

Eves,1998)が、in vivo で我々は活性型のAktが脳内、特に海馬の神経細胞に認められることを、免疫組織化学的方法を用いてを明らかにしてきた。

今回我々はこの pAkt の老化による変化の同定を試み、それが脳内のリン酸化の障害によるものか、Akt 発現の差によるものかを検討した。さらに、同一条件下で飼育されたラットで脳内のアポトーシス細胞をTUNEL 法(Negoescu,1996)により検討を行った。

## B. 研究方法

### ①老齢ラットにおける Akt の発現状況の検討

10週令および75週令のラットを用いて検討を行った。動物は購入後、動物実験施設の環境に1週間、十分に慣らせた後、ネンブタール麻酔下にて4%パラホルムアルデヒドで灌流固定をおこなった。固定後速やかに脳を摘出し、灌流液と同一組成で後固定を行い、その後 PBS にて洗浄した。組織はドライアイスで急速に凍結、40  $\mu$  m に薄切を行った。染色にはフリーフローティング法をよって行い、抗 pAkt 抗体でインキュベーションを行った後、2次抗体、ABC キットを用いて染色をおこなった。染色後、顕微鏡で pAkt 陽性細胞数を、標本の内訳を知らない単一の測定者が計測した。

### ②Akt 陽性細胞の検討

①で薄切した組織を用いて Akt 陽性細胞の染色を行った。染色は pAkt 抗体を使い、その他は①同様に行った。

### ③TUNEL 陽性細胞の検出

10週令および75週令のラットを用いて検討を行った。動物は購入後、動物実験施設の環境に1週間、十分に慣らせた後、ネンブタール麻酔下にて4%パラホルムアルデヒドで灌流固定をおこなった。固定後速やかに脳を摘出し、灌流液と同一組成で後固定を行い、その後 PBS にて洗浄した。組

織はパラフィン包埋の後、5  $\mu$  m ごとに薄切を行った。この切片をTUNEL法にて染色を行った。標本の観察には蛍光顕微鏡を用い、TUNEL 陽性細胞数を、標本の内訳を知らない単一の測定者が計測した。

## C. 研究結果

老令(75週令)および若例(7週令)ラットを用いた検討からは、海馬における活性型 Akt 陽性細胞は、海馬 CA1領域において有意にその数が増加していた。

Akt 陽性細胞は老齢群でやはり CA1領域で増加していた。

TUNEL 陽性細胞数は、老齢群で DA で若令群と比較して有意にその数が増加していた。一方で CA1領域では老令、若令群間で差は認められなかった。

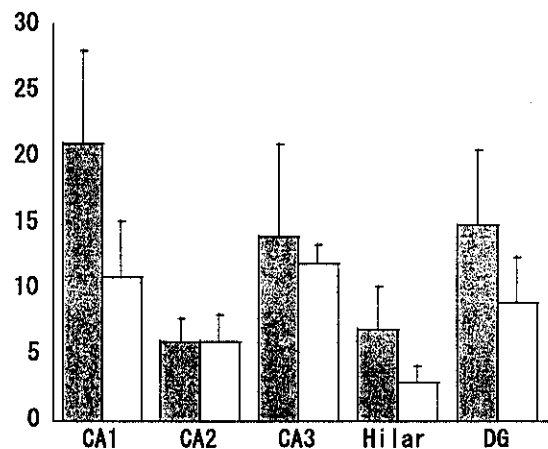


図1海馬の各領域におけるpAkt陽性細胞の数。CA1領域で有意に( $p < 0.05$ )老令群で陽性細胞の増加が認められた。

## D. 考察

老令(75週令)および若例(7週令)ラットを用いた検討からは、海馬における活性型 Akt 陽性細胞は、海馬 CA1領域において

有意にその数が増加していた。更に我々は、この差が Akt の産生、または上述したリン酸化過程のいずれの差であるのか検討するために、活性化されていない Akt 陽性細胞数を同じラットの標本を用いて検討したが、この結果、すでに Akt の段階で、海馬の CA1 領域で陽性細胞が増加していることが明らかとなった。以上のことから、ラット海馬 CA1 領域の活性型 Akt 陽性細胞の増加には、このキナーゼの産生の増加が関与していることが考えられた。しかし、染色切片上で活性型でない Akt は、明らかに活性型のものより多く、この活性化に関係するリン酸化過程も影響していることが推察された。

老令ラットにおけるアポトーシス細胞(TUNEL陽性細胞)の差を検討したところ、CA1 領域では、DA 領域で認められる TUNEL 陽性細胞数の変化は検出されなかった。このことから CA1 領域の pAkt が、同領域のアポトーシスの老化による増加を抑制している可能性が考えられた。

これらの結果は、老化による神経細胞死の制御の過程に Akt が関与していることを示すものと考えられ、老化による精神機能低下の機序を解明するために重要と考えられた。

#### 引用文献

Adams, J.D., Mukherjee, S.K., Klaidman, L.K., Chang, M.L., and Yasharel, A. Apoptosis and oxidative stress in the aging brain. (1996) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 786:135-51.

Adamson, M., Axelsson, K., blomberg, I., James, S., and Walum, E. (1998) Apoptosis in Neuronal cell lines. *Toxicol. in vitro* (1998) 567-568.

Cameron H.A., and Gould F. (1996) Distinct population of cells in the adult dentate gyrus undergo mitosis or apoptosis

in response to adrenalectomy. *J. Comp. Neurol.* 369, 56-63.

Coffer P.J., Jin J., and Woodgett R. (1998) Protein Kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J. Biochem.* 335, 1-13.

Crowder R.J., and Freeman R.S. (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor dependent sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 18, 2933-2943 .

Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y., and Greenberg M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

Downward J. (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. opin. cell biol.* 10, 262-267 .

Eves E.M., Xiong W., Bellacosa A., Kennedy S.G., Tsichlis P.N., Rosner M.R., and Hay N. (1998) Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2143-2152.

Hassan, A.H.S., Patchev, V.K., Von Rosenstiel, P., Holsboer, F., and Almeida, O.F.X. (1999) Plasticity of hippocampal corticosteroid receptors during aging in the rat. *FASEB* 13, 115-122.

Hassan A.H.S., Von Rosenstiel P., Patchev V.K., Holsboer F., and Almeida O.F.X. (1996) Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp. Neurol.* 140, 43-52.

Kennedy S.G., Wagner A.J., Conzen S.D.,

Jordán J., bellacosa A., Tsihlio P.N., and Hay N. (1997) The PI3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Gene. Dev.* 11, 701-713.

Kroemer,G. (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* 3, 614-620.

Kulik G., Klippel A., and Weber M.J. (1997) Antiapoptotic signaling by the insulin-like growth factor 1 receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1595-1606.

Nigoescu,A., Lorimier,P., Labat-Moleur,F., Drouet,C., Robert,C., Guilleamet,C., Brambilla,C., and Brambilla,E. (1996) In situ apoptic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J. histochemi. Cytochemi.* 44, 959-968.

Pollard, H., Charriaud-Marlangue, C., Cantagrel,S., Represa,A., Robain, O., Moreau, J., and Ben-Ari, Y. (1994) Kainate-induced apoptotic cell death in hippocampal neurons. *Neuroscience* 63, 7-18.

Yao.R.,and Cooper,G.M. (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267, 2003-2006.

## 潜在性脳梗塞と認知・感情障害に関する研究

分担研究者 山脇成人 広島大学医学部神経精神医学講座教授

### 研究要旨

老年期うつ病患者において、その病態や治療経過に対して潜在性脳梗塞（SCI）の影響を明らかにするために 50 歳以上のうつ病患者を対象として以下について検討した。

1) 抗うつ薬に対する治療反応性：ハミルトンうつ病評価尺度（HRSD）の改善率によって評価した。抗うつ薬の処方量は SCI を伴う群、伴わない群ともに差はなかった。SCI を伴う群では入院後 2 週間、退院時とも HRSD の改善は SCI を伴わない群と比較して有意に低値であり、入院期間も有意に長期であった。

2) 維持療法継続中の認知機能：WAIS-R、内田-クレベリン精神作業検査を用いて評価した。評価時の HRSD は両群とも差がなかったが、SCI を伴う群では伴わない群と比較して全般性の認知機能の低下が認められた。

3) 精神免疫学的指標の検討：うつ病患者において病相期と寛解期を比較して G-s alpha subunit の減少、DNA repair protein の増加、マクロファージ遊走阻止因子関連カルシウム結合蛋白の増加が病相期に認められた。

今後、老年期うつ病において、その病態や治療経過に対して SCI の影響をさらに検討することは、老年患者のクオリティー・オブ・ライフの向上につながるものと考えられる。

キーワード：

depression, magnetic resonance imaging, infarction, treatment response, cognitive function

### A. 研究目的

老年期精神医学は高齢者人口の急増とその有病率の高さにより、今や精神医学の中でも特に主要な領域となっている。老年期精神医学のなかの重要な研究領域のひとつに老年期うつ病がある。これまでの臨床

研究により、老年期うつ病についても特徴の一端が明らかにされ、診断法や対処法についてもある程度の進展が認められるが、今なおその知識は断片的であり、十分ではない。

老年期うつ病は成年期のうつ病に比べて遺伝的素因の関与が少ない一方、脳血管障

害などの器質的要因の関与が深いと考えられている。近年の MRI を用いた脳の形態研究により、老年期うつ病には健常成人と比べて深部白質病変が多いことが相次いで報告され、MRI にて脳血管障害が発見されるうつ病を Vascular Depression と呼ぶことが提唱されている。この Vascular Depression の概念はわれわれが検討してきた潜在性脳梗塞 (SCI) を伴ううつ病も含まれ重複する部分が多い。これまでにわれわれは、初老期以降に発症したうつ病の多くに SCI が関与していることを明らかにし、SCI を基盤とするうつ病の臨床的特徴を SCI を伴わないうつ病と比較して検討してきたが、いまだ不明な点も多い。

そこで今回、われわれは SCI を伴ううつ病の臨床的特徴を明らかにするため、1) SCI を伴ううつ病患者の抗うつ薬に対する治療反応性、2) SCI を伴ううつ病患者の維持療法継続中の認知機能について検討をおこなった。これらの研究では脳血管障害を認めない年齢、性別を一致させた大うつ病患者 (SCI を伴わないうつ病) を対照とした。3) 更に予備的な検討として、老年期うつ病患者の精神免疫学的指標について Micro array 法を用いて測定した。

## B. 研究方法

1) 1993 年 1 月から 1999 年 12 月の間に広島大学医学部附属病院精神科神経科において入院治療をおこなった 50 歳以上の大うつ病患者のうち、神経学的に無症候であり、入院時・入院後 2 週間・退院時の時点でハ

ミルトンうつ病評価尺度により症状評価がなされている患者すべて (47 名) を対象とした。

上記の対象を頭部 MRI 所見にて SCI を伴う群 20 名と SCI を伴わない群 27 名に分類し、両群において抗うつ薬に対する治療反応性を比較した。

頭部 MRI 所見の判定は T1 強調画像にて低信号域かつ T2 強調画像にて直径 5mm 以上の高信号域病変が同一半球に 4 個以上存在する患者を SCI を伴う群とし、これを満たさないものを SCI を伴わない群とした。

抗うつ薬に対する治療反応性はハミルトンうつ病評価尺度 (HRSD) 総得点の減少率： $(\text{入院時の HRSD 総得点} - \text{治療後の HRSD 総得点}) \div (\text{入院時の HRSD 総得点}) \times 100$  によって評価した。

治療内容については、稲垣らの換算表に基づいて、抗うつ薬の処方量をイミプラミンに、抗不安薬・睡眠薬の処方量をセルシンに換算して評価した。

(倫理面への配慮) 本研究では通常 of 精神科診療で行われる精神症状の評価以外はおこなっておらず、その結果についても数字にすべて置き換えて分析しているため倫理面の問題はないものと考えている。

2) 1993 年 1 月から 1998 年 12 月の間に広島大学医学部附属病院精神科神経科を受診した初発時の年齢が 50 歳以上の大うつ病患者のうち、神経学的に無症候であり、本研究に参加した時点ではうつ病は寛解状態にあり、維持療法を継続中で、本研究への書面でのインフォームドコンセントが得られたもの 35 名を対象とした。

上記の対象を研究 1 と同様の方法にて SCI を伴う群 17 名と SCI を伴わない群 18

名に分類し、両群において認知機能を比較した。

認知機能の評価には知的機能の測定に WAIS-R を、Mental Speed の測定に内田-クレペリン精神作業検査を使用した。

(倫理面への配慮) 本研究でおこなわれた神経心理学的検査は通常精神科診療で行われる検査を大きく超えるものではないが、検査時間はできるだけ短時間でおこない、疲労が少なくなるようによく常に配慮した。また、得られたデータの取り扱いについては、数字にすべて置き換えて分析しており、個人のプライバシー保護と人権擁護の面から十分な配慮をした上で書面でのインフォームドコンセントが得られたものだけを対象としておこなっている。

3) 1998年1月から12月までの間に、国立呉病院精神科において入院治療をおこなった50歳以上の大うつ病患者のうち、本研究への書面でのインフォームドコンセントが得られたもの3名を対象とした。対照群としては、年齢・性別を一致させた寛解期の大うつ病患者3名とした。

上記の対象に対して Micro array 法を用いて精神機能、免疫機能に関連することが指摘されている多種類の遺伝子発現を同時に測定した。

(倫理面への配慮) 本研究は国立呉病院倫理委員会において十分検討され、承認を受けた上でおこなわれている。得られたデータの取り扱いについては、数字にすべて置き換えて分析しており、個人のプライバシー保護と人権擁護の面から十分な配慮をした上で書面でのインフォームドコンセントが得られたものだけを対象としておこなっている。

## C. 研究結果

### 1) 抗うつ薬に対する治療反応性：

入院時の HRSD 総得点は SCI を伴う群で  $24.4 \pm 9.7$  点、SCI 伴わない群で  $22.5 \pm 6.9$  点であり、両群間で差はなく、HRSD の各項目の得点にも両群間で差はなかった。

HRSD の減少率は SCI を伴う群では入院2週間後では 22.8%、退院時では 57.8%であったのに対して、SCI を伴わない群では入院2週間後では 43.8%、退院時では 76.6%で HRSD の減少率は SCI を伴う群で有意に低値であった。入院期間は SCI を伴う群では  $106.1 \pm 64.8$  日、SCI を伴わない群では  $68.7 \pm 28.1$  日と SCI を伴う群で有意に長期であった。

イミプラミンに換算した抗うつ薬の処方量は SCI を伴う群では入院後2週間では最大  $154.3 \pm 54.4$  mg / day、退院時は  $135.0 \pm 78.0$  mg / dayであったのに対して SCI を伴わない群では入院後2週間では最大  $144.4 \pm 91.7$  mg / day、退院時は  $108.7 \pm 72.9$  mg / day であり、両群間に有意差を認めなかった。抗不安薬・睡眠薬の処方量についても抗うつ薬と同様に両群間に有意な差はなかった。この結果より、本研究で認められた治療反応性の差は薬物療法の差に起因するものではなく、SCI の存在に起因することが明らかになった。

2) うつ病相寛解後の維持療法期間中の認知機能の検討では SCI を伴う群の WAIS-R の平均得点は全 IQ : 88.2、言語性 IQ : 91.9、動作性 IQ : 85.1 であったのに対して、SCI を伴わない群では全 IQ : 108.8、言語性 IQ : 109.3、動作性 IQ : 108.0 であり、SCI を伴う群では全 IQ、言語性 IQ、動作性 IQ のい

ずれも SCI を伴わない群と較べて有意に低値であった。WAIS-R の下位項目においても、数唱以外のすべての項目において SCI を伴う群では有意に低値であった。内田・クレペリン精神作業検査においても SCI を伴う群の平均作業量は前半 21.0、後半 22.4 であったのに対して、SCI を伴わない群ではそれぞれ 40.4、45.4 と SCI を伴う群で有意に低値であった。この結果から SCI を伴う群においてはうつ病相寛解後の維持療法中の期間においても明らかな認知機能の低下が存在することが明らかになった。

3) 高齢者うつ病患者の精神免疫学的指標の検討では、うつ病病相期においては寛解期と比較して、G-s alpha subunit の減少、DNA repair protein の増加、マクロファージの遊走阻止因子関連カルシウム結合蛋白の増加が認められた。今回得られた結果と SCI の存在の有無との関連を調べることでうつ病全般に共通した異常と SCI を伴ううつ病に特有な異常の違いが明らかとなることが期待される。

#### D. 考察

潜在性脳梗塞を伴ううつ病の抗うつ薬に対する治療反応性については、われわれの報告も含めてこれまでもいくつかなされている。それらの報告ではせん妄などの中枢神経系の副作用の出現の頻度が高いことや、入院治療における寛解率の低さなどを指摘しているが、薬物治療の内容の比較がされていない。今回のわれわれの検討の結果も治療反応性についてはこれまでの報告の結果を支持するものであるが、抗うつ薬・抗不安薬・睡眠薬などの薬物治療の種

類および処方量が SCI を伴う群と伴わない群の間で有意な差はなかったことから、治療反応性の差は薬物療法の差に起因するものではなく、SCI の存在に起因するものであると考えられた。今後、潜在性脳梗塞がどのような機序を介して治療反応性に対して影響を与えるかを更に検討していく必要があると考えられた。

うつ病相寛解後の維持療法期間中の認知機能の検討では SCI を伴う群では SCI を伴わない群と比較して全般性の認知機能の低下が認められた。上述の抗うつ薬に対する治療反応性の違いも含めて、老年期うつ病患者の早期発見や治療法、うつ病寛解後の日常生活に対する援助の方法を考えていく上で示唆に富む点であると考えられた。

高齢者うつ病患者の精神免疫学的指標の今回の検討結果は少数例での検討であり、この結果から何らかの結論を導き出すことはできないが、うつ病と免疫機能低下との関連性を考えていく上で、多種類の既知の遺伝子発現を一回のハイブリダイゼーションによって同時に検討することができる Micro array 法を用いることは各遺伝子の変化のみならず各遺伝子間の相互の作用についても明らかにすることができると期待され、高齢者の精神機能老化機序の解明に対して新たな精神神経免疫学的研究法の可能性が示唆された。

#### E. 結論

老年期うつ病患者において、その病態や治療経過に対して SCI の影響を明らかにするために 50 歳以上のうつ病患者を対象として薬物治療反応性、維持療法中の認知機能、精神免疫学的指標について検討した。

その結果、老年期うつ病の患者の中で、脳梗塞を基盤とする患者の特徴のいくつかが明らかとなったことで老年期うつ病患者をSCIを中心としてサブグループに分けることができるものと考えた。

また、これらの研究により、高齢者の精神機能の老化が精神障害の発現や病像特徴に与える影響が明らかになれば、高齢者の精神障害の予防や早期発見ひいてはクオリティ・オブ・ライフの向上に役立つものであると考えられる。

今後は病態生理に沿った治療指針の作成や高齢者の精神機能低下の生物学的基盤の解明を目的として、時間分解能、空間分解能ともに優れた脳磁計を用いて認知課題や情動を惹起するような刺激への脳の反応を測定し、SCIとの関連を検討することで気分障害と認知障害を惹起・持続させる因子の共通性と相違点を検討する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Takebayashi, M., Kagaya, A., Inagaki, M., Kozuru, T., Jitsuiki, H., Kurata, K., Okamoto, Y. and Yamawaki, S. : Effects of antidepressants on  $\gamma$ -aminobutyric acid- and N-methyl-D-aspartate-induced intracellular  $Ca^{2+}$  concentration increases in primary cultured rat cortical neurons. *Neuropsychobiology* (in press).

堀口淳, 佐伯俊成, 山脇成人: うつ病専門外来について うつ病の診断と治療: 真興交易(株)医書出版部 (東京), 134-142, 1999.

藤川徳美, 山脇成人: 潜在性脳梗塞とうつ病 -Vascular depression の概念- 臨床精

神医学 28 巻 141-149, 1999

柳井一郎, 山脇成人 : 抑うつ状態と無症候性脳梗塞 *Clinical Pharmacotherapy* 5 : 214-219, 1999

山脇成人 : 潜在性脳梗塞とうつ病の関連について *老年期痴呆研究会誌* 11 : 145-148, 1999

山脇成人 : 潜在性脳梗塞と抑うつ症状 *Geriatric Medicine* 37 : 1329-1333, 1999

## 2. 学会発表

山下英尚, 堀口 淳, 山脇成人, 藤川徳美 : MRI-defined Vascular Depression 患者における認知機能の評価  
第 14 回日本老年精神医学会、平成 11 年 6 月、東京

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし