

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 (IV)

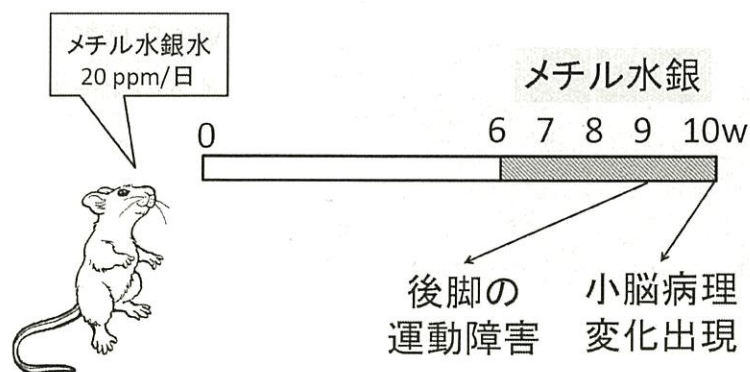
報告者：新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野 下畑享良

目的：

平成 26 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。昨年度までの検討により、メチル水銀投与後に VEGF 発現が亢進し、血液脳関門 (BBB) の破綻を来すことが神経障害を増悪させることが予想された。本年度は VEGF 中和抗体による VEGF の抑制がメチル水銀の神経障害を抑制するか明らかにすることを目的とする。

方法：

6 週令の 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 週間行う。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う。10 週令で解剖を行う。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を使用する。一方の半分は灌流固定なしで組織を凍結保存し、生化学測定および凍結切片に用いる。生化学測定は片脳の大脳皮質を前頭葉、頭頂葉、後頭葉に 3 分割したもの、および小脳に分けて検討する。6 週令、8 週令において VEGF 中和抗体を尾静脈より投与し運動機能を検討した。

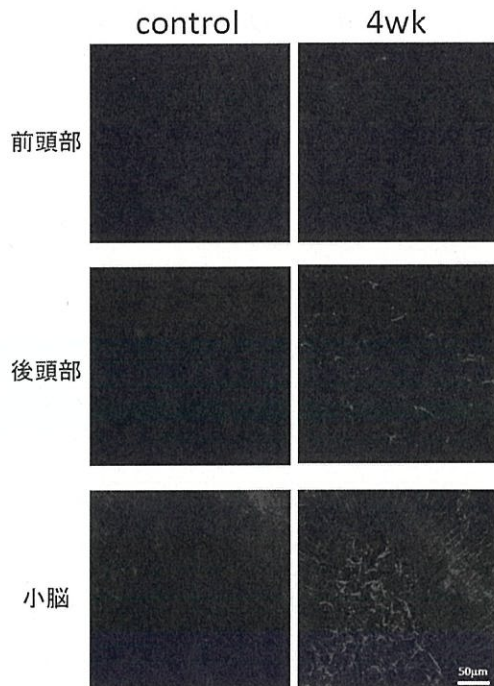


BBB 関連蛋白について免疫染色およびウエスタンブロット法で評価した。運動機能評価は後脚交叉現象を用いた。

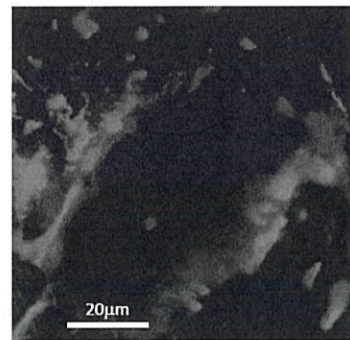
結果：

免疫組織化学ではメチル水銀投与群の小脳で VEGF の発現亢進がみられ、VEGF 発現は血管内皮細胞のマーカ―RECA-1 とは共局在せず、多くはアストロサイトのマーカ―である GFAP が陽性の細胞と一致していた。

また BBB 関連タンパクの免疫染色では、小脳において RECA-1 が対照群に比しメチル水銀投与群で染色性が高度に低下していた。さらにメチル水銀投与群の小脳では、ラットの血管内に存在する IgG が血管外へ漏出しており BBB の破綻が示唆された。



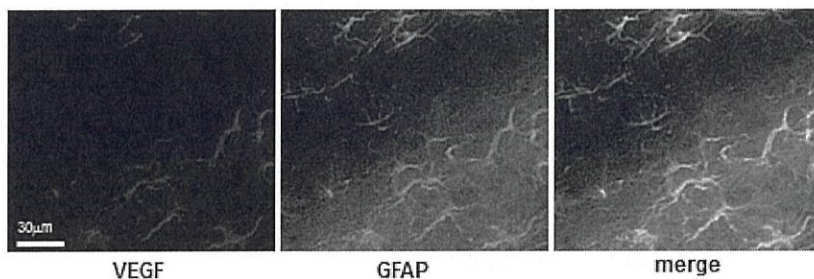
免疫組織化学によるVEGF発現
4週投与群の小脳で著明なVEGF(赤)の発現亢進が認められた。



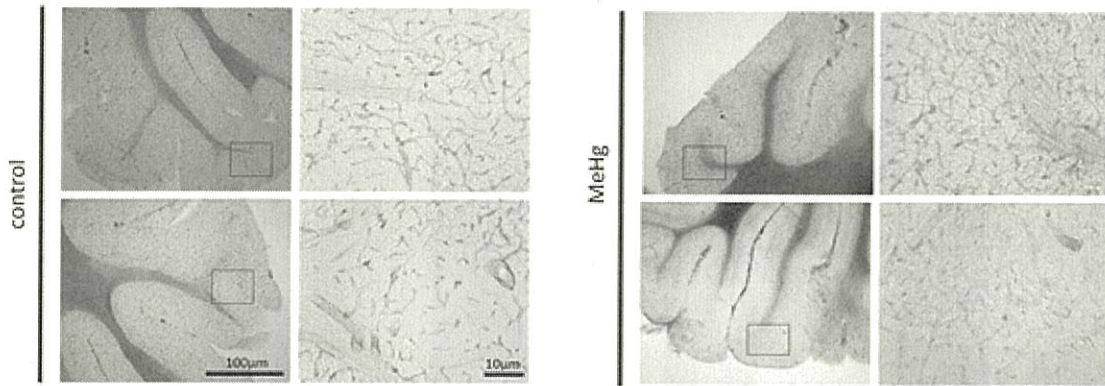
赤: VEGF
緑: RECA1

免疫組織化学によるVEGFの局在(1)

VEGF(赤)は血管内皮細胞のマーカ―であるRECA1(緑)陽性細胞の周囲に認められた。

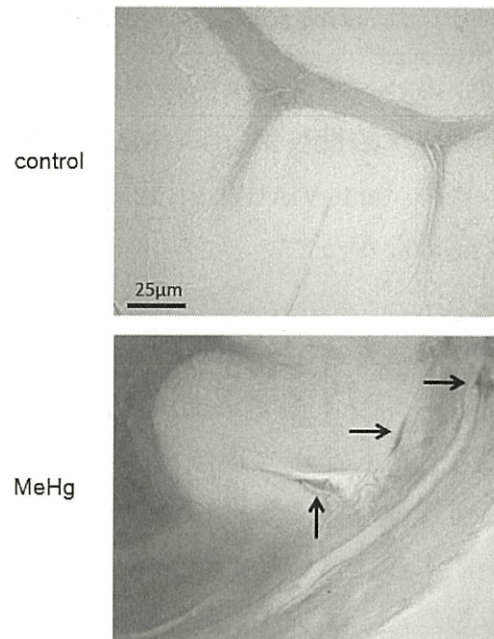


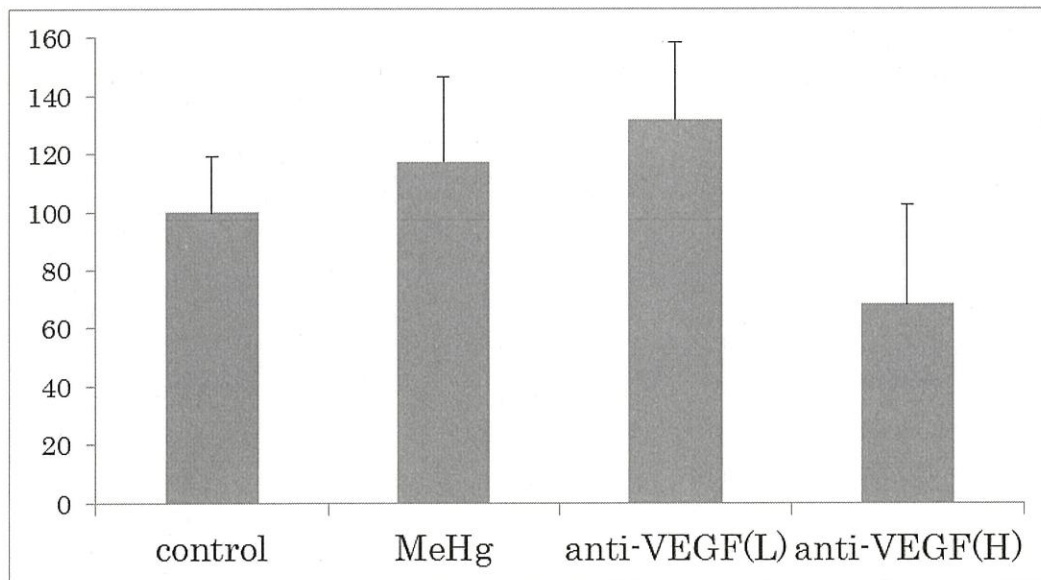
図：VEGF はアストロサイトのマーカ―GFAP と共局在する



上図：対照群（control,左）に比べメチル水銀投与ラット（MeHg,右）では血管内皮細胞のマーカーRECA-1の染色性が低下している

右図：メチル水銀投与ラット（MeHg,下）では血管内のIgGが血管外の組織に漏出していると考えられる像を認める。（矢印）
対照群（control,上）ではみられない。





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。

考察とまとめ：

ラットへの 4 週間メチル水銀投与により、小脳において VEGF の発現亢進が認められた。発現亢進はアストロサイトで主に認められた。ラット血管内の IgG が血管外組織に漏出していることを示し、BBB の破綻が起きていることを明らかにすることが出来た。また BBB 構成タンパクの中で、RECA-1 発現の低下がみられた。メチル水銀中毒の病態として、VEGF 発現の亢進が BBB の破綻を引き起こし、神経障害に関わる可能性が示唆された。しかし、エバンスブルー色素を用いた検討では、メチル水銀投与後の BBB の破綻を VEGF 中和抗体が抑制するという結果は得られなかった。今回のエバンスブルー色素漏出による検討ではメチル水銀投与群と対照群の間で差がないため、実験法の検討が必要である。

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のメカニズムの検討が今後も必要である。

水俣病、緑内障における中心視野機能と構造変化の関係性 (クラスタ化による検討)

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

眼球に由来する視覚刺激は人間が外部環境から得ている情報の中でも大部分を占めているといわれている。一方で視覚情報は明暗や色彩、物体の動きなど原始的なものから、微細な物体の識別に至るまで多岐にわたる。これらの中でも今日我々が社会生活を送る上で重要と考えられるのが、読み書きといった対象の弁別能力である。この弁別能は中心視野において最も高く、特に固視点近傍では視力に相当し、多くの疾患において視機能を評価する検査として使用されている。

水俣病や緑内障では中枢神経および網膜神経節細胞が不可逆的に障害される結果、視野障害を発症し、重症例では視力も低下する。このような症例では生涯にわたる Quality of life(QOL)の低下を余儀なくされる。特に本邦における緑内障の有病率は40歳以上の約5%とされており、高齢化により重症例が増加していることが考えられ、社会的損失となっていることが予想される。

緑内障は緩徐な進行傾向を持つ超慢性疾患であるが、一方で安全かつ確実な治療方法が確立されていないため、患者個々の病状に応じた疾患管理が必要とされる。先に述べた通り QOL に根ざした管理を行っていく上で、中心視野を障害温存できるか否かが重要な観点となることから、中心視野障害をできるだけ早期に検出し、期を逃さず治療強度を高める判断が必要である。

我々はこれまでの研究で、広義原発開放隅角緑内障 (POAG) 患者を対象に視力が中心窩閾値および傍中心耳側の視野感度と相関がみられることを明らかにした。また、中心10度内の視野感度が網膜光干渉断層計 (OCT) における黄斑部網膜内層厚および視神経乳頭周囲神経線維層厚と相関を示し、構造の変化が機能障害に先行して出現することを報告した。

本研究では、緑内障性視野障害が網膜神経線維の走行に起因する特徴的な視野障害パターンを示すことに注目し、クラスタ化された視野と該当する網膜領域の構造変化の関係について明らかにし、中心視野障害の早期診断に有用であるかについて検討を行った。

対象と方法

対象

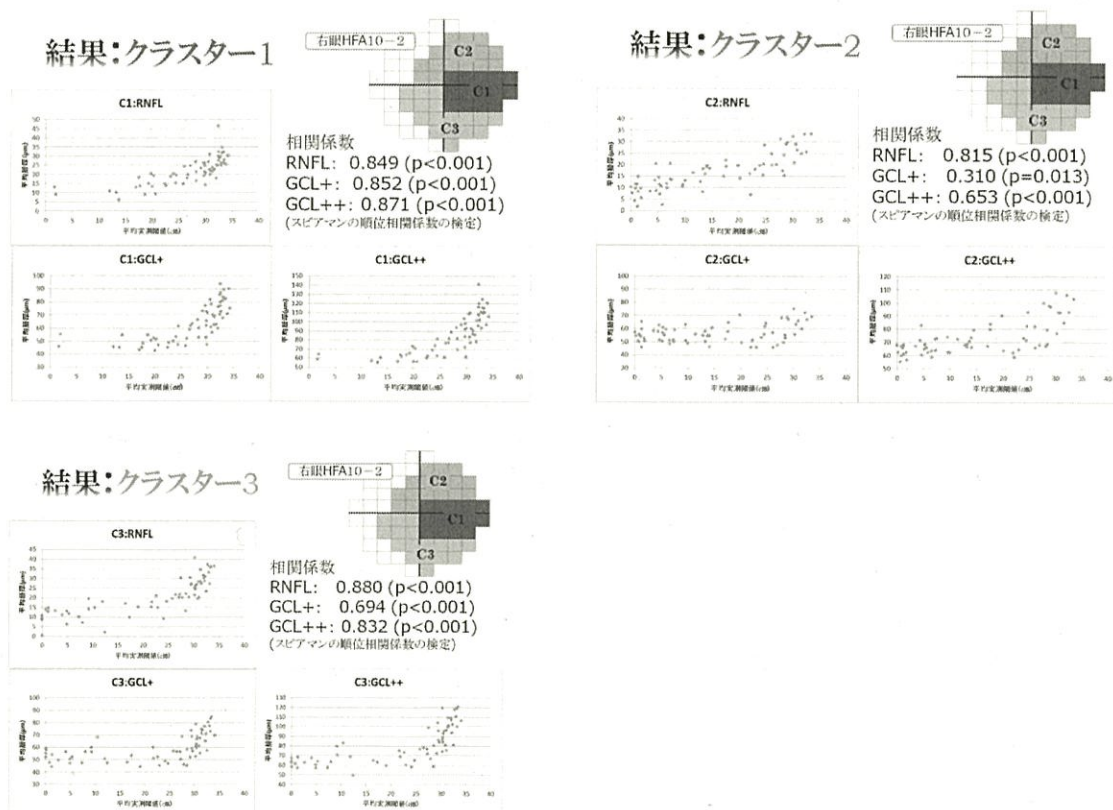
新潟大学医歯学総合病院眼科、緑内障外来通院中である20歳~70歳の広義原発開放隅角緑内障患者(広義 POAG)を対象とした。細隙灯検査、眼底検査、圧平式眼圧測定、隅角鏡検査が施行され、ハンフリー視野検査 (HFA、カールツァイスメドテック) で Anderson-Patella

広義POAG 65例65眼	
性別	男性 34眼 女性 31眼
年齢	56.2±10.0 才
病型	狭義POAG 31眼、NTG 34眼
左右	右眼 30眼、左眼 35眼
矯正視力(log MAR)	-0.03 ±0.12
屈折	-3.2±2.3 D
MD値	-14.25±8.25 dB

各クラスタにおける視野感度と各網膜内層厚の相関分布

C1、C2、C3 における HFA10-2 実測閾値の平均と、それぞれの RNFL、GCL+、GCL++の平均層厚はいずれも有意な相関を示した。C1 では全てのパラメータが強い相関を示し、C2 と C3 では RNFL、GCL++が GCL+よりも実測閾値との相関が強かった(図 3)。一方で平均実測閾値が 25dB までの初期の感度低下では RNFL、GCL+、GCL++の各構造パラメータは良く相関するものの、これを下回る感度低下を生じている場合は感度低下を反映しない傾向にあった。

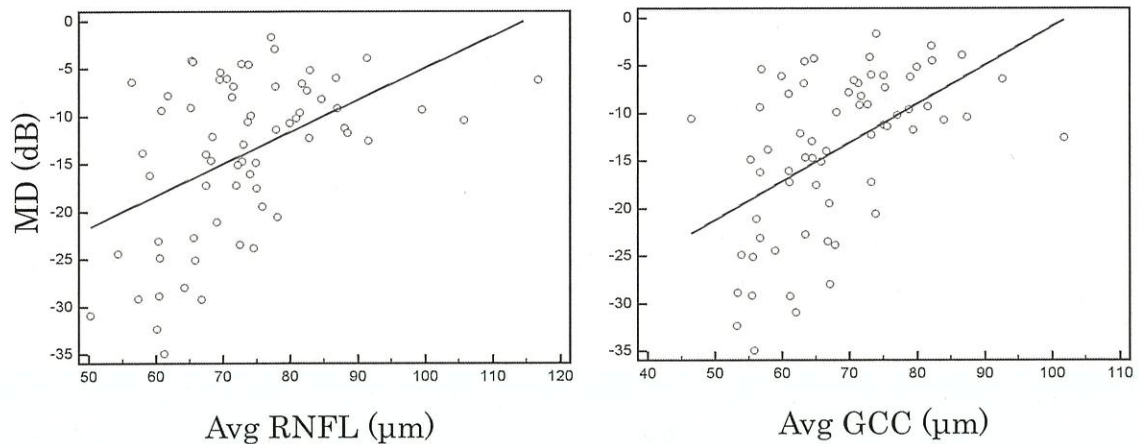
図 3



考察

緑内障性視神経症においては網膜神経節細胞の軸索および細胞体の消失が起こり、これらによって構成される黄斑部内層網膜が菲薄化することが知られている。我々は過去の研究において、緑内障眼における網膜構造変化と10度以内の中心視野障害視野指標との間に相関が見られることを明らかにしている。加えて網膜内層および神経線維層の菲薄化は視野感度の低下に先行して生じていることが解明した(図4)。

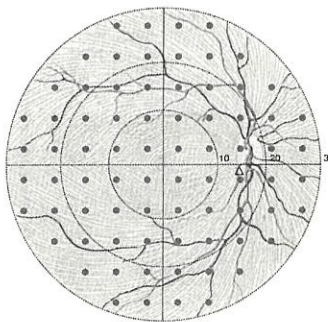
図4



10-2 視野指標 (mean deviation (MD)) と乳頭周囲網膜線維層厚 (RNFL)、神経節細胞複合体 (GCC) との相関

よって临床上、この領域の構造変化に注目して経過観察を行うことが、QOLの悪化を引き起こすような視野障害を早い段階で発見し、治療の強化に結び付けられることが示唆される。緑内障性視野障害の特徴は網膜神経線維の走行(図5)に沿って出現する感度低下であることから、2次元の広がりを持つ検査点をこれに沿った領域をクラスタとして処理することは感度および特異度の面から有用であるとされている。そこで我々は前年度の研究で得られた中心窩閾値との相関を元に視野領域のクラスタ化を行い、視野と構造の関係について明らかにした。

図5



視力と密接な関係を持つ中心窩閾値に加えて、中心 10 度内の視野は我々の日常生活に非常に重要な部位である。特に中心窩閾値との相関が高い C1 クラスタにおいては RNFL、GCL+、GCL++全てにおいて視野感度と高い相関を示したことより、いずれの網膜層厚測定も有用であると考えられた。また C2、C3 においては RNFL、GCL++が相関を認めた。GCL+では RNFL が解析に含まれないことから、網膜神経節細胞と内網状層の複合層の厚みに比べ、神経線維層厚の変化量が大きいいため、鋭敏に菲薄化を捉えることが可能であるためと考えられる。

以上より、QOL を重視した緑内障診療を行っていく上で必要な、極早期の中心視野障害を検出する目的で OCT を利用した黄斑部網膜内層の解析が有用であると考えられる。また、視野検査は患者に負担を強いる検査で頻回に行うことは困難である。一方で OCT は既にクリニックも含めた 8 割以上の眼科施設に導入されていることから、比較的簡便な中心視野障害の評価法となることが期待される。

結論

緑内障を対象に、中心視野感度と対応する部位の網膜構造変化との関係について明らかにした。中心窩閾値との相関に基づいてクラスタ化された各領域で黄斑部網膜内層の菲薄化が初期の視野障害を検出することが可能であることが確認された。

平成 27 年度水俣病研究事業

研究者 堀井 新 (新潟大学大学院教授医歯学総合研究科耳鼻咽喉科分野教授)

研究要旨

心因性素因の眼振への影響に関する検討

研究協力者

宮尾益道(新潟大学医歯学総合病院耳鼻咽喉科講師)

A) 研究目的：

めまいに心因性素因が強く関与することは以前より多く報告されている。眼振はめまいに特徴的な所見の一つであるが、心因性素因が眼振にどのように影響していくかを平衡機能検査等より分析する。有機水銀中毒（水俣病）は主に中枢性の聴覚・平衡障害を引き起こすが、近年ではその陳旧性変化の評価に、水俣病診断の主眼が移行している。社会的背景より、水俣病患者（疑い例含む）は様々な肉体的、精神的ストレスを抱えていることが予想され、心因性素因と平衡障害との関連を検討することは意義がある事と考えられる。

B) 研究方法：

当科で施行された、各種平衡機能検査（特に眼振所見）をもとに心因性めまいと診断された症例とその他の疾患群との相違を分析する。また、めまいの質問票(Dizziness Handicap Inventory)の結果との対比も検討する。心因性素因を持つ患者の眼振の特徴について解明することが、本計画の目標となる。

本研究では 2015 年 1 月から 2015 年 12 月までの 1 年間に、当科で平衡機能検査を施行しためまい症例 289 例を対象とした。平衡機能検査や病歴を基に診断し、質問票の結果に関しては事前にチェックすると診断に影響を与えてしまう可能性があるため、診断後に比較検討を行った。

C) 研究結果

めまい患者のうち、心因性素因が関与すると考えられた症例は 47 例(16.2%)であった。明らかな心因性めまいと診断されたものが 6 例、他の 41 例は他の器質的要因が認められなかった（狭義の）めまい症の中で心因性要因が関与していると考えられた症例である。心因性が疑われるめまいと代表的な末

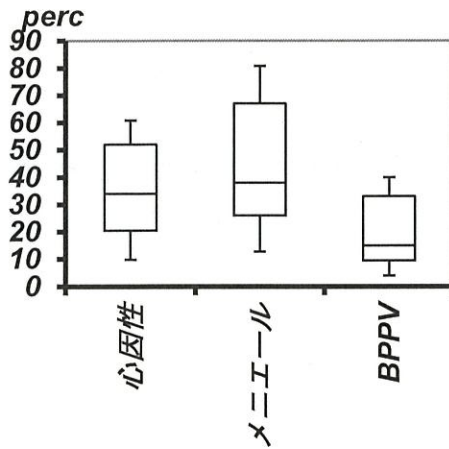
稍性疾患であるメニエール病、良性発作性頭位めまい症(BPPV)の3郡で比較検討した。

① 眼振所見

心因性めまいにおいて、電気眼振図検査で眼振（もしくは異常眼球運動）を認めた症例は5例(10.6%)であった。一方、メニエール病では40%に、BPPVでは37.5%に眼振が認められた。また、頭位眼振、頭位変換眼振検査ではメニエール病、BPPV共に精密検査上で眼振を認める症例が一定数存在したが、心因性めまい症例では全く認められなかった。

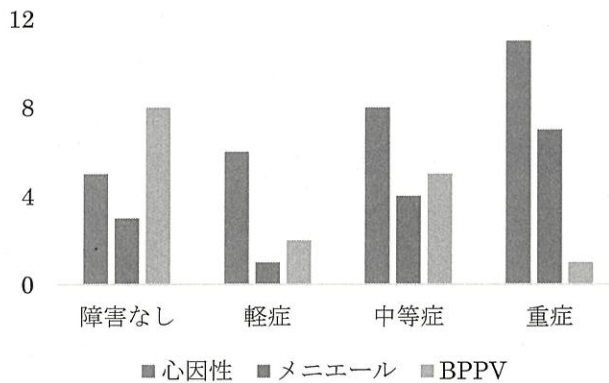
② Dizziness Handicap Inventory (DHI)

DHIは全疾患平均で35点であった。(中央値32点) DHIの重症度を0-14点：障害なし、16-26点：軽症、28-44点：中等症、46点以上：重症と区分した。



メニエール病は平均して最も得点が高かった。BPPVは他の2群に比し有意に得点は低かった。

重症度



重症度で分けると、心因性は重症の割合が高い。

めまい症例には、器質的異常がみられる例だけではなく、末梢前庭系や小脳脳幹系の平衡機能に異常のみられない症例も 25%程度みられることが知られている。末梢前庭障害では頭位刺激による眼振誘発がみられることが多いが、今回の検討では心因性めまいにおいて 1 例も認めなかった。頭位眼振検査や頭位変換眼振検査は、器質的疾患、特に末梢障害によるめまいを検出するのに有用と考えられる。心因性めまいの中には、電気眼振図で自発眼振を認めるものが少数であるが認められた。不安等による不自然な眼球運動（キョロキョロする等）を電気眼振図でとらえた可能性はある。

DHI はめまいによる障害度を評価するための質問紙で、Jacobson らにより作成され、本邦でも多施設で利用されている。DHI の合計点数が 46 点以上となるような重症例では、身体疾患の有無にかかわらず不安、抑うつなどの心因が高率に合併していると言われている。当科を受診しためまい患者全例における DHI は 35 点であり、これは中等症に該当する。既に、他施設で経過が思わしくなく、治療に難渋している例が多いためと思われ、明らかな心因的要因が認められなくても、ストレス等が難治化、めまいの遷延化につながっていると考えられる。また、心因性めまい、メニエール病、良性発作性頭位めまい症 (BPPV) の 3 郡で比較したところ、メニエール病でも DHI の点数が高くなる傾向にあった。メニエール病は内耳の器質的疾患であると同時に、ストレスとの関連が強いといわれており今回の結果はそれを支持するものであったと言える。重症度別に分けると、心因性めまいでは重症の割合が高く、他覚的検査で異常がみられないにもかかわらず DHI で高得点を認めるものは、心因性を強く疑い対応する必要があると思われた。

以上より、DHI はめまい患者の心因性素因の検出に有用と考えられた。今後は、1 つの間診票で不安傾向、うつ傾向を判断できる hospital anxiety and depression scale (HADS) も併用し、より効果的な治療を模索していきたいと考えている。

E) まとめ

心因性めまいにおいては、頭位不可による眼振誘発は起こらず、頭位眼振検査、頭位変換眼振検査は他の器質的疾患との鑑別に有用と考えられた。DHI はめまい患者の心因性要因の把握に有用であると考えられた。