

氏 名	三木 峻平
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	(薬科学)
学位授与番号	博甲第 7470 号
学位授与の日付	2026 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科博士後期課程薬科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)
学位論文の題目	メチル水銀曝露による新規脳障害部位の同定とその病態生理的役割に関する研究
論文審査委員	小野 敦 教授 上田 真史 教授 井上 剛 准教授

学位論文要約

【背景・目的】

メチル水銀 (MeHg) は食物連鎖を通じて魚介類に高濃度で蓄積されるため、地球規模の環境汚染物質として認知されている。MeHg は血液脳関門を容易に通過し、水俣病に代表される中枢神経障害を惹起する。水俣病の公式確認から 65 年以上が経つにもかかわらず、その毒性機序や治療法は未だ不明である。

本研究では MeHg の毒性病態の理解を深めることを目的として下記の解析を行った。

① MeHg による神経症状に対する化学シャペロンの治療機会

当研究室では、これまでに MeHg 曝露マウスにおいて神経細胞特異的に小胞体ストレスが誘導されること、さらに小胞体ストレスを抑制する作用を持つ化学シャペロンの 4-フェニル酪酸 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA) によって MeHg 誘導性神経障害が抑制されることを報告してきた。本研究ではこれらの知見を発展させ、MeHg 誘導性神経障害における小胞体ストレスの役割と治療標的としての有効性を検討することを目的とした。とくに、4-PBA による治療介入が有効となる治療機会 (Window of Opportunity) を神経症状の測定によって定量的に解析し、MeHg 中毒の病態進展メカニズムを明らかにすることを試みた。

② MeHg 中毒における精神症状の病態解析

重度の MeHg 中毒により発症する水俣病では、主として小脳および大脳皮質 (体性感覚野、運動野、視覚野、聴覚野、嗅覚路) に神経細胞障害が生じ、これに対応して知覚鈍麻、運動失調、視野狭窄、聴覚障害、嗅覚障害などの症状が出現する。さらに水俣病患者では、抑うつ、性格変化、不安などの精神症状も報告されている。一方、これまでは運動・感覚機能に着目した研究が主に進められており、精神症状に関連する病態生理や責任病巣は明らかにされていない。本研究では、MeHg 中毒における精神症状の責任病巣を明らかにするために、モデル動物を用いて精神症状に関連する領域での神経障害を検討した。

【実験方法】

4-PBA の治療機会を検討するため、野生型 C57BL/6J マウスに MeHg 含有水 (終濃度 30 ppm) を最大 8 週間自由飲水させた。MeHg の曝露開始と同時または一定の期間中 (1-4 週間) に 4-PBA (120 mg/kg/day) を投与し、神経細胞保護効果を後肢伸長反射により評価した。

MeHg 中毒における精神症状の責任病巣を検討するため、野生型 C57BL/6J マウスに MeHg (終濃度 30 ppm) 含有水を最大 8 週間自由飲水させた。情動や認知機能に関与する大脳辺縁系および間脳を対象に、アポトーシス細胞を特異的に検出する TUNEL 染色により障害部位を探索した。同定した新規障害部位について、神経細胞特異的マーカーである NeuN により神経細胞の減少を評価した。また、グルタミン酸作動性神経および GABA 作動性神経については、

それぞれの特異的マーカーである VGLUT1/2, GAD65/67 の免疫染色により定量した. MeHg 曝露に伴うマウスの行動変化をオープンフィールド試験, 高架式十字迷路試験, 明暗箱試験によって評価した. 精神行動における GABA シグナルの寄与については, GABA_A 受容体アゴニストであるクロルメザノンを行動試験の前に投与し, 精神行動の変化を同様の行動試験によって評価した.

【結果】

1. MeHg 中毒に対する 4-PBA の有効な治療機会

当研究室では, これまでに 4-PBA の投与によってマウス脳内における MeHg 誘導性の小胞体ストレスと神経細胞死が抑制されることを見出してきた. さらに, これらの病理変化と相関して, MeHg 中毒マウスの神経症状として汎用される後肢伸長反射の障害も抑制されることを示した. そこで本解析では 4-PBA の後処理による神経保護効果を後肢伸長反射の測定により評価した. その結果, MeHg 曝露開始 2 週間後までに 4-PBA の投与を開始した場合, 神経症状が有意に改善した (図 1). 一方, MeHg 曝露開始後 3 週以降の投与では神経症状を緩和できなかったことから, MeHg 毒性に対する 4-PBA の有効な治療機会は投与後 2 週間であることが示唆された.

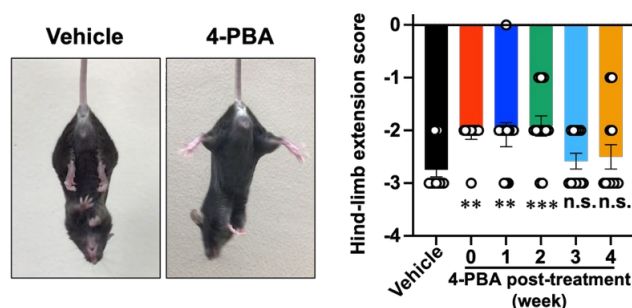


図 1. MeHg 投与開始後 8 週間時点での後肢伸長スコア

0 = 正常, -1 = 軽度の異常, -2 = 中等度の異常, -3 = 重度の異常.

$n = 12$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test; n.s., not significant.

2. MeHg 曝露による精神症状関連領域の影響

MeHg は情動・意思決定に関わりの深い大脳辺縁系や間脳に属する脳領域で神経細胞死を惹起するか否かを検討した. その結果, MeHg の曝露に伴って前帯状皮質, 側坐核, 扁桃体中心核, 扁桃体基底外側核, 視床背内側核の 5 領域で TUNEL 陽性細胞の有意な増加が認められた. これらの領域は, 情動や意思決定を司る主要な神経回路である皮質-線条体-視床-扁桃体 (CSTC) ループおよび前頭前野-扁桃体回路を構成する主要な脳領域であることが知られており, これらの脳領域での障害が MeHg 中毒における精神症状の発症に関与していることが推定された. さらに 5 つ全ての領域で NeuN 陽性細胞の減少が認められた (図 2). 以上より, MeHg の曝露は大脳辺縁系および間脳に属する複数の脳領域においても神経細胞死を惹起することが明らかになった.

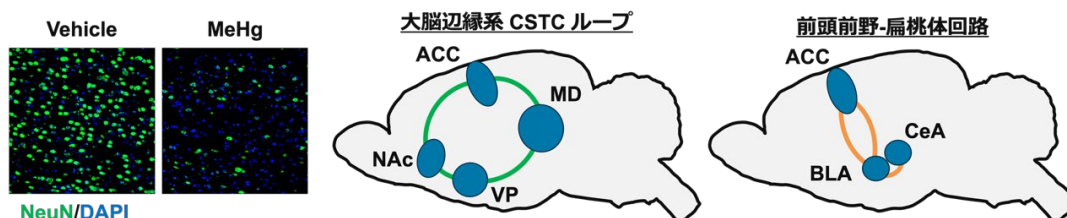


図 2. 前帯状皮質 (ACC) における神経細胞の減少と情動・意思決定に関与するマウス脳の神経回路略語: ACC (前帯状皮質), NAc (側坐核), MD (視床背内側核)

VP (腹側淡蒼球: 本研究では未検討), CeA (扁桃体中心核), BLA (扁桃体基底外側核)

3. MeHg 曝露による GABA/グルタミン酸シグナルの変化

CSTC ループおよび扁桃体-前頭前野経路では、グルタミン酸による興奮性シグナルと GABA による抑制性シグナルが形成する興奮/抑制 (Excitatory/Inhibitory, E/I) バランスが、神経伝達を中核的に制御している。この E/I バランスの破綻は強迫性障害や不安症などの精神疾患の病態と関連することが示されている。MeHg が脳内の E/I バランスに及ぼす影響をグルタミン酸作動性神経終末マーカー VGLUT1/2 および GABA 作動性神経マーカー GAD65/67 の免疫組織化学染色によって評価した。その結果、MeHg の曝露に伴う VGLUT1/2 陽性神経終末の減少は比較的軽微であった一方、GAD65/67 陽性神経細胞は著明に減少した (図 3)。

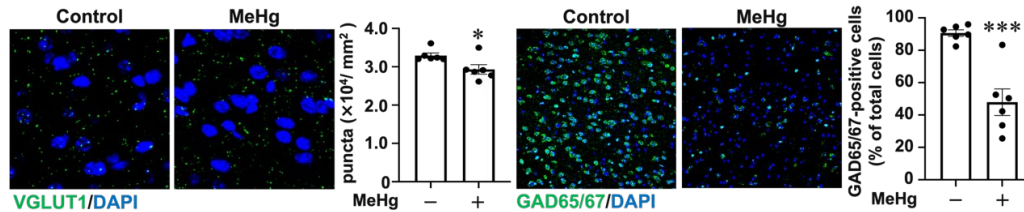


図 3. 扁桃体基底外側核 (BLA) における神経終末および神経細胞の減少
画像は核および VGLUT1 (緑), GAD65/67 (緑) の蛍光染色像を示す。
 $n = 6$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, by two-tailed Student's t-test.

4. 精神行動に対する MeHg 曝露の影響

MeHg 曝露によって惹起された GAD65/67 陽性細胞の著明な減少がマウスの精神行動に及ぼす影響を行動試験により評価した。MeHg 曝露マウスをオープンフィールド試験に供したところ、個体死のおよそ 6 日前から活動量の増加が認められた。また、MeHg 曝露マウスにおいてのみ異常なジャンプ行動が認められた (図 4)。高架式十字迷路試験, 明暗箱試験においては過活動傾向が認められたが一貫した不安・抗不安様行動は認められなかった。

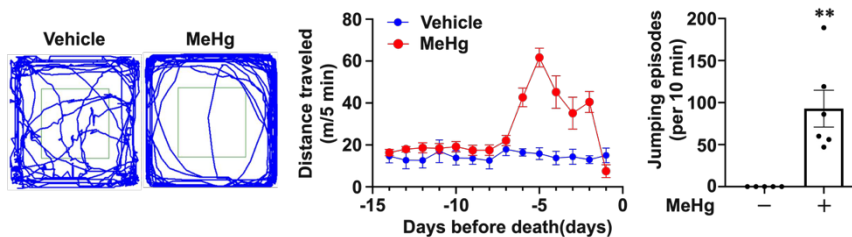


図 4. MeHg 曝露マウスの精神行動
オープンフィールド試験における軌跡と個体死に至るまでの活動量およびジャンプ量の変化を示す。

5. 精神行動に対する薬理的な抑制

MeHg 曝露マウスにおいて GABA 作動性神経の減少が認められたことから、GABA_A 受容体アゴニストであるクロルメザノン MeHg 曝露マウスに投与し、精神行動変化への影響を解析した。その結果、オープンフィールド試験において認められる MeHg 誘導性の過活動および異常なジャンプ行動はクロルメザノンによって有意に抑制された (図 5)。

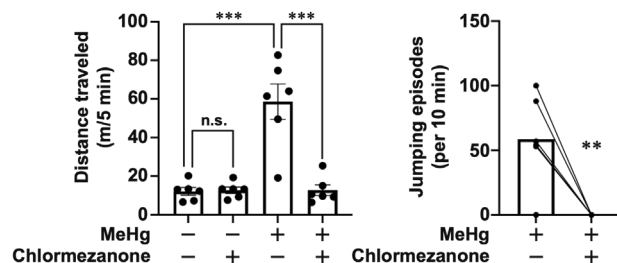


図 5. クロルメザノンによる MeHg 誘導性の過活動とジャンプ行動の抑制
クロルメザノンの投与による MeHg 曝露マウスの活動量およびジャンプ回数の変化を示す。
 $n = 6$, *** $p < 0.001$ by two-way ANOVA with Tukey's post hoc test.; n.s., not significant. (活動量)
 $n = 6$, ** $p < 0.01$ by two-tailed Student's t-test. (ジャンプ発作回数)

【考察】

1. MeHg 中毒に対する 4-PBA の有効な治療機会

本研究では、MeHg への曝露 2 週目から 4-PBA 投与を開始しても神経症状の抑制効果が得られることを示した。本成果より、4-PBA による治療機会は MeHg 曝露後少なくとも 2 週間存在し、この期間において小胞体ストレスが MeHg 毒性発現の主要機序として機能していることが示唆された。以上より、小胞体ストレスは曝露早期における有効な治療標的であり、この時間域内での小胞体ストレスの抑制が神経保護効果をもたらすと考えられる。一方で MeHg 曝露 3 週目以降は酸化ストレスやミクログリアによる寄与が増加するため、これらが小胞体ストレス非依存的かつ不可逆的な細胞死の進行に関与している可能性がある。

2. MeHg 曝露による精神症状関連回路の破綻

MeHg 曝露により、大脳辺縁系および間脳に位置する 5 領域で神経細胞死が誘導された。これらの領域では GABA 作動性神経の顕著な脱落を認め、抑制シグナルの低下による E/I バランスの破綻が示唆された。これらの領域は、情動・意思決定機能に深く関与しており、精神症状との関わりも深い。過去の MeHg 中毒患者においても抑うつ・不安・易刺激性などの症状が報告されており、大脳辺縁系領域における神経細胞死が誘導する E/I バランスの破綻が MeHg 中毒における精神症状の発症に寄与していることが推定された。

3. MeHg 誘導性の過活動におけるクロルメザノンの行動薬理的な評価

クロルメザノンの投与は、コントロール群では鎮静効果を示さない一方で、MeHg 曝露群において過活動および異常なジャンプ行動を抑制した。この成果は、薬効が一般的な鎮静・運動抑制によるものではなく、クロルメザノンが MeHg 誘導性の行動異常を特異的に抑制したことを示唆する。以上より、MeHg 曝露により生じる GABA シグナルの機能低下がマウスの行動異常に寄与している可能性を示す。

【結論】

本研究により以下の知見を得た。

- 1) MeHg 毒性に対する 4-PBA の有効な治療機会は MeHg 曝露後 2 週間であった。
- 2) MeHg の曝露は情動・意思決定に関与する前帯状皮質、側坐核、扁桃体中心核、扁桃体基底外側核、視床背内側核の 5 領域を障害した。
- 3) MeHg の曝露はグルタミン酸シグナル伝達と比較して、GABA シグナル伝達を著明に障害した。
- 4) MeHg の曝露はマウスの運動量の増加と異常なジャンプ行動を誘導した。
- 5) GABA_A 受容体アゴニストであるクロルメザノンは MeHg 曝露に伴う過活動と異常なジャンプ行動を抑制した。

MeHg の毒性発現初期における小胞体ストレスの寄与が明らかになったことから、今後は小胞体ストレスの下流で神経細胞死に直接関与する因子の同定を進める予定である。さらには、MeHg による GABA 作動性神経の選択的な障害機構についても検討を進める予定である。

3 参考文献および関連文献

【参考文献】

- 1) Therapeutic potential of 4-phenylbutyric acid against methylmercury-induced neuronal cell death in mice. Ryohei Miki, Ryosuke Nomura, Yuta Iijima, Sho Kubota, Nobumasa Takasugi, Takao Iwawaki, Masatake Fujimura, Takashi Uehara.
Archives of Toxicology, **99**, 563–574 (2025) (IF: 6.9)

【関連文献】なし