

分担研究報告書

Myelin proteins を用いたベンゾピレン投与ラットでの生薬の効果検討

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、感覚刺激による定量的閾値評価法、酸化ストレス・抗酸化力の測定法、Western blot 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が、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の有意な上昇がみられ、その閾値上昇はケイヒの投与により有意に抑制された。酸化ストレス度に関しては、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で有意な酸化ストレス状態の改善が見られた。また、Western blot 法を用いた myelin basic protein (MBP)、cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1)、myelin-associated glycoprotein (MAG) の発現検討では、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒの投与群で MAG の発現低下の抑制、CYP1A1 の発現増加の抑制がみられた。しかし、MBP の発現に関しては群間有意な差はみられなかった。本研究の結果から、ベンゾピレン投与はその毒性が触・圧覚を伝える A 線維に作用し、脱髄を起こすることで、感覚異常等を発生させた可能性が示唆された。また、その作用は抗酸化作用と AHR 活性化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が改善され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患者は、現在でも様々な後遺症で苦しんでいる¹⁾。特に、一部の患者では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等が報告されている²⁻⁴⁾。近年、ベンゾピレン(ダイオキシン類似化合物)を用いた動物実験の結果、ベンゾピレン投与ラットで末梢のしびれ感等に関連する A 神経線維の伝導速度が低下していることが確認された。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⁾。ベンゾピレンの様な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ことが報告されている。また、Uchi ら⁶⁾はその AHR の活性を様々な植物成分や生薬で抑制させることが出来ると報告している。特に、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、抗酸化ストレス作用を発揮することが明らかになっている。近年、我々はベンゾピレン投与ラットにケイヒを投与し、その効果を検討した結果、ケイヒの投与がベンゾピレン投与ラットの感覚異常を改善させる可能性を確認した。しかし、そのケイヒの効果やメカニズムはまだ明らかではない。そこで本実験では、ベンゾピレン投与ラットにケイヒを投与し、5Hz、250Hz、2000Hz の正弦波感覚刺激による定量的閾値評価法、ウェスタンブロット法、酸化ストレス・抗酸化力測定法を用いて、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確認することを目的とした。

B . 研究方法

5 週齢の Wistar 系雄性ラット(SLC株、静岡)を用いた。ベンゾピレン投与群、ベ

ンゾピレン+ケイヒ投与群に分けた。ベンゾピレン投与は 30mg/kg を、経口投与器を用いてそれぞれのラットに一回 500 μ l ずつ胃に直接投与した。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、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、2 週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。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 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 (μ A) 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、心臓から採血後、左右の坐骨神経と脊椎標本を採集し、-80 に凍結した。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 社) を用いた。凍結した坐骨神経と脊椎標本は解凍後、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 (P450) 1A1 (CYP1A1, Santa Cruz Biotechnology)、myelin basic protein (MBP, Cosmo Bio)、myelin-associated glycoprotein (MAG, Cosmo Bio)、2,3-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase (CNPase、GENETEX)、 α -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) により分離し分析を実施した。

(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 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 2 週間後わずかな感覚閾値の変化がみられたが、有意差は認められなかった。また、ベンゾピレン+ケイヒ投与群でもベンゾピレン投与群と比較し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に関しても、ベンゾピレン投与群、ベンゾピレン+ケイヒ投与群共に投与 2 週間後でも群間の有意な感覚閾値の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において、ベンゾピレン投与群では、投与前と比較して投与 2 週間後に感覚閾値の上昇がみられた。ベンゾピレン+ケイヒ投与群では、投与 2 週間後、ベンゾピレン投与群に対して感覚閾値の上昇抑制がみられた (Fig.1C)。

酸化ストレス度に対する影響の検討では、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で、酸化ストレスの抑制傾向がみられたが、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、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)。これらの結果から酸化ストレス度を計算した結果が Fig.2C である。BAP/d-ROMs 12.5 の場合を酸化ストレス状態とみなす。酸化ストレス度では、ベンゾピレン投与群に対し、ケイヒ投与群で有

意な酸化ストレス状態の改善が見られた。

ケイヒの投与による感覚閾値の改善メカニズムを検討するため、取り出した坐骨神経から CYP1A1 (Fig. 3A)、MBP (Fig. 3B)、MAG (Fig. 3C) タンパク質の変化を測定した。AHR の標的遺伝子である CYP1A1 に関しては、ベンゾピレン投与群において、Corn oil 投与群と比較して CYP1A1 タンパク質の発現増加がみられたが、ケイヒ投与群においては、発現増加の抑制傾向が観察された。また MBP、MAG タンパク質に関して、MBP では群間有意な差はみられなかったが、MAG タンパク質において、ベンゾピレン投与群で Corn oil 投与群より発現の低下がみられ、ケイヒ投与群においてその低下の抑制がみられた。

D . 考察

本実験では、ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果を電気刺激による感覚閾値の評価法を用いて行った。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がみられた。PCB、PCDF、dioxin 等の dioxin 類化合物の複合中毒であるカネミ油症事件は、末梢神経障害由来のもの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⁾。また、古谷ら⁴⁾はカネミ油症患者で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。末梢のしびれ感は、A 線維の伝導速度の緩徐化が関係していると考えられ、近年我々はベンゾピレンが A 神経線維の伝導速度を低下させること

を明らかにした⁵⁾。A 神経線維の場合、2000Hz の電気刺激でも選択的に刺激することが出来ると植田ら⁸⁾は報告しており、Koga ら⁹⁾はラットの DRG を用いた実験で、2000Hz での刺激では 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。これらの結果から、本研究における 2000Hz の電気刺激による閾値の上昇はベンゾピレンの毒性による A 線維の異常で発生した感覚異常である可能性が考えられる。また、末梢神経の障害による感覚異常では、感覚神経の伝導速度の遅延を認めることが多いとの報告がある¹⁰⁻¹²⁾。伝導速度の遅延の一つ原因として脱髄(脱ミエリン)が考えられ、また脱髄は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である。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^{12,13)}。脱髄疾患は、神経を覆っているミエリンが消失し(脱ミエリン化)、神経信号がうまく伝達できなくなるため、四肢のしびれなど様々の神経症状が出る原因不明の難病である。本研究では伝導速度の遅延と脱ミエリンの関係を検討するために MBP、MAG タンパク質の発現を比較した結果、ベンゾピレン投与群で MAG タンパク質の有意な発現低下がみられたが、ケイヒ投与群では発現低下の抑制がみられた。Pronker ら¹⁴⁾によると MAG は、ミエリン鞘の形成と維持に重要なタンパク質であり、MAG 遺伝子の変異は、脱髄疾患に関係すると報告している。これらの結果から、ベンゾピレン投与群における感覚閾値の上昇はベンゾピレンの毒性により脱髄が起こることで、神経の伝導速度が低下し、感覚閾値上昇がみられた可能性が考えられる。

本研究の結果、ケイヒの投与はベンゾピレン投与群に対し、感覚閾値の上昇抑制、酸化ストレス度の改善、CYP1A1 の発現増加の抑制、MAG の発現低下を抑制させた。

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 の標的遺伝子である CYP1A1 タンパク質の発現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⁾。これらの結果は、AHR の活性化抑制と抗酸化ストレス作用を持つケイヒはベンゾピレンの毒性により発生される AHR の活性化や酸化ストレスを抑制させることを示唆している。

本研究の結果から、ベンゾピレン投与はその毒性が触・圧覚を伝える A 線維に作用し、脱髄(脱ミエリン)を起こすることで、感覚異常等を発生させた可能性が示唆された。また、その作用は抗酸化作用と AHR 活性化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が改善され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 活性の阻害作用を持つケイヒ等の植物成分や生薬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。今後、更なる研究を通して、慢性中毒モデルでの効果検討も必要である。

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) 林 信太郎, 他 : 大脳認知機能の客観的評価法の開発 . 食品を介したダイオキシン類等の人体への影響の把握とその治療法の開発等に関する研究 . 平成 24 年度 総括・分担研究報告書 , 2012 .
- 8)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.
- 9)Koga K, et al . Selective Activation of Primary Afferent Fibers Evaluated by Sine-Wave Electrical Stimulation. Mol. Pain 1:13 ,2005.
- 10)Michalek JE, et al: Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of Operation Ranch Hand . Neurotoxicol. 22(4):479-90, 2001 .
- 11)Thömke F, et al : Cranial nerve function in workers exposed to polychlorinated dioxins and furans . Acta Neurol . Scand . 106(3):155-158, 2002 .
- 12) 三井 良之, 他 : 末梢神経の障害 .

日本内科学会雑誌.97(8):1771-1777, 2008.

13) 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.

14) Pronker MF, et al: Structural basis of myelin-associated glycoprotein adhesion and signalling. Nature Communications. 7:13584, 2016.

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

申敏哲, 行平崇, 小牧龍二, 土井篤, 福永貴之, 吉村恵. 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. 第70回西日本生理学会. 令和元年11月2日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

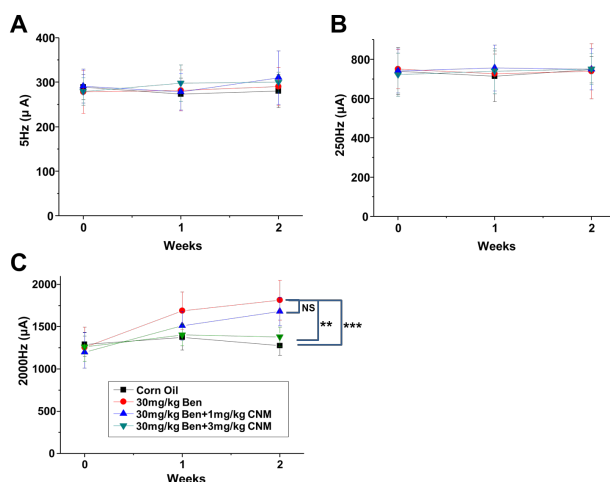
2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

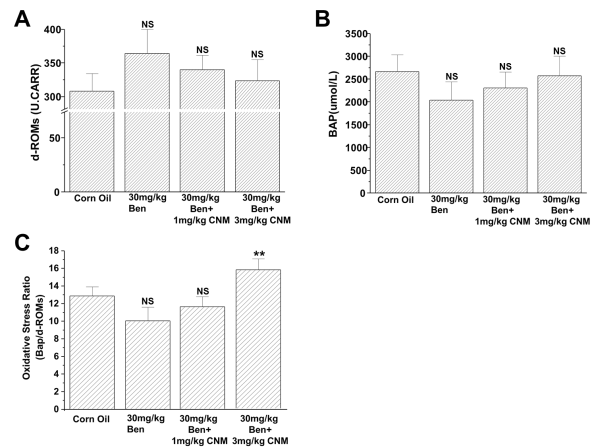
Fig1. ベンゾピレン又はベンゾピレン+ケイヒ投与がラットの各電気刺激周波数による感覚閾値の経時的変化に及ぼす影響。



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 .

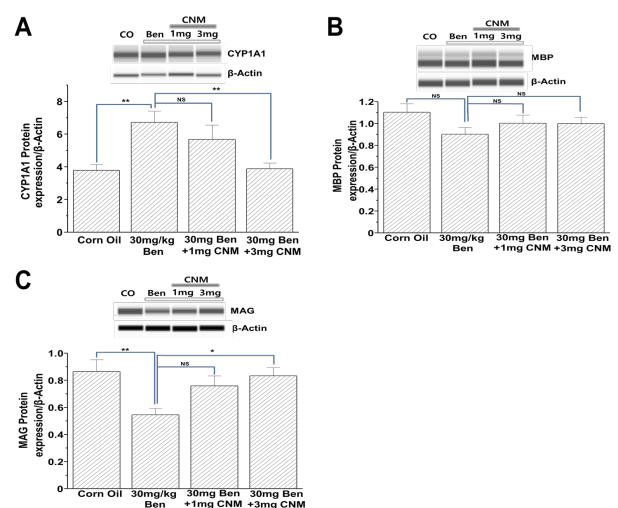
Ben, ベンゾピレン ; CNM, ケイヒ ; NS, no significant ; **, P<0.01 ; ***, P<0.001 ; Mean ± S.D. n=6.

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 . C, 酸化ストレス度 . Ben, ベンゾピレン ; CNM, ケイヒ ; NS, no significant ; **, P<0.01 ; Mean ± S.E. n=6.

Fig3. ベンゾピレン又はベンゾピレン+ケイヒ投与が CYP1A1、MBP、MAG タンパク質の変化に及ぼす影響。



A, 抗酸化力 . B, 酸化ストレス . C, 酸化ストレス度 . Ben, ベンゾピレン ; CNM, ケイヒ ; NS, no significant ; *, P<0.05 ; **, P<0.01 ; Mean ± S.E. n=6.