

が示された。反対に患者群において H1 受容体密度が上昇を認めた部位はなかった。また、この他、BPRS スコア、haloperidol 投与量、biperiden 投与量、年齢、罹病期間などの変数と、H1 受容体の増減との相関も調べたが、有意な相関を認めた部位もなかった。(Fig.3)

2-2.

関心領域毎に比較した結果でも、両患者群の前頭前野と帯状回において、正常群と比較して、H1 受容体結合能の有意な低下を認めた。(Fig.4)

2-3.

薬物精神病の症例は 1 名のみで、受容体密度の統計的比較はできなかったが、統合失調症群と同様に、H1 受容体密度は低下している傾向であった。

D. 考察

解析法については、3compartment model に Logan 法を用いて、動脈採血を省略した場合でも、標準とした方法 [2compartment model + 非線型最小二乗推定; 動脈採血 (+)] と概ね良好な相関が確認された。この方法は簡便性と非侵襲性の点において優れた方法と考えられ、今回の統合失調症および薬物精神病患者とその比較対照群においてもこれを用いた。

また、実際の PET 撮影の結果、統合失調症患者の前頭葉や帯状回などにおいて H1 受容体が低下していることが分かった。

過去の研究では、統合失調症死後脳における H1 受容体の低下⁶が報告されているが、今回の PET 研究の結果も、それと同じ傾向を示していた。また、患者の髄液中におけるヒスタミン代謝産物の増加⁷も報告されており、これらの報告からは、統合失調症の慢性期におけるヒスタミン神経伝達の亢進や、それに伴う後シナプスの H1 受容体のダウンレギュレーションが想定される。

薬物精神病の 1 例は、大麻を中心とした、多剤併用による遅発性精神病性障害であったが、妄想型の統合失調症に酷似した精神病症状を有し、実際には鑑別困難な症例である。薬物使用歴や病歴によって、より明瞭に統合失調症から区別された薬物精神病群における検討が今後期待される。

また、患者群においては、休薬が困難であったために、複数の併用薬物を容認しているが、この影響も否定できず、結果においては慎重な検討を要する。H1 受容体に対する親和性に加えて、他の受容体を経由したヒスタミン神経系への影響を慎重に検討する必要がある。今後は、薬物未使用もしくは休薬期間中の被検者における検査と、薬物歴や診断の明瞭な、とくに覚せい剤精神病の被検者における PET 検査を行っていききたい。

文献

1. Cho AK, Segal DS: Amphetamine and its analogs : psychopharmacology, toxicology, and abuse. San Diego: Academic Press, 1994
2. Ito C, Onodera K, Watanabe T, et al: Effects of histamine agents on methamphetamine-induced stereotyped behavior and behavioral sensitization in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 130:362-367., 1997
3. Ito C, Sato M, Onodera K, et al: The role of the brain histaminergic neuron system in methamphetamine-induced behavioral sensitization in rats. *Ann N Y Acad Sci* 801:353-360., 1996
4. Kubota Y, Ito C, Sakurai E, et al: Increased methamphetamine-induced locomotor activity and behavioral sensitization in histamine-deficient mice. *J Neurochem* 83:837-845., 2002
5. Logan J, Fowler JS, Volkow ND, et al: Graphical analysis of reversible radioligand binding from time-activity measurements applied to [N-11C-methyl]-(-)-cocaine PET studies in human subjects. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:740-747., 1990
6. Nakai T, Kitamura N, Hashimoto T, et al: Decreased histamine H1 receptors in the frontal cortex of brains from patients with chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* 30:349-356., 1991
7. Prell GD, Green JP, Kaufmann CA, et al: 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

8. Talairach J, Tournoux P: Co-planar stereotaxic atlas of the human brain : 3-dimensional proportional system : an approach to cerebral imaging. Stuttgart ; New York Thieme Medical Publishers, 1988
9. Watanabe T, Wada H: Histaminergic neurons : morphology and function. Boca Raton: CRC Press, 1991

Fig.1

2compartment model、非線形最小二乗法、
動脈採血(+)のDVと、3compartment model、
Logan法、動脈採血(+)のBPの相関

回帰直線: $Y = 0.02 * x - 0.22$

相関係数: $R = 0.64$

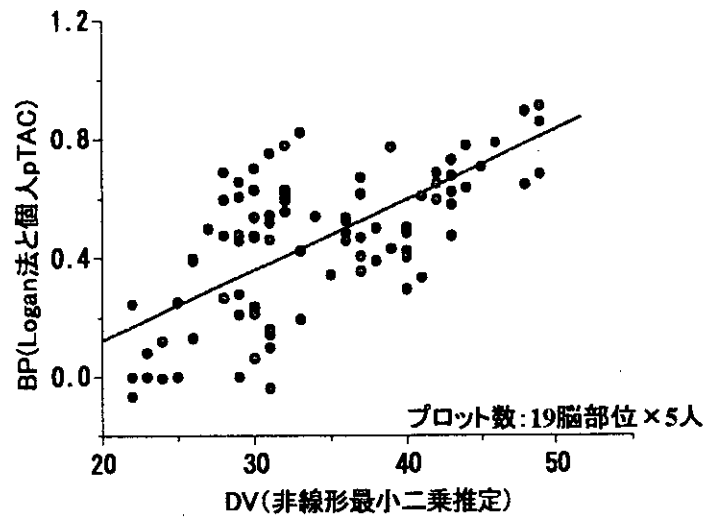


Fig.2

2compartment model、非線形最小二乗法、
動脈採血(+)のDVと、3compartment model、
Logan法、動脈採血(-)のBPの相関

回帰直線: $Y = 0.023 * x - 0.32$

相関係数: $R = 0.68$

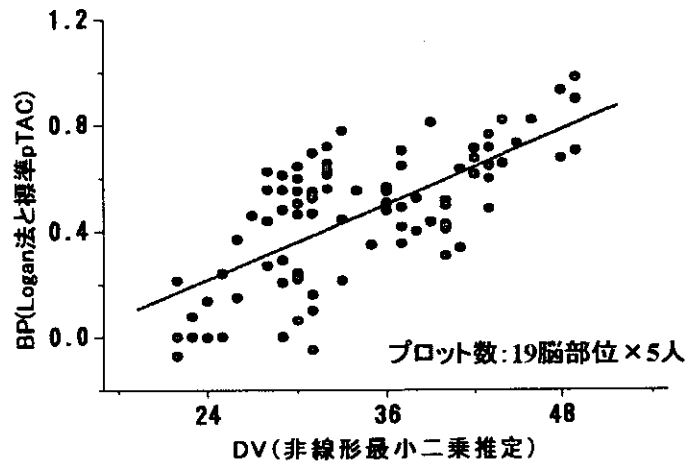


Fig.3

3compartment model、Logan法、動脈採血
(+)のBPと、3compartment model、Logan法、
動脈採血(-)のBPの相関

回帰直線: $Y = 0.9 * x + 0.04$

相関係数: $R = 0.99$

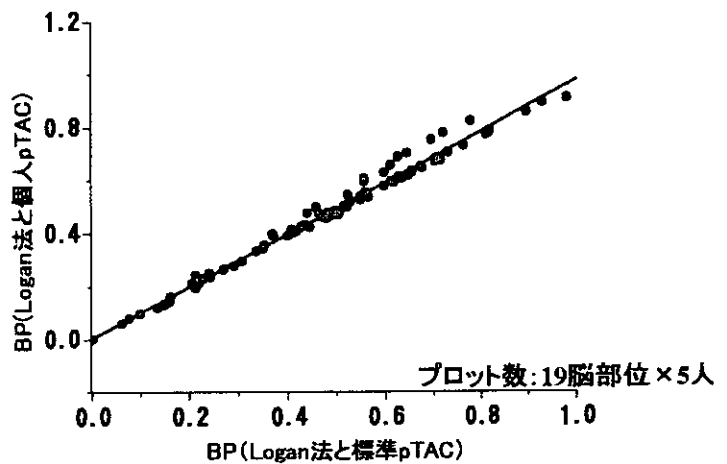
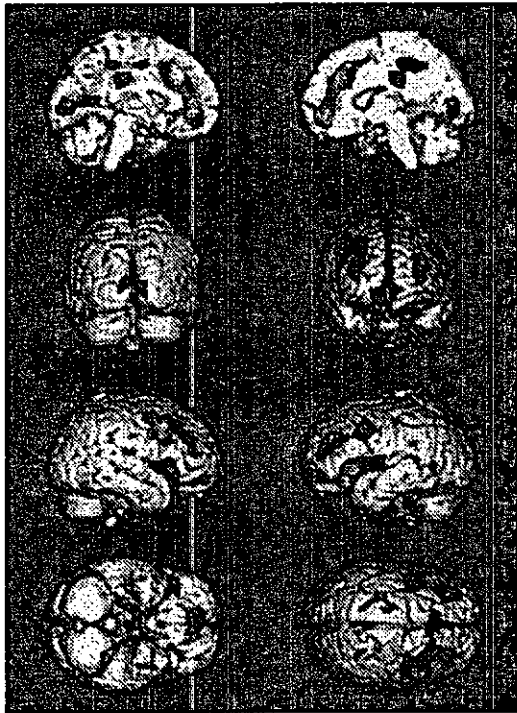


Fig.3

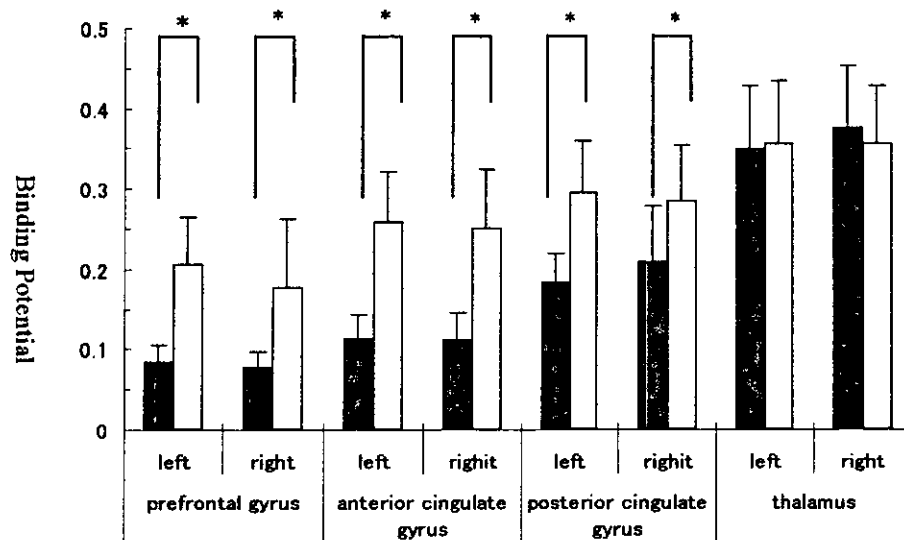
SPM99による正常群と統合失調症患者群のH1受容体結合能の比較
 (統合失調症患者群においてH1受容体が有意に低下している領域 ; $P < 0.001$)



Region	Brodmann Area	Side	Talairach coordinates			Z score
			x	y	z	
<i>Gyrus frontalis medialis</i>	8	L	-10	32	44	4.37
<i>Gyrus frontalis inferior</i>	47	L	-28	30	-12	4.33
<i>Gyrus frontalis medius</i>	9	L	-28	42	36	4.05
<i>Gyrus frontalis medius</i>	6	L	-46	4	46	3.95
<i>Gyrus frontalis inferior</i>	47	R	46	26	-2	3.87
<i>Gyrus occipitalis medius</i>	19	L	-50	-60	-4	3.69
<i>Gyrus lingualis</i>	18	R	16	-82	0	3.54
<i>Precuneus</i>	7	R	16	-34	50	3.53
<i>Gyrus frontalis medialis</i>	6	L	-12	-8	48	3.46
<i>Precuneus</i>	7	L	-14	-36	48	3.43

Fig.4

正常群と統合失調症患者群のH1受容体結合能の比較
 (関心領域毎の比較 * : Bonferroniの多重比較で $P < 0.05$)



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、フェンシクリジン投与による前シナプス側

関連蛋白 mRNA と転写因子 Nurr 1 mRNA の変化

分担研究者 秋山一文¹

共同研究者 憲武人¹、下田和孝¹

所属 ¹獨協医科大学精神神経医学教室

【研究要旨】

シナプス小胞からの神経伝達物質の放出に関与する前シナプス側の蛋白の mRNA、及び中脳ドパミン作動性神経の維持に重要な役割をもつとされる転写因子 Nurr1 の mRNA を取り上げ、精神刺激薬投与による影響を引き続き検討した。メタンフェタミン(METH)急性投与により synaptotagmin IV の mRNA 発現は線条体と側坐核に於いて増加し、これは SCH23390 の前処置によって阻止された。メタンフェタミン(METH)急性投与により SNAP25a の mRNA 発現は線条体と海馬歯状回に於いて増加し、これは SCH23390 の前処置によって阻止された。METH 急性投与により Nurr 1 の mRNA 発現は大脳皮質の広汎な部位、海馬 CA1、黒質緻密層、腹側被蓋野に於いて増加し、これも SCH23390 の前処置によって阻止された。以上の拮抗薬前処置の成績は synaptotagmin IV、SNAP25a、Nurr1 の mRNA 発現が主にドパミン D1 受容体依存性に増加している可能性を示唆している。一方、フェンシクリジン(PCP)急性投与により Nurr 1 の mRNA は大脳皮質の広汎な部位で、synaptotagmin IV の mRNA は帯状回皮質後部でそれぞれ有意に増加した。これらの mRNA 発現は PCP の反復投与後の定常状態では不変で、PCP 再チャレンジに対しても急性単回投与と同程度の変動しかもたらさなかった。

A. 目的

メタンフェタミン(METH)による行動感作（逆耐性現象）の機序はシナプス結合のパターンなど持続的な構造変化を基礎とした神経可塑性にある

と考えられている¹²⁾。しかしながらその分子的基礎の実態については明らかにされていない。シナプス小胞と前シナプス側の膜蛋白はいわゆる docking/fusion steps によって神経伝達

物質の放出に関与することが知られている¹³⁾。精神刺激薬による逆耐性現象がシナプス可塑性に基づくと仮定すれば¹²⁾、これらの一連の蛋白の発現の変化を伴う可能性が考えられる^{7,14)}。昨年度の研究ではラットにメタンフェタミン(METH)を急性投与及び反復投与し、前シナプス側の蛋白として synaphin 1, synaphin 2, SNAP25a, SNAP25b, synaptotagmin I, synaptotagmin IV を取り上げこれらの mRNA を in situ hybridization によって解析した。その結果、METH の急性投与によって synaptotagmin IV の mRNA が線条体で、SNAP25a の mRNA が内側前頭皮質、線条体、海馬歯状回で増加することを報告した。また発達期中脳ドパミン作動性神経の生存分化及び神経終末の伸長に重要な役割をもつとされる転写因子 Nurr 1¹⁸⁾ の mRNA も検討し、METH 急性投与によって Nurr 1 の mRNA が広汎な大脳皮質、海馬錐体細胞、腹側被蓋野で増加することも報告した。本研究では METH 急性投与によるこれらの mRNA の変化に対するドパミン D1 受容体拮抗薬、非競合性 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体拮抗薬の影響を検討した。またフェンシクリジン(PCP)の急性・反復投与によるこれらの mRNA に与える影響を検討した。

B. 対象と方法

実験動物として7週齢のSD系雄性ラットを用い7日間のハンドリングを行った。METHの急性薬理作用を検討するために、ドパミンD1受容体拮抗薬のSCH23390の0.5 mg/kgまたは非競合性NMDA受容体拮抗薬のMK801の0.5 mg/kgまたは生食を前処置して、30分後にMETH 4 mg/kg i.p. または生食を投与し、さらにその3時間後に断頭した。PCP急性投与実験として、PCP 10 mg/kg i.p.投与後1, 3, 6, 24時間後に断頭した。対照群には生食を投与し3時間後に断頭した。一部の動物にはMK801の0.5 mg/kg i.p.投与後1, 3, 6, 24時間後に断頭した。PCP反復投与実験ではPCP 10 mg/kg/dayまたは生食を1週間連日i.p.投与した後、3日間の断薬期間をおき、PCP 10 mg/kgまたは生食をチャレンジしてその3時間後に断頭した(SS群、SP群、PS群、PP群として設定)。

摘出した脳を凍結し、10 μ mの厚さの冠状断に切りスライドグラスにマウントした。synaphin 1, synaphin 2のmRNAはIshizukaら¹⁰⁾、SNAP25a, SNAP25bのmRNAはBoschertら⁹⁾、synaptotagmin I, synaptotagmin IVのmRNAはBertonら³⁾、Nurr 1のmRNAはHonkaniemiらの報告⁹⁾に従って解析した。すなわちそれぞれの相捕的

な oligonucleotide probe の 3' 端を [³⁵S]dATP で標識し、in situ hybridization を行った。画像解析から読み取った optical density を同一のフィルムに expose させたスタンダードから nCi/g tissue に変換した値を one way ANOVA と Fisher の PLSD によって統計解析した。

C. 結果

1. METH 急性投与による synaptotagmin IV の mRNA の増加は線条体と側坐核に於いて SCH23390 の前処置によって阻止された。海馬 CA1、歯状回に於いては METH 急性投与によって synaptotagmin IV の mRNA は有意に増加したが、SCH23390 の前処置によって阻止されなかった (Fig 1)。
2. METH 急性投与による SNAP25a の mRNA の増加は線条体と歯状回に於いて SCH23390 の前処置によって阻止された。
3. METH 急性投与による Nurr 1 の mRNA の増加は眼窩皮質、内側前頭皮質、海馬 CA1、黒質緻密層、腹側被蓋野に於いて SCH23390 の前処置によって阻止された。SCH23390 の前処置は内側前頭皮質、海馬 CA3、黒質緻密層、腹側被蓋野に於いて生食投与による Nurr 1 の mRNA の発現を阻止した (Fig 2)。
4. PCP 10 mg/kg 急性投与から 3 時間後で synaptotagmin IV の mRNA は帯状回皮質後部に於いて有意に増加した。PCP 10 mg/kg/day を 1 週間投与し、3 日間断薬させたのちに PCP 10 mg/kg/day をチャレンジすると (PP 群)、PS 群に比べて synaptotagmin IV の mRNA は帯状回皮質後部に於いて有意に増加した。しかし PP 群では SP 群を上回る増加はなかった。
5. PCP 急性投与から 1 時間後ないし 3 時間後で Nurr 1 の mRNA は大脳皮質の広汎な部位で有意に増加した (Fig 3)。MK801 0.5 mg/kg 急性投与から 1 時間後ないし 3 時間後でも Nurr 1 の mRNA は大脳皮質の広汎な部位で有意に増加した。大脳皮質の各部位で Nurr1 の mRNA は PS 群に比べて PP 群では有意な増加を示したが、SP 群を上回る増加はなかった。
6. synaphin 1, synaphin 2, SNAP25b, synaptotagmin I は METH、PCP の急性または慢性投与によっていずれの脳部位でも有意な変化は認められなかった。

D. 考察

synaptotagmin はシナプス小胞側に位置し、Ca²⁺流入に伴う神経伝達物質の放出に関与することが示唆されている¹³⁾。synaptotagmin はいくつものアイソフォームからなるが、なかでも synaptotagminIV は脱分極または痙攣によって増加することが報告^{15,16)}されている一方、膜輸送(membrane trafficking)に関与することが指摘されている⁹⁾。先行研究ではコカインの急性投与によって線条体の synaptotagminIV の mRNA が増加することが報告⁷⁾されているが、拮抗薬を前処置して精神刺激薬の効果を検討した成績はない。

SNAP25a は神経終末上の細胞膜側にあり軸索の伸長やシナプスの結合の形成と再構成に関与することが示唆されている。SNAP25 は alternative splicing によって SNAP25a, SNAP25b の isoform として存在する¹⁾。SNAP25a の mRNA の発現は発達に応じて増加し⁹⁾、また長期増強(long term potentiation)によって変化することも報告されている¹⁴⁾。

METH の急性投与によって synaptotagminIV の mRNA が線条体と側坐核で増加し、この増加はドパミン D1 受容体拮抗薬の SCH23390 によって阻止された。6-hydroxydopamine で黒質線条体系のドパミンを枯渇さ

せ後シナプスドパミン受容体の過感受性をもたらした状態でドパミン D1 受容体の作動薬を投与すると、障害側の線条体に於いて synaptotagminIV の mRNA が著明に増加することが報告されている⁹⁾。これらのことから synaptotagminIV の mRNA はドパミンニューロンによる緊張性制御を受けており、線条体からの遠心性ニューロンに存在することが示唆される。METH の急性投与によって線条体、歯状回に於いて SNAP25a の mRNA が増加し、この増加もドパミン D1 受容体拮抗薬の SCH23390 によって阻止された。

METH をはじめとする逆耐性現象の形成にはドパミン D1 受容体に関わり、線条体からの主な遠心性ニューロンに存在するサブスタンス P の放出は METH 急性投与によって増加すること、それはドパミン D1 受容体拮抗薬によって阻止されることが知られている⁹⁾。ニューロン内の小胞では synaptotagmin をはじめとするシナプス小胞蛋白とサブスタンス P が共存することも知られていることから²⁾、synaptotagminIV, SNAP25a がドパミン D1 受容体を介して神経可塑性関連遺伝子としてその発現を変化させる可能性が示唆される。

Nurr1 は nuclear receptor superfamily のひとつでリガンドは不明なオーファ

ン核内受容体とされる。Zinc-finger DNA binding domain をもつ転写因子であり、中脳ドパミン作動性神経の生存分化¹⁶⁾、あるいは神経終末の伸長に必須とされる¹⁷⁾。本研究では広汎な大脳皮質で METH 急性投与後で Nurr1 の mRNA 発現の増加を認め、この増加はドパミン D1 受容体拮抗薬の SCH23390 によって阻止された。PCP は非競合性の NMDA 受容体拮抗薬であるが、PCP の乱用によって陽性症状（幻覚妄想）のみならず思考障害、陰性症状（自閉、感情鈍麻、思考・会話の減少、快感喪失）など精神分裂病の主要な症状に酷似した症状を引き起こす。PCP はラットでも迷路通過など作業記憶を必要とする行動の障害、仲間からの孤立(social isolation)などそれぞれ精神分裂病の認知障害、陰性症状に似た行動も引き起こす。PCP の急性投与により広汎な大脳皮質で 1 - 3 時間後で Nurr1 の mRNA の増加が、帯状回皮質後部で synaptotagminIV の mRNA の増加が認められたが、PCP の反復投与はこの増加に影響は与えなかった。

E. 結論

以上から、METH 投与による synaptotagmin IV、SNAP25a と Nurr1 の mRNA 発現は主にドパミン D1 受容体依存性に増加すること、Nurr1 と

synaptotagminIV の mRNA 発現に対する反復投与の効果は PCP ではなく METH で認められることが明らかとなった。METH 反復投与による行動感作（逆耐性現象）の形成や維持の機序にこれらの候補的な神経可塑性遺伝子の変化が関わっていることが示唆される。

【引用文献】

1. Bark I.C. : Structure of the chicken gene for SNAP-25 reveals duplicated exons encoding distinct isoforms of the protein. *J. Mol. Biol.* 233:67-76, 1993.
2. Berg E.A., Johnson R.J., Leeman S.E. et al.: Isolation and characterization of substance P-containing dense core vesicles from rabbit optic nerve and termini. *J. Neurosci. Res* 62:830-839, 2000.
3. Berton F., Iborra C., Boudier J.-A., et al.: Developmental regulation of synaptotagmin I, II, III, and IV mRNAa in the rat CNS. *J. Neurosci.*, 17:1206-1216, 1997.
4. Berton F., Cornet V., Iborra C. et al. : Synaptotagmin I and IV define distinct populations of neuronal

- transport vesicles. *Eur. J. Neurosci.* 12:1294-1302, 2000.
5. Boschert U., O'shaughnessy C., Dickinson R., et al.: Developmental and plasticity-related differential expression of two SNAP-25 isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 367:177-193, 1996.
 6. Castel M.N., Morino P., Hokfeld T. : Modulation of the neurotensin striato-nigral pathway by D1 receptors. *Neuroreport* 5:281-284, 1993.
 7. Denovan-Wright E.M., Newton R.A., Armstrong J.N., et al.: Acute administration of cocaine, but not amphetamine, increases the level of synaptotagmin IV mRNA in the dorsal striatum of rat. *Mol. Brain Res.*, 55:350-354, 1998.
 8. Glavan G., Zorec R., Babic K., et al.: Dopaminergic regulation of synaptotagmin I and IV mRNAs in hemiparkinsonian rats. *Neuroreport* 11:4043-4047, 2000.
 9. Honkaniemi J., and Sharp F.R. : Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene mRNAs and decreased protein synthesis following kainic acid induced seizures. *Eur. J. Neurosci.*, 11:10-17. 1999.
 10. Ishizuka T., Saisu H., Odani S., et al. : Distinct regional distribution in the brain of messenger RNAs for the two isoforms of synaphin associated with the docking/fusion complex. *Neurosci.*, 88:295-306, 1999.
 11. Roberts L.A., Morris B.J., O'Shaughnessy C.T. Involvement of two isoforms of SNAP-25 in the expression of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neuroreport* 9:33-36, 1998.
 12. Robinson T.E., and Kolb, B.: Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J. Neurosci.*, 17:8491-8497, 1997.
 13. Schiavo G., Stenbeck G., Rothman J.E. et al. : Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked

- vesicles at neurotoxin-treated synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:997-1001, 1997.
14. Subramaniam S., Marcotte E.R., and Srivastava L.K.: Differential changes in synaptic terminal protein expression between nucleus accumbens core and shell in the amphetamine-sensitized rat. *Brain Res.*, 901:173-183, 2001.
 15. Tocco G., Bi X., Vician L. et al. : Two synaptotagmin genes, *Syt 1* and *Syt4*, are differentially regulated in adult brain and during postnatal development following kainic acid-induced seizures. *Mol Brain Res.*, 40:229-239, 1996.
 16. Vician L., Lim I.K., Ferguson, G. et al. Synaptotagmin IV is an immediate early gene induced by depolarization in PC12 cells and in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:2164-2168, 1995.
 17. Witta J., Baffi J.S., Palkovits M. et al.: Nigrostriatal innervation is preserved in *Nurr1*-null mice, although dopaminergic neuron precursors are arrested from terminal differentiation. *Mol. Brain Res.*, 84:67-78, 2000.
 18. Zetterstrom, R.H., Williams, R., Perlmann, T. et al.: Cellular expression of the immediate early transcription factors *Nurr1* and *NGFI-B* suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Mol. Brain Res.*, 41:111-120, 1996.

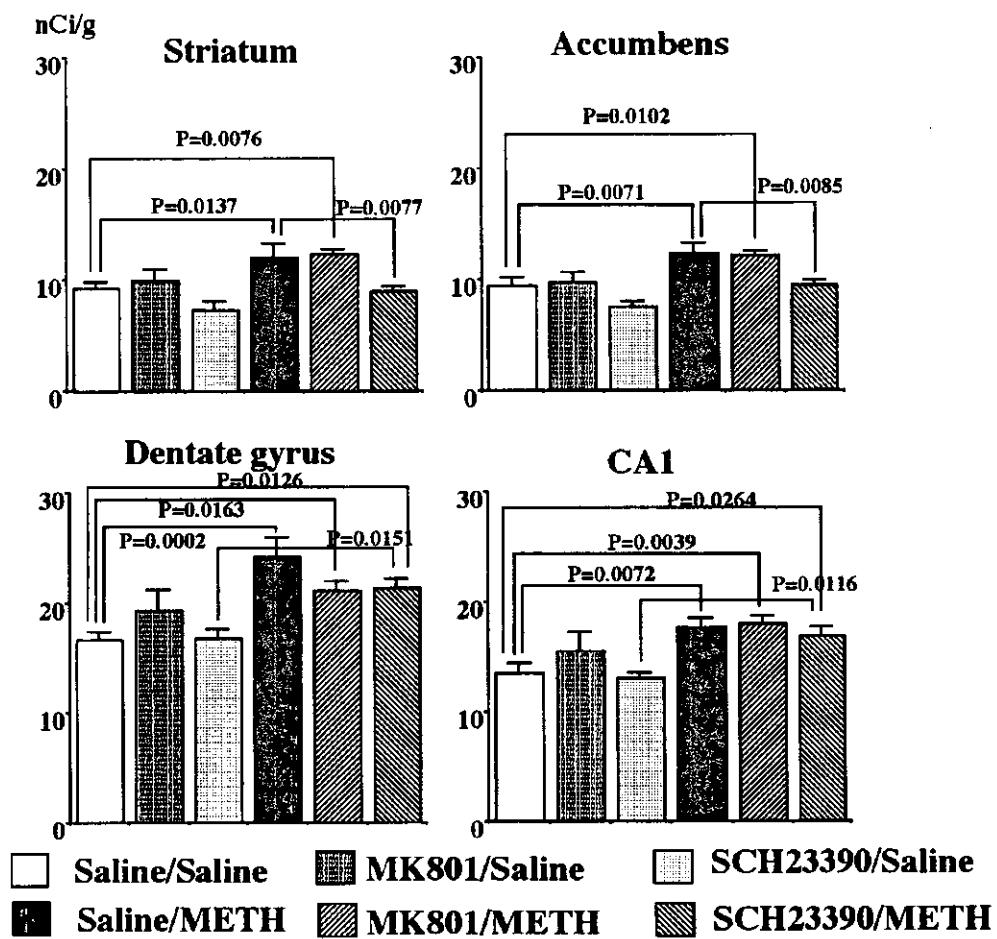


Fig 1: METH 急性投与による synaptotagmin IV mRNA 発現に対する MK801, SCH23390 前処置の効果

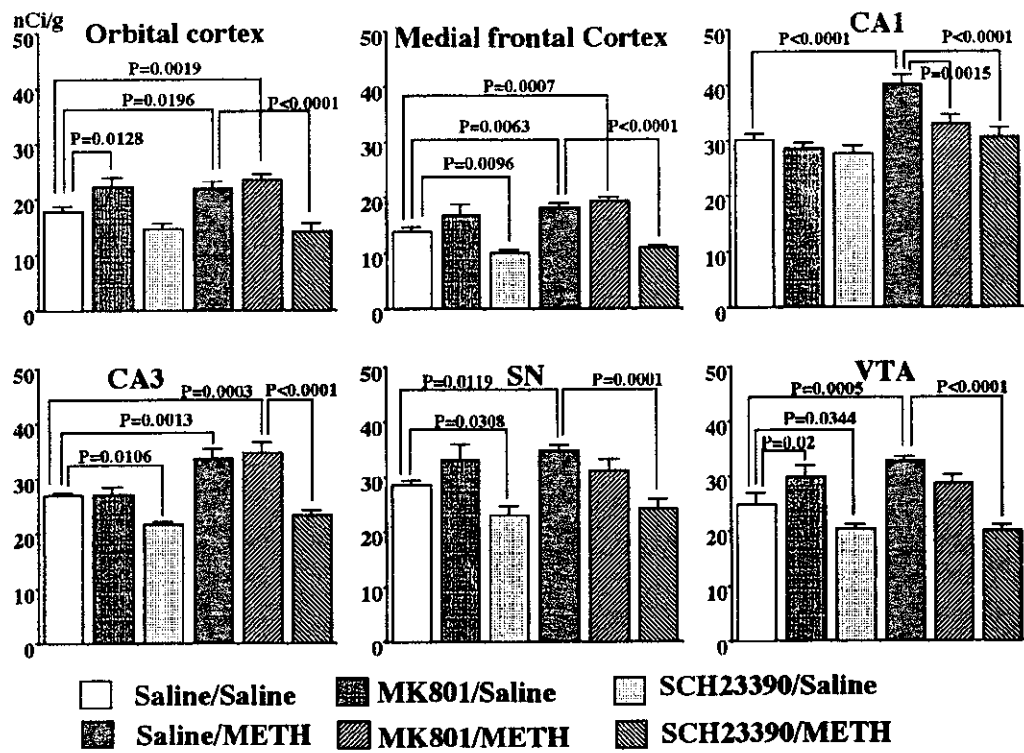


Fig 2: METH 急性投与による Nurr1 mRNA 発現に対する MK801, SCH23390 前処置の効果

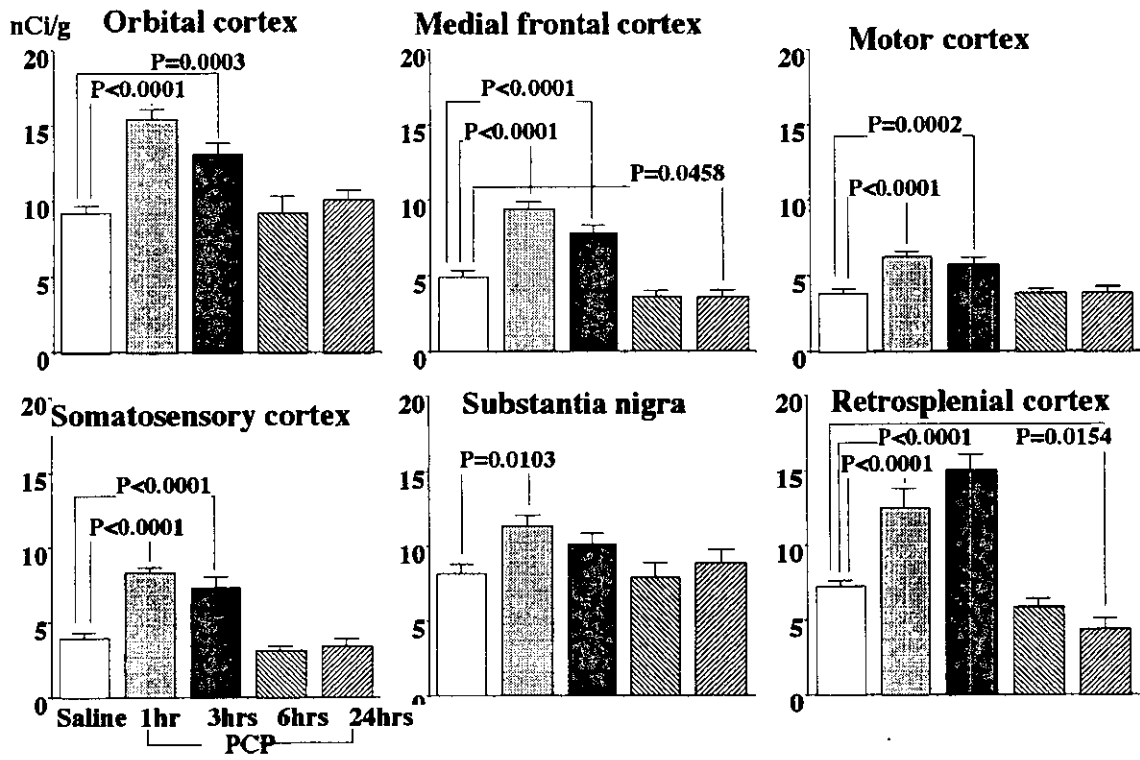


Fig 3 : PCP 急性投与による Nurr1 mRNA 発現の効果

様式第1 (第7条関係)

平成_____年度厚生労働科学研究費補助金 (_____研究事業) 研究計画書 (新規申請用)

平成____年____月____日

厚生労働大臣_____殿

住 所 _____
フリガナ _____
申請者 氏 名 _____
生年月日 19____年____月____日生

平成_____年度厚生労働科学研究費補助金による_____研究事業を実施したいので次のとおり研究計画書を提出する。

1. 研究課題名 (公募課題番号) : _____ (_____)
2. 当該年度の計画経費 : 金 _____ 円也 (うち間接経費 _____ 円)
3. 当該年度の研究事業予定期間 : 平成_____年____月____日から平成_____年____月____日
(_____年計画の1年目)

4. 申請者及び経理事務担当者

申請者	①所属機関 (部局)		②所属機関 所在地	〒		
	③連絡先 TEL・FAX E-mail		④所属機関に おける職名			
	⑤最終卒業学 校・卒業年 次及び学位		⑥専攻科目			
経理事務 担当者	(フリガナ) ⑦氏名		⑧連絡先 所属機関 部・課名 TEL・FAX E-mail	〒		
					⑨研究の承諾 の有・無	有・無
					⑩事務の委任 の有・無	有・無

5. 研究組織

①研究者名	②分担する研究項目	③最終卒業学校・ 卒業年次・学位 及び専攻科目	④所属機関及び 現在の専門 (研究実施場所)	⑤所属機関 における 職名	⑥研究費配 分子定額 (千円)

分担研究報告書

モノアミントランスポーター欠損マウスモデルを用いた 覚醒剤の分子作用機序の検討

分担研究者： 曾良一郎^{1,2}

共同研究者： 沈昊偉²、萩野洋子²、小林秀昭²、井手聡一郎²、近江香予¹、山下元康¹、
山本敏文^{2,3}、山本秀子²、池田和隆²、沼知陽太郎¹

(¹東北大学大学院医学系研究科精神神経生物学分野、²東京都医学研究機構・精神研・分子精神医学、³横浜市立大大学院総合理学研究科)

【研究要旨】

コカインや覚醒剤（アンフェタミン、メタンフェタミンなど）はドーパミントランスポーター（DAT）、セロトニントランスポーター（SERT）及びノルエピネフリントランスポーター（NET）と結合し、報酬効果および逆耐性現象を引き起こす。DAT、SERT、NETのいずれの欠損でもコカインの報酬効果は減少しなかったが、DAT欠損にSERT欠損が加わることによりコカインの報酬が消失した。これらの報酬効果に対応する脳内モノアミン神経伝達の解析を目的として、脳内微小透析法を用いてコカインに対する側坐核（NAc）と前頭前野皮質（PFC）細胞外ドーパミン（DA）、セロトニン（5-HT）濃度の変化を検討した。DATを欠損したノックアウト（KO）マウスのNAcでは、コカイン投与でDAが変化しなかった。PFCでは、DAT/SERTダブルKOマウスでもコカイン投与によりDAが上昇したので、残存するNETがDA再取り込みを補完したと考えられた。

また、中枢ドーパミン（DA）作動性神経系はメタンフェタミン（MAP）逆耐性形成において重要な役割を果たすと考えられているが、DA以外のモノアミン神経系の関与は十分には明らかにされていない。我々はMAPの標的分子であるDAT、SERTを欠損したノックアウトマウスを用いてMAP逆耐性形成を検討した。DATもしくはSERTの部分欠損は、逆耐性の形成（expression）に影響しないが、DATの部分欠損は逆耐性の発現（development）を抑制した。DAT完全欠損もしくはSERT完全欠損では、逆耐性が形成されなかった。これらの結果から、逆耐性の形成にはDATの正常な発現が必須であること、さらにSERTも重要な役割を果たしていることが示唆された。

A. 目的

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。従来、コカインの報酬効果は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^{1,2}。しかし、DATを欠損したノックアウト（KO）マウスでもコカインの報酬は保持され、セロトニントランスポーター（SERT）、ノルエピネフリントランスポーター（NET）がそれぞれ単独に欠損したKOマウスでも、コカインの報酬効果は保持されていた³⁻⁵。最近、DAT欠損にSERT

部分あるいは完全欠損が加えるとコカインの報酬は消失することが見出された⁶。これらの結果は、コカイン報酬にはDATとSERTが共に関与し、同族トランスポーターの補完作用が存在することを示唆している。我々は、報酬に関するこれらの結果に対応する脳内モノアミン神経伝達の解析を目的として、脳内微小透析法を用いてコカインに対する線条体（CPu）、側坐核（NAc）と前頭前野皮質（PFC）細胞外ドーパミン（DA）、セロトニン（5-HT）濃度の変化を検討してきた。昨年度には、DATKOマ

ウスでコカイン投与により線条体 DA が上昇したが、DAT/SERT ダブル KO マウスでは、その上昇が観察されなかったことを報告した。これらの結果は、SERT が DA 再取り込みを補完したことを示唆している。

覚醒剤であるアンフェタミン及びメタンフェタミン(MAP)はモノアミントランスポーターに作用し、モノアミンを細胞外へ逆流出させて、シナプス間隙のモノアミン濃度を増加させ、神経伝達を亢進する⁷。覚せい剤は長期使用により妄想性精神病状態を生じることが知られているが⁸、このような精神病状態は、断薬か治療によって症状が軽快しても覚せい剤の再使用、或いは心理社会的なストレスで再燃しやすい。この経過は逆耐性現象と呼ばれる⁹。実験動物においても覚醒剤を反復投与すると常同行動・移所運動量が増加し、長期断薬後には以前に無効であった少量の覚醒剤でこの増加が再現する¹⁰。これより、実験動物に覚せい剤を反復投与した際に観察される逆耐性現象は、覚せい剤精神病や統合失調症の再発・脆弱性の有用な疾患モデルとされている。MAP は強力な DA 作動薬なので、逆耐性現象に関するこれまでの研究では、DA 神経伝達の変化を中心として行われてきた^{11,12}。一方、セロトニン神経伝達の関与についてはまだ十分には明らかにされていない。DAT および SERT の KO マウスは、MAP の標的分子の一部を欠損しているため、MAP 逆耐性形成の変化が予測される。

今年度我々は (1) コカインの報酬効果に対応する脳内モノアミン神経伝達の解析を目的として DAT and/or SERT の KO マウス脳の NAc と PFC で、コカイン投与による DA と 5-HT の変化を調べた；(2) 逆耐性現象における DA 及び 5-HT 神経伝達系の関与を解明すること

を目的に、DAT and/or SERT の KO マウスの MAP 逆耐性形成を検討した。

B. 方法

実験動物：

実験動物：本実験は雄性、10-12 週齢、体重 18-25 g の 129/C57 混合遺伝背景の KO マウスを用いた。DAT/SERT ダブル KO マウスは、既報に従い DAT 単独 KO マウスと SERT 単独 KO マウスを交配して作製した (Sora et al, 2001)。KO マウス遺伝型判別は、尻尾断片組織からゲノム DNA を抽出し、PCR 法にて判別した。野生型、DAT ヘテロ KO (DAT+/-)、DAT-KO (DAT-/-)、SERT ヘテロ KO (SERT+/-)、SERT-KO (SERT-/-)、DAT/SERT ダブル KO (DAT-/-SERT-/-) マウス計 6 群、各群 n=7~15 として以下の実験に供した。本研究は当研究所の動物実験委員会の許可を得て、倫理的な配慮のもとに行った。

脳内微量透析法：

ペントバルビタール麻酔下、マウスの頭部を脳定位固定装置に固定し、透析プローブ（透析膜の長さ 2 mm）を Franklin と Paxinos の脳アトラスに基づいて NAc と CPu に挿入した。各マウスは、24 時間後に実験に用いた。無拘束の条件下で Ringer 液を 1 microl/min の速度で灌流し、10 分毎に自動的に液体高速クロマトグラフィシステムに注入した。DA と 5-HT は逆相カラム (PP-ODS) で分離し、電気化学検出器 (ECD-100) を用いて検出、定量した。移動相には、EDTA(50mg/l)、デカンサルホン酸ナトリウム(500mg/l)および 1%メタノールを含む 0.1M リン酸緩衝液(pH5.5)を用いた。灌流開始 3.5 時間後、コカイン (10mg/kg) が生食塩水を皮下投与した。

移所運動量計測：

MAP(1mg/kg)をマウスに隔日皮下投与し、7回投与後一週間休薬した後に、8回目のMAPを再投与した。マウスはMAP投与3時間前にホームケージより行動量測定装置(Supremex、室町機械)内に移し、馴化過程における移所運動量の変化およびMAP投与後3時間の移所運動量の変化を5分ごとに計測した。

統計解析：

(1) 各種遺伝型マウスの細胞外 DA か 5-HT 基礎濃度について one-way ANOVA で、薬物による各種遺伝型 KO マウスの細胞外 DA と 5-HT の変化について two-way ANOVA(因子 A: 薬物、因子 B: 遺伝型)で解析した。多重比較は最小有意差法を用いて行なった。(2) 初回投与後と反復投与後の比較について、対応のある *t* 検定 (paired *t*-test) を用いた。MAP 反復投与後の 1 時間目の運動量は初回投与時に比べて運動量は増加した場合、逆耐性が形成されたものと認めた。(3) 逆耐性形成を認めた場合、Badiani ら(1995)の方法¹³を採用し、逆耐性形成の発展過程に対する評価を各回投与後の運動量の直線回帰の傾き (slope coefficient) で算出した後、*t* 検定 (Students's *t*-test) を用いて野生型マウスとの比較を行なった。有意水準は $p < 0.05$ とした。統計ソフトは STATISTICA for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, USA)を用いた。

C. 結果

シナプス間隙モノアミン基礎濃度(Tab. 1)：

DAT-KO と DAT/SERT ダブル KO マウスの DA 基礎濃度は NAc では野生型マウスより有意に高かったが($P < 0.001$)、PFC では野生型マウスと比べて有意な差がなかった。SERT-KO と DAT/SERT ダブル KO マウスの

5-HT 基礎濃度は NAc と PFC 両方とも野生型マウスより有意に高かった($P < 0.001$)。

コカインによる細胞外 DA レベルの変化 (Fig. 1)：

DAT-KO と DAT/SERT ダブル KO マウスではコカイン投与後細胞外 DA は NAc で有意に変化しなかったが、PFC では野生型マウスと同じように著しく上昇した($P < 0.001$)。

コカインによる細胞外 5-HT レベルの変化 (Fig. 2)：

SERT-KO マウスではコカイン投与後 NAc では、細胞外 5-HT の上昇は野生型マウスほど高くないが、生理食塩水対照群より高かった ($p < 0.05$)。PFC では、SERT-KO と DAT/SERT ダブル KO マウスはコカインによる 5-HT の上昇を示さなかった。

MAP の反復投与による移所運動量の変化 (Fig. 3)：

(1) 野生型マウス群では、2 回目投与から、MAP 投与後の 1 時間目の運動量は初回投与後に比べて運動量は増加していた ($p < 0.01$)。また、一週間の休薬後に MAP を 8 回目再投与した際にも同様に運動量が増加し、逆耐性形成を認めた。(2) DAT+/-マウス群では、3 回目投与してから、MAP 投与後の 1 時間目の運動量は初回投与後に比べて増加していた ($p < 0.05$)。1 週間休薬後も、再投与後の 1 時間運動量は初回投与後より有意に高く ($p < 0.01$)、逆耐性形成を認めた。(3) SERT+/-マウス群では、4 回目投与以降、MAP 投与後の 1 時間目の運動量は初回投与後に比べて運動量は増加していた ($p < 0.01$)。また、1 週間休薬後、再投与後の 1 時間運動量は初回投与後より有意に高く ($p < 0.01$)、逆耐性形成を認めた。(4) DAT-/-、SERT-/- 或いは DAT-/-SERT-/-マウス群では、初回投与後と反復投与後の 1

時間運動量は有意な変化がなかった。(5) 野生型、DAT+/-と SERT+/-マウスでは逆耐性形成を認められた為、逆耐性が発展する際の直線回帰の傾きを算出した。野生型マウス： $R^2=0.9546$, $p<0.001$; Average (\pm S.E.M.) of slope coefficient for individual mice = 323.25 ± 75.11 。DAT+/-マウス： $R^2=0.8452$, $p<0.01$; Average (\pm S.E.M.) of slope coefficient for individual mice = 126.38 ± 46.41 。SERT+/-マウス： $R^2=0.9263$, $p<0.001$; Average (\pm S.E.M.) of slope coefficient for individual mice = 222.19 ± 43.80 。野生型と SERT+/-マウスの逆耐性が発展する傾きには有意な差が認められなかったが、DAT+/-マウスは野生型マウスより低かった。従って野生型と SERT+/-マウスの逆耐性の発展には差がなく、DAT+/-マウスは逆耐性の発展が野生型マウスに比べて遅れていることが示された。

D. 考察

コカインによる細胞外 DA と 5-HT の変化と報酬効果の関連

中脳辺縁系の DA 神経伝達は覚醒剤の報酬効果に重要な役割を担っていると考えられてきた^{14,15}。しかし、コカイン報酬効果を保持している DAT-KO マウスは側坐核ではコカインによる DA の上昇を示さなかった。一方、PFC では、DAT が欠損しても、細胞外 DA 基礎濃度及びコカインによる DA の上昇は野生型マウスと同じであった。この結果は PFC において DA の再取り込みが DAT か SERT に依存しない、他のトランスポーターによるものであることを示唆している。PFC には、DAT の分布は少ないため^{16,17}、細胞外 DA は NET によって再取り込みしていることが報告されているので¹⁸⁻²⁰。DAT が欠損した場合でも、PFC の DA 再取り込みは NET によるものであ

ると考えられる。NAc と CPu では、NET による DA の再取り込みがなかったが、原因として次の 3 点が考えられる。(1) NAc と CPu には NET の発現量は少ない²¹。(2) 我々の結果が示したように、CPu と NAc の DA レベルは PFC より遥かに高い。(3) NET の DA に対する親和性は DAT の約 1/10 である^{22,23}。

PFC の DA 神経伝達もコカインの報酬効果に関与すると報告されているが^{14,24}、本実験では、コカインの報酬効果が消失した DAT/SERT ダブル KO マウスでも PFC において DA が著しく上昇したことから、DAT が欠損した時、PFC のみの DA 上昇はコカインの報酬効果を引き起さないことを示唆している。従って、昨年度で報告したように、DAT-KO マウス線条体でのコカインによる DA の上昇は、報酬効果に重要であると考えられる。また、DAT/SERT ダブル KO マウスで消失したコカインによる 5-HT の上昇は DAT-KO マウスでは認められるので、5-HT の神経伝達は DAT が欠損した時コカインの報酬作用を補完している可能性が考えられる。

DAT/SERT KO マウスにおける MAP 逆耐性

DAT+/-マウスは MAP 初回投与による運動量の増加は見られず、しかも MAP に対する感受性は低く、逆耐性の発展は野生型マウスより遅れていた。しかし、反復投与によって、逆耐性の形成を認めた。MAP とは異なり、コカインの投与による移所運動量の増加は DAT+/-マウスと野生型マウスで変わらなかった⁶。さらに、DAT+/-マウスではコカインによる細胞外 DA の増加は野生型マウスと変わらなかった。DAT が部分欠損すると、MAP によるモノアミンのトランスポーターを介した放出は野生型に比べて減少するので、DAT+/-マウスの MAP に対する感受性が低下

したと考えられる。DAT 発現の減少は逆耐性の発展を阻害すると考えられるので、覚せい剤長期使用者の中脳辺縁系 DAT の減少は²⁵、薬物長期使用の結果と考えるのが妥当と思われる。

SERT^{+/+}マウスでは MAP 初回投与後運動量の増加が観察され、しかも反復投与によって野生型マウスと同じ発展過程で逆耐性が形成された。一方、SERT^{-/-}マウスは MAP 初回投与後運動量が変化せず、反復投与による逆耐性が形成されなかった。SERT が部分欠損すると、MAP による 5-HT 放出は減少すると考えられるが、SERT^{+/+}マウスの細胞外 5-HT 基礎濃度は野生型と変わらない。SERT が欠損すると、細胞外 5-HT は野生型マウスの約 10 倍に上昇する。この高濃度の細胞外 5-HT のために、SERT^{-/-}マウスでは複数の 5-HT 受容体が down-regulation か desensitization になっていることが報告されている²⁶⁻²⁸。従って、SERT^{-/-}マウスにおける逆耐性形成の阻害は、高濃度の細胞外 5-HT か二次的な 5-HT 受容体の機能低下によるものと考えられる。

結論として、(1) コカインの報酬効果は、モノアミントランスポーターのいずれかが欠損しても他のものが補うと考えられ、複雑な分子機構が予想された。(2) DAT もしくは SERT の部分欠損は、逆耐性の形成には影響しないが、DAT の部分欠損は逆耐性の発展を抑制すること、DAT 或いは SERT の完全欠損は逆耐性形成を阻害することが示された。これらの結果から、逆耐性の形成には DAT の正常な発現が非常に重要であり、また SERT も重要な役割を果たしていることが示唆された。

E. 結論

ドーパミントランスポーター (DAT) 欠損マウスの側坐核では、コカイン投与でドーパミン(DA)が変化しなかった。前頭前野皮質では、DAT とセロトニントランスポーター (SERT) ダブル KO マウスでもコカイン投与で DA が上昇したので、残存するノルエピネフrintransポーターが DA 再取り込みを補完したと考えられた。

また、DAT の部分欠損はメタンフェタミン (MAP) 逆耐性の発展 (development) を抑制した。DAT 完全欠損もしくは SERT 完全欠損では、逆耐性が形成されなかった。従って、逆耐性の形成には DAT の正常な発現が必須であること、さらに SERT も重要な役割を果たしていることが示唆された。

【参考文献】

1. Koob, G. F. & Nestler, E. J. The neurobiology of drug addiction. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9, 482-97. (1997).
2. Kuhar, M. J., Ritz, M. C. & Boja, J. W. The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci* 14, 299-302. (1991).
3. Rocha, B. A. et al. Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat Neurosci* 1, 132-7. (1998).
4. Sora, I. et al. Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7699-704. (1998).
5. Xu, F. et al. Mice lacking the