

こころの健康科学研究事業
分担研究報告書

神経ステロイドの脳波学的解析

分担研究者 内山 真 国立精神・神経センター精神保健研究所 精神生理部 部長

研究協力者 田ヶ谷浩邦、鈴木博之、尾崎章子、栗山健一、渋井佳代、有竹清夏
国立精神・神経センター精神保健研究所 精神生理部

研究要旨: dehydroepiandrosterone (DHEA) や pregnenolone (PREG) などの神経ステロイドは、脳内でコレステロールから直接合成され、細胞核の steroid 受容体に対する活性がなく主に GABAA 受容体クロライドイオンチャンネル複合体のステロイド結合部位に作用してこの受容体の機能をアロステリックに調節する作用を持つ。動物実験では、種々のストレス負荷により脳内ニューロステロイドが変動し、情動や記憶など高次脳機能との関連が考えられている。ヒトにおける神経ステロイドの作用については、不安やうつ状態とニューロステロイドの血漿中レベルが相関するとの報告があり、不安障害やうつ病との関連が示唆されている。神経ステロイドの作用の解明は、ストレス負荷からうつ病発症へといたる病態機序を考える上で重要な示唆を与えるものと考えられる。ヒトにおいて神経ステロイドの中樞神経系への作用を客観的に知るマーカーは明らかにされていない。近年、神経ステロイド投与で睡眠中のシグマ帯域の活動が増強され、デルタ帯域の活動が抑制されることがわかってきた。本研究では、睡眠脳波解析と睡眠中の長期増強に関連すると考えられる獲得技能の睡眠後の改善を指標に、ヒトにおける神経ステロイドの作用について明らかにすることを目的とした。今年度は、実験系の確立を目標とし、1) ヒトにおける睡眠中長期増強の指標として視覚弁別課題の開発、2) GABAA 受容体複合体に作用するベンゾジアゼピンを睡眠前に投与した際の獲得技能の睡眠後の改善に与える影響について検討した。

A. 研究目的

dehydroepiandrosterone (DHEA) や pregnenolone (PREG) などの神経ステロイドは、脳内でコレステロールから直接合成され、細胞核の steroid 受容体に対する活性がなく主に GABAA 受容体クロライドイオンチャンネル複合体のステロイド結合部位に作用してこの受容体の機能をアロステリックに調節する作用を持つ。さらに、近年神経ステロイドは NMDA 受容体やシグマ受容体にも作用することが明らかになっている。動物実験では、種々のストレス負荷により脳内ニューロステロイドが変動し、情動や記憶など高次脳機能との関連が考えられている。うつ病モデル動物において、DHEA や PREG が抗うつ作用を示し、選択的シグマ受容体アンタゴニストは、この作用を拮抗する。したがって、これらの抗うつ作用はシグマ受容体を介したものと考えられている。ヒトにおける神経ステロイドの作用については、不安やうつ状態とニューロステロイドの血漿中レベルが相関するとの報告があり、不安障害やうつ病との関連が示唆されている。血漿中 DHEA が低値のうつ病患者に対して DHEA を投与するとうつ状態が改善したという報告がある。抗うつ薬に抵抗性の難治性うつ病に対し DHEA が効果があったとの報告がある。

これらから神経ステロイドの作用の解

明は、ストレス負荷からうつ病発症へといたる病態機序を考える上で重要な示唆を与えるものと考えられる。しかし、ヒトにおいて神経ステロイドの中樞神経系への作用を客観的に知るマーカーは明らかにされていない。近年、神経ステロイド投与で睡眠中のシグマ帯域の活動が増強され、デルタ帯域の活動が抑制されることがわかってきた。Friess らは、9 例の健常成人男性にプロゲステロンを投与したところ、シグマ帯域の脳波パワーの増強とデルタ帯域パワーの抑制を観察した。この所見が、これまでベンゾジアゼピンを主とする GABAA 受容体アゴニストとみられる所見に相当し、かつ血中の pregnenolone 濃度と関係していたことから、プロゲステロン投与による脳波変化は、神経ステロイドである pregnenolone の GABAA 受容体に対する作用を介したものであることを明らかにした。

われわれは、この点に注目し、睡眠脳波解析と睡眠中の長期増強に関連すると考えられる獲得技能の睡眠後の改善を指標に、ヒトにおける神経ステロイドの作用について明らかにすることを目的とした。今年度は、実験系の確立を目標とし、1) ヒトにおける睡眠中長期増強の指標として視覚弁別課題の開発、2) GABAA 受容体複合体に作用するベンゾジアゼピンを睡眠前に投与した際の獲得技能の睡眠

後の改善に与える影響について検討した。

B. 研究方法

対象として健康な 20 歳から 22 歳の成人男性 8 名が参加した。研究に参加するにあたり、実験についての十分な説明を行い、書面による同意を得た。実験 1 週間前から規則正しい生活をし、飲酒をしないこと、睡眠に影響するような薬物（感冒薬など）を服用しないよう指示した。

実験に先立ち、被験者に 1 週間の睡眠日誌を記録させるとともに、アクチウォ

ッチ（Mini Mitter 社）を用いて連続活動量記録を行った。アクチウォッチは 1 分間あたりの非利き手の活動量を連続的に記録するようにセットした。

1 週間の間隔をあけて 1 人の被験者が 2 回の実験セッションに参加した。各実験セッションにおいて、トリアゾラム 0.25mg の入った不透明なゼラチンカプセルまたは、乳糖を入同じカプセルに入れたプラセボを double blind cross-over manner で被験者に投与した。

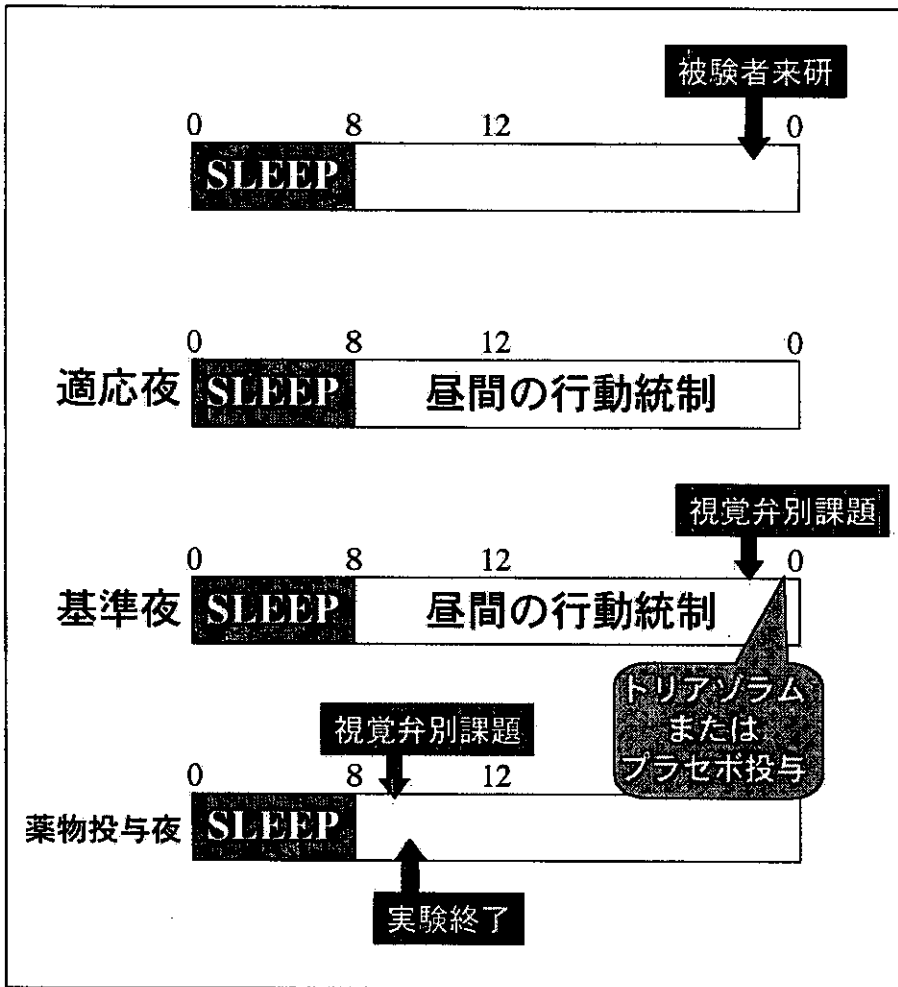


図 1: 実験プロトコール

各実験セッションのスケジュールを図1に示す。実験1日目は、17時に国立精神・神経センター精神保健研究所の時間隔離ユニットに集合し、終夜睡眠ポリグラフ検査のための電極装着を行い、24時に就床させ、終夜睡眠ポリグラフ記録を行った。実験第2日目は8時に起床し、隔離実験室内で自由に過ごさせた。この間中、実験者が行動をモニターし、日中に居眠りをしないよう行動統制を行った。24時に就床させ、終夜睡眠ポリグラフ記

録を行った。実験3日目は8時に起床させ、実験第2日目と同様に実験者のモニターのもとで隔離実験室内で自由に過ごさせた。22時より視覚弁別課題を課した後、23時にトリアゾラム0.25mgまたはプラセボを投与し、24時に就床させ、終夜睡眠ポリグラフ記録を行った。実験第4日目は、8時に起床させ充分覚醒したことを確認した後、10時より視覚弁別課題を課した。視覚弁別課題が終了した後に各実験セッションを終了した。

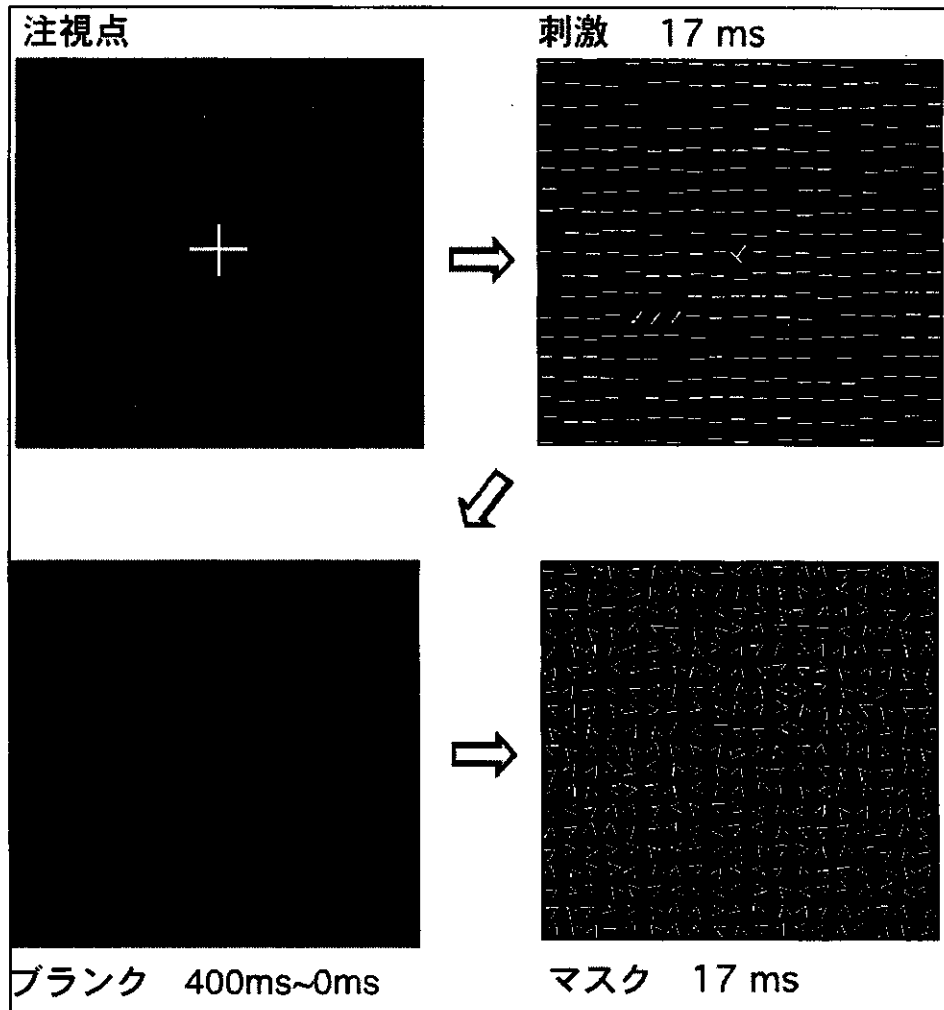


図2: 視覚弁別課題の手順

視覚弁別課題は、Karniの開発したものをを用いた（図2）。視覚弁別課題とは、特定の対象（目標刺激）を、それとは異なった特性をもつ複数の対象（妨害刺激）の中から視覚的に見つけ出す課題である。視覚的探索とも呼ばれる。妨害刺激に対して、単一の特徴だけが異なる目標刺激を見つけ出す課題（特徴探索 feature search）では、目標刺激が目飛び込んでくるように見える。この現象をpop-outと呼び、探索時間が妨害刺激の数に依存しない並列走査が行われる。課題の内容は、以下の通りである。被験者は注視点が画面中央に表示された後、注視点を見つめながらボタンを押す（図2左上）。刺激が17ms表示される。水平の短い線分を背景に、中心にLかTが回転したもの、四分分割された視野の一つに斜めの線分が縦か横かに3つ並んで表示される（図2右上）。図2右上の刺激図版は中心にT、左下の視野に横に並んだ斜めの刺激が表示されている。ブランクが300~0ms表示される（図2左下）。この表示時間が短いほど、刺激の認識が困難となる。この後マスク刺激が刺激の残像を妨害する（図2右下）。マスク表示後、被験者は刺激図形の中心部がLかTか、3つの斜めの線分が縦並びか横並びかを判断する。これらは、すべて自動化されたコンピュータプログラムにより、ビデオディスプレイ上に提示された。ブ

ランクの時間を400msから順次、300ms、200ms、160ms、120ms、100ms、80ms、60ms、40ms、20ms、0msと順次短縮していった。400msから160msまでは50回の試行を行い、120ms以下では150回の試行を行った。前試行終了には、90分かかった。

C. 結果

現在4例についての解析が終了したところであり、ここでは4例についての所見を記述的に検討する。視覚弁別課題の睡眠前後の結果を、各被験者ごとに図3示した。縦軸には正答率横軸には、ブランクの提示時間がとってある。点線が夜間就床前の試行で、実線が起床後の試行である。図に示すように、80%正答率を指標とすると、placebo条件においては、subject M、subject Oでは、改善がみられ、subject Yおよびsubject Hでは不変であった。トリアゾラム投与時には、subject Mでは改善、subject Oでは悪化、subject Hおよびsubject Yでは不変であった。各被験者ごとに、トリアゾラム投与時とプラセボ投与時におけるそれぞれ1晩の変化率の差をとると、subject Hではトリアゾラム投与により、7%の改善、subject Mでは15%の改善、subject Oでは94%の悪化、subject Yでは2%の悪化であった。subject Oにおいては、トリアゾラム投与後の起床時に持ち越し効果によると思われる眠

気を訴えたため、これによる著しい悪化がみられたものと考えられた。その他の被験者ではいずれの投与夜においても、眼気の訴えはみられなかった。

眠段階 2 の増加と睡眠段階 3+4 の減少が全例でみられた。しかし、これらと視覚弁別課題に対するトリアゾラムの効果との明らかな関連はみられなかった。

夜間睡眠構造との関連をみると、トリアゾラム投与により 30 秒頁判定により睡

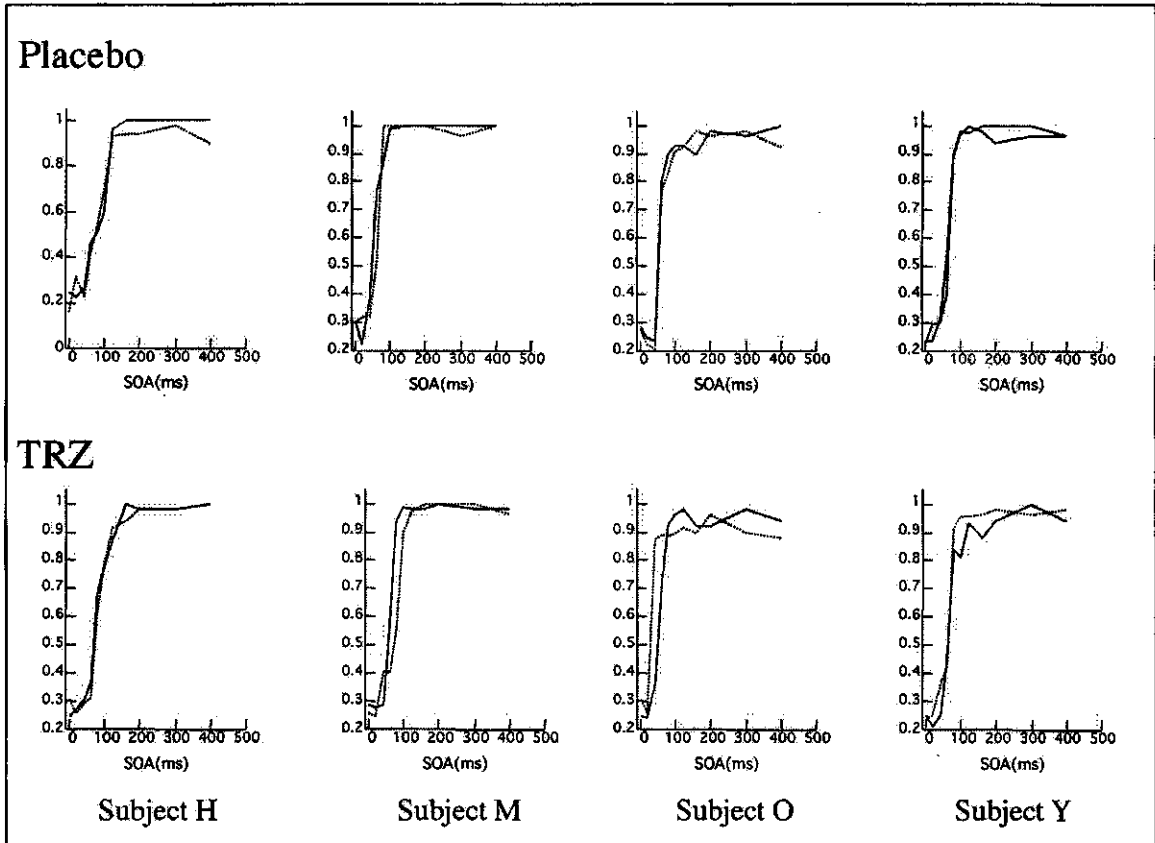


図 3 : 視覚弁別課題の結果

点線は睡眠前の結果、実線は睡眠後の結果を示す

D. 考察

視覚弁別課題とは、特定の対象（目標刺激）を、それとは異なった特性をもつ複数の対象（妨害刺激）の中から視覚的に見つけ出す課題である。視覚的探索とも呼ばれる。妨害刺激に対して、単一の

特徴だけが異なる目標刺激を見つけ出す課題（特徴探索 feature search）では、目標刺激が目飛び込んでくるように見える。この現象を pop-out と呼び、探索時間が妨害刺激の数に依存しない並列走査が行われる。

本研究で用いた視覚弁別課題は Karni (1991)が開発したものであり、課題成績の向上が特定の視野にのみ起こること、背景と刺激の方向の関係に依存することを示し、課題実行に伴うヒトの視覚野の可塑性をあらわした。

さらに Karni et al. (1994) はこの課題を行った後に、深い NREM 睡眠である徐波睡眠を剥奪しても成績は向上するが、REM 睡眠を剥奪することにより向上が無くなることを示し、この課題の向上には REM 睡眠が不可欠であることを示した。NREM 睡眠も課題向上に必要であるという結果も得られている。Gais, Plihal & Born (2000) は夜間睡眠の前半もしくは後半の 3 時間だけに制限して、課題の成績を検討したところ、徐波睡眠が多く含まれる前半の睡眠をとった群のみが成績向上を示した。Stickgold et al. (2000) は通常睡眠後の課題成績と睡眠状態との関係を検討した。睡眠の時間経過を 4 つのブロックに分割し、それぞれに含まれる睡眠段階量と課題成績の関係をみたところ、最初のブロックに含まれる徐波睡眠量と最後のブロックに含まれる REM 睡眠量で成績の向上量を 80%説明できることをあらわした。これらの結果から、視覚弁別課題の成績向上には REM 睡眠だけでなく、深い NREM 睡眠とその後の REM 睡眠という 2 段階の処理が必要だと考えられている。これらは、学習機能が長期記憶増強に関わる機能と近似の機構である事を示唆する所見として注目を集めている。

本研究において、視覚弁別課題における技能習得に GABA 神経系が与える影響

について、トリアゾラムを用いて検討した。その結果、トリアゾラム投与により、2 例で睡眠による技能獲得の成績が明らかに改善し、2 例で悪化をみた。悪化例のうち 1 例は、持ち越し効果によると考えられる眠気の影響が明らかであり、1 例の悪化例においてもその悪化は 2%と改善例の 15%および 7%と比較して軽度であった。先に述べたように、前半睡眠における徐波睡眠量や後半睡眠における REM 睡眠量が睡眠による技能習得の強化・改善と関連しているという報告から考えると、ベンゾジアゼピン誘導体の徐波睡眠抑制作用および REM 睡眠抑制作用はこうした技能習得の強化・改善を妨げるものと考えられる。しかし、本研究の結果では、むしろ反対の結果であったことが注目される。今回は、GABA 神経系の活動を反映する脳波定量解析によるデルタ帯域パワーおよびシグマ帯域パワーの検討を行っていないが、この点について解析が進めば、より詳細な検討が行えるものと考えられる。実験系としての、安定性については、持ち越し効果による朝起床後の視覚弁別課題への眠気の影響をいかに排除するかが検討課題として残った。この点については何らかの行動統制により眠気の影響を最小にする実験的工夫が必要と考えられる。

E. 結論

睡眠脳波解析と睡眠中の長期増強に関連すると考えられる獲得技能の睡眠後の改善を指標に、ヒトにおける神経ステロイドの作用について明らかにすることを目的として、今年度は、実験系の確立を

目標とし、1) ヒトにおける睡眠中長期増強の指標として視覚弁別課題の開発、2) GABAA 受容体複合体に作用するベンゾジアゼピンを睡眠前に投与した際の獲得技能の睡眠後の改善に与える影響について検討した。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kubota T, Uchiyama M, Suzuki H, Shibui K, Kim K, Tan X, Tagaya H, Okawa M, Inoue S: Effects of nocturnal bright light on saliva melatonin, core body temperature and sleep propensity rhythms in human subjects. *Neurosci Res* 42(2): 115-122, 2002.
2. Iwase T, Kajimura N, Uchiyama M, Ebisawa T, Yoshimura K, Kamei Y, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Katoh M, Watanabe T, Nakajima T, Ozeki Y, Sugishita M, Hori T, Ikeda M, Toyoshima R, Inoue Y, Yamada N, Mishima K, Nomura M, Ozaki N, Okawa M, Takahashi K, Yamauchi T. Mutation screening of the human *Clock* gene in circadian rhythm sleep disorders. *Psychiatry Research* 109: 121-128, 2002.
3. 鈴木博之, 久我隆一, 内山真: 超短時間睡眠・覚醒スケジュールを用いた睡眠状態と夢見体験の検討. *生理心理学雑誌* 20: 19-28, 2002.
4. Suzuki H, Uchiyama M, Shibui K, Kim K, Tagaya H, Shinohara K: Long-term rectal temperature measurements in a patient with menstrual-associated sleep disorder. *Psychiatry Clin Neurosci*. 56(4):475-8, 2002.
5. Tagaya H, Uchiyama M, Shibui K, Kim K, Suzuki H, Kamei Y, Okawa M. Non-rapid-eye-movement sleep propensity after sleep deprivation in human subjects. *Neurosci Lett*. 323:17-20, 2002.
6. Uchiyama M, Shibui K, Hayakawa T, Kamei Y, Ebisawa T, Tagaya H, Okawa M, Takahashi K: Larger phase angle between sleep propensity and melatonin rhythms in sighted humans with non-24-hour sleep-wake syndrome. *Sleep* 25: 83-88, 2002.
7. 有竹清夏, 栗山健一, 鈴木博之, 譚新, 渋谷佳代, 金圭子, 尾崎章子, 亀井雄一, 大久保善朗, 田ヶ谷浩邦, 内山真: 夜間睡眠中の時間認知. *脳と精神の医学* 13: 317-323, 2002
8. 内山真, 金圭子, 田ヶ谷浩邦: 日本人のライフスタイルと睡眠障害. 香川靖雄監修: 生活習慣病-遺伝子から病態まで-. 最新医学社出版, 3月増刊号 pp277-289, 2002.
9. 福田信, 亀井雄一, 田ヶ谷浩邦, 内山真: 新しい睡眠薬 (クアゼパム, ソルピデム) の臨床効果と副作用. *精神医学* 44 (3): 313-318, 2002.
10. 内山真, 田ヶ谷浩邦: 時差による体調変化. *総合臨床* 2002; 51: 951-955.
11. 田ヶ谷浩邦, 内山真: 睡眠障害の社会的問題点. **CLINICAL**

- NEUROSCIENCE 2002; 20: 561-563.
12. 内山真, 亀井雄一: 睡眠覚醒リズム障害(睡眠相後退症候群). PROGRESS IN MEDICINE 2002; 22: 128-131.
 13. 内山真, 亀井雄一, 田ヶ谷浩邦, 金圭子, 渋井佳代: 概日リズム睡眠障害の生理学的背景と治療の進め方. PROGRESS IN MEDICINE 2002; 22: 1411-1415.
 14. 田ヶ谷浩邦, 内山真: 歳をとると睡眠時間が短くなるのはなぜか. CLINICAL NEUROSCIENCE 2002; 20: 1209.
 15. 加藤隆史, 内山真: 歯科医師と睡眠医療. 歯界展望 2002; 100: 1125-1131.
 16. 田ヶ谷浩邦, 内山真: 概日リズム睡眠障害の病態・診断・治療. Pharma Medica 2002; 20(suppl): 51-56.
 17. 内山真: 睡眠社会学の今後の展開. Pharma Medica 2002; 20 (suppl): 98-102.
 18. 亀井雄一, 金圭子, 栗山健一, 尾崎章子, 山崎英明, 田ヶ谷浩邦, 内山真: 神経精神疾患治療の EBM -睡眠障害(1)-. 脳の科学 2002; 24: 877-882.
 19. 田ヶ谷浩邦, 渋井佳代, 内山真: 神経精神疾患治療の EBM-睡眠障害(2)-. 脳の科学 2002; 24: 975-981.
 20. 内山真: 睡眠障害. クリニカ 29: 66-70, 2002.
 21. 田ヶ谷浩邦, 内山真: 高齢者の睡眠障害に対する薬物療法. 臨床精薬理 2002; 5: 1581-1589.
 22. 田ヶ谷浩邦, 内山真: 概日リズム睡眠障害の診断と治療. 精神科 2002; 1: 367-372.
 23. 栗山健一, 田ヶ谷浩邦, 内山真: PTSDの生物学的研究病態生理「PTSDと睡眠」. 臨床精神医学 2002; 増刊号: 90-97.
 24. 内山真, 亀井雄一, 金圭子, 鈴木博之, 譚新, 栗山健一: 睡眠物質の睡眠障害治療への応用. 早石修監修, 井上昌次郎編著: 快眠の科学. 朝倉書店出版, 東京, pp129-135, 2002.
 25. 内山真: 睡眠障害の疫学調査-日本において、睡眠障害で悩んでいる人はどれくらいいますか? 内山真, 土井永史監修: 睡眠障害の診断・治療 Q&A. 診療新社出版, 大阪, pp6-10, 2002.
 26. 内山真: 睡眠障害の分類(1) 睡眠障害の主要な分類法を概説して下さい。内山真, 土井永史監修: 睡眠障害の診断・治療 Q&A. 診療新社出版, 大阪, pp11-15, 2002.
 27. 内山真: 睡眠障害の分類(2) 睡眠障害は年齢別にみて、特徴がありますか。内山真, 土井永史監修: 睡眠障害の診断・治療 Q&A. 診療新社出版, 大阪, pp16-20, 2002.
 28. 土井永史, 内山真: 睡眠障害の非薬物療法とその意義についてご教示下さい。内山真, 土井永史監修: 睡眠障害の診断・治療 Q&A. 診療新社出版, 大阪, pp30-37, 2002.
 29. 内山真, 土井永史: (監修) 睡眠障害ハンドブック. 診療新社出版, 大阪, 2002.
 30. 内山真, 金圭子, 田ヶ谷浩邦: 日本人のライフスタイルと睡眠障害. 香川靖雄監修: 生活習慣病-遺伝子から

病態まで一。最新医学社出版,増刊号 pp277-289, 2002.

31. 内山真:(編集)臨床医のための睡眠・覚醒ハンドブック。メディカルレビュー社発行,大阪,2002.
32. 内山真:不眠が主訴の場合。内山真編:臨床医のための睡眠・覚醒ハンドブック。メディカルレビュー社発行,大阪,pp20-28, 2002.
33. 内山真:(編集)睡眠障害の対応と治療ガイドライン。じほう,東京,2002.

2. 学会発表

1. 田ヶ谷浩邦,内山真,金圭子,渋井佳代,尾崎章子,譚新,鈴木博之,有竹清夏,栗山健一,土井由利子,林三千恵,高橋泉:高校生の睡眠習慣と心身の問題に関する研究-千葉県におけるコミュニティ研究-。日本睡眠学会第27回定期学術集会,仙台国際センター,仙台,2002.7.4-5.
2. 渋井佳代,内山真,田ヶ谷浩邦,金圭子,譚新,栗山健一,鈴木博之,有竹清夏,尾崎章子:小学生の睡眠習慣と心身の訴え-埼玉県蕨市におけるコミュニティ研究-。日本睡眠学会第27回定期学術集会,仙台国際センター,仙台,2002.7.4-5.
3. 早川達郎,内山真,亀井雄一,田ヶ谷浩邦,渋井佳代,金圭子:非24時間睡眠覚醒症候群の臨床的特徴について-視覚障害のない60自験例の検討。日本睡眠学会第27回定期学術集会,仙台国際センター,仙台,2002.7.4-5.
4. 鈴木博之,栗山健一,有竹清夏,渋井佳代,金圭子,譚新,尾崎章子,田ヶ谷浩邦,亀井雄一,内山真:NREM睡眠からの覚醒時における夢見体験と睡眠状態の関係。日本睡眠学会第27回定期学術集会,仙台国際センター,仙台,2002.7.4-5.
5. 栗山健一,鈴木博之,有竹清夏,渋井佳代,金圭子,尾崎章子,譚新,田ヶ谷浩邦,亀井雄一,内山真:時間知覚と概日リズム。日本睡眠学会第27回定期学術集会,仙台国際センター,仙台,2002.7.4-5.
6. 有竹清夏,栗山健一,鈴木博之,譚新,渋井佳代,金圭子,尾崎章子,亀井雄一,内山真:睡眠中の主観的経過時間に影響を及ぼす要因について。日本睡眠学会第27回定期学術集会,仙台国際センター,仙台,2002.7.4-5.
7. 譚新,内山真,田ヶ谷浩邦,渋井佳代,鈴木博之,金圭子,亀井雄一,有竹清夏,尾崎章子,栗山健一:超短時間睡眠・覚醒スケジュール下の睡眠概日リズム。日本睡眠学会第27回定期学術集会,仙台国際センター,仙台,2002.7.4-5.
8. 亀井雄一,内山真,譚新,鈴木博之,有竹清夏,早川達郎,工藤吉尚:日中の高照度光照射の睡眠に対する影響。日本睡眠学会第27回定期学術集会,仙台国際センター,仙台,2002.7.4-5.
9. 譚新,内山真,田ヶ谷浩邦,渋井佳代,鈴木博之,金圭子,亀井雄一,有竹清夏,尾崎章子,栗山健一:超短時間睡眠・覚醒スケジュール下の徐波の概日リズム。第9回日本時間生物学会,名古屋市,2002.11.14-15.
10. 木下郁美,亀井雄一,渋井佳代,金圭子,譚新,尾崎章子,栗山健一,鈴木

博之, 有竹清夏, 田ヶ谷浩邦, 内山
真:メラトニン分泌リズムと睡眠習慣
の関係. 第9回日本時間生物学会,
名古屋市, 2002.11.14-15.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を
含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

こころの健康科学研究事業

分担研究報告書

恐怖条件付け反応と神経神経細胞の再生における成育環境の解析

分担研究者 神庭重信 山梨大学医学部精神神経医学教室 教授

研究要旨： 哺乳類では、養育環境がその後のストレス反応に大きな影響を与える。人間においても劣悪な出生環境はうつ病や PTSD のリスクファクターとしてよく知られている。出生後、母親から長時間、引き離されたラットは成熟後、ストレスに対し脆弱になる。今回、我々は Wis/st 系ラットと SD 系ラットに対して出生早期の母子分離を行い、5 週齢でプラスメイズテストを行い、不安行動について観察した。母子分離自体よりもその後の不安行動については母親の養育行動の一つである Arched-back nursing の変化が影響を与える可能性が示唆された。

A. 研究目的

出生早期の母子分離によりストレスに対し脆弱な個体が育つことは動物でも人間でも同様である。今回我々は、出生早期のラットに母子分離を行い、母親の養育行動を観察し 5 週齢に達した時点での不安行動をプラスメイズテストを用いて行うことによりストレス脆弱性と養育環境の関連を調べた。

B. 研究方法

Wistar/st と SD の 2 系統のラットに対し、出生後 7 日目に 24 時間の母子分離を行い、母子分離後の母親の養育行動を観察した。離乳後、5 週齢でプラスメイズテストを行った。

C. 研究結果

SD 系の母ラットは母子分離後、Arched-back nursing が減少したが Wis/st 系のラットでは母子分離後 Arched-back nursing が逆に増加した。5 週齢の仔ラットに plus maze テストを行ったところ、SD 系のラットでは、従来の報告どおりオープンアームの滞在時間が減少した。Wis/st 系のラットでは SD 系とは逆にオープンアームの滞在時間が増加し不安感受性が低いことが示唆された。

D. 考察

母子分離ストレスの影響は、Wis/st 系のラットでは、SD 系のラットの場合とは逆の結果となった。これは母親の養育行動の違いによる可能性が高い。今回の研究

により、劣悪な養育環境に一時的にさらされていても、親の養育行動によって、その影響がレスキューされる可能性があることが示された。

E. 結論

母ラットの養育行動の変化がストレス脆弱性を生み出す可能性が示唆された。しかし、今回は別の系統のラットで実験を行ったため、遺伝的背景による影響を否定できない。今後、同一の系統を用い Arched -back nursing の多い群と少ない群で仔ラットの海馬、扁桃体、視床下部の遺伝子発現の差異を調べることで創薬につながるタンパク同定を行う。

F. 健康危険情報

特記事項無し

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

こころの健康科学研究事業

分担研究報告書

うつ病におけるグルココルチコイドホルモン受容体異常の検討

分担研究者 渡辺 義文 山口大学医学部高次神経科学講座 教授

研究要旨: 視床下部-下垂体-副腎皮質系のネガティブフィードバック機能において重要な役割を果たしているグルココルチコイドホルモン受容体の α 、 β isoform の発現量比を検討したところ、うつ病患者における β isoform の発現比率が低下していた。この変化はうつ状態の改善とは相関せず、trait dependent な指標と考えられた。

A. 研究目的

うつ病の遺伝的素因としてストレス脆弱性が想定されている。その根拠となった事実の一つは、うつ病にみられる視床下部-下垂体-副腎皮質(HPA)系の機能異常である。この HPA 機能異常には視床下部におけるコルチコトロピン遊離ホルモン(CRH)の分泌亢進と、グルココルチコイドホルモン(GC)によるネガティブフィードバック機能低下の2側面がある。

HPA 系ネガティブフィードバック機構において主役を演じる GC 受容体は非活性化時は細胞質内に存在し、GCによって活性化されると核内へと移行し、dimer を形成して標的遺伝子上流結合して、その発現調節を行う。しかし近年、GC 受容体には alternative splicing により α 、 β 2種類の isoform が存在することが報告されている。従来考えられていた GC 受容体は α 受容体であり、それより35アミノ酸

短い β 受容体は GC との結合能を持たず、常時核内に存在し、活性化されて核内に移行してきた α 受容体の標的遺伝子発現調節機能を阻害すると考えられている。

β 受容体のこのような α 受容体阻害作用は、 α 受容体の遺伝子発現調節作用のみならず HPA 系ネガティブフィードバック作用に対してもバランスをとる働きをしているものと想像され、うつ病の HPA 系機能異常という病態生理において β 受容体は重要な役割を演じているものと考えられる。しかし、うつ病患者における β 受容体の検討はこれまで全く行われていない。

本研究ではうつ病の HPA 機能異常における GC 受容体異常を検討することを目的として、GC 受容体の α 、 β isoform の発現比率をうつ病患者と健常人との間で比較するとともに、うつ状態の治療経過における変化を検討した。

B. 研究方法

健常者 8 名 (41.0±4.4 歳)、うつ病患者 9 名 (単極性 6 名、双極性 3 名、64.4±3.6 歳) に対して検討を行った。うつ病患者については、初診時もしくは入院時、ついで 2 ヶ月、4 ヶ月、6 ヶ月後に検討をおこなった。

採取した血液 20ml を低浸透圧で溶血した後、遠心分離して得られたリンパ球を蛋白変性剤中でホモゲナイズし、RNA 分離用スピカラムで遠心分離して総 RNA を得た。総 RNA を逆転写し、上流は α と β に共通の 2158-2178 番ヌクレオチドを、下流はそれぞれ固有の PCR プライマーを用い、競合的 PCR を行いそれぞれ 477bp と 366bp の PCR 産物を得た。 α と β の cDNA 量を 100:1、10:1、1:1、1:10、1:100 の比で混合して競合的 PCR を行い、 α と β の量比とサイクル数の関係から検量線を作製し、リンパ球における α と β の RNA 発現量比を求めた。

(倫理面への配慮)

あらかじめ本研究の目的、方法を文書をもって説明し、同意の得られた者のみを研究対象者とした。その際、目的の GC 受容体遺伝子以外の遺伝子については検討しないこと、結果の公表時には個人が特定されないよう配慮することを十分説明し、理解を得た。

C. 研究結果

健常者 8 名とうつ病患者 9 名の間に、GC 受容体 α isoform 発現量の差は認められなかった。またうつ病治療過程における変動もみられなかった。

一方 GC 受容体 β isoform 発現量につい

ては、健常人 (8 名、photodensity 28314 ±1562) に比べてうつ病患者 (HAMD20 点以上 9 名、12816±2518) は有意に低い値を示した。単極性 6 名(12079±3225)と双極性 3 名(14290±4741)の間には有意な差は認められず、いずれの群も健常人に比べて有意に低い値を示した。

うつ状態の変化による GC 受容体発現量の変動については、 α isoform に変化はみられなかったが、 β isoform についてもうつ状態(HAMD20 点以上、12816±2518)と寛解状態(HAMD10 点以下、15098±1695)の間に有意な変化はみられず、寛解状態においてもうつ病患者における β isoform の発現量は健常人より有意に低かった。また、単極性と双極性の間にも有意な差はみられなかった。治療開始後 6 ヶ月の経過を 7 症例で検討したが、治療開始時に異常低値を示した 1 例を除いては、全経過を通して β isoform の発現量に目立った変動は認められなかった。

D. 考察

本研究により、GC 受容体のうち β isoform の発現のみがうつ病患者において状態や治療にかかわらず、健常人に比べて有意に低いことが明らかとなった。このことは、GC 受容体 β isoform の発現低下はうつ病における trait marker である可能性を示唆している。

本研究における健常人の平均年齢が 41 歳と患者群の 64.4 歳に比べて若いことは一つの問題として残っているが、健常人 8 名をみても β isoform の発現量と年齢に明らかな相関はみられないことから、 β isoform 発現量に対する加齢の影響は少

ないものと推察される。しかし、今後この加齢の問題は健常人の例数を増やして検討すべき課題と考えている。

うつ病の trait marker としての可能性が示唆された β isoform の発現量低下は、本研究において単極性、双極性いずれにおいてもみられたことから、遺伝的には異質と考えられている両者に共通する指標として興味深い。HPA 系ネガティブフィードバック機能低下が単極性、双極性いずれのうつ状態においても共通して認められることを考えると、 β isoform の発現量低下は HPA 系機能異常を含め何らかのうつ状態の病態生理に関与しているものと考えられる。

うつ状態における HPA 系の機能異常はうつ状態の改善とともに消退することが知られているが、 β isoform の発現量低下は状態依存性の変化を示さない。実際、preliminary な結果ではあるが、デキサメサゾン/CRH 負荷試験における異常と β isoform 発現量低下の間に明らかな関連は見いだせなかった。しかし、うつ病における HPA 系機能異常のなかでも視床下部室傍核の CRH 産生細胞の過活動など、状態依存性とは異なる異常も報告されており、 β isoform 発現量低下はうつ病の何らかの HPA 系機能の脆弱性に関与しているものと考えられる。

GC 受容体の 2 つの isoform はその相互作用によって GC の神経作用のバランスをとっているものと想像されるが、 β isoform の機能についての詳細は未だ明らかとなっていない。核内においては α と β isoform が heterodimer を形成することによって、GC 受容体による遺伝子発現

調節作用がコントロールされていると考えられている。うつ病患者において β isoform の発現量が低下しているとするれば、GC による遺伝子発現調節に何らかの異常が出現している可能性が考えられるが、その発現異常をきたしている遺伝子の探索は今後の重要な課題と考えられる。

GC 受容体の作用は核内だけではなく、細胞質内においても遺伝子発現調節のような長時間を要さない、短時間の作用がいくつか明らかにされている。免疫抑制作用は有名であるが、この作用への β isoform の関与が、喘息やクローン病、潰瘍性大腸炎といった自己免疫疾患患者のなかのステロイド抵抗性を示す患者群で β isoform の発現量が有意に増加しているとの事実から示唆されている。さらに興味深いことに、 β isoform が存在しないマウスの好中球に β isoform を transfection することで、その好中球の細胞死が抑制されることや、ヒト白血球細胞で β isoform 発現を抑制すると細胞死が促進されるという報告から、 β isoform はアポトーシスに関与していることが推測されている。以上のような細胞質内での β isoform の作用を考えると、本研究で確認されたうつ病における β isoform の発現量低下は GC に対する過感受性、神経可塑性の脆弱性を引き起こしている可能性を強く示唆しており、今後検討していく予定である。

E. 結論

単極性、双極性うつ病いずれにおいても GC 受容体 β isoform 発現量は健常人に比べ有意に低下していた。この β isoform

発現量の低下はうつ状態依存性ではなく trait marker と考えられた。GC 受容体 β isoform の発現低下より、うつ病における GC への過感受性、神経可塑性の脆弱性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

こころの健康科学研究事業

分担研究報告書

感情障害剖検脳の細胞構築学的研究

分担研究者 池田 研二 東京都精神医学総合研究所 参事研究員

研究要旨： 感情障害の神経心理学的研究や脳画像研究等で前頭前野背側部の異常が示されていることに鑑みて、その神経病理学的基盤研究を行った。感情障害剖検脳の検討では前頭葉背側に皮質体積の有意な減少がある。その細胞構築・細胞病理学的な要因として、グリア細胞密度の減少、神経細胞の密度の減少、神経細胞のサイズが小さいこと等が報告されているが、今回の検討ではグリア細胞や神経細胞の密度、神経細胞のサイズは正常対象群との間に相違はなかったが、皮質 II 層において小型細胞密度が有意に低いことが明らかとなった。この結果は感情障害脳における介在ニューロンの機能障害と関連している可能性がある。

A. 研究の目的

前頭前野において感情障害脳の脆弱性を示唆する所見や、脳画像研究等で機能異常が指摘されている。剖検脳の形態学的検討で同部位の皮質幅が薄いことを見いだされた。本研究は対象に較べて有意に薄い前頭前野の形態学的背景について検討することを目的とする。

B. 研究の方法

東京都精神医学総合研究所に保存されている剖検脳のなかから、感情障害 8 例（躁うつ病 6 例、退行期うつ病 2 例、43～69 歳、平均年齢 61.25 歳）、正常対照 8 例（42～61 歳、平均年齢 52.38 歳）（50～64 歳、平均年齢 54.75 歳）を選び、第 9 野を

中心とする左側前頭前野検索対象領域とし、20 μ m 厚パラフィン切片に 1%チオン染色標本を用いて以下の検討を行った。

1) 神経細胞とグリア細胞の密度比および小細胞と大細胞（錘体細胞）の密度比を検討する目的で、各症例の II-V 層の各層に出現する神経細胞数（小細胞と錘体細胞数）とグリア数をマイクロメーターで算定し（対物 20 倍下で 0.1mm², 30 グリッド算定）、各層における神経細胞とグリア数を調べた。

2) 神経細胞のサイズを調べる目的で、II 層の小型細胞と IIIc 層の大型神経細胞についてそれぞれ任意に 50 個、100 個を選び、細胞画像を CCD カメラで取り込んでタブレット上で描画し、NIH イメージで

面積をピクセル数で算定した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮であるが、今回、研究に共された剖検脳は厚労省指針の B 群試料に相当する。東京都精神医学総合研究所と都立松沢病院の研究倫理委員会で研究承認を得、情報管理者による匿名化操作を経て研究に供した。

C. 研究結果

1) ブロードマン第9野において、細胞総数に対するグリア細胞の占める割合は感情障害群と対象群の間で有意差はなかった。II~V層の各層別でもグリア細胞の占める割合に有意差は認められなかった。従って、感情障害においてグリア細胞密度の増減は認められなかった。II? V層の各層における小細胞の総細胞数に対する割合はII層においてのみ有意差が認められ、感情障害群において対象群に較べて18.9%の減少が認められた。

2) II, IIIc層で検討した小細胞と錘体細胞のサイズの検討では感情障害群と対象群の間に有意な細胞サイズの相違は認められなかった。

D. 考察

感情障害では前頭前野で脳血流量とグルコース代謝の変化が示されており、画像研究でも同領域の体積減少が報告されている。これまでの剖検脳の検討で前頭前野背側部の皮質幅の減少が確認されたので、第9野において皮質幅減少の病理学的基盤を検討した。前頭葉を対象としたこれまでの感情障害剖検脳での研究では、グリアの密度の減少、神経細胞の密度の

減少やサイズが小さいことが形態的变化として報告されている。とくにグリアの密度の減少に関する報告は多いが、今回の検討ではグリア細胞密度に増減は認められなかった。神経細胞についてもそのサイズが小さいことは確認できなかった。今回の検討で唯一、有意差が認められたのはII層において小型細胞密度が有意に低いことであった。II層の小型細胞が少ないことは Benes らにより統合失調症と感情障害の両方で報告されており、両疾患に共通する所見は介在ニューロンとしての機能障害に関係するとともに、脳の早期の発達の混乱にも関係している可能性がある。

E. 結論

感情障害脳では第9野を中心とする前頭前野背側部には有意な皮質体積の減少がある。その細胞病理学的な基盤としてII層の小型細胞の密度が低いことが示された。グリア密度、神経細胞のサイズに有意な異常は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuchita K, Nakayama H, Iritani S, Arai T, Niizato K, Haga C, Matsushita M, Ikeda K: Distribution of basal ganglia lesions in diffuse neurofibrillary tangles with calcification: a clinicopathological study of five autopsy cases. Acta Neuropathol 103: 555-564, 2002

2. Togo T, Akiyama H, Iseki E, Kondo H, Ikeda K, Kato M, Oda T, Tsuchiya K, Kosaka K: Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J Neuroimmunol* 124: 83-92, 2002
 3. Dickson DW, Bergeron C, Chin SS, Duyckaerts C, Horoupian D, Ikeda K, Jellinger K, Lantos PL, Lippa CF, Mirra SS, Tabaton M, Vonsattel JP, Wakabayashi K, Litvan I: Office of rare neuropathologic criteria for corticobasal degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 935-946, 2002
 4. 池田研二: 痴呆性疾患の病理. *クリニカ* 29: 177-182, 2002
 5. Tsuchiya K, Ikeda K, Niizato K, Watabiki S, Anno M, Taki K, Haga C, Iritani S, Matsushita M: Parkinson's disease mimicking senile dementia of the Alzheimer type: a clinicopathological study of four autopsy cases. *Neuropathology* 22: 77-84, 2002
 6. Yokota O, Terada S, Ishizu H, Tsuchiya K, Kitamura Y, Ikeda K, Ueda K, Kuroda S: NACP/ α -synuclein immunoreactivity in diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNFC). *Acta Neuropathol* 104: 333-341, 2002
 7. Yokota O, Ishizu H, Terada S, Tsuchiya K, Haraguchi T, Nose S, kawai K, Ikeda K, Kuroda S: Preservation of nigral neurons in Pick's disease with Pick bodies: a clinicopathological and morphometric study of five autopsy cases. *J Neurol Sci* 194: 41-48, 2002
 8. Tsuchiya K, Ikeda K, Mimura M, Takahashi H, Anno M, Shiotsu H, Akabane H, Niizato K, Uchihara T, Tmonaga I, Nakano I: Constant involvement of the Betz cells and pyramidal tract in amyotrophic lateral sclerosis with dementia: a clinicopathological study of eight autopsy cases. *Acta Neuropathol* 104: 249-259, 2002
 9. Terada S, Ishizu H, Yokota O, Tsuchiya K, Nakashima H, Ishihara T, Fujita D, Ueda K, Ikeda K, Kuroda S: Glial involvement in diffuse Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 105: 163-169, 2003
 10. Ikeda K: Clinical aspects of "senile dementia of tangle -type: a subset of dementia in senium separable from late-onset Alzheimer's disease. Review Series Dementia 2, 2002
2. 学会発表
1. 池田研二: 感情障害の神経病理. 第32回神経精神薬理学会年会. 前橋, 10月17日, 2002
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし