

受性を示す可能性が示唆される。ラットにストレスを負荷した場合、グルコルチコイドの作用により、海馬神経細胞の樹状突起が萎縮するとの報告がある。さらに、GR $\beta$ は好中球でのデキサメサゾンによるアポトーシス誘導を抑制することも示されており、GR $\beta$ がアポトーシスに関与すると推測されている。以上から、気分障害患者では、GR $\beta$ 発現量が低下しているために、ストレス負荷時の血中グルコルチコイド濃度上昇による影響を受けやすい状態にあり、グルコルチコイドによる神経細胞の萎縮やアポトーシスを生じやすい状態にある可能性が示唆される。

最近では細胞質内においてもシグナル伝達系に関与するなどの作用がいくつか明らかにされていることから、ストレス負荷時の細胞内シグナル伝達系にGRがどのように関与しているかを明らかにすることも重要な課題である。

#### E. 結論

気分障害患者では GR $\beta$  発現量は健常人に比べ有意に低下していた。GR $\beta$  発現低下はうつ状態や抗うつ薬依存性ではなく、気分障害患者血縁者でも認められることから trait marker と考えられる。GR $\beta$  の発現低下が気分障害の病態やストレス脆弱性にどのように関与するかは今後の課題であるが、気分障害におけるグルコルチコイドへの過感受性、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

松原敏郎, 信本政昭, 渡辺義文  
気分障害患者における末梢白血球中グルコルチコイドレセプター mRNA の測定  
第 25 回日本生物学的精神医学会

#### 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

## 感情障害の発症脆弱性素因に関する神経発達・神経新生的側面からの検討並びにその修復機序に関する分子生物学的研究

山梨大学精神神経医学・臨床倫理学講座  
教授 神庭 重信

### 研究要旨:

昨年、Arched Back Nursing という母ラットの養育行動が成熟後の仔ラットの不安行動を減少させることを報告した。本年度はこの報告をもとに、母ラットが Arched Back Nursing を行うとき誘導される遺伝子を、養育行動の中核である MPOA と扁桃体で検索した。いくつかの候補遺伝子が発見され、今後 real time RT PCR や in situ hybridization などを用い今回の結果を確認する。

### A. 研究目的

うつ病や不安性障害、PTSD といった精神疾患では虐待や無視といった、生育早期の環境が危険因子になることが知られている。

げっ歯類の母親の養育行動には Arched Back Nursing (ABN) といわれる授乳行動や Licking & Grooming (LG) と言われる幼獣を腹の下においてなめまわすという行動がある。ABN や LG といった行動を、頻回に行う母獣に育てられた仔ラットや仔マウスの海馬依存の学習能力は高く、ストレス耐性も同様に高いことが知られている。昨年度、我々も ABN の増加が成熟後のラットの不安行動を減少させることを報告した。

未妊娠の雌性ラットに仔ラットを与えることにより養育行動を引き起こすことが可能である。この操作を sensitization とよぶ。未妊娠の雌性ラットに養育行動を引き起こす解剖学的な中枢は通常の母ラットと同様に、促進系では MPOA (medial preoptic nucleus) であり、抑制系では扁桃体である。今回の実験は未妊娠の雌性ラットに sensitization を行い ABN が誘導されるときに MPOA や扁桃体部位でいかなる遺伝子が発現するかという検討を行った。

動を観察した。Grooming & Licking (仔ラットを雌性ラットがなめまわす行動)、retrieval (仔ラットを一箇所に集める行動)、Nursing (授乳行動) を観察した。ABN 成立を養育行動の成立とした。養育行動が成立した次の日に断頭し、脳を凍結保存した。凍結保存された脳をクライオスタットにて薄切し、medial preoptic nucleus、扁桃体を切り出して保存した。よい授乳行動を示した群の組織を混合し、cDNA を作成し clontech 社の micro array にて発現遺伝子解析を行った。

### (倫理面への配慮)

実験は山梨大学動物実験倫理委員会の承認を得ておこなった。

### B. 研究方法

#### 動物

Wistar 系ラット 雌性 8 週齢

#### 方法

未妊娠の雌性ラットに出産直後の仔ラットを与え、ビデオモニターにて養育行

C. 研究結果

38 頭の雌性ラットのうち Arched back nursing を強く示しかつ Grooming & Licking を強くしめたラットは 3 頭であった。

3 頭の MPOA、扁桃体をコントロールの雌性ラットと比較したところ下記の遺伝子に変化が観察された。

MPOA	Gene
3.3 ↓	metabotropic glutamate receptor subtype
4.8 ↓	transforming growth factor-beta (TGF-beta) masking protein large subunit
3.6 ↓	spinophilin
5.5 ↑	DPDE1; cAMP-dependent 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4C
23.9 ↓	choline transporter
5.8 ↓	neuron-derived orphan receptor
4.1 ↑	Synuclein, gamma

Amygdala	Gene
5.6 ↓	Putative protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit
3.4 ↑	Adrenagic receptor kinase, beta 1
3.6 ↑	Beta spectrin 3
5.0 ↓	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1
4.3 ↓	urcortin
3.8 ↑	Choline transporter
3.2 ↑	Coagulation factor X

D. 考察

仔ラットによる刺激で養育行動が誘発された時に発現した遺伝子のスクリーニングを行った。多数の mRNA の変化が見られたが、特に MPOA と扁桃体で逆の動きを見せている mRNA の存在は養育行動に深くかかわるものとして注目している。

今回の実験は母親の養育行動を制御する遺伝子を知るための第一歩に過ぎない。今後、real time RT PCR や in situ hybridization を行い、今回のスクリーニング結果を確認する必要がある。MPOA や扁桃体でいかなる遺伝子発現が起き、行動がコントロールされているかを調べることにより、養育行動を制御することが動物レベルで可能になる。さらに言えばこの制御が可能になることにより、動物レベルで養育行動に起因するストレス

脆弱モデルを容易にうみだすことができるかもしれない。現在のところ人間への臨床応用はまだまだ困難な面を含んでいるが、この方面における研究の発展は、よりよい養育関係を生み出す方法を明らかにする可能性をもつ。

E. 結論

養育行動に関連する候補遺伝子を今回見出した。今回のスクリーニングで得られた遺伝子を今後、real time RT PCR や in situ hybridization で確認する。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Sugiyama, N., Kanba, S., and Arita, J.:  
Temporal changes in the expression of  
brain-derived neurotrophic factor mRNA in  
the ventromedial nucleus of the  
hypothalamus of the developing rat brain.  
*Molecular Brain Research* 15: 69-77, 2003.

Yamada K. Yagi G. Kanba S. Clinical  
efficacy of tandospirone augmentation in  
patients with major depressive disorder: A  
randomized controlled trial. *Psychiatry &  
Clinical Neurosciences*. 57(2):183-7, 2003.

Yamada K., Yagi G, Kanba S.:  
Effectiveness of Gorei-san (TJ-17) for  
treatment of SSRI-induced nausea and  
dyspepsia: Preliminary observations.  
*Clinical Neuropharmacology* 26: 112-114,  
2003.

## 2. 学会発表

### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

#### 1. 特許取得

#### 2. 実用新案登録

#### 3. その他

## 躁うつ病における膜受容体からの細胞骨格への シグナル伝達異常に関する研究

群馬大学大学院医学系研究科高次細胞機能学分野  
教授 白尾智明

### 研究要旨:

本研究の目的は、感情障害の物質的基盤を明らかにするために、躁うつ病患者の脳におけるドレブリン発現・細胞内局在様式を明らかにしようとするものである。本年度は、ドレブリン A 特異抗体を作製し、シナプス形成期におけるドレブリンのアイソフォームと細胞内局在の関連を、生化学的・免疫組織化学・免疫電子顕微鏡の技術を用いて検討した。

### A. 研究目的

ドレブリンは神経細胞の発達およびシナプス可塑性に重要な役割を果たすと考えられているアクチン結合蛋白である。本年はドレブリンの神経細胞特異的なアイソフォームであるドレブリン A の細胞内局在を発達期および成熟ラットの脳を用いて明らかにすることを目的とした。また、躁うつ病モデルラットを作製し、各種の抗ドレブリン抗体を用いて脳内の Rostral Migratory Stream の細胞数を定量的に解析し、正常脳と比較することにより、感情障害の予防・治療のための基礎的データを作製する。

### B. 研究方法

(抗体作製) 昨年度ラットドレブリン A に特異的なアミノ酸配列を有するペプチドを抗原として作製した抗血清を、上記のペプチドを用いたアフィニティーカラムにより精製し、ドレブリン A 特異抗体を調整した。

(免疫組織染色法) ラット脳を 4%パラホルムアルデヒド (0.1Mリン酸バッファ pH7.2) により経心的に環流固定を行った。ラット脳を凍結包埋後、クライオスタットを用いて薄切切片を作製した。免疫蛍光染色には FITC 標識あるいは TRITC 標識の二次抗体を用いて染色し、蛍光顕微鏡あるいはコンフォーカル顕微鏡にて観察した。また、好感度の検出のために、ビオチン標識二次抗体により処理後、FITC 標識ストレプトアビジンあるい

は HRP 標識アビジンを用いた。HRP の基質としては、DAB を用いた。

免疫電子顕微鏡としては、金コロイドを用いて局在を同定した。

(ウェスタンブロット) ラットおよびマウス脳より海馬、大脳皮質を取り出し、それぞれ 10 倍量の SDS サンプルバッファでホモゲナイズして、サンプルを調整した。サンプルは Laemmli のバッファ系を用いて SDS-PAGE により分離後、イモビロン膜にブロッティングし、各抗体で染色した。発色には ECL キットを用いた。

### (倫理面への配慮)

免疫組織染色に供したヒト脳切片は共同研究者の所属する各施設の倫理委員会にプロトコルを提出し、承認を得たものである。検体は個人の非特定化に留意し、プライバシーの保護に万全を期した。動物実験実施に際しては、群馬大学昭和地区動物実験委員会の倫理規定に従った。

### C. 研究結果

昨年度の研究で、側脳室下帯の移動中の細胞 (いわゆる Rostrally migrating stream の嗅球顆粒細胞の前駆細胞) とおもわれる細胞は抗ドレブリンモノクローナル抗体 M2F6 により強く染め出されることが明らかとなった。今年度は、抗ドレブリンモノクローナル抗体 M2F6 により染め出される細胞の集団が、分裂したばかりの細胞であるかどうかを検

討するために、まずBrdUを取り込ませたラット脳を抗BrdU抗体で染色した。その結果、抗ドレブリンモノクローナル抗体M2F6により染め出される細胞の集団とBrdUを取り込んだ細胞の分布に類似性が確認できた。また、抗Ki67抗体による染色で染め出される細胞群とも分布が重なることがわかった。現在、M2F6と抗Ki67抗体による二重染色を試みているところである。以上の結果は、ドレブリンを細胞体に発現している側脳室下帯の細胞は移動中の細胞であるという我々の仮説に一致した。

さらに今年度は、これらの細胞が発現しているドレブリンのアイソフォームを解析するために、昨年度得られた抗血清を、エピトープセレクションによりさらに精製した。得られた抗体はラット脳およびマウス脳のウェスタンブロッティングの結果ドレブリンAを特異的に認識することがわかった。この抗体を用いて10週ラット脳の免疫組織化学を行ったところ、スパイン部のドレブリンを認識したが、抗ドレブリンモノクローナル抗体M2F6で染め出される細胞群は染まらなかった。

次に、鬱病モデル動物として、慢性ストレスラットを作製し、コントロールラットと慢性ストレスラットにおける側脳室下帯の移動中の細胞の比較を、上記二種類の抗体を用いた二重免疫染色により行った。現在、移動中の細胞数を定量的に解析中である。

また、成熟および発生過程におけるドレブリンAの存在様式を免疫電顕により解析した(ニューヨーク大学青木博士との共同研究)。生後10週の成熟ラットの大脳および海馬においては、ドレブリンAはスパイン部に限局して存在することがわかった。しかし、驚いたことに、生後1週の大脳および海馬においては、シナプス形成極初期のシナプス部にドレブリンAが観察され、むしろ完成したスパイン部にはあまり観察されなかった。

#### D. 考察

昨年度、我々は抗ドレブリン抗体を用いて側脳室下帯の移動中の細胞(いわゆる

るRostrally migrating streamの嗅球顆粒細胞の前駆細胞)を標識できる可能性を示唆した。今年度の抗BrdU抗体や抗Ki67抗体を用いた免疫組織化学により、これら標識細胞が分裂後間もない細胞であることが確認できた。また、エピトープセレクションにより精製したドレブリンA特異的抗血清を用いた免疫組織化学により、この移動中の細胞はドレブリンAを発現していないことがわかった。抗ドレブリンモノクローナル抗体M2F6はドレブリンEおよびドレブリンAとともに認識するので、移動中の神経細胞はドレブリンEは発現しているが、まだドレブリンAは発現していないことがわかった。

今後は、鬱病モデル動物および情動障害患者の死後脳を用いて、上記の二種のドレブリン抗体の染色法により側脳室下帯の移動中の細胞に生じる異常を定量的に解析する予定である。

#### E. 結論

今回、ドレブリンA特異的アミノ酸配列を持ったペプチドを抗原として、エピトープセレクションによりドレブリンA特異的抗体を作製することに成功した。本抗体と従来の抗ドレブリンモノクローナル抗体M2F6を用いて移動中の細胞を同定する方法を開発することができた。今後は、本法を用いて、鬱病患者脳における細胞移動の異常を解析する予定である。

#### F. 健康危険情報

特記事項無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ferhat, L., Esclapez, M., Represa, A., Fattoum, A., Shirao, T., and Ben-Ari, Y. "Upregulation of acidic calponin during dendritic spine plasticity following pilocarpine-induced seizures" *Hippocampus* 13:845-858 (2003)

Takahashi, H., Sekino, Y., Tanaka S., Mizui, T., Kishi, S, and Shirao, T., "Drebrin-dependent Actin Clustering in Dendritic Filopodia Governs Synaptic Targeting of Postsynaptic Density-95 and Dendritic Spine Morphogenesis" *J. Neurosci.* 23:6586-6595 (2003)

Kobayashi R, Sekino Y, Shirao T, Tanaka S, Ogura T, Inada K, and Saji M. "Antisense knockdown of drebrin A, a dendritic spine protein, causes stronger preference, impaired pre-pulse inhibition, and an increased sensitivity to psychostimulant." *Neurosci. Res.* in press

Butkevich, E., Huelsmann, S., Wenzel, D., Shirao, T., Duden, R., Majoul, I., "Drebrin is a novel Connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton." *Curr. Biol.* in press

## 2. 学会発表

Sixth IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, Czech Republic. July 10-15, 2003. Y. Sekino, T. Shirao and K. Obata. "Adenosine A1 Receptor Activity Regulates Signal Processing in the Hippocampus"

Sixth IBRO World Congress of Neuroscience, Prague, Czech Republic. July 10-15, 2003. Shirao T, Takahashi H, Sekino Y, and Obata K. "Drebrin Clustering with Actin Filaments is a first Essential Step of Dendritic Spine Morphogenesis."

International Synaptogenesis meeting, Vienna, Austria Jun 5-7, 2003. Shirao T, Takahashi H, and Sekino Y. "Drebrin Clustering with Actin Filaments is an Essential Step of Dendritic Spine Morphogenesis"

Society for Neuroscience 33th Annual Meeting, 2003. T. Shirao\*; H. Takahashi; Y. Sekino; T. Mizui "Cluster formation of drebrin in filopodia is an essential step for dendritic spine morphogenesis."

Society for Neuroscience 33th Annual Meeting, 2003. Makoto Ito, Kenji Doya, Tomoaki Shirao and Yuko Sekino "Spatial distribution of Fos-positive neurons in the

supramammillary nucleus and the hippocampus of rats placed in a novel environment"

白尾智明、高橋秀人、関野祐子、田中聡一、水井俊幸「樹状突起スパイン形成初期におけるドレブリン-アクチン複合体の出現」第 763 回日本薬理学会年会・第 80 回日本生理学会大会、福岡、2003 年 3 月 24 日～26 日

関野祐子、伊藤真、小林千穂、笹川快生、白尾智明「新規環境探索行動における上乳頭体核と海馬の神経活動」第 76 回日本薬理学会年会・第 80 回日本生理学会大会、福岡、2003 年 3 月 24 日～26 日

Yoshio Sasagawa, Chiho Kobayashi, Yoko Sekino, Hirokazu Murakami, Tomoaki Shirao "Generation of transgenic mice expressed GFP-drebrin A in the hippocampus" 第 26 回日本神経科学学会、名古屋、2003 年 7 月 23 ～ 2003 年 7 月 25 日

Mizui Toshiyuki, Takahashi Hideto, Koyama Hiroshi, Shirao Tomoaki "Abnormal shape of dendritic filopodia and spines induced by overexpression of drebrin A in cultured hippocampal neurons" 第 26 回日本神経科学学会、名古屋、2003 年 7 月 23 ～ 2003 年 7 月 25 日

Sekino Y., Tanaka, S., Shirao T. "Drebrin is redistributed to the dendritic shafts with actin filaments by glutamate receptor activation" 第 26 回日本神経科学学会、名古屋、2003 年 7 月 23 ～ 2003 年 7 月 25 日

小林千穂、伊藤真、小林静香、佐治真理、白尾智明、関野祐子 "Activity of Supramammillary nucleus is involved in the acquisition of the novel information" 第 26 回日本神経科学学会、名古屋、2003 年 7 月 23 ～ 2003 年 7 月 25 日

Hideto Takahashi, and Tomoaki Shirao "Functional roles of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis during development." 第 26 回日本神経科学学会、名古屋、2003 年 7 月 23 ～ 2003 年 7 月 25 日

Hiroyuki Yamazaki, Chiho Kobayashi  
Toshiyuki Mizui and Tomoaki Shirao  
“Subcellular localization of Drap1, drebrin  
associated protein 1, in cultured hippocampal  
neurons”第26回日本神経科学学会、名古屋、  
2003年7月23 ~ 2003年7月25日

伊藤真、銅谷賢治、白尾智明、関野祐子  
「新規環境下ラットの扁桃体神経活動は  
上乳頭体核により調節される」第13回日  
本神経回路学会、東京2003年9月8日~9月  
10日

Hiroyuki Yamazaki, Toshiyuki Mizui, Chiho  
Kobayashi, Tomoaki Shirao “Domain  
analysis of Drebrin-associated protein 1,  
Drap1” 第46回神経化学学会大会、新潟、  
2003年9月24日~26日

Toshiyuki Mizui, Kenji Hanamura, Hideto  
Takahashi, Tomoaki Shirao, Yuko Sekino  
“Time lapse recording of translocation of  
GFP-drebrin A, an actin-binding protein in  
dendritic spines, induced by activation of  
glutamate receptors in hippocampal neurons”  
(シンポジウム Regulation of synaptic  
functions ) 第46回日本神経化学学会大会、  
新潟、2003年9月24日~26日

高橋秀人、関野祐子、水井利幸、白尾智  
明「海馬錐体細胞の発生過程での樹状突  
起フィロポディアからスパインへの変化  
におけるアクチン細胞骨格の役割」海馬  
と高次脳機能学会、東京、2003年11月23  
日~24日

白尾智明「樹状突起スパインの形態形成」  
(シンポジウム神経細胞の形態制御の分  
子機構)第77回日本薬理学会年会、大阪、  
2004年3月8日~10日

関野祐子、水井俊幸、花村健次、白尾智  
明「グルタミン酸により誘発されるドレ  
ブリンのスパインから樹状突起幹への移  
行:GFP標識ドレブリンAのタイムラプス  
レコーディングによる解析」第77回日本  
薬理学会年会、大阪、2004年3月8日~10  
日

笹川快生、小林千穂、白尾智明、関野祐  
子「ドレブリンA過剰発現マウスの海馬  
スライスにおける長期増強」第77回日本  
薬理学会年会、大阪、2004年3月8日~10  
日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含  
む。)

1. 特許取得

Drap1 のアミノ酸シーケンスを応用し  
た細胞内小器官局在化補助剤 (予定)  
シナプス成熟障害動物 (予定)

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し



## 動物モデルを用いた躁うつ病の再発脆弱性に関する研究

理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チーム

チームリーダー 加藤 忠史

## 研究要旨：

(研究要旨) 本研究の目的は、遺伝子改変モデルマウスを用いて、躁うつ病の動物モデルを作成し、その病態を解析することである。本研究により躁うつ病のモデル動物が確立できれば、これまでの対症療法的な治療薬でなく、より本質的な病態を改善する予防薬の開発が可能となると考えられる。本年度は、我々の作成したミトコンドリア遺伝子変異が蓄積するトランスジェニックマウスについて、行動学的解析および分子生物学的解析を行った。

## A. 研究目的

躁うつ病(双極性障害)は、躁状態、うつ状態の再発を繰り返すことにより社会生活障害を来す疾患である。社会生活障害を防ぐには、再発を予防することが重要である。抗うつ薬、抗精神病薬の作用は対症療法的に過ぎず、予防のためには気分安定薬が用いる必要があるが、気分安定薬、特にリチウムは副作用が強いいため、治療を中断する患者も少なくない。また、複数の気分安定薬を服用しても、病相をコントロールできない患者も多く存在する。こうしたことから、新規気分安定薬の開発が望まれる。しかし、既存の躁うつ病モデルは、全て「躁状態のモデル」か「うつ状態のモデル」であり、躁・うつの病相を反復するような動物モデルは存在しないため、新たな気分安定薬開発の試みはほとんど行われていなかった。

慢性進行性外眼筋麻痺(CPEO)は、眼瞼下垂などの比較的軽症の筋症状を呈する、成人発症の、比較的軽症のミトコンドリア病である。その病態には、ミトコンドリアDNA(mtDNA)の多重欠失が関与していることがわかっている。近年、その原因遺伝子が3つ同定された。これら3つの原因遺伝子、すなわちポリメラーゼ $\gamma$ (POLG)、アデニンヌクレオチドトランスロケター-1(ANT1)、Twinkleの変異により生じるCPEOは、いずれもうつ病または躁うつ病(双極性障害)を伴う場合が少なくないことが報告されている。一方、我々はこれまで孤発性の双極性障

害患者において、脳内およびリンパ球において、mtDNA欠失が増加していることを報告してきた。したがって、脳特異的にmtDNAを増加させることで、躁うつ病の動物モデルを作成することができると考えた。

本研究の目的は、遺伝子改変モデルマウスを用いて、躁うつ病の動物モデルを作成すると共に、このモデル動物の病態を解析することである。

## B. 研究方法

ミトコンドリア遺伝子変異を加速させるため、マウスのミトコンドリア遺伝子複製酵素(ポリメラーゼ $\gamma$ , pol $\gamma$ )全長cDNAのMg<sup>2+</sup>結合部位に、D181Aという一塩基変異を導入し、その校正活性を失わせた変異体を作成した。これに、calmodulin kinase II  $\alpha$  (CAMKII $\alpha$ )のプロモーターを連結したジーンコンストラクトを作成し、C57B6/Jマウスの受精卵にインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作成した。

マウス脳より、RNAおよびDNAを抽出し、変異型ポリメラーゼ $\gamma$ の発現量を、ABI 7900HTを用いて、リアルタイムPCR法により定量した。mtDNA欠失は、サザンロット法により定量した。

行動解析は、理化学研究所脳科学総合研究センター動物実験施設において行った。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に際しては、理化学研究所脳科学総合研究センター動物実験施設の倫理規程に従った。

### C. 研究結果

4系統作成できた CAMKII $\alpha$ -pol $\gamma$ マウスのうち、最も変異型ポリメラーゼ $\gamma$ 発現量の高い1系統を、その後の解析に用いた。

このマウスにおいて、ミトコンドリアDNAの欠失を調べたところ海馬および大脳皮質において、約2kbの欠失型ミトコンドリアDNAの存在が確認された。

この動物において、オープンフィールド試験、高架型十字迷路、長期の行動リズム測定などを行った。

オープンフィールド試験では、行動量の減少が見られた。高架型十字迷路では、open armへの滞在時間の減少が見られ、不安の増強が疑われた。長期の行動リズム測定では、周期的な行動量の変化が見られた。

### D. 考察

校正機能を失わせたマウスポリメラーゼ $\gamma$ を過剰に発現させるトランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスではmtDNA欠失が増加し、躁うつ病類似の行動異常を呈したことから、今後躁うつ病モデルとして検討する価値があると考えられた。

### E. 結論

我々は、躁うつ病の遺伝的モデルマウスを確立した。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

加藤忠史、垣内千尋(印刷中) 躁うつ病関連遺伝子. 医学のあゆみ

加藤忠史(2003) Wolfram病と気分障害. 分子精神医学 3: 89-93

Kato T: MRS Investigations and the pathophysiology of affective disorders. (In Soares JC (ed) Brain Imaging in Affective Disorders, pp159-180, Marcel Dekker, Inc., New York), 2003

#### 2. 学会発表

Kato T: Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. American College of Neuropsychopharmacology San Juan, Dec 2003

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

#### 1. 特許取得

ミトコンドリア遺伝子変異が蓄積するトランスジェニック非ヒト哺乳動物  
(出願中)

出願の種類	特許(通常)
出願人	理化学研究所
出願日	平成15年10月21日
発明者	笠原和起、加藤忠史

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

## 抗うつ療法の奏功機転候補分子の機能的評価と 神経可塑的变化の可視化に関する研究

昭和大学医学部  
専任講師 山田 光彦

### 研究要旨:

我々はうつ病の病態と治癒機転を理解するために神経回路網の機能的および形態学的変化に注目している。そこで、分担研究者は抗うつ療法の奏功機転候補分子の機能的評価と神経可塑的变化の可視化に関する研究をおこなった。本研究では、differential cloning 法を用いてラット脳から同定した抗うつ薬関連遺伝子・EST 群の一部が、軸索の伸展・退縮の調節、神経伝達物質の開口放出に関与する分子クラスターに分類されることをホモロジー解析と定量的遺伝子発現解析により明らかとすることができた。平成 15 年度は、ADRG#14 をモデルに、候補遺伝子群が神経回路網の再編といった神経可塑的变化に重要な役割を果たしていることを培養神経細胞をモデルに画像解析法を用いて証明した。分担研究者が行った一連の研究は、神経回路網の再編成といった神経可塑的变化における機能の検討を通して、主任研究者が行う「感情障害の発症脆弱性素因に関する神経発達・神経新生的側面からの検討並びにその修復機序に関する分子生物学的研究」に寄与するものと考えられた。

### A. 研究目的

我々は、differential cloning 法を用いて抗うつ薬の奏効機転に関連する遺伝子・ESTを探索するプロジェクトを開始している。現在までに、複数の候補遺伝子をラット前頭葉皮質から同定し、antidepressant related genes (ADRGs) と名付けて検討を進めている。これら候補遺伝子の機能別クラスタリングを試みた結果、既知遺伝子と高相同性を示した ADRG 遺伝子群の一部は、神経細胞において軸索の伸展、退縮の調節、神経伝達物質の開口放出に関与する分子クラスターに分類されることが明らかとなった。そのため、これらの候補遺伝子群が神経回路網の再編といった神経可塑的变化に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、抗うつ薬の奏効機転において神経回路網の再編が重要であるという仮説について検証を行うべく抗うつ療法の奏功機転候補分子の機能的評価と神経可塑的变化の可視化に関する研究を進めることを目的とした。

### B. 研究方法

(1) 実験動物及び薬物投与：実験には、Sprague-dawley 系雄性ラットを用い、5 週

齢のものを入荷し 2 週間環境に馴化させた後、7 週齢目より以下の処置を開始した。三環系抗うつ薬のイミプラミン及び選択的セロトニン再取り込み阻害薬のサートラリンをそれぞれ 10 mg/kg、1 日 1 回 3 週間腹腔内投与した。対照群には溶媒として用いた 1.5% Tween 80 含有生理食塩水を投与した。各処置を負荷したラットは、最終処置から 24 時間後に断頭し、脳を摘出後、前頭葉皮質、視床下部、線状体、海馬、中脳、視床に分け、液体窒素で素早く凍結後、-80℃冷蔵庫にて保存した。

(2) Differential Cloning 法：平成 15 年度は、これまでに開発を進めた ADRG microarray を用いて解析を進め、発現変化が認められた ADRG 遺伝子については FASTA 法を用いてホモロジー検索を行った。

(3) 抗うつ薬投与による ADRG 遺伝子の発現変化の検討：抗うつ薬投与による ADRG のタンパクレベルでの発現変化は、Western Blot 法により検討した。抗うつ薬を長期又は単回投与したラット前頭葉皮質よりタンパクを抽出した。ポリアクリルアミド電気泳動 (12.5% ゲル) によりタンパクを分離し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。3% スキムミルクでブロッキング後、1 次抗体、2 次抗体とインキュベーションし、ECL 法に

より抗 ADRG 抗体陽性バンドを検出した。

(4) タンパク導入試薬による抗 ADRG 抗体トランスフェクション: PC12 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/3.5 cm dish) をポリ-L-リジンコートしたディッシュに播種し、1日後、血清を含まない培地で3回洗浄し、2 mL の同培地を加えた。タンパク導入試薬 (Chariot) を用いて抗 ADRG 抗体 (1:500) を PC12 細胞に導入し、3時間後、NGF を 50 ng/mL とするよう添加した。

(5) 抗 ADRG 抗体トランスフェクションによる神経伝達物質の開口放出への影響: PC12 細胞は、ラット副腎髄質褐色細胞腫より単離し株化された細胞であり、NGF の添加により長い神経繊維を伸長し神経様細胞へと分化する。そこで、抗 ADRG 抗体をタンパク導入試薬を用いて PC12 細胞内に導入し、内在性の ADRG 分子の機能を抑制することにより神経伝達物質の開口放出に生じる影響を検討した。導入3日後、 $[3H]$  ノルアドレナリンを培養液中に添加し、2時間後、High K 刺激により放出された  $[3H]$  ノルアドレナリン量を測定した。放出した量および細胞に残存した量の和を全取り込み量とし、数値は放出量/全取り込み量とした。

(6) 抗 ADRG 抗体トランスフェクションによる神経突起長及び数への影響: 抗 ADRG 抗体導入3日後、phosphate buffer saline (PBS) で3回洗浄し、2%パラホルムアルデヒド/PBS で15分間固定し、0.2% Triton X-100/PBS で5分間処理後、FITC ラベル抗ウサギ IgG 抗体を1時間処置し、PBS で3回洗浄した。さらに、Alexa Fluor 568 phalloidin を20分間処置し PBS で3回洗浄した。共焦点レーザー顕微鏡 MRC 500 (BIO RAD 社製) で観察し、励起波長 488 nm と 568 nm の画像を取得した。GFP 画像 (488 nm) を抗体導入の指標に、phalloidin 画像 (568 nm) を用いて神経突起長及び数を NIH image 1.62 により計測した。

### C. 研究結果

(1) プレシナプスの小胞上に存在する ADRG 遺伝子の同定: ADRG microarray を用いて2次スクリーニングを行った結果、抗うつ薬長期投与により多岐にわたる遺伝子の発現変化が認められた。次に、これらの ADRG

遺伝子について、塩基配列を決定し GeneBank database と同源性検索を行い、既知遺伝子と同源性が高いものについて機能別クラスタリングを行った結果、VAMP2 (ADRG#14)、cysteine string protein (ADRG#55)、Rab3 (ADRG#280)、synapsin I (ADRG#279)、synaptotagmin (ADRG#563) 等、プレシナプスの小胞上に存在するタンパクが多数得られた。

(2) 抗うつ薬長期投与による ADRG#14 の発現変化: ADRG microarray の解析の結果、抗うつ薬投与により発現増加が認められた ADRG#14 (VANP2) のタンパクレベルでの発現変化を Western blot 法により検討した。イミプラミン、サートラリンの長期投与により ADRG#14 の有意な発現の増加が認められたが、これらの抗うつ薬の単回投与で発現変化は認められなかった。

(3) 抗 ADRG 抗体トランスフェクションによる神経伝達物質の開口放出への影響: 平成15年度は、ADRG#14 をモデルとして検討した。最初に対照群における High K 刺激による経時変化を検討した結果、刺激後10秒で無刺激の約1.5倍となり、30秒で2倍となりその後10分まで一定であった。一方、抗 ADRG#14 抗体を導入した PC12 細胞では、10秒、30秒後ともに放出量の増加が認められなかった。

(4) 抗 ADRG 抗体トランスフェクションによる神経突起長及び数への影響: 平成15年度は、ADRG#14 をモデルとして検討した。抗 ADRG#14 抗体の PC12 細胞内へのトランスフェクション効率、導入3日後で70~80%であった。共焦点レーザー顕微鏡下、対照および抗 ADRG#14 抗体トランスフェクタントを比較したところ、トランスフェクタントでは、神経突起の長さは退縮し、神経突起数も減少していることが認められた。続いてこれを数値化するために、各群、120~150の細胞について神経突起長および数を計測した。その結果、1個の細胞における神経突起の合計の長さの平均は、対照群で  $95.7 \pm 5.0 \mu\text{m}$ 、トランスフェクタント群では  $56.1 \pm 3.7 \mu\text{m}$  であり、神経突起数は、対照群で  $3.3 \pm 0.3$ 、トランスフェクタント群では  $2.4 \pm 0.5$  であり有意に減少していた。一方、細胞径には有意差は認められなかった (対照群:  $22.0 \pm 0.4 \mu\text{m}$ 、トランスフェクタン

ト群:  $22.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ 。

#### D. 考察

これまでに、我々は Differential Display 法を用いて、対照群に抗うつ薬 3 週間投与において特異的に発現が増減する複数の cDNA 断片を同定してきた。

これらの ADRG 遺伝子について、塩基配列を決定し GeneBank database と相同性検索を行い、既知遺伝子と相同性が高いものについて機能別クラスタリングを行った結果、プレシナプスの小胞上に存在するタンパクが多数得られた。プレシナプスの小胞上に存在するタンパクは、神経伝達物質の開口放出とともに、神経突起の伸長・退縮に関与するという報告がある。そこで、ADRG#14 (VAMP2) をモデルとして内在性 ADRG#14 タンパクの機能を抑制した神経様細胞 (NGF で分化させた PC12 細胞) における開口放出能を測定し、続いて神経突起を可視化し、突起長及び数を計測する系を構築した。抗 ADRG#14 抗体を導入した PC12 細胞を高 K により刺激した結果、対照群に比べ有意な抑制が認められた。このことより、内在性 ADRG#14 タンパクの機能が抑制されていることが確認された。次に、共焦点レーザー顕微鏡下、対照および抗 ADRG#14 抗体トランスフェクタントを可視化し比較したところ、トランスフェクタントでは神経突起の長さは退縮し、神経突起数も減少していることが認められた。これを数値化するために、各群、120~150 の細胞について神経突起長および数を計測した結果、トランスフェクタントにおいて有意な神経突起の退縮及び神経突起数の減少が認められた。これら結果は、抗うつ薬のターゲットの 1 つと考えられたプレシナプスの小胞上のタンパクの発現変化により、神経伝達物質の開口放出、神経突起の形態変化等が引き起こされていることが示唆された。また、抗うつ薬の奏効機転にこうした神経可塑的变化が重要であることが明らかとなった。今後は、得られた他の ADRG についてもこのような機能を有するかを検討するため、本研究で確立したアッセイ系に挿入していく計画である。

以上のことより、抗うつ薬のターゲットの 1 つに、シナプス小胞上のタンパクが考えられた。また、抗うつ薬の奏効機転に神経伝達

物質の開口放出、神経突起の形態変化等の神経可塑的变化が重要であることが明らかとなった。我々の一連の研究は、偶然の発見に頼ることのない新規中枢神経系治療薬の戦略的、合理的創薬へとつながると期待される。

#### E. 結論

分担研究者が行った一連の研究は神経回路網の再編成といった神経可塑的变化における機能の検討を通して主任研究者が行う「感情障害の発症脆弱性素因に関する神経発達・神経新生的側面からの検討並びにその修復機序に関する分子生物学的研究」に寄与するものと考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし

#### G. 研究成果発表

##### 1. 論文発表

Kudo, K., Yamada, M., Takahashi, K., Nishioka, G., Tanaka, S., Hashi-guchi, T., Fukuzako, H., Takigawa, M., Higuchi, T., Momose, K., Kamijima, K. and Yamada, M.: Differential expression of kf-1 after repetitive transcranial magnetic stimulation in rat frontal cortex and hippocampus. (submitted for publication)

Yamada, M., Iwabuchi, T., Takahashi, K., Kurahashi, K., Ohata, H., Momose, K., Kamijima, K., Higuchi, T. and Yamada, M.: Identification and characterization of frizzled-3 protein: decrease in rat frontal cortex after antidepressant or electroconvulsive treatment. (submitted for publication)

Takahashi, K., Yamada, M., Ohata, H., Higuchi, T., Yamada, M. and Momose, K.: Differential expression of NDRG2-S and NDRG2-L after anti-depressant and electroconvulsive treatment in rat frontal cortex. (submitted for publication)

山田光彦, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享: 神経回路網の再編成に注目した新規抗うつ薬ターゲット分子の機能評価, 精神薬療研究年報, in press, 2004

Yamada, M., Yamada, M., Higuchi, T.:

Antidepressant-elicited changes in gene expression -Remodeling of neuronal circuits as a new hypothesis for drug efficacy. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry*, in press, 2004

Yamada, M., Takahashi, K., Tsunoda, M., Iwabuchi, T., Kobayashi, S., Tsukahara, N., Nakagawa, T., Awatsu, M., Yamazaki, S., Hirano, M., Ohata, H., Nishioka, G., Kudo, K., Tanaka, S., Kamijima, K., Higuchi, T., Yamada, M. and Momose, K. : Antidepressant research in the era of functional genomics. Farewell to the monoamine hypothesis. *Biogenic Amines*, in press, 2004

Nishioka, G., Yamada, M., Kudo, K., Takahashi, K., Kiuchi, Y., Higuchi, T. Momose, K., Kamijima, K. and Yamada, M.: Induction of *kf-1* after repeated electroconvulsive treatment and chronic antidepressant treatment in rat frontal cortex and hippocampus. *J Neural Transm* 110, 277-285, 2003

山田光彦, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享 : 神経可塑性変化に注目した新規抗うつ薬ターゲット分子の探索と機能評価, 精神薬療研究年報, 34, 45-51, 2003

## 2. 学会発表

Yamada, M. and Higuchi, T.: Pharmacogenomics, neuroplasticity and antidepressant research -beyond the monoamine hypothesis. 2nd Annual Meeting of the International Society of Pharmacogenomics joint meeting with the Pacific Rim Association for Clinical Pharmacogenetics, 2003

Takahashi, K., Yamada M. Yamada M, Kamijima K. Higuchi T, Momose K: Characterization of a novel anti-depressant related gene 123 in rat frontal cortex. *Neurosci Meeting*, 2003

山田光彦: 神経可塑性変化に注目した抗うつ薬ターゲット分子の探索と機能評価. 昭和大学医学部同窓会学術講演会, 2004

山田光彦: 治癒機転の解明による抗うつ薬の新規ターゲット分子探索戦略, 創薬薬理フォーラム, 2003

山田光彦: 抗うつ薬奏効機転の解明による新

規治療ターゲットの探索, 日本精神神経学会, シンポジウム, ポストゲノム時代の精神疾患の遺伝子研究, 2003

山田光彦, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享 : 神経回路網の再編成に注目した新規抗うつ薬ターゲット分子の機能評価, 発表要旨集, 精神神経系薬物治療研究報告会, 2004

山田美佐, 高橋弘, 角田美果, 岩渕知子, 小林真也, 塚原奈津子, 中川知之, 栗津万里, 工藤謙太郎, 西岡玄太郎, 田中聡史, 樋口輝彦, 山田光彦, 百瀬和享 : 抗うつ薬の奏効機転に關与するラット脳内遺伝子の検討, 第14回高次脳機能障害シンポジウム, 2003

角田美果, 高橋弘, 山田美佐, 岩渕知子, 塚原奈津子, 西岡玄太郎, 工藤謙太郎, 田中聡史, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享, 山田光彦: ラット前頭葉皮質における抗うつ薬と電気けいれん療法による ADRG#14 の発現変化, 第22回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 2003

塚原奈津子, 山田美佐, 高橋弘, 角田美果, 岩渕知子, 工藤謙太郎, 西岡玄太郎, 田中聡史, 上島国利, 樋口輝彦, 百瀬和享, 山田光彦 : 抗うつ薬関連遺伝子 ADRG#102 の同定及び発現変化, 第22回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会, 2003

高橋弘, 山田美佐, 山田光彦, 樋口輝彦, 百瀬和享: ラット前頭葉皮質での新規抗うつ薬件連遺伝子#123 の同定, 学会抄録集, 第76回日本薬理学会, 2003

平野美保, 山田美佐, 山田光彦, 樋口輝彦, 百瀬和享: リチウム及び高頻度経頭蓋的磁気刺激長期負荷後の cysteine string protein の発現変化, 学会抄録集, 第76回日本薬理学会, 2003

角田美果, 山田美佐, 山田光彦, 樋口輝彦, 百瀬和享: ラット前頭葉皮質における抗うつ薬と電気けいれん療法による VAMP2/synaptobrevin2 の発現変化, 学会抄録集, 第76回日本薬理学会, 2003

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案  
なし

3. その他  
なし

## 神経ステロイドの脳波学的解析

国立精神・神経センター精神保健研究所 精神生理部

部長 内山 真

研究協力者

鈴木博之、田ヶ谷浩邦、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、ヒトにおける睡眠中の長期増強の指標として視覚弁別課題の開発と視覚弁別課題における睡眠による成績向上と関連を有する脳波パラメーターを明らかにし、次年度における薬物投与実験における評価法確立を目標とした。この結果、睡眠後半における深いノンレム睡眠、特にデルタ帯域波の出現が睡眠中の技能獲得に関連していることが明らかになった。シグマ帯域波と睡眠中の技能獲得との関連は見いだせなかった。

### 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増強を観察した。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、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と視覚弁別課題における睡眠による成績向上と関連を有する脳波パ

ラメーターを明らかにし、次年度における薬物投与実験における評価法確立を目標とした。

## B. 研究方法

### 1) 対象

8名の健康な成人(男性2名、女性6名)が実験に参加した(平均24.5±3.4才)。研究に参加するにあたり、実施される実験内容、予測される危険性について十分な説明を行い、書面による同意を得た。被験者は規則正しい生活をし、最近3ヶ月以内に時差地域に旅行しておらず、22時以降にシフトワークや夜勤についていない者を選んだ。実験前1週間は飲酒・喫煙をしないよう指示し、毎日の入床時刻、入眠時刻、覚醒時刻、起床時刻の睡眠日誌への記録と、携帯型活動量測定装置(アクチグラフ、Mini Mitter社製)を用いた連続的な活動量測定を行い、睡眠習慣が規則的であることを確認した。本実験は、国立精神・神経センター精神保健研究所精神生理部の時間隔離実験室で行った。

### 2) 実験デザイン

実験1夜目を順応夜、2夜目を実験夜とするプロトコルを用いた。実験1日目は19時に被験者を集合させ、20時より脳波(10-20法: C3, C4, O1, O2)、眼球運動および筋電図、心電図の電極を装着した。実験は完全空調の隔離実験室で行い、実験室内は温度24℃、

## Experiment protocol

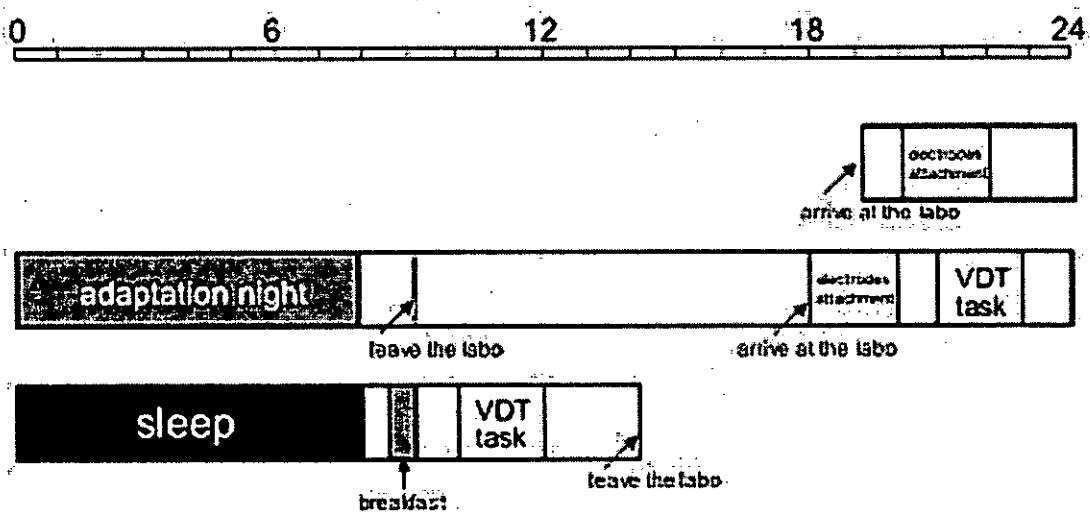


図1. 実験デザイン

湿度 60%、照度 150lux に保つことで、外部からの音、光、温度が睡眠に与える影響を最大限に除外した。0時から8時まで睡眠を取り、9時に実験室から帰宅した。

2夜目は18時に被験者は実験室に集合し、1夜目と同様に電極装着をおこなった後、21時より視覚弁別課題を行った。0時に消灯し8時の起床まで終夜睡眠ポリグラフィを試行した。起床後9時より朝食を取り、11時に再び視覚弁別課題を行い、課題終了をもって実験の終了とした。視覚弁別課題は25回のセッションから成り立ち、回数を増すごとに刺激間隔の減少により難易度が高くなる。各刺激間隔における正答率をグラフ化し、正答率が80%にまで低下したときの刺激間隔(ms)を算出し、これを課題成績とした。睡眠前後の課題成績の差を求め、成績向上量とした。

### 3) 睡眠脳波解析

睡眠ポリグラフ記録に対し、30秒ごとに Rechtschaffen & Kales の基準に従って視察による睡眠段階判定を行った。脳波データは時定数 0.3 秒、ハイカットフィルタ 60Hz で記録され、サンプリング周波数 200Hz でデジタル化された。C3-A2 導出脳波に対して PASS PLUS (Delta Software, St. Louis) を用いて FFT 解析を行った。FFT 解析は 5.12 秒のウェルチテーパウインドウを 2.62 秒の重なりを持って移動させることにより、30 秒間のデータに対して 12 のデータを算出した。上記の手続きにより、Delta (0.3-3Hz)、Theta (3-8Hz)、Alpha (8-12Hz)、Sigma (12-15Hz)、Beta (15-20Hz) 各周波数帯域の 30 秒間あたりのパワー値を算出した。

### 4) 視覚弁別課題

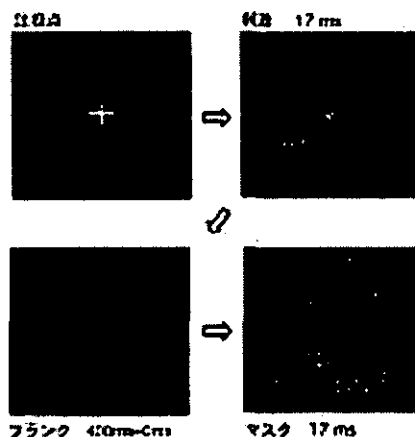


図2. 視覚弁別課題の手順

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。全試行終了には、90分かかった。

### C. 結果

Subjects	Before (ms)	After (ms)	Improvement (ms)
A	156.7	120.0	36.7
B	60.0	53.3	6.7
C	140.0	111.7	28.3
D	78.3	73.3	5.0
E	80.0	91.7	-11.7
F	65.0	53.3	11.7
G	82.2	65.6	16.7
H	115.0	98.3	16.7
Mean	78.4	63.4	15.0
SD.	33.0	24.1	11.8

表1. 各被験者の課題向上量

1) 課題成績

7名の参加者に成績向上が認められ、1名はわずかな低下を示した。平均向上量は15.0 ± 11.8 msecであった。最大向上量は36.7ms、低下した参加者は1.7msの低下であった。

2) 睡眠変数と向上量の関係

睡眠時間は465.5 ± 2.8分、睡眠段階1 (S1)出現時間は31.6 ± 11.0分、睡眠段階2 (S2)出現時間は241.1 ± 33.0分、睡眠段階3+4 (SWS)出現時間は81.1 ± 34.4分、レム睡眠 (SREM)出現時間は111.8 ± 23.2分であった。各睡眠段階と向上量の関係をピアソンの相関係数を用いて検討した結果、S1: r = -0.14, p = 0.74, S2: r = -0.24, p = 0.58, SWS: r = 0.28, p = 0.52, SREM: r = 0.03, p = 0.95であり、全ての睡眠指標において

Sleep Parameters	Mean(min)	S.D.	%
Stage1	31.6	11.0	6.6%
Stage2	241.1	33.0	50.2%
SWS	81.1	34.4	16.9%
REM	111.8	23.2	23.3%
Total Sleep Time	465.5	2.8	97.0%

表2. 全睡眠時間における睡眠変数

有意な相関は見られなかった。

次に一晩の睡眠を前半と後半に分けて、それぞれの睡眠指標と向上量との関係を検討した。睡眠前半の各睡眠段階出現時間は、S1: 13.0 ± 7.4分、S2: 115.1 ± 24.6分、SWS: 65.3 ± 23.6分、SREM: 37.4 ± 7.3分であった。

Sleep Variables	Mean(min)	S.D.	%
<b>Early</b>			
Stage1	13.0	7.4	5.4%
Stage2	115.1	24.6	40.0%
SWS	65.3	23.6	27.2%
REM	37.4	7.3	15.6%
<b>Late</b>			
Stage1	18.6	7.0	7.8%
Stage2	125.9	20.5	52.5%
SWS	15.8	14.6	6.6%
REM	74.3	19.1	31.0%

表3. 睡眠前半・後半における睡眠変数

睡眠後半では S1: 18.6 ± 7.0分、S2: 125.9 ± 20.5分、SWS: 15.8 ± 14.6分、SREM: 74.3

± 19.1分であった。前半と後半の睡眠段階出現時間を対応のある t 検定を用いて比較したところ、S1: t = -1.712, p = 0.13, S2: t = -0.98, p = 0.36, SWS: t = 7.37, p = 0.0002, SREM: t = -6.05, p = 0.0005であり、前半の睡眠にSWSが、後半の睡眠にREMがそれぞれ有意に多く出現していることが確かめられた。これらの睡眠変数と向上量の関係を検討した結果、睡眠後半(4時から8時)のSWS出現時間と向上量に有意な正の相関が認められた (r = 0.728, p < 0.038)。前半後半ともに、その他の睡眠段階と向上量の間には有意な相関は認められなかった。

Sleep Variables	r	p value
<b>Early</b>		
Stage1	0.38	0.37
Stage2	-0.25	0.58
SWS	-0.05	0.92
REM	0.24	0.58
<b>Late</b>		
Stage1	-0.63	0.10
Stage2	-0.09	0.84
SWS	0.73	0.039
REM	-0.06	0.90

表4. 各睡眠変数と向上量との相関

3) 睡眠脳波の周波数解析結果と向上量の関係睡眠中の各周波数帯域のパワー値は、Delta: 62.72, Theta: 9.06, Alpha: 2.56, Sigma: 1.04, Beta: 0.66であった。向上量との相関を求めたところ、全ての帯域との間に有意な相関は認められなかった。

FFT Bands	All	Early	Late
Delta(0.3-3Hz)	62.72	84.89	40.40
Theta(3-8Hz)	9.06	11.19	6.92
Alpha(8-12Hz)	2.56	2.95	2.16
Sigma(12-15Hz)	1.04	1.10	0.97
Beta(15-23Hz)	0.66	0.67	0.63

表5. 各周波数帯域のパワー値

睡眠前半の各周波数帯域のパワー値は、Delta: 84.89, Theta: 11.19, Alpha: 2.95, Sigma: 1.10, Beta: 0.67であった。睡眠後半の各周波数帯域のパワー値は、Delta: 40.40, Theta: 6.92, Alpha: 2.16, Sigma: 0.97, Beta: 0.65であった。前半の睡眠と後半の睡眠で各周波数帯域のパワー値を比較したところ、Delta: t = 4.12, p = 0.0045, Theta: t = 3.99, p = 0.0053, Alpha: t = 2.944, p = 0.02, Sigma: t = 0.86, p =

0.042, Beta :  $t = 0.10$ ,  $p = 0.92$ であった。睡眠前半の Delta, Theta, Alpha 帯域のパワー値が有意に大きかった。これらの睡眠変数と向上量の関係を検討した結果、睡眠後半のノンレム睡眠中に出現した Delta 帯域のパワー値と向上量の間には有意な正の相関が認められた ( $r = 0.729$ ,  $p < 0.038$ )。

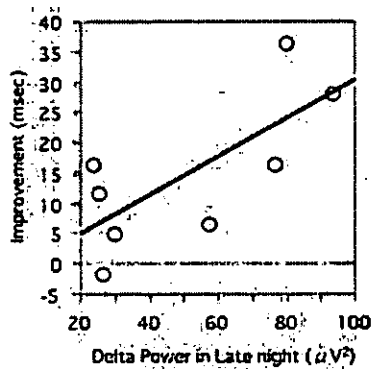


図3. Delta 帯域パワー値と向上量

#### 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。さらに視覚弁別課題の成績向上には睡眠が必要であることが実験的に示されており、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。

本実験は統制された条件下において手続き記憶測定課題である視覚弁別課題を行い、視察による睡眠段階判定と FFT による周波数解析法を用いた睡眠脳波解析による分析を行い、睡眠前後の課題向上量との関係を検討したものである。その結果、睡眠後半の深いノンレム睡眠と手続き記憶の向上量が有意な正の相関を示すこと、睡眠後半の Delta

帯域出現量と向上量が有意な正の相関を示すことが明らかになった。睡眠後半に脳が休息していることがこの手続き記憶学習の向上に関わっていると考えられた。

従来手続き記憶の向上にはレム睡眠が大きく関わると考えられてきた。Karni et al. (1994)はレム睡眠を選択的に奪った場合、視覚弁別課題の成績が向上しないことを報告した。Stickgold et al. (2000)は睡眠後半のレム睡眠出現量が成績向上に大きく関わっていることを示した。しかし、本実験においては総睡眠時間、睡眠前半、後半全てにおいて、レム睡眠と向上量との間には有意な相関が認められなかった。先行研究における結果との相違は、本実験においてレム睡眠出現過程が阻害されなかったことによると考えられる。本実験においてレム睡眠出現量は平均 111 分であり、全体の睡眠時間に占める割合は 23.3%であった。この値は健康成人における標準的な値である。さらに睡眠前半においては平均 37.4 分、後半では 74.3 分と睡眠経過に伴い増加を示した。この睡眠経過によるレム睡眠の増加は脳内のレム睡眠機構の概日変動を反映したものである。これらの結果は、参加者の睡眠が統制された実験室環境において妨げられることがなかったことを示している。本実験における結果は、レム睡眠が通常睡眠において一定量出現したときには課題の向上が見られるが、その出現量と向上量は関係しないことを示唆している。Karni(1994)においては選択的レム睡眠剥奪が行われており、一定量のレム睡眠が出現しなかったことが課題向上をもたらさなかったのかも知れない。Stickgold et al. (2000)が報告した、後半のレム睡眠量が課題向上量と関係するという結果は、特定の参加者において睡眠後半のレム睡眠が何らかの要因によって阻害されたことが影響していた可能性もある。彼らの結果では睡眠後半にレム睡眠のしめる割合が 5%以下であった参加者が 12 名中 4 名おり、通常睡眠過程が阻害されていた可能性が考えられる。

ノンレム睡眠と手続き記憶の関係を強調する報告もいくつか見られる。Gais et al. (2000)は、3 時間の睡眠を通常睡眠時間の前半または後半に取らせて、その前後に視覚弁別課題を行い、前半睡眠と後半睡眠で課題向上量を比較した。その結果、後半睡眠の前