

methamphetamine psychosis. World Congress for Psychiatric Genetics,2001

9) Ujike H,Nakata K,Takaki M *et al* : Association study between methamphetamine psychosis and the dopamine transporter gene polymorphisms. Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum Regional Meeting Hiroshima, 2001

10) 氏家寛、中田謙二、坂井歩、他：覚せい剤精神病に関わる臨床遺伝学的研究-ドパミン・トランスポーターおよび D2 ドパミン受容体遺伝子における関連研究、平成13年度厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）研究「規制薬物の依存及び神経毒性に関わる仕組みの分子生物学的解明に関する研究」分担報告書：5-13,2002

11) Yen DJ, Wang SJ, Ju TH *et al* : Stroke associated with methamphetamine inhalation. Eur Neurol ;34(1):16-22,1994

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

規制薬物の依存及び神経毒性の発現に係わる仕組みの分子生物学的解明に関する研究
分担研究課題：逆耐性モデルを用いた覚醒剤精神病における脳障害の分子病態の解明

分担研究者 西川 徹 東京医科歯科大学大学院精神行動医科学分野

共同研究者 柏 淳、伊藤 卓、黒田安計、梶井 靖、山本直樹、石井澄和、
海野麻未

[研究要旨]

覚醒剤精神病の発症・再発のモデルである逆耐性現象に関連する候補分子として、ラット大脳新皮質において、逆耐性が形成され始める生後発達段階以降にmethamphetamine (MAP) への応答性を獲得する遺伝子群を探索している。検出された遺伝子のうち、ラットmrt1bのヒトカウンターパートをクローニングし、そのヒトmrt1bと相互作用する分子を酵母two hybrid法を用いて検索した。免疫共沈降法による検証の結果、これまでに既知蛋白2つ、未知蛋白4つの計6つのクローンが得られ、mip(mrt1b interacting protein)1~6と命名した。mipsは、mrt1bとともに逆耐性現象の成立に関わる分子カスケードを構成していることが考えられるため、さらに、これらの機能解析と相互関係を検討中である。

A. 目的

本研究は、覚醒剤（amphetamine、methamphetamine (MAP) など）、コカイン等の、精神分裂病（分裂病）様症状を引き起こす規制薬物による長期持続性脳機能障害の分子機構を解明し、新しい治療法開発の標的となる神経機構や、臨床診断、経過、予後などのマーカー物質を見いだすことを目的としている。このため、1)覚醒剤の精神機能に及ぼす影響が思春期前後では異なり、小児期までは覚醒剤を連用しても依存形成や精神症状が生じ難いことが知られている^{1,12)}、2)齧歯

類では、覚醒剤精神病の発症や再燃のモデルと考えられている逆耐性現象が一定の生後発達期以降にしか成立せず、覚醒剤が引き起こす脳の活動異常のパターンも生後発達に伴って変化し、一定の時期から成熟期のパターンになる^{15,5,10,11)}、などの点に着目して分子生物学的研究を進めた。すなわち、以上の事実は、覚醒剤によって異常を来す脳内情報処理系は、特定の発達段階に成熟して薬物の影響を受けるようになることを示唆している。

そこで、このような情報処理系を構築する分子群を明らかにする目的で、覚醒

剤が誘発する逆耐性現象や脳の活動性の異常が成熟期型のパターンを示す時期以後に、MAPに対して応答性を獲得する遺伝子群を検索した。昨年度までに、候補として、*mrt1* (MAP-responsive transcript 1)、*mrt2*、*mrt3*等が検出された^{7,8,9,10}。

このうち*mrt1*に関する検討が最も進み⁴⁾、①C末端の異なる少なくとも2種類のisoform(Mrt1a, Mrt1b)をコードし、そのうち*mrt1b*のみが覚醒剤急性投与により発現が誘導され逆耐性の成立と平行して基礎的発現が高値を示すこと、②構造からはPX, PDZドメインをもちprotein-protein interactionを介して細胞内情報伝達に関与すると考えられること、③PSD分画に存在せずsynaptosome分画に存在することからpresynapseに局在する可能性が高いこと等が示唆された。今年度は、このラット*mrt1*のヒト相同遺伝子としてヒトMRT1bをクローニングするとともに、ヒトMRT1b遺伝子の産物であるMrt1b蛋白を含む分子カスケードの同定のため、Two Hybrid法を用いて、Mrt1bと相互作用する蛋白のクローニングを行い検討した。

B. 方法

(1)ヒトMRT1bのクローニング

human brain marathone cDNA library (クロンテック) をテンプレートに、ラット*mrt1a*, *mrt1b*にそれぞれ特異的なプライマーを設計し、5'-RACE法および3'-RACE法の組み合わせによりヒトMRT1a, MRT1bのクローニングを行った。

(2)Two Hybrid Screening

新たにクローニングされたヒトMRT1bのcoding領域全長(528アミノ酸に相当する)をbaitとしてpGBKT7ベクターにサブクローニングし、pACT2ベクターに入ったヒト脳ライブラリ(クロンテック)をスクリーニングした。4.1x10⁸cfuを-Trp-Leu-His-Ade+10mM 3-aminotriazole+ α -galの条件下でスクリーニングし、得られたクローンをすべてシーケンスした上で独立クローンに分類した。ベクター同志を交換して再度Two Hybrid反応を見ることにより一次検証を行った。

(3)細胞内強制発現と免疫共沈降

human *mrt1b*全長をHAタグのついたpCMV-HA発現ベクターへ、Two Hybridで得られたクローンを各々MycタグのついたpCMV-Myc発現ベクターへそれぞれサブクローニングして、HEK293細胞にlipofectamine法により共強制発現させた。蛍光ラベルした抗HA抗体による免疫蛍光染色により、human *mrt1b*の細胞内分布を確認した。また、抗HA抗体にて免疫沈降を行い、RIPAバッファーで洗った後SDS-PAGE/ウエスタンブロットを行い、抗Myc抗体にて免疫共沈降を確認した。

C. 結果

RACE法により、ヒトMRT1a, MRT1bに相当する遺伝子のクローンをそれぞれ得た。ヒト*mrt1b*はラット*mrt1b*と遺伝子レベルで92.9%、アミノ酸レベルで98.1%の相同性を持つことがわかった。細胞内強制発現では、*mrt1b*は細胞質に広く分布するパターンを示した。このヒトMrt1bをbaitに

したTwo Hybrid Screeningにより、140個の陽性クローンを得、すべてをシークエンスした結果、独立クローンは63種類であった。ferritinなどの高頻度偽陽性を除外した上で、現在までに13クローンを免疫共沈降にかけ、うち6つのクローンで免疫共沈降が確認された。これらをmrt1b-interacting proteins (mips)と命名し、mip1-mip6と番号をつけた。2つが既知蛋白、4つが未知蛋白であった。残りのクローンについても、順次免疫共沈降による検討を行っているところである。

D. 考察

これまでの研究により、mrt1bは①覚醒剤に対する応答性が逆耐性成立と同じく生後3週頃以降に出現する、②COCに対する交叉逆耐性を有する、③MAP反復投与後基礎発現量の持続的上昇を見る、などの点で逆耐性現象と薬理学的特徴が一致することがわかっている。mrt1は神経伝達物質の受容体・トランスポーター・遊離装置等と細胞骨格蛋白等を結合させる働きを持つ分子に多く見られるPDZドメイン²⁾、細胞内の蛋白局在に関与すると考えられるPXドメイン¹³⁾、細胞膜上での分子の安定化や整列に関わるB41ドメイン(band4.1 homologue)³⁾を一つずつ持つ。これらのドメイン構造より、mrt1はシナプス膜上において受容体等の膜分子のダイナミックな動的変化を司る物質であることが想定される。すなわち、逆耐性現象というシナプスの可塑性にかかわると考えられる膜上のダイナミックな変化を引き起こす一連の分子カスケードの一部

をなすと考えられる。

この分子カスケードを明らかにすることが逆耐性現象の分子メカニズム解明への端緒となることを期待し、現在mrt1bと相互作用を持つ分子のクローニングを行っている。これまでに得られた分子にはPDZ、B41、WWなどを含む分子もあり、mrt1とともにこれらのドメインを介して情報伝達を行うアダプター分子と考えられる。今後はこの分子カスケードの全容を明らかにすることで、逆耐性現象の分子メカニズムにアプローチしていく予定である。

E. 結論

(1) 覚醒剤による脳機能障害の分子機構にアプローチする目的で、覚醒剤による依存形成および精神症状が小児期には生じにくく、実験動物においても、覚醒剤精神病の発症や再発のモデルである逆耐性現象が特定の生後発達段階以降に成立するようになることに注目し、ラット大脳新皮質において、覚醒剤に一定の生後発達時期から成熟期における応答性を獲得する遺伝子およびそれらが構築する分子カスケードの検索を進めた。

(2) 覚醒剤に発達依存的応答を示す新規遺伝子群のうち、従来から報告してきたmrt1のヒト相同遺伝子MRT1がコードするMRT1b蛋白と直接相互作用をもつ蛋白mips 1-6 (mrt1 interacting proteins 1-6) を、yeast two-hybrid法を用いて検出した。また、in vitroにおける相互の結合を免疫沈降法により確認した。

[参考文献]

- 1) Fujiwara Y, Kazahaya Y, Nakashima M, Sato M, Otsuki S. Behavioral sensitization to methamphetamine in the rat: an ontogenic study. *Psychopharmacol*, 1987;91:316~319.
- 2) Hata Y, Nakanishi H, Takai Y. Synaptic PDZ domain-containing proteins. *Neurosci Res*, 1998;32:1~7.
- 3) Hoover KB, Bryant PJ. The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12:229-34.
- 4) Kajii Y, Muraoka S, Hiraoka S, Fujiyama K, Umino A, Nishikawa T. A Developmentally-regulated and psychostimulant-inducible novel rat gene *mrt1* encoding PDZ-PX proteins isolated in the neocortex, *Mol Psychiatry*, in press.
- 5) Murata M., Kashiwa A., Oshima A., et al.: Nomifensine-induced c-fos mRNA expression in the discrete brain areas of the developing rat. *Neurosci Lett*, 303: 99-102, 2001.
- 6) 西川 徹 : 覚醒剤精神病の分子生物学
Current Insights in Neurological Science 9: 2-4, 2001.
- 7) 西川徹、梶井靖、藤山航、他 : 乱用薬物による脳機能障害の分子機構解明. 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 (佐藤光源 編)、pp. 104-110、1999.
- 8) 西川徹、梶井靖、平岡秀一、他 : 乱用薬物による脳機能障害の分子機構解明. 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11年度研究報告書 (佐藤光源 編)、pp. 108-113、2000.
- 9) 西川徹、梶井靖、村岡新一郎、他 : 乱用薬物による脳機能障害の分子機構解明. 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12年度研究報告書 (佐藤光源 編)、pp. 196-201、2001.
- 10) 西川徹、梶井靖、村岡新一郎、他 : 逆耐性モデルを用いた覚醒剤精神病における脳障害の分子病態の解明. 厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業) 「規制薬物の依存及び神経毒性の発現に係わる仕組みの分子生物学的解明に関する研究」平成13年度研究報告書 (佐藤光源 編)、pp. 26-31、2002.
- 11) 西川徹、海野麻未、梶井 靖、他 : 分裂病の成因は薬理・生化学的アプローチから解明されるか *精神科治療学* 12:617-623, 1997.
- 11) Nishikawa T., Umino A., Kashiwa A., et al.: Stimulant-induced behavioral sensitization and cerebral neurotransmission. In *Neurotransmitters in neuronal plasticity and psychiatric disorders*, pp. 53-62, Excerpta Medica, Ltd. Tokyo, 1993.
- 13) Wishart MJ, Taylor GS, Dixon JE. Phoxy Lipids: Revealing PX domains as phosphoinositide binding modules. *Cell* 105: 817-820, 2001.

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

分担研究課題：覚醒剤精神病におけるグルタチオンの役割：治療薬としての抗酸化物質 NAC およびグルタチオン関連酵素の遺伝子多型

分担研究者：伊豫雅臣^{1,10)}

研究協力者：橋本謙二¹⁾、深見悟郎¹⁾、小泉裕紀¹⁾、小池 香¹⁾、岡村斉恵¹⁾、熊切 力¹⁾、清水栄司¹⁾、関根吉統^{2,10)}、尾崎紀夫^{3,10)}、稲田俊也^{4,10)}、原野陸正^{5,10)}、小宮山徳太郎^{6,10)}、山田光彦^{7,10)}、曾良一郎^{8,10)}、氏家 寛^{9,10)}

¹⁾千葉大学大学院医学研究院精神医学、²⁾浜松医科大学精神科、³⁾藤田保健衛生大学医学部精神医学、⁴⁾名古屋大学大学院医学研究科精神医学、⁵⁾久留米大学医学部精神神経科、⁶⁾国立精神・神経センター武蔵病院精神科、⁷⁾昭和大学附属烏山病院精神神経科、⁸⁾東北大学大学院医学系研究科精神神経生物学、⁹⁾岡山大学大学院医歯学総合研究科精神神経病態学、¹⁰⁾JGIDA (Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse)

研究要旨

覚醒剤 (methamphetamine; MAP) 投与による神経毒性を予防する薬剤として、抗酸化作用を有する *N*-acetylcysteine (NAC) の効果を調べた。雄性 Wistar 系ラットに NAC および MAP を投与し、ラット線条体におけるドパミン量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。MAP のみ投与された群では対照群に比し有意にドパミン量が低下した。MAP 投与前に NAC を投与した群では、NAC の用量依存的に MAP 投与によるドパミン量の低下を抑制した。このように、覚醒剤投与によるドパミン神経系の障害は、NAC の前投与によって有意に抑制されることが判った。また、NAC の前投与は覚醒剤による急性の行動異常および逆耐性の形成を有意に抑制することが判った。今回の結果より、覚醒剤精神病患者の治療として NAC を投与することで、覚醒剤の神経毒性を防ぎ、精神症状の慢性化を予防できる可能性が示唆された。

GSTM1 遺伝子型に関しては、男性（健常者&覚醒剤乱用者）では有意な差は認められないが、女性（健常者&覚醒剤乱用者）では有意な差が認められた ($p=0.032$)。さらに、欠損アレルを有する女性の乱用者は、欠損アレルを有する男性の乱用者と比較して有意に高かった ($p=0.007$, odds ratio: 2.77, 95% CI 1.30-5.89)。今回の結果より、GSTM1 遺伝子が女性の覚醒剤乱用者の脆弱性に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年の画像診断技術により、覚醒剤使用者の脳内ドパミントランスポーターの密度が健常者と比較して有意に減少している事が報告されている。^{5,11,12)} 覚醒剤によって過剰に放出されるドパミンは、自己酸化によりドパミンキノンなどを生じ、ドパミン神経の障害に寄与している可能性が示唆されている。最近我々は、培養

細胞を用いた評価系において抗酸化物質であるグルタチオンや *N*-アセチルシステイン (NAC: *N*-acetyl cysteine) が 6-OH DA の神経細胞死を抑制することを報告した。⁶⁾ ところで、臨床の現場において、覚醒剤の急性中毒患者への治療はハロペリドールなどの抗精神病薬の投与による精神症状の鎮静が主である。これらの急性期治療を濃厚に行っても、精神症状が

残遺する群が存在する。原因として、MAPの神経毒性による神経細胞の変性が関与しているとされており、MAPによる精神症状残遺の予防として、神経毒性からの保護を目的とした治療の併用も有効ではないかと推測される。今回、ラットを用いて覚醒剤投与によるドーパミン神経系の障害および覚醒剤投与による逆耐性形成に及ぼすNACの効果を検討した。

一方、薬物依存や薬物誘発性精神病の形成には、遺伝要因が関与している事が指摘されている。⁸⁾ グルタチオントランスフェラーゼ(GST)は、生体内でいろいろな有害物質等の解毒作用に関与している事が知られている。⁹⁾ 今回、覚醒剤乱用者における遺伝子要因を明らかにする目的として、GSTのサブタイプの一つであるGSTM1遺伝子解析を行った。

B. 方法

1. 実験には、雄性Wistar系ラット(7週齢)を使用した。生食+生食投与群、生食+MAP(7.5 mg/kg)投与群、NAC(1, 3, 10, 30 mg/kg)+MAP(7.5 mg/kg)投与群に分け、2時間間隔で4回投与した。投与はすべて腹腔内投与にて行い、生食あるいはNACはMAP投与30分前に投与した。また投与時に直腸温を測定し、体温上昇による影響を調べた。MAP投与から1週間後にラット脳線条体を摘出し、線条体内のドーパミン量をHPLCにて測定した。統計解析は、ドーパミン量についてはone-way ANOVAにて、体温についてはtwo-way ANOVAにて解析した。
2. 実験には、雄性Wistar系ラット(7週齢)を使用した。急性投与実験においては、生食(1 ml/kg)あるいはNAC(1, 3, 10, 30 mg/kg)を投与し、30分後にMAP(2 mg/kg)を投与した。投与はすべて腹腔内投与にて行い、生食あるいはNACはMAP投与30分前に投与した。運動量をSCAN

ETで測定した。MAP投与による逆耐性形成に及ぼす実験においては、1日1回5日間投与し、最終投与10-11日後に、MAP(1 mg/kg)のチャレンジを行った。運動量をSCANETで測定し、逆耐性のスコアは既報の方法に準じて評価した。統計解析はone-way ANOVAにて解析した。

3. JGIDAより提供されたサンプルを用いてGSTM1も遺伝子型タイピングを既報³⁾に準じて行った。統計には、Fischerの直接確立検定を用いた。

C. 結果

1. 対照群の線条体ドーパミン量は 11.19 ± 0.28 ng/mg tissue であるのに対し、MAPのみの投与を行った群では 8.37 ± 0.53 ng/mg tissue であり、線条体ドーパミン含量がMAP投与により有意に低下することが判った。NAC(1, 3, 10, 30 mg/kg)の前投与は、MAP投与による線条体ドーパミン量の低下を用量依存的に抑制した。NAC投与量が10, 30 mg/kgの群ではMAPのみを投与した群に比べて有意であった(Fig 1)。また、NAC前投与はMAP投与による体温上昇による影響を与えなかった。
2. NAC(30, 100, 300 mg/kg)の前投与は、MAP(2 mg/kg)単回投与による行動異常を用量依存的に抑制した。さらにNAC(100 mg/kg)の前投与はMAP投与による逆耐性の形成を有意に抑制することが判った(Fig 2)。
3. GSTM1遺伝子型に関しては、男性(健常者&覚醒剤乱用者)では有意な差は認められないが、女性(健常者&覚醒剤乱用者)では有意な差が認められた($p=0.032$) (Table 1)。さらに、欠損アレルを有する女性の乱用者は、欠損アレルを有する男性の乱用者と比較して有意に高かった($p=0.007$, odds ratio: 2.77, 95% CI 1.30-5.89)。

D. 考察

覚醒剤投与による神経毒性の発現機序は、過剰に放出されるドーパミンの自己酸化から ROS (reactive oxygen species) の産生を起し酸化ストレスを引き起こしたり、グルタミン酸遊離から NO (nitric oxide) を産生し酸化ストレスを引き起こす経路、あるいは MAP 自体が DNA にダメージを与えたり、アポトーシスカスケードの関与も示唆されている。^{1, 2, 9, 10} したがって、これらの酸化ストレスからの防御機能を高めたり、抗アポトーシス因子を増強させたりすることが治療に有用であると考えられている。今回用いた NAC は、抗酸化作用のあるグルタチオンの前駆物質であるが、グルタチオンと同様に抗酸化作用を有する。今回の実験において、覚醒剤投与によるドーパミン神経系の障害は、NAC の前投与によって有意に抑制されることが判った。また、NAC の前投与は覚醒剤による逆耐性の形成を有意に抑制することも判った。以上の結果より、覚醒剤精神病患者の治療として、NAC を投与することで、覚醒剤の神経毒性を防ぎ、精神症状の慢性化を予防できる可能性が示唆された。

グルタチオントランスフェラーゼ (GST) は、覚醒剤投与によって過剰に放出されたドーパミンが自己酸化されて生成されるドーパミンキノンなどを解毒する作用を有している。⁷ GSTM1 遺伝子においては、欠損型/欠損型、非欠損型/欠損型、非欠損型/非欠損型の 3 つに分類され、欠損型/欠損型は GSTM1 の酵素活性が無い。今回の実験において GSTM1 遺伝子型に関しては、男性 (健常者 & 覚醒剤乱用者) では有意な差は認められないが、女性 (健常者 & 覚醒剤乱用者) では有意な差が認められた ($p=0.032$)。さらに、欠損アレルを有する女性の乱用者は、欠損アレルを有する男性の乱用者と比較して有意に高かった。近年、薬物乱用における性差が注目されており、女性の方が

薬物に対して依存になりやすい事などが知られている。⁴ 今回の結果より、GSTM1 遺伝子が女性の覚醒剤乱用者の脆弱性に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

今回の結果より、抗酸化物質 NAC は覚醒剤投与による神経毒性および逆耐性の形成を抑制することが判った。将来、覚醒剤精神病患者の治療として、抗精神病薬による治療に併せて NAC を投与することで、覚醒剤の神経毒性を防ぎ、精神症状の慢性化を予防できる可能性が示唆された。さらに臨床遺伝解析により、GSTM1 遺伝子が女性の覚醒剤乱用者の脆弱性に関与している可能性が示唆された。

【参考文献】

1. Cubells J.F., Rayport S., Rjendran G., Sulzer D.: Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *J. Neurosci.*, 14: 2260-2271, 1994.
2. 喜多 大三, 中嶋 敏勝.
Methamphetamine 神経毒性における最近の動向. *日本神経精神薬理学雑誌* 22: 35-47, 2002.
3. Harada S., Tachikawa H., Kawanishi Y.: Glutathione S-transferase M1 gene deletion may be associated with susceptibility to certain forms of schizophrenia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281: 267-71, 2001.
4. Lynch W.J., Roth M.E., Carroll M.E. Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. *Psychopharmacol.*, 164: 121-137, 2002.
5. Sekine Y., Iyo M., Ouchi Y., Matsunaga T., Tsukada H., Okada H., Yoshikawa E., Futatsubashi M., Takei N., Mori N.: Methamphetamine-related psychiatric symptoms and reduced brain dopamine transporters studied with PET. *Am. J. Psychiatry*, 158: 1206-1214, 2001.
6. Shimizu E., Hashimoto K., Komatsu N., Iyo M.: Roles of endogenous glutathione levels on 6-hydroxydopamine-induced apoptotic neuronal cell death in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Neuropharmacology*, 43: 434-43, 2002.
7. Smythies J., Galzigna L.: The oxidative metabolism of catecholamines in the brain: a review. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1380: 159-62, 1998.
8. Uhl G.R., Liu Q.R., Naiman D.: Substance abuse vulnerability loci: converging genome scanning data. *Trends Trends Genet.*, 18: 420-425, 2002.
9. Villemagne V., Yuan J., Wong D.F., Dannals R.F., Hatzidimitriou G., Mathews W.B., Ravert H.T., Musachio J., McCann U.D., Ricaurte G.A.: Brain dopamine neurotoxicity in baboons treated with doses of methamphetamine comparable to those recreationally abused by humans: evidence from [¹¹C]WIN-35,428 positron emission tomography studies and direct in vitro determinations. *J. Neurosci.*, 18: 419-27, 1998.
10. Wagner G.C., Ricaurte G.A., Seiden L.S., Schuster C.R., Miller R.J., Westley J.: Long-lasting depletions of striatal dopamine and loss of dopamine uptake sites following repeated administration of methamphetamine. *Brain Res.*, 181: 151-160, 1980.
11. Volkow N.D., Chang L., Wang G.J., Fowler J.S., Leonido-Yee M., Franceschi D., Sedler M.J., Gatley S.J., Hitzemann R., Ding Y.S., Logan J., Wong C., Miller E.N.: Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. *Am. J. Psychiatry*, 158: 377-82, 2001.
12. Volkow N.D., Chang L., Wang G.J., Fowler J.S., Franceschi D., Sedler M., Gatley S.J., Miller E., Hitzemann R., Ding Y.S., Logan J.: Loss of dopamine transporters in methamphetamine abusers recovers with protracted abstinence. *J. Neurosci.*, 21: 9414-8, 2001.

Table 1 Allele and Genotype Frequencies of the GSTM1 Gene Deletion Polymorphism in MAP Abusers and Controls

	Male		Female	
	Abusers (n=125)	Controls (n=157)	Abusers (n=32)	controls (n=43)
GSTM1 allele frequency				
D	172 (68.8%)	210 (66.9%)	55 (85.9%)	63 (73.3%)
N	78 (31.2%)	104 (33.1%)	9 (14.1%)	23 (26.7%)
	P=0.651		P=0.071	
GSTM1 genotype frequency				
DD	58 (46.4%)	67 (42.7%)	24 (75.0%)	21 (48.8%)
DN	56 (44.8%)	76 (48.4%)	7 (21.9%)	21 (48.8%)
NN	11 (8.8%)	14 (8.9%)	1 (3.1%)	1 (2.3%)
	P=0.819		P=0.032	

Note. D, deletion allele ; N, nondeletion allele.

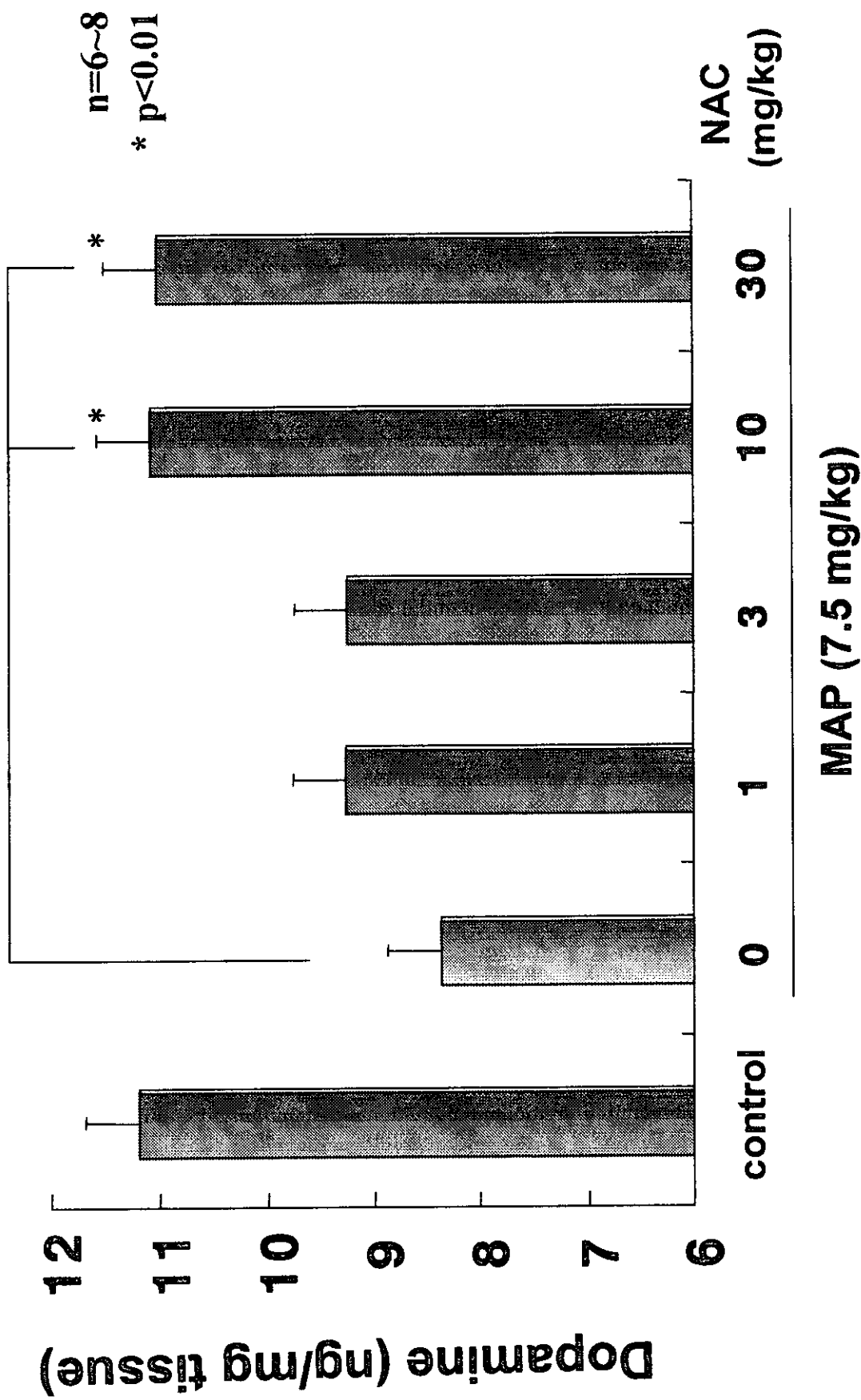


Figure 1. Effects of NAC on MAP-induced neurotoxicity in rat striatum.

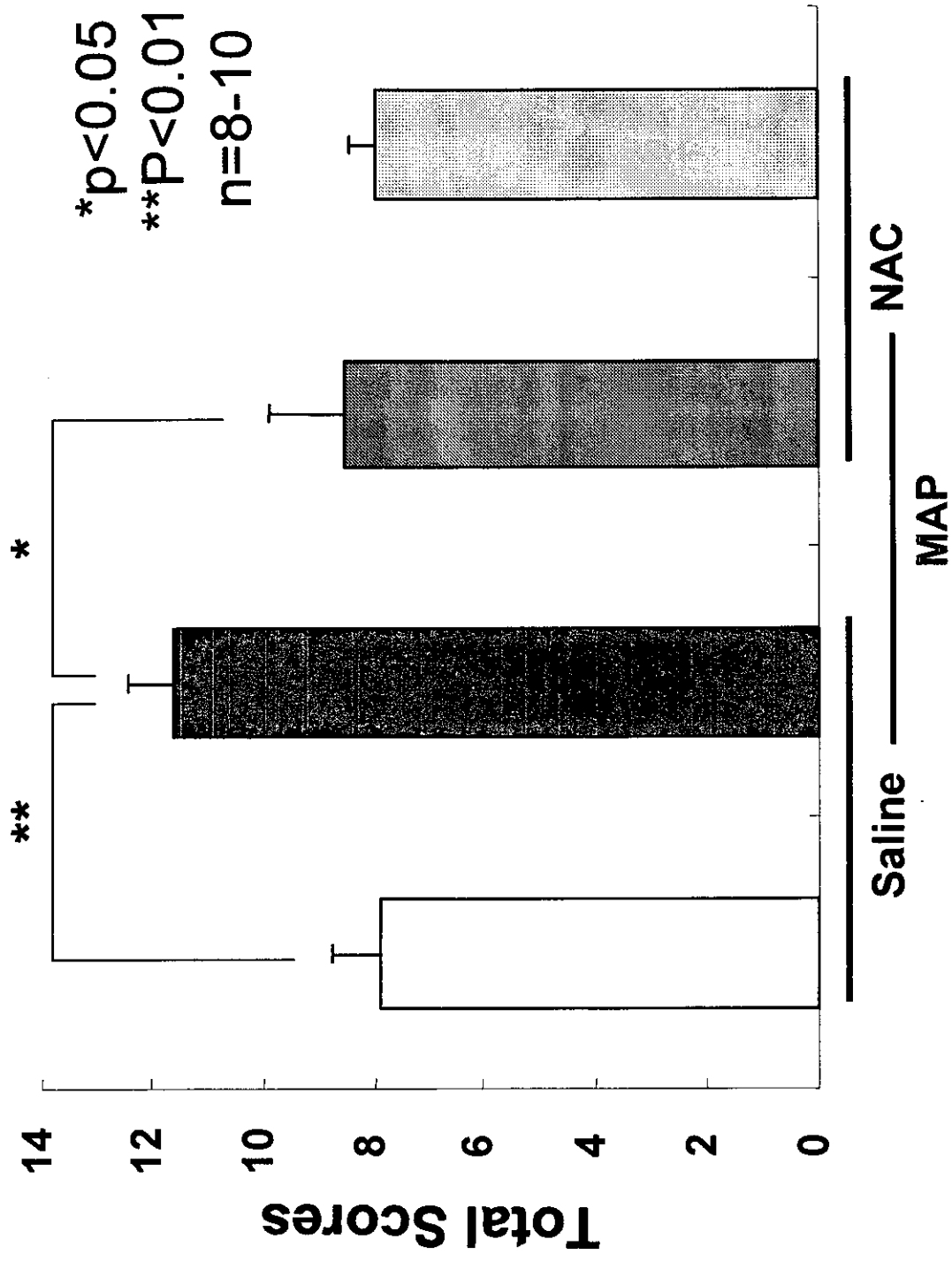


Figure 2. Effects of NAC on development of MAP sensitization in rats.

分担研究課題：覚醒剤精神病におけるヒスタミン神経の役割：画像医学的研究と小動物モデルの薬理学的研究

分担研究者：谷内一彦¹⁾（東北大学大学院医学系研究科 細胞・病態薬理学）

研究協力者：奥田友宏¹⁾、代紅梅¹⁾、岩淵健太郎¹⁾²⁾、櫻井映子¹⁾、小島照正¹⁾²⁾、陳忠¹⁾、伊藤千裕²⁾、渡邊建彦¹⁾

東北大学大学院医学系研究科細胞・病態薬理学分野¹⁾、同精神神経学分野²⁾

要旨

覚醒剤精神病の発症には逆耐性現象の構築、及びストレスによる誘発が深く関わっている。覚醒剤使用時にはドーパミンが過剰に遊離されるが、その時に賦活されるドーパミン神経系からのドーパミンの遊離増加は、ドーパミン受容体を介してヒスタミン神経系を賦活する。ヒスタミン神経系の賦活は覚醒剤反復投与による逆耐性形成を遅延させることをヒスタミン受容体リガンドやヒスタミン受容体遺伝子欠損マウスおよびヒスタミン合成酵素遺伝子欠損マウスなどを使用して報告してきた。すなわちヒスタミン神経系の低下は覚醒剤による逆耐性を増強し、ヒスタミン神経系の賦活は抑制すると考えている。本年度は我々の仮説を検証し、ストレスの MAP 逆耐性への影響を明らかにするために、鎮静性抗ヒスタミン薬のメタンフェタミン（MAP）急性投与における行動変化と社会的隔離ストレスの MAP 逆耐形成への影響を調べた。鎮静性抗ヒスタミン薬である d-クロルフェニラミンは MAP の行動変化感作を増強し、ストレスは MAP 逆耐性を促進させることが明らかになった。

A. 研究目的

ヒスタミンの作用は4種類の H1 (Gq/11)、H2 (Gs)、H3 (Gi)、H4 (Gi) 受容体を介して起こることが知られている。またヒスタミンは NMDA 受容体のポリアミン部位に結合しその機能を高めることも知られている。ヒスタミン神経は視床下部後部の結節乳頭核にあり、神経伝達物質として、睡眠・覚醒・自発運動量、食欲の抑制、情動、体温調節、神経内分泌などに関係している。4種類の受容体のうち H1、H2 受容体は古くから薬理的性質がよく研究されており、視床下部、扁桃体、前頭葉に多く存在している。ヒスタミン神経系は覚醒反応に重要な機能を担っている。表1に今ま

で古典的な薬理的手法で明らかにされてきたヒスタミン神経系の機能を示す。我々はヒスタミン神経の機能として興奮性と抑制性の作用があることを提唱している (1)。興奮性作用として覚醒、認知機能亢進、痛み受容機能の亢進に関係し、抑制性の作用として食欲の抑制、ストレスやメタンフェタミンによる過興奮の抑制に関係している。最近、ヒスタミン関連遺伝子のノックアウトマウスが開発され小動物における生理的・病態生理的研究の新たな展開が生じている。すなわち H1、H2、H3 受容体遺伝子 KO マウスや、ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 遺伝子 KO マウスの作成である (2, 3, 4, 5)。このようなヒスタミン関連遺伝

子 K0 マウス研究からも表 1 に示す神経性ヒスタミンの機能が証明されている。

B. 実験方法：

急性投与実験では鎮静性抗ヒスタミン薬である d-クロルフェニラミンと非鎮静性抗ヒスタミン薬であるエバスチンをラットに急性投与してその行動変化への影響を調べた。脳に移行するヒスタミンH1受容体拮抗薬である d-クロルフェニラミンと覚醒剤と併用した場合に起こる行動変化がどのようなものであるか明らかにするために、驚愕反応と自発運動量を指標に行動への影響を調べた。さらに覚醒剤精神病はまた、統合失調症と類似していることから、本研究では統合失調症の陰性症状のモデルである社会的隔離ストレスある isolation stress マウスモデルを作製し、MAP 逆耐性モデルを作成して行動変化とヒスタミン神経系を含むモノアミン神経系について HPLC 測定法により研究を行った。

C. 結果

MAP 急性投与実験：8週令の SD ラットを用いた MAP の急性投与に対するクロルフェニラミンの影響は、経時的に自発運動量（図 1）を増加させただけでなく事前音刺激に対する慣れ（Pre-pulse inhibition, PPI、図 2）を消失させた。しかし非鎮静性抗ヒスタミン薬であるエバスチンは MAP の行動変化にほとんど影響も及ぼさなかった。覚醒剤使用時に鎮静性抗ヒスタミン薬を服用することの危険性が明らかになった。

Isolation stress モデル研究：3週令の C57BL/6 マウスを SLC より購入し、個別に飼育したマウスと 4 匹を同じケージ入れてグループで飼育したマウスの自発運動量を購入後 4 週目に測定し

たところ、有意に個別飼育したマウスの行動量は減少していた。さらに 4 週目から隔日にメタンフェタミン（以下 MAP と省略）1 mg/kg を 7 回投与し、MAP を投与する毎に 30 分後に測定した自発運動量も、個別飼育群では少なかった。一週間断薬した後に MAP 1 mg/kg を再チャレンジして 20 分後に驚愕反応を調べたところ、個別飼育群はグループ飼育群に比べて音刺激に対する感受性が亢進していた（図 3）。統合失調症の患者では事前音刺激に対する慣れが生じないことが報告されているが、慣れの現象が観察されたグループ飼育群に比べ個別飼育群では慣れの現象も低下していた。脳内ヒスタミン含量、モノアミン含量を測定したところ、個別飼育群ではグループ飼育群に比べ、ヒスタミンおよび覚醒系のモノアミン含量が多く、ドパミンの代謝回転が減少していた（図 4、5）。Isolation ストレス負荷時に MAP 逆耐性が促進され、それに関連してモノアミン系の機能異常が生じることが明確になった。

D. 考察

ヒスタミンH1受容体拮抗薬である d-クロルフェニラミンは OTC として市販されている風邪薬の中に必ず含有されているため、覚醒剤と併用した場合に起こる行動変化がどのようなものであるか明らかにすることは重要である。本研究から MAP と鎮静性抗ヒスタミン薬である d-クロルフェニラミンの相互作用により MAP の効果が増強することが示された。そのメカニズムとして d-クロルフェニラミンのモノアミントランスポーターへの遮断が考えられる。セロトニン、ノルエピネフリン、ドパミン・トランスポーターに対する阻害濃度は、それぞれ 15、1440、1060 nM であることが知られている。またそのほかの可能性とし

て、H1 受容体を介する GABA 遊離促進作用 (6) の遮断により MAP の効果が増強された可能性もある。今後そのメカニズムを明らかにする予定である。

社会的隔離ストレスの MAP 逆耐性への影響は今までに十分に研究されていない。ヒスタミンはストレス反応やストレス脆弱性に密接に関係する (8,9)。また社会的隔離ストレスは統合失調症の陰性モデルとも考えられている。本研究から社会的隔離ストレスは MAP 逆耐性を増強し、そのメカニズムとしてモノアミン系神経伝達の異常が存在することが明確になった。今後さらにノックアウトマウス等を用いて MAP 逆耐性形成に関する脆弱性の決定因子を明らかにしていく予定である。

文献

- (1) Watanabe, T and Yanai K. *Tohoku. J. Exp. Med.* 195: 197-217 (2001)
- (2) Inoue, I. Yanai K. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13316-13320 (1996)
- (3) Yanai, K. et al. *Neuroscience* 87: 479-487 (1998)
- (4) Ohtsu, H. et al. *FEBS letts.* 502: 53-56 (2001)
- (5) Toyota, H. Yanai, K. et al. *Mol. Pharmacol.* 62: 389-397 (2002)
- (6) Chen, Z. Yanai K, et al. *Brain Res.* 968: 162-166 (2003)
- (7) 谷内一彦、岩淵健太郎、鹿野理子。精神疾患におけるヒスタミン神経系の役割。医学のあゆみ 204 : 262-264 (2003)
- (8) 遠藤雅俊、櫻井映子、渡邊建彦、谷内一彦。ヒスタミンとストレス応答。 *Clinical Neuroscience* 21(2): 180-183 (2003)

- (9) 岩淵健太郎、佐藤光源、谷内一彦。精神薬物療法と脳画像解析。 *精神医学* 44(11):1181-1187 (2002)

表1. ヒスタミン神経系の機能:興奮性作用と抑制性作用

脳機能	ヒスタミン神経系の機能
覚醒・睡眠	覚醒の増加と除波睡眠の減少
認知機能	学習と記憶の増強
運動量	自発運動量の増加
侵害刺激	痛み受容の増強
摂食	摂食行動の抑制
痙攣	けいれん抑制
ストレス	ストレスによる過興奮の抑制
覚醒剤精神病	キンドリング形成の抑制
Neural plasticity	除神経による過感受性抑制

興奮作用

抑制作用

図1

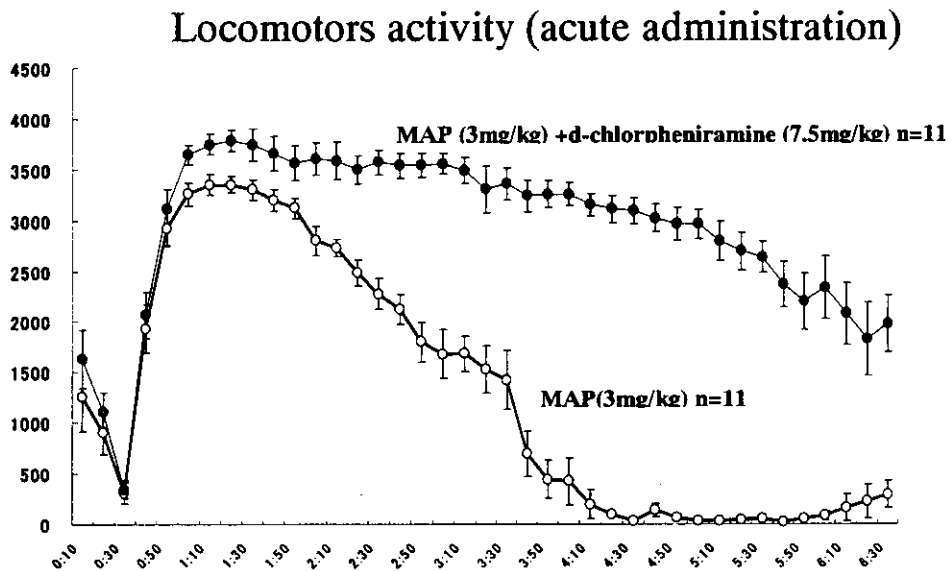


図1. 鎮静性 d-クロルフェニラミンによる MAP 自発運動量増加に及ぼす影響。MAP (3mg/kg) と d-クロルフェニラミン (7.5mg/kg) を同時に投与して自発運動量への影響を経時的に調べた。

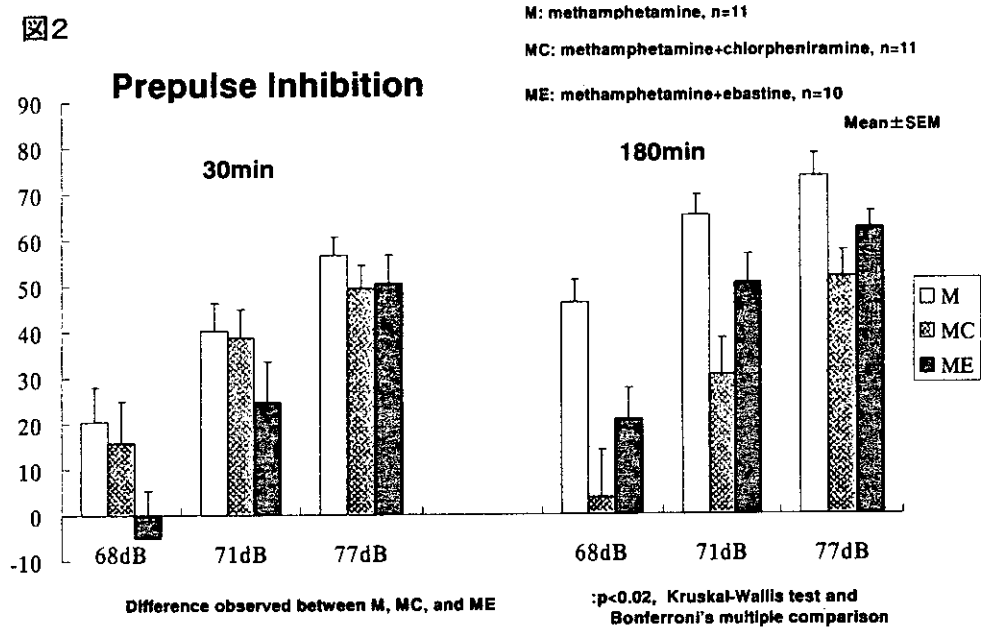


図2. 鎮静性抗ヒスタミン薬である d-クロルフェニラミンと非鎮静性のエバスタチンの MAP 急性効果への影響。MAP (3 mg/kg) と d-クロルフェニラミン (7.5 mg/kg) あるいはエバスタチン (10 mg/kg) を同時投与した後、30 分、180 分後の PPI 反応を比較した。MAP 投与後 180 分の時点で自発運動量と同様に d-クロルフェニラミン同時投与群で PPI の減少が認められる。

図3 逆耐性獲得後のMAP再投与によるPPIの比較

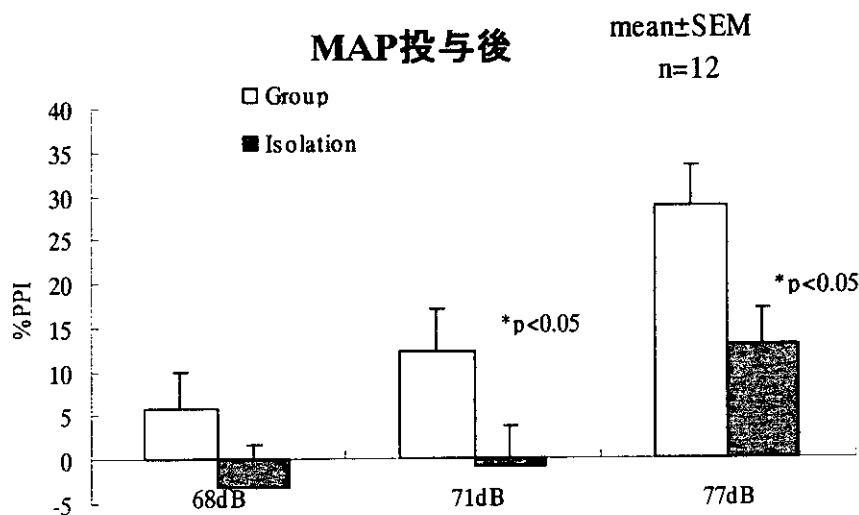


図3. 社会的隔離ストレス群 (1 匹ずつ隔離して飼育したマウス) とグループで飼育したマウス群で 7 回の MAP 連続投与後に PPI を測定した。PPI は社会的隔離ストレス群で有意に抑制される。

図4 脳内モノアミン含量は隔離ストレス群で増加する

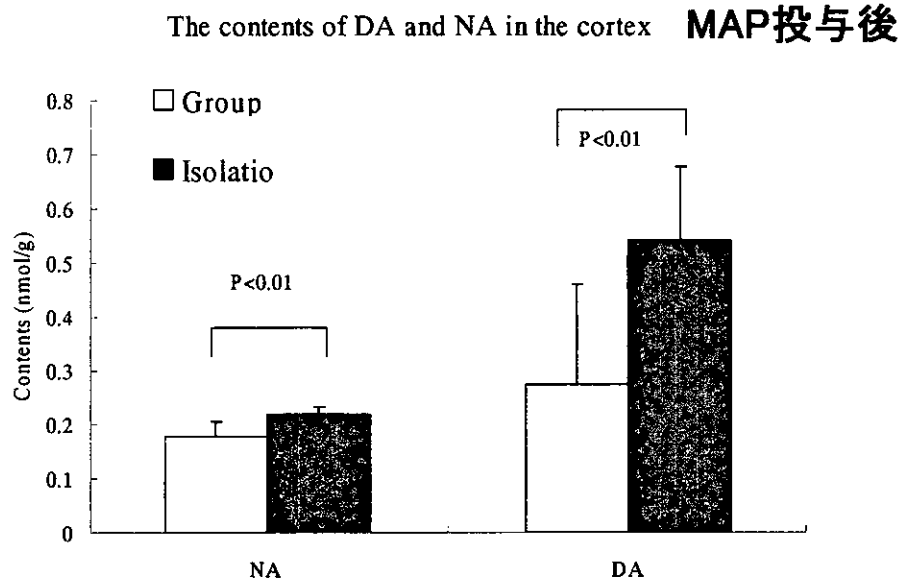


図4.社会的隔離ストレス群とグループで飼育したマウス群で7回のMAP連続投与後にノルアドレナリン (NA) とドパミン (DA) を測定した。社会的隔離ストレス群でNAとDAは有意に増加する。

図5 脳内ヒスタミン含量は隔離ストレス群で増加する

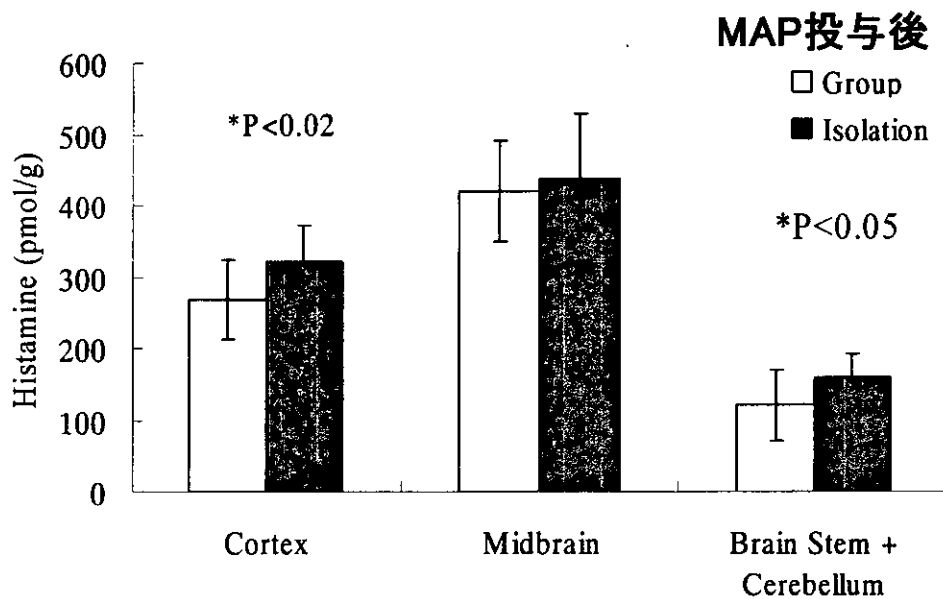


図5.社会的隔離ストレス群とグループのヒスタミン含量。

厚生科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

分担研究課題：PET を用いた薬物精神病および統合失調症における
中枢ヒスタミン神経系の役割に関する研究

分担研究者 佐藤光源²⁾

共同研究者 岩淵健太郎¹⁾³⁾、伊藤千裕¹⁾、望月秀紀³⁾、田代学³⁾、加藤元久³⁾、岩田錬⁴⁾、
伊藤正敏⁴⁾、松岡洋夫¹⁾、木村裕一⁵⁾、石井賢二⁵⁾、石渡喜一⁵⁾、谷内一彦³⁾

¹⁾東北大学大学院医学系研究科精神神経学分野、²⁾東北福祉大学大学院精神医学、

³⁾東北大学大学院医学系研究科細胞・病態薬理学分野、

⁴⁾東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター、

⁵⁾東京都老人総合研究所ポジトロン医学研究部門

研究要旨

薬物精神病および統合失調症患者と健常人におけるヒスタミン神経系の動態の相違を明らかにする為に、H1 受容体の放射性リガンドである[¹¹C]doxepin を用いて、PET による脳内 H1 受容体の測定を行った。また、解析モデルおよび連続動脈採血の有無による受容体測定の定量性を検討する必要性があり、健常人において[¹¹C]doxepin PET 撮影を行い、解析モデルと動脈採血の有無による解析結果の比較を行い、その妥当性について検討した。その結果、3compartment model において Logan 法を用いて、実際の連続動脈血採血によって得られた血漿中時間放射能曲線 (pTAC) を入力に用いる代わりに、東北大学において過去に測定した 6 例の正常被験者の pTAC の平均値を用いた場合でも、画像解析の結果には殆ど影響がないことが分かった。この方法は、検査の侵襲性の点でも利点があり、その後の PET 撮影は、この方法を用いて行なった。統合失調症患者群においては、正常群に比較して、前頭葉や帯状回周辺を含めた大脳皮質の広い範囲において、H1 受容体の減少が認められた。大麻使用による薬物精神病の 1 例においても、同様の傾向を認めた。統合失調症および薬物精神病におけるヒスタミン神経系の関与が PET によって示され、これらの病態においては、ヒスタミン神経系の伝達は減弱していることが示唆された。

A. 研究目的

ヒスタミン神経系は脳内において、多様な生理機能を調節していると考えられている⁹⁾。我々は今までに、統合失調症のストレス逆耐性仮説の動物モデルである methamphetamine (MAP) 逆耐性において、その関与を報告してきた。ヒスタミン受容体ノックアウトマウスを含む小動物を用いた実験から、ヒスタミン神経系は、MAP による急性および慢性の効果に対して抑制的に作用すること³⁾や、そのヒスタミン神経系の MAP 効果に対する抑制的な作用は、H1 および

H2 受容体の両者を介して伝達されること²⁴⁾を示してきた。

ヒトにおいては、MAP をはじめとする amphetamine 類や cocaine、phencyclidine などの乱用によって、しばしば、統合失調症と類似した精神病症状が生じることが知られており¹⁾、薬物精神病や統合失調症の病態における、ヒスタミン神経系の関与も興味深い。そこで、薬物精神病および統合失調症患者と健常人におけるヒスタミン神経系の動態の相違を明らかにする為に、H1 受容体の放射性リガンドである

[11C]doxepin を用いて、PET による脳内 H1 受容体の測定を行った。また解析モデルおよび連続動脈採血の有無による受容体測定の定量性を検討する必要性があり、健常者において [11C]doxepin PET 撮影を行い、解析モデルと動脈採血の有無による解析結果の比較を行い、その妥当性について検討した。

B. 方法

1. ヒスタミン H1 受容体 PET 撮影における解析法の検討

説明の上、書面で同意を得た健常成人男子 5 名（年齢 20-26 歳）において、静脈から [11C]doxepin を投与後に PET により脳の放射能を測定し、H1 受容体を測定した。また同時に橈骨動脈にラインを留置して動脈血放射能と [11C]doxepin 代謝物の測定を行った。比較した解析モデルは、以下の 3 つを用いた。

① 3compartment model+Logan 法；

動脈採血 (+)

連続動脈採血により得られた血漿中時間放射能曲線 (pTAC) と組織時間放射能曲線 (tTAC) を用いて、3compartment model において、Logan 法により受容体結合能 (BP) を推定する。

② 3compartment model+Logan 法；

動脈採血 (-)

連続動脈採血は行わず、東北大学において過去に測定した 6 例の被験者の pTAC の平均値 (標準 pTAC) に標識薬剤の投与量 (Bq) を乗じた pTAC を被験者毎に計算し、その pTAC と tTAC を用いて 3compartment model と Logan 法により Binding Potential (BP) を推定する。

③ 2compartment model + 非線型最小二乗推定；動脈採血 (+)

本研究で採用した 5 例の被験者の pTAC と tTAC を用いて、2compartment model により Distribution Volume (DV) を推定する。

2. 統合失調症および薬物精神病患者における脳内ヒスタミン H1 受容体の PET 撮影

DSM-IV 診断による統合失調症患者 10 名 (29.4 +/- 6.1 歳)、大麻を中心とする薬物精神病患者 1 名 (28 歳)、および年齢を合わせた正常者 10

名 (29.9 +/- 7.9 歳) において、H1 受容体結合能を PET によって計測した。被検者に [11C]doxepin を静注した後、SET2400W (島津製作所) PET スキャナーを用いて、90 分間の dynamic scan を行った。doxepin の H1 受容体結合能は、標準 pTAC を用いた Logan 法による graphical analysis⁵ により、H1 受容体の少ない小脳を参照部位として各 voxel 毎に算出した。それらの結果を、関心領域 (ROI) 毎の比較の他に、全画素各々に対して統計学的検定を行う statistical parametric mapping 99 (SPM99; Wellcome department of Cognitive Neurology, London, UK) を用いて、脳アトラス⁸ に基づいた空間的な標準化を行なった上で各 voxel 毎に比較した。

C. 結果

1-1.

2compartment model、非線形最小二乗法、動脈採血(+)の場合の DV の結果と、3compartment model、Logan 法、動脈採血(+)の場合の BP の結果をとって相関をみたところ、相関係数は 0.64 と有意であった。(Fig.1)

1-2.

2compartment model、非線形最小二乗法、動脈採血(+)の場合の DV の結果と、3compartment model、Logan 法、動脈採血(-)の場合の BP の結果の相関をみたところ、相関係数は 0.68 と有意であり、動脈採血(+)のときよりもわずかに良好な結果であった。(Fig.2)

1-3.

3compartment model、Logan 法、動脈採血(+)の場合と(-)の場合との相関では、相関係数 0.99 と殆ど一致した。(Fig.3)

これらの結果を併せて、3compartment model、Logan 法において標準 pTAC を用いた場合は、動脈採血がなく、解析も容易にできるという利点があるため、今回我々は統合失調症の [11C]doxepin PET では、この方法を用いた。

2-1.

SPM99 による正常群と統合失調症患者群の H1 受容体結合能の比較では、患者群の (左) 上前頭回内側部、(左/右) 下前頭回、(左/右) 中前頭回、(左/右) 内側後頭側頭回、(右) 舌状回 (左/右) 楔前部などで H1 受容体密度の減少