

受容体機能を促進し、治療効果を発揮する可能性があることが明らかになった。D-サイクロセリンは、部分的コアゴニストであるため、臨床用量の設定が難しく、できるだけ少量の投与が望ましいが、以上の作用は、D-サイクロセリンの投与量の抑制を検討するのに、きわめて有用と考えられる。

D-サイクロセリンによる細胞外液中の D-セリンを増加は、これまでに報告されている D-サイクロセリンの薬理作用のうち、1) D-セリン取り込み能をもつ proton/amino acid transporter 1 (PAT1) または PAT2 の阻害、2) D-セリン分解能をもつ D-アミノ酸化酵素活性の抑制等によってもたらされている可能性がある。この解明は、今後の検討をまたなければならないが、D-セリン-NMDA 受容体シグナルを増強する治療薬の標的分子の手がかりになることが期待される。

高次脳機能障害における D-セリンシステムの病態とそれに対する治療法を開発するためには、D-セリンの各代謝系を備えた脳細胞の種類を同定することが不可欠である。D-セリンは、主にアストロサイトで合成・貯蔵され、グルタミン酸受容体の調節下にここから放出されるという仮説が提唱されているが、最近では、ニューロンにも D-セリン免疫反応を認めたという報告が複数の研究者から発表され、未だ結論が得られていない。私たちのデータは初代培養細胞という制約があるが、少なくとも双方に同程度の D-セリンが含有されることを支持している。培養細胞中の D-セリン濃度が、生体における濃度より低いことから、異なる培養条件や他種類の脳細胞についても、詳細な検討を要すると考えられる。

## E. 結論

不可逆的グリア毒素を注入した内側前頭葉皮質で、組織中 D-セリン濃度が低下することや、ラット大脳皮質から培養したアストロサイトおよびニューロンにおいて D-セリンが免疫組織化学的・生化学的に検出され、D-セリン代謝にグリアとニューロンの双方が関与することを示す昨年度までの研究結果が強く支持された。また、D-サイクロセリンの新たな薬理作用として、細胞

外液中 D-セリン濃度を上昇させることが見出され、NMDA 受容体のグリシン調節部位刺激作用とともに、高次脳機能障害改善効果をもたらす NMDA 受容体機能の促進に関係していることが示唆された。この所見は、D-サイクロセリンの臨床応用における用量設定に重要な意義があるばかりでなく、D-セリン-NMDA 受容体シグナル増強薬開発の新規標的分子の手がかりになると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### (1) 原著

1. Kaneko Y, Kashiwa A, Ito T, Ishii S, Umino A, Nishikawa T. Selective serotonin reuptake inhibitors, fluoxetine and paroxetine, attenuate the expression of the established behavioral sensitization induced by methamphetamine. *Neuropsychopharmacol* 2007; 32: 658-664.
2. Takeuchi T, Furuta K, Hirasawa T, Masaki H, Yukizane T, Atsuta H, Nishikawa T. Perospirone in the treatment of patients with delirium. *Psychiatry Clin Neurosci* 2007; 61: 67-70.
3. Tanaka Y, Obata T, Sassa T, Yoshitome E, Ikehira H, Suhara T, Okubo Y, Nishikawa T. Quantitative magnetic resonance spectroscopy of schizophrenia: relationship between decreased N-acetylaspartate and frontal lobe dysfunction. *Psychiatry Clin Neurosci* 2006; 60: 365-372.
4. Kuroda Y, Motohashi N, Ito H, Ito S, Takano A, Nishikawa T, Suhara T. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on [ $^{11}\text{C}$ ] raclopride binding and cognitive function in patients with depression. *J. Affect. Disorder*, 2006; 95: 35-42.
5. Kanematsu S, Ishii S, Umino A, Fujihira T, Kashiwa A, Yamamoto N, Kurumaji A, Nishikawa T. Evidence for involvement of glial cell activity in the control of extracellular

D-serine contents in the rat brain. *J Neural Transm* 2006; 113: 1717-1721.

(2) 著書

1. Nishikawa T. A systematic approach to the brain d-serine system. Fujii N, Homma H, Bruecker H, Fisher GH, Konno R (eds.) *A New Frontier in Amino Acid and Protein Research*. New York: Nova Science Publishers; 2007, in press.
2. 濱村貴史, 山本直樹, 黒田安計, 西川徹. 抗精神病薬の作用機序. 精神科薬物療法研究会編. 統合失調症の薬物治療アルゴリズム. 東京: 医学書院; 2006. pp. 95-122.
3. 谷口 豪, 西川 徹. 3. グルタミン酸-D-セリンシステムと統合失調症. V. 「グルタミン酸」と「てんかん、統合失調症」. 鶴紀子編. 脳とこころの科学. 東京: 新興医学出版; 2006. pp. 114-123.

(3) 総説

1. Yui K, Kajii Y, Nishikawa T. Neurobiological and molecular bases of methamphetamine-induced behavioral sensitization and spontaneous recurrence of methamphetamine psychosis, and its implication in schizophrenia. *Current Psychiatry Reviews* 2006; 2: 381-393.
2. 西川徹. 統合失調症の分子機構研究の最前線; 疾患解明 Overview. *実験医学*. 2006; 24: 2663-2671.
3. 西川 徹. 脳の発達障害としての統合失調症. *日本薬理学雑誌*. 2006; 128: 13-18.
4. 日比野英彦, 西川 徹. アシル化アミノ酸の行動薬理学的評価—脂質による高次脳機能異常改善作用の機序を中心に—. *オレオサイエンス* 2006; 6: 93-105.
5. 山本直樹, 西川徹. 違法ドラッグと依存性薬物による精神障害の分子病態. *医学のあゆみ*. 2006; 217: 1147-1151.
6. 熱田英範, 西川 徹. 統合失調症の薬理学的発展; 特集「統合失調症解明へのアプローチ」. *精神科* 2006; 8: 257-263.

7. 正木秀和, 西川 徹. 統合失調症の治療薬開発研究; 特集「新しい時代の統合失調症—研究から治療へ—」. *臨床精神医学* 2007; 36: 43-51.

2. 学会発表

(1) 特別講演・シンポジウム

(国内)

1. 西川 徹. 薬理学的に見た統合失調症の分子病態. 岐阜薬科大学大学院特別講義. 岐阜, 6.26, 2006.
2. 西川 徹. 脳内 D-セリンの代謝・機能の分子機構と病態—グリアとの関連に注目して—. 特定領域班「神経-グリア回路網」サマールワークショップ「グリア研究の新しい展開を求めて」. 熱海, 7.13, 2006.
3. 西川 徹. 統合失調症における神経情報処理障害の分子基盤. 日本薬学会 第 22 回創薬セミナー. 甲斐大泉, 7.26, 2006.
4. 西川 徹, 山本直樹, 柏 淳, 石井澄和, 海野麻未, 竹林裕直, 嶋津 奈, 佐藤潤子, 平岡優一, 車地暁生. 統合失調症の分子異常への薬理学的・発達神経学的アプローチ. 科学研究費補助金(特定領域研究)第5領域「病態脳」夏のワークショップ, 札幌, 8.22, 2006.
5. 西川 徹. 統合失調症の分子異常への発達神経科学的アプローチ. 科学研究費補助金特定領域研究「ゲノム」4 領域 2006 年度合同班会議. 大阪, 9.21, 2006.
6. 西川 徹. グリア・ニューロンモジュレーターとしての D-セリンと精神神経疾患. 第 11 回グリア研究会. 東京, 11. 10, 2006.

(2) 国際学会

1. Yujiro Kaneko, Atsushi Kashiwa, Takashi Ito, Sumikazu Ishii, Asami Umino and Toru Nishikawa Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, Fluoxetine and Paroxetine, Attenuate the Expression of the Established Behavioral Sensitization Induced by Methamphetamine. Keystone Symposia; Neurobiology of Addiction (C3), Santa Fe, 2.25-3.1, 2007.

(3) 国内学会

1. 西川 徹, 山本直樹, 海野麻未, 石井澄和, 藤平隆久, 兼松宗太郎, 小方茂弘, 白久博史, 小柄 渚. 脳における細胞外液中 D-セリン濃度の調節機構- グリア毒および神経毒の影響-. 第2回D-アミノ酸研究会学術講演会. 京都, 9.8, 2006.
  2. 車地暁生, 伊藤 卓, 石井澄和, 海野麻未, 西川 徹. An investigation of candidate genes for stress responses in the hippocampus. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会合同年会, 名古屋, 9.14, 2006.
  3. 山本直樹, 村岡新一郎, 梶井 靖, 海野麻未, 柏 淳, 西川 徹. Characterization of a novel methamphetamine-induced transcript mrt3 in the rat cerebral cortex. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会合同年会, 名古屋, 9.14, 2006.
  4. 藤平隆久, 兼松宗太郎, 海野麻未, 石井澄和, 小方茂弘, 白久博史, 山本直樹, 西川 徹. Effects of D-cycloserine on the extracellular contents of D-serine in the rat frontal cortex. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会合同年会, 名古屋, 9.14, 2006.
  5. 竹林裕直, 山本直樹, 西川 徹. Phencyclidine-induced gene expression in the thalamus of developing rats. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会合同年会, 名古屋, 9.16, 2006.
  6. 小方茂弘, 兼松宗太郎, 藤平隆久, 石井澄和, 海野麻未, 山本直樹, 西川 徹. Effects of selective gliotoxins on extracellular D-serine contents in the rat medial frontal cortex. Effects of selective gliotoxins on extracellular D-serine contents in the rat medial frontal cortex. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会合同年会, 名古屋, 9.16, 2006.
  7. 白久博史, 藤平隆久, 兼松宗太郎, 石井澄和, 海野麻未, 山本直樹, 西川 徹. Effects of clozapine on extracellular contents of various amino acids in the rat frontal cortex. Effects of clozapine on extracellular contents of various amino acids in the rat frontal cortex. 第28回日本生物学的精神医学会・第36回日本神経精神薬理学会・第49回日本神経化学学会大会合同年会, 名古屋, 9.16, 2006.
  8. 橋本ほしみ, 高木俊輔, 熱田英範, 柳下和慶, 真野喜洋, 大島一成, 車地暁生, 西川 徹. 間歇型一酸化炭素中毒症の軽快後に再燃した疼痛に対して ifenprodil が有効であった持続性身体表現性疼痛障害の1例. 東京精神医学会第78回学術集会, 三鷹市, 10.14, 2006.
  9. 光定博生, 熱田英範, 前原健寿, 大野喜久郎, 大島一成, 車地暁生, 西川 徹. 側頭葉てんかんに対する側頭葉切除術後2年を経過して精神病症状を呈した1例. 東京精神医学会第78回学術集会, 三鷹市, 10.14, 2006.
  10. 竹内 崇, 行実知昭, 正木秀和, 熱田英範, 宮本康史, 治徳大介, 川上礼子, 甫母瑞枝, 西川 徹. 東京医科歯科大学医学部附属病院における精神科コンサルテーション・リエゾン活動. 第19回日本総合病院精神医学会総会, 宇都宮, 12.2, 2006.
  11. 山本直樹, 嶋津奈, 海野麻未, 石井澄和, 櫻井新一郎, 谷口豪, 小柄 渚, 金子雄二郎, 竹林裕直, 兼松宗太郎, 柏 淳, 車地暁生, 西川 徹. グルタミン酸- D-セリン系に作用する統合失調症の新規治療薬開発に関する研究. 第39回精神神経系薬物治療研究報告会, 豊中, 12.8, 2006.
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得  
本分担課題と直接関係するものはない
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
特記すべきことなし

## 神経・グリア細胞死における D-セリンシステムの役割の解明

分担研究者 福井 清

徳島大学分子酵素学研究センター・教授

**研究要旨** 本研究では D-アミノ酸酸化酵素を、中枢神経内在性の遊離 D-セリンの代謝と動態を制御する因子であるとの作業仮説に基づき、本酵素に関する分子酵素学的研究を基盤として、神経系を構成する細胞レベルにおける、本酵素の構造と活性制御の解析を行い、神経・グリア細胞死における D-セリンシステムの役割の解明と、脳虚血後神経細胞死の克服に向けた医学応用を目指す。

### A. 研究目的

本研究は『中枢神経系において D-アミノ酸酸化酵素が、脳内 D-セリンの代謝を司るキーエンザイムであり、NMDA 受容体のコアゴニストである D-セリンの代謝調節を介して、脳虚血後神経細胞死に密接に関与する』との仮説の検証を行う。D-アミノ酸酸化酵素(DAO)と細胞死との関連はほとんど知られておらず、本研究が先導的な役割を果たすと考えられる。タンパク質レベルでのプロテオーム解析並びにヒト酵素の活性に関する構造機能相関の解析は、神経・グリア細胞死における D-セリンシステムの役割の解明に重要な意義を有すると考えられる。

### B. 研究方法

本研究では、D-アミノ酸酸化酵素に関する分子酵素学的研究を基盤として、分子のレベルから、中枢神経組織を構成する細胞・組織レベル、さらに個体レベルに至る解析を行い、脳の発生・分化及び老化の過程や病態における D-セリンとその代謝酵素の生理的・病態生理学的意義の解明を目指す。

#### (倫理面への配慮)

本研究の動物実験に関しては、動物愛護上のガイドラインに沿って行い、実施施設である徳島大学の動物実験委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

D-アミノ酸酸化酵素は FAD を補酵素とするフラビン酵素の一つで、生体内では腎臓、肝臓、脳において、細胞内のペルオキシソームに局在する。本研究では、ヒト DAO の立体構造を明らかにするとともに、フェノチアジン系を代表する向精神薬であるクロルプロマジンによる、ヒト DAO 阻害機構の解析を行った。

まず、ヒト酵素の結晶構造（三次元構造）を X 線結晶解析により 2.5 オングストロームの分解能で決定した。ヒト酵素はブタ酵素と同様に二量体（39 kDa が二分子）を形成しており、反応に重要な残基は FAD のフラビン環の *re* 面においては完全に保存されていた。しかしながらフラビン環の *si* 面において、一次構造が完全に同一であるにも関わらず、疎水性ストレッチ（残基 47-51, Val-Ala-Ala-Gly-Leu）の主鎖の構造がブタ酵素と比べて大きく異なっていた。

我々は既にラット C6 細胞と mouse DAO 遺伝子を恒常的に発現する C6 細胞を用いて、D-セリン添加実験を行い、DAO 遺伝子の発現量が高い細胞では、細胞外 D-セリンがアストログリア細胞で代謝された結果、細胞死が誘導されることを観察している。この現象は、D-セリンの代謝により生成された過酸化水素の作用であると考えられたが、この細胞死は DAO の阻害剤である安息

香酸とともに、フェノチアジン系を代表する向精神薬であるクロルプロマジンの添加により抑制された。

そこでヒト DAO 精製酵素標品を用いてクロルプロマジンによる酵素阻害効果の検討を行った。クロルプロマジンによる、DAO に対する阻害作用は、既にブタ酵素において、FAD に対する拮抗阻害であることが報告されているが、ヒト酵素において検討したところ、同様に阻害作用を示すことが明らかとなった。さらに、クロルプロマジンが投与患者において光線過敏症を引き起こすこと、また紫外線やペルオキシダーゼ等によりラジカルを生じることから、生体内でより強い阻害剤に変化する可能性が考えられた。そこで、本薬剤に白色光を照射して阻害活性の変化を検討したところ、本酵素に対する阻害活性の上昇が認められた。

#### D. 考察

ヒト DAO 結晶構造の疎水性ストレッチの主鎖の構造はブタ酵素と異なっていたが、グリシンを含むペプチドには、環境依存性に「主鎖の構造の多様性」が存在し、Structurally ambivalent peptide (SAP) として知られている。したがって本酵素にも VAAGL ストレッチにおける“構造のゆらぎ”が存在し、ヒト酵素に特徴的な酵素化学的性質の一因として考えられた。

また、D-セリンの投与により観察される細胞死が D-アミノ酸酸化酵素による代謝の結果引き起こされた現象であることが予想され、脳においては、D-セリンの代謝にアストログリア細胞に存在する DAO が積極的に関与することが示唆された。さらにクロルプロマジンの示す薬理作用に、D-アミノ酸酸化酵素活性阻害の作用が寄与する可能性が示唆された。

#### E. 結論

中枢神経系において、D-アミノ酸酸化酵素は、脳内在性 D-セリンの代謝を司るキーエンザイムとして、D-セリンシステムの生理的また病態生理学意義に寄与すると考えられた。本研究が

NMDA 受容体の機能異常に基づく神経・グリア細胞死などの神経疾患の病態に対する新規治療薬としての酵素阻害剤開発の基盤研究となる展開が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) T. Kawazoe, H. Tsuge, T. Imagawa, K. Aki, S. Kuramitsu, K. Fukui: Structural basis of D-DOPA oxidation by D-amino acid oxidase: alternative pathway for dopamine biosynthesis: Biochem. Biophys. Res. Commun. 355; 385-391 (2007)
- 2) T. Kawazoe, h. Tsuge, M. S. Pilone, K. Fukui: Crystal structure of human D-amino acid oxidase: context-dependent variability of the backbone conformation of the VAAGL hydrophobic stretch located at the *si*-face of the flavin ring: Protein Sci. 15; 2708 - 2717 (2006)
- 3) Y. Umena, K. Yorita, T. Matsuoka, A. Kita, K. Fukui, Y. Morimoto: The crystal structure of L-lactate oxidase from *Aerococcus viridans* at 2.1 Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition: Biochem. Biophys. Res. Commun. 350; 249-256 (2006)
- 4) G. Molla, S. Sacchi, M. Bernasconi, M. S. Pilone, K. Fukui, L. Pollegioni: Characterization of human D-amino acid oxidase: FEBS Letters 580; 2358-2364 (2006)
- 5) X. Teng, T. Sakai, L. Liu, R. Sakai, R. Kaji, K. Fukui: Attenuation of MPTP-induced neurotoxicity and locomotor dysfunction in Nucling-deficient mice via suppression of the apoptosome pathway: J. Neurochemistry 97; 1126-1135 (2006)
- 6) 朴 煥埼、川添僚也、岩名沙奈恵、小野公嗣、頼田和子、坂井隆志、福井 清: 生体内不斉アミノ酸分子の病態生理学的意義: 日本応用酵素協会誌: 41, 21-31 (2006)

##### 2. 学会発表

- 1) K. Fukui: Potential Role for Astroglial D-amino Acid Oxidase in Extracellular D-Serine Metabolism and Pathogenesis of Schizophrenia. The 47th International Symposium of Korean Society of Life Science (2006 年 9 月 大邱市 (韓国) )
- 2) K. Fukui: Potential Role for Astroglial D-amino Acid Oxidase in Extracellular D-Serine Metabolism and Pathogenesis of Schizophrenia. The 14th Symposium of Dongguk University Medical Research Institute (2006 年 9 月 慶州市 (韓国) )
- 3) K. Yorita, Y. Umena, T. Matsuoka, D. P. Ballou,

- A. Kita, Y. Morimoto, K. Fukui: Active Site Topology of L-Lactate Oxidase from *Aerococcus Viridans*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006 年 6 月 京都市)
- 4) S. Iwana, K. Yorita, T. Kawazoe, S. P. Chung, R. Abou El-Magd, H. K. Park, K. Fukui: Inhibitory effect of an antipsychotic, chlorpromazine, and its derivative on D-amino acid oxidase. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006 年 6 月 京都市)
- 5) K. Ono, H. Park, T. Kawazoe, S. Iwana, S. P. Chung, R. Abou El-Magd, Y. Tomita, K. Yorita, T. Sakai, K. Fukui: Gene Expression of D-Amino Acid Oxidase in the brain. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006 年 6 月 京都市)
- 6) L. Liu, S. Takashi, X. Teng, R. Mukai-Sakai, R. Kaji, K. Fukui: Nucling inhibits nuclear translocation and activation of NF- $\kappa$ B through interaction with NF- $\kappa$ B-p50. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006 年 6 月 京都市)
- 7) T. Kawazoe, H. Tsuge, M. S. Pilone, K. Fukui: Crystal structure of human D-amino acid oxidase: Implications for a Hypothetical Activation Mechanism. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006 年 6 月 京都市)
- 8) X. Teng, T. Sakai, L. Liu, R. Sakai, R. Kaji, K. Fukui: Attenuation of MPTP-induced neurotoxicity and locomotor dysfunction in Nucling-deficient mice via suppression of the apoptosome pathway. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006 年 6 月 京都市)
- 9) T. Sakai, L. Liu, R. Mukai-Sakai, N. Sano, R. Kaji, K. Fukui: Pro-inflammatory stress promotes carcinogenesis through NF- $\kappa$ B-activation and inactivation pathway. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006 年 6 月 京都市)
- 10) 岩名沙奈恵、頼田和子、川添僚也、小野公嗣、鄭 丞弼、Rabab Abou El-Magd、朴 煥埼、福井 清: 向精神薬クロロプロマジンとその光反応産物による D-アミノ酸酸化酵素の活性阻害; 日本ビタミン学会第 58 回大会 (2006 年 5 月 徳島市)
- 11) 川添僚也、岩名沙奈恵、小野公嗣、朴 煥埼、頼田和子、津下英明、福井 清: ヒト D-アミノ酸酸化酵素の構造および活性化機構への仮説モデル; 日本ビタミン学会第 58 回大会 (2006 年 5 月 徳島市)
- 12) 頼田和子、梅名泰史、松岡 毅、喜田昭子、森本幸生、福井 清: 結晶 X 線回折法による L-乳酸酸化酵素の活性中心の構造; 日本ビタミン学会第 58 回大会 (2006 年 5 月 徳島市)
- 13) 小野公嗣、朴 煥埼、川添僚也、岩名沙奈恵、鄭 丞弼、Rabab Abou El-Magd、富田優美子、頼田和子、福井 清: 脳内における D-アミノ酸酸化酵素の遺伝子発現; 第 47 回日本生化学会中四国支部例会 (2006 年 5 月 松江市)
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許出願
- 「新規アポトーシス誘導タンパク質及びそれをコードする遺伝子」福井 清、坂井隆志  
特願 2001-326784

## 脊髄小脳変性症に対するサイクロセリンの 二重盲検用量依存性クロスオーバー試験

分担研究者 川井 充

国立病院機構東埼玉病院・副院長

**研究要旨** サイクロセリンは NMDA 結合型のグルタミン酸受容体のグリシンサイトにアゴニストとして作用する。これまで脊髄小脳変性症患者のモデル動物、脊髄小脳変性症患者において抗結核薬として使用される用量のおよそ 10 分の 1 で失調症状の改善効果が確認されており、脊髄小脳変性症の治療薬としての期待がもたれている。しかしプルキンエ細胞に対する過剰な興奮刺激は細胞の障害をもたらす危険もある。従来の用量の 2 倍量を脊髄小脳変性症患者に投与したとき、確実な効果の増強が認められるかどうかを検証することを目的として二重盲検用量依存性のクロスオーバー試験を行った。対象は 20 名の脊髄小脳変性症患者で 1 日投与量を 50mg と 100mg の 2 群に設定した。投与日数は実薬、偽薬とも 10 日間で 7 日の休薬期間を設定した。50mg 群と 100mg 群ともに投与前に比べて臨床症状の改善を認めた。しかし偽薬でも約 6 割の患者に効果を認めたこともあり偽薬と比較して統計的に有意差はなかった。また 50mg 群と 100mg 群との間に有意な差もなかった。50mg 群、100mg 群ともに副作用はなかった。サイクロセリンは脊髄小脳変性症に有効な可能性があるが今回の検討では用量依存性ははっきりしなかった。ので一日あたり 50mg が推奨使用量と考えられる。副作用は認めず投与にほとんど問題がなかった。のでより長期の臨床試験をおこない有用性を確認する必要がある。

### A. 研究目的

脊髄小脳変性症は小脳の神経細胞の変性脱落により運動失調を主体とする神経症状を呈する一群の疾患の総称である。有病率は人口 10 万人あたり 7-10 人程度で、進行性の経過をとり日常生活に著しい支障をきたすため、特定疾患に指定されている。神経細胞の変性脱落に対する治療は研究段階であり、本邦では運動失調症状の改善を目的として甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンとその誘導体（タルチレリン）が治療薬として承認されているがその効果は十分ではない。ほかにも様々な薬が試されているものの効果がはっきりと認められているものはない。

サイクロセリンは抗結核薬として用いられてきた抗生物質であるが、血液脳関門を容易に通過して、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 結合型グル

タミン酸受容体のグリシンサイトにアゴニストとして作用することが知られている。我々は脊髄小脳変性症のモデル動物である *reeler mice* および *Ara-C treated mice* でサイクロセリンが症状改善に有効であったことをふまえ、ヒトの患者に動物実験とほぼ同等の用量である 50mg を投与し、失調症状の改善に有効であったことを報告した。この用量は結核に用いる用量の 10 分の 1 である。一昨年度はこの用量で長期投与を行ったところ効果は 3 ヶ月持続したことを報告した。

以上の結果はサイクロセリンが脊髄小脳変性症の失調症状の改善に対して有効な治療薬であることを示しているが、NMDA 結合型グルタミン酸受容体を介した興奮刺激が過剰になると神経細胞の障害を加速する可能性はある。投与量

を増やしても効果の増加がみられなければ、安易な増量はひかえるべきである。そこで本年度は 50mg と 100mg の 2 つの投与量を設定し、二重盲検クロスオーバー試験をおこなった。

## B. 研究方法

20 名の歩行可能な脊髄小脳変性症患者を無作為に 1 日 50mg 投与群と 100mg 投与群のいずれかに割り付け両群を 10 例ずつとした。てんかんや精神障害を有する患者は除外した。サイクロセリン以外の薬剤とリハビリテーションは研究期間中変更しなかった。サイクロセリンは朝夕食後に 2 分割 10 日間投与した。2 群とも偽薬とのクロスオーバー試験とし、クロスオーバーの間は 10 日間の休薬期間を設定した。薬剤の調剤および患者の両群への割付けは国立精神・神経センター武蔵病院薬剤部と国立病院機構東埼玉病院薬剤科が担当した。評価項目は国際運動失調評価尺度(ICARS)、Barthel 指数、機能的自立評価法、10m 往復平地歩行時間、自覚症状記録。主要評価項目は ICARS とした。一般採血検査、検尿、脳波をおこない自覚症状とともに副作用のチェックとした。

研究計画は国立精神・神経センター武蔵地区倫理委員会および国立病院機構東埼玉病院倫理委員会の承認を得た。インフォームドコンセントを得るために、被験者は説明文書を用いて説明を受け、十分な質問の機会を持ち被験者本人に文書で同意を得た。研究に参加しなくてもなんら不利益を受けないこと、研究に参加意思を表明したあともいつでも参加を取りやめることができることも説明した。

統計方法は、50mg 投与群と 100mg 投与群との患者の年齢は t 検定、性別はカイ二乗検定を用いた。投与前後の検定はパラメトリックな指標は repeated-ANOVA をもちい、ノンパラメトリックな指標はフリードマン検定を行った。これらの検定で有意差があれば post-hoc 検定を行った。全ての統計で危険率 5% 以下を有意とした。

## C. 研究結果

50mg 群は年齢  $58.8 \pm 12.9$  歳、男性 6 例、女性 4 例。診断は小脳症状が強い多系統萎縮症 (MSA-C) 4 例、小脳皮質変性症 (CCA) 1 例、Machado-Joseph 病 (MJD) 3 例、SCA6 1 例、遺伝子診断陰性の家族性 SCD 1 例。100mg 群は  $59.0 \pm 8.6$  歳、男性 6 例、女性 4 例。MSA-C 4 例、CCA 2 例、MJD 2 例、SCA6 2 例。両群の年齢や性別に有意な差はなく病型にも大きな差はなかった。

50mg 群と 100mg 群では効果にほとんど差がみられなかったので両群を合わせて統計した結果を記載する。ICARS の総点では、サイクロセリン投与前  $38.2 \pm 10.4$ 、投与後  $36.9 \pm 10.8$ 、偽薬投与前  $39.1 \pm 11.4$ 、投与後  $37.5 \pm 10.8$  とともに投与後で有意に改善していた。サイクロセリン投与後と偽薬投与後には有意な差はなかった。ICARS の下位項目の各点では改善傾向はしめたものの有意差を認めたものはなかった。10m 往復平地歩行時間 (秒) は、サイクロセリン投与前  $55.4 \pm 50.1$ 、投与後  $50.4 \pm 40.5$ 、偽薬では投与前  $50.3 \pm 46.5$ 、投与後  $51.3 \pm 48.4$  と実薬でのみ改善傾向を示したが危険率は 7% で統計的に有意ではなかった。Barthel 指数には、実薬、偽薬とも投与前後で変化はみられなかった。病型による差はあまり認められなかった。

自覚症状、採血・検尿、脳波では特に投与による副作用は認めず全例で投与に問題は生じなかった。

## D. 考察

小脳皮質で唯一の興奮性ニューロンである小脳顆粒細胞は平行線維と呼ばれる軸索により、グルタミン酸を神経伝達物質として小脳プルキンエ細胞の樹状突起にシナプスを形成する。脊髄小脳変性症の一型であるオリブ橋小脳変性症で NMDA 結合型グルタミン酸受容体を介した興奮刺激が過剰になり神経細胞が障害されるという推定をした報告がある。一方顆粒細胞から放出されるグルタミン酸が病的に減少すればプルキンエ細胞の興奮は抑制され、小脳機能に障



害がおこると考えられる。遺伝性脊髄小脳変性症で glutamate dehydrogenase(GDH)の減少が報告されている。GDH はグルタミン酸の生成と分解のどちらにも働くが、平行常数からグルタミン酸合成側に偏っていると考えられており、GDH の減少はグルタミン酸の欠乏を引き起こすと考えられる。実際に一部の遺伝性脊髄小脳変性症で小脳皮質のグルタミン酸が減少していることが報告されている。以上の議論よりグルタミン酸アゴニストは少量投与で小脳性失調症状の改善に有効であるが、過剰に投与した場合は細胞毒性を呈する可能性がある。

今回の検討では短期投与では 50mg と 100mg 投与群には差はみられなかったので 50mg 投与で實際上十分であると推測されうる。今回の検討では投与により改善をみとめたことは確かであるが偽薬でも ICARS 総点では 20 人中 12 人もの患者で改善をみており実薬投与と偽薬投与間に有意差がでなかった。これまでの我々の検討でもサイクロセリンで全く効果のない脊髄小脳変性症患者もみられるので偽薬で 6 割の患者に

有効性を認めると統計上の有意差はかなりでにくいものと思われる。

今回の検討でも歩行時間では実薬のみ改善傾向を認めており効果判定に偽薬効果がより出にくい指標を用いることも必要と思われる。また今回は 10 日間の短期投与であったのでより長期の投与期間による検討も必要と思われる。

## E. 結論

今回の検討で 50mg と 100mg の間で効果に顕著な差がなかったので、興奮性アミノ酸の細胞毒性の観点から一日 50mg を推奨投与量とすることが妥当である。効果の有無をより正確に判定するため評価の指標を工夫しさらに長期の投与による研究が必要である。

## F. 研究発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧

## 【西川 徹】

### 1. 論文発表

#### (1) 原著

1. Kaneko Y, Kashiwa A, Ito T, Ishii S, Umino A, Nishikawa T. Selective serotonin reuptake inhibitors, fluoxetine and paroxetine, attenuate the expression of the established behavioral sensitization induced by methamphetamine. *Neuropsychopharmacol* 2007; 32: 658-664.
2. Takeuchi T, Furuta K, Hirasawa T, Masaki H, Yukizane T, Atsuta H, Nishikawa T. Perospirone in the treatment of patients with delirium. *Psychiatry Clin Neurosci* 2007; 61: 67-70.
3. Tanaka Y, Obata T, Sassa T, Yoshitome E, Ikehira H, Suhara T, Okubo Y, Nishikawa T. Quantitative magnetic resonance spectroscopy of schizophrenia: relationship between decreased N-acetylaspartate and frontal lobe dysfunction. *Psychiatry Clin Neurosci* 2006; 60: 365-372.
4. Kuroda Y, Motohashi N, Ito H, Ito S, Takano A, Nishikawa T, Suhara T. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on [<sup>11</sup>C] raclopride binding and cognitive function in patients with depression. *J. Affect. Disorder*, 2006; 95: 35-42.
5. Kanematsu S, Ishii S, Umino A, Fujihira T, Kashiwa A, Yamamoto N, Kurumaji A, Nishikawa T. Evidence for involvement of glial cell activity in the control of extracellular D-serine contents in the rat brain. *J Neural Transm* 2006; 113: 1717-1721.

#### (2) 著書

1. Nishikawa T. A systematic approach to the brain d-serine system. Fujii N, Homma H, Bruecker H, Fisher GH, Konno R (eds.) *A New Frontier in Amino Acid and Protein Research*. New York: Nova Science Publishers; 2007, in press.
2. 濱村貴史, 山本直樹, 黒田安計, 西川徹. 抗精神病薬の作用機序. 精神科薬物療法研究会編. 統合失調症の薬物治療アルゴリズム. 東京: 医学書院; 2006. pp. 95-122.
3. 谷口 豪, 西川 徹. 3. グルタミン酸-D-セリンシステムと統合失調症. V. 「グルタミン酸」と「てんかん、統合失調症」. 鶴紀子編. 脳とこころの科学. 東京: 新興医学出版; 2006. pp. 114-123.

#### (3) 総説

1. Yui K, Kajii Y, Nishikawa T. Neurobiological and molecular bases of methamphetamine-induced behavioral sensitization and spontaneous recurrence of methamphetamine psychosis, and its implication in schizophrenia. *Current Psychiatry Reviews* 2006; 2: 381-393.
2. 西川徹. 統合失調症の分子機構研究の最前線; 疾患解明 Overview. *実験医学*. 2006; 24: 2663-2671.
3. 西川 徹. 脳の発達障害としての統合失調症. *日本薬理学雑誌*. 2006; 128: 13-18.
4. 日比野英彦, 西川 徹. アシル化アミノ酸の行動薬理的評価—脂質による高次脳機能異常改善作用の機序を中心に—. *オレオサイエンス* 2006; 6: 93-105.
5. 山本直樹, 西川徹. 違法ドラッグと依存性薬物による精神障害の分子病態. *医学のあゆみ*. 2006; 217: 1147-1151.
6. 熱田英範, 西川 徹. 統合失調症の薬理学的発展; 特集「統合失調症解明へのアプローチ」. *精神科* 2006; 8: 257-263.
7. 正木秀和, 西川 徹. 統合失調症の治療薬開発研究; 特集「新しい時代の統合失調症—研究から治療へ—」. *臨床精神医学* 2007; 36: 43-51.

【福井 清】

1. 論文発表

(1) 原著

1. Kawazoe, T. Tsuge, H. Imagawa, T. Aki, K. Kuramitsu, S. Fukui, K.: Structural basis of D-DOPA oxidation by D-amino acid oxidase: alternative pathway for dopamine biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355: 385-391 (2007)
2. Kawazoe, T. Tsuge, H. Pilone, M. S. Fukui, K.: Crystal structure of human D-amino acid oxidase: context-dependent variability of the backbone conformation of the VAAGL hydrophobic stretch located at the *si*-face of the flavin ring. *Protein Sci.* 15: 2708 - 2717 (2006)
3. Umena, Y. Yorita, K. Matsuoka, T. Kita, A. Fukui, K. Morimoto, Y.: The crystal structure of L-lactate oxidase from *Aerococcus viridans* at 2.1 Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350: 249-256 (2006)
4. Molla, G. Sacchi, S. Bernasconi, M. Pilone, M. S. Fukui, K. Pollegioni, L.: Characterization of human D-amino acid oxidase. *FEBS Letters* 580: 2358-2364 (2006)
5. Teng, X. Sakai, T. Liu, L. Sakai, R. Kaji, R. Fukui, K.: Attenuation of MPTP-induced neurotoxicity and locomotor dysfunction in Nucling-deficient mice via suppression of the apoptosome pathway. *J. Neurochemistry* 97: 1126-1135 (2006)
6. 朴 煥埼、川添僚也、岩名沙奈恵、小野公嗣、頼田和子、坂井隆志、福井 清: 生体内不斉アミノ酸分子の病態生理学的意義. *日本応用酵素協会誌* 41: 21-31 (2006)

【川井 充】

1. 論文発表

なし

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, Fluoxetine and Paroxetine, Attenuate the Expression of the Established Behavioral Sensitization Induced by Methamphetamine

Yujiro Kaneko<sup>1</sup>, Atsushi Kashiwa<sup>1</sup>, Takashi Ito<sup>1</sup>, Sumikazu Ishii<sup>1</sup>, Asami Umino<sup>1</sup> and Toru Nishikawa<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Section of Psychiatry and Behavioral Sciences, Tokyo Medical and Dental University Graduate School, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

To obtain an insight into the development of a new pharmacotherapy that prevents the treatment-resistant relapse of psychostimulant-induced psychosis and schizophrenia, we have investigated in the mouse the effects of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI), fluoxetine (FLX) and paroxetine (PRX), on the established sensitization induced by methamphetamine (MAP), a model of the relapse of these psychoses, because the modifications of the brain serotonergic transmission have been reported to antagonize the sensitization phenomenon. In agreement with previous reports, repeated MAP treatment (1.0 mg/kg a day, subcutaneously (s.c.)) for 10 days induced a long-lasting enhancement of the increasing effects of a challenge dose of MAP (0.24 mg/kg, s.c.) on motor activity on day 12 or 29 of withdrawal. The daily injection of FLX (10 mg/kg, s.c.) or PRX (8 mg/kg, s.c.) from 12 to 16 days of withdrawal of repeated MAP administration markedly attenuated the ability of the MAP pretreatment to augment the motor responses to the challenge dose of the stimulant 13 days after the SSRI injection. The repeated treatment with FLX or PRX alone failed to affect the motor stimulation following the challenge of saline and MAP 13 days later. These results suggest that the intermittent and repetitive elevation of serotonergic tone may inhibit the expression of the motor sensitization induced by pretreatment with MAP. It is proposed that clinically available serotonin reuptake inhibitors could be useful for preventing the recurrence of hallucinatory-paranoid state in drug-induced psychosis and schizophrenia.

*Neuropsychopharmacology* (2007) **32**, 658–664. doi:10.1038/sj.npp.1301111; published online 31 May 2006

**Keywords:** behavioral sensitization; methamphetamine; fluoxetine; paroxetine; methamphetamine psychosis; schizophrenia

## INTRODUCTION

The addiction of amphetamine, methamphetamine (MAP), cocaine, and other psychostimulants with dopamine agonist properties has been a serious worldwide health and social concern, and has been estimated to affect more than 60 million patients based on recent reports from the World Health Organization. The abuse of these drugs causes a growing intensification of craving of psychotomimetic substances, and stimulant-induced psychiatric symptoms exhibit progressive quantitative alterations from a non-psychotic to a prepsychotic and finally to a hallucinatory-paranoid state indistinguishable from that of schizophrenia (Ujike and Sato, 2004). The robust drug craving and psychotic state have been observed to easily reoccur even after long period of abstinence by reuse of a small amount of a stimulant or an unspecific stressor (Ujike

and Sato, 2004). These observations indicate that the severe vulnerability to relapse of the above psychotomimetic effects may be established during stimulant abuse (Ujike and Sato, 2004). The difficult clinical problems of stimulant craving and psychosis, and their unpredictable relapses often lead to antisocial behavior and require the development of a novel treatment that can eliminate the enduring vulnerability.

One of the rational approaches to develop this type of treatment appears to explore the substances that reverse an animal model of the drug-induced craving and recurrent psychosis, psychostimulant-induced reverse tolerance, or behavioral sensitization. The behavioral sensitization is a characteristic phenomenon in that the single or repeated exposure to amphetamines and other psychostimulants results in a progressive enhancement of the psychotomimetic responses to these drugs or stress, including hyperactivity and stereotypy, in the rodents (Nishikawa *et al*, 1983; Robinson and Becker, 1986; Vanderschuren and Kalivas, 2000). The augmented behavioral responses have been shown to persist even long after drug discontinuation. Because the progressively intensifying, cross-reactive (to stimulants and stress), easily relapsing, long-lasting, and dopamine agonist-inducible nature of the behavioral sensitization of rodents seems to mimic that of stimulant-

\*Correspondence: Dr T Nishikawa, Section of Psychiatry and Behavioral Sciences, Tokyo Medical and Dental University Graduate School, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan, Tel: +81 3 5803 5237, Fax: +81 3 5803 0135, E-mail: tnis.psyc@tmd.ac.jp  
Received 14 November 2005; revised 5 April 2006; accepted 19 April 2006

Online publication: 5 May 2006 at <http://www.acnp.org/citations/Npp050306050677/default.pdf>

induced drug craving and psychosis in humans, these animal and human abnormalities induced by stimulants have been considered to share a common pathophysiology underlying the vulnerability to their recurrences (Ujike and Sato, 2004; Vanderschuren and Kalivas, 2000). Moreover, in remitted or stable schizophrenic patients, a hallucinatory-paranoid state reappeared or was exacerbated following a small and subpsychotomimetic dose of a psychostimulant for normal volunteers (Segal and Janowsky, 1978; Snyder, 1973). These results support the idea that, like the patients with stimulant-induced psychosis, a subpopulation of schizophrenic patients may be much more sensitive to psychotomimetic effects of stimulants than normal volunteers. Taken together, the behavioral sensitization may also be a useful model for the relapse vulnerability in schizophrenic patients. Therefore, the treatment that produces a lasting inhibition of the expression of the once established behavioral sensitization can be expected to possess a prophylactic efficacy on the recurrence of psychotic states of stimulant-induced psychosis and/or schizophrenia.

Recently, the repeated systemic administration with a dopamine D1 agonist (Li *et al.*, 2000), an NMDA antagonist plus dopamine D2 receptor agonist (Li *et al.*, 2000), serotonin-2 (5-hydroxytryptamine-2; 5-HT<sub>2</sub>) antagonists (Davidson *et al.*, 2002a), and a 5-HT<sub>3</sub> antagonist (King *et al.*, 1998, 2000; Davidson *et al.*, 2002b), during the withdrawal period after the repetitive injection of cocaine, amphetamine, or MAP has been reported to attenuate the expression of behavioral sensitization. Although the exact mechanisms underlying these attenuating effects are still unclear, several lines of evidence indicate that the cerebral serotonergic systems could be involved in the modification of the stimulant-induced long-lasting changes in the behavioral responses. Thus, (1) the unlimited self-administration of cocaine produced a sustained decrease in the extracellular 5-HT concentration in the nucleus accumbens during the withdrawal period (Parsons *et al.*, 1995), (2) the enhanced synaptic levels of serotonin by administration of a 5-HT precursor L-tryptophan or of a 5-HT selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine (FLX) reduced the reinforcing effects of cocaine (Lyness, 1983; Carroll *et al.*, 1990; Richardson and Roberts, 1991; Takamatsu *et al.*, 2005), and (3) repeated MAP treatment has been shown to fail to cause behavioral sensitization in the mice lacking a 5-HT transporter with an excess of extracellular 5-HT contents (Shen *et al.*, 2003). These data suggest that the decreased serotonergic tone may play an important role in the maintenance of sensitization elicited by the psychostimulant drugs and, in turn, increased cerebral serotonergic transmission could suppress the expression of the established sensitization.

To test the possible suppression by 5-HT agonists, we have studied the influences of repeated administration of typical SSRIs, FLX, and paroxetine (PRX), during withdrawal of the repetitive treatment with MAP, on the ability of a challenge dose of MAP to cause an augmented motor response in mice following a drug-free period after the SSRI injections. We have chosen these clinically available SSRIs because we have considered the future clinical applications of these drugs for the purpose of the prophylaxis against the

relapses of stimulant-induced craving or psychotic state and/or of schizophrenia if they could reverse the established sensitization.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

The present animal experiments were performed in strict accordance with the guidance of the Tokyo Medical and Dental University and were approved by the Animal Investigation Committee of the Institution. Male ddY mice (Clea Japan Inc., Japan) at ages ranging from postnatal days 50 to 56 weighing 32–42g were used. The animals were housed in groups of 4–5 per cage at 23.0 ± 0.5°C in a humidity-controlled room under a light-controlled (14-h/12-h light/dark cycle, lights on at 0600 hours) and had free access to food and water.

### Chemicals

MAP hydrochloride was purchased from Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd (Osaka, Japan), with official permission of the Tokyo Metropolitan Bureau of Public Health. FLX HCl and PRX maleate were purchased from TOCRIS (Avonmouth, UK). The other chemicals used were of ultrapure quality and were commercially available. Doses for the injections always refer to the free bases. Each drug was dissolved in saline (SAL) (0.9% NaCl) and subcutaneously (s.c.) injected in a volume of 0.005 ml/g body weight. The control mice were treated with SAL.

### Drug Administration Schedule

*Establishment and maintenance of behavioral sensitization.* To confirm the establishment and maintenance of the behavioral sensitization under our experimental conditions, 16 mice were pretreated with 1.0 mg/kg of MAP (s.c.) (eight mice) or SAL (eight mice) once daily for 10 days. On days 1, 3, 7, and 10 of the pretreatment, these mice were placed into the movement measurement apparatus to count their spontaneous activities. On day 11 (12 animals) of withdrawal following pretreatment with MAP or SAL, the animals were injected with SAL and, on the next day, with a challenge dose of MAP (0.24 mg/kg, s.c.). The two experimental groups were

- (1) MAP (1.0 mg/kg/day for 10 days) + MAP (0.24 mg/kg on day 12 of withdrawal) (*N* = 8) and
- (2) SAL (for 10 days) + MAP (0.24 mg/kg on day 12 of withdrawal) (*N* = 4).

*Treatment with SSRIs.* In the experiments to study the effects of SSRIs on the MAP-induced behavioral sensitization, the mice pretreated with MAP or SAL for 10 days were repeatedly administered with FLX (10 mg/kg/day, s.c.) or PRX (8 mg/kg/day, s.c.) once daily from day 12 to 16 of pretreatment withdrawal. These animals received a challenge of MAP or SAL 13 days after the repeated treatment with FLX or PRX, respectively. Table 1 summarizes the 16 groups for the SSRI experiments.



**Table 1** Schedules and Doses for Pretreatment and Challenge of MAP, FLX, PRX, and SAL and Cumulated Motor Activity after Challenge of MAP or SAL

Group (duration)	N	Pretreatment with MAP or SAL (10 days)	Withdrawal period I (11 days)	Pretreatment with SSRI or SAL (5 days)	Withdrawal period II (12 days)	Challenge	Cumulated motor activity (counts/60 min)
<i>Fluoxetine</i>							
1	8	SAL		SAL		SAL	1143 ± 161
2	8	SAL		FLX		SAL	1581 ± 300
3	8	MAP		SAL		SAL	1378 ± 255
4	8	MAP		FLX		SAL	2682 ± 344
5	8	SAL		SAL		MAP	2883 ± 735
6	8	SAL		FLX		MAP	2488 ± 800
7	8	MAP		SAL		MAP	8066 ± 831
8	8	MAP		FLX		MAP	4689 ± 725
<i>Paroxetine</i>							
1	10	SAL		SAL		SAL	1923 ± 200
2	10	SAL		PRX		SAL	2016 ± 657
3	10	MAP		SAL		SAL	1561 ± 351
4	10	MAP		PRX		SAL	1822 ± 399
5	10	SAL		SAL		MAP	3476 ± 722
6	10	SAL		PRX		MAP	2353 ± 620
7	10	MAP		SAL		MAP	7770 ± 862
8	10	MAP		PRX		MAP	3843 ± 776

The different dosing regimens for the eight groups in each experiment are summarized. Methamphetamine (MAP; 1.0 mg/kg, s.c.) or saline (SAL) was repeatedly injected during the pretreatment period. The pretreatment with FLX (fluoxetine; 10 mg/kg/day, s.c.), PRX (paroxetine; 8 mg/kg/day, s.c.), or SAL for 5 days was initiated from day 12 to 16 of withdrawal of the repeated MAP injection. The animals pretreated with MAP or SAL plus FLX, PRX, or SAL were challenged with MAP at the dose of 0.24 mg/kg or SAL (s.c.) on day 13 of withdrawal of FLX, PRX, or SAL treatment. Each cumulated motor activity is expressed as means with SEM of the data obtained from 8 to 10 determinations.

## Behavioral Analyses

To evaluate the behavioral effects of MAP (1.0 or 0.24 mg/kg, s.c.), the spontaneous vertical and horizontal movements including locomotion, rearing, and head movements were quantified by automatically counting the number of heat changes in the multiple zones of the test cage by means of the heat sensor with a Supermex instrument (Muromachikikai Co. Ltd, Tokyo, Japan) (Masuo *et al*, 1995; Hara *et al*, 2001). The mice were placed into the acrylic test cage (24.5 × 17.5 × 12.5 cm) within a soundproof and illuminated wood box at an ambient temperature of 23.0 ± 0.5°C. The Supermex consists of a monitor that was mounted above the test cage to detect changes in heat across multiple zones of the cage through an array of Fresnel lenses. The body heat radiated by an animal was detected by the sensor head of the monitor, which contained paired infrared light ray pyroelectric detectors. Every behavioral analysis was always performed for 120–150 min before and for 60 min after the injection of the MAP or SAL.

## Statistical Analyses

Results are usually reported as means with SEM of the data. For comparison between the two groups, statistical evaluations were made using the two-tailed Student's *t*-test. Statistical differences among more than three groups were estimated by a one-way analysis of variance (ANOVA; homo-

geneous variance) or the Kruskal–Wallis test (heterogeneous variance) followed by the Dunnett or Scheffé *post hoc* test. The significance level was set at  $p < 0.05$  for all comparisons.

## RESULTS

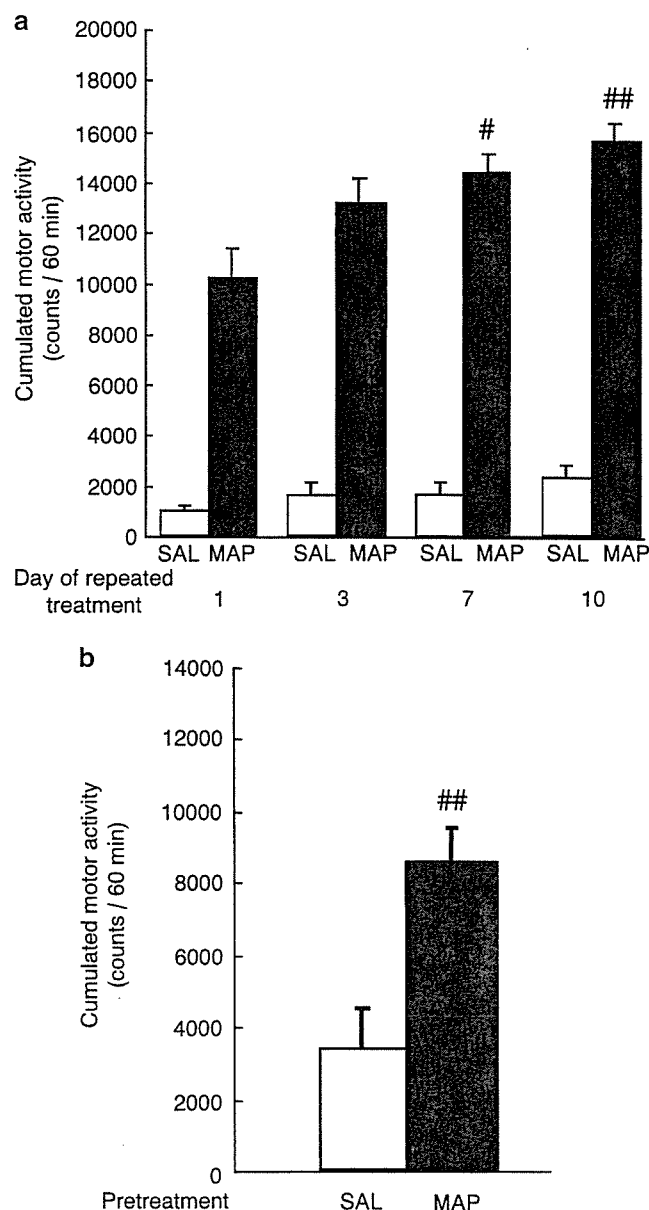
### Establishment and Maintenance of Behavioral Sensitization by Repeated MAP Treatment

As shown in Figure 1a, repeated treatment of ddY mice with MAP (1 mg/kg once daily for 10 days, s.c.) resulted in a progressive and significant enhancement of the ability of MAP to increase the amounts of motor activity for 60 min on the 7th ( $p < 0.05$  vs the 1st day) and 10th ( $p < 0.01$ ) day of the drug regimen. The enhanced motor responses to MAP were also observed 12 days after discontinuation of the repeated treatment with MAP (Figure 1b). Because these observations confirmed the establishment of the MAP-induced sensitization and were consistent with those in the previous sensitization experiments (Vanderschuren and Kalivas, 2000), we routinely applied this MAP treatment schedule to the present behavioral experiments.

### Effects of FLX and PRX on the Established Behavioral Sensitization after Repeated MAP Treatment

In the experiments using MAP and SSRIs (see Figures 2 and 3), the long-lasting nature of behavioral sensitization

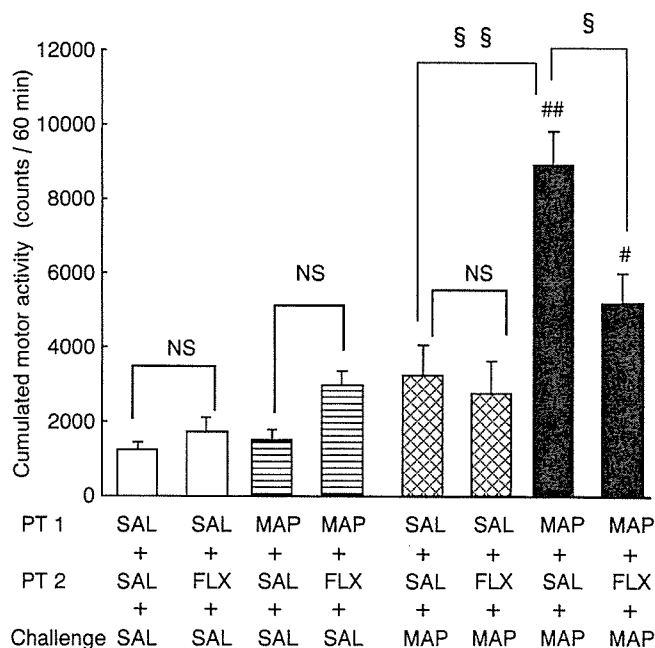
was further verified by the results that the mice pretreated with MAP (1 mg/kg once daily for 10 days, s.c.) exhibited augmented motor responses to a challenge dose of MAP on day 29 of withdrawal (SAL + SAL + MAP vs MAP + SAL + MAP in Figures 2 and 3).



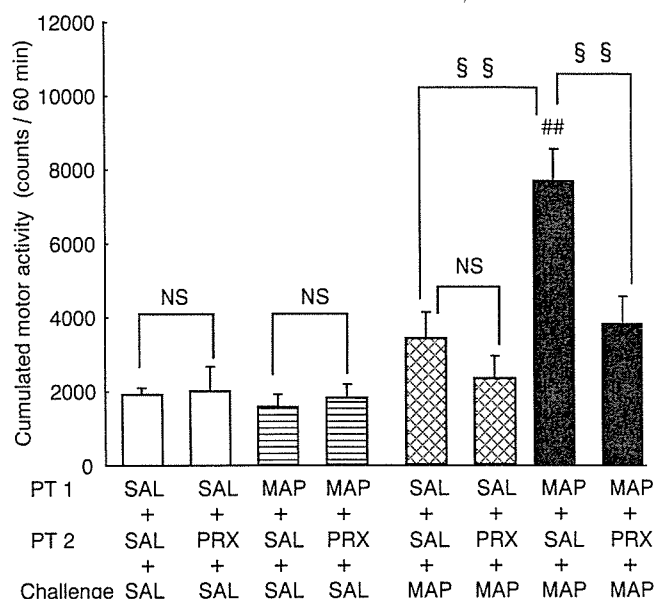
**Figure 1** Changes in behavioral responses to MAP challenge during or after repeated MAP pretreatment. (a) Cumulated motor activity for 60 min following daily injection of MAP (1.0 mg/kg, s.c.) or SAL during repeated treatment for 10 days in mice. Each value is the mean with SEM of eight determinations.  $^{\#}p < 0.05$ ,  $^{##}p < 0.01$  vs values obtained on the first treatment day in the respective experimental group. Statistical analysis of the present data with a homogeneous variance (Bartlett test: MAP,  $\chi^2 = 2.3480$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0.5033$ ; SAL,  $\chi^2 = 5.3896$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0.1454$ ) was performed using a one-way ANOVA followed by the Dunnett *post hoc* test (SAL,  $F(3, 28) = 1.997$ ,  $p = 0.137$  (no statistically significant difference); MAP,  $F(3, 28) = 5.926$ ,  $p < 0.01$  ( $p = 0.0029$ )). (b) Cumulated motor activity for 60 min following a challenge dose of MAP (0.24 mg/kg, s.c.) on day 12 of withdrawal of the repeated treatment with MAP or SAL. Each value is the mean with SEM of 4–8 determinations.  $^{##}p < 0.01$  vs the respective SAL-pretreated controls. Statistical analysis of the present data with a homogeneous variance ( $F = 0.604$ ,  $p = 0.3670$ ) was performed using the two-tailed Student's *t*-test ( $t = -3.35$ ,  $p < 0.01$  ( $p = 0.0074$ )).

As shown in Figure 2, in the SAL-pretreated mice, repeated FLX administration failed to cause a significant change in the cumulated motor activity after a challenge of SAL (SAL + FLX + SAL) or MAP (SAL + FLX + MAP) on day 13 of FLX withdrawal as compared to the corresponding repetitive vehicle-treated animals (SAL + SAL + SAL and SAL + SAL + MAP). There was a trend toward, but not statistically significant, increase in the motor response to SAL challenge in the repeatedly MAP-pretreated FLX-injected mice (MAP + FLX + SAL) when compared to the repeatedly MAP-pretreated vehicle-injected mice (MAP + SAL + SAL) (Figure 2). However, in the MAP-pretreated behaviorally sensitized mice, repeated FLX injection led to significantly lower counts of spontaneous movements after a challenge dose of MAP (MAP + FLX + MAP) on day 13 of FLX withdrawal than the repeated vehicle injection (MAP + SAL + MAP) (Figure 2). No stereotyped behavior was observed after a MAP challenge in any of the experimental groups of animals. These results indicate that repeated FLX treatment may reduce the expression of the behavioral sensitization following a MAP challenge without apparent changes in the motor responses to SAL in the sensitized and the nonsensitized animals, and to MAP in nonsensitized mice.

Similarly, the repeated PRX administration inhibited the ability of a subsequent challenge of MAP to increase



**Figure 2** Effects of repeated injections of fluoxetine during withdrawal of MAP pretreatment on behavioral responses to MAP challenge. The detailed schedules of the drug administrations are shown in Table 1. The motor activity was automatically quantified and cumulated for 60 min following MAP challenge (0.24 mg/kg, s.c.) on days 29 and 13 of withdrawal of the repeated treatment with MAP (PT 1; pretreatment 1) and that with fluoxetine (PT 2; pretreatment 2), respectively. Each value is the mean with SEM of eight determinations.  $^{\#}p < 0.05$ ,  $^{##}p < 0.01$  vs SAL-pretreated (for two times) and SAL-challenged animals (absolute controls).  $^{\S}p < 0.05$ ,  $^{\S\S}p < 0.01$  between the two groups linked with a solid line. NS: no statistically significant difference between the two groups linked with a solid line. Statistical analysis of the present data with a heterogeneous variance (Bartlett test:  $\chi^2 = 28.5574$ ,  $df = 7$ ,  $p < 0.01$  ( $p = 0.0002$ )) was performed using the Kruskal–Wallis test ( $p < 0.0001$ ) followed by the Scheffé *post hoc* test.



**Figure 3** Effects of repeated injections of PRX during withdrawal of MAP pretreatment on behavioral responses to MAP challenge. The detailed schedules of the drug administrations are shown in Table 1. The motor activity was automatically quantified and cumulated for 60 min following MAP challenge (0.24 mg/kg, s.c.) on days 29 and 13 of withdrawal of the repeated treatment with MAP (PT 1; pretreatment 1) and that with PRX (PT 2; pretreatment 2), respectively. Each value is the mean with SEM of 10 determinations.  $^{##}p < 0.01$  vs SAL-pretreated (for two times) and SAL-challenged animals (absolute controls).  $^{§§}p < 0.01$  between the two groups linked with a solid line. NS no statistically significant difference between the two groups linked with a solid line. Statistical analysis of the present data with a heterogeneous variance (Bartlett test:  $\chi^2 = 22.2354$ ,  $df = 7$ ,  $p < 0.01$  ( $p = 0.0023$ )) was performed using the Kruskal–Wallis test ( $p < 0.0001$ ) followed by the Scheffé *post hoc* test.

the number of movements in the MAP-pretreated mice (MAP + PRX + MAP vs MAP + SAL + MAP) on day 13 of PRX withdrawal (Figure 3). This PRX regimen failed to change the behavioral response to SAL challenge in the SAL- and MAP-pretreated animals (SAL + PRX + SAL and MAP + PRX + SAL) and to a challenge dose of MAP in the SAL-pretreated mice (SAL + PRX + MAP vs SAL + SAL + MAP) (Figure 3). The MAP challenge produced no apparent stereotyped behavior in any of the experimental groups.

## DISCUSSION

In the present study, we have verified that 10 daily administrations of MAP (1 mg/kg, s.c.) produced a progressive and enduring augmentation in the increased movements elicited by a subsequent challenge of MAP, that is, behavioral sensitization. Our obtained data first demonstrate that the repeated injection of FLX or PRX to behaviorally sensitized mice by MAP pretreatment attenuates the expression of the enhanced behavioral response to a challenge dose of MAP after a 13-day drug-free interval. This attenuation suggests that FLX and PRX may be able to reverse the established behavioral sensitization following an exposure to psychostimulants.

The nonspecific phenomena including the long-term sedation or accumulation of either SSRI or its active

metabolites after repeated SSRI treatment could produce the attenuating effects of the SSRIs on the challenge MAP-induced movements. FLX and its active desmethyl metabolite, nor-fluoxetine, have indeed been reported to display long half-lives ranging between 1 and 4 days and between 7 and 15 days, respectively, in humans (Hiemke and Hartter, 2000; Sills *et al*, 2000). However, the above presumptions are unlikely because (1) neither the repeated FLX nor PRX treatment diminished the basal amounts of movements (SAL-induced movements) in the SAL- and MAP-pretreated mice and the ability of a MAP challenge to increase significantly the movements in the SAL-pretreated mice (Figures 2 and 3), (2) a subchronic injection of FLX for 5 days potentiated the increasing effects of an acute amphetamine application on motor activity on days 1 and 2, but not on day 5, of withdrawal (Sills *et al*, 2000), and (3) repeated treatment with FLX or PRX for 27 days enhanced the psychomotor stimulatory effects of an alcohol challenge on the 28th day of the experiments (Goeldner *et al*, 2005). Moreover, no apparent stereotypy following a challenge dose of MAP in any experimental groups seems to deny the possibility that the apparent reduction in the MAP-induced movements (Figures 2 and 3) might reflect the diminished ambulation owing to the robust sensitization with increased frequencies of the stereotyped behavior in one location.

Both repeated FLX and PRX treatment by themselves tended to reduce, although nonsignificantly, the locomotor response to acute MAP administration. These tendencies are also likely to be associated with SSRI-induced attenuation of the expression of behavioral sensitization, because the repeated SAL treatment as repeated injection stress could augment the ability of amphetamines to induce abnormal behavior. This view seems to be supported by the previous observation (Antelman *et al*, 1980) indicating that repeated mild stress (tail pressure stress) resulted in an enhanced behavioral response to *d*-amphetamine.

Based upon the fact that the common selective and potent action between FLX and PRX is 5-HT uptake inhibition, it is more likely that the reduced expression of behavioral sensitization in the animals treated with these SSRIs after the establishment of the sensitization may be connected to an enhanced serotonergic tone in the brain. Although increased synaptic 5-HT has been reported to prevent the development of the stimulant-induced behavioral sensitization and craving (see Introduction), there has so far been no study to test the effects of 5-HT agonists on the sustainment of these behavioral changes. The elevated contents of the synaptic 5-HT by SSRIs (Felton *et al*, 2003) could reverse the stimulant-induced sensitization by compensating the plausible persistent decrease in the basal extracellular release of 5-HT in the nucleus accumbens, which has been suggested to play an important role in sustaining the sensitization (Parsons *et al*, 1995).

The SSRI-induced disruption of the sensitization could be mediated by the specific 5-HT receptor subtypes that interact with the ascending dopamine neurons projecting from the ventral tegmental area to the nucleus accumbens, because these neurons have been proved to participate in the development and expression of the long-lasting locomotor sensitization (Vanderschuren and Kalivas, 2000). In terms of this interaction, it is of interest to note that 5-HT<sub>1B</sub> (Yan and Yan, 2001; Yan *et al*, 2004) and 5-HT<sub>2A</sub>

(Auclair *et al*, 2004; Esposito, 2006) receptors in either of the two brain areas have been well known to be involved in the control of dopamine release from the nucleus accumbens. Recent studies have further suggested the modification of the meso-accumbens dopamine neurons by the 5-HT<sub>1A</sub> (Andrews *et al*, 2005), 5-HT<sub>2C</sub> (Esposito, 2006), and 5-HT<sub>3</sub> (De Deurwaerdere *et al*, 2005) receptors. The increased vulnerability to cocaine (Rocha *et al*, 1998) and amphetamine (Bronsert *et al*, 2001) in mice lacking the 5-HT<sub>1B</sub> receptor favors the possible role of 5-HT<sub>1B</sub> receptor stimulation in the reversal of the stimulant-induced locomotor sensitization. However, inhibition of the expression of the established behavioral sensitization was caused by the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, ondansetron, and some agents with the 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist property including clozapine, mianserin, and ketanserin (Davidson *et al*, 2002a,b). Activation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor was reported to prevent the development of the behavioral sensitization to L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) (Tomiyama *et al*, 2005), but has not yet been tested with respect to the established sensitization phenomenon. To clarify the 5-HT receptor subtypes critical for the reversal effects of SSRIs on the expression of the MAP sensitization, further investigation is needed to try to block the reversal effects using 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, and 5-HT<sub>3</sub> antagonists.

Because the long-lasting nature of the behavioral sensitization has been considered to be associated with brain plasticity, the SSRIs used in this study could modulate the plastic changes underlying behavioral sensitization through their influences on the brain growth factors (Sodhi and Sanders-Bush, 2004) and hippocampal neurogenesis, which are related to the rearrangements or remodeling of the neuron circuits (Duman *et al*, 2001). This view is supported by the findings that (1) the repetitive administration of a psychostimulant, cocaine, has been shown to decrease neurogenesis in the adult rat hippocampus (Yamaguchi *et al*, 2004), (2) the single or repeated treatment with amphetamine, MAP, or cocaine has been found to alter the levels of mRNA or proteins in the brain-derived growth factor (Meredith *et al*, 2002; Grimm *et al*, 2003; Le Foll *et al*, 2005), and (3) stress causes the suppression of neurogenesis, debranching, and shortening of the dendrites in the adult rat hippocampal dentate gyrus, which have been documented to be reversed by repeated FLX (Malberg *et al*, 2000; Malberg and Duman, 2003; Kodama *et al*, 2004).

MAP-induced behavioral sensitization has been considered to be an animal model of MAP craving or psychosis, or paranoid schizophrenia (Ellinwood *et al*, 1973; Robinson and Becker, 1986; Ujike and Sato, 2004). The patients with these disorders often suffer from relapses for many years or a lifetime even after the long discontinuance of MAP and/or the continued treatment with antipsychotic drug. The markedly reduced expression of sensitization by a temporary treatment with FLX and PRX observed here suggests that the short-term treatment with these SSRIs might attenuate the relapse of the psychotic state associated with psychostimulants and/or schizophrenia. Therefore, it would be relevant for the development of an additional pharmacotherapy for MAP psychosis and/or a group of schizophrenia to test the ability of a subchronic regimen of FLX and PRX to mitigate or prevent the recurrence of the hallucinatory-paranoid state in these psychoses. However,

before start of such a clinical test, careful considerations are required of the previous data indicating that SSRI augmentation of antipsychotics in the treatment of schizophrenia improved negative symptoms of schizophrenia and had no effect on positive symptoms (Silver and Shmugliakov, 1998; Silver, 2004), although the therapeutic target of the SSRIs is not the positive symptoms by themselves but the vulnerability to their relapse. It should also be noted that some cases were omitted from the clinical trials owing to the worsening of the positive symptoms (Silver and Shmugliakov, 1998; Poyurovsky *et al*, 1999).

In conclusion, the present study indicates that a 5 days treatment with SSRIs, FLX, and PRX, during the withdrawal period of chronic MAP treatment, may, at least in part, reverse the MAP-induced behavioral sensitization. It is proposed that these SSRIs could be clinically useful as prophylactic agents against the easy reactivation of serious psychotic states in patients with MAP craving or psychosis, and/or some schizophrenic patients.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ms M Asakawa and M Kurita for their excellent assistance. This work was partly supported by a Research Grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare (Japan), and a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture (Japan).

## REFERENCES

- Andrews CM, Kung HF, Lucki I (2005). The 5-HT<sub>1A</sub> receptor modulates the effects of cocaine on extracellular serotonin and dopamine levels in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 508: 123–130.
- Antelman SM, Eichler AJ, Black CA, Kocan D (1980). Interchangeability of stress and amphetamine in sensitization. *Science* 207: 329–331.
- Auclair A, Drouin C, Cotecchia S, Glowinski J, Tassin JP (2004). 5-HT<sub>2A</sub> and alpha1b-adrenergic receptors entirely mediate dopamine release, locomotor response and behavioural sensitization to opiates and psychostimulants. *Eur J Neurosci* 20: 3073–3084.
- Bronsert MR, Mead AN, Hen R, Rocha BA (2001). Amphetamine-induced locomotor activation in 5-HT(1B) knockout mice: effects of injection route on acute and sensitized responses. *Behav Pharmacol* 12: 549–555.
- Carroll ME, Lac ST, Asencio M, Kragh R (1990). Intravenous cocaine self-administration in rats is reduced by dietary L-tryptophan. *Psychopharmacology (Berlin)* 100: 293–300.
- Davidson C, Lazarus C, Xiong X, Lee TH, Ellinwood EH (2002a). 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonists given in the acute withdrawal from daily cocaine injections can reverse established sensitization. *Eur J Pharmacol* 453: 255–263.
- Davidson C, Lee TH, Xiong Z, Ellinwood EH (2002b). Ondansetron given in the acute withdrawal from a repeated cocaine sensitization dosing regimen reverses the expression of sensitization and inhibits self-administration. *Neuropsychopharmacology* 27: 542–553.
- De Deurwaerdere P, Moison D, Navailles S, Porras G, Spampinato U (2005). Regionally and functionally distinct serotonin3 receptors control *in vivo* dopamine outflow in the rat nucleus accumbens. *J Neurochem* 94: 140–149.
- Duman RS, Nakagawa S, Malberg J (2001). Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* 25: 836–844.