

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006 ~ 2008

課題番号：18700321

研究課題名(和文) 虚血性脳障害による精神病理学的後遺症の神経基盤

研究課題名(英文) Neuronal base of psychopathologic delayed effect in ischemia

研究代表者 菅 理江(SUGE RIE)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：10342685

研究成果の概要：

一過性虚血は学習の維持と再学習を障害する。さらに虚血慢性期、本研究の実験条件下に置いては虚血後 75 日前後の活動性の低下をもたらした。この現象は抗血小板剤シロスタゾールによって回避できる。この時期のうつ傾向計測を行ったところ、慢性期の反応性の低下はうつ傾向よりも認知機能低下の亢進である可能性が示唆された。シロスタゾールによる予防は脳損傷部位の縮小あるいは進行の予防によるものではないかと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	210,000	3,710,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：行動神経科学・虚血・海馬・うつ傾向

1. 研究開始当初の背景

従来虚血動物モデルを用いた実験においては、ラットを用いた研究が主流であり、特に虚血直後から始まる遅発性ニューロン死をいかに防ぐかという視点が多く、慢性期の精神病理学的評価は注目されていなかった。Winterら(2005)は卒中後うつ病に注目して129/SVマウスを用いた神経精神学的後遺症の評価を行ったがうつ様症状を捉えることはできなかった。またラットでは海馬領域(CA1)が特異的に損傷を受けることが知られているが、線状体を中心とした損傷を報告している。我々のC57BL/6を使った研究では海馬での神経細胞脱落を確認したが、むしろCA2, 3領域を中心とした損傷が認められた(菅他 2003, 図1)。このように虚血後の行動・損傷は様々でメカニズムの解明には至って

いない。また近年成体の海馬におけるニューロン新生とうつ病との関連性が示唆され(Kempermann 2002), その分子基盤と行動の関連性の解明と臨床への応用が期待されている。

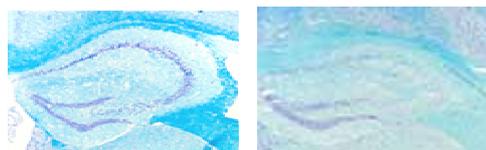


図1：虚血後の海馬損傷例

マウス、ニッスル・クリューバーバレー染色。偽手術群(左)、虚血群(右)の海馬。

2. 研究の目的

これまでの研究(Suge 2005)によって、虚血が既習の学習の維持・再学習両方に障害をもたらすことが明らかにされ、慢性期において著しい成績の低下、特に学習課題へのモチベーションの低下(反応率の低下)が観察された(図2)。さらにこの現象は抗血小板剤シロスタゾールの慢性投与によって予防された。シロスタゾールは虚血による損傷部位の縮小の効果が報告されている。

これらのことから、虚血動物を用いた長期的な学習課題は卒中後うつ病のモデルとして有効であると考えられる。本研究課題ではこの現象に注目し、この現象は本当に鬱病を反映したものなのか、脳のどのような障害(状態)がこのような現象をもたらすのかを明らかにする。

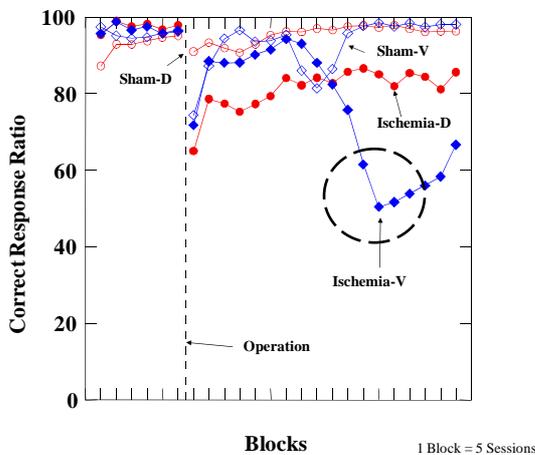


図2: 視覚弁別課題における慢性期の反応性低下

Ischemia-D: 虚血 + シロスタゾール
Ischemia-V: 虚血 (投薬なし)
Sham-D: 偽手術 + シロスタゾール
Sham-V: 偽手術 (投薬なし)

3. 研究の方法

うつ病の行動評価として一般に使われている強制水泳課題を用いて、動物のうつ傾向を測定し、反応性の低下はうつ傾向と対応するのか検討した。

被験体:

雄マウス(c57b6/j)10週齢、及び30週齢(反応低下時期に相当)を使用した。8週齢より個別飼育。飼育室のライトサイクルは12:12hで、行動実験は明期に実施された。このため、実験群間の比較に問題は無いが、マウスの活動性は暗期よりも抑制されていることを考慮に入れる必要がある(Poulos and Borlongan, 2000)。実験前2週間各群同一量のハンドリングを行った。餌および水の摂取制限はしなかった。シロスタゾール群ではメチルセルロースに懸濁したシロスタゾール

(50 mg/kg)、統制群ではメチルセルロースのみを強制経口投与した。

虚血:

一過性両側総頸動脈結紮(10分間)を用いた。偽手術群は結紮をのぞき、虚血群と同様な操作を行った。実験終了後TTC(トリフェニルテトラゾリウム塩)あるいはニッスル・クリューバーバレー染色で脳損傷部位を検討した。

強制水泳課題:

強制水泳用装置(スーパーメックス、室町、水温25℃)を使用して、水中のマウスの活動量及び無動時間を計測した。不動時間が長いことが強いうつ傾向を示す。装置に入れた直後の反応を除くため、実験時にはまず2分間の馴化時間を取り、その後に計測を始めた。実験1日目(トレーニング)には15分間の強制水泳を課し、終了後は装置から出し、水を拭き取った後ケージに戻す。実験開始から24時間後に2回目の強制水泳(テスト、5分間)を行い、活動量、不動時間を測定した。

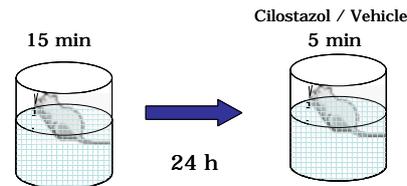


図3: 強制水泳課題

1日目トレーニングフェーズ15分
2日目テストフェーズ5分の強制水泳

(1) シロスタゾールの行動への影響の検討
虚血していないマウスの行動に対するシロスタゾールの影響を週齢の影響を含め検討した。

被験体: 雄マウス(c57b6/j)10週齢、及び30週齢

強制水泳課題: 2日目のテスト1時間前に経口による投薬を行った。

(2) 虚血慢性期のうつ傾向の検討
虚血後75日前後のうつ傾向を検討した。

被験体: 雄マウス(c57b6/j)に18週齢で虚血手術を行った。術後75-80日に強制水泳課題を行い、行動を計測した。シロスタゾールの投与は行わなかった。

4. 研究成果

(1) シロスタゾールの行動への影響と週齢の

効果

シロスタゾールそのものの抗うつ効果の検討のために、非虚血群への投与効果を検討した。情動行動は特に週齢による影響を受ける可能性が高いと考えられるため、成熟マウスとして比較的若い 10 週齢と、実際に前回の研究で反応性の低下が見られた時期に相当する 30 週齢の行動を検討することで週齢による影響を検討した。

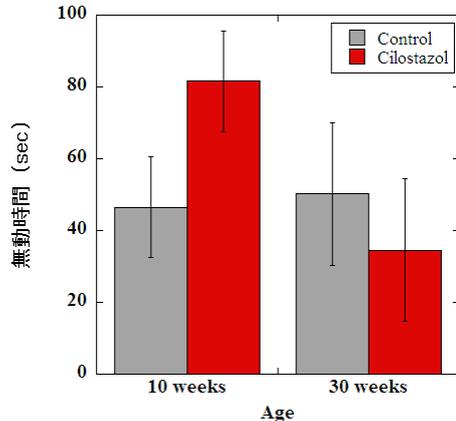


図 4：強制水泳課題 2 日目（テストフェーズ）の無動時間

トレーニングフェーズにおける無動時間に週齢による差は見られなかった。図 4 に見られるように、テストフェーズの不動時間は週齢によって、かなり異なる傾向がみられた。10 週齢においては非投与群に比べシロスタゾール投与群の不動時間が長く、この結果のみを見れば、シロスタゾールはどちらかというとうつ傾向を進める働きを示した。虚血実験の慢性期に対応する 30 週齢の被験体においては差が見られなかった。このことから、週齢による効果の違いはあるものの、シロスタゾールそのものにうつ傾向を予防または活動性を上昇させる効果が無いと結論できる。さらに、このように週齢の違いが重要であることが示されたことから、虚血慢性期の実験には 30 週齢の個体を用いることにした。

(2) 虚血慢性期のうつ傾向

虚血・非虚血群を使った虚血後慢性期のうつ傾向計測を行ったところ、虚血群非虚血群で異なる結果を得た。図 5 に見られるように、トレーニングフェーズの無動時間においては、虚血非虚血の差は見られなかった。非虚血群ではトレーニング時（最初の 5 分間の不動時間を抽出）に比較してテストフェーズにおける無動時間が増加しトレーニングの効果が観察された。しかし、虚血群ではトレーニングフェーズに比較して不動時間が変化せず、むしろ短くなる傾向が観察された。このことから虚血による慢性期の反応性の低下に対応する時期のうつ傾向は非虚血群

に比較して、強まる傾向は見られずむしろ、弱まっている結果が得られた。

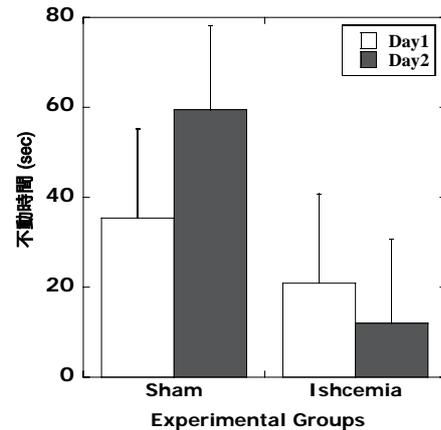


図 5：虚血による強制水泳の学習効果
トレーニングフェーズとテストフェーズの無動時間の比較。虚血と非虚血に行動的な差がみられたが、うつ傾向は観察されなかった

(3) 考察

シロスタゾールの効果

シロスタゾール投与群の無動の時間の増加からシロスタゾールが急性に抗うつ効果あるいは活動性を上昇するような効果を持つわけではないということが言える。実験ではシロスタゾール投与後 1 時間でテストをおこなっており、ラットの実験では脳血流量の上昇が見られるタイミングである（大塚製薬資料）が、本研究においては活動性の上昇などにつながる変化はみられなかった。週齢による効果の違いは予期しない物であったが、少なくとも反応性の低下をもたらした実験条件下においては、シロスタゾールが抗うつ作用をもたらさなかったことが結論できる。

虚血慢性期の活動性の低下

虚血群と非虚血群間ではっきりとした行動の違いが見られたが、虚血によって不動時間がむしろ減少する傾向が見られた。このことは、強制水泳課題で計測可能なうつ傾向は虚血によって引き起こされている訳ではないと結論出来る。さらに統制群に比較してトレーニングによる効果が見られないということから、むしろ認知機能低下の亢進である可能性が示唆される。強制水泳課題が学習性無気力 (learned helplessness) を計測する物であると考えれば、この学習にあたる部分こそが障害されている可能性がある。シロスタゾール自身に抗うつ効果が見られないこととあわせて考えると、シロスタゾールによる反応性低下の予防は脳損傷部位の縮小あるいは進行の予防によるものではない

いかと考えられる。うつ傾向に関連する行動と脳損傷の明確な関連性は見られなかった。

虚血による活動性上昇の可能性
虚血動物においては、しばしば慢性期まで続く虚血後の活動性の上昇が報告されている(例えば最近では Milot and Plamondon 2008, Wappler et al. 2009)。この上昇が学習効果を隠しているのではないかという指摘を多くの研究者から学会発表等において受けたが、本研究においてはトレーニング時の活動性に虚血、非虚血群間に差が見られないことからその可能性は否定できる。また学習障害の一つの要因として活動性の上昇にともなう“注意の欠如による正答率の減少”(Wappler et al. 2009)が指摘されているが、我々の実験で見いだされた反応性の低下は反応数そのものの低下が見られるため、説明出来ない。新奇性テストやオープンフィールドテストへの虚血の影響と認知機能障害の機序の解離が指摘されている(Milot and Plamondon 2008, Plamondon et al. 2008)ことから、認知機能そのものの慢性時の低下としてこの現象を捉えて、脳損傷との関連を検討していく必要がある。

Kempermann G (2002) *Bipolar Disorders*, 4, 17-33

Milot M, Plamondon H (2008) *Behavioural Brain Research* 192, 166-172.

Plamondon et al. (2008) *Behavioural Brain Research*, 189, 145-151.

Poulos SG and Borlongan CV (2000) *Neuroscience Letters* 280, 33-36.

Suge R et al. (2005) *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 65, Suppl., 92

菅理江・澤田雅彦他3名(2005)日本動物心理学会第65回大会

Wappler et al. (2009) *Physiology and Behavior*, 97, 107-114.

Winter B et al. (2005) *Biological Psychiatry*, 57, 1166-1175

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計3件)

菅理江、虚血マウスにおける慢性期学習障害の検討、第31回日本神経科学大会、2008年7月9日、東京

菅理江、マウス強制水泳課題におけるシロスタゾールの効果、第67回日本動物心理学会大会、2007年10月7日、東京 2007

Suge, R., Long-range effect of temporal global brain ischemia on learned behaviour in mice, FENS Forum 2006, 2006年7月10日、Vienna, Austria

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅理江 (SUGE RIE)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：10342685

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし