

令和 2 年度 学 位 論 文

論 文 題 目

〈邦 文〉

糖尿病性末梢神経障害の感覚低下に対する牛車腎気丸の有効性と作用機序に関する基礎的研究

〈欧 文〉

Basic study on the efficacy and mechanism of action of Goshajinkigan for hypoesthesia of diabetic peripheral neuropathy

名城大学大学院 薬学研究科 薬学専攻 博士課程

氏 名

稲 垣 晃 熙

1. 本論文は、2021 年 2 月名城大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 能勢 充彦 教授

副査 平松 正行 教授

早川 伸樹 教授

2. 本論文は、学術雑誌に収載された次の報文を基礎とするものである。

- (1) Koki Inagaki, Yoshikazu Arai, Taishi Akasaki, Tami Yamada, Rui Tanaka, Shinsuke Hisaka, Mitsuhiko Nose: Effect of goshajinkigan on the mechanical hypoesthesia of streptozotocin-induced diabetic peripheral neuropathy in mice.

Trad. Kampo Med., 7, 153-165 (2020)

- (2) Koki Inagaki, Masataka Furuta, Izumi Asada, Shinsuke Hisaka, Mitsuhiko Nose: Goshajinkigan increases peripheral capillary diameter in non-diabetic and diabetic mice.

Trad. Kampo Med., <https://doi.org/10.1002/tkm2.1267> (2020)

3. 本論文の基礎となる研究は、能勢 充彦 教授の指導の下に名城大学大学院薬学研究科において行われた。

略語表

AR-I	aldose reductase inhibitor
CPZ	capsazepine
CaM	calmodulin
DM	diabetes mellitus
DPN	diabetic peripheral neuropathy
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
EPS	epalrestat
GJG	Goshajinkigan (牛車腎気丸)
HJG	Hachimijiougan (八味地黄丸)
HPLC	high performance liquid chromatography
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IP ₃	inositol triphosphate
IRS	insulin receptor substance
KJBT	Keishikajutsutou (桂枝加朮附湯)
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginine methyl ester
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
OPA	σ -phthalaldehyde
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIP ₂	phosphatidylinositol diphosphate
PKC	protein kinase C
RJG	Rokumijiougan (六味地黄丸)
SNP	sodium nitroprusside
SNRI	serotonin noradrenaline reuptake inhibitor
STZ	streptozotocin
TRP	transient receptor potential
TRPA1	transient receptor potential ankyrin 1
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1
TSGST	Toukishigyakukagoshuyushoukyoutou (当帰四逆加呉茱萸生姜湯)

序論	1
本論	
第一章 糖尿病性末梢神経障害感覚低下に与える漢方方剤の影響	
第一節 ストレプトゾトシン誘発糖尿病性末梢神経障害モデルマウスの作製	3
第二節 糖尿病性末梢神経障害感覚低下に有効な漢方方剤の探索	5
第三節 糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における牛車腎気丸の作用特性	8
第四節 牛車腎気丸の糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における一酸化窒素の関与	12
第二章 牛車腎気丸の感覚低下改善作用における有効成分の探索	
第一節 牛車腎気丸類方の糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用	18
第二節 牛車腎気丸の糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における有効生薬の探索	21
第三節 牛車腎気丸および有効画分、有効生薬に含まれる L-アルギニンおよび L-シトルリン含量	25
第四節 糖尿病性末梢神経障害感覚低下に対する L-アルギニンおよび L-シトルリンの改善作用	27
第五節 牛車腎気丸投与後の血中一酸化窒素濃度上昇の検証	29
第三章 糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における TRPV1 および A1 チャネルの関与	
第一節 牛車腎気丸の TRPV1 および A1 チャネルを介した感覚低下改善作用	37
第二節 桂皮、附子の TRPV1 および A1 チャネルを介した感覚低下改善作用	41
第四章 健常マウスおよび糖尿病マウスの末梢血管径に与える影響	
第一節 一酸化窒素による血管拡張作用の評価	48
第二節 健常マウスにおける牛車腎気丸の血管拡張作用	52
第三節 糖尿病マウスにおける牛車腎気丸の血管拡張作用	54
結論	59
謝辞	60
実験の部	61
引用文献	75

序論

令和元年度の国民健康・栄養調査によれば、わが国における「糖尿病が強く疑われるもの」の割合は男性 19.7%、女性 10.8 である (1)。また、年齢階級別に見ると年齢が高い層でその割合が高く、男女ともに 60 歳から 69 歳でそれぞれ 25.3%、10.7%を示し、70 歳以上となると男性で 26.4%、女性で 19.4%にも上るなど、高齢者医療においても糖尿病は大きな課題であることがわかる。

2019 年 11 月 14 日 世界糖尿病デーに、国際糖尿病連合会が発表したところによると、世界では成人の 11 人に 1 人が糖尿病患者であり、その総数は 4 億 6300 万人に上り、2030 年までに 5 億 7800 万人に増加すると予測されている。また糖尿病患者の 3 分の 2 は都市部に居住し、その 4 分の 3 は就労世代が占めること、また患者の 5 人に 1 人は 75 歳以上の高齢者であることも明らかになっており、2019 年において糖尿病に起因する死亡は 420 万人に上ることも報告されている (2)。

さらに、国際糖尿病連合の報告によれば、糖尿病関連の医療費は全世界において 7600 億米ドル (約 83 兆円) であることも発表され、それは医療費全体の 10%を占めると報告されている。また、糖尿病の合併症治療に伴う医療費は糖尿病に関連した医療費の 50%以上を占めており、医療費の負担を増加させていることを明らかにし、糖尿病の医療費を抑えるためには合併症の予防が必要であるとした (2)。中でも、糖尿病性末梢神経障害 (DPN) は発症率が最も高く、糖尿病患者の約 54%は足に何らかの自覚症状 (ジンジン、ピリピリするなどの感覚過敏や疼痛など) を感じ、約 58%は足に外観異常 (創傷治癒の遅延、皮膚の乾燥やひび割れなど) を感じている (3)。

この DPN の発症機序については、高血糖を起因とする代謝性異常や血管性因子などが考えられ、それぞれに対応した治療法が試行錯誤されてきたが、現時点において満足し得る薬剤や治療法は確立されていない。DPN の成因と考えられる有力なものとして、ポリオール代謝異常が提唱されている。すなわち、高血糖によるポリオール代謝経路の亢進に伴い、細胞内にソルビトールが蓄積することで浸透圧ストレスなどが生じる。また、ソルビトールから生じるフルクトースによる糖化反応の亢進など一連の反応が神経細胞障害を引き起こしているのではないかとする考えもある (4)。そのため、ポリオール代謝経路の律速酵素であるアルドース還元酵素の阻害剤 (AR-I) が有用ではないかと考えられ、わが国ではエパルレスタット (EPS) が上市された。しかしながら AR-I は日本でのみ承認されている医薬品であり、世界的に認知されたものとは言い難い。また、エパルレスタットも初期の軽微な自覚症状の改善には有効とする報告がある一方で、長期間の高血糖状態により神経組織の変性が進行し、DPN の後期では、効果が期待できないとされるなど、現在ではその効果に疑問がある (5)。同様に、DPN の発症機序として、ポリオール代謝異常とも関係が考えられている酸化ストレスの亢進に注目し、ドイツでは抗酸化剤である α -リポ酸を用いた治療が認可されているが、わが国では未承

認である。 α -リポ酸による治療は、神経症状と身体所見を改善するが、神経伝達速度の低下を改善しないことなどが知られており、標準治療薬にはなっていない(6)。その他、DPNの成因についてはプロテインキナーゼC(PKC)の活性化亢進や炎症、神経栄養因子障害なども考えられ、それぞれに基づく治療薬開発も行われているものの、未だ決定的な医薬品の開発には至っていない(7)。

DPNは、初期から中期においてはジンジン、ピリピリといった感覚過敏や疼痛などの陽性症状が主体であるが、後期においては感覚低下などの陰性症状に移行する(8)。近年、この陽性症状とされる有痛性DPNの対症療法として、プレガバリンやデュロキセチンが使用されているが、患者自身の薬物処理能力の影響や傾眠、嘔気などの副作用の懸念もある。またカルバマゼピンやガバペンチンなどの抗けいれん薬も有痛性DPNには有効であることが報告されている(5)が、保険適応はない。さらに、陰性症状である感覚低下に対しては、候補となる医薬品すらないのが現状である。

さて、わが国では西洋医薬品と同様に漢方方剤を保険適応の範囲内で用いることができ、臨床医の約8割以上が漢方薬の処方経験を持つ。一般に、漢方方剤は、患者によって奏功する場合もあれば効果を示さない場合もあるなど、レスポnderやノンレスポnderの存在が示唆されることや複数の生薬を組み合わせ用いる多成分系の薬剤であるため、活性本体や作用機序が不明であるなど、科学的根拠に乏しいとされる。しかしながら、近年、漢方方剤は化学療法剤による末梢神経障害の改善にも用いられることが多く、そのひとつである牛車腎気丸(GJG)の有用性については基礎・臨床両面から報告がある。牛車腎気丸については、DPNの疼痛や痛覚過敏に抑制作用を示したとする報告があるものの、その作用機序に関してはまだ不明な点も残されている。また、DPNの感覚低下に及ぼす作用については、まったく検討されていない。先にも述べたように、DPNの早期に生じる陽性症状については、患者も医療者も気づきやすいが、感覚低下などの陰性症状は気づきにくく、重大な転帰となることが危惧されており、薬剤開発が強く望まれている。

そこで、本研究では、DPNの後期に出現する感覚低下について、マウスを用いた実験モデルを構築し、薬物データベースとしての漢方方剤の中から有用なものを見出すことを最初の目的とした。さらに有効な処方を見出すことができれば、その作用機序や有効生薬ならびに活性成分などの詳細を明らかにすることで、臨床応用へと展開させることを目標として検討を進めた。

本論

第一章 糖尿病性末梢神経障害感覚低下に与える漢方方剤の影響

本章では、DPN の後期に出現する感覚低下について、マウスを用いた実験モデルを構築し、薬物データベースとしての漢方方剤の中から有用なものを見出すことを目的として、検討を開始した。

第一節 ストレプトゾトシン誘発糖尿病性末梢神経障害モデルマウスの作製

感覚低下を示す DPN モデルマウスの作製を行った。

実験動物として雄性 ICR マウス（6 週齢）を用い、ストレプトゾトシン（STZ、150 mg、*i.v.*）により糖尿病を惹起した。STZ の投与 72 時間後に血糖値の測定を行い、300 mg/dL を超えた個体を糖尿病として実験に供した。感覚試験は、機械的刺激として知られている von Frey 試験を実施し、up-down 法にて 50% 閾値を算出した。その結果を、Fig. 1 に示す。

STZ 投与後 2 週目をピークとして 50% 閾値の低下を認め、その後経時的に 50% 閾値の増加を認めた。一方、非糖尿病マウスでは、その 50% 閾値はほぼ一定の値を示した。

これらの結果は、臨床における DPN の経時変化とよい一致を示し、7 週以降のマウスを用いて、感覚低下改善作用をもつ漢方方剤の探索を試みた。

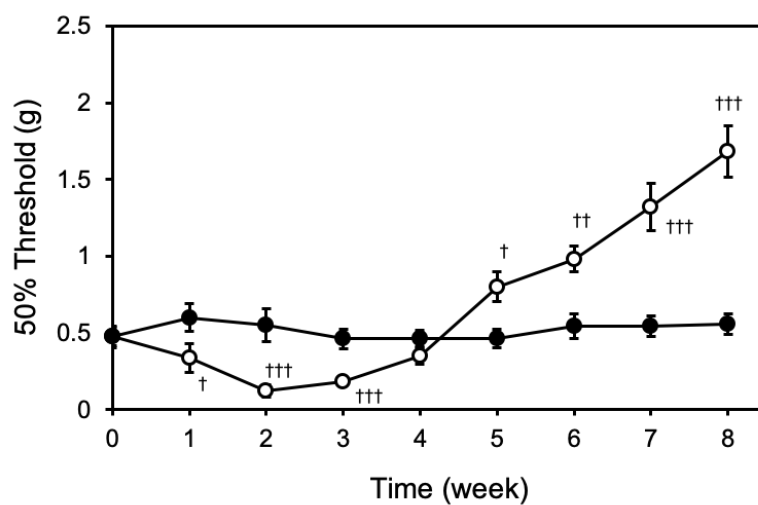


Fig. 1. Effect of diabetes on the 50% paw withdrawal threshold in mice.

●, vehicle (non-diabetic mice); ○, streptozotocin (diabetic mice). The 50% paw withdrawal thresholds were determined by the up-down method using the von Frey test. The von Frey test was performed once a week. Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of 14 or 15 mice. $†††p < 0.001$, $††p < 0.01$, $†p < 0.05$ vs. the respective non-diabetic group by the Mann-Whitney U -test.

第二節 糖尿病性末梢神経障害感覚低下に有効な漢方方剤の探索

DPN の感覚過敏に対して臨床報告のある GJG、桂枝加朮附湯 (KJBT)、当帰四逆加呉茱萸生姜湯 (TSGST) の 3 処方 (Table 1) (9) が DPN の感覚低下に与える影響について検討を行った。

第一節と同様に、実験動物として雄性 ICR マウス (6 週齢) を用い、STZ 投与により糖尿病を惹起した。STZ 投与後 9 週目から von Frey 試験を実施して、糖尿病マウス (CTRL) において同週齢の非糖尿病マウス (N) に比較し、有意な 50% 閾値の上昇を認め (Fig. 2A)、これらを DPN マウスとした。その後、被験薬物の数に合わせてグループ分けを行い、被験漢方方剤を単回投与、さらに 1 週間連続投与して、投与後 1 時間に von Frey 試験を実施し、50% 閾値に及ぼす影響を検討した。

また、本邦において DPN の適応を有する AR-I である EPS を用い、DPN の感覚低下に与える影響を併せて検討した。

まず、単回投与において、GJG は 50% 閾値の上昇を低下させ、糖尿病マウスの機械的刺激に対する感覚低下を改善することが明らかとなった。また、有意ではないものの、KJBT も 50% 閾値の上昇を低下させた。一方、TSGST や EPS 投与群では、50% 閾値の変化は観察されなかった (Fig. 2B)。

また、1 週間の連続投与により、GJG 投与群では 50% 閾値が非糖尿病マウスと同程度となり、KJBT 投与群でも有意な 50% 閾値の低下が観察されるなど、連続投与によって、感覚低下改善作用は増強されることが示唆された (Fig. 2C)。

さらに、1 週間の連続投与後、薬物投与を 1 週間休止して各群の von Frey 試験を実施したところ、GJG 投与群においても 50% 閾値は上昇し、対照群との差異がないほどとなったことから、単回投与や 1 週間の連続投与によって観察された 50% 閾値の低下は GJG の作用であることを確認した (Fig. 2D)。

Table 1. Structure of Goshajinkigan (GJG), Keishikajutsubutou (KJBT) and Toukishigyakukagoshuyushoukyoutou (TSGST)

Recipe	Structure
牛車腎気丸 (GJG)	地黄、山茱萸、山薬、沢瀉、茯苓、牡丹皮、桂皮、牛膝、車前子、附子
桂枝加朮附湯 (KJBT)	桂皮、芍薬、大棗、生姜、甘草、白朮、附子
当帰四逆加呉茱萸生姜湯 (TSGST)	当帰、桂皮、芍薬、木通、細辛、甘草、大棗、呉茱萸、生姜

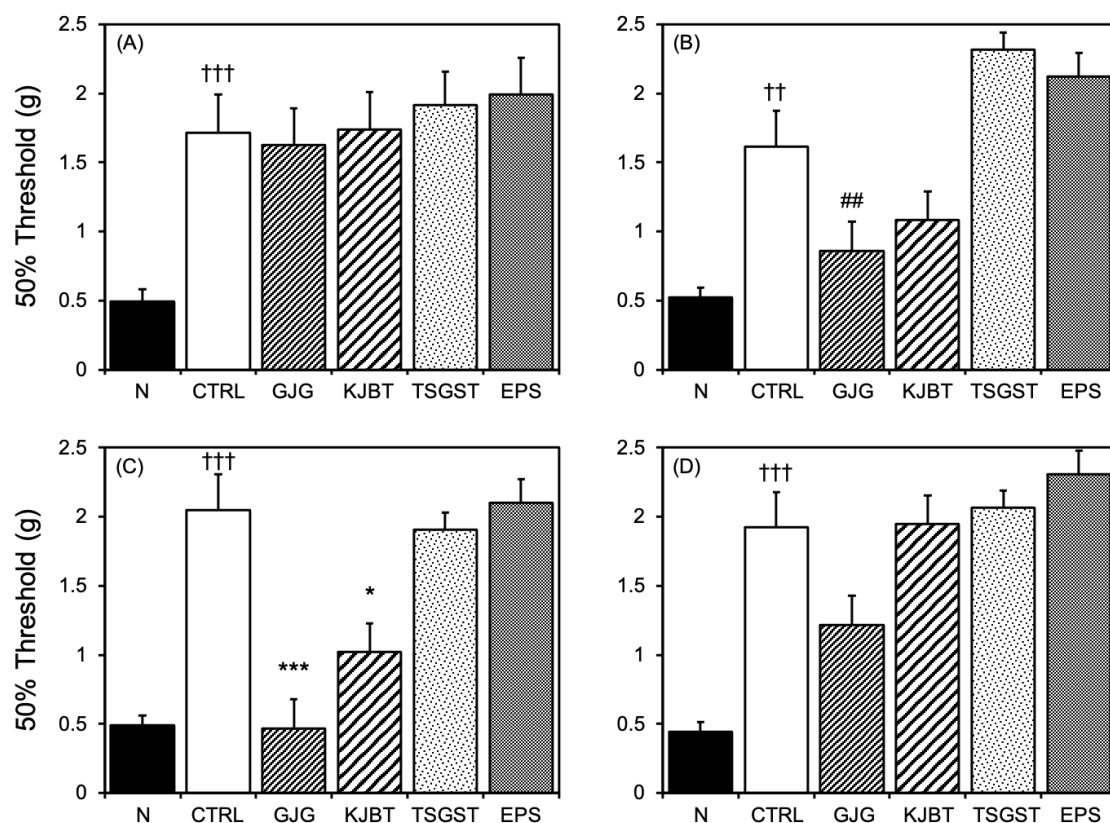


Fig. 2. Effects of Goshajinkigan (GJG), Keishikajutsuto (KJBT), Tokishigyakukagoshuyushokyo (TSGST) and Epalrestat (EPS) on the mechanical hypoesthesia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice.

(A) Before treatment with each Kampo extract, (B) single administration of each Kampo extract, (C) consecutive administration of each Kampo extract for 7 days, (D) washout of each Kampo extract for 7 days. After nine weeks from the STZ treatment (150 mg/kg, *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypo-esthesia; the diabetic mice were divided into five groups and then subjected to the experiment. Kampo extracts were administered orally at a dose of 10 times the human daily dose as follows, 1.53 g/kg for GJG, 1.16 g/kg for KJBT and 1.23 g/kg for TSGST. EPS was also administered orally at a dose of 0.1 g/kg. At 60 min after administration, the von Frey test was performed. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 9 or 10 mice. ††† p < 0.001, †† p < 0.01 vs. the normal group by the Mann-Whitney *U*-test. *** p < 0.001, * p < 0.05 vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. ## p < 0.01 vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for the selected two comparisons.

第三節 糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における牛車腎気丸の作用特性

前節において感覚低下改善作用を認めた GJG について、投与量依存性や作用の持続時間など、その作用特性について検討を行った。

実験動物として雄性 ICR マウス（6 週齢）を用い、先と同様に STZ 投与により糖尿病を惹起した。STZ 投与後 9 週目に感覚低下を確認した（Fig. 3A）後、被験薬物の数に合わせてグループ分けを行い、GJG をヒト 1 倍量（0.153 g/kg）、5 倍量（0.765 g/kg）、10 倍量（1.53 g/kg）と単回投与、さらに 1 週間連続投与し、投与後 1 時間に von Frey 試験を実施して、50%閾値に及ぼす影響を検討した。

単回投与において、GJG は投与量依存的に 50%閾値の上昇を低下させ、ヒト 10 倍量で有意な感覚低下改善作用を認めた（Fig. 3B）。さらに、1 週間連続投与した後にも、その作用に投与量依存性を認め、この場合ヒト 5 倍量においても有意に改善作用を認めた（Fig. 3C）。

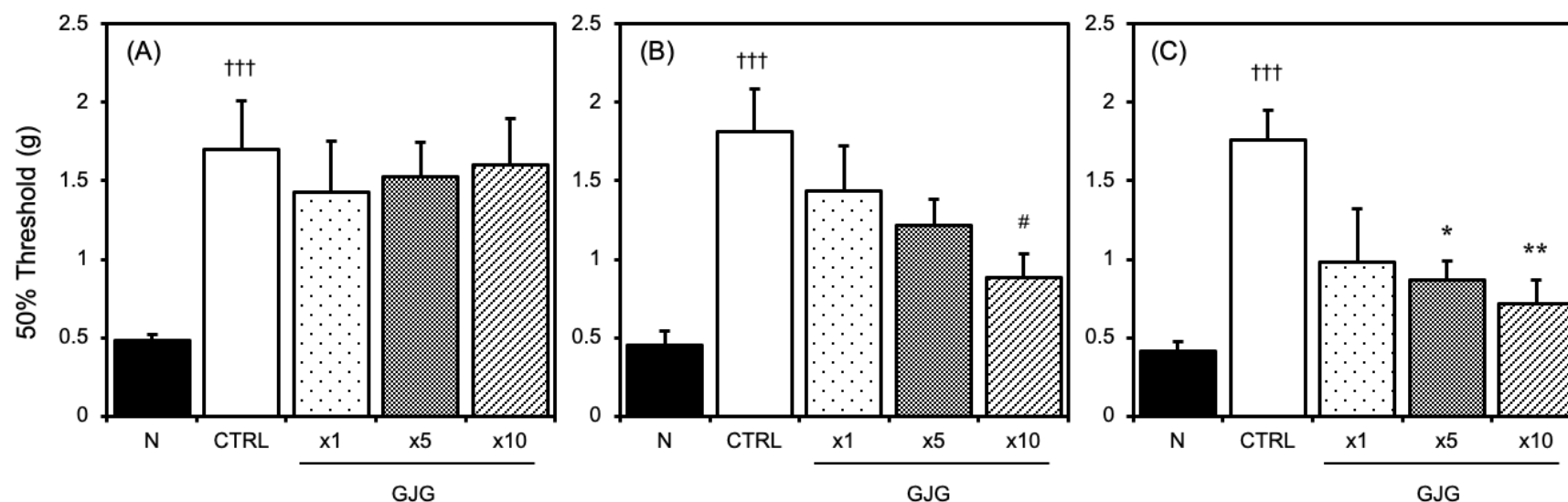


Fig. 3. Dose dependence in the ameliorative effect of Goshajinkigan (GJG) on the mechanical hypoesthesia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice.

(A) Before treatment with GJG, (B) single administration of GJG, (C) consecutive administration of GJG for 7 days. Nine weeks after the STZ treatment (150 mg/kg *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypoesthesia, and the diabetic mice were divided into four groups and then subjected to the experiment. GJG was orally administered 1 h before the von Frey test in three different doses as follows; $\times 1$; an equivalent to the human daily dose (0.153 g/kg); $\times 5$; five times that of the human daily dose (0.765 g/kg); $\times 10$; 10 times that of the human daily dose (1.53 g/kg). Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 9 or 10 mice. $^{***}p < 0.001$ vs. the normal group by Mann-Whitney U -test. $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. $^{\#}p < 0.05$ vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for the selected two comparisons.

次に、感覚低下改善作用の持続時間について検討を行った。

実験動物として雄性 ICR（6 週齢）マウスを用い、STZ 投与により糖尿病を惹起した。STZ 投与後 8 週目に感覚低下を確認し（Fig. 4A）、投与後 1 時間と 5 時間後に von Frey 試験を実施し、50%閾値に及ぼす影響を検討した。

単回投与において、DPN マウスでは、GJG 投与後 1 時間に有意な 50%閾値の上昇を低下させ、（Fig. 4B）、5 時間後にはこの作用の減弱が認められた（Fig. 4C）。

さらに、1 週間、2 週間連続投与においても、DPN マウスでは投与後 1 時間で 50%閾値の上昇を低下させ（Fig. 4D, F）、投与後 5 時間でこの作用は減弱した（Fig. 4E, G）。また、投与を繰り返すことによって、わずかであるが GJG による感覚低下改善作用の増強も認められた。

一方で、いずれの投与期間においても非糖尿病マウスでは、GJG は感覚に影響を与えなかった。

以上の結果から、GJG の DPN 感覚低下改善作用は、投与後比較的早く出現し、一過性の作用であることが明らかとなった。

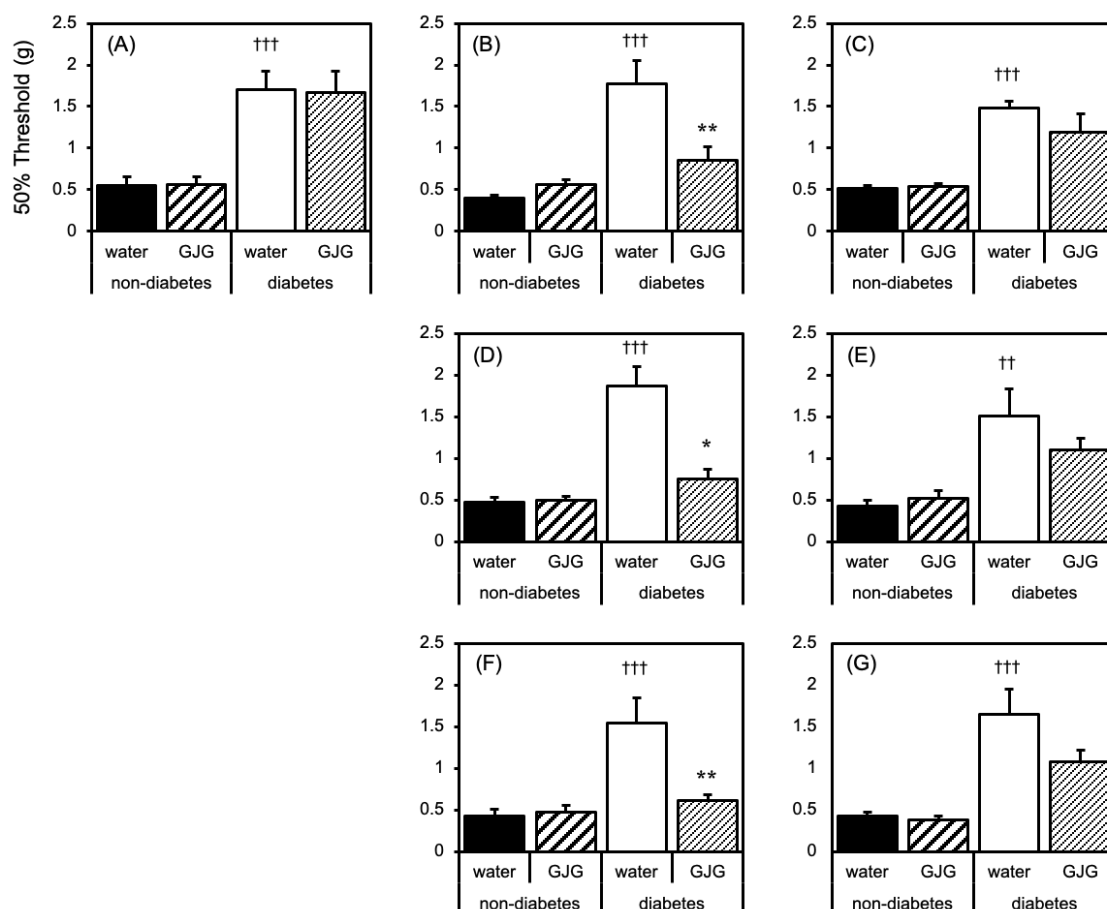


Fig. 4. Duration of the ameliorating effect of Goshajinkigan (GJG) on the mechanical hypoesthesia in streptozotocin-induced diabetic mice (DM) or non-diabetic mice (N)

(A) before treatment of GJG, (B) 1 h after single administration of GJG, (C) 5 h after single administration of GJG, (D) 1 h after consecutive administration of GJG for 7 days, (E) 5 h after consecutive administration of GJG for 7 days, (F) 1 h after consecutive administration of GJG for 14 days, (G) 5 h after consecutive administration of GJG for 14 days. Eight weeks after from the STZ treatment (150 mg/kg, *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypoesthesia, and the diabetic mice were subjected to the experiment. The von Frey test was performed at 1 h and 5 h after oral administration of GJG (1.53 g/kg) or vehicle in each experiment. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 7 or 8 mice. ††† p < 0.001, †† p < 0.01 *vs.* the water-administered group in non-diabetes by Mann-Whitney *U*-test. ** p < 0.01, * p < 0.05 *vs.* the water-administered group in diabetes by Mann-Whitney *U*-test.

第四節 牛車腎気丸の糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における一酸化窒素の関与

先行研究において、GJG が示す DPN の感覚過敏やアロディニアといった陽性症状改善作用には、ダイノルフィン産生と一酸化窒素 (NO) 産生が関わっていることが示唆されている (25)。前節までに認めた GJG の DPN 感覚低下改善作用において、鎮痛作用を示すダイノルフィンの関与はないと考えたが、NO 産生については関与している可能性があると考え、検討することとした。

そこで、NO 合成酵素阻害剤である N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) が GJG の DPN 感覚低下改善作用に与える影響について検討した。

実験動物として雄性 ICR マウス (6 週齢) を用い、STZ 投与により糖尿病を惹起し、投与後 7 週目に、感覚低下を確認し (Fig. 5A)、DPN マウスを 4 つのグループを分けた。L-NAME は、von Frey 試験当日、GJG の経口投与 30 分前に 5 mg/kg を腹腔内投与した。

GJG の単回投与において、L-NAME の前処置により、GJG が示す 50% 閾値を低下させる作用は消失した (Fig. 5B)。さらに、GJG の連続投与による 50% 閾値を低下させる作用も L-NAME の前処理により消失することが確認された (Fig. 5C)。

一方、L-NAME 単独処理群では、有意ではないものの、50% 閾値の上昇傾向が観察された。

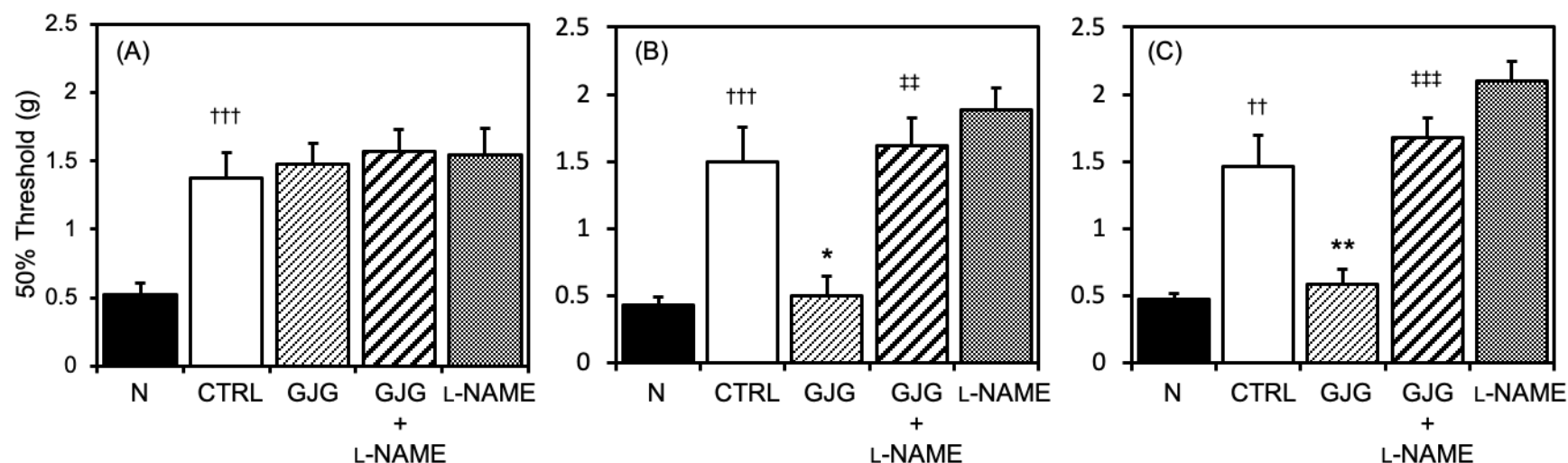


Fig. 5. Effect of pre-treatment of N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on the ameliorating effect of Goshajinkigan (GJG) on the mechanical hypoesthesia in streptozotocin-induced diabetic mice.

(A) before treatment of GJG, (B) single administration of GJG, (C) consecutive administration of GJG for 7 days. Seven weeks after the STZ treatment (150 mg/kg, *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypoesthesia, and the diabetic mice were subjected to the experiment. The intraperitoneal injection of L-NAME (5 mg/kg) was carried out 30 min prior to oral administration of GJG (1.53 g/kg). Each column represents the Mean $\pm$ S.E.M. of 7 to 10 mice. ††† p < 0.001, †† p < 0.01 *vs.* the normal group by Mann-Whitney *U*-test. ** p < 0.01, * p < 0.05 *vs.* the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. ††† p < 0.001, †† p < 0.01 *vs.* the GJG group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.

L-NAME の前投与によって、GJG でみられた感覚低下改善作用の消失を認めたことから、この感覚低下改善作用には NO 産生が関与していることが推定された。

そこで次に、NO 自体に DPN の感覚低下改善作用があるかどうか、NO ドナーである sodium nitroprusside (SNP、1 mg/kg、*s.c.*) 投与による影響について、同様に検討した。

実験動物として雄性 ICR マウス（6 週齢）を用い、STZ 投与により糖尿病を惹起した。STZ 投与後 8 週目に、感覚低下を確認し（Fig. 6A）、SNP を投与して 1 時間後に von Frey 試験を実施し、50%閾値に及ぼす影響を検討した。

SNP 投与によって GJG と同様、50%閾値の上昇を低下させた（Fig. 6B）。これらのことから、GJG による感覚低下改善作用には NO が関与している可能性が強く示唆された。

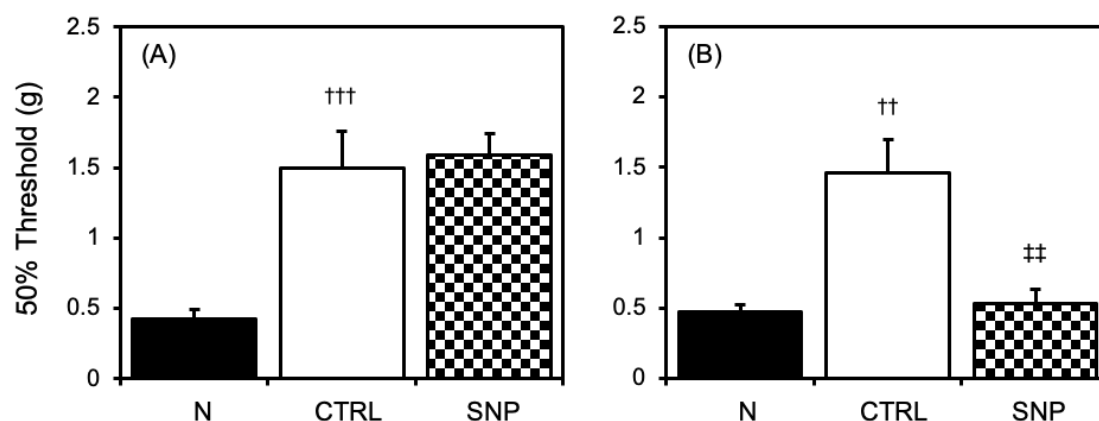


Fig. 6. Effect of sodium nitroprusside (SNP) on the mechanical hypoesthesia in streptozotocin-induced diabetic mice

(A) before treatment of SNP, (B) single administration of SNP. After eight weeks from the STZ treatment (150 mg/kg, *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypoesthesia, and the diabetic mice were subjected to the experiment. SNP was administered (1.0 mg/kg, *s.c.*) and the von Frey test was carried out at 60 min later. Each column represents the Mean $\pm$ S.E.M. of 7 to 10 mice. $†††p < 0.001$, $††p < 0.01$ vs. the normal group by Mann-Whitney *U*-test. $‡‡p < 0.01$ vs. the CTRL group by Mann-Whitney *U*-test.

考察

DPN の治療薬については、AR-I である EPS がわが国では唯一処方可能な医薬品として上市されているが、血糖コントロールが良好で、神経障害罹患期間が 3 年未満と短く、進行した網膜症や腎症の合併がないほど効果が大きいとされる。また、本研究の主題である感覚低下や足部筋委縮が目立たない、言わば DPN の病期が進行していない患者を対象に、血糖コントロールを行いながら投与することが推奨されている (5)。また、EPS は神経障害性疼痛治療薬ではないため、疼痛対策は別途 Ca^{2+} チャネル $\alpha_2\delta$ リガンドであるプレガバリンやセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害剤 (SNRI) であるデュロキセチン、三環系抗うつ薬のアミトリプチリンなどによって行われている。さらに、EPS は本邦のみで使用されている薬剤であり、残念ながら国際的な治療薬ではない。一方、海外では抗酸化薬の α -リポ酸がドイツにおいて承認されているが (6)、わが国では未承認である。このように、DPN の陽性症状である感覚過敏やアロディニアに対する治療法も確立されているとは言えない状況において、陰性症状である感覚低下に対する薬剤開発は未だ成し遂げられておらず、本合併症がアンメット・メディカルニーズの上位に存在する所以となっている。

その中で、本研究では、漢方方剤のひとつである GJG が糖尿病マウスの 8 週以降に出現する感覚低下を改善することを初めて見出した。その効果は、単回投与後 1 時間という比較的早期に発現し、5 時間後には減弱する一過性のものではあったが、von Frey 試験においては機械的刺激に対して非糖尿病マウス程度の忌避反応を示すほどに回復するなど顕著なものであった。また、連続投与することで、その効果はさらに増強される傾向を示し、継続して服用することで治療薬として臨床応用できる可能性をもつと考えられる。

モデルとして用いた 1 型糖尿病マウスは、温痛覚刺激に対する tail-flick 試験を用いた先行研究において、その忌避反応が本研究と類似した結果を示しており (10, 11)、糖尿病性末梢神経障害における温痛覚や触圧覚に対する反応が臨床における経過と類似していることから、薬剤開発のためには適したモデルであると考えられる。

また、このモデルの感覚低下に対して、EPS が効果を示さなかったことは、上述した理由により、適用できる範囲になかったからではないかと考えられる。そういった点でも、GJG は、DPN の感覚過敏に対しても抑制作用を示すことが既に明らかにされており、本研究の結果からも DPN の予防や治療に有益な薬剤であるとの期待が高まる。

今回見出した DPN の感覚低下改善作用のメカニズムについて、NO 産生の観点から検討したところ、先行研究で示されている感覚過敏の抑制 (12) だけでなく、感覚低下においても NO 産生が重要な鍵を握っていることが明らかとなった。実際、糖尿病が進行したマウスを掌に乗せると、四肢の体温が低下しており、末梢組織における血流が低下していることが推定され、さらに GJG 投与により体温の上昇が感じられる個体もあ

ったことから、DPN の状態を一種の虚血と考え、その循環障害を NO 産生の充進を介して改善するのではないかと推定して L-NAME の前処置実験を行った。その結果、GJG の感覚低下改善作用は完全に消失し、この DPN マウスモデルの感覚低下における血流障害の重要性が明らかとなった。ヒトにおける本合併症の病因や病態形成過程との詳細な比較によって、治療のターゲットが見えてくるのではないかと予想している。

本章の実験では、GJG 以外に KJBT も改善効果を示した。GJG は、本来「体力中等度以下で、疲れやすくて、四肢が冷えやすく、尿量減少し、むくみがあり、ときに口渴するものの次の諸症：下肢痛、腰痛、しびれ、高齢者のかすみ目、かゆみ、排尿困難、頻尿、むくみ、高血圧に伴う随伴症状の改善（肩こり、頭重、耳鳴り）」を効能効果としてもつ処方であり、KJBT は「体力虚弱で、汗が出、手足が冷えてこわばり、時に尿量が少ないものの次の諸症：関節痛、神経痛」を効能効果としてもつ処方である。一方、同様に検討し、効果を認めなかった TSGST は、「体力中等度以下で、手足の冷えを感じ、下肢の冷えが強く、下肢または下腹部が痛くなりやすいものの次の諸症：冷え症、しもやけ、頭痛、下腹部痛、腰痛、下痢、月経痛」を効能効果としてもつ。これらの 3 処方は、GJG であれば駆瘀血剤である牡丹皮や地黄、KJBT であれば芍薬、TSGST であれば当归や芍薬、呉茱萸というように、それぞれ血流改善に働く生薬をもつものの、本実験で用いたモデルに対する効果には大きな差異があり、単純に構成生薬の違いやもともとの方意・方格で読み取れるものはなかった。

さらに、効果の認められた GJG と KJBT では、構成生薬において桂皮が共通するものの、桂皮は効果のなかった TSGST にも配合されており、その点でも今回見出した作用を説明する糸口を得ることはできなかった。

DPN の感覚過敏においては、その鎮痛作用には附子が関与していることが報告され (12)、また GJG の糖尿病ラットにおける血小板凝集阻害には、山薬と沢瀉が有効生薬として同定されている。この山薬と沢瀉の作用には、NO 産生が関わっていることも推定されており (13)、本研究で見出した GJG の作用における有効生薬や有効成分の同定が次の課題である。

第二章 牛車腎気丸の感覚低下改善作用における有効成分の探索

第一章では、GJG が DPN における感覚低下改善作用を有することを見出し、感覚過敏に対する有用性を示した先行研究とともに、DPN の改善薬・治療薬として有望であることを示した。本章では、その有効生薬ならびに有効成分について検討を加えた。

第一節 牛車腎気丸類方の糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用

GJG は、地黄、山茱萸、山薬、沢瀉、牡丹皮、茯苓、附子、桂皮、牛膝、車前子の 10 種の生薬から構成される処方である。GJG は、地黄を「君薬」とする一連の処方群に属し、八味地黄丸 (HJG) と六味地黄丸 (RJG) もまた繁用処方として使用されている。HJG は、GJG から牛膝と車前子を除いた八味で構成され、RJG は HJG から附子と桂皮を除いた六味から構成される (Fig. 7)。これら「地黄丸」類は、漢方医学でいう「補腎剤」に位置付けられ、RJG は「補陰剤」、HJG と GJG は「補陽剤」として、それぞれ「腎」の機能低下と「陰液不足」を補う処方であり、現代医学的には乳幼児の成長過程での遅れや加齢による種々の機能低下などに応用されている。また近年、抗がん剤の副作用としての末梢神経障害に応用されることもあり、それぞれ有用性が報告されている (14-17)。これら 3 種の処方は共通する構成生薬を含むこともあり、有効生薬を絞り込んでいく上でも、また DPN に対する選択肢を増やすうえでも、GJG を含めたこれらの類方の感覚低下に与える影響について興味をもたれた。

そこで、まずこれら 3 種の「地黄丸」類の DPN 感覚低下に及ぼす影響について検討した。

実験動物として雄性 ICR マウス (6 週齢) を用い、これまでと同様、STZ 投与により糖尿病を惹起した。STZ 投与後 9 週目に感覚低下を確認し (Fig. 8A)、DPN マウスを水投与群と GJG、HJG、RJG 投与群に分け、それぞれヒト 10 倍量で同様の検討を行った。

まず、単回投与においては、類方である HJG および RJG 投与群においても、50% 閾値の上昇を、有意ではないものの、低下させ (Fig. 8B)、1 週間連続投与により、両処方にも GJG と同様の 50% 閾値の上昇を低下させることを認めた (Fig. 8C)。

以上のことから、GJG のほかに、HJG および RJG もまた DPN の感覚低下を改善する可能性があることが明らかとなり、臨床において、治療の選択肢が広がったと考えられる。

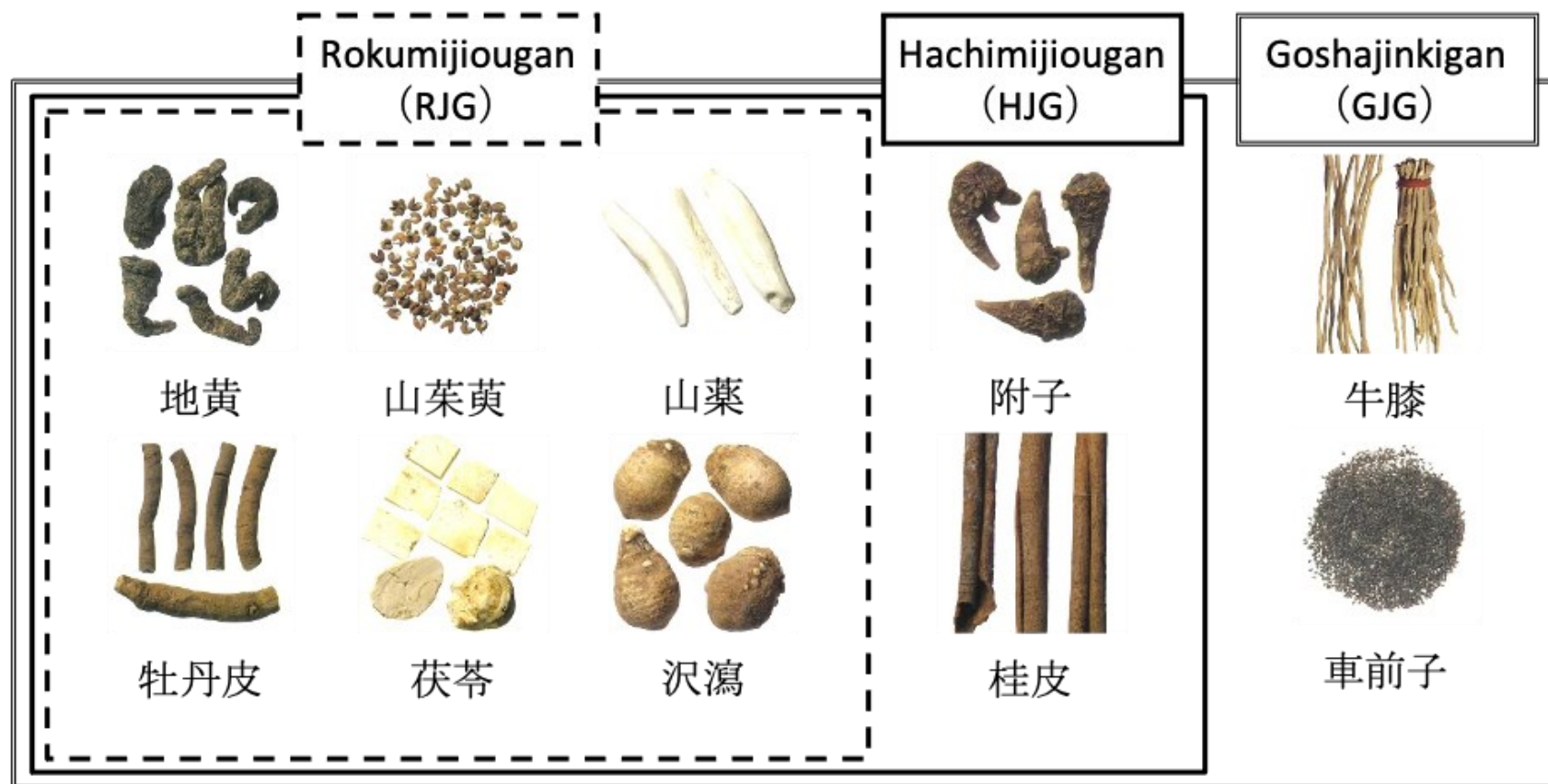


Fig. 7. Structure of Goshajinkigan (GJG), Hachimijiougan (HJG) and Rokumijiougan (RJG)

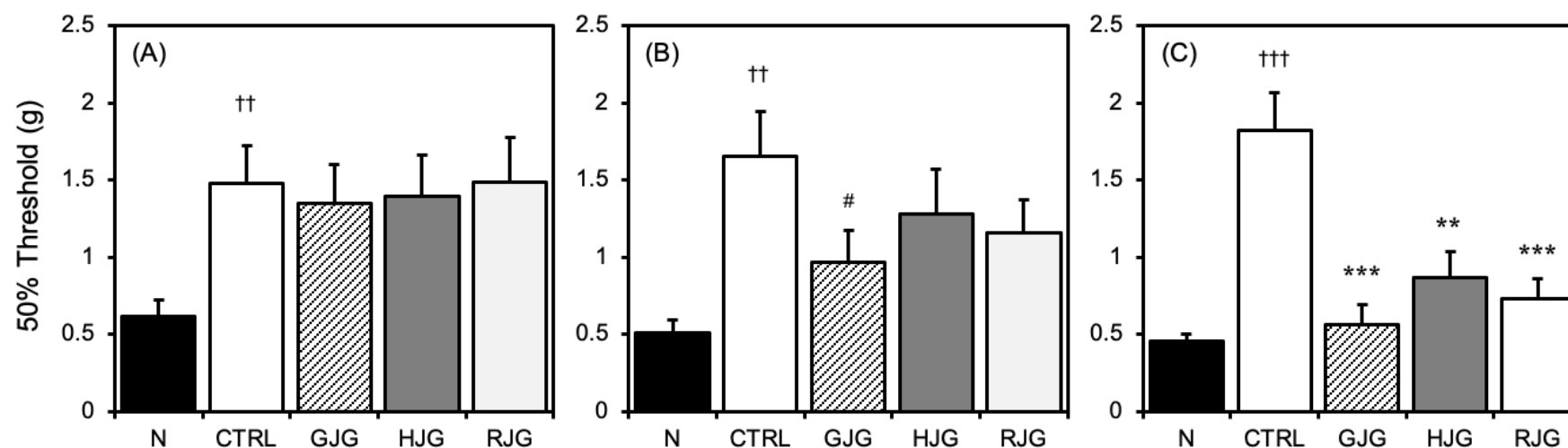


Fig. 8. Effects of Goshajinkigan (GJG), Hachimijiogan (HJG) and Rokumijiogan (RJG) on the mechanical hypoesthesia in streptozotocin-induced diabetic mice.

(A) before treatment of each Kampo extract, (B) single administration of each Kampo extract, (C) consecutive administration of each Kampo extract for 7 days. Nine weeks after the STZ treatment (150 mg/kg, *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypoesthesia, and the diabetic mice were divided into four groups and then subjected to the experiment. Kampo extracts were administered orally at a dose of 10 times that of the human daily dose as follows, 1.53 g/kg for GJG, 1.16 g/kg for HJG and 1.08 g/kg for RJG. Each column represents the Mean $\pm$ S.E.M. of 9 to 10 mice. $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$, $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs. the normal group by Mann-Whitney *U*-test. $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$ vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. $^{\#}p < 0.05$ vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for the selected two comparisons.

第二節 牛車腎気丸の糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における有効生薬の探索

前節では、GJG による感覚低下について、類方である HJG、RJG においても改善することが明らかとなった。構成生薬から考えると、共通する RJG の 6 種の生薬の中に有効生薬が存在することが予想された。また、DPN の感覚過敏に対する抑制作用を検討した先行研究からは、有効生薬のひとつとして附子が報告されている。

一方、糖尿病ラットにおける GJG の血小板凝集阻害作用からは、山薬と沢瀉が NO 産生を介した阻害作用を示すことが明らかにされており (13)、また最近ではオキサリプラチンによる末梢神経障害に対する GJG の改善作用において、車前子の aucubin と pedicularislactone が有効成分として同定されたとする報告もあり (18)、単純に RJG の構成生薬の中だけに、今回見出した DPN の感覚低下改善作用の有効生薬が存在するとは言えないと考えられた。

そこで本節では、この感覚低下を担う有効生薬を明らかにすべく、GJG をいくつかに分画して DPN の感覚低下に及ぼす影響を検討することにした。

第一に、類方間での構成生薬の違いから、牛膝・車前子画分と附子・桂皮画分という 2 つの画分を設定した。また、先行研究において山薬と沢瀉が NO を介した血小板凝集抑制を示したことから、六味の部分を山薬・沢瀉画分とその他の四味画分 (地黄・山茱萸・牡丹皮・茯苓) に分けて、それぞれエキスを作製し、これら 4 つの画分エキ스가 DPN の感覚低下に与える影響について検討した。

実験動物として雄性 ICR マウス (6 週齢) を用い、STZ 投与により糖尿病を惹起した。STZ 投与後 7 週目に、有意な感覚低下を確認した (Fig. 9A) 後、DPN マウスを水投与群とそれぞれ画分エキス投与群に分け、これまでと同様のスケジュールで実験を行った。

単回投与において、山薬・沢瀉エキス、附子・桂皮エキス投与群は、50% 閾値の上昇を低下させ (Fig. 9B)、DPN の感覚低下を有意に改善した。さらに、1 週間連続投与を行ったところ、それら両画分だけでなく、牛膝・車前子画分においても 50% 閾値の上昇を低下させた (Fig. 9C)。

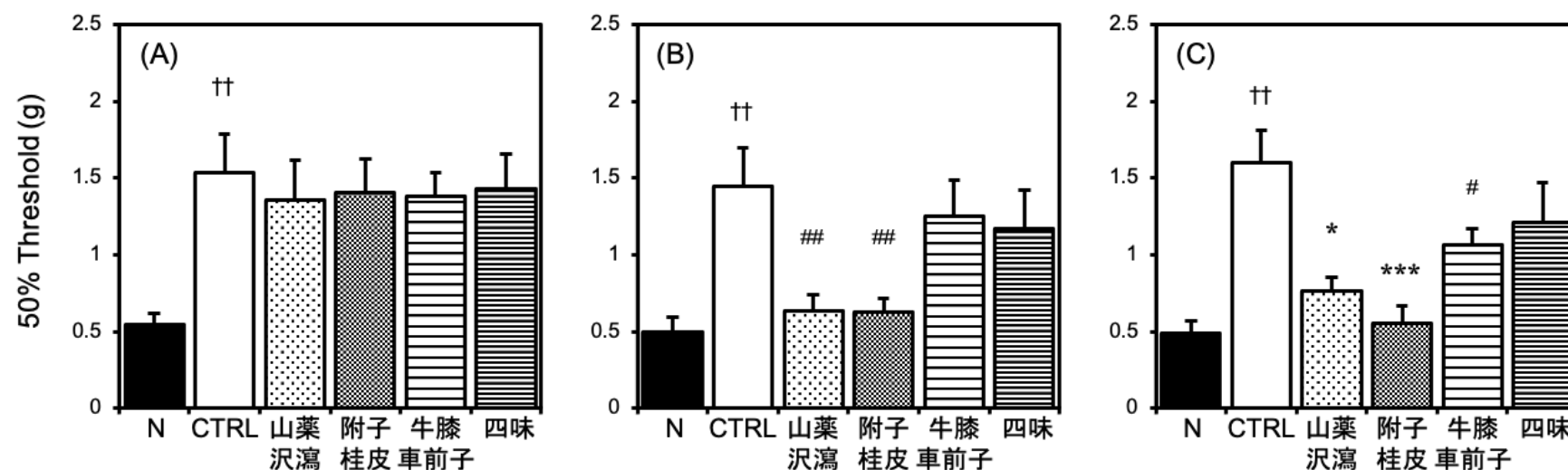


Fig. 9. Search for the effective fractions for Goshajinkigan (GJG) on the mechanical hypoesthesia in streptozotocin-induced diabetic mice.

(A) before treatment of each extract, (B) single administration of each extract, (C) consecutive administration of each extract for 7 days. Seven weeks after the STZ treatment (150 mg/kg, *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypoesthesia, and the diabetic mice were subjected to the experiment. The dose of each extract was as follows; 0.23 g/kg for 山薬-沢瀉, 0.03 g/kg for 附子-桂皮, 0.33 g/kg for 牛膝-車前子, 0.96 g/kg for 四味. Each column represents the Mean $\pm$ S.E.M. of 8 to 10 mice. †† p < 0.01 vs. the normal group by Mann-Whitney *U*-test. *** p < 0.001, * p < 0.05 vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. ## p < 0.01, # p < 0.05 vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for the selected two comparisons.

次に、単回投与で、他の画分に比べて顕著に効果が認められた山薬・沢瀉エキス、附子・桂皮エキスに着目し、それぞれ単味生薬エキスを作製し、同様の検討を行った。

実験動物として雄性 ICR マウス（6 週齢）を用い、STZ 投与により糖尿病を惹起した。STZ 投与後 7 週目に、感覚低下を確認した（Fig. 10A）後、DPN マウスを水投与群と山薬、沢瀉、附子、桂皮各エキス投与群に分け、単回、1 週間連続投与後、50% 閾値に及ぼす影響を検討した。

山薬、桂皮、附子エキス投与群においては、単回投与により、有意な 50% 閾値の上昇の低下を認め、沢瀉エキスにおいては若干の低下が観察されただけであった（Fig. 10B）。

さらに、1 週間連続投与を行ったところ、山薬と桂皮エキス投与群では非糖尿病マウスと同程度の 50% 閾値を示し、次いで附子エキス投与群、沢瀉エキス投与群で、それぞれ有意な 50% 閾値の低下作用を認めた（Fig. 10C）。

これらの結果から、その作用強度に違いはあるものの、GJG 構成生薬のうち、山薬、沢瀉、附子、桂皮の 4 生薬が感覚低下改善作用をもつことを明らかにした。

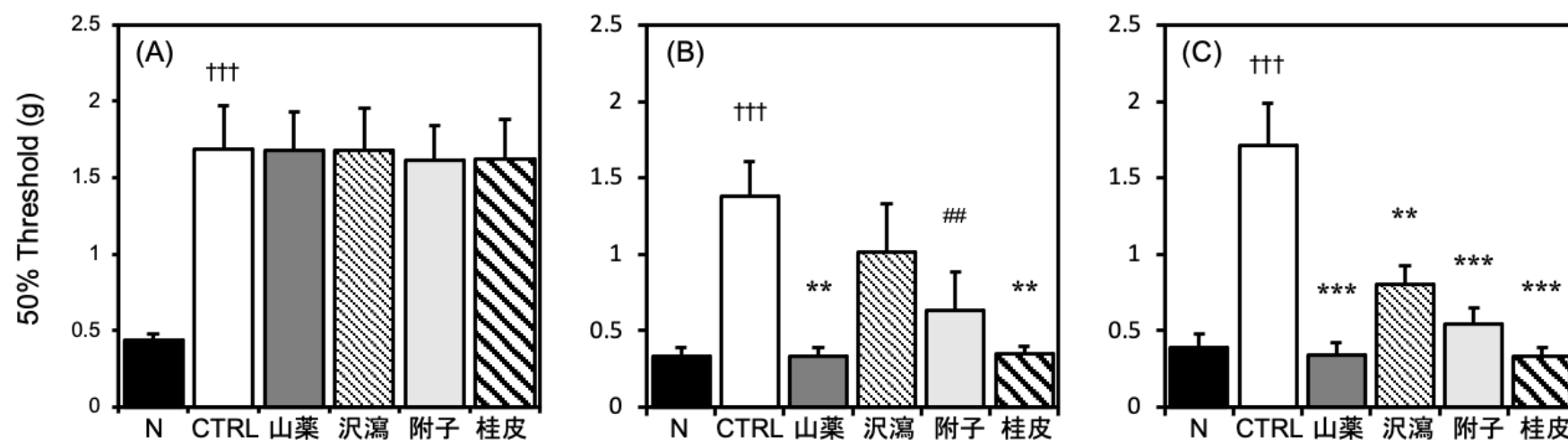


Fig. 10. Search for the effective crude drugs for Goshajinkigan on the mechanical hypoesthesia in streptozotocin-induced diabetic mice.

(A) before treatment of each extract, (B) single administration of each extract, (C) consecutive administration of each extract for 7 days. Seven weeks after the STZ treatment (150 mg/kg, *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypoesthesia, and the diabetic mice were subjected to the experiment. The dose of each extract was as follows; 0.13 g/kg for a hot water extract of 山藥, 0.09 g/kg for a hot water extract of 沢瀉, 0.03 g/kg for a hot water extract of 附子, and 0.02 g/kg for a hot water extract of 桂皮. Each column represents the Mean $\pm$ S.E.M. of 8 to 10 mice. ††† p < 0.001 vs. the normal group by Mann-Whitney *U*-test. *** p < 0.001, ** p < 0.01 vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. ## p < 0.01 vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for the selected two comparisons.

第三節 牛車腎気丸および有効画分、有効生薬に含まれる L-アルギニンおよび L-シトルリン含量

先節までに、GJG で認められた DPN の感覚低下改善作用は、投与後 1 時間に認められたものの、5 時間後には減弱していることから、一過性ではあるものの、作用の発現は比較的早いと考えられる。また、その作用には NO 産生が関わっていることも明らかになっているが、その NO 産生は 1 時間以内に生じなければならない。つまり、NO 合成酵素 (NOS) の誘導というメカニズムは考えにくく、基質の供給か、NOS の活性化かという 2 つの可能性が考えられた。

NO 産生に関わる合成酵素は、血管内皮細胞に存在する内皮型 NOS (eNOS) か、神経細胞に存在する神経型 NOS (nNOS) かのいずれかが考えられたが、まずはその検証よりも簡単な基質の供給の可能性について検討した。

NOS は、L-アルギニンを基質として NO を産生する。L-アルギニンは生体内の NOS によって代謝を受けて NO を放出し、自身は L-シトルリンに変換される。また、L-シトルリンは、生体内で尿素回路の基質として代謝を受け、L-アルギニンへと変換される。

そこで、GJG に L-アルギニンが含有されているかどうか、さらに L-シトルリンは含まれているのかについて、エキス中の両アミノ酸含量を、 σ -フタルアルデヒド (OPA) を用いたプレカラム誘導体化法による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて測定した。

GJG エキス一日量中には、それぞれ 31.63 mg と 2.87 mg の L-アルギニンと L-シトルリンが含有されていることが判明した (Table 2)。

また、構成生薬のうち、山薬、沢瀉、附子、桂皮の 4 生薬が GJG の感覚低下改善作用に関与することが明らかになったことから、これら単味生薬エキスおよび画分についても同様に分析を行った。

その結果、GJG 中の両アミノ酸は主に山薬・沢瀉エキスに存在することが明らかとなり、単味生薬エキスは山薬と沢瀉がその多くの L-アルギニンや L-シトルリンを含有することが明らかとなったものの、附子や桂皮の単味エキス、さらに牛膝・車前子エキスではこれを認めなかった (Table 3)。

Table 2. Determination of L-arginine and L-citrulline contents in Goshajinkigan (GJG) extracts

Sample	Yield (g)	Content (mg/human daily dose)	
		L-arginine	L-citrulline
GJG	9.18 ± 0.12	31.63 ± 0.31	2.87 ± 0.17

Table 3. Determination of L-arginine and L-citrulline contents in Goshajinkigan's fraction extracts and crude drug extracts

Sample	Yield (g)	Content (mg/human daily dose)	
		L-arginine	L-citrulline
山薬-沢瀉	1.38 ± 0.03	23.43 ± 1.44	3.36 ± 0.23
附子-桂皮	0.17 ± 0.06	1.16 ± 0.28	0.01 ± 0.00
牛膝-車前子	1.97 ± 0.02	0.49 ± 0.08	not tested
四味	5.76 ± 0.02	6.43 ± 0.53	not tested
山薬	0.80 ± 0.02	8.66 ± 0.45	3.38 ± 0.23
沢瀉	0.52 ± 0.01	17.45 ± 0.49	0.69 ± 0.02
附子	0.19 ± 0.02	2.84 ± 0.24	trace
桂皮	0.10 ± 0.01	0.02 ± 0.02	trace

第四節 糖尿病性末梢神経障害感覚低下に対する L-アルギニンおよび L-シトルリンの改善作用

前節において、GJG エキスは比較的多くの L-アルギニンと L-シトルリンを含有することが明らかになった。そこで、L-アルギニンおよび L-シトルリンの供給によっても、GJG と同様の感覚低下改善作用が認められるかを検討した。

実験動物として雄性 ICR マウス（6 週齢）を用い、STZ 投与により糖尿病を惹起した。STZ 投与後 8 週目に感覚低下を確認し（Fig. 11A）、GJG 相当量の L-アルギニンおよび L-シトルリン、その 10 倍量の L-アルギニンおよび L-シトルリン投与群を設定して 50% 閾値に及ぼす影響を検討した。

その結果、検討した GJG に含有される量の L-アルギニンおよび L-シトルリン投与群では、単回投与においては GJG ほどではないものの、1 週間の連続投与においては GJG と同程度の 50% 閾値の上昇に対する低下作用を示した。さらに、その 10 倍量の L-アルギニンおよび L-シトルリン投与においても、有意な 50% 閾値の上昇に対する低下作用を認め（Fig. 11B, C）、GJG の DPN 感覚低下改善作用は、L-アルギニンおよび L-シトルリンといった NOS の基質の供給が考えられた。

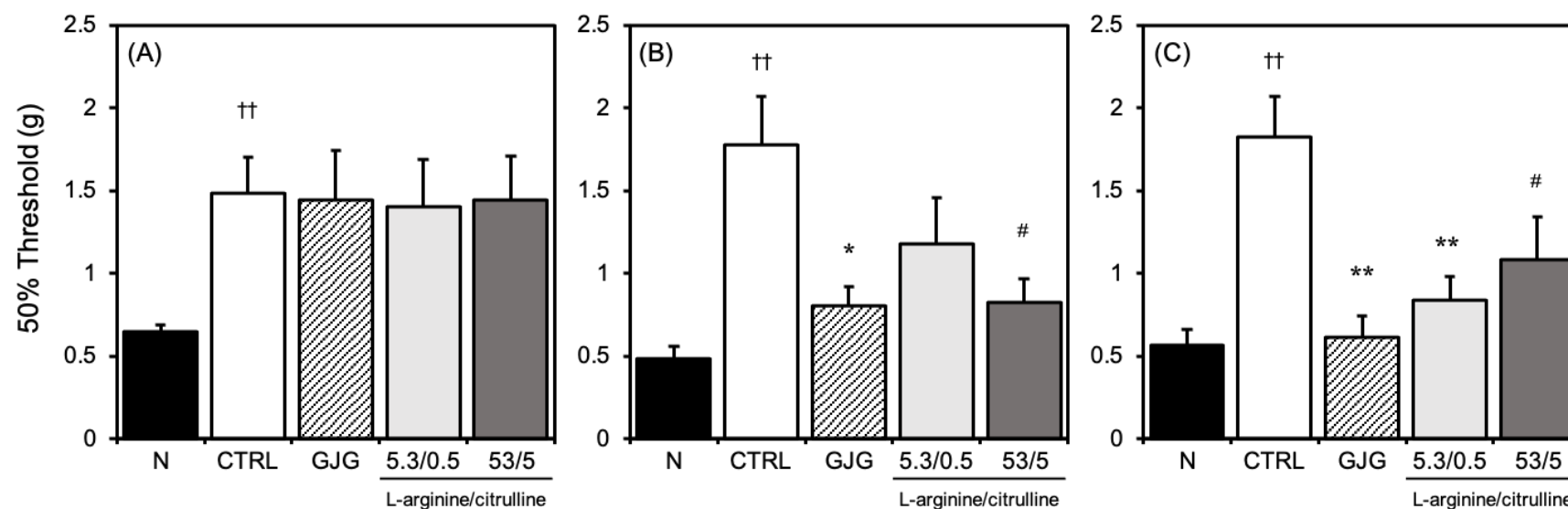


Fig. 11. Effects of L-arginine and L-citrulline on the mechanical hypoesthesia in streptozotocin-induced diabetic mice (A) before treatment, (B) single administration, (C) consecutive administration for 7 days. Eight weeks after the STZ treatment (150 mg/kg, *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypoesthesia, and the diabetic mice were subjected to the experiment. The dose of GJG was 1.53 g/kg, and the dose of L-arginine/L-citrulline as GJG equivalent dosage was 5.27 mg/kg for L-arginine and 0.48 mg/kg for L-citrulline. The dose of L-arginine/L-citrulline as 10 times GJG dosage was 52.7 mg/kg and 4.8 mg/kg, respectively. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 7 to 9 mice. †† p < 0.01 *vs.* the normal group by Mann-Whitney *U*-test. ** p < 0.01, * p < 0.05 *vs.* the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. # p < 0.05 *vs.* the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for the selected two comparisons.

第五節 牛車腎気丸投与後の血中一酸化窒素濃度上昇の検証

これまでに GJG による DPN の感覚低下改善作用は、NO 産生を介して発現することが示唆された。そこで、本節では、GJG の投与後、血液中で NO 産生の亢進を検出できるかどうか検討を行った。

NO は非常に不安定なラジカルであり、生体内では速やかに亜硝酸イオン (NO_2^-) や硝酸イオン (NO_3^-) などの窒素酸化物へと代謝される。NO の定量には、一般的に窒素酸化物のうち硝酸イオンを酵素的に還元し、得られた亜硝酸イオンを Griess 法にて比色定量する方法がとられている。

そこで、まず GJG と同様に感覚低下改善作用が認められた SNP 投与後の血中窒素酸化物濃度を測定し、作用発現と関連する血中 NO 濃度の上昇を確認できるかどうか検討した。

実験動物として雄性 ICR マウス (6 週齢) を用い、SNP (1 mg/kg) を皮下投与し、1.5 %イソフルラン麻酔下にて下大静脈から採血し、得られた血清を用いて血中窒素酸化物濃度の測定を行った。

SNP 投与 15 分後をピークに血中窒素酸化物濃度の有意な上昇を認めた (Fig. 12)。

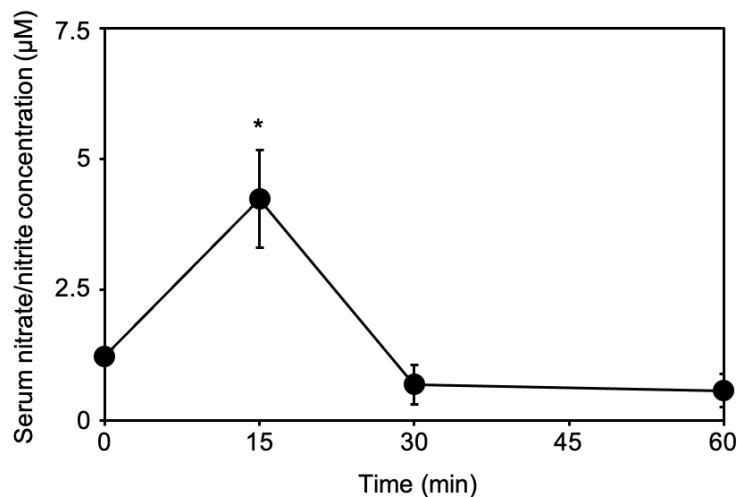


Fig. 12. Serum nitrate/nitrite concentration at 0 to 60 min after administration of sodium nitroprusside (SNP)

Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of 5 mice. * $p < 0.05$ vs. the initial group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.

次に、GJG の経口投与によっても血中窒素酸化物濃度の上昇が認められるかを検討した。

実験動物として、雄性 ICR マウス（6 週齢）を用い、GJG を経口投与して、1.5 % イソフルラン麻酔下にて、下大静脈から採血し、得られた血清を Griess 法にて測定した。

GJG 投与 30 分後をピークに血中窒素酸化物濃度の有意な上昇を認めた (Fig. 13)。

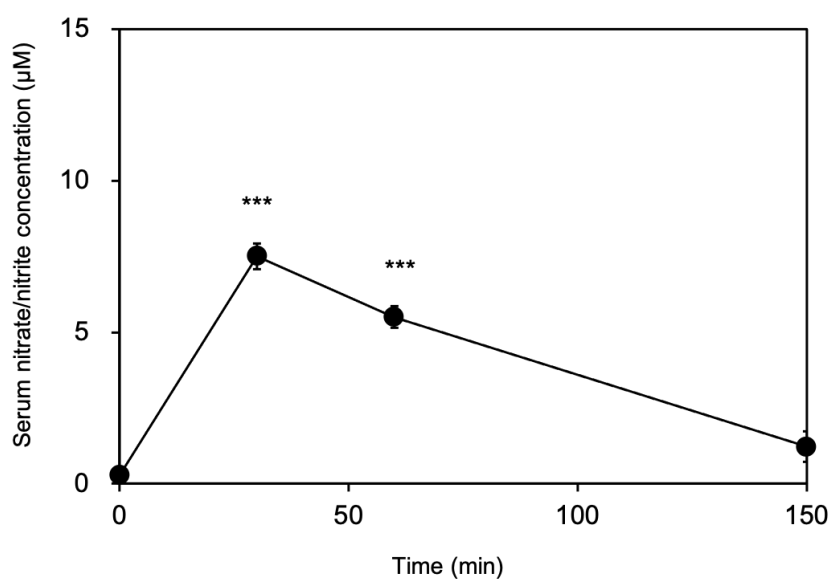


Fig. 13. Serum nitrate/nitrite concentration at 0 to 150 min after administration of Goshajinkigan (GJG)

Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of 3 mice. *** $p < 0.001$ vs. the initial group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.

さらに、DM マウスを用いて、SNP または GJG を投与後の血中窒素酸化物濃度についての検討を行った。その結果、SNP は 10 分後に、GJG は 30 分後に血中窒素酸化物濃度の上昇を認めた (data not shown)。

次に、GJG によって認められた血中窒素酸化物濃度の上昇が、同様に感覚低下改善作用を認めた GJG 類方である HJG と RJG によっても認められるかどうかの検証実験を行った。

GJG 投与群においては、有意な血中窒素酸化物濃度の上昇を認めたものの、他の類方投与群においては、わずかな上昇に留まったため (Fig. 14)、一連の結果を見直すこととなった。

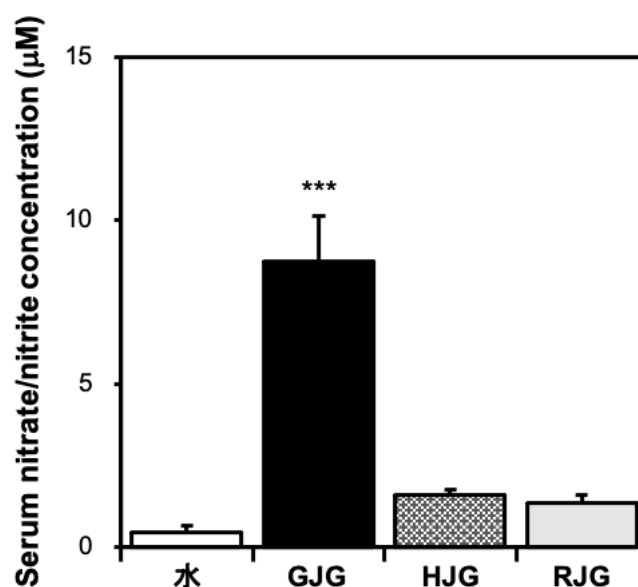


Fig. 14. Serum nitrate/nitrite concentration 30 min after administration of Goshajinkigan (GJG), Hachimijiogan (HJG) and Rokumijiogan (RJG). Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 5 mice. *** $p < 0.001$ vs. the initial group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.

対象とした 3 種の地黄剤の DPN 感覚低下改善作用と Griess 法による測定結果を比較し、何故 GJG でのみ血中窒素酸化物濃度の上昇が認められるのかについて、構成生薬から検証することとした。

GJG に特有の構成生薬は、牛膝と車前子である。生薬としての特徴を教科書的に比較したところ、牛膝は比較的大量のカリウムを含有することが判明した。そこで、そのカリウムの対イオンとして硝酸塩が存在するのではないかと考え、GJG および分画、単味生薬エキス中の硝酸塩濃度の測定を行った。測定対象として、GJG、四味、山薬-沢瀉、附子-桂皮、牛膝-車前子、牛膝、車前子の 7 サンプルを実験に供した。

予想通り GJG エキスには、高濃度の硝酸イオンが存在し、その構成生薬の中では牛膝-車前子画分にその大部分が、さらに牛膝エキスにも、GJG エキス中の硝酸イオンが存在することが確認された (Fig. 15)。

残念ながら、GJG 投与後に上昇すると考えられた血中窒素酸化物濃度は NO 由来のものではなく、GJG に含有される硝酸塩が吸収された結果であることが判明した。

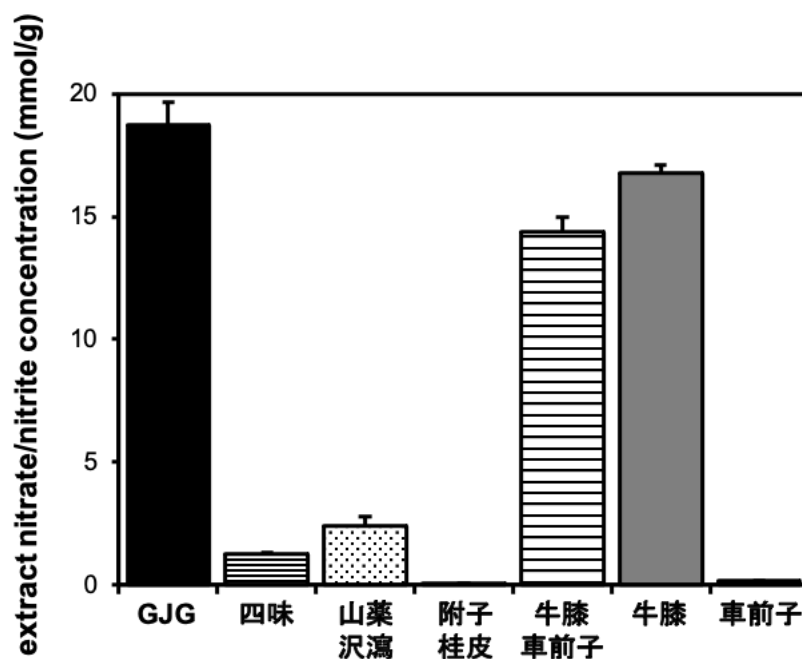


Fig. 15. Extract nitrate/nitrite concentration of Goshajinkigan (GJG), its fractions and crude drugs

Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 3 or 4 samples.

先の検討により、GJG 投与による血中 NO 濃度の上昇を Griess 法にて検証することは、困難であることが明らかとなった。そこで、GJG 投与による血中 NO 濃度の変化について、他の NO 代謝物である nitrotyrosine を対象として検出することができるかどうか検討した。

nitrotyrosine は、NO が生体内で superoxide と反応し、peroxynitrite へと変換され、これが生体内のタンパク質のチロシン残基と、反応することにより生成される化学修飾アミノ酸である。

実験動物として、雄性 ICR マウス（6 週齢）を用い、GJG を経口投与し、あるいは SNP を皮下投与して、60 分後に 1.5 %イソフルラン麻酔下にて下大静脈から採血し、得られた血清中の nitrotyrosine を ELISA 法にて測定した。

SNP 投与群では、有意な nitrotyrosine の上昇が確認され、血中に NO が増加した結果を示したと考えられた。一方で、GJG 投与群では、有意ではないものの、nitrotyrosine の減少が確認された (Fig. 16)。

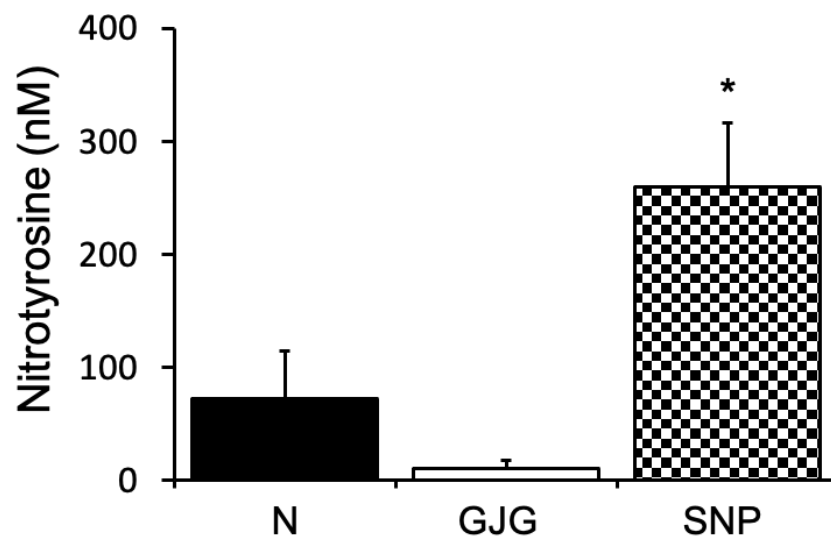


Fig. 16 Serum nitrotyrosine concentration 60 min after administration of Goshajinkigan (GJG) and SNP

Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 4 to 6 samples. * $p < 0.05$ vs. the N group by Student's t -test.

考察

本章では GJG による DPN の感覚低下改善作用について、その有効生薬ならびに有効成分の探索を目的に検討を行った。

先行研究において、オキサリプラチン誘発性疼痛モデルマウスで認められた疼痛反応に対して、GJG および、その類方である HJG、RJG は、いずれも抑制効果が認められている (19)。そこで、これらの地黄丸類が DPN の感覚低下に与える影響について検討を行ったところ、いずれの処方においても感覚低下改善作用を認めた。したがって、共通する六味地黄丸構成生薬に感覚低下に対する有効生薬が含まれることが示唆された。また、これら処方間の作用強度を考えると、残りの附子、桂皮、牛膝、車前子の 4 生薬にも感覚低下改善作用に寄与しうると考えられる。

これら、類方における構成生薬の違いから、いくつかのグループに分画し、DPN の感覚低下改善作用に与える影響を検討したところ、山薬・沢瀉画分、附子・桂皮画分では単回投与での強い作用を認め、牛膝・車前子画分では 1 週間連続投与によって効果を認めた。山薬・沢瀉は、これら 3 処方に共通し、附子・桂皮は、GJG と HJG に共通する生薬である。また、牛膝・車前子は GJG にのみ含まれる生薬であることから、GJG において感覚低下改善作用が最も強く認められたことと一致する。

これら分画による作用をもとに、山薬・沢瀉・附子・桂皮の 4 生薬における、DPN の感覚低下に与える影響を検討したところ、いずれの生薬においても感覚低下改善作用を認め、その強度は、桂皮>山薬>附子>沢瀉であった。

これまでに、GJG による感覚低下改善作用には NO 産生亢進を介した作用であることが示唆されている。先行研究において、GJG は NO を介した鎮痛作用を持つことが報告されており (20)、その構成生薬では、山薬、沢瀉において、NO 産生亢進作用による血小板凝集抑制作用が認められている (13)。これらの結果からも、GJG および有効生薬における感覚低下改善作用として、NO 産生亢進作用を介した作用が存在することがより強く考えられた。

また、第一章で述べたように、GJG による感覚低下改善作用は単回投与で認められ、投与後 1 時間でも認められた。短時間での作用発現であることを考えると、GJG による感覚低下改善作用として NOS の誘導ではなく、NOS への基質の供給もしくは NOS の活性化あるいは、その両方の機序を持つことが考えられた。

本章では、GJG による NO 産生亢進が NOS への基質供給を介した作用であるかを検討した。一般的に、NO は L-アルギニンを基質とし、NOS によって合成される。また、L-シトルリンは、生体内で尿素回路などにより代謝を受け、L-アルギニンへと変換されることで、再び基質として利用される。先行研究において、ウサギに L-アルギニンおよび L-シトルリンを静脈内投与したところ、血中窒素酸化物濃度と cGMP の上昇が投与後 1 時間をピークに認められ、耳介での末梢血流の上昇が認められている (21)。

L-シトルリンはL-アルギニンに比較し、バイオアベイラビリティも高く、NO 産生における基質として重要な役割を担っているといえる (22)。そこで、GJG および有効画分、有効生薬に含まれる、これらのアミノ酸を定量したところ、GJG は感覚低下改善作用を示す程度の基質を含有することが明らかとなった。先行研究において、細胞内 L-アルギニン濃度が飽和しているにもかかわらず、外部から新たに L-アルギニンを供給することで NO 産生が亢進するアルギニンパラドックスが知られている。また、L-アルギニンおよび L-シトルリンが与える影響として、*in vivo* では、ラットとウサギにおいて L-アルギニンと L-シトルリンの併用では、単独投与に比べ早期の血中アルギニン濃度、血中窒素酸化物濃度の上昇が認められており、L-シトルリンは L-アルギニンのバイオアベイラビリティの上昇させることが報告されている (21)。また、*in vitro* では、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を高グルコース下に曝すことで eNOS タンパクの発現や、NO 産生が抑制されたものの、L-アルギニンおよび L-シトルリン添加により、これらの回復が認められた (23) と報告されている。このことから、GJG 相当の基質供給が NO 産生を亢進し、脈管系へ影響を与えることで、感覚低下改善作用を認めたのではないかと示唆された。

一方で、GJG 構成生薬におけるこれらのアミノ酸の供給源の大半は、山薬、沢瀉であることが明らかとなった。しかしながら、有効生薬であるのにも関わらず、附子、桂皮については、これらのアミノ酸をほとんど含まないことが明らかとなった。すなわち、有効生薬に含まれるこれらの基質とその感覚低下改善作用に相関は認められなかった。そのため、GJG としての感覚低下改善作用は、基質の供給のみならず NOS の活性化をも介する作用を持つことが示唆された。HUVEC を用いた *in vitro* での検討において、桂皮成分である cinnamaldehyde が、Akt/eNOS、PI3K/IRS のリン酸化を介して NO 産生を亢進することが報告されている。また、cinnamaldehyde が NO のバイオアベイラビリティを上昇させることにより NO による血管拡張を亢進し、SHR-CP ラットの血圧を低下させることも明らかとなっている (24)。したがって、GJG による NO 産生亢進は、基質である L-アルギニンおよび L-シトルリンの供給に加え、NOS の活性化を介した作用もあることが予想された。

また、NO 産生亢進作用について、GJG およびその類方の経口投与後の血中窒素酸化物濃度から検討したところ、GJG では有意な上昇を認めたものの、他の類方においては、この上昇が認められなかった。そこで、エキス中の硝酸イオン濃度の測定を行ったところ、GJG には大量の硝酸イオンが含まれており、その大部分は牛膝由来のものであることが考えられた。このことから、GJG による血中窒素酸化物濃度の上昇は、NO 産生亢進によるものよりも、エキス由来の硝酸イオンの吸収による影響であることが示唆された。そのため、GJG による NO 産生亢進について、血中窒素酸化物から検討することはできなかった。次に NO 代謝物である血中 nitrotyrosine を測定した。その結果、GJG 投与後の血中 nitrotyrosine は、予想に反して、CTRL よりも減少が認められ

た。nitrotyrosine は、その生成過程において superoxide と NO が反応し、peroxynitrite が生成され、これが生体内の tyrosine と反応することで生成される。先行研究において、ラットにおける GJG 経口投与後に catalpol や loganin などの抗酸化作用をもつイリドイド化合物が 1 時間以内にピークを迎えている (25) ことから、これらの化合物が吸収されることによって、生体内の superoxide が除去され、nitrotyrosine の生成が抑制されたためであると考えられた。

このように、GJG による NO 産生の変化を定量的に捉えることができておらず、*in vivo* でこれを捉えることは非常に困難であると考え、今後 *in vitro* での検討を行うことで GJG の NO 産生亢進作用についての詳細な解析を行うことを計画している。

第三章 糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における TRPV1 および A1 チャネルの関与

前章において、GJG 相当量の L-アルギニンおよび L-シトルリンの投与によって DPN の感覚低下改善作用を認めた。しかしながら、単味生薬における感覚低下改善作用は、この基質含量とその作用には相関がないことから、NO 産生亢進の一端として、NOS の活性化作用を有すると考えられた。そこで本節は、感覚低下改善作用を誘導する作用点について検討を行った。

一方で、transient receptor potential (TRP) チャネルは非選択的陽イオンチャネルとして知られ、Ca²⁺が細胞内へ流入するひとつの経路として考えられる。また、GJG 構成生薬である桂皮に含まれる cinnamaldehyde は、TRPA1 チャネルのアゴニストとして知られており、ラットにおいては投与量依存的な皮膚血流の増加が認められている (26)。また、cinnamaldehyde は *in vitro* における検討においても eNOS の活性化を介して、NO 産生を亢進する作用が認められている (27)。本研究においても、桂皮は有効生薬として同定しており、血流改善作用が報告されている附子についても類似の作用機序が想定される。

そこで、GJG の作用点として TRP チャネルが関わる可能性を検証することとした。

第一節 牛車腎気丸の TRPA1 および V1 チャネルを介した感覚低下改善作用

はじめに、脊髄後根節において、DPN の陽性症状では発現上昇が認められ、陰性症状では発現減少が認められている TRPV1 (28, 29) と GJG の感覚低下改善作用についての検討を行った。

実験動物として雄性 ICR マウスを用い、STZ 投与により糖尿病を惹起した。STZ 投与後 8 週目に感覚低下を確認した (Fig. 17A) 後、DPN マウスを 4 つのグループに分け、GJG 投与の前に TRPV1 アンタゴニスト処置して、その影響を検討した。von Frey 試験当日、TRPV1 アンタゴニストとして capsazepine (CPZ) を GJG の経口投与 30 分前に 5 mg/kg を腹腔内投与した。

GJG の単回投与で認められた 50% 閾値の上昇を低下させる作用は、CPZ の前処置によって消失した (Fig. 17B)。また、1 週間連続投与による GJG の作用も同様に、CPZ の前処置により、完全な消失がみとめられた (Fig. 17C)。

この結果から、GJG による感覚低下改善作用の作用点として、TRPV1 が関与していることが示唆された。

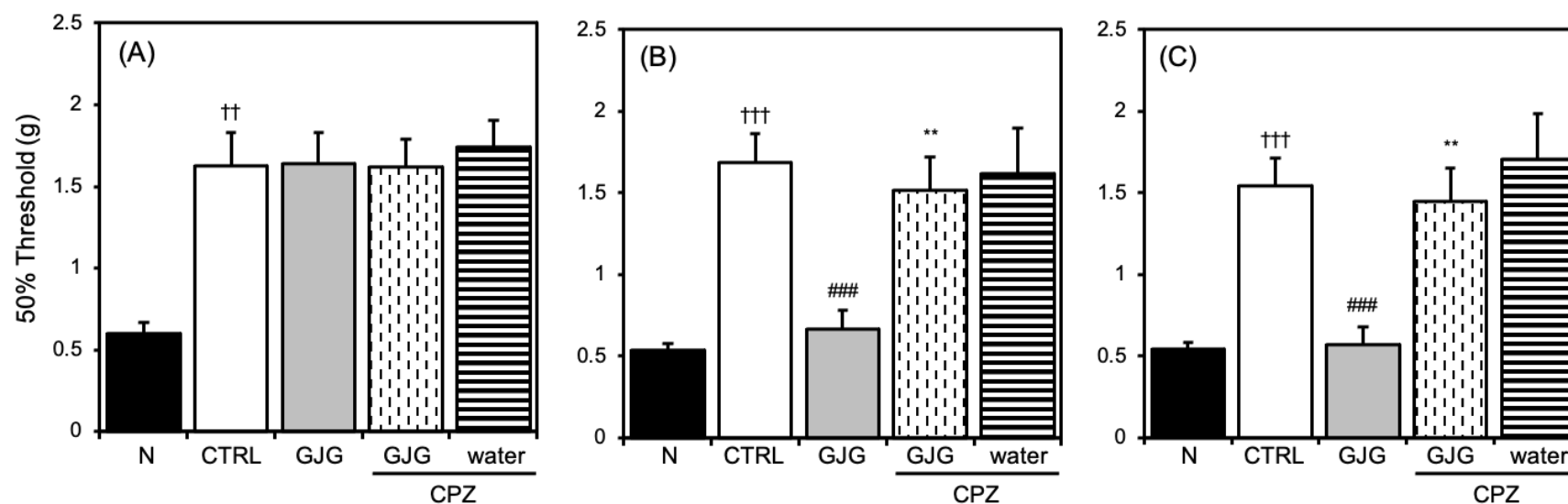


Fig. 17. Effect of pre-treatment of capsazepine (CPZ) on the ameliorating effect of Goshajinkigan (GJG) (A) before treatment, (B) single administration, (C) consecutive administration for 7 days. Eight weeks after the STZ treatment (150 mg/kg, *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypoesthesia, and the diabetic mice were subjected to the experiment. The intraperitoneal injection of CPZ (5 mg/kg) was carried out 30 min prior to oral administration of GJG (1.53 g/kg). Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 13 to 20 mice. ††† p < 0.001, †† p < 0.01 vs. the normal group by the Mann–Whitney U -test. ### p < 0.001, ## p < 0.01, # p < 0.05 vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. ** p < 0.01 vs. the GJG group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.

さらに、TRPA1 と GJG の感覚低下改善作用についても同様に、感覚低下を確認し (Fig. 18A)、検討を行った。TRPA1 アンタゴニストとして、A-967079 を von Frey 試験当日の GJG 経口投与 30 分前に 6.22 mg/kg を腹腔内投与した。

単回投与において GJG で認められた 50% 閾値の上昇を低下させる作用は、A-967079 の前処置によって消失した (Fig. 18B)。しかしながら、1 週間連続投与では、その作用の消失は部分的であった (Fig. 18C)。

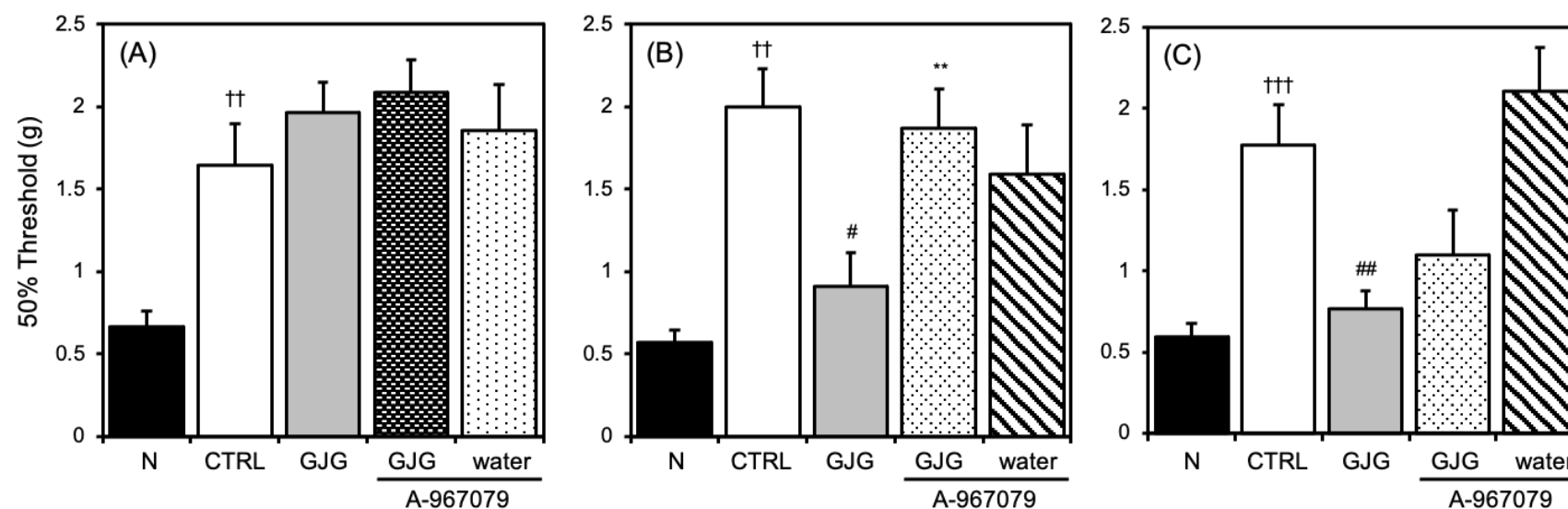


Fig. 18. Effect of pre-treatment of A-967079 on the ameliorating effect of Goshajinkigan (GJG)

(A) before treatment, (B) single administration, (C) consecutive administration for 7 days. Eight weeks after the STZ treatment (150 mg/kg, *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypoesthesia, and the diabetic mice were subjected to the experiment. The intraperitoneal injection of A-967079 (6.22 mg/kg) was carried out 30 min prior to oral administration of GJG (1.53 g/kg). Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 to 10 mice. $^{\dagger\dagger}p < 0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$ vs. the normal group by the Mann-Whitney *U*-test. $^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#}p < 0.05$ vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. $^{**}p < 0.01$ vs. the GJG group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.

第二節 桂皮、附子の TRPV1 および A1 チャネルを介した感覚低下改善作用

前節において、GJG による DPN の感覚低下改善作用の作用点のひとつに TRP チャネルの関与が示唆された。前章において、桂皮および附子は、NO の基質である L-アルギニンおよび L-シトルリンをほとんど含まないのにもかかわらず、感覚低下改善作用を認めた。そこで、桂皮および附子について、その作用と TRP チャネルの関与について検討を行った。

はじめに、先行研究より、cinnamaldehyde の TRPA1 を介した作用 (24, 30) が報告されていることから、桂皮の作用における TRP チャネルへの関与について検討した。

実験動物として雄性 ICR (6 週齢) マウスを用い、STZ 投与により糖尿病を惹起した。STZ 投与後 8 週目に感覚低下を確認した (Fig. 19A) 後、先と同様にして、各種アンタゴニスト処置や被験単味エキスの経口投与を行い、投与 1 時間後に von Frey 試験を実施して 50% 閾値に及ぼす影響を検討した。桂皮エキスの投与量は、感覚低下改善作用を認めた 0.02 mg/kg で経口投与した。

桂皮エキスの単回投与により認められた 50% 閾値の上昇を低下させる作用は、A-967079 および CPZ の前処置により消失した (Fig. 19B)。しかしながら、桂皮エキスの 1 週間連続投与で認められた作用は、CPZ によって消失したものの、A-967079 の前処置によっては消失が認められなかった (Fig. 19C)。

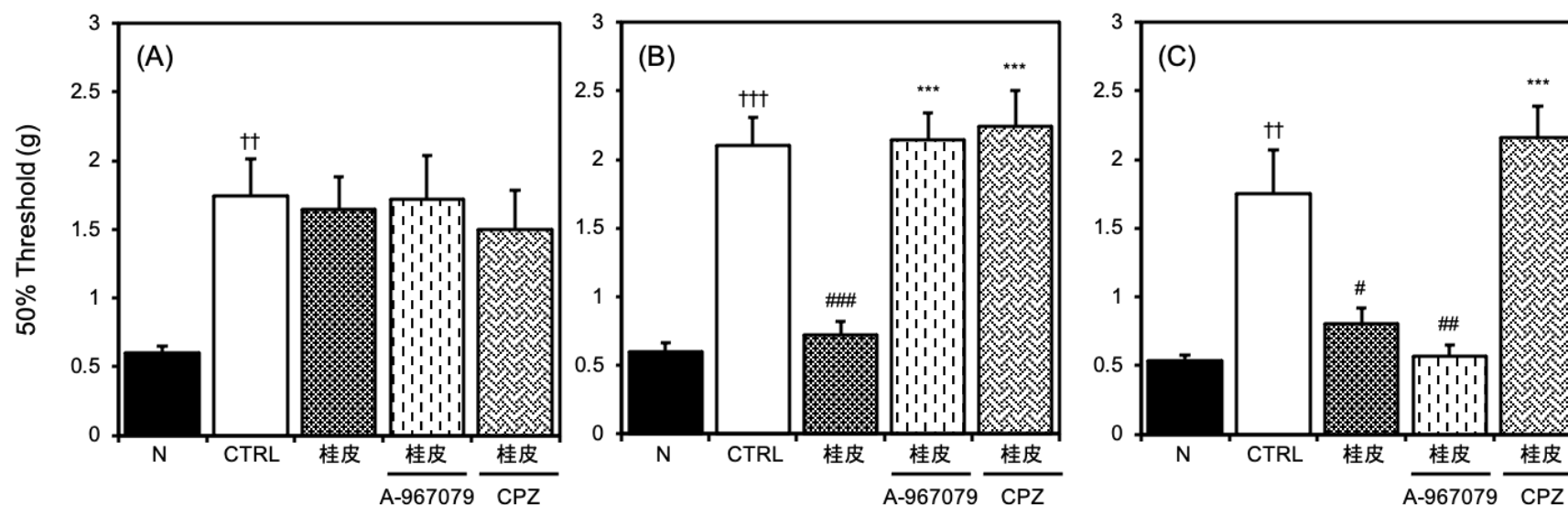


Fig. 19. Effect of pre-treatment of A-967079 or capsazepine (CPZ) on the ameliorating effect of Cinnamomi Cortex (桂皮) (A) before treatment, (B) single administration, (C) consecutive administration for 7 days. Eight weeks after the STZ treatment (150 mg/kg, *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypoesthesia, and the diabetic mice were subjected to the experiment. The intraperitoneal injection of CPZ (5 mg/kg) was carried out 30 min prior to oral administration of 桂皮 (0.02 g/kg). Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 7 to 9 mice. $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$, $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs. the normal group by the Mann-Whitney *U*-test. $^{###}p < 0.001$, $^{##}p < 0.01$, $^{\#}p < 0.05$ vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. $^{***}p < 0.001$ vs. the 桂皮 group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.

次に、附子の作用における TRP チャンネルへの関与についても同様に、感覚低下を確認し (Fig. 20A)、検討を行った。附子エキスの投与量は、感覚低下改善作用を認めた 0.03 mg/kg で経口投与した。

附子エキスの単回投与により認められた 50% 閾値の上昇を低下させる作用は、CPZ の前処置によって消失したものの、A-967069 の前処置によってその作用の消失を認めなかった (Fig. 20B)。この各種アンタゴニストによる影響は、附子エキスの 1 週間連続投与においても同様に認められた (Fig. 20C)。

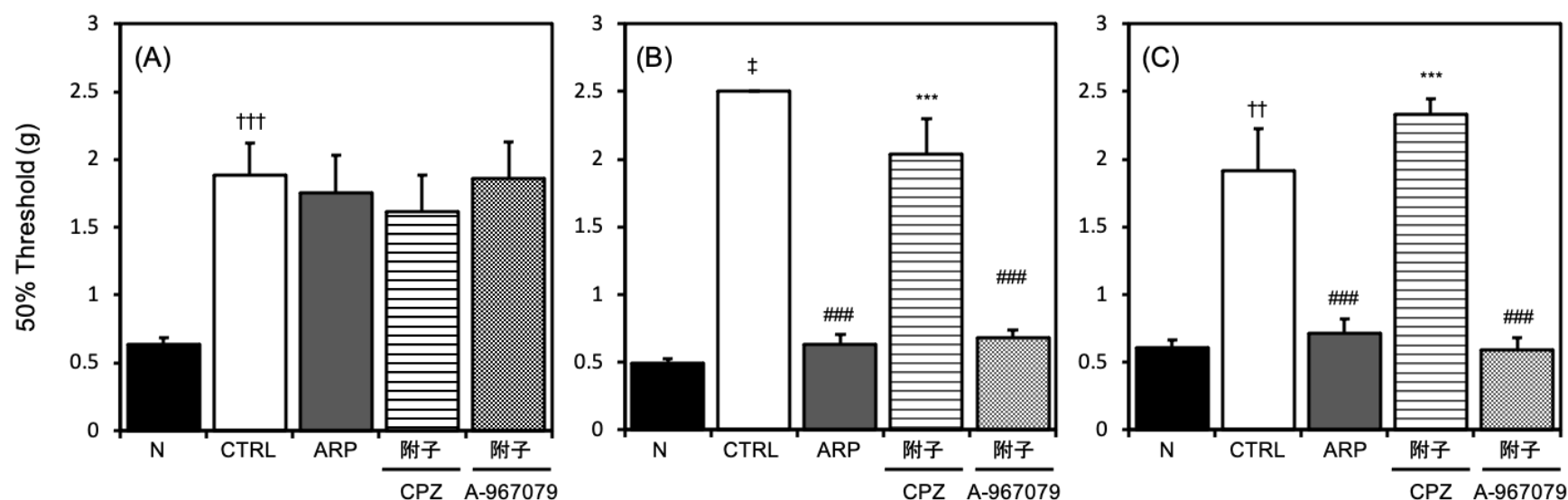


Fig. 20. Effect of pre-treatment of A-967079 or capsazepine (CPZ) on the ameliorating effect of Aconiti Radix Processa (附子) (A) before treatment, (B) single administration, (C) consecutive administration for 7 days. Seven weeks after the STZ treatment (150 mg/kg, *i.v.*), it was confirmed that the mice exhibited hypoesthesia, and the diabetic mice were subjected to the experiment. The intraperitoneal injection of CPZ (5 mg/kg) or A-967079 (6.22 mg/mL) was carried out 30 min prior to oral administration of 附子 (0.03 g/kg). Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 5 to 10 mice. $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$, $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ vs. the normal group by the Mann-Whitney *U*-test. $^{\dagger}p < 0.01$ vs. the normal group by Wilcoxon signed-rank test. $###p < 0.001$ vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. $***p < 0.001$ vs. the 附子 group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.

考察

GJG による感覚低下改善作用について、基質の供給によって誘導されることを明らかにしたものの、有効生薬の検証結果からは基質の供給のみでは感覚低下改善作用を説明することはできない。そこで、NO 産生亢進作用として、eNOS の活性化を介した作用があるのではないかと考えた。

eNOS は、血管内皮細胞に発現する NOS であり、nNOS と同様に構成的に発現しており、誘導型 NOS (iNOS) のように誘導されることはない。一方で、eNOS の活性型として Ser1177 のリン酸化が知られており、刺激や薬剤によって活性化することが知られている。このリン酸化は、カルモジュリン (CaM) によって支配されることが明らかになっている (34)。CaM は、細胞内カルシウム濃度の上昇により、活性化される。ここで細胞内カルシウム濃度の上昇は、小胞体およびミトコンドリアからの放出と細胞外からの流入のふたつが考えられる。前者においては、Gq タンパク共役型受容体の関与がある。Gq タンパク共役型受容体へ、リガンドが作用することにより、phosphatidylinositol diphosphate (PIP₂) が加水分解され、inositol triphosphate (IP₃) が生成される。生成された IP₃ は小胞体および、ミトコンドリアからのカルシウム遊離を促し、CaM を活性化させる。後者については、細胞外からの流入に関わるチャネルや輸送体が作用することで、細胞内カルシウム濃度が上昇し、CaM を活性化させる。

一方先行研究において、DPN の経過と TRPV1 チャネルの発現についての報告がいくつかある。この TRPV1 は糖尿病マウスの脊髄後根節において、DPN 早期の陽性症状で発現上昇が認められ、後期の陰性症状ではその発現の減少が認められている (28, 29)。また、この TRP チャネルは、TRPC、TRPV、TRPA、TRPM、TRPP、TRPML の 6 つのサブファミリーに分類され、非選択的な陽イオンチャネルとしても知られる。このうち、TRPA1 は、GJG 構成生薬である桂皮に含まれる cinnamaldehyde により活性化することが、知られている。先行研究において、cinnamaldehyde は、脈管系への作用として、ラットにおいて投与量依存的な皮膚血流の増加が認められている (26)。また、cinnamaldehyde は *in vitro* における検討においても eNOS の活性化による NO 産生亢進作用が認められている (27)。

これらのことから、TRP チャネルが DPN の感覚低下改善作用における作用点のひとつであると考え、GJG による感覚低下改善作用における TRPV1 および A1 の関与について検討を行った。

はじめに、GJG による感覚低下改善作用について、CPZ と A-967079 を前投与したところ、単回投与においては CPZ と A-967079 とともに感覚低下改善作用の消失を認めた。さらに、1 週間連続投与においては CPZ による感覚低下改善作用の消失を認めたものの、A-967079 では、その作用の消失は部分的なものに留まった。ここで、TRPA1 アゴニストでもあり、有効生薬の桂皮成分である cinnamaldehyde の作用様式に着目し

た。cinnamaldehyde は、TRPA1 に対して共有結合し、活性化することが知られている (30)。したがって、GJG で認められた A-967079 による作用の消失が減弱したのは、cinnamaldehyde が TRPA1 に共有結合し、持続的な活性化が誘導されることに起因することが考えられた。

また、桂皮および附子においても CPZ および A-967079 による感覚低下改善作用に与える影響を検討した。

桂皮では、単回投与において CPZ と A-967079 とともに感覚低下改善作用の消失を認めた。1 週間連続投与において CPZ による感覚低下改善作用の消失を認めたものの、A-967079 による作用の消失が認められなかった。これは GJG で認められた変化と同様のものであることから、TRPA1 を介した作用を cinnamaldehyde が担っていることが考えられた。

一方、附子では、単回投与において CPZ による感覚低下改善作用の消失を認めたものの、A-967079 による作用の消失が認められなかった。この変化は、1 週間連続投与においても同様に認められた。

CPZ を処置した群では、GJG および桂皮、附子のいずれにおいても、単回、連続投与とともに感覚低下改善作用の消失を認めたことから、GJG および桂皮、附子には、TRPV1 に対するアゴニストが含まれることが示唆された。しかしながら、GJG および桂皮、附子に関する TRPV1 アゴニストに関する先行研究は未だないことから、TRPV1 アゴニスト作用を担う未知の化合物が含まれることが示唆された。

また、GJG において、A-967079 による作用の消失が部分的にとどまったことから、GJG としての作用には、cinnamaldehyde による作用様式と異なる成分が感覚低下改善作用において関与することが示唆された。

先行研究において、糖尿病ラットの後根神経節へ TRPV1 アゴニストであるカプサイシンの処置によって活性酸素種が誘導され、アンタゴニスト前処理によって、抑制されたことから、TRPV1 の活性化が DPN 初期の後根神経節での傷害に寄与していることが報告されている (31)。また、TRPA1 アゴニストである Chembridge-5861528 は、STZ 誘発 DPN 疼痛モデルにおける機械的アロディニアに対して鎮痛効果を示したこと (32) が報告されている。このように、神経系での TRP チャネルが、DPN の発症や陽性症状の治療における作用点としても考えられている。GJG および桂皮、附子エキスによる DPN の感覚低下改善作用として、TRPV1 あるいは、TRPA1 をターゲットとしたメカニズムが存在することが示唆された。しかしながら、これらの TRP チャネルへの作用が、eNOS の活性化に寄与するかを明らかにすることはできず、nNOS への作用である可能性も考えられた。

これらの先行研究から、DPN 治療におけるターゲットとして、TRP チャネルの有意性は高いと考えられた。GJG による eNOS 活性化における作用点として、TRPV1 お

よび TRPA1 が機能しているかどうかも含めた検討を行うため、HUVEC を用い eNOS の活性化についての検討を別途行っている。

第四章 健常マウスおよび糖尿病マウスの末梢血管径に与える影響

これまでに、GJGにより認められた感覚低下改善作用は、NO 産生亢進作用を介した作用であることを明らかにしてきた。先行研究にて、糖尿病ラットにおいて GJG の 4 週間連続投与によって腓腹筋血流低下の改善作用を認めたこと (33) から、GJG は糖尿病マウスにおいても NO 産生を介した血管拡張作用をもつことが想像された。また DPN の発症において、高血糖状態による炎症や代謝異常によって、脈管系での内皮機能障害が生じ、神経栄養血管での拡張低下や血流量の低下による虚血・再灌流障害が生じ、更なる炎症や酸化ストレスが誘発され、DPN の進行に寄与するといわれている。そこで、GJG による NO 産生亢進作用を介して、血管拡張作用が認められるかを検証した。

本章では、健常マウスと糖尿病マウスに GJG を投与し、毛細血管血流マイクロスコプを用いて末梢血管径の変化を直接測定し、GJG の血管拡張効果を評価した。

第一節 一酸化窒素による血管拡張作用の評価

これまで、末梢神経障害の感覚変化を評価する von Frey 試験ではマウスの左足蹠を用いていたが、足蹠には毛細血管と大血管が混在しており、検出に悪影響を与えてしまうことや、体毛が画角内に映り込むことによって、検出時に影響を与えてしまう。そこで、これらの影響を受けない測定部位として、マウス左耳介の血管を測定対象とした。また、観察を進めると耳介における血管は遠心性の血管と求心性の血管の 2 種類存在することが明らかとなった。その方向と位置から、それぞれの血管を細動脈と細静脈であると位置付けた。また、耳介での一般的な血管径である、50 μm 以下の細動脈 (⇨) と、50 μm 以上かつ 105 μm 以下の細静脈 (➡) を測定対象とした (Fig. 12)。

はじめに、NO ドナーである SNP (1.0 mg/kg, *s.c.*) が、血管径に与える影響を検討した。

実験動物として ICR 雄性 (7 週齢) のマウスを使用した。1.5 %イソフルラン麻酔下で、投与前のマウス左耳介血管を撮影し、得られた血管径を 0 分での血管径とした。その後、PBS または SNP を皮下投与し、投与 15 分後と 60 分後の同一部位における血管の撮影を行い、それぞれの時間における血管径の測定を行った。

SNP 投与後の末梢血管径の代表例を Fig. 21 に示す。

さらに、測定後の血管径の推移と血管径の変化を投与群間で比較検討した結果を Fig.

22 に示す。

個体における細静脈径の経時的変化については、PBS 投与群においても観察された (Fig. 22A) が、SNP 投与群においてはさらに顕著な血管径の増加として認められ (Fig. 22B)、その血管径の変化は投与後 15 分をピークとした (Fig. 22E)。また、細動脈での変化は細静脈ほどではなく (Fig. 22C, D)、SNP 投与による影響についてはばらつきも大きく、拡張傾向を示すにとどまった (Fig. 22G)。

これらの血管系の変化は、第二章第五節で示した SNP 投与後の血中窒素酸化物濃度の上昇とほぼ一致した経過を辿っており、血流観察スコープを用いた NO による血管径の変化を測定することが可能であることを示している。

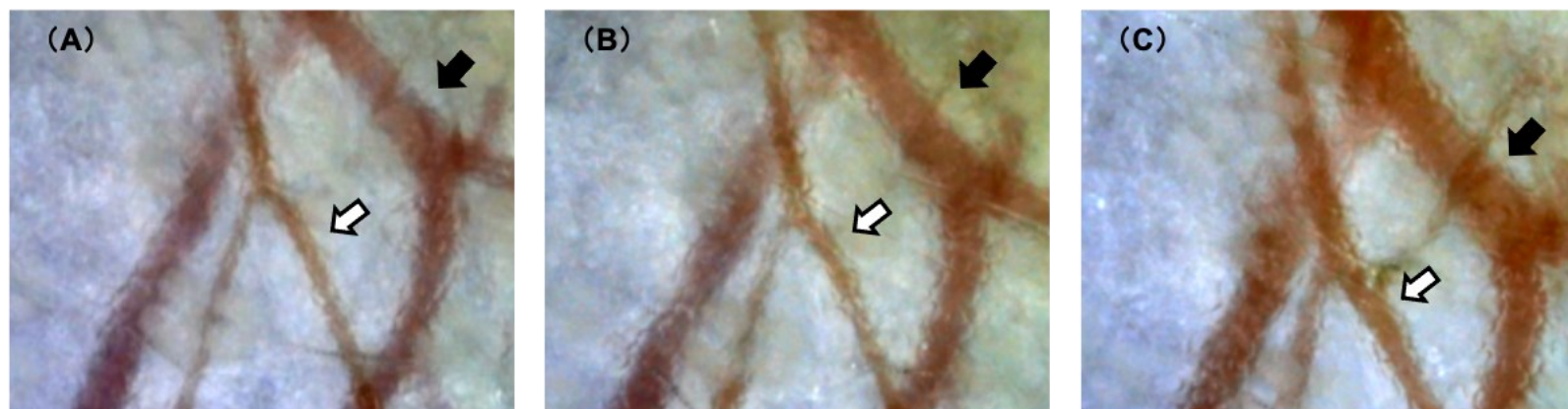


Fig. 21 Image after administration of sodium nitroprusside (SNP) on venule and arteriole in auricle
(A) before administration of SNP, (B) 15 minutes after administration of SNP, (C) 60 minutes after administration of SNP. The vessel located in the center of each image (⇨) is an arteriole and the right side of each image (➡) is a venule. All images are the same site.

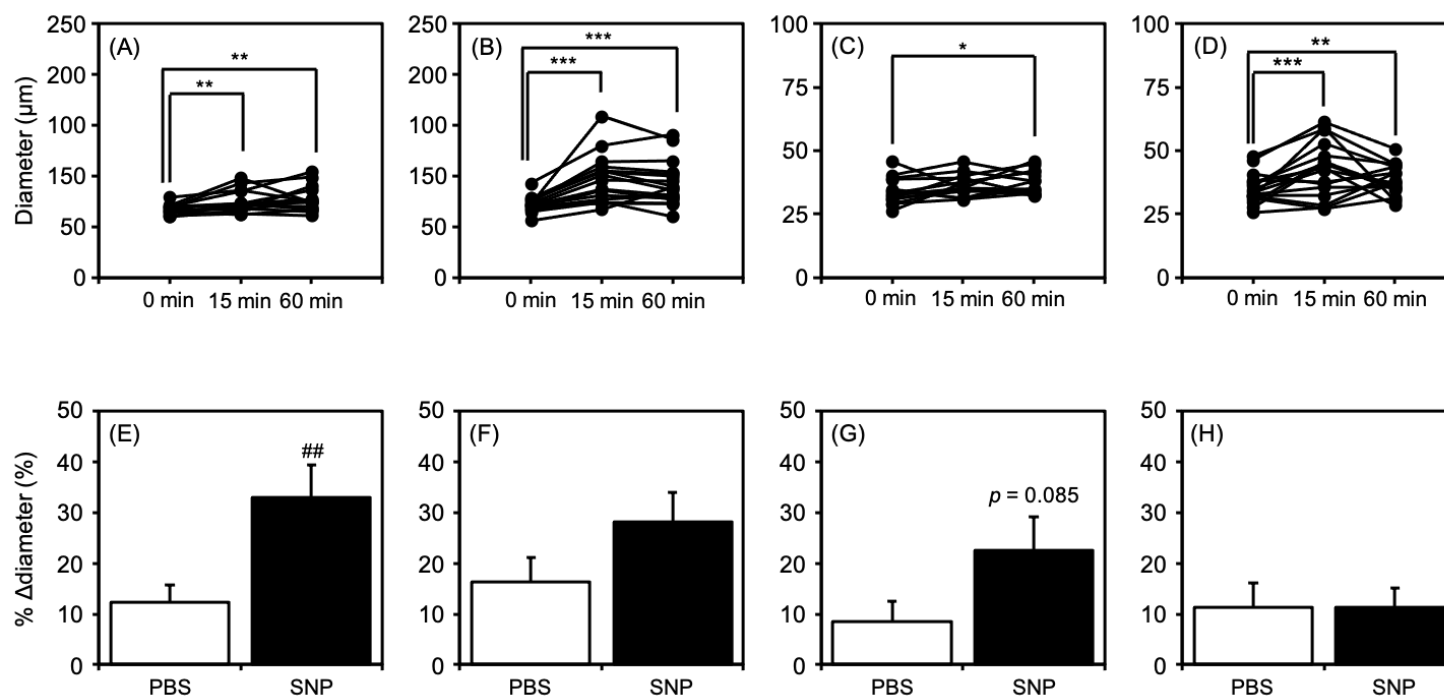


Fig. 22. Effect of sodium nitroprusside (SNP) on venule and arteriole diameters in auricle

(A) venule diameter in phosphate buffer (PBS)-treated mice, (B) venule diameter in SNP-treated mice, (C) arteriole diameter in PBS-treated mice, (D) arteriole diameter in SNP-treated mice, (E) changes of diameters in venule at 15 min, (F) changes of diameters in venule at 60 min, (G) change of diameters in arteriole at 15 min, (H) changes of diameters in arteriole at 60 min. (A) - (D), each point represents the diameter of an individual mouse. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. the baseline by paired t -test. (E) - (H), each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 14 to 17 mice. ## $p < 0.01$ vs. the PBS-treated group by Welch's t -test.

第二節 健常マウスにおける牛車腎気丸の血管拡張作用

先節において、血流観察スコープによる皮膚細動脈および細静脈血管径の測定が可能であることが明らかとなったので、次に GJG が末梢血管に与える影響について健常マウスを用いて検討を行った。

実験動物として ICR 雄性（7 週齢）のマウスを使用した。1.5 %イソフルラン麻酔下で、投与前のマウス左耳介血管を撮影し、得られた血管径を 0 分での血管径とした。その後、水または GJG を経口投与し、投与 15 分後と 60 分後の同一部位における血管の撮影を行い、それぞれの時間における血管径の測定を行った。また、同様にして血管径の推移と変化を投与群間で比較検討した。

各個体における血管径の経時的変化において、細静脈径は GJG 投与によって、15 分後から増加が認められ 60 分まで持続した (Fig. 23B)。水投与によっても血管径の増加が認められたものの (Fig. 23A)、血管径の変化を比較したところ、GJG 投与 15 分後において有意な血管拡張が認められた (Fig. 23E)。さらに、細動脈においても、GJG 投与後 15 分と 60 分後で、血管拡張作用を認め、有意ではなかったが、対照群に比較して血管径の増加傾向を示した (Fig. 23H)。

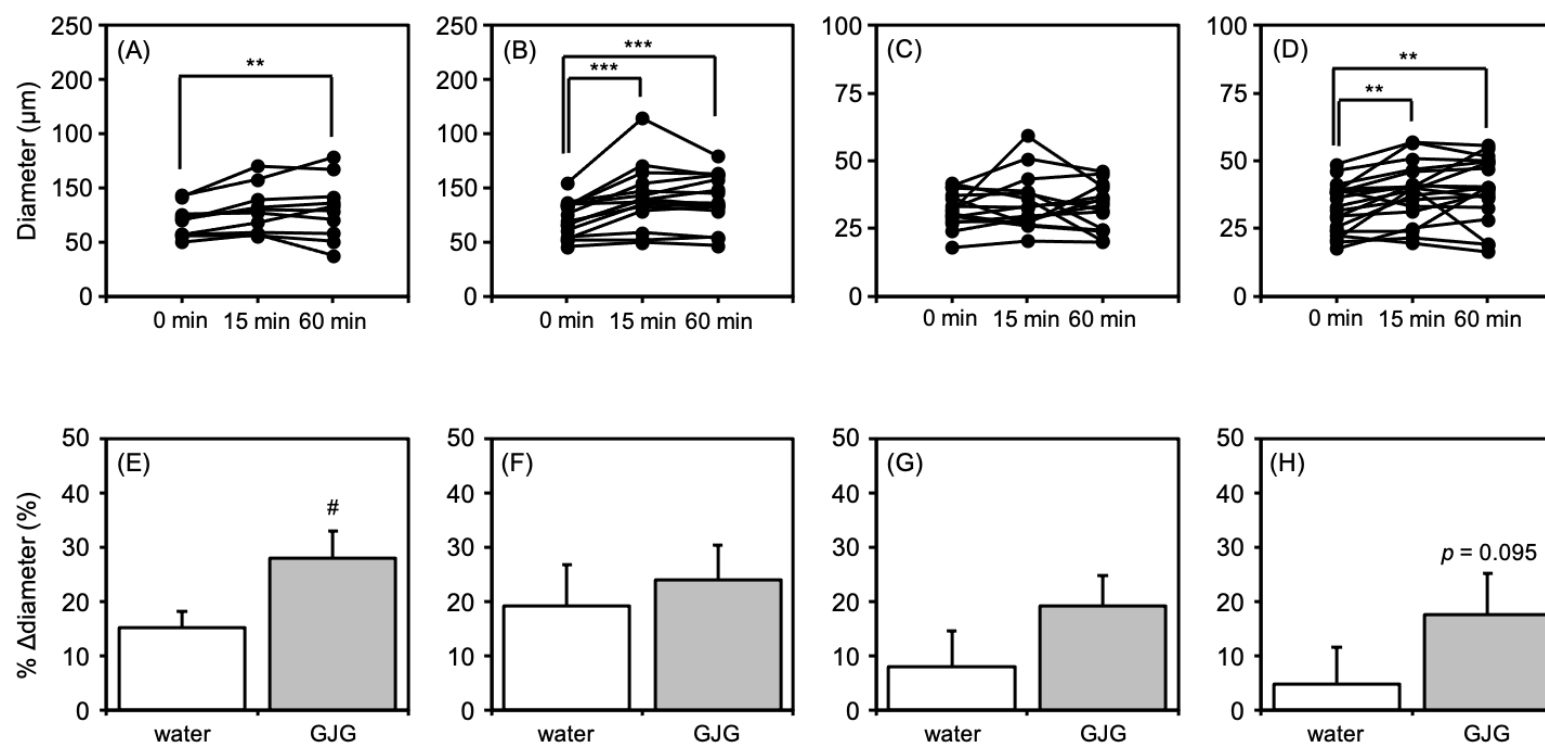


Fig. 23. Effect of Goshajinkigan (GJG) on venule and arteriole diameters in auricle in normal mice
 (A) venule diameter in water-treated mice, (B) venule diameter in GJG-treated mice, (C) arteriole diameter in water-treated mice, (D) arteriole diameter in GJG-treated mice, (E) changes of diameters in venule at 15 min, (F) changes of diameters in venule at 60 min, (G) change of diameters in arteriole at 15 min, (H) changes of diameters in arteriole at 60 min. (A) - (D), each point represents the diameter of an individual mouse. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. the baseline by paired t -test. (E) - (H), each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 10 to 20 mice. # $p < 0.05$ vs. the PBS-treated group by Welch's t -test.

第三節 糖尿病マウスにおける牛車腎気丸の血管拡張作用

先節において、健常マウスにおける GJG の血管拡張作用について明らかにした。そこで、GJG が DPN マウスモデルにおいて末梢血管に与える影響を検討した。

実験動物として ICR 雄性マウス（6 週齢）を使用し、STZ 処置 8 週目に von Frey 試験を実施し、健常マウスに比較して有意な感覚低下を確認したのち、9 週目に末梢血管の測定を同様に行なった。

細静脈においては、各個体における経時変化を観察したところ、GJG 投与により 15 分、60 分と経時的な血管径の増加が観察され（Fig. 24C）、血管径の変化割合としても投与後 60 分に有意な増加を認めた（Fig. 24H）。

一方、細動脈においては、それぞれの変化が小さく、個体間のばらつきも大きかったことから、GJG 投与後 60 分には増加傾向が認められたものの（Fig. 24F）、ごくわずかなものであった。

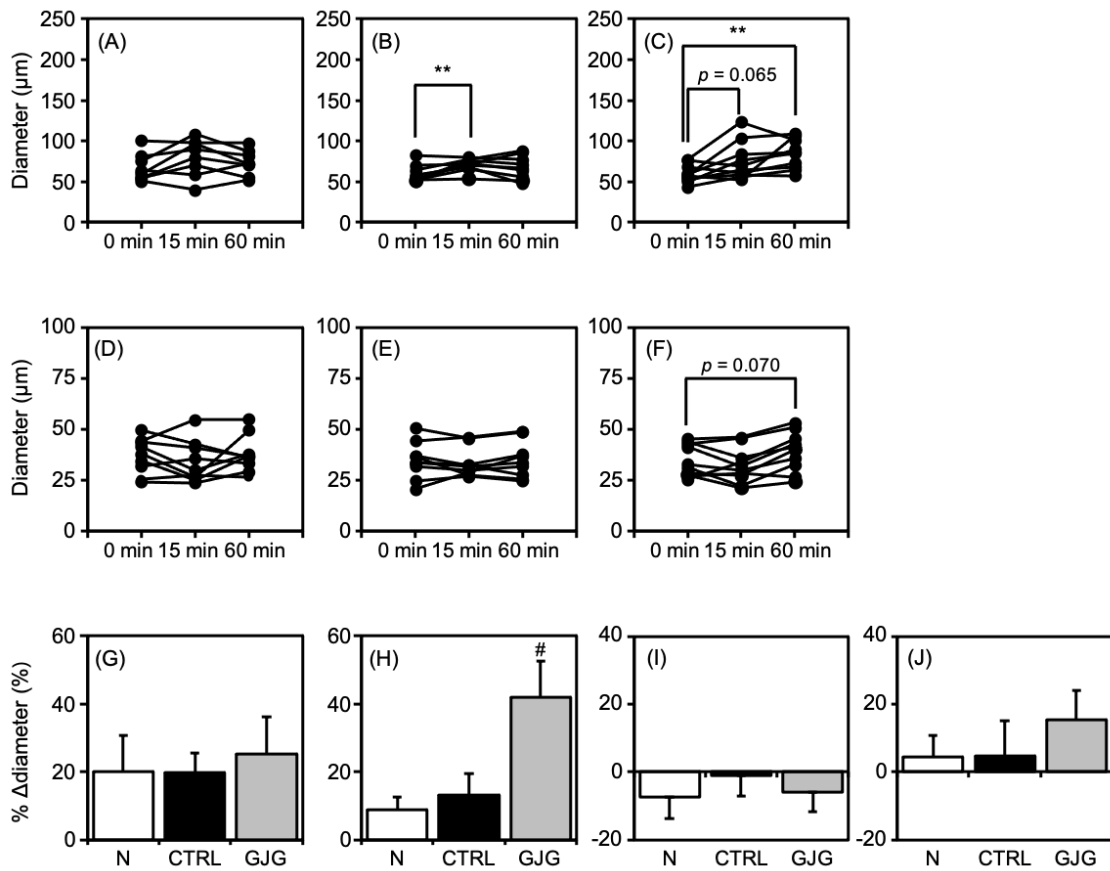


Fig. 24. Effect of Goshajinkigan (GJG) on venule and arteriole diameters in auricle in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice

(A) venule diameter in water-treated normal mice (N), (B) venule diameter in water-treated diabetic mice (CTRL), (C) venule diameter in GJG-treated diabetic mice (GJG), (D) arteriole diameter in water-treated normal mice (N), (E) arteriole diameter in water-treated diabetic mice (CTRL), (F) arteriole diameter in GJG-treated diabetic mice (GJG), (G) changes of diameters in venule at 15 min, (H) changes of diameters in venule at 60 min, (I) change of diameters in arteriole at 15 min, (J) changes of diameters in arteriole at 60 min. (A) - (F), each point represents the diameter of an individual mouse. ** $p < 0.01$ vs. the baseline by paired t -test. (G) - (J), each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 9 to 10 mice. # $p < 0.01$ vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons.

つぎに、GJGによる血管拡張がNO産生による作用であることを明らかにするために、GJGによる血管拡張作用に与えるL-NAMEの影響について検討した。

実験動物としてICR雄性マウス（6週齢）を使用し、STZ処置8週目にvon Frey試験を実施し、健常マウスに比較して有意な感覚低下を確認したのち、9から10週目にかけて末梢血管の測定を同様にして行った。0分での血管径を測定する30分前にL-NAME（5 mg/kg）を腹腔内投与した。その後、水またはGJGを経口投与し、投与15分後と60分後の同一部位における血管の撮影を行い、それぞれの時間における血管径の測定を行ない、血管径の変化を投与群間で比較検討した。

細静脈における変化についてGJG投与60分後に認められた拡張作用が、L-NAMEによって消失した（Fig. 25B）。また、細動脈における変化についても、GJG投与15分後に認められた拡張作用が消失した（Fig. 25C）。これらの結果から、GJGで認められた血管拡張作用はNO産生亢進を介した作用であることが示唆された。

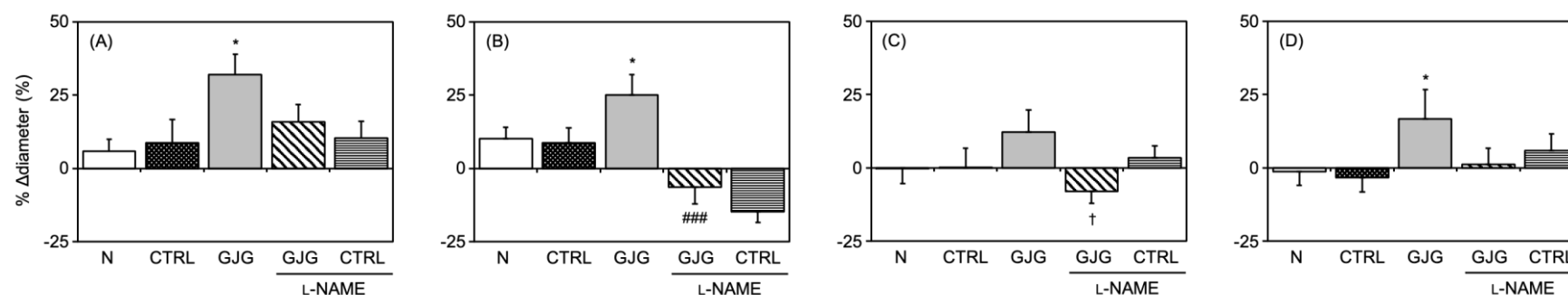


Fig. 25. Effect of N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on the vasodilating action of Goshajinkigan (GJG) in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice

(A) changes of diameters in venule at 15 min, (B) changes of diameters in venule at 60 min, (C) change of diameters in arteriole at 15 min, (D) changes of diameters in arteriole at 60 min. Each column represents the mean $\pm$ S.E.M. of 8 to 12 mice. * $p < 0.05$ vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for selected two groups. ### $p < 0.001$ vs. the GJG group by ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons. † $p < 0.05$ vs. the CTRL group by ANOVA with Bonferroni correction for selected two groups.

考察

糖尿病患者では、高血糖が血管内皮機能障害を引き起こし、様々な合併症を引き起こす。先行研究およびこれまでの検討では、GJG が血管内皮細胞からの NO 産生を亢進し、DPN の感覚低下改善作用を示すことが示唆されている。*in vivo* においては、GJG 投与により糖尿病ラットの腓腹筋血流低下の改善作用を認められており (33)、近年では、末梢毛細血管の可視化や、マイクロスコープによる血流・血管径の測定が可能になってきている (34)。

本章では、SNP を用いた検証実験により、耳介内の末梢血管径を測定することで血管拡張作用を直接評価できることを実証した。さらに、GJG は健常マウスでは動脈および静脈径に対して血管拡張作用を示したが、個体間ではかなりのばらつきがあった。健常マウスにおいて、GJG 投与 15 分後から細静脈、細動脈ともに拡張を認めた。一方、糖尿病マウスにおいては、この作用発現に時間がかかる傾向があったが、同様の血管拡張作用が観察された。この遅延は、STZ 投与 9 週間後に糖尿病マウスに内皮細胞機能障害が出現したことに起因すると考えられるが、この仮説についてはさらなる検証が必要である。

これまで、GJG が DPN の感覚低下に対して NO 産生を亢進することにより、改善することを示唆した。同様に、GJG の血管拡張作用にも NO が関与していると考え、L-NAME の前処理による影響を検証した。その結果、糖尿病マウスにおける GJG の血管拡張作用が減少したことから、GJG の血管拡張作用には NO 産生が関与していることが示唆された。桂皮成分の cinnamaldehyde は、*in vitro* で HUVEC において、Akt による細胞内シグナルを経た eNOS の活性化により、NO の産生を促進する (26)。また、cinnamaldehyde は NO のバイオアベイラビリティを増加させることで NO 依存性血管拡張作用が認められている。(27)。

DPN の成因のひとつに血管性因子の影響があることから、血液循環の改善が感覚低下改善作用に関与することが考えられた。しかしながら、この血液循環の改善は脈管系での影響か、神経系での影響かについては明らかにできていない。今後、DPN の感覚低下改善作用を認めた有効生薬において、血管拡張作用が認められるかについて、検討を行う必要がある。

結論

1. ストレプトゾトシンを投与して作製したマウス糖尿病性末梢神経障害モデルの感覚低下を牛車腎気丸は有意に改善することを見出した。
2. 牛車腎気丸の感覚低下改善作用は、投与後 1 時間といった比較的短時間で出現し、その作用機序には一酸化窒素の関与が推定された。
3. 牛車腎気丸の感覚低下改善作用の発現には、構成生薬の中でも山薬、沢瀉、附子、桂皮が関わっていることを明らかにした。それらの生薬は、一酸化窒素合成酵素への基質の供給だけでなく、酵素自体の活性化に寄与することを推定した。
4. 牛車腎気丸の感覚低下改善作用における作用点として、温度感受性チャネルである TRPV1 と TRPA1 を推定した。
5. 牛車腎気丸が末梢血管拡張作用を有することを明らかにした。

謝辞

本研究に際して、終始温かくご指導、ご鞭撻を賜りました名城大学薬学部薬学研究科 能勢 充彦 教授に深甚なる感謝の意を申し上げます。

本論文を作成するにあたり、有益なご助言とご校閲を賜りました名城大学薬学部薬学研究科 平松 正行 教授、名城大学薬学部薬学研究科 早川 伸樹 教授に深謝いたします。

本研究の遂行、ならびに論文の執筆にあたって、終始ご懇篤なご指導、ご鞭撻を賜りました名城大学薬学部 日坂 真輔 助教に心より厚く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、数々のご討論、ご助言を頂きました株式会社ツムラ ツムラ漢方研究所 大宮 雄司 博士、溝口 和臣 博士に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、実験の一部を協力していただきました荒井 貴一 氏、赤崎 大志 氏、山田 民 氏、村田 留衣 氏、古田 聖尊 氏、水野 彩香 氏、浅田 和泉 氏に深謝いたします。

本研究の全般に渡りご協力いただきました、名城大学薬学部生薬学研究室の皆様心より感謝申し上げます。

実験の部

【使用動物】

雄性 ICR マウス 5 週齢（日本エスエルシー株式会社 引佐支所、大原支所）を温度 23 ± 1 °C、湿度 50 ± 5 %、ステンレススチール製の網の上で飼育した。また、水と食餌（MM-3）は自由に与えてある。本学施設へ搬入後、1 週間の予備飼育を行い、実験に供した。

【DPN マウスモデルの作製】

18 時間絶食した雄性 ICR マウスに 0.1 N クエン酸緩衝液（pH = 4.5）/生理食塩水に溶解した STZ（150 mg/kg）を尾静脈から投与して糖尿病を惹起した。STZ 投与 72 時間後に、グルテスト Neo スーパー（株式会社 三和化学研究所）を用いて血糖値を測定し、300 mg/dL 以上の個体を糖尿病マウスとして実験に供した。

【von Frey 試験】

機械的刺激による、感覚異常（感覚過敏や感覚鈍麻）を評価する試験である。von Frey filament（DanMic Global）を用いて、マウスの左後ろ足の人差し指・中指・薬指の付け根にある 2 つの肉球と、足の中心の 3 点を結んでできる三角形の中心を目安にして、その位置に filament が触れてから、曲がるまで垂直に押し当て、離れるまでの一連の動作を約 3 秒間でおこない、刺激に対する逃避行動の有無を観察した。刺激に反応しなかった（負の応答）場合は filament を 1 段階太いものに変えて再度刺激し、反応した（正の応答）場合は 1 段階細いものに変えて刺激するという up-down 法で試験し、最初に反応した後さらに 4 回試験を行った (37)。

試験は、

- a) マウスが覚醒状態にある
- b) マウスが四肢を金網につけている

という条件のもと実施した。また、刺激に対する正の応答の判断基準として、

- A) 足を振る
- B) 足を引っ込める
- C) 足をなめる
- D) 足の指を縮める
- E) 足の指を開く

という条件を設けた。A)~E) の反応を示さない場合は負の応答とした。von Frey

filament は 0.02、0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1.0、1.4 及び 2.0 g のものを使用し、0.4 g の filament から試験を開始した。刺激は、下記 1)~3)の項目をそれぞれ約 1 秒間行った。

- 1) filament が曲がるまで垂直に押し付ける
- 2) filament が曲がった状態を維持する
- 3) filament を離す

連続して刺激すると、刺激に慣れてしまい鈍感になる、又は敏感になる可能性があるため、一度刺激した個体は、次の刺激を行うまでに約 5 分間のインターバルを設けた。刺激に対する 50%閾値 (g) は、下記の式を用いて算出した。

$$50\% \text{ 閾値 (g) } = \{10^{(Xf + K \cdot D)}\} / 10000$$

$Xf = \log\{10 \times \text{最後に用いた von Frey filament の値 (mg)}\}$

$K =$ 正および負の応答パターンによって得られた定数

$D =$ 使用した filament の mg 値を log 換算し、その差を平均した値

0.02 g の filament で正の応答を示した場合には 50%閾値 (g) = 0.015 とし、2.0 g の filament で負の応答を示した場合 (9 回目の試験は除く) には、50%閾値 (g) = 2.5 とし、それぞれ cut off 値を設けた。

【漢方方剤の調製】

漢方方剤のヒト 1 日量に相当する各種生薬を紙パックに入れ、これをマイコン煎じ器 2 (ハリオ) に入れ、600 mL の蒸留水を注ぎ、強モードで 1 時間熱水抽出した。この抽出液を凍結乾燥することにより、粉末エキスを得た。

【各漢方方剤と分画の構成生薬と収量】

牛車腎気丸 : 熟地黄 6 g、山茱萸 3 g、山薬 3 g、沢瀉 3 g、茯苓 3 g、
牡丹皮 3 g、桂皮 1 g、牛膝 3 g、車前子 3 g、炮附子 0.5 g

(収量 : 9.18 ± 0.12 g)

桂枝加朮附湯 : 桂皮 4 g、芍薬 4 g、大棗 4 g、生姜 1 g、甘草 2 g、白朮 4 g、
炮附子 0.5 g (収量 : 6.64 g)

当帰四逆加呉茱萸生姜湯 : 当帰 3 g、桂皮 3 g、芍薬 3 g、木通 3 g、細辛 2 g、
甘草 2 g、大棗 5 g、呉茱萸 2 g、生姜 1 g (収量 : 7.36 g)

八味地黄丸 : 熟地黄 5 g、山茱萸 3 g、山薬 3 g、沢瀉 3 g、茯苓 3 g、

牡丹皮 3 g、桂皮 1 g、炮附子 1 g (収量 : 6.96 g)

六味地黄丸 : 熟地黄 5 g、山茱萸 3 g、山薬 3 g、沢瀉 3 g、茯苓 3 g、
牡丹皮 3 g (収量 : 6.48 g)

山薬-沢瀉 : 山薬 3 g、沢瀉 3 g (収量 : 1.38 ± 0.03 g)

附子-桂皮 : 桂皮 1 g、炮附子 0.5 g (収量 : 0.17 ± 0.06 g)

牛膝-車前子 : 牛膝 3 g、車前子 3 g (収量 : 1.97 ± 0.02 g)

四味 : 熟地黄 6 g、山茱萸 3 g、茯苓 3 g、牡丹皮 3 g
(収量 : 5.76 ± 0.02 g)

山薬 : 山薬 3 g (収量 : 0.78 g)

沢瀉 ; 沢瀉 3 g (収量 : 0.54 g)

附子 ; 炮附子 0.5 g (収量 : 0.18 g)

桂皮 ; 桂皮 1 g (収量 : 0.12 g)

【DPN マウスへの経口投与】

各漢方方剤、EPS、GJG 分画並びに単味生薬のマウス投与量は、ヒトとの体表面積の比較で約 12.3 倍とされていることから (38)、エキス収量をもとに以下の通り経口投与した。

GJG : 1.53 g/kg, KJBT : 1.16 g/kg, TSGST : 1.23 g/kg, HJG : 1.16 g/kg, RJG : 1.08 g/kg, EPS : 0.10 g/kg, 山薬-沢瀉 : 0.23 g/kg, 附子-桂皮 : 0.03 g/kg, 牛膝-車前子 : 0.96 g/kg, 四味 : 0.96 g/kg, 山薬 : 0.13 g/kg, 沢瀉 : 0.09 g/kg, 附子 : 0.03 g/kg, 桂皮 : 0.02 g/kg, GJG 相当量の L-アルギニンおよび L-シトルリン : 1.53 g/kg および 5.27 mg/kg

【ストレプトゾトシン誘発糖尿病性末梢神経障害モデルマウスの作製】

von Frey 試験は、飼育ケージから観察用ケージに移し、60 分後に実施した。試験終了翌日に STZ により糖尿病を惹起した。その 1 週間後に再度 von Frey 試験を実施した。これを 1 週間に 1 回、合計 9 回繰り返した。

【糖尿病性末梢神経障害感覚低下に有効な漢方方剤の探索】

STZ 処置 9 週目のマウスを用い、観察用ケージに移した後、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 10 週目に水もしくは GJG、KJBT、TSGST 経口投与後に観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。さらに、経口投与を 1 週間継続し、最終投与日にも同様のスケジュールにて試験を行った。また、最終経口投与から 1 週間休薬後にも同様のスケジュールにて試験を行った。

【糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における牛車腎気丸の作用特性（投与量依存性）】

STZ 処置 9 週目のマウスを用い、ガラス製の観察用ケージに移し、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 10 週目に水もしくはヒト相当量、5 倍相当量、10 倍相当量の GJG 経口投与後に観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。さらに、経口投与を 1 週間継続し、最終投与日にも同様のスケジュールにて試験を行った。

【糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における牛車腎気丸の作用特性（作用持続性）】

STZ 処置 8 週目のマウスを用い、ガラス製の観察用ケージに移し、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 9 週目に水もしくは GJG 経口投与後に観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。さらに、投与から 5 時間後にも同様にして von Frey 試験を実施した。また、経口投与を 2 週間継続し、1 週間後と最終投与日にも同様のスケジュールにて試験を行った。

【牛車腎気丸の糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における一酸化窒素の関与 (L-NAME の影響)】

STZ 処置 7 週目のマウスを用い、ガラス製の観察用ケージに移し、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 8 週目に生理食塩水もしくは

は L-NAME (5 mg/kg) を腹腔内投与し、30 分後に水もしくは GJG 経口投与し観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。また、経口投与を 1 週間継続し、最終投与日にも同様のスケジュールにて試験を行った。

【牛車腎気丸の糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における一酸化窒素の関与 (SNP の影響)】

STZ 処置 8 週目のマウスを用い、ガラス製の観察用ケージに移し、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 9 週目に PBS もしくは SNP (1 mg/kg) を皮下投与後に観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。

【牛車腎気丸類方の糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用】

STZ 処置 9 週目のマウスを用い、ガラス製の観察用ケージに移し、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 10 週目に水もしくは GJG、HJG、RJG 経口投与後に観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。さらに、経口投与を 1 週間継続し、最終投与日にも同様のスケジュールにて試験を行った。

【牛車腎気丸の糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における有効生薬の探索 (分画による影響)】

STZ 処置 7 週目のマウスを用い、ガラス製の観察用ケージに移し、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 8 週目に水もしくは山薬・沢瀉、附子・桂皮、牛膝・車前子、四味画分経口投与後に観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。さらに、経口投与を 1 週間継続し、最終投与日にも同様のスケジュールにて試験を行った。

【牛車腎気丸の糖尿病性末梢神経障害感覚低下改善作用における有効生薬の探索 (単味生薬による影響)】

STZ 処置 7 週目のマウスを用い、ガラス製の観察用ケージに移し、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 8 週目に水もしくは山薬、沢瀉、附子、桂皮を経口投与後に観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。さらに、経口投与を 1 週間継続し、最終投与日にも同様のスケジュールにて試験を

行った。

【糖尿病性末梢神経障害感覚低下に対する L-アルギニンおよび L-シトルリンの改善作用】

STZ 処置 8 週目のマウスを用い、ガラス製の観察用ケージに移し、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 9 週目に水もしくは GJG、GJG 相当量の L-アルギニンおよび L-シトルリン、GJG10 倍量の L-アルギニンおよび L-シトルリンを経口投与後に観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。さらに、経口投与を 1 週間継続し、最終投与日にも同様のスケジュールにて試験を行った。

【牛車腎気丸の TRPV1 および A1 チャネルを介した感覚低下改善作用（CPZ による影響）】

STZ 処置 8 週目のマウスを用い、ガラス製の観察用ケージに移し、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 9 週目に生理食塩水もしくは CPZ（5 mg/kg）を腹腔内投与し、30 分後に水もしくは GJG 経口投与し観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。また、経口投与を 1 週間継続し、最終投与日にも同様のスケジュールにて試験を行った。

【牛車腎気丸の TRPV1 および A1 チャネルを介した感覚低下改善作用（A-967079 による影響）】

STZ 処置 8 週目のマウスを用い、ガラス製の観察用ケージに移し、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 9 週目に生理食塩水もしくは A-967079（6.22 mg/kg）を腹腔内投与し、30 分後に水もしくは GJG 経口投与し観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。また、経口投与を 1 週間継続し、最終投与日にも同様のスケジュールにて試験を行った。

【桂皮、附子の TRPV1 および A1 チャネルを介した感覚低下改善作用（桂皮による影響）】

STZ 処置 8 週目のマウスを用い、ガラス製の観察用ケージに移し、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 9 週目に生理食塩水もしくは CPZ (5 mg/mL) または A-967079 (6.22 mg/kg) を腹腔内投与し、30 分後に水もしくは桂皮を経口投与し観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。また、経口投与を 1 週間継続し、最終投与日にも同様のスケジュールにて試験を行った。

【桂皮、附子の TRPV1 および A1 チャネルを介した感覚低下改善作用（附子による影響）】

STZ 処置 7 週目のマウスを用い、ガラス製の観察用ケージに移し、von Frey 試験を 60 分後に実施した。有意な感覚低下を確認した後、STZ 処置 8 週目に生理食塩水もしくは CPZ (5 mg/mL) または A-967079 (6.22 mg/kg) を腹腔内投与し、30 分後に水もしくは附子を経口投与し観察用ケージに移し、60 分後に von Frey 試験を実施した。また、経口投与を 1 週間継続し、最終投与日にも同様のスケジュールにて試験を行った。

【L-アルギニン、L-シトルリンの定量】

L-アルギニンおよび L-シトルリンの定量は、OPA を用いたプレカラム法にて定量した (39)。OPA を 125 mg 正確に秤量し、0.75 mL のエタノールで溶解し、0.4 M ホウ酸緩衝液で 5 mL にメスアップした。これに 100 μ L 2-メルカプトエタノールを加え、OPA 試液とした。試液は、4°C 遮光保存し、9 日以内に使用した。各粉末エキ스는 10-100 mg/mL となるように溶解し、4°C、13200 $\times$ g、10 分間遠心分離した。得られた上清 5 μ L を 95 μ L 蒸留水、100 μ L OPA 試液と 5 秒間ボルテックスを用いて混和し、2 分後に HPLC へ供した。

HPLC condition

Apparatus ; LC-10AD

Detector ; SPD-10A

Column ; COSMOSIL 5C18-AR-II (5 μ m, ϕ 4.6 $\times$ 150 mm)

Eluent ; A THF : MeOH : phosphate buffer (10 mM, pH = 7.5) = 1 : 8 : 91

B MeOH : phosphate buffer (10 mM, pH = 7.5) = 80 : 20

A : B = 85 : 15

Flow rate ; 1.0 mL/min

Column temperature ; 40°C

Wavelength ; 254 nm

【血中およびエキス中窒素酸化物濃度の測定】

オールインワン小動物用麻酔器 MK-AT210D（室町機械株式会社）を使用し、1.5%イソフルラン吸入麻酔下で、下行大静脈より採血を行い、血清を得た。測定には Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical Company) を使用し、定法に則って測定した。

【血中 nitrotyrosine の測定】

オールインワン小動物用麻酔器 MK-AT210D（室町機械株式会社）を使用し、1.5%イソフルラン吸入麻酔下で、下行大静脈より採血を行い、血清を得た。測定には Nitrotyrosine ELISA Kit (Cell Biolabs, Inc.) を使用し、定法に則って測定した。

【毛細血管径の測定】

血管径の測定には、マウス左耳介の毛細血管を利用した。測定には、オールインワン小動物用麻酔器 MK-AT210D（室町機械株式会社）を使用し、1.5%イソフルラン吸入麻酔下で、毛細血管血流スコープ Bscan Z（株式会社徳）を使用し、光学倍率を 350 倍で撮影を行い、血管血流画像解析ソフト Capi Scope II（KK Technology）を用いて血管径の定量を行った。遠心性の細動脈と求心性の細静脈が同一視野に入るように撮影を行い、細動脈径については被験薬投与前の径が 50 μm 未満の部位を対象に、細静脈径については被験薬投与前の径が 50 μm 以上 105 μm 未満の部位を対象に測定を行った。

【各漢方方剤の 3D HPLC】

各漢方方剤の粉末エキスを蒸留水で 50 mg/mL となるように溶解し、これを 0.45 μ m メンブランフィルター (Merck Millipore) 処理して分析に供した。

HPLC condition

Apparatus ; JASCO PU-2089

Detector ; JASCO MD-2018

Column ; TSK gel ODS-80Ts (5 μ m, ϕ 4.6 $\times$ 150 mm)

Eluent ; A 50 mM ammonium acetate (pH = 3.6), B acetonitrile

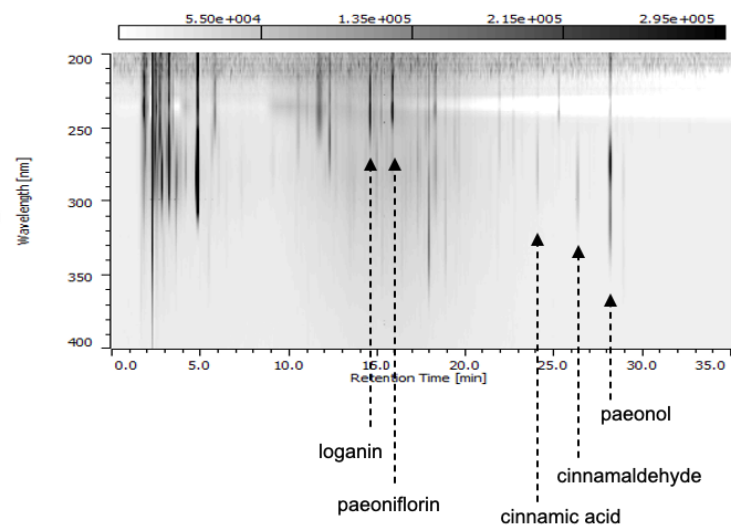
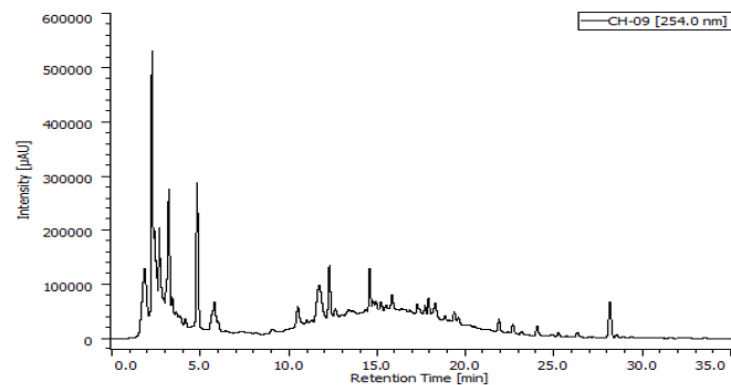
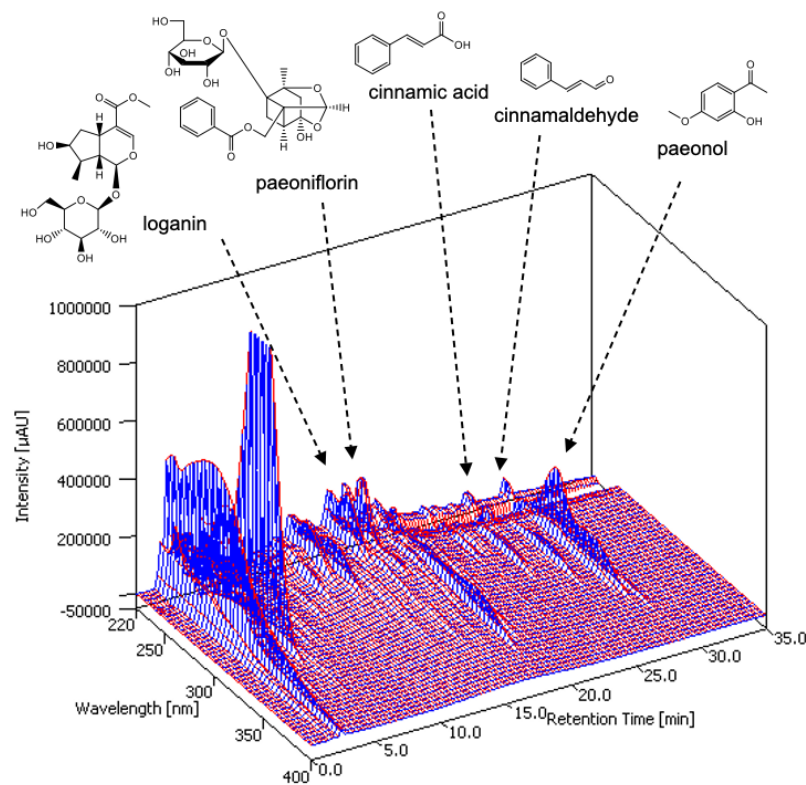
0-5 min, 5% B; 5-55 min, 5-95% B; and 55-60 min, 95% B

Flow rate ; 1.0 mL/min

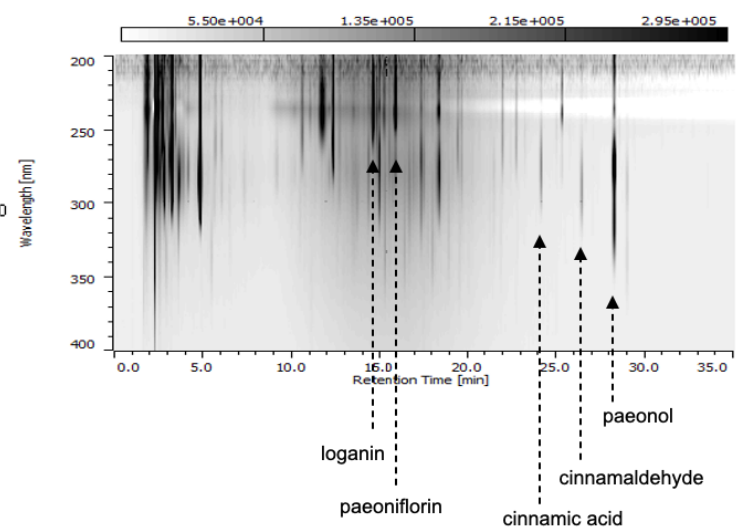
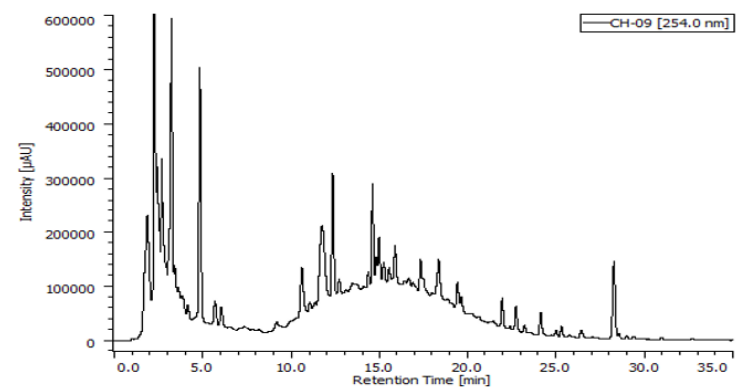
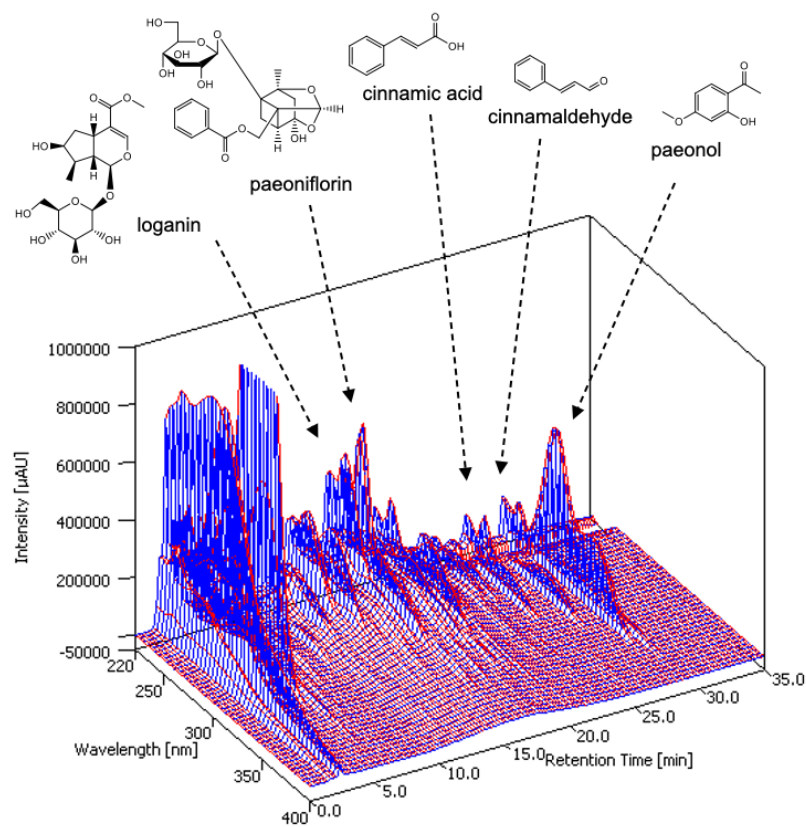
Column temperature ; room temperature

Wavelength ; 220-400 nm

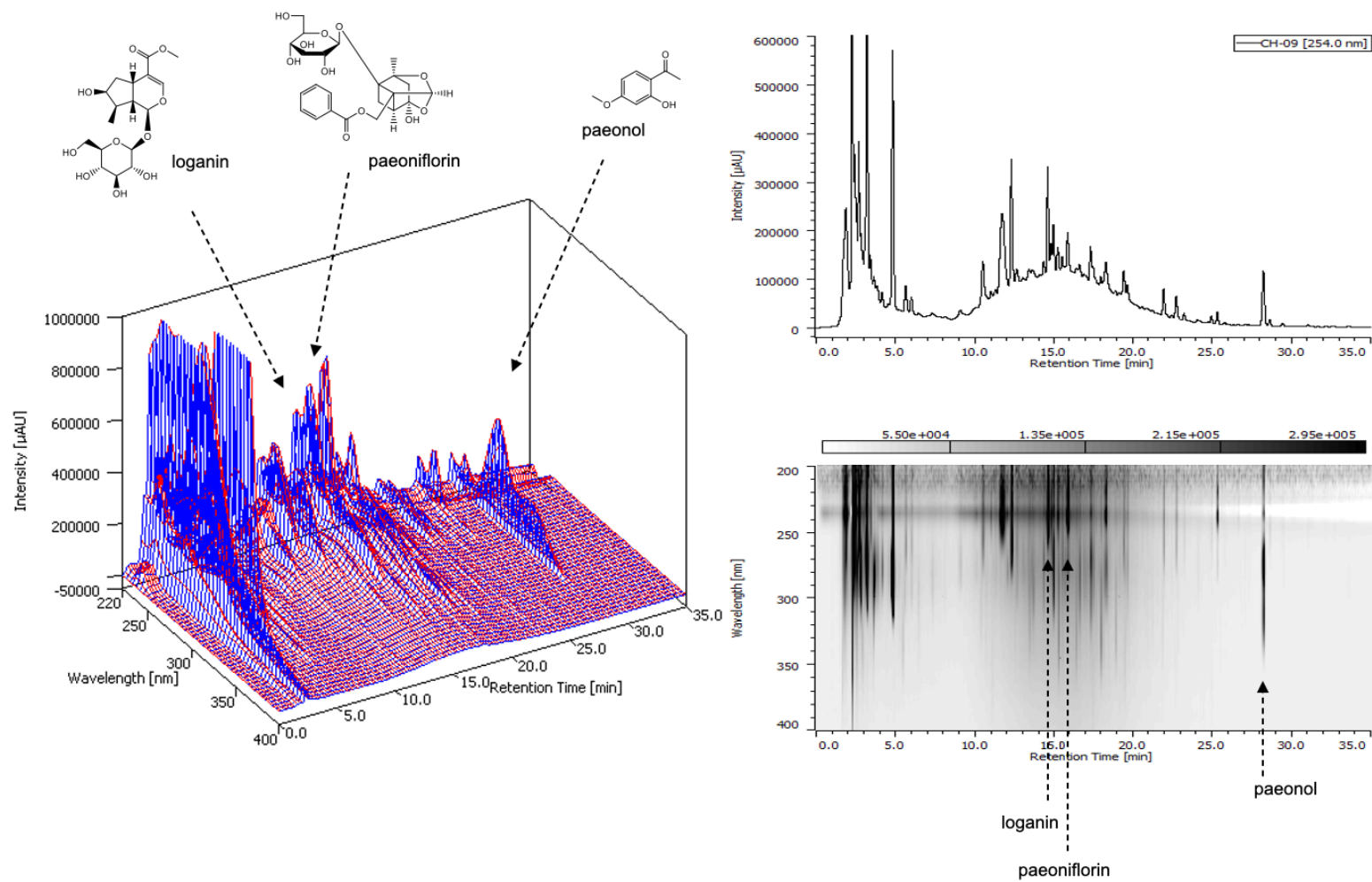
goshajinkigan (GJG)

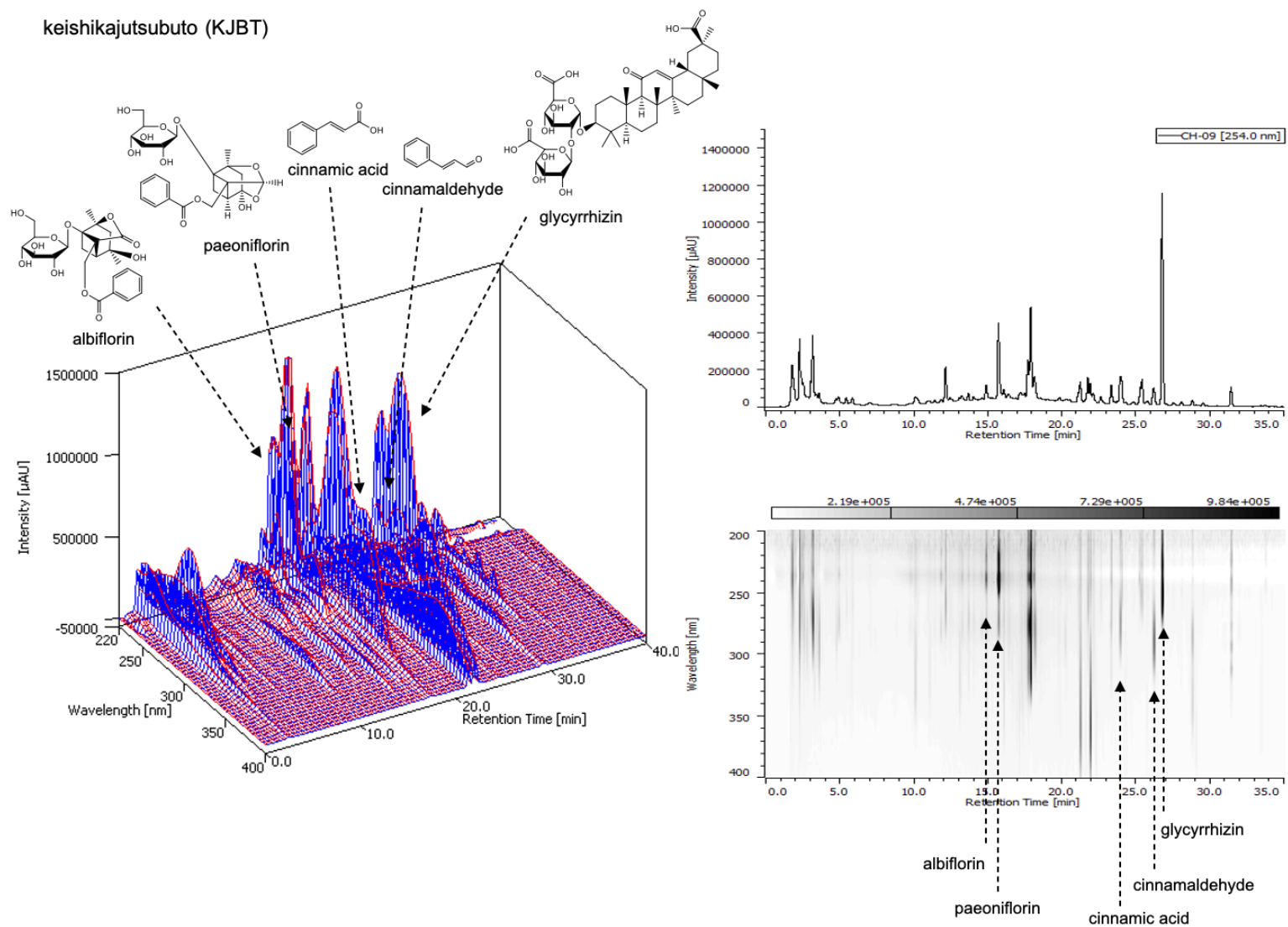


hachimijiogan (HJG)

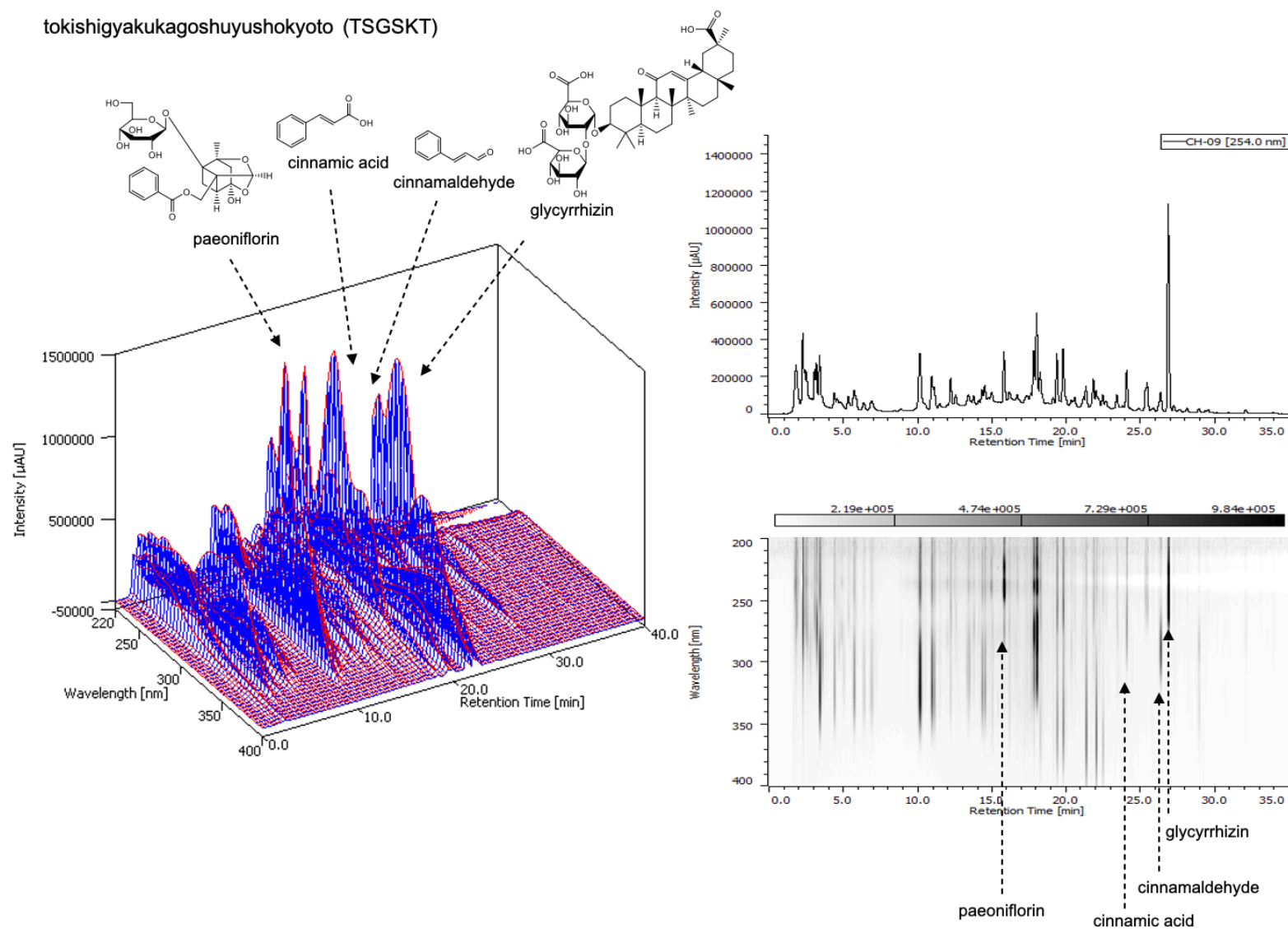


rokumijogon (RJG)





tokishigyakukagoshuyushokyo (TSGSKT)



引用文献

1. 厚生労働省、令和元年 国民健康・栄養調査結果の概要、2020、20
2. IDF, Diabetes Atlas, 2019, **9**: 32-61
3. 日本糖尿病対策推進会議、日本における糖尿病患者の足外観異常および糖尿病神経障害の実態に関する報告、2008
4. 杉本一博、糖尿病性神経障害の成因 代謝性因子、月間糖尿病、2011、**3**: 26-32
5. 日本糖尿病学会、糖尿病診療ガイドライン 2019: 169-181
6. A S Ametov, A Barinov, P J Dyck, R Hermann, N Kozlova, W J Litchy, P A Low, D Nehrlich, M Novosadova, P C O'brien, M Reljanovic, R Samigullin, K Schuette, I Stokov, H J Tritschler, K Wessel, N Yakhno, D Ziegler. The sensory symptoms of diabetic polyneuropathy are improved with alpha-lipoic acid: the SYDNEY trial. *Diabetes care*, 2003, **26**: 770-776
7. 安田 斎、臨床神経学雑誌、2009、**49**: 149-157
8. 神谷英紀、中村二郎、糖尿病性末梢神経障害の治療 2 成因に則った治療、月刊糖尿病、2011、**3**: 70-76
9. 佐藤 弘、手足のしびれ、腰痛、*J. Clin. Rehabil.*, 1999、**8**: 886-891
10. Kamei J, Ohsawa M, Miyata S, Endo K, Hiroyuki H. Effects of cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) on the thermal nociceptive threshold in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, **598**: 32-36
11. Ohsawa M, Miyata S, Carlsson A, Kamei J. Preventive effect of acetyl-L-carnitine on the thermal hypoalgesia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 2008, **588**: 213-216
12. Suzuki Y, Goto K, Ishige A, Komatsu Y, Kamei J. Antinociceptive effect of Gosha-jinki-gan, a Kampo medicine, in streptozotocin-induced diabetic mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, 1999, **79**: 169-175
13. Suzuki Y, Goto K, Ishige A, Komatsu Y, Kamei J. Effect of Gosha-jinki-gan, a kampo medicine, on enhanced platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 1998, **78**: 87-91
14. Nishioka M, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Morimoto S, Yoshikawa K, Higashijima J, Miyatani T, Kono T. The Kampo medicine, Goshajinkigan, prevents neuropathy in patients treated by FOLFOX regimen. *Int. J. Clin. Oncol.*, 2011, **16**: 322-327

15. Mizuno K, Kono T, Suzuki Y, Miyagi C, Omiya Y, Miyano K, Kase Y, Uezono Y. Goshajinkigan, a traditional Japanese medicine, prevents oxaliplatin-induced acute peripheral neuropathy by suppressing functional alteration of TRP channels in rat. *J. Pharmacol. Sci.*, 2014, **125**: 91-98
16. Kono T, Hata T, Morita S, Munemoto Y, Matsui T, Kojima H, Takemoto H, Fukunaka M, Nagata N, Shimada M, Sakamoto J, Mishima H. Goshajinkigan oxaliplatin neurotoxicity evaluation (GONE): a phase 2, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of goshajinkigan to prevent oxaliplatin-induced neuropathy. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 2013, **72**: 1283-1290
17. Matsumura Y, Yokohama 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*, 2014, **10**
18. Toume K, Hou Z, Yu H, Kato M, Maesaka M, Bai Y, Hanazawa S, Ge Y, Andoh T, Komatsu K. Search of anti-allodynic compounds from Plantaginis Semen, a crude drug ingredient of Kampo formula "Goshajinkigan". *J. Natural Med.*, 2019, **73**: 761-768
19. 安東 嗣修, 倉石 泰, プナム ガウチャ, 北村 亮, 緒方 孝行, 小松 かつ子, 柴原 直利, 伏見 裕利, 条 美智子, 白 焱晶、牛車腎気丸及び関連漢方方剤の抗癌薬誘発末梢神経障害性疼痛への効果に関する研究、和漢薬の科学基盤形成事業、2011: 19-24
20. Suzuki Y, Goto K, Ishige A, Komatsu Y, Kamei J. Antinociceptive Mechanism of Goshajinkigan in Streptozotocin-Induced Diabetic Animals: Role of Nitric Oxide in the Periphery. *J. pharmacol.*, 1999, **79**: 387-391
21. Morita M, Hayashi T, Ochiai M, Maeda M, Yamaguchi T, Ina K, Kuzuya M. Oral supplementation with a combination of L-citrulline and L-arginine rapidly increases plasma L-arginine concentration and enhances NO bioavailability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014, **454**: 53-57
22. 林 登志雄、動脈硬化とアルギニン、シトルリン、生化学、2014、**86**: 352-359
23. Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki A, Fukatsu A, Funami J, Q F Ding, Kamalanathan S, Hattori Y, Louis J I, Iguchi A. Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: Implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sci.*, 2006, **103**: 17018-17023
24. Zhang L, Wu L, Liu X, Yoshitomi H, Ikeda K, Negishi H, Pan Y, Sun W, Qin L, Li JE, Xu T, Liu T, Gao M. Trans-cinnamaldehyde promotes nitric oxide release *via*

- the protein kinase-B/v-Akt murine thymoma viral oncogene -endothelial nitric oxide synthase pathway to alleviate hypertension in SHR. Cg-Lepr^{cp}/NDmcr rats. *J. Tradit. Chin. Med.*, 2018, **38**: 548-555
25. Kono T, Suzuki Y, Mizuno K, Miyagi C, Omiya Y, Sekine H, Mizuhara Y, Miyano K, Kase Y, Uezono Y. Preventive effect of oral goshajinkigan on chronic oxaliplatin-induced hypoesthesia in rats. *Sci. Rep.*, 2015, **5**: **16078**: 1-11
 26. Wei H, Saarnilehto M, Falck L, Viisanen H, Lasiererra M, Koivisto A, Pertovaara A. Spinal transient receptor potential ankyrin 1 channel induces mechanical hypersensitivity, increases cutaneous blood flow, and mediates the pronociceptive action of dynorphin A. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2013, **64**: 331-340
 27. J Ramadoss, M B Pastore, R R Magness. Endothelial caveolar subcellular domain regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Clin. Exp. Phamacol. Physiol.*, 2013, **40**: 753-764
 28. Hong S, Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *J. Bio. Chem.*, 2005, **280**: 618-627
 29. R M Pabbidi, S-Q Yu, S Peng, R Khardori, M E Pauza, L S Pewmkumar. Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain sensitivity *Mol. Pain*, 2008, **4**
 30. A Hinman, H-H Chuang, D M Bautista, D Julius. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proceedings of the National Academy of Sci.*, 2006, **103**: 19564-19568
 31. Hong S, Agresta L, Guo C, J W Wiley. The TRPV1 receptor is associated with preferential stress in large dorsal root ganglion neurons in early diabetic sensory neuropathy. *J. Neurochem.*, 2008, **105**: 1212-1222
 32. Wei H, Hämäläinen M M, Saarnilehto M, Koivisto A, Pertovaara A. Attenuation of mechanical hypersensitivity by an antagonist of the TRPA1 ion channel in diabetic animals. *Anesthesiology*, 2009, **111**: 147-154
 33. Suzuki Y, Goto K, Ishige A, Komatsu Y, Kamei J. Effects of gosha-jinki-Gan, a kampo medicine, on peripheral tissue blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1998, **20**: 321-328
 34. Nakagami G, Sanada H, Matsui N, Kitagawa A, Yokogawa H, Sekiya N, Ichioka S, Sugama J, Shibata M. Effect of vibration on skin blood flow in an *in vivo* microcirculatory model. *Bio. Sci. Trends*, 2007, **1**: 161-166
 35. Kondo T, Okano H, Ishiwatari H, Watanuki K. Evaluation of the Hemodynamic Effects of AC magnetic field exposure by measurement of an FMD and a

- microscope. In: Duffy V, Lightner N (eds). *Advances in Human Factors and Ergonomics in Healthcare and Medical Devices*, 2019, **2019**: 68-79
36. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci.*, 1994, **53**: 55-63
 37. Dixon WJ. Efficient analysis of experimental observations. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1980, **20**: 441-62
 38. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.*, 2016, **7**: 27-31
 39. Pereira V, Pontes M, Camara J S, Marwues JC. Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in loop orthophthalaldehyde derivatization procedure. *J. Chromatogr. A*, 2008, **1189**: 435-443