

ことである。さらに GR 遺伝子改変動物を用いて GR 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のかを明らかにしていきたい。

#### E. 結論

大うつ病性障害および双極性障害において GR  $\alpha$  mRNA 発現量は健常人に比べ有意に低下していた。GR  $\alpha$  mRNA 発現低下はうつ状態や抗うつ薬依存性ではなかった。双極性障害患者第一度血縁者でも GR  $\alpha$  mRNA 発現低下を認めることから、双極性障害に関しては trait-dependent な変化であると考えられる。

#### 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、出射 綾、船戸弘正、西田 朗、渡辺 義文

気分障害患者における末梢血白血球中グルココルチコイド受容体  $\alpha$ 、 $\beta$  の検討

第 26 回 日本生物学的精神医学会 (2004)

東京

船戸弘正、出射 綾、西田 朗、松原敏郎、渡辺義文

抗うつ薬によるグルココルチコイド受容体発現への影響

第 26 回 日本生物学的精神医学会 (2004)

東京

船戸弘正、出射 綾、西田 朗、松原敏郎、渡辺義文

抗うつ薬はグルココルチコイド受容体発現

を増加させる

第 27 回 日本分子生物学会 (2004) 神戸

Hiromsa Funato, Aya Idei, Toshio Matsubara, Akira Nishida, Yoshifumi Watanabe

Influence of antidepressants on the expression of glucocorticoid receptor

Society for Neuroscience, 34th Annual meeting (2004) SanDiego

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

うつ病の脆弱性に関する神経生物学的研究：  
interferon- $\alpha$  によるうつ病脆弱性モデルの解析

分担研究者 神庭重信

九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野 教授

近年、抗うつ薬の作用が海馬神経新生の促進と関係している可能性が示唆されている。今回我々は、うつ病の脆弱性のモデルとして、うつ病を誘発することで知られるサイトカイン interferon 投与による海馬神経新生への影響を調べた。その結果、hIFN- $\alpha$  投与により、アストログリアを介した IL-1 $\beta$  産生反応が誘発され、BrdU 陽性細胞が減少する。hIFN- $\alpha$  の中枢作用機序の一端が明らかにされた。抗うつ薬の機序からのみ推定されていた、うつ病の病態として、海馬神経新生の抑制が関与している可能性が裏付けられた。

#### A. 研究目的

human interferon- $\alpha$  (hIFN- $\alpha$ ) は白血球の産生するサイトカインであり、NK 細胞活性化や IL-1,2,6, TNF- $\alpha$  等サイトカインの誘導による免疫賦活作用、抗腫瘍、抗ウィルス作用を持つため、C 型慢性肝炎、多発性硬化症などの治療に臨床応用されている。中枢神経系の有害作用、特に IFN 誘発性うつ病が hIFN- $\alpha$  療法中の患者の 30~45% に見られるが、抗うつ薬が有効である。

海馬歯状回(DG)では成長後も神経幹細胞の増殖・分化による神経新生が持続し、この現象が記憶・学習などの脳高次機能や各種ストレスに関連して亢進・抑制することが知られており、また抗うつ薬は DG の神経新生を促進する。IFN- $\alpha$  の CNS への作用機序は未だ不明だが、我々は DG における神経新生の抑制との関連を調べた。

昨年までの研究で、hIFN- $\alpha$  投与により、ラット海馬歯状回における BrdU 陽性細胞が減少すること、この減少 IL-1 $\beta$  産生と逆相関していることがわかった。今年度は、hIFN- $\alpha$  が BrdU 陽性細胞を減少させる機序の解明に迫った。

#### B. 研究方法

hIFN- $\alpha$  (5000IU/kg , 20000IU/kg , 50000IU/kg) 又は vehicle を 7 日間連日経静脈投与し、最終投与 24 時間前に BrdU で DNA 合成している細胞をラベルしたラットを還流固定して脳を取り出し、クリオスタット薄切して free-floating section を作成した。この切片について BrdU 免疫組織染色を行い、海馬歯状回の BrdU 陽性細胞を光学顕微鏡下でカウントした。同時に血中コルチコステロンを測定し、HPA axis との関連を見た。更にこの切片について IL-1 $\beta$  , TNF- $\alpha$  免疫組織染色を行い、脳の各部位における陽性領域の面積比を測定してサイトカイン誘導を解析した。IL-1 $\beta$  はウェスタンで定量化した。IL-1RA の前処置により、hIFN- $\alpha$  の BrdU 陽性細胞数の減少は抑制された。

#### C. 研究成果

DG の BrdU 陽性細胞数は、hIFN- $\alpha$  投与群すべてにおいてコントロール群に対し有意に減少しており、また hIFN- $\alpha$  投与量と正の相関を認めた。hIFN- $\alpha$  投与量・BrdU 陽

性細胞数と血中コルチコステロン値には関連は認められなかった。

IL-1 $\beta$ 陽性領域については、海馬でのみ低用量(5000IU/kg)IFN- $\alpha$ 群でも有意な増加を認め、TNF- $\alpha$ 陽性領域は、海馬・皮質・視床下部の全部位で最高用量群(50000IU/kg)のみ有意な増加を認めた。IL-1RAの前処置でhIFN- $\alpha$ によるBrdU陽性細胞の減少が抑制された。

#### D. 考察

hIFN- $\alpha$ 投与でヒトでは高率にうつ病を発症し、ラットでは強制水泳試験における無動時間が延長する。この実験で我々はhIFN- $\alpha$ によってDGのBrdU陽性細胞数が減少することを示した。本年、神経幹細胞の存在が抗うつ薬の作用機序に関連していることが示され、神経新生とストレス脆弱性の関連が示唆されており、本研究は薬物起因性という限界はあるものの、抑うつ状態の神経病理のひとつのモデルを提唱するものである。

我々の実験結果は、海馬が他の部位と比較してIL-1産生刺激に対して感受性が高いことを示している。またIL-1投与による行動異常や学習障害の報告の多いことから、DGにおけるIL-1産生を介するBrdU陽性細胞の減少が関与している可能性が高いと結論される。

#### E. 結論

hIFN- $\alpha$ 投与により、アストログリアを介したIL-1 $\beta$ 産生反応が誘発され、BrdU陽性細胞が減少する。hIFN- $\alpha$ の中樞作用機序の一端が明らかにされた。

#### F. 研究危険情報

該当せず

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

無し

##### 2. 学会発表

1. Kaneko N, Kudo K, Mabuchi T, Takemoto K, Wati H, Iguchi H, Fujimaki K and Kanba S: Role of neurogenesis in human interferon-alpha induced animal model of depression. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, Oct., 2004

#### H. 知的財産その他

無し

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

分担研究者 白尾 智明

群馬大学大学院医学系研究科高次細胞機能学分野 教授

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、昨年度作製したドレブリンA特異抗体と従来の汎ドレブリン抗体M2F6を組み合わせることにより、脳内の神経細胞移動を網羅的に解析出来るシステムの開発に成功した。

A. 研究目的

これまでの本研究班の研究成果により、躁鬱病において細胞移動の異常があることが推測されている。本研究は、BrdUや放射性同位元素などを事前に投与することなく、死後脳において網羅的に移動神経細胞を同定する方法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

(抗体の特異性の検定)

抗体の特異性の検定は、昨年度ウェスタンブロットにより確認済みであったが、さらに慎重を期すためにドレブリンAノックアウトマウスを用いて確認した。ウェスタンブロット用には、脳より海馬、大脳皮質を取り出し、それぞれ10倍量のSDSサンプルバッファーでホモゲナイズして、サンプルを調整した。サンプルはLaemmliのバッファー系を用いて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。マウスの免疫染色には、4% PFA + 1% glutaldehydeにより固定し、1% NaBH<sub>4</sub>処理を行った(室温 30分)後、免疫染色を行った。

(ラット免疫組織染色法) ラット脳を4%パラフォルムアルデヒド(0.1Mリン酸バッファー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。

(倫理面への配慮)

動物実験獅子に際しては、群馬大学昭和畜動物実験委員会の倫理規定に従った。動物は十二分に振麻酔を施し、苦痛を除去して実験を行った。また、動物使用数に関しても最低限の必要動物数を用いた。

C. 研究成果

(抗体の特異性について)

昨年度作製したドレブリンA特異的抗体は、ドレブリンAノックアウトマウスでは、ウェスタンブロットでも免疫染色でも陽性のシグナルを検出できないことが確かめられた。

(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」)の免疫染色)

側脳室下帯の移動中の細胞は、M2F6抗体

により濃染するが、ドレブリンA特異抗体では全く染まらなかった。従って、移動中の細胞はドレブリンEのみを発現していると考えられた。これに反して、ニューロピルの染まり、M2F6絵もドレブリンA特異抗体でも同様の点状の染まり方を示した。この点状の染まりは従来の研究成果より樹助突起スパインであると考えられる。今回の染色結果より、スパインには少なくともドレブリンAが集積していることがわかった。しかしながら、ドレブリンEがドレブリンAと同じようにスパインに集積しているかどうかはわからない。

また、これらの抗体を用いて慢性ストレスラットの側脳室下帯の神経細胞移動を解析したところ、明らかな差は観察できなかった。

#### D. 考察

以上の結果より、移動中の神経細胞をM2F6抗体で細胞体が濃染し、ドレブリンA特異抗体では染まらないような細胞として同定することにより、BrdUや放射性同位元素の事前投与無しに、かつ移動中の神経細胞を網羅的に解析することを可能とするシステムを開発できた。この免疫染色システムを用いて、慢性ストレスラットの側脳室下帯の神経細胞移動を解析したところ、明らかな差は観察できなかった。今後は免疫染色像のより定量的な測定方法を開発する必要があることがわかった。また、今後このシステムを用いて、鬱病患者の死後脳を解析することにより、鬱病患者死後脳に観察される大脳皮質の層構造異常が、細胞移動の異常によるものかどうかを解析することが出来ると考えられる。

#### E. 結論

移動中の神経細胞をM2F6抗体で細胞体が濃染し、ドレブリンA特異抗体では染まらないような細胞として同定することが出来ると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tezuka, M., Oda, O., Shirao, T., Inoue, H.K., "Microglia/macrophage reactions and cell proliferation during the repair of spinal cord injuries in infant rats" *Neurotrauma Res*, 15: 17-20 (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.* 49:205-217 (2004)

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.* 14:650-658 (2004)

Hanaoka, R., Ohmori, Y., Uyemura, K., Hosoya, T., Hotta, Y., Shirao, T., Okamoto, H. "Zebrafish gcmb is required for pharyngeal cartilage formation" *Mech Dev.* 121:1235-1247 (2004)

Aoki, C., Sekino, Y., Hanamura, K., Fujisawa, S., Mahadomrongkul, V., Ren, Y., and Shirao, T. "Drebrin A is a Postsynaptic Protein that Localizes in vivo to the Submembranous Surface of Dendritic Sites Forming Excitatory Synapses" *J. Comp. Neurol* 483: 383-402. (2005)

関野祐子、高橋秀人、白尾智明「スパインアクチン細胞骨格は興奮生シナプス成熟を制御する」蛋白質・核酸・酵素 49: 270-275 (2004)

白尾智明、関野祐子、高橋秀人「蛋白レベルから見た神経シナプスの発達と異常」日本精神神経薬理学雑誌 24: 247-256 (2004)

##### 2. 学会発表

The 6th biennial meeting of the Asian-Pacific Society, Hong Kong, China. February 2004. Yamazaki H., Shirao, T. "A novel drebrin

- binding protein, Drap1, is localized in synaptic site, nucleus and non-clathrin-coated vesicle.”
- First ISN special Neurochemistry Conference  
“Changes in neuronal gene expression and CNS drug responses” May 13-16, 2004, Avignon, France. Shirao, T., Takahashi, H.; Sekino, Y.; Hanamura, K. “Expression of Drebrin A Induces Drebrin-dependent Actin Clustering and Synaptic Targeting of Postsynaptic Density-95
- Gordon Research Conferences “Cell Biology Of The Neuron” chaired by Halpain S. and Neher E. June 20-25, 2004 Colby-Sawyer College, New London, NH (Invited)
- Workshop on “Molecular Basis of Synaptic Plasticity “June 27 – June 30, 2004 Center for Neural Science, NYU, New York, NY (Organized and Invited)
- Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004. Minisymposium on “Mechanisms of structural plasticity of dendritic spines” chaired by Penzes P., T. Shirao, H. Takahashi, Y. Sekino and T. Mizui. “Activity-dependent regulation of drebrin-actin cluster formation during spine development.” (Invited)
- 14th Neuropharmacology Conference: The Cytoskeleton and Synaptic Function October 20-22, 2004, San Diego, CA, USA. Takahashi, H., Mizui, T., Sekino, Y., Yamazaki, H., Shirao, T. “Bidirectional regulation of dendritic spine morphogenesis during development by AMPA and NMDA receptor activities via postsynaptic actin organization.”
- 14th Neuropharmacology Conference: The Cytoskeleton and Synaptic Function October 20-22, 2004, San Diego, CA, USA. Sekino, Y., Mizui, T., Takahashi, H., Shirao, T. “Dynamics of drebrin A in the dendritic spine of cultured hippocampal neuron”
- Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004. Kobayashi, C., Sasagawa, Y., Sekino, Y., Yamazaki, H., Shirao, T. “Morphological and electrophysiological analysis of transgenic mice overexpressing GFP-drebrin A”
- Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004. Ito, M., Doya, K., Shirao, T., Sekino, Y. “Fos imaging reveals that the supramammillary nucleus enhances hippocampal activity of rats placed in a novel open field”
- Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, 2004. Takahashi, H., Mizui, T., Sekino, Y., Yamazaki, H., Shirao, T. “Bidirectional regulation of dendritic spine morphogenesis during development by AMPA and NMDA receptor activities via postsynaptic actin organization”
- 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
- 伊藤真、銅谷賢二、白尾智明、関野祐子「オープンフィールド探索時のラットにおける海馬 c-Fos 発現に対する上乳頭体核イボテン酸破壊の効果」第81回日本生理学会年会、札幌、2004年6月2日～8日
- 高橋秀人、水井利幸、関野祐子、山崎博幸、白尾智明「発生過程のスパインアクチン細胞骨格形成に対する AMPA と NMDA 受容体活動の役割」第81回日本生理学会年会、札幌、2004年6月2日～8日
- 花村健次、水井利幸、白尾智明「海馬神経細胞におけるドレブリン A と PSD95 の局在」第47回日本神経化学学会大会第27回日本神経科学大会合同大会、大阪、2004年9月21日～23日
- 水井利幸、高橋秀夫、白尾智明「ドレブリン A 過剰発現による F アクチンと PSD-95 の樹

状突起フィロポディアへの集積」第47回  
日本神経化学会大会第27回日本神経科学大会合同大会、大阪、2004年9月21日～23日

山崎博幸、水井利幸、白尾智明「ドレブリン結合タンパク質DBP1の樹状突起スパインでの局在はc末端領域の配列に依存する」第47回日本神経化学会大会第27回日本神経科学大会合同大会、大阪、2004年9月21日～23日

宋明橋、花村健次、三國雅彦、白尾智明「成熟ラット脳内の移動中の神経前駆細胞はドレブリンEを発現しているがドレブリンAは発現していない」第47回日本神経化学会大会第27回日本神経科学大会合同大会、大阪、2004年9月21日～23日

高橋秀人、水井利幸、関野祐子、山崎博幸、白尾智明「樹状突起スパイン形成のAMPA受容体とNMDA受容体活性による二方向性制御」第47回日本神経化学会大会第27回日本神経科学大会合同大会、大阪、2004年9月21日～23日

関野祐子、伊藤真、銅谷賢二、白尾智明「新規場所符号化におけるラット海馬神経活動に対する上乳頭体核の関係」第47回日本神経化学会大会第27回日本神経科学大会合同大会、大阪、2004年9月21日～23日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

無し

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

分担研究者 加藤忠史

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

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、生理学的解析を行った。

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。既存の気分安定薬は作用が不十分であり、新規治療薬の開発が望まれる。しかし、これまで双極性障害の動物モデルは存在しなかった。

我々は、ミトコンドリア DNA(mtDNA)の多重欠失による慢性進行性外眼筋麻痺（CPEO）で気分障害を合併すること、双極性障害患者の死後脳で mtDNA 欠失が見られたことに着目し、CPEO の原因遺伝子の 1 つであるポリメラーゼ  $\gamma$  (POLG) に点変異を導入したモデルマウスを作成し、双極性障害類似の表現型を呈することを見出した。本年度は、このマウスの生理学的特性を調べた。

B. 研究方法

マウスを断頭し、脳を取り出し、海馬切片を作成した。海馬 CA1 錐体細胞にパッチピペットを挿入し、蛍光色素カルシウムグリーンを注入し、細胞内カルシウム濃度を測定し、細胞外から与えた種々の薬物の影響を観察した。

（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

本トランスジェニックマウスでは、G 蛋白質を介したカルシウムシグナリングが減衰していることが判明した。

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、双極性障害モデル動物となりうることを示した。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、カルシウムシグナリングに変化を生じたことから、今後双極性障害モデル動物として、創薬研究に用いることができると考えられた。

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

Iwamoto K, Bundo M, Kato T (2005) Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. Hum



Mole Genet 14: 241-53.

Munakata K, Tanaka M, Mori K, Washizuka S, Yoneda M, Tajima O, Akiyama T, Nanko S, Kunugi H, Tadokoro K, Ozaki N, Inada T, Sakamoto K, Fukunaga T, Iijima Y, Iwata N, Tatsumi M, Yamada K, Yoshikawa T, Kato T (2004) Mitochondrial DNA 3644T → C mutation associated with bipolar disorder. Genomics 84: 1041-1050

## 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

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

### 3. その他

抗うつ療法の奏効機転候補分子の機能的評価に関する研究

分担研究者 山田光彦 国立精神・神経センター精神保健研究所 部長

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をしている。そこで、分担研究者は抗うつ療法の奏効機転候補分子の機能的評価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 16 年度は、神経伝達物質の開口放出に関与する分子クラスターの候補分子について発現解析を行い、候補遺伝子群がシナプス前機能変化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証明した。分担研究者が行った一連の研究は、シナプス前機能変化といった神経可塑的变化の検討を通して、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シナプス前機能変化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シナプス前機能変化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効機転候補分子の機能的評価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 16 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。また、透過型電子顕微鏡を用いて神経細胞の形態 (微細構造) 変化について検討した。

### 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 と相溶性検索を行い、既知遺伝子と相溶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。プレシナプスの小胞上に存在し、神経伝達物質の開口放出に関与する ADRG のタンパクレベルでの発現変化を検討した結果、抗うつ薬長期投与による発現増加が認められた。一方、プレシナプス膜上に存在する SNAP 25 及び syntaxin に発現変化は認められなかったが、小胞マーカーの synaptophysin 及び secretogranin は顕著に増加していた。続いて、透過型電子顕微鏡を用いてプレシナプスの形態を観察した結果、抗うつ薬長期投与により active zoon の面積が増加している傾向が示された。

### 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 と相溶性検索を行い、既知遺伝子と相溶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に関与するという報告がある。一方、本研究においてプレシナプス膜上のタンパク発現は変化せず、小胞マーカータンパクにおいて増加が認められたことから、小胞の数の増加が示唆された。さらに、active zoon の面積の増加傾向は開口放出能の増加を示す可能性が考えられたが今後の詳細な検討を要する。

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あらためて考えられた。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機構の変化等が引き起こされていることを示唆するものである。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
  1. Takahashi K, Yamada M, Ohata H, Momose K, Higuchi T, Honda K and Yamada M : Expression of Ndr2 in the rat frontal cortex after antidepressant and electroconvulsive treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*, 8, 1-9, 2005
  2. Kudo K, Yamada M, Takahashi K, Nishioka G, Tanaka S, Hashiguchi T, Fukuzako H, Takigawa M, Higuchi T, Momose K, Kamijima K, Yamada M: Repetitive transcranial magnetic stimulation induces klf-1 expression in the rat brain. *Life Sci*, in press, 2005
  3. 西岡玄太郎, 山田光彦 : 気分障害における脳画像研究の進歩. *精神科 5* : 44-47, 2004
  4. Yamada M, Yasuhara H.: Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. In "Monoamine oxidases: molecular, pharmacological and neurotoxicological aspects" Eds. A. Nicotra, et al., Elsevier (Amsterdam), pp215-pp222, 2004
2. 学会発表
  1. Yamada, M.: Pharmacogenomics and depression research, antidepressant elicited changes in gene expression. WFSBP Asia-Pacific Congress and 41st Meeting of KSBP, Seoul, 2004.7.9-11.
  2. 斎藤顕宜, 山田光彦, 山田美佐, 亀井淳三: 慢性投与モデルを評価系に用いたオピオイドδ受容体作動薬の抗うつ作用の解析. シンポジウム「分子からこころを探る」. 第34回日本神経精神薬理学会第26回日本生物学的精神医学会合同年会, 東京, 2004.7.21-23
  3. Yamada, M.: Functional genomics in search for novel therapeutic target for novel antidepressant. Showa University International Symposium for Life Sciences 1st Annual Meeting. *New Frontiers in Neuroscience Research*, Tokyo, 2004.8.31.
  4. 山田光彦 : 個人至適化医療確立のための抗うつ薬関連遺伝子多型の系統的探索. 第25回日本臨床薬理学会年会, 東京, 2004.9.16-18.
  5. 山田光彦, 山田美佐, 百瀬和享, 上島国利, 樋口輝彦 : 抗うつ薬治療反応性の背景にあるヒト遺伝子多型の系統的探索. 第37回精神神経系薬物治療研究報告会, 大阪, 2004.12.10.
- 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

(参考資料1)

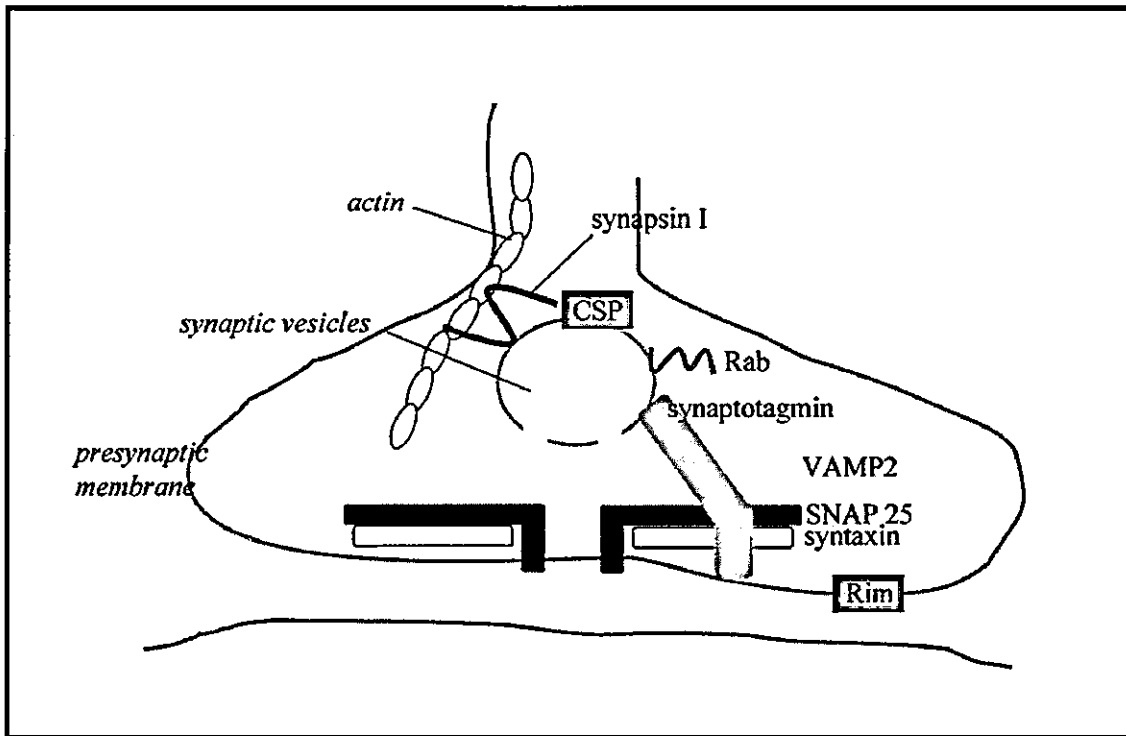


図1. 神経伝達物質の開口放出に関与するプレシナプスタンパク

神経伝達物質の開口放出は、プレシナプスに存在する多数のタンパクの相互作用により引き起こされる。本研究では開口放出に関連する ADRG として ADRG#14 の VAMP 2、ADRG#55 の CSP、ADRG#279 の synapsin I、ADRG# 280 の Rab 3、ADRG#425 の Rab1 A、ADRG#563 の synaptotagmin が検出された。

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

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：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。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、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、脳波定量解析を用いて検討した。この結果、ベンゾジアゼピン系睡眠薬を投与した際に、睡眠中のシグマ帯域パワー値の増加がみられる場合に獲得技能の睡眠後の改善が悪化することがわかった。

A. 研究目的

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 例の健康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。

本分担課題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、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、Friess らと同様な FFT による脳波定量解析を用いて検討した。

## B. 研究方法

対象として健康な 20 歳から 22 歳の規則的な生活を送っている成人男性 8 名が参加した。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。

実験 1 日目は、17 時に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。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。

視覚弁別課題は、Karni の開発したものをを用いた。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。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。ブランクが 300-0ms 表示される。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。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。

実験第 3 日目の終夜睡眠ポリグラフについて、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。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。30 秒間のデータに対して 12 のデータを算出し、デルタ(0.3-3Hz)、シータ(3-8Hz)、アルファ(8-12Hz)、シグマ(12-15Hz)、ベータ(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。

(倫理面への配慮)

本研究においては、国立精神・神経センター国府台地区倫理委員会の承認を得て行った。実験参加者に対しては、研究の目的・趣旨・方法・予測される危険性等についての十分な説明を行い、さらに書面による同意を得た。

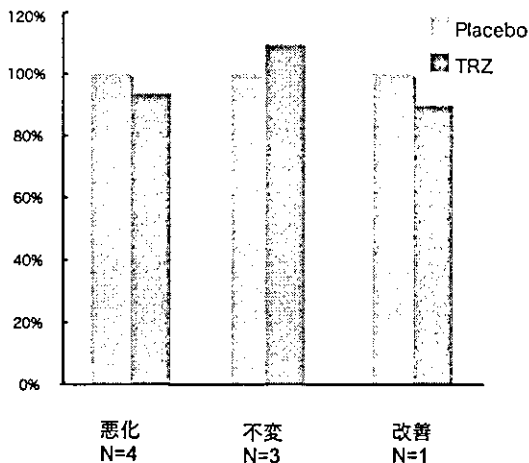
## C. 研究結果

8 例における視覚弁別課題の成績について、paired t-test を用いて検討したが、トリアゾラムの投与による有意な変化はみられなかった。このため、トリアゾラム投与後の変化が 10%未満であったものを不変例、10%以上改善したものを改善例、10%以上の悪化を示したものを悪化例として検討した。

この結果、悪化例が4例、不変例が3例、改善例が1例であった。

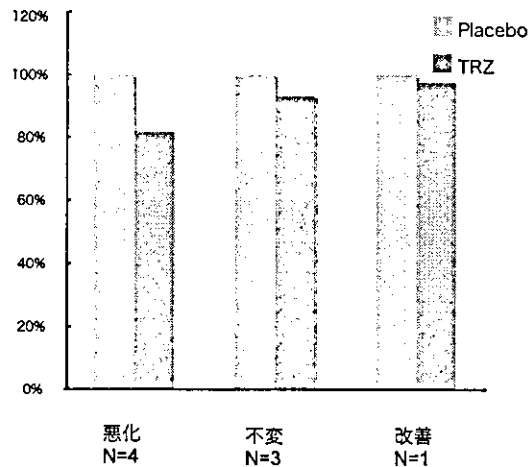
トリアゾラム投与によりいずれの群においても、視察判定より得られた睡眠段階2の増加と睡眠段階3+4の減少が全例でみられた。悪化例、不変例、改善例で特徴的な変化はみられなかった。

トリアゾラム投与による  
Delta帯域活動量の変化

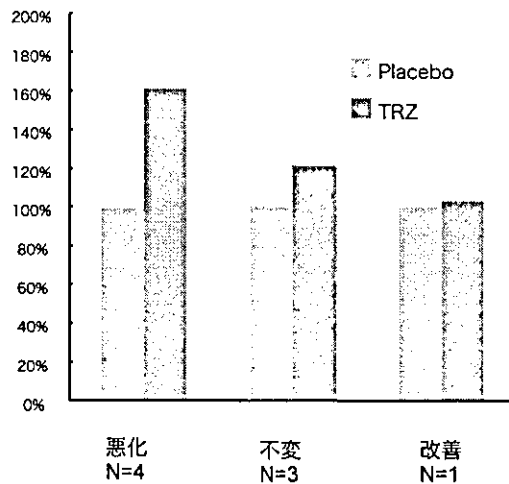


3群について、終夜睡眠ポリグラフで得られた睡眠脳波のパワー値についてトリアゾラム投与による変化を検討した。その結果、デルタ帯域およびシータ帯域パワー値に関しては、3群で一定した変化はみられなかった。アルファ帯域パワー値については、悪化例では19%減少、不変例では7%減少、改善例では1%減少であった。シグマ帯域パワー値については、悪化例では62%増加、不変例では23%の増加がみられ、改善例においては2%とほぼ変化がみられなかった。

トリアゾラム投与による  
Alpha帯域活動量の変化



トリアゾラム投与による  
Sigma帯域活動量の変化



#### D. 考察

本研究において、視覚弁別課題における夜間睡眠前後の技能習得にGABA神経系が与える影響について、8例の健常者を対象に、就床時二重盲験法でトリアゾラムを投与しその変化について検討した。その結果、トリアゾラム投与により、4例で視覚弁別課題の成績向上が悪化、3例で不変、1例で改善した。先行研究において、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。

本研究においては、終夜睡眠ポリグラフの視察判定では、全例でベンゾジアゼピンに特徴とされる脳波変化がみられたが、悪化例、不変例、改善例を特徴づける変化はみられなかった。しかし、FFT を用いた周波数解析を行うと、悪化例においてシグマ帯域パワー値の上昇、アルファ帯域パワー値の低下がみられた。これらの変化は、GABAA 受容体に作用する薬物を投与した際の睡眠脳波特性に一致する。このため、ベンゾジアゼピンは、睡眠による技能習得・強化に対して抑制的に働くものと考えられた。

#### E. 結論

ヒトにおいて、睡眠中に手続き記憶の獲得・強化が行われていることが、明らかになった。これに関してベンゾジアゼピン誘導体は、手続き記憶の獲得・強化に抑制的に働くことがわかった。さらに、この作用は睡眠中の GABA 神経系の活動と関係していることが示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kaneita Y, Ohida T, Uchiyama M, Takemura S, Kawahara K, Yokoyama E, Miyake T, Harano S, Suzuki K, Yagi y, Kaneko A, Tsutsui T, Akashiba T: Excessive daytime sleepiness among Japanese General population. *Journal of Epidemiology* 15: 1-8, 2005.
- 2) Suzuki H, Uchiyama M, Tagaya H, Ozaki A, Kuriyama K, Aritake S, Shibui K, Tan X, Kamei Y, Kuga R. Dreaming During Non-rapid Eye Movement Sleep in the Absence of Prior Rapid Eye Movement Sleep. *SLEEP* 27: 1486-1490, 2004.
- 3) Hiroki M, Uema T, Kajimura N, Ogawa K, Nishikawa M, Kato M, Watanabe T, Nakajima T, Takano H, Imabayashi E, Ohnishi T, Takayama Y, Matsuda H, Uchiyama M, Okawa M, Takahashi K, Fukuyama H. Cerebral White Matter Blood Flow Is Constant During Human Non-Rapid Eye Movement Sleep: A Positron Emission Tomographic Study. *J Appl Physiol*. 2004 Dec 23;
- 4) Suzuki K, Ohida T, Kaneita Y, Yokoyama E, Miyake T, Harano S, Yagi Y, Ibuka E, Kaneko A, Tsutsui T, Uchiyama M: Mental health status, shift work, and occupational accidents among hospital nurses in Japan. *J Occup Health* 46: 448-454, 2004.
- 5) Masudomi I, Isse K, Uchiyama M, Watanabe H. Self-help groups reduce mortality risk: a 5-year follow-up study of alcoholics in the Tokyo metropolitan area. *Psychiatry Clin Neurosci* 58: 551-7, 2004.
- 6) Aritake S, Uchiyama M, Tagaya H, Suzuki H, Kuriyama K, Ozaki A, Tan X, Shibui K, Kamei Y, Okubo Y, Takahashi K: Time estimation during nocturnal sleep in human subjects. *Neurosci Res* 49: 387-93, 2004.
- 7) Takano A, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Inoue Y, Kamei Y, Kitajima T, Shibui K, Katoh M, Watanabe T, Hashimoto-dani Y, Nakajima T, Ozeki Y, Hori T, Yamada N, Toyoshima R, Ozaki N, Okawa M, Nagai K, Takahashi K, Isojima Y, Yamauchi T, Ebisawa T. A Missense Variation in Human Casein Kinase I Epsilon Gene that Induces Functional Alteration and Shows an Inverse Association with Circadian Rhythm Sleep Disorders. *Neuropsychopharmacology*. 29: 1901-09, 2004.
- 8) Tagaya H, Uchiyama M, Ohida T, Kamei Y, Shibui K, Ozaki A, Tan X, Suzuki H, Aritake S, Li L, Takahashi K: Sleep habits and factors associated with short sleep duration among Japanese high-school students: A community study. *Sleep and Biological Rhythms* 2: 57-64, 2004.
- 9) Kajimura N, Nishikawa M, Uchiyama M, Kato M, Watanabe T, Nakajima T, Hori T,

- Nakabayashi T, Sekimoto M, Ogawa K, Takano H, Imabayashi E, Hiroki M, Onishi T, Uema T, Takayama Y, Matsuda H, Okawa M, Takahashi K. Deactivation by benzodiazepine of the basal forebrain and amygdala in normal humans during sleep: a placebo-controlled [15O]H<sub>2</sub>O PET study. *Am J Psychiatry*. 161: 748-51, 2004.
- 10) Uchiyama M, Kamei Y, Tagaya H, Takahashi K: Poor compensatory function for sleep loss in delayed sleep phase syndrome and non-24-hour sleep-wake syndrome. *SLEEP AND BIOLOGICAL RHYTHMS* vol.2 supplement 1: s 5- s 6, 2004.
- 11) 内山真: 不眠に対する非薬物療法. *こころの科学* 116 : 57-63, 2004.
- 12) 内山真, 田ヶ谷浩邦, 尾崎章子, 亀井雄一, 渋井佳代, 譚新, 栗山健一, 鈴木博之, 有竹清夏: 概日リズム睡眠障害について. *精神保健研究* 49 : 121-126, 2004.
- 13) 田ヶ谷浩邦, 内山真: 時間生物学からみたうつ病. *CLINICAL NEUROSCIENCE* 22: 158-160, 2004.
- 14) 田ヶ谷浩邦, 内山真: 不眠症薬物療法の新しい展開. *臨床精神薬理* 7 : 173-181, 2004.
- 15) 田ヶ谷浩邦, 内山真: 薬によらない不眠治療. *Clinical Neuroscience* 22: 80-82, 2004
- 16) 内山真: 概日リズムの睡眠障害のうつ病について. *臨床精神薬理* 7 : 1037-1047, 2004.
- 17) 内山真: 不眠症につきあうために. *Prog. Med* 24 : 1828-1837, 2004.
- 18) 内山真: 知っておきたい睡眠の知識. *調剤と情報* 11 月号 : 1626-1631, じほう, 2004.
- 19) 阿部又一郎, 栗山健一, 内山真: 不眠と睡眠の科学①睡眠を科学する 睡眠と記憶・学習. *こころの科学* : 48-52. 2004.
- 20) 内山真, 土井永史: (監修) 睡眠障害ハンドブック. 診療新社, 2004.
- 21) 内山真: 成人の睡眠覚醒リズム障害に対するメラトニンの効果. メラトニン研究会 編: メラトニン研究の最近の進歩. 星和書店, 東京, pp177-190, 2004.
- 22) 内山真, 田ヶ谷浩邦, 亀井雄一: 睡眠薬. 山田信博編: 治療薬イラストレイテッド. pp179-182, (株) 羊土社発行, 東京, 2004.
- 23) 内山真: 精神保健福祉用語辞典. 社団法人日本精神保健福祉士協会, 日本精神保健福祉学会: 監修, 中央法規出版 (株) 発行, 東京, 2004.
- 24) 亀井雄一, 内山真: 睡眠障害 (不眠). 日本医師会雑誌特別号 vol.131, 上島国利, 牛島定信, 武田雅俊, 丹羽真一, 宮岡等 監・編: 精神障害の臨床, pp154-157, 2004.
- 25) 亀井雄一, 内山真: 高照度光療法. 久保木富房, 中村純, 山脇成人 編: NAVIGATOR, pp222-223, メディカルレビュー社発行, 東京, 2004.
- 26) 内山真: 不眠症. *Medical Practice* 編集委員会 編: 内科外来診療実践ガイド pp306-308, 文光堂, 東京, 2004.
- 27) 内山真: 睡眠時無呼吸症候群. *Medical Practice* 編集委員会 編: 内科外来診療実践ガイド pp309-310, 文光堂, 東京, 2004.
- 28) 尾崎章子, 内山真: すこやかな眠りを導くための看護実践ハンドブック. (株) 社会保険研究所, 東京都, 2004.
- 29) 内山真: 睡眠障害. 高久史磨, 北村惣一郎, 猿田享男, 福井次矢 監修 家庭医学大全科 p835-837, (株) 法研, 東京, 2004.
- 30) 内山真: ナルコレプシー. 高久

史磨、北村惣一郎、猿田享男、福井次矢 監修 家庭医学大全科 p837-838, (株)法研, 東京, 2004.

31) 内山真: 睡眠時無呼吸症候群. 高久史磨、北村惣一郎、猿田享男、福井次矢 監修 家庭医学大全科 p838-839, (株)法研, 東京, 2004.

32) 内山真: 睡眠相後退症候群. 高久史磨、北村惣一郎、猿田享男、福井次矢 監修 家庭医学大全科 p839, (株)法研, 東京, 2004.

33) 内山真: 神経内科のトピック 6. 睡眠障害の最新治療. 金澤一郎、柴崎浩、東儀英夫、小林祥泰、祖父江元、佐古田三郎、西澤正豊、水澤英洋、梶籠兒 編: 神経内科の最新医療. Pp33-38, 先端医療技術研究所, 東京, 2004.

## 2. 学会発表

1) Uchiyama M: Are there cultural differences in the alertness concept? 2nd International Sleep Disorders Forum. Paris, France, 2004. 9. 10-12.

2) Uchiyama M: Abnormal circadian organization in delayed sleep phase syndrome and non-24-hour sleep-wake syndrome. Presidential symposium: Circadian rhythm sleep disorders. 17th CONGRESS OF THE EUROPEAN SLEEP RESEARCH SOCIETY, 2004. 10. 6-10, Prague, Czech Republic.

3) Tagaya H, Uchiyama M, Ohida T, Kamei Y, Shibui K, Ozaki A, Tan X, Suzuki H, Aritake S, Li L, Takahashi K: Sleep habits and factors associated with short sleep duration among Japanese high-school students: A community study (proceeding). 17th Congress of The EUROPEAN SLEEP RESEARCH SOCIETY, Prague, Czech, 2004 Oct 5-9.

4) Tagaya H, Uchiyama M, Kamei Y, Shibui K, Ozaki A, Tan X, Suzuki H, Aritake S, Li L: Subjective sleep duration under high and low

sleep pressure conditions (proceeding). 17th Congress of The EUROPEAN SLEEP RESEARCH SOCIETY, Prague, Czech, 2004 Oct 5-9.

5) 亀井雄一, 早川達郎, 渋井佳代, 田ヶ谷浩邦, 内山真. 2004. 非 24 時間睡眠覚醒症候群に対するメラトニン治療の有効性. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004.7.1-2.

6) 栗山健一, 内山真, 鈴木博之, 田ヶ谷浩邦, 尾崎章子, 有竹清夏, 渋井佳代, 亀井雄一. 2004. 時間知覚の概日変動. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004.7.1-2.

7) 田ヶ谷浩邦, 内山真, 亀井雄一, 渋井佳代, 尾崎章子, 譚新, 鈴木博之, 有竹清夏, 李嵐. 2004. 異なる睡眠圧による主観的睡眠時間への影響. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004.7.1-2.

8) 田ヶ谷浩邦, 内山真, 大井田隆, 亀井雄一, 渋井佳代, 尾崎章子, 譚新, 鈴木博之, 有竹清夏, 李嵐, 高橋清久. 2004. 高校生の短い睡眠時間に関する要因- 千葉市、四街道市におけるコミュニティー研究-. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004.7.1-2.

9) 藤井猛, 亀井雄一, 宇佐見政英, 齋藤万比古, 田ヶ谷浩邦, 内山真. 2004. 家庭内暴力、集団不適応をおこした学童期発症のナルコレプシーの一例. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004.7.1-2.

10) 尾崎章子, 渋井佳代, 李嵐, 譚新, 鈴木博之, 栗山健一, 有竹清夏, 田ヶ谷浩邦, 内山真. 2004. 100 歳以上の高齢者における睡眠と心身の健康、生活習慣、生活環境. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004.7.1-2.

11) 有竹清夏, 鈴木博之, 栗山健一, 尾崎章子, 譚新, 李嵐, 渋井佳代, 亀井雄一, 田ヶ谷浩邦, 松浦雅人, 内山真. 2004. 昼間睡眠中の時間認知. 日本睡眠学会第 29 回学術集会, 東京, 2004.7.1-2.

12) 李嵐, 尾崎章子, 渋井佳代, 関口夏奈

子,譚新,栗山健一,鈴木博之,有竹清夏,田ヶ谷浩邦,内山真. 2004.睡眠不足、日中の眠気と心身不調との関連- 全国一般成人における疫学的検討-. 日本睡眠学会第 29 回学術集会,東京, 2004.7.1-2.

13) 鈴木博之,有竹清夏,栗山健一,渋井佳代,李嵐,譚新,尾崎章子,田ヶ谷浩邦,内山真. 2004.睡眠後の手続き記憶向上と睡眠脳波の関係.日本睡眠学会第 29 回学術集会,東京, 2004.7.1-2.

14) 譚新,鈴木博之,有竹清夏,尾崎章子,李嵐,渋井佳代,栗山健一,松浦雅人,田ヶ谷浩邦,内山真. 2004.暗条件下のメラトニン分泌リズムと睡眠習慣の関係.日本睡眠学会第 29 回学術集会,東京, 2004.7.1-2.

15) 内山真: (ワークショップ) 超短時間睡眠・覚醒スケジュールによる眠気の日内変動測定. 第 11 回日本時間生物学会, 滋賀県大津市, 2004.11.11-12.

16) 高野敦子,内山真,梶村尚史,三島和夫,井上雄一,豊嶋良一,尾崎紀夫,大川匡子,高橋清久,磯島康史,海老澤尚: ヒト Case in Kinase epsilon 遺伝子の機能的多型と概日リズム睡眠障害との相関. 第 11 回日本時間生物学会, 滋賀県大津市, 2004.11.11-12.

17) 譚新,渋井佳代,尾崎章子,鈴木博之,李嵐,有竹清夏,栗山健一,亀井雄一,田ヶ谷浩邦,内山真: 概日リズムと睡眠との位相関係. 第 11 回日本時間生物学会, 滋賀県大津市, 2004.11.11-12.

18) 栗山健一,内山真,鈴木博之,田ヶ谷浩邦,尾崎章子,有竹清夏,渋井佳代,亀井雄一: 時間知覚の概日変動. 第 11 回日本時間生物学会, 滋賀県大津市, 2004.11.11-12.

19) 鈴木博之,有竹清夏,栗山健一,渋井佳代,李嵐,譚新,尾崎章子,田ヶ谷浩邦,内山真: 睡眠前半後半の定量的脳波

活動と手続き記憶の向上. 第 11 回日本時間生物学会, 滋賀県大津市, 2004.11.11-12.

20) 有竹清夏,鈴木博之,栗山健一,尾崎章子,譚新,李嵐,渋井佳代,亀井雄一,田ヶ谷浩邦,内山真: 昼夜逆転させた昼間睡眠中における時間認知. 第 11 回日本時間生物学会, 滋賀県大津市, 2004.11.11-12.