

イソフラボンのパーキンソン病予防効果の検討

久寶真一*

関西医科大学生理学第2講座

Preventive Effects of Isoflavone on the Animal Model of Parkinson's Disease

Shinichi KYUHO

Department of Physiology, Kansai Medical University, Moriguchi 570-8506

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by resting tremor, rigidity and bradykinesia. In patients with PD, dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc) degenerate. Women with low estrogen exposure developed PD earlier than did women with high exposure. Although estrogen has many positive effects on the treatment of PD, estrogen has many risks such as cancers. As a natural alternative to estrogen replacement after menopause, isoflavone is a potential candidate for treatment. However, it is not clear whether isoflavone is acting like estrogen in the brain to provide neuroprotection. The present animal study aims to investigate the preventive effects of isoflavone on the motor dysfunctions of PD. In ovariectomized rats, unilateral injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the medial forebrain bundle (MFB) induced motor dysfunctions in the forelimbs on the side contralateral to the lesions assessed by cylinder and step tests. Pretreatment of genistein, an isoflavone, significantly preserved the motor dysfunctions. Morphologically, tyrosine hydroxylase (TH) positive neurons in the SNc were markedly reduced after injection of 6-OHDA into the MFB. Treatment of genistein significantly prevented the reduction of the TH positive neurons. TH positive nerve terminals and dopamine transporter expression in the striatum were also preserved after genistein administration. Taken together, isoflavone is suggested to serve to prevent PD in the post-menopausal women. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 142-146, 2008.

Key words : isoflavone, estrogen, Parkinson's disease, dopamine, female

*〒570-8506 守口市文園町10-15

パーキンソン病は寡動と固縮、振戦を主な3つの症状とする神経変性疾患である。病理学的には、黒質ドパミン細胞の脱落が主な原因である。有病率は人口10万人に対し約150人といわれ、日本人口の高齢化に伴い増加傾向にある。パーキンソン病の平均死亡年齢男女とも72~73歳で、平均寿命は一般人と比較して大きな差はないが、生活の質（QOL）は著しく阻害されることや身体がきかないため失業する人が多い（推定失業率54%）。膨らむ公費負担のため、2006年に厚生労働省は特定疾患（難病）治療研究事業によるパーキンソン病治療費の公的補助（2004年度の補助対象者は7万8千人）の対象縮小を検討したが、国会で見送りになったのは記憶に新しい。日本における大規模な疫学調査により、女性のほうが男性の約1.8倍もパーキンソン病患者が多いことが判明している¹⁾（ただし、海外では男性優位とする報告が多い）。年齢別の男女比でも女性が多いことから、単に女性のほうが長生きするという理由だけで女性のパーキンソン病有病率が高いというわけではない。閉経後に多いことや、卵巣を摘出した女性にパーキンソン病の危険率が高いことから、女性のパーキンソン病発症にエストロゲンの低下が関わっていることが指摘されている。イソフラボンは大豆食品より無理なく摂取でき、エストロゲン活性もあるので、イソフラボンのパーキンソン病予防効果について動物実験を用いて検討した。

方 法

メスSprague-Dawley rat（180~250 g）の卵巣を両側切除し、術後2 wk以上経ってから実験に使用した。ラットを抱水クロラルで麻酔し、6-hydroxydopamine（6-OHDA; 2 mg/mL あるいは6 mg/mL）を左側の内側前脳束に1 μ L局所注入した。コントロール群では6-

OHDAの代わりに生理的食塩水を注入した。イソフラボンのゲニステイン（10 mg/kg）は、6-OHDAの投与の2日前より連日10日間腹腔内投与した。

運動機能評価

アポモルフィンによる回転運動：ドパミンアゴニストのアポモルフィン（0.3 mg/kg）を皮下投与し、ラットを直径41 cmの半球状の容器に入れ、注入してから60 min間における回転運動を観察した（Fig. 1A）。

Stepping test：ラットの後肢と片側の前肢を補拭した状態で、自由のきく前肢を幅90 cmのサイドテーブルに手をつかせ5秒間に90 cm移動する早さで、実験者がラットをフォアハンド方向あるいはバックハンド方向に動かした。この時における姿勢保持のstep動作を計測した（Fig. 1B）。

Cylinder test：直径21 cm高さ34 cmのガラスのシリンダーにラットを入れて探索行動させる。探索行動時に前肢で壁を支える動作を観察する。壁を支える時、左右どちらの前肢を使用するかを5 min間測定し、左右前肢使用の非対称性を評価する（Fig. 1C）。

免疫組織化学

運動機能計測終了後、動物をリン酸緩衝液で灌流し4%パラホルムアルデヒド溶液で固定してから、脳を取り出した。中脳部分を凍結し、厚さ20 μ mの前頭断切片を作成し、チロシン水酸化酵素（TH）に対するモノクローナル抗体により免疫組織化学的に黒質ドパミン細胞を検出した。細胞数の評価では、ブレグマより4.8 mm, 5.1 mm, 5.4 mm, 5.7 mm, 6.0 mm後方の5枚の中脳切片におけるドパミン細胞の数をカウントした。障害の程度は、6-OHDAを注入した障害側と6-OHDAを注入しなかった非障害側の細胞数の比により算出した。

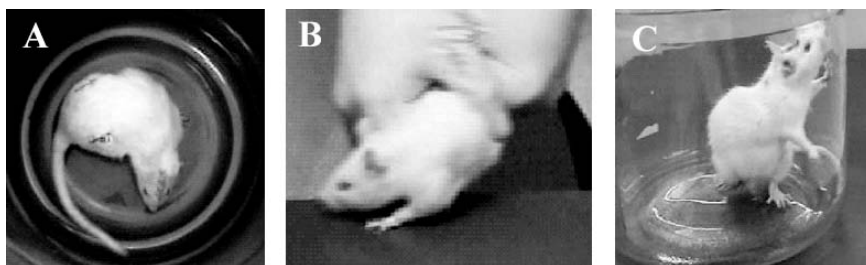


Fig. 1. Assessment of motor functions in the animal model of Parkinson's disease. A: Rotation test induced by administration of apomorphine. B: Stepping test. C: Cylinder test.

結 果

アポモルフィン投与による回転運動

ドパミンアゴニストのアポモルフィン (0.3 mg/kg) の皮下投与によりコントロール群 (control: C群) では回転運動がほとんどなかったのに対して, 6-OHDA 投与群 (6-OHDA: OHDA群) では著名な回転運動が

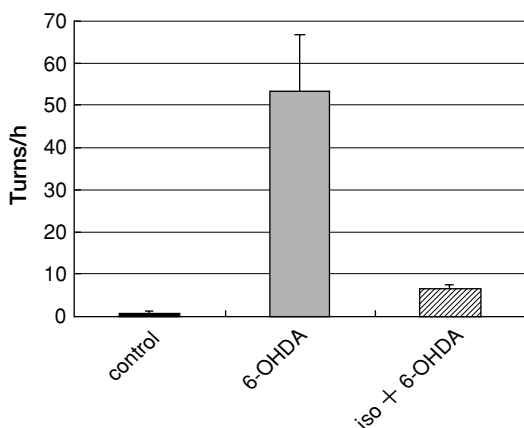


Fig. 2. The number of apomorphine-induced rotations for 60 min. These data were obtained from the rats after injection of a small amount of 6-OHDA.

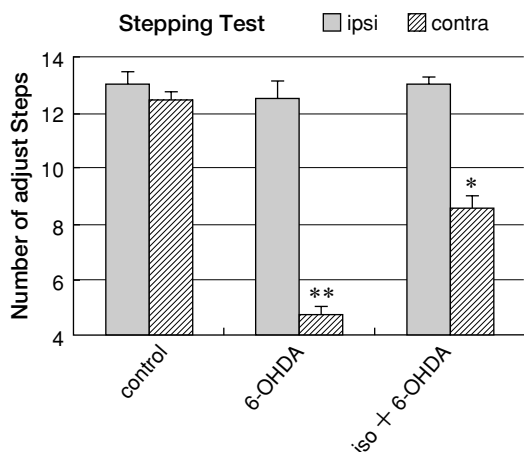


Fig. 3. The stepping test. Each symbols indicates the mean $\pm$ SEM performed with impaired (contralateral) and unimpaired (ipsilateral) forelimb by rats with and without treatment of isoflavone.

認められた. イソフラボン投与を6-OHDA注入前から開始した群 (iso + 6-OHDA: iso群) では, 有意に回転数が減少していた (Fig. 2). このアポモルフィンの回転運動は, ドパミン投射の減少を反映していると考えられており, iso群で回転数が少ないのは機能的なドパミン投射がかなり残存していることを意味する.

Stepping test : 神経毒注入と同側の左前肢においては, adjust step数はC群, OHDA群, iso群の間で有意差がなかった. 一方, 注入と反対側の右前肢においては, adjust step数はC群に比べてOHDA群では著明に減少していた (Fig. 3). adjust stepの減少は姿勢保持機能低下を反映するとされている. このような機能障害は, iso群がOHDA群より有意に少なかった.

Cylinder test : C群では, 探索行動で立ち上がった時, 前肢をほとんど左右対称に壁をついて体を支えていた. OHDA投与群では, 神経毒注入と反対側の右前肢の使用が著名に減少し前肢使用の非対称性が認められた. iso群では有意な前肢使用の非対称性がなかった (Fig. 4). この前肢使用の非対称性は前肢の寡動 (bradykinesia) を反映していると考えられている.

免疫組織化学

黒質ドパミン細胞と考えられるTH陽性細胞は, OHDA群では著明に細胞数が減少していた (Fig. 5B). iso群では, OHDA群より有意に残存率が多かった (Fig. 5).

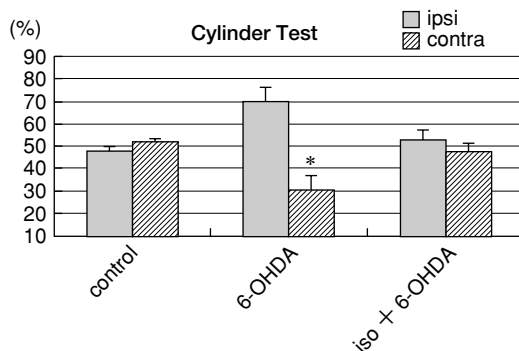


Fig. 4. The cylinder test. The number of wall contacts with impaired (contralateral) and unimpaired (ipsilateral) forelimbs during 5 min inside cylinder is expressed as the percentage of the total number of forelimb contacts (limb-use asymmetry cylinder test).

考 察

イソフラボン投与により、卵巣摘出ラットにおける6-OHDA注入による運動機能低下を防ぎ、黒質ドパミン細胞の減少をある程度くいとめることができた。黒質緻密部のドパミン細胞には、エストロゲン受容体が発現しており、エストロゲンがドパミン細胞に対して細胞保護効果をもつという研究がある²⁾ので、イソフラボンのエストロゲン作用により抗パーキンソン病効果をもたらした可能性が高い。

エストロゲン濃度の低下がパーキンソン病の危険因子であることは以前から指摘されており、閉経後の女性のパーキンソン病に対するエストロゲン補充療法に関する大規模研究 (Parkinson's disease On Estrogen Therapy Replacement in the menopause Years: POETRY) もアメリカで進められている³⁾。このようにパーキンソン病に対するエストロゲン補充療法には大きな期待を寄せられている一方で、エストロゲン補充療法には虚血性疾患や乳がんなどのリスクも報告されている⁴⁾。イソフラボンはエストロゲン活性をもちながらも虚血性疾患に対する予防効果もあることが報告されている⁵⁾。大豆を介したイソフラボン摂取は、より安全に閉経期の女性のパーキンソン病予防に使用できると考えられる。

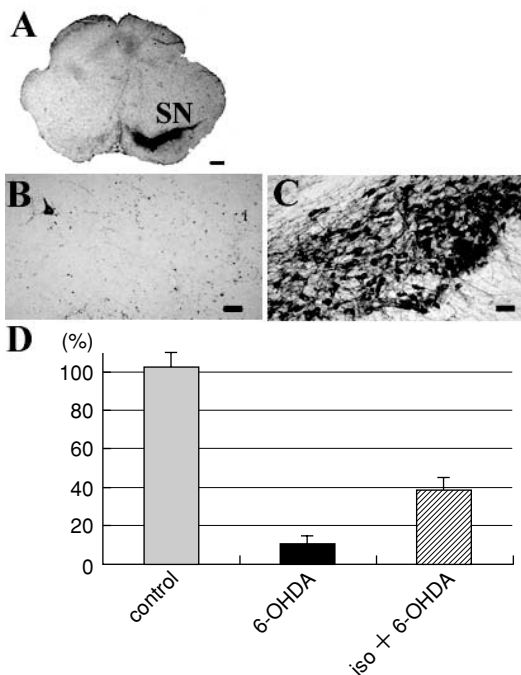


Fig. 5. Immunohistochemical study for tyrosine hydroxylase (TH) positive (dopaminergic) cells in the substantia nigra (SN) of the rats. A: Coronal sections of the midbrain including the SN after injection of a large amount of 6-OHDA into the left medial forebrain bundle. Higher magnification of the images in the impaired (B) and unimpaired side (C). D: Quantitative analysis of TH positive cell numbers in the SN after injection of a small amount of 6-OHDA. Results are expressed as the percentage survival of dopaminergic cells in the impaired SN compared with the unimpaired side. Calibrations: 500 μ m in A, 100 μ m in B and C.

要 約

卵巣切除ラットにおいてイソフラボン投与は、黒質ドパミン細胞を神経毒の6-OHDAから保護する効果が認められた。神経毒により生じる運動機能障害も、イソフラボン投与により有意に減少した。以上の結果から、イソフラボンには閉経後の女性におけるパーキンソン病を予防する効果が期待できる。

文 献

- 1) Kimura H, Kurimura M, Wada M, Kawanami T, Kurita K, Suzuki Y, Katagiri T, Daimon M, Kayama T and Kato T (2002): Female preponderance of Parkinson's disease in Japan. *Neuroepidemiology*, **21**, 292-296.
- 2) Murray H, Pillai A, McArthur S, Razvi N, Datla K, Dexter D and Gillies G (2003): Dose- and sex-dependent effects of the neurotoxin 6-hydroxydopamine on the nigrostriatal dopaminergic pathway of adult rats: differential actions of estrogen in males and females. *Neuroscience*, **116**, 213-222.
- 3) Shulman LM (2007): Gender Differences in Parkinson's Disease. *Gend Med*, **4**, 8-18.
- 4) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM and Ockene J (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*, **288**, 321-333.
- 5) Kokubo Y, Iso H, Ishihara J, Okada K, Inoue M and Tsugane S (2007): Association of dietary intake of soy, beans, and isoflavones with risk of cerebral and myocardial infarctions in Japanese populations: the Japan Public Health Center-based (JPHC) study cohort. *Circulation*, **116**, 2553-2562.