

学位論文

「脳内炎症を反映した新たな病態モデルとしてのクプリゾン
短期曝露マウスの解析」

指導教授名 高橋 正身

申請者氏名 手塚 智章

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

炎症は生体が内外から有害な刺激を受けた時に生じる生体防御反応であり，これにより誘導される免疫応答と症候，あるいは病理学的変化を指す．微生物感染などに代表される急性炎症と異なり，長期にわたるストレス応答のため炎症反応が蔓延化し，臓器の機能不全を引き起こす慢性炎症は，各種疾患に共通する基盤病態として重要視されている．脳は血液脳関門の存在により末梢と区別されており，脳内の免疫系ではミクログリアやアストロサイトが重要な役割を果たす．統合失調症並びに精神症状を示す患者においては，ミクログリアやアストロサイトの活性化亢進や炎症性サイトカインの上昇が認められることから，脳内の炎症反応が亢進していると考えられている．サイトカインは，種々の細胞の増殖，分化及び細胞死を調節するなど多彩な作用をもつことが知られており，脳内においては脳発達及び脳機能に影響を及ぼす．

近年の画像解析技術の進展により，統合失調症患者の脳において，水分子の拡散異方性の低下といった白質の軽度な構造異常が検出されている．白質を構成するミエリンは神経伝導速度を上げ，細胞間の情報伝達に重要な役割を果たすことから，白質の異常は，脳機能が障害される統合失調症並びに精神症状の原因となっている可能性が考えられるが，このような白質の異常がどのような機序で生じているかについては，未だ明らかにはされていない．この問題を解決するために私は1つの作業仮説として，白質異常の成因の1つに脳内炎症があるのではないかと考え，この仮説を検証するツールとなり得る動物モデルとして，新たにクプリゾン短期曝露マウスを構築した．

銅キレーターであるクプリゾンをマウスに長期間混餌投与すると，ミエリンが減少し，脱髄を生じる．このマウスは，脱髄性疾患である多発性硬化症の動物モデルとしてこれまで研究に用いられてきたが，クプリゾン長期曝露マウスは脱髄を生じることから，私は，精神疾患を対象とした動物モデルには，不適切と考えた．そこで，脱髄を生じずに，脳内で炎症反応の亢進するマウスを作製する目的で，クプリゾンを従来よりも短期間，成体期のマウスに混餌投与したクプリゾン短期曝露マウスを作製し，以下の解析を行った．

これらのマウスに対し，免疫組織染色及び定量 PCR を用い，アストロサイトのマーカーである **glial fibrillary acidic protein (GFAP)**，ミクログリアのマーカーである **ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1)** を測定した．その結果，タンパク質，遺伝子レベルともに，クプリゾン短期曝露マウスの脳において **GFAP** 及び **Iba1** の有意な増加が認められた．また，炎症性サイトカインである **interleukin 6 (IL-6)** 遺伝子の発現量を定量 PCR で測定した結果，クプリゾン短期曝露マウスの脳において有意な発現上昇が認められた．これらの結果から，クプリゾン短期曝露マウスの脳内では，炎症反応が亢進していることが示唆された．次に，クプリゾン短期曝露マウスに対し，免疫組織染色を用いて **myelin basic protein (Mbp)** を検出した結果，クプリゾン短期曝露マウスは対照マウスと比べ，**Mbp** の染色性に違いは認められなかった．さらに，クプリゾン短期曝露マウスの軸索とミエリンを観察，計測した結果，両群の間に違いが認められなかった．以上の結果から，クプリゾン短期曝露マウスでは脱髄は生じていないと考えられた．しかし，定

量 PCR を用いて Mbp 遺伝子を測定した結果、遺伝子レベルではクプリゾン短期曝露マウスにおいて有意な減少が認められた。Mbp はタンパク質レベルでは違いは認められなかったが、遺伝子レベルにおいては減少が見られたことから、クプリゾン短期曝露マウスにおいても、脱髄は生じていないが、白質に形態的には検知できない何らかの異常を生じている可能性が示唆された。

脱髄を伴わずに炎症反応が亢進しているクプリゾン短期曝露マウスに対し、異常行動が生じているか検証した。急性の精神症状の指標として、メタンフェタミン及びフェンサイクリジンに対する運動亢進量を測定した。その結果、対照マウスに比べ、クプリゾン短期曝露マウスにおいて運動量の有意な増加が認められた。これらの結果から、クプリゾン短期曝露マウスは急性の精神症状に対する感受性が亢進していることが示唆された。次に、空間的な短期記憶の評価として Y 字迷路試験、また、視覚的認知機能の評価として新奇物体認識試験を実施した。その結果、Y 字迷路試験において自発交替率の有意な低下が、新奇物体認識試験において新奇物体に対する探索嗜好性の有意な低下が認められた。これらの結果から、クプリゾン短期曝露マウスは認知機能が低下していることが示唆された。

本研究において、クプリゾン短期曝露マウスは、脳内で炎症反応は亢進しているが、脱髄といった顕著な病変は生じていないという神経化学的な特徴を持つこと、並びに、急性の精神症状に対する感受性の亢進や、認知機能の低下といった、ヒトで認められる一部の精神症状を反映した異常行動を示すことが示唆された。クプリゾン短期曝露マウスは、脳内の炎症反応の亢進を反映した新たな病態モデルとしての可能性が示唆される。炎症亢進から異常行動に至るメカニズムには更なる研究が必要であるが、本モデルを用いた解析を進めることで、私は、精神疾患の新たな病態理解、更には既存薬とは異なるメカニズムに根差した、新たな作用機序をもつ薬剤の開発に繋がたいと考える。

目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 方法	
2-1. クプリゾン短期曝露マウスの作製 -----	2
2-2. 免疫組織染色 -----	2
2-3. 定量 PCR -----	3
2-4. In situ hybridization と免疫組織染色による二重染色 -----	4
2-5. 脳内の銅含有量の測定 -----	5
2-6. 電子顕微鏡観察 -----	5
2-7. Black-Gold 染色 -----	5
2-8. メタンフェタミン誘発運動亢進試験 -----	6
2-9. フェンサイクリジン誘発運動亢進試験 -----	6
2-10. メタンフェタミン及びフェンサイクリジンの脳内濃度の測定 -----	6
2-11. Y 字迷路試験 -----	7
2-12. 新奇物体認識試験 -----	7
2-13. プレパルス抑制試験 -----	7
3. 結果	
3-1. クプリゾン短期曝露による脳内の炎症作用	
3-1-1. GFAP 及び Iba1 の免疫組織学的解析並びに遺伝子発現解析 -----	8
3-1-2. IL-6 の遺伝子発現解析 -----	9
3-1-3. IL-6 と GFAP 及び Iba1 の二重染色 -----	9
3-1-4. クプリゾン短期曝露マウスにおける脳内の銅含量測定 -----	9
3-2. クプリゾン短期曝露によるミエリンへの作用	
3-2-1. Mbp の免疫組織学的解析 -----	9
3-2-2. 電子顕微鏡を用いたミエリンと軸索の観察 -----	10
3-2-3. Black-Gold 染色法を用いたミエリンの染色 -----	10
3-2-4. Mbp の遺伝子発現解析 -----	10
3-3. クプリゾン短期曝露による行動への影響	
3-3-1. メタンフェタミン誘発運動亢進に対する作用 -----	10
3-3-2. フェンサイクリジン誘発運動亢進に対する作用 -----	11

3-3-3. メタンフェタミン及びフェンサイクリジンの脳内濃度の測定 -----	11
3-3-4. Y字迷路試験に対する作用 -----	11
3-3-5. 新奇物体認識試験に対する作用 -----	12
3-3-6. プレパルス抑制 (PPI) 試験に対する作用 -----	12
4. 考察	
4-1. クプリゾン短期曝露による脳内の炎症作用について -----	12
4-2. クプリゾン短期曝露によるミエリンへの作用について-----	13
4-3. クプリゾン短期曝露による行動への影響について -----	13
5. 総括 -----	14
6. 今後の課題 -----	15
7. 謝辞 -----	16
8. 引用文献 -----	17
9. 業績目録 -----	19
(10. 図表 -----	20)

1. 序論

炎症とは、病原微生物の感染や組織腫瘍、または外来異物の侵入などによって起こる生体応答である。例えば、病原微生物の感染などにより、免疫応答が引き起こされると、免疫系細胞は炎症性サイトカイン及びケモカインなどを分泌する。何らかのきっかけで一過性に終わるはずの炎症が慢性化してしまうと、他の疾患の誘発や増悪につながる事が明らかにされ、近年重要視されている(1)。このような慢性炎症は、比較的短期間に炎症反応の活性化と退縮を生じる急性炎症と異なり、長期にわたるストレス応答のために炎症反応が蔓延化し、適応の破綻により不可逆的な組織リモデリングを生じて組織の機能不全をもたらす。また、組織リモデリングの前段階となる低レベルの炎症状態でも、内皮細胞機能障害やインスリン抵抗性が誘導され、糖尿病や動脈硬化性疾患の原因となることが報告されている(2)。

脳は免疫学的に特異な部位であり、細菌やウイルスなどの影響を防ぐための特殊な関所として、血液脳関門が形成されている。この血液脳関門の存在により、脳には免疫細胞が透過できない。そのため、脳内の免疫系にはミクログリアとアストロサイト（両者をまとめて、以降、炎症性グリアとする）が重要な役割を果たす。これらの細胞は、脳内で炎症がおきると形を変えて活性化し、サイトカインやケモカインに代表される、細胞を傷害する複数の因子を放出して神経細胞の機能不全や細胞死を引き起こす(3)。活性化した炎症性グリアには、末梢性ベンゾジアゼピン受容体が発現する。近年、新たに開発された末梢性ベンゾジアゼピン受容体の **positron emission tomography (PET)** リガンドを用いた解析結果から、統合失調症並びに精神症状を生じている患者において、炎症性グリアが亢進していることが明らかとなった(4, 5)。

炎症性グリアから分泌されるサイトカインは、細胞の分化、神経発達、シナプス可塑性及び細胞死を調節するなど、多彩な役割を果たしていることが知られており、脳発達や脳機能に影響を及ぼすと考えられている。実際に、サイトカインを胎仔期あるいは新生仔期に投与された動物は、成熟後に認知機能異常を示す(6)。また、統合失調症患者を用いたメタ解析において、統合失調症の初発期や再発急性期に、血中や脳脊髄液中で **IL-6**, **interleukin 1 beta (IL-1 β)** 及び **tumor necrosis factor alpha (TNF- α)** などの炎症性サイトカインが亢進していることが報告されている(7 - 9)。これらの報告から、脳内での炎症反応の亢進は、統合失調症患者並びに精神症状の原因の 1 つと考えられており、脳内での炎症反応のメカニズム解明は、重要な研究として注目されている。

Magnetic resonance imaging (MRI) などの神経画像を用いた研究は、患者の脳の形態を非侵襲的に調べることができる有用な方法である。近年のさらなる画像解析技術の進歩により、水分子の拡散を **MRI** 信号に反映する技術である拡散テンソル画像 (**diffusion tensor image, DTI**) 技術が発達した(10)。中枢神経系の組織のうち、神経線維の方向が揃っている白質では、細胞膜が水分子の透過を制限するため、神経線維に沿った方向の水分子の拡散は早く、神経線維と直行する方向の拡散は遅い性質を持つ。この水分子の拡散異方性率を測定することで、白質の微細な構造異常を非侵襲的に探ることができるようになり、白質の軽度な病変の検出が可能となった。この **DTI** 技術を用いた測定から、統合失調症患者の脳において、水分子の拡散異方性の低下が認められ、白質線維の統合性の低下が示されている(11)。

グリア細胞の 1 つであるオリゴデンドロサイトは、神経細胞の軸索周囲にミエリンと呼ばれる

白い絶縁層を形成する。この絶縁性のミエリンが軸索を覆うことにより、個々の神経細胞の跳躍伝導を引き起こし、脳の高速演算を可能にする。ミエリンは脳の情報処理を速めるために進化の過程で獲得された構造であり、ミエリンに富んだ白質は、脳機能の発達したヒトで特に発達している。統合失調症患者において、白質に軽度な異常が認められることから、白質の異常は脳機能が障害される統合失調症並びに精神症状の原因となっている可能性が考えられている。

炎症性サイトカインは、それ自体がオリゴデンドロサイトに対する障害性を有することから(12, 13)、私は、白質障害の成因の1つとして脳内炎症に着目し、検証試験のツールとなり得る動物モデルとして、クプリゾン短期曝露マウスを構築した(14)。銅キレーターであるクプリゾンをマウスに長期間混餌投与すると、脳において炎症性グリアや炎症性サイトカインの亢進が認められ、ミエリンが減少して脱髄を生じる。このマウスは、脱髄性疾患である多発性硬化症の動物モデルとして、これまで研究に用いられてきた(15 - 17)。しかし、脱髄といった顕著な病変を伴うことから、精神疾患を対象とした脳内炎症の動物モデルとしては不適切であると考えた。そこで、本研究において、私は、脱髄を生じずに、脳内で炎症反応の亢進するマウスを作製する目的で、クプリゾンを従来の報告よりも1週間という短期間、マウスに曝露することとした。このクプリゾン短期曝露マウスを対象に、組織化学的解析、遺伝子発現解析並びに行動薬理的解析を実施し、精神疾患を対象とした新たな病態モデルの可能性について検討した。その結果、本マウスでは、脱髄といった病変は生じないが *Mbp* 遺伝子の発現減少から、白質に何らかの異常が示唆されること及び脳内において炎症反応が亢進していることが明らかとなった。さらに、種々の行動試験の結果から、急性の精神症状に対する感受性の亢進や、認知機能に異常を生じていることが明らかとなった。このような結果から、クプリゾン短期曝露マウスは、脳内炎症を反映し、白質異常及び精神症状を関連付ける性質を持つ、新たな病態モデルの可能性が示唆された。

2. 方法

2-1. クプリゾン短期曝露マウスの作製

動物の取り扱いについては田辺三菱製薬株式会社の動物実験委員会の承認を受け、田辺三菱製薬の動物実験管理要領を遵守して行った。また、動物の苦痛を最小限にすること、並びに、使用動物数を必要最小限に留めることに努めた。

日本チャールス・リバー株式会社から7週齢で入荷し、1週間馴化飼育した8週齢の雄性 C57BL/6J マウスを実験に用いた。なお、マウスは、温度 23 (20-26) °C、湿度 55 (30-70) % 及び明期 7-19 時の条件で飼育した。8週齢の雄性 C57BL/6J マウスに対し、自由摂食摂水下で 0.2% クプリゾン (Sigma) 混餌を7日間与え続けた。クプリゾン混餌は、動物飼育用の MF 飼料 (オリエンタル酵母工業) に 0.2% (w/w) の含量で混合製造加工したものを使用した。比較対照のマウスは正常の MF 飼料を1週間与えた。

2-2. 免疫組織染色

実験には、クプリゾン短期曝露マウスと対照マウスを各3例用いた。マウスをイソフルランで麻酔した後、心臓から10%中性緩衝ホルマリン固定液を灌流し、脳を摘出した。摘出した脳

をさらに 10%中性緩衝ホルマリン固定液で浸漬固定後、各個体を冠状断にて切り出し、パラフィン包埋した。海馬を含む面 (Bregma -2.06 mm) 及び中隔を含む面 (Bregma 0.74 mm) で、8 μ m の厚さの切片を作製した。

作製した切片を 0.01 mM クエン酸緩衝液で処理し、流水水洗後に 3%過酸化水素/H₂O を室温で 10 分間静置した。流水水洗及び PBS で洗浄した後、室温でブロッッキングを行った。ブロッッキング時間は、Mbp は 60 分間、GFAP と Iba1 は 10 分間とした。PBS で洗浄し、一次抗体で 4℃一晩静置した。各々一次抗体として、Mbp は抗 MBP マウスモノクローナル抗体 (Sternberger Monoclonals, 18000 倍希釈), GFAP は抗 GFAP ウサギポリクローナル抗体 (Dako, 50 倍希釈), Iba1 は抗 Iba1 ウサギポリクローナル抗体 (Wako, 16,000 倍希釈) を用いた。Mbp のみは一次抗体反応後に PBS で洗浄し、さらに室温で 10 分間ブロッッキングした。一次抗体反応またはブロッッキング後に、PBS で洗浄し、二次抗体と反応させた。二次抗体はヒストファイン・シンプルステイン (ニチレイバイオサイエンス) によるペルオキシダーゼ標識アミノ酸ポリマー法を適用した。各々反応時間として、Mbp は室温で 10 分間、GFAP 及び Iba1 は室温で 30 分間とした。二次抗体反応後、PBS で洗浄し、DAB 溶液 (ナカライテスク) で発色させた。流水洗浄後にエタノールで脱水させ、キシレンに浸してスライドガラスに封入した。いずれの場合も、DAB で褐色に発色した部位を免疫陽性とみなした。

2-3. 定量 PCR

実験には、クプリゾン短期曝露マウスと対照マウスを各 5 例用いた。マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、海馬、線条体及び前頭皮質を摘出し RNAlater (Ambion) に入れ、4℃以下で保存した。採取した脳組織から、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA はマイクロ分光光度計 NanoDrop (Thermo Scientific) を用いて RNA 濃度を測定した。測定した RNA 濃度に基づき、RNA 800 μ g 分に ReverTra Ace (TOYOBO) 1 μ L, 酵素付属の 5 $\times$ buffer 8 μ L, 10mM dNTP (Invitrogen) 4 μ L 及び Random Primer 9 mer (TAKARA) 2 μ L を混合し、RNase free water で全量が 40 μ L となるように PCR チューブに調製した。調製した反応液を i-Cycler (BIO RAD) にセットし、30℃で 10 分、42℃で 30 分、50℃で 30 分及び 99℃で 5 分間反応させた後 4℃におく逆転写反応により、cDNA を作製した。

定量 PCR に用いたプライマー及びプローブを Table.1 に示す。Mbp, GFAP 及び Iba1 の測定には、Applied biosystems の市販品を用いた。作製した cDNA または standard 用精製 PCR アンプリコン 2 μ L を鋳型とし、そこに taqman FAST universal PCR master mix 5 μ L 及び各測定遺伝子のプローブ 0.25 μ L を混合し、RNase free water で全量が 20 μ L となるように 96well プレートに調製した。GAPDH 及び IL6 の測定には、カスタム合成したプライマーとプローブを用いた、作製した cDNA または standard 用精製 PCR アンプリコン 2 μ L を鋳型とし、そこに taqman FAST universal PCR master mix 5 μ L, 10 μ M forward primer 1.2 μ L, 10 μ M reverse primer 1.2 μ L 及び 20 μ M probe 0.2 μ L を混合し、RNase free water で全量が 20 μ L となるように 96well プレートに調製した。調製した 96well プレートを ABI PRISM7500 (Applied biosystems) にセットし、95℃で 20 秒の熱変性後に、95℃で 1 秒、60℃で 20 秒を 1 サイクルとした計 40 サイクルの増幅反応を行った。

各遺伝子の検量線を作成し、サンプル内の各遺伝子のコピー数を定量した。さらに、コピー数を GAPDH で標準化した相対比を算出した。GAPDH で標準化した相対比に対し、対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて、Student's t-test を実施して検定を行った。なお、多重性は Bonferroni の方法で調整した。有意水準は両側 5%とした。

2-4. In situ hybridization と免疫組織染色による二重染色

実験には、クプリゾン短期曝露マウスを 3 例用いた。マウスをネブタールで麻酔した後、心臓からホルムアルデヒド固定液 (GenoStaff) を用いて灌流し、脳を摘出した。摘出した脳をさらにホルムアルデヒド固定液で浸漬固定後、矢状断にて切り出し、パラフィン包埋した。厚さ 6 μ m の連続切片を作製し、interaural lateral 1.50 mm 近傍の切片を染色に用いた。

In situ hybridization に用いた IL-6 のプローブ情報を Table 2 に示す。プローブ配列を pGEM-T-Easy vector (Promega) にサブクローニングし、Digoxigenin (DIG) RNA Labeling Mix (Roche) を用いた in vitro transcription 法により Digoxigenin 標識 RNA プローブを合成した。

作製した切片を 4%パラホルムアルデヒドで固定した後、PBS で洗い、Proteinase K (8 g/ml) で 37°Cで 30 分間処理した。PBS で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで再固定した。PBS で洗浄した後、0.2N HCl 内に 10 分間置いた。PBS で洗浄した後、0.1M tri-ethanolamine-HCl (pH8.0), 0.25% acetic anhydride で 10 分間インキュベートし、アセチル化した。PBS で洗浄した後、エタノールで脱水した。合成した RNA プローブを Probe Diluent-1 (GenoStaff) で 300 ng/mL に希釈し、60°C16 時間ハイブリダイズした。ハイブリダイズ後に、HybriWash (GenoStaff) で 60°C20 分間、さらに 50% formamide/HybriWash で 60°C20 分間洗浄した。RNaseA (50 μ g/ml) で 37°C 30 分間処理し、HybriWash で 60°C20 分間 4 回洗浄し、さらに TBST (0.1% Tween20 in TBS) で洗浄した。0.5% blocking reagent (Roche) で 30 分間ブロッキング処理し、1000 倍希釈した anti-DIG AP conjugate (Roche) で室温 2 時間インキュベートした。TBST で 2 回洗浄した後、100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween20, 100 mM Tris-HCl (pH9.5)でインキュベートした。NBT/BCIP 溶液 (Sigma-Aldrich) で室温一晩インキュベートし、発色させた。

In situ hybridization の後に、続けて GFAP または Iba1 の免疫組織染色を実施した。切片を PBS で洗浄後に 0.3%過酸化水素/PBS を室温で 30 分間静置した。TBS で洗浄した後、室温で 10 分間ブロッキングを行った。TBS で洗浄後、一次抗体で 4°C一晩静置した。各々一次抗体として、GFAP は抗 GFAP ウサギポリクローナル抗体 (Dako, 0.1 μ g/mL), Iba1 は抗 Iba1 ウサギポリクローナル抗体 (Wako, 0.1 μ g/mL) を用いた。TBST で洗浄し、二次抗体として anti-Rabbit Ig Biotin (Dako)を用い、室温で 30 分間反応させた。TBST 及び TBS で洗浄後、HRP 標識ストレプトアビジン (ニチレイバイオサイエンス) を用い、室温で 5 分間反応させた。TBST 及び TBS で洗浄後、DAB 溶液 (ナカライテスク) で発色させた。流水洗浄後にエタノールで脱水させ、キシレンに浸してスライドグラスに封入した。

光学顕微鏡を用いて染色した切片を観察し、全脳領域を撮像した。撮像した全脳領域内における, in situ hybridization での IL-6 陽性細胞と、免疫組織染色での GFAP 陽性細胞または Iba1 陽性細胞で、共染色された全細胞数を計測した。

2-5. 脳内の銅含有量の測定

実験には、クプリゾン短期曝露マウスと対照マウスを各 3 例用いた。マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、脳半球を摘出し、液体窒素にて直ちに凍結させた。摘出した脳の湿重量の 3 倍量 (weight/volume) の 0.01 M HCl を加えてホモジナイズした後に遠心し、上清を測定サンプルとして採取した。

ホモジナイズした測定サンプル中の銅含有量を、メタロアッセイ低濃度銅測定 LS キット (Metalloginics) を用いて測定した。測定サンプル 100 μ L またはキット付属の銅標準液 (40 μ g/dL) 100 μ L に、キット付属の発色試薬を加えて混合した後、室温で 10 分間インキュベートした。インキュベート後に、582 nm (主波長) 及び 675 nm (副波長) の吸光度を、SpectraMax M2 (Molecular devices) にて測定した。測定した主波長の吸光度から副波長の吸光度を差分した値を OD 値として、標準液の銅濃度からサンプル中の銅含有量を算出した。算出した銅含有量に対し、対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて Student's t-test を実施して検定を行った。有意水準は両側 5%とした。

2-6. 電子顕微鏡観察

実験には、クプリゾン短期曝露マウスと対照マウスを各 3 例用いた。マウスをイソフルランで麻酔した後、心臓から 2.5%グルタルアルデヒド固定液を注入して灌流し、脳を摘出した。摘出した脳をさらに 2.5%グルタルアルデヒド固定液に浸し、4°Cで保存した。2%四酸化オスミウム溶液で二次固定し、PBS で洗浄した後、エタノール脱水した。エポキシ樹脂に置換、包埋し、脳梁領域を対象に、ウルトラミクロトーム UC7 (Leica) を用いて 100 nm の厚さの超薄切片を作製した。作製した切片を酢酸ウラン・鉛で二重染色し、電子顕微鏡用観察標本を作製した。

作製した標本を、透過型電子顕微鏡 JEM-1400 (日本電子株式会社) を用いて観察し、撮影した。撮影した全画像を Image J software に取り込み、3 μ m² の画像内の全軸索に対し、軸索の最大直径と、軸索+ミエリンの最大直径を計測し、g-ratio [(軸索の最大直径) / (軸索+ミエリンの最大直径)] を算出した。各個体あたり総計 40 - 70 個の軸索の g-ratio を算出し、平均値を計算した。個体ごとに算出した g-ratio の平均値に対し、対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて Student's t-test を実施して検定を行った。有意水準は両側 5%とした。

2-7. Black-Gold 染色

実験には、クプリゾン短期曝露マウス 4 例と対照マウス 3 例を用いた。マウスをイソフルランで麻酔した後、心臓からヘパリン含有 PBS (20 U/mL) を注入して脱血させた。10%中性緩衝ホルマリン固定液で灌流し、脳を摘出した。摘出した脳をさらに 10%中性緩衝ホルマリン固定液に浸して 4°Cで一晩浸漬固定し、翌日 25% sucrose 含有 PBS に移してさらに 4°Cで一晩置換した後、ドライアイス上で O.C.T. compound に包埋した。包埋した凍結ブロックから、20 μ m の厚さで海馬を含む連続冠状切片を作製した。

作製した連続冠状切片から、bregma -2.00 mm 近傍の切片を選び、各個体あたり 4 枚ずつ染色し

た。染色には **Black-Gold II myelin staining kit (Millipore)** を使用した。連続冠状切片をミリ Q 水に 2 分間浸して洗浄した後、キット付属の **0.3% Black-Gold II solution** に浸して 60℃で 30 分間静置した。ミリ Q 水で 2 回洗浄した後、キット付属の **1% sodium thiosulfate solution** に浸して 60℃で 3 分間静置した。ミリ Q 水で 3 回洗浄した後、キット付属の **cresyl violet solution** に浸し、室温で 3 分間静置した。ミリ Q 水で 3 回洗浄した後、エタノールに浸して脱水させた。脱水させた切片をキシレンに浸した後、スライドガラスに封入した。

染色した切片を、光学顕微鏡を用いて観察し、画像を撮影した。撮影した画像を **Image J software** に取り込み、各個体あたり 4 切片の脳梁領域の、単位面積あたりの輝度を計測した。計測値をもとに、個体ごとの平均値を算出し、対照マウスの平均値を 100%とした相対値を算出した。算出した相対比に対し、対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて **Student's t-test** を実施して検定を行った。有意水準は両側 5%とした。

2-8. メタンフェタミン誘発運動亢進試験

実験には、クプリゾン短期曝露マウスと対照マウスを各 10 例用いた。メタンフェタミン (大日本住友製薬) は生理食塩水 (大塚製薬工場) で溶解し、投与容量が **10 mL/kg** となるように用時調製した。マウスをホームケージごと実験部屋前室で 1 時間以上放置した後、**SCANET® MV-20plus** 運動解析装置内に移し、運動量を赤外線ビーム横切り回数として測定した。30 分間装置に馴化させた後、メタンフェタミンを **0.3 mg/kg** 皮下投与し、60 分間の運動量を測定した。対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて、投与前 30 分間の運動量の総和に関して **Student's t-test** を実施した。また、投与後 30 分ごとの運動量の総和に関しては、投与前 30 分間の運動量の影響を調整するために、共分散分析により比較を行った。有意水準は両側 5%とした。

2-9. フェンサイクリジン誘発運動亢進試験

実験には、クプリゾン短期曝露マウスと対照マウスを各 12 例用いた。フェンサイクリジン (田辺三菱製薬で合成) は生理食塩水 (大塚製薬工場) で溶解し、投与容量が **10 mL/kg** となるように用時調製した。マウスをホームケージごと実験部屋前室で 1 時間以上放置した後、**SCANET® MV-20plus** 運動解析装置内に移し、運動量を赤外線ビーム横切り回数として測定した。30 分間装置に馴化させた後、フェンサイクリジンを **2.5 mg/kg** 皮下投与し、60 分間の運動量を測定した。対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて、投与前 30 分間の運動量の総和に関して **Student's t-test** を実施した。また、投与後 30 分ごとの運動量の総和に関しては、投与前 30 分間の運動量の影響を調整するために、共分散分析により比較を行った。有意水準は両側 5%とした。

2-10. メタンフェタミン及びフェンサイクリジンの脳内濃度の測定

メタンフェタミン及びフェンサイクリジンは生理食塩水で溶解し、投与容量が **10mL/kg** となるように用時調製した。クプリゾン短期曝露マウス及び対照マウスにメタンフェタミン **0.3 mg/kg** もしくはフェンサイクリジン **2.5 mg/kg** を皮下投与し、30 分または 60 分後に脳を採取した。各群 3 例ずつ実施した。採取した脳に生理食塩水を加えて超音波破碎し、測定サンプルと

して 20%脳ホモジナイズ溶液を作製した。東レリサーチセンターに委託し、LC/MS/MS (Prominence UFLC [Shimadzu] and API 5000 [AB/MDS Sciex]) を用いて、投与化合物の脳内濃度を測定した。クプリゾン短期曝露マウス及び対照マウスの各測定時点での脳内濃度の平均値及び標準誤差を算出し、対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスに対し、二元配置分散分析による検定を行った。有意水準は両側 5%とした。

2-11. Y 字迷路試験

実験には、クプリゾン短期曝露マウスと対照マウスを各 10 例用いた。試験実施当日の試験開始前に、マウスをホームケージごと実験室へ運び、1 時間以上部屋環境へ馴化させた。試験は Y 字迷路試験装置規格 (22×20× 6.5 cm, 120° の角度で Y 字を形成) の内の 1 つのアームの先端に進路とは反対向きにマウスを置き、5 分間自由歩行させて各アームへの進入回数を記録した。各アームへの進入は四肢がすべてアーム内に入ることと定義した。自発交替行動の指標として以下の自発交替率 (%) を用いた。A→B→C や B→A→C のように 3 本の異なるアームに順に入った回数を α 、総アーム進入回数を β とした場合、自発交替率 (%) = $100 \times \alpha / (\beta - 2)$ と定義した。また、総アーム進入回数を運動量の指標とした。Y 字迷路試験における自発交替率及び総アーム進入回数について、各群における平均値及び標準誤差を算出した。対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスにおける、自発交替率及び総アーム進入回数に対し、Student's t-test による検定を行った。有意水準は両側 5%とした。

2-12. 新奇物体認識試験

実験には、クプリゾン短期曝露マウスと対照マウスを各 10 例用いた。測定箱は蓋付き半透明アクリル箱 (45.5×25×35cm) を用いた。試験前日に、マウスを測定箱に馴化させる目的で、物体を置かずに 5 分間の自由探索を行わせた (pretraining phase)。試験当日、まず獲得試行 (training phase) として、測定箱の同じ壁側の両隅に、大きさ、形及び色が同一の 2 つの物体を置き、この箱の中へマウスを 1 匹ずつ入れて 5 分間の探索を行わせた。獲得試行の 3 時間後に保持試行 (test phase) を行った。保持試行では、物体 (familiar object) の一方を、獲得試行で用いた物体と形状及び色が異なる新奇な物体 (novel object) に変更し、獲得試行時と同じ位置に設置して、マウスに 5 分間の探索を行わせた。なお、測定ごとに糞尿は取り除き、測定箱の底面および壁を水で拭いて清掃した。探索嗜好性 (% exploratory preference) は、 $Tb/(Ta+Tb)$ [Ta: 獲得試行時では片方の物体への、保持試行時では familiar object への探索時間, Tb: 獲得試行時ではもう一方の物体への、保持試行時では novel object への探索時間] で示される式により計算した。「探索」の定義は、物体への sniffing, biting, および鼻先や前肢による意識的な物体への接触とした。対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスにおける、獲得試行時及び保持試行時の探索嗜好性に対し、Student's t-test による検定を行った。有意水準は両側 5%とした。

2-13. プレパルス抑制 (PPI) 試験

実験には、クプリゾン短期曝露マウスと対照マウスを各 10 例用いた。実験装置には小動物用

驚愕反応測定装置 (4 ch) を用いた。マウスをホームケージごと実験部屋前室で 1 時間以上馴化させた後、実験装置内にマウスを置いた後、70 dB の background noise のみを与える 5 分間の馴化の後、以下の 5 種の trial を 1 単位としてランダム化し平均 15 秒間隔 (範囲: 12-18 秒) で各 12 回ずつ、計 60 trial 実施し 1 session として、各 trial の驚愕反応を測定した。ホルダー内に入れたマウスを実験装置内に置いた後、70 dB の background noise のみを与える 5 分間の馴化の後、以下の 5 種の trial を 1 単位としてランダム化し平均 15 秒間隔 (範囲: 12-18 秒) で各 12 回ずつ、計 60 trial 実施し、1 session として、各 trial の驚愕反応を測定した。

- ① PULSE ALONE trial: 40 msec, 120 dB の音刺激を呈示。
- ② PREPULSE trial (1): 40 msec, 120 dB の音刺激の呈示 100 msec 前に、20 msec, 80 dB の微弱な音刺激を呈示。
- ③ PREPULSE trial (2): 40 msec, 120 dB の音刺激の呈示 100 msec 前に、20 msec, 85 dB の微弱な音刺激を呈示。
- ④ PREPULSE trial (3): 40 msec, 120 dB の音刺激の呈示 100 msec 前に、20 msec, 90 dB の微弱な音刺激を呈示。
- ⑤ NOSTIM trial: Background noise のみ。

各 trial 種の初回の測定値は集計から除外し、反応が安定する 2 回目以降 11 回の測定値の平均を用いて、以下の式に従って PPI 率 (%) を算出した。

PPI 率 (%) = $100 - \{[(\text{PREPULSE trial での驚愕反応} - \text{NOSTIM trial での驚愕反応}) / (\text{PULSE ALONE trial での驚愕反応} - \text{NOSTIM trial での驚愕反応})] \times 100\}$

驚愕反応のデータは、体重で補正した数値を用いた。対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスにおける、驚愕反応の大きさ及び PPI 率に対し、Student's t-test による検定を行った。有意水準は両側 5% とした。

3. 結果

3-1. クプリゾン短期曝露による脳内の炎症作用

3-1-1. GFAP 及び Iba1 の免疫組織学的解析並びに遺伝子発現解析

脳内で炎症反応が亢進すると、炎症性グリアであるアストロサイト及びミクログリアの活性化が亢進する。そこで、私は、クプリゾン短期曝露マウスに対し、脳内の炎症反応を測定する目的で、免疫組織染色を用いてアストロサイト及びミクログリアを検出した。アストロサイトのマーカーには GFAP 抗体を、また、ミクログリアのマーカーには Iba1 抗体を用いた。GFAP 及び Iba1 の、対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスにおける代表的な免疫組織染色像を Figure 1 及び 2 に示す。クプリゾン短期曝露により、GFAP, Iba1 ともに大脳皮質、海馬及び線条体において免疫染色性の増加が認められた。GFAP は特に海馬において強い染色の増加が見られた。

クプリゾン短期曝露マウスにおいて、タンパク質レベルでの増加が確認されたので、次に遺伝子レベルにおける GFAP 及び Iba1 を定量する目的で、定量 PCR を用いて測定した。測定した GFAP 遺伝子及び Iba1 遺伝子に対する発現解析結果を Figure 3 及び 4 に示す。GFAP 遺伝子

及び Iba1 遺伝子とともに、いずれの脳部位においても、対照マウスに比べて、クプリゾン短期曝露マウスで有意な発現増加を示した。GFAP は特に海馬における発現が遺伝子レベルにおいても顕著であった。

3-1-2. IL-6 の遺伝子発現解析

炎症性グリアが活性化されると、炎症性サイトカインを放出することが知られている。また、IL-6 は統合失調症の精神症状との関連が多数報告されていることから(7-9)、次に、私は、炎症性サイトカインの一例として、IL-6 の発現に関し、定量 PCR を用いて測定した。測定した IL-6 の遺伝子発現解析結果を Figure 5 に示す。IL-6 遺伝子は海馬及び線条体において、対照マウスに比べて、クプリゾン短期曝露マウスで有意な発現増加を示した。IL-6 は特に海馬における発現が顕著であった。炎症性グリア及び IL-6 が増加していることから、クプリゾン短期曝露マウスの脳において、炎症反応が亢進していることが示唆された。

3-1-3. IL-6 と GFAP 及び Iba1 の二重染色

先の定量 PCR 結果において、GFAP と IL-6 はともに海馬での発現上昇が顕著に見られ、似た発現パターンを示したことから、私は、in situ hybridization と免疫組織染色の二重染色を実施し、IL-6 発現細胞の特定を試みた。クプリゾン短期曝露マウスにおける代表的な二重染色像を Figure 6A に示す。また、撮像した全脳領域内における GFAP/IL-6 陽性細胞数及び Iba1/IL-6 陽性細胞数の定量結果を Figure 6B に示す。IL-6 陽性細胞の約 60% が GFAP と共染色された。一方、IL-6 陽性細胞の約 3% が Iba1 と共染色された。これらの結果から、IL-6 の多くは GFAP と共発現していることが明らかとなった。クプリゾン短期曝露により、IL-6 は主にアストロサイトから放出される可能性が示唆された。

3-1-4. クプリゾン短期曝露マウスにおける脳内の銅含量測定

クプリゾン曝露により生じる、脳内での作用の指標として、私は、脳内の銅含量を測定した。脳内の銅含量は、クプリゾン長期 (3-9 ヶ月間) 曝露したマウスの脳において、有意な増加が報告されている(18)。測定した対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの、脳内の銅含量の測定結果を Figure 7 に示す。対照マウスに比べてクプリゾン短期曝露マウスの脳において、有意な銅含量の増加が認められた。

3-2. クプリゾン短期曝露によるミエリンへの作用

3-2-1. Mbp の免疫組織学的解析

多発性硬化症、また、クプリゾン長期曝露マウスにおいては、ミエリンが脱落し、脱髄を生じることが知られている。そこで、私は、クプリゾン短期曝露マウスにおける脱髄の有無を検証する目的で、ミエリンを構成するオリゴデンドロサイトのマーカーである Mbp の抗体を用いた免疫組織染色を実施した。クプリゾン短期曝露マウスの代表的な免疫組織染色像を Figure 8 に示す。クプリゾン短期曝露マウスと対照マウスの間に Mbp の免疫染色性に差異は認められな

かったことから、クプリゾン短期曝露マウスにおいては、脱髄を生じないことが示唆された。

3-2-2. 電子顕微鏡を用いたミエリンと軸索の観察

次に、クプリゾン短期曝露マウスに対し、電子顕微鏡を用いて、軸索及びミエリンを詳細に観察した。クプリゾン長期曝露マウスにおいては、軸索及びミエリンの脱落していることが既に報告されている(16)。観察した対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの軸索及びミエリンの代表的な電子顕微鏡画像をそれぞれ Figure 9A 及び 9B に示す。電子顕微鏡観察の結果、対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスにおいて、軸索及びミエリンに形態的に違いは見られず、異常は認められなかった。また、ミエリン障害の指標として、数値化した **g-ratio** のグラフを Figure 10 に示す。対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスの間で **g-ratio** においても有意な違いは認められなかった。

3-2-3. Black-Gold 染色法を用いたミエリン染色

クプリゾン短期曝露マウスにおける、さらなる脱髄の検証を目的に、**Black-Gold** 染色法を用いてミエリンを染色し、定量した。対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの脳梁領域の髄鞘の代表的な染色画像を Figure 11A 及び 11B に示す。また、髄鞘の染色強度として、染色された髄鞘の輝度の平均値を数値化したグラフを Figure 12 に示す。測定した髄鞘の染色強度からも、対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスの間に、有意な違いは認められなかった。これらの結果から、クプリゾン短期曝露マウスにおいては、脱髄を生じていないことが示唆された。

3-2-4. Mbp の遺伝子発現解析

先の Mbp の免疫組織染色の結果から、クプリゾン短期曝露マウスでは、タンパク質レベルにおいて Mbp の低下は認められなかった。そこで、私は、遺伝子レベルでの Mbp 発現を検証する目的で、定量 PCR を用いて、クプリゾン短期曝露マウスでの Mbp 遺伝子の発現を測定した。対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの海馬、線条体及び前頭皮質における Mbp 遺伝子の定量 PCR 結果を Figure 13 に示す。Mbp 遺伝子は、いずれの脳部位においても、対照マウスに比べてクプリゾン短期曝露マウスで、有意な発現減少を示した。遺伝子レベルでは Mbp の減少が見られることから、クプリゾン短期曝露マウスにおいて脱髄は生じていないが、白質に何らかの異常を生じている可能性が示唆された。

3-3. クプリゾン短期曝露による行動への影響

3-3-1. メタンフェタミン誘発運動亢進量に対する作用

上記のように、脱髄は生じないが、脳内炎症の亢進する特徴を示すクプリゾン短期曝露が、行動に与える影響を検証する目的で、私は、クプリゾン短期曝露マウスに対し、種々の行動試験を実施した。

まず、ヒトにおける急性の精神症状に対応した指標として、私は、メタンフェタミン 0.3 mg/kg 皮下投与後 60 分間の運動量を測定した。メタンフェタミンは主に神経終末からのドーパミン放

出を促進させてドーパミンシグナルを賦活させ、中枢神経を興奮させる覚せい剤として知られており、メタンフェタミン投与後の運動亢進量は、急性の精神症状の指標に用いられている。対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの運動量の推移を Figure 14A, 30 分ごとの運動量の総和を Figure 14B に示した (n=10)。対照マウスに比べ、クプリゾン短期曝露マウスは、メタンフェタミン投与前の運動量に有意な増加が認められた。また、投与前の運動量を調整した、投与後 30 分ごとの運動量の総和に関しても、クプリゾン短期曝露マウスは、有意な増加が認められた。対照マウスでは、メタンフェタミン 0.3 mg/kg 投与においては、運動量の増加は認められなかった。これらの結果から、クプリゾン短期曝露マウスは、ドーパミンシグナルを介した急性の精神症状に対し、感受性の亢進していることが示唆された。

3-3-2. フェンサイクリジン誘発運動亢進量に対する作用

加えて、急性の精神症状の指標に、フェンサイクリジン 2.5 mg/kg 皮下投与後 60 分間の運動量を測定した。フェンサイクリジンは N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体拮抗薬であり、フェンサイクリジン投与後の運動亢進量は、グルタミン酸シグナルを介した急性の精神症状の指標に用いられている。対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの運動量の推移を Figure 15A, 30 分ごとの運動量の総和を Figure 15B に示した (n=12)。対照マウスに比べ、クプリゾン短期曝露マウスは、フェンサイクリジン投与前の運動量に有意な増加が認められた。また、投与前の運動量を調整した、投与後 30 分ごとの運動量の総和に関しても、クプリゾン短期曝露マウスは、有意な増加が認められた。これらの結果から、クプリゾン短期曝露マウスは、グルタミン酸シグナルを介した急性の精神症状に対しても、感受性の亢進していることが示唆された。

3-3-3. メタンフェタミン及びフェンサイクリジンの脳内濃度

対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスでの、メタンフェタミン及びフェンサイクリジンの脳内曝露量を比較するため、メタンフェタミン 0.3 mg/kg もしくはフェンサイクリジン 2.5 mg/kg を皮下投与し、30 分後または 60 分後の各薬剤の脳内濃度を測定した。メタンフェタミン及びフェンサイクリジンの測定結果を Figure 16A 及び 16B に示す。いずれの測定時間においても、対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスにおけるメタンフェタミン及びフェンサイクリジンの脳内濃度に有意な差は認められなかった。これらの結果から、対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスの間で、メタンフェタミン及びフェンサイクリジンの脳内曝露量が変わることにより、感受性の亢進をきたしているわけではなく、クプリゾン短期曝露に対する何らかの応答異常が生じることにより、運動量を増加させることが考えられる。

3-3-4. Y 字迷路試験に対する作用

次に、クプリゾン短期曝露マウスにおける、認知機能への影響を検証する目的で、Y 字迷路試験を実施した。Y 字迷路試験は、マウスは直前に選択したルートとは異なるルートを選ぶ（自発交替行動）という特性を利用し、空間的な短期記憶の評価に利用されている。Y 字迷路試験

の模式図を Figure 17A に、対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの自発交替率を Figure 17B に、総アーム侵入回数を Figure 17C に示す。クプリゾン短期曝露マウスは対照マウスに比べ、自発交替率の有意な低下が認められたことから、クプリゾン短期曝露により、空間的な短期記憶を低下させることが示唆された。また、運動量の指標として総アーム進入回数には、対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスに有意な差は認められなかったことから、自発的な運動量に影響はないことが示唆された。

3-3-5. 新奇物体認識試験に対する作用

加えて、認知機能に対する影響を検証する目的で、新奇物体認識試験を実施した。新奇物体認識試験は、新奇性を好む探索嗜好性というマウスの特性を利用して、視覚的認知機能の評価に利用されている。新奇物体認識試験の模式図を Figure 18A に、対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの、獲得試行時及び保持試行時の探索嗜好性を Figure 18B に示す。同一の2つの物体を探索させる獲得試行時の探索嗜好性には両群間で違いは認められず、どちらの物体にも等しい嗜好性を持った。その一方で、物体の1つを新奇な物体に変えて探索させる保持試行時の探索嗜好性は、対照マウスに比べてクプリゾン短期曝露マウスにおいて、有意な低下を示した。この結果から、クプリゾン短期曝露マウスは、新奇性のある物体を認知する機能の低下することが示唆された。

3-3-6. プレパルス抑制 (PPI) 試験に対する作用

さらに、クプリゾン短期曝露マウスの情報処理能力に対する影響を検証する目的で、PPI 試験を実施した。PPI 試験は、驚愕刺激（パルス）の直前に微弱な刺激（プレパルス）が先行することにより驚愕反応が大幅に抑制される現象を測定する。これは、情報処理（聴覚フィルター機能）障害を表していると考えられており、PPI 試験は抗精神病薬のスクリーニングとして研究がなされている(19)。対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスでの驚愕反応及び PPI 率をそれぞれ Figure 19A 及び 19B に示す。対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスにおいて、微弱な刺激を与えない驚愕反応に、有意な差は認められなかった。また、条件を3種類分けて微弱な刺激を与えた後の PPI 率についても、対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスにおいて、有意な差は認められなかった。これらの結果から、クプリゾン短期曝露による障害は、聴覚を介した情報処理能力には影響を与えなかったことが示唆された。

4. 考察

4-1. クプリゾン短期曝露による脳内の炎症作用について

本研究において、私は、脱髄を生じずに、脳内で炎症反応の亢進するマウスを作製する目的で、クプリゾンマウスに短期曝露することとした。そこで、まず、作製したクプリゾン短期曝露マウスの脳内の炎症性グリア並びに IL-6 を測定した。その結果、炎症性グリア及び IL-6 ともに有意な増加が見られたことから、クプリゾン短期曝露マウスの脳内において、炎症反応の亢進していることが示唆された。

クプリゾン短期曝露マウスは、前頭皮質に比べ、特に海馬及び線条体において炎症反応が強く亢進している結果を示した。論文にて報告されているクプリゾン長期（6週間）曝露マウスにおいて、脳梁、背側海馬、外包及び線条体の背側部の一部等で脱髄が観察されているが、その一方で、線条体の腹側部、嗅覚器官、大脳全交連及び大脳脚等では、脱髄は見られていない(18)。線条体の腹側部は大きな白質線維で構成されているが、背側部は細かな白質線維で密に構成されている。また、3週齢、6週齢及び8か月齢のマウスにクプリゾンを長期（6週間）曝露すると、若い時期に曝露したマウスの方が、脳梁において、より重篤に脱髄を生じることが報告されている(21)。これらの報告から、クプリゾンによる反応の差異は、各脳部位における白質線維の構造の違いにより生じる可能性が考えられる。

炎症が誘発される原因を探るため、私は脳内でのクプリゾンの作用マーカーとして、脳内の銅含量を測定した。その結果、報告されているクプリゾン長期（3 - 9ヶ月間）曝露マウスの脳での有意な増加と同様に(18)、脱髄を伴わず炎症反応が誘発されるクプリゾン短期曝露マウスの脳においても有意な銅含量の増加が認められた。ラット心臓の初代培養細胞では銅の添加により、IL-6が発現誘導されることが報告されている(22)。このようなことから脳においても銅の蓄積が炎症反応を誘導する可能性が考えられるが、炎症反応の誘発機序に関しては更なる追加実験が必要である。

4-2. クプリゾン短期曝露によるミエリンへの作用について

クプリゾン短期曝露マウスの脳内において、炎症反応の亢進が示唆されたことから、次に、クプリゾン短期曝露マウスに対し、ミエリンへの作用を検証した。ミエリンを構成するオリゴデンドロサイトのマーカーである Mbp の免疫組織染色、電子顕微鏡を用いたミエリンの観察及び Black-Gold 染色によるミエリンの染色において、対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスの間に有意な違いは認められなかった。これらの結果から、クプリゾン短期曝露マウスの脳では、脱髄は生じていないと結論した。これまで、脱髄を生じるクプリゾン長期曝露マウスの脳内においても、炎症反応の亢進は報告されているが(15 - 17)、本研究結果から、炎症反応は脱髄の結果生じたものではないことが明らかになった。

脱髄が生じていないことはミエリンの主要タンパク質である Mbp のタンパク質発現量が変化しないことから確かめられた。しかし、定量 PCR を用いて、遺伝子レベルで Mbp を測定した結果、対照マウスに比べ、クプリゾン短期曝露マウスにおいて、Mbp 遺伝子の有意な発現低下が認められた。形態的な変化は伴わないが白質に軽度な異常の生じている統合失調症患者においても、Mbp はタンパク質レベルでは変化がないにもかかわらず、遺伝子レベルでの発現減少が報告されている(21)。このようなことから、クプリゾン短期曝露マウスにおいても白質に何らかの異常を生じている可能性が考えられる。

4-3. クプリゾン短期曝露による行動への影響について

クプリゾン短期曝露マウスではタンパク質レベルでの Mbp の減少や脱髄を起こすことなく、脳内で炎症反応の亢進していることが確認できたので、次に、私は急性の精神症状及び認知機能に

対する影響について検証した。

急性の精神症状の指標として、ドーパミンシグナルを賦活するメタンフェタミンを用いた運動亢進量を測定した結果、クプリゾン短期曝露マウスにおいて、運動亢進量に有意な増加が認められた。クプリゾン短期曝露マウスは、ドーパミンシグナルを介した急性の精神症状に対し、感受性の亢進していることが示唆された。また、グルタミン酸シグナルを介した急性の精神症状の指標として、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体拮抗薬であるフェンサイクリジンを用いた運動亢進量を測定した結果、クプリゾン短期曝露マウスにおいて運動亢進量に有意な増加が認められた。クプリゾン短期曝露マウスは、ドーパミンシグナル及びグルタミン酸シグナルいずれのシグナルを介した急性の精神症状に対しても、感受性の亢進することが示唆された。

次に、クプリゾン短期曝露マウスの認知機能に対する影響を検証する目的で、Y 字迷路試験と新奇物体認識試験を実施した。Y 字迷路試験において、クプリゾン短期曝露マウスは、対照マウスに比べ、自発交替率の有意な低下を示したことから、空間短期記憶の低下が示唆された。また、新奇物体認識試験において、クプリゾン短期曝露マウスは、対照マウスに比べ、新奇な物体に対する探索嗜好性の有意な低下が認められたことから、視覚的認知機能の低下が示唆された。これら 2 つの試験結果から、クプリゾン短期曝露マウスは、認知機能が低下していることが考えられた。

さらに、クプリゾン短期曝露マウスの情報処理能力に対する影響を検証する目的で、PPI 試験を実施した。しかしながら、クプリゾン短期曝露マウスにおいては PPI の減弱は認められなかった。この結果から、クプリゾン短期曝露による脳の障害は、PPI の情報処理能力には影響を与えなかったと考えられる。

以上の一連の結果から、クプリゾン短期曝露マウスは、急性の精神症状に対する感受性の亢進や認知機能の低下といった、ヒトで認められる一部の精神症状を反映した異常行動を示すことが明らかとなった。

5. 総括

ヒトの病態理解、特に細胞や分子レベルから病態が形成される過程を明らかにするためには、動物を用いた研究は重要と考えられる。しかしながら、ヒトと動物では脳の構造上、特に大脳皮質の構造に顕著な違いがあるため、ヒトの高次脳機能の多くは、マウスでは再現困難である。そこで、高次脳機能が侵される精神疾患に対しては、設定した病態仮説に対応する、神経病理学的所見や中間表現型などの指標を利用して適切に評価する必要がある。また、得られる情報の意義を十分に吟味して捉える必要がある。私は、動物モデルを用いて、ヒトの病態の全体像を捉えることは難しいが、ある一面を捉えることは可能と考える。

これまで、脳内炎症を基盤とした動物モデルとして、例えば polyriboinosinic-polyribocytidilic acid (poly I:C) モデルが報告されている(24)。Poly I:C モデルは、合成 2 本鎖 RNA アナログである poly I:C を妊娠早期のマウスに投与することで、ウイルス感染に近い免疫反応を生じさせるモデルである。この母体から生まれた仔マウスは成長した後、学習・記憶の障害、感覚情報処理の障害、不

安関連行動の増加などが認められ、さらに、学習・記憶との関連性が示唆される海馬でのグルタミン酸放出の異常が確認されている。これらの異常は、周産期におけるウイルス様感染により、急性の免疫炎症反応に伴って誘導される炎症性サイトカインが脳神経発達障害を引き起こし、成長後の脳機能に影響を及ぼすことが原因と考えられている。妊婦がインフルエンザに感染すると胎児が統合失調症などの精神疾患を発症するリスクが高くなることから(25)、Poly I:C モデルは、一部の統合失調症患者で見られる、胎生期でのウイルス感染による発達障害を模したモデルと考えられている。

今回私は、成体期で見られる脳内炎症を基盤とした新たな病態モデルとして、8 週齢のマウスにクプリゾンを 1 週間曝露したクプリゾン短期曝露マウスを作製し、神経化学的解析及び行動薬理的な解析を実施した。その結果、クプリゾン短期曝露マウスは脳において、炎症性グリア及び IL-6 が亢進すること、並びに、脱髄といった顕著な病変は生じないが、Mbp の遺伝子レベルでの減少が見られるという神経化学的な特徴を持つことを明らかにした。少なくとも一部の統合失調症並びに周辺症状を示す患者においても、成体期において、炎症性グリアあるいは IL-6 をはじめとする炎症性サイトカインは上昇しているが、脱髄は生じていない特徴を示す。また、本研究の行動試験結果から、クプリゾン短期曝露マウスは、急性の精神症状の亢進や認知機能の低下といった、ヒトで認められる一部の精神症状を反映した異常行動を示すことが明らかとなった。これらの結果から、クプリゾン短期曝露マウスは、ヒトの成体期で見られる脳内炎症、軽度の白質異常及び精神症状を関連付ける性質を持つ、新たな病態モデルとしての可能性が示唆された。また、本モデルマウスは脳内炎症に起因する精神疾患治療薬のスクリーニング系としても利用できると考える。

6. 今後の課題

本研究において、クプリゾン短期曝露マウスでは、オリゴデンドロサイトマーカーである Mbp の遺伝子レベルでの減少が見られたことから、何らかの軽度の白質異常を生じていることが考えられる。しかしながら、まだその実態は捉えられていない。画像技術の進展により、統合失調症患者において水分子の拡散異方性の低下といった軽度の白質異常が示されていることから、今後クプリゾン短期曝露マウスにおいても DTI 技術等を用いた解析を行うことで、白質の軽度の異常について検証することが重要と考える。

また、本モデルにおいて、炎症亢進及び白質異常から異常行動に至るメカニズムに関しては更なる研究が必要である。本研究において、IL-6 はアストロサイトから分泌される可能性が示唆された。統合失調症においても IL-6 の発現亢進が多数報告されていることから(7 - 9)、IL-6 を介したシグナル調節機構の解明は、脳内炎症亢進に至る病態理解の手掛かりとなることが考えられる。今後トランスジェニックマウスまたはアデノ随伴ウイルス等の技術を用い、IL-6 を発現制御すること、特にアストロサイト特異的な発現制御を施したマウスの、クプリゾン短期曝露における異常行動へ影響を評価することで、IL-6 及びアストロサイトの病態関与について検証することが有用と考える。

これまで抗精神病薬は主にドーパミン D₂ 受容体拮抗作用を機序とする定型抗精神病薬、また、

ドーパミン D₂ 受容体拮抗作用にセロトニン 5-HT_{2A} 受容体をはじめとする D₂ 以外の受容体への作用を併せ持つ非定型抗精神病薬が開発されてきた。これらの既存薬は幻覚や妄想などの陽性症状には一定の改善効果を示すが、陰性症状や認知機能に対する効果はまだ不十分である。そのため、統合失調症治療薬はアンメット・メディカル・ニーズが高く、既存薬とは異なる新たなメカニズムに立脚した創薬が重要と考えられる。今回私は、脳内炎症を新たな病態仮説に設定し、クプリゾン短期曝露マウスを構築した。本マウスを用いた解析を進めることは、新たなメカニズムに基づく創薬につながることを期待できる。更なるメカニズム解析とともに評価指標を拡充し、病態仮説に根差した創薬ストラテジーを取ることで、私は、アンメット・メディカル・ニーズを満たす薬剤の開発を実践したいと考える。

7. 謝辞

本論文の作成にあたり、終始適切な助言を賜り、丁寧にご指導して下さいました北里大学医学部生化学の高橋正身先生に感謝致します。

また、本研究に対し、ご指導、ご鞭撻を賜りました共同研究者であります、ジョンスホプキンス大学の澤明先生、Mari A. Kondo 先生、加野真一先生に感謝致します。

最後になりますが、本研究の機会を与えてくださった梶井靖さん、実験に快く協力いただき、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた田村誠さん、阿部倫一さんをはじめ、田辺三菱製薬の多くの研究者の方々に深くお礼を申し上げます。ありがとうございました。

8. 引用文献

1. C. Nathan, A. Ding, Nonresolving inflammation. *Cell* **140**, 871 (Mar 19, 2010).
2. R. Medzhitov, Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428 (Jul 24, 2008).
3. B. Becher, A. Prat, J. P. Antel, Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* **29**, 293 (Feb 15, 2000).
4. J. Doorduyn *et al.*, Neuroinflammation in schizophrenia-related psychosis: a PET study. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* **50**, 1801 (Nov, 2009).
5. W. C. Kreisl *et al.*, A genetic polymorphism for translocator protein 18 kDa affects both in vitro and in vivo radioligand binding in human brain to this putative biomarker of neuroinflammation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **33**, 53 (Jan, 2013).
6. Y. Watanabe, T. Someya, H. Nawa, Cytokine hypothesis of schizophrenia pathogenesis: evidence from human studies and animal models. *Psychiatry and clinical neurosciences* **64**, 217 (Jun, 2010).
7. B. J. Miller, P. Buckley, W. Seabolt, A. Mellor, B. Kirkpatrick, Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biological psychiatry* **70**, 663 (Oct 1, 2011).
8. D. L. Garver, R. L. Tamas, J. A. Holcomb, Elevated interleukin-6 in the cerebrospinal fluid of a previously delineated schizophrenia subtype. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **28**, 1515 (Aug, 2003).
9. A. Lin *et al.*, The inflammatory response system in treatment-resistant schizophrenia: increased serum interleukin-6. *Schizophrenia research* **32**, 9 (Jun 22, 1998).
10. B. J. Jellison *et al.*, Diffusion tensor imaging of cerebral white matter: a pictorial review of physics, fiber tract anatomy, and tumor imaging patterns. *AJNR. American journal of neuroradiology* **25**, 356 (Mar, 2004).
11. I. Ellison-Wright, E. Bullmore, Meta-analysis of diffusion tensor imaging studies in schizophrenia. *Schizophrenia research* **108**, 3 (Mar, 2009).
12. M. Buntinx *et al.*, Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines: I. Synergistic effects of IFN-gamma and TNF-alpha on apoptosis. *Journal of neuroscience research* **76**, 834 (Jun 15, 2004).
13. M. Buntinx *et al.*, Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines. II: Alterations in gene expression induced by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of neuroscience research* **76**, 846 (Jun 15, 2004).
14. T. Tezuka *et al.*, Cuprizone short-term exposure: astrocytic IL-6 activation and

- behavioral changes relevant to psychosis. *Neurobiology of disease* **59**, 63 (Nov, 2013).
15. P. N. Koutsoudaki *et al.*, Demyelination of the hippocampus is prominent in the cuprizone model. *Neuroscience letters* **451**, 83 (Feb 13, 2009).
 16. L. Liu *et al.*, CXCR2-positive neutrophils are essential for cuprizone-induced demyelination: relevance to multiple sclerosis. *Nature neuroscience* **13**, 319 (Mar, 2010).
 17. G. K. Matsushima, P. Morell, The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol* **11**, 107 (Jan, 2001).
 18. P. Zatta *et al.*, Copper and zinc dismetabolism in the mouse brain upon chronic cuprizone treatment. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **62**, 1502 (Jul, 2005).
 19. N. R. Swerdlow, M. Weber, Y. Qu, G. A. Light, D. L. Braff, Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. *Psychopharmacology* **199**, 331 (Aug, 2008).
 20. H. J. Yang *et al.*, Region-specific susceptibilities to cuprizone-induced lesions in the mouse forebrain: Implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Brain research* **1270**, 121 (May 13, 2009).
 21. H. Wang *et al.*, Cuprizone-induced demyelination in mice: age-related vulnerability and exploratory behavior deficit. *Neuroscience bulletin* **29**, 251 (Apr, 2013).
 22. V. Ansteinsen *et al.*, Zinc- and copper-induced interleukin-6 release in primary cell cultures from rat heart. *Cardiovascular toxicology* **9**, 86 (Jun, 2009).
 23. P. R. Matthews, S. L. Eastwood, P. J. Harrison, Reduced myelin basic protein and actin-related gene expression in visual cortex in schizophrenia. *PloS one* **7**, e38211 (2012).
 24. U. Meyer, J. Feldon, To poly(I:C) or not to poly(I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology* **62**, 1308 (Mar, 2012).
 25. P. H. Patterson, Neuroscience. Maternal effects on schizophrenia risk. *Science* **318**, 576 (Oct 26, 2007).

9. 業績目録

(I) 原 著

- ◎ 1. Tezuka T, Tamura M, Kondo M, Sakaue M, Okada K, Takemoto K, Fukunari A, Miwa K, Ohzeki H, Kano S, Yasumatsu H, Sawa A, Kajii Y : Cuprizone short-term exposure: Astrocytic IL-6 activation and behavioral changes relevant to psychosis. *Neurobiol Dis*, 59: 63-68, 2013.
- 2. Fukushima T, Tezuka T, Shimomura T, Nakano S, Kataoka H : Silencing of insulin-like growth factor-binding protein-2 in human glioblastoma cells reduces both invasiveness and expression of progression-associated gene CD24. *J Biol Chem*, 25:18634-44, 2007.
- 3. Amada N, Tezuka T, Mayeda A, Araki K, Takei N, Todokoro K, Nawa H : A novel rat orthologue and homologue for the Drosophila crooked neck gene in neural stem cells and their immediate descendants. *J Biochem*, 5:615-23, 2003.

(II) 著 書

な し.

(III) 総説・講座

- 1. 手塚智章 : 新たな病態モデルとしてのクプリゾン短期曝露マウスの解析. *日本薬理学雑誌* (in press)
- 2. 手塚智章, 田村誠, Kondo M, 阪上匡紀, 岡田欣也, 嶽本香奈, 福成篤, 安松浩, 梶井靖 : 新たな病態モデルとしてのクプリゾン短期摂取マウスの解析. *日本神経精神薬理学雑誌*, 33:65-66, 2013.

(IV) 症例・臨床治験・その他

な し.

Table.1 定量 PCR に用いたプライマー及びプローブ.

A, TaqMan gene expression assays.

Gene	ID
MBP	Mm00521980_m1
GFAP	Mm01253033_m1
Iba1	Mm00479862_g1

B, Custom designed specific primers and probes.

Gene	Sequence	
GAPDH	Forward primer	5'-CAAATTCAACGGGCACAGTCAAG-3'
	Reverse primer	5'-CCTCACCCCATTTGATGTTAGTG-3'
	Probe	FAM-CCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGAC-TAMRA
IL6	Forward primer	5'-TGTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3'
	Reverse primer	5'-GCAAGTGCATCATCGTTGTTCA-3'
	Probe	FAM-CAGAATTGCCATTGCACAACTCTTTTCTCA-MGB

Table 2. in situ hybridization に用いた IL-6 のプローブ配列.

Accession#	NM_031168.1
Sequence Position	66-461
Size	396
A	134(33.84)
T	94(23.74)
G	83(20.96)
C	85(21.46)
[G+C]%	42.42
TTGCCTTCTTGGGACTGATGCTGGTGACAACCACGGCCTTCCCTACTTCACAAGTCC GGAGAGGAGACTTCACAGAGGATACCACTCCCAACAGACCTGTCTATACCACTTCA CAAGTCGGAGGCTTAATTACACATGTTCTCTGGGAAATCGTGGAATGAGAAAAG AGTTGTGCAATGGCAATTCTGATTGTATGAACAACGATGATGCACTTGCAGAAAAC AATCTGAACTTCCAGAGATACAAAGAAATGATGGATGCTACCAAACCTGGATATA ATCAGGAAATTTGCCTATTGAAAATTTCTCTGGTCTTCTGGAGTACCATAGCTACC TGGAGTACATGAAGAACAACCTTAAAAGATAACAAGAAAGACAAAGCCAGAGTCCT TCAGA	

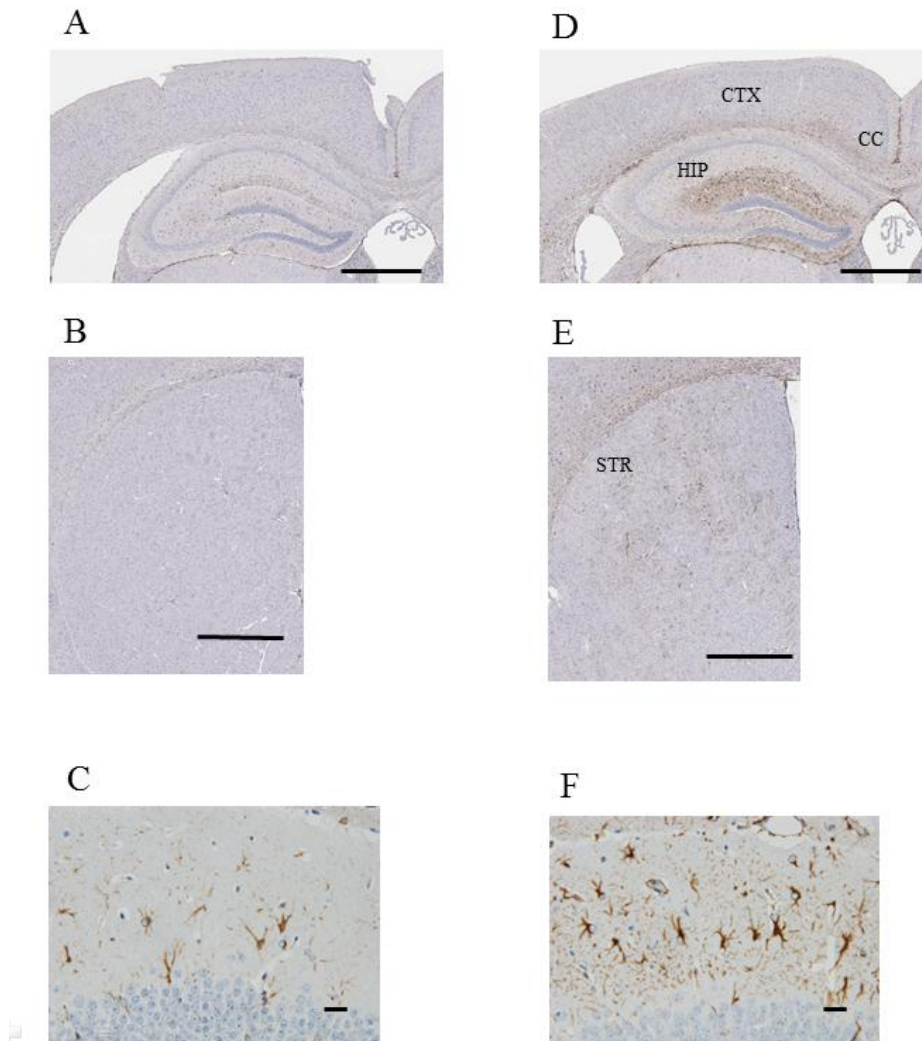


Figure 1. GFAP の免疫組織染色像

対照マウス (A, B 及び C) 及びクプリゾン短期曝露マウス (D, E 及び F) の代表的な GFAP 免疫組織染色像を示した. A 及び D は bregma -2.06 mm, B 及び E は bregma 0.74 mm の位置の染色像を示した. スケールバーは 1 mm. C 及び F は海馬の拡大像を示した. スケールバーは 20 μ m. CTX, cortex; HIP, hippocampus; CC, corpus callosum 及び STR, striatum.

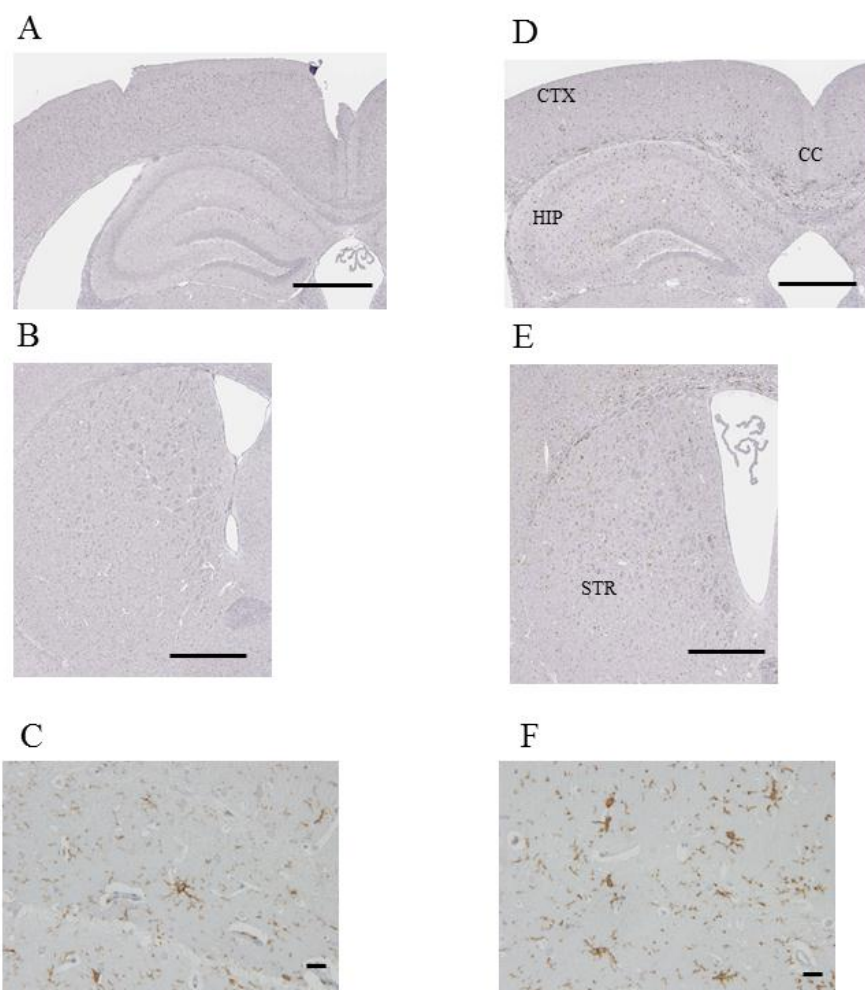


Figure 2. Iba1 の免疫組織染色像

対照マウス (A, B 及び C) 及びクプリゾン短期曝露マウス (D, E 及び F) の代表的な Iba1 免疫組織染色像を示した. A 及び D は bregma -2.06 mm, B 及び E は bregma 0.74 mm の位置の染色像を示した. スケールバーは 1 mm. C 及び F は海馬の拡大像を示した. スケールバーは 20 μ m. CTX, cortex; HIP, hippocampus; CC, corpus callosum 及び STR, striatum.

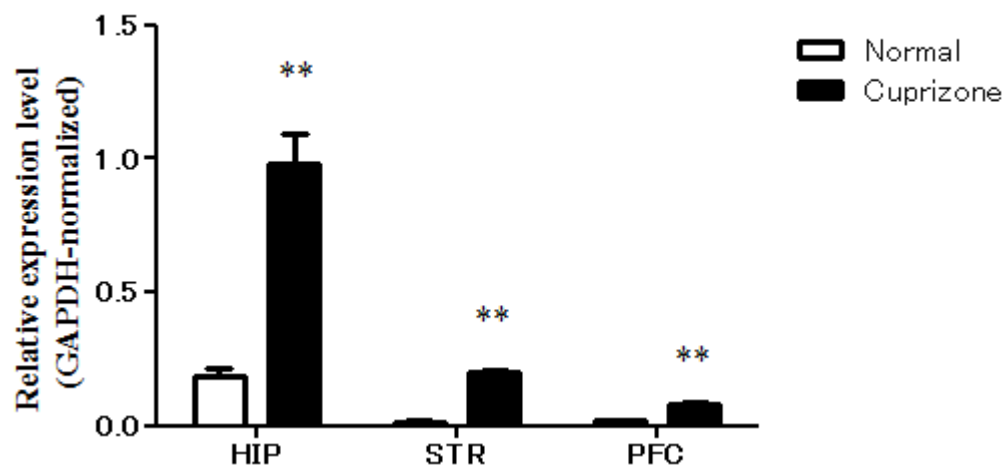


Figure 3. GFAP の定量 PCR 結果

対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの GFAP 遺伝子の発現量を示した。値は平均値±SEM で表示した (n=5)。脳部位毎に対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて Student's t-test を実施した。なお、多重性を Bonferroni の方法で調整し、** p<0.01 を表示した。HIP, hippocampus; STR, striatum; PFC, prefrontal cortex.

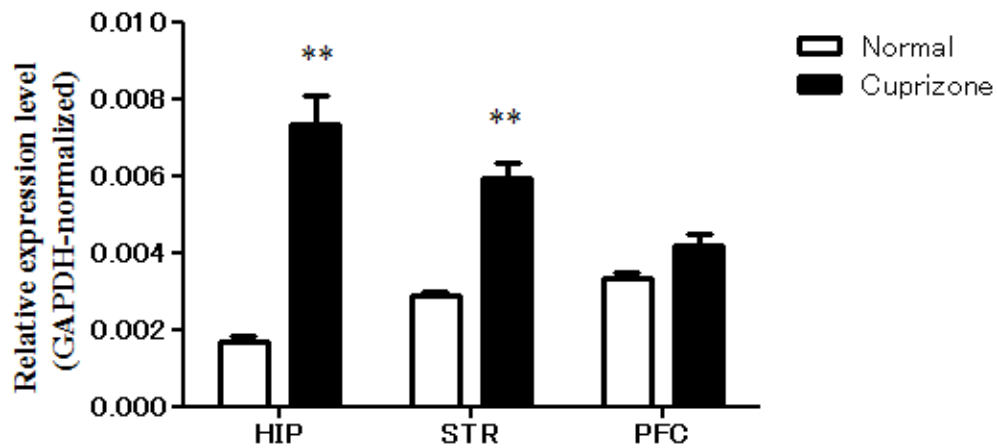


Figure 4. Iba1 の定量 PCR 結果

対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの Iba1 遺伝子の発現量を示した。値は平均値±SEM で表示した (n=5)。脳部位毎に対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて Student's t-test を実施した。なお、多重性を Bonferroni の方法で調整し、* $p < 0.05$ 及び ** $p < 0.01$ を表示した。

HIP, hippocampus; STR, striatum; PFC, prefrontal cortex.

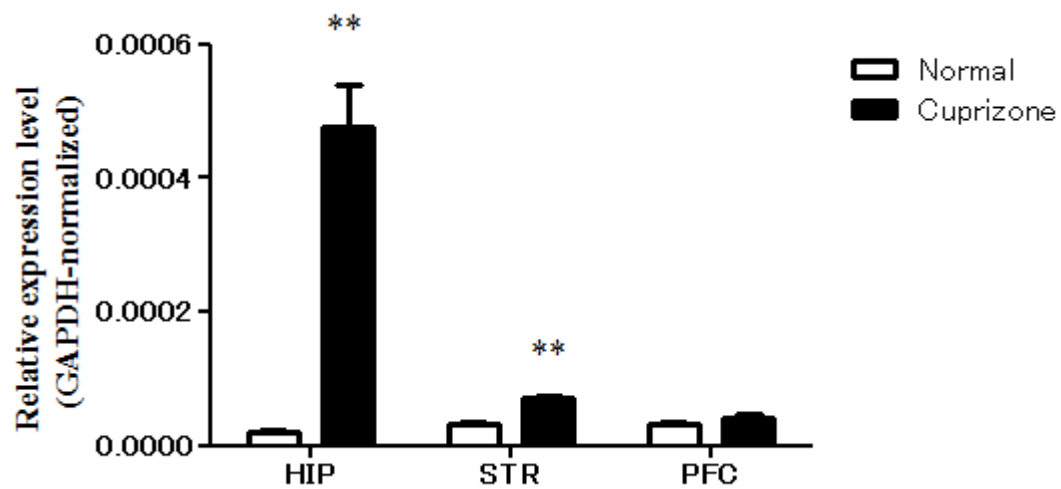
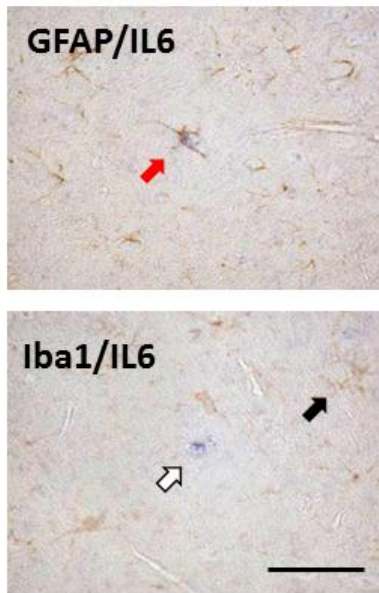


Figure 5. IL-6 の定量 PCR 結果

対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの IL-6 遺伝子の発現量を示した。値は平均値±SEM で表示した (n=5)。脳部位毎に対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて Student's t-test を実施した。なお、多重性を Bonferroni の方法で調整し、** p<0.01 を表示した。HIP, hippocampus; STR, striatum; PFC, prefrontal cortex.

A



B

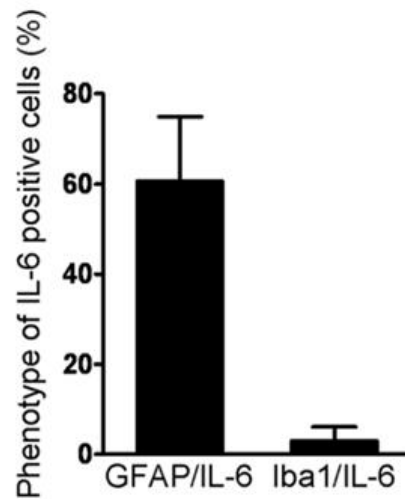


Figure 6. In situ hybridization と免疫組織染色を用いた IL-6 とグリアマーカーとの二重染色. クプリゾン短期曝露マウスの GFAP/IL-6 及び Iba1/IL-6 の染色像を拡大して示した (A). 代表的な GFAP/IL-6 陽性細胞を赤矢印, Iba1 陽性細胞を黒矢印及び IL-6 陽性細胞を白矢印で示した. スケールバーは 20 μ m. 撮像した全脳領域内における GFAP/IL-6 陽性細胞数及び Iba1/IL-6 陽性細胞数を示した (B). 値は平均値 $\pm$ SEM で表示した (n=3).

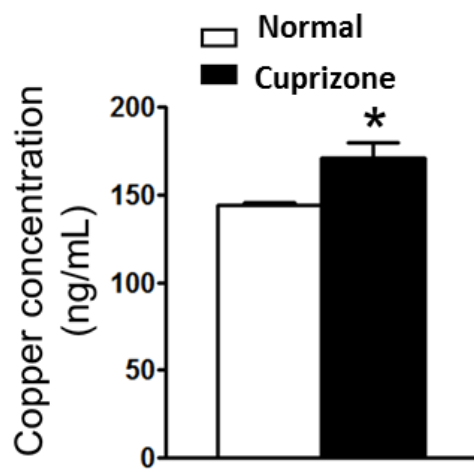


Figure 7. 脳内の銅含量の測定結果.

対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの脳内の銅含量を示した. 値は平均値 $\pm$ SEM で表示した (n=3). 対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて Student's t-test を実施し, * p<0.05 を表示した.

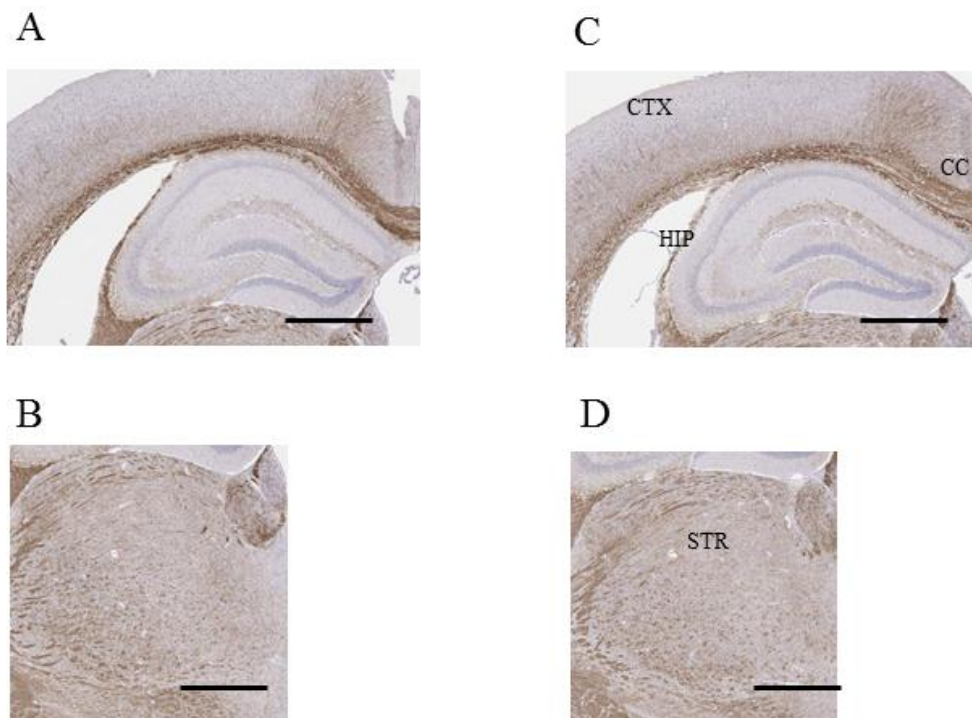
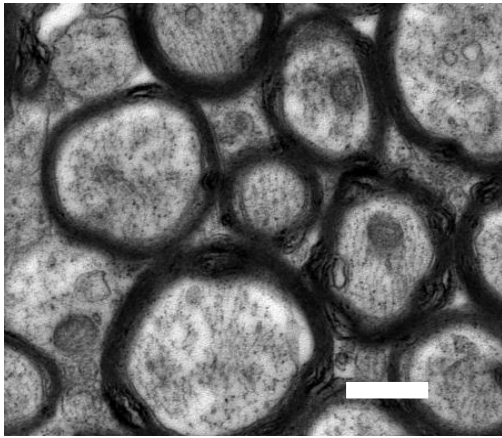


Figure 8. クプリゾン短期曝露マウスに対する Mbp の免疫組織染色像.
 対照マウス (A, B) 及びクプリゾン短期曝露マウス (C, D) の代表的な Mbp 免疫組織染色像を示した. スケールバーは 1 mm. CTX, cortex; HIP, hippocampus; CC, corpus callosum; STR, striatum.

A



B

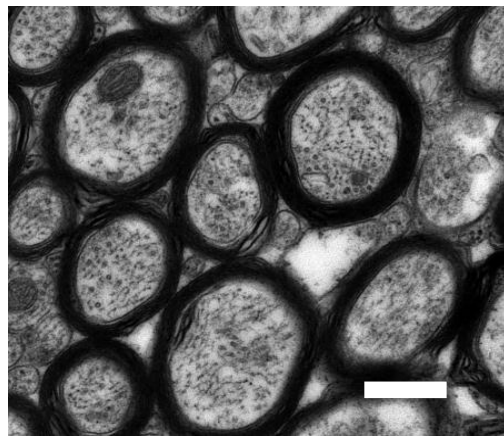


Figure 9. 電子顕微鏡での撮像写真.

対照マウス (A) 及びクプリゾン短期曝露マウス (B) の代表的な電子顕微鏡撮像写真を示した.
スケールバーは 500 nm.

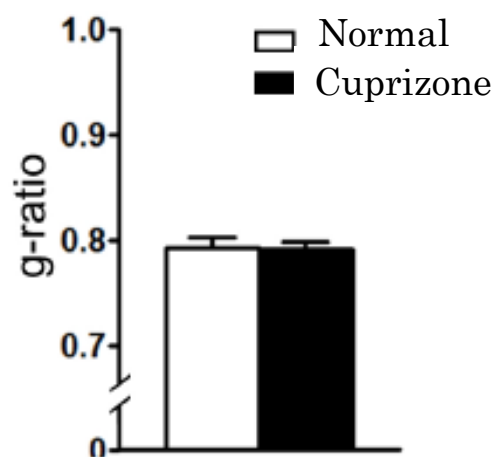


Figure 10. G-ratio による定量結果.

電子顕微鏡写真から計測した，対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの g-ratio を示した．値は平均値±SEM で表示した (n=3) ．

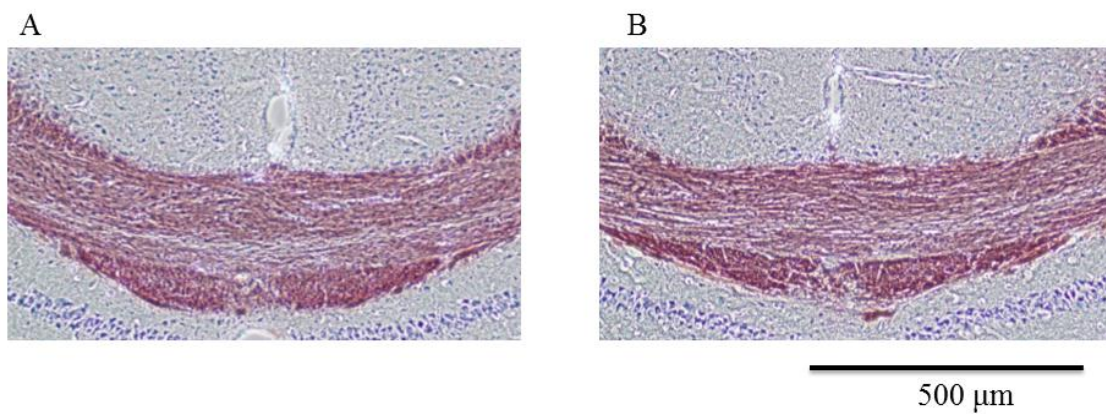


Figure 11. Black-Gold 染色像.

対照マウス (A) 及びクプリゾン短期曝露マウス (B) の脳梁領域の代表的な Black-Gold 染色像を示した. スケールバーは 500 μm .

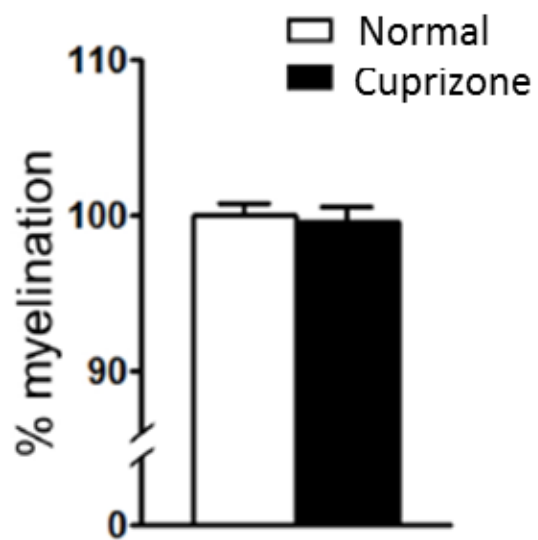


Figure 12. Black-Gold 染色の定量結果.

対照マウス (n=3) 及びクプリゾン短期曝露マウス (n=4) の Black-Gold 染色の定量結果を, 対照マウスを 100%とした相対値で示した. 値は平均値 $\pm$ SEM で表示した.

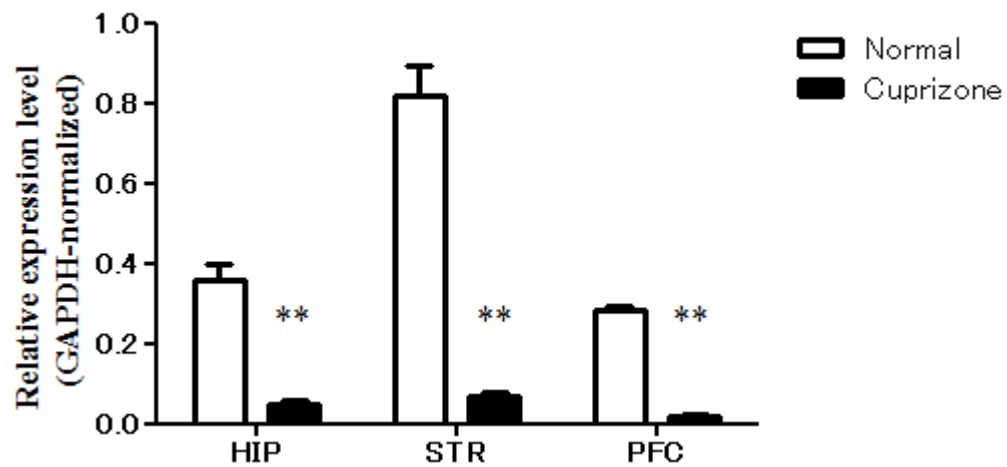


Figure 13. Mbp の定量 PCR 結果

対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの Mbp 遺伝子の発現量を示した. 値は平均値±SEM で表示した (n=5). 脳部位毎に対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて Student's t-test を実施した. なお, 多重性を Bonferroni の方法で調整し, ** p<0.01 を表示した. HIP, hippocampus; STR, striatum; PFC, prefrontal cortex.

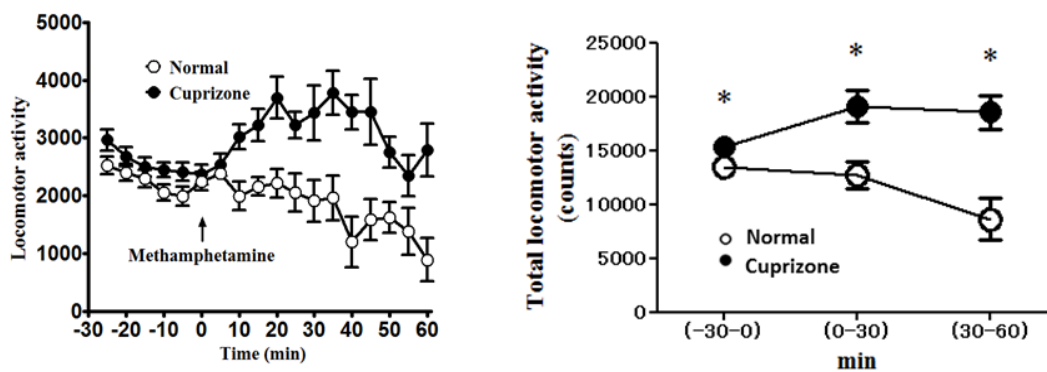


Figure 14. メタンフェタミン投与後の自発運動量の測定結果.

対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの自発運動量の推移 (A) 及び 30 分ごとの運動量の総和 (B) を示した (n=10). 対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて, 投与前 30 分間の運動量の総和に関しては Student's t-test を実施し, 投与後 30 分ごとの運動量の総和に関しては投与前 30 分間の影響を調整するために共分散分析で比較した. *p<0.05 を表示した.

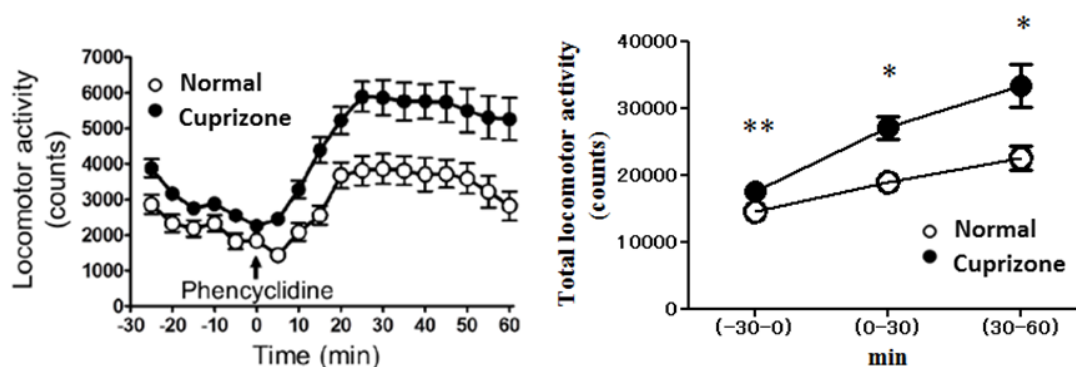


Figure 15. フェンサイクリジン投与後の自発運動量の測定結果.

対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの自発運動量の推移 (A) 及び 30 分ごとの運動量の総和 (B) を示した (n=12). 対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて、投与前 30 分間の運動量の総和に関しては Student's t-test を実施し、投与後 30 分ごとの運動量の総和に関しては投与前 30 分間の影響を調整するために共分散分析で比較した. ** $p < 0.01$ 及び * $p < 0.05$ を表示した.

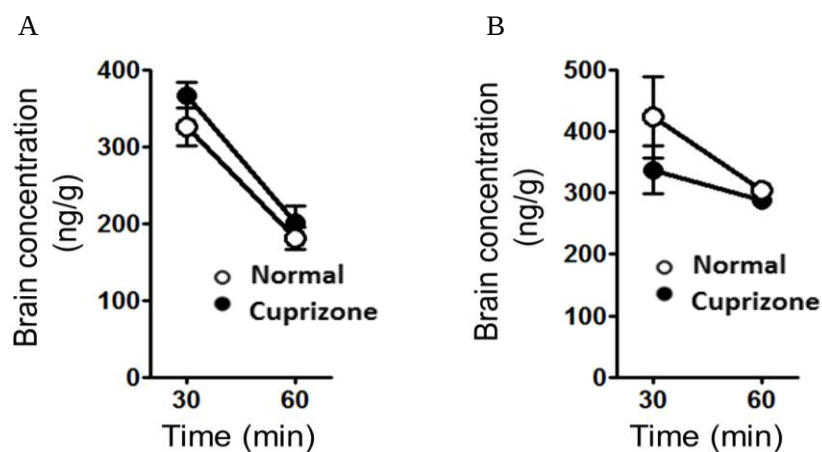


Figure 16. メタンフェタミン及びフェンサイクリジンの脳内濃度.

対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスに対し, メタンフェタミン 0.3 mg/kg (A) もしくはフェンサイクリジン 2.5 mg/kg (B) を皮下投与し, 30 分または 60 分後の脳内濃度を示す. 値は平均値±SEM で表示した (n=3) .

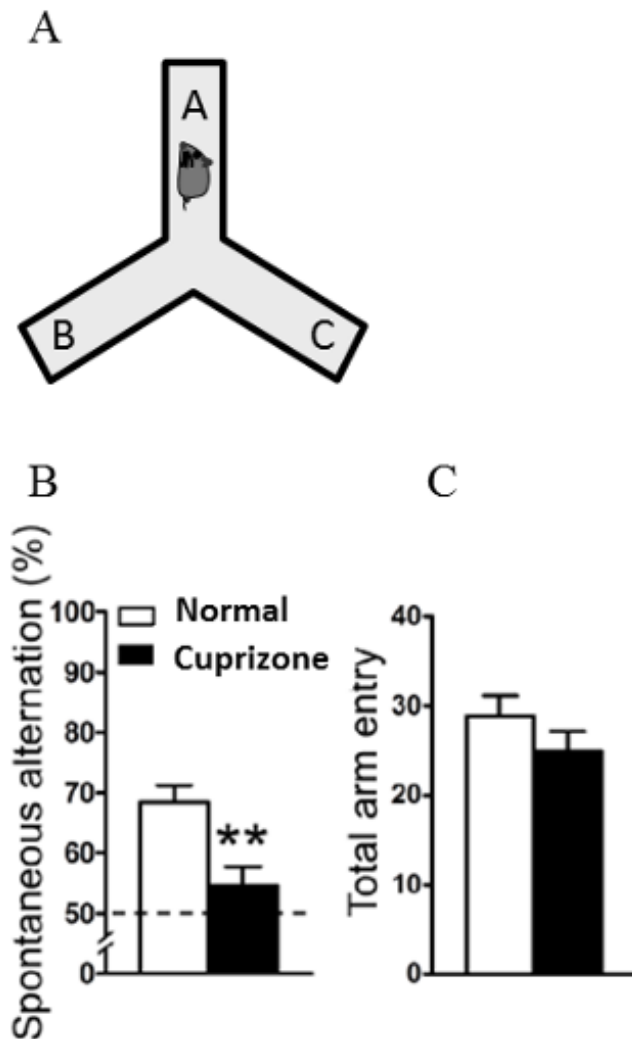


Figure 17. Y 字迷路試験の結果.

Y 字迷路試験の模式図 (A) . $A \rightarrow B \rightarrow C$ や $B \rightarrow A \rightarrow C$ のように 3 本の異なるアームに順に入った回数を α , 総アーム進入回数を β 及び自発交替率 (%) = $100 * \alpha / (\beta - 2)$ と定義した. また, 総アーム進入回数を運動量の指標とした. Y 字迷路試験における自発交替率及び総アーム進入数について, 各群における平均値及び標準誤差を算出した. 対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの Y 字迷路における自発交替率 (B) 及び総アーム侵入回数 (C) を示した (n=10) . 対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて Student's t-test を実施し, ** $p < 0.01$ を表示した.

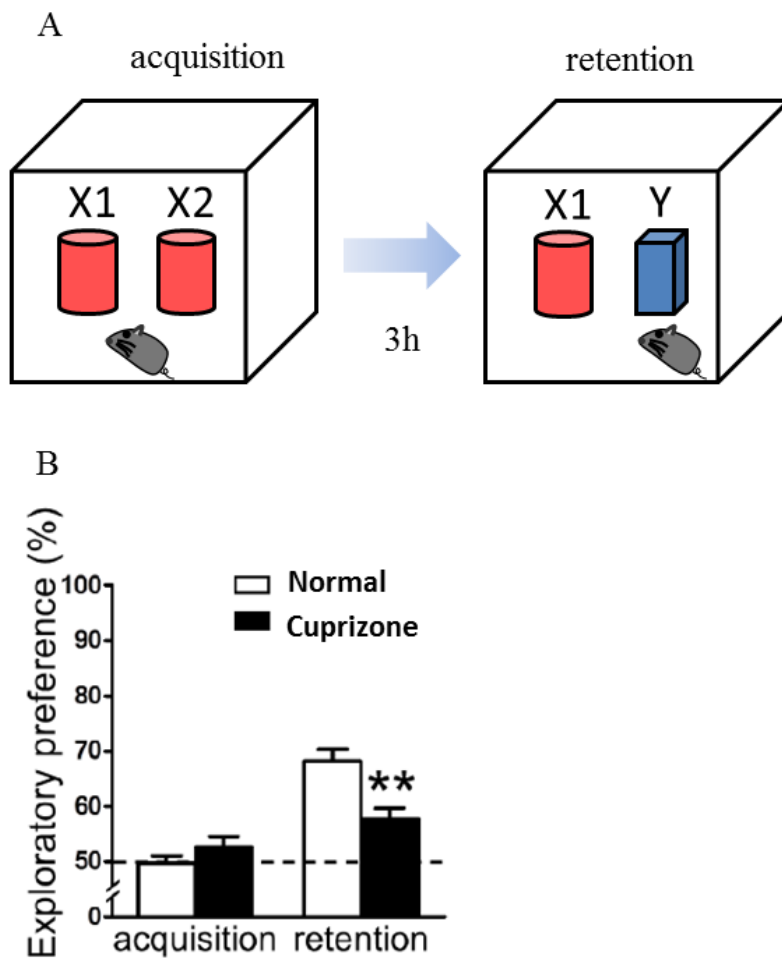


Figure 18. 新奇物体認識試験の結果.

新奇物体試験の模式図 (A) . 獲得試行 (training phase)として, 同一の2つの物体を置き, 箱の中へマウスを1匹ずつ入れて5分間の探索を行わせた. 3時間後の保持試行では, 物体 (familiar object) の一方を, 新奇な物体 (novel object) に変更し, マウスに5分間の探索を行わせた. 探索嗜好性 (% exploratory preference) は, $Tb/(Ta+Tb)$ [Ta : 獲得試行時では片方の物体への, 保持試行時では familiar object への探索時間, Tb : 獲得試行時ではもう一方の物体への, 保持試行時では novel object への探索時間] で示される式により計算した. 対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの獲得試行時及び保持試行時における探索嗜好性 (B) を示した ($n=10$) . 対照マウスとクプリゾン短期曝露マウスについて Student's t-test を実施し, ** $p<0.01$ を表示した.

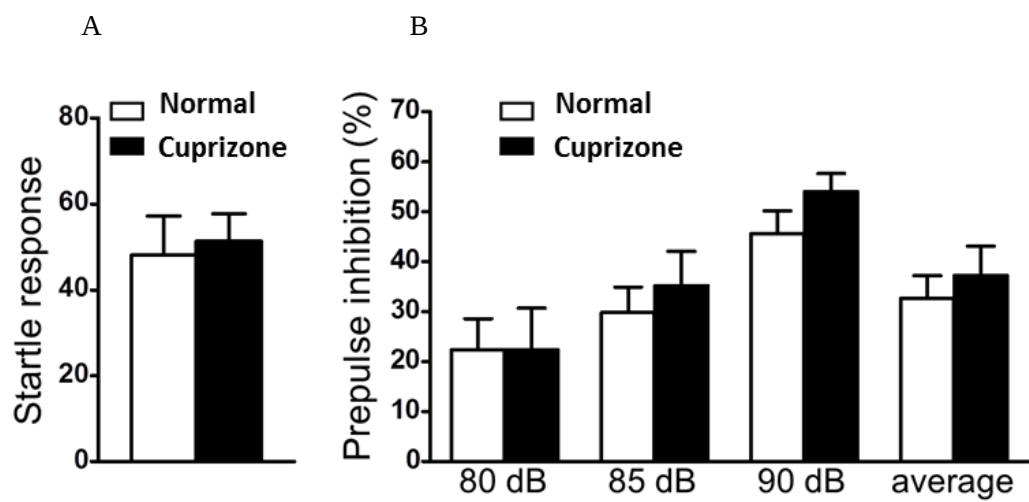


Figure 19. プレパルス抑制試験の結果.

対照マウス及びクプリゾン短期曝露マウスの驚愕反応 (A) 及び PPI 率 (B) を示した (n=10) .