

Fig. 1 コントロール群(control)とMAP逆耐性群(Repeated MAP)におけるMAP(5mg/kg)静脈内投与時の血漿中(A)および脳組織間隙内(B)のMAP濃度-時間推移
* p<0.05, ** p<0.01 vs. corresponding control group.

混和し窒素ガスにて蒸発乾固させ、血漿サンプルと同様に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 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、血漿サンプルと同様に HPLC による MAP 定量に供した。なお、検量線には既知濃度の MAP を血漿中またはリングル液中に添加したものを上記と同様の抽出および反応操作により MAP をダンシル化したものを使用した。

DNS-MAP 測定は LC-6A システム(島津)を用い、移動相には 1mM イミダゾール含有アセトニトリル-水 (80 : 20) 溶液 (pH 7.0)を用いた。蛍光検出器(RF-530)はその波長を Ex. 343 nm、Em. 530 nm として蛍光を検出した³⁾。

9. 薬物速度論的解析

MAP 体内動態の解析は Winnonlin Estimation Program を用いてモデル非依存的に解析した。

$$Vd_{ss} = (\text{Dose} \times \text{AUMC}) / \text{AUC}^2$$

$$CL_{sys} = D / \text{AUC}$$

$$t_{1/2} = 0.693 / k_{e1}$$

なお、 Vd_{ss} は分布容積を、 CL_{sys} は全身クリアランスを、 $t_{1/2}$ は薬物の半減期を示している。また、AUMC は 1 次モーメント曲線下面積を、AUC は血中濃度-時間曲線下面積を、 k_{e1} は消失速度定数をそれぞれ表している。

C. 研究結果

コントロール群および MAP 連続投与で作成した MAP 逆耐性群に MAP (5 mg/kg) を静脈内投与後、経時的に採血し、その MAP 濃度を測定したデータを Fig. 1A に示す。MAP の血中濃度は両群とも時間依存的に減少したがいずれの時間においても MAP 逆耐性群の濃度が高く、MAP 投与 2 時間後まで有意に高値を示した。

Table 1 にはそのデータを解析した薬物動態学的パラメーターを示した。MAP 逆耐性群では分布容積の有意な低下、血中濃度-時間曲線下面積の有意な上昇と全身クリアランスの有意な低下および半減期の有意な遅延が観察された。

一方、MAP (5 mg/kg) 投与後の脳透

Table 1 MAP (5 mg/kg)投与時の薬物動態学的パラメーター

	コントロール群	MAP 逆耐性群
AUC (ng · h/ml)	1000 ± 148	1411 ± 93 **
CL _{sys} (L/h/kg)	5.56 ± 0.68	3.58 ± 0.22 *
V _{d ss} (L/kg)	7.29 ± 1.03	4.91 ± 0.22 *
t _{1/2} (min)	47.4 ± 4.4	57.1 ± 1.4 *

* p<0.05, **p<0.01 vs. コントロール群

析液濃度は投与直後にピークを示し、その後、時間経過とともに減少した (Fig.1B)。MAP 逆耐性群での脳透析液濃度はいずれの時間においてもコントロール群に比して有意に高値であった。

MAP の組織移行性を検討する目的で各臓器における MAP 濃度を測定し、血

漿中濃度との比を換算した。結果は Fig.2 に示すとおりであり、今回検討した臓器の MAP 濃度はいずれも血漿中濃度に比してはるかに高濃度であった。コントロール群では腎臓の MAP 集積性が最も高く、ついで肺 > 肝臓 > 脳 ≧ 心臓 > 筋肉の順となった。MAP 逆耐性群ではコントロール群に比して肺および心臓での MAP 集積性が有意に低下していた。

一般に血液脳関門は遊離型薬物のみが輸送されると考えられている。そこで血液脳関門における MAP 輸送機構を検討する目的で、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 濃度の相関関係を検討した。結果は Fig. 3 に示すようであり、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た。血漿中遊離型 MAP 濃度が高くなるとコントロール群、MAP 逆耐性群のいずれも脳組織間隙内遊離型 MAP 濃度が上昇しにくくなり、いわゆる飽和現象が観察された。しかし、MAP 逆耐性群の脳組織間隙内遊離型 MAP 濃度は血漿中遊離型 MAP 濃度が上昇してもコントロール群に比して飽和がかかりにくいことが明らかとなった。

なお、結果には示さないが腎機能および肝機能を示す血清学的パラメーターには両群間に有意な差が見られなかった。

D. 考察

今回、我々は MAP を連続投与して作成した MAP 逆耐性ラットを用いて MAP 体内動態をコントロール群と比較検討した。

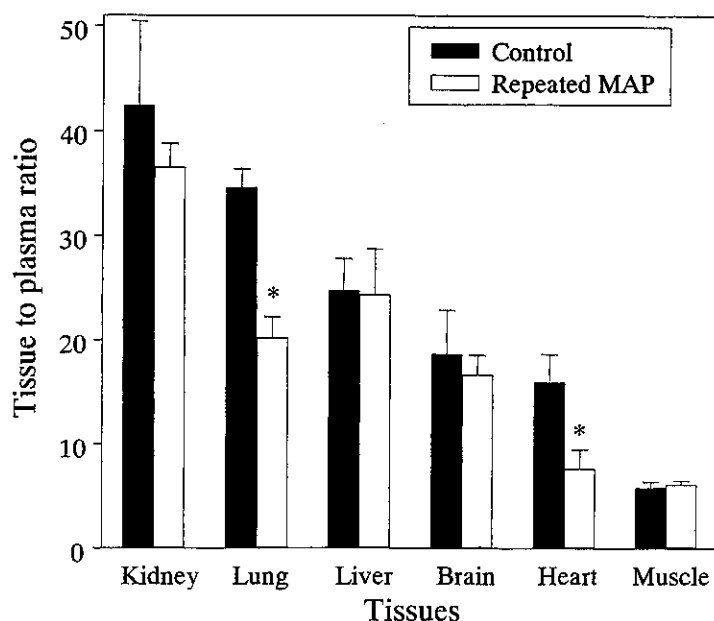


Fig. 2 コントロール群(control)とMAP逆耐性群(Repeated MAP)におけるMAP(5mg/kg)静脈内投与2時間後の血漿中MAP濃度に対する組織中MAP濃度の比率

* p<0.05, corresponding control group.

るのに必要な能動輸送系を介して脳あるいは胎児へMAPが取り込まれている可能性を示唆しているものと思われる。

さらに、今回の研究結果は、MAP 逆耐性動物ではコントロール群に比して脳内への MAP 取り込み能が上昇していることを明らかにした。この結果は、コントロール群に比して MAP 逆耐性動物では少なくとも脳内に高濃度の遊離型 MAP を保持しやすくなっていることを示している。したがって、MAP 逆耐性動物での行動感作現象やさまざまな神経機能の変化の一部には MAP の脳移行性の増大による脳組織間隙内遊離型 MAP 濃度上昇が関与していることが示唆された。

最近、有機カチオンの輸送担体である OCTN2 がクローニングされたが¹⁵⁾、この輸送担体は MAP 輸送能を有していることが明らかにされた¹⁰⁾。さらに興味深いことにラットではこの OCTN2 は心臓、腎臓、胎盤そして脳に発現している¹⁶⁾。今後、MAP の組織取り込みに変化が認められた心臓および肺、そして取り込み能に変化のあった脳組織を用い、OCTN2を含めた有機カチオン輸送担体の発現について検討を進め、MAP 逆耐性動物における分布容積の変化や脳取り込み機構との関連を明らかにする予定である。

F. 結論

本実験において MAP 逆耐性モデルラットではコントロール群に比して

- 1) 血漿中 MAP 濃度が有意に高値であること
- 2) 脳組織間隙 MAP 濃度が有意に高

値であること

- 3) 肺および心臓での MAP の組織移行性が低下していること
- 4) 血液脳関門での MAP 取り込み能力に変化が生じていることが明らかになった。

今年度の結果を元に、MAP 逆耐性モデルラットを用いて MAP の脳移行あるいは組織移行の変化のメカニズムを検討することが今後の検討課題となった。

[参考文献]

- 1) Burchfield D.J.: Disposition and pharmacodynamics of methamphetamine in pregnant sheep. JAMA, 265: 1968-1973, 1991.
- 2) Busto U., Bendayan R., Sellers E.M.: Clinical pharmacokinetics of non-opiate abused drugs. Clin. Pharmacokinet., 16: 1-26, 1989.
- 3) Hayakawa K., Hasegawa K., Imaizumi N.: Determination of amphetamine-related compounds by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence and fluorescence detections. J. Chromatogr., 464: 343-352, 1989.
- 4) 北市清幸, 高木健次, 柴田英治: 依存性薬物メタンフェタミンの脳内移行に関する基礎的検討. 第96回日本薬理学会近畿部会 要旨集, p. 32.
- 5) Kitaichi K., Hori T., Srivastava L. K.: Antisense oligodeoxynucleotides against the muscarinic m_2 , but not m_4 , receptor supports its role as autoreceptors in the rat hippocampus. Mol. Brain Res., 67: 98-106, 1999.

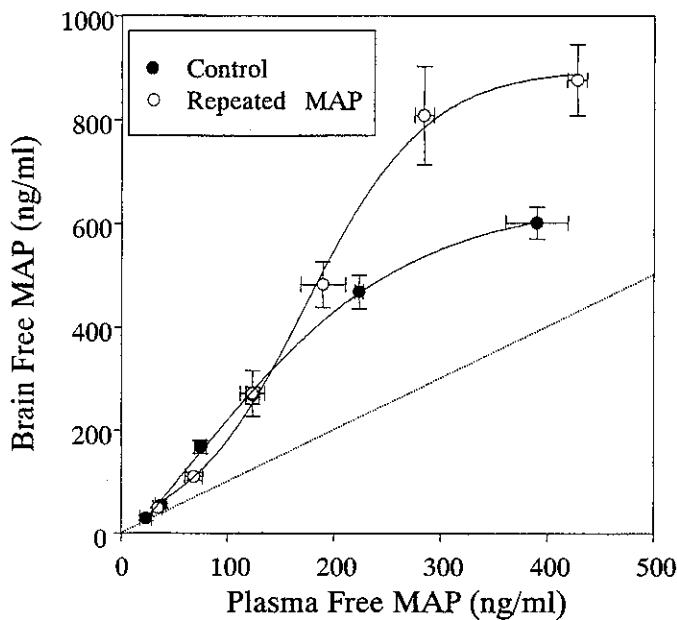


Fig. 3 コントロール群(control)とMAP逆耐性群(Repeated MAP)における血漿中遊離MAP濃度と脳組織間隙内遊離MAP濃度の相関
点線はy軸=x軸を示している。

その結果、MAP 逆耐性群では血中 MAP 濃度の有意な上昇とそれに伴う脳組織間隙内 MAP 濃度の有意な上昇が観察された。また、MAP 逆耐性群では MAP の全身クリアランス(CL_{sys})が有意に低下していた。MAP の体内からの消失には腎排泄と肝代謝が重要であるが、腎機能および肝機能を示す血清学的パラメーターには両群間に有意な差が見られなかった。したがって、MAP 腎排泄の低下あるいは肝代謝能の低下がこれらの変化に寄与している可能性は少ないものと思われる。

そこで我々は分布容積(V_{dss})の変化に着目し、組織中 MAP 濃度の変化について検討を行った。その結果、MAP 逆耐性群では肺および心臓での MAP 集積性の有意に減少していることが明らかになった。以上の結果より、一部臓器での MAP 取り込みの低下あるいは組織からの MAP 汲みだしの促進が分布容積の減少に寄与し、

血中 MAP の消失遅延に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Mizugakiらはイヌを用いた検討で逆耐性形成時に脳内濃度が上昇するものの MAP 血中濃度-時間推移にはコントロール群との間に差がないことを報告している⁹⁾。一方、ヒトでは MAP 依存患者では逆に MAP 分布容積の増加が起こることが報告されている²⁾。したがって、この分布容積の変化は MAP 逆耐性に普遍的な現象ではない可能性も否定できない。したがって分布容積の変化のメカニズムについてはさらに詳細な検討を行う必要がある。

血液脳関門にはグルコース、アミノ酸、モノカルボン酸などの栄養物質を血液中より取り込むそれぞれの栄養物質輸送担体、ホルモンや炎症性物質を輸送するペプチド輸送担体などが存在することが確認され、各種薬物の脳移行へは単純拡散だけではなく、各種輸送担体を介した脳移行と排出が複雑かつ非特異的に行われていることが示唆されている。今回の我々は脳組織間隙遊離 MAP 濃度が血漿中遊離 MAP 濃度よりも高く維持されていることを見出した。これは血液脳関門が MAP 濃度勾配を脳組織側で高く維持する能力を持っていることを示唆している。また、脳組織間隙遊離 MAP 濃度と血漿中遊離 MAP 濃度の関係が飽和を示したことより、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は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。血液胎盤関門でも血液脳関門と同様の現象が観察されており、妊娠羊に MAP を投与した場合、胎児の血漿中 MAP 濃度は母体よりも高く維持されることがすでに報告されている¹⁾。これらの結果は、生体必須物質を輸送す

- 6) Kitaichi K., Wang L., Iwase M.: *In vivo* evidence for the role of nitric oxide in decreased hepatic drug metabolizing enzyme activity by endotoxin in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43: 2697-2701, 1999.
- 7) McCann U.D.: Reduced striatal dopamine transporter density in abstinent methamphetamine and methcathinone users: evidence from positron emission tomography studies with [¹¹C]WIN-35,428. *J Neurosci.*, 18: 8417-8422, 1998.
- 8) Mizugaki M., Hishinuma T., Nakamura H.: Distribution of carbon-11 labeled methamphetamine and the effect of its chronic administration in mice. *Nucl. Med. Biol.*, 20: 487-492, 1993.
- 9) Mizugaki M., Nakamura H., Hishinuma T.: Positron emission tomography (PET) study of the alterations in brain distribution of [¹¹C]methamphetamine in methamphetamine sensitized dog. *Nucl. Med. Biol.*, 22: 803-807, 1995.
- 10) Ohashi R., Tamai I., Yabuuchi H.: Na⁺-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291: 778-784, 1999.
- 11) Paxinos G., Watson D.: *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, New York, 1987.
- 12) Rivière G. J., Byrnes K. A., Gentry W. B.: Spontaneous locomotor activity and pharmacokinetics of intravenous methamphetamine and its metabolite amphetamine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291: 1220-1226, 1999
- 13) Ujike H.: Competitive and non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonists fail to prevent the induction of methamphetamine-induced sensitization. *Life Sci.*, 50: 1673-1681, 1992.
- 14) Vanderschuren L. J. M. J., Donné Schmidt E., De Vries T. J.: A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *J. Neurosci.*, 19: 9579-9586, 1999.
- 15) Wu X.: Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 290: 1482-1492, 1999.

厚生省科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

分担研究課題：依存性薬物の連用による薬物動態の変化と依存強度の解析：
morphine 投与ラットにおける naloxone 誘発場所嫌悪性試験（place aversion）に及
ぼす nicotine の影響

分担研究者：五味田 裕（岡山大学医学部附属病院薬剤部）

研究協力者：荒木博陽¹⁾、末丸克矢¹⁾、川上賢哉²⁾

岡山大学医学部附属病院薬剤部¹⁾、岡山大学医療薬学専攻臨床薬剤学²⁾

研究要旨：

我々は、morphine 単回投与において naloxone 誘発 place aversion が惹起されることを前回報告した。今回は、本作用における作用機序解明の一環として nicotine の影響について検討した。nicotine は naloxone 投与前の投与により place aversion に拮抗した。この nicotine の抑制作用は、中枢性 nicotine 受容体拮抗薬の mecamylamine によって拮抗されたが、末梢性 nicotine 受容体拮抗薬の hexamethonium では影響されなかった。さらに、dopamine (DA) D₁ 受容体遮断薬 SCH-23390 ならびに DA D₂ 受容体遮断薬 haloperidol、raclopride、eticlopride 投与により nicotine の作用は抑制された。しかしながら、serotonin (5-HT)_{1A} 受容体作用薬の(±)-8-OH-DPAT、5-HT₂ 受容体作用薬の(±)-DOI、あるいは 5-HT₃ 受容体拮抗薬の ondansetron では影響されなかった。以上の結果より、nicotine は morphine 単回投与ラットにおける naloxone 誘発 place aversion を抑制し、その作用には中枢性の nicotine ならびに DA 神経系の関与があることが示唆された。

A. 研究目的

乱用される薬物には、ヘロイン、コカイン等の麻薬の他、覚醒剤、大麻、シンナーなどの有機溶媒、睡眠薬、喫煙、抗不安薬等多種にわたるものの、どの依存性薬物においても、その根底をなしているのは精神依存（渴望）である。しかしながら、この精神依存的発症メカニズムは未だ解明されていない。

我々はこれまで嗜好品であるタバコ喫煙およびタバコの主成分である

nicotine が種々薬物の体内動態に影響を及ぼすことを発表してきた。しかしながら今回使用した morphine に代表される麻薬や覚醒剤といった依存形成薬物の薬効、体内動態への影響は未だ明確にはなっておらず、薬力学的、薬物動態学的に依存性薬物と nicotine およびタバコ喫煙との関連について明らかにしていくことは非常に興味深い。そこで、まず前回確立した morphine 退薬評価法である naloxone 誘発 place aversion 法を用い、nicotine 投

与による影響およびその作用機序について検討した。

B. 方法

1. 実験動物

実験には実験開始時の体重が 220g-380g の Sprague-Dawley 系雄性ラット (日本チャールズリバー) を用いた。

2. 実験方法

本実験で用いた place condition 装置は Parker らの方法¹⁰⁾に準じ、2つの区画に分かれた木製の BOX を使用した。それぞれの区画は 30×42×29cm の区画からなり、壁は黒色にしてある。一方の区画の床には金網を敷き、他方の区画の床にはサンドペーパー (5×5cm) を基盤目上に敷きつめた。金網は 0.65×0.65cm の網目のものを使用し、サンドペーパーは 40 号を使用した。初日に saline を皮下投与し、金網区画にて 30 分間条件付けを行った。2 日目に、morphine (10 mg / kg) または saline をホームケージ内で皮下投与した。3 日目には、opioid 受容体拮抗薬である naloxone (0.5 mg / kg) または saline を皮下投与した後、サンドペーパー区画に 30 分間条件付けを行った。nicotine (0.01-0.5 mg / kg) 投与は、3 日目の naloxone 投与または 2 日目の morphine 投与 15 分前に腹腔内投与した。DA 受容体遮断薬は 3 日目の nicotine 投与 30 分前 (haloperidol は 2 時間前)、5-HT 関連薬は 15 分前 (ondansetron は 30 分前)、DA 受容体作動薬は naloxone 投与 5 分前にいず

れも皮下投与した。5 日目に、装置を 2 つの区画に仕切っている仕切り板を外し、薬物の影響がない状態で、各区画に滞在する時間をビデオカメラで撮影した後解析した。

3. 使用薬物

実験には、morphine hydrochloride (武田薬品工業)、naloxone hydrochloride (Sigma chemical)、(-)-nicotine tartrate (Sigma chemical)、mecamylamine hydrochloride (RBI)、hexamethonium bromide (和光純薬工業)、haloperidol (セレネース注：大日本製薬)、R(+)-SCH-23390 hydrochloride (RBI)、S(-)-raclopride l-tartrate (RBI)、S(-)-eticlopride hydrochloride (RBI)、(±)-8-hydroxy-DPAT hydrochloride (RBI)、(±)-DOI hydrochloride (RBI)、ondansetron hydrochloride (ゾフラン注：日本グラクソ)、apomorphine hydrochloride (SIGMA)、L-ascorbic acid (半井化学薬品) を用いた。nicotine は saline に溶解後、NaOH 液で pH を 7.0 に調整した。haloperidol、ondansetron は saline で希釈した。apomorphine は ascorbic acid 溶液 (0.2 mg/kg) に溶解した。その他の薬物はすべて saline に溶解し使用した。

4. 統計学的検定

測定値はサンドペーパー区画に滞在した時間から金網区画に滞在した時間を引いた値を用い、平均値±標準誤差 (sec.) で示した。得られたデータは一元配置分散分析 (one-way

ANOVA) を行った後、Dunnett テスト
または Tukey テスト、および Student'
s-t テストを用いて解析した。

C. 結果

1. morphine 単回投与ラットにおける naloxone 誘発 place aversion の検討

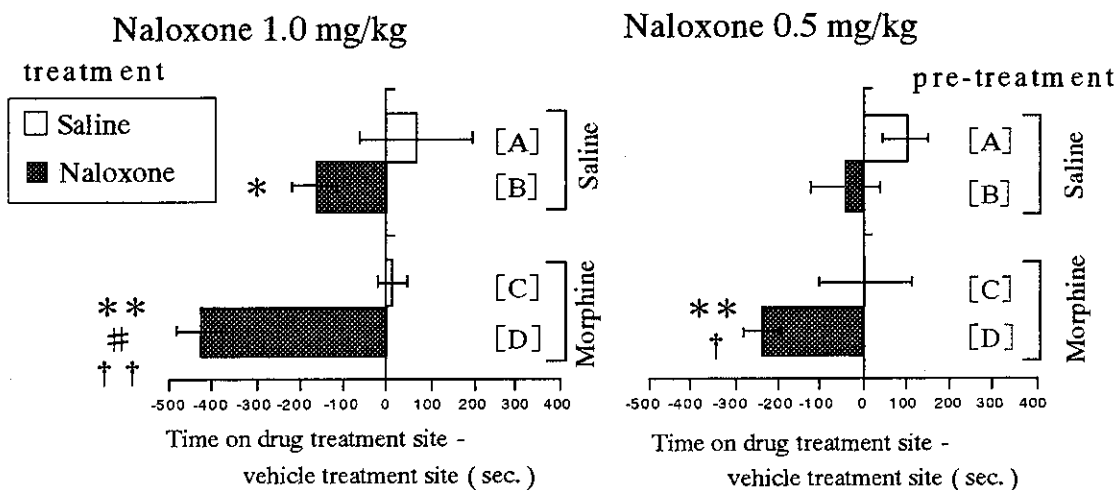
saline のみによる投与ではサンドペ
ーパーおよび金網区画のいずれかに
滞在時間が偏ることはなかった。一方、
morphine および naloxone 投与群では明
らかに naloxone を投与した区画とは反
対側の区画に長く滞在した。すなわち
place aversion が確認できた。しかしな
がら、naloxone 1.0mg/kg では naloxone
単独群でも place aversion が確認された
ため、以後の実験における naloxone の
投与量は単独で place aversion が認めら
れない 0.5mg/kg とした。(Fig.1.)

2. morphine 投与ラットにおける naloxone 誘発 place aversion に及ぼす nicotine の影響

naloxone 誘発 place aversion に対する
nicotine 投与による影響の検討におい
て、nicotine 0.05 および 0.1 mg/kg 投与
群では place aversion の有意な抑制はみ
られなかった。しかし、nicotine 0.2
mg/kg 投与群では有意な抑制作用が認
められた(Fig.2.)。なお、nicotine 0.2
mg/kg 単独投与では、いずれかの区画
に滞在する時間が長いという偏りは
みられなかった。

nicotine の投与タイミングが及ぼす
影響に関しては、nicotine 0.2, 0.5 mg/kg
を 3 日目の naloxone 投与 15 分前に投
与した群では、place aversion の有意な
抑制作用が認められたが、2 日目の
morphine 投与 15 分前に投与した群で
は全く影響は認められなかった。

3. morphine 投与ラットでの naloxone 誘 発 place aversion における nicotine の抑 制作用に及ぼす nicotine 受容体拮抗薬 の影響



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

Fig.1. Dosage of naloxone on place aversion test 1day after morphine administration.

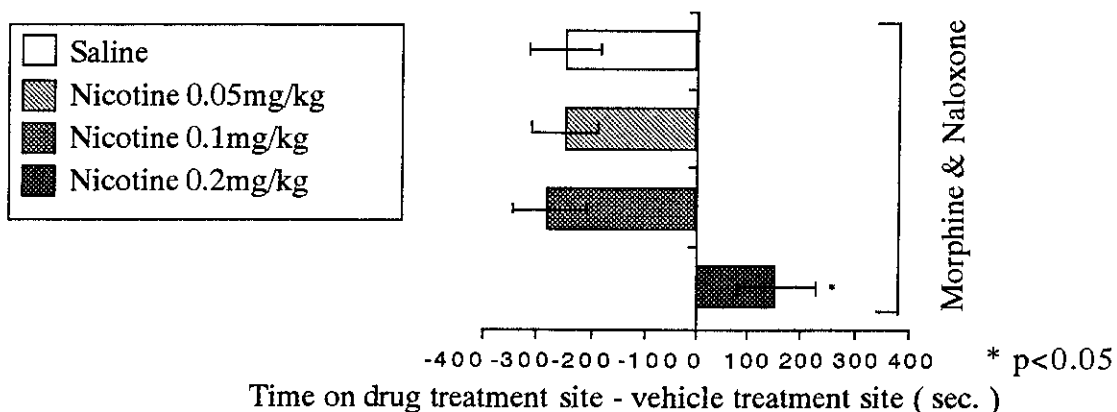


Fig.2. Effect of nicotine(0.05 - 0.5 mg/kg) on naloxone-induced place aversions in morphine injected rat.

中枢性 nicotine 受容体拮抗薬 mecamylamine および末梢性 nicotine 受容体拮抗薬 hexamethonium の naloxone 誘発 place aversion における nicotine の抑制作用に及ぼす影響について検討したところ、mecamylamine 1.0mg/kg を nicotine 投与 30 分前に投与した群では nicotine による抑制作用は顕著に拮抗された。一方、hexamethonium 1.0mg/kg ではこのような作用は全く認められなかった(Fig.3.)。また、mecamylamine および hexamethonium 単独投与ではいずれか一方の区画に滞在が偏るといような現象は認められなかった。

4.morphine 投与ラットでの naloxone 誘発 place aversion における nicotine の抑制作用に及ぼす DA 受容体遮断薬の影響

DA 受容体遮断薬の naloxone 誘発 place aversion における nicotine の拮抗作用に及ぼす影響について検討した。haloperidol (0.01-0.1 mg/kg) を nicotine 投与 2 時間前に皮下投与すると、naloxone 誘発 place aversion における nicotine の抑制作用は 0.05mg/kg の用量から有意に拮抗された(Fig.4.)。DA D₁ 受容体遮断薬である SCH-23390 0.1 mg/kg、DA D₂ 受容体遮断薬である raclopride 1.0 mg/kg、eticlopride 0.1

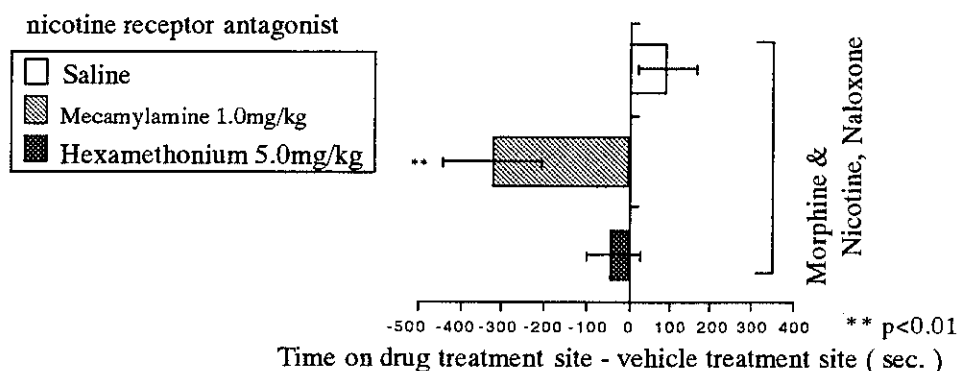


Fig.3. Effect of mecamylamine and hexamethonium on nicotine-induced attenuation of naloxone-induced place aversion in morphine injected rat.

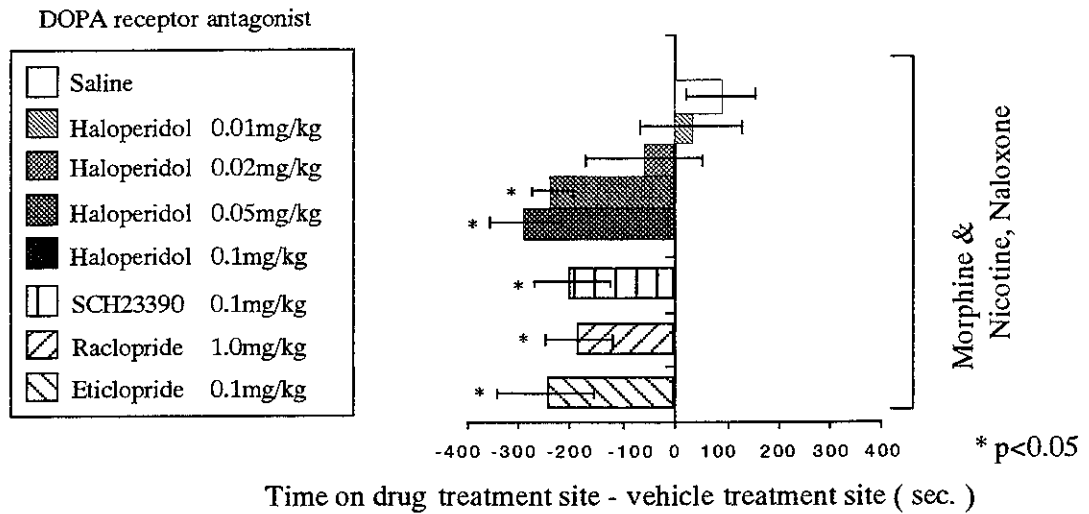


Fig.4. Effect of dopamine antagonists on nicotine-induced attenuation of naloxone-induced place aversion in morphine injected rats.

mg/kg でも同様に nicotine による抑制作用に拮抗した(Fig.4.)。なお、haloperidol 0.1 mg/kg、SCH-23390 0.1 mg/kg、raclopride 1.0 mg/kg、eticlopride 0.1 mg/kg 単独投与ではいずれか一方の区画への偏りは認められなかった。

DA 作動薬である apomorphine (0.03、0.1、0.3 mg/kg) を用いて naloxone 誘発 place aversion に対する影響について検討した。apomorphine を投与した群では、nicotine と同様に morphine および naloxone による place aversion の有意な抑制作用が認められた(Fig.5.)。なお、apomorphine 0.3 mg/kg 単独投与ではいずれか一方の区画への偏りは認められなかった。

5. morphine 投与ラットにおける naloxone 誘発 place aversion に及ぼす DA 作動薬の影響

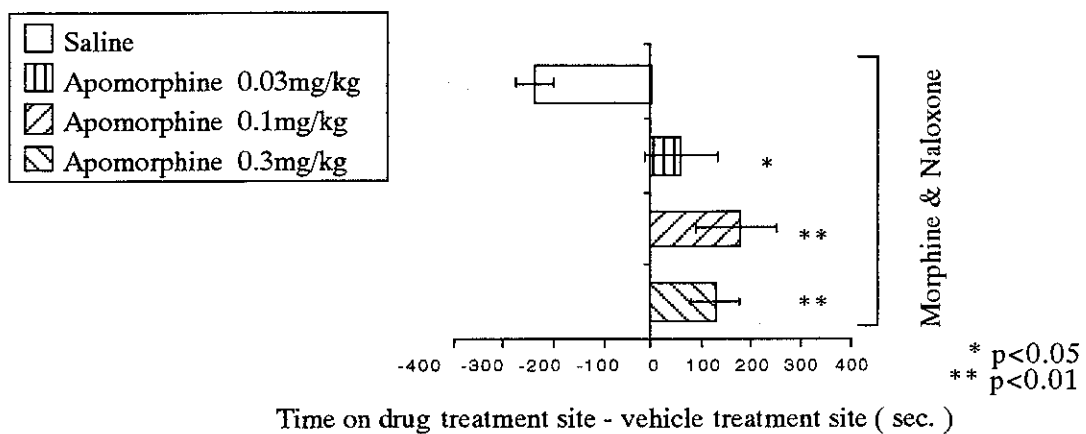


Fig.5. Effect of apomorphine(0.03 - 0.3 mg/kg) on naloxone-induced place aversions in morphine injected rat.

6. morphine 投与ラットでの naloxone 誘発 place aversion における nicotine の抑制作用に及ぼす 5-HT 関連薬物の影響

5-HT_{1A} 受容体作動薬である(±)-8-OH-DPAT (0.042、0.125 mg/kg)、5-HT₂ 受容体作動薬である(±)-DOI (0.1、0.3、1.0、3.0 mg/kg) および 5-HT₃ 受容体作動薬である ondansetron (0.1 mg/kg) を用いて naloxone 誘発 place aversion における nicotine の抑制作用に及ぼす影響について検討した。(±)-8-OH-DPAT および(±)-DOI は、naloxone 誘発 place aversion における nicotine の抑制作用に対して何ら影響を及ぼさなかった。しかし、ondansetron では有意に nicotine による抑制作用に拮抗した(Fig.6.)。なお、(±)-8-OH-DPAT 0.25 mg/kg、(±)-DOI 3.0 mg/kg、ondansetron 0.1 mg/kg 単独投与ではいずれか一方の区画への偏りは認められなかった。

D. 考察

morphine 投与ラットに naloxone 1.0

および 0.5mg/kg を投与すると明らかな place aversion が発現した。すなわち naloxone 投与の反対側の区画での滞在時間が著明に延長した。しかしながら、morphine 非投与ラットにおいても naloxone の 1.0mg/kg では有意な place aversion が認められた。これは、内因性の opioid に対して naloxone が拮抗したためと考えられる¹¹⁾。今回の実験では、内因性 opioid の影響を除去するために、以下の実験では naloxone 単独で place aversion を起こさない 0.5 mg/kg を至適用量として検討を行った。

この morphine 投与ラットにおける naloxone 誘発 place aversion の発現機序を明らかにする目的で、同様に精神的依存作用を有する nicotine を用いて検討を行った。nicotine (0.2-0.5 mg/kg) を naloxone 投与 15 分前に投与したところ、明らかな place aversion の抑制がみられた。この nicotine による抑制作用の機序について明らかにする目的で、まず nicotine の作用が中枢性なのか末梢性なのかについて検討した。中

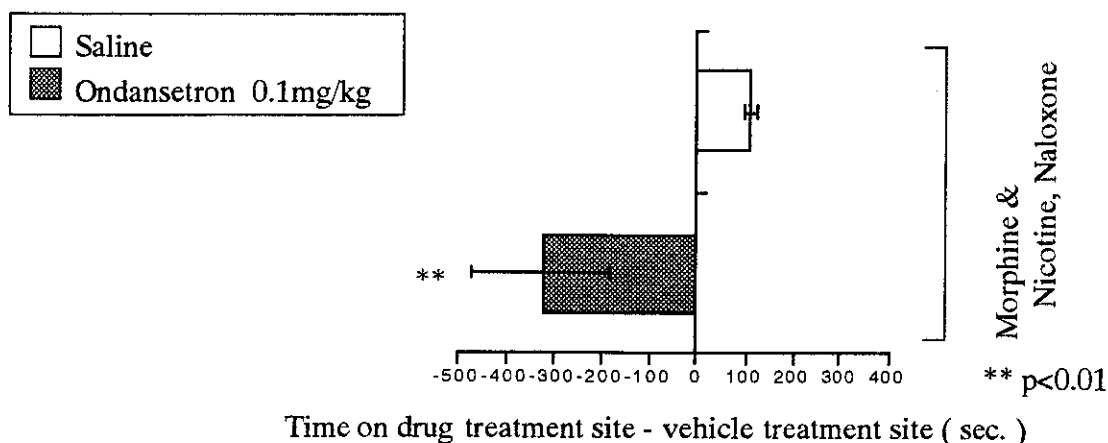


Fig.6. Effect of ondansetron on nicotine-induced attenuation of naloxone-induced place aversion in morphine injected rats.

中枢性の nicotine 受容体拮抗薬である mecamylamine は naloxone 誘発 place aversion に対する nicotine の抑制作用に拮抗したが、末梢性 nicotine 受容体拮抗薬 hexamethonium では影響が認められなかったことから、morphine 投与ラットでの naloxone 誘発 place aversion に対する nicotine の作用は中枢性であることが示唆された。また、nicotine の投与タイミングが及ぼす影響に関しては、morphine 投与前に nicotine を投与した場合、nicotine は naloxone 誘発 place aversion に拮抗しなかったが、naloxone の前に投与した場合には place aversion に拮抗したことから、nicotine の作用は morphine が引き起こす脳の何らかの変化に対して作用するのではなく、naloxone の誘発作用に拮抗している可能性が示唆された。Zarrindast ら¹⁴⁾は、naloxone 誘発 morphine 退薬症状の jumping 行動を nicotine が抑制し、この抑制作用は mecamylamine で阻害されるが、hexamethonium では阻害されないと報告している。実験方法は異なるものの、place aversion を morphine 退薬症候の1つと考えれば、我々の結果を支持するものと考えられる。

また、鈴木ら¹³⁾は、nicotine 0.8mg/kg により place preference が発現し、その nicotine の作用は mecamylamine および DA 受容体遮断薬の haloperidol、SCH-23390 で抑制されたことを報告している。これは nicotine 受容体が線条体や中脳辺縁系の細胞体や神経終末に局在しており³⁾、nicotine 受容体の刺激により線条体や中脳辺縁系から DA の放

出が起こることに基因するものと考えられる^{4, 6-8)}。我々の実験系において DA 受容体遮断薬；DA D₁ 受容体遮断薬 SCH-23390、DA D₂ 受容体遮断薬 haloperidol、raclopride、eticlopride のいずれにおいても nicotine の place aversion 抑制作用に拮抗した。Zarrindast ら¹⁴⁾も jumping 実験において SCH-23390 が nicotine の抑制作用を軽減したことを報告している。また、DA 作動薬である apomorphine は、nicotine と同様に naloxone 誘発 place aversion を有意に抑制した。これらの事実より、今回の nicotine による morphine 投与ラットにおける naloxone 誘発 place aversion の抑制作用には DA 神経系の関与が強く示唆された。

一方、DA 神経系の機能亢進により 5-HT 神経系の機能低下が起こっている可能性が示唆されている⁹⁾。もしそうであれば、5-HT 神経系の賦活薬投与によって naloxone 誘発 place aversion に対する nicotine の抑制作用に影響が認められるのではないかと考えられる。しかし、(±)-8-OH-DPAT および (±)-DOI はいずれも naloxone 誘発 place aversion における nicotine の抑制作用に拮抗しなかった。従って、nicotine 投与による place aversion 阻害作用に 5-HT 神経系の関与は少ないものと推察される。nicotine の 5-HT 神経系への影響について、Ribeiro ら¹²⁾は、microdialysis 法を用いて全身性に nicotine を投与したラットの前脳皮質の細胞外 5-HT 濃度を測定した結果、nicotine 1.6mg/kg では有意な 5-HT の放

出増加が起こったが、0.8 mg/kg 以下の nicotine 投与量では有意な増加は起こらなかったことを報告している。今回、我々の研究で使用した nicotine の量は 0.2mg/kg であり、5-HT の放出が nicotine により増加した可能性は少ないものと考えられる。

しかしながら、5-HT₃ 受容体拮抗薬である ondansetron は、nicotine による naloxone 誘発 place aversion の抑制作用に拮抗した。Corrigall ら⁵⁾によると、nicotine 投与による place preference は脳内報酬系とされる中脳-辺縁・皮質系 DA 神経路が関与しており、ondansetron はこの nicotine 投与による place preference を抑制することを報告している²⁾。さらに、Carboni ら⁷⁾は、5-HT₃ 受容体拮抗薬 ICS205-930 が nicotine 投与による側坐核からの DA 放出を用量依存的に抑制することを報告している。これらの事実より、5-HT₃ 受容体拮抗薬は nicotine による DA 放出作用を阻害することが推察される。

今後の検討として、5-HT_{1A,2} 受容体拮抗薬を用いて、morphine 投与ラットでの naloxone 誘発 place aversion における nicotine の拮抗作用に及ぼす影響を検討する。また、c-Fos 蛋白を指標として、morphine 投与ラットにおける naloxone 誘発 place aversion での脳活性部位と、不快を生じる脳部位との比較検討を試みる。さらに、morphine 長期負荷ラットやタバコ喫煙負荷ラットを用いて naloxone 誘発 place aversion がどのように変化するかを検討すると共に、nicotine およびタバコ喫煙による

morphine の体内動態への影響を検討する。

E. 結論

morphine 単回投与ラットでの naloxone 誘発 place aversion が確認できたが、naloxone 単独で place aversion が認められない 0.5 mg/kg を検討用量とした。この naloxone 誘発 place aversion は、nicotine 投与により有意に抑制された。nicotine 投与を naloxone 投与前に行うと有意な抑制作用が認められたことから、本作用は morphine が引き起こす脳の何らかの変化に対してではなく、naloxone による place aversion の誘発作用を阻害するように作用しているものと考えられた。また、本抑制作用は、中枢性の nicotine 受容体拮抗薬 mecamylamine で拮抗され、末梢性の nicotine 受容体拮抗薬 hexamethonium では拮抗されないこと、DA 受容体遮断薬で拮抗されること、および DA 受容体作動薬では nicotine 同様に本作用を抑制すること、また 5-HT_{1A,2} 受容体作動薬は naloxone 誘発 place aversion における nicotine の抑制作用に対して何ら影響を及ぼさなかったが、DA 放出を抑制するとされる 5-HT₃ 拮抗薬では明らかな拮抗作用が認められた。これらの結果より、morphine 投与ラットにおける naloxone 誘発 place aversion に対する nicotine の抑制作用には中枢作用および DA 神経系の関与が強く示唆された。

参考文献

- 1) Carboni E., Acquas E., Frau R. and Di Chiara G. Differential inhibitory effects of a 5-HT₃ antagonist on drug-induced stimulation of dopamine release. *Eur. J. Pharmacol.* 164: 515-519, 1989.
- 2) Carboni E., Acquas E., Leone P., Perezani L. and Di Chiara G.: 5-HT receptors antagonists block morphine- and nicotine-induced place-preference conditioning. *Eur. J. Pharmacol.* 151: 159-160, 1988.
- 3) Clarke P.B.S. and Pert A. : Autoradiographic evidence for nicotine receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic neurons.: *Brain Res.* 348 : 355-358, 1985.
- 4) Connelly, M.S.; Littleton, J.M. Lack of stereoselectivity in ability of nicotine to release dopamine from rat synaptosomal preparations. *J. Neurochem.* 41: 1297-1302, 1983.
- 5) Corrigall W. A. : Understanding brain mechanisms in nicotine reinforcement. *Br. J. Addiction.* 621: 311-318, 1993.
- 6) Fung, Y. K., and Lau Y.-S.: Effect of nicotine pretreatment on striatal dopaminergic system in rats., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32: 221-226, 1989.
- 7) Giorguieff, H.F., Kemel, M.L., Wandscheer D. and Lowinski, J.G.: Regulation of dopamine release by presynaptic nicotine receptors in rat striatal slices: Effect of nicotine in low concentration. *Life Sci.* 25: 1257-1262, 1979.
- 8) Imperato A., Mulas A. and Chiara G.D.: Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats., *Eur. J. Pharmacol.*, 132: 337-338, 1986.
- 9) McMahon L. R. and Cunningham K. A.: Antagonism of 5-hydroxytryptamine (4) receptors attenuates hyperactivity induced by cocaine: putative role for 5-hydroxytryptamine(4) receptors in the nucleus accumbens shell. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291: 300-307, 1999.
- 10) Paeker L. A. and Joshi A.: Naloxone-precipitated morphine withdrawal induced place aversion: Effect of naloxone at 24 hours post morphine., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 61: 331-333, 1998.
- 11) Paeker L. A. and Rennie M.: Naltrexone-induced aversion: Assessment by place conditioning, taste reactivity and taste avoidance paradigms., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41: 559-565, 1992.
- 12) Ribeiro E. B., Bettiker R. B., Bogdanov M. and Wurtman R. J.: Effect of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. *Brain Res.* 621: 311-318, 1993.
- 13) 鈴木 勤、伊勢雄也、三澤美和 : 薬物依存の研究 (第 276 報) : Nicotine 処置ラットにおける place preference および place aversion. 第 6 回ニコチン依存研究会記録集.
- 14) Zarrindast M-R. and Farzin D.: Nicotine attenuates naloxone-induced jumping behaviour in morphine-dependent mice., *Eur. J. Pharmacol.* 298: 1-6, 1996.

分担研究報告書

分担研究課題：神経特異的蛋白質 Amida のクローニングとその機能解析—モルヒネ投与による発現変化の解析—

主任研究者：三木直正

研究協力者：入江康至、宮本薫、平英一

大阪大学大学院医学系研究科情報薬理

研究要旨

神経特異的発現遺伝子に及ぼす依存性薬物の影響を検討し、薬物依存の機構を明らかにするために神経特異遺伝子 Arc 結合蛋白質の検索を行った。この結果、新規に、2種類の蛋白質をコードする遺伝子の単離に成功した。新規蛋白質 Amida はクローニングの結果、核蛋白質であり、実際に Arc との結合活性が確認できた。Amida は神経系における発現が強く、モルヒネ投与によりその発現を変化させた。このモルヒネの作用はナロキソンにより抑制されること、慢性投与により減弱する事を明らかとした。さらに Amida には2個の核移行シグナルが存在することと、過剰発現された Amida の核移行が細胞死を引き起こすことを明らかにした。

A 研究目的

薬物依存は近年日本においても社会的に大きな問題となりつつある。神経科学的見地からも、脳内生理活性物質の作用の一つとしての薬物依存、耐性現象は神経系の生理機能を明らかにする上で大きな問題を提起している。我々のグループでは従来より、神経特異的遺伝子の機能解析を行ってきた。これら神経特異的蛋白質は神経機能の一端を担っていると考えられるが、この神経機能の中でも記憶の保持は高次神経機

能を担う上でも重要な役割を担っていると考えられる(3)。薬物依存、耐性はある状態、現象の持続状態と解釈でき、薬物依存機構の解明はこういった記憶のような高次神経機能の解明につながると期待できる。このために我々は神経活動における神経特異的遺伝子の機能、発現を明らかにするためにこれら分子の単離、さらにはその機能解析を行うと共にこれら因子の発現等を検討し、薬物依存との関連を検討することにより、記憶保持等の神経機能の解明を行ってきた。今回、神経活動関連遺伝子 Arc に

結合する蛋白質を検索、解析を行い、薬物依存との関連を検討する（1, 2, 4）。

B 方法

1 Arc 結合蛋白質の同定。

イーストツーハイブリット法を用いて Arc 結合蛋白質のスクリーニングを行った。このために、ラット Arc cDNA を PCR 法により増幅後、Gal4 蛋白質の DNA 結合領域と Arc との融合蛋白質の発現ベクターを作成した。これを用いてラット脳 Gal4 蛋白質活性領域との融合蛋白質発現プラスミドライブラリーのスクリーニングをベータガラクトシダーゼの発現により行った。

2 Arc 結合蛋白質の塩基配列の決定

イーストツーハイブリット法により得られた cDNA クローンの塩基配列をダイデオキシ法により決定した。さらに、この cDNA の全長を得るためにラット脳のライブラリーのハイブリダイゼーション法によるスクリーニングを行った。これにより得られたクローンの塩基配列をさらにダイデオキシ法により決定した。この結果、Arc 結合蛋白質 cDNA の全塩基配列を決定した。

3 Amida の発現分布

ラット各種臓器より RNA を摘出し、ノーザンブロット解析によりその発現分布を解析した。

4 Arc と Arc 結合蛋白質との結合

Arc と、Arc 結合蛋白質の myc-tag, EGFP との融合蛋白質をそれぞれ作成した。これらの融合蛋白質を発現ベクターに挿入後、COS-7 細胞にリポフェクトアミンを用いて

導入した。その後、細胞抽出液を抗 myc 抗体を用いて免疫沈降した。この沈降物を抗 EGFP 抗体を用いたウエスタンブロット法により検討した。一方、*in vitro* で蛋白合成させたメチオニン³⁵S-標識 Amida 蛋白質を Arc を多く発現する PC12 細胞の抽出液と混合し、抗 Arc 抗体で免疫沈降させた。その免疫沈降物を SDS-PAGE 後、RI 標識 Amida をオートラジオグラフィーにて検出した。

5 Amida 蛋白質の培養細胞における発現

EGFP と Amida の融合蛋白質を COS-7 細胞にリポフェクトアミンを用いて導入した。その後、蛍光顕微鏡を用いてその細胞内分布を検討した。さらに、各種欠損ミュータントを作成し、それぞれ EGFP との融合蛋白質を発現するプラスミドを作成した。欠損ミュータントは塩基配列から明らかとなった 2 カ所の核移行シグナルを中心に作成した。この各種欠損ミュータントと EGFP との融合蛋白質を COS-7 細胞にリポフェクトアミンを用いて導入したのち、その細胞内局在を蛍光顕微鏡で検討した。

6 Arc と Amida の結合部位の決定。

前述した各種欠損ミュータントと EGFP の融合蛋白質を myc-tag との融合蛋白質と同時に COS-7 細胞にリポフェクトアミンを用いて導入した。そのトランスフェクタントの細胞抽出液を抗 myc 抗体により免疫沈降させ、その沈降物を抗 EGFP 抗体によるウエスタンブロット法で検討した。

7 Amida と細胞死の検討

全長及び各種欠損ミュータントと EGFP の融合蛋白質を発現するベクターを COS-7 細胞

胞にリポフェクトアミンを用いて導入した。その後、72時間にわたり培養を行った後、DAPIによる染色、さらにTunnel法による染色を行い、アポトーシスとの関連を検討した。

さらに、Amidaを発現しているPC12細胞にアポトーシスを引き起こす薬物（サイクロヘキシミド、A23187）を加え、時間ごとに細胞からRNAを抽出した。このRNAでノーザンブロット解析を行い、Amidaの発現の変化を検討した。

8. マウスAmidaのクローニング

ラットAmidaの翻訳域両端をプライマーとしたPCRを用い、マウス脳から抽出したRNAよりRT-PCRを行った。このPCR産物をプラスミドに導入後、ダイデオキシ法によりマウスAmidaの一部塩基配列を決定した。さらに、データベースの検索を行い、マウスAmidaと思われるESTクローンを検索した。このクローンの塩基配列を元にさらにPCRプライマーを作成し、マウスAmidacDNAの全長を決定した。

9 マウス中枢におけるモルヒネ投与後のAmidaの発現変化

マウス（ddY, オス, 20g）にモルヒネ（20mg/kg）を腹腔内投与し、その後時間に従ってその全脳を摘出した。この摘出脳からRNAを抽出し、ノーザンブロット法による解析を行った。さらに、コカイン（10mg/kg）、メタアンフェタミン（2mg/kg）についても同様の実験を行うと共に、モルヒネについてはナロキソン（20mg/kg）との同時投与、ナロキソン単独投与についても検討した。また、モルヒ

ネについては慢性処理（初日10mg/kg、その後20, 40, 80 100mg/kgと増量後、100mg/kgでさらに3日処理）も行い、最終投与後の発現についても検討した。

10 培養細胞におけるモルヒネのAmida発現に及ぼす影響の検討。

オピオイド受容体を発現するNG108-15細胞にモルヒネ（50 μ M）を投与し、その後時間に従って細胞からRNAを抽出し、ノーザンブロット法による解析を行った。

C 結果

1 Arc結合蛋白質の同定。

イーストツーハイブリットシステムを用いて約200,000個の遺伝子をスクリーニングし、15個の陽性クローンを得た。このうち1個のクローンは、既知の遺伝子と相同性のない、700塩基対からなる挿入配列を持っていた。

2 Arc結合蛋白質の塩基配列の決定

イーストツーハイブリット法により得られたcDNAクローンの塩基配列をダイデオキシ法により決定した。さらに、このcDNAの全長を得るためにラット脳のライブラリーのハイブリダイゼーション法によるスクリーニングを行った。これにより得られたクローンの塩基配列をさらにダイデオキシ法により決定した。この結果、Arc結合蛋白質cDNAの全塩基配列を決定した。Arc結合蛋白質は250個のアミノ酸からなり、アミノ酸配列でも既知の蛋白質やモチーフと高い相同性を持たないことがわかった。アミノ酸配列のR59~K72、R181~R185の、二箇所、塩基性アミノに富むクラスターが

あり、核局在シグナルの可能性が示唆された。我々はこの蛋白質をAmidaと銘々した。

3 Amida の発現分布

ノーザンブロット法ではamida mRNAは約1.2kbと1.0kbの2本バンドとして認められ、得られたクローンが全長を含むことが確認された。Amida mRNAの発現は脳に非常に多いが、心臓、腎臓、脾臓、胸腺、肝臓にも低レベルの発現が見られた。Arcの場合と異なり、MECS(最大電撃痙攣刺激)による著明な発現誘導は見られなかった。in situ hybridizationでは、歯状回と小脳に発現が比較的多く見られた。

4 Arc と Arc 結合蛋白質との結合

AmidaがArcと会合していることを確かめるために、in vitroの再構成実験を行なった。標識したAmida蛋白質を生体外で合成し、Arc蛋白質を豊富に発現しているPC12細胞の抽出液と混合培養した後、特異的な抗Arc抗血清を用いて免疫沈降を行なった。対照として用いたAmida以外のtwo hybrid陽性クローンを翻訳した蛋白質の場合は免疫共沈されなかったが、標識したAmida蛋白質はArc蛋白質とともに特異的に免疫共沈された。さらに、生細胞内での会合を確認する実験を行なった。COS-7細胞にEGFP-Arcとmyc-tag-Amidaを発現させ、その細胞抽出液を抗myc抗体で免疫沈降を行なった。その後、抗Arc抗血清を用いたウエスタンブロット法により解析するとEGFP-Arc融合蛋白質はmyc-tag-Amida蛋白質と特異的に共沈された。

5 Amida蛋白質の培養細胞における発現

細胞におけるAmida蛋白質の機能を調べる

ため、緑色蛍光蛋白質EGFPとAmidaの融合蛋白質を、一過性にCOS-7細胞に形質導入したところ、強い蛍光信号が核に局限して認められた。一方、EGFPだけを発現するベクターの場合は、細胞全体に蛍光信号が分布した。さらに、各種欠損ミュータントとEGFPの融合蛋白質を発現させたところ、2カ所の核移行シグナルが確認できた。

6 Arc と Amida の結合部位の決定。

前述した各種欠損ミュータントとEGFPの融合蛋白質をmyc-tagとの融合蛋白質をCOS-7細胞に発現させ、その細胞抽出液を抗myc抗体により免疫沈降させた。その沈降物を抗EGFP抗体によるウエスタンブロット法で検討した。その結果、Amidaは2つの核移行シグナルの間の領域でArcと結合することが明らかとなった。

7 Amida と細胞死の検討

全長及び各種欠損ミュータントとEGFPの融合蛋白質を発現するベクターをCOS-7細胞にリポフェクトアミンを用いて導入し、DAPIによる染色、さらにTunnel法による染色を行い、アポトーシスとの関連を検討した。その結果、Amidaを過剰発現させると、72時間後に細胞にアポトーシスが起きることが明らかとなった。

さらに、Amidaを発現しているPC12細胞にアポトーシスを引き起こすサイクロヘキシミド、A23187を加え、ノーザンブロット解析を行った。その結果、16時間、8時間後からAmidaの発現が上昇することが明らかとなった。

8. マウスAmidaのクローニング

ラット Amida の翻訳域両端をプライマーとした PCR を用い、マウス脳から抽出した RNA より RT-PCR を行い、マウス Amida の一部塩基配列を決定した。さらに、マウス Amida と思われる EST クローンを検索し、このクローンの塩基配列を元にさらに PCR によりマウス Amida cDNA の全長を決定した。その結果、ラットとは全長にわたりほぼアミノ酸配列が保存されていた。

9 マウス中枢におけるモルヒネ投与後の Amida の発現変化

マウスにモルヒネ、コカイン、メタアンフェタミンを各々腹腔内投与し、その全脳 RNA のノーザンブロット法による解析を行った。その結果、4 時間後にモルヒネにより Amida の RNA レベルが上昇することが明らかとなった。このモルヒネの作用はナロキソンにより阻害され、またナロキソン単独による変化は認められなかった。また、モルヒネの慢性処理により、この RNA の増加は認められなくなった。

10 培養細胞におけるモルヒネの Amida 発現に及ぼす影響の検討。

NG108-15 細胞にモルヒネを投与し、その RNA によるノーザンブロット解析を行った。その結果、オピオイド受容体を発現するこの細胞においても 1 時間後から Amida RNA の上昇が見られ、4 時間後にピークを迎える事が明らかとなった。

D 考察

我々は脳特異的蛋白質の同定とその機能解析を行うことにより、神経機能の解析を行ってきている。薬物に対する耐性、依存形

成は臨床的、社会的問題も大きいですが、中枢神経系を理解する上で大きな問題を提供しており、神経機能の解明のためにもその機構の解明は不可欠であると考えられる。我々は神経特異的に発現し、各種神経刺激に反応する蛋白質である Arc の機能を解明するため、さらには Arc との結合蛋白質を検索することにより解析新たな神経特異的蛋白質を単離し、その機能を解析するために Arc との結合蛋白質を検索した。その結果、Amida と名付けた新規蛋白質の単離に成功した (4)。この蛋白質は Arc と異なり、主に核に分布し、その過剰発現は細胞にアポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。我々はさらに Amida の機能を解析するためにその発現分布を検討したところ、多臓器に比べ脳に多いことが明らかとなった。そこでモルヒネ等の薬物によりその発現量を検討したところ、モルヒネでその発現が変化することが明らかとなった。これはナロキソンで拮抗され、さらに培養系においても発現に変化が見られることから、モルヒネ受容体を介した特異的作用と考えられる。さらにこの反応はモルヒネの長期投与により減弱することから、耐性現象への関与が示唆される。一方、Amida は過剰発現により、細胞死を引き起こすことが培養系から明らかとなった。さらに欠損ミュータントの発現実験より、2 個の核移行シグナルに挟まれた部分が核に移行されることが細胞死に関係していることが明らかとなった。今後、Amida 蛋白質の本来の生理的機能を明らかにすると共に、モルヒネによる制御機構とモルヒネ耐性形成におけるその働きを明らかにしたい。

参考文献

- 1) Fosnaugh, J.S. Bhat, R.V., Yamagata, K. et al. , Activation of arc, a putative "effector" immediate gene, by cocaine in rat brain. *J. Neurochem.* 64: 2377-2380, 1995.
- 2) Lyford, G.L. Yamagata, K., Kaufmann, W.E.et al., Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskelton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites., *Neuron* 14: 433-445, 1995.
- 3) Worley, P.F., Cole,A.J., Murphy, T.H.et al., Synaptic regulation of immediate-early genes in brain. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55: 213-223, 1990.
- 4) Y.Irie, K.Yamagata, Y.Gan. et al., Molecular cloning and characterization of Amida, a novel protein which interacts with a neuron specific immediate early gene product Arc, contains novel nuclear localization signals, and causes cell death in cultured cells. *J. Biol. Chem.*, 275, 2647-2653, 2000.