

学会発表

1. 内山 真: PET で見る夢見時の脳活動. 第 1 回睡眠Symposium: 睡眠と夢の最新医学, 1999 年, 東京.
2. 内山 真: 教育講演: 睡眠・覚醒機構の画像解析と病態生理. 第 95 回日本精神神経学会, 1999 年, 東京.
3. Uchiyama, M.: Circadian and homeostatic aspects of circadian rhythm sleep disorders. Gordon Conference on Chronobiology, 1999, Luka, Italy.
4. Uchiyama, M.: Functional neuroanatomy of sleep: What can we see now? Third International Congress of World Federation of Sleep Research Societies, 1999, Dresden, Germany.
5. 内山真: 生体リズム障害の臨床生理学. 「生体リズム研究の進歩」シンポジウム、第 29 回日本脳波・筋電図学会学術集会、京王プラザホテル、東京、1999.11.11.
6. 田ヶ谷浩邦、内山真、渋井佳代、金圭子、劉賢臣、工藤吉尚、大川匡子: ノンレム睡眠出現の概日リズム. 第 6 回日本時間生物学学術大会、仙台市福祉プラザ、仙台市、1999.11.18-19.
7. 久保田富夫、内山真、大川匡子、鈴木博之、渋井佳代、金圭子、工藤吉尚、劉賢臣、田ヶ谷浩邦、有竹清夏、鈴木啓予、井上昌次郎: 深部体温・メラトニン・Sleep propensity リズムの夜間の高照度光照射による位相変化. 第 6 回日本時間生物学学術大会、仙台市福祉プラザ、仙台市、1999.11.18-19.
8. 鈴木博之、内山真、渋井佳代、金圭子、田ヶ谷浩邦、亀井雄一、早川達郎、大川匡子: 月経前緊張症候群 (PMS) 患者における月経周期に伴う深部体温リズム特性の変化. 第 6 回日本時間生物学学術大会、仙台市福祉プラザ、仙台市、1999.11.18-19.
9. 海老沢尚、梶村尚史、内山真、加藤昌明、関本正規、渡辺剛、尾関裕二、池田正明、上土井貴子、杉下真理子、岩瀬利郎、亀井雄一、金圭子、渋井佳代、工藤吉尚、山田尚登、大川匡子、高橋清久、山内俊雄: ヒトメラトニン受容体の変異と概日リズム障害. 第 6 回日本時間生物学学術大会、仙台市福祉プラザ、仙台市、1999.11.18-19.
10. 内山真、大川匡子、渋井佳代、金圭子、劉賢臣、田ヶ谷浩邦、工藤吉尚、早川達郎、亀井雄一、浦田重治郎: 睡眠相後退症候群と非 24 時間睡眠・覚醒症候群における睡眠とメラトニンリズムの関連. 第 6 回日本時間生物学学術大会、仙台市福祉プラザ、仙台市、1999.11.18-19.
11. Liu X, Uchiyama M, Okawa M, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Tagaya H, Suzuki H: Preference for morningness / eveningness, sleep habits, circadian sleep propensity and

melatonin rhythm in healthy subjects. 第 6
回日本時間生物学学術大会、仙台市福祉プラザ、
仙台市、1999.11.18-19.

12. Uchiyama, M.: Pathophysiology of
circadian rhythm sleep disorders.
Neuroscience Workshop of The
Netherlands National Brain Institute, 2000,
Amsterdam, the Netherlands.

分担研究報告書

概日リズム睡眠障害の病態・治療法開発に関する研究：

I. 睡眠ポリグラム、深部体温リズム測定および短期間の光療法を用いた臨床的研究

II. ポジトロンCTを用いた基礎的研究

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

研究協力者 渡辺 剛，関本正規，加藤昌明，堀 達，中島 亨，高橋清久

国立精神・神経センター武蔵病院精神科

研究要旨

概日リズム睡眠障害の病態を解明し、その治療法を開発するため、睡眠相後退症候群10名と非24時間睡眠覚醒症候群6名において、終夜睡眠ポリグラムと直腸温による深部体温リズム測定を行い、健常者の結果と比較するとともに、睡眠相後退症候群患者7名では、5日間の光療法を施行し、光療法前後におけるこれらの指標の変化についても検討した。睡眠相後退症候群では、徐波睡眠の減少や中途覚醒の増加などの睡眠異常がみられ、健常者に比べ最低体温出現時刻が睡眠相の前半部に位置していた。一方、非24時間睡眠覚醒症候群の典型例では、睡眠異常はみられず、最低体温出現時刻は健常者と有意な差はなかった。短期間の光療法は、睡眠相後退症候群患者7名の全例で睡眠相を前進させ、睡眠相後退症候群に対する光療法の効果は開始後早期にみられることが示された。体温リズムの結果が得られた5例中4例で光療法後に最低体温出現時刻が睡眠相の後半に移動した。以上のことから、睡眠相後退症候群の病態として、睡眠・覚醒リズムと体温リズムの位相関係が健常者とは異なっている可能性があることが示された。さらに、光療法により症状が改善すると、睡眠相後退症候群の睡眠相と体温リズムとの位相関係も改善されることが示唆された。

つぎに、概日リズム睡眠障害の病態をさらに明らかにするための第一段階として、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。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。

I. 睡眠ポリグラム、深部体温リズム測定および短期間の光療法を用いた臨床的研究

A. 研究目的

近年、社会生活の多様化や交代性勤務の増加さらに夜間の過剰な光環境などの影響から、睡眠障害の

中でも睡眠・覚醒リズム障害が増加している。このような睡眠・覚醒リズム障害は、産業事故や交通事故の大きな原因のひとつにもあげられており、社会的にも問題となってきた。睡眠・覚醒リズム障害の中では、睡眠相後退症候群および非24時間睡眠覚醒症候群がその中核群ともいふべきものであり、これまでビタミンB12や高照度光療法あるいはメラ

トニンなどの時間生物学的治療が試みられている(1,2)。しかし、睡眠相後退症候群や非24時間睡眠覚醒症候群の病態や病因について詳細に検討した報告は少なく、その治療法についてもなお確立されていない。そこで、本研究では睡眠相後退症候群と非24時間睡眠覚醒症候群の患者の睡眠と体温リズムについて、終夜睡眠ポリグラム記録や直腸温連続測定などの精神生理学的指標を用いて詳細に検討し、健常者と比較した。さらに、睡眠相後退症候群患者では、5日間の光療法を施行し、光療法前後における終夜睡眠ポリグラム記録と深部体温リズム測定を行い、これらの指標の変化を解析することにより、睡眠相後退症候群に対する短期間の光療法の効果(光反応性)についても検討した。

B. 研究方法

1. 対象

睡眠障害国際分類の診断基準を満たした睡眠相後退症候群患者10名(男性8名, 女性2名, 平均年齢29.1歳), 非24時間睡眠覚醒症候群患者6名(男性3名, 女性3名, 平均年齢25.7歳)および健常被験者11名(男性8名, 女性3名, 平均年齢28.1歳)を対象とした。睡眠相後退症候群患者および非24時間睡眠覚醒症候群患者はいずれも未治療あるいは少なくとも今回の検査前4週間は全く治療されておらず、健常対照群は普段規則正しい睡眠・覚醒スケジュールで生活している被験者であった。短期間の光療法前後の睡眠と体温リズムの検討については、睡眠相後退症候群患者7名(男性4名, 女性3名, 平均年齢24.0歳)を対象としたが、患者は未治療あるいは少なくとも今回の光療法前4週間は全く治療されていなかった。

なお、健常者と概日リズム睡眠障害患者のいずれの被験者にも研究に先立ち、本研究に参加する目的と意義、方法、危険性、本人の意志でいつでも検査を中断できることなどを説明し、十分に理解しても

らった上で同意を得た。

2. 方法

睡眠相後退症候群患者、非24時間睡眠覚醒症候群患者および健常被験者には終夜睡眠ポリグラム記録(PSG)を2夜連続で施行したが、PSGと平行して携帯用長時間体温ロガーを用いて直腸温測定を行った。睡眠相後退症候群患者、非24時間睡眠覚醒症候群患者では入院の上で入院第2夜目よりPSGを施行したが、睡眠相後退症候群患者では普段通りの時間帯に就床し起床するよう指示し、非24時間睡眠覚醒症候群患者では概ね深夜から早朝にかけて眠ると予想される時期に入院させ、就床および起床は患者の任意とした。健常者では就床は23時30分、起床は翌朝7時とした。PSGはOXFORD社製睡眠脳波解析装置DEE-1100を用いてゼロクロス法により定量解析するとともに睡眠段階の判定も行った。第2夜目の結果について、得られた睡眠変数や睡眠1時間当たりの各周波数帯域波の個数などについて比較した。睡眠・覚醒リズム障害患者と健常被験者とは、終夜睡眠ポリグラム記録の条件が異なっているため、睡眠変数については入眠から7時間までの結果についても比較検討を行った。直腸温については、最低体温出現時刻と入眠時刻までの時間および最低体温出現時刻から覚醒時刻までの時間を睡眠・覚醒リズム障害患者と健常者でそれぞれ比較することにより、両者の体温リズムと睡眠相との関係について検討した。

睡眠相後退症候群における短期間の光療法の効果については、まず睡眠相後退症候群患者を入院させ、普段通りの時間帯に就床し起床するよう指示した上で、入院第2夜目より2夜連続でPSGを施行し、引き続いて位相前進にもっとも効果的であると考えられる時間帯(最低体温時刻の1.5時間後より3時間)に光療法室で光療法を5日間連続で行った。光療法終了日にPSGを1夜施行し、光療法施行前の第2夜目のPSG結果と比較検討した。さらに、入院の期

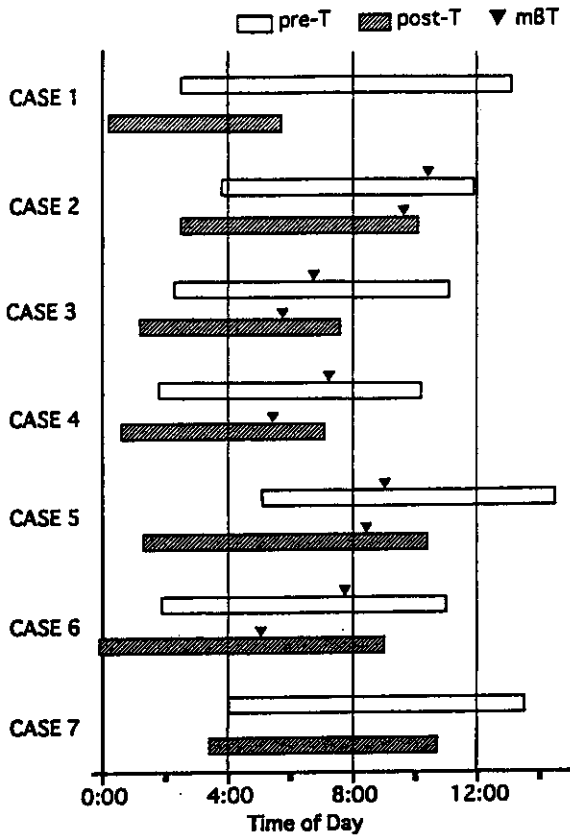


図1 睡眠相と最低体温時刻

間、覚醒時刻は1-7時間の前進を示した(図1)。光療法前後のPSGによる各睡眠変数を比較すると、光療法後に入眠時刻と覚醒時刻は有意に前進し、総睡眠時間は短縮した(表4)。各睡眠段階については、光療法後にstage 2とstage REMの出現時間が減少したが、徐波睡眠の量には光療法前後で変化はなかった(表5)。体温リズムについても、結果の得られた5例全例で光療法後には最低体温出現時刻が前進した(図1)。体温リズムと睡眠相との位相関係に

表4 睡眠変数

光療法前後での全睡眠を対象とした結果(その1) ♯: p<0.1, *: p<0.05

Sleep variables	pre-treatment	post-treatment
Sleep onset time	3:01±26'	1:16±26' *
Sleep offset time	12:00±35'	8:36±40' *
Sleep episode duration (min)	539.2±22.9	440.9±28.9 ♯
Total sleep time (min)	517.1±19.1	426.6±26.7 ♯
REM latency (min)	76.5±16.0	98.1±16.6
Intermittent awake (min)	9.3±4.7	4.4±2.0
Movement time (min)	12.9±1.8	9.8±1.2
Sleep efficiency (%)	98.4±0.8	99.1±0.4

Mean ± S.E.

表5 睡眠変数

光療法前後での全睡眠を対象とした結果(その2) ♯: p<0.1, *: p<0.05

Sleep variables	pre-treatment	post-treatment
% Stage 1	7.7±1.8	6.0±1.3
Stage 1 (min)	40.4±9.3	26.4±5.5
% Stage 2	49.6±4.0	51.5±4.1
Stage 2 (min)	255.1±21.9	219.1±20.5 ♯
% Stage 3+4	16.8±4.7	20.4±4.8
Stage 3+4 (min)	86.9±25.8	87.4±18.5
% REM	25.9±1.6	22.0±1.2 *
REM (min)	134.6±10.6	93.9±7.6 *

Mean ± S.E.

ついては、5例中4例で光療法後に最低体温出現時刻が睡眠相の後半に移動した(図1)。

D. 考察

睡眠相後退症候群患者10例と年齢を一致させた健康者11例を対象とした今回の終夜睡眠ポリグラフの結果では、睡眠相後退症候群では徐波睡眠が少なく、stage1が多く、中途覚醒も増加していることが示された。これまで睡眠相後退症候群患者の睡眠については、入眠時刻と覚醒時刻の遅れはあるが、睡眠構造自体には特に問題はないとされてきた3)。しかし、睡眠相後退症候群の睡眠構造についての終夜睡眠ポリグラフを用いた先行研究では、いずれも症例数は少なく、年齢を一致させた健康対照群を用いたものはない。したがって、今回の対照群を用いた研究結果から、睡眠相後退症候群における睡眠の質は必ずしも良くないことが示唆されたことは興味深い。睡眠相後退症候群における睡眠の質についてはその診断にも関係することであり、今後さらに症例数を増やして検討していく必要がある。一方で、睡眠脳波定量解析の結果から睡眠相後退症候群患者の睡眠中には健康者に比べ、比較的高振幅で低周波数のδ帯域波の出現数が少なく、このようなδ帯域波の出現様式にも健康者と違いがあるという結果が得られた。これは睡眠相後退症候群における徐波睡眠の減少に対応する所見であり、睡眠相後退症候群

間を含めて約2週間継続して携帯用長時間体温ロガーを用いた直腸温測定を行い、光療法前後の体温リズムおよび体温リズムと睡眠相との関係についても検討した。

C. 研究結果

睡眠相後退症候群患者は健常者に比べ、総睡眠時間、中途覚醒時間が有意に長く、睡眠効率が低下していた(表1)。各睡眠段階については、徐波睡眠が有意に減少しており、浅い睡眠であるstage 1が著明に増加していた(表1)。入眠から7時間までの結果についても、睡眠相後退症候群患者は健常者に比べ、徐波睡眠が少なく、stage 1が多かった(表2)。各周波数帯域波については、 θ 、 α および β 帯域波の出現数には両群間で有意な差はみられなかった。 δ 帯域波は0.33-3.0 Hz、 $5\mu V$ 以上のものについてその出現数を検討したが、振幅および周波数ごとに細分して比較した。睡眠相後退症候群患者では、 δ 帯域波のうち35-45 μV および0.5-1.0 Hzのもの単位時間あたりの出現数が健常者に比べると減少していた。徐波睡眠の判定に關与する高振幅 δ 波(0.5-2.0 Hz、 $\geq 31\mu V$)の経時的出現量の変化を入眠から2.5時間ごとに3分割して検討したところ、睡眠相後退症候群患者では健常者に比べ、高振幅 δ 波の総数が減少しており、睡眠初期の2.5時間で特に少なかった。体温リズムに関しては、睡眠相後退症候群患者は健常者に比べ、入眠から最低体温出現時刻までの時間には差はなかったが、最低体温出現時刻

表1 睡眠変数

入眠から覚醒までの全ての睡眠を対象とした結果 **: p<0.05, **: p<0.01

	Normal (n=11)	OSPS (n=10)	non-24 (n=6)
Sleep onset time	23:29 ± 5'	1:15 ± 46'	1:30 ± 79'
Sleep offset time	6:58 ± 3'	10:01 ± 54' **	9:19 ± 79' *
Sleep Latency (min)	9.7 ± 2.2	138.6 ± 43.9 **	58.9 ± 25.6 *
Total sleep time (min)	435.0 ± 7.4	501.3 ± 16.5 **	446.4 ± 26.0
REM latency (min)	96.1 ± 10.5	80.7 ± 8.4	89.4 ± 20.2
Intermittent awake (min)	2.1 ± 1.0	15.2 ± 5.9 *	13.5 ± 7.8
Stage 1 (min)	26.0 ± 2.4	70.6 ± 11.9 **	41.4 ± 8.1 *
Stage 2 (min)	232.6 ± 10.0	274.2 ± 17.5 *	219.6 ± 12.6
Stage 3+4 (min)	78.5 ± 12.1	41.4 ± 11.9 *	78.8 ± 9.1
REM (min)	98.0 ± 7.1	115.1 ± 11.2	102.1 ± 10.0

Mean ± S.E.

表2 睡眠変数

入眠から7時間までの睡眠を対象とした結果 *: p<0.05

	Normal (n=11)	OSPS (n=10)	non-24 (n=6)
Total sleep time (min)	405.4 ± 3.5	400.1 ± 5.0	390.3 ± 9.3
REM latency (min)	96.1 ± 10.5	79.7 ± 8.0	89.4 ± 20.2
Intermittent awake (min)	2.0 ± 0.9	11.6 ± 5.3	7.6 ± 3.4
% Stage 1	6.0 ± 0.6	11.9 ± 2.8 *	7.7 ± 1.1
Stage 1 (min)	23.9 ± 2.5	47.4 ± 11.0 *	29.9 ± 4.4
% Stage 2	53.3 ± 2.1	57.6 ± 4.0	50.3 ± 1.9
Stage 2 (min)	215.8 ± 8.1	230.0 ± 15.5	195.7 ± 4.6
% Stage 3+4	18.3 ± 2.4	10.2 ± 2.9 *	19.5 ± 2.0
Stage 3+4 (min)	74.1 ± 9.7	41.5 ± 11.9 *	76.6 ± 9.1
% REM	22.5 ± 1.8	20.3 ± 1.6	22.5 ± 2.1
REM (min)	91.6 ± 7.7	81.7 ± 6.7	88.2 ± 8.6

Mean ± S.E.

から覚醒までの時間が有意に延長していた(表3)。

非24時間睡眠覚醒症候群患者の睡眠変数については、健常者に比べ睡眠効率が低く、stage1が多かったが、徐波睡眠量には有意な差はなかった(表1)。両者の睡眠変数を入眠から7時間までの区間で比較すると、睡眠効率やstage 1の出現量を含め、非24時間睡眠覚醒症候群患者と健常者の間で有意な差を示すものはなかった(表2)。定量解析では、すべての δ 帯域波(0.33-3.0 Hz、 $\geq 5\mu V$)の単位時間あたりの出現数にも徐波睡眠段階の判定に關与する比較的高振幅の δ 帯域波(0.5-2.0Hz、 $\geq 31\mu V$)の出現数にも両群間に有意な差は認めなかった。また、この比較的高振幅の δ 帯域波の単位時間あたりの出現数の経時的出現パターンについても両群間で有意な差はなかった。深部体温の結果については、入眠から最低体温出現までと最低体温出現から覚醒までの時間には両群間で差はなかった(表3)。

睡眠相後退症候群における短期間の光療法の効果については、睡眠相後退症候群7例の全例で光療法後に睡眠相は前進したが、入眠時刻はおよそ1-2時

表3 睡眠相と体温リズムとの位相関係

: p<0.05, **: p<0.01

	Normal (n=9)	OSPS (n=6)	non-24 (n=4)
1) Sleep onset time	23:29 ± 5'	1:38 ± 39' **	2:07 ± 77'
2) Sleep offset time	6:58 ± 2'	10:28 ± 54' **	9:41 ± 74'
3) mini. BT time	5:28 ± 30'	6:57 ± 40'	6:28 ± 50'
4) 1) → 3) (min)	357 ± 30	319 ± 35	261 ± 42
5) 3) → 2) (min)	91 ± 30	211 ± 33 *	193 ± 44

Mean ± S.E.

の睡眠の質が低下しているという所見を支持する。

深部体温の結果については、睡眠相後退症候群では健常者に比べ、入眠から最低体温出現時刻までの時間には差はなかったが、最低体温出現時刻から覚醒までの時間が有意に延長していた。このことから、睡眠相後退症候群と健常者とでは体温リズムと睡眠との位相関係に違いがあることが示唆された。時差ぼけに代表されるように体内時計に脱同調を生じると睡眠障害を呈することはよく知られている。したがって、今回睡眠相後退症候群の睡眠にみられた徐波睡眠の減少、浅い睡眠の増加、中途覚醒の増加などの睡眠異常は、健常者とは異なった体温リズムと睡眠・覚醒リズムの位相関係により生じている可能性が推測される。

非24時間睡眠覚醒症候群患者の睡眠構造については、特別な異常はないとされてきたが、これまで終夜睡眠ポリグラムを用いて系統的に調べた報告はまったくない。今回、非24時間睡眠覚醒症候群患者6名についての結果では、徐波睡眠量や睡眠中の δ 帯域波の出現量などを含めた睡眠変数に健常者と全く差はなく、非24時間睡眠覚醒症候群患者の睡眠の質には健常者と大きな違いはないことが示唆された。また、深部体温の結果についても、入眠から最低体温出現までの時間にも最低体温出現から覚醒までの時間にも非24時間睡眠覚醒症候群と健常群とで差はなかった。すなわち、体温リズムと睡眠相との位相関係については、非24時間睡眠覚醒症候群と健常群とでは違いがなく、非24時間睡眠覚醒症候群では体温リズムと睡眠・覚醒リズムとが健常者と同様な位相関係を呈しているのかもしれない。しかし、今回試験を行った非24時間睡眠覚醒症候群患者はいずれも睡眠相が毎日1-2時間ずつずれていくいわゆる典型例であり、終夜睡眠ポリグラム検査に際しても就床および起床はその時点での睡眠・覚醒スケジュールにしたがって患者の任意とした。したがって、今回の結果はこのような限られた条件下のもの

であり、非24時間睡眠覚醒症候群の病態をすべて説明するものではない。

睡眠相後退症候群7例の全例で短期間の光療法後に睡眠相の前進が認められた。睡眠相後退症候群では、入院という環境変化によっても睡眠相が前進することがあるため、今回みられた睡眠相や体温リズムの前進が果たして光療法の効果によるものかどうかが問題となる。しかし、今回の対象となった睡眠相後退症候群患者はすべて個室（光療法室）への入院であり、入院中の食事、消灯、起床などは病棟のスケジュールと関係なくすべて患者の任意とした。また、光療法の開始時期は入院5日後であり、睡眠相の前進もこの光療法の開始に伴ってみられていることから、今回認められた睡眠相後退症候群における睡眠相の前進はおもには光療法によるものと考えられる。いずれにせよ、5日間という短期間の光療法でも、睡眠相後退症候群における後退した睡眠相を前進させることが示され、睡眠相後退症候群での光療法の効果は開始後早期にみられると考えられる。

光療法前後の睡眠相後退症候群の睡眠変数については、光療法後に総睡眠時間は短縮し、stage 2とstage REMの出現時間が減少したが、徐波睡眠の量には光療法前後で変化はなかった。今回光療法を施行した睡眠相後退症候群7例のうち3例は10代の患者であり、光療法前より徐波睡眠の量がきわめて多かったため、光療法前後で徐波睡眠の量には差がなかった可能性がある。一方で、残りの4例では光療法前の徐波睡眠の量は平均よりも少なく、光療法後に徐波睡眠の量が増加する傾向を示した。したがって、先に述べたように睡眠相後退症候群ではやはり睡眠の質は低下しており、光療法により睡眠相が前進して症状が改善すると浅い睡眠が減少し総睡眠時間は短縮、睡眠の質は改善するのかもしれない。

体温リズムと睡眠相との位相関係については、睡眠相後退症候群5例中4例で光療法後に最低体温出現

時刻が睡眠相の後半に移動した。我々は、睡眠相後退症候群患者と健常者とでは体温リズムと睡眠との位相関係に違いがあり、睡眠相後退症候群では最低体温出現時刻が睡眠相の前半にあることを報告した(5,6)。今回、光療法により睡眠相が前進すると体温リズムと睡眠相との位相関係も改善する可能性があることが示されたことはきわめて興味深い。睡眠相後退症候群の病態には体温リズムと睡眠リズムとの位相関係の変化が関連するというこれまでの我々の報告(5,6)を支持する結果と考えられる。

E. 結論

睡眠相後退症候群では、徐波睡眠の減少などの睡眠異常を示し、その病態として最低体温出現時刻が睡眠相の前半部に移行していること、すなわち、体温リズムと睡眠・覚醒リズムとの位相関係が健常者とは異なっていることが示唆された。一方、典型的な非24時間睡眠・覚醒症候群では、とくに睡眠異常はみられず、最低体温出現時刻にも健常者と違いはみられなかった。短期間の光療法は、睡眠相後退症候群の睡眠相や体温リズムを前進させ、睡眠相と体温リズムとの位相関係を改善させる可能性があることが推測された。

II. ポジトロンCTを用いた基礎的研究

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、概日リズム睡眠障害の病態解明への応用を図る。

B. 研究方法

1. 対象

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)であった。

被験者には、本研究に参加する目的と意義、方法、危険性、本人の意志でいつでも検査を中断できることなどを説明し、十分に理解してもらった上で、文書にて同意を得た。

2. 方法

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、総被曝量は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ムを参照して選択的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 ($H_2^{15}O$) を使い、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、前脳基底部分、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}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、 H_2^{15}O 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。 H_2^{15}O 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⁷⁾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、前脳基底部分における著明な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⁸⁾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、前脳基底部分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

様ではなく、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、 $H_2^{15}O$ を用いた脳血流の解析が行われている。Maquetら9)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10)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 $H_2^{15}O$ 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7)やBraunら8)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、中前頭回後部、下前頭回後部、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9)やBraunら10)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。

E. 結論

概日リズム睡眠障害の病態解明の第一段階として、 $H_2^{15}O$ 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。

参考文献

- 1) Okawa M et al.: Vitamin B12 treatment for sleep-wake rhythm disorders. Sleep13: 15-23, 1990.

2) Rosenthal NE et al.: Phase-shifting effects of bright morning light as treatment for delayed sleep phase syndrome. *Sleep* 13: 354-361, 1990.

3) Diagnostic Classification Steering Committee, Thorpy MJ, Chairman: International Classification of Sleep Disorders: Diagnostic and Coding Manual. American Sleep Disorders Association, Rochester, 1990.

4) Minors DS et al.: A human phase-response curve to light. *Neurosci Lett* 133: 36-40, 1991.

5) Watanabe T et al.: Polysomnography and body temperature changes by phototherapy in a delayed sleep phase syndrome case. *Psychiatry Clin Neurosci* 52: 255-256, 1998.

6) Watanabe T et al.: A study of polysomnography & body temperature in delayed sleep phase syndrome patients. *J Sleep Res* 7: 301, 1998.

7) Maquet P et al.: (1997) Functional neuroanatomy of human slow wave sleep. *J Neurosci* 17: 2807-2812, 1997.

8) Braun AR et al.: (1997) Regional cerebral blood flow throughout the sleep-wake cycle: An $H_2^{15}O$ study. *Brain* 120: 1173-1197, 1997.

9) Maquet P et al.: Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature* 383: 163-166, 1996.

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

F. 研究発表

1. 論文発表

渡辺 剛, 加藤昌明, 関本正規, 梶村尚史,

高橋清久: DSPS患者における終夜睡眠 脳波と体温リズムの検討 *脳波と筋電図* 25: 202, 1997.

Watanabe T, Kato M, Sekimoto M, Kajimura N, Takahashi K: A sleep-EEG study on patients with non-24-hour sleep-wake syndrome. *Psychiatry Clin Neurosci* 51: S66, 1997.

梶村尚史, 高橋清久: 睡眠相前進症候群 (Advanced sleep phase syndrome: ASP), 睡眠相後退症候群 (Delayed sleep phase syndrome: DSPS) *日本臨床* 56: 134-139, 1998.

Watanabe T, Kato M, Kajimura N, Sekimoto M, Takahashi K: Polysomnography and body temperature changes by phototherapy in a delayed sleep phase syndrome case. *Psychiatry Clin Neurosci* 52: 255-256, 1998.

Kato M, Kajimura N, Sekimoto M, Watanabe T, Takahashi K: Melatonin treatment for rhythm disorder. *Psychiatry Clin Neurosci* 52: 262-263, 1998.

Watanabe T, Kato M, Sekimoto M, Kajimura N, Takahashi K: A study of polysomnography & body temperature in delayed sleep phase syndrome patients. *J Sleep Res* 7: 301, 1998.

梶村尚史: ヒト概日リズムの病理 睡眠相後退症候群と睡眠相前進症候群 *日本時間生物学会会誌* 5: 4-11, 1999.

渡辺 剛, 梶村尚史, 加藤昌明, 関本正規, 中林哲夫, 高橋清久: 光療法によるDSPSの終夜睡眠脳波への影響 *脳波と筋電図* 27: 209, 1999.

- Watanabe T, Kajimura N, Kato M, Sekimoto M, Takahashi K: Effects of phototherapy in patients with delayed sleep phase syndrome. *Psychiatry Clin Neurosci* 51: 231-233, 1999.
- 梶村尚史: PET画像解析からみた睡眠・覚醒機構 脳と精神の医学 9: 111-118, 1998.
- 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.
- 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. *J Sleep Res* 7: 128, 1998.
- 梶村尚史: シンポジウム I 「睡眠研究と画像解析」 PET画像解析と睡眠 脳波と筋電図 27: 104-105, 1999.
- Kajimura N, Uchiyama M, Takayama Y, Uchida S, Uema T, Kato M, Sekimoto M, Watanabe T, Nakajima T, Horikoshi S, Ogawa K, Nishikawa M, Hiroki M, Kudo Y, Matsuda H, Okawa M, Takahashi K: Activity of midbrain reticular formation and neocortex during the progression of human non-rapid eye movement sleep. *J Neurosci* 19: 10065-10073, 1999.
- 梶村尚史: 睡眠とPET画像解析 臨床脳波 42: 80-84, 2000.
2. 学会発表
- 加藤昌明, 梶村尚史, 関本正規, 渡辺 剛, 高橋清久: 非24時間型睡眠覚醒リズム障害のメラトニン治療例 第22回日本睡眠学会学術集会 東京 7.4, 1997.
- 渡辺 剛, 加藤昌明, 関本正規, 梶村尚史, 高橋清久: 睡眠相後退症候群 (DSPS) の光治療有効例における終夜睡眠脳波所見の検討 第22回日本睡眠学会学術集会 東京 7.4, 1997.
- 渡辺 剛, 加藤昌明, 関本正規, 梶村尚史, 高橋清久: 非24時間睡眠・覚醒症候群の終夜睡眠脳波と体温リズムの検討 第4回日本時間生物学会学術大会 東京 11.8, 1997.
- 渡辺 剛, 梶村尚史, 加藤昌明, 関本正規, 中林哲夫, 高橋清久: DSPSにおける光療法施行前後の終夜睡眠脳波所見の検討 第23回日本睡眠学会学術集会 秋田 6.5, 1998.
- Watanabe T, Kato M, Sekimoto M, Kajimura N, Takahashi K: A study of polysomnography & body temperature in delayed sleep phase syndrome patients. 14th European Congress on Sleep Research, Madrid, 9.12, 1998.
- 渡辺 剛, 梶村尚史, 加藤昌明, 関本正規,

中林哲夫, 高橋清久: 光療法によるDSPPSの終夜睡眠脳波への影響 第28回日本脳波・筋電図学会学術大会 神戸 11.11, 1998.

中林哲夫, 渡辺 剛, 梶村尚史, 加藤昌明, 関本正規, 高橋清久: 光療法がDSPPS患者の睡眠に及ぼす影響 第5回日本時間生物学会学術大会 福岡 11.13, 1998.

渡辺 剛, 梶村尚史, 加藤昌明, 関本正規, 中林哲夫, 堀 達, 高橋清久: 光療法により改善した非24時間睡眠・覚醒症候群の一例 第24回日本睡眠学会学術集会 広島 6.13, 1999.

堀 達, 渡辺 剛, 梶村尚史, 加藤昌明, 関本正規, 中林哲夫, 高橋清久: 高照度光療法が著効した睡眠相後退症候群 (DSPPS) の一例 第24回日本睡眠学会学術集会 広島 6.13, 1999.

Hori T, Watanabe T, Kajimura N, Kato M, Sekimoto M, Takahashi K: A case of delayed sleep phase syndrome successfully treated with phototherapy. III International Congress of World Federation of Sleep Research Societies, Dresden, 10.9, 1999.

渡辺 剛, 梶村尚史, 加藤昌明, 関本正規, 堀 達, 中島 亨, 高橋清久: 非24時間睡眠・覚醒症候群に対する光療法時における終夜睡眠脳波と体温リズムの検討 第6回日本時間生物学会学術大会 仙台 11.18, 1999.

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) III 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, 西川將巳, 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, 西川將巳, 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, 西川將巳, 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,
西川將巳, 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 I 「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を対象に、メラトニン 1A 受容体、1B 受容体遺伝子やヒト *period 3* 遺伝子などの生体時計関連遺伝子の解析を行い、疾患発症に関与している可能性が高い変異を複数見出した。メラトニン 1A 受容体の R54W 変異は非 24 時間睡眠覚醒症候群に多く認められ、受容体蛋白の性質が正常型とは大きく異なることを突き止めた。ヒト *period 3* 遺伝子の変異の一つは睡眠相後退症候群に多く見られた。これらの変異は正常コントロール群にも認められ、体内リズムの個体差の一因となっている可能性が示された。

A. 研究目的

最近、脳科学研究の進展が著しいが、特に生体時計の分野での発展は目覚ましい。生体時計機構は視交叉上核などの限られた領域に重要な機能が集中しているため研究対象を絞りやすいことや、概日リズムという、客観的評価が比較的容易な現象を扱っているためと思われる。

生体時計機構の分子生物学的研究は、最初アカバシカビやショウジョウバエなどの下等動物から始まった。それぞれから *frq* や *period* という遺伝子が概日リズム形成に不可欠な遺伝子として単離され、一つの遺伝子の変異が概日リズムの変化をもたらすことが判明した。その後ショウジョウバエの *timeless* 遺伝子も、概日リズムに変化を引き起こす遺伝子として単離された。

1997 年に *Clock* 遺伝子が単離されたのを皮切りに、哺乳動物などの高等動物からも次々に時計遺伝子が単離された。現在では *period 1*, *period 2*, *period 3*, *cry 1*, *cry 2*, *BMAL*

1, *timeless* などの遺伝子群が知られている。それぞれ視交叉上核の神経細胞に発現し、相互に作用しあってフィードバックループを形成し、概日リズムを生み出しているらしい(図 1)。

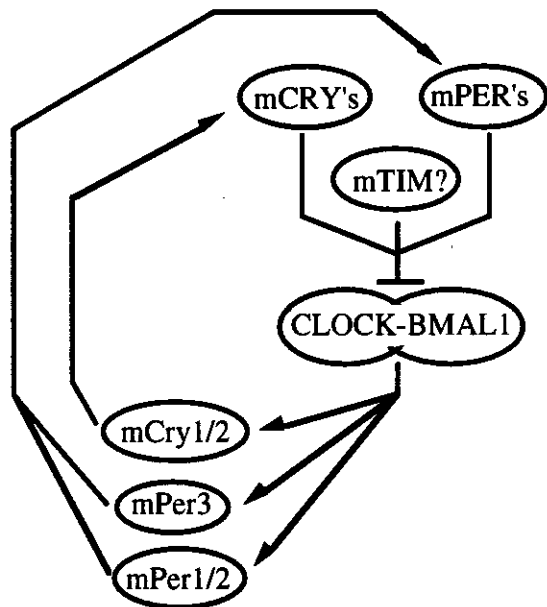


図 1. マウスの生体時計機構；各時計遺伝子の相互作用のモデル図

mCry, mPer は各遺伝子を、mCRY, mPER, mTIM, CLOCK, BMAL1 は各蛋白を表す。矢印は促進作用を、横棒線は抑制作用を示す。(Hardin, PE et al. Science 286, pp2461 より改変して引用)

生体時計はショウジョウバエからヒトにいたるまで類似の物質・機構で構成されており、進化の過程で強く保存されてきた生理作用であることも明らかになりつつある。

ショウジョウバエでは *period* 遺伝子や *timeless* 遺伝子の変異で概日リズムの異常が生じるが、マウスでも *period 2*, *Clock*, *cry 1*, *cry 2* 遺伝子の異常が概日リズムの異常・消失をもたらすことが示され、高等動物である哺乳動物でも生体時計遺伝子の変異がリズム異常に結びつくことが明らかになった。従ってヒトの場合もこれらの遺伝子に変異があれば概日リズムに変化が生じると思われる。

生体時計機構に影響を与える因子の研究も進んでいる。メラトニンは、主に松果体で産生されるホルモンで、夜間の血中濃度が日中の数十倍から百倍に増加するが、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ることができる。Jet lag syndrome（いわゆる時差ぼけ）や睡眠相後退症候群、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持つ人たちの治療薬として用いられ、成果を上げている。睡眠覚醒リズム障害にはしばしばメラトニン分泌異常が認められること、睡眠覚醒リズム障害に対してメラトニンを投与した場合、その感受性に個体差が

あることなどが示されており、メラトニンと概日リズム障害との関連が示唆されている。

一方で、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群などの概日リズム障害の中に家族性発症を示す例があると報告されている。従って少なくとも一部の概日リズム障害ではメラトニン受容体遺伝子、*period* 遺伝子などの生体時計関連遺伝子の変異が発症要因になっている可能性が高いと考えられる。

そこで、我々は概日リズム障害を持つ患者を対象に、生体時計関連遺伝子の変異の有無を解析している。

概日リズム障害の病因遺伝子が判明すれば、その原因にあったオーダーメイドの治療法の開発が可能になる。また、その過程で正常人の生活リズムの個体差を遺伝子解析によって把握することが可能になり、その人固有の概日リズムにあった生活習慣の指導・助言が可能になることも期待できる。

我々は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、今回はメラトニン1A,1B受容体遺伝子のほか、新たに *period 3* 遺伝子の解析結果についても報告する。

B. 研究方法

（倫理面への配慮）

本研究は埼玉医科大学、国立精神神経センター武蔵病院・同国府台病院、滋賀医科大学及び参加各施設の倫理委員会より承認を受けている。また、被検者に対しては本研究について十分説明し、文書による同意を得てい

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、滋賀医科大学精神科などに通院中の概日リズム障害を示す患者計 68 名（睡眠相後退症候群 45 名、非 24 時間睡眠覚醒症候群 23 名）である。また、文書による同意を得られた 83 人の正常コントロール群についても対象とした。

2) 採血及びゲノム DNA の抽出

対象者より静脈血を採取し、QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Midi Kit を使ってゲノム DNA を抽出した。5ml の静脈血から 30-80 μ g のゲノム DNA を得ることができた。

3) メラトニン 1A, 1B 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。

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、我々が解析を始めた際には翻訳領域以外の配列はほとんど報告されていなかった。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。メラトニン 1A, 1B 受容体遺伝子のゲノム構造を図 2 a,b に示す。

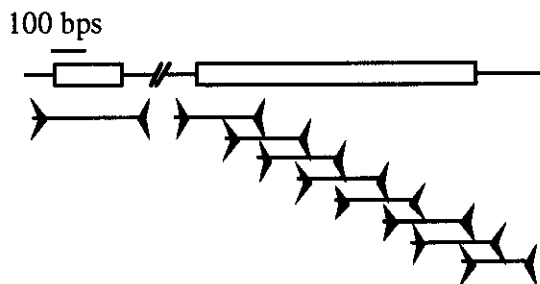


図 2a. メラトニン 1A 受容体遺伝子のゲノム構造及び変異解析に用いられた SSCP プライマーの位置

四角は翻訳領域、両端の黒線は非翻訳領域、矢印とその間の黒線は、SSCP 解析に用いられたプライマー及び DNA 増幅断片を示す。

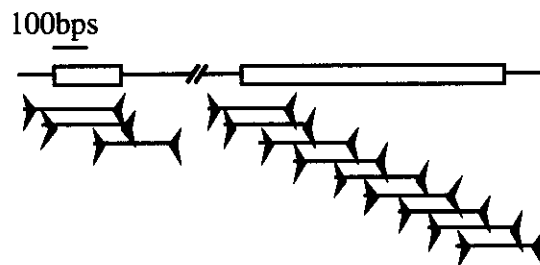


図 2b. メラトニン 1B 受容体遺伝子のゲノム構造及び変異解析に用いられた SSCP プライマーの位置

4) ヒト *period 3* 遺伝子のゲノム構造の解析

ヒト *period 3* 遺伝子を含む領域のゲノム遺伝子の配列はデータベース上に公開されているが、cDNA の配列は未公表であり、エクソン・イントロン構造が判明していなかった。そこで我々は、通産省工業技術院 石田直理雄博士及びかずさ DNA 研究所 長瀬隆弘博士らと共同で、5'-RACE や 3'-RACE 法を用いることにより、ヒト *period 3* cDNA の全長を単

離し、配列を決定した。その配列をゲノム遺伝子の配列と比較対照することで、ヒト *period 3* 遺伝子の翻訳領域は 21 のエクソンに分かれ

ていることを突き止め、PCR 法を用いた変異解析を可能にした。(図 3)

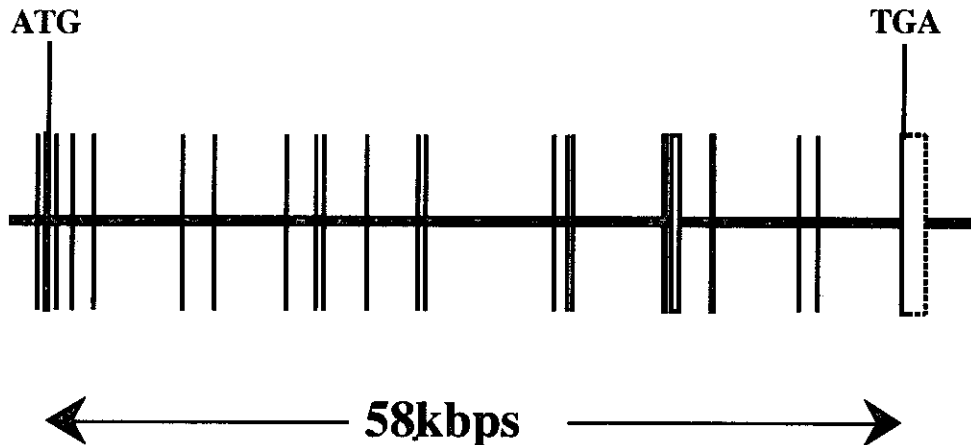


図 3 : ヒト *period 3* 遺伝子のゲノム構造

縦線及び四角はエクソンを示す。

5) その他の時計遺伝子のゲノム構造の解析

BMAL 1 遺伝子については当大学第一生理学教室 池田正明博士との共同研究でゲノム構造を解析した。*Clock* 遺伝子、*timeless* 遺伝子、*period 2* 遺伝子、*cry 1* 遺伝子、*cry 2* 遺伝子など他の生体時計関連遺伝子についてもデータベースの活用、エクソン間での long PCR の使用などによりゲノム構造の解析を終了し、その配列を元に SSCP 解析用プライマーを設計した。

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

上記の解析で得たゲノム情報を基に、各生体時計関連遺伝子の翻訳領域全長を SSCP 法でカバーできるようプライマーを設計し、

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を検出して遺伝子の点突然変異を見出す手法である。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 300 base pairs 以下とした。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た(図 2a,b)。ヒト *period 3* 遺伝子に関しては 21 のエクソンに対して 25 組計 50 本のプライマーを作製した。プライマーは蛍光標識し、島津製作所製 DNA シーケンサ

一DSQ-500S で電気泳動パターンが読み取れるようにした。対象者の血液より抽出したゲノムDNAを鋳型にしてPCR法を施行し、PCR産物を DSQ-500S で電気泳動して泳動パター

ンの変化を検出した。電気泳動用ゲルは 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4)

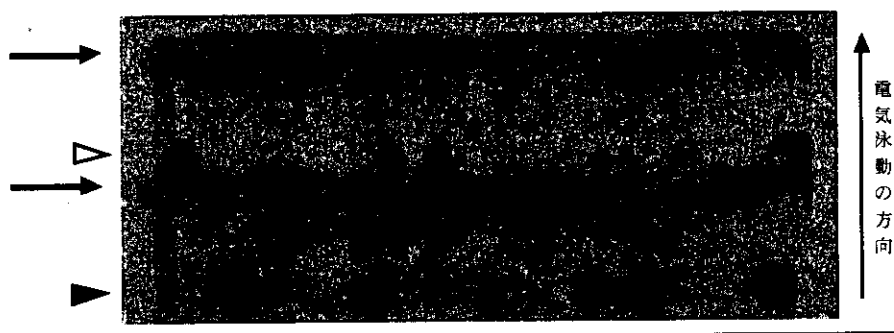


図4. ヒト *period 3* 遺伝子の SSCP 解析の結果

野生型の配列を持つゲノムでは矢印の位置(2ヶ所)のみにバンドが現れるが、変異があると別の位置(黒と白の三角で示す)にもバンドが出現する。

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 法で増幅し、直接核酸配列を決定した(直接シーケンス)。直接シーケンスで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。

6) 変異メラトニン受容体遺伝子の作製

メラトニン 1A,1B 受容体の変異が受容体蛋白の機能変化を生じているか探るため、変異受容体の発現実験を行った。ヒト視床下部の cDNA から、PCR 法によってヒトメラトニン 1A 受容体及び 1B 受容体 cDNA の coding region の全長を増幅した。発現ベクター

pcDNA1.1/AMP (Invitrogen 社製)に挿入した後 PCR 法を用いて変異を導入した。

7) 変異メラトニン受容体遺伝子の発現

6)で作製した変異メラトニン受容体遺伝子を GibcoBRL 社製 Lipofectamine を使用して 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)に導入し、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 MgCl₂] で懸濁し、¹²⁵I-melatonin (New England Nuclear 社製)を用いて受容体結合実験を行った。非

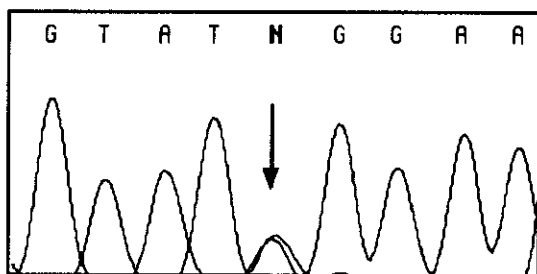
特異結合の測定には 10 μ M melatonin を加えて結合実験を行った。Total volume を 0.2 ml とし、25°C で 1.5 時間インキュベートした後 Brandel 社製 Cell harvester を用いて Whatmann GF/B filter で濾過した。結合実験の結果は Ligand program (Munson and Rodbard) を用いて解析した。

C. 研究結果:

1) メラトニン 1A 受容体

症例及び正常コントロール群についてメラトニン 1A 受容体遺伝子を解析したところ、2 種類のミスセンス変異（アミノ酸置換を伴う変異）を見出した。第 160 番目のシトシンがチミンに変わる変異 160(C→T)、及び 470 番目のシトシンがチミンに変わる変異 470(C→T) の 2 つで、それぞれ 54 番目のアルギニンをトリプトファンに (R54W)、157 番目のアラニンを変性 (A157V) 置き換える変異だった。

R54W



A157V

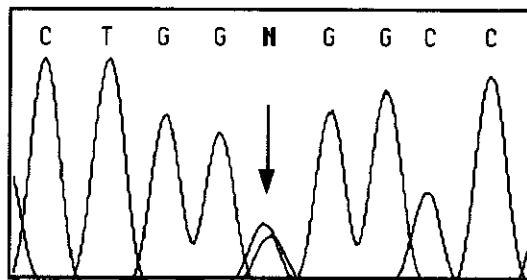


図 5. 直接シーケンスの結果

矢印は変異の位置を示す。

図 5 に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、それぞれシトシン(C)のバンドの山のみが出現するはずの場所で、シトシンの山が小さくなりチミンの山も出現しているため山が二重になっているのが判る（原図はカラーで、シトシンが青、チミンが赤の線で区別されている）。これは、2 つの allele のうち一つはシトシンのままだが、もう一つではチミンに変化していることを示す。R54W 変異は第一細胞内ループ領域に、A157V 変異は第 4 細胞膜貫通部位に位置している（図 6）。