

# ビタミンDを用いた統合失調症発症予防

牧之段 学

公立大学法人奈良県立医科大学 助教

## 緒言

統合失調症は人口の約1%を占める主要な精神疾患である。その症状は、妄想や幻覚などの陽性症状、思考の貧困などの陰性症状および認知機能障害などによって特徴づけられる。その病因・病態については疫学、遺伝学、死後脳や画像、動物モデルを用いた研究などで幅広く行われ、これまでのところ複数の脆弱性遺伝子が複合的に作用して遺伝的基盤を形成し、環境要因と相互作用しながら発病に至ると考えられているがいまだその解明には至っていない。

環境要因の一つに母体感染症が考えられている。妊娠中に母体が感染症に罹患し、その母から生まれた児では統合失調症や他の精神病性障害の罹患率が高くなることが報告されている<sup>1-4</sup>。そして、妊娠中にインフルエンザウイルスを感染させたマウスから産まれた児では、感覚情報処理制御機能の指標である prepulse inhibition (PPI) が統合失調症患者と同じように障害されており、行動異常がみられる<sup>5</sup>。同様にインフルエンザウイルス感染に類似した免疫反応を引き起こす dsRNA である polyinosinic-polycytidylic acid (polyIC) を妊娠マウスに投与しても、その児 (polyIC マウス) で PPI の障害がみられる<sup>5</sup>。さらに炎症性サイトカインである IL-6 や他のサイトカインを母体ラットに投与し生まれた児でも PPI の障害や統合失調症様行動異常がみられるという報告がある<sup>6,7</sup>。これらの知見に共通する病態として感染によって母体で産生された炎症性サイトカインが胎盤を通じて移行し、胎児脳に影響を及ぼし統合失調症様行動異常や PPI の障害を引き起こしていることが推測される。

また動物モデルや疫学から、妊娠中、発達期のビタミンD欠乏によって統合失調症発症リスクが上昇し、PPI の障害が生じることが示されている<sup>8-10</sup>。そして、ビタミンDは骨代謝に関わるだけではなく、全身ならびに中枢の免疫反応制御に関わり炎症を抑制することがわかっている<sup>11,12</sup>。

以上の様に polyIC マウスを用いて統合失調症の病因

に着目した研究は数多くなされているが、同マウスを用いて統合失調症の予防という観点での研究報告はほとんどないのが現状である。今回、妊娠中の感染を模した polyIC による免疫反応の亢進がもたらす PPI の障害ならびに統合失調症様行動異常の出現を、抗炎症作用をもつビタミンD投与によって予防できると仮説を立て、検討した。

## 実験方法

### 1. 動物の調整

生後10~12週齢のC57B6/J系雌マウスを妊娠させ、妊娠9.5日目 (E9.5) の時期に経腹的に polyIC (20 mg/kg, Sigma-Aldrich) を投与した。また polyIC 投与に先立ち E7.5 から E13.5 まで 活性型 ビタミン D3 (1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3: vitD3, Sigma-Aldrich) を経口的に 100 ng/d で投与した。polyIC または vitD3 のコントロールはともに PBS (phosphate buffered saline) を経腹・経口胃的に投与した。つまり、経腹的-経口胃的投与の組み合わせから、PBS-PBS 群、PBS-vitD3 群、polyIC-PBS 群、polyIC-vitD3 群の四群となり以下この組み合わせを用いて解析を行った。

### 2. 行動実験

処置マウスから産まれた各群のマウスを用いて、生後56日から63日の間に以下の行動学的解析を行った。

open field test (OF)

40 cm 四方の亚克力ボックス中心に被験動物を置き、30分間の行動を録画し、画像解析ソフト TopScan Suite (Clever sys) を用いて活動量を測定した。また不安評価については、20 cm 四方の中央分画への進入時間が短いほど不安が強いと評価した。

Y-maze test

3方向120度の角度毎にアーム (長さ: 34 cm、幅: 6 cm、深さ: 14.5 cm、各アームを A、B、C として標識) が突き出している Y-maze 装置を用いた。マウスを

迷路中心に置き、各アームへの侵入する様子を録画する。画像解析ソフト TopScan Suite (Clever sys) を用いて3連続して異なるアームへの侵入した組み合わせを求め、これを総侵入数-2で割り、交替行動率として評価する。これはマウスが探索行動で自発的に異なるアームに入る性質を利用した試験で、空間認知・記憶能力が保たれていると交替行動率が高くなり、空間記憶能力が低下すると低下する。

#### 受動的回避反応試験

記憶障害評価に用いたステップスルー型受動的回避反応試験装置 (MPB-M010、ST-10、SG-1000E、MELQUEST、富山) は明室 (○×△×□mm、透明アクリル板) と暗室 (○×△×□mm、遮光アクリル板) の2つの区画からなり、ギロチンドアにより連結されている。まず記憶獲得試行を行う。マウスを明室に入れ10秒後にギロチンドアを開けるとマウスは暗室に入る。動物が暗室に入ったところでギロチンドアを閉じ、暗室のグリッド床に5秒間通電 (強いフットショック: 0.5 mA) する。次に記憶獲得試行の翌日から連続して4日間、記憶保持の程度を評価するためマウスが明室から暗室に入るまでの明室滞在時間を反応潜時 (Latency time) として測定した。反応潜時の測定は300秒とした。反応潜時が長いほど回避記憶が保たれていると判断する。

#### 聴覚性驚愕反応およびPPI試験

聴覚性驚愕反応およびPPI測定は驚愕反応測定装置 (SR-LAB systems、サンディエゴ社、米国) を用いて測定した。マウスを透明アクリルケージ (7 cm×7 cm×ca. 16.5 cm) に入れ、驚愕反応測定装置内の圧電位加速度計上に設置し、5分間65 dBのバックグラウンドノイズで馴化させる。驚愕反応およびPPI測定に120 dB、40 msec、バックグラウンドノイズと、バックグラウンドノイズから4 dB、8 dB、16 dB高いプレパルス (69 dB、73 dB、81 dB) を用いた。120 dBで40 msec、20 msecのプレパルス刺激の150 msec後に120 dBで40 msec、バックグラウンドノイズのみ (未刺激) を合計64試行を行った。驚愕強度のPPIは次の様に計算した。100 - [(プレパルス刺激のあるときの振動強度 - 未刺激の振動強度) / (120 dBのみの刺激時の振動強度 - 未刺激の振動強度)] × 100。

### 3. 統計学的解析

各試験の結果は平均±標準偏差あるいは箱ひげ図で示した。各群間の優位性は、サンプル数が少なかったた

めノンパラメトリック解析を行い、Kruskal-Wallisの検定、さらに各二群間の解析にMan-WhitneyのU検定を行った。多重比較のp値の補正にRyanの方法を用いた。全ての検定においてp値が0.05以下を有意差ありと判断した。

## 結 果

### OFテスト

OFテストでは活動量または不安状態を評価した。活動量は各群の比較においてpolyIC-PBS群とpolyIC-vitD3群で有意な差を認めた (p=0.018) (Fig. 1)。また不安状態を呈するマウスは中央部での探索行動が低下するが、各群の比較において有意な差は認められなかった (Fig. 2)。

### Y-mazeテスト

統合失調症では認知機能障害の1つとして短期記憶の保持の障害が知られている。今回、Y-mazeテストを用い、各群の空間認知・記憶について解析を行った。試験の結果、polyIC処置、またvitD3投与による交替行動率

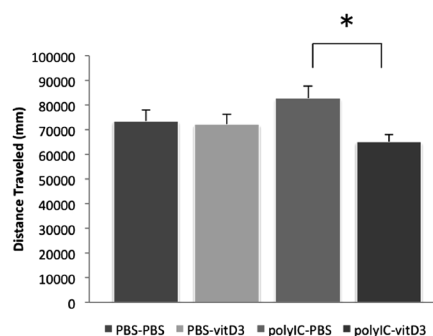


Fig. 1 open field test (distance traveled)

PBS-PBS n=16, PBS-vitD3 n=19, polyIC-PBS n=16, polyIC-vitD3 n=22

\* p<0.05

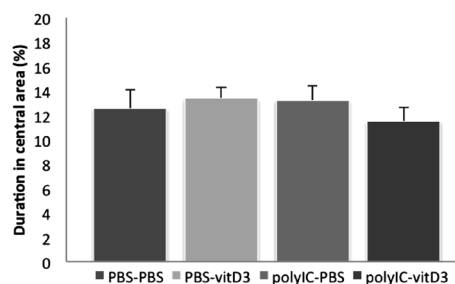


Fig. 2 open field test (duration in central area)

PBS-PBS n=16, PBS-vitD3 n=19, polyIC-PBS n=16, polyIC-vitD3 n=22

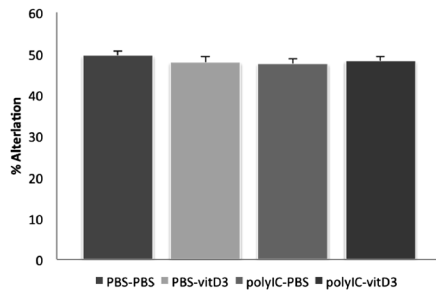


Fig. 3 Y-maze test

PBS-PBS  $n=17$ , PBS-vitD3  $n=14$ , polyIC-PBS  $n=16$ , polyIC-vitD3  $n=19$

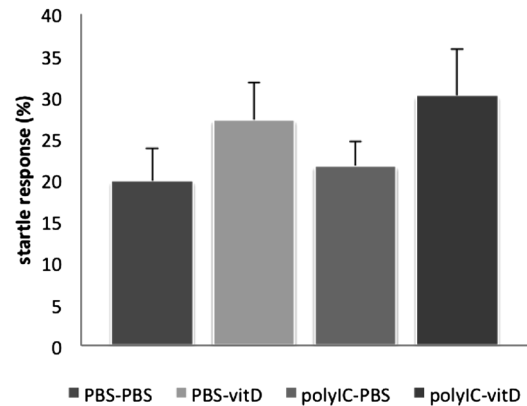


Fig. 5 startle response

PBS-PBS  $n=17$ , PBS-vitD3  $n=25$ , polyIC-PBS  $n=27$ , polyIC-vitD3  $n=22$

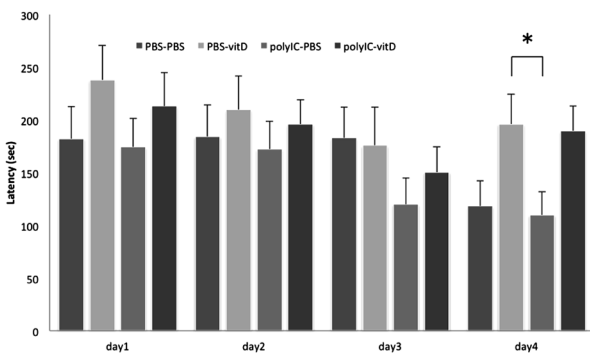


Fig. 4 passive avoidance test

PBS-PBS  $n=17$ , PBS-vitD3  $n=12$ , polyIC-PBS  $n=21$ , polyIC-vitD3  $n=22$   
\*  $p < 0.05$

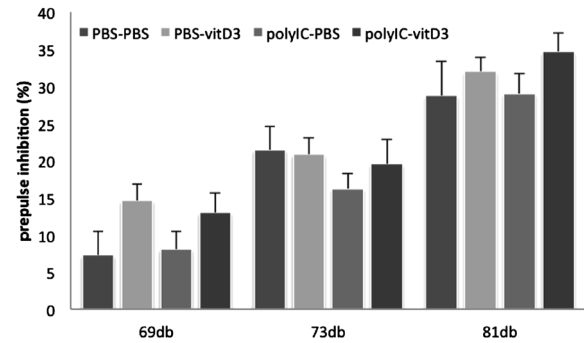


Fig. 6 prepulse inhibition test

PBS-PBS  $n=17$ , PBS-vitD3  $n=25$ , polyIC-PBS  $n=27$ , polyIC-vitD3  $n=22$

の変化は見られなかった (Fig. 3)。

### 受動的回避反応試験

受動的回避反応試験の結果を Fig. 4 に示した。獲得施行後、1 日目では反応潜時は各群で有意な差は認められなかった。しかし、4 日目では polyIC-PBS 群と比べ PBS-vitD3 群で反応潜時の有意な短縮 ( $p=0.036$ )、polyIC-vitD3 群で短縮傾向 ( $p=0.076$ ) を認めた。なお PBS-PBS 群と polyIC-PBS 群で差はみられなかった。

### 聴覚性驚愕反応および PPI 試験

聴覚性驚愕反応試験において、各群に有意な差を認めなかった (Fig. 5)。PPI 試験でも 69 db、73 db、81 db 刺激いずれにおいて、各群に PPI の有意な差は認められなかった (Fig. 6)。69 db で PBS-PBS 群と PBS-vitD3 群で  $p=0.084$  (Man Whitney  $U$  test) と PPI の改善傾向がみられた。

### 考 察

我々の研究室では polyIC マウスの解析を行い、母体の免疫反応による炎症が発達期に海馬の髄鞘化を遅延させ、神経軸索の直径が縮小させることを報告している<sup>13)</sup>。また発達期に脱髄をおこしたマウスは統合失調症様の行動異常を生じる<sup>14)</sup>ことから、髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトの正常な発達が極めて重要であることを報告している。また脱髄疾患の動物モデルを用いた研究からは、ビタミン D3 はその重症度を低下させ、脱髄の程度を弱めることが示されている<sup>12, 15)</sup>。これらの知見から、polyIC マウスでみられる発達期での髄鞘化の遅延をビタミン D3 によって予防または軽症化できると仮説を立て、検討した。

動物モデルで妊娠中の polyIC 投与によって生まれた児に PPI の障害が生じることが報告されているが、今回 polyIC-PBS 群、PBS-PBS 群と比較し PPI の障害をもたらすことを確認できなかった。一方、69 db では PBS-

PBS群と比べ、PBS-vitD3群で $p=0.084$ 、polyIC-PBS群とPBS-vitD3群で $p=0.058$ とPPIの改善傾向を認めた。またpassive avoidance testにおいてPBS-PBS群とpolyIC-PBS群はvitD3投与群に比べてlatencyの短縮を認め、恐怖記憶の保持が障害されていることが示唆された。これらの結果からPBS-PBS群がpolyIC-PBS群と同程度行動学的な変化を生じた理由について考察を行った。行動に影響を与える因子としてvitD3 (対象にPBS)投与方法が考えられた。本研究で用いた経口胃投与とはゾンデを経口的に胃まで挿入し薬剤を注入する方法である。E7.5からE13.5まで連続して7日間この投与方法を用いてvitD3またはPBSを与えた。投与を繰り返すことで母獣は忌避反応、攻撃性を示すため、比較的侵襲性が高い処置であることがわかった。Bronsonらは、妊娠中の母獣に連続して7日間異なるストレスを与えることで、胎盤でのIL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-2Raなどの炎症性サイトカイン、ケモカインのmRNAの上昇がみられると報告している。また、同様の母獣へストレスを与えたモデルでは、過活動、記憶の低下などの行動異常を呈することが報告されている<sup>16, 17)</sup>。

以上から本研究における薬剤の経口胃投与自体が生まれた児の行動に多大な影響を及ぼすことが推測された。この点を配慮し、vitD3の保護効果について検討した。ビタミンDの欠乏またはビタミンD受容体ノックアウトマウスがPPIの障害をもたらすと報告されている<sup>9, 18)</sup>。一方、母獣の高ビタミンD3血症によって児の骨塩量低下や致死性が報告されているが<sup>19)</sup>、ビタミンD過剰投与によるPPIへの影響については報告されていない。特に今回のモデルは妊娠中にビタミンDを投与するため、児に与える影響について評価する必要があった。PBS-PBS群とPBS-vitD3群の比較からは、本実験で用いたビタミンDの投与量では感覚情報処理制御機能の障害を生じず、むしろPPIの改善傾向がみられた。またビタミンD投与が、open field testにおいてpolyICによる活動量の増加を軽減し、passive avoidance testでpolyICによる記憶保持の低下を防いでいることが示された。これらの結果からは、母胎ストレスまたは母胎感染モデルで生じる行動異常にビタミンDは保護的な効果を持つことが示唆された。

今回、経口胃投与が母胎ストレスとなり行動学的に影響を及ぼし、polyICとビタミンDのもたらす影響を

正確に評価できていない可能性が大きいと考えられた。今後、ビタミンD投与方法を、水または食餌に混ぜるなど、よりストレスの少ない方法に変更し、行動解析また組織学的解析を行っていく予定である。

## 要 約

母胎感染によって統合失調症の発症率が高くなることが知られており、その機序として母体免疫反応が関与していることが考えられている。そしてビタミンDは免疫調節作用を持ち、特に抗炎症性作用が注目されている。本研究において、母胎感染によって生じる児の行動異常がビタミンD投与により軽減されることが示された。また母胎ストレスによる行動異常にもビタミンDが保護的な効果を持つことが示唆された。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団のご支援をいただきましたことを感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) S. A. Mednick, et al.: *Arch. Gen. Psychiatry*, **45**, 189–192, 1988.
- 2) N. Takei, et al.: *Am. J. Psychiatry*, **151**, 117–119, 1994.
- 3) A. S. Brown, et al.: *Arch. Gen. Psychiatry*, **61**, 774–780, 2004.
- 4) S. L. Buka, et al.: *Biol. Psychiatry*, **63**, 809–815, 2008.
- 5) L. Shi, et al.: *J. Neurosci.*, **23**, 297–302, 2003.
- 6) S. E. Smith, et al.: *J. Neurosci.*, **27**, 10695–10702, 2007.
- 7) M. Tohmi, et al.: *Neurosci. Res.*, **50**, 67–75, 2004.
- 8) D. K. Kinney, et al.: *Schizophrenia Bulletin*, **35**, 582–595, 2009.
- 9) T. H. Burne, et al.: *Physiol. Behav.*, **81**, 651–655, 2004.
- 10) J. McGrath: *Psychol. Med.*, **41**, 892–893; author reply 894, 2011.
- 11) C. Lefebvre d'Hellencourt, et al.: *J. Neurosci. Res.*, **71**, 575–582, 2003.
- 12) S. Wergeland, et al.: *PLoS ONE*, **6**, e26262, 2011.
- 13) M. Makinodan, et al.: *J. Neurosci. Res.*, **86**, 2190–2200, 2008.
- 14) M. Makinodan, et al.: *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **33**, 978–985, 2009.
- 15) M. T. Cantorna, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7861–7864, 1996.
- 16) S. L. Bronson, T. L. Bale: *Endocrinology*, en20141040, 2014.
- 17) B. R. Mueller, T. L. Bale: *Physiol. Behav.*, **91**, 55–65, 2007.
- 18) T. H. Burne, et al.: *Behav. Brain Res.*, **157**, 299–308, 2005.
- 19) L. Lieben, et al.: *Bone*, **57**, 123–131, 2013.