

Fig. 4 Effect of adenosine A2a receptor agonist CGS21680 on cocaine reinforcement (n=4)

D. 考察

D-1 Cocaine SA の基礎検討

Cocaine SA は、ほぼ20日間もの安定した反応が得られた。自己投与パターンは非常に規則的であり、その dose-response curve は、unit dose の高濃度(0.50 mg / infusion) において非線形性を現した。Cocaine の体内動態が1-コンパートメントモデルに従い、レバー押しに cocaine 体内濃度の閾値が存在すると仮定する。その閾値を D_s , cocaine の unit dose を D_u , cocaine の1次消失定数を k , 半減期を $T_{1/2}$ とすると、実験によって測定された平均レバー押し間隔時間 τ との間には、

$$(D_s + D_u) \exp(-k\tau) = D_s \quad \dots(1)$$

という関係が生じることが予想できる。この式を変形して次式を得る：

$$\tau = T_{1/2} \ln(1 + D_u/D_s) / \ln 2 \quad \dots(2)$$

Unit dose の高濃度域での応答の非線形性、および低濃度域の線形性はこの式から説明されるかもしれない。Cocaine の半減期 $T_{1/2} = 8.67$ 分は、実測の τ と D_u とのプロットを式(2)によって非線形回帰することで得られる。これは、Tsubulsky らの報告¹⁰⁾に極めて近い数値である。

なお、安定した自己投与パターンが獲得された個体においては、どの dose でも time out 期間中の無効なレバー押しはほとんど認められなかった。

D-2 Cocaine 強化効果に対する 5-HT_{1B} 受容体作動薬および adenosine 受容体作動薬の影響

TFMPP は、cocaine の自己投与回数に影響を与えなかった。しかしながら最近、選択性の高い 5-HT_{1B} 受容体作動薬である CP 93,129, CP

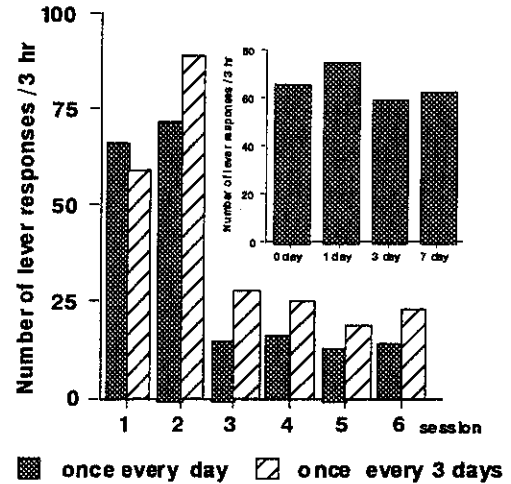


Fig. 5 Transition of lever responses in repeated saline SA (n=1, respectively)

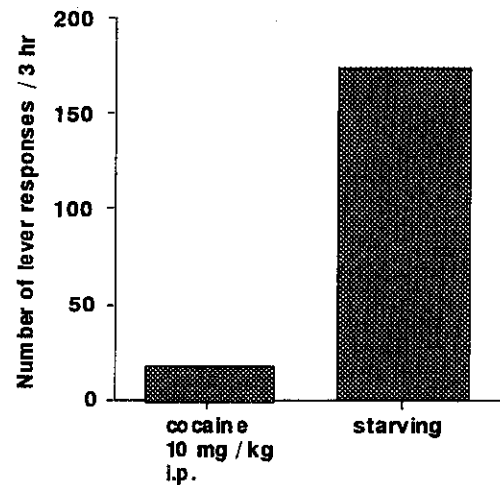


Fig. 6 Reinstatement to lever responses in saline SA (n=1, respectively)

94,253 が cocaine の報酬効果を増強するという報告がなされた¹⁾。TFMPP は、5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} 受容体にも 5-HT_{1B} 受容体と同程度の affinity をもっている。さらに、5-HT_{1A} 受容体の選択的アゴニストである 8-OH-DPAT は cocaine による報酬を減じること⁷⁾、また 5-HT_{2C} 受容体アゴニスト Ro 60-0175 は腹側被蓋野の dopamine 神経の発火を抑制すること¹¹⁾も明らかにされている。この事から、TFMPP 投与により cocaine 報酬効果の増強作用が認められなかったのは、5-HT_{1B} 受容体刺激による cocaine 報酬効果が 5-HT_{1A} および 5-HT_{2C} 受容体に対する作用によってマスクされたことに起因する可能性が高い。

Adenosine 受容体は、近年 dopamine 神経系との相互作用が注目されている。中枢では、A₁, A₂ の受容体サブタイプが存在し、A₁ 受容体は

dopamine D₁ 受容体と拮抗的な相互作用があり、A_{2a} 受容体は同様にD₂ 受容体と拮抗的な関係にあることが知られている⁹⁾。当研究室の研究でも、A₁ 受容体作動薬 CHA が、線条体 dopamine 遊離に影響を与えることなく、急性に投与された methamphetamine による hyperactivity および methamphetamine 慢性投与による逆耐性の発現をも抑制することをすでに明らかにしている。しかしながら、cocaine 強化効果に対する今回の実験では、CHA (0.032 mg/kg) によって cocaine 自己投与回数は逆に減少し (Fig. 3)、cocaine 強化効果の増強を示唆する結果を得た。CHA の鎮静作用に基づくレバー押し反応の減少の可能性があるが、この群の4例すべてにおいて cocaine SA 開始から1回目の infusion までの時間は vehicle と変化なく、純粹に infusion 間隔の延長が見られたことから否定される。さらにこの自己投与パターンが、cocaine の unit dose を上昇させた時 (Fig. 1B) と類似していることも、CHA により cocaine の強化効果が増強されていることを支持する。A₁ 受容体刺激が cocaine の強化効果を増強させる詳細なメカニズムは現時点では明らかでないが、CHA の慢性投与は methamphetamine の locomotor activity 亢進作用も増強させる (unpublished data)。いずれにせよ、A₁ 受容体アゴニストによる cocaine 報酬効果の増強作用は本研究によって初めて明らかにさせたものである。A₂ 受容体アゴニスト CGS 21680 は、cocaine SA 回数を増加させる傾向にあった (Fig. 4)。これは、dopamine 遊離に対する CGS 21680 の抑制作用に基づくと考えられる。morphine SA に対し、CHA は影響を与えないが、CGS 21680 はその自己投与回数を増加させることが最近報告された⁹⁾。今回の実験結果と相違する事から、報酬効果に関与する神経系に cocaine と morphine では差異がある可能性が考えられる。

D-3 コカイン探索行動についての基礎検討

薬物の「強化効果」と薬物への「欲求」を分離して評価する実験系の確立は、“依存症”の動物モデルを作成する上において重要である。我々は、連続して cocaine SA を体験したラットに、強化効果を有しない saline に切り換えて自己投与させることによって生じるレバー押し反応を、薬物への「欲求」と解釈することができるのではないかと考えた。最終セッションの7日後でも爆発的なレバー押しが生じた (Fig. 5) ことは、渴望 (craving) 状態が断薬後も persistent に続くとい

う臨床的知見と一致している。しかしながら、この saline セッションを毎日続けることによってそのレバー押し反応は減衰した (Fig. 5)。この減衰は、saline セッションの回数に依存し、最終 cocaine セッションからの時間には依存しないことから、薬物に対する欲求の減少を意味しているのではなく、学習効果によると考えられる。その事は、絶食ストレスを付加することによって一度減衰したレバー押し反応が増加したことからも支持される。また、この現象は臨床上の「再燃 (reinstatement)」に極めて類似する事から、reinstatement モデルとして、さらには薬物に対する「欲求」が永続的に続く薬物依存モデルとして有用であると考えられる。

E. 参考文献

- 1) Di Matteo V., Di Giovanni G., Di Mascio M.: SB 242084, a selective serotonin 2C receptor antagonist, increases dopaminergic transmission in the mesolimbic system. *Neuropharmacology*, 38(8):1195-205, 1999
- 2) Fere S., O'Connor WT., Fuxe K., The striopallidum neuron: an aim locus for adenosine-dopamine interactions in the brain. *J. Neurosci.* 13(12):5402-6, 1993
- 3) Fere S., O'Connor WT., Svenningsson P.: Dopamine D1 receptor-mediated facilitation of GABAergic neurotransmission in the rat strioentopeduncular pathway and its modulation by adenosine A1 receptor-mediated mechanisms. *Eur. J. Neurosci.* 8(7):1545-53, 1996
- 4) Fuxe K., Fere S., Zoli M.: Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 26(2-3):258-73, 1998
- 5) Lucas JJ., Segu L., Hen R.: 5-Hydroxytryptamine 1B receptors modulate the effect of cocaine on c-fos expression: converging evidence using 5-hydroxytryptamine 1B knockout mice and the 5-hydroxytryptamine 1B/1D antagonist GR127935. *Mol. Pharmacol.* 51(5):755-63, 1997
- 6) Muramatsu M., Lapid MD., Tanaka E.: Serotonin inhibits synaptic glutamate currents in rat nucleus accumbens neurons via presynaptic 5-HT1B receptors. *Eur. J. Neurosci.* 10(7):2371-9, 1998
- 7) Parsons LH., Weiss F., Koob GF.: Serotonin 1B receptor stimulation enhances cocaine reinforcement. *J. Neurosci.* 18(23):10078-89, 1998
- 8) Richardson NR., Roberts DC.: Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J. Neurosci. Methods*, 66(1):1-11, 1996
- 9) Saha H., Motamed F., Khoshbaten A.: Adenosine A2 receptors inhibit morphine self-administration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 27:383(2):107-13, 1999
- 10) Tsibulsky VL., Norman AB.: Satiety threshold: a quantitative model of maintained cocaine self-administration. *Brain Res.* 21:839(1):85-93, 1999

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

分担研究課題：Cocaine 誘発数種薬理作用の遺伝解析

分担研究者：鈴木 勉

研究協力者：成田 年、矢島 義識

星薬科大学薬品毒性学教室

〔研究要旨〕薬物の薬理作用の発現は遺伝因子により大きな影響を受けることが知られている。近年、組換え近交系 (recombinant inbred; RI 系) マウスが開発され、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が可能となった。そこで、本研究では、近交系 A/J と SM/J 系マウスを祖先系統とする SMXA RI 系マウスを用いて、cocaine の数種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。Cocaine (20 mg/kg, s.c.) 誘発自発運動促進作用 A/J よりも SM/J の方が強度で有意であったことから、遺伝因子の関与が示唆された。そこで、SMXA RI を用いて遺伝解析を行った結果、第 4、6、14 染色体上の 7 遺伝子座の関与が示唆された。また、cocaine (20 mg/kg, s.c.) 反復投与によ A/J では cocaine 自発運動促進作用に対する有意な逆耐性形成が認められたのに対し、SM/J では有意な変化はみられなかった。このことから、cocaine 反復投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成にも遺伝因子が関与していることが明らかとなった。そこで、SMXA RI 系を用いた遺伝解析を行った結果、第 3、4、5、8、12、16 染色体上の 52 遺伝子座の関与が示唆された。さらに、cocaine (8 mg/kg, s.c.) 誘発報酬効果は A/J で有意に発現したのに対し、SM/J では有意な変化がみられなかった。したがって、cocaine の精神依存発現には遺伝因子が関与することが明らかとなり、SMXA RI を用いて同様の遺伝解析を行った結果、第 5、8、9、15 染色体上の 13 遺伝子座の関与が示唆された。以上の結果より、cocaine の自発運動促進作用、その逆耐性および精神依存の発現に関与する可能性の高い染色体およびその遺伝子座を明らかにした。

A. 目的

Cocaine の薬理遺伝学的研究は、自発運動促進作用を中心に検討がなされ (1-12)、遺伝因子が大きな影響を与えていることが明らかとなっている。Cocaine 誘発自発運動促進作用を検討した結果では (1-12)、C3H/21bg 系マウスが最も運動量増加を示し、DBA/21bg と C57BL/61bg では中程度であり、BALB/cByJ 系マウスではほとんど増加しない

が、脳内の cocaine 濃度にはあまり差がないことが報告されている (1)。また、C57BL/6 と DBA/2 系マウスを用いて cocaine により誘発される行動変化について検討した結果、cocaine 誘発自発運動促進作用は C57BL/6 よりも DBA/2 の方が強く発現し、この作用は DBA/2 では耐性が生じるのに対し、C57BL/6 では変化が認められなかった。Cocaine 誘発常同行動については、DBA/2 では

常同行動を発現し反復投与により逆耐性が生じるのに対し、C57BL/6 では cocaine の単回および反復投与のいずれによっても常同行動は発現しないことが知られている (2-5)。さらに、Koff ら (6) は、CD-1、DBA/2J、BALB/cByJ、C57BL/6J および B6AF1/J 系マウスを用いて cocaine 反復投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成について検討した。DBA/2J、BALB/cByJ および C57BL/6J では有意な逆耐性が形成されたのに対し、B6AF1/J では cocaine 20 mg/kg で有意な逆耐性が形成されたが、cocaine 40 mg/kg では有意な変化はみられず、CD-1 の逆耐性はほとんど形成されない。また、cocaine 誘発自発運動促進作用は系統間のみではなく、性間や飼育環境によっても影響を受けることも知られている (7, 8)。さらに、Reith ら (9) は、BALB/cByJ と C57BL/6ByJ 系マウスを用いて検討し、cocaine 誘発自発運動促進作用は BALB/cByJ よりも C57BL/6ByJ の方が強いのに対し、cocaine のアナログである [³H]2β-carbomethoxy-3β-(4-fluorophenyl)-tropan ([³H]CFT) を用いた結合実験ではこれら 2 系統間に有意な差は認められないことを報告している。また、C57BL/6 と DBA/2 系マウスを用いた検討によっても、自発運動促進作用は DBA/2 の方が C57BL/6 よりも作用が強いのに対し、脳内 cocaine 濃度、dopamine transporter の数および dopamine D₁ 受容体の数は両系統間で有意な差はなく、serotonin transporter は DBA/2 の方が C57BL/6 よりも数が多く、dopamine D₂ 受容体は逆に DBA/2 よりも C57BL/6 の方が数が多いことも明らかとなっている (10,11)。

Cocaine の嗜好性を two-bottle choice 法を用いて検討した結果では、C57BL/6

の方が DBA/2 系マウスよりも cocaine を好むことが報告されている (2,7)。また、自己投与法を用いた検討により、C57BL/6 の方が DBA/2 系マウスよりも速く自己投与が獲得されることも報告されている (12)。

以上のように、cocaine 誘発自発運動促進作用、常同行動、その逆耐性形成および嗜好性には系統差が存在することから、これらの薬理作用の発現に遺伝因子が大きな影響を与えていると考えられる。また、自発運動促進作用は DBA/2 の方が C57BL/6 系マウスよりも作用が強いのに対し、cocaine の嗜好性は C57BL/6 の方が DBA/2 よりも高いことなどから、これらの薬理作用の発現にはそれぞれ異なる遺伝因子が関与していることが考えられる。そこで、本研究では cocaine の自発運動促進作用、その逆耐性および報酬効果について、SM/J、A/J および SMXA 組換え近交系 (リコンビナント・インブレッド; RI) 雄性マウスを用いて遺伝解析を行った。

B. 方法

本研究では、体重 26-31 g の A/J、21-25 g の SM/J および体重 19-38 g の SMXA RI 系 (26 系統) マウスを 1 群 11-12 匹として使用した。

1) Cocaine 誘発自発運動促進作用とその逆耐性の薬理遺伝学的解析

実験には cocaine hydrochloride を生理食塩液に溶解し、マウスの体重 10 g あたり 0.1 ml の割合で背部皮下に投与した。マウスの自発運動量の測定は tilting cage 法に従って行った。この装置はバケツ型ケージで、この中に入れられたマウスの動きに伴う傾きをマイクロスイッチを介してカウントし、これを自発運動量として測定するものである。マウスを

実験装置のバケツ型ケージに 1 匹ずつ入れ、30 分間新規環境に適応させた。その後、生理食塩液あるいは cocaine (20 mg/kg, s.c.) を投与し、投与後の自発運動量を 10 分間隔で 180 分間にわたり連続的に測定した。また、cocaine 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性を検討するため、生理食塩液および cocaine を 3 日おきに 7 回投与し、同様に自発運動量を測定した。自発運動量は平均値 ± 標準誤差として表示し、有意差検定は、自発運動量の経時変化には二元配置分散分析、総運動量には Wilcoxon の順位和検定を用いて行った。

遺伝解析は以下のように行った。各 SMXA RI 系において、cocaine (20 mg/kg, s.c.) 処置による自発運動量から生理食塩液処置による自発運動量を差し引いたものを cocaine (20 mg/kg, s.c.) 処置による自発運動量の変化として、自発運動促進作用のスコアとした。そして、このスコアを用いて遺伝解析用ソフト Map Manager vol. 3.0 により cocaine 誘発自発運動促進作用の発現に関与する遺伝子座について検討を行った。

2) Cocaine 誘発報酬効果の薬理遺伝学的解析

報酬効果の測定には、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。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-compartment box である。また、一方の区画は白色でその床面は滑りにくく加工しており、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。条件づけはカウンターバランス方式に従い、マウスに cocaine (8 mg/kg) あるいは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。4 日間の条件づけ試行の後、5 日目にマウスに薬物および生理食塩液のいずれも投与せずに以下のような試験試行を行った。仕切り板を床から 6 cm の高さまで引き上げ、白と黒の区画の分割部に金網製プラットホームを設置し、その上にマウスを乗せる。そして、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。各群のスコア (sec) は平均値 ± 標準誤差で表示し、有意差検定は Wilcoxon の順位和検定を用いて行った。

Cocaine 誘発報酬効果の遺伝解析は以下のように行った。各 SMXA RI 系において、cocaine (8 mg/kg, s.c.) 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 cocaine 誘発報酬効果のスコアとした。このスコアを用いて Map Manager vol. 3.0 により cocaine 誘発報酬効果の発現に関与する遺伝子座について検討を行った

C. 結果

A/J の cocaine (20 mg/kg, s.c.) 処置時の自発運動量は対照群と比較して有意な増加を示した ($F[1,226]=6.706, p<0.001$)。また、A/J では cocaine 処置 30 分後から運動量が増加し、90 分後に 55.6 ± 12.9 counts/10 min となり最大値を示し、160 分後にはほぼ対照群レベルに回復した。一方、SM/J においても cocaine 処置により、有意な増加を示した ($F[1,207]=14.982, p<0.001$)。しかし、SM/J では、

cocaine 処置直後から運動量が増加し、40 分後に 241.6 ± 38.7 counts/10 min となり最大値を示し、140 分後にはほぼ対照群レベルに回復した。A/J において、対照群では 94.0 ± 17.0 counts/180 min、cocaine 処置群では 405.0 ± 78.2 counts/180 min であり、cocaine 処置により有意な自発運動量の増加がみられた ($p < 0.01$)。一方、SM/J においても、対照群では 527.0 ± 76.8 counts/180 min、cocaine 処置群では 2469.0 ± 268.1 counts/180 min であり、cocaine 処置により有意な自発運動量の増加がみられた ($p < 0.01$)。以上の結果から、cocaine により、A/J、SM/J ともに運動量の有意な増加を示すが、その経時変化が系統間では異なることを明らかにした。

SMXA RI における cocaine 誘発自発運動促進効果は SMXA-8 の 139.8 counts/180 min から SMXA-3 の 4489.7 counts/180 min 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 cocaine 誘発自発運動促進作用の結果は連続的であったことから、cocaine 誘発自発運動促進作用の発現には複数の遺伝子が関与していると考えられる。SMXA RI における cocaine 誘発自発運動促進作用の結果を用いて遺伝解析を行った結果、5% の危険率で第 4 染色体上の D4Rik154 遺伝子座、Mup1 遺伝子座、D4Mit17 遺

伝子座、第 6 染色体上の D6Rik86 遺伝子座および D6Rik87 遺伝子座、1% の危険率で第 14 染色体上の D14 Rik 131 遺伝子座および D14 Rik 136 遺伝子座が同定された。

A/J では cocaine 処置により回数に依存して有意な自発運動量の増加、すなわち逆耐性の形成がみられた ($F[6,28]=2.463, p < 0.05$)。特に、cocaine 投与 7 回目 (1137.0 ± 169.4 counts/180 min) の自発運動量は、cocaine 投与 1 回目の自発運動量 (405.0 ± 78.2 counts/180 min) と比較して有意な増加を示した ($p < 0.05$)。一方、SM/J では cocaine の反復投与により、有意ではないが自発運動量のわずかな増加がみられた。以上の結果より、cocaine 反復投与により A/J では有意な自発運動促進作用に対する逆耐性を形成し、SM/J では逆耐性が形成されないことを明らかにした。そこで、A/J において cocaine 投与 1 回目と比較して、有意な自発運動量の増加のみみられた cocaine 投与 7 回目を逆耐性形成の指標として用いた。Cocaine 反復投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成は cocaine 投与 5 回目の運動量から 1 回目の運動量を差し引いた値をスコアとした。Cocaine の反復投与により、A/J では 732.0 counts/180 min の増加を示し、SM/J では 493.0 counts/180 min の増加を示した。また、SMXA RI における cocaine 反復投与による自発運動促進作用の逆耐性形成は、SMXA-14 の -395.0 counts/180 min から SMXA-22 の 2738.2 counts/180 min まで連続的な結果が得られた。SMXA RI における cocaine 反復投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成の結果が連続的であったことから、この逆耐性形成の発現には複数の遺伝子が関与していると考えられる。

この結果をもとに、Map Manager vol. 3.0により cocaine 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性形成に関する遺伝解析を行った。その結果、5%以下の危険率で第3染色体上の8遺伝子座および第4染色体上の5遺伝子座、第5染色体上の1遺伝子座、第8染色体上の4遺伝子座、第12染色体上の6遺伝子座および正確な位置が不明である NaA122 (B6) 遺伝子座が同定された。また、1%以下の危険率で第3染色体上の7遺伝子座、第8染色体上の16遺伝子座および第16染色体上の2遺伝子座が同定された。さらに、0.1%以下の危険率で第3染色体上の1遺伝子座および第16染色体上の2遺伝子座が同定された。以上の結果より、cocaine 反復投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成には、これらの遺伝子座上の遺伝子が関与している可能性が考えられる。

2) Cocaine 誘発報酬効果の薬理遺伝学的解析

A/J の対照群におけるスコアは 56.3 ± 38.5 sec であったのに対し、cocaine 処置群のスコアは 279.6 ± 31.3 sec であり、cocaine 処置により有意な報酬効果が誘発された ($p < 0.01$)。一方、SM/J の対照群のスコアは 52.8 ± 34.7 sec であったのに対し、cocaine 処置群のスコアは 60.7 ± 43.6 sec であり、cocaine 処置により有意な報酬効果は誘発されなかった。以上の結果より、cocaine 誘発報酬効果の発現には A/J と SM/J の間に有意な差が認められた。このことから、cocaine 誘発報酬効果の発現に遺伝因子が関与していることが明らかとなった。

A/J、SM/J および SMXA RI の cocaine 処置群のスコアから対照群のスコアを差し引いた値を cocaine 誘発報酬効果のスコアとした。Cocaine 処置による A/J

のスコアは 223.3 sec、SM/J のスコアは 7.9 sec であった。また、SMXA RI における cocaine 誘発報酬効果は SMXA-8 の -56.3 sec から SMXA-19 の 237.5 sec まで連続的な結果が得られたことから、cocaine 誘発報酬効果の発現には複数の遺伝子が関与していると考えられる。

Cocaine 誘発報酬効果の発現に関する遺伝解析の結果、5%以下の危険率で第5染色体上の D5Rik141 遺伝子座、第8染色体上の D8Rik126 遺伝子座、D8Rik127 遺伝子座、D8Rik128 遺伝子座、D8Rik129 遺伝子座、D8Rik131 遺伝子座、D8Mit10 遺伝子座、第9染色体上の D9Rik96 遺伝子座、D9Rik97 遺伝子座、D9Rik98 遺伝子座、D9Rik99 遺伝子座、D9Mit10 遺伝子座および第15染色体上の D15Rik51 遺伝子座の13遺伝子座が同定された。以上の結果より、cocaine 誘発報酬効果の発現には、これらの遺伝子座上の遺伝子が関与している可能性が示唆された。

D. 考察

近交系や選択交配動物を用いた研究から、依存性薬物の薬理作用は、遺伝因子により大きな影響を受けることが明らかにされている。Cocaine の薬理作用についても薬理遺伝学的研究から (1-12)、cocaine により誘発される種々の薬理作用の発現には、遺伝因子が関与していることが明らかとなってきている。また、組換え近交系 (recombinant inbred; RI 系) マウスを用いて薬理作用を検討することにより、そ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できる (13,14)。そこで、本研究では A/J と SM/J、さらに SMXA RI を用いて、cocaine により誘発される自発運動促進作用、その逆耐性形成および精神依存性を測定し、

これらの結果を用いて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について検討を行った。

Cocaine は神経終末における noradrenaline、dopamine および serotonin といった monoamine の再取込みを阻害し、シナプス間隙における monoamine の含量を増加させることが知られている。また、自発運動促進作用の発現には脳内における黒質-線条体系および中脳-辺縁 dopamine 神経系が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。Cocaine はこれらの神経系における dopamine の再取込みを阻害することにより、種々の薬理作用を発現すると考えられている。

Cocaine (20 mg/kg, s.c.) により誘発される自発運動量の変化を A/J および SM/J を用いて検討した結果、両系統とも有意な自発運動促進作用を示した。しかし、その経時変化には違いが見られ、SM/J では cocaine 投与 40 分後に運動量が最大になるのに対し、A/J では 90 分後に最大運動量を示した。また、SM/J の方が A/J よりも cocaine 処置による自発運動量の増加の程度が大きかった。これまでに、C3H/21bg、DBA/21bg、C57BL/61bg および BALB/cByJ を用いて検討した結果、cocaine 誘発自発運動促進作用には著明な系統差はみられたものの脳内 cocaine 濃度には有意な差がないこと(1)、さらに、dopamine transporter の密度にも差がないことが報告されている(9-11)。A/J および SM/J についてはまだこのような検討はなされていないが、この両系統間の差は cocaine の薬物動態によるものというよりは、cocaine 誘発自発運動促進作用の発現に関与する dopamine 神経系などにおける違いであると考えられる。以上より、cocaine 誘

発自発運動促進作用の発現に遺伝因子が強く影響を与えることが明らかとなった。

SMXA RI を用いて cocaine 誘発自発運動促進作用について検討した結果、cocaine により自発運動量の増加が少なかった SMXA-8 から自発運動量の顕著な増加を示した SMXA-3 まで各系統間で連続的な結果が得られたことから、cocaine 誘発自発運動促進作用の発現には複数の遺伝子が影響を与えていると考えられる。SMXA RI における cocaine 誘発自発運動促進作用の結果を用いて遺伝解析を行った結果、第 4、6、14 染色体上の 7 遺伝子座が同定された。これまでに、BXD RI を用いた研究により、cocaine 誘発自発運動促進作用には第 9、11、16 および 17 染色体上の遺伝子座が関与することが報告されている(15)。また、Miner と Marley は、BXD RI を用いて cocaine 誘発自発運動促進作用について検討し、第 3、4、5、8、9 および 16 染色体上の遺伝子座を同定している(16)。これらの報告と本研究の結果が異なっただのは、測定方法や測定時間、cocaine の用量や投与経路などが異なるためであると考えられる。

Cocaine を間欠的に反復投与することにより、自発運動促進作用の増強、すなわち逆耐性が形成される(17)。逆耐性の発現機序については明らかにされていないが、これまでに逆耐性形成には黒質-線条体系および中脳-辺縁 dopamine 神経系の投射先よりも細胞体の方が重要な役割を果たしていること、また、dopamine 神経系の細胞体側に投射している興奮性アミノ酸神経系からの入力が強関与していることなど dopamine 神経系のみならず他の神経系も関与していることが明らかとなっている(17)。Cocaine を反復投与することにより誘発される自発運動

促進作用に対する逆耐性形成について A/J および SM/J を用いて検討した結果、A/J は cocaine の投与回数に依存して有意な自発運動量の増加、すなわち逆耐性が形成されたのに対し、SM/J では cocaine を反復投与しても有意な変化は認められなかった。これまでに、DBA/2J では cocaine 反復投与により常同行動に逆耐性が形成され、C57BL/6J では逆耐性は形成されないことが報告されている(3)。さらに、cocaine 反復投与により自発運動促進作用に逆耐性が形成される DBA/2J では、逆耐性形成時に dopamine transporter の密度も増加するが、逆耐性形成と dopamine transporter の増加の経時変化は一致しないことも報告されている(6)。A/J および SM/J においてはこのような検討はなされていないが、この両系統間の差は cocaine 反復投与による自発運動促進作用に対する逆耐性の形成に関与する神経系などにおける違いであることが考えられる。以上より、cocaine 反復投与による逆耐性の形成には遺伝因子が大きな影響を与えていることが明らかとなった。

SMXA RI を用いて cocaine 反復投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成について検討した結果、cocaine 反復投与により逆耐性をほとんど形成しなかった SMXA-14 から強く形成した SMXA-22 まで各系統間で連続的な結果が得られたことより、cocaine 反復投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成には複数の遺伝子が関与していると考えられる。SMXA RI における cocaine 反復投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成の結果を用いて遺伝解析を行った結果、第 3、4、5、8、12、16 染色体上の 52 遺伝子座が同定された。これまでに、cocaine 反復投与による自発運

動量の変化について遺伝解析を行った結果、第 5、8 および 17 染色体上の遺伝子座が同定されている(15)。第 5 および 8 染色体は、この報告と本研究の両方において解析されており、さらに第 8 染色体は ethanol の反復投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成においても解析されていることから(18)、これらの染色体上には cocaine 反復投与による自発運動促進作用の変化に強く関与する遺伝子が存在すると考えられる。また、これらの相違は、この報告では cocaine 32 mg/kg を用い、反復投与による自発運動促進作用の減弱、すなわち耐性を検討しているのに対し、本研究では cocaine 20 mg/kg を用い、反復投与による自発運動促進作用の増強すなわち逆耐性を検討しているためであると考えられる。また、第 3 および 16 染色体上にはそれぞれ興奮性アミノ酸である glutamate receptor の AMPA2 受容体および NMDA 受容体 NR2A subunit の遺伝子が存在することが明らかになっている。さらに、cocaine の自発運動促進作用が AMPA 受容体および NMDA 受容体拮抗薬により抑制されるという報告もなされていることより(19, 20)、cocaine の自発運動促進作用には興奮性アミノ酸である glutamate が関与している可能性も考えられる。以上より、cocaine 反復投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成には第 3、4、5、8、12 および 16 染色体上の遺伝子が関与している可能性が考えられる。

依存性薬物における精神依存には中脳辺縁 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。Cocaine は主に dopamine 神経系の神経終末における dopamine の再取り込みを阻害し、細胞間隙における dopamine の含有量を増加することにより、dopamine 神経系の

活性化がoccurり、精神依存性を示すと考えられている。Cocaine の精神依存を検討するために、conditioned place preference 法により A/J および SM/J を用いて検討した結果、A/J では処置により有意な報酬効果を発現したのに対し、SM/J では報酬効果を発現しなかった。これまでに、two-bottle choice 法により cocaine の嗜好性を検討した結果では、C57BL/6 の方が DBA/2 よりも cocaine を好み、また self-administration 法を用いた検討でも C57BL/6 の方が DBA/2 よりも早く自己投与を獲得するが、脳内 cocaine 濃度には有意な差は認められないことが報告されている(2, 7, 12)。しかし、A/J および SM/J ではこの様な検討なされていないが、本研究においてみられた系統差は cocaine の薬物動態によるものというよりは cocaine の精神依存に関与する dopamine 神経系などの相違によるものと考えられる。以上より、cocaine の精神依存には遺伝因子が強く関与していることが明らかとなった。

SMXA RI を用いて cocaine 誘発報酬効果について検討した結果、cocaine 処置により報酬効果よりもむしろ嫌悪効果の傾向を示した SMXA-8 から強い報酬効果を発現した SMXA-19 系マウスまで各系統間で連続的な結果が得られた。この結果より、cocaine の精神依存性には複数の遺伝子が関与していると考えられる。

SMXA RI における cocaine 誘発報酬効果の結果を用いて遺伝解析を行った結果、第 5、8、9、15 染色体上の 13 遺伝子座の関与が示唆された。第 9 染色体上には dopamine D₂ 受容体および serotonin 5-HT_{1b} 受容体の遺伝子が存在することが明らかとなっており(21)、またヒトにおいて薬物の乱用および依存と dopamine D₂ 受容体の多型とが相関することから

(22)、これらの遺伝子が cocaine の精神依存に関与していると考えられる。以上より、cocaine の精神依存性には、第 5、8、9 および 15 染色体上の遺伝子が関与している可能性が示唆された。

以上の結果より、cocaine 誘発自発運動促進作用、その逆耐性形成および精神依存性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可能性のあ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ことから、薬理作用の種類により関与する遺伝子が異なることを明らかにした。

E. 結論

近年日本で開発された、組換え近交系 SMXA RI およびその祖先系である A/J と SM/J 系マウスを用いて、cocaine の数種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。Cocaine 誘発自発運動促進作用は A/J よりも SM/J の方が有意に強度であり、遺伝因子の関与が示唆された。そこで、SMXA RI を用いて遺伝解析を行った結果、第 4、6、14 染色体上の 7 遺伝子座の関与が示唆された。また、cocaine 反復投与により A/J では自発運動促進作用に対する有意な逆耐性形成が認められたのに対し、SM/J では有意な変化がみられなかった。このことから、cocaine の逆耐性にも遺伝因子が関与することが明らかとなった。そこで、SMXA RI を用い遺伝解析を行った結果、第 3、4、5、8、12、16 染色体上の 52 遺伝子座の関与が示唆された。さらに、cocaine 誘発報酬効果は A/J で有意に発現したのに対し、SM/J では有意な変化がみられなかった。したがって、cocaine の精神依存にも遺伝因子の関与

が明らかとなり、SMXA RI 系を用いて同様の遺伝解析を行った結果、第 5、8、9、15 染色体上の 13 遺伝子座の関与が示唆された。以上の結果より、cocaine の種々の薬理作用の発現に関与する可能性の高い染色体およびその遺伝子座を明らかにした。

[引用文献]

- 1) Ruth JA, Ullman EA and Collins AC: An analysis of cocaine effects on locomotor activities and heart rate in four inbred mouse strains. *Pharmacol Biochem Behav* **29**: 157-162, 1988.
- 2) Jones BC, Reed CL, Radcliffe RA and Erwin VG: Pharmacogenetics of cocaine: I. Locomotor activity and self-selection. *Pharmacogenetics* **3**: 182-188, 1993.
- 3) Tolliver BK and Carney JM: Sensitization to stereotypy in DBA/2J but not C57BL/6J mice with repeated cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* **48**: 169-173, 1994.
- 4) Tolliver BK and Carney JM: Comparison of cocaine and GBR 12935: Effects on locomotor activity and stereotypy in two inbred mouse strains. *Pharmacol Biochem Behav* **48**: 733-739, 1994.
- 5) Tolliver BK and Carney JM: Locomotor stimulant effects of cocaine and novel cocaine analogs in DBA/2J and C57BL/6J inbred mice. *Pharmacol Biochem Behav* **50**: 163-169, 1995.
- 6) Koff JM, Shuster L and Miller LG: Chronic administration is associated with behavioral sensitization and time-dependent changes in striatal dopamine transporter binding. *J Pharmacol Exp Ther* **268**: 277-282, 1994.
- 7) Morse AC, Erwin VG and Jones BC: Strain and housing affect cocaine self-selection and open-field locomotor activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **45**: 905-912, 1993.
- 8) Morse AC, Erwin VG and Jones BC: Behavioral responses to low doses of cocaine are affected by genetic and experimental history. *Physiol Behav* **58**, 891-897 (1995)
- 9) Reith MEA and Selmeci G: Cocaine binding sites in mouse striatum, dopamine autoreceptors, and cocaine-induced locomotion. *Pharmacol Biochem Behav* **41**: 227-230, 1991.
- 10) Womer DE, Jones BC and Erwin VG: Characterization of dopamine transporter and locomotor effects of cocaine, GBR 12909, epidepride, and SCH 23390 in C57BL and DBA mice. *Pharmacol Biochem Behav* **48**: 327-335, 1994.
- 11) Erwin VG, Womer DE, Campbell AD and Jones BC: Pharmacogenetics of cocaine: II. Mesocorticolimbic and striatal dopamine and cocaine receptors in C57BL and DBA mice. *Pharmacogenetics* **3**: 189-196, 1993.
- 12) Grahame NJ and Cunningham CL: Genetic differences in intravenous cocaine self-administration between C57BL/6J and DBA/2J mice. *Psychopharmacology* **122**: 281-291, 1995.
- 13) Gora-Maslak G, McClearn GE, Crabbe JC, Phillips TJ and Belknap JK: Use of recombinant inbred strains to identify quantitative trait loci in psychopharmacology. *Psychopharmacology* **104**: 413-424, 1991.
- 14) Wehner JM, Pounder JI and Bowers BJ: The Use of recombinant inbred strains to study mechanisms of drug action. In *Behavioral and Biochemical Issues in Substance Abuse*, ed. George FR, Clouret D and Stimmel B, pp. 89-107, The Haworth Press, 1991.

- 15) Tolliver BK, Belknap JK, Woods WE and Carney JM: Genetic analysis of sensitization and tolerance to cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **270**, 1230-1238 (1994)
- 16) Miner LL and Marley RJ: Chromosomal mapping of the psychomotor stimulant effects of cocaine in BXD recombinant inbred mice. *Psychopharmacology* **122**: 209-214, 1995.
- 17) Kalivas PW and Stewart J: Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res* **16**: 223-244, 1991.
- 18) Phillips TJ, Lessov CN, Harland RD and Mitchell SR: Evaluation of potential genetic associations between ethanol in BXD/Ty recombinant inbred mice. *J Pharmacol Exp Ther* **277**: 613-623, 1996.
- 19) Pulvirenti L, Swerdlow NR, Koob GF: Nucleus accumbens NMDA antagonist decreases locomotor activity produced by cocaine, heroine or accumbens dopamine, but not caffeine. *Pharmacol Biochem Behav* **40**: 841-845, 1991.
- 20) Witkin JM: Blockade of the locomotor stimulant effects of cocaine and methamphetamine by glutamate antagonists. *Life Sci* **53**: PL405-410, 1993.
- 21) Copeland NG, Jenkins NA, Gilbert DJ, Eppig JT, Maltais LJ, Miller JC, Dietrich WF, Weaver A, Lincoln SE, Steen RG, Stein LD, Nadeau JH and Lander ES: A genetic linkage map of the mouse: Current applications and future prospects. *Science* **262**: 57-66, 1993.
- 22) Commings DE, Muhleman D, Ahn C, Gysin R and Flanagan SD: The dopamine D2 receptor gene: A genetic risk factor in substance abuse. *Drug Alcohol Depend* **34**: 175-180, 1994.

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

分担研究課題：メタアンフェタミン反復投与後における腹側被蓋野一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

分担研究者 笹 征史¹⁾

共同研究者 天野 託¹⁾、松林弘明¹⁾、石原熊寿²⁾

広島大学医学部薬理学教室¹⁾、臨床薬学²⁾

研究要旨

メタアンフェタミン(MAP)の反復投与後(5日間)後に、腹側被蓋野(VTA)のドーパミンニューロンにおいて、ドーパミンおよびMAPに対するドーパミンD2レセプターの感受性亢進が起ることを報告してきた。今回は同様のMAPの反復投与によりVTAのドーパミンD1およびD3レセプターに感受性の変化が起こるか否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. : MAP投与群)あるいは生理的食塩水(生食投与群)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日後においてVTAドーパミンニューロンに対するドーパミンD1およびD3レセプターアゴニストならびにD1/D2アゴニスト同時投与時の作用を検討した。VTAドーパミンニューロンは電気生理学的性状(低頻度の自発発火、長時間持続性活動電位、大きな過分極および1秒間の下向きの矩形波を与えたときのtime-dependent voltage sag)によって同定した。(1)電流固定下に、SKF38393(D1アゴニスト)を単独投与した場合には生食投与群もMAP投与群においても膜電位に影響を及ぼさなかった。一方、talipexole(D2アゴニスト)は用量依存性に生食投与群およびMAP投与群において過分極を惹起した。SKF38393とtalipexoleを同時投与したときにえられる過分極の増大作用はMAP投与群において生食投与群よりもさらに増大した。(2)VTAドーパミンニューロンの静止膜電位におよび自発発火はPD128907によって影響を受けなかった。以上の成績から、MAP反復投与により、VTAドーパミンニューロンにおいてドーパミンD2レセプターのみならずD1レセプターにも感受性亢進が起ると考えられる。しかし、VTAドーパミンニューロンにはD3レセプターが存在しないか、機能していないと考えられる。

A. 研究目的

MAPを連用した場合、次第に神経細胞のMAPに対する感受性が亢進し容易に精神病様症状が発現する逆耐性現象が起こる事が知られている^{3,4,5)}。我々はこれまでこの逆耐性現象についてニューロンレベルでの変化を明らかにするために主として電気生理学的研究を行ってきた。すなわち、in vivoの実験においてMAP(5mg/kg/日、s.c.)を5日間反復投与した場合、側坐核ニューロンは、マイクロイ

オントホレーシス法により投与したドーパミン及びMAPに対し、最終投与後24~30時間後においては低感受性を、最終投与後5日後においては過感受性を、10日後には生理的食塩水投与群の動物におけると同程度の感受性を示すことを報告した¹⁾。さらに、スライスパッチクランプ法を用いた研究において、新生児ラットに対する同様の処置をした場合、MAP投与中止5日後において、VTA

ドーパミンニューロンのD2レセプターはドーパミンあるいはD2アゴニストのtalipexoleに対し感受性亢進が起きていることを報告した²⁾。今回さらに、MAPの同様の処置によりVTAドーパミンニューロンにおけるドーパミンサブタイプであるD1およびD3レセプターに感受性の変化が起こるかを明らかにするために、スライス標本を用い、パッチクランプ法により検討を行った。

B. 研究方法

生後7日齢の雄性WistarラットにMAP(5mg/kg/日、s.c. : MAP投与群)を連続5日間投与した。コントロール群として同用量の生理的食塩水(生食投与群)

を同様に投与した。

最終投与より5日後に断頭し、氷冷下にVTAを含む厚さ150 μ mのスライス標本を作成し、人工脳脊髄液(イオン組成(mM) : NaCl, 113; KCl, 3; NaHCO₃, 25; NaH₂PO₄, 1; glucose, 11; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; pH 7.4)にて灌流している小水槽内(容量 : 1ml; 35 $^{\circ}$ C)に1時間保持後に実験に供した。パッチ電極(イオン組成(mM) : K-gluconate, 130; KCl, 10; NaCl, 9; CaCl₂, 1; MgCl₂, 2; HEPES, 10; EGTA, 10; pH 7.3)を用い、顕微鏡直視下にVTAドーパミンニューロンを同定し、室温下にホールセル記録を行った(Fig.1A)。薬物は3ml/min速度で灌流している液中に投与した。

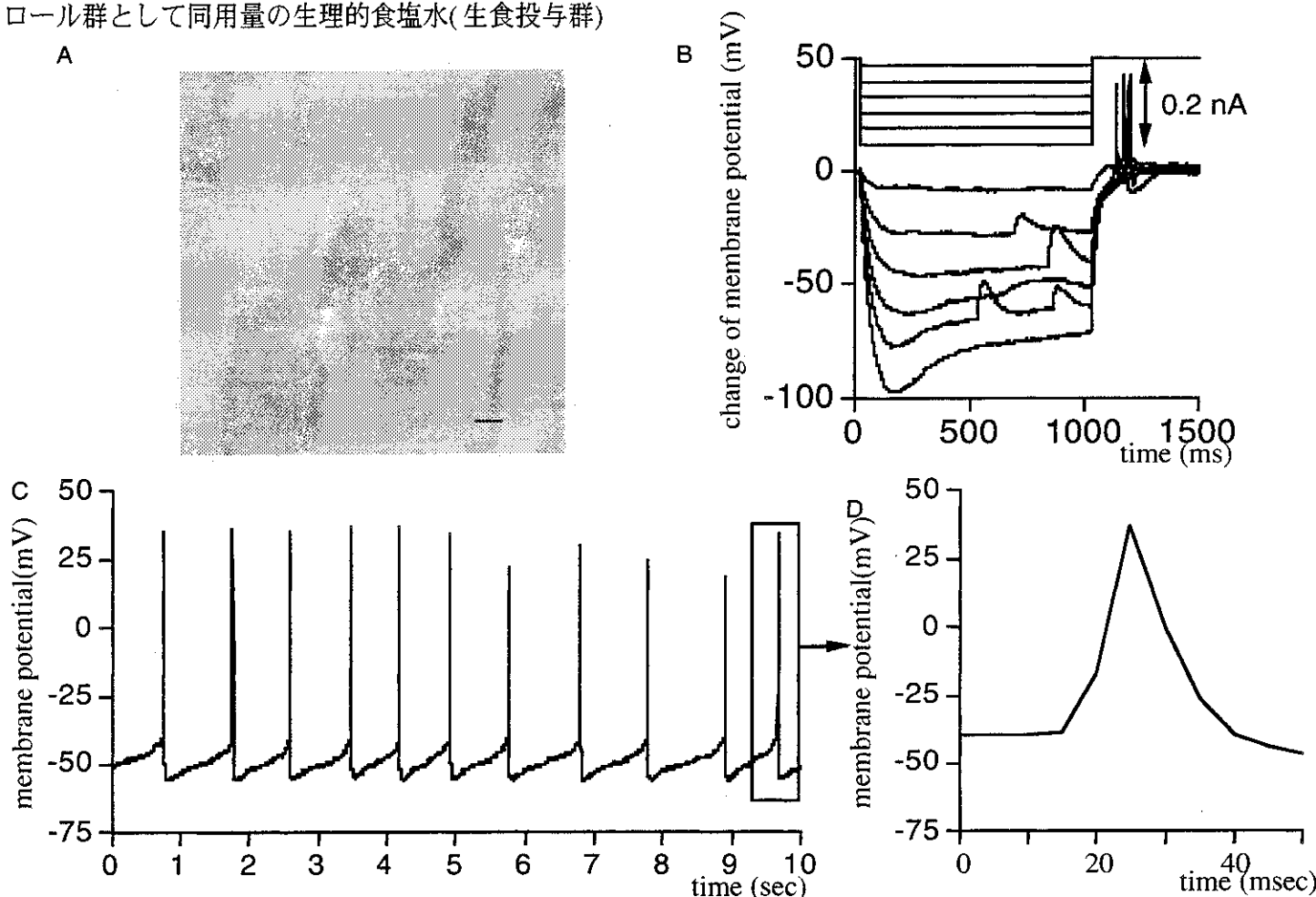


Fig.1 (A) Ventral tegmental area (VTA) neuron of the rat under Nomarski optics. Horizontal bar 10 μ m. (B) Time-dependent voltage sag of VTA dopamine neuron. (C) Spontaneous firing of VTA dopamine neurons. (D) Fast sweep of recording of spontaneous firing.

C. 研究結果

VTA ドーパミンニューロンは電気生理学的性状により同定した。すなわちドーパミンニューロンは自発発火は少なく、0.1~1/sec以下であり、活動電位は1msec以上の長時間持続性であること、活動電位に引きつづいておこる大きな過分極が出現することや1秒間の過分極性のステップパルスを加えた時に、膜電位の過分極が大きくなるほど、膜電位にtime-dependent sag (time dependent hyperpolarizing rectification) が観察され事により同定できる(Fig.1B)。顕微鏡下で測定したドーパミンニューロンの長径は25~35 μm であった (Fig.1A)。

電流固定下のドーパミンニューロンは生食投与群およびMAP投与群の両群においてSKF38393(D1アゴニスト)100 μM のによっては膜電位に変化をきたさなかつた。しかし、SKF38393 (100 μM) と talipexole(D2アゴニスト,100 μM)を同時投与した場合、talipexole単独投与よりもさらに大きな過分極が認められた (Fig. 2A)。SKF38393による talipexole作用の増大効果はMAP投与群においてさらに増大した(Fig. 2&3)。SKF38393 (100 μM) と talipexole (100 μM) の同時投与による増大率 [(SKF38393+talipexole 投与時の過分極/talipexole単独投与の過分極) $\times 100$]は生食群において、129.0%であり、MAP投与群においては、

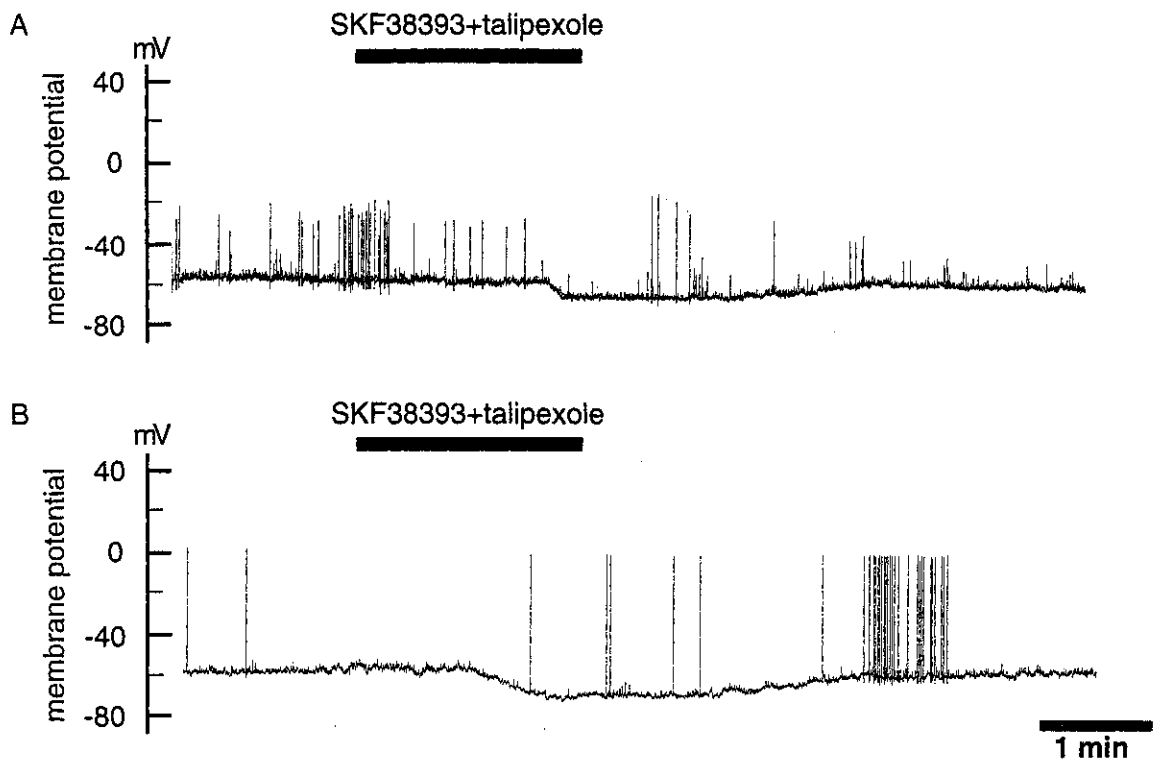


Fig.2 Effects of concomitant application of SKF38393(D1 agonist) and talipexole (D2 agonist) on the membrane potentials of dopamine neurons of ventral tegmental area in saline (A)- and MAP (B)- treated groups.

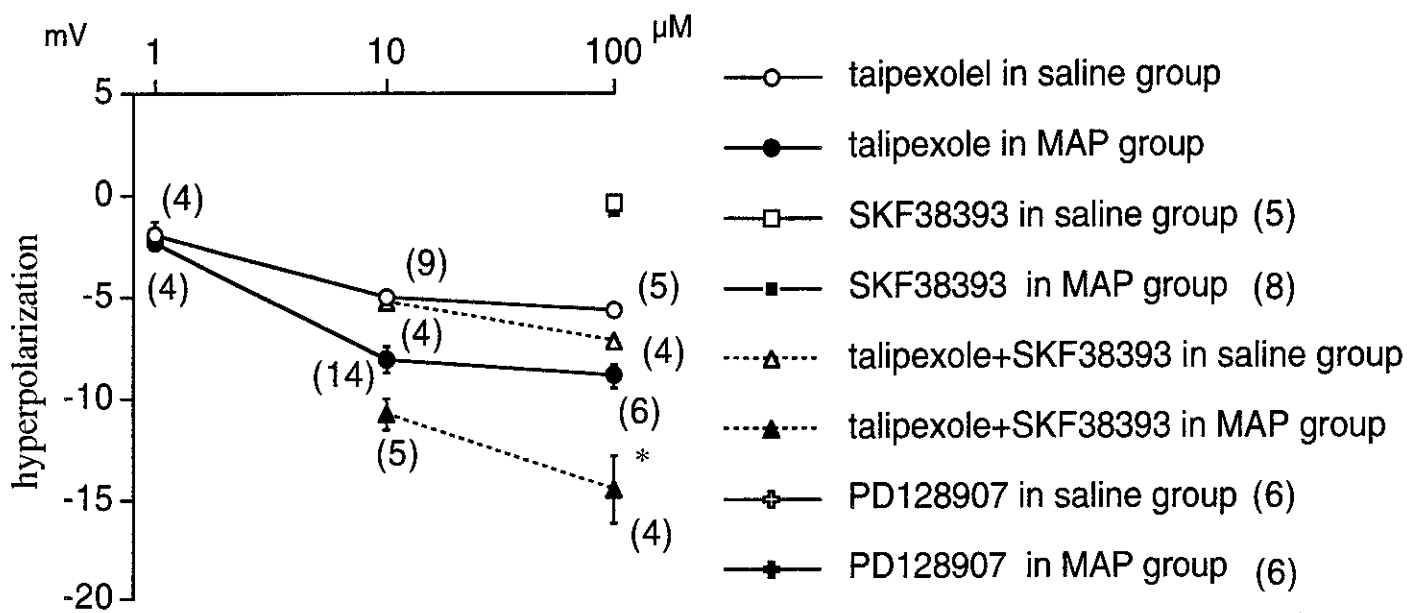


Fig.3 Effects of talipexole (D2 agonist) and SKF38393(D1 agonist) and their combination on the membrane potentials of dopamine neurons of ventral tegmental area in physiological saline- and methamphetamine (MAP)-treated group. ():number of neurons. verticalbars: s.e.

162.3%となり、MAP投与群において有意 ($p < 0.01$) に大であった。

(2) D3アゴニストであるPD128907 (100 μM) を単独投与した場合には、生食投与群およびMAP投与群においても共に膜電位に影響を及ぼさなかった。

D. 考察

VTAドーパミンニューロン活動はその樹状突起から遊離されるドーパミンによりD2レセプター (オートレセプター) を介して抑制される。この抑制はオートレセプターを介してカリウムチャンネルが開放されることにより細胞内から外にK⁺を流出することによって過分極が起こる。この時D1レセプターの活性化のみではドーパミンニューロン活動に変化はきたさない。し

かし、D1レセプターを刺激するとD2レセプターの活性化が増大される^{7,8)}。今回の研究ではMAP反復投与によってもD1レセプターアゴニストの単独投与ではニューロン活動に変化は認められない事が明らかにされた。しかし、MAP反復投与によりD1レセプターとD2レセプターの同時刺激によるD2レセプターの反応の増大はさらに増大した。このことからMAP反復投与によりD1レセプターにも感受性の亢進が起こるものと考えられる。一方、VTAドーパミンニューロンはD3アゴニストによって影響を受けなかった。このことはVTAドーパミンニューロンにはD3レセプターが存在していないか、機能していないものと考えられる。最近、D3レセプターの遺伝子がVTAにはほとんど存在しないとの報告があり、今回の成績と一致している⁶⁾。

E. 結論

MAP反復投与により、VTAドーパミンニューロンにおいてドーパミンD2レセプターのみならずD1レセプターにもドーパミンおよびMAPに対し感受性亢進が起ると考えられる。VTAドーパミンニューロンにはD3レセプターが存在していないと思われる。

参考文献

1. Amano T., Matsubayashi H., and Sasa M.: Hypersensitivity of nucleus accumbens neurons to methamphetamine and dopamine following repeated administrations of methamphetamine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 801:136-147, 1996
2. Amano T., Matsubayashi H., Muhammad A., and Sasa M.: Dopamine D2 receptor-mediated hypersensitivity in VTA dopamine neurons following repeated methamphetamine treatment with the patch clamp method. *Japan.J. Pharmacol.*, 79, suppl.I, 223P, 199, 1999.
3. Bickel W. K., DeGrandpre R. J. and Higgins S. T. : The behavioral economics of concurrent drug reinforcers: a review and reanalysis of drug self-administration research . *Psychopharmacology (Berl)*, 118, 250-259, 1995.
4. Carroll M. E. : PCP and hallucinogens. *Adv Alcohol Subst Abuse*, 9, 167-910, 1990.
5. Collier H. O.: Cellular site of opiate dependence. *Nature*, 283, 625-629, 1980.
6. Diaz J., Levesque D., Lammers C.H., Griffon N., Martres M. P., Schwartz J. C. and Sokoloff P.: Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience*, 65, 731-745, 1995.
7. Momiyama T., Sasa M., and Takaori S.: Enhancement of D2 receptor agonist-induced inhibition by D1 receptor agonist in the ventral tegmental area. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 713-718, 1993
8. Momiyama T., Todo N., and Sasa M.: A mechanism underlying dopamine D1 and D2 receptor-mediated inhibition of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 933-940, 1993

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

分担研究課題名: メタンフェタミン逆耐性動物モデルにおけるメタンフェタミン体内動態
および脳内移行の解析

分担研究者: 長谷川 高明

共同研究者: 高木 健三、柴田 英治、高木 健次、北市 清幸

名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

研究要旨

規制薬物の薬物依存形成と薬物体内動態の関係を明らかにすることを目的として、依存形成薬物メタンフェタミン(MAP)の血中濃度および脳組織内濃度の時間推移をラットを用いて検討した。

MAP(6 mg/kg)を1日1回5日間投与した後21日間休薬したラット(MAP逆耐性群)に5 mg/kgのMAPを静脈内注入したところ、MAPの血中濃度-時間推移は生理食塩水を投与したラット(コントロール群)に比して有意に高値を示した。薬物動態学的パラメーターはMAP逆耐性群でMAPの全身クリアランスが有意な減少と、MAP体内分布容積(Vd)の有意な低下が観察された。また、MAP逆耐性群では脳組織間隙内のMAP濃度においてもコントロール群に比してコントロール群)に比して有意に高値を示した。MAP(5 mg/kg)を投与した後2時間後に各臓器を取り出し、組織中MAP濃度を検討したところ、MAP逆耐性群で肺および心臓でのMAP集積性が有意に減少していた。以上の結果より、MAP逆耐性群における血漿中および脳組織間隙内MAP濃度の上昇にはMAPの組織移行性の変化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

血液脳関門でのMAPの挙動を検討するために、蛋白結合率(53.9%)によって補正した血漿中遊離型MAP濃度とマイクロダイアリシス法によって得られたMAP脳透析液濃度を回収率(17.3%)で補正した脳組織間隙内遊離型MAP濃度の関係を検討したところ、脳組織間隙内遊離型MAP濃度は血漿中遊離型MAP濃度よりも高く維持されていることが明らかとなり、血液脳関門におけるMAPの輸送には脂溶性に基づく受動輸送だけでなく薬物輸送担体を介した能動輸送が関与していることが推察された。

以上の結果よりMAP依存における神経機能の変化にMAP体内動態および脳内移行の変化が一部関与していることが示唆された。今後は血液脳関門におけるMAP輸送機構、特に薬物輸送単体との関与を解明することが今後の検討課題となった。

A.研究目的

精神刺激薬メタンフェタミン(MAP)は依存薬であり、長期連用によって薬物に対する反応性が増大するいわゆる逆耐性現象を発現する。

MAPを連続投与した後、再度MAPを投

与すると過行動や常同行動が著明に増加することは逆耐性形成(行動感作)現象として比較的古くから知られている。すでにこの現象における脳内ドパミン作動性神経系の活性の亢進、すなわち神経終末からのドパミン遊離の上昇¹⁴⁾、ドパミントラ

ンスポーター発現量の変化⁷⁾などが確認されており、神経科学的側面での逆耐性現象の研究はかなり進展しているといえる。

一方、MAP の体内動態、特に逆耐性形成後の MAP 体内動態の報告は極めて少ない。これは、MAP の血中濃度が非常に低く検出が難しいこと、MAP の体内動態の種差が大きいこと、あるいは逆耐性モデルに対するコンセンサスが得られていないため投与量、休薬期間にばらつきがあることなどが原因であると推察される。また、ラットにおける MAP 薬物動態学的パラメーターは系統、投与量および解析モデルの選択などにより報告間に大きな差異がある。最近 Riviere らは SD ラットにおける MAP 体内動態を検討し、同一系統の個体間でも分布容積 (Vd)、血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) にはばらつきが大きいことを報告している¹²⁾。そして他の報告との差異についても言及し、その原因として高容量の MAP 投与による心血管系興奮作用が血流量を増加させ、肝クリアランスを増大させると共に組織移行性 (分布容積) を変化させる可能性があるとして指摘している¹²⁾。

逆耐性形成後の MAP 脳内濃度の検討にはわが国の Mizugaki らの報告がある^{8,9)}。彼らは MAP を連続投与したマウスではいくつかの脳部位で MAP の集積性が増大すること⁸⁾、MAP 逆耐性イヌでは MAP 血中濃度には変化がないものの PET スキャンで解析した場合、脳内各部位で MAP 脳内濃度が上昇することを報告している⁹⁾。

最近、Vanderschuren らは MAP の活性代謝物である amphetamine をラットに単回投与するだけで逆耐性現象が成立することを報告した¹⁴⁾。これはたった一回

の amphetamine 投与が脳の可塑性を変化させ、依存を形成する能力があることを示唆している。きわめて重要な知見である。しかし、薬物動態学的観点から見れば単回投与で組織に大量に移行した amphetamine が反復投与と同等の効果を発現したと考えることもできる。

そこで本研究では、従来用いられている MAP 逆耐性モデルラットを用いて MAP 体内動態および脳移行に変化があるかどうかについて薬物動態学的側面から検討を行った。

B. 研究方法

1. 試薬

塩酸メタンフェタミン (MAP) は大日本製薬製、 β -フェニルエチルアミン (PEA) は Sigma 社製、ダンシルクロライド (DNS) は Merck 社製をそれぞれ使用した。その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

2. 動物

日本 SLC で購入した Wistar 系雄性ラット (体重 260-300 g) を使用した。動物は温度 (22 - 24 °C)、湿度 (55 ± 5 %) の条件下で自由摂取、自由給水のもと少なくとも 3 日間飼育したものを使用した。

3. MAP 逆耐性動物モデルの作成

MAP 逆耐性動物モデルの作成は Ujike らの方法¹⁴⁾を一部改変して行った。すなわち、ラットに MAP (6 mg/kg) を 1 日 1 回 5 日間、腹腔内に連続投与した後、21 日間休薬して MAP 逆耐性群を作成した。対照には生理食塩水を 1 日 1 回 5 日間投与した後、休薬した動物をコントロール

群として使用した。原法での休薬期間は7日間であるが、MAPの体内残存の影響をできるだけ排除するため3倍の21日の休薬期間を設定した。なお、今回、行動学的評価のデータは示さないが、Repeated MAP群はコントロール群に比してMAP(5 mg/kg)静脈内投与によって誘発される常同行動および過行動が増強され、逆耐性が形成されていることを確認している。

3. 手術

MAP注入および血液採取のための静脈へのカニューレシオンおよび脳組織内薬物濃度測定のためのダイアリシスプローブの埋め込みはすべてペントバルビタール(50 mg/kg)麻酔下で行った。すなわち、右頸静脈内にはポリエチレンチューブを⁹⁾、線条体(AP +0.2 mm DV -4.5 mm)¹¹⁾にはKitaichiらの方法⁵⁾に基づき、線条体を水平に横切る形でダイアリシスプローブ(AN69 ホローファイバー)を各側3 mmずつ組織を灌流するように埋め込んだ。

4. 薬物投与

MAPは生理食塩水に溶解し、静脈内投与では体重100 gあたり0.2 mlを投与した。

5. 採血およびマイクロダイアリシス

MAP(5 mg/kg)を静脈内投与後、静脈内に埋め込んだカニューレより経時的に血液を約0.2 ml採取すると共にマイクロダイアリシスプローブに5 μ l/minの流速でリングル液を還流し経時的に脳透析液を採取した¹¹⁾。採血後、血液は6,000 rpmで10分間遠心して血漿を分離した。サンプルはすべて-30°Cで保存し、測定に供した。なお、5 μ l/minの流速における in

vitroでのMAP回収率は17.3%であり、脳内プローブの位置は標準的な組織学的手法を用いてその部位を確認した。

5. 組織中MAP濃度および血液生化学的パラメーターの測定

MAP(5 mg/kg)を静脈内投与後、2時間後にペントバルビタール麻酔を施し、腹部大動脈より全採血を行った。その後、脳、腎臓、肝臓、肺、心臓、筋肉を取り出し、MAP濃度測定まで組織サンプルはすべて-30°Cで保存した。

血液は血漿に分離し、各種生化学的パラメーターを測定した。

組織はその後、湿重量の4倍の氷冷した精製水中で氷冷状態のままホモゲナイズし、そのホモジネート中のMAP濃度を測定した。

8. MAP測定⁴⁾

血漿あるいは組織ホモジネートサンプルはその50 μ lを取り、飽和食塩溶液50 μ l、5% NaOH溶液10 μ l、内部標準物質 β -フェニルエチルアミン(0.5 μ g/ml, PEA)含有アセトニトリル溶液350 μ lと激しく混和し、除蛋白およびMAPの抽出を行った。遠心して蛋白を沈殿させた後、アセトニトリル層300 μ lを分取し、窒素ガスにて蒸発乾固させた。乾固したサンプルに10 mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0)100 μ l、1 mMダンシルクロライド(DNS)含有アセトニトリル溶液100 μ lを加え、遮光下で45°C、1時間反応させた。反応後、サンプルは直ちに氷冷し、HPLCによるMAP定量に供した。

一方、マイクロダイアリシスによって採取したリングル液はその全量を取り、PEA(0.5 μ g/ml)含有アセトニトリル溶液350 μ lと