

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

規制薬物の依存メカニズムと慢性精神毒性に関する神経科学的研究

平成 12 年度 総括研究報告

平成 10 - 12 年 3 年間のまとめ

**Neuroscientific Research on Mechanism of Dependence and Chronic
Psychotoxicity of Regulated Drug**

Annual Report

**Supported by Grant from the Ministry of Health
And Welfare, Japan in 2000
(Chief ; Mitsumoto Sato)**

平成 13 年 3 月

主任研究者 佐藤光源

1. 平成10年度～12年度総括研究報告	佐藤 光源	1
2. 3年のまとめ		
依存性薬物の数種薬理作用に関する薬理遺伝学的研究	星薬科大学薬品毒性学 鈴木 勉	11
モルヒネ依存形成に関わる遺伝子発現の研究	大阪大学医学部第一薬理学 三木 直正	18
依存性薬物における脳内 diazepam binding inhibitor (DBI) の病態生理学的役割とその発現機序	川崎医科大学薬理学 大熊 誠太郎	20
麻薬性鎮痛薬による依存形成・禁断症状発現のメカニズムに関する分子薬理学的研究	京都大学大学院薬学研究科生態機能解析学 佐藤 公道	25
乱用薬物の反復投与による認知障害と薬物依存症モデルの確立に関する研究	九州大学大学院薬学研究科薬効解析学 山本 経之	29
薬物依存発症時における覚醒剤の体内動態の変化に関する研究	名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻 長谷川 高明	32
Morphine 投与ラットにおける naloxone 誘発場所嫌悪性試験法に関する研究	岡山大学医学部附属病院薬剤部 五味田 裕	37
薬物依存における細胞内情報伝達物質の役割	名古屋大学大学院医学研究科医療薬学 鍋島 俊隆	40
methamphetamine 反復投与による腹側被蓋野-側坐核ドーパミンニューロン系の機能変化の関する電気生理学的研究	広島大学医学部薬理学 笹 征史	49
PET を用いた覚醒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 III	千葉大学医学部精神医学講座 伊豫雅臣	52
覚醒剤慢性投与による行動感作と海馬の関わりについて	福島県立医科大学医学部・神経精神医学教室 丹羽 真一	56
覚醒剤モデルにおける行動感作形成のメカニズムおよび行動感作と神経毒の相互作用についての研究	北海道大学医学部精神医学教室 小山 司	59

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 東北大・医・精神神経学 佐藤 光源	62
乱用薬物による脳機能障害の分子機構の解明 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部 西川 徹	67
覚醒剤精神病における異常回路形成の神経機序の研究 岡山大学医学部神経精神医学 分担研究者 氏家 寛	72
3. 平成 12 年度総括研究報告 佐藤 光源	77
4. 平成 12 年度分担研究報告	
ラット自己投与法を用いた薬物依存症動物モデルに関する基礎的検討 分担研究者 山本 経之 研究協力者 藪内 健一、渡辺 繁紀 九州大学大学院薬学研究科薬効解析学	83
メタンフェタミン逆耐性動物モデルにおけるメタンフェタミン体内動態の解析－有機カチオン輸送担体の機能変化に関する検討－ 分担研究者 長谷川 高明 研究協力者 高木 健三、柴田 英治、高木 健次、北市 清幸 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻	91
methamphetamine 反復投与による腹側被蓋野-側坐核ドーパミンニューロン系の機能変化の関する電気生理学的研究- 分担研究者 笹 征史 研究協力者 天野 託、松林弘明 広島大学医学部薬理学	100
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：nicotine 退薬症候における serotonin 神経機構の関与 分担研究者 五味田 裕 ^{1, 2)} 研究協力者 荒木 博陽 ^{1, 2)} 、末丸 克矢 ¹⁾ 、安田 佳代 ²⁾ ¹⁾ 岡山大学医学部附属病院薬剤部、 ²⁾ 岡山大学医療薬学専攻臨床薬剤学	105
麻薬依存形成・禁断症状発現に対するグルタミン酸神経系の可塑的变化－グリア型グルタミン酸トランスポーターの関与－ 分担研究者 佐藤 公道 研究協力者 中川 貴之 京都大学大学院薬学研究科生態機能解析学	115

依存性薬物における脳内 diazepam binding inhibitor (DBI) の病態生理学的役割とその発現機序	123
分担研究者 大熊 誠太郎 研究協力者 桂 昌司 川崎医科大学薬理学	
モルヒネの依存形成に対するデハイドロエピアンドロステロン硫酸塩の抑制作用：脳内シグナル伝達系の関与	131
分担研究者 鍋島 俊隆 ^{1, 2)} 研究協力者 野田 幸裕 ^{1, 2)} 、間宮 隆吉 ¹⁾ 、任 修海 ¹⁾ 、永井 拓 ¹⁾ 、 亀井 浩行 ^{1, 2)} ¹⁾ 名古屋大学大学院医学研究科医療薬学、 ²⁾ 名古屋大学付属病院薬剤部	
Methamphetamine 誘発数種薬理作用の遺伝解析	138
分担研究者 鈴木 勉 研究協力者 成田 年、矢島義識 星薬科大学薬品毒性学	
モルヒネ依存形成に関わる遺伝子発現の研究	146
分担研究者 三木 直正 研究協力者 郭 哲輝 大阪大学大学院医学系研究科情報薬理	
PET を用いた覚醒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 III	151
分担研究者 伊豫雅臣 ¹⁾ 研究協力者 関根吉統 ²⁾ 、松永勉 ²⁾ 、森則夫 ²⁾ 、尾内康臣 ³⁾ 、 塚田秀夫 ⁴⁾ ¹⁾ 千葉大学医学部精神医学講座、 ²⁾ 浜松医科大学精神神経医学講座、 ³⁾ 県西部浜松医療センター、浜松ホトニクス中央研究所 ⁴⁾	
行動感作獲得における海馬の役割：腹側海馬ニューロン活動に及ぼす覚醒剤反復投与の影響の検討（担当：丹羽）	156
分担研究者 丹羽 真一 研究協力者 竹内 賢 ¹⁾ 、鈴木 善明 ¹⁾ 、浄土英一 ²⁾ ¹⁾ 福島県立医科大学医学部・神経精神医学教室、 ²⁾ 同・生理学第2講座	
Methamphetamine 神経毒性発現下における行動感作形成の有無について	166
分担研究者 小山 司 ¹⁾ 研究協力者 安倍川 智浩 ¹⁾ 、伊藤 耕一 ²⁾ 、本田 稔 ¹⁾ ¹⁾ 北海道大学医学部精神医学教室、 ²⁾ 国際医療センター精神科	

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	180
分担研究者 佐藤 光源 ²⁾ 研究協力者 窪田 恭彦 ^{1,2)} 、大津 浩 ¹⁾ 、櫻井 映子 ¹⁾ 、伊藤 千裕 ²⁾ 、 渡邊 建彦 ¹⁾ 、 東北大・医・ ¹⁾ 細胞薬理学、 ²⁾ 精神神経学	
メタンフェタミン精神病モデルラットにおける可塑性関連遺伝子 MAPkinase Phosphatase (MKP) -1、-3 の脳内での発現変化	186
分担研究者 氏家 寛 研究協力者 高木 学、児玉 匡史、武久 康、山本 文子 中田謙二、黒田 重利 ¹⁾ 岡山大学医学部神経精神医学、 ²⁾ 福山友愛病院	
乱用薬物による脳機能障害の分子機構の解明	196
分担研究者 西川 徹 研究協力者 梶井 靖、村岡新一郎、海野麻未、黒田安計、柏淳 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部、	
5. 分担研究者氏名一覧	203

平成12年度 総括研究報告

主任研究者 佐藤光源

平成 12 年度厚生科学研究費補助金医薬安全総合事業
「規制薬物の依存メカニズムと慢性精神毒性に関する神経科学的研究」

研究代表者 佐藤光源

総括研究報告

本研究の目標は、薬物依存とそれに伴う精神毒性の発生機序を明らかにすることである。両者の脳内基盤には移行する部分や共有部分があるので厳密には分けることはできないが、便宜上、鍋島グループは主に薬物依存メカニズムを、佐藤グループは主に慢性の精神毒性を担当している。本年度は 3 年間の研究期間の最終年度であり、昨年と同様に多くの研究成果が得られたので、その概要を報告する。

なお今年度も両グループが一堂に会して研究報告会（2001 年 2 月 1 日、サンケイ会館、東京）を行い、活発かつ有意義な討論が行われた。本研究の統括ならびに研究報告会を円滑に運営できたのは、事務局の櫻井映子先生（東北大学大学院細胞薬理）のご努力によるところが大きい。研究者を代表して、謝意を表したい。

(I) 薬物依存メカニズムに関する研究

1. ラット自己投与法を用いた薬物依存症動物モデルに関する基礎的検討
(九州大学大学院薬学研究科薬効解析学 山本 経之)
2. メタンフェタミン逆耐性動物モデルにおけるメタンフェタミン体内動態の解析－有機カチオン輸送担体の機能変化に関する検討－
(名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻 長谷川 高明)
3. メタンフェタミン反復投与後における腹側被蓋野－側坐核ドーパミン系ニューロンの機能変化に関する電気生理学的研究－
(広島大学医学部薬理学 笹 征史)
4. 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：nicotine 退薬症候における serotonin 神経機構の関与
(岡山大学医学部附属病院薬剤部 五味田 裕)
5. 麻薬依存形成・禁断症状発現に対するグルタミン酸神経系の可塑的变化－グリア型グルタミン酸トランスポーターの関与－
(京都大学大学院薬学研究科生態機能解析学 佐藤 公道)
6. 依存性薬物における脳内 diazepam binding inhibitor (DBI) の病態生理学的役割とその発現機序
(川崎医科大学薬理学 大熊 誠太郎)
7. モルヒネの依存形成に対するデハイドロエピアンドロステロン硫酸塩の抑制作用：脳内シグナル伝達系の関与

(名古屋大学大学院医学研究科医療薬学 鍋島 俊隆)

8. Methamphetamine 誘発数種薬理作用の遺伝解析
(星薬科大学薬品毒性学 鈴木 勉)
9. モルヒネ依存形成に関わる遺伝子発現の研究
(大阪大学医学部第一薬理学 三木 直正)

(II) 慢性精神毒性に関する研究

1. PET を用いた覚醒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Ⅲ
(浜松医科大学精神神経医学 伊豫雅臣)
2. 行動感作獲得における海馬の役割：腹側海馬ニューロン活動に及ぼす覚醒剤反復投与の影響の検討
(福島県立医科大学医学部・神経精神医学 丹羽 真一)
3. Methamphetamine 神経毒性発現下における行動感作形成の有無について
(北海道大学大学院精神医学 小山 司)
4. 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ノックアウトマウスを用いた研究
(東北大学大学院医学系研究科精神医学 佐藤 光源)
5. メタンフェタミン精神病モデルラットにおける可塑性関連遺伝子MAPkinase Phosphatase (MKP) -1、-3の脳内での発現変化
(岡山大学医学部神経精神医学 氏家 寛)
6. 乱用薬物による脳機能障害の分子機構の解明
(国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第三部 西川 徹)

1. 依存メカニズムの研究 (鍋島班)

精神依存メカニズムでは、依存形成に薬物動態の変化が関係するという作業仮説が検証され、薬物摂取への渴望を生む脳報酬系の変化(中脳被蓋野の A10 細胞の各種ドーパミン受容体の変化)、モルヒネ依存形成、退薬症候群の発現期序が明らかになり、依存形成で生じる遺伝子発現の変化、MAP 誘発自発運動促進作用に関する遺伝子座の特定作業が進んだ。

1) ラット自己投与法を用いた薬物依存症動物モデルに関する基礎的検討(担当：山本)

自己投与実験手法を用いて、コカイン報酬効果に対するアデノシン受容体の関与を調べたところ、コカインを生理食塩水に切り換えてコカイン摂取が出来ない状況下になると、レバー押し反応が著しく増強された。この反応はアデノシン A1 受容体作動薬の N⁶-cyclohexyladenosine(CHX)やグルタミン酸遊離阻害薬の riluzole によって抑制さ

れた。この CHA の抑制作用は、グルタミン酸遊離を阻害し、発現していることを見出した。これらの結果より、コカインに対する渴望の発現にグルタミン酸作動性神経系が関与していることを示唆した。

2) メタンフェタミン逆耐性動物モデルにおけるメタンフェタミン体内動態の解析—有機カチオン輸送担体の機能変化に関する検討— (担当：長谷川)

メタンフェタミンによる依存形成と薬物体内動態の関係を調べるため、腎透析膜を用いた改良型ダイアリス法を用いて検討した。その結果、メタンフェタミン逆耐性群におけるメタンフェタミンの血漿中濃度および腎排泄クリアランスは、コントロール群に比べ有意にそれぞれ高値および低値を示した。このメタンフェタミン体内動態の変化には、有機カチオントランスポーター、特に有機カチオントランスポーター 3 の発現低下によるメタンフェタミン腎排泄と組織移行性の変化が重要な役割を果たしていることを見出した。

3) メタンフェタミン反復投与後における腹側被蓋野—側坐核ドーパミン系ニューロンの機能変化に関する電気生理学的研究— (担当：笹)

メタンフェタミンによる依存の発現機序を解明するため、メタンフェタミン連続投与後の側坐核ドーパミン神経系の機能をホールセルパッチクランプ法により電気生理学的に検討した。メタンフェタミン連続投与により、側坐核ニューロンにおけるドーパミンおよびメタンフェタミンに対する感受性の亢進が認められ、この機能変化は、ドーパミン受容体サブタイプの質的な変化でなく、量的な変化によることが示唆された。

4) 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：nicotine 退薬症候における serotonin 神経機構の関与 (担当：五味田)

ニコチン退薬症候におけるセロトニン(5-HT)受容体の関与およびその発現機構について検討した結果、ニコチン退薬時には 5-HT 神経機能が変化し、特に 5-HT₂ 受容体に対する感受性が増大していることが示唆された

5) 麻薬依存形成・禁断症状発現に対するグルタミン酸神経系の可塑的变化—グリア型グルタミン酸トランスポーターの関与— (担当：佐藤公道)

グルタミン酸作動性神経系は、シナプスの可塑性変化に関与していることから、モルヒネ依存マウスおよびラットを用いて、モルヒネ依存発現機序を調べた。モルヒネ依存マウスにグルタミン酸トランスポーター阻害薬の TBOA の脳内投与によって退薬症状が増悪され、モルヒネ依存ラットにおいて脳内グリア型グルタミン酸トランスポーター GLT-1 mRNA の発現量が減少していた。従って、麻薬依存形成・禁断症状発現におけるグルタミン酸神経機能の可塑的变化に脳内グリア型グルタミン酸トランスポーター GLT-1 が関与していることが示唆された。

6) 依存性薬物における脳内 diazepam binding inhibitor (DBI) の病態生理学的役割とその発現機序 (担当：大熊)

モルヒネによる依存の機序を解明するため、モルヒネの長期投与による脳内 diazepam binding inhibitor(DBI)の発現変化とその機序を検討した。モルヒネ長期投与に

よって脳内 DBI mRNA が増加し、この増加は薬物の退薬によりさらに増加した。初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用いてその発現変化の機序を検討したところ、長期にわたるオピオイド受容体の μ 1および μ 2受容体の活性化に起因することを見出した。

6) モルヒネの依存形成に対するデハイドロエピアンドロステロン硫酸塩の抑制作用：

脳内シグナル伝達系の関与 (担当：鍋島)

神経ステロイドのデハイドロエピアンドロステロン硫酸塩(DHEAS) はモルヒネの依存形成を抑制すること、モルヒネの依存形成に cyclic AMP (cAMP)および extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)カスケードが関与していることから、モルヒネ依存形成に対する DHEAS の抑制作用にこれらのカスケードが関与しているかどうかについて調べた。その結果、モルヒネの依存形成に対する DHEAS の抑制作用はシグマ 1 受容体を介するシグナル伝達系、特に ERK カスケードが関与している可能性が示唆された。

7) モルヒネ依存形成に関わる遺伝子発現の研究 (担当：三木)

PC12 細胞を用いてモルヒネのカルモジュリン(CaM)遺伝子発現に対する作用および強制発現させた Pur α の遺伝子発現に対する作用を検討した。その結果、モルヒネ処置によって μ 受容体を介する CaM mRNA と CaM 蛋白量が増加され、Pur α を強制発現させた PC12 細胞において CRE-レポータ遺伝子発現活性が抑制されていた。これらの結果、モルヒネは CaM の遺伝子発現に、また、Pur α は CRE 配列を有する遺伝子の転写活性に作用し、遺伝子発現を調節する可能性が示唆された。

8) Methamphetamine誘発数種薬理作用の遺伝解析 (担当：鈴木)

近交系 SM/J と A/J 系マウスの組換え近交系 (SMXA) マウス 26 系統を用いてメタンフェタミンの数種薬理作用の発現に関与する染色体および遺伝子座の同定を行った、メタンフェタミン誘発報酬効果には、第 2, 17, 18, 19 染色体上の 5 遺伝子座、自発運動促進作用には第 10, 11 染色体上の 3 遺伝子座、その逆耐性形成には第 3 染色体上の 2 遺伝子座が関与していることを明らかにした。

2. 慢性精神毒性の研究 (佐藤班)

慢性の精神毒性については、臨床研究において倫理委員会の承認を得て、覚せい剤精神病から回復した人のドーパミントランスポーター(DAT)密度の変化と可逆性が PET 画像解析で明らかにされ、動物研究において、逆耐性獲得に関する海馬の役割を確認し、MAP 逆耐性に対して脳ヒスタミン(HA)神経系が抑制系をなすということ HA 合成酵素(HDC)ノックアウト動物で確認し、逆耐性現象の基盤をなす神経可塑性の変化に特異的に関わる遺伝子及び転写機構の変化-mrt1-を特定できた。

1) PETを用いた覚醒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III

(担当：伊豫)

側坐核、前頭前野におけるドーパミントランスポーター (DAT) 密度を算出し、BPRS による精神症状および覚醒剤使用歴などの臨床データとの関係を調べた。その結果、1) 側坐核における DAT 密度は線条体における DAT 密度とほぼ同程度であるが、前頭前野における DAT 密度はそれらの約 20 分の 1 であった。2) 線条体、側坐核、前頭前野における DAT 密度は覚せい剤使用者群 (11 名) では健常者群 (9 名) に比し有意に低下していた。3) 線条体および側坐核における DAT 密度の低下は使用期間および残遺精神症状の重症度とそれぞれ有意な負の相関を認めた。これらから、覚せい剤長期使用により脳内ドーパミン神経の神経終末に存在する DAT 密度は有意に低下し、覚せい剤の後遺症状と深く関与していること示唆された。

2) 行動感作獲得における海馬の役割：腹側海馬ニューロン活動に及ぼす覚醒剤反復投与の影響の検討 (担当：丹羽)

ラットの腹側海馬に慢性に微小電極を埋め込み、覚醒剤を 5 回腹腔内反復投与して行動感作を獲得させ、その前後で定常状態、生理食塩水負荷、覚醒剤負荷時のそれぞれにおいて腹側海馬のニューロンの発火頻度を観察した。腹側海馬活動が行動感作獲得に影響を与えている可離が示唆された。

3) Methamphetamine 神経毒性発現下における行動感作形成の有無について (担当：小山)

覚醒剤の神経毒性発現条件下で行動感作が成立するか否かを検討した。以上の結果は、2 時間毎のわずか 4 回の高用量あるいは低用量 MA 処置のみで MA の stereotypy 誘発効果に対する行動感作が形成され、また、MA の locomotion 誘発効果に対する行動感作は神経毒性を生じる高用量 MA 処置のみで形成されることを示唆する。これらの行動感作発現のメカニズムはシナプス後 D1, D2 DA 受容体の感受性亢進では説明できなかった。

4) 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 (担当：佐藤光源)

メタンフェタミン (MAP) 急性投与における中枢ヒスタミン (HA) 神経系の脳内アミン、アミノ酸に対する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 MAP を急性投与し、1 時間後の脳内アミン含量およびアミノ酸含量を解析した。その結果、神経系の変化が HDC-KO マウスにおける MAP 投与による移所運動量の増加の一端を担っている可能性が示唆された。

5) 乱用薬物による脳機能障害の分子機構の解明 (担当：西川)

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) に関連する候補遺伝子として、昨年度までに、ラット大脳新皮質から、逆耐性が形成され始める生後 3 週頃から methamphetamine (MAP) への応答を獲得する新規遺伝子群 mrt1 (MAP responsive transcript 1)、mrt2 および mrt3 を同定した。本年度

は、主に *mrt1* がコードすることが予測される PDZ 蛋白質に対する抗体を用いた解析を進めた。その結果、*Mrt1B* 蛋白が脳のシナプスで逆耐性形成に関与する神経可塑性関連分子として機能していることが示唆された。

6) メタンフェタミン精神病モデルラットにおける可塑性関連遺伝子 MAPkinase Phosphatase (MKP) -1、-3 の脳内での発現変化 (担当: 氏家)

METH による逆耐性現象において、大脳皮質、視床、線状体においては MKP-1 mRNA、大脳皮質、線状体、海馬においては MKP-3 mRNA の発現が増加していることを *In situ hybridization* 法を用いて初めて示した。逆耐性現象の形成と維持期において、様々な脳部位で MKP、MAP キナーゼカスケードが活性化されており、これらの脳部位で複雑に制御された脳可塑性が生じていることが示唆された。

平成12年度 分担研究報告

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：ラット自己投与法を用いた薬物依存症動物モデルに関する基礎的検討

主任研究者：山本 経之

研究協力者：藪内 健一、渡辺 繁紀

九州大学大学院薬学研究科医療薬科学専攻薬効解析学分野

研究要旨

Cocaine を初めとする依存性薬物の乱用が引き起こす諸問題のうち、最も深刻な問題の1つがその「逆戻り(relapse)」現象である。その神経化学的な機構の解明と共に、ヒトにおける「渴望」を的確に再現するよりよい動物モデルの確立と、それを用いての依存症の治療薬の前臨床的評価法の確定が望まれる。そこで本研究では、cocaine の自己投与実験法を用い、saline 置換時のレバー押し行動を薬物探索行動の指標として、まず「渴望」の再燃モデルの確立を試みた。安定した cocaine 自己投与行動を習得したラットに対し、cocaine を生理食塩水に置換すると激しいレバー押し行動が誘発された。このレバー押し行動は同様の実験を繰り返すと減弱した。この時、cocaine 10 mg / kg の腹腔内投与によりこのレバー押し行動は有意に増加し、「再燃」した。この結果は、ヒトにおける cocaine 渴望の再燃である「逆戻り (relapse)」現象を反映していると考えられる。この再燃したレバー押し行動は、adenosine A1 受容体作動薬 CHA 0.032 mg / kg により抑制される傾向が認められた。また、グルタミン酸遊離阻害薬 riluzole 3.2 mg/kg は、レバー押しの再燃を有意に抑制した。これらの結果は、CHA がグルタミン酸遊離を阻害し cocaine に対する「渴望」を減じた可能性を示唆する。本研究は cocaine に対する渴望の発現にグルタミン酸神経系の伝達の亢進が促進的に関与する事を明らかにすると同時に、本モデルを用いての薬物依存症の治療薬の開発の可能性をも示すものである。

A. 研究目的

Cocaine を初めとする依存性薬物の乱用が引き起こす諸問題のうち、最も深刻な問題の1つが、その「逆戻り(relapse)」現象である。Cocaine の乱用に伴って現れる二次的な症状（不安障害、躁鬱などの気分障害、分裂病様症状、心疾患）は殆ど治療可能であるにもかかわらず、cocaine 依存は常に再燃する危険性をはらんでいる。Cocaine 依存者は、その摂取の長期的な中断後も、少量の cocaine 再投与⁽⁵⁾、ストレス⁽¹¹⁾および薬物摂取を連想させる条件刺激⁽⁷⁾を与えることによって cocaine に対する渴望が再燃し、cocaine 探索行動が誘発される。従って cocaine 依存の本質的な解決のためには、cocaine 依存者に見られるこの relapse の防止が中心的課題となる。さらにその神経機構の解明や薬物療法の開発の為には、「再燃」を再現した動物モデルの確立が必須である。

動物を用いて薬物に対する「渴望 (craving)」の評価を試みた報告は、その困難さから未だ少な

い。当研究室では、昨年度の報告において cocaine 探索行動モデルを提案した。すなわち、動物に自己投与法により cocaine 摂取を体験させた後、同じ条件で薬物を生理食塩水に置換すると、動物は「無駄な」レバー押しを繰り返す。こうしたレバー押し行動は非強化子によるセッションを繰り返すことで消去されるが、ストレス付加によって「再燃」することを報告した。今年度はより一般的に、実験者による少量の cocaine の投与によって引き起こされる cocaine 探索行動の再燃現象について検討を加えた。

一方、選択的な dopamine D1 受容体作動薬によって cocaine 自己投与行動ならびに cocaine 探索行動の再燃は抑制されることが報告されている^(3, 10)。また、AMPA 受容体拮抗薬 CNQX の側坐核内局所注入によって、cocaine 探索行動の再燃は抑制される⁽³⁾。さらに、側坐核中型有棘細胞標本を用いての in vitro 実験で、dopamine D1 受容体の刺激が共存する NMDA 受容体の活性化とそれに伴う adenosine の放出を促進すること、そ

の adenosine が A1 受容体を介して逆行性に側坐核へ入力する興奮性入力を抑制することが分かっている⁴⁾。これらの知見から、adenosine A1 受容体は cocaine 探索行動に対して抑制的な調節をしている可能性が推察されるが、それに関する報告は皆無である。そこで、cocaine 探索行動の再燃に対する adenosine A1 受容体作動薬の作用を検討した。併せて、グルタミン酸遊離阻害作用を持つ萎縮性側索硬化症の治療薬 riluzole についても、同様の検討を行った。

B. 方法

B-1 動物

すべての実験には、8週齢のWistar ST 雄性ラット (240~250 g; 日本 SLC) を使用した。

B-2 装置

自己投与実験のオペラント箱 (ニューロサイエンス社製) は、1つのレバーとレバーランプおよびルームランプを装備している。レバーを決められた回数押すと、オートインジェクタ (Med Associates 社製) からカテーテルを通じて薬物が注入される。薬物注入中および注入後 20 秒間 (time out) はレバーランプが消灯し、この間のレバー押しを無効とした。また1回の注入量は 100 μ l (6 秒) となるように設定した。レバー押し回数および注入回数は、time out 内も含めすべてコンピュータに記録した。オペラント箱は、外部の音を遮断するため防音チャンバー内に収納した。

B-3 オペラント訓練および外科的手術

初めの5日間は、餌、水とも自由に摂取できる条件下で動物飼育室内で飼育した。その後2日間の食餌制限を経てオペラント装置に入れ、45 mg 餌ペレットを強化子としたオペラント行動をクライテリア (FR 3 / 50 個 / 400 sec 以内) に達するまで2~3日間にわたって訓練した。学習完成後、ラットの外頸静脈を切開しシラスコン製カテーテルを右心房に達するまで挿入、留置した。さらに、ラット肩甲骨付近から正中線に沿って尾側へ1 cm 程度皮膚を切開し、皮下にメッシュボタンを固定した。同時に、挿入したカテーテルの他端を腋下の皮下、メッシュボタンの中心孔を経て体外に出し、そこにコネクタを繋いで固定した。手術後5日間は回復期間にあて餌、水とも自由に摂取させた。回復後、24時間の餌制限下で再び45

mg 餌ペレットによるオペラント行動を再トレーニングし、クライテリアに達したラットから漸次自己投与実験を行った。自己投与実験期間中、ラットは一定の餌制限下 (35 ~ 40 g) においた。

B-4 cocaine 自己投与行動の獲得

cocaine 自己投与の獲得期間 (7~11日) においては、単位用量 0.25 mg/100 ml / infusion, FR 1 の条件下で、2時間のトレーニングセッションを1日1回行った。トレーニングは、連続した3回のセッションで自己投与回数の誤差が10%以内であり、かつその回数が1セッションにつき16回以上という安定した infusion pattern が表れるまで継続した。

B-5 cocaine 自己投与における単位用量反応曲線

安定した自己投与行動獲得のクライテリアに達したラットを用いて、cocaineの単位用量を 0.50, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.016, 0.008, 0.004 mg / infusion の順に半量ずつ減量したセッションを、1単位用量につき1日1回、計8日にわたって行い、さらに9日目には溶媒である生理食塩水を用いて自己投与回数を記録した。単位用量以外の条件は、獲得期間と同様に設定した。

B-6 cocaine 自己投与行動に対する adenosine A1 受容体作動薬 N⁶-cyclohexyladenosine (CHA) の効果

安定した自己投与行動を獲得したラットを用いて、トレーニングセッションと同じ条件下での cocaine 自己投与行動に対する adenosine A1 受容体作動薬 CHA の効果を検討した。CHA は cocaine 自己投与セッションの開始前30分に動物に腹腔内投与し、自己投与回数を記録した。CHA は、0.01-0.10 mg/kg までの4用量をラテン方格法に従った順序で投与した。こうしたテストセッションは1日に1回とし、全てのラットが4日間のテストセッションを体験した。なお、このテストセッションが終了から、通常のコカイン自己投与セッションを2-3セッション行われた後、DPCPX 0.10 mg/kg 腹腔内投与による拮抗実験を行った。このとき用いた CHA の用量は、最高用量である 0.10 mg/kg とした。DPCPX の投与は CHA 投与の直前に行われた。

B-7 CHA の cocaine 単位用量応答曲線に対する影響

安定した自己投与行動を獲得したラットを用いて、CHA 0.056 mg / kg の腹腔内投与が cocaine 自己投与行動の単位用量反応曲線に及ぼす効果を検討した。7種類の cocaine の単位用量 (0.50, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.016, 0.008 mg / infusion) によるセッション開始前30分に、CHA 0.056 mg / kg を腹腔内投与し、cocaine 自己投与回数を記録した。全てのラットは、高濃度の cocaine 単位用量から順に、計7回7日間の CHA セッションを体験した。

B-8 cocaine 探索行動の消去と再燃

安定した自己投与行動のクライテリアに達した動物に対して、cocaine の最終自己投与セッションから24時間後に、cocaine を生理食塩水に置換し、セッション内のレバー押し応答を記録した。この時他の実験条件は cocaine 自己投与行動獲得期間と同一とした。さらに、こうした saline 自己投与セッションを1日1回行い、レバー押し回数の推移 (レバー押しの消去過程) を記録した。レバー押し応答の消去に対するクライテリアは、「連続した3回の saline 自己投与セッションにおいて、2時間のセッション時間内で10回以下」とした。

レバー押し応答の消去がクライテリアに達した動物には、その最終セッションから24時間後に、cocaine (1-10 mg / kg) を腹腔内投与し、その直後に再び saline 自己投与セッションを行い、レバー押し回数を記録した (レバー押しの再燃)。

B-9 adenosine A1 受容体作動薬 CHA およびグルタミン酸遊離阻害薬 riluzole の cocaine 探索行動の再燃に及ぼす効果

前項で、saline 自己投与セッションの反復によりレバー押し応答が消去されたラットを用いて、cocaine 10 mg / kg の腹腔内投与が惹起するレバー押し行動の再燃に対する adenosine A1 受容体作動薬 CHA (0.032 mg / kg) およびグルタミン酸遊離阻害薬 riluzole (1, 3.2, 5.6 および 10 mg / kg) の効果を検討した。各薬物は、cocaine 投与の30分前に腹腔内に投与した。投与15分後に、45 mg の餌ペレット強化によるオペラント行動の前試験を行った後、cocaine 10 mg / kg 腹腔内投与の直後から saline 自己投与セッションを行い、2時間のセッション内のレバー押し回数を記録した。なお、この実験は1個体に対して1回のみ行っ

た。

B-10 薬物

実験には、cocaine HCl (武田薬品工業株式会社)、N⁶-cyclohexyl adenosine (CHA ; RBI)、8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX ; RBI)、riluzole (RBI) を使用した。cocaine HCl および CHA は、用時に0.9% 生理食塩水に溶解させて調整した。DPCPX は、20%DMSO に溶解させて調製した。riluzole は、用時に10% Tween 80 に懸濁して使用した。

C. 結果

C-1 Cocaine 自己投与行動

Cocaine 0.25 mg / infusion、FR 1 によるトレーニング期間において、各ラットはおおむね第8セッション以降ほぼ安定した自己投与回数を示した (Fig. 1)。このときの自己投与パターンはどの個体でも非常に規則的であった。

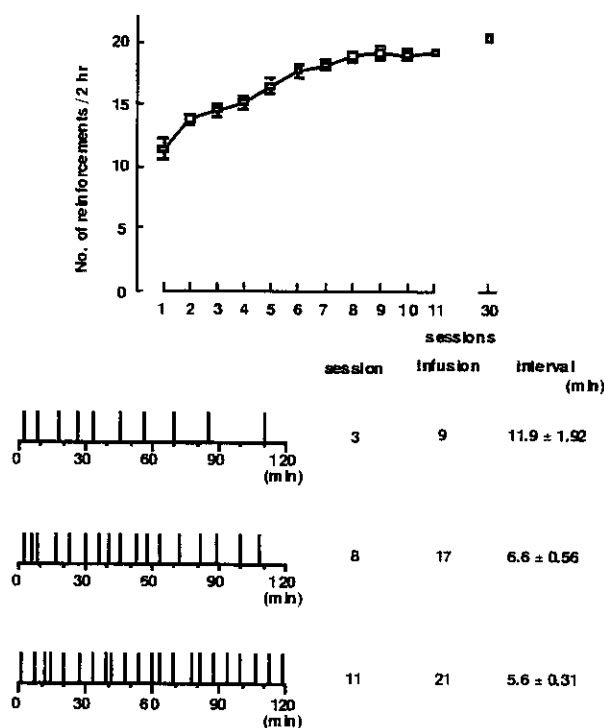


Fig. 1 Acquisition curve for i.v. cocaine self-administration

Fig. 2 に、cocaine の単位用量を高用量から低用量に変化させていくことで得られた単位用量応答曲線と、各単位用量における代表的な自己投与パターンを示した。Cocaine の単位用量が0.031 mg/infusion より高いとき、自己投与回数は右肩下がりではほぼ逆比例的な相関を見せた。すなわち、レバー押し応答は1セッション内の全摂取量をほ

とんど不変とするように維持された。このとき、自己投与パターンはほとんどすべての個体において規則的であった。単位用量 0.031 mg/infusion において、10 匹中 1 匹においてのみ規則的な投与パターンが観察されなかった。0.016 mg/infusion より低い cocaine の単位用量の場合、自己投与回数は右肩上がりとなった。0.004 mg/infusion での自己投与回数は saline と同じレベルにまで減少し、また自己投与間隔時間のばらつきも大きく、投与パターンが不規則であった。

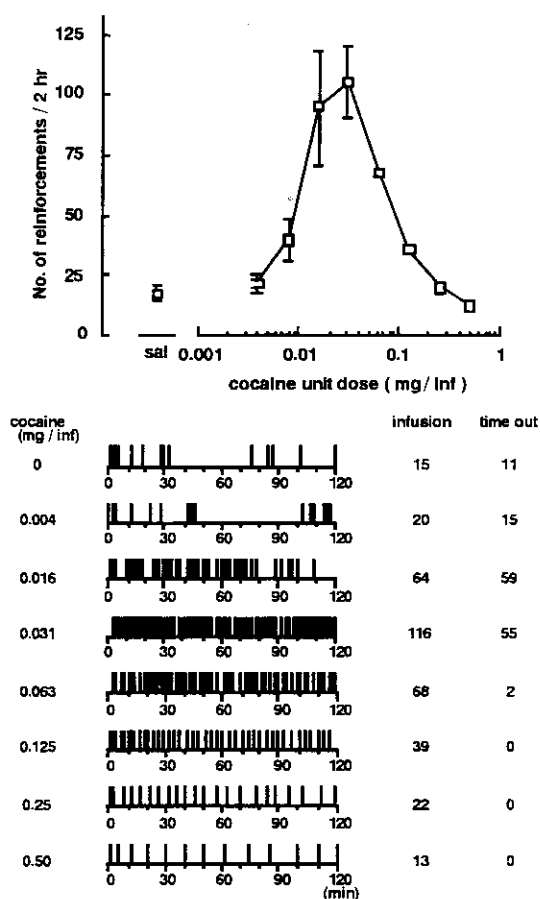


Fig. 2 Dose - response curve for i.v. cocaine self-administration

C-2 Cocaine 自己投与行動に対する adenosine 受容体作動薬 CHA の効果

Fig. 3 に、0.25 mg / infusion, FR1 の条件下での cocaine 自己投与行動に対する CHA の効果を示した。CHA は用量依存的かつ有意に cocaine の自己投与回数を減少させた ($p < 0.001$; repeated ANOVA)。対比 (contrast) により CHA 0.056, 0.10 mg / kg の投与による減少はそれぞれ vehicle に比べ有意であることが明らかとなった ($p = 0.0064$, $p = 0.0001$, respectively)。投与パターンの検討により CHA は 0.10 mg / kg 以外

の用量では cocaine 自己投与回数の規則的なパターンに影響を与えなかった。さらにこれらの用量ではセッションを開始してから3分以内に1回目の自己投与が起こった。自己投与セッションの15分前に行った45 mgの餌ペレットを強化子としたオペラント実験においてもこれらの用量のCHAは顕著な変化を起こさなかった。しかしながら、CHA 0.10 mg / kg では、6例中3例に置いてセッション開始から30分以上自己投与が認められず、餌強化のオペラント実験でもレバー押し行動が全例で抑制された。なお、この効果はA1受容体の選択的な拮抗薬であるDPCPX 0.1 mg / kg によって拮抗され、自己投与回数は有意に回復した ($p = 0.014$, Welch's t-test)。

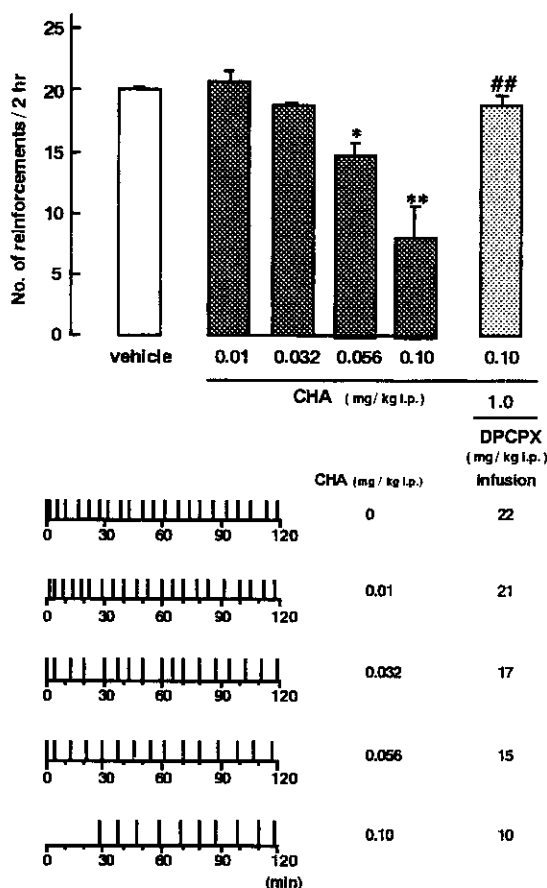


Fig. 3 Effect of adenosine A1 receptor agonist CHA on i.v. cocaine self-administration

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus vehicle, ## $P < 0.01$ versus CHA 0.1

上記検討で、CHA 0.056 mg / kg の前処置はレバー押し行動自体を抑制せず、有意に自己投与回数を減少させることが明らかとなった。そこで、CHA 0.056 mg / kg の前処置が cocaine 自己投与行動の単位用量反応曲線に及ぼす影響を検討した (Fig.4)。CHA 0.056 mg / kg は、cocaine 自己投与の単位用量応答曲線を下方にシフトさせることが明らかとなった ($F(1, 36) = 12.218$, $p = 0.0068$; repeated ANOVA)。また、CHA 処置

と単位用量との間には、有意な交互作用が見られた ($F(4, 36) = 3.115, p=0.027$; repeated ANOVA)。

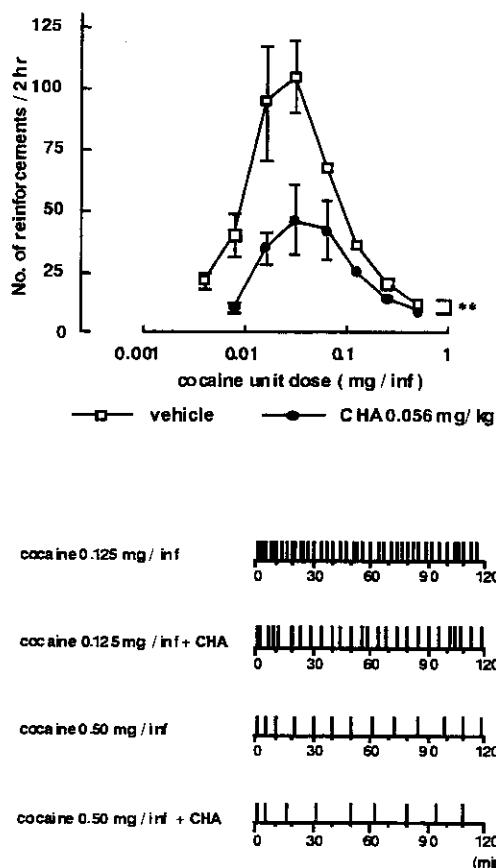


Fig. 4 Effect of CHA on dose-response curve for i.v. cocaine self-administration ** $p < 0.01$, repeated ANOVA

C-3 cocaine 探索行動についての基礎検討

安定した cocaine 自己投与行動のクライテリアに達したラットに、cocaine 自己投与の最終セッションから24時間後に生理食塩水セッションを行わせたところ、爆発的なレバー押し行動が誘発された (extinction bursting)。このときのレバー押しパターンは全く不規則であり、高頻度にレバー押し行動が生じる時間と、全く生じない時間が混在していた。また、タイムアウト期間においてもレバー押し行動が数多く見られた。こうした爆発的なレバー押し応答は、同じセッションを重ねるにつれて減少し、5回目から7回目のセッションでは全例で10回以下となった。つまり、レバー押し応答は消去された (Fig. 5)。

その最終 saline セッションから 24 時間後に、cocaine (1 - 10 mg / kg) を腹腔内に投与して saline セッションを行った (Fig. 6)。Cocaine 10 mg / kg の投与によってレバー押し行動は有

意に増加した ($p=0.0017$, Mann-Whitney's U-test)。このときのレバー押しパターンは、消去過程における1回目の saline セッションで得られたものと類似して、不規則であった。高頻度にレバー押しが生じる時間帯は全く不規則に現れ、一定の傾向を示さなかった。

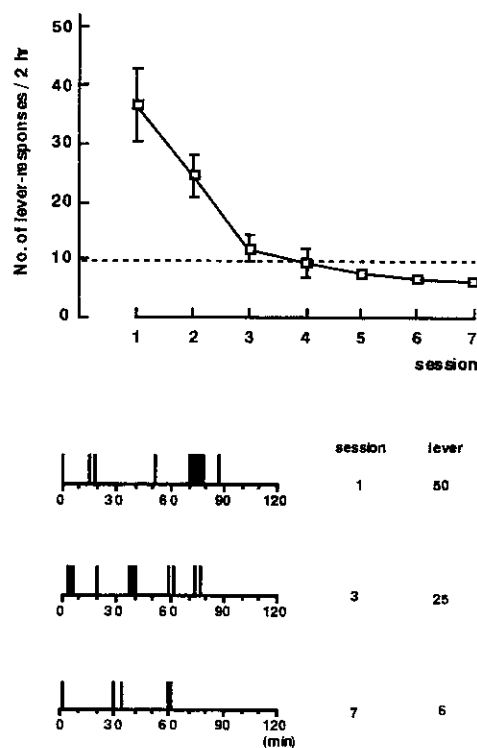


Fig. 5 Extinction of lever responses in withdrawal state following cocaine self-administration

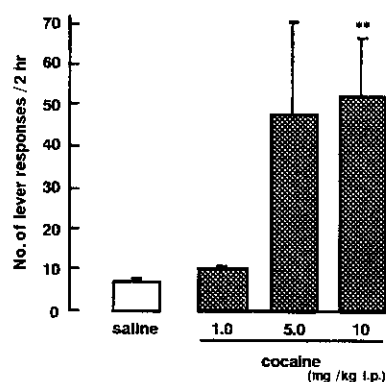


Fig. 6 Reinstatement of cocaine-seeking behavior induced by cocaine re-administration

** $p < 0.01$ versus saline, Mann-Whitney's U-test

C-4 cocaine 探索行動の再燃に対する adenosine A1 受容体作動薬 CHA およびグルタミン酸遊離阻

害薬 riluzole の効果

adenosine A1 受容体作動薬 CHA 0.032 mg / kg により、cocaine 10 mg / kg の腹腔内投与によって惹起される cocaine 探索行動は、抑制される傾向にあった (Fig.7)。レバー押しのパターンは全く不規則であったが、高頻度のレバー押し行動は減弱する傾向にあった。なお、この実験に先立ち行われた餌ペレットを強化子としたオペラント行動は、CHA 投与によって全く影響を受けなかった。

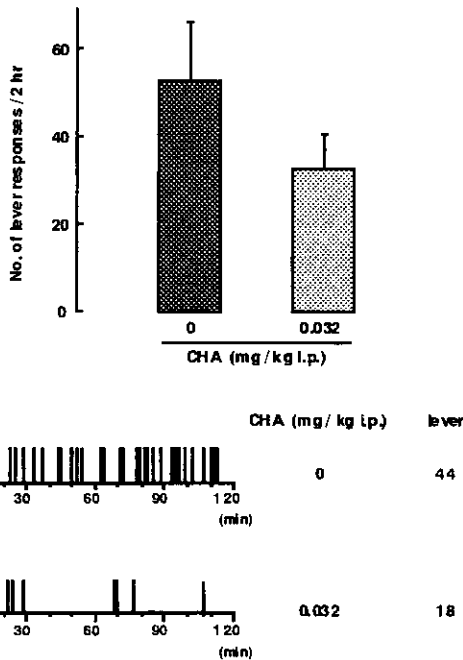


Fig. 7 Effect of CHA on reinstatement of cocaine-seeking behavior induced by cocaine re-administration

グルタミン酸の遊離阻害薬である riluzole は、用量依存的に cocaine 誘発性の cocaine 探索行動の発現を抑制した (Fig. 8)。特に、riluzole 3.2 mg / kg による効果は有意であった ($p=0.0407$, Mann-Whitney's U-test)。このとき、餌獲得のためのオペラント行動は、全く影響を受けなかった。riluzole 5.6 および 10 mg / kg は、cocaine 探索行動を完全に抑制したが、こ餌獲得のためのオペラント行動も同時に障害された。

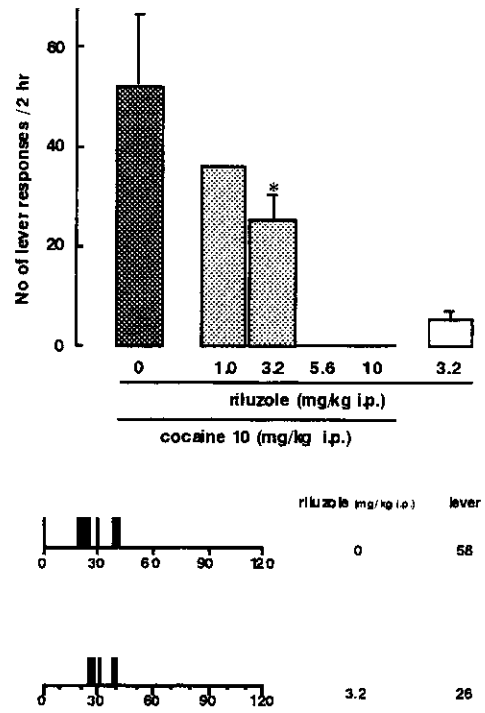


Fig. 8 Effect of riluzole on reinstatement of cocaine - seeking behavior

* $p < 0.05$ vs vehicle, Mann-Whitney's U-test

D. 考察

0.25 mg / infusion の単位用量による cocaine の自己投与行動に対して、adenosine A1 受容体作動薬 CHA は用量依存的にその自己投与回数を減少させた。この作用は、A1 受容体の選択的拮抗薬である DPCPX によって有意に拮抗されたことから、A1 受容体刺激によって起こることが確認された。さらにこの減少は、レバー押し間隔の延長に基因することが、自己投与パターンの解析によって明らかとなった。このレバー押し間隔の延長は cocaine の単位用量の増加に伴う変化と類似していることから、CHA は cocaine の強化効果を増強した可能性が考えられる。しかし、CHA は cocaine 自己投与行動の単位用量応答曲線を左方にシフトさせず単に下方にシフトさせただけであった。in vitro の検討によって、dopamine は D1 受容体を介して、ラット側坐核スライスの中型有棘細胞に入力するグルタミン酸神経からのグルタミン酸遊離を抑制することが報告されている⁽⁶⁾。さらにこの作用は、同神経細胞における NMDA 受容体の活性化と、それに伴う adenosine の放出を介しており、この放出された adenosine が逆行性にグルタミン酸神経終末に存在する A1

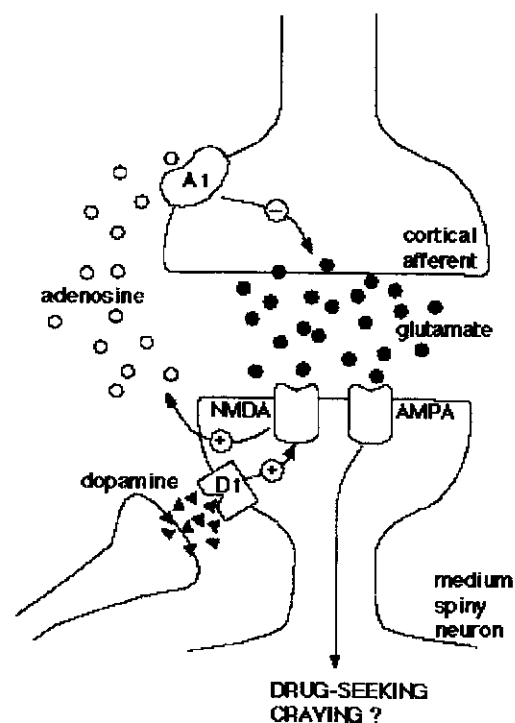
受容体に作用することによって、最終的にグルタミン酸遊離を抑制する⁽⁴⁾。一方で、選択的な D1 アゴニストも cocaine 自己投与行動の単位用量応答曲線を下方シフトさせる⁽¹⁾事実から、今回明らかとなったCHA による自己投与回数の減少は D1 受容体作動薬による作用と同様に、側坐核に入力するグルタミン酸遊離の阻害に基づく可能性がある。言い換えれば、D1 受容体作動薬による cocaine 自己投与行動の抑制作用は、側坐核における A1 受容体のグルタミン酸遊離阻害作用に収束することが示唆される。in vivo において cocaine 自己投与実験中における側坐核ニューロンの発火頻度は cocaine 注入直後に抑制され、それが回復して一定のレベルに達したときに次のレバー押し行動が生じる⁽⁸⁾。側坐核ニューロンの発火は、専ら前頭皮質、海馬、扁桃体および視床からのグルタミン酸入力に依っている。これらを考え併せると、cocaine 注入直後に見られた発火頻度の抑制は、D1 受容体から A1 受容体を経由したグルタミン酸入力の阻害の結果であることが推察される。グルタミン酸入力のそうした阻害作用からの回復が、cocaine を求めての次のレバー押しを惹起させると仮定すれば、cocaine に対する欲求の本質は、側坐核ニューロンにおいてグルタミン酸入力が回復する過程そのものであると言える。従って、A1 受容体作動薬あるいは D1 受容体作動薬の cocaine 自己投与行動を抑制する作用は、これらの薬物がこのグルタミン酸入力の回復を遅らせたことに起因するかも知れない。本研究において得られたCHA によるレバー押し間隔の延長は、まさしくこの仮定を裏付けるものと考えられる。

安定した cocaine 自己投与行動を獲得したラットに、cocaine 自己投与の最終セッションから 24 時間後に生理食塩水に置換したセッションでは爆発的なレバー押し行動が出現した。Cocaine 投与によって惹起される cocaine 探索行動の再燃は、adenosine A1 受容体作動薬 CHA の餌ペレットを強化子としたレバー押し行動には全く影響を与えない用量である 0.032 mg / kg の前投与によって減少する傾向にあった。この事から、CHA によるレバー押し行動の減少は運動抑制などの非特異的な作用に基づくものではなく、cocaine に対する渴望の再燃を抑制した可能性が示唆された。このCHA の作用は、レバー押し行動そのものに影響を与えないグルタミン酸遊離阻害薬 riluzole の、3.2 mg / kg 投与で cocaine 探索行動の再燃

が有意に抑制された。従って CHA による cocaine 誘発探索行動の抑制は、そのグルタミン酸遊離阻害作用に基づくことが明らかとなった。

近年、側坐核への AMPA 注入が cocaine の探索行動を再燃させること⁽²⁾、また、cocaine 投与によって惹起される cocaine 探索行動の再燃は dopamine 受容体拮抗薬では抑制されず、AMPA 受容体拮抗薬 CNQX の側坐核内注入で抑制されること⁽³⁾が報告された。これらの報告は本研究の結果と併せて、cocaine 探索行動の再燃には側坐核内のグルタミン酸伝達の亢進が必要であることを強く示唆するものである。さらに、dopamine D1 受容体の選択的なアゴニストは、cocaine 投与による cocaine 探索行動の再燃を抑制する^(9, 10)が、この作用も adenosine A1 受容体を介したものである可能性が高いと考えられる。

以上、自己投与実験法を用いての cocaine 探索行動モデルは、cocaine に対する渴望の発現に関与する神経機構の解明と同時に、薬物への渴望を抑制する依存症治療薬の開発に寄与することが示唆される。



E. 参考文献

- (1) Caine SB, Negus SS, Mello NK, Bergman J, "Effects of dopamine D(1-like) and D(2-like) agonists in rats that self-administer cocaine."