

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590683

研究課題名（和文） 法医剖検脳における統合失調症組織診断法の開発

研究課題名（英文） A research for a development of histopathological diagnosis method for schizophrenia on forensic autopsied brains

研究代表者

西村 明儒 (NISHIMURA AKIYOSHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：60283561

研究成果の概要（和文）：

認知症や統合失調症で、海馬歯状回に検出された数種のレクチンに反応する球状沈着物に対して蛍光多重染色および免疫電顕の手法を用いてその特性を調べた。本沈着物は、アポトーシスを起こしているコリンおよびグルタミン酸作動性ニューロンおよびD-ニューロンに認められることが明らかとなった。これは、統合失調症脳のニューロンのミグレーション異常説と合致する結果で、本沈着物が、病理診断に有用である可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

On this research, multi-lectin positive spherical shaped deposits detected in the hippocampal formation of degenerative demented and schizophrenic brains were examined by mean of multi-fluorescent immunohistochemical and lectin histochemical method and immuno electron microscope method. These deposits were detected in cholinergic and glutamatergic neurons and D-neuron at the stage of apoptosis. This result and theories of insufficient migration of neurons in schizophrenic brains are in harmony, which suggests the lectin positive spherical shaped deposits detected in the hippocampal formation is a predominant histopathological marker of the postmortem diagnosis for schizophrenia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医病理学

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでに統合失調症や認知症性

脳変性疾患の剖検例の海馬歯状回分子層において数種類のレクチンに反応を示す直径 2

～3 μm の球状の構造物を検出し、これを spherical deposits (SPD) と名付け、その組織化学的特性や電子顕微鏡による超微細構造の特徴について報告している¹⁾⁻⁷⁾。SPD は、若年の非精神病者には、ほとんど認められず、高齢者であっても認知症や脳変性疾患でなければ出現していてもその頻度はきわめて低い。Alzheimer 型認知症、Tangles 型認知症、嗜銀性顆粒型認知症、あるいはレビー小体病の如き、変性疾患脳では、この SPD が比較的高頻度に検出されるとともに Bodian 法、渡辺法、Gallias-Braak 法などの塗銀染色によって、老人斑、neurofibrillary tangles、嗜銀性顆粒、レビー小体などの各疾患における特徴的な変性所見もまた高頻度に認められる。一方、統合失調症脳では、SPD は高い頻度で検出されるが、変性所見はまったく検出されない。この特徴を利用して、従来の病理組織学的検査と併用することで、脳の変性所見がないにも拘わらず、SPD が高頻度に出現しているものを統合失調症と剖検診断することが可能ではないかと我々は提唱している^{3),4)}。これまでに Pre-embedding 法による免疫電顕の手法を用いて、本沈着物の超微細構造を示し、その形態から lysosome に関連したものであることを明らかにしている⁵⁾が、SPD の本態、成因については依然不明の状態であり、統合失調症の剖検診断へ応用するためには、更なる研究を必要としている。本研究は、SPD を用いた統合失調症剖検診断法を開発するための礎として、SPD の組織化学的特徴を共焦点レーザー顕微鏡を用いて明らかにするとともに免疫電顕の手法を用いて超微細構造を検討することによって、その本態、成因および病理組織学的意義を解明することを目的とする。本研究の期間内では、特に SPD が、脳組織内のどの細胞由来であるか、すなわち、neuron か glia かを明らかにしたいと考える。統合失調症剖検脳 3 例を用いた準備段階の研究では、neuron の可能性が高く、しかも、apoptosis を起こしている印象である。neuron であれば、dopamine、glutamate、serotonin、GABA、acetylcholine のいずれの系列であるか、また、glia であれば、astrocyte、oligodendroglia、microglia のいずれであるかを明らかにしたい。統合失調症では dopamine 神経伝達の異常が最も広く受け入れられている生化学的仮説であり、特に幻覚、妄想等の陽性症状に関係し

ていると言われている。同時に glutamate 作動神経は陰性症状、serotonin 作動神経は気分に関係していると言われているが、以前は、neuron の機能異常としてとらえられ、神経伝達物質に対する受容体の質的、量的異常についての研究が行われていた。最近では、neuron の分布異常が指摘され、単純な機能的異常とは言い切れなくなっている。統合失調症での neuro-network 構築異常については、古くは鍍銀染色による光顕的観察によって、細胞体が本来存在する場所より白質寄りに分布していることから発育段階での migration の異常であるとの報告⁸⁾があり、これは、近年、modified Gimsa 染色⁹⁾や cresyl violet 染色の如き神経染色による全 neuron の大脳皮質内分布の調査¹⁰⁾や NADPH diaphorase formazan formation 法¹¹⁾や抗 NOS 抗体を用いた免疫組織化学的手法¹²⁾によって cholinergic neuron で確認されている。また、統合失調症では対照例に比べて軸索が太く、葛籠折れ状態であることが migration 異常の結果と指摘されており¹³⁾、これに関して我々は、免疫組織化学的に D-neuron の軸索が同様の形態を示すことを報告している¹⁴⁾。統合失調症の成因として提唱されているものに、この migration 異常が、発育段階の何らかのストレスによって引き起こされ、思春期に再びストレスに曝されることによって統合失調症を発症するという二段階ストレス仮説がある¹⁵⁾。我々は、この仮説に着目し、neuro-network の破壊と再構築が繰り返されている認知症脳変性疾患と統合失調症に共通にみられる所見を検索し、本研究の標的である SPD を見出した。統合失調症における形態的異常は、最近の報告¹⁶⁾⁻¹⁸⁾においても指摘されており、dopamine のみならず、cholinergic neuron¹⁹⁾や GABA neuron²⁰⁾の組織学的異常も再指摘されるとともに neurogenesis²¹⁾や neuron の細胞体の apoptosis²²⁾や synapse の apoptosis²³⁾の存在を示唆する所見も報告されている。本研究の標的である SPD がこれら統合失調症脳において検出されている現象のいずれかと関連する可能性は高く、SPD が neurogenesis や apoptosis と関係していることが明らかとなり、二段階ストレス仮説の傍証となる可能性は高いと考える。

2. 研究の目的

本研究では、統合失調症や認知症性脳変

性疾患の海馬歯状回分子層において検出され、健常者にはほとんど見られないレクチン反応陽性球状沈着物の本態を明らかにし、各種塗銀染色など従来の病理組織検査によって検出される神経変性所見と本沈着物の出現頻度を組合せた統合失調症の剖検診断法を開発し、ひいては感情障害や人格障害をも含めた死後の精神鑑定法を開発することを目的とする。

レクチン反応陽性球状沈着物における糖鎖や神経伝達物質合成酵素等の各種抗原の局在を共焦点レーザー顕微鏡ならびに免疫電顕的手法を用いて明らかにし、統合失調症の組織剖検診断法の開発に寄与することを目的とする。現在、統合失調症を病理組織学的に診断する方法はなく、罹患の有無の判断は、診療歴に頼っているのが現状で、診療歴のない統合失調症に関しては為す術がない。本研究で統合失調症の病理組織学的診断法が確立することの法医鑑定上の意義は極めて大きいと考える。将来的には、現在継続中である Alzheimer 型認知症や Tangles 型認知症等の認知症性脳変性疾患における生前の大脳連合野皮質機能評価法の開発も合わせ、ひいては感情障害や人格障害をも含めた総合的な死後の精神鑑定法を開発を目指したい。

3. 研究の方法

剖検時、脳重量を測定し肉眼的外表検査を行った後、直ちに大脳脚を切断し大脳と小脳および脳幹部とに分け、大脳は左右の大脳半球に分離した後、約1cm厚さに前頭断し、脳幹部は正中で切断して左右を分離、小脳は約1cmの厚さに水平断し、直ちに4%パラホルムアルデヒド0.1Mリン酸緩衝溶液(pH7.4)(4℃)にて2~3日浸漬固定後、15%シュウクロース0.1Mリン酸緩衝溶液(pH7.4)(4℃)に浸漬保存する。この際、海馬、扁桃核、大脳皮質(前頭連合野、聴覚連合野、高次視覚連合野、体性感覚連合野、連合連合野)、大脳基底核、脳幹部および小脳(扁桃、虫部)等の部位の組織を採取・ホルマリン固定し、パラフィン包埋・薄切した切片にH.E.、鍍銀(Bodian、Gallias-Braak)、L.F.B.等の染色を施して病理組織学的検査を行い、脳腫瘍、脳炎、脳血管障害、頭部外傷、Alzheimer型痴呆、非Alzheimer型変性痴呆などの器質的疾患の有無を検索する。

既往症ならびに病理組織検査によって、これらの剖検例を

- a) 臨床的に統合失調症と診断されていた症例
- b) 認知症性脳変性疾患(Alzheimer型認知症、Tangles型認知症、嗜銀性顆粒

型認知症など)の病理所見を示す症例

- c) 20歳から64歳の精神疾患既往のない症例

- d) 65歳以上の非認知症例

などに分類し、b)~d)については、Gallias-Braakの鍍銀染色によるBraak and Braakの評価基準に基づき、病変の病理学的進行度を6段階に評価する。個人情報、後述の通り慎重に管理する。

各症例の海馬のホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片に対して各種レクチン(Griffonia simplicifolia isolectin B4(GS-I-B4)、Ulex europaeus isolectin I(UEA-I)、Dolichos biflorus(DBA)、Canavalia ensiformis(Con A)、Pisum sativum(PSA))および糖鎖抗原(コンドロイチン硫酸)に対する抗体を用いてレクチン組織化学的染色および免疫組織化学的染色を施し対象物の存在を確認し、出現頻度をGrade 0およびGrade 1~Grade 4の5段階に評価する。

パラホルムアルデヒド固定後、シュウクロース浸漬保存した脳組織から海馬を切り出し、マイクロスライサーを用いて厚さ50μmの切片とし、蛍光標識したレクチンを用いて染色、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光三重撮影する。レクチンおよび抗体にはAlexa633、Alexa546、Alexa488を用いて検鏡波長が重ならないようにならないように留意し、レクチンには、直接蛍光物質を結合させて用い、抗体では、蛍光物質を結合させた二次抗体を反応させる。コンピュータで画像処理し、Alexa546を赤、Alexa488を緑、Alexa633を青に変換して画像の重ね合わせを行う。また、核染色には、レクチンや抗体を3種類用いたものに対しては、水色で発色するDAPIを用いて4重染色とし、レクチンや抗体を2種類用いた場合は、緑に発色するSYBR Green Iを用いて3重染色とする。3重染色の際は、本学共同設備であるKarl Zeiss社製共焦点レーザー顕微鏡LSM510で撮影するが、4重染色の際は、Karl Zeiss本社所有の社製共焦点レーザー顕微鏡LSM510metaを借用して撮影する。将来的には躁うつ病やアルコール関連精神障害の剖検脳に関する研究を進展させ、既に行っている脳血管障害、Alzheimer型認知症やTangles型認知症等の認知症性脳変性疾患における生前の大脳連合野皮質機能評価法の開発および頭部外傷等の器質的精神障害者の剖検脳に関する研究と併せ、ひいては感情障害や人格障害をも含めた剖検脳における死後の精神鑑定法の総合的な開発・実用化に取り組みたい。

4. 研究成果

本沈着物は、GFAP 陽性のアストログリア内には、見られず、NF 陽性のニューロン内に認められた。この際、核は、比較的弱く染色される印象であった。次に抗 single strand DNA 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。抗体ならびにレクチンの発色は、Alexa488 および 633、核染色は、SYBR green を用いて三重染色を行った。さらに、ピプラトーム薄切切片にレクチン組織化学染色を施し、DAB で発色後、エポン樹脂で包埋、60nm 厚超薄切切片とし、ウラン、鉛による電子染色を施し、透過型電子顕微鏡で検鏡した。蛍光多重染色では、SYBR green による染色性が低下した核の一部が崩壊し、その部分でレクチンと single strand DNA の共染が認められた。免疫電顕では、核の一部が崩壊し、そこにレクチン陽性の構造物が散在する様子が観察された。これらのニューロンは、その形態から apoptosis を起こしているものと考えられた。コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT)、小胞アセチルコリントランスポーター (VACHAT)、中枢神経由来の酸化窒素合成酵素 (bNOS)、NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット (NMDAR1, NMDAR2B)、チロシン水酸化酵素 (TH)、トリプトファン水酸化酵素 (TPH)、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) に対する抗体を用いて、レクチン陽性の構造物の存在するニューロンの種類の判別を試みたところ、TH および TPH は、いずれの症例にも検出されなかったが、ChAT、VACHAT、bNOS、NMDAR1、NMDAR2B ならびに AADC については、陽性を示す症例が認められた。

さらにコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT)、小胞アセチルコリントランスポーター (VACHAT)、中枢神経由来の酸化窒素合成酵素 (bNOS)、NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット (NMDAR1, NMDAR2B)、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) に対する抗体を用いて、レクチンとの蛍光多重染色を試みたところ、ChAT、NMDAR2B ならびに AADC については、レクチンと共存していることが明らかになった。これらの結果ならびに以前の結果を総合すると本沈着物は、ドーパミンやセロトニン作動性ニューロンではなく、アセチルコリンおよびグルタミン酸作動性ニューロン、ならびに AADC のみを持ち、TH と TPH を持たない、いわゆる D-ニューロンがアポトーシスを起こして生じていることが明らかになった。vimentin、N-CAM、S-MAG、N-cadherin 等の細胞接着分子に対する抗体を用いた検索を試みたが、検出されなかった。

[参考文献]

1) Nishimura A, Sawada S, Ushiyama I, Yamamoto Y, Nakagawa T, Tanegashima A, Nishi K:

Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. *Forensic Sci Int* 113(1-3), 265-269, 2000.

- 2) Nishimura A, Sawada S, Ushiyama I, Tanegashima A, Nakagawa T, Ikemoto K, Yamamoto Y, Satoh K, Rand S, Brinkmann B, Nishi K: Postmortem diagnosis of brain disorders -The histochemical detection of glycoconjugate deposition with lectins., *Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology* 2000 Vol. 1, No. 2 (July-Dec 2000): http://anil299.tripod.com/vol_001_no_002/paper003.html, 2000.
- 3) Nishimura A, Sawada S, Ushiyama I, Tanegashima A, Yamamoto Y, Ikemoto K, Satoh K, Nishi K: The aberrant glycogenesis in the hippocampus of schizophrenia. *Acta Crim Japon* 67, 49-55, 2001.
- 4) Nishimura A, Ikemoto K, Satoh K, Yamamoto Y, Rand S, Brinkmann B, Nishi K: The carbohydrate deposits detected by histochemical methods in the molecular layer of the dentate gyrus in the hippocampal formation of patients with schizophrenia, Down's syndrome and dementia, and aged person. *Glycoconjugate J* Nov. 17(11), 815-822, 2001.
- 5) 西村明儒, 黒川清, 池本桂子, 大久保岩男, 西克治, 海馬歯状回糖代謝異常所見の免疫電顕による観察, *犯罪学雑誌* 67, 231-236, 2001.
- 6) Nishi K, Tanegashima A, Yamamoto Y, Ushiyama I, Ikemoto K, Yamasaki S, Nishimura A, Rand S, Brinkmann B: Utilization of lectin histochemistry in forensic neuropathology: Lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. *Legal Med* 5, 117-131, 2003.
- 7) Nishimura A, Kurokawa K, Ikemoto K, Yamamoto Y, Rand S, Brinkmann B: Ultrastructural Characteristics of the carbohydrate deposits detected in the molecular layer of the dentate gyrus in the hippocampal formation of patients with schizophrenia. *Acta Crim Japon* 70, 11-15, 2004.
- 8) Falkai P, Bogers B, Roberts GW, et al: Measurement of the alpha-cell-migraton in the entorhinal region: a marker for the developmental disturbances in schizophrenia? *Schizophr Research* 1, 157-158, 1988.
- 9) Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS: Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch Gen Psychiatry* 52(10), 805-18, discussion 819-20, 1995.
- 10) Scheff SW, Baldwin SA: Preparation and Staining of Tissue for Counting Neurons. *Kopf Carrier* 45, 1-4, 1996.
- 11) Akbarian S, Bunney WE Jr, Potkin SG, Wigal SB, Hagman JO, Sandman CA, Jones EG: Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. *Arch Gen Psychiatry* 50(3), 169-77, 1993.
- 12) Yanik M, Vural H, Kocyigit A, Tutkun H, Zoroglu SS, Herken H, Savas HA, Koylu A, Akyol O: Is the arginine-nitric oxide pathway involved in the pathogenesis of schizophrenia? *Neuropsychobiology* 47(2), 61-5, 2003.
- 13) Benes FM, Majocha R, Bird ED, et al: Increased vertical axon numbers in cingulate cortex of

- schizophrenics. Arch Gen Psychiatry 44, 1017-1021, 1987.
- 14) Ikemoto K: Significance of human striatal D-neurons: Implications in neuropsychiatric functions. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 28, 429-434, 2004.
 - 15) Nuechterlein KH, Dawson ME, Gitlin M, Ventura J, Goldstein MJ, Snyder KS, Yee CM, Mintz J: Developmental Processes in Schizophrenic Disorders: longitudinal studies of vulnerability and stress. Schizophr Bull 18(3), 387-425, 1992.
 - 16) Choi JS, Kang DH, Kim JJ, Ha TH, Roh KS, Youn T, Kwon JS: Decreased caudal anterior cingulate gyrus volume and positive symptoms in schizophrenia. Psychiatry Res 139(3), 239-47, 2005.
 - 17) Nierenberg J, Salisbury DF, Levitt JJ, David EA, McCarley RW, Shenton ME: Reduced left angular gyrus volume in first-episode schizophrenia. Am J Psychiatry 162(8), 1539-41, 2005.
 - 18) Chance SA, Esiri MM, Crow TJ: Ventricular enlargement in schizophrenia: a primary change in the temporal lobe? Schizophr Res 62(1-2), 123-31, 2003.
 - 19) Lauer M, Johannes S, Fritzen S, Senitz D, Riederer P, Reif A: Morphological abnormalities in nitric-oxide-synthase-positive striatal interneurons of schizophrenic patients. Neuropsychobiology 52(3), 111-7, 2005.
 - 20) Pillai-Nair N, Panicker AK, Rodriguiz RM, Gilmore KL, Demyanenko GP, Huang JZ, Wetsel WC, Maness PF: Neural cell adhesion molecule-secreting transgenic mice display abnormalities in GABAergic interneurons and alterations in behavior. J Neurosci 25(18), 4659-71, 2005.
 - 21) Murrell W, Bushnell GR, Livesey J, McGrath J, MacDonald KP, Bates PR, Mackay-Sim A: Neurogenesis in adult human. Neuroreport 7(6), 1189-94, 1996.
 - 22) Jarskog LF, Selinger ES, Lieberman JA, Gilmore JH: Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. Am J Psychiatry 161(1), 109-15, 2004.
 - 23) Glanz LA, Gilmore JH, Lieberman JA, Jarskog LF: Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. Schizophr Res 81, 47-63, 2006.

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)

[雑誌論文] (計 1件)

- 1 Akiyoshi Nishimura: Are lectin positive spherical deposits detected in the molecular layer of the hippocampal formation related with neuronal apoptosis? The Journal of Medical Investigation, 57(3,4), 183-190, 2010.

[学会発表] (計 2件)

- 1 西村明儒: 統合失調症の組織診断法開発への取り組みについて、第25回 Neuroscience Seminar Tokushima、平成23年3月7日、徳島
- 2 Akiyoshi Nishimura: Lectin positive spherical deposits detected in the molecular layer of the hippocampal formation are related with neuronal apoptosis on schizophrenia. The 7th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2008, Sep 8, Osaka, Japan.

[図書] (計 0件)

該当なし。

[産業財産権]

該当なし。

[その他]

ホームページ等

該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 明儒 (NISHIMURA AKIYOSHI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 60283561

(2) 研究分担者

藤原 敏 (FUJIWARA SATOSHI)
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 20173487
南部 さおり (NAMBU SAORI)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号: 10404998
徳永 逸夫 (TOKUNAGA ITSUO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
研究者番号: 30116842

(3) 連携研究者

池本 桂子 (IKEMOTO KEIKO)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90184449