

博士論文

メチル水銀の毒性機序および新規障害部位の解析

令和6年3月

飯島 悠太

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

博士後期課程

薬科学専攻

目次

序章	3
第1章 メチル水銀毒性発現におけるアポトーシス関連因子 CHOP の役割	6
1-1. 序論.....	7
1-2. 実験方法.....	11
1-2-1. 実験に使用した動物	11
1-2-2. MeHg の投与.....	11
1-2-3. 生体試料中総水銀量の測定.....	12
1-2-4. 後肢伸展反射の評価	12
1-2-5. 組織染色に供する脳切片の作製.....	13
1-2-6. TUNEL 染色	13
1-2-7. 免疫組織化学染色	15
1-2-8. 各種染色の撮像および定量解析.....	17
1-2-9. 統計解析.....	17
1-3. 実験結果.....	18
1-3-1. マウスへの MeHg の曝露	18
1-3-2. 水銀蓄積に対する CHOP 欠失の影響	19
1-3-3. MeHg 中毒症状に対する CHOP 欠失の影響.....	20
1-3-4. MeHg 誘発性神経細胞死に対する CHOP 欠失の影響	22
1-4. 考察.....	27
1-4-1. MeHg 曝露条件の妥当性	27
1-4-2. UPR に対する CHOP 欠失の副次的な影響	29
1-4-3. MeHg による UPR を介した細胞死惹起機構	29
第2章 マウス嗅覚系に対するメチル水銀曝露の影響.....	31
2-1. 序論.....	32
2-2. 実験方法.....	37
2-2-1. 実験に使用した動物	37
2-2-2. MeHg の投与.....	37
2-2-3. 生体試料中総水銀量の測定.....	37

2-2-4. 後肢伸展反射の評価	38
2-2-5. 組織染色に供する脳切片の作製	38
2-2-6. 免疫組織化学染色	38
2-2-7. TUNEL 染色	39
2-2-8. 免疫蛍光染色	39
2-2-9. ヘマトキシリン・エオジン染色	41
2-2-10. 各種染色の撮像および定量解析	41
2-2-11. 統計解析	43
2-3. 実験結果	46
2-3-1. MeHg 中毒モデルの作製と評価	46
2-3-2. 嗅覚系における水銀蓄積	48
2-3-3. 主嗅球に対する MeHg 曝露の影響	49
2-3-4. 嗅皮質神経細胞に対する MeHg 曝露の影響	52
2-3-5. 二次嗅皮質神経細胞に対する MeHg 曝露の影響	58
2-3-6. 嗅皮質における MeHg 誘発性神経細胞死の特徴	61
2-3-7. グリア細胞に対する MeHg 曝露の影響	66
2-3-8. 嗅上皮に対する MeHg 曝露の影響	72
2-3-9. 腹腔内投与による鼻粘膜および嗅球への水銀蓄積の検討	78
2-4. 考察	79
2-4-1. 嗅覚系を傷害する既知の化学物質と比較した MeHg の特性	79
2-4-2. 主嗅球に対する MeHg 曝露の影響	80
2-4-3. 嗅皮質に対する MeHg 曝露の影響	82
2-4-4. 嗅上皮に対する MeHg 曝露の影響	82
2-4-5. 他の神経変性疾患における嗅覚障害の病巣と本研究の比較	83
2-4-6. 水俣病嗅覚障害モデルとしての MeHg 中毒マウスの適性	84
2-4-7. 統計学的妥当性について	85
終章	91
引用文献	96
参考文献	116
謝辞	117

序章

水銀は常温で液体である唯一の金属であり、他の金属とアマルガムを形成する性質から、古来より工業および商用用途で広く用いられてきた。一方で、水銀および水銀化合物の利用は世界各地で健康被害を引き起こしており、本邦では過去に水俣病というメチル水銀（methylmercury, MeHg）による深刻な公害を経験した。MeHg は元来、海洋に沈着した無機水銀が堆積物中の微生物によって代謝されることで生じる有機水銀の一種である。海洋に沈着する水銀の起源としては、火山活動による大気中への水銀放出といった自然的要因が挙げられる。しかし現代においては、自然的要因の約 5 倍もの水銀が人為的要因によって大気中に放出されており¹、金採掘や石炭利用、セメント製造などの産業活動が大きく影響している²。大気中の水銀量は産業革命以前と比して約 3 倍に増加しており³、いかに水銀の利用および人為的排出が増加したかを物語っている。水銀はひとたび排出されると環境中ではほとんど分解されず、大気、水系、堆積物、土壌、生物相を様々な化学形態で循環する。北極圏では人為的な水銀排出量は僅少であるにも関わらず⁴、その近郊に棲む生物に取り込まれた水銀量が近代以降大幅に増加しており（図 1）、今まさに地球規模で水銀汚染のピークを迎えていることが推定される。こうした背景から、水銀および水銀化合物の人為的排出からヒトの健康および環境を保護することを目的とした「水銀に関する水俣条約」が発効されるなど、水銀汚染への危機意識が世界的に高まっている。

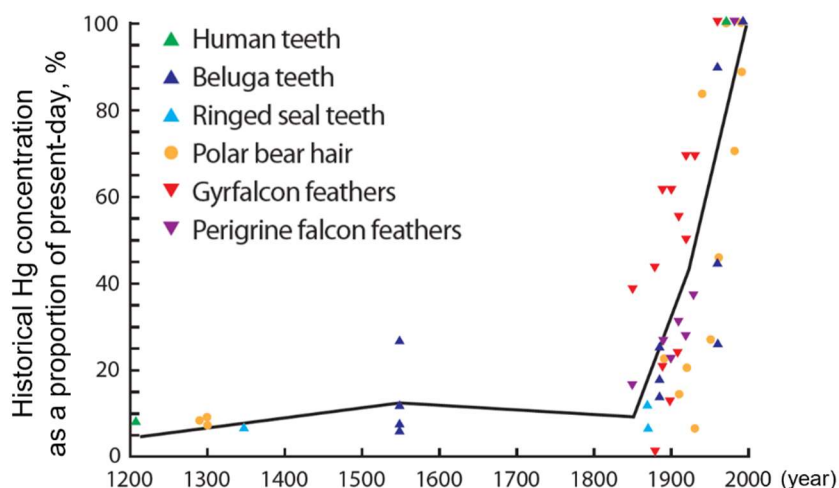


図 1. 北極圏近郊に棲む生物の水銀量の推移（西暦 1200 年から 2000 年まで）

Global Mercury Assessment 2013 より一部改変した⁵。

前述の通り、様々な要因によって大気中に放出された水銀の一部は、海洋に沈着したのち、堆積物中の微生物によって MeHg に変換される。MeHg は生体蓄積性が高く、生物濃縮によって水生食物連鎖に高度に蓄積することから、その頂点に位置するマグロや海洋哺乳類を摂取することで、我々は現代においても MeHg に曝露されるリスクがある⁶。MeHg は他の水銀化合物と比して強力な神経毒性を有することから、特に生体への悪影響が懸念されている。消化管からの吸収率は無機水銀の一種である塩化水銀 (II) が 10%前後であるのに対して、MeHg は約 95%と極めて高い⁷。また、血液脳関門を通過することが可能であり、脳移行性が高いことが特徴的である⁸。脳内に蓄積した MeHg は神経細胞死を惹起し、水俣病のような中枢神経障害を引き起こすとされている (図 2)。成人型の水俣病では特に小脳、中心後回 (大脳皮質体性感覚野)、中心前回 (大脳皮質運動野)、後頭葉 (大脳皮質視覚野) および横側頭回 (大脳皮質聴覚野) において神経細胞の脱落が顕著であり^{9,10}、これらの病変と一致して、患者は四肢遠位部の知覚鈍麻、運動失調、視野狭窄、聴力障害などの症候を示す¹¹。しかしながら、水俣病の発生から半世紀以上経過した現在においても、MeHg の曝露によって神経細胞死に至るメカニズムは明らかになっておらず、傷害される脳領域においても未解明な点が残されている。そこで、第 1 章では MeHg の毒性機序の解析、第 2 章では新規障害部位の同定という 2 つの観点から研究課題を設定し、MeHg による病態メカニズムを検討した。

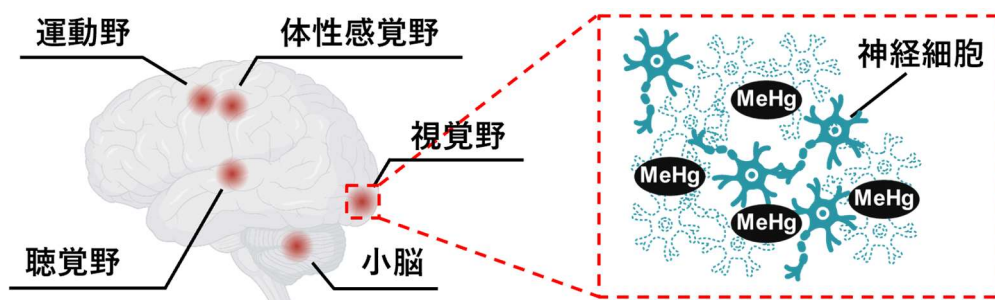


図 2. 水俣病の臨床学的特徴

水俣病は、MeHg によって中枢神経系が障害を受ける中毒性疾患であり、主として小脳や大脳皮質の特定の領域において神経細胞の変性・脱落が生じる。一部のイラストは BioRender (<https://www.biorender.com/>) から取得した。

第 1 章

メチル水銀毒性発現における アポトーシス関連因子 CHOP の役割

1-1. 序論

システインは、タンパク質の機能的に重要な部位に高度に保存されたアミノ酸残基の一つであり、側鎖にチオール（-SH）基を有している。ヒトゲノム中にコードされているシステイン残基は約 214,000 個と試算されるが、大半はタンパク質内部に埋没しているか、ジスルフィド結合あるいは亜鉛などの金属イオンの配位子として利用されている¹²。一方で、システイン残基の 10-20%程度は酸解離定数 pKa が低いために、生理的条件下でプロトン（H⁺）が解離しやすく、求核性の高いチオレートアニオン（-S⁻）となる。このような反応性の高いシステイン残基は、しばしば活性中心として利用され触媒作用を有するほか¹³、一酸化窒素や電子密度の低い部位を有する親電子物質の標的となり、S-ニトロシルや親電子物質との共有結合といった多様な化学修飾を形成する^{14,15}。同じく親電子性を有する MeHg の場合、チオール基に対する親和性は、他のアミノ酸側鎖よりもはるかに高い^{16,17}。この化学的特性に基づき、MeHg は生体内においてシステイン残基に特異的に結合し、種々のタンパク質と S-水銀化と呼ばれる化学修飾を形成する（図 3）。S-水銀化は被修飾タンパク質の構造や酵素活性を変調することで、MeHg の毒性発現に関与すると考えられている¹⁸。

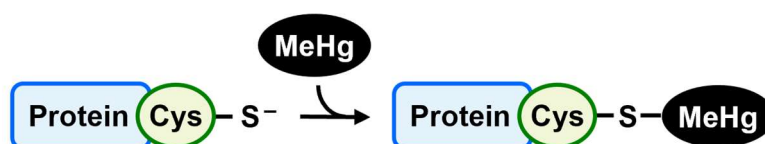


図 3. タンパク質システイン（Cys）残基の S-水銀化

MeHg とチオレートアニオンとの共有結合は S-水銀化と呼ばれ、タンパク質の機能変化を引き起こす。

MeHg による神経細胞傷害の様式として、高度に制御されたプログラム細胞死の一形態であるアポトーシスが強く示唆されている¹⁹⁻²¹。一般的に、アポトーシスのシグナル伝達は細胞表面のデスレセプター、DNA 損傷、ミトコンドリアや小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) ストレスによって介在されるが、白杵ら (2008 年) は、MeHg によって生じる ER ストレスがアポトーシスを誘導する可能性を見出している²²。その後当研究室では、新生タンパク質の成熟化を担う protein disulfide isomerase (PDI) の酵素活性が S-水銀化によって低下することを明らかにし²³、MeHg がいかにして ER 内にミスフォールドしたタンパク質の蓄積を引き起こすか、すなわち ER ストレスを惹起する機序の一端を示している (図 4)。さらに、MeHg に曝露されたマウス脳内で神経細胞死が生じる以前に、神経細胞選択的に ER ストレスが惹起されることを明らかにした²⁴。他のグループからも MeHg の曝露によって ER ストレスが惹起されることが支持される結果が報告されており²⁵⁻²⁷、神経細胞死の原因として有力であるが、肝心のアポトーシスを誘導する分子機構は定かでない。

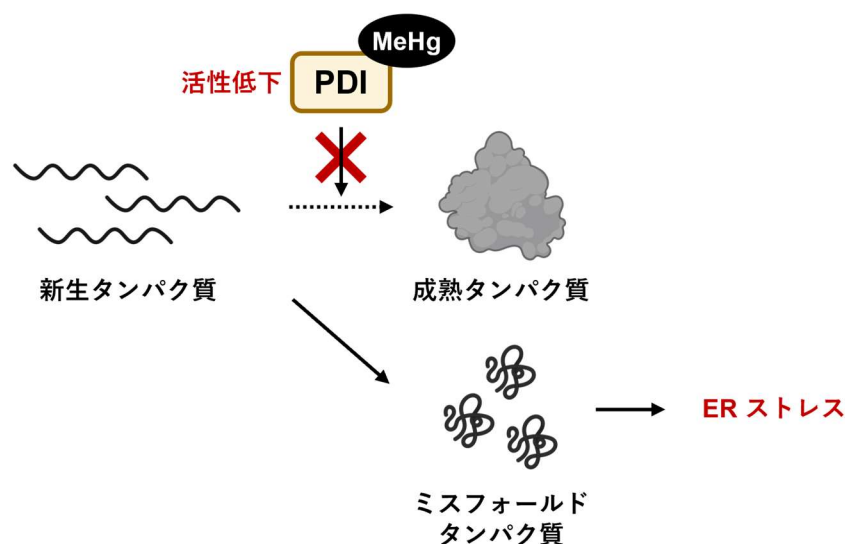


図 4. PDI の S-水銀化による ER ストレスの惹起

ER 内で新生タンパク質のフォールディングを触媒する PDI は S-水銀化によって酵素活性が阻害され、その結果ミスフォールドタンパク質の増加につながる。一部のイラストは BioRender (<https://www.biorender.com/>) から取得した。

細胞は ER ストレスに対して、unfolded protein response (UPR) と呼ばれる防御機構を備えている。UPR は ER 膜に局在する 3 種類のストレスセンサータンパク質、inositol-requiring enzyme 1 alpha (IRE1 α)、protein kinase RNA-like ER kinase (PERK)、activating transcription factor 6 (ATF6) を起点とした転写調節機構から構成され、大きく以下の 3 つの働きによってミスフォールドタンパク質の蓄積を回避する^{28,29}。

- (1) 新規に合成されるタンパク質の翻訳抑制
- (2) 分子シャペロンの転写誘導によるタンパク質のフォールディング促進
- (3) ER-associated degradation (ERAD) によるミスフォールドタンパク質のプロテアソーム依存的な分解促進

しかしながら、UPR の処理能力を超えるほどの重度な、あるいは長期的なストレスが負荷された場合、細胞はアポトーシスを誘導する (図 5)。

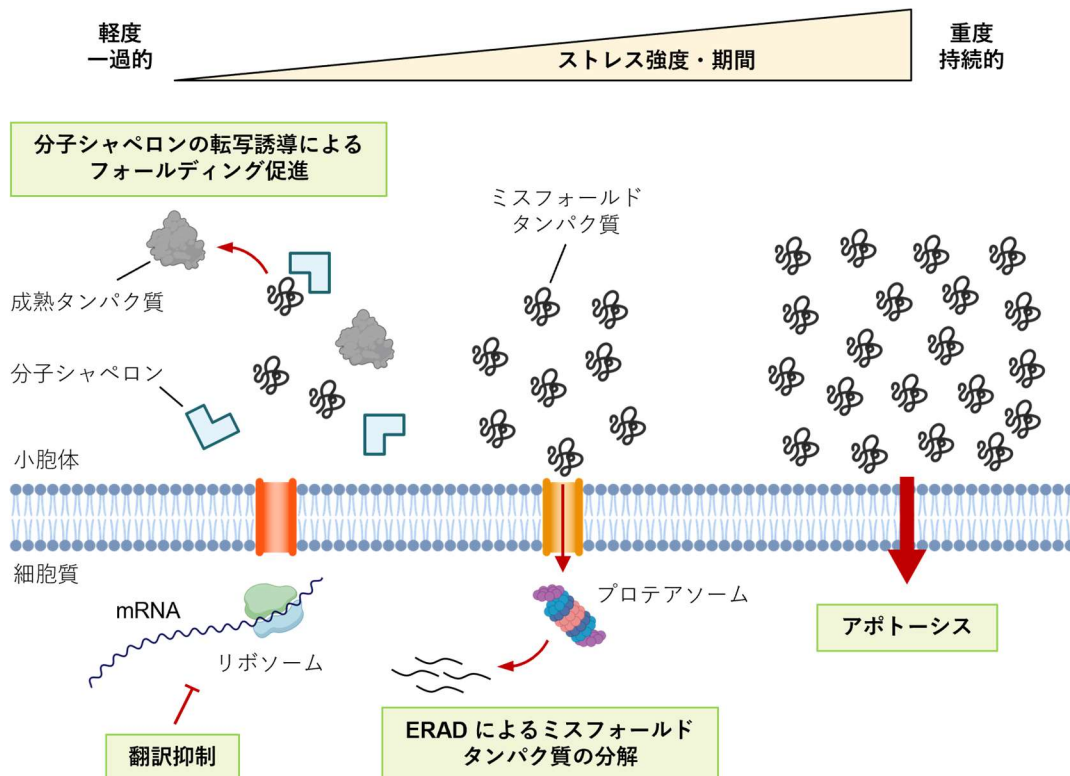


図 5. ER ストレスに対する UPR の働き

一部のイラストは BioRender (<https://www.biorender.com/>) から取得した。

当研究室はこれまで、MeHgがPERKおよびATF6をそれぞれ活性化し³⁰、下流のアポトーシス関連因子であるC/EBP homologous protein (CHOP)の発現を誘導することを明らかにしてきた²³。さらに、MeHgに曝露されたマウス脳内においてもアポトーシス細胞の増加と相関して、PERK-CHOP経路が活性化しており³¹、CHOPがMeHg誘導性アポトーシスを介在する可能性が示唆された(図6)。CHOPは生理的条件下ではごく低発現であるが、ERストレスに応じて強力に転写誘導される。CHOPは転写因子として機能し、Bcl-2ファミリータンパク質に属するapoptosis regulator Bcl-2 (BCL2)やBcl-2-like protein 11 (BIM)、Bcl-2 binding component 3 (PUMA)をはじめとする様々な抗アポトーシス因子およびプロアポトーシス因子の発現を制御する³²⁻³⁴。CHOPの誘導はERストレス性アポトーシスの主要な経路の一つと考えられており^{35,36}、細胞死を伴う種々の疾患制御の標的として注目されてきた。実際に、CHOPノックアウトマウスは脳虚血や神経毒である6-ヒドロキシドパミンによって誘発される神経細胞死に抵抗性を示す^{37,38}。一方で、MeHg誘導性神経細胞死におけるCHOPの役割は不明であった。そこで本章では、CHOPノックアウトマウスを用いてMeHgの神経毒性におけるCHOPの関与を検証した。

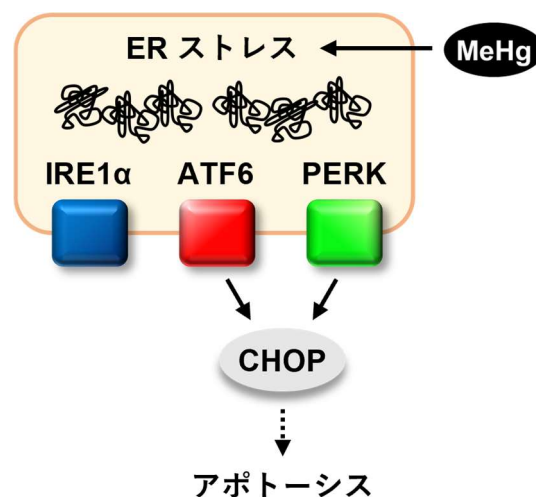


図6. 想定されるMeHg誘導性アポトーシスの分子機構

1-2. 実験方法

1-2-1. 実験に使用した動物

本実験には、野生型の C57BL/6NJcl マウス (以下, 野生型マウス) および C57BL/6 を遺伝的背景とし CHOP の発現が全身で欠失したホモノックアウトマウス (以下, CHOP ノックアウトマウス) を使用した. 野生型マウスは日本クレア株式会社から購入し, CHOP ノックアウトマウスは徳島大学・先端酵素学研究所・生体機能学分野 親泊政一 教授から取得した³⁹. CHOP ノックアウトマウスは正常に発達することが確認されている⁴⁰. 動物飼育施設は 12 時間の明暗サイクルのもと, 25°C ± 2°C, 相対湿度 65% ± 5% に維持した. 全てのマウスは 1 ケージあたり 5 匹を上限として, 木製床敷 (ホワイトフレック, The Jackson Laboratory Japan) を詰めたプラスチックケージ内で飼育され, 食餌 (CE-2, CLEA Japan) と飲水を自由に摂取可能とした. 週に 2 回の頻度でケージ交換および各個体の体重測定を行った. イソフルラン (#095-06573, Fujifilm Wako Pure Chemical) による深麻酔下でマウスを開腹し, 心採血により安楽死させた. 血液の凝固を防止するため, ヘパリンナトリウム (#3334401A6140, Nipro) を中に通した注射器を用いて採血を行った. マウスを経心的に生理食塩水で灌流した後, 脳を摘出し剃刀で右脳と左脳に分けた. 一連の動物実験は国立水俣病総合研究センターの管理下で, 同研究センターの動物実験規定に従って実施した (動物倫理委員会承認番号 050315-1).

1-2-2. MeHg の投与

塩化メチル水銀 (#M0589, Tokyo Chemical Industry) 150 mg と還元型グルタチオン (#073-02013, Fujifilm Wako Pure Chemical) 190 mg を 4 L の滅菌精製水に溶解させ, 終濃度 30 ppm の MeHg を含む飲水を調製した. 上記と同量の還元型グルタチオンのみを溶解させた飲水をコントロール (以下, Vehicle) として設定した. 2 ヶ月齢の雄性マウスを無作為に Vehicle 群と MeHg 群のケージに分け (1 ケージあたり 3 匹), 8 週間にわたって給水瓶から飲水を自由に摂取させることで, Vehicle および MeHg をそれぞれ投与した.

1-2-3. 生体試料中総水銀量の測定

全血は滅菌精製水で 20 倍に希釈し，測定まで 4°C で保存した．右脳から大脳の一部を摘出し，測定に供するまで -20°C で保存した．滅菌精製水で 5N に調製した水酸化ナトリウム (#31533-54, Nacalai Tesque) を脳組織 1 mg あたり 19 μ L 添加し，70°C に設定したアルミブロック恒温槽 (#1-4154-22, As One) で 30 分以上加温することで，組織を完全に溶解した．溶解した試料は測定前に，滅菌精製水で 5N に調製した塩酸 (#37313-25, Nacalai Tesque) で中和した．加熱気化一金アマルガム捕集一原子吸光法による水銀測定装置 MA-2/BC-1 (Nippon Instruments) を用いて，血液および大脳試料中の総水銀量を測定した．既知濃度の水銀標準溶液を用いて，0, 10, 30, 100 ppm の 4 点から検量線を作成し，機器付属の MA2000 software version 1.7.8. (Nippon Instruments) を用いて未知試料中の水銀濃度を算出した．

1-2-4. 後肢伸展反射の評価

両後肢が体側から大きく外側に広がる場合を 0 点 (正常な表現型)，片方の後肢が腹部側に後退している，あるいは両後肢が後退しているが体側よりも外側に位置する場合を -1 点 (軽度の障害)，接触はしないが両後肢が体側よりも内側に位置する場合を -2 点 (中等度の障害)，両後肢が腹部側に完全に後退し，互いに接触している場合を -3 点 (重度の障害) として，-3 点から 0 点までの 4 段階で各個体の後肢伸展反射の障害を評価した (図 7)．測定は週に 1 回行った．

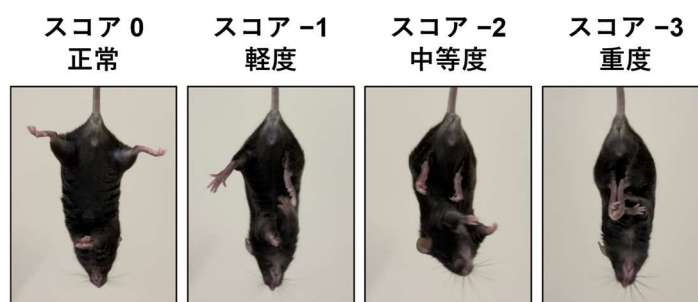


図 7. 後肢伸展反射の評価

後肢伸展反射の各スコアの代表的な例を示す．後肢伸展反射はマウスの尾を持って逆さに吊るした際に，後肢を左右に大きく開く現象を指す．一方で，MeHg 中毒が進行すると，次第に後肢同士が近接する．

1-2-5. 組織染色に供する脳切片の作製

左脳を摘出後すぐに4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) 溶液で浸漬固定した。4% PFA 溶液の組成は以下の通りである。

4% PFA 溶液 4 w/v% PFA (#26123-55, Nacalai Tesque)
160 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O (#31723-35, Nacalai Tesque)
42 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O (#192-02815, Nacalai Tesque)

固定した脳組織のパラフィン包埋は株式会社バイオ病理研究所に外注した。回転式マイクロトーム (#RM2245, Leica) を用いてパラフィンブロックから厚さ 5 μm の矢状切片を作製し、スライドガラス (#S9903, Matsunami Glass Ind.) に固定した。切片は各種染色に供する前に、以下の前処理を行った。キシレン (#46004-70, Kanto Chemical) 中で5分間×3回静置し、パラフィンを除去した。エタノール (#14033-70, Kanto Chemical) 中で5分間静置し、キシレンを除去した。続いて滅菌精製水で90%, 80%, 70%に調製したエタノール中で順に各5分間静置した。10分間の流水洗によってエタノールを除去した後、滅菌精製水で切片を洗浄した。

1-2-6. TUNEL 染色

terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色は In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (#12156792910, Roche) を用いて行った (図 8)。具体的な手順を以下に示す。Proteinase K (#1114886, Qiagen) を 10 mM Tris-HCl pH 7.5 で 1,000 倍に希釈し、終濃度 20 μg/mL の Proteinase K を含む浸透化液を調製した。前項 1-2-5 の通りに前処理した切片に浸透化液 300 μL を添加し、切片を並べた湿式チャンバーを 37°C に設定した恒温槽 (#TVN480DA, Advantec) 中で 20 分間静置した。Label Solution と Enzyme Solution を 9:1 の容量比で混和し、1 サンプルあたり 20 μL の TUNEL 反応液を調製した。切片を Phosphate-buffered saline (PBS, #4417-100TAB, Sigma-Aldrich) 中で 5 分間×2 回洗浄し、水気を切ったあとに TUNEL 反応液 20 μL を添加した。プラスチックフィルム (#90421-K, Merk Millipore) で切片を覆い、切片を並べた湿式チャンバーを 37°C に設定した恒温槽中で 1 時間静置した。PBS 中で 5 分間×3 回洗浄した後、水気を切った切片に

4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含有した蛍光染色用封入剤 VECTASHIELD Vibrance Antifade Mounting with DAPI (#H-1800, Vector Laboratories) 40 μ L を添加し、カバーガラス (#C024321, Matsunami Glass Ind.) を重ねて封入した。

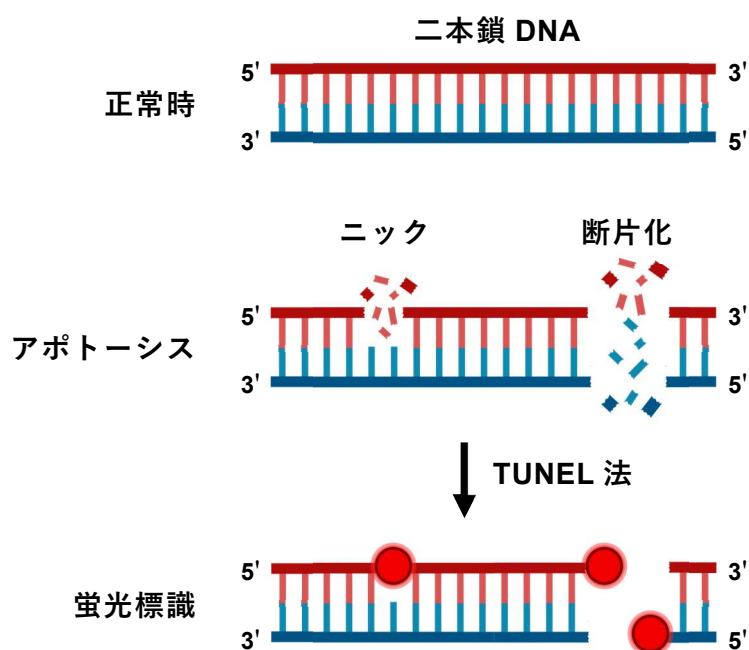


図 8. TUNEL 染色の原理

アポトーシスの中・後期段階ではゲノム DNA のニックや断片化が起き、3'末端に遊離した OH 基 (3'-OH 基) が生じる。TUNEL 法では、この 3'-OH 基を任意の標識付きデオキシリボヌクレオチドでラベリングすることで、アポトーシスを特異的に検出する。In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red では、一本鎖および二本鎖 DNA の 3'-OH 基にデオキシリボヌクレオチドを重合する酵素として Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) が用いられ、その基質としてテトラメチルローダミンで標識したデオキシウリジン三リン酸 (TMR-dUTP) が選択されている。これらの混合物を目的の切片と反応させることで、in situ でアポトーシス細胞を可視化することができる。一部のイラストは BioRender (<https://www.biorender.com/>) から取得した。

1-2-7. 免疫組織化学染色

前項 1-2-5 の通りに前処理した切片を 10 mM Citrate buffer pH 6 (#RM102-C, Genemed Biotechnologies) に浸し, 600W に設定した電子レンジ(#MRO-DT5, Hitachi) で 20 分間加熱することで, 抗原賦活化処理を行った. 室温で 30 分以上冷ました後, 滅菌精製水で切片を洗浄した. 切片をメタノール(#25183-70, Kanto Chemical) で調製した 3 v/v% 過酸化水素(#18084-00, Kanto Chemical) 中で 20 分間静置することで, 内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化した. PBS 中で 5 分間×2 回洗浄した後, 切片をブロッキング処理および抗原抗体反応に供した. ブロッキング処理および抗原抗体反応は VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit (#PK-6101, Vector Laboratories) を用いて行った. 本キットはアビジン-ビオチンの相互作用(ABC 法)を利用して抗原を検出する(図 9). 一次抗体として, Rabbit anti-neuronal nuclei (NeuN) antibody (#GTX133127, 希釈率 1:250, GeneTex) を用いた. 一次抗体および二次抗体は Can Get Signal immunostain Solution B (CGS Solution B, #NKB-601, Toyobo) によって希釈した. 発色は DAB Substrate Kit(#SK-4100, Vector Laboratories) を用いて行った. 具体的な手順を以下に示す. 表 1 に従って各種反応液を用時調製した. 水気を切った切片に Blocking solution 250 μ L を添加し, 室温で 20 分間静置した. PBS 中で 10 分間×2 回洗浄した後, Primary antibody solution 250 μ L を切片に添加し, 室温で 30 分間静置した. PBS 中で 10 分間×2 回洗浄した後, Secondary antibody solution 250 μ L を切片に添加し, 室温で 30 分間静置した. PBS 中で 10 分間×2 回洗浄した後, ABC reagent 250 μ L を切片に添加し, 室温で 30 分間静置した. PBS 中で 10 分間×2 回洗浄した後, Substrate working solution 250 μ L を切片に添加し, 室温で 2 分間静置した. 直後に, 水を満たしたドレーズで切片を濯ぐことで発色反応を停止した. 5 分間の流水洗によって基質を除去し, 滅菌精製水で切片を洗浄した. 切片をエタノール中で 5 分間×3 回静置し, 脱水処理を行った後, キシレン中で 5 分間×3 回静置し, 透徹処理を行った. 免疫組織化学染色用封入剤 EUKITT (#6.00.01.0001.04.01.EN, ORSAtec) を切片に適量添加し, カバーガラス(#C024321, Matsunami Glass Ind.) を重ねて封入した.

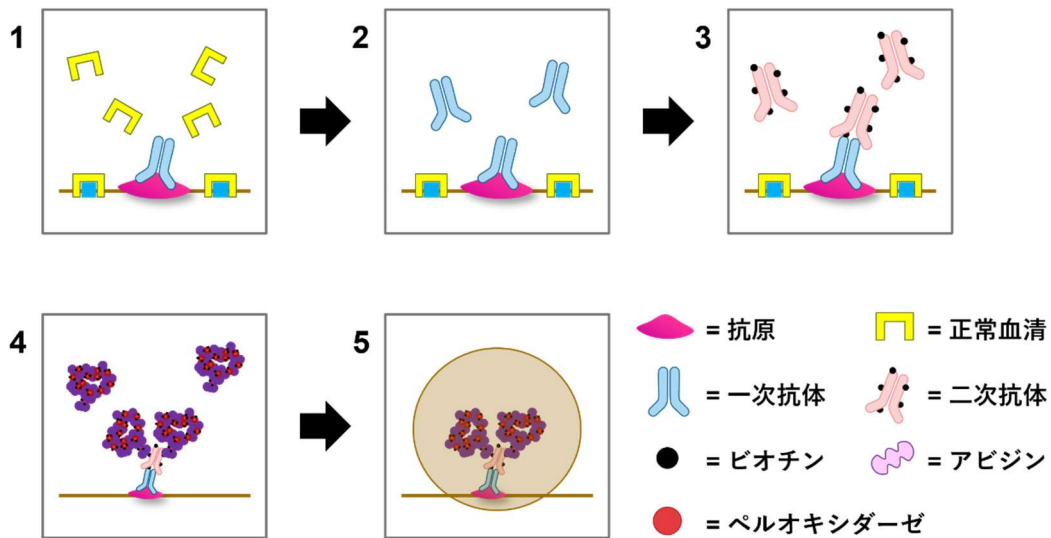


図 9. ABC 法による免疫組織化学染色の原理

(1) 正常血清によって抗体の非特異的結合をブロッキングする。(2) 抗原特異的な任意の一次抗体を反応させた後、(3) 一次抗体の動物種に応じたビオチン標識二次抗体を反応させる。(4) さらにアビジンとビオチン化ペルオキシダーゼとの複合体をビオチン標識二次抗体に反応させる。(5) 最後にペルオキシダーゼの基質となる 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) を反応させ、切片を染色する。

表 1. 免疫組織化学染色に用いた 1 サンプルあたりの反応液の組成

Solution	Reagent	Volume
Blocking solution	Normal goat serum	2.75 μ L
	PBS	250 μ L
Primary antibody solution	一次抗体	1 μ L
	CGS Solution B	250 μ L
Secondary antibody solution	Normal goat serum	2.75 μ L
	Biotinylated secondary antibody	1.25 μ L
	CGS Solution B	250 μ L
ABC reagent	Reagent A	5 μ L
	Reagent B	5 μ L
	PBS	250 μ L
Substrate working solution	Buffer pH 7.5	5 μ L
	DAB	10 μ L
	Hydrogen peroxide	5 μ L
	滅菌精製水	250 μ L

1-2-8. 各種染色の撮像および定量解析

TUNEL 染色に供した切片は、共焦点顕微鏡 ECLIPSE Ti (Nikon Instruments) および NIS-Elements AR imaging software version 4.00.06 (Nikon Instruments) を用いて撮像した。撮影した画像をもとに、NIS-Elements AR imaging software version 4.00.06 を用いて TUNEL 陽性細胞の定量解析を行った。TUNEL 陽性細胞は、DAPI 陽性細胞数に占める TUNEL 陽性細胞数の割合 (%) として示した。免疫組織化学染色に供した切片は、偏光顕微鏡 BX50 (Evident) および FLOVEL image filling system version 2.30.03 (Flovel) を用いて撮像した。撮影した画像をもとに、ImageJ version 1.54d⁴¹ を用いて NeuN 陽性細胞の定量解析を行った。NeuN 陽性細胞は、一定の面積あたりの NeuN 陽性細胞数として示した。観察する脳領域の矢状切片における位置は、アレン脳科学研究所がオンラインで公開している成体マウスの脳地図 (<http://atlas.brain-map.org/>) を参照して特定した (図 10)。

1-2-9. 統計解析

データは平均値 ± 標準誤差で表した。統計解析およびグラフの作成には GraphPad Prism software version 10.0.2 (GraphPad Software) を使用した。群間の平均値の差は Two-way analysis of variance (ANOVA) により検定し、事後検定として Uncorrected Fisher's LSD または Tukey's multiple comparisons test を実施した。上記の検定の結果、 $p < 0.05$ の場合に統計学的に有意であるとみなした。

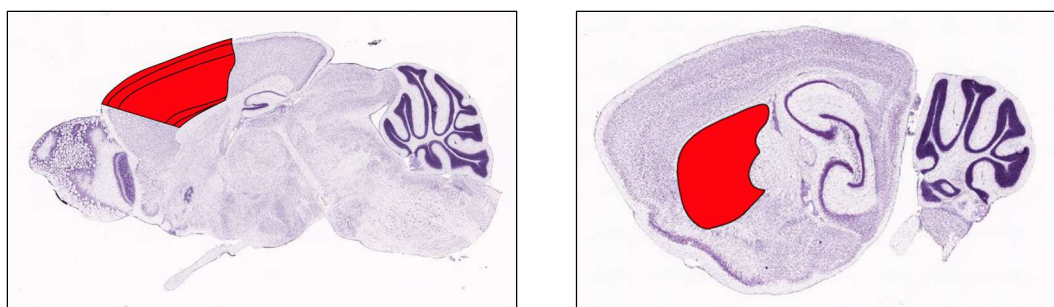


図 10. マウス脳矢状切片における観察領域の位置

観察領域を赤色で示す (左図：大脳皮質運動野, 右図：線条体)。画像は The Allen Mouse Brain Atlas から取得した、成体マウス脳矢状面のニッスル染色像である。

1-3. 実験結果

1-3-1. マウスへの MeHg の曝露

30 ppm の MeHg を含む飲水を 8 週間投与した雄性 C57BL/6NJcl マウス的大脑皮質において，神経細胞の減少やアポトーシス細胞の増加などの神経病理学的変化が認められる⁴²．そこで，野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウスに先行研究と同様の手法で MeHg を曝露させ，両マウスの病態および中毒症状の経過を比較することで，MeHg 毒性に対する CHOP 欠失の影響を検討した（図 11）．



図 11. MeHg の亜慢性曝露

野生型マウス (WT) および CHOP ノックアウトマウス (KO) に Vehicle または 30 ppm の MeHg を含む飲水を 8 週間自由に摂取させた．その後，マウスを解剖し以降の解析に供した (WT + Vehicle, $n = 6$; WT + MeHg, $n = 9$; KO + Vehicle, $n = 6$; KO + MeHg, $n = 11$)．

1-3-2. 水銀蓄積に対する CHOP 欠失の影響

MeHg の蓄積に対する CHOP 欠失の影響を検証した。図 11 で示した通りに Vehicle または MeHg を曝露させた野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウスから血液および大脳を採取し、試料中の総水銀量を測定した。その結果、野生型マウスでは MeHg の曝露によって血液および大脳で総水銀量の有意な増加が認められ (図 12), 血中総水銀量は先行研究 (14.0 ± 1.6 ppm) と同程度であった⁴²。一方, CHOP ノックアウトマウスの血液および大脳においても, MeHg の曝露によって野生型マウスと同程度の水銀が蓄積しており, 両者に差異は認められなかった (図 12)。以上の結果から, CHOP の欠失は少なくとも投与 8 週目における, MeHg の血液および大脳の存在量にはほとんど影響しないことが示唆された。

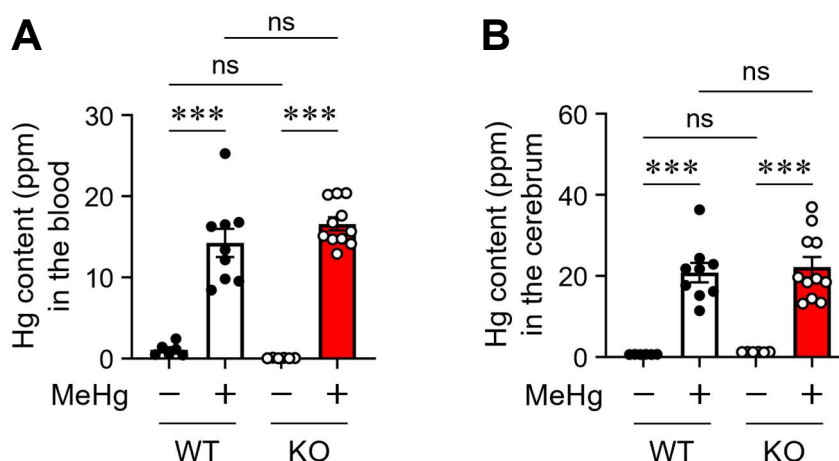


図 12. 水銀蓄積に対する CHOP 欠失の影響

A) 投与開始から 8 週後における, 野生型マウス (WT) および CHOP ノックアウトマウス (KO) の血液中の総水銀量を示す。

B) 投与開始から 8 週後における, 野生型マウス (WT) および CHOP ノックアウトマウス (KO) の大脳中の総水銀量を示す。

各マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与した。データは平均値±標準誤差で表した ($n = 6-11$, *** $p < 0.001$ by two-way ANOVA with uncorrected Fisher's LSD test; ns, not significant)。

1-3-3. MeHg 中毒症状に対する CHOP 欠失の影響

動物実験における MeHg 中毒の神経症候学的指標として、体重減少、運動失調、歩行障害、後肢伸展反射の障害、正向反射消失、自発運動量増加、学習障害、痙攣、麻痺などが報告されている⁷。本項では、げっ歯類における MeHg 毒性評価の代表的な指標である後肢伸展反射の障害と体重減少に着目し、野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウスで比較した。正常なマウスは尾を持ち上げて逆さに吊ると、両後肢の伸展反射が認められる。一方で、MeHg 中毒が進行すると、次第に両後肢が近接することが知られている^{31,43}。そこで、前項 1-2-4 の通りに各マウスの後肢伸展反射の程度を評価した。Vehicle を投与した野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウス間では、解析期間を通じてスコアに差異は認められなかったことから（図 13A）、CHOP の欠失は正常な後肢伸展反射に影響しないことがわかった。MeHg に曝露された野生型マウスでは、投与 5 週目から次第にスコアが低下し 6 週目から 8 週目にかけて有意であった（図中には未記載）。一方で、MeHg に曝露された野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウス間では、解析期間を通じてスコアの推移に有意な差は認められなかった（図 13A）。また、MeHg に曝露されたマウスでは、後肢伸展反射の障害から後行して体重の低下も観察されるが³¹、体重に関しても同様に、解析期間を通じて野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウス間で差異は認められなかった（図 13B）。

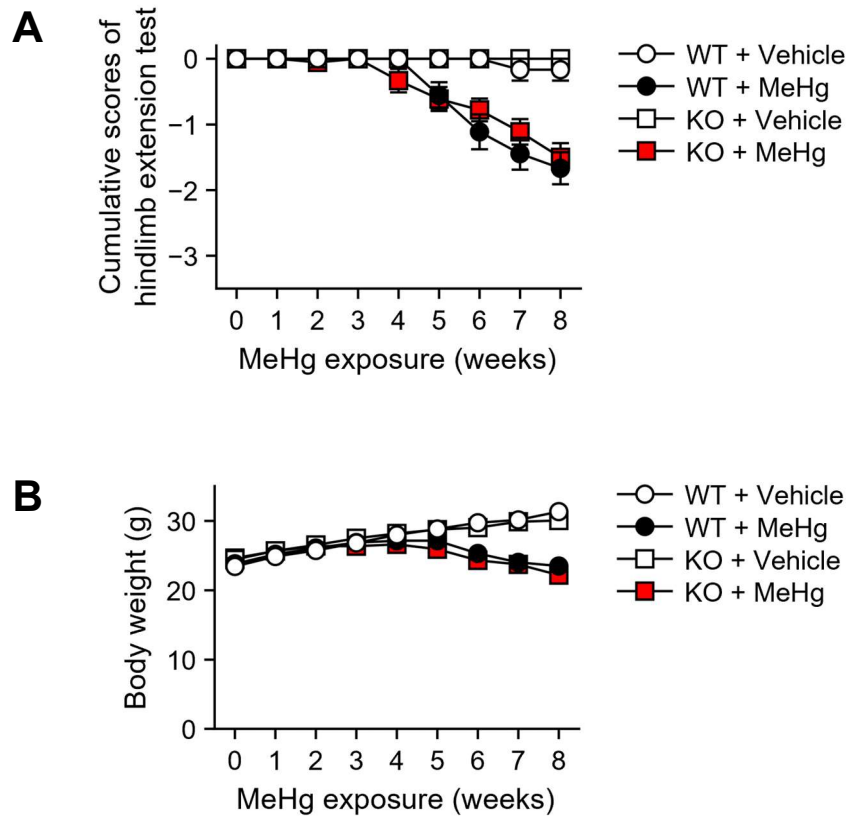


図 13. MeHg 中毒症状に対する CHOP 欠失の影響

A) 投与開始 (0 週) から解剖 (8 週) に至るまでの、野生型マウス (WT) および CHOP ノックアウトマウス (KO) の後肢伸展反射のスコアを示す。

B) 投与開始 (0 週) から解剖 (8 週) に至るまでの、野生型マウス (WT) および CHOP ノックアウトマウス (KO) の体重変化を示す。

各マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与した。8 週以内に死亡したマウスは、残りの期間を最後の測定値でプロットした。データは平均値±標準誤差で表した。図 13A, 図 13B とともに解析期間を通じて、WT と KO 間で有意差はなかった ($n=6-18$, two-way ANOVA with Tukey's post hoc test)。

1-3-4. MeHg 誘発性神経細胞死に対する CHOP 欠失の影響

MeHg に曝露されたマウスの大脳皮質および線条体において、アポトーシス細胞の増加に伴って CHOP の発現が誘導されることが明らかにされている³¹。そこで、TUNEL 染色によって大脳皮質および線条体の細胞死を解析し、野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウスで比較した。先行研究の結果と一致して、野生型マウスの大脳皮質運動野 (図 14) および線条体 (図 15) では、MeHg の曝露によって TUNEL 陽性細胞が有意に増加した。一方で、CHOP ノックアウトマウスにおいても MeHg の曝露によって、野生型マウスと同程度に大脳皮質運動野 (図 14) および線条体 (図 15) で TUNEL 陽性細胞が増加しており、両者に差異は認められなかった。続いて、神経細胞マーカーである NeuN の免疫組織化学染色によって大脳皮質運動野および線条体の神経細胞数を解析し、野生型マウスおよび CHOP ノックアウトマウスで比較した。その結果、MeHg の曝露によって野生型マウスの大脳皮質運動野 (図 16) および線条体 (図 17) において神経細胞が有意に減少したが、CHOP ノックアウトマウスとの間に差異は認められなかった。すなわち、MeHg 誘発性神経細胞死に対して CHOP 欠失による保護的な効果は認められなかった。

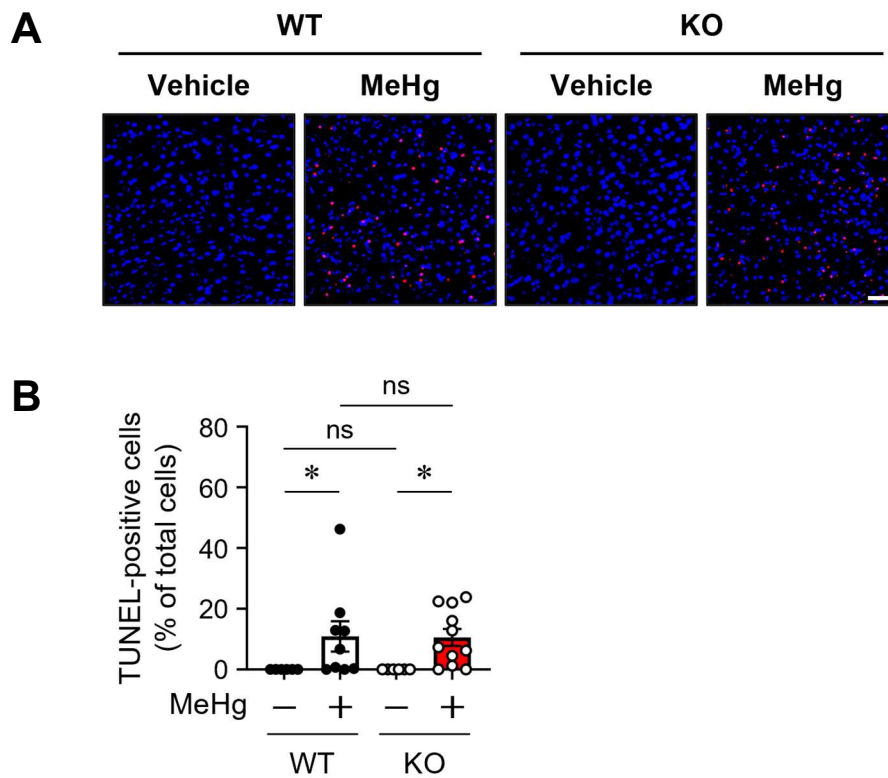


図 14. 大脳皮質運動野における MeHg 誘発性細胞死に対する CHOP 欠失の影響

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，投与開始から 8 週後に TUNEL 染色を行った．野生型マウス (WT) および CHOP ノックアウトマウス (KO) の大脳皮質運動野における染色像を示す．赤色シグナルは TUNEL，青色シグナルは DAPI を示す．スケールバーは 50 μm を表す．

B) TUNEL 染色像を定量した．グラフの縦軸は DAPI 陽性細胞数に占める TUNEL 陽性細胞数の割合 (%) であり，データは平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 6-11$, $*p < 0.05$ by two-way ANOVA with uncorrected Fisher's LSD test; ns, not significant)．

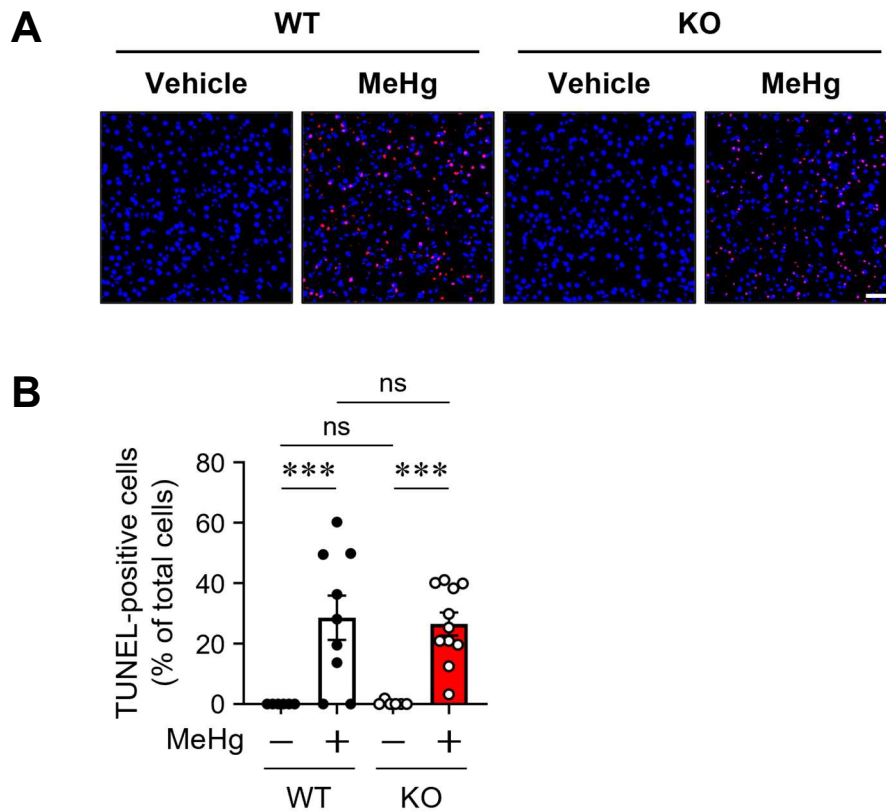


図 15. 線条体における MeHg 誘発性神経細胞死に対する CHOP 欠失の影響

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，投与開始から 8 週後に TUNEL 染色を行った．野生型マウス (WT) および CHOP ノックアウトマウス (KO) の線条体における染色像を示す．赤色シグナルは TUNEL，青色シグナルは DAPI を示す．スケールバーは 50 μ m を表す．

B) TUNEL 染色像を定量した．グラフの縦軸は DAPI 陽性細胞数に占める TUNEL 陽性細胞数の割合 (%) であり，データは平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 6-11$, *** $p < 0.001$ by two-way ANOVA with uncorrected Fisher's LSD test; ns, not significant)．

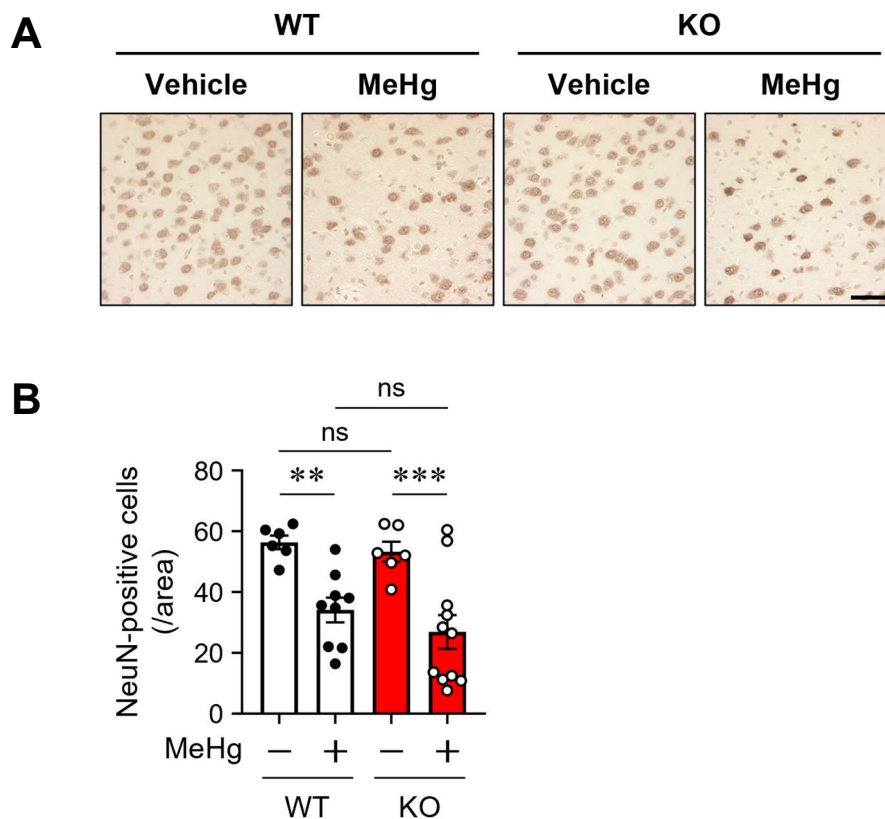


図 16. MeHg による大脳皮質運動野神経細胞の減少に対する CHOP 欠失の影響

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，投与開始から 8 週後に神経細胞マーカーである NeuN の免疫組織化学染色を行った．野生型マウス (WT) および CHOP ノックアウトマウス (KO) の大脳皮質運動野における染色像を示す．スケールバーは 50 μm を表す．

B) NeuN 染色像を定量した．グラフの縦軸は視野 ($250 \times 250\text{-}\mu\text{m}^2$) あたりの NeuN 陽性細胞数であり，データは平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 6\text{-}11$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by two-way ANOVA with uncorrected Fisher's LSD test; ns, not significant)．

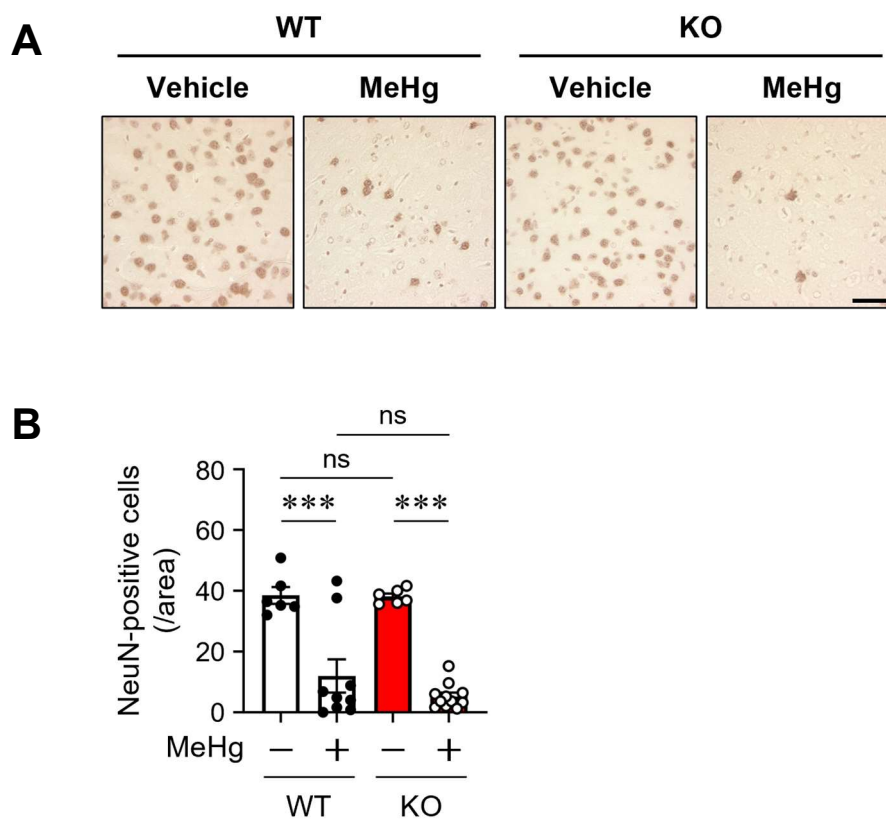


図 17. MeHg による線条体神経細胞の減少に対する CHOP 欠失の影響

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，投与開始から 8 週後に神経細胞マーカーである NeuN の免疫組織化学染色を行った．野生型マウス (WT) および CHOP ノックアウトマウス (KO) の線条体における染色像を示す．スケールバーは 50 μm を表す．

B) NeuN 染色像を定量した．グラフの縦軸は視野 (250- \times 250- μm^2) あたりの NeuN 陽性細胞数であり，データは平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 6-11$, *** $p < 0.001$ by two-way ANOVA with uncorrected Fisher's LSD test; ns, not significant)．

1-4. 考察

1-4-1. MeHg 曝露条件の妥当性

(1) MeHg の投与量について

熊本県水俣湾周辺を中心とする八代海沿岸で発生した水俣病は、化学工場のアセトアルデヒド製造工程からの排水に含まれる MeHg に汚染された、魚、エビ、カニ、貝などの魚介類を日常的に摂取した住民の間で認められた。工場排水の排出量の推移や期間は定かでないが、少なくとも水俣病が公式確認された 1956 年から工場廃水処理施設が稼働した 1960 年までは多量に排出され、アセトアルデヒドの製造が停止する 1968 年まで続いたと想像する。水俣湾魚介中の水銀濃度について、入鹿山ら（1967 年）は「水俣湾内魚では 1961 年 3 月は乾燥重量当り（以下同じ）20-60 ppm, 1963 年 10 月はボラ、コノシロの 1-3 ppm を除けば多くは 10 ppm 前後, 1965 年 5 月はボラも 1 ppm を除けば 6-30 ppm を示した」と報告している⁴⁴。また、同時期の貝類には最大 85 ppm と、高濃度の水銀が含まれていたことが記録されている。しかしながら、上記の値は魚介類中の総水銀量であることを考慮すべきである。一般的に魚肉中の総水銀の 90%以上が MeHg として存在するが^{45,46}、水俣病発生当時の特殊な環境下でも同様であったかは不明である。また、魚介類中の総水銀量は、その種類や捕獲された場所、測定した時期によって左右される。したがって、水俣病発生当時の状況に単純に外挿することは困難であるが、上記の試算は本研究でマウスに投与した 30 ppm という MeHg の濃度が、水俣病発生当時の摂取源に含まれていた量を大きく逸脱するものではないことを示唆している。

(2) 大脳中総水銀量について

急性期および亜急性期の水俣病患者脳の水銀濃度を測定した記録がある⁴⁷。水俣病と診断されてから比較的に日が浅い患者は、脳内の総水銀濃度が 20 ppm を超える場合がある（表 2）。本研究で用いた MeHg 中毒マウス脳内の総水銀濃度はこの値を大きく逸脱したものではなかった（前項 1-3-2）。一方で、ヒトにおける MeHg の生物学的半減期は 44-80 日と推定されている⁴⁸。すなわち、MeHg に曝露されなくなってから実際に測定するまでに一定の期間が空いた患者では、総水銀濃度がピークアウトしていた可能性が高い。MeHg の曝露量や曝露期間には大きな個人差があることから、総水銀濃度と曝露歴の関係をよく整理してデータを解釈する必

要があるにもかかわらず，対象者や測定方法について一貫した正確な情報を得ることができなかった。また，MeHgを単回経口投与されたマウス血中および脳内の総水銀量は，どちらも約2週間以内にピーク時の半分程度に減少することから⁴⁹，マウスはヒトよりも生物学的半減期が短いと思われる。したがって，組織中の総水銀濃度という観点からは，MeHgに継続的に曝露されたマウスと，水俣病患者として一括りにされた症例を比較して議論することは難しい。

表 2. 急性期および亜急性期水俣病患者の脳内総水銀濃度

Sex	Age	Clinical course (days)	Brain Hg (ppm)
Male	35	19	9.6
Female	5	26	15.4
Male	48	45	24.8
Male	56	48	7.8
Female	29	53	9.0
Female	58	60	21.3
Male	62	70	7.8
Male	49	86	9.5
Female	50	90	4.9
Male	59	90	6.4
Male	34	96	4.6
Male	52	100	2.6
Male	57	480	2.8
Female	4.5	553	5.3
Female	8	993	1.3
Female	28	1000	0.1
Male	7	1467	2.2

引用文献より一部改変した⁴⁷

1-4-2. UPR に対する CHOP 欠失の副次的な影響

CHOP ノックアウトマウスは、脳虚血や 6-ヒドロキシドパミンによって誘発される神経細胞死に抵抗性を示す一方で^{37,38}、本研究から MeHg 誘発性神経細胞死に対しては保護的な効果を示さないことが明らかとなった。本項では、野生型マウスと CHOP ノックアウトマウスで MeHg 曝露の影響に差異が認められなかったことに関して、CHOP 欠失による代償機構が働いた可能性について考察する。例えば、低酸素刺激では、IRE1 α の基質である X-box binding protein 1 (XBP1) のスプライシングや mitogen-activated protein kinase (MAPK) の一種である c-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化は、CHOP 発現の有無に関わらず同程度に惹起される³⁷。一方で、ER ストレス誘導薬として汎用されているツニカマイシを処理した場合には、野生型と比して CHOP 欠失によって XBP1 のスプライシングが低下し、JNK のリン酸化レベルはかえって増加する⁵⁰。すなわち、CHOP の欠失が特定の刺激やストレスに対する UPR の応答性に影響する懸念がある。XBP1 のスプライシングは神経細胞の生存に有利に働く反面、JNK のリン酸化はアポトーシスのシグナル伝達を介在することが知られている^{51,52}。そのため、こうした機構が本来 CHOP の欠失によって生じるはずの抗細胞死効果を相殺するよう機能する可能性がある。CHOP の欠失が MeHg に対する UPR の応答性に影響するかは不明であり、CHOP 欠失に起因した他の細胞死機構の代償的な活性化が、CHOP 欠失の抗細胞死効果を相殺した可能性は否定できない。

1-4-3. MeHg による UPR を介した細胞死惹起機構

一般に、CHOP の誘導は ER ストレスに起因したアポトーシスの代表的な経路と考えられているが、本研究から CHOP の欠失のみでは MeHg 誘発性神経細胞死に決定的な影響を与えないことが判明した。一方で、PERK 阻害薬である GSK2606414 や化学シャペロンである 4-フェニル酪酸が MeHg による細胞死を抑制することが明らかにされており^{30,53-55}、ER ストレスおよび UPR の活性化は依然として MeHg 誘導性アポトーシスの有力な要因の一つと考えられる。UPR の活性化は最終的に多様な転写因子を駆動し、遺伝子発現調節を介して細胞恒常性の回復に働く。しかしながら、過度の ER ストレスに起因したアポトーシスの誘導に関しては、個々の転写因子がどのように機能しているのかは不明な点が多い。MeHg は CHOP の他

にも，IRE1 α 下流の Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit (c-JUN) および XBP1，PERK 下流の activating transcription factor 4 (ATF4)，そして ATF6 の細胞質ドメイン (ATF6f) などの転写因子の誘導や活性化を引き起こすことが示唆されている^{22,24,30,53,56}。前項 1-4-2 で言及したように，CHOP 欠失自体に抗細胞死効果がなかったのか，あるいは CHOP 欠失の副次的な影響によって細胞死が減弱しなかったのかは定かでないが，いずれにしても ER ストレスに関連した CHOP 非介在性のストレス応答機構が，MeHg 誘導性アポトーシスに寄与する可能性が考えられる (図 18)。

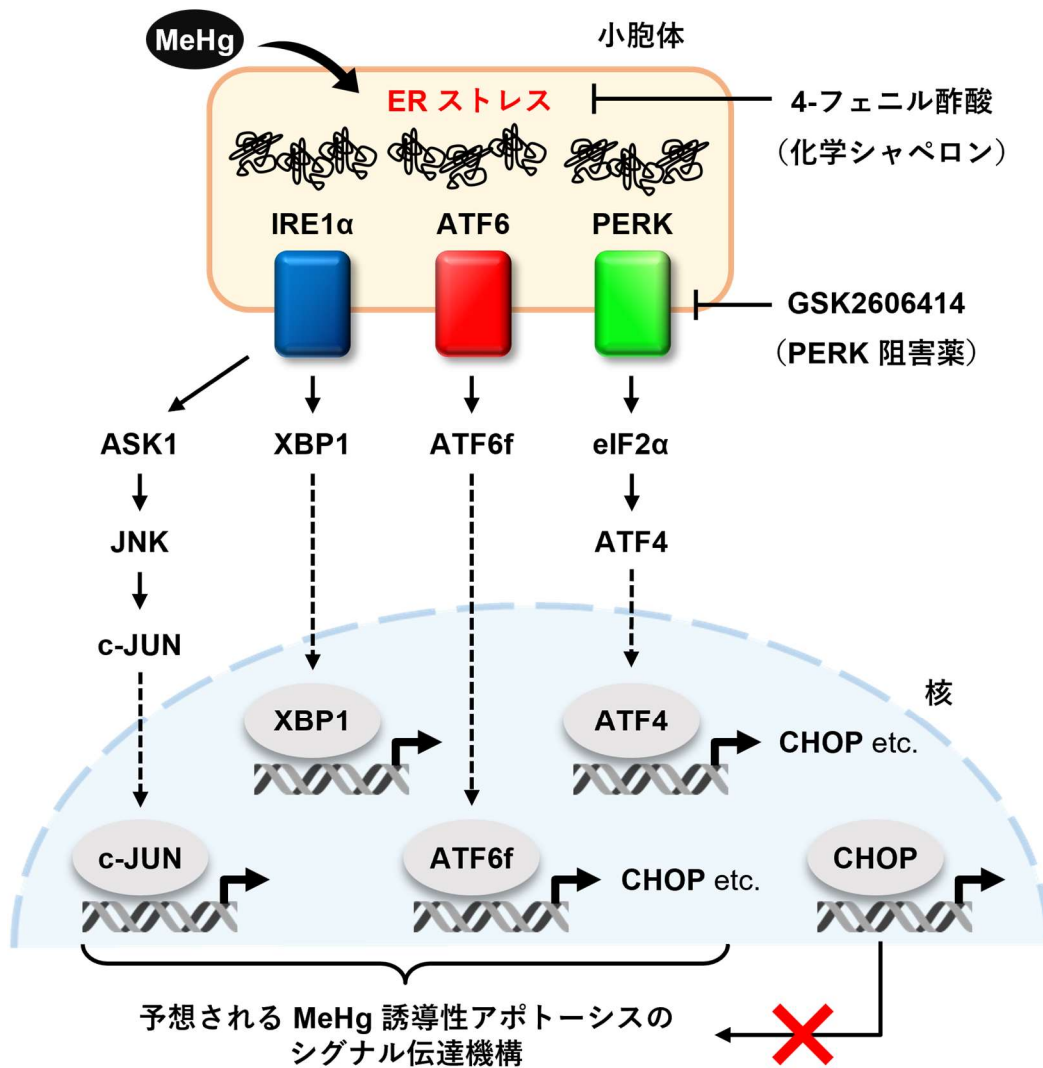


図 18. MeHg による UPR を介した細胞死惹起機構の展望

第 2 章

マウス嗅覚系に対するメチル水銀曝露の影響

2-1. 序論

嗅覚は、匂いをもたらす化学物質が化学受容器を刺激することで感じる感覚であり、五感の一つに数えられている。陸上動物においては空気中に存在する特定の揮発性低分子およびそれらの混ざりものが匂いの正体である。哺乳類の嗅覚を司る感覚器は鼻であり、鼻孔から空気を吸い込むことで匂いを能動的に“嗅ぐ”ことができる。吸い込まれた匂い分子は化学受容器である嗅細胞で電気信号に変換された後、脳に伝達されることで初めて認識される。同じく化学物質によって引き起こされる感覚として味覚があるが、味覚は対象が接触しなければ受容できないのに対し、嗅覚は対象から一定の距離が離れていても判断することが可能である。嗅覚の閾値は味覚の閾値に比べるとはるかに低く、感度が高いとされている⁵⁷。そのような性質から嗅覚は特に、摂食行動（食物の位置の特定、微生物汚染や毒の回避、食欲の調節など）、環境危険の回避（外敵や火災の検出など）、社会的コミュニケーション（性行動、感情や記憶の形成など）において不可欠な役割を果たしている⁵⁸。

嗅覚に関する神経路は嗅覚系と称され、哺乳類では大きく主嗅覚系と副嗅覚系から成る。前者は主に匂い分子、後者は主にフェロモンの受容に関わっている⁵⁹。主嗅覚系は、嗅細胞が存在する嗅上皮、嗅細胞の軸索、すなわち嗅神経の投射先である主嗅球（嗅球の後背側に位置し、副嗅覚系を構成する副嗅球とは機能的かつ解剖学的に区別される）、さらに主嗅球からの二次神経の投射を受ける嗅皮質から構成されている（図 19）⁶⁰。吸気に含まれる匂い分子は鼻腔深部にある嗅上皮に達し、そこで粘膜上を覆う鼻粘液に溶解する。嗅上皮の表面には嗅細胞から伸びる嗅繊毛が広がっており、嗅繊毛に存在する嗅覚受容体に匂い分子が結合すると、嗅細胞が脱分極して電氣的に興奮する（図 20）⁶¹。電気信号に変換された匂いの情報は、嗅神経を介して一次嗅覚中枢である主嗅球に伝搬される。主嗅球には、興奮性神経細胞である僧帽細胞および房飾細胞、抑制性神経細胞であり介在神経として機能する傍系球体細胞および顆粒細胞が存在する。嗅神経は糸球体と呼ばれる構造で僧帽/房飾細胞とシナプスを形成する（図 21）⁶²。僧帽/房飾細胞の軸索は嗅皮質という巨大な複合領域に投射しており、最終的には眼窩前頭皮質や視床下部、海馬などの他の脳領域にまで情報が伝搬される^{63,64}。

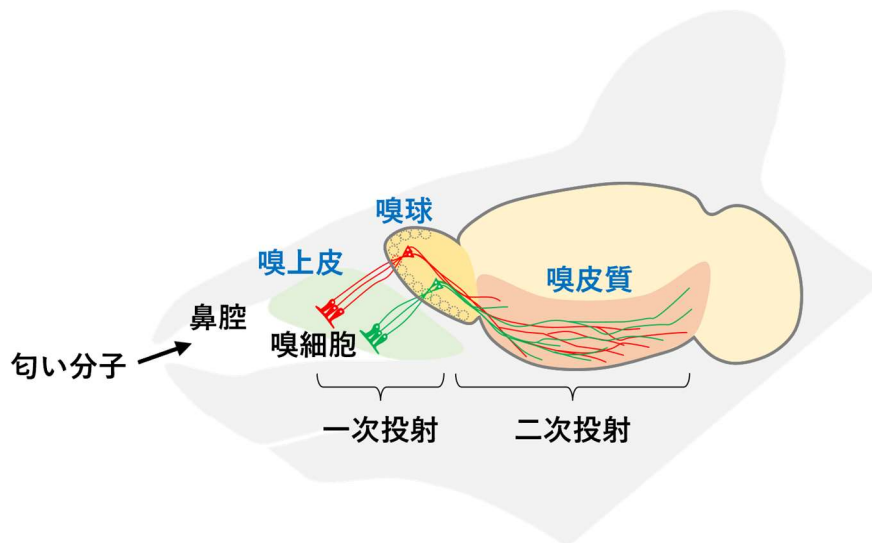


図 19. マウス主嗅覚系の基本構造

嗅覚受容体遺伝子はマウスでは約 1,100 種類，ヒトでは約 400 種類にも及ぶ巨大な遺伝子ファミリーを形成している^{65,66}. 個々の嗅細胞はこのうち一種類のみを選択し発現する⁶⁷. 同種の嗅覚受容体を発現する嗅細胞は，その軸索を主嗅球内の特定の糸球体に投射する^{68,69}. 同種の嗅覚受容体を発現する嗅細胞は，嗅上皮では散在しているが，図では模式的に赤および緑で区別した.

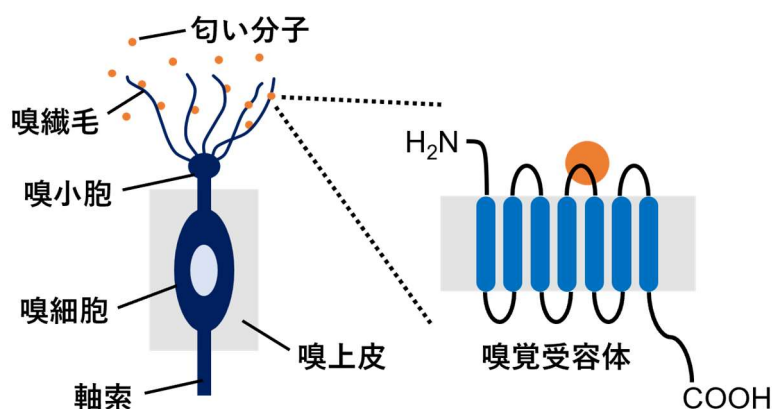


図 20. 嗅細胞と嗅覚受容体の構造

嗅細胞は双極性の神経細胞であり，細胞体から鼻腔へ伸びる樹状突起および主嗅球に投射する軸索を有している．樹状突起先端にある嗅小胞からは多数の嗅繊毛が表出している．嗅繊毛に発現する嗅覚受容体によって，匂い分子が感知される．

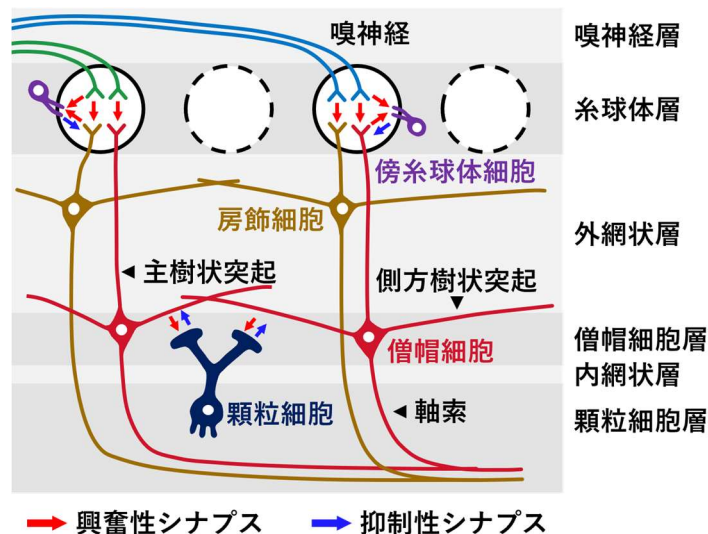


図 21. 主嗅球の神経回路

嗅細胞の軸索（嗅神経）は嗅神経層を経て糸球体に接続する。糸球体の中では嗅神経が僧帽細胞、房飾細胞および傍糸球体細胞の樹状突起にグルタミン酸性の興奮性シナプスを形成する。一方で、傍糸球体細胞は僧帽/房飾細胞に γ -アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) 性の抑制性シナプスを形成する。僧帽/房飾細胞は、複数の側方樹状突起を外網状層に広く伸ばしており、顆粒細胞の樹状突起との間で双方向性のシナプスを形成する。嗅球から嗅皮質へと出力するのは僧帽細胞と房飾細胞のみであり、それらの軸索は嗅球の後方外側で外側嗅索となって嗅皮質へと接続する。

一方で、嗅覚は様々な要因によって障害を受ける⁷⁰。特筆すべきは、嗅覚系は匂い分子を受容する嗅細胞が物理的に外部環境にさらされているため、ウイルスや環境化学物質に対して特に脆弱なことである（図 22A）。実際に、揮発性あるいは大気への拡散性のある特定の農薬、大気汚染物質、重金属が嗅上皮を傷害し、嗅覚機能障害をもたらすことが疫学的かつ実験的に支持されている⁷¹⁻⁷³。また、孤発性のアルツハイマー病患者およびパーキンソン病患者の約 85-90%が、嗅覚障害を抱えていることが示唆されている^{74,75}。これらの神経変性疾患における嗅覚障害のメカニズムは定かでないが、嗅球や嗅内皮質でアミロイド β の凝集や神経原繊維変化、レビー小体などの病理学的変化が出現しており^{75,76}、嗅覚の情報処理に關与する脳領域の病理学的変性に起因すると考えられている（図 22B）。また、アセチルコリンをはじめとする脳内神経伝達物質の量的変化が嗅覚障害の発現に關与している可能性がある⁷⁷⁻⁷⁹。嗅覚障害は認知障害や運動症状などの主症状より早期に出

現することから、神経変性疾患の早期発見に有用なバイオマーカーとして期待されている。このように、嗅覚系は環境化学物質の毒性評価のみならず、脳疾患の病態メカニズムを解析するモデルとしても有用だと考えられる。

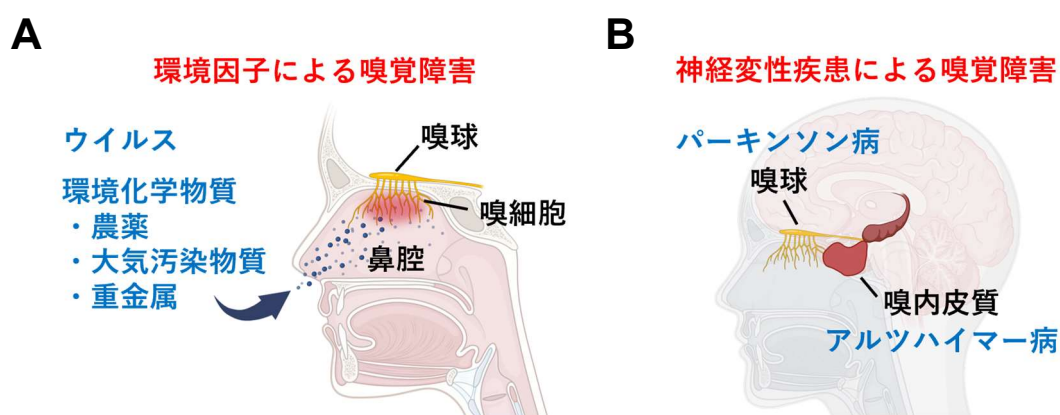


図 22. 嗅覚障害の要因

A) 嗅覚系は外部に神経細胞が露出しているため、他の神経系と比してウイルスや神経毒性を有する化学物質の影響を受けやすく、嗅細胞が傷害され脱落することで嗅覚機能に異常をきたす。また、一部のウイルスや化学物質は嗅球にまで到達し、組織を傷害することが実験的に明らかにされている。

B) パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患では、最初期に嗅球および嗅内皮質で病理学的変性が生じ、疾患の進行とともに病巣が拡大する。匂いの検知能力（嗅覚閾値）よりも匂いの種類を特定する能力（同定能）や匂いを嗅ぎ分ける能力（識別能）が優位に傷害される。その他、脳挫傷、脳腫瘍、脳出血、脳梗塞も嗅覚障害の原因となりうる。

一部のイラストは BioRender (<https://www.biorender.com/>) から取得した。

水俣病患者は嗅覚機能障害を呈することが報告されている⁸⁰。その嗅覚障害の特徴として、① 進行性（遅発性）であり、障害は比較的高度である、② 嗅覚錯誤を呈する、③ 味覚障害や味覚錯誤を随伴することが多いと記録されている⁸¹。発症頻度は定かでないが、野坂（1966年）は熊本水俣病30例中14例（40.2%）⁸²、原田（1972年）は熊本水俣病266例中9例（3.3%）⁸³、井形ら（1989年）は水俣病認定患者93例中38例（40.9%）⁸⁴、二塚（2015年）は水俣病認定患者117例中61例（52.1%）⁸⁵に嗅覚障害が認められたと報告している。しかしながら、嗅覚障害は他の症状に比して衰えを自覚しにくく、水俣病発生当時には嗅覚系の神経回路の構造および情報処理の基本原理の理解が不明瞭であった背景もあり、その病態や責任病巣は明らかにされていない。嗅覚は末梢の化学受容器あるいは、情報処理に参与する中枢領域が様々な要因によって傷害されることで、その機能に異常をきたす。ここまで、環境化学物質および神経変性疾患を例に挙げたが、環境化学物質であり、かつ水俣病のような中枢神経障害を引き起こすという2つの特徴を併せ持ったMeHgが嗅覚系に一体どのような影響を及ぼすのかということが、本研究の最大の関心事である。一方で、以下5つの根拠から水俣病における嗅覚障害は中枢神経障害に起因すると推測される。① MeHgの主な曝露経路は魚食であり、無毒性量を超えるほどのMeHgを吸入するリスクはほとんどない。② MeHgは脳移行性が高く、中枢神経系を不可逆的に傷害する。③ 水俣病では体性感覚や視覚、聴覚といった感覚系の異常が認められ、これらが中枢領域の障害に起因する。④ 水俣病発症から時日が経過しても、嗅覚障害が認められる。⑤ 特定の神経変性疾患は嗅覚障害を引き起こす。

本章では、嗅覚系においてMeHgによって傷害される領域を同定することを目的とし、特に水俣病の病理学的特徴の一つである神経細胞死に着目し、組織学的な解析を行った。なお、副嗅覚系は一部の霊長類には存在せず、ヒトでは退化していると考えられているため、本研究では主嗅覚系を「嗅覚系」と称し、副嗅覚系については言及しない。

2-2. 実験方法

2-2-1. 実験に使用した動物

本実験には、日本クレア株式会社から購入した野生型の C57BL/6NJcl マウスを使用した。マウスの飼育および解剖は、前項 1-2-1 と同様に行った。なお、鼻腔の冠状切片を作製する場合には、マウスを経心的に生理食塩水で灌流した後、断頭し頭部を取得した。一連の動物実験は国立水俣病総合研究センターの管理下で、同研究センターの動物実験規定に従って実施した（動物倫理委員会承認番号 041116）。

2-2-2. MeHg の投与

(1) 飲水投与

前項 1-2-2 と同様に行った。水俣病患者における嗅覚障害の性差に関する確たる知見はない。既知の病態や障害部位との比較を容易にするために、従来 MeHg の毒性研究で用いられてきた雄性 C57BL/6NJcl マウスを用いることとした^{42,86}。大脳皮質と海馬における MeHg の傷害性を比較解析した先行研究を参考に、サンプルサイズは最大で $n = 6$ に設定した。

(2) 腹腔内投与

塩化ナトリウム（#31319-45, Nacalai Tesque）を滅菌精製水に 0.9 w/v% で溶解することで生理食塩水を調製した。生理食塩水に溶解した 1 mg/mL 塩化メチル水銀（#M0589, Tokyo Chemical Industry）を 3 ヶ月齢の雄性 C57BL/6NJcl マウスの腹腔内に 10 mg/kg body weight の用量で投与した。同量の生理食塩水を投与した個体をコントロールとして設定した。

2-2-3. 生体試料中総水銀量の測定

へパリン処理した全血は、4°C、2,600×g、5 分間遠心し、血漿とその他に分画した。採取した血漿は測定まで 4°C で保存した。右脳から嗅球、嗅結節、梨状皮質および大脳皮質の残りの部分をそれぞれ一部摘出し、測定に供するまで -20°C で保存した。両側の鼻腔が露出するように鼻部を背側から切開し、鼻粘膜を摘出した。鼻粘膜は測定に供するまで -20°C で保存した。滅菌精製水で 5N に調製した水酸化ナトリウム（#31533-54, Nacalai Tesque）を組織 1 mg あたり 19 μL 添加し、70°C に設定し

たアルミブロック恒温槽（#1-4154-22, As One）で 30 分間静置した後，ボルテックスミキサーで混和することで組織を完全に溶解した．溶解した試料は測定前に，滅菌精製水で 5N に調製した塩酸（#37313-25, Nacalai Tesque）で中和した．加熱酸化一金アマルガム捕集—原子吸光法による水銀測定装置 MA-2/BC-1（Nippon Instruments）を用いて，血漿および各組織試料中の総水銀量を測定した．既知濃度の水銀標準溶液を用いて，0, 10, 30, 100 ppm の 4 点から検量線を作成し，機器付属の MA2000 software version 1.7.8.を用いて未知試料の総水銀量を算出した．

2-2-4. 後肢伸展反射の評価

前項 1-2-4 と同様に行った．

2-2-5. 組織染色に供する脳切片の作製

(1) 脳の矢状切片

前項 1-2-5 と同様に行った．

(2) 鼻腔の冠状切片

マウスの頭部を摘出後すぐに 4% PFA 溶液で浸漬固定した．固定した頭部の処理，骨組織の脱灰，鼻組織の切り出しおよびパラフィン包埋は株式会社バイオ病理研究所に外注した．回転式マイクローム（#RM2245, Leica）を用いてパラフィンブロックから厚さ 5 μm の冠状切片を作製し，スライドガラス（#S9903, Matsunami Glass Ind.）に固定した．切片は各種染色に供する前に，以下の前処理を行った．キシレン（#46004-70, Kanto Chemical）中で 5 分間×3 回静置し，パラフィンを除去した．エタノール（#14033-70, Kanto Chemical）中で 5 分間静置し，キシレンを除去した．続いて滅菌精製水で 90%，80%，70% に調製したエタノール中で順に各 5 分間静置した．10 分間の流水洗によってエタノールを除去した後，滅菌精製水で切片を洗浄した．

2-2-6. 免疫組織化学染色

(1) NeuN を染色する場合

前項 1-2-7 と同様に行った．

(2) GFAP および Iba1 を染色する場合

前項 1-2-7 の工程において、以下の変更を加えた。DAB の発色反応を停止した後、切片をヘマトキシリン (#S3301, Dako) に浸し、5 分間静置した (対比染色)。5 分間の流水洗によってヘマトキシリンを除去し、滅菌精製水で切片を洗浄した。脱水処理以降は前項 1-2-7 と同様に行った。

一次抗体として、Rabbit anti-NeuN antibody, Rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody および Rabbit anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) antibody を用いた。Rabbit anti-NeuN antibody は Can Get Signal immunostain Solution B (CGS Solution B, #NKB-601, Toyobo) によって希釈した。その他は PBS によって希釈した。表 3 に使用した一次抗体の詳細を示す。

表 3. 免疫組織化学染色で用いた一次抗体

抗原	宿主	製造元	品番	抗体 希釈率	一次抗体 の溶媒	二次抗体 の溶媒
NeuN	Rabbit	GeneTex	GTX133127	1:250	CGS Solution B	CGS Solution B
GFAP	Rabbit	Genemed Biotechnologies	60-0032-7	1:2	PBS	PBS
Iba1	Rabbit	Fujifilm Wako Pure Chemical	013-27691	1:250	PBS	PBS

2-2-7. TUNEL 染色

前項 1-2-6 と同様に行った。

2-2-8. 免疫蛍光染色

前項 2-2-5 の通りに前処理した切片を 10 mM Citrate buffer pH 6 (#RM102-C, Genemed Biotechnologies) に浸し、600W に設定した電子レンジ (#MRO-DT5, Hitachi) で 20 分間加熱することで、抗原賦活化処理を行った。室温で 30 分以上冷ました後、滅菌精製水で切片を洗浄した。水気を切った切片に、PBS で 3 v/v% に調製した Normal Goat Serum (#S-1000, Vector Laboratories) 200 μ L を添加し、室温で 1 時

間静置した。PBS で 1 v/v% に調製した Normal Goat Serum で任意の濃度に希釈した一次抗体 200 μ L を切片に添加し、室温で 1 時間静置した。PBS 中で 10 分間 \times 2 回洗浄した後、PBS で任意の濃度に希釈した二次抗体 200 μ L を切片に添加し、遮光下室温で 1 時間静置した。一方で、Rabbit anti-NeuN antibody を用いる場合のみ、一次抗体および二次抗体を Can Get Signal immunostain Solution B (CGS Solution B) (#NKB-601, Toyobo) によって希釈した。PBS 中で 10 分間 \times 3 回洗浄した後、水気を切った切片に DAPI を含有した蛍光染色用封入剤 VECTASHIELD Vibrance Antifade Mounting with DAPI (#H-1800, Vector Laboratories) 40 μ L (脳切片の場合) あるいは 20 μ L (鼻腔切片の場合) を添加し、カバーガラス (脳切片の場合 #C024321, 鼻腔切片の場合 #C218181, Matsunami Glass Ind.) を重ねて封入した。一次抗体として、Rabbit anti-NeuN antibody, Rabbit anti-GFAP antibody, Rabbit anti-Iba1 antibody および Rabbit anti-olfactory marker protein (OMP) antibody を用いた。二次抗体として、Goat anti-rabbit IgG antibody Alexa Fluor 488 conjugate (#A31627, 希釈率 1:1,000, Thermo Fisher Scientific) および Goat anti-rabbit IgG antibody Alexa Fluor 594 conjugate (#A-11012, 希釈率 1:1,000, Thermo Fisher Scientific) を用いた。表 4 に使用した一次抗体の詳細を示す。

表 4. 免疫蛍光染色で用いた一次抗体

抗原	宿主	製造元	品番	抗体 希釈率	一次抗体 の溶媒	二次抗体 の溶媒
NeuN	Rabbit	GeneTex	GTX133127	1:500	CGS Solution B	CGS Solution B
GFAP	Rabbit	Genemed Biotechnologies	60-0032-7	1:2	PBS	PBS
Iba1	Rabbit	Fujifilm Wako Pure Chemical	013-27691	1:250	PBS	PBS
OMP	Rabbit	Abcam	ab183947	1:1,000	PBS	PBS

2-2-9. ヘマトキシリン・エオジン染色

(1) 嗅球の矢状切片の場合

前項 2-2-5 の通りに前処理した切片をヘマトキシリン (#S3301, Dako) に浸し、20 分間静置した。10 分間の流水洗によってヘマトキシリンを除去した後、滅菌精製水で切片を洗浄した。切片をエオジン (#8659, Sakura Finetek Japan) に浸し、20 分間静置した。滅菌精製水で 70%、80%、90% に調製したエタノール中で順に切片を軽くすすぎ、エオジンを除去した。さらに 100%エタノールで軽くすすいだ後、100%エタノール中で 5 分間×2 回静置し、脱水処理を行った。切片をキシレン中で 5 分間×3 回静置し、透徹処理を行った。免疫組織化学染色用封入剤 EUKITT (#6.00.01.0001.04.01.EN, ORSAtec) を切片に適量添加し、カバーガラス (#C024321, Matsunami Glass Ind.) を重ねて封入した。

(2) 鼻腔の冠状切片の場合

染色は株式会社バイオ病理研究所に外注した。

2-2-10. 各種染色の撮像および定量解析

(1) 免疫組織化学染色に供した切片の場合

偏光顕微鏡 BX50 (Evident) および FLOVEL image filling system version 2.30.03 (Flovel) を用いて撮像した。撮影した画像をもとに、ImageJ version 1.54d⁴² を用いて NeuN 陽性細胞、GFAP 陽性細胞および Iba1 陽性細胞の定量解析を行った。NeuN 陽性細胞、GFAP 陽性細胞および Iba1 陽性細胞はそれぞれ、一定の面積あたりの陽性細胞数として示した。一方で、顆粒細胞層の NeuN 陽性細胞は、視野における NeuN で染色された面積の占める割合 (%) として示した。

(2) TUNEL 染色および免疫蛍光染色に供した切片の場合

共焦点顕微鏡 ECLIPSE Ti (Nikon Instruments) および NIS-Elements AR imaging software version 4.00.06 (Nikon Instruments) を用いて撮像した。撮影した画像をもとに、NIS-Elements AR imaging software version 4.00.06 を用いて TUNEL 陽性細胞、NeuN 陽性細胞および OMP 陽性細胞の定量解析を行った。TUNEL 陽性細胞および NeuN 陽性細胞はそれぞれ、DAPI 陽性細胞数に占める TUNEL 陽性細胞数および

NeuN 陽性細胞数の割合 (%) として示した. 一方で, 顆粒細胞層の TUNEL 陽性細胞は, DAPI 陽性細胞の面積 1 mm^2 あたりの TUNEL 陽性細胞数として示した. OMP 陽性細胞は, 嗅上皮 $100 \mu\text{m}$ あたりの OMP 陽性細胞数として示した. 観察する脳領域の矢状切片における位置は, アレン脳科学研究所が公開している成体マウスの脳地図 (<http://atlas.brain-map.org/>) を参照して特定した (図 23).

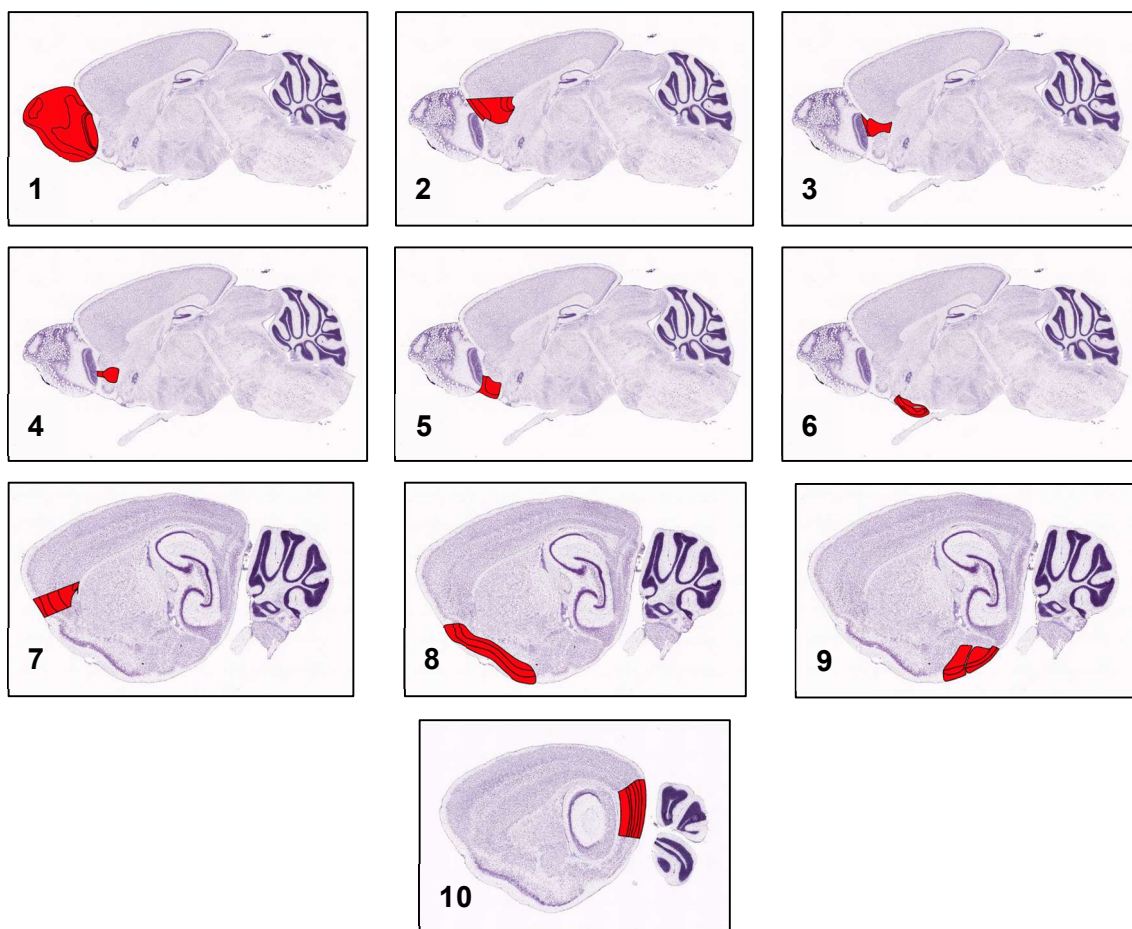


図 23. マウス脳矢状切片における観察領域の位置

観察領域を赤色で示す (1: 嗅球, 2: 眼窩前頭皮質, 3: 背側蓋紐, 4: 前嗅核, 5: 腹側蓋紐, 6: 嗅結節, 7: 無顆粒島皮質, 8: 梨状皮質, 9: 扁桃皮質後部, 10: 嗅内皮質外側部). 画像は The Allen Mouse Brain Atlas から取得した, 成体マウス脳矢状面のニッスル染色像である.

(3) ヘマトキシリン・エオジン染色に供した切片の場合

a) 嗅球の矢状切片の場合

偏光顕微鏡 BX50 (Evident) および FLOVEL image filling system version 2.30.03 (Flovel) を用いて撮像した。

b) 鼻腔の冠状切片の場合

バーチャルスライド顕微鏡 VS200 (Evident) を用いて撮像した。撮像は株式会社バイオ病理研究所に外注した。撮影した画像をもとに OlyVIA image viewer software version 4.1 (Evident) を用いて、嗅上皮の厚さを測定した。嗅上皮の厚さは、上皮表面から基底細胞の境界面までの長さを意味する (図 24)。鼻腔の冠状面から、鼻中隔 nasal septum の背側部 dorsal および腹側部 ventral (DS および VS), 内側鼻甲介 medial turbinate の領域 1 および領域 2 (MT1 および MT2) および外側鼻甲介 lateral turbinate の領域 1 および領域 2 (LT1 および LT2) の 6 つの亜領域を定義した (図 25)。各個体について、全ての亜領域で両側の嗅上皮を測定し、両側の平均値を算出した。加えて、撮影した画像をもとに OlyVIA image viewer software version 4.1 (Evident) を用いて、鼻中隔上端から鼻中隔軟骨の下端 (鼻咽頭管との境界) までの距離 a, 鼻腔左右両端の距離 (背側 b および腹側 c) を測定し、組織の構造変化を評価した (図 26)。

2-2-11. 統計解析

データは平均値 ± 標準誤差で示した。統計解析およびグラフの作成には GraphPad Prism software version 10.0.2 (GraphPad Software) を使用した。群間の平均値の差は Student's *t*-test および Two-way ANOVA により検定し、事後検定として Bonferroni's multiple comparisons test を実施した。観察領域の NeuN 陽性細胞数および血漿中水銀濃度の相関を評価するために、Pearson's correlation analysis を行った。上記の検定の結果、 $p < 0.05$ の場合に統計学的に有意であるとみなした。

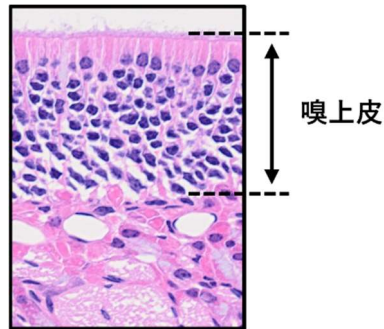


図 24. 嗅上皮の厚さの測定

鼻粘膜の拡大図を示す。破線の間の距離を嗅上皮の厚さとして測定した。

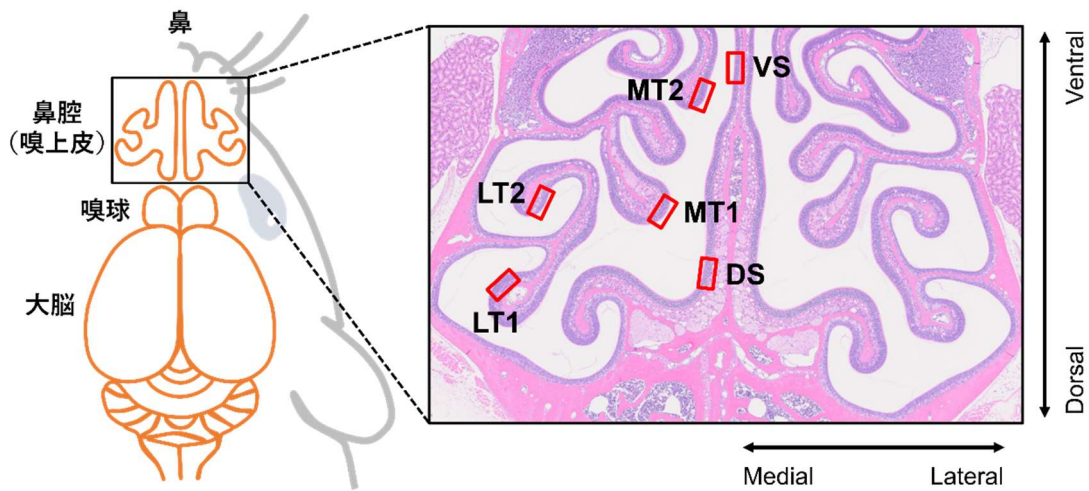


図 25. 鼻腔冠状切片における観察領域の位置

観察領域として設定した鼻中隔 nasal septum の背側部 dorsal および腹側部 ventral (DS および VS), 内側鼻甲介 medial turbinate の領域 1 および領域 2 (MT1 および MT2) および 外側鼻甲介 lateral turbinate の領域 1 および領域 2 (LT1 および LT2) の 6 つの亜領域を赤枠で示す。右の画像は成体マウス鼻腔冠状面のヘマトキシリン・エオジン染色像である。

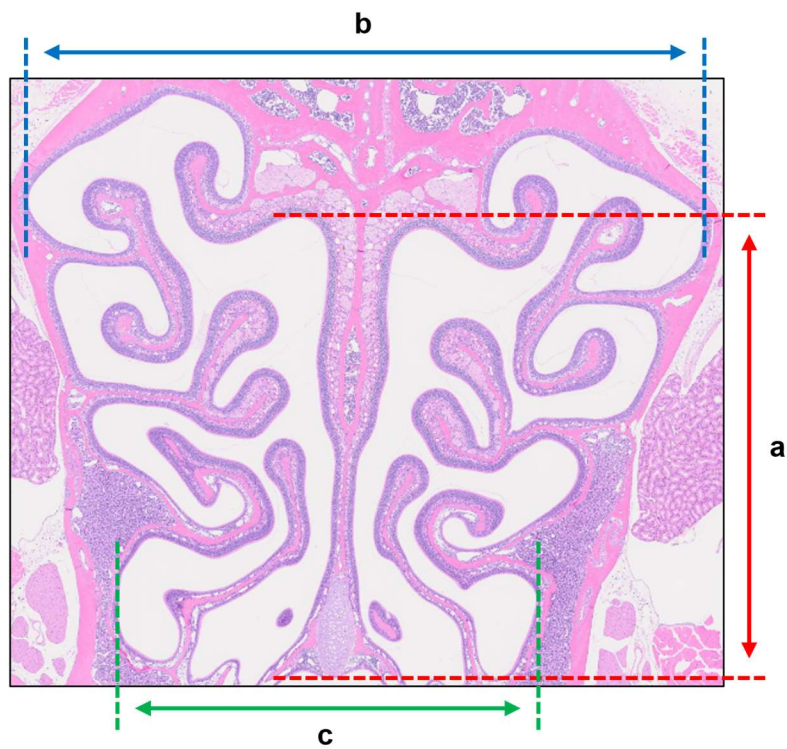


図 26. 鼻腔冠状切片のサイズ計測

鼻腔冠状面のヘマトキシリン・エオジン染色像を示す。MeHg 曝露に伴う鼻腔冠状切片の構造変化を検証するために、破線の中の距離 a-c をそれぞれ測定した。

2-3. 実験結果

2-3-1. MeHg 中毒モデルの作製と評価

30 ppm の MeHg を含む飲水を雄性 C57BL/6NJcl マウスに 8 週間投与することで、MeHg 中毒マウスを作製した (図 27)。本法では、MeHg 投与開始から 8 週目まで大脳皮質の総水銀量は漸次増加し⁸⁶、マウスは 10 週以内に死亡する⁴²。先行研究の結果と一致して⁴²、MeHg に曝露されたマウスは大脳皮質に水銀が顕著に蓄積しており (図 28A)、大脳皮質運動野では NeuN 陽性細胞の減少が認められた (図 28B)。一般に、脳内の総水銀量が 10 ppm を超えると神経変性が生じるとされている^{87,88}。投与開始 4 週目には大脳皮質の総水銀量が 10 ppm 程度に達し⁸⁶、5 週目から TUNEL 陽性細胞の増加が観察される³¹。これらの知見と一致して、MeHg 投与 5 週目から次第に後肢伸展反射のスコアが低下し、7 週目および 8 週目に有意であった (図 28C)。以上の結果から、本研究で 8 週にわたって MeHg を曝露させたマウスは、従来報告されている病態の経過と矛盾のない所見を示し、かつ十分な中毒状態に達したものと判断し、以降の嗅覚系に対する MeHg の影響を検証するために用いることとした。

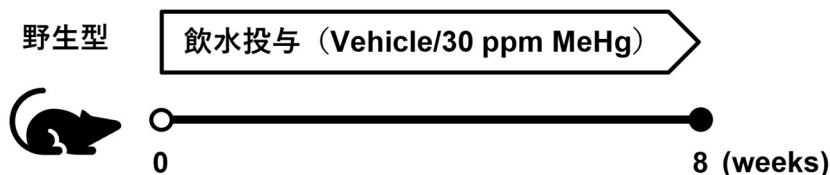


図 27. MeHg 中毒マウスの作製

野生型マウスに Vehicle または 30 ppm の MeHg を含む飲水を 8 週間自由に摂取させた。その後、マウスを解剖し以降の解析に供した。

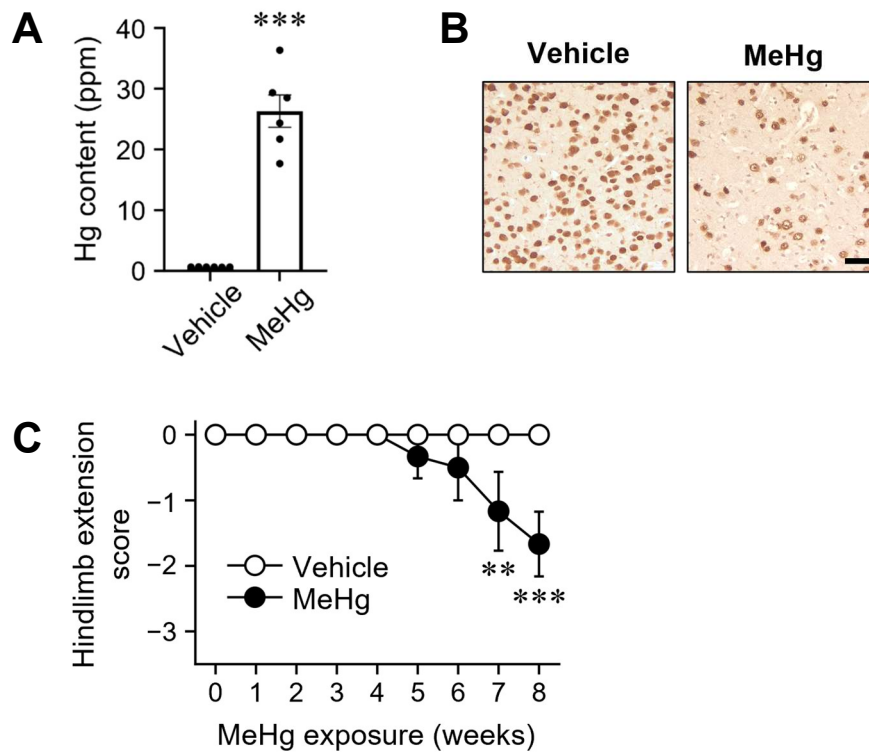


図 28. MeHg 中毒マウスの評価

A) 投与開始から 8 週後における大脳皮質中の総水銀量を示す。

B) 投与開始から 8 週後に神経細胞マーカーである NeuN の免疫組織化学染色を行った。大脳皮質運動野における染色像を示す。スケールバーは 50 μm を表す。

C) 投与開始 (0 週) から解剖 (8 週) に至るまでの後肢伸展反射のスコアを示す。

データは平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 6$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test)。

2-3-2. 嗅覚系における水銀蓄積

嗅覚系における MeHg の移行性および蓄積性を明らかにするために、鼻粘膜、嗅球および嗅皮質の亜領域である嗅結節と梨状皮質を摘出し、総水銀量を測定した。その結果、MeHg に曝露されたマウスの各組織において、大脳皮質と同程度の水銀が蓄積していた（図 28A および図 29）。したがって、MeHg 中毒マウスの嗅覚系に MeHg が広く分布することが示唆された。

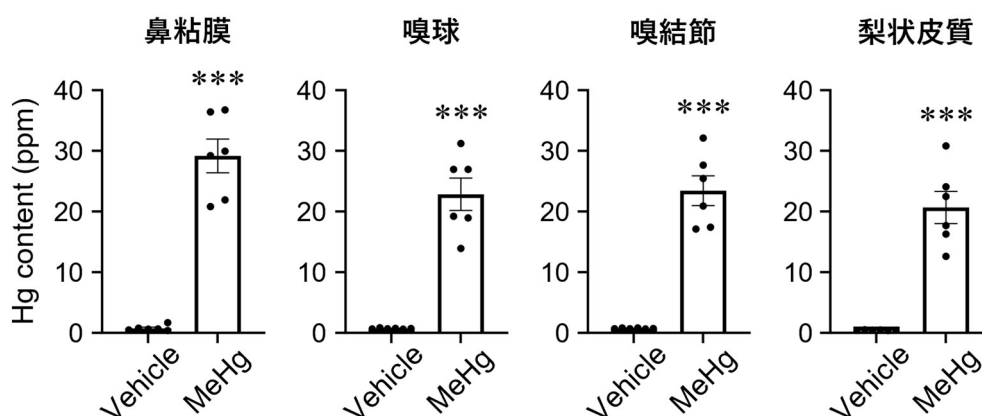


図 29. 嗅覚系における水銀蓄積

投与開始から 8 週後における鼻粘膜、嗅球および嗅皮質（嗅結節および梨状皮質）中の総水銀量を示す。各マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与した。データは平均値±標準誤差で表した ($n = 6$, $***p < 0.001$ by two-tailed Student's t -test).

2-3-3. 主嗅球に対する MeHg 曝露の影響

嗅球の矢状切片をヘマトキシリン・エオジン染色に供し、組織形態を観察した(図 30)。その結果、MeHg を曝露させたマウスの外網状層ではエオジン好染の領域で空胞の増加が顕著であり、僧帽細胞層および顆粒細胞層ではヘマトキシリンの染色性が低下していた(図 31)。細胞死を評価するために TUNEL 染色に供したところ、主嗅球の 6 つの細胞層のうち、顆粒細胞層で MeHg の曝露によって TUNEL 陽性細胞が有意に増加していた(図 32)。なお、MeHg 群のうち嗅球の総水銀量が最も高かった個体でのみ、僧帽細胞層においても若干の TUNEL 陽性細胞が観察された(図 33)。さらに、神経細胞マーカーである NeuN の免疫蛍光染色に供したところ、顆粒細胞層で NeuN の染色性が有意に低下していた(図 34)。以上の結果から、顆粒細胞層はその他の層に比して、MeHg の曝露に対して脆弱であることが示唆された。

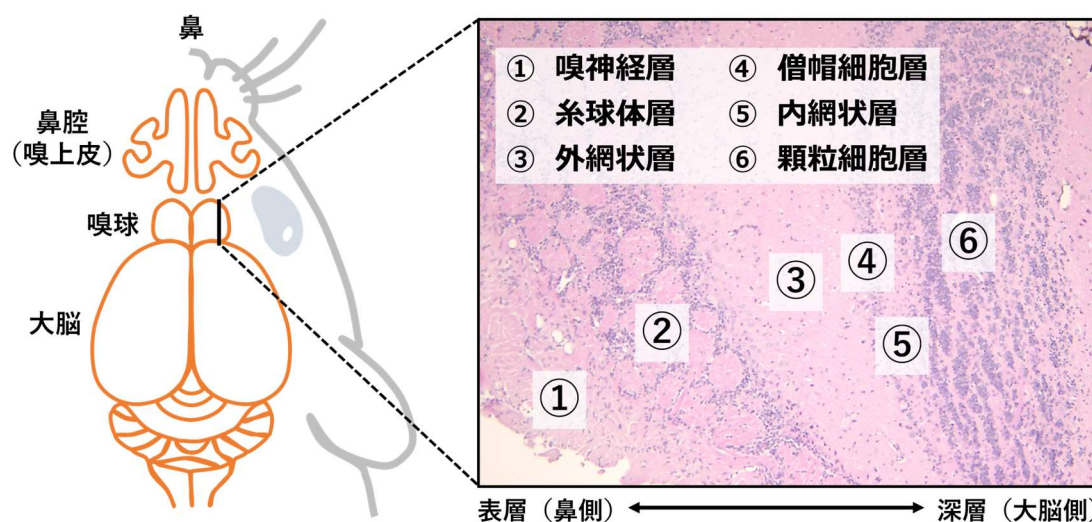


図 30. 主嗅球の層構造

嗅球の矢状面のヘマトキシリン・エオジン染色像を示す。主嗅球には層構造があり、表層から順に嗅神経層、糸球体層、外網状層、僧帽細胞層、内網状層および顆粒細胞層から構成されている。

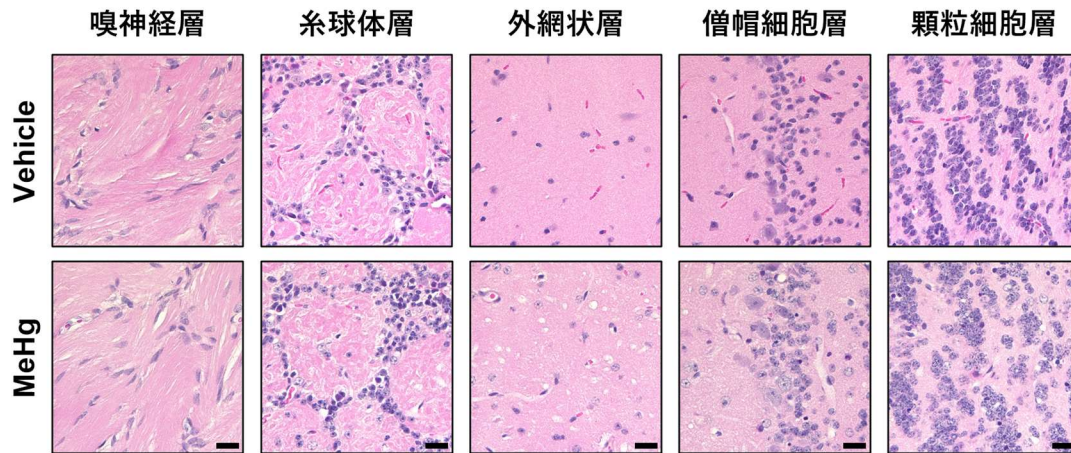


図 31. MeHg による主嗅球の組織学的変化

マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。嗅神経層、糸球体層、外網状層、僧帽細胞層および顆粒細胞層における染色像を示す。スケールバーは 25 μm を表す。

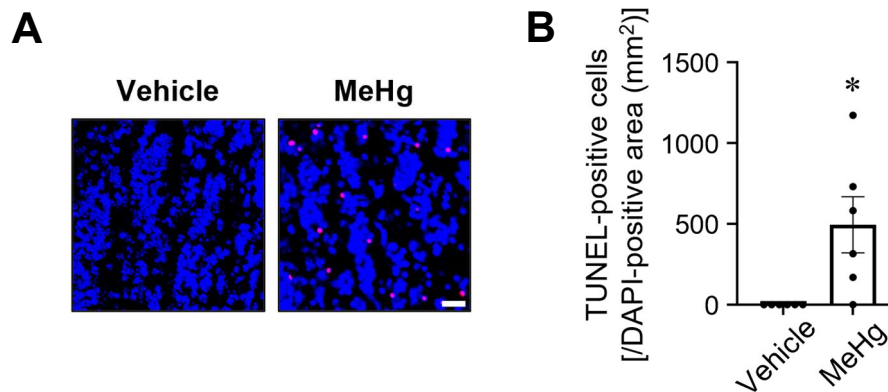


図 32. 顆粒細胞層における MeHg 誘発性細胞死

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し、TUNEL 染色を行った。顆粒細胞層における染色像を示す。赤色シグナルは TUNEL、青色シグナルは DAPI を示す。スケールバーは 25 μm を表す。

B) 顆粒細胞層の TUNEL 染色像を定量した。グラフの縦軸は DAPI 陽性細胞の面積 1 mm² あたりの TUNEL 陽性細胞数であり、データは平均値±標準誤差で表した ($n=6$, $*p<0.05$ by two-tailed Student's t -test)。

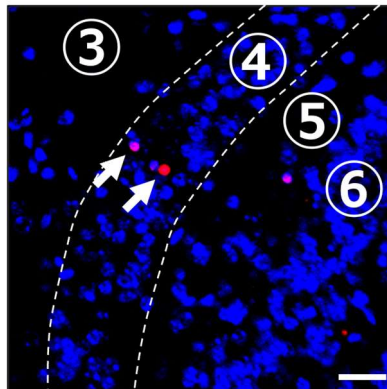


図 33. 僧帽細胞層における MeHg 誘発性細胞死

嗅球の総水銀量が最も高かった個体の TUNEL 染色像を示す。③ 外網状層，④ 僧帽細胞層（破線の内側の領域），⑤ 内網状層，⑥ 顆粒細胞層。赤色シグナルは TUNEL，青色シグナルは DAPI であり，僧帽細胞層における TUNEL 陽性細胞を矢印で示す。スケールバーは 25 μm を表す。Vehicle 群および MeHg 群のうち残りの 5 例では，僧帽細胞層において TUNEL 陽性細胞は観察されなかった。

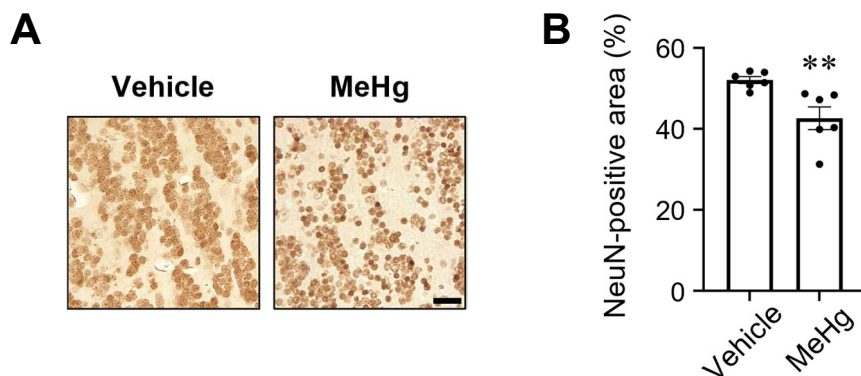


図 34. MeHg による顆粒細胞層神経細胞の減少

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，神経細胞マーカーである NeuN の免疫組織化学染色を行った。顆粒細胞層における染色像を示す。スケールバーは 25 μm を表す。

B) 顆粒細胞層の NeuN 染色像を定量した。グラフの縦軸は視野における NeuN で染色された面積の占める割合 (%) であり，データは平均値 \pm 標準誤差で表した ($n=6$, $**p < 0.01$ by two-tailed Student's t -test)。

2-3-4. 嗅皮質神経細胞に対する MeHg 曝露の影響

水俣病患者では、大脳皮質体性感覚野、運動野、視覚野、および聴覚野において神経細胞の脱落が観察されているが^{9,47}、嗅覚に關与する脳領域への影響は全く不明である。そこで、主嗅球からの投射を受ける嗅皮質において、MeHg が神経細胞死を惹起するか否かを図 35 に示した亜領域単位で検証した。初めに、脳の矢状切片を TUNEL 染色に供し細胞死を評価した。その結果、腹側蓋紐および梨状皮質で MeHg の曝露によって TUNEL 陽性細胞が有意に増加した。また、統計学的に有意ではなかったものの、MeHg に曝露された一部の個体において前嗅核、扁桃皮質、背側蓋紐、嗅結節で TUNEL 陽性細胞が増加する傾向が認められた。一方で、嗅内皮質では著明な変化は認められなかった（図 36）。なお、いずれの亜領域においても、DAPI 陽性細胞数に有意な差は認められなかった（表 5）。続いて、神経細胞マーカーである NeuN の免疫蛍光染色に供したところ、腹側蓋紐および嗅結節で MeHg の曝露によって NeuN 陽性細胞が有意に減少した。また、統計学的に有意ではなかったものの、MeHg に曝露された一部の個体において前嗅核、扁桃皮質、背側蓋紐で NeuN 陽性細胞が減少する傾向があった。一方で、梨状皮質および嗅内皮質では著明な変化は認められなかった（図 37）。以上の結果から、MeHg の曝露によって嗅皮質の神経細胞死が惹起されることが示唆された。なお、梨状皮質（図 36B）および嗅結節（図 37B）について有意差が得られているものの、いずれの測定系においても有意な変化を示した腹側蓋紐と比較すると、僅かな変化量であった。

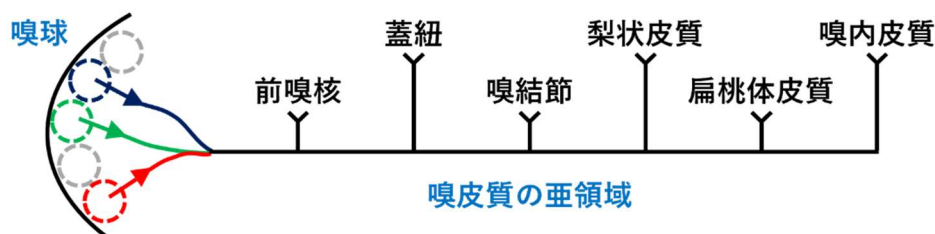


図 35. 本研究で解析した嗅皮質の亜領域

嗅皮質は主嗅球から直接入力がある領域として定義され、複数の亜領域に分類される。本研究では、代表的な亜領域である前嗅核、蓋紐（背側と腹側に細分化される）、嗅結節、梨状皮質、扁桃皮質、嗅内皮質に着目した^{63,64}。

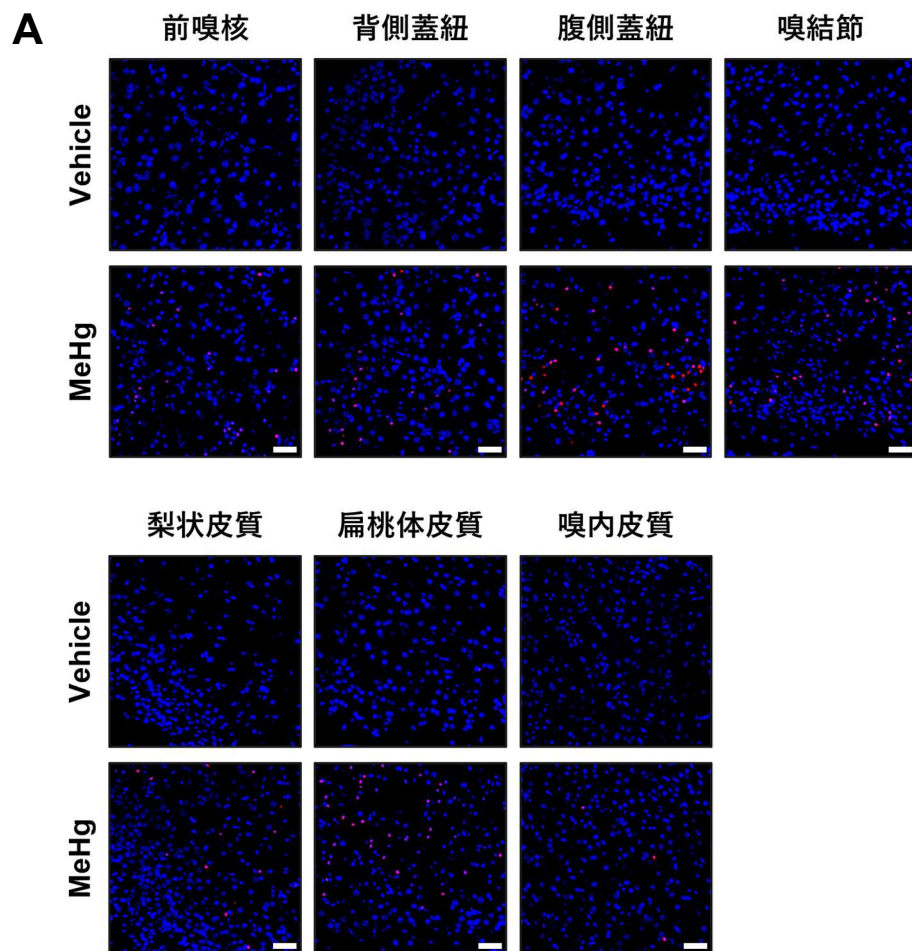
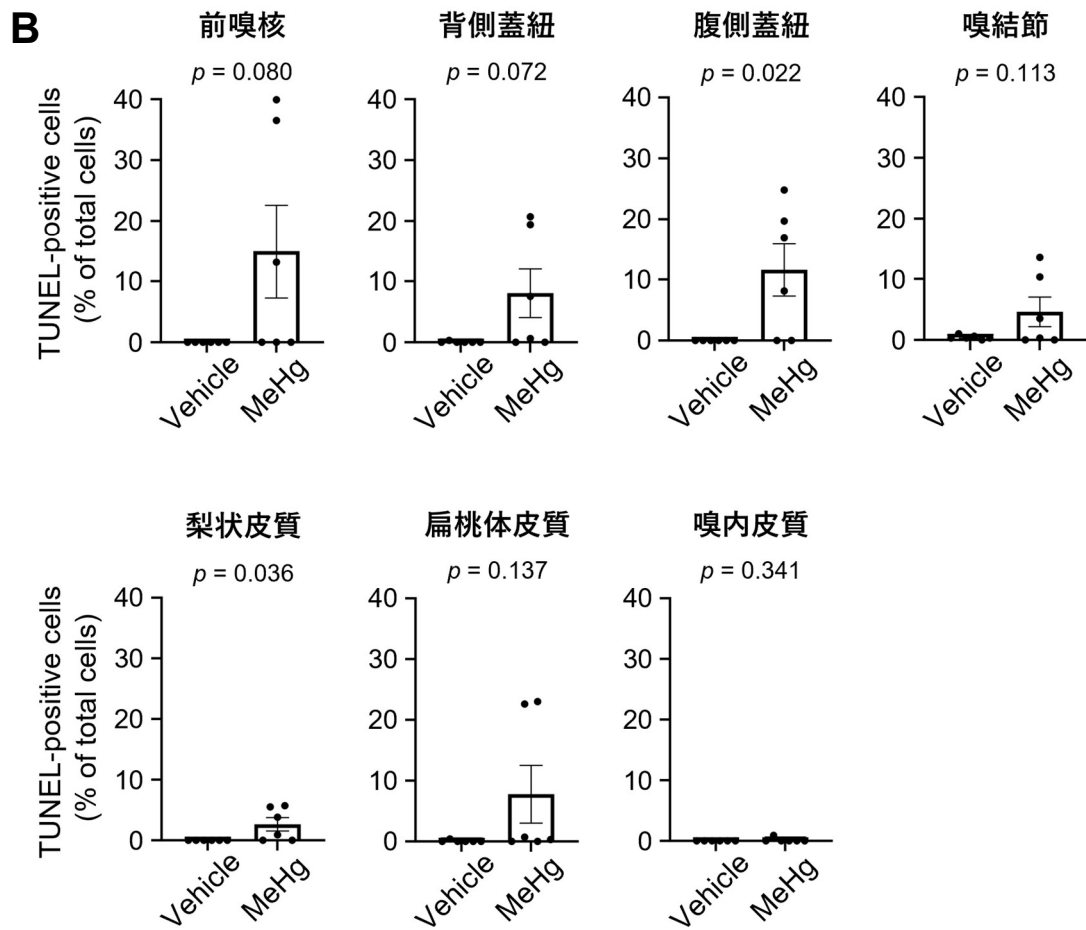


図 36. 嗅皮質における MeHg 誘発性細胞死

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，TUNEL 染色を行った．嗅皮質の各亜領域における染色像を示す．赤色シグナルは TUNEL，青色シグナルは DAPI を示す．スケールバーは 50 μ m を表す．

(次頁に続く)

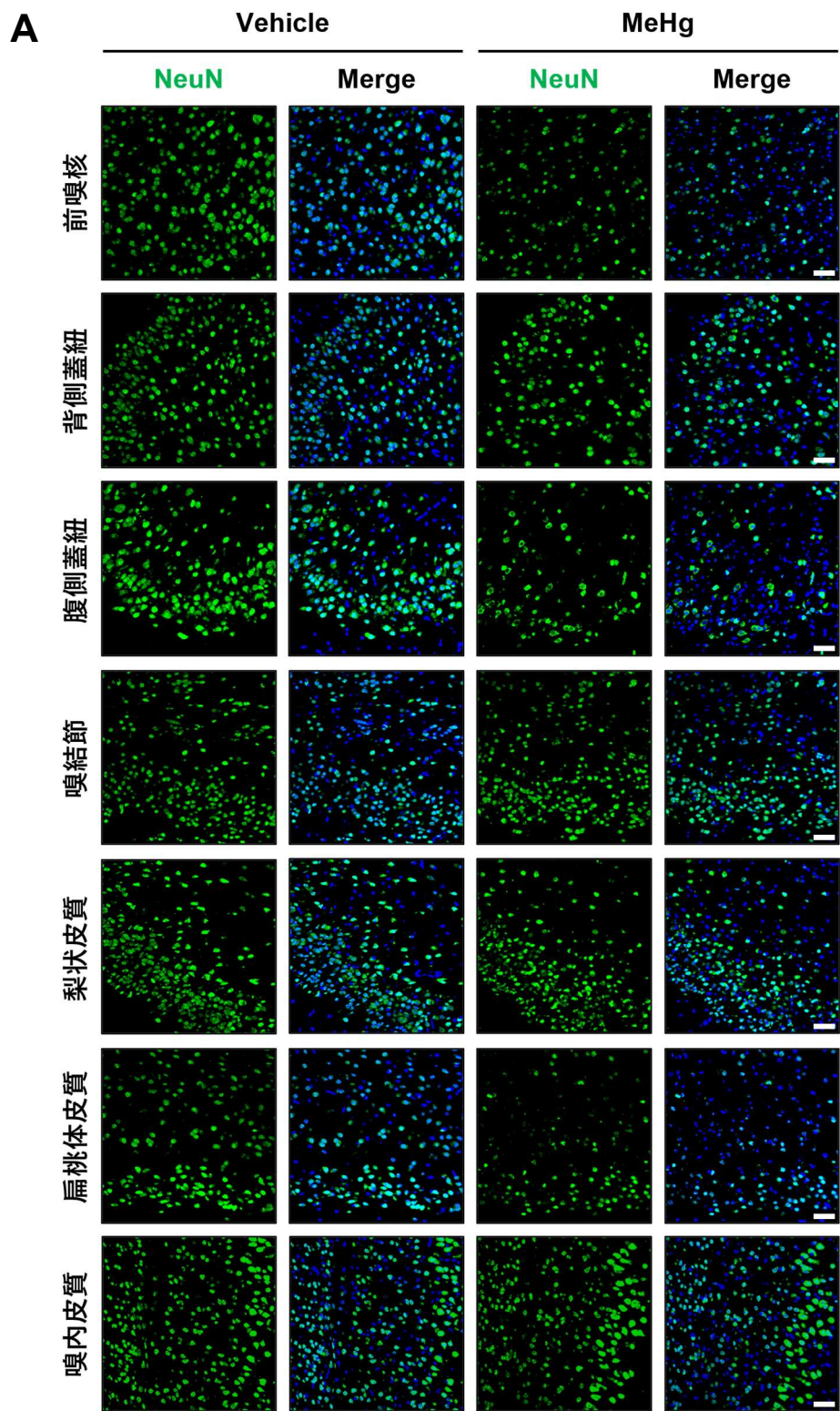


B) 各亜領域の TUNEL 染色像を定量した。グラフの縦軸は DAPI 陽性細胞数に占める TUNEL 陽性細胞数の割合 (%) であり、データは平均値±標準誤差で表した ($n = 6$, p 値は two-tailed Student's t -test に基づく)。

表 5. 嗅皮質の DAPI 陽性細胞数

亜領域	Vehicle	MeHg
前嗅核	264 ± 6	292 ± 12
背側蓋紐	299 ± 5	294 ± 5
腹側蓋紐	291 ± 5	306 ± 14
嗅結節	358 ± 12	379 ± 12
梨状皮質	335 ± 18	360 ± 18
扁桃体皮質	302 ± 30	336 ± 18
嗅内皮質	399 ± 17	381 ± 19

TUNEL 染色像における各亜領域の視野 (400- × 400- μm^2) あたりの DAPI 陽性細胞数を示す。データは平均値 ± 標準誤差で表した。全ての亜領域において、Vehicle 群と MeHg 群間で有意差はなかった ($n = 6$, two-tailed Student's t -test)。



(次頁に続く)

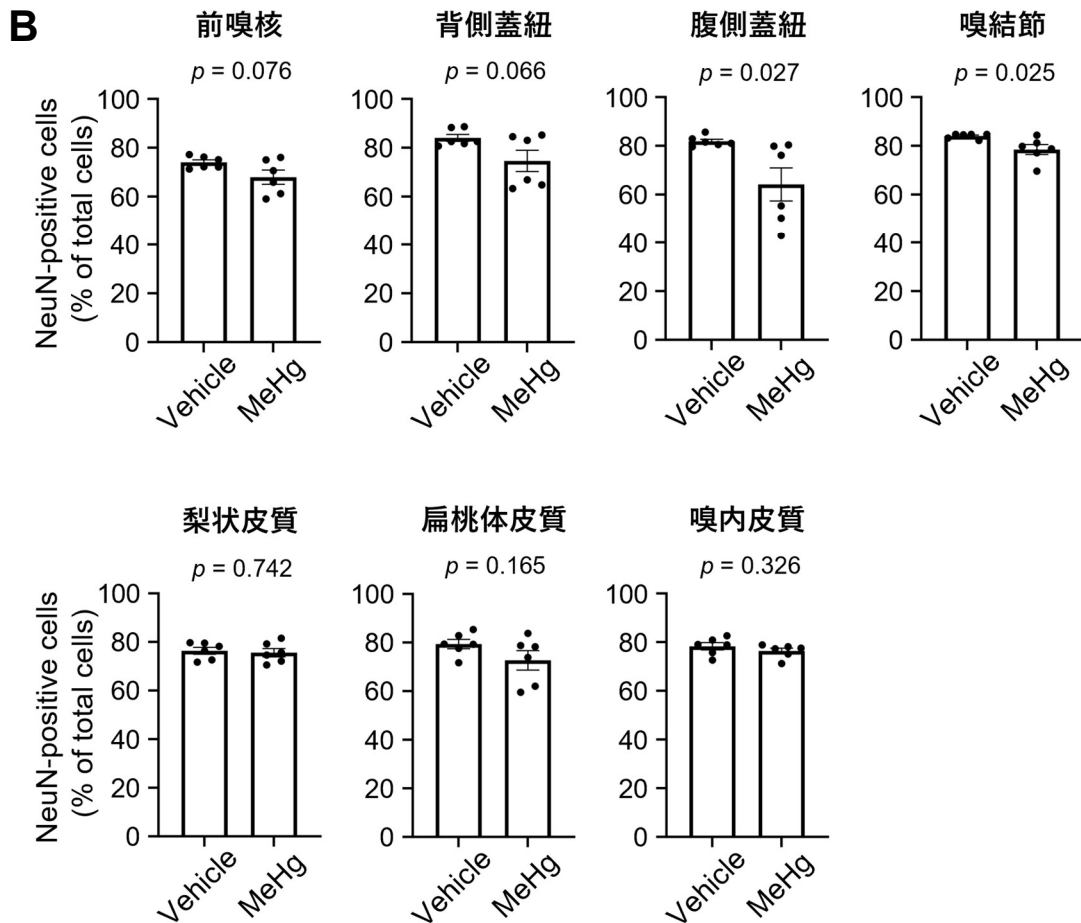


図 37. MeHg による嗅皮質神経細胞の減少

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し、神経細胞マーカーである NeuN の免疫蛍光染色を行った。嗅皮質の各亜領域における染色像 (NeuN 染色像単独および NeuN と DAPI をマージした染色像) を示す。緑色シグナルは NeuN、青色シグナルは DAPI を示す。スケールバーは 50 μm を表す。

B) 各亜領域の NeuN 染色像を定量した。グラフの縦軸は DAPI 陽性細胞数に占める NeuN 陽性細胞数の割合 (%) であり、データは平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 6$, p 値は two-tailed Student's t -test に基づく)。

2-3-5. 二次嗅皮質神経細胞に対する MeHg 曝露の影響

嗅皮質の一部の亜領域は、感覚統合に関与する眼窩前頭皮質や島皮質（げっ歯類では無顆粒島皮質）などの高次の皮質領域に接続しており、これらの領域も匂い刺激によって活性化される^{63,89-91}。本研究では、眼窩前頭皮質および無顆粒島皮質を二次嗅皮質として定義し、嗅皮質と同様に MeHg が神経細胞死を惹起するか否かを検証した。その結果、眼窩前頭皮質では MeHg の曝露によって TUNEL 陽性細胞数が有意に増加した（図 38）。なお、いずれの亜領域においても、DAPI 陽性細胞数に有意な差は認められなかった（表 6）。TUNEL 染色の結果と一致して、NeuN 陽性細胞は有意に減少した（図 39）。また、統計学的に有意ではなかったものの、無顆粒島皮質では MeHg に曝露された一部の個体において、TUNEL 陽性細胞が増加し、NeuN 陽性細胞が減少する傾向が認められた（図 38 および図 39）。以上の結果から、MeHg の曝露によって眼窩前頭皮質および無顆粒島皮質において、神経細胞死が惹起されることが示唆された。

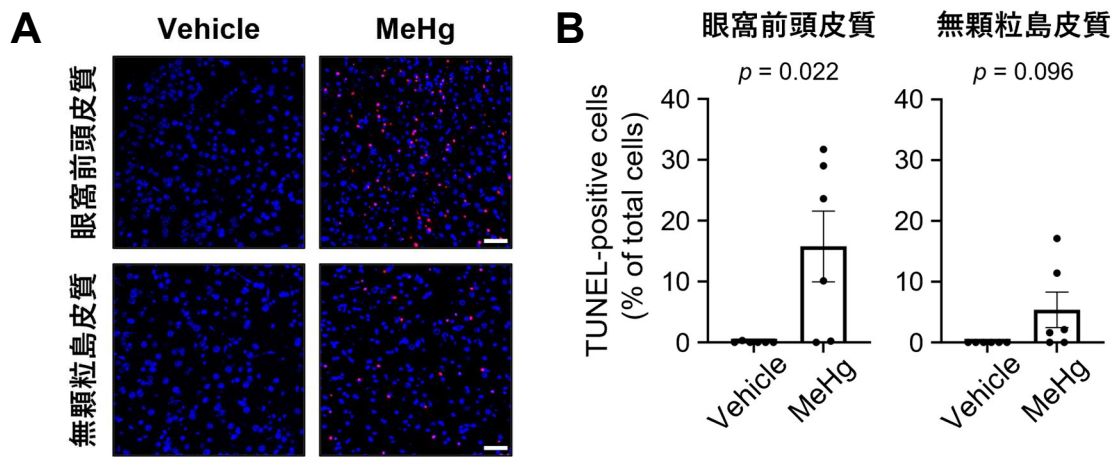


図 38. 二次嗅皮質における MeHg 誘発性細胞死

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し、TUNEL 染色を行った。二次嗅皮質の各亜領域における染色像を示す。赤色シグナルは TUNEL、青色シグナルは DAPI を示す。スケールバーは 50 μm を表す。

B) 各亜領域の TUNEL 染色像を定量した。グラフの縦軸は DAPI 陽性細胞数に占める TUNEL 陽性細胞数の割合 (%) であり、データは平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 6$, p 値は two-tailed Student's t -test に基づく)。

表 6. 二次嗅皮質の DAPI 陽性細胞数

亜領域	Vehicle	MeHg
眼窩前頭皮質	374 \pm 11	394 \pm 15
無顆粒島皮質	328 \pm 17	329 \pm 10

TUNEL 染色像における各亜領域の視野 (400- \times 400- μm^2) あたりの DAPI 陽性細胞数を示す。データは平均値 \pm 標準誤差で表した。全ての亜領域において、Vehicle 群と MeHg 群間で有意差はなかった ($n = 6$, two-tailed Student's t -test)。

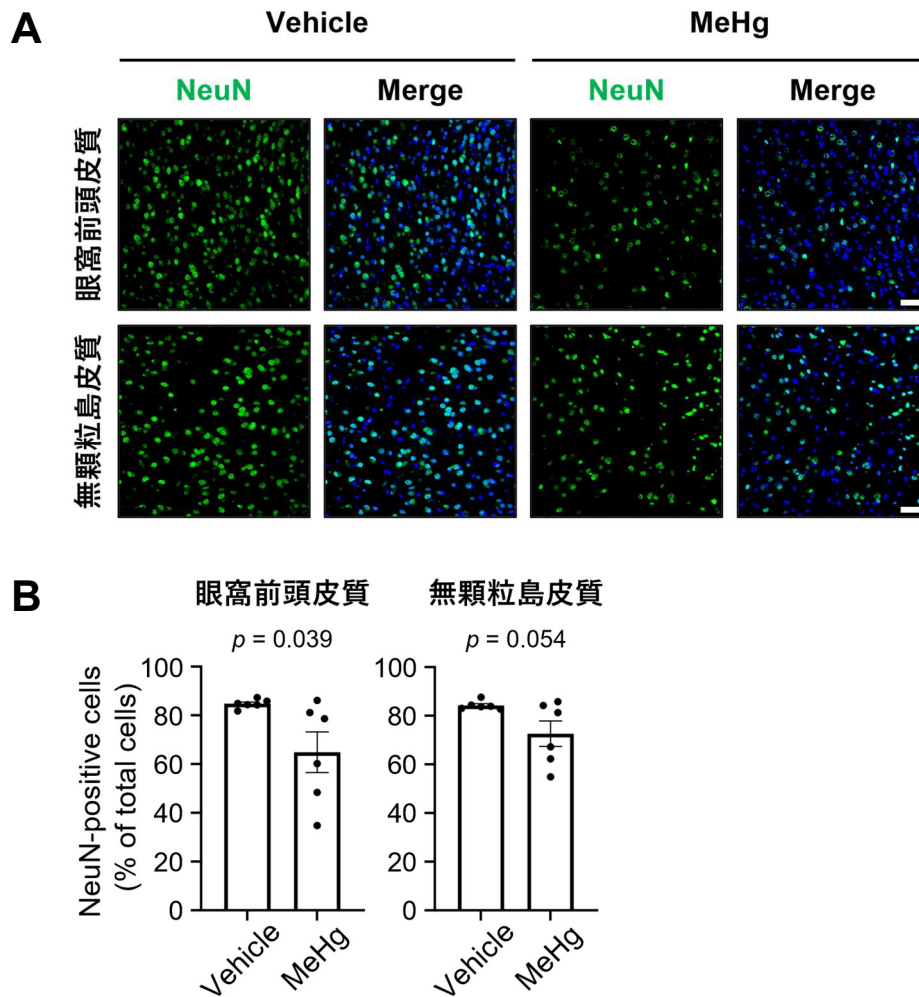


図 39. MeHg による二次嗅皮質神経細胞の減少

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，神経細胞マーカーである NeuN の免疫蛍光染色を行った．二次嗅皮質の各亜領域における染色像（NeuN 染色像単独および NeuN と DAPI をマージした染色像）を示す．緑色シグナルは NeuN，青色シグナルは DAPI を示す．スケールバーは 50 μm を表す．

B) 各亜領域の NeuN 染色像を定量した．グラフの縦軸は DAPI 陽性細胞数に占める NeuN 陽性細胞数の割合 (%) であり，データは平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 6$, p 値は two-tailed Student's t -test に基づく)．

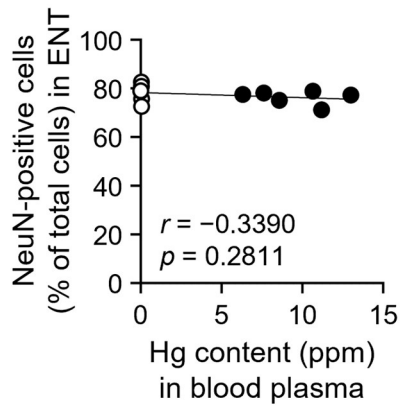
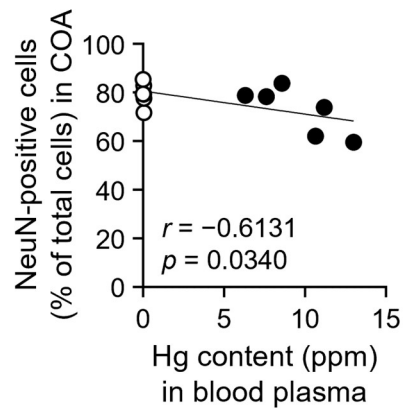
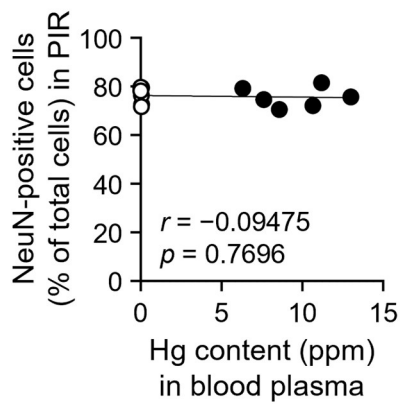
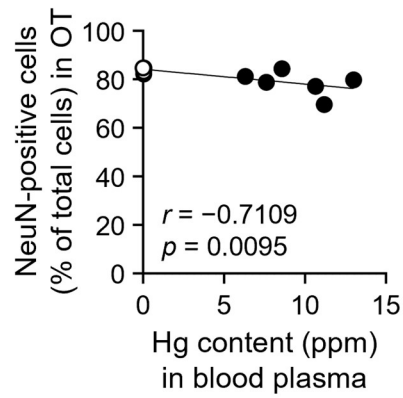
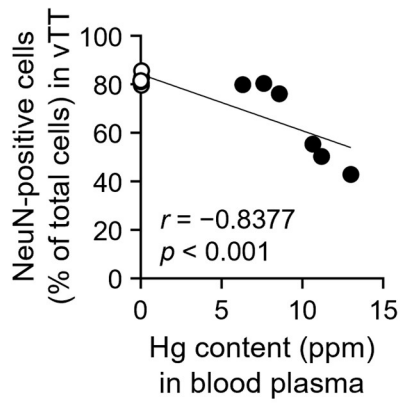
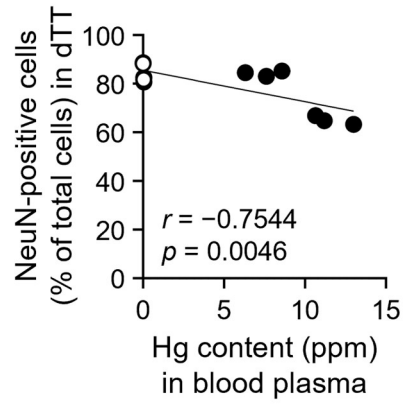
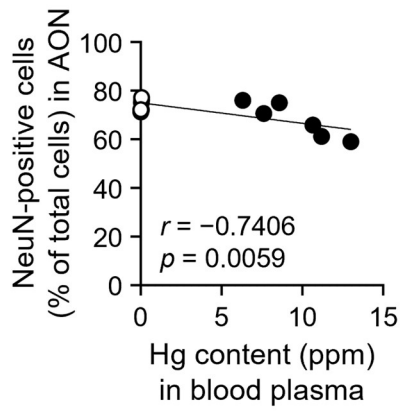
2-3-6. 嗅皮質における MeHg 誘発性神経細胞死の特徴

前項 2-3-4 および 2-3-5 において、MeHg の曝露が嗅皮質および二次嗅皮質を傷害することが明らかとなった。一方で、(1) 傷害の程度が MeHg の蓄積量と関連しているのか、(2) 嗅皮質の傷害は既知の MeHg 標的部位の傷害と平行に生じるのか、あるいは既知の MeHg 標的部位が傷害されているが嗅皮質は傷害されないケースがあるのかという疑問が生じた。これらの疑問を解消すべく、以下2つの検討を行った。

初めに、MeHg 曝露による神経細胞の減少が MeHg の蓄積と関連しているか否かを明らかにするために、各個体の血漿中水銀濃度と嗅皮質および二次嗅皮質の亜領域ごとの NeuN 陽性細胞数の相関を解析した。その結果、梨状皮質および嗅内皮質を除いた亜領域で血漿中水銀濃度と有意な負の相関があり、嗅皮質では腹側蓋紐、二次嗅皮質では眼窩前頭皮質で特に強い相関が認められた(図 40)。さらに散布図から、MeHg による傷害が顕著であった腹側蓋紐(前項 2-3-4 図 37B)および眼窩前頭皮質(前項 2-3-5 図 39B)では、血漿中水銀濃度が高い個体ほど神経細胞数が少ない傾向があることが読み取れた(図 40)。以上の結果から、傷害の程度と血漿中水銀濃度の因果関係は不明であるものの、MeHg の蓄積量が多い個体ほど神経細胞死が顕著である可能性が示唆された。

続いて、嗅皮質の傷害は既知の MeHg 標的部位と平行に生じるか否かを明らかにするために、大脳皮質運動野の NeuN 陽性細胞数と嗅皮質および二次嗅皮質の亜領域ごとの NeuN 陽性細胞数の相関を解析した。その結果、前項 2-3-4 図 37B において MeHg による傷害がほとんど観察されなかった梨状皮質および嗅内皮質では、大脳皮質運動野の NeuN 陽性細胞数が Vehicle 群と比して顕著に減少している個体であっても、NeuN 陽性細胞数はほとんど変動していないことが判明した(図 41)。梨状皮質および嗅内皮質以外の亜領域では大脳皮質運動野の NeuN 陽性細胞数と有意な正の相関があり、腹側蓋紐および眼窩前頭皮質で特に強い相関が認められた(図 41)。さらに、腹側蓋紐および眼窩前頭皮質を示した散布図から、大脳皮質運動野の NeuN 陽性細胞数が少ない個体ほど、神経細胞数が少ない傾向があることが読み取れた(図 41)。以上の結果から、各亜領域のうち MeHg によって傷害される部位は少なくとも、大脳皮質運動野と同時に細胞死が進展する可能性が示唆された。

A



(次頁に続く)

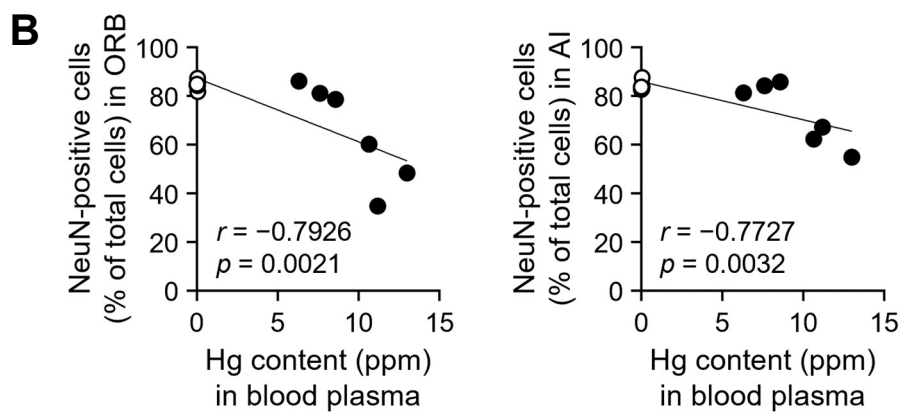
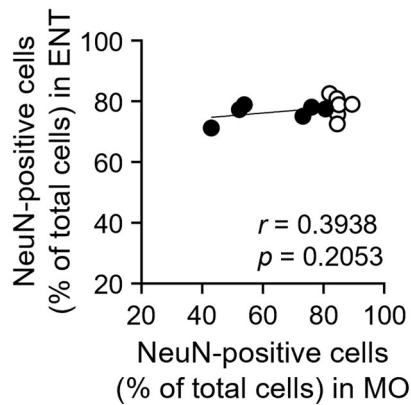
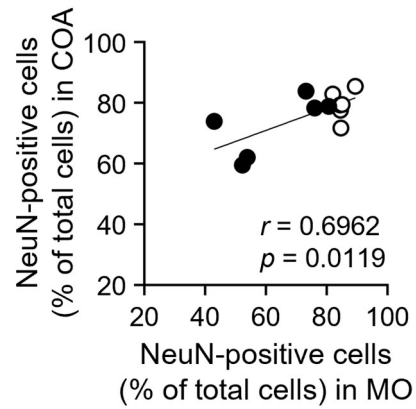
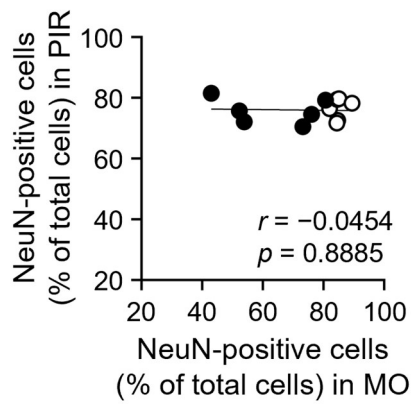
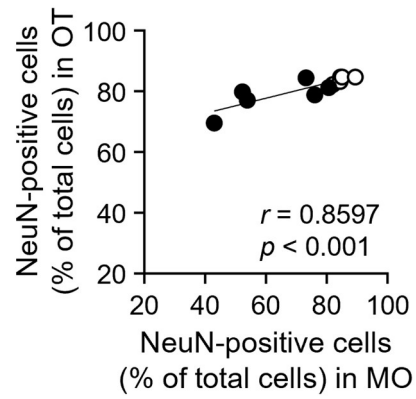
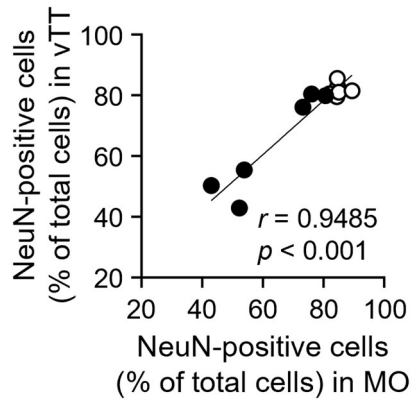
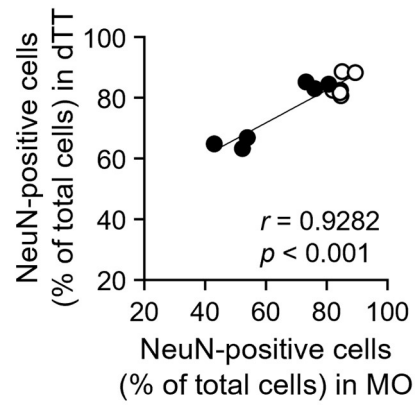
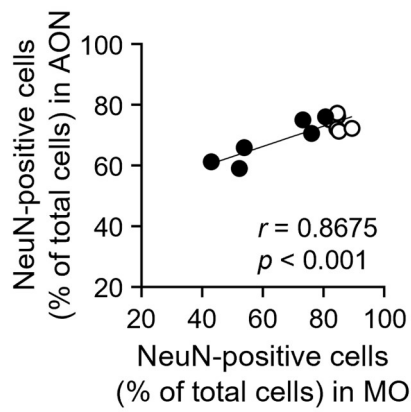


図 40. 嗅皮質神経細胞数と血漿中水銀濃度との相関

A) 縦軸を図 37B に示した嗅皮質の「各亜領域の NeuN 陽性細胞数」、横軸を「各個体の血漿中水銀濃度」とした散布図を示す。

B) 縦軸を図 39B に示した二次嗅皮質の「各亜領域の NeuN 陽性細胞数」、横軸を「各個体の血漿中水銀濃度」とした散布図を示す。

Vehicle 群 ($n=6$) を open circles, MeHg 群 ($n=6$) を closed circles でプロットした。相関係数 r および p 値は, Pearson's correlation analysis に基づく。略号は以下の通りである。AI (agranular insular cortex, 無顆粒島皮質), AON (anterior olfactory nucleus, 前嗅核), COA (cortical amygdala, 扁桃体皮質), dTT (dorsal tenia tecta, 背側蓋紐), ENT (entorhinal cortex, 嗅内皮質), OT (olfactory tubercle, 嗅結節), ORB (orbitofrontal cortex, 眼窩前頭皮質), PIR (piriform cortex, 梨状皮質), vTT (ventral tenia tecta, 腹側蓋紐)。

A

(次頁に続く)

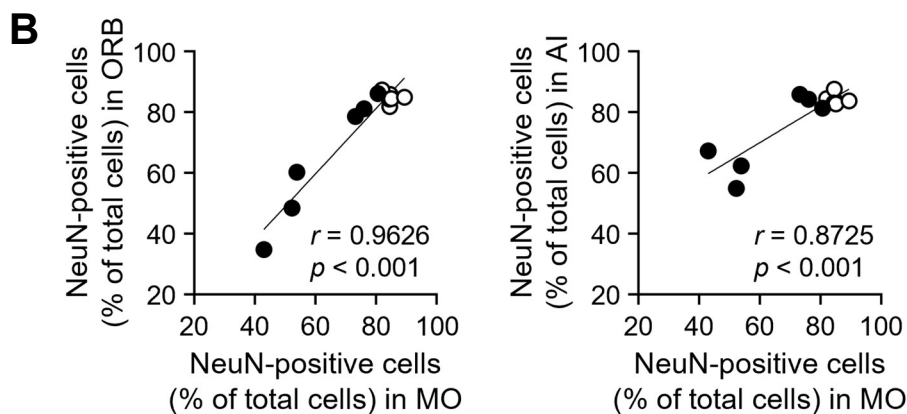


図 41. 嗅皮質神経細胞数と運動野神経細胞数との相関

A) 縦軸を図 37B に示した嗅皮質の「各亜領域の NeuN 陽性細胞数」、横軸を「大脳皮質運動野の NeuN 陽性細胞数」とした散布図を示す。

B) 縦軸を図 39B に示した二次嗅皮質の「各亜領域の NeuN 陽性細胞数」、横軸を「大脳皮質運動野の NeuN 陽性細胞数」とした散布図を示す。

Vehicle 群 ($n = 6$) を Open circles, MeHg 群 ($n = 6$) を Closed circles でプロットした。相関係数 r および p 値は Pearson's correlation analysis に基づく。略号は以下の通りある。AI (agranular insular cortex, 無顆粒島皮質), AON (anterior olfactory nucleus, 前嗅核), COA (cortical amygdala, 扁桃体皮質), dTT (dorsal tenia tecta, 背側蓋紐), ENT (entorhinal cortex, 嗅内皮質), MO (motor cortex, 大脳皮質運動野) OT (olfactory tubercle, 嗅結節), ORB (orbitofrontal cortex, 眼窩前頭皮質), PIR (piriform cortex, 梨状皮質), vTT (ventral tenia tecta, 腹側蓋紐)。

2-3-7. グリア細胞に対する MeHg 曝露の影響

神経細胞の脱落に加えて、水俣病患者脳ではアストログリオシスが認められる^{9,47}。また、MeHgに曝露されたげっ歯類の脳皮質と小脳では、ミクログリアの増殖が観察されている^{42,92}。これらのグリア細胞の活性化は神経損傷部位の近傍で起こることから、嗅覚系に対するMeHgの影響を評価する指標になりうると考えた。そこで主嗅球、嗅皮質および二次嗅皮質におけるアストロサイトおよびミクログリアの活性化を検証するため、アストロサイトマーカーであるGFAPとミクログリアマーカーであるIba1の免疫蛍光染色を行った。MeHgに曝露されたマウスの主嗅球では、GFAP陽性細胞が肥大化しており、外網状層と顆粒細胞層に多く集積していた(図42)。また、Iba1陽性細胞は細胞体が大きなアメーバ状に変化し、細胞質突起が太くなっており、GFAP陽性細胞と同様に外網状層と顆粒細胞層に多く集積していた(図43)。また、MeHgに曝露されたマウスの嗅皮質では、GFAP陽性細胞およびIba1陽性細胞が、扁桃体皮質と嗅内皮質を除く全ての垂領域で顕著に増加していた(図44, 図45, 表7, 表8)。以上の結果から、嗅覚に關与する脳領域においても、MeHgの曝露によってアストロサイトおよびミクログリアがともに活性化する可能性が示唆された。

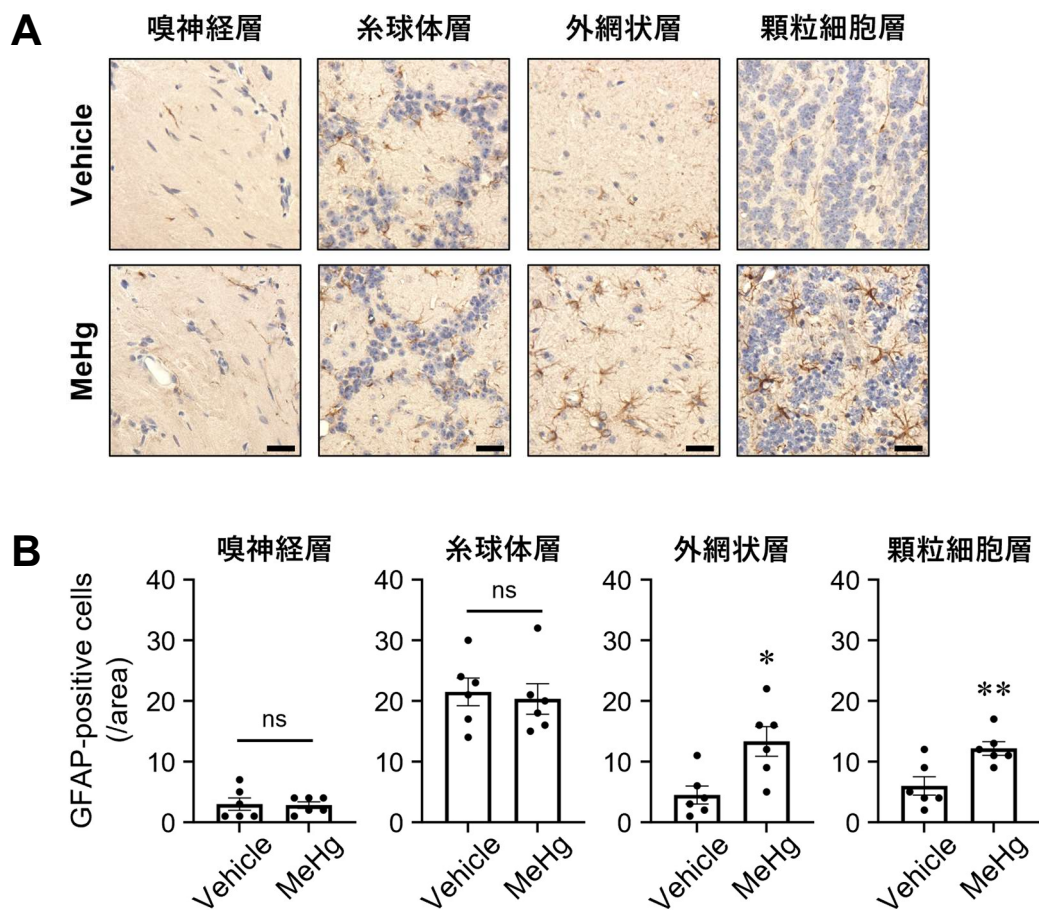


図 42. 主嗅球における MeHg によるアストロサイトマーカーの増加

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し、アストロサイトマーカーである GFAP の免疫組織化学染色およびヘマトキシリンによる対比染色を行った。嗅神経層、糸球体層、外網状層および顆粒細胞層における染色像を示す。スケールバーは 25 μm を表す。

B) 嗅神経層、糸球体層、外網状層および顆粒細胞層の GFAP 染色像を定量した。グラフの縦軸は視野 ($169 \times 169\text{-}\mu\text{m}^2$) あたりの GFAP 陽性細胞数であり、データは平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 6$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by two-tailed Student's t -test; ns, not significant)。

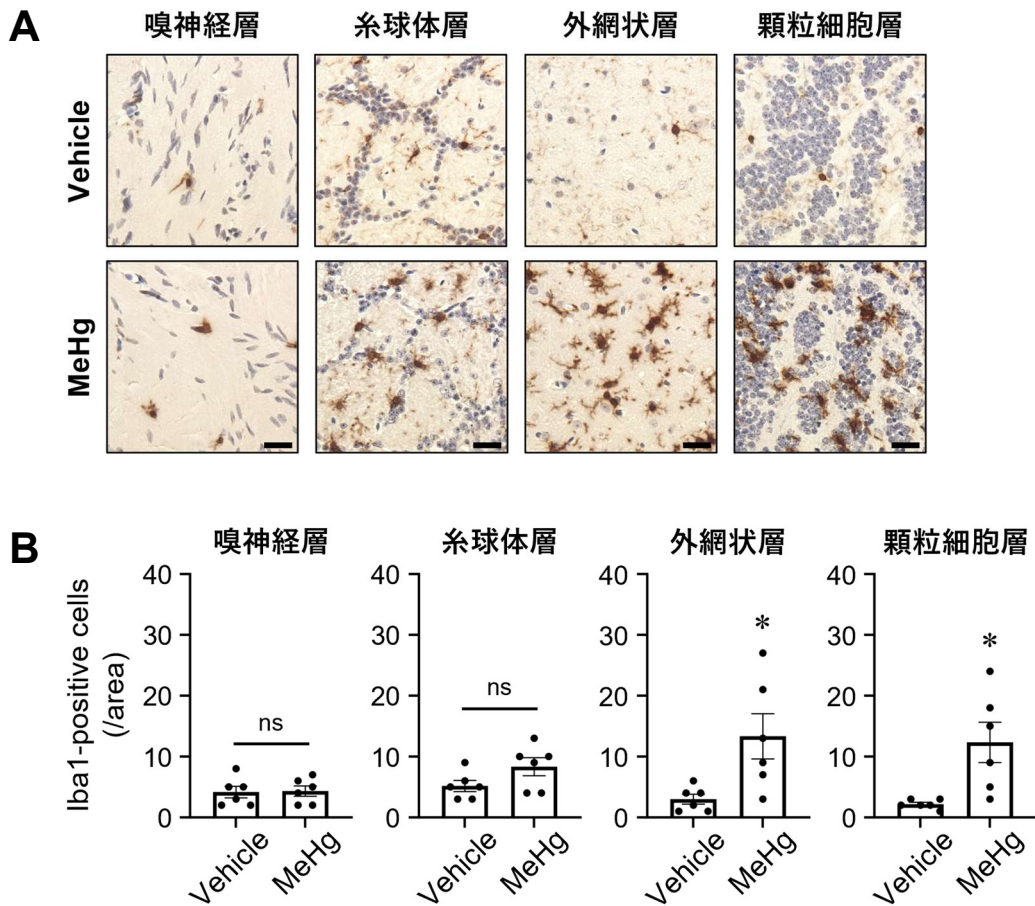


図 43. 主嗅球における MeHg によるミクログリアマーカーの増加

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，ミクログリアマーカーである Iba1 の免疫組織化学染色およびヘマトキシリンによる対比染色を行った．嗅神経層，糸球体層，外網状層および顆粒細胞層における染色像を示す．スケールバーは 25 μm を表す．

B) 嗅神経層，糸球体層，外網状層および顆粒細胞層の Iba1 染色像を定量した．グラフの縦軸は視野 (169- \times 169- μm^2) あたりの Iba1 陽性細胞数であり，データは平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 6$, $*p < 0.05$ by two-tailed Student's t -test; ns, not significant)．

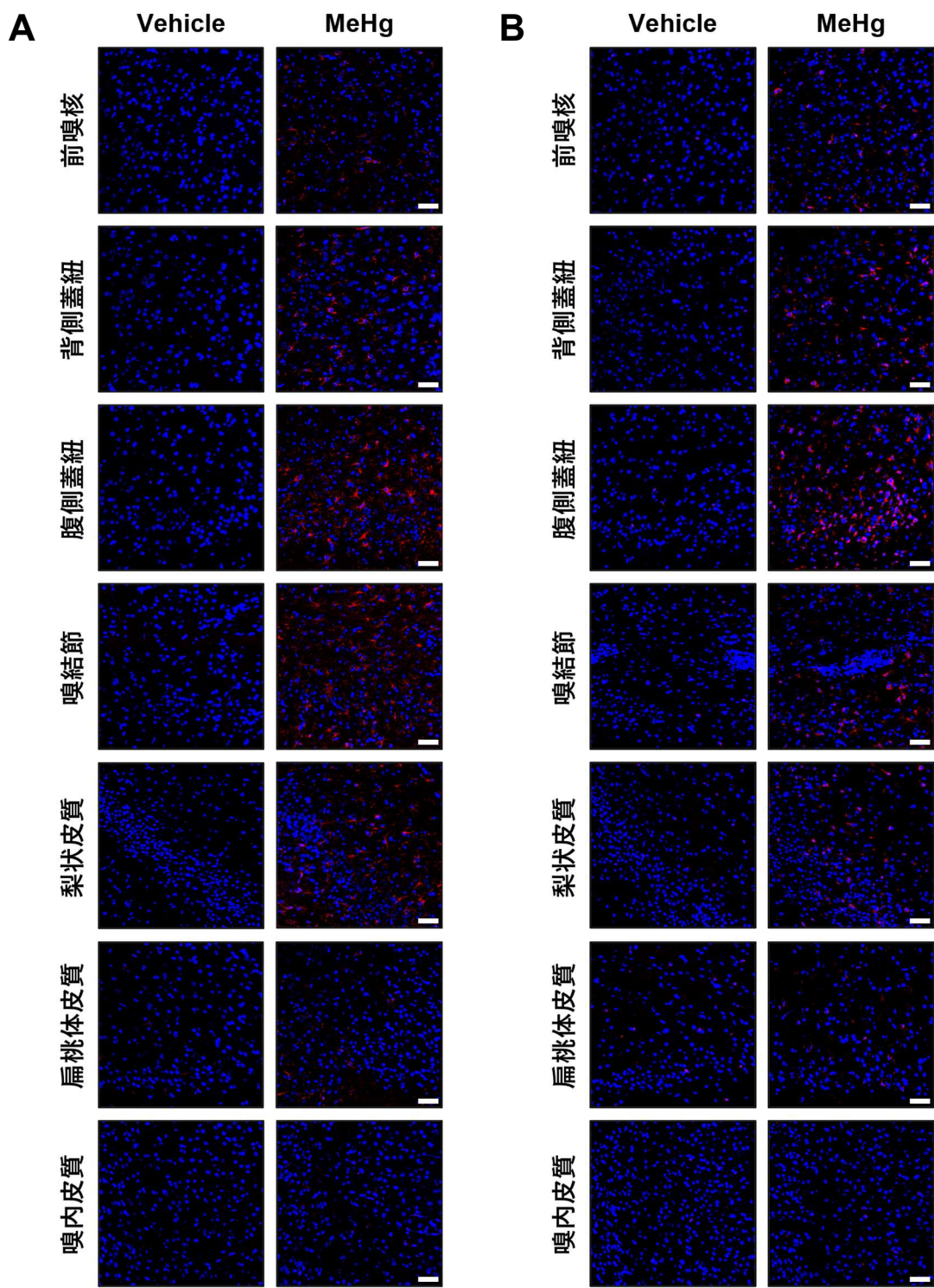


図 44. 嗅皮質における MeHg によるアストロサイトマーカーおよび
ミクログリアマーカーの増加

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，GFAP の免疫蛍光染色を行った ($n=2$ で実施し，同様の傾向を示した)．嗅皮質の各亜領域における染色像を示す．赤色シグナルは GFAP，青色シグナルは DAPI を示す．スケールバーは $50\ \mu\text{m}$ を表す．

B) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，Iba1 の免疫蛍光染色を行った ($n=2$ で実施し，同様の傾向を示した)．嗅皮質の各亜領域における染色像を示す．赤色シグナルは Iba1，青色シグナルは DAPI を示す．スケールバーは $50\ \mu\text{m}$ を表す．

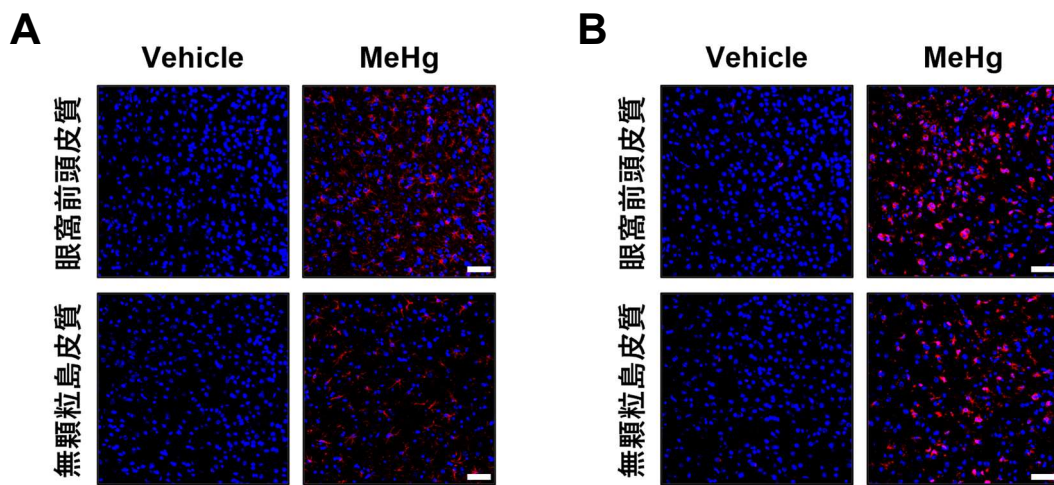


図 45. 二次嗅皮質における MeHg によるアストロサイトマーカーおよび
ミクログリアマーカーの増加

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，アストロサイトマーカーである GFAP の免疫蛍光染色を行った ($n=2$ で実施し，同様の傾向を示した)．二次嗅皮質の各亜領域における染色像を示す．赤色シグナルは GFAP，青色シグナルは DAPI を示す．スケールバーは $50\ \mu\text{m}$ を表す．

B) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，ミクログリアマーカーである Iba1 の免疫蛍光染色を行った ($n=2$ で実施し，同様の傾向を示した)．二次嗅皮質の各亜領域における染色像を示す．赤色シグナルは Iba1，青色シグナルは DAPI を示す．スケールバーは $50\ \mu\text{m}$ を表す．

表 7. 嗅皮質および二次嗅皮質における MeHg による GFAP 陽性細胞の増加

亜領域	Vehicle	MeHg
前嗅核	0	33
背側蓋紐	0	39
腹側蓋紐	1	59
嗅結節	0	89
梨状皮質	2	61
扁桃体皮質	4	14
嗅内皮質	0	1
眼窩前頭皮質	4	100
無顆粒島皮質	0	47

図 44A および図 45A に示した染色像から GFAP 陽性細胞を計数した。

表 8. 嗅皮質および二次嗅皮質における MeHg による Iba1 陽性細胞の増加

亜領域	Vehicle	MeHg
前嗅核	4	17
背側蓋紐	5	34
腹側蓋紐	4	91
嗅結節	4	36
梨状皮質	3	40
扁桃体皮質	11	6
嗅内皮質	2	4
眼窩前頭皮質	4	140
無顆粒島皮質	2	62

図 44B および図 45B に示した染色像から Iba1 陽性細胞を計数した。

2-3-8. 嗅上皮に対する MeHg 曝露の影響

カドミウムやニッケル，亜鉛などの特定の金属化合物をマウスの鼻腔内に投与すると，嗅細胞死および嗅上皮の萎縮が認められる⁹³⁻⁹⁵。興味深いことに，MeHg に曝露されたマウスの鼻粘膜には大脳皮質と同程度の水銀が蓄積していたことから（図 28A および図 29），MeHg が嗅上皮を傷害する可能性を考えた。そこで，ヘマトキシリン・エオジン染色および成熟嗅細胞マーカーである OMP の免疫蛍光染色から，嗅上皮の形態および嗅細胞数をそれぞれ解析することで，嗅上皮に対する MeHg の傷害性を評価した。初めに，鼻腔の冠状切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色に供した。前項 2-2-10 で定義した 6 つの亜領域について，ヘマトキシリン・エオジン染色像から嗅上皮の厚さを定量した。その結果，鼻中隔（DS および VS）と内側鼻甲介（MT1 および MT2）では著変は認められなかったが，外側鼻甲介（LT1 および LT2）では MeHg の曝露によって嗅上皮の厚さが有意に減少していた（図 46）。なお，鼻腔切片全体の形態やサイズに著変は認められなかった（図 47 および表 9）。続いて鼻腔の冠状切片を OMP の免疫蛍光染色に供した結果，MeHg に曝露されたマウスの外側鼻甲介（LT1 および LT2）で OMP 陽性細胞数が顕著に減少していた（図 48）。以上の結果から，MeHg の曝露によって嗅上皮が部分的に傷害されることが示唆された。

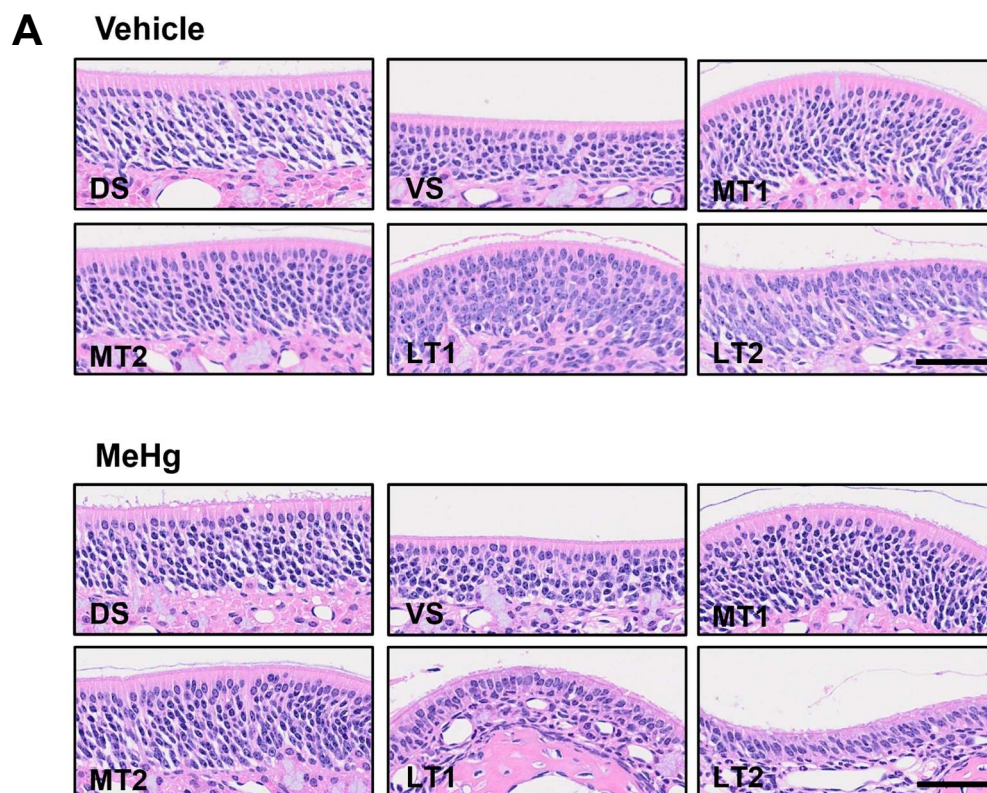
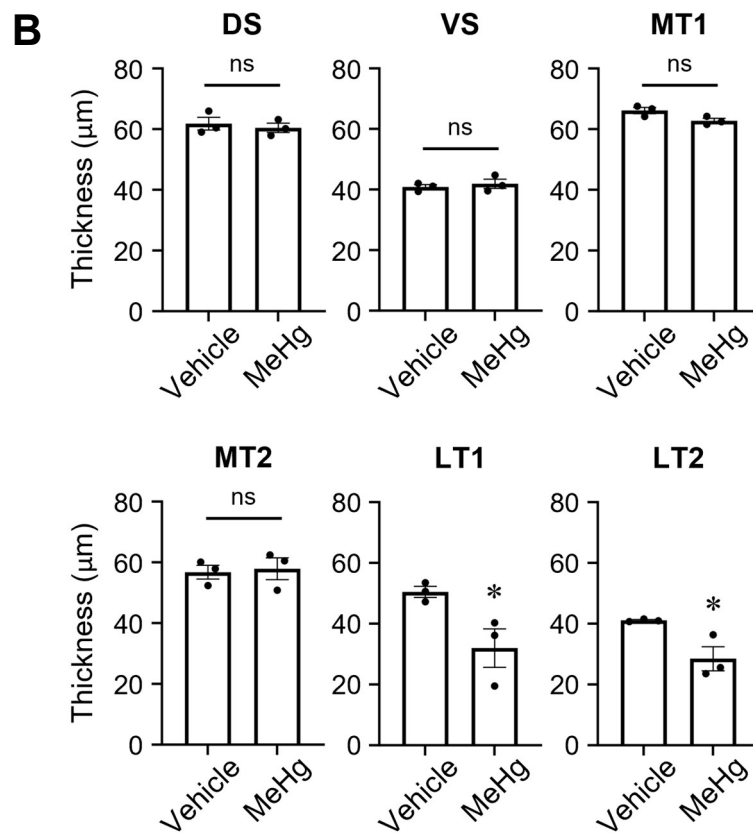


図 46. MeHg による嗅上皮の萎縮

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。各亜領域の染色像を示す。亜領域の定義は前項 2-2-10 および図 25 に示した通りである。スケールバーは 50 μ m を表す。

(次頁に続く)



B) ヘマトキシリン・エオジン染色像から各垂領域の嗅上皮の厚さを定量した。データは平均値±標準誤差で表した ($n=3$, $*p < 0.05$ by two-tailed Student's t -test; ns, not significant).

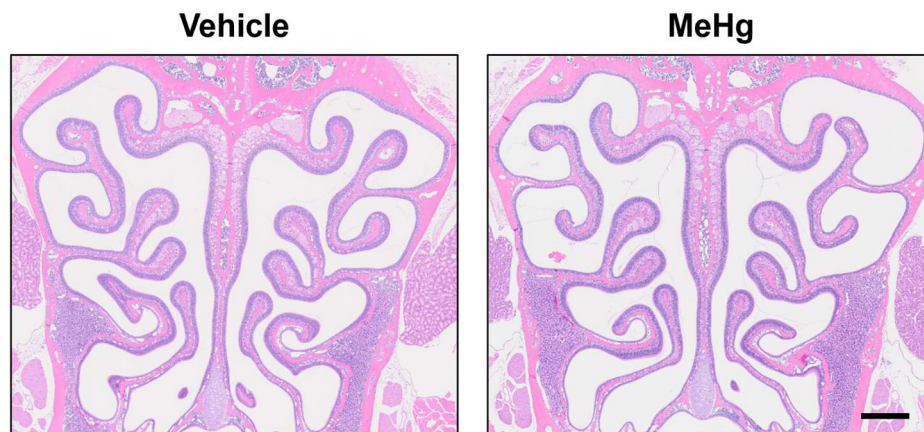


図 47. 鼻腔の形態観察

マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。鼻腔全域の染色像を示す。スケールバーは 500 μm を表す。

表 9. 鼻腔サイズの比較

位置	Vehicle	MeHg
a	3.07 \pm 0.04	2.97 \pm 0.02
b	4.41 \pm 0.02	4.47 \pm 0.01
c	2.72 \pm 0.01	2.73 \pm 0.04

マウス鼻腔のヘマトキシリン・エオジン染色像から、前項 2-2-10 および図 26 に示した位置 a-c の距離 (mm) を計測した。データは平均値 \pm 標準誤差で表した。位置 a-c の全てにおいて、Vehicle 群と MeHg 群間で有意差はなかった ($n = 3$, two-tailed Student's t -test)。

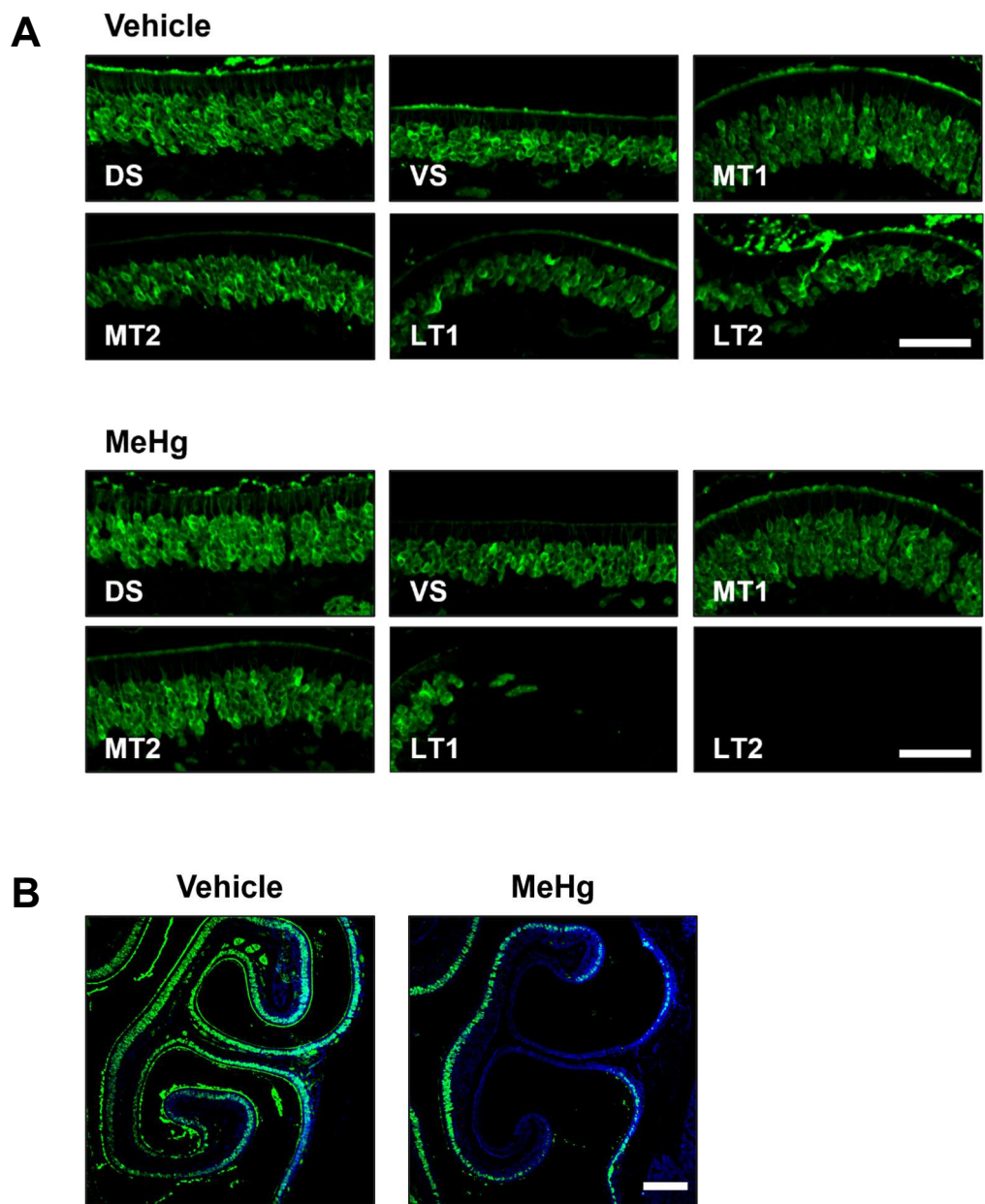
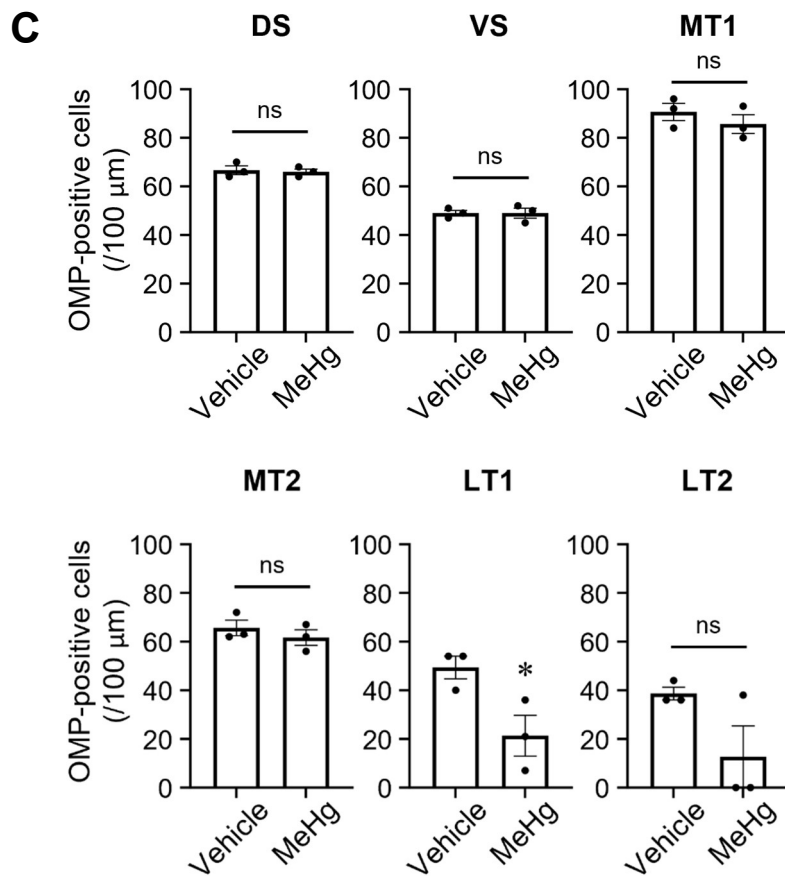


図 48. MeHg による嗅細胞の減少

A) マウスに Vehicle および 30 ppm の MeHg を 8 週間飲水投与し，成熟嗅細胞マーカーである OMP の免疫蛍光染色を行った．各垂領域の染色像を示す．垂領域の定義は前項 2-2-10 および図 25 に示した通りである．スケールバーは 50 μm を表す．

B) LT1 および LT2 近傍の OMP 染色像を示す．緑色シグナルは OMP，青色シグナルは DAPI を示す．スケールバーは 200 μm を表す．

(次頁に続く)



C) 各亜領域の OMP 染色像を定量した。グラフの縦軸は嗅上皮 100 μm あたりの OMP 陽性細胞数であり、データは平均値 \pm 標準誤差で表した ($n = 3$, $*p < 0.05$ by two-tailed Student's t -test; ns, not significant).

2-3-9. 腹腔内投与による鼻粘膜および嗅球への水銀蓄積の検討

飲水投与によって作製された MeHg 中毒マウスの鼻粘膜および嗅球には、大脳皮質と同程度の水銀が蓄積することが明らかになった（前項 2-3-2）。しかしながら、飲水が鼻腔内に侵入したことで MeHg が鼻粘膜に直接付着した可能性がある。また、マウス鼻腔内に投与されたカドミウムやマンガンは、嗅上皮を介することで血液脳関門を迂回して嗅球に達することが示唆されており⁹⁶、飲水投与時の鼻粘膜および嗅球への MeHg の移行経路には解析の余地がある。一方で、マウスに塩化メチル水銀（MeHgCl；10 mg/kg body weight）を腹腔内投与し総水銀量を測定した結果、鼻粘膜と嗅球で水銀の蓄積が認められたことから（図 49）、MeHg は少なくとも循環系を介してこれらの組織に分布することが示唆された。

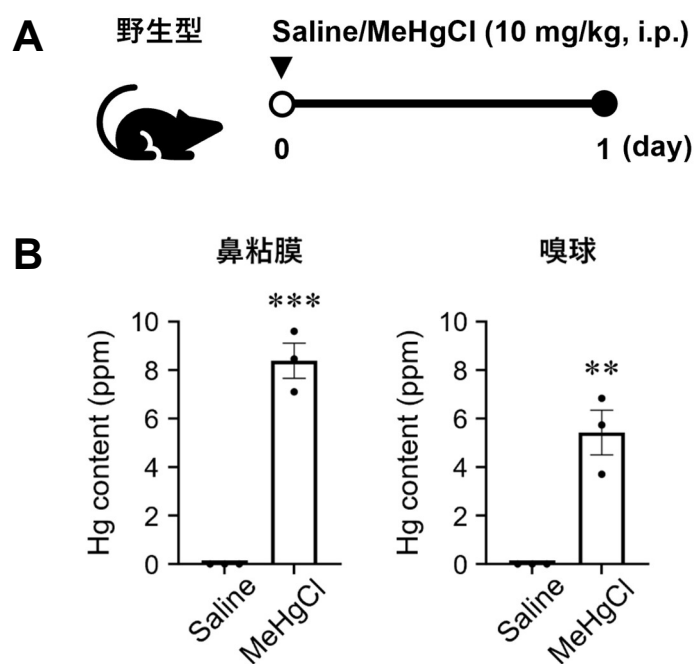


図 49. MeHg の腹腔内投与による水銀蓄積

A) 野生型マウスに生理食塩水（Saline）で調製した 1 mg/mL 塩化メチル水銀（MeHgCl）を 10 mg/kg body weight の用量で腹腔内投与（intraperitoneal injection, i.p.）し、24 時間後に解剖した。コントロールとして同量の Saline を投与した個体を設定した。

B) 投与 24 時間後に摘出した鼻粘膜および嗅球中の総水銀量を示す。データは平均値±標準誤差で表した（ $n = 3$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ by two-tailed Student's *t*-test）。

2-4. 考察

2-4-1. 嗅覚系を傷害する既知の化学物質と比較した MeHg の特性

特定の化学物質への曝露と嗅覚機能障害との相関が報告されている⁷³。特に化学産業の労働環境や鉱物の採掘現場では、粘膜に対する刺激性や腐食性、神経毒性を有する化学物質に曝露されるリスクが高い。我々は土壌や大気、粉塵に含まれる有害な化学物質を、吸気によっていとも簡単にかつ非意図的に体内に取り込んでしまう。そのため、化学物質の嗅覚系への影響を調べた動物実験の多くが吸入曝露を想定しており、鼻腔内投与によって吸気の通り道である嗅上皮に対する毒性が主に評価されてきた。一方で、MeHg は主として魚食によって経口で摂取され、循環系を介して全身に分布する。さらに、MeHg は血液脳関門を容易に通過するため、脳内にも蓄積し神経毒性を示す。nasal toxicity (= 嗅上皮の傷害性) を有する既知の化学物質と比して揮発性や大気への拡散性に乏しい MeHg が、嗅覚系に一体どのような影響を及ぼすのかが最大の関心事であり、これを明らかにすることが本章の実験目的であった。そこで実際に、MeHg の飲水投与によって MeHg 中毒マウスを作製し (前項 2-3-1)、嗅覚中枢に水銀が蓄積することを確認した (前項 2-3-2)。さらに、主嗅球の顆粒細胞層が MeHg の曝露に特に脆弱であることを見出し (前項 2-3-3)、嗅覚の情報処理に関わる脳領域においても神経細胞死が生じることを明らかにした (前項 2-3-4 および前項 2-3-5)。以上の結果は、MeHg がその神経毒性のみならず、生物蓄積性や脳移行性といったある種の特殊な性質に従って、嗅覚系に対して類例のない傷害性を発揮することを示唆している。さらに興味深いことに、MeHg 中毒マウスでは鼻粘膜にも水銀が蓄積しており、嗅上皮が部分的に傷害されていた (前項 2-3-8)。本研究は MeHg によって嗅覚系が傷害されることを *in vivo* で初めて実証すると同時に、MeHg のように経口曝露を主とする環境化学物質であっても、脳や鼻粘膜に蓄積することで嗅覚機能障害を引き起こす懸念があることを示すものである。

2-4-2. 主嗅球に対する MeHg 曝露の影響

(1) グリア細胞の活性化について

MeHg 中毒マウスの主嗅球では、外網状層から深層でアストロサイトマーカーおよびミクログリアマーカーが活性化していたが（前項 2-3-7）、これらは空胞の増加やヘマトキシリンの染色性の低下が認められた領域と一致していた（前項 2-3-3）。僧帽細胞層および顆粒細胞層には神経細胞の細胞体が存在しており、これらの層での空胞の増加やヘマトキシリンの染色性の低下は、MeHg の曝露によって神経細胞が傷害され、場合によっては脱落したことに起因すると考えられる。外網状層には、糸球体層近傍に房飾細胞の細胞体が存在するものの、大部分は僧帽細胞および房飾細胞の神経突起が占めている。外網状層での空胞の増加が病態生理的に何を意味し、どのような変化に起因するのかは定かでないが、興味深い結果と捉えている。例えば、MeHg に曝露されたラットでは、脊髄後索で軸索変性に伴う空胞の増加が認められる^{97,98}。脊髄後索は白質であり、神経細胞の細胞体に乏しく主に神経線維が集積し走行している点では外網状層と共通している。活性化されたミクログリアから放出される一酸化窒素や tumor necrosis factor alpha (TNF- α) などの炎症性サイトカインは、神経突起の変性を引き起こすが⁹⁹⁻¹⁰¹、ラット脊髄後索では MeHg の曝露によって、inducible nitric oxide synthase (iNOS) の発現や TNF- α などの炎症性サイトカインが増加しており⁹⁷、軸索変性の要因になることが示唆されている。グリア細胞の活性化は神経変性に伴う二次的なものであるという主張もあるが、いずれにしても外網状層において iNOS の発現や各種炎症性サイトカインが MeHg の曝露によって増加するか否かを明らかにし、神経突起の形態変化を *in situ* で解析することができれば、空胞の増加を含む外網上層の病理学的変化が嗅覚の情報伝達に与える影響を理解するきっかけになると考えている。

(2) 細胞死について

MeHg 中毒マウスの主嗅球では、6つの細胞層のうち顆粒細胞層で TUNEL 陽性細胞の著明な増加が認められた。僧帽細胞層においても 6例中 1例のみ若干の TUNEL 細胞が観察されるなど、細胞層によって MeHg の傷害性に違いがあることが明らかになった（前項 2-3-3）。興味深いことに、ER ストレス誘導薬として汎用されているツニカマイシンを嗅球に直接投与された仔ラットでは、僧帽細胞層お

よび顆粒細胞層において CHOP の発現が誘導される¹⁰²。このことから、僧帽細胞層および顆粒細胞層は他の細胞層に比して ER ストレスに対する感受性が高く、同じく ER ストレスを惹起する MeHg の影響を受けやすい可能性がある。また、生田ら (1974 年) は、MeHg 中毒患者 1 例の剖検から「嗅球の mitral cell および内顆粒層の神経細胞はほとんど脱落しており、高度な膠細胞繊維で置換されている」と報告しており¹⁰³、ヒトにおいても僧帽細胞層および顆粒細胞層が MeHg 曝露の影響を受けやすい可能性が示唆されている。MeHg の部位および細胞種選択的な傷害性は主嗅球に限らず他の脳領域でも観察されており、その原因やメカニズムは未解決な課題として長らく注目されている。例えば、大脳皮質は浅層に比して、特に顆粒細胞の多い第 IV 層付近の深層が傷害されやすい^{104,105}。小脳皮質では、唯一の出力細胞であるプルキンエ細胞と比して顆粒細胞が MeHg に対して特に脆弱である¹⁰⁶⁻¹⁰⁸。このように、MeHg による神経毒性は顆粒細胞のような小さな細胞において生じやすい。本研究から、僧帽細胞層と顆粒細胞層を比較すると後者の方が MeHg の曝露に対してより感受性が高い傾向があり、主嗅球においても上記の知見と矛盾しない結果が得られた。しかしながら、細胞の大きさは MeHg の神経毒性の指標とはなっても、傷害性の違いを生む直接的な原因としては考え難い。神経伝達物質の種類に着目すると、小脳皮質の顆粒細胞はグルタミン酸神経であり、プルキンエ細胞は GABA 神経である。一方で、主嗅球の顆粒細胞は GABA 神経であり、僧帽細胞はグルタミン酸神経であることから、少なくとも神経伝達物質の種類に依らない他の要因によって細胞毒性に違いが生じると予想されるが、その詳細は不明である。

主嗅球の顆粒細胞は、僧帽細胞および房飾細胞の側方樹状突起と多数の樹状突起間双方向性シナプスを形成している^{109,110}。僧帽/房飾細胞からの入力によって興奮した顆粒細胞は、入力元のみならず、接続している他の僧帽/房飾細胞に対しても抑制性の出力を行う (前項 2-1 図 21)。この側方抑制を介して、匂い分子によって強く活性化された僧帽/房飾細胞と弱く活性化された僧帽/房飾細胞のコントラストが維持・強化されることで、匂い分子への応答特異性が向上すると考えられている¹¹¹⁻¹¹³。そのため、MeHg による顆粒細胞の喪失は僧帽/房飾細胞の神経発火の調節障害を引き起こし、その結果、匂いの識別に異常をきたすと推測され、水俣病患者で嗅覚錯誤が生じることを裏付ける根拠の一つとして有力だと思われる。

2-4-3. 嗅皮質に対する MeHg 曝露の影響

水俣病患者では、体性感覚や聴覚、視覚といった感覚系の異常が認められ、これらの症状は上記の感覚系を支配する大脳皮質および小脳が責任病巣であるとみなされているが^{10,11}、嗅覚に関与する脳領域の病態は依然として不明である。そこで本研究では、水俣病患者脳で特徴的な神経細胞の脱落およびグリア細胞の活性化という病理学的変化が、嗅皮質を構成する主要な亜領域においても認められるか否かを、MeHg 中毒マウスを用いて検討した（前項 2-3-4, 2-3-5, 2-3-7）。その結果、ほとんどの亜領域で複数の個体から上記の病理学的変化が観察された。腹側蓋紐および眼窩前頭皮質は、TUNEL 染色および NeuN の免疫蛍光染色の両実験系で、顕著かつ有意に変化していたことから、MeHg の曝露に対して特に脆弱であると示唆される。しかしながら、項目 2-4-7 で述べた通り、上記の結果には統計学的に不十分な要素を含むことから、例えばサンプルサイズを拡大するなどして、再検討した上で結論づけるのが望ましい。

2-4-4. 嗅上皮に対する MeHg 曝露の影響

特定の重金属は nasal toxicity を有することが知られているが⁷²、同一元素でありながら嗅上皮に対して無毒な化学形態も存在するなど、重金属の嗅覚への影響は我々が想像するよりも複雑である。本研究では、MeHg 中毒マウスにおいて外側鼻甲介の嗅上皮が選択的に傷害されていたことから（前項 2-3-8）、MeHg が nasal toxicity を有することが示唆された。一方で、なぜ嗅上皮の傷害部位に選択性があつたのかは明らかでない。以下に想定される 3 つの要因を列挙する。一つ目は、嗅上皮における抗酸化タンパク質の発現パターンの違いである。嗅上皮の一部の領域、特に背側鼻中隔の周辺は抗酸化酵素 NAD(P)H quinone dehydrogenase (NQO1) が高発現している¹¹⁴。一方で、この領域では MeHg の曝露による嗅上皮の傷害は認められなかった。MeHg は酸化ストレスを介して細胞毒性を引き起こすが^{22,115-118}、同時に細胞には NQO1 など種々の抗酸化タンパク質を誘導することで、MeHg 誘発性の酸化ストレス、ひいては細胞毒性を相殺する機構が備わっている¹¹⁹⁻¹²²。そのため、抗酸化タンパク質の発現パターンの違いが、嗅上皮における MeHg に対する抵抗性を規定している可能性がある。二つ目は、ER ストレスの関与である。嗅覚受容体は嗅細胞に特異的に発現する 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容

体であり、マウスでは約 1,100 種類、ヒトでは約 400 種類に及ぶほど圧倒的な多様性がある^{65,66}。嗅細胞に嗅覚受容体が発現すると、ER ストレスが惹起され PERK 経路が活性化される¹²³。興味深いことに、発現する嗅覚受容体の種類によって個々の嗅細胞の ER ストレス強度が変化する。嗅細胞は最終的に、ER ストレス強度の違いによって生じる PERK 経路のシグナル変化を、軸索誘導関連因子の転写調節に利用することで、軸索の投射位置を制御している¹²⁴。このように、嗅細胞は ER ストレスに関連したシグナル伝達経路を嗅神経回路の形成に利用することが特徴的である。一方で、ER ストレスと細胞死の観点から、例えば、基底状態で強い ER ストレスが生じている嗅細胞は、更なるストレスを認容できる範囲が小さく細胞死に向かいやすいなど、嗅細胞ごとに異なる ER ストレスの強度が、MeHg に対する感受性に違いをもたらしている可能性がある。三つ目は、飲水の鼻腔内への侵入である。トリパンブルーをマウス鼻腔内に投与すると、外側の嗅上皮が強く染色されることから¹²⁵、鼻腔内に侵入した液体の分布には偏りがあり、特に外側にアクセスしやすいことが推定される。これらの複数の要因が組み合わさった結果として、嗅上皮の傷害部位に選択性が生じたと考えられる。特に三つ目の要因については、経口で摂取され循環系を介して全身に移行するという MeHg 本来の曝露経路に反している。そのため、嗅上皮に対する MeHg の影響については、腹腔内投与や皮下投与など、鼻腔内に MeHg が直接侵入するリスクの低い投与方法でも嗅上皮が傷害されるか否かを検討した上で、慎重に結論を導く必要がある。

2-4-5. 他の神経変性疾患における嗅覚障害の病巣と本研究の比較

水俣病患者は、Hyposmia（嗅覚低下）や Parosmia（嗅覚錯誤）などの嗅覚機能障害を呈する⁸⁰。Hyposmia は、匂いを嗅ぎ分ける能力および匂いを感知する能力が低下した量的機能障害であり、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患によっても引き起こされる¹²⁶。アルツハイマー病患者やアルツハイマー病モデルマウスでは、嗅覚中枢の中でも海馬と解剖学および機能的な結びつきが強い嗅内皮質において、アルツハイマー病の原因タンパク質であるアミロイドβやタウタンパク質の異常、さらには組織代謝活動の低下が生じやすい¹²⁷⁻¹²⁹。一方で、MeHg 中毒マウスの嗅内皮質では、神経細胞の減少やグリア細胞の活性化といった病理学的変化は認められなかった（前項 2-3-4 および 2-3-7）。このとき MeHg

中毒は十分に進行しており、他の脳領域では傷害が認められたことから、嗅内皮質は MeHg に抵抗性があることが示唆された。MeHg 中毒マウスでは同じく海馬においても傷害が認められず^{42,86}、海馬の神経細胞は大腦皮質の神経細胞と比して MeHg の曝露に対する抵抗性が高い¹³⁰。海馬では、copper, zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) や manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), glutathione peroxidase 1 (GPx1) などの抗酸化酵素の発現や酵素活性が大腦皮質よりも高く⁸⁶、MeHg の感受性に違いを生む要因の一つとして考えられている。このように、アルツハイマー病および水俣病はともに中枢神経障害を引き起こし、二次的に嗅覚機能障害を呈するという点で共通しているが、その傷害部位については明確な違いがあることが明らかになった。特定の匂いを嗅ぐことで、その匂いに結び付く記憶や感情が呼び起こされる現象をプルースト効果というが、嗅覚は五感の中でも特に記憶や情動を司る海馬や扁桃体などの大腦辺縁系との結びつきが強いことで知られる。ある種のアルツハイマー病モデルマウスでは、嗅覚の記憶に関わる行動テストの成績が悪化する¹³¹。一方で、記憶の形成に重要な海馬や嗅内皮質に目立った病理学的変化のない MeHg 中毒マウスが、同様の行動テストでどのような結果を生むのかには高い関心がある。傷害部位と行動テストの関係性を検証することが、MeHg 中毒における嗅覚機能障害の理解を深める鍵になると考えている。

2-4-6. 水俣病嗅覚障害モデルとしての MeHg 中毒マウスの適性

Parosmia は、匂い分子が持つ本来の匂いを正しく知覚できず、匂いの誤認識を招く質的機能障害であり、その要因として一般的に、① 嗅細胞の部分的喪失、② 嗅球の介在神経の傷害、③ 嗅覚情報の統合に関与する脳領域の傷害、④ 嗅神経の再生時に生じる軸索投射の異常が提唱されている^{132,133}。MeHg 中毒マウスでは、鼻腔外側の嗅上皮（前項 2-3-5）、主嗅球の顆粒細胞（前項 2-3-3）、眼窩前頭皮質（前項 2-4-4）で、神経細胞死が顕著であった。これらの傷害は少なくとも Parosmia の要因に挙げられている①から③と一致しており、水俣病の病態をよく反映しているものと推測される（図 50）。したがって、MeHg 中毒マウスを用いて嗅覚行動や機能に対する MeHg の影響を解析し明らかにすることが、今後の重要な課題の一つである。

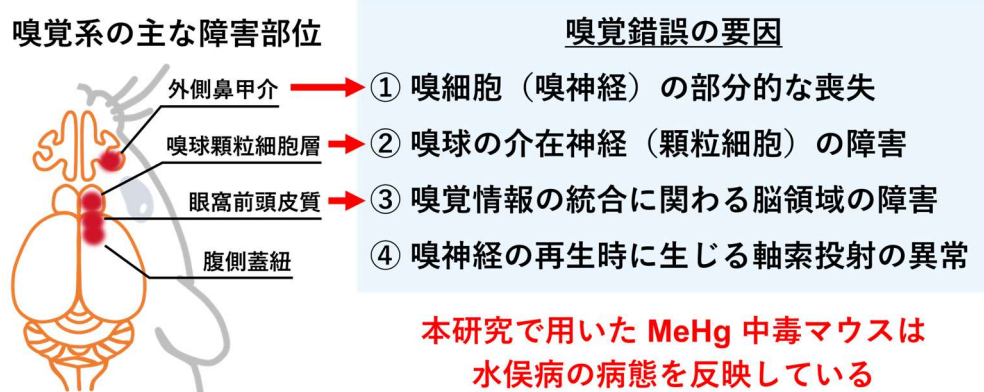


図 50. MeHg 中毒マウス障害部位から推理する水俣病における嗅覚障害の病態

2-4-7. 統計学的妥当性について

前項 2-3-4 では、実験開始前から事前に計画していた $n = 6$ の 2 群のデータに対して、パラメトリック検定の代表的な手法の一つである Student's *t*-test を実施し、TUNEL 陽性細胞数および NeuN 陽性細胞数の群間の差異について議論した。Student's *t*-test は 2 つの標本がともに正規分布の母集団から得られたものであり、かつその分散が等しいことを仮定している¹³⁴。一方で、図 36B および図 37B のグラフから、正規分布とみなされない可能性があるデータが窺われたため、本項では、前項 2-3-4 で示したデータに関して、因果関係を証明するために妥当な統計解析手法が用いられたか、さらに実験デザインが適切であったかを検証する。

(1) 正規性の検定

統計解析ソフト Statcel3 (オーエムエス出版) を用いて正規性の検定を実施した。有意水準を 5% に設定した場合、図 36B のデータに関しては、2 群とも正規分布に従うとみなされたのは嗅結節のみであった。6 例とも同一の値が並ぶデータセット、すなわち Vehicle 群で全ての値が 0 であったものでは検定を適用できなかった。TUNEL 染色の性質上、Vehicle 群のデータセットが 0 を示す限り、そもそもデータの分布やばらつきが存在しないことが原因と考えられる。図 37B のデータに関しては、背側蓋紐および梨状皮質を除くすべての亜領域で 2 群とも正規分布に従い、GraphPad Prism software version 10.0.2 を用いた正規性の検定では背側蓋紐および梨

状皮質についても 2 群とも正規分布に従うとみなされた。母集団がどのような分布であっても、サンプルサイズを極限まで大きくすれば、中心極限定理に従って平均値の分布は正規分布に収束する¹³⁵。一方で、動物実験という性質上、サンプルサイズを極端に大きくすることは容易ではないため、少なくとも TUNEL 染色を扱った図 36B については、特定の分布を仮定しないノンパラメトリック検定を実施することが望ましいと考えられた。ただし、組織のターンオーバーなどによって生理的状态でアポトーシスが誘導される状況や、実験手技に起因した擬陽性やデブリの存在によっては、TUNEL 陽性細胞数が完全な 0 を示すことがなくなる、すなわち同値を示すサンプルが少なくなり、データが正規分布に従う場合もある。実際に嗅結節の Vehicle 群のデータセット (0.6, 0.3, 0.3, 0, 0.3, 1 の 6 サンプル) では僅かにシグナルが検出されたサンプルの存在によって、正規分布に従うという検定結果が得られている。このような、ある種の干渉できない実験的エラーが存在するため、再度同じサンプルサイズで同様の検討を行った際に、正規性の検定結果が再現されるかは定かでない。

(2) Mann-Whitney U test による図 36B の結果の再検討

図 36B のデータに関して、Statcel3 を用いてノンパラメトリック検定の代表的な手法の一つである Mann-Whitney U test を実施した。両側検定で有意水準を 5% に設定した場合、背側蓋紐、腹側蓋紐および梨状皮質において有意差が認められた (表 10)。Student's *t*-test の場合と比して、背側蓋紐が新たに有意水準を下回る結果となった。しかしながら、Mann-Whitney U test は 2 つの標本を抽出した母集団が同一であること (母集団の等分散性) を前提条件としており、2 群の分散の差が大きいと検定精度の低下を招くことがある^{136,137}。したがって、図 36B のデータは不等分散性が明らかのため、Mann-Whitney U test が最適な検定法であるかは疑問が残る。

表 10. Mann-Whitney U test の検定結果

亜領域	<i>p</i> 値	Summary
前嗅核	0.0585	ns
背側蓋紐	0.0495	*
腹側蓋紐	0.0222	*
嗅結節	0.566	ns
梨状皮質	0.0222	*
扁桃体皮質	0.074	ns
嗅内皮質	0.317	ns

検定には図 36B で使用したデータを用いた ($n=6$, p 値は two-tailed Mann-Whitney U test に基づく. $*p < 0.05$; ns, not significant).

(3) permuted Brunner-Munzel test による図 36B の結果の再検討

図 36B のデータに関して, R version 4.3.2 を用いて等分散性の仮定を必要としないノンパラメトリック検定の一つである Brunner-Munzel test を実施した^{138,139}. 両側検定で有意水準を 5% に設定した場合, Student's *t*-test の場合と同様に腹側蓋紐および梨状皮質において有意差が認められた (表 11). しかしながら, サンプルサイズが 10 未満の場合には, Brunner-Munzel test の使用は推奨されない¹⁴⁰. この場合, permuted Brunner-Munzel test を用いればより正確に計算できるとされている¹³⁷. そこで, R version 4.3.2 を用いて permuted Brunner-Munzel test を実施したところ^{138,139}, 全ての亜領域において有意な差は認められなかった (表 12).

表 11. Brunner-Munzel test の検定結果

亜領域	<i>p</i> 値	Summary
前嗅核	0.07559	ns
背側蓋紐	0.1789	ns
腹側蓋紐	0.02503	*
嗅結節	0.634	ns
梨状皮質	0.02503	*
扁桃体皮質	0.06869	ns
嗅内皮質	0.3632	ns

検定には図 36B で使用したデータを用いた ($n = 6$, p 値は two-tailed Brunner-Munzel test に基づく. $*p < 0.05$; ns, not significant).

表 12. permuted Brunner-Munzel test の検定結果

亜領域	<i>p</i> 値	Summary
前嗅核	0.1818	ns
背側蓋紐	0.1818	ns
腹側蓋紐	0.06061	ns
嗅結節	0.5909	ns
梨状皮質	0.06061	ns
扁桃皮質	0.1061	ns
嗅内皮質	1	ns

検定には図 36B で使用したデータを用いた ($n = 6$, p 値は two-tailed permuted Brunner-Munzel test に基づく. ns, not significant).

(4) 等分散性の検定 (F 検定)

各亜領域のデータが正規分布に従うとみなされた図 37B のデータに関して、2 群の母分散が等しいかを Statcel3 を用いて検定した。両側検定で有意水準を 5% に設定した場合、前嗅核、背側蓋紐、腹側蓋紐、および嗅結節は等分散ではないとみなされた。図 37B のデータから、上記 4 つの亜領域は Vehicle 群では各個体が同程度の値でまとまっているのに対し、MeHg 群では NeuN 陽性細胞数の減少を示す個体と変化のない個体が混在しており、集団として一様な挙動でないことが読み取れる。MeHg の毒性発現には一定の個体差が存在するが、前項 2-3-6 では特定の亜領域において NeuN 陽性細胞数と個体の血漿中水銀濃度に負の相関があることが示されている (図 40)。すなわち MeHg の蓄積量が毒性発現の個体差につながる可能性がある。一方で、本研究では MeHg の曝露方法として 8 週間の飲水投与を採用したため、個体間の飲水量の違いが MeHg の総曝露量に与える影響が大きいと推測される。実験者が個体間で等量の被験物質を投与する方法と比して、毒性発現の個体差が大きくなることは想像に容易く、おそらくは不等分散の生じる要因の一つに数えられる。本実験系においては、サンプルサイズをさらに拡大するほか、投与方法を工夫することで分散の等質性を保証することが可能になるかもしれない。

(5) Welch's *t*-test による図 37B の結果の再検討

正規性を示すが不等分散であるデータについては、一般に Welch's *t*-test が実施される¹³⁴。そこで図 37B のデータに関して、Statcel3 を用いて Welch's *t*-test を実施した。両側検定で有意水準を 5% に設定した場合、Student's *t*-test の場合と同様に腹側蓋紐および嗅結節において有意差が認められた (表 13)。

表 13. Welch's *t*-test の検定結果

亜領域	<i>p</i> 値	Summary
前嗅核	0.0951	ns
背側蓋紐	0.0841	ns
腹側蓋紐	0.0488	*
嗅結節	0.0458	*
梨状皮質	0.742	ns
扁桃皮質	0.177	ns
嗅内皮質	0.329	ns

検定には図 37B で使用したデータを用いた ($n = 6$, *p* 値は two-tailed Welch's *t*-test に基づく。* $p < 0.05$; ns, not significant)。

(6) 総括

Student's *t*-test の他に、生物統計で代表的な前提条件の異なる検定方法をいくつか試したが、腹側蓋紐は図 36B および図 37B のいずれのデータセットにおいても、比較的良好な検定結果を示した。その他の亜領域についても、検定方法によって統計学的有意性が大きく異なることはないように思われた。一方で、特に図 36B のデータについては、分布や分散の問題から検定方法の最適解を見出すことができなかった。おそらくは TUNEL 染色および MeHg の毒性発現の性質上、数値 0 と数値ありで二極化されるようなデータになる傾向が判明したため、場合によっては Fisher's exact test のように 2×2 の分割表で表される検定法が有効かもしれない。本検討では全て両側検定を実施したが、TUNEL 陽性細胞数に対する MeHg 曝露の影響は増加する一方向にしか変化しないことが自明であることから、片側検定が適用できると考えられ、これにより統計学的な解釈も変わる可能性がある。正規性の検定や等分散の検定を経て、本実験系において統計学的により頑健なデータを

得るためには、少なくともサンプルサイズを 7 以上に設定することが望ましいとわかった。ただし、サンプルサイズが大きくなればなるほど、実質的な差がなかった場合でも、 p 値は小さくなり、統計学的に有意であるという結果が得られやすくなるという問題がある。そのため、特に亜領域ごとに傷害性の違いがあるか否かを究明するためには、 p 値のみで判断するのではなく、変化量の違いを指標に加えること、傷害の発現時期に違いがあるかを検討すること、複数の実験系に供することなど、多角的に検証し判断されるのが望ましい。前項 2-3-4 のデータの他にも、本研究で示した一部のデータで正規分布および等分散性を満たさない可能性があるが、本項の検討を踏まえると、それらも統計学的妥当性を極端に欠いたものではないと推定される。

終章

MeHg の毒性発現機序および障害部位に関する研究を行い、以下の知見を得た。

第 1 章 メチル水銀毒性発現におけるアポトーシス関連因子 CHOP の役割

1. MeHg による後肢伸展反射の障害および体重減少に対して、CHOP 欠失はほとんど影響しない。
 2. MeHg による神経細胞死に対して、CHOP 欠失はほとんど影響しない。
- すなわち、CHOP の欠失は MeHg の毒性発現に決定的な影響を与えないことが明らかとなった。

第 2 章 マウス嗅覚系に対するメチル水銀曝露の影響

1. MeHg を曝露させたマウスにおいて、嗅覚系に水銀が広く蓄積する。
 2. 主嗅球の顆粒細胞層は他の層に比して、MeHg の曝露に対して特に脆弱である。
 3. MeHg の曝露によって嗅皮質および二次嗅皮質の神経細胞が傷害される
 4. 嗅皮質の神経細胞数の減少は、血漿中水銀濃度と関連する。
 5. MeHg の曝露によって嗅上皮および嗅細胞が部分的に傷害される。
- すなわち、MeHg は嗅覚を担う中枢領域および化学受容器を傷害することが明らかとなった。

一方で、本研究から新たに検討すべき課題がいくつか明らかになった。第2章の内容に関して、考察の項目では言及できなかったものを今後の展開を示す意味で以下に列挙する。

グリア細胞に対する MeHg 曝露の影響

MeHg によるアストロサイトの機能変化は神経保護的に働く反面¹⁴¹⁻¹⁴³、活性化したミクログリアは神経細胞死に寄与すると考えられている¹⁴⁴⁻¹⁴⁶。本研究では、MeHg 中毒マウスの主嗅球および嗅皮質において、アストロサイトマーカーおよびミクログリアマーカーが増加していた（前項 2-3-7）。興味深いことに、MeHg を曝露されたマウス体性感覚野において、神経細胞が減少する以前にアストロサイトマーカーおよびミクログリアマーカーが増加することが報告されている²⁴。したがって、MeHg の曝露によるグリア細胞の活性化は単に MeHg 誘導性神経細胞死によって二次的に生じるものではなく、曝露初期から中期にかけて神経細胞死やシナプス伝達などの神経機能に影響する可能性がある。したがって、神経細胞への影響とグリア細胞活性化の前後関係に着目した経時的な解析に加えて、MeHg によってグリア細胞が活性化する要因を究明することが今後の課題の一つである。

嗅上皮の再生過程に対する MeHg の影響

嗅細胞は、神経細胞でありながら生後も神経新生が起こるという特異な性質を有している¹⁴⁷。生理的状态において嗅細胞は絶えずターンオーバーしているが、ウイルス感染や化学物質の曝露等により嗅上皮が傷害された際にも、基底細胞の一部が分化することで新たな嗅細胞が補填され、嗅上皮が再生する（図 51）^{148,149}。本研究から MeHg は嗅細胞を傷害することが明らかとなった反面、基底細胞の細胞死を引き起こすなどによって嗅細胞の再生に悪影響を及ぼす可能性がある。そのため、合成核酸アナログである bromodeoxyuridine (BrdU) を用いた細胞増殖の解析、増殖細胞マーカーである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) や基底細胞の活性化の指標として未成熟嗅細胞マーカーである growth associated protein 43 (GAP43) の免疫染色、そして成熟嗅細胞マーカーである OMP の免疫染色に供することで、MeHg の曝露によって傷害された嗅上皮の再生能を評価することに高い関心がある。

水俣病においては 6 例という少数のデータではあるが、嗅覚障害を訴えた患者の鼻粘膜には著変がなかったという記録がある⁸¹。しかしながら、嗅上皮が傷害されなかったものと断定するのは早計であり、一過性の MeHg 曝露によって損傷した嗅上皮が再生された可能性も十分に考えられる。嗅細胞の傷害および再生に対する MeHg 曝露の影響を真に明らかにするためには、上述の様々な分化・増殖マーカーを用いた解析と併せて、飲水投与のみならず腹腔内投与や皮下投与など複数の投与方法を比較する、MeHg を一過性に曝露させる、経時的な解析を行うなどの複雑な曝露条件を検討する必要がある。

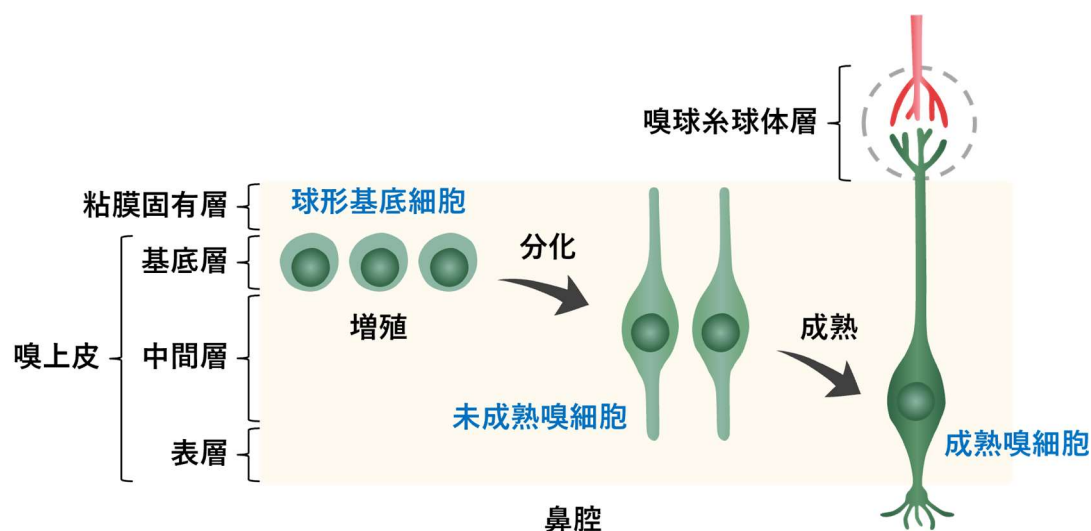


図 51. 嗅上皮の再生

嗅上皮は形態的に表層、中間層、基底層に分類される。表層には支持細胞が存在し、中間層には嗅細胞（成熟および未成熟）が存在している。基底層は球状基底細胞と水平基底細胞という 2 種類の細胞から構成されている。嗅上皮の再生は球状基底細胞が分裂して、新生細胞が産生されることにより開始される。新生細胞は表層に向かって遊走しながら分化し、未成熟嗅細胞を経て最終的には OMP を発現する成熟嗅細胞となる。新生された嗅細胞は軸索を嗅球に向けて伸長し、シナプスを形成する。近年、水平基底細胞も球状基底細胞を経て嗅細胞に分化可能であることが明らかにされている¹⁵⁰⁻¹⁵²。なお、支持細胞および水平基底細胞は図示していない。

上記以外の嗅覚系における未検討な課題

水俣病の感覚障害（体性感覚，視覚，聴覚，平衡覚）は中枢性のものとみなされており，それらを支配する大脳皮質および小脳の傷害性ばかりが注目されてきた。一方で，本研究から MeHg は嗅覚中枢のみならず嗅細胞を傷害することが明らかになった。また，味覚については味細胞や唾液腺などの末梢組織が傷害される事例も確認されている¹⁵³。匂い分子の検出には嗅細胞の他にも，匂い分子の捕捉や鼻粘膜の保護に重要な鼻粘液の量や組成，鼻粘液を分泌する Bowman 腺，嗅覚受容体が発現している嗅繊毛，嗅繊毛の起点となる嗅小胞などの微細構造，嗅覚受容体の種類やその発現量がそれぞれ重要な役割を担っている。今後これらの要素に対する MeHg の影響を解析することは，水俣病における嗅覚障害メカニズムの解明に資するばかりでなく，水俣病における感覚系の障害メカニズムに関して，末梢組織の重要性を示す根拠となる可能性がある。

嗅皮質情報処理メカニズムの解明に向けた MeHg 中毒モデルの展望

嗅皮質の各亜領域には固有の機能があることが明らかになりつつある一方で，我々が匂いを実感している状況や様々な匂いの価値に対応するためには，多様な脳領域が連動して働かなければならない。各亜領域が複雑に相互接続することで神経回路が成り立っていることを鑑みると，解剖学的位置を個別具体的な機能や行動に紐づけて解析する現行の研究手法では，脳における匂い受容のメカニズムの全容を明らかにすることは難しい。幸い，MeHg 中毒マウスでは程度に違いはあるが，嗅内皮質を除き嗅皮質で広範に傷害が認められることから，嗅覚系の機能をよりマクロな視点で包括的に解析するための動物モデルとして応用できると期待している。そのためには，扁桃体と大脳皮質の境界に位置する皮質扁桃体移行領域や扁桃体と梨状皮質の境界に位置する扁桃体梨状皮質移行領域，外側嗅索核など，本研究では未検討な亜領域についても MeHg の傷害性を明らかにする必要がある。

最後に，本研究が MeHg の毒性研究の枠を越えて，環境化学物質の健康リスク評価や嗅覚系の病態生理の解明において，その一助になれば幸いである。

引用文献

- 1) Gworek, B., Dmuchowski, W. & Baczevska-Dąbrowska, A. H. Mercury in the terrestrial environment: a review. *Environ. Sci. Eur.* **32**, 128 (2020).
- 2) United Nations Environment Programme, Global Mercury Assessment 2018 (2019).
- 3) Hylander, L. D. & Meili, M. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Sci. Total Environ.* **304**, 13-27 (2003).
- 4) Steenhuisen, F. & Wilson, S. J. Development and application of an updated geospatial distribution model for gridding 2015 global mercury emissions. *Atmos. Environ.* **211**, 138-150 (2019).
- 5) United Nations Environment Programme Global Mercury Assessment 2013: Sources, emission, releases and environmental transport (2013).
- 6) Hong, Y. S., Kim, Y. M. & Lee, K. E. Methylmercury exposure and health effects. *J. Prev. Med. Public Health* **45**, 353-363 (2012).
- 7) National Research Council (US) Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury. Toxicological Effects of Methylmercury. National Academies Press (US) (2000).
- 8) Aschner, M. & Aschner, J. L. Mercury neurotoxicity: mechanisms of blood-brain barrier transport. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **14**, 169-176 (1990).
- 9) Eto, K. & Takeuchi, T. A pathological study of prolonged cases of Minamata disease. With particular reference to 83 autopsy cases. *Acta Pathol. Jpn.* **28**, 565-584 (1978).

- 10) Eto, K. Pathology of Minamata disease. *Toxicol. Pathol.* **25**, 614-623 (1997).
- 11) Harada, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol.* **25**, 1-24 (1995).
- 12) Jones, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **295**, C849-C868 (2008).
- 13) Marino, S. M. & Gladyshev, V. N. Analysis and functional prediction of reactive cysteine residues. *J. Biol. Chem.* **287**, 4419-4425 (2012).
- 14) Rudolph, T. K. & Freeman, B. A. Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Sci. Signal.* **2**, re7 (2009).
- 15) Poole, L. B. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic. Biol. Med.* **80**, 148-157 (2015).
- 16) Simpson, R. B. Association constants of methylmercury with sulfhydryl and other bases. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 4711-4717 (1961).
- 17) Rabenstein, D. L. The aqueous solution chemistry of methylmercury and its complexes. *Acc. Chem. Res.* **11**, 100-107 (1978).
- 18) Kanda, H., Shinkai, Y. & Kumagai, Y. S-Mercuration of cellular proteins by methylmercury and its toxicological implications. *J. Toxicol. Sci.* **39**, 687-700 (2014).
- 19) Kunimoto, M. Methylmercury induces apoptosis of rat cerebellar neurons in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 310-317 (1994).

- 20) Nagashima, K., Fujii, Y., Tsukamoto, T., Nukuzuma, S., Satoh, M., Fujita, M., Fujioka, Y. & Akagi, H. Apoptotic process of cerebellar degeneration in experimental methylmercury intoxication of rats. *Acta Neuropathol.* **91**, 72-77 (1996).
- 21) Fujimura, M., Usuki, F., Sawada, M., Rostene, W., Godefroy, D. & Takashima, A. Methylmercury exposure downregulates the expression of Rac1 and leads to neuritic degeneration and ultimately apoptosis in cerebrocortical neurons. *Neurotoxicology* **30**, 16-22 (2009).
- 22) Usuki, F., Fujita, E. & Sasagawa, N. Methylmercury activates ASK1/JNK signaling pathways, leading to apoptosis due to both mitochondria- and endoplasmic reticulum (ER)-generated processes in myogenic cell lines. *Neurotoxicology* **29**, 22-30 (2008).
- 23) Makino, K., Okuda, K., Sugino, E., Nishiya, T., Toyama, T., Iwawaki, T., Fujimura, M., Kumagai, Y. & Uehara, T. Correlation between attenuation of protein disulfide isomerase activity through S-mercuration and neurotoxicity induced by methylmercury. *Neurotox. Res.* **27**, 99-105 (2015).
- 24) Hiraoka, H., Nomura, R., Takasugi, N., Akai, R., Iwawaki, T., Kumagai, Y., Fujimura, M. & Uehara, T. Spatiotemporal analysis of the UPR transition induced by methylmercury in the mouse brain. *Arch. Toxicol.* **95**, 1241-1250 (2021).
- 25) Zhang, Y., Lu, R., Liu, W., Wu, Y., Qian, H., Zhao, X., Wang, S., Xing, G., Yu, F. & Aschner, M. Hormetic effects of acute methylmercury exposure on grp78 expression in rat brain cortex. *Dose Response* **11**, 109-120 (2013).
- 26) Liu, W., Yang, T., Xu, Z., Xu, B. & Deng, Y. Methyl-mercury induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial apoptosis pathways activation in rat cortical neurons. *Free Radic. Res.* **53**, 26-44 (2019).

- 27) Chung, Y. P., Yen, C. C., Tang, F. C., Lee, K. I., Liu, S. H., Wu, C. C., Hsieh, S. S., Su, C. C., Kuo, C. Y. & Chen, Y. W. Methylmercury exposure induces ROS/Akt inactivation-triggered endoplasmic reticulum stress-regulated neuronal cell apoptosis. *Toxicology* **425**, 152245 (2019).
- 28) Smith, M. H., Ploegh, H. L. & Weissman, J. S. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* **334**, 1086-1090 (2011).
- 29) Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081-1086 (2011).
- 30) Hiraoka, H., Nakahara, K., Kaneko, Y., Akiyama, S., Okuda, K., Iwawaki, T., Fujimura, M., Kumagai, Y., Takasugi, N. & Uehara, T. Modulation of unfolded protein response by methylmercury. *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 1595-1598 (2017).
- 31) Nomura, R., Takasugi, N., Hiraoka, H., Iijima, Y., Iwawaki, T., Kumagai, Y., Fujimura, M. & Uehara, T. Alterations in UPR signaling by methylmercury trigger neuronal cell death in the mouse brain. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 15412 (2022).
- 32) McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y. & Holbrook, N. J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1249-1259 (2001).
- 33) Puthalakath, H., O'Reilly, L. A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P. N., Huntington, N. D., Hughes, P. D., Michalak, E. M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., Gotoh, T., Akira, S., Bouillet, P. & Strasser, A. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**, 1337-1349 (2007).

- 34) Cazanave, S. C., Elmi, N. A., Akazawa, Y., Bronk, S. F., Mott, J. L. & Gores, G. J. CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **299**, G236-G243 (2010).
- 35) Oyadomari, S. & Mori, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* **11**, 381-389 (2004).
- 36) Nishitoh, H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J. Biochem.* **151**, 217-219 (2012).
- 37) Tajiri, S., Oyadomari, S., Yano, S., Morioka, M., Gotoh, T., Hamada, J. I., Ushio, Y. & Mori, M. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ.* **11**, 403-415 (2004).
- 38) Silva, R. M., Ries, V., Oo, T. F., Yarygina, O., Jackson-Lewis, V., Ryu, E. J., Lu, P. D., Marciniak, S. J., Ron, D., Przedborski, S., Kholodilov, N., Greene, L. A. & Burke, R. E. CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism. *J. Neurochem.* **95**, 974-986 (2005).
- 39) Oyadomari, S., Takeda, K., Takiguchi, M., Gotoh, T., Matsumoto, M., Wada, I., Akira, S., Araki, E. & Mori, M. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10845-10850 (2001).
- 40) Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L. & Ron, D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes. Dev.* **12**, 982-995 (1998).

- 41) Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671-675 (2012).
- 42) Fujimura, M., Usuki, F., Sawada, M. & Takashima, A. Methylmercury induces neuropathological changes with tau hyperphosphorylation mainly through the activation of the c-jun-N-terminal kinase pathway in the cerebral cortex, but not in the hippocampus of the mouse brain. *Neurotoxicology* **30**, 1000-1007 (2009).
- 43) Fujimura, M. & Usuki, F. Pregnant rats exposed to low-level methylmercury exhibit cerebellar synaptic and neuritic remodeling during the perinatal period. *Arch. Toxicol.* **94**, 1335-1347 (2020).
- 44) 入鹿山且朗, 牛草貞雄, 田島静子, 中村弘, 桑原駿介, 大森昭子, 伝勉. 水俣湾魚介中の有機水銀とその有毒化機転に関する研究 第9報 水俣湾およびその付近の汚染状況の推移. *日本衛生学雑誌* **22**, 416-423 (1967).
- 45) Watanabe, N., Tayama, M., Inouye, M. & Yasutake, A. Distribution and chemical form of mercury in commercial fish tissues. *J. Toxicol. Sci.* **37**, 853-861 (2012).
- 46) Bloom, N. S. On the chemical form of mercury in edible fish and marine invertebrate tissue. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **49**, 1010-1017 (1992).
- 47) Takeuchi, T., Morikawa, N., Matsumoto, H. & Shiraishi, Y. A pathological study of Minamata disease in Japan. *Acta Neuropathol.* **2**, 40-57 (1962).
- 48) U.S. Environmental Protection Agency. Mercury Study Report to Congress Volume I: Executive Summary (1997).
- 49) Yasutake, A. & Hirayama, K. Strain difference in mercury excretion in methylmercury-treated mice. *Arch. Toxicol.* **59**, 99-102 (1986).

- 50) Chen, C. M., Wu, C. T., Chiang, C. K., Liao, B. W. & Liu, S. H. C/EBP homologous protein (CHOP) deficiency aggravates hippocampal cell apoptosis and impairs memory performance. *PLoS One* **7**, e40801 (2012).
- 51) Valdes, P., Mercado, G., Vidal, R. L., Molina, C., Parsons, G., Court, F. A., Martinez, A., Galleguillos, D., Armentano, D., Schneider, B. L. & Hetz, C. Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 6804-6809 (2014).
- 52) Lei, K. & Davis, R. J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2432-2437 (2003).
- 53) Yang, C. Y., Liu, S. H., Su, C. C., Fang, K. M., Yang, T. Y., Liu, J. M., Chen, Y. W., Chang, K. C., Chuang, H. L., Wu, C. T., Lee, K. I. & Huang, C. F. Methylmercury induces mitochondria- and endoplasmic reticulum stress-dependent pancreatic beta-cell apoptosis via an oxidative stress-mediated JNK signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 2858 (2022).
- 54) Pan, J., Li, X., Liu, H., Wang, C., Xu, S., Xu, B., Deng, Y., Yang, T. & Liu, W. Exploring the molecular mechanisms underlie the endoplasmic reticulum stress-mediated methylmercury-induced neuronal developmental damage. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **245**, 114099 (2022).
- 55) 野村亮輔. メチル水銀による小胞体ストレス応答を介した神経細胞死誘導機構. 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科. 学位論文 (2023).
- 56) Usuki, F., Fujimura, M. & Yamashita, A. Endoplasmic reticulum stress preconditioning attenuates methylmercury-induced cellular damage by inducing favorable stress responses. *Sci. Rep.* **3**, 2346 (2013).

- 57) 都甲潔. 人工嗅覚システムの開発. におい・かおり環境学会誌 **50**, 399-406 (2019).
- 58) Stevenson, R. J. An initial evaluation of the functions of human olfaction. *Chem. Senses* **35**, 3-20 (2010).
- 59) Meredith, M. Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: comparisons and contrasts. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* **39**, 601-614 (1991).
- 60) Sakano, H. Developmental regulation of olfactory circuit formation in mice. *Dev Growth Differ* **62**, 199-213 (2020).
- 61) Reisert, J. & Reingruber, J. Ca²⁺-activated Cl⁻ current ensures robust and reliable signal amplification in vertebrate olfactory receptor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 1053-1058 (2019).
- 62) Wilson, R. I. & Mainen, Z. F. Early events in olfactory processing. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 163-201 (2006).
- 63) Wilson, D. A., Xu, W., Sadrian, B., Courtiol, E., Cohen, Y. & Barnes, D. C. Cortical odor processing in health and disease. *Prog. Brain Res.* **208**, 275-305 (2014).
- 64) Schröder, H., Moser, N. & Huggenberger, S. The Mouse Olfactory System. *Neuroanatomy of the Mouse Chapter 14*, 319-331 (2020).
- 65) Barnes, I. H. A., Ibarra-Soria, X., Fitzgerald, S., Gonzalez, J. M., Davidson, C., Hardy, M. P., Manthravadi, D., Van Gerven, L., Jorissen, M., Zeng, Z., Khan, M., Mombaerts, P., Harrow, J., Logan, D. W. & Frankish, A. Expert curation of the human and mouse olfactory receptor gene repertoires identifies conserved coding regions split across two exons. *BMC Genomics* **21**, 196 (2020).

- 66) Mainland, J. D., Li, Y. R., Zhou, T., Liu, W. L. L. & Matsunami, H. Human olfactory receptor responses to odorants. *Sci. Data* **2**, 150002 (2015).
- 67) Chess, A., Simon, I., Cedar, H. & Axel, R. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* **78**, 823-834 (1994).
- 68) Vassar, R., Chao, S. K., Sitcheran, R., Nun˜ez, J. M., Vosshall, L. B. & Axel, R. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* **79**, 981-991 (1994).
- 69) Ressler, K. J., Sullivan, S. L. & Buck, L. B. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* **79**, 1245-1255 (1994).
- 70) Schafer, L., Schriever, V. A. & Croy, I. Human olfactory dysfunction: causes and consequences. *Cell Tissue Res.* **383**, 569-579 (2021).
- 71) Ajmani, G. S., Suh, H. H. & Pinto, J. M. Effects of ambient air pollution exposure on olfaction: a review. *Environ. Health Perspect.* **124**, 1683-1693 (2016).
- 72) Sunderman, F. W., Jr. Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **31**, 3-24 (2001).
- 73) Werner, S. & Nies, E. Olfactory dysfunction revisited: a reappraisal of work-related olfactory dysfunction caused by chemicals. *J. Occup. Med. Toxicol.* **13**, 28 (2018).
- 74) Woodward, M. R., Amrutkar, C. V., Shah, H. C., Benedict, R. H., Rajakrishnan, S., Doody, R. S., Yan, L. & Szigeti, K. Validation of olfactory deficit as a biomarker of Alzheimer disease. *Neurol. Clin. Pract.* **7**, 5-14 (2017).

- 75) Doty, R. L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* **8**, 329-339 (2012).
- 76) Murphy, C. Olfactory and other sensory impairments in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **15**, 11-24 (2019).
- 77) Liu, X. Y., Wang, K., Deng, X. H., Wei, Y. H., Guo, R., Liu, S. F., Zhu, Y. F., Zhong, J. J., Zheng, J. Y., Wang, M. D., Ye, Q. H., He, J. Q., Guo, K. H., Zhu, J. R., Huang, S. Q., Chen, Z. X., Lv, C. S. & Wen, L. Amelioration of olfactory dysfunction in a mouse model of Parkinson's disease via enhancing GABAergic signaling. *Cell Biosci.* **13**, 101 (2023).
- 78) Yuan, Y., Ma, X., Mi, X., Qu, L., Liang, M., Li, M., Wang, Y., Song, N. & Xie, J. Dopaminergic neurodegeneration in the substantia nigra is associated with olfactory dysfunction in mice models of Parkinson's disease. *Cell Death Discov.* **9**, 388 (2023).
- 79) Doty, R. L. Olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases: is there a common pathological substrate? *Lancet Neurol.* **16**, 478-488 (2017).
- 80) Furuta, S., Nishimoto, K., Egawa, M., Ohyama, M. & Moriyama, H. Olfactory dysfunction in patients with Minamata disease. *Am. J. Rhinol.* **8**, 259-264 (1994).
- 81) 猪初男, 水越鉄理. メチル水銀中毒症の耳鼻咽喉科的所見と平衡機能. 神経研究の進歩 **18**, 932-940 (1974).
- 82) 野坂保次. 水俣病における聴力, 前庭機能, 嗅覚および味覚の傷害. 水俣病, 139-148 (1966).
- 83) 原田正純. 16年後の水俣病と臨床的・疫学的研究. 神経研究の進歩 **16**, 870-880 (1972).

- 84) 井形昭弘, 浜田陸三, 音瀬広章, 上永吉達彦, 納光弘. 水俣病の臨床像－この15年間の推移－. 水俣病に関する総合的研究 昭和 63 年度 環境庁公害防止等調査研究委託費による報告書, 34-38 (1989).
- 85) 二塚信. 水俣病の疫学～病像のとらえ方を中心に～. 日本衛生学雑誌 **70**, 271-276 (2015).
- 86) Fujimura, M. & Usuki, F. In situ different antioxidative systems contribute to the site-specific methylmercury neurotoxicity in mice. *Toxicology* **392**, 55-63 (2017).
- 87) 国立水俣病総合研究センター. 平成 23 年度 国立水俣病総合研究センター年報 第 32 号 (2012).
- 88) Takahashi, T., Fujimura, M., Koyama, M., Kanazawa, M., Usuki, F., Nishizawa, M. & Shimohata, T. Methylmercury Causes Blood-Brain Barrier Damage in Rats via Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *PLoS One* **12**, e0170623 (2017).
- 89) Mizoguchi, N., Muramoto, K. & Kobayashi, M. Olfactory signals from the main olfactory bulb converge with taste information from the chorda tympani nerve in the agranular insular cortex of rats. *Pflugers Arch.* **472**, 721-732 (2020).
- 90) Rolls, E. & Baylis, L. Gustatory, olfactory, and visual convergence within the primate orbitofrontal cortex. *J. Neurosci.* **14**, 5437-5452 (1994).
- 91) Roy-Cote, F., Zahal, R., Frasnelli, J., Nguyen, D. K. & Boucher, O. Insula and olfaction: a literature review and case report. *Brain Sci.* **11**, 198 (2021).

- 92) Sakamoto, M., Miyamoto, K., Wu, Z. & Nakanishi, H. Possible involvement of cathepsin B released by microglia in methylmercury-induced cerebellar pathological changes in the adult rat. *Neurosci. Lett.* **442**, 292-296 (2008).
- 93) Bondier, J. R., Michel, G., Propper, A. & Badot, P. M. Harmful effects of cadmium on olfactory system in mice. *Inhal. Toxicol.* **20**, 1169-1177 (2008).
- 94) Jia, C., Roman, C. & Hegg, C. C. Nickel sulfate induces location-dependent atrophy of mouse olfactory epithelium: protective and proliferative role of purinergic receptor activation. *Toxicol. Sci.* **115**, 547-556 (2010).
- 95) McBride, K., Slotnick, B. & Margolis, F. L. Does intranasal application of zinc sulfate produce anosmia in the mouse? An olfactometric and anatomical study. *Chem. Senses* **28**, 659-670 (2003).
- 96) Tjälve, H., Henriksson, J., Tallkvist, J., Larsson, B. S. & Lindquist, N. G. Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats. *Pharmacol. Toxicol.* **79**, 347-356 (1996).
- 97) Fujimura, M., Usuki, F. & Nakamura, A. Fasudil, a Rho-associated coiled coil-forming protein kinase inhibitor, recovers methylmercury-induced axonal degeneration by changing microglial phenotype in rats. *Toxicol. Sci.* **168**, 126-136 (2019).
- 98) Fujimura, M., Usuki, F. & Nakamura, A. Methylmercury induces hyperalgesia/allodynia through spinal cord dorsal horn neuronal activation and subsequent somatosensory cortical circuit formation in rats. *Arch. Toxicol.* **95**, 2151-2162 (2021).

- 99) Munch, G., Gasic-Milenkovic, J., Dukic-Stefanovic, S., Kuhla, B., Heinrich, K., Riederer, P., Huttunen, H. J., Founds, H. & Sajithlal, G. Microglial activation induces cell death, inhibits neurite outgrowth and causes neurite retraction of differentiated neuroblastoma cells. *Exp. Brain Res.* **150**, 1-8 (2003).
- 100) Xing, B., Bachstetter, A. D. & Van Eldik, L. J. Microglial p38 α MAPK is critical for LPS-induced neuron degeneration, through a mechanism involving TNF α . *Mol. Neurodegener.* **6**, 84 (2011).
- 101) di Penta, A., Moreno, B., Reix, S., Fernandez-Diez, B., Villanueva, M., Errea, O., Escala, N., Vandebroek, K., Comella, J. X. & Villoslada, P. Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. *PLoS One* **8**, e54722 (2013).
- 102) Tong, J., Okutani, F., Murata, Y., Taniguchi, M., Namba, T., Wang, Y. J. & Kaba, H. Tunicamycin impairs olfactory learning and synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Neuroscience* **344**, 371-379 (2017).
- 103) 生田房弘, 卷淵隆夫, 大浜栄作, 古賀誠, 山村安弘, 小宅洋, 斎藤恒, 管野三郎, 喜田村正次. 微量慢性有機水銀中毒症の病理. *神経進歩の研究* **18**, 861-881 (1974).
- 104) 浴野成生, 二宮正, 今村桂子, 諏佐マリ. メチル水銀による大脳皮質損傷水俣病を診断するために. *精神神経学雑誌* **109**, 420-437 (2007).
- 105) Fujimura, M. & Usuki, F. Methylmercury-mediated oxidative stress and activation of the cellular protective system. *Antioxidants (Basel)* **9**, 1004 (2020).

- 106) Leyshon, K. & Morgan, A. J. An integrated study of the morphological and gross-elemental consequences of methyl mercury intoxication in rats, with particular attention on the cerebellum. *Scanning Microsc.* **5**, 895-904 (1991).
- 107) Edwards, J. R., Marty, M. S. & Atchison, W. D. Comparative sensitivity of rat cerebellar neurons to dysregulation of divalent cation homeostasis and cytotoxicity caused by methylmercury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **208**, 222-232 (2005).
- 108) Du, K., Hirooka, T., Sasaki, Y., Yasutake, A., Hara, T., Yamamoto, C., Fujiwara, Y., Shinoda, Y., Fujie, T., Katsuda, S., Eto, K. & Kaji, T. Pathogenesis of selective damage of granule cell layer in cerebellum of rats exposed to methylmercury. *J. Toxicol. Sci.* **48**, 429-439 (2023).
- 109) Yokoi, M., Mori, K. & Nakanishi, S. Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 3371-3375 (1995).
- 110) Isaacson, J. S. & Strowbridge, B. W. Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron* **20**, 749-761 (1998).
- 111) Nusser, Z., Kay, L. M., Laurent, G., Homanics, G. E. & Mody, I. Disruption of GABA(A) receptors on GABAergic interneurons leads to increased oscillatory power in the olfactory bulb network. *J. Neurophysiol.* **86**, 2823-2833 (2001).
- 112) Abraham, N. M., Egger, V., Shimshek, D. R., Renden, R., Fukunaga, I., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Klugmann, M., Margrie, T. W., Schaefer, A. T. & Kuner, T. Synaptic inhibition in the olfactory bulb accelerates odor discrimination in mice. *Neuron* **65**, 399-411 (2010).

- 113) Nunes, D. & Kuner, T. Disinhibition of olfactory bulb granule cells accelerates odour discrimination in mice. *Nat. Commun.* **6**, 8950 (2015).
- 114) Gussing, F. & Bohm, S. NQO1 activity in the main and the accessory olfactory systems correlates with the zonal topography of projection maps. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2511-2518 (2004).
- 115) Yee, S. & Choi, B. H. Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology* **17**, 17-26 (1996).
- 116) Usuki, F., Yasutake, A., Umehara, F., Tokunaga, H., Matsumoto, M., Eto, K., Ishiura, S. & Higuchi, I. In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci. Lett.* **304**, 199-203 (2001).
- 117) Farina, M., Campos, F., Vendrell, I., Berenguer, J., Barzi, M., Pons, S. & Suñol, C. Probucol increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. *Toxicol. Sci.* **112**, 416-426 (2009).
- 118) Franco, J. L., Posser, T., Dunkley, P. R., Dickson, P. W., Mattos, J. J., Martins, R., Bainy, A. C., Marques, M. R., Dafre, A. L. & Farina, M. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 449-457 (2009).
- 119) Toyama, T., Yoshida, E., Shinkai, Y. & Kumagai, Y. DNA microarray analysis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to methylmercury. *J. Toxicol. Sci.* **36**, 843-845 (2011).

- 120) Yoshida, E., Abiko, Y. & Kumagai, Y. Glutathione adduct of methylmercury activates the Keap1-Nrf2 pathway in SH-SY5Y cells. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 1780-1786 (2014).
- 121) Unoki, T., Akiyama, M., Kumagai, Y., Gonçalves, F. M., Farina, M., da Rocha, J. B. T. & Aschner, M. Molecular pathways associated with methylmercury-induced Nrf2 modulation. *Front. Genet.* **9**, 373 (2018).
- 122) Alqahtani, M. A., El-Ghiaty, M. A., El-Mahrouk, S. R. & El-Kadi, A. O. S. Methylmercury (MeHg) transcriptionally regulates NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) in Hepa-1c1c7 cells. *Curr. Res. Toxicol.* **5**, 100126 (2023).
- 123) Dalton, R. P., Lyons, D. B. & Lomvardas, S. Co-opting the unfolded protein response to elicit olfactory receptor feedback. *Cell* **155**, 321-332 (2013).
- 124) Shayya, H. J., Kahiapo, J. K., Duffie, R., Lehmann, K. S., Bashkirova, L., Monahan, K., Dalton, R. P., Gao, J., Jiao, S., Schieren, I., Belluscio, L. & Lomvardas, S. ER stress transforms random olfactory receptor choice into axon targeting precision. *Cell* **185**, 3896-3912 (2022).
- 125) Hasegawa-Ishii, S., Shimada, A. & Imamura, F. Lipopolysaccharide-initiated persistent rhinitis causes gliosis and synaptic loss in the olfactory bulb. *Sci. Rep.* **7**, 11605 (2017).
- 126) Ubeda-Bañon, I., Saiz-Sanchez, D., Flores-Cuadrado, A., Rioja-Corroto, E., Gonzalez-Rodriguez, M., Villar-Conde, S., Astillero-Lopez, V., Cabello-de la Rosa, J. P., Gallardo-Alcañiz, M. J., Vaamonde-Gamo, J., Relea-Calatayud, F., Gonzalez-Lopez, L., Mohedano-Moriano, A., Rabano, A. & Martinez-Marcos, A. The human olfactory system in two proteinopathies: Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Transl. Neurodegener.* **9**, 22 (2020).

- 127) Stranahan, A. M. & Mattson, M. P. Selective vulnerability of neurons in layer II of the entorhinal cortex during aging and Alzheimer's disease. *Neural Plast.* **2010**, 108190 (2010).
- 128) Khan, U. A., Liu, L., Provenzano, F. A., Berman, D. E., Profaci, C. P., Sloan, R., Mayeux, R., Duff, K. E. & Small, S. A. Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **17**, 304-311 (2014).
- 129) Igarashi, K. M. Entorhinal cortex dysfunction in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **46**, 124-136 (2023).
- 130) Fujimura, M. & Unoki, T. Preliminary evaluation of the mechanism underlying vulnerability/resistance to methylmercury toxicity by comparative gene expression profiling of rat primary cultured cerebrocortical and hippocampal neurons. *J. Toxicol. Sci.* **47**, 211-219 (2022).
- 131) Zhang, J., Zhao, Z., Sun, S., Li, J., Wang, Y., Dong, J., Yang, S., Lou, Y., Yang, J., Li, W. & Li, S. Olfactory evaluation in Alzheimer's disease model mice. *Brain Sci* **12**, 607 (2022).
- 132) Ciurleo, R., De Salvo, S., Bonanno, L., Marino, S., Bramanti, P. & Caminiti, F. Parosmia and neurological disorders: a neglected association. *Front. Neurol.* **11**, 543275 (2020).
- 133) Altundag, A. Parosmia and phantosmia: managing quality disorders. *Curr. Otorhinolaryngol. Rep.* **11**, 19-26 (2023).
- 134) 柳井久江. 4Steps エクセル統計 第3版. オーエムエス出版 (2011).

- 135) 小林賢, 佐古兼一, 井上俊夫, 岩崎祐一, 加藤剛, 熊倉隆二. わかりやすい薬学系の統計学入門 第2版. 講談社 (2022).
- 136) Kasuya, E. Mann–Whitney U test when variances are unequal. *Anim. Behav.* **61**, 1247-1249 (2001).
- 137) 名取真. マン・ホイットニーのU検定と不等分散時における代表値の検定法. 霊長類研究 **30**, 173-185 (2014).
- 138) R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R, Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>> (2023).
- 139) Ara, T. brunnermunzel: (Permuted) Brunner-Munzel Test. R package version 2.0, <<https://CRAN.R-project.org/package=brunnermunzel>> (2022).
- 140) Brunner, E. & Munzel, U. The nonparametric Behrens-Fisher problem: asymptotic theory and a small-sample approximation. *Biom. J.* **42**, 17-25 (2000).
- 141) Noguchi, Y., Shinozaki, Y., Fujishita, K., Shibata, K., Imura, Y., Morizawa, Y., Gachet, C. & Koizumi, S. Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y(1) receptor-mediated pathways in astrocytes. *PLoS One* **8**, e57898 (2013).
- 142) De Simone, U., Caloni, F., Gribaldo, L. & Coccini, T. Human co-culture model of neurons and astrocytes to test acute cytotoxicity of neurotoxic compounds. *Int. J. Toxicol.* **36**, 463-477 (2017).
- 143) Ishihara, Y., Itoh, K., Oguro, A., Chiba, Y., Ueno, M., Tsuji, M., Vogel, C. F. A. & Yamazaki, T. Neuroprotective activation of astrocytes by methylmercury exposure in the inferior colliculus. *Sci. Rep.* **9**, 13899 (2019).

- 144) Hoshi, T., Toyama, T., Naganuma, A. & Hwang, G.-W. Methylmercury causes neuronal cell death via M1-microglial activation in organotypic slices prepared from mouse cerebral cortex. *Fundam. Toxicol. Sci.* **6**, 167-170 (2019).
- 145) Shinozaki, Y., Danjo, Y. & Koizumi, S. Microglial ROCK is essential for chronic methylmercury-induced neurodegeneration. *J. Neurochem.* **151**, 64-78 (2019).
- 146) Toyama, T., Hoshi, T., Noguchi, T., Saito, Y., Matsuzawa, A., Naganuma, A. & Hwang, G.-W. Methylmercury induces neuronal cell death by inducing TNF- α expression through the ASK1/p38 signaling pathway in microglia. *Sci. Rep.* **11**, 9832 (2021).
- 147) Malnic, B. & Armelin-Correa, L. Perspectives of Stem Cells: From tools for studying mechanisms of neuronal differentiation towards therapy, 35-45, Springer (2010).
- 148) Urata, S., Maruyama, J., Kishimoto-Urata, M., Sattler, R. A., Cook, R., Lin, N., Yamasoba, T., Makishima, T. & Paessler, S. Regeneration profiles of olfactory epithelium after SARS-CoV-2 infection in golden syrian hamsters. *ACS Chem. Neurosci.* **12**, 589-595 (2021).
- 149) Schwob, J. E. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat. Rec.* **269**, 33-49 (2002).
- 150) Leung, C. T., Coulombe, P. A. & Reed, R. R. Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat. Neurosci.* **10**, 720-726 (2007).
- 151) Iwai, N., Zhou, Z., Roop, D. R. & Behringer, R. R. Horizontal basal cells are multipotent progenitors in normal and injured adult olfactory epithelium. *Stem Cells* **26**, 1298-1306 (2008).

- 152) Fletcher, R. B., Das, D., Gadye, L., Street, K. N., Baudhuin, A., Wagner, A., Cole, M. B., Flores, Q., Choi, Y. G., Yosef, N., Purdom, E., Dudoit, S., Risso, D. & Ngai, J. Deconstructing olfactory stem cell trajectories at single-cell resolution. *Cell Stem Cell* **20**, 817-830 (2017).
- 153) 加藤讓治, 又賀泉, 土川幸三, 土持真, 森和久, 岡野篤夫, 佐藤栄祐, 岡田広明. 新潟水俣病にみられる口腔乾燥症について. *日本口腔科学会雑誌* **33**, 55-67 (1984).

参考文献

本研究内容は原著論文として、以下のように発表した。

1. Characterization of pathological changes in the olfactory system of mice exposed to methylmercury.

Iijima Y, Miki R, Takasugi N, Fujimura M, Uehara T.

Archives of Toxicology (2024), doi: 10.1007/s00204-024-03682-w.

2. Methylmercury-induced brain neuronal death in CHOP-knockout mice.

Iijima Y, Miki R, Fujimura M, Oyadomari S, Uehara T.

The Journal of Toxicological Sciences 49(2), 55-60 (2024)

謝辞

終わりに臨み、本研究の遂行に際してご指導およびご教鞭を賜りました岡山大学・学術研究院医歯薬学域（薬学系）・薬効解析学 上原孝 教授に謹んで感謝の意を表します。

折に触れ多大なる御助言を賜りました岡山大学・学術研究院医歯薬学域（薬学系）・薬効解析学 高杉展正 准教授に心より感謝申し上げます。

本博士論文を審査していただき、有益なご助言を賜りました岡山大学・学術研究院医歯薬学域（薬学系）・構造生物薬学 山下敦子 教授，神経生物物理学 井上剛 准教授，臨床薬物動態学 合葉哲也 准教授に厚く御礼申し上げます。

動物実験に関してご指導いただきました国立水俣病総合研究センター・基礎研究部 藤村成剛 部長ならびに CHOP ノックアウトマウスをご恵与くださいました徳島大学・先端酵素学研究所・生体機能学分野 親泊政一 教授に謝意を表します。

多くの時間を共有し、研究生活を支え合った薬効解析学の皆様方，研究活動に専念できるよう様々なサポートをしていただいた 末吉寿恵 氏ならびに 松本真里 氏に心から感謝申し上げます。

最後に、岡山大学ならびに同大学院への進学を後押しし、今日まで様々なサポートをしていただいた家族と友人に感謝の意を示し、謝辞とさせていただきます。

令和6年3月 飯島 悠太