

## 論文の内容の要旨

論文題目 抗甲状腺剤メチマゾール投与によって誘発されるラット嗅細胞障害の障害  
機序に関する研究  
氏 名 坂本 幸士

嗅覚をつかさどる嗅上皮は、嗅細胞、支持細胞、基底細胞、Bowman 腺などによって構成されている。末梢受容器として働くのは双極性ニューロンである嗅細胞であり、末梢側には鼻腔内に向かって一本の樹状突起を伸ばしており、中枢側には長い軸索をのぼし、頭蓋内の嗅球に達している。このように嗅細胞は鼻腔内という外的環境に直接暴露されているため、細菌やウイルスによる炎症、化学物質などの障害を受けやすい状況にある。これに対する適応機序として嗅細胞は、障害の結果として失われた細胞を、基底細胞より分化再生し代償するという特徴的な性質を有している。

嗅覚障害はウイルス感染、慢性炎症、薬剤の副作用などの様々な原因により生じ、治療としては、手術適応例では原疾患の治療を行うのが原則である。手術不適応例や原因不明例では薬物療法が中心となるが、治療抵抗性の症例に遭遇することも多く、嗅細胞障害の機序の解析に基づいた新しい治療薬の開発が望まれる。

実験動物においてこれまでに確立された、嗅細胞障害モデルとしては以下のものがある。

I：嗅球切除術、II：軸索切断術、III：鼻腔内細菌感染、IV：鼻毒性を有する薬剤の鼻腔内局所投与、V：鼻毒性を有する薬剤の全身投与

細胞死の様式は、古典的には生理的な死であるアポトーシスと病的な死であるネクローシスに大別されているが、IとIIは外傷性嗅覚障害の状態を反映しており、嗅細胞障害がアポトーシスによることが証明されている。IIIは副鼻腔炎による嗅覚障害の状態を反映しており、これも嗅細

胞障害がアポトーシスによることが証明されている。IVとVは薬剤性嗅覚障害の状態を反映しており、IVによる嗅細胞障害はネクローシスによるという説が有力であるが、Vに関しては詳細な検討を行った報告はない。細胞死の様式が、アポトーシスとネクローシスのどちらが優位かを解析することは、細胞死の抑制を試みる場合、阻害点を決定する上で重要である。

本研究では薬剤性嗅覚障害の実験モデルとして、人においても嗅覚障害の報告のある抗甲状腺剤メチマゾールを採用し、ラットに全身投与（腹腔内投与）した。そして、その際の嗅細胞障害の機序を検討した。

まず、予備実験としてメチマゾール投与後の嗅上皮の障害の程度、及び再生による代償を経時的に検討した。体重 100 g 前後の雄の Sprague-Dawley ラットを対象とし、各時点につきコントロール群とメチマゾール 300mg/kg 投与群、それぞれ 2 匹を用いた（各時点 n = 4）。実験群には PBS に溶解した 300 mg/kg のメチマゾール溶液を腹腔内に投与した。コントロールには PBS のみ投与した。投与 12 時間後、1 日後、3 日後、7 日後、14 日後の鼻腔組織のホルマリン固定・パラフィン包埋冠状断切片を作成した。ヘマトキシリン-エオジン染色による形態学的評価をするとともに、成熟嗅細胞のマーカーである olfactory marker protein (OMP) に対する抗 OMP 抗体による免疫染色を行い、OMP の染色性を指標にして障害の程度、再生による代償の程度を検討した。

ヘマトキシリン-エオジン染色では、メチマゾール投与 12 時間後では、まだ嗅上皮の形態的変化は明らかではなかった。1 日後では、多数の剥離細胞を認め、一部の剥離細胞ではアポトーシスの形態学的特徴とされている核の濃縮像と細胞の収縮像を認めた。3 日後においても剥離細胞の痕跡が認められ、その部位に核の濃縮像と細胞の収縮像を認めた。7 日後では剥離細胞は認められなかったが、嗅上皮の厚さはコントロールと比較して菲薄化していた。14 日後でも剥離細胞は認められなかったが、嗅上皮の厚さはコントロールと近いレベルまで回復していた。

抗 OMP 抗体による免疫染色では、メチマゾール投与 12 時間後では、まだ嗅上皮の障害は明らかではなかった。1 日後では、剥離細胞が顕著となり、剥離細胞の大部分には OMP の染色性が認められた。3 日後においても剥離細胞の痕跡が認められた。7 日後になると剥離細胞は目立たなくなるが、OMP の染色性は、コントロールよりも減少していた。14 日後では OMP の染色性は 3 日後、7 日後よりも回復していたが、コントロールよりも減少していた。

これらの結果から、300 mg/kg のメチマゾールの腹腔内投与により 24 時間後には、嗅細胞に細胞障害が誘発されること、細胞傷害はアポトーシスが関与している可能性が高いこと、再生による代償は 14 日後の時点では完成されていないことが示された。また、嗅細胞障害の急性期の評価対象として、投与 1 日後と投与 7 日後を象徴的な 2 点として着目しても合理的と考えられた。

次にアポトーシスが優位な場合、嗅球切除術で証明されているのと同様に、メチマゾールの場合もカスパーゼ-9 活性化からカスパーゼ-3 活性化による経路によりアポトーシスが誘発されているか否かを検討するために本実験を行った。

96 匹の体重 100g 前後の雄の Sprague-Dawley ラットを対象とし、ラットは無作為に以下の 4

群に割当てられた。(各群の n = 24)

グループ 1 (vehicle + vehicle)

ラットに vehicle である PBS を腹腔内注射し、30 分後に、同様の PBS を 2 腹腔内注射した。

グループ 2 (vehicle + methimazole)

ラットに vehicle である PBS を腹腔内注射し、30 分後に、300 mg/kg のメチマゾール・PBS 溶液を腹腔内注射した。

グループ 3 (caspase-3 inhibitor + methimazole)

ラットに 9 mg/kg の細胞透過性カスパーゼ-3 阻害剤 (Ac-DEVD-CHO) ・PBS 溶液を腹腔内注射し、30 分後に、300 mg/kg のメチマゾール・PBS 溶液を腹腔内注射した。

グループ 4 (caspase-9 inhibitor + methimazole)

ラットに 9.6 mg/kg の細胞透過性カスパーゼ-3 阻害剤 (Ac-LEHD-CHO) ・PBS 溶液を腹腔内注射し、30 分後に、300 mg/kg のメチマゾール・PBS 溶液を腹腔内注射した。

メチマゾール投与 1 日後と 7 日後に、各群 12 匹 (各時点の n = 6) のラットから鼻腔組織のホルマリン固定・パラフィン包埋冠状断切片を作成した。また、各群 12 匹 (各時点の n = 6) のラットから未固定のまま、鼻腔組織を採取した。冠状断切片を用いてヘマトキシリン-エオジン染色、抗 OMP 抗体・抗活性化カスパーゼ-3 抗体・抗活性化カスパーゼ-9 抗体・抗活性化カスパーゼ-8 抗体・抗 cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 抗体による免疫染色、TUNEL 染色を行った。特に細胞障害が顕著な群に関しては抗活性化カスパーゼ-3 抗体と抗 OMP 抗体の二重染色を行った。未固定鼻腔組織より細胞質分画の蛋白質を抽出し、各種カスパーゼ活性の測定、ウエスタンブロットによる細胞質分画中のチトクローム c の測定を行った。また、嗅覚の機能的評価として投与 1 日後から 7 日後にかけてバニリンを用いた嗅覚行動検査を行った。

ヘマトキシリン-エオジン染色では投与 1 日後のグループ 2 で多数の剥離細胞を認め、一部の細胞ではアポトーシスの形態学的特徴とされている核の濃縮像を認めた。その他のグループでは形態的な変化はなかった。投与 7 日後ではグループ 2 では嗅上皮の厚みの減少を認めたが、他のグループでは形態的な変化はなかった。抗 OMP 抗体による免疫染色ではグループ 2 で予備実験と同様の染色性を示したが、他のグループ間では染色性に有意差はなかった。抗活性化カスパーゼ-3 抗体・抗活性化カスパーゼ-9 抗体・抗 cleaved PARP 抗体による免疫染色と TUNEL 染色では投与 1 日後のグループ 2 のみで剥離細胞に一致して染色性の亢進を認めたが、その他のグループ、及び投与 7 日後の全てのグループ間では染色性に有意差はなかった。抗活性化カスパーゼ-8 抗体による免疫染色では投与 1 日後と投与 7 日後の両方で、全てのグループ間で染色性の有意な差

認められなかった。抗活性化カスパーゼ-3 抗体と抗 OMP 抗体による二重免疫染色では投与 1 日後のグループ 2 で OMP 陽性の剥離細胞に一致して、活性化カスパーゼ-3 を多数認めた。

カスパーゼ-3 とカスパーゼ-9 の活性は投与 1 日後のグループ 2 で活性の有意な亢進を認めたが、その他のグループ、及び投与 7 日後の全てのグループ間では活性に有意差はなかった。カスパーゼ-8 の活性は、投与 1 日後と投与 7 日後の両方で、全てのグループ間で有意な差はなかった。

ウェスタンブロットによる投与 1 日後の細胞質分画を用いたチトクロム c の半定量ではグループ 1 (vehicle + vehicle) と比較してグループ 2、グループ 3、グループ 4 では増加していた。また、グループ 2、グループ 3、グループ 4 間では統計学的に有意な差はなかった。

嗅覚行動検査ではグループ 2 において嗅覚の感度が有意に低下していたが、その他のグループ間では有意な差はなかった。

以上の結果より、メチマゾールによる嗅細胞障害は細胞質へのチトクロム c の放出→カスパーゼ-9 の活性化→カスパーゼ-3 の活性化の経路で誘発されるアポトーシス優位に生じていることが示唆された。さらにカスパーゼ-3 阻害剤、カスパーゼ-9 阻害剤の事前の投与により嗅細胞障害が形態的にも機能的にも抑制されたことは、嗅細胞障害が上記の経路で誘発されるアポトーシスであることの間接的な証明でもあり、カスパーゼ阻害剤による薬剤性嗅覚障害の新たな治療法の可能性を示唆した。