

- 3) Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Cadet, J. L. and Ogawa, N.: Methamphetamine-induced increase in striatal p53 DNA-binding activity is attenuated in Cu,Zn-superoxide dismutase transgenic mice. *Neurosci. Lett.*, 325: 191-194, 2002.
- 4) Israeli, D., Tessler, E., Haupt, Y., Elkeles, A., Wilder, S., Amson, R., Telerman, A. and Oren, M.: A novel p53-inducible gene, PAG608, encodes a nuclear zinc finger protein whose overexpression promotes apoptosis. *EMBO J.*, 16: 4384-4392, 1997.
- 5) Varmeh-Ziaie, S., Okan, I., Wang, Y., Magnusson, K.P., Warthoe, P., Strauss, M. and Wiman, K.G.: Wig-1, a new p53-induced gene encoding a zinc finger protein. *Oncogene*, 15: 2699-2704, 1997.
- 6) Tomasevic, G., Shamloo, M., Israeli, D. and Wieloch, T.: Activation of p53 and its target genes p21<sup>WAF1/Cip1</sup> and PAG608/Wig-1 in ischemic preconditioning. *Mol. Brain Res.*, 70: 304-313, 1999.
- 7) Gillardon, F., Spranger, M., Tiesler, C. and Hossmann, K.-A.: Expression of cell death-associated phospho-c-Jun and p53-activated gene 608 in hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *Mol. Brain Res.*, 73: 138-143, 1999.
- 8) Hermann, D.M., Kuroiwa, T., Hata, R., Gillardon, F., Ito, U. and Mies, G.: Expression of redox factor-1, p53-activated gene 608 and caspase-3 messenger RNAs following repeated unilateral common carotid artery occlusion in gerbils-relationship to delayed cell injury and secondary failure of energy state. *Neuroscience*, 102: 779-787, 2001.
- 9) Asanuma, M. and Cadet, J.L.: Methamphetamine-induced increase in striatal NF- $\kappa$ B DNA-binding activity is attenuated in superoxide dismutase transgenic mice. *Mol. Brain Res.*, 60: 305-309, 1998.
- 10) Itzhak, Y. and Ali, S.F.: The neuronal nitric oxide synthase inhibitor, 7-nitroindazole, protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in vivo. *J. Neurochem.*, 67: 1770-1773, 1996.
- 11) Imam, S.Z., Newport, G.D., Itzhak, Y., Cadet, J.L., Islam, F., Slikker, W., Jr. and Ali, S. F.: Peroxynitrite plays a role in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: evidence from mice lacking neuronal nitric oxide synthase gene or overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *J. Neurochem.*, 76: 745-749, 2001.
- 12) Kita, T., Shimada, K., Mastunari, Y., Wagner, G.C., Kubo, K. and Nakashima, T.: Methamphetamine-induced striatal dopamine neurotoxicity and cyclooxygenase-2 protein expression in BALB/c mice. *Neuropharmacology*, 39: 399-406, 2000.
- 13) Asanuma, M., Nishibayashi-Asanuma, S., Miyazaki, I., Kohno, M. and Ogawa, N.: Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. *J. Neurochem.*, 76: 1895-

1904, 2001.

- 14) Ladenheim, B., Krasnova, I.N., Deng, X., Oyler, J.M., Polettini, A., Moran, T.H., Huestis, M.A. and Cadet, J.L.: Methamphetamine-induced neurotoxicity is attenuated in transgenic mice with a null mutation for interleukin-6. *Mol. Pharmacol.* 58: 1247-1256, 2000.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- ① Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Cadet, J. L. and Ogawa, N.: Methamphetamine-induced increase in striatal p53 DNA-binding activity is attenuated in Cu,Zn-superoxide dismutase transgenic mice. *Neurosci. Lett.*, 325: 191-194, 2002.
- ② Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Tanaka, K., Haque, Md. E., Fujita, N. and Ogawa, N.: Aggravation of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic lesions in metallothionein-I and -II knock-out mouse brain. *Neurosci. Lett.*, 327: 61-65, 2002.
- ③ Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I., Haque, M.E., Fujita, N., Tanaka, K. and Ogawa, N.: The p53-activated gene, PAG608, requires a zinc finger domain for nuclear localization and oxidative stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 277: 42224-42232, 2002.
- ④ Yoshioka, M., Tanaka, K., Miyazaki, I., Fujita, N., Higashi, Y., Asanuma, M. and Ogawa, N.: The dopamine agonist cabergoline provides neuroprotection by activation of the glutathione system and scavenging free radicals. *Neurosci. Res.*, 43: 259-267, 2002.
- ⑤ Miyazaki, I., Asanuma, M., Higashi, Y., Aoki Sogawa, C., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Age-related changes in expression of metallothionein-III in rat brain. *Neurosci. Res.*, 43: 323-333, 2002.
- ⑥ Haque, M.E., Asanuma, M., Higashi, Y., Miyazaki, I., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1619: 39-52, 2003.
- ⑦ 浅沼幹人, 東 洋一郎, 宮崎育子, 小川紀雄: ニューロメラニン合成酵素チロシナーゼのドパミン神経障害への関与. *Prog. Med.*, 22: 212-215, 2002.
- ⑧ 浅沼幹人, 宮崎育子, 東 洋一郎, 田中健一, 小川紀雄: アルツハイマー病脳で減少している growth inhibitory factor (GIF) の加齢にともなう変化. *分子精神医学*, 3: 69-70, 2003.
- ⑨ Tanaka, K., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Blockade of late-onset reduction of muscarinic acetylcholine receptors by immunosuppressants in forebrain ischemia. In: (ed.) Borlongan, C.V., Isacson, O. and Sanberg, P.R., *Immunosuppressant Analogs in Neuroprotection*, Humana Press, Totowa, 2002, pp215-229.
- ⑩ Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox. Res.*, in press.
- ⑪ 浅沼幹人: テトラサイクリン誘導体ミノサイクリンの種々の神経障害に対する保

護作用. ファルマシア, 38: 1105-1106, 2002.

## 2. 学会発表

- ① 浅沼幹人, 宮崎育子, 東 洋一郎, 田中健一, 小川紀雄: チロシナーゼの Parkinson 病モデルに対する神経機能補完作用. 第 43 回日本神経学会総会, 2002.
- ② 田中健一, 藤田尚子, 東 洋一郎, 浅沼幹人, 小川紀雄: 非免疫抑制性イムノフィリンリガンドの神経保護効果とその分子機構 (3) - 抗アポトーシス作用 -. 第 25 回日本神経科学学会大会, 2002.
- ③ 浅沼幹人, 宮崎育子, 東 洋一郎, 小川紀雄: パーキンソン病モデル線条体グリア細胞におけるドパミントランスポーターの発現誘導. 第 45 回日本神経化学学会大会, 2002.
- ④ 宮崎育子, 浅沼幹人, 東 洋一郎, 小川紀雄: アストロサイトにおけるドパミントランスポーターを介したドパミン取り込み機構. 第 45 回日本神経化学学会大会, 2002.
- ⑤ Yoshioka, M., Tanaka, K., Fujita, N., Miyazaki, I., Asanuma, M., Ogawa, N.: Molecular mechanism in neuroprotective properties of a dopamine agonist, cabergoline. 第 45 回日本神経化学学会大会, 2002.
- ⑥ 辻 武史, 浅沼幹人, 宮崎育子, 田中健一, 小川紀雄: メタフェタミンによるドパミン神経障害に対する非ステロイド性消炎鎮痛薬の効果. 第 32 回日本神経精神薬理学会年会, 2002.
- ⑦ 浅沼幹人, 宮崎育子, 東 洋一郎, 田中健一, 小川紀雄: メラニン合成酵素チロシナーゼのドパミン神経機能補完作用. 第 32 回日本神経精神薬理学会年会, 2002.
- ⑧ 小川紀雄, M. Emdadul Haque, 宮崎育子, 東 洋一郎, 浅沼幹人: L-DOPA およびドパミンのキノン体生成を介したアポトーシス誘導性とそれに対する防御に関する検討. 第 32 回日本神経精神薬理学会年会, 2002.
- ⑨ 宮崎育子, 浅沼幹人, 東 洋一郎, 辻 武史, 小川紀雄: アストロサイトにおけるドパミンレセプター発現と情報伝達系の存在に関する検討. 第 32 回日本神経精神薬理学会年会, 2002.
- ⑩ Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Effects of tyrosinase replacement in hemiparkinsonian model. 32nd Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2002.

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：メタンフェタミン反復投与によるセロトニン神経系に対する神経毒性の電気生理学的検討

分担研究者：石原熊寿<sup>1)</sup>

研究協力者：木村丈司<sup>1)</sup>、笹 征史<sup>2)</sup>

広島大学大学院医歯薬学総合研究科病態薬物治療学講座<sup>1)</sup>、渚病院<sup>2)</sup>

【研究要旨】ラットにおいて、メタンフェタミンの反復（5日間）投与後におけるニューロン活動調節の変化について、セロトニン神経系の役割を海馬ニューロン活動を指標に電気生理学的研究を行った。実験には Wistar 系雄性ラットを用い、スライス作成時（電気生理学的実験時）に 5-6 週令になるように塩酸メタンフェタミン（5mg/kg）あるいは生理食塩水を 1日1回、5日間、腹腔内投与した（MAP 群および Control 群）。最終投与の約 24 時間後、5 日後および 10 日後に海馬スライスを作成し、細胞外記録法にて CA1 野の集合活動電位を記録した。外的に投与したセロトニンにより用量依存的に海馬 CA1 野の集合活動電位は抑制された。Control 群においてセロトニンは 1 $\mu$ M では抑制作用がほとんど見られず、また 100 $\mu$ M では完全に抑制をしてしまうことから、10 $\mu$ M による抑制作用を用いて比較を行った。最終投与約 24 時間後においてはセロトニン 10 $\mu$ M により Control 群および MAP 群共に 50-70% の抑制が見られ、両群間に差は認められなかった。最終投与 5 日後においてはセロトニン 10 $\mu$ M による抑制作用は MAP 群において Control 群よりも有意に増強されていた。最終投与 10 日後においては有意差は認められなくなったものの、セロトニン 10 $\mu$ M による抑制は MAP 群の方が強い傾向を示した。セロトニンレセプターサブタイプのひとつである 5-HT<sub>1A</sub> レセプターに選択性の高いアゴニストの 8-OH-DPAT（1 $\mu$ M）の作用を最終投与 5 日後において検討したところ、Control 群と MAP 群ともに同程度の抑制作用が観察され、両群間に差は認められなかった。以上の成績から、メタンフェタミン反復投与によりセロトニン神経機能にも変化が誘導され、その持続は投与後数日にわたることが示された。変化の時間経過は側坐核等で見られたドパミン神経機能に対する作用と類似したものであったが、若干、変化の持続が長い傾向が示唆された。セロトニンによる海馬 CA1 野ニューロン活動の抑制は 5-HT<sub>1A</sub> レセプターを介したものが主であるが、今回のセロトニンの抑制作用の増強に 5-HT<sub>1A</sub> レセプター機能の亢進が関与する可能性は低いものと考えられた。

#### A. 研究目的

覚せい剤の連用後には薬物の使用を休止していても使用時の幻覚妄想状態が再発するフラッシュバックや休止後に再使用した時や反復使用時にその作用が増強される逆耐性現象が認められる。これらの現象には脳内のニューロン活動調節機構における何らかの長期的変化が関与していると考えられる。そこで、これらの現象の神経

メカニズムを明らかにするために脳内ニューロン活動およびその調節の変動を指標に研究を行って来ている。これまでの研究により、ラットにおいて、メタンフェタミンを反復（5日間）投与した場合、投与中止後、側坐核ニューロン、および腹側被蓋野のドパミンニューロンのドパミンレセプターの感受性は生体位およびスライス標本を用いた電気生理学的実験で、投与中止 5 日後には

亢進することが明らかになっている。しかしこの亢進は 10 日後にはもとの状態に回復してしまう<sup>2)</sup>。この亢進にはドパミンレセプターサブタイプの D<sub>2</sub>レセプター機能の亢進が関与することが明らかとなっている。一方、メタンフェタミンの反復投与によってはドパミン神経系のみならず、セロトニン神経系にも神経毒性的影響が及ぶ事が明らかになっている<sup>8)</sup>。そこで、ドパミンと同様にメタンフェタミンによって影響を受けるセロトニン神経系についてメタンフェタミン反復投与によりドパミン神経系と同様にレセプター機能が影響を受けるか否かについて電気生理学的に検討を行った。実験は縫線核よりセロトニン神経系の支配を受け、現在知られているセロトニンレセプターサブタイプのほとんどすべてが存在する海馬におけるニューロン活動を指標にした。

## B. 方法

実験には Wistar 系雄性ラットを用い、スライス作成時(電気生理学的実験時)に 5-6 週齢になるように実験を計画した。塩酸メタンフェタミン(5mg/kg, 大日本製薬)あるいは生理食塩水を腹腔内投与した 2 群のグループを作成した(MAP 群および Control 群)。薬物投与は 1 日 1 回、5 日間行った。最終投与の約 24 時間後、5 日後および 10 日後に電気生理学的実験を行った。海馬スライス作成法および集合活動電

位記録解析法は当研究室にて従来より行っている方法を用いた<sup>1)</sup>。エーテル麻酔下に断頭し、脳を摘出し、直ちに氷冷した Ca<sup>2+</sup>を含まない人工脳脊髄液(Ca-free ACSF)中で正中で 2 分割した。片側の脳の正中面をスライス作成用ステージにシアノアクリレート系接着剤にて固定し、マイクロスライサー(DTK-1000, 堂坂 EM)を用いて厚さ 450 $\mu$ m の海馬スライスを作成した。作成したスライスは 34°C で 1 時間インキュベートし、スライスの状態を回復させたのち、記録に用いるまで室温下にて保存した。スライスの作成中はすべて Ca-free ACSF を用い、作成したスライスのインキュベーション以降、記録中の灌流液までは通常的人工脳脊髄液(ACSF)を用いた。ACSF の組成は次のとおりである: NaCl 113mM, KCl 3mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, NaHCO<sub>3</sub> 25mM, Glucose 11mM。Ca-free ACSF の場合は CaCl<sub>2</sub> を含まず、MgCl<sub>2</sub> を 5mM とした。いずれの ACSF も常に 95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub> 混合ガスを通気した状態で用いた。記録時には 1 枚のスライスを ACSF を流速 2.0-2.5ml/min で灌流している記録用小水槽に移し、金属性の重しにて、保持した。記録用小水槽は 30.5°C ( $\pm$ 1.5°C) に加温した。双極刺激電極を CA2 野近傍の放線層に刺入し、シェーファー側枝/交連線維を刺激した(Fig.1A)。集合活動電位は 3M NaCl を充

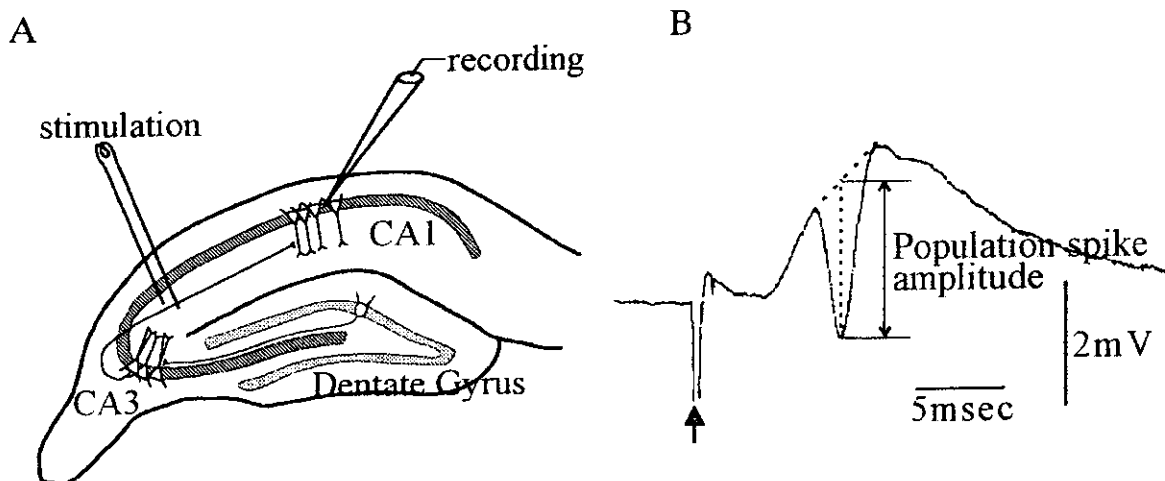


Fig.1 A: Arrangement of electrodes for recording of population spikes in hippocampal CA1 regions.  
B: An example of population spike recorded in hippocampal CA1 region and method of measurement of population spike amplitude. Stimulus was applied to the Shaffer collateral/ commissural fibers at the time indicated by the arrow.

填したガラス微小電極(抵抗 5–15MΩ)を CA1 野の錐体細胞層に刺入し、細胞外記録法にて記録した(Fig.1A)。刺激は 5 分毎に 11 回与え、そのうち後半 6 回の集合活動電位を加算平均して、チャートレコーダー上に記録した。刺激は持続 0.1msec の矩形波電流で、強度はそれぞれのスライスにおいて 10V で誘発される集合活動電位を最大とみなし、その約 80%の振幅の反応が得られる電圧を用いた。海馬スライスにおける記録時の電極配置および記録された集合活動電位の一例とその振幅測定法を Fig.1 に示す。このような集合活動電位が安定して 3 回以上連続して記録される事を確認した後セロトニン系薬物の作用を検討した。セロトニン系薬物は灌流により、スライスに適用し、その効果を検討した。セロトニン系薬物の投与時間は原則として 20 分間とし、その後薬物を含まない ACSF にて灌流し、回復過程を 30 分まで記録した。セロトニン系薬物としてセロトニン (5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex, Sigma), および 5-HT<sub>1A</sub>

レセプター選択的アゴニストの (R)-(+)-8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino) tetralin HBr (8-OH-DPAT, Tocris)を用いた。

得られたデータは集合活動電位の振幅を Fig.1B に示す方法(すなわち陰性のピーク前後の陽性ピークを結んだ線から陰性ピークに垂線をひき、その垂線の高さを計測)にて測定し、セロトニン系薬物の適用前 3 回の振幅の平均を 100%として、各測定時間の集合活動電位の振幅を標準化した。データはすべて平均±SEM で表示し、群間の比較には Student's t-test を用いた。

### C. 結果

外的に投与したセロトニンにより用量依存的に海馬 CA1 野の集合活動電位は抑制された。Control 群においてセロトニンは 1μM では抑制作用がほとんど見られず、また 100μM では完全に抑制をしてしまう(反応が 0 になってしまう)ので、10μM による抑制作用を用いて比較を行った。Fig.2 に Control 群の最終処置約 24 時間後におい

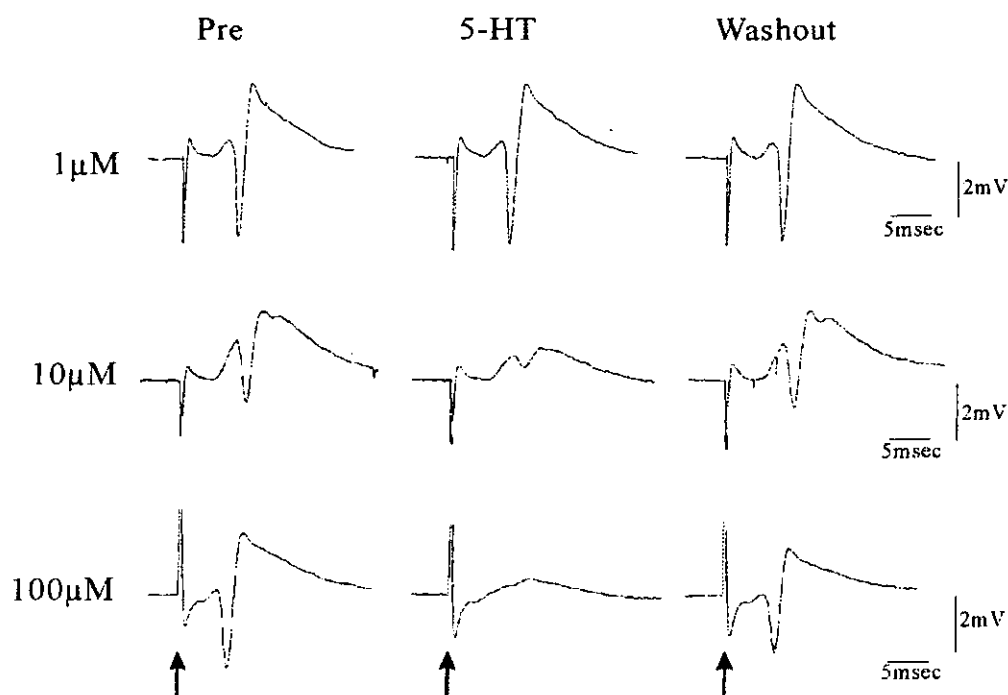


Fig.2. Examples of serotonin-induced inhibition of population spikes in hippocampal CA1 region. Population spikes were recorded in 3 different slices from control rats at 24hrs after final saline-injection. Upper, middle and lower traces show the effects of 1, 10 and 100μM serotonin, respectively.

て実際に記録された集合活動電位に対するセロトニン 1, 10 および 100 $\mu$ M の作用の一例を示す。

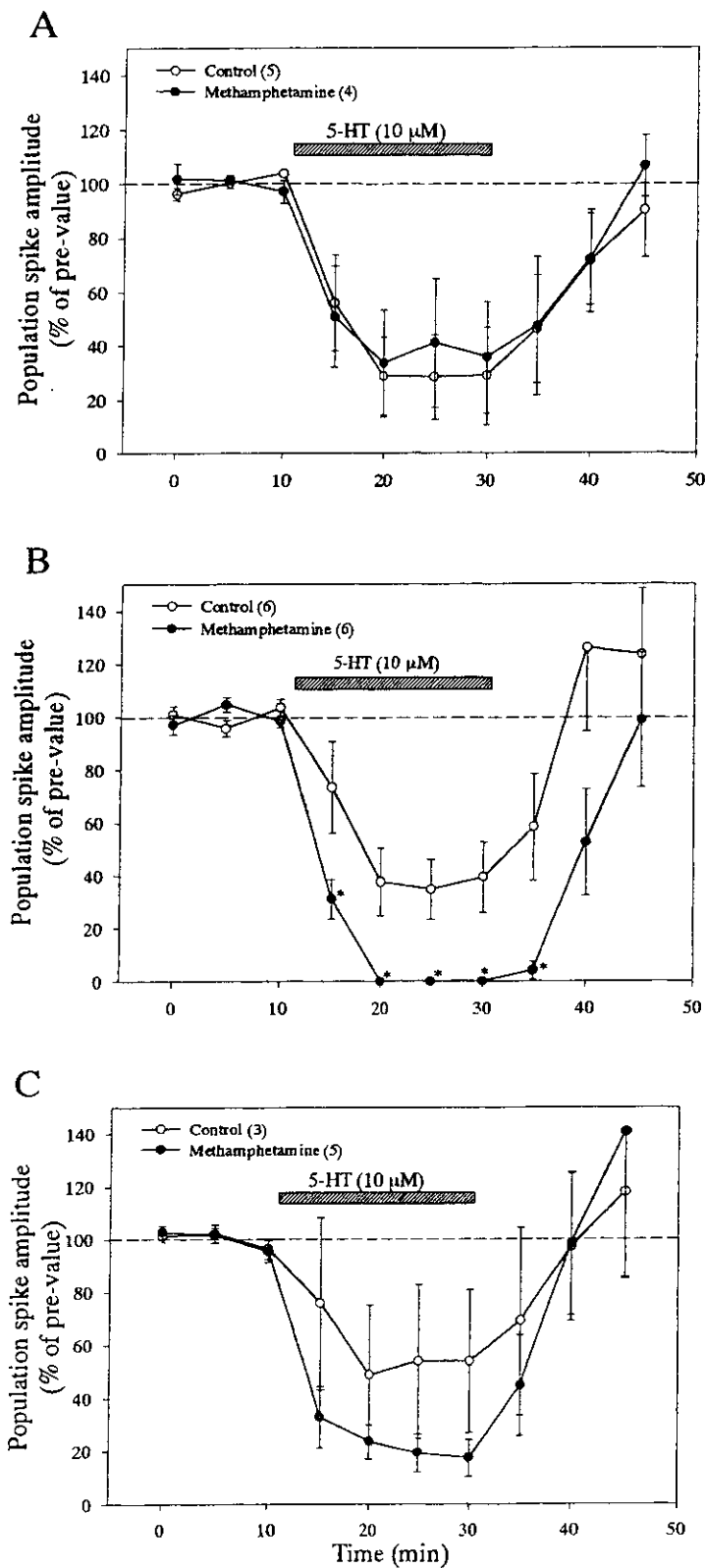


Fig.3 Effects of serotonin on population spikes in hippocampal CA1 region from rats at 24hrs(A), 5days(B) and 10days(C) after final injection of saline (control) and methamphetamine. Abscissa and ordinate indicate the time in min and population spike amplitude in % of pre-value, respectively. Serotonin was applied during the bar indicated in the graph. Numbers in parenthesis are number of slices tested. \* P<0.05 vs. control.

投与終了約 24 時間後においてはセロトニン  $10\mu\text{M}$  により Control 群では適用後最初の記録では平均約 50%の抑制がみられその後 60–70%の抑制が適用中観察された (Fig.3A)。一方、MAP 群においても同様の時間経過で集合活動電位の 50–70%の抑制が観察された。すなわち、投与終了 24 時間後では、Control 群および MAP 群の両群間にセロトニン誘発抑制に差は認められなかった (Fig.3A)。

投与終了 5 日後においては MAP 群からのスライスにて記録された集合活動電位はセロトニン  $10\mu\text{M}$  により適用後最初の記録では約 70%の抑制が観察されたが、その後集合活動電位は記録したすべてのスライスにおいて完全に抑制された (Fig.3B)。一方、Control 群の集合活動電位に対する抑制作用はセロトニンの適用期間中約 60%であり、MAP 群におけるセロトニンの抑制作用は Control 群よりも有意に増強されていた (Fig.3B)。

投与終了 10 日後においては Control 群ではセロトニン適用後、抑制作用が安定する時間では約 50%の抑制が認められた (Fig.3C)。一方、MAP 群ではセロトニン適

用後最初の記録で約 70%の抑制作用が見られ、その後も適用中は 70–80%の抑制が持続した。統計学上の有意差は認められないが、投与終了後 10 日後におけるセロトニン  $10\mu\text{M}$  による抑制は MAP 群の方が Control 群よりも強い傾向を示した (Fig.3C)。Fig.4 は各スライスにおけるセロトニンの抑制作用の時間経過のグラフにおいてセロトニン投与中の抑制分を面積として計算し、セロトニン  $10\mu\text{M}$  による抑制作用の MAP 群と Control 群の投与終了後の各時点でのまとめである。

次に、最終投与 5 日後に観察されたセロトニンによる集合活動電位の抑制作用の増強に関与するレセプターサブタイプを検討するため、セロトニン  $5\text{-HT}_{1A}$  レセプターに選択性の高い 8-OH-DPAT の作用を検討した。8-OH-DPAT  $1\mu\text{M}$  は海馬 CA1 野の集合活動電位を抑制した。Control 群の最終投与 5 日後のラットから作成した海馬スライスにおける 8-OH-DPAT の集合活動電位抑制作用は適用後作用が安定する時間で約 70%の抑制作用が観察された (Fig.5)。一方、MAP 群の最終投与 5 日後のラットから作成した海馬スライスにおける

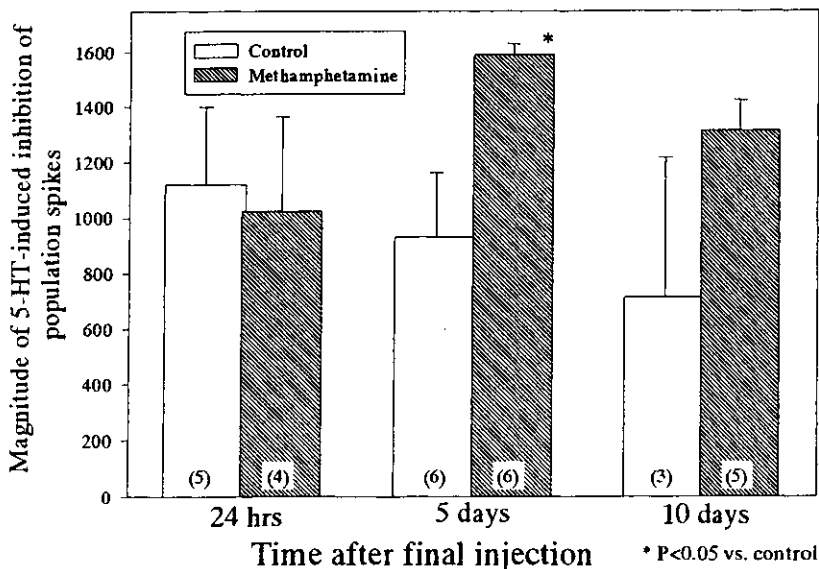


Fig.4 Summary of serotonin-induced inhibition of population spikes in hippocampal CA1 region. Ordinate indicates the magnitude of serotonin-induced inhibition as calculated area of time-course graph.



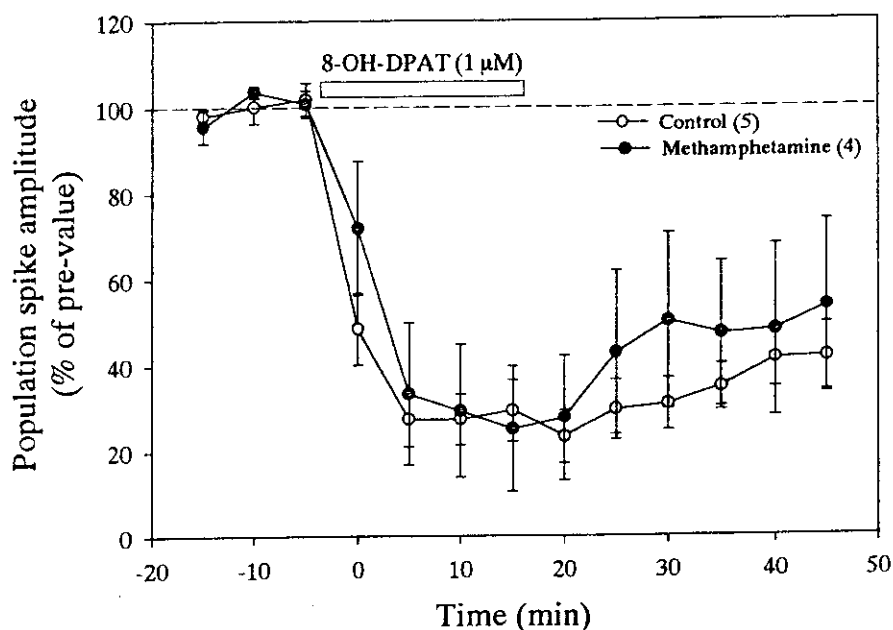


Fig.5 Effects of 8-OH-DPAT on population spikes in hippocampal CA1 region from rats at 5 days after final injection of saline (control) and methamphetamine. Abscissa and ordinate indicate the time in min and population spike amplitude in % of pre-value, respectively. 8-OH-DPAT was applied during the bar indicated in the graph.

8-OH-DPAT の集合活動電位抑制作用は適用後作用が安定する時間で約 70%の抑制が観察された (Fig.5)。このことから、最終投与後 5 日後において 8-OH-DPAT の作用に Control 群と MAP 群の間に差がないことが示された。

#### D. 考察

以上の成績から、メタンフェタミン反復投与によりセロトニン神経機能にも変化が誘導され、その変化は投与後数日にわたって持続することが示された。変化の時間経過は側坐核等で見られたドパミン神経機能に対する作用<sup>2)</sup>と類似したものであったが、若干、変化の持続が長い傾向が示唆された。今回の研究では海馬を用いているので、依存とセロトニン神経機能変化の関連は直接考察できないが、海馬は側坐核に対して興奮性の投射をもち、海馬刺激により側坐核ニューロン活動が亢進する事が報告されている<sup>7)</sup>。このことから、海馬ニューロン活動の抑制およびその抑制の増強は側坐核ニュー

ロン活動の抑制方向への調節を引き起こすことになると考えられる。この調節の方向性は側坐核におけるドパミンによるニューロン活動抑制と同一の方向であり、側坐核ニューロン活動のメタンフェタミン投与後の調節変化に関与していることが示唆される。さらに、側坐核内でのセロトニン性調節機構の変化についても検討が必要と考えられる。

今回の研究で得られたメタンフェタミン反復投与後のセロトニン反応の増強に関与するレセプターサブタイプについて予備的な実験を加えた。海馬 CA1 野においてはこれまでにそのニューロン活動調節機能が明らかになっているものとして 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> および 5-HT<sub>4</sub> レセプターが挙げられる<sup>3)</sup>。海馬 CA1 野ニューロンは 5-HT<sub>1A</sub> レセプターを介して抑制され、5-HT<sub>4</sub> レセプターを介して興奮する<sup>5)</sup>。従って、メタンフェタミンによるセロトニン作用の増強は 5-HT<sub>1A</sub> レセプター機能の亢進によると考えられたが、5-HT<sub>1A</sub> レセプター選択的アゴニストを用いて検討したところ薬物処置後 5 日目におけ

る海馬 CA1 野集合活動電位の抑制作用は Control 群と MAP 群で差が認められなかったことから 5-HT<sub>1A</sub> レセプター機能の亢進の可能性は低いものと考えられた。5-HT<sub>1A</sub> レセプター機能変化の可能性以外に考えられることとして、次に、5-HT<sub>4</sub> レセプター機能の抑制という可能性が考えられる。加えて海馬 CA1 野の抑制性介在ニューロン上には 5-HT<sub>2A</sub> および 5-HT<sub>3</sub> レセプターも存在し GABA の遊離を促進する働きをしていることがあきらかになっている<sup>3, 6)</sup>。今後これらの 5-HT<sub>1A</sub> レセプター以外のサブタイプのレセプター機能も含めてセロトニン神経機能の変化について明らかにする必要がある。加えて、高用量のメタンフェタミン投与後にはセロトニンのシナプス終末への取り込みを媒介するセロトニントランスポーターの機能低下が起こることが報告されている<sup>4)</sup>。今回のセロトニンによる抑制反応の増強にこのセロトニントランスポーター機能変化が関与するか否かについても検討する必要があると考えられる。

#### E. 結論

今回の研究結果から、メタンフェタミン反復投与 24 時間後においてはセロトニンの海馬ニューロン活動抑制作用にはメタンフェタミン投与による影響は見られなかったが、5 日後にはセロトニンの抑制作用が増強されることが明らかとなった。この増強機構にはセロトニンレセプター 5-HT<sub>1A</sub> サブタイプの機能亢進の関与の可能性は低いことが示唆された。

#### 【参考文献】

- 1) Akbar M., Ishihara K., Sasa M. et al.: Inhibition by L-3,4-dihydroxyphenylalanine of hippocampal CA1 neurons with facilitation of noradrenaline and  $\gamma$ -aminobutylic acid release. *Eur. J. Pharmacol.* 414: 197-203, 2001
- 2) Amano T., Matsubayashi H. and Sasa M.: Hypersensitivity of nucleus accumbens neurons to methamphetamine and dopamine following repeated administration of methamphetamine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 801: 136-147, 1996
- 3) Andrade R.: Regulation of membrane excitability in the central nervous system by serotonin receptor subtypes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 861: 190-203, 1998
- 4) Fleckenstein A. E., Haughey H. M., Metzger R. R. et al.: Differential effects of psychostimulants and related agents on dopaminergic and serotonergic transporter. *Eur. J. Pharmacol.* 382: 45-49, 1999
- 5) Ishihara K., Amano T., Hayakawa H. et al.: Enhancement of serotonin 1A receptor function following repeated electroconvulsive shock in young rat hippocampal neurons in vitro. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2: 101-104, 1999
- 6) Ishihara K. and Sasa M.: Potentiation of 5-HT<sub>3</sub> receptor functions in the hippocampal CA1 region of rats following repeated electroconvulsive shock treatment. *Neurosci. Lett.* 307: 37-40, 2001
- 7) O'Donnell P., Greene J., Pabello N. et al.: Modulation of cell firing in the nucleus accumbens. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 877: 157-175, 1999
- 8) Ricaurte G.A., Schuster C. R. 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: 153-163, 1980

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：低濃度ドパミン連続曝露に伴う大脳皮質神経細胞におけるL型高電位開口性カルシウムチャネルの機能変化

分担研究者：大熊 誠太郎

研究協力者：桂 昌司

川崎医科大学薬理学教室

研究要旨

初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、低濃度ドパミンを連続曝露した場合のL型高電位開口性カルシウムチャネル(HVCC)の機能変化を、30 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入、HVCCサブユニット発現、および $[^3\text{H}]\text{diltiazem}$ 結合の観点から検討を加えた。ドパミン(0.1  $\mu\text{M}$ )の連続刺激により $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入は経時的に増加し、曝露24時間後には流入増加はplateauに達した。この流入増加はD1受容体(D1R)拮抗薬であるSCH23390により用量依存性に抑制されたが、D2受容体(D2R)拮抗薬であるsurupirideは流入増加に影響を与えなかった。D1R作動薬であるSKF38393(0.1  $\mu\text{M}$ )の連続曝露もドパミンの場合と同様に30 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の増加をもたらしたが、D2R作動薬であるbromocriptineは変化を与えなかった。D1R作動薬のSKF38393(0.1  $\mu\text{M}$ )の連続曝露による30 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入はL型HVCC遮断薬であるnifedipineにより完全に抑制されたが、P/QおよびN型HVCC拮抗薬では影響を受けなかった。Western blot法により上記HVCCのサブユニットのDBI mRNA発現変化を解析したところ、それぞれP/QおよびN型HVCCを構成する $\alpha 1\text{A}$ および $\alpha 1\text{B}$ サブユニットのみならず、L型HVCCの $\alpha 1\text{C}$ および $\alpha 1\text{D}$ サブユニットの発現も変化が認められなかった。さらに $[^3\text{H}]\text{diltiazem}$ 結合実験を行ったところ、SKF38393(0.1  $\mu\text{M}$ )の連続曝露により $[^3\text{H}]\text{diltiazem}$ 結合は増加し、この増加はKd値の低下に起因していた。これらの成績から、ドパミン連続曝露により誘発されるL型HVCC機能の亢進は、D1R連続刺激を介してL型HVCCの $\text{Ca}^{2+}$ に対する親和性を増加させることが起因となっていることが明らかとなった。

A. 研究目的

覚醒剤であるコカインやアンフェタミンにより誘発される動物の行動異常は5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬やオピオイド受容体拮抗薬などにより修飾されることが報告されている[1]。L型カルシウムチャ

ネル拮抗薬は身体依存を誘発するエタノール、モルヒネ、ベンゾジアゼピン系薬物、バルビツール酸誘導体などの依存性薬物の退薬症候を減弱するのみならず[2]、覚醒剤により生じる動物行動などを減弱させることが報告されて

いる [3-5]。

一方、覚醒剤の L 型高電位開口性カルシウムチャネル (HVCC) に及ぼす影響についての検討はほとんどなされておらず、心筋などを用いた電気生理学的検討が行われており [6]、コカイン投与が選択的に L 型 HVCC を介するカルシウム電流の増強をもたらすことが報告されている。しかしながら、生化学的、薬理的観点からの検討を行った成績は報告されていない。

コカインやアンフェタミンは神経系ではシナプス間隙におけるモノアミン量の増加を介してその薬理作用を発現することは周知の通りである。そこで、本研究ではドパミン D1 様および D2 様受容体 (D1R および D2R) を有していることが確認されている初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、低濃度ドパミンを持続曝露した場合に生じる L 型 HVCC 機能の変化について検討した。

## B. 方法

### 1. マウス大脳皮質神経細胞の単離および初代培養

マウス大脳皮質は既報に準じて行った [7]。胎齢 15 日目の ddY 系マウス新皮質を酵素処理および遠心操作を加えて単離し、15%ウシ胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 中で 3 日間培養した。ついで 10  $\mu$ M cytosine arabinoside および 10%ウマ血清を含有する DMEM 中で 24 時間培養した後、10%ウマ血清含有 DMEM 中で培養を継続した。培養液は 4 日毎に新鮮な 10%ウマ血清含有 DMEM に変更し、培養 14 日目の神経細胞を実験に供した。

なお、本研究で用いた培養細胞は 95% 以上が神経細胞であった。

### 2. 神経細胞へのドパミン、D1R および D2R 作動薬の曝露

神経細胞へのドパミンの曝露は、ドパミン含有培養液をドパミンの連続曝露中は毎日新鮮なものに交換した。

D1R 作動薬である SKF38393 および D2R 作動薬である bromocriptine は Hank's 液に溶解したものを直接培養液中に添加した。なお、これら薬剤の培養皿への添加、神経細胞への曝露などの操作はすべて暗室内で行った。

### 3. 神経細胞への [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入の測定

神経細胞への [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入の測定は既報 [7] に従って行った。神経細胞を  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs-Ringer bicarbonate buffer (10 mM Hepes 含有: KRB-H) とともに、37°C、10 分間の preincubation を行ったのち、buffer を吸引除去し、新鮮な  $\text{Ca}^{2+}$ -free KRB-H を加え、2.7 mM [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ]Cl<sub>2</sub> (1 mCi [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ]/dish) の存在下に 37°C、2 分間の incubation を行った。反応終了後、神経細胞を氷冷した KRB-H で 5 回洗浄し、0.5 M NaOH とともに神経細胞を培養皿より剥離し、その一部を等モルの酢酸で中和し、シンチレーターとともに液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

30 mM KCl の添加は [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] の添加と同時にを行った。それぞれ L、P/Q、N 型 HVCC 阻害薬である nifedipine、 $\omega$ -agatoxin IVA ( $\omega$ -ATX)、 $\omega$ -conotoxin GVIA ( $\omega$ -CTX)、および L 型 HVCC 活性

化薬である Bay k 8644 の添加は [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] の添加の 15 秒前に行った。また、D1R および D2R 拮抗薬である SCH23390 および sulpiride の作用を検討する場合には、これら薬物を [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] の添加の 15 秒前に buffer 中に添加した。

#### 4. Immunoblot 法による HVCCs の測定

Immunoblot 法による HVCCs の測定は既報 [8] に従って行った。培養神経細胞を 4℃ の条件下で 6% trichloroacetic acid を含有する 0.15 M NaCl で固定したのち培養皿から剥離した。この試料を遠心 (10,000  $xg$ , 4℃, 5 分) し、得られた pellet を氷冷した 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄した。次いで、sample buffer (4 % sodium lauryl sulfate, 12 %  $\beta$ -mercaptoethanol, 20 % glycerol 含有 100 mM Tris-HCl, pH 6.8) を添加し最終容量が 0.2 ml となるよう調整したのち攪拌し、超音波破碎、3 分間の煮沸処理、遠心操作 (10,000  $xg$ , 4℃, 60 分) を順次行い、得られた上清を実験に供するまで -80℃ で保存した。

7.5% SDS-PAGE ゲル (100×100×0.5 mm) を用いて電気泳動 (20 mA, 70 分) を行った後、semi-dry 型 transblotter (160 mA, 60 分) で転写させた nitro-cellulose 膜 (Hybond-C extra, Amersham Biotech, Buckinghamshire, England) を PBS で洗浄し、1%ウシ血清アルブミン含有 Tris buffered saline (TBS; 0.15 M NaCl 含有 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) で固定した。この nitrocellulose 膜に L・N・P/Q 型 HVCC  $\alpha$ 1 subunit に対する抗体を 37℃ で 1 時間反応させた後、0.05% Tween 20 を含有する TBS で 4 回洗浄し、さらに抗

ウサギ IgG 抗体および発色剤で反応させた。得られた HVCCs サブユニットの immunoreactive band の染色強度は、ImageMaster 1D Elite software (Amersham Biotech, Buckinghamshire, England) にて解析した。泳動された蛋白質は coomassie brilliant blue で染色し確認した。

#### 5. [ $^3\text{H}$ ]Diltiazem 結合実験

[ $^3\text{H}$ ]Diltiazem 結合は神経細胞より調整した顆粒画分を用いて、既報 [8] に準じて行った。保存した顆粒画分を解凍したのち、氷冷した 50 mM Tris-HCl buffer で 1 回洗浄し、同一の buffer で懸濁した。各種濃度 (0.025 ~ 6.4 nM) の [ $^3\text{H}$ ]diltiazem の存在下で 25℃、90 分間の incubation を行ったのち、Whatman GF/B フィルターを用いて吸引濾過し、フィルター上に残存する放射活性を測定した。非特異的結合の測定は、10  $\mu\text{M}$  の非放射性 diltiazem の存在下に上述と同様の方法を用いて結合実験を行った。

#### 6. 蛋白定量

顆粒画分および 0.5 M NaOH した神経細胞中に含有される蛋白の定量は、bovine serum albumin を標準物質とした Lowry らの方法 [9] により行った。

#### 7. 統計的検討

実験成績はすべて平均値  $\pm$  標準誤差で表示し、統計的有意差の検定は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) の後に Bonferroni's test および Dunnett's test を用いて行った。

#### C. 結果

### 1. ドパミン連続曝露による 30 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の変化

ドパミンを 0.01~3  $\mu\text{M}$  の濃度範囲で神経細胞に 72 時間曝露したところ、0.03  $\mu\text{M}$  で有意な 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の上昇が認められ、0.1  $\mu\text{M}$  で 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入量は最大値に達し、この流入量は 3  $\mu\text{M}$  でも変化がなかった (Fig. 1)。なお、本研究で用いたドパミン濃度は、LDH 漏出率および trypan blue 排泄試験の検討から、細胞毒性を示さないことが確認されている。

ドパミン (0.1  $\mu\text{M}$ ) の連続刺激により  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入は経時的に増加し、曝露後 6 時間目には有意な増加が観察され、24 時間後には流入増加は plateau に達し、この増加は曝露後 72 時間目においても 24 時間目のそれと同程度であった (Fig. 2)。

### 2. ドパミン連続曝露による 30 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入増加に対する DIR および D2R 拮抗薬の影響

ドパミン (0.1  $\mu\text{M}$ ) の連続刺激により誘発された 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加に対し、それぞれ DIR および D2R 拮抗薬である SCH23390 および sulpiride を 30 mM KCl 添加直前に buffer 中に添加させたところ、SCH23390 は用量依存性に  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加を抑制したが、sulpiride は何らの影響も与えなかった (Fig. 3)。この実験成績から、ドパミン (0.1  $\mu\text{M}$ ) の連続刺激により誘発された 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加には DIR が関与している可能性が高いと考えられる。

### 3. SKF38393 および bromocriptine の長期曝露の 30 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入への影響

SKF38393 および bromocriptine を 72 時間連続曝露した後の 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入を検討したところ、DIR 作動薬である SKF38393 は用量依存性に  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入を増加させたが、bromocriptine は影響を与えなかった (Fig. 4)。なお、いずれの薬物も基礎  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入には影響を与えなかった。

0.1  $\mu\text{M}$  の SKF38393 を 72 時間連続曝露するとき、D2R 拮抗薬である SCH23390 (0.1  $\mu\text{M}$ ) を共存させると SKF38393 連続曝露により誘発された 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入の増加は完全に消失した (Fig. 5)。しかしながら、SCH23390 単独曝露では  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入に影響を与えなかった (Fig. 5)。

### 4. SKF38393 連続曝露により誘発された 30 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入増加に対する各種 HVCC 拮抗薬の影響

SKF38393 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は Fig. 6 に示すように、L 型 HVCC 拮抗薬である nifedipine によってのみ有意に抑制された。一方、P/Q および N 型 HVCC 拮抗薬は影響を与えなかった。これらから、SKF38393 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入増加は L 型 HVCC の機能亢進に起因する可能性が示唆される。

### 5. SKF38393 連続曝露後における Bay k 8644 の 30 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入に対する影響

SKF38393 連続曝露後に、Bay k 8644 存在下に 30 mM KCl 誘発性  $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$  流入

を検討したところ、SKF38393 非曝露群に比して有意に増加していた。この増加量は SKF38393 曝露群および非曝露群における Bay k 8644 存在下において得られた 30 mM KCl 誘発性 [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入量に等しかった (Fig. 7)。

#### 6. SKF38393 連続曝露後における各種 HVCC $\alpha 1$ サブユニットの発現変化

SKF38393 連続曝露後、神経細胞における各種 HVCC  $\alpha 1$  サブユニットの発現にいかなる変化が生じているのかを immunoblot 法を用いて検討した。その結果、P/Q 型、N 型 HVCC の  $\alpha 1$  サブユニットのみならず、L 型 HVCC  $\alpha 1$  サブユニットの発現も、非曝露群との間に有意な相違は認められなかった (Fig. 8)。

#### 7. SKF38393 連続曝露後における [ $^3\text{H}$ ]diltiazem 結合の変化

SKF38393 連続曝露後の神経細胞から調製した顆粒画分への [ $^3\text{H}$ ]diltiazem 結合は非曝露群に対し、有意な増加を示していた。Scatchard 解析を行ったところ、この結合増加は、 $K_d$  値の減少に起因することが判明した (Fig. 9)。

#### D. 考 察

本研究ではコカインやアンフェタミンなどの覚醒剤の長期曝露が神経細胞の L 型 HVCC 機能にいかなる影響を与えるのかを明らかにする目的で、初代培養マウス大脳皮質神経細胞を用い、低濃度ドパミンを持続曝露することにより検討を行った。

低濃度ドパミンの連続曝露が 30 mM KCl 誘発性 [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入を増加させるこ

と、およびこの増加が DIR 拮抗薬によってのみ生じていることから、ドパミンの連続曝露により生じる [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入の増加には DIR が関与している可能性が示唆される。

上述に実験成績を確認するために、本研究では、さらに DIR 作動薬である SKF38393 を連続曝露させた後に 30 mM KCl 誘発性 [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入を測定した。その結果、SKF38393 を連続曝露では [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入の増大が誘発されること、この流入増加は L 型 HVCC の機能亢進によるもので、他の HVCC である P/Q 型および N 型 HVCC は関与していないことが明らかとなった。心筋細胞では、コカインが L 型 HVCC を介したカルシウム電流を増加させることが報告されて [6]。覚醒剤がシナプス間隙におけるモノアミン量の増加をもたらすこと、および本研究で得られた DIR 連続刺激による L 型 HVCC 機能の亢進を誘発することを勘案すると、上述の心筋におけるカルシウム電流の増加には、少なくとも DIR が関与している可能性が考えられる。

本研究では DIR の連続刺激による 30 mM KCl 誘発性 [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ] 流入の増加が L 型 HVCC の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性の亢進によるもので、チャンネル蛋白質の量的変化は関与していないことを [ $^3\text{H}$ ]diltiazem 結合実験および immunoblot 法による検討から明らかにした。一方、コカインを連続投与したラットでは、側坐核神経細胞におけるカルシウム電流は N 型 HVCC を介するもののみが減少し、P/Q 型および L 型 HVCC を介するカルシウム電流には変化がないこと

が報告されている [10]。この研究報告と本研究とは、HVCC の反応が著しく異なるが、この相違は、本研究では DIR のみを連続刺激していること、両研究で用いた実験材料が異なること、しかも使用した神経細胞が異なる脳内部位のものであること、などが関係すると思われるが、詳細は不明である。

コカイン中毒者を対象とした臨床研究では、L 型 HVCC 拮抗薬である nimodipine がコカインにより誘発された神経障害の一部を改善することが報告されている [11]。本研究で得られたように、DIR 連続刺激により誘発される L 型 HVCC 機能の変化がこのような nimodipine の薬理作用と関係している可能性が考えられるが、覚醒剤がセロトニンを介してセロトニン受容体の活性化を誘発していることから、今後セロトニン受容体の持続的な活性化に伴う HVCC 機能の変化を検討する必要があると考えられる。

#### D. 結 論

本研究の結果から、低濃度ドパミンの連続曝露は DIR を介して L 型 HVCC のみの機能亢進を誘発し、この亢進は L 型 HVCC のカルシウムイオンに対する親和性の亢進に起因することが判明した。

#### [参考文献]

- 1) Calcagnetti D.J., Keck B.J., Quatrella L.A., et al.: Blockade of cocaine-induced conditioned place preference: Relevance to cocaine abuse therapeutics. *Life Sci.* 56: 475-483, 1995.
- 2) Little, H.J.: The role of neuronal calcium channels in dependence on ethanol and other sedatives/hypnotics. *Pharmac. Ther.* 50: 347-365, 1991.
- 3) Ansah, T.-A., Wade, L.H., and Shockley, D.C.: Effects of calcium channel entry blockers on cocaine and amphetamine-induced motor activities and toxicities. *Life Sci.* 53: 1947-1956, 1993.
- 4) Martellotta, M.C., Kuzmin, A., Muglia, P., et al.: Effects of the calcium antagonist isradipine on cocaine intravenous self-administration in rats. *Psychopharmacology* 113: 378-380, 1994.
- 5) Licata, S.C., Freeman, A.Y., Pierce-Bancroft, A.F., et al.: Repeated stimulation of L-type calcium channels in the rat ventral tegmental area mimics the initiation of behavioral sensitization to cocaine. *Psychopharmacology* 152: 110-118, 2000.
- 6) Premkumar, L.S.: Selective potentiation of L-type calcium channel currents by cocaine in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* 56: 1138-1142, 1999.
- 7) Ohkuma S., Katsura M., Higo A., et al.: Peroxynitrite affects  $Ca^{2+}$  influx through voltage-dependent calcium channels. *J. Neurochem.* 76: 341-350, 2001.
- 8) Katsura, M., Mohri, Y., Shuto, K., et al.: Up-regulation of L-type voltage-dependent calcium channels after long term exposure to nicotine in cerebral cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 277: 7979-7988 2002.



- 9) Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., et al.: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 293: 265-275, 1951.
- 10) Zhang, X.-F., Cooper, D.C., and White, F.J.: Repeated cocaine treatment decreases whole-cell calcium current in rat nucleus accumbens neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301: 1119-1125, 2002.
- 11) Ross, R.B., Alim, T.N., Fay-McCarthy, M., et al.: Nimodipine pharmacotherapeutic adjuvant therapy for inpatient treatment of cocaine dependence. *Clin. Neuropharmacol.* 17: 348-358, 1994.

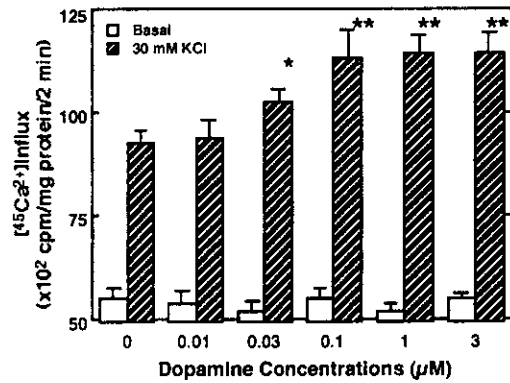


Fig.1 Changes in 30 mM KCl-stimulated [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]influx into cerebral cortical neurons following exposure to various concentrations of dopamine. \*p<0.05 and \*\*p<0.01, compared with the control value (without treatment of dopamine, Dunnett's test).

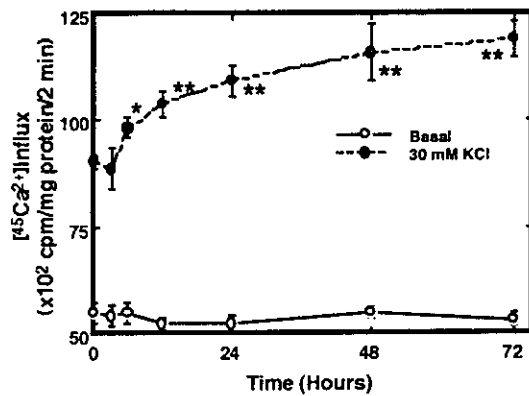


Fig.2 Time course of changes in 30 mM KCl-stimulated [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]influx into cerebral cortical neurons following exposure to dopamine. \*p<0.05 and \*\*p<0.01, compared with the control value (without treatment of dopamine, Dunnett's test).

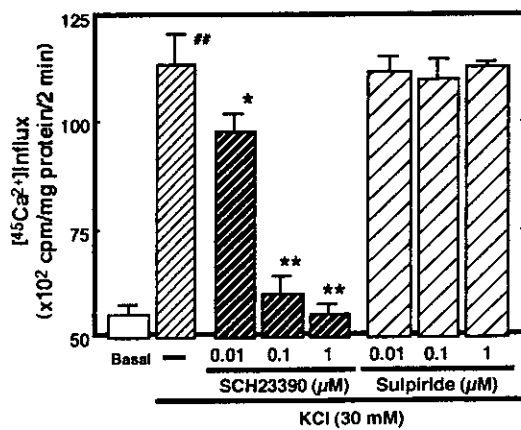
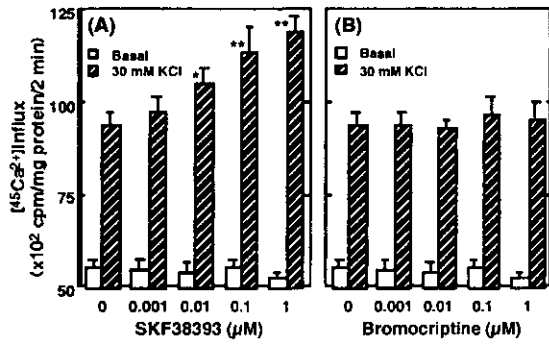
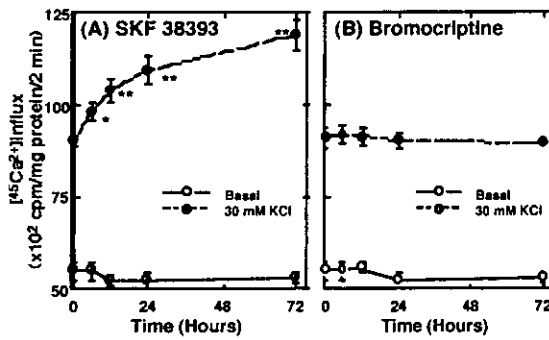


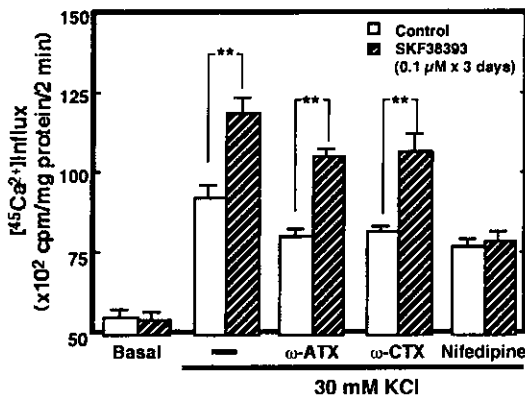
Fig.3 Effects of D1-like and D2-like dopamine receptor antagonists on 30 mM KCl-stimulated [<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>]influx into cerebral cortical neurons following exposure to dopamine. ##p<0.01, compared with the control value (without treatment of dopamine, Bonferroni's test). \*p<0.05 and \*\*p<0.01, compared with the value determined in the presence of KCl alone (Dunnett's test).



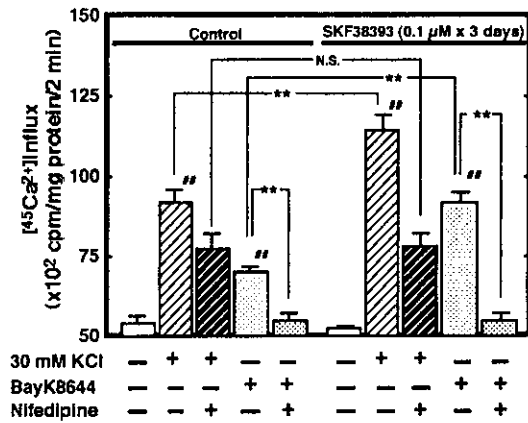
**Fig.4** Changes in 30 mM KCl-stimulated [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ]influx into cerebral cortical neurons in following exposure to various concentrations of (A) SKF 38393 and (B) bromocriptine. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , compared with the control value (without treatment of SKF 38393, Dunnett's test).



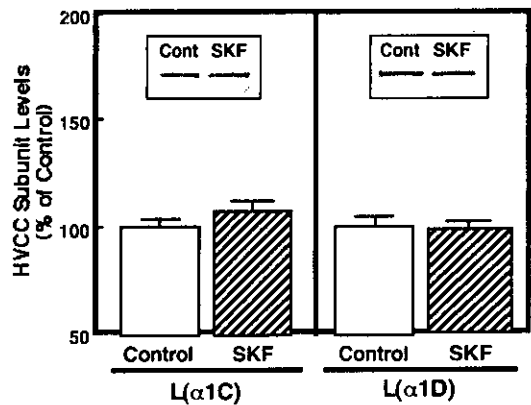
**Fig.5** Time course of changes in 30 mM KCl-stimulated [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ]influx into cerebral cortical neurons following exposure to (A) SKF 38393 and (B) bromocriptine. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , compared with the control value (without treatment of SKF 38393, Dunnett's test).



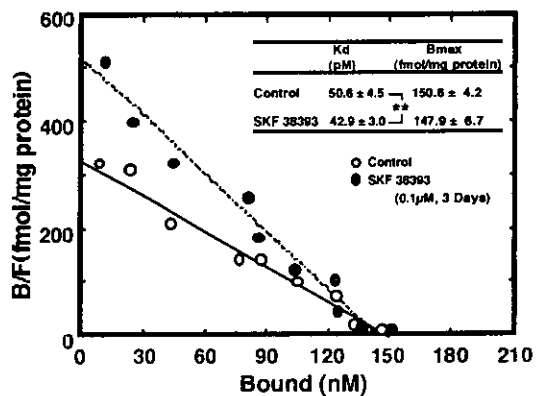
**Fig.6** Effects of various inhibitors for high voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels on 30 mM KCl-stimulated [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ]influx into cerebral cortical neurons following exposure to SKF 38393. \*\* $p < 0.01$ , Bonferroni's test. Drug concentrations:  $\omega$ -ATX, 1  $\mu\text{M}$ ;  $\omega$ -CTX, 1  $\mu\text{M}$ ; nifedipine, 1  $\mu\text{M}$ .



**Fig.7** Effect of nifedipine on Bay k 8644-stimulated [ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ]influx into cerebral cortical neurons following exposure to SKF 38393. ## $p < 0.01$ , compared with each control value (Bonferroni's test). \*\* $p < 0.01$ , Bonferroni's test. N.S.; not significant.



**Fig.8** Effect of SKF 38393 (SKF) exposure on expression of high voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel (HVCC) subunits in cerebral cortical neurons.



**Fig.9** Scatchard analysis of [ $^3\text{H}$ ]diltiazem binding to the particulate fractions from cerebral cortical neurons following exposure to SKF 38393 (SKF). \*\* $p < 0.01$  (Bonferroni's test).

## 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- $\alpha$ の保護作用

分担研究者：鍋島俊隆<sup>1</sup>

研究協力者：新田淳美<sup>1</sup>、山田清文<sup>2</sup>、中島 晶<sup>1</sup>、永井 拓<sup>1</sup>、山田裕一郎<sup>1</sup>、曾 南<sup>1</sup>、内  
山武久<sup>1</sup>、宮本嘉明<sup>1</sup>、野田幸裕<sup>1</sup>、齋藤邦明<sup>3</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学大学院医学系研究科・医療薬学・附属病院薬剤部

<sup>2</sup>金沢大学薬学部・病院薬学

<sup>3</sup>岐阜大学医学部・臨床検査医学

#### 研究要旨

腫瘍壊死因子（TNF- $\alpha$ ）はマクロファージや単球などの免疫担当細胞で産生される炎症性サイトカインである。近年、脳でも産生され、高次神経機能に関与していることが報告されている。本研究では、昨年度に引き続いて、メタンフェタミンの逆耐性・精神依存および精神・神経毒性に対するTNF- $\alpha$ の保護作用の検討をおこない、さらに、そのメカニズムについて検討した。メタンフェタミンをラットに5日間連続投与すると側坐核、線条体、海馬および扁桃体でのTNF- $\alpha$  mRNA 発現量が著明に増加した。二重免疫組織化学染色法によって、このときのTNF- $\alpha$ の産生細胞は神経細胞と考えられた。一方、メタンフェタミンの単回投与後では、今回実験を行ったいずれの脳部位においてもTNF- $\alpha$  mRNA の発現量に変化は観察されなかった。

TNF- $\alpha$ をマウスに腹腔内投与するとメタンフェタミンにより誘導される運動量増加の逆耐性を抑制した。逆耐性の抑制作用はラット側坐核にTNF- $\alpha$ を直接注入した際にも、観察された。

ラットの薬物弁別試験において、TNF- $\alpha$ はメタンフェタミンの弁別刺激効果を抑制した。このとき、薬物弁別試験によって増加する側坐核でのc-Fosの発現量の増加をTNF- $\alpha$ は有意に抑制した。

以上の結果より、（1）メタンフェタミンの連続投与により脳各部位でTNF- $\alpha$ が誘導されること、（2）TNF- $\alpha$ はメタンフェタミンの精神神経毒性や弁別刺激効果に対して抑制的に作用し、（3）その作用点の一つとして、側坐核におけるc-Fosの発現が関与している可能性が考えられた。

## A. 研究目的

覚せい剤であるメタンフェタミンの乱用により精神的依存が形成され、妄想型の統合失調症に類似した精神病状態が形成される<sup>9)</sup>。一方、マウスやラットなどの小動物においては、メタンフェタミンの連続投与により感受性が長期間にわたり持続的に増加する逆耐性現象が認められる<sup>3, 11)</sup>。さらに、メタンフェタミンの大量投与によりドパミン作動性神経終末では可逆的な神経毒性が惹起される<sup>8, 11)</sup>。

我々は、メタンフェタミンによって誘発される神経毒性のメカニズムを解明するために、ラットにメタンフェタミンを連続投与することにより発現が変化する遺伝子をcDNAマイクロアレイ法を用いて検討した。その結果、薬物依存に重要な役割を果たしている側坐核において、メタンフェタミンの連続投与により腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) の受容体 TNFR1 の発現が増加していた。

TNF- $\alpha$  はマクロファージや単球などの免疫担当細胞で産生される炎症性サイトカインであり、中枢神経系に対しては神経毒性と神経保護作用を有することが報告されている。神経突起の進展を抑制する<sup>7)</sup>一方で、神経栄養因子の産生を誘導し、神経細胞死を防ぐことも報告されている<sup>10)</sup>。

我々は、TNF- $\alpha$  遺伝子欠損マウスでは、不安様行動が増加し<sup>14)</sup>、ネズミのレトロウイルスである LPBM-5 の感染に伴う認知障害 (AIDS 痴呆症のモデル) の発症が抑制されることを明らかにしている<sup>1)</sup>。これらの結果は、TNF- $\alpha$  が脳機

能の調節および神経精神疾患の病態生理に関与している可能性を示唆している。本研究班では、昨年度はメタンフェタミンを連続投与することによって、マウス脳内で TNF- $\alpha$  の発現量が増加することを報告した。本年度は、そのメカニズムおよびメタンフェタミンによって引き起こされる精神神経毒性に対する TNF- $\alpha$  の保護効果について検討した。

## B. 方法

### 1. 動物および薬物

実験には7~8週齢のWistar系雄性ラット (日本チャールスリバー) または C57/BL6 (日本 SLC) を用いた。TNF- $\alpha$  遺伝子欠損マウスは、既報にしたがって作成した<sup>1)</sup>。実験を開始する前、少なくとも1週間、動物は明暗サイクル (明期9時から21時) の室内 (室温 23 $\pm$ 1度、湿度 50 $\pm$ 5%) で飼育し、水および餌は自由に摂取させた。メタンフェタミンは塩酸メタンフェタミン (ヒロポン、大日本製薬) を使用した。ヒト TNF- $\alpha$  は、大日本製薬より恵与された。

本動物実験計画は名古屋大学医学部動物実験委員会で承認され、名古屋大学医学部動物実験指針、文部科学省動物実験指針および Principle of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication, 85-23, 1985) に準じて行った。

### 2. Real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (リアルタイム RT-PCR) 法による TNF- $\alpha$ mRNA の定量