

臨床ビッグデータ解析と薬理学的実証を用いたドパ  
ミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬誘発多動性障害抑制法の創出

2021

長岡 巧樹

## 目次

緒言 .....	1
<b>第 1 章 ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬誘発ジスキネジア抑制法の探索 .....</b>	<b>4</b>
実験方法 .....	6
実験結果 .....	13
第 1 節 FAERS 解析を用いたドパミン D <sub>2</sub> 受容体遮断薬誘発ジスキネジア抑制薬の探 索 .....	13
第 2 節 JMDC 解析を用いたドパミン D <sub>2</sub> 受容体遮断薬誘発ジスキネジアとアセトア ミノフェンの使用との因果関係の推定 .....	15
第 3 節 ジスキネジア齧歯類モデルを用いたアセトアミノフェンの作用 .....	19
第 4 節 ジスキネジア症状に対するアセトアミノフェン脳代謝物の作用 .....	23
第 5 節 アセトアミノフェンのジスキネジア抑制作用に対する TRPV1 の関与 .....	24
第 6 節 AM404 およびカプサイシンのジスキネジア抑制作用に対する TRPV1 の関 与 .....	26
第 7 節 アセトアミノフェンによる背側線条体間接路有棘神経細胞の神経活動変化 .....	27
第 8 節 背側線条体間接路有棘神経細胞の化学遺伝学的活性化によるジスキネジア 症状の変化 .....	29
考察 .....	32
<b>第 2 章 ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬長期使用による多動性障害に対するアセトアミノフ         ェンの応用 .....</b>	<b>36</b>
実験方法 .....	37
実験結果 .....	41
第 1 節 FAERS 解析を用いたドパミン D <sub>2</sub> 受容体遮断薬誘発アカシジアとアセトアミ ノフェン使用との相関関係の推定 .....	41
第 2 節 IBM 解析を用いたドパミン D <sub>2</sub> 受容体遮断薬誘発アカシジアとアセトアミ ノフェン使用との因果関係の推定 .....	42
第 3 節 ハロペリドール長期投与ラットにおける行動変化とそれに対するアセトア ミノフェンの作用 .....	47
考察 .....	50
総括および結論 .....	53
謝辞 .....	54

発表論文目録.....55

参考文献.....56

## 緒言

ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬は、統合失調症や躁病患者に使用される抗精神病薬などとして幅広く用いられており、高い治療効果を示している。一方で、ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬による精神疾患の治療は長期にわたる場合が多く、その間に生じる副作用である多動性障害が臨床上大きな問題となっている。中でも、顔面などに出現する持続的な不随意運動である遅発性ジスキネジアや、落ち着きのなさや運動過多を症状とするアカシジアは、患者の対人関係や社会復帰の妨げとなり、ひいては QOL 低下の原因となることが問題となっている。また、ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬を中断した場合でも約 80% の患者で症状の改善が見られないため、遅発性ジスキネジアやアカシジアは解決すべき医療ニーズであると考えられる。この問題を解決するため、近年医療・創薬における利活用が期待されている「臨床ビッグデータ」に着目した。本研究では臨床ビッグデータ解析と従来の薬理学的実験を組み合わせた検討を行い、以下の新知見を得た。

第 1 章では、2 つの臨床ビッグデータ解析と薬理学的検討を用いて、解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェンが TRPV1 活性化を介して口唇ジスキネジアを抑制することを明らかにした。

第 2 章では、ジスキネジア抑制薬として見出したアセトアミノフェンが、ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬を長期使用した際に生じる多動性障害を抑制することを明らかにした。

これらの研究成果について、以下に論述する。

なお、本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AAV:	adeno-associated viral
ACSF:	artificial cerebrospinal fluid
<i>Adora2A</i> :	adenosine A <sub>2A</sub>
ALT:	alanine aminotransferase
AMPA:	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AM404:	<i>N</i> -(4-hydroxyphenyl)arachidonamide
AP:	anterior-posterior
AST:	aspartate aminotransferase
ATP:	adenosine 5'-triphosphate
BARS:	Barnes Akathisia Rating Scale
CB <sub>1</sub> :	cannabinoid type 1
CNO:	clozapine- <i>N</i> -oxide
CNS:	central nervous system
CRE:	creatinine
DL-APV:	DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid
DMSO:	dimethylsulfoxide
DNQX:	dinitroquinoxalin-2,3( <i>1H</i> , <i>4H</i> )-dione
DV:	dorsal-ventral
D2R:	dopamine D <sub>2</sub> receptor
EGTA:	ethylene glycol tetraacetic acid
FAAH:	fatty acid amide hydrolase
FAERS:	FDA Adverse Event Reporting System
FDA:	Food and Drug Administration
HAS:	Hillside Akathisia Scale
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethane-sulfonic acid
hM3Dq:	human M3 muscarinic receptor
IBM:	IBM MarketScan Research Database
ICD10:	International Classification of Disease 10
iMSNs:	indirect pathway medium spiny neurons
IR:	incidence rate
IRR:	incidence rate ratio
ML:	medial-lateral
NAPQI:	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzoquinone imine
ppENK:	preproenkephalin
RLS:	restless legs syndrome

ROR:	reporting odds ratio
SNRI:	serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor
SSRI:	selective serotonin reuptake inhibitor
TD:	tardive dyskinesia
TRPA1:	transient receptor potential vanilloid 1
TRPV1:	transient receptor potential ankyrin 1
VCM:	vacuous chewing movement
VMAT2:	vesicular monoamine transporter2

# 第1章 ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬誘発ジスキネジア抑制法

## の探索

ジスキネジアは、舌、顔面、顎、四肢などに生じる不随意的な運動を特徴とする神経学的症状である。薬剤誘発性ジスキネジアには、パーキンソン病患者に見られるレボドパ誘発ジスキネジアと、抗精神病薬などのドパミン D<sub>2</sub> 受容体 (D<sub>2</sub>R) 遮断薬の長期服用により生じる遅発性ジスキネジア (TD) の2種類があり、それぞれ異なる病態を示す。遅発性ジスキネジアは、ハンチントン病の症状としても生じることから、線条体間接経路中有棘神経細胞 (iMSNs) の機能不全が関係していると考えられている (1)。

TD は、抗精神病薬の長期服用患者の 20~30% で発症し、さらに D<sub>2</sub>R 遮断薬の服用を続けることにより、その症状は不可逆的になる (2)。TD を予防・緩和するための治療戦略としては、アマンタジン、コリン作動性薬物、β-アドレナリン遮断薬、GABA 作動薬、抗酸化剤など、様々な薬物が検討されているが (3)、どれも TD の治療を支持する十分な証拠はない。近年、小胞モノアミントランスポーター2 (VMAT2) の特異的な阻害薬が TD の治療薬として米国食品医薬品局 (FDA) に承認された。しかしながら最近の警告によると (4)、VMAT2 阻害薬の使用は、脳内モノアミンを枯渇させることにより、うつや自殺念慮を引き起こす可能性があるとしてされている。そのため、TD のリスクを低減する新たな戦略の開発が求められている。

TD のような薬物有害事象に対する有効な治療法を見つけるための一つのアプローチは、臨床ビッグデータを解析し、未知の薬物相互作用を検索することである。FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) は、自発報告による有害事象を集めた世界最大のデータベースである。FAERS を解析することで、いくつかの新規の薬物相互作用が発見されている (5、6)。これらの研究では、電子カルテや動物実験を組み合わせることで、対象となる薬物 (薬物 A) の有害事象の発生が、別の薬物 (薬物 B) の併用によって顕著に抑制されることが報告されている。したがって、FAERS データの解析は、特定の臨床有害事象の交絡因子に関する新たな仮説を生み出す貴重な戦略となり得ることが考えられる。しかしながら、FAERS データでは、薬物 B の併用と有害事象の発生率の変化との間の因果関係を算出することができないという方法論上の問題がある。そこで、本研究では、FAERS データの解析に加えて、550 万人の会社員とその扶養家族の診断、治療、処方に関する月次診療記録を収録した JMDC 保険請求データベース (JMDC Claims) から収集した情報を組み合わせることで、薬剤誘発性のジスキ

ネジアに対する時系列的な発生状況を調査した。

まず、著者は FAERS と JMDC Claims のデータから、薬剤誘発性のジスキネジアの発生に対する負の交絡因子となる薬物を探索することで、アセトアミノフェンがジスキネジアの抑制薬として有望であることを見出した。次に齧歯類モデルでその有効性を検証し、さらにその治療標的と分子メカニズムを明らかにした。



## 実験方法

### FAERS データベース解析

2004 年から 2018 年までの有害事象報告を FDA の Web サイトから入手した (7)。重複した報告 (合計 11,904,706 件のうち) は既報の通り排除し (8)、残りの 9,948,368 件の報告を解析した。また FAERS に登録されている薬物名は任意記載形式であるため、ライフサイエンス辞書シソーラスを駆使したテキストマイニングにより薬物名を一般名に統一した。ジスキネジアの報告は、MedDRA (バージョン 22.0) の「Dyskinesia」および「Tardive dyskinesia」で定義した。FAERS データの解析は、既報に従い行った (6)。ボルケーノプロットでは、*P* 値の代わりに *Z* スコアを使用した。

図 1-1A における算出方法を下記に示す。FAERS データに報告されている患者を以下の 4 つのグループに分けた。(a) 対象薬物 (薬物 A) を投与され、かつジスキネジアを発症した人、(b) 薬物 A を投与され、かつジスキネジアを発症しなかった人、(c) 薬物 A を投与されず、かつジスキネジアを発症した人、(d) 薬物 A を投与されず、かつジスキネジアを発症しなかった人。95% 信頼区間 (CI) 付きの報告オッズ比 (ROR) および *Z* スコアは、以下の式に従って算出した。

$$\text{ROR} = \frac{a/b}{c/d} \dots\dots\dots (1)$$

$$95\% \text{ CI} = \exp \left\{ \log(\text{ROR}) \pm 1.96 \sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}} \right\} \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{Z score} = \frac{\log(\text{ROR})}{\sqrt{\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d}}} \dots\dots\dots (3)$$

なお、a、b、c、d は各グループの例数を示す。

図 1-1B-D における算出方法を下記に示す。ハロペリドール、アリピプラゾール、またはメトクロプラミド (薬物 A) を投与された患者を以下の 4 つのグループに分けた。(a1) 併用薬 (薬物 B) を投与され、かつジスキネジアを発症した人、(b1) 薬物 B を投与され、かつジスキネジアを発症しなかった人、(c1) 薬物 B を投与されず、かつジスキネジアを発症した人、(d1) 薬物 B を投与されず、かつジスキネジアを発症しなかった人。薬物 A によるジスキネジアの 95% CI 付きの ROR と *Z* スコアを以下の式に従って算出した。

$$\text{ROR} = \frac{a1/b1}{c1/d1} \dots\dots\dots (4)$$

$$95\% \text{ CI} = \exp \left\{ \log(\text{ROR}) \pm 1.96 \sqrt{\frac{1}{a_1} + \frac{1}{b_1} + \frac{1}{c_1} + \frac{1}{d_1}} \right\} \dots\dots\dots (5)$$

$$\text{Z score} = \frac{\log(\text{ROR})}{\sqrt{\frac{1}{a_1} + \frac{1}{b_1} + \frac{1}{c_1} + \frac{1}{d_1}}} \dots\dots\dots (6)$$

なお、a1、b1、c1、d1 は各グループの例数を示す。

### **JMDC Claims データベース解析**

2005 年 1 月から 2018 年 3 月までの保険請求データは、株式会社 JMDC から購入した。このデータセットには、5,550,241 人の従業員とその扶養家族の毎月の医療診断と処方箋の請求が含まれていた。日本の国民健康保険制度と従業員層の特徴のため、患者は 65 歳以下が中心で、75 歳以上の患者は含まれていなかった。

診断名は、国際疾病分類 10 (ICD-10) に基づいて指定した。ジスキネジアの症例は、「遅発性ジスキネジア」、「口唇ジスキネジア」「口舌ジスキネジア」など、ICD-10 の標準病名に「ジスキネジア」を含む疾患名で定義したが、ジストニア、アカシジア、振戦、パーキンソニズム、その他の運動過多の症状は含まないものとした。傾向スコアマッチングでは、危険因子として、気分障害=F30-F39、アルコール、薬物乱用/依存=F10-F19、糖尿病=E10-E14、肝疾患=K70-K77 を用いた。

薬物名については、アリピプラゾールは ATC コード N05AX12 で定義した。ハロペリドールは、ハロペリドールの注射のみを処方されていた患者 ( $n = 9,892$ ) を除外し、ハロペリドールまたはハロペリドールデカン酸エステルを日常的に処方されていた患者 ( $n = 6,053$ ) を対象とした。同様に、メトクロプラミドは、短期的に服用していた患者 ( $n = 398,512$ ) は除外し、日常的に服用していた患者 ( $n = 302,064$ ) を対象とした。アセトアミノフェンは、ATC コード N02BE01、R05X、N02AA58、N02BE71、N02AJ13 のいずれかに該当する薬物を処方された患者を対象とした。傾向スコアマッチングにおいては、抗パーキンソン病薬 (N04) と追加の抗精神病薬 (N05A) を用いた。

JMDC Claims データの解析では、R v4.0.2 および R studio v1.3.959 ソフトウェア (R Foundation for Statistical Computing) を用いて行った。時系列解析には、R パッケージの survival および MatchIt を用いた。D2R 遮断薬使用によるジスキネジアの発生率は、Poisson 回帰を用いて評価し、その結果を発生率比 (IRR)、95% CI、Z スコアで表した。D2R 遮断薬のコホートを 2 群 (アセトアミノフェン使用群と非使用群) に分けた後、1:1 の傾向スコアマッチング (9) を用いて、危険因子を持つ患者数の偏りを解消した。傾向スコアマッチのペアは、0.2 (ハロペリドール) または 0.01 (アリピプラゾールとメトク

ロプラミド) のキャリパー幅で最近傍法を用いて 2 群をマッチングすること  
で作成した (10)。また、36 ヶ月の観察期間で *sequence symmetry analysis* を  
用いて因果関係を評価した (11)。マッチング後に得られたコホートペアを用  
いて、D2R 遮断薬とアセトアミノフェンの 1 日あたりの投与量、累積投与量、  
投与期間を算出し、比較した。ジスキネジアの累積発生率をアセトアミノフ  
ェン投与群と非投与群で比較し、生存曲線を Kaplan-Meier プロットで表した  
(12)。統計的有意性は、ログランク検定と Cox 比例ハザードモデルを用い  
てハザード比を算出して評価した。Number at risk は、毎月ジスキネジアが発  
症する可能性のある患者数を示す。

## 動物

すべての実験は、動物の使用数と実験回数を最小限にするように設計され  
た。雄性 Wistar 系ラット (9 週齢、200-250g) および雄性 C57BL/6J 系マウス  
(6-7 週齢、20-30g) は、日本 SLC から購入した。Transient receptor potential  
vanilloid 1 (TRPV1) 遺伝子欠損 (TRPV1-KO) マウス (B6.129X1-Trpv1<sup>tm1Jul</sup>/J、  
RRID : IMSR\_JAX : 03770) は University of California, San Francisco David Julius  
教授より御供与いただいた (13)。Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)  
遺伝子欠損 (TRPA1-KO) マウス (B6.129P-Trpa1<sup>tm1Kykw</sup>/J、RRID : IMSR\_JAX :  
006401) は Jackson Laboratory から購入した。アデノシン A<sub>2A</sub> (*Adora2A*) -Cre  
マウス ( B6.FVB(Cg)-Tg(*Adora2a-cre*)KG139sat/ Mmucd 、 RRID :  
MMRRC\_036158-UCD) は、Mutant Mouse Regional Resource Center から購入し  
た。全ての動物は室温が 24±1°C、明暗周期が 12 時間の室内で飼育し、餌およ  
び水は自由に摂取させた。

## 試薬

ハロペリドールは東京化成工業から、アセトアミノフェンとカプサイシン  
はナカライテスクから、*N*-(4-hydroxyphenyl)arachidonylamide (AM404) は  
Alomone Labs から、メタンフェタミンは大日本住友製薬から、clozapine-*N*-  
oxide (CNO) は Cayman Chemical から購入した。DL-2-amino-5-  
phosphonopentanoic acid (DL-APV) は MilliporeSigma から、dinitroquinoxalin-  
2,3(*1H,4H*)-dione (DNQX) は Tocris Bioscience から、ビククリンは Enzo Life  
Science から、ペントバルビタールは共立製薬から購入した。

ハロペリドール (ラット : 1 mg/kg、マウス : 2 mg/kg) およびアセトアミノ  
フェン (ラット : 50 または 100 mg/kg、マウス : 300 mg/kg) は 0.5%カルボキ  
シメチルセルロースに懸濁した。AM404 は 20%dimethylsulfoxide (DMSO) に  
溶解 (ラット)、または 5%の DMSO に 1%の Tween80 溶解し、生理食塩水

で希釈した（マウス）。カプサイシンは 5%の DMSO に 1%の Tween80 を加えて溶解し、生理食塩水で希釈した。メタンフェタミンは使用前に生理食塩水に溶解した。CNO は 1%の DMSO に溶解し、行動試験では生理食塩水で、電気生理学的検討では人工脳脊髄液（ACSF）で希釈した。

### **ラット脳室内投与**

ラットは 60 mg/kg のペントバルビタールで麻酔し、ブレグマとラムダが同じ水平面に保たれるように定位装置に固定した。頭蓋骨に穴を開け、右側脳室にステンレス製のガイドカニューレ（エイコム社）埋め込んだ。ラット脳アトラスをもとに、座標としてはブレグマから AP = +0.6 mm、ML = +1.6 mm、DV = +4.5 mm の位置を設定した。ガイドカニューレは歯科用アクリルで固定し、30 ゲージのステンレス製スタイレットをガイドカニューレの中に入れることで異物の侵入を防いだ。ラットは術後 3~5 日目から実験に使用した。

試薬は、ガイドカニューレに 30 ゲージのインジェクションカニューレを装着し、インジェクターにポリエチレンチューブで取り付けた 10  $\mu$ L のマイクロシリッジ（ハミルトン社）を通して脳室内に投与した。AM404（10 nmol または 50 nmol）またはその溶媒を、注入ポンプを用いて 1  $\mu$ L/min の速度で、5  $\mu$ L 投与した。試験後、エバンスブルー溶液（5  $\mu$ L）をカニューレから投与し、投与部位の確認を行った。投与部位が間違っていた場合、その動物は解析から除外した。

### **マウスマイクロインジェクション**

マウスはペントバルビタール（50 mg/kg）で麻酔し、ガイドカニューレを両側の背側線条体（AP = +0.3 mm、ML =  $\pm$ 2.6 mm、DV = +3.0 mm、角度 10°）に埋め込んで、歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。試験当日、インジェクションカニューレをガイドに装着し、AM404（0.5 または 1 pmol）またはその溶媒を 0.25  $\mu$ L/min の速度で、1  $\mu$ L 投与した。インジェクションカニューレは固定したまま測定を行った。試験後、カニューレからエバンスブルー溶液（0.5  $\mu$ L）を投与し、投与部位を確認した。投与部位が間違っていた場合、その動物は解析から除外した。

### **AAV ベクターの作製と伝達**

pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry は Addgene 社から入手した（プラスミド 44361）。アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、既報に従い調製した（14）。Lenti-X 293T 細胞をポリエチレンイミン（Max、Polysciences）を用いて、pAAV-hSyn-DIO-hM3D、pAAV-DJ、および pHelper でトランスフェクシ

ンした。トランスフェクションの 72 時間後、細胞を回収し、凍結融解を 4 回行うことで細胞膜を破壊した。ベンゾナーゼ・ヌクレアーゼ (MilliporeSigma) を用いて DNA と RNA を除去した。溶液を 17,781g で 10 分間遠心分離し、上澄みを回収した。この手順を少なくとも 5 回繰り返す、細胞のデブリを除去した。Adora2A-Cre マウス (6-7 週齢、20-30g) をペントバルビタールで麻酔し、小動物用定位装置 (Narishige) に固定した。AAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry または AAV-hSyn-DIO-mCherry (0.25  $\mu$ L/side) を両側の背側線条体 (AP = +0.6 mm、ML =  $\pm$ 2.4 mm、DV = +3.2 mm) に注入した。マウスはウイルス注入から少なくとも 4 週間後から行動試験および電気生理学的検討に使用した。

### **ハロペリドール誘発 VCMs**

ラットモデル (18) では、ハロペリドール、アセトアミノフェン、またはその両方を 1 日 1 回、21 日間経口投与した。最後の投与から約 24 時間後に、ラットを個別に透明のケージ (10  $\times$  20  $\times$  30 cm) に入れ、3 分間中の VCMs の回数を数えた。ケージへの馴化は、評価前 3 日間に 30 分、評価直前に 30 分行った。観察時は、ケージの両側にビデオカメラを 2 台設置し、ラットの行動を記録した。VCMs は、物理的な物質に向けられていない、垂直面での空の咀嚼行動と定義し、ブラインド下でカウントした。

マウスモデルでは、ハロペリドールを 21 日間経口投与した。最後の投与から約 24 時間後、アセトアミノフェンまたはその溶媒を経口投与し、個別に底面が透明な固定用チャンバー (直径 28 mm) に入れた。チャンバーへの馴化は、評価前 3 日間に 30 分行った。薬物投与の 60 分後から、マウスの下に設置したビデオカメラでマウスの行動を記録した。ブラインド下で 3 分間中の VCMs 数を 3 回カウントし、その平均値を算出した。

### **背側線条体へのマイクロインジェクション後の VCMs 評価**

WT および TRPV1-KO マウスにハロペリドールを 21 日間経口投与した。最後の投与から約 24 時間後、マイクロインジェクション前に VCMs を 5 分間測定した後、半数のマウスを、あらかじめ背側線条体に埋め込んだカニューレから、溶媒 (グループ 1) または薬物 (グループ 2) を無作為に割り当て投与した。その 5 分後に再び VCMs を 5 分間測定し、投与した薬物の効果を評価した。ハロペリドールの連続投与をさらに 4 日間続け、26 日目に、クロスオーバーデザインで、グループ 1 に薬物を、グループ 2 に溶媒を投与し、2 回目の VCMs 測定を行った。実験後、エバンスブルー染色を用いて投与部位を確認した。

## **免疫染色法**

マウスにハロペリドールまたはその溶媒を 21 日間経口投与し、灌流の 3 日前から単飼いで飼育した。摘出当日、アセトアミノフェンまたは溶媒を投与した 90 分後、マウスをペントバルビタールで麻酔し、4%パラホルムアルデヒド（ナカライテスク）を含むリン酸緩衝生理食塩水で灌流した。灌流固定後、脳を固定液中で 90 分間保存し、さらに 15%スクロースに 24 時間浸けた。その後脳はドライアイスで凍結した。脳はクリオスタット（Leica CM3050S : Leica Biosystems）を用いて厚さ 30  $\mu\text{m}$  の冠状切片に切り出し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

c-Fos 免疫染色のため、切片を 0.25% Triton X-100 を含むリン酸緩衝生理食塩水に浸して透過処理を行い、マウスモノクローナル抗 c-Fos 抗体（1 : 500 ; NBP2-50037、Novus Biologicals）およびウサギモノクローナル抗 preproenkephalin (ppENK) 抗体（1 : 500 ; RA14124、Neuromics）を用いて室温で一晩インキュベートした。その後 Alexa Fluor 594 標識ロバ抗マウス IgG（1 : 200 ; A21203、Thermo Fisher Scientific）および Alexa Fluor 488 標識ロバ抗ウサギ IgG（1 : 200 ; A21206、Thermo Fisher Scientific）を用いて室温で 1.5 時間、遮光でインキュベートした。画像は、共焦点蛍光顕微鏡 (Fluoview FV10i; オリンパス社) を用いて撮影した。ブレグマ+0.3 mm の位置にある背側線条体 0.045  $\text{mm}^2$  範囲における c-Fos<sup>+</sup>ppENK<sup>+</sup>細胞数を測定した。測定は 1 枚の切片につき 4 枚行った。

## **iMSNs の化学遺伝学的活性化とハロペリドール誘発 VCMs**

無傷の *Adora2A-Cre* マウスに、興奮性 Gq 結合型ヒト M3 ムスカリン受容体 (hM3Dq) -mCherry または mCherry のウイルスベクターを 1 日目に背側線条体に注入し、8 日目から 21 日間ハロペリドールを経口投与した。29 日目に、半数のマウスは溶媒（グループ 1）を、残りのマウスには 0.5 mg/kg の CNO（グループ 2）を腹腔内投与した。30 分後、VCMs の数を 3 分間、3 回カウントした。ハロペリドール投与をさらに 4 日間継続し、33 日目に 2 回目の VCMs 測定をクロスオーバーデザインで行った。その際 CNO をグループ 1 に、溶媒をグループ 2 に投与した。ハロペリドールを継続投与した 4 日後、c-Fos の免疫染色を行った。

## **神経活動の記録**

電気生理学的記録は、既報に従って行った (15)。 *Adora2A-Cre* マウスに AAV を注入してから 4 週間後に、線条体を含む冠状脳スライス（厚さ 200  $\mu\text{m}$ ）を作成した。脳は記録の前に  $32^{\circ}\text{C}$ で酸素入り ACSF（組成は mM : 124 NaCl、3

KCl、26 NaHCO<sub>3</sub>、1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2.4 mM CaCl<sub>2</sub>、1.2 mM MgCl<sub>2</sub>、10 D-glucose、pH 7.3) 中で少なくとも 1 時間回復させた。記録時には、DNQX (20 μM)、DL-APV (50 μM)、ビククリン (20 μM) を含む酸素入り ACSF を連続的に灌流し、チャンバーを 27°C±1°C に保った。電極の抵抗は、内液 (組成は mM : 140 K-gluconate、5 KCl、10 HEPES、2 Na-ATP、2 MgCl<sub>2</sub>、0.2 EGTA、pH 7.3 になるよう KOH で調整) を通した時、3~7 MΩ であった。直列抵抗は 70% で補正し、35 MΩ 以内で維持した。CNO 灌流 (3 μM、5 分) の前後に、current injection により背側線条体の hM3Dq 発現神経細胞の発火活動を記録した。

### **統計解析**

動物実験の統計解析は Prism v9.1.0 (GraphPad Software) を用いて、one-way および two-way analysis of variance (ANOVA)、または two-tailed paired *t*-test による解析を行った。Post hoc one-way および two-way ANOVA 試験では、それぞれ Tukey の多重比較検定と Sidak の多重比較検定を用いた。データは平均値±標準誤差 (SEM) で表し、危険率 5% 未満を統計的に有意であるとみなした。

### **研究の承認**

すべての後ろ向き観察研究は、京都大学医学部の倫理委員会の承認を得て行った (番号 R1018-1)。すべての動物実験は、京都大学動物実験委員会の倫理指針に基づき行った (番号 14-42-4、20-42)。

## 実験結果

### 第 1 節 FAERS 解析を用いたドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬誘発ジスキネジア抑制薬の探索

まず、不均衡分析を用いて ROR とその Z スコアを計算することで、FAERS データにおける薬物の使用とジスキネジアの発生との関連性を調べた。FAERS には報告バイアスがあること、さらに自発報告であるため母数が分からないことから、これらの値は実際の発生率を反映していない (16)。しかしながら、10 種類以上の D2R 遮断薬は ROR と Z スコアが高く、薬物の使用とジスキネジアの発生との間に強い正の相関を示した (図 1-1A)。そこで、定型抗精神病薬のハロペリドール、D2R 部分作動薬である非定型抗精神病薬のアリピプラゾール、制吐薬のメトクロプラミドという、薬理学的分類の異なる 3 つの D2R 遮断薬を選んだ。これら 3 剤は報告数が多かったことから、ジスキネジアの潜在的な交絡因子をさらに検討することができた。これらの D2R 遮断薬に関して、ジスキネジアは最も頻度の高い有害事象であり、ROR も高かった。一方で、クエチアピン、オランザピンなどの非定型抗精神病薬は、代謝性の副作用が強く、ジスキネジアの ROR を阻害し、その報告を過小評価する可能性があるため、選択しなかった。

各 D2R 遮断薬を使用した患者集団において、すべての薬物の組み合わせによるジスキネジアの ROR への交絡効果を評価したところ、併用した多くの薬物は、それ単独ではジスキネジアの ROR を変化させず、D2R 遮断薬誘発ジスキネジアの ROR に影響を与えた (図 1-1B-D)。ROR を低下させた薬物の中では、アセトアミノフェンが最も高い Z スコアの絶対値を示した。その他では、アスピリン、プロトンポンプ阻害薬、チロキシン、利尿薬、中枢神経 (CNS) 抑制薬などが強い抑制作用を持つ候補薬として見出された。



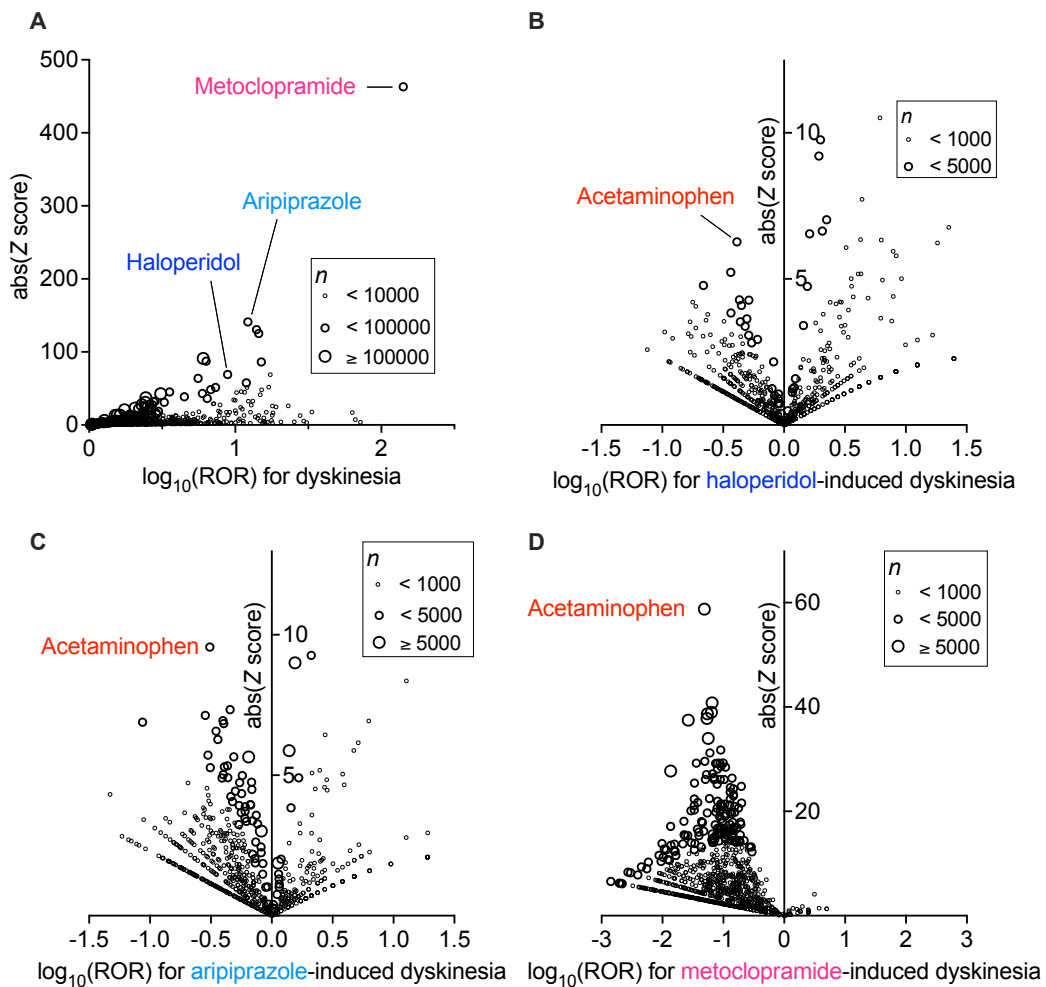
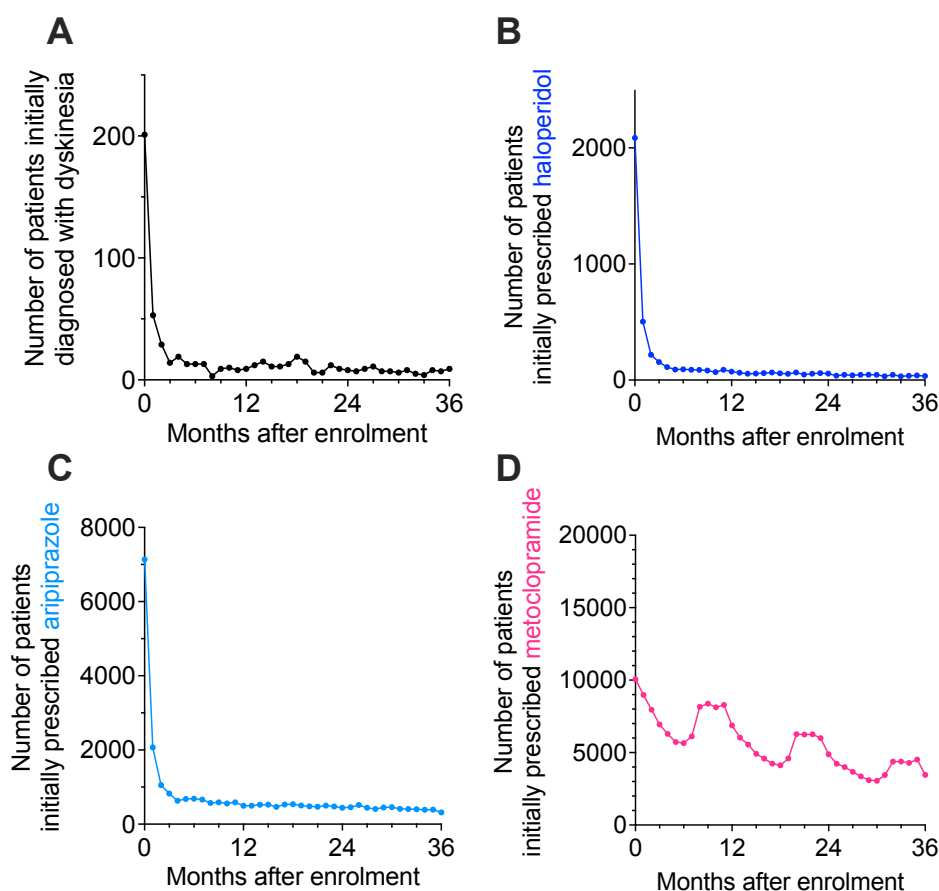


図 1-1 FAERS データにおける D2R 遮断薬使用によるジスキネジアの ROR 増加と、併用薬による薬剤誘発性ジスキネジアへの交絡効果

FAERS データ (2004 年から 2018 年までの  $n=9,948,368$ ) の統計解析は、R v4.0.2 および R studio v1.3.959 ソフトウェアを用いて行った。ボルケーノプロットは対数スケールの ROR と有意性の指標 (Z スコアの絶対値) で示している。各丸は個々の薬物を示し、丸の大きさはその薬物を服用している患者の例数を反映している。(A) メトクロプラミド、アリピプラゾール、ハロペリドールなどの D2R 遮断薬を使用している患者では、ジスキネジアの ROR が著しく有意に増加した。(B-D) それぞれの D2R 遮断薬を服用している患者集団において、薬剤誘発性ジスキネジアの ROR に対する併用薬の交絡効果を示している。

## 第 2 節 JMDC 解析を用いたドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬誘発ジスキネジアとアセトアミノフェンの使用との因果関係の推定

D2R 遮断薬の使用とジスキネジア発生との因果関係を調べるために、JMDC Claims を解析した。JMDC 登録後の初回イベント発生の時間分布を見ると（図 1-2）、最初にジスキネジアと診断された、またはハロペリドールが処方された、またはアリピプラゾールが処方された患者の数は、最初の 2 ヶ月が非常に多く、3 ヶ月目以降は安定していた。一方、メトクロプラミドが処方された患者数は、最初の 2 ヶ月は高かったものの、その後は概年周期を示したことから、冬場に非ステロイド系抗炎症薬とメトクロプラミドの併用が増えていることが示唆された。これらの結果から、登録後 2 ヶ月以内にジスキネジアの診断を受けたり、ハロペリドール、アリピプラゾール、メトクロプラミドを処方されたりした患者は、登録前または登録直後にジスキネジアを示す可能性があると考えられる。従って、これらの患者（登録から 0~2 ヶ月の期間中にジスキネジアの診断を受けたり、ハロペリドール、アリピプラゾール、メトクロプラミドの処方をされたりした患者）は研究対象から除外した。



**図 1-2 JMDC Claims データにおける登録後、最初のイベント発生までの時間分布**

患者の保険加入からジスキネジアの初回診断 (A)、ハロペリドール (B)、アリピプラゾール (C)、メトクロプラミド (D) の初回処方までの期間。患者数は月単位で示している。

次に、D2R 遮断薬の使用とジスキネジア発生との全体的な関連性を、ジスキネジアの IRR を推定することで評価した。JMDC コホートでは、ハロペリドールとアリピプラゾールが高い IRR を示した。メトクロプラミドにおいても増加の程度は小さいながらも、IRR は有意であり (表 1-1)、これは D2R 遮断薬の効力を反映していると考えられる。

**表 1-1 JMDC Claims データにおける D2R 遮断薬誘発ジスキネジアの発生率比 (IRR)**

Haloperidol	Cases	Incidence (%)	IRR (95% CI)	Z score	$-\log_{10}P$
+	11 / 3,104	0.182	70.1 (38.4 - 127.8)	13.9	42.9
-	320 / 5,211,178	0.003			

Aripiprazole	Cases	Incidence (%)	IRR (95% CI)	Z score	$-\log_{10}P$
+	70 / 29,512	0.134	61.0 (46.9 - 79.4)	30.6	205
-	268 / 5,177,545	0.002			

Metoclopramide	Cases	Incidence (%)	IRR (95% CI)	Z score	$-\log_{10}P$
+	38 / 269,889	0.007	2.51 (1.79 - 3.51)	5.35	7.06
-	313 / 4916587	0.003			

ハロペリドール、アリピプラゾール、メトクロプラミドを処方された 3 つの患者集団を抽出する際に、ジスキネジアや各薬剤における既知の交絡因子である高齢、女性、抗パーキンソン病薬、抗精神病薬の追加使用、アルコールや薬物の乱用・依存、気分障害、糖尿病、肝疾患の診断などを排除するため、1:1 の傾向スコアマッチングを行った (表 1-2) (3)。D2R 遮断薬服用患者のマッチング後のコホートでは、各 D2R 遮断薬の 1 日投与量および累積投与量、累積投与期間は、アセトアミノフェン併用の有無にかかわらず、それぞれで同程度であった (表 1-3)。しかしながら、これらの特性を見ると、ハロペリドールとメトクロプラミドのコホートは、さらにジスキネジアの解析を行う薬剤には適していないと考えた。ハロペリドールのコホートでは、ハロペリドール処方後 2 ヶ月 (中央値) 以内にジスキネジアと診断された患者は 11 人のみで、また累積投与量は 80 mg であった。これは少量かつ短期間の使用であり、十分な患者数とは言えない。また、メトクロプラミドのコホートでは、累積投与期間の中央値が 4~5 日と短く、さらに累積投与量が 60~70 mg と、これも TD の原因と考えるには不十分であった。一方、アリピプラゾールのコホートでは、適切な累積投与量 (中央値 300 mg 以上) と投与期間 (3 カ月以上) で、かつ十分なジスキネジアの患者数が存在したことから、このアリピプラゾールに焦点を当て次の解析を行った。

表 1-2 JMDC Claims データにおける D2R 遮断薬処方患者集団の傾向スコアマッチング各群の患者数を示す。

Population with haloperidol	Before Matching			After Matching		
	Without acetaminophen	With acetaminophen	P Value	Without acetaminophen	With acetaminophen	P Value
<b>Total</b>	1,274	1,830	–	1,265	1,265	–
<b>elderly(≧65)</b>	73	93	0.48	68	70	0.93
<b>female</b>	610	949	0.03	605	601	0.90
<b>Antiparkinsonian Drug</b>	653	1,076	$3.72 \times 10^{-5}$	652	662	0.72
<b>Antipsychotic Drug</b>	798	1,337	$9.07 \times 10^{-10}$	797	833	0.15
<b>Mood Disorder</b>	682	1,122	$1.83 \times 10^{-5}$	676	683	0.81
<b>Alcohol, Substance abuse / dependence</b>	70	112	0.51	68	77	0.49
<b>Diabetes Mellitus</b>	477	875	$1.22 \times 10^{-8}$	476	483	0.81
<b>Hepatic Disease</b>	405	844	$1.56 \times 10^{-15}$	405	410	0.86

Population with aripiprazole	Before Matching			After Matching		
	Without acetaminophen	With acetaminophen	P Value	Without acetaminophen	With acetaminophen	P Value
<b>Total</b>	13,781	15,731	–	12,216	12,216	–
<b>elderly(≧65)</b>	225	189	$1.98 \times 10^{-3}$	149	147	0.95
<b>female</b>	6,245	7,465	$2.50 \times 10^{-4}$	5,538	5,457	0.30
<b>Antiparkinsonian Drug</b>	1,979	2,899	$< 2.20 \times 10^{-16}$	1,889	1,823	0.25
<b>Antipsychotic Drug</b>	5,352	7,691	$< 2.20 \times 10^{-16}$	5,219	5,178	0.60
<b>Mood Disorder</b>	10,997	12,704	0.04	9,628	9,722	0.14
<b>Alcohol, Substance abuse / dependence</b>	362	644	$5.31 \times 10^{-12}$	332	352	0.46
<b>Diabetes Mellitus</b>	4,013	6,303	$< 2.20 \times 10^{-16}$	3,947	3,955	0.92
<b>Hepatic Disease</b>	3,872	6,578	$< 2.20 \times 10^{-16}$	3,850	3,889	0.60

Population with metoclopramide	Before Matching			After Matching		
	Without acetaminophen	With acetaminophen	P Value	Without acetaminophen	With acetaminophen	P Value
<b>Total</b>	65,479	204,410	–	65,464	65,464	–
<b>elderly(≧65)</b>	3,002	4,917	$< 2.20 \times 10^{-16}$	2,989	2,989	1.00
<b>female</b>	35,832	106,451	$< 2.20 \times 10^{-16}$	35,823	35,835	0.95
<b>Antiparkinsonian Drug</b>	542	2,621	$< 2.20 \times 10^{-16}$	538	496	0.20
<b>Antipsychotic Drug</b>	2,168	8,883	$< 2.20 \times 10^{-16}$	2,161	2,126	0.60
<b>Mood Disorder</b>	5,204	19,591	$< 2.20 \times 10^{-16}$	5,202	5,184	0.86
<b>Alcohol, Substance abuse / dependence</b>	714	2,546	$1.68 \times 10^{-3}$	704	711	0.87
<b>Diabetes Mellitus</b>	11,290	41,865	$< 2.20 \times 10^{-16}$	11,289	11,321	0.82
<b>Hepatic Disease</b>	12,269	51,412	$< 2.20 \times 10^{-16}$	12,264	12,307	0.77

表 1-3 JMDC Claims データにおいて傾向スコアマッチングにより選択された患者集団における D2R 遮断薬とアセトアミノフェンの 1 日および累積投与量、累積投与期間各群の中央値、四分位範囲 (IQR)、最小値-最大値の範囲を示す。

Matched haloperidol cohort	Without acetaminophen		With acetaminophen			
	Haloperidol		Haloperidol		Acetaminophen	
	Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range
Daily dose (mg)	1.5 (0.8-3)	0.1-54	1.5 (0.8-3)	0.1-56	600 (450-1,045)	0.8-9,750
Cumulative dose (mg)	80 (21-392)	0.4-33,471	91 (25-482)	0.6-34,784	6,250 (2,650-15,350)	4-1,678,725
Administration period (day)	52 (14-198)	1-4,267	63 (18-284)	1-7,407	10 (5-24)	1-1,456

Matched aripiprazole cohort	Without acetaminophen		With acetaminophen			
	Aripiprazole		Aripiprazole		Acetaminophen	
	Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range
Daily dose (mg)	3 (2.5-6)	0.1-360	3 (2.3-5.7)	0.1-321	675 (450-1,200)	0.8-36,000
Cumulative dose (mg)	306 (84-1,113)	1.8-84,870	414 (90-1,647)	0.7-104,124	5,175 (2,400-11,300)	4-2,970,325
Administration period (day)	98 (28-293)	1-5,716	142 (30-465)	1-6,889	7 (4-16)	1-2,306

Matched metoclopramide cohort	Without acetaminophen		With acetaminophen			
	Metoclopramide		Metoclopramide		Acetaminophen	
	Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range
Daily dose (mg)	15 (15-15)	0.3-60	15 (12-15)	0.2-100	643 (450-1,083)	20-39,900
Cumulative dose (mg)	60 (45-105)	0.9-48,300	69 (45-120)	0.2-79,020	6,100 (2,960-13,300)	60-3,366,625
Administration period (day)	4 (3-7)	1-2,055	5 (3-8)	1-4,959	10 (4-21)	1-2,955

アリピプラゾール患者において sequence symmetry analysis を行ったところ、調整順序比が 3.3 (95% CI : 2.2-5.4) であったことから、アリピプラゾールの使用とジスキネジア発症との間に因果関係が認められた (図 1-3A)。マッチング後のコホートを用いた Kaplan-Meier 曲線および Cox 比例ハザードモデルによると、ハザード比が 0.33 (95% CI : 0.19-0.58、ログランク検定  $P=4.0 \times 10^{-5}$ ) であったことから、アセトアミノフェンの併用によりアリピプラゾール誘発ジスキネジアの累積発生が有意に低下した (図 1-3B)。これと対応し、アリピプラゾールのコホートでは、ジスキネジアリスクのある残存患者数減少の程度もアセトアミノフェンによって弱められたことから、長期のアリピプラゾール治療からの脱落者がアセトアミノフェン併用によって減少することが示唆された。これらの実臨床データの解析結果より、アセトアミノフェンを併用することで、D2R 遮断薬によるジスキネジアが軽減される可能性が見出された。

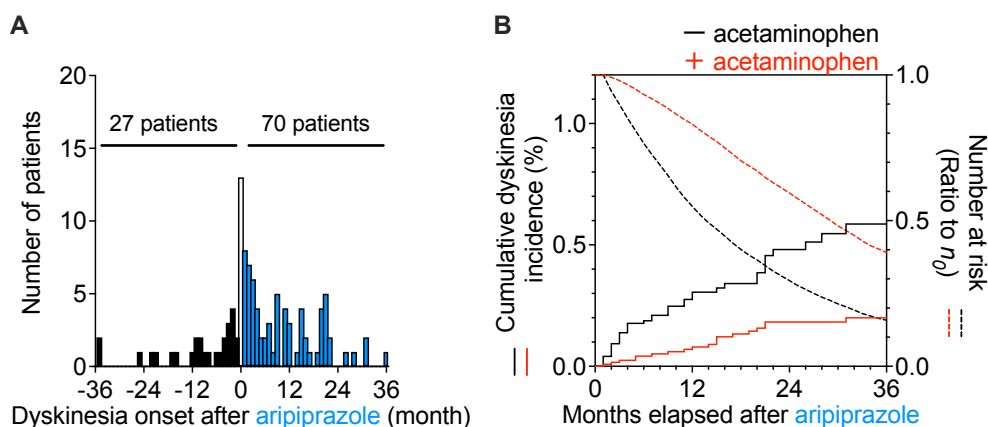


図 1-3 JMDC Claims データのうち、アリピプラゾールを処方された患者集団におけるジスキネジア発生率の時間推移

健康保険の加入から 0~2 ヶ月の患者は、導入期間を設けるために解析から除外した (図 1-2 に示した結果に基づく)。(A) Sequence symmetry analysis では、 $\pm 36$  ヶ月の観察期間 ( $n = 97$ ) において、アリピプラゾール投与開始とジスキネジア発症との間の調整順序比が 3.3 (95% CI : 2.2-5.4) であり、因果関係があることを示す。0 ヶ月目 (white bar) では、正確な時系列が不明なため、解析からは除外した。(B) 母集団の特性は表 1-2 のように一致させた。アリピプラゾール服用患者におけるジスキネジアの累積発生率の Kaplan-Meier 曲線を、アセトアミノフェン非併用群 (黒) と併用群 (赤) に分けて個別に示した。Cox 比例ハザードモデルによると、ハザード比は 0.33 (95% CI : 0.19-0.58、ログランク検定  $P = 4.0 \times 10^{-5}$ ) となり、アセトアミノフェンとの併用により、アリピプラゾール誘発ジスキネジアの発生率が有意に低下することが示された。点線は、全体の患者数 (両群とも  $n_0 = 12,216$ ) に対するリスクのある患者数の比率を示す。

### 第 3 節 ジスキネジア齧歯類モデルを用いたアセトアミノフェンの作用

*In vivo* でアセトアミノフェンが D2R 遮断薬誘発ジスキネジアを抑制しうるか検討するため、TD の齧歯類モデルとして汎用されている、ハロペリドールを連続投与することで誘発する vacuous chewing movements (VCMs) モデルを使用した。齧歯類モデルにおいて、ハロペリドールは口唇ジスキネジアを確実に誘発する唯一の薬剤であるため、アリピプラゾールは使用しなかった (17)。TD 様症状を確立するためにはハロペリドールの長期投与が望ましいが、著者はラットに十分な行動および生化学的変化を引き起こすことが可能な 3 週間投与の短期プロトコルを選択した (18)。本研究では、ハロペリドールの最終投与から約 24 時間後に VCMs 数を測定した。ラット (1 mg/kg/day) およびマウス (2 mg/kg/day) にハロペリドールを 21 日間連日投与したところ、最終投与の 24 時間後に VCMs 数の著しい増加が認められた。さらに、それらの VCMs 行動はハロペリドール

の退薬後少なくとも3日間は続いた (図 1-4)。

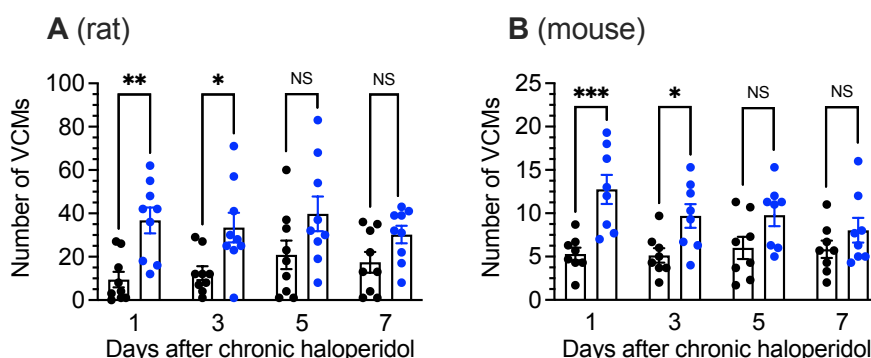


図 1-4 齧歯類にハロペリドールを 21 日間経口投与した後の退薬期における口唇ジスキネジア

ラット (A,  $n=9$ ) およびマウス (B,  $n=8$ ) にハロペリドールを 1 日 1 回、21 日間経口投与 (ラット: 1 mg/kg/day、マウス: 2 mg/kg/day) した。最後の投与約 24 時間後 (day1) から 3 分間の空の咀嚼行動 (VCMs) の回数を 2 日間隔で測定した。各データは平均値  $\pm$ SEM で示した。統計的有意性は、two-way ANOVA with post hoc multiple comparisons を用いて検定した (A, Time:  $F_{3,48} = 0.86$ ,  $P = 0.46$ ; Drug:  $F_{1,16} = 20.6$ ,  $P < 0.001$ ; Subject:  $F_{16,48} = 1.34$ ,  $P = 0.21$ 。B, Time:  $F_{3,42} = 1.32$ ,  $P = 0.28$ ; Drug:  $F_{1,14} = 16.3$ ,  $P < 0.01$ ; Subject:  $F_{14,42} = 2.04$ ,  $P < 0.05$ )。\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; NS, not significant。

ラットにハロペリドール (1 mg/kg/day, orally [p.o.]) とアセトアミノフェン (50 または 100 mg/kg/day, p.o.) を共処置したところ、ハロペリドールのみを投与したラットに比べて VCMs 数が有意に減少した (図 1-5A, one-way ANOVA,  $F_{4,55} = 8.37$ ,  $P < 0.001$ )。加えて、ハロペリドール (1 mg/kg/d, p.o.) を 21 日間投与し、最終投与の翌日にアセトアミノフェン (100 mg/kg, p.o.) を投与したところ、ハロペリドール誘発の VCMs 数の増加も有意に減少した (図 1-5B, one-way ANOVA,  $F_{3,25} = 19.2$ ,  $P < 0.001$ )。これらの結果より、アセトアミノフェンはジスキネジアの発症を予防し、かつジスキネジアの症状を急性的に抑制する効果があることが示唆された。

ハロペリドールの抗精神病作用に対するアセトアミノフェンの影響を検証したところ、メタンフェタミンによって誘発された自発行動量増加は、ハロペリドールによって有意に抑制された。一方、その作用はアセトアミノフェン 100 mg/kg を急性投与しても影響を受けなかった (図 1-6A, one-way ANOVA,  $F_{3,12} = 24.8$ ,  $P < 0.001$ )。さらに、ハロペリドール、アセトアミノフェン、またはその両方を 21 日間投与したラットにおける 30 分間の行動量に変化は認められなかった (図 1-6B, one-way ANOVA,  $F_{4,35} = 0.43$ ,  $P = 0.78$ )。アセトアミノフェンの過剰摂取は、ヒトにおいて肝障害や腎障害を引き起こすことが知られている (19, 20)。



そこで各ラットの血清を調べたところ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST、one-way ANOVA、 $F_{4,15} = 1.09$ 、 $P = 0.40$ )、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT、 $F_{4,15} = 1.28$ 、 $P = 0.32$ )、アルブミン ( $F_{4,15} = 0.36$ 、 $P = 0.83$ )、およびクレアチニン (CRE、 $F_{4,15} = 1.72$ 、 $P = 0.20$ ) の血清レベルには差はなかった (図 1-6C-F)。

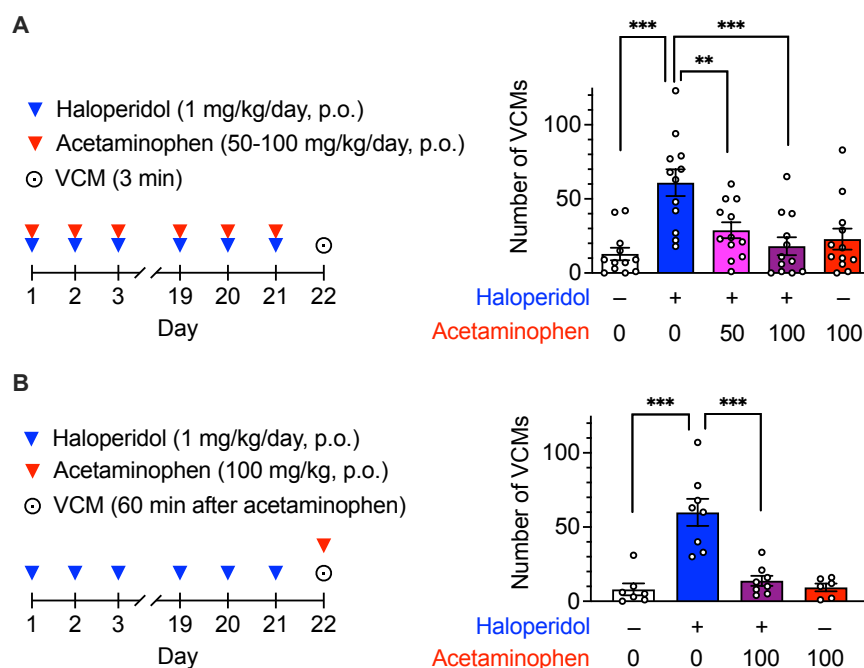


図 1-5 ラットにおけるハロペリドール誘発 VCMs 増加に対するアセトアミノフェンの作用

(A) ラット ( $n=12$ ) にハロペリドール (1 mg/kg/day)、アセトアミノフェン (50 または 100 mg/kg/day)、またはその両方を 1 日 1 回、21 日間経口投与し、最後の投与約 24 時間後から 3 分間 VCMs の数を測定した。(B) ラット ( $n=6-8$ ) にハロペリドール (1 mg/kg/day) を 1 日 1 回、21 日間経口投与し、ハロペリドール最終投与 23 時間後にアセトアミノフェン (100 mg/kg) を経口投与した。VCMs の数は、アセトアミノフェンまたは溶媒投与の 60 分後から 3 分間測定した。統計的有意性は、one-way ANOVA with post hoc Tukey's test を用いて検定した。\*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$ 。



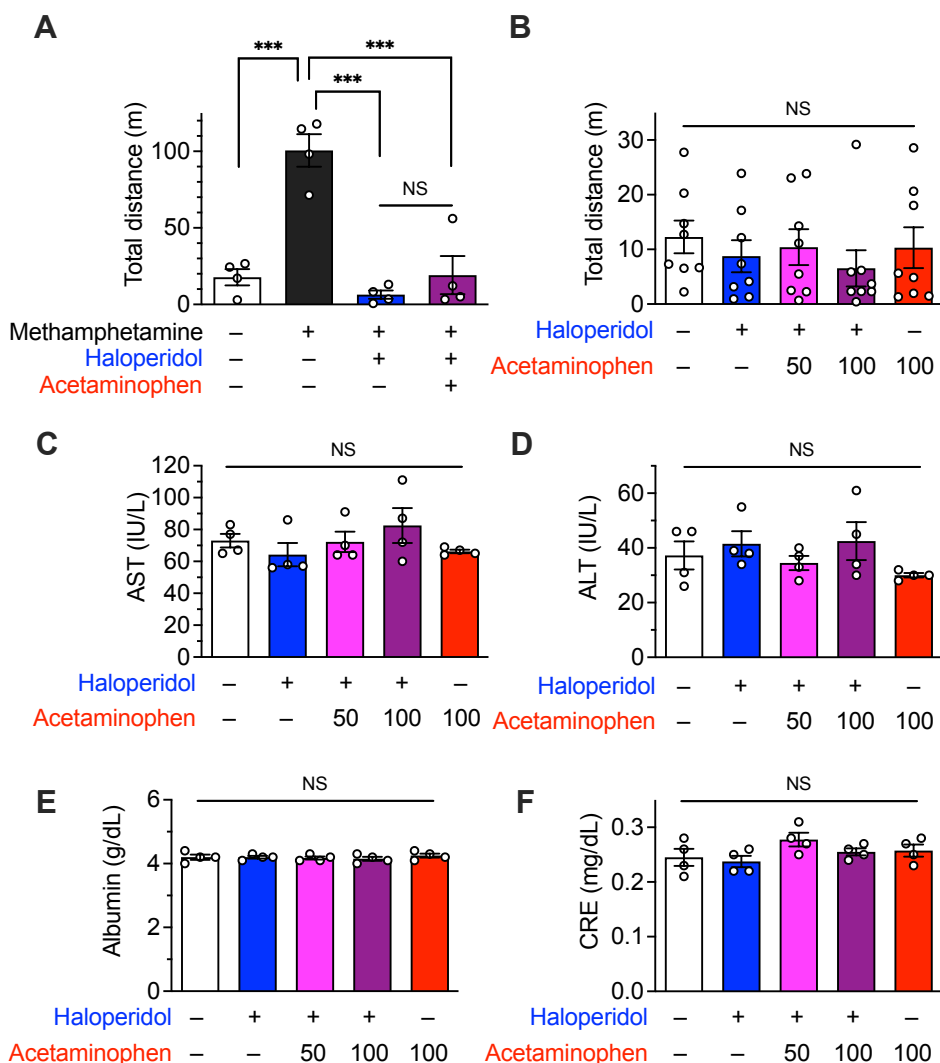


図 1-6 ラットの自発行動量、ハロペリドール誘発抗精神病作用、肝機能および腎機能に対するアセトアミノフェンの影響

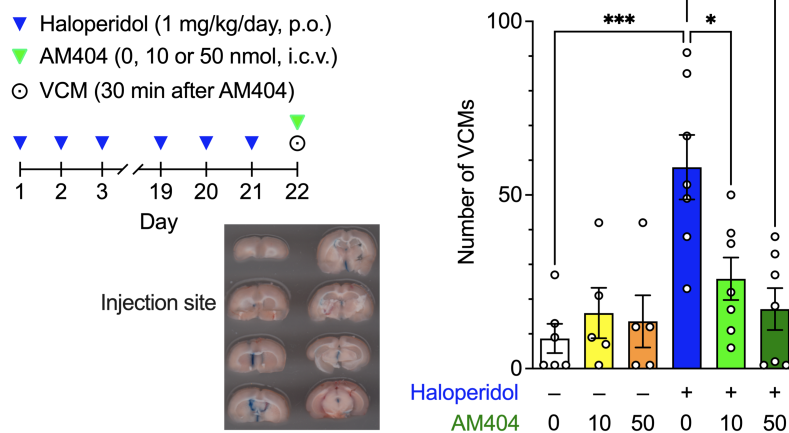
(A) ラット ( $n=4$ ) にハロペリドール (1 mg/kg)、アセトアミノフェン (100 mg/kg)、またはその両方を経口投与し、その 45 分後にメタンフェタミン (2 mg/kg) を腹腔内投与した。メタンフェタミン投与の 15 分後から 30 分間、ラットの行動量を測定した。(B) ラット ( $n=8$ ) にハロペリドール (1 mg/kg/day)、アセトアミノフェン (50 または 100 mg/kg/day)、またはその両方を 1 日 1 回、21 日間経口投与した。最終投与 24 時間後から 30 分間、ラットの行動量を測定した。(C-F) ラット ( $n=4$ ) にハロペリドール (1 mg/kg/day)、アセトアミノフェン (50 または 100 mg/kg/day)、またはその両方を 1 日 1 回、21 日間経口投与し、最終投与の 24 時間後に心臓から採血をした。そして血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST、C)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT、D)、アルブミン (E)、クレアチニン (CRE、F) の濃度を測定した。各データは平均値 $\pm$ SEM で示した。統計的有意性は、one-way ANOVA with post hoc Tukey's test を用いて検定した。

\*\*\* $P < 0.001$  ; NS, not significant.

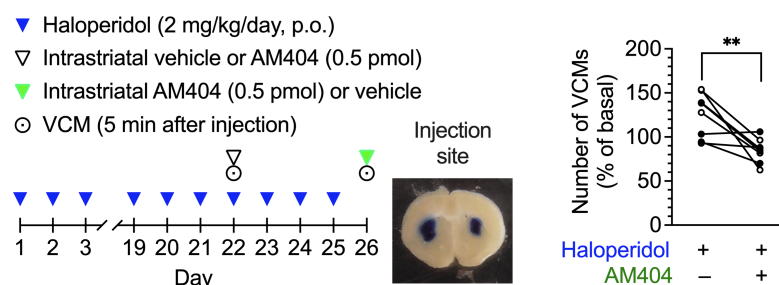
#### 第4節 ジスキネジア症状に対するアセトアミノフェン脳代謝物の作用

アセトアミノフェンは、*p*-アミノフェノールに代謝され、中枢で脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) によるアラキドン酸との結合を経て、AM404 に変換される (21)。アセトアミノフェンのジスキネジア抑制作用が、その代謝物である AM404 の活性を介している可能性を検証するため、ハロペリドールを 21 日間投与した後のラットの脳室内に、あらかじめ埋め込んだカニューレを介して AM404 を投与した。AM404 (10 nmol または 50 nmol) の脳室内投与から 30 分後に VCM 数を測定したところ、ハロペリドール誘発 VCMs 数の増加は用量依存的に減少し (図 1-7A、one-way ANOVA、 $F_{5,31} = 7.03$ 、 $P < 0.001$ )、アセトアミノフェンのジスキネジア抑制作用に AM404 が関与していることが示唆された。しかしながら、VCMs 数を減少させるのに必要な AM404 の量は予想以上に多かった。また、連続した脳の冠状切片におけるエバンスブルー色素の分布から明らかかなように、AM404 は単回の脳室内投与ではラットの脳実質まで十分に拡散しなかったと考えられる。背側線条体 iMSNs がジスキネジアに関与していること (1) を考慮し、ハロペリドール誘発 VCMs モデルマウスの背側線条体に AM404 を直接投与した。ハロペリドール連続投与 22 日目と 26 日目の 2 回、AM404 またはその溶媒の投与前と投与 5 分後に VCMs 数を繰り返し測定するクロスオーバー試験を行ったところ、対照群と比較し、AM404 (0.5 pmol/side) 投与後に、VCMs 数の相対的な減少が認められた (図 1-7B、paired *t*-test、 $P < 0.01$ )。

A (rat)



B (mouse)



### 図 1-7 齧歯類におけるハロペリドール誘発 VCMs に対する AM404 脳室内投与の作用

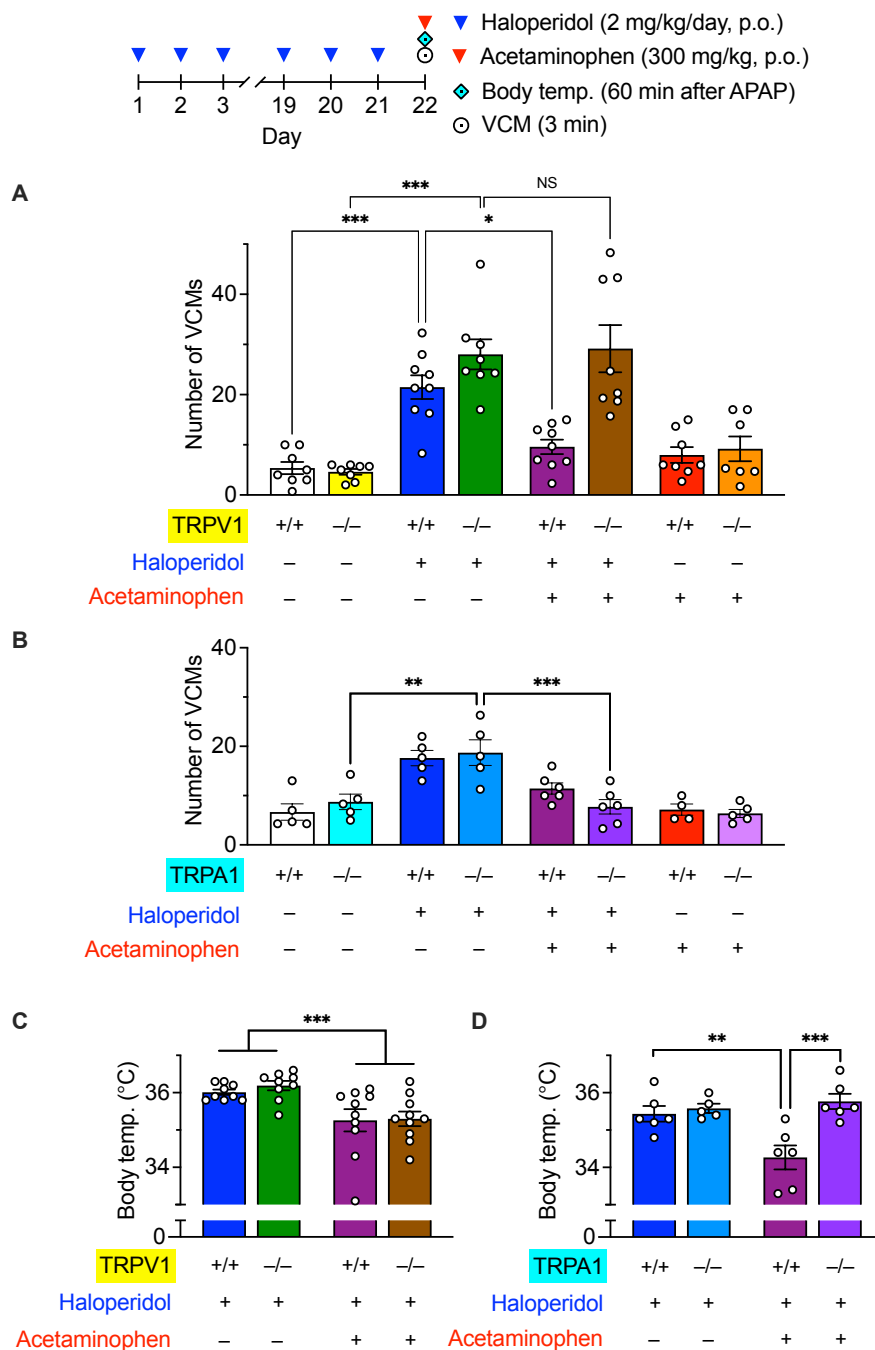
(A) ラット ( $n=5-7$ ) にハロペリドール (1 mg/kg/day) を 1 日 1 回 21 日間経口投与し、ハロペリドールの最終投与 23 時間後に AM404 (0、10、50 nmol) を脳室内投与した。AM404 投与 30 分後から 3 分間 VCMs の回数を測定した。試験後、カニューレからエバンスブルーを注入して投与部位を確認した。連続した脳の冠状切片の代表的な画像を示す(実寸で幅 43 mm)。各データは平均値 $\pm$ SEM で示した。統計的有意性は、one-way ANOVA with post hoc Tukey's test を用いて検定した。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 。(B) マウス ( $n=8$ ) にハロペリドール (1 mg/kg/day) を 1 日 1 回 21 日間経口投与した。22 日目にベースラインとして VCMs を 5 分間測定した後、半数のマウスには溶媒を投与し(グループ 1)、残りのマウスには AM404 (0.5 pmol/side ; グループ 2) を背側線条体に埋め込んだカニューレから投与した。投与の 5 分後、さらに 5 分間、VCMs 数を測定することで、投与した薬物の作用を検討した。ハロペリドール連続投与をさらに 4 日間継続した。26 日目に、クロスオーバー試験で 2 回目の VCMs 測定を行い、グループ 1 には AM404 を、グループ 2 には溶媒を投与した。試験後、カニューレからエバンスブルーを注入し、投与部位を確認した。線条体冠状切片の代表的な画像を示す(実寸で幅 11.5 mm)。22 日目および 26 日目の各マウスについて、VCMs 数の変化を、ベースラインの VCMs 数に対する百分率で表した。白丸と黒丸は、それぞれグループ 1 とグループ 2 の結果を示す。統計的有意性は、two-tailed paired *t*-test を用いて検定した。 $**P < 0.01$ 。

## 第 5 節 アセトアミノフェンのジスキネジア抑制作用に対する TRPV1 の関与

TRPV1 は末梢の感覚神経だけでなく中枢にも発現が認められる (22)。アセトアミノフェンの抗侵害受容作用は、AM404 を介した中枢の TRPV1 の活性化が関与する (23)。一方で、アセトアミノフェンの体温低下作用は、中枢神経系の TRPA1 の関与が報告されている (24)。そこで、TRPV1-KO および TRPA1-KO マウスを用いて、ハロペリドール誘発 VCMs 増加に対するアセトアミノフェンの影響と、アセトアミノフェン誘発の体温変化を比較した。

ハロペリドール (2 mg/kg/day, p.o.) を 21 日間連日投与したところ、22 日目に野生型 (WT) と TRPV1-KO マウスの両方で VCMs 数が有意に増加した。WT マウスにおいて、アセトアミノフェン (300 mg/kg, p.o.) の急性投与はハロペリドール誘発 VCMs 数の増加を有意に抑制したが、TRPV1-KO マウスでは抑制しなかった (図 1-8A, two-way ANOVA, drug :  $F_{3,57} = 28.3$ ,  $P < 0.001$  ; genotype :  $F_{1,57} = 14.6$ ,  $P < 0.001$  ; interaction :  $F_{3,57} = 7.05$ ,  $P < 0.001$ )。一方、ハロペリドールおよびアセトアミノフェンの作用は、WT マウスと TRPA1-KO マウス間で差はなかった (図 1-8B, two-way ANOVA, drug :  $F_{3,33} = 20.9$ ,  $P < 0.001$  ; genotype :

$F_{1,33} = 0.09$ ,  $P = 0.76$ ; interaction:  $F_{3,33} = 1.42$ ,  $P = 0.26$ ). 従って、アセトアミノフェンのジスキネジア抑制作用には TRPA1 ではなく、TRPV1 が関与していることが示唆された。



### 図 1-8 WT、TRPV1-KO、TRPA1-KO マウスにおけるハロペリドール誘発 VCMs および体温に対するアセトアミノフェン急性処置の作用

(A および B) WT、TRPV1-KO および TRPA1-KO マウス ( $n=4-9$ ) にハロペリドール (2 mg/kg/day) を 1 日 1 回 21 日間経口投与し、最終投与の 23 時間後にアセトアミノフェン (300 mg/kg) または溶媒を経口投与した。アセトアミノフェン投与 60 分後から 3 分間、VCMs の数を測定した。(C および D) WT、TRPV1-KO および TRPA1-KO マウス ( $n=5-10$ ) にハロペリドール (2 mg/kg/day) を 1 日 1 回 21 日間経口投与した。最終投与の 23 時間後にアセトアミノフェン (300 mg/kg) または溶媒を経口投与し、アセトアミノフェン投与 60 分後に直腸温を測定した。各データは平均 $\pm$ SEM で示した。統計的有意性は、two-way ANOVA with post hoc multiple comparisons を用いて検定した。\* $P < 0.05$  ; \*\* $P < 0.01$  ; \*\*\* $P < 0.001$  ; NS, not significant。

VCMs の測定と同じスケジュールで体温を測定したところ、WT および TRPV1-KO マウスともに、アセトアミノフェンは有意な体温低下を誘発した (図 1-8C、two-way ANOVA、drug :  $F_{1,34} = 16.8$ 、 $P < 0.001$  ; genotype :  $F_{1,34} = 0.30$ 、 $P = 0.59$  ; interaction :  $F_{1,34} = 0.12$ 、 $P = 0.73$ )。一方、TRPA1-KO マウスではアセトアミノフェンの体温低下作用は認められなかった (図 1-8D、two-way ANOVA、drug :  $F_{1,19} = 12.4$ 、 $P < 0.01$  ; genotype :  $F_{1,19} = 4.38$ 、 $P < 0.05$  ; interaction :  $F_{1,19} = 8.36$ 、 $P < 0.01$ )。このことから、アセトアミノフェンの体温低下作用には TRPA1 が関与していることが示唆された。

## 第 6 節 AM404 およびカプサイシンのジスキネジア抑制作用に対する TRPV1 の関与

AM404 は、元々細胞内アナンダミドの取り込みを阻害し、内因性カンナビノイドの濃度を増加させる薬物として合成された (25)。その後、カプサイシンと同等の強力な TRPV1 アゴニストであること (26)、弱いシクロオキシゲナーゼ阻害作用を有するアセトアミノフェンの代謝物であること (27) が報告されている。AM404 のジスキネジア抑制作用に対する TRPV1 の関与を調べるため、クロスオーバー試験を用いて、WT マウスと TRPV1-KO マウスの背側線条体に高用量の AM404 または TRPV1 アゴニストのカプサイシンを投与し、VCMs 数を比較した。WT マウスでは、1 pmol/side の AM404 を両側の背側線条体へ投与すると、対照群と比較して VCMs 数が減少した。一方、TRPV1-KO マウスでは、対照群と比較し、AM404 を投与しても VCMs 数に有意な変化は認められなかった (図 1-9A および B、two-way ANOVA、drug :  $F_{1,32} = 4.35$ 、 $P < 0.05$  ; genotype :

$F_{1,32} = 1.57$ ,  $P = 0.22$  ; interaction :  $F_{1,32} = 6.83$ ,  $P < 0.05$  )。また、カプサイシン (10 ng/side) の背側線条体内投与は、WT マウスにおけるハロペリドール誘発 VCMs 数の増加を抑制したが、TRPV1-KO マウスにおける VCMs 数は抑制しなかった (図 1-9C および D、two-way ANOVA、drug :  $F_{1,24} = 0.91$ ,  $P = 0.35$  ; genotype :  $F_{1,24} = 2.35$ ,  $P = 0.14$  ; interaction :  $F_{1,24} = 8.33$ ,  $P < 0.01$  )。

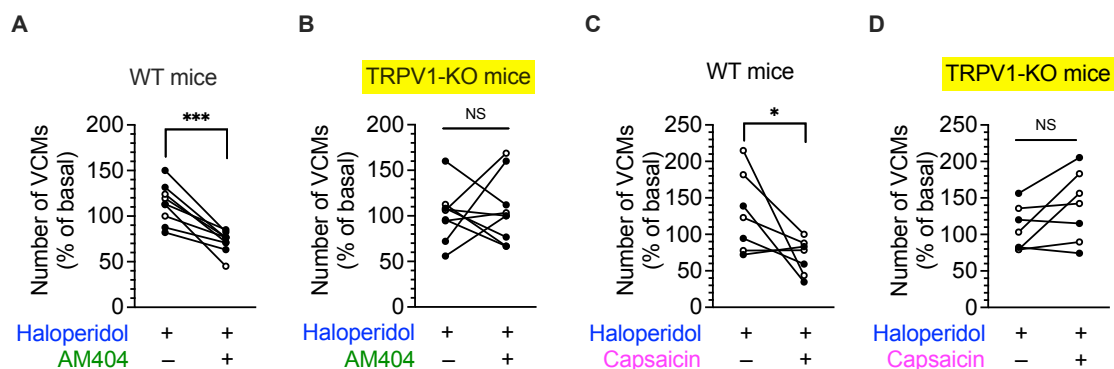


図 1-9 WT および TRPV1-KO マウスにおけるハロペリドール誘発 VCMs に対する AM404 およびカプサイシンの背側線条体内投与の作用

WT および TRPV1-KO マウスに、ハロペリドール (2 mg/kg/day) を 1 日 1 回 21 日間経口投与した。22 日目にベースラインとして VCMs を 5 分間測定した後、半数のマウスには溶媒を投与し (グループ 1)、残りのマウスには AM404 (1 pmol/side) またはカプサイシン (10 ng/side) (グループ 2) を背側線条体に埋め込んだカニューレから投与した。投与 5 分後、さらに 5 分間、VCMs の数を測定することで、投与した薬物の作用を検討した。ハロペリドール連続投与をさらに 4 日間継続した。26 日目に、クロスオーバー試験で 2 回目の VCMs 測定を行い、グループ 1 には AM404 またはカプサイシンを、グループ 2 には溶媒を投与した。(A および B) ハロペリドール誘発 VCMs に対する AM404 の背側線条体内投与の作用 ( $n = 9$ )。(C および D) ハロペリドール誘発 VCMs に対するカプサイシンの線条体内投与の作用 ( $n = 7$ )。22 日目および 26 日目の各マウスについて、VCMs 数の変化を、ベースラインの VCMs 数に対する百分率で表している。白丸と黒丸は、それぞれグループ 1 とグループ 2 の結果を示す。統計的有意性は、repeated measures two-way ANOVA with post hoc multiple comparisons を用いて検定した。\* $P < 0.05$  ; \*\*\* $P < 0.001$  ; NS, not significant.

## 第 7 節 アセトアミノフェンによる背側線条体間接路有棘神経細胞の神経活動変化

線条体の GABA 作動性 iMSNs は、D2R、A<sub>2A</sub>R、エンケファリンを発現している (28)。また D2R 遮断薬の長期使用で生じるジスキネジアにおいて、D2R の過敏化を介して iMSNs の活動低下を引き起こすことが報告されている (1)。そこ

で著者は、抗 ppENK 抗体を用いて背側線条体の iMSNs を特定し、c-Fos の免疫染色によりこれら細胞の神経活動を評価した。

WT マウスでは、一部の細胞で ppENK<sup>+</sup>と c-Fos<sup>+</sup>の共発現が認められた (図 1-10A)。ハロペリドール (2 mg/kg/day、po) を 21 日間投与したマウスでは、c-Fos<sup>+</sup>ppENK<sup>+</sup>細胞数が有意に減少したことから、iMSNs の神経活動低下が示唆された。また WT マウスでは、この減少はアセトアミノフェンの経口投与 90 分後に改善したが (図 1-10B、 $F_{2,15} = 8.64$ 、 $P < 0.01$ )、TRPV1-KO マウスでは、アセトアミノフェンは c-Fos<sup>+</sup>ppENK<sup>+</sup>細胞数の減少を改善しなかった (図 1-10C および D、 $F_{2,15} = 5.46$ 、 $P < 0.05$ )。これらの結果より、アセトアミノフェンは TRPV1 の活性化を介して、背側線条体 iMSNs の神経活動を亢進することが示唆された。

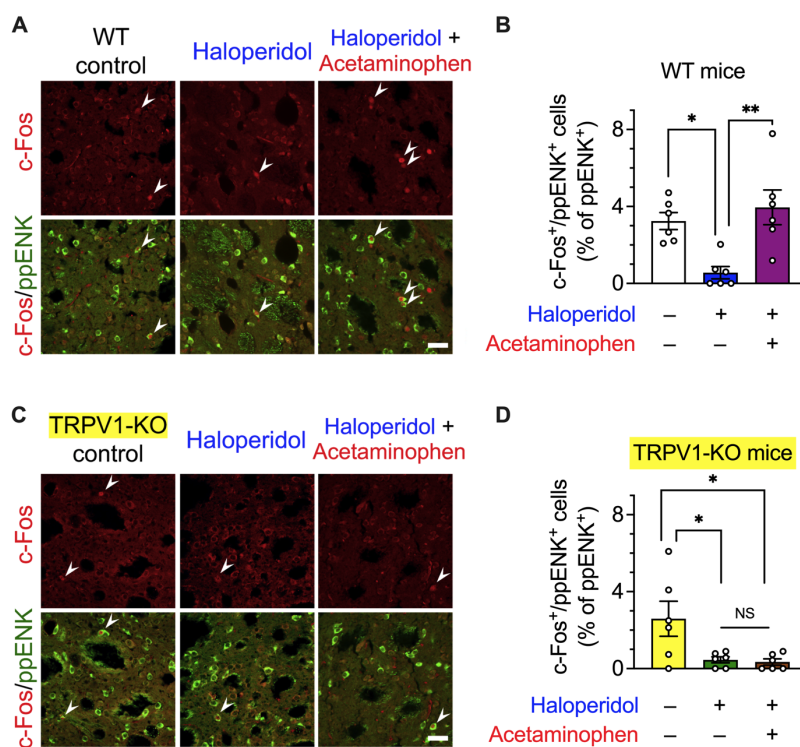


図 1-10 WT および TRPV1-KO マウス線条体における、プレプロエンケファリン (ppENK) および c-Fos に対する抗体を用いた iMSNs の免疫染色

WT (A および B) および TRPV1-KO (C および D) マウス ( $n = 6$ ) に、ハロペリドール (2 mg/kg/day) を 1 日 1 回 21 日間経口投与し、最終投与の 23 時間後にアセトアミノフェン (300 mg/kg) または溶媒を経口投与した。アセトアミノフェン投与 90 分後、背側線条体を含む冠状切片を作成し、抗 c-Fos 抗体および抗 ppENK 抗体で染色し、共焦点顕微鏡で画像を撮影した。c-Fos<sup>+</sup>ppENK<sup>+</sup>細胞 (矢じり) の数を測定した。iMSNs の総数を反映するため、ppENK<sup>+</sup>細胞の数に対する百分率で示した。Scale bars : 30  $\mu$ m。各データは平均  $\pm$ SEM で示した。統計的有意性は、one-way ANOVA with post hoc Tukey's test を用いて検定した。\* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; NS, not significant。

## 第 8 節 背側線条体間接路有棘神経細胞の化学遺伝学的活性化によるジスキネジア症状の変化

線条体の iMSNs を選択的に活性化することでハロペリドール誘発 VCMs の増加が抑制されるのか明らかにするため、*Adora2A* 特異的プロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと、デザイナーズドラッグにより排他的に活性化する hM3Dq をコードする Cre 誘導性 AAV ベクターを用いた (29)。この AAV ベクターを *Adora2A*-Cre マウスの背側線条体に注入したところ、4 週間後にはその領域全体に mCherry シグナルが観察され、そのいくつかは ppENK<sup>+</sup>神経と共発現していた (図 1-11A および B)。電気生理学的に mCherry 蛍光タグを発現させた線条体スライス切片の神経活動を記録したところ、光学的な形態と、current injection に応じた特徴的な遅い脱分極と発火パターンが認められ、iMSNs が同定された (30)。活動電位の頻度は、3 M の CNO を灌流した後に増加した (図 1-11C、paired *t*-test :  $t_2 = 10.0$ 、 $P < 0.01$ )。ランプ電流を流して活動電位を誘発する最小の電流振幅を解析したところ、CNO 投与後に基電流が減少していたことから (図 1-11D、paired *t*-test :  $t_2 = 8.49$ 、 $P < 0.05$ )、hM3Dq に作用する CNO に反応して iMSNs の興奮性が高まったと考えられる。

最後に、*Adora2A*-Cre マウスに hM3Dq-mCherry または mCherry を運ぶウイルスベクターを背側線条体内へ注射し、その 4 週間後にクロスオーバー試験を用いてハロペリドール誘発 VCMs を評価した (図 1-11E)。対照群である mCherry 発現ベクターを投与したマウスにおいて、ハロペリドール誘発 VCMs は CNO の急性投与により変化しなかった。しかしながら、hM3Dq-mCherry 発現ベクターを投与したマウスにおいては、CNO 急性投与後に VCMs 数の有意な減少が認められた (図 1-11F、repeated measures two-way ANOVA、drug:  $F_{1,15} = 10.14$ 、 $P < 0.01$  ; genotype :  $F_{1,15} = 0.05$ 、 $P = 0.82$  ; interaction :  $F_{1,15} = 3.65$ 、 $P = 0.08$ )。さらに、CNO の急性投与により、背側線条体の hM3Dq を発現する iMSNs における c-Fos<sup>+</sup>神経の数が増加した (図 1-11G)。これらの結果より、hM3Dq が CNO 処置により iMSNs を刺激していることが示唆された。



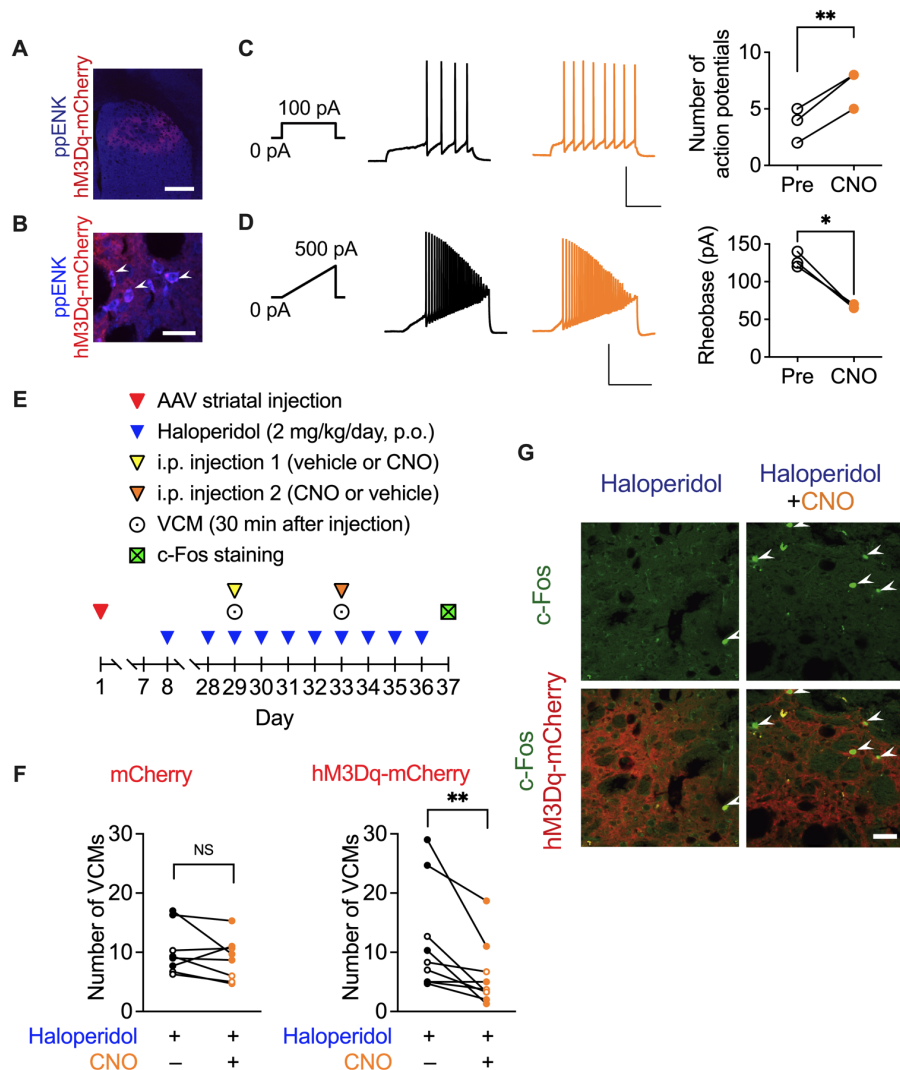


図 1-11 背側線条体神経の化学遺伝学的活性化が、マウス iMSNs の電気生理学的な神経活動およびハロペリドール誘発 VCMs に及ぼす影響

*Adora2A-Cre* マウスに AAV-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry を線条体に注入してから 4 週間後に線条体の画像を撮影した。低倍率 (A、スケールバー：500  $\mu\text{m}$ ) および高倍率 (B、スケールバー：30  $\mu\text{m}$ ) の画像から、背側線条体全体の ppENK<sup>+</sup>神経 (矢じり) に mCherry 融合タンパク質が共発現していることを示している。(C) hM3Dq-mCherry を発現させたマウスから得られた線条体 iMSNs に current injection (100 pA, 500 ms) すると活動電位が誘発され、その頻度は冠状切片に CNO (3  $\mu\text{M}$ ) を灌流した後に有意に増加した ( $n=3$ , two-tailed paired *t* test,  $**P < 0.01$ )。スケールバー：50 mV, 200ms。(D) CNO (3  $\mu\text{M}$ ) の処置 (Pre) と処置後 (CNO) にランプ電流 (500 pA, 1s) を注入して誘導した活動電位は、基電流の有意な減少を示している ( $n=3$ , two-tailed paired *t*-test ;  $*P < 0.05$ )。スケールバー：50 mV, 500ms。続きは次頁に示す。

#### 図 1-11 続き

(E) iMSNs を化学遺伝学的に刺激して VCMs 数を繰り返し測定する実験プロトコル。詳細なプロトコルは「実験方法」を参照。(F) 各マウスについて、CNO 投与による VCMs 数の変化を、29 日目と 33 日目の測定値に基づいて表した ( $n = 8-9$ )。白丸と黒丸は、それぞれグループ 1 とグループ 2 の結果を示す (実験方法参照)。統計的有意性は、repeated measures two-way ANOVA with post hoc multiple comparisons を用いて検定した。\*\* $P < 0.01$  ; NS, not significant。(G) mCherry タグを発現させたマウスでは、CNO (0.5 mg/kg) を腹腔内投与した 90 分後の線条体冠状切片において、c-Fos<sup>+</sup>神経細胞 (矢じり) の数が増加していた。スケールバー : 30  $\mu\text{m}$ 。

## 考察

本研究では、D2R 遮断薬の長期使用によって生じる口唇ジスキネジアを、抗侵害受容作用および解熱作用を持つアセトアミノフェンが軽減することを初めて明らかにした。この知見は、2種類の臨床ビッグデータ解析と、ハロペリドール誘発 VCMs によるジスキネジア齧歯類モデルを用いた *in vivo* 実験によって強く裏付けられた。アセトアミノフェンのジスキネジア抑制作用は、その活性代謝物 AM404 による背側線条体 TRPV1 の活性化を介しており、体温低下作用に非依存的であった。

これまでに、FAERS を用いたデータマイニングにより、有害事象の交絡因子として未知の薬物相互作用が多数確認されている (5、6)。多様な臨床症状にも関わらず、FAERS のデータセットサイズが大きかったため、D2R 遮断薬とジスキネジアの関連性は十分に強かった。さらにいくつかの D2R 遮断薬は特に例数が多いため、他の薬剤との関係をより高感度に検出することができた。ジスキネジアに対する強力な軽減作用は、アセトアミノフェン、アスピリン、プロトンポンプ阻害薬、チロキシシン、利尿剤の使用と関連していたが、これら薬剤は、これまでに動物モデルやヒトのジスキネジア患者での有効性が示されていなかった (3)。唯一の例外はフェンタニルで、これは以前の FAERS 解析で抗コリン薬として有効であると報告されている (31)。興味深いことに、今回の解析では、ほとんどの抗コリン薬は効果がなく、D2R 遮断薬誘発ジスキネジアの ROR を増加させた。これは以前の臨床観察研究と一致している (32)。他の併用薬の、ジスキネジア抑制作用の分子メカニズムを解明するためにはさらなる検討が必要である。しかしながら、アセトアミノフェンが対象としたすべての D2R 遮断薬の中で最も高い Z スコアを示したため、今回はアセトアミノフェンの効果に焦点を当てた。

JMDC Claims を用いた時系列解析により、D2R 遮断薬によるジスキネジアの正確な発生率と時間的变化を評価した。日本で最も頻繁に処方されている薬物の一つであるメトクロプラミドにおいて、ジスキネジア IRR の増加の程度が小さかったことは、D2R 遮断薬の中で、メトクロプラミドのジスキネジアリスクが最小であることを示した過去の報告と一致している (33)。これは FAERS でジスキネジアの ROR が最も高かったこととは対照的であり、黒枠警告が適用された後にメトクロプラミドのジスキネジア報告が大幅に増加し (34)、その結果、メトクロプラミドのリスクが過大評価されたと考えられる。ジスキネジアの IRR はハロペリドールとアリピプラゾールでより高かったが、年間の発症率は1%未満であった。これらの値は過去の報告の有病率よりもはるかに低く (2)、それは今回の患者集団では、D2R 遮断薬が低用量、短期間で処方されていたためだと

考えられる。ハロペリドールのコホートでは、累積投与量が少なく、累積投与期間も短かった。従って、詳細な時系列解析を行うために、今回は代表的な抗精神病薬である D2R 部分作動薬のアリピプラゾールを選択した。また、アセトアミノフェンの投与期間も短く、四分位範囲が 1 カ月以内に収まっていたが、これはアセトアミノフェンの、解熱鎮痛薬としての一時的な使用を反映していると考えられる。しかしながら、マッチング後の後ろ向きコホート解析を行ったところ、短期間のアセトアミノフェン投与は、アリピプラゾールの累積投与量を大きく変えることなく、アリピプラゾール誘発ジスキネジアの 3 年間の累積発生率を半減させるのに有効であることが示された。

アセトアミノフェンは、痛みや発熱の治療に最も使用され、広く普及している薬物の一つであるが、その作用機序は複雑である (21)。脳や脊髄では、アセトアミノフェンは脱アセチル化されて *p*-アミノフェノールとなり、FAAH によってアラキドン酸と抱合した後、AM404 に変換される (27)。アセトアミノフェンは、肝臓でグルクロニドおよび硫酸との抱合を経て、不活性代謝物へ変換され尿中に排泄される。残ったアセトアミノフェンの代謝物は、シトクローム P450 によって酸化され、*N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) となり肝障害を引き起こす。本研究では、アセトアミノフェンの投与量は肝障害や腎障害を引き起こさない程度の低用量であったが、ジスキネジアを抑制するには十分な量であった。

代謝物である AM404 と NAPQI は、アセトアミノフェンの治療効果に異なる形で寄与している。AM404 は、脳内の TRPV1 を活性化することで抗侵害受容作用を示し (23)、NAPQI とその副次生成物は、脊髄の TRPA1 を介した抗侵害受容作用に関与している (35)。強力な TRPA1 活性化薬である NAPQI は、高用量のアセトアミノフェン投与時の体温低下作用にも関与している (24)。一方、エンドトキシン誘発発熱モデルでは、アセトアミノフェンの解熱作用は、脳内のシクロオキシゲナーゼの阻害とプロスタグランジン E<sub>2</sub> の産生低下を介して行われることが報告されている (36)。TRPV1-KO マウスおよび TRPA1-KO マウスを用いた今回のデータは、アセトアミノフェン、AM404、およびカプサイシンのジスキネジア抑制作用には TRPV1 のみが関与し、一方、アセトアミノフェンの体温低下作用には TRPA1 が、おそらく NAPQI を介して関与することを見出した。

AM404 は、TRPV1 活性化作用に加え、アナンダミドの細胞内取り込みを阻害することでエンドカンナビノイドを増加させ (25)、カンナビノイドタイプ 1 (CB<sub>1</sub>) 受容体を活性化する。またアナンダミドは CB<sub>1</sub> 受容体の活性化を介してハロペリドール誘発 VCMs を抑制することが知られている (37)。CB<sub>1</sub>/TRPV1 活性化薬による多動性障害抑制作用は、ハンチントン病ラットモデルでも報告されている (38)。エンドカンナビノイドは、TRPV1 の内因性活性化薬である可能性があ

るため、CB<sub>1</sub>受容体と TRPV1 の協調作用がアナンダミドのジスキネジア抑制作用に関与していることが考えられる。しかしながら、アナンダミドの役割に関するいくつかの研究において、FAAH 欠損マウスや FAAH 阻害薬を用いて、エンドカンナビノイドの分解酵素を阻害してその量を増やしている。FAAH は脳内でアセトアミノフェンから AM404 を生成するのに必要であり、FAAH を欠損させるとアセトアミノフェン投与後の AM404 が欠乏するため、これらの研究は慎重に解釈する必要がある (23、27)。加えて、AM404 はアナンダミドの取り込みを阻害するために必要な濃度よりもはるかに低い濃度で TRPV1 を活性化する (26)。以上のことから、AM404 およびアセトアミノフェンのジスキネジア抑制作用に対する CB<sub>1</sub> 受容体の寄与は小さいと考えられる。

TD は、D2R を長期的に遮断することで、背側線条体の iMSNs に発現する D2R の増加および過敏化が起り、その結果、iMSNs が過剰に抑制されることで発症すると考えられている (1)。今回の結果から、アセトアミノフェンによる背側線条体 iMSNs の活性化とジスキネジア抑制作用に TRPV1 が重要な役割を果たしていることが示唆され、TRPV1 が背側線条体の iMSNs を活性化することで、運動機能の制御に寄与していると考えられる。この仮説は、背側線条体の iMSNs を光遺伝学的に活性化させることで、ハロペリドール誘発 VCMs が減少するという結果からも支持されている (39)。著者は化学遺伝学的に背側線条体の iMSNs を刺激すると、iMSNs の c-Fos シグナルが増加し、ハロペリドール誘発 VCMs が減少することを示し、この仮説を確認した。従って、TRPV1 を介した背側線条体の iMSNs 活性化が、アセトアミノフェンのジスキネジア抑制作用の根底にある分子メカニズムであると考えられる。

TRPV1 が線条体のシナプス特性に関与していることを示唆する研究が増えており、おそらく双方向の調節作用を持っていると考えられる。線条体では、TRPV1 はプレシナプスとポストシナプス MSNs の両方に発現している。プレシナプスの TRPV1 は、グルタミン酸放出確率を増加させることにより、背側および腹側の線条体における興奮性入力を促進する (40)。対照的に、腹側線条体の iMSNs におけるポストシナプス TRPV1 の活性化は、AMPA 受容体のエンドサイトーシスに起因する長期抑圧の誘導に関与する (41)。TRPV1 を介した興奮性入力制御の方向性と大きさは、TRPV1 レベルとドパミンシグナルに影響されることが示唆されており、腹側線条体における TRPV1 を介した興奮性入力の細胞種特異的、経路特異的な制御であることを表している (42)。背側線条体と腹側線条体では、グルタミン酸入力、遺伝子発現、ドパミンシグナルは領域不均一的である (43)。従って、TRPV1 による背側線条体 iMSNs の活性化メカニズムを明らかにするためには、背側線条体の TRPV1 を介した経路特異的なシナプス制御についてさらなる研究を行う必要がある。

結論として、本研究での発見は、ヒトの後ろ向き観察研究と動物モデルの薬理学的実証の両方を用いて、アセトアミノフェンが D2R 遮断薬によるジスキネジアを抑制させるのに有効であることを示している。このように、臨床ビッグデータ解析と基礎研究と組み合わせたドラッグリポジショニングアプローチは、高い臨床予測性を有する研究手法であり、新たな治療法の手がかりとなりうると考えられる。アセトアミノフェンの長期使用は、NAPQI による肝毒性、およびアセトアミノフェンのカンナビノイドとしての作用による乱用・過剰摂取を引き起こす可能性があるため、中枢の TRPV1 を選択的に活性化する新規の非刺激性化合物の開発が望まれる。

以上、本章において著者は、アセトアミノフェンによる中枢 TRPV1 の活性化が、D2R 遮断薬誘発口唇ジスキネジアを抑制することを明らかにした。

## 第2章 ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬長期使用による多動性障

### 害に対するアセトアミノフェンの応用

アカシジアは落ち着きのなさや、身体、特に下肢を動かしたいという衝動から来る多動を特徴とする運動障害であり、重症化すると攻撃的になり、ひいては自殺念慮にも繋がる (44)。アカシジアは抗精神病薬などの D<sub>2</sub>R 遮断薬や抗うつ薬などの副作用として知られており、有病率は抗精神病薬服用患者の 15-35%程度とされている (45)。その症状の発現時期によって、急性アカシジア、遅発性アカシジア、離脱性アカシジアといった、いくつかのサブタイプに分類される。

遅発性アカシジアは、抗精神病薬による治療の後期 (1~3 ヶ月以上) に発症するが、抗精神病薬の中止や減量後にも出現する。またその症状は抗精神病薬を中止した後も数ヶ月から数年間持続し (46)、発症者の多くは TD を併発する。遅発性アカシジアに対する研究は乏しいため、病態メカニズムについては不明である。アカシジアを予防・緩和するための治療戦略としては、抗コリン薬やβ遮断薬、ベンゾジアゼピン系薬が使用されているが (46)、遅発性アカシジアはこれらの薬剤に対し治療抵抗性を示すことから、遅発性アカシジアを改善する新たな戦略の開発が求められている。

薬物有害事象を解決する手法として、近年、臨床ビッグデータ解析を基礎研究へと応用する手法が注目されつつある。著者は過去に、世界最大の薬物有害事象自発報告データベース FAERS と、日本の保険請求データベース JMDC Claims を解析することで、解熱鎮痛薬アセトアミノフェンが D<sub>2</sub>R 遮断薬誘発ジスキネジアを抑制することを見出し、その効果を齧歯類モデルで実証した (47)。そこで本研究では、FAERS とアメリカの保険請求データベース IBM MarketScan Research Database (IBM) の解析と、齧歯類モデルを組み合わせ、D<sub>2</sub>R 遮断薬誘発アカシジアとアセトアミノフェンの関係について調査した。

まず、著者は FAERS と IBM のデータから、アセトアミノフェンが D<sub>2</sub>R 遮断薬誘発アカシジアを抑制することを見出した。次にラットを用いてその有効性を検証した。

## 実験方法

### FAERS データベース解析

2004 年から 2019 年までの有害事象報告を FDA の Web サイトから入手した (7)。重複した報告は既報の通り排除し (8)、残りの 11,438,031 件の報告を解析した。また FAERS に登録されている薬物名は任意記載形式であるため、ライフサイエンス辞書シソーラスを駆使したテキストマイニングにより薬物名を一般名に統一した。アカシジアの報告は、MedDRA (バージョン 23.0) の「Akathisia」で定義した。FAERS データの解析は、既報に従って行った (6)。ボルケーノプロットでは、 $P$  値の代わりに  $Z$  スコアを使用した。詳細な算出方法については第 1 章に同じ。

### IBM データベース解析

2017 年 1 月 1 日から 2019 年 12 月 31 日までの保険請求データは、株式会社 IBM から購入した。このデータセットには、43,723,094 人の加入者情報が含まれており、解析には外来患者のみ (36,440,717 人) を対象とした。

アカシジアの診断名は、ICD-10 code G2570 : Drug induced movement disorder, unspecified、G2571 : Drug induced akathisia、G2579 : Other drug induced movement disorders に基づいて定義した。アカシジアは誤診例も多いため、G2570 と G2579 も定義に追加した。傾向スコアマッチングでは、危険因子として、気分障害=F30-F39、アルコール、薬物乱用/依存=F10-F19、糖尿病=E10-E14、肝疾患=K70-K77 を用いた。

薬物については、アリピプラゾールは「アリピプラゾール」、「アリピプラゾールラウロキシル」で定義した。ハロペリドールは、「ハロペリドール」、「乳酸ハロペリドール」のうち、注射のみを処方されていた患者を除外した患者、または「ハロペリドールデカン酸エステル」で定義した。アセトアミノフェンは、「アセトアミノフェン」を含む合剤のうち、オピオイド (オキシコドン、ヒドロコドン、コデイン、トラマドール) との合剤を除いた薬剤で定義した。傾向スコアマッチングにおいては、抗パーキンソン病薬 (ATC コード N04) と追加の抗精神病薬 (N05A のうち、リチウム製剤を除く)、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) とセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) (ジメルジン、フルオキセチン、シタロプラム、パロキセチン、セルトラリン、アラプロクラート、フルボキサミン、エトペリドン、エスシタロプラム、デュロキセチン、ベンラファキシン、デスベンラファキシン、ミルナシプラン、レボミルナシプラン)、鉄製剤 (B03A のうち、鉄を含



む薬剤) を用いた。

IBM データの解析では、R v4.1.0 および R studio v1.4.1717 ソフトウェア (R Foundation for Statistical Computing) を用いて行った。時系列解析には、R パッケージの survival および MatchIt を用いた。

D2R 遮断薬とアカシジア発生との因果関係は 3 年の観察期間で sequence symmetry analysis と発生率 (IR) を用いて評価した。

D2R 遮断薬のコホートを 2 群 (アセトアミノフェン使用群と非使用群) に分けた後、1:1 の傾向スコアマッチング (9) を用いて、危険因子を持つ患者数の偏りを解消した。傾向スコアマッチのペアは、0.01 のキャリパー幅で最近傍法を用いて 2 群をマッチングすることで作成した (10)。マッチング後に得られたコホートペアを用いて、D2R 遮断薬とアセトアミノフェンの 1 日あたりの投与量、累積投与量、投与期間を算出した。

D2R 遮断薬処方後にアセトアミノフェンを処方した場合を併用とみなし、D2R 遮断薬単独と併用群における IR を算出した。

統計的有意性は、カイ二乗検定および Fisher の正確確率検定を用いて評価した。

## **動物**

すべての実験は、動物の使用数と実験回数を最小限にするように設計された。雄性 Wistar 系ラット (9 週齢、200-250g) は、日本 SLC から購入した。全ての動物は室温が  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、明暗周期が 12 時間の室内で飼育し、餌および水は自由に摂取させた。

## **試薬**

ハロペリドールは東京化成工業から、アセトアミノフェン、(2-ヒドロキシプロピル)- $\beta$  シクロデキストリン、およびメタンスルホン酸はナカライテスクから購入した。イソフルランはファイザー株式会社より購入した。

ハロペリドール (1 mg/kg/day) はメタンスルホン酸で酸性にした 20% (2-ヒドロキシプロピル)- $\beta$  シクロデキストリンに温めながら溶解させた。その後ハロペリドールが析出しないところまで、NaOH で pH を調整した (48)。ハロペリドールは浸透圧ミニポンプ (model 2ML4, 28day delivery ; Alzet) にて投与した。アセトアミノフェン (200 mg/kg) は 0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁した。

## **浸透圧ミニポンプの埋め込み**

実験動物用吸入麻酔気化器 (TK-4, TK-7; バイオマシナリー) を用いてイソ

フルランでラットを麻酔した。濃度 3%で麻酔導入を行い、手術中は濃度 2%で維持した。麻酔下で、溶媒またはハロペリドールを含む浸透圧ミニポンプを留置した。各動物の腰部に 1.5 cm 幅の切開を加え、流量調節器を切開部から遠ざけるようにミニポンプを挿入した。切開部は 9mm の外科用ステープルで閉じられ、70%エタノールで洗浄した (49)。

## **投与プロトコル**

溶媒またはハロペリドールを含む浸透圧ミニポンプを各ラットに埋め込み、薬物投与を開始した。21 日目にポンプを取り外し、新しいポンプを同様の方法で埋め込んだ。42 日目にポンプを取り出し、47 日目、すなわち投与中止後 5 日目にアカシジア様行動評価、7 日目にオープンフィールド試験、13 または 14 日目に免疫組織化学的検討のための断頭を行った。

## **アカシジア様行動評価**

ラットアカシジア様行動は、薬剤誘発アカシジアに対するヒトの評価尺度に基づき評価した。ヒトにおけるアカシジア尺度は 2 つ設計されており、1 つは Barnes Akathisia Rating Scale (BARS) である。これは手足のそわそわした動きや、じっとしてられないなどの運動症状を評価する (50)。もう一つの Hillside Akathisia Scale (HAS) は、主にアカシジア症状の重症度を評価するために用いられる (51)。HAS で使用される症状の重症度は、下記のアカシジア様行動を示した時間で評価した。BARS に記載された観察可能な行動については、すでに霊長類での研究において適応されており (52)、ここでは以下の 6 つの指標を用いている；1. 目的のない動き/常同行動、2. 足の揺れ/その場での歩き、3. 体位を変える、4. 異常な手足の動き、5. じっとしてられない、6. 不穏。加えて、すべてのスコアを考慮した全体的な落ち着きのなさの程度を評価している。今回上記の行動のうちいくつかを齧歯類モデルに適応した。行動としては、常同行動としてのグルーミングとリアリング、体位を変える行動としてのローテーションをアカシジア様行動とした。さらに全体的な落ち着きのなさとして無動時間を評価した。試験当日、溶媒またはアセトアミノフェンの経口投与 20 分後、ラットを個別に透明のケージ (10×20×30 cm) に入れた。ケージの両側にビデオカメラを 2 台設置し、ラットの行動を 60 分間撮影した。最初の 10 分間は探索行動により症状が正しく評価できないため解析から除外し、残りの 50 分間におけるアカシジア様行動と無動時間の合計をそれぞれ算出した。

## **オープンフィールド試験**

試験当日、ラットに溶媒またはアセトアミノフェンを経口投与した。その30分後、ラットを白色のアクリル製試験箱からなる open-field chamber (90 cm × 90 cm × 40 cm) に入れ、30分間自由に探索させ、ビデオカメラで記録した。記録した動画はビデオ追跡システム (ANY-maze ver4.99 ; Stoelting) を用いて解析した。試験期間中の総移動距離を測定した。

## **免疫染色法**

摘出当日、アセトアミノフェンまたは溶媒を投与した90分後、ラットをペントバルビタールで麻酔し、4%パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) を含むリン酸緩衝生理食塩水で灌流した。灌流固定後、脳を固定液中で90分間保存し、さらに15%スクロースおよび30%スクロースにそれぞれ24時間浸けた。その後脳はドライアイスで凍結した。脳はクリオスタット (Leica CM3050S : Leica Biosystems) を用いて厚さ 30 μm の冠状切片に切り出し、-80°Cで保存した。

c-Fos 免疫染色のため、切片を 0.25% Triton X-100 を含むリン酸緩衝生理食塩水に浸して透過処理を行い、マウスモノクローナル抗 c-Fos 抗体 (1 : 500 ; NBP2-50037) およびウサギモノクローナル抗 ppENK 抗体 (1 : 500 ; RA14124) を用いて室温で一晩インキュベートした。その後 Alexa Fluor 594 標識ロバ抗マウス IgG (1 : 200 ; A21203) および Alexa Fluor 488 標識ロバ抗ウサギ IgG (1 : 200 ; A21206) を用いて室温で1.5時間、遮光でインキュベートした。画像は、共焦点蛍光顕微鏡 (Fluoview FV10i) を用いて撮影した。ブレグマ +0.2~+0.8 mm の位置にある線条体 0.045 mm<sup>2</sup> 範囲における c-Fos<sup>+</sup>ppENK<sup>+</sup>細胞数を測定した。測定は1枚の切片につき4枚行った。

## **統計解析**

動物実験の統計解析は Prism v9.1.0 (GraphPad Software) を用いて、one-way ANOVA 試験による解析を行った。Post hoc one-way ANOVA 試験では、Tukey の多重比較検定を用いた。データは平均値±SEM で表し、危険率 5%未満を統計的に有意であるとみなした。

## 実験結果

### 第 1 節 FAERS 解析を用いたドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬誘発アカシジアとアセトアミノフェン使用との相関関係の推定

まず、不均衡分析を用いて ROR とその Z スコアを計算することで、FAERS データにおける D<sub>2</sub>R 遮断薬とアカシジア発生との関連性を調べた。10 種類以上の D<sub>2</sub>R 遮断薬で ROR と Z スコアが高く、D<sub>2</sub>R 遮断薬の使用とアカシジア発生との間に強い正の相関が認められた (図 2-1A)。その中で、著者は D<sub>2</sub>R 遮断薬の中でも特に高い ROR と Z スコアを示した定型抗精神病薬のハロペリドール、D<sub>2</sub>R 部分作動薬である非定型抗精神病薬のアリピプラゾールの 2 剤を選んだ。一方で、制吐薬であるメトクロプラミドにおいても ROR と Z スコアは著しく高かった。しかしながら、メトクロプラミドは 2009 年に FDA から遅発性ジスキネジアに対して黒枠警告が出されている (34)。FAERS には黒枠警告が出ると類似の症状に対しても報告数が増加する可能性があるため、メトクロプラミドのアカシジアリスクが過大評価されたと考えられる。従って、今回メトクロプラミドは選択しなかった。また、他の非定型抗精神病薬は、代謝性の副作用が強く、アカシジアの ROR を阻害し、その報告を過小評価する可能性があるため、選択しなかった。

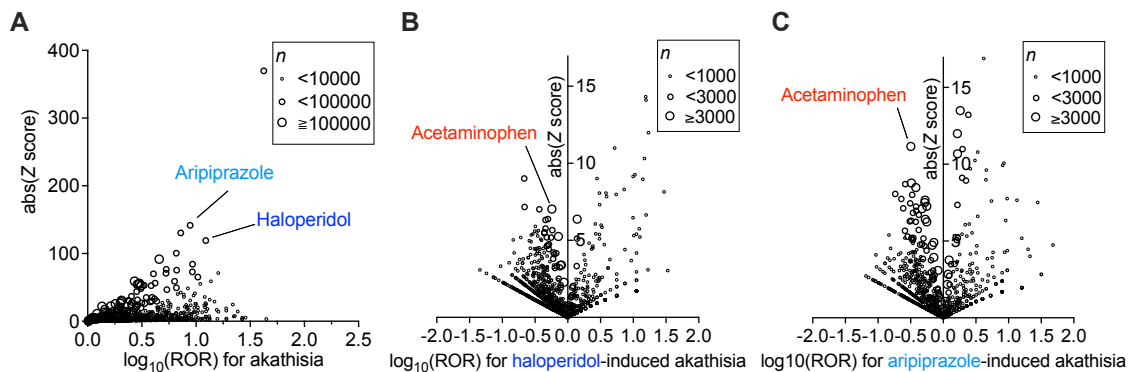


図 2-1 FAERS データにおける D<sub>2</sub>R 遮断薬使用によるアカシジアの ROR 増加と、アセトアミノフェンによる薬剤誘発性アカシジアの交絡効果

FAERS データ (2004 年から 2019 年までの  $n = 11,438,031$ ) におけるボルケーノプロットは対数スケールの ROR と有意性の指標 (Z スコアの絶対値) で示している。各丸は個々の薬物を示し、丸の大きさはその薬物を服用している患者の例数を反映している。(A) アリピプラゾール、ハロペリドールなどの D<sub>2</sub>R 遮断薬を使用している患者では、アカシジアの ROR が著しく有意に増加した。(B および C) ハロペリドール、アリピプラゾールを服用している患者集団において、薬剤誘発性アカシジアの ROR に対する併用薬の交絡効果を示している。

ハロペリドール、アリピプラゾールを使用した患者集団において、アセトアミノフェンの併用がアカシジア ROR を低下させるか調査した。その結果、アセトアミノフェンの併用はハロペリドール、およびアリピプラゾール誘発アカシジア ROR を有意に低下させたことから、アセトアミノフェンの使用と D2R 遮断薬誘発アカシジアとの間に負の相関が認められた (図 2-1B および C)。

## 第 2 節 IBM 解析を用いたドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬誘発アカシジアとアセトアミノフェン使用との因果関係の推定

D2R 遮断薬の使用とアカシジア発生との因果関係を調べるために、IBM データを解析した。IBM 登録後の初回イベント発生の時間分布を見ると (図 2-2)、最初にアカシジアと診断された、またはハロペリドールが処方された、またはアリピプラゾールが処方された患者の数は、最初の 3 ヶ月が非常に多く、4 ヶ月目以降は安定していた。これらの結果から、登録後 3 ヶ月以内にアカシジアの診断を受けた、またはハロペリドールやアリピプラゾールを処方された患者は、登録前または登録直後にアカシジアを示す可能性があると考えられる。従って、これらの患者 (登録から 0~3 ヶ月の期間中にアカシジアの診断を受けた、またはハロペリドール、アリピプラゾールの処方を受けた患者) は研究対象から除外した。

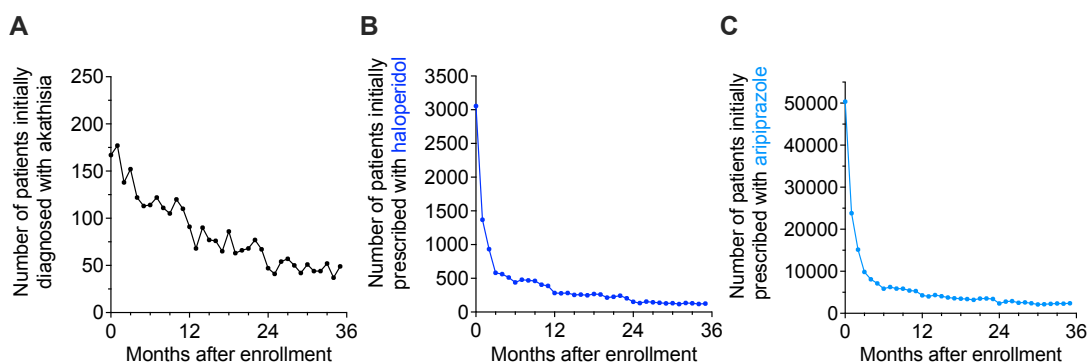


図 2-2 IBM データにおける登録後、最初のイベント発生までの時間分布

患者の保険加入からアカシジアの初回診断 (A)、ハロペリドール (B)、アリピプラゾール (C) の初回処方までの期間。患者数は月単位で示している。

次に、D2R 遮断薬の使用とアカシジア発生との関連性を sequence symmetry analysis と IR を用いて評価した。Sequence symmetry analysis において、調整順序比がハロペリドールは 2.00 (95% CI : 1.23-3.72、図 2-3A)、アリピプラゾールは 2.60 (95% CI : 2.11-3.29、図 2-3B) であったことから、ハロペリドール、およびアリピプラゾールの使用とアカシジア発症との間に因果関係が認められた。また、D2R 遮断薬非服用患者と服用患者に分けてアカシジア患者数を調査した (表 2-1)。それをもとにアカシジア IR の推定を行ったところ、ハロペリドール (図 2-4A) およびアリピプラゾール (図 2-4B) において IR の増加が認められ、その数値はハロペリドールでより大きかった。

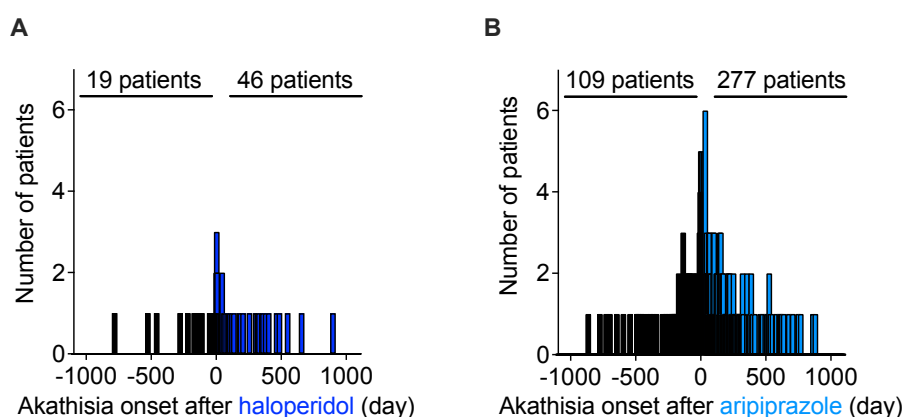


図 2-3 IBM データにおける D2R 遮断薬を処方された患者のアカシジア発症リスクの時間推移

保険加入から 0~3 ヶ月の患者は、導入期間を設けるために解析から除外した (図 2-2 に示した結果に基づく)。±3 年の観察期間における sequence symmetry analysis 解析の結果。

(A) ハロペリドール投与開始とアカシジア発症との間の調整順序比が 2.00 (95% CI : 1.23-3.72) であり、因果関係があることを示す ( $n=65$ )。0 ヶ月目は正確な時系列が不明なため、解析からは除外した。(B) アリピプラゾール投与開始とアカシジア発症との間の調整順序比が 2.60 (95% CI : 2.11-3.29) であり、因果関係があることを示す ( $n=386$ )。0 ヶ月目は正確な時系列が不明なため、解析からは除外した。

表 2-1 IBM データのうち、D2R 遮断薬有無におけるアカシジア症例数

Haloperidol	Cases with akathisia	Cases without akathisia
+	46	8,305
-	2,336	39,582,061

Aripiprazole	Cases with akathisia	Cases without akathisia
+	278	123,500
-	1,987	39,377,763

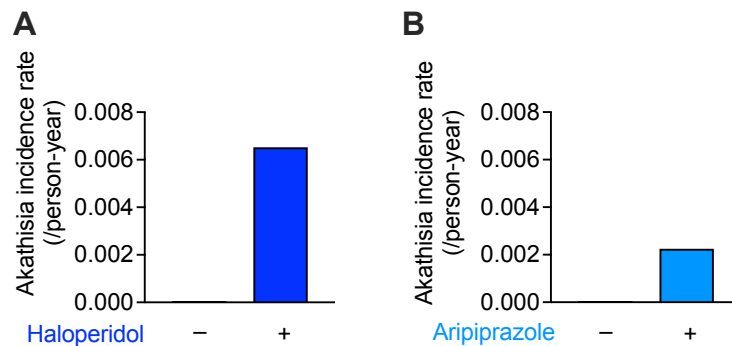


図 2-4 IBM データのうち、D2R 遮断薬有無におけるアカシジア発生率 (IR) の変化

健康保険の加入から 0~3 ヶ月の患者は、導入期間を設けるために解析から除外した (図 2-2 に示した結果に基づく)。(A) IBM データに登録されている患者をハロペリドール非服用患者と服用患者に分け、3 年の観察期間におけるアカシジア発症患者数を調査した (表 2-1 に患者数を記載)。対照群 ( $IR = 3.22 \times 10^{-5}$ ) と比較し、ハロペリドール群 ( $IR = 6.52 \times 10^{-3}$ ) においてアカシジアの IR が増加した。(B) IBM データに登録されている患者をアリピプラゾール非服用患者と服用患者に分け、3 年の観察期間におけるアカシジア発症患者数を調査した (表 2-1 に患者数を記載)。対照群 ( $IR = 2.75 \times 10^{-5}$ ) と比較し、アリピプラゾール群 ( $IR = 2.25 \times 10^{-3}$ ) においてアカシジアの IR が増加した。

ハロペリドール、アリピプラゾールを処方された 2 つの患者集団を抽出する際に、以前の著者の研究およびアカシジアにおける既知の交絡因子に着目し、高齢、女性、抗パーキンソン病薬、追加の抗精神病薬、SSRI、SNRI、鉄製剤、気分障害、アルコール、薬物乱用/依存、糖尿病、肝疾患の診断などの影響を排除するため、1:1 の傾向スコアマッチングを行った (表 2-2) (46、47)。ハロペリドール服用患者のマッチング後のコホートでは、ハロペリドールの 1 日投与量および累積投与量、累積投与期間は、アセトアミノフェン併用の有無に関わらず、それぞれで同程度であった。またアリピプラゾール服用患者のマッチング後のコホートでは、アリピプラゾールの 1 日投与量はアセトアミノフェンの有無に関わらず同程度であったが、累積投与量、累積投与期間は、アセトアミノフェン併用群でより多かった (表 2-3)。

表 2-2 IBM データにおける D2R 遮断薬処方患者集団の傾向スコアマッチング

各群の患者数を示す。

Population with haloperidol	Before Matching			After Matching		
	Without acetaminophen	With acetaminophen	P Value	Without acetaminophen	With acetaminophen	P Value
Total	5,537	32	–	32	32	–
elderly(≧65)	1,751	4	0.03	4	4	1.00
female	2,710	24	$5.73 \times 10^{-3}$	24	24	1.00
Antiparkinsonian drug	246	2	0.65	2	2	1.00
Antipsychotic drug	2,854	19	0.48	19	19	1.00
SSRI and SNRI	6	0	1.00	0	0	1.00
Iron preparation	52	0	1.00	0	0	1.00
Mood disorder	2,418	21	0.02	21	21	1.00
Alcohol, Substance abuse / dependence	1,026	9	0.24	9	9	1.00
Diabetes mellitus	689	2	0.42	2	2	1.00
Hepatic disease	152	1	0.59	1	1	1.00

Population with aripiprazole	Before Matching			After Matching		
	Without acetaminophen	With acetaminophen	P Value	Without acetaminophen	With acetaminophen	P Value
Total	78,966	720	–	718	718	–
elderly(≧65)	1981	10	0.07	10	10	1.00
female	45,612	607	$< 2.20 \times 10^{-16}$	605	605	1.00
Antiparkinsonian drug	1,502	26	$1.41 \times 10^{-3}$	26	26	1.00
Antipsychotic drug	18,384	229	$9.43 \times 10^{-8}$	227	227	1.00
SSRI and SNRI	214	5	0.05	4	4	1.00
Iron preparation	1,970	30	$6.23 \times 10^{-3}$	28	28	1.00
Mood disorder	58,470	581	$6.02 \times 10^{-5}$	579	579	1.00
Alcohol, Substance abuse / dependence	13,013	126	0.49	125	125	1.00
Diabetes mellitus	4,807	88	$1.51 \times 10^{-11}$	88	88	1.00
Hepatic disease	1,613	41	$1.94 \times 10^{-11}$	39	39	1.00

表 2-3 IBM データにおいて傾向スコアマッチングにより選択された患者集団における D2R 遮断薬とアセトアミノフェンの 1 日および累積投与量、累積投与期間

各群の中央値、四分位範囲 (IQR)、最小値-最大値の範囲を示す。

Matched haloperidol cohort	Without acetaminophen		With acetaminophen			
	Haloperidol		Haloperidol		Acetaminophen	
	Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range
Daily dose (mg)	4 (2.0 – 6.1)	1 – 50	5 (2.2 – 10.9)	0.5 – 46.9	1,530 (902 – 2,600)	325 – 39,000
Cumulative dose (mg)	145 (37.5 – 417)	10 – 3,000	150 (39.4 – 630)	2.5 – 4,800	23,200 (8,450 – 96,800)	1,620 – 826,000
Administration period (day)	30 (28 – 76.5)	5 – 330	30 (14 – 97)	2 – 373	13 (6 – 40.5)	1 – 187

Matched aripiprazole cohort	Without acetaminophen		With acetaminophen			
	Aripiprazole		Aripiprazole		Acetaminophen	
	Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range	Median (IQR)	Range
Daily dose (mg)	5 (2 – 9)	0.02 – 1,420	5 (2 – 8.4)	1 – 2,000	1,300 (812 – 1,950)	92 – 195,000
Cumulative dose (mg)	300 (150 – 600)	4.2 – 255,000	510 (150 – 1,350)	30 – 300,000	15,600 (9,000 – 39,000)	900 – 56,600,000
Administration period (day)	60 (30 – 90)	1 – 952	90 (30 – 240)	10 – 1,200	15 (5 – 40)	1 – 896



マッチング後のコホートを用いて、D2R 遮断薬誘発アカシジア IR に対するアセトアミノフェン併用の影響を調査した。D2R 遮断薬服用患者をアセトアミノフェンの併用有無に分け、アカシジア患者数を調査した (表 2-4)。ハロペリドール服用患者において、アセトアミノフェン非併用群では 32 人中 15 人アカシジアを発症したが、併用群では発症者はいなかった。アリピプラゾール服用患者においても、アセトアミノフェン非併用群では 718 人中 160 人アカシジアを発症した。しかしながら、併用群では非併用群と比較し、アリピプラゾール処方量が多く、長期間の処方にも関わらず、アカシジア発症者はいなかった。さらにアカシジア IR を推定したところ、ハロペリドール (図 2-5A) およびアリピプラゾール (図 2-5B) におけるアカシジア IR はアセトアミノフェン併用により低下した。これら実臨床データの解析結果より、アセトアミノフェンを併用することで、D2R 遮断薬によるアカシジアが軽減される可能性が見出された。

表 2-4 IBM データのうち、D2R 遮断薬を処方された患者集団に対するアセトアミノフェン併用有無によるアカシジア症例数

Matched haloperidol cohort		Cases with akathisia	Cases without akathisia
Acetaminophen	+	0	32
	-	15	17

Matched aripiprazole cohort		Cases with akathisia	Cases without akathisia
Acetaminophen	+	0	718
	-	160	558

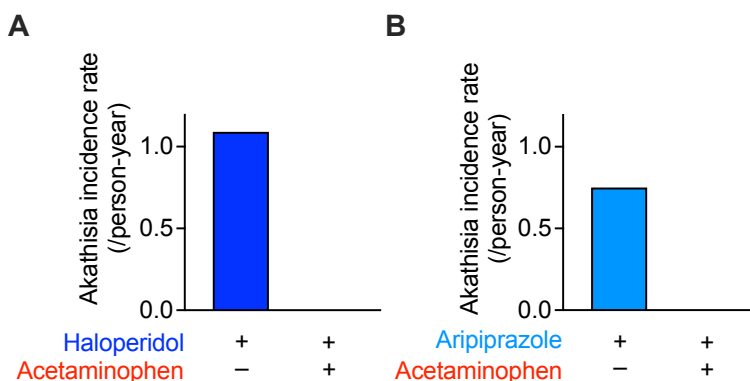


図 2-5 IBM データにおける D2R 遮断薬を処方された患者集団のアカシジア IR 変化

健康保険の加入から 0~3 ヶ月の患者は、導入期間を設けるために解析から除外した (図 2-2 に示した結果に基づく)。母集団の特性は表 2-2 のように一致させた。(A) IBM データに登録されているハロペリドール服用患者をアセトアミノフェン非併用患者と併用患者に分け、3 年の観察期間におけるアカシジア発症患者数を調査した (表 2-4 に患者数を記載)。対照群 (IR=1.09) と比較し、アセトアミノフェン併用群 (IR=0) においてアカシジアの IR が低下した。(B) IBM データに登録されているアリピプラゾール服用患者をアセトアミノフェン非併用患者と併用患者に分け、3 年の観察期間におけるアカシジア発症患者数を調査した (表 2-4 に患者数を記載)。対照群 (IR=0.75) と比較し、アセトアミノフェン併用群 (IR=0) においてアカシジアの IR が低下した。

### 第 3 節 ハロペリドール長期投与ラットにおける行動変化とそれに対するアセトアミノフェンの作用

*In vivo* でアセトアミノフェンが D2R 遮断薬誘発アカシジアを抑制しうるか検討するため、齧歯類にハロペリドールを長期投与して行動変化を誘導した。実臨床データの検討において、アリピプラゾールよりもハロペリドールでより発生率が高かったことから、今回アリピプラゾールは使用しなかった。また、遅発性アカシジアの臨床像を反映させるため、著者はハロペリドールを 6 週間、浸透圧ミニポンプを用いて長期持続投与するプロトコルを採用した。さらに、遅発性アカシジアは長期の D2R 遮断薬の服用後、休薬した際に症状が発現することが知られているため、浸透圧ポンプの摘出 5 日~7 日後に行動試験を行った (図 2-6A)。

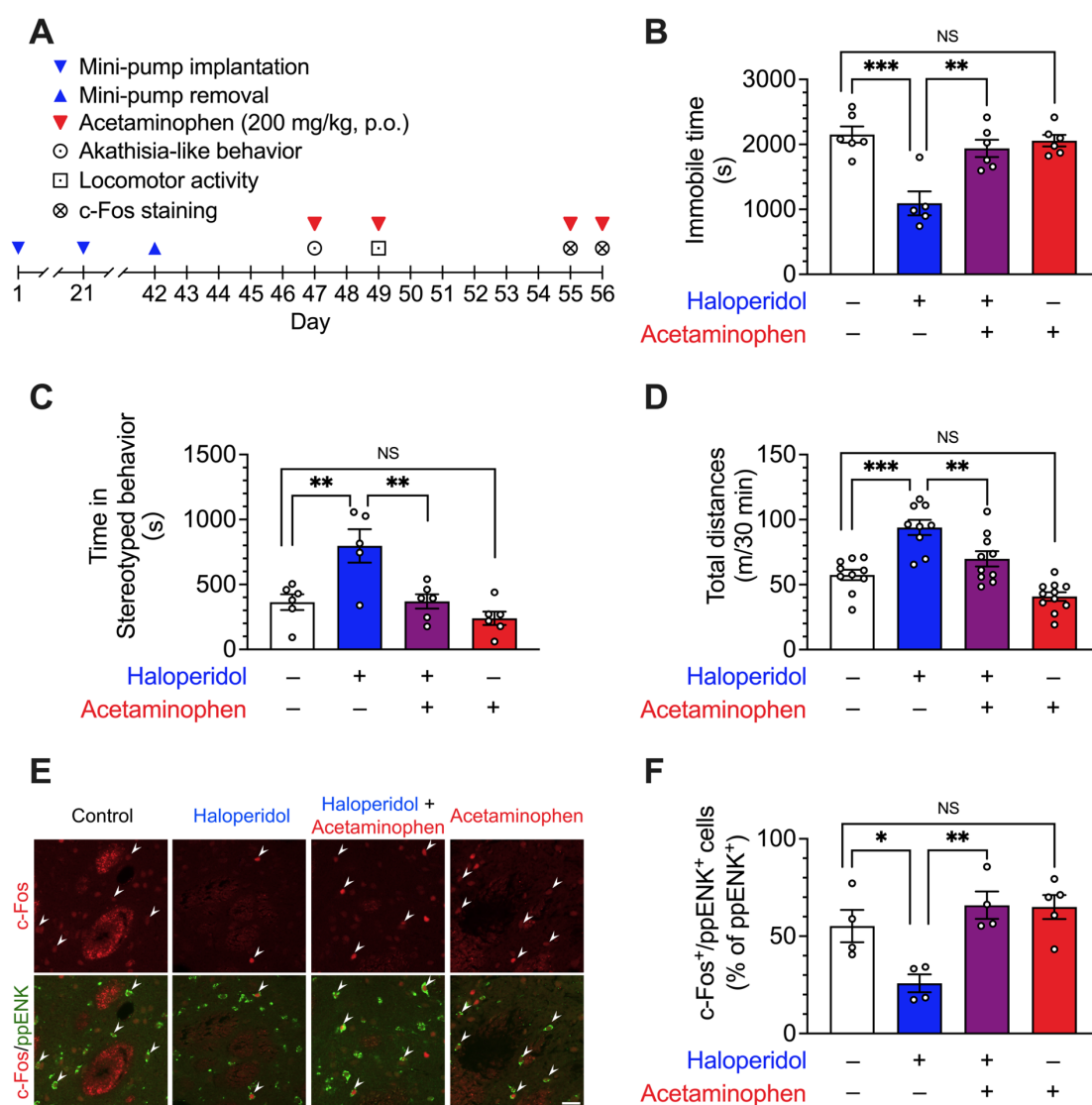
まず無動時間と常同行動の時間を評価したところ、ハロペリドールを 6 週間持続投与したラットにおいて、無動時間の減少と常同行動が増加し、アカシジアのような多動の症状が認められた。そこで、このラットにアセトアミノフェン (200 mg/kg, p.o.) または溶媒を投与したところ、アセトアミノフェンを投与したラットにおいて、ハロペリドール誘発無動時間減少の改善 (図 2-6B, one-way ANOVA,  $F_{3,19}=12$ ,  $P<0.001$ )、および常同行動増加の抑制が認められた (図 2-6C, one-way ANOVA,  $F_{3,19}=9.7$ ,  $P<0.001$ )。

次に、著者は自発行動量の変化を評価した。アカシジアと似た臨床症状を示す疾患として restless legs syndrome (RLS) が挙げられる (53)。また RLS 齧歯類モデルでは自発行動量の増加が認められ (54)、RLS 齧歯類モデルの行動評価は、RLS に関連する他の多動性障害 (アカシジアや注意欠陥多動性障害) への適応をも示唆している (55)。従って、ハロペリドールを 6 週間持続投与したラットにおいて、オープンフィールド試験を用いて自発行動量を評価した。その結果、ハロペリドールを 6 週間持続投与したラットで行動量の増加が認められた。そこで、このラットにアセトアミノフェン (200 mg/kg, p.o.) または溶媒を投与したところ、アセトアミノフェンを投与したラットにおいて、ハロペリドール誘発行動量増加が抑制された (図 2-6D, one-way ANOVA,  $F_{3,36}=21$ ,  $P<0.001$ )。これらの結果より、アセトアミノフェンはアカシジアのような多動の症状を抑制する効果を持つことが示唆された。

遅発性アカシジアの病態生理は不明であるが、D2R 遮断薬長期使用による線条体 iMSNs の活動低下が多動性障害を誘発することが示唆されている (1, 56)。著者は過去に、ハロペリドールを 3 週間投与したマウスの線条体において c-Fos<sup>+</sup>ppENK<sup>+</sup>細胞数が減少すること、さらにそのマウスにアセトアミノフェンを急性処置することで c-Fos<sup>+</sup>ppENK<sup>+</sup>細胞数の減少が改善することを明らかにしている (47)。そこで著者は、ハロペリドールを 6 週間持続投与したラットの線条

体について抗 ppENK 抗体を用いて iMSNs を同定し、抗 c-Fos 抗体を用いてこれら細胞の神経活動を評価し、さらにアセトアミノフェンの作用についても検討した。

対照群では、一部の細胞で ppENK<sup>+</sup>と c-Fos<sup>+</sup>の共発現が認められた(図 2-6E)。ハロペリドールを 6 週間持続投与、かつ退薬させたラットでは、c-Fos<sup>+</sup>ppENK<sup>+</sup>細胞数が有意に減少したことから、iMSNs の神経活動が低下していることが示唆された。またこの減少はアセトアミノフェンの経口投与 90 分後に改善した(図 2-6F、 $F_{3,13} = 7.7$ ,  $P < 0.01$ )。これらの結果より、アセトアミノフェンは線条体 iMSNs の神経活動を亢進することが示唆された。



**図 2-6 ラットにおけるハロペリドール誘発無動時間減少、常同行動、自発行動量増加、および ppENK 陽性 iMSNs の活動低下に対するアセトアミノフェンの作用**

(A) ラットにハロペリドール (1 mg/kg/day) を浸透圧ミニポンプで 6 週間持続投与し、ポンプを摘出した 5 日後にアカシジア様行動評価、7 日後に自発行動量評価、13 および 14 日後に免疫組織学的検討を行った。(B および C) ラット ( $n=5-6$ ) にアセトアミノフェン (200 mg/kg) を経口投与した。アセトアミノフェンまたは溶媒投与の 20 分後にラットをケージに入れ、60 分間その行動を撮影した。無動時間および常同行動の時間は、最初の 10 分間を除外した残り 50 分間測定した。(D) ラット ( $n=9$ ) にアセトアミノフェン (200 mg/kg) または溶媒を経口投与し、その 30 分後から 30 分間、オープンフィールド試験で自発行動量を測定した。(E および F) ラット ( $n=4$ ) にアセトアミノフェン (200 mg/kg) または溶媒を経口投与した。アセトアミノフェン投与 90 分後、背側線条体を含む冠状切片を作成し、抗 c-Fos 抗体および抗 ppENK 抗体で染色し、共焦点顕微鏡で画像を撮影した。c-Fos<sup>+</sup>ppENK<sup>+</sup>細胞 (矢じり) の数を測定した。iMSNs の総数を反映するため、ppENK<sup>+</sup>細胞の数に対する百分率で示した。Scale bars : 30  $\mu$ m。各データは平均 $\pm$ SEM で示した。統計的有意性は、one-way ANOVA with post hoc Tukey's test を用いて検定した。\* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  ; \*\*\* $p < 0.001$  ; NS, not significant。

## 考察

本研究では、D2R 遮断薬の長期使用によって生じるアカシジアを、アセトアミノフェンが軽減することを初めて明らかにした。この知見は、2種類の臨床ビッグデータ解析と、ハロペリドール長期投与による多動症状を示す齧歯類モデルを用いた *in vivo* 実験によって強く裏付けられた。

過去に著者は、FAERS 解析を用いて、D2R 遮断薬とジスキネジア発生との間に正の相関があることを明らかにしたが (47)、D2R 遮断薬誘発アカシジアにおいても十分例数が存在していたため、D2R 遮断薬とアカシジアとの間の正の相関を確認することができた。また、解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェンがジスキネジアのみならず、D2R 遮断薬誘発アカシジアにおいてもその ROR を有意に低下させた。これまでにアセトアミノフェンの動物モデルやヒトのアカシジア患者に対する有効性は報告されていなかったため (45)、このデータは初めて有効性を示唆する結果である。

IBM を用いた時系列解析により、D2R 遮断薬によるアカシジアの正確な発生率を評価した。アカシジアは一般的に定型抗精神病薬との関連が大きいと言われている。例えば、メタアナリシスにおいてアカシジアの有病率は定型抗精神病薬で高く、非定型抗精神病薬で低いという結果が報告されている (57)。実際著者の結果においてもアリピプラゾールよりもハロペリドールの方が発生率は高かった。これらの結果はアカシジアの実臨床を反映できていると考えられる。しかしながら今回の患者集団では、D2R 遮断薬の累積投与期間の四分位範囲は、ハロペリドールで 14-97 日、アリピプラゾールでは 30-240 日であり、遅発性アカシジア患者のみを対象にできていない。また、アセトアミノフェンの使用は、D2R 遮断薬の累積投与量、累積投与期間を減少させることなく、アカシジアの3年間の発生率を大幅に低下させるのに有効であることが示された。遅発性アカシジア患者をより多く抽出できる解析デザインや、アセトアミノフェン併用患者の特徴など、今後更に詳細な検討を行う必要があるが、著者は動物を用いた実証実験を行うことでこの仮説を裏付けた。

アカシジアの病態生理を調べるため、いくつかの動物モデルが使われている。ラット排便モデル (58)、薬剤誘発性アカシジアに類似した症状を誘発する腹側被害野および内側前頭前野の病変モデル (59)、SSRI による落ち着きのなさを誘導するモデル (60)、イヌの運動亢進モデル (61) が報告されている。霊長類においても、サルでの毛づくろい行動の増加 (62)、ハロペリドール、アリピプラゾール、ホスホジエステラーゼ 10A 阻害薬の短期投与により落ち着きのなさを誘導するモデル (52) などが報告されている。しかしながら、これらは全て急性アカシジアを模倣するためのモデルであり、遅発性アカシジアに対する動物モ

デルは報告されていない。今回、著者は遅発性アカシジアの臨床像を反映させるため、ラットに D2R 遮断薬であるハロペリドールを長期投与した後、退薬させた。このラットにおいても行動量や常同行動の増加といった、アカシジア様症状を示した。従って、このラットは遅発性アカシジアの齧歯類モデルとして有用であるかもしれない。しかしながら、遅発性アカシジアは多動に加え、不安などの精神症状を伴うことは注意すべきであり、今後はこのモデルにおける精神症状の変化なども検討していく必要があると考える。

アセトアミノフェンのアカシジア様症状抑制作用の作用点は不明なままである。アセトアミノフェンは脳や脊髄で AM404 に変換される (27)。AM404 は、低濃度で脳内の TRPV1 を活性化させるが (23)、高濃度ではアナンダミドの細胞内取り込みを阻害することでエンドカンナビノイドを増加させ (25)、CB<sub>1</sub> 受容体を活性化させる。一方、肝臓では NAPQI へと変換され、脊髄の TRPA1 を活性化させる (35)。さらに、脳内のシクロオキシゲナーゼの阻害とプロスタグランジン E<sub>2</sub> の産生低下を介して解熱作用を示す (36)。遅発性アカシジアは遅発性ジスキネジア同様、D2R 遮断薬を長期使用することで生じる遅発性症候群の特徴の一つとして知られている (46)。遅発性症候群の病態生理は不明な点が多いが、最も広く考えられているのは D2R の過敏化である。D2R を長期的に遮断することで、線条体の iMSNs に発現する D2R が増加および過敏化され、その結果、iMSNs が過剰に抑制されることで運動障害が生じる。これは、抗精神病薬による患者の脳内で DRD2 の発現増加が生じること (63)、動物に D2R 遮断薬を長期使用すると、線条体の D2R 増加や自発行動量増加、ジスキネジア症状が発現することなどから示唆される (39、64、65)。今回の検討では、ラットにハロペリドールを長期投与することで生じる行動量や常同行動の増加、線条体 iMSNs における c-Fos シグナルの減少が、アセトアミノフェン急性処置で改善した。著者は過去にアセトアミノフェンの急性処置が、ジスキネジア症状を示すマウスの線条体 iMSNs の c-Fos シグナルを増加させること、その作用が TRPV1-KO マウスでは消失することを明らかにしている (47)。このことから、アセトアミノフェンによるラット線条体 iMSNs の活性化および多動症状抑制作用においても TRPV1 が関与している可能性が考えられる。しかしながら、今回使用したアセトアミノフェンの濃度は、以前使用した濃度よりも高濃度である。また D2/D3R アゴニスト、キンピロールによる自発行動量と常同行動の増加が、エンドカンナビノイドの分解酵素を阻害することで抑制されることが報告されている (66)。これらより、アセトアミノフェンの多動症状抑制作用における CB<sub>1</sub> 受容体の寄与を排除することはできない。エンドカンナビノイドは、TRPV1 の内因性活性化薬である可能性があるため、CB<sub>1</sub> 受容体と TRPV1 の協調作用が多動症状抑制作用に関与していることも考えられるため、今後遺伝子改変動物や阻害剤など

を用いて更なる研究を行う必要がある。

結論として、本研究での発見は、ヒトの後ろ向き観察研究と動物モデルの薬理学的実証の両方を用いて、アセトアミノフェンが D2R 遮断薬長期使用によるアカシジアを抑制させるのに有効であることを示している。臨床ビッグデータと基礎研究の両面から裏付けられたアセトアミノフェンは、アカシジア症状を抑制する新たな解決策になりうると考えられ、類似の症状やメカニズムを呈する他の多動性障害への応用も期待できる。

以上、本章において著者は、遅発性ジスキネジア抑制薬として見出したアセトアミノフェンが、D2R 遮断薬を長期使用した際に生じるアカシジアを抑制することを明らかにした。

## 総括および結論

本研究では、D2R 遮断薬を長期使用した際に生じる多動性障害抑制法について、臨床ビッグデータ解析と従来の薬理学的実験を組み合わせた検討を行い、以下の新知見を得た。

第1章では、D2R 遮断薬誘発口唇ジスキネジアが、解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェンの併用によって抑えられることを、FAERS と JMDC Claims の解析を用いて発見した。次に、動物実験でジスキネジアの症状を再現し、アセトアミノフェンが動物で治療効果を発揮することを実証した。最後に、アセトアミノフェンの活性代謝物である AM404 がジスキネジアを抑制すること、さらに AM404 は脳内にある TRPV1 を活性化することで背側線条体 iMSNs の神経活動を改善することを見出した。

第2章では、D2R 遮断薬誘発アカシジアが、ジスキネジア抑制薬として見出したアセトアミノフェンの併用により抑制されることを、FAERS と IBM MarketScan の解析を用いて発見した。次にラットにハロペリドールを長期投与することでアカシジア様症状を再現し、それがアセトアミノフェン急性投与により抑制されることを明らかにした。

以上、本研究よりアセトアミノフェンが D2R 遮断薬の長期使用による多動性障害を抑制することが明らかとなった。本研究のような、薬理学研究に臨床ビッグデータ解析を組み合わせた研究手法は高い臨床予測性を有しており、今後臨床ビッグデータに基づく新たな創薬戦略の展開が期待される。



## 謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導および御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授 金子周司 先生に謹んで感謝の意を表します。また、直接御指導を賜り、多くの有益な御助言をいただきました京都大学大学院薬学研究科准教授 白川久志 先生、助教 永安一樹 先生ならびに京都大学大学院医学研究科特定助教 浅岡希美 先生に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言をいただきました京都大学医学部附属病院薬剤部副薬剤部長・准教授 中川貴之 先生、富山大学大学院総合医薬学研究科教授 久米利明 先生、神戸薬科大学薬学部講師 泉安彦 先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、TRPV1-KO マウスをご提供下さいましたカリフォルニア大学サンフランシスコ校教授 David Julius 先生、生理学研究所教授 富永真琴 先生、TRPA1-KO マウスをご提供下さいました京都大学大学院工学研究科教授 森泰生 先生、*Adora2A-Cre* マウスをいただきました名古屋大学医学研究科教授 貝淵弘三 先生、特任助教 黒田啓介 先生、助教 船橋靖弘 先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行に多大なる御協力をいただきました、日本大学医学研究科助教授 長島卓也 先生、Soni Siswanto 博士、古田晴香 学士、山本浩貴 学士、戸田千尋 学士、栢沼玄 君に心から感謝いたします。また、研究生活を始めるにあたり御指導、御助言をいただきました河合洋幸 学士をはじめ諸先輩方に心から感謝いたします。そして、日々の研究生活において互いに切磋琢磨し合えた抱将史 学士、澁井紀宏 学士、矢野佑一 学士、大橋佳奈 修士、永井佑菜 修士に心から御礼を述べると共に、金沢大学医薬保健研究域助教 西谷直也 先生、宮之原遵 博士、川原田宗一 博士、鈴木茉莉 学士、周子剣 修士、幡鎌輝 修士、岩井信太郎 君、小林萌音 さん、山田麻莉 さんをはじめとする京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野の諸氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行に関しまして御援助をいただきました京都大学大学院教育支援プログラム、ならびに藤多仁生奨学金をいただきました故藤多哲郎 先生、およびご遺族・関係者に深く感謝いたします。

最後に、著者の良き理解者であり研究活動に専念できるよう終始支えてくださいました父 洋司、母 弘美、兄 拓海、および両祖父母に心から感謝いたします。

## 発表論文目録

- 1) Striatal TRPV1 activation by acetaminophen ameliorates dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonists-induced orofacial dyskinesia

(アセトアミノフェンによる線条体 TRPV1 の活性化はドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬誘発口唇ジスキネジアを軽減させる)

Koki Nagaoka, Takuya Nagashima, Nozomi Asaoka, Hiroki Yamamoto, Chihiro Toda, Gen Kayanuma, Soni Siswanto, Yasuhiro Funahashi, Keisuke Kuroda, Kozo Kaibuchi, Yasuo Mori, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Shuji Kaneko

2021年5月24日発行 JCI insight 第6巻 Article number: e145632 doi: 10.1172 に掲載

- 2) ドパミン D<sub>2</sub> 受容体遮断薬長期使用による多動性障害に対するアセトアミノフェンの応用  
未発表

## 参考文献

1. Stahl SM. Neuronal traffic signals in tardive dyskinesia: not enough “stop” in the motor striatum. *CNS Spectr*. 2017;22(6):427–434.
2. Carbon M, Hsieh CH, Kane JM, Correll CU. Tardive dyskinesia prevalence in the period of second-generation antipsychotic use: a meta-analysis. *J Clin Psychiatry*. 2017;78(3):e264–e278.
3. Salem H, Pigott T, Zhang XY, Zeni CP, Teixeira AL. Antipsychotic-induced tardive dyskinesia: from biological basis to clinical management. *Expert Rev Neurother*. 2017;17(9):883–894.
4. Khorassani F, Luther K, Talreja O. Valbenazine and deutetrabenazine: vesicular monoamine transporter 2 inhibitors for tardive dyskinesia. *Am J Health-Syst Pharm*. 2020;77(3):167–174.
5. Zhao S et al. Systems pharmacology of adverse event mitigation by drug combinations. *Sci Transl Med*. 2013;5(206):206ra140.
6. Nagashima T, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Prevention of antipsychotic-induced hyperglycaemia by vitamin D: a data mining prediction followed by experimental exploration of the molecular mechanism. *Sci Rep*. 2016;6:26375.
7. US FDA. Questions and Answers on FDA’s Adverse Event Reporting System (FAERS). <https://www.fda.gov/drugs/surveillance/questions-and-answers-fdas-adverse-event-reporting-system-faers>. Accessed April 23, 2021.
8. Banda JM, Evans L, Vanguri RS, Tatonetti NP, Ryan PB, Shah NH. A curated and standardized adverse drug event resource to accelerate drug safety research. *Sci Data*. 2016;3:160026.
9. Olmos A, Govindasamy P. Propensity scores: a practical introduction using R. *J Multidiscip Eval*. 2015;11(25):68–88.
10. Austin PC. Optimal caliper widths for propensity-score matching when estimating differences in means and differences in proportions in observational studies. *Pharm Stat*. 2011;10(2):150–161.
11. Lai EC et al. Sequence symmetry analysis in pharmacovigilance and pharmacoepidemiologic studies. *Eur J Epidemiol*. 2017;32(7), 567–582.
12. Yokoyama S, Tanaka Y, Nakagita K, Hosomi K, Takada M. Bleeding risk of warfarin and direct oral anticoagulants in younger population: a historical cohort study using a Japanese claims database. *Int J Med Sci*. 2018;15(14):1686–1693.
13. Caterina MJ et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000;288(5464):306–313.

14. Deguchi Y et al. mDia and ROCK mediate actin-dependent presynaptic remodeling regulating synaptic efficacy and anxiety. *Cell Rep.* 2016;17(9):2405–2417.
15. Asaoka N et al. An adenosine A<sub>2A</sub> receptor antagonist improves multiple symptoms of repeated quinpirole-induced psychosis. *eNeuro.* 2019;6(1):0366-18.
16. Michel C, Scosyrev E, Petrin M, Schmouder R. Can disproportionality analysis of post-marketing case reports be used for comparison of drug safety profiles? *Clin Drug Invest.* 2017;37(5):415–422.
17. Turrone P, Remington G, Nobrega JN. The vacuous chewing movement (VCM) model of tardive dyskinesia revisited: is there a relationship to dopamine D<sub>2</sub> receptor occupancy? *Neurosci Biobehav Rev.* 2002;26(3):361–380.
18. Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK. Carvedilol attenuates neuroleptic-induced orofacial dyskinesia: possible antioxidant mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 2002;136(2):193–200.
19. Jaeschke H, Xie Y, McGill MR. Acetaminophen-induced liver injury: animal models to humans. *J Clin Transl Hepatol.* 2014;2(3):153–161.
20. Mazer M, Perrone J. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *J Med Toxicol.* 2008;4(1):2–6.
21. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev.* 2006;12(34):250–275.
22. Mezey E et al. Distribution of mRNA for vanilla receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(7): 3655–3660.
23. Mallet C et al. TRPV<sub>1</sub> in brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. *PLoS One.* 2010;5(9):e12748.
24. Gentry C, Andersson DA, Bevan S. TRPA1 mediates the hypothermic action of acetaminophen. *Sci Rep.* 2015;5:12771.
25. Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science.* 1997;277(5329):1094–1097.
26. De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG, Di Marzo V. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett.* 2000;483(1):52–56.
27. Hogestatt ED et al. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acetylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem.* 2005;280(36):31405–31412.

28. Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci.* 2014;17(8):1022–1030.
29. Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(12):5163–5168.
30. Belleau ML, Warren RA. Postnatal development of electrophysiological properties of nucleus accumbens neurons. *J Neurophysiol.* 2000;84(5):2204–2216.
31. Xu D et al. MSBIS: a multi-step biomedical informatics screening approach for identifying medications that mitigate the risks of metoclopramide-induced tardive dyskinesia. *EBioMedicine.* 2017;26:132–137.
32. Desmarais JE, Beauclair L, Margolese HC. Anticholinergics in the era of atypical antipsychotics: short-term or long-term treatment? *J Psychopharmacol.* 2012;26(9):1167–1174.
33. Al-Saffar A, Lennernäs H, Hellström PM. Gastroparesis, metoclopramide, and tardive dyskinesia: risk revisited. *Neurogastroenterol Motil.* 2019;31(11):e13617.
34. Ehrenpreis ED, Deepak P, Sifuentes H, Devi R, Du H, Leikin JB. The metoclopramide black box warning for tardive dyskinesia: effect on clinical practice, adverse event reporting, and prescription drug lawsuits. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(6):866–872.
35. Andersson DA et al. TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. *Nat Commun.* 2011;2:551.
36. Ayoub SS, Flower RJ. Loss of hypothermic and anti-pyretic action of paracetamol in cyclooxygenase-1 knockout mice is indicative of inhibition of cyclooxygenase-1 variant enzymes. *Eur J Pharmacol.* 2019;861:172609.
37. Röpke J et al. Anandamide attenuates haloperidol-induced vacuous chewing movements in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014;54:195–199.
38. de Lago E, Urbani P, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz J. Arvanil, a hybrid endocannabinoid and vanilloid compound, behaves as an antihyperkinetic agent in a rat model of Huntington's disease. *Brain Res.* 2005;1050(1–2):210–216.
39. Bordia T, Zhang D, Perez XA, Quik M. Striatal cholinergic interneurons and D2 receptor-expressing GABAergic medium spiny neurons regulate tardive dyskinesia. *Exp Neurol.* 2016;286:32–39.
40. Musella A et al. TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. *Mol Cell Neurosci.* 2009;40(1):89–97.

41. Grueter BA, Brasnjo G, Malenka RC. Postsynaptic TRPV1 triggers cell-type specific LTD in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci.* 2010;13(12):1519–1525.
42. Deroche MA, Lassalle O, Castell L, Valjent E, Manzoni OJ. Cell-type and endocannabinoid-specific synapse connectivity in the adult nucleus accumbens core. *J Neurosci.* 2020;40(5):1028–1041.
43. Puighermanal E et al. Functional and molecular heterogeneity of D2R neurons along dorsal ventral axis in the striatum. *Nat Commun.* 2020;11(1):1957.
44. Van Putten T. The many faces of akathisia. *Compr Psychiatry.* 1975;16(1):43-7.
45. Salem H, Nagpal C, Pigott T, Teixeira AL. Revisiting Antipsychotic-induced Akathisia: Current Issues and Prospective Challenges. *Curr Neuropharmacol.* 2017;15(5):789–798.
46. Lohr JB, Eidt CA, Abdulrazzaq Alfaraj A, Soliman MA. The clinical challenges of akathisia. *CNS Spectr.* 2015;20:1–14.
47. Nagaoka K et al. Striatal TRPV1 activation by acetaminophen ameliorates dopamine D2 receptor antagonist-induced orofacial dyskinesia. *JCI Insight.* 2021;6(10):e145632.
48. Thomsen M et al. Effects of acute and chronic aripiprazole treatment on choice between cocaine self-administration and food under a concurrent schedule of reinforcement in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2008;201(1):43–53.
49. Oda Y et al. G protein-coupled receptor kinase 6/ $\beta$ -arrestin 2 system in a rat model of dopamine supersensitivity psychosis. *J Psychopharmacol.* 2015;29(12):1308-13.
50. Barnes TR. The Barnes Akathisia Rating Scale--revisited. *J Psychopharmacol.* 2003;17(4):365–70.
51. Fleischhacker WW et al. The Hillside Akathisia Scale: a new rating instrument for neuroleptic-induced akathisia. *Psychopharmacol Bull.* 1989;25(2):222–6.
52. Bleickardt CJ, Kazdoba TM, Jones NT, Hunter JC, Hodgson RA. Antagonism of the adenosine A2A receptor attenuates akathisia-like behavior induced with MP-10 or aripiprazole in a novel non-human primate model. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;118:36–45.
53. Sieminski M, Zemojtel L. Akathisia Is More Than Restlessness in the Legs. *J Clin Sleep Med.* 2019;15(9):1383.
54. Lyu S et al. The Role of BTBD9 in Striatum and Restless Legs Syndrome. *eNeuro.* 2019;6(5):0277–19.
55. Qu S et al. Locomotion is increased in a11-lesioned mice with iron deprivation: a possible animal model for restless legs syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007;66(5):383–8.

56. Mulroy E, Balint B, Bhatia KP. Tardive syndromes. *Pract Neurol*. 2020;20(5):368–376.
57. Zhang JP et al. Efficacy and safety of individual second-generation vs. first-generation antipsychotics in first-episode psychosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013;16(6):1205–18.
58. Broadhurst PL. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. *Br J Psychol*. 1957;48(1):1–12.
59. Moal ML, Cardo B, Stinus L. Influence of ventral mesencephalic lesions on various spontaneous and conditioned behaviors in the rat. *Physiol Behav*. 1969;4(4):567–573.
60. Teicher MH, Klein DA, Andersen SL, Wallace P. Development of an animal model of fluoxetine akathisia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1995;19(8):1305–19.
61. Bruhwyler J, Chleide E, Houbeau G, Waegeneer N, Mercier M. Differentiation of haloperidol and clozapine using a complex operant schedule in the dog. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993;44(1):181–9.
62. Lublin H, Gerlach J, Mørkeberg F. Long-term treatment with low doses of the D1 antagonist NNC 756 and the D2 antagonist raclopride in monkeys previously exposed to dopamine antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*. 1994;114(3):495–504.
63. Iyo M et al. Optimal extent of dopamine D2 receptor occupancy by antipsychotics for treatment of dopamine supersensitivity psychosis and late-onset psychosis. *J Clin Psychopharmacol*. 2013;33(3):398–404.
64. Tadokoro S et al. Chronic treatment with aripiprazole prevents development of dopamine supersensitivity and potentially supersensitivity psychosis. *Schizophr Bull*. 2012;38(5):1012–20.
65. Oda Y et al. Alterations in glutamatergic signaling in the brain of dopamine supersensitivity psychosis and non-supersensitivity psychosis model rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2017;234(20):3027–3036.
66. Luque-Rojas MJ et al. Hyperactivity induced by the dopamine D2/D3 receptor agonist quinpirole is attenuated by inhibitors of endocannabinoid degradation in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013;16(3):661–76.