坐核でのDA含量、内側前頭前野での5-HT含量が減少することなどを報告したが、stereotypy については検討していない。Short ら 14)は高用量 AMPH(10 mg/kg, q 12 hr, for 5 days)投与により、3 日間の断薬後に AMPH(10 mg/kg)の stereotypy 誘発効果および AMPH(5 mg/kg)の locomotion 誘発効果に対して行動感作が形成されることを報告したが、断薬期間が 3 日間と短く、神経毒性については全脳でしか検討しておらず、その程度も不十分である。Ellison ら 4)は高用量 AMPH 投与(24 mg をペレットで 5 日間持続投与)により、7 日間の断薬後に AMPH(3 mg/kg)の stereotypy 誘発効果に対して行動感作が形成されることを報告したが、locomotion の検討、神経毒性効果の提示をしていない。今回の我々の研究は、これらの問題点を考慮に入れ、毒性量の MA 処置後 10 日間という十分な断薬期間を設け、神経化学的基盤が異なるとされる stereotypy8) と locomotion6)を別々に検討し、さらに、シナプス後 DA 受容体の感受性の指標として APO に対する行動反応性の変化も検討した。また、投与間隔、投与回数、断薬期間を全く同じに設定した非毒性量の MA 処置による諸変化の検討も行い、毒性量 MA 処置による変化との比較を行った。

本研究では高用量 MA 投与により DA 系については線条体のみで神経毒性を認め、5-HT 系については線条体、側坐核の両部位で神経毒性を認めた。この結果はこれまでの報告 9)により支持される。主に線条体に関連すると考えられるMAのstereotypy 誘発効果 8)に対する行動感作は、同部位で DA 系、5-HT 系神経毒性を生じる毒性量 MA 処置群とこれらの神経毒性を生じていない非毒性量 MA 処置群の両群で形成された。従って、stereotypy の誘発効果に対する行動感作を DA および 5-HT 系神経毒性の有無によって説明することはできない。一方、主に側坐核に関連すると考えられる MA の locomotion 誘発効果 6)に対する行動感作は、同部位で 5-HT 系神経毒性を生じる毒性量 MA 処置群でのみ形成されたが、非毒性量 MA 処置群では形成されなかった。側坐核を含む中脳辺縁 DA 系は黒質線条体 DA 系よりもより密接に精神病症状と関連するとの指摘 7)を考慮すると、短期間での大量の覚醒剤乱用により断薬後にも長期持続する覚醒剤精神病の非可逆的な再発脆弱性が形成されてしまう可能性が示唆される。5-HT 神経毒性を生じない AMPH の間欠的反復投与によっても locomotion 誘発効果に対する行動感作は形成される 11)ことから、本研究で得た MA の locomotion 誘発効果に対する行動感作を側坐核での 5-HT 神経毒性で直接的に説明することは難しい。

Robinson と Becker10)は AMPH の神経毒性モデルが AMPH psychosis のモデルとして不適当な理由をいくつか提示している。第一に、AMPH 神経毒性モデルでは AMPH に対する持続的な過感受性が生じないという。しかしながら、本研究は毒性量 MA の処置が MA の stereotypy、

locomotion 誘発効果に対する行動感作を形成することを、断薬 10 日後の時点で確認した。臨床的には、この結果は、毒性量の MA を短期間で集中的に乱用しただけで MA 再使用による再発脆弱性が形成され、しかも長期間維持される可能性を示唆する。我々の既報 1)と考え合わせると、大量の MA の集中的乱用による神経毒性の程度は、過去に MA を長期間乱用していた者より全く乱用歴のない者のほうが大きく、しかも、わずか数時間の乱用でも脳に非可逆的な再発脆弱性を誘発する危険性を示唆している。第二に、AMPH psychosis を呈した患者で DA 系、5-HT 系に対する神経毒性が生じている証拠がないという。しかし、Wilson ら 15)は MA 乱用者の死後脳で線条体、側坐核での DA 含量、DA 再取込み部位数の減少、tyrosine hydroxylase 活性の低下、内側前頭前野での 5-HT 含量の減少を報告した。第三に、AMPH 神経毒性は長期間持続するのに AMPH psychosis は AMPH 投与期間中にしか出現せず、断薬後には消退してしまうという。しかし、Sato ら 13) は MA 乱用者において MA 使用中止後にも長期間持続する覚醒剤精神病を報告している。以上の議論から、AMPH 類の神経毒性モデルもまた覚醒剤精神病のモデルとして検討する必要があることは明らかである。

いくつかの研究により AMPH 類の間欠的投与により AMPH に対する行動感作の形成された動物いおいて D1, D2 DA 受容体アゴニストである APO による行動効果の亢進が確認された（いわゆる cross-sensitization)。このことから、AMPH に対する行動感作の発現は DA 受容体の感受性亢進によるものと考えられた。しかしながら、APO による行動効果の増強は認めないとの報告も多い 2, 5)。受容体結合実験でも D2 DA 受容体の過感受性を否定する報告がほとんどである。

本研究では、APO の stereotypy 誘発効果に対する感受性は高用量 MA 処置群では変化なく、低用量 MA 処置群では低下した。APO の locomotion 誘発効果に対する感受性は高用量、低用量 MA 処置両群において低下した。APO の stereotypy 誘発効果および locomotion 誘発効果のそれぞれが主に線条体 8)および側坐核 6)のシナプス後 D1, D2 DA 受容体を介していると仮定すると、今回の結果より以下の推測が可能である。すなわち、線条体のシナプス後 D1, D2 DA 受容体の感受性は高用量 MA 処置では変化せず、低用量 MA 処置では低下し、側坐核での同受容体の感受性は高用量、低用量 MA 処置両群で低下すると推測される。以上の APO に対する行動反応性の変化の所見から MA の stereotypy および locomotion 誘発効果に対する行動感作の形成を D1, D2 DA 受容体の過感受性で説明することは困難である。これらの DA 受容体の感受性変化のメカニズムは不明である。

Robison ら 12)は、我々と同様の毒性量の MA 処置により行動感作が形成されること ,断薬後の MA 再投与による線条体での DA 放出の増加の程度はコントロール群と

差がないことを報告した。前述の APO に対する行動反応性の所見と考え合わせると、毒性量 MA 処置による MA の stereotypy 誘発効果に対する行動感作発現のメカニズムを、線条体でのシナプス後あるいはシナプス前 DA 機能の変化によって説明するのは困難である。それゆえ、glutamate 系、GABA 系、あるいは acetylcholine 系神経伝達の機能変化を追求する必要があるものと考えられる。さらに、今回の実験結果を包括的に説明するために、毒性量 MA 処置後の MA 再投与による側坐核での DA 放出の増加の変化、あるいは、非毒性量 MA 処置後の線条体、側坐核両部位での DA 放出増加の変化についても明らかにししていく必要がある。

E. 結論

1. MA の stereotypy 誘発効果に対する行動感作は、線条体の DA 系、5-HT 系に神経毒性を生じる高用量 MA 処置とこれらの神経毒性を生じない低用量 MA 処置のいずれによっても形成された。

2. APO の stereotypy 誘発効果に対する感受性は、毒性量の MA 処置によっては変化がなく、非毒性量の MA 処置によって低下した。これらより、MA の stereotypy 誘発効果に対する行動感作の形成、維持をシナプス後 D1, D2 DA 受容体の過感受性で説明することは困難であることが示唆された。

3. MA の locomotion 誘発効果に対する行動感作は側坐核の 5-HT 系に神経毒性を生じる高用量 MA 処置によってのみ形成された。

4. APO の locomotion 誘発効果に対する感受性は毒性量の MA 処置あるいは非毒性量の MA 処置によって低下した。このことから、MA の locomotion 誘発効果に対する行動感作の形成、維持をシナプス後 D1, D2 DA 受容体の過感受性で説明することはできないことが示唆された。

5. これらの所見より、“run”、“binge”といった覚醒剤の短期間での大量乱用によって、断薬後にも長期持続する覚醒剤に対する再発脆弱性が形成される可能性が示唆された。

参考文献

1. Abekawa, T., Ohmori, T. and Koyama, T., Tolerance to the neurotoxic effect of methamphetamine in rats behaviorally sensitized to methamphetamine or amphetamine, Brain Res., 767(1997)34-44.

2. Antelman, S.M. and Chiodo, L.A., Amphetamine as a stressor. In I. Creese(Ed.), Stimulations: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives, Raven Press, New York, 1983, pp. 269-299.

3. Connell, P.H., Amphetamine Psychosis, Chapman and Hill, London, 1958.

4. Ellison, G.D. and Morris, W., Opposed stages of continuous amphetamine

administration: parallel alterations in motor stereotypies and in vivo spiroperidol accumulation, Eur. J. Pharmacol., 74(1981)207-214.

5. Jackson, D.M., Bailey, R.C., Christie, M.J., Crisp, E.A. and Skerritt, J.H., Long-term D-amphetamine in rats: Lack of a change in postsynaptic dopamine receptor sensitivity, Psychopharmacology, 73(1981)276-280.

6. Kelly, P.H., Seviuor, P.W. and Iversen, S.D., Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum, Brain Res., 94(1975)507-522.

7. Lipska, B.K. and Weinberger, D.R., Cortical regulation of the mesolimbic dopamine system: Implications for schizophrenia. In P.W. Kalivas and C.D. Barnes(Eds.), Limbic Motor Circuits and Neuropsychiatry, CRC Press, Inc, 1993, pp. 329-349.

8. Randrup, A. and Munlvad, I., Biochemical, anatomical and psychological investigations of stereotyped behavior induced by amphetamines. In E. Costa and S. Garattini(Eds.), Amphetamines and Related Compounds, Raven Press, New York, 1970, pp. 695-713.

9. Ricaurte, G.A., Schuster, C. and Seiden, L.S., Long-term effects of repeated methylamphetamine administration on dopamine and serotonin neurons in the rat brain: A regional study, Brain Res.,193(1980)153-163.

10. Robinson, T.E. and Becker, J.B., Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal models of amphetamine, Brai Res. Rev., 11(1986)157-198.

11. Robinson, T.E., Jurson, P.A., Bennet,J.A. and Bentgen, K.M., Persistent sensitization of dopamine neurotransmission in ventral striatum(nucleus accumbens) produced by prior experience with (+)-amphetamine: A microdialysis study in freely moving rats, Brain Res., 462(1988)211-212.

12. Robinson, T.E., Yew, J., Paulson, P.E. and Camp, D.M., The long-term effects of neurotoxic doses of methamphetamine on the extracellular concentration of dopamine measured with microdialysis in striatum, Neurosci. Lett., 110(1990)193-198.

13. Sato, M., A lasting vulnerability to psychosis in patients with previous methamphetamine psychosis, Annals. New York Acad. Sci., 654(1992)160-

179.
14. Short, P.H. and Shuster, L., Changes in brain norepinephrine associated with sensitization to d-amphetamine, Psychopharmacology, 48(1976)59-67.
15. Wilson, J.M., Kalasinsky, K.S., Levey, A.I., Bergeron, C., Reiber, G., Anthony, R.M., Schmunk, G.A., Shannak, K., Haycock, J.W. and Kish, S.J., Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users., Nature Med., 2(1996)699-703.

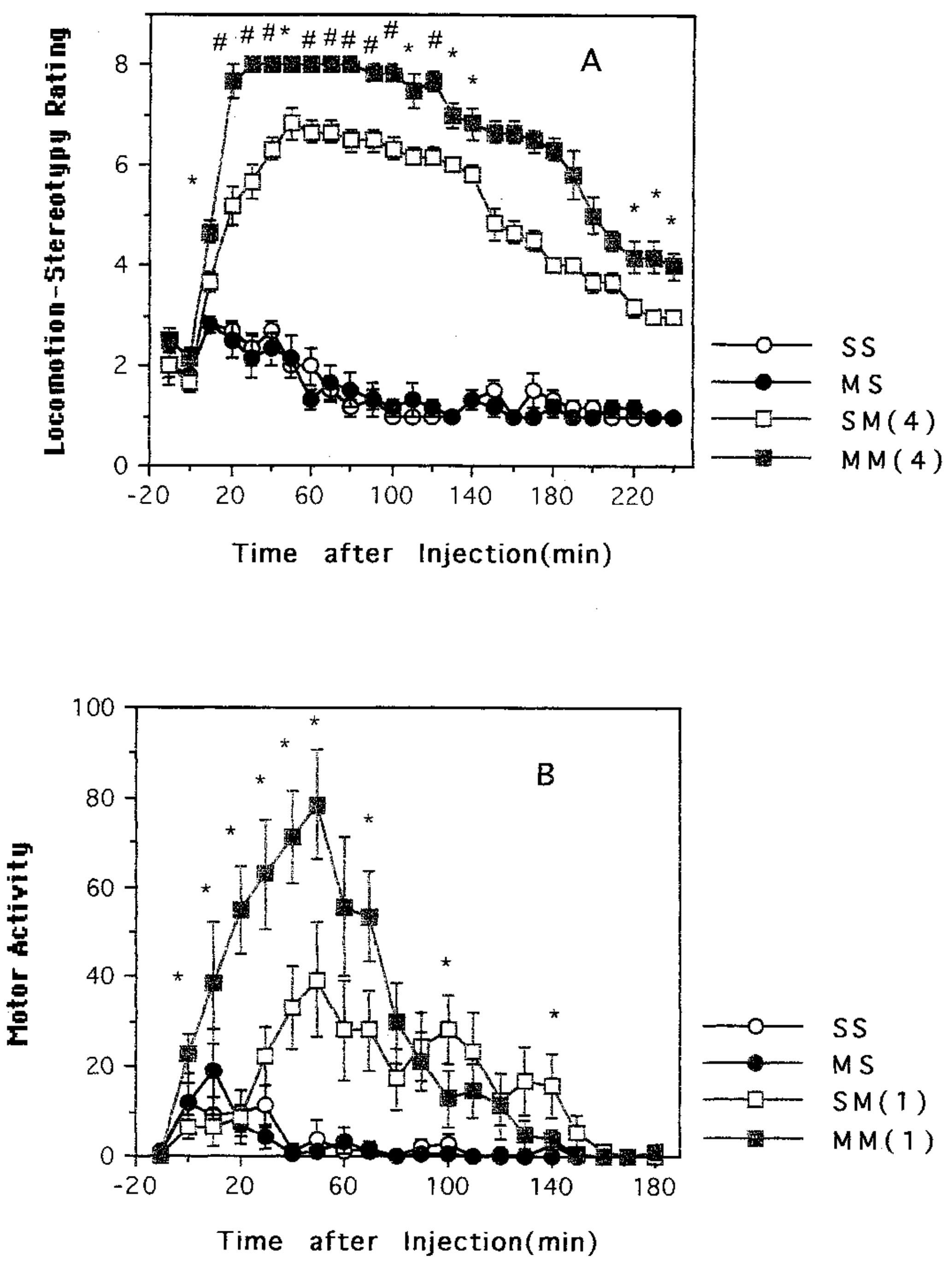


Fig. 1. MA(4 mg/kg and 1 mg/kg)- or saline-induced changes of locomotion-stereotypy rating score 10 days after a high dose of MA(6 mg/kg x 4) or saline(1 ml/kg x 4) treatment.

(A) Animals were challenged with MA(4 mg/kg, s.c.) or saline(1 ml/kg, s.c.) 10 days after the MA or saline treatment. SS: saline treatment-saline challenge group(n=6), MS: MA treatment-saline challenge group(n=6), SM(4): saline treatment-MA challenge group(n=6), MM(4): MA treatment-MA challenge group(n=6). Significant differences between MA(4) group and SM(4) group are designated by *(p<0.05) and #(p<0.01).

(B) Animals were challenged with MA(1 mg/kg, s.c.) or saline(1 ml/kg, s.c.) 10 days after the MA or saline treatment. SS: saline treatment-saline challenge group(n=6), MS: MA treatment-saline challenge group(n=6), SM(1): saline treatment-MA challenge group(n=6), MM(1): MA treatment-MA challenge group(n=6). F value for motor activity was $F_{57,400}=7.78$ ($p<0.01$). Significant differences between MA(1) group and SM(1) group are designated by *(p<0.05).

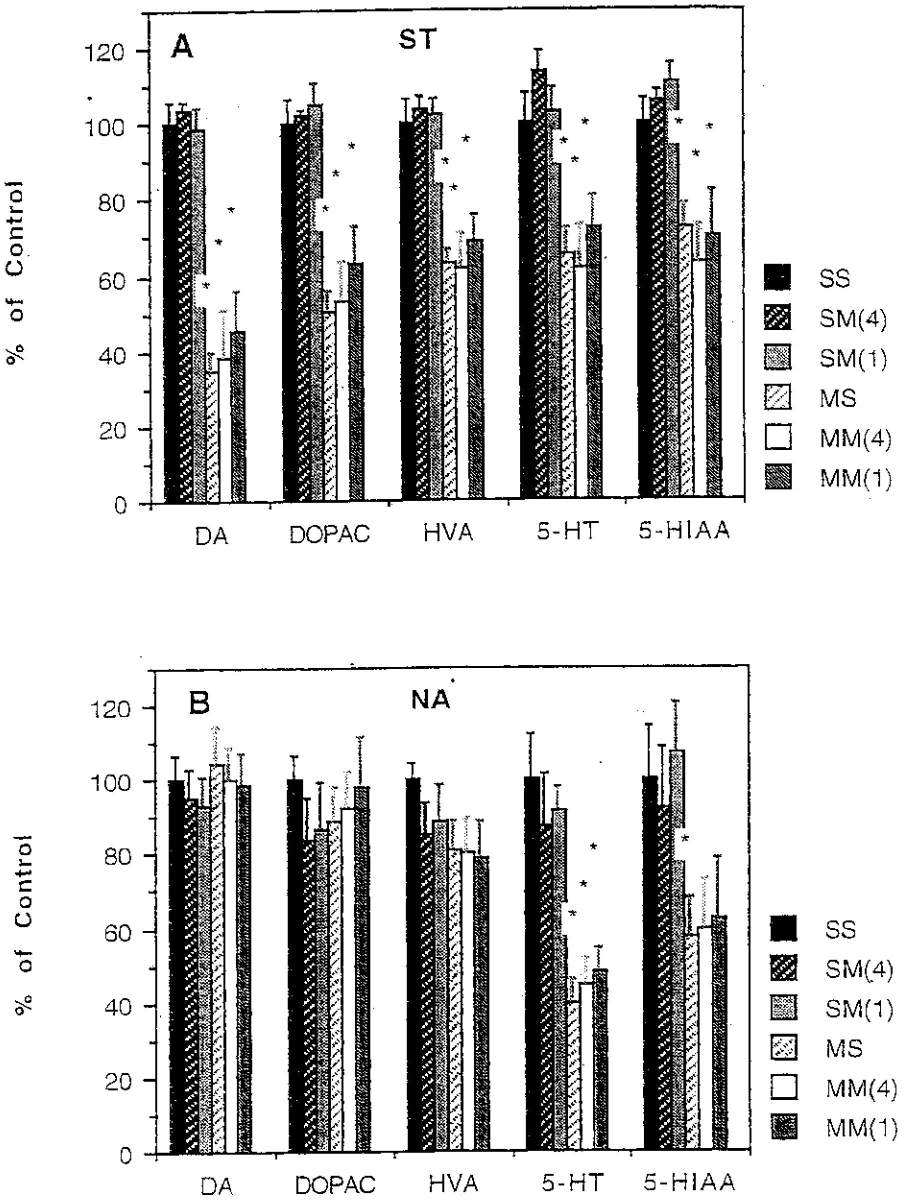
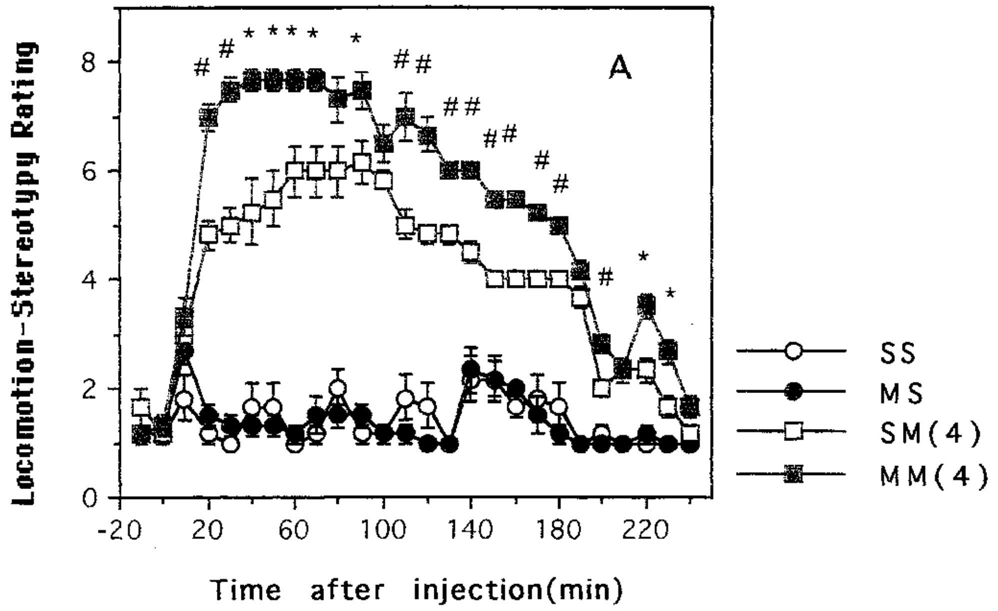


Fig. 2. Changes of contents of DA, 5-HT and their metabolites in the ST(A) and NA(B).

Animals treated with a high dose of MA(6 mg/kg x 4) or saline(1 ml/kg x 4) were challenged with MA(4 mg/kg or 1 mg/kg) or saline(1 ml/kg) 10 days after the MA or saline treatment. The rats were sacrificed 5 days after the MA or saline challenge. Animal number of each group was six. The absolute value(p mol/mg protein) of contents of monoamines and their metabolites of SS group(control group) were as follows. DA: 565.46±32.67(ST), 347.41±22.00(NA)., DOPAC: 65.64±4.18(ST), 53.42±3.43(NA)., HVA: 57.01±3.83(ST), 25.96±1.21(NA)., 5-HT: 10.4±0.85(ST), 15.15±1.83(NA)., 5-HIAA: 15.82±1.02(ST), 9.93±1.46(NA). F value($p<0.01$) for DA, DOPAC, HVA, 5-HT or 5-HIAA in the ST was $F_{5,30}$=18.46, 12.93, 11.33, 7.36 or 7.06, respectively. F value for 5-HT or 5-HIAA in the NA was $F_{5,30}$=8.24($p<0.01$), 2.47($p<0.05$), respectively. Significant differences from SS group are designated by *($p<0.05$).



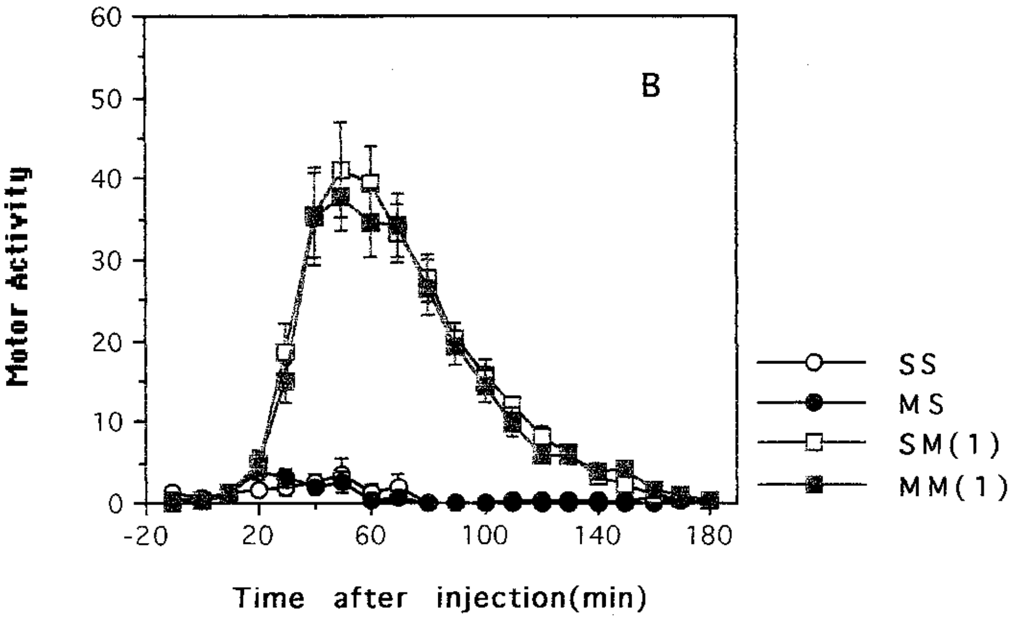


Fig. 3. MA(4 mg/kg and 1 mg/kg)- or saline-induced changes of locomotion-stereotypy rating score 10 days after a low dose of MA(1.5 mg/kg x 4) or saline(1 ml/kg x 4) treatment.

(A) Animals were challenged with MA(4 mg/kg, s.c.) or saline(1 ml/kg, s.c.) 10 days after the MA or saline treatment. SS: saline treatment-saline challenge group(n=6), MS: MA treatment-saline challenge group(n=6), SM(4): saline treatment-MA challenge group(n=6), MM(4): MA treatment-MA challenge group(n=6). Significant differences between MA(4) group and SM(4) group are designated by *($p<0.05$) and #($p<0.01$).

(B) Animals were challenged with MA(1 mg/kg, s.c.) or saline(1 ml/kg, s.c.) 10 days after the MA or saline treatment. SS: saline treatment-saline challenge group(n=6), MS: MA treatment-saline challenge group(n=6), SM(1): saline treatment-MA challenge group(n=9), MM(1): MA treatment-MA challenge group(n=9). F value for motor activity was $F_{57,520}=17.01$ ($p<0.01$).

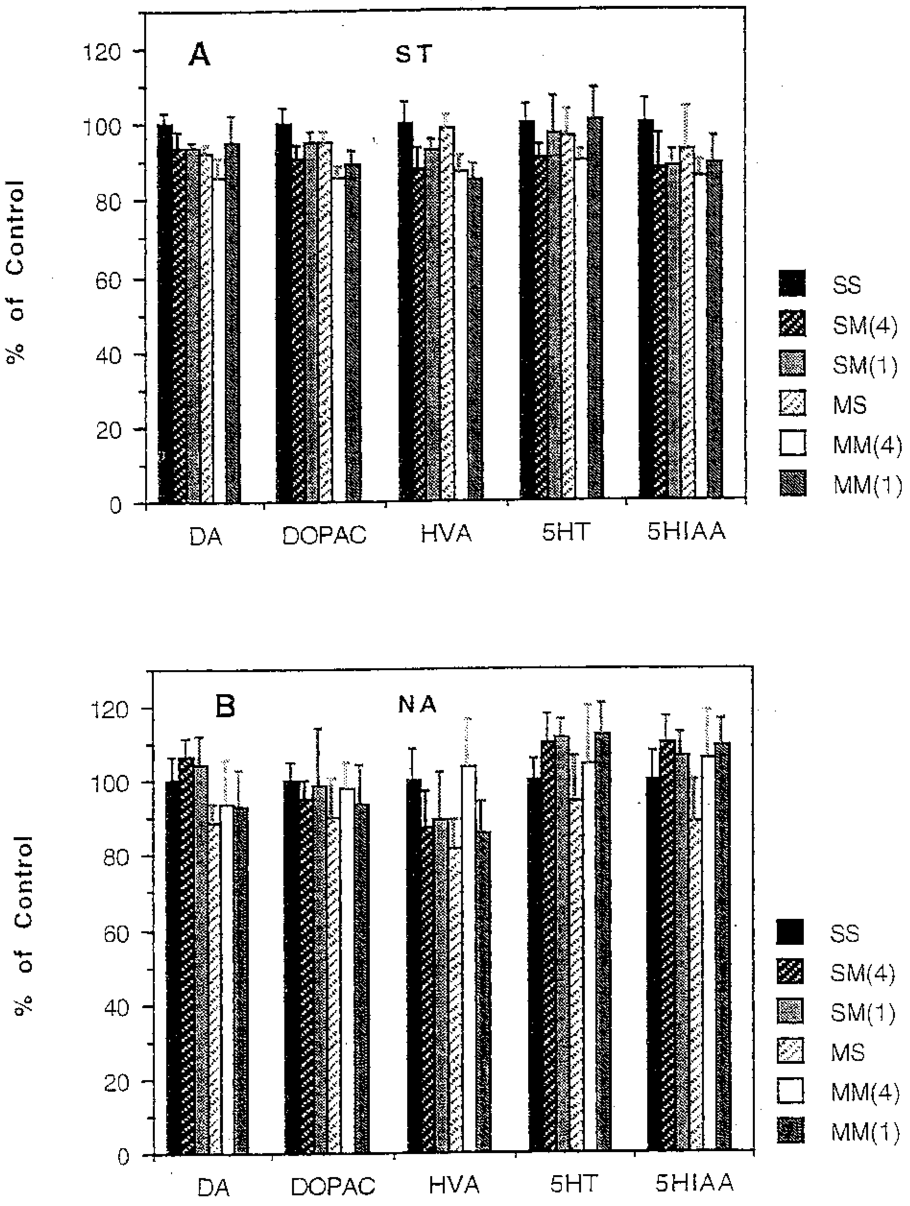


Fig. 4. Changes of contents of DA, 5-HT and their metabolites in the ST(A) and NA(B).

Animals treated with a low dose of MA(1.5 mg/kg x 4) or saline(1 ml/kg x 4) were challenged with MA(4 mg/kg or 1 mg/kg) or saline(1 ml/kg) 10 days after the MA or saline treatment. The rats were sacrificed 5 days after the MA or saline challenge. Animal number of each group was six. The absolute value(p mol/mg protein) of contents of monoamines and their metabolites of SS group(control group) were as follows. DA: 858.44±25.37(ST), 415.31±27.65(NA)., DOPAC: 89.81±4.10 (ST), 60.66±3.05(NA)., HVA: 72.46±4.28(ST), 33.47±2.88(NA)., 5-HT: 15.85 ±0.85(ST), 24.46±1.44(NA)., 5-HIAA: 15.02±1.02(ST), 11.09±0.88 (NA).

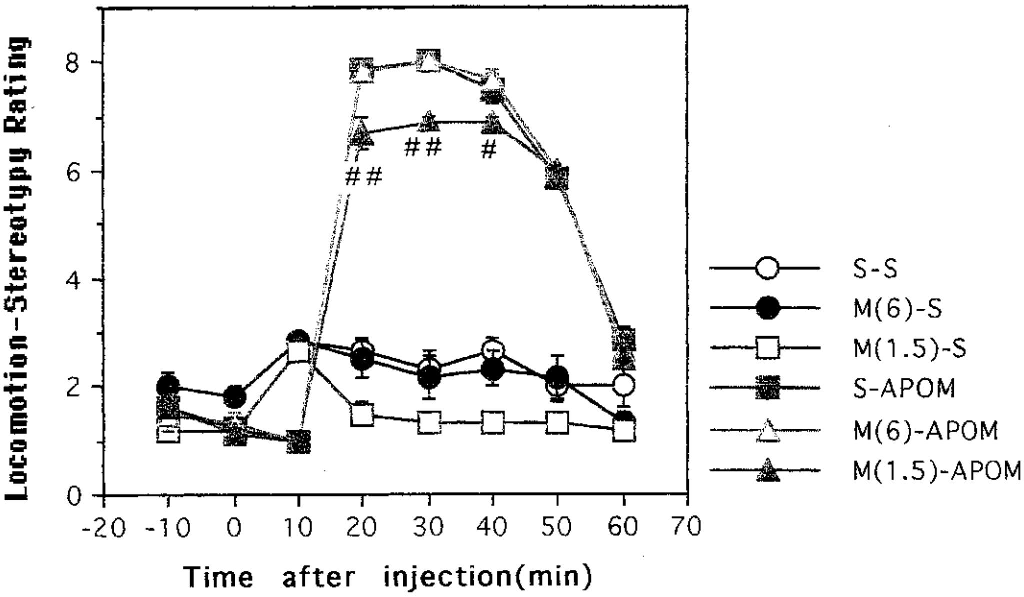


Fig. 5. APOM(0.5 mg/kg)-induced stereotypy, 10 days after a high dose(MA: 6 mg/kg x 4) or a low dose(MA: 1.5 mg/kg x 4) of MA-treatment.

\# : $p<0.05$ M(1.5)-APOM group vs. S-APOM group

\## : $p<0.01$ M(1.5)-APOM group vs. S-APOM group

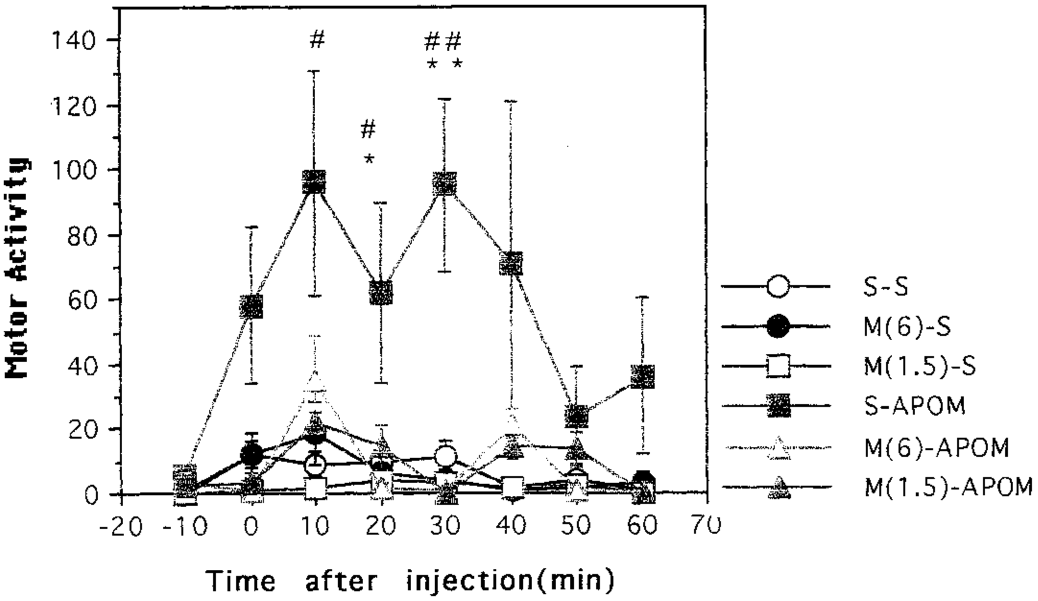


Fig. 6. APOM(0.2 mg/kg)-induced locomotor activity, 10 days after a high dose(MA: 6 mg/kg x 4) or a low dose(MA: 1.5 mg/kg x 4) of MA-treatment.

* : $p<0.05$ M(6)-APOM group vs. S-APOM group

** : $p<0.01$ M(6)-APOM group vs. S-APOM group

\# : $p<0.05$ M(1.5)-APOM group vs. S-APOM group

\## : $p<0.01$ M(1.5)-APOM group vs. S-APOM group

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

分担研究課題：覚醒剤逆耐性現象における中枢ヒスタミン神経系の作用：ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究

主任研究者：佐藤光源 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)、渡邉建彦 1)

東北大学医学部細胞薬理学分野 1)、精神神経学分野 2)

研究要旨

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、①生理食塩水を投与した HDC-KO マウスの間脳におけるノルエピネフリン（NE）含量は野生型に比較して有意に減少していた。一方ドパミン（DA）、DOPAC、ホモバニリン酸、セロトニン、5-HIAA 含量には有意な変化がみられなかった。②野生型における HA 含量は、MAP 投与により皮質で増加し、間脳と小脳で有意に減少していた。③MAP 投与により HDC-KO マウスの DA 含量は、生理食塩水投与群に比較して、皮質において増加し、間脳において減少していた。さらに、野生型マウスで見られた DOPAC 含量の有意な減少がみられなくなった。④アミノ酸含量に関しては、間脳において MAP 投与による GABA 含量の減少が HDC-KO マウスで消失していた。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。

A. 研究目的

覚醒剤であるメタンフェタミン（MAP）は、ドパミントランスポーターに作用して、その再取り込みを阻害すると共に、遊離を促進する[1, 2]。MAP をマウスやラットに急性投与すると、上記の神経化学的変化に伴い移所運動活性の増加や常同行動の出現が見られる[3-5]。さらに MAP の反復投与により、これらの行動が長期持続的に増強されることが知られており、この増強は逆耐性現象と呼ばれている[3-6]。一方同じ生理活性アミンのひとつであるヒスタミン（HA）は L-ヒスチジンからヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）により合成され、神経伝達物質あるいは神経修飾物質とみなされている[7-10]。HA ニューロンは後部視床下部の結節乳頭核に限局し、そこから中枢神経系に幅広く分布しており、さまざまな脳機能（とりわけ視床下部の機能である睡眠／覚醒リズム、食欲、性行動や精神神経機能）に関与している[7-10]。

これまでにわれわれは、HA の合成酵素である HDC 遺伝子ノックアウト（KO）マウスを作成し、MAP 急性投与および慢性

投与による逆耐性現象における中枢 HA 神経系の作用につき検討した。その結果、MAP 急性投与による移所運動量の増加時間が、KO マウスで延長しており、さらに逆耐性現象の形成が促進されることが明らかになった。中枢 HA は覚醒アミンとして働く一方で、MAP の急性運動効果および逆耐性現象形成過程を抑制することを明らかにした。

今回、MAP 急性投与による中枢 HA 神経系の脳内アミンおよびアミノ酸に対する作用をさらに明らかにする目的で、HDC 遺伝子 KO マウスと野生型マウスに MAP を急性投与し、投与後 1 時間の脳内アミンおよびアミノ酸含量を計測した。

B. 方法

1．動物

HDC 遺伝子 KO マウスは、大津らによって相同組換え法を用いる定法に従って作成された[11]。

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

2．薬物投与

野生型及び HDC 遺伝子 KO マウスの腹腔内に MAP（ヒロポン、大日本製薬）（1mg/kg）を投与し、1 時間後に断頭した。氷上にて脳を取り出し前脳、中脳、小脳の 3 部位に分割し、速やかにホモジナイズした。ホモジネートを遠心し、フィルターろ過した。ノルエピネフリン（NE)、エピネフリン（NE）ホモバニリン酸（HVA）ドパミン (DA)、DOPAC、セロトニン (5 HT)、5-HIAA は HPLC 電気化学検出法により測定した。HA は HPLC 蛍光法にて測定した。アミノ酸はアミノ酸分析器にて測定した [12]。

データは一元配置分散分析法と Bonferroni 法により解析し、P 値は 0.05 未満を有意とした。

C. 結果

①生理食塩水を投与した HDC-KO マウスの間脳におけるノルエピネフリン（NE）含量は野生型に比較して有意に減少していた。一方ドパミン（DA）、DOPAC、ホモバニリン酸、セロトニン、5-HIAA 含量には有意な変化がみられなかった（Table 1)。②野生型における HA 含量は、MAP 投与により皮質で増加し、間脳と小脳で有意に減少していた（Table 1)。③MAP 投与により HDC-KO マウスの DA 含量は、生理食塩水投与群に比較して、皮質において増加し、間脳において減少していた。さらに、野生型マウスで見られた DOPAC 含量の有意な減少がみられなくなった（Table 1)。④アミノ酸含量に関しては、間脳において MAP 投与による GABA 含量の減少が HDC-KO マウスで消失していた（Table 2)。

D. 考察

HDC-KO マウス間脳の NE 含量が減少していたことは、日内リズムの形成、維持に対して、HA 神経系が NE 神経系と相互作用を持っていることを示唆すると考えられる。一方 MAP 投与による運動量増加に関しては、HA 神経系が抑制的に作用し、MAP 投与後に HA 神経系の機能亢進がみられることが報告されている。野生型における HA

の変化は、MAP 投与が HA 神経系を活性化するという、これまでの報告に合致した結果と考えられた[13-16]。また、HDC-KO マウスにおいて MAP 投与による DA 遊離が増強され、その代謝に変化をもたらすことが示唆されるとともに、GABA 含量の変化も観察され、これらの神経系の変化が 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。

文献

1. Giros, B., et al., Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. Nature, 1996. **379**(6566): p. 606-12.
2. Jones, S.R., et al., Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. J Neurosci, 1998. **18**(6): p. 1979-86.
3. Robinson, T.E. and J.B. Becker, Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. Brain Res, 1986. **396**(2): p. 157-98.
4. Kalivas, P.W. and J. Stewart, Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. Brain Res Brain Res Rev, 1991. **16**(3): p. 223-44.
5. Segal, D.S. and R. Kuczenski, Behavioral pharmacology of amphetamine., in Amphetamine and its analogs, A.K. Cho and D.S. Segal, Editors. 1994, Academic Press: New York. p. 115-150.
6. Seiden, L.S., K.E. Sabol, and G.A. Ricaurte, Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1993. **33**: p. 639-77.
7. Prell, G.D. and J.P. Green, Histamine as a neuroregulator. Annu Rev Neurosci, 1986. **9**: p. 209-54.
8. Schwartz, J.C., et al., Histaminergic transmission in the mammalian brain. Physiol Rev, 1991. **71**(1): p. 1-51.
9. Watanabe, T. and H. Wada, eds. Histaminergic Neurons: Morphology and Function. 1991, CRC Press: Boca Raton, Florida.
10. Onodera, K., et al., Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. Prog Neurobiol, 1994. **42**(6): p. 685-702.
11. Ohtsu, H., S. Suzuki, and T. Watanabe, Assessment of in vivo effect of histamine using histidine decarboxylase (HDC) gene disrupted mice. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1998. **358**(Suppl. 2): p. R 762.
12. Sakai, N., et al., Long-term depletion of brain histamine induced by alpha-fluoromethylhistidine increases feeding-associated locomotor activity in mice with a modulation of brain amino acid levels. Behav Brain Res, 1995. **72**(1-2): p. 83-8.
13. Ito, C., et al., The effect of methamphetamine on histamine level and histidine decarboxylase activity in the rat brain. Brain Res, 1996. **734**(1-2): p. 98-102.

14. Ito, C., et al., Effects of dopamine antagonists on neuronal histamine release in the striatum of rats subjected to acute and chronic treatments with methamphetamine. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **279**(1): p. 271-6.
15. Ito, C., et al., The role of the brain histaminergic neuron system in methamphetamine- induced behavioral sensitization in rats. Ann N Y Acad Sci, 1996. **801**: p. 353-60.
16. Ito, C., et al., Effects of histamine agents on methamphetamine-induced stereotyped behavior and behavioral sensitization in rats. Psychopharmacology (Berl), 1997. **130**(4): p. 362-7.

Table 1. HDC ノックアウトマウスにおけるモノアミン含量の変化

Region	genotype and treatment		Norepinephrine	Dopamine	DOPAC	HVA
Forebrain	+/+	saline	9.76 ± 2.16	4.24 ± 0.43	0.51 ± 0.02	0.78 ± 0.24
		METH	10.69 ± 1.94	5.46 ± 0.83	0.39 ± 0.09	0.69 ± 0.10
	-/-	saline	10.06 ± 2.53	3.96 ± 1.31	0.44 ± 0.10	0.83 ± 0.26
		METH	9.52 ± 1.49	5.47 ± 0.45	0.40 ± 0.10	0.92 ± 0.42
Midbrain	+/+	saline	4.72 ± 0.33	0.57 ± 0.10	0.31 ± 0.04	0.54 ± 0.25
		METH	4.20 ± 0.51	0.42 ± 0.05	0.21 ± 0.01	0.41 ± 0.26
	-/-	saline	3.71 ± 0.37 *	0.70 ± 0.17	0.31 ± 0.06	0.50 ± 0.34
		METH	3.81 ± 0.48	0.42 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.38 ± 0.07
Cerebellum	+/+	saline	2.19 ± 0.16	0.01 ± 0.01	0.10 ± 0.06	0.53 ± 0.49
		METH	2.21 ± 0.49	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.41 ± 0.32
	-/-	saline	2.17 ± 0.42	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.15 ± 0.05
		METH	2.25 ± 0.45	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.20 ± 0.04

Region	genotype and treatment		5-HT	HIAA	Histamine
Forebrain	+/+	saline	1.41 ± 0.22	0.90 ± 0.45	304.80 ± 80.29
		METH	1.62 ± 0.43	1.00 ± 0.48	412.89 ± 66.12
	-/-	saline	1.46 ± 0.45	0.64 ± 0.20	27.65 ± 16.15*
		METH	1.85 ± 0.43	0.79 ± 0.24	18.39 ± 4.00
Midbrain	+/+	saline	2.02 ± 0.20	1.69 ± 0.90	439.08 ± 115.77
		METH	2.01 ± 0.34	1.68 ± 0.53	293.23 ± 51.39
	-/-	saline	1.81 ± 0.19	1.66 ± 0.59	28.04 ± 15.97*
		METH	2.11 ± 0.23	1.65 ± 0.66	20.59 ± 18.37
Cerebellum	+/+	saline	0.37 ± 0.14	0.57 ± 0.25	124.36 ± 34.84
		METH	0.34 ± 0.11	0.42 ± 0.23	51.17 ± 10.34
	-/-	saline	0.27 ± 0.09	0.54 ± 0.22	19.56 ± 7.48*
		METH	0.37 ± 0.11	0.53 ± 0.16	24.91 ± 5.81

* $p < 0.05$ (saline +/+ vs -/-), † $p < 0.05$ (METH +/+ vs -/-)

# $p < 0.05$ (-/- saline vs -/- METH), & $p < 0.05$ (+/+ saline vs +/+ METH)

Table 2. HDC ノックアウトマウスにおけるアミノ酸含量の変化

Region		treatment	PSER	SER	TAU	CYS
forebrain	+/ +	saline	5.00 ± 0.41	19.65 ± 1.76	204.37 ± 18.78	0.77 ± 0.21
		METH	4.19 ± 0.17	17.19 ± 0.58	171.25 ± 5.02	0.48 ± 0.03
	- / -	saline	4.58 ± 0.40	18.96 ± 1.86	179.49 ± 13.37	0.59 ± 0.05
		METH	5.32 ± 0.91	21.01 ± 2.87	201.63 ± 29.92	0.81 ± .
midbrain	+/ +	saline	5.59 ± 0.11	12.32 ± 0.72	107.39 ± 3.68	1.39 ± 0.11
		METH	4.89 ± 0.10	10.79 ± 0.45	96.89 ± 1.99	1.20 ± 0.06
	- / -	saline	4.46 ± 0.16	12.57 ± 0.93	109.61 ± 10.23	1.37 ± 0.05
		METH	4.74 ± 0.21	11.51 ± 0.48	96.61 ± 2.80	1.24 ± 0.15
cerebellum	+/ +	saline	5.49 ± 0.22	24.69 ± 1.16	363.85 ± 20.13	1.50 ± 0.16
		METH	5.42 ± 0.26	26.25 ± 0.63	390.93 ± 14.09	1.47 ± 0.17
	- / -	saline	6.36 ± 1.47	33.74 ± 4.52	457.75 ± 68.93	2.01 ± 0.31
		METH	5.60 ± 0.51	27.80 ± 2.31	384.89 ± 24.43	1.61 ± 0.19

Region		treatment	GLU	GLY	ASP	GABA	
forebrain	+/ +	saline	257.11 ± 23.11	16.30 ± 1.60	67.13 ± 5.97	52.04 ± 4.98	
		METH	222.02 ± 9.12	14.02 ± 0.59	57.63 ± 2.75	44.06 ± 1.93	
	- / -	saline	226.83 ± 20.45	15.16 ± 1.38	60.39 ± 5.36	44.27 ± 3.29	
		METH	275.73 ± 41.23	16.22 ± 2.16	53.37 ± 9.95	52.32 ± 6.90	
midbrain	+/ +	saline	198.12 ± 7.29	59.75 ± 1.90	90.76 ± 1.97	74.97 ± 1.74	
		METH	181.39 ± 9.92	54.07 ± 1.83	83.45 ± 5.04	66.49 ± 1.97	
	- / -	saline	186.80 ± 12.31	54.35 ± 2.69	85.25 ± 4.05	76.38 ± 3.92	
		METH	184.12 ± 4.70	56.59 ± 1.94	85.24 ± 2.75	77.08 ± 1.15	†
cerebellum	+/ +	saline	410.84 ± 7.91	51.11 ± 3.07	161.07 ± 5.42	99.97 ± 4.33	
		METH	473.51 ± 15.43	50.70 ± 1.20	171.91 ± 4.06	103.34 ± 1.45	
	- / -	saline	484.40 ± 70.92	64.99 ± 8.80	209.84 ± 28.45	114.57 ± 4.73	
		METH	392.30 ± 12.46	59.44 ± 5.28	175.76 ± 16.64	129.00 ± 7.16	

* $p < 0.05$ (saline +/ + vs - / -), † $p < 0.05$ (METH +/ + vs - / -)

\# $p < 0.05$ (- / - saline vs - / - METH) , & $p < 0.05$ (+/ + saline vs +/ + METH)

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題
メタンフェタミン精神病モデルラットにおける可塑性関連遺伝子 MAP kinase phosphatase (MKP) -1、-3 の脳内での発現変化。

分担研究者　氏家　寛
共同研究者　高木　学、児玉匡史、武久　康、山本文子、中田謙二、黒田重利
所属　　　　岡山大学医学部神経精神医学教室

（研究要旨）
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。MKP-1mRNA の発現は、D_1 受容体遮断薬である SCH 23390、 NMDA 受容体遮断薬である MK-801 の前処置により、METH 急性投与にて発現の増加が見られたすべての脳部位で発現が抑制された。一方、MKP-3 mRNA の発現は、SCH 23390 の前処置により、METH 急性投与にて発現が増加していたすべての脳部位で発現が抑制され、 MK-801 の前処置により海馬以外の部位で発現が抑制された。これらより、METH による MKP-1mRNA の発現には、D_1、NMDA 受容体の活性化を介していることが、MKP-3 mRNA の発現には、大脳皮質、線状体では D_1、NMDA 受容体、海馬 CA1、CA3 では D_1 受容体のみの活性化を介していることが示された。10 日間 METH 慢性投与実験では、MKP-1 mRNA が線状体をのぞいて METH 急性投与にて発現の増加していたすべての脳部位で発現が増加していたのに対し、MKP-3 mRNA は海馬 CA1 においてのみ発現の増加が見られた。蛋白レベルでは、MKP-1 蛋白が METH 反復投与によって、最終投与 3 時間後に発現していることが western blot 法にて示された。MKP ファミリーは、様々な可塑性に関与している MAP キナーゼと連動していることを考えると、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。

A. 目的

Amphetamine(AMPH) や Methamphetamine (METH) といった神経刺激物質の乱用により妄想型精神分裂病に類似した精神病状態が形成される [11]。一度精神病が形成されると、断薬により軽快しても、少量の神経刺激物質の再使用や非特異的ストレスによって容易に再燃する [11]。一方、実験動物に見られる、逆耐性現象は、AMPH や METH を反復投与する事によって次第に行動が変化する現象として知られている。この逆耐性現象は、精神分裂病の再発脆弱性の良い動物モデルとして広く研究されてきた。逆耐性現象では、長期にわたって薬物反応性の亢進が持続することが知られており、その現象には中枢神経の可塑性が関与していると考えられている。可塑性には種々のものがあるが、逆耐性現象ではその長期持続性からシナプス再構築を含む解剖学的変化を伴う可塑性が生じていると推定される。

一昨年、われわれは、細胞質、樹状突起に存在する、細胞骨格関連蛋白である activity regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) mRNA が METH 急性、慢性投与により、大脳皮質、線条体において発現増加していることを見いだし [8]、昨年、前シナプスの膜蛋白であり、開口分泌に関与し、シナプス密度のマーカーとして報告されている synaptophysin と、growth-associated protein(GAP)であり、リン酸化が細胞の分化増殖に関与し、神経可塑性に関与していると考えられている stathmin が、METH 急性投与においてそれぞれ、前者は前頭葉、側坐核、側頭葉において、後者は前頭葉においてのみ発現が増加していることを示した。[12]。

今回、我々は細胞成長、分化、アポトーシス、転写などを含む様々な可塑性変化に関与していることが知られている Mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ) を脱リン酸化することで不活化し、negative feedback として、機能していることが

知られている MAP kinase phosphatase (MKP) 、中でも脳内に発現が多いことが知られている MKP-1、MKP-3 に注目した [1)2)3)5)6)]。両者は MAP キナーゼファミリーに対する基質特異性が異なっていることも示されている [9)]。

そこで、METH 単回投与、反復投与による、働きの異なる MKP-1、MKP-3 mRNA の変化を in situ hybridization 法を用いて経時的に検討し、また併せてドパミン D_1 受容体遮断薬である SCH 23390[14)]、または、NMDA 受容体遮断薬である MK-801[7)]前投与による薬理学的検討、ミクロオートラジオグラフィー、Western blot 法による MKP-1 蛋白量の検討を行い、METH による各脳部位での働きを検討し、逆耐性現象における可塑性変化について検討した。

B. 方法

1. 対象

7 週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラット（体重 220-240 g）を用いた。全てのラットには、各実験に先だって、1 日 1 回約 3 分のハンドリングを 1 週間施した。すべての実験は岡山大学医学部の動物実験ガイドラインに準じて行われた。

2. 薬物処置

経時的変化の検討には、METH 4mg/kg を腹腔内投与し、30 分、1 時間、3 時間、6 時間、24 時間後に断頭した（n=6）。なお 0 時間の対照群は無処置とした。

薬理学的検討は、前処置として、30 分前にドパミン D_1 受容体遮断薬である SCH 23390 0.5mg/kg、または NMDA 受容体遮断薬である MK-801 0.25mg/kg、または生食を腹腔内投与し、後に METH あるいは生食投与 1 時間後に断頭したもの 6 群とした(n=6 or 8)。

慢性投与実験は METH 4mg/kg 、または同量の生食を 1 日 1 回 10 日間連続腹腔内投与した。生食群は最終投与 1 時間後に断頭し、METH 群は最終投与 1 時間後に断頭したものと 24時間後に断頭したものの 2 群を作り、計 3 群とした(n=8)。

Western blot analysis では METH 4mg/kg 、または同量の生食を 1 日 1 回 14 日間連続腹腔内投与した。最終投与 3 時間後に断頭したものを使用した (n=2)。

3. オリゴヌクレオチドプローブの作成と In situ hybridization

それぞれのラット mRNA に相補的なオリゴヌクレオチドプローブを作成した。これらのプローブは先の報告で特異性が証明されている [4)]。GenBank での相同性検索では、これら塩基配列と他の遺伝子との類似はみられなかった。in situ hybridization におけるプローブの特異性を調べるため、50 倍量の非標識プローブが標識シグナルを完全に抑制することを確認した。In situ hybridization は過去の報告と同じ方法にて行った [8)12)]。

4. Western blot analysis

取り出したラット脳は直ちに大脳皮質、海馬を切り分け凍結保存した。RIPA バッファーを 30 μl を加え、超音波破砕機を用いて組織をホモゲナイズしたのち 4℃、20min、15000×g で遠心分離しその上澄みをサンプルとした。towbin buffer (10×Tris/Glysin/SDS 90ml, methanol 180ml, 蒸留水 630ml)を用い、SDS-PAGE(10%)にて 100V、2.00A にて 90 分電気泳動したのちニトロセルロースメンブレンに 30V、12～16 時間、0.06mA で通電し転写した。TBS で洗浄した後 1 時間 Blocking し、TTBS で洗浄した後、ゼラチンを入れた MKP-1 抗体(Santa Cruz Biotechnology)を 1:500 で加え 24 時間シェイカーにかけた。TTBS で 2 回洗浄した後、ゼラチンを入れた anti-rabbit IgG 二次抗体(Amersham biotech) 16.5 μl と HRP 標識ストレプトアビジンを 5.5 μl いれて 90 分シェイカーにかけ、TTBS で洗浄し、ECL にて発色しフイルムに expose し、自動現像機にて現像した。

5. 統計処理

one-way ANOVA、下位検定に Fisher's test を用いて解析を行い、$p<0.05$ の場合を有意差ありとした。

C. 結果

1. METH 急性投与後の時間経過

MKP-1 mRNA の METH 急性投与による効果を Fig. 1A に示す。MKP-1 mRNA は主に大脳皮質、視床、線条体に分布が見られた。$F_{5,30}=18.079$, $p=0.0001$; 眼窩回皮質、$F_{5,30}=10.306$, $p=0.0001$; 前頭葉、$F_{5,30}=11.883$, $p=0.0001$; 側頭葉、$F_{5,30}=9.848$, $p=0.0001$; 頭頂葉、$F_{5,30}=12.139$, $p=0.0001$; 後頭葉、$F_{5,30}=3.705$, $p=0.0099$; 線条体、 $F_{5,30}=2.964$, $p=0.0273$; 視床、で 30 分～1h 後に 50%～300%と著しく発現が増加し 3 時間後には定常状態に戻っていた(Fig. 2A)。

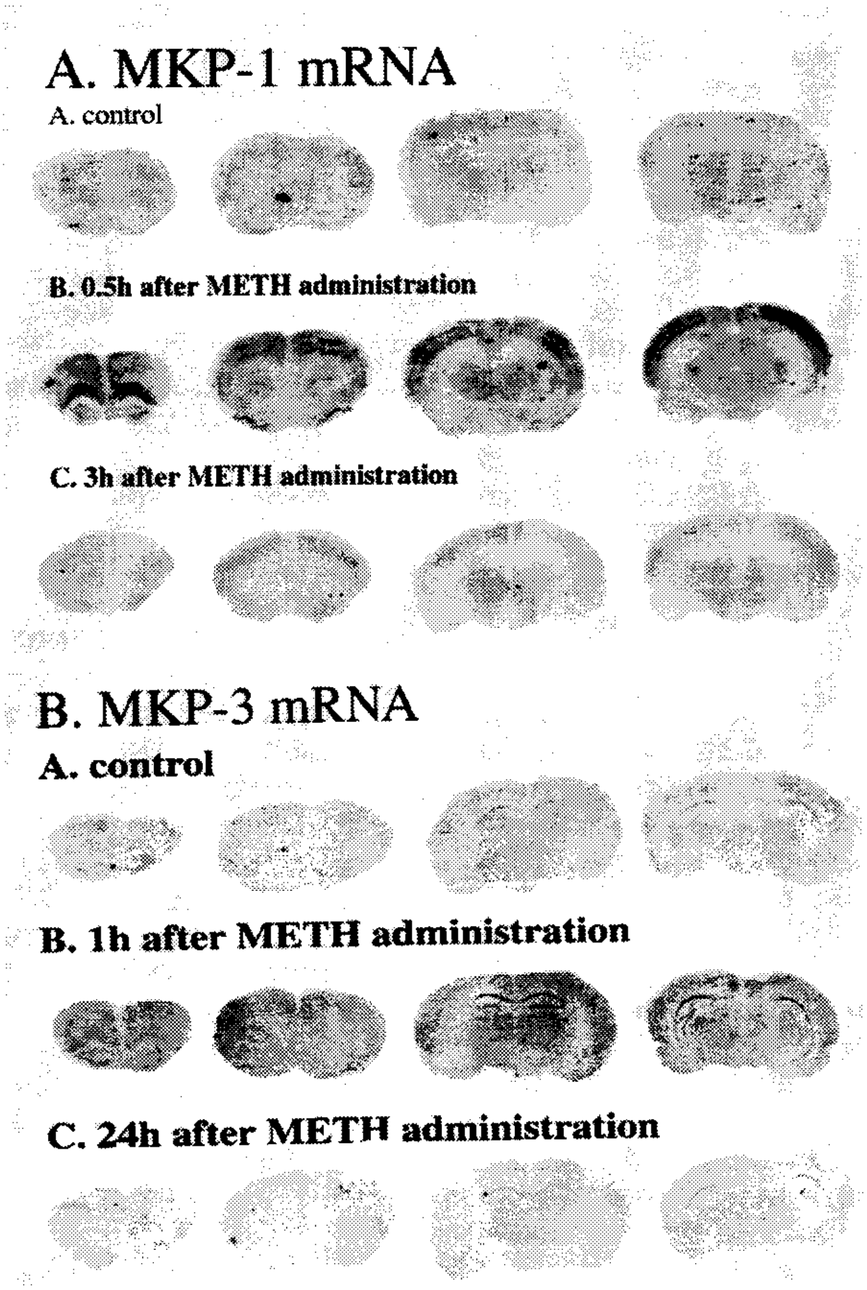
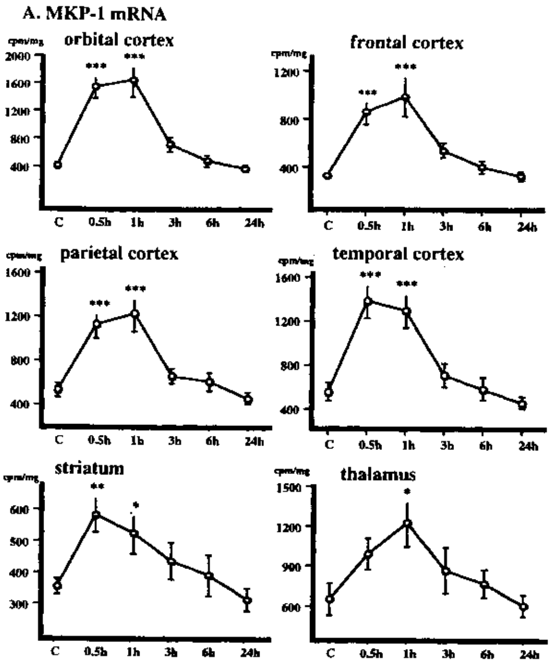


Fig. 1　METH 単回投与後の MKP-1 (A)、MKP-3 (B) mRNA の in situ hybridization による分布と発現変化。MKP-1 mRNA は主に大脳皮質、視床、線条体に分布が見られ 0 分～1h 後に 50%～300%と著しく発現が増加し 3 時間後には定常状態に戻っていた。MKP-3 mRNA は海馬 CA1、CA3 を中心に大脳皮質、線条体に分布が見られ３０分～3ｈ後に 10%～60%発現が増加し 6 時間後には定常状態に戻った。

MKP-3 mRNA の METH 急性投与による効果を Fig. 1B に示す。MKP-3 mRNA は、MKP-1 mRNA と異なり、海馬を中心に大脳皮質、線条体に分布が見られた。$F_{5,30}=11.999$, $p=0.0001$; 眼窩回皮質、$F_{5,30}=5.688$, $p=0.0008$; 前頭葉、$F_{5,30}=17.813$, $p=0.0001$; 側頭葉、$F_{5,30}=14.919$, $p=0.0001$; 頭頂葉、$F_{5,30}=17.353$, $p=0.0001$; 後頭葉、$F_{5,30}=8.097$, $p=0.0001$; 線条体、$F_{5,30}=14.479$, $p=0.0001$; 海馬 CA1、$F_{5,30}=6.560$, $p=0.0003$; 海馬 CA3、で３０分～3ｈ後に 10%～60%発現が増加し 6 時間後には定常状態に戻っていた(Fig. 2B)。

フィルムオートラジオグラフィーと同一切片のニッスル染色をコンピュータ上で合成すると、頭頂葉皮質では IV、VI 層に限局し MKP-1 mRNA が強く発現し層状構造が見られた(Fig. 3A)。MKP-3 mRNA は層状構造は見られなかった。ミクロオー



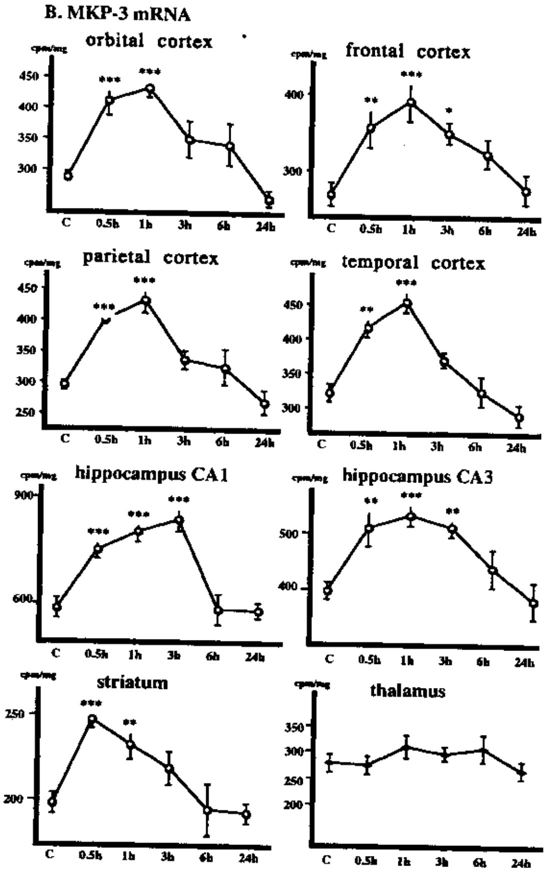


Fig. 2 METH 単回投与後 MKP-1 (A)、MKP-3 (B) mRNA 変化。4mg/kg METH 腹腔内投与後、0.5、1、3、6、24 時間後断頭 (n=6)。各数値は平均±標準誤差で表示。*$p<0.05$、**$p<0.01$、***$p<0.001$。

トラジオグラフィーでは、大脳皮質の MKP-1 mRNA のシグナルは主に中型細胞に見られ、グリア細胞には認められなかった (Fig. 3B) 。一方、海馬における MKP-3 mRNA の発現のシグナルも同様のパターンを示した (Fig. 3D) 。注射の非特異的影響を知るための予備的実験では、生食投与後の各脳部位で、定常状態に比較しわずかに MKP-1、MKP-3 mRNA の発現増加が見られたのみであった (Fig. 3C, 3E) 。

2. SCH 23390 の前投与の効果

SCH 23390 前投与による、METH の MKP-1 mRNA 発現に対する効果を示す。$F_{3,24}=50.947$, $p=0.001$; 眼窩回皮質、$F_{3,24}=30.689$, $p=0.0001$; 前頭葉、$F_{3,24}=50.477$, $p=0.0001$; 側頭葉、$F_{3,24}=52.592$, $p=0.0001$; 頭頂葉、$F_{3,24}=34.994$, $p=0.0001$; 後頭葉、$F_{3,24}=26.078$, $p=0.0001$; 線条体、$F_{3,24}=36.386$, $p=0.0001$; 視床で有意差が見られ MKP-1 mRNA 発現は SCH23390 によって完全に発現抑制された(Fig. 4A)。SCH 23390 前投与のみ (SCH-SAL 群) では生食投与 (SAL-SAL 群) との差はなかった。

SCH 23390 前投与による、METH の MKP- 3 mRNA 発現に対する効果を示す。$F_{3,24}=19.769$, $p=0.0001$; 眼窩回皮質、$F_{3,24}=15.113$, $p=0.0001$; 前頭葉、$F_{3,24}=19.269$, $p=0.001$; 側頭葉、$F_{3,24}=23.733$, $p=0.001$; 頭頂葉、$F_{3,24}=5.775$, $p=0.040$; 後頭葉、$F_{3,24}=5.934$, $p=0.042$; 線条体、$F_{3,24}=4.673$, $p=0.0104$; 海馬 CA1、$F_{3,24}=5.787$, $p=0.0040$; 海馬 CA3、で有意差が見られ MKP-3 mRNA 発現は SCH23390 によって完全に発現抑制された(Fig.4B)。SCH 23390 前投与のみ (SCH-SAL 群) では生食投与 (SAL-SAL 群) との差はなかった。

3. MK-801 の前投与の効果

MK-801 前投与による、METH の *MKP-1 mRNA* 発現に対する効果を示す。$F_{3,24}=63.679$, $p=0.0001$; 眼窩回皮質、$F_{3,24}=31.702$, $p=0.0001$; 前頭葉、$F_{3,24}=66.832$, $p=0.0001$; 側頭葉、$F_{3,24}=49.481$, $p=0.0001$; 頭頂葉、$F_{3,24}=24.155$, $p=0.0001$; 後頭葉、$F_{3,24}=28.817$, $p=0.0001$; 線条体、$F_{3,24}=62.888$, $p=0.0001$; 視床で有意差が見られ MKP-1 mRNA 発現は MK-801 によって完全に発現抑制された(Fig. 5A)。MK-801 前投与のみ (MK-SAL 群) では生食投与 (SAL-SAL 群) と比較して、前頭葉、頭頂葉、後頭葉、視床において MK-801 前処置によっても発現の増加を認めた。

MK-801 前投与による、METH の *MKP-3 mRNA*