

## 分担研究報告書

### 慢性ベンゾピレン中毒ラットに対する芍薬甘草湯の効果検討

研究分担者 申 敏哲 熊本保健科学大学、リハビリテーション学科 教授  
研究協力者 吉村 恵 医療法人社団温故会 直方中村病院

**研究要旨** 本研究では、ベンゾピレンを投与ラットに対する芍薬甘草湯の効果と、それに伴う神経系の変化を行動学的および分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、コーンオイル投与群 (Corn-DW) に対し、ベンゾピレン投与群 (Ben-DW) で感覚閾値の有意な上昇が認められた。その上昇はベンゾピレン投与後に芍薬甘草湯を投与したラット群において抑制された。ベンゾピレンおよび芍薬甘草湯投与による感覚閾値の変化と神経内の変化との関連を検討するため、坐骨神経を取り出し、CYP1A1 および MAG タンパク質の発現を測定した。AHR の標的遺伝子である CYP1A1 について、Ben-DW 群では Corn-DW 群と比較して CYP1A1 タンパク質の有意な発現増加が認められたが、芍薬甘草湯投与群ではその発現増加の抑制が見られた。一方、MAG タンパク質の発現に関しては Ben-DW 群で低下が認められた。しかし、芍薬甘草湯投与群では MAG タンパク質の発現低下の抑制傾向が見られたが、有意差は認められなかった。さらに、酸化ストレスに関する検討では、Ben-DW 群で酸化ストレス度の上昇が認められたが、芍薬甘草湯投与群ではその上昇の抑制が認められた。以上の結果から、ベンゾピレン投与は AHR を介して末梢神経に障害や炎症を引き起こし、それが感覚閾値の変化につながる可能性が示唆された。しかし、この影響は、芍薬甘草湯の抗炎症および抗酸化作用により抑制され、神経損傷からの保護により感覚異常の改善に寄与した可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

ダイオキシン類化合物による複合中毒事件であるカネミ油症は、発生から約 55 年が経過した現在においても、多くの後遺症が報告されている<sup>1)</sup>。カネミ油症における神経障害は、Polychlorinated biphenyls (PCB) が神経系に与える影響の一つであり、暴露された人々は手足のしびれや刺すような痛み、筋力低下、運動機能障害などを訴えることが多い。これらの症状は神経への損傷によって引き起こされると考えられているが、そのメカニズムには依然として不明な点が多い。特に、全身倦怠感、頭痛、手足のしびれといった自覚症状は現在も約 50% の患者に認められ、これらの症状はダイオキシン類が末梢神経系のみならず、中枢神経系にも何らかの

影響を及ぼす可能性を示唆している<sup>2-4)</sup>。

近年、私たちはダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンを用いた動物実験において、ベンゾピレンの投与が触・圧覚を伝える  $\text{A}\beta$  線維に作用し、感覚異常を引き起こす可能性があることを報告した<sup>5)</sup>。また、この作用は生薬の一つであるケイヒの投与によって改善される可能性も報告している。カネミ油症患者に対する漢方治療に関する報告では、芍薬甘草湯が神経症状を緩和することが報告されている。芍薬甘草湯は、血液不足や血行不良の改善、筋肉のつっぱり・こわばり・けいれんを伴う筋肉痛や神経痛、さらには腰痛や肩こりなどに広く用いられている。最近では、抗がん剤治療後に生じる末梢神経障害 ( CIPN: Chemotherapy-Induced

Periphera 1 Neuropathy) に伴うしびれや痛みの予防および軽減に芍薬甘草湯が効果を示す可能性が報告されている<sup>8,9)</sup>。昨年、油症研究班の会議において、芍薬甘草湯が神経のしびれに有効である可能性が臨床研究結果として報告された。しかし、この報告は油症患者の一部を対象としたものであり、その効果は未だ明確ではないのが現状である。そこで、本研究では、ベンゾピレン暴露ラットにおける芍薬甘草湯の効果を、行動学的手法および分子生物学的手法を用いて検証することを目的とした。

## B. 研究方法

5週齢のWistar系雄ラット (SLC株、 静岡)を用い、コーンオイル 2週間連続投与後蒸留水投与群 (Corn-DW)、ベンゾピレン 2週間連続投与後蒸留水投与群 (Ben-DW)、ベンゾピレン 2週間連続投与後芍薬甘草湯投与群 (Ben-100 mg SKT および Ben-300 mg SKT) に分けた。

コーンオイル投与群にはコーンオイルを、ベンゾピレン投与群には 30mg/kg ベンゾピレンを、それぞれ経口投与器で 2 週間、一回 500  $\mu$ l ずつ胃に直接に投与した。2 週間のベンゾピレン投与後、コーンオイル投与群およびベンゾピレン投与群には蒸留水、芍薬甘草湯投与群には 100 mg/kg および 300 mg/kg の芍薬甘草湯を、それぞれ経口投与器を用いて 500  $\mu$ L ずつ、4 週間にわたり胃に直接投与した。時間的経過による感覚の変化は、小動物用電気刺激装置 (STG2000 バイオリサーチセンター) を用いて、電気刺激による感覚閾値を測定した。測定に際しては、ラットを拘束装置に入れて一定時間放置し、ラットが環境に慣れた頃合いをみて開始した。周波数は、5 Hz、250Hz、2000Hz の正弦波電気刺激を用い、覚醒下のラット右後肢足底部に与えた。刺激後、ラットの逃避反応が観察されるまでの時間を計測し、p-clamp ソフトウ

ェア (Axon Instrument 社製) で刺激時間から刺激強度 ( $\mu$  A) に換算した。測定はコーンオイルおよびベンゾピレン投与前と最終日のみ行った。最終日の行動実験後、直ちに 3 種混合麻酔薬を用いてラットを麻酔し、心臓から採血後に安楽死を誘導した。その後、坐骨神経を採取し、-80°C に凍結しました。凍結した坐骨神経標本は解凍後、T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク質を抽出した。得られたタンパク質抽出液は、cytochrome P450 1A1 (CYP1A1、Santa Cruz Biotechnology)、myelin-associated glycoprotein (MAG、Cosmo Bio)、 $\beta$ -Actin (Cell Signaling Technology) の抗体を用いて、タンパク質自動分析装置 WES (Protein Simple) で分析を実施した。血液試料は遠心分離し、取り出した血清を用いて、72 時間以内に酸化ストレスと抗酸化力の測定を行った。測定機器はフリーラジカル解析装置 FREE CARRIO DUO (WISMERLL 株) を用いた。

### (倫理面への配慮)

動物の飼育および実験に関しては、熊本保健科学大学動物倫理委員会の許可(登録番号、動 18-10)を得て行った。全身麻酔下でラットの心臓から採血を行い、その後過量の 3 種混合麻酔薬を腹腔内に追加投与して死に至らしめるため痛みなどの侵襲は殆ど無い。

## C. 研究結果

ベンゾピレンと芍薬甘草湯の経口投与後、電気刺激による感覚閾値の経時的变化を小動物用電気刺激装置で測定した。その結果、5Hz および 250Hz の電気刺激周波数における感覚閾値の測定では、各群で若干の閾値変化が認められたが、有意差はなかった (図 1A、B)。一方、2000Hz の電気刺激周波数での感覚閾値変化において、Corn+DW 群に対し、Ben+DW 群で感覚閾値の

有意な上昇が認められ、芍薬甘草湯を投与した Ben-100 mg SKT および Ben-300 mg SKT 群では、その感覚閾値上昇の抑制傾向または抑制が見られた（図 1C）。

ベンゾピレンと芍薬甘草湯の投与によるラットの行動変化および末梢神経内の変化の関連性を検討するため、坐骨神経を取り出し、アリル炭化水素受容体 (AHR) の活性を測定するために CYP1A1 タンパク質（図 2A）、閾値変化との関係を検討するために myelin-associated glycoprotein (MAG) タンパク質（図 2B）を測定した。AHR の標的遺伝子である CYP1A1 に関しては、Ben+DW 群で Corn+DW 群に対し CYP1A1 タンパク質の有意な発現増加が認められた。この増加は、芍薬甘草湯を投与した Ben-100 mg SYK および Ben-300 mg SYK 群で抑制が見られた。MAG タンパク質においては、Corn+DW 群に対し Ben+DW 群で発現減少が見られ、Ben-100 mg SKT および Ben-300 mg SKT 群ではその発現減少の抑制傾向が見られたものの、有意差は認められなかった。

ラットの行動変化と酸化ストレスの関連性を明らかにするため、酸化ストレス度への影響を検討した。Corn-DW 群に対し、Ben-DW 群で酸化ストレスの有意な上昇が認められ、その上昇は Ben-100 mg SYK および Ben-300 mg SYK 群で抑制傾向が見られたが、有意差はなかった（図 3A）。抗酸化力に関しては、Corn-DW 群に対し、Ben-DW 群で抗酸化力の低下が認められ、Ben-100 mg SKT および Ben-300 mg SKT 群では、Ben 群に対して抗酸化力低下の抑制傾向が見られた（図 3B）。これらの結果から、酸化ストレス度を計算した結果が図 3C に示されている。酸化ストレス度が BAP/d-ROMs  $\leq$  12.5 の場合、酸化ストレス状態とみなされる。酸化ストレス度に関しては、Ben-DW 群が Corn-DW 群に対して酸化ストレス状態であり、Ben-100 mg SKT および Ben-300 mg SKT 群では Ben-DW 群に対して

酸化ストレス状態の改善が認められた。

#### D. 考察

本実験では、ダイオキシン類似化合物であるベンゾピレンを投与したラットに対し、芍薬甘草湯の効果を行動学的評価法と分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、感覚閾値の測定において、ベンゾピレン投与群ではコーンオイル投与群に比べて感覚閾値の有意な上昇が認められた。一方、芍薬甘草湯投与群では、その感覚閾値上昇の抑制傾向が観察された。カネミ油症に関する報告では、患者の約 50% に感覚鈍麻、しびれ感、刺すような痛み、筋力低下、さらには運動機能障害が見られるとされている。これらの症状は、末梢神経障害や中枢神経障害によるものであり、特にダイオキシン類や PCB が長期間にわたり蓄積し、神経系に対する慢性的な毒性を与えることが関与しているとされている<sup>2-4)</sup>。末梢神経障害の一因として、末梢神経の A  $\beta$  線維や C 線維の損傷が関与していることが報告されており<sup>5-7)</sup>、これが感覚異常やしびれ感を引き起こすメカニズムの一つと考えられる。本研究の結果、ベンゾピレン投与による感覚閾値の上昇が、A  $\beta$  線維の伝導速度低下や 2000Hz の電気刺激での閾値上昇と関連している可能性が示唆されている。A  $\beta$  神経線維は 2000Hz の電気刺激によって選択的に刺激されることが知られており<sup>10)</sup>、この結果からベンゾピレンが引き起こす感覚異常は、A  $\beta$  線維の異常によるものであることが考えられる。閾値の上昇は神経障害や炎症によってみられ、感覚異常やしびれ感を引き起こすことが報告されている<sup>11, 12)</sup>。

さらに、ベンゾピレン投与ラットにおける AHR の活性化と脱ミエリン、酸化ストレスの関与についても検討した。ダイオキシン類の毒性は AHR を介して引き起こされることが報告されており、AHR 活性化による神経障害や炎症の進行が考えられる。こ

れに関連して、いくつかの生薬が AHR 活性を抑制することも報告されており<sup>13)</sup>、本研究でもその可能性が示唆されている。本研究では、ベンゾピレン投与ラットにおける感覚閾値の上昇と CYP1A1 タンパク質発現上昇、また MAG タンパク質の発現低下と酸化ストレス度の上昇を確認した。その結果、神経の伝導速度の低下が脱髓疾患によるものである可能性が高いことを示唆しており<sup>11-15)</sup>、ベンゾピレンによる神経毒性が  $\text{A}\beta$  線維の異常や脱髓に関与していることを裏付けている。近年、生薬の一つであるケイヒの主成分であるシンナムアルデヒドが AHR の標的遺伝子である CYP1A1 タンパク質の発現を抑制し、抗酸化ストレス作用が強いことが明らかになっている<sup>13)</sup>。本研究では、芍薬甘草湯がベンゾピレン中毒ラットにおける神経症状に与える影響を調べた結果、以下の重要な知見が得られた。

本研究では、漢方薬の一種である芍薬甘草湯がベンゾピレン中毒ラットに対する効果を検討した。その結果、ベンゾピレン中毒による感覚閾値上昇の抑制や CYP1A1 タンパク質発現の増加抑制、MAG タンパク質の発現低下の抑制傾向が確認された。また、酸化ストレス度の上昇が抑制される傾向が示され、これが神経保護に寄与している可能性が示唆されている。芍薬甘草湯は、血液不足や血行不良の改善、筋肉の緊張を緩和し、痛みを和らげる作用があるとされている。特に、筋肉痛や神経痛、腰痛や肩こりなどに広く使用されている。最近では、抗がん剤治療後の末梢神経障害の予防や軽減に有効であることが報告された<sup>8,9)</sup>。芍薬甘草湯には、芍薬と甘草が主に入っています。芍薬と甘草の成分には、強力な抗酸化作用、抗炎症作用、神経保護作用があることが報告されている<sup>16-19)</sup>。特に、芍薬の成分であるペオニフロリンやペオニカラシル、甘草の主要成分であるグリチルリチンが、神経炎症を抑制し、神経修

復を助ける作用を示すことが動物実験や細胞実験で報告されている<sup>16-19)</sup>。これらの成分は、ベンゾピレンの毒性に関する神経の炎症や酸化ストレスを軽減し、神経修復を促進する可能性があると考えられる。これらの報告から、芍薬甘草湯はベンゾピレンの毒性による神経損傷（脱髓）を抑制し、神経異常の改善に寄与する可能性が示唆される。

## E. 結論

本研究の結果、ベンゾピレンの投与は、その毒性が AHR を介して触覚および圧覚を伝達する  $\text{A}\beta$  線維に作用し、これらの線維の軸索変性を引き起こすことで感覚異常などの症状を引き起こした可能性が示唆された。一方、芍薬甘草湯は、抗炎症作用および抗酸化作用を通じて、ベンゾピレンの毒性による神経損傷を保護し、感覚異常の症状の改善に寄与する可能性が示唆された。これらの結果から、今後の神経疾患や神経障害の予防・治療において、芍薬甘草湯が有効な治療薬として利用できることが示唆された。

## 引用文献

- 1) Aoki Y : Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxin, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters what we have learned from Yusho disease. Environ Res, 86(1):2-11, 2001.
- 2) 黒岩義五郎, 村井由之, 三田哲司 : 油症患者における神経学的所見. 福岡医誌, 60 : 462-463, 1969.
- 3) 岩下宏, 志田堅四郎, 増田義人 : 慢性油症患者における頭痛, 四肢異常感と血中 PCB. 福岡医誌, 68 : 139-144, 1977.
- 4) 古谷博和, 大八木保政, 山田猛, 他 : 36 年以上経過した油症患者における神経症候. 福岡医誌, 96: 152-156,

- 2005.
- 5) 申 敏哲, 行平 崇, 小牧龍二, 他:感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討. 福岡医誌, 112(2) : 155-163, 2021.
  - 6) 小牧龍二, 行平崇, 福永貴之, 他:ベンゾピレンの投与による感覚障害モデルラットに対する Vitamin B2 関連物質  $\beta$ -NMN の効果検討. Journal of Kumamoto Health Science University, 20 : 01-10, 2023.
  - 7) 蜂須賀研二:自由走行がラットの acrylamide neuropathy に及ぼす影響-いわゆる overwork weakness について - リハ医学, 20:241-250, 1983.
  - 8) Kimata Y, Ogawa K, Okamoto H, et al.: Efficacy of Japanese traditional (Kampo) medicine for treating chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A retrospective case series study. World J Clin Cases. 4(10): 310-317, 2016.
  - 9) Andoh T, Kurokawa Y, Kato M, et al.: Local preventive effects of shakuyakukanzoto and paeoniflorin external gel on paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain in mice. Traditional & Kampo Medicine 9(3):186-191, 2022.
  - 10) 植田 弘師, 松本 みさき: ニューロメーターを用いた新しい知覚線維選択的侵害受容評価法. 日本薬理学雑誌, 131: 367-371, 2008.
  - 11) O'Neill J, Sikandar S, McMahon SB, et al.: Human psychophysics and rodent spinal neurones exhibit peripheral and central mechanisms of inflammatory pain in the UVB and UVB heat rekindling models. Pain, 156(9):16 66-1675, 2015.
  - 12) Bove GM, Delany SP, Hobson L, et al.: Manual therapy prevents onset of nociceptor activity, sensorimotor dysfunction, and neural fibrosis induced by a volitional repetitive task. Pain, 160(3):632-644, 2019.
  - 13) Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, et al: Inhibition of aryl hydrocarbon receptor signaling and induction of NRF2-mediated antioxidant activity by cinnamaldehyde in human keratinocytes. J Dermatol Sci, 85 (1): 36-43, 2017.
  - 14) Michalek JE, Akhtar FZ, Arezzo JC, et al: Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of Operation Ranch Hand. Neurotoxicol, 22(4): 479-490, 2001.
  - 15) Thömke F, Jung D, Besser R, et al: Cranial nerve function in workers exposed to polychlorinated dioxins and furans. Acta Neurol Scand, 106(3): 155-158, 2002.
  - 16) Zhu K, Zhu X, Liu S, et al: Glycyrrhizin Attenuates Hypoxic-Ischemic Brain Damage by Inhibiting Ferroptosis and Neuroinflammation in Neonatal Rats via the HMGB1/GPX4 Pathway. Oxid Med Cell Longev. 2022; 2022: 8438528.
  - 17) Kim MJ, Kang HH, Seo YJ, et al: Paeonia lactiflora Root Extract and Its Components Reduce Biomarkers of Early Atherosclerosis via Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects In Vitro and In Vivo. Antioxidants (Basel) 23;10(10):1507, 2021.
  - 18) Hong HZ, Lu X, Wu CS, et al: A

- review for the pharmacological effects of paeoniflorin in the nervous system. *Front Pharmacol.* 15;13:898955, 2022.
- 19) Lee YK, Roh SS. The Experimental Study of Glycyrrhiza uralensis on Wound Healing by Antioxidant Effect 大田大學校韓醫學研究所論文集. 25(1) :145-153, 2016.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

小牧 龍二, 福永 貴之, ○申敏哲. 舌への感覚刺激が脳血管性認知症モデルラットの認知機能低下に及ぼす影響. 第58回日本作業療法学会札幌コンベンションセンター11月9.10. 2024年11月9日-10日.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

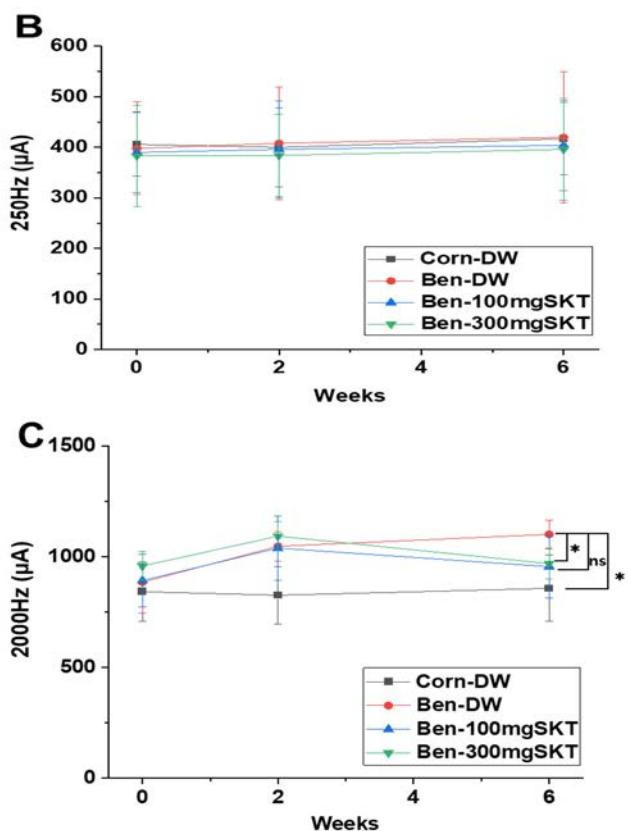
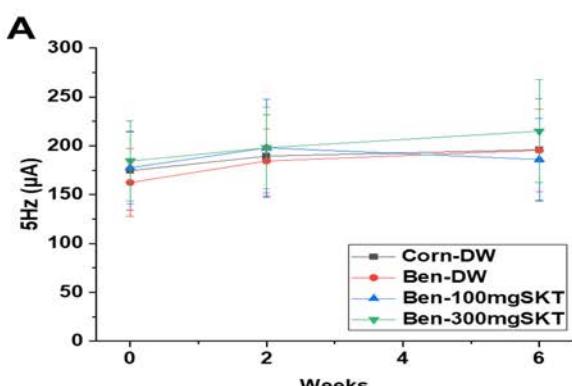
##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

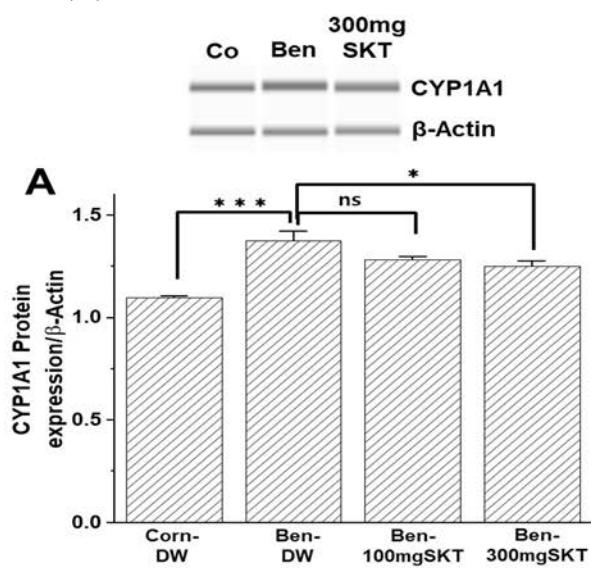
なし

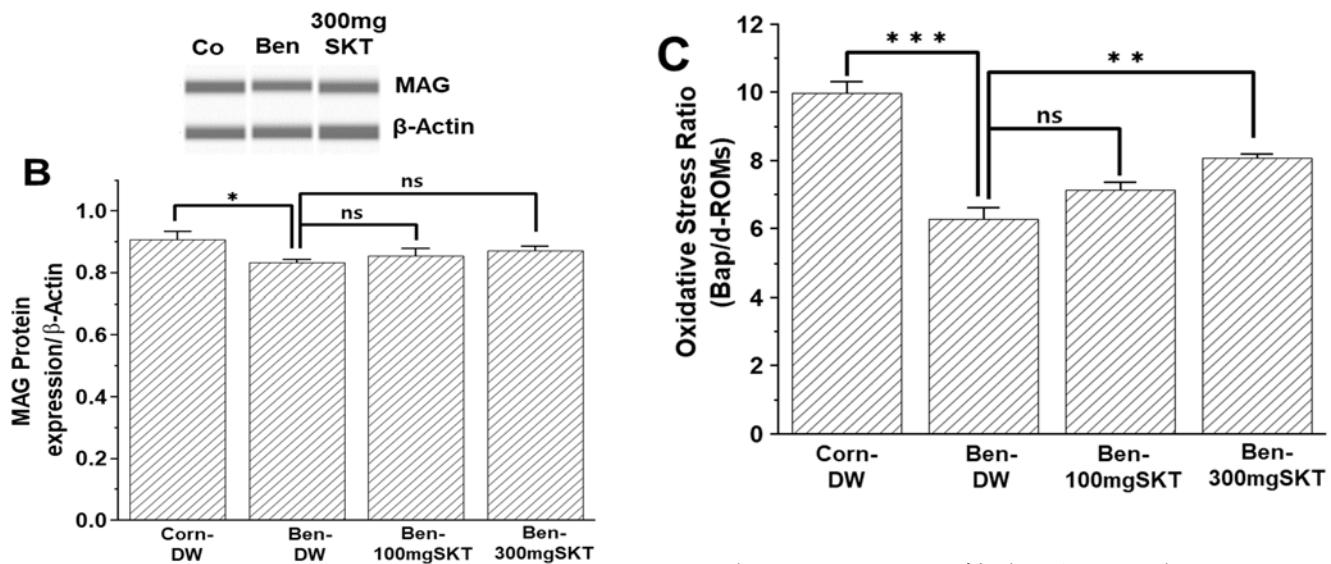
Fig 1. ベンゾピレンと芍薬甘草湯の投与がラットの感覚閾値の変化に及ぼす影響。



Corn, Corn-oil; DW, 蒸留水; Ben, 30mg/kg ベンゾピレン; SKT, 芍薬甘草湯。\*, P<0.05; ns, not significant; Mean±S.D.

Fig 2. ベンゾピレンと芍薬甘草湯の投与がラットの CYP1A1、MAG タンパク質の発現に及ぼす影響。





A、CYP1A1 タンパク質の変化; B、MAG タンパク質の変化; Co・Corn、Corn-oil; DW、蒸留水; Ben、30mg/kg ベンゾピレン; SKT、芍薬甘草湯; CYP1A1、cytochrome P450 (P450) 1A1; MAG、myelin-associated glycoprotein。\*、 $P<0.05$ ; \*\*\*,  $P<0.001$ ; ns、not significant; Mean±S.E.

A、酸化ストレス。B、抗酸化力。C、酸化ストレス度; Corn、Corn-oil; DW、蒸留水; Ben、30mg/kg ベンゾピレン; SKT、芍薬甘草湯; \*、 $P<0.05$ ; \*\*\*,  $P<0.01$ ; \*\*\*,  $P<0.001$ ; ns、not significant; Mean±S.E.

Fig 3. ベンゾピレンと芍薬甘草湯の投与がラットの酸化ストレス度に及ぼす影響。

