

A. 研究目的

精神刺激薬メタンフェタミン(MAP)は依存性薬物であり、長期連用によって薬物に対する反応性が増大する、いわゆる逆耐性現象を発現する。

これまでに我々は、MAP を連続投与した後、休薬して作成した MAP 逆耐性動物では血漿中および脳組織間隙中の MAP 濃度が上昇することを明らかにしてきた¹⁾。すなわち、MAP 逆耐性動物での行動感作現象やさまざまな神経機能の変化の一部には血漿中 MAP 濃度の上昇と MAP 脳移行性の増大による脳組織間隙内遊離型 MAP 濃度上昇が関与している可能性があることを示唆してきた¹⁾。

本研究では、MAP 逆耐性モデルラット(R-MAP)の体内動態の変化に関する要因が無いかどうかを明らかにする目的で、MAP 代謝能および MAP 腎排泄に関与する因子のうちの薬物再吸収過程に焦点をあて、これらに変化がないかどうかについて検討を行った。

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)、テトラエチルアンモニウム(TEA)は Sigma 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 260-300 g)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. MAP 逆耐性動物モデルの作成

MAP 逆耐性動物モデルの作成は Ujike らの方法²⁾を一部改変して行った。すなわち、ラットに MAP(6 mg/kg)を 1 日 1 回 5 日間、腹腔内に連続投与した後、21 日間休薬して MAP 逆耐性群を作成した(R-MAP)。対照には生理食塩水を 1 日 1 回 5 日間投与した後、休薬した動物を使用した(Control)。なお、原法での休薬期間は 7 日間であるが、MAP の体内残存の影響をできるだけ排除するため 3 倍の 21 日の休薬期間を設定した。

R-MAP における逆耐性の形成は、MAP(0.8 mg/kg)を静脈内投与し、それによって誘発される過行動を行動量測定装置(SCANET MV-10, メルクエスト)によって確認した。

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はペントバルビタール(50 mg/kg)麻酔下で行い、右頸静脈内にポリエチレンチューブを挿入した。実験当日に動物は、必要に応じ、ペントバルビタール麻酔下で、MAP 持続注入および尿採取のために右大腿静脈および膀胱にカニューレーションを施した。

4. 腎排泄能評価実験

MAP 腎排泄能を評価する実験では、MAP 血中濃度を定常状態に維持した後、実験を行った。すなわち、MAP(1 mg/kg)を急速静注した後、MAP(834 μ g/hr/kg)を流速 2 ml/hr で右大腿静脈より持続的に注入して MAP 定常状態を作成した。実験では、MAP 持続注入開始 1 時間後より 20 分間隔で 3 回、尿およ

び脳透析液を採取すると共に、尿の採取時間の中間点で採血を行った。持続注入開始 2 時間後からは 7.5% NaHCO₃ 中に溶解した MAP を持続注入し、注入約 30 分後に尿 pH がアルカリにシフトしていることを確認した後、再び 20 分間隔で 2 ~ 3 回、尿採取と採血を行った。尿および血液を遠心して得た血漿はすべて -30℃ で保存し、測定に供した。

5. 血漿中コルチゾール濃度の評価

血漿中コルチゾール測定の実験では動物に MAP (5 mg/kg) を静脈内投与し、20, 40, 60, 90, 120 分後に血液を採取した。採取した血液を遠心して得た血漿はすべて -30℃ で保存し、測定に供した。

6. MAP 測定および血漿中コルチゾール測定

血漿はその 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℃、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、希釈した尿サンプル 50 μ l は、PEA (0.5 μ g/ml) 含有アセトニトリル溶液 350 μ l と混和し窒素ガスにて蒸発乾固させた。乾固したサンプルは血漿サンプルと同様に 10 mM 炭酸ナトリウム緩衝液

(pH 9.0) 100 μ l、1 mM DNS 含有アセトニトリル溶液 100 μ l を加え、遮光下で 45℃、1 時間反応させ、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ゲ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。

DNS-MAP 測定は LC-10A_{VP} 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 (66:33) 溶液 (pH 7.0) を用いた。蛍光検出器 (RF-10A_{XL}) はその波長を Ex. 343 nm、Em. 530 nm として蛍光を検出した³⁾。

なお、血漿中コルチゾール濃度は RIA 法によって測定した。

7. RT-PCR

R-MAP および Control ラットは麻酔下で脱血し、直ちに臓器を取り出した。取り出した臓器は早やかにドライアイス上で凍結させ、RT-PCR 法による CYP2D1/5, CYP2D2, OCTN2 mRNA の定量に供した。

凍結した組織サンプルは TRIzolTM 試薬により常法に従い、mRNA を抽出し、reverse-transcriptase (Superscript Preamplification SystemTM) によって cDNA に変換した。得られた cDNA は示適なプライマー^{4,5)} と Taq DNA polymeraseTM を用いて PCR 反応を行い、増幅させた。対照となる遺伝子の発現は β -アクチンを内部標準遺伝子としてその発現を相対評価した。

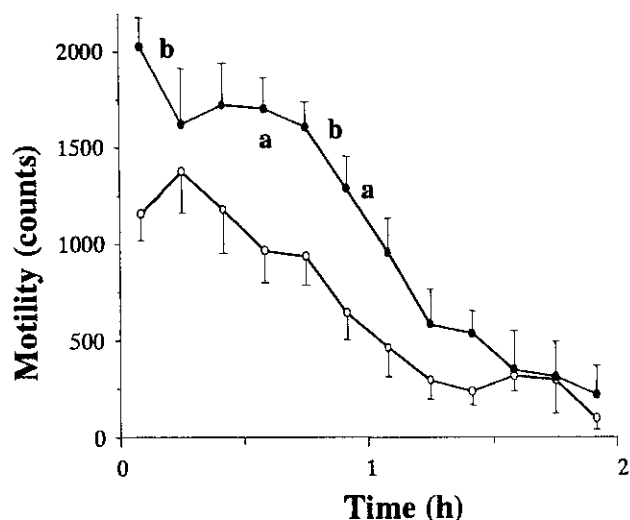


Fig. 1 ControlおよびR-MAPにおけるMAP(0.8 mg/kg)誘発過行動。a $p < 0.05$, b $p < 0.01$ vs. control.

C. 研究結果

MAP (0.8 mg/kg) の静脈内投与は常同行動を惹起せず、過行動を誘発する。この条件下における MAP 誘発過行動は R-MAP では Control に比して有意に増強することが明らかになった (Fig. 1)。なお、MAP 投与前の自発運動には両者の間で有意な差は見られなかった。

MAP の代謝に重要なヒト CYP2D6 のラット類縁 CYP である CYP2D1/5 および CYP2D2 の mRNA の肝臓での発現を検討した。その結果、Control および R-MAP の間には顕著な差が見られなかった (Fig. 2)。

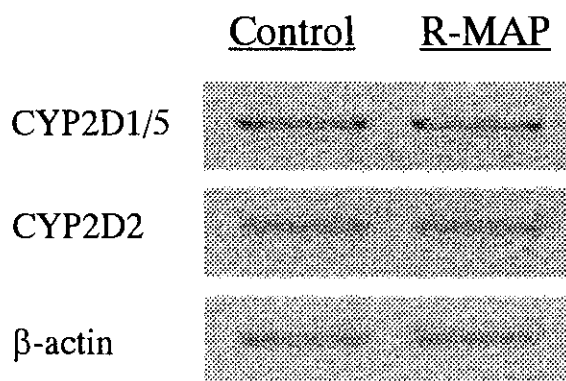


Fig. 2 肝におけるCYP2Ds mRNAの発現

Control および R-MAP に MAP (834 $\mu\text{g/hr/kg}$) を持続注入し、MAP 血中濃度を定常状態にした後、それぞれの血漿中 MAP 濃度、尿中 MAP 濃度を測定して算出した MAP の CL_r は尿アルカリ化により著明に低下したが、その低下の程度は Control および R-MAP の間では有意な差が見られなかった (Fig. 3)。

ラットにおいて腎尿細管細胞に存在し、カチオン性薬物の再吸収に関与していることが報告されている⁵⁾ OCTN2 に関し、その mRNA の発現を検討した。OCTN2 mRNA の発現もまた、Control および R-MAP の間では差が見られなかった (Fig. 4)。

先に我々はその発現が低下していることを見出した OCT3 は他の OCT と同様にステロイドによってその基質輸送能が調節される⁶⁾。そこで、我々は Control および R-MAP に MAP (5 mg/kg) を投与し、血漿中コルチゾール濃度の経時的変化を検討した。非常に興味深いことに R-MAP のコルチゾール濃度は安静時において Control に比して高値であることが明らかになった (Fig. 5)。また、Control で見られる MAP のコルチゾール遊離刺激作用

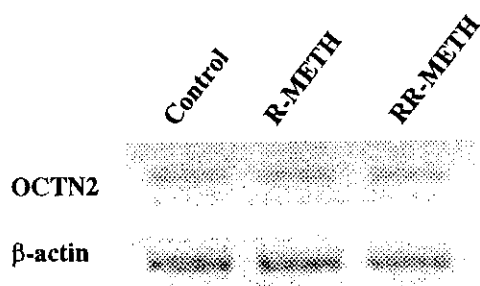


Fig. 3 腎におけるOCTN2 mRNAの発現

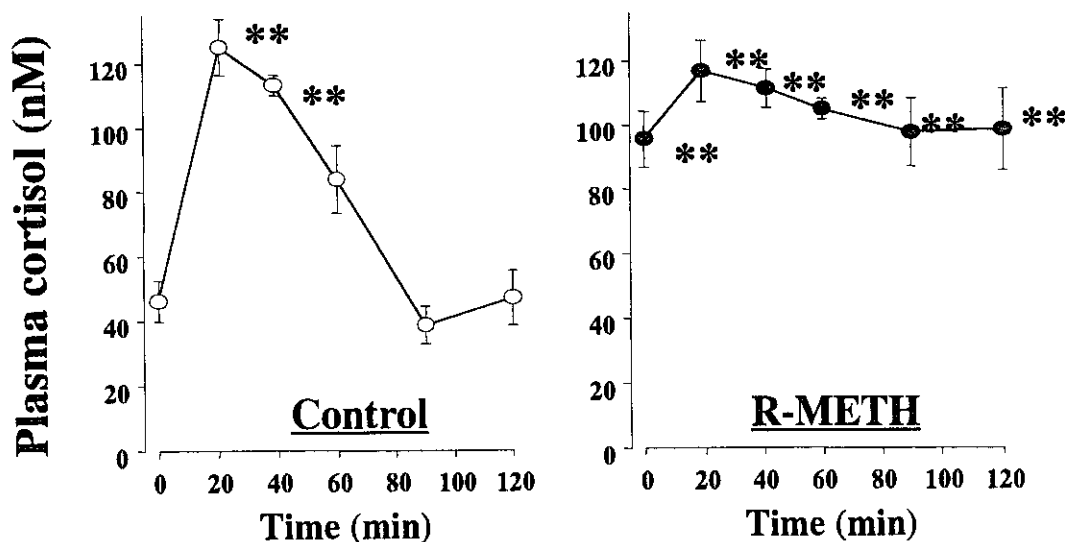


Fig. 4 MAP投与後の血漿中コルチゾール濃度の時間推移

は R-MAP では消失していることが明らかになった。

D. 考察

今回、我々は MAP 体内動態の変化に関与する可能性のある因子のうち、MAP 代謝能および MAP 尿細管再吸収過程に焦点をあて、これらが MAP 逆耐性モデルラット (R-MAP) で変化していないかどうかについて検討を加えた。

MAP は肝薬物代謝酵素によって様々な形に代謝されて尿中に排泄されるが、ヒトおよびラットにおける尿中の主な代謝物は芳香環のパラ位が水酸化された 4-hydroxymethamphetamine (4-OH-MAP) (ヒトで約 18%、ラットで約 29%) である⁶⁾。また、MAP は脱メチル化を受けて活性代謝産物である AMP (ヒトで約 15%、ラットで 5% 以下) とその水酸化物 4-hydroxyamphetamine (4-OH-AMP) (ラットで 10% 以下) に変換され、共に尿中に検出される⁶⁾。したがって、MAP 代謝の変化は MAP の体内動態の変動に

とって重要な因子であると考えられる。

この MAP から 4-OH-MAP、AMP から 4-OH-AMP の代謝にはヒトでは CYP2D6 という薬物代謝酵素が関与している。これまでの報告により、この CYP2D6 は特に薬物依存の発現に重要な CYP であることが指摘されている。すなわち、CYP2D6 はコデインやデキストロメトルファンのような麻薬性および非麻薬性鎮咳薬、フェンシクリジンのような依存性薬物の代謝に関与している⁷⁾。また、CYP2D6 はその活性に個人差があることがよく知られている。すなわち、白人の 10%、日本人の 1% には CYP2D6 に遺伝子欠損 (CYP2D6*5 など数種類) があり、CYP2D6 による薬物処理をほとんど行うことが出来ない。さらに日本人の約 40% は CYP2D6 の別の遺伝子変異 (CYP2D6*10) により薬物処理能が健常人に比べて低下している。したがって、MAP の分解・解毒機構の個人差が依存発現の個人差につながっているのではないかとこの可能性も指摘されている⁷⁾。

ラットにおけるヒト CYP2D6 の類縁 CYP は CYP2D1 と CYP2D1 とほぼ同様の特

性を有する CYP2D5 および CYP2D2 である。事実、CYP2D1/5, CYP2D2 活性は実際に MAP の体内動態に関与しており、CYP2D1/5, CYP2D2 活性が Sprague-Dawley ラットに比して低い Dark Agouti ラットは、MAP 血中濃度は Sprague-Dawley ラットに比して高く維持されると共に MAP による神経毒性や AMP による過剰所行動が強く発現することが報告されている⁸⁾。そこで、我々は MAP 逆耐性形成後の CYP2D1/5, CYP2D2 の変化について RT-PCR 法を用いて検討を行った。しかしながら、いずれの CYPs mRNA の発現も R-MAP では変化が見られなかった。したがって、MAP 逆耐性形成後に我々が観察した MAP 体内動態の変化は MAP 代謝能の変化に起因するものではないことが明らかになった。

次に、我々は腎臓における MAP の排泄機構について詳細な検討を行った。先に我々は、R-MAP では MAP の腎排泄能を表わす腎排泄クリアランス (CLr) が Control に比して低下していることを明らかにしている¹⁾。腎における薬物の尿中排泄に重要なイベントは糸球体濾過、尿細管分泌、尿細管再吸収である。R-MAP では有機カチオントランスポーター OCT3 の発現が低下していること、この OCT3 が薬物の尿細管分泌に関与している可能性が高いことを考えると、MAP の尿細管分泌の低下が、R-MAP における CLr の低下に関与している可能性が高いが、他の因子に関しての検討は行われていない。そこで、今回は MAP の受動的/能動的尿細管再吸収の変化について詳細な検討を行った。

MAP 尿中排泄に受動的な尿細管再

吸収が関与していることはすでにヒトで実証されている。すなわち、Beckett と Rowland⁹⁾ は NaHCO₃ の投与によって尿をアルカリ性になると、MAP が細胞膜を透過しやすい分子型となり、受動的に再吸収されるため、体内からの消失が遅延することを報告している。我々もこの実験と同様にラットの尿をアルカリ化して、MAP の CLr を低下させ、その変化の度合いを比較検討した。しかしながら、MAP の受動的再吸収 (CLr の低下) は Control と R-MAP の間では差がないことが明らかになった。

一方、カチオン性薬物の能動的な再吸収には、MAP 輸送能を有しているドラッグトランスポーター OCTN2 が関与していることが最近、報告された¹⁰⁾。そこで、我々は、この OCTN2 の発現についても RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、OCTN2 mRNA の発現もまた Control と R-MAP の間では差がないことが明らかになった。この結果は、MAP の腎排泄には OCTN2 の基質であるカルニチンは影響を与えないという我々の先の報告とよく一致している¹⁾。かくて、MAP 逆耐性の形成は MAP の能動的尿細管再吸収にも影響を与えていないことが明らかとなった。したがって、今回、我々が得た MAP の受動的/能動的再吸収の結果とこれまでの知見を考えると、R-MAP における MAP 腎排泄の低下には、OCT3 の発現低下による MAP 尿細管分泌の低下が重要であることが示唆される。

一方、OCT3 はステロイドホルモンの共存によってその輸送担体としての機能が減弱することがすでに報告されている¹¹⁾。MAP 逆耐性現象下では血漿中コルチゾール濃度が上昇することを考え合わせると、

ステロイドホルモン量の変化が OCT3 の発現を変化させ、MAP 体内動態の変化に関与している可能性がある。そこで、我々は、R-MAP における血漿中コルチゾール濃度について Control と比較検討を行った。その結果、血漿中コルチゾールは R-MAP ではベースライン値が高いこと、また、R-MAP 群では MAP を投与しても血漿中コルチゾール濃度の上昇が観察されないことが明らかになった。このような血漿中コルチゾール遊離能の変化が何故起きたのか、これが OCT3 の発現や MAP 腎排泄の低下にどのように関与しているかについてはまだ不明であるが、MAP 体内動態とステロイドホルモンの関連については今後さらに検討を進める必要があると思われる。

F. 結論

本実験において

- 1) R-MAP の代謝能には変化がないこと、
- 2) R-MAP の腎における MAP の受動的再吸収には変化がないこと、
- 3) R-MAP の腎における MAP の能動的再吸収には変化がないこと、
- 4) R-MAP では血漿中コルチゾールの遊離能に変化が生じていること、
が明らかになった。

以上の結果より、OCT3 を分子標的とした MAP 体内動態の是正および MAP 逆耐性におけるステロイドホルモンの関与についてさらに検討を行い、規制薬物の依存／神経毒性のメカニズムの解明を試みることが今後の課題となった。

[参考文献]

- 1) 北市清幸, 森下友喜, 長谷川高明. 逆耐性動物モデルにおけるメタンフェタミンの生体内挙動変化. 日本神経精神薬理学会誌, 21 133-144, 2001.
- 2) Ujike H., Tsuchida H., Kanzaki A: Competitive and non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonists fail to prevent the induction of methamphetamine-induced sensitization. *Life Sci.*, 50: 1673-1681, 1992.
- 3) 北市清幸, 高木健次, 柴田英治: メタンフェタミン逆耐性ラットにおけるメタンフェタミン体内動態および脳内移行の変化. 第30回日本神経精神薬理学会年会 (発表要旨集 p.100), 2000
- 4) Hiroi, T., Imaoka, S., Chow, T., and Funae, Y. Tissue distributions of CYP2D1, 2D2, 2D3 and 2D4 mRNA in rats detected by RT-PCR. *Biochim Biophys Acta* 1380: 305-312, 1998.
- 5) Spaniol, M., Brooks, H., Auer, L., Zimmermann, A., Solioz, M., Stieger, B., and Krahenbuhl, S. Development and characterization of an animal model of carnitine deficiency. *Eur J Biochem* 268: 1876-1887, 2001.
- 6) Hutchaleelaha, A., and Mayersohn, M. Influence of activated charcoal on the disposition kinetics of methamphetamine enantiomers in the rat following intravenous dosing. *J Pharm Sci* 85: 541-545, 1996.
- 7) Marzo, A., and Balant, L. P. Investigation of xenobiotic metabolism by CYP2D6 and CYP2C19: importance of enantioselective analytical methods. *J Chromatogr B Biomed Appl* 678: 73-92,

- 1996.
- 8) Vorhees, C. V., Morford, L. L., Inman, S. L., Reed, T. M., Schilling, M. A., Cappon, G. D., Moran, M. S., and Nebert, D. W. Genetic differences in spatial learning between Dark Agouti and Sprague-Dawley strains: possible correlation with the CYP2D2 polymorphism in rats treated neonatally with methamphetamine. *Pharmacogenetics* 9: 171-181, 1999.
 - 9) Beckett, A. H., and Rowland, M. Urinary excretion of methylamphetamine in man. *Nature* 206: 1260-1261, 1965.
 - 10) Tamai I., China K., Sai Y., Kobayashi D., Nezu J., Kawahara E. and Tsuji A. Na(+)-coupled transport of L-carnitine via high-affinity carnitine transporter OCTN2 and its subcellular localization in kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 1512, 273-284, 2001.
 - 11) Wu X., Kekuda R., Huang W.: Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J. Biol. Chem.*, 273: 32776-32786, 1998.

平成13年度 分担研究者氏名一覧

規制薬物の依存及び神経毒性の発現にかかわる仕組みの分子生物学的解明に関する研究

| 区分 | 氏名 | 所属施設・職名 | 住所 |
|----|--------|---|---|
| 主任 | 佐藤 光源 | 東北福祉大学大学院 精神医学・教授 | 〒981-8522 仙台市国見1-8-1 TEL:022-301-1241 |
| 分担 | 谷内 一彦 | 東北大学大学院医学系研究科 病態薬理学分野・教授 | 〒980-8575 仙台市青葉区星陵町2-1 TEL:022-717-8055 |
| 分担 | 西川 徹 | 国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第3部・部長 | 〒187-8052 小平市小川東町4-1-1 TEL:0423-46-1714 |
| 分担 | 氏家 寛 | 岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経精神医学教室・助教授 | 〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1 TEL:086-235-7241 |
| 分担 | 伊豫 雅臣 | 千葉大学医学部 精神医学講座・教授 | 〒260-8670 千葉市亥鼻1-8-1 TEL:043-226-2148 |
| 分担 | 秋山 一文 | 獨協医科大学 精神神経医学教室・教授 | 〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町大字北小林 880 TEL:0282-86-1111 内線 2730 |
| 分担 | 内村 直尚 | 久留米大学医学部 精神科学・助教授 | 〒830-0011 久留米市旭町 67 TEL:0942-31-7564 |
| 分担 | 小島 卓也 | 日本大学医学部 精神神経科学教室・教授 | 〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町30-1 TEL:03-3972-8111 内線2430 |
| 分担 | 鍋島 俊隆 | 名古屋大学医学部付属病院薬剤部 教授・薬剤部長 | 〒466-8560 名古屋市昭和区鶴舞町65 TEL:052-744-2674 |
| 分担 | 浅沼 幹人 | 岡山大学大学院医歯学総合研究科 神経情報学部門・助教授 | 〒700-8558 岡山市鹿田町2-5-1 TEL:086-235-7408 |
| 分担 | 笹 征史 | 広島大学医学部 薬理学教室・教授 | 〒734-8551 広島市南区霞1-2-3 TEL:082-257-5142 |
| 分担 | 曾良 一郎 | 財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学 総合研究所、分子精神医学研究部門・部門長 | 〒156-8585 東京都世田谷区上北沢2-1-8 TEL:03-3304-5701 (内線529) |
| 分担 | 長谷川 高明 | 名古屋大学医学部保健学科 検査技術専攻基礎検査学・教授 | 〒461-8673 名古屋市東区大幸南1-1-20 TEL:052-719-1506 |
| 分担 | 船田 正彦 | 国立精神・神経センター、精神保健研究所 薬物依存研究部・依存性薬物研究室長 | 〒272-0827 千葉県市川市国府台1-7-3 TEL:047-372-0141 (内線1222) |
| 分担 | 大熊 誠太郎 | 川崎医科大学 薬理学教室・教授 | 〒701-0192 倉敷市松島577 TEL:086-462-1111 |