

特集 「環境医学と神経系疾患」**神経病理から見たSMONと水俣病の展開**

長嶋和郎

北海道大学医学部病理学第二講座

薬害SMONおよび公害水俣病の発症が終息して20年以上経過し、すでに歴史的な病気となっている。キノフォルムやメチル水銀が肝臓や腎臓に多量に存在するが、障害部位が神経系に限られており、選択的に神経組織が犠牲となった理由は未だ不明である。しかしその後続いた研究からいくつかの新しい知見が得られたので紹介し、環境汚染における神経組織の感受性とその特異性について考察する。

SMONは犬を用いた実験でほぼヒトSMONと同じ病態を誘発することができる。キノフォルムを経口投与し下肢不全麻痺を呈した犬はヒトSMON同様に脊髄後索・視神経に変性が見られる。変性axonは200KD燐酸化Neurofilamentのモノクロナール抗体を用いた免疫染色で濃染することで容易に病変を追及することが可能となった。これを応用するとSMONでは脊髄小脳路にも変性が生じていることが明らかとなり、また脊髄小脳路線維の小脳皮質終末は顆粒層のcerebellar glomeruliに相当していることが電顕的検索で始めて明らかとなった。

水俣病の動物モデルとしてはメチル水銀投与ラットで知覚神経系と小脳に特異的病変を誘発することができる。SMONと同様変性axonは200KD燐酸化Neurofilamentが濃染し、実際に変性部位で燐酸化Neurofilamentの増量をWestern blot 解析で示すことができた。小脳の変性は顆粒細胞の核凝縮による細胞死であり、電顕的にもアポトーシスの所見であった。また末梢神経の再生は神経節近傍から始まり、燐酸化Neurofilament 蛋白は断片的に発現され、変性と再生におけるNeurofilament 蛋白の動向に注目された。

以上の所見からこれらの神経毒性物質が神経障害を誘発する機構を解析する上で貴重な手掛かりが得られるものと推測された。

1. SMON実験犬の新たな解析

[目的] 実験的SMONにおいて脊髄小脳路の終末に当

たる小脳皮質の変化を微細構造的に明らかにする。

[方法] 雑犬2頭にキノフォルムを漸次増量法式にて50mg~1,000mgを4週間以上連続投与し(全量6~10g/kg)、後肢麻痺による発症を確認し、ケタラール麻酔後4%パラフォルムによる還流固定後、中枢及び末梢神経より組織を採取した。小脳虫部の一分を2.5%グルタル、1%オスミウムに再固定し電子顕微鏡にて観察した。対照犬2頭も同様に検索し、さらに過去の実験材料をも参考とした。

[結果] 発症犬は脊髄後索に変性が認められSMONと確認された。脊髄小脳路にも変性が認められ、変性は200KD 燐酸化ニューロフィラメント認識抗体を用いた免疫染色にて明瞭に認められた。変性線維は小脳白質にまで追跡できた。小脳皮質には顕微鏡的に異常を認めなかった。

電顕でみるとPurkinje 細胞には著変が見られないがmossy fiber rosette の不明瞭化、glomerulus のsynaps 腫大空胞化、顆粒細胞の細胞質膨化空胞化、Purkinje 細胞周囲に多数の膨らんだシナプス終末がみられた(1)。

[考察] 今回の研究は脊髄小脳路の最終末である小脳にどのような変化が生じているかを中心として検索したが、顕微鏡的にはほとんど異常を認めなかった。しかし電顕でみると脊髄小脳路の終末と言われている苔状線維のみならず顆粒細胞とそのシナプス終末にも変化が見られ、かなり広範な異常が小脳皮質に生じていることが判明した。Purkinje 細胞周囲のシナプスは登状線維の終末に相当しており、オリブ核神経細胞の変化と考えられた。

[結論] SMONにおける小脳皮質には小脳皮質求心性線維終末の二次性変化のみならず顆粒細胞などの一次変性も存在することが示唆された。

別刷請求宛先：長嶋和郎

〒060 札幌市北区北15条西7丁目 北海道大学医学部病理学第二講座

Reprint Requests to Kazuo Nagashima, Department of Pathology, Hokkaido University School of Medicine, N-15, W-7, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 060 Japan

2. 実験的ラット有機水銀中毒の新知見

[目的] メチル水銀中毒症からの回復、すなわち神経再生の程度と期間と水銀量との関係を調べ、ヒト水俣病の回復過程を解析する。ついで回復再生促進剤などの効果を判定する指標となる動物モデルを作成し、その神経病理学的基礎を確立する。

[方法] メチル水銀 (methyl mercury chloride: MMC, Nacalai Tasque INC) を胃ゾンデを用いて隔日経口投与した。直接刺激と悪臭を避けるため5% Powdered milk (Yukijirushi) in 5% ethanol と0.25% Vanilla essence (Meijiya) にてMMCを溶解し投与した。

動物はウイスター系雄性ラット (8週齢、体重200g前後) を使用した。A群 (n=4) : 8mg/kg/2 days, ×12。B群 (n=8) : 4mg/kg/2 days, ×16。B'群 (n=8) : 4mg/kg/2 days, ×12。C群 (n=4) : 溶媒液 (5% powdered milk, 0.25% Vanilla essence in 5% ethanol)。

A群及びB群は発症時にether 麻酔後4% paraformaldehyde の還流固定により屠殺し、各臓器の水銀量の測定と、神経組織の病理学的検索を行った。水銀量は還元気化無炎原子吸光法により測定した (筑波大学社会医学系)。

病理学的には通常のHE染色の他、KB法による髄鞘染色、Bodian 法による軸索染色、200KD Neurofilament 免疫染色を行った。また小脳・三叉神経節・末梢神経については電子顕微鏡の検索も行った。

[結果]

1) 臨床症状と体重変化: A群は投与8回目頃より体重減少が見られ、12回後に後肢交差にて発症し瀕死の状態となった。B群では投与8回目頃より体重減少が見られ、16回投与後発症し、瀕死の状態となった。B群のうち一部の動物は3ヶ月間存命させたのち症状回復の様子を検索した。B群の投与量を12回目でやめ観察したB'群はわずかな異常症状を呈したまま体重は減少せず、長期間の観察が可能となった。

この結果B'群 (4mg/kg/2 days ×12) が回復を観察する一つの基準となった。

2) 蓄積水銀量: A群発症時では大脳・小脳に約20μg/gの蓄積が見られ、脊髄・末梢神経では12~13μg/gであった。投与量を下げたB群では発症時大脳・小脳で約15μg/gで脊髄・末梢神経でもそれぞれA群より少ない量で発症していた。B群投与量で12回投与したB'群では大脳・小脳・脊髄ではほぼ1/3~1/4に減少していた

が末梢神経ではさほど減少してなく、この群での病変が末梢神経に強いことと関連していることが示唆された。投与中止後3ヶ月目の動物は症状が持続しているにもかかわらず水銀量はいずれも1/10以下となっていた。ただし腎臓には高濃度の水銀が検出された。

3) 神経病理所見:

大脳: すべての群において大脳皮質や基底核に病変は見られなかった。特に瀕死となつてから3ヶ月経過した動物でも大脳視覚野に著変は見られず、猫やヒトと病変が異なることが明らかとなった。

小脳: A群でもB群でも顆粒細胞に変性が見られ、小型神経細胞はApoptosisの形態を取つて変性していた。瀕死の動物の3ヶ月後では顆粒細胞はすべて消失し、glia線維と石灰沈着が見られた。B'群の動物には変化が見られず、この群での投与量では下記末梢神経が変性しており、末梢神経よりも小脳顆粒細胞のほうがより抵抗性を示すことが判明した。

脊髄: A群B群ともに脊髄後索の知覚神経流入路に変性が見られた。変性は末梢神経変性に連続するもので、B'群6ヶ月後でも変性線維が200KD Neurofilament 抗体にて陽性に染色された。B'群の投与量でも脊髄の再生が完成するには6ヶ月以上必要とすることが明らかとなった。

神経節・末梢神経: A群、B群及びB'群のすべての群で知覚脊髄根神経・神経節内神経線維・末梢神経に変性が認められた。200KD Neurofilament 免疫染色では変性した軸索が濃染するが、急性期では神経の変性にもかかわらず神経節細胞は染色されない。ところが慢性期の回復期では軸索の染色は少ないが神経細胞が強く染まること判明した。変性末梢神経も濃染しているが、再生期ではmyelin形成やaxon再生はそれぞれKB染色、Bodian染色にて認められるものの200KD Neurofilament染色では断片的に陽性所見が得られ、神経再生におけるフィラメント蛋白の発現と線維形成に分離現象が観察された。

[考察] 山口他 (1991) (2) の報告によると7.98mg/kg/dayのMMC皮下投与で発症時水銀量は大脳で30μg/g、脊髄・末梢で20μg/gとなっている。今回の我々の投与方法では発症時大脳で15μg/g、脊髄・末梢で10μg/gの量であり、隔日投与により少ない量で発症することが判明した。さらに2mg/kg/every other dayなどの少ない量で実験しMMCの最小発症量を決定することが重要と考えられた。また大脳・小脳に比べ脊髄・末梢の

ほうが少ないことも判明した。

かなりの重症から存命させた動物においても視覚野を含めた大脳皮質に病変が見られなかったことはラットの病変がヒトや猫と異なることを現していると考えられた。

小脳では急性の変性時には顆粒層細胞がApoptosisの形態を取って変性していくことが推測され、MMCによる細胞変性を考える上で重要な所見と考えられた。重症から3ヶ月経た動物では顆粒層細胞がほとんど消失し、石灰化した玉が形成されることが明瞭となった。しかし小量にて発症させた動物では小脳の変性は見られないことが明らかとなった。

脊髄後索には慢性期になっても変性が残存した。はたしてラットの中樞神経病変が再生するのかをさらに長期間で観察する必要があると考えられた。

末梢神経変性は最も少ない量で生じ、かつ6ヶ月後でも完全に修復していなかった。しかし神経節近傍の神経線維は比較的回復しており、末梢神経の中樞側から再生していくことが推測された。その間 200KD Neurofilament 蛋白は断片的に発現していることが観察された。また発症時では見られなかった神経節神経細胞が200KD Neurofilament に陽性になることも観察された。このような現象がどのような意義を持っているのかの検索が今後の課題と考えられた。

[結論]

ウイスター系ラットを用いたMMCの種々の投与方法の中から神経の変性と再生を観察できる条件として4mg/kg/every other day ×12 経口投与が一つの基準と考えられた。この条件では大脳・小脳に病変はなく、末梢神経に変性が見られた。この変性は6ヶ月後に回復過程を示し、神経再生を検索していく病理学的基礎となると考えられた。

おわりに

SMONと水俣病は医療薬剤問題および環境汚染問題の最もおおきな疾患であった。原因判明をもってこの問題を終結せずに常にそれぞれの病態発症機構を追及する中で次々と新しい知見が得られ、神経病理学のみならず神経学や幅広く生物現象の問題にまで発展してきたと言えよう。環境問題とその絶えまない研究が広く生物および生命機能の解析に貴重であることを認識し、多くの人々の理解を得ることが大切なことと思われた。

文献

- 1) 長嶋和郎、他：厚生省特定疾患スモン調査研究班、平成4年度研究報告書、p. 90, 1993
- 2) 山口誠哉、他：水俣病に関する総合的研究、日本公衆衛生協会、p. 91, 1991