

分担研究報告書

感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対する β -NMN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 β -Nicotinamide mononucleotide (β -NMN) はビタミン B2 関連物質であり、ミトコンドリアに作用して Adenosine triphosphate (ATP) 産生量の増加、ニューロンの axon や dendrite の発育促進や神経損傷からの回復促進、神経保護作用、血液脳関門 (blood-brain barrier、BBB) を通過しての脳組織の保護作用等がすでに確認されている。本研究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用いてベンゾピレン中毒ラットに対する β -NMN の効果を、Wistar 系雄性ラットを使用し、コーンオイル投与後蒸留水投与群 (Corn+DW)、ベンゾピレン単回投与後蒸留水投与 (Ben+DW) 群、ベンゾピレン投与後 100mg/kg β -NMN 投与 (Ben+ β -NMN) 群に分け、感覚刺激による定量的閾値評価法、酸化ストレス・抗酸化力測定法、Western blot 法を用いて検討した。その結果、 β -NMN の投与はベンゾピレン投与群に対し、感覚閾値上昇の抑制、酸化ストレス度の改善傾向、cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1) の発現増加の抑制、myelin basic protein (MBP) の発現低下抑制傾向、myelin-associated glycoprotein (MAG) の発現低下の抑制を示した。本研究の結果から、 β -NMN の投与は抗酸化作用と AHR 活性化抑制作用によりベンゾピレン中毒を抑制させることで感覚異常の症状改善に有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

カネミ油症事件発生からおおよそ 50 年の時間が経過した現在までも頭痛や倦怠感、痤瘡様皮疹などの後遺症が報告されている¹⁾。特に、末梢の感覚鈍麻やしびれ感、などの末梢神経障害が多く、多くの患者で報告されているが、その発生機序や治療方法については未だ不明な部分が多い²⁻⁴⁾。近年私たちはこれらの神経症状の発生機序や治療方法について、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て動物実験を行い、ベンゾピレンの毒性が触・圧覚を伝える A β 線維に作用し、感覚異常等を発生させた可能性を確認した。また、その症状は抗酸化作用と AHR 活性化の阻害作用をもつケイヒの投与により改善される可能性を報告した⁵⁾。

β -Nicotinamide mononucleotide (β -NMN) は Vitamin B2 関連物質であり、ミ

トコンドリアに作用して Adenosine triphosphate (ATP) 産生量を亢進し、生命を延長する効果があると報告された。最近の in vitro と in vivo 研究では、ATP 産生量の増加作用だけではなく、ニューロンの axon や dendrite の発育促進や神経損傷からの回復促進、神経保護作用、血液脳関門 (blood-brain barrier、BBB) を通過しての脳組織の保護作用まで確認されている⁶⁻⁸⁾。これらの報告から β -NMN はダイオキシン類似化合物の複合中毒で起こる感覚鈍麻やしびれ感などの末梢神経障害等の症状改善に影響を与える可能性が考えられる。従って、本研究では、2 週間以上のベンゾピレン投与によるベンゾピレン暴露ラットにおける β -NMN の効果を感覚刺激による定量的閾値評価、酸化ストレス・抗酸化力の測定、Western blot 法を用いて検討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) を用いて、Corn-oil 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 β -NMN 投与群 (Ben+ β -NMN) 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、 β -NMN 投与群には 30mg/kg、100mg/kg の β -NMN 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髓標本を採集し、 -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)、 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

1. 体重の変化

ベンゾピレンの摂取が体重の変化に及ぼす影響を検討した。図 1 はベンゾピレン投与前を 0 日とした 1 週間ごとの体重の推移を示す。Corn-oil + 蒸留水投与群 (Corn+DW)、30 mg/kg ベンゾピレン + 蒸留水投与群 (Ben+DW)、30 mg/kg ベンゾピレン + β -NMN 投与群 (Ben+ β -NMN) 共に最終測定時には 200g 程度の体重増加を示し、有意な体重の変化はみられなかった (図 1)。

2. 感覚閾値の経時的変化

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、250Hz の電気刺激周波数による感覚閾値の測定では、各群若干の閾値の変化がみられたが、有意差は認められなかった (図 2A、B)。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た。しかし、Ben+ β -NMN 群では、その感覚閾値上昇の抑制がみられた (図 2C)。

3. CYP1A1、MBP、MAG タンパク質の変化に及ぼす影響

ベンゾピレン経口投与ラットに対する β -NMNの作用メカニズムを調べる為に取り出した坐骨神経からCYP1A1(図3A)、MBP(図3B)、とMAG(図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+DW群において、Corn+DW群に比べ、CYP1A1タンパク質の有意な発現増加がみられたが、Ben+ β -NMN群においては、その発現増加の抑制傾向がみられたが有意差はなかった。MBPタンパク質においては、各群若干の変化はみられたが、有意差はなかった。MAGタンパク質においては、Ben+DW群でCorn+DW群より発現の低下がみられたがBen+ β -NMN群においてはその低下の抑制がみられた。

4. ベンゾピレン、 β -NMN投与が酸化ストレスと抗酸化力に及ぼす影響

ベンゾピレン投与と β -NMNの投与が酸化ストレスに及ぼす影響について検討するために、血清を用いて酸化ストレスと抗酸化力を測定した。図4は酸化ストレス(図4A)と抗酸化力(図4B)、酸化ストレス度(図4C)の結果を示す。酸化ストレスに関しては、Corn+DW群に対し、Ben+DW群で酸化ストレスの有意な増加がみられ、Ben+ β -NMN投与群ではその酸化ストレス増加の抑制傾向がみられたが、有意差は認められなかった(図4A)。抗酸化力に関しては、Corn+DW群に対し、Ben+DW群で抗酸化力の抑制傾向がみられたが、有意差は認められなかった。しかし、Ben+ β -NMN投与群については、ベンゾピレンによる抗酸化力抑制が改善する傾向にあったものの、有意差はなかった。これらの結果から酸化ストレス度を計算した結果が図4C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。酸化ストレス度では、Ben+DW群に対し、Ben+ β -NMN投与群で酸化ストレス状態の改善傾向が見られたも

の、有意差は認められなかった。

D. 考察

本研究ではダイオキシン類似化合物中毒による末梢神経障害症状を呈したラットへの β -NMN投与が及ぼす影響について検討した。その結果ベンゾピレンの投与による体重への影響は若干の変化はみられたが、有意差はなかった。感覚閾値の経時的変化では、ベンゾピレン投与群では2000Hz電気刺激で感覚閾値の上昇が認められ、ベンゾピレン+ β -NMN投与群で感覚閾値上昇抑制がみられた。

ダイオキシン類は、化学的化合物の一種で、難分解性の環境汚染物質(POPs)である。ヒトへの暴露の90%以上は、食物、主として肉類、乳製品、魚介類を通じてであり、毒性が強く、生殖や成長面の問題を引き起こす可能性があり、免疫システムやホルモン、神経に障害をもたらす、発がん性もある⁹⁾。カネミ油症事件は食用油にポリ塩化ビフェニル(PCB)などのダイオキシン類が製造過程で混入し、その食用油を摂取した人々やその胎児に障害などが発生した、西日本一帯における食中毒事件である。カネミ油症事件は発生から50年が過ぎた現在までも顔面などへの色素沈着や塩素挫瘡(クロロアクネ)など肌の異常、頭痛、手足のしびれ、肝機能障害など様々な後遺症で苦しんでいる患者さんは少なくない。特に、一部の患者では自律神経失調症、末梢の感覚鈍麻やしびれ感等の末梢神経障害および中枢経障害等が報告されている⁴⁾。

近年、我々はカネミ油症の末梢のしびれ感と神経線維の関係について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を行った。その結果、ベンゾピレン投与がA β 神経線維の伝導速度の低下に影響を与える可能性を確認した。A β 線維の伝導速度の緩徐化は、末梢のしびれ感と関係が有ると報告されてい

る¹⁰⁾。A β 神経線維は、2000Hz の電気刺激によって選択的に刺激することが出来ると植田ら¹¹⁾は報告しており、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 β 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¹²⁻¹⁴⁾。これらの結果から、ベンゾピレンの毒性による A β 線維の異常で 2000Hz の電気刺激による閾値の上昇が発生した可能性が考えられる。また、伝導速度が遅延した要因として脱髄が考えられる。脱髄は中の軸索は保たれ、髄鞘には障害が生じる現象である。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おり、脱髄疾患は四肢のしびれなど様々な神経症状が出る原因不明の難病で、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に起こるとされている^{14,15)}。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 タンパク質と 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と MBP タンパク質の低下傾向がみられた。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、感覚閾値が上昇した可能性が考えられる。

本研究の結果、 β -NMN の投与はベンゾピレン投与群に対し、感覚閾値上昇の抑制、酸化ストレス度の改善傾向、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、様々な生薬が AHR 活性を抑制することが報告されている¹⁶⁾。近年、ケイヒ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報告されている¹⁶⁾。本研究ではベンゾピレン投与ラットに β -NMN を投与した結果ケイヒと同様の結果が得られた。最近の研究では、NMN の投与がニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ (NAMPT) ノックアウトマウスの運動機能障害の改善と寿命も延長させることが明らかになり、ニューロンの NAMPT がミトコンドリアの生体エネルギー、運動機能、生存に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。NAMPT は、ビスファチンまたはプレ B 細胞コロニー増強因子としても知られ、哺乳類におけるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) サルベージ合成の酵素である⁶⁾。NAMPT-NAD 軸はエネルギー生産において重要な役割を果たし、SIRT、ポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP) および CD38 に接続する。それによってさまざまなストレスに対する強力な内因性防御システムを構成することが報告されている⁶⁻⁷⁾。Vitamin B2 誘導体である β -NMN は、これまでの in vitro と in vivo 実験で、ミトコンドリアに作用し ATP 産生量の増加、ニューロンの axon や dendrite の発育促進、神経損傷からの回復促進、神経保護作用、血液脳関門 (blood-brain barrier、BBB) を通過しての脳組織の保護作用、生命の延長などが確認されている⁶⁻⁸⁾。近年、多くの神経変性疾患はミトコンドリアの異常と関連していることが報告されている¹⁷⁾。また、ミトコンドリアが生理学および病理学的条件下で軸索の変性および再生において重要な役割を果たすことが確認されている。特にミトコンドリアの機能障害は、軸索変性の初期段階で発生し、酸化ストレス、エネルギー不足、ミトコンドリアダイナミクスの不均衡、ミトコンドリア輸送の欠陥、およびマイトファジー調節不全を伴う¹⁸⁾。ミトコンドリア輸送の強化、活性酸素種 (ROS) のクリアランス

および生体エネルギーを改善することで、軸索再生に大きく影響を与えることが報告されている¹⁸⁾。これらの報告から、ベンゾピレンの投与はその毒性によりミトコンドリアの機能不全が起こることで軸索の変性による神経伝導速度の低下が起こる可能性が考えられ、 β -NMN の投与はベンゾピレンの毒性によって引き起こされるミトコンドリアの機能不全を抑制することによって得られる、本来の神経保護作用の維持、また機能不全となったミトコンドリアに作用し回復させることで axon や dendrite の神経損傷からの回復を促進させ感覚異常の症状を改善させた可能性が示唆される。

E. 結論

本研究の結果から、ベンゾピレンの毒性が AHR を介し、触・圧覚を伝える A β 線維に作用することで軸索の変性を起こし、感覚異常等を発生させた可能性が示唆された。しかし、 β -NMN の投与はミトコンドリア機能不全の抑制による神経保護又は機能不全になったミトコンドリアに作用し回復させることでベンゾピレンによる感覚異常の症状改善に有効である可能性が示唆された。

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) 申 敏哲, 行平 崇, 小牧龍二, 他: 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. *福岡医誌*, 112(2) : 155-163, 2021.
- 6) Yoshino J, Baur JA, and Imai SI : NAD⁺ intermediates: The biology and therapeutic potential of NMN and NR. *Cell Metab*, 27(3): 513- 528, 2018.
- 7) Kiss T, Nyúl-Tóth Á, Balasubramanian P : Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation promotes neurovascular rejuvenation in aged mice: transcriptional footprint of SIRT1 activation, mitochondrial protection, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects. *Geroscience*, 42(2):527-546, 2020.
- 8) 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.
- 9) 公益社団法人日本 WHO 協会: ダイオキシンとその人体への影響. https://japan-who.or.jp/factsheets/factsheets_type/dioxins-and-their-effects-on-human-health/ (2021 年 10 月 14 日)
- 10) 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検討. *福岡医誌*, 108 (3) : 27-34, 2017.
- 11) 植田 弘師, 松本 みさき : 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.
- 12) Michalek JE, Akhtar FZ, Arezzo JC, et al : Serum dioxin and peripheral neuropathy in veterans of Operation

Ranch Hand. Neurotoxicol, 22(4): 479-490, 2001.

- 13) Thömke F, Jung D, Besser R, et al: Cranial nerve function in workers exposed to polychlorinated dioxins and furans. Acta Neurol Scand, 106(3): 155-158, 2002.
- 14) 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.
- 15) 荒記俊一, 村田勝敬: 鉛による末梢神経障害の診断. 産業医学, 26(1):3-8, 1984.
- 16) 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.
- 17) Mandal A, Drerup CM: Axonal Transport and Mitochondrial Function in Neurons. Front Cell Neurosci, 9:13:373, 2019.
- 18) Wang B, Huang M, Shang D, et al: Mitochondrial Behavior in Axon Degeneration and Regeneration. Front Aging Neurosci, 13:650038, 2021.

F. 研究発表

1. 論文発表

1. **申敏哲**, 行平崇, 小牧龍二, 福永貴之, 田中哲子, 土井 篤, 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. 福岡医誌 112(2): 155-163, 2021.

2. 学会発表

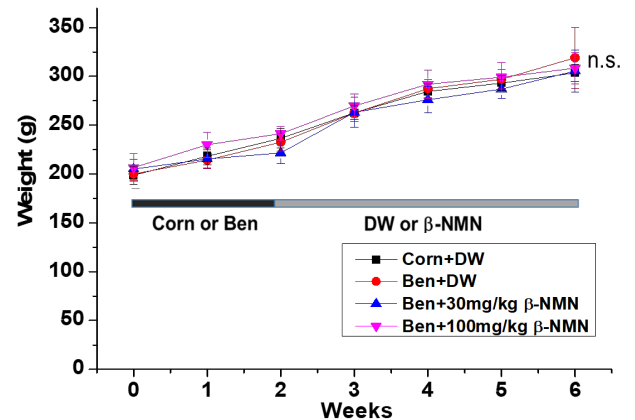
- ① **申敏哲**, 行平 崇, 小牧 龍二, 田中 哲子, 福永 貴之, 亀山 広喜, 坂本 亜里沙, 吉村 恵. 感覚評価を用いたベンゾピレン投与ラットに対するβ-NMN

の効果検討. 第72回西日本生理学会. 2021年11月5日.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

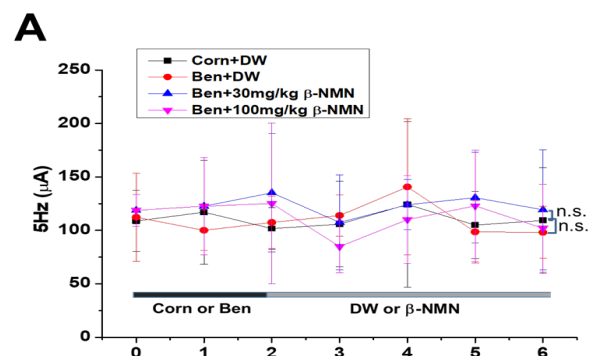
1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

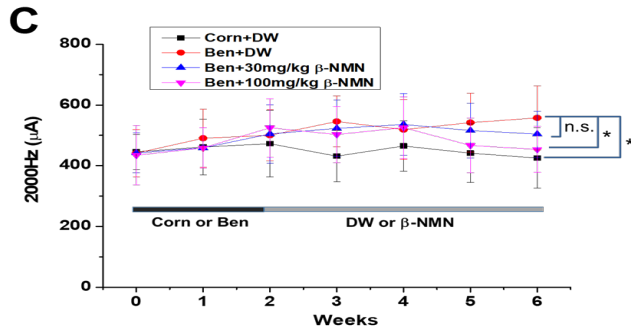
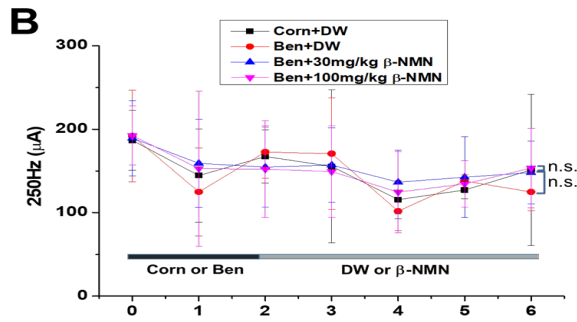
図 1. ベンゾピレン、β-NMN 投与による体重の変化



Corn, Corn-oil; DW, 蒸留水; Ben, 30mg/kg ベンゾピレン; β-NMN, β-Nicotinamide mononucleotide; n.s., no significant; Mean±S.D.; n=6

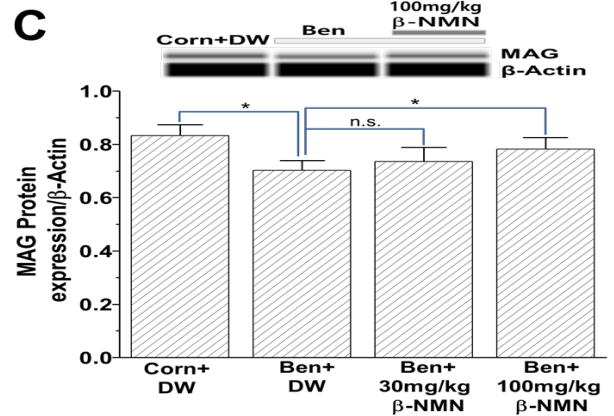
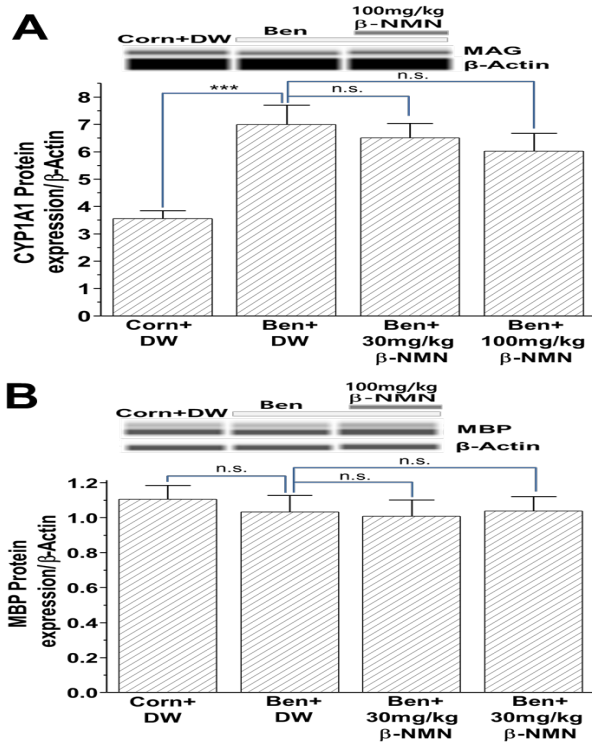
図 2. ベンゾピレン、β-NMN 投与による感覚閾値の経時的変化





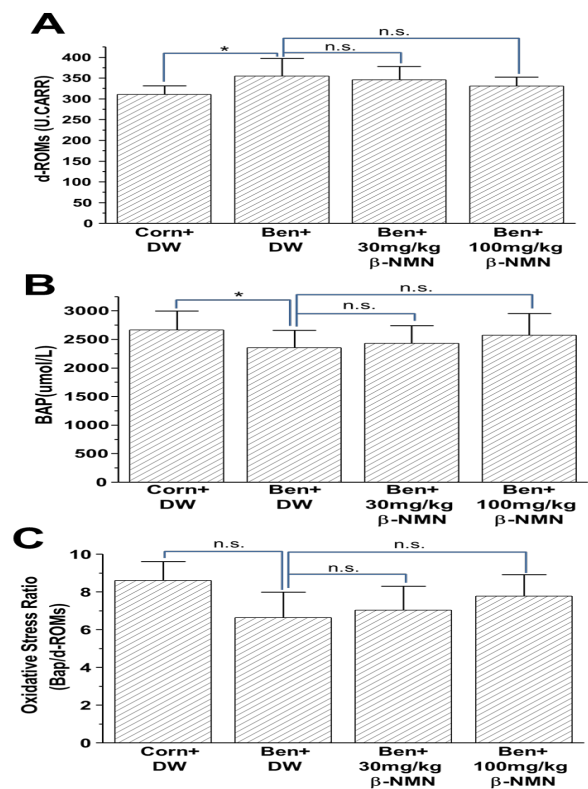
(A), 5Hz ; (B), 250Hz ; (C), 2000Hz ; Corn, Corn-oil ; DW, 蒸留水 ; Ben, 30mg/kg ベンゾピレン ; β -NMN, β -Nicotinamide mononucleotide ; *, $P < 0.05$; n.s., no significant ; Mean \pm S.D. ; $n = 6$

図 3. ベンゾピレン、 β -NMN 投与による CYP1A1、MAG タンパク質の変化



(A), CYP1A1 タンパク質の変化 ; (B), MBP タンパク質の変化. ; (C), MAG タンパク質の変化. Corn, Corn-oil ; DW, 蒸留水 ; Ben, 30mg/kg ベンゾピレン ; β -NMN, β -Nicotinamide mononucleotide ; CYP1A1, cytochrome P450 (P450) 1A1 ; MBP, myelin basic protein. ; MAG, myelin-associated glycoprotein. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; n.s., no significant ; Mean \pm S.E. ; $n = 6$

図 4. ベンゾピレン、 β -NMN 投与による酸化ストレス、抗酸化力の変化



(A), d-ROMs (酸化ストレス) ; (B), BAP
(抗酸化力) ; (C), 酸化ストレス度 ;
Corn, Corn-oil ; DW, 蒸留水 ; Ben,
30mg/kg ベンゾピレン ; β -NMN, β -
Nicotinamide mononucleotide ; n. s.,
no significant ; Mean \pm S. E. ; n=6