

## 分担研究報告書

### 行動量計と分子生物学的手法を用いたベンゾピレン投与ラットに対する ケイヒの中樞神経系での効果検討

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 療法人社団温故会 直方中村病院 病院長

**研究要旨** 本研究では、ベンゾピレン投与ラットに対するケイヒの効果とその際の中樞神経内の変化を行動量計と分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、コーンオイル投与群 (Corn-DW) に対し、ベンゾピレン投与群 (Ben-DW) で夜間の自発運動量の有意な低下がみられ、その低下はベンゾピレン投与後 3 mg と 10 mg のケイヒを投与したラット群 (Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM) で有意に抑制された。2000Hz の電気刺激による感覚閾値の経時的変化検討では、Corn+DW 群に対し、Ben+DW 群で感覚閾値の有意な上昇がみられ、ケイヒ投与群で、その感覚閾値上昇の抑制がみられた。酸化ストレスに関する検討では、Corn-DW 群に対し Ben-DW 群で酸化ストレス状態になり、ケイヒの投与によりその状態の改善がみられた。ベンゾピレンとケイヒの投与による中樞神経内の変化を検討するために L1~L5 の脊髄を取り出し CYP1A1、MAG、MBP タンパク質を測定した。AHR の標的遺伝子である CYP1A1 に関しては、Ben-DW 群で Corn-DW 群に対し CYP1A1 タンパク質の有意な発現増加がみられたが、ケイヒを投与した群においては、その発現増加の有意な抑制がみられた。MAG、BMP タンパク質においては、Ben-DW 群で Corn-DW 群より若干の発現低下がみられたが有意差は認められなかった。また、ケイヒ投与群においても若干の MAG、BMP タンパク質の変化がみられたものの、有意差はみられなかった。これらの結果からベンゾピレン投与は末梢神経と中樞神経内で AHR を活性化させ、その毒性により神経系が影響を受けることで自発運動量が低下した可能性が示唆された。その作用はケイヒの投与による抗酸化作用と AHR 活性化阻害作用で毒性が抑制されたことにより運動量の低下が改善したものと考えられる。しかし、ベンゾピレンによるラットの行動量低下と中樞神経内脱髄 (脱ミエリン) との関連性については未だ明らかではなく、今後更なる検討が必要である。

#### 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は、発生からおおよそ 50 年の年月が経過した現在においても様々な後遺症が多く報告されている 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樞神経障害等が報告されているが、その理由については不明な部分が多い 2-4)。油症の急性期には、全身倦怠感、食欲不振、体重減少、頭重感といった全身症状が見られることが報告されている。特に全身倦怠感、頭痛、手足のしびれといった自覚症状は、未だに 50% の患者さんに認められ、これらの症状はダイオキシン類が

末梢神経系に限らず中樞神経系にも何らかの影響を与える可能性を示唆している。ダイオキシン類は、芳香族炭化水素受容体 (Arylhydrocarbon receptor、以下 AHR) を介してその毒性を発揮させることと様々な植物成分や生薬が AHR の活性を抑制させることが Uchi ら 6) により報告されている。特に、生薬の一つであるケイヒは、抗酸化作用と AHR 活性化の阻害作用があり、ダイオキシン類の中毒症状を改善させる可能性が報告されている 5)。近年、私たちが行った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、ベンゾピレンに暴露されたラットの末梢のしびれ感等に関係が有るとされる

A $\beta$  神経線維の伝導速度が低下していることが確認された 5)。これらの行動学的・電気生理学的動物実験による結果は、ダイオキシン類が末梢神経系に明らかに影響を与えることを示したものの、中枢神経系に与える影響については未だ明らかでないのが現状である。従って、本研究では、24 時間行動評価ができる自発運動量計を用いた行動学的評価法と分子生物学的手法を用いた脊髄神経内の変化を検討することでベンゾピレン投与ラット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、コーンオイル 2 週間連続投与後蒸留水投与群 (Corn-DW)、ベンゾピレン 2 週間連続投与後蒸留水投与群 (Ben-DW)、ベンゾピレン 2 週間連続投与後ケイヒ投与 (Ben-1 mg CNM と Ben-3 mg CNM) 群に分けた。コーンオイル投与群にはコーンオイルを、ベンゾピレン投与群には 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 $\mu$ 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コーンオイル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 と 10mg/kg のケイヒを、それぞれ経口投与器を用いて 500 $\mu$ l ずつ、4 週間胃に直接投与した。時間的経過による行動の変化は、小型運動量計であるナノタグ (キッセイコムテック株式会社、nanotag) を使用した。3%イソフルランを使用し深麻酔下で背中側の毛を剃った後、除毛部位の皮膚を一部切開し、皮膚と筋肉の間にナノタグを挿入した後、手術用の糸を用いて筋肉に固定した。切開した皮膚は手術用の糸にて縫合し、ヨード液で傷部位の消毒を行った。自発運動量は夜行性であるラットの習性を利用し、行動量が多い夜の時間帯の行動変化を測定できる。本実験では昼夜の自発運動量変化を比較検討した。測

定時間は、20 時から翌日の 20 時までの 24 時間とし、週 1 回計測した。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。周波数は、末梢のしびれ感と関係する A $\beta$  線維の刺激が可能性である 2000Hz の正弦波電機刺激のみを利用し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 ( $\mu$ A) を換算した。測定はコーンオイル、ベンゾピレン投与前と最終日だけ行った。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、心臓から採血後安楽死を誘導した。その後、L1~L5 の脊髄標本を採集し、-80 $^{\circ}$ 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)、 $\beta$ -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

時間的経過による自発運動量の変化を、ナノタグを用いてベンゾピレンの投与前、投与2週間後、その後の蒸留水又はケイヒの連続4週間投与まで1週間毎に測定を行った。その結果、コーンオイル2週間連続投与後蒸留水投与群(Corn-DW)に対し、ベンゾピレン2週間投与後蒸留水投与群(Ben-DW)で有意な夜の自発運動量の低下がみられた。また、ベンゾピレンを2週間投与後からケイヒを投与した(Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM)群については自発運動量の低下の抑制が認められた。しかし、昼の自発運動量については各群間で有意な変化は認められなかった(Fig. 1)。

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、2000Hzの電気刺激周波数による感覚閾値変化においては、Corn+DW群に対し、Ben+DW群で感覚閾値の有意な上昇がみられ、ケイヒ投与群で、その感覚閾値上昇の抑制がみられた(Fig. 2)。

自発運動量の変化と酸化ストレスの関係を明らかにするために、酸化ストレス度に対する影響を検討した。Corn-DW群に対し、Ben-DW群で酸化ストレスの有意な上昇がみられ、その上昇はBen-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM 群で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. 3A)。抗酸化力に関しては、Corn-DW群に対し、Ben-DW群で抗酸化力低下がみられたが、Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM 群では、Ben群に対し、抗酸化力の上昇傾向又は有意な上昇が認められた(Fig. 3B)。これらの結

果から酸化ストレス度を計算した結果がFig. 3Cである。BAP/d-ROMs $\leq$ 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-DW群でCorn-DW群に対し、酸化ストレス状態であり、Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM 群では Ben-DW 群に対し、有意な酸化ストレス状態の改善が見られた。

ベンゾピレンとケイヒの投与による自発運動量の変化や酸化ストレス度の変化及び中枢神経内の変化の関連性を検討するためにL1~L5の脊髄を取り出し、AHRの活性を測定するためにCYP1A1タンパク質(Fig. 4A)、中枢神経内の脱髄と自発運動量変化の関係を検討するためにMAG(Fig. 4B)、MBP(Fig. 4C)タンパク質を測定した。AHRの標的遺伝子であるCYP1A1に関しては、Ben-DW群でCorn-DW群に対しCYP1A1タンパク質の有意な発現増加がみられたが、ケイヒを投与したBen-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM 群においては、発現増加の有意な抑制がみられた。MAG、BMPタンパク質においては、Ben-DW群でCorn-DW群より若干の発現低下がみられたが有意差は認められなかった。また、Ben-3 mg CNM と Ben-10 mg CNM 群においても若干のMAG、BMPタンパク質の変化がみられたものの、有意差はみられなかった。

### D. 考察

本実験では、ダイオキシン類似化合物の一つであるベンゾピレンを投与したラットに対するケイヒの効果を、自発運動量計を用いた行動学的評価法と中枢神経内のタンパク質の変化を分子生物学的手法で比較検討し、動物の行動変化と中枢神経内の変化の関連性について検討を行った。自発運動量計を用いた行動学的評価法では、ベンゾピレン投与群(Ben-DW)でコーンオイル投与群(Corn-DW)に対し、夜間の自発運動量の有意な低下がみられたが、ケイヒ投与群でその低下が抑制された。古谷ら

4)によると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ことが明らかになっている。末梢のしびれ感は、末梢神経の中でも A $\beta$  線維の伝導速度緩徐化が関係していると考えられており、近年私たちのベンゾピレンを用いた研究の結果でもベンゾピレンの毒性による A $\beta$  神経線維の伝導速度低下が確認されている<sup>5)</sup>。また、ベンゾピレンを投与したラットでの閾値測定結果でも先行研究と同様、2000Hz の電気刺激で閾値の上昇がみられたことからダイオキシン類の毒性が A $\beta$  線維の神経異常を起し、感覚異常に影響を与えた可能性が考えられる。しかし、油症の急性期には、全身倦怠感、食欲不振、体重減少、頭重感といった全身症状がみられることが報告されており、特に全身倦怠感、頭痛、手足のしびれといった自覚症状は、50%の患者さんに認められており、これらの症状はダイオキシン類が末梢神経系に限らず中枢神経系にも何らかの影響を与える可能性を示唆している<sup>2-4)</sup>。従って、坐骨神経と L1~L5 までの脊髄を取り出し分子生物学的手法を用いて自発運動量の変化や感覚閾値の上昇と AHR の活性化や脱ミエリンとの関係について末梢神経と中枢神経を用いて検討した。その結果、ベンゾピレン投与により末梢神経と中枢神経内の CYP1A1 タンパク質の発現増加がみられ、その増加はケイヒ投与群で抑制されたことが確認された。MAG タンパク質については、ベンゾピレン投与群の坐骨神経内のみ MAG タンパク質の発現低下がみられ、ケイヒ投与によりその発現低下が抑制されたが、脊髄神経内の MAG タンパク質と坐骨神経や脊髄内の MBP タンパク質 においては、タンパク質発現の若干の変化はみられたものの、有意差が無かった。中枢神経系の神経回路の多くは、神経軸索の周囲が髓鞘に覆われ、跳躍電動を行う有髓神経回路である。また、髓鞘は内部の軸索に対して栄

養供給をする働きもあることから<sup>12)</sup>、髓鞘は神経機能の恒常性維持に重要な役割を担う構造物と認識されている。種々の中枢神経疾患で病巣周囲に髓鞘の脱落が検出され、脱髓は症状の発症や悪化をもたらす現象と認識されている<sup>12)</sup>。従って、油症でみられる全身倦怠感、頭痛、手足のしびれといった自覚症状は、ベンゾピレンによって引き起こされる A $\beta$  神経線維の脱髓と同様に、ダイオキシン類によって中枢神経の脱髓が引き起こされた影響である可能性も考えられる。一方で末梢神経の脱髓疾患は、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疾患とされており、いずれの脱髓疾患も原因不明の疾患である<sup>10, 11)</sup>。本研究では、ベンゾピレンの毒性作用を CYP1A1 タンパク質で測定した結果、末梢と中枢神経の両側でその作用がみられ、末梢神経ではその毒性によって脱髓が引き起こされたことで神経の伝導速度が低下し、感覚閾値が上昇した可能性が考えられたが、中枢神経の脱髓に関する検討では各群間に差がみられなかったことから、中枢神経よりも末梢神経の方がベンゾピレンによる影響を受けやすいと考えられる。今回使用したナノタグを用いた行動実験の場合、ベンゾピレンの毒性による神経作用が自発運動量低下に影響を与えた可能性が考えられるが、その作用は中枢神経よりも末梢神経の異常による感覚障害が影響を与えた可能性が考えられた。また、本研究では、ベンゾピレン投与ラットに対する 3 mg・10 mg/kg ケイヒの効果を検討した。その結果、自発運動量低下改善、感覚閾値の上昇抑制、酸化ストレス度の改善、CYP1A1 の発現増加抑制、末梢神経内の MAG タンパク質の発現低下抑制傾向がみられた。ケイヒの主な成分であるシンナムアルデヒドは 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

酸化ストレス作用が強い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投与による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、ベンゾピレ投与により発生する 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可能性があると考えられる。

## E. 結論

本研究の結果から、ベンゾピレンの暴露による中毒の場合、末梢及び中枢神経の両側でその毒性が作用し感覚異常を起こした可能性 (CYP1A1 の検討結果) が示唆された。しかし、その影響は中枢神経より末梢神経が受けやすいこと (MAG タンパク質の検討結果) が考えられる。また、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はダイオキシン類の暴露に効果的である可能性が示唆された。しかし、今回の研究でも中枢神経でのベンゾピレン等のダイオキシン類の作用を明確に調べることができなかった。今後は脳神経内での感覚と関連する部位までの分析を通して中枢神経での影響まで検討する必要があると考えられる。

## 引用文献

- 1) Aoki Y : Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxin, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disruptors 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, 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) Uchi H, Yasumatsu M, Morino-Koga S, 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.
- 6) 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.
- 7) Philips T and Rothstein JD : Oligodendroglia : metabolic supporters of neurons. *J Clin. Invest*, 127 : 3271-3280, 2017.
- 8) Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, et al : Myelin in the Central Nervous System : Structure, Function, and Pathology. *Physiol. Rev*, 99 : 1381-1431, 2019.
- 9) 三井 良之, 楠 進 : 末梢神経の障害. *日本内科学会雑誌*, 97(8) : 1771-1777, 2008.
- 10) 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

小牧龍二, 行平崇, 福永貴之, 田中哲子, 申敏哲. ベンゾピレンの投与による感覚障害モデルラットに対する Vitamin B2 関連物質  $\beta$ -NMN の効果検討.

2. 学会発表

申敏哲, 行平 崇, 小牧 龍二, 福永 貴之. 自発運動量、感覚閾値を用いたベンゾピレン暴露ラットに対するケイヒの効果検討. 第73回西日本生理学会. 2022年10月28日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

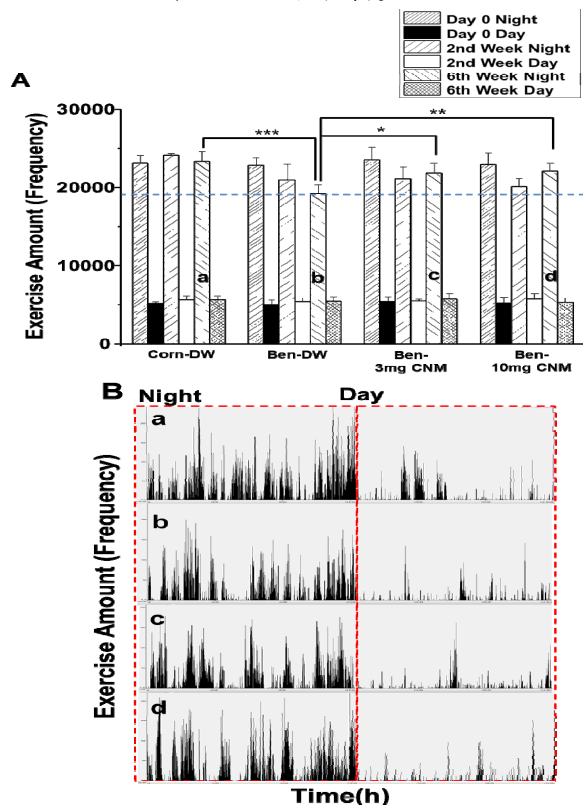
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Fig 1. ベンゾピレンとケイヒの投与がラットの自発運動量変化に及ぼす影響。



A, 時間的経過による自発運動量の変化. B 自発運動量の例.

Fig 2. ベンゾピレンとケイヒの投与がラットの感覚閾値の変化に及ぼす影響。

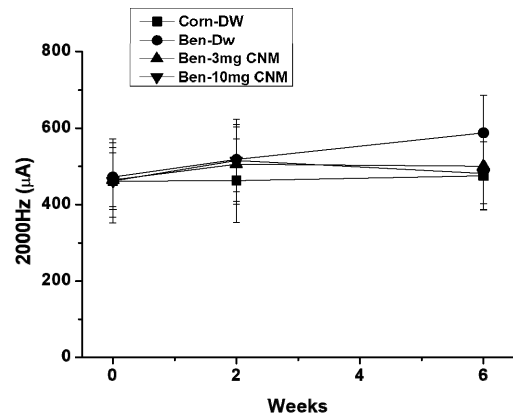
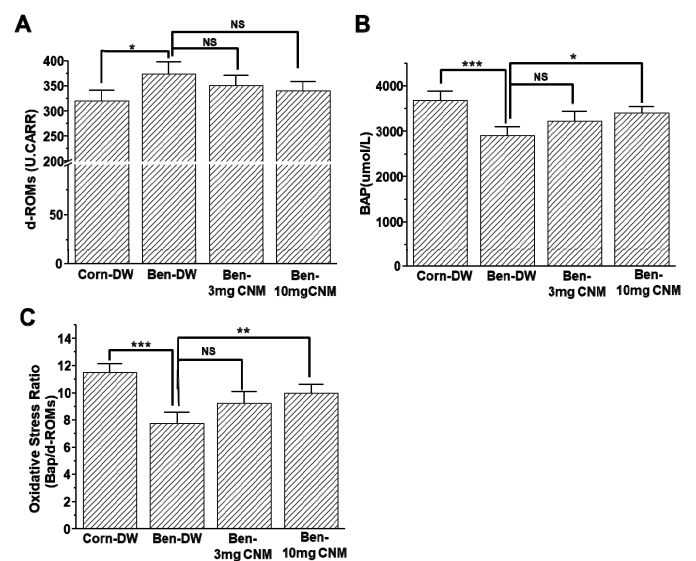


Fig 3. ベンゾピレンとケイヒの投与がラットの酸化ストレス度に及ぼす影響。



A, 酸化ストレス. B, 抗酸化力. C, 酸化ストレス度.

Fig 4. ベンゾピレンとケイヒの投与がラットのCYP1A1、MAG、MBPタンパク質の発現に及ぼす影響。

