

令和元年5月9日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20099

研究課題名(和文) 糖尿病性神経障害性疼痛に対する抑肝散と加味逍遙散の鎮痛効果の検討

研究課題名(英文) Analgesic effect in streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain by administration of Yokukansan and Kamishoyosan

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性神経障害性疼痛(DMラット)に対する抑肝散(YKS)と加味逍遙散(KSS)の鎮痛効果(抗アロディニア効果)を検討した。単回投与ではYKS投与群に有意な抗アロディニア効果を認め、継続的投与ではYKS投与群・KSS投与群に有意な抗アロディニア効果を認めた。YKSの抗アロディニア効果発現部位の1つが脊髄である可能性を考え、YKSを継続的に投与したDMラットの髄腔内に3つのセロトニン(5-HT)受容体拮抗薬を投与した。その結果、すべての5-HT受容体拮抗薬で疼痛閾値の低下が認められた。YKSの抗アロディニア効果の発現には脊髄の5-HT受容体が関与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性神経障害性疼痛に対して、抑肝散の単回経口投与は有意な鎮痛効果を示した。すなわち、抑肝散には屯用による鎮痛も期待できる。また、継続的投与では、抑肝散も加味逍遙散も有意な鎮痛効果を示し、投与終了までその鎮痛効果は継続した。すなわち、両薬剤は継続的に投与することで鎮痛薬としての効果を発揮しうると考えられた。その効果部位に関しては、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有意な疼痛閾値の低下つまり疼痛が再燃したことから、抑肝散の鎮痛効果は脊髄のセロトニンによる下降性疼痛抑制伝導経路の関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the analgesic effect (antiallodynic effect) in streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain (DM rats) by a single and continuous administration of Yokukansan (YKS) and Kamishoyosan (KSS). In the case of single administration, only the group to which YKS was administered showed a significant antiallodynic effect. In the case of continuous administration, each groups of YKS and KSS showed significant antiallodynic effects. The expression of the antiallodynic effect of YKS may involve the 5-HT receptor in the spinal cord, so that three serotonin (5-HT) receptor antagonists were administered intrathecally in DM rats to which YKS was continuously administered. As a result, all 5-HT receptor antagonists reduced the pain threshold. It is considered that the 5-HT receptor in the spinal cord may be involved in the expression of the antiallodynic effect of YKS.

研究分野：痛み

キーワード：糖尿病性神経障害性疼痛 抑肝散 加味逍遙散 抗アロディニア効果 セロトニン 下降性疼痛抑制伝導経路

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

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、糖尿病患者が急速に増加しており、その 60%以上が神経障害を合併している。さらに、神経障害合併糖尿病患者の約 20%が神経障害性疼痛を発症している (Partanen J, et al. N Engl J Med 1995)。糖尿病性神経障害性疼痛は難治性で、非ステロイド性抗炎症薬やモルヒネなどの麻薬性鎮痛薬を使用しても疼痛管理が困難であることが知られている (Clark Jr, et al. N Engl J Med 1983)。また糖尿病患者の約 20%にうつ病を合併しており、抑うつ症状の遷延が疼痛を悪化させることもしばしば認められる (Coleman SM, et al. Psychosomatics 2013)。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、脊髄の下降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 (Yamagushi T, et al. Int Psychogeriatr 2007)。また、加味逍遥散は 10 種類の生薬 (柴胡・蒼朮・茯苓・当帰・甘草・芍薬・牡丹皮・山梔子・生姜・薄荷) を一定の割合で混合した漢方薬の 1 つである。更年期にみられる不安や不眠、抑うつなどに効果があり、強力な抗不安作用があるとも報告されている (Mizowaki M, et al. Life Sci 2001)。その作用機序としては、GABA 受容体の関与やステロイド代謝物の関与が考えられている (Mizowaki M, et al. Life Sci 2001)。

(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 (Firds 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、糖尿病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。また、神経結紮モデルマウスでの研究では抑肝散の鎮痛効果が認められており、特にその構成成分の生薬である甘草に鎮痛効果を認めている (Ebisawa S, et al. Evid Based Complement Alternat Med 2015)。加味逍遥散の鎮痛効果に関しては報告がないが、その構成成分に甘草が含まれていることから抗アロディニア効果を有する可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、漢方薬の抑肝散と加味逍遥散の鎮痛効果に関して、糖尿病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抗アロディニア効果の脊髄レベルでのメカニズムを免疫組織学的手法にて明らかにすることを目的としている。

(1) 糖尿病性神経障害性疼痛モデル動物に対する抑肝散と加味逍遥散の単回経口投与による鎮痛効果について、効果発現時期・効果持続時間をアロディニア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) 糖尿病性神経障害性疼痛モデル動物に対する抑肝散と加味逍遥散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・効果持続時間をアロディニア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。

(3) 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糖尿病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とアストロサイト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。

(4) セロトニン受容体拮抗薬の髄腔内投与によるアロディニアの変化率など、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) 糖尿病動物の作製：実験動物としては、雄の Sprague-Dawley (SD) ラットを用いる。週齢 6 週の雄 SD ラットに Streptozotocin (STZ) 75mg/kg を腹腔内投与する。STZ 投与 2 週後に血糖値を測定し、血糖値が 350mg/dl 以上の動物を糖尿病と定義する (Kajiyama, et al. Brain Res

2005)。

(2) 糖尿病性神経障害性疼痛（アロディニア）発症の評価：STZ 投与 2 週目に行動学的実験法 (Dynamic Plantar test) を行い、正常動物と比較して疼痛閾値が 50%以下（アロディニアあり）となったものを糖尿病性疼痛モデル動物（糖尿病ラット）と定義し実験に採用する（Matsunaga et al. Eur J Pharmacology 2007）。

(3) 抑肝散（YKS）・加味逍遙散（KSS）の経口投与：糖尿病ラットに対し、STZ 投与 2 週目より YKS・KSS の連日経口投与を行う。なお、薬剤は蒸留水 2ml に溶解し、毎日胃管から投与するものとする。以下の 4 群に分類し検討を行う。

- N 群)：正常動物に蒸留水を連日経口投与する群
- C 群)：糖尿病ラットに蒸留水を連日経口投与する群
- Y 群)：糖尿病ラットに YKS：1g/kg を連日経口投与する群
- K 群)：糖尿病ラットに KSS：1g/kg を連日経口投与する群

(4) YKS・KSS 単回経口投与による鎮痛効果（抗アロディニア効果）の評価：N・C・Y・K 群について、STZ 投与 2 週目におけるアロディニアの経時的变化を Dynamic Plantar test により評価する。薬剤経口投与前・投与後 60 分・120 分・180 分・240 分の時点で Dynamic Plantar test を行い、薬剤の抗アロディニア効果について効果発現時期、効果持続時間を明らかにする。

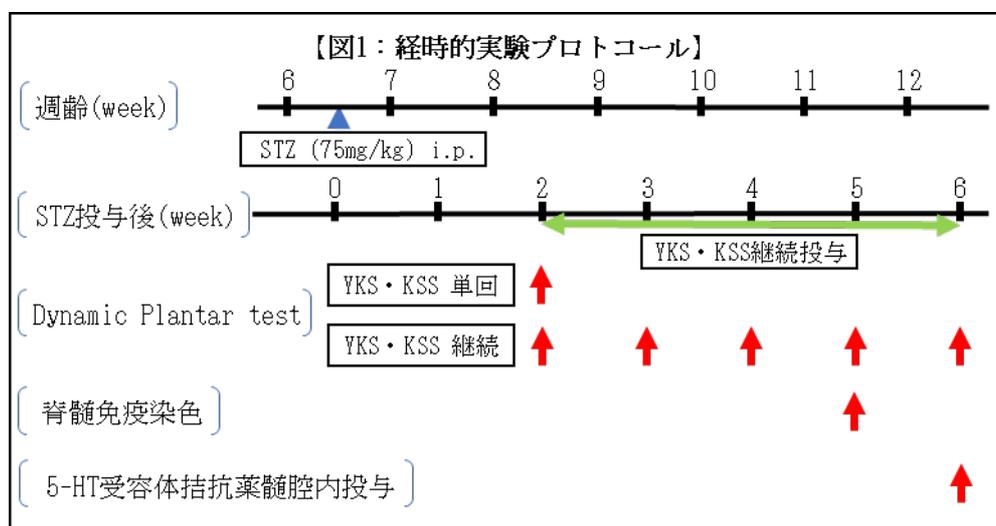
(5) YKS・KSS 継続的経口投与による抗アロディニア効果の評価：N・C・Y・K 群について、STZ 投与 2 週目から 6 週目におけるアロディニアの長期的变化を Dynamic Plantar test により評価する。薬剤の経口投与開始前・投与後 1 週・2 週・3 週・4 週に Dynamic Plantar test を行い、薬剤の長期投与による抗アロディニア効果の推移を明らかにする。

(6) 脊髄の免疫染色によるグリア細胞の経時的变化：YKS 継続的経口投与 3 週の Y 群の脊髄を摘出する。全身麻酔下に 4%パラホルムアルデヒド 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) とアストロサイト (anti-GFAP antibody) の活性の変化について検討する。

(7) 髄腔内カテーテルの挿入・留置手術：糖尿病ラットに対し、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) YKS の継続的経口投与と脊髄におけるセロトニンの関与の解明：Y 群について、Vehicle (100%DMSO) あるいは 3 種類のセロトニン受容体拮抗薬 (WAY100635：5-HT<sub>1</sub> antagonist、Ketanserin：5-HT<sub>2A/2C</sub> antagonist、Ondansetron：5-HT<sub>3</sub> 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 4 週目の Y 群に髄腔内投与し、アロディニアの変化を Dynamic Plantar test を用いて検討する (Kato, et al. Hiroshima J Med Sci 2013)。

最後に経時的実験プロトコルを図 1 に示す。



#### 4. 研究成果

(1) 糖尿病ラットの作製：N・C・Y・K群の体重と血糖値の推移を図2・3に示す。C・Y・K群はN群と比較してSTZ投与後2週から有意に体重の増加が抑制され、体重増加の抑制はSTZ投与後6週まで継続した。また、C・Y・K群はN群と比較してSTZ投与後2週から有意に血糖値が高く、STZ投与後6週まで継続した。糖尿病ラットの発生率は81%（57/70匹）であった。

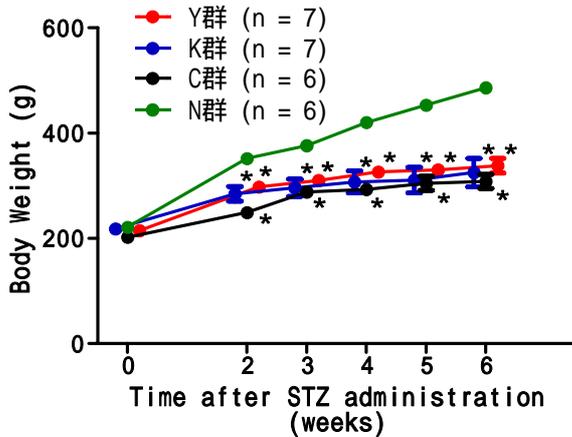


図2：体重の推移  
\* p<0.001 v.s. N群

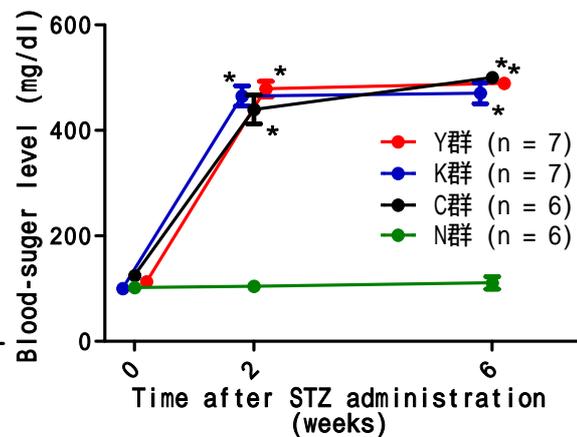


図3：血糖値の推移  
\* p<0.001 v.s. N群

(2) YKS・KSS単回経口投与による抗アロディニア効果の評価：  
C・Y・K群の単回投与による抗アロディニア効果の推移を図4に示す。

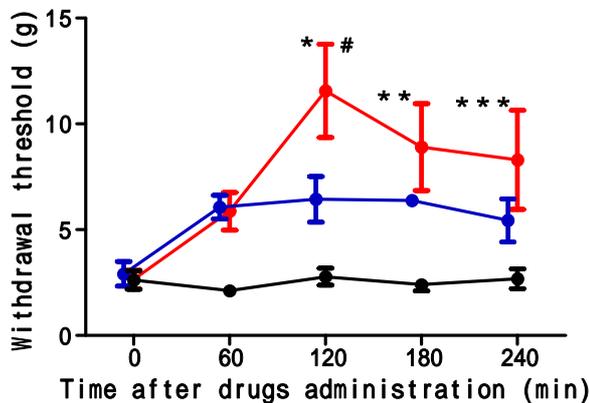


図4：YKS・KSS単回投与時のアロディニアの経時的変化  
\* p<0.001, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.05 v.s. C群  
# p<0.05 v.s. K群

Y群はC群と比較して、YKS投与後120分で有意な抗アロディニア効果を示し、その効果はYKS投与後240分まで持続した。また、Y群はK群と比較してYKS投与後120分後に有意な抗アロディニア効果を示した。

(3) YKS・KSS継続的経口投与による抗アロディニア効果の評価：  
C・Y・K群の継続的投与による抗アロディニア効果の推移を図5に示す。

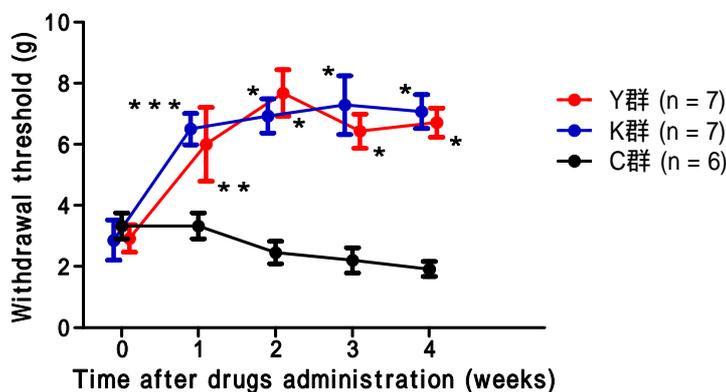
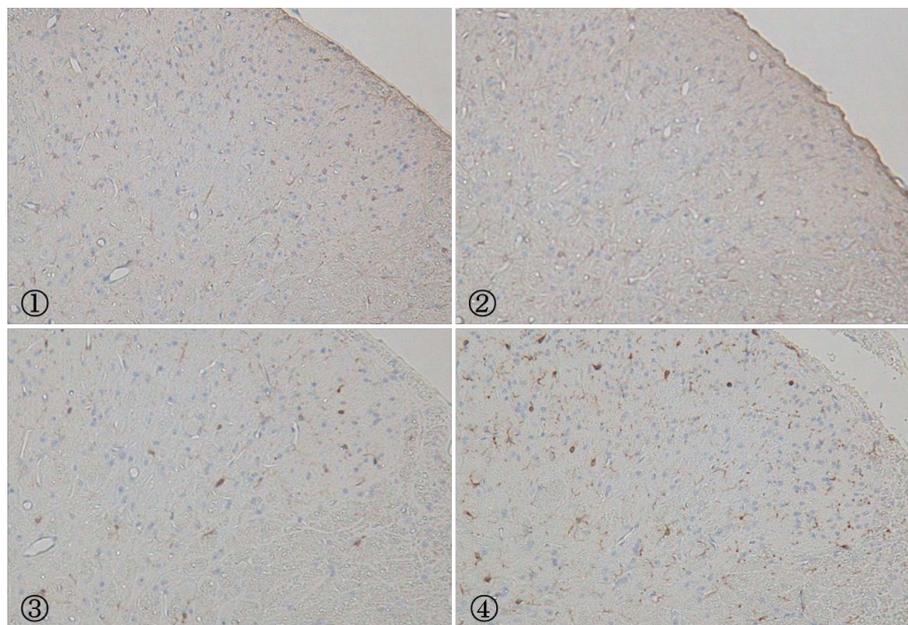


図5：YKS・KS継続的投与時のアロディニアの経時的変化  
\* p<0.001, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.05 v.s. C群

Y群・K群ともにC群と比較して、薬剤投与後1週目から有意な抗アロディニア効果を認め、両群とも薬剤投与後4週目まで有意な抗アロディニア効果は持続した。

(4) 脊髄の免疫染色によるグリア細胞の経時的変化：図 6 に YKS 継続的投与 3 週目の糖尿病ラットと同週の YKS を継続投与していない糖尿病ラットの脊髄免疫染色を示す。



現在、ミクログリアとアストロサイトの活性を比較検討中である。

図6:YKS継続的投与による脊髄のグリア細胞の変化

- ① YKS投与/ミクログリア染色 ② YKS投与/アストロサイト染色  
③ YKS非投与/ミクログリア染色 ④ YKS非投与/アストロサイト染色

(5) 5-HT 拮抗薬の髄腔内投与によるアロディニアの変化：図 7 に YKS 継続的投与 4 週目の糖尿病ラットの髄腔内に DMSO 及び 3 種類の 5-HT 拮抗薬を投与した際のアロディニアの変化を示す。

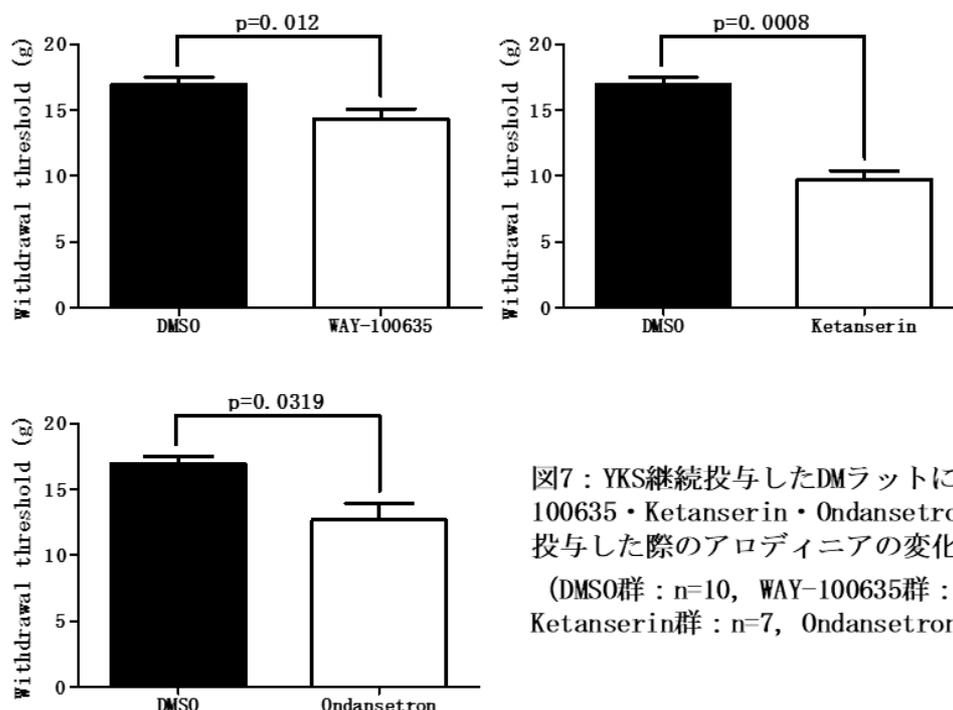


図7：YKS継続投与したDMラットにWAY-100635・Ketanserin・Ondansetronを髄腔内投与した際のアロディニアの変化  
(DMSO群：n=10, WAY-100635群：n=5, Ketanserin群：n=7, Ondansetron群：n=5)

3 種類の 5-HT 拮抗薬はいずれも DMSO を投与した Control 群と比較して有意に疼痛閾値が低下した。つまり、YKS の継続的経口投与による抗アロディニア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

[学会発表](計1件)

発表者：高田菜々子、発表タイトル：糖尿病性神経障害性疼痛ラットにおける抑肝散・加味逍遙散長期投与による抗アロディニア効果の検討、学会名：日本ペインクリニック学会第 50 回大会、発表年：2016 年

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。