

## 嗅覚系の異常とカルシウム局在化

荒川 泰昭

静岡県立大学・食品栄養科学部・公衆衛生学教室

### Olfactory Disorders and Calcium Localization

Yasuaki ARAKAWA

*Department of Hygiene & Preventive Medicine, Faculty of Health Sciences, The University of Shizuoka*

Deficiency and excesses of trace elements induce various kinds of brain lesion. In this study, organotin exposure- and zinc deficiency- induced olfactory lesions were kinetically analyzed from the viewpoints of the movement of trace elements, an inhibition of signal transduction and toxic cell death (necrosis or apoptosis) in the olfactory systems.

Remarkable results were that organotin exposure and zinc deficiency induced each excessive accumulation of calcium in the olfactory system such as olfactory epithelium and olfactory bulb. This calcium localization depended upon the number and species of ligand of organotin compounds in case of organotin exposure and was parallel with the degree of manifestation of deficiency symptom in case of zinc deficiency. In case of organotin exposure, excessive increases of parathyroid hormone (PTH), cAMP and excessive decreases of inositol triphosphate ( $IP_3$ ),  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-dependent protein kinase II (CaM kinase II) were seen. In case of zinc deficiency, a remarkable decrease of PTH and a little decreases of cAMP,  $IP_3$  were seen in the olfactory tissues, and a remarkable decrease of calcium and a remarkable increase of PTH were seen in the cerebrospinal fluid.

Putting all results together, the calcium localization in the olfactory system seems to be due to the processes such as the activation of adenylcyclase by an excessive increase of PTH in the special regions of the brain, excessive increase in the formation of cAMP by the activation of adenylcyclase, disorder of cAMP-activated channels by the excessive increase of cAMP, and an excessive influx of extracellular  $Ca^{2+}$  by the disorder of the channels. Moreover this rapid and excessive increase in the concentration of intracellular  $Ca^{2+}$  seems to inhibit CaM kinase II functions followed by leading to necrosis or apoptosis in vivo or toxic cell death in vitro.

微量元素はその欠乏あるいは過剰によって生体系に種々の影響を及ぼす<sup>1-4)</sup>。我々はこれまでに免疫

系において、欠乏では亜鉛欠乏<sup>5,6)</sup>、過剰では有機錫暴露<sup>7,8)</sup>が最もドラマチックに、しかも互いに類似の症状や現象を呈することから、この2つのモデル系を使って種々検討してきたが、脳神経系においても同様に両者が学習記憶系ばかりでなく、嗅覚系においても類似の症状や現象を呈することを見いだし、ある程度の知見を得たので報告する<sup>9,10)</sup>。

## 実 験 方 法

### 1. 動物実験

1) 亜鉛欠乏実験：SPF動物実験施設において、SPF Wistar系幼若ラット（雄性，3週齢，体重40g前後）に亜鉛無添加飼料（Zn含量：0.05mg%，オリエンタル酵母K.K.）もしくは亜鉛添加飼料（コントロール飼料，ZnCO<sub>3</sub>添加，Zn含量：5.8mg%，同社）および超純水（自作）を与え4週間飼育した。その後，両群のラットにコントロール飼料を与え，さらに6週間飼育した。投与開始後0，4ならびに10週目に両群のラットを断頭し，海馬，線条体，皮質，小脳，延髄ならびに嗅球の各部位を摘出し，超純水で洗浄後，凍結乾燥した。

2) 有機錫暴露実験：Wistar系ラット（雄性，6週齢，体重200g前後）にコーンオイルに溶解したトリブチル錫クロリド（2.0mg/kg body weight）を腹腔内（i.p.）に1回投与し，0，1，2，3，4日後に断頭して海馬，皮質，小脳，延髄，線条体，嗅球を摘出，それぞれの組織を超純水で洗浄した後，凍結乾燥した。

また，カルシウム局在化の程度と有機錫の化学構造の違いとの関連性を検討する実験では，同様に6週齢の雄性Wistar系ラットを使用し，コントロール群にはコーンオイルのみを，有機錫暴露群にはコーンオイル溶解の等モルの各種有機錫；モノブチル錫トリクロリド（BuSnCl<sub>3</sub>），ジエチル錫ジクロリド（Et<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub>）ジブチル錫ジクロリド（Bu<sub>2</sub>SnCl<sub>2</sub>），トリメチル錫クロリド（Me<sub>3</sub>SnCl），トリブチル錫クロリド（Bu<sub>3</sub>SnCl），トリプロピル錫クロリド（Pr<sub>3</sub>SnCl），テトラブチル錫（Bu<sub>4</sub>Sn）をそれぞれ腹腔内投与（3.072×10<sup>-3</sup>M溶液を0.4ml投与，トリブチル錫クロリドの場合，2.0mg/kg body weightに相当）し，2日経過後に断頭し，嗅球を摘出した。

### 2. 放射化分析

亜鉛欠乏実験ならびに有機錫暴露実験で得た飼料を，照射カプセルに封入し，京都大学原子炉実験所において圧気輸送管（KUR-Pn-1）を用いて炉心部に送り，30秒間ならびに60分間，熱中性子束を照射し，これを適時冷却後，高分解能Ge半導体検出器を装着した波高分析器（Pulse height analyzer, PHA）を用いてγ線スペクトロメトリーによる多元素分析を行なった。

### 3. 副甲状腺ホルモン（PTH）の測定

血清はそのまま，組織は20倍量の0.6M PBS中にてモホジナイズし，遠心分離後，上清中のPTHを<sup>125</sup>I標識ラットPTH抗体を用いたラジオイムノアッセイ法<sup>11-15)</sup>にて測定した。

### 4. イノシトールトリホスフェイト（IP<sub>3</sub>）測定

嗅球IP<sub>3</sub>摘出画分，<sup>3</sup>H標識1,4,5-IP<sub>3</sub>，IP<sub>3</sub>レセプター含有膜調整，IP<sub>3</sub>標品を用いてリガンド結

合の競合反応を利用したラジオレセプターアッセイ (RRA) により、嗅球中の 1,4,5-IP<sub>3</sub> を測定した<sup>16,17)</sup>。

5. サイクリックアデノシンモノホスフェイト (cAMP) 濃度測定

嗅球中の cAMP を 6% トリクロロ酢酸により抽出し、サクシニル化後、[<sup>125</sup>I]-サクシニル cAMP の抗血清に対する競合反応を行い、抗体に非結合の [<sup>125</sup>I]-サクシニル cAMP チロシンメチルエステルをデキストランコーティングの活性炭で吸着除去し、上清の放射活性を測定した<sup>18,19)</sup>。

6. Ca<sup>2+</sup>/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM キナーゼ II) 活性測定

嗅球より CaM キナーゼ II を抽出し、そのリン酸化活性を基質に Syntide 2 を用い、[<sup>32</sup>P] で標識することにより測定した<sup>20)</sup>。

結果ならびに考察

1. 亜鉛欠乏ならびに有機錫暴露による脳内微量元素の変動

亜鉛欠乏あるいは有機錫暴露によって特異的にカルシウムが嗅覚系へ過剰蓄積することがわかった

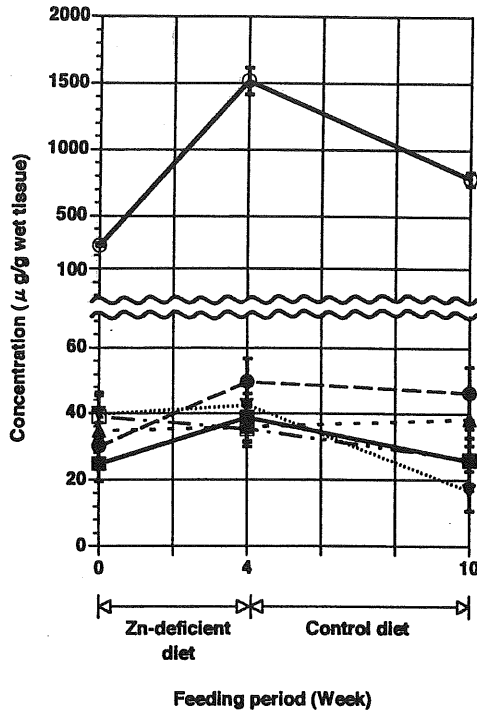
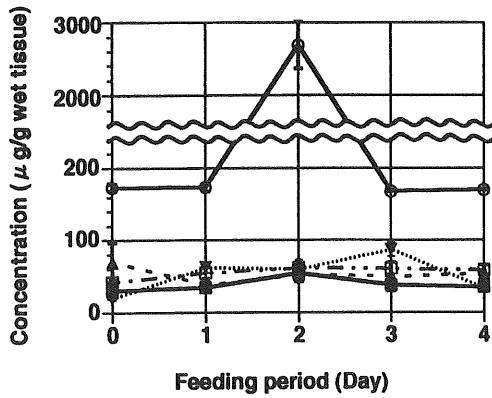


Fig. 1. Movement of calcium concentration in various brain tissues of zinc-deficient rat. SPF Wistar-derived male rats (3 weeks ages) fed with zinc-deficient diet for 4 weeks and after that period a control diet for 6 weeks. Vertical bars denote SE of the mean for 5 determinations.

(—○—) olfactory, (—■—) hippocampus, (---●---) cerebellum, (·-▲-·) medulla oblongata, (····▽····) cortex, (---□---) corpus striatum



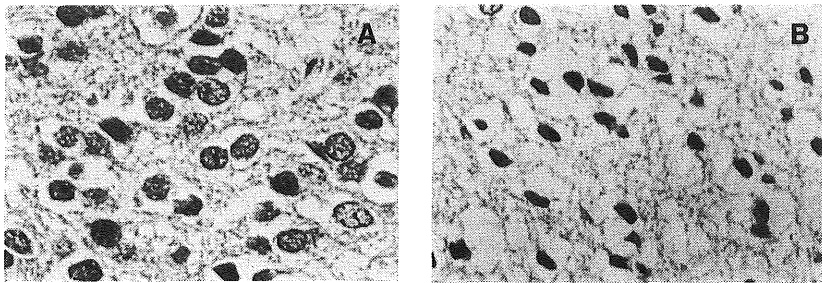
**Fig. 2.** Movement of calcium in various brain tissues of rats which received single i.p. injection of tributyltin chloride (2.0mg per kg body weight). Vertical bars denote SE of the mean for 5 determinations.  
 (—○—) olfactory, (.....▼.....) cortex, (—■—) hippocampus, (---□---) corpus striatum, (.....▲.....) medulla oblongata.

(Fig. 1, 2)。他の有意に変動する微量元素については前報<sup>21)</sup>で報告したので、本稿では割愛する。

## 2. 嗅覚系の異常

### 1) 嗅覚系の病理所見

組織病理学的所見でも、亜鉛欠乏あるいは有機錫暴露のいずれの場合においても嗅球ならびに嗅上皮において神経細胞，特に顆粒ニューロンの破壊が観察された (Fig. 3)<sup>10)</sup>。この細胞死は形態学的にはネクローシスならびにアポトーシスの両方が観察された。

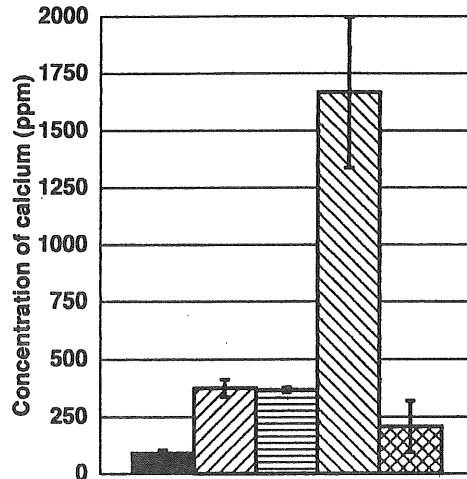


**Fig. 3.** Olfactory cortex, (A) control, (B) tributyltin-treated, 3 days. Extensive destruction of the cortical neurons was observed, x 250.

### 2) カルシウム局在化の程度と有機錫の化学構造の違いとの関連性

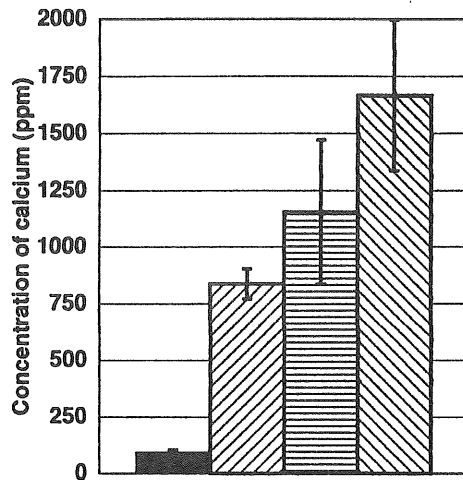
有機錫暴露をモデルにして検討すると、カルシウムの局在化の程度は有機錫の側鎖の数や種類に依存することがわかった。例えばブチル錫では、カルシウム局在化の程度はアルキル基の数の違いによって

$Bu_3Sn \gg Bu_2Sn = BuSn > Bu_4Sn$  の順であった (Fig. 4)。また、トリアルキル錫の間では、その程度はアルキル基の種類の違いによって変動し、 $Bu_3Sn > Pr_3Sn > Me_3Sn$  の順であった (Fig. 5)。これらの結果は嗅覚系に対する有機錫の毒性の強さとも良く一致しており、その中で特にトリブチル錫が最も強



**Fig. 4.** Comparison of the concentration of calcium in the olfactory bulb of rats which received single i.p. injections of various kinds of butyltin compounds (6.144mol/kg body weight). Vertical bars denote SE of the mean for 5 determinations.

(■) : control, (▨) : monobutyltin trichloride, (▤) : dibutyltin dichloride, (▥) : tributyltin chloride, (▧) : tetrabutyltin.



**Fig. 5.** Comparison of the concentration of calcium in the olfactory bulb of rats which received single i.p. injections of various kinds of trialkyltin chlorides (6.144mol/kg body weight). Vertical bars denote SE or the mean for 5 determinations.

(■) : control, (▨) : trimethyltin chloride, (▤) : tripropyltin chloride, (▥) : tributyltin chloride.

く嗅覚系にカルシウムを局在化させるということは注目すべきことであり、嗅覚系へのカルシウムの局在化と嗅覚障害の発症との関連性を解析する上で、極めて重要な糸口となる。

3) 亜鉛欠乏の発症と嗅覚系へのカルシウム局在化との関連性

有機錫暴露の場合と同様に、亜鉛欠乏の発症とともに嗅上皮や嗅球など嗅覚系において特異的なカルシウムの局在化が見られたが、亜鉛欠乏を発症しない群（ここでは亜鉛欠乏耐性群と呼称する）ではこの局在化は見られなかった (Fig. 6)。これは亜鉛欠乏によって特異的に嗅覚系における微量元素とくにカルシウムバランスの調節機構に異常が生じていることを示している。

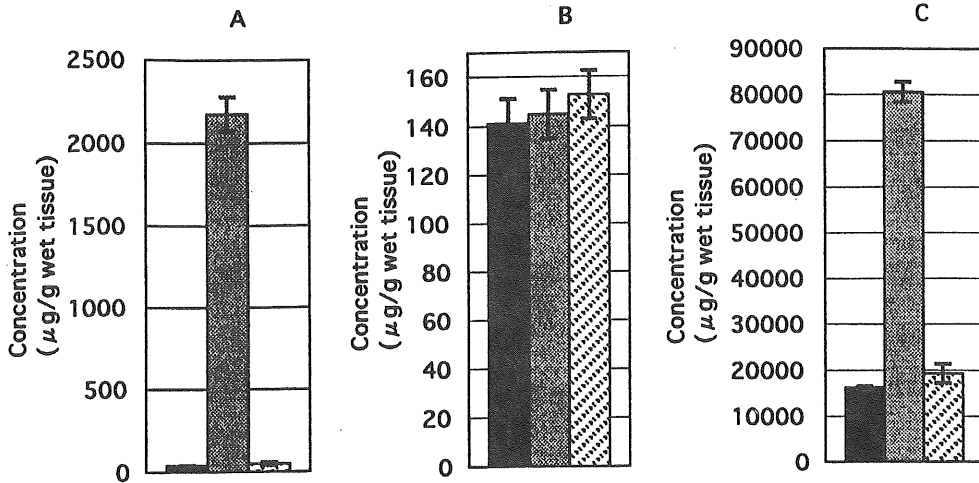


Fig. 6. The comparison of calcium and magnesium concentrations in the olfactory bulb and olfactory epithelium of zinc-deficient rat and its tolerant rat. SPF Wistar-derived male rats (3 weeks ages) fed with zinc-deficient diet or zinc-supplement diet (control diet) for 4 weeks. Vertical bars denote the SE of the mean for 5 determinations.

(A) : calcium in the olfactory bulb, (B) : magnesium in the olfactory bulb, (C) : calcium in the olfactory epithelium  
 (■) : control, (■) : zinc deficiency, (▨) : tolerance for zinc deficiency

3. 嗅覚系へのカルシウム局在化の機序解析

嗅覚情報伝達系では、細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入経路として主に  $IP_3$  作動性チャンネルおよび cAMP 依存性チャンネルの2つのチャンネルの介在が考えられている<sup>22)</sup>。また、細胞内における  $Ca^{2+}$  遊離の機構として小胞体 (ER) からの  $IP_3$  作動性のカルシウム遊離が考えられる (Fig. 10)。

1) 有機錫暴露

Fig. 7 に示す如く、有機錫暴露に伴ってカルシウム過剰増大、cAMP 著増、 $IP_3$  著減、CaM キナーゼ II 活性低下などが見られた<sup>23,24)</sup>。この動的解析結果から、有機錫暴露による嗅球へのカルシウムの過剰蓄積は細胞内ではトリブチル錫による小胞体膜破壊あるいは構造変化といった  $IP_3$  非依存性のカルシウム遊離による増大も考えられるが、量的観点からこの細胞内カルシウム遊離のみでは説明し得ず、細

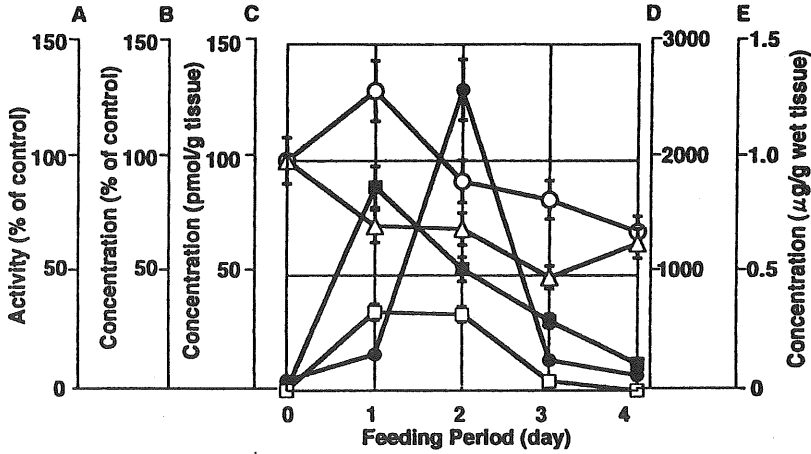


Fig. 7. Changes with the passage of time in the activity of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (○ in the A axis), in the concentration of inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) (△ in the B axis), cAMP\* (□ in the C axis), calcium (● in the D axis), and organotin (■ in the E axis) in the olfactory of rats which received single i.p.injections of tributyltin chloride (2.0 mg/kg body weight). Vertical bars denote SE of the mean for 5 determinations. \*Each cAMP value in the C axis is corrected for the value taken without tributyltin at each feeding period.

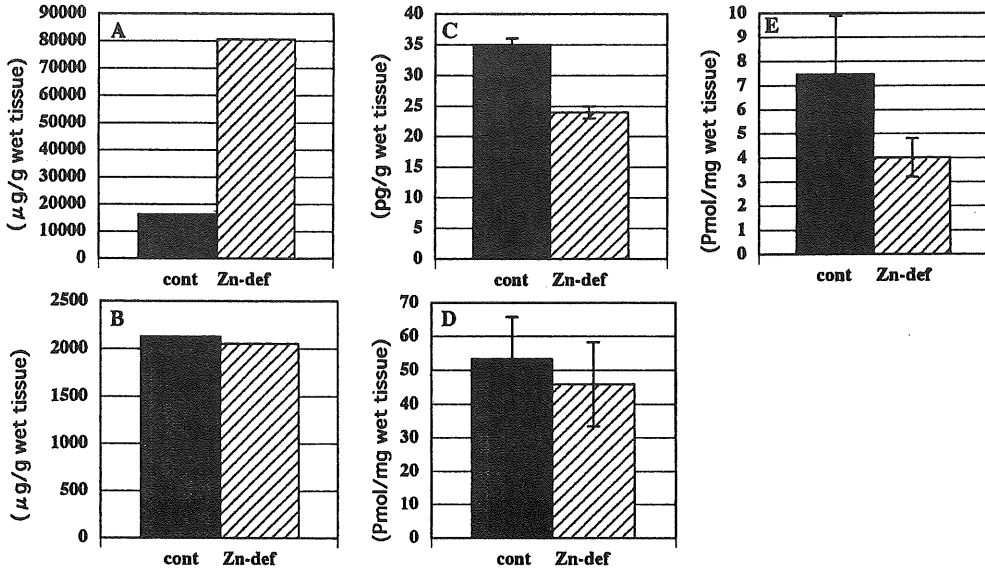


Fig. 8. The relationship of calcium, magnesium, parathyroid hormone (PTH), cAMP and inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) in the olfactory epithelium of zinc-deficient rats, SPF Wistar-derived male rats (3 weeks ages) fed with zinc-deficient diet or zinc-supplement diet (control diet) for 4 weeks. Vertical bars is the mean of SD ; those marked with asterisks differ significantly (student's t test) from the corresponding control value. \* p<0.05 \*\* p<0.01 \*\*\* p<0.001 A : calcium, B : magnesium, C : PTH, D : cAMP, E : IP<sub>3</sub>

胞外からの  $Ca^{2+}$  流入が考えられる。しかも、 $IP_3$  作動性チャンネル介在ではなく、cAMP 依存性チャンネル介在の細胞外  $Ca^{2+}$  の流入が考えられる<sup>23,24)</sup>。

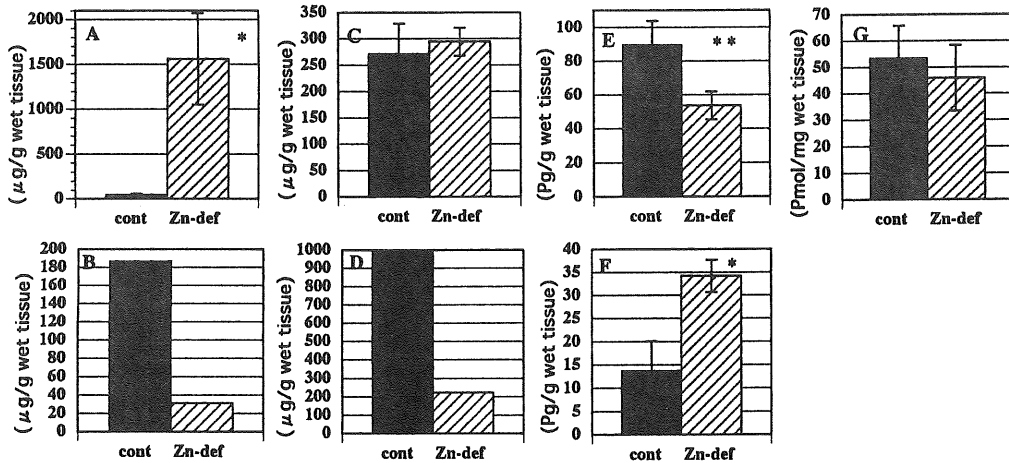
また、有機錫の脳内暴露に伴ってカルシウムの嗅球への著しい移行と嗅球中副甲状腺ホルモン (PTH) の著しい増大とが相関していることから<sup>21)</sup>、嗅球カルシウムの過剰増大の要因の1つとして組織内外 (あるいは細胞外) における PTH の著増が考えられる。即ち、細胞外カルシウム流入の引き金となっていることが考えられる。そして、この結果はとりもなおさず脳内にも PTH 作動機構が存在することを示唆している。ちなみに、ヒツジの下垂体での PTH 産生<sup>25)</sup> や脳内での PTH レセプターの存在<sup>26)</sup> が確認されている。

また、このとき細胞内カルシウム濃度増大に伴って作動する CaM キナーゼ II 活性も過剰カルシウムにより失活し、この酵素作用の異常が細胞死を誘発する要因の一つになっているものと思われる。

## 2) 亜鉛欠乏

亜鉛欠乏症の完成期では、亜鉛欠乏という長期の異常状態によりホメオスタシスが壊れ、種々の代謝系に異常が生じ、ネガティブフィードバック機構の作動あるいは細胞死が誘起されている状態である。

Fig. 8 に示す如く、亜鉛欠乏時の嗅上皮ではカルシウム過剰蓄積、マグネシウム不変、PTH 低下、cAMP 微低下、 $IP_3$  低下などが見られた。また、Fig. 9 に示す如く、嗅球ではカルシウム過剰蓄積、マグネシウム微増大、PTH 低下、cAMP 微低下、 $IP_3$  微低下が見られ、脳脊髄液ではカルシウム低下、マ



**Fig. 9.** The relationship of calcium, magnesium, parathyroid hormone (PTH) and cAMP in the cerebrospinal fluid and olfactory bulb of zinc-deficient rats. SPF Wistar-derived male rats (3 weeks ages) fed with zinc-deficient diet or zinc-supplement diet (control diet) for 4 weeks. Vertical bars is the mean of SD; those marked with astericks differ significantly (student's t test) from the corresponding control value.

\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$

A : calcium in the olfactory bulb, B : calcium in the cerebrospinal fluid, C : magnesium in the olfactory bulb, D : magnesium in the cerebrospinal fluid, E : PTH in the olfactory bulb, F : PTH in the cerebrospinal fluid, G : cAMP in the olfactory bulb.



グネシウム低下, PTH 増大などが見られた。これらの結果をまとめると, 1) カルシウムについては髄液中カルシウムの低下, 組織中カルシウムの増大により髄液から組織へのカルシウム過剰流入が窺える。2) マグネシウムについては変動は量的には少ないが, カルシウム同様, 髄液から組織への流入が窺える。3) cAMP ならびに IP<sub>3</sub> についてはいずれも微低下を示したが, これはネガティブフィードバック機構の作動や代謝系の破綻, あるいは細胞死に因るものであろうと思われる。4) PTH については組織中で著減し, 髄液中で著増した。組織中 PTH の著減は同様に代謝系の破綻や細胞死により PTH のレセプターへの親和性や結合量が低下したためであろうと思われる。また, 髄液中 PTH の著増は髄液中の低カルシウムや低マグネシウムを, あるいは組織中 PTH の著減を改善すべく PTH 産生が亢進され, 髄液中濃度が増大しているものと思われる。

3) 結論

Fig. 10 に嗅覚情報伝達系図を示すが, 有機錫あるいは亜鉛欠乏いずれの場合においても嗅覚系 (特に嗅上皮, 嗅球) へのカルシウムの過剰蓄積, 即ち局在化は脳内特定部位での PTH の著増によるアデニルシクラーゼの活性化とそれに伴う cAMP 過剰産生, そしてこの cAMP の過剰増大による cAMP 依存性カルシウムチャンネルの調節異常, そしてこのチャンネルの調節異常による細胞外カルシウムの過剰流入といった一連のプロセスに因るものであろうと考えられる。

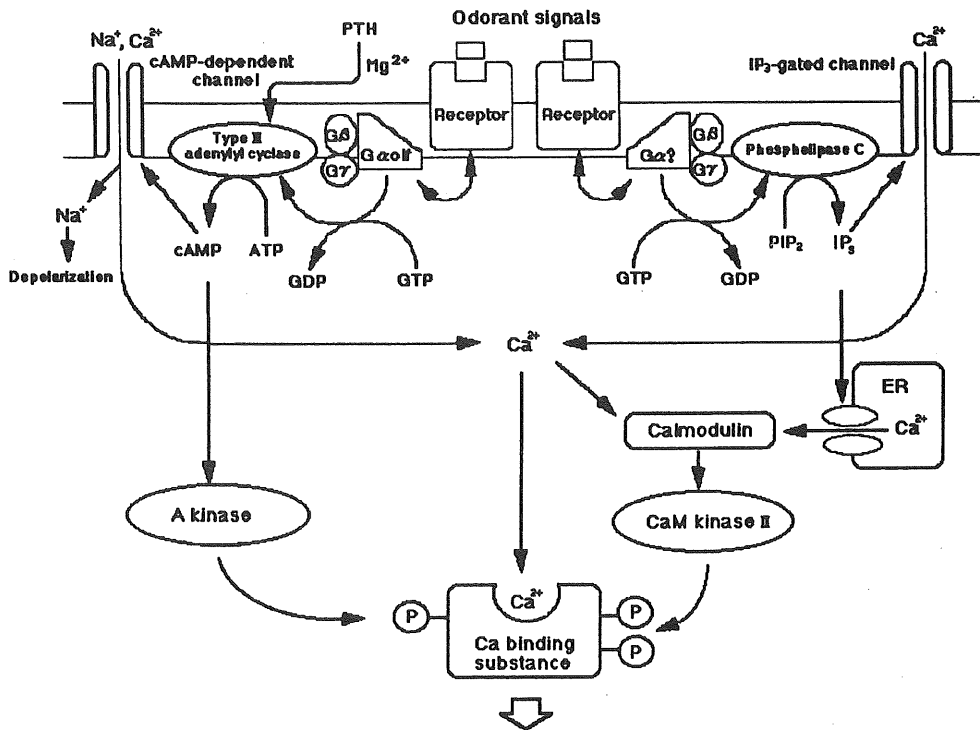


Fig. 10. A scheme of the mechanism proposed for olfactory signal transduction.

## 参 考 文 献

- 1) 荒川泰昭 (1996) : 脳の機能と微量金属—記憶・学習と亜鉛— (総説), *ぶんせき* (日本分析化学会雑誌) 東京, No.6, pp428-435.
- 2) 荒川泰昭 (1995) : 疾患と微量元素—免疫と亜鉛—, *Gut Fronts*, 協和企画通信, 東京, No.4, 7-10.
- 3) 荒川泰昭 (1994) : 総合食品安全辞典 第3章「食品汚染性有機物」, 産業調査会, 東京, pp368-376.
- 4) 荒川泰昭 (1991) : 栄養健康科学シリーズ 公衆衛生学 第12章「金属中毒」, 南光堂, 東京, pp185-187.
- 5) 荒川泰昭, 栗山孝雄, 国友譲他 (1992) : *Biomed. Res. Trace Elements* 3(3) : 319-329.
- 6) 荒川泰昭 (1995) : *Biomed. Res. Trace Elements* 6(3) : 135-136.
- 7) Arakawa, Y. (1995) : Tin and Immunity—Review—*Biomed. Res. Trace Elements* 6(2) : 1-34.
- 8) 荒川泰昭 (1997) : 錫の生物活性と免疫 (総説), *産業衛生学雑誌*, 39 : 1-20.
- 9) Arakawa, Y. et al. (1993) : Chapter 4 Biological properties of alkyltin compounds. in *Metal Ions in Biological Systems, Volume 29, Biological Properties of Metal Alkyl Derivatives.* (Sigel, H., ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A., 101-136.
- 10) Arakawa, Y. (1997) : Chapter 10. Recent studies on the mode of biological action of the di- and tri-alkyltin compounds. in *Chemistry of Tin.* (Smith, P. J., ed), Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, Glasgow, U.K., 388-428.
- 11) Finch, J. L., Rapp, N., Martin, K. J., and Slatopolsky, E. (1992) : *J. Bone and Mineral Res.* 7 : 229-233.
- 12) Calvo, M. S., Gundberg, C. M., Heath, III, H., and Fox, J. (1991) : *Am. J. Physiol.* 261 : E262-E268.
- 13) Garner, S. C., Boass, A., Toverrud, S. U. (1989) : *J. Bone and Mineral Res.* 4 : 577-583.
- 14) Garner, S. C., Peng, T., Toverud, S. U. (1988) : *J. Bone and Mineral Res.* 3 : 319-323.
- 15) Toverud, S. U., Boass, A., Garner, S. C., and Endres, D. B. (1986) : *Bone and Mineral*, 1 : 145-155.
- 16) Challiss, R. A. J., et. al. (1988) : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157 : 684.
- 17) Brecht, D. S., et. al. (1989) : *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159 : 976.
- 18) Steiner, A. L., Parker, C. W. and Kipnis, D. M. (1972) : *J. Biol. Chem.* 247 : 1106.
- 19) Steiner, A. L., Pagliara, A. S., Chase, L. R. and Kipnis, D. M. (1972) : *J. Biol. Chem.* 247 : 1114
- 20) Ochiishi, T., et. al. (1992) : *Brain Res.* 610 : 97-107.
- 21) 荒川泰昭, 平野裕司, 村田純子他 (1995) : 微量栄養素研究 第12集, 107-112.
- 22) Reed, R. R. (1992) : *Neuron* 8 : 205-209.
- 23) 荒川泰昭, 伊倉宏一, 吉成章子他 (1996) : 微量栄養素研究 第13集, 63-67.
- 24) 荒川泰昭, 伊倉宏一, 吉成章子他 (1996) : *Biomed. Res. Trace Elements* 7(3) : 221-222.
- 25) Balabanova, S., Peter, J. and reinhardt, G. (1986) : *Klin. Wochenschr* 64 : 173-176.
- 26) Harvey, S. and Hayer, S. (1993) : *Peptides* 14 : 1187-1191.