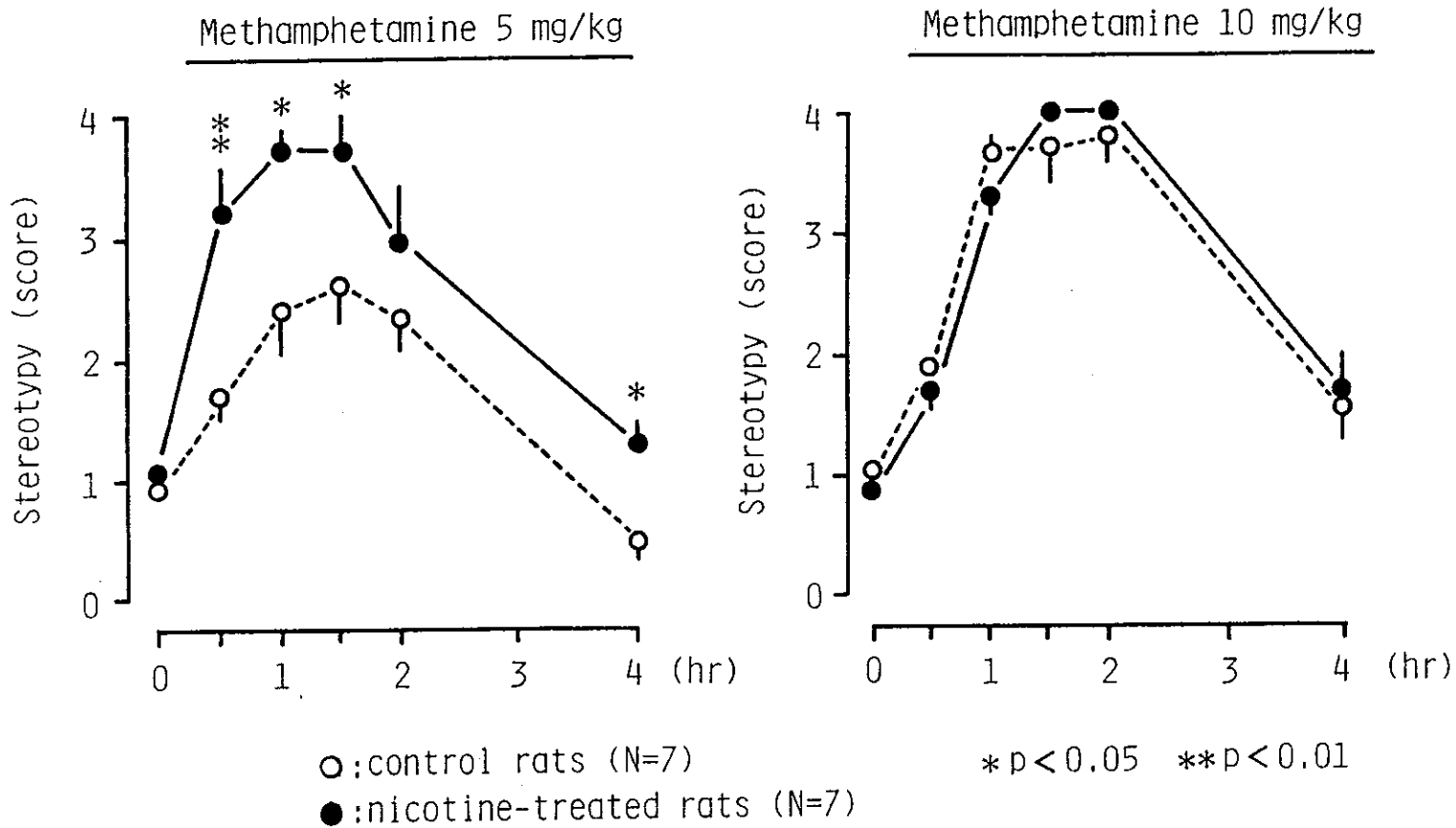
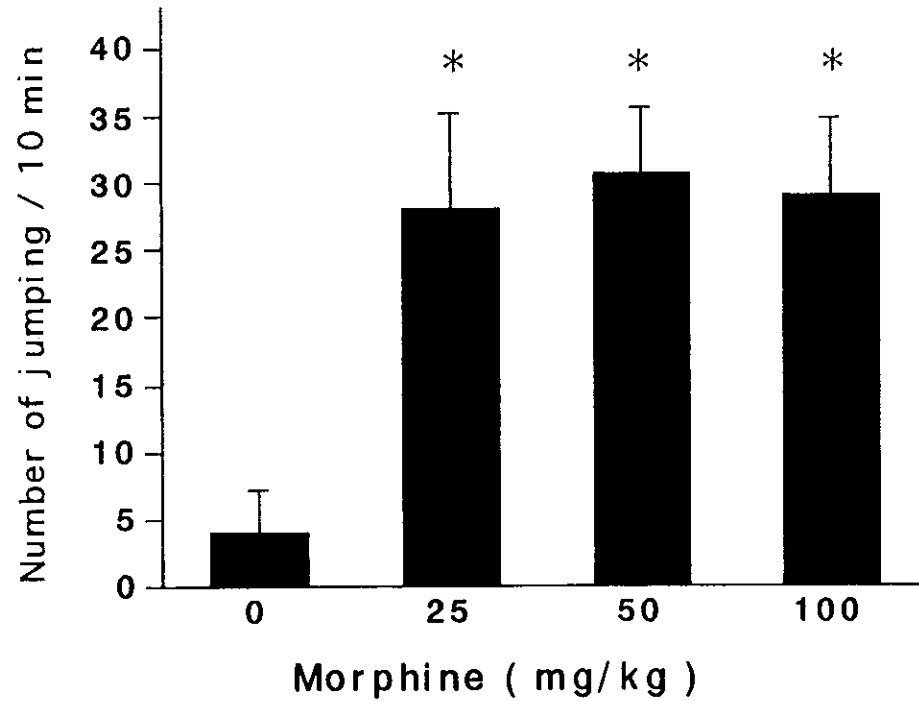


# EFFECTS OF CHRONIC TREATMENT OF NICOTINE ON METHAMPHETAMINE-INDUCED STEREOTYPED BEHAVIOR IN RATS



3

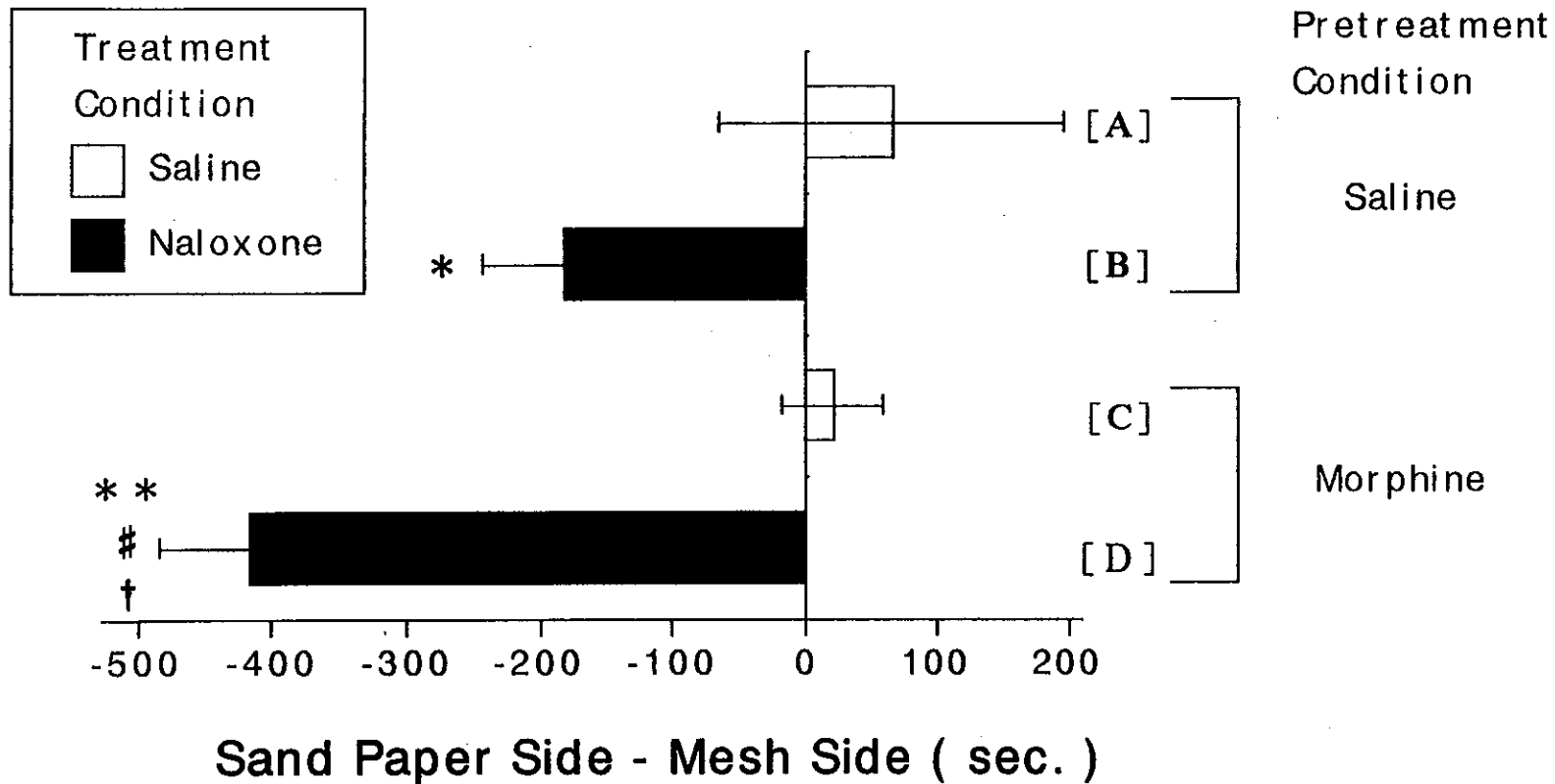
### Jumping behavior induced by naloxone 1 day after morphine administration



\*  $p < 0.01$  vs. Morphine 0 mg/kg

4

## Place Aversion induced by naloxone 1 day after morphine administration



\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. [A] ; #  $p < 0.05$  vs. [B] ; †  $p < 0.01$  vs. [C]

# メタアンフェタミン連続投与後における腹側被蓋野—側坐核ドーパミン系ニューロンの機能変化に関する電気生理学的研究

笹 征史 広島大学医学部薬理学教室  
松林 弘明 広島大学医学部薬理学教室  
天野 託 広島大学医学部薬理学教室

## [要旨]

メタアンフェタミン(MAP)の反復投与(5日間)後に腹側被蓋野のドーパミンニューロンにドーパミンに対する感受性の変化が起こることを前回報告した。今回はドーパミンレセプターサブタイプである  $D_1$  あるいは  $D_2$  レセプターのいずれに感受性の亢進が起こるかを明らかにするため、スライス標本を用い、ホールセルパッチクランプ法により検討した。MAP (5mg/kg/日、s.c.) を、生後7日の雄性 Wistar ラットに5日間反復投与し、最終投与より5日後における腹側被蓋野ドーパミンニューロンのドーパミン  $D_1$  及び  $D_2$  アゴニストに対する感受性を検討した。 $D_2$  アゴニストの talipexole (1~100  $\mu$ M) あるいは  $D_1$  アゴニストの SKF38393 (100  $\mu$ M) を投与した時の膜電位の変化を電流固定下に測定した。MAP 最終投与5日後のドーパミンニューロンにおいて talipexole は用量依存性に生理的食塩水(生食)投与群のそれよりもより大きな過分極をひきおこした。しかし、SKF38393 (100  $\mu$ M) は両群のドーパミンニューロンの膜電位に変化を及ぼさなかった。これらのことから反復投与した MAP の投与中止5日後において、ドーパミンニューロンではドーパミンに対し  $D_2$  レセプターの感受性亢進が起こっており、 $D_1$  レセプターは変化を受けないことが明らかになった。

## [A. 目的]

我々はこれまで、メタアンフェタミン (MAP) (5mg/kg/日、s.c.) を5日間反復投与した後の側坐核ニューロンのドーパミン(DA)および MAP に対

する反応性の変化について検討した。

この結果、側坐核ニューロンは生体位 (in vivo) においてマイクロイオントホレーシス法により投与した DA 及び MAP に対し、最終投与後 24~30

100  $\mu$ M 投与時には生食投与群および MAP 投与群の両者において膜電位の変化は認められなかった。

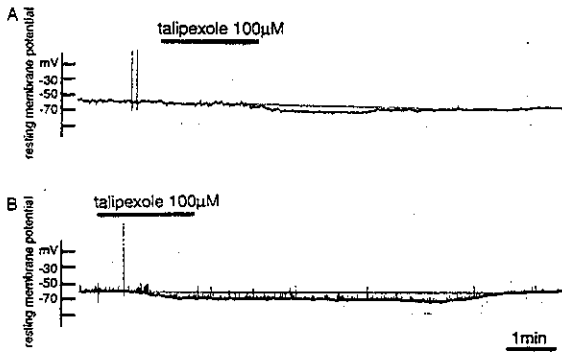


図 2. 生食投与群 (A) およびメタアンフェタミン投与群 (B)における腹側被蓋野ドーパミンニューロンの talipexole (100  $\mu$ M) による過分極反応

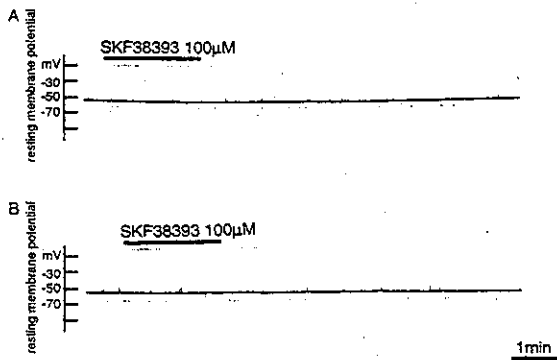


図 3. 生食投与群 (A) およびメタアンフェタミン投与群 (B)における腹側被蓋野ドーパミンニューロンの SKF38393 に対する無反応

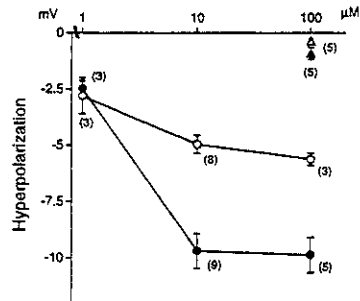


図 4. 腹側被蓋野ドーパミンニューロンの talipexole および SKF38393 に対する用量作用曲線

#### [D.考察]

腹側被蓋野ドーパミンニューロンはその樹状突起から遊離されるドーパミンにより  $D_2/D_3$  のタイプのオートレセプターを介して抑制される<sup>3-5, 7, 8</sup>。この場合ドーパミンはこの  $D_2/D_3$  レセプターに働き、 $K^+$ チャネルの活性化により過分極を引き起こす<sup>9</sup>。この時  $D_1$  レセプターの活性化のみではこのドーパミンニューロンに変化はきたさないが、 $D_2$  レセプターが活性化されると、 $D_2$  アゴニストの作用を増大するように働いている<sup>5,6</sup>。

前回の研究において比較的大量の MAP (5mg/kg/日) を比較的短時間 (5日間) 投与した場合にも投与中止後において、側坐核ニューロンと同様ドーパミンニューロンにもドーパミ

ンに対する過感受性が起こることが明らかにされた。

今回の研究においてドーパミンニューロンのドーパミンに対する感受性の亢進は D<sub>2</sub> レセプターの感受性亢進によることが明らかになった。さらにこの場合、D<sub>1</sub> レセプター自体にはやはり変化が起こっていないように思われる。前回の研究において MAP 投与群のドーパミンニューロンは MAP に対しては感受性の変化が起こらなかったことから、ドーパミンニューロンの樹状突起から MAP により遊離したドーパミンは、ドーパミンニューロンを強く抑制はするものの、その投射先の神経終末からのドーパミン遊離には影響せず、側坐核における D<sub>2</sub> レセプターには強く働くものと考えられる。

#### [参考文献]

- 1) Amano, T., Matsubayashi, H. and Sasa, M.: Hypersensitivity of nucleus accumbens neurons to methamphetamine and dopamine following repeated administration of methamphetamine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 801: 136-147, 1996.
- 2) Amano, T., Matsubayashi, H., Momiyama, T., Ishihara, K., Todo, N. and Sasa, M.: Antagonizing effects of a novel antipsychotic quinolinone derivative (OPC-14597) on dopaminergic inhibition of neuronal activities in the nucleus accumbens. *Progress Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 19: 105-116, 1995.
- 3) Momiyama, T., Sasa, M. & Takaori, S. (1990). D<sub>2</sub> receptor-mediated inhibition by a substituted quinolinone derivative, 7-[3-[4-(2,3-dimethylphenyl)piperazinyl]propoxy]-2(1H)-quinolinone (OPC-4392), of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Life Sci.*, 47:761-769.
- 4) Momiyama, T., Todo, N. and Sasa, M.: A mechanism underlying dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor-mediated inhibition of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Life Sci.*, 49: 535-543.
- 5) Momiyama, T., Todo, N. and Sasa, M.: A mechanism underlying dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor-mediated inhibition of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area in vivo. *British J. Pharmacology.*, 109: 933-940, 1993.
- 6) Momiyama, T., Sasa, M. and Takaori, S.: Enhancement of D<sub>2</sub> receptor agonist-induced inhibition by D<sub>1</sub> receptor agonist in the ventral tegmental area. *British J. Pharmacology*, 110: 713-718, 1993.
- 7) Momiyama, T., Amano, T., Todo, N. and Sasa, M.: Inhibition by a putative antipsychotic quinolinone derivative

(OPC-14597) of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Eur. J. Pharmacology*, 310: 1-8, 1996.

8) Sasa, M. and Amano, T.: Unique pharmacological profile of a novel antipsychotic drug, Aripiprazole (OPC-14597). *CNS Drug Reviews*, 3 (1): 24-33, 1997.

## モルヒネ誘発鎮痛および依存性の遺伝解析

分担研究者 鈴木 勉 星薬科大学薬品毒性学教室教授

要約：本研究では近交系 SM/J と A/J 系マウスの組換え近交系 (SMXA) マウス 26 系統を用い、モルヒネ誘発鎮痛、精神依存および身体依存に關与する染色体および遺伝子座の同定を行った。実験には近交系雄性 SM/J と A/J 系マウス、およびその組換え近交系 (SMXA) マウス 26 系統を用い、morphine (5 mg/kg, s.c.) の鎮痛効果は tail-flick 法に従い測定した。また、morphine (5 mg/kg, s.c.) の精神依存は白黒 2-コンパートメントボックスを用いた条件づけ場所嗜好性試験より報酬効果として測定した。さらに、身体依存は morphine 8 - 45 mg/kg を 1 日 2 回、5 日間にわたり皮下投与し、最終投与の 2 時間後に naloxone (3 mg/kg, s.c.) を投与して誘発される退薬症候を 1 時間測定した。これらの結果を遺伝解析用ソフト Map Manager vol. 3.0 を用い、morphine 誘発鎮痛、精神依存および身体依存に關与する染色体および遺伝子座の同定を行った。モルヒネの鎮痛効果は A 系が最も強く 100 % であったが、SM 系は 20.3 % であった。SMXA 近交系マウス 26 系統の morphine 誘発鎮痛効果は約 10 % から 100 % まで連続的に分布した。これらの遺伝解析の結果、morphine 誘発鎮痛には第 1, 2, 5, 10, 15, 16 および X 染色体上の 26 遺伝子座が有意に關与していることが明らかになった。また、morphine 誘発報酬効果もまた A 系が最も強く 757.3 秒であったが、SM 系は 3.5 秒であった。SMXA 近交系マウス 26 系統では morphine によりわずかに嫌悪効果を示す系統から非常に強い報酬効果を示す系統まで連続的に分布した。これらの遺伝解析の結果、morphine 誘発報酬効果には第 1, 3, 9, 13 および 18 染色体上の 13 遺伝子座が有意に關与していることが明らかになった。さらに、morphine 依存マウスにおける naloxone 誘発 jumping の発現率は A 系が最も強く 100 % であったが、SM 系は 10 % であった。SMXA 近交系マウス 26 系統では jumping を発現しない系統から 100 % 発現する系統まで連続的な分布を示した。これらの遺伝解析の結果、naloxone 誘発 jumping には第 1, 2, 3, 10 および 15 染色体上の 16 遺伝子座が關与していることを明らかにした。このようにモルヒネ誘発鎮痛、精神依存および身体依存には遺伝因子が深く關与し、これらに關与する染色体および遺伝子座をそれぞれ同定した。

A. 目的 近年、薬理遺伝学的な研究が数多く報告され、様々な薬物の薬理作用の発現には遺伝因子が影響を与えることが明らかとなっている (6)。薬理遺伝学的な研究は、これまで主に近交系動物や選択交配動物を用いて行われてきた。古くから、morphine の薬理作用についての薬理遺伝学的研究が盛んに行われ (4, 13, 14)、morphine の種々の薬理作用の発現には遺伝因子が大きく影響を与えていることが明らかとなってきた。

近年、組換え近交系 (recombinant inbred; RI 系) マウスが開発され、薬理遺伝学の研究に大きく貢献している。この RI 系とは、相互に血縁関係のない 2 つの近交系を交配し、得られた  $F_2$  をそれぞれ独立に兄妹交配を 20 世代以上継続することによって近交系化した一群の系統をいう。このような近交系群では、そのすべての遺伝子がどちらかの親の近交系に由来した遺伝子であり、他からの遺伝子が全くないことが特徴である。つまり、ある RI 系統群から 1 つの系統を取

り、その遺伝子座に固定している遺伝子をみれば、どれもどちらかの親の近交系と同じものを持っていることになる。逆に、特定の遺伝子座について RI 系統群のすべてについてみれば、半数の系統では一方の親系統から由来した遺伝子に、もう半数はもう一方の親系統から由来した遺伝子に固定していることが期待できる。また、これらの RI 系では、染色体の各遺伝子座または遺伝子がそれぞれどちらの親系統に由来したものであるかが明らかとなっており、系統間分布パターン (strain distribution patterns; SDP) が作成されている。親系統において、ある形質が異なっている場合、RI 系を用いてその形質について検討し、その結果と SDP とを比較し、もしその形質の分布と全く同じ分布を示す遺伝子座または遺伝子があれば、この形質はその遺伝子あるいはその染色体上の非常に近いところに連鎖する遺伝子により支配されていることが推定できる。

最近になって、近交系である A/J 系と SM/J 系マウスを祖先系統とする 30 系統の SMXA RI 系



RI系マウスが開発され、現在はそのうちの26系統が維持されている(11)。A/J系マウスとSM/J系マウスとを比較すると、身体の大きさはA/J系マウスの方がSM/J系マウスよりも大きく、被毛の色はA/J系マウスは白色であるのに対しSM/J系マウスでは黒または茶色であり、また腫瘍の発現率がA/J系マウスの方がSM/J系マウスよりも高いなど、A/J系マウスとSM/J系マウスとの間にはかなりの差があるため、これら2系統を祖先系統として持つSMXA RI系マウスは薬理遺伝学的解析を行う上で非常に有用であると期待される。また、SMXA RI系マウスは26系統を有し、これまでに報告されているRI系の中でもっとも系統数の多いBXD RI系マウスと並んで世界最大数であるため、薬理遺伝学的解析を行う上で非常に有用であると考えられる。さらに、SMXA RI系マウスではSDPが作成されているため、その形質に関与する染色体およびその遺伝子座を同定することができる。

以上のように、morphineの薬理作用が遺伝因子により影響を受けていると考えられていること、SMXA RI系マウスが薬理遺伝学的解析に非常に有用であることから、本研究では、SMXA RI系マウスを用いて、morphine誘発抗侵害刺激作用、身体依存および報酬効果について検討し、その結果を用いて遺伝解析を行い、それぞれの薬理作用の発現に関与する染色体およびその遺伝子座の同定を行った。

## B. 実験方法

### 1. 使用動物および飼育条件

本研究では、体重20-40gのSMXA組換え近交系(recombinant inbred; RI系)雄性マウスを使用した。

### 2. 抗侵害効果の測定

抗侵害刺激効果の測定には、tail-flick 輻射熱刺激装置(8)(NK-205E; 夏目製作所)を使用した。マウスの尾根部から約2cmの部分マジックで黒く塗り、透明なプラスチック製の50mlの注射筒(テルモ)にマウスを入れて固定した。そして、黒く塗った尾根部へ局所的に輻射熱刺激(100V)を加え、マウスが輻射熱により尾を振り上げる反応を仮性疼痛反応とみなし、その発現までの時間(潜時: latency)を測定した。

測定は、薬物投与前に3回行い、3回の測定値の平均をcontrol latencyとした。また、

morphine(5 mg/kg, s.c.)投与40分後のlatencyをtest latencyとした。マウスの尾の損傷を避けるため、測定限界(cut off time)を10秒とした。抗侵害刺激効果(%)は以下の式より算出した。

$$\% \text{Antinociception} = \frac{\text{test latency} - \text{control latency}}{\text{cut off time} - \text{control latency}}$$

### 3. 報酬効果の測定

Morphineの強化効果の測定には、15 x 30 x 15 cmのアクリル製シャトルボックスを使用した(10)。この装置は、中央に設置した上下に移動可能な仕切り板により等分割されている2-コンパートメントボックスである。また、暗くて床面が粗い場所を好むマウスの性質による区画間の偏りを防ぐために、一方の区画は白色でその床面は滑りにくく加工してあり、もう一方の区画は黒色でその床面は滑りやすく加工してある。

本研究において、条件づけスケジュールにはカウンターバランス方式を採用した(15)。マウスに薬物としてmorphine(5 mg/kg)あるいは溶媒である生理食塩液を皮下投与し、一方の区画に50分間入れ、翌日は前日とは異なる処置を行い、もう一方の区画に50分間入れるという試行を交互に2回ずつ繰り返して行った。実験手順による偏りを避けるため、最初に薬物を投与し、その翌日に生理食塩液を投与する動物、また反対に、最初に生理食塩液を投与し、その翌日に薬物を投与する動物を設けた。また、区画の使用順序についても同様に、最初に白の区画に入れ、翌日黒の区画に入れる動物、また反対に、最初に黒の区画に入れ、翌日白の区画に入れる動物を設けた。

4日間の条件づけ試行の後、5日目に区画を等分割している仕切り板を床から6cmの高さまで引き上げ、ボックスの中央境界部に金網製プラットホーム(1.5 x 3 x 6 cm)を設置し、その上にマウスを乗せ、マウスがプラットホームから降り、白と黒の両区画を自由に出入りできる状況になってから15分間、各区画内への滞在時間を計測した。そして、薬物処置区画への滞在時間と生理食塩液処置区画への滞在時間との差をスコア(sec)として算出し、薬物処置区画への滞在時間の延長を報酬効果の指標とした。

### 4. Morphine 身体依存の形成

Morphine 身体依存の形成法としては、注射法を

用いて行った。注射法は Maldonado ら (9) のスケジュールに従い、morphine を皮下に慢性的に処置した。Morphine の投与用量は、1 日目に 8 mg/kg および 15 mg/kg、2 日目に 20 mg/kg および 25 mg/kg、3日目に 30 mg/kg および 35 mg/kg、4 日目に 40 mg/kg および 45 mg/kg、5 日目に 45 mg/kg とし、1 日 2 回 5 日間漸増適用した。1 回目の投与は午前 8 時、2 回目の投与は午後 8 時に行った。そして、5 日目の最終投与 2 時間後に naloxone (3 mg/kg) を皮下投与し、誘発される退薬症候を直径 35 cm、高さ 70 cm のプラットホーム上で観察した。Jumping は naloxone 投与後 30 分間観察した。また、体重の測定は、naloxone 投与 60 分後に行った。

#### 5. Morphine 誘発数種薬理作用の発現に関する薬理遺伝学的解析

26 系統の SMXA RI 系では、各染色体上のほぼ等距離に存在する遺伝子が祖先系統である A/J 系および SM/J 系のいずれに由来したものであるかが、882 遺伝子座について判明しており、遺伝子座系統間分布パターン (strain distribution patterns; SDP) が作成されている。各 SMXA RI 系において、それぞれの指標のスコアを用いて、SMXA RI 系の SDP をもとにした解析用ソフトである Map Manager vol. 3.0 を使用して morphine の各種薬理作用に関与する遺伝子座の

同定を行った。

#### C. 実験結果

A/J 系、SM/J 系および SMXA RI 系マウスにおける morphine 誘発抗侵害刺激効果の小さいものから大きいものへと並べた結果を図 1 に示した。A/J 系マウスと SM/J 系マウスの morphine 誘発抗侵害刺激効果を比較検討した結果、A/J 系マウスでは morphine 処置により強度の抗侵害刺激効果を示した。SMXA RI 系マウスにおいては、SM/J 系と同様、morphine 処置により抗侵害刺激効果をほとんど示さなかった SMXA-5 の 8.3 % から、A/J 系と同様、morphine 処置により強度の抗侵害刺激効果を示した SMXA-14 の 100 % まで連続的な結果が得られた。

RI 系では、ほぼすべての遺伝子について親系統のどちらかと同じものをホモとして持っているので、親の系統間で異なる形質が単一の遺伝子で支配されている場合、RI 系についてその形質を調べると、親のそれぞれの系統と同じ形質をもつ系統数がほぼ 1:1 となる。もしその形質が複数の遺伝子により支配されている場合には、RI 系についてその形質を調べると連続的な結果が得られる。SMXA RI 系における morphine 誘発抗侵害刺激作用の結果は連続的であったことから、morphine 誘発抗侵害刺激作用の発現には複

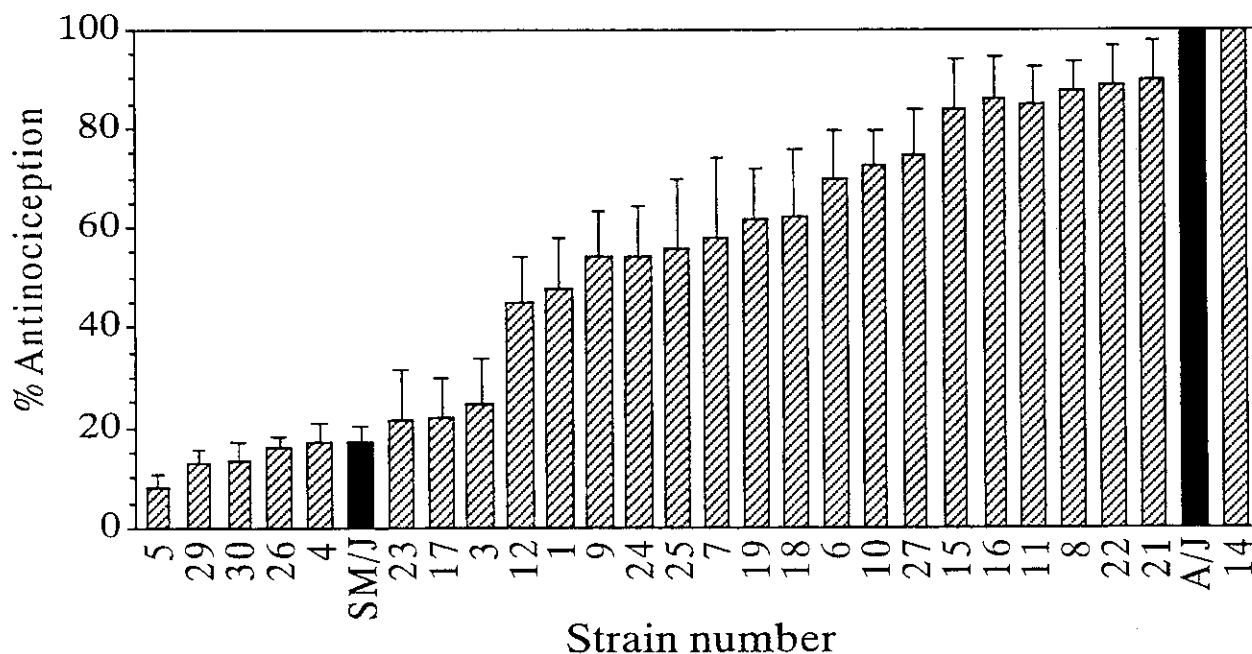


Fig. 1 Morphine (5 mg/kg, s.c.)-induced antinociception in A/J, SM/J and 26 SMXA RI strains of mice. A/J, SM/J and SMXA RI strains are listed in order from weak (left) to potent (right) intensity of morphine-induced antinociception. Each column represents the % antinociception of 5-17 mice.

Table. 1 Loci related to morphine (5 mg/kg, s.c.)-induced antinociception and candidate gene located in regions by provisionally mapped QTLs for morphine-induced antinociception.

Locus	Chr	cM	P value	add value	Candidate gene
D1Rik124	1	41-52	0.04858	26.25	
D1Rik125	1	41-52	0.04858	26.25	
D1Rik126	1	41-52	0.04858	26.25	
D1Rik127	1	41-52	0.04858	26.25	
D1Rik128	1	41-52	0.04858	26.25	
D1Rik129	1	41-52	0.04858	26.25	acetylcholine receptor delta (52.30)
D1Rik130	1	41-52	0.04858	26.25	acetylcholine receptor gamma (52.30)
D2Rik107	2	32-40	0.03992	-26.99	
D2Mit11	2	40	0.02301	-29.36	
D2Rik109	2	40-53	0.02301	-29.36	glutamic acid decarboxylase 1 (43.00)
D2Rik110	2	40-53	0.02301	-29.36	acetylcholine receptor alpha (44.00)
D2Rik111	2	40-53	0.02301	-29.36	
D2Rik112	2	40-53	0.02301	-29.36	
D2Rik113	2	40-53	0.00470	-34.64	
D2Rik114	2	40-53	0.03534	-29.3	
D2Mit15	2	53	0.03769	-27.62	
D5Rik164	5	60-72	0.03459	-27.26	nitric oxide synthase 1, neural (70.00)
D10Rik66	10	30-49	0.00646	32.37	glutamate receptor, kainate 2 (29.00)
D10Rik67	10	30-49	0.00646	32.37	
D10Mit12	10	49	0.01401	30.2	
D10Rik68	10	57-63	0.03358	32.8	
D15Rik51	15	32-42.7	0.01217	31.37	somatostatin receptor 3 (44.00)
D16Mit2	16	14	0.03614	-28.4	catechol-O-methyltransferase (13.00)
					somatostatin (19.00)
DXMit38	X	48	0.00957	33.81	
DXRik17	X	48-63	0.01077	33.45	
DXRik18	X	48-63	0.01704	35.36	

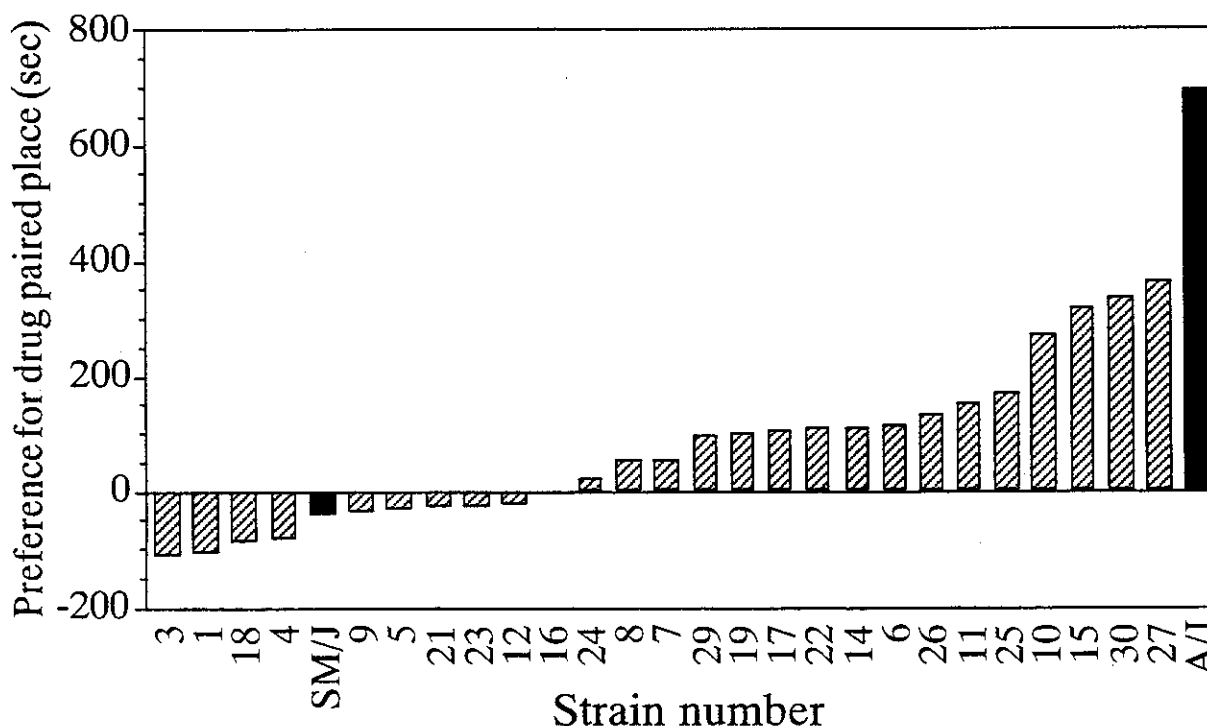


Fig. 2 Place preference conditioning produced by morphine (5 mg/kg, s.c.) in A/J, SM/J and 26 SMXA RI strains of mice. A/J, SM/J and SMXA RI strains are listed in order from place aversion (left) to a great place preference (right) by morphine. Each column represents the mean conditioning score of 6-13 mice.

数の遺伝子が関与していると考えられる。

Morphine 誘発抗侵害刺激作用の発現に関する遺伝解析を行った結果を表 1 に示した。遺伝解析の結果、第 1 染色体上の 41-52 cM、第 2 染色体上の 32-53 cM、第 5 染色体上の 60-72 cM、第 10 染色体上の 49 および 57-63 cM、第 16 染色体上の 14 cM および X 染色体上の 48-63 cM の 26 遺伝子座の関与が示唆された。

A/J 系、SM/J 系および SMXA RI 系マウスの morphine 処置群のスコアから生理食塩液処置群のスコアを差し引いた値を morphine 誘発 place preference のスコアとした。そして、A/J 系、SM/J 系および SMXA RI 系マウスの morphine (5 mg/kg, s.c.) 誘発 place preference を、スコアの小さいものから大きいものへと順に並べた結果を図 2 に示した。Morphine (5 mg/kg, s.c.) を処置することにより、A/J 系マウスのスコアは 694.5 sec を示し、SM/J 系マウスのスコアは -38.5 sec を示した。また、SMXA RI 系マウスにおける morphine (5 mg/kg, s.c.) 誘発 place preference は、SMXA-4 の 111.6 sec から SMXA-30 の 576.1 sec まで連続的な結果が得られた。

Morphine 誘発 place preference の発現に関する遺伝解析を行った結果を表 2 に示した。遺伝解析の結果、第 1 染色体上の 58.7-63.1 cM、第 3 染色体上の 49.2-55 cM、第 9 染色体上の 61 cM、第 13 染色体上の 5.0-9.0 cM および第 18 染色体上の 50-57 cM の 13 遺伝子座の関与が示唆された。

A/J 系、SM/J 系および SMXA RI 系マウスにおける naloxone (3 mg/kg, s.c.) 誘発退薬症候の結果を図 3 に示した。SMXA RI 系マウスにおける naloxone 誘発 jumping (図 3) および体重減少は、いずれの退薬症候も発現率または減少率の小さいものから大きなものまで連続的な結果が得られた。

Naloxone 誘発種々の退薬症候の発現に関する遺伝解析を行い、その結果を表 3 に示した。Naloxone 誘発 jumping の発現に関する遺伝解析の結果、第 1 染色体上の 41 cM、第 2 染色体上の 53-62 cM、第 3 染色体上の 0-10.5 cM、第 5 染色体上の 0-8 cM、第 10 染色体上の 14-30 cM および第 15 染色体上の 22.2 cM の 16 遺伝子座の関与が示唆された。Naloxone 誘発体重減少の発現に関する遺伝解析の結果、第 4 染色体上の 71-79 cM、第 9 染色体上の 8-42 cM、第 10 染色

体上の 30-49 cM および第 19 染色体上の 20-32 cM の 26 遺伝子座の関与が示唆された。

#### D. 考察

Morphine の鎮痛作用は、morphine が延髄網様核や中脳水道周囲灰白質、大縫線核および青斑核などに作用して noradrenaline や serotonin 神経系といった下行性抑制を強め、また、脊髄後角における morphine の直接作用により、痛みの伝達が抑制され鎮痛作用が発現すると考えられている。

本研究において、morphine (5 mg/kg, s.c.) により誘発される抗侵害刺激作用を tail-flick 法により A/J 系および SM/J 系マウスを用いて検討した結果、A/J 系マウスでは morphine により顕著な抗侵害刺激作用が発現したのに対し、SM/J 系マウスでは morphine によりほとんど抗侵害刺激作用を示さなかった。SMXA RI 系マウスを用いて、morphine (5 mg/kg, s.c.) 誘発抗侵害刺激作用について検討した結果、morphine 処置により抗侵害刺激作用をほとんど示さない SMXA-5 系マウスから強い抗侵害刺激作用を示す SMXA-14 系マウスまで連続的な結果が得られた。もし、morphine 誘発抗侵害刺激作用が単一の遺伝子により支配されているならば、抗侵害刺激作用を示さない系統と示す系統が 1:1 に分かれるはずである。しかし、本研究の結果では morphine 誘発抗侵害刺激作用が各系統間で連続的な結果となったことから、morphine 誘発抗侵害刺激作用の発現には複数の遺伝子が影響を与えていることが示唆できる。

SMXA RI 系マウスにおける morphine 誘発抗侵害刺激作用の結果を用いて遺伝解析をおこなった結果、第 1、2、5、10、15、16 染色体および X 染色体上の 26 遺伝子座が同定された。これまでに、BXD RI 系マウスを用いて morphine 誘発抗侵害刺激作用について遺伝解析を行った結果、第 2、3、4、7、9、10、11 染色体および第 19 染色体上の遺伝子座が同定されている (1)。さらに、Belknap らは BXD RI 系マウスを用いて morphine 誘発抗侵害刺激作用について遺伝解析を行い、第 10 染色体上の遺伝子座を同定している (2)。解析結果が一致しないものについては、Belknap らは morphine 誘発抗侵害刺激作用を hot-plate 法を用いて測定しているのに対し、本研究では tail-flick 法を用いていること、また、用いた morphine の用量が Belknap らは 16 mg/kg を腹腔内投与しているのに対し、本研究では 5 mg/kg を皮下投与してい

Table. 2 Loci related to morphine (5 mg/kg, s.c.)-induced place preference and candidate gene located in regions by provisionally mapped QTLs for morphine-induced place preference.

Locus	Chr	cM	P value	add value	Candidate gene
D1Mit11	1	58.7	0.00886	151.14	
D1Rik134	1	58.7-63.1	0.00886	151.14	Serotonin receptor 5B (63.00)
D1Rik135	1	58.7-63.1	0.00886	151.14	
D3Rik96	3	49.2-55	0.02952	-158.28	
D3Rik97	3	49.2-55	0.02952	-158.28	
D9Mit16	9	61	0.04644	-125.92	
D13Mit1	13	5	0.01123	155.48	
D13Rik67	13	5.0-9.0	0.00599	164.13	
D13Rik68	13	5.0-9.0	0.00599	164.13	
D13Rik69	13	5.0-9.0	0.00599	164.13	
D18Mit17	18	20	0.04100	131.32	
D18Rik58	18	50-57	0.03419	134.55	
D18Rik59	18	50-57	0.03419	134.55	

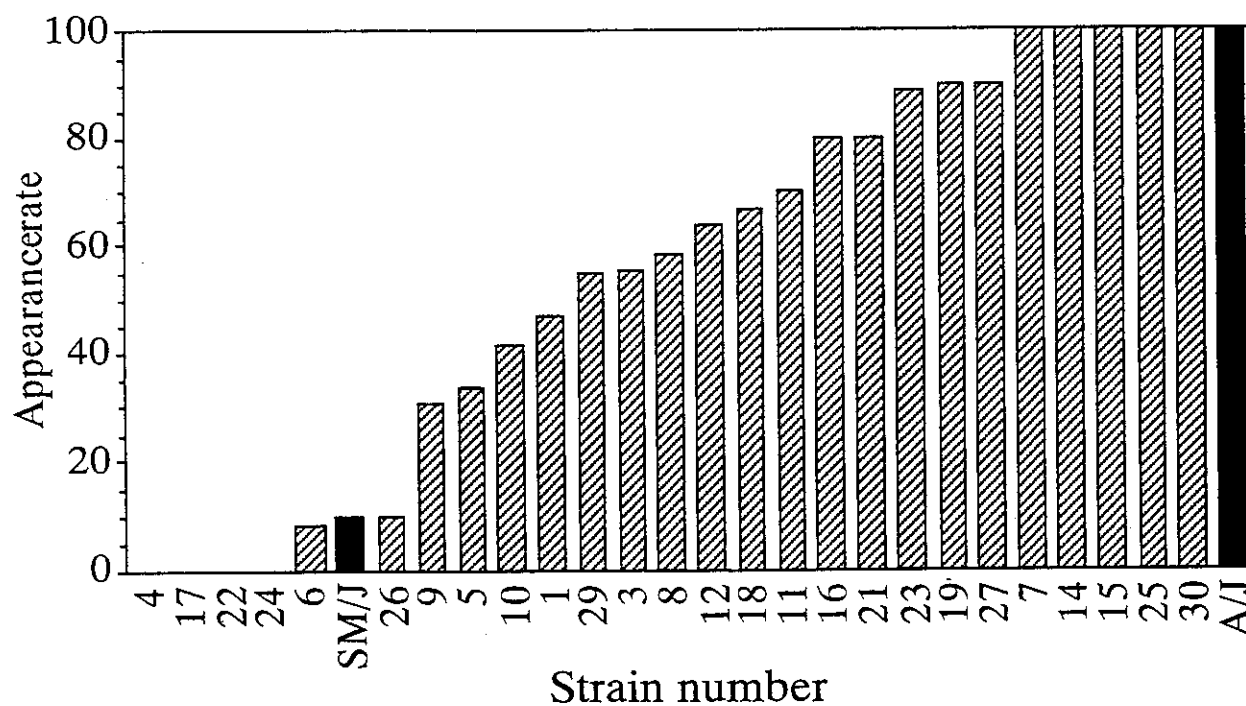


Fig. 3 Naloxone (3 mg/kg, s.c.)-precipitated withdrawal jumping in A/J, SM/J and 26 SMXA RI strains of mice treated with morphine using the injection method. A/J, SM/J and SMXA RI strains are listed in order from low (left) to high (right) ratio of jumping expression. Each column represents the (positive mice)/(used mice) of 6-17 mice.

Table. 3 Loci related to naloxone (3 mg/kg, s.c.)-precipitated withdrawal jumping and candidate gene located in regions by provisionally mapped QTLs.

Locus	Chr	cM	P value	add value	Candidate gene
D1Mit7	1	41	0.02400	36.01	
D2Rik115	2	53-62	0.03823	-33.67	
D2Rik116	2	53-62	0.03823	-33.67	
D3Rik79	3	0-4.6	0.02026	36.7	
D3Mit62	3	4.6	0.03915	33.46	
D3Rik80	3	4.6-10.5	0.03915	33.46	
D3Rik81	3	4.6-10.5	0.03915	33.46	
D3Rik82	3	4.6-10.5	0.03915	33.46	
D3Rik83	3	4.6-10.5	0.03915	33.46	
Car1	3	10.5	0.03915	33.46	
D5Rik136	5	0-8	0.04470	35.2	
D10Mit2	10	14	0.01255	38.09	opioid receptor, mu (8.00)
D10Rik57	10	14-30	0.01255	38.09	
D10Rik58	10	14-30	0.01255	38.09	Glutamate receptor kainate 2 (29.00)
D10Rik59	10	14-30	0.01255	38.09	
D15Mit85	15	22.2	0.04581	-32.83	

るためであると考えられる。さらに、本研究により解析された第 2 染色体上には  $\gamma$ -amino-butylic acid (GABA) 合成酵素である glutamic acid decarboxylase 1 の遺伝子が存在すること、第 10 染色体上には glutamate receptor, kainate 2 の遺伝子が存在すること、第 15 染色体上には somatostatin receptor 3 遺伝子、第 16 染色体上には somatostatin の遺伝子が存在することが明らかになっていることから、これらの遺伝子が morphine 誘発抗侵害刺激作用の発現に関与していることが考えられる。

依存形成薬物における精神依存性には、脳内における dopamine 神経系、特に中脳辺縁 dopamine 神経系が重要な役割を果たしていると考えられている。Morphine は dopamine 神経系に抑制的に働いている GABA 神経系における GABA の遊離を抑制することにより、脱抑制の機構で dopamine の遊離を増加させることにより、dopamine 神経系が活性化され、精神依存性を示すと考えられている。

本研究において、morphine の精神依存性を検討するために conditioned place preference 法により A/J 系および SM/J 系マウスを用いて検討した結果、A/J 系マウスでは morphine (5 mg/kg, s.c.) を処置することにより有意な place preference が発現したのに対し、SM/J 系マウスでは有意な place preference および place aversion

のいずれも発現しなかった。SMXA RI 系マウスを用いて morphine (5 mg/kg, s.c.) 誘発 place preference について検討した結果、morphine 処置により place preference を示さず、むしろ place aversion の傾向を示す SMXA-4 系マウスから強い place preference を発現する SMXA-30 系マウスまで連続的な結果が得られたことから、morphine の精神依存性には複数の遺伝子が影響を与えていることが明らかとなった。

SMXA RI 系マウスにおける morphine 誘発 place preference の結果を用いて遺伝解析をおこなった結果、第 1、3、9、13 および 18 染色体上の 13 遺伝子座の関与が示唆された。これまでに、BXD RI 系を用いて two-bottle choice 法により morphine の嗜好性について遺伝解析を行った結果、第 3、7、8、9、10、12 染色体および第 18 染色体上の遺伝子座が同定されている (1)。また、同様の検討により第 2、4、8 染色体および第 9 染色体上の遺伝子座が同定されている (7)。さらに、C57BL/6 系マウス、DBA/2 系マウスおよびその交配により得られた F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> を用いて two-bottle choice 法により morphine の嗜好性について遺伝解析を行った結果、第 1、6 染色体および第 10 染色体上の遺伝子座が同定されている (3)。本研究の結果と一致した第 1、3、9 染色体および第 18 染色体上の遺伝子が morphine の嗜好性に強く関与しているものと考えられ、

一致しなかった第 2、4、7、8、10、12 染色体および第 13 染色体については、これらの報告では BXD RI 系マウスまたは C57BL/6 系、DBA/2 系およびその F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> マウスを用いて two-bottle choice 法により測定しているのに対し、本研究では SMXA RI 系マウスを用いて conditioned place preference 法により測定しているためであると考えられる。また、本研究で解析された第 1、9、13 染色体および第 18 染色体上にはいずれも ethanol の嗜好性に関与する遺伝子座が存在するため (5)、薬物依存そのものに関与する遺伝子が存在する可能性が考えられる。さらに、本研究により解析された第 1 染色体上には serotonin receptor 5B の遺伝子が存在することが明らかになっていることから、この遺伝子が morphine の精神依存性に関与している可能性が考えられる。

Morphine の身体依存性は主に morphine 依存を形成させた後に、opioid 受容体非選択的拮抗薬である naloxone を処置することにより発現する退薬症候の強度により評価される。これらの退薬症候はいずれも morphine の急性投与による薬理作用とは全く逆の症状を示す。こういった退薬症候の発現には、退薬時における脳内 noradrenaline 神経系の活性化および dopamine 神経系の抑制が特に重要であると考えられている。

本研究において、morphine 身体依存を検討するために、注射法により morphine 依存を形成し、naloxone (3 mg/kg, s.c.) により誘発される退薬症候について A/J 系および SM/J 系マウスを用いて検討した結果、退薬症候の種類により異なる系統差がみられた。Naloxone 誘発 jumping は A/J 系マウスの方が SM/J 系マウスよりも発現率が高く、naloxone 誘発体重減少は SM/J 系マウスの方が A/J 系マウスよりも減少率が大きかった。これまでに、morphine 依存時における naloxone 誘発退薬症候には系統差が存在し、退薬症候の種類により発現率が異なることが報告されている (4,14)。以上より、morphine 依存時における naloxone 誘発退薬症候には遺伝因子が強く影響を与えていることが明らかとなった。SMXA RI 系マウスを用いて morphine 依存時における naloxone (3 mg/kg, s.c.) 誘発退薬症候について検討した結果、退薬症候のいずれの指標においても発現の少ないものから多いものまで連続的な結果が得られ、morphine 依存時における naloxone 誘発退薬症候の発現には複数の遺伝子が影響を与えていることが示唆された。

SMXA RI 系マウスにおける morphine 依存時の naloxone 誘発退薬症候の結果を用いて遺伝解析をおこなった結果、jumping の発現には第 1、2、3、5、10 および 15 染色体上の 16 遺伝子座、体重減少には第 4、9、10 および 19 染色体上の 26 遺伝子座が関与している可能性が示唆された。このことより、退薬症候の種類により異なる染色体および遺伝子座が関与していることが明らかになった。ここで、naloxone 誘発 jumping において解析された第 10 染色体上には  $\mu$ -opioid 受容体の遺伝子が存在することが明らかになっている。Morphine は主に  $\mu$ -opioid 受容体に作用すると考えられているので、 $\mu$ -opioid 受容体の遺伝子が退薬症候 jumping の発現に関与していることが考えられる。一方、naloxone 誘発体重減少の発現において解析された第 9 染色体上には glutamate receptor AMPA4 遺伝子、dopamine D2 receptor の遺伝子が存在していることが明らかになっていることから、これらの遺伝子が退薬症候の発現に関与していることも考えられる。また、morphine 依存時における naloxone 誘発退薬症候は、退薬症候の種類により異なる遺伝子が関与している可能性が示唆された。

SMXA RI 系マウスにおける結果より、morphine 誘発抗侵害刺激作用、精神依存性および身体依存性はいずれも作用の弱いものから強いものまで連続的な結果が得られたことから、これらの薬理作用の発現には複数の遺伝子が関与することが明らかとなり、さらにそれぞれの薬理作用の発現に関与する染色体およびその遺伝子座が同定された。また、これら薬理作用の発現に関与する染色体およびその遺伝子座はそれぞれ異なるものであったことから、薬理作用の種類により関与する遺伝子が一部異なることが明らかとなった。

#### E. 結論

遺伝解析の結果、morphine 誘発抗侵害効果には第 1、2、5、10、15、16 および X 染色体上の 28 遺伝子座、morphine 誘発報酬効果には第 1、3、9、13 および 18 染色体上の 13 遺伝子座が関与することが明らかとなった。また、morphine 身体依存の遺伝解析の結果、jumping の発現には第 1、2、3、5、10 および 15 染色体上の 16 遺伝子座、体重減少には第 4、9、10 および 19 染色体上の 26 遺伝子座が関与していることが明らかになった。Morphine 誘発数種薬理作用の遺伝解析

の結果、関与が認められた遺伝子座は一部共通したものや全く共通しなかったものまで様々なものが認められた。このことより、morphineの薬理作用には様々な遺伝因子が関与しており、薬理作用によって関与する遺伝子も異なることが示唆された。

#### 参考文献

- 1) Belknap J.K. and Crabbe J.C.: Chromosome mapping of gene loci affecting morphine and amphetamine responses in BXD recombinant inbred mice. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 654: 311-323, 1992
- 2) Belknap J.K., Mogil J.S., Helms M.L., Richards S.P., O'Toole L.A., Bergeson S.E. and Buck K.J.: Localization to chromosome 10 of a locus influencing morphine analgesia in crosses derived from C57BL/6 and DBA/2 strains. *Life Sci.*, 57: PL117-124, 1995
- 3) Berrettini W.H., Ferraro T.N., Alexander R.C., Buchberg A.M. and Vogel W.H.: Quantitative trait loci mapping of three loci controlling morphine preference using inbred mouse strains. *Nature Genet.*, 7: 54-58, 1994
- 4) Brase D.A., Loh H.H. and Way E.L.: Comparison of the effects of morphine on locomotor activity, analgesia and primary and protracted physical dependence in six mouse strains. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 201: 368-374, 1977
- 5) Cunningham C.L.: Localization of genes influencing ethanol-induced conditioned place preference and locomotor activity in BXD recombinant inbred mice. *Psychopharmacology*, 120: 28-41, 1995
- 6) George F.R. and Goldberg S.R.: Genetic approaches to the analysis of addiction processes. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 10: 78-83, 1989
- 7) Gora-Maslak G., McClearn G.E., Crabbe J.C., Phillips T.J. and Belknap J.K.: Use of recombinant inbred strains to identify quantitative trait loci in psychopharmacology. *Psychopharmacology*, 104: 413-424, 1991
- 8) Lednicer D. and VonVoigtlander P.F.: 4-(p-Bromophenyl)-4-(dimethylamino)-1-phenethylcyclohexanol. An extremely potent representative of a new analgesic series. *J. Med. Chem.*, 22: 1157-1158, 1979
- 9) Maldonado R., Dauge V., Callebert J., Villette

B.P.: Comparison of selective and complete inhibitors of enkephalin-degrading enzymes on morphine withdrawal syndrome. *Eur. J. Pharmacol.*, 165: 199-207, 1989

- 10) Mucha R.F. and Herz A.: Motivational properties of kappa- and mu-opioid receptor agonists studied with place and taste preference conditioning procedure. *Psychopharmacology*, 86: 274-280, 1985
- 11) Nishimura M., Hirayama N., Serikawa T., Kanehira K., Matsushima Y., Katoh H., Wakana S., Kojima A. and Hiai H.: The SMXA: A new set of recombinant inbred strain of mice consisting of 26 substrains and their genetic profile. *Mamm. Genome*, 6: 850-857, 1995
- 12) Phillips T.J., Crabbe J.C., Metten P. and Belknap J.K.: Localization of genes affecting alcohol drinking in mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 18: 931-941, 1994
- 13) Semenova S., Kuzmin A. and Zvartau E.: Strain differences in the analgesic and reinforcing action of morphine in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50: 17-21, 1995
- 14) 鈴木 勉, 深川雪路, 三澤美和: BALB/c, C57BL/6 および CBF1 系マウスにおける morphine の鎮痛効果と身体依存の薬理遺伝学的研究. *薬物・精神・行動*, 10: 289-295, 1990
- 15) Suzuki T., Masukawa Y. and Misawa M.: Drug interactions in the reinforcing effects of over-the-counter cough syrups. *Psychopharmacology*, 102: 438-442, 1990



## Nicotine 誘発性 diazepam binding inhibitor (DBI) 発現の神経化学的機序

大熊 誠太郎 川崎医科大学薬理学教室  
桂 昌司 川崎医科大学薬理学教室

Nicotine 長期投与がマウス大脳皮質における diazepam binding inhibitor (DBI) 発現の増加が誘発することから、その発現機序を初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用いて神経化学的に検討した。Nicotine 長期曝露により DBI およびその mRNA の発現増加が誘発され、これらの変化は nicotine 性 acetylcholine 受容体 (nAChR) 拮抗薬 (hexamethonium)、膜脱分極阻害薬 (tetrodotoxin)、Na<sup>+</sup>チャネル阻害薬 (procainamide)、および膜安定化薬 (dibucaine など) の共存により消失した。さらに、nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現は L 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネル (VDCCs) 阻害薬および Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CAM II kinase) 阻害薬である nifedipine および KN-62 により完全に阻害されたが、P/Q および N 型 VDCCs 阻害薬は何らの変化も与えなかった。これらの実験成績から、nicotine 長期曝露による神経細胞内 DBI 発現の増加は、nAChR 活性化に伴う神経細胞膜興奮に引き続いて生じる L 型 VDCCs を介した細胞内への Ca<sup>2+</sup>流入増加に起因する CAM II kinase 活性化により生じる可能性が示唆される。

### A. 目的

Nicotine は依存形成薬物の 1 つであり、その依存形成後には種々の精神的あるいは身体的症状あるいは症候が認められることはよく知られている。中枢神経系に存在する nicotine 性 acetylcholine 受容体 (nAChR) は 5 量体であり、それぞれのサブユニットの組み合わせにより多様な生理機能に関与している<sup>13)</sup>。中枢神経系における nAChR はその活性化により神経細胞膜の脱分極を誘発し、この結果細胞内への Ca<sup>2+</sup>流入の増大とこれに伴う諸種の機能変化、すなわち、記憶の充進、痙攣、食欲や易怒性の抑制、局所的な glucose 消費の低下などが生じるとされている<sup>11)</sup>。同様に、このような nAChR の機能の多様性が nicotine 依存とその退薬時にみられる諸種の精神的および身体的な症状や症候の出現に関係していると考えられている。

一方、内在性 benzodiazepine 様物質として知られている diazepam binding inhibitor (DBI) は、脳内  $\gamma$ -

aminobutyric acid (GABA) 作動性神経細胞の軸索終末部小胞体において、GABA と共存する約 10 kDa の内在性神経活性ペプチドであることが見いだされて以来<sup>9)</sup>、その中枢神経機能における役割が注目されている。現在までの国内外の研究により、DBI は抗不安薬として臨床で常用されている BZD 系薬物の特異的受容体に対して、inverse agonist としての薬理活性を示すことが明らかにされていることから、その主要な薬理作用として精神的不安に誘発に関与するものと考えられている<sup>2)</sup>。したがって、各種ストレス環境下および薬物依存禁断症状発現時などの多くの精神症状の変化に深く関与している可能性が考えられている。また、近年 DBI の単離<sup>5)</sup>と cDNA の塩基配列<sup>10)</sup>および DBI の脳内分布<sup>14)</sup>などについて解明がなされており、また、各種ストレスや薬物依存状態<sup>4)</sup>における DBI の変化についても検討されつつあるが、DBI の脳内生合成変化とその調節機構については全く検討されておらず、またこれまで

にこれら病態発現の機序を DBI の脳内変化の面から解析した報告は皆無である。

そこで、依存形成薬物の1つである nicotine をマウスに長期投与した場合に出現する依存状態では、DBI mRNA 発現がマウス大脳皮質において著明に亢進していることが報告されていること<sup>8)</sup>、および各種薬物依存の形成過程ならびにその退薬徴候発現時における精神症状の変化と、DBI の脳内生成調節機構の変化との関連性を解明することを目的として、本研究では、nicotine 長期投与による DBI mRNA 発現の機序を解明するために、初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用いて神経化学的に検討を加えた。

## B. 方法

### 1. 神経細胞の単離・初代培養と EtOH の処置

マウス大脳皮質からの神経細胞の単離およびその初代培養は、Ohkuma らの方法に準じて調製した<sup>12)</sup>。すなわち、胎齢 15 日目の ddY 系マウス胎児より新皮質を採取し、髄膜を除去したのち細切した。Trypsin 処理により得られた細胞を遠心操作により分離し、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) に再浮遊の後、nylon mesh (mesh size; 60  $\mu\text{m}$ ) でろ過した。このようにして得られた細胞を含むろ液を、予め 24 時間 poly-L-lysine で処理した培養皿 (PRIMARIA<sup>TM</sup>, Falcon) に添加し、湿度 100%、37°C、95% air - 5% CO<sub>2</sub> の条件下で 1 時間放置した。その後、培養液を 15% fetal bovine serum を含む DMEM に変更し、上述と同一条件下で 3 日間培養した。次に、培養液を 10% horse serum および 10  $\mu\text{M}$  cytosine arabinoside を含む DMEM に置換して 24 時間培養し、再度 10% horse serum を含む DMEM で培養を継続した。培養液は 4 日毎に新鮮な 10% horse serum 含有 DMEM に変更し、実験には培養 14 日目の神経細胞を使用した。なお、本研究で使用した培養細胞は 90% 以上が大脳皮質神経細胞であった。

培養細胞への各種薬物ならびに nicotine の曝露は、Hanks 液で希釈したものを培養皿中に直接添加することにより行った。

### 2. 神経細胞への nicotine 曝露法

初代培養神経細胞への nicotine の曝露は既報<sup>7)</sup>に準じて行った。すなわち、最終濃度が 0.1  $\mu\text{M}$  となるように Hank's solution に溶解した nicotine を直接培養液中に添加し、24 時間の曝露を行った。予備実験から、本研究で用いた nicotine の濃度および曝露時間は、最大の DBI mRNA 発現を誘発する条件であることが判明している<sup>11)</sup>。また、nicotine 非存在下で得られた DBI mRNA 発現量を対照とした。同一の nicotine 濃度で 15 分および 1 時間の曝露を行った場合を短期曝露とし、それぞれの曝露ののちの 12 および 24 時間目においても DBI 発現を測定した。

### 3. PCR によるマウス DBI cDNA のクローニング

マウス DBI cDNA のクローニングは Katsura らの方法に準じて作製した<sup>7)</sup>。すなわち、マウス全脳より FastTrack<sup>TM</sup> mRNA Isolation kit (Invitrogen) を用いて poly(A)<sup>+</sup> RNA を精製し、First strand cDNA 合成キット (Pharmacia) を用い、oligo(dT) をプライマーとして一本鎖の cDNA を合成した。この cDNA をテンプレートとして、PCR 法によりマウス DBI の cDNA を増幅した。なお、マウス DBI に特異的な一対のプライマーは、DNA 合成装置 (Pharmacia) により合成し、5' 末端を T4 kinase でリン酸化したものをを用いた。95°C、55°C、72°C にて各 1 分を 30 回繰り返すことにより増幅反応を行った結果、302 base pair の DNA 断片が増幅され、プラスミドにクローニングを行った後にその塩基配列の確認を行ったところ、DBI cDNA の塩基配列を有していた。

つぎに、得られた PCR 産物をフェノール処理およびエタノール沈殿により精製し、EcoRI アダプターを連結させ、さらに末端をリン酸化して pUC18 の EcoRI サイトに挿入した。こうして得られた DNA を大腸菌に導入して培養し、プラスミド DNA を超遠心で精製し、EcoRI で切断後アガロース電気泳動により cDNA を精製した。なお、本プローブをランダムプライマーと [<sup>32</sup>P]dCTP によりラベルしたものをプローブとしてノーザンブロット法により検討を行ったところ、マウス DBI mRNA を認識する約 650 base pair の単一バンドのみの

発現が認められた。

#### 4. ノーザンブロット法による DBI mRNA の測定

上述の 1.により得られたマウス大脳皮質より、FastTrack™ mRNA Isolation kit (Invitrogen) を用いて poly(A)<sup>+</sup> RNA を精製し、ノーザンブロット法による解析を行った<sup>7)</sup>。

#### 5. DBI 蛋白の合成

マウス全脳より poly(A)<sup>+</sup> RNA を精製し、マウス脳 cDNA に特異的なプライマー Tag dTN を合成した。このうち Tag に相当する部分と AflIII の開始 codon を有するマウス DBI cDNA をテンプレートとして PCR 法によりマウス DBI cDNA を増幅させた。つぎに、得られた PCR 産物を精製し、AflIII および PmlI アダプターを連結させ、pTrec99A ベクターの NcoI/SmaI サイトに挿入することにより DBI 蛋白発現用プラスミドを作製した。つぎに、このプラスミドを大腸菌(W3110)に導入し、casamino acid を含む M9 培地にて培養することにより DBI 蛋白を合成した<sup>8)</sup>。

初期増殖完了後の大腸菌を採取し、凍結融解、超音波破碎および AmSO<sub>4</sub> 塩析を行うことにより可溶性 DBI 蛋白を分離し、さらにゲル濾過、疎水および逆相クロマトグラフィーを行うことにより DBI 蛋白を精製した。

#### 6. 抗 DBI 血清の作製

抗 DBI 血清は Alho らの方法<sup>9)</sup>に従って作製した。すなわち、日本白色雄性家兔(体重 2.5kg)に DBI 蛋白の 0.2 mg を含む complete Freund adjuvant を皮内投与した。初回免疫の 1 カ月後に再び追加免疫を行い、最終的に追加免疫の 10 日後に血清を採取した。なお、このようにして作製した抗 DBI 血清の抗体価は 1:32,000 以上であった。

本実験条件下に得られた抗 DBI 血清の特異性を検討するために、DBI 標準蛋白質を用いてウェスタンブロット法により検討したところ、本血清は DBI 蛋白(10 kDa)に相当する単一バンドのみを認識することが明らかとなった<sup>9)</sup>。

#### 7. DBI 含量の測定

DBI 含量の測定用試料の調製は、Ferrase らの方法<sup>3)</sup>

を若干改変することにより行った。すなわち、マウス大脳皮質を 1N acetic acid にてホモゲナイズし、95℃にて 15 分間の熱抽出を行った。得られた試料はモルカットにより分子量 5,000 以下の低分子蛋白を除去した後、凍結乾燥し、測定まで -80℃ に保存した。

DBI 含量の測定は、抗 DBI 血清よりアフィニティー用 FPLC カラム(Protein G superose)を用いて DBI 認識 IgG (一次抗体)を精製し、さらにその一部を horseradish peroxidase にて標識(二次抗体)した、ELISA-サンドイッチ法により行った<sup>11)</sup>。すなわち、上述で得られた試料を phosphate buffered saline (pH7.4)にて再溶解し、一次抗体と 37℃ で 1 時間の反応を行った。二次抗体を加えてさらに 37℃ で 1 時間反応を行った後、o-phenylenediamine/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 発色液にて発色し、直ちに波長 490 nm にて測定した。

#### 8. 蛋白定量

試料中蛋白の定量は、bovine serum albumin を標準物質とした Lowry らの方法<sup>9)</sup>により行った。

#### 9. 統計的検討

実験成績はすべて平均値±標準誤差で表示し、統計的有意差の検定は一元配置分散分析(one-way ANOVA)の後に Bonferroni's test および Dunnett's test を用いて行った。

### C. 結果

#### 1) 長期 nicotine 曝露に伴う神経細胞内 DBI 含量および DBI mRNA 発現量の変化とこれに及ぼす hexamethonium の影響

初代培養神経細胞に 24-36 時間の nicotine を曝露した場合、有意な DBI/DBI mRNA 発現の増加がみられ、最大発現は 24 時間の曝露ののちに認められた。一方、nicotine の短期曝露では曝露終了後 24 時間までは何らの DBI mRNA 発現変化も認められなかった。

Nicotine 長期曝露に伴う DBI mRNA 発現の増加が nAChR 受容体の活性化により生じているのか否かについて、nAChR 拮抗薬である hexamethonium 共存下で DBI および DBI mRNA 発現の変化を検討した。その結

果、hexamethonium は用量依存性に nicotine 誘発性 DBI および DBI mRNA 発現の増加を抑制した (Fig. 1)。なお、DBI の測定は nicotine 曝露開始後 36 時間目に行ったが、これは DBI 発現が DBI mRNA 発現に比して 12-24 時間遅れて発現することが明らかにされていることによる<sup>8)</sup>。一方、 $\beta$ -actin mRNA 発現は nicotine 曝露により何ら影響を受けなかった。また、hexamethonium 単独存在下においても DBI および DBI mRNA 発現に変化は認められなかった。これらの実験成績から、DBI および DBI mRNA 発現は nicotine 曝露により誘発されること、しかもこれらの発現は nAChR 活性化に伴う現象であることが明らかとなった。また、アルコール依存形成などでみられたのと同様に、DBI mRNA 発現は DBI の発現を伴っていることは明らかと考えられることから、以下の実験では DBI mRNA 発現の変化を観察することとした。

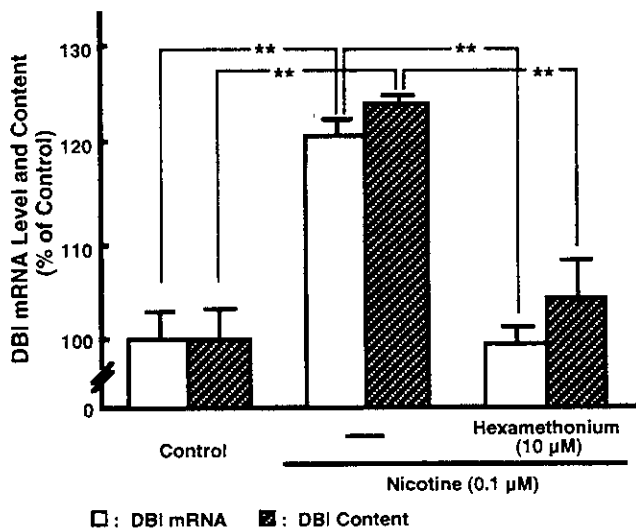


Fig.1 Effect of hexamethonium on nicotine-induced DBI and DBI mRNA expression. Each value represent the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 separate experiments. \*\* $p < 0.01$  (Bonferroni's test).

## 2. Nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現増強に対する神経細胞膜脱分極の関与

上述の実験成績にみられたように、nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現の増強には nAChR 活性化が関与していること、さらに nAChR 活性化には神経細胞膜脱分極を誘発すること、などから、DBI mRNA 発現増強が神経細胞膜の脱分極が関与している可能性が考えられるため、脱分極を抑制した条件下での nicotine による DBI mRNA 発現変化について検討した。

細胞膜脱分極阻害薬である tetrodotoxin (TTX) は、用量依存性に nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現を抑制し、生理学的に脱分極を抑制する濃度である  $0.1 \mu\text{M}$  では DBI mRNA 発現は完全に消失した (Fig. 2)。また、 $\text{Na}^+$  チャネル阻害薬である procainamide、局所麻酔薬であり、かつ神経細胞膜安定化作用を有する dibucaine および lidocaine は、いずれも有意に nicotine 誘発性 DBI mRNA 発現を抑制するのが観察された。これらの結果は、nicotine による DBI mRNA 発現には、nAChR 活性化に伴う神経細胞膜の脱分極が関与していることを示唆すると考えられる。

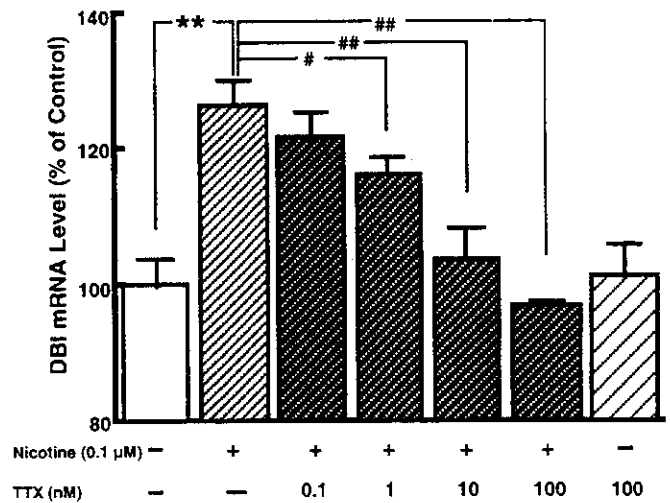


Fig.2 Effect of TTX on nicotine-induced DBI mRNA expression. Each value represent the mean  $\pm$  S.E.M. obtained from 4 separate experiments. \*\* $p < 0.01$  (Bonferroni's test). ## $p < 0.01$  (Dunnett's test).