

surgery and polymorphisms of an opioid metabolism-related gene, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (*ABCB1*). We studied 129 patients (74 males, 55 females; aged 28-80 years old) who were administered analgesics, including opioids, for pain relief following major abdominal surgery and who provided informed consent. The analyses were performed using multivariate analysis, with  $p < 0.05$  considered statistically significant. We found a significant association between analgesic requirements and *ABCB1* polymorphisms. Studies on gene polymorphisms associated with analgesic requirements are important for developing appropriate personalized treatments with less side-effects.

## 1. Introduction

Opioids are commonly used as effective analgesics for the treatment of acute and chronic pain. However, sensitivity to opioid analgesics is well known to vary widely among individual subjects [1]. Because of this variability, a dose of an opioid analgesic that can produce satisfactory pain relief without adverse effects in some patients might cause under-dosing or overdosing in other patients. Among opioid-related genes, the  $\mu$ -opioid receptor gene is the major candidate gene for investigation [2] because  $\mu$ -opioid receptor knockout mice display abolished morphine-induced analgesia in several tests of nociceptive responsiveness [3]. Recently, several studies in humans have revealed a relationship between genetic variations in the  $\mu$ -opioid receptor gene and sensitivity to opioid analgesics [4-8].

An opioid metabolism-related gene, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 (*ABCB1*), encodes a blood-brain barrier transporter P-glycoprotein that plays an important role in controlling substance passage between the blood and brain. Thus, the *ABCB1* protein reportedly plays a role in morphine metabolism [9]. Genetic variations in the human *ABCB1* gene have been the most extensively studied. More than 50 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertion/deletion polymorphisms in the *ABCB1* gene have been reported. However, information is still limited with respect to the actual effects of these genetic polymorphisms on the function of the *ABCB1* protein. In the present study, we examined the possible association of three *ABCB1* polymorphisms with sensitivity to opioid that have been reportedly associated with methadone requirements, an opioid used in heroin dependence treatment.

## 2. Methods

### 2.1. Subjects

One hundred twenty-nine patients participated in the association study. Subjects had undergone major open abdominal surgery, mostly gastrectomy for gastric cancer and colectomy for colorectal cancer, under combined general and epidural anesthesia at Research Hospital, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, or at Toho University Sakura Medical Center. Peripheral blood or oral mucosa samples were collected from these subjects for gene analysis.

The study protocol was approved by the Institutional Review Boards at the Institute of Medical Science, The University of Tokyo (Tokyo, Japan), Toho University Sakura Medical Center (Sakura, Japan), and the Tokyo Institute of Psychiatry (Tokyo, Japan). All subjects provided informed, written consent for the genetics studies.

## 2.2. Clinical Data

Postoperative pain was managed primarily with continuous epidural analgesia with fentanyl or morphine. Fentanyl or morphine was diluted with 0.25% bupivacaine in a total volume of 100 ml and infused through the catheter placed in the lower thoracic or upper lumbar epidural space at a constant rate of 2 ml/h. Whenever the patient complained of significant postoperative pain despite continuous epidural analgesic, appropriate doses of opioids, including buprenorphine, pentazocine, and pethidine, and/or nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), including diclofenac, flurbiprofen, and indomethacin, were systemically administered as rescue analgesics at the discretion of surgeons. Also, epidural morphine was administered in some patients. The clinical data sampled included age, gender, body height, body weight, postoperative diagnosis, type of operation, duration of operation, and frequency and doses of rescue analgesics (opioids and/or NSAIDs) administered during the first 24 h postoperative period, for which analgesic therapy would be required in most patients.

To allow intersubject comparisons of rescue analgesic doses required during the first 24 h postoperative period, doses of opioids and NSAIDs administered as rescue analgesics during this period were converted to the equivalent dose of systemic pentazocine. The dose of epidural morphine required for pain relief after abdominal surgery is approximately one-fifth that of systemic morphine [10]. Systemic pentazocine is one-third as potent as systemic morphine, and systemic buprenorphine is approximately 30-times as potent as systemic morphine [11]. Systemic flurbiprofen, diclofenac, and indomethacin are equivalent [12, 13]. The analgesic effect of systemic diclofenac, 1 mg/kg, is comparable to that of systemic fentanyl, 1 µg/kg [14, 15]. Systemic fentanyl is 100-times more potent than systemic morphine [16]. Therefore, systemic buprenorphine, 400 µg was converted to the equivalent systemic pentazocine dose of 30 mg in this study. As systemic pethidine is considered to be less potent than systemic morphine, 35 mg systemic pethidine was converted to the equivalent systemic morphine dose of 10 mg and thus systemic pentazocine dose of 30 mg. Systemic flurbiprofen, 50 mg, and systemic diclofenac, 50 mg, and systemic indomethacin, 50 mg, were converted to the equivalent systemic pentazocine dose of 15 mg. The frequency of rescue analgesic administration was determined as the frequency of the use of rescue analgesics during the first 24 h postoperative period. The total dose of rescue analgesics administered was determined as the sum of systemic pentazocine-equivalent doses of all opioids and NSAIDs given to patients as rescue analgesics during the same period.

### 2.3. Genotyping

Total genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by standard procedures. For genotyping rs1128503, the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was adopted. To perform PCR-RFLP, the restriction enzyme EcoO109I (Takara K.K. Japan, Shiga, Japan) and two primers of H44 and H45 were used (Table 1).

**Table 1. Primers used in the analyses of *ABCB1* polymorphisms**

rsID	Sequence	Forward/Reverse	Primer No.
1128503	ATCCAGCTCTCCACAAAATATCATAAAG	Forward	H44
	CTGATCACCGCAGGGTCTAGCTCGCATGG GTCCTC	Reverse	H45
1045642	ACACAACTTTTCCTTAATCTCACAG	Forward	H51
	TTGGTTGCTAATTTCTCTCACTTC	Reverse	H52
2032582	ACTCTTAGCAATTGTACCCATCAT	Forward	H46
	AAACACATTCTTAGAGCATAGT	Reverse	H50

First, PCR was performed in a final volume of 10  $\mu$ l containing 5 $\times$  GoTaq<sup>TM</sup> reaction buffer (Promega K.K. Japan, Tokyo, Japan), 0.8 mM dioxynucleoside triphosphate, 0.5  $\mu$ M of each primer, 0.05 U GoTaq<sup>TM</sup> DNA polymerase (Promega), and 5-50 ng extracted genomic DNA as the template. The PCR program was the following: 95°C for 1 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min. The amplified DNA fragments were digested by the restriction enzyme at 37°C in a total of 10  $\mu$ l reaction solution containing 10 $\times$  L Buffer, 0.75 U EcoO109I (Takara K.K. Japan, Shiga, Japan), and 5  $\mu$ l PCR product as the substrate. The digestion products were analyzed by electrophoresis using 1-2% agarose gel and ethidium bromide staining for visualization under ultraviolet illumination. The appearance of both the 366 bp and 134 bp DNA fragments of the loaded sample corresponded to the C/C genotype. The appearance of the 490 bp, 366 bp, and 134 bp fragments corresponded to the T/C genotype, and the appearance of the 490 bp fragment corresponded to the T/T genotype.

For genotyping rs1045642, the PCR-RFLP method was also adopted. To perform PCR-RFLP, the restriction enzyme Mbo I and two primers of H51 and H52 were used (Table 1). First, PCR was performed in a final volume of 10  $\mu$ l containing 2 $\times$  GoTaq<sup>TM</sup> Master Mix (Promega), 0.5  $\mu$ M of each primer, and 5-50 ng extracted genomic DNA as the template. The PCR program was the following: 95°C for 1 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min. The amplified DNA fragments were digested by the restriction enzyme at 37°C in a total of 10  $\mu$ l reaction solution containing 10 $\times$  K Buffer (Takara), 1 U MboI (Takara), and 5  $\mu$ l PCR product as the substrate. The digestion products were analyzed by electrophoresis using 1-2% agarose gel and ethidium bromide staining for visualization under ultraviolet illumination. The appearance of the 172 bp, 169 bp, and 98 bp DNA fragments of the loaded sample corresponded to the C/C genotype. The appearance of the 341 bp, 172 bp, 169 bp, and 98 bp

fragments corresponded to the T/C genotype, and the appearance of the 341 bp and 98 bp fragments corresponded to the T/T genotype.

For genotyping rs2032582, direct sequencing was adopted. To perform direct sequencing, two primers of H46 and H50 were used (Table 1). First, PCR was performed in a final volume of 10  $\mu$ l containing 2 $\times$  GoTaq™ Master Mix (Promega), 0.5  $\mu$ M of each primer, and 5-50 ng extracted genomic DNA as the template. The PCR program was the following: 95°C for 1 min, followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min. Following the cycle sequencing reaction with the BigDye® Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions and purification of the PCR products, DNA sequences of the fragments were determined using the automated sequencer ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Japan) with both forward and reverse primers.

#### 2.4. Statistical Analysis

The  $\chi^2$  test was performed for all genotype frequency data using FreeJSTAT 8.2 for Windows (free software by M. Sato, Japan; current version is available at <http://www.vector.co.jp/soft/win95/business/se030917.html>; accessed October 13, 2008) to investigate the deviation of the distributions from those in the theoretical Hardy-Weinberg equilibrium. Analysis of variance (ANOVA) was performed to examine the contribution of the SNPs to the frequency of 24 h analgesic requirements and postoperative 24 h analgesic requirements. ANOVA was performed using SPSS (12.0J for Windows, SPSS Japan, Tokyo, Japan). Power analyses were performed using G\*Power version 3.0.5 [17]. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. Results

The clinical data of the 129 subjects who were included in the association study are provided in Table 2. Rescue analgesics were required in 72 patients. Doses of rescue analgesics administered to patients are shown in Table 2. The allele frequencies in these SNPs were similar to those in a previous report [18] (Table 3). The genotype distributions for the three SNPs selected were not significantly different from the theoretical values of Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown).

Two-way ANOVA was performed to examine the effects of SNPs and gender on the frequency of rescue analgesic administration and the total dose of rescue analgesics administered. Statistical power analyses for the ANOVA revealed that the expected power (1 minus type II error probability) was 71% for the Cohen's conventional "medium" effect size 0.25 [19] when the sample size was 129 and type I error probability was set at 0.05. Significant associations were not observed between rs1045642 and rs2032582 and the frequency of rescue analgesic administration and total dose of rescue analgesics administered (data not shown). Significant associations were not observed between the three SNPs and

total dose of rescue analgesics administered after Bonferroni correction. However, a significant main effect of the *ABCB1* rs1128503 SNP on the frequency of rescue analgesic administration was found when the C/C genotype was compared with the combined C/T and T/T genotypes ( $F_{1, 125} = 6.283$ ,  $p = 0.013$ ; Figure 1). This difference was significant even after Bonferroni correction for the three SNPs ( $p = 0.039$ ), indicating that the carriers of the C/C genotype required less frequent rescue analgesics compared with carriers of the C/T or T/T genotype.

**Table 2. Clinical data of subjects included in the study**

N	Minimum Maximum	Mean	SD
Gender			
male	74		
female	55		
Age	129	28 80	63.57 9.92
Height (cm)	129	133 175	158.21 8.34
Weight (kg)	129	35 80	56.24 10.42
Frequency of analgesic administration	129	0 8	0.95 1.18
Total dose of rescue analgesics (mg)	129	0 112.5	14.07 18.56
Epidural morphine (mg)	2	0.5 2	1.25 1.06
Systemic pentazocine (mg)	24	15 75	26.25 17.83
Systemic buprenorphine (mg)	15	0.2 0.8	0.47 0.16
Systemic petidine (mg)	2	17.5 35	26.25 12.37
Systemic diclofenac (mg)	24	25 100	39.58 19.39
Systemic flurbiprofen (mg)	12	50 150	62.50 31.08
Systemic indomethacin (mg)	4	25 50	43.75 12.5

**Table 3. Genotype and allele frequency of *ABCB1* polymorphisms**

rs1128503(1236T/C)			rs2032582(2677G/T/A)			rs1045642(3435C/T)		
t	N	frequency	Genotype	N	frequency	Genotype	N	frequency
C/C	25	0.194	A/A	7	0.054	C/C	52	0.403
C/T	52	0.403	A/G	23	0.178	C/T	51	0.395
T/T	52	0.403	A/T	18	0.136	T/T	26	0.202
			G/G	23	0.178			
			G/T	30	0.233			
			T/T	27	0.209			
total	129	1.000	total	129	1.000	total	129	1.000
Allele frequency			Allele frequency			Allele frequency		
C	102	0.395	A	55	0.213	C	155	0.601
T	156	0.605	G	99	0.384	T	103	0.399
			T	102	0.395			
total	258	1.000	total	258	1.000	total	258	1.000

## 4. Discussion

Genetic variations of the human *ABCB1* gene have been the most extensively studied. More than 50 SNPs and insertion/deletion polymorphisms in the *ABCB1* gene have been reported. However, information is still limited with respect to the actual effect of these genetic polymorphisms on the function of the ABCB1 protein.

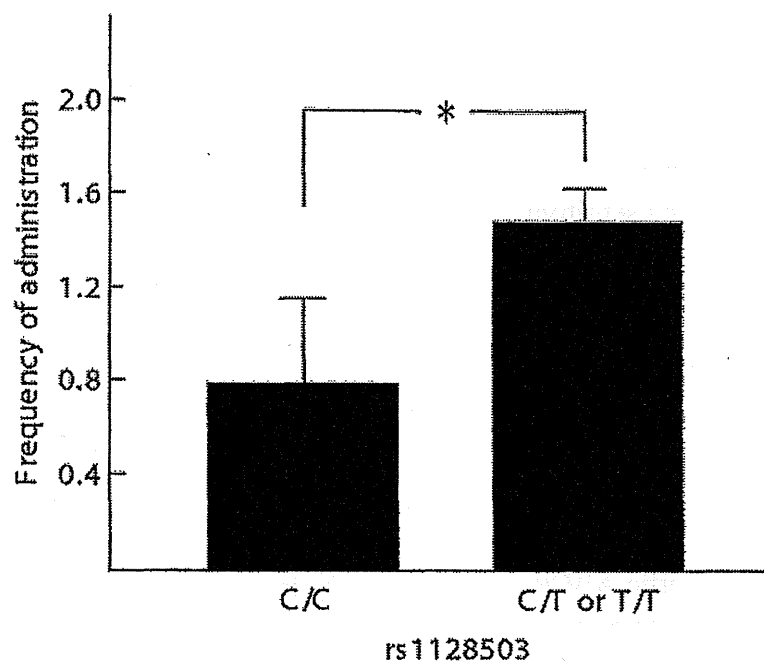


Figure 1. Association between frequency of rescue analgesic administration and *ABCB1* rs1128503. The data are presented as mean  $\pm$  SEM. Asterisk indicates significant difference (\* $p < 0.05$ ).

In the present study, we analyzed three *ABCB1* gene polymorphisms in a Japanese population who underwent major open abdominal surgery under combined general and epidural anesthesia. Previous studies have reported associations between the rs1045642, rs2032582, and rs1128503 SNPs and methadone doses required for effective treatment of heroin dependence [20].

Methadone is a  $\mu$ -opioid receptor agonist used for treating opiate dependence and is also a substrate of the transporter P-glycoprotein that is encoded by the *ABCB1* gene, similar to other opioids. Therefore, we chose these three *ABCB1* SNPs for the present association study.

We found associations between the *ABCB1* gene polymorphism (rs1128503) and frequency of rescue analgesic administration. A significant main effect of the *ABCB1* rs1128503 SNP on the frequency of rescue analgesic administration was observed when the C/C genotype was compared with the combined C/T and T/T genotypes (Figure 1). Blood levels of opioids are reported to depend on the activity of the ABCB1 protein, and the activity of the ABCB1 protein in patients requiring more rescue analgesics may be higher than in other patients. This hypothesis suggests that the activity of the ABCB1 protein in patients with the C/C genotype may be lower than in patients with the C/T and T/T

genotypes. rs1128503 is a synonymous variant that does not result in a change in amino acid sequence. It is located in exon 12 and within one of the intracellular loops of the protein, adjacent to an ATP-binding/utilization domain. rs1128503 may affect translation regulation, RNA stability, or other molecular mechanisms.

For our ANOVA, the desirable sample size was calculated as 158 for the effect size 0.25 to achieve 80% power. This suggests that the sample size of 129 in the present study might be insufficient to detect reliably moderate differences between the SNP genotypes. Further investigations with larger samples may reveal further associations between the *ABCB1* polymorphism and sensitivity to opioids.

In the present study, the data from patients who received NSAIDs not as main analgesics, but rather as rescue analgesics, were also analyzed. The amount of NSAIDs administered as rescue analgesics during the 24 h postoperative period were converted to the equivalent dose of systemic pentazocine. This study, therefore, investigated the relationship between *ABCB1* polymorphisms and sensitivity to opioids, not NSAIDs.

## 5. Conclusion

The present study analyzed *ABCB1* polymorphisms (rs1045642, rs2032582, rs1128503) in a Japanese population who underwent major open abdominal surgery under combined general and epidural anesthesia. We found an association between the *ABCB1* gene polymorphism rs1128503 and frequency of rescue analgesic administration. This study suggests that specific *ABCB1* variants may have clinical relevance by influencing the opioid doses required. The present findings will contribute to future personalized pain treatment.

## 6. Acknowledgments

We acknowledge Mr. Michael Arends for his assistance with editing the manuscript. We are grateful to the volunteers for their participation in this study and the anesthesiologists and surgeons at Research Hospital, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, and Toho University Sakura Medical Center for collecting clinical data. This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H17-Pharmaco-001, H19-Iyaku-023), the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (20602020, 19659405, 20390162), The Naito Foundation, and The Mitsubishi Foundation. The authors declare no conflict of interest.

## 7. References

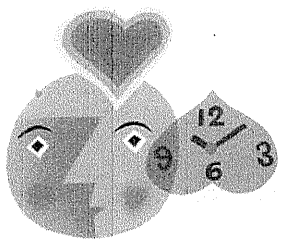
- [1] Ikeda K, Ide S, Han W, Hayashida M, Uhl GR, Sora I. How individual sensitivity to opiates can be predicted by gene analyses. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:311-317.

- [2] Uhl GR, Sora I, Wang Z. The  $\mu$  opiate receptor as a candidate gene for pain: polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7752-7755.
- [3] Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, Miner LL, Uhl GR. Opiate receptor knockout mice define  $\mu$  receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1544-1549.
- [4] Bruehl S, Chung OY, Donahue BS, Burns JW. Anger regulation style, postoperative pain, and relationship to the A118G mu opioid receptor gene polymorphism: a preliminary study. *J Behav Med* 2006;29:161-169.
- [5] Chou WY, Wang CH, Liu PH, Liu CC, Tseng CC, Jawan B. Human opioid receptor A118G polymorphism affects intravenous patient-controlled analgesia morphine consumption after total abdominal hysterectomy. *Anesthesiology* 2006;105:334-337.
- [6] Chou WY, Yang LC, Lu HF, Ko JY, Wang CH, Lin SH, Lee TH, Concejero A, Hsu CJ. Association of  $\mu$ -opioid receptor gene polymorphism (A118G) with variations in morphine consumption for analgesia after total knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;50:787-792.
- [7] Coulbault L, Beaussier M, Verstuyft C, Weickmans H, Dubert L, Trégouet D, Descot C, Parc Y, Lienhart A, Jaillon P, Becquemont L. Environmental and genetic factors associated with morphine response in the postoperative period. *Clin Pharmacol Ther* 2006;79:316-324.
- [8] Klepstad P, Rakvåg TT, Kaasa S, Holthe M, Dale O, Borchgrevink PC, Baar C, Vikan T, Krokan HE, Skorpen F. The 118 A > G polymorphism in the human  $\mu$ -opioid receptor gene may increase morphine requirements in patients with pain caused by malignant disease. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48:1232-1239.
- [9] Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. Absence of the mdr1a P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporine A. *J Clin Invest* 1995;96:1698-1705.
- [10] Klinck JR, Lindop MJ. Epidural morphine in the elderly: A controlled trial after upper abdominal surgery. *Anaesthesia* 1982;37:907-912.
- [11] Hoskin PJ, Hanks GW. Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states. *Drugs* 1991;41:326-344.
- [12] Buchanan WW, Kassam YB. European experience with flurbiprofen: a new analgesic/anti-inflammatory agent. *Am J Med* 1986;80:145-152.
- [13] Sunshine S, Olson NZ. Nonnarcotic analgesics. In: Wall PD, Melzack R (ed) *Textbook of Pain*, 3rd edn. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994, pp. 923-942.
- [14] Basar H, Yilmaz E, Ozcan S, Buyukkocak U, Sari F, Apan A, Batislam E. Four analgesic techniques for shockwave lithotripsy: eutectic mixture local anesthetic is a good alternative. *J Endourol* 2003;17:3-6.
- [15] Ozcan S, Yilmaz E, Buyukkocak U, Basar H, Apan A. Comparison of three analgesics for extracorporeal shock wave lithotripsy. *Scand J Urol Nephrol* 2002;36:281-285.
- [16] Pathak KS, Brown RH, Nash CL Jr, Cascorbi HF. Continuous opioid infusion for scoliosis fusion surgery. *Anesth Analg* 1983;62:841-845.



- 
- [17] Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007;39:175-191.
- [18] Sai K, Kaniwa N, Itoda M, Saito Y, Hasegawa R, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Kitamura Y, Kamatani N, Ozawa S, Sawada J. Haplotype analysis of *ABCBI/MDRI* blocks in a Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics* 2003;13:741-757.
- [19] Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (revised edition). Academic Press, New York, 1977.
- [20] Levran O, O'Hara K, Peles E, Li D, Barral S, Ray B, Borg L, Ott J, Adelson M, Kreek MJ. *ABCBI (MDRI)* genetic variants are associated with methadone doses required for effective treatment of heroin dependence. *Hum Mol Genet* 2008;17:2219-2227.

Reviewed by Drs. Ichiro Sora (Tohoku University Graduate School of Medicine) and Soichiro Ide (Hokkaido University Graduate School of Pharmaceutical Sciences).



# 心の分子メカニズムの探索 気持ちよさの生まれ方

こころの働きと  
病・覚醒剤

東京都精神医学総合研究所  
池田 和隆



池田 和隆

いけだ かずたか

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・分子精神医学研究ディレクター

1984年筑波大学附属駒場高校卒業、89年東京大学工学部反応化学科卒業、91年大阪大学大学院医学研究科修士課程修了、95年新潟大学大学院医学研究科博士課程修了。博士(医学)。

95年理化学研究所フロンティア研究システム研究員、97年理化学研究所脳科学総合研究センター研究員、2000年東京都精神医学総合研究所主任研究員を経て、03年より現職。

首都大学東京客員教授、日本神経精神薬理学会理事などを兼務。

専門は分子精神医学、特に快情動発現の分子メカニズムの解明をライフワークとしている。

01年日本神経科学学会奨励賞受賞、04年Distinguished International Scientist Collaboration Program Award (National Institute on Drug Abuse, USA) 受賞、06年東京都医学研究機構理事長表彰受賞。

著書に「精神の脳科学」(東京大学出版会2008年発行[分担執筆])などがある。

趣味は散歩、旅行。

東京学芸大学附属高校での講演(図1)という

ことで、今日はとても楽しみにしてきました。

それには二つの理由があります。まず、皆さんの先輩方にとってもお世話になっているためです。

先日、高名な東京医科歯科大学医学部精神科の西川徹教授と厚生労働省の研究班で一緒にした

ときに、「今度、学芸大附属高校へ講演に行くことになりました」とお話ししたところ、「僕はそ

このOBです」と伺いました。別の研究班でお世話になっている東北大学の大隅典子教授もこち

らのOGですし、皆さんよくご存じの茂木健一郎さんと理化学研究所脳科学総合研究センタ

ーの伊藤正男先生の研究室で一緒にしましたが、茂木さんもこのOBです。そして、この世の

中で私がつとも頭が上がない人が、こちら



図1 東京学芸大学附属高等学校での講演会の様子  
(精神研写真室庄田洋撮影)

のOGです。私の家内です。

もう一つの理由は、私自身が脳研究を目指したのが皆さんに近い年頃だったということです。浪人生のころ、友だちから「脳ってすごいぞ」という話を聞きました。僕は「脳ってそんなもんかなあ」と思っていたのですが、本屋へ行ったとき『脳の人間学』という本を試しに買ってちょっと読んだところ、非常に衝撃をうけました。「脳のことがわかると、すごい。人間の本质がわかってしまうんでは？」「脳の研究は世の中で一番大事じゃないか！」と思えたわけです。

最近、脳のがすごいブームですが、皆さんは、脳に関してどの程度関心がありますか。脳に関心がある方は、手をあげてください。

案外、少ないですね。では、僕の話聞いて、「ちょっとおもしろいかも」「脳の研究ってやりがいがあるな」ともし思っていただけばうれしく思います。

本日は、つかみどころのない神秘的なところの働きが、分子レベルで研究できるかもしれないという話をします。最初に、ここらにどのようにアプローチして研究を進めているのかを説明して、次に、快感の分子メカニズム、つまり、気持ちよさがどのように脳で生まれるか、現在までに解明されていることについてお話します。そのあと、基

礎的な研究が社会や医療にどのように役に立つかということと、「薬物依存」「痛みをとる」「小児の精神疾患、注意欠如多動性障害(AD/HD)」の三つの例をあげて紹介します。

#### 薬はこころの働きを解明する糸口

私たち脳研究者は、こころは脳がつくりだしていると考えています。しかし、こころには心臓の「心」という字をあてますし、英語の「heart」も、心臓とこころの両方の意味で使いますから、こころは心臓がつくりだしていると思っている方もいるかもしれません。

大人の脳の重さは、たかだか一・二〜一・四キログラムほどです。この臓器も分子が集まってできています。つまり、脳は物質でできていることから、脳を構成している物質の一つひとつの働きを明らかにすることができれば、徐々にこころの働きが理解できるようにになると、私たちは考えています。脳は、こころを研究するうえで重要な糸口なのです。

では、こころとは、どのようなものでしょうか。

まず、こころを生み出す脳に何らかの情報がはいります。たとえば、「友だちと喧嘩

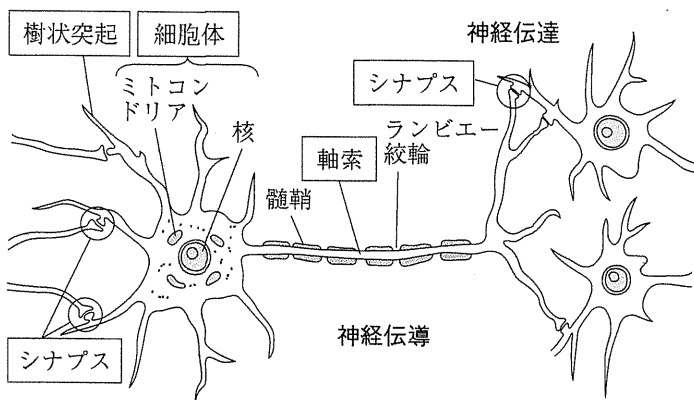


図3 神経細胞の模式図『脳神経科学イラストレイテッド』（羊土社、2000年、31ページより改変）（口絵カラー参照）

#### 脳の構造と神経伝達物質

ここで、脳の構造について簡単に説明します。脳には百五十億個とも一十億個ともいわれるたくさんの神経細胞があります。この神経細胞の細胞体から軸索（ヒゲ）が伸びて次の神経細胞とシナプスでつながっています（図3）。そして、ある一つの細胞体がほかの神経細胞から情報をうけとって興奮すると、細胞体は電気的なシグナルをつくりだし、このシグナルが軸索を伝わっていきまします。この電気的な流れを神経伝導といいますが、この神経伝導の情報を次の神経細胞に伝えるとき、シナプスが重要な役割を演じます。

シナプスでは情報を電氣的に伝えるので

して悲しい思いをした」「好きな人と話ができて今日は楽しかった」というように刺激が脳にはいると、こころが生まれます。

こころが生まれるとき、モルヒネなどの薬が影響することがあります。モルヒネは植物のアヘンケシの蕾（つぼみ）から抽出される主成分ですが、このモルヒネ以外にも、コカイン、お酒の主成分であるエタノール、タバコの主成分のニコチン、大麻やマリファナの主成分であるカンナビノイド、抗うつ薬、はては有機溶剤のトルエンやベンゼンなども脳に作用して、こころに重大な影響を及ぼします（図2）。薬は構造もわかっていてる分子です。薬が脳に影響することでも、分子間の相互作用が起こって、最終的にこころという複雑なものが生まれます。そこで、こころの働きを解き明かすための一つとして、薬から攻めるアプローチが考えられるのです。

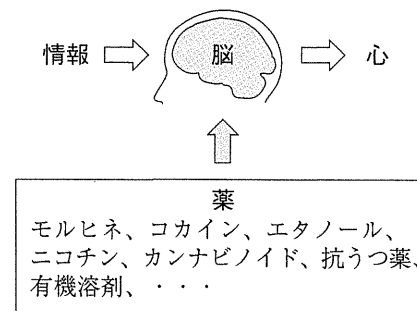


図2 こころが生まれる経路の模式図

はなく、情報の種類に応じた神経伝達物質という化学物質を使います。つまり、興奮した細胞体がつくりだした電気的なシグナルがいったん神経伝達物質に変換されて、その神経伝達物質がシナプスで放出され、それを次の神経細胞がうけとって、今度はその神経細胞が興奮して電気信号をつくりだしていきます。そして、その電気信号が神経伝導によって次のシナプスに伝えられると、そこでまた神経伝達物質が放出されます。このようにして、信号が次々と神経細胞に伝えられていくのです。シナプスでの情報の伝達を神経伝達といいます。

神経伝達物質には、神経の興奮を伝えるグルタミン酸などと、興奮を抑えるための情報を伝えるGABAなどいろいろな種類があり、それらを使い分けています。そして、情報をうけとる神経細胞のシナプスには、特定の神経伝達物質だけと結合する受容体というたんばく質が備わっています。

#### シナプスの受容体と薬物

モルヒネという薬物はシナプスにあるオピオイド受容体に作用します。オピオイド受容体は脳のなかにはごくわずかしが存在しませんが、ごく微量のオピオイド受容体をモルヒネは探し出して結合して作用します。また、覚醒剤の一種のメタンフェタミンとい

う物質は、シナプスにあるモノアミントランスポートという分子に作用します。カンナビノイドはカンナビノイド受容体に、ニコチンはアセチルコリン受容体に結合して作用します。

コーヒーや紅茶にはいつているカフェインには眠気をとばす作用がありますが、カフェインはアデノシン受容体に作用します。統合失調症などで苦しんでいる方が服用している抗精神病薬は、ドーパミン受容体に作用します。さらに、うつになった方が飲む抗うつ薬は、セロトニントランスポートに、睡眠薬はGABA受容体に、幻覚剤はセロトニン受容体に結合して作用します。それぞれの薬は、脳のなかに多数存在している神経細胞に広く作用するわけではありません。ごく限られた、その薬が結合する受容体やトランスポートをもった神経細胞にだけ作用するのです。

そして、たとえばモルヒネによってオピオイド受容体が活性化されると、その情報は細胞内の分子に伝えられ、さらに次の神経細胞の分子へと情報が伝えられていき、こころに影響を及ぼします。薬から始まって最終的にこころが生まれるところまでを、分子の言葉で細かく説明できる可能性があるのです。薬はこころを分子レベルで解明するうえでの糸口になります。

行動解析、遺伝子、精神疾患からこの働きを知る

薬を使う以外に行動解析という方法も、この働きを知るうえで重要です。分子がある受容体に結合したとか、細胞や臓器の状態をいくら詳しく調べても、この働きはわかりません。しかし、動物の行動をみていると、ある程度この働きを推測することができます。

もう一つ、遺伝子の変異を利用する方法があります。最近では遺伝子をかなり自在に操作することができるようになりましたので、遺伝子を組み換えた動物の行動を詳しく観察することで、遺伝子レベルでこの働きに迫ることができます。

ちなみに、ヒトの遺伝子の解説が二〇〇年にひと通り終わりました。ヒトの遺伝子のすべての配列がわかったわけではありませんが、ヒトによって遺伝子の配列はほとんど同じであることがわかっています。ただし、一人ひとり顔や背丈、性格が違うように、個人個人によって遺伝子の配列がほんの少し違っています。ヒトの場合、全体の九九・九％は誰でも同じですが、〇・一％だけ違ってきます。その違っていている遺伝子の箇所を遺伝子多型といいます。この遺伝子が違うことによって、この生まれ方も少し違ってきます。たとえば、一つの卵から分割して生まれてきた一卵性双生児と、もともと二

つの卵があって生まれてきた二卵性双生児を比べることで、遺伝子の影響を知ることができます。まったく同じというわけではありませんが、一卵性双生児はこの働きが似ています。このことから、この働きにも遺伝子がかかわっていることがわかります。

さらに、統合失調症やうつ、睡眠障害、注意欠陥・多動性障害(AD/HD)などさまざまな精神疾患の研究も重要です。これらの精神疾患では、どんなこの状態が生み出されているかを知り、その疾患が発症するメカニズムを理解することができれば、その知識をもとにして、病気になつていない人たちがどのような働きをもっているのかもある程度わかるようになります。

薬のほかにも、このような行動解析、遺伝子、精神疾患を糸口とすることで、この働きの解明を目指しています。

#### 快情動の分子メカニズム

私は、快情動の分子メカニズムの研究をライフワークにしています。気持ちよさや幸福感などの快情動は、人が人として暮らしていくうえで非常に大事だと思っからです。脳の働きのなかでも、特に喜怒哀楽といった感情・情動が生まれるメカニズムは

重要です。

ところで、「脳の研究をしています」というと、「頭のよくなる方法がわかりませんか」「頭のよくなる薬をつくってください」とよくいわれます。このように記憶や学習という脳の働きには大きな関心が集まっていますが、記憶や学習は、ある意味でロボットやコンピュータでもできることです。これに対して、何か悲しいことがあったとき、ロボットにかわりに悲しんでもらうわけにはいきません。うれしいことがあっても、コンピュータと一緒に喜んではくれません。喜怒哀楽は、本質的に、個人個人で感じとるべきものです。喜怒哀楽がなくなったら人間でなくなりません。そして喜怒哀楽は一人ひとりで違っています。

私に関心をもっている快の情動をつくりだすシステムは、脳にいろいろ備わっているのですが、そのなかで特に大事なものはオピオイドシステムとドーパミンシステムの二つです。オピオイドシステムには、さきほどからでてきているモルヒネやヘロインなどが作用します。もう一つのドーパミンシステムには、覚醒剤やココアの木から抽出されるコカインなどが作用します。そこで私たちは、オピオイドシステムとドーパミンシステムのなかでこれらの薬物の標的である $\mu$ (ミュー)オピオイド受容体とドーパミントラン

### オピオイド受容体の種類

- ・ ミュー ( $\mu$ ) : Morphine (モルヒネ) 鎮痛、多幸感
- ・ デルタ ( $\delta$ ) : vas deferens (輸精管) 鎮痛、抗うつ
- ・ カッパ ( $\kappa$ ) : Ketocyclazocine (ケトシクラゾシン) 鎮痛、嫌悪感

### 細胞内シグナル伝達経路

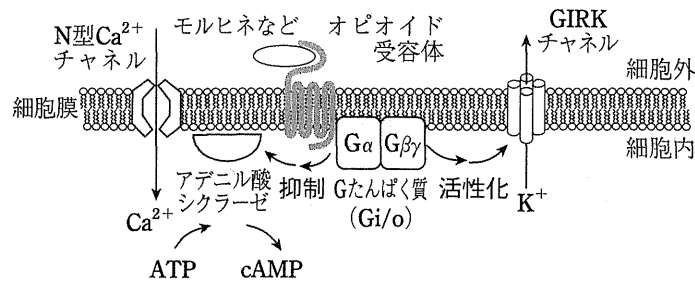


図4 オピオイドシステム (イラスト: 笠井慎也)

スポーターの働きについて、遺伝子を組み換えたり導入したりして研究をしています。

#### オピオイド受容体

オピオイド受容体には $\mu$ 、 $\delta$ (デルタ)、 $\kappa$ (カッパ)という三種類があります(図4)。それぞれに痛みをとる鎮痛効果がありますが、情動については違った効果を生み出します。 $\mu$ オピオイド受容体は多幸感を引き起こしますし、 $\delta$ オピオイド受容体は抗うつ効果を、 $\kappa$ オピオイド受容体は嫌悪感を引き起こします。

これらオピオイド受容体は、モルヒネなどによって活性化された後、



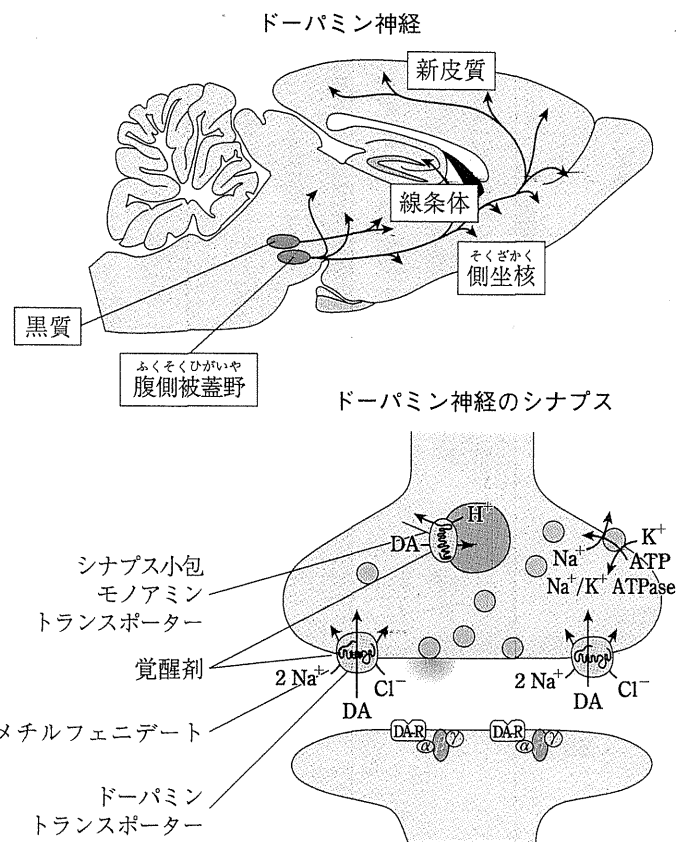


図5 ドーパミンシステム

Gたんぱく質に情報を伝えます。情報をうけたGたんぱく質からは酵素やイオンチャネルへ情報が伝わり、さらに次の神経細胞へと情報が伝えられていきます。

もう一つのドーパミントランスポーターは、図5に示すように、脳の黒質と腹側被蓋野という部分にあるドーパミン神経細胞に存在しています(生物学では「発現」という)。そして、ドーパミン神経細胞はその末端、つまり軸索の先のシナプスでドーパミンを放出します。ドーパミン神経細胞が興奮するとドーパミンが放出され、次の神経細胞に情報を伝えていきますが、そのときシナプス前部にあるドーパミントランスポーターは、ドーパミン受容体に結合せずに残ったドーパミンを取り込みます。この再取り込みをすることで、シナプスのすき間をきれいにします。ドーパミンは放出された一瞬だけ情報を伝えますが、余ったドーパミンはドーパミントランスポーターによって回収されるため、いつまでもドーパミンが作用して情報を伝え続けるような状態は起こりません。そして、再取り込みされたドーパミンは再利用されます。

ところが、覚醒剤やコカインは、ドーパミントランスポーターの働きをおかしくしてしまうため、ドーパミンの再取り込みができなくなると、余分なドーパミンがシナプスの間(間隙)に長く残るようになります。その結果、次の神経細胞にドーパミンによる

情報が伝わったままになってドーパミンの神経伝達が強まってしまいます。いつまでも興奮状態が続くわけです。

### モルヒネによる脳変化

μオピオイド受容体とドーパミントランスポーターは、快の情動にとって重要です。そこで、これらの分子をなくした動物で、快の情動の生まれ方を、薬物条件付け場所嗜好試験という方法で調べてみました。これはすごく長い名前で複雑そうな試験のように思えますが、装置はとても単純です。二つの部屋があるだけです(図6A)。マウスにモルヒネを打って一つの部屋に閉じ込めるという操作を繰り返して何度も行っていると、そのあとモルヒネを打たないで部屋を選ばせると、モルヒネを打たれたあとにいた部屋に長く滞在するようになります。そこで、マウスが二つの部屋のどちらに長く滞在したかで、打った薬に快楽を引き起こす作用があったかどうかを知るという実験です。

また、自己投与試験といって、薬物依存の状態に非常に近い状態のマウスをつくることができます(図6B)。たとえば、マウスがレバーを押すと薬物が心臓に投与されるようにすると、モルヒネなどの薬を欲しがって自分でレバーを押すようになります。これが自己投与の試験です。

また、マイクロダイアリシス法(図6C)では、ドーパミンやセロトニンなどの物質の濃度を、脳のごくごく狭い領域で測ることができます。

### 脳の快楽中枢はどこか

もう一つ、半世紀以上前にオルズとミルナーが発見した脳内自己刺激という画期的な方法があります(図6D)。オルズはこの方法を発見した当時、博士号を

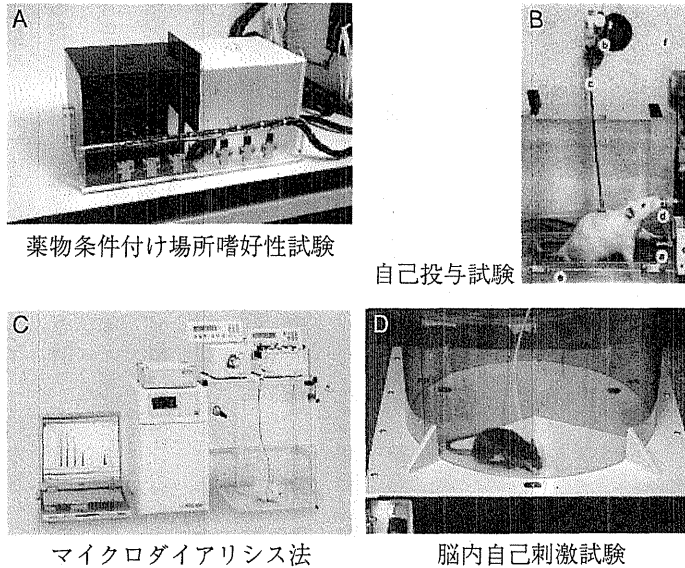


図6 快情動を調べる行動解析法(A、Dは精神研写真室庄田洋撮影、BはBehavioural Neuroscience A Practical Approach Vol. II, Sahgal Ed., 119ページより転載、Cは株式会社エイコムホームページより転載)

取得してすぐで、もう一人のミルナーは大学院生でした。この若い二人が、この方法によって快中枢の発見という画期的な発見をしました。

ちなみに、画期的な発見はだいたい若い人がします。ワトソンとクリックがDNAの二重らせん構造を発見したとき、ワトソンは二十四歳、クリックは三十六歳でした。私はいま四十一歳です。もう画期的な研究はできないかもしれないかもしれませんが、まだ頑張ります。皆さんもあまり余裕はありませんよ。世の中をかえるような研究をするには、二十歳代くらいが勝負かもしれません。

さて、オルズとミルナーが発見した脳内自己刺激は、最初ラットで見つかりましたが、その後、無脊椎動物のナメクジでも自分自身で刺激することがわかりました。ヒトでもわかっています。非常に強い報酬効果があります。脳の三分の一ほどの領域は、刺激すると、またそこを刺激したくなるといわれています。私たちは、マウスが穴を覗くと、電気刺激がなされるようにしています。すると、マウスは自分の脳を刺激したくて逆立ちするほどにもなつて、激しく刺激し続けます。この脳内自己刺激という現象の発見により、脳に快の中枢があることがわかりました。

この脳内自己刺激試験を、 $\mu$ オピオイド受容体とドーパミントランスポーターをもつていないマウスで行ってみました。 $\mu$ オピオイド受容体はモルヒネのターゲットになつて快楽をつくりだす分子ですから、これがなくなると脳内自己刺激をしなくなると予想しました。ところが、結果は、逆でした。 $\mu$ オピオイド受容体をもつていないマウスは、もつと強く自分を刺激したのです。

一方、ドーパミントランスポーターがないとドーパミンが回収されないため、ドーパミンの神経伝達が強まる結果、脳内自己刺激をもつとよくすると予想されます。これは予想通りでした。普通のマウスより強く脳内自己刺激をします。

もう一つ、電気刺激をもらうために必要な労力をだんだんふやすという方法で解析してみました。最初は、一回穴を覗けば一回電気刺激をもらえることを十分間ほど体験させます。その次の十分間は、二回穴を覗かないと刺激がこない、次は三回と、だんだん覗く回数をふやしていつて、最終的には二十八回穴を覗かないと一回の刺激をもらえないようになります。たとえば、皆さんも一教科でもよい成績をとればゲーム機かソフトを買ってもらえるようなご褒美があれば、その教科を頑張ると思います。次に、二教科でよい成績をとらないとゲーム機をもらえない、最終的には全教科でよい成績をとらないとゲーム機をもらえないということになると、「ゲーム機ごときのために全教科いい成

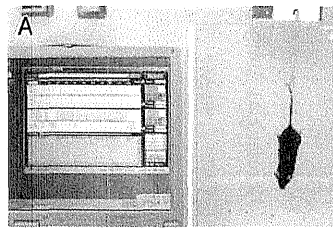
續なんてとる気にもならない」となるかもしれません。労力がかかるとご褒美をもらおうとする行動は弱まります。それと同じように、労力をだんだんふやしていくと、普通のマウスは自己刺激をしなくなります。

しかし、 $\mu$ オピオイド受容体をもっていないマウスは報酬にこだわります。「労力にみあわない」と思っても、頑張ります。ドーパミントランスポーターがないマウスでは、それがもっと顕著です。普通に一回に一回のときより、四回に一回しかご褒美がもらえないときのほうがかえって頑張つて穴覗きの行動をします。これは薬物依存に近い状態です。薬物依存では、薬が欲しくて我慢できなくなります。薬物依存者が全財産をはたいても薬が欲しくなるのと同じように、このマウスは労力を惜しまず快をむさぼります。ドーパミントランスポーターのない状態は薬物依存に非常によく似ています。

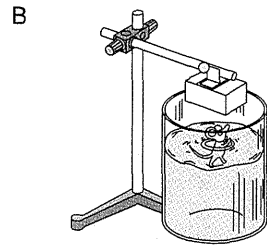
さきほど、 $\mu$ オピオイド受容体がなくなると、かえって脳内自己刺激をするようになるといういましたが、逆にモルヒネを投与して $\mu$ オピオイド受容体を活性化してみましました。すると、脳内自己刺激がモルヒネの濃度に依りて抑制されます。 $\mu$ オピオイド受容体が働けば働くほど脳内自己刺激は抑えられるのです。

#### 絶望状態での脳の働き

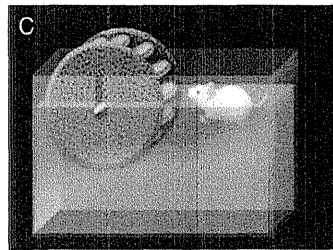
次に、嫌なものから逃れるような行動について調べてみました(図7A)。嫌なところから逃れたいという意欲も $\mu$ オピオイド受容体をもっていないマウスでは強まっていました。尾懸垂試験といって、マウスを尻尾でぶら下げて宙吊りにします。最初、マウスは逃げようとして一生懸命、動きます。しかし、「逃れられない」とわかると、だんだん絶望的になって動かなくなります。普通のマウスに比べて $\mu$ オピオイド受容体をもっていないマウスは、そのような絶望的な状況になったときでもよく動きます。



尾懸垂試験



強制水泳法



水車法

図7 逃避意欲を調べる行動解析法(Aは写真:精神研写真室庄田洋撮影、Bはイラスト:室町機械株式会社、Cはイラスト:井手聡一郎)