

- J Pharmacol Exp Ther , 291(1) : 353-60, 1999
- (2) Cornish JL, Duffy P, Kalivas PW, "A role for nucleus accumbens glutamate transmission in the relapse to cocaine-seeking behavior." Neuroscience , 93(4):1359-67, 1999
- (3) Cornish JL, Kalivas PW, "Glutamate Transmission in the Nucleus Accumbens Mediates Relapse in Cocaine Addiction." J Neurosci (Online) , 20(15) : RC89, 2000
- (4) Harvey J, Lacey MG, "A postsynaptic interaction between dopamine D1 and NMDA receptors promotes presynaptic inhibition in the rat nucleus accumbens via adenosine release." J Neurosci , 17(14) : 5271-80, 1997
- (5) Jaffe JH, Cascella NG, Kumor KM, Sherer MA, "Cocaine-induced cocaine craving." Psychopharmacology (Berl) 97(1):59-64 , 1989
- (6) Nicola SM, Kambian SB, Malenka RC, "Psychostimulants depress excitatory synaptic transmission in the nucleus accumbens via presynaptic D1-like dopamine receptors." J Neurosci , 16(5) : 1591-604, 1996
- (7) O'Brien CP, Childress AR, McLellan T, Ehrman R, "Integrating systemic cue exposure with standard treatment in recovering drug dependent patients." Addict Behav 15(4):355-65, 1990
- (8) Peoples LL, Uzwiak AJ, Guyette FX, West MO, "Tonic inhibition of single nucleus accumbens neurons in the rat: a predominant but not exclusive firing pattern induced by cocaine self-administration sessions." Neuroscience , 86(1):13-22 , 1998
- (9) Self DW, Barnhart WJ, Lehman DA, Nestler EJ, "Opposite modulation of cocaine-seeking behavior by D1- and D2-like dopamine receptor agonists." Science , 271(5255):1586-9 , 1996
- (10) Self DW, Karanian DA, Spencer JJ, "Effects of the novel D1 dopamine receptor agonist ABT-431 on cocaine self-administration and reinstatement." Ann N Y Acad Sci , 909 :133-44, 2000
- (11) Sinha R, Catapano D, O'Malley S, "Stress-induced craving and stress response in cocaine dependent individuals." Psychopharmacology (Berl) 142(4):343-51, 1999

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)  
分担研究報告書

分担研究課題名：メタンフェタミン逆耐性動物モデルにおけるメタンフェタミン体内動態の解析－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

共同研究者：高木 健三、柴田 英治、高木 健次、北市 清幸

名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻

研究要旨

これまでに我々は規制薬物の薬物依存形成と薬物体内動態の関係を明らかにすることを目的としてメタンフェタミン(MAP)逆耐性動物を用いて様々な検討を行ってきた。そしてMAP逆耐性動物ではMAPの血中濃度・時間推移および脳組織間隙内濃度・時間推移が健常動物に比して有意に高値を示すことを明らかにしてきた。今回はMAP逆耐性動物におけるMAP体内動態の変化の詳細を明らかにするために、MAP逆耐性群における薬物輸送担体、特に有機カチオントランスポーターの機能変化に着目してさらなる検討を加えた。

MAP(6 mg/kg)を1日1回5日間投与した後21日間休薬したラット(MAP逆耐性群)あるいは生理食塩水を1日1回5日間投与した後21日間休薬したラット(コントロール群)にMAP(834 µg/hr/kg)を静脈内に持続的に注入することにより得られる定常状態におけるMAP血漿中濃度を比較検討した結果、MAP逆耐性群におけるMAP血漿中濃度はコントロール群に比して有意に高値を示した。したがって、昨年度に我々が示したように、MAP逆耐性群におけるMAP全身クリアランスの有意な減少やMAP組織移行性の有意な低下がMAP逆耐性群の血中濃度上昇に寄与していることが考えられた。

一方、健常ラットにおけるMAP腎排泄クリアランスは糸球体濾過速度に比してはるかに大きく、MAPは尿中に能動的に輸送・分泌されていることが示唆されたが、MAP逆耐性群ではこの腎排泄クリアランスが有意に低下しており、MAPの尿中への排泄低下が、MAP血中濃度上昇に関与している可能性が示唆された。

MAP逆耐性群で観察されたMAP血漿中濃度の上昇とMAP尿中排泄の低下は典型的なカチオン性薬物テトラエチルアンモニウム(TEA)の併用によって健常動物においても観察された。この結果はMAP逆耐性群では有機カチオントランスポーター(OCTs)の発現が低下していることを示唆している。そこでOCTsの発現が変化しているか否かについて、RT-PCR法にて検討を行った。その結果、MAP逆耐性群では腎臓において有機カチオン性薬物の尿中排泄に最も重要な役割を果たしていると考えられているOCT3 mRNAの発現が低下していることが明らかになった。また、OCT3 mRNAの発現の低下は脳および肺でも生じていることが明らかになった。以上の結果より、MAP逆耐性群におけるMAP体内動態の変化にはOCTs、特にOCT3、の発現の低下によるMAP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が示唆された。

## A. 研究目的

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

これまでに我々はMAPを連続投与した後、休薬して作成したMAP逆耐性動物では血漿中および脳組織間隙中のMAP濃度が上昇することを明らかにしてきた<sup>7)</sup>。すなわち、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血漿中MAP濃度の上昇とMAP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可能性があることを示唆してきた。

この結果は、MAPを連続投与したマウスではいくつかの脳部位でMAPの集積性が増大するというMizugakiらの報告<sup>8,9)</sup>を支持している。しかしながら、このようなMAP体内動態の変化がどのようにして起きたのかについての詳細は未だに明らかではない。

そこで本研究では、MAP逆耐性モデルラットにおけるMAP体内動態および脳移行の変化の機序を明らかにすると共に、薬物輸送担体の機能および発現の変化について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

塩酸メタンフェタミン(MAP)は大日本製薬製、 $\beta$ -フェニルエチルアミン(PEA)、テトラエチルアンモニウム(TEA)、カルニチン(CAR)はSigma社製、ダンシルクロライド(DNS)はMerck社製をそれぞれ使用した。その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

### 2. 動物

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

### 3. MAP逆耐性動物モデルの作成

MAP逆耐性動物モデルの作成はUjikeらの方法<sup>11)</sup>を一部改変して行った。すなわち、ラットにMAP(6mg/kg)を1日1回5日間、腹腔内に連続投与した後、21日間休薬してMAP逆耐性群を作成した。対照には生理食塩水を1日1回5日間投与した後、休薬した動物をコントロール群として使用した。なお、原法での休薬期間は7日間であるが、MAPの体内残存の影響をできるだけ排除するため3倍の21日の休薬期間を設定した。なお、今回、行動学的評価のデータは示さないが、MAP逆耐性群ではコントロール群に比してMAP(1または5mg/kg)静脈内投与によって誘発される常同行動および過行動が増強され、逆耐性が形成されていることを確認している。

### 3. 手術

MAP注入および血液採取のための静脈へのカニューレションおよび脳組織内薬物濃度測定のためのダイアリスプローブの埋め込みはすべてペントバルビタール(50mg/kg)麻酔下で行った。すなわち、右頸静脈内にはポリエチレンチューブを<sup>6)</sup>、線条体(AP+0.2mm DV-4.5mm)<sup>10)</sup>にはKitaichiらの方法<sup>4)</sup>に基づき、線条体を水平に横切る形でダイアリスプローブ(AN69ホローファイバー)を各側3mmずつ組織を灌流するように埋め込んだ。実

験当日に動物はペントバルビタール麻酔下で MAP 持続注入および尿採取のために右大腿静脈および膀胱にカニューレーションを施した。

#### 4. 採血およびマイクロダイアリシス

MAP 血中濃度を定常状態に維持するために、MAP (1 mg/kg) を急速静注した後、MAP (834 µg/hr/kg) を流速 2 ml/hr で右大腿静脈より持続的に注入した。マイクロダイアリシスプローブには 5 µl/min の流速でリンゲル液を還流し、実験終了まで脳透析を行った<sup>11)</sup>。実験ではまず、MAP 持続注入開始 1 時間後より 20 分間隔で 3 回、尿および脳透析液を採取すると共に、尿の採取時間の中間で採血を行った。さらに、持続注入開始 2 時間後からは TEA (15.1~151 mg/hr/kg) あるいは CAR (264 mg/hr/kg) を MAP と共に持続注入し、TEA あるいは CAR 投与 30 分後より再び 20 分間隔で 2~3 回、尿および脳透析液採取と採血を行った。

尿、脳透析液および血液を遠心して得た血漿はすべて -30℃ で保存し、測定に供した。なお、脳内プローブの位置は標準的な組織学的手法を用いてその部位を確認した。

#### 5. MAP 測定<sup>5)</sup>

血漿はその 50 µl を取り、飽和食塩溶液 50 µl、5% NaOH 溶液 10 µl、内部標準物質 β-フェニルエチルアミン (0.5 µg/ml, PEA) 含有アセトニトリル溶液 350 µl と激しく混和し、除蛋白および MAP の抽出を行った。遠心して蛋白を沈殿させた後、アセトニトリル層 300 µl を分取し、窒素ガスにて蒸発乾固させた。乾固したサンプルに 10 mM 炭酸ナトリウム緩衝液

(pH 9.0) 100 µl、1 mM ダンシルクロライド (DNS) 含有アセトニトリル溶液 100 µl を加え、遮光下で 45℃、1 時間反応させた。反応後、サンプルは直ちに氷冷し、HPLC による MAP 定量に供した。

一方、希釈した尿サンプル 50 µl あるいはマイクロダイアリシスによって採取したリンゲル液全量は、PEA (0.5 µg/ml) 含有アセトニトリル溶液 350 µl と混和し窒素ガスにて蒸発乾固させた。乾固したサンプルは血漿サンプルと同様に 10 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) 100 µl、1 mM DNS 含有アセトニトリル溶液 100 µl を加え、遮光下で 45℃、1 時間反応させ、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ゲ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 1 mM イミダゾール含有アセトニトリル-水 (66:33) 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<sup>3)</sup>。

#### 6. RT-PCR 法による OCTs mRNA の定量

ラットは麻酔下で脱血し、直ちに臓器を取り出した。取り出した臓器は早やかにドライアイス上で凍結させ、RT-PCR 法による OCTs mRNA の定量に供した。

凍結した組織サンプルは TRIzol™ 試薬により常法に従い、mRNA を抽出した。さらに抽出した mRNA は reverse-transcriptase (Superscript Preamplification System™) によって cDNA に変換した。得られた cDNA は表 1

に示すプライマーと Taq DNA polymerase™を用いてPCR反応を行い、増幅させた。対照となる遺伝子の発現はβ-アクチンを内部標準遺伝子としてその発現を相対評価した。

表1 今回使用したプライマー

β-actin (PCR産物の分子量: 456 bp):

Forward

5' TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGC 3'

Reverse

5' CTCATAGCTCTTCTCCAGGGAGGA 3'

OCT1 (989 bp)<sup>1)</sup>:

Forward

5' CCTGGGCTCCCTGGTTGTGGGTTA 3'

Reverse

5' AATGAGGGGCAGGGCTTGCCAAA 3'

OCT2 (795 bp)<sup>2)</sup>:

Forward

5' CCGCTATCCCTGGGCTGTGTCAAA 3'

Reverse

5' TGGCCCACAGCTCCCTTGGGTATT 3'

OCT3 (851 bp)<sup>13)</sup>:

Forward

5' CCACCATCGTCAGCCAGTTT 3'

Reverse

5' ACACGACACCCCTGCCACTA 3'

### 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 (834 μg/hr/kg)を持続注入し、MAP血中濃度を定常状態にした後、それぞれの血漿中濃度を測定した。Fig. 1Aに示すようにMAP逆耐性群では定常状態におけるMAP血漿中濃度はコントロール群に比して有意に高値を示した(コントロール群: 156±4 ng/ml; MAP逆耐性群: 200±10 ng/ml, p < 0.01)。

MAP腎排泄クリアランス(CLR)はFig. 1Bに示すとおりであり、コントロール群(2.1±0.2 L/hr/kg)に比してMAP逆耐性群

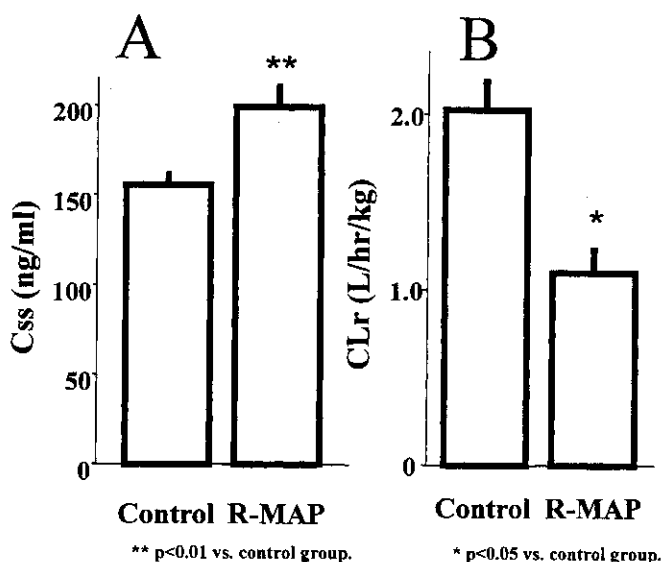


Fig. 1 コントロール群(control)とMAP逆耐性群(R-MAP)におけるMAP(834 μg/hr/kg)静脈注入時の(A)血漿中MAP濃度および(B)腎排泄クリアランス

\* p<0.05, \*\* p<0.01 vs. corresponding control group.

のCLRは有意に低値を示した(1.1±0.1 L/hr/kg, p < 0.05)。

Fig. 2はMAPの定常状態における血漿中濃度および腎排泄クリアランスに及ぼすTEAおよびCARの影響を示している。MAP血漿中濃度はTEAの併用により用量依存的に上昇したが、CARはこれに何ら影響を与えなかった(Fig. 2A)。また、TEAは用量依存的にMAP腎排泄クリアランスを低下させたが、CARはこれに影響を与えなかった(Fig. 2B)。

次に、我々はMAP逆耐性群においてOCTsの発現が変化しているか否かについてをRT-PCR法によって検討した。その結果、腎ではOCT1~OCT3のうち、OCT3 mRNAの発現が低下していることが明らかになった(Fig. 3)。また、MAP逆耐性群では心臓のOCTs mRNAの発現に変化は認められなかったが、脳および肺に

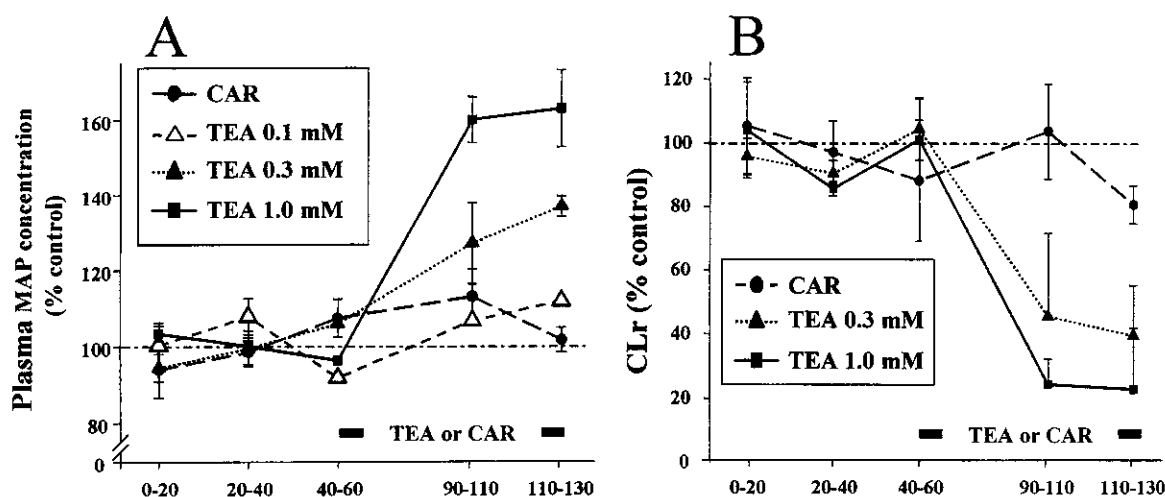


Fig. 2 MAP(834  $\mu\text{g/hr/kg}$ )静脈注入時の(A)血漿中MAP濃度および(B)腎排泄クリアランスに及ぼすTEAおよびCARの影響

においては OCT3 mRNA の発現が低下していることが明らかになった(Fig. 3)。なお、腎、脳、肺における OCT3 mRNA の発現低下は MAP 逆耐性形成 4 ヶ月後においても十分に維持されていることが明らかになった(Fig. 3)。

#### D. 考察

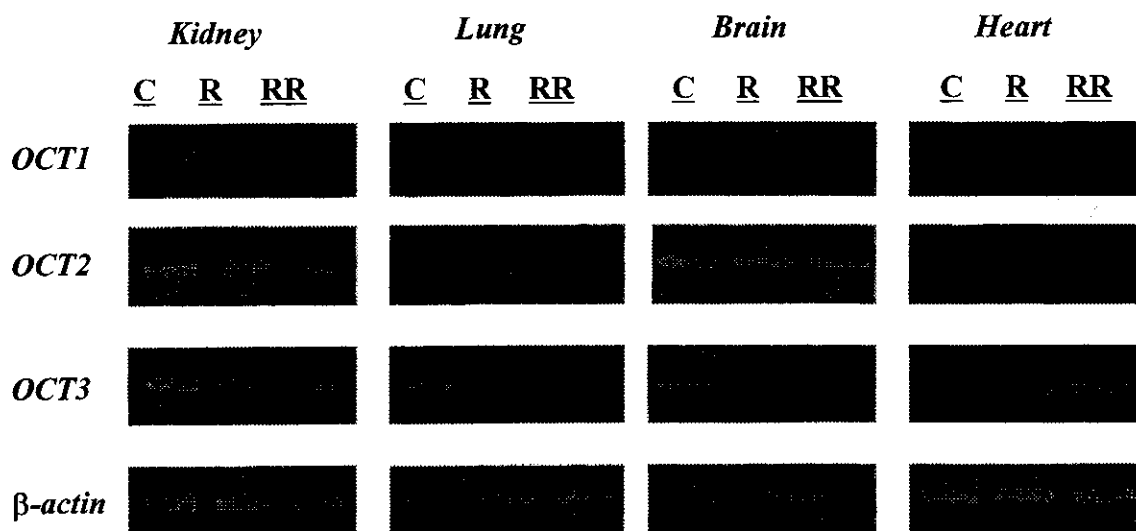
今回、我々は MAP 逆耐性群における MAP 体内動態および脳移行性の変化を詳細に検討するために、MAP を静脈内に持続注入して得られる各種薬物動態学的パラメーターについて解析を行った。

その結果、MAP 持続注入後、定常状態に達した MAP 血漿中濃度は MAP 逆耐性群ではコントロール群に比して有意に高値に維持されていることが明らかになった。この結果は我々が先に報告した MAP (5mg/kg) 投与時の MAP 逆耐性群における MAP 全身クリアランスの有意な減少や MAP 組織移行性の有意な低下を反映しており、本モデルが MAP 逆耐性群の MAP 体内動態の解析に有用であることを

示唆している。

今回、我々は尿を採取し、コントロール群および MAP 逆耐性群の MAP 腎排泄能を比較検討した。非常に興味深いことに CLr はコントロール群では  $2.1 \pm 0.2$  L/hr/kg と糸球体濾過速度よりもはるかに大きく、MAP は尿中へ薬物輸送担体を介して能動的に分泌されている可能性が示唆された。さらに、MAP 腎排泄能の CLr はコントロール群に比して有意に低下していた。以上の結果より、MAP 逆耐性群における MAP 尿中排泄の低下が、MAP 血中濃度上昇に一部関与している可能性が示唆された。

MAP は有機カチオン性薬物であり、in vitro 実験においてはすでに有機カチオントランスポーターによって輸送されることが報告されている<sup>13,14)</sup>。現在までに有機カチオントランスポーターには2つのサブファミリー(OCTsとOCTNs)とそれに属する5つのトランスポーター(OCT1~3, OCTN1~2)がクローニングされている。そこで MAP 血漿中濃度の調節にいずれのサブファミリーが関与しているかを知る目的で



**Fig. 3 MAP逆耐性群におけるOCTs mRNAの発現量の変化**

mRNA発現はRT-PCR法によって解析した。C: control; R: repeated MAP with 3 weeks-withdrawal; RR: repeated MAP with 4 months-withdrawal.

OCTs に親和性の高い薬物であるテトラエチルアンモニウム(TEA)および OCTNs に親和性の高い薬物であるカルニチン(CAR)を選択し、それぞれの薬物の MAP 血中濃度および CLr に及ぼす影響を比較検討した。その結果、TEA が用量依存的に定常状態における MAP の血漿中濃度を上昇させると共に、MAP の腎排泄クリアランスを低下させることが明らかになった。一方、CAR ではこれらいずれにも影響を与えなかった。したがって、MAP の血漿中濃度および腎排泄には OCTs が重要な役割を果たしており、MAP 逆耐性群では OCTs の発現低下が起きている可能性が示唆された。

そこで次に、我々は MAP 逆耐性群において OCTs mRNA の発現が変化しているか否かについて、RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、MAP 逆耐性群では腎において OCT3 mRNA の発現が低下していることが明らかになった。OCT3 は近位尿細管に局在しており、OCTs の中でも有機カチオン性薬物の尿中への分泌・排泄

に最も重要な役割を果たしていると考えられている<sup>15)</sup>。かくて、MAP 逆耐性群における OCT3 の発現低下が MAP 腎排泄の低下に重要な役割を果たしていることが示唆された。

先に我々は、MAP の組織集積性は腎臓が最も高く、ついで肺 > 肝臓 > 脳 ≧ 心臓 > 筋肉であること、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ることを報告している<sup>7)</sup>。そこで肺、心臓、脳についても OCTs mRNA の発現が変化しているか否かについて検討を行った。その結果、心臓では OCTs mRNA の発現に変化が認められなかったが、脳および肺では腎と同様に OCT3 mRNA の発現が低下していることが明らかになった。したがって、MAP 逆耐性群における MAP 組織集積性の変化にも OCTs、特に OCT3、の発現の変化が関与している可能性が示唆された。

なお、これら臓器における OCT3 mRNA の発現低下は MAP 逆耐性形成から 4 ヶ月を経ても観察された。したがって、MAP

逆耐性現象で観察される神経機能の不可逆的変化と同様に OCT3 の発現低下もまた長期かつ不可逆的に生じている可能性が示唆された。

我々は先に MAP は脳組織中および脳組織間隙内ではいずれも血漿中濃度より高値を示すことを報告している<sup>7)</sup>。また、MAP 逆耐性群では血漿中 MAP 濃度の上昇に比例して脳組織間隙内 MAP 濃度 / 血漿中 MAP 濃度比がコントロール群に比して高くなることから、血液脳関門 (BBB) で何らかの機能変化が生じていることが推察される。今回、我々は脳において OCT3 mRNA の発現が、腎や肺と同様に、低下していることを見出した。OCT3 は脳では神経細胞には局在せず、血管内皮細胞あるいはグリア細胞に局在することが報告されている<sup>13)</sup>。以上の結果を考えると、OCT3 は BBB において脳組織間隙から血管内への有機カチオン輸送担体として機能しており、MAP 逆耐性群では OCT3 の発現が低下することにより、MAP の脳内からの排出が遅延している可能性が示唆された。

OCT3 は末梢組織においては主に血管内皮細胞に局在しており、有機カチオンの組織移行に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、OCT3 の輸送方向がどちらであるのか (組織→血管内、血管内→組織) については明らかでない。今回、我々は MAP 組織集積性が他の臓器に比して高い肺において MAP 逆耐性群では MAP 組織集積性が低下すると共に OCT3 mRNA の発現が低下していることを見出した。したがって、少なくとも一部の臓器では OCT3 が血管内から組織への有機カチオンの輸送に重要な役割を果たしているように思われる。今後、さらに

この点についてはさらに詳細な検討を行う予定である。

今回、我々は MAP 逆耐性群で OCT3 mRNA の発現が低下していることを見出した。OCT3 はステロイドホルモンの共存によってその輸送担体としての機能が減弱することがすでに報告されている<sup>13)</sup>。一般に MAP 逆耐性現象下では血漿中コルチコステロン濃度が上昇することを考え合わせると<sup>12)</sup>、ステロイドホルモン量の上昇が OCT3 の発現を変化させ、MAP 体内動態の変化に関与している可能性が考えられた。さらに、OCT3 は TEA の他にも様々な有機カチオンを基質としており、内因性物質としてはドパミンおよびセロトニンを含むモノアミン、NMNA、ニコチン、薬物としては抗うつ薬 desipramine、抗精神病薬 clonidine、潰瘍治療薬 cimetidine などを基質とする<sup>3)</sup>。なかでもドパミンおよびセロトニンを基質とする点は非常に興味深く、MAP 逆耐性現象で観察される再燃現象や幻覚や妄想を伴う MAP 精神病の増悪には OCT3 発現低下によるドパミンおよびセロトニンの脳内からの消失遅延が一部関与している可能性がある。この点についてもまた今後さらに検討を加える必要がある。

## F. 結論

本実験において

- 1) MAP 逆耐性モデルラットでは、MAP (834  $\mu\text{g/hr/kg}$ ) を静脈内に持続的に注入することによって得た MAP の定常状態における血漿中濃度がコントロール群に比して有意に高値を示すこと、
- 2) MAP 逆耐性モデルラットでは、MAP 腎排泄クリアランスがコントロール群に



- 比して有意に低下していること、
- 3) カチオン性薬物 TEA の併用によって健常動物においても MAP 血漿中濃度の上昇と MAP 尿中排泄の低下が引き起こされること、
  - 4) MAP 逆耐性群では腎臓において有機カチオン性薬物の尿中排泄に最も重要な役割を果たしていると考えられている OCT3 mRNA の発現が低下していること、
  - 5) MAP 逆耐性群では OCT3 mRNA の発現の低下が脳および肺でも生じていること、
  - 6) これら OCT3 mRNA の発現低下は MAP 逆耐性形成から 4 ヶ月を経ても観察されること、
- が明らかになった。

MAP 逆耐性現象における OCTs 発現変化のメカニズムをさらに検討し、薬物依存治療の一助とすることを試みるのが今後の課題となった。

#### [参考文献]

- 1) Grundemann D., Koster S., Kiefer N.: Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2. *J. Biol. Chem.*, 273: 30915-30920. 1998.
- 2) Grundemann D., Babin-Ebell J., Martel F.: Primary structure and functional expression of the apical organic cation transporter from kidney epithelial LLC-PK1 cells. *J. Biol. Chem.*, 272: 10408-10413, 1997
- 3) Kekuda R., Prasad P.D., Wu X.: Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J. Biol. Chem.*, 273: 15971-15979.
- 4) Kitaichi K., Hori T., Srivastava L. K.: Antisense oligodeoxynucleotides against the muscarinic m<sub>2</sub>, but not m<sub>4</sub>, receptor supports its role as autoreceptors in the rat hippocampus. *Mol. Brain Res.*, 67: 98-106, 1999.
- 5) 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, 1999
- 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) 北市清幸, 高木健次, 柴田英治: メタンフェタミン逆耐性ラットにおけるメタンフェタミン体内動態および脳内移行の変化. 第30回日本神経精神薬理学会年会 (発表要旨集 p.100), 2000
- 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 [<sup>11</sup>C]methamphetamine in methamphetamine sensitized dog. *Nucl. Med. Biol.*, 22: 803-807, 1995.
- 10) Paxinos G., Watson D.: The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, New York, 1987.

- 11) Ujike H., Tsuchida H., Kanzaki A:  
Competitive and non-competitive  
N-methyl-D-aspartate antagonists fail to  
prevent the induction of  
methamphetamine-induced sensitization.  
Life Sci., 50: 1673-1681, 1992.
- 12) 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.
- 13) Wu X., Kekuda R., Huang W.: Identity  
of the organic cation transporter OCT3  
as the extraneuronal monoamine  
transporter (uptake2) and evidence for  
the expression of the transporter in the  
brain. J. Biol. Chem., 273: 32776-32786,  
1998.
- 14) Wu X., Huang W., Prasad P.D.:  
Functional characteristics and tissue  
distribution pattern of organic cation  
transporter 2 (OCTN2), an organic  
cation/carnitine transporter. J.  
Pharmacol. Exp. Ther., 1290: 1482-1492,  
1999.
- 15) Wu X., Huang W., Ganapathy M.E.:  
Structure, function, and regional  
distribution of the organic cation  
transporter OCT3 in the kidney. Am J  
Physiol. Renal. Physiol., 279: F449-458,  
2000.

## 厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

### 分担研究報告書

分担研究課題：メタアンフェタミン反復投与後における腹側被蓋野一側坐核ドーパミン系ニューロンの機能変化に関する電気生理学的研究

分担研究者 笹 征史

共同研究者 天野 託、松林 弘明

広島大学医学部薬理学教室

### 研究要旨

メタアンフェタミン(MAP)を5日間反復投与した場合、側坐核ニューロンはマイクロイオントホレーシス法により投与したドーパミン及びMAPに対し、最終投与後5日後においては過感受性を示すことを報告してきた。今回は同様のMAPの反復投与により、過感受性のメカニズムを明らかにするために、スライス標本を用い側坐核ニューロンにおける、ドーパミンおよびMAPに対する感受性の変化を、IR-DICを用いたホールセルパッチクランプ法により検討した。MAP(1mg/kg/日、i.p.：MAP投与群)あるいは生理的食塩水(生食投与群)を、生後5週目の雄性Wistarラットに5日間反復投与し、最終投与より5日後において側坐核ニューロンに対するドーパミンおよびMAPの作用を検討した。また、実験終了後、電極内に採取した細胞質からのmRNAをRT-PCRにより増幅し、ドーパミン受容体サブタイプに変化があるか否かを検討した。(1)電流固定下に、ドーパミンおよびMAPを投与した場合には生食投与群よりもMAP投与群において大きな過分極が認められた。(2)側坐核ニューロンにはD1およびD2LレセプターのmRNAが存在したが、生食投与群およびMAP投与群ではドーパミンレセプターのmRNA分画には変化は認められなかった。以上の成績から、MAP反復投与により、側坐核ニューロンにおいてドーパミンおよびMAPに感受性亢進が起ると考えられる。しかし、側坐核ニューロンのドーパミンレセプターサブタイプの分画には変化はなく、おそらくレセプターの量の変化により機能が亢進していると考えられる。

### A. 研究目的

MAPを連用した場合、次第に神経細胞のMAPに対する感受性が亢進し容易に精神病様症状が発現する逆耐性現象が起こる事が知られている<sup>3,4,5)</sup>。我々はこれまでこの逆耐性現象についてニューロンレベルでの変化を明らかにするために主として電気生理学的研究を行ってきた。すなわち、*in vivo*の実験においてMAPを5日間反復投与した場合、側坐核ニューロンは、マイクロイオントホレーシス法により投与したドーパミン及びMAPに対し、最終投与後24~30時間後においては低感受性を、最終投与後5日後にお

いては過感受性を、10日後には生理的食塩水投与群の動物におけると同程度の感受性を示すことを報告した<sup>1)</sup>。さらに、スライスパッチクランプ法を用いた研究において、新生児ラットに対する同様の処置をした場合、MAP投与中止5日後において、腹側被蓋野ドーパミンニューロンのD1およびD2レセプターは感受性亢進が起こっていることを報告した<sup>2)</sup>。今回さらに、MAPの同様の処置により側坐核ニューロンにおけるドーパミンおよびMAPに感受性の変化が*in vivo*実験のように起こるか否かを明らかにするために、スライス標本を用い、パッチクランプ

法により検討を行った。また、実験終了後の単一神経細胞より、mRNAを採取しRT-PCR法を用いてドーパミンレセプターサブタイプの変化をMAP投与群と生食群とについて比較検討した。

## B. 研究方法

5週齢の雄性WistarラットにMAP(1mg/kg/日、i.p. : MAP投与群)を連続5日間投与した。コントロール群として同用量の生理的食塩水(生食投与群)を同様に投与した。

### B-1. パッチクランプ記録

最終投与より5日後に断頭し、氷冷下に側坐核を含む厚さ500 $\mu$ mのスライス標本を作成し、人工脳脊髄液(イオン組成(mM) : NaCl, 113; KCl, 3; NaHCO<sub>3</sub>, 25; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; glucose, 11; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 1; pH 7.4)にて灌流している小水槽内(容量 : 1ml; 35 $^{\circ}$ C)に1時間保持後に実験に供した。パッチ電極(イオン組成(mM) : K-gluconate, 130; KCl, 10; NaCl, 9; CaCl<sub>2</sub>, 1; MgCl<sub>2</sub>, 2; HEPES, 10; EGTA, 10; pH 7.3)を用い、赤外線カメラ(IR-DIC)を用い側坐核ニューロンを観察下に、室温にてホールセル記録を行った。薬物は3 ml /

min速度で灌流している液中に投与した。

### B-2. RT-PCR法によるmRNAの測定

実験終了後、パッチ電極内に陰圧をかけ細胞質を電極内に吸い込み、回収した細胞質をPCRチューブに移した後、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM dNTP、20 units RNase inhibitor、2.5  $\mu$ M random hexamer、50 units MuLV reverse transcriptase (PE Biosystems) を含んだ逆転写反応液を加え全容量20  $\mu$ lで、42 $^{\circ}$ C 50分間逆転写反応を行った。逆転写反応終了後、反応液2  $\mu$ lに、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTP、0.2  $\mu$ M 1st PCR用上流および下流の特異的primers、2.5 units AmpliTaq Gold DNA polymerase (PE Biosystems) を加え全容量100  $\mu$ lとして、次の条件でPCRを行った。95 $^{\circ}$ Cにて10分間、次いで95 $^{\circ}$ Cにて30秒間、各アニーリング温度にて30秒間、さらに72 $^{\circ}$ Cで1分間の条件にて、45サイクルにて1st PCRを行った。その後1st PCR反応液2  $\mu$ lに、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.2mM dNTP、0.2  $\mu$ M 2nd PCR用上流および下流の特異的primers、2.5 units Gold Taq DNA polymeraseを加え全容量100  $\mu$ lとし、1st PCRと同様の条件下で2nd PCRを行った。2nd PCR反応液10  $\mu$ lを1% agarose電気泳動で、また、0.25  $\mu$ lを4%

Table 1. 側坐核ニューロンの電気生理学的特性

		生食群	MAP投与群
静止膜電位 (RMP)	mV	-62.2 $\pm$ 3.8	-65.2 $\pm$ 3.0
diameter	$\mu$ m	30.9 $\pm$ 1.7	32.5 $\pm$ 1.2
capacitance	pF	40.8 $\pm$ 4.1	40.0 $\pm$ 3.3
series resistance	M $\Omega$	31.6 $\pm$ 3.4	30.2 $\pm$ 3.7
Input resistance	M $\Omega$	197.5 $\pm$ 14.3	198.2 $\pm$ 20.9

Values are mean  $\pm$  s.e.; numbers of neurons in MAP-and PS-treated animals are 6 and 13, respectively.

MAP: methamphetamine, PS: physiological saline.

polyacrylamide電気泳動で分析し、各々、ethidium bromide染色あるいはBAS2000 Bioimaging analyzer (Fujix) で検出解析した。

### C. 研究結果

#### C-1. 側坐核ニューロンについてのパッチクランプ記録

側坐核ニューロンは生食群とMAP投与群では、静止膜電位 (RMP)、大きさ (diameter)、膜容量 (capacitance) およびinput resistanceには変化がなかった (Table1)。

静止膜電位はMAP投与群および生食群においてそれぞれ、 $-65.2 \pm 3.0$  および  $-62.2 \pm 3.8$  mV (n=6) であった。電流固定下のドーパミンニューロンは生食投与群およびMAP投与群の両群においてドーパミン  $100 \mu$  M および MAP  $100 \mu$  M の投与に

よって、過分極が認められた (Fig.1)。ドーパミンによる過分極は生食群において  $4.3 \pm 0.6$  mV であったが、MAP投与群では  $7.8 \pm 0.4$  mV であり、MAP投与群において有意に増大していた。MAPを投与した場合においても過分極は生食群において  $2.6 \pm 0.5$  mV、MAP投与群において  $7.0 \pm 0.3$  mV であり、MAP投与群で有意に増大していた。

C-2. ドーパミンレセプターサブタイプmRNA  
実験終了後の電極内に得たmRNAをRT-PCRにより増幅した結果、側坐核にはD1およびD2Lレセプターが認められた。しかし、生食群とMAP投与群とにおいてドーパミンレセプターサブタイプの分画には変化は認められなかった (Fig.2)。

A. physiological saline -treated animal  
dopamine  $100 \mu$ M



B. methamphetamine-treated animal  
dopamine  $100 \mu$ M



C. physiological saline -treated animal  
methamphetamine  $100 \mu$ M



D. methamphetamine-treated animal  
methamphetamine  $100 \mu$ M

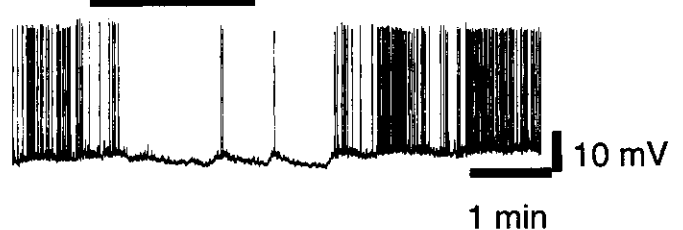


Fig.1 Effects of dopamine and methamphetamine on the membrane potentials of nucleus accumbens neurons in saline (A,C)- and MAP (B,D)- treated groups under the current clamp condition.

#### D. 考察

in vivoの実験においては、MAPを反復投与した場合、休薬24~30時間後において側坐核ニューロンはマイクロイオントフォレーシス法により投与したドーパミン及びMAPに対して低感受性がみとめられ、休薬5日後には過感受性が亢進すると事を報告した<sup>1)</sup>。今回は、過感受性が確立された休薬5日後の動物における、過感受性のメカニズムを明らかにするために、IR-DICスライスパッチクランプ法を用いた。側坐核

ニューロンの電気生理学的性状は反復MAP投与によって変化しなかったが、ドーパミンに対する過分極反応は生食群よりMAP投与群において亢進していた。MAPに対する側坐核ニューロンの過分極反応も生食群よりもMAP投与群において増大していた。このことはMAPによるドーパミン遊離と再摂取抑制を増大させた可能性もあるが、内在性のドーパミンによる後シナプスレセプター以降に反応性の増大が起こることを示しており、逆耐性反

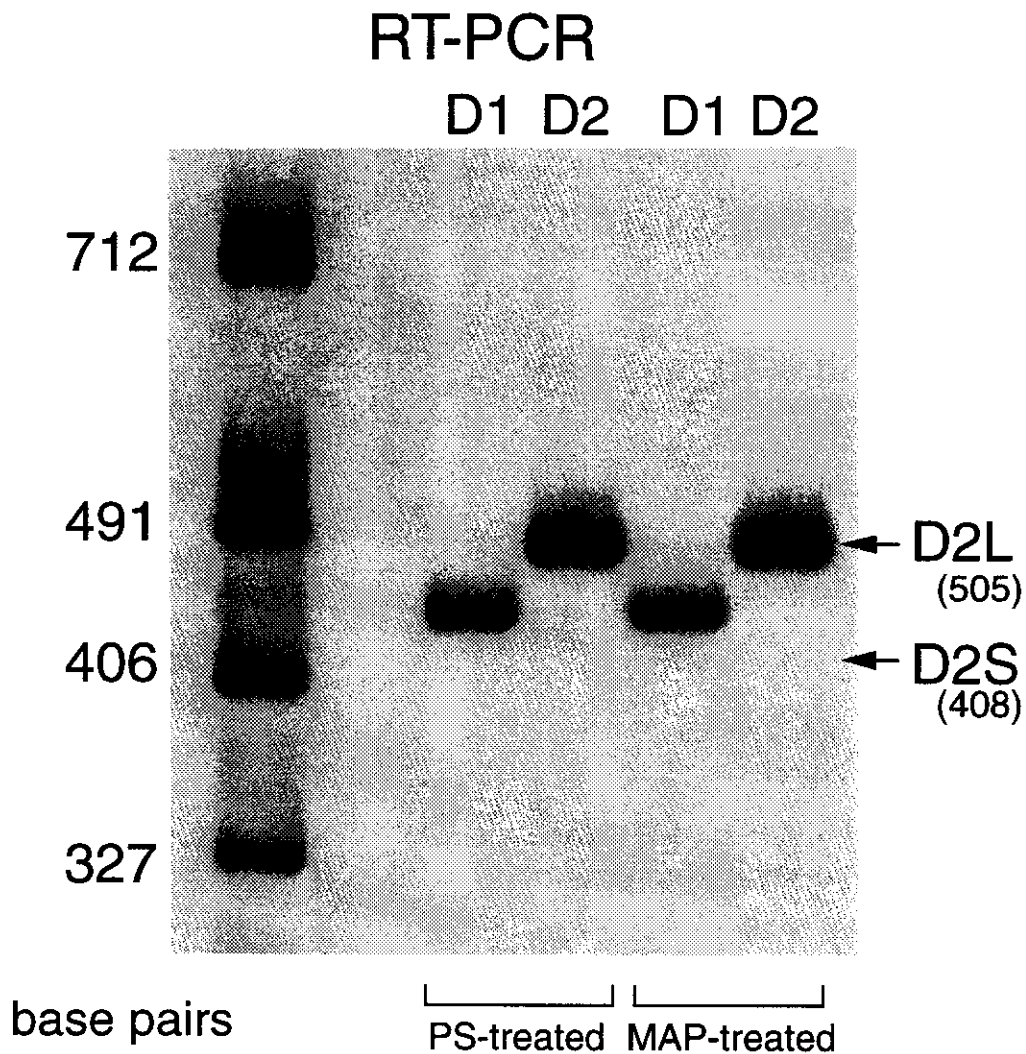


Fig.2 RT-PCR of a 430bp intronless D1 sequence and a 505bp intron-containing D2L sequence in nucleus accumbens neurons. PS: physiological saline-treated animal, MAP: methamphetamine-treated animal.

応がニューロンレベルで起こることを示唆している。また、実験終了後の電極内からmRNAをRT-PCRにより増幅した結果のドーパミンレセプターサブタイプに質的な変化は認められなかった。以上のことから、MAPの反復投与によりドーパミンレセプターの分画が変容することはなく、ドーパミンレセプターの数が増えるか、細胞内伝達系を変容させることにより、過感受性が起っていると考えられる。

#### E. 結論

MAP反復投与により、側坐核ニューロンにおいてドーパミンおよびMAPに感受性亢進が起ると考えられる。しかし、側坐核ニューロンのドーパミンのサブタイプに質的な変化はなく、レセプターの量の変化により機能が亢進していると考えられる。

#### 参考文献

1. Amano T., Matsubayashi H., and Sasa M.: Hypersensitivity of nucleus accumbens neurons to methamphetamine and dopamine following repeated administrations of methamphetamine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 801:136-147, 1996
2. Amano T., Matsubayashi H., Muhammad A., and Sasa M.: Dopamine D2 receptor-mediated hypersensitivity in VTA dopamine neurons following repeated methamphetamine treatment with the patch clamp method. *Japan.J. Pharmacol.*, 79, suppl.I, 223P, 199, 1999.
3. Bickel W. K., DeGrandpre R. J. and Higgins S. T. : The behavioral economics of concurrent drug reinforcers: a review and reanalysis of drug self-administration research . *Psychopharmacology (Berl)*, 118, 250-259, 1995.
4. Carroll M. E.: PCP and hallucinogens. *Adv Alcohol Subst Abuse*, 9, 167-910, 1990.
5. Collier H. O.: Cellular site of opiate dependence. *Nature*, 283, 625-629, 1980.

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：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（岡山大学医学部附属病院薬剤部）1、2）

研究協力者：荒木博陽1、2）、末丸克矢1）、安田佳代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：

我々はこれまでの研究で nicotine が morphine 単回投与ラットにおける naloxone 誘発 place aversion を抑制することを明らかにし、その神経機構に nicotinic, dopamineergic, serotonergic 神経系の関与が考えられた。そこで、本年度は nicotine に注目し、nicotine 退薬症候における serotonin(5-HT)受容体の関与およびその発現機構について検討を行った。その結果、nicotine 自然休薬 24 時間後では、DOI 誘発 head twitch response(HTR) が有意に増強した。また、nicotine 自然休薬 24 時間後では、脳内 5-HT 代謝回転が有意に減少することを明らかにした。さらに、この 5-HT 代謝回転の経時的変化が DOI 誘発 HTR の行動変化と相関性を示すことを明らかにした。加えて、nicotine 受容体拮抗薬の投与により強制的に nicotine の作用を抑制した場合でも同様に DOI 誘発 HTR が有意に増強された。また、この現象には  $\alpha_4\beta_2$ -nicotine 受容体 subtype が重要な役割を担っていることが明らかになった。以上、nicotine 退薬時には 5-HT 神経機能に変化し、特に 5-HT<sub>2</sub> 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。

#### A. 研究目的

タバコ煙中に含まれる nicotine は依存性物質である。そのため、喫煙行動の根底には nicotine の精神作用が一次的な役割を持つと考えられている。すなわち、nicotine を摂取したときの自覚効果として満足感、多幸感、覚醒効果、緊張緩和効果などが報告されており、これらの効果を得るため

に nicotine を再び摂取したいという欲求が生じる。これまでの研究により、これらの nicotine 正の強化効果発現には、脳内報酬系を構成する中脳-辺縁・皮質系 DA 神経が重要な役割を果たしていると考えられている。

一方、nicotine 依存者では nicotine 摂取の中止または減量によりその血中濃度が低



下すると、離脱症状（退薬症候）が出現する。退薬症候には精神依存と身体依存が存在するが、nicotine の場合、不安、抑うつ気分、不快感などの精神症状が主体である。この離脱時の精神症状は嫌悪的であることから、その症状から逃れるために nicotine への強い欲求（渴望）が生じる。Hughes らは、fluoxetine、nortriptyline あるいは bupropion などの抗うつ薬が nicotine の退薬症候に有効であると報告しているが<sup>9)</sup>、nicotine の退薬症状の一つとして抑うつ症状が認められる。一般に、これらの抑うつや不安などの気分変調には、5-HT<sub>2</sub> 受容体の関与が示唆されている<sup>9)</sup>。しかしながら、nicotine 退薬時における 5-HT 神経系の役割については明確でない。

そこで、nicotine 退薬症候における 5-HT 神経系、特に 5-HT<sub>2</sub> 受容体の関与およびその発現機構を明らかにすることを目的として検討を行った。

## B. 方法

### 1. 実験動物

実験動物には、体重 20～30 g の BALB/C 系雄性マウス（日本チャールス・リバー）を使用した。

### 2. 実験方法

#### 2.1. Head twitch response の測定方法

動物をホワイトフレックを薄く敷いたケージ（プラスチック製；12×24×17 cm）に入れ、30 分間測定環境に慣らした後、実

験を開始した。HTR の測定は、DOI を腹腔内投与した直後に動物を観察箱（プラスチック製；12×24×17 cm）に入れ、動物が頭を左右に鋭く振る回数を測定することにより行った。なお、HTR の測定時間は 30 分間とした。

#### 2.2. ニコチン自然退薬時の影響

nicotine 退薬時の 5-HT<sub>2</sub> 受容体機能の変化を調べるため、マウスに nicotine (0.05-1 mg/kg) あるいは saline を 7 日間 1 日 1 回皮下投与し、最終投与の 24 時間後に、DOI 誘発 HTR を観察した。また、nicotine 反復投与期間による影響を調べるため、マウスに nicotine (0.5 mg/kg) あるいは saline を 1, 3 および 7 日間 1 日 1 回皮下投与し、最終投与の 24 時間後に DOI 誘発 HTR を観察した。次に、ニコチン休薬期間による影響を調べるために、マウスに nicotine (0.5 mg/kg) あるいは saline を 7 日間 1 日 1 回皮下投与し、最終投与の 1.5 時間後ならびに 1, 2 および 7 日後に、DOI 誘発 HTR を観察した。最後に、マウスに 7 日間の nicotine (0.5 mg/kg) 反復投与の 30 分前に、毎回 mecamylamine あるいは hexamethonium を腹腔内投与し、その 24 時間後に DOI 誘発 HTR を観察し、DOI 誘発 HTR に対する nicotine の効果が直接 nicotine 受容体を介して作用しているか、またその作用が中枢性か末梢性かを検討し

た。

### 2.3. ニコチン受容体拮抗薬による強制退薬時の影響

拮抗薬によるニコチン強制退薬時の 5-HT<sub>2</sub> 受容体機能の変化を調べるため、マウスに nicotine (0.5 mg/kg) あるいは saline を 7 日間 1 日 1 回皮下投与し、最終投与の 1 時間後に mecamylamine を腹腔内投与し、その 30 分後に DOI 誘発 HTR を観察した。また、nicotine 受容体の subtype についても検討を行うため、同様に nicotine 最終投与の 1 時間後に  $\alpha_4\beta_2$  競合的 nicotine 受容体拮抗薬である DH $\beta$ E あるいは  $\alpha_7$  競合的 nicotine 受容体拮抗薬である MLA を脳室内投与し、その 10 分後に DOI 誘発 HTR を観察した。

### 2.4. 脳内モノアミンの測定方法

Nicotine (0.5 mg/kg) を 7 日間反復したマウスを最終投与の 24 および 48 時間後に断頭し、脳内 monoamine (5-HT, 5-HIAA, DA および DOPAC) 量を電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフ (HPLC-ECD) にて測定した。断頭により取り出した全脳は、小脳を除去した後、100 $\mu$ l M EDTA-2Na および内部標準物質 (isoproterenol 100 ng/ml) を含む 0.2M HClO<sub>4</sub> 中で homogenate し、15,000 rpm で 15 分間遠心分離した。その上清を 0.45  $\mu$ m メンブランフィルター (Millipore

Sumplep HV、Nihon Millipore Kogyo K.K.) で濾過後、1M CH<sub>3</sub>COONa にて pH 3.0 に調整し、これを被検試料とした。

HPLC-ECD 測定には、ポンプ EP-300 (Eicom Corp.)、カラム Eicompak CA-50DS 2.1 mm  $\phi$   $\times$  150 mm (Eicom Corp.)、カラム恒温槽 ATC-300 (Eicom Corp.) および WE-3G グラファイト電極付き電気化学検出器 ECD-300 (Eicom Corp.) から構成される装置を使用した。測定条件は、移動相 15 % methanol (Kanto Chemical Co., Inc.)、150 mg/ml sodium 1-octanesulfonate (SOS; Nacalai Tesque, Inc.)、5 mg/ml EDTE-2Na を含む 0.1M CH<sub>3</sub>COONa-0.1M citric acid buffer (pH 3.5) を流速 0.23 ml/min で流し、カラム温度 28  $^{\circ}$ C、ECD の電極には加電圧 450 mV vs Ag/AgCl の条件で測定した。

### 3. 使用薬物

本実験に使用した薬物、溶媒、投与量および投与経路は、Table 1 に示す。

Nicotine は saline に溶解後、NaOH 溶液で pH を 7.0 に調製した。DH $\beta$ E および MLA は saline に溶解後、脳室内に注入した。また、control 群には同量の溶媒を投与した。

### 4. 統計学的検定

得られたデータは、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。一元配置分析 (one-way ANOVA)

Table 1. Drugs

Drugs	Route of ad.	Solvent	Volume
(-)-nicotine tartrate (Sigma Chemical)	sc	saline	0.1ml/10g
(±)-DOI hydrochloride (RBI)	ip	saline	0.1ml/10g
ketanserin tartrate (RBI)	ip	saline	0.1ml/10g
mecamylamine hydrochloride (RBI)	ip or sc	saline	0.1ml/10g
hexamethonium bromide (Sigma Chemical)	ip	saline	0.1ml/10g
DHβE hydrobromide (RBI)	icv	saline	5μl / mouse
MLA (RBI)	icv	saline	5μl / mouse

を行った後、二群間の検定には Student's *t* テスト、三群間以上の検定には Dunnett テストを用いて個々の値を検定した。なお、*p* 値が 0.05 以下の場合を有意な差とした。

### C. 結果

#### 1. ニコチン自然休薬時の影響

##### 1-1 DOI 誘発 head twitch response

HTR は用量依存的に増加したことより、以降の HTR に関する実験にはすべて、DOI の用量として 1 mg/kg を用いることにした (Fig. 1)。Ketanserin は DOI 誘発を有意に低下させた。すなわち、DOI 誘発 HTR が 5-HT<sub>2</sub> 受容体を介して起きる反応であることが確認された。

##### 1-2 Nicotine 反復投与の影響

Nicotine の 1 回投与だけでは、control 群と比較し、有意な変化は見られなかった。しかしながら、nicotine の 3 回投与で、control 群と比較し、有意な HTR の増加が認められ、その作用は 7 日間の nicotine 反復投与によりさらに増強された (Fig. 2)。

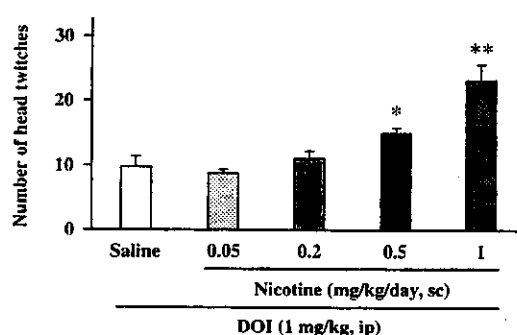


Fig. 1 DOI-induced head twitch response (HTR) in mice pretreated with nicotine for 7 days. Data were analyzed by Dunnett's test. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01

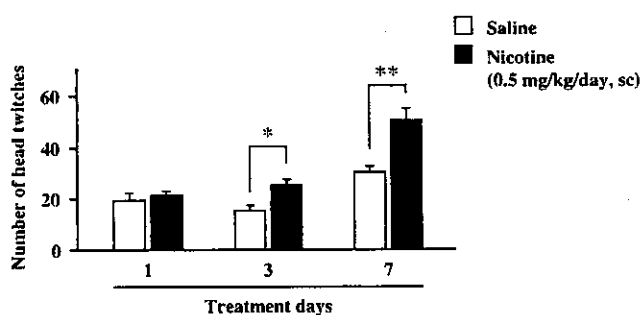


Fig. 2 Effect of nicotine-treatment period on the DOI-induced head twitch response (HTR) in mice. Data were analyzed by Student's *t* test. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01

### 1.3 Nicotine 休薬の影響

nicotine 7 日間反復投与群においてはその 24 時間後、すなわち 1 日後に、control 群と比較し、有意な HTR の増加が認められた。この HTR の増強作用は、2 日後には消失しており、7 日間の休薬期間をおいた後でも同様の結果であった(Fig. 3)。

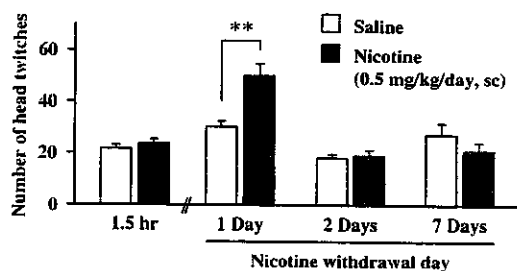


Fig. 3 Effect of nicotine withdrawal on DOI-induced head twitch response (HTR) in mice pretreated with nicotine for 7 days. Data were analyzed by Student's *t* test. \*\**p*<0.01

### 1.4 ニコチン受容体拮抗薬の影響

nicotine による HTR 増強作用は、連日の mecamlamine 前処置により有意に抑制された。しかしながら、hexamethonium の前処置によっては全く影響を受けなかった。

### 1.5. 脳内モノアミンの変化

Table 2 にニコチン休薬時の脳内モノアミン量の変化を示す。Nicotine 7 日間反復最終投与の 24 および 48 時間後における脳内の 5-HT、5-HIAA、DA および DOPAC 量に有意な変化はみられなかった。しかしながら、5-HIAA/5-HT 比については

nicotine 最終投与の 24 時間後に、control 群と比較し、有意な減少が認められた。この 5-HIAA/5-HT 比の低下は、nicotine 最終投与の 48 時間後には control 群レベルにまで回復した。なお、nicotine を 1 回投与しただけでは、その 24 時間後の 5-HIAA/5-HT 比は  $0.395 \pm 0.005$  であり、control 群 ( $0.386 \pm 0.007$ ) と比較し、有意な変化はなかった。

## 2. ニコチン受容体拮抗薬による強制退薬時の影響

### 2-1 ニコチン受容体拮抗薬の影響

Saline 反復投与群においては mecamlamine による影響は全くみられなかった。しかしながら、nicotine 反復投与群において mecamlamine は用量依存的に自然休薬時と同様の HTR の増強作用を示した(Fig. 4)。

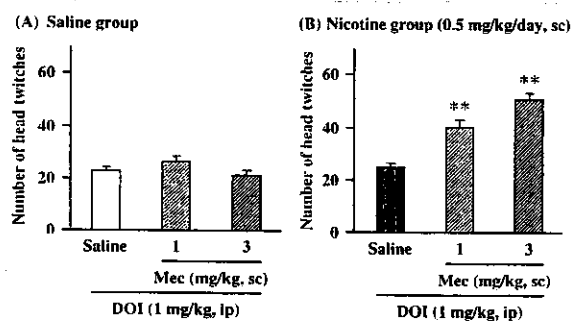


Fig. 4 Effect of mecamlamine (Mec) on DOI-induced head twitch response (HTR) in mice pretreated with nicotine for 7 days. Data were analyzed by Dunnett's test. \*\**p*<0.01