

Fig.5 TNF- α mRNA expression in the nucleus accumbens of mice after Leu-Ile and methamphetamine co-treatment. Mice were treated with Leu-Ile (1.5 or 15 μ mole/kg, i.p.) 1hr before methamphetamine (1 mg/kg, s.c.) treatment for 9days (n = 8-10). *p<0.05 vs. saline/saline-treated group. # p<0.05 vs. saline/methamphetamine-treated group.

本年度、TNF- α 遺伝子欠損マウスの側坐核において GDNF 含量が減少し、野生型マウスに TNF- α を末梢投与した際には側坐核の GDNF 含量が増加するという事を明らかにした。以上のことを考え合わせると、TNF- α および GDNF はともに薬物依存に対して抑制的に働くが、そのメカニズムとして脳内の TNF- α の増加が GDNF の産生誘導をしている可能性が示唆された。

しかし、薬物依存に対して抑制効果を示す TNF- α および GDNF は共に末梢投与による治療薬への応用は期待できない。TNF- α は炎症性のサイトカインであり、末梢からの投与を続けられれば、種々の副作用が予想される。一方、GDNF は分子量 42kD のタンパクであるため、血液脳関門を通過することが出来ず、また血中のプロテアーゼによって分解されやすいが、脳に GDNF を直接投与することは倫理的に問題があり、患者の quality of life を考えると避けなければならない治療法である。

そこで末梢から脳血液関門を通過し、脳内において特異的に TNF- α および GDNF を産生出

来る物質を見出せれば、薬物依存治療薬の開発につながると考えられる。

Leu-Ile は TNF- α 同様にメタンフェタミンの依存形成を抑制するだけではなく、依存が形成したマウスにおいても改善効果を示した。Leu-Ile を 12 日間末梢投与すると脳内の TNF- α mRNA が増加した。また、Leu-Ile とメタンフェタミンを併用投与すると TNF- α mRNA の増加はいずれの単独投与に比べても更に増加した。培養アストロサイトに TNF- α を添加すると GDNF の mRNA 発現およびタンパク含量を増加させることも報告されている¹⁴。これらを考え合わせると、Leu-Ile による場所嗜好性および自発運動亢進に対する抑制作用のメカニズムの 1 つには TNF- α が増加し、増加した TNF- α が GDNF の産生を誘導することによる可能性が考えられる。

E. 結論

本年度の研究成果から、TNF- α が、メタンフェタミンによる精神神経毒性形成後においても、

有効であることを明らかにした。さらに、メタンフェタミンによる依存を抑制する物質 Leu-Ile を見出し、その少なくとも1部には、TNF- α や GDNF の産生誘導が関与している可能性が示唆された。今後、Leu-Ile が TNF- α を誘導するメカニズムを詳細に検討することによって、薬物依存予防および治療薬開発への新しい糸口になりうると考えられる。

[参考文献]

1. Elena A, Ofer K and Chaya B. Regulation of GDNF expression in cultured astrocytes by inflammatory stimuli. *Neuroreport* 8: 3309-3312. 1997
2. Iida R, Saito K and Nabeshima T. Suppression of neurocognitive damage in LP-BM5-infected mice with a targeted deletion of the TNF-alpha gene. *FASEB J* 14: 1023-1031. 2000
3. Messer CJ, Eisch AJ and Nestler EJ. Role for GDNF in biochemical and behavioral adaptations to drugs of abuse. *Neuron* 1: 247-257. 2000
4. McNaught KS and Jenner P. Dysfunction of rat forebrain astrocytes in culture alters cytokine and neurotrophic factor release. *Neurosci Lett* 285 :61-65. 2000
5. Nitta A, Ito M, Fukumitsu H and Furukawa S. 4-methylcatechol increases brain-derived neurotrophic factor content and mRNA expression in cultured brain cells and in rat brain in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 1276-1283. 1999
6. Nitta A, Nishioka H and Furukawa S. A hydrophobic dipeptide protects dopaminergic denervation in mice. *Soc Neurosci* 2003
7. Noda Y, Miyamoto Y and Nabeshima T. Involvement of dopaminergic system in phencyclidine-induced place preference in mice pretreated with phencyclidine repeatedly. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 44-51. 1998

メタンフェタミンによるドバミン神経毒性の

チロシナーゼによる修飾

分担研究者： 浅沼幹人

共同研究者： 宮崎育子, Md. Emdadule Haque, 小川紀雄

(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)

【研究要旨】

メタンフェタミンは線条体ドバミン神経終末の急性毒性を起こす。メタンフェタミンによる神経毒性には種差があり、brown DBA/2N マウスよりも albino BALB/c マウスの方がより毒性が強く、C57BL マウスではほとんど毒性がみられないという報告がある (Kita et al., 1998)。本検討においても、メタンフェタミン (4 mg/kg x4) 投与による線条体ドバミントランスポーター発現およびドバミン量の著明な減少が albino ICR, BALB/c マウスでみられるのに対して、有色 C57BL, 129 マウスではほとんどみられなかった。また、メタンフェタミン投与によるドバミン神経毒性におけるチロシナーゼの関与を明らかにするために、われわれはカテコールアミン系 CATH.a 細胞を用いてメタンフェタミン神経毒性に対するチロシナーゼ阻害剤 phenylthiocarbamide (PTU)の影響について検討した。CATH.a 細胞でのメタンフェタミン神経毒性は PTU 処置により増悪された。さらに、メタンフェタミンをあらかじめチロシナーゼと incubate し、albino マウスに投与すると、メタンフェタミンの神経毒性が減弱された。これらのことから、チロシナーゼあるいはその関連分子は末梢においてメタンフェタミンに何らかの修飾を加え、メタンフェタミンによるドバミン神経毒性を減弱させる可能性が示唆された。

A. 目的

覚醒剤メタンフェタミン(METH)は線条体ドバミン神経終末の急性毒性を起こす。動物実験でのMETHによるドバミン神経毒性には種差・系差があり、brown マウスよりも albino マウスの方がより毒性が強く、C57BL マウスではほとんど毒性がみられないという報告がある(1)。また、われわれはメラニン合成酵素チロシナーゼの機能抑制により、過剰ドバミンによる神経細胞死が増悪すること(2)、チロシナーゼは過剰ドバミンおよびそれから生成される毒性の高いキノン体を速やかに代謝することで神経保護的に作用している可能性を報告した(3-5)。METH の急性毒性では、小胞より駆出されたドバミンが自

動酸化をうけて酸化ストレスが生じると考えられていることから、チロシナーゼの欠如 (albino)あるいはそれに伴う変化がMETHによるドバミン神経毒性を増悪させている可能性が考えられる。そこで、METH のドバミン神経毒性におけるチロシナーゼの関与の有無を明らかにするために、albino および有色マウスといった数系統のマウスを用いてMETHのドバミン神経毒性の差異について検討し、チロシナーゼを添加したMETHのドバミン神経毒性の変化をみた。また、カテコールアミン系培養神経細胞を用いて、チロシナーゼの抑制のMETH毒性への影響についても検討した。さらに、チロシナーゼによるMETH分子への直接修飾の可能性について、in vitroの実験を行った。

B. 方法

1. METH 投与によるドバミン神経毒性のマウス系差

チロシナーゼ-null マウスとして albino 雄性 ICR, BALB/c 系マウスおよびチロシナーゼを発現している有色 colored 雄性 C57BL/6j, 129S 系マウス(いずれも 8 週齢)を用いて, METH (4 mg/kg, i.p. × 4 回, 2 時間毎)を投与し, 3 日後の線条体でのドバミントランスポーターの脱落を免疫染色で, ドバミンおよびその代謝産物(DOPAC, HVA)の変化を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した。

2. チロシナーゼ添加 METH 投与によるドバミン神経毒性の変化

また, METH (2 mg/ml, 生食に溶解)をあらかじめ等容量のチロシナーゼ(0.5 mg/ml, 2060 U/mg protein, 10 mM sodium phosphate beffer pH 7.4 に溶解)と 37°C で 2 時間 incubate し, 雄性 BALB/c 系マウス(8 週齢)に 最終濃度 4 mg/kg (× 4 回, 2 時間毎)となるように投与し, 3 日後の線条体ドバミントランスポーターの変化を免疫染色で評価した。

3. チロシナーゼの活性抑制の METH ドバミン神経細胞毒性への影響

カテコールアミン系 CATH.a 細胞を用いて, METH (500 μM, 1 mM) 24 時間添加により惹起される細胞死に対するチロシナーゼ阻害剤 phenylthiocarbamide (PTU)添加の影響について, 細胞障害性を LDH assay により検討した。

4. チロシナーゼの METH との直接反応

さらに, METH (2 mg/ml, 生食に溶解)およびあらかじめ等容量のチロシナーゼ(0.5 mg/ml, 2060 U/mg protein, 10 mM sodium phosphate beffer pH 7.4 に溶解)と 37°C で 2 時間 incubate した METH の薄層クロマトグラフィーを行い, チロシナーゼによる METH の直接修飾の有無について検討した。

C. 研究結果

1. METH 投与によるドバミン神経毒性のマウス系差

METH (4 mg/kg, i.p. × 4 回, 2 時間毎)投与による線条体ドバミントランスポーターおよびドバミン量の著明な減少が albino の ICR, BALB/c 系マウスでみられるのに対して, 有色 colored の C57BL/6j, 129S 系マウスではほとんどみられず, 抵抗性であった。

2. チロシナーゼ添加 METH 投与によるドバミン神経毒性の変化

あらかじめチロシナーゼと incubate した METH を, 最終濃度 4 mg/kg (× 4 回, 2 時間毎)となるように albino マウスに投与すると, METH 単独投与群でみられる線条体ドバミントランスポーターの脱落が軽減されていた。

3. チロシナーゼの活性抑制の METH ドバミン神経細胞毒性への影響

培養 CATH.a 細胞への METH 添加により用量依存性の細胞死が認められ, 培地への LDH の放出量の有意な増加が見られた。一方, チロシナーゼ阻害剤の PTU 処置によっても濃度依存性の細胞死ならびに LDH 放出量の増加が認められた。これに対し, METH と PTU を添加した群では, それぞれの単独添加群に比して相乗的な細胞死の増悪ならびに LDH 放出量の増加が認められた。

4. チロシナーゼの METH との直接反応

チロシナーゼと 37°C で 2 時間 incubate した METH について薄層クロマトグラフィーを行ったところ, 無処置の METH に比してチロシナーゼ処置 METH の移動度は変化していた。

D. 考察

われわれはマウスを用いた動物実験において, METH の大量急性投与による線条体ドバミン神経終末の脱落に系差があり, albino マウスが METH に対して感受性であり, 有色マウスが比較的抵抗性であることを経験していた。また, 既報においても, METH によるドバミン神経毒性に種差・系差があり, 有色の brown マウス, C57BL マウスよりも albino マウスの方がより毒性が強い

ことが報告されている(1)。一方、われわれは既にメラニン合成酵素であるチロシナーゼの機能抑制により、過剰ドパミンによる神経細胞死が増悪すること(2)、チロシナーゼは過剰ドパミンおよびそれから生成される毒性の高いキノン体を速やかに代謝することで神経保護的に作用している可能性を報告した(3-5)。METHの大量急性投与による線条体ドパミン神経終末の脱落には、METHによって神経終末のシナプス小胞から駆出されたドパミンが自動酸化をうけ惹起される酸化ストレスが関与していると考えられている。したがって、有色マウスではチロシナーゼがMETHを直接あるいは間接的に修飾し、そのドパミン神経毒性を減弱させている、逆にalbinoマウスにおいては、チロシナーゼの欠如あるいはそれに伴う変化がMETHによるドパミン神経毒性を増悪させているという可能性が考えられた。

本検討により、METHのドパミン神経毒性に明らかな系差があり、albinoマウスがMETHに対して感受性であり、有色マウスが明らかに抵抗性であることを確認できた。これにより、チロシナーゼあるいはその関連分子がMETHによるドパミン神経毒性を修飾している可能性が考えられた。ドパミンおよびチロシナーゼを豊富に有するカテコールアミン系培養神経細胞CATH.a細胞を用いた検討で、チロシナーゼ抑制によりMETHの細胞毒性が相乗的に増悪することが明らかになった。したがって、チロシナーゼがMETHの細胞毒性を減弱することが明らかになった。しかし、チロシナーゼは脳内では発現量が低いあるいはほとんど無いとの報告もあり、METHはむしろ末梢においてチロシナーゼにより修飾されていることも考えられた。そこで、あらかじめチロシナーゼとincubateしたMETHをalbinoマウスに投与し、神経毒性の変化を検討したところ、チロシナーゼ処理を行ったMETHを投与した群では、METH単独投与群でみられる線条体ドパミントランスポーターの脱落が有意に軽減されていた。さらに、チロシナーゼによるMETH分子への直接修飾の可能性について、薄層クロマトグラ

フィーで検討したところ、METH分子が直接チロシナーゼにより修飾を受ける可能性が示された。以上の結果から、METHは末梢においてチロシナーゼにより修飾され、そのドパミン神経毒性が減弱されるということを明らかにできた。

E. 結論

メラニン合成酵素チロシナーゼあるいはその関連分子は末梢においてMETHに何らかの修飾を加え、METHによるドパミン神経毒性を減弱させる可能性があることを明らかにした。

〔参考文献〕

- 1) Kita, T., Paku, S., Takahashi, M., Kubo, K., Wagner, G.C. and Nakashima, T.: Methamphetamine-induced neurotoxicity in BALB/c, DBA/2N and C57BL/6N mice. *Neuropharmacology* 37: 1177-1184, 1998.
- 2) Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Inhibition of tyrosinase reduces cell viability in Catecholaminergic neuronal cells. *J. Neurochem.* 75: 1771-1774, 2000.
- 3) 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.
- 4) Haque, M.E., Asanuma, M., Higashi, Y., Miyazaki, I., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase protects neuroblastoma cells against dopamine cytotoxicity accompanied by increase in their glutathione level. *Neurosci. Res.*, 47: 31-37, 2003.
- 5) 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.*, 5: 165-176, 2003.

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.
- ② Haque, M.E., Asanuma, M., Higashi, Y., Miyazaki, I., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase protects neuroblastoma cells against dopamine cytotoxicity accompanied by increase in their glutathione level. *Neurosci. Res.*, 47: 31-37, 2003.
- ③ Asanuma, M., Tsuji, T., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Methamphetamine-induced neurotoxicity in mouse brain is attenuated by ketoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Neurosci. Lett.*, 352: 13-16, 2003.
- ④ Kakishita, M., Nakamura, K., Asanuma, M., Morita, H., Saito, H., Kusano, K., Nakamura, Y., Emori, T., Matsubara, H., Sugaya, T., Ogawa, N. and Ohe, T.: Direct evidence for increased hydroxyl radicals in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through angiotensin II type 1a receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 42 (suppl. 1): S67-70, 2003.
- ⑤ Diaz-Corrales, F.J., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Rotenone induces disassembly of the Golgi apparatus in the rat dopaminergic neuroblastoma B65 cell line. *Neurosci. Lett.*, 354: 59-63, 2004.
- ⑥ Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Expression of metallothionein-III and cell death in differentiated catecholaminergic neuronal cells. *Neurol. Res.*, in press.
- ⑦ 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.

- ⑧ 浅沼幹人, 宮崎育子, M. Emdadul Haque, 東 洋一郎, 小川紀雄: ドパミンおよびその誘導体のキノン体生成を介したアポトーシス誘導性. *Prog. Med.*, 23: 2736-2741, 2003.
- ⑨ 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.*, 5: 165-176, 2003.
- ⑩ 浅沼幹人, 宮崎育子, 辻 武史, 小川紀雄: 非ステロイド性消炎鎮痛薬の神経保護作用の新展開. *日本神経精神薬理学会雑誌*, 23: 111-119, 2003.

2. 学会発表等

- ① 浅沼幹人, 宮崎育子, M. Emdadul Haque, 東 洋一郎, 小川紀雄: ドパミンおよびその誘導体のキノン体生成を介したアポトーシス誘導性. 第11回カテコールアミンと神経疾患研究会, 2003, 4.
- ② 浅沼幹人, 東 洋一郎, 宮崎育子, 服部信孝, 水野美邦, 小川紀雄: マンガン誘発ドパミン神経毒性におけるパーキン蛋白の関与. 第44回日本神経学会総会, 2003, 5.
- ③ 浅沼幹人: ソニサミドのグルタチオン増加作用は過剰 L-DOPA による神経障害に有効か? シンポジウム1「ソニサミド: 新しい抗パーキンソン病薬?」, 第18回大脳基底核研究会, 2003, 6.
- ④ 浅沼幹人, 東 洋一郎, 宮崎育子, 服部信孝, 水野美邦, 小川紀雄: Involvement of parkin protein in manganese-induced ER stress in dopaminergic cells. 第26回日本神経科学大会, 2003, 7.
- ⑤ 宮崎育子, M. Emdadul Haque, 浅沼幹人, 小川紀雄: Possible involvement of tyrosinase in methamphetamine-induced dopaminergic toxicity. 第26回日本神経科

- 学大会, 2003, 7.
- ⑥ Asanuma, M., Miyazaki, I., Higashi, Y., Tsuji, T. and Ogawa, N.: Specific gene expression and possible involvement of inflammation in methamphetamine-induced neurotoxicity. International Society For Neurochemistry (ISN) /Asian Pacific Society For Neurochemistry (APSN) Sponsored Satellite Meeting. Current Status of Dependence/Abuse Studies: Cellular and Molecular Mechanisms of Drugs of Abuse and Neurotoxicity, 2003, 8.
- ⑦ 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: パーキンソン病モデル線条体へのメラニン合成酵素チロシナーゼ産生細胞の移植. 第46回日本神経化学会, 2003, 9.
- ⑧ 宮崎育子, 浅沼幹人, 小川紀雄: 線条体アストロサイトにおけるドパミンレセプターの発現. 第46回日本神経化学会, 2003, 9.
- ⑨ 辻 武史, 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: メタン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 - II -. 第33回日本神経精神薬理学会年会, 2003, 10.
- ⑩ 宮崎育子, 浅沼幹人, 東 洋一郎, 服部信孝, 水野美邦, 小川紀雄: マンガン誘発神経毒性におけるパーキン蛋白のドパミン神経特異的な関与. 第33回日本神経精神薬理学会年会, 2003, 10.
- ⑪ F. Diaz, 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: Rotenone induce fragmentation of Golgi apparatus in dopaminergic neuroblastoma cell line. 第33回日本神経精神薬理学会年会, 2003, 10.
- ⑫ 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: メタロチオネインとパーキンソン病, 老化. メタロチオネイン2003, シンポジウム II メタロチオネインの臨床, 2003, 11.

メタンフェタミン反復投与後の側坐核ニューロン活動調節変化 におけるセロトニン神経系の関与

分担研究者：石原 熊寿¹

研究協力者：木村 丈司¹、笹 征史²

(¹ 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治療薬効学研究室、² 渚病院)

【研究要旨】

側坐核におけるセロトニン性調節が塩酸メタンフェタミン (MAP) の反復 (5 日間) 投与により影響を受けるか否かについてラットを用い電気生理学的検討を行った。Wistar 系雄性ラットに MAP (5 mg/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)。側坐核領域を含むスライスにおいて集合活動電位を記録した。側坐核の集合活動電位に対して、ドパミン (100 nM) およびセロトニン (10 nM) は抑制作用を示した。MAP 反復投与後のラットにおいて、ドパミンによる抑制は投与中止 24 時間後においては減弱する傾向が見られ、5 日後においては増強された。一方、セロトニンによる抑制作用は最終投与 24 時間後においては MAP 群と Control 群の間に差はなかったが、5 日後においてはセロトニンによる抑制が MAP 群において消失した。側坐核におけるセロトニン性調節はそのグルタミン酸性シナプス活動を抑制するように作用することが示された。このセロトニンによる抑制作用はドパミンによる抑制作用とは異なる影響を MAP 反復投与により受けることが明らかとなった。最終投与 5 日後における側坐核でのセロトニン性抑制の消失は側坐核におけるシナプス伝達の増強を意味しており、精神依存発現におけるセロトニン神経機能の変化の役割が示唆された。

A. 目的

覚せい剤の連用後にみられるフラッシュバックや逆耐性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。我々はこれまで、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。ラットにおいて、塩酸メタンフェタミン (MAP) を反復 (5 日間) 投与した場合、投与中止 5 日後には側坐核ニューロンおよび腹側被蓋野ドパミンニューロンのドパミン受容体の感受性が亢進することが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示されている^{1,2}。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ことが明らかになっている³。

昨年度、海馬において側坐核ニューロンに対するドパミンの作用と同様の時間経過でセロトニン性神経調節が MAP 反復処置により影響を受けることを報告した⁴。この海馬でのセロトニン性調節の変化は MAP 投与後に見られる学習障害に関与している可能性が考えられる⁵。今回は、精神依存に深く関与する脳部位であるとされる側坐核におけるセロトニン性調節が MAP 反復投与により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。

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 5-7 週令になるように MAP (5 mg/kg, 大日本製薬) あるいは生理食塩水を腹腔内投与した (MAP 群および

日後に電気生理学的実験を行った。側坐核スライス作成法および集合活動電位記録解析法は Pennartz らの報告⁶を参考に、当研究室にて従来より海馬スライスを用いて行っている方法を改変して用いた⁷。

エーテル麻酔下に断頭し、脳を摘出し、直ちに氷冷した Ca^{2+} を含まない人工脳脊髄液 (Ca-free ACSF) 中で正中で 2 分割した。両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 400 μm の側坐核を含む矢状断スライス (側坐核スライス) を作成した。作成したスライスは 34 $^{\circ}C$ 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 113 mM, KCl 3 mM, NaH_2PO_4 1 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, Glucose 11 mM。Ca-free ACSF の場合は $CaCl_2$ を含まず、 $MgCl_2$ を 5mM とした。いずれの ACSF も常に 95% O_2 +5% CO_2 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 2.0-2.5 ml/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 $^{\circ}C$ (± 1.5 $^{\circ}C$) に加温した。双極刺激電極を側坐核内の吻側に刺入し、局所刺激を行った (Fig. 1A)。集合活動電位は

ACSF を充填したガラス微小電極 (抵抗 2-8 M Ω) を刺激電極から 300-800 μm 離して刺入し、細胞外記録法にて記録した (Fig. 1A)。刺激は 5 分毎に 0.2Hz の頻度で 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およびコンピューターに記録した。刺激は持続 0.1 msec の矩形波電流で、強度はそれぞれのスライスにおいて 10 V 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。側坐核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ことを確認した後、ドパミンおよびセロトニン系薬物などの作用を検討した。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 20 分まで記録した。薬物としてセロトニン (5-hydroxytryptamine creatinine sulfate complex, Sigma), および 5-HT_{1A} 受容体選択的アゴニストの (R)-(+)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin HBr (8-OH-DPAT, Tocris) およびドパミン (塩酸ドパミン, Wako), グルタミン酸受容体 (non-NMDA 型) アンタゴニストの 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium (CNQX, Tocris)⁸ 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 (すなわちコンピューターに記録

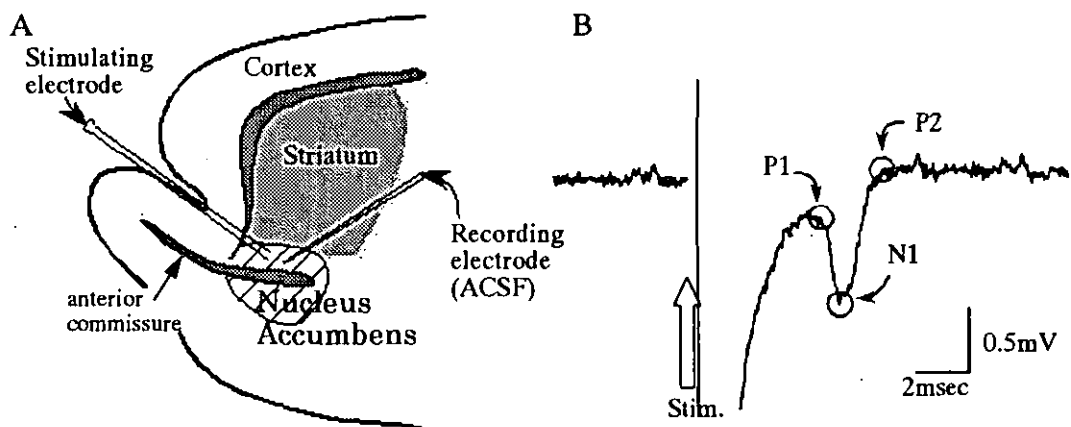


Fig.1 Slice of nucleus accumbens (A) and population spikes in nucleus accumbens (B).

された陰性のピーク前後の陽性ピーク(P1 および P2の平均と陰性ピークN1の差を計算)にて測定し、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

側坐核において記録した集合活動電位は ACSF を low-Ca ACSF (Ca^{2+} 0.2 mM, Mg^{2+} 10 mM) に置換すると消失した。また、Non-NMDA 型グルタミン酸受容体アンタゴニストの CNQX により抑制された (Fig. 2)。

集合活動電位に対して、ドパミン(100 μM)およびセロトニン(10 μM)は抑制作用を示したが、ド

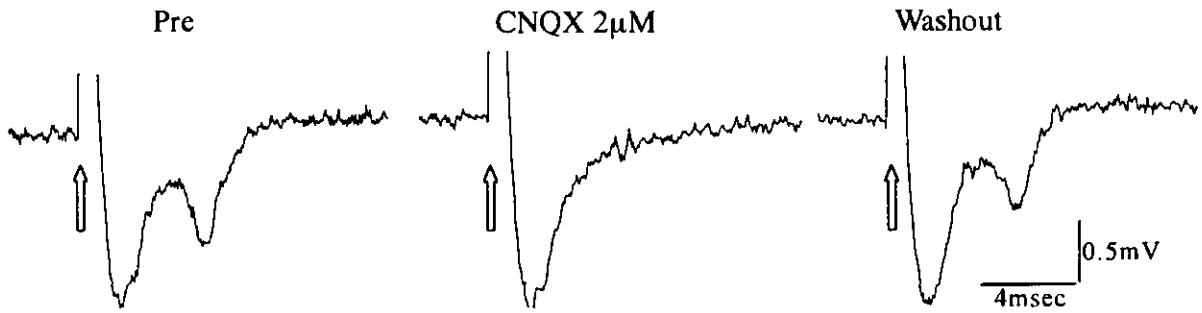


Fig.2 A non-NMDA type glutamate receptor antagonist, CNQX, blocked induction of population spikes in nucleus accumbens.

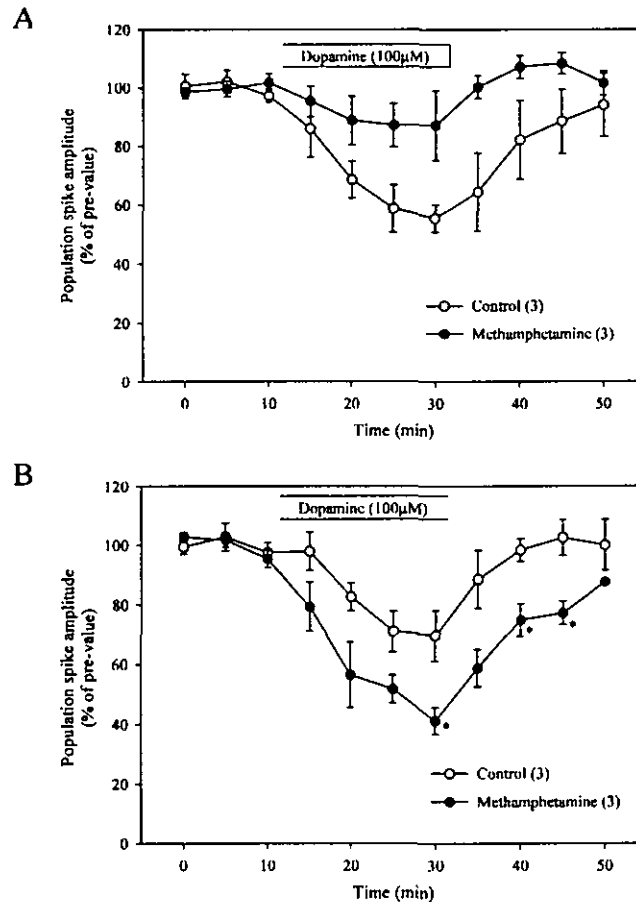


Fig.3 Effects of dopamine on population spikes in nucleus accumbens 24hrs (A) and 5days (B) after final injection of saline (control) or methamphetamine. * $P < 0.05$ vs. control.

パミン 10 μM およびセロトニン 1 μM はほとんど 抑制作用を示さなかった。

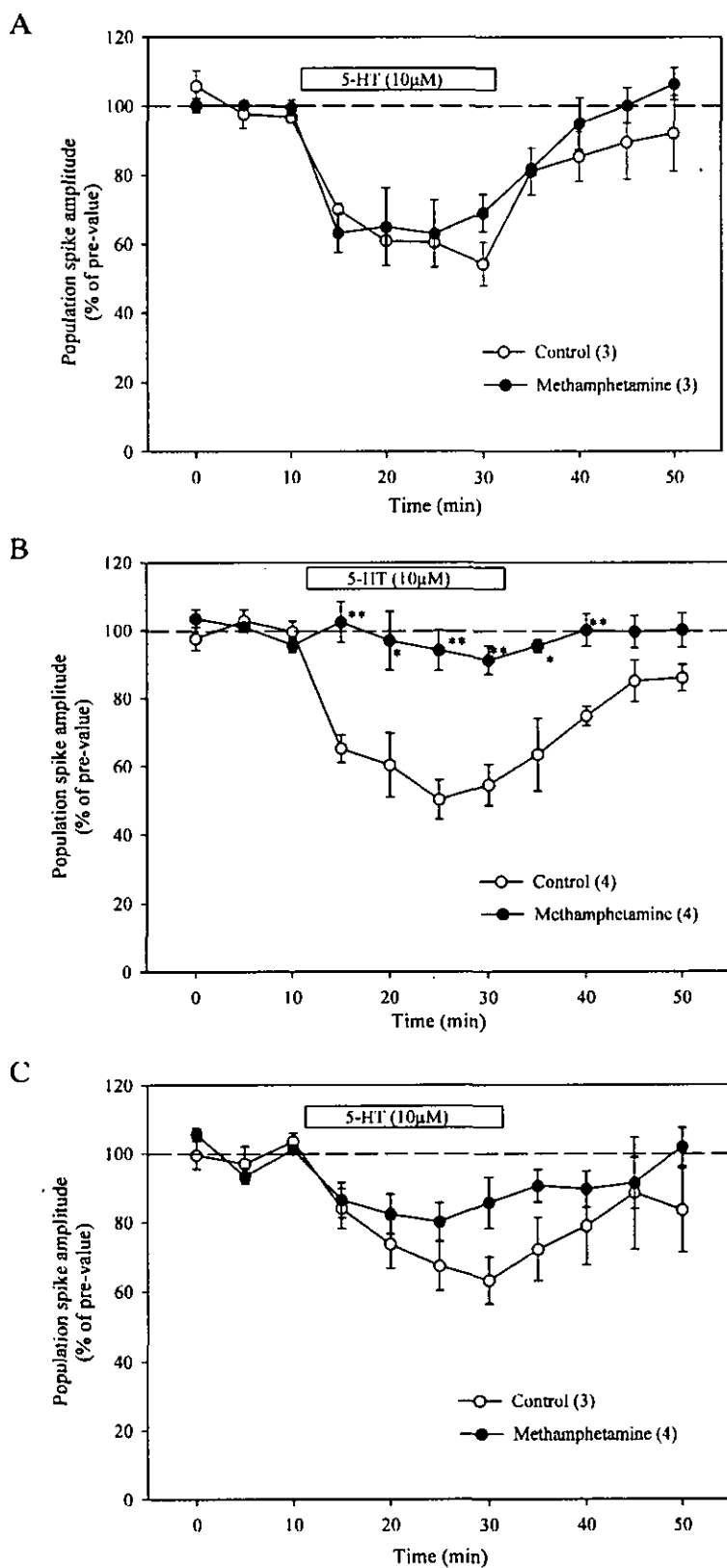


Fig.4 Effects of 5-HT on population spikes in nucleus accumbens 24 hrs (A), 5 (B) and 10 (C) days after final injection of saline (control) or methamphetamine. *P<0.05, **P<0.01 vs. control.

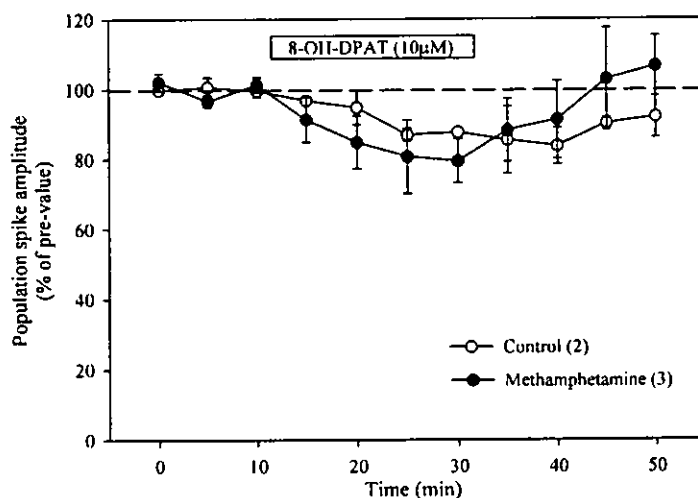


Fig.5 Effects of 8-OH-DPAT on population spikes in nucleus accumbens 5 days after final injection of saline (control) or methamphetamine.

連続投与中止 24 時間後においては Control 群では約 40%の抑制がドパミンにより誘発されたのに対して、MAP 反復投与後のラットではドパミンによる抑制は約 10%であり、ドパミンの抑制作用は減弱する傾向が見られた (Fig. 3A)。一方、投与中止 5 日後においては Control 群ではドパミンにより約 30%の抑制が観察されたのに対し、MAP 群では約 50%の抑制が観察され、ドパミンによる抑制は有意に増強された (Fig. 3B)。

一方、セロトニンによる抑制作用は最終投与 24 時間後においては MAP 群と Control 群ともに約 40%の抑制が観察され、両群間に差は見られなかった (Fig. 4A)。しかし、5 日後においては Control 群では約 40%の抑制が観察されたのに対し、MAP 群では抑制は 10%までであり、セロトニンによる抑制が MAP 群において消失していた (Fig. 4B)。投与中止 10 日後にはセロトニンによる抑制は Control 群で約 30-40%であり、MAP 群で約 20%であり、MAP 群でのセロトニンの作用が弱い傾向が観察されたが、統計的な有意差は認められなかった (Fig. 4C)。

この 5 日後のセロトニン抑制作用消失に関与する受容体サブタイプを明らかにするため 5-HT_{1A} 受容体を選択性の高いアゴニストの 8-OH-DPAT (10 μM) の作用を検討した。

8-OH-DPAT は Control 群および MAP 群ともに約 10-20%の抑制を誘発し、両群間において抑制作用に差は認められなかった (Fig. 5)。

D. 考察

側坐核スライスにおいて記録された集合活動電位は ACSF の Ca²⁺濃度を低下させることにより消失したことからシナプスを介したものであり、逆行性にニューロンを興奮させた反応ではないことが示された。記録された集合活動電位を引き起こしているシナプスの伝達物質はグルタミン酸であり、non-NMDA 型受容体を介するものであることが示された。側坐核は腹側被蓋野のドパミンニューロンの入力に加えて、前頭皮質、海馬や扁桃核からの興奮性入力、おそらくグルタミン酸性シナプス入力、を受けている⁹。今回の研究では側坐核内の局所刺激であるので、どの部位からの入力かは断定できないが、これらのグルタミン酸性シナプス伝達を記録したものと考えられる。

側坐核スライスで記録された集合活動電位が外的に投与したドパミンによって抑制されたことはこれまでの *in vivo* および *in vitro* でのニューロン活動記録における抑制作用と一致する^{1, 2, 10}。また、これまでの *in vivo* の研究で MAP 反復投与後約 24 時間で見られたドパミンの抑制作用の

減弱¹が、今回のスライス標本での実験でも観察されたことから、*in vivo* で見られた変化は MAP の残存やその残存効果によるシナプス領域のドパミン量の増加によるものではなく受容体以降での変化であることが示唆された。加えて、5 日後のドパミン抑制作用の増強は単一ニューロンでの結果と一致するものであり、MAP 反復投与後には側坐核ニューロン活動に対するドパミンの抑制作用が一過性に増強されることが今回の結果からも示された。

さらに、セロトニンによって側坐核の集合活動電位が抑制されたことから、側坐核におけるセロトニン性調節はそのグルタミン酸性シナプス活動を抑制するように作用することが示された。このセロトニンによる抑制作用は MAP 投与中止後 24 時間目ではその作用に変化が見られなかったが、5 日目にはその抑制作用がほぼ消失した。このことはセロトニン性調節が投与中止直後ではなく、しばらく経ってから変化が現れることを示している。この変化はドパミンによる抑制作用とは異なる影響を MAP 反復投与により受けることを示している。このようなドパミンとセロトニン系調節機構に対する覚せい剤の影響の差はトランスポーターについても報告されている¹¹。また、アンフェタミン類似物質の methylendioxyamphetamine (MDMA) の投与によっても側坐核のニューロン活動が抑制されるが、この作用にはドパミンとセロトニン神経系の両方が関与していることが示されている¹²。

このセロトニン性抑制の投与後 5 日目の消失に関与する受容体サブタイプの検討にとりかかったが、海馬 CA1 野での抑制作用の大部分を担うと考えられる 5-HT_{1A} 受容体について^{13, 14}、選択的アゴニストの 8-OH-DPAT を用いて検討したところ、海馬での研究で使用した濃度よりも 10 倍高い濃度においても集合活動電位の抑制が 10–20% 程度であった。しかしながら、このわずかな抑制に関しても Control 群と MAP 群の間においてその作用に差は見られなかったことから、5-HT_{1A} 受容体の変化の可能性は低いと考えられる。側坐核では 5-HT_{1A} 受容体の活性化によりその活動が抑制的に調節されることが報告され

ているが¹⁵、5-HT_{1A} 受容体サブタイプの発現量そのものはあまり多くないことも示されている¹⁶。5-HT_{1A} アゴニストの 8-OH-DPAT のさらに高濃度 (100 μM) を用いて Control 群で十分な抑制が発現することを確認して、追加の検討が必要であると考えられる。また、他のサブタイプとしては 5-HT_{1B} 受容体がシナプス前性に側坐核の活動を抑制的に調節することも報告されていること¹⁷、加えて側坐核では促進的な機能を持つとされるサブタイプである 5-HT₄ 受容体の発現が多くみられること¹⁸ から 5-HT_{1B} 受容体や 5-HT₄ 受容体機能の変化の検討も必要であると考えられる。5-HT_{1B} 受容体機能の変化と依存との関係については 5-HT_{1B} 受容体ノックアウトマウスにおいてコカインに対する脆弱性が亢進する事が示されている¹⁹。一方、5-HT₄ 受容体は海馬での昨年度の研究でその機能変化が MAP 反復投与後に引き起こされることを発見している⁴ ので、側坐核での変化についても興味もたれる。

加えて、5-HT₃ 受容体はセロトニン受容体の中で唯一イオンチャネル型であり、海馬 CA1 野では GABA の遊離を促進してニューロン活動を抑制する方向に働いている²⁰。この 5-HT₃ 受容体がドパミン性神経伝達を介した行動変化に影響を与えることが報告されているが²¹、この作用には側坐核に投射するドパミンニューロンの起核である腹側被蓋野における作用が関与するとされる報告がされている²²。腹側被蓋野のドパミンニューロンのドパミンに対する感受性亢進も MAP 投与後 5 日目に引き起こされることが示されていること² から、この腹側被蓋野でのセロトニン性調節も MAP 反復投与により影響を受ける可能性が考えられる。

また、セロトニンの投与により、側坐核でのドパミン遊離が促進されることが示されており²³、側坐核におけるドパミン系調節とセロトニン系調節の相互関係についても検討を加える必要がある。

側坐核におけるセロトニン性抑制の消失の生理的意義については更なる検討が必要であるが、MAP が側坐核内グルタミン酸遊離増加作用を示すことが報告されている²⁴。このことと今回の成績を考え合わせると、MAP 投与中止後にはセロ

トニンによる抑制消失による脱抑制が側坐核のシナプス伝達に起こり、その神経伝達が促進されることが考えられる。このシナプス伝達の変化が精神依存や逆耐性現象の発症に関与する可能性が考えられる。加えて覚醒剤投与後には不安・焦燥などの症状が発現することがあるがセロトニン機能の変化はこの症状発現にも関与している可能性が考えられる。また、覚せい剤連用中止後にうつ症状に類似の行動が認められることがげっ歯類で最近報告され²⁵、うつ病のモデルとしての可能性が示されている²⁶。この症状の発現にもMAP連用後のセロトニン系神経機能の変化が関与することが考えられる。

E. 結論

今回示された、最終投与5日後における側坐核でのセロトニン性抑制の消失は側坐核におけるシナプス伝達の増強を意味しており、精神依存発現におけるセロトニン神経機能の変化の役割が示唆される。また、セロトニン作用の減弱はMAP連用時にみられる不安、焦燥などやMAP中止後の抑うつ様症状を引き起こす要因のひとつである可能性が考えられる。

【参考文献】

1. 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).
2. Amano, T., Matsubayashi, H., Seki, T., Sasa, M. and Sakai, N. Repeated administration of methamphetamine causes hypersensitivity of D2 receptor in rat ventral tegmental area. *Neurosci Lett.* 347, 89-92. (2003).
3. 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).
4. Kimura, T., Ishihara, K., Ozawa, K. and Sasa, M. Augmentation of serotonin-induced inhibition of neuronal activity in the hippocampus following repeated treatment with methamphetamine. *Ann. NY Acad. Sci.* in press.
5. Schroder, N., O'Dell, S. J. and Marshall, J. F. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 49, 89-96. (2003).
6. Pennartz, C. M. A., Boeijinga, P. H. and Lopes da Silva, F. H. Locally evoked potentials in slices of the rat nucleus accumbens: NMDA and non-NMDA receptor mediated components and modulation by GABA. *Brain Res.* 529, 30-41. (1990).
7. Akbar, M., Ishihara, K., Sasa, M. and Misu, Y. Inhibition by L-3,4-dihydroxyphenylalanine of hippocampal CA1 neurons with facilitation of noradrenaline and g-aminobutylic acid release. *Eur. J. Pharmacol.* 414, 197-203. (2001).
8. Honore, T., Davies, S. N., Drejer, J., Fletcher, E. J., Jacobsen, P. Lodge, D. and Nielsen F. E. Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science* 241, 701-703. (1988).
9. O'Donnell, P., Greene, J., Pabello, N., Lewis, B. L. and Grace, A. A. Modulation of cell firing in the nucleus accumbens. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 877, 157-175. (1999).
10. Buckby, L.E. and Lacey, M.G. Depression of excitatory cortico-nucleus accumbens synaptic transmission in rat brain slices by dopamine, but not adenosine, depends upon intracortical mechanisms. *Exp. Brain Res.* 141, 560-566. (2001).
11. 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).
12. Obradovic, T., Imel, K. M. and White, S. R. Methylendioxyamphetamine-induced inhibition of neuronal firing in the nucleus accumbens is mediated by both serotonin and dopamine. *Neurosci.* 74, 469-481. (1996).
 13. Andrade, R. Regulation of membrane excitability in the central nervous system by serotonin receptor subtypes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 861, 190-203. (1998).
 14. 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).
 15. Nagaoka, I., Sasa, M. and Yamawaki, S. 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of nucleus accumbens neurons activated by stimulation of parafascicular nucleus of thalamus. *Psychopharmacol.* 135, 230-235. (1998).
 16. Khawaja, X. Quantitative autoradiographic characterization of the binding of [³H]WAY-100635, a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Brain Res.* 673, 217-225. (1995).
 17. Muramatsu, M., Lapiz, M. D., Tanaka, E. and Grenhoff, J. Serotonin inhibits synaptic glutamate currents in rat nucleus accumbens neurons via presynaptic 5-HT_{1B} receptors. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2371-2379. (1998).
 18. Jakeman, L. B., To, Z. P., Eglen, R. M., Wong, E. H. and Bonhaus, D.W. Quantitative autoradiography of 5-HT₄ receptors in brains of three species using two structurally distinct radioligands, [³H]GR113808 and [³H]BIMU-1. *Neuropharmacol.* 33, 1027-1038. (1994).
 19. Roca, B. A., Scarce, L. K., Lucas, J. J., Hiroi, N., Castanon, N., Crabbe, J. C., Nestler, E. J. and Hen, R.: Increased vulnerability to cocaine in mice lacking the serotonin-1B receptor. *Nature* 393, 175-178. (1998).
 20. Ishihara, K. and Sasa, M. Potentiation of 5-HT₃ receptor functions in the hippocampal CA1 region of rats following repeated electroconvulsive shock treatment. *Neurosci. Lett.* 307, 37-40. (2001).
 21. Fletcher, P. J. and Higgins, G. A. Differential effects of ondansetron and a -flupenthixol on responding for conditioned reward. *Psychopharmacology* 134, 64-72. (1997).
 22. Gillies, D. M., Mylecharane, E. J. and Jackson, D. M. Effects of 5-HT₃ receptor-selective agents on locomotor activity in rats following injection into the nucleus accumbens and the ventral tegmental area. *Eur. J. Pharmacol.* 303, 1-12. (1996).
 23. Parsons, L. H. and Justice Jr., J. B. Perfusate serotonin increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 606, 195-199. (1993).
 24. Xue, C. J., Ng, J. P., Li, Y. and Wolf, M. E. Acute and repeated systemic amphetamine administration: effects on extracellular glutamate, aspartate, and serine levels in rat ventral tegmental area and nucleus accumbens. *J. Neurochem.* 67, 352-363. (1996).
 25. Cryan, J. F., Hoyer, D. and Markou, A. Withdrawal from chronic amphetamine induces depressive-like behavioral effects in rodents. *Biol. Psychiatry* 54, 49-58. (2003).
 26. Barr, A. M., Markou, A. and Phillips, A. G. A 'crash' course on psychostimulant withdrawal as a model of depression. *Trends in Pharmacol. Sci.* 23, 475-482. (2002).

覚醒剤神経毒性モデルにおける覚醒剤脳移行性の経時的変化に関する検討

分担研究者： 長谷川 高明

共同研究者： 高木 健三、高木 健次、伊藤佑希子、青山 渚、福田昌也、北市清幸
(名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻)

〔研究要旨〕

これまでに我々は規制薬物の薬物依存形成と薬物体内動態の関係を明らかにすることを目的としてメタンフェタミン(METH)を用いて様々な検討を行ってきた。昨年度の報告で我々はMETHを短期間に反復投与して作成するMETH神経毒性モデル作成中のMAP体内動態はMETHの組織移行性の低下に伴い変化することを報告してきた。今回はこの神経毒性モデル作成後のMETH体内動態および脳移行性について検討を行った。

METH神経毒性モデルは常法に基づき、METH(3 mg/kg)を2時間おきに4回投与することによって作成した。モデル作成より1週間後あるいは1ヵ月後にMETH(5 mg/kg)を投与して、その血漿中濃度-時間推移、脳組織間隙内濃度-時間推移を検討した。その結果、METH血漿中濃度には影響が見られなかったものの、METH脳組織間隙内濃度は対照群に比して有意に上昇することが明らかになった。

我々はMETH脳組織移行が神経毒性モデル作成中に著明に低下することを先に報告している。そこで先の検討と同様にモデル作成より1週間後あるいは1ヵ月後のMETH脳組織移行性についても検討を行った。その結果、モデル作成1週間後ではモデル作成中と同程度の著明なMETH脳組織移行低下が観察されること、1ヵ月後にはMETH脳組織移行が若干回復するものの以前、コントロールレベルには復さないことが明らかになった。したがって、長期的に持続するMETH脳組織移行の低下はMETH脳組織間隙内濃度の上昇に一部関与していることが示唆された。

次に、METHの脳組織間隙内からの除去に重要であるOCT3の発現についても検討を行った。その結果、OCT3の発現はモデル作成より1週間後あるいは1ヵ月後のいずれにおいても有意に低下していることが明らかになった。したがって、このOCT3発現の長期的な低下もまたMETH脳組織間隙内濃度の上昇に一部関与している可能性が示唆された。

以上の結果より、METH神経毒性モデル作成後においてもMETHの体内挙動には変化があることが明らかになった。METHによるこのようなMETH生体内挙動変化と依存形成の関連、METH生体内挙動の変化を防止する薬剤の探索と、その効果の確認を行うことが今後の課題となった。

A. 目的

覚醒剤依存は大きな社会問題となっている。しかしながら、そのメカニズムの本質は明らかではない。我々はこれまでに覚醒剤メタン

フェタミン(METH)を用い、覚醒剤依存のメカニズムを解析する目的で、覚醒剤を連用したときに行動変化が生じる2種の依存症動物モデル、METH逆耐性モデルおよびMETH神経毒性モデルを用い、METHの体内動態および脳移行性の変化を指標にした実験を行ってきた。

その結果、我々は、METH 逆耐性モデル¹⁾および METH 神経毒性モデル形成時のいずれにおいても相違点はあるものの、METH の血中濃度-時間推移に変化が生じることを明らかにした。また、我々はこれまでに METH 逆耐性モデルにおいては METH の脳移行性が上昇することもすでに明らかにしている¹⁾。

しかしながら、METH 神経毒性モデル形成後における METH 体内動態および脳移行性の変化については検討を行っておらず、既報においても検討はなされていない。

なお、METH 神経毒性モデル形成後の行動評価や毒性評価では、モデル作成後の様々な時期で評価を行う²⁾。例えば、最も古くから用いられている METH 神経毒性の指標である脳内モノアミン含量の低下はモデル作成後1週間から数ヶ月まで持続することから、この間の様々な時期を用いて実験が行われる³⁾。また、METH によるアポトーシス様作用は数時間から3日あるいは1週間で観察されることから、この間の様々な時期を用いて実験が行われる⁴⁾。一方で、METH の標的分子であるドパミントランスポーター (DAT) に関しては少なくともモデル作成後1週間までは METH 依存患者⁵⁾と同様に⁶⁾線条体における DAT 結合能が低下することが報告されている⁷⁾。

そこで本研究では METH 神経毒性モデル作成から、1週間後あるいは1ヵ月後の動物を用い、METH 神経毒性形成後の METH 体内動態および脳移行性について経時的変化について検討を行った。

B. 方法

1. 試薬

塩酸メタンフェタミン (METH)は大日本製薬製、 β -フェニルエチルアミン (PEA)、(+)-MK-801 (MK) およびハロペリドール (HAL)

は Sigma 社製、ダンシルクロライド (DNS)は Merck 社製をそれぞれ使用した。その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した。

2. 動物

日本 SLC で購入した Wistar 系雄性ラット (体重 260-300 g) を使用した。動物は温度 (22 - 24 °C)、湿度 (55 ± 5 %) の条件下で自由摂取、自由給水のもと少なくとも3日間飼育したものを使用した。

3. METH 神経毒性モデルの作成

METH 神経毒性モデルの作成は常法に従い²⁾、ラットに METH (3 または 5 mg/kg) を2時間おきに4回投与することにより作成した。また、神経毒性モデルはモデル作成より7日後あるいは1ヵ月後の動物を使用した。なお、今回、データには示さないが、METH 神経毒性モデルではコントロール群に比して線条体ドパミン含量の有意な低下が起きることを観察している。

3. 手術

METH 注入および血液採取のための静脈へのカニューレシオンおよび脳組織内薬物濃度測定のためのダイアリスプローブの埋め込みはすべてペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下で行った。すなわち、右頸静脈内にはポリエチレンチューブを、線条体 (AP +0.2 mm DV ? 4.5 mm) には Kitaichi らの方法¹⁾に基づき、線条体を水平に横切る形でダイアリスプローブ (AN69 ホローファイバー) を各側 3 mm ずつ組織を灌流するように埋め込んだ。

4. 採血およびマイクロダイアリス

モデル作成後1週間あるいは1ヵ月後に METH (5 mg/kg) を急速静注し、経時的に採血を行った。また、マイクロダイアリスプロ

ープには 5 μ l/min の流速でリングル液を還流し、実験終了まで脳透析を行った¹⁾。脳透析液および血液を遠心して得た血漿はすべて -30°C で保存し、測定に供した。なお、脳内プローブの位置は標準的な組織学的手法を用いてその部位を確認した。

5. METH 測定³⁾

METH 測定は既法に準じて行った。すなわち、血漿はその 50 μ l を取り、5% NaOH 溶液 10 μ l、内部標準物質 β -フェニルエチルアミン (0.5 μ g/ml, PEA) 含有アセトニトリル溶液 350 μ l と激しく混和し、除蛋白および METH の抽出を行った。遠心して蛋白を沈殿させた後、アセトニトリル層 300 μ l を分取し、窒素ガスにて蒸発乾固させた。乾固したサンプルに 10 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) 100 μ l、1 mM ダンシルクロライド (DNS) 含有アセトニトリル溶液 100 μ l を加え、遮光下で 45°C、1 時間反応させた。反応後、サン

プルは HPLC による METH 定量に供した。

また、組織中 METH 濃度は組織の 4-20 倍容の生理食塩水中でホモジナイズした組織懸濁液を血漿と同様に 50 μ l を取り、血漿と同様の方法で抽出・ダンシル化を行って評価した。

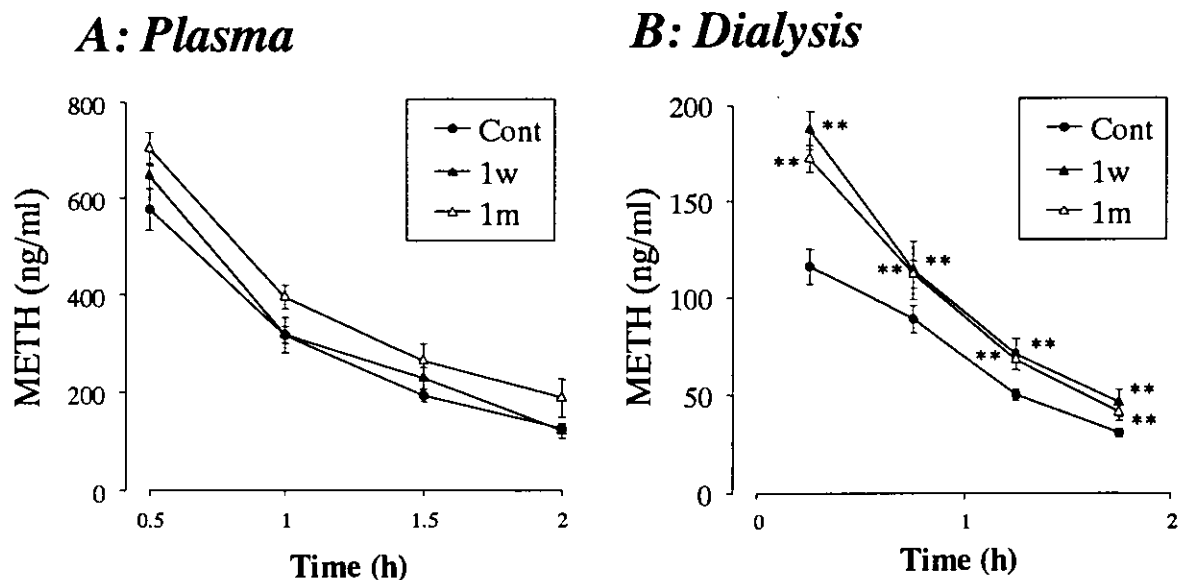
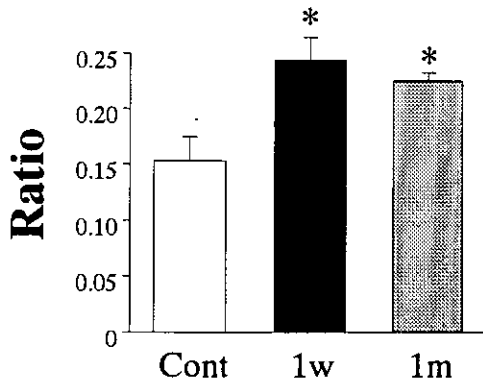


Fig. 1 Time-course effect of METH neurotoxicity on the concentration-time profile of METH in plasma (A) and brain dialysate (B).

** P < 0.01 vs. control.

AUC_{0-0.5h} Dialysis/plasma ratio



AUC_{1.5-2h} Dialysis/plasma ratio

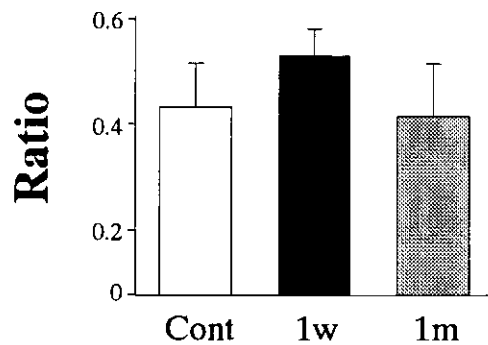


Fig. 2 Time-course effect of METH neurotoxicity on dialysis/plasma AUC ratio of METH at different time-points
** P < 0.01 vs. control.

なお、検量線には既知濃度の METH を血漿中またはリンゲル液中に添加したものを上記と同様の抽出および反応操作により METH をダンシル化したものを使用した。

DNS-METH の測定は LC-10A システム (島津) を用い、移動相には 1mM イミダゾール含有アセトニトリル-水 (66 : 33) 溶液 (pH 7.0) を用いた。蛍光検出器 (RF-530) はその波長を Ex. 343 nm、Em. 530 nm として蛍光を検出した³⁾。

8 Western blotting

OCT3 のウェスタンブロッティングは常法に基づき、脳組織ホモジネートを用いて行った。

C. 研究結果

METH 神経毒性作成後の METH 血漿中濃度および脳組織間隙内濃度についてモデル作成後 1 週間および 1 ヶ月後の動物を用いて検討を行った。

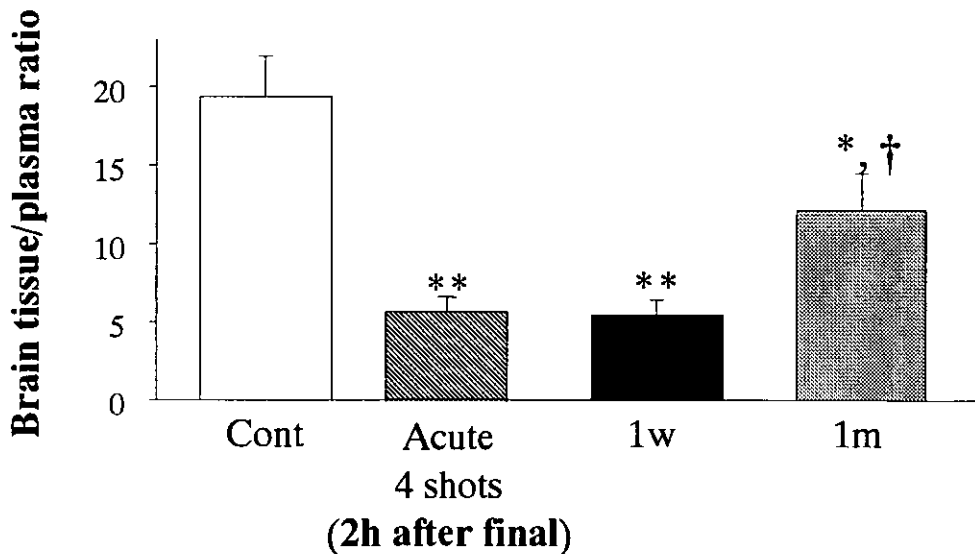


Fig. 3 Time-course effect of METH neurotoxicity on brain tissue/plasma ratio of METH. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. control. † P < 0.05 vs 1w.

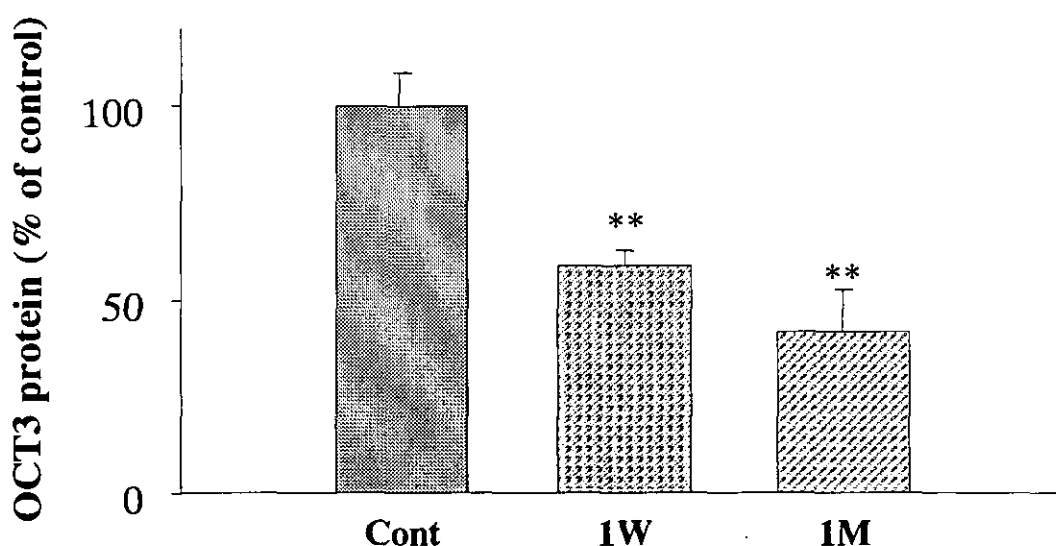


Fig. 4 Time-course effect of METH neurotoxicity on OCT3 expression in brain. ** $P < 0.01$ vs. control.

その結果、モデル作成後1週間および1ヵ月後においてMETH投与から2時間後までのMETH血漿中濃度には対照群に比して有意な差は見られないことが明らかになった(Fig. 1A)。一方、線条体におけるMETHの脳組織間隙内濃度はいずれの時間においても対照群に比して有意に高値である事が明らかになった(Fig. 1B)。

なお、METH神経毒性モデルにおけるMETHの脳組織間隙内濃度は投与直後の値のほうが、投与1-2時間後に比して差が大きかったので、さらにMETHの脳移行性を詳細に検討するためにMETHの脳組織間隙内濃度-時間曲線下面積(AUCdialysis)に対するMETHの血漿中濃度-時間面積曲線下(AUCplasma)の割合をそれぞれの時間で算出し、比較検討した。その結果、METH投与から0.5-1時間後のAUCdialysis/AUCplasmaは対照群に比して有意に高かったが、1.5-2時間後のそれには有意な差がないことが明らかになった(Fig. 2)。

次に、METHの組織移行性を検討するためにMETH脳組織内濃度とMETH血漿中濃度の比

(Kp)について検討を行った。先に、我々はMETH神経毒性モデル作成時にKpが著明に低下することを報告しているが、この低下はMETH神経毒性モデル作成1週間後でもほぼ同等であり、1ヵ月にはやや回復するが以前対照群のレベルには戻らないことが明らかになった(Fig. 3)。

次に、OCT3の発現について検討を行った。その結果、OCT3発現はMETH神経毒性モデル形成1週間後および1ヵ月後のいずれにおいても有意に低下していることが明らかになった(Fig. 4)。

D. 考察

今回、我々はMETH神経毒性モデル形成後のMETH体内動態について検討を行った。その結果、METH神経毒性モデル作成後ではMETH血漿中濃度には変化が見られないものの、METH脳組織内間隙濃度が有意に上昇することが明らかになった。

また、我々は先の報告でMETH神経毒性モデル作成時にはMETHの組織移行性が著明に