

inhibition on brain infarction in SOD-1-transgenic mice following transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow & Metab.* 16: 1153-1157, 1996.

4) Lipton S.A., Choi Y.B., Pan Z.H. et al.: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632, 1993.

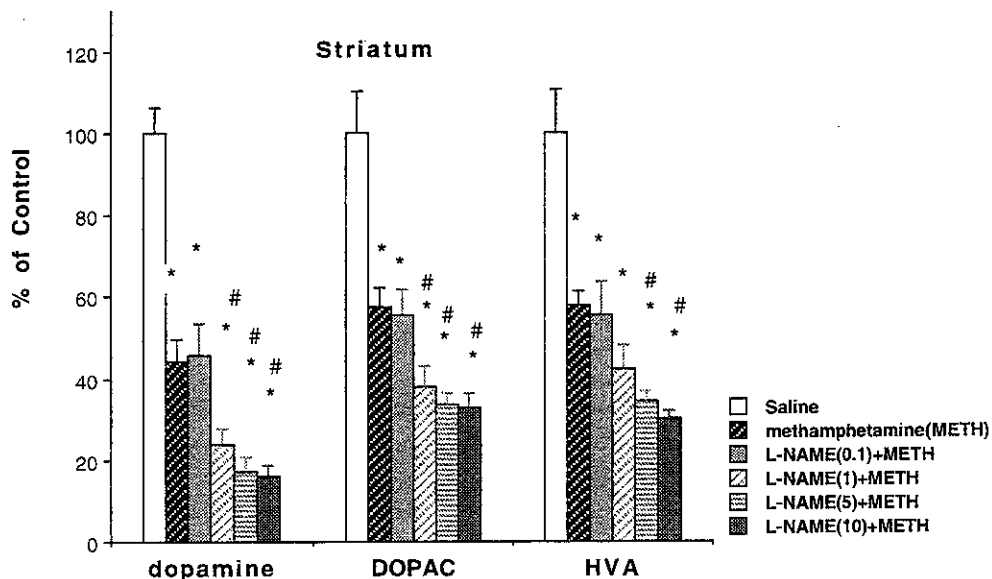


Fig. 1. Effects of L-NAME on contents of dopamine, DOPAC and HVA in the striatum. Rats received four subcutaneous injections of METH(5 mg/kg, s.c., x 4) or saline at 2 h intervals. L-NAME(0.1, 1, 5 and 10 mg/kg, i.p., x1) was administered 1h prior to the first METH injection. Saline group(n=7); METH group(n=7); L-NAME(0.1 mg/kg)+METH group(n=7); L-NAME(1 mg/kg)+METH group(n=7); L-NAME(5 mg/kg)+METH group(n=6); L-NAME(10 mg/kg)+METH group(n=6). The results are expressed in percentage of Saline control values and represent the mean±S.E.M.. \* : P<0.05 vs Saline group, # : P<0.05 L-NAME+METH group vs METH group ( post hoc Duncan new multiple range test ). Contents of dopamine and its metabolites in the striatum of Saline control are as follows. dopamine:536.69±27.23, DOPAC:53.88±5.44, HVA:52.58±5.44. Each value represents the mean±S.E.M. expressed as pmol/mg protein.

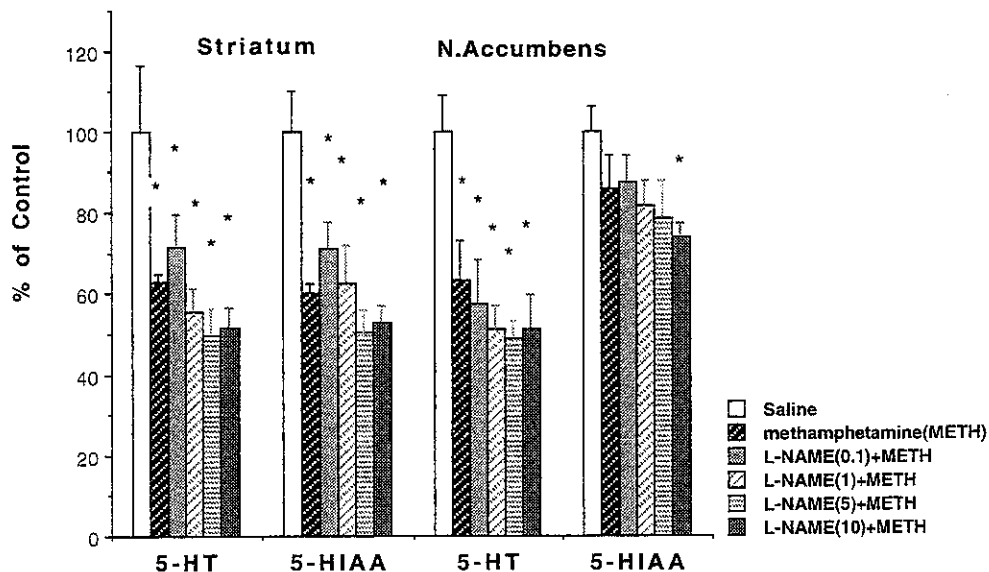


Fig. 2. Effects of L-NAME on contents of 5-HT and 5-HIAA in the striatum and n. accumbens. Rats received four subcutaneous injections of METH(5 mg/kg, s.c., x 4) or saline at 2 h intervals. L-NAME(0.1, 1, 5 and 10 mg/kg, i.p., x1) was administered 1h prior to the first METH injection. Saline group(n=7); METH group(n=7); L-NAME(0.1 mg/kg)+METH group(n=7); L-NAME(1 mg/kg)+METH group(n=7); L-NAME(5 mg/kg)+METH group(n=6); L-NAME(10 mg/kg)+METH group(n=6). The results are expressed in percentage of Saline control values and represent the mean±S.E.M.. \* : P<0.05 vs Saline group ( post hoc Duncan new multiple range test ). Contents of 5-HT and 5-HIAA in the striatum and n. accumbens of Saline control are as follows. 5-HT: 10.19±1.01(striatum);11.66±0.76(n. accumbens), 5-HIAA:12.66±1.29(striatum); 8.65±0.55(n. accumbens). Each value represents the mean±S.E.M. expressed as pmol/mg protein.

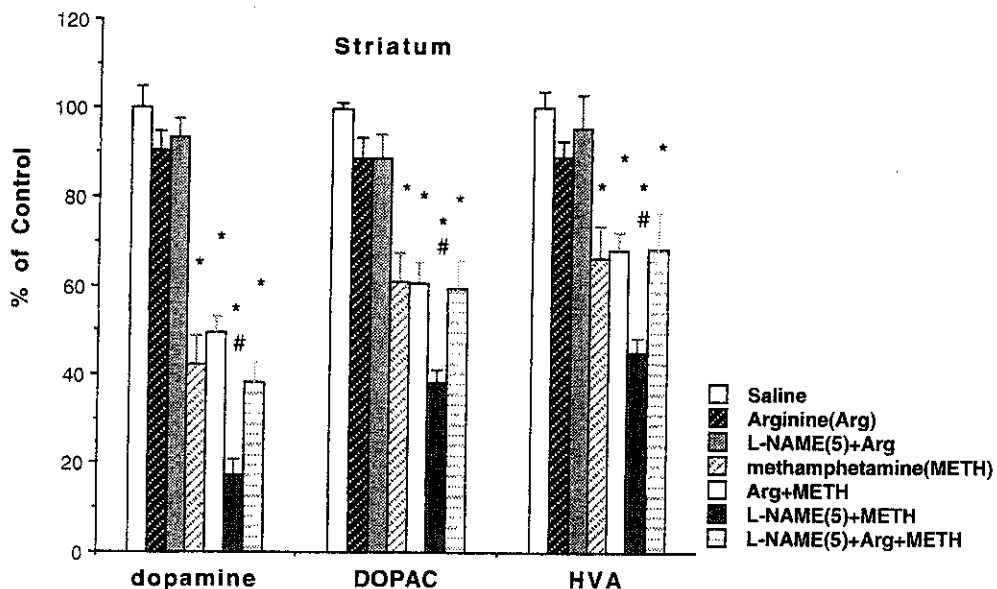


Fig.3 Effects of L-arginine on the L-NAME enhancement of methamphetamine(METH)-induced decreases in contents of dopamine, DOPAC and HVA in the striatum. L-arginine(500 mg/kg, i.p., x 4) was administered immediately before each of the METH injection(5 mg/kg, s.c., x4) to the rats which received L-NAME(5 mg/kg, i.p, x1) and METH. Saline group(n=6); L-arginine group(n=6);L-NAME+L-arginine group(n=6); METH group(n=7); L-arginine+METH group(n=6); L-NAME+METH group(n=7); L-NAME+METH+L-arginine group(n=7). The results are expressed in percentage of Saline control values and represent the mean±S.E.M.. \* : P<0.05 vs Saline group, # : P<0.05 L-NAME+METH+L-arginine group vs L-NAME+METH group( post hoc Duncan new multiple range test ). Contents of dopamine, DOPAC and HVA in the striatum of Saline control group are as follows. dopamine: 581.32±27.75, DOPAC: 63.95±0.91, HVA: 53.06±1.97. Each value represents the mean±S.E.M. expressed as pmol/mg protein.

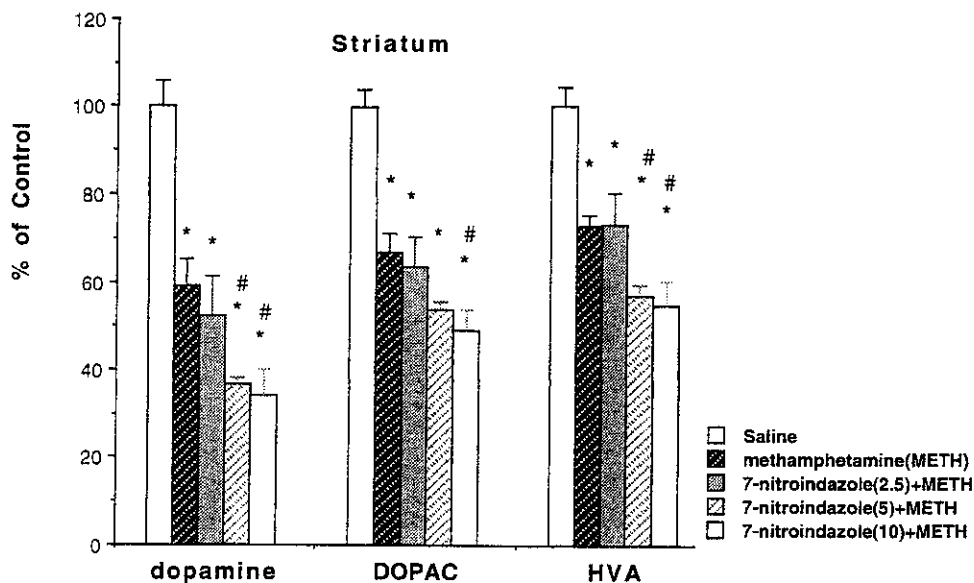


Fig. 4. Effects of 7-nitroindazole on contents of dopamine, DOPAC and HVA in the striatum. Rats received four subcutaneous injections of METH(5 mg/kg, s.c., x 4) or saline at 2 h intervals. 7-nitroindazole(2.5, 5 and 10 mg/kg, i.p., x 2) was administered 30 min prior to and 4 h after the first METH injection. Saline group(n=6); METH group(n=6); 7-nitroindazole(2.5 mg/kg)+METH group(n=6); 7-nitroindazole(5 mg/kg)+METH group(n=6); 7-nitroindazole(10 mg/kg)+METH group(n=6). The results are expressed in percentage of Saline control values and represent the mean±S.E.M.. \* : P<0.05 vs Saline group, # : P<0.05 7-nitroindazole+METH group vs METH group ( post hoc Duncan new multiple range test ). Contents of dopamine, DOPAC and HVA in the striatum of Saline control group are as follows. dopamine:616.66±35.97, DOPAC:80.34±2.98, HVA:61.17±2.755. Each value represents the mean±S.E.M. expressed as pmol/mg protein.

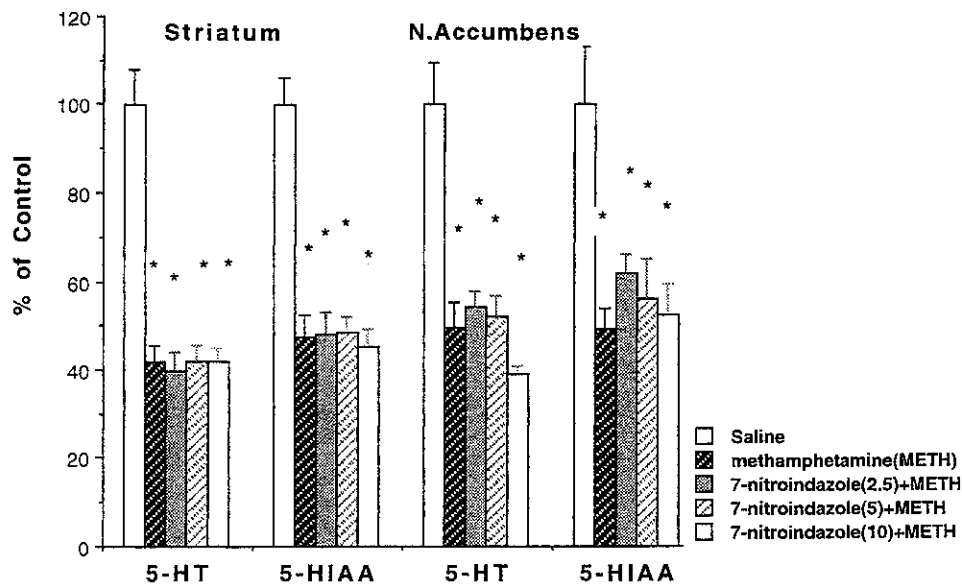


Fig. 5. Effects of 7-nitroindazole on contents of 5-HT and 5-HIAA in the striatum and n.accumbens. Rats received four subcutaneous injections of METH(5 mg/kg, s.c., x 4) or saline at 2 h intervals. 7-nitroindazole(2.5, 5 and 10 mg/kg, i.p., x 2) was administered 30 min prior to and 4 h after the first METH injection. Saline group(n=6); METH group(n=6); 7-nitroindazole(2.5 mg/kg)+METH group(n=6); 7-nitroindazole(5 mg/kg)+METH group(n=6); 7-nitroindazole(10 mg/kg)+METH group(n=6). The results are expressed in percentage of Saline control values and represent the mean±S.E.M.. \* : P<0.05 vs Saline group( post hoc Duncan new multiple range test ). Contents of 5-HT and 5-HIAA in the striatum and n.accumbens of Saline control are as follows. 5-HT: 11.29±0.86(striatum); 15.95±1.45(n.accumbens), 5-HIAA: 14.01±0.83(striatum); 8.37± 1.06(n.accumbens). Each value represents the mean±S.E.M. expressed as pmol/mg protein.

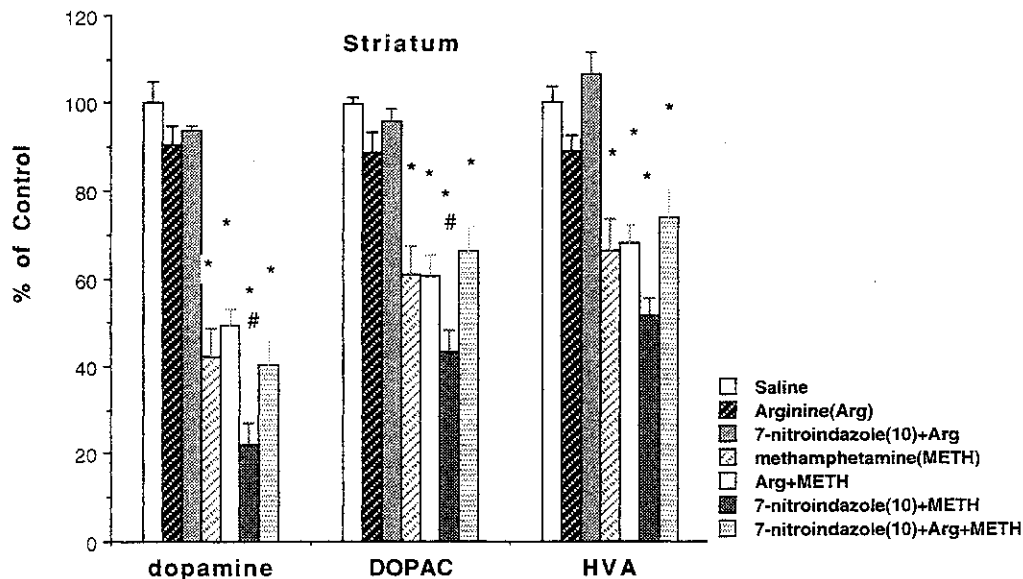


Fig. 6. Effects of L-arginine on the 7-nitroindazole enhancement of methamphetamine (METH)-induced decreases in contents of dopamine, DOPAC and HVA in the striatum. L-arginine(500 mg/kg, i.p., x 4) was administered immediately before each of the METH injection(5 mg/kg, s.c., x 4) to the rats which received 7-nitroindazole(10 mg/kg, i.p., x 2) and METH. Saline group(n=6); L-arginine group(n=6); 7-nitroindazole+L-arginine group(n=6); METH group(n=7); L-arginine+METH group(n=6); 7-nitroindazole+METH group(n=7); 7-nitroindazole +METH+L-arginine group(n=7). The results are expressed in percentage of Saline control values and represent the mean±S.E.M.. \* : P<0.05 vs Saline group, # : P<0.05 7-nitroindazole+METH+L-arginine group vs 7-nitroindazole+METH group( post hoc Duncan new multiple range test ). Contents of dopamine, DOPAC and HVA in the striatum of Saline control group are presented in the legend of Fig 3.

Table 1. The colonic temperature at 1hr and 5 hr after the first METH injection.

	Saline	METH	L-NAME(0.1)+METH	L-NAME(1)+METH	L-NAME(5)+METH
Pre(°C)	37.45±0.18	38.04±0.11	38.30±0.08	38.18±0.17	37.98±0.12
1h (°C)	38.28±0.11a	39.82±0.11ac	39.76±0.11ac	39.56±0.07ac	39.34±0.15ac
5h (°C)	37.93±0.08a	39.18±0.09ac	39.44±0.22ac	39.38±0.22ac	39.64±0.17ac
	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6
	Saline	METH	7-nitroindazole(2.5)+METH	7-nitroindazole(5)+METH	7-nitroindazole(10)+METH
Pre(°C)	37.45±0.065	37.73±0.11	37.43±0.03	37.64±0.15	37.41±0.09
1h (°C)	38.23±0.2a	39.18±0.13ac	38.95±0.09ac	39.26±0.1ac	39.32±0.08ac
5h (°C)	37.73±0.06	39.83±0.19abc	39.30±0.43ac	40.00±0.15abc	39.64±0.17abc
	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6

Saline group(n=6); METH(5 mg/kg, s.c., x4) group(n=6); L-NAME(0.1, 1 and 5 mg/kg, i.p., x 1)+METH group(n=6, respectively); 7-nitroindazole(2.5, 5 and 10 mg/kg, i.p., x2)+METH group(n=6, respectively). The results represent the mean±S.E.M.(°C). a:P<0.05 vs Pre temperature(°C) of of each group, b:P<0.05 vs 1 h temperature(°C), c : P<0.05 vs Saline group(°C).

## 覚醒剤と海馬：行動感作獲得における海馬の役割と海馬に対する神経毒性効果に関する研究

分担研究者；丹羽 真一 福島県立医科大学医学部・神経精神医学教室

研究協力者；小野正美、宍戸恭子、渡部芳徳、宍戸壽明、竹内賢、加藤光三、小林正憲、鈴木善明、松木智彦、星野研洋  
福島県立医科大学医学部・神経精神医学教室

### [研究要旨]：

齧歯類に覚醒剤を反復投与した場合、当初異常行動を発現しなかった用量でも異常行動の発現が認められるようになり、これを行動感作、または逆耐性とよび、覚醒剤精神病や精神分裂病の動物モデルとして有用である。覚醒剤による移所運動量や常同行動の急性変化は側坐核や線条体のdopamine(DA)放出の増加を伴うため、当初、行動感作にはDA系の変化のみが関連していると考えられていたが、現在ではグルタミン酸系やGABA系等の変化も重要視されるようになり、行動感作獲得に関与するDA系やグルタミン酸系、GABA系等を含む神経回路網の存在が推測されている。この神経回路網を明らかにするために各脳部位の破壊実験が行われているが、統一された見解には至っておらず、また、海馬体の破壊実験の報告はこれまでにない。我々は、側坐核や前頭皮質などと密な連絡を持ち、グルタミン酸受容体の豊富な腹側海馬に注目した。はじめの実験として、我々は、腹側海馬をイボテン酸で傷害したラットを用い、覚醒剤(methamphetamine, MAP)に対する行動感作獲得の過程を観察した。その結果、腹側海馬傷害が行動感作獲得を抑制することが明らかとなった。

次の実験として、我々は、高用量MAPの海馬に対する神経毒性効果について検討した。高用量amphetamine類(AMP)を幼若期の齧歯類に投与すると海馬体積が減少することが知られている。しかし、成熟期にAMPを投与し海馬体積を計測した報告はこれまでにない。そこで我々は、成熟マウスに高用量MAPを反復投与し、画像解析装置を用いて海馬歯状回(背側海馬・中側海馬・腹側海馬それぞれの分子層・顆粒層・門、計9部位)の体積を計測した。その結果、腹側海馬の分子層のみに有意な体積減少を認めた。以上の結果より、成熟マウスにおいても高用量MAP反復投与によって海馬体積の減少が生じること、この体積減少には部位特異性があることが明らかとなった。

### A. 目的

昨年度我々は、事象関連電位(P3様電位)を指標として、慢性覚醒剤投与により認知過程が障害される可能性を示し<sup>14)</sup>、methamphetamine (MAP)投与とphencyclidine (PCP)投与時の行動変化および側坐核におけるdopamine(DA)系の変化を検討することで、その行動変化にはDA系のみではなくグルタミン酸系が何らかの係わりあいを持つということを示唆した<sup>8)</sup>。行動感作は、ラットにMAPを慢性的に投与した際、移所運動量や常同行動の増大として観察されるようになる。覚醒剤による移所運動量や常同行動の急性変化は側坐核や線条体のDA放出の増加によるため、当初、行動感作にはDA系の変化のみが関連していると考えられていたが、現在ではグルタミン酸系やGABA系等の変化も重要視されるようになり、行動感作獲得に関与するDA系やグルタミン酸系、GABA系等を含む神経回路網の存在が推測されている<sup>2)7)11)</sup>。

この神経回路網を明らかにするために各脳部位の破壊実験が行われており、これまでに前頭葉や扁桃核の破壊、海馬から側坐核への投射神経路を破壊することで行動感作獲得が抑制されたとの報告がある

<sup>18)20)</sup>。しかし一方で、海馬から側坐核への投射神経路を破壊しても行動感作獲得には影響がなかったとの報告もあり<sup>6)</sup>、統一された見解には至っていない。他にも、行動感作獲得の過程には「条件刺激-強化刺激-学習反応獲得」という学習記憶系の関与も示唆されており<sup>12)17)</sup>(MAP効果条件反応)、海馬が何らかの役割を果たしている可能性が高いが、これまで慢性覚醒剤投与による行動感作獲得に関する海馬自身の役割については十分な検討がなされていない。学習記憶系には海馬が重要な役割を果たしていること、海馬から側坐核へグルタミン酸系の投射があること等から、我々は海馬に注目し、側坐核や前頭皮質などとの連絡が密である腹側海馬の傷害が行動感作獲得に及ぼす影響について検討した(実験1)。

次に我々は、高用量MAPの海馬に対する神経毒性効果について検討した。齧歯類に高用量AMPの単回投与、あるいは、持続投与を行うと、DA含有量の減少<sup>5)</sup>、glial fibrillary acidic protein(GFAP)の増加<sup>9)</sup>神経線維の変性<sup>13)</sup>、形態学的変化<sup>16)</sup>、自傷行為<sup>15)</sup>、致死率の増加<sup>4)5)10)</sup>などが生じることが知られている。これらの生化学的・組織学的研究は、主に前脳(前頭葉皮質や

線条体など)について検討されている。一方、AMPによる形態学的変化は幼若期に障害されやすい海馬体(特に歯状回<sup>1)</sup>16)に焦点が当てられている。しかし、我々の知る限り、成熟期にAMPを投与し海馬体積を計測した報告はこれまでにない。そこで我々は、高用量MAPの反復投与が成熟マウスの歯状回体積に及ぼす効果について画像解析装置を用いて検討した(実験2)。

## 実験 1

### B.方法

#### 1.実験動物と傷害

生後 49 日目の Sprague-Dawley 系雄性ラット(日本 SLC)を無作為に傷害群と対照群に振り分け、Paxinos&Watson のアトラスに従って、傷害群にはイボテン酸(6  $\mu$ g/ $\mu$ l)を腹側海馬に注入して傷害し、対照群には人工脳脊髄液を同量同部位に注入した。

#### 2.覚醒剤投与と行動測定

傷害1週間後(生後 56 日目)から3日4日おきに methamphetamine (MAP, 1.5mg/kg)を計5回腹腔内投与し、その際 440mm $\times$ 430mm のアクリルケース内にラットを入れ、赤外線式行動量測定装置(OPTOVARIMEX, COLUMBUS)を用いて各々の移所運動量を 90 分間測定した。

#### 3.行動感作

最終投与(5回目)から1週間後に MAP(1.5mg/kg)を再投与して、その際の移所運動量を同様に測定した。行動観察後、脳を還流固定し海馬が傷害されていたもののみ、Data として採用した。

#### 4.統計

行動感作獲得については、傷害群・対照群それぞれの群について、MAP の投与回数(初回から 5 回目)を反復要因とした one-way analysis of variance (ANOVA)を用いて検討した。また、行動感作発現については、両群における MAP 初回投与と休薬期間における再投与時の行動量を従属変数とし、状態(傷害群、対照群)、MAP 投与(初回、再投与時)を要因とした two-way ANOVA を用いて検討し、各々 Tukey の post-hoc 法にて検定した。P<0.05 を有意とした。

## C.結果

### 1.組織学的検討

生後 49 日目に海馬を傷害したラットでは両側に腹側海馬の萎縮、錐体細胞の消失を認め、

空洞を形成しているものもあった。

## 2.行動測定

行動感作獲得において、傷害群・対照群のそれぞれ群について、one-way ANOVA を用いて検定したところ、対照群では、MAP の反復投与の影響が有意であり[F(4,20)=4.603,p=0.038](図1)、傷害群では、MAP の反復投与の影響は有意ではなかった[F(4,20)=1.937,p=0.194](図2)。両群における MAP 初回投与時と再投与時の行動量についての ANOVA の結果は、MAP 投与の影響は有意であり[F(1,10)=9.334,p=0.012]、状態の影響[F(1,10)=3.065,p=0.111]と、MAP 投与と状態の交互作用[F(1,10)=1.812,p=0.208]は有意ではなかった。また、Tukey の検定では、対照群において再投与時の行動量は初回投与時と比較して有意に増加しており(p<0.05)、傷害群では、有意な変化は見られなかった(図3)。

## D.考察

対照群では MAP 反復投与の影響が有意であることから、行動感作を獲得していると考えられ、傷害群では行動感作獲得が抑制されていると考えられた。また、対照群では MAP 再投与時の行動量が初回投与時と比較して有意に増加しており、傷害群では有意な差を認めないことから、腹側海馬傷害が行動感作獲得と発現を抑制していると考えられた。このことから、行動感作獲得と発現における神経回路には腹側海馬が関与しており、腹側海馬には NMDA 受容体が豊富であることから、生化学的機能系としてはグルタミン酸系が関与している可能性が示された。

## 実験 2

### B.方法

成熟 BALB/C マウス(雄性, 23-26g)に連続5日間 methamphetamine (MAP, n=8, 30mg/kg/day, IP)または、同量の生理的食塩水 (SAL, n=6)を投与した。MAP 群 8 匹のうち 3 匹が MAP 投与2日以内に死亡したため、残り 5 匹につき海馬体積の計測を行った。最終投与7日後に脳を灌流固定し、厚さ 20  $\mu$ m の連続切片を作成し cresylviolet 染色により海馬構造を同定した。なお、本研究は福島県立医科大学動物実験倫理委員会の承認を得ている。

海馬体積の測定は渡部らの方法<sup>19)</sup>に準じた。大脳皮質表面 2800  $\mu$ m から腹側 4600  $\mu$ m にかけて、二枚おきの切片を選び、合計 30 枚の切片で画像解析を行った。背側海馬部 (DOR)は 2800  $\mu$ m - 3400

$\mu\text{m}$  (10 切片)、中側海馬部 (MID) は  $3400\ \mu\text{m}$ – $4000\ \mu\text{m}$  (10 切片)、腹側海馬部 (VEN) は  $4000\ \mu\text{m}$ – $4600\ \mu\text{m}$  (10 切片) とした (Fig. 4A)。海馬歯状回内の分子層 (ML)、顆粒層 (GL)、門 (H) の面積をそれぞれの切片で計測した ( $A$  in  $\mu\text{m}^2$ , Fig. 4B)。以下の9部位の体積を計測した: DOR-ML, GL and H; MID-ML, GL and H; VEN-ML, GL and H。計算式には以下を用いた: ( $\mu\text{m}^3$ ) =  $(A_1 + A_2 + \dots + A_{10}) \times 20\ \mu\text{m} \times 3$ 。

体重変化の統計には Student's t-test を、体積変化の統計には one-way ANOVA followed by Scheffe's F-test を用いた。

### C. 結果

MAP 投与によりマウスの体重は有意に減少した (Fig. 5,  $p < 0.05$ )。

海馬歯状回での体積測定の結果、腹側海馬部 (VEN) の分子層 (ML) において有意な体積減少が認められた (Fig. 6,  $p < 0.001$ )。一方、背側海馬部 (DOR) と中側海馬部 (MID) の分子層 (ML) に MAP 投与による体積変化は認められなかった (Fig. 6)。同様に、背側海馬部 (DOR)・中側海馬部 (MID)・腹側海馬部 (VEN) の顆粒層 (GL) と門 (H) に MAP 投与による体積変化は認められなかった (data not shown)。

### D. 考察

本研究における主要な知見は、高用量 MAP が成熟期マウスの海馬体積を減少させたことである。さらに、我々は、この体積減少が部位特異的 (歯状回内9部位のうち腹側海馬部の分子層のみ) であることを見出した。Tavares と Silva<sup>16)</sup> は幼若期ラットに高用量 AMP を投与すると海馬体積が減少すると報告しているが、彼らは生後1日から30日まで AMP を連日投与し (25 mg/kg/day, s.c.)、投与最終日に脳を灌流固定している。本研究は、我々の知る限り、高用量 MAP が成熟期齧歯類の海馬体積を持続的に (我々は MAP 最終投与7日目に脳の灌流固定をしている) 減少させたことを示した報告としては初めてのものである。AMP 投与が食餌習慣を変えることから、我々は体重減少による海馬体積への影響を排除するために、体重減少が回復するのを確認した後に灌流固定を行った。また、体積減少が部位特異的であったことから、体重減少による海馬体積減少の可能性は否定的であると考えられる。

海馬歯状回分子層は比較的細胞体が少なく顆粒細胞の樹状突起でしめられている。また、dopamine 神経線維の一部は中脳から始まり海馬に投射して

おり、背側海馬や中側海馬よりも腹側海馬に多く分布している<sup>3)</sup>。MAP の神経毒性は神経終末を障害すると考えられ<sup>13)</sup>、MAP 投与による体積変化の程度は、dopamine 神経線維の解剖学的な分布と一致している。これらの事実から、腹側海馬分子層の体積減少は dopamine 神経線維の変性、あるいは、顆粒細胞の樹状突起の減少によるものと推察される。しかしながら、MAP による海馬体積の減少は、細胞数の変化によるものか樹状突起やシナプスの数の変化によるものかは不明であるため、今後、組織学的な検討がさらに必要であろう。

### E. 結論

腹側海馬傷害は、行動感作獲得と発現を抑制することが確認された。また、高用量 MAP 反復投与は、成熟期マウスの腹側海馬分子層体積を持続的・特異的に減少させた。この体積減少は、dopamine 神経線維の変性、あるいは、顆粒細胞の樹状突起の減少によるものと推察された。



Fig.1 Effects of repeated MAP injection in sham rats.

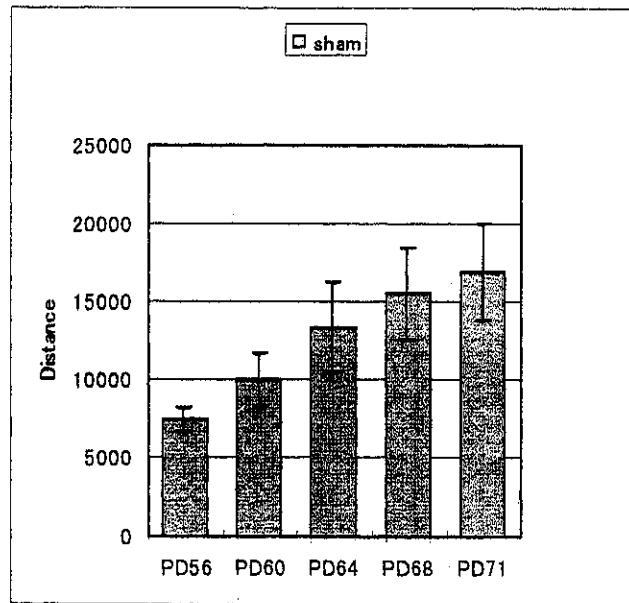


Fig.2 Effects of repeated MAP injection in lesion rats.

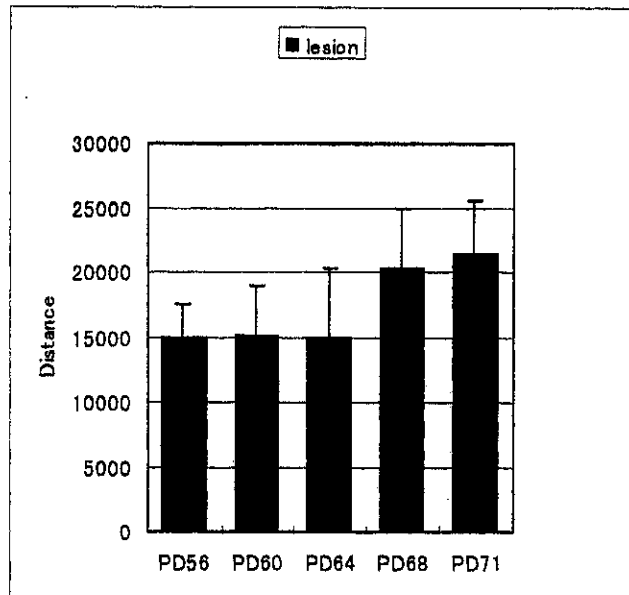


Fig.3 Expression of hippocampal lesions on MAP sensitization.

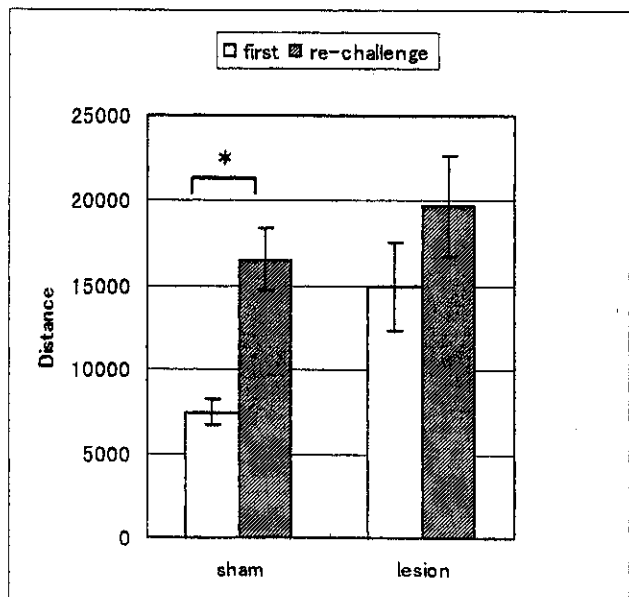


Fig.4

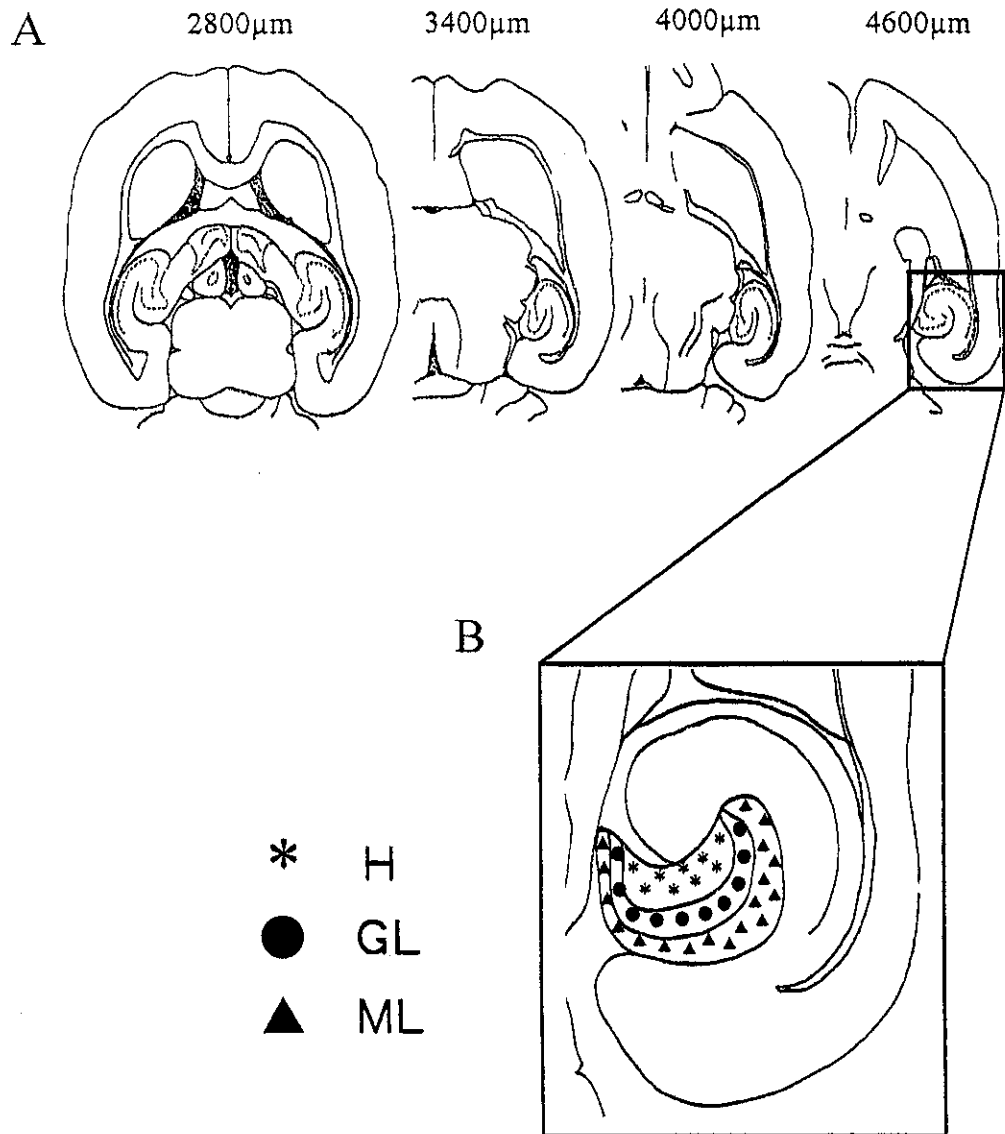


Fig.5

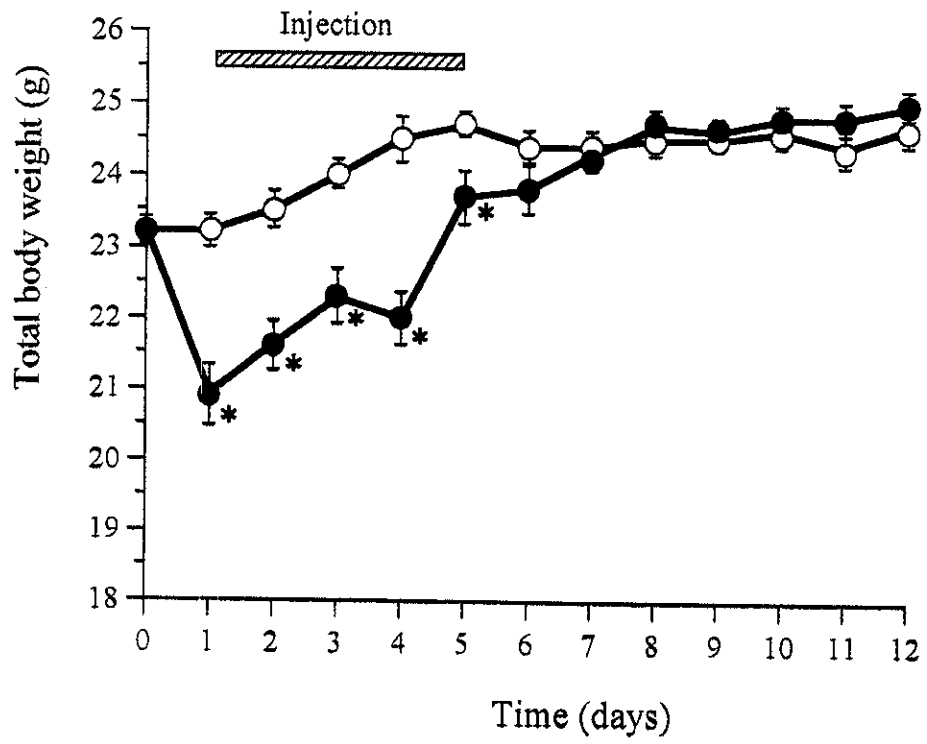
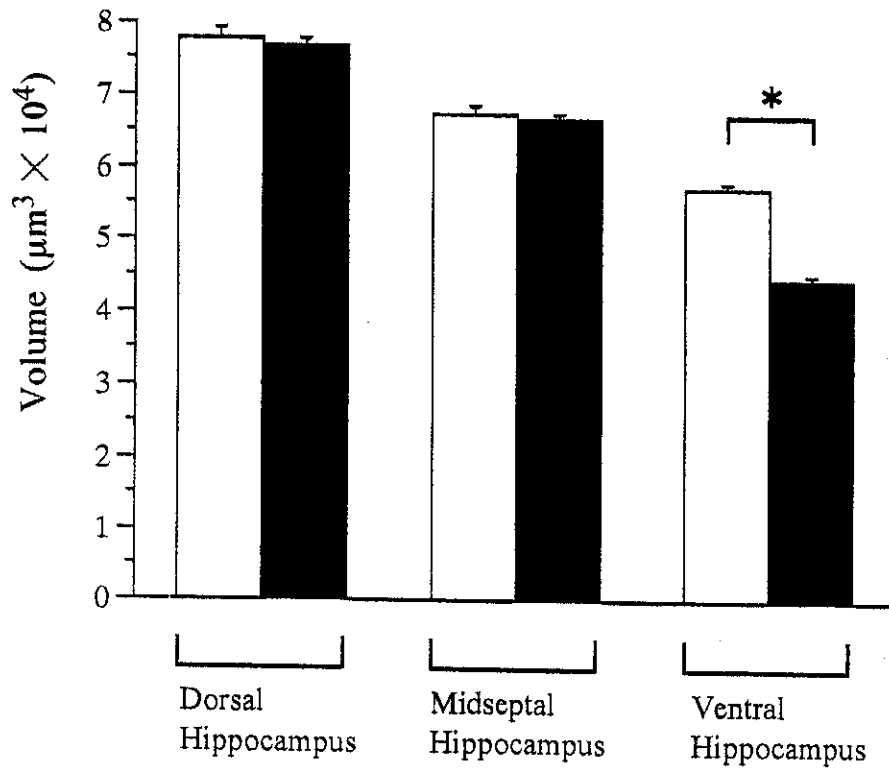


Fig.6



## 文献

- 1) Bedi KS. Effects of undernutrition during early life on granule cell numbers in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 311, 425-433 (1991).
- 2) Chang-Jiang X, Jeffrey P, Marina W et al. Acute and Repeated Systemic Amphetamine Administration: Effects on Extracellular Glutamate, Aspartate, and Serine Levels in Rat Ventral Tegmental Area and Nucleus Accumbens. *J. Neurochem.* 67, 352-363 (1996).
- 3) Goldsmith SK and Joyce JN. Dopamine D2 receptor expression in hippocampus and parahippocampal cortex of rat, cat and human in relation to tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibers. *Hippocampus* 4, 354-373 (1994).
- 4) Gomita Y, Kataoka Y, Ichimaru Y et al. Methamphetamine mortality to emotional stimuli administered in the form of affective communication. *Life Sci* 32, 941-947 (1983).
- 5) Jonsson G and Nwanze E. Selective (+)-amphetamine neurotoxicity on striatal dopamine nerve terminals in the mouse. *Br J Pharmacol* 77, 335-345 (1982).
- 6) Kaitlin EB, Aldo B and Terry ER. Fimbria-Fornix Lesions Do Not Block Sensitization to the Psychomotor Activating Effects of Amphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53, 899-902 (1996).
- 7) Karler R, Calder LD, Chaudhry IA et al. Blockade of reverse tolerance to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci.* 45, 599-606 (1989).
- 8) 加藤光三、小野正美、丹羽真一ら：幼若期腹側海馬傷害ラットの成熟後の phencyclidine 反応性と側坐核における dopamine およびその代謝産物の変化。精神薬療基金研究年報第 31 集：23-29
- 9) Miller DB and O'Callaghan JP. Environment-, drug- and stress-induced alterations in body temperature affect the neurotoxicity of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 270, 752-760 (1994).
- 10) O'Callaghan JP and Miller DB. Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 270, 741-751 (1994).
- 11) Ohmori T, Abekawa T and Koyama T. Scopolamine prevents the development of sensitization to methamphetamine. *Life Sci.* 56, 1223-1229 (1995).
- 12) Post RM, Lockfeld A, Squillace KM et al. Drug-environment interaction: Context dependency of cocaine-induced behavioral sensitization. *Life Sci.* 28, 755-760 (1981).
- 13) Ricaurte GA, Seiden LS, Schuster CR. Further evidence that amphetamines produce long-lasting dopamine neurochemical deficits by destroying dopamine nerve fibers. *Brain Res* 303, 359-364 (1984).
- 14) Satoshi Takeuchi, Eiichi Jodo, Yoshiaki, Yukihiro Kayama et al. Effects of repeated administration of methamphetamine on P3-like potentials in rats. *International Journal of Psychophysiology* 32, 183-192 (1999).
- 15) Shishido T, Watanabe Y, Kato K et al. Effects of dopamine, NMDA, opiate and serotonin-related agents on acute methamphetamine-induced self-injurious behavior in mice. *Pharmacol Biochem Behav* (in press).
- 16) Tavares MA and Silva MC. Body weight and hippocampal volumes of rats exposed neonatally to psychostimulants. *Brain Res* 619, 137-145 (1993).
- 17) Tilson HA and Rech RH. Conditioned drug effects and absence of tolerance to d-amphetamine induced motor activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1, 149-153 (1973).
- 18) Yoshikawa T, Shibuya H, Toru M et al. Blockade of Behavioral sensitization to methamphetamine by lesion of hippocampo-accumbal pathway. *Life Sci.* 48, 1325-1332 (1991).

19) Watanabe Y, Johnson RS, Butler LS et al. Null mutation of c-fos impairs structural and functional plasticities in the kindling model of epilepsy. *J Neurosci* 16, 3827-3836 (1996).

20) Wolf M, Dahlin S, White K et al.. Effects of lesions of prefrontal cortex, amygdala, or fornix on behavioral sensitization to amphetamine: comparison with N-methyl-D-aspartate antagonists. *Neurosci.* 69, 417-439 (1995).

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）  
分担研究報告書

乱用薬物対策等に関する研究

分担研究課題：乱用薬物による脳機能障害の分子機構の解明

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

研究要旨

RAP-PCR (RNA arbitrarily primed PCR) 法および定量的RT-PCR法を用い、ラット大脳新皮質からmethamphetamine (MAP) またはphencyclidine (PCP) 急性投与1時間後において、生後8日には生理的食塩水を投与した対照群と差がないが生後50日には有意な発現誘導が見られる転写産物、mrt (MAP responsive transcript) -1、mrt-2、mrt-3、ならびにprt (PCP responsive transcript) -1を検出した。mrt-1は、1)amphetamine類やコカインによる分裂病類似の精神病状態のモデルである行動感作（逆耐性現象）が形成され始める生後3週頃からMAPによって発現誘導され、2)成熟期ではコカインにも応答し、3)MAPによる発現誘導は行動感作形成を阻害するSCH23390によって阻害される、4)MAP反復投与後に基礎的発現量が長期間増加し、この変化もSCH23390によって消失する、等の性質をもつことから、行動感作の形成および持続の分子機構に関与することが示唆される。prt-1は、1)PCPと同様に分裂病の陰性症状様の異常を引き起こすNMDA受容体遮断薬のdizocilpineによっても発現が誘導されるが、2)分裂病様の陽性症状を惹起するMAPおよびコカインやSCH23390、ペントバルビタール等の投与後には有意な変化を示さなかったことから、NMDA受容体拮抗作用をもつ薬物の乱用によって生ずる陰性症状様の異常に関係する可能性がある。

A. 研究目的

本研究は、アンフェタミン類 (amphetamine、methamphetamine (MAP) など)、コカイン、フェンサイクリジン (phencyclidine (PCP)) などの、精神分裂病 (分裂病) 様症状を引き起こす乱用薬物による長期的脳機能変化の発生機序を分子レベルで解明し、新しい治療法の

標的となる神経機構や、臨床診断と経過のマーカー物質を見いだすことを目的としている。このため、1)臨床経験的に、amphetamine類や、PCPと同様の異常を発現させるケタミンが、小児期までは依存形成や精神症状を生じさせ難いことが知られている<sup>7)</sup>、2)実験動物においては、これらの薬物による異常行動や脳の活動異

常のパターンが生後発達に伴って変化し、一定の時期以降に成熟期のパターンになる<sup>1,6,8</sup>、などの点に着目して分子生物学的研究を進めた。これらの事実は、分裂病様症状を発現させる乱用薬物によって異常となる脳内情報処理分子系は、特定の発達段階以降に成熟して薬物の影響を受けるようになることを示唆している。そこで、これらの分子群を明らかにする目的で、乱用薬物が誘発する行動や脳の活動性の異常が成熟期型のパターンを示す時期より、MAPまたはPCPに対して応答性を獲得する遺伝子群を検索した。

## B. 研究方法

### (1)対象および薬物

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

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

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

#### a)RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) によるRNA fingerprinting<sup>11)</sup>

生後8日齢および50日齢の動物にMAP、PCPまたは生理食塩水を投与後1時間で断頭し、大脳新皮質よりtotal RNAを抽出した。random hexamer によって合成したcDNAをテンプレートとし、12merからなるプライマーを用いてarbitrarily primed

PCRを行った。増幅産物を変性ポリアクリルアミドゲルにて分離し、Syber Green Iで染色後、蛍光イメージアナライザー (FMBIO II、TAKARA) で解析してfingerprintを得た。Fingerprint上で50日齢特異的に発現誘導が変化するcDNAバンドをクローニングし塩基配列を決定した。さらに、RAP-PCRクローンに基づいてoligo dT-primed cDNAをクローニングし、対応する遺伝子の構造を解析した。

#### b)定量的RT-PCR

Fingerprintによる結果を確認するため、5~7個体のRNAサンプルのプールからrandom hexamerを用いて合成したcDNAの希釈系列を用いてRT-PCRを行い、exponentialな増幅条件下で対照群と薬物投与群の相対的な発現量を比較した。このため、種々の薬物処置によってほとんど変動がないと考えられる28S ribosomal RNAを同一チューブ内で同時に増幅し、目的とする遺伝子転写産物の発現量を28S ribosomal RNAの発現量で補正した。すなわち、3'末端をリン酸化処理した特殊なオリゴマーを一定の比率で加えることによって28sの増幅のカイネティックスを調整し、できるだけ広い範囲のサイクル数で目的とする転写産物と同じ条件で定量性が得られるように工夫した。また、各個体のサンプルにおける絶対的な発現量を検討する実験では、各個体の一定量のRNAからcDNAを合成し、既知濃度のポイントミューテーションを導入したcDNA断片をcompetitorとしてcompetitive RT-PCR<sup>9)</sup>を行った。増幅産物を制限酵素処理した後にアガロースゲル電気泳動し、Syber Green Iまたはethidium bromideで染色

した。DNAの定量解析は染色したゲルをCCDカメラで撮影した後、densitographにて行った。

### C. 研究結果

#### (1)MAPによる発現誘導が発達依存的に変化する転写産物*mrt-1*の検討

MAP (4.8 mg/kg, s.c.) 急性投与1時間後のラットの大脳新皮質から、生後8日には生理的食塩水を投与した対照群と差がないが生後50日には有意な発現誘導が見られる転写産物群、*mrt* (MAP responsive transcript) -1, *mrt-2*, *mrt-3*が検出され、このうち*mrt-1*に関する解析を進めた。昨年度までに、1)splicing acceptor siteの選択により2種類のコーディングフレームが存在すること、2)*mrt-1*βイソフォーム (beta isoform) は、amphetamine類やコカインによる分裂病類似の精神病状態のモデルである行動感作 (逆耐性現象) が形成され始める生後3週頃からMAPに対し著明な反応を示し、成熟期においてコカインにも反応すること、等を明らかにしてきた。また、浸透圧ミニポンプにより*mrt-1*特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを脳室内に持続注入した成熟ラットでは、MAPを反復投与しても逆耐性現象が成立しないことがわかった。さらに、*mrt-1*の発現と逆耐性現象の関係をさらに調べる目的で、MAPと併用投与すると逆耐性の成立を阻害するドーパミンD1受容体遮断薬SCH23390<sup>10)</sup>の影響を検討した。

MAP単回投与群の大脳新皮質で認められる*mrt-1*βの発現量増加は、SCH23390前処置によって抑制された。ここで、

MAPによる発現量の増加率は、昨年度までに報告したcompetitive RT-PCR法で得られた結果と良く一致しており、今回用いた定量法の妥当性が確認された。SCH23390の単独投与群では、*mrt-1*βの発現量に有意な変化は認められなかった。MAPの5日間反復投与群では、2週間後にMAPを投与していない状態でも大脳新皮質*mrt-1*β発現量の有意な上昇が認められた。この現象は、毎回のMAP反復投与時にSCH23390の前処置を行うことによって見られなくなった。SCH23390を反復投与したラット大脳新皮質の*mrt-1*β発現量は、やや増加傾向を示したが統計学的有意差はなかった。

#### (2)PCPによる発現誘導が発達依存的に変化する転写産物*prt-1*の検討

##### 1)単離および構造解析

Fingerprint上で生後8日齢および50日齢の大脳新皮質における発現パターンをPCP (5mg/kg, s.c.) 投与群と生理食塩水投与群で比較し、50日齢の動物においてPCPにより発現が誘導される転写産物を単離し、塩基配列を解析した。503塩基のバンドとして単離された遺伝子を*prt-1* (phencyclidine-responsive transcript 1) と名づけた。得られた部分配列から、cDNAの全長の塩基配列を解析したところ、約2.7kbのコード領域をもつものであることが明らかとなった。さらに、fingerprint上から単離されたクローンに対して99塩基のinsertionを持つmRNAの存在が示されたことから、*prt-1*にはalternative splicingによる2種類のmRNAがあり、fingerprint上から単離されたshort formのほ



かに、long formが存在することが明らかとなった。そこで、今回得られたshort formだけでなく、long formについてもその発現量を定量し、比較検討を行うこととした。

#### 2)PCP投与時におけるprt-1遺伝子発現の定量解析

prt-1 mRNAは、long formおよびshort formともに、8日齢の動物ではPCP投与群および生理食塩水投与群の間で差は見られなかった。50日齢では、long form、short formともに、PCP投与群においてprt-1 mRNA発現量が生理食塩水を投与した対照群の約130%に増加した。

#### 3)発達段階におけるprt-1の基礎的発現の変化

生後発達にともなう基礎的な発現量の変化はlong form、short formの間で大きく異なっていた。生後8日齢においては双方とも発現量が低かったが、long formが15日齢までの間にわずかに増加した後ほとんど変化しないのに対して、short formは23日齢までの間に大きく増加し、その後も発達段階に従って緩やかな増加を続けることがわかった。

#### 4. prt-1発現の薬理的解析

生後50日齢ラットの脳新皮質において、prt-1の発現は、SCH23390(0.5mg/kg, i.p.)、ドーパミン作動薬であるMAP(4.8 mg/kg, s.c.)およびコカイン(30mg/kg, i.p.)、GABA-A受容体を賦活するpentobarbital<sup>5)</sup>(50mg/kg, i.p.)等の投与では有意な変化を示さなかったが、PCPと同様にNMDA(N-methyl-D-aspartate)型グルタミン酸受容体遮断作用をもつ

dizocilpine<sup>3)</sup>(0.5~1.0mg/kg, s.c.)の投与後に有意に増加した。

#### D. 考察

##### (1)MAPによる発現誘導が発達依存的に変化する転写産物mrt-1の検討

今年度の結果から、D1受容体遮断薬SCH23390の処置により、MAPの急性投与がラット大脳新皮質においてmrt-1 $\beta$ の発現を増加させる作用を阻害することがわかった。一方、MAP反復投与後持続する大脳新皮質のmrt-1 $\beta$ 発現量の上昇は、MAPとSCH23390の併用反復投与を行った動物では認められなくなった。

これらの所見は、MAP急性投与時のmrt-1 $\beta$ の発現誘導には、少なくともD1受容体の刺激が関与していることを示唆している。また、MAPを5日間反復投与し2週間後にMAPを再投与していない条件下でもmrt-1 $\beta$ の発現量が増加している現象にも、D1受容体の繰り返し刺激が関係することが推測される。MAP反復投与による逆耐性現象の成立は、各反復投与時にD1受容体遮断薬を前処置すると阻害されることから、今回の実験結果は、mrt-1 $\beta$ が中枢刺激薬の引き起こす逆耐性現象の形成や維持に必要なシグナルカスケードを構成する分子またはそれと相互作用をもつ分子のひとつである可能性をさらに支持している。

##### (2)PCPによる発現誘導が発達依存的に変化する転写産物prt-1の検討

本研究において、発達段階に依存してPCPに対する応答性を獲得する遺伝子の

一つとして *pvt-1* を単離した。 *pvt-1* には少なくとも2種類の *splicing variant* (long form, short form) が存在し、それらの発現量の定量的解析を行ったところ、検討した薬物に対する反応性は類似していたが、生後発達にともなう基礎的な発現量の変化には著しい違いがあった。

双方の *variant* ともに、成熟期のラット大脳新皮質においてはPCPにより発現が誘導されたが、幼若期のラットではPCPへの有意な反応性がみられなかった。このようにPCPに対してある発達時期から反応を示す遺伝子が見いだされたのは、私たちの知る限り *pvt-1* が初めてである。たとえば *c-fos* 遺伝子は、PCPによって発現誘導が見られる脳部位およびその程度は発達に伴って変化するが、いずれの発達時期でもPCPに反応して発現誘導される<sup>8)</sup>。

*pvt-1* の発現は、D1受容体遮断薬、ドーパミンの再取り込みを阻害し遊離を促進する薬物 (MAPやコカイン<sup>2,4,6)</sup>、GABA-A受容体賦活薬等の投与では変化しないが、強力にNMDA受容体チャンネルを遮断するPCPと *dizocilpine*<sup>3)</sup> により有意に増加することが明らかになった。したがって、PCP投与後の *pvt-1* 発現の上昇は、PCPのドーパミン再取り込み阻害作用<sup>4)</sup> あるいは非特異的作用ではなく、NMDA受容体遮断作用<sup>3,4)</sup> によって生じていると推測される。また、MAPおよびコカインが抗精神病薬に反応性の分裂病様幻覚・妄想状態を引き起こす<sup>2,6)</sup> こと、PCP<sup>2,3)</sup> および *dizocilpine*<sup>3)</sup> が分裂病様の幻覚・妄想に加えて感情鈍麻、意欲減退などの陰性症状も引き起こすことを考えあ

わせると、 *pvt-1* はPCP乱用によって生ずる感情や意欲の障害に関係している可能性がある。

今後さらに、 *pvt-1* のmRNAや産生蛋白の分布と局在、 *pvt-1* がコードするタンパク質の生理機能、PCPによる *pvt-1* の誘導が強く生ずる脳部位、 *pvt-1* の *antisense oligonucleotide* のPCP誘発性異常行動に対する作用等を調べることにより、陰性症状様異常の分子機構の手がかりが得られることが期待される。

## E. 結論

(1) 乱用薬物による脳機能障害の分子機構にアプローチするため、乱用の対象となる薬物またはこれらと同様の作用をもつ薬物による依存形成および精神症状が思春期以前には生じにくく、実験動物においても、これらの薬物による異常行動や脳の活動異常のパターンが生後発達に伴って変化することに注目し、ラット大脳新皮質より、MAPまたはPCPに一定の発達段階から成熟期における反応性を獲得する遺伝子をスクリーニング・解析した。

(2) Amphetamine類やコカインが誘発する分裂病様幻覚・妄想状態の発症・再燃のモデルである行動感作 (逆耐性現象) が形成され始める生後3週頃からMAPに反応性を示す *pvt-1* について、成熟期ではコカインにも反応することのほか、1) MAPによる発現誘導は行動感作形成を阻害するSCH23390によって阻害される、2) MAP反復投与後に基礎的な発現量が長期間増加し、この変化もSCH23390によって消失する、等の性質をもつことがわか

った。以上の結果は、*mrt-1*が少なくとも、amphetamine類やコカインによる幻覚・妄想状態の発現や再燃の分子機構に關与することが示唆される。

(3) PCPに対して発達依存的応答を示す遺伝子として、*pvt-1*が単離・同定された。*pvt-1*は、1)PCPと同様に分裂病の陰性症状様の異常を引き起こすNMDA受容体遮断薬 dizocilpineによっても発現が誘導されるが、2)MAPおよびコカイン、SCH23390、ペントバルビタール等の投与後には有意な変化を示さなかったことから、NMDA受容体拮抗作用をもつ薬物の乱用によって生ずる陰性症状様の異常に關係する可能性がある。

#### [参考文献]

- 1)Fujiwara Y., Kazahaya M., Nakashima M., et al.: Behavioral sensitization to methamphetamine in the rat: an ontogenic study. *Psychopharmacol.* 91: 316-319, 1987.
- 2)Javitt D.C.: Negative symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *Hillside J. Clin. Psychiat*, 9: 12~35, 1987.
- 3)Javitt D.C., Zukin S.R.: Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148: 1301-1308, 1991.
- 4)Johnson K.M., and Jones S.M.: Neuropharmacology of phencyclidine: basic mechanisms and therapeutic potential. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1990; 30:707~750.
- 5)Mohler H., Malherbe P., Draguhn A., et al.: GABAA-receptor subunits: functional expression and gene localisation. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1990;46:23-34
- 6) Nishikawa T., Umino A., Kashiwa A., et al.: Stimulant-induced behavioral sensitization and cerebral neurotransmission. In *Neurotransmitters in neuronal plasticity and psychiatric disorders*, pp. 53-62, Excerpta Medica, Ltd. Tokyo, 1993.
- 7) Reich D.L., and Silvey G.: Ketamine. an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Can J Anaesth*, 36: 186~197, 1989.
- 8) Sato D., Umino A., Kaneda K., et al.: Developmental changes in distribution patterns of phencyclidine-induced c-Fos in rat forebrain. *Neurosci. Lett*, 239: 21~24, 1997.
- 9) Siebert P.D., and Larrick J.W.: PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques* 14:244-9, 1993.
- 10)Ujike H., Onoue T., Akiyama K., et al.: Effects of selective D-1 and D-2 dopamine antagonists on development of methamphetamine-induced behavioral sensitization. *Psychopharmacology (Berl)* 98: 89-92, 1989.
- 11) Welsh J., Chada K., Dalal S.S., et al.: Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 4965-4970.

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: PET を用いた覚せい剤使用者の線条体ドーパミン・トランスポーターに関する研究 II

分担研究者: 伊豫雅臣<sup>1)</sup>

研究協力者: 関根吉統<sup>1)</sup>、松永勉<sup>1)</sup>、森則夫<sup>1)</sup>、尾内康臣<sup>2)</sup>、塚田秀夫<sup>3)</sup>

浜松医科大学精神神経医学講座<sup>1)</sup>、県西部浜松医療センター<sup>2)</sup>、浜松ホトニクス中央研究所<sup>3)</sup>

【研究要旨】

昨年度我々は、覚せい剤使用者7名と健常者9名を対象にポジトロンCT検査により線条体ドーパミン・トランスポーター(DAT)密度を測定した。今年度は、覚せい剤使用者3名を追加し、BPRSによる精神症状に加えて精神医学的状态像(無症状、神経症様状態、精神病状態)との関係を調べた。また覚せい剤使用者3名について6~9カ月の断薬後にPET再検査を行ない、DAT密度の可逆性について調べた。その結果、覚せい剤使用者では健常者に比し有意にDAT密度は低下しており、その低下は使用期間および精神病症状の重症度とそれぞれ有意な負の相関を認めた。また、6~9カ月の断薬期間によってもDAT密度は変化せず、その低下は不可逆的であることが示唆された。さらに、精神医学的状态像とDAT密度の関係では無症状、神経症様状態、精神病状態の順位でDAT密度が低下していた。これらから、覚せい剤長期使用によりDAT密度は低下し、その低下は不可逆的であり、覚せい剤の後遺症状と深く関与していることが示唆された。

A. 目的

覚せい剤は長期使用により、幻覚妄想を主体とした精神病状態を惹起する。さらにその覚せい剤精神病は一度体験すると、少量の覚せい剤使用や飲酒などにより容易に再燃することが知られている<sup>1)</sup>。また、近年その後遺症状として神経症様状態や精神病状態が遷延化することが問題となっている<sup>2)</sup>。ところで精神病状態は精神分裂病の陽性症状に類似しており、覚せい剤精神病は精神分裂病のモデルと考えられている一方で、長期に精神病状態が持続する症例は精神分裂病が惹起されたとの考え方もなされている<sup>3)</sup>。このような精神病状態や神経症様状態が覚せい剤の後遺症として生じているか否かを明らかとするには、覚せい剤により生じる脳内神経伝達系の

変化と精神病症状との関連を明きかとする必要がある。しかし現在までそのような関連は不明である。

覚せい剤は脳内ドーパミントランスポーター(DAT)を介してその主な作用を発現していると考えられている。最近、死後脳研究<sup>4)</sup>やPET研究<sup>5)</sup>により、覚せい剤長期使用者では脳内DATが低下していることが明らかとされてきた。そこで我々は昨年、覚せい剤使用者と健常者を対象にポジトロンCT(PET)検査による線条体DAT密度の測定を行い、覚せい剤使用者においてDAT密度が有意に低下していることを確認し、さらにその低下と精神症状の重症度が相関することを報告した。今年度は症例を増やすとともに、覚せい剤使用者3名にPET再検査を施行し低下の経時的变化を