

して、脳内微量透析法を用いてコカインに対する線条体(CPu)、側坐核(NAc)と前頭前野皮質(PFc)細胞外ドーパミン(DA)、セロトニン(5-HT)濃度の変化を検討してきた (Table 1)。コカインの報酬に対応して細胞外 DA 濃度が上昇したのは、側坐核、前頭前野皮質ではなく、線条体であることが分かった。言い換えると、DAT-KO マウスでは DAT が欠損しているにもかかわらずコカインの報酬があり、DAT/SERTダブルKO マウスで報酬がなくなるのは、線条体において DAT-KO マウスで細胞外 DA 濃度の増加があり、DAT/SERTダブルKO マウスでは細胞外 DA 濃度の増加がないからと考えられる。線条体における細胞外 DA 濃度の増加がコカインの報酬と関連しているものと考えられた。この結果は、DAT-KO マウスで DAT が欠損しているにもかかわらず細胞外 DA 濃度が増加しているのは、SERT が DA 再取り込みを補完したことを示唆している。側坐核では DAT が欠損すると細胞外 DA の濃度の増加が見られないが、前頭前野皮質では DAT-KO マウス、DAT/SERTダブルKO マウスでも細胞外 DA 濃度の増加が見られ、前頭前野皮質では NET による DA 再取り込みが考えられた。5-HT については、SERT-KO で前頭前野皮質での細胞外濃度の増加が見られないが、線条体、側坐核では細胞外濃度の増加が見られ、DAT/SERT ダブル KO マウスで見られなくなったことから、線条体、側坐核では DAT が 5-HT の再取り込みを補完していると考えられた。以上の結果はモノアミンに対応していないトランスポーターによる取り込みと考えられるものの、複雑な神経ネットワークの関与も考えられる。そこで、今年度は線条体において cocaine を局所投与し、細胞外モノアミン濃度の変化を検討した。

覚醒剤であるアンフェタミン及びメタンフェタミン (MAP)はモノアミントランスポーターに作用し、モノアミンを細胞外へ逆流出させて、シナプス間隙のモノアミン濃度を増加させ、神経伝達を変化させる⁸。覚せい剤は長期使用により妄想性精神病状態を生じることが知られているが⁹、このような精神病状態は、断薬か治療によって症状が軽快しても覚せい剤の再使用、或いは心理社会的なストレスで再燃しやすい。この経過は逆耐性現象と呼ばれる¹⁰。実験動物においても新規環境下で覚醒剤を反復投与すると常同行動・移所運動量が増加し、長期断薬後には以前に無効であった少量の覚醒剤でこの増加が再現する^{11,14}。これより、実験動物に覚せい剤を反復投与した際に観察される逆耐性現象は、覚せい剤精神病や統合失調症の再発・脆弱性の有用な疾患モデルとされている。MAPは強力なDA作動薬なので、逆耐性現象に関するこれまでの研究では、DA神経伝達の変化を中心として行われてきた^{12,13}。一方、5-HT神経伝達の関与についてはまだ十分には明らかにされていない。昨年度までに我々はDAT/SERT-KOマウスを用いて、MAPの逆耐性について報告してきた (Table 2)。DAT-KO and/or SERT-KOマウスではMAPで逆耐性が形成されなかった。このことはDATのみならずSERTも逆耐性形成に関与していることを強く示唆している。さらにDATヘテロKOマウスでは、逆耐性の表出(expression)には影響しないものの、逆耐性の発展(development)が遅延されることが分かった。SERTヘテロKOでは逆耐性の表出、発展ともに認められた。今年度はこのDATヘテロKOにおける逆耐性の発展形成と関連する部位を明らかにすることを目的に脳内微量透析法を用いてより詳細に解析を行った。

Table 1. モノアミントランスポーター欠損マウスにおけるコカイン報酬とモノアミンの放出

Genotype	CPP		DA release			5-HT release		
	DAT	SERT	CPu	NAc	Pfc	CPu	NAc	Pfc
+/+	+/+	reward	++	++	++	++	++	++
+/+	-/-	enhanced	++	++	++	+	+	NS
-/-	+/+	reward	+	NS	++	++	++	++
-/-	-/-	no	NS	NS	++	NS	NS	NS

CPP: 条件付け場所嗜好試験

NS: not significant

Table 2. MAPによる逆耐性形成

Genotype	逆耐性の発展と表出
Wild	++
DAT+/-	+
DAT-/-	-
SERT+/-	+
SERT-/-	-
DAT-/-SERT-/-	-

DAT+/-マウスは、逆耐性の表出は見られるものの、逆耐性の発展は遅延する

B. 方法

実験動物:

本実験は雄性、10-12 週齢、体重 18-35gの 129/C57 混合遺伝背景のKOマウスを用いた。DAT/SERT ダブル KO マウスは、既報に従い DAT 単独 KO マウスと SERT 単独 KO マウスを交配して作製した⁷。KO マウス遺伝型判別は、尻尾断片組織からゲノム DNA を抽出し、PCR 法にて判別した。野生型、DAT ヘテロ KO (DAT+/-)、DAT-KO (DAT-/-)、SERT ヘテロ KO (SERT+/-)、SERT-KO (SERT-/-)、DAT/SERT ダブル KO (DAT-/-SERT-/-)マウス計 6 群、各群 n=7~15 として以下の実験に供した。本研究は研究実施施設の動物実験委員会の許可を得て、倫理的な配慮のもとに行った。

脳内微量透析法:

ペントバルビタール麻酔下、マウスの頭部を脳定位固定装置に固定し、透析プローブ(透析膜の長さ2mm)をFranklin と Paxinosの脳アトラスに基づいて前頭前野皮質、側坐核と線条体に挿入した。各マ

ウスは、24 時間後に実験に用いた。無拘束の条件下で Ringer 液を 1microL/min の速度で灌流し、10 分毎に自動的に液体高速クロマトグラフシステムに注入した。DA と 5-HT は逆相カラム (PP-ODS) で分離し、電気化学検出器 (ECD-100) を用いて検出、定量した。移動相には、EDTA (50mg/l)、デカンスルホン酸ナトリウム (500mg/l) および 1%メタノールを含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH5.5) を用いた。灌流開始 3.5 時間後、コカイン (10mg/kg) が生食塩水を透析プローブを介して直接脳内に投与した (Fig.1)。また、MAP (1mg/kg) を皮下投与した。

統計解析:

各種遺伝型マウスの細胞外 DA と 5-HT の基礎濃度について one-way ANOVA で、薬物による各種遺伝型 KO マウスの細胞外 DA と 5-HT の変化について two-way ANOVA (因子 A: 薬物、因子 B: 遺伝型) で解析した。多重比較は最小有意差法を用いて行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。統計ソフトは STATISTICA for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, USA) を用いた。

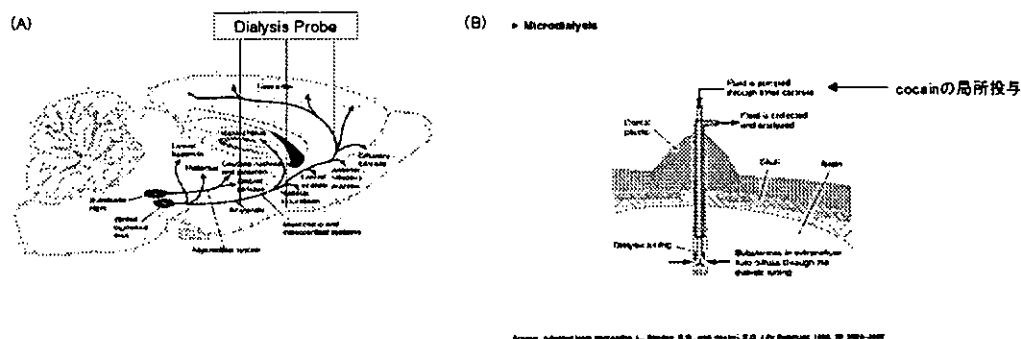


Fig.1 脳内微量透析法と局所投与
 (A)には透析プローブを挿入した位置を模式的に示した。
 (B)には脳内局所投与の方法を示した。脳内微量透析法では透析液を透析プローブの内側から流すが、その経路で一時的にコカインを投与した。

C. 結果

線条体へのコカイン局所投与 (Fig.2)

DAT-KO マウスにコカインを投与すると線条体において細胞外 DA 濃度の増加が見られるものの、DAT/SERT ダブル KO では細胞外 DA 濃度の増加が見られなくなったことから、可能性として2つのことが考えられた。一つは SERT による DA の取り込みであり、もう一つは神経ネットワークの関与である。そこで、コカインを局所投与して、細胞外 DA 濃度に変化が見られるか検討した。実験では線条体への局所投与には脳内微量透析用に脳内に固定した透析プローブを通じて直接コカインを注入した。その結果、DAT-KO マウスでは皮下投与の時と異なり、局所投与では細胞外 DA 濃度の増加が見られなくなった。線条体内の SERT に直接コカインが拮抗し DA が増加するのであれば、局所投与においても DA が増加するはずであった。このことは、当初考えていた SERT による DA 取り込みの補完作用ではなく、複雑な神経ネットワークによるものである可能性を強く示唆している。DAT-KO マウスで見られる細胞外 DA 濃度の増加は、5-HT 神経系或いは NE 神経系への間

接的な刺激によるものであり、細胞外 DA 濃度の増加は単なるトランスポーターの阻害ではなく、放出に何らかの制御が関わっている可能性が考えられる。5-HT についても同様に検討したところ、SERT-KO マウスでは皮下投与と同様、細胞外 5-HT 濃度の増加が認められた。5-HT については DAT が局所的に補完的に働いていることが強く支持された。

MAP 投与による線条体での DA 遊離 (Fig.3)

DAT ヘテロ KO マウスでは、逆耐性の発展が遅延することを昨年度報告した。この機序を明らかにすることを目的に、MAP 投与後の細胞外 DA 濃度の変化を線条体と側坐核で検討した。その結果、側坐核では細胞外 DA 濃度の増加は野生型マウスと変わらず、野生型マウスと DAT ヘテロ KO マウスで変化は見られなかった。これに対し、線条体では細胞外 DA 濃度の増加は野生型マウスの 1/3 程度となり、増加量は大幅に減少した。このことから、線条体が MAP の逆耐性の発展に何らかの関与をしていることが示唆された。

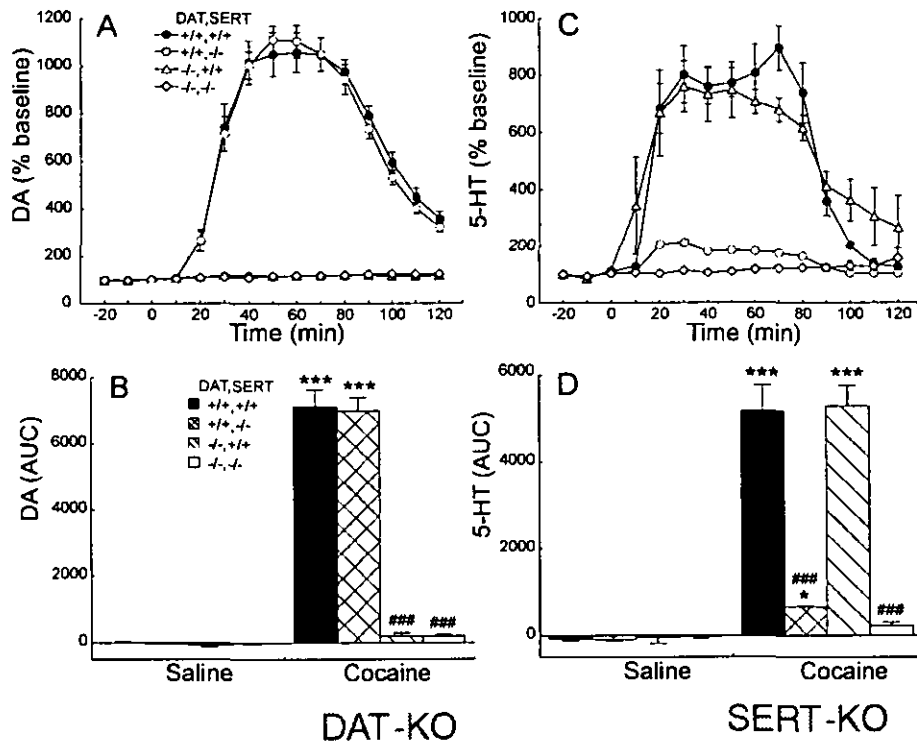


Fig.2 コカインのCPuへの直接投与
 コカインの還流液中への局所投与は、SERT欠損では細胞外5-HT濃度を増加させるが、DAT欠損では細胞外DA濃度を増加させない。(A)各遺伝子欠損マウスにおける細胞外DA濃度の変化。(B)は(A)の0-120minまでについて0min時点に比べて上昇したものを累積したもの。(C)各遺伝子欠損マウスにおける5-HTの変化。(D)は(C)の0-120minまでについて0min時点に比べて上昇したものを累積したもの。

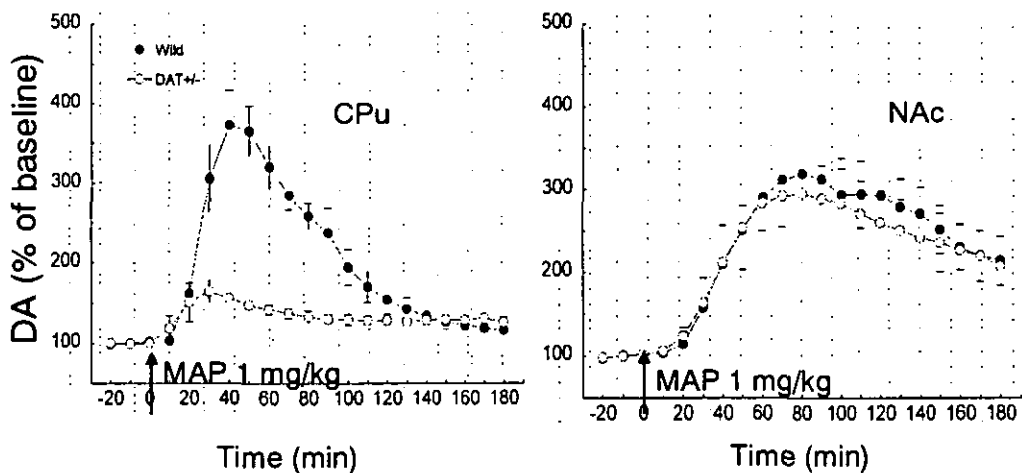


Fig.3 MAP皮下投与によるDA遊離
 線条体ではDAT部分欠損はDAの上昇を抑制した。しかし、側坐核では影響はなかった。

D. 考察

コカインによる細胞外 DA と 5-HT の変化と報酬効果の関連

中脳辺縁系の DA 神経伝達は覚醒剤の報酬効果に重要な役割を担っていると考えられてきた^{15,16}。

我々は DAT/SERT-KO マウスを用いてコカインの報酬が、DAT ホモ欠損に SERT ヘテロ或いはホモ欠損が加わることにより消失することを行動学的に示し、線条体における細胞外 DA 濃度の増加が行動学的解析と一致することを示してきた。この過程で細胞外 DA 濃度の増加が DAT-KO マウスでみられるという興味深い結果を得ていた。DAT-KO マウスにおける細胞外 DA 濃度の増加は部位特異的であり、側坐核では見られず、前頭前野皮質ではみられる。この前頭前野皮質の結果は、DAT-KO に SERT-KO が加わることによっても残っていることから、前頭前野皮質では線条体とは別の放出機構が考えられる。前頭前野皮質では、DAT の分布が少なく^{17,18}、細胞外 DA は NET によって再取り込みされていることが報告されていることから¹⁹⁻²¹、DAT and/or SERT 欠損によっても NET が関与していると考えられた。今年度は線条体に注目し、局所的にコカインを投与し、細胞外 DA 濃度の変化を検討したところ、細胞外 DA 濃度の増加は抑制された。このことは、SERT が DA の取り込みを補完しているのではなく、複雑な神経回路ネットワークがその DA 増加に関与していることが強く示唆された。線条体では NET の発現は少ないため²²、NE 神経系の関与は少ないと考えられる。5-HT では SERT-KO マウスで細胞外濃度の増加が見られたことから、5-HT は DAT によって補完されていることが支持された。これは免疫染色法を用いた結果によっても支持されている²³。SERT による DA の取り込みについては、*in vitro* での親和性がわずかしか見られないことから^{24,25}、取り込み過程についてはより詳細な検討が必要と思われる。コカインの報酬において線条体の細胞外 DA 濃度の増加が重要であることをこれまで我々は明らかにしてきたが、その制御機構として神経回路ネットワークの存在が今回の結果より強く支持され、そのネットワークを明らかにすることが、コカインの報酬の機構解明に必要であると考えられる。

DAT ヘテロ KO マウスにおける MAP 逆耐性発展の抑制

昨年までに DAT and/or SERT-KO マウスを用いて、MAP による逆耐性の形成を検討し、従来考えられていた DAT だけではなく SERT も逆耐性形成に関与していることを示してきた。さらに DAT 発現が半減しているヘテロ KO マウスでは、逆耐性の表出は見られるものの、逆耐性の発展は遅延している。この分子機序を明らかにすることを目的に、細胞外 DA 濃度変化との相関を今年度は線条体と側坐核について検討した。側坐核では MAP 投与によっても細胞外 DA 濃度の増加は野生型マウスと同じであったが、線条体では半分以下に抑制された。線条体での細胞外 DA 濃度の変化が逆耐性発展の遅延に関与している可能性が考えられた。我々の結果は、覚醒剤長期使用者の中脳辺縁系で報告されている DAT の減少²⁶ は覚醒剤依存の原因の一つではなく、覚醒剤の長期使用の結果であることを示唆している。

DAT ヘテロ KO マウスでは、DAT の発現が半減しているものの、野生型マウスと比べ自発運動量は変化せず、また、線条体での基礎的細胞外 DA 濃度も変化していない。また、MAP と異なり cocaine による投与では細胞外 DA 濃度の増加が野生型と比べ変化しないことから、DAT の発現が半減しても DA を十分に再取り込みできると考えられる。また、側坐核においても細胞外 DA 濃度の増加は低下していない。これらのことから、DAT ヘテロ KO マウスの線条体での MAP による細胞外 DA 濃度増加の抑制の分子機序は、単なる線条体の DAT 阻害とは考えにくい。Cocaine と MAP の作用部位による違い、また、モノアミンに対応していないトランスポーターによる取り込みなど複雑な分子機構が予想される。

E. 結論

今年度は脳内局所投与という方法を主に用いて、覚醒剤の分子作用機序を検討した。これらの結果から覚醒剤による細胞外へのモノアミンの放出・再取り込みは複雑な分子機構であり、脳部位によって異なることが予想された。さらに、覚醒剤による逆耐性形

成過程における表出についてもモノアミントランスポーターの発現量が影響することが示唆された。これらの結果から覚醒剤の分子作用機序におけるモノアミントランスポーターの役割は、従来想定されていた以上に複雑な分子機構が予想された。

【参考文献】

1. Koob GF, Nestler EJ. The neurobiology of drug addiction. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9, 482-97. (1997).
2. Kuhar MJ, Ritz MC, Boja JW. The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci* 14, 299-302. (1991).
3. Rocha BA, Fumagalli F, Gainetdinov RR, Jones SR, Ator R, Giros B, Miller GW, Caron MG. Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat Neurosci* 1, 132-7. (1998).
4. Sora I, Wichems C, Takahashi N, Li XF, Zeng Z, Revay R, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR. Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7699-704. (1998).
5. Xu F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Bohn LM, Miller GW, Wang YM, Caron MG. Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat Neurosci* 3, 465-71. (2000).
6. Hall FS, Li XF, Sora I, Xu F, Caron M, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR. Cocaine mechanisms: enhanced cocaine, fluoxetine and nisoxetine place preferences following monoamine transporter deletions. *Neuroscience* 115, 153-161. (2002).
7. Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li XF, Wei HB, Wichems C, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR. Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5300-5. (2001).
8. Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA. Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33, 639-77. (1993).
9. Ellinwood EH Jr, Sudilovsky A, Nelson LM. Evolving behavior in the clinical and experimental amphetamine (model) psychosis. *Am J Psychiatry* 130, 1088-93. (1973).
10. Sato M, Numachi Y, Hamamura T. Relapse of paranoid psychotic state in methamphetamine model of schizophrenia. *Schizophr Bull* 18, 115-22. (1992).
11. Robinson TE, Becker JB. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 396, 157-98. (1986).
12. Kalivas PW, Stewart J. Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16, 223-44. (1991).
13. Pierce RC, Kalivas PW. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* 25, 192-216. (1997).
14. Badiani A, Anagnostaras SG, Robinson TE. The development of sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine is enhanced in a novel environment. *Psychopharmacology (Berl)* 117, 443-52. (1995).
15. Bardo MT. Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit Rev Neurobiol* 12, 37-67. (1998).
16. Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 22, 3306-11. (2002).
17. Freed C, Revay R, Vaughan RA, Kriek E, Grant S, Uhl GR, Kuhar MJ. Dopamine transporter immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 359, 340-9. (1995).
18. Sesack SR, Hawrylak VA, Matus C, Guido MA, Levey AI. Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex

- exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J Neurosci* 18, 2697–708. (1998).
19. Di Chiara G, Tanda GL, Frau R, Carboni E. Heterologous monoamine reuptake: lack of transmitter specificity of neuron-specific carriers. *Neurochem Int* 20 Suppl, 231S–235S. (1992).
 20. Tanda G, Pontieri FE, Frau R, Di Chiara G. Contribution of blockade of the noradrenaline carrier to the increase of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex by amphetamine and cocaine. *Eur J Neurosci* 9, 2077–85. (1997).
 21. Yamamoto BK, Novotney S. Regulation of extracellular dopamine by the norepinephrine transporter. *J Neurochem* 71, 274–80. (1998).
 22. Berridge CW, Stratford TL, Foote SL, Kelley AE. Distribution of dopamine beta-hydroxylase-like immunoreactive fibers within the shell subregion of the nucleus accumbens. *Synapse* 27, 230–41. (1997).
 23. Zhou FC, Lesch KP, Murphy DL. Serotonin uptake into dopamine neurons via dopamine transporters: a compensatory alternative. *Brain Res.* 28, 109–19. (2002).
 24. Giros B, Wang YM, Suter S, McLeskey SB, Pifl C, Caron MG. Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine-norepinephrine transporters. *J Biol Chem* 269, 15985–8. (1994).
 25. Gu H, Wall SC, Rudnick G. Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J Biol Chem* 269, 7124–30. (1994).
 26. 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, 1206–14. (2001).

覚せい剤精神病に関わる臨床遺伝学的研究 — prodynorphin および dihydropyrimidinase-like 2 遺伝子における相関研究

分担研究者： 氏家 寛¹⁾

共同研究者： 野村 晃¹⁾、坂井 歩^{1,2)}、勝 強志¹⁾、稲田俊也³⁾、原野睦生⁴⁾、小宮山徳太郎⁵⁾、山田光彦⁶⁾、関根吉統⁷⁾、曾良一郎⁸⁾、岩田仲生⁹⁾、伊豫雅臣¹⁰⁾、尾崎紀夫³⁾、黒田重利¹⁾、JGIDA¹¹⁾

(¹⁾岡山大学大学院医歯学総合研究科精神神経病態学分野、²笠岡病院、³名古屋大学、⁴久留米大学、⁵国立精神・神経センター武蔵病院、⁶昭和大学附属鳥山病院、⁷浜松医科大学、⁸東北大学、⁹藤田保健衛生大学、¹⁰千葉大学、¹¹Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse)

【研究要旨】

覚せい剤依存および覚せい剤精神病における遺伝子リスクファクターを遺伝子相関法により検討した。候補遺伝子としてオピオイド系の dynorphin などをコードする prodynorphin 遺伝子と、最近、日本人統合失調症、特に妄想型の発症予防因子であることが発見された dihydropyrimidinase-like-2 (以下 DRP-2) 遺伝子について検討した。対象は健常コントロール 221 名、覚せい剤依存者 198 名 (内、精神病性障害合併は 164 名) である。

prodynorphin 遺伝子多型の 68bp-VNTR は promoter 領域にあり、転写活性に影響を与えることが知られている。1-4 リピートの 4 種類のアレルがあり、その頻度は、3.8%、81.6%、13.4%、1.2% であり、ヨーロッパ系白人、ヒスパニック系白人、アフリカ系アメリカ人のいずれとも大きく異なり、民族差があることがわかった。疾患では覚せい剤依存および覚せい剤精神病は遺伝子型で有意な相関 ($p=0.0037$ および 0.0057) を示し、後者はアレル頻度でも有意な相関を示した ($p=0.0250$)。更に、機能との関連から、1-2 リピートを L (低活性) アレル、3-4 リピートを H (高活性) アレルと定義すると、やはり強い相関が得られ、H アレルのオッズ比は、覚せい剤依存症で 1.83、覚せい剤精神病で 1.75 であった。覚せい剤依存患者の臨床パラメーターでの検討では、初回使用の年齢、初回使用から精神病発現までの潜時、治療後の寛解までの期間、フラッシュバックの有無では相関が無かったが、多剤乱用の有無ではより重度の多剤乱用 (シンナー以外の大麻やコカインの使用歴) と相関を示した (H アレルのオッズ比 1.88)。DRP-2 遺伝子では、統合失調症で最も強い相関が報告されたエクソン 14 上の *2236T>C 多型を解析したが、覚せい剤依存、精神病および臨床パラメーターと相関は示さなかった。今回の結果から、prodynorphin 遺伝子多型が覚せい剤依存と多剤乱用の危険因子であることが明らかとなった。

A. 目的

薬物依存や薬物誘発性精神病の形成に遺伝要因が強く影響していることが双子研究、家族研究、養子研究などから指摘されており、特に興奮剤、オピオイドでこの傾向は顕著である^{10,14,16)}。しかし、本邦で最も乱用されている覚せい剤についての遺伝要因の研究は国内外においてほとんど無い。そのため、覚せい剤依存・精神病患者での遺伝子要因を解析し、その発症脆弱性や予後に関わ

る因子を検討してきた。昨年度までに覚せい剤の脳内一次作用点であるドパミントランスポーター遺伝子、hDAT1 とその生理作用発現部位と考えられるドパミン D2、D3、D4 受容体をコードする DRD2、DRD3、DRD4 遺伝子を検討し、hDAT1 遺伝子の 3'非翻訳部位 VNTR で 9 回リピート以下のアレルを有する患者は覚せい剤精神病が遷延しやすい (治療後 1 ヶ月以上精神病が持続するもの) ことを見出した¹³⁾。一方、DRD2 遺伝子の TaqIA 多型の A1/A1 遺伝子型を有する患者では

遷延型が有意に少なく、また、フラッシュバックの合併も少ないことが示され、予後の良い因子であることが示唆された¹⁵⁾。逆に、DRD2 遺伝子-141C Del アレルは精神病潜時が短縮する予後の悪い因子であることを明らかにした。DRD2 遺伝子で統合失調症と関連が示されている Ser311Cys 多型、DRD3 の Ser9Gly 多型、DRD4 遺伝子の-521 C>T 多型、エクソン 3 上の VNTR 多型は覚せい剤依存・精神病の発症脆弱性および臨床経過・予後には影響していないことが明らかとなった¹⁵⁾。本年度ではドパミン系以外について検討した。候補遺伝子としてオピオイド系の dynorphinA, Bなどをコードする prodynorphin 遺伝子と、最近、日本人統合失調症、特に妄想型の発症予防因子であることが発見された dihydropyrimidinase-like-2 (以下 DRP-2) 遺伝子⁹⁾について検討した。

B. 方法

1. 対象

対象は覚せい剤使用者 198 名で、男性 158 名、女性 40 名、平均年齢 36.6 +/- 11.8 歳と昨年度に較べ約 30 名の新規患者を加えた。すべて日本人である。遺伝子バックグラウンドの拡散をできるだけ軽減するため、九州北部、瀬戸内地方、中京東海地方、関東の病院の受診者とし、関東以北や南九州、北陸地方は本研究には組み入れなかった。非使用対照者は性、年齢を一致させた健常者で、薬物依存以外にその他の精神神経疾患の既往歴が無く、また、家族歴にもアルコールを含め薬物依存歴の無いものとした。また、できるだけ居住地も一致させた 221 名で、男性 171 名、女性 50 名で、平均年齢は 36.6 +/- 10.6 歳であり、対照群も昨年度より約 10 名増やした。研究に先立ち、岡山大学及び各参加病院、施設で倫理委員会の審査、承認を受け、すべての対象者からは文書

表 1. 覚せい剤依存症および精神病患者での Prodynorphin 遺伝子 VNTR 解析結果

Prodynorphin	N	Genotypes of Repeat Numbers										p
		1R/1R	1R/2R	1R/3R	1R/4R	2R/2R	2R/3R	2R/4R	3R/3R	3R/4R		
Control	209	0.5%	5.7%	1.0%	0.0%	65.1%	25.4%	1.9%	0.0%	0.5%		
METH Dependence	143	0.0%	4.9%	3.5%	0.0%	54.5%	28.7%	1.4%	7.0%	0.0%	0.0037	
METH Psychosis	130	0.0%	5.4%	3.8%	0.0%	55.4%	26.9%	1.5%	6.9%	0.0%	0.0057	
Age of First Use												
20y<	63	0.0%	4.8%	3.2%	0.0%	55.6%	27.0%	1.8%	7.9%	0.0%	0.99	
20y≥	64	0.0%	6.3%	3.1%	0.0%	54.7%	28.1%	1.6%	6.3%	0.0%		
Latency of Psychosis												
3y<	55	0.0%	3.6%	3.6%	0.0%	61.8%	23.6%	1.8%	5.5%	0.0%	0.61	
3y≥	62	0.0%	6.5%	1.6%	0.0%	51.6%	30.6%	0.0%	9.7%	0.0%		
Prognosis of Psychosis												
Transient	75	0.0%	8.0%	4.0%	0.0%	49.3%	29.3%	1.3%	8.0%	0.0%	0.60	
Prolonged	49	0.0%	2.0%	2.0%	0.0%	63.3%	24.5%	2.0%	6.1%	0.0%		
Spontaneous Relapse												
+	48	0.0%	6.3%	6.3%	0.0%	52.1%	27.1%	2.1%	6.3%	0.0%	0.79	
-	78	0.0%	5.1%	1.3%	0.0%	57.7%	26.9%	1.3%	7.7%	0.0%		
poly-drug abuse												
- or mild	74	0.0%	6.8%	2.7%	0.0%	58.1%	24.3%	2.7%	5.4%	0.0%	0.24	
heavy	46	0.0%	2.1%	4.2%	0.0%	45.8%	35.4%	0.0%	12.5%	0.0%		

表1. 続き

Prodynorphin	N	Repeat Numbers				p
		1R	2R	3R	4R	
Control	418	3.8%	81.6%	13.4%	1.2%	0.025
METH Dependence	268	4.5%	70.1%	24.6%	0.7%	
METH Psychosis	260	4.6%	72.3%	22.3%	0.8%	
Age of First Use						
20y<	126	4.0%	72.2%	23.0%	0.8%	0.99
20y≥	128	4.7%	72.7%	21.9%	0.8%	
Latency of Psychosis						
3y<	110	3.6%	76.4%	19.1%	0.9%	0.47
3y≥	124	4.0%	70.2%	25.8%	0.0%	
Prognosis of Psychosis						
Transient	150	6.0%	88.7%	24.7%	0.7%	0.32
Prolonged	98	2.0%	77.6%	19.4%	1.0%	
Spontaneous Relapse						
+	98	6.3%	89.8%	22.9%	1.0%	0.71
-	156	3.2%	74.4%	21.8%	0.6%	
poly-drug abuse						
= or mild	146	4.7%	75.0%	18.9%	1.4%	0.06
heavy	96	3.1%	64.6%	32.3%	0.0%	

によるインフォームドコンセントを得ている。

患者の診断は ICD-10 に拠った、その内訳は依存症 (F15.2) が 184 名、そのうち精神病性障害 (F15.5) を合併しているものが 168 名 (以下、単に覚せい剤精神病と呼ぶ)、使用のみで依存症のない者が 14 名である。

2. ゲノム解析による相関研究

対象者から末梢血 6ml を採血し、スタンダードな方法でゲノム DNA を抽出し、以降の解析に使用した。

Prodynorphin 遺伝子 (X02536) の上流のプロモーター領域に 68bp の繰り返し多型 VNTR があることが Zimprich ら¹⁰⁾により報告されている。この VNTR 多型を含む領域を Chen らの方法¹¹⁾で PCR 増幅 (プライマーセット 5'-CTGTGTATGGAGAGGCTGAGT-3', 5'-AGGCGGTTAGGTAGAGTTGTC-3', アニール 60 度) し、3% アガロースゲルにて解析した。386bp が 1 リピート (1R)、454bp が 2 リピート (2R)、522bp が 3 リピート (3R)、590bp が 4 リピート (4R) と判定した。DRP-2 遺伝子エクソン

14 の 3'UTR 領域の*2236T>C は Nakata ら⁹⁾の方法に従い、5'-GTCTTCCTGTTTTTCCTGTACC-3'、5'-TATTTTGCCATCAAGACAGTGG-3'にて PCR 増幅 (アニール 56 度) し、BspTI で消化した後、3% アガロースゲルでゲノタイプした。

統計には χ^2 乗検定、Fisher's exact test およびモンテカルロ法による CLUMP を用いた。

C. 結果

1. 臨床症状

患者の内訳は上述したが、男女比は約 4 : 1 と男性に多く、これまでとほぼ同様である。覚せい剤の初回使用年齢は 21.0 +/- 5.5 歳であった。初回使用から精神病像の出現までは平均 5.7 年であった。精神病の治療後の経過では、治療後 1 ヶ月以内に消退する早期消退型が 58% で、治療後 1 ヶ月以上持続する遷延型が 42% で、昨年より遷延型の患者の割合が増えた。また、いわゆるフラッシュバック (ICD-10 で定義するフラッシュバック F1X.70) ではなく、薬物使用無しに精神病状態が出現する自然再燃をここでは指

表2. Prodynorphin 遺伝子 VNTR 多型解析結果

Prodynorphin	N	Genotype			p	Allele		p
		L/L	L/H	H/H		L	H	
Control	209	71.3%	28.2%	0.5%		85.4%	14.6%	
METH Dependence	143	59.4%	33.6%	7.0%	0.0000	76.2%	23.8%	0.002
METH Psychosis	130	60.8%	32.3%	6.9%	0.0014	76.9%	23.1%	0.005
Age of First Use								
20y<	63	60.3%	31.7%	7.9%	0.93	76.2%	23.8%	0.82
20y≥	64	60.9%	32.8%	6.3%		77.3%	22.7%	
Latency of Psychosis								
3y<	55	65.5%	29.1%	5.5%	0.60	80.0%	20.0%	0.62
3y≥	62	58.1%	32.3%	9.7%		74.2%	25.8%	
Prognosis of Psychosis								
Transient	75	57.3%	34.7%	6.0%	0.67	74.7%	25.3%	0.32
Prolonged	49	65.3%	28.6%	6.1%		79.6%	20.4%	
Spontaneous Relapse								
+	48	58.3%	35.4%	6.3%	0.78	76.0%	24.0%	0.68
-	78	62.8%	29.5%	7.7%		77.6%	22.4%	
poly-drug abuse								
- or mild	74	64.9%	29.7%	5.4%	0.14	79.7%	20.3%	0.038
heavy	48	47.9%	39.8%	12.5%		67.7%	32.3%	

す)の合併は42%に見られ、覚せい剤以外の多剤乱用は69%にみられた。また、アルコールやシンナーのように比較的入手が容易なもの以外、例えば大麻、コカインなども使用した事があるものを重度多剤乱用と定義したが、これは38%

にみられた。2. 遺伝子相関研究

今回調べた prodynorphin および DRP-2 遺伝子の各多型分布は Hardy-Weinberg 分布から逸脱していなかった。

表3. Dihydropyrimidinase like-2 遺伝子の解析結果

DRP-2 *2236T>C	N	Genotype			p	Allele		p
		TT	TC	CC		T	C	
Control	221	70.1%	27.1%	2.7%		83.7%	16.3%	
METH Dependence	198	70.7%	27.3%	2.0%	0.93	84.3%	15.7%	0.65
METH Psychosis	184	70.7%	27.4%	1.8%	0.90	84.5%	15.5%	0.64
Age of First Use								
20y<	96	70.8%	27.1%	2.1%	0.98	84.4%	15.6%	0.91
20y≥	103	69.9%	28.2%	1.9%				
Latency of Psychosis								
3y<	76	72.4%	26.3%	1.3%	0.57	85.5%	14.5%	0.29
3y≥	82	64.6%	32.9%	2.4%				
Prognosis of Psychosis								
Transient	91	69.2%	29.7%	1.1%	0.52	84.1%	15.9%	0.88
Prolonged	67	73.1%	23.9%	3.0%				
Spontaneous Relapse								
+	71	67.6%	29.6%	2.8%	0.63	82.4%	17.6%	0.41
-	95	72.6%	26.3%	1.1%				
poly-drug abuse								
-	59	71.2%	25.4%	3.4%	0.71	83.9%	16.1%	0.51
mild	62	66.1%	32.3%	1.6%				
heavy	71	76.1%	22.5%	1.4%				

Prodynorphin 遺伝子の VNTR 多型では 1R から 4R までの 4 種の多型が同定され、コントロールでは 2R が 81.6% と最も多く、ついで、3R の 13.4% で 1R、4R は 5% 以下であった。このアレル分布は Chen らの報告でのヨーロッパ系白人、ヒスパニック系白人、アフリカ系アメリカ人のいずれとも大きく異なっており、人種差が大きいことがあきらかになった。また、日本人での遺伝子型では 1R/4R は存在せず、全部で 8 種であった。疾患での比較では、覚せい剤依存患者全体、覚せい剤精神病患者全体でどちらもコントロールに比べて有意に異なる遺伝子型分布を示した (覚せい剤依存; $p=0.0037$, 覚せい剤精神病; $p=0.0057$, by clump method)。また、アレル頻度でも有意な差が見られ、患者群では common allele である 2R が少なく、3R が多かった。患者の臨床プロフィールとの関係では、初回薬物使用年齢、薬物使用から精神病発現までの潜時、治療後の予後 (遷延性精神病の有無)、いわゆるフラッシュバック合併の有無においては有意な関連は見られな

った。多剤乱用については、遺伝子型では差がないが、アレル頻度ではアルコールやシンナー以外の、大麻、コカイン、ヘロインといったより重度の薬物乱用を有するものに 3R アレルが多い傾向 ($p=0.08$) がみられた。この prodynorphin 遺伝子 VNTR 多型は活性アレルであることが知られており、promoter 領域に位置しており、また、リピート部分には TGACTTA という AP-1 コンセンサスシーケンスを含んでおり、prodynorphin 遺伝子の転写活性に影響する可能性がある。Zimprich ら¹⁸⁾による in vitro での転写活性試験で、3R、4R アレルは 1R、2R アレルに比べて転写活性が約 1.5 倍になることから前者を H (高活性) アレル、後者を L (低活性) アレルと名付け、2 分法にて再検討した。その結果、覚せい剤依存患者および覚せい剤精神病患者において強い関連がみられ、遺伝子型では H/H 型が、アレルでは H アレルが有意に多い (覚せい剤依存; 遺伝子型 $p<0.00001$ 、アレル $p=0.002$ 、覚せい剤精神病; 遺伝子型 $p=0.0014$ 、アレル $p=0.005$)。オッズ比ではそれ

それ1.83、1.76であった。臨床特性では、同様に多剤乱用での重度においてHアレルが有意に多いという結果であった(遺伝子型 $p=0.14$ 、アレル $p=0.036$)。

DRP-2 遺伝子については3'UTR の*2236T>Cにおいて、覚せい剤依存症、覚せい剤精神病のい

D. 考察

今回の研究から prodynorphin の Hアレルが覚せい剤依存及び精神病の危険因子であることがわかった。一方で、それ以外の臨床特性、特に精神病発現潜時や治療後の予後、いわゆるフラッシュバックの合併などには影響していないことがわかった。このことは、この prodynorphin の Hアレルは覚せい剤依存自体の方に影響し、その結果、覚せい剤乱用を促し、最終的に精神病に陥った患者においても相関したと考えられる。このアレルが重度の多剤乱用の危険因子にもなっており、このことも依存自体に影響することを示唆していると思われる。

Prodynorphin は Enkephalin B または Prepronkephalin Bとも呼ばれ、dynorphin A, B, α -neoendorphinの前駆体であり、生体内ではこれらは主に κ agonistとして作用する。 κ agonistまたは κ 伝達系はヘロインなどのオピオイド依存においては重要な役割を果たしていることは多くの研究から証明されている。一方で、覚せい剤を含む精神刺激薬においても κ オピオイド系が関わっている可能性を示す報告も多く見られる。例えば、 κ agonist/ μ antagonistである cyclozocine がラットにてコカイン自己投与を抑制したという報告⁹⁾、純粋な κ agonistである U69593 がコカイン自己投与を抑制したという報告がある¹⁾。同様に種々の κ agonist がサルのコカイン自己投与を抑制¹⁰⁾したという報告がある。U69593 はコカインやアンフェタミンで感作しておいた動物の薬物探索行動を減少させる⁹⁾ことも報告されており、 κ agonist がコカインの精神依存を抑制し、薬物探索行動を防止する可能性が示されている。これはヒトでの臨床知見の結果とも一致しており、

いずれとも有意な関連はなかった。また、各臨床特性である初回薬物使用年齢、薬物使用から精神病発現までの潜時、治療後の予後(遷延性精神病の有無)、いわゆるフラッシュバック合併の有無、多剤乱用の有無においても有意な関連はなかった。

buprenorphine (κ agonist/ μ antagonist) 療法がオピオイド依存だけでなく、コカイン乱用予防に methadone 療法と同等の効果が得られたことと報告されている¹⁾。また、 κ agonist がコカインやアンフェタミンの急性行動効果を抑制し¹¹⁾、逆にアンフェタミン、コカイン投与が prodynorphin mRNA を増加させ、 κ agonist がアンフェタミンの行動と prodynorphin mRNA 増加作用を抑制した^{11, 12)}と報告されており、精神刺激薬は prodynorphin を活性化させるが、これは κ 受容体を活性化し、精神刺激薬の効果を抑制するという negative feedback になっていることが動物での研究から推測される。しかし、一方で、コカイン乱用者死後脳で κ 受容体が側坐核などの辺縁系で増加している、更に幻覚のあるものは扁桃核でも増加していたという報告⁹⁾があり、動物での知見とは合致しないような報告もされており、単純な negative feedback だけでは理解できない。

今回の研究では prodynorphin の Hアレルが覚せい剤依存者の危険因子であることが明らかになった。このことは単純に解釈すれば、prodynorphin 遺伝子の転写活性が増加している、すなわち内因性 κ agonist の生合成が増加している個人では覚せい剤依存に陥りやすいということになり、上述した動物実験の結果とは合わないように見える。一方、死後脳研究ではコカイン乱用者では側坐核 κ 受容体が増加しており⁹⁾、 κ オピオイド系が亢進している可能性が示されており、今回の結果と一致する。恐らく、これは steady state と精神刺激薬投与時に分けて考える必要があると思われる。精神刺激薬急性負荷時には過大なドパミン放出が生じるが、これに対し、dynorphin 系は negative feedback としてブレーキの役割を果たしており、この精神刺激薬の急性効果に対し緩衝作用として

機能すると考えられる。一方、精神刺激薬などを使用していないsteady stateで、この κ オピオイド系が持続的に亢進していると、逆に依存形成を促進する報告に働くのかもしれない。

今回の結果は、先行研究である Chenら¹⁾のコカイン依存者での結果と一致しない。彼らはHアレルがコカイン依存者に少ないという結果を得ている。これはコカインと覚せい剤ではprodynorphin遺伝子多型の影響が異なることを示すのかも知れない。一方、彼らは異なる3つの人種(ヨーロッパ系アメリカ人、ヒスパニック系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人)で調べており、各アレル頻度に人種差を認めている。にも関わらず、これらのデータをpoolし、統計処理しており、方法論的に問題であり、false positiveの可能性を検討しておく必要があるようである。実際、彼らのデータの各人種毎での検討では、すべて有意ではない。いずれにせよ、今回の結果については追試による確認が必要と考えられる。

DRP-2遺伝子においては覚せい剤精神病、依存症において有意な関連は認められなかった。我々は、統合失調症においてこの遺伝子が関連し、特に妄想型において*2236Cアレルが発症予防に働くことを見出している⁴⁾。この、遺伝子は神経の発達、特に軸索の伸長のガイダンスに関わっており、脳発達では早期の神経分化・成熟に重要である。こういった早期の脳発達での影響は統合失調症の発症脆弱性には重要だが、覚せい剤といった外因による精神病形成にはあまり重要ではないのかも知れない。少なくとも、DRP-2遺伝子は統合失調症と覚せい剤精神病での共通する脆弱性には寄与していないことが明らかとなった。

E. 結論

覚せい剤依存症および精神病における遺伝子リスクファクターの検索において、prodynorphin 遺伝子 H アレルがその危険因子であることが明らかとなった。また、重度の多剤乱用の危険因子であることも明らかとなった。DRP-2 遺伝子は覚せい剤依存症、精神病には関連しなかった。以上より、 κ オピオイド

系が覚せい剤依存に関与することがゲノムレベルで明らかとなった。

【参考文献】

- 1) Chen, A.C., LaForge, K.S., Ho, A., et al.: Potentially functional polymorphism in the promoter region of prodynorphin gene may be associated with protection against cocaine dependence or abuse. *Am J Med Genet*, 114: 429-35, 2002.
- 2) Glick, S.D., Visker, K.E. and Maisonneuve, I.M.: Effects of cyclazocine on cocaine self-administration in rats. *Eur J Pharmacol*, 357: 9-14, 1998.
- 3) Mello, N.K. and Negus, S.S.: Effects of kappa opioid agonists on cocaine- and food-maintained responding by rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 286: 812-24, 1998.
- 4) Nakata, K., Ujike, H., Sakai, A., et al.: The human dihydropyrimidinase-related protein 2 gene on chromosome 8p21 is associated with paranoid-type schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 53: 571-6, 2003.
- 5) Negus, S.S., Gatch, M.B., Mello, N.K., et al.: Behavioral effects of the delta-selective opioid agonist SNC80 and related compounds in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 286: 362-75, 1998.
- 6) Schenk, S. and Partridge, B.: Effect of the kappa-opioid receptor agonist, U69593, on reinstatement of extinguished amphetamine self-administration behavior. *Pharmacol Biochem Behav*, 68: 629-34, 2001.
- 7) Schenk, S., Partridge, B. and Shippenberg, T.S.: U69593, a kappa-opioid agonist, decreases cocaine self-administration and decreases cocaine-produced drug-seeking. *Psychopharmacology (Berl)*, 144: 339-46, 1999.

- 8) Schottenfeld, R.S., Pakes, J.R., Oliveto, A., et al.: Buprenorphine vs methadone maintenance treatment for concurrent opioid dependence and cocaine abuse. *Arch Gen Psychiatry*, 54: 713-20, 1997.
- 9) Staley, J.K., Rothman, R.B., Rice, K.C., et al.: Kappa2 opioid receptors in limbic areas of the human brain are upregulated by cocaine in fatal overdose victims. *J Neurosci*, 17: 8225-33, 1997.
- 10) Tsuang, M.T., Lyons, M.J., Eisen, S.A., et al.: Genetic influences on DSM-III-R drug abuse and dependence: a study of 3,372 twin pairs. *Am J Med Genet*, 67: 473-7., 1996.
- 11) Turchan, J., Przewlocka, B., Lason, W., et al.: Effects of repeated psychostimulant administration on the prodynorphin system activity and kappa opioid receptor density in the rat brain. *Neuroscience*, 85: 1051-9, 1998.
- 12) Tzaferis, J.A. and McGinty, J.F.: Kappa opioid receptor stimulation decreases amphetamine-induced behavior and neuropeptide mRNA expression in the striatum. *Brain Res Mol Brain Res*, 93: 27-35, 2001.
- 13) Ujike, H., Harano, M., Inada, T., et al.: Nine- or fewer repeat alleles in VNTR polymorphism of the dopamine transporter gene is a strong risk factor for prolonged methamphetamine psychosis. *Pharmacogenomics J*, 3: 242-7, 2003.
- 14) 氏家 寛: 薬物依存におけるゲノム解析. *分子精神医学*, 2: 38-45, 2001.
- 15) 氏家 寛, 勝 強志, 野村 晃ほか: 覚せい剤精神病に関わる臨床遺伝学的研究 - ドパミンD2、D3、D4受容体遺伝子多型における相関研究. 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14年度総括研究報告書: 17-25, 2003.
- 16) van den Bree, M.B., Johnson, E.O., Neale, M.C., et al.: Genetic and environmental influences on drug use and abuse/dependence in male and female twins. *Drug Alcohol Depend*, 52: 231-41., 1998.
- 17) Vanderschuren, L.J., Schoffelmeer, A.N., Wardeh, G., et al.: Dissociable effects of the kappa-opioid receptor agonists bremazocine, U69593, and U50488H on locomotor activity and long-term behavioral sensitization induced by amphetamine and cocaine. *Psychopharmacology (Berl)*, 150: 35-44, 2000.
- 18) Zimprich, A., Kraus, J., Woltje, M., et al.: An allelic variation in the human prodynorphin gene promoter alters stimulus-induced expression. *J Neurochem*, 74: 472-7, 2000.

覚せい剤精神病のドパミンレセプターD2 遺伝子 Taq I A 多型と 脳 MRI に関する相関研究

分担研究者:内村 直尚¹

共同研究者:原野 陸生^{1,14}、上野 雄文¹、安倍 等思²、石橋 正彦³、飯田 信夫⁴、田中 得雄⁵、前田 久雄¹、
曾良 一郎^{6,14}、伊豫 雅臣^{7,14}、橋本 謙二^{7,14}、小宮山 徳太郎^{8,14}、山田 光彦^{9,14}、関根 吉統^{10,14}、
稲田 俊也^{11,14}、尾崎 紀夫^{11,14}、岩田 仲生^{12,14}、氏家 寛^{13,14}

(¹ 久留米大学医学部 精神神経科、² 同 放射線医学、³ 十全会 十全病院、⁴ 同 回生病院、⁵ 大法山病院、⁶ 東北大学大学院医学系研究科 精神神経生物学分野、⁷ 千葉大学医学部 精神科、⁸ 国立精神・神経センター武蔵病院 精神科、⁹ 昭和大学附属烏山病院 精神神経科、¹⁰ 浜松医科大学 精神神経科、
¹¹ 名古屋大学大学院医学系研究科 精神生物学分野、¹² 藤田保健衛生大学医学部 精神医学教室、
¹³ 岡山大学大学院医歯学総合研究科 精神神経病態学、¹⁴ 薬物依存ゲノム解析研究グループ(JGIDA))

【研究要旨】

近年の覚せい剤関連精神障害についての分子生物学的研究は、脆弱性を規定する遺伝子多型の存在を明らかにしつつある。われわれは、それらの中でも最も代表的な遺伝子多型の一つであるドパミンレセプターD2(DRD2)遺伝子の Taq I A 多型について、疾患との関わりをより明らかにすることを目的に、患者-対照群の相関解析を行うとともに、併せて、endophenotype として MRI による脳の形態にも着目し、解析、検討を行った。特に、脳の形態解析は、MRI のデータを Voxel-Based Morphometry によって解析し、定量的に行った。その結果、覚せい剤精神病と DRD2 遺伝子の Taq I A 多型との間に相関があること、覚せい剤精神病患者では、左) 側頭葉 (中側頭回・上側頭回前部) と中脳 (被蓋) が健常者に比べて狭小であること、A2/A2 遺伝子型の罹患者では、特に中脳 (被蓋) と左) 前頭葉下面 (内側眼窩回) が狭小であることが示された。これらの結果は、Taq I A 多型が覚せい剤精神病の発症・重篤化の規定因子であることを明らかにするとともに、左側頭葉と中脳の一部分が責任部位である可能性を示唆し、さらに、その責任部位とは別に同多型と係わる発症・重篤化の責任部位が左) 前頭葉下面の内側眼窩回に存在する可能性をも示唆している。

A. 目的

違法薬物として乱用される覚せい剤の主成分は、methamphetamine および amphetamine であり、本邦では、そのうち主に methamphetamine が覚せい剤として密かに流通・乱用されている。本邦における覚せい剤の乱用は、1940年代の第一次乱用期に始まり、以降、幾多の取締り関連法令の改正・追加および警察・税関など関係行政機関の取締りなど種々の対策が講じられているにもかかわらず、現在でも「第三次覚せい剤乱用期」と言われるように、若年層を含めた社会への汚染が広く浸透し、大変深刻な状況にある。このように覚せい剤の乱用は、広く世間で行われているにもかかわらず、取締りの陰で、巧妙に、秘密裏に、行われるため、覚

せい剤依存や覚せい剤精神病の発症メカニズムの解明は、障害を抱える者の数の多さや障害をもたらす個人的・社会的損失の重大さ・深刻さからすると、立ち遅れていると言わざるを得ない。このような状況から、覚せい剤関連障害に関する発症メカニズムの解明は、急務といえる。さらに言うなら、覚せい剤精神病が示す精神症状は、統合失調症のそれと酷似しており、両疾患とも共通してドパミンアンタゴニストである抗精神病薬が症状の抑制に奏効することなどから、覚せい剤は統合失調症の誘発薬剤とも想定され、統合失調症の病因や病態解明という観点からも覚せい剤精神病の発症メカニズムの解明には、期待がかかる。

ところで、これまでに蓄積された臨床経験的知見などから、覚せい剤の乱用をしても社会生活

の支障となるような目立った障害が出現しない者は少なくないと、想像される。これは、関係行政機関などが推定する本邦での覚せい剤乱用者数が約100万人とされているのに対して、受療する者がせいぜい数万人程度であることから裏づけられる。双生児研究では、覚せい剤使用者が使用から乱用・依存に至るか否かは、環境的要因より遺伝的要因によるところが大きいことが示されている^{1,2}。以上のことより、覚せい剤の使用から、乱用、依存、そして精神病に陥る背景には、遺伝的要因が深く関わっているものと考えられる。これらの知見を背景に、近年の覚せい剤関連障害についての分子生物学的研究は、脆弱性を規定するいくつかの遺伝子多型の存在を示唆している。本研究の共同研究者でもある氏家らは、ドパミンレセプターD2(DRD2)遺伝子の Taq I A 多型と-141 Ins/Del 多型、ドパミントランスポーター遺伝子(hDAT1)の3'UTRのVNTR多型が覚せい剤精神病的症状の遷延などに有意な相関をもち、特に DRD2 遺伝子 Taq I A 多型については、A1/A1 遺伝子型を持つ者は、有意に覚せい剤使用から精神病発病までの潜時が長く、治療後は遷延型になりやすく、フラッシュバックも生じにくいと報告し、覚せい剤精神病的脆弱性規定遺伝子の存在と遺伝子多型の違いによる症状・経過の差異を明らかにしている^{3,4,5}。

本研究は、その Taq I A 多型に基づいて覚せい剤精神病的を亜分類し、亜分類されたそれぞれの群、つまり、より純化された疾患単位において、endophenotypeとして脳MRIを検討し、その特徴を明らかにすることによって、覚せい剤精神病的の発症メカニズム解明の一助とすることを目的としている。

B. 方法

対象:

福岡県下の物質関連障害患者の診療を中心に行っている精神科病院に入院中の覚せい剤精神病罹患患者、つまり、社会的にも選別されたと考えられる重篤な覚せい剤精神病罹患患者、および健常者を対象に、本研究についてのインフォームド・コンセントを十分に行い、書面にて同意の得られた者を対象とした。覚せい剤精神病的の診断は、DSM-

IVを用い、覚せい剤精神病以外の精神疾患の既往や家族歴がある者は、対象から除外した。健常者の収集にあたっては、精神疾患の既往や家族歴がある者、そして物質依存歴や乱用歴がある者は除外し、学歴や職歴にも偏りが生じないように配慮した。その結果、現在までのところ、覚せい剤精神病罹患患者 40 名(全て男性、平均年齢±S.D.=43.7±12.4 歳)、健常者 30 名(全て男性、54.6±13.7 歳)の協力が得られた。

尚、本研究は、久留米大学倫理委員会の審査・承認を受けている。実施にあたっては、被験者の人権やプライバシーの保護に十分な配慮を行った。

遺伝子多型解析:

対象者から提供していただいた末梢静脈血から、genomic DNA をフェノール法で抽出し、その genomic DNA を用い、DRD2 遺伝子の Taq I A 多型を、PCR-RFLP 法によって解析・判定した。

MRI 撮影:

MRI 撮影装置は、大学病院で一般臨床用に用いられている GE Signa MR/i High Speed 1.5T (1.5T)を用いた。全ての対象者を同一の装置で撮影した。撮像データの内 T1 強調画像のデータを、dicom ファイルとして記録した。

撮像データの解析:

撮像データを Windows XP 上で、Osiris 4⁶と MRIcro Ver.1.37⁷で 3D データとして統合した後、Windows 2000 上の MATLAB 5.3⁸および SPM 99⁹による Voxel-Based Morphometry (V.B.M.)¹⁰によって、データ解析・比較を行った。

統計学的検定:

遺伝子多型および allele の分布頻度についての統計学的検定は、 χ^2 乗検定で行った。V.B.M. に用いた SPM 99 は、そのアルゴリズムにおいて t 検体を行い、それによって有意な差異が認められた部位が、t 値に応じた濃淡となって脳MRI画像上に示されるようプログラムが構成されている。

C. 結果

遺伝子多型:(Table 1)

遺伝子多型解析の結果は、罹患群 (MAP) が A1/A1 : A1/A2 : A2/A2 =4:16:20、健常群 (NC) が

7:15:8 で(単位:名)、遺伝子型での比較では $\chi^2 p=0.097$ 、A1-allele を持つ群 (A1/A1 および A1/A2 遺伝子型を持つ者の群)と持たない群 (A2/A2 遺伝子型を持つ者の群)に分けての比較

では $\chi^2 p=0.049$ (オッズ比(OR)=2.8)、Allele 頻度での比較では $\chi^2 p=0.027$ (OR=2.2) で相関を認めた。(Table 1b)

Table 1a. Genotype and allele frequency

	Genotype			Allele	
	A1/A1	A1/A2	A2/A2	A1	A2
NC	7 (23.3%)	15 (50%)	8 (26.7%)	29 (48%)	31 (52%)
MAP	4 (10%)	16 (40%)	20 (50%)	24 (30%)	56 (70%)

Table 1b. Statistical analysis

	$\chi^2 p$	Odds Ratio
Genotype	0.097	
(A1/A1+A1/A2) vs. (A2/A2)	0.049	2.8
Allele	0.027	2.2

脳の形態比較:

1) 健常群と罹患群との比較:(Figure 1)

健常群(NC, n=30、平均年齢±S.D.=54.6±13.7 歳)と罹患群(MAP, n=40、43.7±12.4 歳)の脳MRIのV.B.M.による比較では、罹患群の左側頭葉の皮質(中側頭回・上側頭回前部)、および中脳の被蓋が有意に狭小であった。

2) 健常群を A1-allele を持つか否かで2つの亜群に分けての比較:(Figure 2)

健常群を A1-allele を持つ亜群(A1/NC 群)と持たない亜群(A2/NC 群)に分けての、つまり、健常者のうち A1/A1 遺伝子型および A1/A2 遺伝子型を持つ者の群(A1/NC 群, n=22、平均年齢±S.D.=53.9±13.7 歳)と、A2/A2 遺伝子型を持つ者の群(A2/NC 群, n=8、54.9±13.6 歳)との脳MRIのV.B.M.による比較では、両側頭葉内側の一部が A2/NC 群で有意に狭小であったが、中側頭回・上側頭回・中脳などでは、差異を認めなかった。

3) 健常群の内 A1-allele を持つ亜群と、罹患群の内 A1-allele を持つ亜群との比較:(Figure 3)

健常群の内 A1-allele を持つ亜群(A1/NC 群)と、罹患群の内 A1-allele を持つ亜群(A1/MAP

群)との比較、つまり、健常者のうち A1/A1 遺伝子型および A1/A2 遺伝子型を持つ者の群(A1/NC 群, n=22、平均年齢±S.D.=53.9±13.7 歳)と、罹患者のうち A1/A1 遺伝子型および A1/A2 遺伝子型を持つ者の群(A1/MAP 群, n=20、45.8±14.7 歳)との比較では、左側頭葉の中側頭回が A1/MAP 群で有意に狭小であったが、上側頭回と中脳での差異は認められなかった。

4) 健常群の内 A1-allele を持つ亜群と、罹患群の内 A1-allele を持たない亜群との比較:(Figure 4)

健常群の内 A1-allele を持つ亜群(A1/NC 群)と、罹患群の内 A1-allele を持たない亜群(A2/MAP 群)との比較、つまり、健常者のうち A1/A1 遺伝子型および A1/A2 遺伝子型を持つ者の群(A1/NC 群, n=22、平均年齢±S.D.=53.9±13.7 歳)と、罹患者のうち A2/A2 遺伝子型を持つ者の群(A2/MAP 群, n=20、41.4±9.0 歳)との比較では、A2/MAP 群の左側頭葉・中脳に加え、小脳虫部・左前頭葉下面(内側眼窩回)も狭小であった。

5) 罹患群を A1-allele を持つか否かで2つの亜群に分けての比較:(Figure 5)

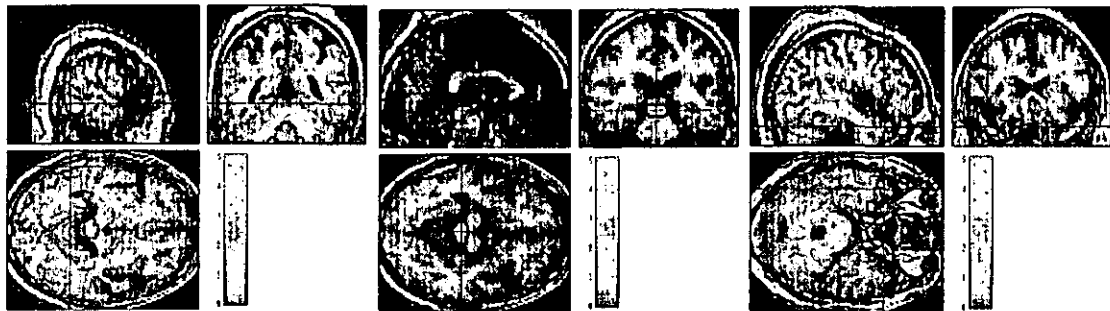
罹患群を A1-allele を持つか否かで2つの亜

群に分けての比較、つまり、罹患者のうち A1/A1 遺伝子型および A1/A2 遺伝子型を持つ者の群 (A1/MAP 群、n=20、平均年齢±S.D. = 45.8 ± 14.7 歳) と、A2/A2 遺伝子型を持つ者の群 (A2/MAP 群、n=20、41.4 ± 9.0 歳) との比較では、A2/MAP 群の左) 前頭葉下面 (内側眼窩回) のみが狭小であった。

脳 MRI の亜群間での比較結果のまとめ: (Table 2)

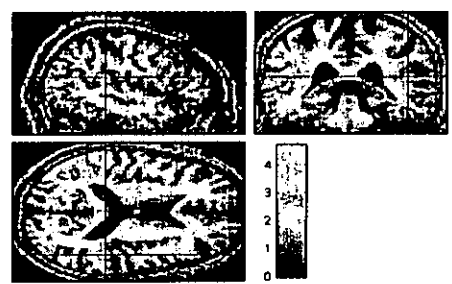
以上の脳 MRI の各(亜)群間での比較結果をまとめると、遺伝子型に係わり無く罹患者では、左) 側頭葉が狭小であった。また、罹患者の内、遺伝子型が A2/A2 である者の亜群 (A2/MAP 群) では、中脳の被蓋、左) 前頭葉下面の内側眼窩回が狭小である傾向のあることが伺えた。

Figure 1. 健常群と罹患者との V.B.M.による比較



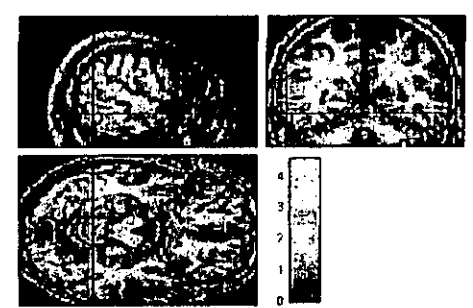
健常群と罹患者との MRI の V.B.M.による比較では、罹患者の左)側頭葉中側頭回(左の3枚組の画像)、中脳の被蓋(中央の3枚組の画像)、左)側頭葉上側頭回前部(右の3枚組の画像)が狭小であった。(上段左:矢状断、上段右:前額断、下段左:水平断、下段右:t値スケール)

Figure 2. 健常群を A1-allele を持つか否かで2つの亜群に分けての V.B.M.による比較



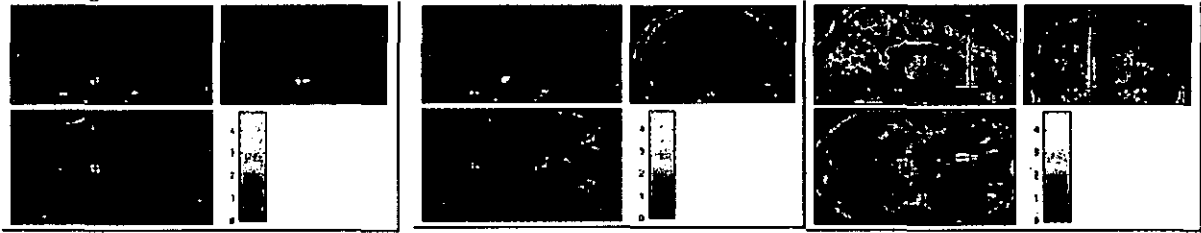
健常群を A1-allele を持つか否かで2つの亜群に分けての MRI の V.B.M.による比較では、A2/A2 遺伝子型を持つ者の群の両)側頭葉内側部が狭小であった。

Figure 3. 健常群の内 A1-allele を持つ亜群と、罹患者の内 A1-allele を持つ亜群との V.B.M.による比較



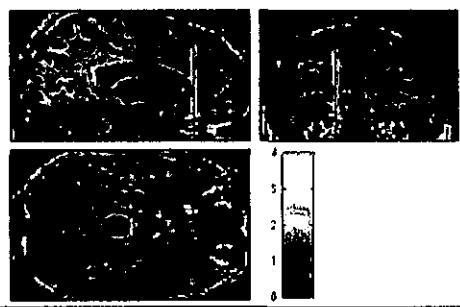
健常群の内 A1-allele を持つ亜群と、罹患者の内 A1-allele を持つ亜群との MRI の V.B.M.による比較では、A1-allele を持つ罹患者の左)側頭葉の中側頭回が狭小であった。

Figure 4. 健常群の内 A1-allele を持つ亜群と、罹患群の内 A1-allele を持たない亜群との V.B.M.による比較



健常群の内 A1-allele を持つ亜群と、罹患群の内 A1-allele を持たない亜群との MRI の V.B.M.による比較では、A2/A2 遺伝子型をもつ罹患群の中脳の被蓋と左)側頭葉の中側頭回(左の3枚組の画像)、小脳虫部(中央の3枚組の画像)、左)前頭葉下面の内側眼窩回(右の3枚組の画像)が狭小であった。(上段左:矢状断、上段右:前額断、下段左:水平断、下段右:t 値スケール)

Figure 5. 罹患群を A1-allele を持つか否かで2つの亜群に分けての V.B.M.による比較



罹患群を A1-allele を持つか否かで2つの亜群に分けての MRI の V.B.M.による比較では、A2/A2 遺伝子型を持つ者の亜群の左)前頭葉下面の内側眼窩回が狭小であった。

Table 2. 脳 MRI の亜群間での V.B.M.による比較結果のまとめ

比較した(亜)群	狭小であった部位
NC vs. MAP	左)側頭葉中側頭回 中脳(被蓋) 左)側頭葉上側頭回前部
A1 vs. A2 /NC	両)側頭葉内側
A1/NC vs. A1/MAP	左)側頭葉中側頭回
A1/NC vs. A2/MAP	左)側頭葉中側頭回 中脳(被蓋) 左)前頭葉下面(内側眼窩回) 小脳虫部
A1 vs. A2 /MAP	左)前頭葉下面(内側眼窩回)

「vs.」の前の群に比して「vs.」の後の群が狭小であった部位を示している。各部位の順位・配置には、便宜的な意味しかない。
(NC:健常群、MAP:罹患群、A1:A1/A1あるいはA1/A2 遺伝子型の亜群、A2:A2/A2 遺伝子型の亜群、A1/NC:A1/A1あるいはA1/A2 遺伝子型を持つ健常者の亜群、A2/MAP:A2/A2 遺伝子型を持つ罹患者の亜群)

D. 考察

健常群の構成:

本研究の健常群(対照群)の平均年齢(54.6 ± 13.7歳)は、罹患群(43.7 ± 12.4歳)に比べて10歳余り高くなっており、両群間での年齢のマッチングがとれていない。これは、脳の容積や形態と、I.Q.ないしは学歴などとの間にある程度の相関が存在すること¹¹、さらに、それらI.Q.や学歴などが違法薬物の使用ないしは乱用のきっかけにも影響す

ること²が指摘されているため、それらのことに留意し、安易に医療スタッフなどを被験者として組み入れず、また、インフォームド・コンセントの制約等のため、被験者(健常者)の収集が容易に進まなかった結果であるが、研究デザインの根幹に係わる問題である。現在、年齢のマッチングを図るべく被験者を追加収集中であり、近日中に、年齢のマッチングのとれた罹患-健常群での解析結果を報告する予定である。しかしながら、脳は加齢によって萎縮していくという普遍性を考慮すると、平均年齢の