

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18275

研究課題名（和文）パクリタキセルによる神経障害性疼痛に対する抑肝散の鎮痛効果の検討

研究課題名（英文）Analgesic effect in paclitaxel-induced neuropathic pain by administration of Yokukansan

研究代表者

加藤 貴大 (Kato, Takahiro)

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：10432668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：パクリタキセルによる神経障害性疼痛に対する抑肝散の鎮痛効果を検討した。抑肝散の継続経口投与では、有意な鎮痛効果を認めた。抑肝散の鎮痛効果にセロトニンが関与すると考え、セロトニン合成阻害薬を投与した。その結果、セロトニン合成阻害薬を投与した群では有意な疼痛閾値の低下を認めた。さらに、抑肝散の鎮痛効果発現部位の1つが脊髄である可能性を考え、3つのセロトニン受容体拮抗薬を髄腔内に投与した。結果、2つのセロトニン受容体拮抗薬で有意に疼痛閾値が低下した。抑肝散はパクリタキセルによる神経障害性疼痛に対し鎮痛効果を有し、その効果発現には脊髄のセロトニンが関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抑肝散の継続投与はパクリタキセルによる神経障害性疼痛に対し鎮痛効果を示した。また、抑肝散を継続的に投与したモデルの脊髄腔内にセロトニン受容体拮抗薬を投与したところ、一部ではあるが有意な疼痛閾値の低下、すなわち疼痛の再燃が認められた。抑肝散は本邦で臨床適応されており安価な薬剤である。本研究の結果、抑肝散は癌化学療法に伴う末梢神経障害を緩和する可能性が考えられた。また、抑肝散の鎮痛効果の発現には、脊髄におけるセロトニン下性疼痛抑制伝導経路が関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the analgesic effect in paclitaxel-induced neuropathic pain by a continuous administration of Yokukansan. Continuous oral administration of Yokukansan showed a significant analgesic effect. Assuming that serotonin is involved in the analgesic effect of Yokukansan, we administered a serotonin synthesis inhibitor. As a result, a significant decrease in withdrawal threshold was observed in the group administered the serotonin synthesis inhibitor. Furthermore, considering the possibility that one of the analgesic effects of Yokukansan is expressed in the spinal cord, three serotonin receptor antagonists were administered intrathecally. As a result, two serotonin receptor antagonists significantly lowered the withdrawal threshold. Yokukansan has an analgesic effect on paclitaxel-induced neuropathic pain, and it was suggested that serotonin in the spinal cord may be involved in the manifestation of this effect.

研究分野：痛み

キーワード：抑肝散 パクリタキセル 神経障害性疼痛 鎮痛効果 セロトニン

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗がん剤によるがん化学療法は、がん疾患における重要な治療法の1つであるが、疼痛や痺れなどの末梢神経障害が大きな問題となっている。抗がん剤による末梢神経障害は比較的高頻度で出現し、その発現や増悪により患者のQOLが著しく低下する。さらに症状が悪化すれば、抗がん剤の減量や治療中止につながる場合もある。抗がん剤による末梢神経障害は抗がん剤治療終了後も持続することが多く、既存の鎮痛薬や鎮痛補助薬による改善が難しいことから、新たな予防・治療法の開発が強く求められている。パクリタキセル（Paclitaxel：PTX）は最も広く使用されている抗癌剤の1つであり、非小細胞肺癌や卵巣癌など固形癌と呼ばれる悪性腫瘍に適応がある。PTXによる末梢神経障害は60～70%の患者に発症すると報告されている（Paice JA, et al. Pain 2011）。症状の発現や強さは一回投与量、投与期間、総投与量、合併症などに依存する。通常、症状は投与中止により改善するが慢性化することもある。神経症状はいわゆる“グローブ&ストッキング様”で四肢末端に出現し、痛み・しびれ・知覚低下などの知覚異常が主であるが、まれに運動機能障害も出現する。PTXによる痛みはQOLを低下させるだけでなく、治療中断を余儀なくされるため予後にも影響を及ぼす重大な合併症である。PTXはチューブリンに高い親和性を有しており、末梢神経の軸索において微小管の重合を促進し、異常微小管束を形成することにより、正常な軸索輸送が阻害されて末梢神経障害が発生すると考えられている。漢方薬の1つである牛車腎気丸はしびれなどの治療に用いられ、糖尿病性神経障害性疼痛やPTXなどの化学療法誘発性神経障害性疼痛に有効との報告がある（Matsumura Y, et al. Mol Pain 2014）。一方、抑肝散は7種類の生薬（柴胡・蒼朮・茯苓・当帰・甘草・釣藤鈎・川芎）を一定の割合で混合した漢方薬の1つである。不眠症・神経症・頭痛・認知症の周辺症状である精神・行動症状などに有効とされているほか、近年は神経障害性疼痛にも効果があるとの報告がなされており、抗うつ薬と類似した効果が期待される（五十嵐康. Geriatr Med 2008）。抑肝散の作用機序は、セロトニン受容体の親和性は正または受容体結合による神経細胞の興奮抑制作用、グルタミン酸のアストロサイトへの取り込みは正と神経細胞への直接的興奮抑制作用が推察されている（五十嵐康. Geriatr Med 2008）。神経障害性疼痛に対する鎮痛効果は、脊髄の下行性疼痛抑制伝導経路の賦活化が関与すると考えられている（Yamaguchi T, et al. Int Psychogeriatr 2007）。

(2) これまで我々は、糖尿病性神経障害性疼痛ラットを用い、SSRI（Selective Serotonin Reuptake Inhibitors）の1つであるFluvoxamineを連日経口投与することで、Fluvoxamineの経時的な鎮痛効果を行動学的手法にて証明してきた。また、Fluvoxamineの連日経口投与を行った糖尿病性神経障害性疼痛ラットの髄腔内にセロトニン受容体拮抗薬を投与し、脊髄レベルでの経時的なセロトニン受容体の関与を行動学的手法にて証明してきた（Kato T, et al. Hiroshima J Med Sci 2013）。SSRIの鎮痛効果は、神経終末でのセロトニンの再取り込みを阻害することでシナプス間隙のセロトニン量を増加させ、脊髄の下降性疼痛抑制伝導経路の賦活化をもたらすことにあるとされる（Firdls HL, et al. Annu Rev Neurosci 1991）。

(3) 抑肝散の作用機序にはセロトニン受容体の関与が指摘されており、鎮痛効果には脊髄の下降性疼痛抑制伝導経路の関与が考えられている。つまり、PTX誘発性神経障害性疼痛モデルにおいても抑肝散の鎮痛効果発現が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、漢方薬の抑肝散と牛車腎気丸の鎮痛効果に関して、PTX誘発性神経障害性疼痛モデルラットを使用し、行動学的手法により解明する。さらに、抑肝散の継続的投与による鎮痛効果の脊髄レベルでのメカニズムを免疫組織学的手法と行動学的手法にて明らかにすることを目的としている。

- (1) PTX誘発性神経障害性疼痛モデル動物に対する抑肝散と牛車腎気丸の継続的経口投与による鎮痛効果について、効果発現時期・効果持続時間を疼痛閾値の経時的な変化を検討することで行動学的手法により明らかにする。
- (2) 免疫組織学的手法を用いて、抑肝散の継続的経口投与を行ったPTX誘発性神経障害性疼痛モデル動物の脊髄におけるミクログリアの変化について検討し、抑肝散の鎮痛効果維持のメカニズムを明らかにする。
- (3) セロトニン受容体拮抗薬の髄腔内投与による疼痛閾値の変化率など、脊髄レベルにおけるセロトニンの関与の有無を行動学的手法により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PTXによる神経障害性疼痛モデルラット (PTXラット) の作製

実験動物としては、雄の Sprague-Dawley (SD) ラットを用いる。週齢 7 週の SD ラットに PTX (2mg/kg) を 1・3・5・7・9 日目に計 5 回、腹腔内投与する。

(2) PTXによる神経障害性疼痛発症の評価

PTX 投与開始前 (0 週)・投与後 7 日目 (1 週)・14 日目 (2 週)・21 日目 (3 週)・28 日目 (4 週) に、行動学的手法 (Dynamic Plantar test) を用いて疼痛閾値 (withdrawal threshold) を計測する。Dynamic Plantar test とは、プラスチックフィラメントで後肢足底を設定された力の増加率で押し上げ、逃避反応を起こす閾値を測定する方法である。

(3) 抑肝散・牛車腎気丸の継続経口投与

PTX ラットに対し、PTX 投与 1 日目から抑肝散・牛車腎気丸の連日経口投与を行う。なお、薬剤は蒸留水 2ml に混合し、毎日胃管から投与する。

以下の 4 群に分類し検討を行う。

(抑肝散投与での効果を、パクリタキセルによる神経障害性疼痛への鎮痛効果が報告されている牛車腎気丸と比較することで、抑肝散による鎮痛効果の程度を検証できると考えている。)

N 群) 正常動物に蒸留水を連日経口投与する群

P 群) PTX ラットに蒸留水を連日経口投与する群

Y 群) PTX ラットに抑肝散 (1g/kg) を連日経口投与する群

G 群) PTX ラットに牛車腎気丸 (1g/kg) を連日経口投与する群

(4) 抑肝散・牛車腎気丸の継続経口投与による鎮痛効果の評価

N・P・Y・G 群について、各薬剤投与開始前から 4 週目までの疼痛閾値の長期的変化を行動学的手法 (Dynamic Plantar test) により評価する。各薬剤投与開始前 (0 週)・投与後 7 日目 (1 週)・14 日目 (2 週)・21 日目 (3 週)・28 日目 (4 週) に Dynamic Plantar test を行い、各薬剤の長期投与による鎮痛効果の推移を明らかにする。

(5) 脊髄の免疫染色によるグリア細胞の変化の検討

抑肝散継続経口投与 3 週目の Y 群と同週の P 群の脊髄を摘出する。全身麻酔下 (チアミラールとセボフルランを使用) に 4% パラフォルムアルデヒド 500ml を用いて灌流固定した L4-6 の脊髄を摘出し、免疫染色を行う。本研究では、免疫組織学的手法を用いて脊髄におけるミクログリア (anti-Iba1 antibody) の活性の変化について検討する。

(6) 抑肝散継続経口投与とセロトニンの関与の検討

抑肝散継続経口投与 3 週目の Y 群にセロトニン合成阻害薬である 4-Chloro-DL-phenylalanine methyl ester hydrochloride (sigma, America) (PCPA: 100mg/kg) を 3 日間腹腔内投与する。投与後 4 日目に Dynamic Plantar test を行い、Control 群 (同週の Y 群: 生理食塩水を腹腔内投与) と比較することでセロトニン枯渇による疼痛閾値の変化を評価し、抑肝散による鎮痛効果とセロトニンの関係を検討する。

(7) 髄腔内カテーテルの挿入・留置手術

PTX ラットに対し、薬物投与ルートとして全身麻酔下に PE-10 カテーテルの挿入・留置手術を行う。なお、PE-10 カテーテルはその先端が髄腔内の腰部膨大部にくるように挿入する (Kato, et al. Hiroshima J Med Sci 2013)。

(8) 抑肝散継続経口投与と脊髄におけるセロトニンの関与の解明

Y 群に Vehicle (100%DMSO) あるいは 3 種類のセロトニン受容体拮抗薬 (WAY-100635: 5-HT₁ antagonist, Ketanserin: 5-HT_{2A/2C} antagonist, Ondansetron: 5-HT₃ antagonist) の髄腔内投与を行う。Vehicle あるいはセロトニン受容体拮抗薬を YKS 継続的経口投与 3 週目の Y 群に髄腔内投与し、疼痛閾値の変化を Dynamic Plantar test を用いて検討する (Kato, et al. Hiroshima J Med Sci 2013)。

Figure 1 consists of four panels. The top two panels are low-magnification fluorescence microscopy images of a coronal brain section, showing green fluorescence throughout the tissue. The bottom two panels are high-magnification views of the same section. The bottom-left panel includes a label '活性化ミクログリア' (Activated Microglia) with a white arrow pointing to a specific cell. The bottom-right panel is a high-magnification view of the same area, showing a dense population of cells with green and blue fluorescence.

図 6 に抑肝散継続経口投与 3 週目の Y 群と同週の P 群の活性化ミクログリア発現量を示す。

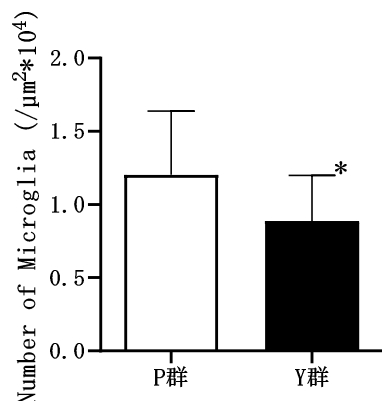


図 6. 抑肝散継続経口投与 3 週目の Y 群と同週の P 群の活性化ミクログリア発現量
各 n=5 * $p<0.05$ v.s. P 群

P 群と比較して Y 群では有意に活性化ミクログリアの発現が抑制された。つまり、抑肝散の投与は疼痛を抑制させる可能性がある。

(4) PCPA 腹腔内投与によるセロトニン関与の評価

図 7 に PCPA 投与後 4 日目の抑肝散継続経口投与 3 週目の Y 群 (PCPA 群) と PCPA 非投与の抑肝散継続経口投与 3 週目の Y 群 (Control 群) の疼痛閾値を示す。

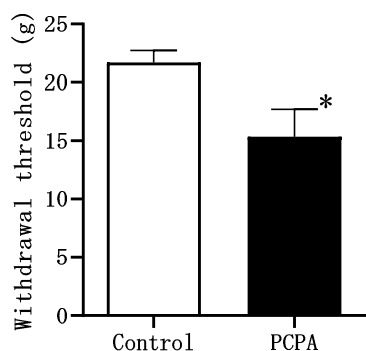


図 7. PCPA 投与の有無による疼痛閾値の変化
Control 群: n=10、PCPA 群: n=5
* $p<0.05$ v.s. Control 群

PCPA 群は Control 群と比較して有意に疼痛閾値が低かった。つまり、抑肝散の鎮痛効果にはセロトニンが関与している可能性がある。

(5) セロトニン受容体拮抗薬の髄腔内投与による疼痛閾値の変化

図 8 に抑肝散継続経口投与 3 週目の Y 群の髄腔内に 100%DMSO (Control 群) 及び 3 種類のセロトニン拮抗薬を投与した際の疼痛閾値の変化を示す。

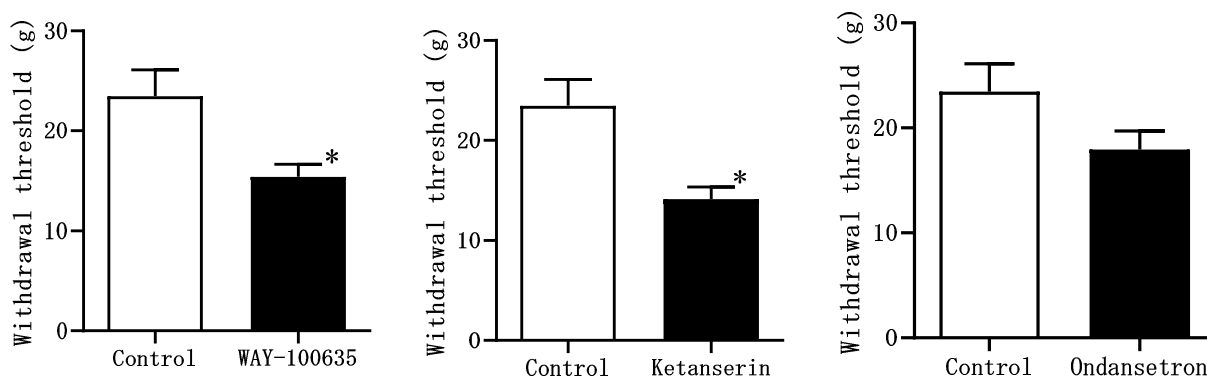


図 8. 抑肝散継続経口投与 3 週目の Y 群に WAY-100635・Ketanserin・Ondansetron を髄腔内投与した際の疼痛閾値の変化

Control 群: n=6、WAY-100635 群: n=6、Ketanserin 群: n=7、Ondansetron 群: n=6

* $p<0.05$ v.s. Control 群

3 種類のセロトニン拮抗薬のうち、WAY-100635 と Ketanserin の髄腔内投与は 100%DMSO の髄腔内投与と比較して有意に疼痛閾値が低下した。つまり PTX による神経障害性疼痛に対する抑肝散の継続経口投与による鎮痛効果は、脊髄のセロトニン受容体を介する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 横見央・加藤貴大・田口志麻・中村隆治・堤保夫
2. 発表標題 Antiallodynic effect of Yokukansan for neuropathic pain due to Paclitaxel
3. 学会等名 AACA2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横見央・加藤貴大・田口志麻・三好寛二・堤保夫
2. 発表標題 パクリタキセル誘発性神経障害性疼痛に対する抑肝散の抗アロディニア効果には脊髄におけるセロトニンが関与する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第70回学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------