

45. セロトニン症候群モデルラットのメタボローム解析

財津 桂

Key words: セロトニン症候群, メタボローム解析,
ガスクロマトグラフィー/タンデム質量分析

名古屋大学 大学院医学系研究科
総合医学専攻 社会生命科学講座
法医生命倫理学

緒 言

セロトニン症候群 (Serotonin syndrome, SS) とは、主に抗うつ薬、特に SSRI (選択的セロトニン再取り込み阻害剤) などの過剰摂取や、これらと他の薬剤の組み合わせによって、脳内セロトニン濃度が過剰に上昇して発症する疾患とされている。主な症状は、高体温、発汗、頻脈、下痢、ミオクローヌス、振戦などであり、重篤な場合、死に至るケースもあるとされる。特に近年では、乱用薬物の1つである MDMA などの過剰摂取によって SS を発症して死亡したと考えられる事例も報告されていることから、法医学的にも関心の高い病態である。しかし、SS ではセロトニン以外の脳内モノアミンの変動も観察されており、その作用機序には不明な点も多い。そこで、本研究では SS のモデルラットを既報²⁾に従って作製し、そのモデルラットの血漿および各脳部位について、内因性代謝物総体解析 (メタボローム解析) を行い、SS がメタボロームに与える影響を観察した。

方 法

1. 動物実験

Wistar 系雄性ラット (6 週齢, 体重 180~240g) を用いた。SS モデルラットの作製 (n=6): Nishijima らの報告²⁾を参考に、薬剤投与 2 時間前から絶食させたラットに、5-ヒドロキシトリプトファン (5-HTP) DMSO 溶液を 120 mg/kg, Clorgyline 生理食塩水溶液を 2 mg/kg で腹腔内投与した。投与前後で直腸温を測定し、投与約 40 分後に解剖を実施し、血液及び脳を採取した。採取した血液は血漿として保存した。また、脳は解剖後、直ちに大脳、海馬、小脳、脳幹および視床下部に分離し、液体窒素で急速凍結した。各試料は分析時まで -80℃ 下で保存した。また、Control 群としてモデルラットと同量の DMSO および生理食塩水を腹腔内投与し、同様に各試料を採取した。

2. 試料前処理³⁾

大脳、海馬、小脳、脳幹および視床下部は、氷上に数分置いて解凍した後、氷冷メタノールを加えて細胞破碎機 (安田機械製 Multi-beads Shocker) を用いてホモジナイズした。その後、遠心分離を行い、上清を分離した。各試料の上清あるいは血漿に、それぞれ内部標準として 2-isopropylmalic acid と L-glutamic acid (安定同位体標識体 (¹³C₅, ¹⁵N₁)) を加え、クロロホルム/メタノール混液を用いて代謝物の抽出を行った。得られた抽出液を遠心濃縮した後、一晚凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥物を、メトキシアミン塩酸塩及び MSTFA で誘導体化し、スキャンモードによる定性分析および MRM モードによる相対定量分析を行った。装置は島津製作所製 トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-TQ8040 を使用し、分離カラムには Agilent 社製 DB-5 (30 cm × 0.25 mm ID) を用いた。また、データ解析には島津製作所製 GC/MS 代謝成分データベース (ver.2) を使用し、多変量解析は Umetrics 社製 Simca-P+ (ver.13) を用いて行った。

結果

SSモデル群とコントロール群の直腸温の変化を図1に示す。モデルでは、薬剤投与約10分後から、体の震えが観察され、時間経過と共に激しいミオクロヌス様症状が観察された。最終的に各モデルの直腸温は40℃以上に上昇し、コントロール群と有意な差 ($p < 0.001$, Welch's test) を示した。

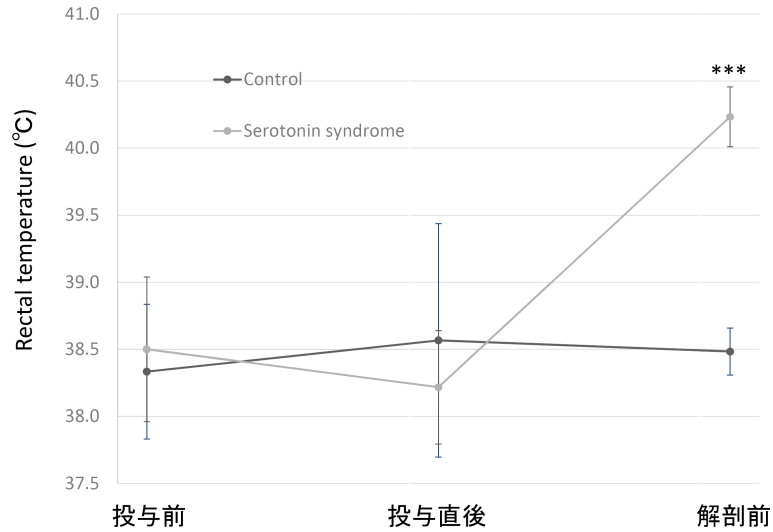


図1. 直腸温度の変化.

コントロールおよびセロトニン症候群モデルラットの直腸温度の変化 ($n=6$). *** $P < 0.001$ (Welch's test).

GC/MS/MSによって、血漿から55種類、大脳から56種類、小脳および海馬から43種類、視床下部から52種類、脳幹から49種類の内因性代謝物が検出された。得られた各メタボロームデータについて、主成分分析 (PCA) を行った。血漿のPCA score plot および loading plot を図2に示す。

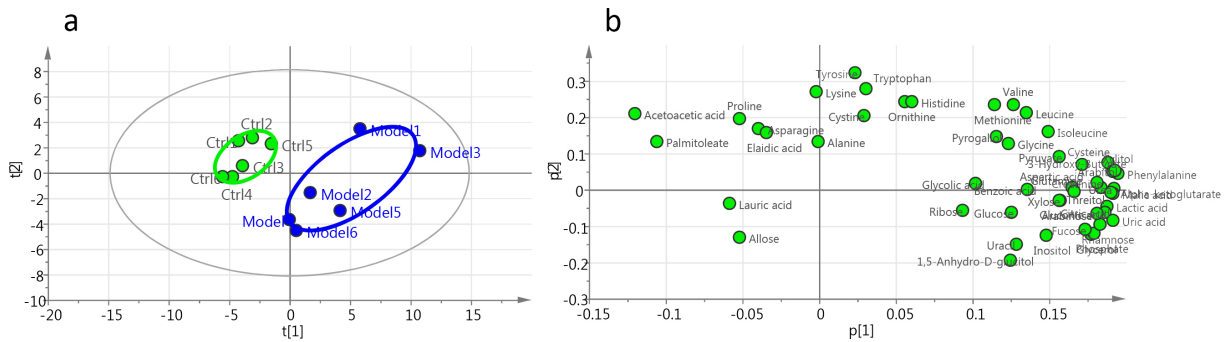


図2. 血漿メタボロームの主成分分析の結果.

a) score plot, b) loading plot. Ellipse shows Hottelling's T2 (95%).

図2aに示すように、score plotにおいて各群は良好に分離した。さらに、loading plotから、TCA回路構成成分や一部の脂肪酸などが群分離に寄与していることが推定された。そこでloading plotでピックアップされた群分離に寄与する成分について、Welch's t-testを実施した結果、29成分について優位差 ($p < 0.05$) が観察された。

一方、脳各部位のメタボロームについても同様にPCAを実施した。結果を図3から5に示す。

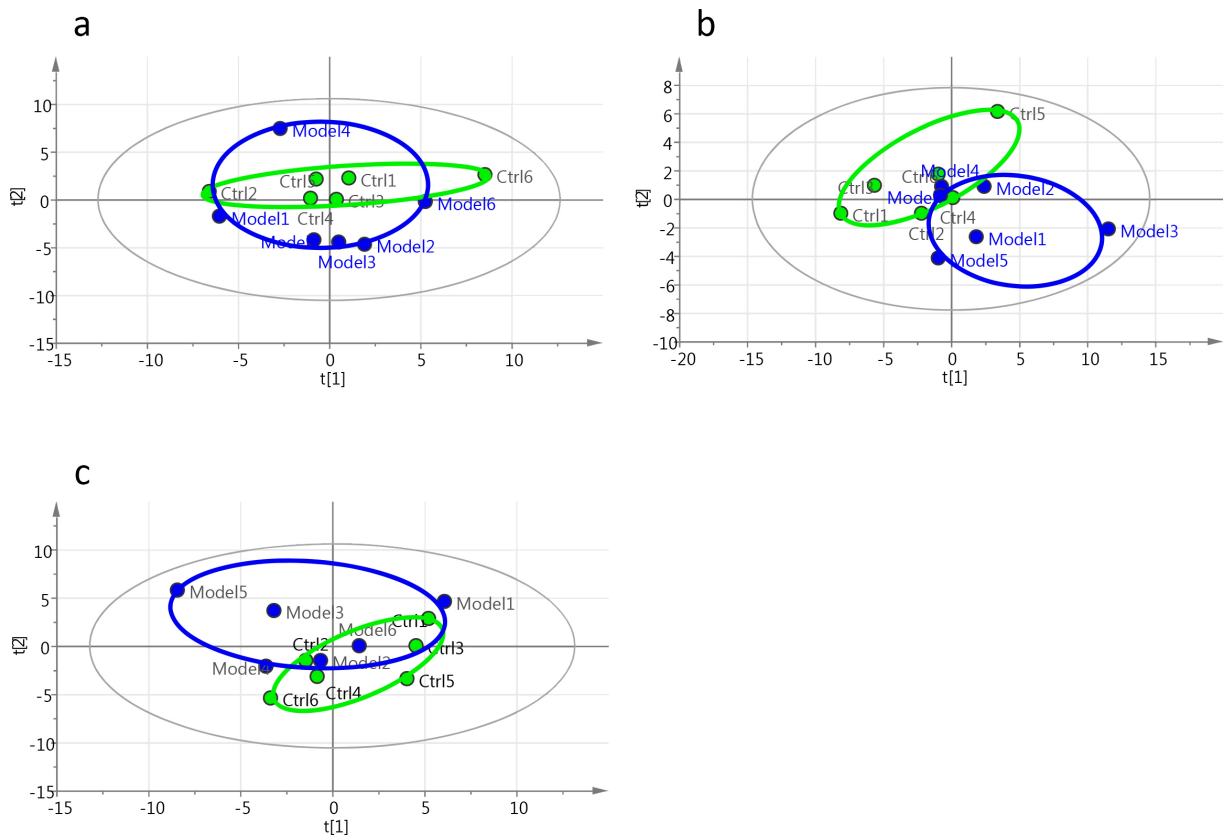


図3. 大脳, 小脳および視床下部メタボロームの主成分分析の結果.
 a) 大脳の score plot, b) 小脳の score plot, c) 視床下部の score plot.

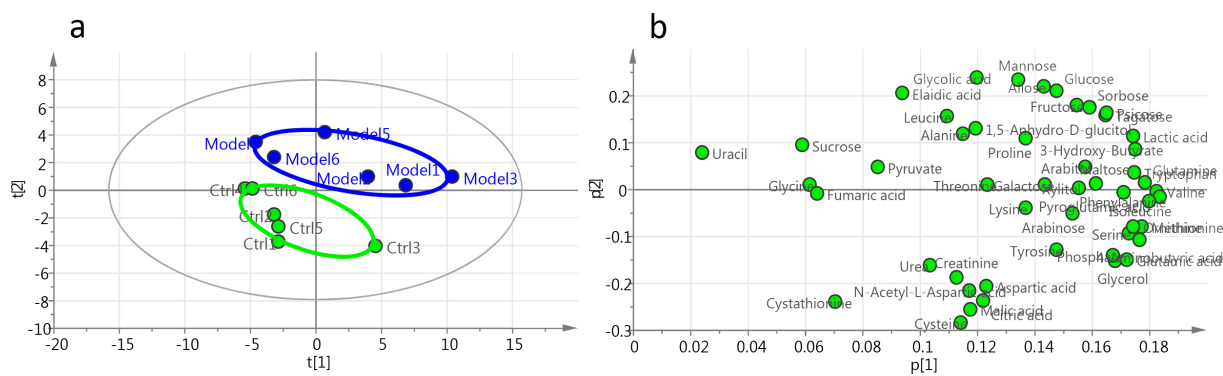


図4. 脳幹メタボロームの主成分分析の結果.
 a) score plot, b) loading plot. Ellipse shows Hotelling's T2 (95%).

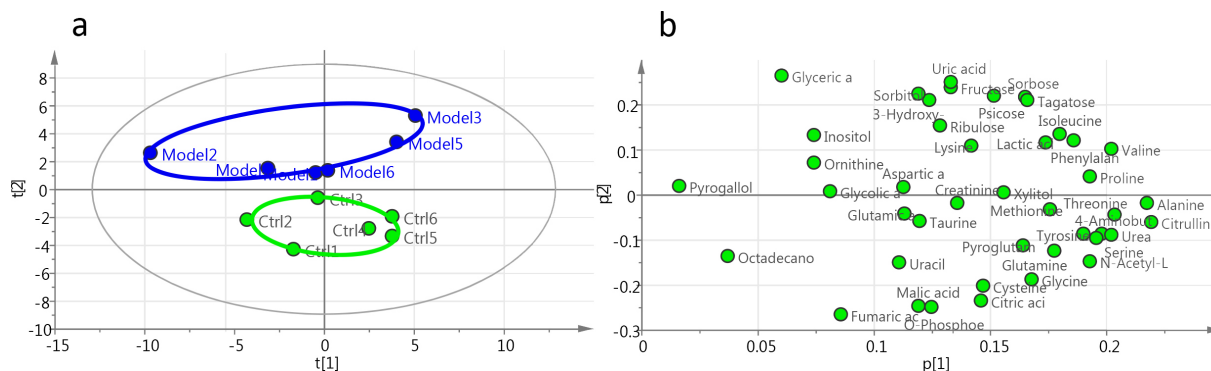


図5. 海馬メタボロームの主成分分析の結果。

a) score plot, b) loading plot. Ellipse shows Hotelling's T2 (95%).

図3に示すように、大脳、小脳および視床下部では score plot 上での群分離が不十分であり、SSモデルにおけるメタボロームの変動が少ないことが示唆された。一方、図4および5に示すように、脳幹および海馬では score plot 上で群分離が観察されたことから、両部位においては、メタボロームの変動が生じていることが示唆された。そこで loading plot から群分離に寄与する成分をピックアップし、Welch's t-test を実施したところ、脳幹および海馬の何れについても、14成分で有意差 ($p < 0.05$) が観察された。

考 察

血漿では、SSモデル群において、 α -ケトグルタル酸、クエン酸、リンゴ酸といったTCA回路構成成分に加え、グルコースおよび乳酸の有意な上昇が観察された。一方で、一部の脂肪酸や3-ヒドロキシ酪酸の有意な減少が観察されたことから、SSは末梢系において、エネルギー代謝および脂肪酸 β 酸化経路に顕著な影響を与えることが示唆された。これはSSの特徴的な症状であるミオクロノス様症状に伴う筋肉の異常収縮による副次的な結果と推定される。

一方、脳では脳幹および海馬においてわずかにメタボロームの変動が観察されたものの、大脳、小脳、視床下部においては、メタボロームの顕著な変動は観察されなかった。よって、SSが脳内メタボロームに与える影響は限定的であり、SSは直接的には脳内メタボロームに影響を与えないものと推定された。すなわち、本研究で観察された脳内メタボロームの限定的な変動は、末梢系におけるミオクロノス様症状や異常高体温等の影響が脳内へフィードバックされた結果であることが推定された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院医学系研究科法医生命倫理学の石井 晃教授および土橋 均招聘教員、名古屋大学大学院医学系研究科医療技術学専攻病態解析学講座の林 由美助教ならびに大阪医科大学予防・社会医学講座法医学教室の鈴木廣一教授および佐藤貴子准教授である。また、本実験を進めるに際しご協力を頂いた名古屋大学医学部の木村友哉氏、瀬瀬雄太氏、小崎朋子氏ならびに名古屋大学大学院医学系研究科の山中麻友美氏に感謝申し上げます。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nishijima, K., Shioda, K. & Iwamura, T. : Neuroleptic malignant syndrome and serotonin syndrome. *Prog. Brain Res.*, **162** : 81-104, 2007.
- 2) Nishijima, K., Yoshino, T., Yui, K. & Katoh, S. : Potent serotonin (5-HT)_{2A} receptor antagonists completely prevent the development of hyperthermia in an animal model of the 5-HT syndrome. *Brain Res.*, **890** : 23-31, 2001.
- 3) Zaitzu, K., Miyawaki, I., Bando, K., Horie, H., Shima, N., Katagi, M., Tatsuno, M., Bamba, T., Sato, T., Ishii, A., Tsuchihashi, H., Suzuki, K. & Fukusaki, E. : Metabolic profiling of urine and blood plasma in rat models of drug addiction on the basis of morphine-, methamphetamine- and cocaine-induced conditioned place preference. *Anal. Bioanal. Chem.*, **406** : 1339-1354, 2014.