

平成25年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
総括研究報告書 (H25-医薬-一般-020)

違法ドラッグ等の薬物依存のトレンドを踏まえた
病態の解明と診断・治療法の開発

主任研究者：鈴木 勉
(星薬科大学薬品毒性学教室)

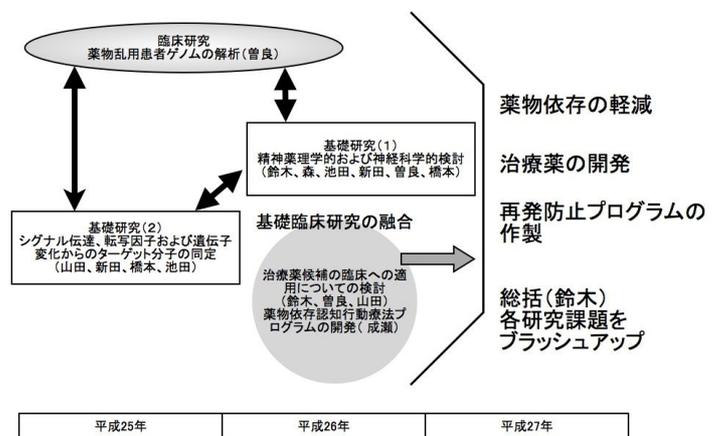
[研究要旨]

【研究目的】近年、薬物乱用の多様化に伴い、様々な違法ドラッグや処方方向精神薬といったゲートウェイドラッグの使用から、より強い作用の薬物を求めることになり、それが覚せい剤などの乱用に繋がっていることが指摘されている。これまでに、覚せい剤依存の作用機序に関する研究が数多く行なわれてきているが、まだまだ不明な点が多く残されている。さらに、ゲートウェイドラッグの作用機序に関する研究に至っては、殆ど行なわれていないのが現状である。一方、これらの薬物依存者の診断・治療も大きな進歩はみられていない。このような背景から、図の様な組織を作製し、本研究では違法ドラッグのリード化合物(MDMAやカンナビノイド等)や覚せい剤依存の病態解明、さらにはこれらの薬物依存のトレンドを踏まえた依存症の薬物療法ならびに有効で現実的な診断および認知行動療法プログラムについて検討を行うことを目的とした。

【研究結果】基礎研究(1)において、メタンフェタミンとメチルフェニデートの感覚効果は

類似しており、MDMAの感覚効果はメタンフェタミンの感覚効果と明らかに異なる事が確認された。また、ドパミントランスポーター遺伝子欠損マウスにおいて多動が引き起され、メチルフェニデートが多動を改善させた。この効果は、ドパミントランスポーターを介さないことが示唆され、このドパミンを介さない機序がゲートウェイドラッグの依存形成に関与している可能性が考えられた。現在は、カチノン系違法ドラッグによる行動薬理的解析および神経毒性を検討しており、内因性カンナビノイド神経の活性化がメタンフェタミン誘発報酬効果を抑制するといった逆説的な知見も得られ、これまで明らかにされてこなかったドパミン神経を介さない各神経系依存的な独特な依存形成の作用機序を見出しつつある。

基礎研究(2)では、メタンフェタミンによる行動異常および神経障害をTrkB受容体作動薬が抑制することを見出した。また、メタンフェタミンを投与したマウスの側坐核において、ERK1/2のリン酸化レベルがD1受容体を発現する中型有棘細胞で特異的に増加することも確認した。さらに、メタンフェタミ



ンにより薬物依存を抑制しうるTMEMおよびShat1/Nat81が側坐核において誘導されることも見出され、これらの受容体およびタンパク質が薬物依存治療の新規な分子ターゲットになりうると思われた。

臨床研究において、上記の分子を速やかに臨床にフィードバックするため、薬物乱用・依存患者を診療する医療施設においてゲノムサンプルを収集し、病態関連候補となる標的分子や関連分子の遺伝子多型をPCR法にて解析している。さらに、違法ドラッグと向精神薬（鎮静薬）の使用障害の再発防止に特化したワークブックや情報提供の資料を作成中であり、認知行動療法的アプローチの各種治療介入ツールと手法を活用し、標準的な治療パッケージの開発にも着手した。

このように基礎研究に関しては、概ね順調に検討が開始されているが、基礎の結果を如何に臨床研究にリンクさせるかが今後の課題であり、その為には、ターゲット分子を早期に絞り込む必要があると思われる。

各分担研究者の目的、方法、結果および考察

1. ゲートウェイドラッグによる依存性形成機序 解明

分担研究者 森 友久
星薬科大学・薬品毒性学教室

ヒトにおいて MDMA や methylphenidate などの種々の精神刺激薬は独特な自覚効果を示すことが知られており、動物においても MDMA と methylphenidate は amphetamine や cocaine などの精神刺激薬の弁別刺激効果に対して般化することも知られている。これらの結果は、MDMA と methylphenidate が動物において類似の弁別刺激効果を示す可能性があることを示唆している。しかしながら、MDMA と methylphenidate の類似性についての検討は未だなされていない。そこで本研究では、MDMA もしくは methylphenidate と生理食塩液の弁別を獲得したラットを用いて、その類似性について検討を行った。

約 80% 体重（約 220g）に摂餌制限した Fischer 344 系雄性ラットを用い、餌を強化子としてレバー押し訓練を行った。レバー押し確立後、MDMA (2.5 mg/kg, s.c.) もしくは methylphenidate (5.0 mg/kg, i.p.) と生理食塩液による弁別訓練を行った。弁別獲得後、精神刺激薬を用いて般化試

験および拮抗試験を行った。

般化試験において、MDMA の弁別刺激効果に対して paroxetine は般化を示さなかったが、fluoxetine および fluvoxamine は部分般化を示した。次に、5-HT_{1A} 受容体作動薬である 8-OH DPAT および 5-HT₂ 受容体作動薬 DOI を用いて、MDMA の弁別刺激効果への影響を検討したところ、両薬物とも完全に般化した。また、拮抗試験において、fluvoxamine の MDMA の弁別刺激効果に対する部分般化は、シグマ1受容体拮抗薬である NE-100 の処置により完全に抑制された。また、MDMA の弁別刺激効果は、5-HT_{1A} 受容体拮抗薬である WAY10047 では、抑制されずに 5-HT₂ 受容体拮抗薬である ritanserin の処置により有意に抑制された。

Methamphetamine および bupropion は methylphenidate の弁別刺激効果に対して般化を示した。さらに、dopamine 受容体作動薬である apomorphine は methylphenidate の弁別刺激効果に対して部分般化を示し、noradrenaline の放出作用を示す ephedrine は完全に般化した。D₁ 受容体拮抗薬 (+)-SCH23390 および D₂ 受容体拮抗薬 haloperidol を用いて拮抗試験を行ったところ、methylphenidate の弁別刺激効果を部分的に抑制し、さらに (+)-SCH23390、haloperidol および prazocine を用いて拮抗試験を行った結果、methylphenidate の弁別刺激効果を有意に抑制し

た。

交差般化試験において、MDMA および methylphenidate は、全く交差般化を示さなかった。非常に興味深いことに methamphetamine は、MDMA の弁別刺激効果に般化を示さなかった。さらに、NE-100 は、MDMA および methylphenidate の弁別刺激効果に影響をおよぼさなかった。

本研究結果より、MDMA の弁別刺激効果発現には、serotonin 5-HT_{1A}/5-HT₂ 受容体活性化、特に、5-HT₂ 受容体を介して発現していることが明らかとなった。また、一部のセロトニン再取り込み阻害薬は、一部、MDMA 様の弁別刺激効果を示すものの、この効果の発現には、セロトニンを介するのではなく、シグマ1受容体を介していることが示唆された。一方、methylphenidate の弁別刺激効果には、dopamine および noradrenaline 両神経系の活性化、特に、noradrenaline 神経系の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。Methylphenidate ならびに MDMA は、精神刺激薬として、乱用が問題となっているが、それぞれの弁別刺激効果の発現機序が異なると共に、得られる弁別刺激効果は明らかに異なることが明らかとなった。

来年度以降は、MDMA の弁別刺激効果に特に着目し、カンナビノイドとの類似性、さらに他の幻覚誘発薬との類似性に関する検討を行い、違法ドラッグの依存性の機序を解明して行く予定である。

2. メチルフェニデート等による依存性の形成機序の解明

分担研究者 池田和隆

(公財) 東京都医学総合研究所
依存性薬物プロジェクト

メチルフェニデートは、注意欠如多動性障害

(ADHD: Attention-Deficit/Hyperactive Disorder) およびナルコレプシーの治療薬として広く用いられている。メチルフェニデートは、ドーパミントランスポーター (DAT) およびノルエピネフリントランスポーター (NET) を阻害することから、覚せい剤であるメタンフェタミンと類似の作用機序を有しており、ゲートウェイドラッグとなるリスクを秘めている。

そこで本研究では、メチルフェニデートの作用機序を詳細に明らかにするために、メチルフェニデートの重要な作用標的である DAT を欠損させたマウス (DAT-KO) におけるメチルフェニデートの効果を検討した。

実験動物

DAT-KO マウスのヘテロ接合体同士の交配により、野生型、ヘテロ接合体、ホモ欠損型マウスを準備した。

移所運動量測定

室町機械社製のスーパーメックスを用いた。測定ケージ内で30分間または60分間移所運動量を測定した後、メチルフェニデートを投与し、その後3時間移所運動量を測定した。

テールサスペンション試験

ニューロサイエンス社製の測定装置を用いた。測定装置でマウスを尾から吊るし、30分間運動量を測定した。メチルフェニデート投与後、引き続き数時間尾から吊るしたままマウスの運動量を測定した。

能動回避試験

室町機械社製の刺激グリッド付シャトルボックス装置を用いた。ランプ点灯と音によるフットショックの予告を5秒間行い、この間に反対側の部屋に移動した場合はフットショックを回避できるようにした。20分間で40回の試行を1セッションとして1日に2セッション行なった。それぞれのセッションの間には少なくとも3時間のインターバルを設け、5日間連続で合計10セッションを

行なった。

マイクロダイアリシス法

マウスの線条体あるいは前頭皮質に半透膜プローブを植え込み、翌日エイコム社製の測定装置（HPLC-ECD）を用いて、遊離ドーパミン量を測定した。

(1) 移所運動量測定

DAT-KO マウスは、多動を示した。メチルフェニデートは、野生型マウスとヘテロ接合体の移所運動量を上昇させたのに対して、DAT-KO マウスの多動を顕著に抑制した。

(2) テールサスペンション試験

メチルフェニデートは、野生型マウス、ヘテロ接合体マウス、DAT-KO マウスの何れにおいても、テールサスペンション試験における運動量を増加させた。

(3) 能動回避試験

野生型マウスとヘテロ接合体では、10セッションの間に回避成功率が約 80%まで徐々に上昇したが、DAT-KO マウスでは全く上昇しなかった。メチルフェニデート投与後に能動回避試験を行ったところ、DAT-KO マウスにおいても回避成功率が30%以上に上昇した。

(4) マイクロダイアリシス解析

野生型マウスでは線条体、前頭皮質の何れにおいてもメチルフェニデートによって遊離ドーパミン量が上昇したが、DAT-KO マウスの線条体では上昇が見られず、前頭皮質では上昇が認められた。

DAT-KO マウスが多動および学習障害を示すことを見出した。また、メチルフェニデートがこれらの障害を改善させることも見出した。一方、メチルフェニデートによってテールサスペンションテストでの運動量が DAT-KO マウスにおいても増加したことから、メチルフェニデートは DAT を介さずに意欲レベルを上昇させると考えられる。脳内マイクロダイアリシス法により、メチルフェ

ニデートが DAT を介さずに前頭前野でドーパミン量を上昇させることが明らかになり、メチルフェニデートによる ADHD 治療効果などの作用機序の一端が解明された。メチルフェニデートの ADHD 治療効果と報酬効果の作用機序の解明は、治療効果を高め、乱用問題を低下させる上で、極めて重要であると考えられる。

3. 覚せい剤依存症および併存疾患における脳内機能変化の解析

研究代表者 鈴木 勉

星薬科大学・薬品毒性学教室

近年、違法ハーブをはじめ、乱用や健康被害が報告されている脱法ドラッグが若年層にも広がっており社会的問題となっている。特に違法ドラッグは覚せい剤へのゲートウェイドラッグであることが指摘されている。

違法ドラッグに含まれる合成カンナビノイドは、カンナビノイド受容体に結合し、多幸福感などを引き起こす。一方、覚せい剤 (methamphetamine: METH) による精神依存の調節因子の一つとしてカンナビノイド (CB) 受容体が報告されている。現在までに、CB2 受容体の刺激はコカインのドーパミン応答を抑制することが報告されており、精神依存形成を抑制する可能性が示唆されている。一般に、CB2 受容体は CB1 受容体に比べ、マクロファージなどの免疫細胞に非常に多く存在することが明らかにされていることから、これらの反応は免疫応答を介する可能性が示唆される。そこで本研究では、薬物依存症における神経免疫系のメカニズム解明を目的として、lipopolysaccharide (LPS) による METH 誘発報酬効果抑制作用機序について CB2 受容体およびその情報伝達系の変化を中心に検討した。

1. 使用動物 実験には 6 週齢の ICR 系雄性マ

ウスを使用した。

2. 報酬効果の測定 METH による精神依存は conditioned place preference (CPP) 法を用いた報酬効果により評価した。Pre 法に従い METH (1 mg/kg, s.c.) あるいは生理食塩液による conditioning を行い、LPS や AM630 を共処置し測定した。

3. Real time RT-PCR 法 薬物を処置したマウスの側坐核より、total RNA を抽出し cDNA を作製した。PCR は TIMP-1, TIMP-2 および陽性対照として GAPDH の DNA 配列に基づいた primer により、SYBR Green を用いて $\Delta\Delta CT$ 法に従い解析した。

METH 誘発報酬効果に対する LPS の影響について検討したところ、METH による報酬効果は LPS の処置により有意に抑制された。この作用は、CB2 受容体拮抗薬である AM630 により有意に消失した。そこで、内因性カンナビノイドである 2-AG を脳室内前処置したところ、METH による報酬効果の形成は有意に抑制された。一方、CB2 受容体を介し tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) が matrix metalloproteinases (MMPs) を阻害することが報告されている。そこで TIMP1 の変化について検討したところ、LPS 処置により TIMP1 mRNA の増加が認められた。

本研究結果より、LPS および 2-AG 処置により METH 誘発報酬効果の抑制が認められ、LPS による METH 誘発報酬効果の抑制にカンナビノイド受容体である CB2 受容体が関与することが明らかとなった。したがって、活性化された免疫細胞により、2-AG の遊離が引き起こされ、これが METH 誘発報酬効果の抑制を引き起こした可能性が考えられる。また、CB2 受容体を介して産生された TIMP1 が細胞外マトリックスを調節することから、LPS により活性化した免疫細胞は CB 受容体を介して TIMP1 の産生を促し、細胞外マトリックスを調節することにより報酬効果を抑制したと考えられる。以上本研究の結果より、

METH による依存形成に対する治療因子として、免疫系における CB2 受容体が有効である可能性が示唆された。

4. 覚せい剤関連精神障害に対する薬物療法の開発

分担研究者 橋本謙二

千葉大学社会精神保健教育研究センター

覚せい剤の乱用はヒトに依存を形成し、様々な精神障害を引き起こすことが知られているが、現在のところ、根本的に治療する薬剤は無い。

一方、脳由来神経栄養因子 (BDNF) およびその受容体 TrkB を介するシグナル伝達は、多くの精神神経疾患の病態および治療メカニズムに関わっている。本研究では、覚せい剤投与によって引き起こされる行動異常における BDNF-TrkB シグナル系の役割を調べた。

神経障害に対する試験

実験には 10 週齢の Balb/c 雄性マウス (日本エスエルシー株式会社) を使用した。急性の行動試験では、溶媒あるいは TrkB アゴニストである 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF; 3, 10, or 30 mg/kg, IP) を投与し、30 分後に覚せい剤 (3 mg/kg, SC) を投与し行動評価を行った。逆耐性の形成に対する試験では、溶媒あるいは 7,8-DHF (10 mg/kg, IP) を投与し、30 分後に溶媒あるいは覚せい剤 (3 mg/kg, SC) を 1 日 1 回 5 日間を投与した。最終投与から 1 週間断薬した後、全てのマウスに覚せい剤 (1 mg/kg, SC) を投与し、運動量を測定した。ドパミン神経系に対する神経障害の試験では、溶媒あるいは 7,8-DHF (10 mg/kg, IP) を投与し、30 分後に溶媒あるいは覚せい剤 (3 mg/kg, SC) を 3 時間間隔で 3 回投与した。引き続き、溶媒あるいは 7,8-DHF (10 mg/kg, IP) を 12 時間間隔で 1 日 2 回 2 日間投与し、翌日にかん流固定して、ドパミ

ントランスポーター (DAT) および MAC1 (activated microglia) の免疫組織化学を行った。

うつ症状に対する試験

実験には 8 週齢の C57/B6 雄性マウス (日本エスエルシー株式会社) を使用した。溶媒あるいは覚せい剤 (3 mg/kg, SC) を 1 日 1 回 5 日間を投与した。最終投与の 3 日後から、2 週間後まで、尾懸垂試験、強制水泳試験、ショ糖飲水試験を用いて、うつ症状を測定した。

TrkB アゴニスト 7,8-DHF の前投与は、覚せい剤投与によって引き起こされる急性の行動異常を用量依存的に抑制した。また 7,8-DHF は覚せい剤の繰り返し投与による逆耐性の形成を有意に抑制した。さらに 7,8-DHF は覚せい剤の繰り返し投与で引き起こされる脳内ドパミン神経障害およびミクログリアの活性化を有意に抑制した。覚せい剤の繰り返し投与したマウスでは、尾懸垂試験、強制水泳試験の無働時間が有意に延長し、ショ糖飲水試験では有意に減少し、うつ症状を呈した。覚せい剤投与後のうつ症状は、最終投与 2 週間後でも観察された。

TrkB アゴニストである 7,8-DHF は、覚せい剤関連障害の予防薬・治療薬として有用であることが示唆された。

5 . 違法ドラッグ等の薬物依存における覚せい剤依存関連分子の関与と診断および治療法の開発

分担研究者 新田 淳美

富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学)

薬物治療学研究室

近年、覚せい剤 (メタンフェタミン: MAP) などの薬物乱用へとつながるゲートウェイ・ドラッグの使用が、大きな社会的問題となってきている。そこで、我々は、その移行を阻止するための診断および治療法開発のために、我々が見出した MAP

連続投与によりマウス脳内で遺伝子発現が増加する薬物依存関連分子 (Shati/Nat8l、Tmem168 および Piccolo) に焦点を当て、ゲートウェイ・ドラッグによる神経機能変化メカニズムを解明する。今年度は、薬物依存抑制分子である Shati/Nat8l の MAP の刺激による遺伝子発現メカニズムを検討するとともに、MAP 依存形成メカニズムにおける機能未知分子 Tmem168 の役割について検討した。

ルシフェラーゼ・レポーター解析

マウス Shati/Nat8l ゲノム DNA の転写開始点上流 (-1100bp) から順次欠失した遺伝子配列を組み込んだ各種ルシフェラーゼ・レポーター・プラスミドを作製した。それらを PC12 細胞にトランスフェクションした後、MAP (1 μ M) で 1 時間刺激した。その細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの注入

Tmem168 遺伝子を組み込んだ AAV-Tmem ベクターまたは対照の AAV-Mock ベクターを、8 週齢の C57BL/6J 雄性マウスの両側側坐核 (anterior = +1.4, lateral = \pm 0.8, ventral = +3.8 from Bregma) に注入した (それぞれを、Tmem マウス、Mock マウスとする)。その後、3 週間が経過してから行動実験を行った。

条件付け場所嗜好性 (CPP) 試験

2-compartment box を用いた CPP 法にて評価した。マウスを 3 日間、実験装置に慣らし、3 日目に滞在時間の Pre 値を測定した。続けて、MAP (1 mg/kg, s.c.) または生理食塩水による条件付けを 1 日 1 回 20 分間、合計 6 回行った。その翌日、滞在時間の Post 値を測定し、Post-Pre 値を CPP スコアとして算出し、場所嗜好性の指標とした。

MAP 刺激による Shati/Nat8l 遺伝子発現調節領域の同定

マウス Shati/Nat8l ゲノム DNA の -1100、-800 および -500bp 配列プラスミドを用いたルシフェ

ラーゼ・レポーター解析では、MAP による刺激によるルシフェラーゼ活性の著しい増加が観察された。しかし、-380bp 配列では、その増加が減少し、-270bp 配列では、有意な増加が観察されなかった。MAP の刺激による Shati/Nat8I 遺伝子発現は、-500 から -270bp の領域によって調節されることが明らかとなった。

MAP 投与による運動過多への側坐核での Tmem168 過剰発現の影響

MAP (1 mg/kg) の投与で、Tmem マウスと Mock マウスの両方で、運動過多が観察された。しかしながら、Tmem マウスにおける MAP 投与による運動過多は、対照群の Mock マウスにおけるそれと比較して有意に減少していた。

MAP 投与による場所嗜好性への側坐核での Tmem168 過剰発現の影響

MAP による条件付けによって、Mock マウスでは場所嗜好性が観察されたが、Tmem マウスでは場所嗜好性が観察されなかった。

MAP 刺激によるルシフェラーゼ・レポーター解析により Shati/Nat8I の遺伝子発現調節領域が明らかとなったため、*in silico* 解析による転写因子結合配列の検討を行った。その結果、発現調節に主要な働きをすると考えられる配列が 2 つ存在した。今後、その 2 つの転写調節配列について更なる検討を行い、Shati/Nat8I の MAP 投与による遺伝子発現メカニズムを明らかにしていく予定である。

一方、我々が見出している新たな薬物依存関連分子 Tmem168 は、アミノ酸残基 697 個から成る複数の膜貫通領域を有するタンパク質であるが、その生理的機能はほとんど報告されていない。我々は、これまでに、Tmem168 mRNA が脳で多く発現しており、MAP およびニコチンの連続投与によって、その発現が増加することを見出している。さらに、今回の行動学的解析から、Tmem168 は薬物依存形成メカニズムにおいて抑制的な役割を

担っていることが示めされた。今後、Tmem168 の生理的機能を明らかにしていくことによって、薬物依存を治療するための新たな標的機構を提唱することを目指すつもりである。

6 . 薬物依存の細胞内シグナルを標的とする遺伝子治療に関する検討

分担研究者 山田 清文

名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部

違法ドラッグがゲートウェイドラッグとなり、メタンフェタミン等の覚せい剤の乱用を経て薬物依存につながると考えられている。これまでに薬物依存に関わる多くのシグナル分子が報告されているが、薬物報酬効果に直接的に関わる分子基盤については未だ不明な点が多い。薬物報酬効果の細胞内シグナル分子の同定は、薬物依存症に対する治療薬の開発に貴重な情報を提供すると思われる。本分担研究課題では、薬物報酬効果のプロセスで中心的役割を果たしているドーパミン受容体シグナルに着目し、その細胞内シグナルを標的とする遺伝子治療に関する基礎研究を推進する。

イムノプロット解析：実験には 7 週齢の雄性 C57BL/6N マウスを使用した。マウスにメタンフェタミン (2-10 mg/kg) SKF81297 (1-5 mg/kg) quinpirole (0.2-1.0 mg/kg) または生理食塩水を腹腔内投与し、投与後 15、30 または 60 分後に側坐核および線条体を摘出した。各組織を 1% SDS 溶液中でホモジナイズし、熱処理 (99 °C, 10 分) および遠心分離した上清をサンプルとした。サンプルを SDS-PAGE により分離後、イムノプロット法により ERK1/2 (Thr202/Tyr204) CaMKII (T286) および MARCKS (S152/156) のリン酸化レベルを解析した。

組織化学的解析：ドーパミン D1 受容体プロモーターの下流で YFP を発現する mDrd1-YFP マウスに SKF81297 (5 mg/kg) または生理食塩水を腹腔内投与し、投与後 15 分後に 4% paraformaldehyde で還流固定を行った。脳を摘出後、凍結切片を作成して抗 ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 抗体によりリン酸化 ERK1/2 の免疫染色を行った。

Adeno-associated virus (AAV) を用いた遺伝子導入：

野生型、ドミナントネガティブ型あるいは恒常的活性化型 MEK1 を組み込んだ AAV ベクターを作製し、HEK293FT 細胞を用いてウイルス液を調製した。調製したウイルス液をマウス側坐核へ注入し、抗 ERK1/2 (Thr202/Tyr204) 抗体によりリン酸化 ERK1/2 の免疫染色およびイムノプロット解析を行った。

メタンフェタミンを投与したマウスの側坐核では ERK1/2 のリン酸化レベルがコントロールマウスに比べて有意に亢進し、投与 30 分後で最大となり、その後コントロールマウスと同レベルまで減少した。また、投与 30 分後のリン酸化 ERK1/2 のレベルはメタンフェタミンの用量依存的であった。同様の変化が線条体でも観察された。一方、pCaMKII および pMARCKS についてはメタンフェタミンを投与しても有意な変化は観察されなかった。

ドーパミン D1 受容体作動薬 SKF81297 を投与したマウスの側坐核ではリン酸化 ERK1/2 のレベルがコントロールマウスに比べて有意に増加した。また、SKF81297 を投与した mDrd1-YFP マウスの側坐核では、リン酸化 ERK1/2 の免疫活性が YFP 発現細胞で認められた。一方、ドーパミン D2 受容体作動薬 quinpirole を投与したマウスではリン酸化 ERK1/2 の有意な変化は認められなかった。

MEK1 の変異体を組み込んだ AAV ベクターを作製し、個体レベルで発現・機能することをリン酸化 ERK1/2 の免疫組織化学およびイムノプロッ

トで確認した。また、リン酸化酵素や基質をドーパミン D1 受容体およびドーパミン D2 受容体発現細胞に特異的に発現させる AAV ベクターの注入条件を検討し、至適化を行った。

本研究では、細胞内の主要な protein kinase がドーパミン受容体刺激により活性化されるかどうかを検討した。メタンフェタミン投与により ERK1/2 のリン酸化レベルが有意に増加し、ドーパミン D1 受容体を発現する中型有棘細胞に特異的な反応であることが示唆された。また、MEK1 の変異体を発現させる AAV ベクターを作製し、個体レベルの解析を行った結果、活性を有する MEK1 が側坐核特異的に発現して ERK1/2 をリン酸化することが確認できた。今後は、ドーパミン D1 受容体を発現する中型有棘細胞特異的に ERK1/2 を活性化するシステムを導入し、薬物の報酬効果に関する下流シグナルの解析を *in vivo* および *in vitro* の実験系で検討する予定である。

7. アルコール依存におけるストレス要因とオピオイド神経伝達の役割

分担研究者 曾良一郎

神戸大学大学院精神医学分野

様々なストレスによりアルコール依存への罹患が増大する。阪神淡路大震災、東日本大震災の被災地の疫学調査でもストレスによる飲酒量の増加や飲酒習慣の変化が示されている。本研究ではストレス下でのアルコール依存形成、病態機序にオピオイド神経伝達がどのように関与しているかについて μ オピオイド受容体(MOR)欠損マウスモデルを用いて解明することを目的とする。

オピオイド神経伝達の機能的役割は鎮痛、報酬との関連について多数の報告がなされてきた。アルコール依存症の治療薬としてもオピオイド受容体拮抗薬が用いられている。我々は μ オピオイ

ド受容体の欠損は心理社会的ストレスへの反応を変化させることを報告した(Komatsu et al. 2011)。

本研究では、 μ オピオイド受容体のストレス下でのアルコール依存形成、病態機序を明らかにするために、研究1として慢性身体ストレス負荷時におけるアルコール摂取量の変化、研究2として心理社会的ストレス負荷時のアルコール摂取量の変化について MOR 欠損(MOR KO)マウスを用いて検討した。

実験動物

雌性マウスはアルコール依存に脆弱であることを報告(Hall et al. 2001)していることから、9~13 週齢の雌性 C57BL/6 系統の野生型マウス及び雌性 MOR KO マウスを用いて実験を行った。

身体ストレス

拘束ストレスは 50ml のプラスチックチューブの先端および側面に径 1cm 程度の換気用の穴を数か所空け、マウスをチューブの先端に頭が来るように入れてキャップを閉め、キャップが下に来るようにチューブ立てに置き行なった。慢性ストレスによる影響を評価するために1時間の拘束ストレス負荷を14日間、実施した。

心理社会的ストレス

離乳後(生後 3 週間)のマウスを同胞マウスと隔離し単独にて飼育し、社会的隔離ストレスを6週間、負荷した。

二瓶選択実験

拘束ストレスあるいは社会的隔離ストレス負荷後、二瓶選択実験を実施した。15ml のガラス瓶に 8% エタノールあるいは水を入れ、14 日間飲水量を測定した。嗜好性を避けるため水とエタノールを日毎に差し替えた。飲水量と同時に、摂餌量・体重を測定した。

研究1：拘束ストレス

雌性 MOR KO マウスでは、アルコール摂取量はストレス負荷の有無にかかわらず雌性野生型マウスと比較して少い傾向がみられた。ストレス負荷時では雌性野生型マウスにおいてアルコール摂取が

有意に低値であった。

研究2：社会的隔離ストレス

雌性野生型マウスではストレス負荷の有無によるアルコールの摂取量に変化はなかった。雌性 MOR KO マウスでは社会的隔離ストレス負荷が無いとアルコールの摂取量が有意に高値であった。

今回の結果では、雌の野生型マウスでは拘束ストレス負荷によりアルコール摂取量が減少した。ストレス負荷によりアルコール依存への脆弱性が高まるとの報告は、拘束等の身体ストレスについては動物種によって必ずしも当てはまらないと考えられた。

大規模災害ストレスでは災害による直接の身体ストレスよりも中長期にわたる心理社会的ストレスが主体と考えられる。雌性 MOR KO マウスにおいて社会的隔離ストレス負荷の有無によりアルコールの摂取量が違った結果は、オピオイド受容体への拮抗作用を有する薬剤が被災者におけるアルコール依存への罹患リスクを軽減させる可能性を示唆していると考えられる。

参考文献

1. Komatsu H, et al. Pharmacology Biochemistry & Behavior (2011)
2. Hall FS, et al. Psychopharmacology (2001)

8 . 現在の薬物依存のトレンドに対応する認知行動療法の開発

研究分担者 成瀬暢也

埼玉県立精神医療センター

わが国における薬物関連精神障害の治療は、中毒性精神病の治療に終始しており、薬物依存症専門医療機関は 10 か所余りに過ぎない。このような状況において、平成 23 年より脱法ドラッグ患者が急増している。脱法ドラッグは法の網を潜り

抜けるべく化学構造式の一部を変えた物質であり、無数に作り出すことが可能である。したがって、特徴はさまざまであり複数の物質が混ぜられていることも多く、既存の薬物依存の治療とは異なる配慮が必要である。本研究では、最近のトレンドである脱法ドラッグ関連障害の診断と治療を適切に行うことを目的とする。とくに依存症に対する認知行動療法プログラムの開発と効果測定を行う。同様に、もう一つのトレンドであるベンゾジアゼピン系向精神薬依存についても検討する。両者は、現在わが国における精神科医療機関を受診する薬物患者の第2位、3位に該当している。

対象は、埼玉県立精神医療センターを受診した脱法ドラッグ、およびベンゾジアゼピン系向精神薬関連障害のうち、以下の2つの条件を満たす者とした。(1) DSM-5における物質使用障害に該当し、(2)使用障害の治療が必要であると判断された者とする。

平成23年6月～平成25年8月までに、研究分担者が直接診察した新規薬物関連患者は257名であり、内訳は覚せい剤118名(45.9%)、脱法ドラッグ83名(32.3%)、向精神薬34名(13.2%)、有機溶剤10名(3.9%)、鎮咳剤5名(1.9%)、鎮痛剤4名(1.6%)などであった。

さらに、平成22年4月～平成25年10月までに当センター救急病棟に入院となった物質関連障害患者は135名で全入院患者の17.5%であった。その内訳は、覚せい剤53名(39.3%)、アルコール38名(28.1%)、脱法ドラッグ17名(12.6%)、有機溶剤13名(9.6%)、鎮静薬11名(8.1%)であった。救急病棟入院後の処遇については、依存症病棟転棟65名(48.1%)、当センター外来(23.7%)、他の医療機関29名(22.2%)、一般閉鎖病棟転棟

5名(3.7%)であった。他の医療機関に依存症治療機関は含まれておらず、当センターには依存症専門外来がある。依存症治療を要する中毒性精神病のほとんどが依存症治療につなぐことができていた。

これは当センターの依存症病棟は閉鎖病棟であり、薬物患者を積極的に治療しているためである。しかし、依存症病棟がないか、あってもアルコール依存症に限定している医療機関がほとんどであることを考慮すると、救急病棟において脱法ドラッグ患者および向精神薬患者に対して、救急病棟スタッフが依存症治療を実施することが求められる。その需要を満たす治療パッケージを作成することが必要である。

対象者に対して、それぞれ依存症治療に導入するための積極的な介入プログラムを開発・実行した群と、これまでの手法による介入群に対し、介入後の治療継続率、薬物再使用状況などについて比較評価する。新たな介入プログラムは、これまでに作成した介入ツールを参考に作成し、動機づけ面接、随伴性マネジメントなどを取り入れたエビデンスに基づいた効果的な治療パッケージとする。

初年度は脱法ドラッグおよび向精神薬使用障害の治療ツールの作成、治療パッケージの開発を行い、次年度にはパイロットスタディを経て調査研究を拡大する。

最終的には、本研究により、薬物の特徴を踏まえた具体的な認知行動療法的治療プログラムを開発し、依存症専門スタッフでなくても介入・提供できるコンパクトな治療パッケージの開発を行い、有効性評価を実施する。これにより、わが国の著しく遅れている薬物依存症治療の普及を目的とする。