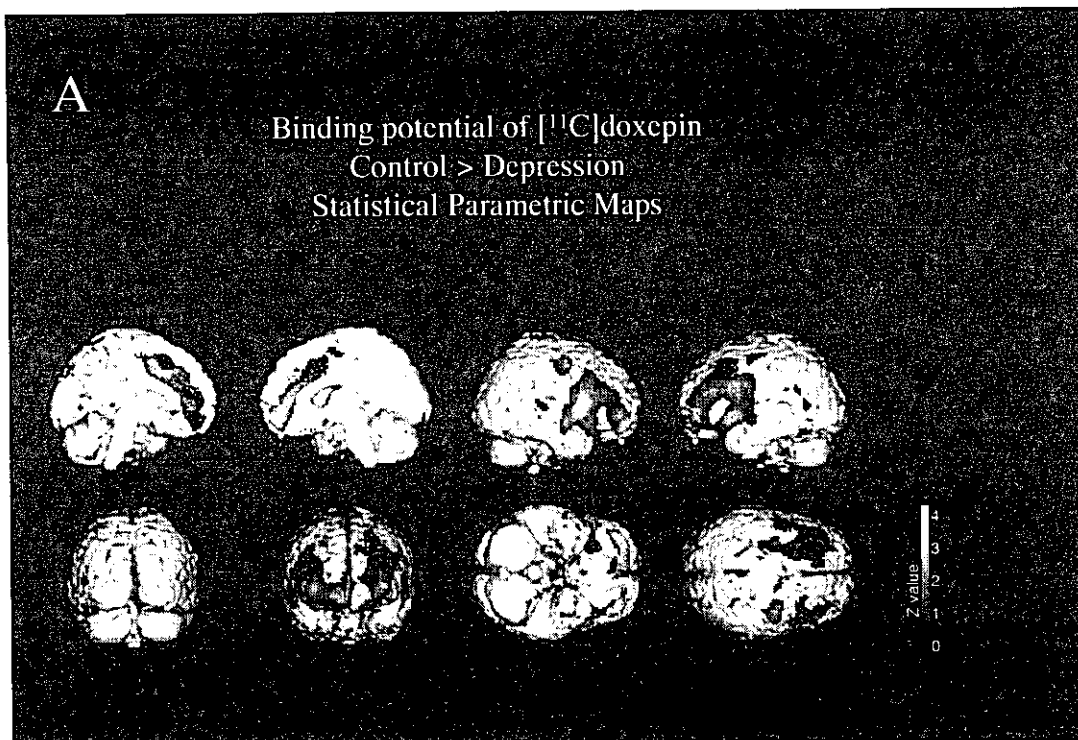


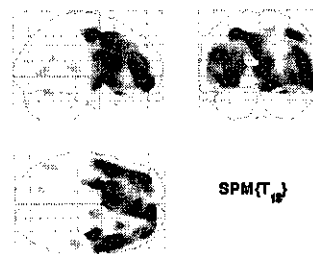
(Fig. 1)

Food-deprived activity stress 負荷後の自発回転運動を経時的に 9 日間計測した。自発回転運動が日にちとともに増加してゆくのわかる。A:ヒスチジン (500 mg/kg) の腹腔内投与により慢性ストレスによる回転運動の減少が認められる。B:FMH (100 mg/kg) の腹腔内投与により回転運動は増大し、過興奮が増大している。C,D:MAP (4 mg/kg) とイミプラミン (10 mg/kg) 投与では、ストレス誘発性過興奮には変化なかった。



B

対照群でうつ病群よりも
H1受容体結合能が有意に高い領域



Area (Brodmann area)	Side	Z-score	Talairach coordinates		
			x	y	z
Middle Frontal Gyrus (10)	L	3.69	-34	50	-6
Inferior Frontal Gyrus (44)	R	3.64	48	14	16
Orbitofrontal cortex (11)	R	3.49	8	58	-14
Inferior Frontal Gyrus (44)	L	3.45	-44	10	26
Anterior Cingulate gyrus (24,32)	L	3.44	-10	10	40
Frontal Lobe	L	3.43	38	-10	52
Precentral gyrus (4)	R	3.4	38	-10	52
Anterior Cingulate gyrus (24,32)	R	3.33	2	38	22
Middle Frontal Gyrus (10)	R	3.19	38	52	-4
Inferior Frontal Gyrus (47)	L	3.12	-40	14	-6
Medial Frontal Gyrus (6)	R	3.74	12	-10	58
Temporal Lobe	L	2.58	-48	-58	-22
Middle Temporal Gyrus (22)	L	2.49	-48	-54	22

(Fig. 2)
うつ病患者群と正常群の脳内 H1 受容体結合能の比較
(正常群>うつ病 SSRI 内服群)

厚生科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

分担研究課題：覚醒剤精神病の臨床経過に関する画像解析：ノックアウトマウスと PET を用いた薬物精神病および精神分裂病における中枢ヒスタミン神経系の役割に関する研究

分担研究者 佐藤光源²⁾

共同研究者 岩淵健太郎¹⁾³⁾、伊藤千裕¹⁾、窪田恭彦¹⁾、小島照正¹⁾、大内雄太¹⁾、松岡洋夫¹⁾、田代学³⁾、加藤元久³⁾、鹿野理子³⁾⁴⁾、本郷道夫⁴⁾、岩田錬⁵⁾、井戸達雄⁵⁾、伊藤正敏⁵⁾、渡邊武⁶⁾、渡邊建彦⁷⁾、谷内一彦³⁾

東北大学医学部精神神経学分野¹⁾、東北福祉大学大学院精神医学²⁾、東北大学医学部病態薬理学分野³⁾、東北大学医学部心療内科学分野⁴⁾、東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター⁵⁾、九州大学生体防御医学研究所⁶⁾、東北大学医学部細胞薬理学分野⁷⁾

研究要旨

1. メタンフェタミン (MAP) の急性および慢性投与時における中枢ヒスタミン神経系の役割を調べる為に、H₁ 受容体、H₂ 受容体、H₁/H₂ 両受容体遺伝子のノックアウト (KO)マウスを用いて、MAP 投与後の自発運動量を測定した。MAP (1mg/kg)を腹腔内に単回投与したところ、急性期の自発運動量増加作用は、H₁/H₂ 受容体遺伝子ダブル KO マウスにおいては、各々の野生型に比して増強していたが、H₁ 受容体および H₂ 受容体 KO マウスにおいては、同様の変化は認められなかった。また、MAP (1mg/kg)を 7 日間連続投与したところ、H₁/H₂ 受容体遺伝子ダブル KO マウスにおいては、野生型に比して迅速かつ明瞭に行動感作が形成されたが、H₁ 受容体および H₂ 受容体 KO マウスにおいては、同様の差は認められなかった。これらの結果から、ヒスタミン神経系は、H₁ および H₂ 受容体の両者を介して、MAP による急性期の自発運動量増加および慢性期の行動感作形成に対して、抑制的に作用していることが示唆された。

2. 薬物精神病および精神分裂病患者と健常人におけるヒスタミン神経系の動態の相違を明らかにする為に、H₁ 受容体の放射性リガンドである [¹¹C]ドキセピンを用いて、PET による脳内 H₁ 受容体の測定を行った。ハロペリドール内服分裂病患者群と健常者群との比較において、分裂病患者の島皮質、後頭葉、前頭前野などにおいて、H₁ 受容体結合能の低下を認め、精神分裂病の病態にヒスタミン神経系が関与することが PET によっても示唆された。

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、ドパミンの再取り込みを阻害すると共に、遊離を促進する。MAP をラットやマウスに急性投与すると、上記の神経化学的な変化に伴い、自発運動量の増加や常同行動の出現が認められる^{1),2),3)}。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^{1),2),3),4)}。また、ヒトにおいては、MAP を繰り返し使用するうちに、はじめにはみられなかった幻覚や妄想などの精神病症状が出現し、精神分裂病と臨床上鑑別困難な状態像を呈することが知られている。この覚醒剤精神病の病態は、長

期の断薬期間を経ても、少量の覚醒剤の再使用やストレスなどで容易に再燃し、再発準備性の潜在化が持続する点において、小動物と類似の逆耐性現象と考えられている。

一方、ドパミンと同じく生理活性アミンの 1 つであるヒスタミンは、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。ヒスタミンニューロンの起始核は後部視床下部の結節乳頭核に限局し、中枢神経系に広く分布し、睡眠覚醒リズムや食欲、性行動をはじめとする多様な精神神経機能に関与するとされている^{5),6)}。

われわれは以前に、HDC 遺伝子 KO マウスを用いて、MAP 急性投与による自発運動量の増加が、

野生型 (WT)マウスに比較して増強かつ延長しており、さらに慢性投与による逆耐性現象の形成も促進していることを確認した。

今回はさらに、 H_1 受容体、 H_2 受容体、 H_1/H_2 受容体遺伝子のダブル KO (-/-) マウスと、各々の野生型 (+/+) マウスを用いて、ヒスタミン神経による MAP の急性運動効果および逆耐性現象形成の抑制効果と、 H_1 および H_2 受容体との関係を検討した。

また、薬物精神病および精神分裂病患者と健康人におけるヒスタミン神経系の動態の相違を明らかにする為に、PET によるヒスタミン受容体測定法を用いて、脳ヒスタミン H_1 受容体の測定を行った。

B. 方法

1-1. 動物

H_1 受容体および H_2 受容体の KO マウスは、渡邊らによって相同組み換え法を用いる定法に従って作成された^{7,8)}。 H_1/H_2 受容体遺伝子のダブル KO マウスは、両者の交配により得られた。8~12 週齢の雄性ホモ型 KO (-/-) マウスと、各々の野生型 (+/+) マウス(30~35g)を、1 匹ずつ通常のケージに入れ、飼料および水は自由に摂取させ、温度と湿度はそれぞれ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ および $65\% \pm 5\%$ に保った室内で、12 時間の明暗周期下で飼育した。

1-2. 薬物および測定

KO および WT マウスの腹腔内に、MAP(ヒロボン、大日本製薬) 1 mg/kg を 1 日 1 回 7 日間連続投与し、投与毎に受動型遠赤外線センサーによる運動量測定装置 (SUPER-MEX、室町機械) と運動量解析システム (CompAct AMS、室町機械) を用いて 5 分間隔で 4 時間の自発運動量を測定した。KO と WT 間での自発運動量の比較は、二元配置の分散分析により、 $p=0.05$ 未満を有意とした。

2-1. PET 検査対象

患者群は、DSM-IV の診断基準に基づき、精神分裂病と診断された男性 9 名 (平均 30.4 ± 6.0 歳) と、健常ボランティア男性 10 名 (平均 41.5 ± 11.0 歳) であり、全員に前もって十分に説明し、書面での同意を得た。患者群は全員が抗精神病薬を継続的に内服していたがいずれも単剤投与で、haloperidol 内服群が 6 名 (平均 $2.5\text{mg} \pm 1.7\text{mg}$) であった。それ以外の内服薬としては、ベンゾジアゼピン系の薬物と抗コリン薬の biperiden があつた。患者群においては、全員に簡易精神症状評価尺度 (BPRS) を用いて精神症状の評価を行った。

2-2. PET 測定および解析

H_1 受容体の放射性リガンドである [^{11}C]ドキセピンを用いて、PET による脳内 H_1 受容体の測定を行った。 [^{11}C]ドキセピンを静脈内投与した後、SET2400W (島津製作所)PET 装置を用いて、3D-mode で 90 分間のダイナミックスキャンを行った。ドキセピンの H_1 受容体結合能 ($BP=B_{\text{max}}/K_d$) は、Logan らによる graphical analysis 法により、 H_1 受容体の少ない小脳を参照部位として各ボクセル毎に算出した⁹⁾。統計解析ソフトの SPM (statistical parametric mapping) 99 を用いて、Talairach と Tournoux の脳アトラス¹⁰⁾に基づいた空間的な脳画像の標準化を行った後、 H_1 受容体結合能の画像的な比較を行った。SPM99 における空間的標準化のための血流テンプレートとしては、ダイナミックスキャンの早期加算画像を用いた。

C. 結果

1. メタンフェタミンによる KO マウスの自発運動量の変化

MAP (1mg/kg)を腹腔内に単回投与したところ、急性期の自発運動量増加作用は、 H_1/H_2 受容体遺伝子ダブル KO マウスにおいては、各々の野生型に比して増強していたが、 H_1 受容体および H_2 受容体 KO マウスにおいては、同様の変化は認められなかった (Fig. 1)。

また、MAP (1mg/kg)を 7 日間連続投与したところ、 H_1/H_2 受容体遺伝子ダブル KO マウスにおいては、各々の野生型に比して迅速かつ明瞭に行動感作が形成されたが、 H_1 受容体および H_2 受容体 KO マウスにおいては、同様の差は認められなかった (Fig. 2)。

2. PET による脳内 H_1 受容体の測定

健常者群との比較において、ハロペリドール内服の精神分裂病患者の島皮質、後頭葉、前頭前野などにおいて、 H_1 受容体結合能の低下を認めた。(Fig. 3) またハロペリドール内服群の BPRS 得点は平均 16.8 ± 7.3 点であった。

D. 考察

MAP はドパミントランスポーターを阻害することにより、シナプス間隙におけるドパミン濃度を上昇させ、過活動や常同運動を引き起こすことが知られているが、中枢におけるヒスタミン含有量を増加させる L-ヒスチジンは、ラットにおける、MAP による常同行動の誘発や逆耐性の形成を減弱させ、また反対に、HDC の阻害薬である α -フルオロメチ

ルヒスチジン (α -FMH)は、それらを増強させることが報告されている¹¹⁾。これらの事から、ヒスタミン神経系が、MAP による急性および慢性の効果に対して抑制的に作用することが示唆され、われわれが前回に行った、HDC 遺伝子 KO マウスにおいて、MAP による急性期の自発運動量増加作用と慢性期の逆耐性形成作用がいずれも増強していたことから、ヒスタミンのもつ同様の作用が示された。

MAP の急性および慢性薬理効果に対する、ヒスタミン神経系の抑制的な効果が、後シナプスに存在する、H₁ および H₂ 受容体をどのように介して伝達されるのかを KO マウスを用いて調べるのが今回の目的であったが、H₁ 受容体阻害薬の pirlamine および H₂ 受容体阻害薬の zolantidine で前処置したラットを用いた以前の研究においては、MAP の効果はいずれも増強しており、MAP の薬理作用に対するヒスタミン神経系の抑制的作用に関しては、H₁ および H₂ 受容体の両者が類似の機能を有していると考えられた¹²⁾。今回の実験で、H₁ 受容体および H₂ 受容体単独の KO マウスにおいては WT マウスと差がなかったのに対して、H₁/H₂ ダブル KO マウスにおいてのみ MAP の作用が増強していたことは、H₁ および H₂ 受容体いずれか一方の欠損マウスにおいては、残存する他方の受容体が MAP の作用に対する抑制機能を代償した為と考えられる。

臨床的には、精神分裂病や薬物精神病の病態に対するヒスタミン神経系の関与を [¹¹C]ドクセピンを用いた PET による脳内 H₁ 受容体の測定を行った結果、精神分裂病患者群の島皮質、後頭葉、前頭前野などにおいて H₁ 受容体結合能の低下を認めた。この結果は精神分裂病患者の死後脳前頭葉の H₁ 受容体の減少の報告と一致している¹³⁾。最近、精神分裂病患者の髄液中におけるヒスタミン代謝産物濃度の上昇¹⁴⁾が報告されてきており、精神分裂病患者の分裂病患者 H₁ 受容体結合能の低下は、中枢ヒスタミン神経系の活動性の上昇に伴う H₁ 受容体のダウンレギュレーションの可能性があると思われる。今回の報告の時点では、薬物精神病の被検者はエントリーされていないが、今後精神分裂病患者とともに症例数を増やし、各種の定型および非定型抗精神病薬の内服患者のデータとも比較することにより、各抗精神病薬の臨床効果や H₁ 受容体占拠率の比較検討にも発展させることが可能と思われる。

文献

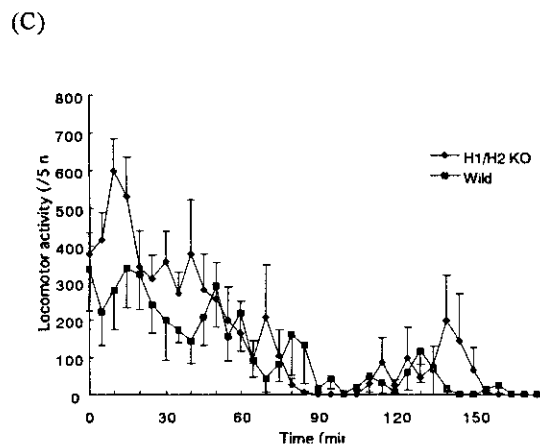
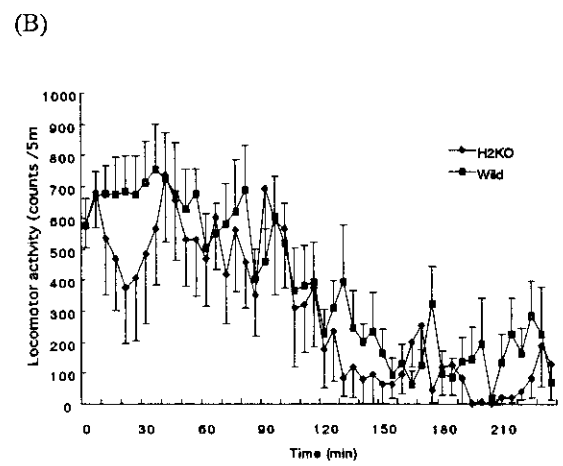
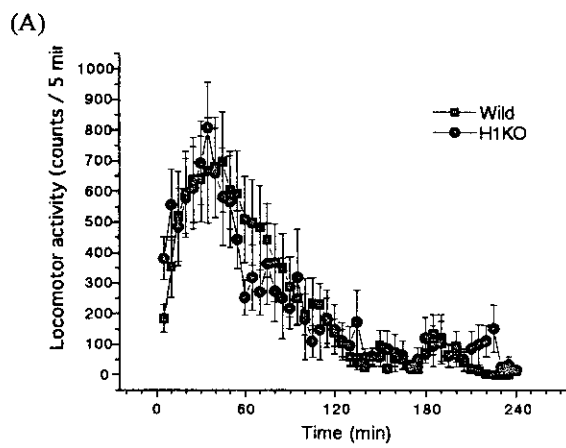
- 1) Cho, A.K., Segal, D.S.: Amphetamine and its analogs. Academic Press, California, 1994.
- 2) Kalivas, P.W., Stewart, J.: Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res. Rev.*, 16:223-244, 1991.
- 3) Robinson TE, Becker JB: Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res.*, 396: 157-98, 1986.
- 4) Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA: Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 33: 639-77, 1993.
- 5) Watanabe T, Wada H: Histaminergic Neurons: Morphology and Function. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1991.
- 6) Onodera K, Yamatodani A, Watanabe T, Wada H: Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders. *Prog Neurobiol.* 42(6): 685-702, 1994.
- 7) Inoue I, Yanai K, Kitamura D, Taniguchi I, Kobayashi I, Watanabe T and Watanabe T: Impaired locomotor activity and exploratory behavior in mice lacking histamine H1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13316-13320, 1996.
- 8) Kobayashi T, Tonai S, Ishihara Y, Koga R, Okabe S and Watanabe T: Abnormal functional and morphological regulation of the gastric mucosa in histamine H2 receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 105, 1741-1749, 2000.
- 9) Yanai K, Watanabe T, Yokoyama H, et al. Histamine H1 receptors in human brain visualized in vivo by [¹¹C]doxepin and positron emission tomography. *Neurosci Lett.* 137: 145-148, 1992.
- 10) Talairach J, Tournoux P. Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain. New York: Theime. Medical Publishers, Inc., 1988.
- 11) Ito C, Onodera K, Watanabe T and Sato M: Effects of histaminergic agents on methamphetamine-induced

stereotyped behavior and behavioral sensitization in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 130, 362-367, 1997.

12) Ito C, Sato M, Onodera K and Watanabe T: The role of brain histaminergic neuron system in methamphetamine-induced behavioral sensitization in rats. *Ann N Y Acad Sci* 801, 353-360, 1996.

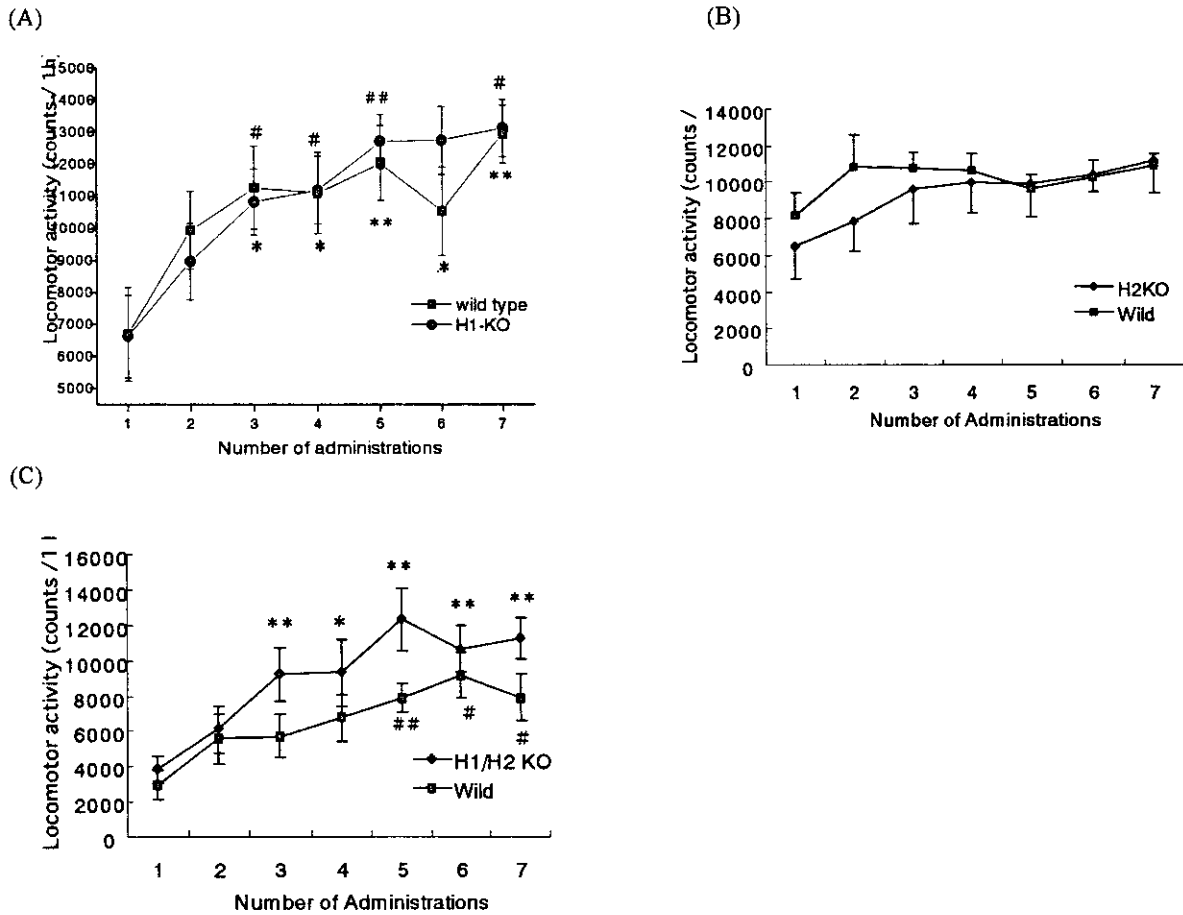
13) Nakai, T., Kitamura, N., Hashimoto, T., Kajimoto, Y., Nishino, N., Mita, T., and Tanaka, C., Decreased histamine H1 receptors in the frontal cortex of brains from patients with chronic schizophrenia. *Biol. Psychiat.* 30, 349-56, 1991.

14) Prell, G.D., Green, J.P., Kaufmann, C.A., Khandelwal, J.K., Morrishow, A.M., Kirch, D.G., Linnoila, M., and Wyatt, R.J., Histamine metabolites in cerebrospinal fluid of patients with chronic schizophrenia: their relationships to levels of other aminergic transmitters and ratings of symptoms. *Schizophr. Res.*, 14, 93-104, 1995.



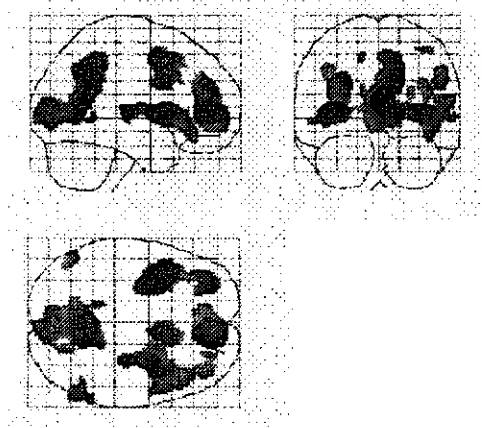
(Fig. 1)

MAP急性投与後のH1-KO(A)とH2-KO(B)、H1/H2-KO(C)と各々の野生型マウスの自発運動量の変化
 MAP(1mg/kg)を1日回明期に腹腔内投与し、投与直後から5分毎の自発運動量を平均値で示した。



(Fig. 2)

MAP慢性投与時のH1-KO(A)とH2-KO(B)、H1/H2-KO(C)と各々の野生型マウスの投与後1時間の自発運動量の変化
MAP(1mg/kg)を1日回明期に腹腔内投与し、各回の投与毎に投与後1時間の自発運動量を平均値で示した。



Regions	Brodmann	side	座標	Z score
島皮質		R	(30,-18,10)	3.16
後頭葉	BA19	R	(2,-58,2)	3.12
後頭葉	BA17	L	(-10,-92,6)	2.88
前運動野	BA6	R	(52,8,24)	3.10
側頭葉	BA21	R	(60,-50,0)	3.06
後部帯状回	BA30	R	(14,40,2)	2.83
前頭前野	BA10	R	(4,62,2)	2.76
被殻		R	(18,10,10)	2.76
前頭前野	BA9	L	(-40,16,42)	2.70
外側前頭前野	BA45	R	(-44,18,6)	2.68

*p<0.05 vs. KO Admin. No. 1 **p<0.01 vs. KO Admin. No. 1

#p<0.05 vs. Wild Admin. No. 1 ##p<0.01 vs. Wild Admin. No. 1

(Fig. 3)

精神分裂病患者群と正常群の脳内H1受容体結合能の比較

(正常群>分裂病ハロペリドール内服群)

検定にはSPM99を使用(P<0.01)

「規制薬物の依存及び神経毒性の発現に係わる仕組みの分子生物学的解明に関する研究」

1. 覚醒剤による神経毒性と精神病の発現下における覚醒剤体内動態の変化に関する基礎的検討

(名古屋大学医学部保健学科検査技術科学 長谷川高明)

メタンフェタミン (MAP) 逆耐性動物における薬物体内動態の変化を調べた。MAP 逆耐性動物では、MAP の体内動態、脳移行、薬物輸送担体(OCT3)の発現および血漿中コルチゾールの遊離能が変化していたが、MAP の代謝能および腎における再吸収能には変化がないことが明らかとなった。従って、体内動態の変化には OCT3 および血漿中コルチゾールの変化が重要な役割を果たしていることを見出した。

2. メタンフェタミン神経毒性における核内 p53 関連分子の関与と細胞内小器官での標的分子の検索

(岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 浅沼幹人)

メタンフェタミン(MAP)により発現が誘導あるいは抑制される細胞内小器官の標的候補分子を検索するために、MAP を添加した培養神経細胞 B65 を用いて cDNA array でのプロファイリングを行った。その結果、MAP により P53 ならびに PAG608 が活性化されることにより、下流のアポトーシス関連因子が活性化され、神経細胞死が惹起される可能性を明らかにした。また、MAP により発現が誘導あるいは抑制される遺伝子・分子のプロファイリングにより、標的候補遺伝子を得ることができた。

3. メタンフェタミンの精神毒性に関する神経精神薬理学的研究：

メタンフェタミンの精神神経毒性における TNF- α の役割

(名古屋大学大学院医学研究科医療薬学・病院薬剤 鍋島俊隆)

メタンフェタミン(MAP)の逆耐性、精神依存および神経毒性における TNF- α の役割を検討した。(1) MAP の連続投与により脳部位特異的に TNF- α が誘導されること、(2) TNF- α は MAP の精神神経毒性に対して抑制的に作用し、(3) その作用の一部にはドパミン取込み

の促進作用が関与していることが示唆された。

4. 覚せい剤反復投与による側坐核および腹側被蓋野ドーパミンニューロンへの毒性に関するパッチクランプ法による解析

(広島大学医学部薬理学 笹 征史)

メタンフェタミン(MAP)連続投与後のドーパミン受容体機能をパッチクランプ法により電気生理学的に検討した。成熟ラットにMAPを反復投与した場合、側坐核ニューロンにおいてドーパミンおよびMAPに対する感受性亢進が惹起され、この現象はD2受容体の感受性亢進によることを見出された。しかし、単一側坐核ニューロンのドーパミン受容体サブタイプD1, D2LおよびD3 mRNAの発現パターンに変化はないことから、この感受性の亢進は受容体密度の増加あるいは細胞内伝達系の変化により機能が亢進している可能性が示唆された。

5. Nicotine 連続投与による電位依存性カルシウムチャネルの機能変化と diazepam binding inhibitor の機能的相関性

(川崎医科大学薬理学 大熊誠太郎)

初代培養マウス大脳皮質神経細胞へのnicotine長期暴露による生じるdiazepam binding inhibitor(DBI)mRNA発現の増加と高電位依存性カルシウムチャネル(HVCCs)との機能的相関を検討した。Nicotine長期暴露により誘発されるDBI発現の増加は、L型HVCCサブユニットである $\alpha 1C$, $\alpha 1D$, $\alpha 1F$ および $\alpha 2/\delta$ サブユニットの発現増加に伴う当該チャネルのup-regulationに付随して生じることが明らかとなった。

6. 覚せい剤精神依存形成に関わる遺伝子発現の研究

(国立精神・神経センター 精神保健研究所 薬物依存研究部 船田正彦)

メタンフェタミン(MAP)慢性投与により誘導される脳内遺伝子群のスクリーニングをマイクロアレイ法を用いて行なった。MAP慢性投与により精神依存および逆耐性が形成された。このMAP精神依存マウスのmidbrainにおける遺伝子発現変化を検討したところ、MAP急性あるいはMAP慢性投与のみで変化する遺伝子を見出した。中でもinositol

1,4,5-triphosphate receptor 1 について蛋白量の変化を調べたところ、遺伝子と同様に変化していた。マイクロアレイ法は、MAP 慢性投与によって制御される脳内遺伝子群のスクリーニングにおいて有用であると考えられる。

7. 遺伝子改変マウスモデルを用いた依存性薬物の分子作用機序

(東京都医学研究機構・精神研・分子精神医学 曾良一郎)

各種モノアミントランスポーター欠損マウスおよび μ 受容体欠損マウスを用いて報酬効果の発現機序を調べた。報酬効果が保持されている各種モノアミントランスポーター欠損マウスはコカインに対するドパミン反応性を示した。また、セロトニン反応性の有無と関係なく、ドパミン反応性を示さなかったマウスはコカインの報酬効果が認められなかった。これらの結果は、コカイン報酬効果においてドパミン神経伝達系が重要な役割を果たしていることを示唆する。一方、 μ 受容体欠損マウスを用いた報酬試験の結果から、 μ 受容体は鎮痛作用以外にもモルヒネ及びエタノールの報酬作用に関与していることが示唆された。

分担研究報告書

覚せい剤精神依存形成に関わる遺伝子発現の研究

分担研究者 船田正彦

研究協力者 佐藤美緒、尾崎茂、和田清

国立精神・神経センター 精神保健研究所 薬物依存研究部

[研究要旨]

薬物による遺伝子発現の変動を探索する方法として、近年開発された DNA chip 法（マイクロアレイ法）が注目されている。本法は、ゲノムプロジェクト後の全遺伝子情報を有効に利用するための技術として重要な役割を担っており、薬物依存形成の原因遺伝子の同定にも応用が期待できる。そこで、本研究では覚せい剤である methamphetamine (MAP) 慢性投与による逆耐性および精神依存動物モデルを作成し、同一条件で多種類の遺伝子発現の解析が可能であるマイクロアレイ法を用いて、MAP 慢性投与により誘導される脳内遺伝子群のスクリーニングを行った。

ICR 系雄性マウスを使用し、MAP (2 mg/kg, s.c.) は1日1回7日間に渡って慢性投与した。運動活性に対する影響を検討したところ、MAP 慢性投与群では、MAP (1 mg/kg, s.c.) 投与による自発運動亢進作用の増感作用が認められ、この効果は MAP 慢性投与終了7日後においても持続していた。同様に、conditioned place preference (CPP)法により精神依存形成の評価を行ったところ、MAP (2 mg/kg, s.c., 1日1回) 7日間の条件付けで place preference の発現が認められた。この効果は、条件付け終了7日間後においても維持されていた。以上の結果から、今回用いた MAP 投与スケジュールでは、MAP の精神依存および運動活性における逆耐性が形成されていることを確認した。

この MAP 慢性投与スケジュールに従って、MAP (2 mg/kg, s.c.) 投与 24 時間および MAP (2 mg/kg, s.c., 7 日間) 慢性投与 24 時間後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の細胞体である腹側被蓋野を含有する midbrain を分画し、mRNA の抽出を行った。マイクロアレイ法により、900 種の遺伝子の発現を検討し、安定した発現量が認められた遺伝子群について変化率を算出した。MAP 急性投与群においては、12 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) し、6 個の遺伝子が低下 (1.5 倍以下) していた。また、MAP 慢性投与群においては 5 個の遺伝子が増加し、21 個の遺伝子が低下していた。一方、MAP 急性投与群と MAP 慢性投与群を比較解析したところ、急性投与のみで変化する遺伝子は 14 個、慢性投与のみで変化する遺伝子は 22 個であった。また、MAP 慢性投与群のみで発現の減少が認められた遺伝子群のうち、Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 について蛋白量の変化を検討した。その結果、赤核において有意な蛋白量の減少が認められた。

今回用いた MAP 投与スケジュールでは、MAP の精神依存および運動活性における逆耐性が形成されていることを確認した。この MAP 精神依存マウスの midbrain における遺伝子発現変化を検討し、MAP 急性投与もしくは MAP 慢性投与のみで変化する遺伝子を見い出した。また、今回の研究で変動を確認した遺伝子である Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 について蛋白量の変化を検討した結果、遺伝子発現と同様の変化を確認できた。マイクロアレイ法は、MAP 慢性投与によって制御される脳内遺伝子群のスクリーニングにおいて有用であると考えられる。今後は、MAP 休薬の解析を加え、MAP 慢性投与および休薬時のみで変動する遺伝子群を同定し、機能解析を進める予定である。

A. 目的

近年、薬物依存の発症機序やその病態について、脳内の遺伝子発現の変化という観点から精力的な研究がなされている。薬物依存関連遺伝子の同定は、薬物依存の診断の指標となり、更には原因遺伝子をターゲットにした遺伝子治療および新規治療薬開発への応用が可能になると予想される。

薬物による遺伝子発現の変動を探索する方法として、近年開発された DNA chip 法（マイクロア

レイ法）が注目されている⁸⁾。本法は、ゲノムプロジェクト後の全遺伝子情報を有効に利用するための技術として重要な役割を担っており、薬物依存形成の原因遺伝子の同定にも応用が期待できる。

本研究では同時に多種類の遺伝子発現の解析が可能であるマイクロアレイ法を用いて、覚せい剤である methamphetamine (MAP) の急性および慢性投与により誘導される脳内遺伝子群のスクリーニングを行った。

B. 方法

使用動物：すべての実験には、ICR 系雄性マウス (20 - 25g) を使用した。

1. MAP 慢性投与による運動活性への影響

MAP (2 mg/kg, s.c.) は1日1回7日間に渡って慢性投与した。MAP 慢性投与終了後、24 時間および7日後に MAP (1 mg/kg, s.c.) 投与により誘発される運動活性を自発運動量測定装置 (BR-AS01, バイオリサーチセンター社) を用いて検討した (Table 1)。

Table 1. MAP 投与スケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7	8	14
	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	○	○

↑ : MAP (2 mg/kg, s.c.)

○ : MAP (1 mg/kg, s.c.)

2. MAP 精神依存形成の評価

精神依存形成の評価には、conditioned place preference (CPP)法を用いた。白黒2区画の CPP 装置 (ENS-CPP, Neuroscience 社) を用いて、MAP (2 mg/kg, s.c.) を1日1回投与し、50 分間装置内に閉じ込め、7 日間にわたって条件付けを行った (Table 2)。対照群は溶媒である生理食塩液を投与し、MAP および溶媒投与の組み合わせはカウンターバランスの実験デザインとした。テストセッションとしては、条件付け 24 時間および7日後に薬物溶媒ともに投与せず、15 分間の白区画および黒区画の滞在時間を測定した。

Table 2. MAP 条件付けスケジュール

DAY	1	2	3	4	5	6	7	8	14
	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	T	T

↑ : MAP (2 mg/kg, s.c.), 溶媒

T : テスト

3. マイクロアレイ法

MAP (2 mg/kg, s.c.) 投与 24 時間および MAP (2 mg/kg, s.c., 7 日間) 慢性投与 24 時間後にマウス全脳を摘出し、中脳辺縁系ドパミン神経系の細胞体である ventral tegmental area (VTA) を含有する midbrain を分画し、mRNA の抽出を行った (Figure 1)。ラベル方法としては、プライマーとして oligo dT(18) primer (300 pmol) を使用し、polyA RNA を鋳型として reverse transcriptase により逆転写反応で Cy3-dUTP および Cy5-dUTP を取込ませた。また、内部標準物質として lambda polyA RNA (50 pg) を反応時に等量ずつ添加した。遺伝子発現のスクリーニングは IntelliGene (Mouse CHIP Set 1, 宝酒造: <http://bio.takara.co.jp/catalog>) を用いて

行った。Cy3 および Cy5 の各波長は、Affymetrix 428 Array Scanner により検出した。データの解析には、BioDiscovery ImaGene Ver. 4.2.を用いた。Cy3-dUTP および Cy5-dUTP ラベルによる蛍光強度から scatter plot を作製し、内部標準物質として加えた lambda および house keeping (β -actin) 遺伝子の発現蛍光強度に対する変化率を算出し、1.5 倍の変動が認められた遺伝子群を抽出した。

MAPによる遺伝子発現の変化

Day	1	2	3	4	5	6	7	8
	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
MAP (2 mg/kg, s.c.)								
Brain	A						C	

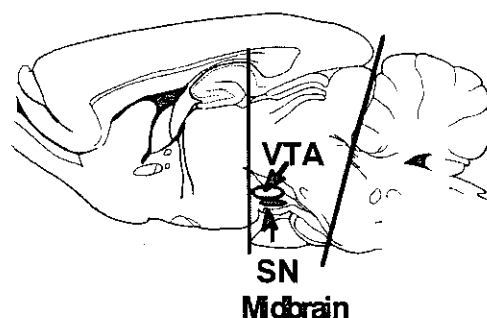


Figure 1. Schedule of MAP treatment and diagram showing location of coronal sections tested.

A: Acute treatment of MAP, C: Chronic treatment of MAP

4. 免疫染色

MAP (2 mg/kg, s.c., 7 日間) 慢性投与 24 時間後に脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド液にて固定後、パラフィン包埋した。標本は、Franklin & Paxinos のアトラス¹⁾に従って、VTA、substantia nigra (SN)、および red nucleus (RN) を含む (bregma: -3.28 mm) 領域をターゲットとして、マイクロトームを用いて 5 μ m 厚にスライスして作成した。標本を脱パラフィン後に水和して、microwave 中で 10 mM クエン酸 (90°C, 5 min) を処理し、その後 0.3% 過酸化水素-メタノール溶液 (30 min) に浸潤し、マウス inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 (2 μ g/ml, sc-6093, Santa Cruz biotechnology, Inc.) 抗体と一晩反応させた。発色はビオチン標識二次抗体で 1 時間インキュベート後、ABC 試薬にて反応させ、ペルオキシダーゼ基質 (DAB+Nickel) により行った。解析は、Mac Scope 2.5.5 を用い、VTA, SN (887.6 μ m X 693.5 μ m) および RN (443.8 μ m X 346.7 μ m) の各脳部位における陽

性細胞数をカウントした。

C. 結果

1. MAP 慢性投与による運動活性への影響

MAP (1 mg/kg, s.c.) 急性投与により、有意な自発運動亢進作用が認められた (Total: 1780.6 ± 252.6 counts/120min)。MAP 慢性投与群では、MAP (1 mg/kg, s.c.) 投与による自発運動亢進作用が認められ、この効果は MAP 急性投与群に比較して有意に増加していた (Total: 2704.5 ± 402.3 counts/120min)。MAP 慢性投与群におけるこの効果は MAP 慢性投与終了 7 日後においても持続していた (Total: 2848.8 ± 436.1 counts/120min) (Figure 2)。

2. MAP 精神依存形成の評価

生理食塩液により条件付けしたマウスでは place preference および place aversion の発現は認められなかった (Figure 3)。一方、MAP の条件付け終了 24 時間後にテストを行ったところ有意な place preference の発現が認められた (139.4 ± 36.7 sec)。この効果は、条件付け終了後、7 日目においても維持されていた (150.8 ± 51.3 sec)。

3. 遺伝子発現の変化

マイクロアレイ法により 900 種の遺伝子の発現変化を検討した結果、MAP 急性投与群では 708 種および MAP 慢性投与群では 698 種の遺伝子において安定した発現量が認められた。安定した発現量が認められた遺伝子群について変化率を算出した (Figure 4, Table 3)。MAP 急性投与群においては、12 個の遺伝子が増加 (1.5 倍以上) し、6 個の遺伝子が低下 (1.5 倍以下) していた。また、MAP 慢性投与群においては 5 個の遺伝子が増加し、21 個の遺伝子が低下していた。一方、MAP 急性投与群と MAP 慢性投与群を比較解析したところ、急性投与のみで変化する遺伝子は 14 個、慢性投与のみで変化する遺伝子は 22 個であった。

MAP 急性投与群および MAP 慢性投与において変動が維持されている遺伝子としては、Glucocorticoid-induced leucine zipper および zinc finger protein 57 であり、遺伝子の転写に関与するものであった。また、MAP 慢性投与群のみで変動が認められた遺伝子としては Inositol phosphatase および Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 などであった。

4. 蛋白質量の変化

マイクロアレイ法による解析の結果から、MAP 慢性投与のみで変動が認められた遺伝子には、

Inositol phosphatase (増加) および Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 (減少) が含まれていた。そこで、今回は Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 に着目して、蛋白質量の変化について検討した。対照群における Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 の分布は VTA および SN では散在しており、RN ではち密な分布を示した。MAP 慢性投与によって、RN においてのみ、Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 蛋白質量の有意な減少が認められた (Figure 5)。

D. 考察

MAP (2 mg/kg, s.c.) の 7 日間慢性投与による行動変化について検討したところ、MAP 自発運動亢進作用において増感現象、すなわち逆耐性の形成が確認された。また、この効果は休薬 7 日後においても維持されていた。さらに、同様の MAP 投与スケジュールで条件付けを行い、MAP 報酬効果を評価したところ、MAP による place preference の発現が確認され、この効果は条件付け 7 日後においても維持されていた。したがって、今回用いた MAP 投与スケジュールで、MAP の逆耐性および精神依存モデル動物の作成が可能であることを確認した。

覚せい剤による逆耐性および精神依存形成には中脳辺縁系ドパミン神経系の関与が示唆されている^{9,10)}。そこで、中脳辺縁系ドパミン神経系の細胞体である VTA を含有する midbrain を標的的部位として、マイクロアレイによる遺伝子発現の変動を検討した。その結果、(1) MAP 急性投与のみ、(2) MAP 慢性投与のみ、もしくは(3) MAP 急性および慢性投与で変化が維持される遺伝子を同定した。MAP 急性投与のみで変化する遺伝子としては、Upstream transcription factor 1 および Signal transducer and activator of transcription 1 などの細胞増殖および転写に関与するものが含まれていた^{2,11)}。また、MAP 慢性投与のみで変化する遺伝子として、ATP-binding cassette (ABC transporter)、GTP 結合蛋白 $\beta 1$ および TATA-box binding protein など多岐に渡る遺伝子の変化が確認された。現時点で、これらの変化の意義は不明であるが、特に MAP 慢性投与のみで変化が認められる遺伝子群については MAP 逆耐性および精神依存形成に関与すると考えられる。一方、既知遺伝子群で MAP 急性投与および MAP 慢性投与で増加が維持される遺伝子は Glucocorticoid-induced leucine zipper および Zinc finger protein 57 であった。これらの遺伝子は DNA 結合性の転写制御に関与することが知られており⁶⁾、MAP による遺伝子発現変動に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。以前の研究では、MAP が転写因子である AP-1

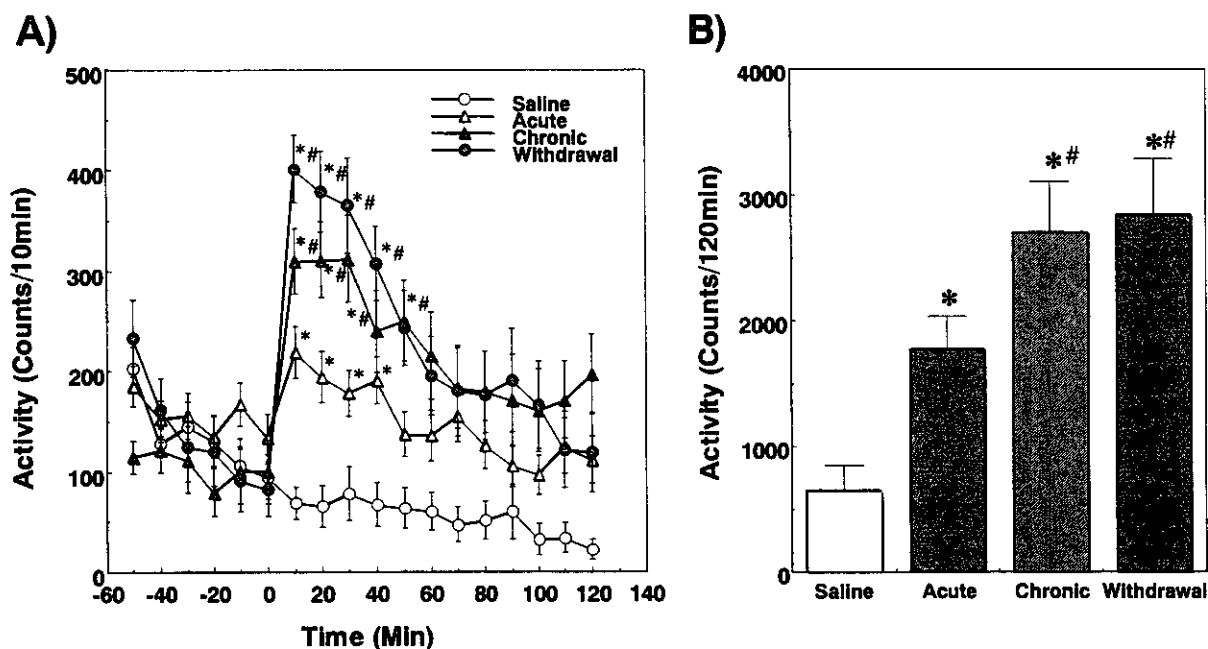


Figure 2. Effect of chronic treatment with methamphetamine on methamphetamine-induced hyperlocomotion in mice. A) Time course changes in methamphetamine (1 mg/kg, s.c.)-induced hyperlocomotion in mice by chronic treatment with methamphetamine (2 mg/kg, s.c.) for 7 days. Each plot represents the mean locomotor activity counts with S.E.M. of 12 - 14 animals. B) Each column represents the mean total locomotor activity counts with S.E.M. of 14 animals for 120 min after methamphetamine treatment.

* $P < 0.05$ vs. saline control. # $P < 0.05$ vs. acute administration of methamphetamine

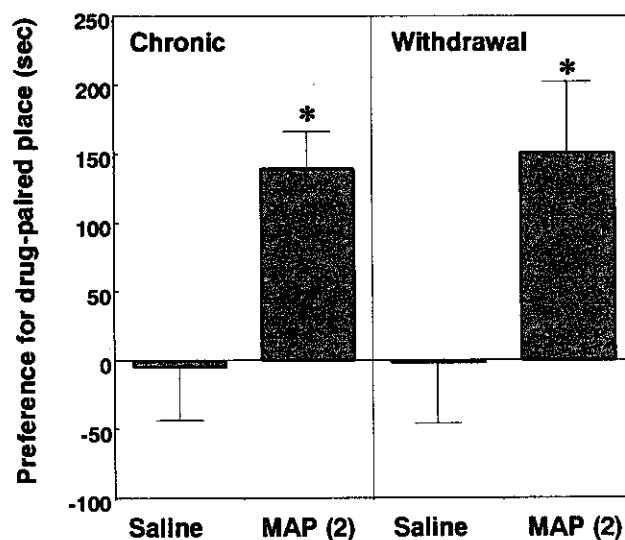


Figure 3. Place conditioning produced by methamphetamine (MAP, 2 mg/kg, s.c.). Conditioning sessions (7 for MAP; 7 for saline) were conducted. On day 8 (Chronic) or 14 (Withdrawal), test of conditioning was performed. Conditioning scores represent the time spent in the drug-paired place minus the time spent in the saline-paired place. Each column represents the mean with S.E.M. of 12 - 14 animals.

* $P < 0.05$ vs. saline control.

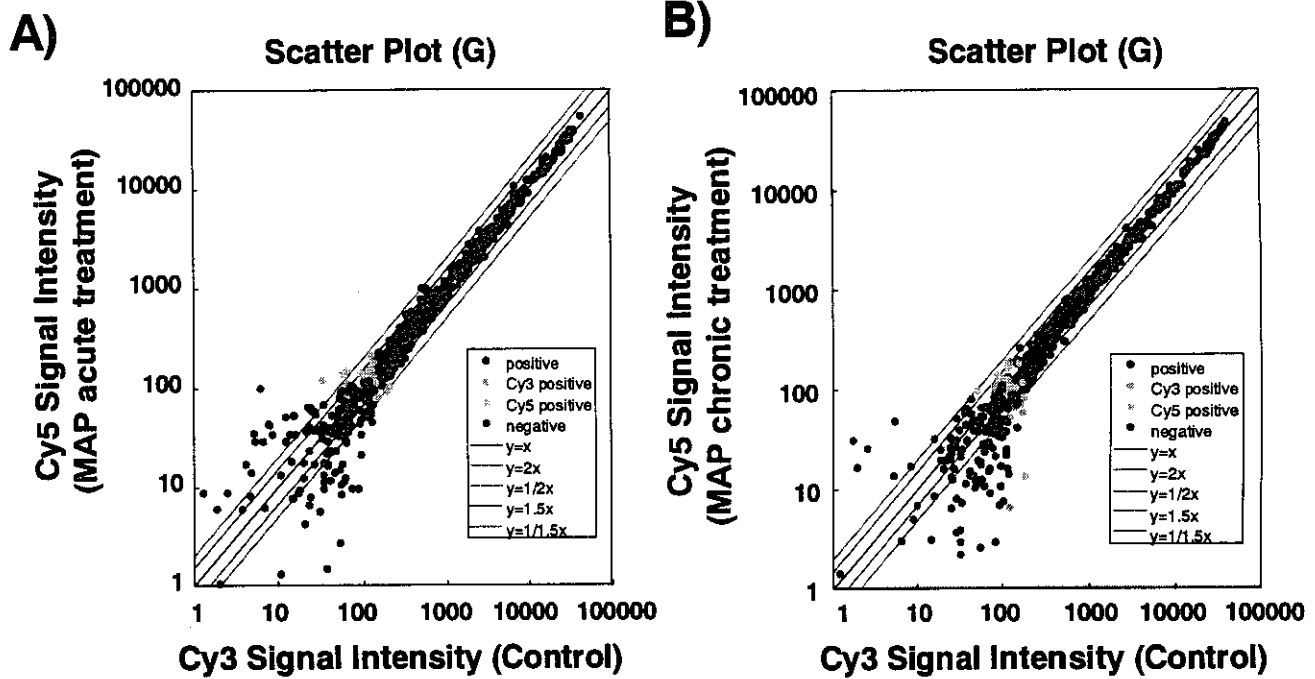


Figure 4. Expression profiling of 900 genes between methamphetamine (MAP) treatment and saline (Control) treatment. For each gene, average expression levels were calculated from two independent hybridization for midbrain, and displayed on a scatter plot.

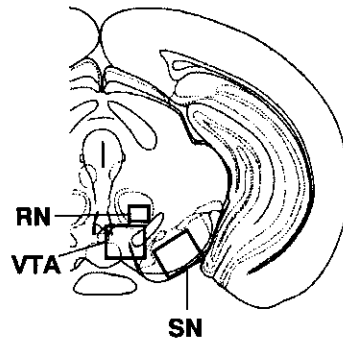
Table 3. List of genes increased expression and decreased expression in the mouse midbrain.

Gene	Accession No.	Fold change	
		A	C
Cytokine Inducible SH2-containing protein	D31943	1.99	0.86
Mouse gene for beta-1-globin	V00722	1.58	1.13
Upstream transcription factor 1	X95316	1.57	1.21
DNA segment, Chr 5	AW413033	1.51	1.25
Murine Glvr-1	M73696	1.50	0.93
Mus musculus tbc1	U33005	1.01	1.61
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE) member 1	U34920	1.00	1.54
Zinc finger protein 57	D21850	2.43	1.61
Glucocorticoid-induced leucine zipper	NM 010286	1.50	1.53
Inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145 kDa	U52044	1.08	1.96
Unknown	A1326878	2.28	1.07
Unknown	A1528727	1.74	0.95
Unknown	A1116931	1.54	0.98
Unknown	AA764080	1.50	1.21
Unknown	A1324037	1.50	1.23
Increase		12(10)*	5(3)*

Gene	Accession No.	Fold change	
		A	C
Procollagen, type XI, alpha 1	D38162	0.40	1.01
Signal transducer and activator of transcription 1	U06924	0.39	0.97
LIM and cysteine-rich domains 1	AU035886	0.39	0.87
Unknown	A1605943	0.41	0.46
Unknown	AA217070	0.39	0.96
Unknown	A1647914	0.37	0.48
Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1	X15373	0.79	0.48
Protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma isoform	M61475	0.94	0.48
Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1A2)	U56649	0.68	0.48
Guanine nucleotide binding protein, beta 1	U29055	0.82	0.48
Transcription factor E2a	X17500	0.72	0.48
TATA box binding protein	U63933	0.71	0.48
Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	NM 010444	0.81	0.48
Acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain	U07159	0.73	0.48
G protein, gamma transducing activity polypeptide 2	AA028742	1.20	0.48
Aplysia ras-related homolog 9 (RhoC)	X80638	0.75	0.44
Zinc finger protein 36	M58691	0.92	0.44
Unknown			8 genes
Decrease		6(4)*	21(19)*

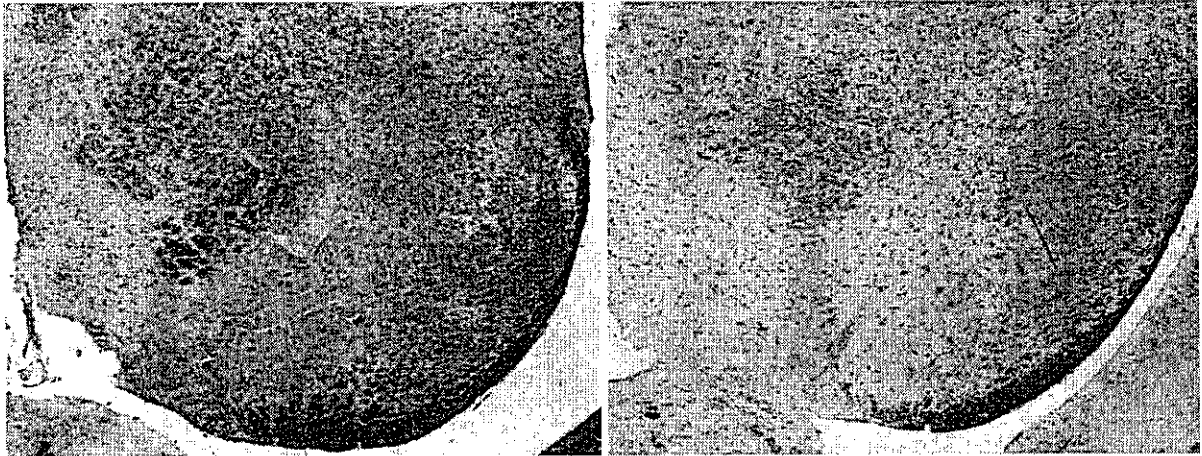
List of genes increased expression (A) and decreased expression (B) in the mouse midbrain. A: Acute treatment with methamphetamine. C: Chronic treatment with methamphetamine. * The number of specific genes in acute or chronic treatment group.

IP3R-I (X100, Santa Cruz)



A) Control

B) Chronic



C)

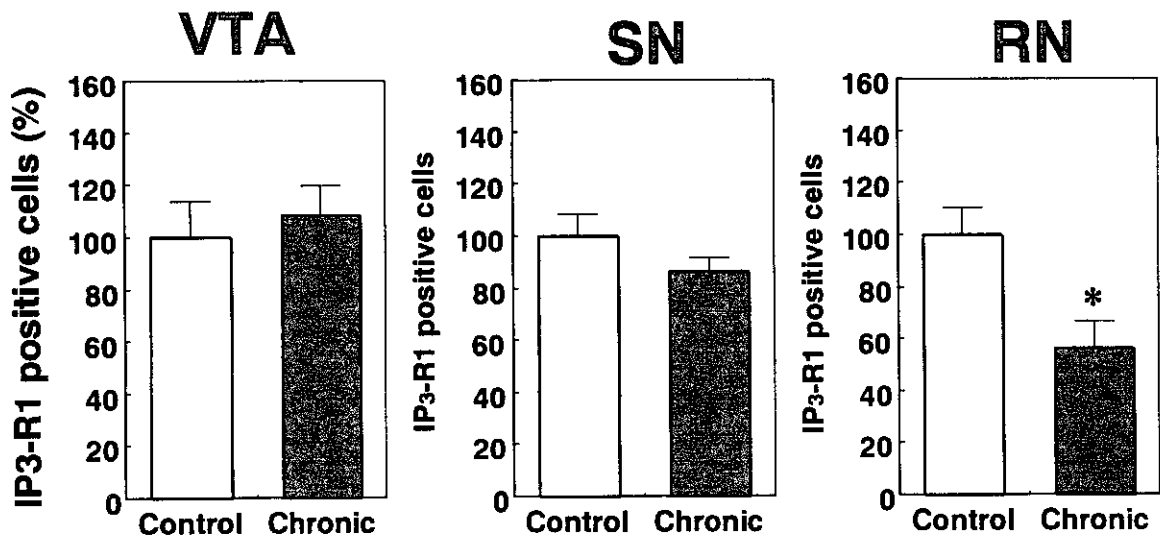


Figure 5. Effects of chronic treatment with methamphetamine on the number of IP3 receptor-1 (IP3-R1) protein immunoreactive cells in the mouse midbrain. Mice were treated with methamphetamine (2 mg/kg, s.c., Chronic) or saline (Control) once a day for 7 days. Coronal sections were labeled by anti-IP3-R1 antibody in saline-treated (A) or methamphetamine-treated (B) mice. C) Each column represents the mean percentage of control group with S.E.M. of 6 animals. VTA: Ventral Tegmental Area, SN: Substantia Nigra, RN: Red Nucleus. * $P < 0.05$ vs. saline control.

の活性を増加させること⁵⁾、さらに依存性薬物の慢性投与により c-Fos と AP-1 の複合体機能が長期間に渡り変化していることが明らかにされている³⁾。一方、最近になって Glucocorticoid-induced leucine zipper の役割として AP-1 の転写機能を調節することが報告されている⁵⁾。したがって、MAP 慢性投与による Glucocorticoid-induced leucine zipper の増加は、MAP 精神依存形成およびその維持に関与する AP-1 などの各種転写過程の適応を引き起こす重要な因子であるかもしれない。

本研究におけるマイクロアレイの解析では、MAP 慢性投与群のみで変動が認められる遺伝子群のなかに Inositol phosphatase (増加) および Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 (減少) というカルシウムシグナリングに関与する因子が含まれることを明らかにした。以前に、Inositol 1,4,5-triphosphate 代謝を抑制する Li と MAP を併用すると MAP 逆耐性形成が抑制されることが報告されている⁷⁾。そこで、今回は Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 遺伝子の減少に着目し、midbrain における蛋白量の変化について検討した。以前の報告から、覚せい剤の精神依存形成および逆耐性形成に midbrain の VTA および SN の重要性が示唆されている^{9,10)}が、今回の解析では、VTA および SN では有意な変化は認められなかった。一方、RN では有意な減少が認められ、マイクロアレイ解析での Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 遺伝子発現の減少という結果と一致していた。以前の行動薬理学的解析では、RN 破壊動物において MAP 逆耐性現象と類似した運動活性の亢進反応を示すことが報告されている⁴⁾。したがって、RN における Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 の減少は、特に逆耐性形成に関与する可能性が示唆された。今後は、中脳辺縁系ドパミン神経系の主要投射先である nucleus accumbens などにおける詳細な検討も必要である。

E. 結論

マイクロアレイ法は多数の遺伝子群から薬物の慢性投与で特異的変動を示す遺伝子を同定し、行動や細胞内情報伝達系の変化を含めて、解析すべき遺伝子の決定に有用である。今回の研究で変動を確認した遺伝子群について、その発現変化のメカニズムと意義については不明である。今後 MAP 体系の解析を加え、詳細に検討すべき遺伝子群を決定し、機能解析を進める必要がある。

[参考文献]

1) Franklin K.B.J., Paxinos G.: The mouse brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, San Diego 1997.

- 2) Henrion A.A., Vaulont S., Raymondjean M., et al.: Mouse USF1 gene cloning: comparative organization within the c-myc gene family. *Mamm Genome*, 7: 803-809, 1996.
- 3) Hope H.E., Nye M.B., Kelz D.W. et al.: Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of the altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatment. *Neuron*, 13, 1235-1244, 1994.
- 4) Isaac W, Kallman WM.: Stimulants and lesions of the substantia nigra and red nucleus. *Physiol. Behav.*, 15: 471-474, 1975.
- 5) Lee Y.W., Hennig B., Yao J. et al.: Methamphetamine induces AP-1 and NF-kappaB binding and transactivation in human brain endothelial cells. *J Neurosci Res*, 66: 583-591, 2001.
- 6) Mittelstadt P.R., Ashwell J.D.: Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem*, 276, 29603-29610, 2001.
- 7) Namima M., Sugihara K., Watanabe Y. et al.: Quantitative analysis of the effects of lithium on the reverse tolerance and the c-Fos expression induced by methamphetamine in mice. *Brain Res Brain Res Protocol*, 4: 11-18, 1999.
- 8) Tanaka T., Jaradat S.A., Lim M.K.: Genomic-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 9127-9131, 2000.
- 9) Pierce R.C., Kalivas P.W.: A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev*, 25: 192-216, 1997.
- 10) White F.J., Kalivas P.W.: Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend*, 51: 141-153, 1998.
- 11) Zhong Z., Wen Z., Darnell J.E. Jr.: Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 4806-4810, 1994.

F. 研究業績

[論文発表]

Funada M., Hara C., Wada K.: Involvement of corticotropin-releasing factor receptor subtype 1 in morphine withdrawal regulation of the brain noradrenergic system. *Eur J Pharmacol*, 430: 277-281, 2001.

Funada M., Hara C.: Differential effects of psychological stress on activation of the 5-hydroxytryptamine- and dopamine-containing neurons in the brain of freely moving rats. *Brain Res*, 901: 247-251, 2001.

Sora I., Elmer G., Funada M., Pieper J., Li X.F., Hall F.S., Uhl G.R.: Mu opiate receptor gene dose effects on different morphine actions: evidence for differential in vivo mu receptor reserve. *Neuropsychopharmacology*, 25: 41-54, 2001.

[学会発表]

Funada M., Sato M., Hara C., Wada K.: Involvement of corticotropin-releasing factor receptor-1 in morphine-induced hyperlocomotion and the rewarding effect in mice. College on Problems of Drug Dependence, 63th Annual Scientific Meeting, Arizona, 2001.

Sato M., Wada K., Funada M.: Changes in G protein-activated inwardly rectifying potassium channel protein levels in morphine-dependent mice. College on Problems of Drug Dependence, 63th Annual Scientific Meeting, Arizona, 2001.

佐藤美緒、和田清、船田正彦：モルヒネの慢性投与はマウス海馬のG protein-activated inwardly rectifying potassium channel proteinの発現を調節する。第31回日本神経精神薬理学会年会、広島、2001。

Funada M., Sato M., Hara C., Wada K.: Effects of corticotropin-releasing factor receptor-1 antagonist CRA1000 on naloxone-precipitated morphine withdrawal in mice. CINP, Hiroshima, 2001.

遺伝子改変マウスモデルを用いた依存性薬物

の分子作用機序

分担研究者： 曾良一郎^{1,2}

共同研究者： 沈昊偉¹、萩野洋子¹、小林 秀昭¹、田中（篠原）慶子¹、井手 聡一郎¹、
George R Uhl²、池田和隆¹、山本敏文^{1,3}、山本秀子¹

(¹ 東京都医学研究機構・精神研・分子精神医学、² Mol. Neurobiol., Natl. Inst. Drug Abuse, USA、³ 横浜市立大大学院・総合理学)

【研究要旨】

コカインはモノアミントランスポーターに結合し報酬効果を発揮するが、その報酬効果は主としてドーパミントランスポーター(DAT)を介していると考えられていた。しかし、DATを単独に欠損してもコカインの報酬は保持され、また、5-HTT,NETがそれぞれ単独に欠損しても、コカインの報酬は保持あるいは増加する結果が得られた。このことから、コカインの報酬はトランスポーターが補完しあい、保持されることが推測された。そこで DAT と 5-HTT のダブル KO マウスを新たに作製し、コカインの報酬が保持あるいは消失するかどうかを検討した。コカインの報酬は DAT(-/-)5-HTT(-/-)および DAT(-/-)5-HTT(+/-)では消失、DAT(+/-)5-HTT (-/-)では保持されたことから、コカイン報酬には DAT と 5-HTT が共に関与しているが、5-HTT よりも DAT がより重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、脳内微量透析法を用いて、これら KO マウスにおける薬物投与による脳内ドーパミン・セロトニンの変化を検討した。線条体ではコカインの報酬効果に対応してドーパミン濃度が上昇していることを見いだした。

モルヒネはプロトタイプ μ 受容体作動薬と考えられているが、モルヒネの鎮痛効果が全く消失している μ オピオイド受容体(μ 受容体)KO マウスは、静脈内自己投与試験、条件付け場所嗜好性試験によるモルヒネの報酬効果も消失していた。これらの結果は、モルヒネの報酬効果には μ 受容体の発現が必要であり、 δ あるいは κ 受容体では代償できないことを示している。さらに、 μ 受容体 KO マウスでは自己投与試験、場所条件付け試験によってエタノールの報酬効果が減少していたことは、モルヒネのみならずエタノールの報酬効果にも μ 受容体が関与していると考えられる。

A. 目的

モノアミントランスポーター、 μ オピオイド受容体 (μ OR) はコカイン、モルヒネなどの依存性薬物の標的分子として、これまで詳細な薬理的な解析が行われてきた。近年、使われ始めた遺伝子改変動物の

一つに特定の遺伝子を標的と定めて組み換えを起させたノックアウトマウス(以下 KO マウス)がある。我々はモノアミントランスポーター、 μ オピオイド受容体の遺伝子 KO マウスを作製し、薬物依存の機序を検討してきた。