

分担研究報告書

ベンゾピレンの末梢神経および脊髄感覚系シナプス伝達に及ぼす作用に関する研究

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科学 准教授

研究協力者 吉村 恵 直方中村病院

研究要旨 ダイオキシン類似化合物による複合中毒であるカネミ油症患者では、末梢のしびれ感や感覚鈍麻、自律神経失調症などの末梢神経障害および中枢神経障害等が多く報告されている。その主な原因として末梢感覚神経の異常が考えられたため、ダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンを経口投与したラットを用い、後根付き神経節細胞から細胞内記録を行い、末梢神経の静止膜電位や伝導速度等を正常ラットのそれと比較検討した。また、脊髄後角におけるシナプス応答の可塑的な変化についても脊髄スライスに後根を付した標本を用い、ベンゾピレンの中枢性感覚神経系に及ぼす作用を検討した。その結果、 $A\beta$ 線維の伝導速度が有意に緩徐化していることを見いだしたが、 $A\delta$ やC線維には有意な変化は見られなかった。また、静止膜電位についても全ての群で有意な差を見いだすことは出来なかった。脊髄内感覚情報伝達に関しても、ベンゾピレンは膠様質細胞の自発性興奮性後シナプス電流および自発性抑制性後シナプス電流と、 $A\delta$ とC線維誘起シナプス応答の振幅には影響を与えないことが明らかになった。今回の結果からベンゾピレンは選択的に $A\beta$ 線維の伝導速度の緩徐化を惹起し、しびれなどの感覚異常を引き起こした可能性が示唆された。しかし、脊髄内膠様質でのシナプス応答には有意な変化が見られなかったことから、本研究の条件下ではダイオキシン類似化合物は主に末梢感覚神経に作用し、脊髄感覚神経におけるシナプス伝達には有意な変化を起こさないことが明らかになった。

A . 研究目的

Dioxin 類化合物による複合中毒であるカネミ油症患者では、約6割に自覚的感覚障害が存在するが末梢神経伝導速度検査や神経学的診察による客観的な検査では末梢神経障害を示すものは2割程度であり、自覚的な症状と他覚的なデータには乖離が見られる¹⁻³⁾。その原因として末梢神経伝導検査やベッドサイドにおける末梢神経検査では明らかな変化として捉えることが出来ない小さな変化が自覚症状として表れている可能性が否定出来ない。多くの患者が訴える手足のしびれ感や感覚鈍麻の発生、自律神経失調症などの末梢神経障害や中枢神経障害などの発生機序については未だ明らかではないが、その原因の一つとして求心性末梢感覚神経の異常が考えられた。そこで今回の研究では、カネミ油症の発生原因の一つであるベン

ゾピレンを経口投与して7日後のモデルラットを用い、後根付き後根神経節標本作製し、神経節細胞から細胞内記録を行い、末梢神経の静止膜電位や伝導速度等を正常ラットのそれらと比較検討した。また、脊髄後角におけるシナプス応答の可塑的な変化について検討するため、脊髄スライスに後根を付した標本を用いて、膠様質の細胞から自発性興奮性後シナプス電流 (sEPSC)、自発性抑制性後シナプス電流 (sIPSC)、および第一次感覚神経誘起EPSCを測定してベンゾピレンの感覚神経系に対する作用を検討した。

B . 研究方法

1) 実験動物

4~8週齢のSprague-Dawley(SD)系雄性ラットを用いた。ラットは市販の飼料および水を自由に摂取させ、動物舎の照明は12

時間ごとに明暗のコントロールし、室温と湿度は 22.0 と $55 \pm 5\%$ の条件下で飼育した。1 週間の適応期間の後、正常ラット群では Corn oil を、ベンゾピレン群ではベンゾピレン 0.3mg/kg、30mg/kg を 1 回のみ、経口投与器を用いて 200 μ l を胃に直接投与した。

(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 14 - 016)を得て行った。全身麻酔下にラットの後根神経節を取り出し、直ちに過量のウレタンを腹腔内に追加投与した後、心臓・大血管を切開して失血死させたため痛みなどの侵襲は殆ど無い。

2) 後根神経節標本の作製と静止膜電位・活動電位記録

Corn oil 又はベンゾピレンをそれぞれ経口投与し、7 日後にウレタン(腹腔内投与: 1.2~1.5 g/kg)麻酔下でラットから後根神経節に後根神経を付した標本を作製した。後根神経節を覆う結合組織を注意深く除去し、記録用チェンバーに設置したシルガードに微細なピンで固定し、微小ガラス電極を用いて神経節細胞から細胞内記録を行い、静止膜電位や後根刺激によって誘起された活動電位の振幅と伝導速度を調べ、正常ラットから得られたものと比較検討した。神経節細胞は A β , A δ および C ニューロンを含むため、各々のニューロンから記録を行い正常ニューロンとの相違を観察した。

3) 脊髄スライス標本の作製と後根刺激誘起シナプス応答記録法

成熟 SD 系雄性ラット(6~8 週齢)をウレタン(腹腔内投与: 1.2~1.5 g/kg)で深麻酔後、腰仙部の椎弓切除を行った。約 1.5 ~ 2.0 cm の長さで脊髄を摘出し、冷却した酸素飽和クレブス液(1~3)に入れた。

手術後直ちにラットに過量のウレタンを腹腔内に追加投与し、心臓・大血管を切開して出血死させた。実体顕微鏡下で、硬膜やクモ膜、軟膜を除去した後に、寒天ブロックに設けた溝に置き、マイクロスライサーを用いて厚さ約 600 μ m の横断スライスを作製した。後根を付した標本を得る場合には、一側の L5 の後根を残し、他の前根や後根を全て切除し、また温存した後根の周囲を除きクモ膜と軟膜を除去した後に、厚さ約 650 μ m の横断スライスを作製した。EPSC は -70 mV(Cl⁻チャンネル電流の逆転電位近く)の保持膜電位で IPSC が記録されない条件下で行った。一方、IPSC は 0mV(EPSC の逆転電位近く)において EPSC が記録されない条件下で行った。

C . 研究結果

1) ベンゾピレン投与が後根神経節に及ぼす影響

後根神経節細胞から細胞内記録を行い、後根神経節に存在する 3 種類の大きさの細胞から静止膜電位、自発性活動電位を記録した。いずれの線維においても自発性の活動電位は記録されなかった。次いで、後根刺激によって誘起される活動電位の刺激からの潜時と刺激部位からの長さを指標にして伝導速度を算出した。正常ラット群では、A β 線維の静止膜電位は -68 ± 1.7 mV でその伝導速度は 20.9 ± 0.6 m/s であった。A δ 線維は静止膜電位が -68 ± 3.0 mV でその伝導速度は 8.8 ± 0.8 m/s であった。また、C 線維の静止膜電位および伝導速度はそれぞれ -71 ± 3.7 mV, 0.8 ± 0.8 m/s であった。

次いで、ベンゾピレンを経口投与したラットから摘出した後根神経節細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、0.3mg/kg、30mg/kg ベンゾピレンを投与したラット群の静止膜電位には若干の差が見られるものの有意ではなかった。次に伝導速度を計測した。A β 線維の伝導速度で

は 0.3mg/kg ベンゾピレン投与群で 15.8 ± 1 m/s ($p < 0.05$)、30mg/kg ベンゾピレン投与群では 13.3 ± 0.1 m/s ($p < 0.05$) で有意に正常ラット群より遅かった。A δ 線維の伝導速度では 0.3 mg/kg ベンゾピレン投与群で 8.3 ± 0.6 m/s、30 mg/kg ベンゾピレン投与群では 8.4 ± 0.4 m/s で有意な変化は認められなかった。また、C 線維でも A δ 線維と同様に 0.3 mg/kg ベンゾピレン投与群で 0.8 ± 0.4 m/s、30 mg/kg ベンゾピレン投与群では 0.9 ± 0.4 m/s で有意な変化は認められなかった。

2) ベンゾピレン投与が膠様質細胞の自発性 EPSC (sEPSC) と IPSC (sIPSC) シナプス応答に及ぼす影響

脊髄後角において如何なる可塑的な変化が生じているかを検討した。正常ラット膠様質細胞から記録を行い、固定膜電位 -70 mV で sEPSC の頻度と振幅を 30mg/kg ベンゾピレン投与ラットのそれらと比較検討したが、有意な差は認められなかった。次に膜電位 0 mV で sIPSC の比較を行ったが、振幅および頻度には有意な差は見られなかった(図 1)。

3) ベンゾピレン投与が後根誘起シナプス応答に及ぼす影響

自発性応答に加えて後根刺激によって誘起される興奮性応答の発現率を調べた。3 種類の後根誘起シナプス応答の発現率では正常ラット群、ベンゾピレン投与群ともに発現率に有意な差は見られなかった(図 2)。また、有髄の A δ 線維や無髄の C 線維刺激によって誘起される EPSC を膠様質細胞から記録し、それぞれの振幅について検討した。A δ 線維刺激によって潜時の短い EPSC が、C 線維刺激によって線維の長い EPSC が記録された。それぞれの振幅と潜時を正常ラットのそれらと比較検討したが有意な差は認められなかった。

D . 考察

カネミ油症患者では、神経のしびれ感や感覚鈍麻の発生などの末梢神経障害および中枢神経障害が多く報告されている⁴⁾。今回の実験ではベンゾピレンを経口投与した7日後のラットを用い、後根付き後根神経節標本から末梢神経の静止膜電位や伝導速度等を正常ラットのそれらと比較検討した。その結果、ベンゾピレン投与ラットの後根神経節の A β 線維で伝導速度が有意に低下している結果を得たが、A δ 線維と C 線維では若干の差は見られたが有意差は無かった。しかし、静止膜電位では群間有意な差を見いだすことは出来なかった。A β 線維の伝導速度の緩徐化は、末梢のしびれ感と関係が有る可能性がある。A β 線維は A δ や C 線維と比較して機械的な圧迫によって機能障害を容易に起こすことが知られている¹⁾。末梢神経、特に太い感覚神経の伝導速度の低下は感覚鈍麻やしびれと密接に関連しており、正座時には太い線維から障害を受け、脚のしびれや感覚鈍麻を来す現象と類似する。これは油症患者が訴えるしびれ感や感覚鈍麻と良く一致しており、それらは主に末梢神経の機能異常によって発生している可能性が高いと考えられる。ここで問題になるのは A β 線維にのみ有意な変化が惹起され、同じ有髄の A δ 線維には何ら有意な変化が見られなかったことである。この点についての検討は電気生理学的な手法では明らかにすることは不可能と考えられ、今後、神経化学的、分子生物学的な手法を用いた説明が必要と思われる。所で、今までの多くの基礎研究から末梢神経の異常は容易に脊髄内での可塑的な変化を引き起こす事が知られている。そのため脊髄内でも何らかの変化が惹起されているものと考えられた。従って、本研究では脊髄後角におけるシナプス応答の可塑的な変化について脊髄スライスに後根を付した標本を用いて検討した。しかし、sEPSC および sIPSC

いずれも有意な変化を見いだすことは出来なかった。また、A δ 及びC線維誘起 EPSCの振幅にも有意な変化はみられなかった。感覚異常は長期に渡って持続すること、脊髄内では可塑的な変化が見られないことから、末梢神経の伝導異常には、A β 線維を包む髄鞘における異常、例えば脱髄などの関与が考えられる。もう一つの可能性は、今回記録を行った膠様質細胞は主にA δ とC線維の入力を受けており、A β 線維からの入力は少ない。実際に後根刺激によって誘起される興奮性応答の発現率をみるとA β 線維の応答がほとんど記録できない。そのためスライス標本を用いた実験ではA β 線維の伝導速度の低下による影響が少く、膠様質における可塑的な変化を捉えることが出来なかった可能性がある。A β 線維は膠様質よりIII層以下の深部に入力しているため、深層の細胞からの記録が必要と考えられる。今後、膠様質のみでなく深層の細胞からも記録を行い、脊髄内においても異常が惹起されているか否かを詳細に調べる必要がある。

E . 結論

正常ラットとベンゾピレン投与ラットの後根神経節細胞から細胞内記録を行った。その結果、A β 線維の伝導速度が有意に緩徐化していることを見いだしたが、A δ やC線維には影響を与えなかった。しかし、静止膜電位では全ての群で有意な差を見いだすことは出来なかった。また、正常とダイオキシシン投与ラットの脊髄スライス標本を用い、脊髄膠様質細胞から記録を行い、脊髄内での可塑的な変化を検討したが、少なくとも膠様質細胞では有意な変化は見られなかった。今回の結果からベンゾピレン投与はA β 線維の伝導速度の変化を起こし、しびれなどの感覚異常を引き起こす可能性が示唆された。

引用文献

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 古谷博和, 大八木保政, 山田猛, 三好甫, 藤井直樹, 吉良潤一. 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
- 4) 金谷邦人, 山下敏彦, 川口哲, 竹林庸雄, 片平弦一郎. 腰椎椎間板ヘルニアにおける current perception threshold. 臨床整形外科. 38(3), 301 - 305, 2003

F . 研究発表

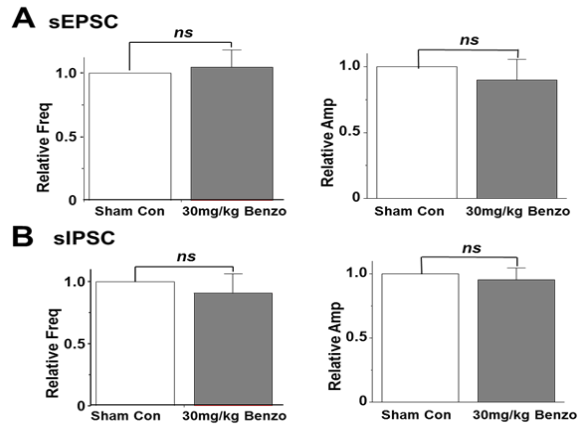
1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

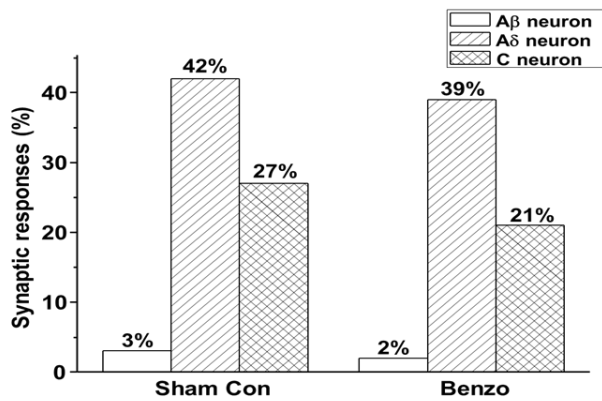


図 1. ベンゾピレン投与が自発性 EPSC と IPSC に及ぼす影響



Sham Con, Sham Control; Benzo, benzo[a]pyrene; Freq, Frequency; Amp, Amplitude; ns, no significance; Mean±SE

図 2. ベンゾピレン投与が後根誘起シナプス応答の発現率に及ぼす影響



Sham Con, Sham Control; Benzo, benzo[a]pyrene; Mean±SE