

パクリタキセルによるマウス精管電気刺激収縮増大に対する 芍薬甘草湯の作用

川筋 透

Effect of Shakuyakukanzoto on the Paclitaxel-induced Potentiation of the Twitch Response to Electrical Stimulation in the Isolated Mouse Vas Deferens

Toru KAWASUJI

要 約

芍薬甘草湯はシャクヤクとカンゾウからなる漢方処方である。芍薬甘草湯エキスは、マウス摘出精管の電気刺激収縮に対して抑制作用を示すことを前報で示した。抗がん薬のパクリタキセルは、主な副作用として末梢神経障害を起こすことが知られており、芍薬甘草湯はこの副作用を緩和するとされている。今回、パクリタキセル、芍薬甘草湯エキス及び関連化合物のマウス精管の twitch 収縮反応に対する作用を検討した。パクリタキセル (10-30 μ g/mL, 10 μ M) は、マウス精管の twitch 収縮を顕著に増大させた。ビンクリスチン (30 μ M) はある程度の収縮増大作用を示したが、オキサリプラチン (30 μ M) には作用はみられなかった。パクリタキセルの存在下及び非存在下で、芍薬甘草湯エキスは同様に twitch 収縮抑制作用を示した。シャクヤクの主成分のペオニフリンは twitch 収縮抑制作用を示さなかった。これらの結果は、パクリタキセルはマウス精管の神経刺激性収縮を増大させる作用を有し、芍薬甘草湯はパクリタキセルの twitch 収縮増大作用を緩和する可能性が示唆された。

Summary

Shakuyakukanzoto is a traditional Chinese medicine formulation consisting of Paeoniae Radix (peony root) and Glycyrrhizae Radix (licorice). In the previous report, Shakuyakukanzoto extract showed the inhibitory effect on the twitch response to electrical stimulation in the isolated mouse vas deferens. Paclitaxel, an anticancer drug, is known to cause the peripheral neuropathy as a main side-effect. Shakuyakukanzoto is considered to attenuate this side-effect of paclitaxel. In the present study, effects of paclitaxel, shakuyakukanzoto and the related compounds on the twitch response of mouse vas deferens were investigated. Paclitaxel (10-30 μ g/mL, 10 μ M) showed the remarkable potentiation of the twitch response. Vincristine (30 μ M) showed the twitch-potentiation and oxaliplatin (30 μ M) did not show the twitch-potentiation. Shakuyakukanzoto showed the twitch-inhibitory effect in the presence and absence of paclitaxel in similar manner. Paeoniflorin, a main constituent of peony root, did not show the twitch-inhibitory effect. These results suggest that paclitaxel possesses the ability to potentiate the neurogenic contraction in the mouse vas deferens and shakuyakukanzoto may attenuate the twitch-potentiating effect of paclitaxel.

キーワード：パクリタキセル、芍薬甘草湯、精管、電気刺激

Key words : Paclitaxel, Shakuyakukanzoto, Vas deferens, Electrical stimulation

芍薬甘草湯は、シャクヤクとカンゾウの2つからなる漢方処方であり、こむら返りなどの骨格筋の痙攣・痛みを緩和するほか、消化管などの内臓平滑筋に対しても鎮痙・鎮痛作用があるとされている^{1,3)}。

マウスの精管を低頻度で電気刺激すると、神経伝達物質の遊離を介した一過性の単収縮 (twitch) が連続的に生じる。マウス精管の電気刺激収縮実験は、神経終末部に作用する薬物の評価等に用いられる^{4,5)}。

twitch 収縮抑制作用がみられた場合は、鎮痙・鎮痛作用が期待されると思われる。薬用植物指導センターで栽培しているシャクヤクの生物活性評価に、マウス精管の

電気刺激収縮実験を用いており、シャクヤクのエキスや成分、市販の芍薬甘草湯エキス等に twitch 収縮抑制作用がみられている⁶⁻⁸⁾。

抗がん薬のパクリタキセルは、副作用として末梢神経障害 (しびれ、感覚障害、痛みなど) を生じさせることが知られている⁹⁾。また芍薬甘草湯は、パクリタキセルで末梢神経障害性の異常感覚を生じさせたマウスで、症状を緩和することが報告されている⁹⁻¹¹⁾。

今回、マウス精管の電気刺激収縮実験で、パクリタキセルの末梢作用が検出できるかを検討したところ、興味深いことにパクリタキセルは顕著な twitch 収縮増大作用

を示した。他の抗がん薬の作用の検討や、パクリタキセル前処置後の芍薬甘草湯エキスの作用等も併せて検討したので報告する。

実験材料及び実験方法

1. 使用薬物

パクリタキセル (和光純薬), 芍薬甘草湯エキス (小城製薬), ピンクリスチン硫酸塩 (和光純薬), オキサリプラチン (和光純薬), ペオニフロリン (生薬精製品) を使用した。芍薬甘草湯エキス, ピンクリスチン硫酸塩及びオキサリプラチンは蒸留水に懸濁して使用した。パクリタキセルは, ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して使用した。マグナス槽内での DMSO の終濃度は, 0.33% とした。

2. マウス精管の電気刺激による twitch 収縮反応に対する作用の検討

ICR 系雄性マウスを頸椎脱臼で致死し, 精管を摘出した。マウスの精管 1 本では発生張力が小さいので, 同じマウスからの 2 本の精管を並列につないで使用した。すなわち, 2 本の精管の下端は固定棒と一緒に結びつけ, 上端は小さい金属リングに通した糸で 2 本の精管を連結した。小リングは糸を介してアイソメトリックトランスジューサー (TB-651T, 日本光電) に連結した。精管標本は, 1 対のリング状白金電極の中に通した状態で, 34°C の McEwen 液 (130 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 0.9 mM NaH₂PO₄, 25.0 mM NaHCO₃, 13.1 mM スクロース及び 11.1 mM グルコース) を満たした 30 mL のマグナス槽内に懸垂した⁷⁾。電気刺激装置 (バイオメディカルサイエンス社) で発生した矩形波パルス (持続時間 1 msec, 刺激頻度 0.1 Hz) を栄養液中に通電し, 電場刺激によって生じる一過性の単収縮 (twitch) を等尺性に記録した。なお, 白金電極のリングの外側は, ポリエチレン樹脂で被覆し, 外側に電流が流れないようにした。標本を懸垂し, 約 0.15 g の静止張力のもとで電気刺激を開始した。30 分後に栄養液を 1 回交換し, その後, 電気刺激を行いながら 30 分経過してから検体を適用し, twitch 収縮反応の変化を 60 分間記録した。

検体適用直前の twitch 収縮反応の振幅に対する振幅減少率から抑制率を算出した。

収縮増大は抑制率のマイナス値として表した。

3. パクリタキセルで増大させた twitch 収縮反応に対する薬物の作用の検討

パクリタキセルによる twitch 収縮増大が安定し, 一定時間経過後 (30-75 分) に, 検体を適用し, twitch 収縮反

応の変化を 60 分間記録した。検体適用直前の twitch 収縮反応の振幅を基準として抑制率を算出した。

実験結果

1. マウス精管の電気刺激による twitch 収縮反応に対するパクリタキセルの作用

パクリタキセルは, 3-30 μ g/mL で, マウス精管の twitch 収縮反応を増大させた (Fig.1)。10 μ g/mL では, 60 分後まで収縮増大が維持されたが, 30 μ g/mL では, 25-45 分で収縮増大がほぼ安定し, 増大が最大時の抑制率は -142% (n=3) であった。その後, 60 分間までに, 若干の収縮増大の減弱がみられた。

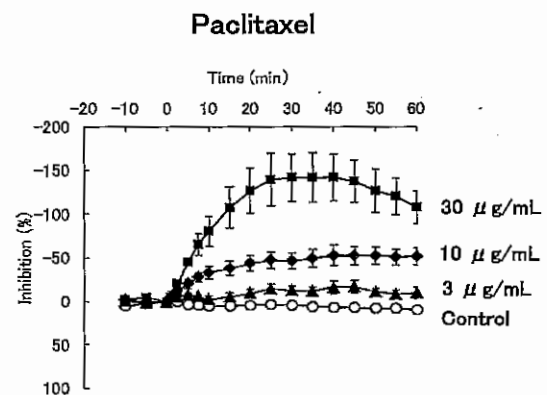


Fig.1 Effect of paclitaxel on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

Paclitaxel was dissolved in DMSO. Error bars indicate the SE from the mean of 3-4 experiments.

2. 芍薬甘草湯エキスの twitch 収縮反応に対する作用

芍薬甘草湯エキス (30-300 μ g/mL) は, マウス精管の電気刺激による twitch 収縮反応に対して顕著な抑制作用を示した (Fig.2)。60 分後の抑制率は, 100 μ g/mL で 60.1% であり, 300 μ g/mL で 93.2% であった。各濃度において 60 分間で最も大きな抑制率に基づき算出した 50% 抑制に要する濃度である IC₅₀ 値は 75.9 μ g/mL であった。

3. パクリタキセル存在下における twitch 収縮反応に対する芍薬甘草湯エキスの抑制作用

パクリタキセル存在下において, 芍薬甘草湯エキス (100 及び 300 μ g/mL) は, twitch 収縮反応を抑制し, 60 分後の抑制率は, 100 μ g/mL で 61.9% であり, 300 μ g/mL で 93.0% であった (Fig.3, Fig.4)。

4. パクリタキセル, ピンクリスチン及びオキサリプラチンの twitch 収縮反応に対する作用の比較

パクリタキセルは, 10 μ M (8.54 μ g/mL) で, twitch

Shakuyakukanzoto

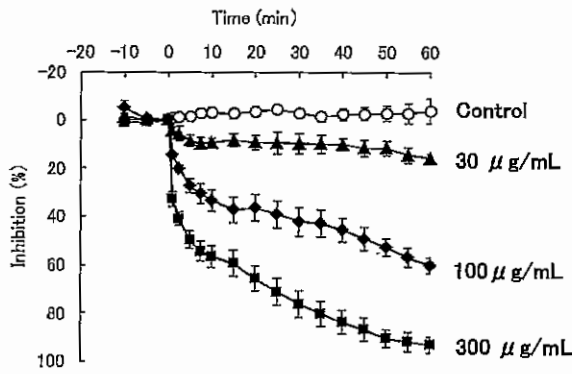


Fig.3 Typical recording of paclitaxel-induced potentiation of twitch response and shakuyakukanzoto-induced twitch-inhibition in the isolated mouse vas deferens

Paclitaxel and Shakuyakukanzoto were added to the bath at the point indicated. Electrical stimulation (1 msec, 0.1 Hz) was stopped at the point indicated.

Fig.2 Effect of shakuyakukanzoto on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

Shakuyakukanzoto was dissolved in water. Error bars indicate the SE from the mean of 3-4 experiments.

Shakuyakukanzoto

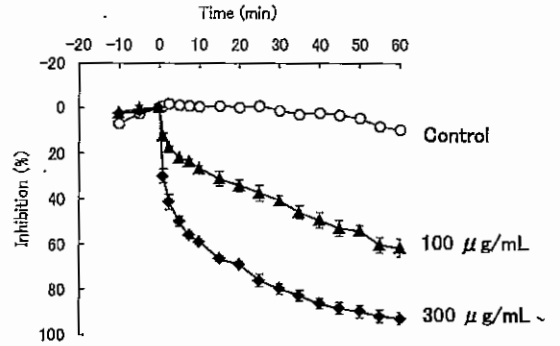
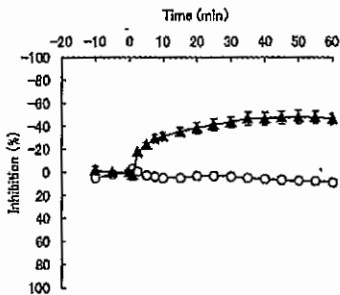


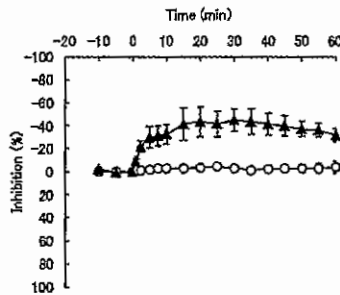
Fig.4 Effect of shakuyakukanzoto on the twitch response in the presence of paclitaxel

Shakuyakukanzoto was applied 30 min after paclitaxel application (10 μg/mL). Error bars indicate the SE from the mean of 3-5 experiments.

A: Paclitaxel 10 μM



B: Vincristine 30 μM



C: Oxaliplatin 30 μM

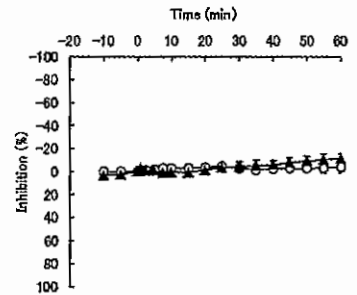


Fig.5 Effect of paclitaxel, vincristine and oxaliplatin on the twitch response in the isolated mouse vas deferens

○ : Control, ▲ : drug application. Paclitaxel was dissolved in DMSO. Vincristine sulfate and oxaliplatin were dissolved in distilled water. Error bars indicate the SE from the mean of 3-4 experiments.

Paeoniflorin 100 μM

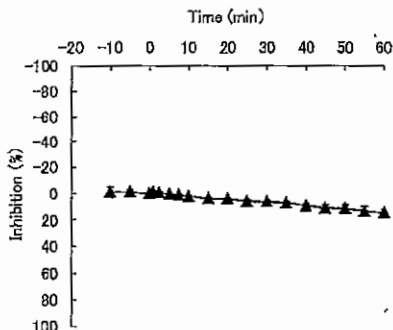


Fig.6 Effect of paeoniflorin on the twitch response in the presence of paclitaxel

Paeoniflorin was dissolved in distilled water and was added to the bath 80 min after application of paclitaxel (10 μM). Error bars indicate the SE from the mean of 3 experiments.

収縮反応を増大させた(30-60分での最大抑制率は-48.1%)。ピンクリスチンは、30 μ Mで、twitch収縮反応を増大させた(30分ではほぼ最大の抑制率は-44.9%)。オキサリプラチンは、30 μ Mで、twitch収縮反応に対して作用を示さなかった。

5. パクリタキセル存在下における twitch 収縮反応に対するペオニフロリンの影響

パクリタキセル 10 μ M (8.54 μ g/mL) の存在下で、シャクヤクの主要成分であるペオニフロリンは 100 μ M で、twitch 収縮反応に対して抑制作用を示さなかった。

考 察

twitch 収縮抑制作用を示す物質は、鎮静・鎮痛作用が期待される一方、twitch 収縮増大を示す物質は、交感神経系機能の低下した状態を改善する効果が期待されると考えられる。また、twitch 収縮の増大が非常に大きくなる場合は、神経が過敏な状態となり、痛みを強めることにつながる可能性も考えられる。

芍薬甘草湯エキスは、300 μ g/mL で、マウス精管の電気刺激収縮に対して顕著な抑制作用を示すことを以前に報告した⁸⁾。今回、別のメーカーの芍薬甘草湯エキスを用いて検討したところ、前回のエキスと同様に、適用後すみやかに抑制が出現した後、徐々に進行する収縮抑制パターンを示した。60分間で最も大きな抑制率に基づき算出した50%抑制に要する濃度であるIC₅₀値は、前回は82.1 μ g/mLであり、今回は75.9 μ g/mLで、ほぼ同じであった。芍薬甘草湯エキスのtwitch収縮抑制作用は、メーカーによる差が少ないものと思われた。

今回、抗がん薬のパクリタキセル(タキサン系)は、マウス精管の電気刺激収縮反応に対して顕著な増大作用を示した。パクリタキセル以外の抗がん薬でも末梢神経障害を生じることが知られていることから、別のタイプの抗がん薬にもtwitch収縮増大作用がみられるかを検討するため、ピンクリスチン硫酸塩(ピンカアルカロイド系)とオキサリプラチン(白金錯体)についても作用を検討した。その結果、ピンクリスチンは、30 μ Mでtwitch収縮増大作用がみられたが、オキサリプラチンには作用がみられなかった。パクリタキセルは、ピンクリスチン(30 μ M)よりも低濃度(10 μ M)で、同程度の増大作用を示したことから、パクリタキセルのtwitch収縮増大作用は、ピンクリスチンよりも強いものと思われる。

パクリタキセルやオキサリプラチンの痛覚過敏などには、TRP(transient receptor potential)が関与しているとされている。TRPは、温度や機械的刺激など多くの刺激で活性化するセンサーで、非選択性の陽イオンチャネ

ルを形成している。また、TRPは細かく分類されている。

パクリタキセルは、TRPA1やTRPV4の活性化物質とされ、パクリタキセルの末梢神経障害は、TRPA1やTRPV4が関与していると考えられている^{12,14)}。精管には知覚神経も散在しているとされ¹⁵⁾、TRPV1を活性化する辛味物質のカプサイシンは、精管のtwitch収縮抑制作用を示すことが報告されている¹⁶⁾。一方で、カプサイシンは比較的高濃度でtwitch収縮増大作用を示すことも報告されている¹⁷⁾。パクリタキセルのマウス精管のtwitch収縮増大作用にTRPが関与している可能性はあると思われる。

ピンクリスチンにはTRPに対する作用の報告はみられないので、ピンクリスチンのtwitch収縮増大作用はTRPに対する作用によらないと思われる。

オキサリプラチンの末梢神経障害には、TRPが関与するという報告があるが^{18,19)}、オキサリプラチンは、パクリタキセルのようなtwitch収縮増大作用がみられなかったことから、パクリタキセルとオキサリプラチンの作用機序が異なるためと思われる。

マウス精管の電気刺激によって、交感神経の終末部からノルアドレナリンとATPが遊離し、twitch収縮反応が生じるとされている⁵⁾。

カプサイシンによるマウス精管のtwitch収縮抑制には、TRPV1の活性化を介して遊離したカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が、神経及び平滑筋側に存在するCGRP受容体に作用し、収縮抑制を生じさせるとされている¹⁶⁾。知覚神経が刺激されて遊離する物質にはCGRP以外に、サブスタンスP(SP)などもあり、SPは、モルモット精管やラットの精管の電気刺激収縮を増大させることが報告されており^{17,20)}、遊離したSPがパクリタキセルによるマウス精管のtwitch収縮増大に関与している可能性もあると思われる。

桂皮の精油成分であるシンナムアルデヒドはTRPA1活性化物質であることが知られている^{12,21)}。以前に実施したマウス精管の電気刺激収縮実験において、シンナムアルデヒドは10 μ g/mLで、最大抑制を示した後、低濃度適用(1.3 μ g/mL)の場合と異なり、大きな収縮の戻りを観察している²²⁾。シンナムアルデヒドは抑制作用とその反対の作用を有し、TRPA1の活性化が関与している可能性があり、パクリタキセルはTRPA1活性化物質として知られており、パクリタキセルのtwitch収縮増大作用にTRPA1が関与しているかもしれない。

今回、パクリタキセルでtwitch収縮を増大させた条件下で、芍薬甘草湯エキスを作用させると、パクリタキセルを前処理しない場合と同様なtwitch収縮抑制作用がみられた。また、シャクヤクの主成分のペオニフロリンは、以前の実験でもtwitch収縮反応に変化を示さず^{6,7)}、今

回のパクリタキセル前処理においてもペオニフロリンに twitch 収縮を変化させる活性はみられなかった。

パクリタキセルの twitch 収縮増大作用の機序や、芍薬甘草湯中の twitch 収縮抑制作用成分とその作用機序が、今後解明の進むことを期待したい。

文 献

- 1) 中田敬吾：漢方基礎講座 処方解説シリーズ 29 芍薬甘草湯，漢方研究，426, 181-187 (2007)
- 2) 改訂 一般用漢方処方の手引き(監修：日本公定書協会，編集：日本漢方生薬製剤協会)，じほう (2009)，p.112
- 3) 中島正光：病棟でよく使う漢方薬 芍薬甘草湯，月刊薬事，60, 448-452 (2018)
- 4) 毒性試験講座 7 機能毒性学，地人書館(1990)，p.67-69, p.185-186, p.229-233
- 5) 廣川 生物薬科学実験講座 14 巻 臓器機能測定法 (編集：岡部進)，廣川書店 (1992)，p.643-646
- 6) 川筋 透，横田洋一，田村隆幸，松永孝之：シャクヤクの品種別薬理試験 (3) マウス精管の電気刺激収縮に対するシャクヤクエキスの作用，富山県薬事研究所年報，39, 51-60 (2012)
- 7) 川筋 透：マウス精管の電気刺激収縮に対するシャクヤク成分及び関連化合物の作用，富山県薬事研究所年報，42, 27-32 (2015)
- 8) 川筋 透：マウス精管での電気刺激収縮反応に対する芍薬甘草湯の作用，富山県薬事研究所年報，40, 46-50 (2013)
- 9) Hidaka T., Shima T., Nagira K., Ieki M., Nakamura T., Aono Y., Kuraishi Y., Arai T., Saito S.: Herbal medicine Shakuyaku-kanzo-to reduces paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in mice, *Eur. J.Pain*, 13, 22-27 (2009)
- 10) Andoh T., Kobayashi N., Kuraishi Y.: Prophylactic repetitive shakuyakukanzoto treatment inhibits paclitaxel-induced mechanical allodynia in mice via peripheral effects, *Trad. Kamp. Med.*, 3, 71-74 (2016)
- 11) 平成 28 年度富山県受託研究 (富山大学) 和漢薬・バイオテクノロジー研究 研究成果報告書，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 (安東嗣修，齋藤滋)，p.17-27 (2017)
- 12) Prekumar L.S.: Transient receptor potential channels as targets for phytochemicals, *American Chemical Society Chem. Neurosci.*, 5, 117-1130 (2014)
- 13) Materazzi S., Fusi C., Benemei S., Pedretti P., Patacchini R., Nilius B., Prenen J., Creminon C., Geppetti P., Nassini R.: TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism, *Pflugers Arch.* 463, 561-569 (2012)
- 14) Matsumura Y., Yokoyama Y., Hirakawa H., Shigeto T., Futagami M., Mizunuma H.: The prophylactic effects of a traditional Japanese medicine, goshajinkigan, on paclitaxel-induced peripheral neuropathy and its mechanism of action, *Mol. Pain*, 10, 61 (2014)
- 15) Donoso M.V., Hermosilla D., Navarrete C., Álvarez P., Lillo J.G., Huidobro-Toro J.P.: Reciprocal sympatho-sensory control: functional role of nucleotides and calcitonin gene-related peptide in a peripheral neuroeffector junction, *Neuroscience*. 203, 216-229 (2012)
- 16) Sheykhzade M., Gupta S., Sørensen T., Sørensen O.A., Koch H., Boonen H.C., Back O., Fjalland B.: Characterization of capsaicin induced responses in mice vas deferens: evidence of CGRP uptake, *Eur. J. Pharmacol.*, 667, 375-382 (2011)
- 17) Moritoki H., Iwamoto T., Kanaya J., Ishida Y., Ando K., Kitagawa K.: Capsaicin enhances the non-adrenergic twitch response of rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.*, 92, 469-475 (1987)
- 18) 田口恭治：抗悪性腫瘍薬パクリタキセルとオキサリプラチンにより誘発される末梢神経障害に対する Transient receptor potential チャネルの関与，*YAKUGAKU ZASSHI*, 136, 287-296 (2016)
- 19) Nakagawa T., Kaneko S.: Roles of transient receptor potential ankyrin I in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy, *Biol. Pharm. Bull.*, 40, 947-953 (2017) (文献)
- 20) Anthes J.C., Chapman R.W., Richard C., Eckel S., Corboz M., Hey J.A., Fernandez X., Greenfeder S., McLeod R., Sehring S., Rizzo C., Crawley Y., Shih N.Y., Piwinski J., Reichard G., Ting P., Carruthers N., Cuss F.M., Billah M., Kreutner W., Egan R.W.: SCH 206272: a potent, orally active tachykinin NK(1), NK(2), and NK(3) receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 450, 191-202 (2002)
- 21) 松本健次郎，加藤伸一，堀江俊治：TRP チャネルと内臓痛，*日薬理誌*，146, 233-235 (2015)
- 22) 川筋透，石黒尋保，松永孝之：シナナムアルデヒド及びケイヒ酸のマウス精油電気刺激収縮に対する作用及びマウスにおける体内動態の検討，富山県薬事研究所年報，43, 22-27 (2016)