

表1 大麻製剤の名称と Δ^9 -THC含有量

名称	植物の部位	Δ^9 -THC含有量 (%)
大麻(マリファナ) バンダ	乾燥した未熟花穂や葉を含む枝先 乾燥した成熟花穂や葉を含む枝先	1.0~3.0
シンセミラ	実のならない雌株花穂(雄株との分離栽培)	3.0~6.0
ガンジャ	実のならない雌株花穂を圧縮したもの	4.0~8.0
ハッシシ(チャラス)	大麻樹脂	10.0~15.0*
ハッシシオイル	大麻樹脂の有効成分をエタノール抽出した液	20.0~60.0

*: 大麻樹脂の密売品には、他の物質が混入していることが多く、 Δ^9 -THC含有量はこれよりずっと低い。

を喫煙すれば1%程度の Δ^9 -THC (2~3 mg/body) が体内に入ると考えられている。約3 mgで陶酔感、約6 mgで知覚・感覚の変容、約12~18 mgで著明な感覚異常、離人感、現実遊離感、幻視・幻聴が現れる。大麻に関する動物を用いた基礎研究の大部分は大麻によって誘発される行動異常や知的機能の障害に基づくものであり、近年、治療薬としての臨床応用の可能性を追究する試みもなされている。

本項では、まず大麻の活性成分の生合成・代謝を概説し、生体における内因性カンナビノイドとその受容体の役割を紹介する。これらを背景に、脳内報酬系との関わりの中で大麻の依存性を中心に覚せい剤および麻薬のそれと比較しながら概説する。

大麻に含まれる成分(天然由来〈植物性〉カンナビノイド)

大麻で生合成される成分中で、分子内にモノテルペン部分とオリベトールとよばれるアルキルフェノール部分が結合した構造を持ち、窒素を含まない大麻特有の化合物がカンナビノイド(cannabinoid: CB)とよばれるものである。このカンナビノイドはこれまで約70種が単離され、構造決定がなされている。なかでもテトラヒドロカンナビノール(tetrahydrocannabinol:

THC)、カンナビジオール(cannabidiol: CBD)およびカンナビノール(cannabinol: CBN)は、その主要成分である(図2)。

THCのナンバリングには2通りあり、ベンゾピラン系から始める方法(Δ^9 -THCと記述)とモノテルペン系から始める方法(Δ^1 -THCと記述)がある。 Δ^9 -THCの異性体である Δ^8 -THCは、 Δ^9 -THCに比べ酸化的代謝を受け難い成分として大麻にわずかながら含まれている。THCとCBDは、アサの中ではテトラヒドロカンナビノール酸およびカンナビジオール酸として存在し、伐採や加熱処理によって脱炭酸を受けてそれぞれTHCとCBDに変換される。一方、CBNはテトラヒドロカンナビノール酸から水素と二酸化炭素がとれて生成される。採取された大麻は時間が経つにつれTHCの含有量は減少し、ほとんどがCBNに変化する。

大麻に含まれるこれらのカンナビノイドの中で、幻覚作用を発現する成分は代謝産物を除外すれば、 Δ^9 -THC(図2)、THCA(図2)、tetrahydrocannabivarin、およびtetrahydrocannabivarinic acidのわずか4種類である。その作用強度は、THCを100%とすると、THCAは0.01%、THCVAは0.05%ときわめて弱い。一方、CBNはそれ自体には活性を持たないが、代謝産物の11-OH-CBNは15%の作用強度を示す。また Δ^9 -THCは、当初はその

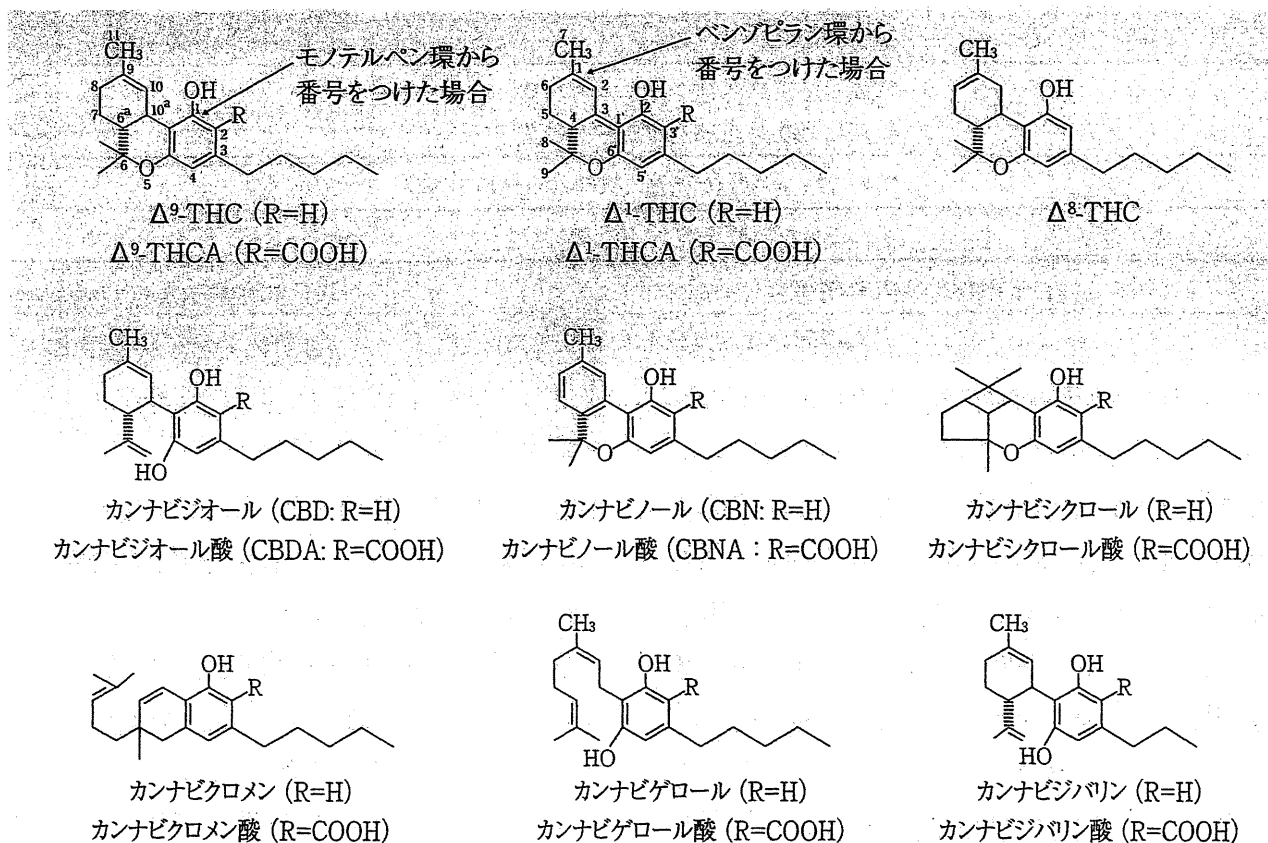


図2 大麻草に含まれる植物由来カンナビノイドの代表的成分

THC：脂溶性，無色油状物質．CBN：脂溶性，白色結晶．CBD：脂溶性，白色結晶．

脂溶性の高さから細胞膜流動性を阻害する作用がクローズアップされ「局所麻酔薬」として分類されていたが，その後 $G_{i/o}$ 蛋白共役型受容体 (G-protein coupled receptors) を介してのアデニル酸シクラーゼ阻害作用を持つことが明らかにされた。

脳に存在する大麻様物質 (内因性カンナビノイド) とその受容体

1. 内因性カンナビノイドとその特異的受容体

最初に発見された内因性カンナビノイドは，ブタ脳から同定された不飽和脂肪酸である *N*-アラキドノイルエタノールアミン (アナンダミド) であり，サンスクリット語で「内なる

至福」を意味する “ananda” に基づいて名づけられた。もう1つの主要な内因性カンナビノイドである 2-アラキドノイルグリセロール (2-arachidonoylglycerol: 2-AG) は，イヌ消化管やラット脳で相次いで発見された。2-AGの脳内濃度は，アナンダミドよりも非常に高いこと (約100倍) がわかっている。内因性カンナビノイドは，いずれも Ca^{2+} 依存性酵素により2段階で生合成される。また，その代謝は，モノアシルグリセロールリパーゼ (monoacylglycerol lipase (MGL)；おもに2-AGの分解) およびアミド加水分解酵素 (fatty acid amide hydrolase (FAAH)；おもにアナンダミドの分解) による加水分解反応と，シクロオキシゲナーゼ2 (cyclooxygenase 2: COX2) による酸化反応の異なる2種の経路により行われる^{2,3)}。

内因性カンナビノイドが特異的に結合するカンナビノイド (CB) 受容体の発見は、内因性カンナビノイドの発見に先駆けてなされている。Matsudaらは1990年に、カンナビノイドが結合し、アデニル酸シクラーゼを抑制する $G_{i/o}$ 蛋白共役型受容体を単離しクローニングすることに初めて成功した⁴⁾。これが7回膜貫通型の473個のアミノ酸からなるCB受容体と見られるものであり、 Ca^{2+} 流入を抑制し、 K^+ チャネルを活性化させることが知られている。CB受容体には、 CB_1 および CB_2 受容体の2種類の存在が明らかにされ、前者はおもに中枢神経系の神経細胞に、後者はおもに末梢の免疫系細胞(脳ではグリア細胞)に局在している。詳細な役割については依然として不明な点が多いが、 CB_1 受容体は神経細胞のみならずグリア細胞(アストロサイト)にも発現していることが明らかにされている。CB受容体の脳内分布は、ラット、サルおよびヒトでは若干の差があるが、運動機能を担う基底核や小脳に最も多く、高いで高次機能を司る大脳皮質(とくに前頭前野)に多い。また、記憶や情動に関わる海馬や扁桃体にも分布しているが、呼吸などの生命中枢が存在する脳幹部にはほとんど分布していない⁵⁾。さらに近年、 CB_1 および CB_2 のいずれにも属さない新規CB受容体として、アブノーマルカンナビジオール(abnormal-cannabidiol: abn-CBD)、 CB_3 およびGPR55受容体が相次いで発見されている。

2. 神経伝達機構における内因性カンナビノイドの役割

神経細胞間の情報伝達はシナプスにおいて行われる。シナプス前ニューロンの軸索末端から神経伝達物質が放出され、それがシナプス後ニューロンの細胞体や樹状突起の伝達物質受容

体に結合し、信号が伝えられる(順行性のシナプス伝達)。内因性カンナビノイドは、このシナプス伝達において逆行性伝達物質(シナプス後ニューロンから放出されシナプス前終末に作用する物質)として神経伝達物質の遊離を制御する役割を演じている。

内因性カンナビノイドは、シナプス後ニューロンの脱分極によって生じる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇または $G_{q/11}$ 蛋白共役型受容体の活性化によって、必要に応じて産生され細胞外へ放出される(図3)。放出された内因性カンナビノイドは、シナプス前終末部に取り込まれ、 CB_1 受容体を活性化する。この受容体が活性化されると Ca^{2+} チャネルが抑制され、シナプス前終末部に活動電位が到達した際の Ca^{2+} 濃度上昇が減弱すると考えられている。その結果、神経伝達物質の放出量が低下し、順行性のシナプス伝達が抑制される(図3)。2-AG/アナンダミドのいずれの内因性カンナビノイドがこの逆行性シナプス伝達を担っているのかは、いまだ明らかではない。しかし、逆行性シナプス伝達は、2-AGの合成阻害により消失し、また2-AGの分解阻害により増強される。このことから、2-AGが逆行性シグナル分子である可能性が示唆されている(図3)³⁶⁾。

CB_1 受容体により遊離が制御される神経伝達物質としては、グルタミン酸(glutamic acid: Glu)、GABA(γ -aminobutyric acid)、グリシン、アセチルコリン、ノルアドレナリン、ドパミン、セロトニンおよびコレシストキニン(cholecystokinin: CCK)があげられる。CB受容体作動薬によるGlu遊離抑制作用は、海馬培養神経細胞を用いた試みにより初めて明らかにされた。カンナビノイド CB_1 受容体作動薬WIN55,212-2は興奮性シナプス後電流(excitatory postsynaptic currents: EPSCs)を減弱し、Glu遊離を減少させる。こ

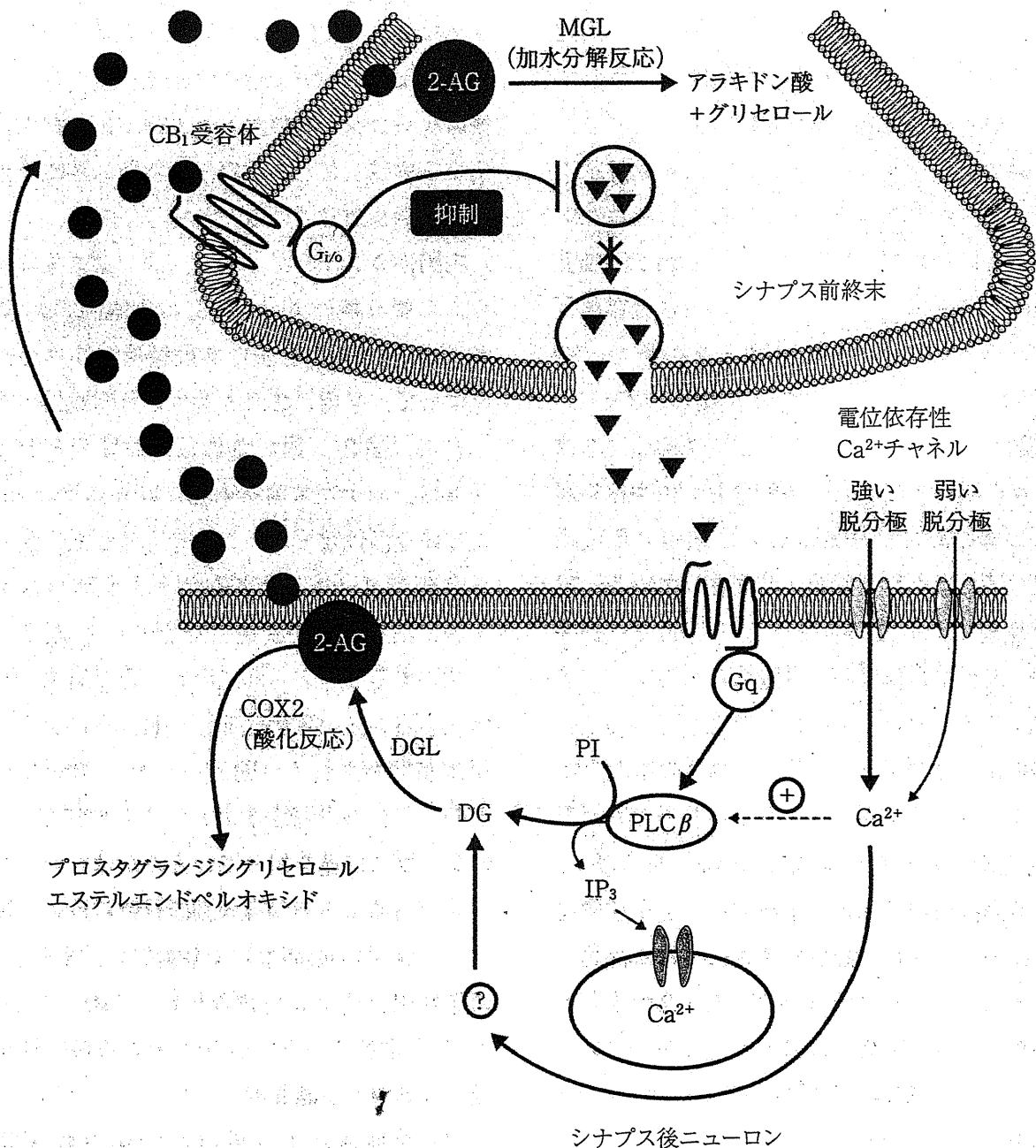


図3 内因性カンナビノイドによる逆行性シナプス伝達機構

内因性カンナビノイド (2-AG) の産生・放出・代謝機構と、CB₁受容体の活性化を介したシナプス前終末部からの神経伝達物質の抑制。

COX2 (シクロオキシゲナーゼ2), DG (ジアシルグリセロール), DGL (ジアシルグリセロールリパーゼ), IP₃ (イノシトール三リン酸), MGL (モノアシルグリセロールリパーゼ), PI (ホスファチジルイノシトール), PLCβ (ホスホリパーゼCβ).

(Hashimotodani Y, et al, 2007⁶⁾, Di Marzo V, 2008²⁾ を改変)

の WIN55,212-2 による EPSCs の阻害作用は、CB₁ 受容体拮抗薬 rimonabant (SR141716A) により拮抗されることから CB₁ 受容体を介した反応であることがわかる。

一方、カンナビノイドによる GABA 遊離抑制作用は、線条体および黒質網様部の神経で初めて明らかにされた。WIN55,212-2 は、GABA 性抑制性シナプス後電流 (inhibitory

postsynaptic currents: IPSCs) を抑制し、GABA の遊離を抑制することが知られている。

大麻の依存性

Olds と Milner は脳内自己刺激行動を指標に、脳内報酬系を発見した。脳内報酬系は腹側被蓋野を起始核とし、内側前脳束を経て側坐核や前頭前皮質へと投射する中脳皮質辺縁系ドパミン (dopamine: DA) 神経路からなる。依存性薬物は報酬としての“快”の知覚効果 (subjective effect) を有し、食餌・水などの“自然報酬 (natural reward)”に対し、特殊な外来刺激としての薬物から得られる報酬として“薬物報酬”とよばれている。依存性薬物の報酬効果 (rewarding effect) あるいは強化効果 (reinforcing effect) は、この DA 神経系の活性化を介して発現すると考えられている。大麻およびその活性成分 Δ^9 -THC は他の依存性薬物同様に、知覚効果として多幸感や幸福感をヒトで誘発することが知られている。この報酬効果を動物で検出・測定する実験方法としては、(1) 薬物弁別試験法 (drug discrimination procedure)、(2) 条件づけ場所嗜好性試験法 (conditioned place preference: CPP) ならびに (3) 薬物自己投与実験法 (drug self-administration procedure) などがあげられる。本項では、上記3つの実験法を中心に大麻の報酬効果 (依存性) を概説する。

1. 薬物弁別試験に基づく大麻の報酬効果

a. 薬物弁別試験法

ヒトはアルコール種の違いや食物の味覚の違いを摂取時の感覚を基に判断し、他との比較の

うえにそのものを認知している。依存性薬物も摂取によって特異な感覚効果を誘発し、ヒトでは質問表によってその薬物の摂取感覚を調べることができる。実験動物の薬物に対する感覚効果は、薬物弁別試験法で追究検討されている。

薬物弁別試験は、一般的には2つのレバーが備え付けられたオペラント装置を用いて実施される。まず動物に、訓練薬物の投与時は2つのうち一方のレバーを、また溶媒投与時には他方のレバーを押すと報酬 (餌など) が得られる条件下に、レバー押し訓練を行う。この訓練は訓練薬物と溶媒とを区別できるようになるまで繰り返し行う。訓練終了後に、被検薬物を投与して、訓練薬物側のレバーを押すのか、あるいは溶媒側のレバーを押すのかを調べることによって被検薬物の薬理学的特性 (感覚的類似性) が明らかになる (般化試験 (generalization test))。このように本実験法は、諸種依存性薬物の類似性を明らかにする目的で頻用されるが、訓練薬物の持つ薬理学的因子のプロフィールを明らかにするための“tool”としても汎用されている⁷⁾。

b. 大麻弁別特性

Δ^9 -THC は、ラットやサルにおいて薬物弁別効果を発現する。この Δ^9 -THC によるラットの弁別刺激効果は、大麻由来の天然カンナビノイドである Δ^8 -THC、THC の代謝活性体である 11-OH-THC によって完全に般化する。一方、同じ天然カンナビノイド類の中でも幻覚などの精神作用を示さない CBD は、THC の弁別刺激効果に対して般化を示さず、また、 Δ^9 -THC による弁別刺激作用に対して拮抗作用も増強作用も示さない⁸⁾。ラットの大麻樹脂喫煙による弁別刺激行動も成立し、 Δ^9 -THC および Δ^8 -THC がそれぞれ般化する。しかし、CBN や CBD では般化しない。このことから、大麻

表2 薬物弁別試験法を用いた Δ^9 -THCの弁別特性

Δ^9 -THCに般化する薬物	Δ^9 -THCに般化しない薬物	
植物由来カンナビノイド	植物由来カンナビノイド	その他の薬物
Δ^9 -THC	カンナビジオール	アンフェタミン
Δ^8 -THC	合成カンナビノイド	LSD
カンナビノール*	(+)- Δ^8 -THC	サイロシビン
代謝活性体	カンナビジオールメチルエーテル	フェンシクリジン
11-OH-THC	アブノーマルカンナビジオール	モルヒネ
合成カンナビノイド	デキストロナントラドール	ペンタゾシン
ナビロン		ケトサイクラゾシン
WIN55,212-2		デキサメタゾン
CP55,940		ペントバルビタール
		イミプラミン
		ハロペリドール
		アトロピン

*: 大麻樹脂喫煙による弁別刺激効果には般化しない。

(Balster RL, et al, 1992⁹⁾ を一部改変)

樹脂には多くの成分が含まれているが、その重要な精神作用の発現にはCBNとCBDは関与していないことがわかる。

一方、 Δ^9 -THCによる弁別刺激効果は、CB₁受容体拮抗薬であるrimonabant(SR141716A)によって完全に拮抗されるが、依存性薬物と関係するDAやオピオイド神経系の拮抗薬では拮抗されない⁷⁾。また、合成CB₁受容体作動薬CP55,940およびWIN55,212-2によって完全に般化するが、幻覚剤サイロシビン、麻薬性鎮痛薬モルヒネ、ベンゾジアゼピン系抗不安薬ジアゼパム、解離性麻酔薬フェンシクリジンには般化しない。これらの知見は、カンナビノイドの弁別刺激特性がきわめて特異的であることを示している⁹⁾(表2)。

近年、SolinasとGoldbergらは Δ^9 -THCの弁別刺激効果がヘロインによって増強され、その増強効果が μ -オピオイド受容体拮抗薬であるnaltrexonにより拮抗されることを報告した¹⁰⁾。さらに、単独では弁別効果が認められない少量の Δ^9 -THC投与でも、腹側被蓋野への内因性オピオイド β -エンドルフィン(内因性 μ -オピオイド受容体作動薬)注入により Δ^9 -

THC弁別刺激行動が成立することが報告されている。しかし、 δ -オピオイド受容体作動薬SNC-80および κ -オピオイド受容体作動薬U50,488では、このような作用は認められず、 μ -オピオイド受容体に特異的な作用であることがわかる。

このように、カンナビノイドの弁別刺激特性は特異的なものであるが、その発現には少なくとも μ -オピオイド受容体が促進的に関わっている可能性が示唆される。一方、 μ -オピオイド受容体作動薬(ヘロインおよびモルヒネ)の弁別刺激効果も、同様に Δ^9 -THCによって増強されることが明らかにされている¹¹⁾。これらの知見は、大麻乱用における多剤併用の薬理的根拠を与えるものと考えられる。

2. 条件づけ場所嗜好性試験を用いての大麻の報酬効果

a. 条件づけ場所嗜好性試験法

条件づけ場所嗜好性(CPP)試験法はパプロフ型条件づけを応用したもので、識別可能な2

つの実験箱（コンパートメント）が用いられる。両コンパートメントは中央部に設置されたギロチンドアにより仕切られ、ドアを外すことによって動物はコンパートメント間を自由に往来することができる。一般的には、動物に被験薬物を投与し特定のコンパートメントに一定時間入れ、翌日溶媒（生理食塩液）を投与し（感覚効果なし）、別のコンパートメントに同様の時間入れるスケジュールを反復訓練する。このような状況下では、動物はある種の薬物による感覚効果とコンパートメントの環境刺激（視覚的、触覚的、および嗅覚的の刺激など）とを受動的に関連づけるようになり、往来が可能な条件下でも薬物投与時に特定のコンパートメントに移動するようになる（条件づけ場所嗜好性行動）。

感覚・知覚効果を有する一連の依存性薬物は、このような条件づけ場所嗜好性行動を起こすことが知られている。言い換えれば、訓練薬物投与によって条件づけ場所嗜好性行動が成立すれば、その被験薬物は報酬・強化効果を有していると推測できる。逆に、訓練薬物投与時とは異なるコンパートメントに移動した場合には回避行動と推測され、その被験薬物は場所嫌悪性（conditioned place aversion: CPA）を有していると推察される。

b. Δ^9 -THC ならびに他のカンナビノイドの場所嗜好性 (CPP) と場所嫌悪性 (CPA)

Δ^9 -THC は、1.0 mg/kg の用量において顕著な CPP が成立し、逆に 2.0 mg/kg ならびに 4.0 mg/kg では CPA が成立する。 Δ^9 -THC の CPP ならびに CPA は、いずれも rimonabant により完全に拮抗される。CP55,940 も CPP が成立し、rimonabant により拮抗される。この CP55,940 による場所嗜好性は μ -オピオイド受容体拮抗薬であるナロキソンによっても完全に拮抗される。 μ -オピオイド受容体欠損マウス

では、 Δ^9 -THC の CPP は成立しないこと、また、 μ -および δ -受容体の二重欠損マウスでは減弱することが報告されている。このように、 Δ^9 -THC を含むカンナビノイドによる場所嗜好性反応には μ -オピオイド受容体が一部関与していることがわかる。

3. 薬物自己投与実験法を用いての大麻の報酬効果と依存性

薬物自己投与実験法は、実験動物が自発的に薬物を摂取する点でヒトでの薬物摂取形態に類似することから、薬物依存研究の手法として採用されている。薬物自己投与実験は、(1) 薬物自己投与行動の獲得・維持過程、(2) 薬物を生理食塩液に置換して行う消去過程、ならびに (3) 薬物探索行動（“渴望”）の発現の3つの要素からなる¹²⁾ (図4)。

一般的にはオペラント装置を用いた小動物での薬物自己投与実験を試みると、ヒトで報酬（強化）効果を発現し依存性を有する薬物によって薬物自己投与行動が成立する。また、薬物自己投与行動（薬物摂取行動）が成立した小動物を用い、訓練薬物から生理食塩液注入に切り替えるとレバー押し行動は減弱する。この退薬時では、ある種の外来刺激によって薬物探索行動（生理食塩液注入下）が誘発されることが知られている。

動物実験における薬物探索行動の誘発因子は、(1) 訓練薬物または興奮性薬物の少量投与（priming）、(2) 薬物摂取時に与えていた関連刺激（音・光；cue）提示、および (3) ストレス負荷（電撃ショックなど）があげられる。これらの誘発刺激によって、生理食塩液注入下であるにもかかわらずレバー押し行動（薬物探索行動）が再燃される（図4）。ヒトでの薬物探索行動を彷彿させることから、小動物における

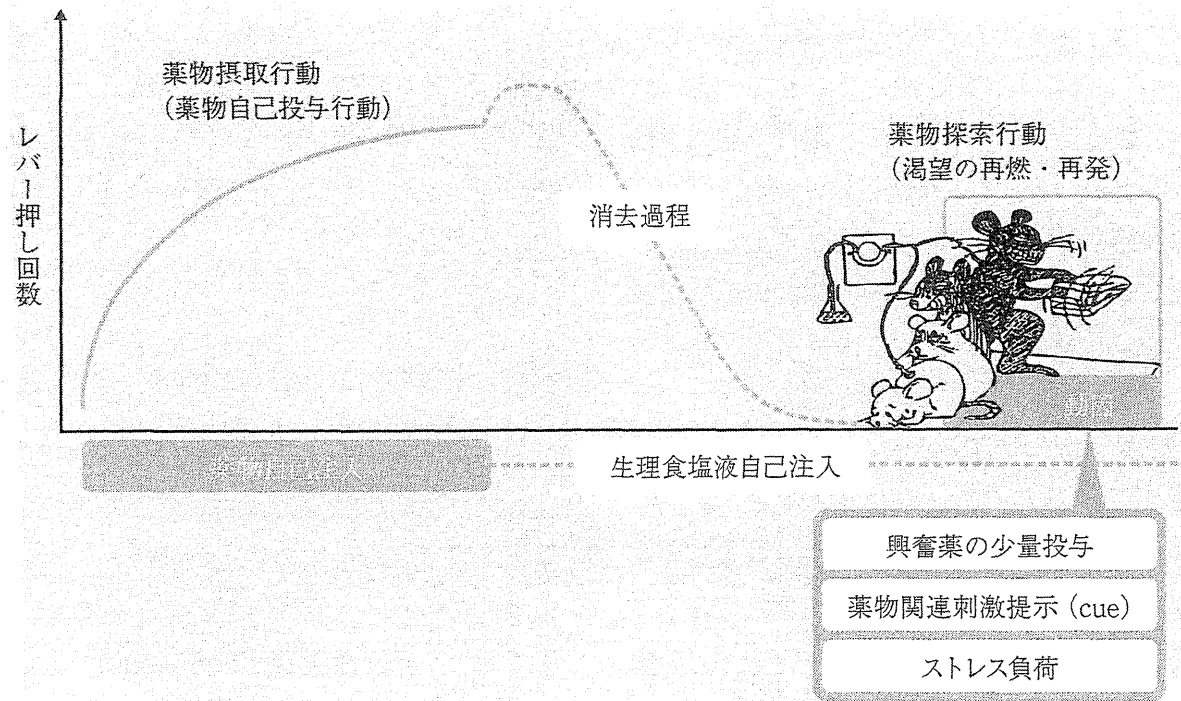


図4 ラットの薬物自己投与実験法を用いての薬物摂取行動ならびに薬物探索行動（“渴望”）の発現
 （山本経之，2007¹²⁾より）

このレバー押し行動は薬物探索行動の指標とされている¹²⁾。

a. 大麻摂取行動の成立

1970年代初頭に始まった Δ^9 -THC自己投与行動に関する研究によって、カンナビノイド類の自己投与行動はナイーブな動物では認められず、コカインやフェンシクリジンなどの依存性薬物の自己投与履歴を持つ動物を用いて、途中から Δ^9 -THC自己投与訓練を行ったときのみ成立すると報告されていた。これらのことから、大麻の依存性はほとんどないものと結論づけられてきた。しかし、Long Evans系およびLister系ラットではカンナビノイド自己投与行動が成立し、Sprague-Dawley系ラットでは成立していない¹³⁾など、ラットの系統差によってカンナビノイドの報酬効果の発現に差があるとの指摘がある。また、 κ -オピオイド受容体欠損マウスではWIN 55,212-2自己投与行動の習得が促進される。Mendizábalら¹⁴⁾はこの点

に着目し、カンナビノイド自己投与行動の成立が困難であるのは、カンナビノイドによる κ -オピオイド受容体の活性化に基づく不快作用のために、報酬効果がマスクまたは減弱されている点にあると指摘している。

一方、2000年代初頭からのGoldbergら^{15,16)}を中心とする研究によって、ラットにおけるカンナビノイド自己投与行動が成立することが明らかにされた。また合成カンナビノイドCB₁受容体作動薬WIN 55,212-2、HU-210およびCP55,940によってもマウスやラットにおいて自己投与行動が成立している。

サルを用いた実験においても、コカイン自己投与行動の履歴を持つ動物に Δ^9 -THCの自己投与訓練を新たに始めると、 Δ^9 -THC自己投与行動が成立する。この結果から、 Δ^9 -THCがコカイン類似の強化効果を発現することがわかる。さらに、薬物履歴のないサルを用いての実験でも、先のコカイン履歴のサルの実験の場合の2倍用量の条件下においてTHC自己投与行動が

成立することも明らかにされている。この Δ^9 -THC 自己投与行動は rimonabant により抑制されることから、 Δ^9 -THC は CB_1 受容体の活性化を介して強化効果を発現していることがわかる。

Justinova らも、リスザルで Δ^9 -THC (4.0 μ g/kg/inj.) の自己投与行動が成立することを明らかにしている¹⁶⁾ (図5)。薬物自己投与行動の発現において、注入量は重要な要因である。 Δ^9 -THC 自己投与行動でのレバー押し反応数は、1回あたりに注入される Δ^9 -THC用量を上げると減弱する。一方、内因性カンナビノイドであるアナンダミドやその合成活性物質メタアナンダミドの自己投与行動もサルで成立することが明らかにされている¹⁷⁾。また、CB受容体作動薬 WIN 55,212-2 も自己投与行動が成立する。この自己投与行動の発現時では、側坐核 shell 部での DA 遊離増加を起こし、その遊離量はレバー押し反応と相関することが示されている。このようにカンナビノイドの強化効果は、側坐核 shell 部での DA の遊離に基づいて発現することが示唆されている。

一方、Solinas らは Δ^9 -THC があらかじめ反復投与された動物を用い、ヘロイン自己投与行動の変容を調べている。この報告では、ナイーブな動物に比べて、 Δ^9 -THC 前処置群では1試行あたりのヘロイン自己投与量が有意に増加することが示されている¹⁸⁾。比率累進法 (progressive ratio) を用いての実験では、種々のヘロイン自己投与量において、いずれも break point の変化は認められていない¹⁸⁾。これらの結果から、Solinas らは、この Δ^9 -THC 前処置によるヘロイン自己投与量の増加作用は、ヘロイン報酬効果の増強を意味するのではなく、 Δ^9 -THC とヘロインとのあいだに交差耐性が生じた結果であろうと結論づけている。いずれにしても、近年のカンナビノイドの知見か

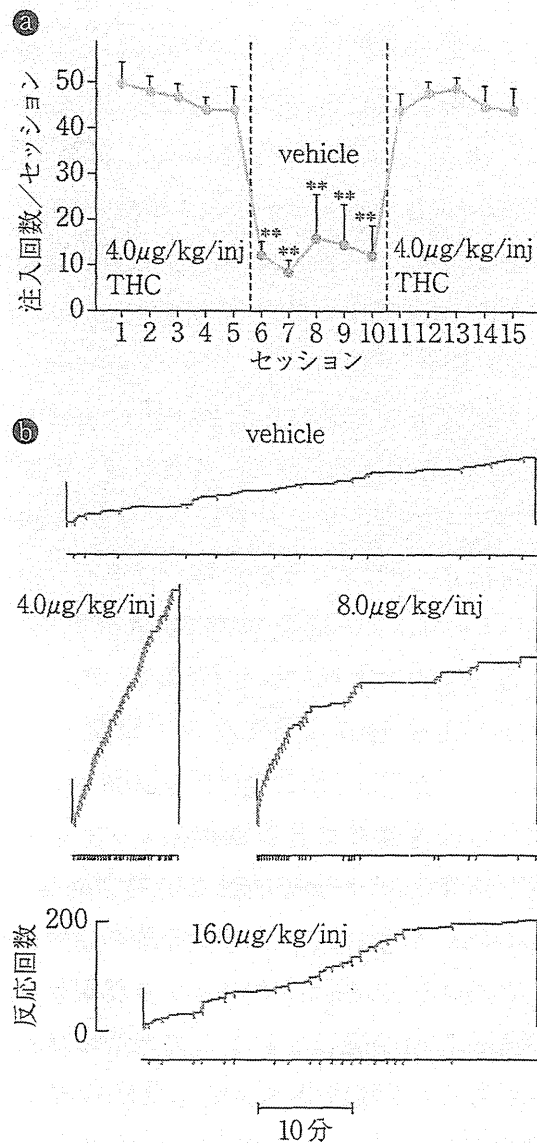


図5 リスザルでの Δ^9 -THC自己投与行動の発現

a: Δ^9 -THC (4.0 μ g/kg/inj) 自己投与行動の発現、消去ならびに再獲得過程での薬物注入回数。

** : $p < 0.01$ vs 維持過程最終投与日。

b: 異なる注入用量を用いての Δ^9 -THC自己投与行動パターン。

縦軸は反応回数を、横軸は時間を表している。低用量の Δ^9 -THC (4.0 μ g/kg/inj) ではセッションを通して安定したレバー押し反応が認められる。一方、高用量のTHC (8.0, 16.0 μ g/kg/inj) ではセッション後半になるにつれレバー押し反応が減少する。

(Justinova Z, et al, 2003¹⁶⁾ より)

ら考えると、大麻 (カンナビノイド) は依存性がないとするのは誤りであり、覚せい剤やコカインに比べて弱いながらも“依存の危険性はある”ととらえるべきである。

薬物自己投与行動の発現メカニズムをカンナビノイド受容体とオピオイド受容体の相互関与の面から追究した研究も行われている。マウスの単回自己投与試験法を用いた実験では、WIN 55,212-2 あるいは HU-210 の薬物自己投与行動は、ナロキソンによりいずれも抑制される。一方、サルを用いた薬物自己投与試験では、 Δ^9 -THC 自己投与行動は、同様に naltrexon の前投与により抑制されることが報告されている。薬物自己投与試験法を用いたこれらの知見は、CPP と同様に、カンナビノイドの報酬効果発現に μ -オピオイド受容体が促進的な役割を演じていることを示唆している。

一方、モルヒネ自己投与行動は、カンナビノイド CB_1 受容体欠損マウスでは成立しない。また、慢性的な薬物自己投与試験では、ヘロイン、モルヒネおよび選択的 κ -オピオイド受容体作動薬の salvinorin 自己投与行動は、rimonabant の急性投与により減弱する¹⁹⁾。さらに比率累進法に基づくヘロイン自己投与行動も、同様に rimonabant によって用量依存的に減少することが報告されている。ヘロイン自己投与行動は、自己投与回数と相関して側坐核 shell におけるアナンダミド遊離を増加させる。しかしながらこのとき、逆に 2-AG 量は減少している²⁰⁾。近年、Justinova らは、FAAH 阻害薬である URB597 投与によって、脳内アナンダミドの増加に伴い 2-AG 量が減少することを明らかにしている²¹⁾。したがって、上記のヘロイン自己投与に伴う 2-AG の減少作用は、アナンダミド遊離増加により生じたダウンレギュレーションの結果と考えられる。このように、オピオイド類の報酬効果発現にはカンナビノイドシステムが促進的な役割を演じていることがわかる。

コカイン、D-アンフェタミンおよびニコチン自己投与行動は、 CB_1 受容体欠損マウスにお

いて野生型マウスと同様に発現する。また、ヘロイン自己投与行動で認められた側坐核 shell での内因性カンナビノイドの変化は、コカイン自己投与時では認められていない²⁰⁾。このように、 CB_1 受容体は、中枢神経刺激薬やニコチンの報酬効果発現には関与していないことがわかる。

b. 薬物探索行動 (“渴望”) の発現における大麻ならびに内因性カンナビノイドの関与

i. カンナビノイド探索行動

リスザルを用いた検討において、 Δ^9 -THC 自己投与後の退薬時に、 Δ^9 -THC priming 投与または薬物摂取時の薬物関連刺激の提示により Δ^9 -THC 探索行動が誘発されることが報告されている (図 6)。高用量 (80 μ g/kg) では、著明な Δ^9 -THC 探索行動は認められていない。高用量での探索行動の減弱は、強化効果としての “satiation (飽和)” もしくは鎮静 / カタレプシー (蟻屈症) などの行動毒性が生じている可能性が考えられる²²⁾ (図 6)。一方、 Δ^9 -THC priming 投与により誘発される THC 探索行動は rimonabant によって抑制されるが、naltrexon では抑制されない²²⁾。また、モルヒネ priming 投与により誘発される THC 探索行動は、naltrexon により抑制されるが、rimonabant では抑制作用が認められていない²²⁾。これら結果から、薬物 priming 投与により誘発される Δ^9 -THC 探索行動の発現機序は、priming 薬物の薬理作用に依存することが推察される。

他のカンナビノイド関連物質であるアナンダミド、メタアナンダミドおよびアナンダミド変換阻害薬 AM404 も、 Δ^9 -THC 探索行動を誘発することが報告されている。さらに、カンナビノイド以外の薬物では、モルヒネも Δ^9 -THC 探

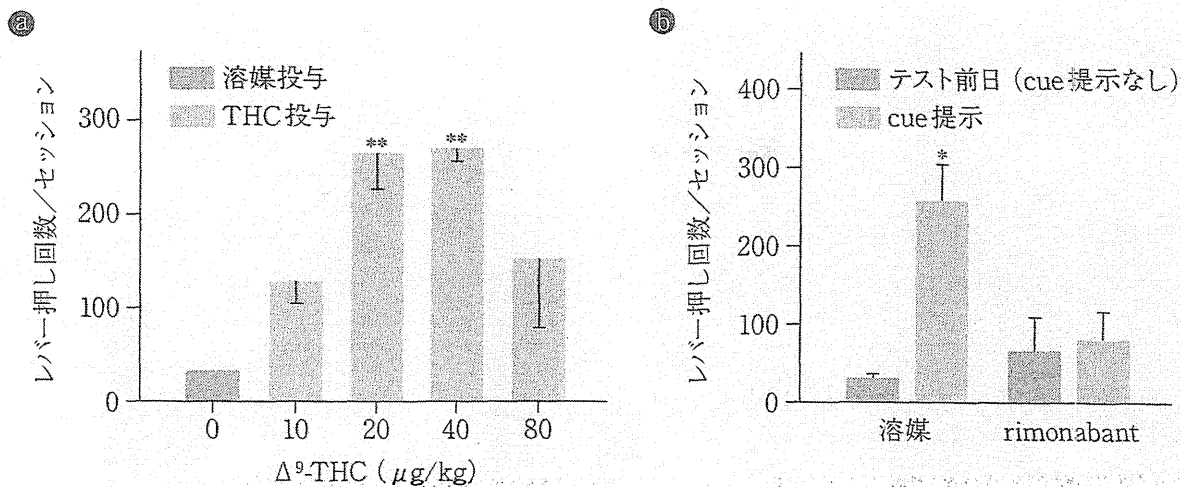


図6 リスザルでの Δ^9 -THC primingならびに薬物関連刺激 (cue) 提示による Δ^9 -THC探索行動の発現

a: Δ^9 -THC (i.v.) のpriming投与. **: $p < 0.01$ vs 溶媒投与.

b: cue提示による Δ^9 -THC探索行動の発現に対するCB₁受容体拮抗薬rimonabant (0.3 mg/kg, i.m.) による拮抗作用. *: $p < 0.05$ vs テスト前日.

(Justinova Z, et al, 2008²²⁾ より)

探索行動を誘発するが、コカインではそのような作用は認められていない²²⁾。このように、 Δ^9 -THC および合成カンナビノイド類の薬物探索行動の発現には、CB₁ 受容体とともに μ -オピオイド受容体の活性化が重要な役割を演じていることがわかる。

一方、WIN 55,212-2 自己投与後の退薬時に、WIN 55,212-2 の priming 投与により WIN 55,212-2 探索行動が発現する。この WIN 55,212-2 探索行動は、コカインまたはヘロインの priming 投与でも誘発される。WIN 55,212-2 およびヘロインによる WIN 55,212-2 探索行動はいずれも rimonabant によって抑制され、興味深いことにはナロキソンによっても抑制される。このように、rimonabant とナロキソンの拮抗作用の相違から、先に述べた Δ^9 -THC 探索行動と WIN 55,212-2 探索行動のそれは、発現メカニズムを異にしていることが推察される。

FAAH 阻害薬 URB597 は脳内アナンダミド量を有意に増加させるが、 Δ^9 -THC 探索行動およびアナンダミド探索行動をいずれも誘

発しない。また、 Δ^9 -THC、アナンダミドおよびコカインの自己投与行動が成立した動物に、URB597 自己投与訓練を加えても、自己投与行動は成立しない。このように、アナンダミドと類似した作用発現が期待される URB597 であるが、薬物自己投与行動ならびに薬物探索行動の発現における作用は大きく異なる。Justinova らは、脳内アナンダミド量を増加させる用量の URB597 は、同時に 2-AG に対しダウンレギュレーションを起こし 2-AG の脳内濃度を著しく減少させるとの興味深い結果も報告している。URB597 が薬物摂取行動や薬物探索行動を発現しないのは、この URB597 による脳内 2-AG 減少作用に基因することが推察される²²⁾。その他、URB597 では、THC で認められるカタレプシー、体温低下や過食作用を誘発しないなど、URB597 はこれまでのカンナビノイドとは異なる作用態度を示すことも明らかにされている。

ii. メタンフェタミンおよびヘロイン探索行動

メタンフェタミンの退薬時 (消去過程) にメタンフェタミン priming 投与または薬物関連

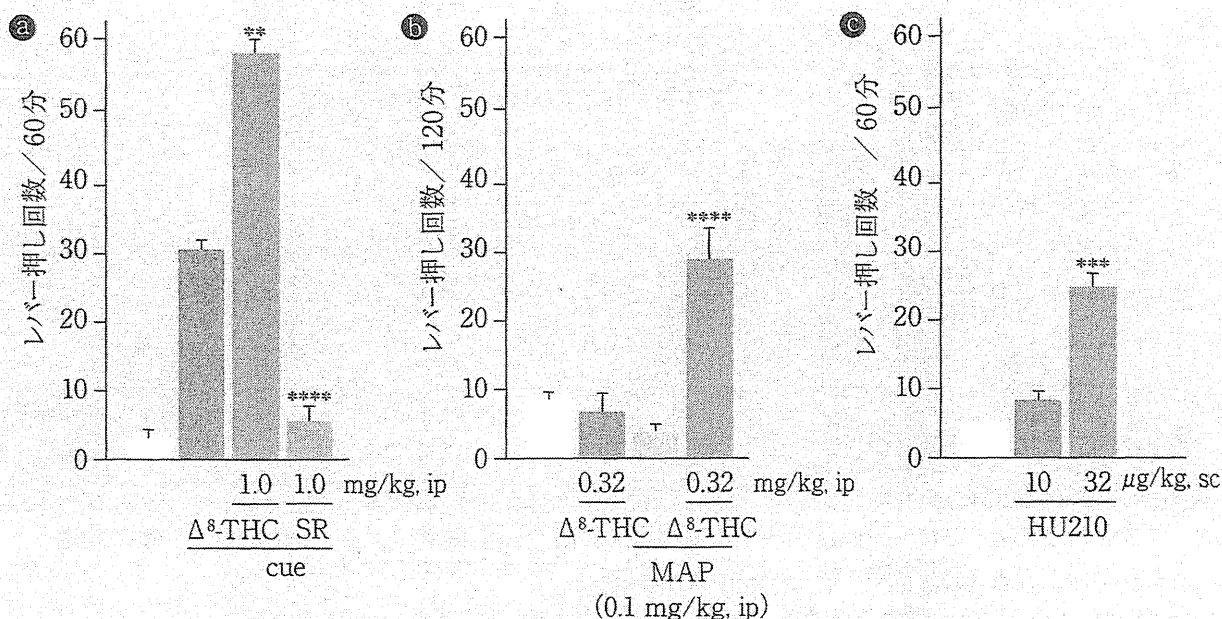


図7 メタンフェタミン (MAP) 探索行動の発現に及ぼす Δ^8 -THC, CB_1 受容体拮抗薬rimonabant (SR) ならびに CB_1 受容体作動薬HU210の作用

- a: 薬物関連刺激 (cue) 提示によるMAP探索行動の発現. **: $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$ vs cue提示群.
 b: 単独ではMAP探索行動を誘発しない用量での Δ^8 -THCならびにMAPの併用投与によるMAP探索行動の発現. ****: $p < 0.0001$ vs 溶媒投与群.
 c: CB_1 受容体作動薬HU210によるMAP探索行動の発現. ***: $p < 0.001$ vs 溶媒投与群.

(Anggadiredja K, et al, 2004²³); Hiranita T, et al, 2008²⁴) より)

刺激を提示すると、メタンフェタミン探索行動が出現する (図7)。しかし、 Δ^9 -THCの同族体である Δ^8 -THC単独投与ではメタンフェタミン探索行動は出現しないが、 CB_1 受容体作動薬HU210では出現する。メタンフェタミン priming 投与または薬物関連刺激によるメタンフェタミン探索行動は、 Δ^8 -THCによって増強され、逆に CB_1 受容体拮抗薬であるrimonabantによって拮抗される (図7)^{23,24}。さらに、単独ではメタンフェタミン探索行動を誘発しない Δ^8 -THC (0.32 mg/kg) ならびにメタンフェタミン (0.1 mg/kg) の併用投与により、著明なメタンフェタミン探索行動が誘発される。

逆に、メタンフェタミンの退薬時に Δ^9 -THCを投与すると、メタンフェタミン探索行動は抑制される²³。コカインの反復投与を行うと、辺縁系での2-AG量は減少することが明らかに

されている。これらの知見を総合すると、脳内 CB_1 受容体の不活性化が薬物探索行動の“準備状態”を形成している可能性が示唆され、薬物探索行動の再燃には脳内 CB_1 受容体の活性化が必須と考えられる。この点から考えると、rimonabantはメタンフェタミン依存症治療薬としての可能性がおおいに期待される。

一方、精神作用を発現しないカンナビノイド類として知られるカンナビジオールは、薬物関連刺激提示により誘発されるヘロイン探索行動を選択的に抑制することが報告された²⁵。Renらはこの点に着目し、カンナビジオールのヘロイン依存症治療薬としての可能性を指摘している。

大麻の退薬症候の発現

オピオイドの反復投与後の自然退薬により、

ジャンプ、前肢振戦 (fore-paw tremor)、瞬間的首振り行動 (head-twitch) および身震い行動 (wet-dog shaking) などの著明な退薬症状が発現することはよく知られている。 Δ^9 -THC はオピオイド類と比べると、少なくとも自然退薬でははっきりとした退薬症状が認められない。これは、 Δ^9 -THC が脂溶性であり、その半減期が比較的長いことに基因すると考えられている。しかし、 Δ^9 -THC を反復投与した後では、カンナビノイド CB_1 受容体拮抗薬である rimonabant の投与により振戦や首振り行動などの Δ^9 -THC の退薬症状が発現する。

大麻のその他の中枢作用

1. Δ^9 -THC によるラットの行動異常

ラットの自発運動量は、5 mg/kg (i.p.) 以下の用量では増加し、また 5 mg/kg (i.p.) 以上の用量では抑制される。このとき、常同的な激しい嗅ぎ回り行動 (sniffing) や、外来の刺激に対して激しい鳴き声を発するなどの被刺激性の増大が観察される。また、後ずさり (walking back) や後肢を軸に回転する行動 (pivot) などの異常行動が出現する。これらの異常行動は、LSD やメスカリンなどの幻覚剤に共通してみられる行動変容である。しかし、幻覚剤で共通して認められる首振り行動は Δ^9 -THC 投与では認められず、幻覚剤の作用プロフィールとも異なる。 Δ^9 -THC の異常行動は反復投与によって耐性も逆耐性も形成されず、また投与中止によりすみやかに消失する。

10 mg/kg (i.p.) 以上の用量を投与すると、静かな環境下で観察した場合にカタレプシー (蠟屈症) 様の不動状態が認められる。この Δ^9 -THC によるカタレプシー様行動は、ハロペリドールを代表とする統合失調症治療薬によって

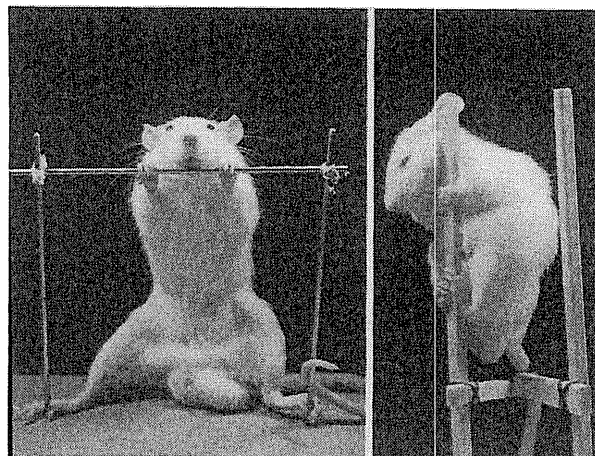


図8 Δ^9 -THCにより誘発されるカタレプシー (蠟屈症) 様作用

認められるそれと類似しているが、外来刺激によって容易に消失する点や黒質-線条体系の関与が低い点で異なっている。いずれにしてもこのカタレプシー様行動は、大麻乱用者で認められる感情の平板化・自発性の減退、また興味・関心の減退を呈する動因喪失症候群 (amotivational syndrome) と行動様式が類似することからその動物モデルととらえている研究者もいる (図8)。

2. Δ^9 -THC によるラットの攻撃性の発現

ラットの隔離飼育条件下に、 Δ^9 -THC (6 mg/kg, i.p.) を1回投与すると、mouse-killing で代表される特徴的な攻撃的攻撃行動 (offensive aggression) が出現する。また、棒に対しても噛み砕くほどの攻撃性や空気を吹き付けるとジャンプするなどの被刺激性の増大が認められる。これらの攻撃行動は、隔離飼育を続ける限り100日以上観察される。しかし、これらの攻撃行動は、ラットの隔離飼育条件を集団飼育条件下に替えるとすみやかに消失する。このことは、 Δ^9 -THC 攻撃行動の発現が環境要因によって左右されることを如実に示すものである。これらの知見は、大麻作用の特徴

の一つである“set (大麻喫煙時の気持ち) and setting (大麻喫煙時の環境)”によって、発現する薬理作用が異なるとの臨床知見を彷彿させる実験結果として興味深い。

3. Δ^9 -THC によるラットの時間的感覚の障害

レバーを押すと陽性強化としての餌ペレットが得られる報酬期 (30 秒間) とそれに続くレバーを押しても餌強化が得られない無報酬期 (5 分間) からなる固定間隔強化課題を訓練すると、ラットは 5 分という時間間隔を把握することができるようになる。すなわち、無報酬期ではレバー押し行動は抑制され、その終了間際の 4 分 30 秒あたりからレバー押し行動が開始され報酬期まで続く。

筆者らはこの実験系を用い、ラットの時間感覚に及ぼす Δ^9 -THC の影響を調べた。 Δ^9 -THC を投与すると 5 分の無報酬期でのレバー押し行動の開始時間が早まり、レバー押し反応のパターンが崩れる。報酬期のレバー押しの回数そのものには Δ^9 -THC 投与による影響はないが、報酬期を的確にとらえきれず餌強化が得られないケースが見受けられる。すなわち 無報酬期のレバー押しの反応曲線は左側に移動し、時間間隔の認識障害が認められるようになる。ラットを用いたこの実験結果は、ヒトで大麻喫煙によって時間経過が実際よりゆっくり経過するように感じ、時間認識の変容が起こるとの臨床知見と考え合わせると興味深い。

おわりに

薬物乱用の爆発的な拡大をみるなかで、ヘロインやコカインなどの“ハードドラッグ”における顕著な有害性を意識するあまり、大麻に“ソ

フトドラッグ”のイメージを与えている。基礎・臨床にかかわらず大麻に関する研究は、世界的に減少傾向にある。

先進国の中で、薬物乱用防止策が比較的に功を奏しているのはわが国だけである。しかし、近年の国際化の波にのまれ、わが国でも薬物乱用の拡大が懸念されている。本項で述べたように、大麻の精神的依存性はほかの依存性薬物に比べると弱いですが、確かに存在する。大麻の臨床知見としても、強迫的な大麻使用者を除けば、探索行動が切迫する患者は少ないが、長期使用しているケースでは精神的依存性は形成されたと考えられている。 Δ^9 -THC は大麻の精神作用に関わる主要な活性成分であるが、大麻に含まれるその含有量は必ずしも一定ではなく、産地や収穫時期によって異なることが知られている。大麻の依存性や精神的な障害を考えるうえにおいて、この点を新たな留意点として再考することも肝要である。

今後の基礎研究としては、(1) 環境要因を加えての Δ^9 -THC の反復投与 (とくに少量) による影響を検討する必要がある。また近年の薬物乱用は、より強力な報酬効果を求めて多剤乱用の傾向にある。大麻喫煙は、他剤の依存性薬物の報酬効果や依存性に影響を及ぼしている可能性もある。これらのことから、(2) Δ^9 -THC と他の乱用薬物の併用による作用態度の変容を調べるのが重要である。さらに、大麻に関する基礎的研究の多くは、大麻成分の中の“ Δ^9 -THC”だけの薬理作用の追究をもって“大麻”としている。これらの“ Δ^9 -THC”だけの薬理作用データを基に、 Δ^9 -THC など数十種の活性成分を含む大麻のヒトにおける臨床効果を予測することは危険であり、妥当性に欠ける面がある。したがって、(3) 小動物を用いた実験においても、“大麻喫煙”曝露下の実験を試みる必要がある。さらに、統合失調症や Alzheimer

病の患者脳での内因性カンナビノイド /CB₁ 受容体の異常性が、すでに散見されている。(4) 大麻乱用における大麻依存症や精神的障害が、内因性カンナビノイド /CB₁ 受容体のいかなる

変容と関係するのかは、新たな解決すべき興味ある課題である。

(山本経之, 縄田陽子)

[引用文献]

1. Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, et al. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 2006; 45: 405–46.
2. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 438–55.
3. Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, et al. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 2009; 89: 309–80.
4. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990; 346: 561–4.
5. Robert MJ. Marijuana: a unique sedative-euphoriant-psychedelic drug. *A Primer of Drug Action*, 8th ed, WH Freeman and Company, New York, 1997; p.319–49.
6. Hashimotodani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M. Ca²⁺-assisted receptor-driven endocannabinoid release: mechanisms that associate presynaptic and postsynaptic activities. *Curr Opin Neurobiol* 2007; 17: 360–5.
7. Yamamoto T, Takada K. Role of cannabinoid receptor in the brain as it relates to drug reward. *Jpn J Pharmacol* 2000; 84: 229–36.
8. Vann RE, Gamage TF, Warner JA, et al. Divergent effects of cannabidiol on the discriminative stimulus and place conditioning effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Drug Alcohol Depend* 2008; 94: 191–8.
9. Balster RL, Prescott WR. Delta(9)-tetrahydrocannabinol discrimination in rats as a model for cannabis intoxication. *Neurosci Biobehav Rev* 1992; 16: 55–62.
10. Solinas M, Goldberg SR. Involvement of mu-, delta- and kappa-opioid receptor subtypes in the discriminative-stimulus effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in rats. *Psychopharmacology* 2005; 179: 804–12.
11. Li JX, McMahon LR, Gerak LR, et al. Interactions between delta(9)-tetrahydrocannabinol and mu opioid receptor agonists in rhesus monkeys: discrimination and antinociception. *Psychopharmacology* 2008; 199: 199–208.
12. 山本経之. カンナビノイド受容体—中枢神経系における役割. *日薬理誌* 2007; 130: 135–40.
13. Solinas M, Yasar S, Goldberg SR. Endocannabinoid system involvement in brain reward processes related to drug abuse. *Pharmacol Res* 2007; 56: 393–405.
14. Mendizábal V, Zimmer A, Maldonado R. Involvement of kappa/dynorphin system in WIN 55,212-2 self-administration in mice. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 1957–66.
15. Tanda G, Munzar P, Goldberg SR. Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. *Nat Neurosci* 2000; 3: 1073–4.
16. Justinova Z, Tanda G, Redhi GH, et al. Self-administration of delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys. *Psychopharmacology* 2003; 169: 135–40.
17. Justinova Z, Solinas M, Tanda G, et al. The endogenous cannabinoid anandamide and its synthetic analog R(+)-methanandamide are intravenously self-administered by squirrel monkeys. *J Neurosci* 2005; 25: 5645–50.
18. Solinas M, Panlilio LV, Goldberg SR. Exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) increases subsequent heroin taking but not heroin's reinforcing efficacy: a self-administration study in rats. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 1301–11.
19. Braidá D, Limonta V, Capurro V, et al. Involvement of kappa-opioid and endocannabinoid system on Salvinorin A-induced reward. *Biol Psychiatry* 2008; 63: 286–92.
20. Caillé S, Alvarez-Jaimes L, Polis I, et al. Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in

- the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. *J Neurosci* 2007; 27: 3695–702.
21. Justinova Z, Mangieri RA, Bortolato M, et al. Fatty acid amide hydrolase inhibition heightens anandamide signaling without producing reinforcing effects in primates. *Biol Psychiatry* 2008; 64: 930–7.
 22. Justinova Z, Munzar P, Panlilio LV, et al. Blockade of THC-seeking behavior and relapse in monkeys by the cannabinoid CB(1)-receptor antagonist rimonabant. *Neuropsychopharmacology* 2008; 33: 2870–7.
 23. Anggadiredja K, Nakamichi M, Hiranita T, et al. Endocannabinoid system modulates relapse to methamphetamine seeking: possible mediation by the arachidonic acid cascade. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 1470–8.
 24. Hiranita T, Nawata Y, Sakimura K, et al. Methamphetamine-seeking behavior is due to inhibition of nicotinic cholinergic transmission by activation of cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology* 2008; 55: 1300–6.
 25. Ren Y, Whittard J, Higuera-Matas A, et al. Cannabidiol, a nonpsychotropic component of cannabis, inhibits cue-induced heroin seeking and normalizes discrete mesolimbic neuronal disturbances. *J Neurosci* 2009; 29: 14764–9.

大麻依存の臨床

大麻 (marijuana; cannabis) の主成分は THC (delta-9-tetrahydrocannabinol) であり、この物質が幻覚、多幸感などを起こすと考えられている。THC は水には溶けにくいですが、有機溶剤には溶けやすく、脳に存在するカンナビノイド受容体に結合し、作用を発現する。THC には麻酔作用と陶酔作用があるとされている。THC が脳に到達するとハイな気分になり、陶酔感や知覚変容がもたらされる。気分変化を求めて繰り返して大麻を乱用することにより精神依存が形成される。しかし、大麻には明らかな離脱症状はなく、身体依存は形成されないとされている。

一部の人は、大麻は依存性が弱いので乱用しても問題がないと考えているが、それは誤った考えである。依存性物質はすべて気分を変えるために乱用され、したがってすべての依存性物質は精神依存が形成される。この精神依存こそが物質

乱用依存の本質であり、一度獲得された乱用依存の体質は一生消えない。脳神経に記憶に似た変化を残すため、何年間も物質使用を中止していても、再使用によりすぐに以前の乱用依存状態に戻ってしまい、さらに悪化するのである。

また、求めた気分変化が十分得られないと、より依存性の強い物質に乱用対象が移行したり併用したりするのが一般的である。したがって、大麻や有機溶剤など若者の薬物乱用の入口になっているゲートウェイドラッグの乱用防止が、薬物乱用防止対策の最重要課題といえる。

疫学

1. 海外での大麻乱用

大麻は、米国では若者の薬物乱用の入口(ゲートウェイドラッグ)となっており、乱用者は900万人とも1,400万人ともいわれている。大麻乱用者では他の薬物への移行と併用が多いことが特徴である。より強い刺激を求めて、コカイン、さらにヘロイン乱用に移行する者を多く

Pathway-specific engagement of ephrinA5-EphA4/EphA5 system of the substantia nigra pars reticulata in cocaine-induced responses

Kensuke Kimura^{a,b}, Takatoshi Hikida^{a,c}, Satoshi Yawata^a, Takashi Yamaguchi^{a,d}, and Shigetada Nakanishi^{a,1}

^aDepartment of Systems Biology, Osaka Bioscience Institute, Suita, Osaka 565-0874, Japan; ^bDepartment of Biological Sciences, Kyoto University Faculty of Medicine, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan; ^cPrecursory Research for Embryonic Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan; and ^dDepartment of Aging Science, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Contributed by Shigetada Nakanishi, May 12, 2011 (sent for review April 28, 2011)

The nucleus accumbens (NAc) serves as a key neural substrate that controls acute and adaptive behavioral responses to cocaine administration. In this circuit, inputs from the NAc are transmitted through two parallel pathways, named the direct and indirect pathways, and converge at the substantia nigra pars reticulata (SNr). Our previous study using reversible neurotransmission blocking (RNB) of each pathway revealed that the dual stimulation of the SNr by both pathways is necessary for the acute response, but that the direct pathway predominantly controls the adaptive response to repeated cocaine administration. This study aimed at exploring the pathway-specific mechanism of cocaine actions at the convergent SNr. We examined a genome-wide expression profile of the SNr of three types of experimental mice: the direct pathway-blocked D-RNB mice, the indirect pathway-blocked I-RNB mice, and wild-type mice. We identified the up-regulation of ephrinA5, EphA4, and EphA5 specific to D-RNB mice during both acute and adaptive responses to cocaine administration. The activation by EphA4 and EphA5 in the SNr of wild-type mice by use of the immunoadhesin technique suppressed the adaptive response to repeated cocaine administration. Furthermore, cocaine exposure stimulated the phosphorylation of Erk1/2 in ephrinA5-expressing SNr cells in a direct pathway-dependent manner. The results have demonstrated that the ephrinA5-EphA4/EphA5 system plays an important role in the direct pathway-dependent regulation of the SNr in both acute and adaptive cocaine responses and would provide valuable therapeutic targets of cocaine addiction.

basal ganglia | drug addiction | Eph-ephrin signaling | gene regulation | transmission blocking

The basal ganglia are the key neural substrates that control motor balance and reward-based and aversive learning (1, 2). Dysfunction of the basal ganglia leads to devastating neurological disorders, such as Parkinson disease and drug addiction (3–5). The projection neurons in the striatum and the nucleus accumbens (NAc), the ventral part of the striatum, are GABA-containing medium-sized spiny neurons, which are divided into two subpopulations: striatonigral neurons in the direct pathway and striatopallidal neurons in the indirect pathway (1, 3, 6). The inputs of these two pathways converge at the substantia nigra pars reticulata (SNr) and control the dynamic balance of the basal ganglia-thalamocortical circuitry (1, 7). Cocaine and other psychostimulants massively increase dopamine levels in the NAc and the striatum and induce abnormal behavioral responses both acutely and chronically (8). We previously developed a gene-manipulating technique that allows separate and reversible neurotransmission blocking (RNB) of the direct pathway (D-RNB mice) and the indirect pathway (I-RNB mice) *in vivo* (9). The use of this technique revealed the distinct regulatory function of the two pathways in acute and chronic responses to cocaine exposure (9). Blockade of the direct pathway abrogates the acute response and then markedly attenuates the chronic re-

sponse to cocaine administration. In contrast, blockade of the indirect pathway abolishes the acute response as well; but the ability to induce normal levels of the chronic response after repeated cocaine administration is retained. The two pathways are thus necessary for the acute cocaine response but the direct pathway plays a predominant role in the adaptive response to repeated cocaine administration (9). However, the molecular and signaling mechanisms that underlie these different adaptive reactions by the two pathways remain to be clarified.

The SNr is composed mostly of GABAergic projection neurons and serves as a main target nucleus that receives GABAergic inputs from the direct pathway and both GABAergic and glutamatergic inputs from the indirect pathway (1, 7). In this study, we investigated what signaling molecules are involved in the pathway-dependent regulation of the SNr after cocaine administration. To address this question, we examined a genome-wide expression profile of the SNr of the D-RNB, I-RNB, and WT mice by using microarray and quantitative RT-PCR techniques. We identified the specific up-regulation of ephrinA5, EphA4, and EphA5 in the D-RNB mice after cocaine administration. We also revealed the inhibitory role and downstream signaling of the ephrinA5-EphA4/EphA5 system in cocaine-induced behaviors. This study has thus disclosed an important mechanism of the pathway-specific regulation of cocaine actions in the basal ganglia circuitry and would provide valuable therapeutic targets of drug addiction.

Results

Profiling of Gene Expression of the SNr in the D-RNB Mice After Cocaine Administration. In this study, we used previously developed RNB transgenic mice, in which the tetanus toxin light chain (TN) is restrictedly expressed in cells of either the direct or the indirect pathway (9). TN is a bacterial toxin that cleaves the synaptic vesicle-associated membrane protein-2 and thus blocks transmitter release from the synaptic vesicles. In RNB mice, the expression of TN is controlled by the tetracycline-responsive element (TRE) and thus driven by its interaction with the tetracycline-repressive transcription factor (tTA) in a tetracycline-derivative doxycycline-regulated manner. The restricted expression of tTA in either pathway is achieved by using the adeno-associated virus (AAV)-mediated gene-expression system, in which the expression of tTA is directed by the substance P promoter or the enkephalin promoter. Recombinant AAVs were bilaterally injected into the NAc, and 2 wk after the viral injection, locomotor activity was measured for 10 min immediately after cocaine (10 mg/kg) or saline administration. Both D-RNB

Author contributions: K.K., T.H., and S.N. designed research; K.K., T.H., S.Y., and T.Y. performed research; K.K. and T.H. analyzed data; and K.K., T.H., and S.N. wrote the paper. The authors declare no conflict of interest.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: snakanis@obi.or.jp.

and I-RNB mice failed to show acute hyperlocomotion after cocaine administration (9).

The SNr, which is a main target nucleus of the direct and indirect pathways, is rich in glutamic acid decarboxylase67 (GAD67)-immunoreactive cells and is located adjacent to the substantia nigra pars compacta (SNc), which is characterized by a high density of tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity (Fig. 1A) (10, 11). The SNr and the SNc could thus be easily separated and dissected by the characteristic architecture and cell shapes of these nuclei. We performed quantitative RT-PCR of dissected SNrs and confirmed that the SNrs used exhibited a high level of the GAD67 mRNA and a minimal contamination of the TH mRNA from the SNc (Fig. 1B). Furthermore, there was no difference in expression levels of the GAD67 mRNA among the D-RNB, I-RNB, and WT mice, regardless of whether the animals were treated or not with cocaine (Fig. 1B).

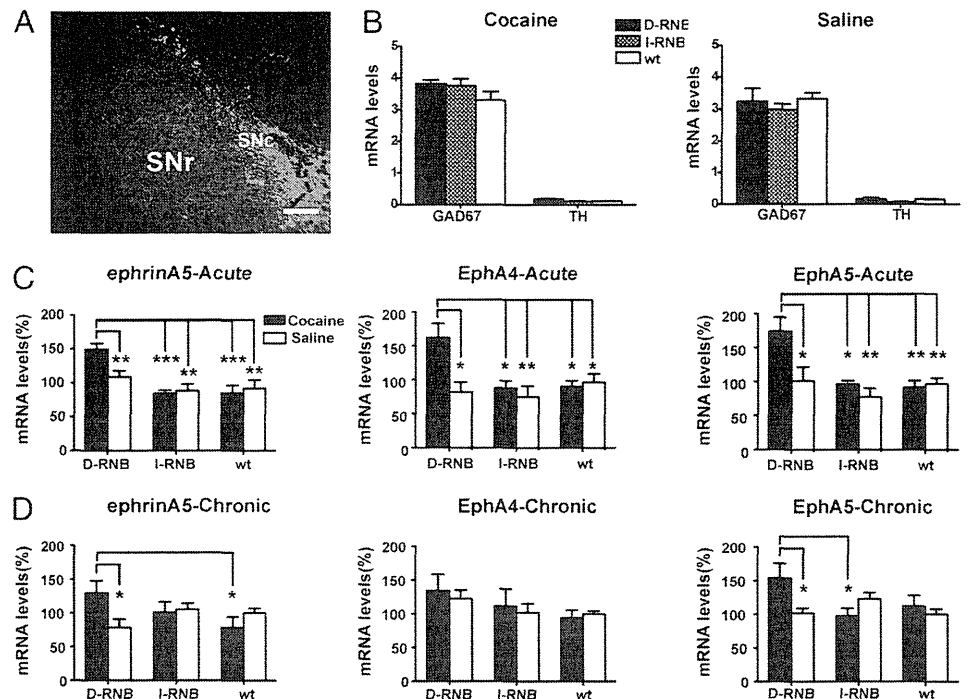
After confirmation of the lack of cocaine-induced hyperlocomotion in individual D-RNB and I-RNB mice, SNrs were mechanically isolated from D-RNB, I-RNB, and WT mice 1 h after cocaine or saline administration. Total RNA was extracted from microdissected SNrs and subjected to microarray analysis. As criteria for the selection of candidate genes, we used hybridization signals of >150 at least in one of the three types of the experimental animals and more than 1.4-fold changes between cocaine and saline treatments in either D-RNB or I-RNB mice, but not in the WT mice. Candidate genes thus selected were further confirmed by quantitative RT-PCR analysis. Among a few candidate genes, we focused on and analyzed in detail the ephrinA5, EphA4, and EphA5 mRNAs, all of which were up-regulated in the SNr of only the D-RNB mice (Fig. 1C) (one-way ANOVA analysis for ephrinA5, $P < 0.001$ – 0.01 ; for EphA4, $P < 0.01$ – 0.05 ; for EphA5, $P < 0.01$ – 0.05). The up-regulation of these mRNAs was not only specific to D-RNB mice after cocaine administration but in addition, the expression of these mRNAs was not altered in saline-treated RNB or WT mice (Fig. 1C and D), indicating that the up-regulation

of these mRNAs depended on both blockade of the direct pathway and cocaine administration.

Because the previous blockade study indicated a key role of the direct pathway in the adaptive response to repeated cocaine administration (9), we next addressed whether the ephrinA5, EphA4, and EphA5 mRNAs remained up-regulated in the SNr of D-RNB mice after repeated administration of cocaine. The SNr was isolated and microdissected after repeated cocaine administration for 5 d. Quantitative RT-PCR showed that the ephrinA5 and EphA5 mRNAs remained up-regulated in the SNr of only the D-RNB mice (Fig. 1D) (one-way ANOVA analysis for ephrinA5, $P < 0.05$; for EphA5, $P < 0.05$). The EphA4 mRNA, although not being statistically significant, tended to be up-regulated in the D-RNB mice (Fig. 1D). These results indicate that ephrin-Eph receptor signaling molecules are specifically up-regulated in the D-RNB mice not only at the acute phase but also at the adaptive phase of cocaine administration.

Localization of EphrinA5, EphA4, and EphA5 in the SNr. GABAergic neurons represent a major cell population, amounting to more than 90% of the neurons in the SNr (12). We investigated the cellular expression patterns of ephrinA5, EphA4, and EphA5 in the SNr by double immunostaining for each of these molecules and either gephyrin, a postsynaptic marker of GABAergic neurons (13), or glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker of astrocytes (14). This analysis showed that gephyrin-immunoreactive GABAergic neurons expressed both the ephrinA5 ligand and the EphA4 and EphA5 receptors (Fig. 2A, C, and E). In contrast, the GFAP-positive astrocytes expressed the EphA4 and EphA5 receptors, but not the ephrinA5 ligand (Fig. 2B, D, and F). In gephyrin-immunoreactive neurons, EphA4 and EphA5 were mostly localized in the soma and proximal dendrites, whereas the ephrinA5 localization extended from the soma to the distal dendrites. Furthermore, double immunostaining among ephrinA5, EphA4, and EphA5 indicated that all three molecules were ubiquitously colocalized in more than 80% of the SNr neurons (Fig. 3).

Fig. 1. Direct pathway-specific regulation of expression of ephrinA5, EphA4, and EphA5 mRNAs in the SNr by cocaine administration. (A) Double immunostaining of coronal sections of the SNr and SNc of WT mice with the GAD67 antibody and the TH antibody. A merged view showed that the GAD67-immunoreactive SNr (red) is located adjacent to the TH-immunoreactive SNc (green). (Scale bar, 100 μ m.) (B) D-RNB, I-RNB, and WT mice were prepared by bilateral injection of the AAVs into the NAC. Two weeks after the viral injection, the animals received a single intraperitoneal injection of either cocaine (10 mg/kg) or saline and were killed 1 h later. The SNr was then isolated, and the levels of the GAD67 and TH mRNAs were quantified by RT-PCR. mRNA levels were normalized by referring to that level of the β -actin mRNA as 1 ($n = 6$ for D-RNB and I-RNB; $n = 12$ for WT). (C) The SNr was isolated as in B, and mRNA levels were quantified by PCR ($n = 6$ for D-RNB and I-RNB; $n = 12$ for WT). (D) Experiments were performed as in B, except that the animals daily received a single intraperitoneal injection of cocaine (10 mg/kg) or saline for 5 d and the SNr was then isolated 1 h after the last intraperitoneal injection ($n = 6$ each). In C and D, levels of each mRNA were expressed by referring to those of the corresponding mRNA in saline-injected WT mice. Columns and bars represent the mean \pm SEM; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



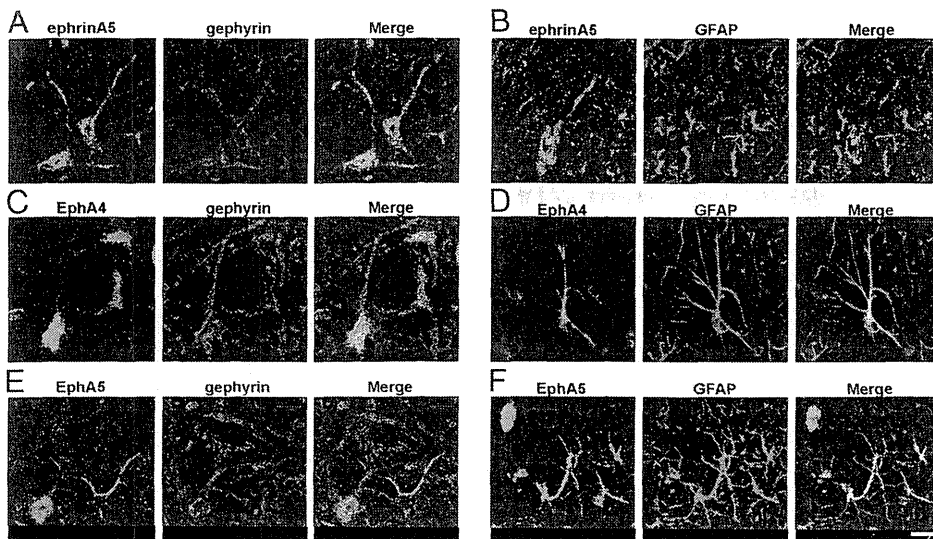


Fig. 2. Immunohistological analysis of ephrinA5, EphA4, and EphA5 in the SNr cells. Coronal sections of the SNr of WT mice were double-immunostained with the following antibodies and visualized by confocal microscopic analysis: (A and B) green, ephrinA5; (C and D) green, EphA4; (E and F) green, EphA5; (A, C, and E) red, gephyrin; (B, D, and F) red, GFAP. (Scale bar, 10 μ m.)

Effects of EphrinA5, EphA4, and EphA5 on Cocaine Sensitization.

Because the above results indicate that the deficit of the direct-pathway transmission selectively up-regulated the ephrin-Eph signaling molecules in the SNr of the cocaine-treated mice, we next addressed whether the activation of this signaling could suppress the adaptive response induced by repeated cocaine administration. To address this question, we used specific immunoadhesin chimeras, which were the fusion proteins consisting of the Fc domain of human IgG and the respective extracellular binding domain of the ephrin or the Eph receptors (15, 16). These immunoadhesins were the dimerized forms, which activate the

corresponding receptors or ligands (17, 18). The immunoadhesin or the control Fc was attached to fluorescent microspheres to prevent diffusion into other brain regions (19).

The immunoadhesin- or the control Fc-attached microspheres were bilaterally injected into the SNr of WT mice, and restricted injection into the SNr was confirmed by visualization of the microsphere fluorescence in brain slices of individual mice killed after behavioral analysis. Four days after injection of the immunoadhesins, cocaine (10 mg/kg) was daily administered for 4 d and locomotor activity was measured immediately after each cocaine administration. Repeated cocaine administration induced a progressive increase in locomotor activity, called locomotor sensitization (9). Both EphA4-Fc and EphA5-Fc significantly suppressed cocaine-induced locomotor sensitization compared with that of the control Fc-injected mice (Fig. 4 B and C) (analyzed by repeated-measure ANOVA: between EphA4-Fc ($n = 10$) and control Fc ($n = 6$), for immunoadhesin, $P < 0.005$; for day, $P < 0.005$; for interaction immunoadhesin \times day, $P < 0.01$; between EphA5-Fc ($n = 8$) and control Fc ($n = 6$), for immunoadhesin, $P < 0.005$; for day, $P < 0.005$; for interaction immunoadhesin \times day, $P < 0.05$). EphrinA5-Fc showed no statistically significant suppression of cocaine-induced hyperlocomotion, as analyzed by repeated-measure ANOVA but tended to reduce locomotor sensitization on days 3 and 4 (Fig. 4A). These results indicate that the EphA4 and EphA5 receptors in the SNr play an important role in controlling adaptive responses to repeated administration of cocaine.

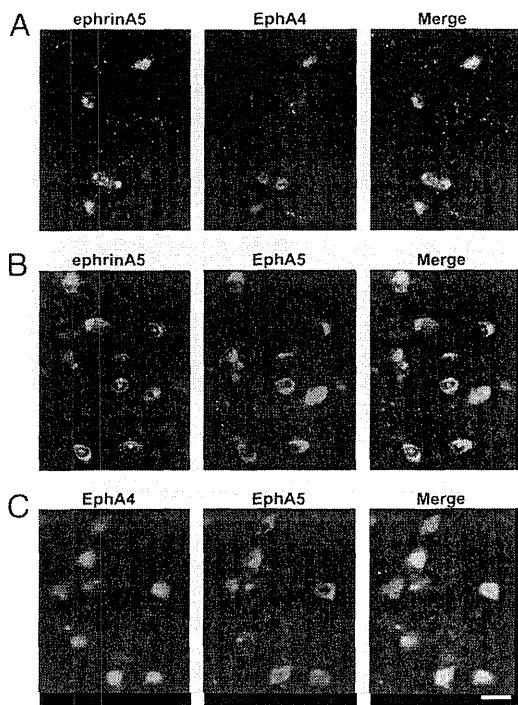


Fig. 3. Coexistence of ephrinA5, EphA4, and EphA5 in the SNr neurons. Coronal sections of the SNr were double-immunostained with the following antibodies and visualized by light microscopic analysis: (A) ephrinA5 (green) and EphA4 (red); (B) ephrinA5 (green) and EphA5 (red); (C) EphA4 (green) and EphA5 (red). (Scale bar, 50 μ m.)

Erk Phosphorylation in EphrinA5-Positive Cells Specific to the Cocaine-Treated D-RNB Mice. Both EphA4 and EphA5 bind to ephrinA5, and this binding reversely stimulates the phosphorylation of the MAP kinases, Erk1 and Erk2, in ephrinA5-bearing cells (20). Therefore, we addressed whether cocaine could enhance phosphorylation of Erk1/2 in ephrinA5-bearing neurons specific to the SNr of D-RNB mice. The SNr of D-RNB, I-RNB, or WT mice was analyzed by double immunostaining with antibodies against ephrinA5 and phospho-Erk1/2 (pErk1/2) after acute or chronic cocaine administration (Fig. 5 A–I). The numbers of cells positive for ephrinA5 or pErk1/2 were counted, and the ratio of pErk1/2-ephrinA5 double-positive cells to ephrinA5-positive cells was calculated. This ratio markedly increased in D-RNB mice in the acute phase of cocaine administration (D-RNB, $69.0 \pm 3.8\%$; I-RNB, $37.0 \pm 1.4\%$; WT, $33.2 \pm 2.3\%$; $P < 0.001$, D-RNB vs. I-RNB or WT) (Fig. 5J). Similarly, this ratio significantly increased in D-RNB mice at the chronic phase of cocaine

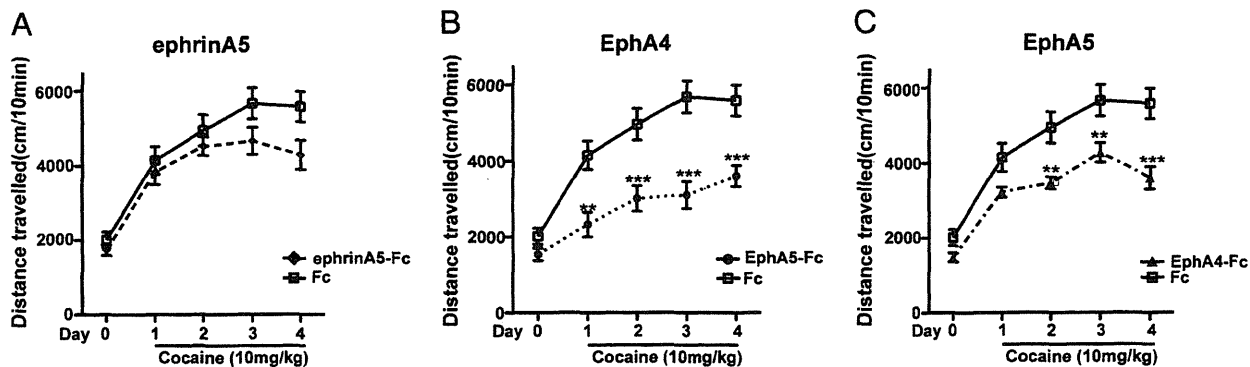


Fig. 4. Suppression of cocaine-induced hyperlocomotion by EphA4 and EphA5 in the SNr. Fluorescent microspheres with attached ephrinA5-Fc (A), EphA4-Fc (B), EphA5-Fc (C), or control Fc (A–C) were bilaterally injected into the SNr of WT mice. One day after immunoadhesin injection, animals received intraperitoneal saline once a day and were habituated for 3 d. Cocaine (10 mg/kg) was then intraperitoneally injected once a day from day 1 to day 4; and immediately after each cocaine injection, locomotor activity was counted for a 10-min period. Symbols and bars represent the mean \pm SEM (ephrinA5-Fc, $n = 14$; EphA4-Fc, $n = 10$; EphA5-Fc, $n = 8$; control Fc, $n = 6$). Statistical significance was analyzed by repeated-measure ANOVA; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (EphA4-Fc or EphA5-Fc vs. control Fc).

administration (D-RNB, $70.4 \pm 7.8\%$; I-RNB, $37.8 \pm 2.9\%$; WT, $31.8 \pm 7.8\%$; $P < 0.001$ – 0.01 , D-RNB vs. I-RNB or WT) (Fig. 5K). Importantly, there was no difference in the relative ratio of two types of cells in three groups of saline-treated mice (Fig. 5J

and K). Upon double immunostaining for NeuN, a marker of mature neurons (21), ephrinA5-immunoreactive cells amounted to 94% to 98% of the NeuN-positive cells in all three groups of mice, regardless of treatment or not with cocaine. Thus, there

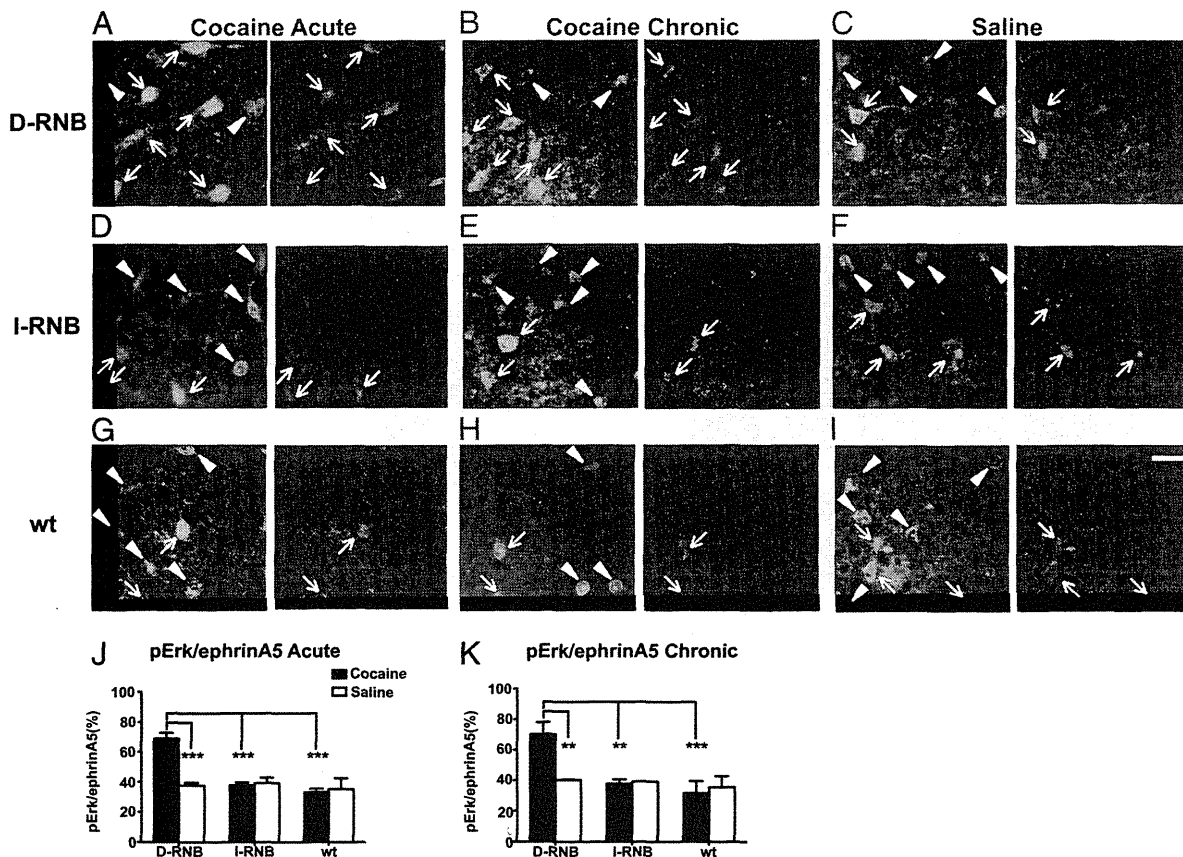


Fig. 5. Activation of Erk1/2 in ephrinA5-expressing SNr neurons specific to D-RNB mice. For Cocaine Acute (A, D, and G) and Saline (C, F, and I), D-RNB, I-RNB, and WT mice received a single intraperitoneal injection of cocaine (10 mg/kg) and saline, respectively, and the SNr was isolated 6 h after cocaine or saline injection. For Cocaine Chronic (B, E, and H), three groups of mice daily received a single intraperitoneal injection of cocaine (10 mg/kg) for 5 d and the SNr was isolated 1 h after cocaine injection. Coronal sections were double-immunostained with antibodies against ephrinA5 (green) and pErk1/2 (red) and visualized by light microscopic analysis. Arrows and arrowheads indicate the pErk1/2-positive and pErk1/2-negative cells, respectively, that were also immunopositive for ephrinA5. (Scale bar, 50 μ m.) (J and K) The numbers of Erk1/2-immunopositive and Erk1/2-immunonegative cells among the ephrinA5-immunoreactive cells were counted, and the ratios of pErk1/2-ephrinA5 double-immunopositive cells to ephrinA5-immunoreactive cells are indicated in J and K. Columns and error bars represent the mean \pm SEM ($n = 4$ each). The statistical significance was analyzed by one-way ANOVA. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.