

6-Hydroxydopamine 処置ラットの行動研究における マイクロダイアリシス法の応用とその動向

筑波大学大学院(博)心理学研究科 岡内 隆

筑波大学心理学系 高砂 美樹 岩崎 庸男

An application of brain microdialysis to behavioral studies on effects of 6-hydroxydopamine treatment in rats: A review

Takashi Okauchi, Miki Takasuna, and Tsuneo Iwasaki (*Institute of Psychology, University of Tsukuba, Tsukuba 305, Japan*)

6-Hydroxydopamine (6-OHDA) is a neurotoxin which produces selective and profound depletion of brain dopamine following desipramine pretreatment. 6-OHDA has been a useful tool for investigating the role of brain dopamine. Either neonatal or adult rats treated with 6-OHDA display various behavioral changes, including motor and learning deficits. Recently, the *in vivo* microdialysis method has been developed to measure real-time synaptic responses of neurotransmitters in freely moving rats. The combination of 6-OHDA lesioning technique with brain microdialysis method should provide us fruitful informations about behavioral functions of brain dopamine.

Key words: 6-hydroxydopamine, microdialysis, dopamine, behavioral study, rats, review.

行動変化を脳内の神経伝達物質の変化と対応させようという試みは、ここ20年間の間に様々な形をとっておこなわれてきた。本稿では、神経伝達物質のうち、報酬や情動に関与していると考えられる脳内ドパミン系の機能的役割を追究するために用いられる2つの手法、すなわち6-ハイドロキシドパミン(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)損傷法とマイクロダイアリシス法の成果について論じる。

1. 6-OHDA を用いた行動研究の流れ

行動を司る脳内の基盤を研究するにあたって、大きく2つの方法が挙げられる。すなわち、刺激法と損傷法である。この2つの方法はさらに電気生理学的手法と薬理学的的手法とに分けられる。脳は解剖学的構造と生化学的構造を有しており、このうち解剖学的構造の解明には主として電気生理学的手法が、生化学的構造の解明には薬理学的手法が用いられる。刺激法・損傷法とも、生体に加えられた人為的な操作の後に観察された反応の変化を、当該の操作

に帰因させることを基本とする。したがって、その操作はより局所的あるいは選択的であることが望ましい。本稿で扱う6-OHDAには、そのような選択的な生化学的損傷を可能にする薬理作用がある。

1.1 6-OHDA 損傷法の概略

6-OHDA の作用が最初に報告されたのは1963年のことであるが、その作用がカテコールアミン作動性ニューロンに対して非常に選択的なものであることや、その効果の持続が当時知られていたどんな薬物よりも長かったことなどが注目されて、それからの10年間には膨大な数の研究が行われるようになった(この間の6-OHDA 研究についてはKostrzewa & Jacobowitz, 1974の総説を参照のこと)。

6-OHDA は神経を破壊する神経毒(neurotoxin)の作用をもっている。その作用機序をまとめると次の通りである。まず、6-OHDA はその化学的構造の類似性から、ノルエピネフリン(norepinephrine, NE)作動性およびドパミン(dopamine, DA)作動性

ニューロン内に容易に取り込まれる。そこで、偽伝達物質と同じ作用によって神経終末のシナプス小胞内に貯蔵された伝達物質を放出させる。6-OHDA自身は放出されずに神経終末に蓄積して、ある濃度以上に6-OHDAが蓄積すると、再取り込み機構の阻害や細胞膜の破壊、さらには逆行性神経破壊によって軸索から細胞体に至るニューロン全体の損傷が生じる。最近の研究から、6-OHDAのこうした損傷には少なくとも2通りの作用機序があることが示唆されている(Decker et al., 1993)。1つは6-OHDAが自然に酸化した際に生じる過酸化水素によって生じる破壊であり、この型の破壊は細胞外からの作用によって起こる。もう1つは6-OHDAの濃度に依存した再取り込み機構の非可逆的不活性化である。いずれにせよ、6-OHDAの損傷効果は中枢神経系においては持続的であり、その結果、半永久的なDAやNEの涸渇が生じるのである。

6-OHDAを用いた損傷法を実施するにあたっては、いくつかの条件を考慮に入れる必要がある。第1に、6-OHDAは血液脳関門を通らない。したがって、中枢のDA神経系に影響を与えるためには、脳室内または大槽内投与によって直接脳内に6-OHDAを入れることが必要である。第2に、6-OHDAはすぐに酸化する一方、低い温度では作用しない。そこで、溶媒に溶かすのを使用直前に限り、酸化防止剤のL-アスコルビン酸を溶媒に加えることが多い。第3に、6-OHDAはDA作動性ニューロンよりもNE作動性ニューロンに優先的に作用するので、DAの選択的涸渇を行う際にはデシプラミン(desipramine)などの三環系抗うつ薬(NEの取り込み阻害作用をもち、6-OHDAがNE作動性ニューロンに取り込まれるのを防ぐ)を前処置しておく必要がある。

さらに近年の研究では、6-OHDAを処置する時期も異なる作用をもたらす大きな要因であることが明らかになってきた。3か月齢の成体ラットの脳内DA含有量を100%とすると、生後1週間内は10%以下の値を保つ。DAレベルは生後2週間から3週間の間に4倍ほどに急増し、そのあとは2か月齢で成体レベルに達するまで緩やかに上昇する(Breese & Traylor, 1972)。したがって、生後1週間以内の新生仔期に6-OHDAを処置すると、少ない用量で確実に脳内DAを涸渇させることができる。そして、このようにして新生仔期に6-OHDAを処置した場合と、成体期に6-OHDAを投与した場合では、DAの涸渇が同程度であっても、異なる行動が出現することがわかってきた。

このように、選択的な作用をもつ6-OHDAの発見

は、脳内DA系の機能を解明するうえで有意義なツールを提供してきた。次節では、6-OHDA損傷法を用いた行動研究を概観する。

1.2 6-OHDA処置ラットの行動

数多くの研究から、脳内DA系にはさまざまな機能的役割があることが示唆されている(Mason, 1984)。ここでは6-OHDA損傷法を用いた行動研究を6つの観点からまとめてみた。

1) 運動行動

成体ラットに6-OHDAを脳室内に急性投与すると、自発移動活動が減少し(Evetts et al., 1970)、感覚運動テストで障害がみられる(Marshall et al., 1976)。特に、運動開始までの時間が増加するアキネジア(akinesia)と四肢が硬直して姿勢を元に戻すのが困難になるカタレプシー(catalepsy)の出現は成体期6-OHDA投与ラットの特徴であり、パーキンソン病の動物モデルといわれる所以である。

6-OHDAを微量投与して脳の一部を損傷したあとで中枢興奮薬のアμφエタミン(d-amphetamine)を投与することによって、アμφエタミンがもたらす移動行動や常同行動の賦活においてどこの部位が中心的役割を果たすのかを調べることができる。Kellyら(1975)は尾状核または側坐核を6-OHDAで損傷したラットにアμφエタミンを投与したところ、尾状核損傷群では高用量のアμφエタミンによって惹起される常同行動が減少すること、そして側坐核損傷群では常同行動は変化しないが、移動行動が減少することを報告した。同様の報告は数多くあり、現在ではアμφエタミンによって惹起される常同行動は尾状核で、移動行動は側坐核および嗅結節でコントロールされていると考えられている。

6-OHDAを新生仔期に処置したラットでは上記のような運動障害が認められない点は興味深い。新生仔期に脳内DAが涸渇したラットはむしろ過活動を示し、環境に対して慣れを示しにくい(Shaywitz et al., 1976)。過活動の出現に関しては必ずしも研究者間で一致した結果を得ているわけではないが(詳説は高砂・岩崎, 1987参照のこと)、現在、新生仔期6-OHDA処置ラットは子供にみられる注意欠陥障害症候群(多動症)の動物モデルの一つとして考えられている。新生仔期処置と成体期処置で対照的な結果が得られたという報告はまだある。抗精神病薬のハロペリドール(haloperidol)を投与すると、6-OHDAを処置した成体ラットでは用量依存的にアキネジアが生じるのに対して、新生仔期6-OHDA処置ラットではそのような運動障害は生じない(Bruno et al., 1985; Duncan et al., 1987)。またパー

キンソン病の治療に用いられるL-DOPA (DAの前駆物質)を投与すると、新生仔期6-OHDA処置ラットでは激しい自傷行動(self-mutilating behavior)が生じるが、成体に6-OHDAを処置した場合はこのような行動はまったく見られない(Breese et al., 1990)。このような同一薬物に対する対照的な効果に関しては、次章で述べるマイクロダイアリス法のように、直接的に脳内の神経伝達物質の変化を調べる方法で再検討することが望まれる。

2) 回転行動

回転行動(circling behavior)は旋回行動とも呼ばれ、黒質線条体系の破壊によって典型的に起こる異常行動である。UngerstedtとArbuthnott(1970)は6-OHDAを黒質線条体に一側性に投与し、そのあとでアンフェタミンを投与すると損傷側へと向かうような回転が生じることを報告した。これは非損傷側ではアンフェタミンによってDAの放出が高まるのに対して、損傷側ではそのような放出の亢進が起こらず、左右の運動出力に不均衡が生じるためであると考えられている。どちらの方向に回転するのかは薬物によって異なり、薬物の作用点を判別するのに便利なツールとして一側性の6-OHDA処置が用いられることも多い。新生仔期に6-OHDA処置を行ったラットでも成体期処置群と同様の回転行動が生じることが報告されている(Abrous et al., 1990, 1992)。

3) 脳内自己刺激行動

ラットの脳に微小電極を刺入して自己刺激行動が生じる部位をマッピングすると、DA系の部位との間に高い相関があることが知られている。70年代初期の6-OHDA研究では、大量の6-OHDAを投与したラットで自己刺激行動がみられなくなるという報告が多かった。しかしながら、この方法では報酬効果と運動抑制効果とを区別することはできない。そこで、Christieら(1973)は黒質内に6-OHDAを一側性に微量投与することによって、左右にある黒質線条体DA神経系の一方だけを損傷し、左右どちらかの視床下部に与えた刺激を報酬とした自己刺激行動が生じるかどうかを検討した。その結果、刺激が非損傷側に与えられたときにのみ自己刺激行動が認められ、自己刺激行動の基盤となる脳内報酬系にDA系が関与していることが確かめられた。

新生仔期に6-OHDAを処置したラットでは自己刺激行動に関する研究はごくわずかであり、いずれも自己刺激行動における障害は認められなかったと報告している(Stellar et al., 1988; Takeichi et al., 1986)。

4) 学習行動

脳内自己刺激行動にDAが関与しているのであ

れば、内因性の報酬系を要する学習のような行動もDAを必要とすると考えられる。したがって、DA系の活動を阻害することで学習行動に障害がみられるはずであるという仮定のもとに、6-OHDAを用いた多くの実験が70年代におこなわれた。

6-OHDAを処置した成体ラットにおける学習行動の評価に関して常に問題となる点は、6-OHDA損傷によって運動障害が起こるために、学習や記憶への影響と遂行への影響を分離しなければならないことである。例えばCooperら(1973)は6-OHDAを脳室内投与してDAを渇かせたラットでは能動的回避課題の障害がみられ、受動的回避課題では影響がなかったと報告しているが、これは学習それ自体というよりも遂行への影響によると考えられる。これに対して、RanjeとUngerstedt(1977)は運動の動機づけを高める水中T迷路を用い、位置弁別や明暗弁別の学習が6-OHDA処置によって阻害されることを見いだした。さらに、既に課題を習得したラットに同様の6-OHDA処置を行うと成績があまり下がらないことから、6-OHDA処置は学習成立過程を妨げることが示唆された。しかしながら、多くの研究から刺激間の連合過程は6-OHDA処置によって阻害されず、このような連合においてはDA系があまり関与しないことが示唆されている(Beninger, 1983)。

新生仔期6-OHDA処置によっても学習障害が生じる。前節で述べたように新生仔期投与では運動障害とは正反対の過活動が生じることから、成体期処置の場合とは異なり、嫌悪性学習課題における逃避反応の出現や迷路学習における反応時間には新生仔期6-OHDA処置の影響はほとんどないものと考えられる。しかしながら、新生仔期6-OHDA処置ラットでは能動的回避学習において特異的に習得障害がみられる(Shaywitz et al., 1976; Smith et al., 1973; 高砂・岩崎, 1987)。一方、放射状迷路学習など報酬性学習課題では新生仔期6-OHDA処置は阻害効果をもたないと考えられる(Pearson et al., 1984; 岩崎・高砂, 1986)。

5) 注意

環境の認知に関するDA系の役割に関しては、注意と誘因動機づけの2つの観点から研究がおこなわれてきたが、6-OHDAを用いた研究は前者と関連したものが多い。成体ラットの線条体に6-OHDAを一側性に投与すると、投与側と反対側の身体に加えられた触刺激に対する定位反応が起こらずに、感覚無視(sensory neglect)が生じる(Marshall et al., 1976; Weihmuller & Bruno, 1989)。このような感覚無視は、新生仔期6-OHDA処置ラットではみられない(Weihmuller & Bruno, 1989)。しかし、T迷路を用

いた弁別学習で段階的に手掛かりとなる刺激の弁別を難しくすると、6-OHDA投与群は弁別の難易度が高い課題で成績が悪くなることが報告されており、注意の障害の一種と解釈することができる(Oke & Adams, 1978)。

6) 摂食・摂水

6-OHDAを成体ラットの線条体に投与すると、拒食(aphagia)と拒飲(adipsia)が生じ、日毎に体重が減少していく(Ungerstedt, 1971)。これは外側視床下部の摂食中枢の損傷によるものと考えられる。そのため、一般に成体ラットに6-OHDAを投与したあとでは人工的に栄養を与えるようにするが多い。新生仔期6-OHDA処置ラットではこのような急性の効果は観察されないが、摂食・摂水量は統制群ラットと比較して少なく、体重も小さい。ただしこの摂食・摂水量を体重あたりに換算すると差はなくなる(Bruno et al., 1984; Smith et al., 1973)。

以上、6-OHDA処置に伴う行動変化をまとめたが、行動上の変化が脳内DA作動性ニューロンのどのような変化と対応するのかを検討するためには、さらに技術的工夫が必要である。本稿の後半では近年、飛躍的に用いられるようになったマイクロダイアリス法を取り上げ、6-OHDA処置ラットの行動研究にどのように活用されているのかについて概説する。

2 マイクロダイアリス法を用いた6-OHDA処置ラットの行動研究

2.1 マイクロダイアリス法の発展

特定の脳部位に存在するさまざまな物質を同定したり定量したりする技術は、行動と脳内のメカニズムの対応を検討するうえで必要不可欠なものといえる。しかしながら、神経終末の変化を特定するために従来用いられてきた方法は、脳組織のホモジネート内の神経伝達物質を定量するというものであり、この方法は行動との随伴性が必ずしも保証されないという欠点がある。すなわち、ある行動が生じた際に即座にその動物の脳を取り出したところで、断頭の手続きなどによって脳内に変化が生じていないとはかぎらない。なによりも、この方法で認められた生化学的変化が意味するものは、組織内の伝達物質含有量の変化であって、神経伝達の変化、すなわちシナプス前部からの神経伝達物質の放出の変化を反映しているわけではない。さらに、ある特定の伝達物質の変化を継続的に測定したい場合には、個体間の比較をおこなわねばならず、被験体も数多く要することになる。

脳内物質と行動との非対応という欠点を克服する

ために、これまでに *in vivo* voltammetry法、push-pull法、cortical cup法など、脳内物質を同定する種々の方法が開発されてきた。本稿で論じるマイクロダイアリス法は1966年に初めて紹介され、1970年代後半から発展を遂げたものである。近年、それまで大きくて不便であった脳内カニューレを小型化したマイクロダイアリス用プローブの開発によって、さらに飛躍的に研究が進んでいる。

2.2 マイクロダイアリス法の原理

マイクロダイアリス(microdialysis)法は微量透析法あるいは脳透析法とも呼ばれる。ダイアリスという名称の通り、その原理は細い透析チューブを特定の脳領域に植え込んで細胞外液と灌流液とを半透膜で隔てることによって、細胞間隙に存在する種々の化学物質、特に神経伝達物質とその代謝産物を透析液中に回収することにある。マイクロダイアリス法の利点は、1)灌流液と組織とが直接触れないので組織の損傷が少なく、比較的長時間にわたって試料を収集することができること、2)透析膜が一種のフィルターとなって比較的汚れの少ないまま試料を得られること、3)回収液の中からタンパク質を除去したり、酵素による分解を考慮したりする必要がないこと、4)自由に動き回っている動物を使って神経伝達物質の放出が測定できること、などにまとめられる(Benveniste, 1989; 中原ら, 1991)。

マイクロダイアリス法によってある特定脳領域における神経伝達物質の細胞外濃度を同定することができるが、試料を細胞間隙から直接回収するわけではないため、透析液中の物質濃度は細胞外液の実際の濃度を部分的に反映しているにすぎない。そこで細胞外液中の真の濃度を推測するためには、プローブを *in vivo* で使用する前に *in vitro* のキャリブレーションをおこなって回収率を算出しておく必要がある。その際、回収率に影響を与える要因として、1)灌流液の流速、2)灌流開始後の時間、3)拡散係数、4)回収物質の濃度、5)透析膜の材料と回収物質の相互作用、6)温度、7)灌流液の組成とドレナージなどが挙げられる(Benveniste, 1989)。

さらに考慮に入れなくてはならないのは、透析液に回収された物質がすべて神経伝達に関連しているとはかぎらないということである。その物質が神経伝達に関係するというための規準として、1)ナトリウムチャンネルを阻害するテトロドトキシン(tetrodotoxin)の添加によって遊離量が減少すること、2)灌流液のカルシウムイオン濃度を低下させると遊離量が減少すること、3)灌流液のカリウムイオン濃度を上昇させると遊離量が増加すること、4)特

定神経路の電気刺激により遊離量が増加すること、5)適切な薬理学的操作に対する反応を示すことなどが挙げられている(中原ら, 1991)。

このような原理のもとに、マイクロダイアリス法の行動研究への応用がすでに始まっている。次節では、それらの研究の動向を探ってみる。

2.3 マイクロダイアリス法を用いたラットの行動研究

2.3.1 種々の行動における脳内 DA の動態

生体の様々な情報処理にかかわる脳内神経伝達物質の量はナノグラム以下という非常に微量なものである。このため、刺激性の強い操作を加えて神経伝達を賦活するような処置を施さないことには、生体の行動表出に伴う伝達物質の変化を検出することは現在の技術ではまだ困難な部分が多い。特に、ある伝達物質の活性がさらに減少することが予想されるような事態でのマイクロダイアリス法の使用には、より一層の工夫が必要である。したがって、現在のマイクロダイアリス法を用いた行動研究は、強い刺激により生起するものや薬理学的操作を伴うものが支配的である。以下にその概要を述べる。

1) 中枢興奮薬の行動賦活作用

KuczenskiとSegal(1989)はアンフェタミンの皮下投与に対する移動行動および常同行動の変化と、それに伴う線条体のDA、セロトニン(serotonin, 5-HT)、そしてそれらの代謝産物であるジハイドロキシフェニル酢酸(3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)、ホモヴァニリン酸(homovanillic acid, HVA)、5-ハイドロキシインドール酢酸(5-hydroxyindole acetic acid, 5-HIAA)の動態を、自由運動時のラットにおいてマイクロダイアリス法を用いて調べた。アンフェタミン投与後、DAは用量依存的に急速に増加したが、逆にDOPACとHVAは減少するという対照的な反応パターンを示した。このことから、DAの代謝産物の減少が、アンフェタミンによって増強されたDA放出とは機能的に区別されるものであることが分かった。さらに2mg/kg以上の用量で5-HTが増加したが、DAとは異なり、その増加は20分から40分までしか持続しなかった。同じ個体内におけるDAと5-HTを比較すると、ベースラインとアンフェタミン投与後の濃度との間には有意な相関があったことから、線条体におけるDA系と5-HT系との間にはなんらかの機能的な相互依存的関係があることが示唆された。アンフェタミンの用量とそれに対する反応を比較すると、アンフェタミン由来の常同行動の増加とDA放出の変化の間には有意な相関があった。しかしながら、伝達物質

の反応の時間的变化と個々の常同行動の生起頻度が必ずしも対応していないことから、常同行動の発生が単純に線条体のDA放出と関連しているとはいえなかった。また、摂食・摂水行動は5mg/kgのアンフェタミンによる5-HTの放出増加と有意な相関を持ち、アンフェタミンによる行動反応はDAと5-HTの相互作用に影響を受けている可能性があることが示唆された。

SteinpreisとSalamone(1993)は、アンフェタミン同様にその濫用により精神病様症状(陰性症状を含む)を発現するフェンサイクリジン(phencyclidine)がラットの行動および側坐核DA系に及ぼす効果を調べている。4mg/kgのフェンサイクリジンを投与すると、ラットの移動活動量が有意に増加すると同時に側坐核DAの放出も増大し、両者の間には有意な相関が認められた。

2) 学習行動

Nakaharaら(1992)は内側前脳束を自己刺激中のラットの内側前頭皮質、側坐核、線条体それぞれのDA系の変化をマイクロダイアリス法によって測定した。自己刺激の結果、内側前頭皮質と側坐核におけるDAおよびDOPAC、HVAが増加した。この増加は刺激半球側に関係なく両側性に観察されたが、線条体における変化は他の部位よりも少なかった。したがって、内側前脳束の自己刺激による脳内DA系の賦活には部位差が存在すること、中脳皮質辺縁系が優先的にかつ両側性に終末におけるDAの放出および細胞内代謝が増進するという知見が得られた。

McCulloughら(1993)はラットのレバー押し回避課題における側坐核DAの役割を調べるために2つの実験を行った。この課題では0.5mAの電気ショックが30秒ごとに5秒間呈示されるが、ラットはレバーを押すことによりショックを30秒間遅延することができた。第1実験であらかじめ回避学習を訓練しておいたラットは、45分間のテストセッション中、回避課題の遂行に伴って細胞外DAおよびその代謝産物レベルが未訓練ラットよりも有意に増加した。また、細胞外DAレベルと回避反応数との間には有意な正の相関があった。第2実験では、訓練後に6-OHDAを投与して側坐核を損傷したところ、ショックを回避または逃避するためのレバー押し反応が減少し、オペラント回避反応における側坐核DAの役割の重要性が示唆された。

3) ストレス下の脳内伝達物質の動態

Imperatoら(1989)は90分間の拘束ストレス下における尾状核、側坐核、前頭皮質、海馬のDAおよびアセチルコリン(acetylcholine, ACh)の変化をin

vivoで調べた。尾状核ではDA, AChとも変化がなかったが、側坐核と前頭皮質ではDAの増加、海馬ではAChの増加がみられた。これらの動物から副腎を除去するとDA, AChの増大は消失することから、拘束ストレスによる辺縁系のDAおよびAChの放出増加には下垂体-副腎皮質系が介在していることが示唆された。

4) 性行動

BeckerとCha(1989)は雌ラットのアンフェタミン誘発性行動と線条体DA放出の変化を同時に測定した。薬物投与後2時間の行動観察では、発情期にある雌ラットは発情期でない雌ラットに比べて移動活動性が低く、反対にsniffingや頭部前肢の動きのような常同行動が多かった。また線条体DA放出の増大は発情期にある雌ラットの方が大きかった。この結果から、雌ラットにおけるアンフェタミン誘発性の行動反応および線条体DA放出には卵巣ホルモンが関与しており、エストロゲン(estrogen)またはプロゲステロン(progesterone)あるいはその両方がアンフェタミンに対する反応を強めたと考えられる。

Meiselら(1993)も動物の性行動には脳内DA系が関与していると考え、雌のハムスターから卵巣を除去した後、卵巣ホルモンであるエストラジオール(estradiol)およびプロゲステロンを投与してから雄ハムスターに遭遇させて側坐核のDA, DOPAC, HVA, 5-HIAAの変化を調べた。これらのホルモン処置により雌は雄に対して容易にロードシスを示したが、側坐核DAは遭遇直後に急激に増大し、観察時間である1時間にわたって高レベルを維持した。したがって、DAが直接的にロードシス表出に関連しているわけではないが、卵巣ホルモンは雌の性行動に伴い側坐核DAの反応性を調節していると考えられる。

5) 摂食行動

McCulloughとSalamone(1992)は摂食に伴う運動活動に関わる側坐核DAの役割をマイクロダイアリシスを用いて調べた。食餌制限されたラットに45秒ごとに45mgの小さな餌ペレットを1個ずつ与えると摂食行動以外の移動活動や後肢立ちが生起する。この時の側坐核DAの放出量は、餌を与えない統制群や一度に大量に与える群よりも多く、誘因に関連していると思われる。またAndersonら(1992)は新生仔ラットが母乳を得るための行動に関わる線条体DA系の役割を調べ、母乳を得ると仔ラットは他の外的刺激に対する反応性が低下し、同時に線条体DAが減少することを報告している。この研究からは、母乳が生後間もない動物の行動や生理機能の調

節に重要な役割を担っていることが示唆された。

2.3.2 成体期6-OHDA処置ラットにおけるマイクロダイアリシス研究

1.2節で述べたように、脳内の神経基盤が発達を終えた成体期に6-OHDAを脳内に投与してDA系を選択的に破壊するという方法は、中枢DA系の機能を研究する手段として多く用いられている。80年代後半になってからはマイクロダイアリシス法がその行動研究にしばしば併用されるようになったが、動向としては損傷動物の単純な行動を指標として、DA系と関連した薬物効果を調べる研究が圧倒的に多い(cf. Abercrombie et al., 1990, 1991; Becker, 1990; Ishida et al., 1991; Mataga et al., 1991; Sarre et al., 1992; Touchet & Bennett Jr, 1989; Wishaw et al., 1992)。例えば、Zetterströmら(1986)は黒質線条体DA系を6-OHDAにより一側性に破壊した後でアンフェタミンまたはL-DOPAを投与し、回転行動中の線条体DA放出の変化をみた。その結果、アンフェタミン投与により損傷ラットでは用量依存的に同側方向への回転行動がみられ、この回転は対側の線条体DA放出レベルの時間的変化および総量に比例していた。L-DOPAを投与すると損傷側の線条体DA放出は非損傷側のベースレベルにまで増加し、損傷と対側性の回転行動が生じた。これらの結果は1.2節の回転行動のところでふれたUngerstedtとArbuthnott(1970)の解釈、すなわちアンフェタミン投与によって非損傷側ではDAの放出が高まるのに対して、損傷側ではそのような放出の亢進が起らず、左右の運動出力に不均衡が生じるため回転が生じるという見解を裏付けた。

成体期6-OHDA処置動物は黒質DA系細胞体の欠落により生じる運動障害を示すために、パーキンソン病の動物モデルとして扱われてきた。そのために、他の行動変化についてマイクロダイアリシス法を併用して研究しているものはきわめて少ない。運動行動以外を指標としたものでは、Keefeら(1990)のストレス下の動物にマイクロダイアリシス法を用いた報告がある。彼らは6-OHDA処置ラットにテールショックストレスを与えて線条体DAの変化を測定した。6-OHDA処置により線条体DAの組織含量は88%減少したが、ストレスによって上昇するDAの細胞外濃度は統制群のベースラインの半分にまで達することを見いだした。

2.3.3 新生仔期6-OHDA損傷ラットにおけるマイクロダイアリシス研究

新生仔期6-OHDA処置ラットについても、近年、

マイクロダイアリスが行動研究にしばしば併用されるようになった。しかし、新生仔期6-OHDA 処置ラットの行動変化についての知識の蓄積は大きい。それらについて *in vivo* の脳内生理指標を同時に測定するといった研究はまだ少ない。ただし、研究の動向としては成体期損傷動物におけるものとは若干異なっている。すなわち、回転行動研究に典型的にみられるように薬物自体の効果を測るために動物をツールとして使用する研究ではなく、新生仔期 DA 系損傷に固有の生理的变化、学習障害、認知障害の解明に研究が向けられているのである。まだ研究の数は少ないが、以下に焦点として2点を挙げてまとめた。

1) 新生仔期6-OHDA 損傷後の線条体 DA 系の機能変化

Castañedaら(1990)は、新生仔期6-OHDA 処置ラットでは成体期6-OHDA 処置ラットに認められる摂食・摂水障害やカタレプシーといった劇的な行動障害がなぜ生じないかを明らかにしようとした。そこで、新生仔期に脳室内に6-OHDA を処置されて DA 系が損傷したラットでは DA 放出を促進・補償するようなシナプス前部の変化が生じているのではないかと考え、ラットの休息状態およびアンフェタミン投与下でマイクロダイアリス法を用いて線条体の細胞外 DA との関連性を追究した。その結果、新生仔期6-OHDA 処置により DA の線条体組織含量は統制群の1%以下に減少していたが、細胞外 DA のベースラインレベルは統制群の12~54%であって、組織の含量に比例した減少はみられなかった。したがって、新生仔期に DA 涸渇した後も細胞外 DA 濃度を比較的高く維持するように、損傷を免れて生き残った DA 系終末が補償的に作用していると考えられる。これらの新生仔期6-OHDA 処置ラットが成体になってあらためて6-OHDA を処置されると摂食・摂水障害といった重篤な機能障害を示すという事実(Rogers & Dunnett, 1989)は、新生仔期処置の損傷効果を受けなかった DA 系ニューロンが機能補償にかかわっていることの間接的な証拠となるであろう。その機能を補償するプロセスとしては DA 生合成の促進や代謝の抑制などが可能性として挙げられる。

しかしながら、このような通常の状態と異なり、多くの DA 放出が惹起されるアンフェタミン処置下では6-OHDA 処置群と統制群では DA 放出に差がみられた。すなわち、統制群では線条体の細胞外 DA 量が劇的に上昇するとともに移動活動量が有意に増加したが、一方、新生仔期6-OHDA 処置ラットでは放出の劇的な上昇も移動活動の増加も認められな

かった。岡内ら(1992)も同様に線条体 DA および移動活動性の両方について、6-OHDA 処置ラットのメタンフェタミン(methamphetamine)に対する低反応性を報告している。以上の知見から、新生仔期6-OHDA 処置ラットにおける様々な学習障害やその他の行動障害には、DA 系神経伝達の増加が必要とされる場面での低反応性が関与している可能性が示唆される。

2) 新生仔期6-OHDA 処置後の線条体5-HT 系の機能変化

新生仔期6-OHDA 処置に伴って、線条体の5-HT レベルが増加することが知られている(Abrous et al., 1990; Castañeda et al., 1990; Duncan et al., 1987)。Stachowiakら(1984)は新生仔期6-OHDA 処置によって脳内 DA が涸渇する一方で、上行性5-HT 作動性ニューロンが線条体吻側部で過剰に神経支配していることを報告した。この文脈から6-OHDA 処置ラットにみられるさまざまな行動障害に及ぼす線条体5-HT の影響を調べる試みがなされている。JacksonとAbercrombie(1992)は生後2日齢のラットの脳室内に6-OHDA を投与し、5-HT 系終末部の密度増加に伴って線条体における5-HT 神経伝達に変化しているかどうかをマイクロダイアリス法を用いて調べた。その結果、線条体における細胞外5-HT のベースラインレベルは6-OHDA 処置によって異ならなかったが、細胞外に放出された5-HT の細胞内への再吸収を阻害するフルオクセチン(fluxetine)をダイアリスプローブを通して局所微量投与すると、6-OHDA 処置ラットの線条体5-HT レベルは統制群の3倍以上に上昇した。またカリウム負荷による5-HT 作動性神経終末の脱分極や5-HT の放出促進剤であるフェンフルタミン(fenfluramine)の腹腔内投与によっても、同じように6-OHDA 処置ラットで統制群の3倍の増加が見られた。これらの結果から、新生仔期に DA を涸渇したラットにおいては線条体の5-HT 作動性ニューロンの過剰な神経支配に伴って5-HT の放出が増加し、同時に5-HT 取り込み部位の親和性も増大することで、通常の状態においては細胞外5-HT 濃度が正常なラットと同じレベルに維持されていることが示唆された。

3. まとめ

6-OHDA 処置ラットの示すさまざまな行動障害は、心理学的な実験場面においても興味深く、またヒトのパーキンソン病、注意欠陥障害症候群などの有効な動物モデルとしての可能性も秘めている。しかし、特に新生仔期6-OHDA 処置では成体期処置と異なり、その後の神経発生に及ぼす種々の要因が絡

んでくるために、その動物の行動変容の原因を特定するためには多くの問題がある。したがって、動物が生活しているそのままの状態では生理指標を広範囲にわたって取り上げることができれば、いずれは行動と脳内の生理的変化の相互作用を解明することも可能になると思われる。その意味でマイクロダイアリシス法は、生体になんらかの実験的操作を与えた時の行動反応に伴う生理的な裏付けを直接取ることができるという利点がある。現在ではまだ生理指標を取る時間間隔、標的部位の大きさ、実施時間、検出感度、実験環境といった様々な制約が存在するが、技術発達のスピードを考えると、やがてこれらの制限は緩和されていくことだろう。

引用文献

- Abercrombie, E.D., Bonatz, A.E. & Zigmond, M.J. 1990 Effects of L-DOPA on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine treated rats. *Brain Research*, **525**, 36-44.
- Abercrombie, E.D., Bonatz, A.E., & Zigmond, M.J. 1991 Effects of haloperidol administration on in vivo extracellular dopamine in striatum and prefrontal cortex after partial dopamine lesions. *Brain Research*, **549**, 155-158.
- Abrous, D.N., Rivet, J.M., Le Moal, M., & Herman, J.P. 1990 Similar post-lesion receptor readjustments following the unilateral 6-hydroxydopamine lesion of the dopaminergic mesotelencephalic system in neonatal and adult rats. *Brain Research*, **526**, 195-202.
- Abrous, D.N., Wareham, A.T., Torres, E.M., & Dunnett, S.B. 1992 Unilateral dopamine lesions in neonatal, weaning and adult rats: Comparison of rotation and reaching deficits. *Behavioural Brain Research*, **51**, 67-75.
- Anderson, S.L., Gazzara, R.A., Robinson, S.R., & Smotherman, W.P. 1992 Effect of milk on dopamine release in the newborn rat: An in vivo microdialysis study. *Developmental Brain Research*, **68**, 286-288.
- Becker, J.B. 1990 Estrogen rapidly potentiates amphetamine-induced striatal dopamine release and rotational behavior during microdialysis. *Neuroscience Letters*, **118**, 169-171.
- Becker, J.B., & Cha, J.-H. 1989 Estrous cycle-dependent variation in amphetamine-induced behaviors and striatal dopamine release assessed with microdialysis. *Behavioural Brain Research*, **35**, 117-125.
- Beninger, R.J. 1983 The role of dopamine in locomotor activity and learning. *Brain Research Reviews*, **6**, 173-196.
- Benveniste, H. 1989 Brain Microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, **52**, 1667-1679.
- Breese, G.R., & Traylor, T.D. 1972 Developmental characteristics of brain catecholamines and tyrosine hydroxylase in the rat: Effects of 6-hydroxydopamine. *British Journal of Pharmacology*, **44**, 210-222.
- Breese, G.R., Criswell, H.E., Duncan, G.E., & Mueller, R.A. 1990 A dopamine deficiency model of Lesch-Nyhan disease: The neonatal 6-OHDA-lesioned rat. *Brain Research Bulletin*, **25**, 477-484.
- Bruno, J.P., Snyder, A.M., & Stricker, E.M. 1984 Effect of dopamine-depleting brain lesions on suckling and weaning in rats. *Behavioral Neuroscience*, **98**, 156-161.
- Bruno, J.P., Stricker, E.M., & Zigmond, M.J. 1985 Rats given dopamine-depleting brain lesions as neonates are subsensitive to dopaminergic antagonists as adults. *Behavioral Neuroscience*, **99**, 771-775.
- Castañeda, E., Whishaw, I.Q., Lermer, L., & Robinson, E.T. 1990 Dopamine depletion in neonatal rats: Effects on behavior and striatal dopamine release assessed by intracerebral microdialysis during adulthood. *Brain Research*, **508**, 30-39.
- Christie, J.E., Ljungberg, T., & Ungerstedt, U. 1973 Dopamine neurones and electrical self-stimulation of the region of the lateral hypothalamus. *Journal of Physiology*, **234**, 80P-81P.
- Cooper, B.R., Breese, G.R., Grant, L.D., & Howard, J.L. 1973 Effects of 6-hydroxydopamine treatments on active avoidance responding: Evidence for involvement of brain dopamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **185**, 358-370.
- Decker, D.E., Althaus, J.S., Buxser, S.E., Von Voigtlander, P.F., & Ruppel, P.L. 1993 Competitive irreversible inhibition of dopamine uptake by 6-hydroxydopamine. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, **79**, 195-208.
- Duncan, G.E., Criswell, H.E., McCown, T.J., Paul, I.A., Mueller, R.A., & Breese, G.R. 1987 Behavioral and neurochemical responses to haloperidol and SCH23390 in rats treated neonatally or as adults

- with 6-hydroxydopamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **243**, 1027-1034.
- Evetts, K.D., Uretsky, N.J., Iversen, L.L., & Iversen, S.D. 1970 Effects of 6-hydroxydopamine on CNS catecholamines, spontaneous motor activity and amphetamine induced hyperactivity in rats. *Nature*, **225**, 961-962.
- Imperato, A., Puglisi-Allegra, S., Casolini, P., Zocchi, A., & Angelucci, L. 1989 Stress-induced enhancement of dopamine and acetylcholine release in limbic structures: Role of corticosteron. *European Journal of Pharmacology*, **165**, 337-338.
- Ishida, Y., Hashiguchi, H., Yamamoto, R., Hashitani, T., Ikeda, T., & Nishino, H. 1991 Effect of intra-amygdala dopaminergic grafts on methamphetamine-induced locomotor activity, extracellular dopamine and dopamine metabolite overflow: A comparison with the effect of intra-accumbens grafts. *Brain Research*, **549**, 342-345.
- 岩崎庸男・高砂美樹 1986 新生仔期 6-hydroxydopamine 投与ラットの自発活動性と放射状迷路学習. *薬物・精神・行動*, **6**, 381-388.
- Jackson, D., & Abercrombie, E.D. 1992 In vivo neurochemical evaluation of striatal serotonergic hyperinnervation in rats depleted of dopamine at infancy. *Journal of Neurochemistry*, **58**, 890-897.
- Keefe, K.A., Stricker, E.M., Zigmond, M.J., & Abercrombie, E.D. 1990 Environmental stress increases extracellular dopamine in striatum of 6-hydroxydopamine-treated rats: In vivo microdialysis studies. *Brain Research*, **527**, 350-353.
- Kelly, P.H., Seviour, P.W., & Iversen, S.D. 1975 Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Research*, **94**, 507-522.
- Kostrzewa, R.M., & Jacobowitz, D.M. 1974 Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. *Pharmacological Reviews*, **26**, 199-288.
- Kuczenski, R., & Segal, D. 1989 Concomitant characterization of behavioral and striatal neurotransmitter response to amphetamine using in vivo microdialysis. *Journal of Neuroscience*, **9**, 2051-2065.
- Marshall, J.F., Berrios, N., & Sawyer, S. 1979 Neostriatal dopamine and sensory inattention. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, **94**, 833-846.
- Marshall, J.F., Levitan, D., & Stricker, E.M. 1976 Activation-induced restoration of sensorimotor functions in rats with dopamine-depleting brain lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, **90**, 536-546.
- Mason, S.T. 1984 *Catecholamines and behaviour*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mataga, N., Imamura, K., & Watanabe, Y. 1991 6R-Tetrahydrobiopterin perfusion enhances dopamine, serotonin, and glutamate outputs in dialysate from rat striatum and frontal cortex. *Brain Research*, **551**, 64-71.
- McCullough, L.D., & Salamone, J.D. 1992 Involvement of nucleus accumbens dopamine in the motor activity induced by periodic food presentation: A microdialysis and behavioral study. *Brain Research*, **592**, 29-36.
- McCullough, L.D., Sokolowski, J.D., & Salamone, J.D. 1993 A neurochemical and behavioral investigation of the involvement of nucleus accumbens dopamine in instrumental avoidance. *Neuroscience*, **52**, 919-925.
- Meisel, R.L., Camp, D.M., & Robinson, T.E. 1993 A microdialysis study of ventral striatal dopamine during sexual behavior in female Syrian hamsters. *Behavioural Brain Research*, **55**, 151-157.
- 中原大一郎・尾崎紀夫・永津俊治 1991 マイクロダイアリス法における基本的問題. *薬物・精神・行動*, **11**, 1-6.
- Nakahara, D., Fuchikami, K., Ozaki, N., Iwasaki, T., & Nagatsu, T. 1992 Differential effect of self-stimulation on dopamine release and metabolism in the rat medial frontal cortex, nucleus accumbens and striatum studied by in vivo microdialysis. *Brain Research*, **574**, 164-170.
- 岡内 隆・岩崎 庸男・中原大一郎 1992 新生仔期6-hydroxydopamine 処置ラットの過活動に及ぼす methamphetamine の効果. *薬物・精神・行動*, **12**, 305.
- Oke, A.F., & Adams, R.N. 1978 Selective attention dysfunctions in adult rats neonatally treated with 6-hydroxydopamine. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, **9**, 429-432.
- Pearson, D.E., Raskin, L.A., Shaywitz, B.A., Anderson, G.M., & Cohen, D.J. 1984 Radial arm maze performance in rats following neonatal dopamine depletion. *Developmental Psychobiology*, **17**, 505-517.
- Ranje, C., & Ungerstedt, U. 1977 Discriminative and motor performance in rats after interference with

- dopamine neurotransmission with spiroperidol. *European Journal of Pharmacology*, **43**, 39-46.
- Rogers, D.C., & Dunnett, S.B. 1989 Neonatal dopamine-rich grafts and 6-OHDA lesions independently provide partial protection from the adult nigrostriatal lesion syndrome. *Behavioural Brain Research*, **34**, 131-146.
- Sarre, S., Herregodts, P., Deleu, D., Devrieze, A., De Klippel, N., Ebinger, G., & Michotte, Y. 1992 Bio-transformation of L-DOPA in striatum and substantia nigra of rats with a unilateral, nigrostriatal lesion: A microdialysis study. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **346**, 277-285.
- Shaywitz, B.A., Yager, R.D., & Klopfer, J.H. 1976 Selective brain dopamine depletion of minimal brain dysfunction. *Science*, **191**, 305-308.
- Smith, R.D., Cooper, B.R., & Breese, G.R. 1973 Growth and behavioral changes in developing rats treated intracisternally with 6-hydroxydopamine: Evidence for involvement of brain dopamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **185**, 609-619.
- Stachowiak, M.K., Bruno, J.P., Snyder, A.M., Stricker, E.M., & Zigmond, M.J. 1984 Apparent sprouting of striatal serotonergic terminals after dopamine-depleting brain lesions in neonatal rats. *Brain Research*, **291**, 164-167.
- Steinpreis, R.E., & Salamone, J.D. 1993 The role of nucleus accumbens dopamine in the neurochemical and behavioral effects of phencyclidine: A microdialysis and behavioral study. *Brain Research*, **612**, 263-270.
- Stellar, J.R., Waraczynski, M., & Bruno, J.P. 1988 Neonatal dopamine depletions spare lateral hypothalamic stimulation reward in adult rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, **30**, 363-370.
- 高砂美樹・岩崎庸男 1987 新生仔期 6-hydroxydopamine 脳内投与ラットの行動に関する研究の動向. 筑波大学心理学研究, **9**, 45-55.
- Takeichi, T., Kurumiya, S., Umemoto, M., & Olds, M.E. 1986 Roles of catecholamine terminals and intrinsic neurons of the ventral tegmentum in self-stimulation investigated in neonatally dopamine-depleted rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, **24**, 1101-1109.
- Touchet, N., & Bennett Jr, J.P. 1989 The metabolism of systemically-administered L-dihydroxyphenylalanine, by intact and dopamine-denervated striata, as revealed by brain microdialysis. *Neuropharmacology*, **28**, 1217-1222.
- Ungerstedt, U. 1971 Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiologica Scandinavica*, **367S**, 95-122.
- Ungerstedt, U., & Arbuthnott, G.W. 1970 Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research*, **24**, 485-493.
- Weihmuller, F.B., & Bruno, J.P. 1989 Age-dependent plasticity in the dopaminergic control of sensorimotor development. *Behavioural Brain Research*, **35**, 95-109.
- Whishaw, I.Q., Fiorino, D., Mittleman, G., & Castañeda, E. 1992 Do forebrain structures compete for behavioral expression?: Evidence from amphetamine-induced behavior, microdialysis, and caudate-accumbens lesions in medial frontal cortex damaged rats. *Brain Research*, **576**, 1-11.
- Zetterström, T., Herrera-Marschitz, M., & Ungerstedt, U. 1986 Simultaneous measurement of dopamine release and rotational behaviour in 6-hydroxydopamine denervated rats using intracerebral dialysis. *Brain Research*, **376**, 1-7.