

## 令和2年度 水俣病研究報告書

研究課題名：神経再生を誘導する末梢血単核球作用の検討

報告者：

新潟大学脳研究所臨床神経科学部門脳神経内科学分野 金澤雅人

目的：

脳内炎症性細胞ミクログリアや末梢血単核球は、低酸素低糖（OGD）刺激を与えることで、神経組織や血管の再生を来しうることを、脳血管障害モデルで示している<sup>1,2)</sup>。しかし、その再生の機序は十分にはわかっていない。OGD 糖刺激で末梢血単核球が、神経細胞再生に作用する機序を解明することができれば、水俣病における神経再生を可能にするものであり、細胞修飾機序解明を目的として、検討を行った。

方法：

1. 末梢血単核球から分泌されるサイトカイン、エクソソームを低酸素低糖刺激前後で、比較する。人から採血し、遠心分離、抗体を用いてマクロファージを含む単核球を分離し、OGD 刺激を行った。その後、正常状態と OGD 状態の培養上清を用い、神経保護、血管新生に作用する VEGF の ELISA を行った。また、細胞修飾機序としてエクソソームを考え、エクソソームの分離を ExoQuick® 試薬を用い、分離されていることを電子顕微鏡で同定した。
2. メチル水銀が与える影響を、ヒト、動物を問わず、既報について検索を行なう。もし有望な病態が同定できた場合には、今後の治療となりえるかも検討していく。

結果：

1. 末梢血単核球から分泌されるサイトカイン、エクソソーム

正常状態（Norm）、低酸素条件（OD）、低糖条件（GD）と OGD 状態の培養上清を用い、VEGF の ELISA を行った（図 1）。OGD では、OD、Norm より有意に VEGF 量が増加していた。また、単核球の培養上清から、エクソソームの分離を試みた。電子顕微鏡で観察したところ 50～100 nm のサイズの微粒子を観察し、エクソソームを分離していること確認した（図 2）。

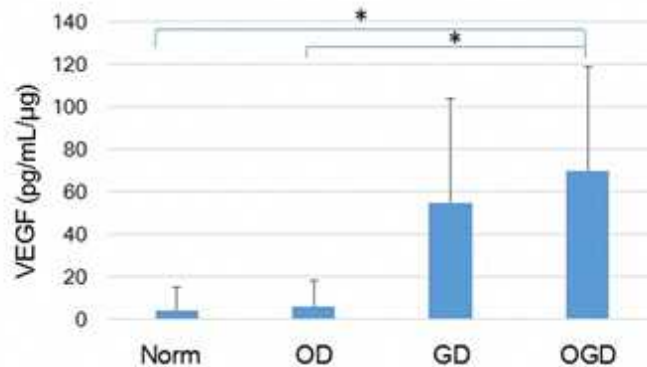


図1 ヒト由来単核球の OGD 刺激後の VEGF 分泌 \*P 値<0.05

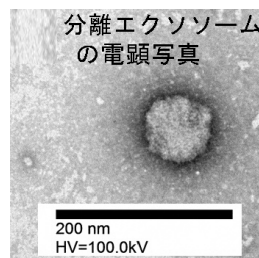


図2 分離後のエクソソーム

## 2. メチル水銀中毒が与える影響

水銀中毒と神経疾患の関係を示した総説では、メチル水銀中毒が血液脳関門破壊、血管性認知症、血管内皮細胞障害、大脳白質病変、脳卒中に関連していることを示していた<sup>3)</sup>。これは、線維芽細胞増殖因子の発現低下や VEGF 発現増加によることが示されていた。

### 考察とまとめ：

メチル水銀中毒では、神経細胞が障害されることが一般的であるが<sup>3)</sup>、さらに脳血管障害同様に血管系が障害されることを報告している<sup>4)</sup>。メチル水銀中毒と脳血管の関与に関しては、特に VEGF が影響する。VEGF は神経細胞再生、血管内皮細胞遊走、増殖、成熟に関与することから、重要な作用をもたらす可能性が考えられる。

今回の検討で、OGD 刺激で末梢血単核球が保護的な VEGF をヒト細胞でも分泌することを表し、細胞極性に関与するエクソソームを分離できていることを示した。メチル水銀をミクログリアの細胞培養液に添加すると、組織障害性の炎症性ミクログリア/マクロファージが増加することも示されている<sup>5)</sup>。炎症性ミクログリア/マクロファージが病態増悪に関わるのであれば、OGD 刺激保護的

マクロファージを増加させることで病態・症状を改善させる可能性がある。ミクログリアは、生体から採取することは困難である。今回、ミクログリアに性質が類似したマクロファージを含むヒト由来の末梢血単核球を分離し、その作用を明らかにした。このことは、水俣病の治療としても、末梢血単核球を OGD 刺激により、VEGF を分泌するタイプに修飾し、この細胞を用いた神経、血管再生に寄与する再生療法につながる可能性があると考えた。

本研究の結果は、今後の水俣病の治療の開発に貢献するものと考えられる。

## 文献

- 1) Kanazawa M, Miura M, Toriyabe M, et al. Microglia preconditioned by oxygen-glucose deprivation promote functional recovery in ischemic rats. *Sci Rep* 2017; 7: 42582.
- 2) Hatakeyama M, Kanazawa M, Ninomiya I, et al. A novel therapeutic approach using peripheral blood mononuclear cells preconditioned by oxygen-glucose deprivation. *Sci Rep* 2019; 9: 16819.
- 3) Patwa J, Flora SJS. Heavy Metal-Induced Cerebral Small Vessel Disease: Insights into Molecular Mechanisms and Possible Reversal Strategies. *Int J Mol Sci.* 2020; 21: 3862.
- 4) Takahashi T, Fujimura M, Koyama M, et al. Methyl mercury causes blood-brain barrier damage in rats via upregulation of vascular endothelial growth factor expression. *Plos one* 2017; 12: e0170623.
- 5) Hoshi T, Toyama T, Shinozaki Y, et al. Evaluation of M1-microglial activation by neurotoxic metals using optimized organotypic cerebral slice cultures. *J Toxicol Sci.* 2019; 44: 471-479.

# 水俣病、緑内障における視野及び 光干渉断層計 (OCT) 網膜内層構造と視覚の質 (QOV) の関係

新潟大学大学院医歯学総合研究科眼科学分野

福地健郎

## はじめに

水俣病や緑内障では中心視野は視覚の質 (QOV) に大きくかかわるとされる。当科における研究でも、光干渉断層計 (OCT) による黄斑部網膜内層厚と視野検査による黄斑部網膜感度や中心窩閾値、つまり構造と機能に相関があることを明らかにしてきた。また、ハンフリー視野検査で得られる視野の重症度の指標が緑内障患者の QOV と相関することを報告した。今回の研究は、OCT で得られる網膜内層構造と視野及び QOV の関係を明らかにすることを目的とする。

## 対象

新潟大学医歯学総合病院眼科通院中、入院患者のうち、同意が得られた水俣病、広義・POAG 患者 210 名 (男性 108 名、女性 102 名) を対象とした。平均年齢は  $59.1 \pm 11.5$  歳であった。ハンフリー視野計、測定モード 24-2 (HFA24-2) の平均偏差 (MD) は better eye が  $-8.7 \pm 7.2$  dB、worse eye が  $-15.3 \pm 7.4$  dB、10-2 の MD は better eye が  $-7.4 \pm 6.6$ 、worse eye が  $-14.9 \pm 8.2$  dB であった。眼軸が 28mm を超えるような強度近視や、水俣病、緑内障以外の視力、視野に影響する可能性のある疾患を有する患者は除外した。

## 方法

視覚に関連した健康関連 QOL を測定する尺度である National Eye Institute Visual Function Questionnaire-25 (NEI VFQ-25) を用いて自己記入式アンケートを実施した。アンケート結果をラッシュスコア化し、そのスコアと、アンケートの前後半年以内に測定した視力 (logMAR 視力)、ハンフリー視野の指標 (MD、visual field index (VFI)、中心窩閾値)、中心  $24^\circ$  内及び  $10^\circ$  内の両眼重ね合わせ視野及び OCT での網膜内層厚に相関があるのかを検討した。両眼重ね合わせ視野には HFA24-2 の IVF (integrated visual field) 及び 10-2 の IVF、HFA24-2 の結果と 10-2 の結果を重ね合わせ、さらに両眼の視野を重ね合わせた高密度重ね合わせ視野 (HDIVF) を用いた。視力、視野指標での検討の際にはそれぞれの指標の値が良い方の眼を better eye (BE)、悪い方の眼を worse eye (WE) と定義した。OCT での網膜内層厚の検討の際には HFA10-2 の MD で BE と WE を定義した。OCT は ZEISS: Cirrus HD-OCT を使用し、網膜内層は神経節細胞層 (GCL) + 内網状層 (IPL) の厚みを用いた。その際に、図 1 に示すように既報<sup>1)</sup> と同様の方法を用いて、それぞれの領域の良い値を組み合わせたデータを用いた。統計にはスピアマンの順位相関係数を用いた。

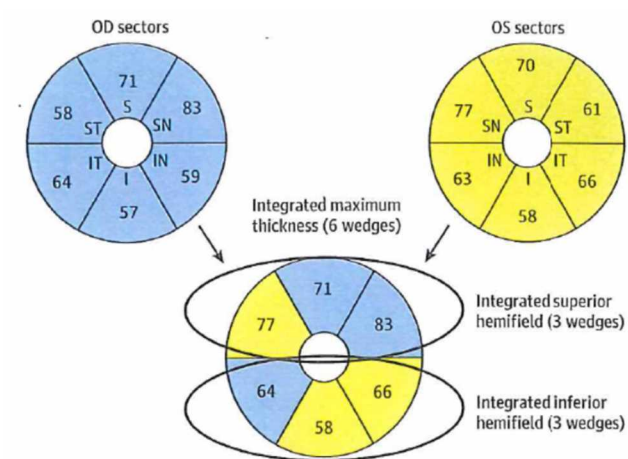


図 1

## 結果

210 例における VFQ-25 ラッシュスコアとそれぞれの指標の相関を表 1 に示す。すべての指標で相関を認めた。HFA24-2MD、HFA10-2MD、VFI といった我々が通常用いている指標は概ね同様の相関の強さであった。重ね合わせ視野では HFA24-2 と 10-2 単独よりも、両方を用いた HDIVF の方がより強い相関を示した。また、すべての指標において WE の方が BE よりも強い相関を示す傾向にあった。

210例	VFQ-25 ラッシュスコア	
	相関係数	P値
BE logMAR	-0.2045	0.0038
WE logMAR	-0.3816	P < 0.001
BE 中心窩閾値(dB)	0.3126	P < 0.001
WE 中心窩閾値(dB)	0.3705	P < 0.001
BE HFA24-2 MD(dB)	0.4173	P < 0.001
WE HFA24-2 MD(dB)	0.4714	P < 0.001
BE VFI(%)	0.4167	P < 0.001
WE VFI(%)	0.4743	P < 0.001
BE HFA10-2 MD(dB)	0.4089	P < 0.001
WE HFA10-2 MD(dB)	0.4578	P < 0.001
IVF HFA24-2 (dB)	0.4398	P < 0.001
IVF HFA10-2 (dB)	0.4438	P < 0.001
HDIVF HFA24-2+10-2 (dB)	0.4592	P < 0.001

表 1 視力、視野の指標とラッシュスコアの相関

210 例中、OCT による信号強度が 6 以上の信頼性のある画像が得られた 185 例を対象とした GCL+IPL とラッシュスコアの相関を表 2 に示す。上方が下方よりも強い相関を示す傾向がみられた。BE と WE には一定の傾向は認められなかった。

	BE 相関係数	P値	WE 相関係数	P値	両眼 相関係数	P値
全体平均	0.3309	P < 0.001	0.3255	P < 0.001	0.3402	P < 0.001
上方平均	0.3135	P < 0.001	0.3296	P < 0.001	0.3357	P < 0.001
下方平均	0.2848	P < 0.001	0.2467	P < 0.001	0.2864	P < 0.001

表 2 網膜内層厚 (GCL+IPL) とラッシュスコアの相関

## 考察

緑内障、水俣病患者において、視力、中心窩閾値、視野の重症度の指標は QOV と相関を認めた。視力と中心窩閾値は、他の指標に比べてやや弱い相関であった。Sawada ら<sup>2)</sup>は、視力は VFI や MD に比して、QOV との相関は弱いと本結果と同様の報告しており、その理由として視力は最後まで残りやすいので、緑内障の病期を反映していないためであると述べている。中心窩閾値と QOV の相関に関する既報はないが、中心窩閾値は視力と相関しており<sup>4)</sup>、視力と同様に同じ値でも病期に大きな差があるためと考えられる。また、対象に視力や中心窩閾値良好例が多く含まれていることも結果に影響している可能性がある。HFA24-2 及び 10-2 の MD、VFI と QOV の相関は同程度であった。中心視野と VFQ に関しては、中心視野に加重している VFIの方が MD よりも VFQ との相関が強いとの報告<sup>2)</sup>、HFA10-2の方が HFA24-2 よりも VFQ25 スコアとの相関が強いという報告<sup>4)</sup>、初期緑内障でも中心 10° 内視野欠損があると VFQ25 スコアが低下するという報告<sup>5)</sup>等、中心視野がより QOV に影響しているとの報告が多いが、本研究において差は認められなかった。両眼重ね合わせ視野に関して、本結果では BE < IVF < WE という相関の強さであった。Chun ら<sup>6)</sup>は BE と同様の相関を示すと報告している。BE と WE の比較で、MD や VFI では BEの方が QOV に与える影響は大きいとの報告が多い<sup>6)</sup>が、本結果は逆で WEの方が QOV とより相関が強いというものであった。これには対象の病期が影響している可能性もある。本研究では HFA24-2MD が BE で  $-8.7 \pm 7.2\text{dB}$ 、WE で  $-15.3 \pm 7.4\text{dB}$  であったが、既報では HFA30-2MD が BE で  $-4.0 \pm 5.8\text{dB}$ 、WE で  $-8.7 \pm 7.5\text{dB}$  であった。大学という特性上、対象に重症例が多く含まれていた。

OCT の網膜内層厚と QOV に関して、本検討では弱いながらも相関を認めたが、Prager らは VFQ-25 ラッシュスコアと GCL+IPL には相関がないと報告している。同様に本研究には重症例が多く含まれていたため、このことが結果に影響した可能性がある。また BE と WE の定義が既報は RGC+IPL を用いているのに対して、本研究は HFA10-2MD を用いて

いる点も異なり、結果に影響している可能性がある。

本研究内容は第74回日本臨床眼科学会の特別講演「緑内障からQOLを守るためのストラテジー EBM からPCMへ」で発表した。

国内学会への参加、発表に加え、海外学会にもオンラインで参加し、本研究内容を発展させるべく、情報の収集を行っている。今後、症例数を増やして検討を行い、さらに研究を進めていきたい。

#### 参考文献

- 1) Prager AJ et al. : Association of Glaucoma-Related, Optical Coherence Tomography-Measured Macular Damage With Vision-Related Quality of Life. JAMA Ophthalmol 135: 783-788, 2017.
- 2) Sawada H et al. : Evaluation of the relationship between quality of vision and the visual function index in Japanese glaucoma patients. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 249: 1721-1727, 2011.
- 3) 本間友里恵ら: 広義・原発開放隅角緑内障眼の中心窩閾値と矯正視力, 傍中心窩視野感度閾値の相関. あたらしい眼科. 34, 1617-21, 2017.
- 4) Blumberg DM et al. : Association Between Undetected 10-2 Visual Field Damage and Vision-Related Quality of Life in Patients With Glaucoma. JAMA Ophthalmol. 135 :742-747, 2017.
- 5) Garg A et al. : Macular Damage, as Determined by Structure-Function Staging, Is Associated With Worse Vision-related Quality of Life in Early Glaucoma. Am J Ophthalmol. 194: 88-94, 2018.
- 6) Chun YS et al : Comparison of Impact of Monocular and Integrated Binocular Visual Fields on Vision-related Quality of Life. J Glaucoma 26 :283-291, 2017.

令和2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

聴覚伝導路を用いた感覚代行システムによる平衡リハビリトレーニングの検討

##### A) 研究目的：

感覚代行とは、最新の医工連携技術により、失われた感覚機能を他の残された感覚受容体や感覚伝達系で代替する画期的な技術である。主に視覚系や聴覚系で進められ、視覚障害者では視覚の役割を健全な触覚や聴覚で代行させている。われわれは聴覚伝導路を利用した感覚代行技術を用いて体平衡を維持するトレーニングを臨床応用したい。

##### B) 研究方法：

聴覚伝導路を利用した感覚代行技術に注目し、平衡機能患者にジャイロセンサーを組み込んだステレオヘッドホンを装着し、ジャイロセンサーでとらえた平衡感覚をヘッドホンから左右方向のピッチとボリュームの程度で聴覚情報として入力し、それに合わせて体平衡を維持するトレーニングの有効性を検討する。

##### C) 研究結果

長岡技術科学大学工学部助教、和田森 直先生と医工連携を図り、デバイス開発やリハビリメニュー、治療評価について、具体的な共同研究の役割として、和田森先生が感覚代行システムと新規平衡状態評価のデバイス、患者の治療コンプライアンス向上目的にスマートフォンアプリ「i めまい日記」の開発を行い、当科では適応症例の選定、リハビリ指導、感覚代行デバイスの性能や感覚代行リハビリの治療評価を行う。

感覚代行装置は、①頭や体に取り付けたセンサから取得した偏倚、傾きなどの平衡情報取得する検出系と、②その平衡情報を中枢神経へ代行伝達する伝達系、③平衡情報を伝達信号へ変換および各系を制御する制御系の3つから構成される。傾いた方向から音が聞こえるように変換した「立体音響」をイヤホンから出力し、例えば、身体の右方への傾きを感覚代

行装置の加速度検出装置が感知すると、右方向から「立体音響」の音が聞こえる。この「立体音響」の音信号が内耳を介して中枢へと伝わる。被験者は、立体音響の方向から自分の体の傾きを立体的に理解し、傾きと逆方向へ体の向きを修正することで体平衡を正しい位置に戻ることができる。このような感覚代行装置を用いて平衡訓練を行う。

現在、上記の計画で試作機を作成中で、綿密な連携をとってシステム開発を行っている。今年度は感覚代行装置のセンサ部分の開発を進めているが、3軸の角度検出をモニターし、bluetoothを介してiPadへデータを送信し、リアルタイムに3軸の角度を可視化する事が可能となった。この試作機の角速度データと既存の重心動揺計の重心位置を同時に測定し、平衡機能正常な症例のデータ採取、比較検討を行い、新規装置のブラッシュアップを図り、音響出力の開発も並行している。また、同時に適応症例を選定しながら治療前の平衡状態を外来診療の中で行い、感覚代行という新たな準備を進めている。

#### D) 考察・まとめ

本研究により、これまで難治とされてきた慢性めまいに対する新規治療開発の礎となるともに、慢性めまいのメカニズム解明に寄与し、水俣病あるいは水俣病の鑑別診断や治療に資する知見に繋がり、高齢化の進む水俣病患者の健康対策に資すると考えている。

#### 研究要旨②

慢性めまいに対する診断方法確立とリハビリテーション介入による治療効果判定

##### A) 研究目的：

メチル水銀中毒による平衡障害は慢性のふらつきを訴える。一般に3か月以上めまい、ふらつきを訴える慢性めまいでは、理学的所見に乏しく、診断が困難である。診断のための簡便な問診票を作成し、診断を容易にするとともに、それぞれの疾患に応じたリハビリテーションを開発する。

##### B) 研究方法：

過去3年間の慢性めまい患者について、めまいの持続時間、めまい誘発要因など問診から情報を抽出し、さらに、眼振検査、重心動揺計による体平衡障害の検査結果を照らし合わせ、慢性めまいの診断に適切な問診票を作成する。その後、作成した問診票の妥当性を検証するために前向きで検討する。同時に、前庭リハビリテーションの介入による平衡障害改善への効果について、疾患ごとに検討し、適切なリハビリ内容を構築する。簡便に診断が可能な問

診票の作成により、慢性的なふらつきを訴える水俣病の診断に際して、より簡便に他疾患を除外できようになると考えられる。

#### C) 研究結果

昨年度に症例を追加し、当科を受診した慢性めまい 238 例の解析を行ったところ、持続性知覚性姿勢誘発めまいが 92 例ともっとも多く、心因性めまいが 42 例、前庭代償不全が 31 例であり、3 疾患で全体の 70%をしめた。他のいずれの診断にもあてはまらないめまい症 16%を加えた 202 例 86%に対して、当科で作成した問診表と平衡機能検査、聴力検査をあわせて作成したフローチャートを用いて分類した。3 疾患の正診率が最も高かったフローは、持続性知覚性姿勢誘発めまい、前庭代償不全、心因性の順に、各疾患の正診率は、90%、64.2%、26.3%となり、3 疾患の正診率は 74.8% と診断ツールとして有用であることが示された。

#### D) 考察・まとめ

いままで診断ができずに、適切な治療に導くことができなかった慢性めまい疾患の原因疾患の頻度が明らかになった。理学的所見は少ないものの、問診や年齢などから、疾患を絞り込むフローチャートの作成ができた。今後はさらに症例を蓄積しつつ、作成したフローチャートを用いて診断し、有用性と妥当性を検証する。さらに、慢性めまいの代表疾患である、持続性知覚性姿勢誘発めまい、前庭代償不全、心因性めまいを正確に診断することによって慢性めまいをよりの確に診断することが可能となった。さらに、疾患ごとに適切なリハビリを構築する手がかりとなりうる。鑑別診断として重要なこれらの診断を容易に診断できるようになり、水俣病健診にとって有用な知見が得られた。