日 1 回経口投与で抗がん薬誘発機械的アロディニア（機械的アロディニア：健常では全く感じない外部刺激＜本実験では細いフィラメントによる触刺激＞）に対して、病態時に非常に激しい過敏状態になること）の発生を抑制すること、更に、この抑制効果が電気生理学的解析により末梢レベルで行われていることを明らかにしてきた。また、芍薬及び甘草のエタノールエキスをそれぞれマウスの機械的アロディニアの評価部位である後肢に抗がん薬投与翌日からの 1 日 2 回塗付すると芍薬のエタノールエキスの塗布において抗がん薬誘発の機械的アロディニアの発生が抑制された。一方、甘草のエタノールエキスではその効果は認められなかった。そこで、我々は、昨年、芍薬の主要成分であるペオニフロリンに着目し、ペオニフロリンの繰り返し外用が抗がん薬誘発の機械的アロディニアの発生を抑制することをみいだした。そこで、本年は、更に単回投与ならびに、塗布局所作用に関して検討し、また昨年効果が認められなかった芍薬甘草湯の甘草の役割に関しても調べた。更に、ペオニフロリンの含有量の多い富山県産の芍薬のエタノールエキスをを用いてこれまで使用していた他県の芍薬のエタノールエキスと効果の比較を行った。

【研究方法】

(実験動物)

実験には、雄性 C57BL/6 マウスを使用した。

(抗がん薬)

抗がん薬パクリタキセル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は、Cremophor EL, 100% エタノール及び生理食塩水を 1:1:8 の割合で調製した溶媒にて溶解し、5 mg/kgの用量で単回腹腔内注射した。

(芍薬エキス, ペオニフロリン, グリチルリチン酸)

芍薬刻み生薬 (富山県産芍薬, 富山; 栃本天海堂, 大阪) を用いエタノール抽出を行い, 抽出エキスをエタノールに溶解し塗布した。また, ペオニフロリン (和光純薬工業, 大阪) 或いはグリチルリチン酸 (東京化成工業, 東京) は, エタノールに溶解し塗布した。これらエタノール溶液は, 1日2回マウスの後肢の足首より指先側 (足掌, 足背, 指) に塗布した。

(行動評価: 機械的アロディニア)

マウス後肢足蹠に von Frey フィラメント (0.69mN) を適用し, この機械的刺激に対する後肢の反応を3段階のスコア化しアロディニアを評価した。

0: 反応なしまたは後肢を横にずらす行動

1: 後肢の引き上げ行動 (lifting)

2: 後肢の振り動作 (flinching) または刺激部位へのなめ行動 (licking)

【結果】

(1) パクリタキセル誘発機械的アロディニアへのペオニフロリンの単回外用による効果

昨年度, パクリタキセル投与マウスへ, パクリタキセル投与翌日からペオニフロリンのエタノール溶液を繰り返し1日2回マウス後肢の足首より先全体 (足掌, 足背, 指) に塗布すると, パクリタキセル誘発機械的アロディニアの発生は抑制されることを報告した。そこで, 今回, パクリタキセル投与後, 機械的アロディニアの形成がピークとなる14日目にペオニフロリンエタノール溶液を単回塗布した。その結果, ペオニフロリンエタノール溶液の塗布は, パクリタキセル誘発機械的アロディニアを抑制しなかった。

(2) パクリタキセル誘発機械的アロディニアへのペオニフロリンの繰り返し外用による局所効果

パクリタキセル投与翌日よりペオニフロリンエタノール溶液を繰り返し1日2回マウス後肢の足首

より先全体（足掌，足背，指）に塗布した。機械的アロディニアの評価は，ペオニフロリンエタノール溶液塗布足及び反対足の両方を評価した。その結果，ペオニフロリンエタノール溶液塗布足のみ，パクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成が抑制された。

(3) パクリタキセル誘発機械的アロディニアへのグリチルリチン酸の繰り返し外用による効果

パクリタキセル投与翌日よりグリチルリチン酸を繰り返し1日2回マウス後肢の足首より先全体（足掌，足背，指）に塗布した。その結果，グリチルリチン酸エタノール溶液の繰り返し塗布は，パクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成を抑制しなかった。

(4) パクリタキセル誘発機械的アロディニアへのペオニフロリンとグリチルリチン酸混液の繰り返し外用による効果

パクリタキセル投与翌日よりペオニフロリン単独及びグリチルリチン酸との混液を繰り返し1日2回マウス後肢の足首より先全体（足掌，足背，指）に塗布した。その結果，殆ど抑制効果を示さない用量のペオニフロリンの繰り返し塗布の効果にグリチルリチン酸を加えることで，ペオニフロリンによるパクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成の抑制効果が増強された。

(5) パクリタキセル誘発機械的アロディニアへの芍薬エタノール抽出物の繰り返し外用の効果（富山県産芍薬と栃本天海堂より購入した日本産芍薬との比較）

富山県では，ペオニフロリンの含有量が多い芍薬栽培を行っている。本研究では，富山県産芍薬及び，これまで使用してきた栃本天海堂より購入した日本産芍薬よりエタノール抽出を行い，パクリタキセル投与翌日よりこれらエタノール抽出物のエタノール再溶解液を繰り返し1日2回マウス後肢の足首より先全体（足掌，足背，指）に塗布した。その結果，両芍薬エタノール抽出物の塗布によりパクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成が抑制された。その抑制効果は，富山県産芍薬の方が栃本天海堂より購入した日本産芍薬より有意に抑制効果が大きかった。

【考察と今後の展望】

ペオニフロリンのパクリタキセル投与翌日からの繰り返し塗布ではパクリタキセル誘発機械的アロディニアの発生が抑制されるが，パクリタキセル誘発機械的アロディニアが形成された時点でのペオニフロリンの単回塗布では機械的アロディニアは抑制されなかった。従って，末梢に塗布されたペオニフロリンは，パクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成過程を抑制（例えば，神経保護作用など）するが，すでに形成されたアロディニアにはペオニフロリンの外用では制御できないことが示唆される。

今回の実験では，ペオニフロリンは，外用局所でのみ効果を示すことが明らかとなった。このことは，全身作用への影響がないということで，今後製剤開発にとって有用な情報となると期待される。

現在、臨床では、抗がん薬投与患者の末梢神経障害への芍薬甘草湯が有用である可能性のある報告が少しずつ出てきている。これまでに芍薬のエタノールエキスの繰り返し塗布がパクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成を抑制し、一方で、甘草のエタノールエキスの繰り返し塗布ではこのアロディニアの形成を抑制することができなかった。本研究では、甘草の主成分であるグリチルリチン酸を用いてその役割に関して検討したところ、グリチルリチン酸がペオニフロリンの効果を増強することを見出した。その増強作用機序の詳細は不明であるが、ペオニフロリンがP糖タンパク質の基質であること、皮膚にはP糖タンパク質があり、グリチルリチン酸がP糖タンパク質の発現を増加することが知られていることから、機序の1つとしてP糖タンパク質の発現増加によるペオニフロリンの吸収増大が関与しているかもしれない。

芍薬成分のペオニフロリンが、抗がん薬誘発の末梢神経障害の形成抑制に効果を示すことが明らかとなってきた。本年は、このペオニフロリンの含有量が現在市販されている芍薬より多い富山県産芍薬を用いても評価した。その結果、日本国内の他県の芍薬より抽出したエタノールエキスより、富山県産芍薬のエタノールエキスの方がパクリタキセル誘発機械的アロディニアの形成抑制効果が大きかった。この結果は、ペオニフロリンが有効成分の一つあることを更に証明し、富山県産芍薬がより有用であることが明らかとなった。

本研究成果を基に、今後、臨床応用に向け、作用機序の解明と安全性の確認、製剤化を検討していく予定である。また、臨床試験実施への倫理委員会への審査請求も行っていく予定である。

【その他活動】

臨床への応用を目指し、臨床試験で使用可能な製剤作製に関して、

- ①富山県くすり政策課職員（担当：藤岡）、本学リエゾンオフィス職員（担当：金田、今川）と共に富山県内製薬関連企業と面談を行った（2015年3月及び12月）
- ②日本薬理学会年会にて「創薬オープンイノベーション企画」にて、製薬企業との個別面談を行った。（2015年3月）
- ③富山県くすり政策課、富山県薬事研究所、富山大学薬学部（応用薬理学）・医学部（産婦人科学）、和漢薬研究所（生物資源科学）、富山大学リエゾンオフィスの合同会議を行った（2015年12月）

【学会発表】

安東嗣修. 下行性疼痛抑制系を介した抗がん薬による末梢神経障害性疼痛制御. 日本臨床腫瘍薬学会学術大会2015; 2015 Mar 14-15: 京都. (招待講演)

小林奈央, 安東嗣修, 北村 亮, 李 峰, 倉石 泰. マウスにおける抗がん薬 paclitaxel 誘発機械的アロディニアへの芍薬甘草湯の効果. フォーラム創薬富山 第41回研究会; 2015 May 28; 富山.

安東嗣修, 小林奈央, 北村 亮, 李 峰, 倉石 泰. マウスにおける paclitaxel 誘発機械的アロディニアへの芍薬甘草湯による末梢作用性抑制効果. 第32回和漢医薬学会学術大会; 2015 Aug 22-23; 富山.

安東嗣修. 抗がん剤による末梢神経障害とその予防対策. 第16回がん化学療法・緩和ケア研修会; 2015 Nov 7; 富山. (招待講演)

小林奈央, 安東嗣修, 北村 亮, 李 峰, 倉石 泰. マウスにおける抗がん薬 paclitaxel 誘発末梢神経障害性疼痛への芍薬甘草湯とその活性成分の効果. 日本薬学会北陸支部会127回例会; 2015 Nov. 15; 富山.

【その他発表】

安東嗣修. 糖尿病や薬剤によって起る「末梢神経障害」～異常感覚（痛みやしびれ）はどうやって起こるの？～. 平成27年度 富山大学サテライト講座; 2015 Aug 8; 富山.

【研究協力者】

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）応用薬理学

小林奈央, 倉石 泰

富山大学和漢医学総合研究所和漢薬の科学基盤形成拠点 拠点推進室

李 峰

Ⅱ－２ 抗癌薬投与患者の末梢神経障害に対する芍薬甘草湯 並びに芍薬成分ペオニフロリン含有外用薬の臨床試験

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学） 産婦人科学

教授 齋藤 滋
准教授 吉野 修
助教 島 友子
助教 鮫島 梓

【研究目的】

抗がん剤使用によりがんの治療成績が向上しており、がんサバイバーも増加している。その一方で、抗がん剤による嘔吐、血液毒性、易感染性、脱毛、肝機能障害などの副作用があるため、種々の対策がなされてきた。一方、抗がん剤による末梢神経障害（痛みや痺れなど）は、生命予後を悪化させないが、治療終了後の患者のQOLを著しく低下させる。これまで抗がん剤による末梢神経障害の発症の詳細な機序が判っておらず、臨床的に大きな問題点となっている。我々は芍薬甘草湯の芍薬がパクリタキセル誘導の末梢性の痛みに対して有用であることを報告し（Eur. J Pain ; 13 : 22-27, 2009）、臨床例においても芍薬甘草湯がパクリタキセルによる筋肉痛に有用であることを報告している（産婦人科漢方のあゆみ ; 28 : 40-45, 2011）。しかし、これまでの報告は患者による主観的評価法に頼っており、客観的な評価法が求められている。申請代表者である安東 嗣修は、電気生理学的手法を用いた検討から、抗がん剤投与マウスの末梢神経において痺れた相当する自家発火が増加していること、ならびに抗がん剤使用後に末梢循環障害が生じ、このことが痛み、痺れにつながることを、世界で初めて見出した。そこで、今回、婦人科がん患者でタキソール製剤を使用する症例に筋電計（T&Tメディカル社ニューロスタディー）および末梢温度を評価するサーモグラフィー（Fluku社Ti-32）を用いて、末梢神経障害を評価し、芍薬甘草湯による末梢神経障害を客観的に評価する方法の確立を目的とした。

【研究方法】

富山大学臨床研究倫理審査に筋電計による神経伝達速度測定およびサーモグラフィーによる末梢温度測定を症例患者に対して行う研究承認を得た。対象は富山大学附属病院産婦人科で外来、入院管理し、タキソールを含む抗がん剤投与症例100例を目標症例とし、今年度より測定を開始した。

同意を得られた患者に抗がん剤投与前（day 1）、7日後（day 8）に筋電計による電気生理学的方法で、電極を2カ所に装着し軽微な電流を流すことで電極間の神経伝達速度を計測した。また手背および足背にサーモグラフィーにかざすことで、非侵襲的に表面体温評価を行なった（図1）。

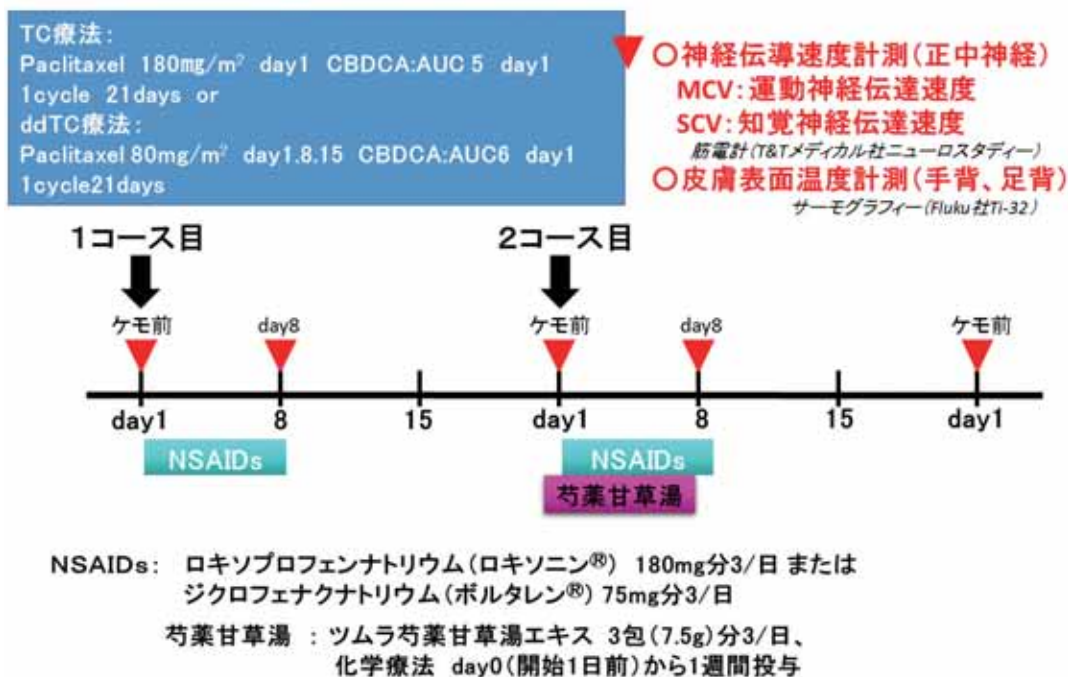


図1. 方法

これらを芍薬甘草湯非投与時(初回)と芍薬甘草湯投与時(2回目以降)とで比較し、自覚症状の改善度とあわせて評価した。今年度は以下の実験計画を立て、検討を開始した。

実験① 婦人科患者に対し、神経伝達速度および末梢(手および足)温度測定を複数回行い、データの集積を行った。

実験② タキソールを含む化学療法の初回治療症例9名のタキソール投与前(day1)および投与7日後(day8)の神経伝達速度および末梢温度を測定し、比較検討した。

実験③ 実験②の被験者のうち、化学療法2回目から、芍薬甘草湯内服を開始した症例に対して、同漢方の効果を検討するため、初回化学療法day8と2回目化学療法day8における神経伝達速度および末梢温度を測定し、比較検討した。

【結果】

実験① 今年度、9名の婦人科患者に対し、のべ48回の神経伝達速度および末梢温度測定を行った。神経伝達速度(運動神経:MCVおよび感覚神経:SCV)と末梢温度の分布を解析し、両者の関係を解析したところ、運動神経伝達速度と手の皮膚温度には有意な正の相関関係を認めた($P<0.05$)。一方、感覚神経伝達速度と手の皮膚温度には相関性は認められなかった。

実験② 初回化学療法を受ける9名の婦人科患者に対し、化学療法前後のデータを解析した。Day1とday8での比較において、神経伝達速度に関しては運動神経(MCV)および感覚神経(SCV)に差を

認めなかった。一方、末梢温度に関しては化学療法後に低下を認め ($P<0.08$)、特に手よりも足においてその傾向を強く認めた。

実験③ 芍薬甘草湯の評価を行うことができた症例は5例であった。芍薬甘草湯投与前後における化学療法 day 8 に得られたデータを解析した。神経伝達速度に関しては運動神経 (MCV) および感覚神経 (SCV) に差を認めなかった。末梢温度に関しては手では特に芍薬甘草湯投与前後で差を認めなかった。一方、足において、統計学的有意差はないものの改善傾向を認めた。

【考察と今後の展望】

これまで、抗がん剤による痛みや末梢神経障害の評価法は主観的であったが、客観的な評価法を確立し、また芍薬甘草湯による効果が客観的な評価でも証明されれば、臨床的に極めて大きな意義がある。今年度、実際に婦人科患者を対象に神経伝達速度および末梢温度の測定を開始した。化学療法および芍薬甘草湯の介入効果に関して、神経伝達速度測定では差を認めなかった。症例数が9例と少なく、データの蓄積が必要である。

一方、末梢温度に関しては化学療法による末梢温度の低下および、芍薬甘草湯投与によるその改善傾向を特に足背で認めた。来年度以降データの蓄積により、有意差が出る可能性がある。来年度は患者本人の自覚症状と神経速度および末梢温度評価という、客観的他覚所見が一致するかも含め検討を行う予定である。

本法は手技が容易であることから、本評価法を確立すれば早めの医療介入も可能となる。また、芍薬甘草湯や牛車腎気丸による抗がん剤の副作用軽減が臨床的に証明されれば、多くの癌症例にとって有益となる。

【学会発表】

1) 島友子 産婦人科漢方研究会 (2015年9月13日) シンポジウム, 東京

【研究協力者】

富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 産婦人科学

吉野 修, 島 友子, 鮫島 梓