

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

規制薬物の依存メカニズムと慢性精神毒性に関する神経科学的研究

平成 10 年度研究報告書

Neuroscientific Research on Mechanism of Dependence and Chronic Psychotoxicity of
Regulated Drug

Annual Report

Supported by Grant from the Ministry of Health
And Welfare, Japan in 1999
(Chief; Mitsumoto Sato)

平成 11 年 3 月

主任研究者 佐藤光源

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

規制薬物の依存メカニズムと慢性精神毒性に関する神経科学的研究

平成 10 年度研究報告書

Neuroscientific Research on Mechanism of Dependence and Chronic Psychotoxicity of
Regulated Drug

Annual Report

Supported by Grant from the Ministry of Health
And Welfare, Japan in 1999
(Chief; Mitsumoto Sato)

平成 11 年 3 月

主任研究者 佐藤光源

1. 平成 10 年度総括研究報告 佐藤光源	1
2. 平成 10 年度分担研究報告	
依存性薬物の脳内移行に関する研究-マイクロダイアリシス法による検討-	11
分担研究者 長谷川高明	
共同研究者 高木健三、柴田英治、高木健次、北市清幸	
名古屋大学医学部保健学科	
Prepulse inhibition および working memory に対する規制薬物の反復投与の影響	19
分担研究者 山本経之	
共同研究者 三原良介、藪内健一、山口拓、渡辺繁紀	
九州大学薬学部薬理学教室	
依存性薬物の連用による薬物動態の変化と依存強度の解析	28
分担研究者 五味田裕 ¹⁾	
共同研究者 荒木博陽 ¹⁾ 、末丸克矢 ¹⁾ 、川上賢哉 ²⁾	
岡山大学医学部付属病院薬剤部 ¹⁾ 、岡山大学医療薬学専攻臨床薬剤学 ²⁾	
メタンフェタミン連続投与における腹側被蓋野-側坐核ドーパミン系ニューロンの機能変化に関する電気生理学的研究	37
分担研究者 笹征史	
共同研究者 松林弘明、天野託	
広島大学医学部薬理学教室	
モルヒネ誘発鎮痛および依存性の遺伝解析	41
分担研究者 鈴木勉	
星薬科大学薬品毒性学教室	
Nicotine 誘発性 diazepam binding inhibitor (DBI) 発現の神経化学的機序	50
分担研究者 大熊誠太郎	
共同研究者 桂 昌司	
川崎医科大学薬理学教室	

- クローン化オピオイド受容体発現細胞におけるアゴニスト持続的処置によるアデニル酸シクラーゼ系の過感受性形成メカニズムに関する検討 57
 分担研究者 佐藤公道
 共同研究者 南雅文、中川貴之、渡辺豪、小澤徹
 京都大学薬学研究科生体機能解析学分野
- トランスジェニック動物を用いた薬物依存発現機序の検討 65
 分担研究者 鍋島俊隆
 共同研究者 野田幸裕、間宮隆吉、宮本嘉明
 名古屋大学医学部医療薬学・付属病院薬剤部
- モルヒネ依存形成に関わる遺伝子発現の研究-モルヒネおよびナロキソンによるカルモジュリンおよびニューロフィラメント遺伝子発現の変化- 71
 分担研究者 三木直正
 共同研究者 郭哲輝、牛三勇
 大阪大学大学院医学系研究科情報薬理学
- メタンフェタミン急性投与における中枢ヒスタミン神経系の作用：
 ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究 78
 分担研究者 佐藤光源¹⁾
 共同研究者 窪田恭彦^{1, 2)}、大津浩²⁾、櫻井映子²⁾、伊藤千裕¹⁾、渡邊建彦²⁾
 東北大学大学院医学系研究科精神神経学分野¹⁾ 東北大学大学院医学系研究科細胞薬理学分野²⁾
- PET を用いた覚醒剤使用者の線条体ドーパミン・トランスポーターに関する研究 88
 分担研究者 伊豫雅臣¹⁾
 共同研究者 関根吉統¹⁾、松永勉¹⁾、森則夫¹⁾、尾内康臣²⁾、塚田秀夫³⁾
 浜松医科大学精神神経医学講座¹⁾、県西部浜松医療センター²⁾、浜松ホトニクス中央研究所³⁾
- 覚醒剤慢性投与による行動感作と認知機能変化における海馬の役割 94
 分担研究者 丹羽真一¹⁾
 共同研究者 竹内賢¹⁾、加藤光三¹⁾、鈴木喜明¹⁾、松木智彦¹⁾、星野研洋¹⁾、小野正美¹⁾、宍戸恭子¹⁾、小林正憲¹⁾、宍戸壽明¹⁾、鍋島俊隆²⁾、古川宏³⁾
 福島県立医科大学神経精神医学教室¹⁾、名古屋大学医学部医療薬学・付属病院薬剤部²⁾、名城大学薬学部薬化学教室³⁾

乱用薬物による脳機能障害の分子機構の解明	104
分担研究者 西川徹	
共同研究者 梶井靖、藤山航、平岡秀一、村岡新一郎、金田小幸、海野麻未、 黒田安計	
国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第3部	
メタンフェタミン精神病におけるシナプス再構築に関する実験的研究 -arc 遺伝子発現の変化から-	111
分担研究者 氏家寛 ¹⁾	
共同研究者 児玉匡史 ²⁾ 、高木学 ¹⁾ 、武久康 ¹⁾ 、黒田重利 ¹⁾	
岡山大学医学部神経精神医学教室 ¹⁾ 、福山友愛病院 ²⁾	
覚醒剤精神病モデルラットにおける gamma-aminobutyric acid(GABA)-benzodiazepine 神経伝達系の役割について	121
分担研究者 小山司	
共同研究者 安倍川智浩、伊藤耕一	
北海道大学医学部精神医学分野	
3. 分担研究者氏名一覧	139

平成 10 年度 総括研究報告

主任研究者 佐藤光源

総括研究報告

本研究班の目標は、薬物依存と慢性精神毒性の発生機序を明らかにすることである。両者に関わる脳内変化には共通部分があるので厳密には分けられないが、鍋島グループは主に薬物依存メカニズムを、佐藤グループは主に慢性精神毒性を担当して、本年度から3年間の研究を行う方針とした。平成 10 年度はその初年度にもかかわらず、多くの研究成果が得られたので、その概要について報告する。

(I) 薬物依存メカニズムに関する研究

1. 依存性薬物の脳内移行に関する研究 -マイクロダイアリシス法による検討-
(名古屋大学医学部保健学科検査技術科学 長谷川高明)
2. Prepulse inhibition および working memory に対する規制薬物の反復投与の影響
(九州大学薬学部薬理学 山本経之)
3. モルヒネ依存に及ぼすタバコ喫煙あるいはニコチン投与の影響
(岡山大学医学部附属病院薬剤部 五味田 裕)
4. メタンフェタミン連続投与による腹側被蓋野ドーパミンニューロン D2 レセプターの過感受性 (広島大学医学部薬理学 笹 征史)
5. モルヒネ依存の薬理遺伝学的解析
(星薬科大学薬品毒性学 鈴木 勉)
6. ニコチンおよびモルヒネの長期投与による脳内 diazepam binding inhibitor (DBI) の変化について (川崎医科大学薬理学 大熊誠太郎)
7. オピオイド持続的適用によるアデニル酸シクラーゼ系過感受性形成機構
(京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学 佐藤公道)
8. トランスジェニック動物を用いた薬物依存発現機序の検討
(名古屋大学医学部附属病院薬剤部 鍋島俊隆)
9. モルヒネおよびナロキソンによる遺伝子発現
(大阪大学医学部第一薬理学 三木直正)

(II) 慢性精神毒性に関する研究

1. メタンフェタミンなど薬物乱用による二次的脳障害における脳内ヒスタミン神経系の関与 (東北大学大学院医学系研究科精神医学 佐藤光源)

2. 覚醒剤長期乱用による臨床的特徴
(浜松医科大学 精神神経医学 伊豫雅臣)
 3. 覚醒剤慢性投与が事象関連電位に及ぼす影響の検討
(福島県立医科大学医学部神経精神科 丹羽真一)
 4. 乱用薬物による脳機能障害の分子機構の解明
(国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究部第3部 西川 徹)
 5. メタンフェタミン精神病におけるシナプス再構築に関する研究
(岡山大学医学部神経精神医学 氏家 寛)
 6. 精神病症状発現メカニズム
(北海道大学大学院精神医学 小山 司)
-

(I) 薬物依存メカニズムに関する研究

麻薬鎮痛薬のモルヒネをヒトや動物に連用すると依存が形成される。薬物依存には、薬物の精神薬理作用による精神依存と退薬による不快な生体反応を示す身体依存（退薬症状の発現）があり、モルヒネによる精神依存や身体依存には、脳内細胞内情報伝達系のアデニル酸シクラーゼ系の代償的な機能亢進が関与している可能性が示唆されている（図1）。すなわち、オピオイド受容体を有する培養細胞の培養液中にモルヒネを添加すると、 G_i 蛋白質共役型受容体のオピオイド受容体は刺激され、 G_i 蛋白質に共役しているアデニル酸シクラーゼ活性は抑制される。しかし、持続的にモルヒネを添加すると、代償的にアデニル酸シクラーゼ活性は上昇することが報告されている。京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学 佐藤公道は、クローン化オピオイド受容体発現細胞を用いてモルヒネの持続的処置によるアデニル酸シクラーゼ系の過感受性の形成機序を解析した。その結果、モルヒネの持続的処置によりアデニル酸シクラーゼ系の過感受性が形成された（図2）。この過感受性の形成には、新規タンパク質合成、受容体のリン酸化およびG蛋白質自身の活性化（GTPase 活性の上昇）は関与していないことが示唆された。G蛋白質-アデニル酸シクラーゼの連関が過感受性の形成に重要な役割を果たしているかどうかを明らかにするため、オピオイド受容体（図3a）と連関し、アデニル酸シクラーゼを抑制する G_i あるいは G_z 蛋白質 α サブユニット α_{i2} （図3b）あるいは α_z （図3c）を共発現させた細胞を用いて検討した。その結果、モルヒネの持続的処置によるアデニル酸シクラーゼ系の過感受性の形成には、アデニル酸シクラーゼを抑制することが可能なG蛋白質 α サブユニット（ α_{i2} と α_z ）によるアデニル酸シクラーゼの持続的な抑制が重要であり、これによってアデニル酸シクラーゼ系の代償的な過感受性が引き起こされるものと示唆された。名古屋大学医学部附属病院薬剤部 鍋島俊隆は、アデニル酸シクラーゼ系を遺伝的に障害させたマウスを用いてモルヒネの依存形成を調べたところ、モ

ルヒネを連続投与した正常マウスでは、退薬症状が顕著に発現するが、アデニル酸シクラーゼ系を遺伝的に障害させたマウスでは退薬症状が抑制されることを見出した(図5)。そこでモルヒネ依存の治療薬を開発する目的で、モルヒネがアデニル酸シクラーゼ活性を抑制し、cyclic AMPの産生を低下させることに注目し、cyclic AMPの分解酵素を阻害する薬物(ロリプラム)をモルヒネと連続併用投与することによってアデニル酸シクラーゼ系の代償的な亢進を引き起こさせないようにしたところ、モルヒネ依存は形成されないことを報告した(図6)。川崎医科大学薬理学 大熊誠太郎は、依存形成時には、脳内で不安誘発物質の diazepam binding inhibitor (DBI) が発現することを報告した。ニコチン長期投与による DBI の増加は、ニコチン受容体活性化により Ca²⁺の流入が増加し、その結果、カルモジュリン II kinase 活性が増加することによることを明らかにした。また、モルヒネ長期投与によっても脳内 DBI mRNA が増加し、この増加は薬物の退薬によりさらに増加することから、DBI はモルヒネ依存形成にも関与することを明らかにした。星薬科大学薬品毒性学 鈴木 勉は、モルヒネ誘発精神依存および身体依存に関与する染色体および遺伝子座の同定を行ったところ、モルヒネ誘発精神依存には第1, 3, 9, 13 および 18 染色体上の 13 遺伝子座、身体依存には第1, 2, 3, 10 および 15 染色体上の 16 遺伝子座が関与していることを明らかにした。大阪大学医学部第一薬理学 三木直正は、モルヒネの連続投与によりDNAとの結合が変化する Pur α の活性化因子を精製したところ、それはカルモジュリンであることを見出した。培養細胞にモルヒネを添加すると、カルモジュリン遺伝子の発現が著明に増加することを見出し、モルヒネ依存にはアデニル酸シクラーゼ系だけでなく、Ca 動態の変化も関与していることを示唆した。また、岡山大学医学部附属病院薬剤部 五味田 裕は、マウスにおいてモルヒネの身体依存はニコチンにより抑制される傾向があることを明らかにした。一方、覚醒剤のメタンフェタミンによる依存形成に関する研究において、名古屋大学医学部保健学科検査技術科学 長谷川高明は、腎透析膜を用いた改良型ダイアリシス法を用いてラットの血中および脳内メタンフェタミン濃度を経時的に測定できる方法を確立した。広島大学医学部薬理学 笹 征史は、生後7日齢のラットにメタンフェタミンを連続投与し、最終投与5日後に腹側被蓋野のドパミン神経活動を電気生理学的に検討したところ、腹側被蓋野ドパミン神経の過感受性が認められ、これは D2 受容体の機能亢進によることを示した。また、九州大学薬学部薬理学 山本経之は、メタンフェタミンの連続投与により認知機能が障害され、モルヒネの連続投与ではそのような障害は認められないが、休薬後に著明に障害され、モルヒネ(身体依存を形成する薬物)とメタンフェタミン(身体依存を形成しない薬物)の認知機能は、両者で異なることを報告した。

1. 依存性薬物の脳内移行に関する研究 -マイクロダイアリシス法による検討- (名古屋大学医学部保健学科検査技術科学 長谷川高明)

メタンフェタミンによる依存形成と薬物体内動態の関係を調べるため、腎透析膜を用

いた改良型ダイアリス法により血中および脳内メタンフェタミン濃度を経時的に測定できる方法を確立した。本研究の結果よりメタンフェタミンの脳内移行性の評価が可能であると考えられる。

2. Prepulse inhibition および working memory に対する規制薬物の反復投与の影響 (九州大学薬学部薬理学 山本経之)

メタンフェタミンの神経毒性である認知機能の障害の発現機序を明らかにするため、認知機能が評価できる prepulse inhibition (PPI) に対するメタンフェタミン およびモルヒネの反復投与の影響を検討した。メタンフェタミンは PPI を障害し、その障害は反復投与によって増強されたが、休薬すると、この障害は回復した。モルヒネの反復投与は PPI に影響を与えなかったが、休薬 24 時間後に著しく障害された。以上の結果より、身体依存を形成するモルヒネの PPI に対する作用態度はメタンフェタミンのそれとは異なることが明らかになった。

3. モルヒネ依存に及ぼすタバコ喫煙あるいはニコチン投与の影響 (岡山大学医学部附属病院薬剤部 五味田 裕)

ニコチンは、ドパミン神経系を介して依存を発現することが報告されている。そこで、モルヒネ退薬症状にドパミン神経系が関与しているかどうかを調べるため、モルヒネ退薬症状に対するニコチンの作用を検討したところ、ニコチンの単回投与は、モルヒネ退薬症状を抑制する傾向が認められた。

4. メタンフェタミン連続投与による腹側被蓋野ドパミンニューロン D2 レセプターの過感受性 (広島大学医学部薬理学 笹 征史)

メタンフェタミンによる依存の発現機序を解明するため、メタンフェタミン連続投与により惹起される腹側被蓋野ドパミン神経系の過感受性におけるドパミン受容体サブタイプの関与について電気生理学的に検討した。生後7日齢のラットにメタンフェタミンを連続投与すると、最終投与5日後に腹側被蓋野ドパミン神経の D2 レセプターが機能亢進を示したが、D1 レセプターは変化しなかった。従って、腹側被蓋野ドパミン神経系の過感受性は、D2 受容体の機能亢進によることが明らかとなった。

5. モルヒネ依存の薬理遺伝学的解析 (星薬科大学薬品毒性学 鈴木 勉)

モルヒネ誘発鎮痛、精神依存および身体依存の機序を解明するため、近交系 SM/J と A/J 系マウスの組換え近交系 (SMXA) マウス 26 系統を用い、モルヒネ誘発鎮痛、精神依存および身体依存に関与する染色体および遺伝子座の同定を行った。モルヒネ誘発鎮痛には第 1, 2, 5, 10, 15, 16 および X 染色体上の 26 遺伝子座、精神依存には第 1, 3, 9, 13 および 18 染色体上の 13 遺伝子座、身体依存 (特に jumping の発現) には第 1, 2, 3, 10 お

よび 15 染色体上の 16 遺伝子座が関与していることを明らかにした。

6. ニコチンおよびモルヒネの長期投与による脳内 diazepam binding inhibitor (DBI) の変化について (川崎医科大学薬理学 大熊誠太郎)

ニコチンおよびモルヒネによる依存の機序を解明するため、ニコチンおよびモルヒネの長期投与による脳内 diazepam binding inhibitor(DBI)の発現変化とその機序を検討した。ニコチン長期投与による DBI 増加は、ニコチン受容体活性化により、Ca²⁺の流入が増加し、その結果 CAM II kinase 活性が増加することに起因することが判明した。モルヒネ長期投与によっても脳内 DBI mRNA が増加し、この増加は薬物の退薬によりさらに増加した。従って、DBI はモルヒネ依存形成にも関与する可能性が示唆される。

7. オピオイド持続的適用によるアデニル酸シクラーゼ系過感受性形成機構 (京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学 佐藤公道)

麻薬性鎮痛薬による依存形成に深く関与していることが指摘されているアデニル酸シクラーゼ (AC) 系の過感受性形成のメカニズムを分子レベルで検討した。クローン化オピオイド受容体発現細胞において、 μ 、 κ 、 δ いずれのタイプのアゴニストの持続的処置によっても形成される AC 系の過感受性は、百日咳毒素により阻害されたが、蛋白質合成阻害薬は影響を与えなかった。オピオイド受容体と変異型 G 蛋白質を共発現させた細胞を用いた検討より、その形成には、G 蛋白質 α サブユニットによる AC の持続的な抑制が関与している可能性が示された。

8. トランスジェニック動物を用いた薬物依存発現機序の検討 (名古屋大学医学部附属病院薬剤部 鍋島俊隆)

薬物依存の形成機序を行動薬理的に解析するため、脳内カテコールアミン合成系および細胞内情報伝達系の遺伝子を改変させたマウスにおいて薬物依存が形成されるかどうかを調べた。Morphine を連続投与した野生型マウスに naloxone を投与すると、退薬症状が顕著に発現した。しかし、tyrosine 水酸化酵素 (TH) および cyclic AMP response element binding protein (CREB) 結合タンパク (CBP) 遺伝子変異マウス、あるいは phosphodiesterase IV 阻害薬の rolipram と morphine を 5 日間併用投与したマウスでは naloxone 誘発退薬症状の発現回数が減少した。Phencyclidine (PCP) 連続投与野生型マウスにおいて、PCP は place preference を惹起したが、TH および CBP 遺伝子変異マウス、あるいは rolipram と PCP を 28 日間併用投与したマウスにおいては、PCP 誘発 place preference は観察されなかった。以上の結果から、依存形成過程には、脳内カテコールアミンおよび cyclic AMP が関与する情報伝達系が重要な役割を果たしていることが示唆された。

9. モルヒネおよびナロキソンによる遺伝子発現 (大阪大学医学部第一薬理学 三木直正)

モルヒネによる依存の機序を解明するため、遺伝子発現について検討した。モルヒネ慢性投与によりDNAとの結合が変化する Pur α の活性化因子を精製したところ、Calmodulin(CaM) であることが明らかとなった。モルヒネ→Ca/CaM→Pur α →遺伝子発現の新たな系を明らかにした。また、CaM のプロモータ領域には PUR エlementが存在しているので、PC12 細胞で、モルヒネによる CaM の発現を調べたところ、48 時間で CaM 遺伝子の著明な発現増加が見られた。

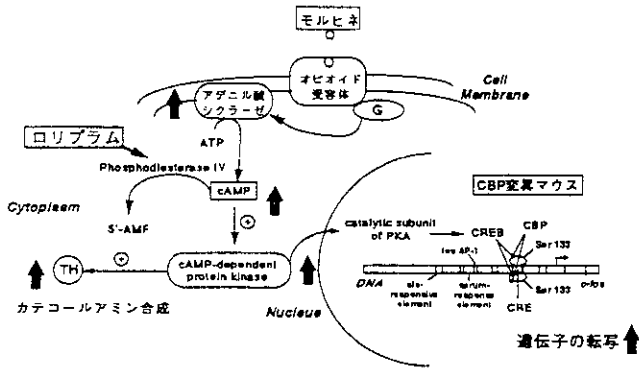


図1 薬物依存形成機序の仮説

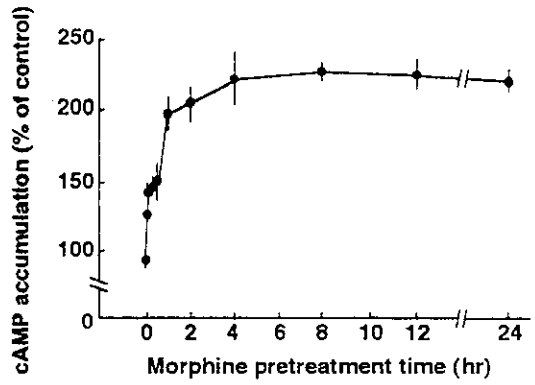


図2 クローン化オピオイド受容体を発現させた細胞におけるモルヒネ持続的処置によるアデニル酸シクラーゼ系の過感受性の時間経過。

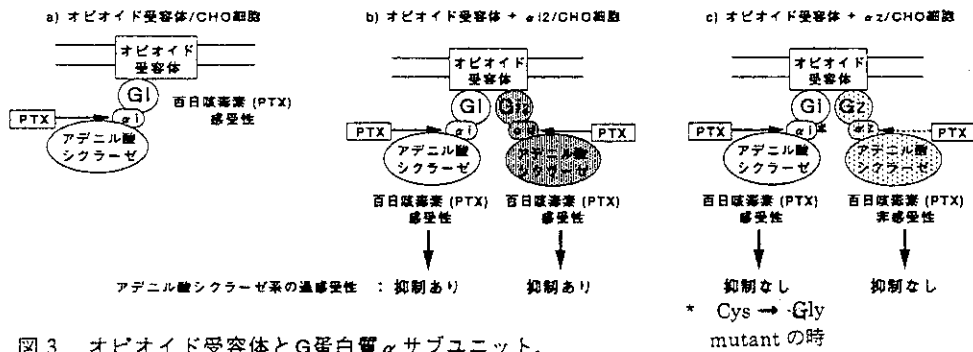


図3 オピオイド受容体とG蛋白質 α サブユニット。

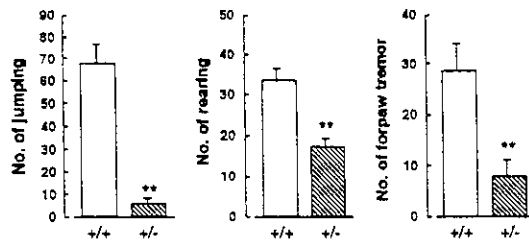


図4 遺伝的にアデニル酸シクラーゼ系を障害させたマウスにおけるモルヒネ依存形成。+/+; wild-type mice, +/-; mutant mice. ** $P < 0.01$ vs wild-type.

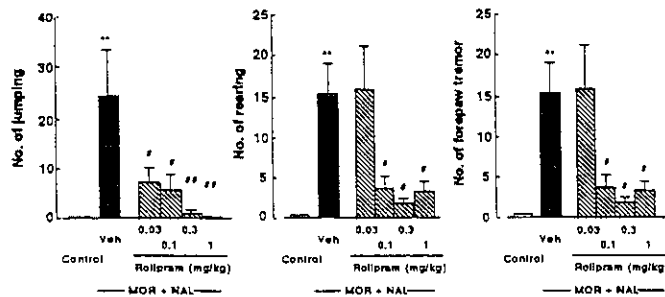


図5 モルヒネおよびロリプラム連続併用投与マウスにおけるモルヒネ依存の形成。Veh: vehicle, MOR: morphine, NAL: naloxone. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs (MOR + NAL)-treated group.

(II) 慢性精神毒性に関する研究

覚せい剤（メタンフェタミン、MAP）を長期にわたり乱用していると、しだいに急性分裂病と識別しがたい精神病エピソードが現れる（覚せい剤精神病）。この精神病エピソードが現れると、回復しても長年にわたって再発しやすさが続き、再使用やフラッシュバックによる再発が頻発するようになる（精神病エピソードの逆耐性現象、逆耐性と略す）。この研究グループは、覚せい剤を長期乱用で急性精神病エピソードが現れるようになるのはなぜか、再発しやすさにはどのような脳内変化によるのかという2点に焦点をあて、精神毒性の研究を行った。研究方法は、症例を対象としたドーパミントランスポーター(dopamine transporter DAT)のPET解析と、動物を用いた分子生物学的な検討が中心であった。

臨床研究では、浜松医科大学精神神経医学の伊豫の研究成果が注目される。彼らは十分な倫理的配慮を行った上で、精神病エピソードを経験したことがある覚せい剤長期乱用者を対象に、脳内 DAT の変化を PET で解析した。その結果、DAT 密度が長期にわたって低下し、その変化と精神症状の重症度が相関することを明らかにした。これは、MAP 長期乱用者について行われた世界で初めての成績で、覚せい剤の長期乱用により脳ドーパミン神経系に長期持続性の変化を生じることが明らかになった。次年度も症例数を増やし、その変化の持続、乱用期間や再発頻度との関係などが明らかになるものと期待される。

動物を用いた基礎実験では、覚せい剤を反復投与したさいにみられる異常行動（常同行動や移所運動量）の逆耐性について、その発生機序や認知機能変化が検討された。

まず、逆耐性の形成に関与する新規遺伝子が、国立精神・神経センター神経研究所の西川らによって発見された。MAP に対する脳内遺伝子応答で逆耐性に特異的に関わる新規遺伝子の代謝産物3つがクローニングされ、そのうちの一つ *mrt-1* が MAP に対して早期に応答し、逆耐性の形成に必要なことが分かった。その全塩基配列の解析を終え、現在、ヒト相同遺伝子の存在も確認し、構造解析を進めている。覚せい剤精神病を経験した乱用者や精神分裂病患者における同遺伝子の変異の有無が注目される。

一方、MAP の慢性投与で常同行動に逆耐性が形成されるが、東北大学大学院細胞薬理学の渡邊らは前期3年の本研究で、脳ヒスタミン神経系がこの形成過程を抑制し、それが H1, H2 受容体を介した抑制であることを見いだした。また、逆耐性を形成すると両受容体の機能亢進がみられることも明らかにした。今年度は、東北大学大学院精神神経学の佐藤らが、ヒスタミン合成酵素ノックアウトマウスに MAP を急性投与し、移所運動量の増加時間の延長を観察した。ヒスタミン神経系が MAP の急性薬理作用を抑制することが分かったので、次年度は、慢性投与による逆耐性形成への影響や各種神経伝達物質の変化の検討が急がれている。

岡山大学医学部神経精神医学の氏家は、覚せい剤精神病における異常神経回路網の形

成機序を知る目的で、MAP 急性および反復投与によるラット脳内 arc mRNA の変化を検討した。その結果、いずれの投与方法でも大脳皮質、線条体、海馬で増加しており、その一部は NMDA 受容体やドーパミン受容体を介していることが分かった。

北海道大学医学部精神医学の小山は、MAP 行動感作（逆耐性）の形成に対する GABA- benzodiazepine の役割を検討し、それを抑制することを示した。

福島県立医科大学神経精神医学の丹羽は、MAP 慢性投与ラットの行動感作（逆耐性）と認知機能障害との関連を明らかにするため、事象関連電位である P3 様電位を指標に検討した。その結果、MAP 慢性投与により P3 様電位が変化すること、MAP 急性効果に対して海馬-前頭皮質-側坐核系が抑制的に働くこと、などを示した。

以上、覚せい剤の慢性使用で脳 DAT が変化することを臨床例で示し、MAP 反復による逆耐性の形成に特異的に関わる新規遺伝子 mrt 1 が発見され、その塩基配列の解析を終えることができた。また、MAP 慢性投与で異常な反応性が獲得されるが、それには脳内ヒスタミン神経系の変化が重要な関与をすることが示された。ヒスタミン神経系が覚醒水準を変化させることから、精神病エピソードにみられる逆耐性現象の形成に何らかの関与をするものと考えられた。

1. メタンフェタミンなど薬物乱用による二次的脳障害における脳内ヒスタミン神経系の関与（東北大学大学院医学系研究科精神医学 佐藤光源）

ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子ノックアウトマウスでは MAP 急性投与後移所運動量増加時間の延長がみられたことから、中枢ヒスタミン神経系が MAP の急性運動効果を抑制する働きのあることがわかった。

2. 覚醒剤長期乱用による臨床的特徴（浜松医科大学 精神神経医学 伊豫雅臣）

覚醒剤長期使用者はドーパミントランスポーター密度が長期に渡って低下し、この変化が精神症状の重症度と有意に相関していた。

3. 覚醒剤慢性投与が事象関連電位に及ぼす影響の検討（福島県立医科大学医学部神経精神科 丹羽真一）

覚醒剤慢性投与により P3 様電位に反映される認知過程が障害される可能性が示唆された。また、正常な海馬-前頭皮質-側坐核の神経回路網の成熟が急性覚醒剤投与の効果に抑制的に働くことも確認した。さらに、側坐核の細胞間隙における DA の増加が認められなくても運動量の増加が起こることも確認され、覚醒剤による行動感作が DA 系だけでなく上記の神経回路網を中心とした DA 系以外の変化により引き起こされている可能性が示唆された。

4. 乱用薬物による脳機能障害の分子機構の解明（国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究部第3部 西川 徹）

メタンフェタミンへの応答性獲得に関与する新規遺伝子代謝産物を3種類クローニング、そのうち1種類はMAP刺激に対して早期に応答し、逆耐性形成に必要であることを明らかとし、また、全塩基配列の解析を終え、予想されるタンパクの存在も明らかとなった。また、これに対するヒト相同遺伝子の存在も確認し、現在構造解析を進めている。さらに他の1種類も逆体制形成に関与することが判明した。

5. メタンフェタミン精神病におけるシナプス再構築に関する研究（岡山大学医学部神経精神医学 氏家 寛）

arc mRNA は急性投与後も慢性投与後も大脳皮質、線状体、海馬で増加し、SCH23390, MK-801 でそれらの変化に一部抑制がみられることから、arc がMAPによる逆耐性現象を含む神経可塑性に重要な役割を担っていることが確認された。

6. 精神病症状発現メカニズム（北海道大学大学院精神医学 小山 司）

運動増強作用を指標とした場合、MAP行動感作獲得を benzodiazepine 作動薬は抑制し、benzodiazepine 拮抗薬は作動薬の効果を抑制する。

平成 10 年度 分担研究報告

依存性薬物の脳内移行に関する研究 -マイクロダイアリシス法による検討-

分担研究者	長谷川 高明	(名古屋大学医学部保健学科 教授)
共同研究者	高木 健三	(名古屋大学医学部保健学科 教授)
	柴田 英治	(名古屋大学医学部保健学科 助教授)
	高木 健次	(名古屋大学医学部保健学科 助教授)
	北市 清幸	(名古屋大学医学部保健学科 助手)

研究要旨

規制薬物の薬物依存形成と薬物体内動態の関係を明らかにすることを目的として、依存形成薬物メタンフェタミン(MAP)の血中濃度および脳組織内濃度の時間推移をラットを用いて検討した。

ダンシルクロライド(DNS)と反応させて生成したダンシル化 MAP (DNS-MAP)を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて測定したところ、検出限界が約 0.5 ng/ml と簡便でかつ鋭敏な MAP 測定系を確立することができた。

ラットに 2 および 5 mg/kg の MAP を静脈内注入した時の MAP の血中濃度-時間推移は 2-コンパートメントモデルに従う消失を示し、その消失相の半減期は 17.4 時間であった。また、その体内分布容積(Vd)は 4.1 liters/kg と非常に大きく、MAP は血液中より、組織、脂肪組織および脳に広く分布することが示唆された。さらに MAP 静脈内注入(5 mg/kg)における脳組織内での MAP 濃度-時間推移を検討した。MAP の薬効発現部位の一つである線条体における MAP 濃度は投与後 0-30 分に最高値を示し、以降血中濃度-時間推移と同様の過程をたどり消失した。

以上の結果より、血漿中および脳組織内の MAP 濃度を定量的に測定することが可能であることに加え、その依存発現時の解析も可能であることが示唆された。今年度の結果を基に、依存症モデルと考えられている MAP 連続投与による異所行動性亢進時における MAP の血中および脳組織内濃度が変化するか、血液脳関門に MAP 取り込み機構または排出機構が存在するかどうかを確認することが今後の検討課題となった。

A. 研究目的

各種規制薬物の乱用と依存は大きな社会問題になっているが、その治療や依存発現メカニズムの詳細は未だ明らかになっていない。一方、依存薬の作用機序の解析には様々な動物モデルが用いられている。例えば、メタンフェタミン(MAP)連用による過行動の亢進などがその例である。しかしながら、その動物モデルでの規制薬

物の体内動態に関する検討はほとんど行われていない。

近年、薬物の脳移行に大きな役割を果たしている血液脳関門(BBB)における薬物輸送担体に関する研究が飛躍的に進歩してきた。その結果、長年にわたり提唱されてきた『薬物の脳移行は脂溶性の大小と分子量閾値で規定される』とする概念は大きく崩れつつある。

例えば、免疫抑制薬シクロスポリンや悪性腫瘍薬ビンクリスチンはいずれも精神安定薬ジアゼパムよりも高脂溶性であるにもかかわらず、脳内移行率が低い。従来は、シクロスポリンやビンクリスチンの分子量の大きさがその脳移行性の低さの原因であるとされてきたが、1989年にBBBの本体である脳毛細血管内皮細胞の管腔側膜にシクロスポリンやビンクリスチンの排出ポンプであるP糖蛋白質の存在が確認された¹⁾。また、P糖蛋白質欠損動物ではシクロスポリンやビンクリスチンの脳内移行が著しく増大することも確認され、このP糖蛋白質がこれら薬物の脳内移行を制御していることが明らかになった⁷⁾。さらに、BBBにはグルコース、アミノ酸、モノカルボン酸などの栄養物質を血液中より取り込むそれぞれの栄養物質輸送担体、ホルモンや炎症性物質を輸送するペプチド輸送担体などが存在することが確認され、各種薬物の脳移行へは単純拡散だけではなく、各種輸送担体を介した脳移行と排出が複雑かつ非特異的に行われていることが示唆されている⁵⁾。しかしながら、これら輸送担体の機能が依存性薬物の連用時のような病態時にどのように変化するかについては全く明らかにされていない。

本研究では、規制薬物の脳移行の特性および薬物依存発現時の規制薬物の薬物動態を解析することを目的として、代表的な規制薬物MAPを用い、その末梢および脳組織内動態の解析モデルの作成を試みた。

B. 研究方法

1. 試薬

塩酸メタンフェタミン (MAP)は大日本製薬製、 β -フェニルエチルアミン (PEA)はSigma社製、ダンシルクロライド (DNS)はMerck社製をそれぞれ使用した。その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

2. 動物

日本SLCで購入したWistar系雄性ラット(体重260-300g)を使用した。動物は温度(22 - 24 °C)、湿度(55 ± 5 %)の条件下で自由摂取、自由給水のもと少なくとも3日間飼育したものを使用した。

3. 手術

MAP注入および血液採取のための静脈へのカニューレーションおよび脳組織内薬物濃度測定のためのダイアリスプローブの埋め込みはすべてペントバルビタール(50 mg/kg)麻酔下で行った。すなわち、右頸静脈内にはポリエチレンチューブを、線条体(AP +0.2 mm DV -4.5 mm)⁶⁾にはKitaichiらの方法³⁾に基づき、線条体を水平に横切る形でダイアリスプローブ(AN69ホローファイバー)を各側3mmずつ組織を灌流するように埋め込んだ。

4. 薬物投与

MAPは生理食塩水に溶解し、静脈内投与では体重100gあたり0.2mlを投与した。

5. 採血

MAP(2または5 mg/kg)投与後、静脈内に埋め込んだカニューレより経時的に血液を約0.2ml採取した。採血後、血液は6,000 rpmで10分間遠心して血漿を分離し、MAP濃度測定まで-30°Cで保存

血漿中MAPの抽出操作

血漿サンプル 50 μ l
飽和食塩溶液 50 μ l
5% NaOH溶液 10 μ l
0.5 μ g/ml PEA 350 μ l

↓
混和
遠心

(4°C, 6,000 rpm, 10 min)

↓
遠心上清 300 μ lを
試験管に移す。

↓
窒素ガスにて蒸発乾固

↓
10 mM炭酸ナトリウム 100 μ l
緩衝液
1 mM DNS 100 μ l

↓
混和、ダンシル化*へ

脳透析液中MAPの抽出操作

脳透析液サンプル 100 μ l
10 μ g/ml PEA 10 μ l
10 mM炭酸ナトリウム 50 μ l
緩衝液
2 mM DNS 50 μ l

↓
混和、ダンシル化*へ

*ダンシル化 (45°C, 1時間)

HPLC測定条件
(Ex. 343 nm, Em. 530 nm)

Fig. 1 血漿中および脳透析液中MAPの抽出操作

した。

6. マイクロダイアリシス

マイクロダイアリシスは手術翌日に施行した。すなわち、プローブに 5 μ l/min の流速でリングル液を灌流した。約 1 時間灌流し、流量が安定したところで MAP (5 mg/kg) を静脈内投与し、最初の 2 時間は 30 分ごとに、その後は 60 分ごとに還流リングル液を回収した。サンプルはすべて 30°C で保存し、測定に供した。なお、5 μ l/min の流速における *in vitro* での MAP 回収率は 17.3 %であった。脳内プローブの位置は標準的な組織学的手法を用いてその部位を確認した。

7. MAP測定のためのサンプル処理方法(図1)

血漿サンプルはその 50 μ l を取り、飽和食塩溶液 50 μ l、5% NaOH 溶液 10 μ l、内部標準物質 β -フェニルエチルアミン (0.5 μ g/ml, PEA) 含有アセトニトリル溶液

350 μ l と激しく混和し、除蛋白および MAP の抽出を行った。遠心して蛋白を沈殿させた後、アセトニトリル層 300 μ l を分取し、窒素ガスにて蒸発乾固させた。乾固したサンプルに 10 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) 100 μ l、1 mM ダンシルクロライド (DNS) 含有アセトニトリル溶液 100 μ l を加え、遮光下で 45°C、1 時間反応させた。反応後、サンプルは直ちに氷冷し、HPLC による MAP 定量に供した。

一方、マイクロダイアリシスによって採取したリングル液はその 100 μ l を取り、PEA (10 μ g/ml) 含有アセトニトリル溶液 10 μ l、10 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) 50 μ l、2 mM DNS 含有アセトニトリル溶液 50 μ l を加え、遮光下で 45°C、1 時間反応させ、血漿サンプルと同様に HPLC による MAP 定量に供した。なお、検量線には既知濃度の MAP を血漿中またはリングル液中に添加したものを上記と同様の抽出および反応操作により MAP をダンシル化したものを使用した。

8. HPLC による DNS-MAP測定

DNS-MAP 測定は LC-6A システム(島津)を用い、移動相には 1mM イミダゾール含有アセトニトリル-水 (80:20) 溶液 (pH 7.0) を用いた。蛍光検出器 (RF-530) はその波長を Ex. 343 nm、Em. 530 nm として蛍光を検出した²⁾。

9. 限外濾過法による MAP の蛋白結合能の同定

既知濃度の MAP を含む血漿 200 μ l をとり、限外濾過チューブ (ミリポア、分子量ふるい 20,000) を用い、遠心 (6,000 rpm、1 時間) して限外濾過液を採取した。限外濾過液はその濃度を HPLC により定