

MDMA のセロトニン放出および神経毒性発現の分子機序の解明

分担研究者 金子周司

共同研究者 中川貴之、山内陽介、鈴木祐一、樋口 萌

（京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野）

〔研究要旨〕 本研究では、MDMA などの依存性薬物によるセロトニン放出および神経毒性発現のメカニズムを分子レベルで明らかにするため、1) セロトニン神経を含む中脳冠状切片培養系を用い、各種依存性薬物の持続的処置によるセロトニン神経毒性およびセロトニン遊離に対する影響を検討するとともに、2) *Xenopus* 卵母細胞発現系を用いて、MDMA のセロトニントランスポーター（SERT）に対する影響を検討し、以下の知見を得た。

1) セロトニン神経含有中脳冠状切片培養系において、MDMA あるいはメタンフェタミン（METH）（10-1000 μM ）を6日間連続処置し、1日間の培養（休薬）後、MDMA あるいはMETH（10 μM ）で30分間 challenge したところ、培養上清中へのセロトニン（5-HT）遊離作用が濃度依存的に増強された。この現象は、MDMA およびMETH の長期処置によってセロトニン神経感作が惹起されたことを示すものであると考えられる。また、本培養中脳切片に、MDMA、METH あるいは5-MeO-DIPT（0.1-1000 μM ）を48時間処置したところ、細胞内5-HT量は、5-MeO-DIPTにより特に顕著に、またMETHによっても一部濃度依存的に減少したが、MDMAによっても有意な変化は認められなかった。また、 $[^3\text{H}]$ シタロプラムによるSERTへの結合量は、5-MeO-DIPTにより濃度依存的に減少したが、METH およびMDMAの処置によっても有意な変化は認められなかった。一方、MDMA あるいはMETHにより5-HT遊離量は濃度依存的に増加したが、5-MeO-DIPTでは5-HT遊離作用は認められなかった。このことから、5-MeO-DIPTは、MDMA やMETHとは異なり、セロトニン遊離作用は示さないものの、顕著なセロトニン神経毒性を示すことが明らかとなった。

2) SERTを発現させた*Xenopus*卵母細胞に、5-HT、ドパミン（DA）およびMDMAを処置すると、濃度依存的に基質流入に伴う内向き電流応答が認められた（5-HT>MDMA>DA>>ノルエピネフリン）。また、細胞外溶液のpHを酸性（pH7.4→pH6.4）にすることで、MDMA輸送電流の感受性は有意に増強されたが、5-HT、DAによる応答に変化は見られなかった。一方、過分極パルスに伴う Na^+ 駆動力の増加による Na^+ 漏れ電流（transient current）は、5-HT、DA およびMDMAにより濃度依存的に抑制されたが、この抑制作用はpHの変化によっても影響を受けなかった。これらの結果から、酸性条件下においては、

MDMA の SERT に対する結合能は変化しないが、SERT を介した MDMA 輸送能が増強されると考えられた。また、 $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ を取り込ませた SERT 発現卵母細胞に MDMA を適用することで逆輸送現象を再現した。この MDMA による 5-HT 逆輸送は、膜電位を -80 mV に固定した場合と比較して、 $+40\text{ mV}$ の場合有意に増強されることを明らかにした。これらの結果から、MDMA による SERT を介した 5-HT 放出作用は、細胞の静止膜電位により影響を受けることが明らかとなった。

A. 研究目的

3,4-メチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA: 通称エクスタシー) は、覚醒剤であるアンフェタミンやメタンフェタミン (METH) と類似の構造をしており、他の依存性薬物と同様に精神依存を形成させ、また精神毒性をも誘発することが知られているが、METH などとは異なり、その作用は主にセロトニン神経を介するものであるとされている。すなわち、その作用機序としては、セロトニン神経終末に存在するセロトニントランスポーター (SERT) に作用して¹³⁾、セロトニン神経終末におけるセロトニン放出促進作用および再取り込み阻害作用、セロトニン代謝酵素の一つである MAO 阻害作用などにより、シナプス間隙のセロトニン量を一過性に上昇させ^{7,9)}、その後、セロトニン合成の律速酵素である tryptophan hydroxylase (TPH) を阻害することにより、セロトニンを枯渇させることなどが知られている^{12,14)}。一方、近年、アンフェタミン、METH、あるいはコカインの反復投与による行動感作の獲得や発現が、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の fluoxetine や paroxetine、5-HT_{2A} 受容体拮抗薬によって抑制されることが報告されている^{6,10,15)}。さらに、*in vivo* マイクロダイアリシス法により、行動感作を獲得したマウスの前頭前皮質において、セロトニン遊離量が、生理食塩水反復処置群と比較して、有意に増加していることが報告された^{1,10)}。また、縫線核由来セロトニン神経と中脳皮質辺縁ドーパミン神経の相互作用も注目されている²⁾。これらの知見は、これまで着目されてきた中脳辺縁ドーパミン神経だけでなく、縫

線核を起始核とするセロトニン神経の活性化も、依存性薬物の行動感作に関与していることを示唆するものである。我々はこれまでに、細胞の分散培養系と比較してより *in vivo* に近い状態にある脳組織切片培養系を用いて、セロトニン神経の起始核である縫線核を含有する中脳冠状切片を培養することに成功している。そこで本年度は、MDMA あるいは METH の長時間処置による培養上清中へのセロトニン遊離量、および組織中におけるセロトニン含有量に対する影響を検討した。また、2005 年 4 月より麻薬指定された 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (5-MeO-DIPT) は、セロトニン受容体に対して親和性を持ち、アゴニストとして作用することが知られていたが⁴⁾、我々の昨年度の SERT を発現させた *Xenopus* 卵母細胞を用いた研究から、SERT に対しても高い親和性で作用し、少なくともセロトニン再取り込み阻害作用を有することを示してきた。そこで本年度は、縫線核セロトニン神経含有中脳切片培養系を用い、5-MeO-DIPT の急性処置によるセロトニン遊離および長期処置によるセロトニン神経毒性に対する作用を検討し、MDMA および METH の場合と比較した。

また、我々は昨年度までの検討において、*Xenopus* 卵母細胞を用いて、基質輸送に伴う Na^+ 細胞内輸送によって生じる内向き電流応答を指標として、MDMA や 5-MeO-DIPT の SERT あるいはドーパミントランスポーター (DAT) に対する作用を電気生理学的に検討してきた。一方、ラット由来の SERT を介して生じる幾つかの電流応答は、細胞外の pH によって影響を受けることが報告さ

れている³⁾。さらに、最近の報告によると、MDMAは脳エネルギー代謝や体温調節の急激な変動から、脳内における乳酸濃度を上昇させ、その結果、脳内 pH を下げる可能性があることが示唆された⁵⁾。そこで本年度は、SERT を発現させた *Xenopus* 卵母細胞を用いて、酸性条件下 (pH 6.4) における、MDMA、5-HT、ドパミン (DA) およびノルエピネフリン (NE) の基質流入に伴う内向き電流応答に対する影響を検討するとともに、過分極パルスに伴う Na⁺漏れ電流 (transient current) のそれら基質による抑制効果に対する影響を検討した。さらに、*Xenopus* 卵母細胞に [³H]5-HT を取り込ませ、MDMA を処置することにより、5-HT 逆輸送現象を再現し、膜電位変化による影響を検討した。

B. 研究方法

1. 縫線核含有中脳切片培養系の作成

生後 2-3 日齢の SD ラットを断頭後、脳を摘出し、骨膜を除去してから氷冷 HBSS 中で冷却後、slice chopper を用いて 350 μ m 厚で縫線核を含む中脳レベルで切断し、氷冷した培地中で切片を分離した。脳切片をポアサイズ 0.4 μ m の多孔質膜上 (Millicell-CM, Millipore Corporation) に置くことにより、37℃、5% CO₂/95 % O₂ 環境下気液界面で培養を行った。培養液は、切片作成の翌日およびそれ以後は 2 日毎に新鮮な 25 % horse serum 含有 MEM に変更した。縫線核含有中脳切片培養系の場合は 12-14 日間の培養後、実験に用いた。

2. 遊離セロトニン量の測定

培地をリンゲル液に交換し、15 分間のインキュベーション後、薬物を溶解したリンゲル液にさらに交換した。30 分間インキュベートした後、リンゲル液を回収し、1N HClO₄ 添加後、セロトニン量を、高速液体クロマトグラフィーにより測定した。なお、培養中脳切片中に含まれるセロトニン神経の量がスライス毎に異なるため、中脳切片培養系で得られたセロトニン遊離量に関する結果は、前

処置を開始する前日に測定した basal レベルでの 5-HIAA 遊離量で補正した。

3. 培養中脳切片中のセロトニン神経毒性の評価

セロトニン神経毒性の評価は、薬物処置後、細胞内のセロトニン含有量を測定することにより行った。すなわち、培養切片を回収後、10 mM Na₂S₂O₅、1 mM EDTA を含む 0.1N 過塩素酸中にて組織をホモジナイズ、さらにソニケーションを行い、細胞を破碎した。これを 15,000 rpm で 15 分間遠心分離し、その上清を pH 3.5 に調整後、0.22 μ m のフィルターで濾過して、可溶性画分のサンプルとした。サンプル中のセロトニン含量の測定は、高速液体クロマトグラフィーにより行った。なお、得られた結果は、前処置を開始する前日に測定した basal レベルでの 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) 遊離量で補正した。

4. cRNA 注入卵母細胞の調製

ラット由来 SERT あるいはヒト由来 DAT をコードするプラスミド DNA を制限酵素 *Sca* I によりリニアライズし、SERT に関しては SP6 RNA ポリメラーゼ、DAT に関しては T7 RNA ポリメラーゼを用いて、各々の cRNA を合成した。低温麻酔を施したアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の腹腔内より卵巣を摘出し、1 mg/ml コラゲナーゼを含む培養液中で 18℃、60 分、緩やかに振とうして、卵母細胞を覆う濾胞を除去した。Dumont 分類の V-VI 相 (直径が 1 mm 以上) のもので、動物極と植物極の境界が鮮明な卵を選択し、SERT cRNA を一卵母細胞あたり 25 ng 注入し、3-7 日培養した。

5. 電気生理学的測定

記録溶液には通常、Frog Ringer 溶液 (Na-FR) (in mM: 115 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, pH 7.4)、もしくは Ba²⁺ Frog Ringer 溶液 (in mM: 115 NaCl, 2 KCl, 2.5 BaCl₂, 2 MgCl₂, 1 EGTA,

10 HEPES, pH 7.4) を用いた。卵母細胞をチャンバーの溝に静置し、重力を利用して記録溶液を流速 1.5 ml/min で灌流した。Whole-cell 膜電流の測定は、膜電位固定用増幅器に接続された、3 M KCl を充填した 2 本のガラス電極 (抵抗: 1-2 M Ω) を細胞内に刺入し、膜電位を -80 mV に固定して行った。全ての薬物は Na-FR に溶解して灌流によって適用した。Transient current を測定するために、膜電位を -40 mV に固定した後、200 ms の +60 mV の脱分極パルスを与え、次に 800 ms の -120 mV の過分極パルスを与えたのち、-40 mV に戻す電位パルスを与えた。Transient current は +60 mV から -120 mV への電位ジャンプに対する電流応答として測定した。薬物により阻害された電流は薬物非存在下での電流応答から薬物存在下での電流応答を差し引くことで算出した。基質輸送電流および transient current 阻害の結果は全て pH 7.4 での 100 μ M 5-HT で得られた値で標準化した。Na⁺ 不含条件下では全ての Na⁺ を *N*-methyl-D-glucamine (NMDG) で置換した NMDG-FR を用い、また Na⁺ を半量置換した Na/NMDG-FR を用いた。

6. [³H]5-HT 放出実験

cRNA を注入した卵母細胞を 100 nM の [³H]5-HT (722 GBq/mmol) を加えた 10 mM 5-HT を含む Na-FR 中で 3 時間培養して [³H]5-HT を取り込ませた。氷冷した NMDG-FR で 3 回洗浄した

後、薬物を含む溶液中で 1 時間インキュベートした。上清および 2% SDS を加えて可溶化した卵母細胞を、それぞれ液体シンチレーションカウンタにより測定し、細胞外に放出された [³H]5-HT、卵母細胞内に残った [³H]5-HT を測定した。膜電位固定実験では、[³H]5-HT を取り込ませた卵母細胞に対して細胞膜電位を固定し、薬物存在下で 30 分間インキュベートすることで放出された [³H]5-HT、卵母細胞内に残った [³H]5-HT を測定した。

C. 研究結果

1. 縫線核セロトニン神経含有中脳切片培養系を用いた検討

a) MDMA および METH 長期処置による 5-HT 遊離に対する影響

縫線核セロトニン神経含有中脳冠状切片培養系に対して、MDMA (10-1000 μ M) を 30 分間処置し、細胞外に遊離される 5-HT 量を測定したところ (急性処置)、濃度依存的に 5-HT 遊離量が増加した。測定後、引き続き 10-1000 μ M の MDMA で 6 日間連続的に処置し、その後再び、10-1000 μ M の MDMA による 5-HT 遊離量を測定したところ (6 日間処置後)、濃度依存的な 5-HT 遊離作用が認められたが、その作用は、急性処置の場合と比べて、有意かつ顕著に増強されていた (Fig.1A)。その後、薬物の存在しない通常の培地に置換し培養した。1 日間の培養 (休薬) 後、10 μ M の MDMA

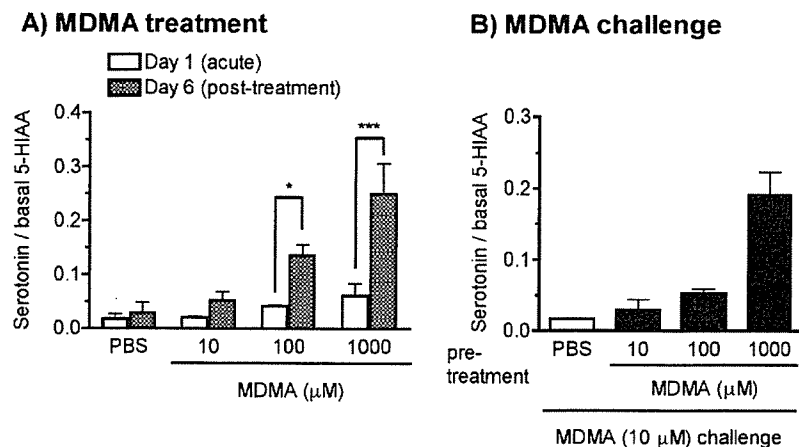
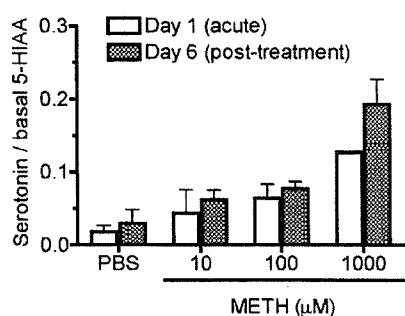


Fig.1 培養中脳切片における MDMA 連続処置によるセロトニン遊離作用の増強効果 (セロトニン神経感作)

縫線核セロトニン神経含有培養中脳切片に、MDMA (10-1000 μ M) を 6 日間処置し、その処置前 (急性処置) および処置後において、MDMA (10-1000 μ M) 30 分処置によるセロトニン遊離量を測定した (A)。さらに、1 日間の培養 (休薬) 後、全ての切片に対し、10 μ M の MDMA で 30 分間 challenge し、セロトニン遊離量を測定した (B)。セロトニン遊離量は、処置開始前日に測定した 5-HIAA 遊離量で補正した。

* P <0.05, *** P <0.01

A) METH treatment



B) METH challenge

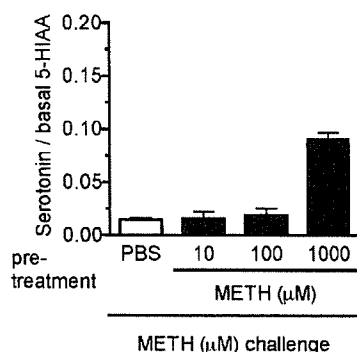


Fig.2 培養中脳切片における METH 連続処置によるセロトニン遊離作用の増強効果 (セロトニン神経感作)

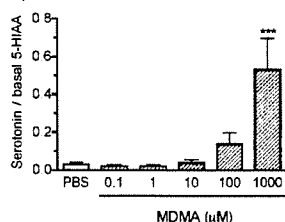
縫線核セロトニン神経含有培養中脳切片に、METH (10-1000 μM) を6日間処置し、その処置前 (急性処置) および処置後において、METH (10-1000 μM) 30分処置によるセロトニン遊離量を測定した (A)。さらに、1日間の培養 (休養) 後、全ての切片に対し、10 μM の METH で30分間 challenge し、セロトニン遊離量を測定した (B)。セロトニン遊離量は、処置開始前日に測定した 5-HIAA 遊離量で補正した。

で30分間 challenge したところ、培養上清中への5-HT 遊離作用は、6日間連続処置した MDMA の濃度依存的に増強された (Fig.1B)。同様に、METH (10-1000 μM) によっても、急性処置により濃度依存的に 5-HT 遊離量が増加した。また METH (10-1000 μM) の6日間連続処置の後に、5-HT 遊離量を測定したところ、急性処置の場合と比べて増強傾向は認められたが、その効果は MDMA の場合と比較すると弱かった。 (Fig.2A)。また、1日間の培養後、10 μM の METH で challenge したところ、5-HT 遊離作用は、1000 μM の METH 連続処置により増強された (Fig.2B)。

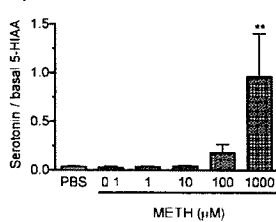
b) 5-MeO-DiPT によるセロトニン遊離およびセロトニン神経毒性に対する影響

縫線核セロトニン神経含有中脳培養切片を用いて、5-MeO-DiPT の急性処置による 5-HT 遊離に対する影響を、MDMA および METH と比較検討した。本中脳培養切片に、MDMA、METH あるいは 5-MeO-DiPT (それぞれ 0.1-1000 μM) を30分間処置し、5-HT 遊離量を測定した。その結果、MDMA および METH の処置により濃度依存的に 5-HT 遊離量が増加したが、5-MeO-DiPT の処置では 5-HT 遊離作用は全く認められなかった (Fig.3)。

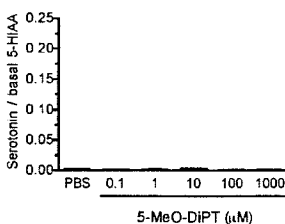
A) MDMA



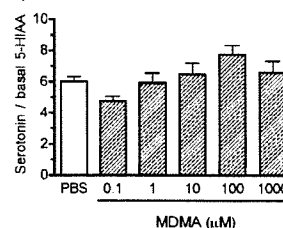
B) METH



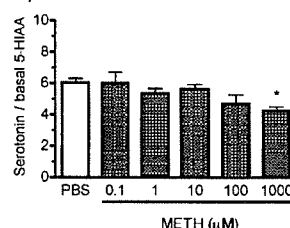
C) 5-MeO-DiPT



A) MDMA



B) METH



C) 5-MeO-DiPT

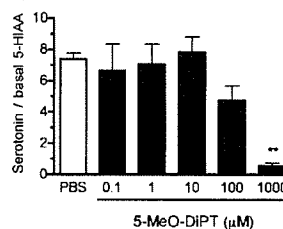


Fig.3 培養中脳切片における MDMA、METH、5-MeO-DiPT によるセロトニン遊離作用

縫線核セロトニン神経含有培養中脳切片に、A) MDMA、B) METH、C) 5-MeO-DiPT (それぞれ 0.1-1000 μM) を30分間処置し、培養上清中に遊離されるセロトニン量を測定した。結果は、処置前日に測定した 5-HIAA 遊離量で補正した。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs PBS.

Fig.4 培養中脳切片における MDMA、METH、5-MeO-DiPT による細胞内セロトニン含有量への影響 (セロトニン神経毒性)

縫線核セロトニン神経含有培養中脳切片に、A) MDMA、B) METH、C) 5-MeO-DiPT (それぞれ 0.1-1000 μM) を48時間処置し、細胞内セロトニン含有量を測定した。結果は、処置前日に測定した 5-HIAA 遊離量で補正した。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PBS.

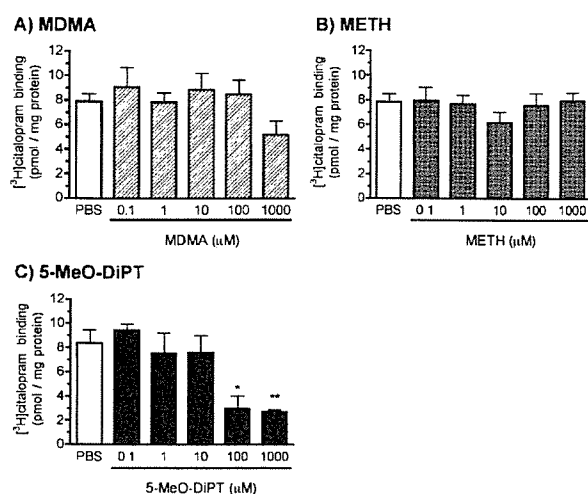


Fig.5 培養中脳切片における MDMA、METH、5-MeO-DIPT による $[^3\text{H}]$ シタロプラム結合量への影響 (セロトニン神経毒性)

縫線核セロトニン神経含有培養中脳切片に、A) MDMA、B) METH、C) 5-MeO-DIPT (それぞれ 0.1-1000 μM) を 48 時間処置し、 $[^3\text{H}]$ シタロプラムを用いた結合実験を行った。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs PBS.

次に、5-MeO-DIPT の 48 時間処置によるセロトニン神経毒性を、細胞内 5-HT 含有量および $[^3\text{H}]$ シタロプラムによる SERT への結合量を指標として、MDMA および METH と比較検討した。本培養中脳切片に、MDMA、METH あるいは 5-MeO-DIPT (0.1-1000 μM) を 48 時間処置し、細胞内 5-HT 含有量を測定した。その結果、高濃度の METH (1000 μM) 処置によって、PBS 処置群と比較して有意な減少が認められたが、その作用は弱いものであった。また、MDMA の 48 時間処置によっては、今回検討した条件下では、有意な変化は認められなかった。一方、5-MeO-DIPT の 48 時間処置によって、濃度依存的に顕著かつ有意な細胞内 5-HT 含有量の減少が認められた (Fig.4)。また、 $[^3\text{H}]$ シタロプラムによる SERT への結合量は、5-MeO-DIPT (0.1-1000 μM) により濃度依存的に顕著に減少したが、METH および MDMA の処置によってはいずれも有意な変化は認められなかった (Fig.5)。

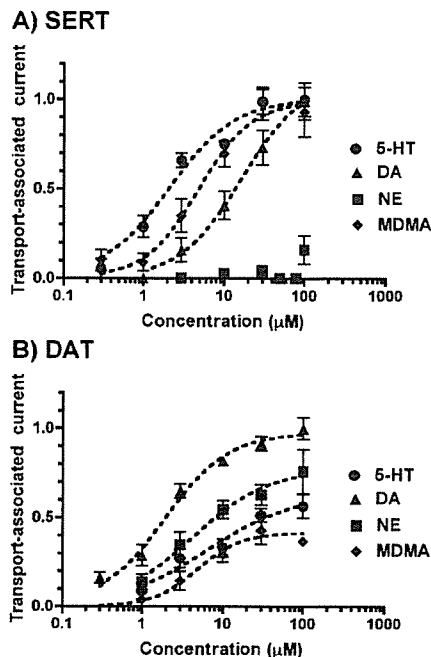


Fig.6 SERT あるいは DAT 発現卵母細胞における MDMA、5-HT、DA、NE による基質輸送電流応答

SERT (A) あるいは DAT (B) を発現させた *Xenopus* 卵母細胞に対して、5-HT、DA、NE あるいは MDMA (それぞれ 0.3-100 μM) を処置し、発生する内向き電流応答を測定した。各々の値は、100 μM 5-HT 処置時の内向き電流応答で標準化した。

2. *Xenopus* 卵母細胞発現系を用いた検討

a) 酸性条件下での MDMA の SERT に対する作用解析

SERT 発現卵母細胞に対して、MDMA、5-HT、DA を 0.1-100 μM の濃度で処置すると、5-HT>MDMA>DA の順でそれぞれ濃度依存的に基質流入に伴う内向き電流応答が認められたが、NE の処置では、そのような基質輸送電流はほとんど見られなかった。また、DAT 発現卵母細胞においては、DA>NE>5-HT>MDMA の順で基質輸送電流が見られた (Fig.6)。

次に、SERT 発現卵母細胞において、酸性条件下における MDMA および 5-HT、DA、NE による基質輸送電流への影響について検討した。その結果、細胞外溶液の pH を 7.4 から 6.4 に変えたとき、5-HT、DA、NE による基質輸送電流応答に有意な変化は見られなかったが、MDMA の基質輸送電

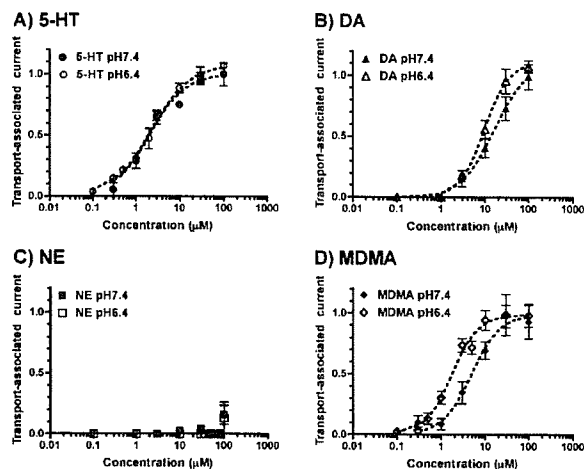


Fig.7 酸性条件下での SERT を介した基質輸送電流応答の変化

SERT を発現させた *Xenopus* 卵母細胞において、通常条件下 (pH7.4) あるいは酸性条件下 (pH6.4) で、5-HT (A)、DA (B)、NE (C) あるいは MDMA (D) による基質輸送電流を測定した。各々の値は、pH7.4 における 100 μ M 5-HT 処置時の内向き電流応答で標準化した。各々の K_m 値、Hill 係数 n^H 、 I_{max} の値は Table 1 に示す。

流の感受性は有意に増強された (Fig.7, Table 1)。

また、*Xenopus* 卵母細胞に対して、脱分極パルスの負荷後、急激な過分極パルスを与えることにより、何も発現させていない卵母細胞と比べて、SERT 発現卵母細胞では、100 ms 程度の間、内向き電流応答 (transient current) が見られた (Fig.8A)。この transient current は、細胞外 Na^+ 依存性であり (Fig.8B)、シタロプラムや 5-HT の適用によって阻害された (Fig.8C)。そこで、MDMA、5-HT、DA、NE の transient current の阻害能を指標に、その pH 感受性を検討したが、酸性条件下 (pH 6.4) においても、これらの transient current の阻害能およびそのパラメーターは、pH 7.4 条件下と比較して、有意な変化は認めらなかった (Fig.9, Table 2)。

Table 1 酸性条件下での SERT を介した基質輸送電流応答の Kinetic values

	K_m (μ M)		n^H		I_{max}	
	pH7.4	pH6.4	pH7.4	pH6.4	pH7.4	pH6.4
5-HT	2.1 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.0
DA	16.5 $\pm$ 7.0	9.7 $\pm$ 1.4	1.1 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1
NE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MDMA	4.8 $\pm$ 1.4	1.8 $\pm$ 0.3 *	1.3 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1

* $P < 0.05$ vs MDMA at pH7.4

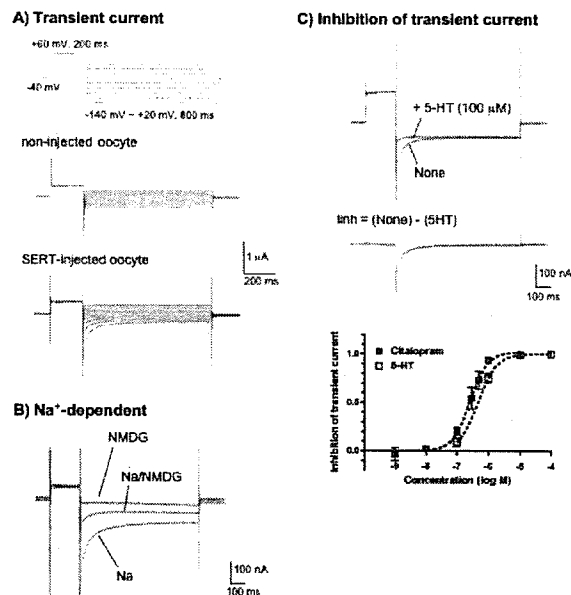


Fig.8 SERT を発現させた *Xenopus* 卵母細胞での過分極パルスによる transient current

(A) SERT 発現卵母細胞において過分極パルスによって transient current が惹起された。(B) transient current の Na^+ 依存性。 Na^+ を NMDG $^+$ で半量あるいは全量置換した灌流液中で、transient current を記録した。(C) transient current の 5-HT あるいはシタロプラムによる抑制。5-HT あるいはシタロプラムの存在下で transient current を記録した。各々の値は、pH7.4 における 100 μ M 5-HT 処置時の内向き電流応答で標準化した。

b) MDMA による [3 H]5-HT 放出作用

SERT 発現卵母細胞を [3 H]5-HT を含む 10 μ M の 5-HT 存在下で 3 時間インキュベートし、 [3 H]5-HT を取り込ませた後に、MDMA を適用し、細胞外に放出される [3 H]5-HT 量を測定することで、*Xenopus* 卵母細胞系で逆輸送現象を再現した。MDMA を 10 μ M あるいは 30 μ M 適用することで細胞外に放出された 5-HT が有意に増加した。またこの作用はパロキセチン 1 μ M 同時適用により有意に抑制された (Fig.10)。次に、MDMA (30 μ M)

Table 2 酸性条件下での SERT を介した transient current の各薬物の阻害の Kinetic values

	K_m (μ M)		n^H		I_{max}	
	pH7.4	pH6.4	pH7.4	pH6.4	pH7.4	pH6.4
5-HT	2.1 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.0
DA	16.5 $\pm$ 7.0	9.7 $\pm$ 1.4	1.1 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1
NE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MDMA	4.8 $\pm$ 1.4	1.8 $\pm$ 0.3 *	1.3 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1

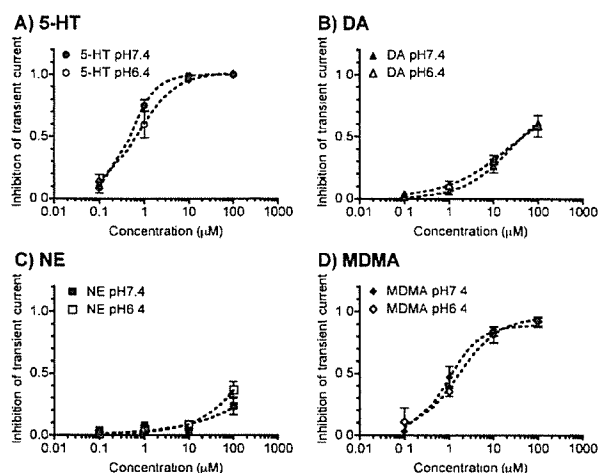


Fig.9 酸性条件下での 5-HT、DA、NE、MDMA による transient current 阻害能の変化

SERT を発現させた *Xenopus* 卵母細胞において、通常条件下 (pH7.4) あるいは酸性条件下 (pH6.4) で、5-HT (A)、DA (B)、NE (C) あるいは MDMA (D) による transient current 阻害能を測定した。各々の値は、pH7.4 における 100 μ M 5-HT 処置時の内向き電流応答で標準化した。各々の K_m 値、Hill 係数 n^H 、 $I_{inh\ max}$ の値は Table 2 に示す。

を適用している間、細胞膜の電位を固定することで、膜電位と逆輸送の関係について検討した。その結果、細胞膜を -80 mV に固定した場合と比べて、+40 mV で固定した場合、MDMA による 5-HT 放出作用が有意に増強された (Fig.11)。

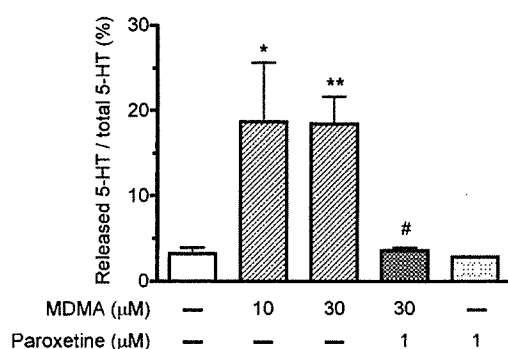


Fig.10 *Xenopus* 卵母細胞における SERT を介した MDMA による 5-HT 放出作用

SERT を発現させた卵母細胞に、 $[^3H]$ 5-HT をインキュベートすることにより取り込ませた後に、MDMA (10 あるいは 30 μ M) を、paroxetine (1 μ M) の存在下あるいは非存在下で 1 時間処置し、細胞外に遊離された $[^3H]$ 5-HT および全 $[^3H]$ 5-HT の放射活性を測定した。値は遊離 $[^3H]$ 5-HT 量/全 $[^3H]$ 5-HT 量を % で表している。* P <0.05, ** P <0.01 vs control, # P <0.05 vs 30 μ M MDMA alone。

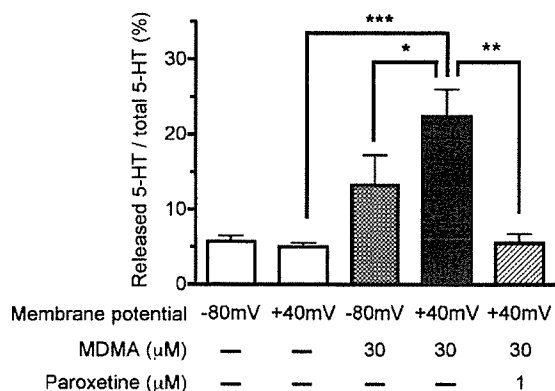


Fig.11 *Xenopus* 卵母細胞における SERT を介した MDMA による 5-HT 放出作用

SERT を発現させた *Xenopus* 卵母細胞に、 $[^3H]$ 5-HT を取り込ませた後、細胞膜電位を -80 mV あるいは +40 mV に固定し、MDMA (30 μ M) を 30 分間処置した。その後、細胞外に遊離された $[^3H]$ 5-HT および全 $[^3H]$ 5-HT の放射活性を測定した。値は遊離 $[^3H]$ 5-HT 量/全 $[^3H]$ 5-HT 量を % で表している。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001。

D. 考察

1. 縫線核セロトニン神経含有中脳切片培養系を用いた検討

昨年度までに樹立した縫線核セロトニン神経含有中脳切片培養系を用いて、MDMA および METH 長期処置による 5-HT 遊離に対する影響したところ、6 日間の長期処置により濃度依存的に MDMA および METH の 5-HT 遊離促進作用の増強現象が生じることを明らかにした。なお、この MDMA および METH の 6 日間の長期処置によっても、セロトニン神経毒性はほとんど生じないことを細胞内 5-HT 含有量を測定することにより確認している。これらの結果は、MDMA および METH の長期処置により、昨年度報告した中脳皮質辺縁脳切片培養系におけるドパミン神経だけでなく、縫線核を起始核とするセロトニン神経も機能亢進される、すなわちセロトニン神経感作が惹起されることを *in vitro* で初めて示したものである。近年、METH あるいはコカインに対する行動感作を獲得したラットの前頭前皮質において、セロトニン遊離促進作用が増強されることが報

告されており、このセロトニン神経感作が少なくとも一部、行動感作に寄与することが示されている^{1,10)}。また、本研究結果から、このセロトニン神経感作は、METHと比較して、よりセロトニン神経選択的に作用し、神経毒性も弱いと考えられるMDMAの方が強く誘導したため、MDMAによる特徴的な神経精神障害を反映しているのではないかと考えている。しかしながら、このセロトニン神経感作のメカニズムについては、まだ不明な点が多く残されており、今後、この本中脳切片培養系を用いた *in vitro* セロトニン神経感作モデルを用いることにより詳細に検討していく予定である。

また、縫線核セロトニン神経含有中脳切片培養系を用いて、5-MeO-DiPTによるセロトニン遊離およびセロトニン神経毒性について評価した。その結果、5-MeO-DiPTは、MDMAやMETHとは異なり、セロトニン遊離作用は示さないものの、顕著なセロトニン神経毒性を示すことが明らかとなった。我々はこれまでに、SERT発現卵母細胞を用いた研究から、5-MeO-DiPTはSERTに対して基質輸送電流を示さず、逆にSSRIなどと同様に外向き電流応答を示し、さらに、少なくとも取り込み阻害作用を有することを示してきた。また他グループによる各種モノアミントランスポーターを発現させた培養細胞を用いた取り込み実験から、5-MeO-DiPTが、DATやNETと比較して、より選択的にSERTに対して取り込み阻害作用を示すことが報告されている^{8,11)}。すなわち、5-MeO-DiPTはSERTに対してブロッカー型の阻害作用を示すと考えられるが、このこととセロトニン神経毒性がどのように関わっているかは未だに不明である。さらに、5-MeO-DiPTによる神経毒性がセロトニン神経に選択的であるかも検討する必要があると考えられる。今後、5-MeO-DiPTのセロトニン神経毒性のメカニズムについてさらに検討していく。

2. *Xenopus* 卵母細胞発現系を用いた検討

Xenopus 卵母細胞発現系を用いた本研究から、SERTにおけるMDMA輸送電流は酸性条件下(pH 6.4)で、その感受性が有意に増大することを見出した。この結果は、酸性条件下では、SERTを介したMDMAの細胞内への輸送が促進されることを意味しており、MDMAの作用が増強される可能性が考えられる。MDMAを大量に摂取した場合、脳内での濃度は数 μ Mに達すると考えられており、この K_m 値の減少は大きな意味を持つと思われる。次に、酸性条件下でMDMAの基質輸送電流の親和性が増大するメカニズムを、より詳細に検討するために、transient currentという現象に着目した。Transient currentは多くのトランスポーターで見られる現象であり、脱分極パルスの後、急激な過分極パルスを与えることにより、一過性に流れる Na^+ 漏れ電流のことをいう。このtransient currentは細胞外 Na^+ 依存性であり、シタロプラムや5-HTの適用によって阻害されたことから、 Na^+ がSERTを透過する経路にSSRIや基質が結合することによってtransient currentが阻害されたと考えられる。すなわち、transient currentの阻害能はSERTへの結合能の指標として用いることができると考えられた。しかしながら、本研究結果から、MDMAや5-HT、DAなどのtransient current抑制の K_m 値に対して、酸性条件(pH 6.4)は何ら影響を与えなかった。これらの結果を併せて考えると、酸性条件はMDMAがSERTに結合する段階には影響を与えず、MDMAがSERTに結合した後、SERTのコンフォメーションを変化させ、細胞内に輸送するというプロセスのいずれかの段階に影響を与えているのではないかと考えられる³⁾。

さらに、本研究において、*Xenopus* 卵母細胞発現系で、MDMAによるセロトニン逆輸送現象を再現し、膜電位と逆輸送の関係について検討した。その結果、MDMAのSERTに対する5-HT放出作用は細胞膜電位が浅いときに増強することが明らかとなった。逆輸送のメカニズムとして、細胞

外のMDMAが細胞内の5-HTと交換されることで5-HT放出が起こることが知られており、MDMAの細胞内輸送には細胞外の Na^+ が、5-HTの放出には細胞内の Na^+ が必要であると考えられている。したがって細胞膜電位が脱分極側にある場合には Na^+ の駆動力という点でそれらの輸送が内から外へ向かいやすくなっており、5-HT放出作用が増強されたのではないかと考えられる。これは生理条件下でも5-HT神経系が活性化し膜電位が浅くなっている条件下では、MDMAによる逆輸送現象が起こりやすいことを示している。これらの実験結果はMDMAの作用機序の解明に寄与するものであると考えられる。

E. 結論

本研究において、縫線核セロトニン神経含有中脳切片培養系を用いて、MDMAおよびMETH長期処置により、セロトニン遊離作用の増強現象、すなわちセロトニン神経感作が惹起されることをin vitroで明らかにした。また、本中脳切片培養系を用いて、5-MeO-DIPTのセロトニン神経に対する作用を解析し、5-MeO-DIPTは、MDMAやMETHとは異なり、セロトニン遊離作用は示さないものの、顕著なセロトニン神経毒性を示すことを明らかにした。一方、*Xenopus* 卵母細胞発現系を用いて、様々な条件下でのMDMAのSERTに対する作用を解析し、酸性条件下(pH 6.4)においては、MDMAのSERTに対する結合能は変化しないが、SERTを介したMDMA輸送能が増強されること、さらに、MDMAによる5-HT放出作用は、細胞の静止膜電位により影響を受けることを明らかにした。

[参考文献]

- 1) Ago, Y., Nakamura, S., Uda, M. et al.: Attenuation by the 5-HT_{1A} receptor agonist osetozotan of the behavioral effects of single and repeated methamphetamine in mice. *Neuropharmacology*, 51: 914-922, 2006.
- 2) Bortolozzi, A., Diaz-Mataix, L., Scorza, M.C. et al.: The activation of 5-HT receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *J. Neurochem.*, 95: 1597-1607, 2005.
- 3) Cao, Y., Mager, S. and Lester, H.A.: H^+ permeation and pH regulation at a mammalian serotonin transporter. *J. Neurosci.*, 17: 2257-2266, 1997.
- 4) Fantegrossi, W.E., Harrington, A.W., Kiessel, C.L. et al.: Hallucinogen-like actions of 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine in mice and rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 83: 122-129, 2006.
- 5) Gramsbergen, J.B. and Cumming P.: Rapid glucose and lactate changes in blood and brain by intravenous 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) ("ecstasy") in awake rats. *Abstr. Soc. Neurosci.*, 111.5, 2005.
- 6) Kaneko, Y., Kashiwa, A., Ito, T. et al.: Selective serotonin reuptake inhibitors, fluoxetine and paroxetine, attenuate the expression of the established behavioral sensitization induced by methamphetamine. *Neuropsychopharmacology*, 32: 658-664, 2007.
- 7) Leonardi, E.T. and Azmitia, E.C.: MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology* 10: 231-238, 1994.
- 8) Nagai, F., Nonaka, R., Satoh, K. et al.: The effects of non-medically used psychoactive drugs on monoamine neurotransmission in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 559: 132-137, 2007.
- 9) Rudnick, G. and Wall, S.C.: The molecular mechanism of "Ecstasy" [3,4-methylenedioxy methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,

89: 1817-1821, 1992.

- 10) Salomon, L., Lanteri, C., Glowinski, J. et al.: Behavioral sensitization to amphetamine results from an uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103: 7476-7481, 2006.
- 11) Sogawa, C., Sogawa, N., Ohyama, K. et al.: Foxy Methoxy, N,N-diisopropyl-5-methoxytryptamine, a selective inhibitor of serotonin transporter. J. Pharmacol. Sci., 100, Suppl. 1, 72P, 2006.
- 12) Schmidt, C.J.: Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymethamphetamine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 240: 1-7, 1987.
- 13) Simantov, R.: Multiple molecular and neuropharmacological effects of MDMA (Ecstasy). Life Sci., 74: 803-814, 2004.
- 14) Stone, D.M., Stahl, D.C., Hanson, G.R. et al.: The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylene-dioxyamphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain. Eur. J. Pharmacol., 22: 128: 41-48, 1986.
- 15) Takamatsu, Y., Yamamoto, H., Ogai, Y., et al.: Fluoxetine as a potential pharmacotherapy for methamphetamine dependence: studies in mice. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1074: 295-302, 2006.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimamoto, K., Otsubo, Y., Shigeri, Y., Yasuda-Kamatani, Y., Satoh, M., Kaneko, S., and Nakagawa T.: Characterization of the tritium-labeled analog of L-threo- β -benzyloxy aspartate binding to glutamate transporters. Mol. Pharmacol., 71: 294-302, 2007
- 2) Deyama, S., Nakagawa, T., Kaneko, S., Uehara, T., and Minami, M.: Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in the negative affective component of visceral and somatic pain in rats.

Behav. Brain Res., 176: 367-371, 2007

- 3) Tokuda, S., Kuramoto, T., Tanaka, K., Kaneko, S., Takeuchi, IK., Sasa, M., and Serikawa, T.: The ataxic groggy rat has a missense mutation in the P/Q-type voltage-gated Ca^{2+} channel α_{1A} subunit gene and exhibits absence seizures. Brain Res., 1133: 168-177, 2007
- 4) Kaneko, S., Kawakami, S., Hara, Y., Wakamori, M., Itoh, E., Minami, T., Takada, Y., Kume, T., Katsuki, H., Mori, Y., and Akaike, A.: A critical role of TRPM2 in neuronal cell death by hydrogen peroxide. J. Pharmacol. Sci., 101: 66-76, 2006
- 5) Fukui, M., Nakagawa, T., Minami, M., Satoh, M., Kaneko, S.: Inhibitory role of supraspinal $\text{P2X}_3/\text{P2X}_{2/3}$ subtypes on nociception in rats. Mol. Pain, 2: 19, 2006
- 6) 中川貴之、金子周司: MDMA によるセロトニン放出および神経毒性発現の分子機序. 週刊医学のあゆみ, 217: 4490-4493, 2006

2. 学会発表

- 1) 中川貴之、山内陽介、鈴木祐一、樋口めぐみ、金子周司: Molecular and neural mechanisms of neuropsychotoxicity induced by drugs of abuse. 第 80 回日本薬理学会年会、名古屋、平成 19 年 3 月.
- 2) 大坪泰斗、八谷由美、中川貴之、金子周司: Mechanism of intracellular clustering and trafficking of glial glutamate transporter GLT-1 in astroglia-neuronal culture. 第 80 回日本薬理学会年会、名古屋、平成 19 年 3 月.
- 3) Yamauchi, Y.: Enhancement of dopamine and MDMA transport by serotonin transporter in acidic condition. 21st Century COE Program Knowledge Information Infrastructure for Genome Science Open International Symposium "From Genomics to Chemical Genomics", 京都、平成 19 年 1 月

- 4) Suzuki, Y.: Effects of repeated treatment with addictive drugs on dopamine release in rat mesocorticolimbic system reconstructed using organotypic slice co-cultures. 21st Century COE Program Knowledge Information Infrastructure for Genome Science Open International Symposium "From Genomics to Chemical Genomics", 京都、平成 19 年 1 月.
 - 5) 中川貴之: オピオイド系鎮痛薬耐性・依存性形成の分子-神経機構. 技術情報協会医薬系セミナー、東京、平成 18 年 12 月.
 - 6) 中川貴之、島本啓子、大坪泰斗、佐藤公道、金子周司: Na^+ 依存性グルタミン酸トランスポーターに対する新規放射性標識リガンド [^3H]ETB-TBOA の結合特性. 第 1 回トランスポーター研究会、東京、平成 18 年 12 月.
 - 7) 中川貴之、大坪泰斗、八谷由美、金子周司: 培養神経
グルタミン酸トランスポーターGLT-1 のクラスター化および細胞内輸送の分子機構. 第 1 回トランスポーター研究会、東京、平成 18 年 12 月.
 - 8) 中川貴之、鈴木祐一、樋口 萌、金子周司: Repeated methamphetamine induces dopaminergic sensitization in mesocorticolimbic slice co-cultures. 第 28 回日本生物学的精神医学会・第 36 回日本神経精神薬理学会・第 49 回日本神経化学会大会 合同年会、名古屋、平成 18 年 9 月.
 - 9) 鈴木 祐一、樋口 萌、中川 貴之、金子 周司: 中脳皮質辺縁脳切片共培養系における依存性薬物反復処置によるドパミン遊離増強作用. 第 27 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、和歌山、平成 18 年 9 月.
 - 10) 山内陽介、泉 貴也、中川貴之、金子周司: Effects of MDMA and 5-MeO-DiPT on serotonin transporter and dopamine transporter. 第 29 回日本神経科学大会、京都、平成 18 年 7 月.
 - 11) 中尾賢治、杉下垂唯子、金子周司: Involvement of Ca^{2+} in thrombin-induced morphological change of 1321N1 astrocytoma cells. 第 29 回日本神経科学大会、京都、平成 18 年 7 月.
 - 12) 鈴木祐一、中川貴之、樋口 萌、金子周司: Effects of MDMA on serotonergic neurons in rat organotypic mesencephalic slice culture including the raphe nuclei. 第 29 回日本神経科学大会、京都、平成 18 年 7 月.
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

メタンフェタミンにより誘発される認知障害の機構の解明と治療法の確立

分担研究者：山田清文¹

研究協力者：田熊一徹¹、溝口博之¹、永井拓^{1, 2}、鍋島俊隆²

（¹金沢大学大学院自然科学研究科薬物治療学，²名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学）

[研究要旨]

覚せい剤乱用者では認知や感覚情報処理機能が低下していると考えられている。本研究では、感覚情報処理機能に対する methamphetamine (METH) の影響を明らかにするために、マウスのプレパルス抑制 (PPI) 反応に関与する神経回路を追究し、同回路機能に及ぼす METH の作用を検討した。

実験には7週齢の雄性ICR系マウスを使用した。PPI装置に固定したのみで音刺激を負荷しない群（コントロール群）、パルス刺激（120 dB）を負荷し驚愕反応を誘発した群（パルス群）、驚愕反応を惹起しないプレパルス刺激（69-81dB）のみを負荷した群（プレパルス群）およびパルス刺激の直前にプレパルス刺激を挿入してPPIを誘発した群（PPI群）の4群を作製した。PPI試験終了から120分後、c-Fos タンパクの発現を免疫染色法により調べた。また、PPIへの関与が示唆された脳部位に lidocaine あるいは GABA 受容体アンタゴニストを微量注入して PPI の変化を解析した。さらに、逆行性トレーサー fluoro-gold を用いて神経投射を調べた。PPI に及ぼす METH の影響は METH (1-3 mg/kg, s.c.) を単回あるいは7日間反復投与し、投与直後、3日後、7日後および14日後にPPI試験を行った。

パルス群では somatosensory cortex (SC)、nucleus accumbens (NAc shell) および caudal pontine reticular nucleus (PnC) において著しい c-Fos 発現が認められた。これらの脳部位におけるパルス刺激誘発性 c-Fos 発現はプレパルス刺激の挿入により抑制された。一方、プレパルス群および PPI 群では lateral globus pallidus (LGP) において c-Fos 発現が認められ、プレパルスにより活性化される LGP の c-Fos 陽性細胞の多くは GAD67 陽性の GABA 作動性神経であった。局所麻酔薬 lidocaine あるいは GABA 受容体アンタゴニストの微量注入実験および逆行性トレーサーを用いた実験より、LGP から pedunculo pontine tegmental nucleus (PPTg) へ投射する GABA 作動性神経が GABA_B 受容体を介して PPI の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。最後に、METH による PPI の障害と LGP 神経との関係を調べた。METH および MK-801 は単回投与により用量依存的に PPI を障害した。さらに、単回投与では PPI に影響を及ぼさない低用量の METH を7日間反復投与すると PPI の障害が誘発され、この障害は断薬後1週間まで持続した。METH および MK-801 処置群では、溶媒投与群で認められる LGP での c-Fos 発現が抑制され、溶媒投与群では認められない PnC において c-Fos 発現が認められた。

以上の結果より、METH の連続投与は遷延性に PPI を障害すること、METH による PPI の障害には LGP の GABA 作動性神経系が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

感覚情報処理機構とは、関係のない刺激や邪魔な刺激による脳への影響を減衰する神経システム、すなわち外界からの入力情報に対するフィルター機構である¹⁾。例えば、ヒトは強烈な聴覚刺激音（パルス刺激）を突然聴かされると骨格や顔面筋の収縮などの驚愕反応を示すが、その強烈な音刺激の直前に小さな音（プレパルス刺激）を挿入すると驚愕反応が減弱する。プレパルス刺激による驚愕反応の抑制はプレパルス抑制（PPI）と呼ばれ、感覚情報処理機能の指標とされる⁶⁾。

これまでの研究により、驚愕反応の出現には聴覚神経から中脳網様体を介して運動神経に至る神経回路が重要な役割を果たしており、下橋網様核が驚愕反応の最終的な出力として機能していることが明らかにされている³⁾。一方、PPI を制御する脳部位についても多くの薬理学的実験が行われ、辺縁系皮質、扁桃核、側座核、淡蒼球、視床、中脳網様核などが注目されている^{3, 6)}。しかし、PPI の発現と制御に関わる神経回路の詳細は未だ不明のままである。

一方、覚せい剤乱用者や統合失調症患者では PPI が障害されており、これらの患者では感覚情報処理機構の機能が低下して情報の氾濫が起きていると考えられている^{1, 2)}。しかし、その障害のメカニズムには不明な点がある。実験動物においても PPI は認められ、覚せい剤である methamphetamine (METH) により PPI が障害されることはよく知られている。さらに、抗精神病薬によってこれら動物モデルにおける PPI の障害が改善されることから、PPI を指標とした感覚情報処理障害に関連する研究は、覚せい剤精神病や統合失調症の病態解明および抗精神病薬の開発につながると考えられる⁴⁾。

本研究では、PPI 試験により誘導される c-Fos タンパクの組織学的解析、逆行性トレーサー (Fluoro-gold; FG)、局所麻酔薬および受容体アン

タゴニストなどの局所微量注入実験を組み合わせ PPI に関与する神経回路の同定を試みた。さらに、感覚情報処理に対する METH の抑制作用のメカニズムを明らかにするために、同神経回路に対する METH の作用を検討した。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には7週齢の雄性 ICR 系マウスを使用した。動物は室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、9:00 AM-9:00 PM 明期の明暗サイクルの部屋で飼育し、水および餌は自由に摂取させた。なお、本研究は金沢大学動物実験委員会の承認を得て、倫理的な配慮のもとで行った。

2. PPI 試験

SR-LAB 驚愕反応測定システム (San Diego Instruments, San Diego, CA, U.S.A.) を用いて驚愕反応 (acoustic startle amplitude) を測定した。装置内には背景ノイズ (Back ground; BG) として 65 dB の音を流した。65 dB の BG 下で 10 分間馴化させた後、次の 3 種類のトライアルをそれぞれ 10 回ずつ負荷した。①驚愕反応を引き起こす 120dB、40 msec の音刺激（パルス刺激）のみ、②パルス刺激の 100 msec 前に 69、73、77 または 81 dB、20 msec の音刺激（プレパルス刺激）を加えたトライアル、③BG のみ。テストでは最初にパルス刺激を 5 回、次に 3 種類のトライアルを 10 から 22 秒の間隔でランダムに 10 回ずつ、最後にパルス刺激を 5 回提示し、合計 70 回のトライアルを負荷した。この時、音刺激と同期させて 1 msec 間隔で 1 秒間驚愕強度を記録した。得られたデータから、以下の式に従い PPI を算出した。

$$\text{PPI}(\%) = [1 - (\text{pPx} / \text{P120})] \times 100$$

P120 : パルス刺激の単独提示時の驚愕強度最大値の平均

pPx : プレパルス刺激 (69-81dB) とパルス刺激

の連続提示時の驚愕強度最大値の平均

PPI に対する METH の効果を調べる場合、METH を単回投与 (1-3 mg/kg) あるいは 7 日間連続投与 (1 mg/kg) した直後にマウスを PPI 装置に入れて実験を開始した。また、METH 連続投与後の断薬の影響を調べるため、断薬 3 日目、7 日目あるいは 14 日間に PPI 試験を実施した。

3. 免疫組織化学

c-Fos タンパクの免疫組織染色実験には以下の 4 群を作製した。なお、それぞれのトライアルの合計は 60 トライアルとした。

- ①PPI 装置に固定したのみで音刺激を負荷しない群 (コントロール群)
- ②パルス刺激 (120 dB) を負荷し驚愕反応を誘発した群 (パルス群)
- ③驚愕反応を惹起しないプレパルス刺激 (69-81dB) を負荷した群 (プレパルス群)
- ④パルス刺激の直前にプレパルス刺激を負荷して PPI を誘発した群 (PPI 群)

PPI 試験終了 2 時間後、常法に従って脳を灌流固定し、ミクロトームを用いて厚さ 14-20 μm の凍結切片を作製し、免疫組織染色に使用した。解析には CCD カメラ付正立顕微鏡 Axioskop (Zeiss) を用いた。c-Fos 免疫陽性細胞数のカウントは解析ソフト IP Lab for Macintosh 3.2 を使用し、目的とする脳部位に測定領域 (500×500 pixels) を設定した上でその領域内にある陽性細胞数をカウントした。この時、1 つの脳部位につき約 300 μm 毎に 3 枚の切片を選択し、さらに 1 枚の切片につき 3 ヶ所の領域を設定して計 9 回のカウントを行った。測定した脳部位は、medial prefrontal cortex (mPFC), somatosensory cortex (SC), core and shell of the nucleus accumbens (NAc), caudate putamen (CPu), ventral pallidum (VP), lateral globus pallidus (LGP), CA1 subfield (CA1) and dentate gyrus (DG) of the dorsal hippocampus, substantia nigra reticular (SNR),

pedunculo pontine tegmental nucleus (PPTg), caudal pontine reticular nucleus (PnC), locus coeruleus (LC) である。

4. 脳内局所微量注入実験

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た。マウスの脳地図を参考に特殊ステンレスパイプ (長さ 11.6 mm、内径 0.4 mm×外径 0.5 mm) を両側の LGP (ブレグマより後方に 0.3 mm、左右に 1.7 mm、頭蓋骨から垂直下方向に 3.5 mm)、PPTg (ブレグマより後方に 4.7 mm、左右に 1.3 mm、頭蓋骨から垂直下方向に 3.0 mm)、または PnC (ブレグマより後方に 5.2 mm、左右に 0.7 mm、頭蓋骨から垂直下方向に 4.5 mm) に挿入した。なお、PnC へは上記座標に到達するようにステンレスパイプを斜め (30 度) に挿入した。その後、歯科用セメントを用いて特殊ステンレスパイプを固定し、ダミーカニューレを特殊ステンレスパイプ内に挿入した。薬物を微量注入する直前にダミーカニューレを取り外し、薬液を満たした 28G 注射針を挿入し、薬液 0.5 μL を 120 秒かけて注入した。注入後は薬液が十分に拡散するように注射針を約 30 秒間静止した。Lidocaine (20 $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{L}/\text{side}$)、picrotoxin (12.5-25.0 $\text{ng}/0.5 \mu\text{L}/\text{side}$) および phaclofen (2.5 $\text{ng}/0.5 \mu\text{L}/\text{side}$) は PPI 試験の直前に注入した。なお、対照群には saline を微量注入した。実験終了後、脳切片をニッスル染色した後、注射針の挿入位置を確認した。

5. 逆行性トレーサー実験

4.の方法に準じて、両側の PPTg (ブレグマより後方に 4.7 mm、左右に 1.3 mm、頭蓋骨から垂直下方向に 3.0 mm)、または PnC (ブレグマより後方に 5.2 mm、左右に 0.7 mm、頭蓋骨からの垂直下方向に 4.5 mm) に saline で希釈した 4% FG を注入した。FG 注入 7 日後、脳切片を fluorescent medium で封入し、蛍光顕微鏡を用いて解析した。

6. 統計解析

データは平均 ± 標準誤差で示した。2 群間の比較は Student's *t*-test を用いて行った。また、独立多群間の比較には一元配置分散分析 (analysis of variance, ANOVA) または反復測定分散分析 (repeated measures ANOVA) を用い、有意差が認められた場合には Bonferroni/Dunn の検定を用いた。いずれの検定においても、危険率 5 % 以下で差が認められる場合を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

1. PPI 試験における驚愕反応の測定

コントロール群、パルス群、PPI 群およびプレパルス群の驚愕強度を Fig. 1 に示した。パルス群はコントロール群に比べ有意に強い驚愕反応を示した ($p < 0.01$)。驚愕反応を引き起こさないプレパルス刺激をパルス刺激の直前に挿入した PPI 群では、パルス群に比べて有意に驚愕強度が減少した ($p < 0.01$)。

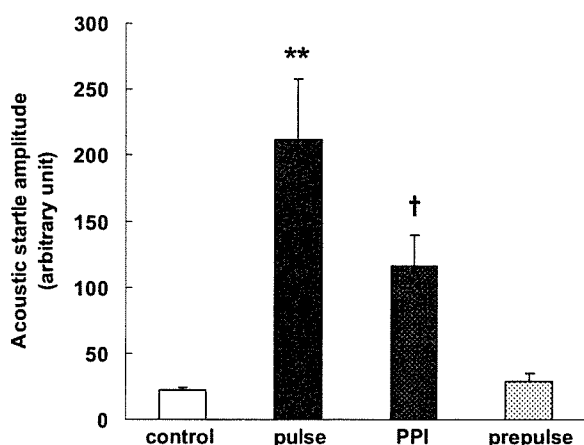


Fig. 1. Effect of prepulse on acoustic startle reflex in mice. Values indicate the mean ± SE ($n = 5-8$). ANOVA analysis: [$F(3,22)=11.056$; $p < 0.001$]. ** $P < 0.01$ vs. control group. † $P < 0.01$ vs. pulse group.

2. 各脳部位における c-Fos の発現変化

PPI の制御に関与する神経回路を調べるため、コントロール群、パルス群、PPI 群 および プレパルス群における c-Fos タンパクの発現を調べた。

本研究では、SC、NAc shell、LGP および PnC の 4 部位で c-Fos 発現の有意な変化が認められた (Fig. 2)。SC、NAc shell および PnC では、コントロール群と比較してパルス群の c-Fos 発現は有意に増加した。そのうち、NAc shell および PnC におけるパルス刺激誘発性 c-Fos 発現は、プレパルス刺激の挿入により有意に抑制された。一方、PPI 群およびプレパルス群の LGP においては、コントロール群と比較して有意に高い c-Fos 発現が認められた。なお、mPFC、NAc core、CPu、VP、CA1、DG、SNR、PPTg および LC では c-Fos 発現に変化は認められなかった。

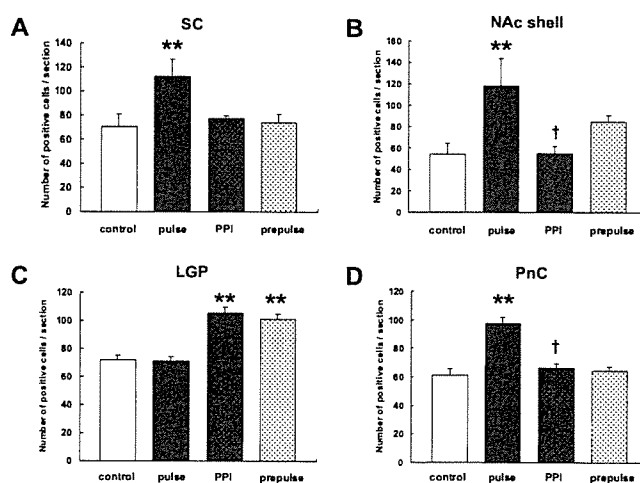


Fig. 2. Changes in c-Fos expression in selected brain areas in control, pulse, PPI and prepulse groups. Values indicate the mean ± SE ($n = 4-6$). (A) SC. $F(3,15)=4.151$, $p < 0.05$. (B) NAc shell. $F(3,16)=6.582$, $p < 0.01$. (C) LGP. $F(3,14)=24.225$, $p < 0.001$. (D) PnC. $F(3,15)=19.274$, $p < 0.0001$. ** $P < 0.01$ vs. control group. † $P < 0.01$ vs. pulse group.

3. LGP における c-Fos と GAD67 の二重染色

LGP には GABA 作動性神経が豊富に存在していることが報告されている。そこで、プレパルス刺激によって活性化される LGP の細胞が GABA 作動性神経系かどうかを調べるため、c-Fos と GABA 作動性神経のマーカーである GAD67 との二重染色を行った。

コントロール群に比べプレパルス群では c-Fos 発現細胞が増加し ($p < 0.01$)、その多くは GAD67

陽性の GABA 作動性神経であった。LGP の GAD67 陽性細胞のうち、プレパルス群では $62.1 \pm 3.2\%$ が c-Fos 陽性細胞であり、コントロール群の $41.9 \pm 4.1\%$ と比較して有意に高値を示した。

4. LGP への lidocaine の微量注入による PPI の変化

PPI おける LGP 神経の役割を明らかにするために、LGP へ局所麻酔薬である lidocaine を微量注入して PPI の変化を解析した。Lidocaine により PPI は障害されたが、驚愕強度は何ら変化しなかった (Fig. 3)。

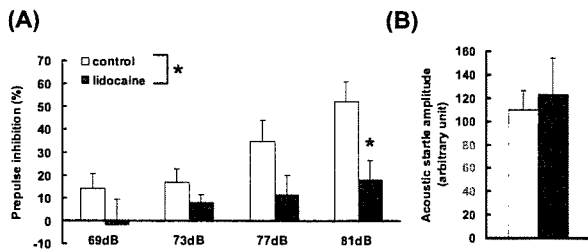


Fig. 3. Effect of bilateral microinjections of lidocaine into the LGP on PPI of the startle reflex in mice. Values indicate the mean $\pm$ SE ($n = 9-10$). (A) PPI. $F(1,17)=5.978$, $p<0.05$. (B) Acoustic startle amplitude. * $P<0.05$ vs. control group.

5. 逆行性トレーサーを用いた神経投射の解析

驚愕反応の出力に重要である PnC へは PPTg からの神経投射が報告されているが、LGP と PnC との間の神経連絡については不明である。そこで、逆行性トレーサーである FG を両側性に PnC へ微量注入して神経投射を調べた。その結果、PPTg では FG 陽性細胞が認められたが、LGP では陽性細胞は認められなかった。一方、FG を PPTg へ微量注入した場合、LGP において FG 陽性細胞が認められた。二重免疫染色の結果より、LGP から PPTg に投射する細胞には GAD67 陽性の GABA 作動性神経が含まれていることが示唆された。

6. PPI に対する GABA 受容体アンタゴニストの作用

PPTg へ GABA 受容体アンタゴニストを微量注入し、PPI に関与する GABA 受容体について解析した。PPTg へ GABA_A 受容体アンタゴニストの picrotoxin あるいは GABA_B 受容体アンタゴニストの phaclofen を両側性に微量注入した結果、溶媒注入群と phaclofen 注入群との間で PPI に有意差が認められた ($p<0.01$, Fig. 4A)。一方、picrotoxin 注入群と溶媒注入群との間に有意な差は認められなかった。なお、驚愕強度には 3 群間で有意な変化は認められなかった (Fig. 4B)。同様に、両側の PnC へ picrotoxin (25.0 ng/0.5 μ L/side) あるいは phaclofen (2.5 ng/0.5 μ L/side) を微量注入したが、何れの薬物も PPI および驚愕反応強度に影響しなかった (Fig. 4C, D)。

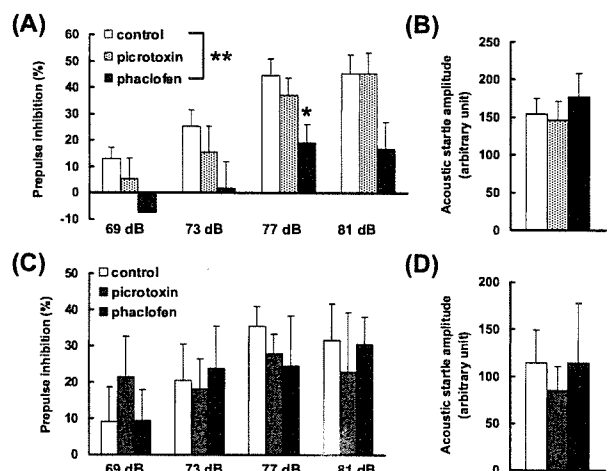


Fig. 4. Effect of bilateral microinjections of GABA receptor antagonists into the PPTg (A, B) or PnC (C, D) on PPI of the startle reflex in mice.

Values indicate the mean $\pm$ SE (A: $n=11-14$, C: $n=6-8$). (A, C) PPI. (A) $F(2,34)=4.711$, $p<0.05$. (C) $F(2,19)=0.019$, $p>0.05$. (B, D) Acoustic startle amplitude. (B) $F(2,34)=0.386$, $p>0.05$. (D) $F(2,19)=0.185$, $p>0.05$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. control group.

7. PPI に対する METH の作用

METH (1-3 mg/kg) の単回投与では驚愕強度は変化しなかったが、用量依存的な PPI の障害が誘発された。同様に、MK-801 (0.3-1 mg/kg) の単回投与でも用量依存的な PPI の障害が認められたが、0.3 mg/kg の MK-801 を処置したマウスでは驚愕反応

の有意な増強も認められた (Fig. 5)。単回投与では PPI に影響しなかった METH (1 mg/kg) を連続 1 週間投与すると、PPI の障害が認められた (Fig. 6)。この METH 連続投与による PPI の障害は断薬 7 日後まで維持されたが、14 日後にはコントロールレベルまで回復した。

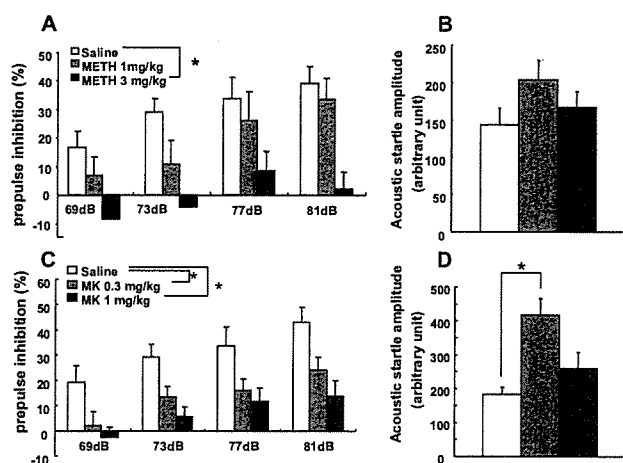


Fig. 5. Effects of METH and MK-801 on PPI of the startle reflex in mice. Values indicate the mean $\pm$ SE (n=11-12). (A, C) PPI. (A) $F(2,31)=8.711$, $P<0.01$. (C) $F(2,29)=8.337$, $P<0.01$. (B, D) Acoustic startle amplitude. (B) $F(2,31)=1.681$, $P=0.2027$. (D) $F(2,29)=7.418$, $P<0.01$. * $P<0.05$ vs. saline-treated group.

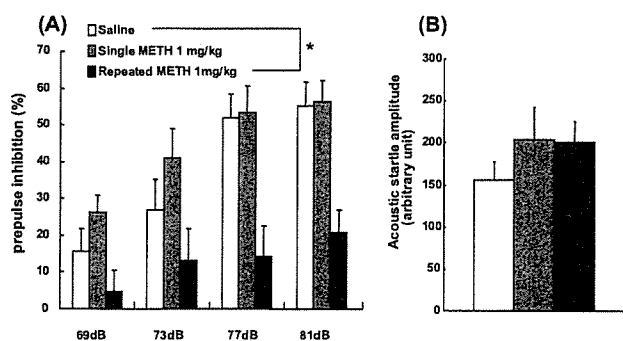


Fig. 6. Effect of single and repeated METH treatment on PPI of the startle reflex in mice. Values indicate the mean $\pm$ SE (n=7). (A) PPI. $F(2,18)=9.152$, $P<0.01$. (B) Acoustic startle amplitude. $F(2,18)=0.793$, $P=0.4678$. * $P<0.05$ vs. saline-treated group.

8. PPI 試験により誘発される LGP および PnC での c-Fos 発現の変化に対する METH の作用

PPI 装置に入れただけのコントロール群に比較して、PPI 群では LGP の c-Fos 発現が顕著に増加した。一方、METH (3 mg/kg) および MK-801 (1

mg/kg) の単回処置あるいは METH (1 mg/kg) の連続投与により PPI が障害された群では、溶媒投与群に比較して LGP における c-Fos 発現が有意に低下し、PnC では c-Fos 発現が増加した (Fig. 7)。

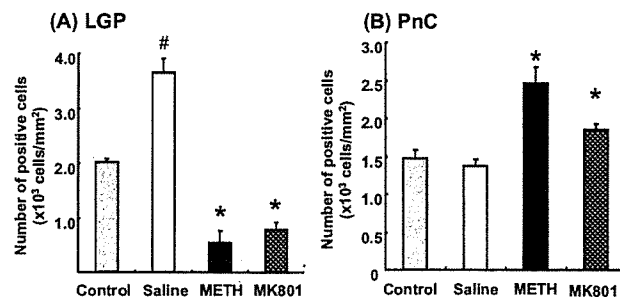


Fig. 7. Changes in c-Fos expression in the LGP and PnC induced by PPI test in mice that were pretreated with METH or MK-801. Values indicate the mean $\pm$ SE (n=4-5). (A) $F(3,14)=60.936$, $P<0.001$. (B) $F(3,14)=14.43$, $P<0.001$. # $P<0.001$ vs. control. * $P<0.01$ vs. saline-treated group.

D. 考察

聴覚刺激によって引き起こされる驚愕反応の発生は、蝸牛神経核、PnC および運動神経を介した神経回路により制御されていると考えられている³⁾。本研究では、驚愕反応を誘発する強大なパルス刺激によって PnC における c-Fos タンパクの発現が増加し、プレパルス刺激の挿入により c-Fos 発現が抑制されることを見出した。この結果は、マウスを用いた電気生理学的実験においてプレパルス刺激が PnC の神経活動を抑制したという報告と一致している。したがって、PnC におけるパルス刺激による c-Fos タンパクの発現増加は、聴覚性の驚愕反応を制御している神経回路の活性化を反映している可能性がある。

これまでの研究により、PPI に影響を与える神経系は、PPI の発現に直接関与する実行回路と PPI を制御する制御回路の 2 つに分けて捉えることが可能であり、それぞれの神経回路が協調して感覚情報処理機構がコントロールされていると考えられている^{3,6)}。PPI の実行回路は、弱いプレパルス刺激を伝達する下丘 (inferior colliculus; IC)、上

丘 (superior colliculus; SC) および PPTg を含む上行性の聴覚神経など、脳幹に存在する神経核から構成されている³⁾。一方、PPI の制御回路は前脳に存在し、特に海馬、mPFC および扁桃体などの辺縁系皮質が PPI の制御に重要な役割を果たしていると考えられている⁶⁾。

本実験では、プレパルス刺激により c-Fos 発現が増加した脳部位は LGP のみであり、LGP で活性化される神経は GABA 作動性神経であることが示唆された。また、lidocaine を局所微量注入して LGP の神経を一過性に抑制すると、PPI の障害が誘発されたことから、LGP の GABA 作動性神経は PPI の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。また、逆行性トレーサーである FG と GAD67 の免疫染色を組み合わせた実験より、LGP の GABA 作動性神経は PPTg へ投射していることが明らかになった。さらに、GABA_B 受容体アンタゴニストである phaclofen を PPTg へ微量注入すると PPI が障害されたことより、LGP から PPTg へ投射している GABA 作動性神経は、脳幹に存在する PPI の実行回路と前脳に存在する制御回路とをつなぐインターフェイスとして機能しており、感覚情報処理機構の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された (Fig. 8)。

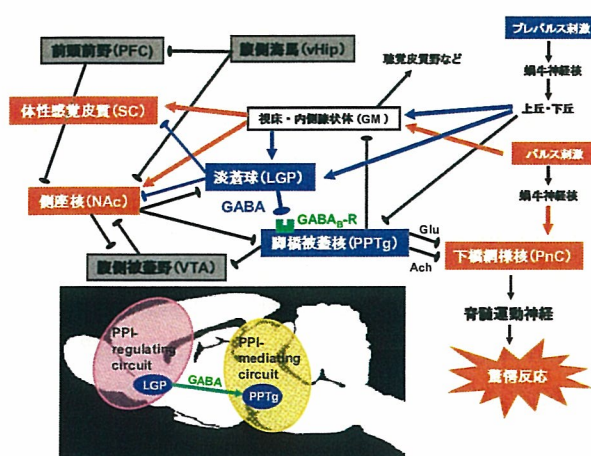


Fig. 8. Possible neural circuit underlying PPI of the startle reflex in mice.

前脳の多くの部位が PPI の制御に関わっている

ことが報告されているが、本研究では LGP 以外の脳部位では c-Fos 発現に変化は認められなかった。したがって、mPFC や海馬などの他の部位については PPI の制御に対する寄与が低い、もしくは PPI の制御に必要な部位ではあるが c-Fos タンパクが誘導される閾値までは活性化されなかった可能性がある。あるいは、PPI に対する LGP 以外の脳部位の作用は活動依存的ではなく、緊張性の抑制であることが考えられる。

METH は、単回投与では PPI に影響のないような低用量でも、連続投与することにより感覚情報処理を障害することが明らかとなった。さらに、METH 連続投与による PPI の障害は遷延性であり、断薬後も障害が維持されることが示唆された。さらに、METH による PPI の障害には LGP の GABA 作動性神経系の機能不全が関与していることが示唆された。

E. 結論

PPI の制御には LGP から PPTg に投射する GABA 作動性神経系が重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、METH の連続投与は遷延性に PPI を障害すること、その障害には LGP の GABA 作動性神経系の機能不全が関与していることが示唆された。

[参考文献]

- 1) Braff, D.L. and Geyer, M.A.: Sensorimotor gating and schizophrenia: human and animal model studies. *Arch. Gen. Psychiatry*, 47:181-188, 1990.
- 2) Braff, D., Grillon, C., Gallaway, E., et al.: Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology*, 15:339-343, 1978.
- 3) Fendt, M., Liang, Li and John, S.Y.: Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology*, 156:216-224, 2001.

- 4) Geyer, M.A., Krebs-Thomson, K., Braff, D.L., et al.: Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology*, 156:117-154, 2001.
 - 5) Lee, Y., Lopez, D.E., Meloni, E.G., et al.: A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J. Neurosci.*, 16:3775-3789, 1996.
 - 6) Swerdlow, N.R., Geyer, M.A. and Braff, D.L.: Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology*, 156:194-215, 2001.
- F. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Kamei, H., Nagai, T., Nakano, H., Togan, Y., Takayanagi, M., Takahashi, K., Kobayashi, K., Yoshida, S., Maeda, K., Takuma, K., Nabeshima, T. and Yamada, K.: Repeated methamphetamine treatment impairs recognition memory through a failure of novelty-induced ERK 1/2 activation in the prefrontal cortex. *Biol. Psychiatry*, 59:75-84, 2006.
 - 2) Chen, L., Yamada, K., Nabeshima, T. and Sokabe, M.: $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction in β -amyloid infused rats. *Neuropharmacology*, 50:254-268, 2006.
 - 3) Yan, Y., Nitta, A., Mizoguchi, H., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Relapse of methamphetamine-seeking behavior in C57BL/6J mice demonstrated by a reinstatement procedure involving intravenous self-administration. *Behav. Brain Res.*, 168:137-143, 2006.
 - 4) Ishikawa, K., Nitta, A., Mizoguchi, H., Mohri, A., Murai, R., Miyamoto, Y., Noda, Y., Kitaichi, K., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Effects of single and repeated administration of methamphetamine or morphine on neuroglycan C gene expression in the rat brain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 9:407-415, 2006.
 - 5) Yan, Y., Nitta, A., Mizuno, T., Nakajima, A., Yamada, K. and Nabeshima, T.: Discriminative-stimulus effects of methamphetamine and morphine in rats are attenuated by cAMP-related compounds. *Behav. Brain Res.*, 173:39-46, 2006.
 - 6) Nagai, T., Kamei, H., Dohniwa, M., Takayanagi, M., Suzuki, M., Matsuya, T., Nabeshima, T., Takuma, K. and Yamada, K.: Involvement of hippocampal ERK1/2 in spatial working memory in rats. *NeuroReport*, 17:1453-1457, 2006.
 - 7) Ito, M., Nagai, T., Kamei, H., Nakamichi, N., Nabeshima, T., Takuma, K. and Yamada, K.: Involvement of tissue plasminogen activator-plasmin system in depolarization-evoked dopamine release in the nucleus accumbens of mice. *Mol. Pharmacol.*, 70:1720-1725, 2006.
 - 8) Nagai, T., Ito, M., Nakamichi, N., Mizoguchi, H., Kamei, H., Fukakusa, A., Nabeshima, T., Takuma, K. and Yamada, K.: The rewards of nicotine: regulation by tissue plasminogen activator-plasmin system through protease activated receptor-1. *J. Neurosci.*, 26:12374-12383, 2006.
 - 9) Takahashi, K., Nagai, T., Kamei, H., Maeda, K., Matsuya, T., Arai, S., Mizoguchi, H., Yoneda, Y., Nabeshima, T., Takuma, K. and Yamada, K.: Neural circuits containing pallidotegmental GABAergic neurons are involved in the prepulse