

精神分裂病死後脳におけるシナプス蛋白の研究

分担研究者 杠 岳文 国立肥前療養所 神経科医長
研究協力者 中原辰雄 九州大学理学部 助教授、国立肥前療養所臨床研究部
本村啓介 国立肥前療養所臨床研究部

研究要旨：ラットにメタアンフェタミンを14日間投与したモデルで、前頭前野の synaptotagmin, synaptobrevin の mRNA が有意に増加し、14日間の断薬後には対照群との有意差がないことや、ラットにハロペリドールを投与したモデルでは数種類のシナプス蛋白の mRNA が有意に低下することが確かめられた。精神分裂病死後脳についても、これまで当院で得られた凍結サンプルを用いて、ウエスタンブロッティング法にて、シナプス蛋白の測定を開始した。

A. 研究目的

精神分裂病の器質的背景の解明は待望久しい研究課題であるが、混沌としており、未だ病因に結びつくようなめぼしい成果が得られていないのが現状である。国立肥前療養所には約350名ほどの患者が入院治療を行っており、平成9年-10年の国立肥前療養所剖検例でブレインバンクに登録された14例中6例が精神分裂病の症例である。精神分裂病の死後脳に関しては、これまで主に神経伝達物質及びその受容体、細胞内伝達に関連する蛋白、あるいは細胞骨格蛋白などについて研究されてきた。われわれは、シナプス前ニューロン末端からの神経伝達物質の開口放出に関連する一群の蛋白であり、神経伝達の変化を伴う様々な病態に関与している可能性のある分子の一つであるシナプス蛋白に注目し、ラットを用いた基礎的研究を経て、ヒト精神分裂病脳でのいくつかのシナプス蛋白の測定に着手した。

B. 研究方法

1) ラットを用いた基礎的研究

Wistar 系雄性ラットにメタアンフェタミン (5mg/kg) あるいは生理食塩水を1日1回14日間投与し、1日及び14日間の断薬後に断頭し、前頭前野、側坐核、線条体等の部位でのシナプス小胞蛋白質である synaptotagmin, synaptobrevin の mRNA を定量した。また同様にラットにハロペリドールの持効剤を投与し、28日後に断頭し、前頭内側野、線条体、側坐核等での synaptotagmin, synaptobrevin 等数種類のシナプス蛋白の mRNA を測定した。

2) ヒト精神分裂病脳を用いた予備研究

国立肥前療養所で解剖され凍結保存された精神分裂病脳の皮質の一部を切り出しウエスタンブロッティング法で、syntaxine, SNAP25, synaptotagmine, synaptophysine 等のシナプス蛋白の測定を行った。

C. 研究結果

1) ラットを用いた基礎的研究

ラットにメタアンフェタミンを投与した群では、前頭前野の synaptotagmin, synaptobrevin の mRNA が有意に増加し、14日間の断薬後には対照群との有意差がないことが明らかになった。一方、ラットにハロペリドールを投与したモデルでは側坐核において数種類のシナプス蛋白の mRNA が有意に低下することが確かめられた。

2) ヒト精神分裂病脳を用いた予備研究

ヒト脳においても syntaxine, SNAP25, synaptotagmine, synaptophysine 等のシナプス蛋白を定量する手技がウエスタンブロッティング法にて確立された。

D. 考察

精神分裂病死後脳におけるシナプス蛋白の研究は1990年以降いくつかの報告がみられるが、未だ病因の解明には至っていない。われわれがラットを用いた研究で得た結果は、覚醒剤精神病や精神分裂病の病態解明のヒントになりうるものであり、この結果を踏まえながら、ヒト精神分裂病脳のサンプル数を増やし健常者と比較しながらシナプス蛋白の mRNA 及び蛋白の測定を行いたい。

E. 結論

神経伝達の変化を伴う様々な病態に関与している可能性のあるシナプス蛋白に注目し、ラットを用いた基礎的研究を経て、ヒト精神分裂病脳でのいくつかのシナプス蛋白の測定に着手した。

F. 研究発表

1) Nakahara T, Nakamura K, Tsutsumi T, et al. Effect of chronic haloperidol treatment on synaptic protein mRNAs in the rat brain. Mol Brain Res 1998; 61: 238-242

前・側頭葉の著明な萎縮を認めた *Argyrophilic grain disease* の一例

分担研究者 井原 雄悦 国立療養所南岡山病院 神経内科 医長

臨床研究部治療開発研究室長

【研究要旨】

44歳で発症した *argyrophilic grain disease* の1例について神経病理学的検討を行った。本症例では前・側頭葉の著明な萎縮を認めるものの Pick 球を欠き、皮質下には *coiled body* が多発していた。また海馬では *argyrophilic grain* が多発し、*Gallyas-negative/ATP8-positive* な神経細胞を多数認めた。本症例は発症が早く、前・側頭葉の著明な萎縮を示す点がこれまでに報告された症例と異なり、*argyrophilic grain disease* の位置付けを考える上で貴重な症例と考えられた。

共同研究者

田辺康之¹, 石津秀樹¹, 黒田重利¹, 高田 裕², 早原敏之²

¹岡山大学・精神科神経科

²国立療養所南岡山病院・神経内科・臨床研究部

A. 研究目的

Argyrophilic grains(AG)は海馬、海馬傍回に認められる嗜銀性の顆粒状構造物で、ADやパーキンソン病(PaD)に共存するもの、単独で出現し皮質下に *coiled body*(CB)を伴うものがあり、後者で痴呆を伴うものを Braakらは *Argyrophilic grain disease* (AGD)と提唱した。その後、AGは進行性核上麻痺、Pick病等において伴うものが報告されている。病理学的にAGのみを認めるものは臨床的には痴呆を認めるもの、認めないものそれぞれが報告されている。AGは非特異的なものか、加齢による所見という報告もあり、その位置づけに関してはいまだ議論をよんでいる。今回我々はピック病様症状を呈し、前・側頭葉の萎縮を認め、AGとCBが多発していたAGDの一例について臨床病理学的検討を加えて報告する。

B. 方法・対象

症例 死亡時60歳男性。家族歴は認めない。お

となしい性格で尋常高等小学校卒。特に問題なく育った。26歳時結婚。34歳時兵役の際に罹患したと思われるマラリアの熱発があった。44歳時人の物がなんでも欲しくなり、空き巣に入り警察に逮捕される。その際盗品をどこに隠したのか自分でも思い出せなかった。何度も同じ動作を繰り返す。55歳時入院時、見当識欠如、多幸的、多弁、軽躁状態。WAIS: 言語性IQ72、動作性IQ78。記銘力障害はそれほど目立たない。57歳時何でも口に入れる。無関心。放便、失禁、不潔行為。58歳時寝たきりとなり、全面介助。60歳時アアアと声を出すのみ。上部消化管出血にて鬼籍に入る。全経過16年。

上記の症例について、以下の方法で検討を行う。

1. ホルマリン固定後のパラフィン切片を用いて一般染色の他、Bodian 染色、Gallyas-Braak 染色を行う。
2. 免疫染色は抗タウ抗体 (τ -1, τ -2, τ -14, τ -46, AT8), 抗ニューロフィラメント抗体 (SMI-31, SMI-32), 抗ユビキチン抗体, 抗 α β クリスタリン抗体を使用する。
3. 一部の切片においては Gallyas-Braak 染色と AT8 免疫染色の二重染色を行う。

C. 研究結果

肉眼所見: 脳重1040g。前頭葉、側頭葉、脳梁の著明な萎縮。側脳室の著明な拡大。

表1. 組織学的所見

	Argyrophilic Grains	Gallyas-negative / AT8-positive neuron	Gallyas-positive Neuronal inclusion
Superior frontal cortex	±	+	±/-
Middle frontal cortex	±/-	++	±
Inferior frontal cortex	+	++	±
Cingulate	+	++	±
Superior temporal cortex	++	++	-
Medial temporal cortex	++	++	-
Inferior temporal cortex	++	++	-
Parietal cortex	-	++	-
Occipital cortex	-	±	-
CA1 hippocampus	+++	+++	-
CA2 hippocampus	±	++	-
CA3 hippocampus	-	±	-
CA4 hippocampus	±	±	-
Subiculum	+++	+++	-
Fascia dentata	±	+	-
Parahippocampus	++	+++	±/-
Amygdala	n.a.	n.a.	n.a.
Thalamus	-	±	-
Subthalamic nucleus	-	±	±
Putamen	±	++	±
Caudate	±	++	-
Globus pallidum	-	++	-
Clastrum	-	+	-
Insular	±	++	-
Substantia nigra	±	-	++
Oculomotor nucleus	-	-	++
Ventro-tegmental mediobasalis nucleus	-	-	++
Red nucleus	-	+	-
Locus ceruleus	-	-	+
Pontine nucleus	-	±	-
Purkinje cells	-	-	-
Dentate nucleus	-	±	-
Hypoglossal nucleus	-	+	±
Inferior olivary nucleus	-	-	±/+

表2. 免疫組織学的所見

Antigen	Antibody	Grain	NFT	Gallyas(-)neuron
Tau	Tau-1	-	-	-
	Tau-2	+	±	±
	Tau-14	±	±	-
	Tau-46	+	±	±
P-Tau	AT-8	+++	+++	+++
npNF	SMI-31	±	-	-
	SMI-32	+	±	-
Ubiquitin	Ubiquitin	++	++	+
αβ crystalin	αβ crystalin	-	-	-
Gallyas-Braak		++	++	-

組織学的所見(表 1)：前頭葉皮質は高度の神経細胞脱落，少数のGallyas陽性の構造物，それを上回るGallyas-negative/ AT8-positive neuron (G(-)A8(+))N)，わずかにballooned neuronを認めた。白質には多数のCB，著明なgliosisを認め，Gallyas染色では同定できないAT8-positiveの顆粒状構造物を認めた。前頭葉帯状回にAGを少数認めた。側頭葉は高度の神経細胞脱落，軽度のAG，多数のG(-)A8(+))N，白質に中等度のCB，gliosisを認めた。辺縁系では，海馬傍回とCA1には中等度，subiculumにAGとG(-)A8(+))Nを多数認めたが，GallyasやBodianに陽性の構造物は認めなかった。線条体，淡蒼球，島葉にはCBとG(-)A8(+))Nを多数，視床にはG(-)A8(+))Nを少数認めた。視床下核の病変は軽度であった。中脳黒質は中等度の神経細胞脱落とgliosis，CB，Gallyas/AT8-positiveのNFTを少数認めた。橋では青斑核にGallyas/AT8-positiveの構造物を認めた。小脳は白質にCB，少数のGallyas/AT8-positiveの構造物を認めたが神経細胞脱落はみとめなかった。オリブ核ではgliosis，極少数のGallyas/AT8-positiveのNFTを認めたが神経細胞脱落はみとめなかった。舌下神経核ではGallyas/AT8-positiveのNFTを少数認めるがそれを上回るG(-)A8(+))Nを認めた。Braak stageはと考へた。老人斑，Pick body，tuft，astrocytic plaqueは認めなかった。G(-)A8(+))NはAGが出現している領域のみならず，萎縮部位を中心に広範囲に出現し，海馬，側頭葉と比べて数は少ないが前頭葉，頭頂葉，線条体にも認められた。

免疫組織学的所見(表 2)：grain はリン酸化タウを認識する AT8 で非常に強く認識され，Gallyas-Braak 染色を上回っていた。一方，リン酸化非依存タウを認識する tau2，14，46 ではあまり認識されず，tau1， $\alpha\beta$ クリスタリンでは全く認識されなかった。ユビキチンでは AT8 や Gallyas-Braak 染色をやや下回る程度に認識されていた。G(-)A8(+))N はタウを含めたその他の抗体ではほとんど認識されな

かった。

D. 考察

AG を伴う疾患は Braak らによる PaD を伴う症例 (52 歳) 及び AD を伴う症例 (58 歳) 報告があるが，比較的高齢者に多い。本例の発症年齢は 44 歳であり AG を伴う痴呆症としては最も若年である。Martinez らは AG を加齢による所見であると考えたが本例は加齢のみが AG の原因ではないことを示唆している。Braak，Tolnay らは AGD を一つの疾患単位とし，多数の Gallyas-negative / AT8-positive neuron を伴うと報告しているが，本症例においても同様の所見が見られた。しかし，前・側頭葉の著明な萎縮がある点で通常の AGD とは異なっていた。Pick 球を欠く Pick 病では少数の AG の出現が報告されているが，本例では多数の AG と CB が見られた点が特異的である。AGD の精神症状は前頭・側頭葉型痴呆の範疇に含まれるとの池田らの報告もあり，本例はその点を支持している。本例の病理像は AGD の中に本例のような非定型的な一群が含まれる可能性を示唆する所見と考えられた。

E. 結論

本例は臨床的にはピック病様症状を呈し，海馬領域に多数の Argyrophilic grains と coiled body が多発を認め，神経病理学的には AGD と考えられた。AG は高齢者に認められる所見とされており，本例のような比較的若年で発症した症例で AG を認めた点，通常の AGD よりも著明な萎縮を前・側頭葉に認めた点，はるかに広範囲にわたって多数の AG と G(-)A8(+))N が出現している点が通常の AGD とは異なっており，本例に特徴的であった。本例の病理像は AGD の中に本例のような非定型的な一群が含まれる可能性を示唆する所見と考えられ，今後の追加症例の検討が重要である。

F. 研究発表

2. 学会発表

田辺康之, 石津秀樹ら : **Argyrophilic grains (AGD) が多発した Pick 病の一例 (いわゆる Argyrophilic grain disease(AGD)との関連)**
第39回日本神経病理学会, 1998, 福岡

発達期に感覚障害を発症する疾患の脳病変に関する研究

-----新生児遷延性肺高血圧症の聴覚伝導路病変の免疫組織学的研究-----

聴覚伝導路における parvalbumin の免疫組織化学的発達

研究協力者：加我牧子¹⁾

井合瑞江²⁾、稲垣真澄¹⁾

1. 国立精神・神経センター精神保健研究所精神薄弱部
2. 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第2部

A. 研究目的

遷延性肺高血圧症など新生児期に重症の呼吸循環障害を呈した症例で、急性期を脱し生存し得た場合、後に高度難聴が進行し、聴性脳幹反応の悪化を示す場合が希にあることを明らかにしてきた。このような病態の病理学的背景を明らかにするため、剖検脳を用いて末梢から脳幹、中脳を経て聴覚中枢に至る脳病変について検討した。さらに聴覚生理学的変化の基礎を明らかにするため Parvalbumin を用いて免疫組織化学的にも検索を行い対照児と比較した。PV はカルシウム結合蛋白の一種で、GABA 作動性ニューロンの一部で陽性となり、聴覚系でも強く発現するとされる。

B. 対象と方法：国立精神・神経センター内、脳バンクの中の凍結および固定ヒト新生児および乳児脳のうちから新生児遷延性肺高血圧症症状を呈した 24 症例とした。各症例の剖検時年齢は日齢 0 から 11 カ月、在胎修正週数で 24 週から 11 カ月であった。また対照は同バンクの中から脳病理学的に異常がなく、胎児新生児期の低酸素状態の既往がなかった在胎 16 週から 3 歳までの胎児・乳幼児 49 症例とした。

検体はホルマリン固定後、パラフィン包埋された脳のブロックから、切片を作成した。切片の一部は HE および Klüver-Barrera 染色を行って通常の病理学的検索を行った。免疫組織化学的にはパラフィンを除去し、10% ウサギ血清でブロッキングした。Sigma 社の抗 Parvalbumin モノクローナル抗体 (1:2,000) を用いて 4℃、24 時間で免疫染色した。

蝸牛から蝸牛神経、橋部聴覚伝導路 外側毛帯、中脳下丘、視床、皮質聴覚野に特に注目して観察し、Parvalbumin の染色性を半定量的に測定した。染色度は神経細胞胞体の染色性が確実なものを 1+, 近位の樹状突起まで強く染まっているものを 2+, neuropil に網状に染色されているものを 3+ とした。

C. 結果

1) 健常対照の聴覚伝導路の Parvalbumin 免疫組織染色性の発達の變化 (表 1)

Developmental changes of parvalbumin in auditory system

Gestational age	N	Cochlear n.	Superior olivary n.	Inferior colliculus	Medial geniculate b.	Auditory cortex
16w	2	0	0	0	0	0
18-21w	6	1+	0	0	0	0
22-23w	6	3+	2+	1+	0	0
24-26w	5	2+	2+	1+	0	0
27-29w	9	2+~3+	3+	2+	0	0
30-35w	5	3+	3+	1+~3+	0	0
36-41w	6	3+	3+	2+	0~1+	0~1+
1-4m	6	ND	3+	3+	2+	3+
1y	2	ND	3+	3+	ND	3+
3y	1	3+	3+	3+	ND	3+
11y	1	3+	3+	3+	ND	3+

1+: immunohistochemically positive in cytoplasm, 2+: in proximal processes, 3+: in neuropils. ND: not done.

2) 新生児遷延性肺高血圧症を呈した症例の病理学的変化ならびに免疫組織化学的染色性

HE 染色標本による検索では 24 症例のうち聴覚伝導路に明らかな病変が確認されたのは 1 例のみであった。この症例では上オリブおよび下丘に神経細胞の picnotic な変化がみられていた。

Parvalbumin 免疫組織染色性については、全体として聴覚伝導路の染色性が一様に落ちている症例 18 のほかに、橋中央部上オリブの染色性は比較的良好なもの、それより上位ルートの染色性が極度に落ちているとみられる症例 6, 12 も存在した。しかし上オリブレベルより上位において染色性低下が確認された症例はなかった。

D. 考察

聴覚系ではカルシウム結合蛋白が多く発現し、聴覚系の機能的発達の一翼を担っていることはよく知られている¹⁾が、これら蛋白の果たす機能は未だ不明である。PV は機能分布に応じた局在を示し、刺激の入力・途絶による発現変化が認められ、聴覚伝導路の発達の指標として有用と考えられる^{2) 3)}。

今回の結果では、ヒト聴覚伝導路における PV 出現は尾頭側方向へと三段階の経過を示した。18-21 週で末梢神経から蝸牛神経核-脳幹への入力部、22 週から橋・中脳の諸核-脳幹内伝導路、在胎 40 週頃から内側膝状体・皮質-大脳内伝導路と、成熟の進展が明らかであった。脳幹での PV 出現に比し、大脳での出現は大きく遅れ、ほぼ出生時期に陽性細胞が出現することを合わせ考えると、聴覚の高次的認識は出生後、急速に変化することがうかがえる。

これまでに加我らは新生児 ICU で治療・管理を行い退院時に記録された ABR が正常で、後に ABR が悪化した症例を 13 例確認した。この中では新生児遷延性肺高血圧症を呈する者が多かった (9/13)。遅れ

て発症する、希な難聴について報告してきた。すなわち ABR の継時的変化は末梢蝸牛病変に由来する可能性が高いが上オリーブや下丘における神経細胞の変化を示す者もあることを明らかにした。またこれらは重度の呼吸循環障害・低酸素状態に引き続いて起こるものであると推測した。

Parvalbumin は抑制性介在ニューロンの指標の一つであるとされ、求心性感覚系神経路に比較的特異的な蛋白であると考えられている。Parvalbumin の発現には感覚入力が増進的に働くことが示唆されている。

今回の結果からは新生児遷延性肺高血圧症を呈する疾患病態において一部の症例では病理学的に上オリーブ、中脳下丘の神経細胞に変化を示す者があること、また蝸牛神経核のレベルからからすでに Parvalbumin 発現の低下しているものがあることが明らかになり、少なくとも中脳下丘までの聴覚伝導路で染色性の低下がみられる者があることが証明された。しかし今回の結果だけからは内側膝状体より上位脳での発現低下は証明できなかった。

この疾患病態に置いて難聴発現が明らかになるのは生後 6 ヶ月以降であり、剖検時には他の要因がない限り難聴が発現している可能性は低い。従って今回の病理及び免疫組織化学所見は感覚入力がないための発現の抑制ではなく、聴覚中枢病変、内側膝状体病変からの逆行性神経変性による機序は考えがたい。神経病理学的には 1 例をのぞいて脳幹聴覚伝導路・中脳に異常は認められず、視床皮質放線・聴皮質の異常も明らかではなかった。しかし Parvalbumin は下丘以下に発現の低下が見られる症例が少なからず存在したことから、下丘までの聴覚伝導路は新生児期のできごとの直接的な影響を受け、後に聴覚障害を発生する状態を準備している可能性が考えられる。本症状群における遅発性難聴発現は、海馬神経細胞で報告された遅発性細胞死とは時期が全く異なる点で同一の機序を考えることはできない。発症を遅らせる要素についてさらに検討が必要であり、今後、年長児症例の検討と全聴覚伝導路の多数例の検討が必要である。

E. 結論

新生児遷延性肺高血圧症状態を呈する症例を健常対照例に比べたところ神経病理学的に上オリーブ、下丘の神経細胞の病変が 24 症例中 1 症例のみに確認された。しかし免疫組織化学的には蝸牛神経核から上オリーブ、台形体核、外側毛帯核、下丘において Parvalbumin の染色性が低下している症例が少なからず存在する事が明らかであった。この所見は本症状群における遅発性難聴発現と関わりがある可能性があり、さらに検討が必要である。

参考文献

- 1) Calcedo A., d'Aldin C et al. Distribution of calcium-binding proteins in the guinea pig auditory brainstem. *Anat.Embryol. (Berl.)* 194:465-487, 1996.
- 2) Calcedo A., d'Aldin C et al. Temporary sensory deprivation Changes calcium-binding proteins levels in the auditory brainstem. *J. Comp. Neurol.* 378:1-15, 1997.
- 3) Kosaki H, Hashikawa T et al. Tonotopic organization of auditory cortical fields delineated by parvalbumin immunoreactivity in macaque monkeys. *Comp Neurol* 386:304-316, 1997.

F. 研究発表

1. 論文発表

Inagaki M, Kaga M, Hirano S, Isumi H, Takashima S. Hypoxia induced ABR change and heat shock protein expression in the pontine auditory pathway of young rabbits. *Brain Res* 1997 in press.

加我牧子, 稲垣真澄, 河野寿夫, 善利裕実, 昆かおり. 新生児脳障害と誘発電位. *脳と発達* 1996;28;138-45.

善利裕実, 河野寿夫, 加我牧子他. 新生児遷延性肺高血圧症の聴覚予後. *日本新生児学会雑誌* 1996;32;278-283.

2. 学会発表

Kaga M, Inagaki M, Kawano T. Deterioration of ABR and progressive hearing impairment after discharge from neonatal intensive care unit. The tenth International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology, Kyoto, 1995年10月. 井合瑞江, 高嶋幸男. 発達期大脳皮質での Parvalbumin の免疫組織科学的検討.-胎外環境の及ぼす影響について.-

第32回日本新生児学会, 高松市, 1996年7月.

井合瑞江, 加我牧子, 高嶋幸男. 聴覚伝導路諸核における発達と障害: parvalbumin の免疫組織化学的検討. 第40回日本小児神経学会, 東京, 1998年6月.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

研究報告書

剖検脳等を用いた精神・神経疾患の発症機序と治療に関する研究

研究協力者 石川俊男 国立精神・神経センター精神保健研究所心身医学研究部

研究要旨：授乳期母子分離ストレスの脳への影響を検討する目的で海馬の神経細胞（錐体細胞）の形態学的変化の有無を、HE染色標本や微小管蛋白（microtubule-associated protein2）の免疫組織化学的染色を施して検討した。SDラットを生後2日目より母親のみ分離群（M）、母子分離隔離飼育群（心理ストレス群：I）、母子分離隔離飼育軽拘束・電気刺激群（心理・身体ストレス群：RF）の3群にわけて3、6、9週時点の海馬の錐体細胞の変性の有無を検討したところ、海馬の錐体細胞は3週でIRF群で錐体細胞の変性が認められその周辺のMAP2染色の脱落が認められた。ところが、6週および9週に従い海馬錐体細胞の変性は減少したが、9週での24時間拘束ストレスにてRF群で容易に再変性が起こることが確認された。しかし、この際のMAP2染色による脱落はHE染色での変性部位に一致するものとしなないものが有った。これらの結果から、授乳期での慢性心理・身体ストレス負荷は海馬錐体細胞の変性を生じ、9週での24時間拘束ストレス負荷によって容易に再現することから海馬の脆弱性の発現が見られることが示唆された。

A. 研究目的

心身症の病態にはその重症化のメカニズムとして幼小児期の対人関係、特に親子関係ストレスの存在が示唆されている。しかしながら、親子関係ストレスがどのような機序で身体疾患の発症や経過に影響を受けるのかは生物学的にはほとんどわかっていない。本研究の目的は授乳期に母子分離ストレスを加えた動物が成長後の身体機能にどのような影響を及ぼすのかを検討し、心身症の動物モデルを作成することにある。先行研究としては、授乳期に母子分離ストレスを加えると成長後に与えた拘束ストレスに対するストレス反応に変化が認められた。例えば過活動や拘束ストレス潰瘍の消失や血中ACTHの上昇の消失、CD4/CD8の低下などである。一方CD4/CD8の低下は成長後の安静下でも認められており授乳期の心理身体ストレスは成長後の身体機能に様々な影響が生じることが明らかとな

った（投稿中）。

そこでこのモデルを用いて海馬の錐体細胞への影響を形態学的に検討した。海馬の錐体細胞は大人の猿などの動物に慢性の心理社会的ストレスを負荷することにより多発性の潰瘍の発症と同時に変性が起こること¹⁾が知られており、それが恐らくは海馬のglucocorticoide受容体を介する反応であることが報告²⁾⁴⁾されている。

B 研究方法

実験には雄性SDラットを用いた。生後2日目に雄のみを次の4群に分けて飼育した。

対照群：3週間の授乳期間を母親とともに飼育し、授乳終了後に2、3匹に分けてケージ飼育とする。母親のみ分離群（M）：授乳期間3週間9:00-16:00/日母親のみを分離飼育する。母子分離隔離飼育群（心理ストレス群：I）：同上期間同

上時間子動物を個別隔離飼育する。母子分離隔離軽拘束・電気刺激群（心理・身体ストレス群：RF）：授乳期間最初の5日間は同上，同時間に拘束ケージにて軽拘束（すこし身体を動かせる程度）次の5日間は一日2回電気刺激（2mA,10Hz,30sec,30min）を9:00, 15:30に行う。いずれの群も3週後には対照群と同様にケージに分けて飼育する。9週の時点で各群に24時間拘束ストレスを負荷する。

3週，6週，9週（自由群と24時間拘束群）にて，エーテル麻酔下で4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した脳をパラフィン包埋後4 μ mに薄切し，HE染色法にて染色した。海馬の観察には顕微鏡を用いた。

MAP2(microtubule-associated protein2)の染色は，MAP2モノクローナル抗体を用いてストレプトアビジン・ビオチン法による免疫組織学的染色を施した。パラフィン包埋薄切4 μ mした組織を脱パラフィン後内因性ペルオキシダーゼを0.3%H₂O₂加メタノールにてブロックし，30倍に薄めたMAP2モノクローナル抗体で染色し二次抗体を通してペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを流しペルオキシダーゼ発色を行い核染色を行った。

血中のCorticosterone(CORT)はRat corticosterone{¹²⁵I} assay system(Amersham International plc)を用いて3週での動物より測定した。血液はエーテル麻酔直前に尾静脈よりEDTA採血により行った。採血時間は全ての実験群で10:00-11:00の間に行われた。

3週では同時に胸腺の重量を測定した。

C. 研究結果

3週，6週，9週での海馬の錐体細胞は，コントロール群では全く変化は認められなかった。また，MAP2も全例で染色された。M群では，6週と9週での24時間拘束ストレス負荷時に錐体細胞の軽度の変性（核の濃染）が認められた。I群では3週で5例中の3例で錐体細胞の軽度の変性とMAP2の脱落が認められた。MAP2の脱落は6週でも認められたが，錐体細胞の変性は認められなかった。9週での24時間拘束ストレスでも1例（4例中）で細胞の軽度変性やMAP2脱落が認められた。一方，RF（心理・身体ストレス）群では3週において海馬のC1領域を中心に錐体細胞の一部が核の濃染，細胞質の空砲化，核や細胞体の細胞外の漏出などの変性が明らかとなった。変性はこれは心理・身体ストレス群の5例中4例で観察されMAP2の脱落を伴った。また，この変性は6週，9週で減少するが，MAP2の脱落は持続した。しかし，9週で24時間の拘束ストレスを負荷すると，5例中4例で3週で見られたのと同様の錐体細胞の変性が認められた。しかし，MAP2の脱落は変性した錐体細胞周辺でも脱落が認められない例もあった。

一方，血中CORTの濃度および胸腺の重量であるが，3週ではRF群で他の群に比し有意に安静時値が低く，同時に胸腺重量も有意に減少していた。

D. 考察

動物を用いた授乳期の母子分離ストレス負荷では成長後の身体機能に様々な影響を与えることが考えられるが，われわれの先行研究では授乳期に母子分離軽拘束電気刺激ストレス（心理身体ストレス）を加えると過活動になり，成長後のストレス反応において胃粘膜病変や血中

ACTH 増加反応が押さえられる。しかし一方で CD4/CD8 の免疫機能は成長後のストレス反応は消失するが基礎値が既に低下しており慢性ストレス状況にあることが示唆された（投稿中）。しかし、脳内ではどのような変化が生じているのかはほとんどわかっていない。

今回の海馬の錐体細胞の変性に関する検討では、これまで大人で慢性のストレス負荷によって生じると報告されていた^{1) 3)}が、幼小児期の慢性の心理・身体ストレスで再現することが明らかとなった。これまでこの海馬の変性は慢性ストレスによる血中 CORT の上昇による海馬の glucocorticoid receptor を介する可能性を示唆する報告が多い^{2) 4)}。今回、授乳期直後の変性には胸腺の萎縮 (C: $4.4 \pm 0.1\text{mg/g}$, M: $4.0 \pm 0.3\text{mg/g}$, RF: $3.0 \pm 0.1\text{mg/g}$ N=4 P<0.05 vs C)を確認しており、慢性ストレス状況にあったことを確認している。また、血中の CORT の低下は (Walker の報告)授乳期に連日生食注射ストレスを負荷すると3週で CORT の基礎値が減少するとの報告⁶⁾や handling stress を授乳期の動物に負荷することでもことが報告⁷⁾されており、今回の我々の成績と同様の結果で授乳期の慢性心理・身体ストレス負荷でも CORT の低下が見られることが明らかとなった。これらのことより授乳期の慢性心理・身体ストレスでも海馬の錐体細胞に変性が生じることが明らかとなった。ただし、単独隔離飼育といった心理的ストレス負荷や母親のみ分離飼育する負荷でも軽度ではあるが錐体細胞の変性が見られることより心理ストレス負荷のみでも何らかの影響が見られる可能性が示唆された。

又、MAP2 は錐体細胞の変性に先行して崩壊する微小管蛋白⁵⁾として知られるが、今回の我々の結果でも錐体細胞の変

性部位に一致して染色の脱落が認められ、これらの結果からも錐体細胞の変性が生じていることが示唆された。

これらの錐体細胞の変性は6週、9週になるに従い消失することが示唆された。これは3週での錐体細胞の変性が何らかの機序で消失したことを示している。顕微鏡下で海馬の錐体細胞数(密度)を測定したが3、6、9週で各群間に差がないことを確認している (data not shown) が全体の錐体細胞数の確認はこの実験系ではできないので、変性した細胞がどのような機序で見えなくなったのかは今後詳細 24 時間拘束ストレスの結果は非常に興味深いものがある。授乳期に心理・身体ストレスを負荷し海馬の錐体細胞の変性を起こした群では、他の群と違い 24 時間の急性拘束ストレスでも海馬の錐体細胞の変性が再現した。これまでの報告は持続的な慢性ストレスの結果と報告されている事が多く、脆弱性の獲得について報告されたものはない。また、この反応には胃粘膜病変の発症を伴わない (data not shown, 投稿中) ことより、これまでの報告¹⁾と異なる機序が考えられる。いずれにしろ海馬の生理的な作用を考えると、授乳期にストレスに曝された錐体細胞が成長後の新たなストレスに対する脆弱性を示したことは心身症の病態を考える上でも非常に興味深い結果である。

海馬の錐体細胞の変性の部位だが今回の我々の成績では CA1 領域の錐体細胞の変性が主体であった。これまでの報告では、慢性のストレス負荷や corticosterone の慢性投与によって生じる変性部位は C3 領域の錐体細胞の変性に関する報告が多く^{1) 2) 3)}みられる。C1 領域の変性に関しては頸動脈などの閉塞による一過性脳虚血による循環不全に基づくと報告⁶⁾

されており，部位によるメカニズムの違いの可能性が報告されている。この点については今回の観察が顕微鏡下でもマクロな形態学的変化しかみれていないのでより詳細な検討が必要であろうと考えられる。

E. 結論

授乳期の慢性母子分離心理身体ストレス負荷は海馬の錐体細胞を変性させ，さらに成長後の急性拘束ストレスに対してその脆弱さが示唆された。

なお，この研究は厚生省精神・疾患研究委託費の補助も受けて行った。

引用文献

- 1) Uno H, Tarara R, Else JG, Sulemen MA, Sapolsky RM: Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. *J Neurosci* 9:1705-1711, 1989
- 2) Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS: Prolonged glucocorticoid exposure reduced hippocampal neuron number: Implication for aging. *J Neurosci*:1222-1227, 1985.
- 3) Watanabe Y, Gould E, McEwen BS: Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res* 588: 341-345, 1992.
- 4) Sapolsky RM, Pulsinelli W: Glucocorticoid potentiates ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science* 229:1397-1399, 1985.
- 5) Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe K, Mikoshiba R, Hata R, Ueda H, Handa N, Fukunaga R, Isaka Y, Kimura K, Kamada T: Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage — Immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neurosci* 31: 401-411, 1989.

6) Walker CD: Chemical sympathectomy and maternal separation affect neonatal stress responses and adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol* 268: R1281-R1288 1995.

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

- 1) 石川俊男，川村則行，吾郷晋浩，高嶋幸男：母子分離ストレスと海馬錐体細胞の変性。第39回日本心身医学会総会，新潟，1998.6.
- 2) 石川俊男，川村則行，吾郷晋浩，高嶋幸男：授乳期母子分離心理・身体ストレスの成長後のストレス反応に及ぼす影響。第7回海馬と高次機能学会，宇都宮，1998.11.
- 3) Ishikawa T, Ago Y, Takashima S: Influence of maternal psycho-physical stress on hippocampal neuron in adult rat. 15th World Congress of Psychosomatic Medicine, Athens-Greece, 16-20, 1999.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
研究報告書

第 19 番染色体上の DNA マイクロサテライトマーカーを
用いた精神分裂病発症脆弱性遺伝子座位の探索

研究協力者 稲田俊也 国立精神・神経センター精神保健研究所老人精神保健室長

研究要旨： 臨床遺伝学的研究から精神分裂病に遺伝要因の関与することが示されているが、遺伝子連鎖研究において、これまでに一貫して連鎖陽性を示す所見はまだ得られていない。われわれは Genetic risk factor の存在を想定して、精神分裂病の発症脆弱性に関連する遺伝子座位を見い出す試みとして、第 19 番染色体に焦点をあて、この染色体上にある DNA マーカーと精神分裂病との関連について検討した。精神分裂病患者 160 名と健常対照者 130 名の対象者から採取した血液より DNA を抽出し、第 19 番染色体上の 9 つの DNA マイクロサテライトマーカーを含む部位をそれぞれ特異的な蛍光プライマーを用いて PCR 法により増幅し、Genetic Analyzer により各対象者の CA リピートの繰り返し配列回数を判定して両群間の分布を比較した。その結果、D19S209、D19S414 および D19S420 との間に有意な関連を示す所見が得られ、これら 3 つの DNA マーカーの近傍に精神分裂病の遺伝的危険因子の存在する可能性が示唆された。また、D19S209 の heterozygosity の出現頻度は精神分裂病群および健常対照群ともに Hardy-Weinberg の理論値よりも有意に低く、日本人およびフランス人健常者の heterozygosity の出現頻度の比較では、D19S209、D19S216 および D19S210 において日本人がフランス人よりも有意に低く、人種差が確認された。

Key words： 精神分裂病, 第 19 番染色体, マイクロサテライト, DNA, 関連研究, 末梢血

研究協力者： 稲田俊也, 北尾淑恵 (国立精神・神経センター精神保健研究所), 中村 中 (財団法人井之頭病院), 山内唯光 (社会福祉法人桜ヶ丘記念病院), 八木剛平 (慶應義塾大学医学部精神神経科学教室)

A. 研究目的

剖検脳や血液試料などの生検材料を用いた精神疾患に関する生物学的研究は近年広く行われており、その重要性が認識されている。本研究の目的は、精神分裂病患者を対象に生検材料として末梢血液を用いて、精神分裂病の発症脆弱性に関連する遺伝子座位を探索することである。臨床遺伝学的研究から精神分裂病に遺伝要因の関与することが示されているが、全ゲノムスキャンによる精神分裂病の遺伝子連鎖研究では最近急速にその報告

数が増加しているにもかかわらず、これまでに一貫して連鎖陽性を示す所見は得られていない。精神分裂病の病因遺伝子が 1 部位とは考えられておらず、また多くの集団に共通する major gene が存在しない可能性も示唆されていることから、われわれは Genetic risk factor の存在を想定して、精神分裂病の発症脆弱性に関連する遺伝子座位を見い出す試みとして、DNA マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムスキャンをすすめており、今回は第 19 番染色体上にある 9 つの DNA マーカーについて検討したので報告する。

B. 研究方法

対象は東京近郊に位置する複数の精神病院に入院中の患者で文書及び口頭で本研究の目的及び意義についての説明を行い、書面での同意の得られ

た精神分裂病患者 160 名と、自発的意志により本研究に参加した主に医療従事者からなる健常対照者 130 名である。これらの対象者から採取した血液より DNA を抽出し、第 19 番染色体上にある 9 つの DNA マイクロサテライトマーカー (D19S209, D19S216, D19S221, D19S226, D19S414, D19S220, D19S420, D19S418, D19S210) について、それらを含む部位をそれぞれ特異的な蛍光プライマーを用いて PCR 法により増幅し、Genetic Analyzer (ABI PRISM 310, PE アプライドバイオシステムズ) により各対象者の CA リピートの繰り返し配列回数を判定した。PCR 増幅成功例が精神分裂病群で 110 例、健常対照群で 80 例を越えた時点で、両群の各マーカーにおけるマイクロサテライト繰り返し配列回数の出現頻度をそれぞれ集計し、群間比較を行った。対象者についてはまず最初に各マイクロサテライトの heterozygosity の出現頻度を各群ごとに算出し、それらが Hardy-Weinberg の平衡法則から得られる理論値との間に有意差があるかどうかを調べ、さらに健常対照者については既に Genethon human genetic linkage map¹⁾ に報告されているフランス人健常者との間に有意差が認められるかどうかについても検討した。統計解析は χ^2 検定および Monte Carlo テスト²⁾ により群間比較を行った。

C. 研究結果

今回調べた第 19 番染色体上の 9 つの DNA マーカーのうち、D19S209 の heterozygosity の出現頻度は精神分裂病群および健常対照群において理論値よりも有意に低かった (精神分裂病群 74% vs 85%, $\chi^2=4.96$, $p<0.05$; 健常対照群 56% vs 81%, $\chi^2=16.7$, $p<0.0005$)。また日本人とフランス人の heterozygosity の出現頻度の比較は、D19S209, D19S216, および D19S210 において日本人がフランス人よりも有意に低かった (D19S209 : 56% vs 77%, $\chi^2=28.0$, $p<0.00005$; D19S216 : 51% vs 76%, $\chi^2=36.5$, $p<0.00005$; D19S210 : 62% vs 74%, $\chi^2=9.5$, $p<0.005$)。精神分裂病群および健常対照群の間で、CA リピートの繰り返し配列回数の全体的な出現頻度の分布については、D19S209 では χ^2 検定および Monte Carlo テストともに有意差がみられた ($\chi^2=43.3$, $df=12$, $p<0.0005$, $T_4=24.2$, $p<0.0005$)。また D19S414 では χ^2 検定による有

意差がみられたが ($\chi^2=22.2$, $df=10$, $p<0.05$)、Monte Carlo テストでは傾向差のみであった ($T_4=9.9$, $p<0.1$)。それとは逆に D19S420 では χ^2 検定では差がみられなかったが ($\chi^2=16.3$, $df=12$, $p=0.18$)、Monte Carlo テストでは有意差がみられた ($T_4=13.1$, $p<0.05$)。D19S216 では χ^2 検定では差がみられなかったが ($\chi^2=10.1$, $df=7$, $p=0.18$)、Monte Carlo テストでは傾向差がみられた ($T_4=8.4$, $p<0.1$)。他の 5 つの DNA マーカーにおいてはいずれも両群間に有意な差はみられなかった (D19S221 : $\chi^2=18.8$, $df=16$, $p=0.28$; D19S226 : $\chi^2=18.6$, $df=15$, $p=0.23$; D19S220 : $\chi^2=10.2$, $df=13$, $p=0.68$; D19S418 : $\chi^2=6.5$, $df=9$, $p=0.69$; D19S210 : $\chi^2=2.3$, $df=6$, $p=0.89$)。次に、各 DNA マーカーについて個別の CA リピートの出現頻度を両群間で比較すると、精神分裂病群では健常対照群よりも D19S209 の 245bp と 251bp, D19S216 の 257bp, D19S414 の 182bp, D19S420 の 79bp の出現頻度が有意に ($p<0.05$) 高く、一方、D19S209 の 253bp, D19S221 の 79bp と 87bp, D19S226 の 245bp, D19S414 の 160bp の出現頻度は有意に ($p<0.05$) 低かった。

D. 考察

これまでに第 19 番染色体については、Neutral amino acid glutamate/aspartate transporter (SLC1A5 ; 19q13.3) で精神分裂病との間に連鎖を否定する報告がみられるものの、まだ十分な検討がなされていないのが現状である。今回われわれが行った検討結果では、精神分裂病と第 19 番染色体上の 3 つの DNA マーカー (D19S209, D19S414, D19S420) との間に有意な関連が認められた。これらの所見は精神分裂病の遺伝的危険因子が D19S209, D19S414, D19S420 の近傍に存在する可能性を示唆するものと考えられ、今後は、これらの近傍の DNA マーカーを用いた検討や、これらの近傍に位置する遺伝子の機能が精神分裂病に及ぼす影響について検討するなど、更に多角的な側面から検討をすすめる必要があるものと考えられた。

また、D19S209 で heterozygosity の出現頻度が両群とも Hardy-Weinberg の平衡法則から得られた理論値よりも有意に低かった要因としては、フランス人で設計されたプライマーの塩基配列が、

たまたま日本人健常者では多型性を示す部位であったために一部のアレルが PCR で増幅されなかった可能性などが考えられるが、今後更に検討すべき課題と思われた。今回の結果では3つの DNA マーカーで日仏間で健常者の出現頻度に有意な差がみられたことから、日本人における精神分裂病の遺伝的脆弱性の検討については日本人のみを対象としたデータ集積の必要性および重要性が改めて示されたものと考えられた。

前年度の報告書でも紹介したように、われわれの研究グループでは、精神分裂病をはじめさまざまな精神疾患患者および健常者の血液試料を既に2,000例以上凍結保存しており、それらの検体試料の情報管理をコンピューターにより行っているが、精神疾患多発家系などを対象とした遺伝子連鎖研究などを行う際には、やはり個人レベルでのサンプル収集には限界があり、十分な検体数を確保できないというような事態にしばしば遭遇し、検体資料のネットワーク化の必要性について改めて痛感する次第である。したがって、稀少サンプルなどを全国レベルで収集して行うような研究等の進展を考慮すると、各施設で保存管理されている検体試料のネットワーク化、すなわち Research Resource Network (RRN) の確立は早急に整備されるべき課題であると考えられた。

E. 結論

精神分裂病患者および健常者から生検材料として末梢血液を採取して、第19番染色体上にある9つの DNA マーカーと精神分裂病の発症脆弱性との関連について検討した結果、D19S209, D19S414 および D19S420 との間に有意な関連が認められ、これら3つの DNA マーカーの近傍に

精神分裂病の遺伝的危険因子の存在する可能性を示唆する所見であると考えられた。

F. 文献

1. Dib C, Faure S, Fizames C et al.: A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380: iii-v, A1-A138, 1996.
2. Sham PC, Curtis D: Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet* 59:97-105, 1995.

G. RRNに関連した発表論文

1. Inada T, Sugita T, Dobashi I, Inagaki A, Kitao Y, Matsuda G, Kato S, Takano T, Yagi G and Asai M: Dopamine D3 receptor gene polymorphism and the psychiatric symptoms seen in first-break schizophrenic patients. *Psychiatr Genet* 5: 113-116, 1995.
2. Inada T, Sugita T, Dobashi I, Inagaki A, Kitao Y, Matsuda G, Kato S, Takano T, Yagi G and Asai M: Dopamine transporter gene polymorphism and the psychiatric symptoms seen in schizophrenic patients at their first episode. *Am J Med Genet (Neuropsychiatric Genetics)* 67: 406-408, 1996.
3. Inada T, Dobashi I, Sugita T, Inagaki A, Kitao Y, Matsuda G, Kato S, Takano T, Yagi G and Asai M: Search for a susceptibility locus to tardive dyskinesia. *Human Psychopharmacology* 12 (1): 35-39, 1997.
4. Dobashi I, Inada T and Hadano K: Alcoholism and gene polymorphisms related to central dopaminergic transmission in the Japanese population. *Psychiatr Genet* 7: 87-91, 1997.