

学位論文題名

有機水銀による実験的末梢神経障害の神経病態学的解析

学位論文内容の要旨

緒 言

近年、種々の薬剤や工業用材による中毒性あるいは代謝性末梢神経障害が報告されてきており、その発症機構の解明が治療法の確立の上でも重要な研究課題である。水俣病の原因である有機水銀中毒症において患者が呈する感覚障害の責任病巣が大脳感覚野の障害なのか感覚性末梢神経障害に由来するのかが大きな問題となっている。

Rat を用いた実験的有機水銀中毒症では末梢神経は感覚神経系が特異的に障害され、運動神経系は侵されないことが報告されている。中毒性の末梢神経障害の場合、primary の病変が軸索を障害する axonopathy, 神経細胞体に生ずる neurotoxicity, および myelin または myelin を形成する Schwann cell の障害による myelinopathy が区別されるが、有機水銀中毒による primary の障害部位は未だ確立されていない。そこで我々は有機水銀中毒による感覚神経障害の primary 障害部位を明らかにするため、ほぼ3週間で発症する亜急性の実験系にて経時的に検索した。検索方法としては従来の形態学的手法のみならず生化学的ならびに免疫組織学的手段も導入した。その結果、rat 有機水銀中毒での感覚神経障害は neurotoxicity と dying back を示す axonopathy の二通りの機構であることが判明した。

材料と方法

動物と実験計画：北海道大学医学研究科付属動物実験施設にて飼育繁殖している生後8週から10週の雄性ラット WKAH を用いた。平均3週間にて後肢麻痺症状を発症する条件を確立し、飲料水として有機水銀 methyl mercury chloride (MMC) を投与。

形態学的検索：投与後11日目、15日目、18日目、21日目ラット(各3匹)を用いた。4% paraformaldehyde にて灌流固定後、脊髓、脊髄後根神経節(dorsal root ganglion: DRG)、坐骨神経(sciatic nerve: SN)を採取し、組織学的、免疫組織学的に検索した。また各群3匹より DRG と SN の生材料も採取し Western blotting を行った。

結 果 と 考 案

末梢神経病変：投与11日目の Epon 包埋 toluidine blue 染色では投与群の末梢神経に軸索の顆粒状変化が認められた。免疫染色では amyloid precursor protein (APP) に陽性になる axon が見られた。Neurofilament 200 kDa (NF) 抗体を用いた免疫染色でも断裂を示す異常 axon が認められた。これらは P0 を用いた myelin 染色や正常対照例では見られず、初期変化は軸索

変性 axonopathy であることが判明した。15 日目以降は axon の変性が著明となり、同時に myelin の崩壊も観察された。Western blotting では NF および P0 の減少が顕著であった。

脊髄後根神経節および脊髄病変：投与後 11 日目のラット脊髄では異常が見られなかったが、DRG を epon 包埋 toluidine blue 染色標本で見ると少数の大型神経細胞(Type A)の腫大空胞化と macrophage マーカー MRF1 で陽性となる細胞浸潤を伴う細胞消失(residual nodules of Nageotte)が認められた。TUNEL 染色陽性となる apoptosis 細胞は認められなかった。このような所見は正常対照例では見られなかった。従って、初期変化として見られた axonopathy は Type A 神経細胞の neurotoxicity による変性に伴う secondary degeneration と考えられた。15 日目から P0 と NF 染色にて axon の変性と myelin の崩壊が SN の末梢側で著明に見られ、18 日目からは DRG 近傍の SN でも認められた。Western blotting でも NF, P0 の減少が著明であった。Type B 神経細胞は 21 日目でも良く保たれていた。変性軸索の定量的検索では、中枢側に比べ末梢側での数が多く見られ、Type B 神経細胞は axon の dying-back 変性であることが判明した。

#### 結 語

有機水銀による末梢神経障害の特異性を明らかにする目的でラットに亜急性中毒症を誘発し、経時的に病理学的、生化学的に検索し、下記の結果を得た。

1. 発症前の早期に DRG Type A neuron の細胞死が生じ、感覚神経系に secondary degeneration が生じていた。
2. Residual nodules of Nageotte を構成する細胞は MRF1 陽性であり macrophage 由来であることが判明した。
3. TUNEL 法による検索でも陽性細胞は見られず、DRG neuron の細胞死は apoptosis とは異なる機序で生じていることが示唆された。
4. 発症前の後期には全ての感覚神経線維の軸索の断裂と髄鞘の崩壊とが明瞭となり、それぞれの構成蛋白の減少が Western blotting で明瞭に示された。
5. 末梢神経変性は中枢側よりも末梢側に著明であった。また DRG Type B neuron は保たれており、この変化は dying-back axonal degeneration によるものと考えられた。

以上の結果から有機水銀の神経細胞障害機序が神経細胞の種類と機能の差を反映し、各々異なっていることが明らかとなった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎  
副 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 渡 邊 雅 彦

## 学位論文題名

### 有機水銀による実験的末梢神経障害の神経病態学的解析

Rat を用いた実験的有機水銀中毒症では末梢神経は感覚神経系が特異的に障害される。中毒性の末梢神経障害の場合, primary の病変が軸索を障害する axonopathy, 神経細胞体に生ずる neurotoxicity, および myelin または myelin を形成する Schwann cell の障害による myelinopathy が区別されるが, 有機水銀中毒による primary の障害部位は未だ確立されていない。そこで我々は有機水銀中毒による感覚神経障害の primary 障害部位を明らかにするため, ほぼ 3 週間で発症する亜急性の実験系にて経時的に検索した。

動物と実験計画：生後 8 週から 10 週の雄性ラット WKAH を用いた。有機水銀 (MMC, CH<sub>3</sub>HgCl), を約 200 g のラットが一日 20 ml 飲水するとして 4 mg/kg/day 量相当を投与。本実験は北海道大学医学研究科で定める Guide for the Care and Use of Laboratory Animals の審査を受け承認の元に行った。

形態学的検索：投与後 11, 15, 18, 21 日目にそれぞれ 3 匹ずつ 4 % paraformaldehyde にて灌流固定を行った。Dorsal root ganglion (DRG), sciatic nerve (SN)は左右のどちらかを灌流固定した組織から電子顕微鏡用標本を作成した。

免疫組織化学：免疫染色には macrophage/microglia のマーカーとして MRF-1 の抗体の他に parvalbumin, calcitonin gene-related peptide, neurofilaments (NF-200 kDa), amyloid precursor protein (APP), S-100, P0 の抗体を使用した。Apoptosis の染色には TUNEL 染色を行った。軸索変性の局在と程度を定量的に神経線維当りの陽性軸索数で表現し, 平均値を $\pm$ SD で現した。

Western blotting には Beaulieu et al. (2002) の方法を採用した。

結果、組織学・免疫組織学的所見として, MMC 投与後 11 日目のラットの末梢神経系を epon 包埋 toluidine blue 染色でみると投与群の末梢神経に軸索の顆粒状変化が認められた。免疫染色では小数の APP に陽性になる axon が見られた。NF-200 kDa 抗体を用いた免疫染色にて断裂を示す異常 axon が認められた。Axon の異常は SN の distal 部で見られ、傍脊椎部の SN proximal には認められなかった。Myelin 染色では対照と比べて差が見られなかった。MMC 投与後 15 日目のラットでは神経変性が著明となり, axon も myelin も崩壊が明瞭とな

った。さらに投与 18 日目のラットでは通常の KB 染色や Bodian 染色でも SN における異常線維が識別可能となり、多数の変性線維が認められた。

DRG および脊髄病変として、投与後 11 日目のラット脊髄では異常が見られなかったが DRG を epon 包埋 toluidine blue 染色標本で見ると少数の大型神経細胞(Type A)の腫大空胞化と細胞浸潤を伴う細胞消失(residual nodules)が認められた。浸潤細胞は MRF-1 免疫染色で陽性となり、macrophage 系であることが示された。投与後 15 日目、18 日目と residual nodules の数が増加したが、大部分の中型神経細胞(Type B)はよく保たれていた。

変性軸索の定量的変化として、11 日目では末梢側にわずかに変性線維が観察されただけであった。15 日目と 18 日目では変性線維が増加するが、やはり末梢側での数が多く見られた。

Western blotting の結果として、末梢神経および DRG で 15 日目、18 日目では P0 および NF-200 kDa の著明な減少が見られた。

以上の結果より、rat 有機水銀中毒での感覚神経障害は DRG における Type A neuron の neurotoxicity と Type B neuron の dying back を示す axonopathy の二通りの機構であることが判明した。

口頭発表に当たり、副査の渡邊教授より sensory 特異的障害の根拠、Type A neuron の terminal area の所見、residual nodules の構成細胞について、同じく副査の吉木教授よりヒト疾患との共通性、慢性例との比較、Type A と Type B neuron の病変差異の解釈、apoptosis の所見、rat strain 等に関する質問があった。また主査の長嶋教授より cell death のメカニズム、axonal degeneration の検出法に関する質問があった。これらの質問に対して申請者はおおむね適切な回答を行った。

この論文は有機水銀による末梢神経障害の発症機序を明らかにした点で優れていると判断され、今後の中毒性神経障害発症機構の解釈に貴重な示唆を与えたものと考えられた。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。