

図3 exon7に同定されたS311C多型⁸⁾
TCC(セリン)とTGC(システイン)のヘテロ接合体(左)とTCC(セリン)のホモ接合体(右)

表2 S311Cのメタ解析

オッズ比	p	症例	対照	論文数	報告者	報告年	文献
1.30	0.007	3,733	5,373	24	Glatt	2003	5
1.42	0.02	3,506	5,646	26	Jönsson	2003	9
1.38	0.002	3,707	5,363	27	Glatt	2006	6
1.47	0.0006	2,268	2,423	16	Liu	2012	13

筆者らが作成。文献5, 6, 9は白人とアジア人の両方で有意差があることを指摘している。Liuらはアジア人のみで解析して、日本人のサンプルで有意差が高く、日本人を除くと他のアジア人サンプルだけでは有意差が消失する。

はみつからなかった。

大規模研究

精力的な関連研究にもかかわらず小さな効果の遺伝子多型しか同定されない状況について、「真の遺伝子(多型)」を見落としている可能性が考えられた。染色体上で位置が近い多型は、まとめて次の世代へ受け継がれる。この性質を利用して、遺伝子頻度の比較的高い(稀ではない)多型を染色体上から一定間隔で選んで、症例・対照間で頻度を比較するゲノムワイド関連研究(genome-wide association study; GWAS)が企画された。GWASで検出された有意に患者群で頻度が高い多型の近傍に、「真の遺伝子(多型)」があるはずだという見込みになる。染色体全域を網羅するた

めに選ばれた多型は50万個という膨大な数に及んだが、DNAチップの出現で50万のタイピングが可能となり、2008年から統合失調症のGWASの成果が発表され始めた。50万という多重比較の検定に耐えて、オッズ比の小さい多型の関連を有意に検出するためには大規模な検体数が必要となった。検体規模は年を追って拡大され、2013年10月に発表された最新のGWASでは、スウェーデンの症例5,001例と対照6,243例でGWASを行い、そこで得られた結果をこれまでのGWASのメタ解析(症例8,832例, 対照12,067例)で確認し、その結果を再現するために別の独立した症例7,413例, 対照19,762例が用いられている¹⁷⁾。その結果、これまでのGWASで統合失調症と有意な関連が報告された染色体1番の

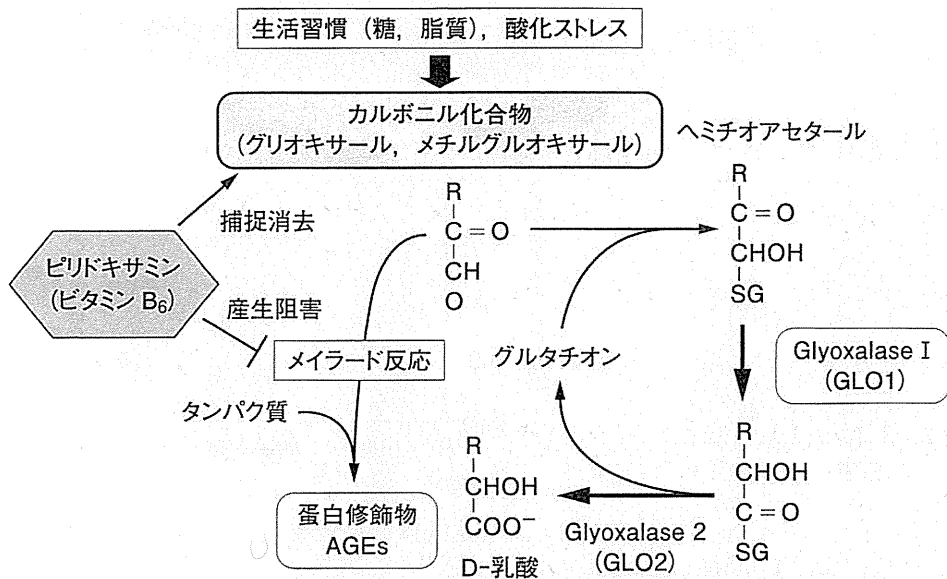


図4 カルボニルストレスと消去系

GLO1がカルボニル化合物を乳酸に分解する。カルボニル化合物はメイラード反応を介して蛋白質などを修飾し、終末糖化産物(AGEs)を生成する。AGEsが蓄積する状態は「カルボニルストレス」と提唱される。カルボニルストレス消去系には、GLO1以外にビタミンB₆があり、スカベンジャーとしてカルボニル化合物と結合してAGEsの腎排泄を促進し、メイラード反応を抑制する。

MIR137, 6番のHLA-DRB9, 8番のMMP16, 10番のC10orf32-AS3MT, SDCCAG8, これまでに双極性障害と関連が報告された染色体19番のMAU2, これまでに統合失調症と双極性障害で関連した染色体3番のITIH3, 12番のCACNA1Cが追認された。また、新規には染色体1番のAKT3, SDCCAG8, 2番のQPCT, ZEB2, FONG, C2orf82, 5番のSLCO6A1, 7番のMADIL1, 8番のTSNARE1, 11番のSNX19, 12番のC12orf65が有意な関連を示した。effect sizeは0.921~1.238だった¹⁷⁾。

稀な遺伝子変異を用いた研究

我々は、大きな遺伝子効果を持った変異を同定するために、稀な身体合併症を持った患者、特徴的な経過や治療抵抗性の症状を示す症例などを用いて、連鎖研究から有望とされた遺伝子や、病態仮説から候補分子とされた遺伝子のresequenceを行った。

その結果、3人同胞の一致例からGLO1遺伝子のexon1にadenineが1塩基挿入する新規の

フレームシフト変異を同定した。GLO1は連鎖が報告された染色体6p21にコードされ、酸化ストレスなどで生じる有害なカルボニル化合物を分解解毒する酵素である(図4)。症例のGLO1遺伝子ではフレームシフトにより本来exon6にあるはずの終始コドンがexon1に早期終始コドンとして発生し、全長184アミノ酸のGLO1が症例では42アミノ酸しか合成されていない可能性が示唆された。そこで、症例のリンパ球を用いてGLO1の発現を測定したところ、mRNA、蛋白質ともに健常者の50%まで低下していた(図5)。カルボニル化合物はメイラード反応を介して蛋白質などを修飾し、終末糖化産物(advanced glycation end products; AGEs)を生成する。AGEsが蓄積する状態は「カルボニルストレス」と提唱され、糖尿病性網膜症や動脈硬化の発症、進展、増悪に関与し、心不全や冠動脈疾患による死亡率とも相関する。カルボニルストレス消去系には、GLO1以外にビタミンB₆があり、スカベンジャーとしてカルボニル化合物と結合してAGEsの腎排泄を促進し、メイラード反応を抑制する(図4)。

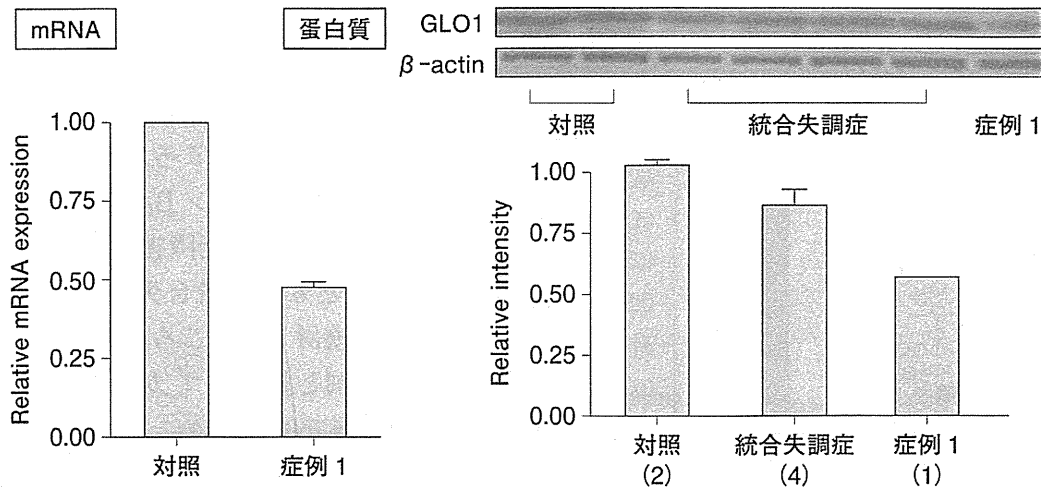


図5 症例1におけるGLO1の発現量
末梢血リンパ球におけるmRNA(左)と蛋白レベル(右)

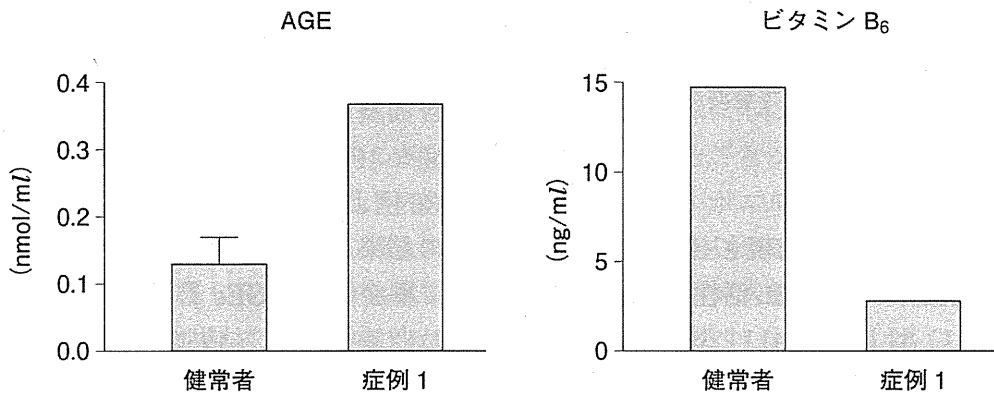


図6 症例1におけるAGEsとビタミンB₆
末梢血におけるAGEs(左)とビタミンB₆(右)

症例ではGLO1活性が50%まで低下していることから、血中AGEs(ペントシジン)濃度の上昇、およびカルボニル消去に動員されることによるビタミンB₆の低下が予測された。そこで、症例の末梢血を解析したところ、AGEs濃度は対照の3.7倍に増加し、ビタミンB₆は対照の20%レベルにまで低下していた(図6)。

稀な症例から一般症例への敷衍

症例では稀な新規のフレームシフト変異によって、GLO1活性が50%低下するという大きな機能変化がもたらされていた。一般症例では、より軽度な活性低下を伴った頻度の高い多型が存在するのではないかと考え、GLO1遺伝子の関連研

究を行った。統合失調症202例と年齢・性別の一致した対照187例を用いて、データベースに登録されている9か所のSNP(single nucleotide polymorphism)の頻度を比較した。その結果、3つのハプロタイプ(複数のSNPの組み合わせ)で有意な関連を認めた。ハプロタイプが重なりあう部分のSNPはGlu111Alaであり、有意ではないがAlaのアレルが統合失調症で高い頻度で認められた(患者8%, 対照5%)。特にAla111ホモ接合体は4例同定されたが、すべて統合失調症だった。このことから、Alaが統合失調症のリスクファクターの可能性が示唆された。

そこで、Glu111型とAla111型のGLO1のcDNAにGFPを融合したコンストラクトを

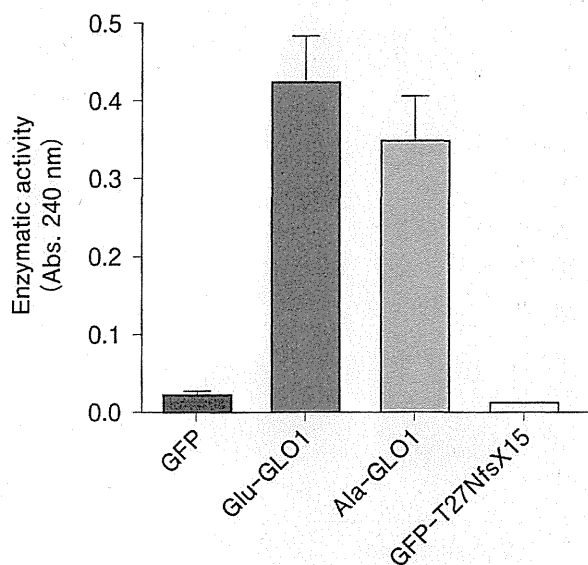


図7 COS-7細胞に発現させたGLO1を用いた活性値³⁾

Glu111型とAla111型のGLO1のcDNAにGFPを融合したコンストラクトをCOS-7細胞へ導入し、強制発現させたGLO1蛋白をGFPで免疫沈降して回収し活性を測定した。

COS-7細胞へ導入し、強制発現させたGLO1蛋白をGFPで免疫沈降して回収し活性を測定した。その結果、Glu111型よりAla111型のGLO1で活性が低かった(図7)。次に、Alaホモ接合体3名の赤血球を用いて酵素活性を測定したところ、Glu/Glu, Glu/Ala型のヒトより有意にGLO1活性が低下していた(16%低下, $p=0.0003$)。

50%活性低下を伴うフレームシフト変異だけでなく、一般症例にも16%活性低下を伴うAla1111ホモ接合体が存在することから、統合失調症には軽度にAGEsが蓄積している症例が広く存在する可能性があると考えた。そこで、AGEsの蓄積要因である糖尿病、腎障害、炎症性疾患を除外規定にして、45例の統合失調症と61例の健常対照の末梢血を用いてAGEsとビタミンB₆を測定した。その結果、統合失調症では対照より有意にAGEs濃度が上昇し($p<0.001$)、ビタミンB₆濃度が有意に低下していた($p<0.001$) (図8)³⁾。AGEs蓄積の有無と患者・対照を χ^2 検定したところ、統合失調症はAGEs蓄積と有意に関連し($p<0.0001$)、オッズ比は25.81と算出

された。

我々は、上述した被験者とは独立に156例の統合失調症と年齢、性別の一致した221例の対照を用いて追試したところ、統合失調症で有意なAGEsの蓄積とビタミンB₆の低下を再現した¹⁶⁾。また、糖尿病と腎機能障害を持たない157例の統合失調症と6例の統合失調感情障害を用いて臨床情報を検討したところ、カルボニルストレスがない67例と比較してカルボニルストレスを伴った26例では、有意に入院症例が多く、入院期間が長く、抗精神病薬の投与量が多い、治療抵抗性の特徴を示した¹⁵⁾。Koudiratら¹²⁾も、55例の統合失調症と年齢、性別、喫煙歴の一致した55例の対照で追試した。彼らは、AGE-ReaderTM(皮膚のAGEsを蛍光法により非侵襲的に計測する装置)を用いて検討した。その結果、統合失調症で有意にAGEsが高く($p<0.0001$)、重症な19例(Kraepelian-schizophrenia¹⁰⁾)は他の36例より有意にAGEsが高かった。Koudiratらの結果は、統合失調症でAGEsが蓄積した点と、重症例がAGEs蓄積と関連した点のどちらにおいても我々の結果を支持した。

稀な症例による異種性の克服

稀だが特徴的な統合失調症罹患者から、GLO1遺伝子に50%の活性低下をもたらす新規のフレームシフト変異を同定した。症例では、カルボニル消去系に機能不全を招来しAGEsが対照の3.7倍に増加し、カルボニルスカルベンジャーであるビタミンB₆の枯渇を認めた。稀だが大きな活性低下をもたらす変異を持った症例において、顕著なAGEs蓄積を同定し、これをプロトタイプとして一般症例に敷衍し46.7%の患者でAGEs蓄積を認めることができた(ペントシジン蓄積あり >55.2 ng/ml; 対照の平均+2SDをカットオフ値)。強い効果の単一遺伝子が病態に関与することを予測して、稀な家族性の症例に注目したので、顕著なカルボニルストレスを同定することができた。また、この症例をプロトタイプとしてとらえた結果、一般症例からもカルボニルストレスを見出

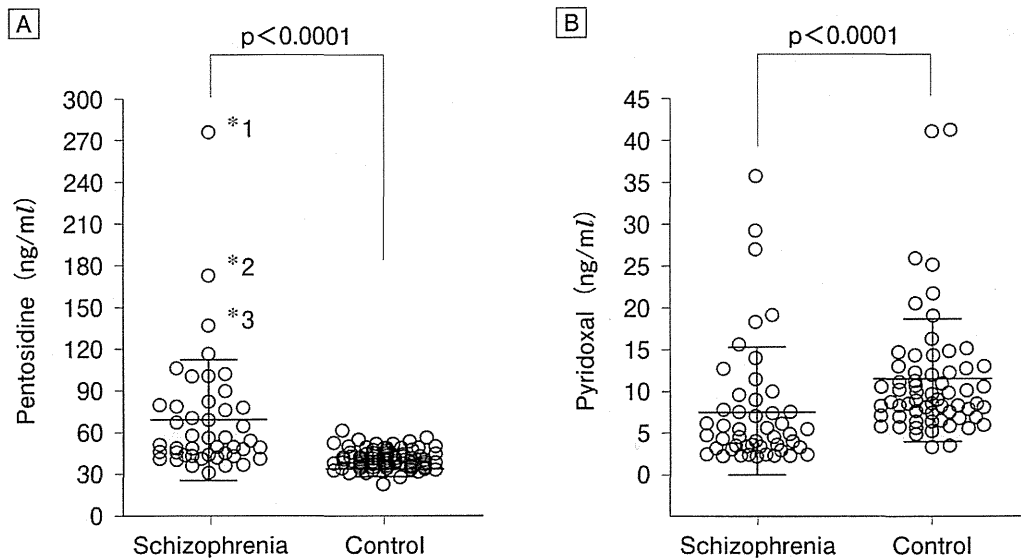


図8 統合失調症と対照の末梢血における AGEs とビタミン B₆³⁾
 (A) AGEs (pentosidine), (B) ビタミン B₆ (pyridoxal) * 1~3 は治療抵抗性の重症例だった。

せたと考えている。130 ng/ml を超える顕著な AGEs 蓄積と 3 ng を下回る顕著なビタミン B₆ 低下を併せ持つ症例は全体の 6% に過ぎず、フレームシフト変異を持った発端症例は、この 6% に含まれていた。臨床像を無視して検体を集積しても、カルボニルストレスを見逃した可能性が高かった。統合失調症は異種性を内包した症候群であり、今回はカルボニルストレスを伴う比較的均一で小さな一群を抽出することができたと考えている。

残される未解明部分

対象から AGEs の増加要因である糖尿病、腎障害、炎症性疾患は除外してある。カルボニルストレスを認めた症例の一部は GLO1 の遺伝的活性低下(フレームシフト変異, Ala111 のホモ接合体)が AGEs 蓄積に寄与したと考える (p = 0.0054; オッズ比 = 5.63)。しかし、フレームシフトや Ala111 ホモ接合体を認めた症例は一部であり、多くのカルボニルストレスの発生機序解明は不明である。ただ、カルボニルストレスがみられた統合失調症では、カルボニルストレスを伴わない統合失調症より遺伝子変異を持たない症例でも有意に GLO1 活性が低下していた¹⁵⁾。遺伝子

変異と無関係に GLO1 活性を低下させる他の要因が示唆されたことから、比較的均一な集団とは述べたが、カルボニルストレスの発症機序には異種性が十分想定しえる。

また、抗精神病薬がカルボニルストレスに影響した疑いは除外しきれていない。ただし、フレームシフト変異のような症例は、発症前からカルボニルストレスが存在した可能性を示唆している。実際に、我々は初発で未服薬の症例でカルボニルストレスを同定した²⁾。しかし、動物に抗精神病薬を投与してカルボニルストレスが発生しないか確認する必要があり、現在、慎重に検討を進めている。

遺伝子変異を持った症例については、カルボニルストレスが発症前から存在した可能性が考えられ、こうした症例に発症前からピリドキサミン(活性型ビタミン B₆: 後述)の予防的投与を行うことで、発症回避の可能性が期待できる。また、一部であるが健常者からもフレームシフト変異を同定しており、これら健常者では AGEs 蓄積が認められなかった。この保因者では、GLO1 の補酵素であるグルタチオンや亜鉛の血中濃度が、平均より高い濃度で認められており、これが GLO1 の活性低下を代償してカルボニルストレスを抑制し

た可能性を考えると、発症回避に向けた環境因子としてカルボニル消去系因子の補充療法に検討の価値があると考ええる。

治療薬としてのピリドキサミン

ビタミン B₆ はピリドキサール、ピリドキシン、ピリドキサミンからなり、互いに平衡関係にある。生体内ではピリドキサールがほとんどを占め、今回計測したビタミン B₆ もピリドキサールである。しかし、カルボニル消去作用を持つのはピリドキサミンだけであり、市販のビタミン B₆ (ピリドキサール) を服用しても、体内でピリドキサミンに移行する量は微量である。我々は、カルボニルストレスの改善効果を狙いピリドキサミンの 24 例の健常男性を対象に第 I 相臨床試験を実施した。有害事象を認めず、Zucker fatty rat で AGEs 生成阻害に有効な 1 日暴露量 (AUC₀₋₂₄) 46 $\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}^{11}$ に達するピリドキサミン投与量も決定した。2011 年 10 月から 2012 年 10 月にかけて、10 例のカルボニルストレス性統合失調症を対象に、ピリドキサミンを用いた医師主導治験を行った。被験者にはピリドキサミンを探索的に 1,200, 1,800, 2,400 mg/日で 6 か月間投与し、PANSS などで重症度変化を解析した。全例実薬を服用するオープン試験であり前期第 II 相治験になる。現在、プラセボ対照を置く後期第 II 相試験実施に向けて準備を進めている。後期第 II 相試験で有効性が証明できれば、製薬メーカーの協力を得て大規模な第 III 相試験を経て厚生労働省に承認申請をすることを目指している。

おわりに

統合失調症に遺伝要因が関与することは間違いないとしても、遺伝子研究は当初考えられていたほど病態解明に結びつく成果を挙げていない。我々は、研究を難航させる一因を統合失調症の異種性にあると想定し、対象の均一化を目指した。すなわち、大きな効果を持つ稀な遺伝子変異を特殊な症例で同定し、当該症例で発生している「強められた病態」の発見に努めた。「強められた病

態」から一般症例へ向けて連続的に「弱められた病態」が続くことを仮定して解析することによって、比較的均一で小さい集団の単離につとめた。GLO1 にフレームシフトを持った発端症例は、統合失調症全体の 6% でしかみられないほど高い AGEs 値と低いビタミン B₆ 濃度を示した。そこからアラニンのホモ接合体を経て、遺伝子変異を持たない一般症例まで約 4 割でカルボニルストレスがゆるやかに広がった。臨床像は治療抵抗性とほぼ一致したが、裾野へ行くほど他の病態との異種性が強まった印象がある。なぜなら、ピリドキサミンを用いた臨床試験で最も想定どおりの反応を示したのはフレームシフト症例であり、遺伝子変異のない末端症例ほど想定外の所見がみられたからである。

研究を難航させる要因には、精神疾患がマクロ経済や気象現象とならぶ複雑系に属していることが関係しているのではないかと考える。複雑系において、還元主義的な——ある遺伝子変異に精神症状の発生原因を集約させる——研究手法は妥当性が低い。メチル化や母体内環境なども関与したかもしれないが、一緒に生育された Genain 家の一卵性 4 つ子が多彩な臨床所見と予後をみせたことは、脳が複雑系だったことも大きな要因だったのではないだろうか。それでも、我々は還元主義的検討が限定的に成立しそうな希少症例を探索し、当該症例をプロトタイプとして一般症例へ敷衍する研究を行った。この方法が有効だとすれば、統合失調症はいくつかの比較的均一で小さな集団からなる症候群として立ち現われてくるかもしれない。とすれば、稀だが「強められた病態」を持った症例を探し出す臨床的視点が、今後も統合失調症を解明するために重要な出発点であり続けると考えている。

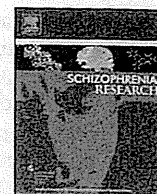
本研究は、東京都医学総合研究所および都立松沢病院と共同研究施設の研究倫理委員会の承認を得て、被験者に研究の説明と書面による同意を得て行われた。

謝辞

本研究は、以下の共同研究者の御協力のもとに実施されました。理化学研究所 吉川武男先生、大西哲生先生、豊田倫子先生、岡山大学 氏家寛先生、東北大学 宮田敏男先生、神戸大学 曾良一郎先生、千葉大学 伊豫雅臣先生、橋本謙二先生、松澤大輔先生、浜松医科大学 森則夫先生、弘前大学 中村和彦先生、大阪大学 武田雅俊先生、橋本亮太先生、福本素由乙先生、名古屋大学 尾崎紀夫先生、久島周先生、東京大学 笠井清登先生、山末英典先生、小池進介先生、滝沢龍先生、筑波大学 有波忠雄先生、東京医科歯科大学 融道男先生、東海大学 瀧澤俊也先生、湯澤公子先生、金沢大学 山本博先生、渡邊琢夫先生、長崎大学 今村明先生、清和病院 稲田俊也先生

文献

- 1) Alderson NL, Chachich ME, Youssef NN, et al : The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int* 63 : 2123-2133, 2003
- 2) Arai M, Koike S, Oshima N, et al : Idiopathic carbonyl stress in a drug-naive case of at-risk mental state. *Psychiatry Clin Neurosci* 65 : 606-607, 2011
- 3) Arai M, Yuzawa H, Nohara I, et al : Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 67 : 589-597, 2010
- 4) Arinami T, Itokawa M, Enguchi H, et al : Association of dopamine D₂ receptor molecular variant with schizophrenia. *Lancet* 343 : 703-704, 1994
- 5) Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT : Meta-analysis identifies an association between the dopamine D₂ receptor gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8 : 911-915, 2003
- 6) Glatt SJ, Jönsson EG : The Cys allele of the DRD2 Ser311Cys polymorphism has a dominant effect on risk for schizophrenia : Evidence from fixed- and random-effects meta-analyses. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B : 149-154, 2006
- 7) 井上英二 : 現在の遺伝精神医学とその問題点—精神分裂病と躁うつ病について. *精神誌* 71 : 1278-1294, 1969
- 8) Itokawa M, Arinami T, Futamura N, et al : A structural polymorphism of human dopamine D₂ receptor, D₂ (Ser311-->Cys). *Biochem Biophys Res Commun* 196 : 1369-1375, 1993
- 9) Jönsson EG, Sillén A, Vares M, et al : Dopamine D₂ receptor gene Ser311Cys variant and schizophrenia : Association study and meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 119B : 28-34, 2003
- 10) Keefe RS, Mohs RC, Losonczy MF, et al : Characteristics of very poor outcome schizophrenia. *Am J Psychiatry* 144 : 889-895, 1987
- 11) Kety SS, Rosenthal D, Wender PH, et al : Mental illness in the biological and adoptive families of adopted schizophrenics. *Am J Psychiatry* 128 : 302-306, 1971
- 12) Kouidrat Y, Amad A, Desailoud R, et al : Increased advanced glycation end-products (AGEs) assessed by skin autofluorescence in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 47 : 1044-1048, 2013
- 13) Liu ZW, Liu JL, An Y, et al : Association between Ser311Cys polymorphism in the dopamine D₂ receptor gene and schizophrenia risk : A meta-analysis in Asian populations. *Genet Mol Res* 11 : 261-270, 2012
- 14) Mirsky AF, Quinn OW : The Genain quadruplets. *Schizophr Bull* 14 : 595-612, 1988
- 15) Miyashita M, Arai M, Kobori A, et al : Clinical features of schizophrenia with enhanced carbonyl stress. *Schizophr Bull* 2013 Sep 23 [Epub ahead of print]
- 16) Miyashita M, Arai M, Yuzawa H, et al : Replication of enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci* (in press)
- 17) Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, et al : Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nat Genet* 45 : 1150-1159, 2013
- 18) Rosenthal D : The Genain quadruplets : A case study and theoretical analysis of heredity and environment in schizophrenia. Basic Books, New York, 1963
- 19) SZGene (<http://www.szgene.org/>)
- 20) Weinberg I : Zum Problem der Erbprognosebestimmung. Die Erkrankungsaussichten der Vetter und Basen von Schizophrenen. *Zeitschr Ges Neurol Psychiat* 112 : 101-171, 1928



Volume reductions in frontopolar and left perisylvian cortices in methamphetamine induced psychosis

Yuta Aoki ^{a,b}, Lina Oriabe ^a, Yoichiro Takayanagi ^b, Noriaki Yahata ^a, Yuriko Mozue ^b, Yasuhiko Sudo ^b, Tatsuji Ishii ^c, Masanari Itokawa ^d, Michio Suzuki ^e, Masayoshi Kurachi ^e, Yuji Okazaki ^b, Kiyoto Kasai ^a, Hidenori Yamasue ^{a,*}

^a Department of Neuropsychiatry, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

^b Department of Psychiatry, Tokyo Metropolitan Matsuzawa Hospital, 2-1-1 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-0057, Japan

^c Department of Radiology, Tokyo Metropolitan Matsuzawa Hospital, 2-1-1 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-0057, Japan

^d Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 2-1-6, Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8506, Japan

^e Department of Neuropsychiatry, University of Toyama Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 November 2012

Received in revised form 21 April 2013

Accepted 22 April 2013

Available online 17 May 2013

Keywords:

Brain

Brodman area (BA) 10

Frontal pole

Human

Stimulant

Substance use

ABSTRACT

Consumption of methamphetamine disturbs dopaminergic transmission and sometimes provokes schizophrenia-like-psychosis, named methamphetamine-associated psychosis (MAP). While previous studies have repeatedly reported regional volume reductions in the frontal and temporal areas as neuroanatomical substrates for psychotic symptoms, no study has examined whether such neuroanatomical substrates exist or not in patients with MAP. Magnetic resonance images obtained from twenty patients with MAP and 20 demographically-matched healthy controls (HC) were processed for voxel-based morphometry (VBM) using Diffeomorphic Anatomical Registration using Exponentiated Lie Algebra. An analysis of covariance model was adopted to identify volume differences between subjects with MAP and HC, treating intracranial volume as a confounding covariate. The VBM analyses showed significant gray matter volume reductions in the left perisylvian structures, such as the posterior inferior frontal gyrus and the anterior superior temporal gyrus, and the frontopolar cortices, including its dorsomedial, ventromedial, dorsolateral, and ventrolateral portions, and white matter volume reduction in the orbitofrontal area in the patients with MAP compared with the HC subjects. The smaller regional gray matter volume in the medial portion of the frontopolar cortex was significantly correlated with the severe positive symptoms in the individuals with MAP. The volume reductions in the left perisylvian structure suggest that patients with MAP have a similar pathophysiology to schizophrenia, whereas those in the frontopolar cortices and orbitofrontal area suggest an association with antisocial traits or vulnerability to substance dependence.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In Japan, it has been recognized in years that administration of methamphetamine (METH) can cause persistent psychosis, including visual and auditory hallucinations and delusions, in healthy subjects without preexisting psychiatric problems. This process was termed METH associated psychosis (MAP) (Ellinwood, 1968; Rylander, 1972; Ellinwood et al., 1973; Iwanami et al., 1991; Sato et al., 1992; McKetin et al., 2006; Matsuzawa et al., 2007; Kishimoto et al., 2008). In the USA, it has been recognized that stimulants can cause initiation and maintenance of schizophrenia-like psychosis (Flaum and Schultz, 1996). A recently published population-based cohort study in California demonstrated that consumption of METH significantly increased the risk of developing schizophrenia-like psychosis (Callaghan et al., 2012). Because of the recent rapid expansion of

illegal usage of METH in the USA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration office of applied studies., 2012), MAP is now of particular interest in the clinical (Grelotti et al., 2010) and research settings (Rounsaville, 2007).

Neuroimaging studies have repeatedly reported that enhanced dopaminergic transmission is the potential underlying pathophysiology of MAP (Sekine et al., 2001, 2003; Grant et al., 2012), and dopamine antagonists effectively attenuate MAP (reviewed in Grant et al., 2012). In addition, genetic studies have also provided evidence that MAP and schizophrenia have many genetic vulnerabilities in common (reviewed in Grant et al., 2012). These clinical and genetic similarities between MAP and schizophrenia have implied that MAP may be a human pharmaceutical model of schizophrenia (Grant et al., 2012). Moreover, they have provoked debate as to whether persistent MAP is distinct from schizophrenia, and hence requires a separate diagnostic classification (Rounsaville, 2007; Callaghan et al., 2012).

Although both patients with MAP and those with schizophrenia experience delusions and hallucinations, patients with MAP tend to

* Corresponding author. Tel.: +81 3 5800 9263; fax: +81 3 5800 6894.

E-mail address: yamasue-tky@umin.ac.jp (H. Yamasue).

have traits such as immorality or antisocial behavior more often than those with schizophrenia (Grant et al., 2012). A number of studies have suggested that the prefrontal cortex, particularly frontopolar cortex (FPC), and its connectivity with temporal lobe are the neural bases of moral judgment (Raine et al., 2000; Laakso et al., 2002; Müller et al., 2008; Yang et al., 2009; Tsujimoto et al., 2011), and that the orbitofrontal cortex is also known to contribute to antisocial behavior via value-based decision making (Lucantonio et al., 2012). Thus, it is reasonable to expect that the specific traits of patients with MAP derive from specific brain structural abnormalities in the frontal and temporal lobe.

Numerous studies have described consistent structural changes in the frontal and temporal lobe in schizophrenia, such as volume reductions in the left perisylvian region (Pantelis et al., 2003; Glahn et al., 2008; Chan et al., 2011; Fusar-Poli et al., 2012). Thus, investigating regions in the frontal and temporal lobe that may mediate the psychosis-general and -specific clinical characteristics in patients with MAP will further elucidate whether MAP is distinct from schizophrenia. Furthermore, such investigations would address whether MAP requires a separate diagnostic and/or pathophysiological classification from schizophrenia in terms of abnormalities in brain structure as an intermediate phenotype between symptomatology and genetics.

To address this question, in this study, we conducted voxel-based morphometry (VBM) using Diffeomorphic Anatomical Registration Using Exponentiated Lie Algebra (DARTEL) (Ashburner, 2007) to explore volumetric changes across the entire brain in patients with MAP. Based on previous studies examining patients with related disorders such as schizophrenia, mood disorders, stimulant abusers, antisocial personality disorder and psychopath, it was hypothesized that morphological abnormalities were observed in the frontal and temporal lobe in patients with MAP compared with matched healthy control (HC).

2. Materials and methods

2.1. Participants and clinical evaluation

All participants in the current study, including both the MAP and HC subjects, were included in our prior published volumetric investigation employing manual-tracing methodology, and their detailed demographic information and clinical assessments are available elsewhere (Orikabe et al., 2011). Briefly, 20 right-handed inpatients and outpatients with MAP were recruited from the Department of Psychiatry, Metropolitan Matsuzawa Hospital, Japan. Ten were male, and ten were female. A diagnosis was determined for each patient according to the International Classification of Diseases-10 (ICD-10) research criteria for MAP (World Health Organization, 1993). The criteria defined the duration of psychosis due to substance use as less than 6 months. At least two experienced psychiatrists separately examined the patients and reached a consensus diagnosis in each subject. The other one psychiatrist (Y.A.) further reviewed the subjects' clinical records to explore preexisting psychiatric diagnoses and confirm that the patients with MAP had no primary diagnosis of or history of consultation for Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV axis I disorders, except substance abuse or dependence and antisocial behavior. Psychiatric symptoms were evaluated by one psychiatrist (Y.T.) using the Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) (Overall and Donald, 1962), within three days prior to magnetic resonance imaging (MRI) scanning.

Similar to previous studies examining METH abusers (Sekine et al., 2001, 2003), detailed information on METH use and its relationship to onset and disappearance of psychotic symptoms was obtained carefully from interviews with the patients and by examining their medical records. As we have adopted the operational definition of the ICD-10 criteria for psychosis due to psychoactive substance use for the diagnosis of MAP, we also confirmed that psychotic symptoms did not exist before first consumption of METH and did not last

more than 6 months (Table 1). Seventeen of the 20 patients received typical neuroleptics. Nine of the 17 patients received both typical and atypical neuroleptics. The other 3 patients received atypical neuroleptics only. According to their charts, all patients with MAP examined in the current study were prescribed antipsychotics after the first episode of psychosis to prevent its recurrence. Although there is no reliable method to confirm that all of these patients took all of their prescribed medications, we assumed that the duration of exposure to antipsychotics was almost identical to the duration between the first episode of psychosis and the conduct of this study, which we defined as the "duration of illness" in the current manuscript.

Twenty age-, gender-, and handedness-matched healthy subjects were employed as controls (Table 1). The socioeconomic status (SES) and parental-SES were assessed using the Hollingshead scale (Hollingshead, 1957). The estimated premorbid Intelligence Quotient (IQ) for the patients and the present IQ for the control subjects were calculated using a shortened version of the Japanese version of the National Adult Reading Test (JART) (Nelson, 1982; Matsuoka et al., 2006).

All subjects were physically healthy at the time of the study, and none had a lifetime history of serious head trauma, neurological illness, or a serious medical or surgical history. No control subjects had a significant alcohol or substance abuse disorder. All subjects participated in this study after providing written informed consent. The ethical committee of Metropolitan Matsuzawa Hospital approved this study. After a complete explanation of the study to the subjects, written informed consent was obtained.

2.2. MRI acquisition

The methods for MRI acquisition have been described in detail elsewhere (Takayanagi et al., 2010; Orikabe et al., 2011). Briefly, the MRI data were obtained using a 1.5-Tesla Gyroscan Intera MR scanner with SENSitivity Encoding (SENSE) (Philips Medical Systems, Best, Netherlands). The repetition time was 20 ms, the echo time 9.2 ms, the slice thickness 1 mm, the field of view $25.6 \times 25.6 \times 19.2$ cm, and the acquisition matrix $256 \times 256 \times 192$. The voxel dimensions were $1 \times 1 \times 1$ mm. We obtained two image datasets in every subject in every session. To improve the signal-to-noise-ratio, two sequential images that were obtained on one occasion were averaged using Statistical Parametric Mapping (SPM) 8 (Wellcome Department of Imaging Neuroscience, London, UK).

2.3. Image processing for VBM

Image processing for VBM analysis was performed, as in our previous study (Yamasue et al., 2011), using SPM8 running on Matlab 2008a (Math Works). The non-uniformity of intensity of all acquired images was corrected using non-parametric non-uniform intensity normalization (N3) (Sled et al., 1998). First, MR images were segmented using the standard unified segmentation model in SPM8. The images were preprocessed using the DARTEL (Ashburner, 2007) VBM8 toolbox. The following steps were conducted for VBM preprocessing: (1) checking for scanner artifacts and gross anatomical abnormalities for each subject, (2) setting the image origin to the anterior commissure, (3) using the DARTEL toolbox to produce a high-dimensional normalization protocol, (4) checking for homogeneity across the sample, (5) using partition cleanup to remove non-brain tissues, and (6) using standard smoothing (i.e., 8 mm). The final voxel resolution after DARTEL was $1.5 \times 1.5 \times 1.5$ mm. A "modulation step" was also included in the normalization to preserve information about the absolute gray matter values. A 'modulation' step was also included to scale the gray matter probability values by the Jacobian determinants of the deformations to ensure that the total amount of gray matter in each voxel was conserved after registration (Ashburner and Friston, 2000).

Table 1
Subject characteristics and test scores.

Variable	Patients with MAP (n = 20)		Control subjects (n = 20)		Independent t-test		
	Mean	SD	Mean	SD	t-value	df	p-value
Age	33.75	7.80	33.70	7.50	0.210	38	0.984
SES ^a	4.05	1.10	1.65	0.49	8.921	38	<0.001
Parental SES ^a	3.05	0.89	2.55	0.76	1.915	38	0.063
Estimated IQ ^b	90.35	10.39	108.52	7.42	-5.872	31	<0.001
First use, age	20.10	4.29					
Onset of illness, years	26.40	6.03					
Duration of illness, years	7.35	7.32					
Medication dose ^c , mg/day	627.9	682.37					
BPRS positive symptoms	7.31	4.08					
BPRS negative symptoms	5.13	2.22					
Total gray matter volume	694.48	60.92	717.60	55.18	-1.258	38	0.216
Total white matter volume	522.24	49.88	533.88	54.46	-0.705	38	0.485
Cerebrospinal fluid	329.43	55.25	307.12	31.54	1.568	38	0.125
Intracranial volume	1546.14	141.92	1558.60	133.72	-0.286	38	0.777

Abbreviations: MAP: methamphetamine-associated psychosis; SES: socioeconomic status; IQ: intelligence quotient; BPRS: brief psychiatric rating scale.

^a Socioeconomic status, assessed using the Hollingshead scale. Higher scores indicate lower status.

^b Estimated IQ, assessed using JART.

^c Based on chlorpromazine equivalents.

2.4. Statistical analysis

2.4.1. Demographic information and global brain volumes

Group differences in demographic information including age, self- and parental-SES, and estimated IQ, and in global brain volumes calculated using VBM processing in SPM were tested using two-sample t-tests. The threshold for statistical significance was set at $p < 0.05$.

2.4.2. VBM analysis

Statistical analyses using pre-processed images were performed by an analysis of covariance model to identify brain regions that showed a significant difference in regional brain volume between subjects with MAP and HC. To account for global anatomical variations, the intracranial volume (ICV) was treated as a confounding covariate. The resulting set of voxel values for each contrast constituted a statistical parametric map of the t statistic (SPM[t]). The significance of each region was corrected for multiple comparisons using family-wise-error (FWE) correction. For peaks located within the frontal and temporal lobe other than the amygdala or hippocampus, small volume correction was applied using PickAtlas (Maldjian et al., 2003) to test our a priori hypothesis. The amygdala and hippocampus were excluded from the regions-of-interest in the current study, because our previous study has already examined the amygdala and hippocampus volumes in the same participants (Orikabe et al., 2011). The statistical thresholds were set at $p < 0.05$ FWE-corrected at the cluster or voxel level (Verhoeff et al., 2000).

To detect neuroanatomical correlates of individual differences in psychotic symptoms, regression analysis in SPM8 was performed with ICV as a confounding covariate and the BPRS positive and negative scores as the covariate of interest within the MAP group. Statistical significance was defined as the peak voxel that was located within clusters showing significant volume deviations from normal and simultaneously reached at $p < 0.001$.

In addition, regression analyses were further performed to investigate the potential effects of clinical information and potential confounders on gray matter volume (GMV) and white matter volume (WMV), including parental-SES, estimated IQ, age at first use of METH, age at onset of MAP, duration of MAP, and antipsychotic dose. To examine the effects of these indices on structural abnormalities in the patients with MAP, the statistical significance was also set as a voxel that was located within clusters showing significant volume deviations from normal and simultaneously reached at $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Demographic and clinical data

An independent t-test revealed that there were no significant differences between patients with MAP and HC in age and parental-SES. On the other hand, the subjects in the MAP group had significantly lower self-SES ($p < 0.001$) and estimated IQs ($p < 0.001$) compared with those in the HC group. There were no significant differences between subjects with MAP and HC in total GMV, WMV, CSF volume, and ICV (Table 1).

3.2. Comparison of regional brain volumes between the MAP and HC groups

VBM analyses demonstrated that there were areas with significantly smaller regional GMVs in the individuals with MAP than in the HC subjects in the left posterior inferior frontal gyrus (IFG) and anterior superior temporal gyrus (STG), and in the bilateral dorsolateral, ventrolateral, dorsomedial, and ventromedial portions of the FPC

Table 2
Results from voxel-based analysis of MR images.

Anatomical location	Peak coordinate			Z score	Peak FWE corrected P	Cluster FWE corrected P	Cluster size (k) (voxel threshold: $p < 0.001$)
	x	y	z				
<i>Gray matter</i>							
<i>Regional volume reduction in the patients (Fig. 1A)</i>							
Left VLFPC	-44	42	-6	4.94	0.009	0.017	791
Left STG	-57	-6	4	4.64	0.031	0.017	794
Right ventral FPC	26	60	-8	4.61	0.036	<0.001	2870
DMFPC	4	56	19	4.52	0.052	0.021	749
Left DLFPC	-39	44	21	4.38	0.086	0.029	681
VMFPC	-2	63	-5	4.24	0.145	0.002	1285
<i>White matter</i>							
<i>Regional volume reduction in the patients (Fig. 1B)</i>							
OFA	9	45	-20	4.59	0.028	0.016	1072

Abbreviations: VLFPC: ventrolateral frontopolar cortex; STG: superior temporal gyrus; FPC: frontopolar cortex; DMFPC: dorsomedial FPC; DLFPC: dorsolateral FPC; VMFPC: ventromedial FPC; OFA: orbitofrontal area.