

2000.

9) Sadakata T, et al. : Pur $\alpha$ , a single-stranded DNA binding protein, suppresses the enhancer activity of cAMP response element (CRE).Mol. Brain Res., 77: 47 - 54, 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：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

分担研究者：伊豫雅臣<sup>1)</sup>

研究協力者：関根吉統<sup>2)</sup>、松永勉<sup>2)</sup>、森則夫<sup>2)</sup>、尾内康臣<sup>3)</sup>、塚田秀夫<sup>4)</sup>

千葉大学医学部精神医学講座<sup>1)</sup>、浜松医科大学精神神経医学講座<sup>2)</sup>、県西部浜松医療センター<sup>3)</sup>、浜松ホトニクス中央研究所<sup>4)</sup>

### 【研究要旨】

今年度は、我々は覚せい剤使用者1名を追加するとともに、健常者を含むすべての症例について再解析し、線条体に加え、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)密度を算出した。またそれらと、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。

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。近年、覚せい剤長期使用者では、死後脳研究<sup>4)</sup>により線条体及び側坐核の、そして PET 研究<sup>5)</sup>により線条体の脳内 DAT 密度が低下していることが明らかとなってきた。しかしそれら密度の低下と精神症状の関係については不明である。また一方、脳内ドーパミン神経系の主要な投射部位としては側坐核、線条体に加え、前頭前野が知られているが、未だ報告はなされていない。我々は現在まで覚せい剤使用者と健常者を対象に、ポジトロン CT (PET) 検査により、線条体における DAT 密度を測定し、臨床データとの関連を調べてきた。今年度は覚せい剤使用者1名を追加するとともに、PET データの再解析により側坐核、前頭前野各部位における DAT 密度も算出した。そしてその変化と使用期間や精神症状の重症度との関連を明らかとした。

対象は、DSM-IV 診断基準に基づきメタンフェタミン使用障害と診断された男性 (合計11名) と、年齢を合わせた健常男性 (合計9名) であった。

トレーサには、DAT 阻害剤である WIN-35,428 を炭素 11 で標識した [<sup>11</sup>C]WIN-35,428 を用いた。PET 計測前に各症例から文書による説明・同意を取得し、簡易精神症状評価スケール (BPRS) により精神症状を評定するとともに、尿検査により methamphetamine 使用の有無について確認した。PET 計測では対象者を PET scanner に仰臥させ、[<sup>11</sup>C]WIN-35,428 を右腕の静脈から静注した。静注直後より、PET 計測を90分間施行した。PET 計測時には動脈採血により、経時的に血漿中 [<sup>11</sup>C]WIN-35,428

濃度を測定した。

関心領域 (ROIs) は DAT 密度測定部位として線条体、側坐核、前頭前野に設定し、また参照部位として DAT の存在しない小脳皮質に設定した (Fig. 1)。各 ROI の DAT 結合能 (BP: binding potential) は 3-compartment、4-parameter model によりを算出した。BP は  $k_3/k_4$  であり、 $B_{max}/K_d$  であり、最大結合数  $B_{max}$  を反映する指標として用いることができる。

線条体、側坐核、前頭前野における DAT 密度についての覚せい剤使用者群と健常者群との比較を Fig.2 に示す。覚せい剤使用者群の DAT 密度は線条体において 20.4%、側坐核において 29.6%、前頭前野において 30.6%と、いずれの部位においても健常者群に比較して有意に低下していた。なお、2回の PET 検査による DAT 密度にはいずれの部位においても明らかな変化は認められなかった。

覚せい剤使用者の臨床データと線条体、側坐核の DAT 密度との相関を Fig.3 に示す。覚せい剤使用期間と線条体及び側坐核の DAT 密度の間には有意な負の相関が認められた (Kendall's tau, 線条体:  $\tau = -0.48$ ,  $df=10$ ,  $p<0.05$ ; 側坐核:  $\tau = -0.73$ ,  $df=10$ ,  $p<0.01$ )。BPRS 得点と DAT 密度には有意な負の相関を認めた。また、BPRS の陽性症状下位尺度得点とそれらの DAT 密度にも有意な負の相関を認めた (Kendall's tau, 線条体:  $\tau = -0.73$ ,  $df=10$ ,  $p<0.01$ ; 側坐核:  $\tau = -0.50$ ,  $df=10$ ,  $p<0.05$ )。

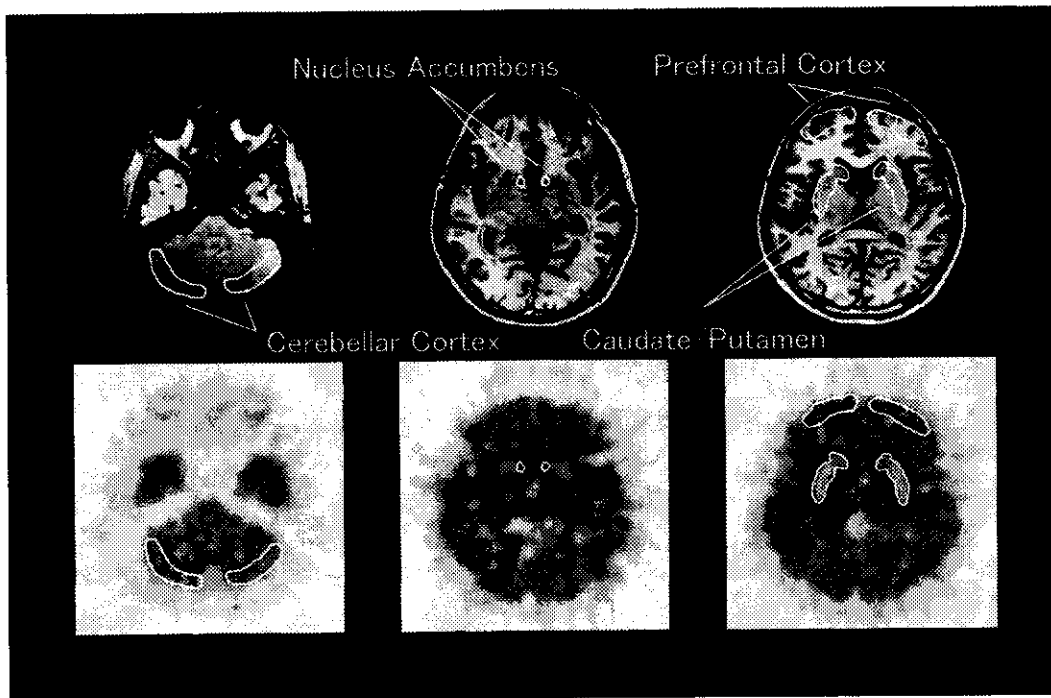
本研究において線条体、側坐核、前頭前

野のいずれの部位においても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有することが明らかとなった。また覚せい剤の使用により低下した DAT 密度は 6 ヶ月から 9 ヶ月の断薬期間にても変化することはなく、DAT 密度の低下は不可逆的であることが示唆された。海外からの先行研究により、覚せい剤長期使用者では脳内 DAT 密度の低下とその低下の不可逆性が示唆されている。我々の研究ではその結果をさらに支持するものであった。一方、その低下と精神症状との関連については不明であったが、我々はその低下と精神症状の重症度との関連を明らかとした。

以上より、本研究により、覚せい剤使用に伴い、脳内 DAT 密度は有意に低下し、その低下は長期に持続する精神症状と関連することが明らかとなった。このことは覚せい剤関連精神症状の発現機序の理解に役立つだけでなく、覚せい剤乱用の有害性を明らかとするとともに、精神症状発現におけるドーパミン神経の役割を示唆するものである。

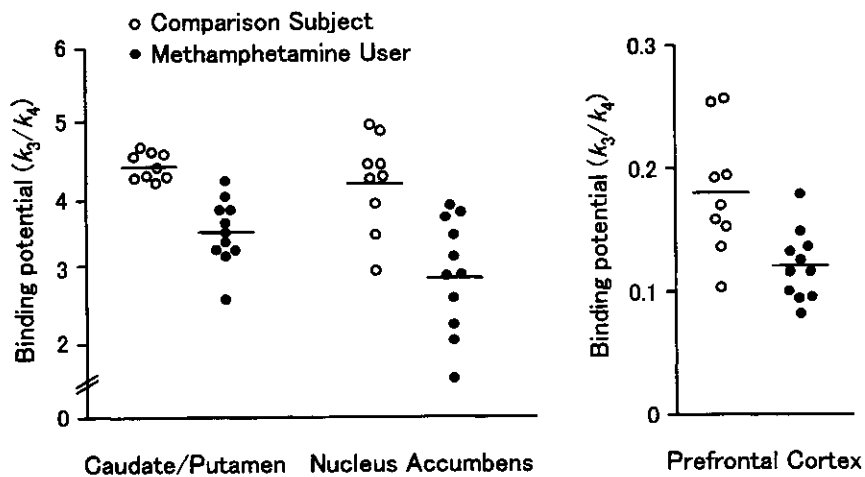
#### 論文発表

1. Shirayama Y, Hashimoto K, Iyo M, Watanabe K, Higuchi T, Minabe Y.: 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy)-induced egr-1 mRNA in rat brain: pharmacological manipulation. *Eur J Pharmacol* 402:215-222,2000.
2. Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, Kobayashi K, Inoue O, Terasaki O, Someya Y, Sassa T, Sudo Y, Matsushima E, Iyo M, Tateno Y, Toru M.: Serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors in schizophrenic patients studied by positron emission tomography. *Life Sci* 66(25):2455-64,2000.
3. Sekine Y, Iyo M, Tanaka K, Matsuyama K, Matsunaga T, Mori N.: Effective adjunctive use of low-dose methylphenidate with mianserin for major depression with silent cerebral infarction: a case report. *J Clin Psychopharmacol* 20:584-5,2000.
4. Iwata Y, Kotani Y, Hoshino R, Takei N, Iyo M, Mori N.: Carbamazepine augmentation of clomipramine in the treatment of refractory obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychiatry* 61(7):528-9,2000.



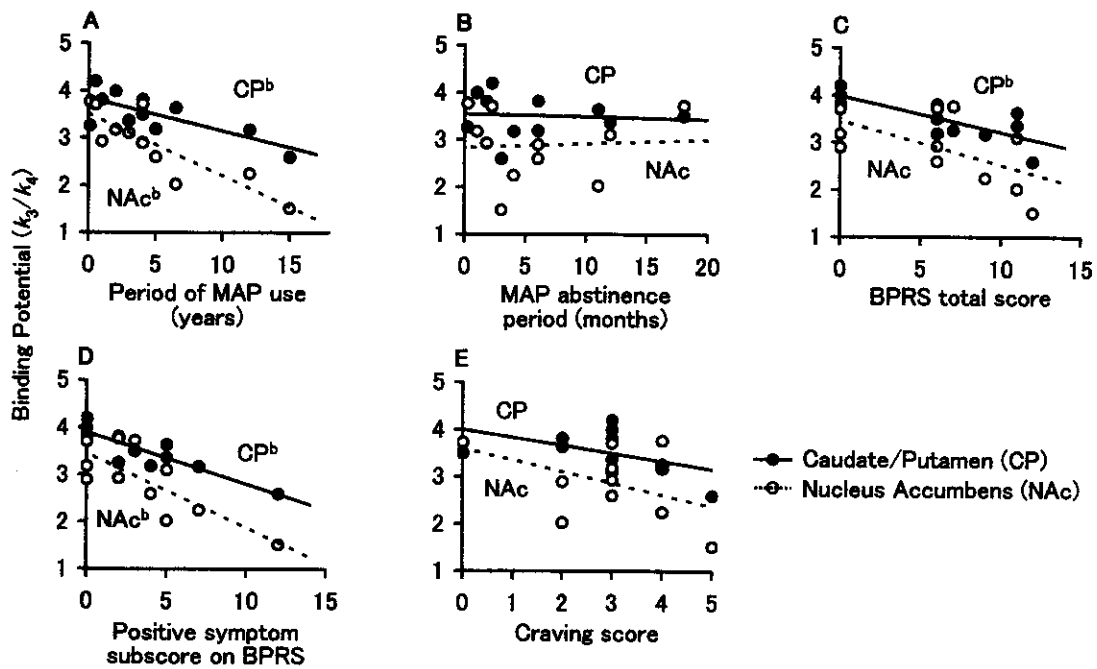
**FIGURE 1. Region of Interest (ROI) Setting<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>ROIs are drawn bilaterally on the MRI (upper row) and on the PET (bottom row) images. Regions placed on the PET images are based on those on the MRI images.



**FIGURE 2. Radioactivity in the Brain and the Arterial Plasma from a Comparison Subject (Upper Row) and Those from a MAP User (Bottom Row), after the Tracer Injection<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>The radioactivity in each region is the averaged value of the left and right sides of the region.



**FIGURE 3. Values of DAT Binding Potentials ( $k_3/k_4$ ) in the Brains of 9 Comparison Subjects and 11 Methamphetamine (MAP) Users<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>The DAT binding potential for the caudate/putamen, nucleus accumbens, and prefrontal cortex was significantly reduced in MAP users compared with the corresponding values in comparison subjects ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney U-test). The horizontal lines represent the means for the DAT binding potential for the different groups.

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  
分担研究者: 丹羽真一<sup>1)</sup>

研究協力者: 竹内 賢<sup>1)</sup>、鈴木喜明<sup>1)</sup>、浄土英一<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>福島県立医科大学医学部・神経精神医学教室、<sup>2)</sup>同・生理学第2講座

[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ACh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、ACh系等を含む神経回路網の存在が推測されている。各脳部位の破壊実験の結果などから、海馬-前頭皮質を含む神経回路の関与が示唆されるものの、海馬の行動感作獲得における役割については不明瞭である。そこで我々は前頭前皮質に豊富な神経投射を持つ腹側海馬に注目し、腹側海馬の神経活動が覚醒剤の反復投与でどのように変化するかを検討した。方法はラットの腹側海馬に慢性に微小電極を埋め込み、覚醒剤(methamphetamine) 1.5mg/kgを計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。その結果、覚醒剤急性負荷時、反復投与後の再負荷時ともに腹側海馬ニューロンの発火頻度は目立った変化を示さなかった。しかし個々のラットを個別に検討すると、行動感作を獲得したラットでは腹側海馬ニューロンの発火頻度が持続的に増加していたのに対し、行動感作を獲得したとは考えられないラットでは腹側海馬ニューロンの発火頻度に変化が認められなかった。この結果から、腹側海馬活動が行動感作獲得に影響を与えている可能性が示唆された。

A. 目的

動物に覚醒剤を反復投与すると、当初以上行動を発現しなかった量でも異常行動の発現が認められるようになる。これを行動感作、または逆耐性現象とよび、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と考えられている<sup>1)</sup>。ラットに覚醒剤を反復投与した場合には、行動感作は移所運動量の増加や常同行動の増大として観察されるが、これらの異常行動は側坐核や線条体における dopamine(DA)放出の増加を基盤としているため、これまで行動感作はDA系の変化のみが関連していると考えられてきた。しかし現在では動物の行動感作については数多くの重要な神経薬理学的知見が蓄積されており、行動感作の獲得には中脳被蓋

野のDA起核<sup>1)</sup>、側坐核<sup>2)</sup>、前頭皮質<sup>3)</sup>、海馬から側坐核への投射路<sup>4,5)</sup>、扁桃核<sup>6)</sup>などの部位や学習記憶系の関与が必要と指摘されている<sup>10,13)</sup>。またDA系以外にも興奮性アミノ酸(EAA)系などのほかの神経回路網の機能変化が必要であると推測されている<sup>2,4,6)</sup>。なかでも前頭葉の破壊や海馬から側坐核への投射経路の破壊により行動感作獲得が抑制されたという結果や、行動感作獲得過程に「条件刺激-強化刺激-学習反応獲得」という学習記憶系が関与しているという結果は、行動感作獲得における前頭皮質-海馬経路の重要性を示唆している。しかしこれまで覚醒剤反復投与による行動感作獲得に関する海馬の役割については十分な検討がなされているとは言いがたかった。そこで

我々はこれまでに事象関連電位 P300 を指標として覚醒剤反復投与により認知過程が障害される可能性を示し<sup>12)</sup>、覚醒剤反復投与が学習や認知に密接に関連する部位である前頭皮質-海馬経路の機能的変化を生じうる可能性を示唆した。また覚醒剤投与と 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かかわりを持つことを示唆した<sup>5)</sup>。また昨年度には覚醒剤反復投与による行動感作獲得と海馬との関連をより直接検討するために、側坐核や前頭皮質にグルタミン酸系の豊富な投射のある腹側海馬に着目し、腹側海馬をイボテン酸で傷害したラットでは、行動感作獲得が抑制されることを報告した<sup>7)</sup>。しかし、傷害実験では傷害部位を含む神経回路網に広汎かつ重篤な影響を与えるため、行動感作獲得に海馬がどのような関与をしているのか、あるいは海馬と関連した脳部位がより重要な関与をしているのかは我々の研究からだけでは明らかにならない。そこで今回我々は、行動感作獲得が腹側海馬にどのような機能変化をもたらしているかを明らかにすることによって、海馬が行動感作獲得に果たす役割について検討するために、行動感作獲得に伴う腹側海馬のニューロン発火活動の変化を検討した。

..

## B. 方法

### 1. 実験動物

実験開始時点で 300 ~ 350g の *Sprague-Dawley* 系雄性ラット (日本 SLC) を対象とした。実験中を通じてそれぞれのラットは福島県立医科大学医学部付属実験動物研究施設において、温度  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、明暗周期 12 時間のもとで個別に飼育した。実験実施中以外は食餌摂取、飲水の制

限は一切行わなかった。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行った。

### 2. 手術手技

それぞれのラットを 40mg/kg の pentobarbital で深麻酔した後、定位脳手術的に軟ステンレス線を用いた双極電極を、Paxinos and Watson<sup>9)</sup> のアトラスに従い先端が左前頭前皮質内に到達するように (bregma より鼻側 3mm、左側 0.8mm、硬膜より 3.5mm 深部) 刺入し、デンタルセメントで固定した。また小脳上にステンレスネジ電極を設置し、接地電極とした。ステンレス製単極電極 (ユニークメディカル社) を、その脇に設置したステンレスネジ電極を基準電極としてニューロン発火を確認しながら bregma から 5mm 尾側、4mm 左側より外方に 15 度の角度をつけて約 7.5mm まで刺入した。前頭前皮質に刺入した双極電極にパルス刺激を加え、腹側海馬に刺入した単極電極から逆行性発火を確認した後、デンタルセメントで固定した。術後 7 日間の回復期間をおき、以後の実験に供した。

### 3. 測定

記録用電極から得られた信号は、ラットの頭部に直接装着したプリアンプで増幅した後 500~3000Hz の帯域フィルタを用いて増幅し、DAT レコーダに記録した。ニューロンの活動電位を背景ノイズから分離するために、実験用のインタフェイスとソフトウェア (CED1401, SPIKE II ; CAMBRIDGE ELECTRONIC DESIGN, Cambridge, UK) を用いた。

測定はラットが自由に動き回れる大きさの実験箱 (縦 30cm、横 30cm、高さ 35cm) の中で行い、記録開始 30 分後に 0.15mg/kg の覚醒剤 (methamphetamine; MAP) ないし 1ml/kg の生理的食塩水を投与した。生理的食塩水投与と MAP 投与は同日に行い、MAP 投与は



生理的食塩水投与後最低 120 分の間隔をおいて行った。

実験中のラットの行動量を、120 分の間ラットの行動をビデオテープに収め、後に評価した。「総運動量」を、あらかじめ実験箱の床を 4 区分したラインを、ラットの鼻先が横切った回数と定義した。このスコアはラットの移所運動量と常同行動を含んだ指標と考えられた。スコアは 2 分ごとに測定した。行動量を含む測定は、ラットが十分に実験箱環境に慣れ、探索行動が見られなくなってから行った。

#### 4. 覚醒剤投与と再測定

初回測定終了後から 3 日 4 日おきに 1.5mg/kg の MAP を計 5 回腹腔内投与した。最終投与後 1 週間の断薬期間をおいた後、初回測定と同様の手順にて再測定を行った。

#### 5. 統計

自由行動下におけるラットの腹側海馬の発火頻度を解析するために、薬物投与前 30 分から薬物投与後 90 分の間、2 分ごとに発火回数を測定してヒストグラムを作成した。薬物投与前 30 分の平均を baseline として発火回数の平均および標準偏差を算出し、baseline の平均  $\pm$  2 SD を 10 分間連続して超えた場合、有意な発火回数の増減があったと定義した。ただし、薬物投与後 6 分間は、薬物の効果そのものよりも注射に伴う疼痛の直接効果の方が強いと考えられるため、統計学的解析から除外した。また薬物投与後 40 分を経過してから発火回数の増減があった場合、薬物の効果自体よりも運動量増加に伴う二次的な影響の方が大であると考へ、統計学的解析から除外した。MAP 負荷時に発火回数が増加したニューロンと減少したニューロンに分け、Fisher の直接検定法を用いて覚醒剤反復投与前後でそれぞれのユニット数について比較した。

実験箱の床に引かれたラインを横切った回数を 2 分ごとに測定し、「運動量」と定義した。行動感作の獲得は、MAP 負荷時における薬物投与後 0 分から 90 分までの運動量を加算して「総運動量」を求め、MAP 投与前と投与後で比較した。

覚醒剤の反復投与の平均発火頻度に与える影響について検討するために、薬物負荷前 30 分の平均発火回数を baseline とした相対発火頻度を計算した。MAP の反復投与前後を群間要因、薬物負荷後の時間経過を群内要因とする Multivariate analyses of variance (MANOVAs) を用いて相対発火頻度の差について検討した。事後検定には Tukey の HSD 検定を用い、薬物反復投与前後で比較した。すべての統計学的検討において、 $p < 0.05$  を有意とした。

### C. 結果

#### 1. 組織学的検討

測定終了後ラットの脳を取り出し、HE 染色して電極位置を確認した。前頭前皮質へのパルス刺激により腹側海馬での逆行性発火が確認できたラットは 4 匹であり、全例が海馬 CA1 領域に電極先端が到達していた (Fig. 1)。

#### 2. 行動測定

Figure 2 に示したように、MAP 負荷時の総運動量を MAP 投与前と MAP 投与後で比較したところ、統計学的有意に達しなかったものの、MAP 反復投与後では投与前に比較して総運動量の増加が認められた (paired t-test:  $t = -2.81$ ,  $p < 0.05$ )。

#### 3. 電気生理学的検討

Table 1 に MAP 反復投与前後での、生理的食塩水負荷時および MAP 負荷時に、発火頻度に変化を生じた腹側海馬ニューロン数を示

した。MAP 反復投与前には、生理的食塩水負荷時発火頻度が減少したニューロンが高頻度に記録されたが(7/9:9ニューロン中7ニューロン)、MAP 負荷時には発火頻度が増加したニューロン(3/9)、減少したニューロン(3/9)、発火頻度に変化のなかったニューロン(3/9)がそれぞれ 1/3 づつを占めた。一方 MAP 反復投与後には、生理的食塩水負荷時には発火頻度が変化しなかったニューロンが高頻度に記録され(4/6)、また MAP 負荷時には発火頻度が増加したニューロンの割合が若干増加した(5/10)。しかし Fisher の直接検定法によって MAP 負荷時に発火頻度が増加したニューロンと減少したニューロンの数を比較すると、この割合の変化は有意ではなかった( $\chi^2=0.63$ , n.s.)。

Figure 3 には MAP 反復投与前後における生理的食塩水負荷時、MAP 負荷時のニューロンの発火頻度の変化を、薬剤投与前 30 分の平均発火頻度に対する相対発火頻度として示した。MAP 負荷群において、薬剤負荷後の時間経過の有意な主効果 [ $F(44,748) = 2.72$ ,  $p < 0.001$ ] および反復投与前後と薬剤負荷後の時間経過の有意な交互作用 [ $F(44,748) = 1.86$ ,  $P < 0.001$ ] が認められた。Tukey の HSD 検定の結果、反復投与前に比較して反復投与後発火頻度が増加したのは、MAP 負荷後 36 分後 [ $P < 0.05$ ]、40 分後 [ $P < 0.05$ ]、44 分後 [ $P < 0.001$ ]、60 分後 [ $P < 0.001$ ]、68 分後 [ $P < 0.01$ ]、70 分後 [ $P < 0.05$ ] であった。一方生理的食塩水負荷群では、MAP 反復投与前と反復投与後とで、発火頻度に有意な変化は認められなかった。

#### 4. 行動感作の獲得と腹側海馬ニューロンの発火頻度の変化の関係

腹側海馬ニューロンの発火頻度の変化を記

録できたラットは 4 匹であったが、個体によって MAP 反復投与による行動感作の獲得のされ方が異なるため、個々のラット毎に行動感作の獲得と腹側海馬ニューロンの発火頻度の変化の関係を検討した。Figure 4 には行動感作が十分に獲得されたと考えられるラットの運動量とニューロンの発火頻度の時間的推移を、figure 5 には行動感作が獲得されたと考えられないラットの運動量とニューロンの発火頻度の時間的推移を示した。行動感作が獲得されたと考えられるラットでは、腹側海馬ニューロンの発火頻度は MAP 反復投与後、およそ MAP 負荷後 10 分程度から持続的に増加していた。これに対して行動感作が獲得されたと考えられないラットでは腹側海馬ニューロンの発火頻度は MAP 反復投与の前後でほとんど変化が認められなかった。

#### D. 考察

本研究における主要な知見は、次に挙げる 3 点である。すなわち、a) MAP の急性投与は腹側海馬ニューロンの発火頻度に大きな影響を及ぼさなかった。b) MAP の反復投与によって、腹側海馬ニューロンの発火頻度はある程度増加した。c) 行動感作を獲得したラットでのみ、MAP 反復投与前に比較して反復投与後に腹側海馬ニューロンの発火頻度が増加した。

先に述べたように、覚醒剤の反復投与による行動感作獲得には DA 系の関与が必須ではあるが、DA 系のみ機能変化で行動感作獲得機序が説明できるものではないことも明らかである。Kalivas らは行動感作獲得に関わる可能性のある神経機構として、中脳辺縁 DA 系の他に、皮質、扁桃核などと並んで海馬を挙げている<sup>3)</sup>。しかし、海馬がどのように行動感作獲得に関連しているのかという点になると、十分なことはわかっていない。しかし、海馬から側坐核への投

射路を破壊すると行動感作獲得が抑制されることから、海馬が側坐核に対して行動感作獲得においては調節性に関与している可能性は高い。

残念ながら十全な統計学的解析を行うに足る個体数が確保できなかったため、今回の研究結果の解釈にあたっては重大な制限が不可避である。しかし c) に挙げたように行動感作を獲得できたラットと獲得できなかったラットの個体差があり、その両者の間で腹側海馬ニューロンの発火頻度の変化に差があることは、覚醒剤反復投与による行動感作獲得と海馬の活動性の間に一定の関連性があることを示唆している。しかも、行動感作の表現型である運動量が、MAP 負荷後約 30 分でピークに達し、その後徐々に低下してくるのに対し、腹側海馬ニューロンの発火頻度は MAP 負荷後約 10 分後より持続的に増加した。このことは腹側海馬の活動性が行動感作に関連があるとしてもそれは行動感作の獲得に対してであって、行動感作の発現に対してではないということを示唆している。この点をさらに明らかにするためには行動感作の獲得過程で縦断的に腹側海馬ニューロンの活動性を評価するといった方法論が必要になるであろう。今回の研究では例数が不足しているために、これらの点を検討することはできなかったが、今後検討すべき課題と考えられる。

## E. 結論

自由行動下のラットを用い、覚醒剤反復投与が腹側海馬の活動性に及ぼす影響について検討した。覚醒剤反復投与によって、腹側海馬ニューロンの発火頻度が増加し、腹側海馬が行動感作獲得に関与している可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) Cador M, Bijiou Y. and Stinus L.: Evidence of a complete independence of the neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization to amphetamine. *Neuroscience*, 65: 385-395, 1995.
- 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) Kalivas P.W. and Stewart J.: Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Rev*, 16: 223-244, 1991.
- 4) Karler R., Calder L.D., Chaudhry I.A. et al.: Blockade of reverse tolerance to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci*, 45: 599-606, 1989.
- 5) Kato K., Shishido T., Ono M. et al.: Effects of phencyclidine on behavior and extracellular levels of dopamine and its metabolites in neonatal ventral hippocampal damaged rats. *Psychopharmacol*, 150: 163-169, 2000.
- 6) Ohmori T., Abekawa T. and Koyama T.: Scopolamine prevents the development of sensitization to methamphetamine. *Life Sci*, 56: 1223-1229, 1995.
- 7) 小野正美、加藤光三、宍戸恭子、他: 覚醒剤 (methamphetamine) に対する行動感作獲得と発現における海馬の役割. 精神薬療基金研究年報 in press.

8)Paulson P. and Robinson T.E.: Sensitization to systemic amphetamine produces an enhanced locomotor response to a subsequent intra-accumbence amphetamine challenge in rats. *Psychopharmacol* 104: 140-141, 1991.

9)Paxinos G. and Watson C.: The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd Edn. Academic Press, Sydney, 1986.

10)Post RM, Lockfeld A, Squillace KM et al. Drug-environment interaction: Context dependency of cocaine-induced behavioral sensitization. *Life Sci.* 28, 755-760 (1981).

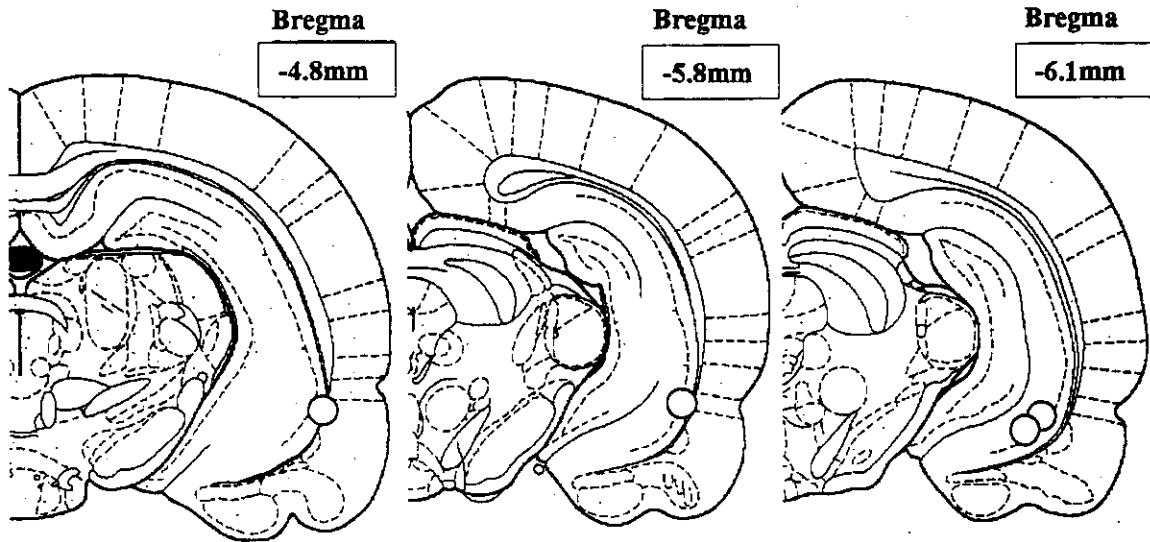
11)佐藤光源、柏原健一 覚醒剤精神病－臨床と基礎－、金剛出版、東京、1986.

12)Takeuchi S., Jodo E., Suzuki Y. et al.: Effects of repeated administration of methamphetamine on P3-like potentials in rats. *Int J Psychophysiol* 32: 183-192, 1999.

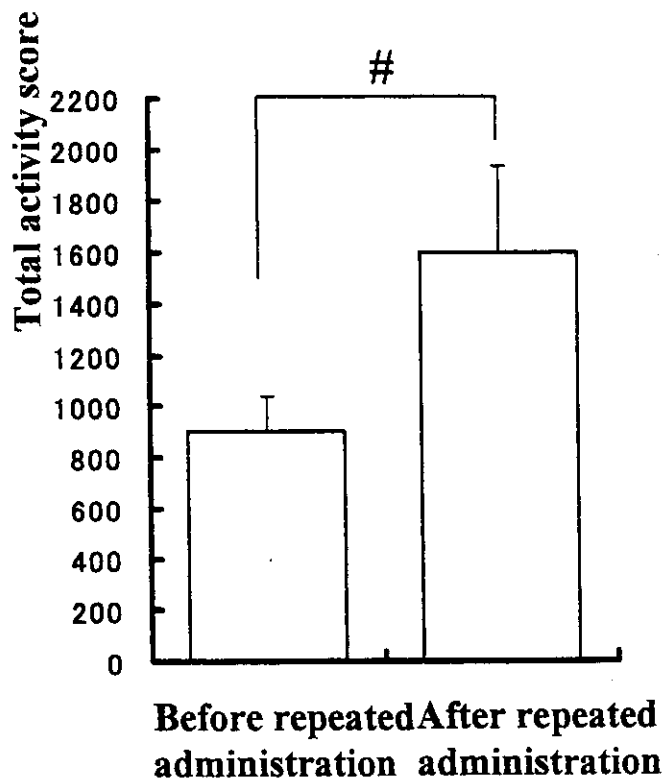
13)Tilson HA and Rech RH. Conditioned drug effects and absence of tolerance to d-amphetamine induced motor activity. *Pharmacol Biochem Behav* 1, 149-153 (1973)

14)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.

15)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.



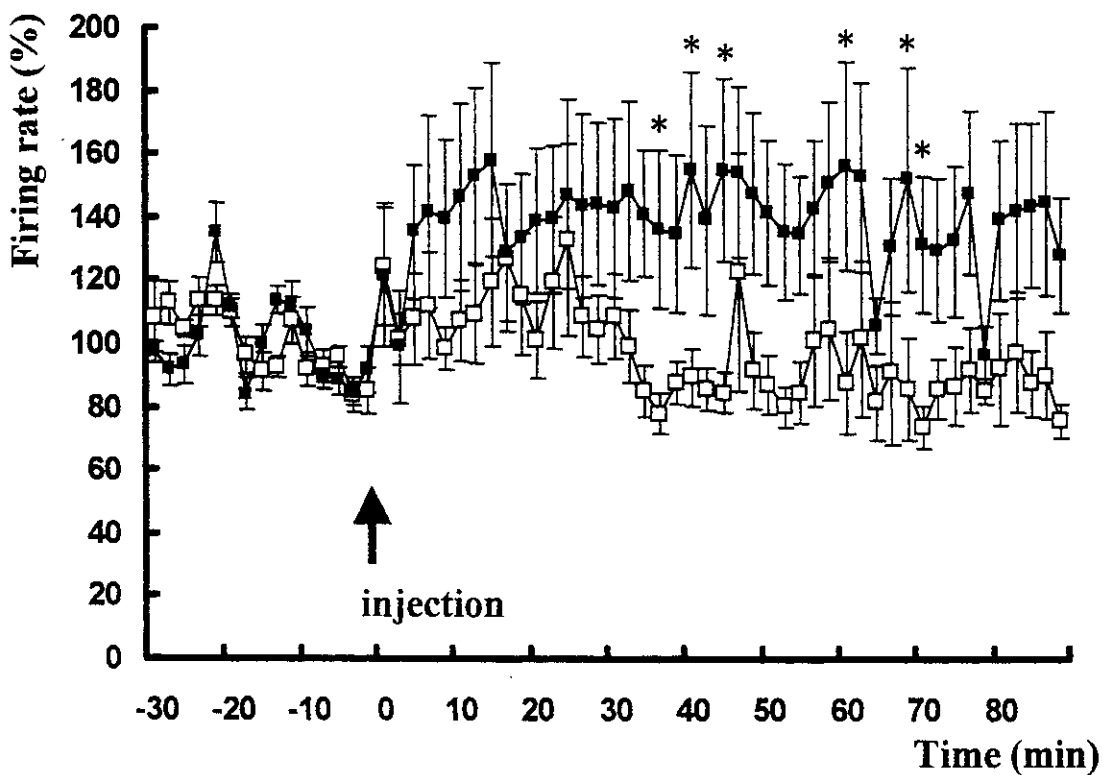
**Figure 1** Histological recording sites of ventral hippocampus in this study.



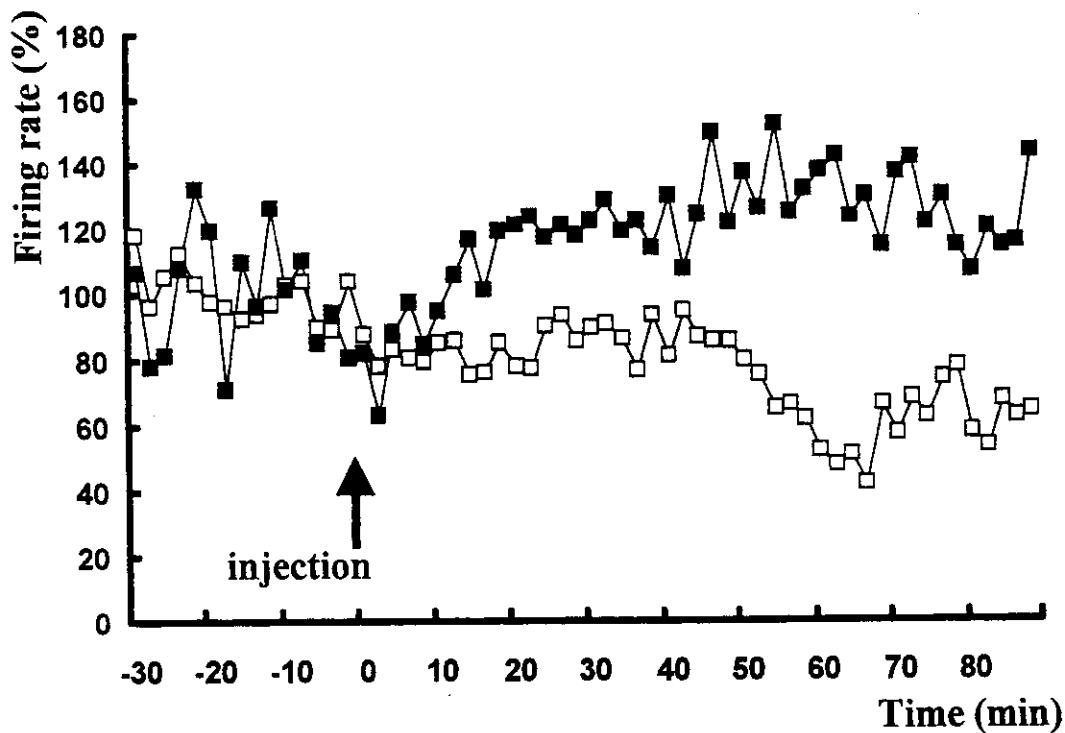
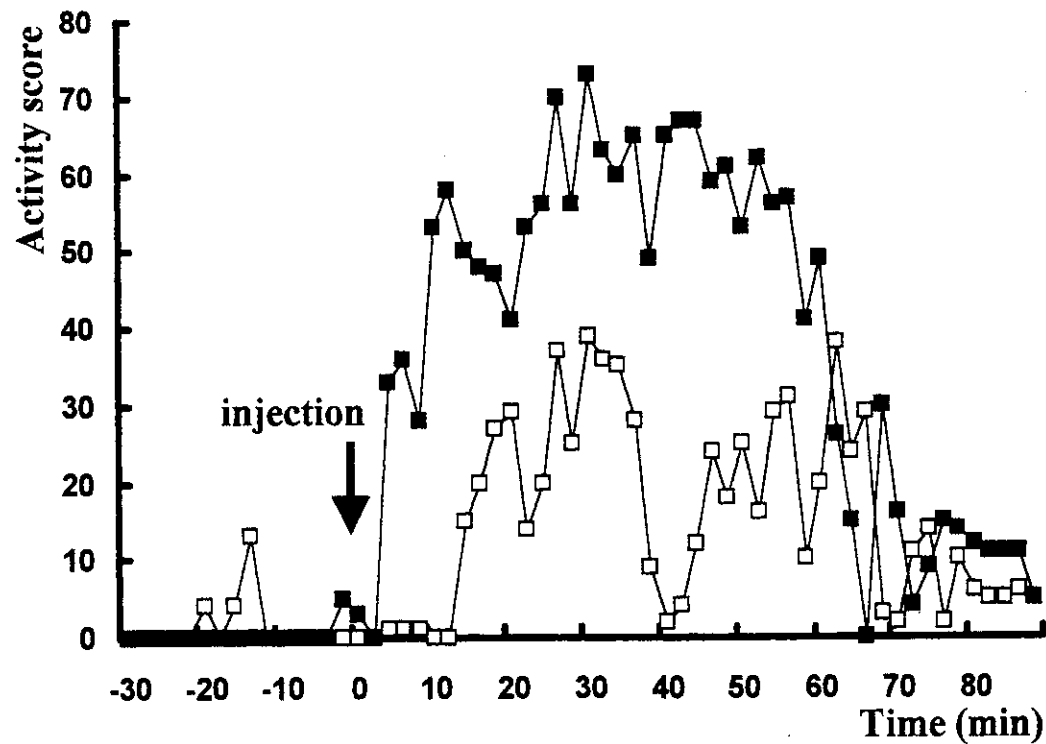
**Figure 2** Comparison of total activity score by MAP challenge between those before repeated MAP administration and those after repeated administration. #,  $p < 0.07$  with paired t-test.

**Table 1** Number of neurons showing changes in firing rate by saline or MAP challenge.

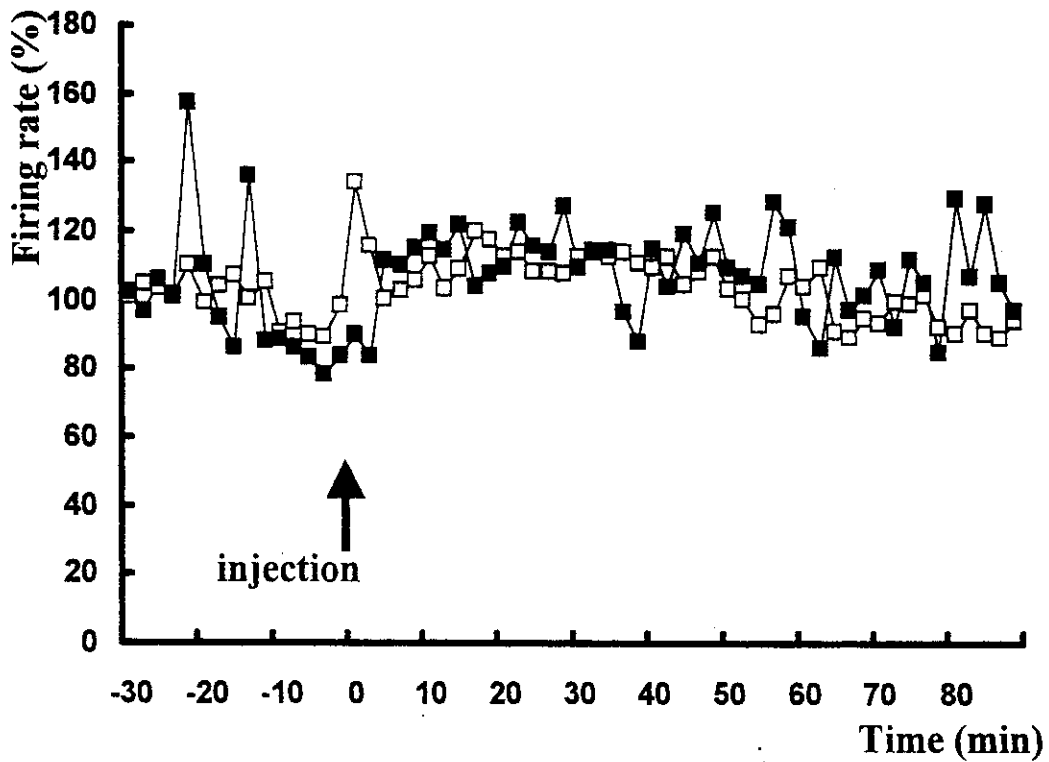
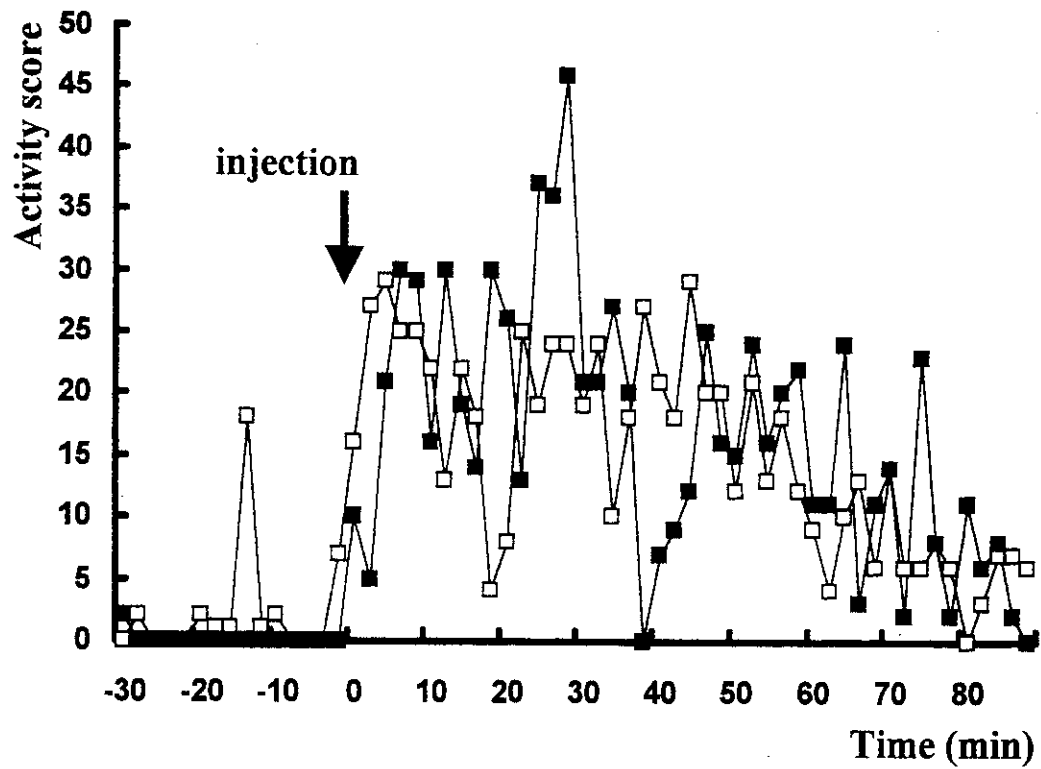
	saline challenge			MAP challenge		
	decrease	no change	increase	decrease	no change	increase
<b>before repeated MAP injection</b>	7	2	0	3	3	3
<b>after repeated MAP injection</b>	2	4	0	2	3	5



**Figure 3** Means and S.E.s of peri-stimulus time histograms of MAP challenged animals before and after repeated MAP administration. Open circles, before repeated MAP administration. Closed circles, after repeated MAP administration. Asterisks revealed that there are statistically significant differences in firing rates between before administration and after administration of MAP.



**Figure 4** Peri-stimulus time histograms activity score and relative firing rate of MAP challenged animals well sensitized with methamphetamine. Upper column, activity score. Lower column, relative firing rate of the ventral hippocampal neuron. Open circles, before repeated MAP administration. Closed circles, after repeated MAP administration.



**Figure 5** Peri-stimulus time histograms activity score and relative firing rate of MAP challenged animals no sensitized with methamphetamine. Upper column, activity score. Lower column, relative firing rate of the ventral hippocampal neuron. Open circles, before repeated MAP administration. Closed circles, after repeated MAP administration.



分担研究課題：**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

分担研究者：小山 司\*

共同研究者：安部川 智浩\*、伊藤 耕一\*\*、本田 稔\*

\*：北海道大学医学部精神医学教室

\*\*：国際医療センター精神科

研究要旨

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。高用量 methamphetamine(MA)の集中投与(MA: 6 mg/kg, s.c., q 2 hr, x 4)により 15 日後の時点で、線条体で dopamine(DA)、serotonin(5-HT)およびこれらの代謝産物の組織内含量が減少し、側坐核で 5-HT および 5-hydroxyindolacetic acid(5-HIAA)の組織内含量が減少した。この高用量 MA 処置の 10 日後の時点で MA(4 mg/kg)の stereotypy 誘発効果および MA(1 mg/kg)の locomotion 誘発効果に対する行動感作の成立が確認された。同時点での D1, D2 DA 受容体アゴニストである Apomorphine(APO)(0.5 mg/kg, s.c.)の stereotypy 誘発効果に対する感受性は不変であったが、APO(0.2 mg/kg, s.c.)の locomotion 誘発効果への感受性は低下した。一方、低用量 MA の処置(MA: 1.5 mg/kg, s.c., q 2 hr, x 4)では線条体、側坐核での DA, 5-HT およびこれらの代謝産物の組織内含量に変化はみられず、MA の stereotypy 誘発効果に対する行動感作は形成されたが、locomotion 誘発効果に対する感作は形成されなかった。同処置により APO の stereotypy および locomotion 誘発効果のいずれに対する感受性も低下した。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。

A. 研究目的

覚醒剤の薬理作用の研究は非可逆的な神経毒性のメカニズム研究と行動感作のメカニズム研究に大別できる。Amphetamine(AMPH)類を 1 日から数日の短期間で大量集中投与すると dopamine(DA)およびその代謝産物の組織

内含量の減少、DA 再取込み部位数の減少、tyrosine hydroxylase 活性の低下、DA 神経終末の組織学的変性などが線条体に選択的に、しかも、非可逆的に生じることから、これらの変化は MA の神経毒性の指標と考えられている。そのメカニズムとして同部位での DA の過剰放出、NMDA 受容体の

刺激、遷延性の glutamate 放出増加およびこれに基づくと推定される一酸化窒素 (nitric oxide) の産生などの関与が報告されている。さらに、側坐核を含む種々の脳部位で serotonin(5-HT) 神経終末に同様の神経毒性が生じることも明らかにされている。この神経毒性モデルは主に欧米においては、脳内覚醒剤の直接作用による覚醒剤精神病の急性中毒モデルと考えられた<sup>3)</sup>。

一方、比較的少量の AMPH 類を間欠的に 7 日から 14 日間反復投与すると、次第に異常行動が増強し、一旦増強するとこの反応性亢進が覚醒剤投与中止後も長期間持続する。この現象は行動感作 (behavioral sensitization) といわれ、そのメカニズムとして DA、glutamate、一酸化窒素、acetylcholine および GABA 系神経伝達を含む神経回路網の関与が考えられている。この行動感作は覚醒剤精神病の発現、遷延性および再発脆弱性のモデルと考えられている<sup>35, 36, 38)</sup>。

多くの研究はこれらの 2 つのモデルを別々に検討し、特に、行動感作のメカニズムを研究する際には神経毒性効果を排除する必要があるとさえされてきた<sup>10)</sup>。しかしながら、いわゆる “run”、“binge” といわれるような大量の覚醒剤の乱用状況<sup>3)</sup> を考慮すると、これら 2 つのモデルの相互関係を調べることは臨床的に重要と考えられる。最近、我々<sup>1)</sup>は、非毒性量の MA の 10 日間の反復投与により行動感作が形成された動物では、7 日間の断薬後に大量の MA を投与すると行動上は感作が発現す

るにもかかわらず、線条体、側坐核での DA、5-HT 系への神経毒性効果には耐性が形成されることを明らかにした。

今回、我々は、短期間での MA 大量集中投与により線条体での DA、5-HT 神経毒性、側坐核での 5-HT 神経毒性が発現された動物で、MA に対する行動感作の成立の有無を検討した。さらにシナプス後 DA D2 受容体感受性の変化の指標として DA D1, D2 受容体アゴニストである apomorphine(APO) に対する行動反応性の変化も検討した。また、本研究では神経化学的基盤が異なるとされる stereotypy<sup>8)</sup> と locomotor activity(locomotion)<sup>6)</sup>を別々に検討した。

## B. 方法

### 1. 動物と薬物

Wistar-King 雄性ラット(200-260 g)を 1 ケージに 1 個体ずつ、一定温度(24.0°C)、一定明暗周期(明期 06:30-18:30)の条件下で飼育した。Methamphetamine(MA)は大日本製薬、apomorphine(APO)は Sigma Chemical より購入した。これらの薬物を生理食塩水(生食)に 1 ml/kg の投与になるように溶解した。実験動物の取り扱いには北海道大学医学部動物実験に関する指針に準じた。

### 2. 実験方法

#### 2.1. 実験 1

ラットに高用量の MA(6 mg/kg)、低用量の MA(1.5 mg/kg)あるいは生食を 2 時間毎に 4 回皮下注射した。10 日間の断薬後 MA(4 mg/kg)、MA(1 mg/kg)あるい

は生食を皮下注射し、行動の変化を測定した。これらの処置によりラットは以下のグループに分類された。SS: 生食処置-生食再投与群、MS: MA(6 mg/kg x 4 or 1.5 mg/kg x 4)処置-生食再投与群、SM(4): 生食処置-MA(4 mg/kg)再投与群、SM(1): 生食処置-MA(1 mg/kg)再投与群、MM(4): MA(6 mg/kg x 4, or 1.5 mg/kg x 4)処置-MA(4 mg/kg)再投与群、MM(1): MA(6 mg/kg x 4 or 1.5 mg/kg x 4)処置-MA(1 mg/kg)再投与群の各群である。

#### 2.1.1. 行動変化の測定

MA(4 mg/kg)投与により誘発される stereotypy は Dougherty&Ellinwood の原法に準じて、MA(1 mg/kg)投与で誘発される locomotion は赤外線センサー装置を用いて10分毎に評価した。

#### 2.1.2. モノアミンおよびその代謝産物の組織内含量の測定

MA(4 mg/kg), MA(1 mg/kg)および生食の再投与による行動変化の測定の5日後に断頭し、線条体と側坐核の2部位における DA, 5-HT およびこれらの代謝産物の組織内含量を HPLC-ECD を用いて測定した。

#### 2.2. 実験2

高用量 MA(6 mg/kg x 4)、低用量 MA(1.5 mg/kg x 4)あるいは生食の処置の10日後に、APO(0.5 mg/kg, 皮下注射)により誘発される stereotypy および APO(0.2 mg/kg, 皮下注射)による locomotion の変化について10分毎に前述した方法により測定した。

#### 2.3. 統計学的解析

Stereotypy の変化については Mann-Whitney の U test を、locomotion の変化およびモノアミン類の組織内含量については ANOVA を用いて解析し、有意水準は  $p < 0.05$  に設定した。

#### C. 結果

高用量 MA(6 mg/kg x 4)処置群の MA(4 mg/kg)再投与による stereotypy 誘発効果は、生食処置群のそれよりも10, 50, 110, 130, 140 と220 から240分の各時点 ( $p < 0.05$ ) および20 から40, 60 から100 と120分の各時点 ( $p < 0.01$ ) で大きかった (Fig. 1A)。

高用量 MA 処置群の MA(1 mg/kg)再投与による locomotion の変化は生食処置群のそれよりも0 から50, 70, 100, 140 と170分の各時点 ( $p < 0.05$ ) で大きかった (Fig. 1B)。

高用量 MA(6 mg/kg x 4)処置により MS, MM(4) および MM(1) 群の DA, dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), 5-HT および 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) の線条体での組織内含量は、生食処置群の同含量に比して減少した ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2A)。高用量 MA 処置によりすべての群で DA およびその代謝産物の側坐核での組織内含量に変化はみられなかったが、同部位での 5-HT 含量は MS, MM(4) および MM(1) の各群で生食処置群の同含量に比して減少した ( $p < 0.05$ )。5-HIAA の含量は MS 群で減

少し( $p < 0.05$ )、MM(4)群( $p = 0.055$ )とMM(1)群( $p = 0.075$ )において減少傾向を示した(Fig. 2B)。

低用量 MA(1.5 mg/kg x 4)処置群の MA(4 mg/kg)再投与による stereotypy 誘発効果は生食処置群のそれよりも 20, 30, 110 から 180 と 200 分の各時点( $p < 0.01$ ) および 40 から 70, 90, 220 と 230 分の各時点( $p < 0.05$ )で大きかった(Fig. 3A)。

MA(1 mg/kg) 再投与による locomotion 変化には低用量 MA 処置群と生食処置群の間で差がなかった(Fig. 3B)。

低用量 MA 処置により各群での線条体、側坐核両部位での DA, 5-HT およびこれらの代謝産物の組織内含量には変化を生じなかった(Fig. 4)。

APO(0.5 mg/kg) 投与による stereotypy 誘発効果は生食処置群のそれに比して、高用量 MA 処置群では有意な差がなかったが、低用量 MA 処置群では 20, 30 分( $p < 0.01$ ) および 40 分( $p < 0.05$ )の各時点で有意に小さかった(Fig. 5)。

APO(0.2 mg/kg) 投与による locomotion 誘発効果は生食処置群のそれに比して、高用量 MA 処置群では 20 分( $p < 0.05$ ) および 30 分( $p < 0.01$ )の各時点で、低用量 MA 処置群では 10 分、20 分( $p < 0.05$ ) および 30 分( $p < 0.01$ )の各時点で有意に小さかった(Fig. 6、図の混乱を避けるために有意差マークは省略)。

#### D. 考察

覚醒剤精神病のモデルの1つである神経

毒性モデルは、高用量 AMPH の短期間での集中的乱用で paranoid psychosis をきたすという臨床的事実を基盤としている 3)。その病態は高濃度の AMPH 血中濃度維持による急性中毒症状と考えられるが、この高用量の覚醒剤乱用による paranoid psychosis の覚醒剤使用中止後の遷延性および再使用による再発脆弱性については臨床的に十分検討されていない。これらの重要な問題点是非毒性量の覚醒剤乱用者について検討され、遷延性、再発脆弱性が明らかにされ、その生物学的基盤として長期間持続する行動感作、すなわち lasting behavioral sensitization(LBS)が提示された 13)。覚醒剤乱用者の“run”、“binge”といった短期間での大量の覚醒剤乱用状況 3)を考慮すると、DA および 5-HT 神経毒性誘発の危険性を有する大量の覚醒剤乱用によって発現する精神症状の遷延性、再使用による再発脆弱性の形成の可能性を検討することは臨床的にも意義深いと考えられる。

高用量の AMPH 類投与後の DA および 5-HT 神経毒性発現下において、AMPH 類の stereotypy あるいは locomotion 誘発効果に対して行動感作が形成されるとのいくつかの研究報告があるが、これらには検討不十分な点がある。Robinson ら 12)は高用量 MA(15 mg/kg, q 6 hr, x 6)投与により、7 日間の断薬後に AMPH(1.5 mg/kg)の locomotion 誘発効果に対して行動感作が形成されるが、線条体での DA 放出の程度は不変であること、線条体、側