

氏名	谷野 伸吾
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第919号
学位授与の日付	平成19年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	細辛およびその主要成分のメチルオイゲノールの鎮痛活性とその作用機序に関する研究
論文審査委員(主査)	宮本 謙一(医学部附属病院・教授)
論文審査委員(副主査)	辻 彰(自然科学研究科・教授), 米田 幸雄(自然科学研究科・教授), 石崎 純子(自然科学研究科・助教授), 加藤 将夫(自然科学研究科・助教授)

Abstract

The antinociceptive effects of the *Asiasari radix* extracts (ARE) were examined using the tail-flick test, tail-pressure test and formalin test in mice. In addition, the antinociceptive effects of methyleugenol (ME), one of a lot of essential oil constituents included in *Asiasari radix*, were examined using the formalin test in mice. ARE did not affect the tail-flick test or the tail-pressure test. However, the oral administration of ARE and ME significantly decreased the duration of licking and biting behavior in the second phase without affecting that of the first phase in the formalin test, as did diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug. ARE and ME also inhibited pain-related behaviors induced by the intrathecal injection of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA). However diclofenac did not affect these behaviors. The pre-treatment of bicuculline, a γ -aminobutyric acid_A (GABA_A) antagonist, antagonized the antinociceptive effects of ARE and ME on the formalin- or NMDA-induced behaviors. Muscimol, a GABA_A agonist, displays the same action as ARE and ME with respect to the formalin test and NMDA-induced behaviors. On the other hand, diclofenac significantly inhibited cyclooxygenase (COX)-1 and -2 activities. However ARE and ME did not affect COX activities. These results suggest that ARE may inhibit development of hyperalgesia via NMDA receptors based on activation of GABA_A receptors and ME may bear a part of the action.

神農本草経上品に記載されている細辛は、主要な生薬の一つとして広く用いられている。細辛は methyleugenol, asaryl ketone などの精油成分を約2~3%含有する他、辛味成分やアルカロイドなども含有する。細辛を配合する漢方処方には、麻黄附子細辛湯や苓甘姜味辛夏仁湯(効能、効果:感冒・気管支炎等)、小青竜湯(抗アレルギー作用・鼻炎等)、当帰四逆加芎藭生姜湯(頭痛・腰痛等)、立効散(抜歯後の痛み・歯痛等)などがある。これらの漢方方剤に配合されている細辛の薬理作用については、抗アレルギー作用、抗炎症作用、抗ヒスタミン作用、Schultz-Dale 反応抑制作用、ホスホジエステラーゼ阻害作用、鎮咳作用などの報告がある。鎮痛作用に関する報告は、1958年にウサギを用いた歯髄刺激法により、細辛の精油成分が鎮痛作用を示した報告に限られている。このように細辛を構成生薬とする漢方処方の多くは鎮痛作用や抗炎症作用を目的として使われているが、細辛に関して報告されている薬理作用の中で、鎮痛活性に関する報告がほとんどない点に着目し、細辛の鎮痛活性と共に、その作用機序あるいは活性成分を明らかにすることを本研究の主要な目標とした。そのため、細辛の鎮痛作用を

行動薬理的な鎮痛評価法を用いてその鎮痛活性の特徴を明らかにすると共に、鎮痛作用機序が脊髄内における GABA 神経系を介する可能性について検討した。また同時に、細辛に最も多く含まれている精油成分の一つである methyleugenol に着目し、その鎮痛作用を同様な方法により検討し、細辛の鎮痛作用における活性成分の可能性を示した。

1. 細辛の鎮痛活性とその作用機序の証明

(1) 細辛の鎮痛活性の評価

細辛エキスの機械的な侵害刺激や熱刺激に対する鎮痛作用を明らかにすることを目的として、正常マウスに細辛エキス(0.3-2.0 g/kg)を経口投与した後に Tail pressure 法、Tail flick 法によって細辛の鎮痛活性を評価した。その結果、蒸留水投与群と同じ反応性を示し、疼痛行動に変化は認められなかった。以上の結果から、細辛には機械的な刺激、熱刺激に対する鎮痛作用を示す可能性は低いと考えられた。

さらに、著者は化学物質を下肢に投与することによって発現する疼痛反応に対する細辛の効果を明らかにするために、ホルマリン法を用いて評価した。ホルマリン法は5.0%のホルマリン25 μ Lをマウスの後肢足蹠皮下に注入することによって発現する仮性疼痛反応(licking: 足舐め反応、biting: かみつき反応)の発現を指標として、5分間に発現する疼痛発現反応時間を測定する方法である。ホルマリン注入直後から発現する即時的な疼痛反応(第1相)と、約20分後から発現する遅発相(第2相)の2相性の疼痛反応が発現する。実験には、ホルマリン注入30分前に細辛エキス(0.1-2.0 g/kg)あるいは、陽性対照薬として抗炎症鎮痛薬である diclofenac (10 mg/kg) を経口投与し、その後の仮性疼痛反応時間を経時的に観察した。細辛エキス(1.0 g/kg以上)および、diclofenac は、ホルマリンによって誘発される第1相の疼痛反応に対して全く影響をおよぼさなかったが、第2相の疼痛反応を用量依存的に有意に抑制した。以上の結果から、ホルマリン誘発疼痛発現に対する細辛エキスの鎮痛効果は、1.0 g/kg以上の投与量において示すことが明らかとなった。

ホルマリンテストにおける第1相反応は、ホルマリンによる注入部位の神経に対する直接的刺激作用によるものであり、その刺激が直接脊髄後角細胞に入力することにより形成されると考えられる。その後発現されるホルマリンによる第2相における疼痛発現は、炎症による疼痛が関与していることが知られている。つまり末梢での傷害、圧刺激や温度変化などによりブラジキニンなどの疼痛発現物質が誘導され、炎症性のサイトカイン等が放出される。その後、神経伝達がC線維などを介して脊髄内に伝わり、脊髄内では興奮性の伝達物質であるグルタミン酸やサブスタンスPが放出され、NMDA受容体の活性化による痛覚過敏が形成され、そのシグナルが脳に伝わり痛みを発現すると考えられている。さらにそのシグナルが下行性抑制経路に伝搬されることによる痛みの調整、いわゆる下行性疼痛抑制機構が働くことも知られている。本研究においても抗炎症作用を持つ diclofenac の投与によりホルマリンによって誘発される疼痛反応において第2相のみを有意に抑制したことからも、第2相の疼痛発現に炎症性の疼痛発現機序の存在を裏付けるものである。以上より、細辛のホルマリンによる疼痛発現に対する鎮痛作用には抗炎症作用による可能性と脊髄内における痛覚過敏形成の抑制などが考えられる。

(2) 細辛の鎮痛作用機序の検討

前項において、ホルマリンテストの第2相目の疼痛発現には炎症性の反応と、脊髄内におけるNMDA受容体の刺激が関与することを述べた。そこで、生体の疼痛反応の発現と抑制に重要な役割を担っている脊髄に直接、疼痛反応に重要な役割を担っていることが知られているN-methyl-D-aspartic acid (NMDA)を脊髄内投与することによって発現する仮性疼痛モデルに対する細辛の鎮痛効果について検討した。さらに脊髄内で抑制性の神経として機能しているGABA神経系に注目し、ホルマリンによる第2相の疼痛発現を抑制した細辛の鎮痛効果に対するGABA_A受容体拮抗薬であるbicucullineの併用処置による影響について検討した。

そこで、まず0.25 nmolのNMDA 5 μLを脊髄内投与することによって生じる仮性疼痛反応、すなわちlicking、bitingの行動時間を指標として細辛エキスの鎮痛作用を評価した。細辛エキス(0.3, 1.0 g/kg)、diclofenac(10 mg/kg)を経口投与した30分後、NMDAを脊髄内投与した。その結果、細辛エキスは、1.0 g/kgの投与で統計的に有意な鎮痛活性を示したが、diclofenacは、有意差は認められなかった。

次に、ホルマリンテストの第2相の疼痛発現を抑制した細辛の鎮痛効果に対する、bicuculline(3.0 mg/kg)の併用処置による影響について検討した。細辛(1.0 g/kg)あるいは、対照薬であるGABA_A受容体作用薬muscimol(0.1 mg/kg)はホルマリンテストによって発現する第1相目の反応には影響を与えることなく第2相の反応を有意に抑制した。これに対してbicucullineの併用処置によって第2相における細辛エキスの効果は完全に消失した。Bicuculline単独ではホルマリンテストの第1相と第2相の反応には全く影響を与えなかった。以上より、細辛の鎮痛作用発現にはGABA_A受容体を介している可能性が示唆された。

さらに、細辛エキス(1.0 g/kg)はNMDA誘発仮性疼痛反応を有意に抑制したことから、その作用に対するGABA_A受容体の関与を明らかにするために、bicucullineの併用処置による影響について検討した。その結果、3.0 mg/kgのbicuculline併用処置によって細辛の作用は有意に抑制された。以上の結果から、細辛エキスの鎮痛作用には脊髄におけるNMDA受容体とGABA神経系が関与している可能性を示唆した。

一方、ホルマリン誘発仮性疼痛反応の第2相に対して特異的に細辛エキスの他、対照薬として用いたdiclofenacも有意な抑制作用を示した結果から、細辛エキスの鎮痛作用機序にdiclofenacのような抗炎症作用を有している可能性が示唆される。そこで、細辛エキスのcyclooxygenase-1 (COX-1)およびcyclooxygenase-2 (COX-2)阻害活性について検討を試みた結果、diclofenacはCOX-1,2共に10⁻⁶ mmol/mL以上で有意に阻害作用を示したが、細辛エキスはCOX-1,2に対して阻害作用を認めなかった。以上の結果から、細辛エキスのホルマリン誘発仮性疼痛反応における鎮痛作用には、抗炎症作用が関与していないことが明らかとなった。

以上、細辛はホルマリンによって引き起こされる疼痛反応の第2相における鎮痛作用を示し、その作用機序は抗炎症作用ではなく、NMDA受容体を介した疼痛過敏形成をGABA_A受容体の活性化に基づき抑制することが示唆された。

2. 細辛の精油成分 methyleugenol の鎮痛活性とその作用機序の証明

細辛には精油成分が約2-3%含まれ、その中でもmethyleugenolは主要な成分と知られており、第1項において提示した細辛エキスの鎮痛作用にmethyleugenolが主要な役割を担っている可能性が推察される。しかし、これまでのmethyleugenolに関する研究報告の中で鎮痛作用に関する詳細な研究は認められないことから、精油成分のmethyleugenolに注目し、その鎮痛作用について細辛と同様な行動薬学的手法を用いて、その有効性と作用機序について検討した。

(1) Methyleugenol の鎮痛活性の評価

Methyleugenol (3.0, 10 mg/kg) の鎮痛活性をホルマリン法を用いて評価した結果、細辛エキスと同様に第1相の反応には影響をおよぼさなかったが、10 mg/kg の methyleugenol および diclofenac (10 mg/kg) は第2相の遅発性の疼痛反応を有意に抑制した。

さらに、脊髄内に興奮性アミノ酸 NMDA を投与することによって発現する仮性疼痛反応に対する methyleugenol の作用について検討した結果、3.0, 10 mg/kg の methyleugenol は有意な鎮痛活性を認めたが、diclofenac (10 mg/kg) には認められなかった。

(2) Methyleugenol の鎮痛作用機序の検討

ホルマリンテストにおいて methyleugenol (10 mg/kg) と同時に GABA_A 受容体拮抗薬 bicuculline (3.0 mg/kg) を皮下に注入した結果、第2相における methyleugenol の効果は完全に消失した。以上の結果から、methyleugenol は GABA_A 受容体を介して鎮痛作用を示している可能性が示唆された。

さらに、NMDA 誘発仮性疼痛反応における bicuculline (3.0 mg/kg) 併用処置による methyleugenol (10 mg/kg) の鎮痛活性について検討した結果、methyleugenol の効果は bicuculline の併用処置によって完全に拮抗された。また、muscimol (0.1 mg/kg) によって NMDA 誘発仮性疼痛反応は有意に抑制された。以上の結果から、methyleugenol の鎮痛活性は muscimol と同様に脊髄内の GABA 受容体を刺激することによって発現している可能性が示唆された。

また、methyleugenol の cyclooxygenase 阻害作用について検討した結果、methyleugenol は COX-1,2 活性に対していずれも有意な阻害作用を示さなかった。以上の結果から、methyleugenol のホルマリン誘発仮性疼痛反応における鎮痛作用は、抗炎症作用は関与していないことが明らかとなった。

以上、methyleugenol はホルマリンによって引き起こされる疼痛反応の第2相における鎮痛作用を示し、その作用機序は抗炎症作用ではなく、NMDA 受容体を介した疼痛過敏形成を GABA_A 受容体の活性化に基づき抑制することが示唆された。

また、細辛には 2-3% の精油成分が含まれ、methyleugenol はそのうち約 50 % 以上を占める主要な成分として報告されている。細辛はホルマリンテストにおいて 1.0 g/kg 以上の投与量において鎮痛活性を示したことから、methyleugenol の最高投与量を 10 mg/kg に設定して検討した結果、細辛と同様な作用が得られた。すなわち、methyleugenol が示した鎮痛活性は、細辛に含まれている methyleugenol とほぼ同じ投与量で同じ鎮痛活性が認められたことから、methyleugenol は細辛の鎮痛活性の主要な活性成分と位置付けられると考えられた。

結論

細辛は脊髄内において、NMDA 受容体を介した痛覚過敏形成を GABA_A 受容体の活性化に基づき抑制し、持続的な疼痛に対する鎮痛作用を有し、その作用の一端を methyleugenol が担うことが示された。

さらに、ホルマリン注入による第2相に発現する疼痛反応は慢性的な疼痛として理解されており、この第2相の疼痛を抑制した細辛及び methyleugenol は、慢性的な疼痛に悩んでいる患者に対する、鎮痛作用を示す薬剤の一つとしての可能性が示唆された。

学位論文審査結果の要旨

細辛は、抗炎症・鎮痛などの効能を有する漢方処方に配合されている生薬であり、その薬理作用については、抗アレルギー作用、抗炎症作用、抗ヒスタミン作用、Schultz-Dale 反応抑制作用、ホスホジエステラーゼ阻害作用、鎮咳作用などの報告がある。しかし、鎮痛作用に関する報告は少ない。そこで、本研究は、細辛とその成分の **methyleugenol** に着目して、鎮痛作用と作用機序を検討して以下の成果を得た。

1) 細辛は、機械的な刺激や熱による刺激、あるいはホルマリンの第1相神経原性疼痛反応に対しては全く影響を与えなかったが、ホルマリン誘発第2相の疼痛反応として発現する炎症性の疼痛反応を有意に抑制することを明らかにした。2) さらに、ホルマリン誘発第2相疼痛発現に対する細辛の鎮痛作用は、脊髄内 GABA 神経系を介している可能性を示した。3) 細辛は COX 阻害活性を全く示さなかった。4) **Methyleugenol** は細辛と同様にホルマリン第2相疼痛に対して GABA 神経系を介した鎮痛作用を示した。

以上、本研究は、細辛が脊髄内 GABA 受容体を介した鎮痛作用を有していることを初めて明らかにすると同時に、その活性成分として **methyleugenol** が重要な役割を担っていることを示した。さらに、ホルマリン注入による第2相に発現する疼痛反応は慢性的な疼痛として理解されており、この疼痛を抑制する細辛及び **methyleugenol** は、慢性的な疼痛に悩んでいる患者に対する、鎮痛薬として有用である事を示唆するなど、今後の漢方薬学および鎮痛薬開発において意義深い研究であると認め、博士(薬学)論文として評価された。