

平成 28 年度 水俣病研究報告書

研究課題名：メチル水銀に対する治療標的分子としての血管内皮成長因子 (VEGF) の検討 (Ⅰ)

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 下畑享良

目的：

平成 27 年度まで行なってきた検討の結果を踏まえ、VEGF を治療標的とした神経・血管保護療法の開発に向け、メチル水銀による神経障害の病態解明を継続する。これまでの検討の結果、ラットメチル水銀モデルにおいて、小脳で VEGF の発現が亢進し、これが病態を悪化させている可能性が考えられた。VEGF の関与するメカニズムについて、特に脳障害の部位特異性に注目し、血液脳関門の破綻等を生化学的に検討する。

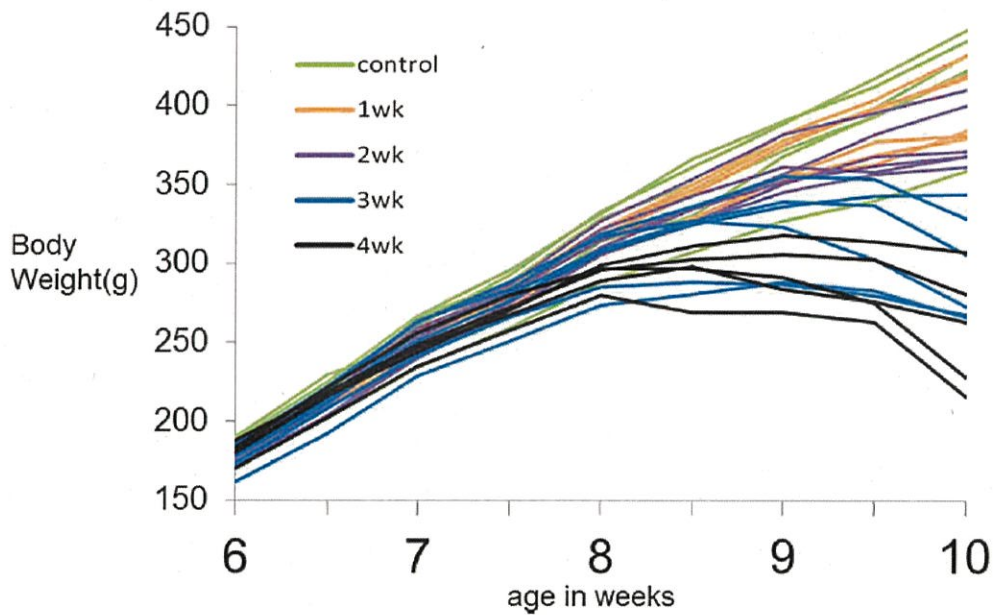
方法：

6 週齢の Wistar ラットの雄に対し、メチル水銀飲水曝露 (20 ppm のメチル水銀水) を 4 週間行った。このとき、すでに VEGF に対する中和作用が確認されている抗 VEGF 抗体 (RB-222)、ないしコントロール抗体を経静脈的に投与し、以後、経時的に①体重変化、②神経症状、③組織水銀量についての確認を行った。そして 10 週令で解剖を行った。

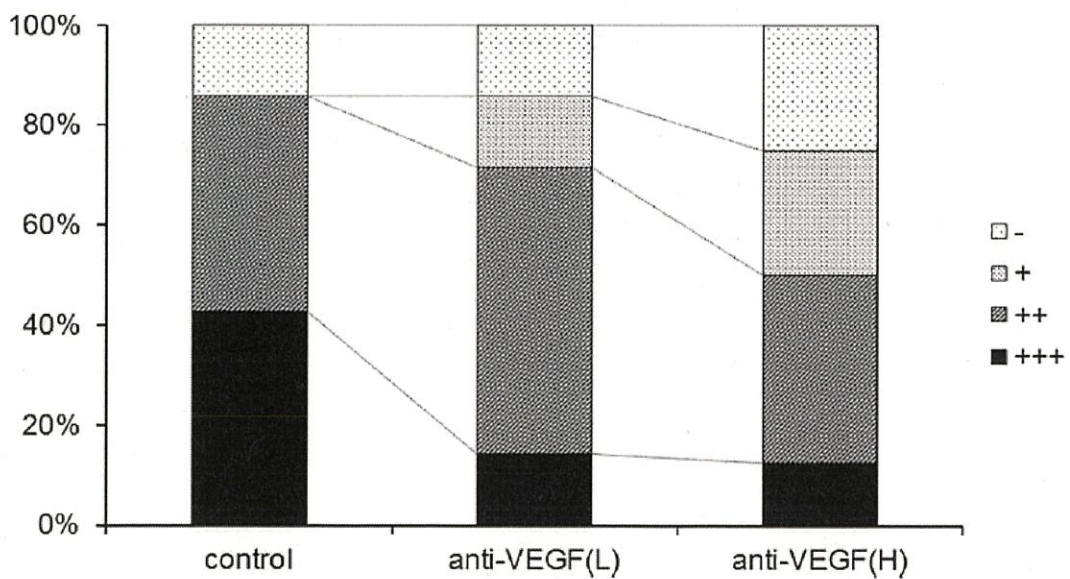
上記モデルに対し、摘出した脳試料の半分は灌流固定し、ホルマリン固定、パラフィン切片および水銀含量測定用に使用した。血液脳関門の破綻の検討はラット内在性タンパクの血管外漏出の免疫染色、さらに血液脳関門を構成する IV 型コラーゲン、RECA-1、claudin5、EBA などの蛋白マーカーでの免疫染色やウエスタンブロット法によるタンパク量の定量により行った。

結果：

ラットを5グループに分け，メチル水銀を投与しないグループと，1，2，3，4週間投与し，中毒症状を示すグループの体重を確認した．下図に示すようにメチル水銀暴露が多くなるほど体重は減少することを確認した．



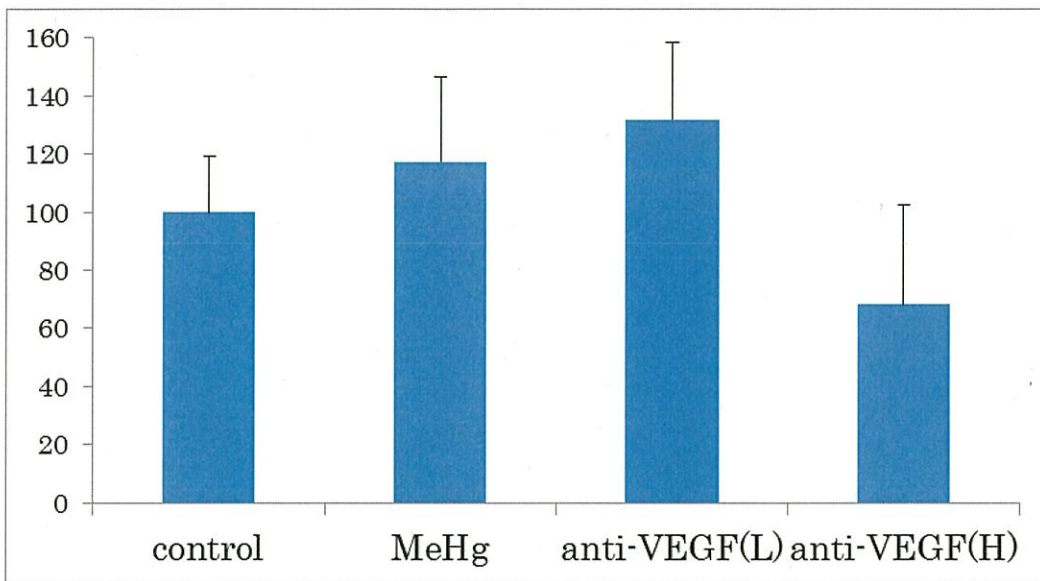
VEGF の作用を中和する抗 VEGF 抗体を，メチル水銀中毒ラットに投与したところ，体重に有意な変化は見られなかったが，運動機能の障害（後肢交叉現象）に改善がみられた．この効果には用量依存性が認められた．



血液脳関門の免疫染色では、内皮細胞における RECA-1 発現の低下を確認した。また脳組織水銀量の抗抗体治療による変化については、試料の不足のため困難であった。

考察とまとめ：

昨年、下記に示すように抗 VEGF 抗体は、エバンスブルー色素を用いた検討で、メチル水銀投与後の BBB の破綻を有意差を認めないものの抑制する傾向を認めた。本年度行った検討では、運動機能の改善を認めた。



図：エバンスブルー色素を経静脈的に投与し、脳実質内への漏出を定量した。メチル水銀投与ラット (MeHg) とメチル水銀投与に加え VEGF 中和抗体を投与した群 (anti-VEGF(L)：低用量、anti-VEGF(H)：高用量) で、漏出量に有意な差を認めなかった。

以上の結果は、メチル水銀による神経障害の原因の1つとして、VEGFが関連する血液脳関門の破綻が重要であることを示している。またこれまでの検討で明らかにしたように、VEGF発現は小脳と後頭葉に顕著に認められたことから、水俣病の部位特異性の原因として関わる可能性が考えられた。本研究の結果は、水俣病の病態の解明、および急性期治療の開発に大きく貢献するものと考えられる。

本研究の内容は、下記論文に報告した。またプレスリリースを行ない、新潟日報や毎日新聞等において報道がなされた。

Takahashi T, Fujimura M, Koyama M, Kanazawa M, Usuki F, Nishizawa M, Shimohata T. Methylmercury Causes Blood-Brain Barrier Damage in Rats via Upregulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression. PLoS One. 2017 Jan 24;12(1):e0170623.

血管障害のメカニズム解明

新大グループメチル水銀でラット実験

新潟大学脳研究所の研究グループは24日、メチル水銀が脳内の血管に障害をもたらし、水俣病の症状を引き起こすメカニズムを明らかにしたと発表した。同大は「新たな治療薬の開発につながる画期的な研究だ」としている。

同研究所は2011年から、国立水俣病総合研究センターと共同研究を続けてきた。

メチル水銀は、平衡感覚をつかさどる「小脳」や視覚に関わる「後頭葉」などの脳の部位に障害をもたらす。後頭葉など、水俣病の症状を引き起こす。

研究結果について説明する下畑準教授（右）（24日午後、新潟大学脳研究所で）



ことが知られている。しかし、障害が起こる詳しいメカニズムは分かかっていなかった。

同研究所は、重症患者の脳内で出血が起きていることに着目し、メチル水銀が脳内の血管に与える影響について、ラットを使って調べた。

その結果、メチル水銀が投与されたラットの「小脳」や「後頭葉」で、血管に障害を引き起こすたんぱく質「血管内皮増殖因子（VEGF）」が多く現れていることが分かった。VEGFの作用で血管の働きが悪くなり、血管から血液中の有害物質が脳内に漏れ出すことで、小脳や後頭葉に障害が起きるといわれる。

さらに、VEGFの作用を抑制する抗体をラットに投与すると、ラットの神経症状が改善することも分かった。メチル水銀そのものを体内から排せつする従来治療とは異なる、VEGFの作用抑制を目的にした

新たな治療薬の開発につながる可能性がある。

記者会見した同研究所の下畑準教授は「今回見つけた新たな治療方法は、メチル水銀を取り込んでから間もない急性期に有効なもの。今後は慢性期に有効な治療薬の開発ができればいい」と話した。

水俣病、緑内障のビッグデータ解析に向けた施設内データベース構築

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

日常生活、社会生活を送る上で外部環境から得られる外的刺激のうち、視覚刺激はかなりの部分を占める。水俣病や本邦での40歳以上の約5%が罹患していると推測される緑内障の視機能障害の進行により、Quality of Life(QOL)低下にも多大な影響を及ぼすと考えられる。緑内障と診断を受ければ生涯にわたる眼科治療や通院管理が必要となる場合がほとんどである。

高齢となっても可能な限り良好な視機能を維持することが望まれるが、緑内障は高齢者ほど有病率が高く、さらに今後のますますの高齢化により重症例や長期経過観察例が増加することが予想される。進行性の疾患である緑内障や水俣病を診療するにあたり、データベース構築とデータのモニタリングは非常に重要と考えられる。

対象

新潟大学医歯学総合病院眼科、緑内障外来通院中の患者のうち、データベース作成開始にあたり、2016年4月1日～2016年12月31日までの期間で緑内障新患外来を受診した277例を対象とした。

眼科初診時、本人（あるいは家族・代理人）が記載する問診票による眼科受診歴および眼科以外で治療中の病気、アレルギー歴の確認を行い、ついで他覚的屈折検査、角膜曲率半径測定、角膜内皮細胞測定、矯正視力および非接触式眼圧測定を行った。

視能訓練士による上記検査後、緑内障担当医により細隙灯検査、圧平式眼圧測定、隅角鏡検査、眼底検査が施行され、病状に応じて各種検査予約、外来予約、入院（検査入院・手術入院）予約が行われた。

結果

上記データをもとに当科緑内障患者 初診時データベースを作成。

対象は277例

対象の年齢、性別データの内訳を以下に示す。

表1 年齢、性別

平均年齢	64.4 歳 ± 15.7 歳 (12~94 歳)
性別	男性 137 例、女性 140 例

図1 年代別の受診者数

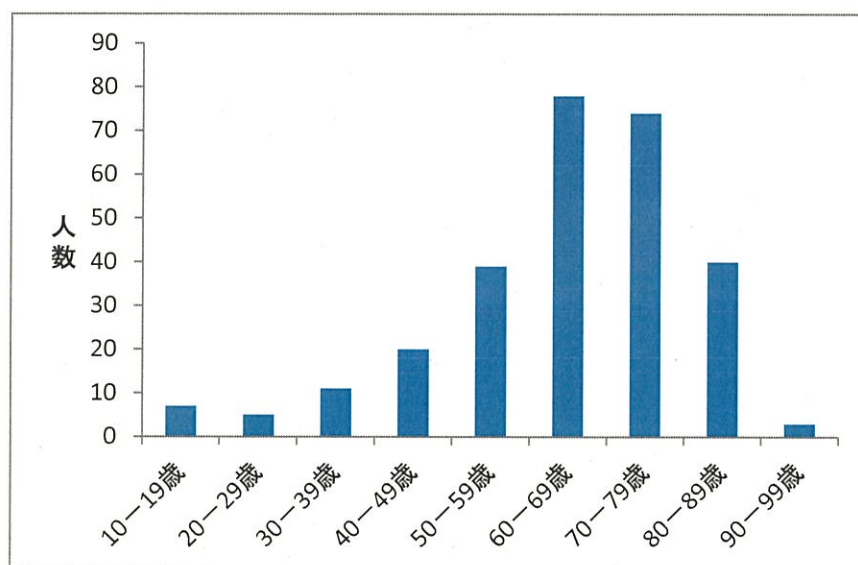


表2 眼科以外のおもな既往歴 (問診票から) (重複含む)

病名	人数	対象内の有病率 (%)
高血圧症	87 人	31.4 %
糖尿病	31 人	11.2 %
心臓病	20 人	7.2 %
喘息	12 人	4.3 %
腎臓病	4 人	1.4 %

表 3 眼科手術 既往歴

眼科 内眼手術の既往あり	82 例 (対象全体の 29.6%)
--------------	--------------------

おもな内眼手術の内訳

水晶体再建術	56 例 (20.2%)	86 眼
緑内障 濾過手術	11 例 (4.0%)	18 眼
緑内障 濾過手術＋水晶体再建術	4 例 (1.4%)	6 眼
緑内障 流出路再建術	5 例 (1.8%)	7 眼
緑内障 流出路再建術＋水晶体再建術	4 例 (1.4%)	5 眼
硝子体手術	3 例 (1.1%)	5 眼
硝子体手術 ＋水晶体再建術	2 例 (0.7%)	3 眼
網膜復位術	7 例 (2.5%)	7 眼

表 4 緑内障 病型の内訳

狭義原発開放隅角緑内障	65 例 (23.5%)
正常眼圧緑内障	61 例 (22.0%)
落屑緑内障	47 例 (17.0%)
原発閉塞隅角緑内障	28 例 (10.1%)
続発性緑内障	25 例 (9.0%)
血管新生緑内障	9 例 (3.2%)
ステロイド緑内障	6 例 (2.2%)

表 5 初診時 平均眼圧

右眼	17.7±7.6 mmHg (2-59mmHg)	左眼	17.7±7.9 mmHg (6-67mmHg)
----	-----------------------------	----	-----------------------------

表6 初診時 緑内障点眼・炭酸脱水酵素阻害薬内服スコア

緑内障点眼数-1剤：1点、配合剤1剤：2点で換算
 炭酸脱水酵素阻害薬-1錠：2点で換算

緑内障点眼スコア 2.74 ± 1.74 点 (0-6点)	緑内障内服スコア 0.73 ± 1.84 点 (0-8点)
----------------------------------	----------------------------------

図2 点眼スコアの内訳

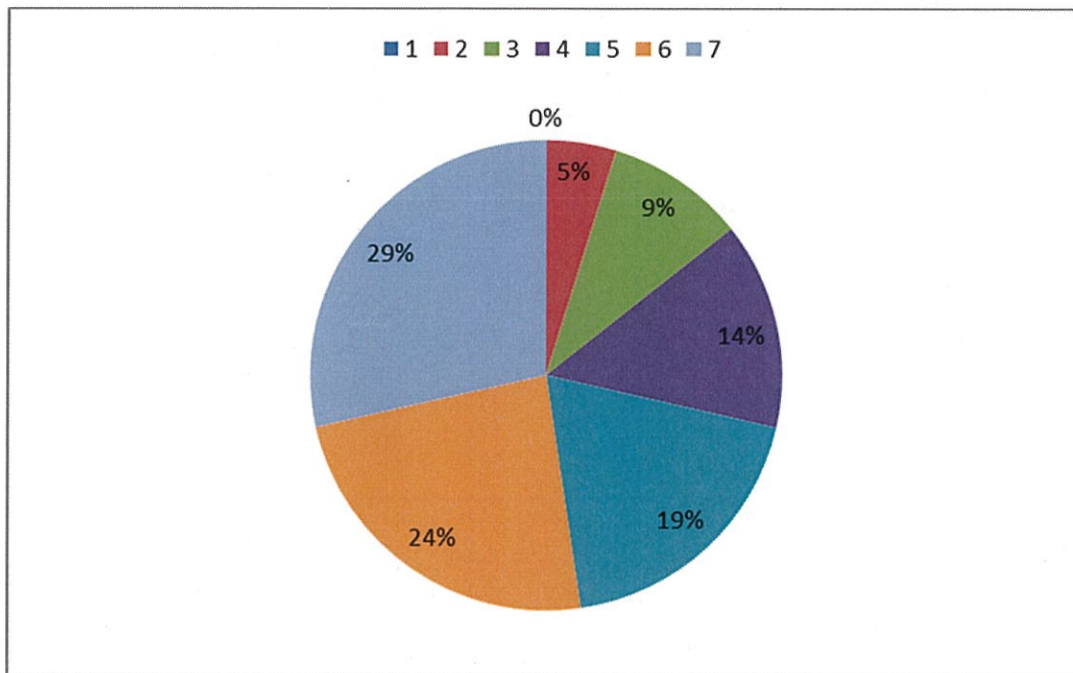


図3 初診後の経過

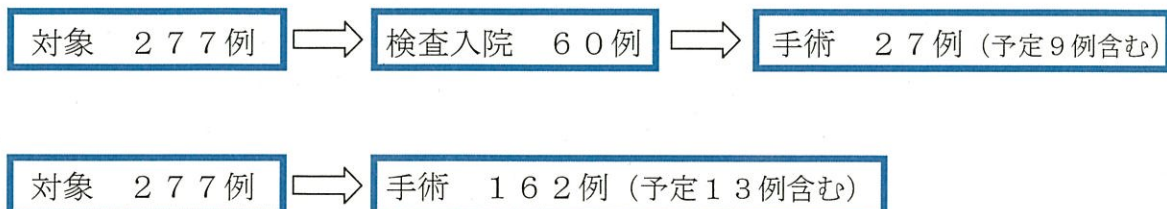


表7 手術 術式の主な内訳

2016年4月1日～12月31日までの期間中、対象患者277名に対して手術加療を行った件数を算出

経過中合併症など生じ、追加手術となった症例も含めて累積件数で表記

() 内は手術件数202件の中の割合を示す。

緑内障 濾過手術	64件 (31.7%)
水晶体再建術+眼内レンズ挿入術	48件 (23.8%)
緑内障 流出路再建術、水晶体再建術+眼内レンズ挿入術	27件 (13.4%)
緑内障 濾過手術、水晶体再建術+眼内レンズ挿入術	24件 (11.9%)
緑内障 隅角癒着解離術、水晶体再建術+眼内レンズ挿入術	18件 (8.9%)
緑内障 濾過胞再建術	8件 (4.0%)
緑内障 隅角癒着解離術	4件 (2.0%)
緑内障 バルベルト インプラントチューブシャント挿入術	3件 (1.5%)
緑内障 毛様体光凝固術	3件 (1.5%)
周辺虹彩切除術	3件 (1.5%)
	合計 202件

考察

当科緑内障外来の初診時年齢は60代、70代が多いが、80歳をこえる高齢患者が全体の約16%を占めた。今後さらに高齢者の受診は増えることが予想される。近年、点眼アドヒアランスの重要性が注目されているが、独居の高齢患者も多く、家人と本人への点眼管理状況や手技の確認は必須と考えられる。当科では点眼指導を初回から積極的にを行い、必要な場合は繰り返し指導することで向上を目指している。

βブロッカー点眼の使用可否につき、特に重要となる心臓病および喘息の既往を有する患者は今回対象の約12%に認め、点眼処方の変更や追加に注意が必要である。

眼科手術の技術向上や手術器具の改良により手術適応が拡大する中、複数回の手術既往や同時多重手術歴のある患者が増加傾向にあり、手術難易度は今後さらに上がる可能性が懸念される。

緑内障の病型も多岐にわたるが、本邦での有病率が高く、高眼圧で進行が早い病型が紹介患者の中では多く認めた。その他、頻度は少ないが小児発達緑内障、視神経低形成合併症例、pit-macular 症候群、濾過胞からの房水漏出など高度機器による画像診断や特殊検査、専門外来での管理が必要な疾患が中心であった。点眼状況からは3剤以上点眼が全体の63%、4剤以上点眼が全体の35%と多剤

使用中の患者が多く、点眼アドヒアランス確認や点眼副作用の出現に注意が必要である。

検査入院での精密検査（各種視野・画像検査、1日眼圧による日内変動の有無、点眼指導や自己点眼の練習など）を行った症例は、約半数が手術の方針となった。病期や眼圧にもよるが、検査入院での病識への理解向上や点眼手技改善などにより手術を回避できる症例も中には含まれた。

手術加療となった症例を検討すると、眼圧下降効果が大きく、どの病型にも適応となる濾過手術の件数が最も多く、ついで有病率の高い白内障に対する水晶体再建術が多かった。濾過手術は眼圧下降が期待できる反面、低眼圧黄斑症や濾過胞感染など重篤な合併症の危険を伴い、長期にわたる慎重な術後管理を要す。また術後経過とともに結膜癒痕や強膜弁の癒着が進行し、眼圧コントロールが再び不良となり再手術が必要となる症例も臨床診療では少なくない。

結論と今後の展望

今後、高齢化に伴い、緑内障患者の受診者数は増加することが予想される。慢性、進行性疾患である緑内障診療においては長期管理と経過観察が非常に重要である。

今後の展望として、緑内障進行評価の中心となるハンフリー自動視野計エクセルデータベースと、2016年度より当科で導入した手術台帳システムとの連携や整備をさらにすすめることで緑内障患者のさらなる診療精度向上に役立てたい。

平成 28 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

視聴覚連合に関する研究—形状認知に關与する大脳内責任部位の同定—

A) 研究目的：

メチル水銀による中毒では、純音聴力に比して語音弁別能が悪化する傾向がある。その機序として、脳内での感覚間の連合が障害されていることが想定される。経験によって特定の音（例えばある人の声）から特定の形（例えばその人の顔）を連想するといった神経処理がそれに該当するが、そのメカニズムはわかっていない。本研究の目的は、マウスで音・図形連想記憶が獲得可能か検証し、そして脳内におけるその責任部位を同定することである。

B) 研究方法：

【行動実験】

スピーカーとタブレット端末を搭載した行動実験用 M 字型迷路 (図 1) を用い視覚依存タスクと連想記憶依存タスクの 2 種類の課題 (図 2) をマウスに行わせた。視覚依存タスクの学習が十分成立した時点で連想記憶依存タスクへ課題を変更し、野生型マウスが音・図形連想記憶を獲得できているかテストする。課題は 1 日 20 トライアル施行する。

【フラビン蛋白蛍光イメージング】

フラビン蛋白は神経細胞内のミトコンドリア電子伝達系に存在する。神経細胞が活動すると還元型フラビン蛋白が酸化型フラビン蛋白に置き換わる。この酸化型フラビン蛋白は青色励起光を当てると緑色自家蛍光を発するため、その蛍光強度の変化を CCD カメラで記録する。(図 3)

連想記憶獲得後のマウスにおいて、連想付け学習に用いた音刺激に対する大脳皮質聴覚野・高次視覚野の反応を、フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて観察する。また短期記憶および異なるモダリティの感覚連合が障害されていると推定されている α 型プロトカドヘリン分子多様性減少マウス (プロトカドヘリン $\alpha 1, 12$ マウス) を用いて同様の実験を行い、野生型マウスとの比較検討を行う。

C) 研究結果

【行動実験】

野生型マウス (BL57/6J 系統) とプロトカドヘリン $\alpha 1, 12$ マウス各々6匹ずつの平均正答率と標準偏差のデータを示す。野生型マウスは課題を視覚依存タスクから連想記憶依存タスクへ変更した直後に正答率は一過性に低下したが、その後数回のセッションで正答率の再上昇がみられた。一方でプロトカドヘリン $\alpha 1, 12$ マウスは視覚依存タスクの正答率は野生型と同等であったが、連想記憶依存タスクの正答率は野生型マウスに比して有意に不良であった。(図4)

【フラビン蛋白蛍光イメージング】

音・図形連想記憶学習に用いた音で刺激した時、音・図形連想記憶を獲得している野生型マウスでは聴覚野背側領域(視覚野腹側領域)の反応が有意に増強していた。プロトカドヘリン $\alpha 1, 12$ マウスでは野生型マウスでみられたような反応増強が認められなかった。(図5)

D) 考察

M字迷路はマウスがタブレット端末ディスプレイに映し出された図形の形状情報の短期記憶に基づいて報酬を得られる通路を選択できるかをテストできる。ディスプレイ上の複雑な図形とスピーカーから出力される音を連想付けさせる学習を行うと、野生型マウスは音から図形を連想し、連想した図形と同じものを選択する能力すなわち音・図形連想記憶を獲得可能であると考えられた。さらに音・図形連想記憶を獲得した野生型マウスの音に対する皮質応答が聴覚野背側(視覚野腹側)に出現した。

一方で音・図形連想記憶能力と聴覚野背側領域の活動はともにプロトカドヘリン $\alpha 1, 12$ マウスで障害されていた。このことから聴覚野背側部が形状認知の責任部位である可能性が示唆された。

以上の結果は、メチル水銀による聴覚障害と感覚間連合障害の関連を解明する上で重要な結果であると考えられた。

E) まとめ

- ① M字迷路を用いて野生型マウスが音・図形連想記憶を獲得可能であることを行動学的に証明した。
- ② 音・図形連想記憶を獲得したマウスでは関連付けられた音刺激に対して聴覚野背側の反応が増強する。
- ③ α 型プロトカドヘリン改変マウス(プロトカドヘリン $\alpha 1, 12$ マウス)では音・図形連想記憶が障害されている。

- ④ ①～③よりマウス聴覚野背側領域が形状認知に大きな役割を果たしている可能性が示唆された。
- ⑤ 以上の結果は、メチル水銀による聴覚障害と感覚間連合障害の関連を解明する上で重要な結果であると考えられた。

研究要旨②

末梢性平衡障害における詳細な障害部位の解析

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。これまで、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。本研究の目的は末梢性平衡障害における障害部位を詳細に解析することとする。

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整備する。これらの検査を同一症例に行うことで、3本の半規管、球形嚢、卵形嚢という平衡感覚器の機能を個別に評価する。さらに従来の電気眼振図を用いた検査との相関などについても検討することを目指す。

C) 研究結果

vHIT の検査を実際に稼働させる体制が整備された。また VEMP については、従来行っていた頸筋を対象とした c-VEMP に加え、外眼筋を対象とした o-VEMP の検査を行うことが可能となった。c-VEMP、o-VEMP については臨床症例に対しての検査を開始しており、現在症例を蓄積中である。vHIT については、正常被験者に対するデータを解析中である。

D) 考察・まとめ

vHIT、VEMP を用いた検査体制を整備し、それぞれ正常被験者、臨床症例に対するデータの蓄積を開始した。今後は、vHIT においては臨床症例への適用を進め、各検査を同一症例に行った際の解析を進めていく方針である。今回の結果から、より正確に末梢前庭機能障害を診断することで、メチル水銀中毒による平衡障害の診断に資するものと考えられる。

