

# メチル水銀による末梢神経障害の分子・細胞的基盤

主任研究者 鍛冶 利幸（東京理科大学薬学部環境健康学研究室教授）

## 研究要旨

水俣病がハンター・ラッセル症候群といわれる中枢神経障害であることから、従前よりメチル水銀の毒性発現機構に関する研究は主に中枢神経を構成するcell typeを対象に行われてきた。しかしながら、水俣病の初期で認められる末梢神経障害、特に感覚神経優位な傷害についての研究はきわめて不十分な状態にある。これまでに我々は、「重金属等による健康影響に関する総合的研究（2016-2018年度）」の支援を得て「メチル水銀による感覚神経優位な傷害の分子的基盤に関する研究」を実施し、ラット後根神経節を材料として、メチル水銀の感覚神経への毒性発現にTNF- $\alpha$ およびTLRシグナルカスケードの活性化が関与し得ること、その要因あるいは結果として、マクロファージの集積、ミクログリアの活性化およびシュワン細胞の増殖が事象として存在することを見出した。本研究はこれまでの研究成果を基盤として、TNF- $\alpha$ およびTLRシグナル経路の関与についてさらなる解析を行った。また、マクロファージやミクログリアの集積/活性化とメチル水銀毒性の関連性について検討した。さらに末梢感覚神経が関与する各種感覚モダリティのメチル水銀毒性に対する脆弱性について行動学的、組織学的な解析を行なった。加えて、妊娠時のメチル水銀曝露による末梢感覚神経毒性についても検討を行なった。その結果、TNF- $\alpha$ がメチル水銀の感覚神経毒性の少なくとも一部を介在すること、および異なる感覚モダリティのメチル水銀に対する感受性は、その表出時期および回復時期に違いがあることが示唆された。これらの研究成果は、メチル水銀による末梢神経障害の分子・細胞的基盤を包括的に解析することを通じて水俣病における末梢神経障害の理解に貢献するものである。

キーワード： 末梢神経障害、感覚神経、前根神経、後根神経節（DRG）、炎症仮説

## 研究者協力者

篠田 陽・東京薬科大学薬学部公衆衛生学教室（准教授）

吉田 映子・東京理科大学薬学部環境健康学研究室（講師）

## I 研究目的

水俣病の初期症状として出現する四肢末端の感覚障害は、中枢性（大脳皮質中心後回）病変によるものと、末梢性（末梢感覚神経）病変によるものとが考えられている。水俣病患者末梢神経の死後病理解析において、運動神経は傷害がなく、感覚神経のみ顕著に傷害されること、その傷害は軸索変性が先行しており髄鞘には変化が見られないことが報告されている。このように、病理組織学的な感覚神経病変は示されているが、末梢神経を構成する神経のなかでも感覚神経のみが傷害される分子的基盤に関する報告例は少なく、有力な仮説もない。

我々はこれまでに、後肢交差を示すメチル水銀中毒ラット（水俣病モデルラット）後根神経節（DRG）の遺伝子発現解析および組織学的解析において、メチル水銀による感覚神経特異的な毒性発現にTNF- $\alpha$ およびTLRシグナルカスケードの活性化が関与し得ること<sup>1)</sup>、その要因あるいは結果としてマクロファージ集積、ミクログリアの活性化、シュワン細胞の増殖が事象として

存在することを見出した<sup>2)</sup>。さらにDRG神経細胞と脊髄前角神経細胞（AHC）の初代培養による比較において、メチル水銀によるDRG特異的な傷害がメチル水銀の細胞内蓄積量に依存すること、そのメカニズムとしてDRGにおけるメチル水銀の細胞内輸送体LAT-1の発現が恒常的に高いことに加え、メチル水銀の細胞外排泄に関わる輸送体MRP-2の発現が低いことが示され、DRG神経細胞がメチル水銀を蓄積しやすい特性を有することを明らかにした。

本研究の目的はこれらの研究を踏まえ、第一のサブテーマとしてメチル水銀による感覚神経への毒性発現に対するTNF- $\alpha$ およびTLRシグナル、およびそれらシグナル経路に寄与するマクロファージやミクログリアの集積/活性化の関与についてより詳細なメカニズムを解明することである（令和元年）。第二のサブテーマとして、それらの得られた知見を活用し、臨床的にも不明な点が多いメチル水銀による種々感覚モダリティの感受性の差異を明らかにすることである（令和2年）。併せて、第三のサブテーマとして、通説として言われている「胎児にメチル水銀が移行するために妊婦ではメチル水銀の毒性が軽減される」という説に関連して、妊娠および未妊娠の動物母体におけるメチル水銀の毒性発現について、特に感覚神経に対する毒性の差異とそのメカニズムについても検討を加えることである（令和3年）。

本年度は、第一にメチル水銀による感覚神経への毒性発現に対するTNF- $\alpha$ およびTLRシグナルの関与を明らかにするため、TNF- $\alpha$ 欠損マウスを用いてメチル水銀の毒性評価を実施、また*in vitro*実験系においてはDRG神経細胞におけるメチル水銀のTNF- $\alpha$ シグナルおよびTLRシグナルに対する影響について検討した。第二に、水俣病モデルラットにおける感覚モダリティ評価と、同評価系を用いたマクロファージやミクログリアの集積/活性化の影響に関する予備的検討についても実施した。第三に、

## II 研究方法

### 方法1（TNF欠損マウスの毒性評価）：

三協ラボサービス株式会社より購入したC57BL/6Jマウス（15～32週齢・オスまたはメス・1群5匹として各実験を3回実施）に、2 mg/mLに調製した塩化メチル水銀水溶液を15 mg/kg/dayで5日間投与2日間未投与のサイクルで2週間経口投与した。コントロールは体重あたり同量のPBSを投与した。投与開始直後より体重測定、生存率の確認を行うとともに、マウスを固定し後肢の踵間の距離を測定し評価した。

### 方法2（*in vitro*）：

ラットDRG神経細胞（感覚神経）およびAHCは、3～4週齢の雄性Wistar Ratの胸椎から仙椎にわたる領域を摘出し、各神経細胞を分離して得た。神経細胞の培養については、米沢らの方法を改良し<sup>3,4)</sup>、DRG細胞を7日間、10% FBS-DMEMにて培養した後、実験に使用した。メチル水銀は1% BSA-DMEMを用いて0.5、1および3  $\mu$ Mに調製し曝露した。タンパク質の発現はウエスタンブロット法を用いた。

### 方法3（水俣病モデルラットを用いた感覚神経の行動学的解析と組織学的解析）：

東京実験動物より購入したWistar Rat（9週齢・オス・対照群21匹/投与群20匹）に、2 mg/mLに調製した塩化メチル水銀水溶液を、ゾンデにより経胃的に6.7 mg/kg/dayで5日間投与2日間未投与のサイクルで1週間若しくは2週間投与した。コントロールは体重あたり同量の水を投与し

た。ミノサイクリン投与は上述のスケジュールにおいて、塩化メチル水銀水溶液投与 1 時間前に 30 mg/kg/day で腹腔内投与を行った。妊娠・未妊娠ラットにおけるメチル水銀感受性解析については、妊娠 5 日目の Wistar Rat (9 週齢) と週齢を同じくした未妊娠ラットに同様に全体重あたりのメチル水銀を投与した (対照群 5 匹・投与群 5 匹)。

行動学的解析については、投与開始直後より体重測定、後肢交差、生存率の確認を行うとともに、Foot shock test (侵害刺激)、von Frey test (圧力刺激)、Tail dipping test (hot & cold) (温・冷感刺激) および Tail flick test (温感刺激) について、1 つの感覚応答実験を順次 1 日 1 回、70 日間行なった。

組織学的解析については、メチル水銀投与したラットを投与開始 7 日後、14 日後に二酸化炭素で深麻酔し、心臓より 200 mL の PBS を灌流、続いて 4% PFA / 0.1 M PB 溶液を灌流して組織固定した。腰椎 (L1-L5) より後根神経節、感覚神経繊維、運動神経繊維を摘出し、20% sucrose / PBS 溶液に置換後 OTC コンパウンドに包埋、クライオスタットにて凍結標本を作成し、常法に従って蛍光免疫組織化学染色を行った。

臓器サンプルはメチル水銀投与したラットを投与開始 14 日後に二酸化炭素で深麻酔し、心臓より採血後、脳 (大脳皮質および小脳を単離)、肝臓、腎臓、DRG を摘出した。また、妊娠ラットからは胎仔を摘出した (3 匹の妊娠ラットから 1 腹あたり 4 匹の胎仔から無作為に選び、全脳サンプルを調製した)。摘出した臓器を湿式灰化し、水銀蓄積量を金-アマルガム法にて ICP-質量分析により測定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は人権の保護やそれに関する法令の遵守を必要とする研究には該当しない。

動物実験については東京理科大学の動物委員会および遺伝子組換え実験安全委員会で承認されたものであり (承認番号 Y20018, Y20019 および 1882), 承認された内容に沿って適切に実施した。また、研究協力者についても所属する東京薬科大学の動物実験委員会により承認された実験方法により (P20-19), 法令および動物実験倫理規定に沿って研究を行った。

メチル水銀を含む有害な化学物質を用いる実験に関しては、安全に留意し、廃棄に関しては学内外の環境汚染防止ならびに生活環境の保全を図るために、東京理科大学環境安全センターおよび東京薬科大学環境安全規定が定める廃棄手順に従い、適切に廃棄した。

### III 研究結果

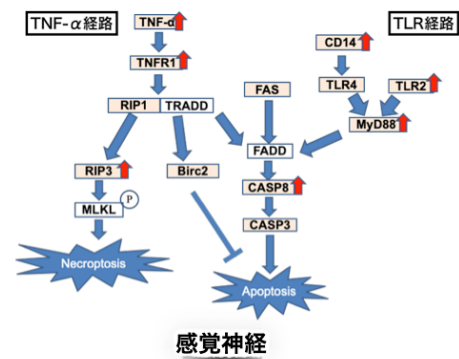
#### 1) メチル水銀の毒性発現に対する TNF- $\alpha$ の役割

メチル水銀の毒性発現に対する TNF- $\alpha$  の役割について検討するため、野生型および TNF- $\alpha$  欠損マウスの雄または雌に対するメチル水銀毒性発現の差異について毒性評価を行った。雄性マウスについては、野生型と欠損マウスを比較して生存率や体重低下、および各臓器における水銀蓄積量に顕著な差は認められなかったが、TNF- $\alpha$  欠損マウスは野生型と比較しメチル水銀による後肢伸長症状に遅延が認められた。一方、雌性マウスについては、野生型と欠損マウスを比較し体重低下には顕著な差は認められなかったが、生存率については TNF- $\alpha$  欠損マウスにおけるメチル水銀感受性が低下しており、雄性マウスと同様にメチル水銀による後肢伸長症状に遅延が認められた。以上より、少なくとも TNF- $\alpha$  欠損がメチル水銀による後肢伸長症状の出現に関与する可能性

が示唆された。

## 2) DRG神経細胞におけるメチル水銀によるTNF- $\alpha$ およびTLR経路の活性化

DRG神経細胞にメチル水銀を24時間曝露したところ、メチル水銀の濃度依存的にCaspase8およびCaspase3の活性化（断片化）が認められ、同条件下においてメチル水銀によるBirc2の発現が低下する傾向が認められた。さらに、メチル水銀はDRG神経細胞のTNF受容体1（TNFR1）およびRIP3の発現を上昇させ、下流シグナルのRIP3/MLKLのリン酸化が増加したことから、TNFR1-RIP3-MLKLシグナルを活性化させることが示唆された。



## 3) 水俣病モデルラットにおける感覚モダリィー評価

感覚神経障害における種々感覚モダリィーのメチル水銀感受性に差が見られるかどうかを明らかにする目的で、水俣病モデルラットを作成し種々感覚行動解析を行った。本研究で作成した水俣病モデルラットは、投与開始40日において生存率が65%程度となる毒性発現条件であった。後肢交差の程度をスコア化したところ、メチル水銀投与群は投与開始1週間頃から弱い後肢交差を示し、投与開始3週目にはほぼ全ての個体が最も強い後肢交差スコアを示した。興味深いことにその後6-7週目より後肢交差スコアの低下（回復）が観察された。種々感覚モダリィーの行動解析においては、冷覚は投与開始16日目から33日目にかけて散発的に有意な鈍麻が、その後39日目から47日目にかけて持続的に有意な鈍麻が観察され、その後回復した。痛覚は8日目から53日目にかけて持続的に有意な鈍麻が観察され、その後回復した。温覚と圧覚については投与開始から68日目までの観察期間において散発的に有意な鈍麻および鋭敏化がそれぞれ観察されたものの、同期間において持続的な変化は観察できなかった。次に各種感覚モダリィーのメチル水銀毒性の感受性について組織学的に明らかにする目的で、投与開始7日および14日目に作成したDRGの組織標本を用い、各種モダリィーを担う神経細胞を免疫組織学的に大まかに同定し、メチル水銀毒性に対する感受性について組織学的評価を行った。主に機械受容や自己受容を担う神経細胞を抗Neurofilament抗体で、侵害受容を担う神経細胞を抗PLXNC1抗体で、温度受容、侵害受容を担う細胞を抗TrkA抗体で、主に機会受容を担う細胞を抗TH抗体でそれぞれ染色して細胞数を比較したところ、投与開始7日目および14日目の標本においてはそれぞれの神経細胞傷害に顕著な差は観察されなかった。

## 4) 水俣病モデルラットにおけるミクログリア・マクロファージ抑制効果

DRGにおける神経細胞死にミクログリアやマクロファージが促進的に寄与しているかどうかを検証する目的で、水俣病モデルラットを作成する際にミクログリア・マクロファージの抑制剤であるミノサイクリンを投与し、その効果検証のためのサンプリングを行った。2週間の投与期間における体重および後肢交差のスコアに関しては、メチル水銀投与群と有意な差が見られなかった。

## 5) 妊娠・未妊娠ラットにおけるメチル水銀感受性に関する評価

妊娠・未妊娠ラットにおけるメチル水銀感受性について明らかにする目的で、メチル水銀を投与したラットにおける各臓器（肺・腎臓・血液・大脳皮質・小脳・DRG）および胎児の水銀蓄積量を測定したところ、未妊娠ラットのDRGにおいて有意な蓄積量の減少が観察された。その他

の臓器では蓄積量に違いは見られなかった。サンプリングまでの生存率、体重、後肢交差についても評価したが、有意な差は見られなかった。

#### IV 考察およびV結論

##### 1) メチル水銀の毒性発現に対するTNF- $\alpha$ の役割

メチル水銀の毒性発現に対するTNF- $\alpha$ の役割について検討するため、野生型およびTNF- $\alpha$ 欠損マウスに対するメチル水銀毒性発現の差異について毒性評価を行ったところ、雄雌性マウスともにTNF- $\alpha$ 欠損マウスは野生型と比較しメチル水銀による後肢伸長症状に遅延が認められたことから、少なくともTNF- $\alpha$ 欠損がメチル水銀による後肢伸長症状の出現に關与する可能性が示唆された。また当研究室の先行研究において、メチル水銀に刺激されたマクロファージからTNF- $\alpha$ の分泌が促進されることを見出しており、水俣病モデルラットのDRGおよび感覚神経において観察されたマクロファージの集積やミクログリアの活性化に、メチル水銀刺激によるTNF- $\alpha$ の分泌促進が關与する可能性が示唆される。現在マクロファージの集積やミクログリアの活性化とDRG神経細胞障害の關連性についてその因果關係を探索している。

##### 2) DRG神経細胞におけるメチル水銀によるTNF- $\alpha$ およびTLR経路の活性化

DRG神経細胞にメチル水銀を曝露したところ、アポトーシスの誘導に關わるCaspase8/Caspase3経路の活性化が認められた。また、メチル水銀は抗アポトーシス因子であるBirc2の発現を低下させる可能性が示唆された。さらに、メチル水銀はTNFR1の発現上昇を介して、TNF- $\alpha$ 経路の一つであるTNFR1/RIP3/MLKLシグナルを活性化させる可能性が示唆された。これらの結果は、篠田らによるメチル水銀中毒ラットのDRGにおけるマイクロアレイ解析の結果と相關するものである。

##### 3) 水俣病モデルラットにおける感覚モダリィー評価

各種感覚モダリィーのメチル水銀毒性感受性についての行動学的解析により、異なる感覚モダリィーにおけるメチル水銀に対する感受性には、その表出時期および回復時期それぞれに違いがある可能性が示唆された。この差異を組織学的に明らかにする目的で、免疫組織化学を使用した神経細胞同定と、その計数によるメチル水銀感受性について評価を行ったが、同定した神経細胞群の間にメチル水銀感受性の違いは同定できなかった。これは使用した4つの抗体が神経細胞を大まかに分類する抗体であったためであると考えられ、現在その発現遺伝子の種類の違いにより11種類存在するとして知られているDRG神経細胞個々の感受性について4群にわけて解析したことで、個々の神経細胞のメチル水銀感受性がマスクされている可能性が考えられた。

##### 4) 水俣病モデルラットにおけるミクログリア・マクロファージ抑制効果

ミノサイクリン投与により、今回の測定期間（投与開始より15日）においては少なくともメチル水銀による体重減少および後肢交差のスコアに有意な差は見られなかった。

##### 5) 妊娠・未妊娠ラットにおけるメチル水銀感受性に関する評価

水俣病患者において、質的な評価として妊娠による母体へのメチル水銀毒性低減が観察されていたため同効果を期待して実験を行ったが、予想に反して水銀化合物の各臓器への蓄積量はほとんど変化がなかったばかりか、DRGにおいては妊娠ラットの方が蓄積量の有意な増加が認められた。また、少なくとも15日の観察期間においては生存率・体重・後肢交差それぞれの指標にお

いて妊娠・未妊娠の双方に有意な差が見られなかったため、ヒトにおける質的な評価はラットでは再現されない可能性が示唆された。

## VI 次年度以降の計画

### 1) メチル水銀による毒性発現に対するTNF- $\alpha$ の役割

現時点ではTNF- $\alpha$ 欠損マウスにおける後肢伸長症状の遅延が中枢由来か末梢由来か不明である。また、メチル水銀による感覚神経特異的な傷害にTNF- $\alpha$ が関与するかの解決には至っていない。今後、TNF- $\alpha$ 欠損マウスにおける後肢伸長症状の遅延に関して大脳、小脳およびDRG（感覚神経および運動神経含む）の病理組織学検討を実施し、特にDRGや感覚神経におけるメチル水銀傷害について野生型マウスと比較する。さらにはメチル水銀を投与した野生型マウスにおいて発現した後肢伸長症状に対して、抗TNF- $\alpha$ 抗体インフリキシマブによる効果が認められるかについて検討する。

また、水俣病モデルラットのDRGおよび感覚神経において観察されたマクロファージの集積やミクログリアの活性化、シュワン細胞の増殖にTNF- $\alpha$ が関与するかについても同様に病理組織学的検討を行い、これらの関連性について明らかにする。またこれら組織学的解析結果とDRG神経細胞死の因果関係を明らかにする目的で、ミクログリア/マクロファージ活性化抑制剤であるミノサイクリン投与下におけるメチル水銀毒性について、ラットDRGを用いた組織学的な検討を行う。

### 2) DRG神経細胞におけるメチル水銀によるTNF- $\alpha$ およびTLR経路の活性化

本年度と同様、メチル水銀によるTNF- $\alpha$ 経路の活性化についてより詳細な検討を実施する。さらに、TLR経路の活性化はTNF- $\alpha$ などの種々の炎症性サイトカインの産生に繋がることから、メチル水銀による感覚神経優位な毒性発現に対するTLR経路の検討を行う。

### 3) 水俣病モデルラットにおける感覚モダリィー評価

行動解析実験において、各種感覚モダリィー間のメチル水銀感受性に差があることが示唆されたものの、組織学的解析においてはその差を明確にすることができなかった。今後は今回4つに大分類した神経細胞に含まれる11種類の神経細胞をできるだけ細かく分類してそれぞれについて毒性評価することにより、各種感覚モダリィーのメチル水銀毒性感受性の差異について組織学的に明らかにし、行動学的解析の結果と対比する。さらに、行動学的解析により各種感覚の回復傾向がみられた期間において、DRGおよび感覚神経線維の組織学的な解析を行い、末梢感覚神経で何が起きているかを明らかにする。さらに、ラットをモデルとしたメチル水銀依存的感覚障害について、大脳皮質一次体性感覚野が本当に影響していないかどうか、組織学的な定量解析を行う事で明らかにする。

## この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) \*Shinoda Y, Tatsumi S, Yoshida E, Takahashi T, Eto K, \*Kaji T, \*Fujiwara Y. *J. Toxicol. Sci.* (2019) 44(8) 549-558. Gene expression profiles in the dorsal root ganglia of methylmercury-exposed rats.
- 2) \*Shinoda Y, Ehara S, Tatsumi S, Yoshida E, Takahashi T, Eto K, \*Kaji T, \*Fujiwara Y. *J. Toxicol. Sci.* (2019) 44(3), 191-199. Methylmercury-induced neural degeneration in rat dorsal root ganglion is associated with the accumulation of microglia/macrophages and the proliferation of Schwann cells.

引用文献

- 3) 米沢猛. 組織培養. 中井, 岡本編. 朝倉書店. 1964; 392.
- 4) Braschler UF *et al.* Journal of Neuroscience Methods, 1989; 29: 121-129

# The molecular and pathological mechanisms of methylmercury-induced sensory disturbance in rodent

Toshiyuki Kaji<sup>\*1</sup>, Eiko Yoshida<sup>\*1</sup>, Yo Shinoda<sup>\*2</sup>

*\*1 Department of Environmental Health, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science and \*2 Department of Environmental Health, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences*

*Keywords:* Dorsal root ganglion (DRG); Methylmercury; Peripheral nervous system; Sensory neuron

## **Abstract**

Since Minamata disease shows a disorder of central nervous system called “Hunter Russell syndrome”, research on mechanisms underlying the toxicity of methylmercury have been mainly performed for cell types composing the central nervous system. However, research on peripheral neuropathy recognized in the early days of Minamata disease, especially sensory nerve-dominant injury, has been incompletely understood. Supported by "Comprehensive Study on Health Effects of Heavy Metals, etc. (2016-2018)", we have conducted "Research on the molecular and pathological mechanisms of methylmercury-induced sensory disturbance in rodent". It was found that activation of TNF- $\alpha$  and TLR signal cascades could be involved in the toxicity of methylmercury to sensory nerves. Additionally, macrophage accumulation, microglia activation, and schwann cell proliferation were observed. Based on these research results, the involvement of TNF- $\alpha$  and TLR signal pathways was further analyzed in the present study. The interrelationship between the accumulation/activation of macrophages/microglia and methylmercury neurotoxicity was also examined. Furthermore, behavioral and histological analyses were performed on the vulnerability of various sensory modalities involving peripheral sensory nerves to methylmercury toxicity. As a preliminary investigation, neurotoxicity of methylmercury on peripheral sensory nerve in pregnant rats was examined. The experiments revealed that TNF- $\alpha$  mediates at least a part of the neurotoxicity of methylmercury on sensory nerve and the sensitivity of different sensory modalities to methylmercury varies in the time of onset and that of recovery. These studies contribute to the understanding of peripheral neuropathy in Minamata disease through comprehensive analysis of the molecular and cellular basis of peripheral neuropathy caused by methylmercury.