

平成 31 年 5 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08298

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛に対する加工ブシの緩和作用とその有効成分の作用メカニズム

研究課題名(英文) Effect of processed aconite root on neuropathic pain and its active ingredients and action mechanisms

研究代表者

牧野 利明 (Makino, Toshiaki)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：80326561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛は、様々な原因により神経が障害されることで、神経が敏感になり、軽微な刺激でも痛みを感じる状態であり、従来からの鎮痛薬が無効であることが多く、治療薬の開発が求められている。我々は、神経障害性疼痛モデルマウスにおける痛み反応に対して、加熱処理したトリカブトの根(加工ブシ)のエキスが有効であることを認め、その有効成分としてネオリンを同定した。これまで加工ブシの鎮痛活性成分として知られていたベンゾイルメサコニンは、以上の神経障害性疼痛モデルに効果を示さなかった。神経障害性疼痛に対しては、ネオリンの含量の高い加工ブシ製剤を選ぶことで、その有用性を高めることが出来ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漢方医学では、トリカブトの根を痛みに対して使用する。しかし、トリカブトの根は毒性が高く、実際には加熱による減毒処理後に利用される。今回、発見した化合物、ネオリンは、従来の鎮痛薬が効きにくい神経障害性疼痛に対して有用性を示し、これまで知られていたトリカブトの根に含まれる鎮痛活性成分(=毒性成分の加熱による分解産物)は無効であった。ネオリンは、トリカブトの根を加熱、減毒処理しても、その含量は変化しなかった。以上のことから、トリカブトの根を減毒処理したものは、神経障害性疼痛治療薬として有用と考えられ、またネオリンをリード化合物とした新しい神経障害性疼痛治療薬の開発も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Processed aconite root (PA), the root of *Aconitum carmichaeli* (Ranunculaceae), is a crude drug used in Japanese kampo medicine to treat pain associated with coldness. The present study investigated the effects of PA on murine peripheral neuropathy models. PA boiled water extract was orally administered, and either neoline or benzoylmesaconine was subcutaneously injected into the murine model. Mechanical hyperalgesia was evaluated via the von Frey filament method. PA extract and neoline significantly attenuated the mechanical hyperalgesia induced by either paclitaxel or partial ligation of the sciatic nerve in mice. Subcutaneous injection of benzoylmesaconine did not attenuate the hyperalgesia induced in each model. The present results indicate that PA and its active ingredient, neoline, are promising agents for the alleviation of neuropathic pain. Neoline can be used as a marker compound to determine the quality of the PA products for the treatment of neuropathic pain.

研究分野：生薬学

キーワード：トリカブト ブシ 神経障害性疼痛 ネオリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブシは、第十六改正日本薬局方においてはハナトリカブト *Aconitum carmichaeli* またはオウトリカブト *A. japonicum* の塊根を加工調製したものである。加工する前のトリカブトの塊根に含まれている代表的な成分は、mesaconitine や aconitine などのアルカロイドであるが、それらはブシによる中毒の原因成分でもあり、ブシを安全に使用するために古くから毒性を軽減するための修治方法が開発されてきた。その修治により、mesaconitine から benzoylmesaconine、aconitine から benzoylaconine に脱エステル化され、毒性は 40~200 分の 1 となり、比較的安全に医薬品としてブシを使用できるようになっている。

ブシは、漢方医学では温裏祛寒、散寒止痛の薬能を持ち、高齢者の腰痛や夜間頻尿などに使用される八味地黄丸や牛車腎気丸などに配合される他、加工ブシ末として鎮痛、強心、利尿の効能を持つ医薬品としても使用される。ブシの鎮痛作用についての薬理試験については古くから行われており、修治前のブシは、正常マウスにおける尾圧法、酢酸ライジング法による疼痛試験で顕著な鎮痛活性を示し、含有成分のうち mesaconitine がとくに強い鎮痛活性をもつ (Hikino H, et al., J. Pharmbio. Dyn. 2:78-83, 1979)。しかし、mesaconitine の修治による分解産物 benzoylmesaconine は、マウスでの鎮痛活性の力価は約 1,000 分の 1 に減弱してしまう (鈴木康之ら. 痛みと漢方 4:15-18, 1993)。一方、正常動物ではなく、反復低温ストレスを負荷して痛覚過敏状態を呈したラットの後肢に圧刺激を加えることによる疼痛試験では、ブシの修治の前後でその力価に大きな差異はなかった (滝沢幸穂ら. 日薬理誌 100:307-316, 1992)。このことから、正常動物で見られる単純な鎮痛活性ではなく、痛覚過敏状態を誘導したときのブシの鎮痛活性は、毒性の強い mesaconitine によるものではなく、修治により分解されない化合物、あるいは修治によって新たに産生する毒性の低い化合物によることが推測される。

フランスでの疫学調査では、慢性疼痛患者は全人口の 32% におよび、その中でも神経障害性疼痛は約 20% (人口あたりで 7%) と、神経障害性疼痛は決してまれな疾患ではない (Eisenberg E, Pain 152, 2-3, 2008)。また、神経障害性疼痛はパクリタキセルやピンクリスチン、オキサリプラチンなどの抗がん薬治療時の有害事象としても多くみられ、その辛さのために治療を中断せざるをえないこともあるほど、がん患者の治療効率や QOL を著しく低下させる原因となっている (大石了三ら, 福岡医誌 104, 171-180, 2013)。

神経障害性疼痛による痛みには通常非ステロイド性抗炎症薬が無効であり、抗うつ薬や抗てんかん薬などが鎮痛補助薬として使用されるものの満足できる治療成果は得られていない。また、対症療法に過ぎないことから、神経障害性疼痛を治療できる慢性疼痛治療薬の開発が切望されている。神経障害性疼痛の原因としては、末梢、中枢神経線維の物理的な圧迫によるという説があり、マクロファージなどの免疫担当細胞による末梢神経の炎症応答や、脊髄内でグリア細胞 (ミクログリアやアストロサイト) による炎症が関与し、このグリア細胞に発現する TRP チャネル、特に TRPM2 や TRPM8 の関与が強く示唆されている。また抗がん薬による神経障害性疼痛には、一次感覚神経の TRPA1 や TRPM8 や電位依存性 Na チャネル (NaV) の関与が示唆されている (Deuis JR, et al., Pain 154, 1749-1757, 2013; 中川貴之, 薬学雑誌, 134, 379-386, 2014)。

既存の治療薬では難治である神経障害性疼痛に対する漢方薬を用いた薬物療法の有効性が示唆されつつあり、ブシはその候補となっている。単純な圧および熱刺激に対する鎮痛活性は修治により大幅に減弱するが、絞扼性神経損傷モデルラット (Xu H, et al., J Ethnopharmacol 103, 392-397, 2006) や坐骨神経部分結紮 (Seltzer) モデル (Shibata K, et al., Plos One 6, e23510, 2011) における神経障害性疼痛に対するブシの疼痛緩和作用は、臨床使用量で十分に認められている。

これまで我々は、オキサリプラチンをマウスへ腹腔内投与したときに誘導される神経障害性疼痛の症状、機械的アロディニアと冷痛覚過敏それぞれに対して、ブシエキスを経口投与したときに抑制作用が見られること、マウス脊髄後根節 (DRG) 初代培養細胞をオキサリプラチンで処理することにより短縮した神経突起に対して、ブシエキスが抑制作用を示すことを明らかにしてきた。後者の作用を指標にブシエキスから有効成分の単離を試み、これまでブシの鎮痛活性成分として知られていた mesaconitine や benzoylmesaconine には活性は認められず、それとは異なる化合物である neoline を単離、さらに neoline のマウス *in vivo* でのオキサリプラチンによる神経障害性疼痛緩和作用を明らかにした。Neoline は、既知のブシ含有成分であるが、これまで薬理活性は報告されておらず、ブシの神経障害性疼痛緩和作用における有効成分である可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究は、加工ブシおよび neoline の神経障害性疼痛モデルに対する緩和作用およびその作用機序の解明により、neoline を新薬として開発するための基礎的なデータを得ること、また加工ブシ中の neoline 含量を高める修治方法を検討して、毒性が低く、かつ神経障害性疼痛緩和作用の力価の高いブシを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 加工ブシおよびその成分の神経障害性疼痛緩和作用

マウスに対してパクリタキセルまたはオキサリプラチンを腹腔内投与する。抗がん薬処置当

日からブシ熱水抽出物を混餌しながら、また、neoline と benzoylmesaconine を 1 日 1 回皮下投与しながら、マウスを飼育する。抗がん剤投与後に生じる神経障害性疼痛を von Frey test により評価する。

(2) Seltzer モデルに対する加工ブシおよびその成分の緩和作用

マウスを麻酔した後、大腿中央部の坐骨神経を露出させ、絹糸で 1/3 から半分を結紮して作製する (Partial Nerve Ligation; PNL)。PNL 処置の 7 日後からブシ熱水抽出物を混餌しながら、また、neoline と benzoylmesaconine を 1 日 1 回皮下投与しながら、マウスを飼育する。PNL 処置後に生じる神経障害性疼痛を von Frey test により評価する。

(3) 加工ブシに含まれる各種アルカロイドの体内動態

ラットに加工ブシ抽出物を経口投与後、経時的に採血し、ブシに含まれる各種アルカロイドの血中濃度推移を LC-MS/MS により分析し、体内動態パラメータを算出する。

(4) トリカプト根中の加熱加工処理による各種アルカロイド含量の変化

加熱加工前のトリカプト根を、経時的に加熱し、その加熱産物に含まれる各種アルカロイドの含量を測定する。

4. 研究成果

(1) 加工ブシおよびその成分の神経障害性疼痛緩和作用

マウスにパクリタキセルを腹腔内投与した時、3 日目から有意な痛覚閾値の低下がみられ、9 日目までその症状は悪化し続けた。加工ブシまたは neoline を投与したマウスでは、3 日目までは無効であったが、その後、回復する傾向が見られ、9 日目にはパクリタキセル投与前と同レベルまで痛覚閾値の有意な回復が認められた。この作用は、neoline と同用量の benzoylmesaconine では認められなかった。

また、マウスにオキサリプラチンを腹腔内投与した時も、3 日目から有意な痛覚閾値の低下がみられ、7 日目までその症状は悪化し続けた。加工ブシまたは neoline を投与したマウスでは、7 日目までオキサリプラチン投与前と同レベルの痛覚閾値を呈して閾値の低下が認められず、5 日目、7 日目で有意な差を認めた。この作用は、neoline と同用量の benzoylmesaconine では認められなかった。

(2) Seltzer モデルに対する加工ブシおよびその成分の緩和作用

マウスに PNL 処理することで、7 日目に有意な痛覚閾値の低下が認められた。その後、加工ブシまたは neoline の投与を開始すると、痛覚閾値は徐々に回復し、PNL 処理 18 日目には処理前と同レベルまで有意に回復した。この作用は、neoline と同用量の benzoylmesaconine では認められなかった。

(3) 加工ブシに含まれる各種アルカロイドの体内動態

加工ブシ熱水抽出エキスは、品質管理上の指標成分である benzoylmesaconine を 0.042% と最も多く含み、次いで neoline 0.026%、benzoylaconine 0.010% を含んでいた。この加工ブシをラットに経口投与後、経時的に採血し、各アルカロイドの血中濃度を測定したところ、15 分後の血中からはその順で高濃度に検出された。9 時間における benzoylmesaconine、neoline、benzoylaconine の血中濃度曲線下面積は、それぞれ 64、65、32 ng/mL・hr と、neoline と benzoylmesaconine は同等の値を示したことから、BM と比較して neoline の生物学的利用能は benzoylmesaconine と比較して高いことが推測された。

(4) トリカプト根中の加熱加工処理による各種アルカロイド含量の変化

加熱加工前のトリカプト根を、経時的に加熱し、その加熱産物に含まれる各種アルカロイドの含量を測定したところ、mesaconitine と aconitine の経時的な減少と、benzoylmesaconine、benzoylaconine の経時的な増加を認めたが、neoline の含量には変化は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yohei Tanimura, Masato Yoshida, Kan'ichiro Ishiuchi, Masahiro Ohsawa, Toshiaki Makino. Neoline is the active ingredient of processed aconite root against murine peripheral neuropathic pain model, and its pharmacokinetics in rats. *Journal of Ethnopharmacology* (印刷中). doi: 10.1016/j.jep.2019.111859

〔学会発表〕(計 2 件)

吉田理人、石内勘一郎、大澤匡弘、牧野利明. Paclitaxel によるマウス神経障害性疼痛に対する加工ブシの緩和作用. 第 34 回和漢医薬学会学術大会、2017, 8, 26-27、福岡.

谷村陽平、吉田理人、石内勘一郎、大澤匡弘、牧野利明. 加工ブシ成分、benzoylmesaconine と neoline の体内動態および神経障害性疼痛に対する作用の比較検討. 第 35 回和漢医薬学会学術大会、2018, 9, 1-2、岐阜.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等：

<https://www.nagoya-cu.ac.jp/about/press/press/release/files/20190409/20190410.pdf>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大澤匡弘

ローマ字氏名：Masahiro Ohsawa

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院薬学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80369173

(2)研究協力者

研究協力者氏名：谷村陽平、吉田理人、石内勘一郎

ローマ字氏名：Tanimura Yohei, Masato Yoshida, Kan'ichiro Ishiuchi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。