

- environment on brain/mind development Plenary Lecture, Korean Society for Biological Psychiatry, 2003
- 15) Bito,H, Arakawa,Y, Furuyashiki,T, Takemoto-Kimura,S, Narumiya,S Dynamic and activity-dependent control of neuronal actin cytoskeleton J PHARMACOL SCI 91 21P Suppl 1 2003 (第76回日本薬理学会年会、福岡、3 24-26, 2003) symposium
- 16) Bito,H Molecular mechanisms controlling actin reorganization during neurite remodeling J PHARMACOL SCI 91 10P Suppl 1 2003 (第76回日本薬理学会年会、福岡、3 24-26, 2003) 学術奨励賞受賞講演
- 17) Takemoto-Kimura,S, Terai,H, Furuyashiki,T, Arakawa,Y, Kikumura,S, Narumiya,S, Bito,H Regulation of CREB activity by CaMK Jpn J Physiol Suppl S68-3, 2003 (第80回日本生理学会大会、福岡、3 24-26, 2003) symposium
- 18) Bito,H, Arakawa,Y, Narumiya, S Control of axon elongation by SDF-1a/Rho/mDia signaling in cerebellar granule neurons 3rd HFSP Awardees' Meeting (Cambridge, UK, July 6-9) Abstracts Book p 36, poster
- 19) Arakawa,Y, Bito,H, Furuyashiki,T, Tsuji,T, Takemoto-Kimura,S, Nozaki,K, Hashimoto,N, Narumiya,S Control of axon elongation via an SDF-1a/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons Neurosci Res S46, O-062, 2003 (第26回日本神経科学学会、7 23-25, 2003、名古屋) 口頭
- 20) Takemoto-Kimura,S, Terai,H, Takamoto,M, Ohmae,S, Kikumura,S, Segi,E, Arakawa, Y, Furuyashiki,T, Narumiya, S, Bito,H CLICK-III, a novel neuronal CAMK, is localized to membrane compartments via CAAX motif Neurosci Res S53, O-105, 2003 (第26回日本神経科学学会、7 23-25, 2003、名古屋) 口頭
- 21) Nonaka,M, Tanaka,A, Doi,T, Fujiyoshi,Y, Takemoto-Kimura,S, Bito,H The ligand dependent synaptic clustering of PSD-95 and its role in neuronal function Bull Jpn Soc Neurochem 42 326, N022, 2003 (第46回日本神経化学学会大会、9 24-26, 2003, 新潟) ミニシンポジウム。
- 22) Arakawa,Y, Bito,H, Furuyashiki,T, Takemoto-Kimura,S, Yamana,N, Nozaki, K, Hashimoto,N, Narumiya,S A critical role for SDF-1a/Rho pathway in control of axon outgrowth and elongation in cultured cerebellar granule neurons Seikagaku 75 732, 3S47-2, 2003 (第76回日本生化学会 10 15-18, 2003, 横浜) シンポジウム
- 23) Takemoto-Kimura,S, Terai,H, Narumiya,S, Bito,H Characterization of CLICK-III/CAMKIg, a novel membrane-anchored neuronal CaMK Seikagaku 75 812, 2P-221, 2003 (第76回日本生化学会 10 15-18, 2003, 横浜) 口頭
- 24) Arakawa,Y, Bito,H, Tomoyuki,F, Tsuji,T, Takemoto-Kimura,S, Nishino,T, Yamana,N, Nozaki,K, Hashimoto,N, Narumiya,S Control of axon elongation via an SDF-1a/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons Soc Neurosci Abstr 29 885 7, 2003 (第33回北米神経科学学会, New Orleans, Nov 8-13, 2003) poster

- 25) Takemoto-Kimura,S , Terai,H , Takamoto,M , Ohmae,S , Kikumura,S , Segi,E , Arakawa,Y , Furuyashiki,T , Narumiya,S , Bito,H Molecular cloning and characterization of CLICK-III/CAMKIIg, a novel membrane-anchored neuronal CaMK Soc Neurosci Abstr 29 898 3, 2003 (第33回北米神経科学学会, New Orleans, Nov 8-13, 2003) poster
- 26) 尾藤晴彦 神経細胞の形態形成とRhoシグナリング。第26回日本医学会総会学術講演要旨集P 184, 4-8-S-1-3, 2003 (第26回日本医学会総会, 4-6, 2003, 福岡) シンポジウム発表。
- 27) 竹本-木村さやか, 寺井久司, 成宮周, 尾藤晴彦 新規膜アンカー蛋白質、CLICK-III/CaMKIIgのクローニング及び制御機構の解析。脂質生化学研究 45 236-237 (III-07), 2003 (第45回日本脂質生化学会 6-20-21, 2003, 仙台) 口頭発表。
- 28) 利島 保, 橋本優花里, 小林正夫, 近藤武夫 2003 乳幼児の認知・情動的クオリアの発達に関する神経心理学的研究(1) 日本心理学会第67回大会発表論文集, 617
- 29) 橋本優花里, 利島 保, 小林正夫V 近藤武夫 2003 乳幼児の認知・情動的クオリアの発達に関する神経心理学的研究(2) 日本心理学会第67回大会発表論文集, 621
- 30) 近藤武夫, 利島 保 2003 視空間的作動記憶容量の個人差と視点依存性—光トポグラフィによる検討— 基礎心理学研究, 第21巻, 印刷中
- 31) 近藤武夫, 橋本優花里, 利島 保, 小林正夫 2004 Strange Situationにおける乳児の顔面温度変化および後頭葉の局所脳血行動態の測定 日本発達心理学会第15回大会発表論文集, 印刷中
- 32) Kondou,T 2003 Individual differences in 3-D object recognition An event-related optical topography study *Technical Report on Attention and Cognition*, 31, 1-2 (*Online Journal*)

H 知的財産の出願・登録状況

該当事項なし。

研究要旨 ストレス適応破綻のメカニズムには、ストレスによる脳内遺伝子発現の変動が深く関与していると予想され、その結果ストレス関連性精神障害が発症してくると考えられる。本分担研究者はこの仮説に従って初年度は、以下のような母子分離ストレスによって形成されるストレス脆弱モデルラットを用いて、脆弱性のメカニズムを遺伝子発現の検討から明らかとした。1) 母子分離によって形成されたストレス脆弱ラット海馬では、成熟期急性拘束ストレス負荷に伴うIGFBP2、IGF1R発現が低下しており、非ストレス下でもIGF1、IGF2、IGF1R、IGF2R発現低下がみられていた。2) 母子分離によって成熟期の海馬を介した記憶・学習機能が低下し、良好な飼育環境の供与によって機能低下が緩和される。3) 母子分離によって形成された記憶・学習機能の低下の機序には、海馬でのIntegrin β 3 (CD61)、ApoE発現の低下の関与している可能性が示唆された。

A 研究目的

幼少時期のストレス体験、特に不遇な養育環境は成人期においてストレス関連精神障害の発症リスクを高めることが示唆されている。同様に母子分離負荷を受けて成長したラットは、成熟期にストレスの影響を受けやすいことが神経内分泌的に明らかにされ、このような成人期ストレス脆弱性のモデルとみなされている。これまで本研究者らは、母子分離負荷ラットが成熟期に拘束ストレスに曝露されると自発運動の顕著な減少を伴ったストレス脆弱性を示し、c-Jun N-terminal kinase-2, 94 kDa glucose-regulated protein の発現が海馬で減少することを明らかにしてきた。その一方で、良好な飼育環境は母子分離による有害な影響を緩和することが報告されている。このようなこれまでのストレス脆弱性に関する研究成果を踏まえ、初年度は下記の研究を行った。1) ストレス脆弱性形成に関与する遺伝子発現障害の検討 母子分離によって形成されるストレス脆弱モデルラットの海馬で、マイクロアレイによ

る検索からストレス脆弱性関連遺伝子として抽出された insulin-like growth factor binding protein2 (IGFBP2) の関与する情報系の障害を、遺伝子発現レベルから検討した。2) 母子分離によって引き起こされる記憶・学習障害の検討 母子分離によって獲得されるストレス脆弱性を、記憶・学習機能の観点から明らかにし、その分子メカニズムの解明を蛋白発現レベルから行う目的で抗体アレイを用いて試みた。同時に良好な飼育環境を母子分離後に供与し、母子分離による記憶・学習障害への好ましい影響について検討した。

B 研究方法

実験には、Sprague-Dawley ラットを用い妊娠ラット以外は全て雄性ラットでの検討であり、12 時間毎に明暗期を保ち飼育した。

B-1 ストレス脆弱性関連遺伝子の検索

ストレスパラダイム 生後 2~9 日までの 8 日間、毎日午前中 1 時間母子分

離を行ったものを母子分離群とした。生後通常の環境下で飼育したものを、正常飼育群とした。離乳は両群とも、生後 21 日目に行った。各群のラットが成長した後(生後 90 日)、拘束ストレス 2 時間を施行し、直後に断頭、海馬を摘出した。

マイクロアレイ法 総計 1152 個の遺伝子に、特異的な oligonucleotide をスポットした Margen 社の Rat Express Microarray を用いた。母子分離+急性拘束ストレス群および正常飼育+急性拘束ストレス群、各 5 匹のラット海馬から抽出した mRNA を混合してプローブ作成に用いた。逆転写酵素を用いて single strand cDNA に逆転写後、double strand cDNA を作成し、これを鋳型に T7 polymerase 反応を用いて biotin-rCTP を取り込ませた cRNA を作成した。この cRNA probe を glass microarray と hybridization 後、biotin に対する二次抗体に cyanine-3 を結合させた複合体と incubation を行った。結果の解析には、GMS417 を用いた。Real-time quantitative PCR マイクロアレイ法にて発現に顕著な違いが認められた insulin-like growth factor (IGFBP2) やこれに関連した遺伝子(IGF1、IGF2、IGF1receptor、IGF2receptor)の coding sequence を Gene Bank より検索し、これをデータに Primer Express ソフトウェアにて forward, reverse primer と TaqMan probe の塩基配列を設計し、各 primer や蛍光標識 TaqMan probe の合成を行った。このようにして作成したプライマーセットを使い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (SDS)を用いて PCR 反応を行い蛍光強度を計測後、SDS ソフトウェアで各遺伝子の定量を行った。

B-2 記憶・学習行動からみたストレス脆弱性の研究

飼育環境パラタイム 妊娠ラットを購入し、出産後の雄性仔ラットを用いた。生後 2 日から 22 日目までの 21 日間、毎日午前中 1 時間母子分離を行ったものを

母子分離群、誕生後通常環境下で養育したものを正常飼育群とした。母子分離後もしくは通常養育後に良好な環境下で飼育した群では、離乳後にケーン内に様々な玩具を設置して、自由に遊べる環境を作成した。

恐怖条件付けパラタイム 上記 4 群(正常飼育群、母子分離群、正常養育+良好な環境群、母子分離+良好な環境群)が成長後、生後 42~45 日の 4 日間で恐怖条件付けパラタイムを行った。ラットを実験用チャンパーに移し、3 分間の観察期間の後、2.8Hz、120db、20 秒の音刺激を行った。音刺激後再び 2 分間の観察期間を設け、最後に 0.8mA、4 秒の foot shock を行った。このパラタイムを 1 日 1 回連日 4 日間行い、行動の評価は一連のセッションをヒテオテープに記録し、2 人の評価者によって測定した。

新規環境での自発運動量測定パラタイム 上記 4 群が 6 週齢に成長した後、メルクエスト社の Scanet MV-10 にて、新規環境暴露後最初の 5 分間の自発運動量の測定を行った。

抗体アレイ法 正常飼育群 母子分離群について、上記恐怖条件付けパラタイムの 3 日目に 3 分間の実験チャンパーへの暴露(観察期間)の直後に断頭、海馬を摘出した。対照群、母子分離群、それぞれ 6 匹のラット片側海馬をホモシテナイストータルタンパク質を抽出した。2 群から得られたトータルタンパク質をそれぞれ半分に分け、各々 Cy5 または Cy3 で標識し、4 種類のサンプルを調製した。タンパク質の標識後、未結合色素をクロマトグラフィー(ケル慮過)で除去し、標識タンパク質を Antibody Microarray と共に 30 分間インキュベートした。その後、Microarray を洗浄、乾燥した後、スキャンし、結合した抗原を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いたストレスパラタイムについては、広島大学動物実験倫理委員会の許可を得ている。

C 研究成果

C-1 ストレス脆弱性関連遺伝子の検索

ラット海馬で正常飼育+成熟期急性拘束ストレス群に比べて母子分離+成熟期急性拘束ストレス群で、マイクロアレイによる検索から著しく発現が低下している IGFBP2 をはじめ IGF 情報系関連遺伝子の発現の検証を、正常飼育群・母子分離群・正常飼育+急性拘束ストレス群・母子分離+急性拘束ストレス群で real-time quantitative PCR 法を用いて行った。具体的には、insulin-like growth factor-1 (IGF1)、insulin-like growth factor-2 (IGF2)、insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R)、insulin-like growth factor-2 receptor (IGF2R) について検討した。その結果、IGFBP2, IGF1R の発現が母子分離+成熟期急性拘束ストレス群で成熟期急性拘束ストレス群に比して有意に減少しており、IGF1、IGF2、IGF2R においても減少していた。また、IGF1、IGF2、IGF1R、IGF2R の発現が母子分離群は正常飼育群に比して有意に減少していた。

C-2 記憶 学習行動からみたストレス脆弱性の研究

恐怖条件付けパラタイム 恐怖条件付けパラタイムの結果解析から第2日目では母子分離群で、正常飼育群・母子分離+良好な環境群と比較して freezing 時間は有意に減少していた。母子分離+良好な環境群では、正常飼育群と比較して、freezing 時間に有意な変化は検出されなかった。正常飼育+良好な環境群では、他の3群と比較して freezing 時間が有意に増加していた。第3日目では母子分離群で、他の3群と比較して freezing 時間は有意に減少していた。第4日目では4群間に、有意な Freezing 時間の差を認めなかった。

新規環境での自発運動量測定パラタイム 新規環境暴露後最初の5分間の自発運動量において、4群間で有意差を認めなかった。

抗体アレイ法 母子分離群と正常飼育

群との海馬での発現比較から、Arginase I、Bog、ZBP-89、Integrin β 3 (CD61)、ApoE のタンパク質の発現が顕著に低下していた。

D 考察

母子分離ストレスを経験して成長したラットは、正常飼育ラットに比して成熟期ストレス負荷に伴う IGFBP2, IGF1R の発現減少が海馬でみられることか明らかとなった。また、母子分離ストレスにより成熟期ラットにおいて海馬 IGF1、IGF2、IGF1R、IGF2R の発現が減少していた。このような結果は、母子分離によってストレス時のみならず非ストレス時でも、海馬 IGF1, IGF2 を介した情報系の機能低下が引き起こされることを示唆している。IGF 情報系は細胞の分化、増殖を促進し、脳の損傷や老化に対し保護的に作用することか知られている。従って本研究成果は、IGF 情報系の障害から由来する海馬機能の低下から、個体のストレス脆弱性が導かれる可能性を示している。今後は、IGF 情報系の機能低下によってどのような行動・中枢機能障害が引き起こされるのかを検討すると同時に、母子分離による情報系の機能障害が発達過程のどの時期から顕現化するのかなどの検討をしていく必要かあると思われる。

恐怖条件付けパラタイムの行動学的解析から、母子分離群での conditioned freezing 時間は正常飼育群に比して有意に減少しており、本結果は母子分離によって記憶・学習機能の低下か或いは不安行動が亢進することを意味している。しかしながら新規環境での自発運動量測定パラタイムの結果から、母子分離によって特に探索行動に変化のないことか示され、このような実験結果を総合してみると記憶・学習行動の低下が母子分離によって引き起こされていると考えられる。同時に良好な環境での飼育が母子分離による conditioned freezing 時間の減少を緩和していることか示され、良好な飼育環境は母子分離による記憶・学習機能の減弱を緩和する可能性のあることか示

唆された。

抗体アレイ法の結果から、母子分離群のラット海馬における Integrin β 3 (CD61) および ApoE のタンパク質の発現が対照群と比較して有意に低下していることが示された。これらの遺伝子の発現障害は、記憶・学習機能の障害と密接な関連をもっていることが報告されている。従って Western blot 法や免疫組織化学法による Integrin β 3 (CD61) および ApoE のタンパク質の発現に関する再解析が必要ではあるか、母子分離群におけるこれらのタンパク質の発現の減少か、母子分離による記憶・学習機能の減弱と関係していると思われる。

E 結論

本分担研究者らの初年度の研究結果から、以下のことが明らかになった。母子分離によって成熟期拘束ストレス曝露に対して脆弱であるストレス脆弱モデルラットの海馬では、成熟期ストレス負荷時・非ストレス負荷時に IGF 情報系の機能低下がみられ、海馬機能の障害に伴うストレス脆弱性の発現機序に関与している可能性が示された。

母子分離によって成熟期ラットの海馬を介した記憶・学習機能が低下し、母子分離後の良好な飼育環境によって記憶・学習機能の減少が緩和されること明らかとなった。母子分離に伴う海馬を介した記憶・学習機能の低下には、海馬での Integrin β 3 (CD61), ApoE 発現の低下の関連している可能性が示された。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

G-1 論文発表

- 1) Okada, G, Okamoto, Y, Morinobu, S, Yamawaki, S, Yokota, N Attenuated left prefrontal activation during a verbal fluency task in patients with depression Neuropsychobiology 47 21-26, 2003
- 2) Tsuji, S, Morinobu, S, Tanaka, K, Kawano, K, Yamawaki, S Lithium, but not valproate, induces the serine/threonine phosphatase activity of protein phosphatase 2A in the rat brain, without affecting its expression Journal of Neural Transmission 110 413-425, 2003
- 3) Katagiri, H, Kagaya, A, Kozuru, T, Jitsuiki, H, Kawano, K, Morinobu, S, Yamawaki, S Effect of repeated treatment with lamotrigine on locomotor activity and on DOI-elicited wet dog shakes in rats Biogenic Amines 17 149-159, 2003
- 4) Morinobu, S, Fujimaki, K, Kawano, K, Tanaka, K, Takahashi, J, Ohkawa, M, Yamawaki, S, Kato, N Influence of immobilization on stress on the expression and phosphatase activity of protein phosphatase 2A in the rat brain Biological Psychiatry 54 1060-1066, 2003
- 5) Kagaya, A, Okamura, H, Takebayashi, M, Akechi, T, Morinobu, S, Yamawaki, S, Uchitomi, Y Mood disturbance and neurosteroids in women with breast cancer Stress and Health 19 227-231, 2003
- 6) Suenaga, T, Morinobu, S, Kawano, K, Sawada, T, Yamawaki, S Influence of immobilization stress on the levels of CaMKII and phospho-CaMKII in the rat hippocampus International Journal of Neuropsychopharmacology 2004(in press)
- 7) Hasegawa H, Osada K, Misonoo A, Morinobu, S, Yamamoto H, Miyamoto E, Asakura M Chronic carbamazepine treatment increases myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation in the rat cerebral cortex via down-regulation of calcineurin A α Brain Res, 994, 19-26,

2003

- 8) Sawada T, Morinobu,S, Tsuji K, Kawano T, Watanabe T, Suenaga T, Yamawaki S, Nishida A Reduction in levels of amphiphysin1 mRNA in the hippocampus of aged rats subjected to repeated variable stress Neuroscience, in press
 - 9) 岡田剛, 森信繁, 山脇成人 ECTとTMSの作用機序—生化学的研究から—臨床精神医学 32 245-251, 2003
 - 10) 田村達辞, 田中和秀, 森信繁, 大川匡子, 山脇成人 統合失調感情障害の薬物治療に関する最近の進歩。臨床精神医学 32 871-876, 2003
 - 11) 白尾直子, 岡本泰昌, 岡本百合, 大田垣洋子, 森信繁, 山脇成人 摂食障害患者と健常者における負の身体イメージ・負の情動に関連した単語と中性の単語の評価の検討。脳と精神の医学 14 141-147, 2003
 - 12) 田中和秀, 森信繁, 大川匡子, 山脇成人 気分障害治療のための合理的薬物選択アルゴリズムの開発。脳の科学 25 1031-1038, 2003
- G-2 学会発表**
- 1) 山下英尚, 藤川徳美, 岡本泰昌, 倉田健一, 森信繁, 山脇成人 中高年女性の気分障害罹患と子宮・卵巣手術の関連 第99回日本精神神経学会総会 2003/5 (東京)
 - 2) 旭修司, 岡本泰昌, 岡田剛, 森信繁, 山脇成人 大うつ病患者のresponse inhibitionに関連した脳機能評価-fMRIを用いた検討 第99回日本精神神経学会 2003/5 (東京)
 - 3) 田村達辞, 森信繁, 菅原幸子, 辻誠一, 末永貴美, 渡辺隆之, 川野樹一郎, 山脇成人 拘束ストレスからラット大脳皮質前頭部におけるphospho-CREBとphospho-ATF-2に及ぼす影響 第25回日本生物学的精神医学会 2003/4 (金沢)
 - 4) 森信繁, 辻誠一, 高橋淳, 田中和秀, 藤巻康一郎, 大川匡子, 山脇成人, 加藤進昌 成熟期ラット海馬のストレス性CREBリン酸化—脱リン酸化反応に対する母子分離の影響 第25回日本生物学的精神医学会 2003/4 (金沢)
 - 5) 世木田幹, 山下英尚, 岡本泰昌, 森信繁, 山脇成人 うつ病患者における急性ストレス負荷のMMNに対する影響 第25回日本生物学的精神医学会 2003/4 (金沢)
 - 6) 旭修司, 岡本泰昌, 岡田剛, 森信繁, 山脇成人 大うつ病患者におけるresponse inhibitionに関連した脳活動-fMRIを用いた検討— 第25回日本生物学的精神医学会 2003/4 (金沢)
 - 7) 加賀谷有行, 川野樹一郎, 森信繁, 山脇成人 クリオーマ由来培養細胞におけるフッ化ナトリウムによる細胞障害の検討—細胞内カルシウムの関与の可能性— 第33回日本神経精神薬理学会 2003/10 (奈良)
 - 8) 渡辺隆之, 森信繁, 草加耕司, 山脇成人 ラットの記憶・学習機能におよぼす生育環境の影響—行動解析と海馬の遺伝子発現からの検討— 第33回日本神経精神薬理学会年会 2003/10 (奈良)
 - 9) 草加耕司, 森信繁, 倉田健一, 渡辺隆之, 岡本泰昌, 加賀谷有行, 山脇成人 母子分離ストレスに伴うラット海馬での細胞内Ca²⁺動員の変化 第33回日本神経精神薬理学会 2003/10 (奈良)
 - 10) 久岡一恵, 西田朗, 前正秀宣, 甲田徹三, 岡本泰昌, 森信繁, 山脇成人, 土岡麻美, 仲田義啓 セロトニンによるC6細胞からのGDNF(glial cell line-derived neurotrophic factor)遊離増加作用 第33回日本神経精神薬理学会 2003/10 (奈良)
 - 11) 松岡龍雄, 小鶴俊郎, 小早川英夫, 高見浩, 佐伯俊成, 森信繁, 山脇成人 市販の外用殺菌消毒薬(マキロン)にて急性心筋障害を来した2症例 第16回日本総合病院精神医学会

総会 2003/11 (京都)

- 12) Yamashita,H , Mori,K , Nagao,M ,
Okamoto, Y, morinobu,S,
Yamawaki,S Effects of atypical
antipsychotic drugs on the quality of
sleep in elderly patients with
schizophrenia ICGP 3rd Annual
Meeting, December12-14, 2003
(Puerto Rico)

H 知的所有権の出願 取得状況

該当事項なし。

養育行動が仔ラットに与える長期的影響と養育行動の神経基盤

分担研究者 神庭重信 山梨大学大学院医学工学総合研究部精神神経医学 教授

研究協力者 金子奈穂子、工藤耕太郎

研究要旨 ストレス脆弱性は養育環境か脳の発達に長期的な弊害をもたらすことによって作られると考えられる。母子分離ストレスか、不安の強さ、学習能力の低さと結びついていることは行動科学的に明らかにされているか、そのメカニズムは不明のままであった。そこで母子分離ストレス負荷ラットを用いて、ストレス脆弱性と関連する遺伝子、遺伝子転写調節因子、神経新生について検討する。次に、明らかになった分子細胞学的メカニズムをレスキューするような物質を探索する。具体的なターゲットを、海馬神経細胞に置き、1) 養育環境か作り出すストレス反応性の分子神経科学的解明とその修復過程を促す薬物、2) うつ病を起こすことか知られているインターフェロンの傷害機序とその修復、3) 放射線照射による傷害とその修復過程を促す薬物の開発を目指した。心因性精神障害の神経科学的機序として注目されている、海馬歯状回の神経新生の調節の一端を明らかにした。また、神経新生障害を予防するあるいは修復する介入や新薬のシートを見いたした。これらの結果を基に、これまでにない作用機序をもつ自殺予防薬の開発の可能性か開けた。

A 研究目的

ストレス脆弱性は養育環境か脳の発達に長期的な弊害をもたらすことによって作られると考えられる。母子分離ストレスか、不安の強さ、学習能力の低さと結びついていることは行動科学的に明らかにされているか、そのメカニズムは不明のままであった。そこで母子分離ストレス負荷ラットを用いて、ストレス脆弱性と関連する遺伝子、遺伝子転写調節因子、神経新生について検討する。次に、明らかになった分子細胞学的メカニズムをレスキューするような物質を探索する。

具体的なターゲットを、海馬神経細胞に置き、1) 養育環境か作り出すストレス反応性の分子神経科学的解明とその修復過程を促す薬物、2) うつ病を起こすことか知られているインターフェロンの傷害機序とその修復、3) 放射線照射による傷害とその修復過程を促す薬物の開発を目指した。

B 研究方法

B-1 生後3日の pup を毎日 15 分間、5 日間に渡りハントリンクし、生後 21 日目に拘束ストレスを 60 分与えた。ストレスに対して海馬の神経新生かどのように変化するかを、BrdU を用いた免疫組織化学的手法で観察した。

B-2 インターフェロンを経静脈的に 5 日間連続投与し、1) と同じ手法で、海馬神経新生への変化を観察した。

B-3 放射線照射による海馬神経幹細胞の障害を、HSP70 の誘導物質か保護作用を発揮するかどうかを観察した。ある種の誘導物質を 3 種類の用量で 5 日間連続投与し、1) と同様の手法で神経新生細胞を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究で行った動物実験は、すべて

山梨大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

C 研究結果

C-1 対照群に対し、ハントリンク群では、拘束ストレス負荷時に海馬神経新生が増加した。

C-2 インターフェロンは 5000IU 投与により、海馬歯状回の神経新生を抑制した。また、海馬歯状回のアストログリアと思われる細胞でインターロイキン-1 が増加した。インターロイキン-1 が神経新生障害につながるのか考えられた。

C-3 放射線は 5G の照射により、海馬神経新生を有意に減らした。この際、HSP70 の誘導物質 X は、用量依存性にこの減少を抑制した。

D 考察

ストレスにより抑制され、それか心因性精神障害の発症と関わるのか予想される海馬歯状回の神経新生を修復する手段の開発は、自殺の予防を目的とした創薬の新たな方向である。この仮説に立って、神経新生を促進する操作を様々な角度から検討した。その結果、よりよい養育環境を準備すること、インターロイキン-1 受容体拮抗薬や HSP70 の誘導物質かあらたな心因性精神障害の予防ないし治療手段となりうること、さらには心因性精神障害と関連する自殺の予防薬となりうるのか明らかとなった。

E 結論

本研究の結果から、1) よりよい養育環境を準備すること、2) インターロイキン-1 受容体拮抗薬や HSP70 の誘導物質、かあらたな心因性精神障害の予防ないし治療手段となりうるのか明らかとなった。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 発表論文

- 1) Horiuchi J, Saigusa T, Sugiyama N, Kanba S, Nishida Y, Sato Y, Hinuma S, Arita J Effects of prolactin-releasing peptide microinjection into the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity in rats Brain Res 958, 201-209, 2002
- 2) Suzuki E, Nakaki T, Shintani F, Kanba S, Miyaoka H Antipsychotic, antidepressant, anxiolytic, and anticonvulsant drugs induce type II nitric oxide synthase mRNA in rat brain Neurosci Lett, 333, 217-219, 2002

ストレス暴露による神経形態変化の分子機構に関する研究

分担研究者 尾藤晴彦 東京大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨 ストレス脆弱の分子機構を解明することを目標とし、ストレス暴露時において興奮性神経細胞の樹状突起スパイン形態変化に関与する分子機構について探索するためのスライス培養実験系を確立した。また興奮性神経細胞の一例として小脳顆粒細胞を取り上げ、その形態形成を制御するRho伝達系を解明した。

A 研究目的

分担研究者らのこれまでの仕事により、中枢神経系の興奮性神経細胞のアクチン細胞骨格制御に関与する分子機構に関する多くの知見が積み重ねられている。特に本研究では、ストレス暴露時におけるこれら意義を特に探求する。特に、1) 海馬興奮性神経細胞における活動依存的アクチン再編成の分子機構の解明、ならび2) 興奮性神経細胞におけるアクチン制御分子の探索を重点的に行う。

B 研究方法

B-1 海馬興奮性海馬興奮性神経細胞における活動依存的アクチン再編成の分子機構の解明

海馬スライス培養系を立ち上げ、海馬内神経回路が保たれた状態での神経活動を持続的にモニターできるシステムを開発し、遺伝子銃やアテノウイルスを用いた遺伝子導入法により、GFPやGFP-actin cDNAを海馬錐体細胞に発現させ、神経刺激下でのアクチン細胞骨格再編成を可視化した。

B-2 興奮性神経細胞におけるアクチン制御分子の探索

興奮性神経細胞のアクチン細胞骨格制御を司る分子の一端を明らかにするため、種々の情報伝達分子、特に低分子量G蛋白のエフェクターやCaMキナーゼファミリー分子のcDNAを小脳顆粒細胞へ過剰発現させ、神経細胞形態への変化を定量した。

（倫理面への配慮）

DNA組換え実験ならびに動物実験に関しては、東京大学医学部の該当の委員会に申請を行い、認められたプロトコールに基づいて実験を行った。

C 研究結果

本年度の実験により、分散培養のみならず、スライス培養系においても、海馬錐体細胞のスパインが活動依存的細胞骨格再編成の極めて活発である部位であることを証明しつつある(Bito et al, 未発表データ)。また、突起形成初期の分子機構を解明する目的で、小脳顆粒細胞神経突起モデルを選び、その形成・伸展機構を探索した結果、Rho結合キナーゼならびにformin蛋白mDia1の必須な砂機能を同定した(Arakawa et al, J Cell Biol, 2003, Bito, J Biochem, 2003)

一方、このようなシナプス特異的細胞骨格修飾を担う分子として CaMK 群に着目し、新規キナーゼ CLICK-III を単離同定した(Takemoto-Kimura et al, JBC, 2003, Bito and Takemoto-Kimura, Cell Calcium, 2003)。本分子は、不安情動を司る中枢である扁桃体の中心核に特異的に発現すること、またその過剰発現により神経突起形成亢進がみられることから、活動依存的細胞骨格修飾を担う分子機構の一端に位置する可能性が出てきた。そこで、その遺伝子破壊マウスの作成に着手し、現

在目的遺伝子断片を欠損したマウス ES細胞の樹立に成功した(Takemoto-Kimura, 未発表データ)。

D 考察

本研究は、ストレス脆弱の分子機構を解明することを大きな目標の一つとしている。近年の研究により、ストレス

最も高い脳部位である海馬において、ストレス暴露時において樹状突起スパインの著しい形態変化が生じることが報告されている。実際、我々はin vitroの分散培養系を用い、ストレス暴露時の過剰なシナプス刺激を模倣するNMDA受容体刺激を与えたところ、シナプスへのアクチン細胞骨格の集積を世界で初めて可視化することに成功した。本年度はスライス培養において、この現象が普遍的に起こることか示唆された。このことから、培養細胞系に過剰神経活動を与え、誘導される細胞骨格再編成を蛍光イメージングし、分子機構を探索していく手法の有効性・重要性が再確認された。

E 結論

活動依存的アクチン集積のストレス暴露時における役割を明らかにするための実験系を完成させ、さらに具体的な興奮性神経細胞において、Rho標的分子mDiaによるアクチン制御の意義を解明した。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

G-1 論文発表

- 1) Takemoto-Kimura S, Terai H, Takamoto M, Ohmae S, Kikumura S, Segi E, Furuyashiki T, Arakawa Y, Narumiya S, Bito H Molecular cloning and characterization of CLICK-III /CaMKII α , a novel membrane-anchored neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) J Biol Chem 278 18597-18605, 2003
- 2) Arakawa Y, Bito H, Furuyashiki T, Tsuji T, Takemoto-Kimura S, Kimura K, Nozaki K, Hashimoto N, Narumiya S Control of axon elongation via an SDF-1 α / Rho / mDia pathway in cultured

- cerebellar granule neurons J Cell Biol 161 381-391, 2003
- 3) Matsuoka Y, Furuyashiki T, Bito H, Ushikubi F, Tanaka Y, Kobayashi T, Muro S, Satoh N, Kayahara T, Higashi M, Mizoguchi A, Shichi H, Fukuda Y, Nakao K, Narumiya S Impaired adrenocorticotrophic hormone response to bacterial lipopolysaccharide in mice deficient in prostaglandin E receptor EP1 and EP3 subtypes Proc Nat Acad Sci USA, 100 4132-4137, 2003
- 4) Bito H, Takemoto-Kimura S Ca²⁺/CREB/CBP-dependent gene regulation a shared mechanism critical in long-term synaptic plasticity and neuronal survival Cell Calcium, 34 425-430, 2003
- 5) Bito H Dynamic control of neuronal morphogenesis by Rho signaling J Biochem 134, 315-319, 2003
- 6) 尾藤晴彦 ROCKインヒビター-神経再生ならびに神経変性防止におけるあらたな創薬標的。医学のあゆみ。208 469-473, 2004
- 7) 奥野浩行, 竹本-木村さやか, 大前彰吾, 岡村理子, 石原奈津実, 尾藤晴彦 シナプス活動による遺伝子発現制御。(蛋白質核酸酵素 増刊号) 蛋白質核酸酵素 49 411-418, 2004
- 8) 尾藤晴彦, 竹本-木村さやか, 大前彰吾, 古屋敷智之, 奥野浩行 Ca²⁺とCaMキナーゼによるシナプス可塑性制御。(実験医学増刊号no 102「脳神経研究2004」pp 119-124実験医学21 2393-2398, 2003
- 9) 尾藤晴彦, 荒川芳輝 中枢神経細胞における突起形態制御機構。脳神経外科速報 13 845-850, 2003
- 10) 古屋敷智之, 成宮周, 尾藤晴彦 神経細胞におけるアクチン細胞骨格系の制御in 動くシナプスと神経ネットワーク(塩坂貞夫編、金芳堂)pp 25-34, 2003

G-2 学会発表

- 1) Bito H, Arakawa Y, Furuyashiki T, Takemoto-Kimura S, Narumiya S Dynamic and activity-dependent control

- of neuronal actin cytoskeleton J PHARMACOL SCI 91 21P Suppl 1 2003 (第76回日本薬理学会年会、福岡、3/24-26, 2003) symposium
- 2) Bito H Molecular mechanisms controlling actin reorganization during neurite remodeling J PHARMACOL SCI 91 10P Suppl 1 2003 (第76回日本薬理学会年会、福岡、3/24-26, 2003) 学術奨励賞受賞講演
 - 3) Takemoto-Kimura S, Terai H, Furuyashiki T, Arakawa Y, Kikumura S, Narumiya S, Bito H Regulation of CREB activity by CaMK Jpn J Physiol Suppl S68-3, 2003 (第80回日本生理学会大会、福岡、3/24-26, 2003) symposium
 - 4) Bito H, Arakawa Y, Narumiya S Control of axon elongation by SDF-1a/Rho/mDia signaling in cerebellar granule neurons 3rd HFSP Awardees' Meeting (Cambridge, UK, July 6-9) Abstracts Book p 36, poster
 - 5) Arakawa Y, Bito H, Furuyashiki T, Tsuji T, Takemoto-Kimura S, Nozaki K, Hashimoto N, Narumiya S Control of axon elongation via an SDF-1a/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons Neurosci Res S46, O-062, 2003 (第26回日本神経科学学会、7/23-25, 2003、名古屋) 口頭
 - 6) Takemoto-Kimura S, Terai H, Takamoto M, Ohmae S, Kikumura S, Segi E, Arakawa Y, Furuyashiki T, Narumiya S, Bito H CLICK-III, a novel neuronal CAMK, is localized to membrane compartments via CAAX motif Neurosci Res S53, O-105, 2003 (第26回日本神経科学学会、7/23-25, 2003、名古屋) 口頭
 - 7) Nonaka M, Tanaka A, Doi T, Fujiyoshi Y, Takemoto-Kimura S, Bito H The ligand dependent synaptic clustering of PSD-95 and its role in neuronal function Bull Jpn Soc Neurochem 42 326, N022, 2003 (第46回日本神経化学会大会、9/24-26, 2003、新潟) ミニシンポジウム。
 - 8) Arakawa Y, Bito H, Furuyashiki T, Takemoto-Kimura S, Yamana N, Nozaki K, Hashimoto N, Narumiya S A critical role for SDF-1a/Rho pathway in control of axon outgrowth and elongation in cultured cerebellar granule neurons Seikagaku 75 732, 3S47-2, 2003 (第76回日本生化学会 10/15-18, 2003, 横浜) シンポジウム
 - 9) Takemoto-Kimura S, Terai H, Narumiya S, Bito H Characterization of CLICK-III/CAMK1g, a novel membrane-anchored neuronal CaMK Seikagaku 75 812, 2P-221, 2003 (第76回日本生化学会 10/15-18, 2003, 横浜) 口頭
 - 10) Arakawa Y, Bito H, Tomoyuki F, Tsuji T, Takemoto-Kimura S, Nishino T, Yamana N, Nozaki K, Hashimoto N, Narumiya S Control of axon elongation via an SDF-1a/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons Soc Neurosci Abstr 29 885 7, 2003 (第33回北米神経科学学会, New Orleans Nov 8-13, 2003) poster
 - 11) Takemoto-Kimura S, Terai H, Takamoto M, Ohmae S, Kikumura S, Segi E, Arakawa Y, Furuyashiki T, Narumiya S, Bito H Molecular cloning and characterization of CLICK-III/CAMK1g, a novel membrane-anchored neuronal CaMK Soc Neurosci Abstr 29 898 3, 2003 (第33回北米神経科学学会, New Orleans, Nov 8-13, 2003) poster
 - 12) 尾藤晴彦 神経細胞の形態形成とRhoシグナリング。第26回日本医学会総会学術講演要旨集P 184, 4-8-S-1-3, 2003 (第26回日本医学会総会、4/4-6, 2003、福岡) シンポジウム発表。
 - 13) 竹本-木村さやか, 寺井久司, 成宮周, 尾藤晴彦 新規膜アンカー蛋白質、CLICK-III/CaMK1gのクローニング及び制御機構の解析。脂質生化学研究 45 236-237 (III-07), 2003 (第45回日本脂質生化学会6/20-21, 2003, 仙台) 口頭発表。
- H 知的財産権の出願・登録状況
該当事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

ストレス性精神障害の病態に関する脳機能画像解析研究

分担研究者 岡本泰昌 広島大学大学院医歯薬学総合研究科（精神神経医科学） 講師

研究要旨 今回、われわれはストレスへの適応強化のための心理機制として、予期と心像生成(Imagery)に着目し、その脳機能局在について検討を行った。その結果、健常者では快刺激の予期と左前頭前野の活動、不快刺激の予期と右前頭前野の活動が関連していることか示唆されたか、これに対してうつ病患者では左前頭前野の活動低下、右前頭前野・帯状回前部腹側領域を含む活動亢進か示唆された。さらにアレキシサイミアでは未来の楽しいイメージを生成する際に後帯状回の活動低下しており、感情を伴うエピソード記憶の利用が乏しい可能性か示唆された。今回得られた所見は、ストレス事象に対する適応を理解し、ストレス適応を強化するための方策を検討していく上で、基礎となるものと考えられた。

A 研究目的

多くの精神障害の発症、症状形成や持続にストレスが関与している。特にストレス関連障害においては脳内のストレス適応機構の破綻した状態と考えられ、適応の脳内機構に関する検討は、精神障害の発症機序 治癒過程の解明につながると思われる。このような観点から、われわれはストレスの適応破綻の脳内メカニズムを明らかにするために、機能的磁気共鳴画像法(functional Magnetic Resonance Imaging fMRI)と脳磁場計測法(Magnetoencephalography MEG)といった脳機能画像解析手法を用いて、様々な急性のストレスにより sensory gating system の適応的变化が生じること、ストレス関連疾患ではこの変化がみられないこと、ストレスの種類や快 不快といった刺激の種類によって反応する脳の laterality が異なることなどを明らかにしてきた。これまでの研究に引き続いて、われわれは、幼少時期に体験されるストレスが成人期に発症するストレス関連障害の危険因子となること、幼少時期に体験されるストレスは Inescapable ストレスであること、Inescapable ストレスに曝されることに対して再度ストレスに曝された時に不適応的行動(回避できない)を示す(学習性無力理論)ことなどから、Inescapable ストレスの認知に関する脳内機構について検討を行う。さらにストレスへの適応強化のための心理機制として、予期と心像生成(Imagery)に着目し、その脳機能局在について検討を行う。

B 研究方法

B-1 健常者を対象とした Inescapable ストレスの認知に関する脳内機構

健常成人を対象として painful てないか

untolerable な嫌悪的な音(3000Hz, 90dB)の暴露下で、コールに到達できる確率を変化させた迷路を行い、コールに到達すると嫌悪的な音か止まる課題を作成する。escapable ストレス条件としてはコールに到達しやすい、inescapable ストレス条件としてコールに到達しえない状況を設定する。脳活動の側定は、inescapable ストレス条件と escapable ストレス条件での比較、inescapable ストレス条件で inescapable となる過程、予め inescapable ストレス条件と escapable ストレス条件を体験した後の escapable 条件下での比較などについて、fMRI、MEG、NIRS を用いて行う。

B-2-1 健常者およびうつ病者を対象としたストレス予期の機能局在に関する fMRI を用いた検討

うつ病患者 6 例と年齢、性をマッチングさせた健常者 6 例を対象に、1.5T の MRI 装置(島津 Marconi 社製)を用い、予期的反応時間課題遂行時の fMRI を撮像した。課題は、二つ 1 組の刺激(予告刺激 S1 と標的刺激 S2)を一定の刺激間隔(4sec)でモニターに呈示し、S2 後にボタン押し反応をさせた。S1 刺激として、○、△、□の幾何学図形を呈示した(100msec)。S2 刺激として、異なる情動価(快/不快/中性、各 30 枚)を持つスライトを呈示した(2sec)。被験者は、○-快、△-不快、□-中性のように S1-S2 の組み合わせを固定した条件(予期可能条件)と、S1-S2 の組み合わせがランダムな条件(予期不可能条件)を交互に行った。解析は SPM99 を用い、予期可能条件と予期不可能条件の時の脳活動領域についてうつ病群および健常対照群について比較検討した。

B-2-2 アレキシサイミアを対象としたイメージ

による感情誘導に関連した脳機能局在の検討

The 20-item Toronto Alexithymia Scale (TAS-20)によって2群に分かれた男性ボランティア22例(アレキシサイミア11例、非アレキシサイミア11例)を対象に、1.5Tの島津Marconi社製のMRI装置を用い、以下の課題を遂行中のfMRIを撮像した。被験者にはあらかじめ過去および未来における楽しい、悲しい、中性の体験をキーワードとともに1つずつあげてもらった。Activation条件ではそれらの体験を画面の指示に従ってイメージしてもらい、baseline条件では提示された+の表示をみるだけで何もイメージを浮かべない安静状態とした。両条件を交互に繰り返すフロンクテサインとし、解析はSPM99を用いて行なった。アレキシサイミア群と非アレキシサイミア群の間での脳活動の差について比較検討した。

(倫理面への配慮)

被験者に対しては研究内容について十分な説明を行い文章にて同意を得た。本研究は広島大学医学部倫理委員会にて承認を受けている研究計画に基づいて実施した。

C 研究成果

C-1 現在、課題の作成の準備段階にあり、次年度より作成した課題を用いて健常者を対象とした行動実験を行い、様々な比較条件下での脳活動について検討を行いたい。

C-2-1 予備的な結果ではあるが、健常者では予期可能条件では予期不可能条件と比較して、前頭前野の領域(内側前頭前野、腹外側前頭前野、背外側前頭前野)で有意な活動上昇を認めた。また、快刺激の予期には左前頭前野(左背外側前頭前野、左内側前頭前野)か、不快事象の予期には右前頭前野(右腹外側前頭前野、右内側前頭前野)、扁桃核、帯状回前部腹側領域および両側の視覚野(左右後頭葉、右嗅部、左舌状回)か関連していることが示された。これに対して、うつ病では、快刺激の予期に関連した左前頭前野の活動が低下し、不快刺激の予期に関連した右腹外側前頭前野の活動低下、右内側前頭前野、帯状回前部腹側領域の活動が亢進していた。

C-2-2 未来の楽しい場面のイメージ生成時に、アレキシサイミア群は非アレキシサイミア群と比較して有意に後帯状回の活動が低くなってい

た。

D 考察

健常者を対象としたInescapableストレスの認知に関する脳内機構の研究結果から、将来の情動刺激予期における前頭前野の役割が示唆された。また、左前頭前野の活動は快刺激の予期と関連し、一方で、右前頭前野の活動は不快刺激の予期と関連していることが示唆された。さらに、扁桃核および帯状回前部腹側領域が、不快刺激の予期に重要な役割を果たしており、視覚野におけるネガティブな情報の入力を調節していると考えられる。うつ病患者では左前頭前野の活動性が低下しており、将来に生じる事象のポジティブな評価が困難であることが考えられる。また、右前頭前野・帯状回前部腹側領域を含む脳内ネットワークの機能異常により、将来に生じるネガティブ事象の重要性の評価や入力処理の機能に異常がある可能性が示唆された。アレキシサイミアを対象としたイメージによる感情誘導に関連した脳機能局在の検討結果と、後帯状回は脳機能画像研究で感情刺激時やエピソード記憶の想起時に活動するという報告をあわせ考えると、アレキシサイミアでは、非アレキシサイミアと比較して未来の楽しいイメージを生成する際に感情を伴うエピソード記憶の利用が乏しく、イメージを用いた肯定的感情の生成が困難になっている可能性が示唆された。イメージを思い浮かべることは、感情のコントロールに重要な役割を担っていると考えられるか、本研究によりイメージによる感情誘導の個人差と性格傾向との関連が明らかにすることかできた。

E 結論

今回、われわれはストレス事象に対する適応を強化する因子として予期や心像生成といった心理機制の脳機能局在について明らかにした。得られた所見は、ストレス事象に対する適応を理解し、ストレス適応を強化するための方策を検討していく上で、基礎となるものと考えられた。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

G-1 論文発表

- 1) Okada G, Okamoto Y, Morinobu S, Yamawaki S, Yokota N Attenuated Left Prefrontal Activation during a Verbal Fluency Task in Patients with Depression *Neuropsychobiology* 47 21-26, 2003
- 2) Ueda K, Okamoto Y, Okada G, Yamashita H, Horii T, Yamawaki S Brain activity during expectancy of emotional stimuli: An fMRI study *NeuroReport*, 2003 14, 51-55
- 3) Shirao N, Okamoto Y, Okada G, Okamoto Y, Yamawaki S Temporomesial activation in young females associated with unpleasant words concerning body image *Neuropsychobiology* 48 136-142, 2003
- 4) Tanaka T, Doya K, Okada G, Ueda K, Okamoto Y, Yamawaki S Different Cortico-Basal Ganglia Loops Specialize in Reward Prediction on Different Time Scales *Neural Information Processing Systems Foundation* 2003
- 5) Asahi S, Okamoto Y, Okada G, Yamawaki Y, Yokota N Negative correlation between right prefrontal activity during response inhibition and impulsiveness: a fMRI study *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* (in press)
- 6) Okada G, Okamoto Y, Ueda K, Yamawaki S, Doya K Selection between small, immediate rewards and large, delayed rewards in prediction of future reward: An fMRI Study (in submitted)
- 7) Yamashita H, Okamoto Y, Morinobu S, Yamawaki S Seppo Kahkonen Visual emotional stimuli modulate auditory sensory gating studied by magnetic P50 suppression (in submitted)
- 8) Shirao N, Okamoto Y, Okada G, Ueda K, Yamawaki S Gender differences in brain activity toward unpleasant linguistic stimuli concerning interpersonal relationships: an fMRI study (in submitted)
- 9) Shirao S, Okamoto Y, Mantani T, Okamoto Y, Yamawaki S Gender differences in brain activity toward unpleasant word stimuli concerning body image: an fMRI study (in submitted)
- 10) Mantani T, Okamoto Y, Okada G, Shirao N, Yamawaki S Neural correlates of imagery disturbance in men with alexithymia: a fMRI

study (in submitted)

H 知的所有権の出願・取得状況

なし

乳幼児の発達に及ぼす母子相互作用の影響に関する神経心理学的研究

分担研究者 利島 保 広島大学大学院教育学研究科 教授

研究要旨

うつ病などのストレス性精神障害に関して、人生のこく初期の、乳幼児と母（もしくは特定の養育者）との愛着関係の不安定さか、後の人生で起こる精神障害や不適応行動の原因ではないかといわれる。しかし、この母子相互作用が乳幼児の脳の発達に及ぼす働きを実証的に調べた研究はほとんどない。本研究は愛着障害を持つ乳幼児や健常児および成人との脳機能イメージングデータの比較を通して、母子相互作用が脳機能の発達に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。本研究の開始にあたり、広島乳児院（広島県下で虐待を受けた乳幼児や児童が保護されている施設）から研究協力の許可を得た。職員や乳幼児との信頼関係形成のために日常業務のボランティアとして通所する傍ら、行動観察により、愛着障害を持つ乳幼児の身体的成長や言語的発達の遅れ、高ストレス状況下での自傷行為、不眠、摂食異常、無表情、無反応といった行動特徴を確認した。上記と並行し、健常児や成人を対象とした母子相互作用の基礎となる多感覚的な情報処理の脳機能データとして、近赤外分光法を用いた視覚・嗅覚処理に関する脳活動の検討を行った。

A 研究目的

平成15年10月1日より、表題の研究課題に着手した。この研究課題は、こころの健康科学研究事業として行っている「ストレス性精神障害の病因解明と予防法開発」の一部を担うものである。うつ病などのストレス性精神障害に関して、人生のこく初期の段階で、乳幼児と母（もしくは養育者である特定の他者）との愛着関係の不安定さか、後の人生でのストレスに対する脆弱性、すなわち精神障害や不適応行動の原因となるのではないかといわれている。こういった仮説は古くは心理学者 Bowlby (1969) をはじめ多くの心理学研究者によって提唱されてきた。しかし、脳機能という観点からみると、どのようなメカニズムが障害の発生原因となっているのかについてはいまだよくわかっていないという現状である。この点について Schore (1994) は、脳機能の発達という観点から、人生初期の母子相互作用に、乳幼児の眼窩前頭回を中心としたストレス対処に関わる脳機能の発達を促す働きがあるという仮説を唱えた。しかし、実際に乳幼児を対象に母子相互作用と脳機能の発達を調べた研究はほぼ皆無といってよく、実証的なデータを示した研究が求められている。

実際に人生の早期に望ましい母子相互作用を得られなかった経験を持つ乳幼児として、親の養育放棄によって十分なケアを受けられ

なかった被虐待児が存在する。親が子供の情緒的なニーズを無視し（不安を感じているときに安心させたり、愛情のこもった愛撫したりといった行為を行わない）、養育や教育を行わないことは「ネグレクト」と呼ばれる。ネグレクト児は、その典型的な問題として、身体的、精神的発達遅滞、うつ状態、愛着障害を呈するといわれる。本研究では、こうしたネグレクト児と健常児の脳の発達を、以下に記述する近赤外分光法と呼ばれる脳機能イメージング法を客観的尺度として用いて比較することで、母子相互作用の有無が脳機能の発達に及ぼす影響を実証的に検討する。

B 研究方法

乳幼児を対象とした発達研究では、これまで観察法（自然／実験的観察法）や選好住視法、馴化・脱馴化法を用いた研究が数多く行われてきた。いずれも乳幼児の行動の観察と分析を通して、内的に起こっている発達の変化を間接的に捉えようとしたものである。これらの方法は現在でも乳幼児の発達を捉えるために有効であることに変わりはないが、脳機能の発達を捉えるためには推測に依存する部分が大きく、やや力不足な感が否めない。これに対して近年、乳幼児の脳内で起こっている変化をより直接的に捉えるためのイメージング法が開発された。近赤外分光法（near-infrared spectroscopy, NIRS）と呼ばれる方法

かそれである。近赤外分光法は、頭皮を經由して近赤外光を照射し、皮質表面を通過してきた近赤外光の減衰率からその皮質部分の酸化・脱酸化ヘモグロビンおよび総ヘモグロビンの変化量を計測する方法である。これらの変化量を通し、どの皮質部分が働いているのかを可視化することか出来る。既存の脳機能イメージング法として、核磁気共鳴法や脳磁図、陽電子放射断層撮影があるか、乳幼児にはこれらの方法の適用は難しい。その理由は第一に、わすかでも侵襲性かあると考えられる方法は倫理的に適用することか難しいことである。第二の理由として、乳幼児に対しては、これらのイメージング法にとって破壊的な影響を与える運動アーチファクトの統制か難しい点かあげられる。乳幼児に「安静にしてください」と伝えて、そうしてしてくれる子供は皆無かと言ってよい。また拘束帯なとて締め付けたり、薬品を用いて安静にさせたりすることにはやはり倫理的な問題かつきまとう。その点 NIRS は、情報キャリアとして人体に全く無害な光を用いており、またその光信号の照射・導入センサか非常に小型で直接頭部に装着可能であるため、身体運動アーチファクトを比較的キャンセルしやすい。このため乳幼児の脳機能イメージング法の最も有力な候補として期待か寄せられている。以上の理由から、本研究でもこの NIRS を用いることとした。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に当たり、乳幼児の母親に研究目的、具体的な研究内容の説明と測定装置の安全性について説明し、研究協力の同意得た後、同意書に署名をしてもらい、乳児に研究参加してもらった。また、本研究の目的・計画並びに協力者への同意手続きを具体的に述べた研究倫理申請書を、平成 15 年 9 月 4 日広島大学大学院教育学研究科倫理審査委員会に申請し、倫理審査結果について承認を得た。

C 研究結果

ネグレクト児の現状については、2003 年 2 月 12 日、NHK による「クローズアップ現代『赤ちゃんか笑わない』』という番組で広島乳児院の事例か全国的に紹介され大きな反響を呼んだ。この施設は、広島県下で虐待を受けた乳幼児か児童か保護されている施設である。本研究の開始にあたって、まずこの施設から研究協力の許可を得ることから始めた。広島乳児院の母体である広島修道院 河野澄子理事長および広島乳児院 山元喜久江院長の研究協

力許可を得ることか出来た。

現在、乳児院に通所し養育業務の補佐を行う傍ら、ネグレクト児の行動観察を続けている。また 2003 年 12 月以降、施設内ケース会議に出席する許可か得られ、担当者の気づき報告を聞き、ケース対応に協力する機会も得られるようになった。これらの経験から、同施設に保護されている乳幼児について、愛着障害（見知らぬ人に不安を感じない）、身体的成長か言語的発達の遅れ、高ストレス状況下での自傷行為（床などに頭を激しく打ち付ける、身体の一部を噛む）、不眠、摂食異常（むさぼり食いとその後のか嘔吐）、無表情、無反応といったネグレクト児の行動特徴を確認することか出来た。またこうした施設は問題を抱える家族か乳幼児のプライハシーについて非常にデリケートな問題を扱っている。そのため現在も継続して業務補佐か行動観察を続けつつ、職員および乳幼児とのラポール（信頼関係）形成に努めている。その結果、2004 年 2 月からは実際にネグレクト児の脳機能データを取得する許可を得ている。

上記の活動と並行して、対照群となる NIRS 健常児データ、成人データの取得を進めてきた。まず始めに、1 歳以下の健常児か母親もしくは見知らぬ他人と相互作用（声かけ、顔と顔を向き合わせ、視線を合わせて、乳児をあやす）しているときの NIRS データを取得し、母親と他人て脳の活性化およびその部位にどのような違いかあるのかを検討した。対象部位は、脳の発達スケジュール的に最も早期に起こるといわれる視覚野を中心とした後頭葉領域とした。その結果、相手か母親か見知らぬ他人かにかかわらず、乳児か他者と相互作用しているとき、左半球の活性化か安静時よりも高かった。ところか、相手か母親か見知らぬ他人かという点に注目して分析を行うと、母親よりも見知らぬ他人と相互作用しているとき、右半球から側頭葉にかけての部位てより大きな活性化か認められた。またこの検討ては、NIRS と同時にサーモグラフィによる顔面温度変化も測定した。顔面温度の変化は、ストレスの尺度として期待されている。愛着の形成されていない見知らぬ他者と、愛着か形成されており、安心して一緒にいることのか出来る母親てはストレスの度合いも大きく異なるたろうという予測から、一部の研究者の間ては愛着の指標として用いようという試みかある。しかし、乳幼児の反応については、ストレス状況に伴って温度か上昇するのか下降するのか、一貫した結果か得られていない。結果、母親か見知らぬ他人かにかかわらず 他者との相互作用によって温度か低

下することか観察された。見知らぬ他者との相互作用により、母親の場合と比較して異なる温度変化パターンが得られることを期待したか、両者の間に差異は見られなかった。この結果から、乳幼児の星相互作用における内的過程を詳細に検討にするためには、やはり NIRS による脳機能イメージングを用いる必要性があることか示された。

上記で検討したような母子相互作用を厳密に見れば、視覚（視線や顔）、聴覚（声かけ）、触覚（肌触り）、嗅覚と味覚（母乳のにおいや味）のように多感覚的な情報処理の上に成り立っていることか考えられる。一方、NIRS は他のイメージング法と比較して非常に新しい技術であり、これまでに報告された研究の件数自体が非常に少ない。そのため、母子相互作用条件下で得られたデータの比較対象となる先行研究が不足している。また、乳幼児の脳神経や脳血管の様態は成人とは異なっており、得られるデータにも差異があるものと予測される。そのため、愛着に障害を持つ乳幼児の NIRS で得られる血行動態反応データかどういった情報処理を反映しているのかを厳密に知るためには、成人、健常児、ネグレクト児の三者のデータを比較検討する必要性がある。

こうした観点から、乳幼児データ取得と同時に、母子相互作用とその障害に関わる多感覚処理に関わる脳機能データの取得を行った。現在、視覚および嗅覚、聴覚についての検討を行った。

視覚については、ネグレクト児と健常児の視覚的認知能力の個人差を NIRS により捉えられるかを検討するため、視覚的認知能力の個人差を測定するテスト (Spatial Span Task Shah & Miyake, 1996) により、課題処理遂行にかかるストレスが増加した際にも高い能力を示す群と、低い能力しか示さない群を抽出し、対象を処理する際の両群の血行動態を比較した。遂行する課題としては、観察方向によって同じ対象であっても見え方が異なる視覚刺激を弁別するという、自然状況での顔やお気に入りの玩具とふれあうときと類似した状況を設定した。その結果、能力の高い群では、観察方向による見え方の変化が増加するのに比例して、視覚野の対象認知に関わる部位（後頭-頭頂領域、紡錘状回）の血流が増加したか、能力の低い群では、見え方の変化が増加しすぎると、それらの部位の血流が増加しなくなる（適切に対象認知処理が遂行できなくなる）ことかわかった。

また、嗅覚は視覚以前の早期愛着対象の手かかりになるといわれるか、その嗅覚での

NIRS については、嗅覚刺激強度や嗅覚的快不快刺激と NIRS で観察される血行動態との関係といったデータも報告されていなかった状態であるため、これらの基礎的データ取得を現在行っている。嗅覚処理に関わるといわれる前頭葉（前頭眼窩回）近傍を対象とした NIRS データを取得したところ、嗅覚刺激強度については、強度が弱まるにつれて刺激提示開始時点からの血流増加の振幅位相が後退することかわかった。

D 考察

本研究には被虐待児という対象の特殊性から、その対象の脳機能の検討についてやや慎重なアプローチを行った。一方は、被虐待児のケース対応を通して乳幼児や施設職員との信頼関係を確立し、その対応の一環として脳機能データの取得を行うというアプローチであり、他方、乳幼児の脳機能データを把握するための基礎データとなる健常乳幼児および成人データの取得である。現在、NIRS による実証的なデータは後者から得られている。母子相互作用を形成すると考えられる多感覚的な情報処理の主要な部分を構成する、視覚情報処理の脳機能データである。その結果、健常な乳幼児では、後頭の視覚野において、見知らぬ他者とふれあう際に母親よりも高い活性化が見られた。また、成人の視覚野機能の個人差について、ストレスの高低に応じた血行動態を測定したところ、処理能力の低い群では高い群と違い、ストレスの増加に伴う視覚野血流量の増加が見られなかった。処理能力の低い群を、ストレスに対する脆弱性を示す群のモデルと考えれば、ネグレクト児といったストレスに対して脆弱性を示すと考えられる乳幼児では、見知らぬ他者と相互作用している条件下で、これらの部位の不活性化が観察されることか予測される。

E 結論

これまでの半年間、ネグレクト児の被験者を得、そのラポール形成と行動観察を続ける傍ら、ネグレクト児の脳の発達を調査する上で必要となる様々な基礎データの取得を進めることか出来た。またここで得たデータは、今後の NIRS を用いた研究の基礎として有用なデータでもある。今後はさらに、本研究の最終的な目的であり、社会的にも大きな関心か寄せられている母子相互作用の脳発達への影響を、ネグレクト児、健常児と成人との直接比較から検討する。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

G-1 論文発表

- 1) 橋本優花里・近藤武夫・利島 保 2003 乳幼児研究におけるイメージング研究の効用と限界 (1) 広島大学大学院教育学研究科紀要第三部 (教育人間科学関連領域), 第 52 号, 印刷中
- 2) 近藤武夫・橋本優花里・利島 保 2003 乳幼児研究におけるイメージング研究の効用と限界 (2) 広島大学大学院教育学研究科紀要第三部 (教育人間科学関連領域), 第 52 号,印刷中

G-2 学会発表

- 1) 利島 保 橋本優花里 小林正夫 近藤武夫 2003 乳幼児の認知・情動的クオリアの発達に関する神経心理学的研究(1) 日本心理学会第 67 回大会発表論文集, 617
- 2) 橋本優花里・利島 保 小林正夫・近藤武夫 2003 乳幼児の認知 情動的クオリアの発達に関する神経心理学的研究(2) 日本心理学会第 67 回大会発表論文集, 621
- 3) 近藤武夫・利島 保 2003 視空間的作動記憶容量の個人差と視点依存性ー光トポグラフィによる検討ー 基礎心理学研究, 第 21 巻, 印刷中
- 4) 近藤武夫・橋本優花里 利島 保 小林正夫 2004 *Strange Situation* における乳児の顔面温度変化および後頭葉の局所脳血行動態の測定 日本発達心理学会第 15 回大会発表論文集, 印刷中
- 5) Takeo Kondou 2003 Individual differences in 3-D object recognition An event-related optical topography study *Technical Report on Attention and Cognition*, 31, 1-2 (*Online Journal*)

H 知的財産権の出願・登録状況

なし