

[原著]

## 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

小 牧 龍 二<sup>1)2)</sup>      行 平      崇<sup>1)3)</sup>      福 永 貴 之<sup>1)4)</sup>  
田 中 哲 子<sup>1)</sup>      申      敏 哲<sup>1)\*</sup>

Effect of  $\beta$ -Nicotinamide mononucleotide on benzo[a]pyrene-treated rats using  
quantitative threshold evaluation

Ryuji KOMAKI<sup>1)2)</sup>, Takashi YUKIHIRA<sup>1)3)</sup>, Takayuki FUKUNAGA<sup>1)4)</sup>,  
Tetsuko TANAKA<sup>1)</sup>, Min-Chul SHIN<sup>1)\*</sup>

### 要旨

本研究では、ベンゾピレン暴露ラットに対する $\beta$ -NMNの効果を5Hz, 250Hz, 2000Hzの異なる3種類の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, ベンゾピレン中毒ラットでは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 $\beta$ -NMNの投与により有意に抑制された。Western blot法を用いたcytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1), myelin basic protein (MBP), myelin-associated glycoprotein (MAG)の発現検討では, ベンゾピレン投与群に対し,  $\beta$ -NMNの投与群でCYP1A1の発現増加の抑制傾向, MAGの発現低下の有意な抑制がみられた。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。酸化ストレス度に関しては, ベンゾピレン投与群に対し,  $\beta$ -NMN投与群で酸化ストレス状態の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, ベンゾピレンの毒性がAHRを介し, 触・圧覚を伝えるA $\beta$ 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,  $\beta$ -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神経損傷によ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, 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軸索や樹状突起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た。

キーワード : benzo[a]pyrene, 感覚閾値,  $\beta$ -Nicotinamide mononucleotide,  
arylhydrocarbon receptor

### I. はじめに

カネミ油症事件発生からおおよそ50年の年月が経過した現在においても, 未だ頭痛や倦怠感, 瘡様皮

疹などの後遺症が報告されている<sup>1)</sup>。しかし, 油症事件発生初期では特徴的な皮膚症状に集中したため, 皮膚科を除くその他多くの研究者の注目を十分に浴びることはなかったが, その後の研究によって本症

所属

<sup>1)</sup> 熊本保健科学大学 保健科学部 リハビリテーション学科 理学療法学専攻

<sup>2)</sup> リハビリテーションセンター 熊本回生会病院

<sup>3)</sup> 帝京大学福岡医療技術学部 理学療法学科

<sup>4)</sup> くまもと南部広域病院

責任著者 : karusu94@kumamoto-hsu.ac.jp

は決して皮膚症状のみならず、全身の症状も有することが明らかとなってきた。特に、これまでも末梢の感覚鈍麻やしびれ感などの末梢神経障害が多く、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<sup>2-4)</sup>。油症の原因となったカネミオイルには Polychlorinated quarterphenyls (PCQ), Polychlorinated biphenyls (PCB), Polychlorinated dibenzofirans (PCDF) 等の dioxin 類が混在していたことが明らかにされている<sup>1)</sup>。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 $\beta$  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<sup>5)</sup>。また、その症状は抗酸化作用と Aryl hydrocarbon receptor (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<sup>5)</sup>。

$\beta$ -Nicotinamide mononucleotide ( $\beta$ -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、生命を延長させる効果がある<sup>6-8)</sup>。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、ニューロンの軸索や樹状突起 (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が確認されている<sup>6-8)</sup>。これらの報告から  $\beta$ -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  $\beta$ -NMN の効果を感じ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。

## II. 対象および方法

### 1. 実験動物と試薬の投与

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  $\beta$ -NMN 投与群 (Ben+ $\beta$ -NMN) に分け、ベンゾピレン投与ラットに対する  $\beta$ -NMN の効果を調べた。ラットは市販の飼料 (CE-2, 日本クレア) および水を自由に摂取させ、動物舎の照明は12時間ごとに明暗のコントロールをし、室温25.0℃、湿度55±5%の条件下で飼育した。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。ベンゾピレン (Benzo[a]pyrene) は富士フィルム和光純薬 (株) から購入した。 $\beta$ -NMN は東京化成工業株式会社から購入し使用した。Corn-oil 投与群では Corn-oil を、ベンゾピレン投与群ではベンゾピレン (30mg/kg) 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、 $\beta$ -NMN 投与群には 30mg/kg, 100mg/kg の  $\beta$ -NMN 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。

### 2. 感覚閾値の測定

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。ラットは拘束装置に入れ、およそ5分程度放置し、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 (Ver10, Axon Instrument 社製) で、刺激時間から刺激強度 ( $\mu$ A) を換算した。

### 3. 酸化ストレス・抗酸化力測定

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、心臓からは採血を、左右後肢からは坐骨神経を採集し、血液は4℃、坐骨神経は-80℃で凍結した。血液試料は遠心分離し、取り出した血清を用いて、採血後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。測定キットは、酸化ストレスの測定に d-ROMs テスト (正常範囲: 200 から300U. CARR) (Diacron 社製)、抗酸化力の測

定に BAP テスト (最適値:  $2200 \mu\text{M/L}$  以上) (Diacron 社製) を使用した。d-ROMs テストでは、 $\text{pH}4.8$  の酢酸緩衝液キュベットを  $37^\circ\text{C}$  まで加温し、保温したキュベットに血清  $20 \mu\text{L}$  を入れた後、呈色液クロモゲン (N, N ジエチエルパラフェニレンジアミン) を  $20 \mu\text{L}$  入れ混合し、光度計に入れて活性酸素・フリーラジカルによる代謝物であるヒドロペルオキシドの量を測定した。単位は U. CARR が用いられ、 $1\text{U. CARR} = 0.08 \text{ mg}/100\text{mLH}_2\text{O}_2$  になる。BAP テストは、チオシアン酸塩誘導体を含む試薬入りのキュベットを  $37^\circ\text{C}$  まで加温する。次に三価鉄塩を含む試薬を  $50 \mu\text{L}$  滴下、混合し赤く呈色させる。その後光度計で三価鉄イオン濃度を測定後、三価鉄イオンが呈色している試薬に血清を  $10 \mu\text{L}$  入れて混合すると血清中の抗酸化物質の作用で二価鉄イオンに還元され、脱色される。その色の変化を光度計で計測し、血清の還元力を評価した。また、BAP を d-ROM で除したものを酸化ストレス度と示し、 $\text{BAP}/\text{d-ROMs} \leq 12.5$  の場合を酸化ストレス状態とみなした<sup>5) 9) 10)</sup>。

#### 4. CYP1A1, MBP, MAG タンパク質の測定

CYP1A1, MBP, MAG タンパク質の測定では、凍結したラットの坐骨神経は解凍後、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。

#### 5. 統計処理

感覚閾値の結果は、標準偏差 (S.D.) で、酸化ストレス・抗酸化力と CYP1A1, MBP, MAG タンパク質測定結果は平均  $\pm$  標準誤差 (S.E.) でそれぞれ算出した。各群間差は、一元配置分散分析し、事後検定として Scheffe 検定を用いた多重比較を行った。なお有意水準は  $5\%$  ( $p < 0.05$ ) とした。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 体重の変化

ベンゾピレンの摂取が代謝等の生体に及ぼす影響を確認するために体重の変化を検討した。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),  $30\text{mg/kg}$  ベンゾピレン + 蒸留水投与群 (Ben+DW),  $30\text{mg/kg}$  ベンゾピレン +  $\beta$ -NMN 投与群 (Ben+ $\beta$ -NMN) 共に最終測定時には  $200\text{g}$  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)。

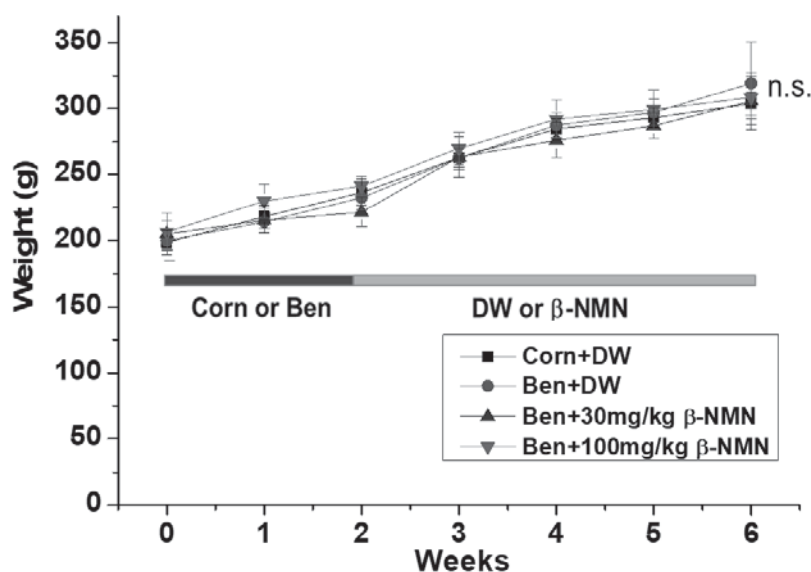


図 1. ベンゾピレン,  $\beta$ -NMN 投与による体重の変化

Corn, Corn-oil; DW, 蒸留水; Ben,  $30\text{mg/kg}$  ベンゾピレン;  $\beta$ -NMN,  $\beta$ -Nicotinamide mononucleotide; n.s., no significant; Mean  $\pm$  S.D.;  $n = 6$

## 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の周波数による電気刺激では、各群若干の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（図2A、B）。2000Hzの周波数による電気刺激では、Corn+DW群に対し、Ben+DW群でベンゾピレン投与3週目から感覚閾値の有意な上昇がみられた（ $425.63 \pm 99.50 \mu A$ 、 $557.56 \pm 105.23 \mu A$ ）。しかし、ベンゾピレン経口投与後30mg/kg  $\beta$ -NMN経口投与群では、感覚閾値上昇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が、100mg/kg  $\beta$ -NMN経口投与群では、 $\beta$ -NMN投与3週目から有意な感覚閾値上昇の抑制がみられた（30mg/kg  $\beta$ -NMN： $504.26 \pm 75.58 \mu A$ 、100mg/kg  $\beta$ -NMN： $454.07 \pm 70.67 \mu A$ ）（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 $\beta$ -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cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1, 図3A), myelin basic protein (MBP, 図3B) と myelin-associated glycoprotein (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、Ben+DW群（ $6.98 \pm 0.71$ ）では、Corn+DW群（ $3.55 \pm 0.29$ ）に比べ、有意な発現増加がみられたが、Ben+ $\beta$ -NMN群においては、有意差は認められなかったものの、その発現増加の抑制傾向がみられた（30mg/kg  $\beta$ -NMN： $6.50 \pm 0.52$ 、100mg/kg  $\beta$ -NMN： $6.01 \pm 0.66$ ）。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（ $0.70 \pm 0.04$ ）でCorn+DW群（ $0.83 \pm 0.04$ ）より発現の低下がみられたがBen+ $\beta$ -NMN群においてはその低下の抑制がみられた（30mg/kg  $\beta$ -NMN： $0.74 \pm 0.05$ 、100mg/kg  $\beta$ -NMN： $0.78 \pm 0.04$ ）。

## 4. ベンゾピレン、 $\beta$ -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 $\beta$ -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（ $310 \pm 21.49 \mu M/L$ ）に対し、Ben+DW群（ $354.3 \pm 30.25 \mu M/L$ ）で酸化ストレスの有意な増加がみられ、Ben+ $\beta$ -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（30mg/kg  $\beta$ -NMN： $345.84 \pm 31.96$ 、100mg/kg  $\beta$ -NMN： $330.59 \pm 21.56$ ）（図4A）。抗酸化力に関しては、Corn+DW群（ $2664.66 \pm 251.30 \mu M/L$ ）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（ $2350.14 \pm 305.27 \mu M/L$ ）。しかし、Ben+ $\beta$ -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（30mg/kg  $\beta$ -NMN： $2430.73 \pm 310.59$ 、100mg/kg  $\beta$ -NMN： $2569.46 \pm 380.53$ ）。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し、酸化ストレス度では、Ben+DW群（ $6.63 \pm 1.36$ ）に対し、Ben+ $\beta$ -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の、有意差は認められなかった（30mg/kg  $\beta$ -NMN： $7.03 \pm 1.28$ 、100mg/kg  $\beta$ -NMN： $7.78 \pm 1.14$ ）。

## IV. 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 $\beta$ -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+ $\beta$ -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、魚介類を通じて起こり、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し、発がん性もある<sup>11)</sup>。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様々な症状をもたらし、西日本一帯における食中毒事件であ

る。また発生から50年が過ぎた現在でも、顔面などへの色素沈着や塩素挫瘡（クロロアクネ）などの皮膚症状、頭痛、手足のしびれ、肝機能障害など様々な後遺症に苦しんでおり、累計の認定患者は2300名

程度存在するとされ、現状の把握はなされていないものの、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神経障害等が報告されている<sup>4)</sup>。

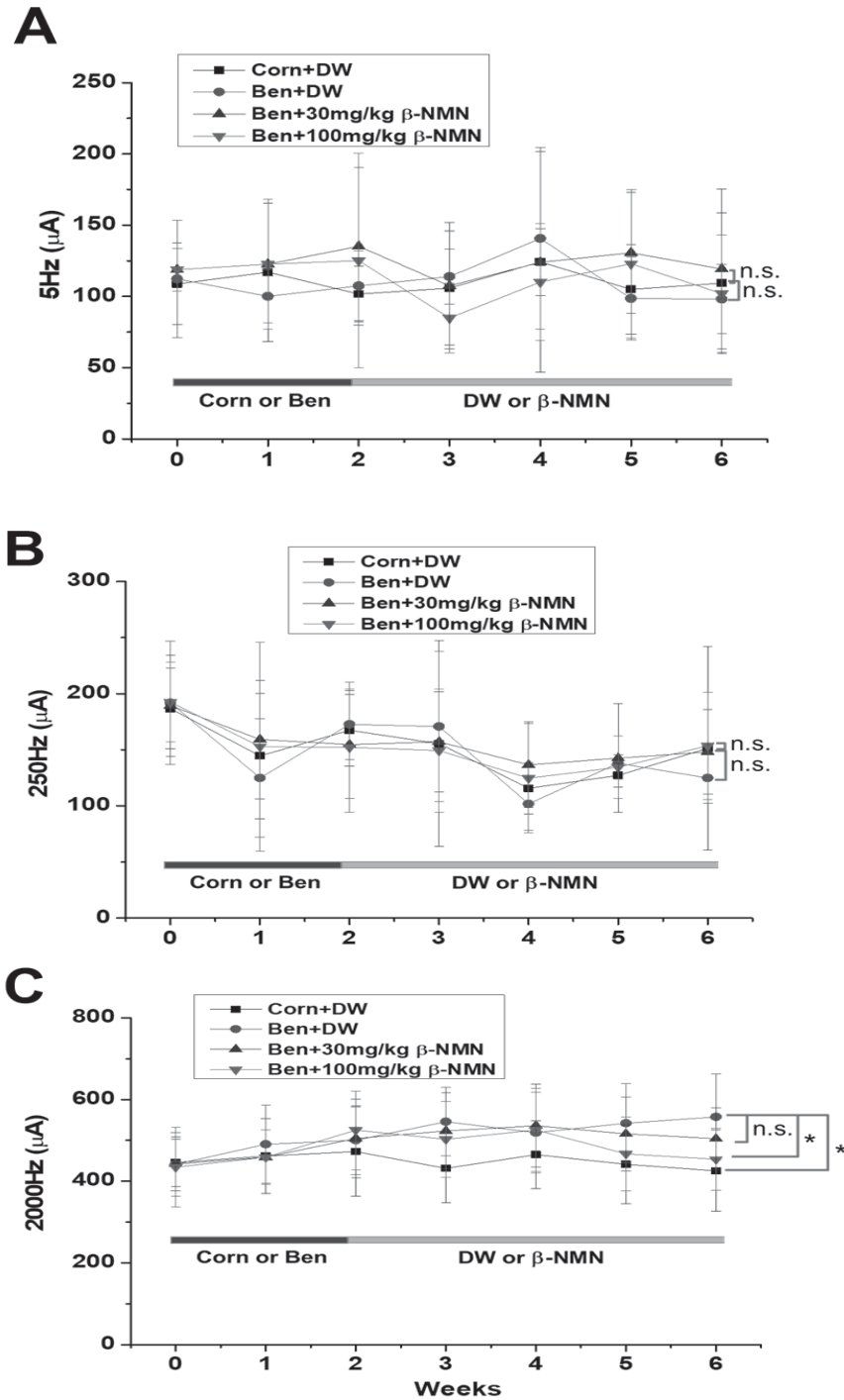


図2. ベンゾピレン、 $\beta$ -NMN 投与による感覚閾値の経時的変化

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

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 $\beta$ 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。古谷らは、感覚異常は小径線維障害を示唆するので、油症患者では小径線維障害が主体であるかもしれない<sup>4)</sup>と述べ、A $\beta$ 線維の伝導速度の緩徐化は、末梢のし

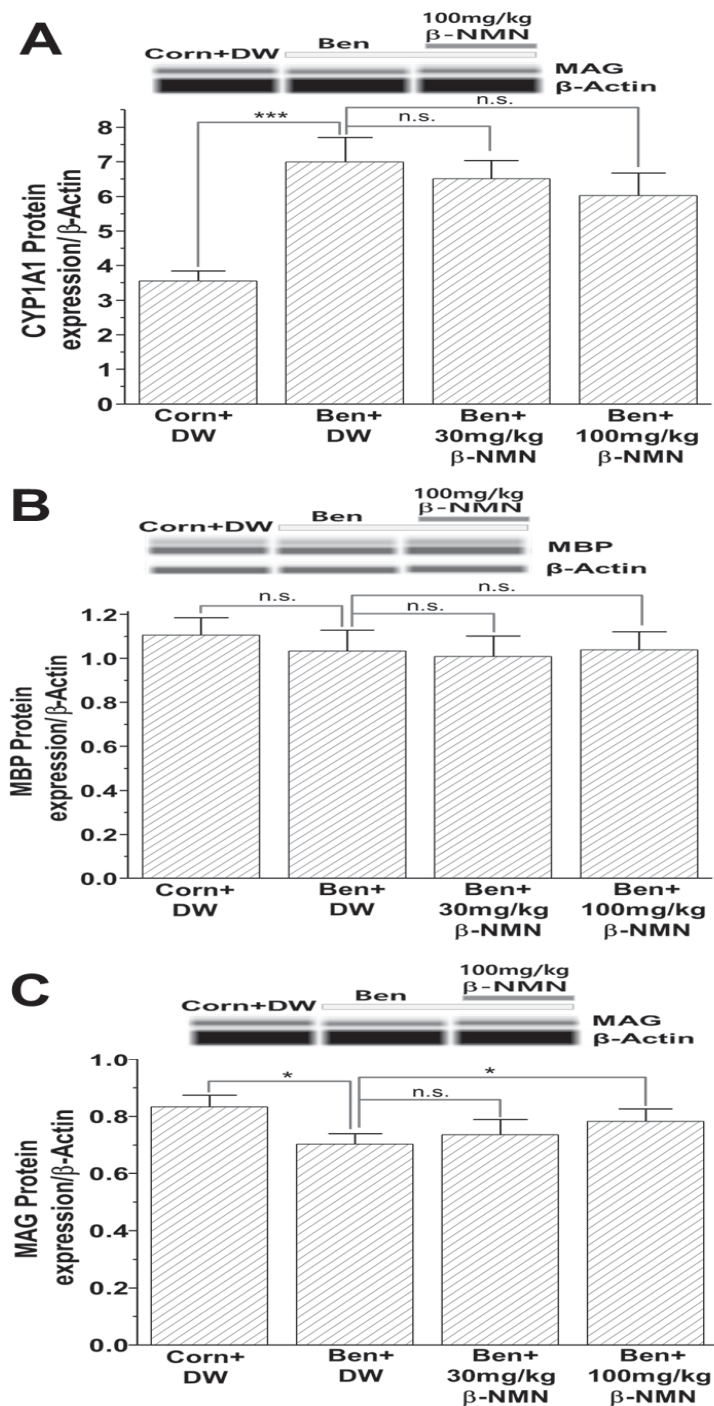


図3. ベンゾピレン、 $\beta$ -NMN 投与による CYP1A1, MBP, MAG タンパク質の変化

(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;  $\beta$ -NMN,  $\beta$ -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.;  $n = 6$

びれ感と関係が有るとの報告もされている<sup>12)</sup>。また、植田ら<sup>13)</sup>は、 $A\beta$ 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 $A\beta$ 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、末梢神経障害由来の感覚異常では、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<sup>14-16)</sup>。ベンゾピレンの毒性に

よって $A\beta$ 線維に異常を来とし、2000Hzの電気刺激における閾値の上昇を認め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。脱髄とは、軸索は保たれるが、髄鞘に障害が生じる現象であり、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。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

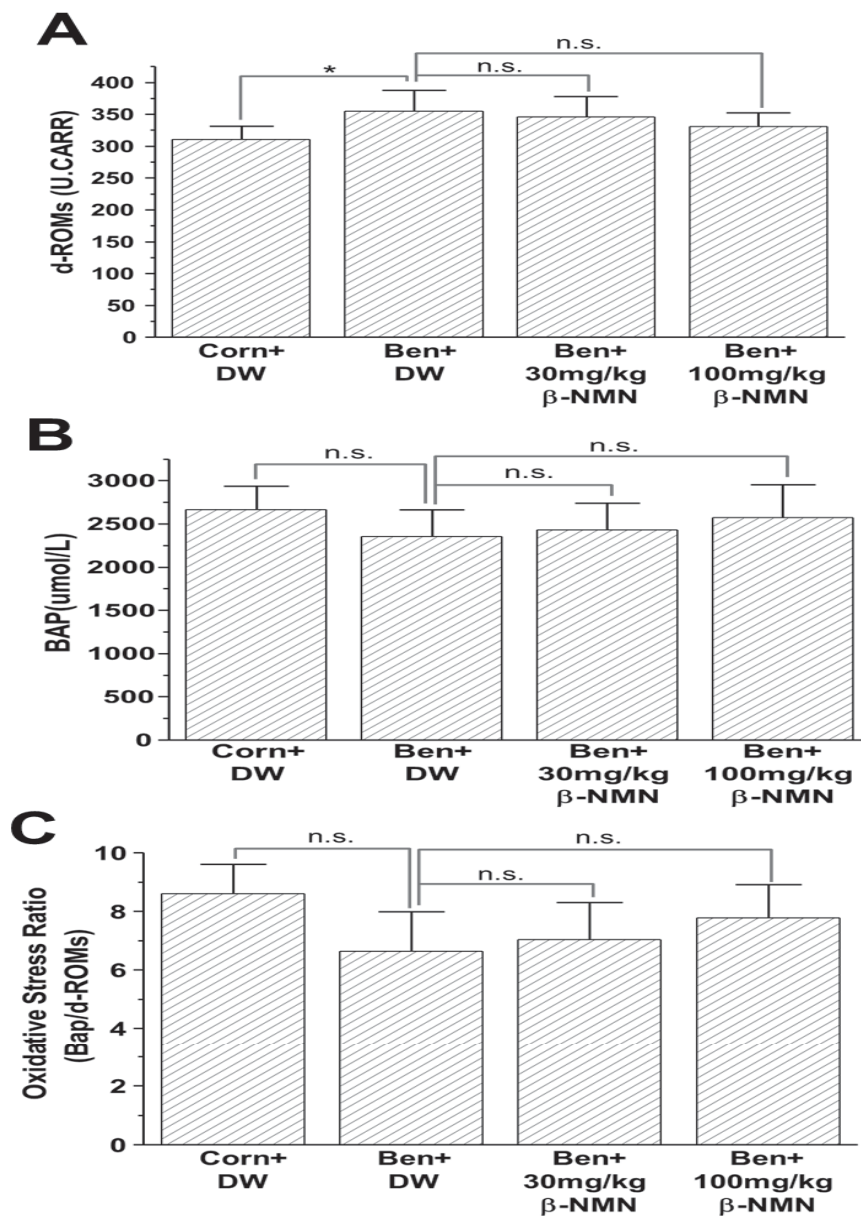


図4. ベンゾピレン、 $\beta$ -NMN 投与による酸化ストレス、抗酸化力の変化

(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;  $\beta$ -NMN,  $\beta$ -Nicotinamide mononucleotide; \*,  $P < 0.05$ ; n.s., no significant; Mean  $\pm$  S.E.;  $n = 6$

うまく伝達できなくなるために起こるとされている<sup>16, 17)</sup>。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、 $\beta$ -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発現増加の抑制傾向、MAGの発現低下を抑制させることを確認した。ダイオキシシン類の毒性は、AHRを介して起こることや、様々な生薬がAHR活性を抑制することが報告されている<sup>18)</sup>。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<sup>18)</sup>。本研究ではベンゾピレン投与ラットに $\beta$ -NMNを投与した結果ケイヒと同様の結果が得られた。最近の研究によって、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を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<sup>6)</sup>。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<sup>6-7)</sup>。Vitamin B2誘導体である $\beta$ -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、ニューロンの軸索や樹状突起の発育促進、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<sup>6-8)</sup>。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<sup>19)</sup>。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い<sup>20)</sup>、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<sup>20)</sup>。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、 $\beta$ -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神経損傷の抑制、又は神経損傷によるミトコンドリアの機能不全を抑制させることで、本来 $\beta$ -NMNが持っていると思われる神経保護作用と併せて、神経の損傷からの回復を促進させることによって感覚異常の症状を改善させた可能性が考えられる。

## V. 結語

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 $\beta$ 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、 $\beta$ -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。

## 謝 辞

本研究は、厚生労働省科学研究費補助金 (食品を介したダイオキシ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, 課題番号:21KA2003) の助成を受けたものである。ここに記して謝辞を表します。

## 利益相反

本研究における利益相反は存在しない。

## VI. 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<sup>+</sup> 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) Nojima, J, Motoki, Y, Tsuneoka, H, et al : Oxidation stress index<sup>1</sup> as a possible clinical marker for the evaluation of non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*, 155 (4) : 528-530, 2011.
- 10) 川上知子, 由良明彦, 小川勝利, 他 : 血中における酸化ストレスと脂質の相関性. *昭和学士会誌*, 74 (4) : 403-412, 2014.
- 11) 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/](https://japan-who.or.jp/factsheets/factsheets_type/dioxins-and-their-effects-on-human-health/) (2021年10月14日)
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) Mandal A, Drerup CM: Axonal Transport and Mitochondrial Function in Neurons. *Front Cell Neurosci*, 9 ; 13 : 373, 2019.
- 20) Wang B, Huang M, Shang D, et al: Mitochondrial Behavior in Axon Degeneration and Regeneration. *Front Aging Neurosci*, 13 : 650038, 2021.

(令和4年11月25日受理)

## Effect of $\beta$ -Nicotinamide mononucleotide on benzo[a]pyrene-treated rats using quantitative threshold evaluation

Ryuji KOMAKI, Takashi YUKIHIRA, Takayuki FUKUNAGA,  
Tetsuko TANAKA, Min-Chul SHIN\*

### Abstract

In this study, we investigated the effects of  $\beta$ -Nicotinamide mononucleotide ( $\beta$ -NMN) on rats treated with benzo[a]pyrene. The investigations were performed using quantitative threshold evaluations with three different sensory stimuli at 5 Hz, 250 Hz, and 2000 Hz, by measuring oxidative stress/antioxidants, and using Western Blotting for components of associated pathways. We found no significant threshold changes in electrical stimulation frequencies of 5 and 250 Hz in benzo[a]pyrene-treated rats. The electrical stimulation frequency of 2000 Hz resulted in an increase in the sensory thresholds of benzo[a]pyrene-treated rats. However, this heightened threshold was suppressed by the administration of  $\beta$ -NMN. Western Blot analysis revealed that the increased expression of cytochrome P450 (P450) 1A1 (CYP1A1) and the decreased expression of myelin-associated glycoprotein (MAG) in the benzo[a]pyrene-treated rats were slightly inhibited and increased upon  $\beta$ -NMN administration, respectively. However, there was no significant difference between the groups in terms of the expression of myelin basic protein (MBP). A slight improvement in the oxidative stress state was observed among the  $\beta$ -NMN-treated rats compared with the benzo[a]pyrene-treated rats, but with no significant differences. These results indicate that the administration of benzo[a]pyrene may lead to demyelination caused by paresthesia due to its toxicity on A  $\beta$  fibers that transmit tactile and pressure sensations. In addition, the administration of  $\beta$ -NMN may improve the symptoms of paresthesia by accelerating recovery from nerve damage, thereby producing a neuroprotective effect and suppressing mitochondrial dysfunction caused by benzo[a]pyrene toxicity.

Keywords: benzo[a]pyrene, sensory threshold,  $\beta$ -Nicotinamide mononucleotide ( $\beta$ -NMN), arylhydrocarbon receptor