

分担研究報告書

ベンゾピレン投与ラットに対する感覚評価を用いたケイヒの効果検討

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 準教授
研究協力者 吉村 恵 療法人社団温故会 直方中村病院 病院長

研究要旨 ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果を 3 種類の感覚刺激による定量的閾値評価と酸化ストレス・抗酸化力の測定方法を用いて検討した。その結果、5Hz、250Hz の電気刺激周波数において、各群有意な閾値の変化はみられなかった。2000Hz の電気刺激周波数ではベンゾピレン投与群で感覚閾値上昇がみられたが、その閾値上昇はケイヒの投与により抑制傾向にあった。また、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で抗酸化力の上昇傾向がみられた。本研究の結果から、ケイヒ等がダイオキシン類化合物による複合中毒でみられる感覚異常の症状改善に寄与する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であるカネミ油症事件発生からおおよそ 50 年の時間が経過しているが、現在までも頭痛などの神経症状、倦怠感などの全身症状、痤瘡様皮疹などの皮膚症状などの後遺症が報告されている¹⁾。特に、多くの患者で末梢の感覚鈍麻やしびれ感、自律神経失調症等の末梢神経障害および中枢神経障害が報告されているが、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、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で、ベンゾピレン投与は A 神経線維の伝導速度低下に影響を与える可能性が示唆された。A 線維の伝導速度の緩徐化は、末梢のしびれ感と関係があると報告されている⁵⁾。ダイオキシン類の毒性の大半は、芳香族炭化水素受容体(arylhydrocarbon receptor、以下 AHR)を介して発揮されるが、様々な植物成分や生薬がこの AHR 活性を抑制させることが報告されている。特に、生薬の中でケイヒの主成分であるシンナムアルデヒドが AHR 活性を阻害するとともに、酸化ストレス作用を発揮することが Uchira⁶⁾によって明らかになった。しかし、

ベンゾピレン投与による感覚異常に対する生薬の効果はまだ明らかになっていない。そこで本実験では、生薬の中で AHR 活性を阻害することが出来ると報告されたケイヒをベンゾピレン投与ラットに投与し、3 種類の正弦波電気刺激(5Hz、250Hz、2000Hz)の感覚刺激による定量的閾値評価と酸化ストレス・抗酸化力の測定方法を用いて、ベンゾピレン投与ラットの感覚異常に対するケイヒの効果を検証した。

B . 研究方法

5 週齢の Wistar 系雄性ラット(九動株、熊本)を用い、ベンゾピレン投与群、ベンゾピレン+1mg/kg ケイヒ投与群、ベンゾピレン+5mg/kg ケイヒ投与群に分けた。ベンゾピレン投与は 30mg/kg ベンゾピレンを、経口投与器を用いてそれぞれ一回 200 μ l を胃に直接投与した。ベンゾピレン投与 1 日後から、ベンゾピレン投与群には蒸留水を、ケイヒ投与群では 1mg/kg と 5mg/kg のケイヒをそれぞれ経口投与器を用いて 500 μ l ずつ、1 ヶ月間胃に直接投与した。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。ラットは拘束装置に入れ、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。周波数 5Hz、250Hz、2000Hz の正弦波電機刺激を覚醒下のラット右後肢足底部に与え、刺激を与えてからラットの逃避反応が観察された時点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 (μA) を換算した。最終日の行動実験実施後、直ちに 3 種混合麻酔薬を用いてラットを麻酔し、心臓から採血を行った。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 社) 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

ベンゾピレンの経口投与後、電気刺激による感覚閾値の経時的変化を小動物用電気刺激装置で測定した。その結果、5Hz の電気刺激周波数による感覚閾値では、ベンゾピレン投与群で、投与前 0 週目 $78.17 \pm 8.22 \mu\text{A}$ 、1 週目 $81.12 \pm 5.97 \mu\text{A}$ 、2 週目 $76.43 \pm 10.3 \mu\text{A}$ 、3 週目 $77.84 \pm 7.33 \mu\text{A}$ 、4 週目 $75.94 \pm 12.11 \mu\text{A}$ であり、ベンゾピレン投与 4 週間後にわずかな感覚閾値の低下がみられたが、有意差は認められなかった。ベンゾピレン + 1mg/kg ケイヒ投与群およびベンゾピレン + 5mg/kg ケイヒ投与群では、投与前 0 週目でそれぞれ $80.96 \pm 8.12 \mu\text{A}$ 、 $78.95 \pm 11.24 \mu\text{A}$ 、4 週目では $81.64 \pm 13.78 \mu\text{A}$ 、 $75.39 \pm 10.31 \mu\text{A}$ であ

り、ベンゾピレン投与群と有意な差はみられなかった (Fig.1A)。250Hz の電気刺激周波数による感覚閾値では、ベンゾピレン投与群で、投与前 0 週目 $98.21 \pm 9.847 \mu\text{A}$ 、1 週目 $100.54 \pm 10.56 \mu\text{A}$ 、2 週目 $97.33 \pm 11.78 \mu\text{A}$ 、3 週目 $103.69 \pm 17.46 \mu\text{A}$ 、4 週目 $97.84 \pm 13.71 \mu\text{A}$ であり、ベンゾピレン投与 4 週間後でも感覚閾値の有意な変化はみられなかった。1mg/kg と 5mg/kg のケイヒを投与した群では、それぞれ投与前 0 週目で $98.63 \pm 11.56 \mu\text{A}$ 、 $101.16 \pm 10.12 \mu\text{A}$ 、4 週目では $102.14 \pm 12.45 \mu\text{A}$ 、 $100.52 \pm 12.47 \mu\text{A}$ であり、ベンゾピレンのみの投与群と有意な差はみられなかった (Fig.1B)。2000Hz の電気刺激周波数による感覚閾値では、ベンゾピレン投与群で、投与前 0 週目 $430.35 \pm 27.56 \mu\text{A}$ 、1 週目 $455.45 \pm 30.95 \mu\text{A}$ 、2 週目 $475.67 \pm 37.42 \mu\text{A}$ 、3 週目 $467.84 \pm 31.97 \mu\text{A}$ 、4 週目 $471.78 \pm 33.45 \mu\text{A}$ であり、ベンゾピレン投与 4 週間後感覚閾値の上昇がみられた。ベンゾピレン投与後 1mg/kg 又は 5mg/kg のケイヒを投与した群では、それぞれ投与前 0 週目で $429.89 \pm 35.08 \mu\text{A}$ 、 $433.11 \pm 36.41 \mu\text{A}$ 、4 週目では $457.23 \pm 37.75 \mu\text{A}$ 、 $450.69 \pm 32.42 \mu\text{A}$ であり、ベンゾピレン投与群に対して感覚閾値の上昇が抑制された (Fig.1C)。

酸化ストレスの変化について検討した結果では、ベンゾピレン投与群に対し、1mg/kg 又は 5mg/kg ケイヒ投与群で、酸化ストレスの若干抑制がみられたが、有意差は認められなかった (Fig.2A)。抗酸化力に関しては、ベンゾピレン投与群に対し、1mg/kg と 5mg/kg ケイヒ投与群で抗酸化力の上昇傾向がみられたが、有意差は認められなかった (Fig.2B)。

D . 考察

カネミ油症事件は PCB、PCDF、dioxin 等の dioxin 類化合物の複合中毒であり、末梢神経障害と考えられる感覚神経障害

等が多く報告されている。発症時には自覚的感覚異常の患者が 39.1%であったが、30 年経過した近年では、患者の 59.4 %に感覚異常の増加が報告されている⁷⁻⁸⁾。

今回の実験では、ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果を検討する為に電気刺激による感覚閾値の評価を実施した。その結果、5Hz と 250Hz の電気刺激を用いた感覚閾値ではベンゾピレン投与ラット群及びベンゾピレン+ケイヒ投与ラット群共に有意な変化はみられなかった。しかし、2000Hz の電気刺激を用いた感覚閾値では、ベンゾピレン投与ラット群で感覚閾値の上昇がみられたが、ケイヒ投与ラット群ではその感覚閾値上昇の抑制傾向がみられた。近年、我々はベンゾピレン投与ラットを用いた実験で、ベンゾピレンが A

神経線維の伝導速度を低下させることを報告している⁵⁾。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⁹⁾。植田ら¹⁰⁾は、5Hz の刺激により C 線維、250Hz の刺激により A 線維、2000Hz の刺激により A

線維を選択的に刺激することが出来ると報告しており、現在臨床でもニューロメーターとして使用している。Koga ら¹¹⁾はラットの DRG を用いた実験で、2000Hz の刺激では A 線維、5Hz の刺激では主に C 線維を選択的に刺激することが出来ると報告している。しかし、250Hz の刺激では A 線維と A 線維の両方を活性化させるが、痛みを伴う感覚が同時に生じる場合は、触覚は知覚されないとしている。これらのことから、本研究での 2000Hz の電気刺激による閾値上昇は A 線維に起因する感覚異常である可能性が考えられる。

本研究の結果、2000Hz の電気刺激で上昇したベンゾピレン群の感覚閾値はケイヒと一緒に投与した群で閾値の上昇抑制

傾向がみられた。ダイオキシン類の毒性は、AHR を介して起こることと、様々な植物成分や生薬がこの AHR 活性を抑制することが報告されている。特に、桂枝茯苓丸の生薬の一つである、ケイヒ、その主成分であるシンナムアルデヒドが AHR 活性を阻害するとともに、抗酸化ストレス作用も持つことが明らかになっている⁶⁾。本研究の結果でも、統計的に有意差はみられなかったが、ケイヒ投与群で酸化ストレスの若干の抑制と抗酸化力の上昇傾向がみられ、また、ベンゾピレン群の感覚閾値上昇がケイヒの投与により閾値上昇抑制傾向がみられたことから、ベンゾピレンによる感覚異常はケイヒの抗酸化作用と AHR 活性の阻害作用により改善された可能性が考えられる。

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、感覚異常等を発生させる可能性が示唆された。また、その作用は抗酸化作用と AHR 活性の阻害作用があるケイヒの投与により抑制されることで感覚異常を改善されることが出来る可能性が示唆された。

E . 結論

本研究の結果から、抗酸化作用と AHR 活性の阻害作用持つケイヒ等がダイオキシン類化合物による複合中毒でみられる感覚異常の症状改善に寄与する可能性が示唆された。しかし、更なる研究を通して、最も効果的な濃度の検討と慢性中毒モデルでの効果検討が必要である。

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, 他: 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, 他: 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, 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, 他: 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.
- 6) Uchi H, 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.
- 7) Michalek JE, et al: Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of Operation Ranch Hand. Neurotoxicol. 22(4):479-90, 2001.
- 8) Thömke F, et al: Cranial nerve function in workers exposed to polychlorinated dioxins and furans. Acta Neurol. Scand. 106(3):155-158, 2002.
- 9) 産井良之, 他: 日本内科学会雑誌. 97(8):1771-1777, 2008.
- 10) 植田 弘師, 他: 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) Koga K, et al. Selective Activation of Primary Afferent Fibers Evaluated by Sine-Wave Electrical Stimulation. Mol. Pain 1:13, 2005.

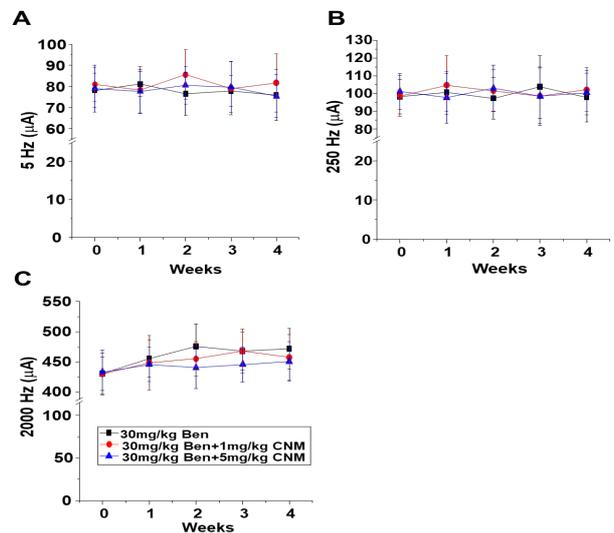
F. 研究発表

1. 論文発表
無し
2. 学会発表
無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

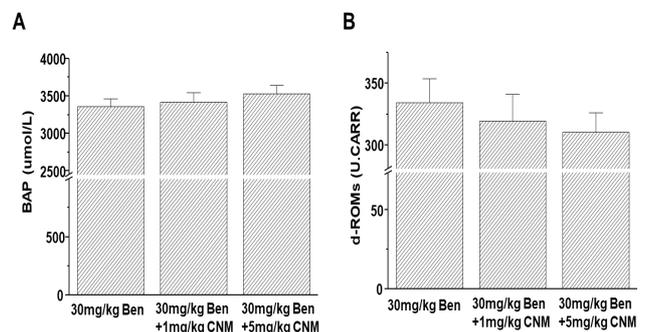
1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

Fig1. ベンゾピレン又はベンゾピレン+ケイヒ投与がラットの各電気刺激周波数による感覚閾値の経時的変化に及ぼす影響



A, 5 Hz 電気刺激周波数. B, 250 Hz 電気刺激周波数. C, 2000 Hz 電気刺激周波数. Ben, ベンゾピレン. CNM, ケイヒ. Mean \pm S.D. n=5

Fig2. ベンゾピレン又はベンゾピレン+ケイヒ投与がラットの抗酸化力と酸化ストレスに及ぼす影響



A, 抗酸化力. B, 酸化ストレス. Ben, ベンゾピレン. CNM, ケイヒ. Mean \pm S.E. n=5.