

氏 名 (本籍) なか中 がわ川 なお直 と人

学 位 の 種 類 博 士 (医療薬学)

学 位 記 番 号 薬 博 (医療薬学) 第 3 号

学位授与年月日 平 成 15 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 、 専 攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 生命薬学専攻

学 位 論 文 題 目

ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリーのメタンフェタ
ミン体内動態研究への応用

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 井 戸 達 雄

教 授 今 井 潤

教 授 山 添 康

論文内容要旨

覚せい剤乱用により生じる精神疾患である覚せい剤精神病は、長期乱用に伴う幻覚、妄想状態が生じやすくなり、服役、入院等による使用中断後（断薬）、少量または短期間の再使用で急速にその状態が再現されることを特徴としている。覚せい剤使用による陶酔感や食欲減退作用、睡眠抑制作用、体温上昇作用等は、反復投与に伴ってその作用が減弱するという耐性が生じやすいが、幻覚や妄想等の精神症状は逆に感受性の増大を呈し、耐性とは正反対の現象を示すことから広く逆耐性現象とも呼ばれている。この現象の発症機序として、症状再燃に関わる不可逆的な何らかの生物学的障害が脳内に生じることが想定されているが、いまだ明確な説明はなされていない。

動物にメタンフェタミン（MAP）を2週間以上反復投与した際に、外部の刺激に関係なく臭い嗅ぎ等の同一運動を繰り返すという異常行動（常同行動）が認められるが、1週間以上の断薬後少量のMAPを投与した場合にこの常同行動の増強反応が認められる。この行動発現を精神病的変化の指標とした逆耐性形成モデルが、覚せい剤精神病の病態解明に広く利用されている。MAPは構造上カテコラミンに類似しており、気分昂揚、覚醒水準の上昇等の中枢作用は脳内カテコラミン系の作用を介して生じると考えられている。中でも、逆耐性の形成は、ドパミンD₂受容体遮断薬であるハロペリドール前処置で阻止されることから、ドパミン作動系が関与しているものと考えられており、特にMAP再投与時のドパミンシナプス間隙へのドパミン放出の亢進が、逆耐性現象発現に最も対応する生物学的変化であると考えられている。また、MAPはドパミン神経におけるドパミントランスポーターを介した交換機序または細胞膜からの拡散機序により取り込まれ、入れ代わりにドパミンの放出をもたすことが提唱されている。従って、脳内シナプス間隙へのMAP自身の量的変動の解析は、逆耐性現象の発症機序の解明に有益な知見を与えるものと考えられる。そこで、MAPの脳内動態並びにそれに影響を与えると考えられる体内動態についての検討が必要である。

先に水柿ら及び中村らは、^{[14]C}MAPを用いて、逆耐性形成マウスおよびイヌにおける^{[14]C}MAPの脳内動態を検討し、^{[14]C}MAPの脳内過剰集積を報告している。このように薬物動態を検討する場合、ラジオアイソトープが広く用いられているが、検出している放射能が代謝により対象薬物を反映していないという可能性や短半減期のラジオアイソトープを用いることによるデータ採取時間の制約、実験者の被曝、ポジトロンエミッショントモグラフィー（PET）等ポジトロン標識体を用いる場合、特殊施設を利用することによる実験回数の制約等の問題がある。

そればかりか、PETの場合、経時的な採血や画像を撮る必要があるため、動物の固定のために麻酔を使用するが、薬物の体内動態に対する麻酔薬の影響が懸念される。そこでまず、PETにおける麻酔薬の影響を検討した。

雄性アカゲザルを用いて、ハロタンガス麻酔0.5～1.0%（H₂O 2.5 L/min, O₂ 2.5 L/min）及びベントバルビタール静脈麻酔25 mg/kgの濃度における^{[14]C}MAPの脳内集積を検討した。採血用及び^{[14]C}MAP投与用に、それぞれ大腿動脈、上腕静脈にカテーテルを挿入した。バイタルサイン（血圧、心拍数、血液pH、

pO₂, pCO₂, 体温)をPET実験中モニターし、いずれも生理的な範囲で維持されていた。 [¹¹C]MAPを上腕静脈から投与し、PETスキャナー (PT931, CIT Inc. Knoxville, USA) によって、脳への集積を画像化し、脳8断面の画像から線条体、前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、視床、小脳に関心領域を設定し、これらの部位への集積量を投与60分まで解析した。その結果、ペントバルビタール静脈麻酔時の [¹¹C]MAPの脳への集積が、ハロタンガス麻酔時に比べて低下することが明らかとなった。集積性に影響を与える因子として脳血流の変化が考えられる。一般に、脳血流はすべてのガス麻酔の吸入速度に依存して増加し、ケタミンを除くすべての静脈麻酔で減少すると言われている。本検討では脳血流速度を実際に測定していないが、 [¹¹C]MAPの脳内動態の差は、脳血流変化により生じている可能性が大きい。また、同じ麻酔下であっても個体の違いにより、 [¹¹C]MAPの動態に若干の違いが見られた。これは個体差による可能性も考えられるが、麻酔深度の差が影響していると考えられる。個々の患者における麻酔深度を見極めることは未だ困難であるため、同じ動物で同じ麻酔条件であっても、各々の実験時における麻酔深度を同一にすることも困難である。従って、PETにより薬物動態を検討する場合、麻酔の影響により、薬物動態の微妙な差を描出できない可能性が示された。

これらラジオアイソトープを用いる実験の様々な問題を改善するためには、ラジオアイソトープを用いない測定法の確立が必要不可欠である。ガスクロマトグラフィー / マススペクトロメトリー (GC/MS) を体内動態の解明に応用すべく検討した。

ガスクロマトグラフィー—選択イオン検出法 (GC-SIM) と重水素標識体を用いる内部標準法とを組み合わせた測定法を構築した。すなわち、MAP, MAP-d₃ (内標準物質) をヘプタフルオロ酪酸誘導体とし、基準ピークである *m/z* 254 及び *m/z* 257 をそれぞれのモニタリングイオンとして使用した。採取試料からの MAP の抽出には、陽イオン交換相と無極性相を有する固相カラム (Bond Elut Certify) を採用した。GC 装置として Vande Berg 型ソルベントレス注入装置を装着した Hewlett Packard 5890 SERIES II を用い、MS 装置として日本電子 JMS-DX303 を用いた。分離カラムに 5% diphenyl 95% methylpolysiloxane (DB-5) 化学結合同型溶融キャピラリーカラム (25 m × 0.25 mm I.D.) を用い、カラム温度は 100℃より 8℃/min の昇温条件 (100℃→180℃) に設定した。注入口温度 320℃, イオン源温度 200℃, キャリアーガス (ヘリウム) 線速度 30 cm/min, 加速電圧 3 kV, イオン化電圧 70 eV, トラップ電流 300 μA, 装置分解能 1000 にて測定した。脳ホモジネート、血清、全血を試料として添加回収試験を実施した結果、脳ホモジネートで 95.7%, 血清で 101.1%, 全血で 103.5% と良好であり、変動係数も 1.4~2.4% と小さく、本測定法の信頼性が示された。

確立した測定法を用いて、正常マウスにおける MAP の脳内動態を検討し、本測定法の有用性を検討した。ddY 系雄性マウスに MAP 4 mg/kg を腹腔内投与し、投与後 24 時間までの全脳及び血清中の MAP 含量を経時的に測定した。測定データは DAR (Differential absorption ratio) で比較した。また、腹腔内投与時の脳内濃度のピークである 15 分後における MAP の取り込みの部位差を、Glowinski と Iversen らの方法に従い、線条体、前頭葉、後頭葉、海馬、視床下部、中脳、延髄、小脳の 8 部位に分けて検討した。その結果、腹腔内投与した MAP は速やかに血中へ吸収された後、短時間に脳へ移行し、血清中では投与後 5 分、

脳中では投与後15～分に最大値を示し、その後経時的に消失した。本測定法では、投与後長時間の脳組織中のMAPの定量が可能であることが明らかとなった。また、MAPの脳内集積には部位差の生じることを見だし、特にドパミン神経投射部位への集積が高いことが明らかとなった。GC/MSを用いた検討により、信頼度の高い定量値として表すことが可能となり、本測定法の有用性が示された。

MAP逆耐性形成に伴い、MAPの脳内過剰集積が生じることが報告されており、逆耐性現象発現と脳内過剰集積との関与が考えられる。その過剰集積機序の解明は、逆耐性発現機構の解明に重要であると考えられる。一般的に薬物の脳内動態は、末梢臓器への集積性により変化する場合が多い。そこで、逆耐性形成時のMAP脳内過剰集積に対する末梢臓器でのMAP体内動態変化の関与に着目し、逆耐性形成ラットを作成して確立した測定法により検討した。逆耐性群は、MAP 4 mg/kgを1日1回2週間腹腔内投与し、1週間断薬して作成した。一方、対照群はMAPの代わりに生理食塩水を同様のプロトコルで投与して作成した。Creese と Iversenの方法により、生じる異常行動を目視にて確認し、スコア化して逆耐性の形成を判定して実験に用いた。ラットをエーテル麻酔下、大腿静脈及び大腿動脈にカニュレーションし、MAP投与経路と採血ラインを確保した。覚醒後、4 mg/kg MAPを大腿静脈から投与し、1分後と10分後に断頭すると共に、同時に採血した。摘出臓器については、脳では主なドパミン投射部位である前頭葉、線条体の2分画とし、末梢臓器については、薬物動態に影響を与えやすい肝臓と腎臓、末梢で最も大きな容積をもつ筋肉、そして覚せい剤中毒患者において心筋症や心肥大等の心機能障害が報告されていることから、心臓も検討対象とした。その結果、代謝に関与する肝臓や排泄に関与する腎臓、分布容積の大きい筋肉におけるMAPの集積変化は見られず、末梢臓器における動態変化の影響は乏しいことが明らかとなった。

また、逆耐性形成に伴い、脳と心臓に特異的なMAPの動態変化が見られることも明らかとなった。心臓における動態変化の報告は他になく、新規知見である。また、投与後1分では両群において脳内集積に差がなく、投与後10分では逆耐性群において脳内過剰集積が見られたことから、以下のような仮説が想定できる。すなわち、投与後1分では血液から脳実質への薬物の流入過程を主に反映する時間であり、その時間において両群で差が見られないことから、流入過程に対する逆耐性形成の影響は小さいものと考えられる。一方、投与後10分は、流入過程と、脳実質からの流出過程とが共に反映される時間であり、その時間において両群の集積に差が見られたことから、MAPの流出過程に対する逆耐性形成の影響が考えられる。つまり、神経細胞やグリア細胞からのMAPの流出の遅延、あるいは血液脳関門におけるMAPの流出の遅延が考えられる。流出過程に関わる因子の同定と、逆耐性形成によるその因子の変化の検討が、本研究をさらに発展させることが可能になると考えられる。

以上より、ラジオアイソトープ実験ではこれまで不明確であったMAPの脳内動態の部位差や、逆耐性形成による心臓でのMAPの集積差を、GC/MSを用いた測定法を応用することによって、逆耐性形成時における精神症状や心毒性等の臨床症状発現を薬物動態学的観点から検討しうることを明らかにした。すなわち、GC/MSをMAPの体内動態解析に応用することの有用性を証明した。

審査結果の要旨

メタンフェタミンに代表される覚せい剤はその乱用によって生じる精神疾患が大きな社会問題を引き起こし、特に長期の服用によってもたらされる逆耐性現象は総合失調症と共通した症状を呈し重篤な精神疾患を起こす。この疾患の発症機序、予防法、治療法などについていろいろな方向からの研究が進められてきたがいまだ解決されていない。本論文は薬物動態解析の観点からメタンフェタミンの逆耐性発現のメカニズムを解明する方法としてガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリーが有効であることを示し、モデル動物での動態解析によって考察を加えたものである。

通常薬物の体内動態の解析には放射性標識薬剤を利用する場合が多く、特に最近ではポジトロン核種で標識した薬剤によるPET法が経時的に且つ可視的に解析できる方法として注目されている。そこで炭素11で標識したメタンフェタミンを合成して猿でのPET測定を行った。しかし本命題に対しては、特に測定時の麻酔薬投与がメタンフェタミンの脳内動態に影響を与え、正確な結果をもたらさないことが明らかにされた。このような問題を解決する方法としてガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリーを選び、重水素標識体内部標準法と固相抽出法を組み合わせることによって、化合物選択性の高い高感度測定法を確立した。次にこの方法でメタンフェタミンの脳内動態を解析したところ、PETでははっきりしなかったドパミン神経投射部位への集積を明らかにすることができた。さらにメタンフェタミン逆耐性形成ラットでは、再投与時に脳内に過剰のメタンフェタミンが集積すること、この過剰集積は末梢臓器による代謝動態の影響ではないこと、脳以外でも心筋において異常集積が起こることを新たに見出した。この方法によるメタンフェタミンの経時的測定結果により、逆耐性形成下での脳内過剰集積をメタンフェタミンの流失過程において細胞の有機カチオントランスポーターの発現と関連つけて考察した。

以上のように本論文は、ラジオアイソトープ実験では不明確であったメタンフェタミンの脳内動態の部位差や、逆耐性形成による心臓での過剰集積などを、自ら確立した測定法で検出し、逆耐性形成時における精神症状や心毒性などの臨床症状発現を薬物動態解析の手段で検討しうることを明らかにし、GC/MSをメタンフェタミン体内動態解析に有効に応用できることを証明し、逆耐性形成メカニズム解明に関しても今後の研究の方向を示した。

よって、本論文は博士(医療薬学)の学位論文として合格と認める。