

Fig.2 METH単回投与後arc mRNA変化。4mg/kg METH腹腔内投与後、0.5、1、3、6、24時間後断頭 (n=5あるいは6)。各数値は平均±標準誤差で表示。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

位では1時間後であった。一方、海馬CA1領域ではそのピークは3時間後まで続いていた。側坐核での発現は弱く、扁桃、黒質、腹側被蓋野での発現はほとんど見られなかった。注射の非特異的影響を知るための予備的実験では、生食投与後の各脳部位で、定常状態に比較しわずかにarc mRNAの発現増加が見られたのみであった。

3. SCH 23390の前投与の効果

Fig. 4にSCH 23390前投与の、METHによるarc mRNA発現に対する効果を示す。各脳部位の4群間で有意差が見られた。F_{3,24}=10.717、p=0.0001 線条体；F_{3,24}=28.801、p<0.0001 前頭葉皮質；F_{3,24}=30.371、p<0.0001 帯状回皮質；F_{3,24}=22.298、p<0.0001 眼窩回皮質；F_{3,24}=22.468、p<0.0001 頭頂葉皮質 (one-way ANOVA、Fig. 5)。SCH 23390前投与のみ (SCH-SAL群) では生食投与 (SAL-SAL群) との差はなかった。SCH 23390前投与による抑制率を以下のように計算した。[(SAL-METH) - (SCH-METH)] / [(SAL-METH) - (SAL-SAL)] x 100 (%)。0.5mg/kg SCH 23390の前投与はMETHによるarc mRNAの増加を前頭葉皮質で

33.1%、眼窩回皮質で39.3%、頭頂葉皮質で43.7%、線条体で95%抑制した。線条体ではSAL-SAL群とSCH-METH群間、あるいはSCH-SAL群とSCH-METH群間に有意差を認めなかったが、その他の部位ではSAL-SAL群、SCH-SAL群よりもSCH-METH群で有意に高かった。

4. MK-801の前投与の効果

Fig. 6にMK-801前投与の、METHによるarc mRNA発現に対する効果を示す。各脳部位の4群間で有意差が見られた。F_{3,24}=10.688、p=0.0001 線条体；F_{3,24}=20.826、p<0.0001 前頭葉皮質；F_{3,24}=30.371、p<0.0001 帯状回皮質；F_{3,24}=24.789、p<0.0001 眼窩回皮質；F_{3,24}=16.698、p<0.0001 頭頂葉皮質 (one-way ANOVA、Fig. 7)。MK-801前投与のみ (MK-SAL群) では生食投与 (SAL-SAL群) との差はなかった。0.25mg/kg MK-801の前投与はMETHによるarc mRNAの増加を前頭葉皮質で45.8%、帯状回皮質で39.7%、眼窩回皮質で63.8%、頭頂葉皮質で41.8%、線条体で105.1%抑制した。線条体ではSAL-SAL群とMK-METH群間、あるいはMK-SAL群とMK-METH群間に有

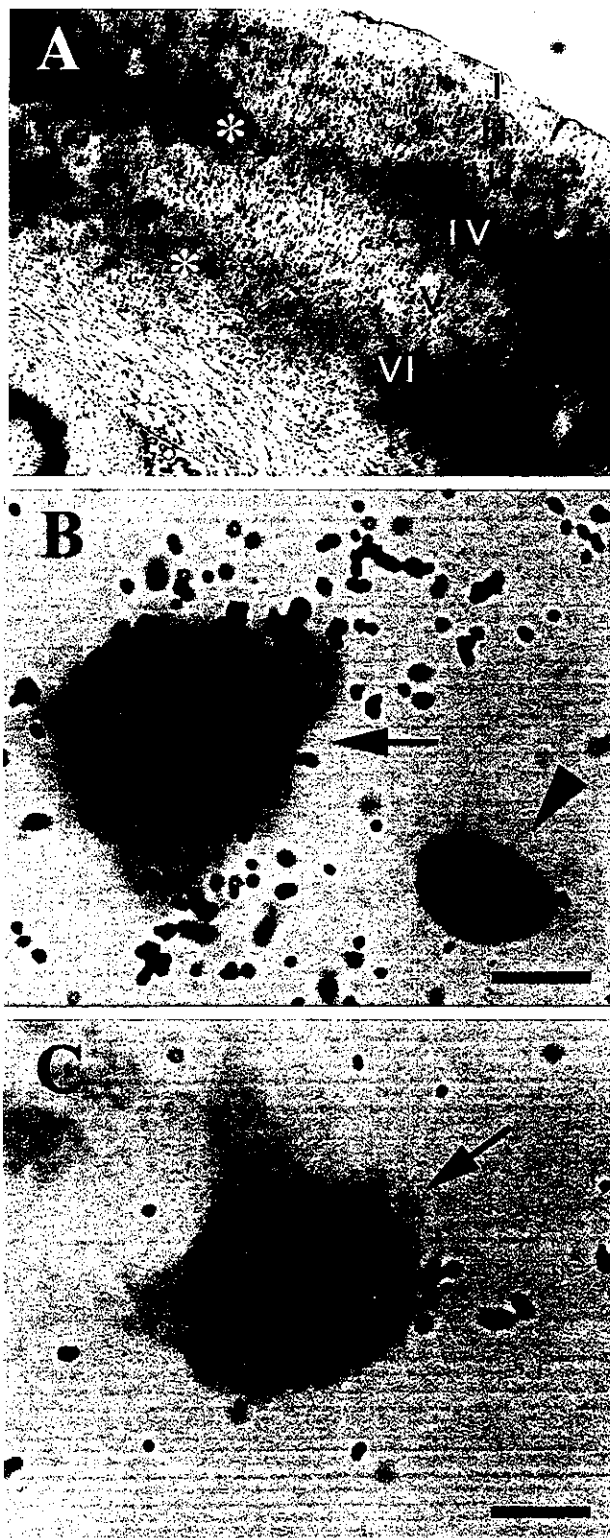


Fig.3. フィルムオートラジオグラフィーを同一切片Nissl染色に合成 (A)。Arc mRNAは頭頂葉皮質第IV層と第VI層に一致して存在 (*)。Scale bar=500 μ m。4mg/kg METH (B) あるいは生食 (C) 投与後のマイクロオートラジオグラフィー。矢印は中型細胞を、矢頭はグリアを示す。Scale bar=5 μ m。

意差を認めなかったが、その他の部位ではSAL-SAL群、MK-SAL群よりもMK-METH群で有意に高かった。

5. METH慢性投与の影響

METH慢性投与と、3週間の断薬期間後の再投与のarc mRNA発現に対する効果をFig. 8、9に示す。各脳部位の4群間で有意差が見られた。F3,24=36.552、 $p<0.0001$ 線条体；F3,24=48.472、 $p<0.0001$ 前頭葉皮質；F3,24=26.208、 $p<0.0001$ 帯状回皮質；F3,24=24.439、 $p<0.0001$ for 眼窩回皮質；F3,24=57.712、 $p<0.0001$ 頭頂葉皮質；F3,24=23.193、 $p<0.0001$ 海馬CA1。定量した全ての脳部位でMETH急性投与後 (SM群) は生食投与群 (SS群) に比較し有意にarc mRNAが増加していた。線条体ではMETH慢性投与後生食再投与群 (MS群) で、生食慢性投与後生食再投与群 (SS群) に比較し有意に ($p=0.0075$) 増加していたが、他の脳部位では有意差を認めなかった。METH慢性投与後METH再投与群 (MM群) は生食慢性投与後METH再投与群 (SM群) に比較し、前頭葉皮質 ($p=0.0175$)、頭頂葉皮質 (0.0008)、海馬CA1領域 (0.0096) で有意に増加を認めた。

D. 考察

今回の研究によって、METHの急性投与がラット線条体、前頭葉皮質、帯状回皮質、眼窩回皮質、頭頂葉皮質、海馬CA1領域のarc mRNA発現を著明に増強することを初めて示した。Genbankに登録されているアミノ酸配列の中で、予想されるarc蛋白と最も近い相同性を持つものは、細胞骨格蛋白である α -スペクトリンである⁸⁾。これまで

SAL-SAL SAL-METH SCH-SAL SCH-METH

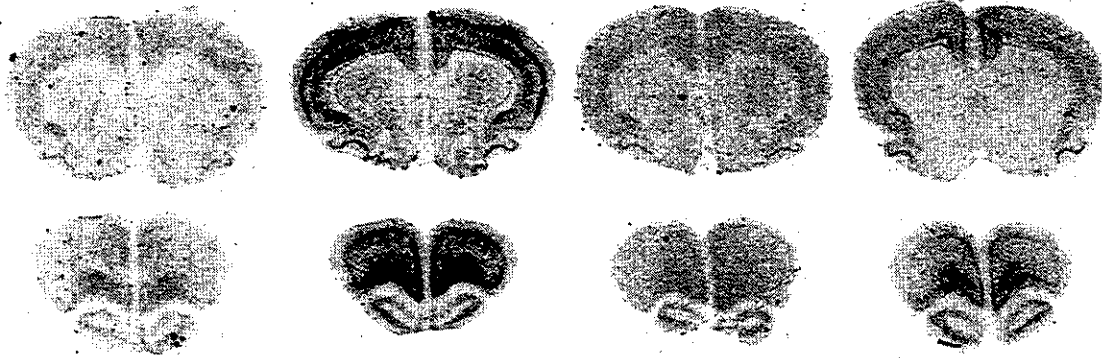


Fig.4 METHによるarc mRNA発現に対するSCH 23390の効果。生食あるいはSCH 23390 (0.5mg/kg) 前投与後30分、生食あるいはMETH (4mg/kg) 投与。その後1時間で断頭。

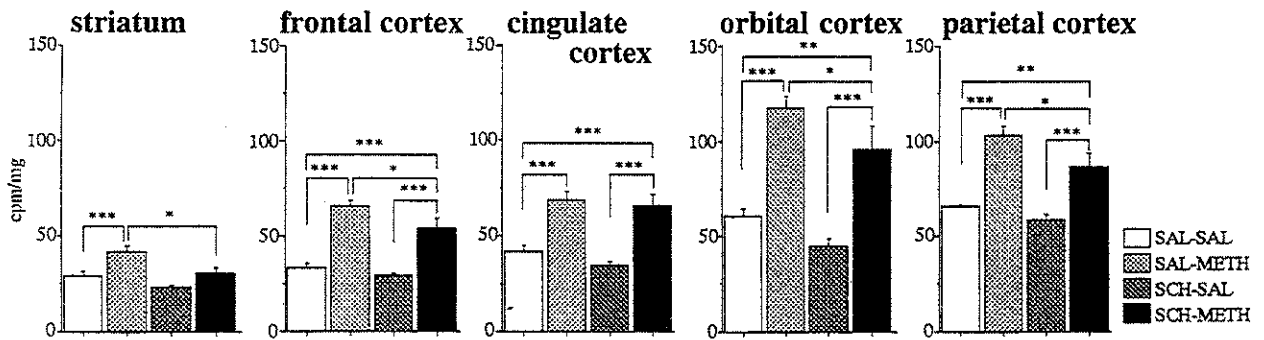


Fig.5 SCH 23390 (0.5mg/kg) 前投与のarc mRNA発現に対する効果の定量結果。生食あるいはSCH 23390 (0.5mg/kg) 前投与後30分、生食あるいはMETH (4mg/kg) 投与。その後1時間で断頭 (n=6あるいは8)。各数値は平均±標準誤差で表示。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

SAL-SAL SAL-METH MK-SAL MK-METH



Fig.6 METHによるarc mRNA発現に対するMK-801の効果。生食あるいはMK-801 (0.25mg/kg) 前投与後30分、生食あるいはMETH (4mg/kg) 投与。その後1時間で断頭。

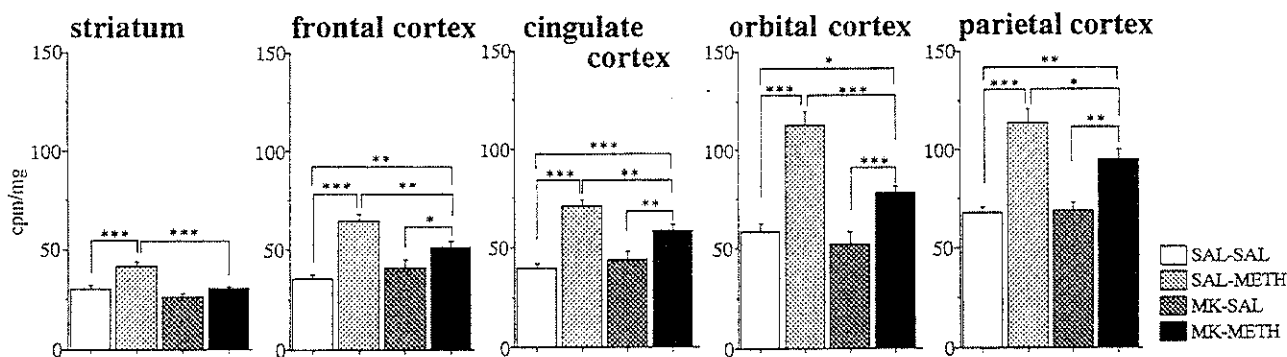


Fig.7 MK-801 (0.25mg/kg) 前投与のarc mRNA発現に対する効果の定量結果。生食あるいはMK-801 (0.25mg/kg) 前投与後30分、生食あるいはMETH (4mg/kg) 投与。その後1時間で断頭 (n=6あるいは8)。各数値は平均±標準誤差で表示。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

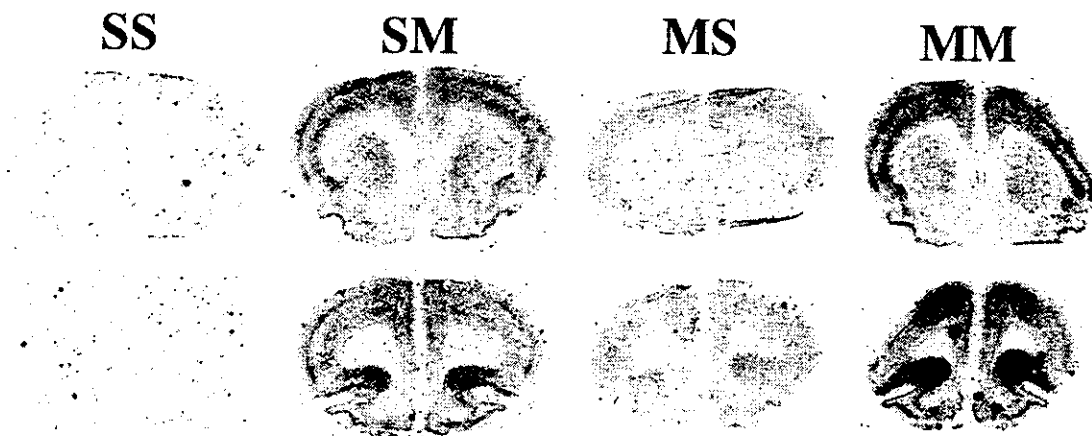


Fig.8 METH慢性投与と断薬期間後の再投与によるarc mRNA発現の変化。METH (4mg/kg) あるいは生食14日間連続投与。21日間の断薬後、METHあるいは生食投与3時間後断頭。METH慢性投与後METH再投与 (MM群)、生食再投与 (MS群)、あるいは生食慢性投与後METH再投与 (SM群)、生食再投与 (SS群)。

に報告のあるラット α -スペクトリンオリゴヌクレオチドプローブ³⁾を用いた我々の予備的実験では、METH急性投与は α -スペクトリンmRNAを変化させなかった。このことは他の細胞骨格蛋白と異なり、arcの発現は神経細胞刺激に反応し調整されていることを示唆する。さらに、生食投与後のarc mRNA量がMETH投与後のそれに比較し、はるかに少ないことは、arc発現が神経活動に依存していることを示す。

薬理的検討のため、これまでにMETHによる逆耐性現象形成を阻止することの知られている2種類の薬剤^{6,13)}、SCH 23390 (ドーパミンD₁受容

体遮断薬)とMK-801 (非競合的NMDA受容体遮断薬)を用いた。その結果は以下のように要約される。(1) 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arc mRNA発現の増強が完全に押さえられた。

(2) 大脳皮質の各部位では有意ではあるが、部分的抑制であった。SCH 23390により線条体でのMETH投与後のarc mRNA増加が抑制されることは、コカイン投与後のarc mRNA発現がD₁受容体遮断によって抑えられることと一致する²⁾。本研究で初めて、MK-801がMETH投与後のarc mRNA増加を抑制することを示した。最近の報告によると線条体中型細胞においては、D₁/D₂受

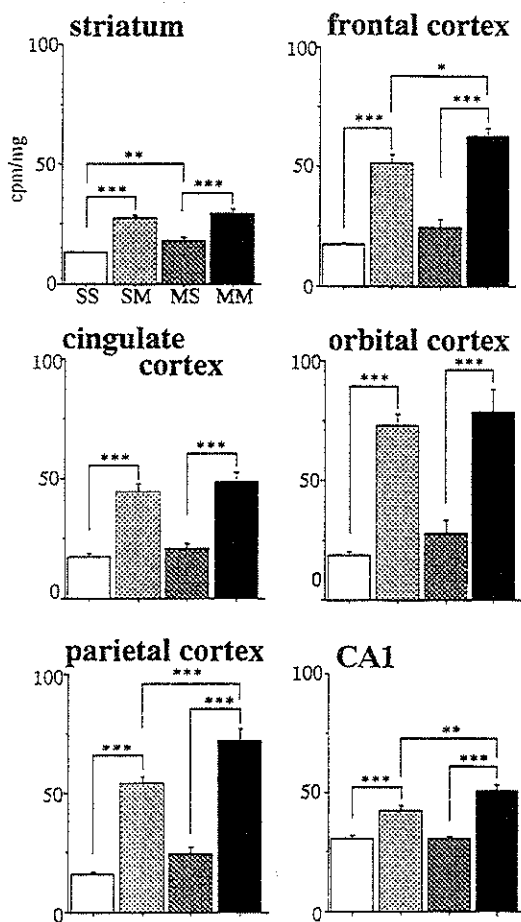


Fig.9 METH慢性投与と断薬期間後の再投与によるarc mRNA発現の定量結果 (n=7)。各数値は平均±標準誤差で表示。*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001。

容体とイオノトロピックな興奮性アミノ酸受容体はあらゆる組み合わせで存在するという¹¹⁾。これはarc mRNAの発現にD₁受容体とNMDA受容体が協調して作用していることを示唆する。このことは他の最初期遺伝子であるzif/268の精神刺激薬による線条体、大脳皮質の発現増強が、D₁あるいはNMDA受容体阻害によって抑制されることと共通している^{15,16)}。

前頭葉におけるD₁受容体の分布はよく知られている。D₁受容体は第VI層に主に分布し、それはmesocorticalなドーパミンニューロンの投射先

に一致する。D₁受容体を持つニューロンの詳細な検討によると、そのいくつかは錐体細胞とシナプスを持つ非錐体細胞である¹⁴⁾。本研究で大脳皮質のarc mRNAの分布は第IV層と第VI層に存在することが分かった。従って、前頭葉でのドーパミン放出を増加させるMETH急性投与⁹⁾によって、直接D₁受容体依存性に、大脳皮質でのarc mRNA発現が増強されると考えられる。もう一つの可能性として、行動量の増加による間接的な影響のため大脳皮質のarc mRNAが増加することが考えられる。4mg/kgのMETH急性投与は活動量増加と常同行動を引き起こす¹³⁾。今回、Arc mRNAが強く発現した頭頂葉皮質は体性感覚の入力を受けているので、大脳皮質におけるarc mRNA増加は末梢からの感覚入力によるものかもしれない。したがって、大脳皮質へのグルタミン酸ニューロンによる体性感覚の入力が、MK-801によって大脳皮質のarc mRNA発現が抑えられたことに関係しているのかもしれない。

慢性投与実験では、逆耐性形成後ラットのMETH再投与により各脳部位でarc mRNAの増加が見られた。特に他の脳部位に比較し、大脳皮質に強く誘導された点が注目された。神経刺激物質による逆耐性形成に大脳皮質が何らかの役割を担っていると予想されている^{5,12)}。Karlerらはドーパミン受容体阻害剤のsulpiride、spiperone、NMDA受容体阻害剤のCPP、GABA_AアゴニストのTHIPの皮質内投与がAMPHによる逆耐性形成を阻害することを報告している⁹⁾。これらの結果はAMPHによる逆耐性形成に、皮質のグルタミン系が促進的に、GABA系が抑制的に作用することを示す。さらに蛋白合成阻害薬であるnisomycinの大脳皮質への局所投与によりAMPHの逆耐性現象の形成が阻害されるが、逆耐性の発現、急性効果の抑制は起こさない⁹⁾。一方、神経刺激物質の反復投与による可塑性の発現に中脳ドーパミンニューロンへ投射する皮質からのグルタミンニューロンが関与することを示唆する知見がある。例えば、Tongら¹²⁾はAMPH慢性投与を受けたラットでは、前頭葉への電気刺激が中脳ドーパミン細

胞の刺激応答を高めると報告している。また、Arc mRNAとその蛋白は共に神経細胞の核内ではなく、細胞質と樹状突起に存在している⁸⁾。このことは、最初期遺伝子であるarcが転写制御因子としてではなく、分子間相互作用によって”エフェクター”として機能していることを示唆する。また、Arcが重合したアクチンと共沈すること⁹⁾は、arcが樹状突起の細胞骨格蛋白と作用する新しいファミリーの最初期遺伝子であることを支持するものと思われる。これらのことを考えあわせると、大脳皮質のarcは逆耐性現象の形成と維持に関与する神経ネットワークに重要な役割を持つことが示唆される。

前頭葉皮質、頭頂葉皮質、海馬CA1でMM群はSM群に比較し、有意に増加を認めた。つまり、逆耐性完成動物では更に強いarc mRNA発現が生じていた。しかし各群の増加率をMM群ではMS群の平均値で除し、SM群ではSS群の平均値で除することで求めると、両群間に有意差はなかった。従って、MM群で認められたMETH再投与によるarc mRNA増強は、その基礎発現量の変化が関与しているとも考えられた。また、いずれの脳部位でもSM群と比較しMM群でarc mRNAの発現に耐性が生じないことは、METH反復投与によってAP-1 (Fos/Jun重合体) 結合活性が耐性を示すことと対照的であり、注目されるべき点と思われる⁴⁾。

線条体では、MM群のみならず、MS群でもSS群に比較しarc mRNAの増加が見られた。即ち、METH慢性投与後3週間断薬後でもarc mRNA発言の亢進が持続していた。この線条体の持続的なarc mRNAの増加はArcが樹状突起の細胞骨格の変化に関与しているとする、シナプスの構造変化が断薬後も持続して生じていることを示唆していると考えられ興味深い。RobinsonとKolb¹⁰⁾は、AMPHの慢性投与により皮質、側坐核での樹状突起の伸長と棘の増加を報告している。このような形態学的変化が線条体でも起こっているかどうかは確認されていないが、今回のarcでの検討はその可能性が高いことを示している。

E. 結論

本研究ではMETH急性投与がドーパミンD₁受容体、NMDA受容体を介し、大脳皮質、線条体、海馬でのarc mRNA発現を増強することを示した。逆耐性現象を引き起こす慢性投与では、METH再投与により耐性を示すことなくarc mRNA発現を誘導した。Arcは神経細胞樹状突起に限局して存在し、細胞骨格関連蛋白として直接細胞機能に影響するエフェクター最初期遺伝子の一つと考えられている。従って、逆耐性現象形成に重要な役割を持つ大脳皮質、線条体で増加するarcはシナプスの構造的変化をもたらし、可塑性に関連する神経回路の再構成に関与している可能性が示唆される。

[参考文献]

- 1) Ariano M.A., Larson E.R., Noblett K.L.: Coexpression of striatal dopamine receptor subtypes and excitatory amino acid subunits. *Synapse*, 26:400-414,1997.
- 2) Fosnaugh J.S., Bhat R.V., Yamagata K.: Activation of *arc*, a putative “effector” immediate early gene, by cocaine in rat brain. *J. Neurochem.*, 64:2377-2380,1995.
- 3) Gelot A., Moreau J., Khrestchatsky M.: Developmental change of α -spectrin mRNA in the rat brain. *Devel. Brain Res.*, 81:240-246,1994.
- 4) Ishihara T., Akiyama K., Kashihara K.: Activator protein-1 binding activities in discrete regions of rat brain after acute and chronic administration of methamphetamine. *J. Neurochem.*, 67:708-716,1996.
- 5) Karler R., Bedingfield J.B., Thai D.K.: The role of the frontal cortex in the mouse in behavioral sensitization to amphetamine. *Brain Res.*, 757:228-235,1997.

- 6) Karler R., Calder L.D., Chaudhry L.A.: Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci.*, 45:599-606.,1989.
- 7) Link W., Konietzko U., Kauselmann G.: Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92:5734-5738,1995.
- 8) Lyford G.L., Yamagata K., Kaufmann W.E.: *Arc*, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 14:433-445,1995.
- 9) Maisonneuve L.M., Keller R.W., Glick S.D.: Similar effects of D-amphetamine and cocaine on extracellular dopamine levels in medial prefrontal cortex of rats. *Brain Res.*, 535:221-226,1990.
- 10) Robinson T.E., Kolb B.: Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J. Neurosci.*, 17:8491-8497,1997.
- 11) Sato M., Chen C.C., Akiyama K.: Acute exacerbation of paranoid psychotic state after long-term abstinence in patients with previous methamphetamine psychosis. *Biol. Psychiatry*, 18:429-440,1983.
- 12) Tong Z. -Y., Overton P.G., Clark D.: Chronic administration of (+)-amphetamine alters the reactivity of midbrain dopaminergic neurons to prefrontal cortex stimulation in the rat. *Brain Res.*, 674:63-74,1995.
- 13) Ujike H., Onoue T., Akiyama K.: Effects of selective D-1 and D-2 dopamine antagonists on development of methamphetamine-induced behavioral sensitization. *Psychopharmacology*, 98:89-92,1989.
- 14) Vincent S.L., Khan Y., Benes F.M.: Cellular distribution of dopamine D₁ and D₂ receptors in rat medial prefrontal cortex. *J. Neurosci.*, 13:2551-2564,1993.
- 15) Wang J.Q., Daunais J.B., McGinty J.F.: NMDA receptors mediate amphetamine-induced upregulation of *zif/268* and preprodynorphin mRNA expression in rat striatum. *Synapse* 18:343-353,1994.
- 16) Wang J.Q., McGinty J.F.: Differential effects of D₁ and D₂ dopamine receptor antagonists on acute amphetamine- or methamphetamine-induced up-regulation of *zif/268* mRNA expression in rat forebrain. *J. Neurochem.*, 65:2706-2715,1995.

覚醒剤精神病モデルラットにおける gamma-aminobutyric acid (GABA) -benzodiazepine 神経伝達系の役割について

分担研究者 小山 司

共同研究者 安部川 智浩、伊藤 耕一

北海道大学医学部 脳科学専攻
神経機能学講座 精神医学分野

A. 目的

覚醒剤 (Methamphetamine) を長期間乱用すると、次第に幻覚妄想状態などの精神分裂病に類似した精神症状が出現し、いったん出現すると薬物休止後も再発準備性が持続し、少量の覚醒剤再使用や、情動ストレス、環境変化などによって精神症状が再燃することが知られている¹⁾。このような精神分裂病の幻覚妄想状態との横断面での類似性と、再燃、治療抵抗性との縦断面での類似性ことから、覚醒剤精神病は精神分裂病の病態モデルとして注目されている。

一方、覚醒剤を実験動物に反復投与すると運動増強作用や常同行動惹起作用が次第に増強し、休薬後にも過敏性が長時間持続し、覚醒剤再投与によって増強反応を示す。この現象は行動感作あるいは逆耐性 (Sensitization) と呼ばれ、コカインなど他の薬物や非特異的なストレスに対しても交差過敏性を示す²⁾。このような類似性から、動物における行動感作のメカニズムの研究は、覚醒剤精神病の解明に有益であり、さらには精神分裂病の理解にも寄与するものと期待される。

行動感作は脳内の可塑的変化を基盤に持つものと思われ、学習やキンドリングあるいは長期増強 (Long Term Potentiation) などと類似する側面を有する。すなわち、いずれの現象も反復刺激によって形成され、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受容体拮抗

薬やムスカリン性アセチルコリン受容体阻害薬、タンパク合成阻害薬などによって形成が抑制される³⁾。このような現象的、薬理学的な共通性を考慮すると、学習やキンドリングに対して抑制的に働く薬剤が、どのような作用を示すかを検討することは意義のあることである。

抑制性神経伝達物質である GABA-benzodiazepine 作動薬は、学習やキンドリングに対し抑制的に働くことが知られている。臨床的にも精神分裂病の急性症状に対する鎮静作用や不安軽減効果を示すという報告⁴⁾や、慢性精神分裂病患者の死後脳研究において benzodiazepine 受容体に変化を認めたとする報告も認められ⁵⁾、精神分裂病の病態にも GABA-benzodiazepine 系はある程度関与していると推定される。本研究では、抑制性神経伝達物質である GABA-benzodiazepine 受容体複合体に作用点を持つ benzodiazepine 系薬剤を用い、精神分裂病のモデルでもある覚醒剤精神病モデル動物を対象に、運動増強作用を指標として行動感作に対する影響を検討した。

B. 方法

1. 実験動物

実験には 190~270g の Wistar-King 系雄性ラットを使用した。ラットは 12 時間周期の明暗サイクル (明期; 6:30~18:30)、室温 24℃、湿度 50% の恒温恒湿条件下で、摂食、飲水の自由にできる状態で、1 ケージに 1 頭ずつ飼育した。ラットは実験開始の少なくとも 4 日前より毎日ハンドリングを行った。動物実験は北海道大学医学部「動物実験に関する指針」に則った。

使用薬剤は、methamphetamine hydrochloride については、生食に溶解して使用した。Flumazenil、clonazepam については、Vehicle (0.5% sodium

carboxymethylcellulose)に懸濁して使用した。全ての投与量は塩を含有した量として計算した。全ての注射処置は午前中に皮下投与した。

2. 行動評価方法

行動評価は次のいずれかの方法を用いた。

1) 視察的観察

投与後の行動は Ellinwood ら³⁾の方法 (Table1) に基づいて 10 分間隔で計 90 分間視察的に評価した (Fig 1~Fig 2)。評価は 2 名で行い、1 名は処置に blind とした。2 名の評価者の評価間信頼度 (interscore reliability) は高値 (0.9 以上) であったが、相違が認められる場合は 2 名の平均値を評価点とした。

2) 赤外線センサーによる測定

投与後の行動は運動量を赤外線センサーを用いて測定した。実験開始の 2 時間前よりラットを観察室に移動し、十分な安静状態をはかった後に、赤外線センサー (Supermex: 室町機械株式会社、東京) 下において、ホームケージ内でのラットの水平方向の運動を 10 分間毎に 90 分間測定した。

Table 1. Rating scale for the behavioral effects of psychomotor stimulants in rats.

Score	Definition	
1	Asleep	Lying Down, Eyes Closed
2	Inactive	Lying Down, Eyes Open
3	Normal in Place Activity	Normal Grooming or Chewing Cage Litter
4	Normal, Alert, Active	Sniffing or Rearing Intermittently
5	Hyperactive	Increased Locomotion, Jerky Movements
6	Slow Patterned	Nearly Continuous Sniffing, Gnawing, or Licking, Normal Level of Locomotor Activity, but Repetitive
7	Fast Patterned	Nearly Continuous Sniffing, Gnawing, or Licking with Hyperactive, Repetitive Exploration of Cage
8	Restricted	Rapid, Intense, Continuous Head and/or Foreleg Activity Sniffing, Licking, or Gnawing in the Same Place
9	Dyskinetic-reactive	Backing Up, Jumping, Seizures, Abnormally Maintained Postures, Dyskinetic Movements

4. 実験方法

(実験 1) Methamphetamine (MA) 急性投与、及び行動感作獲得過程に及ぼす benzodiazepine 作動薬 clonazepam (CZP) の影響

A) 急性投与実験

生食群 (1ml/kg)、CZP 群、MA 群 (1mg/kg)、CZP+MA 群の 4 群に分け皮下投与した。CZP は 0.125、0.5、2.0mg/kg それぞれの投薬量について検討した。CZP+MA 群では CZP を MA 投与 10 分前に前処置し、視察的に評価した。

B) 反復投与実験

生食反復処置群、CZP 反復処置群、MA 反復処置群、CZP+MA 反復処置群の 4 群に分けた。MA 反復処置群には、MA 1mg/kg を 1 日目から 10 日目まで 1 日 1 回皮下投与した。CZP 反復処置群には、CZP を同様のスケジュールで投与した。CZP+MA 反復処置群には、CZP 皮下投与 10 分後に MA 1mg/kg を同様に投与した。CZP は 0.125、0.5、2.0mg/kg 各々の投薬量について検討した。生食反復処置群には、生食 1ml/kg を同様に投与した。処置後 7~8 日間の休薬期間において上記 4 群に対して MA 1mg/kg を皮下投与し、視察的に評価した。

(実験 2) MA 急性投与、及び行動感作獲得過程に及ぼす benzodiazepine 拮抗薬 flumazenil (Flu) の影響

生食反復処置群 (1ml/kg)、Flu 反復処置群 (10mg/kg)、MA 反復処置群 (1mg/kg)、Flu+MA 反復処置群の 4 群に分けた。生食反復処置群と MA 反復処置群には反復処置の 10 分前に Vehicle を皮下投与し、Flu+MA 反復処置群では Flu を MA 投与 10 分前に投与した。Flu 反復処置群には Flu 投与 10 分後に生食を投与した。それぞれの処置を 1 日 1 回 10 日間行い、7~8 日間の休薬期間において各群に MA (1mg/kg) を皮下投与し、Flu

併用が行動感作に与える影響をみた。運動量の測定には赤外線センサーを用い、測定は反復投与1日目(a、急性投与への影響)、休薬期間後のMA再投与時(b、行動感作獲得過程に及ぼす影響)に行った。

(実験3)MA行動感作獲得過程に及ぼすCZPとFlu併用投与の影響

生食反復処置群、MA反復処置群、CZP(0.5mg/kg)+MA反復処置群、Flu+CZP+MA反復処置群の4群に分けた。FluはCZP投与5分前に前処置し、CZPはMA投与10分前に前処置した。CZP、Flu投与時に、その他の群にはVehicleの投与を行った。それぞれの処置を1日1回10日間行い、7~8日間の休薬期間において各群にMA(1mg/kg)を皮下投与した。行動量の測定は赤外線センサーを用い、実験2と同様に反復投与1日目及び、休薬期間後のMA再投与時に行った。

(実験4)MA行動感作発現過程に及ぼすCZPの影響

生食(1ml/kg)または、MA(1mg/kg)を1日1回10日間皮下投与し、7~8日間の休薬期間後にMA反復処置群の半数には、CZP(1mg/kg)投与10分後に、残りの半数にはVehicleの投与10分後にMA(1mg/kg)を再投与した。生食反復処置群にはVehicleの投与10分後にMA(1mg/kg)を投与し、MA行動感作発現効果に対するCZPの影響について検討した。投与後の行動は運動量を赤外線センサーを用いて測定した。

5.統計方法

視察的観察については、90分間の各々のラットの行動評価点の合計点(合計行動評価点)について、Kruskal-Wallisの検定を行い、有意差の認められる場合にはMann-WhitneyのU検定を行い各群間比較した(P<0.05)。

赤外線センサーによる測定は2元配置分散分析(two-way ANOVA)により各群と時間との交互作用をみた。交互作用が認められる場合、Duncanの方法による多重比較を行い有意差をみた(P<0.05)。さらに1元配置分散分析(one-way ANOVA)を行い、各時間ごとにDuncanらの方法による多重比較を行い各群間の比較を行った(P<0.05)。

C.結果

1.実験1

a) MA急性投与に及ぼすCZPの影響

Fig.1はMAの急性投与による運動量増加に対するCZPの影響について示した。結果

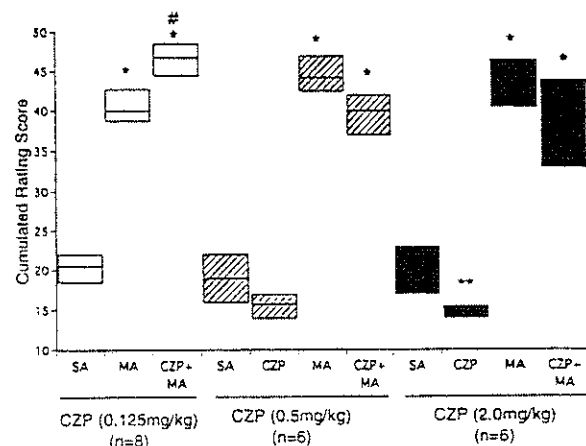


Fig. 1 Effect of CZP on MA-induced motor activity; Rats received a single injection of either SA (1ml/kg), MA (1mg/kg) or CZP. Another group received MA (1mg/kg) 10 min after CZP administration. Three doses of CZP were tested in three separate experiments (0.125, 0.5 and 2.0mg/kg). In the experiment with the smallest dose of CZP, CZP group was omitted. Results represent median and inter-quartile range of the cumulated rating score for 6 or 8 rats per group. * p<0.05 vs. SA group; # P<0.05 vs. MA group; ** P<0.05 vs. SA (Mann-Whitney U-tests). Abbreviations: CZP; clonazepam, MA; methamphetamine, SA; saline

は 90 分間の各々のラット行動評価点の合計点について、中央値 (median) と 4 分位間隔 (inter-quartile range) を用いて表示した。

CZP 各々の投与量において、CZP 併用投与群及び MA 単独投与群共に、生食投与群に対し、有意に合計行動評価点が増加していた (* $P < 0.05$)。CZP 0.125mg/kg 併用投与群では MA 単独投与群と比較して合計行動評価点が増加していた (# $P < 0.05$)。CZP0.5 及び 2.0mg/kg 併用投与群では MA 単独投与群との間に有意差は認められなかった。しかし、CZP2.0mg/kg 単独投与群は生食群と比較して有意に行動評価点が減少していた (** $P < 0.05$)。

b) MA 行動感作獲得過程に及ぼす CZP の影響

Fig.2 は MA 行動感作獲得過程に及ぼす CZP の影響について示した。生食反復処置群、CZP 反復処置群、MA 反復処置群、CZP+MA 反復処置群の 4 群について、反復処置後 7~8 日間の休薬期間をにおいて上記 4 群に対して MA1mg/kg を皮下投与した際の合計行動評価点を、急性投与実験の方法に準じて表示した。

CZP0.125mg/kg において、CZP 併用反復処置群及び MA 単独反復処置群共に、生食反復処置群に対し有意に合計行動評価点が増加していた (* $P < 0.05$)。しかし、CZP0.5 及び 2.0mg/kg では、MA 反復処置群は生食反復処置群に対し合計行動評価点が増加していたが (* $P < 0.05$)、CZP 併用反復処置群は生食反復処置群との間に有意差は認められなかった。

(なお、CZP0.125mg/kg においては CZP 単独反復処置は省略した。より高用量の CZP 0.5、2.0mg/kg において生食反復処置群との間に有意な変化が認められなかったためである。)

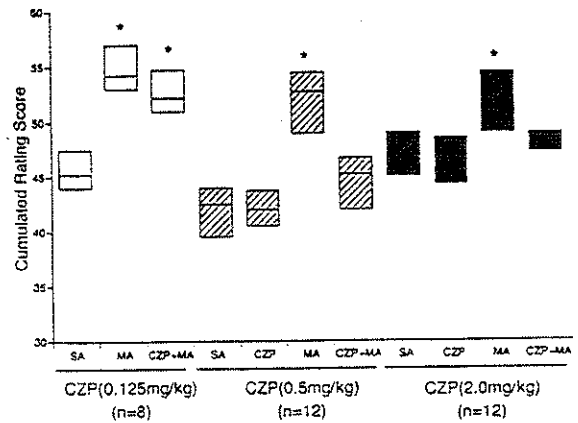


Fig. 2 Effect of CZP on behavioral sensitization to MA; Rats were randomly assigned to one of the following four groups. First group was treated with MA (1mg/kg). Second group received CZP (0.5 or 2.0 mg/kg). Third group received MA (1mg/kg) 10 min after the injection of CZP (0.125, 0.5 or 2.0mg/kg). Fourth group received SA (1 ml/kg). Drugs were injected daily from day 1 to day 10 in their home cages. On day 17 or 18, MA (1mg/kg) was injected to all four groups (MA, CZP, CZP+MA, and SA). These doses of CZP were tested in separate experiments with respective control groups. CZP group was omitted in the experiment with 0.125 mg/kg CZP. Results represent median and inter-quartile range of the cumulated rating score for 8 or 12 rats per group. * $P < 0.05$ vs. SA group (Mann-Whitney U-tests). Abbreviations: CZP; clonazepam, MA; methamphetamine, SA; saline

2. 実験 2

a) MA 急性投与に及ぼす Flu の影響

Fig. 3 は MA の急性投与による運動増加に対する Flu の影響について、赤外線センサーの測定値を 10 分間毎に 90 分間にわたって表示した。MA 投与群 (1mg/kg) は生食投与群に対し有意に運動量が増加していたが、Flu (10mg/kg) +MA 投与群との間には有意な変化は認められなかった。図には表示していないが、Flu の投薬量は 20mg/kg まで増量したが同様な結果を示した。

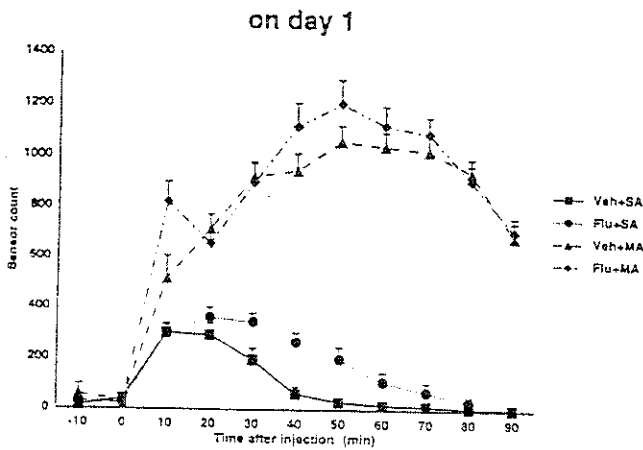


Fig. 3 Effects of Flu on MA-induced motor activity; Rats were randomly assigned to one of the following four groups. Each rat received two injections. First group was treated with Veh (1mg/kg)+MA (1mg/kg). Second group received Flu (10mg/kg)+SA. Third group received Flu (10mg/kg)+MA (1mg/kg). Fourth group received Veh+SA. Each point represents the mean±SEM at each time for 20-24 rats per group. There was no difference between Veh+MA group and Flu+MA group. Abbreviations: Veh; vehicle, MA; methamphetamine, Flu; flumazenil, SA; saline

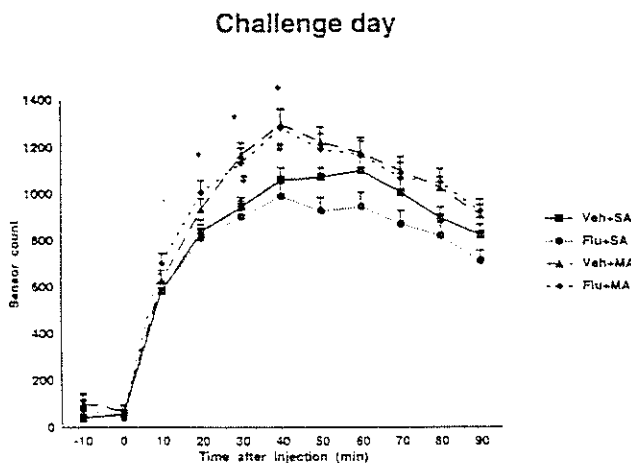


Fig. 4 No effects of Flu on the acquisition of behavioral sensitization to MA; On day 17 or 18, MA (1mg/kg) was injected to all four groups (Veh+MA, Flu+SA, Flu+MA, and Veh+SA) in their home cages and motor activity was measured. Each point represents the mean±SEM at each time

in each group. Veh+MA group from 20 to 40 min (* $p < 0.05$) and Flu+MA group from 20 to 30 (# $p < 0.05$) showed a significant enhancement in sensor counts compared to Veh+SA group. There was no difference between Veh+MA group and Flu+MA group. Abbreviations: Veh; vehicle, MA; methamphetamine, Flu; flumazenil, SA; saline

b) MA 行動感作獲得過程に及ぼす Flu の影響

Fig.4 は生食反復処置群、Flu 反復処置群、MA 反復処置群、Flu+MA 反復処置群について、7~8 日間の休薬期間をおいて各群に MA (1mg/kg) を皮下投与した際の運動量を 90 分間にわたって表示した。

MA 反復処置群は生食反復処置群に対し有意に運動量が増加していたが(* $P < 0.05$)、Flu (10mg/kg) +MA 投与群との間には有意な変化は認められなかった。

3.実験 3

MA 行動感作獲得過程に及ぼす CZP と Flu 併用投与の影響

生食反復処置群、MA 反復処置群、CZP (0.5mg/kg) +MA 反復処置群、Flu (10mg/kg) +CZP+MA 反復処置群の 4 群に分け、赤外線センサーの測定値を時間経過とともに表示した。Fig.5 は反復処置 1 日目(急性投与実験)の運動量を表示した。MA 群、CZP+MA 群、FLU+CZP+MA 群の 3 群間には有意な変化は認められなかった。

Fig.6 はそれぞれの処置を 1 日 1 回 10 日間行い、7~8 日間の休薬期間をおいて各群に MA (1mg/kg) を皮下投与した際の運動量を表示した。MA 反復処置群は生食反復処置群と比較して有意に運動量が増加していた(* $P < 0.05$)。一方、CZP (0.5mg/kg) +MA 反復処置群は生食反復処置群との間には有意な変化は認められなかった。FLU (10mg/kg) +CZP+MA 反復処置群は MA 反復処置群との間には有意な変化は認められなかった。

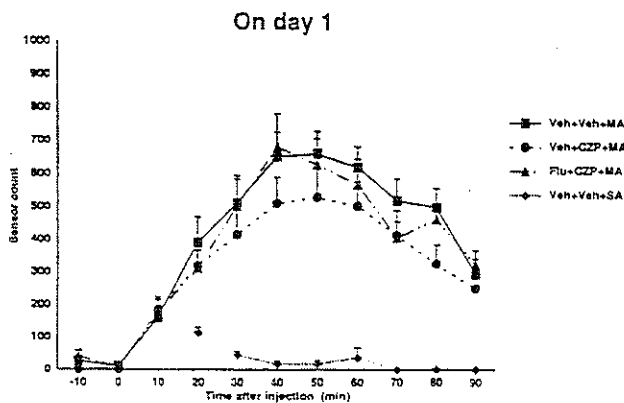


Fig. 5 Effects of Flu and CZP on MA-induced motor activity; Rats were randomly assigned to one of the four groups. Each rat received three injections. First group was treated with Veh+Veh+MA (1mg/kg). Second group received Veh+CZP (0.5mg/kg)+MA. Third group received Flu (10mg/kg)+CZP+MA. Fourth group received Veh+Veh+SA. Each point represents the mean \pm SEM at each time for 16 rats per group. There was no difference among Veh+Veh+MA group, Veh+CZP+MA group and Flu+CZP+MA group. Abbreviations: Veh; vehicle, CZP; clonazepam, MA; methamphetamine, Flu; flumazenil, SA; saline

(Veh+Veh+MA, Veh+CZP+MA, Flu+CZP+MA, and Veh+Veh+SA) in their home cages. Each point represents the mean \pm SEM at each time in each group. Veh+Veh+MA group showed a significant enhancement in sensor counts compared to Veh+Veh+SA group from 20 to 120 min (* $p < 0.05$). There was no difference between either Veh+CZP+MA group and Veh+Veh+SA group, or Flu+CZP+MA group and Veh+Veh+MA group. Abbreviations: Veh; vehicle, CZP; clonazepam, MA; methamphetamine, Flu; flumazenil, SA; saline

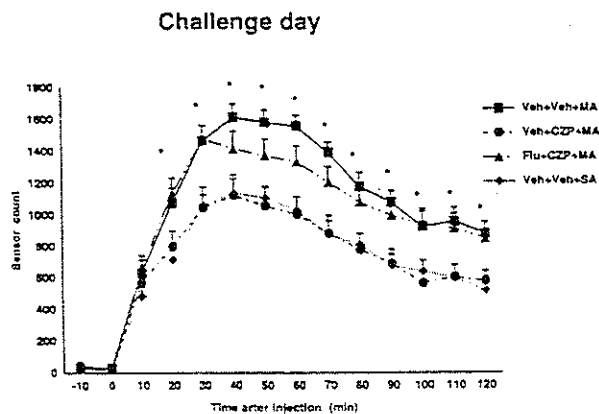


Fig. 6 CZP blocked the acquisition of sensitization to MA and Flu reversed the blockade; On day 17 or 18, MA (1mg/kg) was injected to all four groups

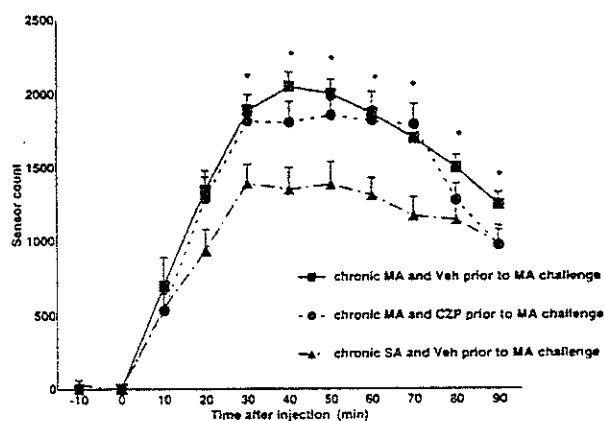


Fig. 7 No effect of CZP on the expression of sensitization to MA; Rats received daily either MA (1mg/kg) or SA (1ml/kg) from day 1 to day 10 in their home cages. On day 17 or 18 (challenge day), each rat received two injections. The second injection (MA) was given 10 min after the first injection. Those treated with MA were assigned to one of the two groups. First group received Veh (1ml/kg)+MA (1mg/kg) and second group received CZP (1mg/kg)+MA. Those treated with SA received Veh+MA. Motor activity was measured in the three groups after MA injection. Each point represents the mean \pm SEM at each time for 8 rats per group. Both MA-treated rats showed enhance motor activity from 20 to 90 min compared to SA-treated rats (* $p < 0.05$). Abbreviations: Veh; vehicle, CZP; clonazepam, MA; methamphetamine, SA; saline

4.実験 4

MA 行動感作発現過程に及ぼす CZP の影響

Fig.7 は休薬期間後に MA (1mg/kg) を投与した際の赤外線センサーの測定値を時間経過とともに表示した。

MA 反復処置群は、MA 再投与の 10 分前に Vehicle を処置した群も CZP を処置した群も同様に、生食反復処置群と比べ運動量が有意に増加していた (* $P < 0.05$)。

D.考察

1. MA 行動感作獲得過程に及ぼす benzodiazepine 拮抗薬の影響

MA (1mg/kg) の投与を 10 日間反復して受けたラットは、生食反復処置を受けた群と比較して、7~8 日間の休薬期間において MA 1mg/kg を皮下投与した際の合計行動評価点が有意に増加していた。このことは行動感作が形成されていたことを示している。CZP を併用反復処置すると、少量 (0.125mg/kg) においては、生食反復処置群に対し MA 単独反復処置群と同様に有意に合計行動評価点が増加していたが、中等度以上の CZP (0.5、2.0mg/kg) 併用反復処置群は、生食反復処置群との間に有意差はなく行動感作は認められなかった (Fig.2)。この結果は CZP は行動感作獲得を用量依存性に抑制することを示している。

今回の結果と類似して、Weiss ら¹⁴⁾ は benzodiazepine 拮抗薬である diazepam がコカインによる行動感作を抑制したと報告している。彼らは、1 日目に特定の環境下でコカインの投与を受けたラットに、2 日目にも同じ特定の環境において同量のコカインを投与した場合、環境依存性に行動感作が成立する (context-dependent sensitization) というモデルを用いている。彼らは 1 日目に diazepam を併用すると、cocaine 急性投与による運動の増加が抑制されたために、2 日目

の行動感作の出現も抑制されたと説明している。しかし、今回の実験ではラットの MA ないし CZP の反復投与も休薬後の MA 再投与もホームケージにおいて行われており、行動感作の獲得のうえで環境依存性の要素は少ないと考えられる。また、行動感作の獲得を抑制する CZP の投与量 (0.5、2.0mg/kg) では、MA の急性投与による運動増加に対しては影響を与えないため (Fig.1)、Weiss らと同様の解釈は困難である。

2. MA 行動感作獲得過程に及ぼす benzodiazepine 拮抗薬の影響

Flu (10mg/kg) + MA 反復処置群について、7~8 日間の休薬期間において各群に MA (1mg/kg) を皮下投与した際の運動量の検討 (Fig.4) では、MA 反復処置群は生食反復処置群に対し有意に運動量が増加していた。Flu (10mg/kg) + MA 反復処置群でも運動量が増加しており、MA 反復処置群との間には有意な変化は認められなかった。また、急性投与実験 (Fig.3) において、Flu (10mg/kg) の投与量では MA の急性投与による運動増加に対しては影響を与えなかった。以上から Flu は MA 行動感作獲得過程は抑制しないと考えられる。

内因性 benzodiazepine 拮抗薬あるいは逆作動薬の存在を示唆する報告も散見され、¹¹⁾ 今回の結果は、もし仮にそれらの内因性のリガンドが存在すると仮定すれば、それらは MA の急性投与による運動増加作用及び行動感作獲得過程には直接的に関与しないと推測される。

3. Benzodiazepine 拮抗薬の MA 行動感作獲得過程抑制効果に及ぼす拮抗薬併用投与の影響

CZP (0.5mg/kg)、Flu (10mg/kg) の用量は MA 急性投与による運動増加作用に対し影響しない量を用いた (Fig.5)。MA 反復

処置群は、生食反復処置群と比較して有意に運動量が増加し行動感作が形成されていた。一方、CZP (0.5mg/kg) +MA 反復処置群は生食反復処置群との間には有意な変化は認められず、先の実験同様に CZP (0.5mg/kg) は行動感作獲得を抑制していた。さらに、FLU (10mg/kg) +CZP+MA 反復処置群は MA 反復処置群との間には有意な変化は認められなかった (Fig. 6)。これらの結果より、FLU (10mg/kg) は CZP (0.5mg/kg) の行動感作獲得抑制効果を阻止したと考えられる。

CZP は中枢性 benzodiazepine 受容体に高い親和性と選択性をもつことが知られており、Flu が CZP の効果を抑制する点を考えると、MA 行動感作獲得に対する CZP の抑制効果は benzodiazepine 受容体を介していることが示唆される。さらに、benzodiazepine 受容体は GABAA 受容体と複合体を形成し作用を発現する。そのため、GABAA 受容体を介した神経伝達系の促進が行動感作獲得の抑制に関連していると推測される。

GABA と benzodiazepine 受容体は中枢神経系においてドーパミンの放出を調整していることが知られている^{4) 10)}。側坐核でのドーパミン受容体刺激は、腹側淡蒼球での GABA の細胞外濃度を減少させる。これらのドーパミンと GABA の相互作用は精神刺激薬の急性行動効果に関係しているかも知れない。しかし、CZP (0.5、2.0mg/kg) では MA の急性効果を抑制することなく行動感作獲得を抑制したため、CZP が MA のドーパミンの放出作用を抑制したために行動感作獲得が抑制されたとは考えにくい。

腹側淡蒼球と側坐核の GABA 系神経は腹側被蓋野に投射しており、腹側被蓋野は中脳-皮質辺縁系ドーパミン神経系の細胞体が存在し、行動感作獲得について重要な役

割をもつことが推測されている⁵⁾。しかし、腹側被蓋野のドーパミン神経細胞体には主に GABAB 受容体が存在していると考えられており¹¹⁾、GABAB 受容体作動薬の腹側被蓋野への局所投与が行動感作獲得を抑制したという報告も認められる⁵⁾。そのため、CZP が直接的に腹側被蓋野に作用し行動感作獲得を抑制したとは考えにくい。

一つの可能性として、CZP は前頭葉皮質の GABA-benzodiazepine 受容体に作用し、行動感作獲得を抑制したと推測することが出来るかもしれない。最近の報告において Karlar ら⁶⁾ は、GABAA 受容体作動薬である 4、5、6、7-tetrahydroisoxazolo[5、4-c]pyridin-3-ol (THIP) の前頭葉皮質への局所投与が、マウスにおける amphetamine 全身投与により生じる行動感作の獲得を抑制したと報告している。しかし、彼らは THIP それ自身も線条体への局所注入では常同行動を生じ、線条体では GABAA 受容体拮抗薬の bicuculline 局所投与が、行動感作獲得を抑制するとも報告している²⁾。これらの知見から、GABA-benzodiazepine 受容体は脳のそれぞれの部位で異なった役割を果たしている可能性が推測される。いずれにしても、今後 CZP の脳内局所投与が正確な作用部位の推定に必要と考えられる。

4. MA 行動感作発現過程に及ぼす benzodiazepine 作動薬の影響

行動感作発現過程に対する影響についての検討 (Fig. 7) では、MA 反復処置群は生食反復処置群と比べ運動量が有意に増加していた。これは、行動感作が形成され、かつ MA 再投与時に行動感作が発現していることを示している。さらに、MA 反復処置群では MA 再投与時に CZP (1mg/kg) を前処置しても運動量の増加に有意な変化は認められなかった。つまり、CZP は MA 行動感

作の発現は抑制しないと考えられる。CZPの投与量については、急性投与実験において CZP (2mg/kg) は MA による運動量増加には有意な変化を与えないものの、自発運動量を有意に減少させるため今回の投与量を選択した。

行動感作発現過程の重要な脳内作用部位としては、側坐核あるいは線条体が推測されている。Bedingfield らは²⁾、GABA_A 受容体拮抗薬の bicuculline の線条体への局所投与が行動感作発現を抑制すると報告している。これらの知見をもとに今回の結果を考えると、GABA-benzodiazepine 神経伝達系の促進ではなく、抑制することが行動感作発現に関連すると推測される。

E. 結論

覚醒剤精神病モデル動物において GABA-benzodiazepine 神経伝達系の関与について検討した。

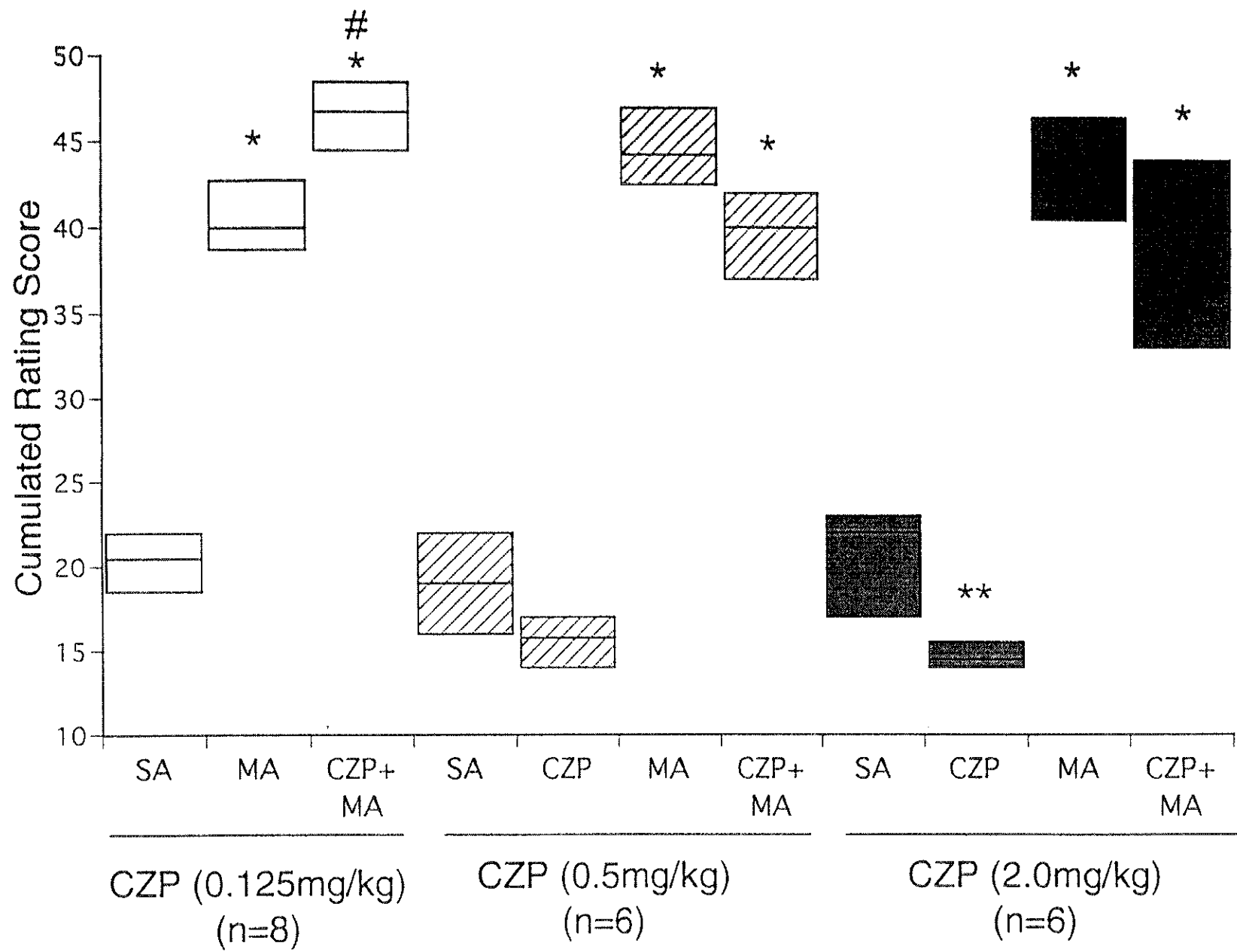
GABA-benzodiazepine 作動薬の CZP により、覚醒剤行動感作発現は抑制されなかったが、行動感作獲得は抑制した。GABA-benzodiazepine 拮抗薬の Flu では行動感作獲得は抑制されなかったが、CZP の行動感作獲得抑制効果を抑制した。これらから GABA-benzodiazepine 受容体の刺激が覚醒剤行動感作獲得に重要な役割を示していると考えられた。

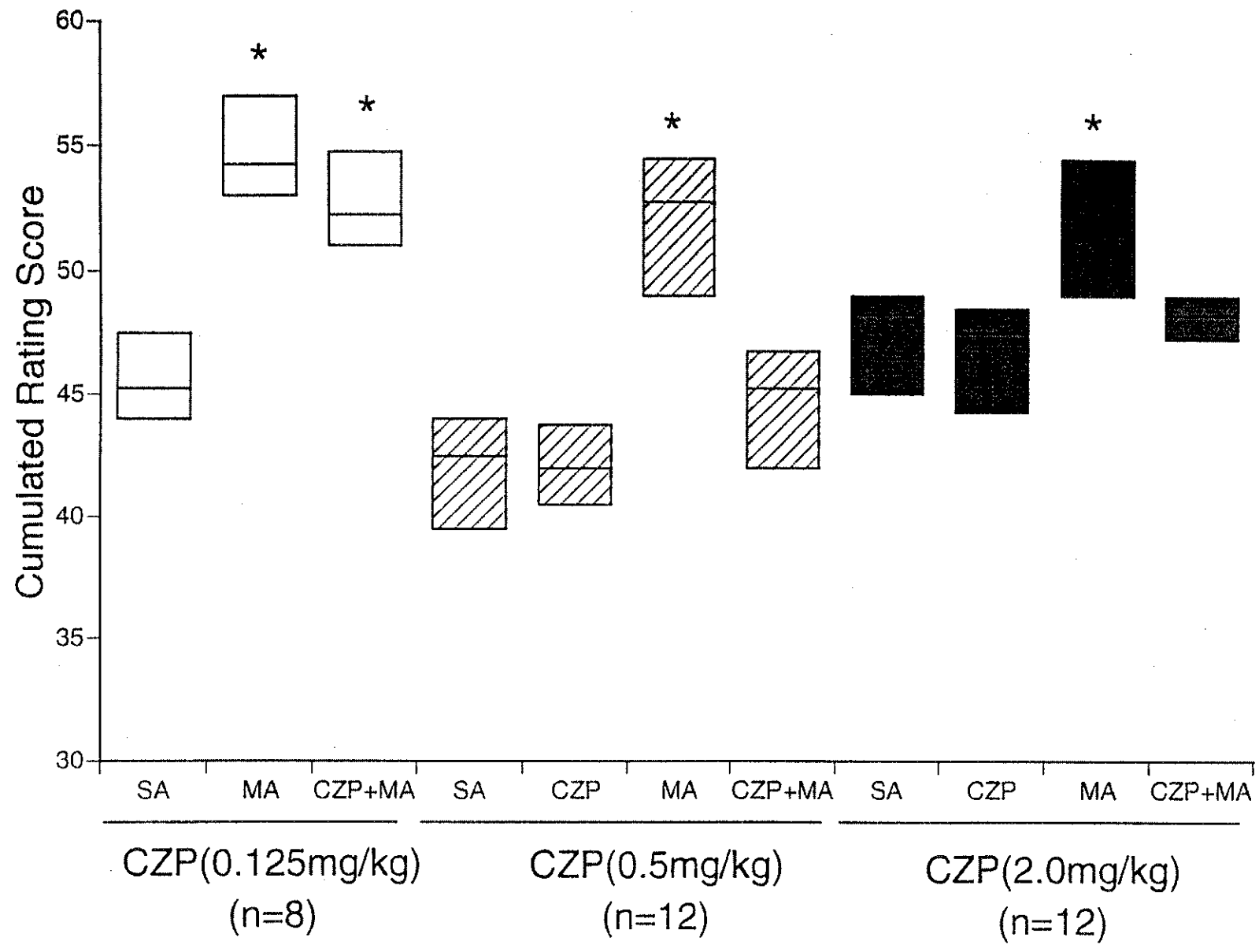
動物における行動感作の成立は、覚醒剤精神病の症状に対応する現象である。したがって、本研究の結果は覚醒剤乱用開始から精神症状の発現にいたる過程において、GABA-benzodiazepine 系の関与を示唆するものであり、覚醒剤精神病の成立において GABA-benzodiazepine 系の関与を示唆するものである。

(参考文献)

1. Altamura A., Mauri M., Mantero M.: Clonazepam/haloperidol combination therapy in schizophrenia: a double-blind study. *Acta Psychiatr Scand* 76: 702-706, 1987.
2. Bedingfield J. B., Calder L. D., Thai D. K.: The role of the striatum in the mouse in behavioral sensitization to amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 56: 305-310, 1997.
3. Dougherty G. G., Ellinwood Jr E. H.: Influence of gamma-butyrolactone on behavior due to dopaminergic drugs. *Physiol. Behav.* 30: 607-612, 1983.
4. Invernizzi R., Pozzi L., Samanin R.: Release of dopamine is reduced by diazepam more in the nucleus accumbens than in the caudate nucleus of conscious rats. *Neuropharmacology* 30: 575-578, 1991.
5. Kalivas P. W., Sorg B. A., Hooks M. S.: The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav Pharmacol* 4: 315-334, 1993.
6. Karler R., Bedingfield J. B., Thai D. K.: The role of the frontal cortex in the mouse in behavioral sensitization to amphetamine. *Brain Research* 757: 228-235, 1997.
7. Kavaliers M., Hirst M.: An octadecaneuropeptide (OND) derived from diazepam binding inhibitor increases aggressive interactions in mice. *Brain Research* 383: 343-349, 1986.

8. Kiughi Y., Kobayasi T., Takeuchi J.: Benzodiazepine receptors: Increase in post-mortem brain of chronic schizophrenics. *Eur Arch Neurol Sci* 239:71-78, 1989.
9. Sato M., Chen C., Akiyama K.: Acute exacerbation of paranoid psychotic state after long term abstinence in patients with previous methamphetamine psychosis. *Biol Psychiatry* 18: 429-440, 1983.
10. Scheel-krüger J.: Dopamine-GABA interaction: evidence that GABA transmits, modulates and mediates dopaminergic functions in the basal ganglia and the limbic system. *Acta Neural Scand Suppl* 302: 1-54, 1986.
11. Sugita S., Johnson S. W., North R. A.: Synaptic inputs to GABAA and GABAB receptors originate from discrete afferent neurons. *Neuroscience Letters* 134: 207-211, 1992.
12. 大森 哲郎、安部川 智浩、伊藤 耕一
覚醒剤および他の中枢刺激薬の中枢薬理
精神神経薬理、19: 1007~1012, 1997
13. Robinson T. E., Becker J. B.: Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res Rev* 11: 157-198, 1986.
14. Weiss S. R. B., Post R. M., Pert A.: Context-Dependent cocaine sensitization: Differential effect of haloperidol on development versus expression. *Pharmacol Biochem Behav.* 34: 655-661, 1989.





on day 1

