

分担研究報告書

ベンゾピレンの投与がラットに及ぼす影響に対する 行動学的、電気生理学的、分子生物学的検討

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 准教授
研究協力者 吉村 恵 医療法人社団温故会 直方中村病院 病院長

研究要旨 ベンゾピレンの投与がラットの求心性末梢神経と行動変化に及ぼす影響について行動学的手法、電気生理学的手法、分子生物学的手法を用いて正常ラットと比較検討した。その結果、VON FREY 式刺激装置を用いた感覚変化の検討では、ベンゾピレン投与群で時間経過とともに多少の閾値上昇による逃避反応の遅延が見られた。行動実験終了後、ラットの後根神経節標本を作製し、活動電位の伝導速度を比較した結果では、ベンゾピレン投与ラットの後根神経節の A 線維で伝導速度の低下がみられた。また、myelin basic protein (MBP) の検討では正常ラット群に対し、ベンゾピレン投与群で若干の MBP の低下が見られたが有意差はなかった。これらの結果から、ベンゾピレン投与は触・圧覚を伝える A 線維の髄鞘に影響を及ぼし、活動電位の伝導速度を低下させることで感覚の鈍麻等を引き起こした可能性が示唆された。

A . 研究目的

1968 年カネミ油症事件発生後、初期の激しい症状は消退傾向にあるが、現在でもしびれや頭重などの神経症状、倦怠感などの全身症状、痤瘡様皮疹などの皮膚症状など様々な症状が後遺症として残っている¹⁾。カネミ油症は脱臭のために熱媒体として使用された PCB(ポリ塩化ビニル)による中毒であり、多くの患者で末梢の感覚鈍麻やしびれ感、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が報告されている。しかしその発生機序については未だ明らかにされていない²⁻⁴⁾。近年、我々の研究結果によると、ダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンの投与は A 線維の伝導速度に影響を与える可能性が示唆された。しかし、ベンゾピレン投与によるラットの求心性末梢神経での影響と行動変化に対する関連性は未だ明らかではない。そこで、ベンゾピレン投与後 1 ヶ月間のラットを利用し、行動学的手法、電気生理学的手法、分子生物学的手法を用

いて求心性末梢神経に対するベンゾピレンの時間経過的作用とラットの行動変化を正常ラットと比較検討した。

B . 研究方法

4 週齢の SD 系雄性ラット(九動株, 熊本)を用い、正常ラット群では Corn oil、ベンゾピレン群では 30 mg/ kg ベンゾピレンを Corn oil に混ぜ経口投与し、時間的経過による感覚の変化を UGO BASILE 社製の VON FREY 式刺激装置を用いて測定した。ラットを測定装置に入れ、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。測定に際しては 5 分以上間隔を開けて合計 3 回施行した。また、ラットの行動実験後、深麻酔下で後根神経節に後根神経を付した標本を作製した。その一部の後根神経節を記録用チェンバーに設置後、微小ガラス電極を用いて神経節細胞から細胞内記録をとり、静止膜電位や末梢神経刺激によって誘起される活動電位の伝導速度を調べ、正常ラットから得られたものと比

較検討した。また、一部の後根神経節は -80 に冷凍保存し、Western Blot 法を用いた myelin basic protein(MBP、abcam) の発現検討に使用した。冷凍した後根神経節は解凍後、Lysis buffer を用いてタンパク質を抽出し、得られたタンパク質抽出液を 10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパク質を分離しこれを PVDF 膜に転写した。この PVDF 膜上の MBP による検出は既報に従って実施した。

(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、その後、過量のウレタン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

ベンゾピレンの経口投与後、時間的経過による感覚の変化を VON FREY 式刺激装置を用いて測定した。その結果、Corn oil 経口投与した正常ラット群より 30 mg/ kg ベンゾピレン投与群で時間の経過とともに多少の閾値上昇が見られた。ベンゾピレン投与 7 日目では 1.12 ± 0.12 、14 日目では 1.08 ± 0.16 、31 日目では 1.11 ± 0.16 で閾値上昇による逃避反応の遅延が見られた(図 1)。

行動実験における逃避反応の遅延と求心性末梢神経の伝導速度の関係を検討するために、逃避反応の遅延が安定した 14 日目のラットを用いて行動実験終了後、深麻酔下で後根神経節の標本を作製し、細胞内記録で末梢神経刺激によって誘起される活動電位の伝導速度を正常ラットから得られたものと比較検討した。Corn oil を経口投与した正常ラット群の A 線維の伝導速度は 22.5 ± 0.8 m/s、A 線維では 9.3 ± 0.7 m/s、C 線維では 0.9 ± 0.4 m/s

であった。30 mg/kg ベンゾピレン投与群の A 線維の伝導速度は 17.2 ± 0.9 m/s、A 線維では 8.7 ± 0.8 m/s、C 線維では 0.8 ± 0.6 m/s であり、A 線維の伝導速度が正常ラット群より低下していることが認められた。

神経線維の伝導速度変化と髄鞘(myelin)の関係を検討するために Corn oil 又はベンゾピレンを投与したラットより得られた後根神経節に後根神経を付した標本を冷凍凍結後、ホモジナイズし、Western Blot 法による myelin 量の解析を行った。図 2 は myelin の Western Blot の結果を示す。Myelin 量は Corn oil 投与した正常ラット群に対し、30 mg/kg ベンゾピレン投与群で若干の低下が見られたが有意差はなかった。

D . 考察

油症の発生から 45 年以上時間が経過しているが、現在でもダイオキシン類特有の症状に悩まされている患者がいる。これら患者の血液中ポリ塩化ビフェニールやダイオキシン類濃度は健常人により高濃度を示している¹⁾。PCB、PCDF、dioxin 等の Dioxin 類化合物による神経障害は感覚神経障害が主であり、末梢神経障害によるものと考えられている。発症時には 39.1%であった自覚的感覚異常の患者は、30 年が過ぎた最近では 59.4 %まで増加している⁵⁻⁷⁾。

今回の実験では、ベンゾピレン投与がラットの求心性末梢神経と行動変化に及ぼす影響について行動学的手法、電気生理学的手法、分子生物学的手法を用いて正常ラットと比較検討した。その結果、VON FREY 式刺激装置を用いた感覚変化の検討では、30 mg/ kg ベンゾピレン群で時間経過とともに多少の閾値上昇による逃避反応の遅延が見られた。行動実験終了後ラットの後根神経節標本を作製し、活動電位の伝導速度を比較した結果では、ベンゾピレン投与

ラットの後根神経節の A 線維で伝導速度が低下している結果を得た。しかし、A

線維と C 線維では若干の差がみられたものの有意差は無かった。古谷ら⁴⁾によるとカネミ油症患者では、感覚鈍麻や神経のしびれ感などの末梢神経障害および中枢神経障害が多いと報告している。末梢神経の障害による感覚異常の場合、感覚神経の伝導速度の遅延を認めることが多い⁸⁾。これらの結果から、ベンゾピレン投与は触・圧覚を伝える A 線維に作用し、活動電位の伝導速度を低下させることで感覚の鈍麻を起こした結果、ラット足裏の触・圧覚刺激による逃避反応の遅延がみられた可能性が示唆される。

Western Blot 法を用いた MBP の検討では正常ラット群に対し、ベンゾピレン群で若干の MBP の低下が見られたが有意差はなかった。髄鞘(Myelin)は伝導性が低いため、髄鞘化された神経線維は神経パルス伝導速度が速くなることが知られている。神経細胞の軸索を取り巻く髄鞘には障害が生じるが、中の軸索は保たれる現象を脱髄という。脱髄は発生部位により視力障害、運動麻痺、感覚障害、排尿障害、精神症状など異なる症状が生じることが報告されている⁸⁾。また、脱髄性病変による感覚障害の電気生理学的検討では、感覚神経の伝導速度遅延が報告されている^{8,9)}。MBP は脳や脊髄神経細胞の軸索に分布し、髄鞘を形成する基本的な蛋白質である。今回の実験では MBP を用いて、逃避反応の遅延、A

線維の伝導速度低下と脱髄の関連性を検討したが有意差はみられなかった。これは、ベンゾピレンが A と C 線維ではなく、A 線維のみに影響を及ぼしたことと、また、A 線維の伝導速度を完全に低下をさせてはいないことから、一部の髄鞘でのみ脱髄が起ったために、明確な差がみられなかった可能性も考えられる。今後、髄鞘を形成する他の蛋白質である、myelin associated glycoprotein (MAG) や

myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)も更なる検討が必要と考えられる。

E . 結論

本実験ではベンゾピレン投与が求心性末梢神経とラットの行動変化に及ぼす影響を行動学的手法、電気生理学的手法、分子生物学的手法を用いて正常ラットと比較検討した。その結果、その結果、VON FREY 式刺激装置を用いた感覚変化の検討では、ベンゾピレン投与群で時間経過とともに多少の閾値上昇による逃避反応の遅延が見られた。行動実験終了後、ラットの後根神経節標本を作製し、活動電位の伝導速度を比較した結果では、ベンゾピレン投与ラットの後根神経節の A 線維で伝導速度の低下がみられた。また、myelin basic protein (MBP) の検討では正常ラット群に対し、ベンゾピレン投与群で若干の MBP の低下が見られたが有意差はなかった。これらの結果から、ベンゾピレン投与は触・圧覚を伝える A 線維の髄鞘に影響を起こし、活動電位の伝導速度を低下させることで感覚の鈍麻等を引き起こした可能性が示唆された。

引用文献

- 1)Aoki Y : Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, 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 , 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.

- 5) Chia LG, Chu FL: A clinical and electrophysiological study of patients with polychlorinated biphenyl poisoning. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 48(9):894-901, 1985.
- 6) Michalek JE, Akhtar FZ, Arezzo JC, Garabrant DH, Albers JW: Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of Operation Ranch Hand. Neurotoxicology 22(4):479-90, 2001.
- 7) Thömke F, Jung D, Besser R, Röder R, Konietzko J, Hopf HC: Cranial nerve function in workers exposed to polychlorinated dioxins and furans. Acta Neurol. Scand. 106(3):155-158, 2002.
- 8) 産井良之, 楠進: 末梢神経の障害. 日本内科学会雑誌. 97(8): 1771-1777, 2008.
- 9) 荒記俊一, 村田勝敬: 鉛による末梢神経障害の診断. 26(1): 3-8, 1984.

F. 研究発表

1. 論文発表

申 敏哲, 吉村 恵. 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. Fukuoka Acta Med, 108(3), 27-34, 2017.

2. 学会発表

無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

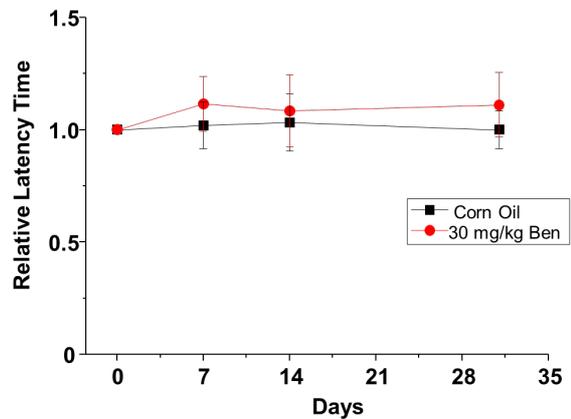
2. 実用新案登録

無し

3. その他

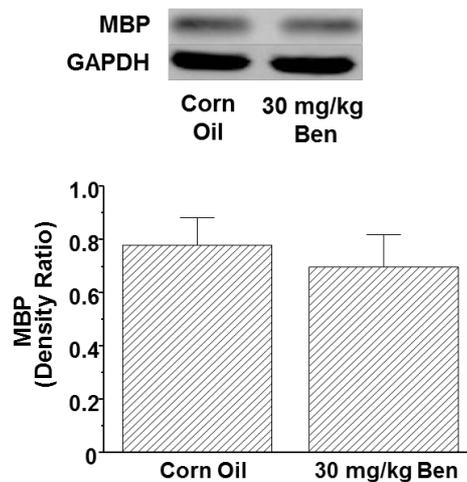
無し

図 1. ベンゾピレン投与による時間的感覚の変化



Ben, ベンゾピレン. n=5

図 2. ベンゾピレン投与が末梢神経 myelin basic protein (MBP) による時間的感覚の変化



MBP, myelin basic protein; Ben, ベンゾピレン. n=4