

20050076 B

厚生労働科学研究研究費補助金
こころの健康科学研究事業

ストレス性精神障害の成因解明と
予防法開発に関する研究

平成15年度～17年度 総合研究報告書

主任研究者 山 脇 成 人

平成18年(2006年)3月

目 次

I. 総合研究報告	
ストレス性精神障害の成因解明と予防法開発に関する研究…………… 1	
山脇 成人	
(資料) 乳幼児期の母子関係におけるリスク因子と補償因子に関する研究(図1, 表1～6)	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表……………47	
III. 研究成果の刊行物・別刷……………51	

I. 総合研究報告

総合研究報告書

ストレス性精神障害の成因と予防法に関する統合的解析及び研究

主任研究者 山脇成人 広島大学大学院医歯薬学総合研究科（精神神経医科学） 教授

研究要旨 うつ病、摂食障害などのストレス性精神障害の病態に関する脳機能画像解析および養育環境が及ぼすストレス脆弱性形成の脳内分子機序を解明し、児童精神医学の観点も含めた予防法開発を試みた。ストレス脆弱性形成の分子機構の解明に関する研究：ストレス性精神障害患者における海馬萎縮や、その発症危険因子として不良な養育環境が関与することなどの報告から、ストレス性脆弱性形成と養育環境の関連性を解明するために、母子分離ラットを用いて行動学的、分子生物学的検討を行った。1)母子分離によるストレス脆弱モデルラットの海馬遺伝子発現を検討した結果、LIMK-1, Insulin-like growth factor (IGF)-1受容体、IGF結合蛋白やIntergin β 3などの神経発達に關与する遺伝子発現が低下しており、母子分離が海馬機能障害を惹起してストレス脆弱性を形成することが示唆された。この分離機序がうつ病などのストレス性精神障害で報告されている海馬萎縮に關与することが推測された。また、この脆弱性が離乳後の良好な飼育環境で修復可能であることも明らかとなった。2)生後早期のストレス暴露はアクチビン機能障害を介して神経新生機能を低下させること、ストレス暴露により細胞骨格蛋白アクチン機能が障害され海馬神経樹状突起スパインの形成変化を誘発されることを明らかにした。この変化を脳由来神経栄養因子BDNFが抑制することから、BDNFの神経保護作用がストレス脆弱性形成の予防に有用である可能性を示唆した。ストレス性精神障害の病態に関する脳機能画像研究：うつ病や摂食障害などのストレス性精神障害の病態や精神病理の脳内機構を解明するために、情動ストレス課題、短期・長期報酬予測課題を用いてfMRIによる脳機能画像解析を行った。また、乳幼児の愛着行動の脳内機構を解明するために、乳幼児を対象とした光トポグラフィー（NIRIS）による脳機能解析を行った。1) fMRIを用いた検討で、うつ病では快予測（左前頭前野）機能が低下する一方で、不快予測（右前頭前野）機能が亢進していること、またセロトニンが關与する長期報酬予測機能が低下することから将来展望が持てず悲観的思考となることが示唆された。2)身体イメージに関する視覚・言語ストレス課題を用いた検討で、女性では前頭前野や扁桃体（情動活動）が反応するのに対し、男性では視覚・空間認識機能に關連する脳部位が反応していることから、女性は身体イメージに情動的に反応し、これが摂食障害の病因に關与することを報告した。3)乳幼児を対象としたNIRSを用いた検討で、母子相互作用に關わる視覚的・嗅覚的要因が、乳幼児の脳機能発達に影響を及ぼし、愛着行動に關与することを明らかにした。ストレス性精神障害の発症予防に関する児童精神医学的検討：上記の脳科学的研究成果を踏まえたストレス性精神障害高リスク児のスクリーニング法確立を目的に、3歳児健診の場で幼児の行動面からみた発達評価と、養育者への問診票Parenting Stress Indexによる養育態度評価を行った。3歳児健診においてストレス性精神障害の高リスク児のスクリーニング法開発を試みた結果、母親の年齢が若く、子供の行動面の問題（機嫌・困らせる度合・規制）が高いと、養育に対するストレス度の大きくなることがわかり、このような特性をもつ家族への3歳児健診を利用した早期発見スクリーニング法を確立し、養育支援がストレス性精神障害の発症予防に重要であることが示唆された。

分担研究者

森信 繁

広島大学大学院医歯薬学総合研究科・
助教授

神庭重信

九州大学大学院医学研究院・教授

尾藤晴彦

東京大学大学院医学系研究科・助教授

井ノ口馨

三菱化学生命科学研究所・主任研究員

岡本泰昌

広島大学大学院医歯薬学総合研究科・講師

利島 保

広島大学大学院教育学研究科・教授

田中康雄

北海道大学大学院教育学研究科・教授

A. 研究目的

A-1. ストレス脆弱性形成の分子機構の解明に関する研究

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くストレス脆弱性の形成されていることが行動学的・神経内分泌学的に明らかにされ、ヒト成人期ストレス脆弱性のモデルとみなされている。平成 12-14 年度の厚生労働省科学研究費こころの健康科学研究の助成を受け、本研究者らは母子分離によって成熟期ラットが拘束ストレスに曝露されると、1) 有意なコルチコステロン分泌亢進を示す、2) 拘束解除後の自発運動が顕著に減少する、3) c-Jun N-terminal kinase-2, 94 kDa glucose-regulated protein の発現が海馬で有意に減少する、ことを明らかにしてきた。これまでの研究に引き続き本研究でも同様に、母子分離ストレスによって引き起こされるストレス脆弱性の分子機序の解明を以下のように行った。A-1) 母子分離による成長後の拘束ストレス脆弱性形成の分子機序の解明、A-2) 母子分離のおよぼす成長後の記憶・学習障害の分子機序の解明、A-3) 母子分離のおよぼす成長後の PTSD 症状形成への影響の検討。

A-2. ストレス性精神障害の病態形成と治療に関する脳機能画像解析研究

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) を用いて、様々な検討を行っている。本研究では、ストレス性精神障害の病態の解明と予防法の開発のため以下の点について明らかにすることを目的とした。

1) ストレスの認知に関する脳内機構

1-1) 情動的ストレス単語の認知、1-2) 自己の身体イメージの認知

2) ストレスへの適応強化のための心理機構の脳内機構

2-1) Imagery , 2-2) Anticipation ,
2-3) Prediction of future rewards

3) ストレス適応の破綻した障害 (うつ病) の脳内機構

3-1) Anticipation, 3-2) Prediction of future rewards

4) ストレス適応機構 (Prediction of future rewards) に対するセロトニンの影響

A-3. 養育環境が作るストレス脆弱性の神経生物学的研究

我々は、以下に概略をまとめた 3 つの大きな研究を 3 年間に行ったので、それぞれにつき、目的・方法・結果と考察をまとめる。

A-3-1. 母子分離操作がうむ子ラットの不安行動と母親の養育行動関連遺伝子の研究
母子分離操作を加え、成熟後の高架式十字迷路実験と open arm での滞在時間測定を行った。この行動変化と、母子分離を行った前後での母ラットの養育行動の変化との関連性を観察し、養育行動の影響を調べた。また、養育行動と深く関係する神経核である medial preoptic area と amygdala を取

り出し、gene chip で発現が変化した遺伝子を同定した。

A-3-2. インターフェロンによる海馬神経新生の抑制のメカニズム：うつ病脆弱性モデル

養育環境で生まれる脆弱性に海馬神経新生の低下が知られている。インターフェロン α (hIFN- α) で起こることを発見したが、この機序をさらに明らかにするために、免疫組織学的手法を用いた研究を行った。

A-3-3. ストレス脆弱性の神経化学的基盤

中枢の主要なストレス反応系である前頭前野カテコールアミン系とグルタミン酸系の機能的連関について検討を行った。

A-4. ストレス依存性海馬神経形態変化の分子機構

ストレス暴露時の過剰神経活動後には、スパイン形態や樹状突起形態に著明な異変が起こることがすでに示されている。そこで、本研究では、ストレス暴露様シナプス活動後のスパイン形態変化の解明と、その変化に関与しうるシグナル経路の同定に焦点を絞り、以下の点について研究を進める。

- 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を解明する。
- 2) 興奮性神経細胞における新規アクチン制御機構の探索を行う。

A-5. 生後脳の神経新生から見た精神疾患発症機序に関する研究

A-5-1. 性的成熟期における神経新生阻害が、大人になってからの行動異常を引き起こす可能性を検討した。

A-5-2. 成熟脳のシナプス可塑性に重要な役割を果たしているアクチピンが、神経新生やストレス脆弱性に関与している可能性を検討した。

A-5-3. いったん強固に形成された恐怖記憶を人為的に消去する方策をさぐり、PTSD治療への展開を探った。

A-6. 乳幼児の認知・情動発達に関する神経心理学的研究

A-6-1. うつ病などのストレス精神障害に関して、人生のごく初期の段階で、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が、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されている。Schoore (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皆無とあってよく、実証的なデータが求められている。本研究は、乳児院在籍のネグレクト症状を示す乳児の観察から、対照群となる一般家庭の健常乳児と大人の他者との相互作用が、乳児の脳機能の発達に及ぼす影響を明確にする必要があると考えて、一般家庭の乳児を対象として、近赤外分光法 (near-infrared spectroscopy, NIRS) と呼ばれる脳機能イメージング法により、大人の他者と相互作用する際に発せられる大人の視覚的情動情報が、乳児の脳機能に及ぼす影響を検討した。

A-6-2. ストレス脆弱性に関わる乳幼児期の要因として、母子間の愛着、絆の不全が古くから指摘されている。母子の相互作用を通じて生まれる母子の絆 (mother-infant-bond) の形成が、単一の感覚モダリティによるものでなく、母親の顔、声、表情、匂い、肌触りといった多感覚的なモダリティが、母子の相互作用を通じて統合され、絆と呼ばれる情動表象を形成していくと考えられる。こうしたマルチモーダルな情報の統合や、母子の相互作用に関わる情動調節機能は、前頭前皮質が深い関わりを持つといわれる。しかし、乳幼児においてマルチモーダルな情報が前頭前皮質でどのように処理されているのかは、これまで乳幼児の脳活動を非侵襲に測定する方法がなかったため、あまり良く知られていない。そこで、本研究は、最新の脳機能イメージング法を用い、各種モダリティを乳幼児に提示した時の前頭前皮質 (眼窩前頭領域 orbitofrontal cortex, OFC) の活動について検討する。

嗅覚刺激の情動誘発性に関して、OFCの活性化動態を、成人を対象に嗅覚刺激のみによる条件とそれ以外の随伴手がかりが存在する条件を設けた研究を行った結果、手がかりが存在しない条件では、OFCには嗅覚

刺激強度に比例した血流量の増加が認められ、逆に、手がかりのある条件では、OFCの血流増加の度合いが少なくなることが認められた。この結果から、成人の場合、嗅覚刺激に対する快・不快といった情動的評価の在り方が、OFCにおける血流の増加・減少を左右することが示唆された。

この研究に基づき、本研究では嗅覚刺激による新生児の前頭領域の血行動態反応への影響を見ることにより、新生児にとっての母子の絆形成の情動情報としての母乳の匂いの機能について検討した。即ち、嗅覚システムはおよそ在胎32週でほぼ完成すると言われており、Bartocci, Winberg, Papendieck, Mustica, Serra, & Lagercrantz (2000)は、母乳のニオイに対する新生児の認識を脳活動レベルで捉える目的で、初乳(出産直後1週間に分泌される母乳)とバニラのニオイ呈示が、嗅覚システムの中核である新生児の前頭眼窩領域の活性化を導くことをNIRSにより確認した。本研究では、母乳に加え人工乳を刺激として用いて、新生児における嗅覚を手がかりとした母親に対する認識が血行動態反応に現れるか否かをNIRSにより検討した。

A-6-3. 母子相互作用事態で与えられる顔の表情刺激の視覚情報が、乳幼児の脳活動に影響する発達過程を検討するため、乳児院在籍並びに一般家庭哺育の1歳未満児を対象として3、6、9ヶ月ごとに縦断的追跡を行い、乳幼児の視覚的認知と情動との関係について検討することを目的とした。すなわち、表情の豊かな顔(笑顔)と表情の乏しい顔(無表情)を乳児が見たときの前頭部位における脳血流中の酸素化ヘモグロビンの状態の測定を、生後3ヶ月と6ヶ月の縦断的な変化について観察した。

A-6-4. 乳幼児にストレス刺激を人為的に与えることができないため、自然的状態でストレス刺激と考えられる痛覚刺激が与えられる事態として、NICUで哺育管理されている極低出生体重児に対して、定期的に与えられる注射の痛覚刺激が、これらの検児の脳血行動態に及ぼす影響を検討することにより、従来痛みに対する感覚が無いとされていた新生児期の乳児の痛覚反応の評価可能性を探るとともに、痛覚刺激の情動機能への影響を間接的に検討することを目

的とした。

A-7. 乳幼児期の母子関係におけるリスク因子と補償因子に関する検討

児童精神医学の分野において、近年注目されているのが、軽度発達障害と児童虐待の問題、および非行問題である。その背景に子どもの育ちを支える家族と地域社会の機能が議論されているが、われわれは、ある失調をつねに誰かの責任という考え方をしがちであり、そのまえに、何が課題となっていて、どのような改善策を提案するかについての着目が弱い傾向にある。

われわれは、子どもの育ちを見守り、支援するうえで重要な意義をもっている3歳児健診事業に対して、子育て支援と親支援としての活用可能性を検討し、親の心労との関連をつかみながら、子どもの育ちを簡便に点検できるチェックリストの開発と、親支援のポイントの抽出を行うことを目的とした。

A-8. 平成17年度3歳児健診制度を用いたストレス性精神障害高リスク児の早期スクリーニングと母親の養育ストレス度調査

本研究では、平成17年度に実施された3歳児健診をフィールドに、ストレス性精神障害高リスク児のスクリーニングのための3歳児健診用チェックリストと母親の養育に伴うストレスを日本語版PSI(Parenting Stress Index)により調査し、ストレス性精神障害高リスク児の早期スクリーニングと養育上のストレスと発症高リスクとの関連を検討した。具体的には、1)母親の属性(年齢、学歴、出産経験)と養育ストレスとの関連、2)母親の属性及び子どもの行動特徴と養育ストレスとの関連、3)過去12ヶ月間に経験した母親のストレスイベント及び子どもに関するストレスが、母親の養育ストレスを予測するかについて検討した。

B. 研究方法

B-1. ストレス脆弱性形成の分子機構の解明に関する研究

実験には、全て雄性Sprague-Dawleyラットを用い、12時間毎に明暗期を保ち飼育した。

B-1-1. 母子分離による成長後の拘束ストレ

脆弱性形成の分子機序の解明

ストレスパラダイム：妊娠ラットを購入し、出産後の雄性仔ラットを用いた。誕生後 2-9 日目までの 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。誕生後通常的环境下で飼育したものを正常飼育群とした。それぞれのラットが成長した後(生後 6 週と生後 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 Mergen 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 T4 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 2 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-1 (IGF1)、IGF2、IGF1 receptor (IGF1R)、IGF2R、IGF-binding protein-2 (IGFBP2) 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。

Western blot 法：ラット海馬を homogenization buffer 中でホモジェナイズし、10000g で 10 分間遠心後、上清を回収した。60 μ g のタンパクを 7.5% SDS ゲル (IGF1R) または 12.5%ゲル (IGFBP2) を用いて電気泳動し、メンブレンに転写した。IGF1R または IGFBP2 の 1 次抗体および 2 次抗体でインキュベーション後に、バンドを

検出し、デンストメーターを用いてシグナルの定量を行った。正常飼育+母子分離群、母子分離+急性拘束ストレス群で比較検討を行った。

免疫組織染色法：ラット海馬内 IGF1R タンパク発現の部位の変動を検討する目的で、免疫組織染色を行った。海馬スライス (15 μ m) を作成し、IGF1R の 1 次抗体および 2 次抗体でインキュベーション後、陽性細胞を検出し、デジタルビデオイメージ解析装置にて画像を得た。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比較検討を行った。

B-1-2. 母子分離のおよぼす成長後の記憶・学習障害の分子機序の解明

動物処置：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、誕生後通常的环境下で養育したものを非母子分離群とした。母子分離後もしくは通常の養育後に良好な环境下で飼育した群では、離乳後にケージ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。

恐怖条件付けパラダイム：上記 4 群 (非母子分離群、母子分離群、通常養育+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ダイムを行った。ラットを実験用チャンバーに移し、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。このパラダイムを 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ビデオテープに記録し、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ダイム：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、新規環境曝露後最初の 5 分間の自発運動量測定を行った。

高架式十字迷路：上記 4 群が 6 週齢に成長した後、恐怖条件付け実験曝露前および実験 3 日間曝露後での高架式十字迷路における 5 分間の自発運動中のオープンアーム滞在時間測定を行った。

抗体マイクロアレイ法：非母子分離群、母子分離群について、上記恐怖条件付けパラダイムの 3 日目に 3 分間の実験チャンバー

への曝露（観察期間）の直後に断頭、海馬を摘出した。非母子分離群、母子分離群、それぞれ 6 匹のラット片側海馬をホモジェナイズし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（ゲル濾過）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。

Western blot 法：ラット海馬内 Intergrin $\beta 3$ および ApoE 蛋白発現量の測定は Western blot 法にて行った。抗体アレイの再現性をみるために、非母子分離群・母子分離群において恐怖条件付け実験 3 日目曝露後、すくみ行動に有意差を認めていない恐怖条件付け実験 4 日目曝露後、タンパク質発現に対する母子分離および恐怖条件付け実験の影響を評価するため実験曝露前の 3 つの時点で測定を行った。その後、母子分離により減弱したインテグリン $\beta 3$ 発現に対する良好な飼育環境の影響を調べるため、恐怖条件付け実験曝露前の非母子分離群、母子分離群、非母子分離 + 良好な飼育環境群、母子分離 + 良好な飼育環境群の 4 群におけるインテグリン $\beta 3$ の発現を検討した。サンプルをホモジネートし得られたタンパク質 40 μg を、Tris - glycine SDS-PAGE（ApoE：10%、Intergrin $\beta 3$ ：7.5%）を用いて電気泳動した。電気泳動後、蛋白質を PVDF メンブレンに転写し各々一次抗体および二次抗体で免疫反応を行った。Blot は比色定量法により検出し、各物質に該当するバンドの濃淡をデンシトメータで計測した。

免疫組織染色法：ラット海馬 Intergrin $\beta 3$ タンパク質発現の部位変動を検討する目的で免疫組織染色を行った。非母子分離群、母子分離群について、上記恐怖条件付けパラダイムの 3 日目に 3 分間の実験チャンバーへの曝露（観察期間）の直後に断頭、海馬を摘出し、海馬スライス（15 μm ）の脳切片を作成して、Western blot 法と同様に一次抗体・二次抗体とハイブリダイゼーション後、anti-biotin-peroxidase system で

陽性細胞を検出し、ビデオイメージ解析装置にて画像を得た。

B-1-3. 母子分離のおよぼす成長後の PTSD 症状形成への影響の検討

動物処置：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 9 日目までの 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、誕生後通常的环境下で養育したものを Sham 群とし、両群ともに生後 22 日目で離乳を行った。8 週齢で SPS ストレス負荷を行い、1 週間の undisturbed period を経て 9 週目で、以下の行動実験を行った。a) Open field locomotor test (角型のオープンフィールドにラットを入れ、5 分間の自発運動量を計測した)・b) 高架式十字迷路 (5 分間、オープンアームへの進入回数、滞在時間などを計測した)・c) 恐怖条件づけ試験・d) Flinch jump test (ラットをスキナーケージに入れ、3 分間の馴化期間を置いた後、電気刺激 (0.05 ~ 1.0mA:0.05mA ずつ電流を増加) を加え、ラットの刺激に対する反応の閾値 (尻込み、泣き声、ジャンプ) を計測した)・e) Hot plate test (ラットを 52.5°C に保った hot plate の中に置き、後ろ肢をなめるまでの潜時を計測した)。EE 処置群は離乳後 4 週間 (3 週目から 6 週の終わりまで)、ケージに輪回しやトンネルを配備した環境で飼育し、同様に行動解析を行った。

B-2. ストレス性精神障害の病態形成と治療に関する脳機能画像解析研究

B-2-1-1. 健常者を対象とした情動的ストレス単語の認知の機能局在の性差に関する fMRI を用いた検討

平均年齢 25 歳の右利きの健常な男女各 13 例に、情動決定課題と対照課題を遂行してもらい、その間の脳活動を fMRI を用いて測定した。情動決定課題では、被験者に対し 5.4 秒ごとに不快な身体イメージに関連した単語 3 語 (例えば '太る' '脂肪' 'ぜい肉' など) を 1 セットにした単語刺激を MRI 装置に入った被験者に見せ、その都度 3 語のなかで最も不快に感じる単語を選んでその単語に対応するボタンを MRI 装置内で押してもらった。対照課題では、同様に情動的に中性的な単語 3 語 (例えば '種類' '時間'

‘述べる’など)を1セットとした刺激を5セット呈示し、その都度3語のなかで最も情動的に中性と感じる単語を選んでボタンを押してもらった。各被験者には機能的MRIの撮像終了後、情動決定課題と対照課題で使用された全60語の単語それぞれについて、「快さ」と「親しみやすさ」を7点満点で評価してもらった。併せて、摂食障害調査表という質問用紙にて、食行動や身体イメージの障害など、摂食障害の症状と関連のある心理学的・行動学的特徴の評価も行った。

B-2-1-2. 健常者を対象とした自己身体イメージ認知の機能局在の性差に関するfMRIを用いた検討

対象は右利きの健常女性11例(平均年齢 \pm SD=24.5 \pm 3.4歳)、右利きの健常男性11例(平均年齢 \pm SD=24.8 \pm 3.1歳)である。身長や体重を測定し、また摂食障害調査表(Eating Disorder Inventory-2: EDI-2)による食行動・身体イメージ障害や心理学的特徴の評価を行なった。男女の2群間で、Body Mass Index、EDI-2総得点に有意差はなかった。課題(body image task)は被験者自身の服装・姿勢(立位)を統一し撮像した全身デジタル画像を取り込み、デジタル操作で-25~+25%まで5%毎に拡大縮小して、やせイメージ、肥満イメージを作成し、真の身体イメージの組み合わせで構成した、やせ課題、肥満課題、対照課題を用いた。これらの課題を30秒ごとに交互に3回ずつ繰り返すブロックデザインで行い、この間の脳活動をfMRIで測定した。肥満課題とやせ課題では、変形身体イメージと真の身体イメージを比較して、どちらがより不快かを選択し、ボタンを押して行い、対照課題では、赤い印がついているイメージを選択し、ボタンを押して行うよう教示した。測定された画像は解析ソフトSPM99を用いて統計解析を行い、各被験者群で変形身体課題遂行中に対照課題遂行中と比較して有意に活動が上昇した領域を同定した。

B-2-2-1. 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ブロックデザインとし、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。

B-2-2-2, B-2-3-1. 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)を持つスライドを呈示した(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)を交互に行なった。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-2-2-3, B-2-3-2. 健常者およびうつ病者を対象とした将来の報酬予測の機能局在に関するfMRIを用いた検討

うつ病患者12例と年齢、性をマッチングさせた健常者12例を対象に、1.5TのMRI装置を用い、時間軸を含まず金額のみ異なる条件(immediate condition;左右どちらのボタンを押しても、1回○が出れば選択した報酬がもらえる)と時間軸と金額の異なる条件(immediate vs. delayed condition;左ボタン(immediate)を選ぶと○が1回であれば10円もらえるが、右ボタ

ン (delayed) を選ぶと○が一回出ただけでは報酬がもらえず、3 回連続で○が出れば 50 円がもらえる。) で構成された課題を遂行中の fMRI を撮像した。

B-2-4. 健常者を対象とした将来の報酬予測の機能局在に対するセロトニンの影響に関する検討

対象は健常ボランティア 15 例で、課題は、白色・黄色の、黒いモザイクに覆われた四角形を提示し、ボタンを押しにより選択し色の四角形を覆うモザイクの量を減らしていき、すべてのモザイクが消えたときに報酬が獲得できる (白色では少額の、黄色では高額報酬)。各試行の初めに提示されるモザイクの量により、少額・高額それぞれの報酬が得られるまでの遅延時間が異なる。制限時間内に獲得できる合計金額が最多になるような選択を学習させる。さらに、われわれは、セロトニン神経系の時間的スケールを加味した報酬予測機能に与える影響を明らかにするために、セロトニンの前駆物質であるトリプトファンの過剰負荷、正常、欠乏した 3 条件のアミノ酸飲料を服用した後、1.5T の島津 Marconi 社製の MRI 装置を用い、脳機能測定を行った。脳の各部位がどのような時間スケールにおける報酬予測に関わるかを調べるために、被験者の脳活動データを強化学習の理論モデルに基づいて解析した。具体的には、各被験者が実際に経験した行動と報酬の時系列を、強化学習のプログラムに疑似体験させ、報酬予測の学習を行わせた。この際、予測の時間スケールを決める値を 6 通りに変えて学習を行わせた。このようにして学習プログラムが推定した各被験者にとっての報酬の「予測値」信号と、各被験者の脳活動データとの相関を調べた。

B-3. 養育環境が作るストレス脆弱性の神経生物学的研究

B-3-1. 母子分離操作を加え、養育環境を破壊したときに、不安行動が増加するかと調べた。

Wistar 系と SD 系ラットを用い、生後 3 日に、24 時間の母子分離操作を加えた。生後 21 日目に、高架式十字迷路実験を行い、open arm での滞在時間を測定した。次に、母子分離を行った前後での、母ラッ

トの養育行動の変化を観察した。

さらに、雌のバージンラットに pup を与えると、養育行動を起こすようになる。バージンの雌ラットに pup を与え、養育行動を起こした時に断頭、養育行動と深く関係する神経核である medial preoptic area と amygdala を取り出し、gene chip で発現が変化した遺伝子を同定した。

B-3-2. hIFN- α (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 β 、TNF- α 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 β はウェスタンで定量化した。IL-1RA の前処置により、hIFN- α の BrdU 陽性細胞数の減少は抑制された。

B-3-3. Wistar 系成熟雄性ラットを用いて、麻酔下に前頭前野に脳内微小透析用プローブを装着した翌日、脳内微小透析実験を行った。各薬物は人工脳脊髄液に溶解しプローブを介して前頭前野に局所還流した。採取した試料中のドパミンとノルエピネフリンをオンライン接続した HPLC-ECD により測定した。以上により、前頭前野細胞外カテコールアミンレベルをリアルタイムにモニタリングすることを可能とした。

B-4. ストレス依存性海馬神経形態変化の分子機構

B-4-1. 活動依存的アクチン再編成の分子機構の解明

これまで確立した海馬錐体細胞分散培養法に加え、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のアクチン細胞骨格系への影響を持続的にモニターできるシステムを開発する。具体的には、遺伝子銃やアデノウィルスを用いた遺伝子導入法により、GFP、GFP-actin、mCherry-actin cDNA を海馬錐体細胞に発現

させ、種々の神経刺激下でのアクチン細胞骨格再編成を可視化する。そして、アクチン動態と他の情報伝達蛋白のダイナミクスを共可視化する手法を開発し、ストレス性シグナルとしてのNMDA過剰投与に拮抗するシグナル伝達系の役割について明らかにする。

B-4-2. 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機構を明らかにするため、引き続き、1) スパインに局在化するアクチン制御機構の探索し、2) さらに、アクチン細胞骨格動態を活性化するカルシウム依存性経路の制御機構について明らかにする。

B-5. 生後脳の神経新生から見た精神疾患発症機序に関する研究

B-5-1. 細胞増殖阻害剤 (methylazoxymethanol acetate, MAM) を性的に未成熟な4.5週齢のラットに一過的に投与した。このラットを10-11週齢まで加齢させ、性的に成熟した時点で一般的活動性テスト・明暗選択テスト・prepulse inhibitionを行った。また、このラットの神経新生を解析した。

B-5-2. アクチビンの特異的阻害タンパク質であるフォリスタチンを生後3週齢以降に前脳特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス (FSM) を作製した。FSMの行動および脳の神経新生を解析した。

B-5-3. 脳海馬の長期増強 (LTP) の持続に必須であるアクチビンの機能を、tet OFF システムで前脳特異的にON/OFFできるトランスジェニックマウスを作製した。任意の時期にエサにDOXを混ぜることにより、アクチビンの特異的阻害タンパク質フォリスタチンの発現を前脳特異的に抑制、あるいはDOXを抜くことにより高発現させることができるマウスの系統を得た。このマウス (BIF) の恐怖条件付け学習を解析した。

B-6. 乳幼児の認知・情動発達に関する神経心理学的研究

B-6-1. 乳児の表情認知に関する前頭部領域における血行動態反応に関する研究

対象児 1歳以下の健常児 (3ヶ月-9ヶ月: 平均月齢5ヶ月3週) 6名 (男4名、女2名)

とその母親。装置 光トポグラフィー装置 (NITACH EIG-100)。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であるNIRS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じ、どの皮質部分が働いているのかを可視化することが出来る。対象部位 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 (16チャンネル) とした。手続き 乳児が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、母親と他人で脳の活性化およびその部位にどのような違いがあるのかを検討した。

B-6-2. 極低出生体重児における痛み刺激前後の脳血流の変化に関する研究

対象児 新生児期にある満期産児9名 (平均日齢4.7日、平均在胎週数39週1日、平均出生体重2922g)。刺激 各新生児の母親の母乳、市販の新生児対応粉ミルク、蒸留水。各刺激溶液をしみこませたガーゼを、新生児の鼻孔約1cmの位置に実験者が呈示した。NIRS装置と測定部位 NIRS装置は浜松ホトニクス社製のNIR0200を用いた。前頭眼窩近傍の血行動態反応を測定するため、前額の左右2箇所計測部を設置した。手続き 測定開始から60秒間をベースラインとし、その後刺激を30秒間呈示した。刺激呈示終了後60秒間を安静状態とし、1つの刺激につき計150秒間の記録を行った。刺激ごとにベースラインを取り直し、手続きを繰り返した。刺激の呈示順序は被験者間でカウンターバランスを取った。

B-6-3. 対象児 一般家庭および乳児院在籍の0歳児4名 (男児1名、女児3名) 課題 見知らぬ女性 (20代) が「いないいないばあ」を5秒に1回のペースで計6回 (30秒) 行い、手を開いた時の顔が笑顔の条件と無表情の条件をビデオテープで撮影し、刺激画像としてPCディスプレイに呈示した。装置 NIR0200 (浜松ホトニクス)、パーソナルコンピューター (SONY) 手続き 乳児を実験協力者が抱きPCの前に座る。刺激

呈示の前後 30 秒ずつ反転するチェッカーボードを呈示した。測定部位 左右前頭部領域。

B-6-4. 対象児 2004 年 5 月から 10 月までに当院 NICU に入院した 1500g 未満児で、外表奇形、心疾患、その他の基礎疾患なく、修正 36 週以降、安定して経口哺乳ができていた時期に、未熟児貧血に対して rEPO 投与を受けているもののうち、保護者の同意を得られた 9 名（在胎 24 週 1 日～31 週 0 日・出生時体重 664～1342 g）を対象とした。
装置 脳血流測定には、浜松ホトニクス社製 NIRO200 を使用した。**手続き** 哺乳後 1～2 時間の安静睡眠時、右または左大腿部に rEPO 皮下注射を施行する前後の脳血流をのべ 17 回（修正 36 週 1 日～46 週 0 日）測定した。前額の左右 2 箇所計測部を設置し、皮下注射前 2 分および、注射から約 10 分間の脳血流を測定し、酸素化ヘモグロビン（以下 [Hb O2]）値を検討した。同時に体動・表情をビデオ撮影し、心拍数、SpO2 の変化を記録した。測定部位 左右前頭部領域。

B-7. 乳幼児期の母子関係におけるリスク因子と補償因子に関する検討

B-7-1. 初年度は、3 歳児健診事業において、軽度発達障害あるいは育てにくい子どもについて抽出し、子育て支援のリストアップを計画した。

B-7-2. 2 年度は、3 歳児健診事業に定期的に参与観察し、さらにより広範囲に自己記入式の発達スクリーニングを行った。

B-7-2. 3 年目は、再度自己記入式の発達スクリーニングと、母親のストレス尺度を活用して分析を行い、相関関係を検討した。同時に 17 年度から市川宏伸主任のもとで「発達障害に係わる実態把握と効果的な発達支援手法の開発に関する研究」（厚生科研）の分担研究として、発達障害の診断あるいは強く疑われる子どもの通う子育て支援センターを対象に行った自己記入式の発達スクリーニングと、母親のストレス尺度の比較検討を行った。

別紙資料として、3 年目に実際に使用した調査票を添付する。

B-8. 平成 17 年度 3 歳児健診制度を用いた

ストレス性精神障害高リスク児の早期スクリーニングと母親の養育ストレス度調査

平成 17 年度の調査には、3 歳児健診スクリーニングチェックリストと日本語版 PSI（Parenting Stress Index）を用いた。3 歳児健診スクリーニングチェックリストは、3 歳児健診でストレス脆弱性高リスク児をスクリーニングするための尺度であり（田中、2003）、項目は、4 項目（育てやすさ・育てにくさ、1 歳半健診の思い、子どもの気質、様子：言葉・行動・運動面、対人面、作業や学習、感覚）からなっていた。回答は、それぞれの項目についてあてはまるものすべてを選択するものであった。日本語版 PSI（Parenting Stress Index）は、養育者の養育ストレスを測定するための自己記入式の評価尺度（Abidin、1986）であり、3 つの下位尺度（親のストレスとしての子どもの特徴、親のパーソナリティと状況の要因、ストレスイベント）からなっていた。親のストレスとしての子どもの特徴は 6 因子（落ち着きのなさ/多動、親を喜ばせること、欲求の強さ、適応力、ムード、受容性）、親のパーソナリティと状況の要因は 7 因子（能力、アタッチメント、うつ、役割、配偶者、健康、孤独感）であった（全 101 項目）。ストレスイベントは、過去 12 ヶ月間に経験したストレスイベントについて回答するものであった。

平成 17 年度に実施された 3 歳児健診の会場にて、臨床心理士が母親に本調査の趣旨を口頭で簡単に述べ、説明をする了解をとり、了解を得られた場合にのみ、調査の内容を説明した。調査用紙と返信用封筒を同封した調査用紙一式を配布し、配布の際に、回答した調査用紙を返信用封筒に記述している所定の住所に郵送していただくよう依頼した。

（倫理面への配慮）

本調査は、広島大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会にて、実施を承諾されている。平成 17 年度の 3 歳児健診で用いた 3 歳児健診スクリーニングチェックリストには、「この調査は、子育ての過程における、母親の精神保健をよりよく理解し、必要であれば子育て相談に活用するために行われるものです。この調査におけるあなたのプ

ライブシーについては、特定される形で外部に漏らさないよう守らせていただきます。また、調査の開始および開始中いつでも参加をやめることができますし、この調査結果についても請求することができます。この調査に関して質問がありましたら、健診会場に出張しております臨床心理士にお問い合わせください。」といった内容を掲げ、あくまでも自由参加であること、不参加による影響のなさを伝え、守秘義務についても強調した。また、平成17年度の3歳児健診に用いたスクリーニングチェックリストは、健診事業の一環として、担当する保健士・機関からの同意を得て実施した。

C. 研究成果

C-1. ストレス脆弱性形成の分子機構の解明に関する研究

C-1-1. 母子分離による成長後の拘束ストレス脆弱性形成の分子機序の解明

マイクロアレイ法にて生後90日のラット海馬の正常飼育+急性拘束ストレス群、母子分離+急性拘束ストレス群における成長因子関連遺伝子の発現を比較検討した。正常飼育+急性拘束ストレス群における発現が母子分離+急性拘束ストレス群における発現の2倍以上である遺伝子にいくつかのIGFシグナル関連遺伝子(IGF1、IGF2、IGF1R、IGF2R、IGFBP2)が挙げられた。これらの遺伝子発現の差の検証をreal-time quantitative PCR法を用いて行った。その結果、IGF1R、IGFBP2 mRNAの発現が母子分離+成熟期急性拘束ストレス群で正常飼育+成熟期急性拘束ストレス群に比して有意に低下していた。また、母子分離のみによりIGF1R mRNA発現は低下していた。IGF1、IGF2、IGF2R mRNAの発現は正常飼育+急性拘束ストレス群、母子分離+急性拘束ストレス群の間で有意差はなかった。

成熟期ラット海馬におけるIGF1RとIGFBP2タンパク発現についてwestern blot法を用いて検討した。Real-time quantitative PCR法での結果と同様に、正常飼育+急性拘束ストレス群と比較して母子分離+急性拘束ストレス群では、IGF1R発現に有意に低下をみた。IGFBP2のタンパク発現レベルに有意差はなかった。

ラット海馬内IGF1Rタンパク発現の部位

的変動を検討する目的で、免疫組織染色を行った。CA1およびCA3錐体細胞層、歯状回顆粒細胞層において母子分離+急性拘束ストレス群では正常飼育+急性拘束ストレス群と比較してIGF1Rの発現が低下していた。C-1-2. 母子分離のおよぼす成長後の記憶・学習障害の分子機序の解明

恐怖条件付けパラダイム：実験2・3日目では母子分離群で、非母子分離群・母子分離+良好な環境群・通常飼育+良好な環境群と比較してcontextual freezing時間は有意に減少していた。実験4日目では4群間に、有意なcontextual 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ダイム：新規環境曝露後最初の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。

高架式十字迷路：恐怖条件付け実験曝露前および実験3日間曝露後でのオープンアーム滞在時間において、4群間で有意差を認めなかった。

抗体マイクロアレイ法：母子分離群の海馬で非母子分離群と比較して、Arginase I、Bog、ZBP-89、Intergrin β 3、ApoEのタンパク質の発現が顕著に低下していた。

Western blot法：ApoEの発現は非母子分離群・母子分離群間で有意差がなく、抗体アレイの結果と一致しなかった。一方、Intergrin β 3の発現は母子分離群において非母子分離群と比べて有意に減少しており、抗体アレイの結果と一致した($n = 12$, $P < 0.05$)。実験4日目におけるIntergrin β 3の発現は、3日目同様母子分離群において有意に減少しており($n = 12$, $P < 0.05$)、contextual freezingの改善に伴った発現の改善は得られなかった。恐怖条件付け曝露前のIntergrin β 3の発現は、実験3・4日目同様に母子分離群において有意に減少していた($n = 12$, $P < 0.05$)。また、母子分離群+良好な飼育環境群でのインテグリン β 3の発現は、非母子分離群に比べ有意に低下していた($n = 12$, $P < 0.05$)。

免疫組織染色法：母子分離群において、非母子分離群に比べCA1およびCA3錐体細胞層においてIntergrin β 3の発現は有意に低下していたが、歯状回顆粒細胞層での発現には影響しなかった。

C-1-3. 母子分離のおよぼす成長後の PTSD 症状形成への影響の検討

Open field locomotor test では各群で自発運動量に差を認めなかった。高架式十字迷路試験では SPS を行った sham 群で有意に %open arm time, %open arm entries が減少し、母子分離 (NI) 群でも減少傾向を認め、不安、回避行動が増加していた。さらに、NI + SPS 群でより不安、回避傾向が強いことが示された。恐怖条件づけ試験では、Sham+SPS 群が sham 群に比べ有意に freezing time が増加しており、母子分離 (NI) 群と SPS を行った stress 群で freezing time に交互作用を認め、母子分離と SPS の相乗作用が示された。嫌悪刺激場面への再暴露に対して NI+SPS 群で文脈的恐怖条件づけが増強し、不安、恐怖がより著しく惹起されることが示された。Flinch jump test や Hot plate test などの痛覚鈍麻 (analgesia) 試験では、SPS を行った stress 群でより痛みを感じる閾値が有意に上昇していた。また、Flinch jump test の jump の指標では母子分離と SPS の相乗作用が示され、NI + SPS 群で analgesia 傾向がより顕著であることが示された。離乳後豊かな環境に暴露すると高架式十字迷路試験で EE 群では %open arm entries が増加したが、NI + EE + SPS 群では増加しなかった。恐怖条件づけ試験では、EE 群で有意に freezing time が減少し、母子分離や SPS ストレスの影響が改善された。しかし NI + EE + SPS 群は NI+SPS 群に比べ、freezing time は減少したものの、有意な改善ではなく、依然長い傾向であった。Flinch jump test での jump の指標では、EE に暴露した Sham + EE + SPS 群、NI+EE+SPS 群ともに sham + SPS 群、NI + SPS 群に比べ痛みを感じる閾値の有意な低下は認めなかった。

C-2. ストレス性精神障害の病態形成と治療に関する脳機能画像解析研究

C-2-1-1. 男性では、身体イメージに関連した不快な単語を使用した情動決定課題遂行中には対照課題遂行中と比較して左内側前頭皮質、左紡錘回、左上側頭回、左海馬などの脳部位で有意な信号上昇が認められ、女性では扁桃体を含む左海馬傍回、左視床、右尾状核にて有意な信号上昇が認められた。

このときの男性の脳活動から女性の脳活動をサブトラクションすると、男性では女性と比較して左内側前頭皮質の先端部の信号上昇が有意に高く、また女性ではこの領域の脳活動が低い被験者ほど、摂食障害調査表の合計点が高値であった。

C-2-1-2. 行動指標として、女性は肥満イメージをより不快と選択する傾向が認められた。脳活動に関して、女性は対照課題遂行中と比較して肥満課題遂行中に、両側前頭前野と扁桃体を含む左大脳辺縁系で有意に活動が上昇し、対照課題遂行中と比較してやせ課題遂行中に、左前頭前野と帯状回を含む左大脳辺縁系や島を含む左傍辺縁系で有意に活動が上昇した。また男性は対照課題遂行中と比較して肥満課題遂行中に、一次、二次視覚野を含む右後頭葉と右側頭葉、右頭頂葉で有意に活動が上昇し、対照課題遂行中と比較してやせ課題遂行中に、一次、二次視覚野を含む左後頭葉と両側紡錘状回を含む側頭葉、右頭頂葉で有意に活動が上昇した。すなわち、心理行動学的データより女性は今回の刺激をストレスと評価しており、ストレスの認知と前頭前野の関連が示唆された。

C-2-2-1. 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。

C-2-2-2. C-2-3-1. 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) が、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)、扁桃体、帯状回前部腹側領域および両側の視覚野 (左右後頭葉、右嚙部、左舌状回) が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-2-3-2. immediate vs. delayed condition において control condition と比較して、基底核および、帯状回前部、左小脳、右前

頭前野、右頭頂葉などにおいて優位な活性化が見られたことから、これらの部位がこの時間的スケールを持った報酬の選択に関与しているものと考えられた。これに対して、うつ病では、これらの領域の活性化が見られなかった。

C-2-4. 強化学習の理論モデルに基づいて解析した結果、被殻で腹側から背側にかけて報酬予測の時間的スケールマップ（短期は腹側部、長期は背側部）を認めたこと、トリプトファン欠乏条件では被殻腹側部で短期時間スケールとの相関およびトリプトファン過負荷条件で被殻背側部と長期時間スケールとの相関が認められた。すなわち、セロトニン機能が低下した状況では短期の報酬予測が中心となり、セロトニン機能が亢進した状況では長期の報酬予測が中心となる可能性を示唆している。

C-3. 養育環境が作るストレス脆弱性の神経生物学的研究

C-3-1-1. Wisrtar系ラットでは、母子分離を受けたラットで不安行動の減少が見られた (Fig. 1)。逆に SD 系では、不安行動の増加が見られた。この結果は、同じ母子分離操作を加えても、ラットの系統により、仔ラットの脳の発達に及ぼす影響が異なることを示唆している。その要因として、ラットの遺伝的バックグラウンドの違い、母子分離後の母親の養育行動の違いが考えられた。そこで、母子分離操作後の母ラットの行動をビデオモニターで観察したところ、Wisrtar系ラットの母親は、母子分離後に養育行動が増加したが、SD系ラットの母親では逆に減少した (Fig. 2)。このことは、母子分離の脳発達への影響には、その後の親の養育行動が大きく影響することを示している。

C-3-1-2. バージンの雌ラットに pup を与え、養育行動を起こした時に断頭、養育行動と深く関係する神経核である medial preoptic area と amygdala を取り出し、gene chip で発現が変化した遺伝子を同定した。それぞれの部位で、発現が増加する遺伝子と減少する遺伝子を同定した (表1、表2)。これらの遺伝子の養育行動における機能的働きを forward genetics の手法を用いて同定していく予定である。

C-3-2-1. DG の BrdU 陽性細胞数は、hIFN- α 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- α 投与量と正の相関を認めた (Fig. 3)。

C-3-2-2. hIFN- α 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。

C-3-2-3. IL-1 β 陽性領域については、海馬でのみ低用量 (5000IU/kg) IFN- α 群でも有意な増加を認め、TNF- α 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。

C-3-2-4. IL-1RA の前処置で hIFN- α による BrdU 陽性細胞の減少が抑制された (Fig. 3)。

C-3-2-5. 人参のサポニン成分である ginseng には海馬神経新生を促進する作用があることを見いだした (Fig. 4)。

C-3-3-1. AMPA を含む人工脳脊髄液を前頭前野に還流すると細胞外ドパミンレベルは有意に上昇したが、ノルエピネフリンレベルには変化がなかった。

C-3-3-2. AMPA と非定型抗精神病薬 (クロザピン、オランザピン) の同時還流は後者によるドパミン、およびノルエピネフリン遊離作用の双方を増強した。一方、AMPA とハロペリドールの同時還流は細胞外ドパミン、およびノルエピネフリンレベルをむしろ低下させた。

C-3-3-2. 非競合的 AMPA 受容体アンタゴニスト SYM2206 (脱分極速度を抑制するサイクロチアザイドを阻害) を還流したところ、非定型抗精神病薬によるカテコールアミン遊離作用に対する AMPA の増強効果が消失したが、同様の SYM2206 の効果はハロペリドールについては認められなかった。

C-4. ストレス依存性海馬神経形態変化の分子機構

平成15～17年度の分担研究により、以下のような成果が得られた。

C-4-1. ストレス性神経回路障害のモデル実験系の確立と応用

これまで海馬錐体細胞分散培養系に限定されていた GFP-actin イメージング法を進展させ、RFP-actin, mCherry-actin と GFP 融合蛋白の共イメージングを可能にした。さらに、海馬スライス培養系におけるイメ

ージング法を確立した。

このようなイメージング法の応用例として、以下のような発展的成果が得られた。

1. スパインに局在化するシナプス後肥厚部 (PSD) 分子である PSD-95 のスパイン形態制御能が synGAP 分子を介していることを解明した。また、このスパイン形態制御能は、PSD-95 のスパイン内集積の誘導活性と強い相関を有していた。すなわち、スパイン形態の制御は、スパイン内分子複合体の集積・分散機構と密接な連関があることが証明された (Nonaka et al., J. Neurosci. et al., in press)。

2. 海馬初代培養系を用い、NMDA 受容体過剰刺激の際に、tyrosine リン酸化活性依存的にアクチン制御分子 cortactin がスパインから排除されてしまうことを見出し、さらにこの排除が BDNF/trkB 経路により拮抗されることを明らかにした (岡部らとの共同研究、Iki et al., 2005)。

C-4-2. ラフト膜シグナリングを介したカルシウム依存的樹状突起形態制御機構の解明

膜結合型新規 CaM キナーゼ CLICK-III を単離クローニング (Takemoto-Kimura et al., 2003; Bito and Takemoto-Kimura, 2003) した結果、一部のシナプスにも認められるラフト膜画分に局在することを見出し、さらに、この局在が樹状突起形態形成に不可欠であることが示唆された (Takemoto-Kimura et al., in preparation)。すなわち、カルシウム・カルモジュリン依存性キナーゼ CLICK-III/CaMKI による樹状突起形態制御がラフト膜内シグナル伝達を介していることを解明した。

C-5. 生後脳の神経新生から見た精神疾患発症機序に関する研究

C-5-1. 一般的活動性および明暗選択テストにおいては MAM 投与ラットと saline 投与ラットの間有意差はなかったが、prepulse inhibition テストでは、MAM を投与したラットにおいてマイルドな障害がみられた。また、4.5 週齢で MAM が投与されたラット海馬の神経新生を解析したところ、MAM 投与期間の直後では海馬歯状回の神経新生能が低下していたが、5 週間経過した性的成熟後では神経新生能が回復しているこ

とが明らかとなった。すなわち、10 週齢をすぎたラットの海馬では正常な神経新生能を回復しているにもかかわらず、PPI の低下を示していた。

C-5-2. 5 週齢の FSM マウスの海馬歯状回において、分裂した細胞のニューロンへの分化能が低下していた。また、FSM マウスは性的成熟後の PPI 低下や一般活動性の低下、不安感の増加などの行動異常を示した。

C-5-3. フォリスタチン cDNA を tet プロモーターの制御下においたトランスジーンを作製した。トランスジーンが染色体に組み込まれたトランスジェニックマウスを 30 系統以上確立した (Tg 系統)。一方、前脳特異的な alpha CaMKII プロモーター制御下で転写因子 tTA が発現するトランスジェニックマウス (tTA) を Jackson lab より購入した。Tg 系統のマウス群を tTA マウスに交配し得られた産仔の中で、DOX 投与で前脳のフォリスタチン発現が OFF になり DOX 非投与でフォリスタチン発現が ON になる系統をスクリーニングした。その結果、3 日間の DOX 投与あるいは 3 日間の DOX 非投与により前脳におけるトランスジーン由来のフォリスタチン量がそれぞれ OFF あるいは ON になるマウス系統を 1 系統 (BIF) 得た。

文脈と電気ショックの組み合わせによる恐怖条件付け課題をこれらのマウスに与え、記憶の保持を解析した。実験中 DOX を連続投与してフォリスタチン発現を OFF にした BIF は、コントロール動物と同様に 1 週間の長期記憶が成立した。これに対して、恐怖条件付けを行う前の 3 日間だけ DOX 投与して条件付けの時だけフォリスタチンが発現している BIF は、24 時間の記憶は正常だったが、1 週間の記憶は有意に低下した。

C-6. 乳幼児の認知・情動発達に関する神経心理学的研究

C-6-1. 相手が母親か、見知らぬ他人かにかかわらず、乳児が他者と相互作用しているとき、左半球の活性化が安静時よりも高かった。ところが、相手が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でより大きな活性化が認められた。また、顔面温度の変化は、ストレスの尺度と考えら

れているので、NIRS と同時にサーモグラフィによる顔面温度変化の測定をした。しかし、相互作用事態で乳幼児の顔面温度の低下が観察され、母親条件と見知らぬ他者条件の相互作用の間に差異は認められなかった。

C-6-2. 刺激提示前 60 秒間の酸化ヘモグロビン（以下[Hb O2]）平均変化量と、刺激提示中 30 秒と提示終了後 30 秒を合計した 60 秒間の[Hb O2]平均変化量とを比較した。哺乳経験により被験児を母乳群・人工乳群・経験無し群に分類した結果、人工乳群で人工乳のニオイに対する強い活性化と、経験無し群で母乳の匂いに対する活性化が見られた。

C-6-3. 刺激 30 秒中の顔が見えている時間帯（「いないいないばあ」の「ばあ」と手を開いて顔が乳児に見えているとき）の 18 秒間の測定値平均から刺激呈示前 30 秒間の測定値平均を減算した値を血流量の変化値とした。算出した変化値を用いて、月齢（2：3 ヶ月・6 ヶ月）×条件（2：笑顔・無表情）×部位（2：右前頭・左前頭）の分散分析を行った結果、月齢と条件の交互作用が $F(1, 6)=16.09$, $p<.01$ で有意であった。

C-6-4. 痛み刺激で顔面表情が変化し、体動が加わるために[Hb O2]の実測数値は比較できないため、皮下注射前の[Hb O2]変化パターン（以下前[Hb O2]）と、皮下注射後、痛み表情、体動、心拍数、SpO2 が刺激前の安静時に回復したと考えられた時点以降の[Hb O2]変化パターン（以下後[Hb O2]）を検討した。前[Hb O2]は左右パラレルに変化し、17 例中 11 例で増減の変動なしであった。このうち 10 例の後[Hb O2]は左右とも上昇で 1 例は左のみ上昇であった。前[Hb O2]の低下は 2 例で、1 例は後[Hb O2]が左右とも上昇し、1 例は右のみ上昇していた。2 例は前[Hb O2]が上昇、後[Hb O2]が変動なしであった。前後[Hb O2]がともに変動なしであったものは 2 例のみであった。また、注射体側と反対側半球での脳血流が同側に比べ高まる非対称傾向が認められた。

C-7. 乳幼児期の母子関係におけるリスク因子と補償因子に関する検討

（図、表については報告書末の資料欄に掲載）

C-7-1. 初年度は、自己記入式による調査

票を作成した。従来経験的に用いている発達の躓きを検討する指標を、育てやすさ、育てにくさ、子どもの気質(Temperament)、言語面、行動面、運動面、対人面、感覚面の各位相のそれぞれの項目（91 項目）を作り、発達の様子が細かく点検できるようリストを作成した。

しかし、実際の 3 歳児健診事業のなかでは、その項目を詳細に見比べて、事例相談に揚げることはできなかった。

C-7-2. 2 年目からは、実際に健診の現場に同席して相談の様子を観察した。すると、午前中の 3 時間強のなかで、30~40 名の親子の面接を手際よく流れ作業で行うのだが、それぞれの相談、診察場面で使用できる時間があまりにも少ない、発達の細やかな、特に最近注目されている軽度発達障害という躓きをもつ子どもの抽出は難しいという印象を得た。さらに親子関係になにかしら不安を認めることができるのは、実は相談、面接を待つ合間の、遊びの空間場面の観察であった。しかし、この場面に常時参与する職人は皆無である。さらに、微妙な養育関係や発達状況にある親子に対して、保健師は、なにかしらの理由を言語化し、継続的介入を行うことに戸惑う様子が目立った。

ごく短時間の相談から、子どもの発達を心配し、親子関係に配慮を求めるという指導的介入は、親の拒否感もある場合があり、なんとなく心配という経験則から介入を提案することは容易ではないと思われた。わずかに試行できた母親の負担、特に母親の心配、不安を検討する調査では子どもの様子とに因果関係を導き出すことは出来なかった。

C-7-3. 3 年目に再度自己記入式の発達スクリーニングと、母親のストレス尺度を活用して分析を行い、発達障害の診断あるいは強く疑われる子どもの通う子育て支援センターとの比較検討を行った。

ここにきて、ようやく一定の結果を得ることが出来たため、本報告ではこの点に集中して、以下に結果を述べる事にする。

1) 研究対象：

石狩支庁の保健センターにおける 3 歳児健診受診対象者

および上富良野の 3 歳児健診受診対象者

調査協力者：総数 124 名（男児 69 名、女児

55名)

2) 結果

表1に示したように、3歳児健診受診対象者では、発達指標として抽出した育てやすさ、育てにくさ、子どもの気質(Temperament)、言語面、行動面、運動面、対人面、感覚面の各位相の91項目において、ほとんどが「当てはまらない」と答えている。そのうち、約半数以上「あてはまる」と回答した項目は、10項目(表2)であり、これを「通常3歳児でよく認められる発達指標」と表現する。

一方で、われわれは17年度から市川宏伸主任のもとで「発達障害に係わる実態把握と効果的な発達支援手法の開発に関する研究」(厚生科研)の分担研究として、発達障害の診断のある、あるいは強く疑われる子どもの通う子育て支援センターを利用している家族のうち、287名の自己記入式の発達スクリーニングと、母親のストレス尺度を検討した。調査用紙は本研究と同じものを活用した。結果を因子分析したところ、いわゆる「注意欠陥多動性障害(以下 ADHD)的傾向」を示す6項目と、「広汎性発達障害(以下 PDD)傾向」を示す4項目(表3)という二つの主成分が明確になり、図1に示したように4つのクラスターに分類できた。

次に、「心身障害幼児をもつ母親のストレス尺度(植村)」(別紙資料の調査票を参照)を用いて、母親の生活全般にわたるストレスの測定を行った。尺度は25の下位尺度、115項目からなるが、今回は下位尺度14の「しんせきの子どもが、この子をバカあつかいするので困る」という項目を削除し、健診対象者では、下位項目のうち、4(この子の発達についての現状把握)、15(仲間・友人関係)、16(近隣・地域社会でのひげめ)、17(近隣・地域社会の理解)、18(近隣・地域社会での子どもの交友関係)、19(行政機関)、20(治療機関)の障害に強く関与している項目を削除して施行した。

3歳児健診受診対象者のうち、ADHD傾向を示す因子が6項目のうち4項目以上、PDD傾向を示す因子4項目のうち3項目以上を満たす群をそれぞれADHD傾向のある健診対象者(ADHD群, n=10)、PDD傾向のある健診対象者(PDD群, n=11)として、この二つを除

外した健診対象者、non-ADHD, PDD群(n=103)の3つの群について母親のストレス尺度の比較を行った。

表4に示したように、植村らの基準値と比較すると、

1) ADHD群では、14の下位項目中10項目で基準値以上の高値を示していた。さらに子育て支援センターで得た値以上を示したのが、やはり10項目である。

2) PDD群について検討すると、基準値をわずかに超えた項目は祖父母とこの子の関わりと保育園・通園施設への不満の二項目であり、子育て支援センターとの比較では、母親自身の自由の制限、老親と夫婦との関わり、保育園・通園施設への不満の三項目で若干の高値を示していた。

3) non-ADHD, PDD群と比べてこの子の育てかた、この子の家庭内、外の問題行動という三項目で極端に低い数値が認められた。

4) non-ADHD, PDD群では、全項目で、基準値、子育て支援センターの値を下回る値であった。

C-8. 平成17年度3歳児健診制度を用いたストレス性精神障害高リスク児の早期スクリーニングと母親の養育ストレス度調査

1) 母親の属性(年齢、学歴、出産経験)と養育ストレスとの関連を検討した結果、短大・専門学校卒以上である母親は、養育ストレスが高かった。

2) 母親の属性と子どもの行動特徴から養育ストレスを検討した結果、年齢が若く、かつ、行動問題が多い子どもをもつ母親は、養育ストレスが高かった。

3) 母親が過去12ヶ月間に経験したストレスイベントの多さと子どもの行動特徴に関するストレスの高さから母親自身に関するストレスの高さを予測した結果、過去12ヶ月間に経験したストレスイベントの多さと、かつ、「子どもの機嫌がいつも悪い」、「期待通りにいかない」という子どもに関するストレスの高さは、子どもへの愛着がもてないことや抑うつ感、孤独感という母親のストレスを予測した。

D. 考察

D-1. ストレス脆弱性形成の分子機構の解明に関する研究

D-1-1. 母子分離による成長後の拘束ストレス脆弱性形成の分子機序の解明：ラット海馬において生後早期の母子分離ストレスにより成熟期のストレス負荷に伴う IGF1R、IGFBP2 の発現が障害されることが明らかとなった。急性拘束ストレス非負荷時においても、母子分離ストレスにより IGF1R 遺伝子の発現が低下していた。IGF シグナルは中枢神経系を含むさまざまな組織の発達に関与している。特に、IGF1 は海馬の neurogenesis や synaptogenesis に関与しており、IGF1R は IGF1 の最も重要メディエーターである。母子分離ラットにおける IGF1R の低下は、IGF1 シグナル伝達の減弱を通して海馬機能の障害に関与している可能性がある。また、IGFBP2 は中枢神経系の障害時に誘導され、神経保護作用を有していると考えられる。母子分離負荷ラットでは急性拘束ストレス負荷後に IGFBP2 誘導がなく、ストレスからの保護が減弱している可能性がある。抗うつ薬投与により海馬での IGF1 レベルが上昇するという報告や、IGF1 投与は抗うつ薬様の効果を示すという報告があり、本研究成果は、IGF シグナル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。母子分離やその後の成熟期ストレスが IGF の細胞内シグナル伝達の活性に影響をあたえているかどうかを検証するさらなる研究が必要とされる。

D-1-2. 母子分離のおよぼす成長後の記憶・学習障害の分子機序の解明

行動学実験から、自発運動や不安に影響を与えることなく母子分離により contextual freezing 時間が減少すること、良好な環境での飼育が母子分離による contextual freezing 時間の減少を緩和していることが示された。これらの結果から、母子分離は海馬依存性の空間記憶に属する contextual freezing が減弱し、良好な飼育環境はこの減弱を緩和することが示唆された。

抗体アレイおよびウエスタンブロット法による検討において、母子分離群でのインテグリン $\beta 3$ の発現が非母子分離群に比べ有意に減少していることが示され、海馬におけるインテグリン $\beta 3$ の発現の低下が母子分離による海馬依存性記憶の障害を引き

起こしている可能性が示唆された。一方、母子分離によるインテグリン $\beta 3$ の減少は良好な飼育環境によっても回復しなかった。加えて、非母子分離群と母子分離群間での海馬依存性記憶に差を認めていない恐怖条件付け実験 4 日目でも、インテグリン $\beta 3$ は母子分離群で減少したままであった。以上の検討の結果から、良好な環境での飼育および恐怖条件付け実験 4 日目に認めた母子分離による機能障害の回復機構は、インテグリン $\beta 3$ ファミリーとは異なる代償的な経路を介したものであると推察された。

D-1-3. 母子分離のおよぼす成長後の PTSD 症状形成への影響の検討

本研究の成果から我々は、SPS 負荷ラット (Sham + SPS 群) での高架式十字迷路における不安行動の亢進、恐怖条件づけ試験における海馬依存性記憶である文脈的恐怖条件づけの亢進、flinch jump test, hot plate test における痛覚鈍麻という PTSD 患者での不安、回避、再体験、麻痺の亢進に類似した所見を得ることができた。これらの所見より、PTSD モデルラットとしての SPS 負荷ラットの妥当性や蓋然性を示すことができた。

幼少期の不遇な体験の与える PTSD 症状への影響を検討する目的で、新生時期に母子分離を体験し成獣後 SPS ストレスに暴露されたラット (NI + SPS 群) の行動を観察した結果、各試験で不安行動、恐怖条件づけ、麻痺が相乗的に亢進した。すなわち、母子分離がその後の PTSD 発症におけるストレス脆弱性および感受性を増強することが示された。母子分離に引き続き離乳後に豊かな環境 (EE) に暴露したところ、SPS ストレスのみを受けたラット (Sham + EE + SPS 群) は高架式十字迷路や恐怖条件づけ試験において、有意なパラメーターの改善を認めた。しかし、母子分離と SPS ストレスを受けたラット (NI + EE + SPS 群) では、恐怖条件づけ試験での freezing time のみの改善を認めた。Pitman et al. (1990) は PTSD 患者における μ -オピオイドを介した stress-induced analgesia の報告を行っており、今回の研究結果である EE が母子分離による PTSD にみられる stress-induced analgesia の亢進を修復しないことは、この機序に関連した痛覚鈍麻の改善には EE の効果が乏しいことを