

分担研究報告書

継続的なベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果検討

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 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 継続的なベンゾピレン暴露により発生する神経異常に対するケイヒの効果を感じ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 法で検討した。その結果、ベンゾピレン単回投与時と同様な結果が得られ、5、250Hz の電気刺激周波数においては、各群有意な閾値の変化はみられなかった。また、2000Hz の電気刺激周波数ではベンゾピレン 2 週間投与群で単回投与時より 1.2 倍程度の感覚閾値の有意な上昇がみられた。先行研究においてベンゾピレン単回投与時には有効であった 3mg/kg ケイヒの投与によって若干の閾値上昇の抑制がみられたものの、有意差は認められなかった。酸化ストレス度、myelin basic protein (MBP)、cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1)、myelin-associated glycoprotein (MAG) の発現に対するケイヒの効果検討でも、ベンゾピレン単回投与時に有効であった 3mg/kg ケイヒの濃度では、若干の改善傾向がみられたものの、有意な効果は認められなかった。本研究の結果から、ベンゾピレン単回投与の様にダイオキシン類の急性中毒では、抗酸化作用と AHR 活性化阻害作用があるケイヒなどの生薬が短時間の服用で有効であるが、継続的な暴露については、更なる服用濃度や期間の検討が必要と考えられる。これらの結果は、抗酸化作用や AHR 活性化阻害作用があるケイヒなどの生薬を日頃服用することで、ダイオキシン類の急性暴露による体内の作用を抑制させることができる可能性を示唆する。

A. 研究目的

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、ベンゾピレン投与がラットの A β 神経線維の伝導速度を低下させる可能性が報告されている。A β 線維の伝導速度の緩徐化は、末梢のしびれ感などに関与することが報告されている¹⁾。これらの結果は、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の後遺症の一つである感覚鈍麻やしびれ感等の末梢神経および中枢神経障害等の症状と関連があると考えられる²⁻⁵⁾。ダイオキシン類の毒性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 AHR の活性を抑制させると報告されている⁶⁾。最近、生

薬の一つであるケイヒを用いてベンゾピレン単回投与ラットに対する効果を検討した結果、ケイヒの投与がベンゾピレン投与により発生する感覚異常を改善させることが確認できた。しかし、ベンゾピレンの単回投与による急性暴露に対するケイヒの効果は確認できたが、継続的なベンゾピレン投与により発生する神経異常に対するケイヒの効果はまだ明らかではない。そこで本実験では、2 週間継続的にベンゾピレンに暴露させた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、ウェスタンブロッティング法、酸化ストレス・抗酸化力測定法を用いて連続的なベンゾピレン暴露により発生する感覚異常に対するケイヒの効果を検討した。

B. 研究方法

5週齢のWistar系雄性ラット(SLC株、静岡)を用いて、Corn-oil 2週間連続投与後蒸留水投与群(Con)、ベンゾピレン 2週間連続投与後蒸留水投与群(Ben)、ベンゾピレン 2週間連続投与後ケイヒ投与群(BeCNM)に分けた。Corn-oil投与群ではCorn-oilを、ベンゾピレン投与群では30mg/kgベンゾピレンを経口投与器でそれぞれのラットに2週間、一回500 μ 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からCorn-oil投与群とベンゾピレン投与群には蒸留水、ケイヒ投与群には3mg/kgのケイヒを、それぞれ経口投与器を用いて500 μ lずつ、4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°C 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)、 β -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

電気刺激による感覚閾値の経時的変化をベンゾピレンの経口投与前、投与2週間、そして蒸留水又はケイヒ経口投与4週間まで小動物用電気刺激装置を用いて測定した。その結果、5Hzの電気刺激周波数による感覚閾値評価では、Corn-oil 2週間投与後蒸留水投与群(Con)に対し、2週間ベンゾピレン投与後蒸留水を投与した群(Ben)で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、ベンゾピレンを2週間投与した後にケイヒを投与した群(BeCNM)でもBen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評価でも、Con群に対し、Ben群、BeCNM群で若干感覚閾値の変化がみられたが群間の有意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評価では、Con群に対し、Ben群でベンゾピレン2週間連続投与後に感覚閾値の有意な上昇がみられ、蒸留水投与4週間後でも有意な感覚閾値の上昇がみられた。BeCNM群では、ベンゾピレン2週間連続投与により上昇した感覚閾値がケイヒの投

与4週後、若干感覚閾値の上昇抑制がみられたが、有意差は認められなかった (Fig. 1C)。

酸化ストレス度に対する影響の検討では、Con群に対し、Ben群で酸化ストレスの有意な上昇がみられたが、BeCNM群では若干酸化ストレスの抑制傾向がみられたものの、有意差は認められなかった (Fig. 2A)。抗酸化力に関しては、Con群に対し、Ben群で抗酸化力低下がみられた。BeCNM群では、Ben群に対し、若干の抗酸化力の上昇傾向がみられたものの、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。酸化ストレス度については、Ben群でCon群に対し、酸化ストレス状態であり、BeCNM群ではBen群に対し、若干の酸化ストレス状態の改善が見られたが、有意差はみられなかった。

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CYP1A1 (Fig. 3A)、MAG (Fig. 3B) MBP (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、Ben群でCon群と比較しCYP1A1タンパク質の有意な発現増加がみられたが、ケイヒ投与したBeCNM群においては、若干の発現増加の抑制傾向がみられたものの、有意差は認められなかった。MAGタンパク質においては、Ben群でCon群より発現の有意な低下がみられ、BeCNM群においてその低下の若干の抑制がみられたものの、有意差は認められなかった。MBPタンパク質に関しては、各群間に有意差はみられなかった。

D. 考察

ダイオキシン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、発症時から30年経過した近年

でも多くの患者から感覚異常が報告されている⁷⁾。これは、ダイオキシン類の長期暴露による慢性中毒の症状と考えられる。最近、私たちの実験において、生菓の一つであるケイヒがベンゾピレン単回投与により発生した急性中毒による感覚異常を改善させることを確認した。しかし、ベンゾピレンの慢性中毒に対するケイヒの効果は未だ明らかではない。従って、本実験では、ベンゾピレンを2週間連続暴露させたラットに対するケイヒの効果を経電刺激による感覚閾値の評価法を用いて評価した。その結果、5Hzと250Hzの電氣刺激を用いた感覚閾値では2週間Corn-oil投与後4週間蒸留水を投与したラット群 (Con) に対し、2週間ベンゾピレン投与後4週間蒸留水を投与したラット群 (Ben群) 及び2週間ベンゾピレン投与後4週間ケイヒを投与したラット群 (BeCNM群) 共に若干の感覚閾値の変化はみられたが有意差は認められなかった。また、2000Hzの電氣刺激では、Con群に対し、Ben群で感覚閾値の有意な上昇がみられたが、BeCNM群ではその感覚閾値上昇の若干の抑制がみられたものの、有意差は認められなかった。

末梢のしびれ感は、A β 神経線維と関係があり、A β 線維の伝導速度の緩徐化が原因である。A β 神経線維は、実験的に2000Hzの電氣刺激で選択的に刺激することが出来ると報告されており^{8,9)}、本研究においても、2000Hzの電氣刺激で2週間連続ベンゾピレンを投与したラットで感覚閾値の上昇がみられ、その上昇はベンゾピレン単回投与ラットより1.2倍程度であった。これらの結果は、ベンゾピレン単回投与による急性中毒と比較して2週間継続して投与した方がより毒性が強かった可能性が示唆された。ダイオキシン類の毒性はAHRを介して発揮されると報告され、AHRの活性化はCYP1A1タンパク質の発現で確認できる⁶⁾。本実験でのCYP1A1タン

パク質の発現検討結果でも、ベンゾピレン単回投与による急性中毒ラットより2週間連続投与を行ったラットで有意な発現増加がみられたことから毒性が強かった可能性が示唆されている。

また、感覚閾値の上昇と脱ミエリンとの関係を検討するために行ったMBP、MAGタンパク質の発現検討では、ベンゾピレン2週間投与ラットでMAGタンパク質の有意な発現低下、MBPタンパク質の発現低下傾向がみられ、ベンゾピレン単回投与時より有意な発現低下を示した。脱髄疾患は、神経を覆っているミエリンが脱ミエリン化し、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^{10,11)}。また、Pronkerら¹²⁾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、ベンゾピレンの2週間連続投与は単回投与による急性中毒よりミエリンを損傷させることで感覚閾値上昇などの神経症状を起こした可能性が考えられる。

本研究で行った、ベンゾピレン2週間投与ラットに対するケイヒの効果検討では、感覚閾値の上昇抑制傾向、酸化ストレス度の改善傾向、CYP1A1の発現増加抑制傾向、MAGタンパク質の発現低下抑制傾向がみられたが、有意差は認められなかった。これらの結果は、3mg/kg ケイヒはベンゾピレン単回投与による急性中毒時よりその効果が乏しかったことを示す。ケイヒは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⁾。前回の私たちの実験の結果でも、3mg/kg ケイヒはベンゾピレン単回投与による急性中毒での神経症状に改善効果があることが確認されたことから、AHRの活性化抑制と抗酸化ストレス作用を持つケイ

ヒは、ベンゾピレン単回投与後の急性中毒により発生するAHRの活性化や酸化ストレスを抑制させることで、ベンゾピレンの毒性による脱髄を抑制させ、神経異常を改善させるが、2週間連続して投与したことにより蓄積されたベンゾピレンの毒性によって発生する神経症状についてはその改善効果が十分では無いことが示唆された。ケイヒなどの生薬は、その効果が出るまで服用期間が長いことが多く、症状の程度に合わせて服用量を決めることが一般的である。従って、ベンゾピレンの暴露期間、症状の程度に合わせてケイヒの投与濃度や期間を検討する必要があると考えられる。

本研究の結果から、ベンゾピレンの2週間連続投与は単回投与による急性中毒よりもその毒性が触・圧覚を伝えるAβ線維に強く作用し、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る可能性が示唆された。また、その作用はベンゾピレン単回投与時に有効であった3mg/kg ケイヒの濃度では症状改善に有効ではないことが示唆された。

E. 結論

本研究の結果から、ダイオキシン類による急性中毒に有効である抗酸化作用とAHR活性阻害作用を持つケイヒ等の植物成分や生薬でもダイオキシン類の暴露期間や症状により、その濃度や服用期間を検討する必要があることが示唆された。また、ダイオキシン類の中毒に有効性があるケイヒなどの生薬を日頃服用することで、ダイオキシン類の急性暴露による体内の作用を抑制させることができる可能性を示唆する。今後、更なる研究を通して、ダイオキシン類の慢性中毒に対するケイヒの効果的な濃度や服用期間を検討する必要がある。

引用文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 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) Aoki Y: Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disruptors-what we have learned from Yusho disease. *Environ Res.* 86(1):2-11, 2001.
- 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) 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.
- 11) 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.
- 12) 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

- ① **申敏哲**, 行平崇, 小牧龍二, 福永貴之, 土井篤, 吉村恵. ベンゾピレン投与ラットでの生薬の効果検討. 第71回西日本生理学会. 2020年11月7日.
- ② **申敏哲**, 吉村恵, 行平崇, 小牧龍二, 福永貴之, 田中哲子, 土井篤. ベンゾピレン投与ラットでの生薬の検討. 第73回日本薬理学会西南部会. 2020年11月21日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

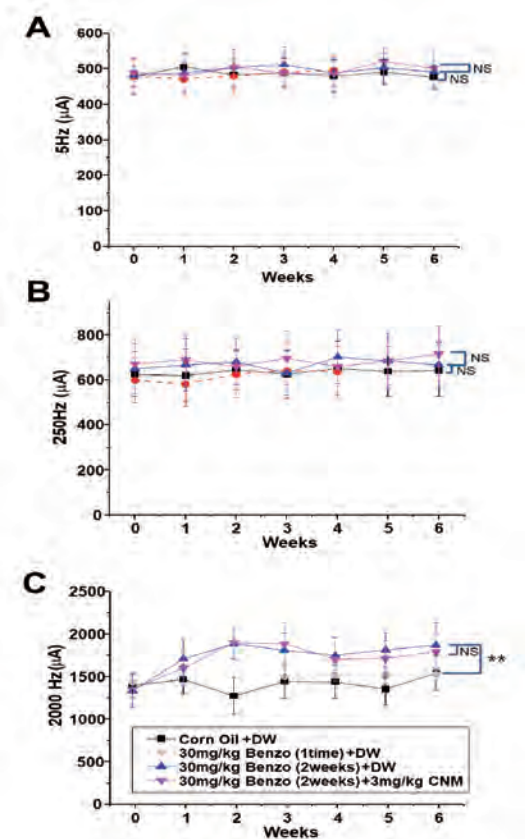
2. 実用新案登録

無し

3. その他

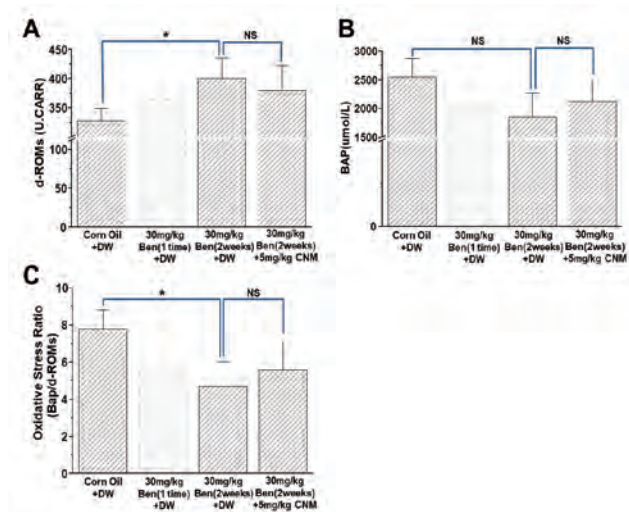
無し

Fig 1. ベンゾピレン2週間投与後蒸留水投与又はベンゾピレン2週間投与後ケイヒを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. DW, 蒸留水; Ben, ベンゾピレン; CNM, ケイヒ; NS, no significant; **, $P < 0.01$; Mean \pm S. D. $n = 10$.

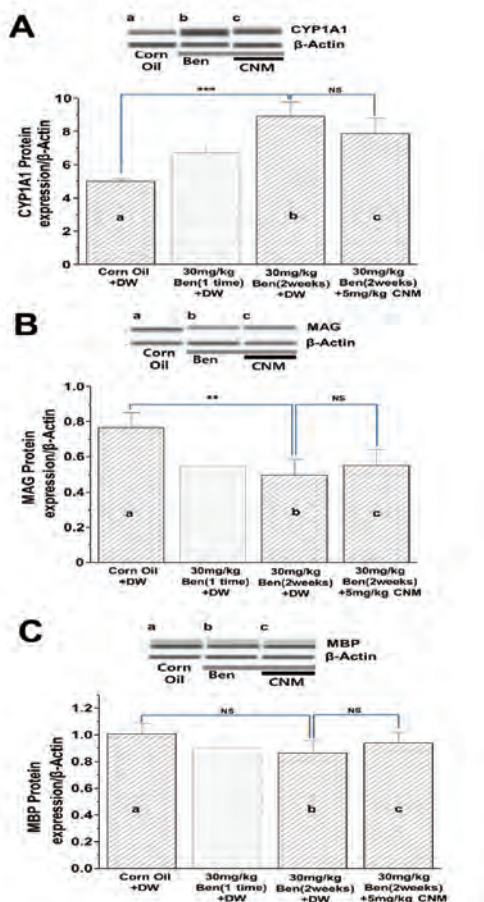
Fig 2. ベンゾピレン 2 週間投与後蒸留水投与又はベンゾピレン 2 週間投与後ケイヒを投与がラットの抗酸化力と酸化ストレスに及ぼす影響。



A, 抗酸化力. B, 酸化ストレス. C, 酸化

ストレス度. DW, 蒸留水; Ben, ベンゾピレン; CNM, ケイヒ; NS, no significant; *, $P < 0.05$; Mean \pm S. E. $n = 10$.

Fig3. ベンゾピレン 2 週間投与後蒸留水投与又はベンゾピレン 2 週間投与後ケイヒを投与が CYP1A1、MAG、MBP タンパク質の変化に及ぼす影響。



A, cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1). B, myelin-associated glycoprotein (MAG). C, myelin basic protein (MBP). DW, 蒸留水; Ben, ベンゾピレン; CNM, ケイヒ; NS, no significant; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; Mean \pm S. E. $n = 10$.