

# 覚醒剤慢性投与による行動感作と認知機能変化における海馬の役割

分担研究者；丹羽真一 福島県立医科大学医学部・神経精神医学教室

研究協力者；竹内賢\*、加藤光三\*、鈴木喜明\*、松本智彦\*、星野研洋\*、小野正美\*、  
宍戸恭子\*、小林正憲\*、宍戸壽明\*、鍋島俊隆\*\*、古川宏\*\*\*

福島県立医科大学医学部・神経精神医学教室\*、名古屋大学医学部医療薬学・付属病院薬剤部\*\*、  
名城大学薬学部・薬化学教室\*\*\*

**研究要旨：** 覚醒剤の長期摂取によって出現する覚醒剤精神病では、顕著な幻覚・妄想をきたすこと、ストレスに対する過感受性が獲得されることなど、分裂病との多くの共通点があり、行動感作または逆耐性と呼ばれている。両者の背景には類似の認知過程の障害が存在する可能性がある。しかし、覚醒剤精神病の認知機能の検討はこれまで十分になされていない。神経薬理学的実験によれば覚醒剤による行動感作の獲得過程には、中脳被蓋野にある Dopamine (DA) 起始核が重要な役割を演じ、その発現過程には、側坐核などの関与が大きいとされる。そのため、行動感作の獲得および認知機能とも深い関わりもつ部位である海馬-側坐核-前頭前皮質の神経回路網の解明が待たれている。

そこで今回の研究では海馬を中心として、海馬の機能と関連し、かつ認知機能と関連すると考えられる事象関連電位を指標にして、覚醒剤慢性投与による認知機能の変化を検討したところ、覚醒剤慢性投与により P3 様電位に反映される認知過程が障害される可能性が示唆された。また、発達期にあるラットの腹側海馬に傷害を与え、覚醒剤を単回投与した際の行動変化および NMDA 受容体の非競合的阻害薬である phencyclidine (PCP) を投与した際の行動変化を観察した。その結果、正常な海馬-前頭前皮質-側坐核の神経回路網の成熟が急性覚醒剤投与の効果に抑制的に働くことが確認できた。さらに、PCP 負荷時において側坐核の細胞間隙における DA の増加が認められなくとも運動量の増加が起こることも確認され、覚醒剤による行動感作が DA 系だけでなく上記の神経回路網を中心とした DA 系以外の変化により引き起こされている可能性が示唆された。

## A. 目的

覚醒剤の長期連用により、ヒトでは分裂病類似の幻覚・妄想状態が引き起こされることが知られており、覚醒剤精神病と呼ばれる<sup>1)10)13)</sup>。動物に覚醒剤を反復投与した場合にも、当初異常行動を発現しなかった量でも異常行動の発現が認められる現象が観察される。この現象は行動感作<sup>10)</sup>と呼ばれ、覚醒剤精神病の重要な動物モデルと考えられている<sup>10)11)</sup>。これまで動物の行動感作については数多くの重要な神経薬理学的知見が蓄積されており、行動感作の獲得には中脳被蓋野の Dopamine (DA) 起始核、側坐核、前頭皮質、海馬から側坐核への投射路、扁桃核などの部位や学習記憶系の関与が必要と指摘されている。また DA 系以外にも興奮性アミノ酸 (EAA) 系などのほかの神経回路網の機能変化が必要であると推測されている。さらに、覚醒剤の急性投

与の効果についても、前頭葉、腹側海馬の破壊によって増強されるという報告がある。

これらの先行研究の結果が示唆しているのは、行動感作の獲得における前頭皮質-海馬-側坐核の神経回路網の関与であり、また EAA 系の関与でもある。

一方前頭皮質-海馬を含む神経回路網は、注意や判断といった重要な認知機能とも関連があると考えられている部位でもある。このような認知機能の一部を反映する指標として、事象関連電位の P300 があるが、P300 の発生メカニズムや発生部位は未だ明らかではなく、さらに覚醒剤精神病患者における P300 の変化についても、重症の患者では減衰するものの<sup>9)</sup>、全体としては健常者と差がない<sup>9)</sup>というように、十分に明らかにはなっていない。そこで今回の研究では、覚醒剤反復投与による海馬を中心とした神経回路網の機能変化を観

察することを目的として、近年可能になったラットからP300類似の成分を導出する手法<sup>6)</sup>を用いて、まず覚醒剤反復投与によるP300の変化を検討した。また覚醒剤誘発性行動に対するEAA系や海馬の関与を検討することを主目的として、発達期にあるラットの腹側海馬に傷害を与え、覚醒剤を単回投与した際の行動変化およびNMDA受容体の非競合的阻害薬であるphencyclidine(PCP)を投与した際の行動変化を観察し、さらに、PCP負荷時の側坐核におけるDAの変化をin vivo brain microdialysis法を用いて測定することで、DA系、EAA系の相互作用を検討した。

## 実験1

### B.方法

#### 1 対象

体重290~400gのSD系雄性ラット15匹を用いた。それぞれのラットは一匹づつケージにわけ、温度 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、明暗周期12時間のもとで飼育した。実験実施中以外は食餌摂取、飲水の制限は一切行わなかった。なお、本研究は福島県立医科大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

#### 2 方法

それぞれのラットを40mg/kgのpentobarbitalで深麻酔した後、定位脳手術的にステンレスネジ電極をそれぞれ左頭頂皮質上(bregmaより尾側3mm、左側4.5mm)、右嗅球上(bregmaより鼻側10mm、右側1mm)に、硬膜に接するように設置し、前者を記録電極、後者を基準電極とした。また小脳上の硬膜に接するようにステンレスネジ電極を用い、接地電極とした。軟ステンレス線を用いた2本の双極電極を、先端が左右の内側前脳束内に達するように設置した。手術後、回復期間として2週間を置いた後、事象関連電位導出のための訓練を開始した。

訓練はJodoら<sup>6)</sup>の方法に準じて行った。薄明にしたシールドルーム内で、ラットを実験用の箱の中におき、箱の側方より2種類の音

刺激を加えた。刺激は1000Hzおよび2000Hzの純音で、音刺激の持続は800msecとし、総刺激回数は600回で、1000Hz音は全体の30%、2000Hz音は全体の70%の頻度となるよう無作為に提示した。それぞれのラットを、1000Hz音の提示が終了した直後に箱の中に設置されたキーを押すよう、内側前脳束に対するパルス刺激を報酬として訓練した。

以上の訓練で正答率がおよそ85%を超えた時点を目途として訓練を終了し、事象関連電位の記録を薬剤の繰り返し投与の前後で2回行った。脳波は0.5~100Hzの帯域フィルタを通した後、生体アンプで増幅し、刺激前200msec~刺激後1000msecまで、サンプリング周波数500HzでA/D変換した。個々の記録の内、振幅が $\pm 250\mu\text{V}$ を越す部分がある記録については、体動によるアーティファクトが混入したと判断し、アーティファクトのない記録のみを1000Hz目標音、2000Hz非目標音ごとに加算平均した。P3様電位は、潜時250~600msecの間の最大陽性成分として同定し、頂点潜時および頂点振幅を記録した。また、キー押しの反応時間と正答率についても記録した。

1回目の事象関連電位の記録が終了した後、8匹をmethamphetamine(MAP)群、7匹をsaline(SAL)群として、4mg/kg/dayのMAPまたは2ml/dayのSALをおのおの15日間にわたって腹腔内に反復投与した。反復投与の初回には、MAP群の5匹、SAL群の5匹については投与前10分~投与後110分にわたって氏家らによるactivity/stereotypyスコア<sup>10)</sup>を評価した。2回目の事象関連電位の記録は、反復投与の終了後7~10日後に行った。さらに2回目の事象関連電位の記録終了後に、MAP群の5匹については4mg/kgのMAPを腹腔内に投与し、activity/stereotypyスコアを再評価した。

#### 3 統計処理

P3様電位の振幅の変化とactivity/stereotypyスコアの変化をSpearmanの順位相関係数を求めて検討した。その他の統計学的解析には多変量分散分析を用いた。P<0.05を有意とし

た。

## C. 結果

### 1 行動感作の獲得

氏家らのスコアを用いて評価したところ、SAL 単回投与群では投与後行動の変化は認められなかったが、MAP 初回投与時には行動異常が投与40分後まで漸増した。MAP 反復投与後の再投与時には、異常行動はより急速に出現し、より強い行動異常が70分後まで維持された。

### 2 課題遂行成績

反復投与の前後での反応時間、正答率にはMAP群とSAL群との間になんらの統計学的効果は認められなかった。

### 3 事象関連電位に対する反復投与の効果

Fig.1に示したように、P3様電位の振幅については反復投与と投与薬剤の有意な交互作用が認められ(投与×薬剤[F(1,14) = 6.86, P < 0.021])、事後分析の結果、MAP群でのみ、目標音に対するP3様電位の振幅が減衰していた[F(1,7) = 29.59, P < 0.001]。P3様電位の潜伏時に対しては、なんらの統計学的効果も認められなかった。

### 4 P3様電位の減衰と常同行動

MAP群において、反復投与前後のP3様電位の振幅の減衰とactivity/stereotypyの変化との間には有意な相関関係は認められなかった。

## D. 考察

今回の研究では、覚醒剤の反復投与は、正答率、反応時間には影響を与えることなく、P3様電位振幅のみを減衰させた。2回目の事象関連電位の測定は反復投与の終了から7日以上断薬期間をおいた後に行っているため、今回認められたP3様電位の振幅の減衰は覚醒剤の急性効果は否定できると考えられる。今回の研究ではP3様電位を導出するための報酬刺激として内側前脳束に対するパルス刺激を用いている。内側前脳束刺激はそれ自身脳内のDA系に作用するので、覚醒剤の効果との相互作用が問題になる。しかし、反復投

与後も正答率、反応時間になんらの変化もなかったこと、報酬は時間的にP3様電位が発生してから与えられており、直接P3様電位の発生に影響を与えていないこと、内側前脳束刺激は食餌や給水などのより自然な報酬と本質的に同等の報酬であること<sup>23)24)15)</sup>などの理由から、内側前脳束刺激を報酬として用いたことそれ自身はP3様電位発生には大きな影響を与えていなかったものと推測される。よって、今回の研究で認められたP3様電位の減衰は、MAPの反復投与それ自身の効果と考えられる。これは、従来覚醒剤精神病患者の一部で認められていたP300振幅の減衰<sup>4)</sup>を支持するものである。

ではMAPの反復投与によるどのような脳内機構の変化が、このようなP3様電位の変化をもたらしたのか。残念ながら今回の研究のみではそれを明らかにすることはできない。しかし、これまでの多数の薬理学的検討によって、MAPを反復投与されたラットでは、MAPの再投与によって側坐核、線条体のDA放出が促進されることが知られており、これは常同行動や移所運動などの異常行動と関わっていることが指摘されている<sup>12)17)</sup>。ところが今回の研究ではP3様電位の振幅の減衰は、activity/stereotypyの変化と目立った関連を示さなかった。従って、P3様成分の減衰は行動感作現象とは別の機序で生じているのかもしれない。しかしこの機序の解明には、側坐核や海馬や前頭皮質など、行動感作に関連した神経回路網における、微小電極をもちいたユニット活動の記録などのより直接的な検討が必要であろう。

## 実験2

### B. 方法

#### 1. 実験動物：

妊娠14日目のSDラット(日本SLC)を購入し、実験1と同様の環境で飼育した。生後7日目の雄性ラット(15-18g)を無作為に傷害群と対照群に分け実験に用いた。

## 2. 傷害手術：

生後7日目の仔ラットの両側海馬を Lipska らの方法<sup>7)</sup>に従って傷害した。低温麻酔した仔ラットを、脳定位固定装置に固定し、0.3  $\mu$ l のイボテン酸 (10  $\mu$ g/ $\mu$ l) を注入することで両側腹側海馬 (AP -3.0 mm, ML  $\pm$ 3.5 mm to bregma, and VD -5.0 mm from dura) を破壊した。対照群には同様の手順で同量の人工脳脊髄液 (pH 7.4) を注入した。傷害群には耳にマーキングをし、対照群と同じ母ラットのもとで飼育した。生後21日目の時点で離乳し、2匹または4匹ごとに上記と同様の環境で飼育した。

## 3. 行動測定：

生後35日目または生後56日目に各組ごと二台の赤外線式運動量測定装置 (OPTO-VARIMEX, COLUMBUS) を用いて異所運動量を測定した。測定時の負荷としては以下の条件を選んだ。(1) 環境変化ストレス (HABITUATION)：測定用アクリルケージ (440mm $\times$ 430mm) に移した後60分間の総移動距離(2) 生理的食塩水負荷 (SAL INJECTION)：生理的食塩水 1.5ml/kg を腹腔内投与した後60分間の総移動距離(3) MAP 負荷 (MAP injection)：MAP 1.5mg/kg を腹腔内投与した後90分間の総移動距離(4) PCP 負荷 (PCP injection)：前記の実験とは別のグループを用いて1時間の HABITUATION 後に PCP 10mg/kg を腹腔内に投与した際の120分間の総移動距離。

## 4. マイクロダイアリシス：

生後56日目に pentobarbital 40mg/kg を腹腔内投与して麻酔し、脳定位固定装置を用いて左側の側坐核 (AP 1.6 mm, ML 1.4 mm to bregma, and VD -5.5 mm from dura) に直管型脳透析用ガイドカニューレ (AG-8: EICOM) を植え込んだ。生後62日目に2mmのプロープ (A-I-8-02型: EICOM) を植え込み、翌日 (生後63日目) に脳透析実験に用いた。側坐核組織からの透析液の回収は人工脳脊髄液を透析チューブ内に流して側坐核を灌流 (流速 2  $\mu$ l/min) することにより行ない、各フラクションを20分ごとに回収した。このようにして得

られた透析液を電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を用いて、DA を測定し、PCP 投与前の連続した3フラクションの平均値を基礎値として、その基礎値に対する変化率をもとめた。

5. 実験終了後は pentobarbital sodium 深麻酔下で脳を取り出し、4%ホルマリン固定した後、20  $\mu$ m 厚の凍結切片を作成し、cresylviolet 染色した切片を用いて傷害部位および透析チューブの挿入部位を確認した。

## 6. 統計学的検定：

行動変化については総移動距離を日齢 (生後35日または生後56日)、傷害の有無、負荷条件 (HABITUATION, SAL INJECTION, MAP INJECTION, PCP INJECTION) の各要因について分散分析法を用いて分析した。その結果が有意であったものについて Scheffe の多重比較検定を用いて分析した。また、PCP 負荷による DA の変化を、薬物投与前に対する投与後の測定値の変化率で示した。そして、これらの変化率について、傷害の効果と薬物投与後の時間経過の効果の2要因を、くりかえしのある二元配置分散分析法を用いて分析した。さらに、薬物の効果と2要因の交互作用の両者が有意な傾向があった場合に、薬物投与後の各時間における変化率の平均値の差を Scheffe の多重比較検定を用いて分析した。有意水準は5%とした。

## C. 結果

### 組織学的検討：

幼若期に海馬を傷害したラットでは両側性に腹側海馬の萎縮、錐体細胞の消失を認め、空洞を形成しているものもあった。背側の海馬は傷害の影響をほとんど受けていなかった。また、扁桃核複合体周辺に弱い傷害を認めたラットも数匹みられた。ダイアリシスのプロープは全例側坐核内に留置されていた。

### 行動測定：

分散分析の結果、負荷条件 (F(3,128)=100.606, P<0.0001)、傷害の有無 (F(1,128)=8.529, P=0.041) および、日齢と傷害の有無の

交互作用 ( $F(1,128)=4.383, P=0.0383$ ) が有意であり、日齢 ( $F(1,128)=0.106, P=0.7447$ )、日齢と負荷条件の交互作用 ( $F(3,128)=1.525, P=0.2711$ )、負荷条件と傷害の有無の交互作用 ( $F(3,128)=2.452, P=0.0664$ )、日齢と傷害の有無と負荷条件の三要因の交互作用

( $F(3,128)=1.117, P=0.3447$ ) は有意ではなかった。このため、それぞれの日齢について各負荷条件での傷害群と対照群の平均値を比較すると、生後35日ではすべての負荷条件で有意差を認めず (Fig.2,3)、生後56日では HABITUATION ( $P=0.0472$ ), MAP INJECTION ( $P=0.035$ ), PCP INJECTION ( $P=0.0286$ ) で有意な運動量の増加を認めた (Fig. 2,3)。

マイクロダイアリシス：

生後63日目の側坐核における DA の変化を Fig. 4 に示した。分散分析の結果、傷害の有無の効果 ( $F(1,96)=3.199, P=0.0989$ ) が有意な傾向を認め、時間経過の効果

( $F(8,96)=11.745, P<0.0001$ ) および傷害の有無と時間経過の交互作用 ( $F(8,96)=3.182, P=0.003$ ) が有意であった。このため、PCP 投与後の各時間における DA の変化を傷害群と対照群で比較すると、投与直後20分間のフラクションにおいて有意差 ( $P=0.0392$ ) が認められた。

#### D. 考察

生後56日目の海馬傷害群では、すべての条件において運動量の増加が認められ、環境変化、MAP 投与では有意に運動量が増加していた。一方、生後35日目では傷害群と対照群の間に明確な行動上の差が認められなかった。このように新生仔期の海馬傷害ラットでは MAP に対する過敏性が成熟後にのみ認められ、正常な海馬-前頭皮質-側坐核の神経回路網の成熟が MAP の急性効果発現に対しては抑制的に働いていることが確認できた。

PCP は、おもに NMDA 受容体を阻害することでその効果を発揮すると考えられ、生後56日目の傷害群で PCP に対する反応性の増加が認められたことは、EAA 系を介した DA

系の過活動の存在が示唆される。また、今回の実験により NMDA を介した行動量の増強についても思春期後になってはじめて有意な変化がおこることが確認された。

生後56日目に PCP 負荷した際の側坐核の細胞間隙における DA 量および DA は、時間経過にともなって両群とも有意な増加を認めた。これは、無処置のラット腹腔内に PCP を投与すると時間経過とともに側坐核における DA 量が増加するという報告<sup>14)</sup>と一致した結果である。細胞間隙における DA 量について両群を比較すると、傷害群では対照群に比べ有意に増加率が少なかった。amphetamine を負荷した際の側坐核での DA 変化を *in vivo* brain microdialysis 法を用いて比較した報告<sup>15)</sup>でも、運動量の有意な増加にも関わらず DA 変化率については両群間に差がなく、逆に絶対値 (fmol/min) で比較すると基礎値およびその増加量に傷害群で減少傾向を認めている。また、ストレス負荷をかけた際の両群の DA 放出を、DA 代謝産物である Methoxytyramine を指標として検討すると、前頭皮質、側坐核、線状体すべてで有意に減少していた<sup>16)</sup>という。このように運動量の増加は側坐核の DA 放出に基づいていると考えられるが、傷害群が対照群に比して運動量の増加をしめす理由としては、DA 放出以外の要因の関与が大きいものと思われる。

#### E. 結論

覚醒剤慢性投与により P3 様電位に反映される認知過程が傷害される可能性が示唆された。また、正常な海馬-前頭皮質-側坐核の神経回路網の成熟が急性覚醒剤投与の効果に抑制的に働くことが確認できた。さらに、側坐核の細胞間隙における DA の増加が認められなくとも運動量の増加が起こることも確認され、覚醒剤による行動感作が DA 系だけでなく上記の神経回路網を中心とした DA 系以外の変化により引き起こされている可能性が示唆された。

生後3週以前に MAP を投与しても行動感

作が獲得されないことから、行動感作獲得には正常な神経発達の必要性があることが考えられ、今後成熟期および発達期の海馬傷害が行動感作獲得にどのように影響を与えるのか、さらに、このような認知過程の障害が脳内のどの部位の傷害と関連しているのかを検討する必要がある。

[参考文献]

- 1)Connell, P.H.:Amphetamine psychosis. Oxford University Press, NewYork. 1958.
- 2)Halperin, R. and Phaff, D.W.:Brain-stimulated reward and control of autonomic function: are they related? In: Phaff, D.W. (ed.) Thephysiological Mechanisms of Motivation. Springer-Verlag, Berlin, 337-375. 1982.
- 3)Hoebel, B.G.:Inhibition and disinhibition of self-stimulation and feeding: hypothalamic control and postingestional factors. J. Comp. Physiol. Psychol. 66, 89-100. 1968.
- 4)Iwanami, A., Suga, I., Kato, N.:Event-related potentials in methamphetamine psychosis during an auditory discrimination task. Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 242, 203-208. 1993
- 5)Iwanami, A., Kanamori, R., Suga, I. :Reduced attention-related negative potentials in methamphetamine psychosis. J.Nerv. Ment. Dis. 183, 693-697. 1995.
- 6)Jodo, E., Takeuchi, S. and Kayama, Y.:P3b-like potential of rats recorded in an active discrimination task. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 96, 555-560. 1995.
- 7)Lipska B. K., Jaskiw G. E.Weinberger D. R. :Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. Neuropsychopharmacol. 9: 67-75. 1993
- 8)Lipska B. K., Chrapusta S. J., Egan M.F. :Neonatal excitotoxic ventral hippocampal damage alters dopamine response to mild repeated stress and to chronic haloperidol. Synapse. 20: 125-130. 1995
- 9)Phillips, A.G. and Megenson, G.J.:Effects of taste on self stimulation and induced drinking. J. Comp. Physiol. Psychol. 66, 654-660. 1968.
- 10)Robinson, T.E. and Becker, J.B.:Enduring changes in brain andbehavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. Brain Res. Rev. 11,157-198. 1986.
- 11)Sato, M., Numachi, Y. and Hamamura, T.: Relapse of paranoid psychoticstate in methamphetamine model of schizophrenia. Schizophrenia Bull. 18,115-122. 1992.
- 12)Sharp, T., Zetterstrom, T., Ljungberg., T.: A direct comparison of amphetamine-induced behaviors and regional brain dopamine release in the rat using intracerebral dialysis. Brain Res. 401,322-330. 1987.
- 13)Snyder, S.H.:Catecholamines in the brain as mediators of amphetamine psychosis. Arch. Gen. Psychiatry 27, 169-179. 1972.
- 14)Steinpreis R. E.Salamone J. D. :The role of nucleus accumbens dopamine in the neurochemical and behavioral effects of phencyclidine: a microdialysis and behavioral study. Brain Res. 612: 263-270. 1993
- 15)Trowill, J.A., Panksepp, J. and Gandelman, R.:An incentive model of rewarding brain stimulation. Physiol. Rev. 76, 264-281. 1969.
- 16)Ujike, H., Kanzaki, A., Okumura, K. :Sima:( $\sigma$ ) antagonist BMY 14802 prevents methamphetamine-induced sensitization. Life Sciences 50, 129-134. 1993.
- 17)Yamada, S., Kojima, H., Yokoo, H. : Enhancement of dopamine release from striatal slice of rats that were subchronically treated with methamphetamine. Biol. Psychiat. 24, 399-408. 1988.
- 18)Wan R.-Q., Giovanni A., Kafka S. H. :Neonatal hippocampal lesions induced hyperresponsiveness to amphetamine: behavioral and in vivo microdialysis studies. behavioural brain research. 78: 211-223. 1996

[研究業績]

Shin-Ichi Niwa Elsevier Science B. V. ,  
Pathophysiology and Hippocampus in Psy-  
chiatric Disorders, Kato, N. (Ed.) The Hip-  
pocampus: Functions and Clinical Relevance,  
pp. 395-403, Amsterdam, Elsevier, 1996

Takeuchi S, Hoshino K, Kurosu S, Mori Y,  
Honda K, Suzuki H, Niwa S  
Serial changes of P300, p-MHPG and  
p-HVA in the course of pharmacological treat-  
ment of schizophrenia  
The XIth International Conference on Event-  
Related Potentials of the Brain(EPIC IX)  
(Okinawa, Japan, 6.25~30)

Takeuchi S, Jodo E, Suzuki Y, Matsuki T,  
Kayama Y, Niwa S  
Reduction of P3-like potentials in rats after  
chronic administration of methamphetamine  
The XIth International Conference on Event-  
Related Potentials of the Brain(EPIC IX)  
(Okinawa, Japan, 6.25~30)

Takeuchi S, Jodo E, Kayama Y, Suzuki Y,  
Matsuki T, Niwa S  
Rats' P3-Like Potentials are reduced after  
chronic administration of methamphetamine  
Fourth IBRO World Congress of Neurosci-  
ence (Kyoto, Japan, 7.9~14)

宍戸 壽明、丹羽 真一  
側頭葉と精神疾患 ; Clinical Neuroscience 別冊、  
14(10),1202-1205,1996

竹内 賢、鈴木喜明、松木智彦、丹羽真一、浄土  
英一、香山雪彦  
課題学習に伴うラットの事象関連電位の変化の検  
討 ; 脳波と筋電図,24:133,1996

松木智彦、竹内 賢、鈴木喜明、丹羽真一、浄土  
英一、香山雪彦  
methamphetamine 慢性投与によるラット P300 様成  
分の変化 ; 脳波と筋電図,124:133,1996

Takeuchi S, Jodo E, Suzuki Y, Matsuki T,  
Kayama Y, and Niwa S

Chronic administration of methamphetamine  
reduced P3-like potentials in rats.  
In:Recent Advances in event-related potential  
research (ed by Ogura C, Koga Y, and Shi-  
mokocho M), 355-359, Elsevier,1996

H.Suzuki, T.Shishido, Y.Watanabe, H.Abe,  
M.Shiragata, K.Honda, R.Horikoshi and S.-  
I.Niwa  
Changes of behavior and monoamine metabo-  
lites in the rat brain after repeated metham-  
phetamine administration: Effects of duration  
of repeated administration ; Prog. Neuro-  
Psychopharmacol. & Biol. Psychiat., vol.21,  
p.359-369, 1997

K.Kato, M.Ono, K.Shiamzu, H.Tago, S.-I.  
Niwa  
Exaggerated responses to methamphetamine  
and phencyclidine after puberty in  
neonatally hippocampal damaged rats  
6th World congress of Biological Psy-  
chiatry, Abstract No.14-108,1997

Toshiaki Shishido, Yoshinori Watanabe, Hi-  
roki Suzuki, Kozo Kato, Shin-Ichi  
Niwa, Jacques Hanoune, Isao Matsuoka  
Effects of repeated methamphetamine admini-  
stration on dopamine D1 receptor,  
D2 receptor and adenylate cyclase type Five  
mRNA levels in the rat striatum  
Neuroscience Letters,222,175-178,1997

Toshiaki Shishido, Yoshinori Watanabe,Isao  
Matsuoka, Hironori Nakanishi,  
Shin-Ichi Niwa  
Acute methamphetamine administration in-  
creases tyrosine hydroxylase mRNA  
levels in the rat locus coeruleus  
Molecular Brain Research,146-150,1997

加藤光三、小野正美、島津恭子、宍戸壽明、鈴木  
裕樹、今泉修一、田子久夫、丹羽真一  
新生仔期ラット海馬傷害による分裂病モデルの作  
製  
第24回日本脳科学会抄録集,42,1997

加藤光三、小野正美、島津恭子、宍戸壽明、鈴木  
裕樹、今泉修一、田子久夫、丹羽真一  
新生仔期海馬傷害ラットでは成熟後の  
methamphetamine,phencyclidine への反応性が増強す

る

第19回生物学的精神医学会抄録集, 235, 1997

小野正美、加藤光三、宍戸恭子、小林正憲、宍戸  
壽明、鈴木裕樹、今泉修一、田子久夫、丹羽真一  
新生仔期腹側海馬傷害ラットの行動量における性  
差と側坐核における dopamine, serotonin 放出の変化  
第20回生物学的精神医学会抄録集, 257, 1998

小野正美、加藤光三、宍戸恭子、小林正憲、宍戸  
壽明、鈴木裕樹、今泉修一、田子久夫、丹羽真一  
新生仔期腹側海馬傷害ラットの行動量における性  
差と側坐核における dopamine, serotonin 放出の変化  
第25回日本脳科学会抄録集, 42, 1998

加藤光三、小野正美、宍戸恭子、小林正憲、宍戸  
壽明、鈴木裕樹、古川宏、鍋島俊隆、丹羽真一  
幼若期腹側海馬傷害ラットの phencyclidine 反応性  
と側坐核のドパミン放出  
第7回海馬と高次脳機能学会抄録集, 1998

丹羽 真一、加藤 光三

辺縁系仮説

こころの臨床 17巻増刊号: 22-26, 1998



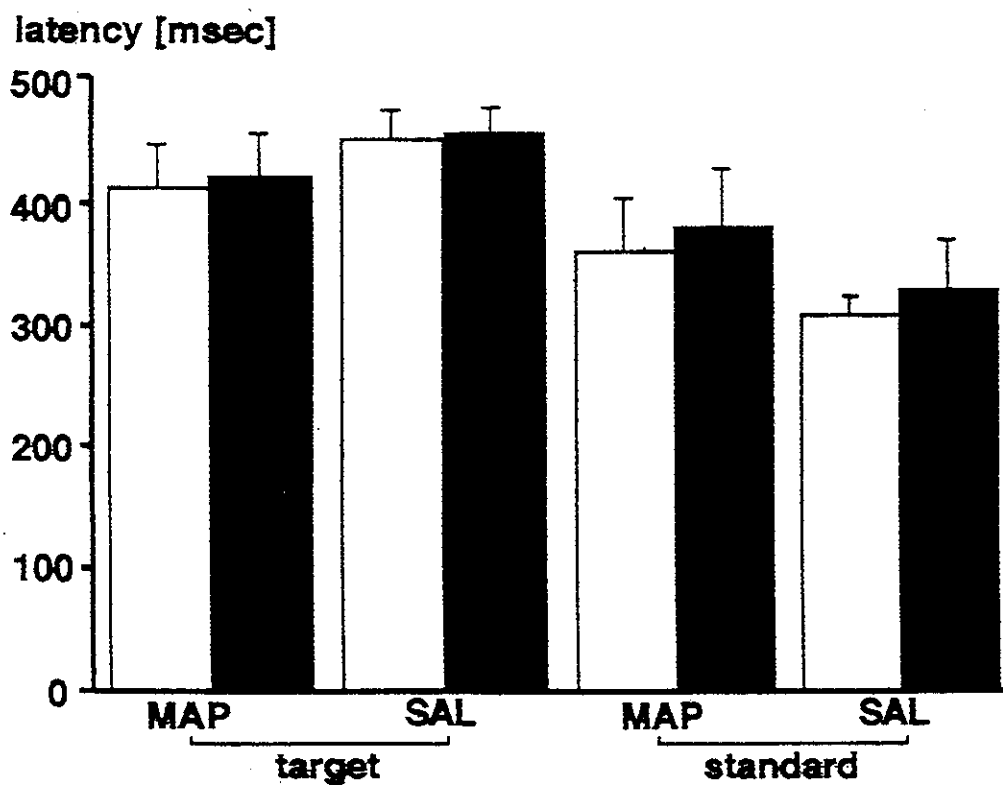
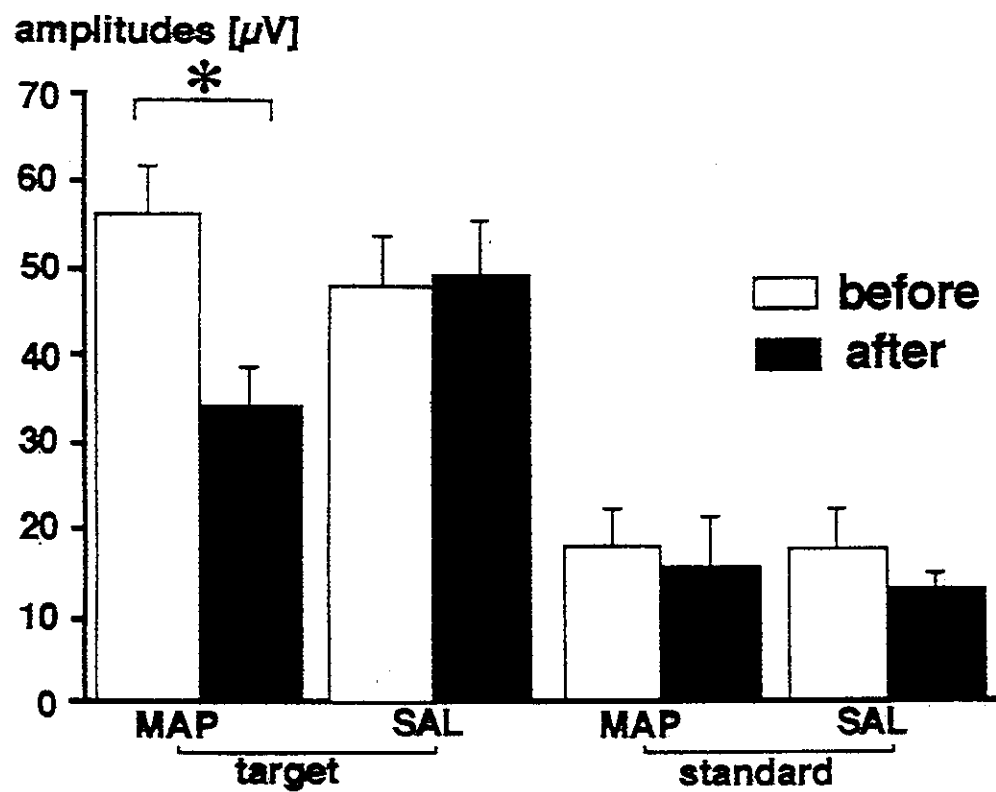
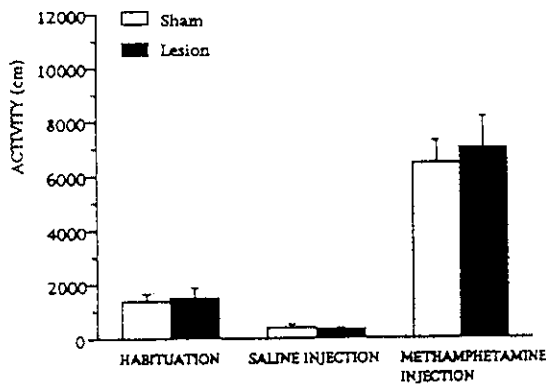


Fig. 1 ラットの P3 様電位に対する覚醒剤反復投与の効果

A: PD35



B: PD56

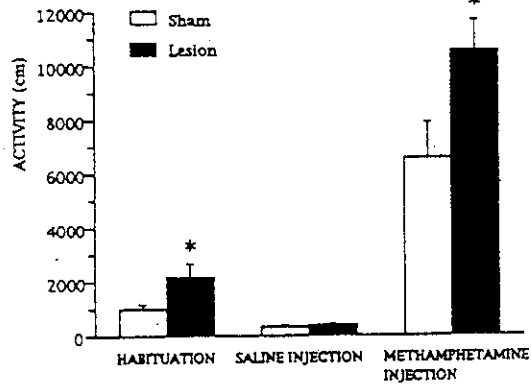


Fig. 2 Locomotor activity of control (Sham) or ibotenic acid-injected (Lesion) groups tested at PD35(A) and PD56(B). (means  $\pm$  SEM,  $n = 10$  per group). (A) At PD35, lesioned rats did not differ from sham rats at any testing condition. (B) At PD56, lesioned rats were more active than sham rats during habituation as well as after methamphetamine ( $p < .05$  post-hoc, Scheffe). \* Significant difference between lesion and sham.

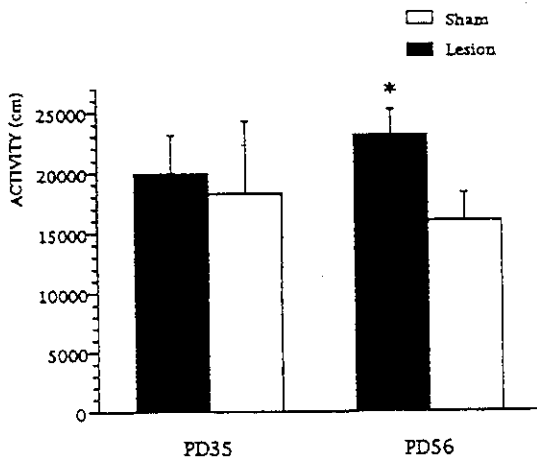


Fig. 3 Locomotor activity of sham or lesion groups after PCP injection at PD35 and PD56 (means  $\pm$  SEM,  $n = 6$  per group). At PD35, lesioned rats did not differ from sham rats. At PD56, lesioned rats were more active than sham rats ( $p < .05$ ). \* Significant difference between lesion and sham.

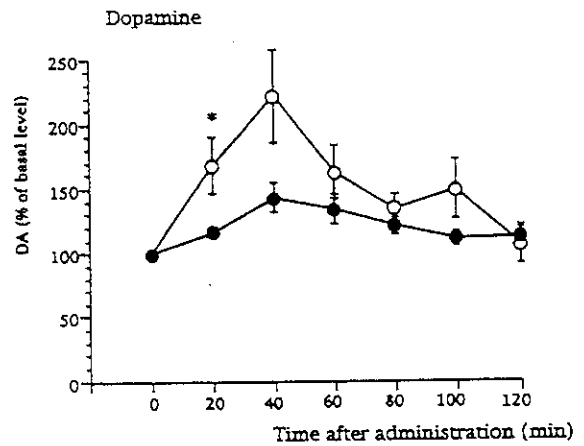


Fig. 4 The effects of PCP at 10 mg/kg, i.p. on the levels of dopamine (DA) in the nucleus accumbens dialysates from sham (O) and from lesion (●) rats. Each data point represents the mean with SEM. The asterisks indicate significant differences between lesioned and sham rats; \* :  $P < .05$

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

乱用薬物対策等に関する研究

分担研究課題：乱用薬物による脳機能障害の分子機構の解明

分担研究者 西川 徹 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第3部 部長  
研究協力者 梶井 靖、藤山 航、平岡秀一、村岡新一郎、金田小幸、海野 麻未、  
黒田安計

研究要旨：RAP-PCR（RNA arbitrarily primed PCR）法および定量的RT-PCR法を用い、ラット大脳新皮質からmethamphetamine（MAP）急性投与1時間後において、生後8日には生理的食塩水を投与した対照群と差がないが生後50日には有意な発現誘導が見られる新規転写産物、mrt（MAP responsive transcript）-1、mrt-2、mrt-3を検出した。mrt-1とmrt-3は、amphetamine類やコカインによる分裂病様症状の再発のモデルである行動感作（乱用薬物等を投与された動物の薬物反応性が高まり異常行動が起こり易くなる現象：逆耐性現象）が形成され始める生後3週頃からMAPによって発現誘導され、成熟期ではコカインにも応答したが行動感作形成を阻害するSCH23390には応答しなかった。mrt-1には複数のsplicing variantsが存在し、翻訳開始点を含む配列に対するアンチセンスオリゴマーを脳室内持続注入した動物では、MAPによる行動感作の形成が抑制されることがわかった。行動感作が成立した動物にMAPを再投与しても、mrt-1 mRNAの増加は見られなかった。以上の所見は、少なくともmrt-1およびmrt-3が乱用中枢刺激薬が引き起こす行動感作の分子機構に関与する可能性を示唆している。

A. 研究目的

本研究は乱用薬物による長期的脳機能変化の発生機序を分子レベルで解明し、新しい治療法の標的となる神経機構や、臨床診断と経過のマーカー物質を見いだすことを目的としている。乱用薬物のうちアンフェタミン類（amphetamine、methamphetamine（MAP）など）、コカインなどの中枢刺激薬を繰り返し経験したヒトや実験動物は、これらの薬物に対する反応性が長期にわたって増強し、精神分裂病（分裂病）様の幻覚・妄想（ヒト）や異常行動（実験動物）が生じ易くなる<sup>3)</sup>。この現象は、逆耐性現象あるいは行動感作（behavioral sensitization）呼ばれる<sup>3,5)</sup>。

臨床的には、薬物の再使用、アルコール、ストレスなどによって中枢刺激薬乱用者の精神症状が容易に再発する状態として観察され<sup>3,5)</sup>、予測が難しくしばしば重大な事故につながるため、鋭敏な診断法や根本的治療法の開発が医学的にも社会的にも急務となっている。そこで、本研究ではラットに見られる乱用薬物による行動感作の分子機構を検討している。

行動感作は、一度成立すると長期間持続することから、記憶・学習やキンドリングなどとともに脳の可塑性にもとづく現象であり、遺伝子および蛋白の発現変化を伴うと推測される<sup>3,5)</sup>。また、ラットやマウスでは行動感作が生後3週頃以降

に形成されるようになる点<sup>1,3,5)</sup>や、分裂病様症状を発現させる乱用薬物が小児期には精神異常を惹起しにくいこと<sup>4)</sup>に注目し、differential cloning法を用いて中枢刺激薬によって発達依存的に脳で誘導されるようになる遺伝子群を探索した。また、薬物乱用患者や分裂病における変異を調べるためにヒト相同遺伝子の同定を試みた。

## B. 研究方法

### (1)対象および薬物

動物実験には、生後8、15、23または56日令のWistar系雄性ラットを用いた。ラットは 22.0±0.5°C、湿度55%、8時より20時を明期とする明暗条件下で飼育した。

試薬は、すべて市販のものを用いた。薬物は生理的食塩水に溶解し、皮下(s.c.)あるいは腹腔内(i.p.)に注射した。対照群の動物には注射溶媒を投与した。薬物の投与量は、常にfree baseで計算した。

### (2)Differential cloning法によるMAP応答性遺伝子の検索

a)RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR)によるRNA finger printing<sup>2,8)</sup>:生後8日齢および50日齢の動物にMAPまたは生理食塩水を投与後1時間で断頭し、大脳新皮質よりtotal RNAを抽出した。random hexamer によって合成したcDNAをプレートとし、12merからなるプライマーを用いてarbitrarily primed PCRを行った。増幅産物を変性ポリアクリルアミドゲルにて分離し、Syber Green Iで染色後、蛍光イメージアナライザー (FluorImager SI, Molecular DynamicsまたはFMBIO II、TAKARA)で解析してfingerprintを得た。Fingerprint上で50日齢特異的に発現誘導が変化するcDNAバンドをクローニングし塩基配列を決定した。さらに、RAP-PCRク

ローンに基づいてoligo dT-primed cDNAをクローニングし、対応する遺伝子の構造を解析した。

b)定量的RT-PCR<sup>6,7)</sup>:fingerprintによる結果を確認するため、5~7個体のRNAサンプルのプールからrandom hexamerを用いて合成したcDNAの希釈系列を用いてRT-PCRを行い、exponentialな増幅条件下で相対的に発現量を比較した。また、各個体のサンプルにおける絶対的な発現量を検討する実験では、各個体の一定量のRNAからcDNAを合成し、既知濃度のポイントミューテーションを導入したcDNA断片をcompetitorとしてcompetitive RT-PCRを行った。増幅産物を制限酵素処理した後にアガロースゲル電気泳動し、Syber Green Iまたはethidium bromideで染色した。DNAの定量解析は染色したゲルをCCDカメラで撮影した後、densitographにて行った。

c)ノーザンブロット分析:薬物あるいは生理食塩水投与1時間後のラット(生後50日齢)の大脳新皮質、あるいは無処置ラットの脳各部位と各末梢臓器からtotal RNAを調整し、oligo dT-celluloseカラムを用いた精製によりpoly(A)-positive fractionとしてノーザンブロット分析を行った。

### (3)アンチセンスオリゴマーを用いた行動実験

mrt-1の翻訳開始コドンを含む配列に対するアンチセンスS-オリゴマー(phosphorotriphosphate型:DNAのリン酸ジエステル結合の酸素原子を一つ硫黄残基に置換修飾)を合成し、脳室内注入用チューブ付の浸透圧ミニポンプ(7日間注入用:1μl/hで溶液を放出)を用いて動物に持続的に投与した。対照群には同じ塩基組成、塩基数で配列をランダムに並べ替えたミスセンスS-オリゴマーを用いた。各オリゴマーを150mM NaClに溶解して0.5、1.0、または2.5μg/μlとして充填し、

これをpentobarbital麻酔下で皮下に装着した（注入1日目）。注入開始3～7日目の5日間に、1日1回、MAP（4.0mg/kg、腹腔内注射）または生理食塩水を反復投与し、9日目に麻酔下で浸透圧ポンプを取り出した。さらに19日間休薬した後、少量のMAP（1.6mg/kg）をチャレンジして行動変化を観察した。

### C. 研究結果

(1)RAP-PCR法と定量的RT-PCRを用い、ラット大脳新皮質からMAP急性投与1時間後において、生後8日には生理的食塩水を投与した対照群と差がないが生後50日には発現誘導が見られる新規転写産物、mrt (MAP responsive transcript) -1、mrt-2 およびmrt-3を見いだした。このうちmrt1の全長にあたるcDNAの構造を解析した結果、4種のsplicing variantsが存在することが明らかになり、mrt1 mRNAはノーザンブロットにおいて5.2kbおよび6.0kb2本の

バンドとして検出されることを確認した（Fig.1）。5.2kbのバンドは、無処置の動物の脳各部位および各末梢臓器で広範に発現していたが、6.0kbのバンドは脳各部位で認められ末梢臓器ではほとんど検出されなかった。

(2)コーディングフレームは、splicing acceptor siteの選択によって、539aaまたは526aaの2種類が存在することが示唆された。推定されるこれら2種の遺伝子産物は、C末端にのみ違いが認められた。さらに、コーディング領域から予想される蛋白質の配列の一部に対して抗体を作製したところ、脳のホモジネートを用いたウェスタンブロットにおいて対応するサイズのバンドが検出され、予想される蛋白質が発現していることが示唆された。

(3)ラット大脳新皮質のサンプルにおける定量的RT-PCRを用いた検討から、mrt1とmrt3のmRNAは、生後8および15日齢ではMAP投与群と生理食塩水を投与した対照群との間に発現量の差が認められなかったが、生後23日と50日にはMAP投与群の方が有意に高くなることがわかった。生後50日において、mrt-1はMAPだけでなくコカイン（30mg/kg、s.c.）によっても発現が誘導されるのに対してD1ドーパミン受容体アンタゴニストのSCH23390（0.1mg/kg、s.c.）投与で有意な変化を示さないことがわかった（mrt2は未検討）。MAP投与ラットの大脳新皮質におけるmrt-1 mRNAの発現誘導は、投与後1時間で最大となった（Fig.2）。

(4)浸透圧ミニポンプ法で脳室内に150mM食塩水やミスセンスS-オリゴマーを持続注入した動物では、MAPを反復投与すると少量のMAPに対する感受性が高まって異常行動が生じやすくなる行動感作（逆耐性現象）が生じた。これに対して、mrt-1の翻訳開始点を含む領域のアンチセ

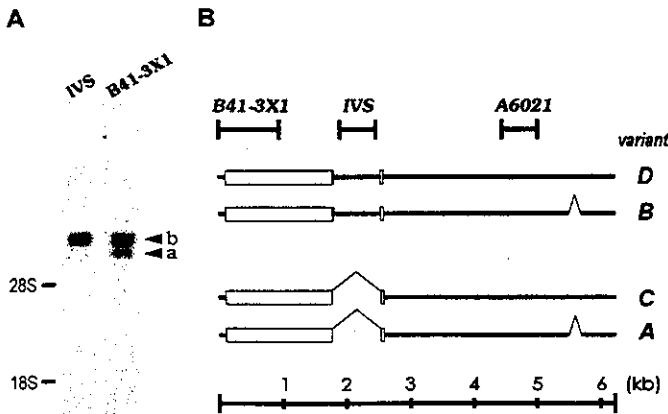


Fig. 1 MAP投与1時間後のラット大脳新皮質におけるmrt-1の発現。A：IVS（左）またはB41-3X1（右）に対するプローブを用いたノーザンブロット分析。B：cDNAの塩基配列から推測されるmrt-1の構造の模式図。4種のsplicing variantsのうちB・Dはノーザンブロットのbに、A・Cはaのバンドに含まれると考えられる。

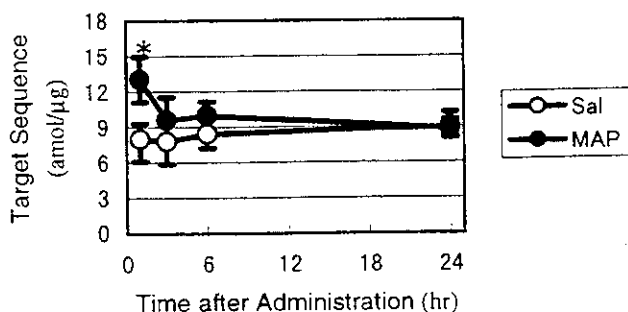


Fig. 2 MAP (●) または生理食塩水 (○) 投与ラットの大脳新皮質におけるmrt-1発現の経時的変化. 主としてFig. 1に示したB・Dの発現を反映している.

ンスオリゴヌクレオチドを注入した動物では、行動感作が形成され難かった。

(5) mrt-1 mRNAのラット大脳皮質における基礎的な発現量は、MAPの反復投与(1日一回4mg/kg腹腔内投与)後14日において生理食塩水反復投与群に比して有意に上昇していた (Fig.3)。この時点でMAP (1.6mg/kg) を再投与すると、生理食塩水前処置群ではmrt-1 mRNAの発現が増加したのに対して、MAP前処置群においては発現誘導が認められなかった (Fig.3)。

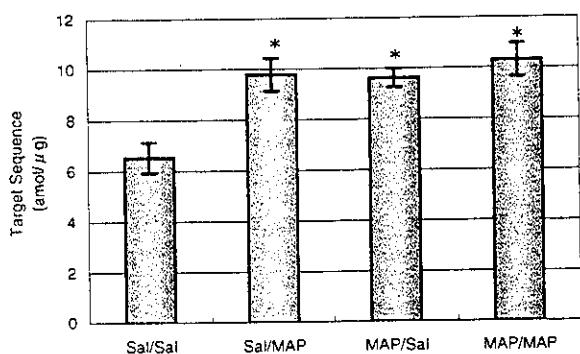


Fig. 3 MAPまたは生理食塩水 (SAL) 反復投与ラットにおけるMAP再投与時のmrt-1発現. SAL/SAL: SAL反復・SAL再投与、SAL/MAP: SAL反復・MAP再投与、MAP/SAL: MAP反復・SAL再投与、MAP/MAP: MAP反復・MAP再投与. 説明は本文参照.

(6) mrt-1のヒト相同遺伝子が存在することがわかり構造解析を進めている。

#### D. 考察

行動感作は、特定の発達時期を過ぎないと獲得されない<sup>1,3,5</sup>)。したがって、行動感作を引き起こす薬物に対する脳の情報処理が発達とともに変化する部位と一定になる時期を知ることができれば、その脳部位で当該時期に行動感作を誘導する薬物に対する反応が成熟する因子を検索することによって、行動感作の形成に係わる分子にアプローチできる可能性がある。

従来の私たちの研究により、ラットでは、MAPやコカイン投与後における脳の神経活動が発達とともに大脳新皮質で著明に変化し、生後3週以降に成熟期のパターンになることが明らかになった<sup>4,5</sup>)。この現象は、少なくとも大脳新皮質に行動感作と密接に関係する情報処理機構が存在することを示唆している。本研究では、RAP-PCR法により、実際にラット大脳新皮質から生後発達とともにMAPに対する応答性を獲得する新規遺伝子転写産物mrt1、mrt2およびmrt3が検出されたため、これらと行動感作との関連を検討した。

mrt1とmrt3について、MAPに対する反応性の生後発達を調べると、行動感作の形成が始まる時期が含まれる生後15日と23日の間に発現誘導が認められるようになることがわかった。また、50日齢のラットの大脳新皮質において、MAPとともに行動感作を引き起こすことが確立されているコカイン<sup>3,5</sup>)を投与した場合にも発現量が増加することや、これらの薬物と併用投与すると行動感作の成立を阻害するD1受容体アンタゴニストSCH23390単独ではほとんど変化しないことも、mrt-1およびmrt-3と行動感作との関係を支

持している。

さらにmrt-1の翻訳開始コドンを含む配列に対するアンチセンスオリゴマーを脳室内に持続的に注入したラットでは、MAPを反復投与しても休薬後MAP再投与時の異常行動の増強がはっきりしないことは、MAPが誘導したmrt-1 mRNAから翻訳された蛋白が、行動感作形成に必要な分子カスケードに含まれている可能性を示唆している。MAPによるmrt-1発現の時間経過を観察した実験では投与1時間後にピークが見られることから、mrt-1は行動感作形成の初期過程に関与すると推測される。これらの点から観ると、MAP反復投与により既に行動感作が成立した動物の大脳新皮質ではMAPを再投与してもmrt-1 mRNA量が増加しない現象は興味深い。一方、大脳新皮質のmrt-1の基礎的発現量は休薬2週間後では、MAP反復投与群の方が生理食塩水反復投与群より高かった。したがって、mrt-1が行動感作の維持にも関与する可能性もあり、今後、この持続的上昇のメカニズムを調べる予定である。また、薬物依存、分裂病をはじめとする精神障害におけるmrt-1の意義を検討するため、現在、ヒト相同遺伝子の同定を進めている。

#### E. 結論

乱用薬物による脳機能障害の分子機構にアプローチするため、amphetamine類やcocaine乱用薬物による分裂病様幻覚・妄想状態の再発モデルである行動感作に関係する遺伝子群を探索した。行動感作がラットでは生後3週以降に形成されることに注目し、RAP-PCR法を用い、ラット大脳新皮質から発達依存的にMAPへの応答を獲得する3種の新規遺伝子転写産物mrt1、mrt2およびmrt3を同定した。mrt1については、全長の塩基配列と複数の

splicing variantsが存在することを明らかにし、MAPによる発現誘導は投与後1時間頃がピークになることが観察された。mrt1とmrt3はMAPによって行動感作が形成され始める発達時期以降にMAPで誘導され(mrt2は未検討)、コカインによっても発現が増加するが、行動感作形成を抑制するD1アンタゴニストSCH23390には反応しなかった。mrt-1の翻訳開始コドンを含む配列に対するアンチセンスオリゴマーを脳室内に持続注入したラットでは、MAPによる行動感作の形成が阻害された。既に行動感作が成立したラットにMAPまたはコカインを投与してもmrt-1の有意な発現誘導は認められなかった。以上の結果は、少なくともmrt-1およびmrt-2と行動感作形成との関連を支持している。

#### [参考文献]

- 1) Fujiwara Y, Kazahaya M, Nakashima M. et al.: Behavioral sensitization to methamphetamine in the rat: an ontogenic study. *Psychopharmacol.* 91: 316-319, 1987.
- 2) 西川 徹、海野麻未、梶井 靖、橋本隆紀、戸田重誠、佐藤大輔、平岡秀一、掛山正心：分裂病の成因は薬理・生化学的アプローチから解明されるか *精神科治療学* 12:617-623, 1997.
- 3) Liang P and Pardee AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971, 1992.
- 4) 西川徹、橋本隆紀. 生体におけるシナプス可塑性—薬物依存. *Clinical Neuroscience* 15:1158-1161, 1997.
- 5) Nishikawa T, Umino A, Kashiwa A et al.: Stimulant-induced behavioral sensitization and cerebral neurotransmission. In *Neurotransmitters in neuronal plasticity and psychiatric disorders*, pp. 53-62, Excerpta Medica, Ltd.

Tokyo, 1993.

6) Siebert PD, Larrick JW: PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques* 14:244-9, 1993.

7) Striker LJ, Peten EP and Striker GE: Analysis of gene expression by PCR: a quantitative approach. In: *Gene probes* (ed. by Hames BD and Higgins SJ), pp.245-265, Oxford University Press, New York, 1995.

8) Welsh J, Chada K, Dalal SS, et al.: Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* 20:4965-4970, 1992

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Umino A, Takahashi K and Nishikawa T: Characterization of phencyclidine-induced increase in prefrontal cortical dopamine metabolism in the rat. *Br J Pharmacol*, 124: 377-385, 1998,

2) Hashimoto T, Kajii Y and Nishikawa T: Psychotomimetic-induction of tissue plasminogen activator mRNA in the corticostriatal neurons in the rat. *Eur J. Neurosci*, 10:3387-3399, 1998.

3) Saigoh K, Matsui K, Takahashi K, Nishikawa T and Wada K: The stereospecific effect of D-serine ethylester and D-cycloserine in ataxic mutant mice. *Brain Res*, 808: 42-47, 1998.

4) Haradahira T, Sasaki S, Maeda M, Kobayashi K, Inoue O, Tomita U, Nishikawa T and Suzuki K: Synthesis and brain distribution of carbon-11 labeled analogs of antagonists for the NMDA receptor coupled PCP-binding site. *J Labelled Cpd Radiopharm* XLI, 843-858, 1998.

5) Sasaki S., Ishibashi N., Kuwamura T., Sano H., Matoba M., Nishikawa T. and

Maeda M: Excellent acceleration of Diels-Alder reaction by microwave irradiation for the synthesis of new fluorine-substituted ligands of NMDA receptor. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 8: 2983-2986, 1998.

6) 西川 徹: 抗精神病薬抵抗性分裂病症状の分子機構へのアプローチ 特集『情動・意欲の神経機構とその病態』、*脳の科学* 20: 781-788, 1998.

7) 西川 徹: 内因性精神病 特集『症候・病態の分子メカニズム』 *Molecular Medicine*, 35: 臨時増刊 569-570, 1998.

8) 久住一郎、小山 司、西川 徹: 分子変異から生ずるてんかん 特集『知能・行動・こころを左右する遺伝子』 *Molecular Medicine*, 35: 1452-1461, 1998.

9) 海野麻未、西川 徹: c-Fos蛋白 臨床精神医学 27: 1303-1305, 1998.

10) 黒田安計、西川 徹: 精神分裂病の生物学専門医のための精神医学レビュー '98-最新主要文献と解説- (風祭 元監修) 総合医学社、東京、pp. 13-19, 1998.

11) 黒田安計、濱村貴史、西川 徹: 抗精神病薬の作用機序 「精神分裂病と気分障害の治療手順-薬物療法のアルゴリズム-」 (佐藤光源、樋口輝彦編) 星和書店、東京、pp. 141-155, 1998.

12) 山本直樹、西川 徹: d フェンサイクリジン、12 他の薬物依存と脳障害、臨床精神医学講座 第8巻 薬物・アルコール関連障害、中山書店、東京、印刷中

### 2. 学会発表

#### a. 特別講演, シンポジウム

1) 西川 徹: 精神疾患とグルタミン酸-グルタミン酸と病態・疾患-, 第2回神経伝達物質研究会「グルタミン酸最新の話題」, 東京, 8. 22, 1998.

2) 西川 徹、梶井 靖、平岡秀一、藤山 航、佐藤大輔、戸田重誠、金田



小幸、海野麻未、黒田安計：精神分裂病の脳内情報処理障害の分子機構—薬理的モデルを用いたアプローチ—、第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会シンポジウム「精神疾患の分子メカニズム」、東京, 9. 21-23, 1998.

3)西川 徹、海野麻未、平岡秀一、金田小幸、土田英人、岩間久行、梶井 靖、山本直樹、黒田安計：精神分裂病とNMDA受容体、第9回高次脳機能障害シンポジウム「創薬基盤としての神経科学は、今」、京都, 10. 29-30, 1998.

4)西川 徹：分裂病の分子メカニズムへのアプローチ、第14回札幌神経科学研究会, 札幌, 11. 6, 1998.

5)西川 徹：分裂病への分子薬理的アプローチ、第14回横浜分裂病研究会, 横浜, 11. 26, 1998.

b. 一般学会

1)梶井 靖、平岡秀一、藤山 航、戸田重誠、金田小幸、海野麻未、西川 徹：発達段階依存的にメタンフェタミンに应答する新規遺伝子*mrt1*のラット脳における発現、第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, 東京, 9. 21-23, 1998

2)戸田重誠、梶井 靖、金田小幸、海野麻未、佐藤光源、西川 徹：Pnut/Septin-like Protein 遺伝子の成熟ラット脳における発現、第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, 東京, 9. 21-23, 1998

メタンフェタミン精神病における  
シナプス再構築に関する実験的研究  
- arc遺伝子発現の変化から -

分担研究者 氏家 寛<sup>a</sup>

共同研究者 児玉匡史<sup>b</sup>、高木 学<sup>a</sup>、  
武久 康<sup>a</sup>、黒田重利<sup>a</sup>

<sup>a</sup>岡山大学医学部神経精神医学教室

<sup>b</sup>福山友愛病院

#### [研究要旨]

ラット脳における methamphetamine (METH) 急性および慢性反復投与による activity-regulated cytoskeleton-associated protein (arc) mRNA の変化を、In situ hybridization法を用いて検討した。脳各部位でMETH (4mg/kg) 投与後30分もしくは1時間後から arc mRNAは有意に増加し始め、3時間後まで持続し、6時間後には定常状態まで戻った。脳部位によって増加の程度とピークの時間が異なった。大脳皮質では arc mRNAはMETH投与1時間後をピークに著明な増加を示した。線条体ではより早く、海馬ではより遅くピークを示し、その増加の程度も少なかった。Arc mRNAの発現は、大脳皮質ではIV層とVI層にあり、線条体では中型細胞に見られた。0.5mg/kg SCH 23390あるいは0.25mg/kg MK-801の前投与により、線条体でのMETHによる arc mRNAの発現増加はほぼ完全に抑制されたが、皮質では部分的抑制であった。慢性投与実験ではMETH反復投与後のMETH再投与によりMETH急性投与後と同様の反応が見られた。Arcは細胞骨格関連蛋白の一つであり神経細胞樹状突起に限局して存在することが知られている。従って、本研究の結果から arcがMETHによる逆耐性現象を含む神経可塑性に重要な役割を担っていることが示唆された。

#### A. 目的

Amphetamine (AMPH) やMethamphetamine (METH) といった神経刺激物質の乱用により妄想型精神分裂病に類似した精神病状態が形成される<sup>1)</sup>。一度精神病が形成されると、断薬により軽快しても、少量の神経刺激物質の再使用や非特異的ストレスによって容易に再燃する<sup>1)</sup>。一方、実験動物に見られる逆耐性現象は、AMPHやMETHを反復投与することによって次第に行動が変化する現象として知られている。この動物モデルは、神経刺激物質による精神病の解明に大きな役割を演じてきた。逆耐性現象では、長期に渡って薬物反応性の亢進が持続することが知られており、その現象には中枢神経の可塑性が関与していると考えられている。可塑性には種々のものがあるが、逆耐性現象ではその長期持続性からシナプス再構築を含む解剖学的変化を伴う可塑性が生じていると推定される。これには新たな蛋白合成を必要とし、一群の遺伝子の発現変化が生じていると考えられる。その候補の一つとして、これまで最初期遺伝子が多く検討されてきた。

最初期遺伝子は二つのグループに分けられる。一つは特定の塩基配列に結合し遺伝子発現を制御する転写制御因子であり、もう一つは細胞質において直接細胞機能に関わる蛋白をコードするものである。後者にはplasminogen activator、rheb、Ras-related protein、cyclooxygenase-2などが含まれる。これまでに、METH逆耐性現象と転写制御因子としての最初期遺伝子に関する研究は多くあるが、後者に関したものはない。

神経刺激に応答して発現する最初期遺伝子として、電気けいれん後のラット海馬から activity-regulated cytoskeleton-associated protein (arc)が同定された<sup>2)</sup>。これはarg 3.1とも呼ばれている<sup>3)</sup>。その蛋白は396アミノ酸からなると予想され、細胞骨格蛋白であるspectrinと最も近い相同性を持つ。Arcは細胞質、樹状突起の細胞蛋白に作用し、直接、細胞機能に関与していると考え

えられている。Fosnaughら<sup>2)</sup>はコカイン投与により、線条体で一過性にarc mRNAが増加することを報告している。更にその増加はドーパミンD<sub>1</sub>受容体阻害薬の前投与により抑制される。このことはarcが神経刺激物質による神経可塑性の形成に重要な役割を担っていることを示唆していると思われる。

これまでに、METH投与によるarcの変化に関する報告はない。そこで今回我々は、METH急性あるいは慢性投与によるラット脳内でのarc mRNAの変化をin situ hybridization法で検討した。

## B. 方法

### 1. 対象

Sprague-Dawley系雄性ラット（体重220-240 g）を用いた。全てのラットには、各実験に先だって、1日1回約3分のハンドリングを1週間施した。

### 2. 薬物処置

Northern blot analysisにはMETH 4mg/kgあるいは同量の生理食塩水（SAL）を単回腹腔内投与し、1時間後に断頭した。

時間的変化を知るための実験では、METH 4mg/kgを腹腔内投与し、30分、1時間、3時間、6時間、24時間後に断頭した（n=5あるいは6）。

薬理的検討として、ドーパミンD<sub>1</sub>受容体遮断薬であるSCH 23390、またはNMDA受容体遮断薬であるMK-801を用いた。METH投与の30分前にSCH 23390 0.5mg/kg、またはMK-801 0.25mg/kg、または生食を腹腔内投与し、METH 4mg/kgあるいは生食投与1時間後に断頭した。つまり、SCH-METH群（SCH 23390前処置後METH再投与）、SCH-SAL群、MK-METH群、MK-SAL群、SAL-METH群、SAL-SAL群の6群である（n=6あるいは8）。

METH慢性投与実験では、METH 4mg/kgまたは同量の生食を1日1回14日間連続腹腔内投与した。21日間の断薬期間をおき、断頭3時間前にMETH4mg/kgあるいは生食を再投与した。つまりMM群（METHを慢性投与してMETHを再投与）、MS群、SM群、SS群の4群（n=7）である。

### 3. オリゴヌクレオチドプローブの作成

ラットarc mRNAの3'側非翻訳領域（2188-2232塩基）に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを作成した。配列は5'-GGCAGCTTCAAGA-GAGGAGGGGACGGTGCTGGTGCTGGGGTGTA-3'である。Genbankでの相同性検索では、この塩基配列と他の遺伝子との類似はなかった。in situ hybridizationにおけるプローブの特異性を調べるため、50倍量の非標識プローブが標識シグナルを完全に抑制することを確認した。

### 4. Northern blot analysis

オリゴヌクレオチドプローブの特異性を確認するためNorthern blot analysisを行った。ラット全脳からISOGEN（Nippongene）を用いたtotal RNAを抽出。RNA 10 µgを1%アガロースゲル（2.2 M formaldehyde, 20 mM MOPS buffer, pH 7.0）で4℃、80V、4時間、電気泳動した後、RNAをナイロンメンブラン（Hybond N+、Amersham）へトランスファーした。ハイブリダイゼーションは、SSPE buffer、0.5% SSC、50% formamide、5 x Denhardt's solution、100 µg/ml denatured salmon sperm DNA、10<sup>6</sup> cpm/mlの<sup>32</sup>P標識プローブを含むバッファーで42℃、over night行った。プローブはOligonucleotide 3'-end labeling system（Du Pont-NEN）を用い<sup>32</sup>P dATPで標識した。洗いは以下の条件で行った。5 x SSPE、0.1% SDS、室温、15分を1回、1 x SSPE、0.1% SDS、室温、15分を2回、0.1 x SSPE、0.1% SDS、室温、15分を1回、0.1 x SSPE、0.1% SDS、60℃、15分を1回。X線フィルムに1週間暴露した。

## 5. In situ hybridization

取り出したラット脳は直ちにドライアイス粉で凍結した後、10  $\mu$ mの冠状断切片を作成した。切片を4%パラフォルムアルデヒドで固定。0.25% acetic anhydride/0.1 M triethanolamine/0.9% NaClで10分アセチル化後、段階希釈したエタノールで脱水。各切片は $10^6$  cpmの $[^{35}\text{S}]$ ラベルされたプローブを含む100  $\mu$ lのハイブリダイゼーションバッファー (40% deionized formamide, 0.6 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, 125  $\mu$ g/ml salmon sperm DNA, 250  $\mu$ g/ml yeast tRNA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1.2 mg/ml heparin, 0.1 M dithiothreitol) で覆被。オリゴヌクレオチドプローブは3'端をOligonucleotide 3'-end labeling system (Du Pont-NEN) を用い、 $[^{35}\text{S}]$ dATPで標識し用いた。切片は湿箱で37  $^{\circ}\text{C}$ 、over night インキュベートし、2x SSC、55  $^{\circ}\text{C}$ 、15分洗浄を4回繰り返した。段階希釈したエタノールで脱水、乾燥。各群すべての個体に対する切片及び10段階に希釈した $[^{35}\text{S}]$ dATPを含む10  $\mu$ mに薄切した脳ペーストをスタンダードとして、同一のX線フィルム (Hyperfilm- $^3\text{H}$ , Amersham) に4週間、感光させた。その後、切片は乳剤 (Hypercoat LM-1, Amersham) 覆被し8週後現像し、さらにニッスル染色を施した。フィルムから左右の線条体、前頭葉皮質、帯状回皮質、眼窩回皮質、頭頂葉皮質、海馬のCA1錐体細胞層の各部位のoptical densityを読み取り、スタンダードを基に定量結果をcpm/mg tissueに変換した。

## 6. 統計処理

one-way ANOVA、下位検定にFisher's testを用いて解析を行い、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

## C. 結果

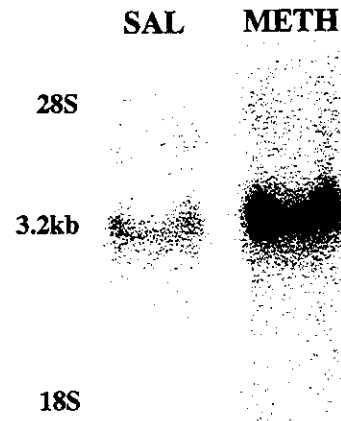


Fig.1 ラット脳のarc mRNA Northern blot analysis. METH (4mg/kg) あるいは生食投与後1時間。

### 1. Northern blot analysis

Northern blot analysisの結果、過去のarcの報告と一致した3.2kbのバンドが認められた<sup>8)</sup>。Arc mRNAは生食投与1時間後では極わずかの発現しか認められなかったが、METH投与後では強く発現が誘導されていた。(Fig. 1)

### 2. METH急性投与後の時間経過

METH急性投与の効果をFig.2に示す。定量したいずれの脳部位でも30分から1時間後にarc mRNAは増加を始めた。3時間後までその増加は持続し、6時間後には定常レベルに戻った。前頭葉皮質、眼窩回皮質、頭頂葉皮質に最も強いarc mRNAの発現を認めた。フィルムオートラジオグラフィと同一切片のニッスル染色をコンピュータ上で合成すると、頭頂葉皮質ではIV、VI層に局限しarc mRNAが強く発現していた (Fig. 3A)。帯状回皮質、海馬 (特にCA1)、線条体にも中等度の発現が見られた。線条体では外側よりも内側により強い発現が見られた。マイクロオートラジオグラフィでは、線条体のシグナルは主に中型細胞に見られ、グリア細胞には認められなかった (Fig. 3 B, C)。Arc mRNAの発現のピークは線条体では30分、大脳皮質の各部