

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

ヒトの脳組織を用いたてんかん脳に関する研究  
側頭葉てんかん患者の興奮系および抑制系に関する受容体の変化

分担研究者 松田一己

国立療養所静岡東病院（てんかんセンター）第二脳神経外科医長

**研究要旨** 側頭葉てんかん患者の摘出海馬で、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸受容体のサブクラスおよび抑制系の GABAA 受容体の変化について免疫組織化学的検索を行った。GABA-A 受容体は海馬硬化にともなって、神経細胞脱落に一致した染色性の低下を認めた。GluR-1 は変化の程度は軽度であったが、ほぼ同様の変化を認めた。GluR2/3 は、神経細胞の胞体に濃厚に染色され、CA1 における染色性の低下はあったが、歯状回については著明な変化は認められなかった。NMDAR-1 では神経細胞脱落に一致して軽度の染色性の低下を認めた。metGluR-1 は神経細胞脱落に一致した陽性細胞体の減少を認め、残存した神経細胞の胞体はより濃染していた。硬化海馬の興奮性・抑制性受容体の変化の程度はサブクラスにより異なっており、残存神経細胞では受容体が増加している可能性も示唆され、海馬のてんかん原性を考える上で興味ある所見と思われた。

A. 研究目的

側頭葉てんかん脳の病理学的変化として、古くから海馬の神経細胞脱落とグリアの増殖、すなわち海馬硬化が知られ、発作発現に重要な役割をなしていると考えられている。最近ではてんかん脳の切除海馬において顆粒細胞の軸索すなわち苔状線維が、本来の投射先である歯状回門および CA3 の錐体細胞の脱落に伴って発芽し、興奮性回路を新生することが知られるようになり、海馬の組織化学的变化が注目されるようになった。しかし、海馬硬化の成立過程および発作発現のメカニズムについては未だに解明されていない。本研究では、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸受容体のサブクラスおよび抑制系の GABAA 受容体に注目して受容体の変化を中心に手術摘出標本の組織化学的検討をおこなった。

B. 研究方法

対象は、難治側頭葉てんかん手術例のうち、腫瘍、血管奇形、皮質構築異常などの限局性器質病変を認めず、術後の組織学的検索で海馬硬化が確認され、今回の検索についてインフォームドコンセントを得られた 35 例（以下 MTS 群）で、発病年齢は 1 から 24 歳（平均 10.1 歳）、手術時年齢は 3 から 41 歳（平均 26.9 歳）、罹病期間は 1 から 19 年（平均 16.8 年）で、全例が月 1

回以上の薬物抵抗性の複雑部分発作を有する難治例であった。側頭葉に器質病変を認め、海馬硬化をとまなわない 10 例（以下非 MTS 群）を対照として検討した。神経病理学的検索の方法は、摘出海馬を、4% パラホルムアルデヒドおよび 3% グルタルアルデヒドを加えた溶液で固定し海馬長軸に垂直な 20  $\mu$  の凍結切片あるいは、8  $\mu$  のパラフィン切片を作成し、HE および KB 染色をおこない海馬硬化の有無を検討した後、GABA-A 受容体およびグルタミン酸受容体のうち GluR1、GluR2/3、metGluR-1、NMDAR-1 に対する免疫組織化学染色を ABC 法を用いて行った。

C. 研究結果

1) GABA-A 受容体染色所見：非 MTS 群では、歯状回分子層および CA1 が瀰漫性に濃染し、門も中等度染色されていた。MTS 群では、神経細胞脱落に一致して CA1、CA3、門で染色性の低下を認めた。2) GluR-1 染色所見：非 MTS 群では、側頭葉皮質に比べ、海馬体および歯状回が層構造を形成して瀰漫性に高度に染色されていた。MTS 群では、CA1、CA3、歯状回を中心として、GABA-A 受容体染色より軽度ではあるが、神経細胞脱落に一致した染色性の低下を認めた。3) GluR2/3 染色所見：非 MTS 群では、側頭葉皮質、海馬体および歯状回がほぼ同

様の染色性を呈していたが、歯状回顆粒細胞の細胞体は高度の染色性を呈していた。MTS 群では、CA1 においては、神経細胞脱落に一致した染色性の低下と陽性細胞体の減少を認めたが、歯状回顆粒細胞層および門では、細胞脱落に一致した染色性の低下を認めたものの陽性細胞体の減少は顕著ではなかった。4) metGluR-1 染色所見：非 MTS 群では、側頭葉皮質、海馬体および歯状回がほぼ同様の染色性を呈していた。MTS 群では、CA1、CA3、歯状回を中心として、神経細胞脱落に一致した陽性細胞体の減少を認めた。しかし残存した神経細胞の胞体は非 MTS 群に比して濃染していた。5) NMDAR-1 免疫染色所見：非 MTS 群では、側頭葉皮質、海馬体および歯状回がほぼ同様の染色性を呈していた。MTS 群では、神経細胞脱落に一致した陽性細胞体の減少を認めた。

#### D. 考察

側頭葉てんかん患者の摘出海馬に認められる神経細胞脱落にともなう神経系の変化について様々な組織化学的検索の結果が報告されている。歯状回分子層における苔状線維の発芽がまず挙げられるが、他に、GABA 神経、AchE 陽性線維などの発芽所見も報告され、てんかんにともなう海馬では複雑な神経回路網が形成されていることが確認されている。一方、本研究により、海馬の神経細胞に存在する興奮性・抑制性受容体が、硬化にともなう減少していたことが確認されたが、その変化の程度は同様ではなく、興奮性受容体の減少がより軽度であったことはてんかん原性を考える上で興味深い。従来の報告でも同様の結果が得られている。さらに、metGluR-1 については、残存神経細胞（顆粒細胞・錘体細胞）で染色性が亢進しており、興奮性受容体の増加の所見と考えられ、神経細胞の興奮性が高まっている可能性も示唆され、電子顕微鏡レベルでのより詳細な検討が必要と思われる。

#### E. 結論

内側側頭葉硬化の海馬では、神経細胞脱落にともなう、GABA-A 受容体およびグルタミン酸受容体が減少していたが、サブ

タイプによって変化の程度が異なっていた。さらに残存神経細胞において、興奮性受容体が増加している可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 松田一己：内側側頭葉硬化. Clinical Neuroscience (臨床神経科学) 17(4):368-369,1999.
- 2) Matsuda K, Kubota Y, Kageyama M, et al: Neuropathological features of mesial temporal sclerosis. Histochemical studies of surgically resected specimens from patients with temporal lobe epilepsy. Neuropathology, 19:217-228,1999.
- 3) 松田一己、藤原建樹：小児のけいれん性疾患。123I-iomazenil SPECT。小児内科。31(4):586-591,1999.
- 4) 松田一己、久保田裕子、影山三千世、馬場好一、大坪俊昭、鳥取孝安、三原忠紘、八木和一：Mesial temporal sclerosis の病理と画像。臨床放射線, 44:1304-1316, 1999

##### 2. 学会発表

- 1) 松田一己、大坪俊昭、臼井直敬、馬場好一、鳥取孝安、三原忠紘 MRI で海馬萎縮の明らかでなかった側頭葉てんかん患者の摘出海馬の臨床・病理学的特徴—特に組織学的に海馬硬化が確認された例を中心に。第 28 回日本神経放射線学会。1999.2.3(札幌)
- 2) 臼井直敬、松田一己、大坪俊昭、他：側頭葉てんかんにおける中枢性ベンゾジアゼピン・レセプター・イメージの役割。123I-iomazenil (IMZ)-SPECT を用いた半定量的解析。第 28 回日本神経放射線学会。1999.2.3(札幌)
- 3) 松田一己：難治部分てんかんの神経病理—手術摘出標本の組織化学的分析ならびに神経画像との対比。第 46 回東海てんかん集談会。1999.2.20(浜松)。

##### [研究協力者]

- 久保田裕子(国立療養所静岡東病院小児科)  
影山三千世(国立療養所静岡東病院精神科)  
三原忠紘 (国立療養所静岡東病院脳外科)  
八木和一 (国立療養所静岡東病院院長)  
佐田佳美 (山梨医科大学小児科)

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

痴呆を伴う種々の神経変性疾患の神経病理学的 検討

分担研究者 名倉 英一

研究要旨：神経病理学的研究分野では、近年繁用されるようになった Gallyas 染色や、種々の抗体を用いた免疫組織化学的検討を加えることによって、従来曖昧であった疾患分類が明瞭となったり、または異なる疾患として捉えられていた疾患間に共通性が見いだされることも多い。また高齢化社会の進む中で、痴呆を伴う神経疾患の基礎病変の確認は重要と考えられる。我々は、痴呆の責任病巣の確定に苦慮した種々の神経疾患について、Gallyas 染色その他の免疫染色を新たに加えて検討することによって、多くの新知見を得ることができた。

A. 研究目的

種々の痴呆を伴う神経変性疾患の剖検脳を用いて、近年頻用されるようになった特殊染色などによって再検討を加え、従来十分解決できなかった神経病理所見について検討する。

B. 研究方法

対象は、痴呆を伴った神経疾患 4 例（症例 1. 前頭葉症状を伴った進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy; PSP)、症例 2. 前頭葉症状を伴った筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS)、症例 3. Polyglucosan body disease (PGD) を合併した Huntington 舞踏病 (HD)、症例 4. 高齢発症の Huntington 舞踏病) である。病理学的検索にはホルマリン固定された脳を用いた。大脳は冠状断、小脳は矢の PAS 陽性物状断、脳幹は水平断にて標本を作製し、hematoxylin-eosin, Kl 殻 er-Barrera, Bodian, methenamin-Bodian, Holzer 染色など従来施行されていたルチーンの染色方法に加えて、Gallyas-Braak (G-B) 染色、tau, ubiquitin, b-protein, glial fibrillary acidic protein (GFAP) を一次抗体として用いた免疫染色を施行した。

C. 研究結果

症例 1. 通常の PSP としての病理所見に加えて、前・前頭葉白質の著明な萎縮を認め、前頭葉から頭頂葉にかけて白質の

gliosis がみられた。前頭葉皮質では細胞脱落は軽度で層構造は比較的保たれていたが、皮質の深層を中心として ballooned neuron が多数見られた。G-B 染色では神経細胞内では、神経原線維変化、pretangle を認めたほか、astrocytic plaque, coiled body などの glial fibrillary tangle が認められた。

症例 2. 一般的な ALS の病理所見に加えて、前頭葉に高度の限局性萎縮を認め、割面にて側脳室の拡大、黒質色素の褪色がみられた。大脳皮質の神経細胞は軽度の変性を示したが、層構造は比較的保たれていた。皮質深層から白質にかけて広範に astrocyte の増生を認め、前頭葉では高度の線維性 gliosis を認めた。基底核や視床でも astrocyte の増生が目立った。側頭葉・前頭葉では神経原線維変化が多数出現し、Meynert 核・黒質。中脳被蓋部・歯状核などにも神経原線維変化が認められた。小脳・脳幹では Purkinje 細胞の軽度の脱落、歯状核・olive 核の神経細胞の脱落、赤核、橋核での astrocyte の増生を認めた。また黒質では神経細胞の軽度の脱落と線維性 gliosis を認めた。

症例 3. Polyglucosan body disease を合併した HD 例であるが、過去に経験した同一家系内の同様症例と対比しつつ検討した。HD としての病理所見は典型的なものであった。一方 PAS 陽性小体が回白質に広範かつ多数認められた。この小体は 1  $\mu$  以下の極めて小さい微細顆粒状のものから径約

20  $\mu$  近くの大型のものまで様々であったが、形態的にはほぼ球形の均質な小体であり、大きなものでは中芯核を有する二重構造を示した。この PAS 陽性小体は、視床に最もよく認められ、大脳皮質にも多数認められた。この小体の組織化学的性質は従来から知られているアミロイド小体、Lafora 小体と同じであり、Polyglucosan (PG) と総称される小体であった。一般臓器の検索では肝臓および心臓に同様の PAS 陽性物質が認められた。

症例 4. 高齢発症の HD において、側頭葉の萎縮が目立ち、G-B 染色にて同部に AGs が多数出現していることが明らかとなった。また、AGs の多数出現していた領域と関連して、coiled body, pretangle, ballooned neuron の出現も認められた。この例において、HD としての病変と AGs に関連した病変とはその分布上明らかに独立して存在していた。

#### D. 考察

症例 1 は臨床症状からは前頭葉症状を伴った PSP と考えられた。剖検当時にはこの前頭葉病変を病理学的に Pick 病とするのか PSP に特有のものとするのか判断が困難であった。その後前頭葉痴呆あるいは Corticobasal degeneration (CBD) などの疾患概念が提唱されるようになり、また G-B 染色の開発により、神経原線維変化の出現する疾患群の整理が可能となってきた。現在でも PSP と CBD の病理学的特徴にはオーバーラップするところがあり、それぞれを完全な疾患単位として確立することは困難である。症例 1 も病理所見から大脳皮質病変は CBD に類似し、神経原線維変化の出現や基底核以下の病変は PSP 相当すると考えられ、PSP と CBD の両特徴を併せもつ症例と考えられた。

症例 2 は症例 1 と同様の部位に変性が認められた。また腰髄に錐体路の変性と gliosis が認められ、頸髄の前角細胞の著明な変性脱落が認められ、ALS と診断された。

これらの病理所見は Guam の ALS-Dementia complex に類似した所見と考えられた。

症例 3 は、我々がかつて報告した PGD を合併した HD の症例の同胞例であるが、以前の例では Polyglucosan body (PG) は神経突起のみに認められたが、今回検討した同胞例では PG は神経突起のみならず少数ながら神経細胞内にも Lafora 小体としてみられた。

このことは Lafora 病、あるいは Lafora 小体病、神経突起のみに PG を認める motor neuron disease を伴う例、今回の報告例とが PGD として代謝異常に基づく一つの疾患単位として存在する可能性も示唆するが、断定するためには症例の蓄積が必要である。

症例 4 では痴呆の原因となりうる病態のひとつとしての AGs が HD に合併していた例である。HD での AGs の出現例は従来報告されおらず、本例は HD でも AGs が出現する可能性があることを示した。また一方 AGs は、痴呆が目立たない高齢者においても出現す

る可能性が報告されている。本例は高齢発症の HD であることから、発症年齢が AGs の出現に関与した可能性も考えられた。今後、病的変化としての AGs の位置づけも検討課題である。

#### E. 結論

近年頻用されるようになった G-B 染色を施行することによって、種々の嗜銀性構造物の観察が極めて容易となった。このことにより剖検当時には明確にすることが困難であった、前頭葉症状を伴う PSP, ALS 例について、疾患の分類上の新知見が得られた。また側頭葉の高度の萎縮が非定型的であった HD 例においては AGs などの異なる病態の合併と、その相互関係について明らかにすることができた。さらに HD と PGD の合併例のように稀少例の蓄積によって、検討が加えられた結果、疾患分類に新たな局面を提示できた例があった。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

剖検脳等を用いた精神神経疾患の発生機序と治療法に関する研究  
臨床的に小脳性運動失調の目立った進行性核上性麻痺の神経病理学的検討

分担研究者 饗場郁子 国立療養所東名古屋病院神経内科医長

## 研究要旨

臨床的に小脳性運動失調の目立った進行性核上性麻痺では高度の歯状核変性に加え、オリブ橋小脳系の変性を伴っていることを明らかにした。

## 研究協力者

橋詰良夫 愛知医科大学加齢医科学研究所 所長

吉田眞理 愛知医科大学加齢医科学研究所 助手

### A. 研究目的

進行性核上性麻痺（Progressive supranuclear palsy; PSP）の中には小脳性運動失調が目立ち、画像上も進行性の小脳萎縮をきたして脊髄小脳変性症と臨床診断される例が存在する。今回臨床的に小脳性運動失調の目立ったPSPを神経病理学的に検討し、運動失調の病理学的背景につき検討する。

### B. 研究方法

神経病理学的にPSPと診断された17例（小脳性運動失調+；3例，-；14例）。発症年齢は $65.1 \pm 6.9$ （平均 $\pm$ SD）歳，死亡時年齢は $70.7 \pm 6.0$ 歳，罹病期間は $5.7 \pm 2.3$ 年である。小脳性運動失調を認めた3例中2例は脊髄小脳変性症と臨床診断されていた。

方法 神経細胞脱落，グリオシス，Neurofibrillary tangle (NFT) および Glial fibrillary tangle (GFT) の出現頻度を小脳歯状核，皮質，白質，および小脳への入力系である橋核，下オリブ核を中心に定性的に評価した。また小脳脳幹病変の程度と小脳性運動失調との関係について検討した。

### C. 研究結果

17例全例で歯状核の神経細胞脱落，小脳白質のGFT，橋核および下オリブ核のNFTを認めた。上記の病変の程度は症例により様々であった。

小脳性運動失調が目立った例では歯状核では高度の神経細胞脱落，グルモース変性に加え，小脳白質には多数のGFTおよびHolzer染色ではグリオシスを認め，小脳白質は明らかに萎縮していた。さらに小脳皮質ではプルキンエ細胞の脱落を認めた。橋核，下オリブ核にはきわめて多数のNFTが出現し，横橋線維は萎縮し橋被蓋に加え橋底部にも高度の萎縮がみられた。運動失調に加え口蓋ミオクローヌスを認めた1例で，下オリブ核の仮性肥大を認めた。

### D. 考察

臨床的に小脳性運動失調の目立ったPSPでは従来報告されている歯状核変性に加え，小脳白質やプルキンエ細胞，橋核や下オリブ核など小脳への入力系にも高度の変性を認めた。小脳性運動失調にはこれらオリブ橋小脳系の病変が関与していると

推察された。

## E. 結論

PSPの中にはオリブ橋小脳系の変性を伴う例が存在し、それらは橋小脳の萎縮をきたし、臨床的にも小脳性運動失調を呈する可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

・後藤敦子, 久米明人, 饗場郁子, 安田武司, 村上信之. 常染色体優性遺伝と考えられた典型的 Melkersson-Rosenthal 症候群の1例. 臨床神経, 39: 1020-1024, 1999.

・Yoshihiko Horimito, Ikuko Aiba, Takeshi Yasuda, Yoshinori Okawa, Taiji

Katayama, Yuki Yokokawa, Atsuko Goto, Yasuhiro Ito. Cerebral atrophy in multiple system atrophy by MRI. J Neurol Sci., 137: 109-112, 2000.

### 2. 学会発表

・大川議徳, 岩井克成, 片山泰司, 堀本佳彦, 横川ゆき, 後藤敦子, 伊藤泰広,

饗場郁子, 安田武司, 伊藤栄一, 村上信之. 嚥下機能障害を有する神経疾患患者に対する経皮内視鏡的胃瘻造設術(PEG)の有用性に関する検討. 第55回日本神経学会総会(東京), 1999.5.19.

・横川ゆき, 大川議徳, 岩井克成, 片山泰司, 堀本佳彦, 後藤敦子, 伊藤泰広, 饗場郁子, 安田武司, 伊藤栄一, 古池保雄. Dementia with Lewy bodies (DLB) の診断における脳波所見の有用性について. 第40回日本神経学会総会(東京) 1999.5.20.

・後藤敦子, 大川議徳, 岩井克成, 片山泰司, 堀本佳彦, 横川ゆき, 伊藤泰広, 饗場郁子, 安田武司, 伊藤栄一. 後大脳動脈領域梗塞における健忘症候群の発現と痴呆化との比較検討. 第40回日本神経学

会総会(東京), 1999.5.21.

・片山泰司, 大川議徳, 岩井克成, 堀本佳彦, 横川ゆき, 後藤敦子, 伊藤泰広, 饗場郁子, 安田武司, 伊藤栄一. Dementia with Lewy bodies における iodine-

<sup>123</sup>I-labeled metiodobenzylguanidine 心筋シンチグラフィ. 第40回日本神経学会総会(東京) 1999.5.21

・饗場郁子, 堀本佳彦, 伊藤泰広, 吉田眞理, 橋詰良夫, 小長谷正明, 酒井素子, 村上信之. 多系統萎縮症における大脳萎縮の神経病理学的検討. 第40回神経病理学会総会. (横浜) 1999.6.4.

・堀本佳彦, 伊藤泰広, 饗場郁子, 伊藤栄一, 村上信之, 吉田眞理, 橋詰良夫. 人工呼吸器装着後約7年半を経過した“痴呆を伴う筋萎縮性側索硬化症”の1剖検例. 第40回神経病理学会総会. (横浜) 1999.6.5.

・横川ゆき, 徳井啓介, 大川議徳, 山岡朗子, 片山泰司, 堀本佳彦, 後藤敦子, 伊藤泰広, 饗場郁子, 安田武司, 伊藤栄一. レビ-小体型痴呆の SPECT 所見について. 第94回日本神経学会東海北陸地方会(名古屋) 1999.6.5.

・後藤敦子, 山岡朗子, 大川議徳, 片山泰司, 横川ゆき, 伊藤泰広, 饗場郁子, 安田武司, 伊藤栄一. 歩行障害が主訴の78歳女性例について. 名東医師会病診連携 1999.7.29.

・鈴木知美, 山岡朗子, 大川議徳, 片山泰司, 横川ゆき, 後藤敦子, 伊藤泰広, 饗場郁子, 安田武司, 伊藤栄一. DCCT (dementia with cerebral calcification and tangles) の一症例. 第23回日本神経心理学会(福岡) 1999.9.9.

・片山泰司, 大川議徳, 瀧崎祐一, 横川ゆき, 後藤敦子, 伊藤泰広, 斎藤由扶子, 饗場郁子, 安田武司, 伊藤栄一. Machado-Joseph disease 患者の

videofluoroscopy を用いた嚥下 機能評価.  
第 95 回日本神経学会東海北陸地方会 (名古屋) 1999.10.2

・片山泰司, 大川議徳, 淵崎祐一, 横川ゆき, 後藤敦子, 伊藤泰広, 斎藤由扶子, 饗場郁子, 安田武司, 伊藤栄一, 吉田眞理, 橋詰良夫 . 著明な側頭葉萎縮を伴い, Pick 嗜銀球 様の封入体が多数出現した全経過 25 年の多系統萎縮症の 1 剖検例. 第 95 回日本神経学会 東海北陸地方会 (名古屋) 1999.10.2

・伊藤泰広, 大川議徳, 淵崎祐一, 片山泰司, 横川ゆき, 後藤敦子, 斎藤由扶子, 饗場郁子, 安田武司, 伊藤栄一. 小阪-柴山病の 1 臨床例. 第 95 回日本神経学会東海北陸地方 会 (名古屋) 1999.10.2

・片山泰司, 大川議徳, 淵崎祐一, 横川ゆき, 後藤敦子, 伊藤泰広, 斎藤由扶子, 饗場郁子, 安田武司, 伊藤栄一, 吉田眞理, 橋詰良夫 . 著明な側頭葉萎縮を伴い, Pick 嗜銀球 様の封入体が多数出現した全経過 25 年の多系統萎縮症の 1 剖検例. 第 27 回臨床神経病理 懇話会 (広島) 1999.10.17.

・饗場郁子, 大川議徳, 片山泰司, 横川ゆき, 後藤敦子, 伊藤泰広, 安田武司, 伊藤栄一, 奥田 聡. 脳卒中リハビリ患者の移動能力レベルの検討—第 4 報— —獲得できる移動 能力およびプラトーまでの期間に関連する背景—. 第 54 回国立病院療養所総合医学会 a (大阪) 1999.11.11

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 本村啓介 国立肥前療養所 精神科  
中原辰雄 九州大学理学部、国立肥前療養所臨床研究部

**研究要旨：**非定型抗精神病薬 clozapine, olanzapine, risperidone 及び定型抗精神病薬 haloperidol のいずれかを投与したラットの脳で、heat shock protein (hsp 70) の mRNA を RT-PCR 法にて測定した。その結果、phencyclidine は内側前頭前野及び側坐核で hsp 70 mRNA を増加させる傾向が見られたが、これらの変化を haloperidol はさらに増加させ、対照的に clozapine, olanzapine, reiperidone は hsp 70 mRNA を減少させた。この結果からも、ヒト精神分裂病脳での研究に当たっては、抗精神病薬の影響についても十分に考慮することの必要性が示唆された。

**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、混沌とした長期未だ病因に結びつかない現状を成している。平成9年-11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37例中17例が精神分裂病の症例である。これまで主に神経伝達物質及びその受容体、細胞内伝達に関する蛋白、あるいは細胞骨格蛋白などに研究されてきた。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着目し、平成10年度よりラットを用いた基礎的研究を開始した。この結果、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、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 が有意に低下する事が確かめられた。これらの基礎的研究の結果を受けて、既にブレインバンクを利活用して、当院や国立下総療養所にて凍結保存してあるヒト精神分裂病脳で各種シナプス蛋白の測定を、ウエスタンブロッティング法にて着手している。本年度は、昨年度に引き続いて本研究を中心

**B. 研究方法**

NMDA 受容体遮断作用を持ち精神分裂病に類似した症状を起こすことで知られる phencyclidine を前投与し、非定型抗精神病薬 clozapine, olanzapine, risperidone 及

び定型抗精神病薬 haloperidol のいずれかを投与したラットの脳で、heat shock protein (hsp 70) の mRNA を RT-PCR 法にて測定した。

**C. 研究結果**

phencyclidine は内側前頭前野及び側坐核で hsp 70 mRNA を増加させる傾向が見られたが、これらの変化を haloperidol はさらに増加させ、対照的に clozapine, olanzapine, reiperidone は hsp 70 mRNA を減少させた。

**D. 考察**

非定型抗精神病薬は haloperidol と比較してセロトニン 2A 受容体遮断作用が強いこと、haloperidol には NR2B subunit を含んだ NMDA 受容体を選択的に遮断する作用があるために phencyclidine の作用を増強する可能性があること、などの機序が結果に関連していると考えられた。

**E. 結論**

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これまで得た結果は、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、これら結果を踏まえながら、ヒト精神分裂病脳でのいくつかのシナプス蛋白の測定を行っている。

**F. 研究発表**

1) Nakahara T, Kuroki T, Hondo H et al. Effects of atypical antipsychotic drugs vs. haloperidol on expression of heat shock protein in the discrete brain regions of phencyclidine-treated rats. Mol Brain Res 1999; 73: 193-197



厚生科学研究費補助金 (RRN)  
分担研究報告書

剖検脳における萎縮の定量的評価について

分担研究者 吉野 英 国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センター  
研究協力者 山田 滋雄 国立精神・神経センター国府台病院神経内科

研究要旨：剖検時に、頭蓋内容物の総重量と脳重を計測することによって、簡単に脳体積/頭蓋内容積を計測し、剖検脳の萎縮度を客観的に評価する方法を開発した。この方法は、剖検脳についての検索結果と臨床画像上で観察される脳の肉眼的脳萎縮の関係を分析する上できわめて有用であると考えられる。

神経疾患では脳に萎縮をみとめることが多い。MRIやCTなどの臨床画像では、脳と頭蓋骨内面の間隙（脳周囲腔）の大きさを程度を指標として脳萎縮の程度を客観的に評価することができる。しかし剖検脳における脳萎縮の評価は、脳溝の拡大や脳回の形態を肉眼に観察して主観的に評価するのみで客観的な評価が行われなことが多く、臨床画像との比較を行うことが困難であった。剖検時に脳の萎縮度を評価する指標としては、脳体積/頭蓋内容積比(1)が従来から知られているが、剖検時に頭蓋内容積を簡単に計測する方法がなかったため、剖検作業中に脳体積/頭蓋内容積比を日常的に計測することは事実上不可能であった。今回われわれは剖検時に、頭蓋内容物の総重量と脳重を計測することによって、簡単に頭蓋内容積を計測する方法(2)を開発した。この方法はきわめて安価かつ簡便に頭蓋内容積を計測することが可能であり、剖検脳の萎縮度を客観的に評価して臨床画像と対比する上できわめて有用であると考えられるので報告する。

A. 研究目的

剖検時に頭蓋内容物の総重量と脳重を計測し、その値から頭蓋内容積を計算する方法（重量法）の信頼度をあきらかにする。

B. 対象および方法

計測の原理

頭蓋内容積は、頭蓋内容物の総体積（脳体積+頭蓋内の脳脊髄液体積）に等しい。重量法で計測する頭蓋内容積をICVw、脳重をBW、髄液の重量をCSFW、とすると、脳及び髄液の比重は、それぞれ約1.037、及び1.006であるから、

$$ICVw = CSFW/1.006 + BW/1.037 \dots$$

(1)

が成り立つ。頭蓋内容物の総重量をTW、とおくと、

$$TW = BW + CSFW$$

なので、上記(1)式は、

$$ICVw = (TW - BW)$$

$$/1.006 + BW/1.037$$

となる。この式に従って、頭蓋内容物の総重量と脳重から、頭蓋内容積を求めることができる。

計測の方法

頭蓋内容物の総重量(TW)の計測

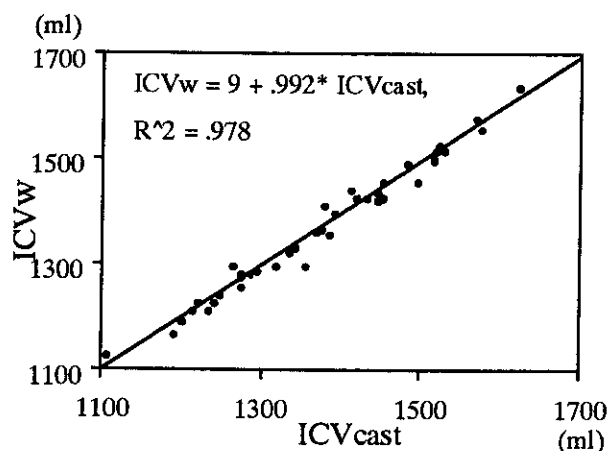
静脈洞から流出して髄液に混入する血液の量を最小限にとどめるために、開頭操作は心臓および肺を摘出した後に開始した。容器を頭部の下方に設置して、開頭術の開始以降に頭部から流出する物質を可能な

限り回収した。摘出した脳および硬膜もこの容器に回収した。さらに乾燥したペーパータオルの小片で頭蓋骨の内面をぬぐい、容器内に收容した。頭蓋内容物およびペーパータオルを收容した容器の総重量を秤量して、容器の乾燥重量との差から頭蓋内容物の総重量TWを求めた。また、硬膜および脳の重量をそれぞれ計測したのち、上記(1)式に依って、頭蓋内容積を算出した。この方法で求めた頭蓋内容積を、すでに測定精度が報告されているアルギン酸ナトリウムを用いた鋳型法による計測値と比較してその精度を明らかにした。

### C. 結果

(1) 実際の剖検例における重量法と鋳型法の比較。

重量法で求めた計測値I(ICVw)は1371±123ml、鋳型法による計測値(ICVcast)は1373±123mlで、両者に有意差はみとめられなかった(P=0.49 paired-t test)。差の標準誤差は、18mlで、頭蓋内容積の約1.3%であった。



(2) 重量法は、1例あたり1分以内に完了し、ほとんどコストがかからなかったが、鋳型法は、1例あたり30分以上を要し、約1500円の経費が必要であった。

### D. 考察

今回開発した方法を用いることにより、各解剖検査例の脳萎縮の程度を日常的に計測することが可能になったと考えられる。この方法を用いて脳バンクに蓄積される脳の萎縮度を評価すれば、種々の剖検脳をもちいた検索結果を臨床画像の変化を関連付ける上できわめて有用であると考えられる。

### E. 結論

脳重と頭蓋内容物の総重量から脳体積/頭蓋内容積比を求める方法は、剖検脳を検索に日常的に利用可能な方法であると考えられる。

なお今回の研究の詳細は、別誌に報告した(3)。

### References

- (1) Davis PJM, Wright EA. A new method for measuring cranial cavity volume and its application to the assessment of cerebral atrophy at autopsy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1977; 3: 341-358
- (2) Harvey FH. The significance of the amount of fluid surrounding the brain to the recognition of brain swelling (or atrophy) at autopsy: a new routinely applicable method of diagnosing abnormal brain size. *J Forensic Sci* 1980; 25: 287-296
- (3) Yamada S, et al. Intracranial cavity volume can be accurately estimated from the weights of intracranial contents: confirmation by the dental plaster casting method. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1999; 25: 341-344

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

## 新しい Cu,Zn-SOD 遺伝子異常を認めた家族性筋萎縮性側索硬化症

研究協力者 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

新しい Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) 変異を伴った家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の 2 家系 4 症例について病理学的及び生化学的研究を行った。4 症例とも臨床的には 1 次運動ニューロン症状を欠き下肢遠位部の筋力低下・筋萎縮より発症するいわゆる“偽多発神経炎型”を示した。58 歳男性例(第 1 家系：症例 1)と 76 歳男性例(第 2 家系：症例 3)では末梢血、36 歳男性例(症例 1 の甥、症例 2)では大腿四頭筋生検のパラフィン包埋標本よりゲノム DNA を抽出し direct sequence 法により遺伝子検索を行い、両症例で SOD1 の Exon5 に Leu126Ser の point mutation を認めた。症例 1 の病理学的検査では、2 次運動ニューロン、軽度の 1 次運動ニューロン、後索の中間根帯・脊髓小脳路、橋核から中小脳脚までの橋小脳路、Purkinje 細胞から白質、歯状核が障害されていた。しかし、オリブ小脳路、黒質、赤核等に病変が見られず、これまで報告された SOD1 遺伝子異常を示す剖検例と比較しても病変の分布が特徴的であった。Lewy body-like hyaline inclusion は変性が認められた領域に観察された。一方、症例 1 と孤発性 ALS(SALS)28 例及び健常人 16 人の酸化的ストレスを電子スピン共鳴装置で比較したところ、症例 1 では SALS と同様に対照に比べ血液 hydroxyl radical は高値、赤血球 SOD 活性は低値の傾向を示したが、症例 1 では血漿 SOD 活性と赤血球 SOD1 蛋白量が SALS と健常人に比べて低値の傾向を示した。

### 共同研究者

武久 康<sup>1</sup>、寺田整司<sup>1</sup>、石津秀樹<sup>1</sup>、氏家 寛<sup>1</sup>、  
黒田重利<sup>1</sup>、田辺康之<sup>2</sup>、高田 裕<sup>2</sup>、佐藤圭子<sup>2</sup>、  
信国圭吾<sup>2</sup>、難波玲子<sup>2</sup>、早原敏之<sup>2</sup>

<sup>1</sup>岡山大学医学部神経精神科

<sup>2</sup>国立療養所南岡山病院神経内科・臨床研究部

### A. 研究目的

家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)は ALS の 5-10% を占め、その 25% に Cu,Zn-superoxide dismutase(SOD1)変異を伴った例がみられる。現在まで 60 種類以上の変異が報告されているが、SOD1 変異を伴った剖検例は 20 例に満たず、8 種類の SOD1 変異しか報告されていない。一方、我々はこれまでに孤発性 ALS(SALS)などの神経筋疾患の病態への酸化的ストレスの関与について報告してきた。今回、我々はこれまでに報告のない SOD1 遺伝子変異を認めた FALS の 2 家系 4 症例を経験

したので、これまでの同部位の SOD1 遺伝子異常がみられた報告例と比較するとともに、SALS との酸化的ストレスの差違について検討した。

### B. 研究方法

#### 【対象】

#### [第 1 家系]

症例 1：58 歳男性。既往歴：特記すべきこと無し。現病歴：52 歳時、下肢の筋力低下にて発症した。その後、両上肢へと筋力低下・筋萎縮がひろがり、更に球麻痺症状進行し 54 歳時 ALS と診断された。深部腱反射は消失し、病的反射、眼球運動障害、感覚障害は認めなかった。筋力低下が強いため失調症状の評価は不能であった。58 歳時に呼吸困難を訴え入院し、1 ヶ月後呼吸困難が悪化しレスピレーターを装着したが、4 日後に死亡した。全経過 6 年。

症例 2(症例 1 の甥)：28 歳時に下肢遠位部の筋

力低下・筋萎縮にて発症し、上肢へと筋力低下・筋萎縮がひろがり、球麻痺症状も出現し ALS と診断された。深部腱反射は消失し、病的反射は認めなかった。36 歳で死亡。全経過 8 年。生存時大腿四頭筋の筋生検施行。

#### [第 2 家系]

症例 3：76 歳男性。既往歴：71 歳時に脳梗塞発症し右下肢麻痺を示した。現病歴：74 歳頃に下肢筋力低下・筋萎縮に気づき、徐々に両上肢にも筋力低下・筋萎縮が出現した。深部反射は低下ないし消失し、病的反射は認めなかった。76 歳で死亡。

症例 4：68 歳女性(症例 3 の妹)：54 歳時、下肢遠位部の筋力低下・筋萎縮にて発症し、上肢へと筋力低下・筋萎縮が進行した。深部反射は消失し、病的反射は認めなかった。68 歳で死亡。

#### [方法]

##### [神経病理学的所見]

症例 1 について神経病理学的検討を行った。

##### [遺伝子検索]

症例 1 と症例 3 は末梢血より、症例 2 は大腿四頭筋筋生検のパラフィン包埋標本よりゲノム DNA を抽出し direct sequence 法により SOD1 遺伝子検索を行った。

##### [酸化ストレスの検討]

症例 1、SALS 28 例(57.6±11.5 歳)、健常人 16 人(61.3±12.2 歳)で同意を得て採血し、次の検討を行った。血液 144 μl に DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide)を加え、40 秒後に電子スピン共鳴装置で hydroxyl radical を測定した。血液は血漿と赤血球に分離し、-80°C で保存した。更に、hypoxanthine 50 μl (4 mmol)、dimethyl sulfoxide 30 μl (2.1 M)、50 μl のサンプル(赤血球又は血漿)か標準 SOD 溶液、DMPO (428 mmol)に xanthine oxidase 50 μl (0.1 U/ml)を加え 40 秒後に superoxide を測定した。そして superoxide 量をサンプルと標準 SOD 溶液で比較して、SOD 活性 (superoxide 消去能)を算出した。また赤血球の SOD1 蛋白量 (ELISA 法)と総蛋白を測定した。以上より次の測定値を得た：血液の hydroxyl radical 量(10<sup>14</sup> spins/ml)、赤血球 SOD 活性(U/mg 蛋白)、血漿 SOD 活性(U/ml)、赤血球 SOD1

蛋白量(μg/mg 蛋白)。SALS と健常人の比較を unpaired t-test で行った。

##### [倫理面への配慮]

研究に関しては十分なインフォームドコンセントを施行した。

#### C. 研究結果

##### [神経病理学的所見(表 1)]

1. 脳重は 1320g。小脳、脳幹、脊髄は萎縮し前角は褐色調を示した。

2. 組織学的には、大脳皮質の層構造は保たれていた。海馬を含め大脳皮質では老年性変化は見られなかった。線条体、淡蒼球、視床下核、視床、黒質、赤核に著変なし。橋では橋核の神経細胞は減少し横走線維の軸索、髄鞘の脱落と、著しい線維性グリオシスが認められた。中小脳脚は萎縮しグリオシスを認めた。上小脳脚は保存され、延髄では舌下神経核は中等度脱落しグリアが増生していた。小脳ではプルキンエ細胞は斑状に脱落し、歯状核神経細胞の数は比較的保たれているがグルモース変性が認められた。

3. 脊髄では前角細胞の脱落、グリオシスを認める。Bunina 小体は観察されない。前脊髄小脳路・後脊髄小脳路、錐体路、後索の中間根帯、前・側索に軸索・髄鞘の脱落およびグリオシス。

4. Lewy body-like hyaline inclusion(LBHI)は舌下神経核、前角、小脳歯状核、橋横走線維の神経細胞内、突起内に認められた。Gallyas 染色で嗜銀性を示し、免疫組織化学では SOD1 陽性、Ubiquitin 陽性、α-Synuclein 陰性であった。超微形態学的には、granule-coated fibril である filamentous な構造物が無秩序に配列しているのが観察された。

##### [遺伝子検索]

症例 1、症例 2、症例 3 で SOD1 の Exon5 に Leu126Ser の point mutation を認めた。

##### [酸化ストレスの検討(表 2)]

SALS では健常人に比較して血液 hydroxyl radical は高値(P<0.001)、赤血球 SOD 活性は低値(P<0.001)を示したが、血漿 SOD 活性と赤血球 SOD1 蛋白量は SALS と健常人で有意差はなかった。一方、症例 1 では SALS と同様に対照に比べ血液

表1. SOD1codon126遺伝子異常を示すFALSの臨床病理所見の比較

	症例1	Kadekawaら	Katoら	
遺伝子変異・欠失	Leu126Ser	2bp欠失	2bp欠失	2bp欠失
発症年齢(歳)	52 y/o	44 y/o	46y/o	54 y/o
罹病期間(ヶ月)	72	24	18	132
大脳				
Betz cell	+++	+	+++	+++
脳神経核				
XII	+++	+++	+++	+++ ,LBHI
III, IV	-	-	-	+++
VIII	+	-	-	+
脳幹				
黒質	-	-	-	+++ ,LBHI
赤核	-	-	-	+++
橋核	+++	-	-	-
横走線維	+++ ,LBHI	-	-	+
下オリブ核	-	-	-	+++ ,LBHI
小脳				
歯状核	+++ ,LBHI	-	-	+++ ,LBHI
プルキンエ細胞	+	-	-	+++
脊髄				
Onuf核	+	-	-	+++ ,LBHI
クラーク柱	+	-	-	+++
前角	+++ ,LBHI	+++ ,LBHI	+++ ,LBHI	+++ ,LBHI
脊髄小脳路	+++	-	-	+++
後索	+	-	+	+++
Ast-LBHI	-	-	-	+

Kadekawa J., et al.:Acta Neuropathol., 96:617-622,1997.

Kato S., et al.:J. Neuropathol. Exp. Neurol.,55:1089-1101,1996.

表2. FALS 症例 (症例1) と SALS の酸化的ストレスの比較

	症例1	SALS n=28 (Mean ± SD)	健常人 n=16 (Mean ± SD)	SALS Vs 健常人
血液 hydroxyl radical	6.33	4.48 ± 2.01	2.14 ± 0.93	P<0.001
赤血球 SOD 活性	3.30	4.98 ± 1.01	8.20 ± 1.31	P<0.001
血漿 SOD 活性	1.38	4.52 ± 3.78	5.88 ± 2.55	NS
赤血球 Cu,Zn-SOD 蛋白	0.30	0.45 ± 0.05	0.45 ± 0.06	NS

FALS : 58 歳、SALS : 57.6 ± 11.5 歳、健常人 : 61.3 ± 12.2 歳。血液 hydroxyl radical : 10<sup>14</sup> spins/ml、赤血球 SOD 活性 : U/mg 蛋白、血漿 SOD 活性 : U/ml、赤血球 Cu,Zn-SOD 蛋白 : μg/mg 蛋白。

検定は unpaired t-test。

hydroxyl radical は高値、赤血球 SOD 活性は低値の傾向を示したが、血漿 SOD 活性と赤血球 SOD1 蛋白量が SALS と健常人に比べて低値の傾向を示した。

#### D. 考察

FALS は変性が運動ニューロンに限局する例と運動ニューロン以外に後索の中間根帯・脊髄小脳路、さらに多系統にみられる例が報告されている。また運動ニューロン変性が2次運動ニューロンのみにみられる例と1次および2次運動ニューロンに見られる例がある。SOD1 codon126 の遺伝子異常は表1のように2塩基欠失例が本邦で3例病理報告されているが、これらは臨床的にも病理学的にも多彩である(表1)。本研究では症例1、2、3においてSOD1のExon5にこれまでに報告のないLeu126Serのpoint mutationを認め、そして、4症例とも発症年齢は差があるが、臨床的には1次運動ニューロン症状を欠き下肢遠位部の筋力低下・筋萎縮より発症するいわゆる“偽多発神経炎型”を示した。また症例3は脳梗塞後遺症のため発症年齢が明らかでないが、症例1、2、4では比較的緩徐進行性で類似の経過をとっている。症例1の病理学的検討では2次運動ニューロン、軽度1次運動ニューロン症状および後索の中間根帯・脊髄小脳路だけでなく橋核から中小脳脚までの橋小脳路、Purkinje細胞から白質、歯状核まで高度に障害されていた。しかし、オリブ小脳路、黒質、赤核等に病変が見られず、病変の分布がSOD1遺伝子異常のすべての剖検例と比較しても極めて特徴的である。LBHIは変性が認められた領域に観察された。本例を含めこれらの病理所見がSOD1遺伝子変異と関連があるかどうかは今後の検討課題である。

SALSでは健常人に比較し血液hydroxyl radicalが増加、赤血球SOD活性が低下し、酸化ストレスが増大していると考えられた。一方、赤血球SOD1蛋白量は健常人との間で差が無く、SALSにおける赤血球SOD活性低下はSOD1蛋白量の減少ではなくSOD1蛋白当たりのSOD活性の低下によると考えられた。症例1でも健常人に比較して血液hydroxyl radicalが増加傾向、赤血球SOD活

性が低下傾向を示し、SALS同様に酸化ストレスが増大していると考えられた。一方、症例1では血漿SOD活性と赤血球SOD1蛋白量がSALSと健常人に比べて低下傾向を示し、症例1では赤血球SOD活性の低下はSOD1蛋白量の低下とSOD1蛋白当たりのSOD活性低下の両方が関与していると考えられた。また、症例1における血漿SOD活性の低下傾向は血漿のSOD1蛋白量の低下が関与している可能性があり、今後の検討が必要と考えられた。

#### E. 結論

SOD1のExon5にこれまでに報告のないLeu126Serのpoint mutationを認め、臨床的には“偽多発神経炎型”を示す2家系4症例を報告した。病理学的にはLBHIを認め、病変の分布がSOD1遺伝子異常を示す既剖検例と比較しても極めて特徴的であった。また、SALSと同様に健常人に比較して血液hydroxyl radicalが増加傾向、赤血球SOD活性が低下傾向を示した。一方、血漿SOD活性と赤血球SOD1蛋白量はSALSと健常人に比べて低下傾向を示した。FALSの検討と並行して行ったパーキンソン病の酸化ストレスの検討では酸化ストレスと臨床所見の関連が認められており、今後FALSにおいても臨床所見、病理学的所見、SOD1遺伝子異常、酸化ストレスの間にとどの様な関連があるかを検討する必要があると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ihara Y., et al.: Hydroxyl radical and superoxide dismutase in blood of patients with Parkinson's disease: relationship to clinical data. *J. Neurol. Sci.*, 170: 90-95, 1999.

##### 2. 学会発表

武久 康ら: Lewy body-like hyaline inclusion (LBHI)を伴った家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)。第40回日本神経病理学会総会、1999、横浜。

## 精神分裂病の発症脆弱性に関連する遺伝子座位の探索と遺伝子関連研究における研究用試料のネットワーク化の必要性について

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

**研究要旨：** 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クランをすすめているが、本年度は引き続きこれらの解析をすすめるとともに、その過程において検体試料のネットワーク化 (RRN) の必要性和それに付随する諸問題についての多角的な側面からの考察も行った。精神分裂病群 (n=322) と健常対照群 (n=196) の2群間で、第 19~22 番染色体上の 34 カ所の DNA マーカーについて、それらのアレル分布頻度の違いについて比較検討した。その結果、D19S209 の精神分裂病群と健常対照群、D20S178 と D21S1256 の健常対照群において heterozygosity の出現頻度は、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。また heterozygosity の出現頻度は、34 の DNA マーカーのうち 14 部位で日本人とフランス人の間に有意差がみられた。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 of 全体的な出現頻度の分布については、D19S209 および D20S95 では有意差がみられ、D20S118 では有意傾向であった。ただし、heterozygosity の出現頻度が 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 D19S209 については、case control comparison で観察された有意差が他の要因に由来する可能性も否定できないので、考察対象から除外した。今回の結果から、D20S95 の近傍にある chromogranin B をコードする遺伝子 (CHGB) および D20S118 の近傍にある proprotein convertase subtilisin/kexin type 2 遺伝子 (PCSK2, PC2) が、精神分裂病の発症と何らかの関連を有する可能性が示唆された。

**Key words：** RRN, 末梢血液, 精神分裂病, マイクロサテライト, DNA, 関連研究

**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), 有波忠雄 (筑波大学基礎医学系遺伝医学), 広津千尋, 青木 敏 (東京大学工学部計数工学科), 山内惟光 (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

血液試料などの生検材料を用いた精神疾患に関する薬理的、生化学的、分子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、およびその際に使用する検体試料のネットワーク化の必要性に関し考察することである。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、全ゲノムスクラ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、今回はこれまでに解析の終了した第19番～第22番染色体上にある34のDNAマーカーについて解析結果を総括的に報告する。なお、昨年度までの解析手法は各マーカーにおけるアリアル出現頻度の2群間の違いを non-specific な差異も検出する統計量(all possible 2 by 2, Monte Carlo Simulation)<sup>1)</sup>で検討してきたが、今年度はより systematic な分布の違いを検出できる統計量を用いて検討を行った。

## 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、DSM-III-R<sup>2)</sup>で精神分裂病の診断を受けた者から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322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196名である。これらの対象者から血液を採取して市販のキットを用いてDNAを抽出し、第19～22番染色体上にある34カ所のDNAマイクロサテライトマーカー(D19S209, D19S216, D19S221, D19S226, D19S414, D19S220, D19S420, D19S418, D19S210, D20S117, D20S95, D20S115, D20S189, D20S186, D20S118, D20S195, D20S107, D20S119, D20S178, D20S196, D20S100, D20S173, D20S171, D21S1256, D21S1253, D21S263, D21S1252, D21S266, D22S420, D22S315, D22S280, D22S283, D22S423, D22S274)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(ABI PRISM Linkage Mapping Set Ver. 1)を用いてPCR法により増幅し、Genetic Analyzer(ABI PRISM 310)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85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な差( $p < 0.05$ )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 map<sup>3)</sup>に報告されているフランス人健常者との間にアリアル出現頻度

の分布に有意な差( $p < 0.05$ )が認められるかどうかについても検討した。統計解析はHirotsuら<sup>4)</sup>を参考にMax(最大chi square統計量,外れ値型(1-to-others)検定統計量)を統計量として選び、Bonferroniの多重比較補正後の有意水準については、 $\alpha < 0.0015 (=0.05/34)$ で有意差あり、 $\alpha < 0.0029 (=0.1/34)$ で有意傾向ありとした。

## C. 研究結果

Table 1には対象となった人口統計学的背景および解析結果を示した。今回調べた第19～22番染色体上の34カ所のDNAマーカーのうち、D19S209の精神分裂病群と健常対照群、D20S178とD21S1256の健常対照群においてheterozygosityの出現頻度は、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。またheterozygosityの出現頻度は、34のDNAマーカーのうち14部位では日本人とフランス人の間に有意差がみられた。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およびD20S95では有意差がみられ、D20S118では有意傾向がみられた。ただし、heterozygosityの出現頻度が、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D19S209については、case-control comparisonで観察された有意差が他の要因に由来する可能性も否定できないので、考察対象には含めなかった。

## D. 考察

今回われわれが行った結果からは、精神分裂病群と健常対照群のアリアル出現頻度の違いはD20S95で有意な差が認められ、またD20S118における分布の差は有意傾向であった。D20S95の近傍にはchromogranin Bをコードする遺伝子(CHGB)があり<sup>6)</sup>、一方D20S118の近傍にはproprotein convertase subtilisin/kexin type 2遺伝子(PCSK2, PC2)がある<sup>6),9),10)</sup>。したがって、これらの遺伝子が精神分裂病の発症と何らかの関連を有する可能性が示唆されたことから、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。



Table 1. Demographic data of the present subjects

	Number of subjects		% of heterozygosity		P value <sup>3</sup>	Deviation from H.W. <sup>4</sup>		Statistics <sup>5</sup>
	Schizophrenia	Control	Japanese <sup>1</sup>	French <sup>2</sup>		Schizo vs Cont	P value	
D19S209	140 (81m, 59f)	117 (44m, 73f)	56%	77%	0.000	0.026 (S), 0.000 (C)	0.000692	
D19S216	151 (85m, 66f)	106 (41m, 65f)	51%	76%	0.000	N.S.	N.S.	
D19S221	117 (72m, 45f)	128 (46m, 82f)	81%	86%	N.S.	N.S.	N.S.	
D19S226	151 (86m, 65f)	92 (45m, 47f)	83%	85%	N.S.	N.S.	N.S.	
D19S414	132 (76m, 56f)	112 (44m, 68f)	55%	78%	0.000	N.S.	0.014504	
D19S220	128 (75m, 53f)	128 (45m, 83f)	84%	84%	N.S.	N.S.	N.S.	
D19S420	134 (77m, 57f)	111 (46m, 65f)	74%	79%	N.S.	N.S.	N.S.	
D19S418	156 (91m, 65f)	87 (39m, 48f)	66%	66%	N.S.	N.S.	N.S.	
D19S210	131 (76m, 55f)	123 (49m, 74f)	62%	74%	0.003	N.S.	N.S.	
D20S117	129 (73m, 56f)	103 (42m, 61f)	86%	84%	N.S.	N.S.	N.S.	
D20S95	126 (72m, 54f)	107 (43m, 64f)	79%	83%	N.S.	N.S.	N.S.	
D20S115	125 (75m, 50f)	136 (50m, 86f)	63%	66%	N.S.	N.S.	0.000113	
D20S189	133 (76m, 57f)	108 (43m, 65f)	61%	75%	0.001	N.S.	N.S.	
D20S186	132 (77m, 55f)	118 (44m, 74f)	86%	86%	N.S.	N.S.	N.S.	
D20S118	116 (65m, 51f)	106 (45m, 61f)	59%	82%	0.000	N.S.	0.001787	
D20S195	149 (87m, 62f)	114 (44m, 70f)	77%	81%	N.S.	N.S.	N.S.	
D20S107	129 (71m, 58f)	114 (43m, 71f)	72%	80%	0.042	N.S.	N.S.	
D20S119	137 (78m, 59f)	121 (46m, 75f)	74%	82%	0.039	N.S.	N.S.	
D20S178	153 (89m, 64f)	108 (42m, 66f)	64%	83%	0.000	0.236 (S), 0.016 (C)	N.S.	
D20S196	129 (74m, 55f)	107 (45m, 62f)	86%	81%	N.S.	N.S.	N.S.	
D20S100	125 (69m, 56f)	112 (46m, 66f)	71%	76%	N.S.	N.S.	N.S.	
D20S173	151 (87m, 64f)	109 (42m, 67f)	66%	67%	N.S.	N.S.	N.S.	
D20S171	132 (77m, 55f)	112 (45m, 67f)	76%	78%	N.S.	N.S.	N.S.	
D21S1256	129 (74m, 55f)	104 (41m, 63f)	54%	65%	0.023	0.147 (S), 0.000 (C)	N.S.	
D21S1253	114 (63m, 51f)	102 (40m, 62f)	78%	77%	N.S.	N.S.	N.S.	
D21S263	128 (74m, 54f)	106 (41m, 65f)	80%	75%	N.S.	N.S.	N.S.	
D21S1252	131 (75m, 56f)	118 (44m, 74f)	84%	80%	N.S.	N.S.	N.S.	
D21S266	126 (72m, 54f)	105 (40m, 65f)	87%	59%	0.000	N.S.	N.S.	
D22S420	140 (82m, 58f)	103 (38m, 65f)	67%	77%	0.022	N.S.	N.S.	
D22S315	130 (74m, 56f)	105 (41m, 64f)	80%	78%	N.S.	N.S.	N.S.	
D22S280	137 (78m, 59f)	103 (41m, 62f)	86%	82%	N.S.	N.S.	N.S.	
D22S283	130 (70m, 60f)	105 (41m, 64f)	71%	89%	0.000	N.S.	N.S.	
D22S423	128 (73m, 55f)	106 (42m, 64f)	74%	82%	0.033	N.S.	N.S.	
D22S274	130 (74m, 56f)	107 (41m, 66f)	82%	77%	N.S.	N.S.	N.S.	

\*1 Observed data in control subjects.

\*2 Data were adapted from the Genethon human genetic linkage map (Gyapay et al., 1994)

\*3 Numerical P values were denoted when  $P < 0.05$  in the proportion test before the multiple test correction was performed.

\*4 Deviation from Hardy Weinberg (H.W.) equilibrium was examined between observed and expected % of heterozygosity in schizophrenia (S) and controls (C), individually.

\*5 The larger value was adopted from the one-to-others statistical value and the max chi squared statistical value. Numerical P values were denoted when  $P < 0.05$  before the multiple test correction was performed.

われわれの研究グループでは、独自に精神分裂病をはじめとする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遭遇することから、検体試料のネットワーク化の必要性についてはかねてから痛感している。実際、精神分裂病の遺伝子研究を実施している他の各研究施設も同様に考えており、われわれも参加している日本人精神分裂病患者を対象とした罹患同胞対遺伝子連鎖研究グループ（通称 JSSLG）においても、分裂病罹患同胞対の稀少サンプルを約 20 の研究施設が協力して、全国レベルで検体試料を収集している実績がある（朝日新聞全国版 1999 年 11 月 28 日朝刊）。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) の確立にあたっては、具体的な運営コストの問題、倫理的配慮に関する問題、研究業績のプライオリティに関する問題などさまざまな側面から検討すべき課題はまだまだ残されているものと思われるが、効率的な研究促進の見地からは最大公約数的に実行可能な範囲から早急に整備されるべき課題であると思われる。

## E. 結論

今回の研究結果からは第19, 20, 21, 22番染色体上の34のDNAマイクロサテライトのうち、精神分裂病群の発症脆弱性に関連する遺伝子座位としてD20S95とD20S118の2部位が示唆された。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は、さまざまな検討課題が残されている状況ではあるが、効率的な研究促進の見地からは早急に整備されるべき課題であると考えられた。

## F. 文献

1. Sham, P.C. & Curtis D.: Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann. Hum. Genet.* 59, 97-105, 1995.
2. American Psychiatric Association (Ed.): Diagnostic

and Statistical Manual of Mental Disorders. 3rd rev., Washington DC. 1987.

3. Gyapay, G., Morissette, J., Vignal, A., et al.: The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nature Genet.* 7, 246-339, 1994.
4. Hirotsu, C., Kuriki, S., Hayter, A.J.: Multiple comparison procedures based on the maximal component of the cumulative chi-squared statistic. *Biometrika* 79, 381-392, 1992.
5. 広津千尋, 青木敏, 稲田俊也, 他: ある精神疾患と遺伝因子の関連検出のための分割表解析によるアプローチ. 第67回日本統計学会抄録集, pp230-231, 1999.
6. Deloukas, P., Schuler, G.D., Gyapay, G., et al.: A physical map of 30,000 human genes. *Science* 282, 744-746, 1998.
7. Landen, M., Grenfeldt, B., Davidsson, P., et al.: Reduction of chromogranin A and B but not C in the cerebrospinal fluid in subjects with schizophrenia. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 9, 311-315, 1999.
8. Vieau, D., Gangnon, F., Jegou, S., et al.: Characterization of the cDNA encoding the pro-hormone convertase PC2 and localization of the mRNA in the brain of the frog *Rana ridibunda*. *Mol. Brain Res.* 63, 1-13, 1998.
9. Seidel, B., Dong, W., Savaria, D., et al.: Neuroendocrine protein 7B2 is essential for proteolytic conversion and activation of proprotein convertase 2 in vivo. *DNA Cell Biol.* 17, 1017-1029, 1998.
10. Rovere C., Barbero P., Kitabgi P.: Evidence that PC2 is the endogenous pro-neurotensin convertase in rMTC 6-23 cells and that PC1- and PC2-transfected PC12 cells differentially process pro-neurotensin. *J. Biol. Chem.* 271, 11368-11375, 1996.

## G. RRNに関連した発表論文

1. Inada T, Sugita T, Dobashi I, et al.: 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, et al.: Dopamine transporter gene polymorphism and the psychiatric

- symptoms seen in schizophrenic patients at their first episode. *Am J Med Genet* 67: 406-408, 1996.
3. Inada T, Dobashi I, Sugita T, et al.: Search for a susceptibility locus to tardive dyskinesia. *Human Psychopharmacology* 12: 35-39, 1997.
  4. Dobashi I, Inada T, Hadano K: Alcoholism and gene polymorphisms related to central dopami-nergic transmission in the Japanese population. *Psychiatr Genet* 7: 87-91, 1997.
  5. Inada T, Arinami T, Yagi G: Association between a polymorphism in the promoter region of the dopamineD2 receptor gene and schizophrenia in Japanese: replication and evaluation for anti-psychotic-related features. *Int J Neuropsychopharmacol* 2:181-186, 1999.