

訓練試行終了直後あるいは 30 分後に脳を摘出し、リン酸化 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 タンパクの発現を Western blotting 法により解析した。

5. 統計解析

結果はすべて平均値と標準誤差で示した。独立多試料間の比較は一元分散分析を用い、さらに各群の比較には、Student-Neuman-Keuls の多重比較検定を行った。2 群間の比較には Student の t 検定法を行った。いずれの検定においても、危険率 5% 以下で差が認められる場合を有意差有と判定した。

C. 研究結果

1. METH 誘発性認知記憶障害

METH (1-4 mg/kg) を訓練試行の前に単回投与しても保持試行における探索嗜好性は全く変化しなかった。一方、METH (1 mg/kg) を 7 日間連続投与すると、訓練から 1 時間後の保持試行では障害は認められなかったが、24 時間後の保持試行では探索嗜好性の有意な低下が認められた (Fig. 1A)。また、METH による認知記憶障害は、METH の断薬から 28 日間経過した後でも認められた (Fig. 1B)。

METH (1-10 mg/kg) を PPI 試験の直前に投与すると METH の用量に依存して PPI の減弱が観察され、METH (10 mg/kg) で有意差が認められた (Fig. 2A)。METH (1 mg/kg) を単回投与し、3 日間の断薬したマウスでは PPI の障害は認められなかったが、METH (1 mg/kg) を 7 日間連続投与し、3 日間の断薬したマウスでは PPI の有意な減弱が観察された。また、METH 誘発 PPI 障害は、METH の断薬から 10 日間経過した後でも認められた (Fig. 2B)。

2. METH による認知記憶障害に対する抗精神病

薬の効果

METH により誘発される認知記憶障害は、METH の断薬後も長期間持続することから、薬物の治療効果を評価することが可能である。そこで、METH 誘発性認知記憶障害に対する抗精神病薬の治療効果について検討した。抗精神病薬として clozapine (3 mg/kg, p.o.) と haloperidol (1 mg/kg, p.o.) を用い、METH の最終投与の翌日より 7 日間連続投与した。Clozapine は METH 誘発性認知記憶障害を有意に改善したが、haloperidol には効果は認められなかった (Fig. 3)。なお、clozapine および haloperidol は単回投与では効果を示さなかった。以上の結果より、METH 誘発性認知記憶障害の治療には clozapine が有効であることが示唆された。

3. METH による認知記憶障害の発現機序

METH の薬理作用にはドパミンが重要な役割を果たしているため、METH 誘発性認知記憶障害におけるドパミン作動性神経系の役割について検討した。

選択的ドパミン D1 受容体アンタゴニストの SCH23390 (0.03 mg/kg, i.p.) を METH と併用投与すると、METH 誘発性認知記憶障害の形成は抑制された (Fig. 4A)。一方、ドパミン D2 受容体アンタゴニストの raclopride (4 および 8 mg/kg, i.p.) 併用投与では METH 誘発性認知機能障害を抑制しなかった (Fig. 4B)。

次に、新奇 object に暴露した時のマウスの脳神経活動の変化と METH 連続投与の影響を Western blotting 法により解析した。訓練試行直後、マウスの前頭前皮質において、リン酸化 ERK 1/2 の増加が認められたが、訓練試行 30 分後では object に暴露しなかったコントロール群との間に有意な差は認められなかった (Fig. 5A)。一方、METH を反復投与したマウスでは、正常マウスで観察されたような ERK 1/2 のリン酸化の増加は認められなかった (Fig. 5B)。ERK 1/2 のリン酸化を制御す

る MAP kinase kinase (MEK) の阻害薬である SL-327 (30 および 50 mg/kg, i.p.) を訓練試行前に投与すると、訓練試行 24 時間後の保持試行における探索嗜好性が溶媒投与群に比べ有意に減少したが、訓練試行 1 時間後では SL-327 投与群とコントロール群との間に有意な変化は認められなかった (Fig. 6A)。さらに、MEK 阻害薬の PD-98059 (2 μ g/1 μ L/side) を訓練試行前に前頭前皮質に微量注入すると、24 時間後の保持試行における探索嗜好性が溶媒投与群に比べ有意に減少した (Fig. 6B)。

D. 考察

本研究において、METH (1 mg/kg) の単回投与では記憶障害が観察されず、METH を反復投与したマウスにおいて記憶障害が観察された。PPI 試験においても同様の結果が得られたことから低用量 METH の反復投与により記憶および感覚情報処理障害が誘発されると考えられる。また、METH を反復投与したマウスの認知記憶障害は訓練試行 24 時間後に認められたことから、METH 誘発性記憶障害は、記憶の獲得や短期的保持ではなく、長期固定の障害によるものと考えられる。さらに、METH 誘発性記憶障害は METH の断薬から 28 日後、METH 誘発性感覚情報処理障害は断薬から 10 日後まで継続したことから METH による認知障害は長期持続性であることが示唆された。

Clozapine は METH 誘発性記憶障害を改善したが、haloperidol には改善効果が認められなかった。この結果は、統合失調症の認知障害に対して非定型抗精神病薬である clozapine が改善効果を示すという臨床報告⁵⁾と一致するものであった。したがって、本研究において作製した認知記憶障害モデルは、覚醒剤依存のみならず統合失調症の認知障害を反映した動物モデルとして有用性が高いと考えられる。さらに、METH 誘発性認知記憶障

害はドパミン D1 受容体アンタゴニストにより抑制され、ドパミン D2 受容体アンタゴニストでは抑制されなかったことから、METH 誘発性認知記憶障害の形成にはドパミン D1 受容体の慢性的な刺激が重要であると考えられる。

ERK 1/2 はシナプス可塑性に関与しており、学習や記憶形成⁶⁻⁹⁾ および依存性薬物に対する行動変化¹⁰⁾ に関与していることが報告されている。これまでの研究から、シナプス可塑性や記憶形成における ERK 1/2 の活性化を引き起こす経路について、① Gs タンパクと共役している G-protein-coupled receptors (GPCRs) を介する経路、② NMDA 受容体を介した細胞内への Ca²⁺流入により活性化される CaMK II が関与する経路および③ Gq タンパクと共役している G-protein-coupled receptors (GPCRs) を介する経路が存在すると考えられている¹¹⁾。ドパミン D1 受容体は Gs タンパクと共役しており、D2 受容体は Gi タンパクと共役している。また、ERK 1/2 の活性化は、ドパミンやセロトニンの刺激後に起こることが報告されている¹²⁾。本研究において、MEK 阻害薬を前頭前皮質に微量注入すると、認知記憶障害が認められたことから、object 暴露による D1 受容体の刺激によって細胞内の cAMP 濃度が上昇し、この cAMP の濃度上昇に伴い ERK 1/2 が活性化されると考えられる。

以上の結果から、object に関する記憶の長期固定には前頭前皮質におけるドパミン D1 受容体を介した ERK1/2 の活性化が重要であることが示唆された。また、METH の連続投与によりドパミン D1 受容体が慢性的に刺激され、ドパミン D1 受容体を介した ERK 1/2 の活性低下により認知記憶が障害されることが示唆された。

E. 結論

METH の連続投与により長期持続性の認知記憶障害が誘発された。この METH 誘発性認知記憶

障害には、前頭前皮質のドパミン D1 受容体を介した ERK 1/2 の活性低下が関与していることが示唆された。METH 誘発性認知記憶障害の治療には clozapine が有効であった。本研究において作製した認知障害モデルは治療効果も確認できることから、覚醒剤精神病の認知記憶障害を反映した動物モデルとして有用性が高いと考えられた。

[参考文献]

- 1) Robinson, T.E. and Becker, J.B.: Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res.*, 396:157-198, 1986.
- 2) Bisagno, V., Ferguson, D. and Luine, V.N.: Short toxic methamphetamine schedule impairs object recognition task in male rats. *Brain Res.*, 940: 95-101, 2002.
- 3) Schroder, N., O'Dell, S.J. and Marshall, J.F.: Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse*, 49: 89-96, 2003.
- 4) Nagai, T., Yamada, K., Kim, H.C., et al.: Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *FASEB J.*, 17: 50-52, 2003.
- 5) Lee, M.A., Jayathilake, K. and Meltzer, H.Y.: A comparison of the effect of clozapine with typical neuroleptics on cognitive function in neuroleptic-responsive schizophrenia. *Schizophr Res.*, 37: 1-11, 1999.
- 6) English, J.D. and Sweatt, J.D.: Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *J. Biol. Chem.*, 271: 24329-24332, 1996.
- 7) Valjent, E., Caboche, J. and Vanhoutte, P.: Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase induced gene regulation in brain: a molecular substrate for learning and memory? *Mol. Neurobiol.*, 23: 83-99, 2001.
- 8) Adams, J.P. and Sweatt, J.D.: Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 42: 135-163, 2002.
- 9) Kelly, A., Laroche, S. and Davis, S.: Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J. Neurosci.*, 23: 5354-5360, 2003.
- 10) Valjent, E., Corvol, J.C., Pages, C., et al.: Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J. Neurosci.*, 20: 8701-8709, 2000.
- 11) Valjent, E., Caboche, J., Vanhoutte, P.: Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase induced gene regulation in brain: a molecular substrate for learning and memory? *Mol. Neurobiol.*, 23: 83-99, 2001.
- 12) Ambrosini, A., Tininini, S., Barassi, A., et al.: cAMP cascade leads to Ras activation in cortical neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 75: 54-60, 2000.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakajima, A., Yamada, K., Nagai, T., Uchiyama, T., Miyamoto, Y., Mamiya, T., Nitta, A., Mizuno, M., Tran, M.H., Seto, A., Yoshimura, M., Kitaichi, K., Hasegawa, T., Saito, K., Yamada, Y., Seishima, M., Sekikawa, K., Kim, H.C. and Nabeshima, T.: Role of TNF- α in methamphetamine-induced drug dependence and neurotoxicity. *J. Neurosci.*, 24: 2212-2225, 2004.

- 2) Nagai, T., Yamada, K., Yoshimura, M., Ishikawa, K., Miyamoto, Y., Hashimoto, K., Noda, Y., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Tissue plasminogen activator-plasmin system participates in the rewarding effect of morphine by regulating dopamine release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 3650-3655, 2004.
- 3) Mizoguchi, H., Yamada, K., Mizuno, M., Mizuno, T., Nitta, A., Noda, Y., and Nabeshima, T.: Regulations of methamphetamine reward by extracellular signal-regulated kinase 1/2/ets-like gene-1 signaling pathway via the activation of dopamine receptors. *Mol. Pharmacol.*, 65: 1293-1301, 2004.
- 4) Zeng, N., Nakajima, A., He, J., Nitta, A., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Fos expression associated with the discriminative stimulus effects of methamphetamine in rats. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1025: 236-241, 2004.
- 5) Yan, Y., Mizuno, T., Nitta, A., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Nefiracetam attenuates methamphetamine-induced discriminative stimulus effects in rats. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1025: 274-278, 2004.
- 6) Nakajima, A., Yamada, K., He, J., Zeng, N., Nitta, A. and Nabeshima, T.: Anatomical substrates for the discriminative stimulus effects of methamphetamine in rats. *J. Neurochem.*, 91: 308-317, 2004.
- 7) Nagai, T., Noda, Y., Ishikawa, K., Miyamoto, Y., Yoshimura, Y., Ito, M., Takayanagi, M., Takuma, K., Yamada, K. and Nabeshima, T.: The role of tissue plasminogen activator in methamphetamine-related reward and sensitization. *J. Neurochem.*, in press.
- 8) Kamei, H., Nagai, T., Nakano, H., Togan, Y., Takayanagi, M., Takahashi, K., Kobayashi, K., Yoshida, S., Maeda, K., Takuma, K., Nabeshima, T. and Yamada, K.: Repeated methamphetamine treatment impairs recognition memory through a failure of novelty-induced ERK1/2 activation in the prefrontal cortex of mice. submitted.
2. 総説・著書
- 1) Yamada, K. and Nabeshima, T.: Pro- and anti-addictive neurotrophic factors and cytokines in psychostimulant addiction (Review). *Ann. NY Acad. Sci.*, 1025: 198-204, 2004.
- 2) Yamada, K., Mizuno, M. and Nabeshima, T.: Interaction of BDNF/TrkB signaling and NMDA receptors in learning and memory. *Drug News Perspect.*, 17: 1-4, 2004.
- 3) Nabeshima, T., Tran, M.H., Kim, H.C. and Yamada, K.: Oxidative stress mechanism of amyloid β -peptide-induced impairment of neurotransmission and memory. *Method Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 26: 1-3, 2004.
- 4) Yamada, K. and Nabeshima, T.: Nitric oxide in learning and memory, In *From Messengers to Molecules: Memories are Made of These* (G. Riedel and B. Platt, eds) p480-491, Georgetown, Texas, LANDES BIOSCIENCE, 2004.
- 5) Yamada, K., Nagai, T. and Nabeshima, T.: Drug dependence, synaptic plasticity and tissue plasminogen activator (Review). *J. Pharmacol. Sci.*, in press.
- 6) 山田清文、永井 拓、中島 晶、鍋島俊隆.: 覚せい剤および麻薬に共通する依存関連分子の検索. *日本薬理学雑誌*, 印刷中、2005.
3. 学会発表
- 1) 山田清文、永井拓、Yan Yijin、亀井浩行、野田幸裕、新田淳美、鍋島俊隆: モルヒネの報酬効果における組織プラスミノゲン活性化

- 因子-プラスミン系の関与 (シンポジウム)
第 77 回日本薬理学会年会 (大阪), (2004.3).
- 2) 山田清文、鍋島俊隆：覚せい剤および麻薬依存に共通する内因性 anti-addictive および pro-addictive substances. (シンポジウム：薬物依存の分子機構) 第 31 回トキシコロジー学会学術年会 (大阪), (2004.7).
 - 3) 永井拓, 亀井浩行, 中野寛子, 東岸由里子, 小林香奈, 田熊一浩, 鍋島俊隆, 山田清文: メタンフェタミン誘発認知障害におけるドパミン作動性神経系の関与, 第 10 回日本行動薬理研究会 (栗駒), (2004, 8).
 - 4) 山田清文、永井 拓、新田淳美、鍋島俊隆：覚醒剤および麻薬依存に共通する依存関連分子の検索、薬理学セミナー2004 (神奈川), (2004. 8).
 - 5) 東岸由里子, 亀井浩行, 永井拓, 田熊一浩, 中野寛子, 鍋島俊隆, 山田清文: メタンフェタミン誘発性認知障害におけるドパミン及び NMDA 受容体の関与, 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学会大会合同大会 (Neuro 2004) (大阪), (2004, 9).
 - 6) Yamada K, Hashimoto K, Nagai T, Kamei H, Takuma K and Nabeshima T: Involvement of tissue plasminogen activator-plasmin system in the modulation of depolarization-evoked dopamine release. 34th Meeting of Society for Neuroscience (San Diego), (2004. 10).
 - 7) 小林香奈, 永井拓, 亀井浩行, 中野寛子, 東岸由里子, 田熊一敬, 鍋島俊隆, 山田清文: 認知記憶における extracellular signal-regulated kinase の関与, 第 106 回日本薬理学会近畿部会 (京都), (2004, 11).
 - 8) 亀井浩行、永井 拓、東岸由里子、小林香奈、中野寛子、田熊一敬、鍋島俊隆、山田清文: メタンフェタミン誘発性認知障害に対する抗精神病薬の効果, 第 8 回ニコチン・薬物依存研

究フォーラム学術年会 (名古屋), (2005, 3).

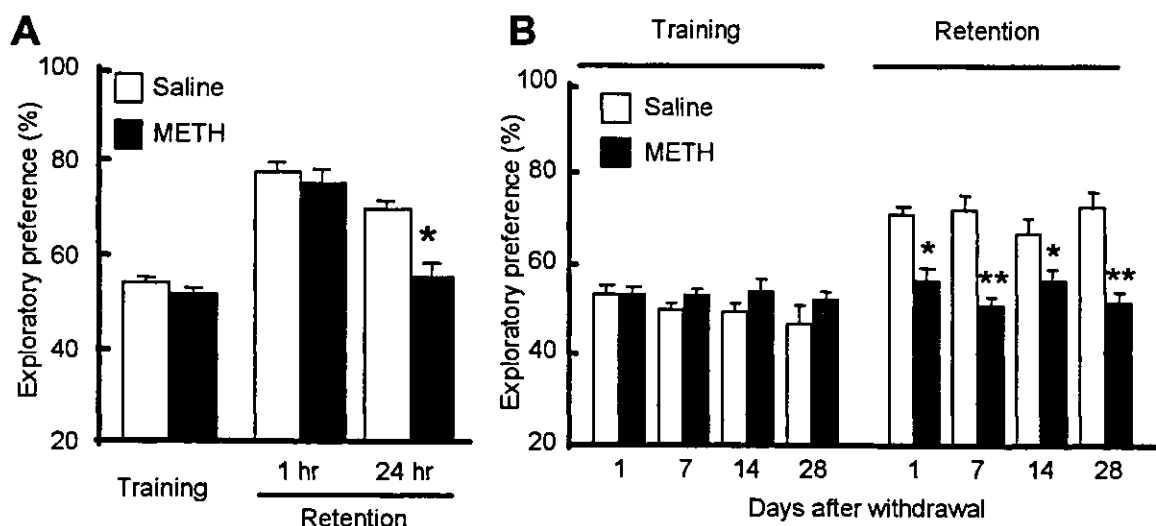


Fig. 1 Effect of repeated administration of METH on performance in NORT. (A) METH-induced cognitive impairment in the retention session 1hr or 24 hr after the training. One day after the last treatment with saline (n=24) or METH (n=24, 1mg/kg, SC, for 7 days), NORT was performed. Retention sessions were performed either 1 hr (n=12) or 24 hr (n=12) after the training session. Values indicate the mean \pm SE (n=12-24). *P<0.05 versus the corresponding saline-treated group. (B) METH-induced cognitive impairment following various periods of withdrawal from METH. One, 7, 14 or 28 days after the withdrawal of METH (1mg/kg, SC, for 7 days), NORT was performed. Values indicate the mean \pm SE (n=10-12). *P<0.05 and **P<0.01 versus the corresponding saline-treated group.

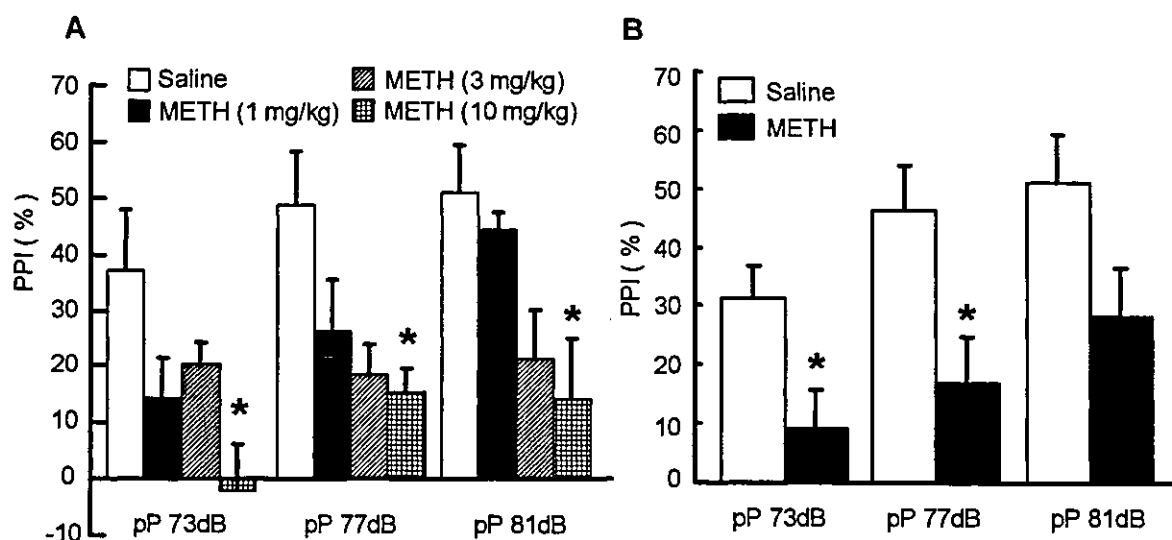


Fig. 2 Effects of acute and repeated administration of METH on performance in PPI test. PPI test was carried out (A) 10 min after acute administration of METH (1-10 mg/kg) or (B) 10 days after the withdrawal of repeated administration of METH (1 mg/kg for 7 days). Values indicate the mean \pm SE (n=9-14) *P<0.05 versus the corresponding saline-treated group.

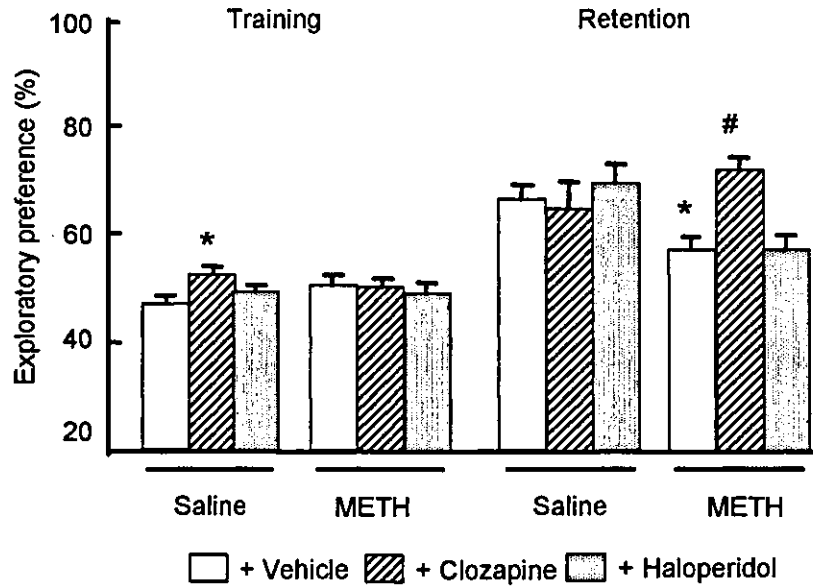


Fig. 3 Effects of clozapine and haloperidol on METH-induced cognitive impairment in NORT. Clozapine (3 mg/kg, PO) or haloperidol (1 mg/kg, PO) was administered once a day for 7 days to mice that had previously been treated with saline or METH (1 mg/kg, SC) for 7 days. NORT was performed 24 hr after the last treatment with clozapine or haloperidol. Values indicate the mean \pm SE (n=14-16). *P<0.05 versus vehicle-treated control group, #P<0.05 versus vehicle-treated METH group.

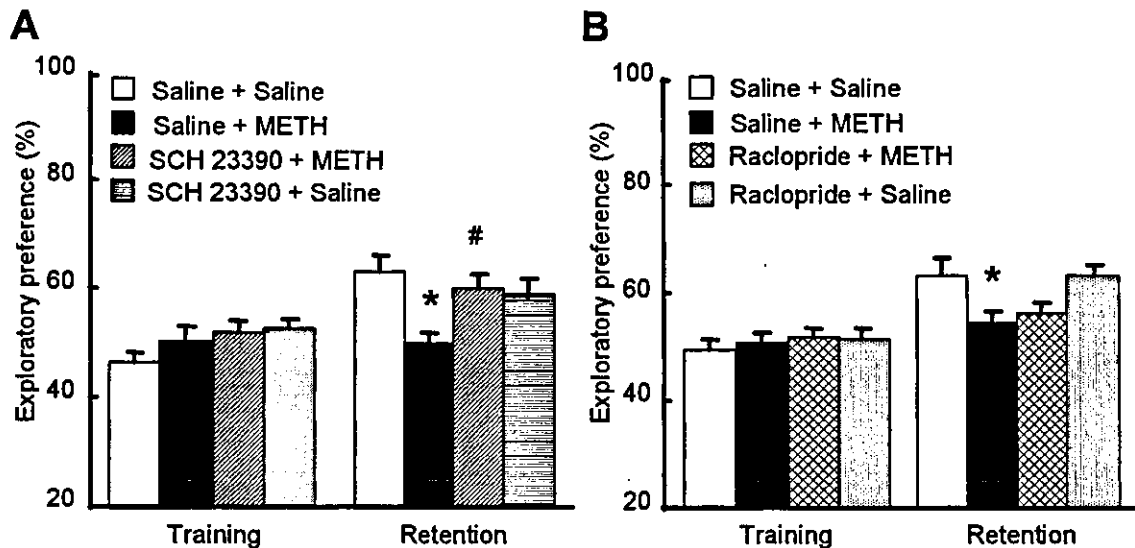


Fig. 4 Effects of SCH23390 (A) and raclopride (B) on METH-induced cognitive impairment in NORT. SCH 23390 (0.03 mg/kg, SC) or raclopride (8 mg/kg, IP) was administered 15 min or 60 min, respectively, before every treatment with METH (1 mg/kg, SC) for 7 days. NORT was performed 24 hr after the last treatment with them. Values indicate the mean \pm SE (n=14-18). *P<0.05 versus vehicle-treated control group, #P<0.05 versus vehicle-treated METH group.

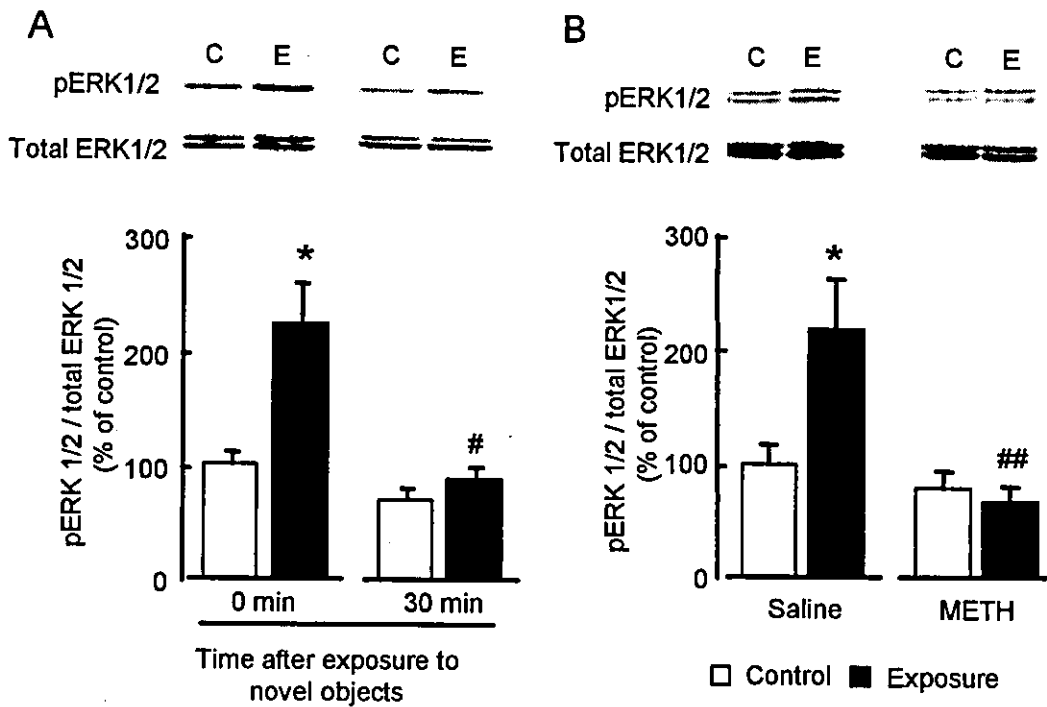


Fig. 5 Changes in ERK1/2 phosphorylation in the prefrontal cortex of mice exposed to novel objects. Control (C); mice were not exposed to novel objects in training session, Exposure (E); mice were exposed to novel objects in training session. Values indicate the mean \pm SE (n=5-6). *P<0.05 versus control group. #P<0.05, ##P<0.01 versus exposed group.

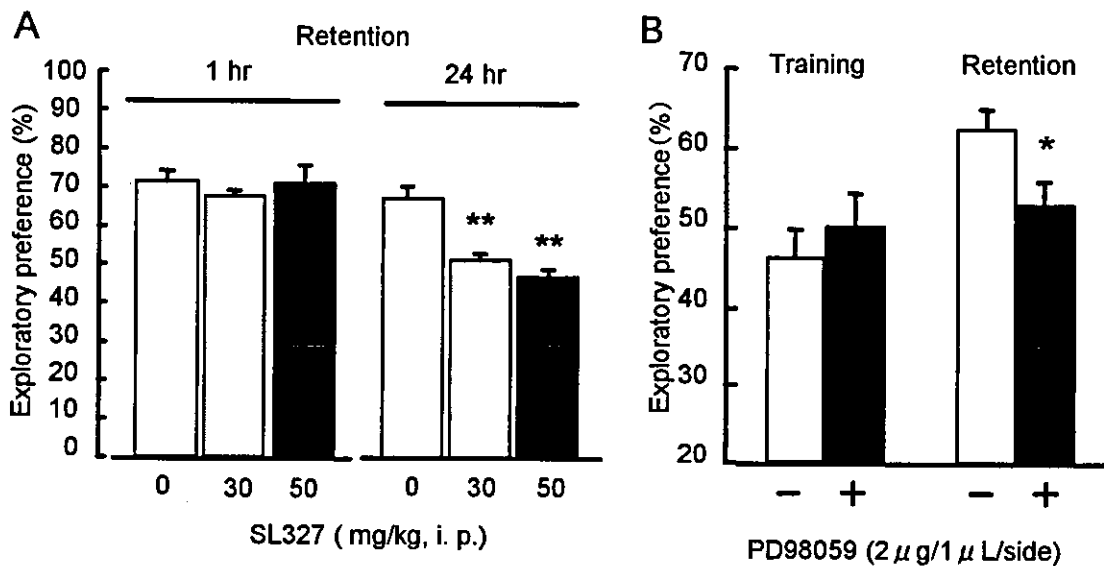


Fig. 6 Effects of SL327 and PD98,059 on performance in NORT. (A) SL327 (30 or 50 mg/kg) was injected i.p. 60 min before the training session, and retention session was carried out 1 or 24 hr after the training. (B) PD98059 (2 µg/1 µL/side) was microinjected bilaterally into the prefrontal cortex (A +1.5, L \pm 0.5 from bregma, V -2.0 from the skull) 20min before the training session, and retention session was carried out 24 hr after the training. Values indicate the mean \pm SE (n=6-10). *P<0.05 and **P<0.01 versus vehicle-treated group.

覚醒剤による行動異常およびドパミン神経系の障害における

ミノサイクリンの効果：ミクログリアの関与

分担研究者：伊豫 雅臣

研究協力者：張 淋、清水 栄司、橋本 謙二

（千葉大学大学院医学研究院・精神医学）

[研究要旨]

本研究では、覚醒剤投与によって引き起こされる行動異常およびドパミン神経系の神経障害におけるグリア細胞の一つであるミクログリアの関与について検討した。覚醒剤投与による過活動は、ミノサイクリンの前投与によって用量依存的に抑制した。また覚醒剤の繰り返し投与（1日1回5日間）による逆耐性の形成は、ミノサイクリンの前投与によって有意に抑制された。さらに覚醒剤投与によるマウス脳内ドパミン神経系の障害は、ミノサイクリンの投与によって有意に抑制されることが判った。免疫組織化学的手法により、覚醒剤投与による脳内のミクログリアの活性化はミノサイクリンの前投与により有意に抑制した。以上の結果より、覚醒剤投与による行動異常およびドパミン神経系の障害にミクログリアが関与している可能性が示唆された。さらに、ミノサイクリンは臨床的に使用されている薬剤であるため、覚醒剤投与による精神障害および神経障害の治療薬として有用であると思われる。

A. 研究目的

覚醒剤を乱用すると脳内のドパミン神経系が障害を受けることが知られているが、現在のところ、詳細なメカニズムは明らかにされていない。一方、最近の研究より、覚醒剤の投与によって脳内のグリア細胞の一つであるミクログリアが活性化することが報告されている(1,2)。またミクログリアの活性化を抑制する作用を有する抗生物質ミノサイクリンが、いろいろな神経障害に対して神経保護作用を有することが報告されている(3-5)。

本研究では、覚醒剤投与による行動異常（急性の過活動と繰り返し投与による逆耐性形成）およ

び脳内ドパミン神経系の障害に及ぼすミノサイクリンの効果を調べた。

B. 研究方法

1. 実験動物

行動実験には7週齢の雄性 ddY マウス（日本エス・エル・シー社）を使用した。神経障害の実験には、7週齢の雄性 Balb/C マウス（日本チャールズ・リバー社）を使用した。

急性の行動実験では、ミノサイクリン（10, 20 or 40 mg/kg, IP）を前投与し、覚醒剤（3 mg/kg, SC）を投与した。行動評価は覚醒剤投与1時間前から行い、覚醒剤投与2時間後まで合計3時間観察した。逆耐性形成の実験では、ミノサイクリン（40

mg/kg, IP) を投与し30分後に、覚醒剤 (3 mg/kg, SC) を投与した。この投与を1日に1回5日間行い、1週間以上の断薬した後、覚醒剤 (1 mg/kg, SC) を投与して行動評価を行なった。

ドパミン神経系の障害の実験では、覚醒剤 (3 mg/kg, SC) を3時間間隔で3回投与した。ミノサイクリン (10, 20 or 40 mg/kg, IP) を覚醒剤投与30分前、およびその後、12時間間隔でミノサイクリンを投与し、覚醒剤投与3日後にマウスを断頭、あるいはかん流固定した。前頭皮質および線条体のドパミンおよび代謝物DOPACは、HPLCで測定した。またドパミントランスポータの免疫組織化学を行なった。さらに、ミクログリアの活性化を観察するためにCD11b免疫組織化学を同様に行なった。

C. 研究結果

覚醒剤 (3 mg/kg) 投与による過活動は、ミノサイクリン (10, 20 or 40 mg/kg) の前投与によって用量依存的に抑制した。また覚醒剤(3 mg/kg)の繰り返し投与 (1日1回5日間) による逆耐性の形成は、ミノサイクリン (40 mg/kg) の前投与によって有意に抑制された。

さらに覚醒剤 (3 mg/kg x 3) の投与による前頭皮質および線条体におけるドパミンおよびその代謝物DOPACの減少は、ミノサイクリンの前投与によって有意に抑制された。さらに免疫組織化学において、覚醒剤投与によるマウス線条体におけるドパミントランスポータの密度の減少およびミクログリアの活性化は、ミノサイクリンの前投与によって有意に改善された。

D. 考察

幾つかの報告により、覚醒剤投与によるドパミン神経系の障害にミクログリアの関与が指摘されている (1,2)。以上の結果より、ミノサイクリンは覚醒剤投与によるミクログリアの活性化を

抑制することにより、覚醒剤投与による脳内ドパミン神経系の障害を抑制しているものと推測される。覚醒剤投与による行動異常 (急性投与による過活動および繰り返し投与による逆耐性の形成) におよぼすミノサイクリンの作用に、ミクログリアが関与しているかどうかは、今後詳細に検討する必要がある。

E. 結論

ミノサイクリンは抗生物質として臨床的に使用されている薬剤であるため、安全性は高い薬剤である。本研究の結果より、ミノサイクリンは覚醒剤投与による精神障害および神経障害の治療薬として有用であると思われる。

[参考文献]

1. Thomas DM et al. Methamphetamine neurotoxicity in dopamine nerve endings of the striatum is associated with microglial activation. *JPET* 311: 1-7, 2004
2. LaVoie MJ et al. Microglial activation precedes dopamine terminal pathology in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Exp Neurol* 187: 47-57, 2004.
3. Thomas M and Le WD. Minocycline: neuroprotective mechanisms in Parkinson's disease. *Curr Pharm Des* 10: 679-686, 2004.
4. Domercq M and Matute C. Neuroprotection by minocyclines. *TIPS* 25: 609-612, 2004.
5. Yong VW et al. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol* 3: 744-751, 2004.

F. 研究発表

1. 論文発表
1. Itoh, K., Hashimoto, K., Kumakiri, C., Shimizu, E., Iyo, M. (2004) Association between brain-derived neurotrophic factor 196 G/A

- polymorphism and personality traits in healthy subjects. *Am J Med Genet* 124B, 61-63.
2. Hashimoto, K., Fukushima, T., Shimizu, E., Okada, S., Komatsu, N., Okamura, N., Koike, K., Koizumi, H., Kumakiri, C., Imai, K., Iyo, M. (2004) Possible role of D-serine in the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28, 385-388.
 3. Fujisaki, M., Hashimoto, K., Iyo, M., Chiba, T. (2004) Role of amygdalo-hippocampal transition area in the fear expression: evaluation by behavior and immediate early gene expression. *Neuroscience* 124, 247-260.
 4. Okamura, N., Hashimoto, K., Shimizu, E., Kumakiri, C., Komatsu, N., Iyo, M. (2004) Adenosine A₁ receptor agonists block the neuropathological changes in rat retrosplenial cortex after administration of the NMDA receptor antagonist dizocilpine. *Neuropsychopharmacol* 29, 544-550.
 5. Koizumi, H., Hashimoto, K., Kumakiri, C., Shimizu, E., Sekine, Y., Ozaki, N., Inada, T., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Takei, N., Iyo, M. (2004) Association between the glutathione S-transferase M1 gene deletion and female methamphetamine abusers. *Am J Med Genet* 126B, 43-45.
 6. Nomura F, Tomonaga T, Sogawa K, Ohashi T, Nezu M, Sunaga M, Kondo N, Iyo M, Shimada H, Ochiai T. (2004) Identification of novel and downregulated biomarkers for alcoholism by surface enhanced laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Proteomics* 4, 1187-94.
 7. Suzuki K, Takei N, Iwata Y, Sekine Y, Toyoda T, Nakamura K, Minabe Y, Kawai M, Iyo M, Mori N. (2004) Do olfactory reference syndrome and jiko-shu-kyofu (a subtype of taijin-kyofu) share a common entity? *Acta Psychiatr Scand* 109, 150-155.
 8. Ozawa K, Kobayashi K, Noda S, Iyo M. (2004) Zonisamide-induced depression and mania in patients with epilepsy. *J Clin Psychopharmacol* 24, 110-111.
 9. Shimizu, E., Hashimoto, K., Iyo, M. (2004) Ethnic difference of the BDNF 196G/A (val66met) polymorphism frequencies: the possibility to explain ethnic mental traits. *Am J Med Genet* 126B, 122-123.
 10. Koike, K., Hashimoto, K., Okamura, N., Ohgake, S., Shimizu, E., Koizumi, H., Komatsu, N., Iyo, M. (2004) Decrease of cell proliferation in the dentate gyrus of hippocampus of alpha-7 nicotinic receptor heterozygous mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28, 517-520.
 11. Koizumi, H., Hashimoto, K., Itoh, K., Nakazato, M., Shimizu, E., Ohgake, S., Koike, K., Okamura, N., Matsushita, S., Suzuki, K., Murayama, M., Higuchi, S., Iyo, M. (2004) Association between the brain-derived neurotrophic factor 196G/A polymorphism and eating disorders. *Am J Med Genet* 127B, 125-127.
 12. Yanahashi, S., Hashimoto, K., Hattori, K., Yuasa, S., Iyo, M. (2004) Role of NMDA receptor subtypes in the induction of catalepsy and increase in Fos protein expression after administration of haloperidol. *Brain Res* 1011, 84-93.
 13. Hashimoto, K., Shimizu, E., Iyo, M. (2004) Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Rev* 45, 104-114.
 14. Hashimoto, K., Okamura, N., Shimizu, E., Iyo, M. (2004) Glutamate hypothesis of schizophrenia and approach for possible therapeutic drugs. *Curr*

- Med Chem-CNS Agents 4, 147-154.
15. Shimizu, E., Hashimoto, K., Kobayashi, K., Mitsumori, M., Ohgake, S., Koizumi, H., Okamura, N., Koike, K., Kumakiri, C., Nakazato, M., Komatsu, N., Iyo, M. Lack of association between angiotensin I-converting enzyme (ACE) insertion (I)/deletion (D) gene functional polymorphism and panic disorder. *Neurosci Lett* 363, 81-83.
 16. Fukami, G., Hashimoto, K., Koike, K., Okamura, N., Shimizu, E., Iyo, M. (2004) Effect of antioxidant N-acetyl-L-cysteine on behavioral changes and neurotoxicity in rats after administration of methamphetamine. *Brain Res* 1016, 90-95.
 17. Ota T, Shinotoh H, Fukushi K, Nagatsuka S, Namba H, Iyo M, Aotsuka A, Tanaka N, Sato K, Shiraishi T, Tanada S, Arai H, Irie T. (2004) A simple method for the detection of abnormal brain regions in Alzheimer's disease patients using [¹¹C]MP4A: comparison with [¹²³I]IMP SPECT. *Ann Nucl Med* 18, 187-193.
 18. Sato K, Fukushi K, Shinotoh H, Nagatsuka S, Tanaka N, Aotsuka A, Ota T, Shiraishi T, Tanada S, Iyo M, Irie T. (2004) Evaluation of Simplified Kinetic Analyses for Measurement of Brain Acetylcholinesterase Activity Using N-[¹¹C]Methylpiperidin-4-yl Propionate and Positron Emission Tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 600-611.
 19. Hashimoto, K., Tsukada, H., Nishiyama, S., Fukumoto, D., Kakiuchi, T., Shimizu, E., Iyo, M. (2004) Protective effects of N-acetyl-L-cysteine on the reduction of dopamine transporters in striatum of monkeys treated with methamphetamine. *Neuropsychopharmacology* 29, 2018-2023.
 20. Shimizu, E., Otsuka, A., Hashimoto, K., Iyo, M. (2004) Blepharospasm associated with olanzapine: a case report. *Eur Psychiatry* 19, 389.
 21. Kubota, O., Hattori, K., Hashimoto, K., Yagi, T., Sato, T., Iyo, M., Yuasa, S. (2004) Auditory-conditioned-fear-dependent c-Fos expression is altered in the emotion-related brain structures of Fyn-deficient mice. *Mol Brain Res* 130, 149-160.
 22. Nakazato, M., Hashimoto, K., Shiina, A., Koizumi, H., Mitsumori, M., Imai, M., Shimizu, E., Iyo, M. (2004) No changes in serum ghrelin levels in female patients with bulimia nervosa. *Prog Neuropharmacol Biol Psychiatry* 28, 1181-1184.
 23. Hashimoto, K., Tsukada, H., Nishiyama, S., Fukumoto, D., Kakiuchi, T., Shimizu, E., Iyo, M. (2004) Protective effects of N-acetyl-L-cysteine on the reduction of dopamine transporters in striatum of monkeys treated with methamphetamine. *Ann N Y Acad Sci* 1025, 231-235.
 24. Iwata N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Ujike H, Ozaki N. (2004) No Association Is Found between the Candidate Genes of t-PA/Plasminogen System and Japanese Methamphetamine-Related Disorder: A Collaborative Study by the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1025, 34-38.
 25. Inada T, Iijima Y, Uchida N, Maeda T, Iwashita S, Ozaki N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iyo M, Sora I, Ujike H. (2004) No Association Found between the Type 1 Sigma Receptor Gene Polymorphisms and Methamphetamine Abuse in the Japanese

- Population: A Collaborative Study by the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1025, 27-33.
26. Kobayashi H, Ide S, Hasegawa J, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Shen HW, Ikeda K, Sora I. (2004) Study of Association between alpha-Synuclein Gene Polymorphism and Methamphetamine Psychosis/Dependence. *Ann N Y Acad Sci* 1025, 325-334.
 27. Ide S, Kobayashi H, Tanaka K, Ujike H, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Ikeda K, Sora I. (2004) Gene polymorphisms of the mu opioid receptor in methamphetamine abusers. *Ann N Y Acad Sci* 1025, 316-24.
 28. Harano M, Uchimura N, Abe H, Ishibashi M, Iida N, Yanagimoto K, Tanaka T, Maeda H, Sora I, Iyo M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Ujike H. (2004) A Polymorphism of DRD2 Gene and Brain Atrophy in Methamphetamine Psychosis. *Ann N Y Acad Sci* 1025, 307-15.
 29. Iyo M, Sekine Y, Mori N. (2004) Neuromechanism of developing methamphetamine psychosis: a neuroimaging study. *Ann N Y Acad Sci* 1025, 288-95.
 30. Itoh, K., Hashimoto, K., Shimizu, E., Sekine, Y., Ozaki, N., Inada, T., Harano, M., Iwata, N., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Nakata, K., Ujike, H., Iyo, M. (2004) Association study of the brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and methamphetamine abusers in Japan. *Am J Med Genet* 132B, 70-73.
 31. Okamoto H, Shimizu E, Ozawa K, Hashimoto K, Iyo M. (2005) Lithium augmentation in milnacipran-refractory depression for the prevention of relapse following electroconvulsive therapy. *Aust N Z J Psychiatry* 39, 108.
 32. Ogai M, Iyo M, Mori N, Takei N. (2005) A right orbitofrontal region and OCD symptoms: a case report. *Acta Psychiatr Scand* 111, 74-76.
 33. Koike, K., Hashimoto, K., Fukami, G., Okamura, N., Zhang, L., Ohgake, S., Koizumi, H., Matsuzawa, D., Kawamura, N., Shimizu, E., Iyo, M. (2005) The immunophilin ligand FK506 protects against methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in mouse striatum. *Neuropharmacology* 48, 391-7.
 34. Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindstrom, L.H., Iyo, M. (2005) Elevated glutamine/glutamate ratio in cerebrospinal fluid of first episode and drug naive schizophrenic patients. *BMC Psychiatry* 5, 6.
 35. Koizumi, H., Hashimoto, K., Shimizu, E., Mashimo, Y., Hata, A., Iyo, M. (2005) Further analysis of microsatellite in the BDNF gene. *Am J Med Genet* in press
 36. Hashimoto, T., Hashimoto, K., Matsuzawa, D., Shimizu, E., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Iyo, M. (2005) A functional glutathione-S-transferase P1 polymorphism is associated with methamphetamine-induced psychosis in Japanese population. *Am J Med Genet* in press.
 37. Hashimoto, K., Shimizu, E., Komatsu, N., Watanabe, H., Shinoda, N., Nakazato, M., Kumakiri, C., Okada, S., Takei, N., Iyo, M. (2005) No changes in serum epidermal growth factor levels in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* in press
 38. Hashimoto, K., Shimizu, E., Iyo, M. (2005) Dysfunction of glia-neuron communication in

- pathophysiology of schizophrenia. *Curr Psychiatry Rev* 1: in press.
39. Ohgake, S., Hashimoto, K., Shimizu, E., Koizumi, H., Okamura, N., Koike, K., Matsuzawa, D., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Shirayama, Y., Iyo, M. (2005) Functional polymorphism of the NQO2 gene is associated with methamphetamine psychosis in Japanese. *Addiction Biol* in press.
 40. Hashimoto, K., Koizumi, H., Nakazato, M., Shimizu, E., Iyo, M. (2005) Role of brain-derived neurotrophic factor in eating disorders: Recent findings and its pathophysiological implications. *Prog Neuropharmacol Biol Psychiatry* in press.
 41. Salama, R., Muramatsu, H., Shimizu, E., Hashimoto, K., Watanabe, H., Komatsu, N., Okamura, N., Koike, K., Shinoda, N., Okada, S., Iyo, M., Muramatsu, T. (2005) Increased midkine levels in sera from patients with Alzheimer's disease. *Prog Neuropharmacol Biol Psychiatry* in press.
2. 学会発表
1. 藤崎美久、橋本謙二、伊豫雅臣 (2004) ラットの心理的ストレスに対する扁桃体海馬以降領域の役割：行動と最初期発現遺伝子による評価。第31回日本脳科学会
 2. 清水栄司、橋本謙二、小林圭介、三森真実、大掛真太郎、小泉裕紀、岡村斉恵、小池香、熊切力、中里道子、小松尚也、伊豫雅臣 (2004) アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 遺伝子多型とパニック障害の関連。第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会
 3. 小池香、橋本謙二、岡村斉恵、大掛真太郎、小泉裕紀、清水栄司、小松尚也、伊豫雅臣 (2004) $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体遺伝子改変マウスの海馬における細胞増殖。第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会
 4. 岡村斉恵、橋本謙二、清水栄司、小池香、大掛真太郎、小泉裕紀、熊切力、小松尚也、伊豫雅臣 (2004) Dizocilpineによるラット後部帯状回の病理学的変化に対する代謝型グルタミン酸受容体作動薬の保護的効果。第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会
 5. 橋本謙二、伊藤加奈子、清水栄司、関根吉統、稲田俊也、尾崎紀夫、岩田仲生、原野陸生、小宮山徳太郎、山田光彦、曾良一郎、中田謙二、氏家寛、伊豫雅臣 (2004) BDNF遺伝子と覚醒剤乱用者の関連研究。第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会
 6. 大掛真太郎、橋本謙二、清水栄司、関根吉統、稲田俊也、尾崎紀夫、岩田仲生、原野陸生、小宮山徳太郎、山田光彦、曾良一郎、中田謙二、氏家寛、伊豫雅臣 (2004) NQO遺伝子多型と覚醒剤乱用との関連研究。第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会
 7. 小泉裕紀、橋本謙二、熊切力、清水栄司、関根吉統、尾崎紀夫、稲田俊也、原野陸生、小宮山徳太郎、山田光彦、曾良一郎、氏家寛、武井教使、伊豫雅臣 (2004) グルタチオンSトランスフェラーゼM1 (GST M1) 遺伝子欠損と覚醒剤乱用者の関連研究。第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会
 8. 橋本謙二、伊藤加奈子、熊切力、清水栄司、伊豫雅臣 (2004) 性格とBDNF遺伝子との関連。第34回日本神経精神薬理学会・第26回日

- 本生物学的精神医学会合同年会
9. 大掛真太郎、清水栄司、橋本謙二、岡村斉恵、小池香、小泉裕紀、村松喬、村松寿子、伊豫雅臣 (2004) ミッドカインノックアウトマウスにおけるメタンフェタミン投与後移所運動活性促進の減少とドーパミンの低下. 第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会
 10. 橋本謙二、塚田秀夫、西山新吾、福元大、垣内岳春、清水栄司、伊豫雅臣 (2004) 覚せい剤投与によるドーパミン神経障害における抗酸化物質Nアセチル-L-システインの効果. 第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会
 11. 小池香、橋本謙二、深見悟郎、岡村斉恵、張淋、大掛真太郎、小泉裕紀、松澤大輔、川村則行、清水栄司、伊豫雅臣 (2004) マウス線条体におけるMethamphetamineによるドーパミン神経毒性に対するFK506の保護. 第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会
 12. 小泉裕紀、橋本謙二、伊藤加奈子、中里道子、清水栄司、岡村斉恵、小池香、大掛真太郎、松下幸生、鈴木健二、村山昌暢、樋口進、伊豫雅臣 (2004) 脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子多型と摂食障害の関連研究. 第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会
 13. Matsuzawa, D., Hashimoto, K., Shimizu, E., Maeda, K., Mashimo, Y., Hashimoto, T., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Hata, A., Sawa, A., Iyo, M. (2004) Association between PICK1 gene polymorphisms and methamphetamine-induced psychosis in Japanese population. The 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA. October 23-27, 2004.
 14. Ohgake, S., Hashimoto, K., Shimizu, E., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Iyo, M. (2004) Association study between polymorphisms of NQO genes and methamphetamine abuse. The 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA. October 23-27, 2004.
 15. Shimizu, E., Hashimoto, K., Fukami, G., Fujisaki, Y., Koike, K., Okamura, N., Ohgake, S., Koizumi, H., Matsuzawa, D., Watanabe, H., Nakazato, M., Shinoda, N., Komatsu, N., Iyo, M. (2004) Posterior cingulate cortex metabolite changes may reflect episodic memory dysfunction in schizophrenia, more than the medial temporal lobes. The 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA. October 23-27, 2004.
 16. Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindstrom, L.H., Iyo, M. (2004) Abnormality of glutamate-glutamine cycle in the drug naive schizophrenic patients. The 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA. October 23-27, 2004.
 17. Koizumi, H., Hashimoto, K., Nakazato, M., Shimizu, E., Mashimo, Y., Matsushita, S., Suzuki, K., Murayama, M., Hata, A., Higuchi, S., Iyo, M. (2004) Association study between polymorphisms for BDNF, TrkB, p75NTR, MMP-7 genes and eating disorders. The 34th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, USA. October 23-27, 2004.
 18. Hashimoto, T., Hashimoto, K., Matsuzawa, D., Shimizu, E., Sekine, Y., Inada, T., Ozaki, N., Iwata, N., Harano, M., Komiyama, T., Yamada, M., Sora, I., Ujike, H., Iyo, M. (2004) A

functional glutathione-S-transferase P1
polymorphism is associated with
methamphetamine-induced psychosis in Japanese
population. The 34th Annual Meeting of Society
for Neuroscience, San Diego, USA. October
23-27, 2004.

依存性薬物および未規制薬物の薬物依存評価システム構築と その形成メカニズム解明に関する研究

分担研究者：船田正彦¹

研究協力者：浅沼幹人²、宮崎育子²、周 曉華¹、佐藤美緒¹、和田 清¹

¹国立精神・神経センター精神保健研究所 薬物依存研究部、²岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学

[研究要旨]

規制薬物である methamphetamine (MAP)、3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) および脱法ドラッグ 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT) の精神依存性と神経毒性の発現およびその脳内メカニズムを検討し、化学物質の乱用危険度を推測する動物研究の実験バッテリー構築を試みた。1) MAP、MDMA および 5-MeO-DIPT の行動解析：MDMA および 5-MeO-DIPT の精神依存形成能は、マウスを使用し conditioned place preference (CPP)法により評価した。MAP、MDMA および低用量の 5-MeO-DIPT で報酬効果の発現が確認され精神依存形成能を有することが確認された。一方、高用量の 5-MeO-DIPT (10mg/kg) においては、嫌悪作用の発現が確認された。したがって、5-MeO-DIPT は精神作用(精神病様作用)などの有害作用を有する可能性がある。薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性に着目すると、中枢興奮作用が発現する用量付近で報酬効果が発現することが示唆された。2) MAP、MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性：MDMA および 5-MeO-DIPT の神経毒性に関して培養細胞 (B65 細胞) を使用して評価した。その結果、MAP、MDMA および 5-MeO-DIPT は細胞障害作用を有し、特に 5-MeO-DIPT は強力な毒性を有することが明らかになった。さらに、MAP もしくは MDMA と 5-MeO-DIPT を併用した場合は細胞毒性を増強させることから、5-MeO-DIPT の併用は非常に危険であると考えられる。3) 脳内モノアミンに対する影響：MAP および MDMA 投与後に、側坐核を分画し HPLC 法に従ってドパミンおよび代謝産物の含量を測定した。MAP および MDMA 投与により、ドパミンおよび 3-MT 含量の増加が確認された。乱用危険性を推測する生化学的マーカーとして、ドパミンおよびその代謝産物の変動が利用できると考えられる。4) MAP および MDMA による脳内遺伝子およびタンパク質発現：MAP (4 mg/kg) および MDMA (10 mg/kg) 投与 4 時間後の側坐核における遺伝子発現変動をマイクロアレイ (3130 種) 法で解析した。MAP 投与によって、144 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) し、MDMA 投与によって、56 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) していた。興味深いことに、MAP および MDMA の投与により共通して glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) 発現レベルが増加していた。そこで、GILZ の抗体を作製し、MAP 投与による変化を検討したところ、MAP 慢性投与により側坐核における GILZ タンパク質の発現量は増加していた。更なる検討は必要であるが、GILZ は中枢興奮薬の依存形成の危険性を予測する生化学的マーカーの 1 つである可能性が示唆された。薬物による中枢興奮作用と精神依存形成能の相関性に着目すると、中枢興奮作用の発現用量を参考に CPP 試験を行うことにより、効率良く化学物質の精神依存性を評価できると考えられる。薬物の神経毒性については、MAP、MDMA および 5-MeO-DIPT が神経毒性を有することが明らかになり、培養細胞系を利用した毒性評価バッテリーは特に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、インターネット等の通信手段の普及により、薬物等の化学物質に関する情報伝播は非常に高速化している。それに伴い薬物等の化学物質の取引は容易かつ迅速になり、幾つかの化学物質は乱用され重大な社会問題となっている。なかでも、法的規制を受けない化学物質である通称“脱法ドラッグ”や 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) に代表される“クラブ・ドラッグ”の乱用は、特に若年層を中心に浸透しているのが現状である。一方、国内で流通が確認されている脱法ドラッグやクラブ・ドラッグの精神依存性および神経毒性発現の有無に関する動物実験などの基礎的な検討は十分になされていない。こうした化学物質について、使用用量、期間、頻度および混入物質の有無などにより強力な精神依存性が生じる危険性や未知の毒性などが発現する危険性が存在する。そこで、覚せい剤および MDMA などの依存性薬物との比較を通じ、脱法ドラッグの依存形成の強度と神経毒性について明確にするのは緊急課題である。

本研究では、規制薬物として覚せい剤である methamphetamine (MAP)、MDMA および脱法ドラッグである 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT)¹⁾ の精神依存性と神経毒性の発現に関する基盤的検討を行った。本研究を通じ、1) 化学物質の乱用危険性を推測する動物研究の実験バッテリーの構築を試みた。また、2) 乱用危険性を予測する生化学的マーカー候補の基礎的な検索を行った。今回の研究では、MAP および MDMA による脳内モノアミンおよび遺伝子発現レベルの変動に関する解析を行った。

薬物による遺伝子発現の変動を探索する方法として、開発された DNA chip 法 (マイクロアレイ法) が注目されている⁶⁾。本法は、ゲノムプロジェクト後の全遺伝子情報を有効に利用するための技術として重要な役割を担っており、薬物依存形成の責任遺伝子の同定にも応用が期待できる。本研究では同一条件下で多種類の遺伝子発現の解析が可能であるマイクロアレイ法を用いて、MAP および MDMA の急性投与において変動する脳内遺伝子群のスクリーニングを試みた。

本研究では、物質の乱用危険度と神経毒性を迅速に推測する研究バッテリーの構築を目指す。さらに、生化学的マーカーの同定により、規制薬物と脱法ドラッグ使用の危険性に関する科学的証拠を収集する。本研究を通じ、将来的に乱用拡大につながる化学物質を迅速に特定し規制薬物指

定への早期の対策が可能になる。

B. 研究方法

使用動物：すべての行動薬理実験には、ICR 系雄性マウス (20 - 25g) を使用した。

使用薬物：規制薬物は methamphetamine (MAP)、3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) および脱法ドラッグとしては 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT) を使用した (Fig. 1)。

1. MAP、MDMA、5-MeO-DIPT による運動活性への影響

MAP (1-2 mg/kg, s.c.)、MDMA (1-15 mg/kg, s.c.) および 5-MeO-DIPT (1-20 mg/kg, s.c.) により、誘発される運動活性を自発運動量測定装置 (BR-AS01, バイオリサーチセンター社) を用いて検討した。

2. MAP、MDMA、5-MeO-DIPT の精神依存性評価

精神依存形成の評価には、conditioned place preference (CPP) 法を用いた。白黒 2 区画の CPP 装置 (ENS-CPP, Neuroscience 社) を用いて、MAP (1-2 mg/kg, s.c.)、MDMA (1-10 mg/kg, s.c.) もしくは 5-MeO-DIPT (0.5-10 mg/kg, s.c.) を 1 日おきに投与し、50 分間装置内に閉じ込め、6 日間にわたって条件付けを行った。対照群は溶媒である生理食塩水を投与し、薬物および溶媒投与の組み合わせはカウンターバランスの実験デザインとした (Table 1)。テストセッションは、7 日目に薬物および溶媒ともに投与せず、15 分間の白区画および黒区画の滞在時間を測定した。

Table 1. 薬物条件付けスケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7
白 or 黒	◎	○	◎	○	◎	○	T
白 or 黒	○	◎	○	◎	○	◎	T

◎：薬物、○：溶媒、T：テスト (薬物、溶媒ともに処置せず)

3. MAP、MDMA、5-MeO-DIPT による脳内モノアミンに対する影響

MAP (2 mg/kg, s.c.)、MDMA (10 mg/kg, s.c.) もしくは 5-MeO-DIPT (10 mg/kg, s.c.) 投与 1 時間後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の主要投射先である側坐核を含む limbic forebrain を分画²⁾した。

高速液体クロマトグラフ法に従い、内標準物質

としてイソプレレノールを使用し、ドパミン、セロトニンおよびそれぞれの代謝産物の測定を行った。ドパミン代謝産物としては、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、homovanilic acid (HVA)、3-methoxytyramine (3-MT)、セロトニンの代謝産物としては5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)を測定した。

4. マイクロアレイ法による遺伝子発現解析

MAP (4 mg/kg, s.c.) および MDMA (10 mg/kg, s.c.) 投与4時間後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の主要投射先である側坐核を含む limbic forebrain を分画²⁾し、mRNA の抽出を行った。ラベル方法としては、プライマーとして oligo dT(18) primer (300 pmol) を使用し、polyA RNA を鋳型として reverse transcriptase により逆転写反応で Cy3-dUTP および Cy5-dUTP を取込ませた。また、内部標準物質として lambda polyA RNA (50 pg) を反応時に等量ずつ添加した。遺伝子発現のスクリーニングはマウス由来既知遺伝子 4277 種の解析が可能である IntelliGene (Mouse CHIP Set II, 宝酒造: <http://www.takara-bio.co.jp/>) を用いて行った。Cy3 および Cy5 の各波長は、Affymetrix 428 Array Scanner により検出した。データの解析には、BioDiscovery ImaGene Ver. 4.2.を用いた。Cy3-dUTP および Cy5-dUTP ラベルによる蛍光強度から scatter plot を作製し、内部標準物質として加えた lambda および house keeping (β -actin) 遺伝子の発現蛍光強度に対する変化率を算出し、1.5 倍以上の変動が認められた遺伝子群を抽出した。

5. MAP および MDMA 精神依存形成における glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) の役割

GILZ antisense 前処置の影響: GILZ S 化 antisense を設計し、MAP (2 mg/kg, s.c.) および MDMA (10 mg/kg, s.c.) 投与による精神依存形成に対する影響を検討した。GILZ antisense (10 nmol/icv) は MAP および MDMA 投与開始前2日間および条件付け期間中は1日置きに投与した。また、GILZ mRNA の変動は RT-PCR 法にて確認した。また、GILZ の抗体を作製 (スクラム社) し MAP 慢性投与動物の limbic forebrain における GILZ 蛋白質量を western blot 法で測定した。

6. 培養神経細胞を利用した神経毒性の評価

a) 5-MeO-DIPT 単独暴露

ラット由来ドパミンおよびセロトニン系神経細胞株 B65 細胞 (3.1×10^4 cells/cm²) を用いて、継

代48時間後に、5-MeO-DIPT (最終濃度 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM) を添加し、24 時間培養後、形態学的変化を観察した。また、細胞毒性の生化学的パラメーターとして、培地中への LDH 放出量を測定し評価した。

b) 5-MeO-DIPT と MDMA 併用添加の効果

B65 細胞 (3.1×10^4 cells/cm²) に、5-MeO-DIPT (最終濃度 100 μ M, 500 μ M) と MDMA (最終濃度 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM) を添加した。添加後 24 時間培養し、LDH 放出量を測定した。

c) 5-MeO-DIPT と MAP 併用添加の効果

B65 細胞 (3.1×10^4 cells/cm²) に、5-MeO-DIPT (最終濃度 100 μ M, 500 μ M) と MAP (最終濃度 250 μ M, 500 μ M, 1 mM, 2 mM, 4 mM) を添加した。添加後 24 時間培養し、LDH 放出量を測定した。

7. MAP と 5-MeO-DIPT 併用による神経毒性

MAP (4 mg/kg) 単独、5-MeO-DIPT (4 mg/kg) 単独もしくは MAP と 5-MeO-DIPT を併用し、2 時間間隔で 4 回連続投与した。投与から 3 日後に、limbic forebrain を分画した。高速液体クロマトグラフ法に従い、ドパミンの組織内含量の測定を行った。

C. 研究結果

1. MAP、MDMA、5-MeO-DIPT による運動活性への影響

MAP (1 および 2 mg/kg)、MDMA (10 および 15 mg/kg) により著しい運動促進作用が発現し、中枢興奮作用を有することが示された (Fig. 2A)。また、5-MeO-DIPT (2 mg/kg) において運動促進作用の発現が確認された。一方、5-MeO-DIPT (5, 10 および 20 mg/kg) においては運動量に著明な影響は認められなかった。

2. MAP、MDMA、5-MeO-DIPT の精神依存性評価

マウスを使用し Conditioned place preference (CPP) 法による精神依存性の評価を行った (Fig. 2B)。MAP (1 および 2 mg/kg)、MDMA (5 および 10 mg/kg) および 5-MeO-DIPT (0.5 mg/kg) の条件付けによって CPP すなわち報酬効果が発現した。一方、5-MeO-DIPT (10 mg/kg) により著明な嫌悪作用が発現した。

3. MAP、MDMA、5-MeO-DIPT による脳内モノアミンに対する影響

薬物依存形成において重要な中脳辺縁系ドパミン神経系に着目し、主要投射先である側坐核を

含有する limbic forebrain をターゲットとした。MAP (2 mg/kg)、MDMA (10 mg/kg) および 5-MeO-DIPT (10 mg/kg) 投与 1 時間後に、limbic forebrain を分画し HPLC-ECD 法に従って、ドパミン、セロトニンおよびそれぞれの代謝産物の含量を測定した(Fig. 3)。MAP 投与によりドパミン、3-MT 含量は有意に増加し、一方、DOPAC は減少し、HVA 含量は減少傾向が認められた。セロトニン含量においては影響が認められず、代謝産物である 5-HIAA は減少していた。ドパミン遊離のインデックスと考えられる 3-MT/DA 比率は著明に増加していた。同様に、MDMA 投与によりドパミン、3-MT 含量は有意に増加し、一方、DOPAC および HVA 含量は減少していた。セロトニン含量においては影響が認められず、代謝産物である 5-HIAA は減少していた。ドパミン遊離のインデックスと考えられる 3-MT/DA 比率は著明に増加していた。5-MeO-DIPT 投与では、ドパミンおよびセロトニン含量には影響は認められず、3-MT 含量のみが有意に減少していた。3-MT/DA 比率は減少していた。

4. マイクロアレイ法による遺伝子発現解析

MAP (4 mg/kg, s.c.) および MDMA (10 mg/kg, s.c.) 投与 4 時間後の limbic forebrain における遺伝子発現変動を検討した。4277 種の遺伝子の発現変化を検討した結果、安定した発現量が認められた 3130 種の遺伝子群について変化率を算出した。MAP 投与によって、144 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) していた。変動が確認された遺伝子群を機能から 4 つに分類したところ、transcription factor に関する gene : 16%、signal transducer 関連 gene : 37% および enzyme 関連 gene : 26% 程度であった。また、機能が明確でない gene が 21% 含まれていた (Fig. 4)。MDMA 投与によって、56 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) していた。変動が確認された遺伝子群を機能から 4 つに分類したところ、transcription factor に関する gene : 7%、signal transducer 関連 gene : 29% および enzyme 関連 gene : 43% 程度であった。また、機能が明確でない gene が 21% 含まれていた (Fig. 4)。興味深いことに、MAP および MDMA の投与により共通して glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) mRNA 発現レベルが増加していた。

GILZ の役割を解明する目的で、GILZ antisense の効果を検討した。MAP および MDMA 条件付け時に GILZ antisense を前処置したところ、MAP および MDMA による精神依存形成は有意に抑制された (Fig. 5A,B)。MAP 投与による GILZ タン

パク質量の変化を検討したところ、MAP 慢性投与により側坐核における GILZ タンパク質の発現量は増加していた (Fig. 5C)。

5. 培養神経細胞を利用した神経毒性の評価

B65 細胞に 5-MeO-DIPT を添加したところ、形態学的には 100 μ M から障害がみられ、500 μ M 以上で著明な細胞死が惹起された。MDMA 単独では、1 mM 以上の高濃度の暴露で細胞死がみられた。MAP 単独では、1 mM より細胞死が見えはじめ、2 mM 以上の高濃度の暴露ではじめて明らかな細胞死が認められた。

生化学的な細胞障害の指標として B65 細胞から培地中への LDH の放出量を測定した(Fig. 6)。5-MeO-DIPT 単独では、形態学的変化と同様に LDH 放出量は 500 μ M から用量依存的な増加がみられた(Fig. 6A)。MDMA 単独添加の場合、1 mM 以下では LDH 放出量は不変で、2 mM で有意に増加した。5-MeO-DIPT+MDMA の同時暴露では、単独では障害性のみられない MDMA (50-500 μ M) を 5-MeO-DIPT (500 μ M) と併用すると、5-MeO-DIPT (50-500 μ M) 単独でみられる LDH の放出をさらに増強し、相乗効果がみられた(Fig. 6B)。MAP 単独暴露では、MDMA 単独添加の場合と同様に、1 mM 以下では LDH 放出量は不変で、2 mM 以上で有意に増加した。5-MeO-DIPT+MAP の併用暴露では、単独では LDH 放出量増加のみられない MAP (500 μ M, 1 mM) を 5-MeO-DIPT (500 μ M) と併用すると、5-MeO-DIPT (500 μ M) 単独でみられる LDH 放出量の増加がさらに増強され、相乗効果がみられた (Fig. 6C)。

6. MAP と 5-MeO-DIPT 併用による神経毒性

薬物投与後、limbic forebrain におけるドパミン組織含量を測定したところ MAP (4 mg/kg) 単独および 5-MeO-DIPT (4 mg/kg) 単独では有意な変化は認められなかった。一方、MAP と 5-MeO-DIPT を併用したところ、有意なドパミン含量の減少が確認され、ドパミン神経において障害が発生していることが明らかになった。

D. 考察

薬物の精神依存性を評価するシステム構築を試みた。MAP、MDMA および 5-MeO-DIPT の精神依存形成能を、マウスを使用し Conditioned place preference (CPP) 法により評価した。今回の実験条件では、MAP、MDMA および低用量の 5-MeO-DIPT