

学 位 論 文 題 名

セロトニン-2 受容体を介する血小板内カルシウム動員を
指標とした感情障害の成因に関する研究

学位論文内容の要旨

I. はじめに

感情障害の成因の生物学的基盤の一つとして、脳内セロトニン（5-HT）受容体機能の異常が想定されている。うつ病者の死後脳や神経内分泌学的研究から前頭葉あるいは視床下部での 5-HT₂ 受容体機能の亢進が示唆されているが、現段階では生体の中枢神経から直接情報を得る研究は方法論的に限界があり、倫理的側面からも縦断的検討が容易でない場合が多い。血小板は 5-HT の取り込み、貯蔵、放出機構を持ち、中枢 5-HT 作動性神経の末梢モデルとして有用とされている。最近、うつ病者血小板の 5-HT₂ 受容体結合測定を行い健常者と比較した報告がみられるが、必ずしも一致した所見は得られていない。その原因として、診断の不均一性、疾患外因子の影響、測定法自体の問題などがあげられる。

近年、蛍光 Ca 試薬の進歩に伴い、比較的簡便な方法で、血小板内遊離 Ca^{2+} 濃度の測定が可能となった。5-HT 刺激による血小板内 Ca^{2+} 濃度増加反応は、5-HT₂ 受容体を介したホスファチジルイノシトール代謝の初期反応として産生されるイノシトール三リン酸が Ca 貯蔵部位から Ca^{2+} を遊離させることから主に生じることが知られている。本研究では、蛍光 Ca 試薬を用いて健康成人血小板における 5-HT 刺激性細胞内 Ca^{2+} 濃度増加反応を測定し、この反応が 5-HT₂ 受容体を介することを確認するとともに、この反応系に影響を及ぼす可能性のある生体側ならびに方法論上の諸因子について検討を加えた。その上で、感情障害患者と健常対照者との比較検討を行うとともに、病型、病状との関連などの横断的側面と、病状経過との関連などの縦断的側面の双方から検討を加えることとした。

II. 対象と方法

1) 血小板の調整ならびに血小板内 Ca^{2+} 濃度の測定

血液試料は通常午前 9 時に ACD 採血し、室温下の遠心により血小板濃厚浮遊液（PRP）

を作成した。この PRP に蛍光試薬 fura - 2 / AM を加えてインキュベートし、さらに遠心分離して得られた沈渣に Krebs - Ringer HEPES 緩衝液を加えて $1 \times 10^8 / ml$ の濃度で血小板を浮遊させ、測定試料とした。血小板内 Ca^{2+} 濃度の測定には蛍光分光光度計を用い、2 種の励起波長における試料の蛍光強度の比率から算出した。

2) 健康成人における 5 - HT 刺激性 Ca 反応に対する諸因子の影響

対象は、精神的あるいは身体的疾患の既往のない健康成人 50 例（男性 25 例女性 25 例）で、少なくとも採血の 4 週間前から未服薬であった。生体側の因子として、性別、年齢の影響や同一被検者での日内変動、季節間変動について、方法論上の因子として、採血後の検体放置時間の影響や採血前の食事摂取、運動の影響について検討した。

3) 未治療感情障害患者における 5 - HT 刺激性 Ca 反応の検討

対象は、身体的疾患の合併がなく、少なくとも測定 4 週間前から未服薬の感情障害患者 53 例と健常対照者 25 例である。患者群の診断は DSM - III - R に基づき、うつ病性双極性障害 14 例、メランコリー型大うつ病 23 例、非メランコリー型大うつ病 16 例と分類された。採血時に、ハミルトンうつ病評価尺度（HRSD）を用いて、抑うつ症状の重症度を評価した。5 - HT 刺激は、静止時 Ca^{2+} 濃度測定後、 EC_{50} 値付近の $0.3 \mu M$ と最大反応を得る $10 \mu M$ の濃度で行った。

4) 症状寛解した感情障害患者における 5 - HT 刺激性 Ca 反応の検討

対象は、以前にうつ病性双極性障害（10 例）またはメランコリー型大うつ病（8 例）と診断され、現在薬物療法により寛解状態にある（HRSD にて 5 点以下）感情障害患者 18 例である。5 - HT 刺激は、未治療群と同様に行った。

Ⅲ. 結 果

健康成人血小板において、5 - HT は濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加し、この反応は選択的 5 - HT_2 受容拮抗薬によってのみ強く阻害された。この 5 - HT 刺激性 Ca 反応は、採血時刻および季節、性別、年齢、採血前の食事摂取や運動の影響を受けなかったが、採血後の検体放置時間の経過につれて徐々に低下した。

未治療の感情障害患者血小板における 5 - HT 刺激性 Ca 反応は、双極性うつ病とメランコリー型大うつ病が非メランコリー型大うつ病や正常対照例に比較して有意な亢進を示した。しかし、抑うつ症状の重症度と 5 - HT 刺激性 Ca 反応の大きさとの間には相関関係は認められなかった。同一症例における治療前後の Ca 反応の比較では、大部分の症例で寛解後もこの反応の

亢進が持続していた。また、薬物治療によって寛解状態にある感情障害患者での 5-HT 刺激性 Ca 反応は、未治療患者の値と有意差はみられなかった。

IV. 考 察

蛍光 Ca 試薬を用いた健康成人血小板での基礎的検討において、5-HT 刺激性細胞内 Ca^{2+} 濃度増加反応は 5-HT₂ 受容体を介していることが確認された。また、この反応に対する生体側ならびに方法論上の諸因子の影響の検討から、採血後の速やかな測定に留意すれば、5-HT 刺激性 Ca 反応は安定した指標であり、感情障害患者の 5-HT₂ 受容体機能を評価するのに適していると考えられた。

未治療感情障害患者における 5-HT 刺激性 Ca 反応の測定では、双極性うつ病とメランコリー型大うつ病が正常対照群に比して有意に高い反応を示し、5-HT₂ 受容体機能の亢進が示唆された。また、抑うつ症状の重症度と Ca 反応の大きさに相関関係の認められないことや寛解後も Ca 反応の高値が持続することから、これらの 5-HT 刺激性 Ca 反応の亢進は状態依存的というよりも素因依存的である可能性が強いと考えられた。

本研究で得られた感情障害患者の一部（いわゆる内因性うつ病）での 5-HT₂ 受容体機能の亢進所見は、うつ病患者の死後脳や神経内分泌学的研究、さらには血小板を用いた 5-HT₂ 受容体数や 5-HT 刺激性ホスファチジルイノシトール代謝の検討における結果とほぼ一致している。しかしながら、この感情障害における 5-HT₂ 受容体機能亢進が 5-HT 伝達あるいは受容体以後の情報伝達機構のいずれの段階での障害に由来するのかは現在のところ明らかではない。今後十分な症例数に基づく疾患特異性の確認が必要であるが、本研究において検討した 5-HT 刺激性 Ca 反応は比較的簡便に 5-HT₂ 受容体機能を評価できる生物学的マーカーとして有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 下 格
副 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 宮 崎 保

感情障害の成因の生物学的基礎の一つとして、脳内セロトニン（5-HT）受容体機能の異常が想定されている。うつ病者の死後脳や神経内分泌学的研究から前頭葉あるいは視床下部での5-HT₂受容体機能の亢進が示唆されている。血小板は5-HTの取り込み、貯蔵、放出機構を持ち、中枢5-HT作動性神経の末梢モデルとして有用とされている。近年、蛍光Ca試薬の進歩に伴い、比較的簡便な方法で、血小板内遊離Ca²⁺濃度の測定が可能となった。5-HT刺激による血小板内Ca²⁺濃度増加反応は、5-HT₂受容体を介したホスファチジルイノシトール代謝の初期反応として産生されるイノシトール三リン酸がCa貯蔵部位よりCa²⁺を遊離させることから主に生じるとされている。本研究では、蛍光Ca試薬を用いて健康成人血小板における5-HT刺激性細胞内Ca²⁺濃度増加反応を測定し、この反応が5-HT₂受容体を介することを確認するとともに、この反応系に影響を及ぼす可能性のある生体側ならびに方法論上の諸因子について検討を加えた。その上で、感情障害患者と健常対照者との比較検討を行うとともに、病型、症状との関連などの横断的側面と、病状経過との関連などの縦断的側面の双方から検討を加えることとした。

血液試料は通常午前9時にACD採血し、室温下の遠心により血小板濃厚浮遊液（PRP）を作成した。このPRPに蛍光試薬fura-2/AMを加えてインキュベートし、さらに遠心分離して得られた沈渣にKrebs-Ringer HEPES緩衝液を加えて1 x 10⁸/mlの濃度で血小板を浮遊させ、測定試料とした。血小板内Ca²⁺濃度の測定には蛍光分光光度計を用い、2種の励起波長における試料の蛍光強度の比率から算出した。

健康成人血小板において、5-HTは濃度依存的に細胞内Ca²⁺濃度を増加し、この反応は選択的5-HT₂受容体拮抗薬によってのみ強く阻害され、5-HT₂受容体を介していることが示唆された。健康成人における5-HT刺激性Ca反応に対する諸因子の影響の検討では、生体側の因子として、性別、年齢の影響や同一被検者での日内変動、季節間変動について、方法論上の因子として、採血後の検体放置時間の影響や採血前の食事摂取の有無、運動の影響について検討したが、採血後の時間経過につれて反応が低下する以外は何の因子も有意な影響を及ぼさなかつ

た。従って、採血後の速やかな測定に留意すれば、5-HT 刺激性 Ca 反応は安定した指標であり、感情障害患者の 5-HT₂ 受容体機能を評価するのに適していると考えられた。

未治療感情障害患者における 5-HT 刺激性 Ca 反応の検討では、双極性うつ病とメランコリー型大うつ病が非メランコリー型大うつ病や正常対照例に比較して有意な亢進を示した。しかし、抑うつ症状の重症度と 5-HT 刺激性 Ca 反応の大きさとの間には相関関係は認められなかった。同一症例における治療前後の Ca 反応の比較では、大部分の症例で寛解後もこの反応の亢進が持続していた。また、薬物治療によって寛解状態にある感情障害患者での 5-HT 刺激性 Ca 反応は、未治療患者の値と有意差はみられなかった。以上の結果から、感情障害の一部、いわゆる内因性うつ病における 5-HT₂ 受容体機能の亢進が示唆され、これらの亢進所見は状態依存的というよりも素因依存的である可能性が強いと考えられた。今後十分な症例数に基づく疾患特異性の確認が必要であるが、本研究において検討した 5-HT 刺激性 Ca 反応は比較的簡便に 5-HT₂ 受容体機能を評価できる生物学的マーカーとして有用であると考えられる。

以上の発表に際し、本間研一教授より 4 点質問を受け、回答した。(1)うつ病で血小板 5-HT₂ 受容体数増加の報告はあるか。－報告されている。(2)素因依存的の意味。－発症脆弱性という意味で、正常者でも今後発症する可能性を持っている。(3)素因依存的パラメータは他にあるか。－状態依存的指標の報告が多く、素因依存的といわれるものは少ない。(4)遺伝的研究に発展する可能性。－今後発展させる計画である。また、宮崎 保教授より 6 点質問を受け、回答した。(1)同一患者の治療前後で測定した症例数。－6 例(2)血小板機能の変化をみているか。－凝集能は測定していない。(3)cyclosporin A 投与による精神的変化の可能性。－経験していない。(4)素因依存的の意味。－発症脆弱性。(5)血小板に異常の出現するメカニズム。－現在のところ明らかではない。(6)ヒトにおける脳と血小板での変化の相関性。－ラットやネコでは報告がみられるが、ヒトでは報告はない。最後に、皆川知紀教授より 1 点質問を受け、回答した。(1)インターフェロン投与による抑うつ状態では。－1 例だけ測定経験があるが、反応亢進は示さなかった。

本研究は、ヒト血小板における 5-HT 刺激による Ca²⁺ 細胞内遊離を測定の指標とし、慎重な予備実験の後に、感情障害のうち特に内因性の傾向の強い症候群に Ca 反応の増加を認め、それが感情障害の症状よりも素因に関連が深いことを指摘したもので、現在なお病態の不明な感情障害の成因の理解に寄与するところが大きく、博士の学位に値するものと判断された。