

nifedipine により有意に KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は阻害され(Fig. 5)、これら 3 種類の阻害薬の共存下では KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は完全に消失した<sup>11)</sup>。一方、nicotine を曝露した神経細胞では $\omega$ -ATX および $\omega$ -CTX により KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は有意に阻害されたが、これらの阻害薬による KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の阻害の程度は、nicotine 無処置の神経細胞のそれと同程度であった。しかしながら、nicotine 曝露後の神経細胞では nifedipine による阻害の程度は著明であり、nicotine 無処置の神経細胞にみられる阻害と同レベルまで阻害された。これらの実験成績は nicotine 長時間曝露後にみられる KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の増加が、L 型 VDCC の機能亢進を介して生じていることを示唆するものと考えられる。

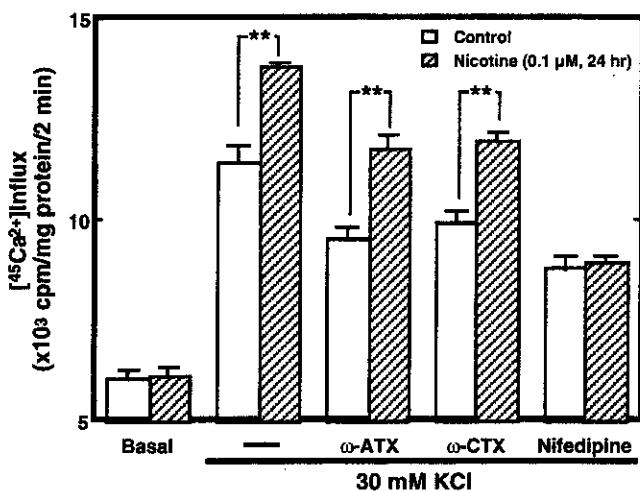


Fig. 5. Effects of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitors on KCl-induced  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx into cerebral cortical neurons following nicotine exposure.  $**p < 0.01$  (Bonferroni's test).  $\omega$ -agatoxin IVA ( $\omega$ -ATX):  $1 \mu\text{M}$ ,  $\omega$ -conotoxin GVIA ( $\omega$ -CTX):  $1 \mu\text{M}$ , nifedipine:  $1 \mu\text{M}$ .

次に nicotine 長時間曝露後にみられる nicotine 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入に及ぼす VDCC 阻害薬の影響を検討した。Nicotine 曝露細胞では有意に nicotine 非曝露細胞に比して nicotine 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は増加しており、しかも $\omega$ -ATX および $\omega$ -CTX はいずれも nicotine 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$

流入に影響を与えなかった(Fig. 6)。一方、nifedipine の共存下では nicotine 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は基礎流入量と同程度まで減少した(Fig. 6)。

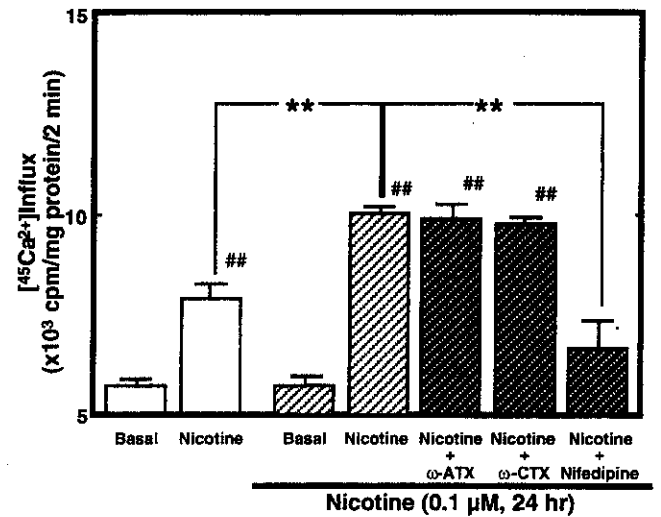


Fig. 6. Effects of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitors on nicotine ( $1 \mu\text{M}$ )-induced  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  influx into cerebral cortical neurons following nicotine exposure.  $##p < 0.01$  vs each basal influx (Bonferroni's test).  $**p < 0.01$  (Bonferroni's test).  $\omega$ -agatoxin IVA ( $\omega$ -ATX):  $1 \mu\text{M}$ ,  $\omega$ -conotoxin GVIA ( $\omega$ -CTX):  $1 \mu\text{M}$ , nifedipine:  $1 \mu\text{M}$ .

L 型 VDCC 活性化薬である Bay k 8644 により直接 L 型 VDCC を活性化させたところ、Fig. 7 に示すように、Bay k 8644 は用量依存性に $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入を増加させ、 $10 \mu\text{M}$  でその流入量は最大値に達した。この流入量は nifedipine の存在下で観察される KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の阻害量と同程度である<sup>11)</sup>ことから、 $10 \mu\text{M}$  の Bay k 8644 の L 型 VDCC 活性化は最大値に達していると考えられる。Nicotine を 24 時間曝露した神経細胞では明らかに対照群に比して Bay k 8644 による $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は有意に増大していた(Fig. 7)。さらにこの流入増加は nifedipine により用量依存性に抑制された(Fig. 7)。従って、nicotine 長時間曝露により生じる $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は L 型 VDCC の機能亢進による結果であると考えられる。

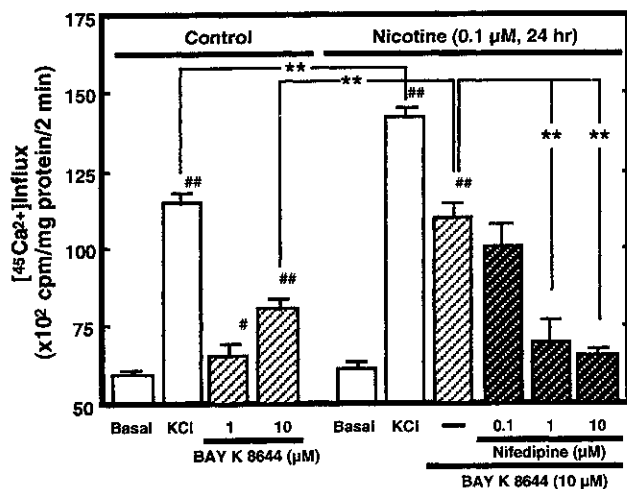


Fig. 7. Effect of nifedipine on Bay k 8644-induced [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]influx into cerebral cortical neurons following nicotine exposure. #p<0.05, ##p<0.01 vs each basal influx (Bonferroni's test). \*\*p<0.01 (Bonferroni's test).

### 3. Nicotine 長時間曝露後における神経細胞膜への [<sup>3</sup>H]verapamil 結合の変化

Nicotine 長時間曝露により L 型 VDCC の機能変化がチャンネル数の増加、あるいは Ca<sup>2+</sup>に対する親和性の増大のいずれに起因するのかについて、nicotine を 24 時間曝露した神経細胞より調製した顆粒画分を用い、 [<sup>3</sup>H]verapamil 結合を調べるにより検討した。その結果、 [<sup>3</sup>H]verapamil 結合の Bmax 値には非曝露群と曝露群とに間に有意差は認められなかった(非曝露群: 96.0 ± 6.1 fmol/mg protein, 曝露群: 94.0 ± 1.1 fmol/mg protein, N=4)。一方、Kd 値は曝露群において有意に低下しているのが観察された(非曝露群: 22.0 ± 1.1 nM, 曝露群: 15.1 ± 0.7 nM, N=4, p<0.01)。

### D. 考察

Nicotine の長期曝露は神経細胞に [<sup>3</sup>H]nicotine 結合の増加を誘発することは多くの研究により報告されている。本研究においても神経細胞に対し nicotine を長時間曝露することにより、神経細胞膜への [<sup>3</sup>H]nicotine 結合

結合の増加が誘発されており、しかも Scatchard 解析からこの結合増加が B max 値の増加に起因するものであることが明らかとなった。従って、本研究で行った処置は明らかに nACh 受容体の up-regulation を誘発していると考えられる。

Nicotine 曝露に付随して生じる nACh 受容体の up-regulation に際し、増加した nACh 受容体の nicotine に対する感受性はむしろ低下していると報告されている<sup>10)</sup>が、この結論は細胞内への Rb の流入が対照群に比して増加していないことを根拠としている。本研究では nicotine の長時間曝露により、nicotine 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]流入のみならず、KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]流入の増加が認められており、この増加は仮に増加した nACh 受容体の感受性が低下していても、既存の受容体により膜電位の変化は誘発されている結果であると考えられる。

Nicotine 長時間曝露により、KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]流入が著明に増大していることが本研究の結果明らかとなったが、この増加がいかなる型の VDCC の機能変化によるのかを各種の VDCC 阻害薬により検討した。本研究で示したように、nicotine 非曝露群および nicotine 曝露群のいずれの細胞においても、それぞれ P/Q および N 型 VDCC 阻害薬である ω-ATX および ω-CTX により阻害される [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]流入量は同一であり、P/Q および N 型 VDCC の機能は nicotine 長時間曝露によっても影響を受けていないことが示唆される。一方、nifedipine による [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]流入阻害量は nicotine 曝露群において有意に大きく、しかも nifedipine 共存下において観察される KCl 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]流入量は同一であることが観察されている。この実験成績から、nicotine 長時間曝露により誘発される [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]流入の増加は L 型 VDCC の活性化に起因する可能性が示唆された。

上述の成績を確認するために、本研究では第 1 に L 型 VDCC を直接活性化する作用を有する Bay k 8644 を用いて nicotine の長時間曝露を行った神経細胞に Bay k 8644 を作用させて [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]流入の変化を非曝露神経細胞の場合と比較した。Nicotine 曝露細胞では非曝露細胞に比して有意な Bay k 8644 誘発性 [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]流入の増加が認

められた。しかも、この増加は、L 型 VDCC 阻害薬である nifedipine により用量依存性に抑制されるのが観察された。この実験成績から、nicotine 長時間曝露により L 型 VDCC の活性増加が生じていることが明らかと判断される。

次に、nicotine の長時間曝露により誘発された L 型 VDCC の活性増加が VDCC の増加によるものか、あるいは  $Ca^{2+}$  に対する VDCC の親和性の増加によるものかを、神経細胞より調製した顆粒画分を用いて [ $^3H$ ]verapamil 結合を調べることにより検討した。本研究で示したように、 $[^3H]$ verapamil 結合は nicotine 曝露を行った神経細胞において有意に増加しており、この増加は  $[^3H]$ verapamil 結合の  $K_d$  値の低下によるものであり、 $B_{max}$  値には変化が認められなかった。従って、nicotine 長時間曝露により誘発される L 型 VDCC 活性亢進は  $Ca^{2+}$  に対する VDCC の親和性の増加に起因することが明らかとなった。

#### E. 結語

薬物依存を起こすことが知られている nicotine の長期曝露により誘発される [ $^{45}Ca^{2+}$ ]流入増加の機序について、初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用いて検討した。その結果、nicotine 誘発性 [ $^{45}Ca^{2+}$ ]流入の増加は、L 型 VDCC の  $Ca^{2+}$  に対する親和性の増加を介した L 型 VDCC の機能亢進に起因することが明らかとなった。

#### F. 参考文献

- 1) Corda M.G., Ferrari M., Guidotti A. et al.: Isolation, purification and partial sequence of a neuropeptide (diazepam binding inhibitor) precursor of an anxiogenetic putative ligand for benzodiazepine recognition site. *Neurosci. Lett.* 47: 319-324, 1984.
- 2) Ferrarese C., Appollonio I., Bianchi M., et al.: Benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor: a possible link between stress, anxiety and the immune system. *Psychoneuroendocrinology* 18: 3-22, 1993.
- 3) Guidotti A., Toffano G. and Costa E.: An endogenous protein modulates the affinity of GABA and benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 257: 553-555, 1978.
- 4) Kadous A., Matsumura F. and Enan E.: High affinity binding of 3H-verapamil to rat brain synaptic membrane is antagonized by pyrethroid insecticides. *J. Environ. Sci. Health B.* 25: 855-871, 1994.
- 5) Katsura M., Hara A., Higo A., et al.: Continuous treatment of morphine increases diazepam binding inhibitor mRNA in mouse brain. *J. Neurochem.* 71: 2638-2641, 1998.
- 6) Katsura M., Ohkuma S., Jun X., et al.: Continuous treatment with nicotine increases diazepam binding inhibitor (DBI) and its mRNA in the mouse brain. *Mol. Brain Res.* 55: 345-349, 1998.
- 7) Katsura M., Ohkuma S., Tsujimura A. et al.: Functional involvement of benzodiazepine receptors in ethanol-induced increases of diazepam binding inhibitor (DBI) and its mRNA in the mouse brain. *Mol. Brain Res.* 54: 124-132, 1998.
- 8) Katsura M., Ohkuma S., Chen D.-Z., et al.: Nicotine increases diazepam binding inhibitor (DBI) mRNA in primary cultured neurons. *Neurosci. Lett.*, 168: 1-4, 1994.
- 9) Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 19: 265-275, 1951.
- 10) Lukas R.J.: Effects of chronic nicotinic ligand exposure on functional activity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by cells of the PC12 rat pheochromocytoma or the TE67/RD human clonal line. *J. Neurochem.* 56: 134-145, 1991.
- 11) Ohkuma S., Katsura M., Hibino Y. et al.: Multiple actions of nitric oxide on voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels in mouse cerebral cortical neurons. *Mol. Brain Res.* 54: 133-140, 1998.
- 12) Sargent P.B.: The diversity of neuronal nicotinic

acetylcholine receptors. *Ann. Rev. Neurosci.* 16: 403-443, 1993

- 13) Zhang X. and Nordberg A.: The competition of (-)-[<sup>3</sup>H]nicotine binding by the enantiomers of nicotine, nornicotine and anatoxin in membranes and solubilized preparations of different brain regions of rat. *Naunyn-schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 348: 28-34, 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：覚醒剤逆耐性現象における中枢ヒスタミン神経系の作用：

ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究

主任研究者：佐藤光源<sup>2)</sup>

研究協力者：窪田恭彦<sup>1),2)</sup>、大津浩<sup>1)</sup>、櫻井映子<sup>1)</sup>、伊藤千裕<sup>2)</sup>、渡邊建彦<sup>1)</sup>

東北大学医学部細胞薬理学分野<sup>1)</sup>、精神神経学分野<sup>2)</sup>

研究要旨

メタンフェタミン (MAP) 慢性投与による逆耐性現象における中枢ヒスタミン (HA) 神経系の作用を検討する目的で、HA の合成酵素である L-ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 遺伝子ノックアウト (KO) マウスにメタンフェタミン (MAP) を慢性投与し、投与毎の移所運動量を解析した。その結果、MAP を連続投与すると、投与回数が増すに従って野生型および HDC 遺伝子 KO マウスの両方で移所運動量増加が増強し、逆耐性現象形成が観察された。移所運動量の増加は HDC 遺伝子 KO マウスでより早く、投与後 1 時間の移所運動量は HDC 遺伝子 KO マウスにおいて連続投与 11 回目まで野生型に比較し有意に大きかった。ところが、連続投与終了後 7 日目に野生型および KO マウスの腹腔に MAP を再投与したときの移所運動量については野生型と KO マウス間で有意差は認められなかった。中枢 HA 神経系は MAP 慢性投与による逆耐性現象形成過程に対して抑制的に働くことが明らかになったが、逆耐性現象完成後には抑制作用を認めなかった。

A. 研究目的

覚醒剤であるメタンフェタミン (MAP) は、ドパミントランスポーターに作用して、その再取り込みを阻害すると共に、遊離を促進する<sup>1, 4)</sup>。MAP をマウスやラットに急性投与すると、上記の神経化学的变化に伴い移所運動活性の増加や常同行動の出現が見られる<sup>5, 14, 16)</sup>。さらに MAP の反復投与により、これらの行動が長期持続的に増強されることが知られており、この増強は逆耐性現象と呼ばれている<sup>5, 14, 16, 17)</sup>。一方同じ生理活性アミンのひとつであるヒスタミン (HA) は L-ヒスチジンからヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) により合成され、神経伝

達物質あるいは神経修飾物質とみなされている<sup>10, 12, 15, 21)</sup>。HA ニューロンは後部視床下部の結節乳頭核に限局し、そこから中枢神経系に幅広く分布しており、さまざまな脳機能（とりわけ視床下部の機能である睡眠/覚醒リズム、食欲、性行動や精神神経機能）に関与している<sup>10, 12, 15, 21)</sup>。

前回われわれは、HA の合成酵素である HDC 遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作成し、MAP 急性投与における中枢 HA 神経系の作用につき検討した。その結果、MAP 急性投与による移所運動量の増加時間が、KO マウスで延長していることから、中枢 HA は覚醒アミンとして働く一方で、

MAP の急性運動効果を抑制することを明らかにした。

今回、MAP 慢性投与による逆耐性現象における中枢 HA 神経系の作用をさらに明確にする目的で、HDC 遺伝子 KO マウスと野生型マウスに MAP を慢性投与し、投与毎の移所運動量の測定と解析を行った。

## B. 方法

### 1. 動物

HDC 遺伝子 KO マウスは、大津らによって相同組換え法を用いる定法に従って作成された<sup>8)</sup>。前回報告したように HDC 遺伝子 KO マウスは、HDC 活性をほとんど有さなかったが、HA 量は約 51% あった。飼料に含有される HA が消化管から吸収されることが分かったため、HA 含量の少ない飼料を特別に用意することにより、体内の HA をさらに低下させたマウスを得ることができた。よって、行動実験に際しては、低 HA 飼料を摂取させた。

9-15 週齢の雄性ホモ型 KO マウスと野生型マウス (35-40g) は 1 匹ずつ通常のケージに入れ、飼料および水は自由に摂取させ、温度、湿度をそれぞれ  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $65 \pm 5\%$  に保った室内で、12 時間の明暗周期下で飼育した (午前 6 時ライト点灯)。

### 2. 薬物投与と行動計測

野生型及び HDC 遺伝子 KO マウスの腹腔内に MAP (ヒロボン、大日本製薬) (1mg/kg) を 1 日 1 回明期に 14 日間連続投与し、各回の投与ごとに受動型遠赤外線センサーによる運動量測定装置、SUPER-MEX と運動量解析システム、CompAct AMS (室町器械、東京) を用い、5 分間隔で 4 時間の移所運動量を測定した。

さらに 14 日間の MAP 連続投与終了後 6 日間の断薬期間をおき 7 日目に野生型及び HDC 遺伝子 KO マウスの腹腔に MAP (1mg/kg) を再投与し、移所運動量を同様に計測した。

## C. 結果

MAP を連続投与すると、投与回数が増すに従って野生型および HDC 遺伝子 KO マウスの両群で移所運動量増加が増強し、逆耐性現象形成が観察された。移所運動量の増加は HDC 遺伝子 KO マウスでより早く、5 回目の MAP 投与までにほぼ最大の運動量に到達したが、野生型は最大の運動量に到達するまで、約 10 回の投与を要した。また、投与後 1 時間の移所運動量の総計は HDC 遺伝子 KO マウスにおいて野生型に比較し有意に大きかった。ところが、連続投与終了後 7 日目に野生型および HDC 遺伝子 KO マウスの腹腔に MAP (1mg/kg) を再投与したときの移所運動量については野生型と HDC 遺伝子 KO マウス間で差は認められなかった (Fig. 1)。

## D. 考察

中枢神経系における HA の機能は、これまでおもに HA 受容体の拮抗薬や作動薬、HA 合成酵素阻害薬を腹腔内注射あるいは脳室内投与することにより研究されてきた。しかし、こうした薬理学的研究の問題点として、薬物の投与方法や代謝、中枢神経系への移行性などがあげられる。たとえば中枢 HA 神経系において、L-ヒスチジンを大量に投与すると、脳の HA 含量は上昇するが、代謝産物である *N*<sup>ε</sup>-メチル HA は変化せず、GABA アゴニストであるイミダゾー

ル酢酸が生成されることが報告されている<sup>13, 20)</sup>。また、生体の中枢神経系における HA の生理的な役割の中には、まだ正確には明らかにされていないものがある。相同組換えによる HDC 遺伝子 KO マウスを用いた研究は、これらの問題点を解決できる可能性を持つと考えられる。

MAP 慢性投与により、野生型および HDC 遺伝子 KO マウスの両群で、MAP による逆耐性現象が形成された。しかし、HDC 遺伝子 KO マウスにおいて連続投与 11 回目までは移所運動量が野生型よりも多かったにもかかわらず、その後両群に有意差はなくなった。これは、HDC 遺伝子 KO マウスにおいて逆耐性現象形成が早期に起こっていることを示唆している。しかし、連続投与終了後 7 日目に MAP を再投与したときの移所運動量の変化は、野生型と HDC 遺伝子 KO マウスで有意差は無かった。最近の報告によると、HA の前駆体である L-ヒスチジンが MAP 慢性投与による逆耐性現象の形成過程を抑制し、HA の合成阻害薬である  $\alpha$ -フルオロメチルヒスチジン、H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるピリラミン、H<sub>2</sub> 受容体拮抗薬であるゾランチジンが逆耐性現象形成を促進することが示されている<sup>3)</sup>。また、H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬をオピオイドと共に使用すると、依存症を形成しやすく<sup>9, 19)</sup>、アメリカ合衆国においては、多くのヘロイン依存症者によって H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるトリペレナミンがペンタゾシンと共に乱用されて、“T’s and blues”として知られている<sup>6, 7, 11, 18)</sup>。このように HA 神経系は H<sub>1</sub> 受容体、H<sub>2</sub> 受容体を介して精神刺激薬の依存症形成に抑制的に働いていることが推測される。一方、ラットにおいて MAP

逆耐性現象完成後 7 日目に MAP を再投与すると、線条体における HA 遊離が促進されるが、その際の常同行動が逆耐性現象完成時に比較して抑制されることはない<sup>2)</sup>。つまり、逆耐性現象が完成してしまうと MAP 急性運動効果の際認められた HA の抑制作用が、行動上の表現型としては捉えられなくなってしまう。おそらく、中枢 HA 神経系が MAP 投与による脳の生化学的、機能的変化を抑制する能力には限界があり、MAP の反復投与による変化を遅らせることはできても、それを完全に抑制することは不可能なのではないかと推察される。言い換えると、HA 神経系は逆耐性現象の中核にある脳の変化を抑制的に修飾する作用を持つが、それを超えて脳の機能変化が完成してしまった場合、それ以降の MAP 投与による行動変化に対する抑制作用が現れにくいのではないかと予想される。

このように、HDC 遺伝子 KO マウスを用いた本研究により、中枢 HA 神経系は MAP 逆耐性現象形成過程に対して抑制的に働いていることが明らかになり、MAP による脳障害に対する生体防御機構の役割を持つことが示唆された。しかし、逆耐性現象が完成した後の長期持続性に関しては、中枢 HA 神経系は抑制作用を持たないようである。

文献

- 1 Giros B; Jaber M; Jones SR et al.: Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 1996 379: 606-12
- 2 Ito C; Onodera K; Sakurai E et al.: Effects of dopamine antagonists on neuronal histamine release in the striatum of rats subjected to acute and chronic treatments with methamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 1996 279: 271-6.
- 3 Ito C; Onodera K; Watanabe T et al.: Effects of histamine agents on methamphetamine-induced stereotyped behavior and behavioral sensitization in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1997 130: 362-7.
- 4 Jones SR; Gainetdinov RR; Wightman RM et al.: Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J Neurosci* 1998 18: 1979-86.
- 5 Kalivas PW; Stewart J: Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 1991 16: 223-44.
- 6 Lahmeyer HW; Steingold RG: Medical and psychiatric complications of pentazocine and tripeleennamine abuse. *J Clin Psychiatry* 1980 41: 275-8.
- 7 Lange WR; Jasinski DR: The clinical pharmacology of pentazocine and tripeleennamine (T's and Blues). *Adv Alcohol Subst Abuse* 1986 5: 71-83.
- 8 Ohtsu H; Suzuki S; Watanabe T: Assessment of in vivo effect of histamine using histidine decarboxylase (HDC) gene disrupted mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998 358: R 762.
- 9 Oishi R; Shishido S; Yamori M et al.: Comparison of the effects of eleven histamine H1-receptor antagonists on monoamine turnover in the mouse brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994 349: 140-4.
- 10 Onodera K; Yamatodani A; Watanabe T et al.: Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. *Prog Neurobiol* 1994 42: 685-702.
- 11 Poklis A; Whyatt PL: Current trends in the abuse of pentazocine and tripeleennamine: the metropolitan St. Louis experience. *J Forensic Sci* 1980 25: 72-8.
- 12 Prell GD; Green JP: Histamine as a neuroregulator. *Annu Rev*



- Neurosci 1986 9: 209-54.
- 13 Prell GD; Hough LB; Khandelwal J et al.: Lack of a precursor-product relationship between histamine and its metabolites in brain after histidine loading. *J Neurochem* 1996 67: 1938-44.
- 14 Robinson TE; Becker JB: Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 1986 396: 157-98.
- 15 Schwartz JC; Arrang JM; Garbarg M et al.: Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* 1991 71: 1-51.
- 16 Segal DS; Kuczenski R: Behavioral pharmacology of amphetamine.; in Cho AK; Segal DS, *Amphetamine and its analogs* (New York, Academic Press 1994).
- 17 Seiden LS; Sabol KE; Ricaurte GA: Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993 33: 639-77.
- 18 Senay EC: Clinical experience with T's and B's. *Drug Alcohol Depend* 1985 14: 305-12.
- 19 Suzuki T; Masukawa Y; Shiozaki Y et al.: Potentiation of pentazocine conditioned place preference by tripeleppamine in rats. *Psychopharmacology* 1991 105: 9-12.
- 20 Thomas B; Prell GD: Imidazoleacetic acid, a gamma-aminobutyric acid receptor agonist, can be formed in rat brain by oxidation of histamine. *J Neurochem* 1995 65: 818-26.
- 21 Watanabe T; Wada H: *Histaminergic Neurons: Morphology and Function.* (Boca Raton, Florida, CRC Press 1991).

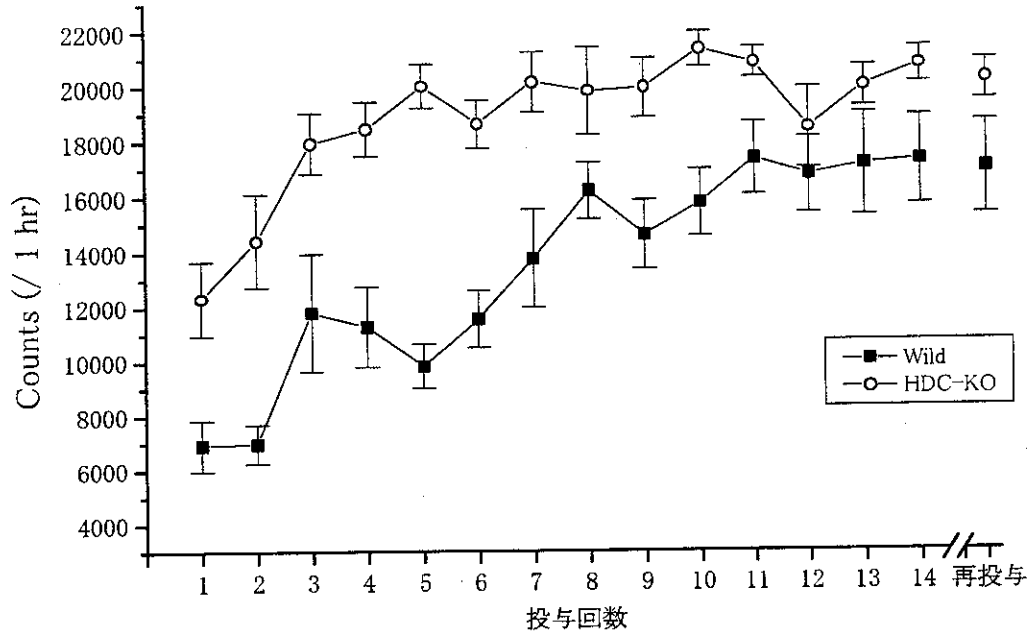


Fig. 1. メタンフェタミン慢性投与が野生型 (■) およびヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子ノックアウト (○) マウスの移所運動量に与える影響。メタンフェタミン (1 mg/kg) を1日1回明期に腹腔内投与し、各回の投与ごとに移所運動量を測定した。データは投与後1時間の移所運動量の平均値で示し、標準誤差を垂直線で表示した。統計解析には二元配置分散分析法を用いた。p < 0.0001, F = 125.7, n = 7 (野生型)、n = 6 (ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子ノックアウトマウス)。

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：メタンフェタミン精神病における可塑性関連遺伝子のラット脳内での発現変化。

*synaptophysin*、*stathmin*、 $\alpha$ -*tubulin*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 高木 学<sup>a</sup>、児玉匡史<sup>b</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りシナプスの可塑性関連遺伝子である、*synaptophysin*、*stathmin*、 $\alpha$ -*tubulin* mRNAの変化を、in situ hybridization法を用いて検討した。急性実験では、*synaptophysin* mRNAは、線状体、側坐核、海馬(CA1, CA3)、大脳皮質（特に前頭葉）において、METH (4mg/kg) 投与後、1から3 h後に有意に約50%増加し、6から24 h後にはほとんどの部位で定常状態まで戻った。*stathmin* mRNAでは、*synaptophysin* mRNAと比較すると少ない部位で、やや早く、0.5から1 h後に約30%と有意に増加し、3 h後にはすべての部位で定常状態まで戻った。 $\alpha$ -*tubulin*は、いずれの部位でも変化が見られなかった。慢性実験では、*synaptophysin*、*stathmin*、 $\alpha$ -*tubulin* mRNAともに、METH 反復投与1h、24h後、saline 1h後の3群の中で、*stathmin*がMETH 反復投与1h後で、線状体、側坐核において、saline群に対して減少したのみで、そのほかの部位では変化がなかった。この結果により、*synaptophysin*、*stathmin*が、METHによる逆耐性現象を含む神経可塑性の形成期(induction process)に重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 目的

Amphetamine (AMPH) やMethamphetamine (METH)、cocaine、といった中枢興奮薬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と、断薬により軽快しても、少量の中枢興奮薬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>18)</sup>。一方、実験動物に見られる逆耐性現象は、中枢興奮薬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、中枢興奮薬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、長期にわた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<sup>22),23)</sup>。昨年、われわれは、細胞質、樹状突起に存在する、細胞骨格関連蛋白であるactivity regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) がMETH急性、慢性投与により、大脳皮質、線条体において増加しており、可塑性に関与している可

能性を報告した。<sup>14)</sup>

この点をさらに検討するためにpresynaptic vesicle proteinであり、シナプスにおいて、伝達物質の開口分泌に関与し、また、シナプス密度のマーカーとして報告されている*synaptophysin*<sup>3),4)</sup>、growth-associated protein(GAP)であり、軸索、樹状突起のgrowth coneに存在しており、その伸張に関与しているSCG10と、69%のアミノ酸を共有し<sup>19)</sup>、細胞内のシグナル伝達に関与していると報告されている*stathmin*<sup>9)</sup>、cytoskeletal proteinであり、カイニン酸による痙攣時にDentate gyrusにて発現が増加すると報告されている $\alpha$ -*tubulin*<sup>5),16)</sup>の、働きが異なる3種のmRNAに注目し、in situ hybridization法をもちいて、METH投与による変化を検討した。

B. 方法

1. 対象

7週齢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

A. 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、その海馬を用いた。

B. 経時的変化の検討には、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=6)。なお、0時間の対照群は無処置とした。METH慢性投与実験では、METH 4mg/kgを、10日間1日1回反復投与し、最終METH注射後、1hと24h後に断頭した。対照群として、10日間salineを反復投与し、最終saline注射後1h後に断頭した (n=8)。

## 3. オリゴヌクレオチドプローブの作成

それぞれのラットmRNAに相補的なオリゴヌクレオチドプローブを作成した。すなわち *synaptophysin*は(1208-1247)5'-CAG GGC TGG GGA ACA GAT AGG GGC TGA GGA ATG CAA GGT C-3'、*stathmin*は(516-555)5'-GTG CTT GTC CTT CTC TCG CAA ACG CTC CAG CTT GGC AGC C-3'、 $\alpha$ -*tubulin*は5'-GGA CCA GAA TAA ACA TCC CTG TGAAAG CAG CAG CAC CTT GTG ACA TTT A-3'である。GenBankでの相同性検索では、これら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

*synaptophysin*、*stathmin* mRNAの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。ラット海馬からISOGEN (Nippongene) を用いtotal RNAを抽出。RNA 10  $\mu$ gを1%アガロースゲル (2.2 M formaldehyde, 20 mM MOPS buffer, pH 7.0) で4°C、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  $\mu$ g/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°C、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°C、15分を1回であった。解析には、富士通BASstation、Mac BASを使用した。 $\alpha$ -*tubulin*の特異性は既に確認されている (東京医科歯科大学、難治疾患研究所、神経疾患研究部門、分子神経学、田中光一、私信)。

## 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<sup>6</sup> cpmの [<sup>35</sup>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、 [<sup>35</sup>S]dATPで標識し用いた。切片は湿箱で37°C、over nightインキュベートし、1x SSCで、予備実験にて決定した、*synaptophysin*、 $\alpha$ -*tubulin*は55°C、*stathmin*は45°Cにて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、乾燥した。解析には、富士通BASstation、Mac BASを使用した。METH投与1時間後の*synaptophysin*、*stathmin*、 $\alpha$ -*tubulin*のそれぞれの結果を (Fig. 2) に示す。左右の線条体、側坐核、前頭葉皮質、頭頂葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質、海馬のCA1、CA3、Dentate gyrus、amygdalaの各部位のoptical densityを読み取り、スタンダードから作製した校正曲線よりcpm/ $\mu$ gに変換した。

## 6. 統計処理

統計には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

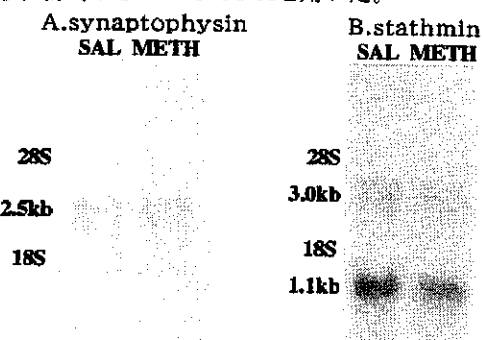
### 1. Northern blot analysis

Northern blot analysisの結果、過去の報告に一致し、*synaptophysin* mRNAは2.5Kb<sup>4)</sup>、*stathmin* mRNAは1.1と3.0Kb<sup>9)</sup>のバンドを形成した。*synaptophysin* mRNA、*stathmin* mRNAともに生食投与、METH投与1時間後における差は海馬全体の標品を用いたnorthern blot analysisでは見られなかった。

### 2. METH急性投与後の時間経過

METH急性投与の効果をFig. 3に示す。*synaptophysin* mRNAは、METH投与0.5h後で側頭葉皮質、1h後で前頭葉皮質、線状体、3h後で後頭葉皮質、海馬のCA1、CA3、側坐核において、有意に約50%増加し、6から24h後にはほとんどの部位で定常状態まで戻った。部位的には、相対的に海馬において、強い発現がみられた。

Fig.1 ラット海馬におけるA. *synaptophysin*, B. *stathmin* mRNAのNorthern blot analysis. METH (4mg/kg)あるいは生食投与1時間後に断頭し、海馬からのtotal RNAを用いた。



一方、*stathmin* mRNAは、0.5h後で前頭葉皮質、1h後で線状体、側坐核、側頭葉皮質、海馬のCA1において、約30%と有意に増加し、3h後にはすべての部位で定常状態まで戻った。部位的には、相対的に前頭葉皮質、海馬で、強い発現が

Fig.2 Distribution (無処置)

### A. *synaptophysin*



### B. *stathmin*

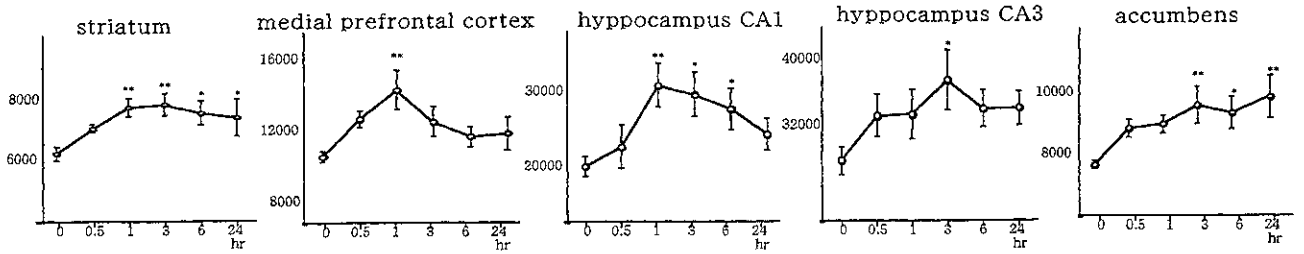


### C. $\alpha$ -tubulin

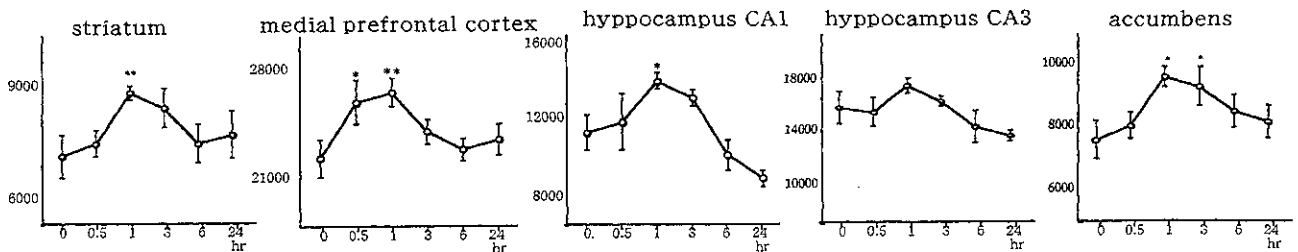


Fig.3 time course in situ hybridization

A. synaptophysin mRNA



B. stathmin mRNA



C.  $\alpha$ -tubulin mRNA

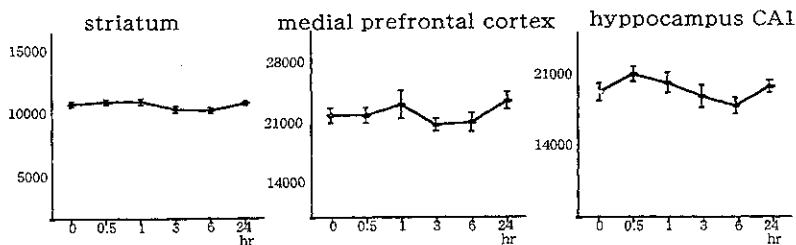


Fig. 3 METH単回投与後 synaptophysin, stathmin,  $\alpha$ -tubulin mRNA変化。METH(4mg/kg)腹腔内投与後、0.5、1、3、6、24時間後断頭 (n=6)。なお、0時間の対照群は無処置である。各数値は平均±標準誤差で表示。 Fisher's test \*p<0.05, \*\*p<0.01

table 1結果						
	acute			clonic		
	synaptophysin	stathmin	$\alpha$ -tubulin	synaptophysin	stathmin	$\alpha$ -tubulin
prefrontal cortex	↑	↑	-	-	-	-
temporal cortex	↑	↑	-	-	-	-
parietal cortex	-	-	-	-	-	-
occipital cortex	↑	-	-	-	-	-
accumbens	↑	↑	-	-	↓	-
striatum	↑	↑	-	-	↓	-
CA1	↑	↑	-	-	-	-
CA3	↑	-	-	-	-	-
DG	-	-	-	-	-	-
Amygdala	-	-	-	-	-	-

みられたが、*synaptophysin* mRNAに比べると海馬での発現が少なかった。(Fig.3B)  $\alpha$ -tubulin mRNAはすべての部位で変化がなかった(Fig.3C)

### 3. METH慢性投与の影響

METH慢性投与では*synaptophysin* mRNA、*stathmin* mRNAともに、METH 反復投与1h、24h後、saline 1h後の3群の中で、*stathmin*がMETH 反復投与1h後で、線状体、側坐核において、saline群に対して減少したのみで、そのほかの部位では変化がなかった。 $\alpha$ -tubulin mRNAも急性投与と同様に変化が見られなかった。in situ hybridizationの結果をまとめたものを(Table 1)に示す。

### D. 考察

逆耐性現象は慢性反復投与で形成されるものであるが、これを形成する神経機序は初回投与から始まっていると考えられるので<sup>24)</sup>、METH単回投与でもこの点を検討した。今回の研究によって、METHの急性単回投与により、ラット線状体、側坐核、前頭葉皮質、側頭葉皮質、海馬で、*synaptophysin*、*stathmin* mRNA発現が増強することを初めて示した。*synaptophysin*、*stathmin* mRNAの発現が、前頭葉皮質で増強されていることは、中枢興奮薬による逆耐性現象に前頭葉が何らかの役割を担っているとの報告に一致して興味深い。<sup>13)20)</sup>

中枢興奮薬による逆耐性現象の機序に、構造的変化を伴うような神経の可塑性変化が生じているという仮説があるが、その具体的な神経機序については報告が少ない<sup>22)</sup>。この傍証になる報告にはGolgi染色の光顕観察にて、METH慢性投与により側坐核のshellとcore、前頭葉皮質で、樹状突起の長さの伸長、分岐数の増加、棘の増加が見られ、頭頂葉、後頭葉では樹状突起の長さには差が無く、棘の数は減少していたという報告や<sup>17)</sup>、先にふれた、*arc* mRNAがMETH急性投与により0.5h~3hに線状体、海馬CA1、前頭葉皮質において有意に増加しているという報告<sup>14)</sup>、神経円錐に存在し、神経の成長、伸張に関与している*neuromodulin*(GAP-43)のリン酸化の亢進が、METH慢性投与にて、線状体でみられていたと言う報告<sup>6)10)11)12)</sup>、cocaineやMETHの急性投与で内側前頭前野、島皮質、梨状葉皮質で、神経円錐の伸張に関与する*tissue type plasminogen activator* (t-PA) mRNAが増加する報告<sup>8)</sup>などが

ある。そして、これらに報告された増加の部位は、我々が今回報告した、METH急性投与により*stathmin* mRNAの発現が増強していた脳部位にほぼ一致している。*stathmin*は、cytoplasmic phosphoproteinで、GAPとして働き、神経構造の可塑性に関与していると言われており、細胞分化や、細胞分裂、細胞増殖を含む細胞のシグナル伝達を統合していると考えられている。<sup>9)19)</sup>また、*SCG10*、最近報告された*RB3*<sup>21)</sup>、*SCLIP*<sup>15)</sup>などともに*stathmin* familyを形成している。そして、その各々が、神経可塑性に関与していると言われている。以上により、今年度、われわれが見出した*stathmin* mRNAのMETHによる発現増加は中枢興奮薬による逆耐性現象の機序に構造的変化を伴うような神経の可塑性変化が生じている、という仮説を支持する報告と考えられる。

また、中枢興奮薬による主要な神経化学的変化の一つは、ドパミン放出の増大である。これにはドパミントランスポーターが重要であるが<sup>7)</sup>、これ以外にも、逆耐性状態では、Ca<sup>2+</sup>依存性の開口分泌性放出が増加しているとの報告もみられる。この傍証になる報告には、開口分泌にはシナプス小胞関連タンパク質がその放出に関与するが、その一つである*synaptotagmin IV* mRNAがcocaine急性投与一時間後に線状体で増加しているという報告<sup>2)</sup>、*synapsin I* 蛋白のリン酸化が増加している<sup>10)11)12)</sup>との報告がある。*synaptophysin*は、presynaptic vesicle proteinであり、神経伝達物質の開口分泌に関与していると考えられており、シナプス密度とも相関することが知られている<sup>3)4)</sup>。そのmRNAが、線状体、側坐核、前頭葉皮質、海馬などで、増加していたことは、これらの部位で、前シナプスにおいて開口分泌性放出が増加していること、シナプス新生が生じていることを示唆すると考えられる。

*synaptophysin* mRNAについての研究では、ratにhaloperidol慢性投与をした実験があり、2週間投与で線状体にて、16週間投与にて線状体、前頭葉皮質、海馬にて増加していることが知られている。これは、後シナプスのドパミン受容体遮断によるnegative feedbackにより、前シナプスからのドパミン放出増大による変化と考えられている<sup>3)4)</sup>。

$\alpha$ -tubulin mRNAには変化はなかった。 $\alpha$ -tubulinは神経微小管の構成成分の一つであり、これらが重合・遊離することで樹状突起や軸索の機能変化を生じるため、新たな合成を必要としないのかもしれない。また、MAP2などの他の神経微小管成分がより重要な役割を持っているのかも

しれない。少なくともMETHによる逆耐性現象においては $\alpha$ -tubulinの発現変化は関与していないことが明らかとなった。

慢性投与では、*synaptophysin*, *stathmin*のmRNAに、どの脳部位においても増加はみられなかった。今回の慢性投与実験は、METH4mg/kgを1日1回10日間、というスケジュールで行ったが、常同行動を指標とした逆耐性現象が、投与3~5日目という比較的早くに完成することを考える<sup>21)</sup>と、常同行為が強く安定して発現する時期には、両分子の転写活性が基礎レベルにまで戻っていたことになる。これらのことは、*synaptophysin*, *stathmin*が、逆耐性現象の形成期(induction process)に重要な役割を果たし、その後の維持期/発現期(maintenance process/expression process)には、大きな関与をしていないと考えられる。この点は、先に報告したArcが、形成期と維持期の両方に強く関与していたことと好対照であった。このことは、逆耐性の形成期と維持期/発現期ではその分子化学的機序が異なっていることを示すと考えられる。今後、他の可塑性関連分子も検討し、そのより詳細な機序を解明していく必要があると考えられた。

#### E. 結論

本研究では、METH急性投与によりシナプスの可塑性関連遺伝子である、*synaptophysin*, *stathmin* mRNAの発現が線状体、側坐核、海馬、大脳皮質(特に前頭葉)において、増加していることがわかった。 $\alpha$ -tubulinは、いずれの部位でも変化が見られなかった。

慢性実験では、*synaptophysin*, *stathmin*,  $\alpha$ -tubulin mRNAともに、増加はみられなかった。この結果により、中枢興奮薬による逆耐性現象の機序に構造的変化を伴うような神経の可塑性変化が生じていること、前シナプスにおいて開口分泌性放出が増加していること、シナプス新生が生じていることを示唆すると考えられた。また、*synaptophysin*, *stathmin*が、METHによる逆耐性現象を含む神経可塑性の形成期(induction process)に重要な役割を果たし、その後の維持期(maintenance process)には大きな関与をしていないと考えられ、このことは、逆耐性の形成期と維持期ではその分子化学的機序が異なっていることを示すと考えられる。

#### [参考文献]

- 1) Beilharz E.J., Zhukovsky E., Lanahan A.A.: Neuronal activity induction of the stathmin-like gene RB3 in the rat hippocampus: Possible role in neuronal plasticity. *J. Neurosci.*, 18:9780-9789,1998.
- 2) Denovan-Wright E.M., Newton R.A., Armstrong J.N.et. al.: Acute administration of cocaine, but not amphetamine, increases the level of synaptotagmin IV mRNA in the dorsal striatum of rat. *Mol. Brain Res.*, 55:350-354,1998.
- 3) Eastwood S.L., Heffernan J., Harrison P.J.,: Chronic haloperidol treatment differentially affects the expression of synaptic and neuronal plasticity associated genes. *Mol. Psychiatry*,2:322-329,1997.
- 4) Eastwood S.L., Burnet P.W.J., Harrison P.J.: Striatal synaptophysin expression and haloperidol-induced synaptic plasticity. *Neuroreport*, 5: 677-680, 1994.
- 5) Freda D. M., Christian C.G.N., Michele D.et. al.: Isotypes of  $\alpha$ -tubulin are differentially regulated during neuronal maturation. *J. Cell. Biol.*, 105: 3065-3073, 1987.
- 6) Gnegy M.E., Hong P., Ferrell S.T.: Phosphorylation of neuromodulin in rat striatum after acute and repeated, intermittent amphetamine. *Mol. Brain Res.*, 20: 289-298,1993.
- 7) Griot B., Jaber M., Jones S.R. et. al.: Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, 379: 606-612, 1996.
- 8) Hashimoto T., Kajii Y., Nishikawa T.: Psychotomimetic-induction of tissue plasminogen activator mRNA in corticostriatal neurons in rat brain. *Eur J Neurosci* , 10:3387-3399, 1998.
- 9) Himi T., Okazaki T., Wang H. et. al. Differential localization of SCG10 and p19/stathmin messenger RNAs in adult rat brain



- indicates distinct roles for these growth-associated proteins. *Neuroscience*, 60: 907-926,1994.
- 10) Iwata S., Hewlett G.H., Ferrell S.T. et. al.: Increased in vivo phosphorylation state of neuromodulin and synapsin I in striatum from rats treated with repeated amphetamine. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 278: 1428-1434,1996.
  - 11) Iwata S., Hewlett G.H., Ferrell S.T. et. al.: Enhanced dopamine release and phosphorylation of synapsin I and neuromodulin in striatal synaptosomes after repeated amphetamine. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 283: 1445-1452, 1997.
  - 12) Iwata S., Hewlett G.H., Gnery M.E.: Amphetamine increases the phosphorylation of neuromodulin and synapsin I in rat striatal synaptosomes. *Synapse*, 26: 281-291, 1997.
  - 13) Karler R., Bedingfield J.B., Thai D.K.et.al.: The role of the frontal cortex in the mouse in behavioral sensitization to amphetamine. *Brain Res.*, 757: 228-235, 1997.
  - 14) Kodama M., Akiyama K., Ujike H. et. al.: A robust increase in expression of arc gene, an effector immediate early gene, in the rat brain after acute and chronic methamphetamine administration. *Brain Res.*, 796:273-283, 1998.
  - 15) Ozon S., Byk T., Sobel A.: SCLIP:a novel SCG10-like protein of the stathmin family expressed in the nervous system. *J. Neurochem.* 70: 2386-2396,1998.
  - 16) Represa A., Pollard H., Moreau J. et. al.: Mossy fiber sprouting in epileptic rats is associated with a transient increased expression of  $\alpha$ -tubulin. *Neuroscience Lett.*, 156: 149-152,1993.
  - 17) 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.
  - 18) 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.
  - 19) Sugiura Y., Mori N.: SCG10 expresses growth-associated manner in developing rat brain, but shows a different pattern to p19/stathmin or GAP-43. *Devel. Brain Res.*, 90: 73-91,1995.
  - 20) 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.
  - 21) 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.
  - 22) 氏家 寛：臨床精神医学講座 8 巻、薬物・アルコール関連障害（松下正明編集）Ⅲ成因論、A. 生物学的側面、A-1. 神経化学的側面、55-73、1999
  - 23) 氏家 寛、児玉匡史：逆耐性現象において神経回路網の再構築は生じているのか？日本神経精神薬理学雑誌、19：47-52、1999
  - 24) Vanderschuren LJ, Schmidt ED, De Vries TJ, et. al.: A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *J Neurosci.* 19:9579-86, 1999.

## 少量の非選択的あるいは選択的 neuronal NO synthase阻害薬の methamphetamine神経毒性効果に対する影響

分担研究者 小山 司

協力研究者 安部川 智浩、伊藤 耕一

北海道大学医学部精神医学教室

### 研究要旨

Methamphetamine(METH)の大量集中投与により発現する非可逆的な神経毒性は、覚醒剤精神病の遷延性および治療抵抗性の病態解明のために重要な研究対象である。METHを実験動物に大量集中投与(たとえば5 mg/kg, s.c., q 2hr, x 4)すると線条体のdopamineおよびその代謝産物の組織含量の非可逆的減少、線条体を含む側坐核、内側前頭前野などでの5-HTおよび5-HIAA含量の非可逆的減少が発現されることが知られている。これらの神経毒性は大量のMETH乱用者の死後脳においても生じていることが明らかにされた。これまで我々は、METH神経毒性におけるNMDA受容体を介したglutamate系神経伝達の関与を明らかにし、nitric oxide synthase(NOS)阻害薬の1つであるN<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)の高用量の併用投与(30 mg/kg, i.p., x 2)がMETHのdopamine神経毒性を減弱させることから、METH神経毒性とnitric oxide(NO)との関連を指摘した。これに反して、今回の実験では、少量のL-NAME(1, 5 and 10 mg/kg, i.p., x 1)の前投与はMETHのdopamine神経毒性を増強させた。L-NAMEはneuronal NOS, endothelial NOSの非選択的阻害薬であるため、neuronal NOSに比較的選択的な阻害薬である7-nitroindazole(7-NI)の少量投与(5 and 10 mg/kg, i.p., x 2)の効果を調べたところ、同様にMETHの神経毒性を増強させた。以上より、少量の非選択的あるいは選択的 NOS阻害薬はMETHのdopamine神経毒性を増強させた。高用量のL-NAMEがMETH神経毒性を減弱させることを考えると、NOはMETH神経毒性に対してneurodestructiveにもneuroprotectiveにも働きうることが示唆された。

## A. 目的

Methamphetamine(METH)の大量集中投与により発現する非可逆的な神経毒性は、覚醒剤精神病の遷延性および治療抵抗性の病態解明のために重要な研究対象である。METHを実験動物に大量集中投与(たとえば5 mg/kg, s.c., q 2hr, x 4)すると線条体のdopamineおよびその代謝産物の組織含量の非可逆的減少、線条体を含む側坐核、内側前頭前野などでの5-HTおよび5-HIAA含量の非可逆的減少が発現されることが知られている。これらの神経毒性は大量のMETH乱用者の死後脳においても生じていることが明らかにされた。これまで我々は、METH神経毒性におけるNMDA受容体を介したglutamate系神経伝達の関与を明らかにし、非選択的nitric oxide synthase(NOS)阻害薬の1つであるN $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)の高用量の併用投与(30 mg/kg, i.p., x 2)がMETHのdopamine神経毒性を減弱させることから、METH神経毒性とnitric oxide(NO)との関連を指摘した。LNAMEは脳虚血モデルなどにおいて、用量によってneuroprotectiveにもneurodestructiveにも作用することが知られている。今回我々は、少量のLNAMEおよび選択的neuronal NOS阻害薬である7-nitroindazoleのMETH神経毒性に対する効果を検討した。

## B. 方法

### 薬物投与プロトコール

Wistar雄性ラットを使用した。METH(5 mg/kg)あるいは生食(1 ml/kg)を2時間毎に皮下注射した。L-NAME(0.1, 1, 5 and 10 mg/kg)はMETHあるいは生食の初回投与1時間前に、7-NI(2.5, 5 and 10 mg/kg)をMETHの初回投与30分前と4時間後に腹腔内投与した。L-NAMEの効果 reverseする目的でL-arginine(500

mg/kg)をMETHの4回のそれぞれの皮下注射の直前に腹腔内投与した。

### 直腸温

上記投与中のMETH初回投与の1時間前、1時間後、5時間後の計3回 Model 49A, Digital Thermometerを用いて直腸温を測定した。

### 神経化学的測定

上記処置の後5日間の断薬の後断頭し、即座に脳をとりだし、-80°Cで保存した。300  $\mu$ mの切片を作り、線条体および側坐核をpunch outした。既報のごとくHPLCを用いてdopamine、5-HTおよびそれらの代謝産物の組織含量を測定した。

### 統計学的検討

統計学的検討にはANOVAを用い、有意水準は $p < 0.05$ に設定した。

## C. 結果

1. 高用量METH(5 mg/kg, s.c., x 4)は線条体のdopamineおよびその代謝産物の含量を有意に減少させ、L-NAME(0.1, 1, 5 and 10 mg/kg)は用量依存性にMETH神経毒性を増強させた (Fig. 1A, 1B)。L-arginineの併用はL-NAME(5 mg/kg)によるMETHのdopamine神経毒性増量効果をreverseした (Fig. 3)。
2. 高用量METHは線条体および側坐核の5-HTおよび5-HIAA含量を有意に減少させたが、L-NAME併用はMETHの5-HT神経毒性には影響しなかった (Fig. 2)。
3. 7-NI(2.5, 5 and 10 mg/kg)は用量依存性にMETHのdopamine神経毒性を増強させた (Fig. 4A, 4B)。L-arginine併用は7-NI(10 mg/kg)によるMETHのdopamine神経毒性増強効果をreverseした

(Fig. 6)。

4. 7-NI併用はMETHの5-HT神経毒性には影響しなかった(Fig. 5)。

5. METH投与は体温を上昇させたが、この体温効果にL-NAMEあるいは7-NIは影響しなかった (Table 1)。

#### D. 考察

METHの高用量集中投与により dopamineおよびその代謝産物の含量は線条体で減少し、5-HTおよび5-HIAA含量は線条体側坐核の両部位で減少した。METHのdopamine神経毒性は非選択的neuronal NOS阻害薬であるL-NAMEの少量前処置により増強し、さらに、選択的neuronal NOS阻害薬7-NIの少量併用投与によっても増強した。このことは、METH高用量集中投与の際にはneuroprotectiveに作用するNOが産生されており、少量のNOS阻害薬はこのneuroprotectiveなNO産生を阻害することでMETH神経毒性を増強している可能性がある。

我々の既報<sup>2)</sup>では、高用量のL-NAME(30 mg/kg, x 2)の併用投与はMETHのdopamine神経毒性を減弱させた。これらの相反する結果は、METH神経毒性においては、NOは条件によってneurodestructiveにもneuroprotectiveにも働きうることを示唆する。しかし、そのメカニズムの統一的理解は難しい。NOは周囲の酸化・還元条件に応じてneurodestructiveなNO<sup>•</sup>およびneuroprotectiveなNO<sup>+</sup>の2つの状態をとりうる<sup>4)</sup>。高用量のNOS阻害薬はNO<sup>•</sup>産生を、低用量のNOS阻害薬はNO<sup>+</sup>産生を阻害しMETH神経毒性に影響したのかもしれない。

METH高用量集中投与により細胞外glutamate濃度は遅発性に増加する<sup>1)</sup>。

高用量のNOS阻害薬はこの遅発性に増加するglutamateによるNMDA受容体刺激の結果産生されるNOの産生を抑制し、METH神経毒性を減弱させるのかもしれない。

METH高用量集中投与の際のearly phaseの細胞外のbasal levelのglutamateによって産生されるNOはendothelial NOSあるいはneuronal NOSを介してMETHによる細胞活動増加を代償するためのエネルギー補充のために局所脳血流を増加させる<sup>3)</sup>のかもしれない。少量のNOS阻害薬はこれらのendothelial NOSあるいはneuronal NOSの機能を阻害することでMETH神経毒性への生体の保護作用を破綻させることで神経毒性を強めているのかもしれない。

#### E. 結論

少量の非選択的neuronal NOSあるいは選択的neuronal NOS阻害薬がMETHのdopamine神経毒性を増強させた。NOはMETH神経毒性において、条件に応じてneuroprotectiveに働きうることを示唆された。

#### [参考文献]

1) Abekawa T., Ohmori T. and Koyama T.: Effects of repeated administration of a high dose of methamphetamine on dopamine and glutamate release in rat striatum and nucleus accumbens. *Brain Res.* 643: 276-281, 1994.

2) Abekawa T., Ohmori T. and Koyama T.: Effects of nitric oxide synthesis inhibition on methamphetamine-induced dopaminergic and serotonergic neurotoxicity in the rat brain. *J. Neural. Transm.* 103: 671-681, 1996.

3) Kamii H., Mikawa S., Murkakami K. et al.: Effects of nitric oxide synthase