研 究

甲状腺機能低下と嗅覚障害の実験的研究

木村 恭之・土定 建夫・坂下 英雄
作本 真・三輪 高喜・古川 俣

Olfactory Disturbance in Hypothyroid Mice

Yasuyuki Kimura, Takeo Donjyo, Hideo Sakashita,
Makoto Sakumoto, Takaki Miwa and Mitsuru Furukawa
(Kanazawa University)

In adult humans, hypothyroidism has been associated with a reduced sense of smell. There are few reports on the effect of hypothyroidism on the sense of smell in adult animals. We examined whether hypothyroidism abolishes the sense of smell in adult mice and examined the changes of the olfactory epithelium. Hypothyroidism was produced in adult mice by addition of thiamazole to their drinking water or intra-peritoneal injection. The olfaction of mice was estimated by successful recording of behavioral task, using cycloheximide, which has been commonly used as a repellent in rodents. The sense of smell was tested before, during, and after thiamazole treatment. Thyroid function was assessed by radioimmunoassay of blood serum for free thyroxine. The mice were killed after treatment and the olfactory epithelium was studied at the light microscopic level to determine the effects of thiamazole treatment.

Mice given 0.01% thiamazole in the drinking water for 100 days were not hyposmic. The control mice given tap water to drink for 100 days maintained their sense of smell. Mice given daily intra-peritoneal injection of 0.5 mg thiamazole for 100 days were not hyposmic. Daily i. p. injection of 1.5 mg thiamazole to the mice for 20 days attenuated their sense of smell. By contrast, the control mice, given daily i. p. injection of 0.1 ml normal saline were normosmic. In the olfactory epithelium of the hypothyroid and hyposmic mouse, the structures composed of basal cells, olfactory cells, and supporting cells were preserved. However, a marked decrease was observed in the number of olfactory cells. These findings indicate that hypothyroidism produces olfactory disturbance in mice and injures the olfactory receptor neurons.

Key words: hypothyroidism, olfaction, mice, behavior

はじめに

内分泌障害と嗅覚障害の関連については古くから関心が払われてきた。女性においては生理のサイクルで嗅覚域値が変化したり¹⁾、偽副甲状腺機能低下症で嗅覚障害がみられる²⁾といった報告がある。臨床的に最も注意が払われてきたのは甲状腺機能低下症における嗅覚障害であるが、両者に明らかな関連があるとするもの、知能低下があるために一見関連があるようにみえるだけだとするものなど種々の意見がある。

実験的な検討の報告はさらに少なく、味覚と甲状腺機能低下についての検討は数編みられるが³⁾⁴⁾、嗅覚と甲状腺機能低下については Mackay-Sim らのグループの研究⁵⁾⁶⁾がみられるのみである。そこでわれわれは成熟マウスに対して抗甲状腺剤を用いて甲状腺機能低下状態を作製した。この報告ではこれらのマウスが実際に嗅覚障害をおこしているか、おこしているとすればどの程度の嗅覚障害かをわれわれの開発した行動学的手法で観察した上で、嗅上皮を組織学的に観察し、障害の原因を検討したので報告する。

材料および方法

1. 実験材料

ddY-conventional 成熟雄マウス(体重 30～50 g)60匹を用い、各10匹ずつ下述のAからE群の6群に分けた。

2. 実験方法

1) シクロヘキシミドについて

シクロヘキシミドについてはわれわれの以前の報告⁷⁾⁸⁾で詳述されているので、ここでは実験的に解明されているシクロヘキシミドのネズミに対する忌避作用機序について簡単に述べる。シクロヘキシミドはネズミには強く感じる特異なニオイを有するが、ネズミはこのニオイだけではシクロヘキシミドを忌避しない。ネズミが嫌うのはシクロヘキシミドの味または口腔粘膜への刺激で、ネズミの口腔に強制的にシクロヘキシミドを注入するとネズミは唾液を出し、口を床面につけてもがく。シクロヘキシミドはネズミにとってよほど嫌な味または口腔粘膜への

刺激性を有しているものと思われ、一度なめただけでその時のニオイと味を記憶し、その後はニオイだけで忌避し飲まなくなるものと考えられる。

2) 嗅刺激性行動についての検討

実際の実験装置を図1に示した。

飼料は任意に与えたがマウスを渴の状態にするために48時間飲水させなかった後、マウス飼育ケージに0.01%シクロヘキシミド水の入った給水びんと水道水の入った給水びんを備えた。ここにマウスを1匹ずつ入れマウスがどちらの給水びんから飲水するかを10分以内の観察時間で各マウス最高10試行ずつ調べた。1回ごとにゲラーマン系列に従って給水びんの位置を替えた。水道水を飲んだ場合を正解とし、シクロヘキシミド水を飲んだ場合をエラーとした。正解数を試行回数で除したものを正解率(%)とした。以上を第1回目の学習とした。第1回目の学習終了後、マウスに十分な飲水をさせた。その後給水びんをはずし水分を与えないようにして48時間後に同様の実験を行い、第2回目の学習とした。この後、処置開始後20日目・50日目・100日目に行動実験を行った。

結果は Scheffe の一元配置分散分析により統計学的に検討した。

3) 甲状腺機能低下状態の作製

抗甲状腺剤のチアマゾルを用いた。

A群(n=10):チアマゾル0.01%を含有した

図1 実験装置

写真撮影のためケージの蓋を半分取り去ってある。

水道水を100日間飲水.

B群 (n=10): 水道水100日間飲水.

C群 (n=10): チアマゾル 0.5 mg を100日間
腹腔内投与.

D群 (n=10): 生理食塩水 0.1 ml を100日間
腹腔内投与.

E群 (n=10): チアマゾル 1.5 mg を50日間
腹腔内投与.

F群 (n=10): 生理食塩水 0.1 ml を50日間腹
腔内投与.

4) 飲水量測定

A群とB群において, 20日間の飲水量を測定した.

5) 甲状腺ホルモンレベルの測定

C群とD群から5匹ずつを選び, 100日間投与終了後, 麻酔下で心臓から採血し, free thyroxine (FT₄) レベルをラジオイムノアッセイで測定した.

6) 組織学的検討

E群とF群の20匹について50日間処置終了後に光学顕微鏡観察の試料採取のため断頭した. 切断した頭部を70%エタノール・ホルマリン 20 ml・氷酢酸 5 ml の混液で2日間浸漬固定し, Plank-Rychlo 液で脱灰, 5%硫酸ナトリウム溶液にて中和, エタノール系列で脱水後セロイジンに包埋, 20 μ の冠状断切片とし, ヘマトキシリン-エオジン染色を施した.

上記の20匹を用いて, 以下の定量的観察を行った. 嗅上皮の厚さを定点にて測定した. 定点は上顎洞と篩骨甲介と上出⁹⁾のいう第1外鼻介が同時に観察される面で鼻中隔面の天蓋から250 μ m 下方の点とした. 1匹について左右の2点を測定した.

総細胞数を上記の地点から鼻中隔上端までの250 μ m において計測した. 総細胞数も1匹について左右を測定した.

結 果

1. 飲水量について

A群, B群においてチアマゾル水と水道水の20日間の飲水量は1匹あたりそれぞれ4.16

ml/日, 5.54 ml/日であり, 飲水量に有意差は認めなかった ($p>0.05$). この実験に先立ち0.1%チアマゾル水を飲水させてみたが, 1匹あたり1.7 ml/日であり, B群と比較して有意に少なかった ($p<0.01$). ちなみに0.1%チアマゾル水の入った給水びんの横に水道水の給水びんを置くとマウスはこちらをむさぼるように飲んだため, 0.1%ではチアマゾルの苦みが強くマウスはかなり渇水状態にあると考えられた. 以後の実験では0.01%チアマゾル水を飲水させた群をA群とした.

2. 行動学的実験結果

1) チアマゾル水飲水群(図2)

第1回目の正解率はA群85.4%, B群87.1%であった. 第2回目の正解率は両群ともに100%となり, 学習が完了したものと考えられた. 処置開始から20日後ではA群は93.9%, B群は97%であった. 50日後ではA群93%, B群97%であったが, 両群に有意差は認めなかった ($p>0.05$). 飲水100日後でもA群の正解率は99%であり嗅覚障害はおこらなかった.

2) チアマゾル 0.5 mg 腹腔内投与群(図3)

C群とD群(生理食塩水腹腔内投与群)を比較した. C群の正解率は処置開始20, 50, 100日後で, それぞれ99.1%, 97.6%, 93.3%であり, 対照群と比較して有意差を認めず, 嗅覚障害はおこらなかった.

図2 嗅刺激性行動 1

○0.01%チアマゾル水飲水 (A群)

●水道水飲水 (B群)

3) チアマゾル 1.5 mg 腹腔内投与群(図 4)

E 群と F 群(生理食塩水腹腔内投与群)を比較した. E 群の正解率は処置開始20日後で80.5%に低下した. この時対照群の F 群は100%であり, 両群の正解率に有意差を認めた ($p < 0.05$). 処置開始から50日後でも78.8%であり, 対照群の100%と比較してやはり有意差を認めた ($p < 0.01$). 以上から処置開始後20日で嗅覚障害が発症し継続していたと考えられた.

4) 血中甲状腺ホルモンレベルの測定(図 5)

C 群(チアマゾル 0.5 mg 腹腔内投与群)では行動学的には嗅覚障害はおこらなかったが, T_4 レベルは例数が5例ずつと少ないが D 群に

図 5 血中甲状腺ホルモンレベル (free T_4)

図 3 嗅刺激性行動 2

○ 0.5 mg チアマゾル腹腔内投与 (C 群)
● 0.1 ml 生理食塩水腹腔内投与 (D 群)

図 4 嗅刺激性行動 3

○ 1.5 mg チアマゾル腹腔内投与 (E 群)
● 0.1 ml 生理食塩水腹腔内投与 (F 群)

図 6 甲状腺機能低下マウスの嗅上皮

A. 弱拡大. S: 鼻中隔 I: 第 I 内鼻介 II: 第 II 内鼻介 1: 第 1 外鼻介 ◀: 嗅上皮の厚さを測定した定点, 天蓋から 250 μ m (H-E 染色 $\times 40$)
B. 強拡大. 嗅細胞層の著明な脱落をみる (H-E 染色 $\times 400$)

比し有意に低下していた ($p < 0.01$).

5) 組織学的検討

E群(チアマゾル 1.5 mg 腹腔内投与群)のマウスのほとんどに図 6 のように嗅細胞層の細胞数が明らかに減少している領域がかなりの範囲で観察された. しかし基底細胞層, 支持細胞層は維持されていた. 嗅上皮の厚さについては, E群では平均 $55.5 \pm 11.5 \mu\text{m}$, F群では $69.5 \pm 12.1 \mu\text{m}$ であり, やや対照群の方が厚かったが, 有意差はみられなかった ($p > 0.05$). 総細胞数についてはE群では 124.7 ± 42.7 個, F群では 233.6 ± 28.2 個であり, 甲状腺機能低下群では有意に細胞数が減少していた ($p < 0.05$) (表 1).

考 察

内分泌ホルモンと嗅覚障害との関連についてはいくつかの報告がみられる. Doty ら¹⁾は女性においては生理のサイクルで嗅覚域値が変化し, 生理と生理のちょうど間が最も鋭敏となるが, サイクルによる変化は経口避妊薬を飲んでいる人でもそうでない人でもおきるとしている. また逆にアジソン病では未治療な症例は嗅覚がよくなり, ステロイドで治療するとふつうのレベルに戻るとされている¹⁰⁾.

内分泌障害の中では, 嗅覚障害との関連の報告がいくつかみられるのは甲状腺機能低下症である. McConnell ら¹¹⁾はピリジンとニトロベンゼンで甲状腺機能低下症患者 18 人について調べた. 特に検知域値の上昇が明らかであったが, 治療により改善したとしている. それに対し Lewitt ら¹²⁾は 16 人の患者と 17 人の対照群について調べた. 検知域値は両群間に有意差はな

かったが, 認知域値は対照群の方が有意に成績が良かったとしている. しかし彼らの報告では対照群の平均年齢が患者群に比べて約 6 歳若く, この影響を無視できないとしている. また味覚障害についても, 嗅覚障害よりも報告は多いが意見は一致していない. ちなみに McConnell ら¹¹⁾は低下していたとしているが, Lewitt ら¹²⁾は主観的にも客観的にも低下していなかったとしている.

実験的に甲状腺機能低下症と味覚障害の関連を論じた報告はいくつかみられる. Fregly ら⁴⁾はプロピールチオウラシルを多く与えて甲状腺機能低下症を作ったラットでは, 普通のラットに比べて濃度の濃い食塩水を多く摂取するとしている. Rivlin ら³⁾は甘味・苦味・酸味・辛味の種々の濃度のびんと普通の水のびんを用意しておき, 2 つのびんの水の消費量を測定したところ, 放射性ヨードを与えて作った甲状腺機能低下ラットは, 甘い水は対照群に比べて消費量が少なく, 苦い水・辛い水は逆に消費量が多かったとしている. この結果を直接的に味覚障害に結論づけることはできないが, 甲状腺機能低下によりラットの味覚嗜好が変化するのは確実のようである.

しかし, 嗅覚障害と甲状腺機能低下の関連を論じた報告はほとんどない. Beard ら⁵⁾はプロピールチオウラシルの 0.1% 水を 50 日間飲水させたところ嗅覚障害が発症したとしている. われわれは同じ抗甲状腺剤でもチアマゾルを用いたが, 当初は 0.1% の溶液を飲水させてみた. しかし, 苦すぎるためか, 飲水量が対照群と比較して極端に少なかった. そこで濃度を 0.01% に下げたわけであるが, 0.01% チアマゾル水飲水を 100 日間続けても嗅覚障害は発症しなかった. このため, 甲状腺機能低下状態を作製するには腹腔内投与が確実であろうと考え 0.5 mg 投与群と 1.5 mg 投与群を作った. マウスの体重を 40 g と仮定すると, 0.5 mg 投与はヒトに換算すると極量の 10 倍, 1.5 mg 投与は極量の 30 倍投与になる. 0.5 mg 投与では嗅覚障害が

表 1 嗅上皮の厚さと総細胞数

	甲状腺機能低下群 (E群)	対照群 (F群)
嗅上皮の厚さ (μm)	55.5 ± 11.5	69.5 ± 12.1
	$p > 0.05$	
総細胞数 (個)	124.7 ± 42.7	233.6 ± 28.2
	$p < 0.05$	

おきなかったことはヒトとマウスの薬剤に対する耐容性の違いにその根拠を求めざるを得ない。マウスでは極量の10倍投与で嗅覚障害が発症しなかったが、ヒトでも極量10倍投与で発症しないとはいき切れないし、1.5 mg 投与で行動学的にも組織学的にも嗅覚障害が発症したことは、臨床的に嗅覚障害を合併する患者が存在することを示唆している。

甲状腺機能低下によりマウスに嗅覚障害がおきたことは行動学的には証明できたが、この嗅覚障害はどのような機序でおきるのだろうか。これを確認するためヘマトキシリン-エオジン染色でE群(チアマゾル 1.5 mg 腹腔内投与群)とF群を比較検討した。鼻腔内の滲出物は両群とも少なく、甲状腺機能低下が感染を惹起して、臨床的にいう呼吸性嗅覚障害の状態となったことは否定的であった。両群の嗅上皮の総細胞数は有意にE群で少なく、上皮の厚さはE群の方がやや薄かったものの有意差がなかったことを考え合わせると、嗅上皮の枠組を変化させるほどの強烈な組織学的変化ではないが、かなりの数の嗅細胞が死滅しており、嗅粘膜性嗅覚障害がおきていることがわかった。ただし今回の観察では嗅上皮の細胞分裂の頻度が減少しているのか、分裂頻度は正常であるが分裂後に成熟ニューロンになる過程で死滅してしまうのかは検討できなかった。この点については現在、免疫組織化学的に検討中である。

甲状腺ホルモンは中枢神経系の発達に不可欠なもので、欠如することにより臨床的にはクレチン病の発症をみる。しかし、成熟後の神経系に甲状腺ホルモンがどのような役割を演じているかについては不明な点が多い。

末梢組織において、サイロキシンは脱ヨード化されて T_3 となり、核に存在する T_3 レセプターに結合する¹³⁾。ラットの脳には T_3 レセプターが存在することがわかっており¹⁴⁾、ニューロトランスミッターとしての T_3 の作用も考えられている。嗅覚路への直接の影響としては、Closら¹⁵⁾は甲状腺機能低下ラットを作製し、

嗅球のDNA含有量は処置30日間で20%減少したが、細胞の大きさには変化がなかったと報告している。またMadeiraら¹⁶⁾は直接の嗅覚路ではないが歯状回の顆粒細胞層の細胞数が甲状腺機能低下ラットで減少したと報告している。マウスでは生後でも中枢神経系の一部では細胞分裂がおこっていることがわかっている。ただ、中枢神経系に対し、甲状腺機能低下状態が細胞分裂に影響し細胞数自体の減少を引き起こすのか、細胞数には影響せず細胞内の機能低下を起こすのかはわかっていない。少なくとも、嗅球等の機能が障害されればシナプスを作っている嗅神経細胞にも変化が現れてくると考えられる。われわれの実験でおこった嗅上皮の変化は中枢レベルでの変化が反映した結果とも考えられ、「嗅粘膜性+中枢性」の嗅覚障害であろうと現在は考えているが、嗅球および高次部分の観察が必須であるため、現在この点について検討中である。

まとめ

チアマゾルによりマウスに甲状腺機能低下状態を作製し、この時のマウスの嗅覚機能について検討した。チアマゾル 1.5 mg 連日腹腔内投与20日間で行動学的に嗅覚障害をきたした。処置50日後の嗅上皮の厚さは対照群に比べ有意差はみられなかった。総細胞数は有意に減少しており、減少は嗅細胞にみられ、支持細胞、基底細胞に変化はみられなかった。この嗅覚障害は少なくとも嗅粘膜性といえるが、文献的に甲状腺機能低下が脳内に及ぼす影響が解明されつつあり、中枢性嗅覚障害との関連も推察された。

参考文献

- 1) Doty RL, Ford M, Preti G, et al: Human vaginal odors change in pleasantness and intensity during the menstrual cycle. *Science* **190**: 1316~1318, 1975.
- 2) Henkin RI: Impairment of olfaction and of the taste of sour and bitter in pseudohypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* **28**: 624~628, 1968.

- 3) Rivlin RS, Osnos M, Rosenthal S, et al : Abnormalities in taste preference in hypothyroid rats. *Am J Physiol* **232** : 80~84, 1977.
- 4) Fregly MJ and Waters IW : Effect of propylthiouracil on preference threshold of rats for NaCl solutions. *Proc Soc Exp Biol Med* **120** : 637~640, 1965.
- 5) Beard MD and Mackay-Sim A : Loss of sense of smell in adult, hypothyroid mice. *Dev Brain Res* **36** : 181~189, 1987.
- 6) Mackay-Sim A and Beard MD : Hypothyroidism disrupts neural development in the olfactory epithelium of adult mice. *Dev Brain Res* **36** : 190~198, 1987.
- 7) Kimura Y, Miwa T, Furukawa M, et al : Effects of topical application of steroids on olfactory disturbance in mice. *Chem Senses* **16** : 297~302, 1991.
- 8) 木村恭之, 上出文博, 宮崎為夫, 他 : マウスの嗅刺激性行動に関する研究 —防鼠剤ナラマイシンを使用して—. *耳鼻臨床* **80** : 469~475, 1987.
- 9) 上出文博 : マウス鼻粘膜嗅部の拡がりと微構造, ならびに $ZnSO_4$ 溶液点鼻によるその変性と再生について. *十全医会誌* **89** : 1~23, 1980.
- 10) Henkin RI and Bartter FC : Studies on olfactory thresholds in normal man and in patients with adrenal cortical insufficiency ; the role of adrenal cortical steroids and of serum sodium concentration. *J Clin Invest* **45** : 1631~1639, 1966.
- 11) McConnell RJ, Menendez CE, Smith FR, et al : Defects of taste and smell in patients with hypothyroidism. *Am J Med* **59** : 354~364, 1975.
- 12) Lewitt MS, Laing DG, Panhuber H, et al : Sensory perception and hypothyroidism. *Chem Senses* **14** : 537~546, 1989.
- 13) 阿部好文 : T_3 と核レセプター. *代謝* **21** : 403~411, 1984.
- 14) 稲田満夫 : 脳における甲状腺ホルモンの代謝と作用機序に関する研究. *日本医師会雑誌* **91** : 569~574, 1984.
- 15) Clos J and Legrand Ch : An interaction between thyroid hormone and nerve growth factor promotes the development of hippocampus, olfactory bulbs and cerebellum ; a comparative biochemical study of normal and hypothyroid rats. *Growth Factors* **3** : 205~210, 1990.
- 16) Madeira MD, Cadete-Leite A, Andrade JP, et al : Effects of hypothyroidism upon the granular layer of the dentate gyrus in male and female adult rats ; a morphometric study. *J Comp Neurol* **314** : 171~186, 1991.

(原稿受付 : 平成 4 年 3 月 25 日
原稿採択 : 平成 4 年 5 月 25 日
別刷請求先 : 木村恭之
〒920 金沢市宝町13-1
金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室)