

# 特別講演

13:00~14:00

## 「精神疾患の臨床からみた動物モデルとは」

森信 繁

広島大学 大学院医歯薬保健学研究院 精神神経医科学  
ストレス脆弱性克服プロジェクト

座長：中川貴之（京都大学 大学院薬学研究科 生体機能解析学分野）

## 精神疾患の臨床からみた動物モデルとは

森信 繁

広島大学大学院医歯薬保健学研究院・精神神経医科学・  
ストレス脆弱性克服プロジェクト

【背景】精神疾患の病態形成には、脳内の遺伝子発現の変動を基盤とした神経回路網の障害が、密接に関与していると考えられている。近年の脳画像研究の進歩によって目覚ましい成果がもたらされているが、精神疾患の責任脳内病巣は未解明であり、ましてや障害部位での遺伝子発現の変化は全く分からないといっても過言ではない現状である。このため精神疾患の病態解明や新規治療薬の開発のためには、臨床病態と類似性の高い動物モデルの開発が必要とされている。しかしながら精神疾患の診断法は、患者や家族との問診や行動観察から得た情報に立脚して行われ、客観的な臨床検査的診断法のない点が、動物モデル作製の大きな障壁となっている。このような実情から演者らのラボでは、うつ病や外傷後ストレス障害(PTSD)の病態解明や治療法開発を目的に、出来るだけ臨床病態に類似した動物モデル作製を行っており、その成果について分かりやすく紹介する。

【方法】1) ラットうつ病モデルを用いた不遇な養育環境のおよぼすうつ病発症脆弱性亢進に関する研究：うつ病モデルは既報の学習性無力(LH)テストを、不遇な養育環境は母子分離(NI)負荷を用いている。仔ラット成長後に LH 試験を行い、うつ病状態(LH)の出現率を NI 群と正常飼育群と比較すると同時に、離乳後の豊かな養育環境による不遇な環境からの脆弱性に対する修復効果も解析した。

2) ラット PTSD モデルの開発とモデルの妥当性の検証：PTSD に比較的多くみられるHPA 系の過剰抑制を表現型の目標として、Michigan 大学の Liberzon 博士の提唱した Single prolonged stress (SPS)負荷を用いて、モデル作製を行った。SPS ラットを対象に、PTSD 患者でみられる臨床症状である、a) 不安・恐怖感の亢進を恐怖条件付け(FC)試験や高架式十字迷路(EPM)で、b) Analgesia を Hot-plate 試験や Flinch-jump 試験で、c) 恐怖記憶の消去の障害を FC 試験で、それぞれ解析した。

【結果】1) NI 群は正常飼育群に比べて有意に LH になる率が多く、離乳後の豊かな養育環境によって NI 群の LH 出現率は正常飼育群と同等まで修復された。

2) SPS ラットは、a) FC にて有意にすくみ行動時間が亢進し EPM にて open arm への滞在時間が減少していた、b) 温痛覚の鈍麻がみられた、c) FC による恐怖記憶の消去の障害がみられた、などの PTSD 患者にみられる症状と同様の行動特徴を示した。

【考察】うつ病モデルを用いた実験からは、精神科領域の疫学研究で指摘されている、幼少期の不遇な環境が成長後のうつ病発症を促進し、豊かな養育環境の提供はうつ病発症脆弱性を修復する、という事実を検証することが出来た。PTSD モデルを用いた実験からは、SPS ラットが PTSD 患者にみられる病態である、不安恐怖感の亢進・Stress-induced Analgesia・恐怖記憶の消去障害、などを反映するモデルであることが明らかになった。このように臨床病態に類似した動物モデルの作製が新たな治療法開発には必要であり、SPS ラットの恐怖記憶の消去障害に対して演者らは d-cycloserine が有効であることを報告(Yamamoto et al., Neuropsychopharmacol 33: 2108-2116, 2008) し、現在、国際的に行われている臨床研究の基盤を提唱した。

# シンポジウム

15:30~17:30

## 「次世代に向けての行動薬理学とその新展開」

オーガナイザー：

永井 拓（名古屋大学 大学院医学系研究科医療薬学・医学部附属病院薬剤部）

山口 拓（長崎国際大学 薬学部 薬理学研究室）

# S-1

## アルコール依存症における脳機能変化の解析

○芝崎真裕、森友久、鈴木勉  
星薬科大学 薬品毒性学教室

【目的】アルコールは嗜好性飲料として広く親しまれているが、長期にわたる多量摂取によりアルコール依存症を引き起こす。特にアルコール依存症では、中枢神経の可塑的变化を伴った精神依存が問題となる。一方、morphine は強力な鎮痛作用を示し、術後痛やがん性疼痛など多くの痛みに対して有効である。しかしながら、morphine を代表とするオピオイド鎮痛薬は強力な鎮痛作用のみならず、強力な精神依存も引き起こす。臨床経験において、がん性疼痛下ではオピオイド鎮痛薬による精神依存は問題とならないことが知られているが、アルコールを含む薬物依存症既往歴のある非がん性疼痛患者では、オピオイド鎮痛薬を使用すると、精神依存が問題となる可能性が高いことが報告されているため基本的に使用しないとされている。しかしながら、アルコール依存症に対する morphine の薬理作用の変化については未だほとんど明らかにされていないのが現状である。そこでアルコール慢性処置による morphine 誘発報酬効果および関連する細胞内情報伝達系の変化について検討を行った。

【方法】実験には C57BL/6J 系雄性マウス (20-25g) を使用した。Liquid diet 法に従い、ethanol を含む液体飼料を 5 日間処置することにより ethanol 慢性処置モデル動物を作製し、ethanol 慢性処置群とした。また、ethanol を含まない液体飼料を与えた群を ethanol 無処置群とした。Ethanol 慢性処置後における精神依存形成の変化は conditioned place preference (CPP) 法を用いて報酬効果により評価した。また細胞内情報伝達系の変化は Western blot 法あるいは RT-PCR 法を用いて検討した。

【結果】Ethanol 慢性処置による morphine 誘発報酬効果の変化について CPP 法を用いて検討した。Ethanol 無処置群では、生理食塩液処置群に比べて morphine (5 mg/kg, s.c.) 処置群において有意な報酬効果が形成された。この ethanol 無処置群で認められた報酬効果は、ethanol 慢性処置により有意に増強された。そこで  $\mu$ -オピオイド受容体を介した情報伝達系の変化について検討する目的で、腹側被蓋野の細胞膜画分での G-protein coupled receptor kinase (GRK) の変化について検討した。GRK1, GRK3 および GRK5 に有意な変化は認められなかったが、GRK2 において有意な増加が認められた。さらに、 $\beta$ -arrestin2 ならびにリン酸化 PP2A に変化は認められなかったが、リン酸化 Akt の有意な減少が認められた。

【考察】本研究結果より、ethanol 慢性処置により morphine 誘発報酬効果の増強が誘導されることが明らかとなった。このような条件下では、報酬効果発現に重要な腹側被蓋野領域における GRK2 を介した Akt の抑制が引き起こされ、これらの発現変化が morphine 誘発薬理作用の応答に影響を与えると推察される。したがって、アルコール長期摂取時には morphine の薬理作用に著明な変化が引き起こされるため、疼痛治療時には注意が必要であると考えられる。

## S-2

### うつ病動物モデルにおける母性行動の解析

○中川西 修、佐藤 敦、根本 互、八百板 富紀枝、只野 武、丹野 孝一  
東北薬大・薬理

【目的】近年、母親が子供を虐待、子育てを放棄するという社会問題が大きく取り上げられており、その様な行動を起こす母親の約3割がうつ病を患っていることが報告されている。しかしながら、その相関関係は不明のままであり、これらを念頭においた動物実験が少ないのが現状である。動物における母性行動には脳内報酬系である中脳辺縁系のドパミン(DA)神経系が深く関与していることが知られており、腹側被蓋野の破壊や、側坐核へのDAアンタゴニストの投与などによって母性行動障害が誘発される。一方、嗅球摘出(olfactory bulbectomy: OBX)を施したげっ歯類は、うつ病患者と類似した行動変化を示すため、うつ病モデル動物として多くの研究で用いられている。以上のことから本シンポジウムでは、OBXを施したメスマウスにおける母性行動および報酬機能関連行動の変化、さらに、母性行動と脳内DA神経系との相関性について行動薬理的に検討した最近の成果<sup>1,2)</sup>について報告する。

【方法】8週齢のddY系雌性マウス(体重28~32g)にOBXを施し、その2週間後に同じ週齢のddY系雄性マウスと交配させた。OBX法は吸引によりanterior olfactory nucleiを含む嗅球の2/3以上を摘出し、コントロールには偽手術群としてのsham群を設けた。母性行動は、出産後0日目(postnatal day: PND 0)および4日目(PND 4)に、母親が子と接触していない状態での行動である①mother off pups、子をなめる行動である②licking and grooming、積極的な養育行動である③arched back postureの3つの母性行動を、75分間測定した。sucrose preferenceは手術の2週間後と出産後0日目に水道水と1% sucrose溶液の24時間の消費量を測定し算出した。DA受容体の測定にはオートラジオグラフィを、tyrosine hydroxylase(TH)の測定には顕微測光解析装置を用いた。

【結果・考察】PND0における母性行動の変化は、sham群と比較した時、OBX群においてmother off pupsの有意な増加とlicking and grooming及びarched back postureの有意な減少が現れた。一方PND4においては、両群間の各母性行動に有意な差は認められなかったが、PND0の時と同様の傾向を示した。PND0におけるOBXの母性行動障害に対してはドパミンアンタゴニストapomorphineやL-DOPAの投与で有意に改善した。さらに、報酬機能の評価のためにsucrose preference testを行った結果、手術の2週間後及びPND0の両方においてOBXマウスにおけるsucrose preferenceが減少していることが観察された。PND0における母親マウスの側坐核におけるD<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>受容体及びTHの発現量は、sham群及びOBX群の両群間において有意な差は認められなかった。

従って、OBXマウスにおいて母性行動障害が認められ、この原因として中脳辺縁系のDA作動性神経機能異常による報酬機能障害が関与している可能性が示唆された。これらの研究結果から、うつ病を発症した母親による育児放棄等はDA作動性神経系を賦活ないしコントロールするような薬物の有効性が今後期待される。

1) Sato A et al., Behav Brain Res, 210, 251-6, 2010

2) Sato A et al., Behav Brain Res, 215, 141-5, 2010

# S-3

## 脳血管性認知症モデルラットの空間記憶障害に対する抑肝散の効果

○野上愛<sup>1,2</sup>、高崎浩太郎<sup>1,2</sup>、窪田香織<sup>1,2</sup>、桂林秀太郎<sup>2</sup>、内田直樹<sup>3</sup>、三島健一<sup>1,2</sup>、藤原道弘<sup>1,2</sup>、西村良二<sup>3</sup>、岩崎克典<sup>1,2</sup>

1 福岡大学加齢脳科学研究所、2 福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室

3 福岡大学医学部精神医学教室

### 【目的】

認知症の症状は、中核症状である記憶障害と、不安や徘徊など周辺症状2つに代表される。我々はこれまでに、脳血管性認知症のモデル動物として報告している繰り返し脳虚血（脳虚血）ラットを用いて、抑肝散が周辺症状に対して有効であることを明らかにした。そこで今回、脳虚血ラットの空間記憶障害に対する抑肝散の効果を検証し、抑肝散が中核症状の改善作用を併せ持つか否かについて検討した。また学習と記憶に重要である海馬のアセチルコリン（ACh）遊離量と、海馬の神経細胞死に対する効果を検証し、抑肝散の作用機序を検討した。中核症状に対して臨床応用されている塩酸ドネペジルの効果も同様に検討した。

### 【方法】

8週齢のWistarラットに10分間の全脳虚血を1時間間隔で2回行い、脳虚血ラットを作製した。空間記憶障害は8方向放射状迷路課題で評価し、海馬のACh遊離量はin vivo マイクロダイアリシス法を用いて測定した。HE染色とTUNEL染色で海馬CA1領域の神経細胞死の有無を確認し、さらにアポトーシス最終実行因子であるcaspase-3をwestern-blotting法で定量して神経細胞死に対する評価を行った。

### 【結果】

抑肝散（1000 mg/kg）の虚血後7日間反復経口投与は、脳虚血により発現する空間記憶障害を有意に改善した。また抑肝散は、投与直後に一過性のACh遊離促進作用を示しただけでなく、最終投与前のACh基礎遊離量の減少も改善した。さらに抑肝散は、脳虚血により発現する海馬CA1領域の神経細胞死を抑制し、脳虚血により増加するcaspase-3量を減少させた。一方塩酸ドネペジルは、投与直後に一過性のACh量増加作用を示したものの、AChの基礎遊離量の減少を改善しなかった。また海馬CA1領域の神経細胞死に対しての改善作用も示さなかった。

### 【考察】

抑肝散は塩酸ドネペジルと同様に海馬のACh神経の賦活作用を介して空間記憶障害を改善することが明らかになった。興味深いことに、塩酸ドネペジルは投与直後のシナプス間隙におけるACh量を増加させたものの、AChの基礎遊離能は改善させなかったのに対し、抑肝散はいずれも改善した。この作用の違いの背景に、抑肝散の細胞保護作用が示唆された。抑肝散は脳虚血によるアポトーシスを抑制し、細胞保護作用を示すことでAChの基礎遊離能を保持したと考えられる。以上より、抑肝散は空間記憶障害を改善したことから脳血管性認知症の周辺症状に加えて中核症状にも有用であり、塩酸ドネペジルとは異なる作用機序を有することが明らかになった。

# S-4

## 薬物依存モデル動物の近視眼的意思決定

○溝口博之<sup>1)</sup>、福本和哉<sup>1)</sup>、王 天<sup>2)</sup>、佐藤 純<sup>1)</sup>、山田清文<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 名古屋大学環境医学研究所近未来環境シミュレーションセンター

<sup>2)</sup> 名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部

【目的】覚せい剤やコカイン依存症患者の意思決定パターンは健常者と異なることが示唆されており、ハイリスクを恐れずハイリターンを好むといったリスク嗜好性が高いことや、安定した小さい利益よりも近い将来の大きな利益を選択する（近視眼的意思決定）などの特徴がある。この意思決定の障害は生体恒常性の制御機構の変化、近い将来の快感に関連する扁桃体を含む衝動的神経回路と遠い将来に関係する思慮的な前頭葉皮質回路のアンバランスに基づくと提唱されている。しかし、薬物依存者の意思決定の障害が薬物乱用の原因であるか、あるいは薬物依存の結果として意思決定に障害が生じたのかは不明である。

そこで、小動物を対象とした意思決定評価法の確立と覚せい剤の効果、さらには意思決定障害の神経回路・責任領域について検討した。

【方法】実験には、摂餌制限した 8 週齢の雄性 Wistar ラットを使用し、8 方向放射状迷路を用いてギャンブルテストを行った。Low リスク・low リターン (LL) アームには餌ペレット 1 個を置いたが、16 試行中 2-8 回の一定の割合でランダムにキニン入り餌ペレット (罰) を置いた。High リスク・high リターン (HH) アームにはキニン入り餌ペレット 1 個を置いたが、16 試行中 2-8 回の一定の割合でランダムに複数の餌ペレット (大報酬) を置いた。16 試行中の HH アームの選択回数 (選択率) と empty アームへの侵入回数を測定した。Methamphetamine (4 mg/kg) を 1 日 1 回、30 回皮下投与することで、覚せい剤依存ラットを作製した。コントロール群には saline を投与した。

【結果】HH アームの大報酬を 2/16 (12.5 %) の確率で訓練したところ、訓練 1 日目の選択率は  $46 \pm 4$  % あったが、訓練日数に依存して選択率は低下し、最終的には  $9 \pm 1$  % まで低下した。HH アームの大報酬を 4-8/16 (25%-50%) の確率で訓練した場合、大報酬獲得確率に依存して HH アーム選択率は減少した。覚せい剤依存ラットでは、コントロール群と比較して HH アーム選択率が有意に増加したが、empty アームへの侵入回数には差は認められなかった。また、HH アーム選択率が高い覚せい剤依存ラットの島皮質、線条体、側坐核において、c-Fos 陽性細胞数は増加していた。覚せい剤依存ラットの島皮質領域に GABA 作用薬を注入すると、HH アーム選択率の増加は抑制された。

【考察】本ギャンブルテストにおいて、覚せい剤依存モデル動物は high リスク・high リターンを好むことが示唆された。この意思決定障害には、島皮質—線条体経路が関与することが示唆された。

# 一般講演

**一般演題 (A) 薬学実務・薬物依存・情動行動** 9 : 30 ~ 10 : 45

---

座長：島添隆雄（九州大学 大学院薬学研究院 臨床育薬学分野）  
森 友久（星薬科大学 薬品毒性学教室）

**一般演題 (B) 神経伝達物質/受容体・疼痛** 10 : 45 ~ 12 : 00

---

座長：稲津正人（東京医科大学 医学総合研究所）  
石塚智子（大阪歯科大学 歯学部 薬理学講座）

**一般演題 (C) 脳虚血・認知機能** 14 : 00 ~ 15 : 15

---

座長：溝口広一（東北薬科大学 機能形態学教室）  
森口茂樹（東北大学 大学院薬学研究科 薬理学分野）



# A-1

## 外来患者の残薬と削減可能な薬剤費に関する研究 ～節薬バッグを用いた取り組み～

○齋藤友亮<sup>1</sup>、打越英恵<sup>1</sup>、小柳香織<sup>1, 2</sup>、小林大介<sup>1</sup>、窪田敏夫<sup>1</sup>、高木淳一<sup>2</sup>、  
木原太郎<sup>2</sup>、山浦竜雄<sup>2</sup>、吉田武夫<sup>2</sup>、三井所尊正<sup>2</sup>、瀬尾隆<sup>2</sup>、島添隆雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>九州大学大学院薬学研究院臨床育薬学分野

<sup>2</sup>社団法人 福岡市薬剤師会

【目的】医療費の増大は年々深刻化している。平成 24 年度の医療保険制度改定により、調剤薬局における薬剤服用歴管理指導料の算定要件に、「残薬の有無の確認」が追加された。残薬確認作業後の処方調整により、医療費の削減が可能である。処方調整とは、残薬と重複する処方薬の処方日数の削減を指すが、これによりどの程度医療費が削減できるかは、これまで小規模で限られた検討しかなされていない。

今回、(社)福岡市薬剤師会と協力の下、「節薬バッグ運動」を実施した。すなわち、患者に「節薬バッグ」と名付けたエコバッグを配布し、患者に残薬を持参して頂き、その薬剤について処方調整を試みた。本研究では、処方調整された残薬を削減可能な薬剤費として捉え、その金額を集計した。また同時に、残薬発生の要因について解析した。

【方法】福岡市内 31 薬局において、チラシ、ポスター等を用いて参加呼びかけを行って、配布した「節薬バッグ」に残薬を入れて、あるいは手持ちで患者に持参して頂いた。対象は、本研究について説明を受け、同意した上で、平成 24 年 6 月 8 日より同年 8 月 31 日までに残薬を持参した 20 歳以上の外来患者とした。参加薬局の薬剤師は、患者持参もしくは申告のあったすべての薬剤について確認し、必要に応じて疑義照会し、医師の了承のもと処方調整を行った後、残薬の情報を「残薬確認シート」に記載し、臨床育薬学分野に送付した。送付されたシートから、残薬総金額、薬剤費削減金額、破棄金額を薬価ベースで集計した。また、残薬発生の要因を患者の性別、年齢、保険負担割合、薬効分類、用法等から解析した。

【結果】今回の「節薬バッグ運動」では、節薬バッグ 1,600 枚を配布して呼びかけを行い、252 名の患者が参加した。持参された残薬の合計金額は 839,655 円であり、そのうち、処方調整により削減できた金額は 702,695 円(83.7%)であった。

残薬の発生は「飲み忘れ」、「患者による自己調節」、「診察日のずれによるもの」などによるものがあつた。残薬発生の要因としては、患者の保険負担割合、用法、一包化の有無が挙げられた。

【考察】 今回の結果から、「節薬バッグ運動」を全国に拡大すると、年間約 3,000 億円以上の薬剤費が削減できる可能性が試算された。すなわち、残薬確認による処方調整が医療費の削減に極めて有効であることが示された。本運動は、平成 25 年 1 月より福岡市内約 650 薬局に規模を拡大して実施しており、残薬確認作業の医療費削減への寄与や、残薬発生要因をさらに詳細に検討する予定にしている。

# A-2

## Methamphetamine およびアルコール誘発報酬効果形成過程における type 1 1,4,5-trisphosphate receptors (IP<sub>3</sub>Rs-1) の関与

○黒川 和宏、水野 晃治、大熊 誠太郎  
川崎医大・薬理

【目的】細胞内小胞体膜上にある inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP<sub>3</sub>Rs) には、3種類のサブタイプが存在しており、特に 1 型 IP<sub>3</sub>Rs (IP<sub>3</sub>R-1) は中枢神経系の神経細胞に特異的に発現し、細胞内 Ca<sup>2+</sup> シグナリングに重要な役割を果たしている。一方、依存性薬物である methamphetamine (METH) およびアルコールは、中脳辺縁 dopamine 神経系に作用して精神依存を形成することが知られている。しかしながら、METH およびアルコール誘発報酬効果形成過程における IP<sub>3</sub>R-1 の関与について明らかにされていない。そこで本研究では METH およびアルコール誘発報酬効果形成過程における IP<sub>3</sub>R-1 の変化ならびに IP<sub>3</sub>R-1 の発現調節機序を conditioned place preference 法、Western blot 法ならびに免疫染色法により行動薬理的ならびに神経化学的に検討した。

【方法】アルコールによる報酬効果は、Goldstein の方法に準じ、アルコール蒸気を 4 日間吸引させたマウスを使用し、条件づけ場所嗜好性試験により行った。また METH による報酬効果は条件づけ場所嗜好性試験により評価した。METH およびアルコール処置により報酬効果が認められたマウスの前脳辺縁部 (側坐核を含む) より細胞膜分画を作製し、IP<sub>3</sub>R-1 の蛋白発現量を Western blot 法により解析した。

【結果】アルコール 4 日間曝露によりマウスの前脳辺縁部において IP<sub>3</sub>R-1 発現増加が認められた。また、アルコールによる報酬効果は、IP<sub>3</sub>Rs の阻害剤である 2-APB により有意に抑制された。さらに、METH による報酬効果は、2-APB の前処置により用量依存的かつ有意に消失した。METH 処置により報酬効果が認められたマウス前脳辺縁部において IP<sub>3</sub>R-1 のタンパク質量の有意な増加が認められた。そこで次に、METH 誘発報酬効果形成に対する dopamine D1 receptors の拮抗薬である SCH23390 の効果について検討したところ、METH 誘発報酬効果は、SCH23390 の処置によっても用量依存的かつ有意に抑制された。さらに、METH の処置により前脳辺縁部での IP<sub>3</sub>R-1 のタンパク質量の増加は、SCH23390 前処置により有意に抑制された。

【考察】これらの実験結果から、METH およびアルコールによる報酬効果形成には IP<sub>3</sub>R-1 が関与し、また、IP<sub>3</sub>R-1 のタンパク質量の増加機構に dopamine D1 receptors を介した調節機序が一部関与している可能性が推察される。

# A-3

## **Involvement of sigma 1 receptor in the SSRI-induced suppression of the methamphetamine-induced behavioral sensitization and rewarding effects in mice**

○Mahardian Rahmadi, Tomohisa Mori, Masahiro Shibasaki, Tsutomu Suzuki

Department of Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Hoshi University, Tokyo 142-8501, Japan

### **【Background】**

The abuse of methamphetamine causes abnormal behaviors such as stereotyped behavior, hallucination and aggressive behavior, which are indistinguishable from schizophrenia in humans. Recent reports have shown that selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) have beneficial effects on methamphetamine-related behaviors including behavioral sensitization and rewarding effects in animals. However, the exact mechanisms by which SSRIs affect methamphetamine-related behaviors have not been yet clear. The present study was designed to investigate the effects of SSRIs on the development of methamphetamine-induced behavioral sensitization and rewarding effects in mice.

### **【Method】**

Behavioral sensitization was measured by examining the locomotor activity of mice using tilting cage method after repeated injections of methamphetamine. The level of dopamine was measured using an in vivo microdialysis procedure in rats. The rewarding effects were measured by the conditioned place preference paradigm.

### **【Result】**

Repeated administration of methamphetamine induced behavioral sensitization, whereas fluoxetine and fluvoxamine, which have sigma-1 receptor agonist activities, but not paroxetine and sertraline, significantly inhibited the development of methamphetamine-induced behavioral sensitization. However, neither fluoxetine nor fluvoxamine affected the methamphetamine-induced release of dopamine from the nucleus accumbens as measured by a microdialysis procedure in rats. Furthermore, the sigma 1 receptor antagonist NE-100 significantly inhibited the inhibitory effects of fluoxetine on methamphetamine-induced behavioral sensitization. Fluoxetine also dose-dependently suppressed the rewarding effects of methamphetamine in NE-100 reversible manner as measured by the conditioned place preference paradigm.

### **【Conclusion】**

These results suggest that sigma-1 receptor agonistic activity might be involved in the attenuating effects of fluoxetine and fluvoxamine on methamphetamine-induced behavioral sensitization and rewarding effects.

# A-4

## Toll-like receptor 7 を介した脳内サイトカイン産生と情動調節機構

○久保靖憲, 柳川芳毅, 松本真知子, 富樫廣子

北海道医療大学 薬学部 薬理学講座 病態生理学

【目的】免疫系と神経系は互いに連携し、生体の恒常性維持において重要な役割を果たしている。また、免疫系と神経系における相互調節機構に異常が起これば、様々な疾患の発症につながると考えられる。Toll-like receptor (TLR) は種々の病原体を感知して自然免疫を誘導する受容体であるが、中枢神経系にも存在し自然免疫のみならず情動調節にも関与していることが報告されている。TLR には少なくとも 10 種類以上のサブタイプが存在し、中でも TLR7 はウイルス由来 1 本鎖 RNA を認識することで、I 型インターフェロン (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) の産生を誘導する。本研究では、TLR7 の特異的リガンドである imiquimod を用いて、TLR7 を介した情動調節機構について検討した。

【方法】雄性 C57BL/6 マウスもしくは TLR7 ノックアウトマウスに、imiquimod (50  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) を腹腔内投与し、以下の実験を行った。恐怖記憶に基づく情動応答を文脈的恐怖条件付け試験により、生得的恐怖に基づく情動応答を高架式十字迷路試験によって評価した。さらに、脳内各種サイトカイン、F4/80 および CD11b の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。

【結果】Imiquimod 投与の 2, 4 または 15 時間後に footshock (FS) による恐怖条件付けを行いすくみ行動の発現率を調べた。その結果、imiquimod 投与から 4 または 15 時間後に条件付けを行った場合、すくみ行動の発現率は有意に増大した。一方で、imiquimod は高架式十字迷路試験における生得的恐怖に基づく情動応答に対して影響を示さなかった。また、脳内における I 型 IFN mRNA 発現量は、imiquimod 投与の 2 時間後から著しく上昇した。TLR7 ノックアウトマウスを用いて同様の実験を行ったところ、imiquimod によるすくみ行動発現率の増大や I 型 IFN mRNA 発現量の上昇は認められなかった。IL-1 $\beta$ , COX-2 mRNA 発現量は imiquimod 投与の 4 時間後に上昇し、COX-1 mRNA 発現量は 15 時間後に上昇した。一方、脳内におけるマクロファージマーカーの mRNA 発現量には、どの時間においても有意な変化が認められなかった。

【考察】TLR7 を介したシグナルは、生体防御系を活性化する一方で、中枢神経系においては恐怖記憶の増強に関与していると考えられる。また、この作用には、脳内における I 型 IFN や IL-1 $\beta$ , COX の発現上昇が関係していると推察される。

# A-5

## **Adult Rats Subjected to Postnatal Stress Exposure are More Likely to Exhibit Behavioural Dysfunction**

○Kerise Lyttle, Yu Ohmura, Takeshi Izumi, Takayuki Yoshida and Mitsuhiro Yoshioka

Department of Neuropharmacology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

### **[Purpose]**

It is well recognized that adverse early environments such as child abuse confer an increased risk of development of mood disorders. As a first step to elucidate the neural mechanisms underlying early life stress-induced predisposition to the development of mood disorders, we attempted to establish an animal model displaying enhanced susceptibility to behavioural dysfunction. Here we used this opportunity to investigate the effect of early postnatal stress on depressive-like behaviour in adult rats.

### **[Methods]**

Twenty-one day-old pups were randomly assigned to either the control group, or the foot shock group which was subjected to 5 consecutive days of foot shock. Behavioural testing in the open field and the 2-day forced swim tests was performed between 10 - 12 weeks old. Additionally, sucrose preference was measured as an indicator of an anhedonic-like state.

### **[Results]**

Rats exposed to postnatal foot shock displayed significantly increased immobility times in the forced swim test when compared to controls. No significant difference in open field locomotor activity values was observed between control and foot shock animals. Neither baseline nor post-forced swimming test exposure sucrose preferences significantly differed between control and postnatally stressed animals.

### **[Discussion]**

While sucrose preference values did not differ significantly from controls, postnatally stressed rats were more likely to exhibit behavioural despair. A higher likelihood of behavioural despair is coincident with the manifestation of learned helplessness, a risk factor for depression. Thus we have established an animal model of early life stress-induced predisposition to behavioural despair.

# B-1

## 胃におけるうま味物質受容によるヒスタミン神経系の活性の変化

○石塚 智子

大阪歯科大学 歯学部 薬理学講座

### 【目的】

近年、種々の味覚受容体が消化管においても発現しており、消化管における味質の受容が中枢に影響に及ぼすことが明らかになりつつある。うま味を呈する L-グルタミン酸は食物中にタンパク質が存在するシグナルとして働き、0.06M L-グルタミン酸ナトリウム(MSG)溶液を胃内投与すると、迷走神経胃枝の求心性活動が上昇することや内側視索前野や視床下部背内側核などの脳部位の活動が特異的に上昇することが示されている。さらに、胃において複数の種類の代謝型グルタミン酸受容体(mGluRs)の発現が mRNA レベルで認められていることから、胃内に存在する mGluRs がうま味物質のセンサーとして働くと推測されているが、胃におけるうま味物質の受容が脳内の神経伝達物質の挙動にどのような影響をもたらすかについては不明である。そこで、本研究ではうま味溶液胃内投与がラット内側視索前野における神経伝達物質動態に及ぼす影響を *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて検討した。

### 【方法】

前日から絶食させたウィスター系雄性ラットをウレタン (1.2g/kg, ip)にて麻酔し、ダイアリシスプローブを内側視索前野に刺入した。プローブにはリンゲル液を流速 1 $\mu$ l/min で灌流した。基礎遊離を 1 時間測定後、ラットの胃内に体重 100g あたり 1ml の 0.06M MSG 溶液を 10 分間投与し、投与 2 時間後までサンプルの回収を行って神経伝達物質 (ノルアドレナリン・ドーパミン・ヒスタミン) の遊離を観察した。

### 【結果】

MSG 溶液の胃内投与によってノルアドレナリン・ドーパミン遊離に変化はなかったが、ヒスタミン遊離に有意な減少が見られた。MSG 溶液投与によるヒスタミン遊離の変化のメカニズムをさらに詳細に検討するため、迷走神経を切断したラットを用いて同様の実験を行ったところ、MSG 溶液投与によるヒスタミン遊離低下の反応が消失した。また、この現象に関与する mGluRs のサブタイプを明らかにするため、うま味受容体として知られている mGluR1 ならびに mGluR4 の作動薬 (mGluR1:キスカル酸, mGluR4:L-AP4)を同様に胃内投与したところ、キスカル酸投与では 0.5mM 投与群で有意なヒスタミン遊離の低下が見られ、L-AP4 投与では 0.2mM・0.5mM 投与群で同様のヒスタミン遊離の低下が観察された。

### 【考察】

以上の結果より、MSG 溶液中に含まれる L-グルタミン酸は胃内に存在する mGluR1 ならびに mGluR4 に結合し、迷走神経から中枢への求心性入力を介して内側視索前野のヒスタミン活性を変化させる可能性が示唆された。

## B-2

### $\alpha_1$ 受容体サブタイプがラットの側坐核のドパミン放出抑制において果たす役割

○青野悠里<sup>1</sup>, 三枝 禎<sup>1</sup>, 田口寛子<sup>2</sup>, 越川憲明<sup>1</sup>  
日本大学歯学部薬理学教室<sup>1</sup>, 日本大学歯学部歯科矯正学教室<sup>2</sup>

#### 【目的】

青斑核および延髄腹側部のノルアドレナリン (NA) 神経は、中脳一辺縁系ドパミン (DA) 神経の主たる投射領域の側坐核へ入力している。我々はこれまで  $\alpha_1$  受容体 agonist の methoxamine の側坐核への灌流投与は、同部位から回収された細胞外液中の NA 量には影響を及ぼさないものの DA 量は減少させること、また基礎的な細胞外 NA および DA 量に影響を与えない低用量の  $\alpha_1$  受容体 antagonist の prazosin は、methoxamine の誘発した DA 量の減少を抑制することをそれぞれ報告している (Saigusa *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 688, 2012)。これらのことは側坐核では  $\alpha_1$  受容体が同部位の DA 放出を抑制的に調節することを示唆するものである。

一方、 $\alpha_1$  受容体には  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  の 3 種類のサブタイプが知られているが、methoxamine 処置が惹き起した DA 量の減少に対するこれら受容体の関与は明らかでない。そこで本研究では、 $\alpha_1$  受容体の各サブタイプの選択的 antagonist が methoxamine の誘発した側坐核の DA 放出低下を抑制するか否かを指標として、 $\alpha_1$  受容体サブタイプが methoxamine の効果発現において果たす役割について検討した。

#### 【方法】

実験には Sprague-Dawley 系雄性ラット (体重約 200 g) を用いた。脳微小透析法により、無麻酔非拘束の条件下で側坐核からサンプルとして回収した細胞外液に含まれる NA および DA を、HPLC-ECD 法で 20 分毎に定量した。使用薬物はいずれも灌流液に溶解し、透析プローブから逆透析で側坐核に局所灌流投与した。各薬物の用量は、灌流液中 (60  $\mu$ l) の絶対量 (pmol) で示した。

#### 【結果】

Methoxamine (24 pmol) の灌流投与の結果、サンプル中の基礎 NA 量に目立った変化はなかったが DA 放出は約 20% 減少した。基礎 NA および DA 放出に影響を及ぼさない用量の  $\alpha_{1A}$  受容体 antagonist の 5-methylurapidil (6 pmol),  $\alpha_{1B}$  受容体 antagonist の cyclazosin (0.6, 6 pmol),  $\alpha_{1D}$  受容体 antagonist の BMY 7378 (0.6 pmol) をそれぞれ前投与したところ、methoxamine が誘発した DA 放出の低下はほぼ完全に消失した。

#### 【考察】

我々は側坐核の DA 神経終末上に局在する  $\alpha_1$  受容体が、DA 放出を抑制的に制御する可能性を指摘してきた (Saigusa *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 688, 2012)。以上の結果から、本研究で  $\alpha_1$  受容体 agonist の methoxamine が示した側坐核の DA 放出抑制作用の発現には、同部位の DA 神経終末上に分布する  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$  の各  $\alpha_1$  受容体サブタイプを同時に刺激する必要があることが示唆された。

## B-3

### トラマドール反復投与による神経障害性疼痛改善作用

榊山 実、前田早苗、白川久志、○中川貴之、金子周司  
京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野

【目的】神経障害性疼痛に対して、三環系抗うつ薬等が第一選択薬とされており、オピオイドは、国内では第三選択薬と位置付けられている。一方、弱オピオイドに分類されるトラマドールは、 $\mu$  オピオイド受容体へのアゴニスト作用に加え、モノアミン再取り込み阻害作用を併せ持ち、国内でも非がん性慢性疼痛への利用が拡大している。これまで、神経障害性疼痛動物モデルに対して、トラマドール単回投与による急性鎮痛作用は数多く報告されてきたが、反復投与による影響を検討した報告は驚くほど少ない。本研究では、トラマドール、モルヒネおよび三環系抗うつ薬アミトリプチリンを反復投与した際の神経障害性疼痛に対する効果を検討するとともに、脊髄グリア細胞およびノルアドレナリン (NA) 神経に対する影響を検討した。

【方法】各薬物を坐骨神経部分結紮 (pSNL) 当日から 6 日後まで (アロディニア誘導に対する抑制作用)、もしくは 7 日後から 14 日後まで (形成されたアロディニアに対する改善作用)、1 日 1 回反復投与した。von Frey フィラメントにより、薬物投与直前に反復投与によるアロディニア改善効果を、投与 1 時間後に急性鎮痛効果を評価した。

【結果】pSNL による機械的アロディニアに対して、モルヒネ (10 mg/kg) は投与毎に急性鎮痛効果を示したが、アロディニアの誘導および維持に影響はなく、むしろ反対側での痛覚過敏が認められた。一方、アミトリプチリン (10 mg/kg) およびトラマドール (20 mg/kg) の反復投与は、急性鎮痛効果に加え、アロディニア誘導抑制作用および形成されたアロディニアに対する改善作用を示した。モルヒネおよびトラマドールの急性鎮痛効果はナロキソンにより、アミトリプチリンおよびトラマドールのアロディニア誘導抑制/改善作用は $\alpha_2$ -アドレナリン受容体 (AR) 拮抗薬ヨヒンビンにより抑制された。トラマドール反復投与によるアロディニア改善作用は、投与中止後も持続し、ヨヒンビンにより影響を受けなかった。また、アミトリプチリンおよびトラマドール反復投与により、pSNL による脊髄ミクログリア活性化に影響は見られなかったが、脊髄アストロサイトの活性化を有意に抑制した。このアストロサイト抑制作用は、ナロキソンにより影響を受けなかったが、ヨヒンビンにより減弱した。また、トラマドール反復投与は、脊髄において NA 合成酵素 dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH) 陽性線維を増加させたが、モルヒネおよびアミトリプチリン反復投与ではそのような効果は認められなかった。

【考察】末梢神経損傷による神経障害性疼痛に対して、トラマドールの反復投与は、 $\mu$ -オピオイド受容体を介した急性鎮痛効果を示すとともに、 $\alpha_2$ -AR 刺激がトリガーとなるアロディニア誘導抑制/改善作用を示すことが明らかとなった。また、その作用には、 $\alpha_2$ -AR を介したアストロサイト活性化抑制が関与すること、さらに、脊髄での下行性 NA 神経線維の増加が関与することが示唆される。トラマドールの持続的な $\mu$ -オピオイド受容体刺激作用およびノルアドレナリン再取り込み阻害作用の相乗効果により、NA 神経線維増加を伴う下行性疼痛抑制系の促進が生じ、おそらくアストロサイト上に発現する $\alpha_2$ -AR を刺激することにより、アストロサイト活性化を抑制し、神経障害性疼痛誘導抑制/改善作用を示したものと推察される。



## B-4

### 慢性疼痛時における脂肪酸受容体 GPR40 の発現変動に対するアストロサイトの関与

○西中崇<sup>1)</sup>、里尚也<sup>1)</sup>、中本賀寿夫<sup>1)</sup>、万倉三正<sup>2)</sup>、小山豊<sup>3)</sup>、糟谷史代<sup>4)</sup>、徳山尚吾<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 神戸学院大・薬・臨床薬学、<sup>2)</sup> 備前化成株式会社、<sup>3)</sup> 大阪大谷大・薬・薬理学、

<sup>4)</sup> 神戸学院大・薬・毒性学

【目的】慢性疼痛は、原因となる病態が改善してもなお、痛みが遷延する状態である。慢性疼痛に対して、既存の医薬品では、十分な治療効果が得られない場合や、長期間の服用による副作用の発現によって、その使用を制限されてしまう場合があり、適切な治療を行うことができない場合がある。そのため、慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬やその疼痛制御機構の解明に関する研究が社会的な課題である。近年、n-3系脂肪酸が関節リウマチ、関節炎および神経障害性疼痛などにおける痛みを抑制するとの報告がなされ、脂肪酸が疼痛制御に関与している可能性が提唱されている。我々はこれまでに、ドコサヘキサエン酸 (DHA) が抗侵害作用を示すこと、さらに、DHA などの長鎖脂肪酸が作用する受容体 GPR40 を介して  $\beta$ -エンドルフィンを遊離させ、疼痛制御に関与していることを報告している。これらの結果から、脂肪酸受容体が生体内の疼痛制御機構において重要な役割をしている可能性が考えられる。しかし、慢性疼痛下におけるこれら脂肪酸受容体の関与については全く不明である。そこで本研究においては、慢性炎症性疼痛モデルマウスを用いて、中枢神経系における GPR40 のタンパク質発現変動およびそれらに対するアストロサイトの関与について検討を行った。

【方法】4 週齢の ddY 系雄性マウスを使用した。慢性炎症性疼痛モデルは、マウスの右後肢足蹠内へ 0.5 mg/kg の complete Freund's adjuvant (CFA) を投与し作製した。vehicle 群には生理食塩水を投与した。疼痛評価には、von Frey test (機械的刺激) および Plantar test (熱的刺激) を用いた。中枢神経系における GPR40 の局在解析、ならびに蛋白質発現は二重免疫染色法およびウエスタンブロット法を用いて行った。細胞増殖抑制剤である flavopiridol (5, 15 nmol/mouse) は CFA 投与直前と 10 時間後の 2 回脳室内投与した。

【結果】CFA 投与 1 日目から、足の腫脹、機械的および熱的刺激に対する疼痛過敏反応が認められた。この条件下における脳内 GPR40 の蛋白質発現を測定したところ、CFA 投与 7 日目において vehicle 群と比較して、延髄および視床下部領域では有意に増加し、中脳においても増加傾向を示した。GPR40 発現が増加したこれらの領域において、二重免疫染色を行ったところ、GPR40 は神経細胞のマーカーである NeuN と共局在を示したが、アストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) とは共局在を示さなかった。視床下部領域の GFAP の発現を測定したところ、CFA 投与 1 日後において有意な発現増加が認められ、7 日後には vehicle 群と同程度の値まで回復していた。CFA 投与 1 日目における GFAP の発現増加および 7 日目における GPR40 の発現増加は flavopiridol の処置により有意に抑制された。

【考察】慢性疼痛時、脳内の疼痛制御に関わる領域において神経細胞上の GPR40 の発現が変動することで疼痛の制御を行っている可能性が示された。また、GPR40 の発現の変動には脳内アストロサイトが関与している可能性が示された。

## B-5

### 抗がん剤 etoposide の反復投与による小腸における ERM の発現変化が P-glycoprotein の発現量に及ぼす影響

○小堀 宅郎、原田 慎一、中本 賀寿夫、徳山 尚吾  
神戸学院大・薬・臨床薬学

【目的】 これまでに我々は、抗がん剤 etoposide (ETP) の反復経口投与によって、薬物排出トランスポーターである P-glycoprotein (P-gp) の小腸における発現増加ならびに薬物排出活性の亢進作用が引き起こされ、経口投与した morphine の鎮痛効果を減弱させることを報告している<sup>1,2)</sup>。さらにこの機構には、小腸における低分子量 G タンパク質である RhoA の活性化を介した P-gp の足場タンパク質として機能する ezrin/radixin/moesin (ERM) の細胞膜における発現量の増加、すなわち活性化が関与することを明らかにしている<sup>3,4)</sup>。活性化した ERM は、リン酸化を受けることによってその活性化状態の持続時間が延長することが知られている。一方、RhoA のエフェクターである Rho-associated coiled-coil containing kinase (ROCK) は、ERM のリン酸化反応を担う主要なキナーゼであることが示唆されている。そこで本研究では、ETP の反復経口投与による小腸細胞膜上での P-gp の発現変動機構における ROCK の活性化ならびに ERM とそのリン酸化体の細胞膜での発現変化に加え、これらの変化が経口投与した morphine の鎮痛効果へ及ぼす影響について検討を行った。

【方法】 実験には 4 週齢の ddY 系雄性マウスを用い、ETP (10 mg/kg/day, p.o.) は 7 日間反復投与した。また、ROCK 活性を阻害する fasudil (5 mg/kg/day, p.o.) は、ETP と同時に反復投与した。小腸における各タンパク質発現量は western blot 法を用いて解析し、morphine (50 mg/kg, p.o.) の鎮痛効果は tail flick 法によって測定した。

【結果】 ETP の反復投与終了 24 時間後、小腸の細胞膜画分における ROCK の発現量は、対照群と比較して増加し、この作用は fasudil の併用投与によって抑制された。さらに同条件下、ETP による同画分における P-gp、ERM/phosphorylated ERM (p-ERM) の発現増加ならびに経口投与した morphine の鎮痛効果の減弱作用は、いずれも fasudil の併用投与によって抑制された。

【考察】 以上の結果から、ETP の反復経口投与による小腸の細胞膜における P-gp の発現増加機構には、RhoA/ROCK の活性化を介した細胞膜における ERM ならびに p-ERM の発現増加が関与し、これらの変化が経口投与した morphine による鎮痛効果を減弱させることが示唆された。

#### References

- 1) Fujita-Hamabe et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, **64** (2012): 496-504
- 2) Kobori et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **47** (2012): 934-940
- 3) Kobori et al., *J. Pharm. Sci.*, **102** (2013): 1095-1105
- 4) Kobori et al., *J. Pharm. Sci.*, (in press)

# C-1

## 視床下部の orexin-A による脳虚血後高血糖および神経障害発現抑制作用 に対する視床下部-延髄系の役割

○原田慎一、山崎由衣、徳山尚吾  
神戸学院大・薬・臨床薬学

【目的】現在、脳卒中の発症に関与する因子の中でも、糖尿病または高血糖状態が重要な危険因子であることはよく知られている。最近では、糖尿病の既往歴のない人でも、脳卒中発症後に高血糖を呈し、それを制御することにより死亡率が抑制されるという報告がなされている。我々はこれまでに、脳虚血ストレス負荷後に、肝臓における insulin 感受性の低下が一過性の耐糖能異常（虚血後高血糖）を誘発し、神経障害を悪化させることを明らかにしてきた。さらに、視床下部から産生される神経ペプチドである orexin-A の脳室内または視床下部内局所投与によって、肝臓における insulin シグナル系の賦活化による虚血後の血糖値上昇が抑制されることで、神経障害の発現抑制に寄与する知見を得てきている。本研究では、orexin-A の視床下部を介した役割を検討するために、肝機能を制御する神経の一つである迷走神経に着目し、その起始核が存在する延髄を介した視床下部における orexin-A の脳虚血後の糖代謝異常および神経障害発現への関与について検討を行った。

【方法】実験には 5 週齢の ddY 系雄性マウスを用いて、中大脳動脈閉塞法 (MCAO, 2 h) によって一過性脳虚血モデルを作成した。神経障害の発現は、梗塞巣形成、行動障害ならびに学習・記憶障害を指標として評価した。Orexin-A (5 pmol/mouse) は、MCAO 後に単回視床下部内局所投与した。Orexin-1 受容体拮抗薬である SB334867 (200 pmol/mouse) は、orexin-A 投与 30 分前に延髄内局所投与した。MCAO 後の血糖値変化として空腹時血糖値 (FBG) を測定し、各種タンパク質の発現変化は western blot 法によって解析した。延髄における c-Fos (神経活性マーカー) の発現は、免疫組織染色により評価した。

【結果】Orexin-A の視床下部内局所投与により、MCAO 3 日後の梗塞巣形成、行動障害、ならびに学習・記憶障害発現は有意に抑制された。さらに、MCAO 1 日後の FBG の上昇は有意に抑制された。同時に、肝臓における insulin およびリン酸化 insulin 受容体の発現減少ならびに糖新生関連酵素 (phosphoenolpyruvate carboxykinase および glucose-6-phosphatase) の発現上昇は、有意に抑制された。この作用は、延髄への SB334867 処置により有意に拮抗された。加えて、正常マウスにおいて、orexin-A を視床下部内局所投与することにより、延髄弧束核における c-Fos の陽性細胞数が増加した。

【考察】本研究から、延髄の orexin-1 受容体は末梢組織における insulin 感受性の改善に重要な役割を担っていると考えられる。さらに、orexin-A による中枢領域から末梢組織へのシグナル伝達に延髄および迷走神経が関与している可能性が示唆された。

## C-2

### ミクログリア/マクロファージにおける TRPM2 を介した NO 産生が脳虚血傷害の病態を悪化させる

○崎元 伸哉、白川 久志、宗像 将也、中川 貴之、金子 周司  
京都大・薬・生体機能解析

【目的】脳虚血傷害において遅発性に惹起される脳内炎症が、治療許容時間の観点からも重要な創薬標的の一つとして挙げられる。この脳内炎症の病態においては、脳常在性のミクログリアや末梢から浸潤してくるマクロファージなどの免疫系細胞が重要な役割を担うことが示唆されているが、その機能制御につながる治療標的分子に関する情報は圧倒的に不足している。一方、Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) は  $\text{Ca}^{2+}$  透過型の非選択的カチオンチャネルであり、脳や免疫系の細胞に広く分布していることが知られており、TRPM2 を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入がミクログリアやマクロファージにおける特定のケモカイン産生を促進し炎症応答増悪に関与することが大きな注目を集めている。本研究では、脳虚血の好発部位である中大脳動脈の一過性閉塞モデルを作成し、野生型 (WT) および TRPM2 欠損 (TRPM2-KO) マウスを用いて脳虚血再灌流傷害の形成における TRPM2 の関与について検討した。

【方法】C57BL/6J 系雄性マウス (8-12 weeks、20-30 g) を用い、60 分間の一過性中大脳動脈閉塞モデルを作成し、梗塞巣体積や神経症状を評価した。骨髄キメラマウスは WT と TRPM2-KO 間で骨髄由来細胞を移植し作成した。

【結果】WT に比べて TRPM2-KO マウスでは再灌流 14 日後までの生存率の低下が有意に抑制された。さらに WT では神経障害および梗塞巣の形成が経時的に悪化もしくは拡大されたのに対し、TRPM2-KO では再灌流 1 日後では有意差は認められなかったが、2 日後から 3 日後にかけて有意に抑制されていた。次に、ミクログリア/マクロファージの活性化抑制薬である minocycline の作用について検討したところ、WT では minocycline 投与群において有意な神経障害の改善と梗塞巣形成の抑制が観察されたが、TRPM2-KO では minocycline 投与による有意な変化は認められなかった。また、免疫細胞の浸潤や集積の影響を免疫組織化学的に検討したところ、TRPM2-KO では梗塞巣周囲におけるミクログリア/マクロファージと想定される Iba-1 陽性細胞数の増大が再灌流 2 日後と 3 日後において有意に抑制されていた。続いて、骨髄キメラマウスを用いて脳虚血再灌流障害への影響を検討したところ、末梢骨髄由来細胞で TRPM2 を欠損した TRPM2-KO ドナー/WT レシピエント (TRPM2-KO→WT) キメラマウス、中枢神経系やミクログリアで TRPM2 を欠損した WT ドナー/TRPM2-KO レシピエント (WT→TRPM2-KO) キメラマウス、双方で TRPM2 を欠損した TRPM2KO→TRPM2KO キメラマウスのいずれにおいても、WT→WT キメラマウスに比べ神経症状が有意に改善した。最後に、iNOS の選択的阻害薬である 1400W の作用について検討したところ、WT では 1400W 投与により有意な神経障害の改善と梗塞巣体積の縮小が観察されたが、TRPM2-KO では 1400W 投与による有意な変化は認められなかった。培養ミクログリアおよびマクロファージを用いた検討において、活性化に伴う NO 遊離が TRPM2 欠損により顕著に抑制された。

【考察】以上の結果から、ミクログリア/マクロファージに発現する TRPM2 を介した NO 遊離が、亜急性期の脳虚血再灌流傷害の増悪に関与していることが示唆される。

# C-3

## Sigma-1 受容体賦活化による認知機能障害およびうつ様症状の改善効果

○森口茂樹、福永浩司  
東北大学大学院薬学研究科薬理学分野

### 【目的】

中枢神経系において de novo 経路により合成される Dehydroxyepiandrosterone (DHEA) は内因性 Sigma-1 受容体のリガンドとしての役割を担う。我々は、DHEA の慢性処置による sigma-1 受容体の賦活化が嗅球摘出マウス (OBX) における認知機能障害をカルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) の活性化を介して改善することを見出した (Moriguchi et al., J. Neurochem. 2011)。本研究では、DHEA 処置による認知機能障害およびうつ様症状のメカニズムについて検討した。

### 【方法】

OBX における DHEA の慢性処置 (30 or 60 mg/kg p.o., 7 日間) による認知機能改善効果もしくは抗うつ様効果について行動解析、電気生理学的解析、免疫組織化学的解析、生化学的解析により検討した。

### 【結果】

OBX の認知機能障害における DHEA 慢性処置による改善効果について検討を行った結果、記憶学習行動の改善、長期増強現象 (LTP) の増強、細胞内に局在する CaMKII の自己リン酸化および AMPA 受容体の Ser-831 部位のリン酸化の亢進が見出された。一方、抗うつ様効果の解析の結果、うつ様行動の改善、歯状回における BrdU 陽性細胞数の増加、Akt および ERK のリン酸化の亢進が見出された。さらに、Akt の下流に局在する GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin の関与も明らかとした。また、これらの改善効果は、sigma-1 受容体阻害薬である NE100 の前処置により有意に阻害されたことより、DHEA による改善効果は sigma-1 受容体を介していることを明らかにした。

### 【考察】

本研究の結果、sigma-1 受容体の賦活化により認知機能障害およびうつ様症状の改善効果が明らかとなった。今後、アルツハイマー病などに代表される認知・精神疾患における sigma-1 受容体の賦活化による治療効果について検討する予定である。

参考論文

Moriguchi et al., J. Neurochem. (2011)

Moriguchi et al., PLoS ONE (under revision)

# C-4

## パーキンソン病モデルマウスの認知機能障害と nobiletin の改善作用

○矢吹悌<sup>1</sup>、大泉康<sup>2,3</sup>、福永浩司<sup>1</sup>

- 1 東北大学大学院薬学研究科薬理学分野、2 静岡県立大学薬学部、
- 3 東北大学大学院 超臨界溶媒工学研究センター

【目的】 Nobiletin は認知・学習障害モデル動物に対し、抗認知症作用を有する柑橘系・果皮由来の天然化合物である。私達は一過性脳虚血モデルマウスにおいて、nobiletin が神経保護作用を示すこと、記憶形成に重要な酵素である Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) を海馬において活性することを報告した。また、パーキンソン病モデルである MPTP 投与マウスの海馬では CaMKII 活性が低下することを明らかにした (Moriguchi and Yabuki et al., *J. Neurochem.* **120**, 541-551 2012)。Nobiletin の認知機能改善効果についてはよく知られているが、その作用機序については解明されていない。本研究では、パーキンソン病モデルマウスを用いて、認知機能障害に対する nobiletin の改善効果とその作用機序について解析した。

【方法】 9 週齢の C57BL/6 N マウスに 1 日 1 回 5 日間 MPTP (25 mg/kg i.p.) を投与した。MPTP 最終投与 24 時間後から nobiletin (25 or 50 mg/kg, i.p.) を 1 日 1 回 2 週間投与した。MPTP 最終投与後 2 週間目と 4 週間目にローターロッド試験及びビームウォーク試験により運動機能の評価した。同時に 4 週間目には新規物体認識試験及び受動回避試験により認知機能の評価した。行動試験終了後、マウスを灌流固定後に脳スライスを作製し、免疫組織化学染色法を用い、nobiletin の神経保護作用を検討した。また、線条体及び海馬 CA1 領域の脳組織を摘出し、細胞内シグナルを免疫ブロット法により解析した。マイクロダイアリシス法によるドパミン放出の解析では無処置のマウスを用いた。

【結果】 Nobiletin 投与 (50 mg/kg, i.p.) により MPTP 投与マウスにおける運動機能障害及び認知機能障害は改善された。しかしながら、MPTP が引き起こすドパミン神経細胞死に対して nobiletin は抑制効果を示さなかった。一方、MPTP 投与マウスの線条体及び海馬 CA1 領域における CaMKII 自己リン酸化反応、dopamine- and cAMP- regulated phosphoprotein-32 (DARPP-32) リン酸化反応の低下が nobiletin 投与 (50 mg/kg, i.p.) により改善した。線条体及び海馬 CA1 領域において、nobiletin は MPTP 投与による tyrosine hydroxylase (TH) タンパク質量の低下は改善しなかったが、CaMKII 及び protein kinase A (PKA) による TH リン酸化反応は有意に改善した。興味深いことに、nobiletin は線条体及び海馬 CA1 領域におけるドパミン放出を亢進した。Nobiletin によるドパミン放出の亢進作用は voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel (VDCC) の阻害薬により有意に抑制された。

【考察】 私達はこれまでに nobiletin が海馬において Ca<sup>2+</sup>/CREB シグナルを活性化することを報告している。本研究では、nobiletin が線条体と海馬で cAMP/Ca<sup>2+</sup> シグナルを活性化すること、ドパミン放出促進がこれらのシグナルの活性化に関与することを明らかにした。ドパミンは意欲や学習に関与することから、nobiletin によるドパミン神経系の活性化は記憶改善効果に関与すると考えられる。

# C-5

## 恐怖記憶における皮質ドーパミン作動性神経の役割

○平出幸子<sup>1</sup>, 松本真知子<sup>1</sup>, 山口 拓<sup>2,3</sup>, 柳川芳毅<sup>1</sup>, 久保靖憲<sup>1</sup>, 井上純孝<sup>1</sup>,  
吉岡充弘<sup>3</sup>, 富樫廣子<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北医療大薬・病態生理, <sup>2</sup>長崎国際大・薬・薬理, <sup>3</sup>北大院・医・神経薬理

### 【目的】

情動神経回路を構成する皮質前頭前野 (medial prefrontal cortex : mPFC) のシナプス応答は精神疾患治療薬で変化することが報告されており, その機能的役割が注目されている. mPFC シナプス応答にはドーパミン (dopamine : DA) 作動性神経が重要な役割を果たしていることが知られている. 本研究は, DA 作動性神経の機能低下による前頭葉機能不全が指摘されている脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP/Ezo : 以下 SHRSP) を用い, 恐怖ストレスに対する mPFC のシナプス応答の機能的役割について, モノアミン作動性神経に着目して検討した.

### 【方法】

6-8 週令の雄性 SHRSP ならびにウィスター京都ラット (WKY) を用い, 電気生理ならびに神経化学的検討を行った. また, 6-hydroxy dopamine によって DA 神経を化学的に破壊したラット (6-OHDA ラット) を作製した.

### 【結果】

- ① SHRSP では, 文脈的恐怖条件付け (contextual fear conditioning : CFC) における恐怖記憶の獲得時のすくみ行動発現率が低下していた. 海馬-mPFC 神経回路ではシナプス伝達の長期増強 (long-term potentiation : LTP) の形成障害を認めた.
- ② 6-OHDA ラットは, SHRSP と類似した行動変容ならびにシナプス応答を示した.
- ③ SHRSP にモノアミン再取り込み阻害薬 Methylphenidate (MPH; 1 mg/kg, i.p.) ならびに選択的ノルアドレナリン (NA) 再取り込み阻害薬 Desipramine (DMI; 3 mg/kg, i.p.) を投与すると, 海馬-mPFC 神経回路の LTP 形成障害が改善されたが, 選択的 DA 再取り込み阻害薬 GBR12909 (GBR; 3 mg/kg, i.p.) では改善されなかった. また, MPH ならびに DMI 投与により mPFC の細胞外 DA 濃度が有意に増加したが, GBR では有意な増加がみられなかった. これら薬理的検討の結果は, CFC における恐怖記憶の獲得障害の改善効果と一致していた.

### 【考察】

海馬-mPFC 神経回路におけるシナプス可塑性は, 恐怖記憶の獲得に関与しており, それには DA 作動性神経が重要な役割を果たしている可能性が示唆された. このことは, 皮質 DA 神経系を賦活する薬理的処置によって, SHRSP のシナプス可塑性と恐怖記憶の獲得障害が改善したという実験結果により支持された.