

5) 薬物の鼻腔内投与による脳内神経機能の制御

研究代表者 宮園 貞治

[研究目的]

我々の脳は、血液脳関門 (BBB; Blood-Brain Barrier) によって、不要な化学物質の流入から守られている。しかしながら、BBB は脳を標的とする新規医薬品開発において薬物送達を困難にする障壁ともなりうる。嗅覚輸送とは、鼻腔内に投与された薬剤、タンパク質、核酸などが、嗅神経軸索、あるいは嗅神経間隙と脳脊髄液を介して、脳内に送達される経路である。嗅覚輸送のメカニズムには未だ不明な点が多いが、BBB をバイパスし迅速に薬物を脳内へ送達可能な経路であ

る。ただし、この有用性は、毒性物質が直接脳内に送られる可能性があることを意味している。

ロテノンは、ミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iの阻害を作用機序とする殺虫農薬であり、哺乳類における腸管吸収、経皮吸収は極めて弱く、環境中での分解が早いことから、比較的安全な農薬とされてきた。しかし、ロテノンをラット頸静脈内に慢性持続投与することで、黒質ドーパミン作動性神経の脱落を伴うパーキンソン病様症状を呈することが報告された (Betarbet et al., *Nat. Neurosci.*, 3, 1301-1306 (2000))。また、ヒトでもロテノンへの暴露履歴によって、パーキンソン病発症リスクが高まることが報告された (Tanner et al., *Environ. Health Perspect.*, 119, 866-872 (2011))。

そこで本研究では、パーキンソン病発症との関連が示唆されている農薬ロテノンをを用いて、嗅覚輸送を介した脳の脆弱性に関して検討した。

[研究方法]

マウス (雌、BALB/c、3-6 月齢) の右側鼻腔内に、ロテノン (0.6 mg/kg) を一日一回、反復投与することによって、嗅覚輸送を介した嗅球への影響を検討した。嗅球におけるドーパミン作動性神経マーカーである Tyrosine Hydroxylase (TH)、並びにミトコンドリアストレスマーカーである PARK2 の遺伝子発現変化は、RT-PCR によって検討した。嗅覚機能の変化に関しては、Y 字迷路を用いた酪酸忌避行動によって評価した。脳内のドーパミン作動性神経の分布は、抗 TH 抗体を用いた蛍光組織免疫染色により観察した。

[結果および考察]

マウス鼻腔内へのロテノン反復投与を 14 日間行くと、嗅球の有意な委縮が両側性に観察された (図 1、2)。また、Y 字迷路を用いて嗅覚機能評価を行ったところ、ロテノン投与マウスは、7 日間投与群において 25% 酪酸に対する忌避行動を、14 日間投与群においては 25% ならびに 100% 酪酸に対する忌避行動を消失することが明らかとなった。

ロテノンは、細胞内においてミトコンドリア呼吸鎖複合体-Iを阻害し、不完全な呼吸鎖反応により活性酸素 (ROS) 産生を増大する。ROS によって傷害されたミトコンドリアの分解には、PARK2 発現増強を介したミトコンドリア特異的オートファジーが関与す

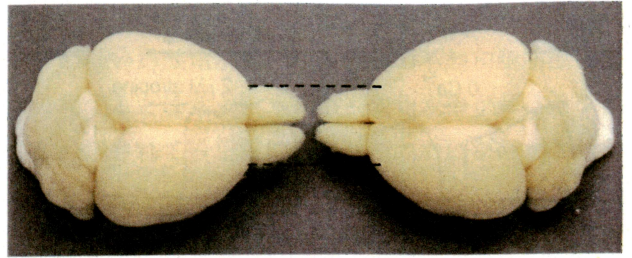


図 1 14 日間鼻腔内ロテノン投与マウス (右) と対照投与マウス (左) の脳

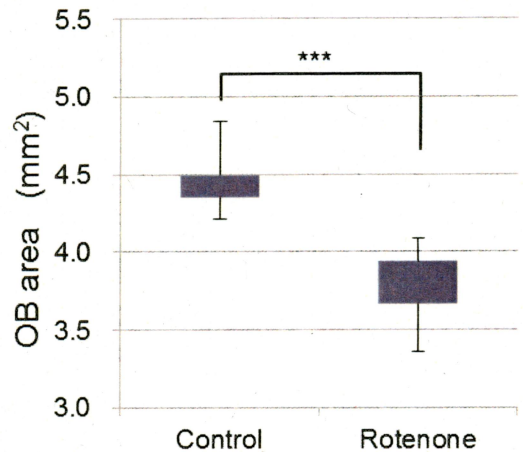


図 2 14 日間鼻腔内ロテノン投与マウス (右) と対照投与マウス (左) の嗅球面積比較 (n=14, p<0.001 by Turkey-Kramer method)

る。そこで、鼻腔内に投与されたロテノンが実際に嗅球に送達されているか否かについて検討するために、嗅球 RNA を用いた RT-PCR によって TH 並びに PARK2 の遺伝子発現を解析した。その結果、投与 1 日後から投与側優位に PARK2 の発現増強が確認され、やがて両側性に発現が増強した。投与 3 日後以降で、同じく投与側優位に TH 発現が減少し、7 日目では両側性に TH 発現の減少が認められた。これらは、ロテノンが嗅覚輸送により嗅球へ送達され、ミトコンドリアストレスを介してドーパミン作動性神経に影響を及ぼしたことを示唆している。

これまでに、ロテノン慢性持続投与動物モデルにおいて、ロテノンは黒質緻密部のドーパミン作動性神経の消失を引き起こし、線条体におけるドーパミン放出量低下がパーキンソン病様症状を惹起すると報告されている。そこで、鼻腔内ロテノン投与が、嗅球におけるドーパミン作動性神経 (A16 細胞群) へどのような

影響を及ぼすかについて、マウス脳・矢状断スライスの抗 TH 抗体染色により検討した。その結果、14 日間反復投与マウスでは、嗅球の糸球体細胞層に存在する A16 細胞群が、ほぼ消失することが明らかとなった。A16 細胞群の消失は、両側性に観察されること、また、線条体においても抗 TH 抗体によるシグナルが減弱することから、鼻腔内に投与されたロテノンは、嗅覚輸送を介して嗅球を傷害し、さらにその影響が広範囲に広がっていくことを示唆している。すなわち、より長期のロテノン鼻腔内投与によってパーキンソン病様徴候が現れるならば、脳が嗅覚輸送を介してドーパミン作動性神経に対する毒性物質に曝されることは、孤発性パーキンソン病の発症リスクとなる可能性がある。また、本研究での、化学物質嗅覚輸送における影響が早期に嗅球で現れるという結果は、毒性物質暴露者の中枢への影響を最小限にするために、早期の嗅覚異常診断が有効であることを示唆している。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、ご助言頂きました旭川医科大学教育研究推進センター 船越洋教授に深謝いたします。