

平成 29 年度 水俣病研究報告書

研究課題名：メチル水銀中毒の神経細胞障害物質，および筋萎縮性側索硬化症（ALS）との関連についての検討

報告者：

新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野 金澤雅人 下畑享良

目的：

平成 28 年度まで行ってきた検討の結果，血液脳関門の破綻が病態を悪化させている可能性が考えられた．血液脳関門の破綻により血管内から脳実質に流入する細胞障害性物質の同定，および近年，水銀曝露との関連が指摘されている ALS への影響について解明するための戦略を検討する．

方法：

1. メチル水銀が全身において与える影響を，ヒト，動物を問わず，既報について検索を行なう．もし有望な神経細胞障害物質の候補が同定できた場合には，国立水俣病総合研究センターと相談の上，ラットメチル水銀中毒モデルを用いて，ELISA や免疫染色による脳の部位ごとの含有量の比較を行なう計画を行なう．
2. メチル水銀と ALS 発症の関係については，第 69 回米国神経学会に発表する Stommel ら（Dartmouth College in Hanover）と議論を行う．新潟水俣病における ALS の発症の有無を確認するとともに，本邦 ALS においてもメチル水銀が危険因子になりうるのかの研究計画を検討する．

結果：

1. 有望な神経細胞障害物質の候補の検討
米国国立医学図書館文献データベース Pubmed に “methylmercury” と “neurotoxicity” の二つの用語の掛け合わせの検索を行った．’ 48 年から本年 2 月までに，646 報の文献がヒットした．過酸化酸素（117 報）1）やミトコンドリア代謝異常（45 報）2）を介する神経毒性が複数報告されていた．

2. メチル水銀中毒と ALS 発症の関連

・第 69 回米国神経学会に発表する Stommel らと議論

米国北東沿岸部バーモント州，ニューハンプシャー州の質問表を用いた ALS 例 (N = 294) と Clinic 対照例 (N = 224) を比較した検討であった。比較的魚の摂取，釣りをする人が多い地域での検討であった。釣り自体は ALS 発症のリスクにならないが (オッズ比 1.1 95%CI 0.7-1.7)，魚の消費は ALS 発症のリスクであった (オッズ比 2.2 95%CI 1.1-5.0)。魚由来の年間水銀摂取量を 1000 μg 以上と未満で分けた解析では，1000 μg 以上では，ALS 発症のオッズ比が 2.53 (95%CI 1.13-5.89, P = 0.027) であった。ただし，彼らは健康のため魚を食すことを否定する結果ではないとのことであった。

同報告はさらに検討を加え，2018 年 1 月 Muscle&Nerve 誌に結果が報告された 3)。メチル水銀蓄積のバイオマーカーである足爪のメチル水銀値測定を行ったところ (ALS 例 N = 46，対照例 N = 66)，ALS 例では平均 0.19 $\mu\text{g/g}$ ，対象例では平均 0.11 $\mu\text{g/g}$ と ALS 例で有意に高値であった (P = 0.022) (図 1)。

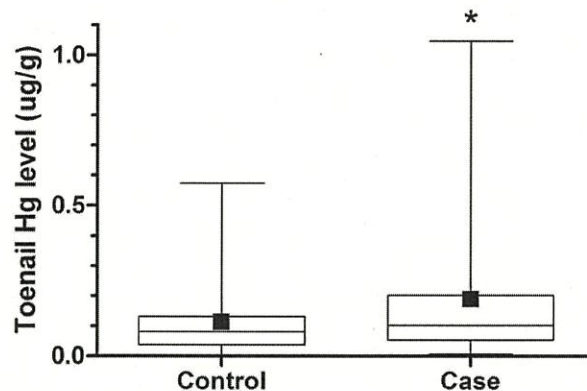


図 1 ALS 例 (Case) と対照例 (Control) の足爪のメチル水銀値

・新潟大学脳研究所神経内科入院患者データベースの検討

当科データベースを用いて，ALS 症例と水俣病症例を検索し，合併例が存在するか検討した。

当科入院症例データベースでは，当科開講'65年から2017年までに13000例の入院例が存在した。うち，水俣病と確定診断した症例は，58例存在し，ALSと診断確定した例は633例存在していた。'72年にALSと診断した6年後に水俣病の合併と診断した60歳男性例も存在していたが，当時はCT，MRIも存在しない状態で，ALSの診断そのものが正しいのかは定かではなく (剖検となったかも不明)，少なくとも直近の40年間では両者の合併例は認めなかった。

考察とまとめ：

1. 有望な神経細胞障害物質の候補の検討

文献上は、メチル水銀中毒に対して、過酸化酸素やミトコンドリア代謝異常に対する治療が候補となるかもしれないことが明らかとなった。実際の臨床応用としては、フリーラジカルスカベンジャーのエダラボン点滴やコエンザイム Q10 内服が考えられる。ただし、前者は慢性経過のメチル水銀中毒に投与し続けるのは現実的でなく、候補としては、後者の内服は考えられた。今後の検討につなげたい。

2. メチル水銀中毒と ALS 発症の関連

ALS 発症にメチル水銀がリスクとなっていることは症例報告 4) やケースシリーズ 5) で報告されていた。その一方で、疫学上は、関連はないとされていた 6)。

今回の、Stommel ら発表では、足爪の水銀値は ALS 例で対照群より有意に高いものの、ALS 例では値のばらつきが大きく、対照群とかなり重なりがあるものであった。また、水銀摂取の推定量が年間 1000 μg 以上では、ALS 発症のオッズ比が 2 倍以上となるものの、魚や海産物由来のほかの毒素の影響もあるのかも知れず、本当に ALS のリスクに関係するのかは定かでない。また、当科入院 ALS 例においては、水俣病合併例はこの 40 年存在していなかった。日本における発症率は 1.1~2.5 人/10 万人/年と見積もられる。それを踏まえると、当科の ALS と診断した症例数は、下越地域の医療圏をカバーする症例数であり、下越地域での ALS 発症と水俣病の因果関係は明らかではないと考えた。さらに、本邦の文献検索サービス医中誌でも 1960 年から本年において、“水俣病” と ALS “の検索語では、会議録も含めて、合併例の報告はされていなかった。以上から、本邦において、メチル水銀中毒と ALS 発症には関連に乏しいと考えた。

本研究の結果は、今後の水俣病の病態の解明、および治療の開発に大きく貢献するものと考えられる。

文献

- 1) Farina M, Aschner M. Methylmercury-Induced Neurotoxicity: Focus on Pro-oxidative Events and Related Consequences. *Adv Neurobiol.* 2017;18:267-286.

- 2) Huang SS, Noble S, Godoy R, et al. Delayed effects of methylmercury on the mitochondria of dopaminergic neurons and developmental toxicity in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol.* 2016;175:73-80.
- 3) Andrew AS, Chen CY, Caller TA, et al. Toenail mercury Levels are associated with amyotrophic lateral sclerosis risk. *Muscle Nerve.* 2018 Jan 4. doi: 10.1002/mus.26055.
- 4) Praline J, Guennoc AM, Limousin N, et al. ALS and mercury intoxication: a relationship? *Clin Neurol Neurosurg.* 2007;109:880-3.
- 5) Qureshi MM, Hayden D, Urbinelli L, et al. Analysis of factors that modify susceptibility and rate of progression in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Amyotroph Lateral Scler.* 2006;7:173-82.
- 6) Gresham LS, Molgaard CA, Golbeck AL, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and occupational heavy metal exposure: a case-control study. *Neuroepidemiology.* 1986;5:29-38.

水俣病、緑内障の Swept Source OCT を用いた視野推定

新潟大学大学院医歯学総合研究科視覚病態学分野

福地健郎

はじめに

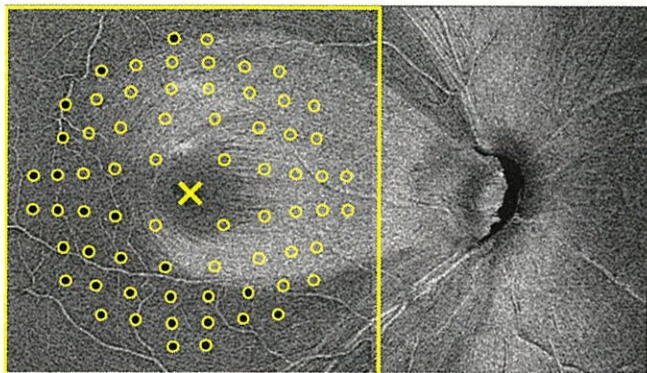
水俣病患者および緑内障患者は中心視野が悪化することにより生活の質 (QOL)、視覚の質 (QOV) が低下する。生涯にわたって必要最低限の視野を維持することが治療の目標となり、視野検査には一般的にハンフリー自動視野計が用いられる。しかし、ある程度の慣れが必要なこと、座位で 10~15 分程度の時間が必要なことから、高齢者や疾患の症状により安静が保てない症例などでは視野の把握が困難となる。その点 Swept Source Optical Coherence Tomography (SS-OCT) は数秒という短時間で撮影ができ、その後の画像処理により得られる En-face 画像から中心 10 度以内の視野を推定することができれば、検査が困難な患者や信頼性の高い検査結果が得られない患者などでは有効であると考えられた。

対象

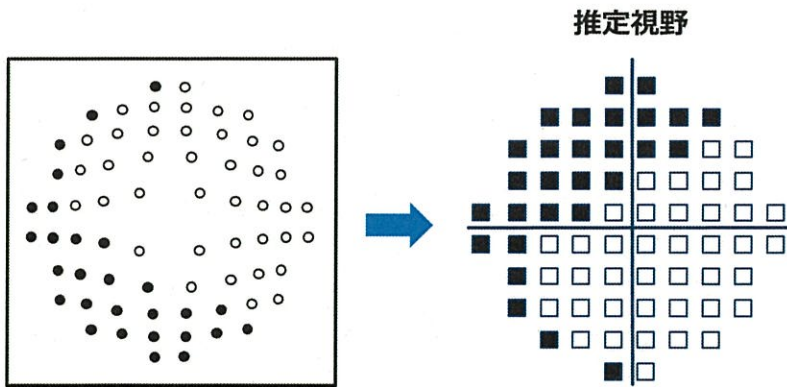
新潟大学医歯学総合病院眼科通院中の水俣病、広義・POAG 患者のうち SS-OCT 撮影を行い良好な画像が得られた 38 眼 (男性 19 例 19 眼、女性 19 例 19 眼) を対象とした。年齢の平均は 56.5 ± 9.7 歳。網膜疾患や視神経疾患など視野検査の感度に影響を及ぼす可能性のある疾患や En-face 画像に影響を及ぼす黄斑上膜などを有する患者は除外した。

方法

SS-OCT によって黄斑部と視神経乳頭の 6×6 mm の 3D 画像を取得し、画像閲覧ソフトで内境界膜面に沿った En-face 面を抽出し神経線維束 (NFB) を観察した。その画像上に RGC displacement を用いて、ハンフリー 10-2 に対応する検査点を重ね合わせ、それぞれの検査点における NFB 欠損を「あり」、「なし」に分類した。



次に上下反転させ、推定視野を作成した。



推定視野と実際に測定された視野（ハンフリー10-2）を比較し、この検査の有用性を検討した。この際に、トータル偏差（TD）とパターン偏差（PD）における<5%、<2%、<1%の検査点を視野欠損と定義し、6パターンで比較した。

結果

全68検査点におけるκ係数による一致度は0.67~0.78であった。TDの1%未満の点を視野欠損と定義した場合が最も一致率が高かったが、他と比べても大きな差はなかった。

TD

PD

1%	HFA (+)	HFA (-)
OCT(+)	真陽性：1012	偽陽性：147
OCT(-)	偽陰性：138	真陰性：1287

1%	HFA (+)	HFA (-)
OCT(+)	真陽性：988	偽陽性：174
OCT(-)	偽陰性：120	真陰性：1302

$\kappa=0.78$

$\kappa=0.77$

2%	HFA (+)	HFA (-)
OCT(+)	真陽性：1066	偽陽性：93
OCT(-)	偽陰性：230	真陰性：1195

2%	HFA (+)	HFA (-)
OCT(+)	真陽性：1032	偽陽性：130
OCT(-)	偽陰性：156	真陰性：1266

$\kappa=0.75$

$\kappa=0.78$

5%	HFA (+)	HFA (-)
OCT(+)	真陽性：1104	偽陽性：53
OCT(-)	偽陰性：385	真陰性：1042

5%	HFA (+)	HFA (-)
OCT(+)	真陽性：1067	偽陽性：96
OCT(-)	偽陰性：205	真陰性：1216

$\kappa=0.67$

$\kappa=0.77$

等価球面別の比較では-6Dを超える強度近視例でも差はなかった。

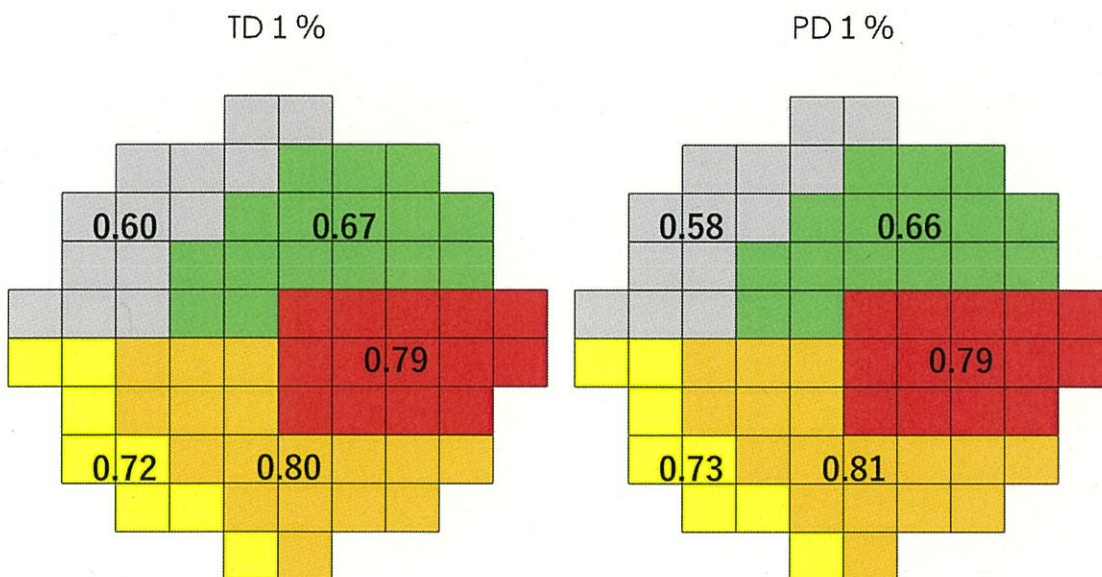
一致度 (κ係数)
 - 6 D以上
 (25例25眼)

全25眼	①1%	②2%	③5%
TD	0.78	0.76	0.71
PD	0.77	0.78	0.77

一致度 (κ係数)
 - 6 D未満
 (13例13眼)

全13眼	①1%	②2%	③5%
TD	0.74	0.73	0.58
PD	0.77	0.77	0.75

クラスター別（右眼に換算）の検討では、乳頭黄斑領域での一致度が高く、下方の一致度が高い傾向があった。



考察

今回の検討には SS-OCT の en-face 画像を用いた。通常の緑内障診断で用いられる乳頭部解析や黄斑部解析は、正常データベースとの比較で異常か正常かを判定している定量的な検査であるのに対して、en-face 画像は直接神経線維の構造を観察している定性的な検査であるという点が大きく異なる。En-face 画像の有用性に関してはコロンビア大学の Hood らが、頭部解析や黄斑部解析のカラーマップと比較して、より細くわずかな視神経束欠損を見つけることができるとし、その優位性を報告している。

今回の我々の結果では、en-face 画像から推定した中心 10 度内視野は実際の中心視野との比較で高い一致度を得ることができた。一般的に κ 係数が 0.8 を超えると非常に高い一致度とされるが、今回の結果はそれに近いものであった。また強度近視眼でも、高い一致度を示したことは特筆すべき点である。通常の OCT での正常データベースとの比較では高度近視眼は対象外となり、判定が困難となる場合があるためである。また、視野の領域別の検討では乳頭黄斑領域で一番高い一致度であった。乳頭黄斑領域は、中心視野の中でも矯正視力や患者の QOV に関わる最も重要な領域とされる。その領域で一致度が高かったことは、患者の QOV を推定する有力な方法となりえる可能性を示唆している。類似の研究としては、東北大学の高橋らが、OCT の黄斑部解析の厚みデータを用いて、中心 10 度の視野を推定するという報告をしている。これは OCT による網膜内層厚と実測感度に相関があることを利用している。

再現性という点に関して、本検討では得られた画像における NFB 欠損の有無を、目視によって分類しており、主観的であるといえる。そこで、別の判定者 1 名によって分類されたものとの一致率を求めた。全 68 点における一致率は平均 93.4% (70.6%~100%) で、一致率の低い例も数例あるが、概ね高い一致率が得られ、再現性のある検査であるということができた。

現時点では症例ごとに手作業で推定視野の作成を行っているが、En-face 画像の定性データと網膜内層厚などの定量データを何らかの形で組み合わせることにより、OCT を撮影したら、自動で中心 10 度内視野が作成されるようになることが最終的な目標である。この方法は一般的な緑内障患者をはじめ、検査が困難な高齢者や水俣病患者の QOV を短時間で推定できる有用な検査となる可能性を秘めているため今後も研究を続けていきたい。

平成 29 年度水俣病研究事業

研究者 堀井 新（新潟大学大学院医歯学総合研究科耳鼻咽喉科頭頸部外科学分野教授）

研究協力者 高橋 邦行（新潟大学大学院医歯学総合研究科耳鼻咽喉科分野准教授）

研究要旨①

マウス大脳皮質聴覚野における OFF 反応のメカニズム解明

A) 研究目的：

ヒトは長い音刺激とは異なり、短い音刺激では音の終わりを認識しないことはしばしばある。これまで音の始まりの反応（ON 反応）についての研究は多く散見されるが、音の終わりの反応（OFF 反応）についての研究は少なく、またメカニズムはわかっていない。また MeHg 中毒患者では純音聴力に比べ、語音弁別能が強く障害される。本研究は動物を用いて聴覚に関する中枢機能を探ること、音の終了を認識する機能がどのような役割を果たしているのか解明し、水俣病における症状発現のメカニズム、今後の聴覚機能検査や治療に有益なものとなると考える。本研究の目的は、マウスの脳内における OFF 反応の責任部位を同定し、どのように制御されているのか解明することとする。

B) 研究方法：

【神経活動の測定】

マクロレベルの聴覚野神経活動は、活動依存的な酸素代謝変化を反映するミトコンドリアフラビン蛋白由来の内因性緑色蛍光を用い、経頭蓋的にイメージング（図 1）を行った。マウスをウレタン麻酔し、直腸温を 37.5 度に保った。右聴覚野上の頭蓋骨を露出し、露出部を顕微鏡下に固定した。麻酔導入後約 1 時間で実験を開始し、動物の状態が安定している 3 時間以内に記録を終了した。またニューロンレベルの活動を解析するときは、二光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングを用いた。この時は頭蓋骨を除去し、フラビン蛋白蛍光イメージングで予め OFF 応答が出現する場所を同定した後、この場所にカルシウム指示薬である Cal-520 を注入し、2 光子顕微鏡で Cal-520 に由来する緑色蛍光を発する細胞体のカルシウム濃度変化を記録した。その際アストロサイトを特異的に染める赤色蛍光色素の SR-101 も注入し、赤色蛍光を発する細胞を除外することでニューロンのカルシウム濃度変化のみを記録した。

【音刺激と測定条件】

音刺激はマウスの 10 cm 前方に置いたスピーカーから 70 dB の強度で与えた。周波数は 5 kHz と 20 kHz を主に用い、7 秒間持続する音刺激を用いて、刺激開始直後の ON 反応と終了後直後の OFF 反応を可視化した。また長い音刺激が短期可塑性を起こす可能性を検証す

るために、1秒間の音刺激に対する OFF 反応を測定し、それに先行するタイミングで長時間の音刺激を予め与えておくと、1秒間の音刺激に対する OFF 反応がどう修飾されるのか検討した。

【薬剤】

皮質可塑性の誘発には NMDA 受容体の関与が想定される。そこで NMDA 受容体拮抗薬である MK801 (0.1-0.5 mg/kg) を腹腔内投与し、投与前と投与後 30 分後の OFF 反応を比較した。

C) 研究結果

我々は 7 秒間持続する音刺激を用いることで明確な OFF 反応を捉えることに成功した (図 2)。OFF 反応の振幅が最も大きくなるピークの位置を解析したところ、ON 反応を用いて分類された前聴覚野 (AAF)、一次聴覚野 (A1)、二次聴覚野 (A2) などの位置とは異なり、A1 の内側に隣接する小さな領域に局在して分布することが判明した (図 3)。また OFF 反応を誘発する音の高さを変化させても OFF 反応のピーク位置は変化しなかった。

次に先行音刺激に対する OFF 反応を解析した。10 秒間の先行音刺激を与え、その 30 秒後に 1 秒間の刺激を行い測定したところ、明確な OFF 反応を記録した (図 4)。またそのピークの位置は 7 秒間刺激に対する OFF 反応のピーク位置と同部位に出現した。10 秒間の先行音刺激と 1 秒間の音刺激をそれぞれ異なる周波数にしても OFF 反応は記録された。また 10 秒間の先行音刺激と 1 秒間の音刺激の間隔を最長 90 秒まで延長しても OFF 反応が記録された。

NMDA 受容体に依存する短期シナプス可塑性と OFF 反応の関係を解析するため、NMDA 受容体阻害剤である MK-801 (0.5 mg/kg) を腹腔内投与したところ、7 秒音刺激に対する OFF 反応が抑制された (図 5)。

OFF 反応領域の個々のニューロン活動を観察するため、二光子カルシウムイメージングを行った。同域 387 個の神経細胞に対する 7 秒音刺激の反応を解析したところ、OFF 反応が ON 反応より有意に大きいことが判った。また OFF 反応に先行して徐々にカルシウム濃度が増加するニューロンが記録された (図 6)。

D) 考察

我々は 7 秒間の長時間音刺激を用い、明確な OFF 反応を捉えることに成功した。OFF 反応のピークは、ON 反応で得られた聴覚野の領野とは明らかに異なる皮質部位に分布し、周波数との特異性はなかった。こうして発見された OFF 領域は音の時間的な情報処理に特化した領野の一つではないかと推測される。

長時間の先行音刺激の効果は 90 秒間持続するので、何らかの短期可塑性が OFF 反応に関与すると考えられる。NMDA 受容体拮抗薬である MK801 が OFF 反応を阻害したという結果は、この推測を裏付ける。二光子カルシウムイメージングの結果、幾つかのニューロ

ンでは OFF 反応に先行して徐々にカルシウム濃度が上昇することが観察された。これは、抑制ニューロンへの興奮性入力に NMDA 受容体に依存する短期抑制で阻害され、その結果脱抑制が生じたとすれば説明できる。長い音刺激を与えることによって脱抑制が生じ、本来は抑制されるはずの OFF 反応が抑制されなくなり、長い音刺激に対する OFF 反応が記録されたと推定される (図 7)。

以上の結果は、新たな後迷路性難聴の診断、ひいては水俣病の中枢性聴覚障害の鑑別診断に有用な知見が得られたと考える。

E) まとめ

- ① フラビン蛋白蛍光法を用いて、7 秒音刺激の終了に同期した OFF 反応を捉えた。
- ② OFF 反応は前聴覚野や一次聴覚野と異なった領域に認め、また周波数 MAP に従わない新たな時間的情報処理に特化した領域と考えられる。
- ③ 1 秒刺激で本来現れなかった OFF 反応が、先行刺激音を与えることで出現した。
- ④ MK-801 の投与により、OFF 反応が抑制された。
- ⑤ 二光子カルシウムイメージングにより OFF 領域で徐々にカルシウム濃度が上昇する幾つかのニューロンを認めた。
- ⑥ ①～⑤より OFF 反応のメカニズムは抑制ニューロンへの興奮性入力に NMDA 受容体に依存する短期抑制で阻害され、脱抑制が生じたと推定される。
- ⑦ 以上の結果は、新たな後迷路性難聴の診断、ひいては水俣病の中枢性聴覚障害の鑑別診断に有用な知見が得られたと考える。

研究要旨②

末梢性平衡障害における詳細な障害部位診断法の確立

A) 研究目的：

メチル水銀中毒による平衡障害の診断のためには末梢前庭障害を除外する必要がある。末梢性平衡機能障害は前庭障害として一律にされてきたが、平衡を司る末梢器官には 3 本の半規管、前庭内の球形嚢、卵形嚢が存在する。本研究では末梢性平衡障害における詳細な障害部位診断法を確立することを目的とする。

B) 研究方法：

新規に導入した video Head Impulse Test (vHIT)、前庭誘発筋電位 (VEMP) を用いた検査体制を遂行する。平衡機能障害症例と対照としての正常被験者に対して video Head Impulse Test を用いた部位診断を行い、他の平衡機能検査との相関、相違などの解析を行う。

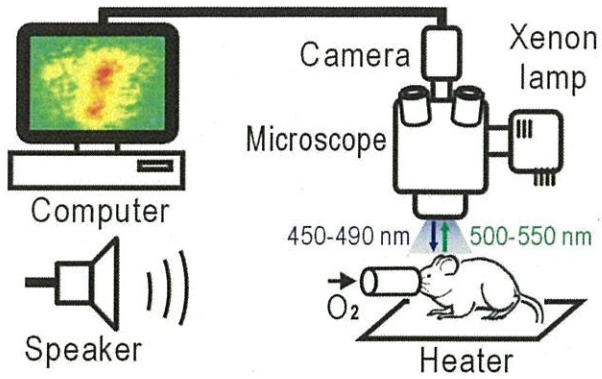
C) 研究結果

正常被験者への vHIT 検査は昨年より継続して行っている。また今年度は、外来を受診した慢性めまい症例に対しても vHIT 検査を開始し、54 例に施行した。臨床症例に対しては vHIT だけでなく VEMP をはじめとする各種平衡機能検査も行っている。それらとの相関を検討し、現時点では、vHIT を用いることで従来より簡便に外側半規管機能の評価が行えることが判明した。今後症例を蓄積し、他の半規管の評価についても解析を行う。

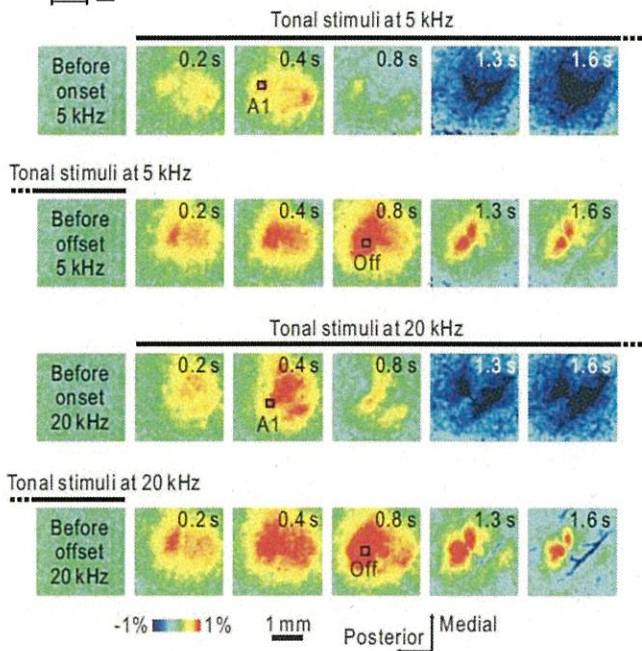
D) 考察・まとめ

正常被験者、臨床症例に対する vHIT 検査を行った。臨床例に対する検討から、本検査により迅速な外側半規管機能の評価が可能となることが明らかとなった。今後は他の半規管・前庭器の評価についての解析も行うとともに、評価基準の確定も目指す。本研究により、臨床所見のみでは評価の難しい前庭機能障害の詳細な診断を確立することで、水俣病に伴う平衡機能障害の診断がより正確に行えるようになると思う。

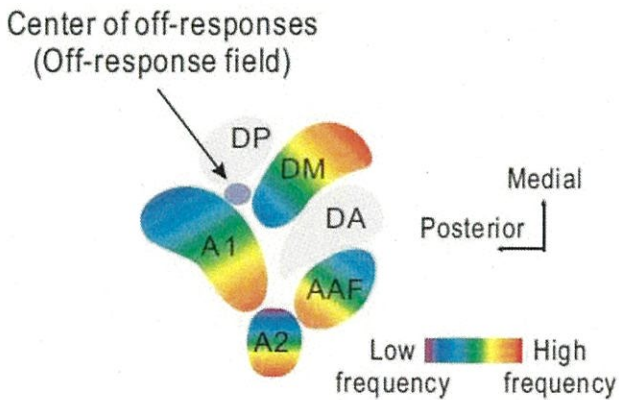
☒1



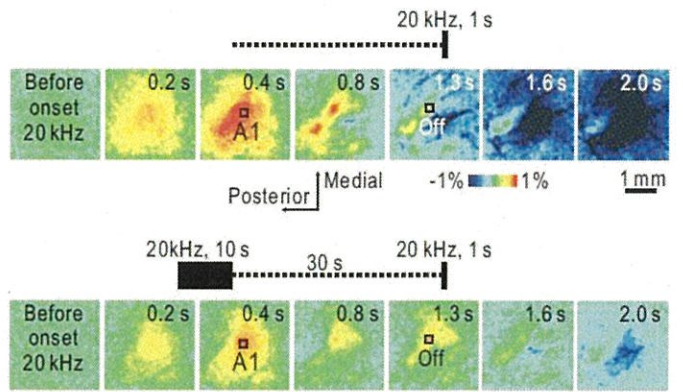
☒2



☒3

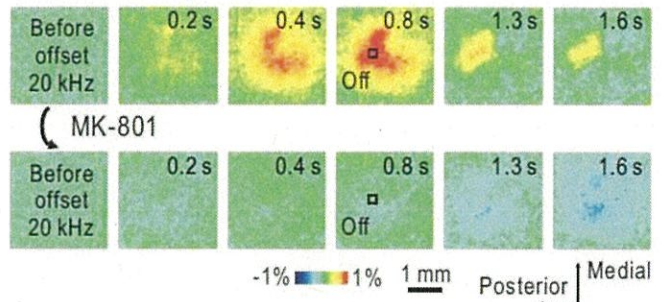


☒4

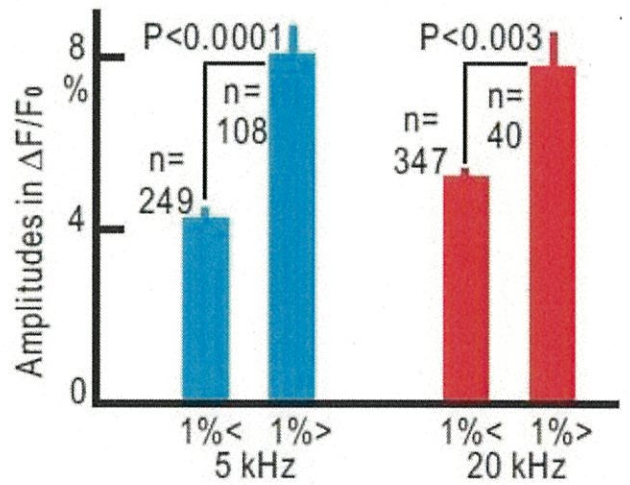


☒5

Off-responses



☒6



☒7

