

図4：光照射によるメラトニン抑制率

光照射時刻とメラトニンの抑制率との関係について示す。横軸は各被験者における光照射時刻(CT)、縦軸はメラトニン抑制率を示す。光照射時刻と抑制率とは相関がみられないことが分かる。

#### D. 考察

これまでに、夕方から夜の高照度光が体温リズムを遅らせることを示す報告がいくつかみられる。Czeislerら<sup>8)</sup>は12000luxの光を様々な時刻に3日間健康成人に照射し夕方から夜の光は深部体温の最低点を遅らせることを報告した。LackとWright<sup>9)</sup>は、実験室条件で早朝覚醒型不眠症の患者に20時から24時まで2日間高照度光(2500lux)照射を行った。その結果、深部体温リズムが2～4時間後退した。これらは、夕方から夜の高照度光が体温リズムを遅らせることを示している。

このように、深部体温を用いた光照射の影響についての検討はあるが、メラト

ニンリズムを用いたものはなく、睡眠の変化とメラトニンリズムを同時に検討したものもない。体温を用いて検討した深夜の時間帯では位相変化が10時間近く起こるという報告<sup>7)</sup>や深夜に光を当てても変化が起こらないという報告<sup>2)</sup>があり、位相反応に関する所見が一致していない。今回我々が、メラトニンリズムを指標として検討したところ、CT14～22の時間帯における光照射のタイミングとその時のメラトニン分泌時刻の位相変化には正の有意な相関が見られた。また睡眠傾向の位相変化もメラトニンと同様に光照射開始時刻と相関することが分かった。すなわち、対象にとって朝にあたる時間帯

(メラトニンが下降する時間帯)に高照度光を照射すると次の日の概日リズムが短縮して入眠のタイミングが早まり、夜にあたる時間帯(メラトニンが上昇する時間帯)に高照度光を照射すると次の概日リズムが延長し、入眠のタイミングが遅くなることが分かった。これまでの報告で結果が一致していなかった深夜の時間帯においては、Czeislerら<sup>8)</sup>の報告に示されているような12時間に近い最大限の位相反応はみられなかった。また、メラトニンが下降する時間帯には照射時刻が遅いほど位相前進の変化が大きく、メラトニンが上昇する時間帯には照射時刻が早いほど位相後退の変化が早いことが分かった。これにより、メラトニンリズムの分泌開始時刻を調べることで、どの時間帯に光をあてたらどれだけ位相が動くかを推定することができる。このことは今後、時差症候群や交代勤務症候群などの睡眠障害の高照度光療法に応用できるものと考えられる。さらに、睡眠相後退症候群や非24時間睡眠・覚醒症候群の治療に高照度光療法を用いるにあたって、睡眠開始時刻の深夜の時間帯よりも睡眠開始時刻や覚醒時刻の近くの方がより効率的な位相反応をもたらすことが示唆された。

本研究において、メラトニン分泌時刻の位相変化が1.7時間の位相後退から1.6時間の位相前進であるのに対し、睡

眠傾向の位相変化は4.0時間の位相後退から5.5時間の位相前進であった。睡眠傾向の位相変化はメラトニンの位相変化に比べて大きいことが明らかになった。これまで、同一の条件で睡眠・覚醒リズムとメラトニンの光による位相反応を比較した研究はなかった。本研究では、位相反応曲線の前進部分については症例数が少ないため今後の検討を要するが、位相後退部分についてはメラトニンリズムに比べて睡眠・覚醒リズムの位相変化が大きいことが明らかである。このことは、メラトニンリズムと睡眠・覚醒リズムがそれぞれ異なった概日リズム発振システムによって制御されている可能性を示唆するものとも考えられ、こうした側面からの検討も今後必要となろう。

## E. 結論

本研究で得られたメラトニンリズムおよび睡眠・覚醒リズムの位相反応曲線の特徴を考慮し、概日リズム睡眠障害に対するより効果的な高照度光療法の開発が可能になろう。

## 参考文献

- 1) 井上慎一：哺乳類；神経生理学的機構、千葉喜彦ら編、時間生物学ハンドブック、朝倉書店
- 2) Minors DS, Waterhouse JM, WirzJustice A: Human phase response

curve to light. *Neurosci Lett* 133:36-40,1991.

3) NHK 世論調査部編 日本人の生活時間 1991. 日本放送協会

4) 久保田富夫、内山真、大川匡子ら：夕方の高照度光照射が深部体温に与える影響. *脳と精神の医学*, 8-3:283-288,1997.

5) 高橋康郎：哺乳類；内分泌学的機構、千葉喜彦ら編、時間生物学ハンドブック、朝倉書店

6) Campbell SS, Murphy PJ: Extra ocular circadian phototransduction in humans. *Science* 279:5349, 396-9, 1998.

7) Lewy AJ, Ahmed S, Jackson JML, et al.: Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiol Int* 9: 380-392, 1992.

8) Czeisler CA, Kronauer RE, Allan JS, et al.: Bright light induction of strong (type 0) resetting of the human circadian pacemaker. *Science* 244:1328-1333, 1989.

9) Lack L, Wright H (1993) The effect of evening bright light in delaying the circadian rhythms and lengthening the sleep of early morning awaking Insomniacs. *Sleep* 16:436-443, 1993.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

内山 真, 大川匡子, 渋井佳代, 金 圭子, 工藤吉尚, 亀井雄一, 早川達郎, 浦田重治郎：概日リズム睡眠障害の病態. *脳と精神の医学*, 9: 93-102, 1998.

内山 真：ナルコレプシー. *こころの健康百科* (大塚俊男, 上林靖子, 福井 進, 丸山 晋編集), 弘文社, 東京, 1998, 333-336 頁.

内山 真：睡眠障害. *臨床精神医学講座 17 リエゾン精神医学・精神科救急医療* (黒澤 尚, 山脇成人編集), 中山書店, 東京, 1998, 80-87 頁.

内山 真：不眠を訴える患者. *精神科ケースライブラリー VIII コンサルテーション・リエゾン精神医療* (山脇成人 専門編集), 中山書店, 東京, 1998, 50-61 頁.

内山 真, 大川匡子：高齡者：睡眠薬と抗不安薬の使い方の実際. *臨床と研究* 76: 312-317, 1999.

内山 真, 中島 亨, 大川匡子：睡眠障害研究をめぐって. *精神医学年報 1998-99* (松下正明, 樋口輝彦, 田邊敬貴, 広瀬徹也, 丹羽真一, 中安信夫編集). 先

端医学社, 東京, 1998, 190-199 頁.

渋井佳代, 内山 真: メラトニンによる睡眠障害治療. 治療 81: 1131-1136, 1999.

Uchiyama, M., Ishibashi, K., Enomoto, T., Nakajima, T., Sibui, K., Hirokawa, G., Okawa, M. : Twennty-four hour profiles of four hormones under constant routine. Psychiatry Clin Neurosci, 52: 117-119, 1998.

Kubota, T., Uchiyama, M., Hirokawa, G., Ozaki, S., Hayasi, M., Okawa, M. : Effects of evening light on body temperature. Psychiatry Clin Neurosci, 52: 124-125, 1998.

Nakajima, T., Uchiyama, M., Enomoto, T., Sibui, K., Ishibashi, K., Kanno, O., Okawa, M. : Human time production under constant routine. Psychiatry Clin Neurosci, 52: 116-117, 1998.

## 2. 学会発表

内山 真, 大川匡子, 渋井佳代, 金 圭子, 工藤吉尚, 亀井雄一, 早川達郎, 浦田重治郎: 睡眠相後退症候群における睡眠

制御について. 第 20 回日本生物学的精神医学会, 1998, 福岡. (第 20 回日本生物学的精神医学会抄録集: 114, 1998.)

内山 真, 大川匡子, 渋井佳代, 金 圭子, 工藤吉尚, 早川達郎, 亀井雄一, 浦田重治郎: 概日リズム睡眠障害のsleep propensity とメラトニンリズム. 第23回日本睡眠学会定期学術集会, 1998 6月, 秋田.

金 圭子, 内山 真, 大川匡子, 土井由利子, 大井田 隆, 箕輪真澄, 荻原隆二: 成人における睡眠障害の訴えと生活習慣との関連. 第23回日本睡眠学会定期学術集会, 1998 6月, 秋田.

分担研究報告書

ヒトの各睡眠段階における  
脳活動や神経回路網の解明に関する研究

分担研究者 梶村尚史 国立精神・神経センター武蔵病院精神科 医長

**研究要旨**

睡眠・覚醒リズム障害の病態解明の第一段階として、健常者の安静覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠時の局所脳血流について、 $H_2^{15}O$  を標識薬物とした PET による研究を行った。局所脳血流では、浅い NREM 睡眠時には、橋、小脳、視床、被殻、帯状回前部で安静時に比べ脳血流は有意に低下したが、徐波睡眠時にはこれらの領域に加え、中脳、視床下部、前脳基底部、尾状核、帯状回後部でも著明な血流低下を示した。皮質領域は、浅い NREM 睡眠時には、中前頭回後部、下前頭回後部、縁上回で左側のみが有意な血流低下を示したが、徐波睡眠時には中心前回、中心後回、側頭葉および後頭葉を除く皮質領域で両側性に血流低下がみられた。REM 睡眠時には、安静時に比べ右側海馬、右側扁桃体および一次視覚野の血流が相対的に増加したが、両側の前頭前野、頭頂連合野および帯状回後部の血流は低下した。睡眠の発現には脳幹網様体賦活系などの覚醒系の神経機構の機能低下が関与しているが、浅い NREM 睡眠時には中脳網様体の機能はなお保たれていることが示された。睡眠中の脳の活動低下は、大脳連合野などの高次脳ほど顕著であることが明らかになった。

**A. 研究目的**

超高解像度ポジトロン CT (PET: Positron Emission Tomography) を使用して、健常者の安静時と NREM 睡眠、REM 睡眠などの各睡眠段階における脳内各部位の脳活動を比較検討し、健常者における睡眠時の脳活動や睡眠に関連する神経回路網を明らかに

し、睡眠・覚醒リズム障害の病態解明への応用を図る。

**B. 研究方法**

被験者は 19 歳から 24 歳の健康な右利き男子大学生 18 例 (平均年齢 21.9 ± 1.5 歳) であり、いずれも本研究の趣

旨について十分に説明し、文書にて同意を得た。被験者には、試験 2 日前に来院させ、試験手順を説明するとともに断眠の確認のためのアクチグラフの装着を行った。試験当日は、19 時に来院させ、アクチグラムにより断眠の有無を確認したが、断眠ができていない場合は試験を中止した。断眠ができていない場合は、脳波、眼球運動記録、筋電図などの睡眠ポリグラムのための電極装着、標識薬物の注入のための静脈路および放射性物質の測定のための動脈路確保、頭部固定のためのマスク装着などの準備を行い、原則として 22 時に消灯し、翌朝 8 時まで終夜睡眠ポリグラム記録を行った。PETscan は、NREM 睡眠で 4 回、REM 睡眠で 4 回、その後覚醒させ安静時に 4 回の合計 12 回行う予定としたが、総被爆量は 1 ミリシーベルト以下とした。基本的には、睡眠前半部で NREM 睡眠の画像をとり、睡眠中間部はポリグラフを参照して選択的 REM 睡眠断眠を行った後に、朝方に REM 睡眠の画像をとるプロトコールとした。標識薬物としては、超短時間放射性同位元素でラベルされた水 (H2150) を用い、最新の画像処理技術を駆使して超高解像度 PET (シーメンス社 ECAT EXACT HR) で、各 scan90 秒間における局所脳血流の画像を得た。NREM 睡眠、REM 睡眠時

の局所脳血流をそれぞれ安静覚醒時のものと比較したが、NREM 睡眠は stage 1, 2 の浅い睡眠と stage 3,4 の深い睡眠(徐波睡眠)とに分けて検討した。結果の解析には statistical parametric mapping (SPM)を用いた統計処理を行った。

### C. 研究結果

これまで 18 例の被験者で試験を行ったが、このうち 13 例 (平均年齢 21.2 ± 1.9 歳)から睡眠時と覚醒時の PET 画像を得ることができた(浅い NREM 睡眠の画像 29 枚、深い NREM(徐波)睡眠の画像 30 枚、REM 睡眠の画像 14 枚と安静覚醒時の画像 37 枚)。各睡眠段階における全脳平均血流量については、安静時に比べ徐波睡眠時には有意に脳血流は低下していたが、浅い NREM 睡眠時や REM 睡眠時と安静時とでは差がなかった。局所脳血流については、浅い NREM 睡眠時には、橋、小脳、視床、被殻、帯状回前部で安静時に比べ脳血流は有意に低下したが、徐波睡眠時にはこれらの領域に加え、中脳、視床下部、前脳基底部、尾状核、帯状回後部でも著明な血流低下を示した。皮質領域は、浅い NREM 睡眠時には、中前頭回後部、下前頭回後部、縁上回で左側のみが有意な血流低下を示したが、徐波睡眠時には中心前回、

中心後回および後頭葉を除く皮質領域で両側性に血流低下がみられた。REM睡眠時には、安静時に比べ右側海馬、右側扁桃体および一次視覚野の血流が相対的に増加したが、両側の前頭前野、頭頂連合野および帯状回後部の血流は低下した。

#### D. 考察

PET は機能的あるいは生化学的 CT といわれ、脳の局所的機能の変化や生化学的情報を画像として得るのに最もすぐれた方法として注目されている。PET で測定できる脳機能としては、脳血流、脳酸素消費率、酸素摂取率、脳グルコース代謝、脳アミノ酸代謝、脳脂質代謝などがあげられるが、脳内のドーパミンやアセチルコリンなどのリセプター測定も可能であり、種々の研究に利用され成果を上げている。PET を用いた睡眠時の脳機能や神経機構に関する研究もいくつかされているが、初期の研究はおもに脳グルコース代謝を指標としたものであった。これらのグルコース代謝を用いた研究結果をまとめると、覚醒時と比べ NREM 睡眠中には脳代謝は低下するという報告が多いが、REM 睡眠中には脳代謝は亢進するか、覚醒とは異なったパターンの脳活動状態を呈するという報告であった。これらの報告は、興味ある結果

ではあるが、PET による脳グルコース代謝測定の場合、その時間分解能の低さが問題となる。すなわち、グルコース代謝測定に使用される標識薬物  $^{18}\text{F}$ -deoxyglucose (FDG) は、半減期が約 2 時間と長く、投与してから脳に取り込まれるまでに 30-45 分と時間がかかることから、この間のおおまかな脳機能は反映できても、ある特定の睡眠段階における脳機能を正確にとらえるにはふさわしいとはいえない。また、一回の試行の影響が長く残るため反復して検査を行うことは困難である。したがって、PET による脳グルコース代謝測定は、短時間の中で変動する睡眠中の脳機能の検討にはあまり適していないと考えられる。

近年、 $^3\text{H}$ 2150 を標識薬物として脳血流を測定することによって、睡眠中の脳機能を検討する研究がされてきており注目を集めている。 $^3\text{H}$ 2150 は半減期が約 2 分間と短く、短時間の間の脳機能をとらえることができ、さらに何度か反復して検査を行えるというメリットがある。Maquet ら(3)は、この方法により徐波睡眠中の脳血流を測定したが、徐波睡眠中には橋、中脳、視床、前脳基底部に於ける著明な rCBF の減少がみられ、これらの部位と睡眠徐波の発生とが密接に関連していると報告した。また、皮質領域については、

眼窩前頭皮質における rCBF の減少が特に目立っていた。Braun ら(4)も、徐波睡眠中の脳血流を測定し、徐波睡眠中には脳幹部、視床、前脳基底部などの覚醒系の活動低下を生じること、皮質機能に関しては徐波睡眠中の活動低下は一樣ではなく、高次連合野の機能が選択的に低下し、一次あるいは二次知覚野の機能は保たれることを明らかにした。一方、REM 睡眠についても、H2150 を用いた脳血流の解析が行われている。Maquet ら(3)は、REM 睡眠中には橋被蓋、左視床、両側扁桃体および帯状回前部の活動が高まり、前頭前野、帯状回後部および楔前部の活動が低下すると報告し、REM 睡眠中の扁桃体の活性化が記憶活動と関連するのではないかと考えた。同様の方法により REM 睡眠中の脳血流を検討した Braun ら(4)は、REM 睡眠中には視覚連合野と辺縁系の活動は高まるが、最初の視覚認知に関連する一次視覚野と視覚情報の最終処理を行う前頭連合野の活動は抑制されるとし、REM 睡眠中には外界と閉ざされた状態での選択的視覚機構の活性化(視覚機能活動の解離パターン)が起こっているとした。

今回のわれわれの研究も H2150 を用いて健常者の睡眠中の脳血流について検討したものである。まず NREM

睡眠の結果については、徐波睡眠では橋、中脳、視床、小脳、前脳基底部、尾状核および広範な皮質領域で安静時に比べ脳血流は著明に低下していたが、中心前回、中心後回と後頭皮質では有意な血流低下はみられなかった。この結果は基本的には Maquet ら(1)や Braun ら(2)の結果と一致するものであり、徐波睡眠中の脳の活動低下は一樣ではなく、大脳連合野などの高次脳ほど顕著であることが明らかになった。一方、浅い NREM 睡眠時には、橋や視床の血流は有意に低下するが、中脳の血流は有意な低下を示さないことから、中脳網様体の機能は浅い NREM 睡眠時にはなお保たれていることが示唆された。さらに、浅い NREM 睡眠時には、皮質領域は、中前回後部、下前回後部、縁上回の左側のみが有意な血流低下を示した。これらの脳部位はいわゆる高次脳であるが、その中でも Broca 領域や Wernicke 領域などの言語領域を含む左側の脳部位でとくに睡眠の早期から活動が抑制されたといえる。言語領域を含む左側の大脳皮質では右側よりも覚醒時の活動レベルが高いとの報告もあり、覚醒時に使われたところほど睡眠時には休息が必要であるとの仮説を支持する結果と考えられる。

REM 睡眠時には、前頭前野や頭頂



連合野などの機能低下が起こるが、右側海馬、右側扁桃体などの辺縁系と一次視覚野の賦活がみられ、これらの所見は REM 睡眠中の夢見体験や記憶活動と関連する可能性が推測された。今回得られた REM 睡眠時の辺縁系の賦活の所見については、Maquet ら(1)や Braun ら(2)の結果と基本的に一致するが、一次視覚野の賦活についてはこれまで報告はなく、今後慎重に検討していきたい。

#### 参考文献

1. Maquet P, Degueldre C, Delfiore G, et al (1997) Functional neuroanatomy of human slow wave sleep. *J Neurosci*, 17: 2807-2812.
2. Braun AR, Balkin TJ, Wesensten NJ, et al (1997) Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle: An H215O study. *Brain*, 120: 1173-1197.
3. Maquet P, Peters JM, Aerts J, et al (1996) Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature*, 383: 163-166.
4. Braun AR, Balkin TJ, Wesensten

NJ, et al (1998) Dissociated pattern of activity in visual cortices and human rapid eye movement sleep. *Science*, 279: 91-95.

#### E. 結論

睡眠・覚醒リズム障害の病態解明の第一段階として、H215O を標識薬物とした PET を使用して健常者の安静覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠時の脳活動や神経回路網を検討した。その結果、NREM 睡眠中には上行性網様体賦活系などの覚醒系の機能低下が起こるが、浅い NREM 睡眠中には中脳網様体の機能は保たれていること、皮質領域においては高次脳機能を有する部位での機能低下が顕著であり、特に左側の前頭連合野と頭頂連合野では早期に活動が抑制されることが示された。REM 睡眠中には、前頭前野や頭頂連合野の機能低下が起こるが、右側海馬、右側扁桃体などの辺縁系と一次視覚野の賦活がみられ、これらの所見は REM 睡眠中の夢見体験や記憶活動と関連している可能性が推測された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kajimura N, Kato M, Sekimoto M,

Watanabe T, Takayama Y, Uema T, Horikoshi S, Ogawa K, Matsuda H, Uchiyama M, Okawa M, Nishikawa M, Uchida S, Nakajima T, Hiroki M, Takahashi K: Regional cerebral blood flow during human sleep assessed by high-resolution PET. Excerpta Medica International Congress Series. In Koga Y, Nagata K and Hirata K (eds) Amsterdam: Elsevier Science, pp 297-302 (1998).

2. 学会発表

Kajimura N, Kato M, Sekimoto M, Watanabe T, Takahashi K, Takayama Y, Uema T, Horikoshi S, Ogawa K, Matsuda H, Uchiyama M, Okawa M, Nishikawa M, Uchida S, Nakajima T: Regional blood flow during sleep in normal humans assessed by high-resolution positron emission tomography (Symposium 7: Sleep and Brain Structure) Pan-Pacific Conference on Brain Topography, Urayasu, 4.2, 1997.

梶村尚史: 厚生省精神・神経疾患研究委託費 精神疾患関連班 第7回合同シンポジウム 「睡眠・覚醒調節機構研究の最前線 - 分子生物学から臨床

まで - 」PET 画像解析からみた睡眠・覚醒機構 東京 12.17, 1997.

梶村尚史、加藤昌明、関本正規、渡辺剛、内山 真、内田 直、中島 亨、高山 豊、上間 武、堀越 悟、小川賢一、西川将巳、廣木昌彦、工藤吉尚、松田博史、大川匡子、高橋清久: ポジトロン CT 画像解析からみた NREM 睡眠機構 第 22 回日本睡眠学会学術集会 秋田 6.4, 1998.

内山 真、中島 亨、工藤吉尚、高山 豊、上間 武、梶村尚史、内田 直、加藤昌明、関本正規、渡辺 剛、堀越 悟、小川賢一、西川将巳、廣木昌彦、松田博史、大川匡子、高橋清久: ポジトロン CT 画像解析による REM 睡眠中の脳活動 第 22 回日本睡眠学会学術集会 秋田 6.4, 1998.

内田 直、内山 真、梶村尚史、高山 豊、加藤昌明、関本正規、渡辺 剛、中島 亨、上間 武、堀越 悟、西川将巳、廣木昌彦、小川賢一、平井伸英、工藤吉尚、松田博史、高橋清久、大川匡子: ヒト睡眠中の脳波周波数分析とポジトロン CT による局所脳血流との関係 第 22 回日本睡眠学会学術集会 秋田 6.5, 1998.

中島 亨、内山 真、梶村尚史、加藤昌明、関本正規、渡辺 剛、工藤吉尚、内田 直、高山 豊、上間 武、堀越悟、小川賢一、西川将巳、廣木昌彦、松田博史、大川匡子、高橋清久：ポジトロン CT 画像解析からみた REM 睡眠時の脳内眼球運動調節部位 第 22 回日本睡眠学会学術集会 秋田 6.5, 1998.

Takahashi K, Kajimura N, Kato M, Sekimoto M, Watanabe T, Takayama Y, Uema T, Horikoshi S, Ogawa K, Matsuda H, Uchiyama M, Okawa M, Nishikawa M, Uchida S, Nakajima T, Hiroki M: Neural correlates and brain functions during sleep in normal humans assessed by high-resolution positron emission tomography. 21th Congress of the Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, Glasgow, 7.15, 1998.

Kajimura N, Kato M, Sekimoto M, Watanabe T, Uchiyama M, Uchida S, Nakajima T, Takayama Y, Uema T, Horikoshi S, Ogawa K, Nishikawa M, Hiroki M, Kudo Y, Matsuda H, Okawa M, Takahashi K : Neural

correlates and brain functions during human NREM sleep assessed by high-resolution PET. 14th European Congress on Sleep Research, Madrid, 9.12, 1998.

梶村尚史: シンポジウム 「睡眠研究と画像解析」PET 画像解析と睡眠 第 28 回日本脳波・筋電図学会学術集大会 神戸 11.11, 1998.

梶村尚史: シンポジウム 「睡眠と夢の最新医学」PET で見る睡眠時の脳活動 第 1 回睡眠シンポジウム 東京 3.20, 1999.

分担研究報告書

ヒトの生体リズム異常の診断・治療法開発に関する基盤研究

分担研究者 海老澤尚 埼玉医科大学精神医学教室 講師

**研究要旨**

概日リズム障害を伴う患者についてメラトニン 1A 受容体、1B 受容体遺伝子全長の解析を行ったところ、正常群より非 24 時間睡眠覚醒症候群に多く認められ、受容体蛋白の性質も正常型とは大きく異なる 1A 受容体遺伝子の変異を見出した。

**A. 研究目的**

最近、ヒトを含む哺乳動物から相次いで概日リズム形成機構に重要な役割を果たすと思われる遺伝子—メラトニン受容体遺伝子、*period* 遺伝子、*Clock* 遺伝子、*timeless* 遺伝子などが単離され、概日リズム障害を遺伝子のレベルで解析することが可能になった。

概日リズムの遺伝子レベルでの研究は、ショウジョウバエなどの下等動物から始まった。1971 年 Konopka と Benzer は人工的に遺伝子変異を導入したショウジョウバエをスクリーニングすることにより、活動周期が正常群 (24.4 時間) より長い群 (28.6 時間)、短い群 (19.5 時間)、活動周期の消失した群のショウジョウバエをそれぞれ見出した。その後の遺伝子解析の結果、これらの異常はすべ

て *period* 遺伝子というただ一つの遺伝子の変異によって生じることが明らかになった。その後 *timeless* 遺伝子も、ショウジョウバエの概日リズム形成に不可欠な遺伝子として単離された。

1988 年、Ralph と Menaker は哺乳動物であるハムスターの中から正常群 (24.1 時間) と比べて有為に短い活動周期 (22.0 時間) を示すオスを一匹発見した。このオスから子孫を作り、解析したところ、この異常は常染色体上にある 1 個の遺伝子 (*tau* と名付けられた) の変異によって起こることが判明した。また、1994 年、Vitaterna らは、人工的に遺伝子変異を導入したマウスを数多く作成し、その中から活動周期の長い個体を見出した。この個体の子孫を使った

遺伝子解析から、1997年に原因となる遺伝子 *Clock* が単離された。つまり、ショウジョウバエからハムスター・マウスなどの哺乳動物に至るまで、ただ一つの遺伝子の異常により概日リズムの周期が変化することが証明された。

そして近年、冒頭で述べたようにヒトからも *period* 遺伝子や *timeless* 遺伝子、*Clock* 遺伝子に類似の遺伝子が見出され、ヒトの概日リズム形成においてもこれらの遺伝子が重要な役割を果たしていると考えられるに至った。

メラトニンは、主に松果体で産生される脂溶性のホルモンで、血液中、髄液中などに存在する。その産生、分泌量は生体時計及び明暗周期に支配されて昼夜リズムを示し、夜間は日中の数十倍から百倍に達する。夜間でも光を網膜に照射すると急激に減少する。逆に、外部から投与すると、視交叉上核にあるメラトニン受容体を介して生体時計に作用し、概日リズムの位相を変化させられることが知られている。ヒトの場合も *jet lag syndrome*（いわゆる時差ぼけ）や睡眠相遅延症候群、非24時間睡眠覚醒症候群、盲目のため明暗周期と自分の生体時計を同期させることができず、24時間より長い周期で睡眠覚醒を繰り返す人たちなど概日リズムの同調に障害をきたした

人たちの治療薬として用いられ、成果を上げている。

メラトニンの概日リズム周期に対する位相変位作用に関しては、ラット脳のスライスを使った実験で、百日咳毒素で処理するとその作用が消失するところから、百日咳毒素に感受性のあるG蛋白に関連した膜表面型受容体を介していると考えられていたが、最近受容体遺伝子が単離され、ヒトでは1A、1Bのサブタイプに分かれ、1Aタイプは、生体時計が存在する視交叉上核に多く発現していることが明らかになっている。その他、網膜や下垂体の *pars tuberalis*、小脳などに発現していることが知られているが、最近の研究で、そのいずれの場所でも既述した時計遺伝子 *period* の messenger RNA が日内変動を伴って発現していることが明らかになり、生体時計の調節に関してメラトニンが重要な役割を果たしていることが示唆されている。

一方、睡眠覚醒リズム障害の臨床研究の成果により、メラトニン分泌異常とリズム障害との関連が指摘されているほか、睡眠覚醒リズム障害に対してメラトニン投与が有効である例、無効である例がそれぞれ報告されており、メラトニンに対する感受性に個体差があることが示されている。

以上のような最近の研究成果から、これらの遺伝子に変異があれば、ヒトにも概日リズム障害が生じると考えられ、少なくともその一部は非24時間睡眠覚醒症候群・睡眠相遅延症候群・季節性感情障害などの表現型となって現れている可能性が高い。我々は、概日リズム障害を示す患者の少なくとも一部に、メラトニン受容体遺伝子などの生体時計関連遺伝子に変異を有する症例が存在する可能性が高いと考え、解析を行ってきた。概日リズム障害を伴う疾患を持つ患者より採血し、ゲノムDNAを抽出して上記遺伝子の変異の有無を順次スクリーニングしているが、メラトニン受容体遺伝子についてはほぼ解析を終え、複数の変異を見出すことができたので報告する。また、変異を持つ遺伝子を培養細胞に発現させてその機能変化を調べた結果も併せて報告する。

## B. 研究方法

本研究は埼玉医科大学および国立精神神経センター武蔵病院・同国府台病院の倫理委員会より承認を受けている。

### 1) 対象

対象は、埼玉医科大学精神科・国立精神神経センター武蔵病院・同国府台病院に通院中の概日リズム障害を示す患者で、

本研究について十分説明し、文書による同意を得られた計56名である。疾患の内訳は睡眠相後退症候群34名、非24時間睡眠覚醒症候群13名、季節性感情障害6名、不規則型睡眠覚醒パターン1名、周期性傾眠症1名、その他1名である。また、文書による同意を得られた59人の正常群についても対象とした。

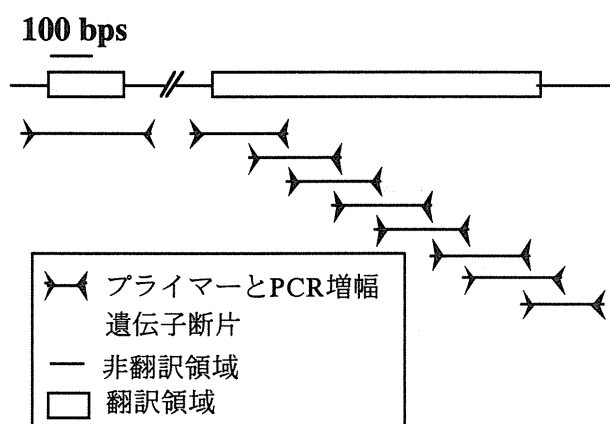


図1a. ヒトメラトニン1A受容体ゲノム遺伝子の構造及びSSCP法に用いたプライマーの位置

### 2) 採血及びゲノムDNAの抽出

対象者より静脈血を採取し、抗凝固剤入りの試験管に注入して保存した。ゲノムDNAの抽出にはQIAGEN Blood & Cell Culture DNA Midi Kitを使用した。5mlの静脈血から30-80 $\mu$ gのゲノムDNAを得ることができた。

### 3) メラトニン受容体遺伝子のゲノム構造の解析

ヒトのメラトニン受容体については、現在までに 1A 及び 1B の 2 種類が知られ、それぞれ complementary DNA の配列が報告されている。

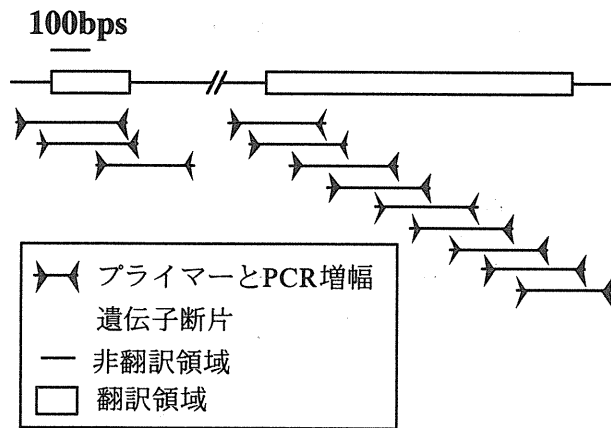


図 1b. ヒト メラトニン 1B 受容体ゲノム遺伝子の構造及び SSCP 法に用いたプライマーの位置

PCR 法を用いて翻訳領域の全域にわたって変異の有無を探るには、翻訳領域近傍の非翻訳領域やイントロン部分の配列を知ることが必要だが、1A、1B 受容体遺伝子ともに翻訳領域が 2 つのエクソンに分かれていることは知られているが、翻訳領域以外の配列はほとんど報告されていない。そこで我々は、まず inverse PCR 法や vectorette 法によっ

てこれら未報告の配列を独自に決定し、解析に使用した。

### 4) Single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法による解析

まず PCR-SSCP 法により変異の有無を調べた。PCR-SSCP 法とは、対象となる遺伝子の領域を PCR 法によって増幅し、産物を非変性ゲルで電気泳動し、そ

の立体構造の違いによる電気泳動度の差違を検出して遺伝子の点突然変異を見出す手法である。メラトニン受容体遺伝子の

翻訳領域を 1A 受容体については 9 個の、1B 受容体については 12 個の部位に分け、それぞれについて一組 2 本ずつの

プライマーを作成し、対象者の血液より抽出したゲノム DNA を鋳型に用いて PCR 法を施行した。プライマーは FITC 化し、島津製作所製 DNA シーケンサー DSQ-500S で電気泳動パターンが読み

取れるようにした。変異検出の感度を上げるため、PCR で増幅される遺伝子断片の長さは 300base pairs 以下とした。

メラトニン 1B 受容体遺伝子については PCR で増幅される遺伝子断片が相互に半分ずつ重なるようプライマーを設計し、翻訳領域上の総ての配列が 2 つの異なる

PCR 増幅遺伝子断片上で解析されるようにして変異の見逃しを最小限にした。

ゲルは 5% グリセロールを加えたもの、

加えないものの2種類使用した。図 1a、1b にメラトニン受容体のゲノム構造と、SSCP 解析に使用したプライマー及び PCR 断片の位置を示した。

#### 5) 変異の位置の特定

SSCP 法により変異が見出された部位については更に別のプライマーを用いて当該箇所を PCR 法にて増幅し、SSCP 法に用いたプライマーを使って直接核酸配列を決定した（直接シーケンス）。直接シーケンスにて配列が決定しづらい場合には産物をベクターにサブクローニングし、得られた組換え体を複数シーケンスすることで配列を確認した。時に応じて orphan peak analysis 法 (OPA 法) も使用した。

#### 6) 変異遺伝子の作製

ヒト視床下部から抽出した mRNA より合成した cDNA (Clontech 社製) を鋳型とし、Pfu polymerase (Stratagene 社製)を用いた PCR 法によってヒトメラトニン 1A 受容体 cDNA 及び 1B 受容体 cDNA の coding region の全長を増幅し、得られた遺伝子断片を発現ベクター pcDNA1.1/AMP (Invitrogen 社製)の EcoR 切断部位に挿入した。双方向より核酸配列を決定し、クローニングの過程で変異が生じていないことを確認した。

次に PCR 法による site-directed

mutagenesis 法を行い、被検者より見出された変異を導入した受容体遺伝子断片を作製した。制限酵素により、この遺伝子断片を pcDNA1.1/AMP に挿入した受容体 cDNA の当該部位と組換え、大腸菌に導入して大量に増幅した後精製し、核酸配列を決定して目的の遺伝子変異が導入されたことを確認した。

#### 7) 変異遺伝子の発現

COS-7 細胞 (ヒューマンサイエンス研究資源バンクより提供) を 10% FBS, 100units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin を含む DMEM 中、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。遺伝子導入には GibcoBRL 社製 Lipofectamine を使用した。遺伝子導入3日後に培養細胞をラバーポリスマンではがし、Phosphate Buffered Saline で洗ってから遠心し、沈殿を-80°Cで保存した。

#### 8) 受容体結合実験

保存された培養細胞粗膜分画を binding buffer [50mM Tris · HCl (PH7.4), 5mM MgCl<sub>2</sub>] で懸濁し、<sup>125</sup>I-melatonin (New England Nuclear 社製) を用いて受容体結合実験を行った。非特異結合の測定には 10 µM の melatonin を加えて結合実験を行った。Total volume を 0.2 ml とし、25°Cで 1.5 時間インキュベートした後 Brandel



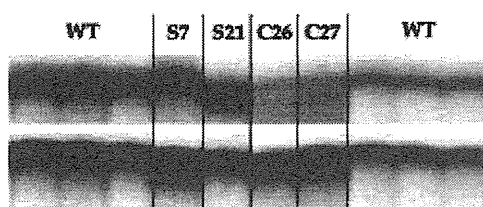
社製 Cell harvester を用いて  
 Whatmann GF/B filter で濾過した。結  
 合実験の結果は Ligand program  
 (Munson and Rodbard) を用いて解析  
 した。

### C. 研究結果

#### 1) メラトニン 1A 受容体

症例及び正常群についてメラトニン  
 1A 遺伝子を解析したところ、計2種類  
 の、アミノ酸置換を伴う核酸配列の変異  
 を見出した。その他に複数のアミノ酸置  
 換を伴わない核酸配列の変異 (silent  
 mutation) も見出したが、詳細について  
 は省略する。アミノ酸配置換を伴う変異  
 のうち1種類についての遺伝子解析の経  
 過の実際を以下に述べる。

図2に、変異が認められた部位につい  
 ての SSCP 法の結果を示す。WT は当該  
 箇所に変異を持たない wild type (野生  
 型) を、S は概日リズム障害患者を C は  
 正常コントロールを表している。便宜上、  
 変異を持たない大多数のサンプルについ  
 ては省略した。概日リズム障害患者のう  
 ち、S7 及び S21 が、解析対象となった  
 遺伝子断片上に変異を持つことが示され  
 ている。また、正常群のうち C26 と C27  
 も変異を持つことが示されている。



WT ; wild type (野生型; 当該遺伝子断片上に変異を持たないもの)  
 S7,S21 ; 概日リズム障害患者  
 C26,C27 ; 正常コントロール

図2. ヒトメラトニン 1A 受容体遺伝子の SSCP 解析

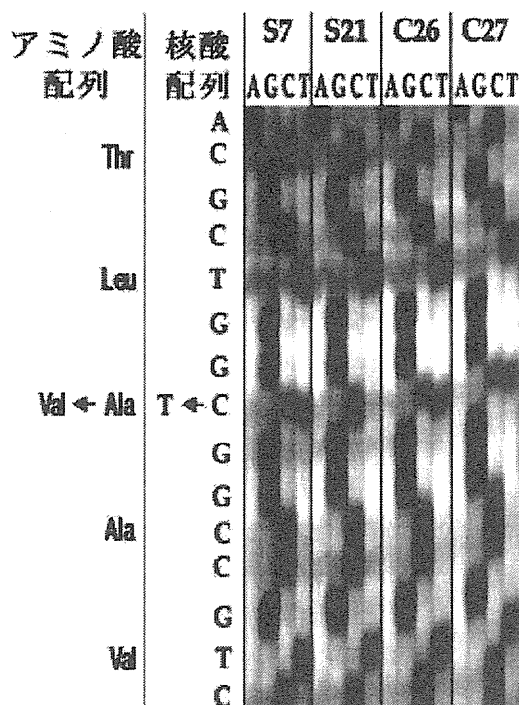


図3. 直接シーケンス法による点突然変異の解析

図3にこれらのサンプルについて行っ  
 た直接シーケンスの結果を示す。図は変  
 異が見つかった部位のみを拡大して示し

ているが、S7 及び C26、C27 では本来 cytosine のバンドがあるべき位置で、cytosine のバンドが薄くなっており、新たに thymine のバンドが出現している。つまりこの3つのサンプルでは2本ある allele のうち1本のみがこの場所で cytosine から thymine に変化し、それがアミノ酸の alanine から valine への変化をもたらしていることになる。S21 では cytosine のバンドのみが色濃く見られ、この変異を持っていないことが分かる。S21 ではここに示さなかった他の場所に、アミノ酸置換を伴わない核酸配列の変異 (silent mutation) があり、これが SSCP 上の変異としてとらえられたことが分かった。また、S7 や C26 及び C27 でも図に示さなかった位置にそれぞれ異なる silent mutation を持ち、それが S7 と C26、C27 での SSCP パターンの違いとしてとらえられたことが判明している。図4はヒトメラトニン 1A 受容体のアミノ酸配列、及び S7、C26、C27 で見出されたアミノ酸配列の変異の位置を示している。変異は第4細胞膜貫通部位に位置している。この変異を 1A 受容体 Type 変異と名付けた。

このほかもう1種類の変異を見出している (Type 変異)。

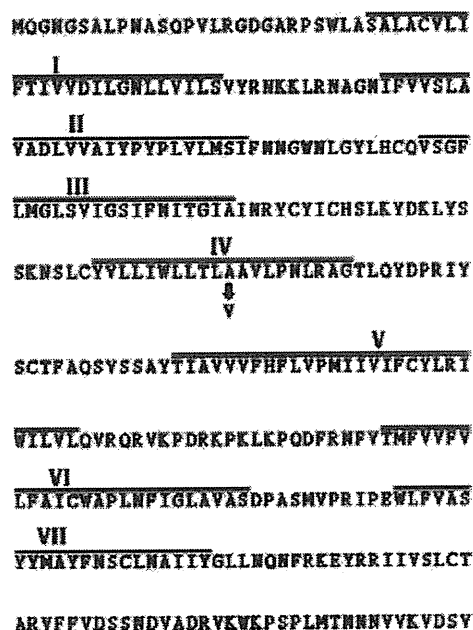


図4. ヒトメラトニン 1A 受容体アミノ酸配列の変異

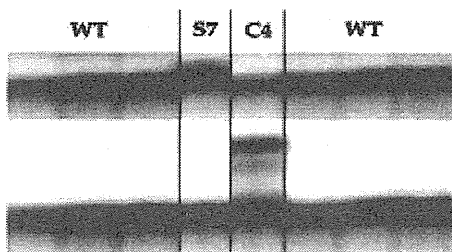
Type 変異の発現頻度は、正常ボランティアでは約20名に1名だったが、非24時間睡眠覚醒症候群では約4名に1名の割合だった (フィッシャーの直接確率検定で P=0.06)。

## 2) メラトニン 1B 受容体

メラトニン 1B 受容体遺伝子についても解析を行ったところ、アミノ酸置換を伴う核酸配列の変異を2種類見出した。

図5に SSCP 法の結果をしめす。S7 及び C4 で変異があることが分かる。つぎにこの S7 及び C4 について直接シーケンスを行って変異の部位を決定したところ、いずれもアミノ酸置換を伴う核酸

配列の変異を持っていることが分かった。その変異の部位及び変化するアミノ酸は、S7 と C4 では異なっており、それぞれ1B 受容体 Type 変異、Type 変異と名付けた。このうち S7 については既述したように 1A 受容体でも変異(1A 受容体 Type 変異) が見つかっている。



WT ; wild type (野生型 : 当該遺伝子断片上に変異を持たないもの)  
S7 ; 概日リズム障害患者  
C4 ; 正常コントロール

図 5. ヒトメラトニン 1B 受容体遺伝子の SSCP 解析

	概日リズム障害患者群 症例数 (疾患別)	正常コントロール群
メラトニン1A 受容体		
Type 変異	3/56 (N-24 : 1*/13)	2/59
Type 変異	5/56 (N-24 : 3/13)	3/59
メラトニン1B 受容体		
Type 変異	1/56 (N-24 : 1*/13)	2/59
Type 変異	0/56	1/59

N-24: 非24時間睡眠覚醒症候群  
DSPS: 睡眠相遅延症候群  
[\* は同じ症例]

表 1. メラトニン受容体遺伝子の変異と頻度

上記の結果のまとめを表 1 に示す。

### 3) 受容体発現実験

それぞれの変異を導入した受容体 cDNA を発現ベクターに挿入し、培養細胞に発現させてから <sup>125</sup>I-melatonin を用いて受容体結合実験を行った。

	Kd (pM)	Bmax (fmols/dish)
メラトニン1A受容体		
正常型	25.1	475
Type 変異	33.1	596
Type 変異	17.8	177
メラトニン1B受容体		
正常型	73.5	299
Type 変異	60.6	259
Type 変異	79.4	206

表 2. 変異を持つメラトニン受容体の性質

表 2 に Scatchard 解析の結果を示す。1A 受容体 Type 変異の発現量(Bmax) は正常型に比べて約 3 分の 1 に減少し、<sup>125</sup>I-melatonin に対する親和性が増加 (Kd 値が減少) 傾向にあった。

1B 受容体では、<sup>125</sup>I-melatonin に対する親和性 (Kd 値) は正常型と比べてほぼ等しかったが、受容体の発現量 (Bmax 値) は正常型、type 変異、type 変異の順に減少している傾向が認められた。

#### 4) 結果のまとめ

56 例の概日リズム障害患者及び 59 名の正常コントロールからメラトニン 1A 受容体について 2 種類、1B 受容体について 2 種類、計 4 種類のアミノ酸置換を伴う核酸配列の変異を見出した。

非 24 時間睡眠覚醒症候群 13 名のうち 3 名がメラトニン 1A 受容体の TypeII 変異を持っていたが、正常コントロールでは 59 名中で 3 名だった。

非 24 時間睡眠覚醒症候群のうち 1 名は、メラトニン 1A・1B 受容体遺伝子の双方に変異を持っていた。

1A 受容体 Type 変異は、培養細胞で発現させると正常型に比べて発現量が少なく、<sup>125</sup>I-melatonin に対する親和性が高い傾向にあった。1B 受容体では、親和性には大きな変化はないが、正常型、type 変異、type 変異の順に発現量が減少している傾向が認められた。

#### D. 考察

メラトニンと概日リズムとの関係については、メラトニンの合成・分泌が生体時計にコントロールされて夜間の血中濃度が日中の数十倍に達するほか、外部よりメラトニンを投与すると生体時計に作用し、概日リズムの位相が変化する（生体時計の針が進む）ことが知られており、

概日リズム周期を維持する際のフィードバック制御の役割を果たしていると考えられている。ラットを用いた実験では、松果体を取り去っても概日リズムに大きな影響は出ないが、明暗周期の異なる環境にラットを移した際、松果体を取り去った個体の方が当初の位相変位の幅が大きいとの報告もあり、メラトニンが概日リズム周期の安定化に関与している可能性がある。

メラトニン受容体の変異と概日リズム周期との関係については、メラトニン 1A 受容体のノックアウトマウスと、メラトニン 1B 受容体が先天的に発現していないハムスターの strain に関する報告がある。いずれの場合もメラトニン投与による概日リズムの位相変位が引き起こされる（1A 受容体 ノックアウトマウスの場合、低濃度のメラトニンに対する反応性は低下し、視交叉上核の神経細胞の活動電位に対するメラトニンの短期作用は消失する）ところから、メラトニン 1A 受容体と 1B 受容体とは相補的に働いている可能性が指摘されている。ただし、実験に使用されるマウスの strain は先天的にメラトニン合成に欠陥がありメラトニンが合成されないので、メラトニンが分泌されている状態で 1A 受容体の変異が概日リズムにどのような変化を起こすか