

1424-1430, 1996.

5) Kajii Y, Muraoka S, Hiraoka S, et al: A Developmentally-regulated and psychostimulant-inducible novel rat gene *mrt1* encoding PDZ-PX proteins isolated in the neocortex, *Mol Psychiatry*, 8: 434-444, 2003.

6) 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.

7) 西川 徹: 覚醒剤精神病の分子生物学
Current Insights in Neurological Science 9: 2-4, 2001.

8) 西川 徹. 4. 逆耐性現象: 神経回路網の分子生物学的研究. 佐藤光源, 櫻井映子編. 覚せい剤精神病と麻薬依存. 仙台: 東北大学出版会; 2003. p43-55

9) 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.

10) 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.

11) 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.

12) 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.

13) 西川徹、柏淳、伊藤卓、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—Mrt1結合淡白の検索—. 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14年度研究報告書(佐藤光源 編)、pp. 35-38、2003.

14) 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.

15) Ohno M. and Watanabe S. (1995) Nitric oxide synthase inhibitors block behavioral sensitization to methamphetamine in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 275, 39-44.

16) Strasser A., McCarron R. M., Ishii H., Stanimirovic D. and Spatz M. (1994) L-arginine induces dopamine release from the striatum in vivo. *Neuroreport.* 5, 2298-2300.

メタンフェタミン、フェンシクリジン投与による Nurr 1 mRNA の変化に及ぼす精神科治療薬の影響

分担研究者 秋山一文¹

共同研究者 憲武人¹、下田和孝¹

所属 ¹獨協医科大学精神神経医学教室

【研究要旨】

オーファン核内レセプターに属する転写因子である Nurr 1 は中脳ドバミン作動性神経終末の分化に重要な役割をもち、発達や産卵などによる神経可塑性への関与が示唆されている。Nurr 1 mRNA の発現について 1) フェンシクリジン (PCP) 急性投与前に抗精神病薬投与処置を施した効果、2) メタンフェタミン (METH) 急性投与によって誘発される mRNA 発現に与える慢性リチウム投与の影響について検討した。1) 抗精神病薬前処置として haloperidol 2 mg/kg, risperidone 2 mg/kg, olanzapine 10 mg/kg, clozapine 20 mg/kg または生食を投与し、1 時間後に PCP 10 mg/kg を投与し、その 1 時間後に断頭した。PCP 急性投与による大脳皮質での Nurr 1 の mRNA 発現増加は olanzapine, clozapine の前処置によってほぼ完全に阻止されたが、haloperidol, risperidone の前処置では阻止されなかった。なお、これらの抗精神病薬単独投与では生食投与と比較して有意な mRNA 発現の変化は引き起こされなかった。2) 塩化リチウム 0.06% を含む餌を 1 週間、同 0.1% を含む餌を 1 週間、摂取させ、対照群のラットには塩化リチウムを含まない餌で飼育した。正常餌、リチウム含有餌で 2 週間飼育されたラットに生食または METH 4 mg/kg を投与、その 1 時間後に断頭した。METH 急性投与によって広汎な大脳皮質で Nurr 1 の mRNA 発現が増加した。retrosplenial cortex での発現はリチウム餌飼育群で有意に抑制されたが、それ以外の部位では有意な影響はなかった。PCP 急性投与によって Nurr 1 の mRNA 発現が olanzapine, clozapine によって阻止されたことは、これらの非定型抗精神病薬が NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗作用を介する精神症状や行動を改善させるという仮説に矛盾していないと考えられる。リチウムの作用機序は細胞内情報伝達系を巡って議論されているが、不明な点も多く残されており、今後の検討が必要である。

A. 目的

ステロイドホルモンや甲状腺ホルモンのレセプター、ビタミン D3 やレチノイド酸のレセプターは核内レセプタースーパーファミリーと呼ばれ、共通した構造としてジンクフィンガーモチーフの存在が知られている。このグ

ループに属する Nurr 1 はリガンドが不明なオーファン核内レセプターとされ⁹⁾、中脳ドバミンニューロンの終末での分化に重要な役割を持っている¹⁰⁾。また Nurr 1 はドバミンニューロン以外では内側前頭皮質、体性知覚野から視覚野に及ぶ大脳皮質の第 4 層と第 6 層、

海馬台や外側手綱核など比較的限局して分布していることが報告されている¹³⁾。痙攣によって海馬歯状回で Nurr1 mRNA 発現が増加するなど神経可塑性への関与も示唆されている¹²⁾。昨年までの研究でメタンフェタミン(METH)急性投与によって Nurr1 の mRNA が広汎な大脳皮質、海馬錐体細胞、腹側被蓋野で増加すること、またフェンシクリジン(PCP)の急性・反復投与によるこれらの mRNA に与える影響を検討した。本研究では Nurr1 mRNA の発現について 1) PCP 急性投与前に抗精神病薬前処置を施した効果、2) METH 急性投与によって誘発される Nurr1 mRNA 発現に与える慢性リチウム投与の影響について検討した。

B. 対象と方法

実験 1) ラットを用い、抗精神病薬前処置として haloperidol 2 mg/kg, risperidone 2 mg/kg, olanzapine 10 mg/kg, clozapine 20 mg/kg または生食を投与し、1 時間後に PCP 10 mg/kg を投与し、その 1 時間後に断頭した。また、別の群で haloperidol 2 mg/kg, risperidone 2 mg/kg, olanzapine 10 mg/kg, clozapine 20 mg/kg または生食を投与し、その 2 時間後に断頭した。実験 2) 塩化リチウム 0.06% を含む餌を 1 週間、同 0.1% を含む餌を 1 週間、摂取させ飼育した。対照群のラットには塩化リチウムを含まない餌で飼育した。正常餌、塩化リチウム含有餌で 2 週間飼育されたラットに生食または METH 4 mg/kg を投与、その 1 時間後に断頭した。摘出した脳を凍結し、10 μ m の厚さの冠状断に切りスライドグラスにマウントして In situ hybridization

を行った。

C. 結果

1. 定常状態における Nurr1 mRNA は既報¹³⁾と同様に、体性知覚野から視覚野に及ぶ大脳皮質では第 4 層と第 6 層に分かれ分布していることが確認された。このためこれらの部位では第 6 層で定量した。
2. 大脳皮質各領域での PCP 急性投与による Nurr1 の mRNA 発現増加は olanzapine, clozapine の前処置によってほぼ完全に阻止されたが、haloperidol, risperidone の前処置では影響されなかった(Fig 1)。なお、これらの抗精神病薬単独投与では生食投与と比較して mRNA 発現に有意な変化はなかった(Fig 2)。
3. METH 急性投与は正常餌、塩化リチウム含有餌で飼育されたラットのいずれにも広汎な大脳皮質で Nurr1 の mRNA 発現を増加させた。retrosplenial cortex での mRNA 発現はリチウム餌飼育群で有意に抑制されたが、それ以外の部位では有意な影響はなかった(Fig 3)。

D. 考察

昨年報告では PCP の急性投与により大脳皮質各領域で 1 - 3 時間後で Nurr1 の mRNA の増加が認められた。本年度はこの PCP 急性投与による Nurr1 mRNA 発現に及ぼす抗精神病薬の前処置の影響を検討した。その結果、olanzapine, clozapine といった非定型抗精神病薬は PCP 急性投与による Nurr1 mRNA 発現

を大脳皮質各部位に於いてほぼ完全に抑制した。haloperidol, risperidone は PCP 急性投与による Nurr1 mRNA 発現に有意な影響を及ぼさなかった。

昨年までの報告でメタンフェタミン(METH)による Nurr1 mRNA 発現はドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390 によって有意に抑制されることを報告した。本研究で前処置として投与した抗精神病薬のドパミン D1 受容体に対する Ki 値(nM)は haloperidol で 25nM, risperidone で 75nM, olanzapine で 31nM, clozapine で 85nM とほぼ同等である³⁾。従って PCP 急性投与による Nurr1 mRNA 発現への olanzapine, clozapine による抑制効果はドパミン D1 受容体拮抗作用では説明できない。

PCP の乱用によって引き起こされる精神症状は統合失調症の陽性症状、陰性症状、認知障害に酷似している。PCP と同様な薬理作用(非競合性 NMDA 受容体拮抗作用)を有するケタミンの投与を受けた統合失調症患者では症状の増悪がみられ、これに対し haloperidol ではなく、clozapine が奏功すると報告されている⁴⁾。実験動物でも PCP や MK801 による移所運動には haloperidol よりも olanzapine, clozapine がより低用量で抑制効果を示す⁴⁾。さらに PCP、ケタミンの投与は prepulse inhibition(PPI)を減弱させるが、この PPI の減弱も haloperidol ではなくて olanzapine, clozapine によって回復することが報告されている⁴⁾。以上の成績は olanzapine, clozapine といった非定型抗精神病薬が定型抗精神病薬とは異なり、NMDA 受容体拮抗作用を緩和させる方向で統合失調症の症状あるい

はその知覚情報処理障害を改善させる効果をもつことを示唆している。

PCP はいくつかの最初期遺伝子の発現を引き起こすことが知られている。そのなかのひとつである Arc mRNA の発現は olanzapine, clozapine の前処置によって抑制されることが既に報告されている⁵⁾。今回、見いだされた PCP 急性投与による Nurr1 mRNA 発現に及ぼす olanzapine, clozapine の抑制作用も Arc と同様な傾向であったことは注目される。以上のことから olanzapine, clozapine は PCP の有する NMDA 受容体拮抗作用によって生ずる Arc mRNA, Nurr1 mRNA 発現増加を抑制する作用を持っていることが示唆される。このことはこれらの非定型抗精神病薬が PCP による行動変化や知覚情報処理障害を改善させることと符合しているものと考えられる。

双極性障害、特に躁状態についての PET などを用いた脳機能画像研究は少ない。健常ボランティアへのアンフェタミン急性投与は気分高揚をもたらす躁状態のモデルともみなされているが、この際グルコース代謝が前頭葉皮質で増加すると報告¹⁰⁾されている。また双極性障害の躁状態で左側前部帯状回皮質と左側尾状核に於いて脳機能の活動性が高まるという報告¹¹⁾がある。リチウムは双極性障害の予防薬としてその効果は確立されているが、双極性障害患者へのリチウム投与の影響を脳機能画像で追った研究も殆どない。わずかに Goodwin ら⁹⁾が SPECT を用いて、リチウム離脱後に脳血流が増加することを報告しているに過ぎない。実験的には躁病のモデルと考えられる METH 急性投与によって引き起こされ

る Fos 発現がリチウム含有餌摂取によって抑制されると報告されている¹¹⁾。リチウムの作用機序は細胞内情報伝達系を巡って議論されてものの、不明な点も多く残されている。今回の研究では METH 急性投与による Nurr mRNA 発現が retrosplenial cortex に於いてリチウム餌飼育群で有意に抑制されたが、それ以外の部位では有意な影響はなかった。今後さらにその他の神経可塑性関連遺伝子発現での検討が必要であろう。

E. 結論

以上から、1) olanzapine, clozapine といった非定型抗精神病薬の前処置が NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗作用をもつ PCP の急性投与による Nurr 1 の mRNA 発現を抑制すること、2) リチウムの慢性投与の作用機序について神経可塑性関連遺伝子発現での検討が必要であるということ、の 2 点が結論付けられる。

【参考文献】

1. Bakshi V.P., Swerdlow N.R., Geyer M.A., Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of the startle response. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 271:787-794, 1994.
2. Blumberg, H.P., Stern, E., Martinez, D. et al. Increased anterior cingulate and caudate activity in bipolar mania. *Biol. Psychiatry*, 48:1045-1052, 2000.
3. Bymaster, F.P., Calligaro, D.O., Falcone, J.F. et al., Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacol.*, 14:87-96, 1996.
4. Corbett, R., Camacho, F., Woods, A.T. et al. Antipsychotic agents antagonize non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist-induced behaviors. *Psychopharmacol.*, 120:67-74, 1995.
5. Goodwin, G.M., Cavanagh, J.T., Glabus M.F., et al. Uptake of 99mTc-exametazine shown by single photon emission computed tomography before and after lithium withdrawal in bipolar patients: association with mania. *Brit. J. Psychiatry* 170:426-430, 1997.
6. Law, S.W., Conneely, O.M., DeMayo, F.J. et al. Identification of a new brain-specific transcription factor, Nurr1. *Mol. Endocrinol.*, 6:2129-2135, 1992.
7. Lee, Y., Hamamura, T., Ohashi, K., et al. The effect of lithium on methamphetamine-induced regional Fos protein expression in the rat brain. *Neuroreport* 10:895-900, 1999.
8. Malhorta, A.K., Adler, C.M., Kennison, S.D. et al. Clozapine blunts N-methyl-D-aspartate antagonist-induced psychosis. A study with ketamine. *Biol. Psychiatry* 42:664-668, 1997.
9. Nakahara T., Kuroki T., Hashimoto K. et al., Effect of atypical antipsychotics on phencyclidine-induced expression of arc in rat brain. *Neuroreport* 11:551-555, 2000.
10. Vollenweider, F.X., Maguire, R.P., Leenders,

- K.L. et al. Effects of high amphetamine dose on mood and cerebral glucose metabolism in normal volunteers using positron emission tomography (PET). *Psychiatry Res.*, 83:149-162, 1998.
11. Witta J., Baffi J.S., Palkovits M. et al. Nigrostriatal innervation is preserved in *Nurr1*-null mice, although dopaminergic neuron precursors are arrested from terminal differentiation. *Mol. Brain Res.*, 84:67-78, 2000.
 12. Xing, G, Zhang, L., Zhang L. et al. Rat *nurr1* is prominently expressed in perirhinal cortex, and differentially induced in the hippocampal dentate gyrus by electroconvulsive vs. kindled seizures. *Mol. Brain Res.*, 47:251-261, 1997.
 13. Zetterstrom, R.H., Williams, R., Perlmann, T. et al.: Cellular expression of the immediate early transcription factors *Nurr1* and *NGFI-B* suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Mol. Brain Res.*, 41:111-120, 1996.

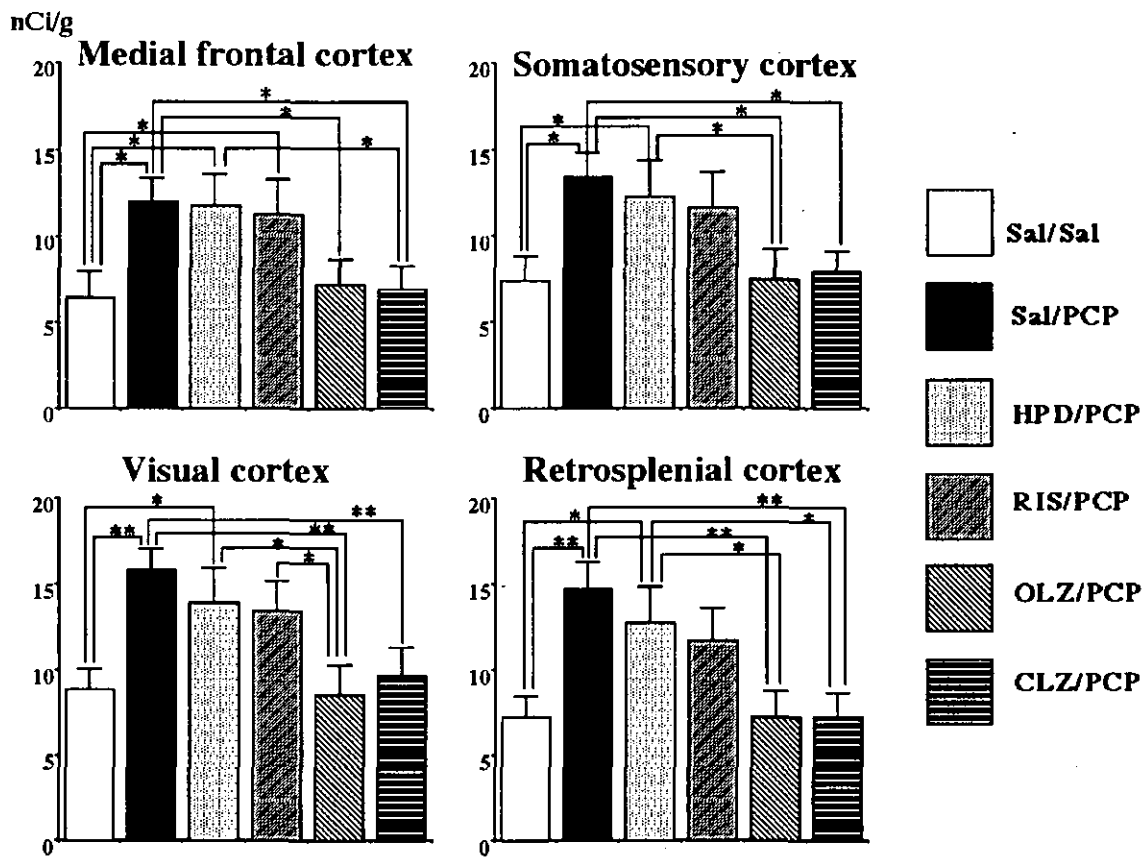


Fig 1 :PCP 急性投与による Nurr1 mRNA 発現に対する抗精神病薬前処置の効果

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

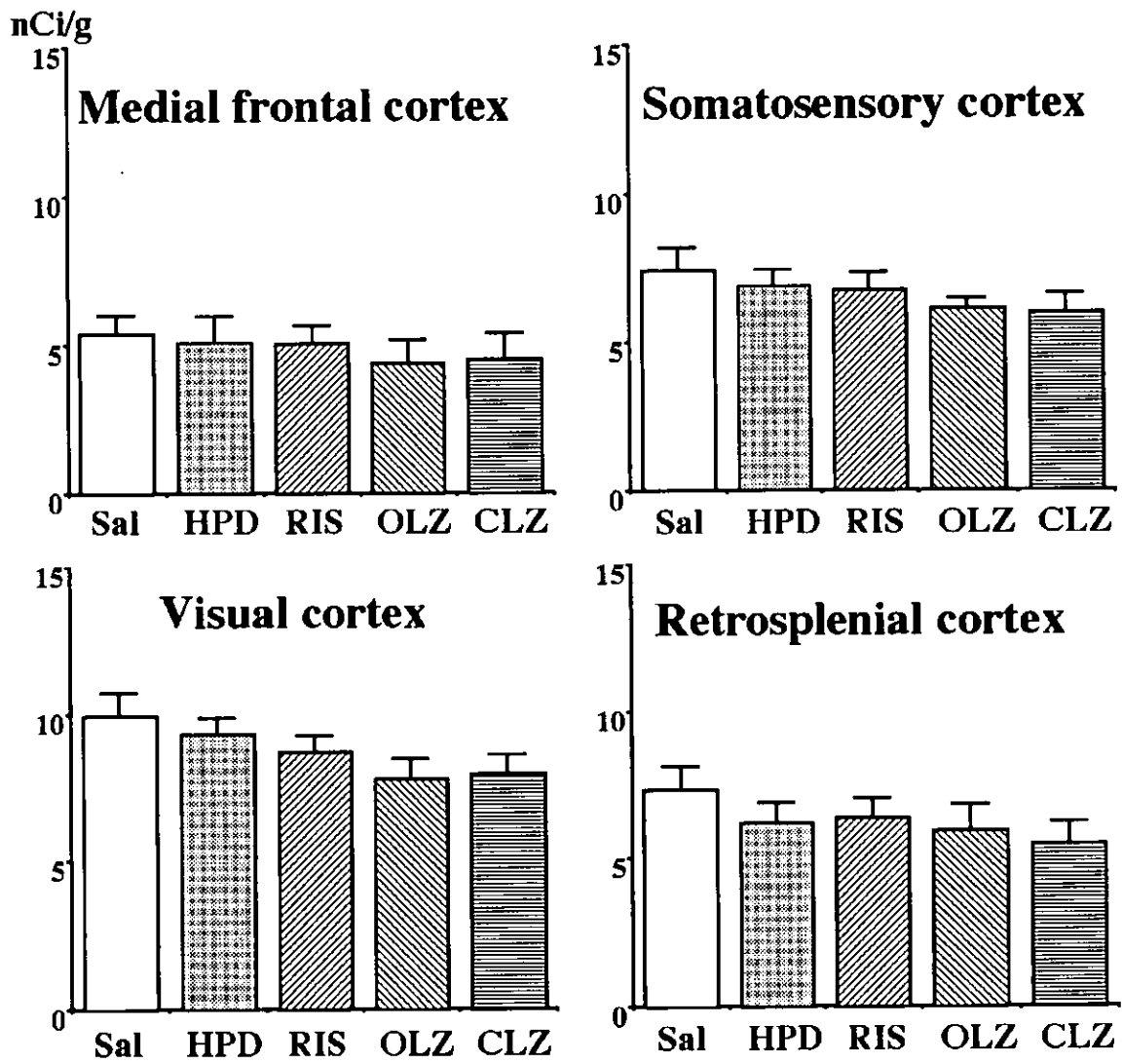


Fig 2: 抗精神病薬急性投与による Nurr1 mRNA 発現への影響

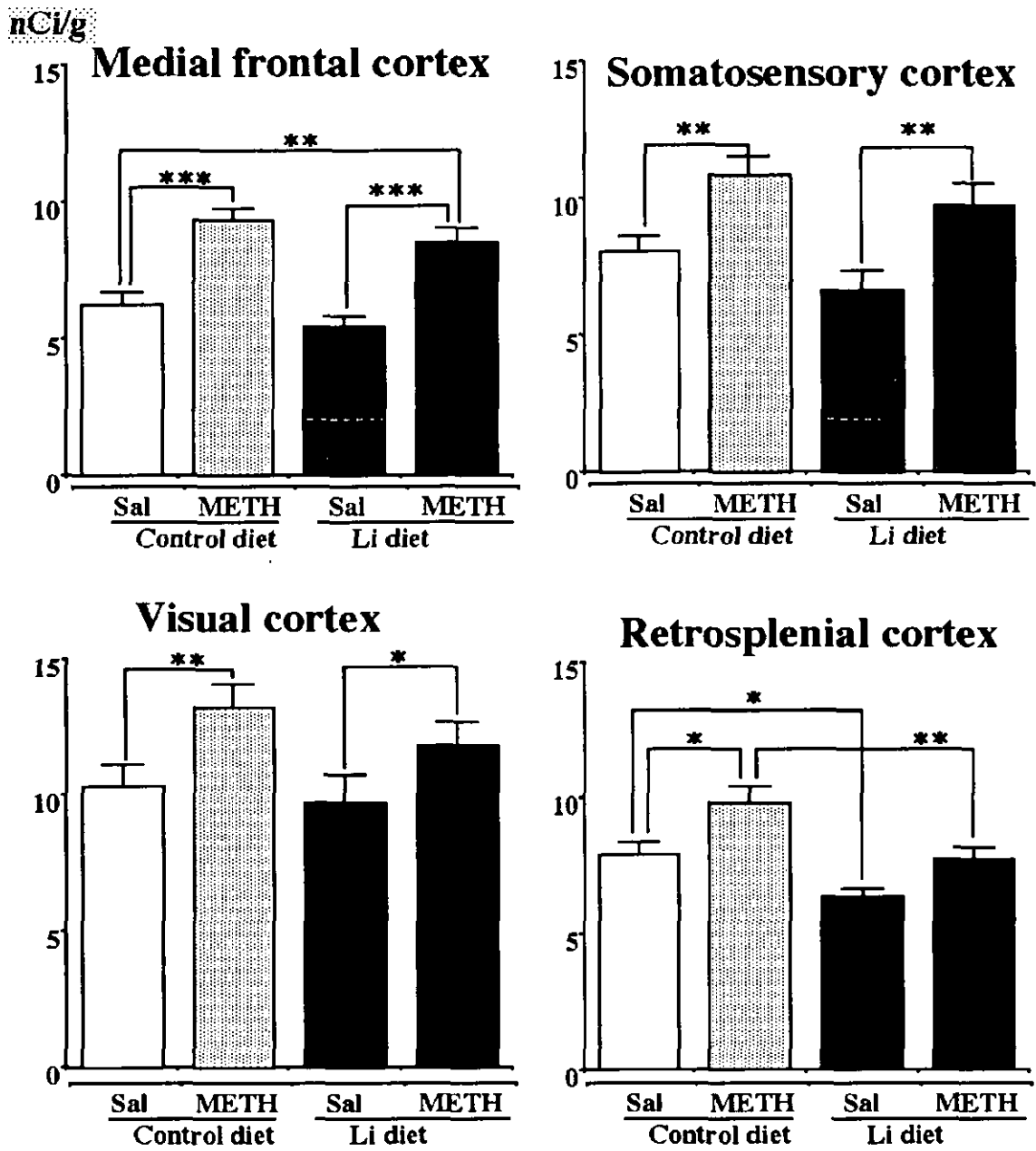


Fig 3 : METH 急性投与による Nurr1 mRNA 発現の効果

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

メタンフェタミン逆耐性形成における中枢ヒスタミン神経系の影響

分担研究者：谷内一彦¹⁾

研究協力者：奥田友宏¹⁾、櫻井映子¹⁾、岩淵健太郎^{1, 2)}、代紅梅¹⁾、中川直人³⁾、菱沼隆則³⁾、後藤順一³⁾

(¹⁾東北大学大学院医学系研究科 細胞・病態薬理学分野、²⁾同 精神神経学分野、³⁾東北大学附属病院・薬剤部)

〔研究要旨〕

ヒスタミン神経系は覚醒の維持に重要なアミン系神経系である(1)。我々は今まで H1、H2 受容体、HDC(histidine decarboxylase) knockout mouse を用いた研究から中枢ヒスタミン神経がメタンフェタミン(MAP)逆耐性形成などの有害な刺激に対して抑制的に作用する可能性を示している。今年度は以下の2点に的を絞って研究を進めた。まず始めに OTC に多く含まれる抗ヒスタミン薬の MAP 逆耐性形成への影響を調べた。自発運動量と驚愕反応の事前音刺激による抑制 (Pre-pulse inhibition) を指標に調べると、抗ヒスタミン薬の中でクロルフェニラミンが特に強く MAP による行動への効果を増大させること、またその増強効果に比例して血清中及び脳組織中 MAP 濃度の測定が数倍増大することが明らかになった。さらに H3 受容体遺伝子ノックアウトマウス (H3KO) を用いて MAP 逆耐性形成過程における H3 受容体の役割を調べた。H3 受容体は auto receptor としてヒスタミンの放出を制御するだけでなく、hetero receptor としてドパミン、ノルアドレナリン、セロトニンなど他の神経伝達物質の放出も調節している。H3KO では MAP 逆耐性の形成が遅延することが明らかになった。

A. 目的

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パミンが過剰に遊離されるが、その時に賦活されるドパミン神経系からのドパミンの遊離増加は、ド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。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、統合失調症の陰性症状のモデルである isolation stress モデルを作製し、MAP 逆耐性モデルの形成におけるストレスの役割を明らかにしてきた (3)。また併行して臨床研究を行い、¹¹C-doxepin-PET により統合失

調症患者や薬物依存症患者脳において H1 受容体が低下していることを報告している(4)。

今年度は主に OTC として市販されている風邪薬の中に多く含有されている抗ヒスタミン薬の MAP 行動変化における効果をしらべ、さらにそのメカニズムを調べるために組織中の MAP 濃度を測定した。またヒスタミン H3 受容体はヒスタミン神経系の自己受容体およびヘテロ受容体として、ヒスタミン、セロトニン、ノルアドレナリン、ドパミンの神経終末に存在して神経伝達物質の遊離を制御しているが、覚醒剤精神病発症における役割は明確ではない (5)。多くの H3 リガンドが最近開発されてきており、H3 受容体の役割が明確になればその意義は大きい。

B. 方法

実験 1：S-D ラットを用いて MAP 単独投与とクロルフェニラミン併用投与での逆耐性形成過程と形成後の行動を測定した。さらにピリラミン、エバスタチ

ンによる併用効果も計測した。測定した行動は自発運動量（スーパーメックスR、室町機械）と事前音刺激による驚愕反応の減弱（PPI）である。驚愕反応はコロバス社製の Responder-XRを使用した。また薬剤1回投与180分後のMAP血清中及び組織中濃度をGC-MSにて測定した（6）。実験2：H3KOマウスを用いてMAP逆耐性形成過程と形成後の自発運動量と行動スコアを測定した。MAP（2 mg/kg）を7日間連続投与し、1週間休薬後、再投与を行った。逆耐性の評価は自発運動量と行動のスコア化により評価した。

C. 結果

実験1：MAPの急性投与実験では、クロルフェニラミン併用群で用量依存的にMAP自発運動量の増加が観察された（図1）。抗ヒスタミン薬による自発運動量増加効果はクロルフェニラミンで最も強く、ピリラミンでわずかに観察されたが、第2世代抗ヒスタミン薬のエバスチンでは認められなかった（図2）。また連続投与したMAP逆耐性形成過程及び形成後ともに運動量の増加を認めた。MAP逆耐性でもクロルフェニラミン併用投与群ではMAP単独投与群と比較して明らかに自発運動量の増加が認められた（図3）。実際にMAP急性投与時の組織中濃度をGC/MSで測定すると、MAP血清中濃度が約8倍、脳組織中濃度が約5倍であった（表1）。また慢性投与時においてMAP組織内濃度増加も同様にクロルフェニラミン投与時に観察された。実験2：H3KOマウスは野生型と比較して運動量が少ない。MAP投与初期では運動量に明確な差があり、H3KOは野生型と比較して逆耐性が形成されない傾向が認められた。しかし逆耐性が形成されるに従い野生型と差がなくなった（図4）。

D. 考察

抗ヒスタミン薬、特にクロルフェニラミンはMAPの急性・反復投与による効果を増大させた。ピリラミンやエバスチンにはその効果がないか弱いことから、クロルフェニラミンに特有の現象と

考えられた。今までの文献的な考察から、抗ヒスタミン薬のMAP増強効果には3種類のメカニズムが考えられる。1)中枢ヒスタミン神経系遮断による中枢でのMAP逆耐性増強効果、2)抗ヒスタミン薬によるドパミントランスポーター遮断による中枢でのMAP増強効果、3)CYP2D6やOCTトランスポーターを介した薬物相互作用。MAP血清中濃度がクロルフェニラミン併用投与群で8倍であったことは本研究で初めて明らかになったことである。以上、抗ヒスタミン薬のクロルフェニラミンによるMAP増強効果は中枢及び代謝による効果が複雑に関連して増強効果を発現していると考えられた。

H3受容体はヒスタミンなどモノアミン遊離を抑制することから、H3受容体が逆耐性に関与している可能性がある。実際に多くのリガンドが開発されてその臨床応用が検討されている。薬物依存についてもそのひとつの可能性であるが、今まで遺伝子改変マウスを用いて十分には研究されてこなかった。本研究ではH3KOマウスを用いてMAP逆耐性形成への影響を調べた。H3KOでは野生型と比較してMAP投与初期では、運動効果が有意に減弱していることが分かった。最終的には逆耐性が形成されるが、投与初期には明確な差があるので用量や用いる行動指標を変えて更なる検討が必要である。

【参考文献】

- (1) Watanabe T & Yanai K. (2001). Studies on functional roles of the histaminergic neuron system by using pharmacological agents, knockout mice and positron emission tomography. *Tohoku J. Exp. Med.* 195: 197-217.
- (2) Iwabuchi K, Kubota Y, Ito C, Watanabe T, Yanai K. 2004. Metamphetamine and Brain Histamine: A Study Using Histamine-Related Genes Knockout Mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* in press (Proceedings of International Society for Neurochemistry).
- (3) Dai H, Okuda H, Iwabuchi K, Sakurai E, Chen Z, Kato M, Iinuma K and Yanai K. (2004). Social isolation stress significantly enhanced the disruption

- of prepulse inhibition in repeatedly methamphetamine-treated mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* in press (Proceedings of International Society for Neurochemistry).
- (4) Iwabuchi K, Ito C, Tashiro M, Mochizuki H, Kato M, Kano M, Ishii K, Ishiwata K, Itoh M, Iwata R, Matsuoka H, Sato M, and Yanai K. submitted.
- (5) H. Toyota, C. Dugovic, M. Koehl, A. D. Laposky, C. Weber, K. Ngo, Y. Wu, D. H. Lee, K. Yanai, E. Sakurai, T. Watanabe, C. Liu, J. Chen, A. J. Barbier, F. W. Turek, W.-P. Fung-Leung, and T. W. Lovenberg. (2002). Behavioral characterization of mice lacking histamine H3 receptors. *Mol. Pharmacol.* 62: 389-397.
- (6) Nakagawa N, Hishinuma T, Nakamura H, Yamazaki T, Tsukamoto H, Hiratsuka M, Ido T, Mizugaki M, Terasaki T, Goto J. (2003). Brain and heart specific alteration of methamphetamine (MAP) distribution in MAP-sensitized rat. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 506-509.
- (7) Okuda T, Hishinuma T, Nakagawa N, Iwabuchi K, Tsukamoto H, Dai H, Chen Z, Watanabe T, Goto J, and Yanai K. The acute and chronic effects of antihistamines on methamphetamine-induced psychomotor activation in rats: The correlation to tissue metamphetamine concentrations. submitted

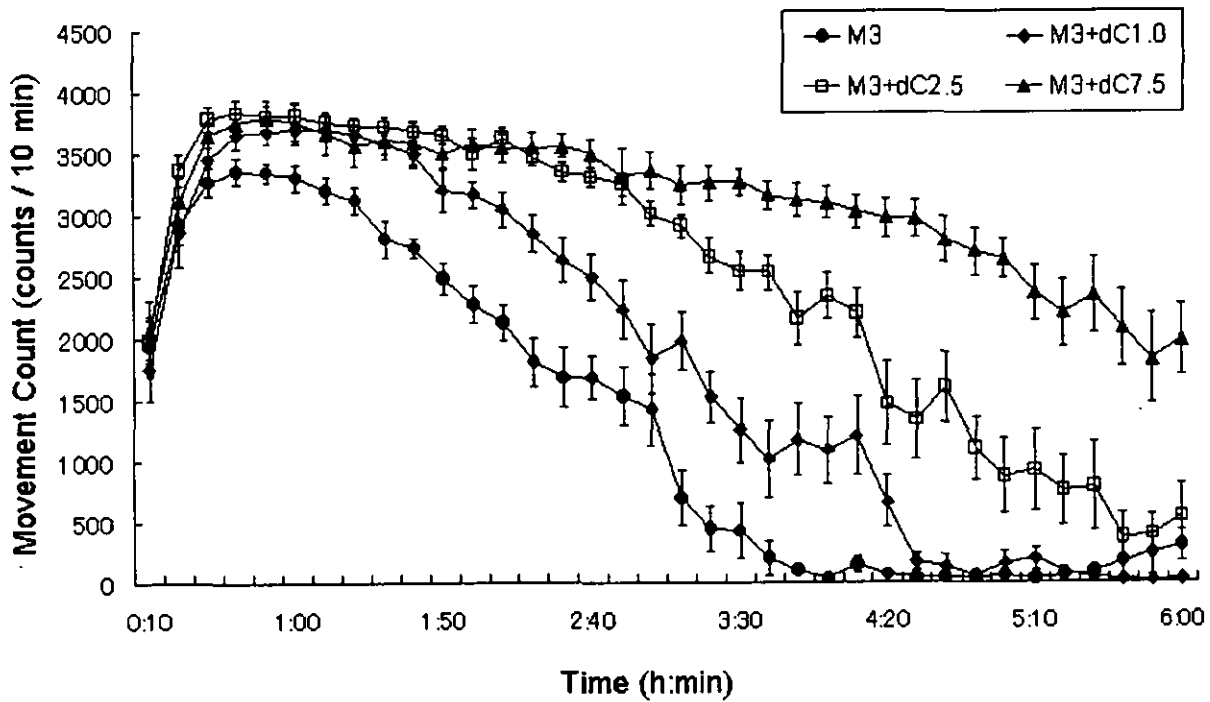


図1. クロルフェニラミンによる MAP 自発運動量増加への影響。MAP (3mg/kg) にクロルフェニラミン (1, 2, 3 mg/kg) を同時に投与したときの自発運動量の変化を示している。

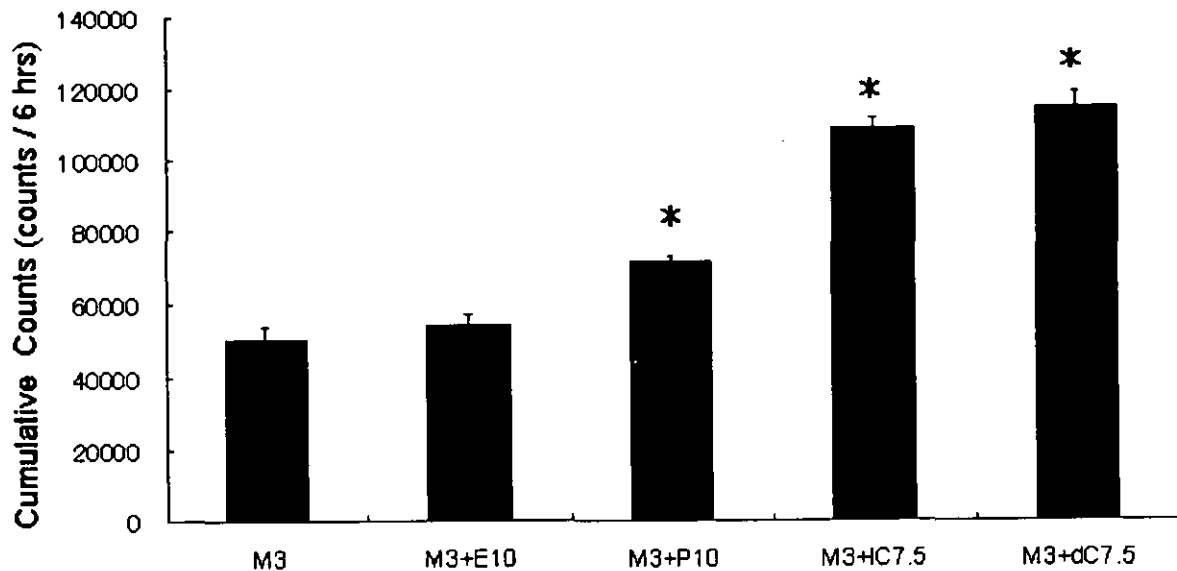


図2. MAP による自発運動量増加におけるエバスチン、ピリラミン、クロルフェニラミン (d 体、1 体) の効果。

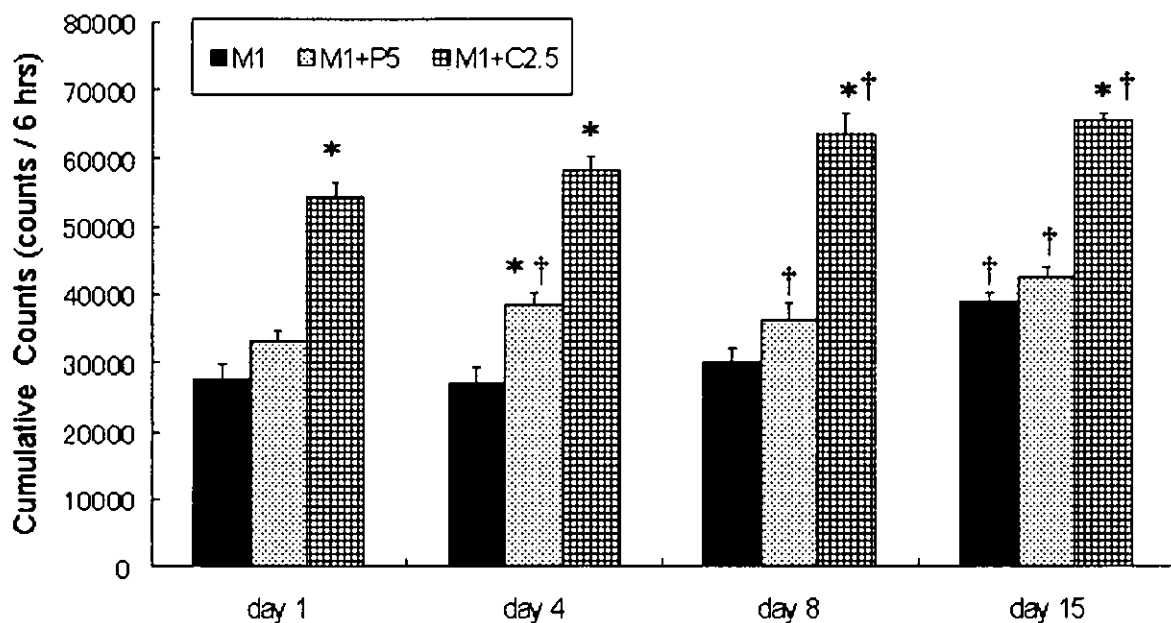
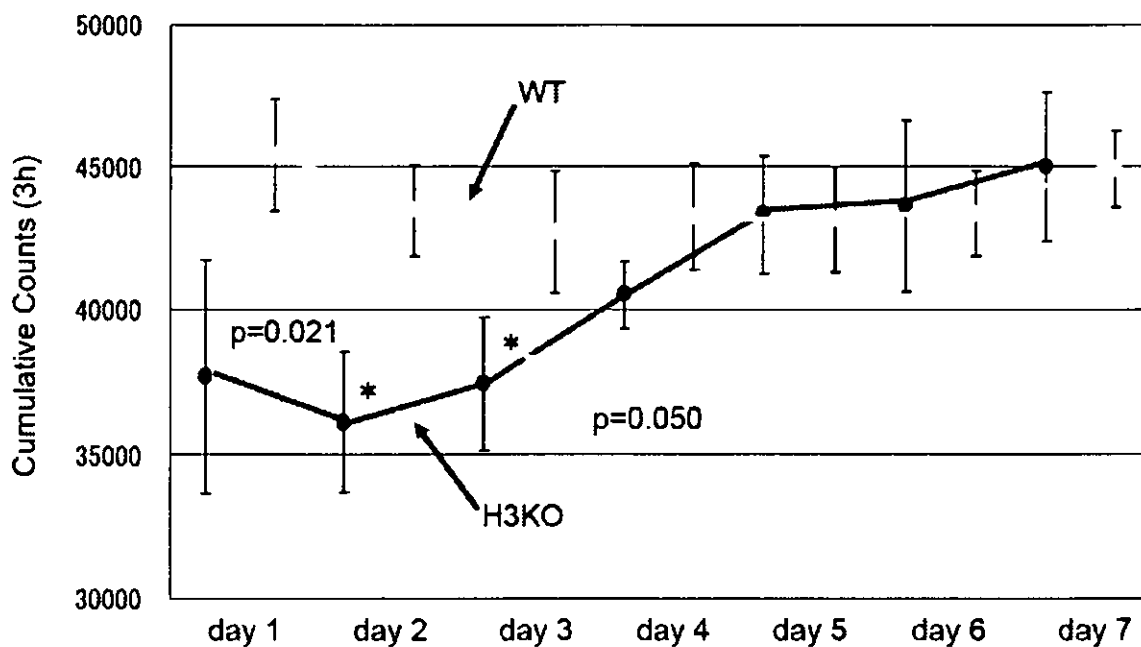


図3. MAP (1mg/kg) 連続投与時におけるピリラミン (5 mg/kg) とクロルフェニラミン (2.5 mg/kg) 併用の自発運動量への効果

A change in locomotor activity



* : $p < 0.05$, significantly lower than Wild type, analyzed by Wilcoxon rank sum test

図4. H3KOのMAP逆耐性形成過程。MAP (2 mg/kg) を投与してその自発運動量を計測した。H3KOとその野生型では明確な差が認められる。

表1. MAP (3 mg/kg) 単回投与時にクロルフェニラミン (dC, 7.5 mg/kg) 併用した場合のMAP組織内濃度。

	血清	全脳	線条体	残り
MAP(3)	11.1±2.7	135.6±47.5	95.1±11.9	80.9±13.1
MAP3+dC7.5	88.5±6.5**	649.6±69.3**	808.2±92.2	664.4±139.62.3**

(単位は ng/g tissue)

分担研究報告書

覚せい剤の神経毒性、体温変化に対するドーパミン・セロトニン神経系の関与

分担研究者:佐藤光源¹

研究協力者:沼知陽太郎²、小原可久²、山下元康²、近江香予²、福島 攝²、畑 春実²、小林秀昭²、沈 昊偉³、山本秀子³、池田和隆³、曾良一郎²³

(¹ 東北福祉大学大学院精神医学、² 東北大学大学院医学系研究科・精神・神経生物学分野、³ (財) 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)

【研究要旨】

覚醒剤(メタンフェタミン、MAP)の神経毒性と体温上昇作用には、主にドーパミン作動性神経系が関与すると考えられているが、セロトニン神経系の役割は明らかではない。我々はMAPの神経毒性と体温上昇作用におけるドーパミン、セロトニン神経伝達の役割を明らかにすることを目的に、MAPの主な作用分子であるドーパミントランスポーター(DAT)とセロトニントランスポーター(SERT)のノックアウト(KO)マウスにおけるMAPの神経毒性と体温上昇効果を調べた。野生型、DAT-KO、SERT-KOマウスではMAPで有意に体温が上昇、DAT/SERT-ダブルKOマウスでは、MAPにより逆に体温が有意に下降した。MAP45mg/kgによる致死率は、野生型マウスの19%に対して、DAT-KOマウスでは9%、SERT-KOマウスとSERT-ヘテロKOマウスで6%、DAT/SERT-ダブルKOマウスでは0%だった(n=8-16)。また、DAT/SERT-ダブルKOマウスで、選択的ノルエピネフリン(NE)取り込み阻害薬のニソキセチン(20mg/kg)は体温を上昇させたが、モノアミン取り込み阻害薬のメチルフェニデート(25mg/kg)、SSRIのフルオキセチン(20mg/kg)は体温を変化させなかった。

DAT/SERTダブルKOマウスでのMAPの体温下降は残存するノルエピネフリントランスポーター(NET)への作用が想定された。しかし、NET拮抗薬のニソキセチンは体温を上昇させたことから、MAPによる逆説的体温下降は、NETへの直接阻害効果ではなく、シナプス小胞への作用を含む複雑な機序が考えられた。さらに、MAPの急性毒性に関しても、DATのみならずSERT欠損が保護的に作用することから、ドーパミンに加えてセロトニン神経伝達がMAP急性毒性に関与することが示唆された。モノアミントランスポーターKOマウスは神経毒性と体温調節作用におけるモノアミン神経伝達の役割を明らかにする上で有用なモデルになることが期待される。

A. 目的

覚醒剤(メタンフェタミン:MAP、アンフェタミン)は、有機溶剤と並んで我が国で最も乱用される薬物である。覚醒剤は乱用により、頻脈、血圧上昇、不整脈、循環性虚脱、瞳孔散大、発熱、呼吸困難、けいれん等の身体症状と、不眠、不安、多幸感、気分昂揚、多動、常同行動、緊張などの精神症状を引き起こす。こうした症状の出現には大きな個人差があり、原因として体質的要因、耐性の形成、純度、他の併用薬物の影響などが想定されている¹。

覚醒剤はドーパミン(DA)、セロトニン、ノルアドレナリン全てのトランスポーターに結合するが、主な作用はDAの取り込み阻害と放出促進である。

この二つの作用は、神経細胞膜上のDATransポーター(DAT)と、シナプス小胞膜上のシナプス小胞モノアミントランスポーター(VMAT2)を介している。覚醒剤は、DATに対してDAと競合し、DATによって細胞内に輸送され、DAを細胞外に輸送させる(交換拡散モデル)。さらに覚醒剤は、VMAT2に対してもDAと競合して小胞内DAの蓄積を抑制し、DATによって細胞外へ放出されるDAの量を増加させる²。

実験動物では、覚醒剤の急性毒性と体温上昇作用は相関するとされている。覚醒剤による体温上昇作用は、DAアンタゴニストのハロペリドールで拮抗されるので、主にDA作動性神経系の関与が想定さ

れていた。体温調節にはモノアミン神経系が広範に関与することが知られているが、覚醒剤の体温上昇作用について、DA 以外のモノアミン神経系に関する研究は行われていなかった。また、覚醒剤の急性毒性に関しては、末梢のノルアドレナリン神経系の関与が知られているが、その他のモノアミン神経系の役割は不明である。

今年度我々は、覚醒剤の急性毒性と体温上昇作用に対するドーパミン、セロトニン神経伝達の関与を詳細に検討するため、MAP の主な作用分子であるドーパミントランスポーター(DAT)とセロトニントランスポーター(SERT)のノックアウト(KO)マウスにおける覚醒剤の急性毒性と体温上昇効果を調べた。

B. 方法

実験動物:

全ての実験は東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の許可のもとに行った。実験には18-32 週齢の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 DA-KO マウスと SERT-KO マウスを交配して作製した³。マウスの遺伝子型は、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/SERT のヘテロ KO と KO マウス、これらを交配して得られた計9つの遺伝子型、各群 n=8~16 について以下の実験を行った。

薬剤:

45mg/kg の塩酸 MAP(ヒロポン、大日本製薬、大阪)、20mg/kg の Fluoxetine hydrochloride (SIGMA 社、St Louis, MO, USA)、20mg/kg の Nisoxetine hydrochloride (SIGMA 社)を生理食塩水溶液にて腹腔内投与した。

体温測定:

薬剤を投与して0~60分後の体温変化を、15分おきに測定した。測定には Physitemp Instruments 社 (Clifton, NJ, USA)の体温測定装置 BAT-10 と、マウス直腸温測定プローブ RET-3 を用いた。

急性毒性:

急性毒性は、45mg/kg の塩酸 MAP 生理食塩水溶液を投与して1時間までの死亡を観察、死亡率を算出した。

統計解析:

薬物によるマウスの体温変化に関しては、one-way ANOVA を用いた。多重比較は Fischer もしくは Scheffe の方法を用いた。死亡率の比較については χ^2 乗検定を用いた。統計ソフトは Statview for Windows (Ver 5.0, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) を用いた。

C. 結果

DAT/SERT KO マウスの、メタンフェタミン(45mg/kg, i.p.)による体温変化:

表1のように、野生型を含むほとんどの遺伝子型のマウスで、MAP によって30-60分間に全て、有意に体温が上昇した(図1a-c)。DAT KO/SERT ヘテロ KO マウスでは、45分でのみ体温が上昇した(図1b)。DAT/SERT ダブルノックアウトマウスでは、MAP によって30-60分にかけて体温が下降した(図1c)。

表1 DAT/SERT KO マウスの、45mg/kg MAP による体温変化のまとめ

DAT	SERT	体温変化
+/+	+/+	↑
+/-	+/+	↑
-/-	+/+	↑
+/+	+/-	↑
+/-	+/-	↑
-/-	+/-	→
+/+	-/-	↑
+/-	-/-	↑
-/-	-/-	↓

図1a DAT KO マウスの、MAP による体温変化 (*: p<0.05, ANOVA)

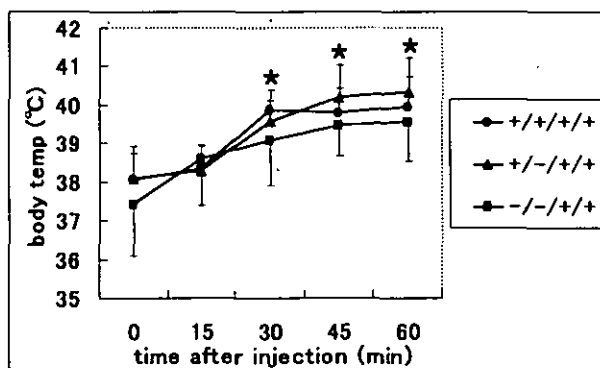


図1b DAT/SERT KO マウスの、MAP による
体温変化(SERT+/-) (*: p<0.05, ANOVA)

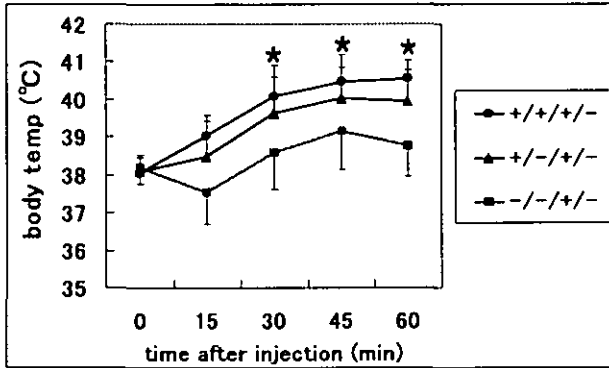
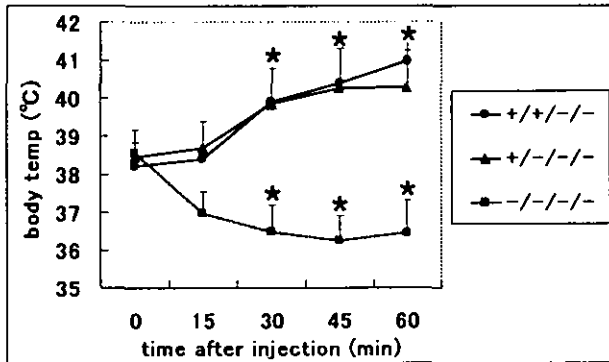


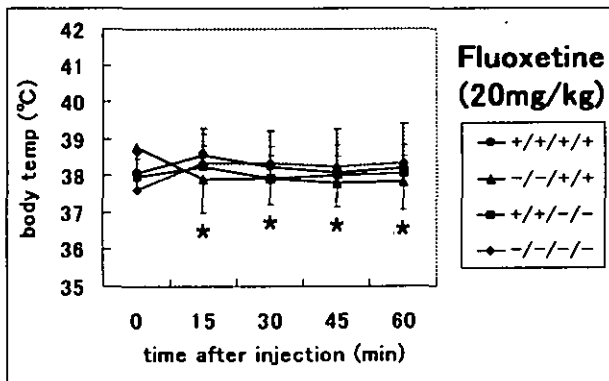
図1c DAT/SERT KO マウスの、MAP による
体温変化(SERT-/-) (*: p<0.05, ANOVA)



DAT/SERT KO マウスの、フルオキシセチン、ニソキセチン(20mg/kg, i.p.)、による体温変化:

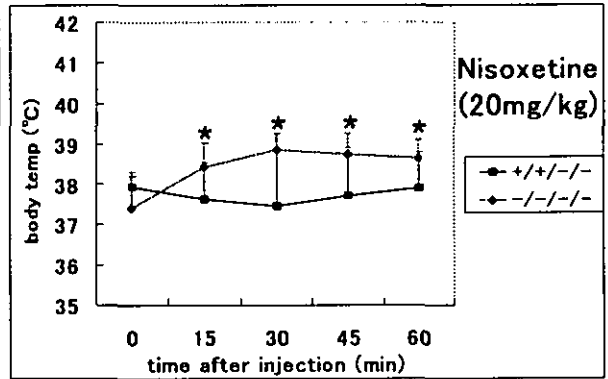
フルオキシセチンによって、DAT KO マウスの体温は有意に低下したが、野生型、SERT KO マウス、DAT/SERT ダブルノックアウトマウスの体温には変化がなかった(図2)。

図2 DAT/SERT KO マウスの、フルオキシセチンによる体温変化 (*: p<0.05, ANOVA)



ニソキセチンでは、DAT/SERT ダブルノックアウトマウスの体温が有意に上昇したが、野生型では変化がなかった(図3)。

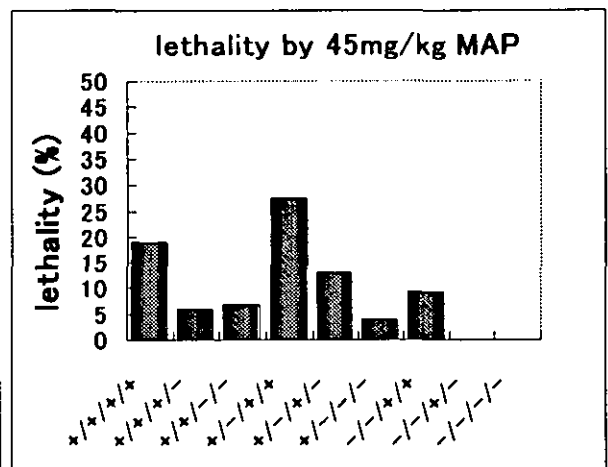
図3 DAT/SERT KO マウスの、ニソキセチンによる体温変化 (*: p<0.05, ANOVA)



DAT/SERT KO マウスの、メタンフェタミンによる急性毒性:

MAP 45mg/kg 投与時の死亡率は野生型に比べて DAT KO マウスで、さらに SERT KO マウスでも低かった(図4)。

図4 DAT/SERT KO マウスの、メタンフェタミンによる死亡率



考察

MAP は表1のように、野生型を含むほとんどの遺伝子型のマウスで、投与後 30-60 分の間に全て、有意に体温を上昇させた。DAT KO マウスに MAP 30 mg/kg を投与しても体温が上昇しなかったとの既報があり⁴、今回我々も、この結果を確認した。しかし今

回、45mg/kgのMAPではDAT KO マウスでも体温が上昇したことから、DAT KO マウスはMAPの体温上昇作用にある程度抵抗性であることが示された。さらに図1bのように、DAT KOにSERTヘテロKOが加わると、MAPの体温上昇作用が投与後45分のみで認められるようになった。従って、MAPの体温上昇作用には、DATだけではなくSERTも重要な役割を果たすことが示された。

MAPによって、DAT/SERTダブルノックアウトマウスの体温は逆説的に低下した。MAPはDATだけでなくSERT、ノルアドレナリントランスポーターにも結合するので、フルオキセチン、ニソキセチンによる体温変化を調べたが、MAPのように低下しなかった。また、DAT、SERTの単独欠損マウスではMAPで体温が上昇したので、DAT/SERTダブルノックアウトマウスのMAPによる体温低下は、DA神経系とセロトニン神経系の相互作用によるものと考えられる。

覚醒剤の神経毒性、急性毒性、体温上昇作用は相関するとされている。しかし、SERT KO マウスでは、MAPで体温は上昇するが、死亡率は低下していた。従って、今回の検討から、覚醒剤の急性毒性と体温上昇作用は必ずしも相関しないことが示された。さらに今回、覚醒剤の急性毒性に対してDAT欠損、SERT欠損がほぼ同様の保護作用があることが示された。今回の結果は、MAPの急性毒性に関しても、DAとセロトニンの相互作用を示唆するものと考えられる。

結論

DAT/SERTダブルノックアウトマウスでは、MAPによって逆説的に体温下降した。NET拮抗薬のニソキセチンは同マウスの体温を上昇させたので、MAPによる体温下降はNETへの直接阻害効果ではなく、シナプス小胞への作用を含む複雑な機序が考えられた。さらに、MAPの急性毒性に関しても、DATのみならずSERT欠損が保護的に作用することから、ドーパミンに加えてセロトニン神経伝達がMAP急性毒性に関与することが示唆された。モノアミントランスポーターKOマウスは神経毒性と体温調節作用におけるモノアミン神経伝達の役割を明らかにする上で有用なモデルになることが期待される。

【参考文献】

1. 佐藤光源 and 柏原健一 覚せい剤精神病. (1986).金剛出版, 東京.
2. Seiden L.S. et al. & Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33, 639-677. (1993).
3. Sora I. et al. & 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, 7699-7704. (1998).
4. Fumagalli F. et al. & Role of dopamine transporter in methamphetamine-induced neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *J Neurosci* 18, 4861-4869. (1998).

平成15年度 分担研究者氏名一覧