

新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断ラットの  
薬物誘発性過活動と連合学習

平成 25 年度

筑波大学大学院人間総合科学研究科  
感性認知脳科学専攻 博士論文

古家 宏樹

第 1 章	序論	1
第 1 節	周産期における神経発達	1
第 2 節	神経発達におけるグルタミン酸 NMDA 受容体の関与	4
1.	グルタミン酸	
2.	NMDA 受容体	
3.	学習・記憶における NMDA 受容体の役割	
4.	神経細胞の増殖、成熟、移動における NMDA 受容体の関与	
5.	神経細胞の生存における NMDA 受容体の関与	
第 3 節	中枢神経系に及ぼす新生仔期 NMDA 受容体遮断の長期的影響	13
1.	形態学的検討	
2.	神経化学的検討	
第 4 節	成体期の行動に及ぼす新生仔期 NMDA 受容体遮断の影響	16
1.	空間学習・空間記憶	
2.	情動行動	
3.	注意機能	
4.	社会行動	
5.	活動性	
第 2 章	本研究の目的と一般的方法	27
第 1 節	本研究の目的	27
第 2 節	本研究における一般的方法	30
第 3 章	新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの薬物誘発性過活動	35
第 1 節	新生仔期 MK-801 慢性投与が MK-801 および scopolamine 誘発性過活動に及ぼす影響【実験 1】	35
第 2 節	成体期 MK-801 慢性投与が MK-801 誘発性過活動に及ぼす影響【実験 2】	46
第 4 章	新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの条件性場所選好	51
第 1 節	新生仔期 MK-801 慢性投与が成体期の methamphetamine による条件性場所選好に及ぼす影響【実験 3】	51
第 2 節	新生仔期 MK-801 慢性投与が成体期のスクロース選好に及ぼす影響【実験 4】	60

第 3 節	成体期 MK-801 慢性投与が後の methamphetamine による条件性場所選好に及ぼす影響【実験 5】	70
第 5 章	新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの恐怖条件づけ	76
第 1 節	新生仔期 MK-801 慢性投与が文脈恐怖条件づけに及ぼす影響【実験 6】	76
第 2 節	新生仔期 MK-801 慢性投与が手がかり恐怖条件づけに及ぼす影響【実験 7】	83
第 6 章	総合的考察	95
要約		103
引用文献		108

## 第 1 章 序論

### 第 1 節 周産期における神経発達

我々の行動を司る中枢神経系は、動物種の違いによってその時期に差異はあるものの、胎生期から出生後初期において爆発的な成長を見せる。その成長の速度は成体期にみられる可塑的な変化と比較しても顕著に異なり、このことは中枢神経系の発達における周産期の重要性を示している。我々の行動は正常な中枢神経系の発達の産物であり、この発達が損なわれると、その後のいかなる時期においても正常な状態に回復させることは容易ではなく、神経系の初期発達から長期間経過した後の行動に様々な異常が現れる。

種によってその期間の長短は異なるものの、哺乳類において出生前後の期間は初期の神経発達に非常に重要な時期とされる。Dobbing & Sands (1973) は、妊娠第 10 週から生後 7 年までのヒト死後脳における脳重量、DNA ポリメラーゼ量、コレステロール量を測定した。DNA ポリメラーゼ量とコレステロール量はそれぞれ総細胞数と髄鞘化の指標として扱われている。その結果、いずれも出生前 10 週から生後 2 年までにかけて急速に増加し、生後 2 年を過ぎるとその増加は緩やかになった。脳重量の増加には神経細胞およびグリア細胞の増殖と神経の伸張および軸索の髄鞘化が反映されているものと考えられる。彼らは脳重量の急激な増加が観察されるこの時期を **brain growth spurt** の時期と位置づけている。また Dobbing & Sands (1979) は、ヒトをはじめ、サル、ブタ、ラットなどの哺乳類における出生前後の脳重量の増加率の変化を調べ、比較検討を行った。彼らによれば、ヒトの場合、出生時をピークとして

妊娠第 3 三半期から生後 3 年までの間に著しい脳重量の増加が示され、この時期がヒトにおける **brain growth spurt** の時期であると考えられる。一方、ラットでは生後 7 日をピークとして出生時から生後 3 週間後までの間に著しく脳重量が増加する。したがって、脳の発達という観点において、ラットにおける生後の数週間はヒトの妊娠第 3 三半期から生後 3 年の期間に相当すると考えることができる。彼らはこの **brain growth spurt** の時期が、栄養上の問題や代謝異常、内分泌系の不均衡など、神経の成長を制限するような事象に対して特に脆弱な時期であると仮定している。事実、げっ歯類を用いた研究から、新生仔期の薬理的な処置は脳の発達を著しく妨げることが示されている (Olney et al., 2000; 2002)。

ヒトにおいては、疫学的調査から、妊娠期の母体への薬物投与が、胎児の発達に影響を及ぼすことが問題視されている。覚醒剤や麻薬などの違法な嗜癖性薬物や、アルコールやニコチンなど合法ではあるが中枢神経系に作用し、胎盤関門を通過して胎児の脳に作用しうる薬物が、胎児の神経発達に悪影響を与えることが示唆されている (Thompson et al., 2009)。特に、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸とその受容体の 1 種である **N-methyl-D-aspartate (NMDA)** 受容体は、初期の脳発達において非常に重要な役割を果たすことが数々の先行研究から明らかになってきている。**Phencyclidine (PCP)** や **ketamine** などの **NMDA** 受容体拮抗薬の嗜好性薬物としての濫用は社会的な問題であり (Bey & Patel, 2007; Dargan & Wood, 2012)、妊娠中の女性による摂取が胎児の発達に深刻な影響を及ぼす可能性が懸念されている。また、**ketamine** など **NMDA** 受容体拮抗薬は臨床場面で麻酔薬として利用されるため、妊娠女性や乳幼児への投薬が、子どもの中枢神経系の発達を妨げ、ひいては精

神経機能の発達の妨げとなり行動障害を引き起こす恐れがある。

動物を用いた実験からは、周産期の NMDA 受容体拮抗薬投与がある種の精神疾患に類似の症状を生じさせることも報告されている (Baier et al., 2009; Fredriksson & Archer, 2003)。そのため、周産期の NMDA 受容体拮抗薬投与が、神経発達にどのような効果を及ぼすのかを明らかにすることは、濫用の危険性を理解し、麻酔薬としての利用の安全性を議論する上で非常に重要である。ただし、細胞レベルでの神経系の発達異常が必ずしも行動レベルでの異常と一致して現れるものではない。神経系の変化の程度によっては、何らかの補償作用によって、行動が正常に保たれている場合もある。また短期的には投薬の影響が観察されたとしても、時間の経過とともに正常な状態まで回復することも考えられる。さらに、行動のある側面は正常であったとしても、別の側面に異常が現れることも考えられる。薬物の中枢神経系への影響を検討する際には、その薬物が中枢神経系の活動の最終的なアウトプットである行動にどのような影響を与えるのかという観点からの議論は重要であり、その処置により生じた神経系の変化と行動の異常を関連付けるためにはまず、どのような行動の変化が生じたのかを詳細に調べる必要がある。周産期の NMDA 受容体拮抗薬投与の神経発達への影響を明らかにするためにもまず、様々な行動指標を用いてその影響を行動学的に観察し、詳細に記述することが必要である。ヒトを対象とした研究手法としては疫学調査が主であるが、疫学調査では調査対象者が置かれている社会的・文化的背景や遺伝的要因の影響を完全には排除しきれず、様々な変数を厳密に統制することは困難である。このようにヒトを対象とした研究には制約があり、周産期 NMDA 受容体拮抗薬投与の影響を明確にするのは容易ではない。そのため、周産期の NMDA 受容体拮抗薬投与の神経発達に及ぼ

す影響を明らかにする上で、実験環境や飼育条件を統制することが比較的容易である動物を用いた基礎研究は欠くことのできないものである。特に神経科学の分野でよく利用されるラットにおける生後数週間は、ヒトの **brain growth spurt** の時期に相当すると考えられる。胎生期の薬物投与は母体へも影響を及ぼす可能性があり、投薬による母親の生理的変化や行動の変化の影響を無視できないが、その点生後に **brain growth spurt** のピークを持つラットの場合、直接仔ラットに投薬でき、母ラットへの薬物の影響を抑えることができる。このような理由から、ラットを対象として新生仔期に **NMDA** 受容体拮抗薬を投与し成長後の行動を詳しく観察することは、周産期の **NMDA** 受容体拮抗薬投与が神経発達に及ぼす影響を検討するうえで非常に有用であると考えられる。

## 第 2 節 神経発達におけるグルタミン酸 **NMDA** 受容体の関与

### 1. グルタミン酸

グルタミン酸は哺乳類の中樞神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり、興奮性アミノ酸の一種である。グルタミン酸は、学習・記憶を含む脳の高次機能や神経細胞死、そして神経回路の発達に深く関わっていることが知られている。グルタミン酸は神経細胞内にてグルタミンから合成され、小胞グルタミン酸トランスポーターによってシナプス小胞内へ輸送・貯蔵される。

### 2. **NMDA** 受容体

グルタミン酸はイオンチャネル型受容体と代謝型受容体に結合する

ことで作用する。イオンチャネル型グルタミン酸受容体は薬理的に NMDA 受容体と non-NMDA 型受容体に大別され、さらに後者は  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体とカイニン酸受容体に分けられる。また代謝型グルタミン酸受容体は mGluR1 から mGluR8 までの 8 つが同定されている (Seeburg, 1993)。

NMDA 受容体は 3 回膜貫通ドメインを持つ複数のサブユニットによって構成されている。NMDA 受容体のサブユニットとして NR1、NR2A、NR2B、NR2C、NR2D、NR3A、NR3B が同定されており、NMDA 受容体は 1 つの NR1 サブユニットと NR2A~NR2D のいずれかの NR2 サブユニットのヘテロ 2 量体によって構成される 4 量体であるとされている (Monyer et al., 1994)。NMDA 受容体は、グルタミン酸結合部位、グリシン結合部位、ポリアミン結合部位、カチオンチャネル部位からなる (萩田・米田、1991)。NR1 サブユニットにはグリシンが結合する部位があり、NR2 サブユニットにはグルタミン酸が結合する部位が存在する。NR1 へのグリシンの結合は NMDA 受容体の生理的活性に不可欠であり、グリシンが結合していない場合、受容体は活性化されない (Johnson & Ascher, 1987)。NMDA 受容体の拮抗薬には、グルタミン酸結合部位に結合して、グルタミン酸が NMDA 受容体に結合するのを阻害する競合的 NMDA 受容体拮抗薬と、カチオンチャネルに結合して細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの流入を妨げる非競合的 NMDA 受容体拮抗薬がある (Fig. 1-1)。前者には、AP5 や CPP、CGP40116、CGP39551 などがあり、PCP、MK-801、ketamine などは後者に該当する。非競合的 NMDA 受容体拮抗薬は、NMDA 受容体のチャネル孔付近に結合することによって  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの細胞内への透過を阻害するが、この時、グルタミン酸は NMDA 受容体のグルタミン酸結合部位に結合することができる。培養細胞を用いた研究



から、MK-801 投与がグルタミン酸誘発性の電流を完全には阻害しないため (Peet et al., 1999; Shanthanelson et al., 2009)、厳密には NMDA 受容体を遮断しているとはいえないが、非競合的 NMDA 拮抗薬が競合的 NMDA 受容体拮抗薬と同様に長期増強の誘導を阻害し (Abraham & Mason, 1988)、また行動実験においても同様の効果をもたらすことから (Heale & Harley, 1990)、非競合的 NMDA 受容体拮抗薬は機能的には NMDA 受容体の機能を阻害する能力を有していると考えられる。そのため、本研究では、便宜的に非競合的 NMDA 受容体拮抗薬が NMDA 受容体を遮断するものと表現する。

中枢神経系においてグルタミン酸による通常の速い興奮性神経伝達は AMPA 受容体を介して行われる。AMPA 受容体にグルタミン酸が結合すると、 $\text{Na}^+$ イオンチャネルが開き、細胞外の  $\text{Na}^+$ イオン細胞内に流入することによって神経細胞の脱分極が起こる。NMDA 受容体のもつイオンチャネルは、 $\text{Ca}^{2+}$ に対して比較的高い透過性を示す。通常、NMDA 受容体のイオンチャネルは、静止膜電位状態ではチャネル孔に  $\text{Mg}^{2+}$ が結合し、イオンが通過できない状態にある (Foster & Fagg, 1987)。しかしシナプス間隙にグルタミン酸が放出され、AMPA 受容体が活性化することによって膜電位が十分に脱分極するとチャネルを塞いでいた  $\text{Mg}^{2+}$ が遊離し、この時に NMDA 受容体にグルタミン酸が結合すると、イオンチャネルを通じて大量の  $\text{Ca}^{2+}$ がシナプス後細胞内に流入する (Mayers & Westbrook, 1985)。NMDA 受容体は、中枢神経系に広く発現が認められるが、特に海馬で最も高密度に発現が見られ、他にも、大脳皮質浅層や側坐核、線条体、視床、扁桃体に高密度で存在していることがわかっている (Monaghan & Cotman, 1985)。様々な種類の学習・記憶に関わる海馬に特に高密度に存在することや、海馬において、学習・記憶の神

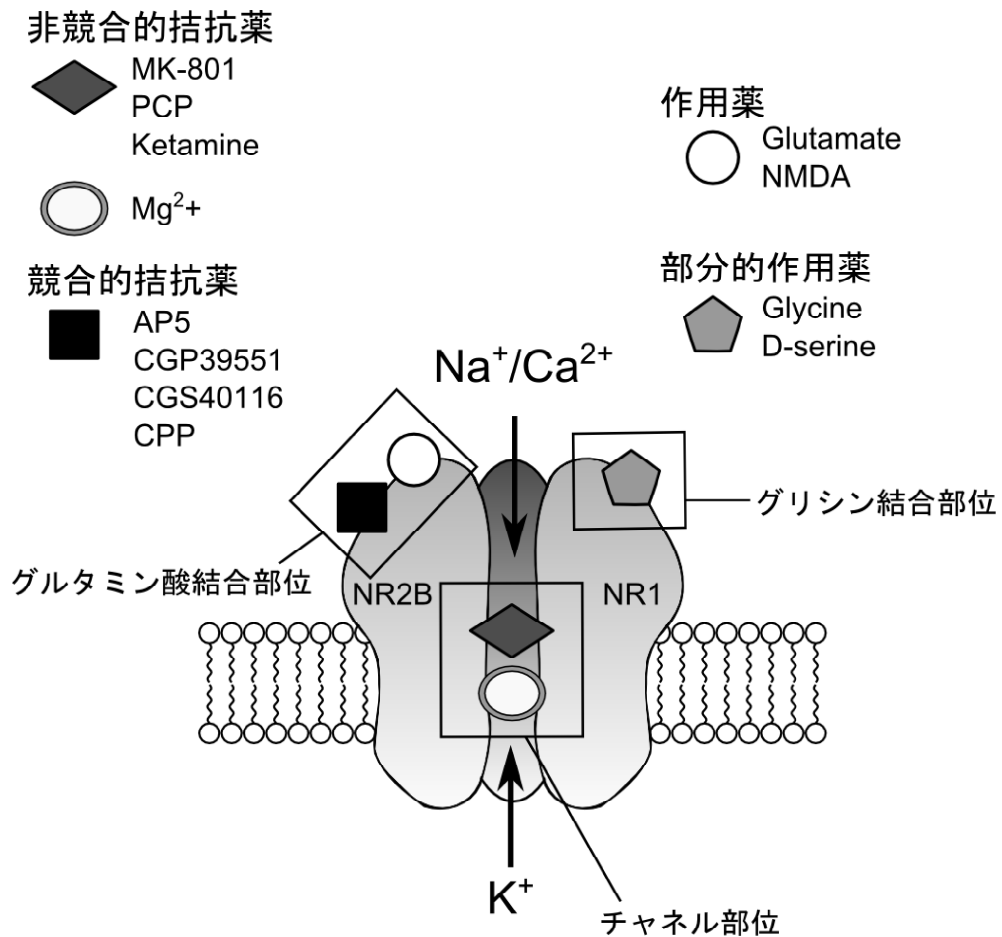


Fig. 1-1 グルタミン酸 NMDA 受容体の概略図。各種の NMDA 受容体拮抗薬および作用薬の結合部位を模式的に表した (Moretti & Torre (2008) より改変)。

経基盤と目される長期増強の誘発に NMDA 受容体が深く関与していることから (Collingridge et al., 1983)、NMDA 受容体は学習・記憶において重要な役割を果たすと考えられている。

### 3. 学習・記憶における NMDA 受容体の役割

Bliss & Lømo (1973) はウサギの海馬切片を用いて、シナプス前ニューロンの軸索に 10~20Hz で 10~15 秒間、あるいは 100Hz で 3~4 秒間の高頻度刺激 (テタヌス刺激) を与えることによりそれまでよりも大きなシナプス後電位が得られ、このシナプス伝達効率の上昇が数時間から数日間という長期にわたって持続することを見出した。この現象は長期増強 (long term potentiation; LTP) として知られる代表的なシナプスの可塑性を示す現象の例である。近年では NMDA 受容体に依存しない LTP の様式も報告されているが、初めて LTP が観察された海馬においては、LTP の誘導に NMDA 受容体が重要な役割を果たしていることが知られている。静止膜電位状態では NMDA 受容体のイオンチャンネルには、 $Mg^{2+}$  が結合し、イオンが通過できない。しかしグルタミン酸作動性神経の神経軸索にテタヌス刺激を与えると、シナプス間隙に大量のグルタミン酸が放出されるため、AMPA 受容体が活性化し、膜電位が十分に脱分極する。これによりチャンネルを塞いでいた  $Mg^{2+}$  が遊離し、イオンチャンネルを通じて大量の  $Ca^{2+}$  がシナプス後細胞内に流入する (Mayers & Westbrook, 1985)。細胞内に流入した  $Ca^{2+}$  イオンは、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) などの分子を含む細胞内情報伝達系を活性化することによって、細胞内 AMPA 受容体の細胞膜上への移行、樹状突起棘の肥大などの変化を生じ、結果として、単回の刺激でそれまでよりも大きなシナプス後電位が得られ、以降のシナ

プスの伝達効率が上昇する。

Hebb (1949) は、学習や記憶が成立するには脳内の神経細胞のシナプスの可塑性がなければならぬと予測し、シナプスの連合強度が、送り手と受け手の神経細胞が同時に興奮した場合に高められるという仮説を立てた。この説は Hebb の法則と呼ばれ、LTP は Hebb の法則に合致する特徴を持つ。つまり LTP は、テタヌス刺激を受けた特定の入力線維とそのシナプス後細胞との間においてのみ生じ (入力特異性)、ある一定以上の強い刺激が生じたときのみ起こるため、単独では LTP を生じないような強さの刺激であっても複数の入力線維からの入力によって生じ (協同性)、ある入力線維からの入力が単独では LTP を生じない弱い刺激であっても、同時に他の入力線維からの強い刺激の入力があることによって生じる (連合性) という特徴を持つ。LTP はテタヌス刺激の後、数週間にわたって続き、またシナプス前ニューロンの発火の後にシナプス後ニューロンの発火が起こった場合にのみ生じる (Kelso et al, 1986; Sastry et al., 1986)。また学習・記憶に深く関与する海馬において顕著に認められることから、LTP は学習・記憶の神経メカニズムの候補と考えられてきた。この考えを支持する行動的証拠として、老齢ラットでは若齢ラットと比較して、LTP、空間的記憶ともに減衰しやすいこと (Barnes & McNaughton, 1985)、テタヌス刺激を与えて LTP を飽和状態にさせると空間的学習が阻害されること (Castro et al., 1989; McNaughton et al., 1986)、若齢ラットでは海馬に対するテタヌス刺激を繰り返し与えると LTP が加重されるのに対し、空間的記憶の減衰を示す老齢ラットではわずかな刺激で LTP が飽和状態に達してしまうこと (Barnes, 1979) などが挙げられる。

Morris et al. (1986) は NMDA 受容体と LTP および学習・記憶との関

係について行動学的に初めて明らかにした。彼らはモリス水迷路課題を用いて、NMDA 受容体拮抗薬 2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5) の脳室内慢性投与が場所学習に及ぼす効果について検討した。その結果、持続的な AP5 脳室内投与は水迷路課題の習得を有意に遅らせることが分かった。AP5 投与は視覚手がかりを利用した逃避課題の遂行を阻害しなかったため、AP5 は感覚機能には影響せず、場所学習を特異的に障害したと考えられた。この時、水迷路学習を阻害した AP5 の濃度は、海馬 LTP の誘導を阻害する濃度と同じであった (Davis et al., 1992; Morris et al., 1986; Morris, 1989)。このような NMDA 受容体拮抗薬による学習・記憶の阻害効果は、モリス水迷路課題に限らず放射状迷路課題や受動的回避課題など、実に様々な課題において報告されており (Bauer et al., 2002; Davis et al., 1992; Kawabe et al., 1998a, b; Morris, 1989; Morris et al., 1986; Venable & Kelly, 1990; Wozniak et al., 1990; Zhang et al., 2001)、現在では、NMDA 受容体が学習・記憶において重要な役割を果たしていると広く考えられている。

#### 4. 神経細胞の増殖、成熟、移動における NMDA 受容体の関与

NMDA 受容体は初期の脳発達においても重要な役割を果たす。胎生期および新生仔期の動物の脳において、NMDA 受容体遮断は、神経の成熟および増殖 (Hirasawa et al., 2003)、移動 (Hirai et al., 1999; Hirasawa et al., 2003; Kihara et al., 2002; Komuro & Rakic, 1993; Reiprich et al., 2005) を阻害する。Hirasawa et al. (2003) は、胎生 17 日のラット大脳新皮質スライスを用いて、競合的 NMDA 受容体拮抗薬 D-AP5 への曝露が新生細胞の移動、増殖、成熟にどのような効果を及ぼすのか調べた。その結果、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) で標識し

た新生細胞が、AP5 を曝露しない統制条件下では 3 日間で脳室帯および脳室下帯から皮質板に移行したのに対し、AP5 曝露条件下では、培養開始から 3 日後でも脳室帯および脳室下帯と皮質板の中間領域にとどまっておき、NMDA 受容体遮断によって細胞の移動が遅延することが示された。また NMDA 投与による皮質板の神経活動は培養初期には NR2B サブユニットの選択的拮抗薬 ifenprodil によって強く抑制されるが、統制条件下では 3 日間の培養によってこの ifenprodil の抑制能が減少する。しかし、AP5 存在下で培養すると、この ifenprodil の抑制能の減少が遅れて生じることがわかった。中枢神経系における NMDA 受容体の各サブユニットの発現はそれぞれ成長に伴って変化し、胎生期ラットの new 皮質には NR1 および NR2B サブユニットの mRNA が発現しており、出生後に NR2A の mRNA の発現が認められるようになる (Watanabe et al., 1992)。Ifenprodil に対する感受性の減少は、成長に伴う NR2A 発現の増加を反映していると考えられたため、彼女らは NMDA 受容体遮断が神経の成熟を遅らせた可能性を示唆した。さらにスライス培養後の BrdU 染色によって、AP5 慢性曝露が脳室下帯の新生細胞を増加させることが明らかとなり、NMDA 受容体が神経前駆細胞の増殖を調節していることが示唆された。

## 5. 神経細胞の生存における NMDA 受容体の関与

NMDA 受容体遮断は、新生仔期の神経細胞の生存にも影響を与える。Ikonomidou et al. (1999) は、生後 7 日のラットに NMDA 受容体拮抗薬を投与し、投与から 24 時間後に脳を取り出し TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色を行った。TUNEL 染色は断片化した DNA を染色することでアポトーシスを検出するために用いられる染色

法である。その結果、NMDA 受容体非競合的拮抗薬 MK-801 0.5 mg/kg を投与してから 24 時間後に TUNEL 陽性細胞の著しい増加が観察され、細胞の変性が確認された。電子顕微鏡を用いた観察から、MK-801 投与によって生じた細胞の変性は、発達中の脳で通常観察される生理学的な（プログラムされた）細胞死と区別できなかった。また TUNEL 陽性細胞はアストロサイトのマーカーである *glia fibrillary acidic protein* (GFAP) に対して陰性であり、電子顕微鏡を用いた観察からも、神経細胞の特徴を備えていることが確認され、新生仔期の NMDA 受容体遮断によってアポトーシス様神経細胞死が生じることが示された。このような神経変性は海馬、視床、視床下部、そして前頭皮質、頭頂皮質、帯状皮質、膨大後部皮質の第 II・IV 層で観察された。また 0、3、7、14、21 日齢のラットに MK-801 を投与し 24 時間後に神経変性を観察したところ、MK-801 誘発性のアポトーシスに対する感受性は 3 日齢から 7 日齢にかけて上昇し、7 日齢から 14 日齢にかけて減少、21 日齢では非常に低い状態であることがわかった。また MK-801 投与によってアポトーシスが増加した部位は日齢によってパターンが異なり、脳の各領域によってそれぞれ NMDA 受容体遮断に対して脆弱である時期が異なっていることが示唆される。MK-801 投与によって生じたアポトーシス様神経細胞死は、AMPA 受容体拮抗薬 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydro-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX) やムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬 scopolamine、ドーパミン D2 受容体拮抗薬 haloperidole の投与では生じず、受容体遮断によるアポトーシス様神経細胞死は NMDA 受容体に特異的なものであることが示された。

### 第 3 節 中枢神経系に及ぼす新生仔期 NMDA 受容体遮断の長期的影響

#### 1. 形態学的検討

NMDA 受容体が神経の発達および生存を調節していることからすると、新生仔期 NMDA 受容体遮断が形態学的にも何らかの変化を生じさせると考えられる。実際に、新生仔期の NMDA 受容体拮抗薬投与が脳重量を変化させるという報告が複数ある。Facchinetti et al. (1993) は、生後 1~22 日のラットへの MK-801 あるいは NMDA 受容体競合的拮抗薬 CGP39551 投与は、最後の薬物投与から 24 時間後の全脳重量を減少させており、この脳重量の減少は 70 日齢時にも観察された。領域ごとの比較によって、同様の重量減少が小脳においても観察されたが、海馬においては統計的に有意な差は認められなかった。彼らはまた、NMDA 拮抗薬投与によって前頭-頭頂皮質の厚みがわずかに薄くなり、線条体の幅が 15% 程度減少することを報告している。Kawabe & Miyamoto (2008) も 7~20 日齢時に MK-801 を投与したラットにおいて成体期の全脳重量が減少したと報告した。その他、Harris et al. (2003) は生後 7 日目の MK-801 投与によって、海馬体の中でも海馬台の容積が減少すること、CA1 領域の神経細胞数が減少することを明らかにし、Coleman Jr. et al. (2009) は、同じく生後 7 日目に 1 mg/kg という高用量の MK-801 を投与した成体マウスの脳で、前頭前皮質第 V 層において錐体細胞が減少するという所見を得た。形態学的な異常がそのまま行動的異常に直結するとは限らないものの、後述するように新生仔期 NMDA 受容体遮断動物は海馬や前頭前皮質に依存する学習・記憶課題において遂行障害を示すため、新生仔期処置によって生じるこれらの脳部位の形態学的異常が何らかの形で後の行動的性質に関与していることが示唆される。



## 2. 神経化学的検討

発達初期の NMDA 受容体拮抗薬の投与は、NMDA 受容体の発現を変化させる。Sircar (2003) は、NMDA 受容体の非競合的拮抗薬である phencyclidine (PCP) 新生仔期投与は NMDA 受容体の親和性には影響しないものの、前頭前皮質および海馬において NMDA 受容体の最大結合数を増加させることを示した。彼女のグループは PCP 投与ラットにおいて、21 日齢時の脳で NMDA 受容体密度と NR2B サブユニットの mRNA の減少が観察されることを報告しており (Sircar & Li, 1994; Sircar et al., 1996)、成体期の NMDA 受容体の発現増加は、NMDA 受容体を介した神経伝達の低下を補償するために生じたものであると解釈している。Harris et al. (2003) は新生仔期 MK-801 投与が成体期ラットの視床背外側核および海馬の背側門部で NR1 サブユニット発現を減少させ、腹側門部および腹側の CA3 領域では逆に増加させることを報告した。同様に大脳皮質における NMDA 受容体の増加が Baier et al. (2009) によって報告されている。Du Bois et al. (2009a) は、生後 7、9、11 日の PCP 投与が成体期の視床および海馬の NMDA 受容体結合数を増加させ、前頭前皮質および前部帯状皮質では 32 日齢時に結合数の増加が認められることを報告した。研究によって発現の変化が認められる領域や日齢に違いがあるものの、これらの相異は新生仔期処置のプロトコルの違いに起因するものと思われ、全体としてみると新生仔期 NMDA 受容体遮断は、特に前頭前皮質や海馬などの領域において NMDA 受容体の発現を増加させるようである。このような NMDA 受容体の増加は、新生仔期 NMDA 受容体遮断によるこの受容体を介した神経伝達の低下を補うために生じたとする見方が一般的である。

新生仔期 NMDA 受容体遮断は、ドーパミンを介した神経伝達にも影響

を与えるようである。新生仔期に PCP を投与されたラットでは、腹側被蓋野においてドーパミンを含むカテコールアミンの合成過程に必要なチロシン水酸化酵素の mRNA が増加し、また線条体においてドーパミントランスポーターの増加が観察された (du Bois et al., 2008)。Gorter et al. (1992a) は、生後 8~19 日にわたる MK-801 投与が、成体期の前頭皮質および線条体での 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC; ドーパミンの代謝産物)/ドーパミン比の増加をもたらすことを示し、このラットにおいてドーパミンの代謝回転が上昇していることを示唆した。また生後 1~22 日の CGP39551 投与が側坐核および線条体においてドーパミン D2 受容体の結合数を増加させることも報告されている (Dall’Olio et al., 1994)。これらの所見はいずれも新生仔期 NMDA 受容体遮断動物でドーパミン伝達が亢進している可能性を示唆しており、実際、後述するようにこの動物はドーパミン作用薬に対して高い感受性を示す。

新生仔期 NMDA 受容体遮断が後の神経伝達に及ぼす影響については、NMDA 受容体およびドーパミンを介した神経伝達の変化に関する所見が主だったところであるが、新生仔期 PCP 投与ラットでは視床および海馬での  $\gamma$  アミノ酪酸 (GABA) 受容体発現が増加しているという報告 (du Bois et al., 2009a) のほか、前頭前皮質でムスカリン受容体発現が増加しているという報告もある (du Bois et al., 2009b)。また Gorter et al. (1992a) は、前頭皮質でセロトニン、線条体でノルアドレナリンの代謝がそれぞれ上昇していることを示した。これらの神経伝達物質とその受容体はいずれも情動や認知機能の調節に関与しているため、ここで述べた神経化学的变化が新生仔期 NMDA 受容体遮断動物において観察される行動異常の背景にあるものと推測されるが、各神経伝達システムの変化と個々の行動との関連については未だ明らかにされていない。い

ずれにしても、生後初期の NMDA 受容体という単一の受容体の遮断によって、成体期の脳において広範な神経化学的変化が生じうることは間違いなく、この変化が種々の行動異常をもたらしていると考えられる。

#### 第 4 節 成体期の行動に及ぼす新生仔期 NMDA 受容体遮断の影響

##### 1. 空間学習・空間記憶

成体期の動物において、海馬 NMDA 受容体が空間学習に関与していること、そして新生仔期の NMDA 受容体遮断が成体期の海馬 NMDA 受容体の神経生理学的変化をもたらす (Gorter et al., 1992b) ことからすると、海馬依存性である空間学習・空間記憶にも何らかの影響があるものと考えられた。実際、出生後早期の NMDA 受容体遮断によって、後の空間認知機能が障害されることが示されている。Gorter & de Bruin (1992) は、新生仔期の NMDA 受容体遮断が成体期におけるラットの空間学習能力を障害することを初めて示した。彼らは生後 8 日～19 日にわたって、NMDA 受容体の非競合的拮抗薬である MK-801 をラットに投与し、120～140 日齢の間に標準的なモリス水迷路課題を行い、空間学習能力を評価した。標準的なモリス水迷路課題では、ラットは水を張った円形プールに入れられ、水面下のいずれかの位置に置かれている逃避台を探し出し、そこに到達することを求められる。プールに貯められた水はラットから逃避台が見えないように白く濁らせてあるため、この課題の遂行には、プール周辺に置かれた空間手がかりを利用し、プール内の逃避台の位置を学習する必要がある。水迷路課題では、学習の指標として、ラットがプールに入れられてから逃避台に到達するまでの逃避潜時や遊泳距離を測定する。新生仔期に MK-801 を投与されたラットは統制群と比べ

て有意に長い逃避潜時を示し、逆転学習においても著しく低い遂行成績を示した。このラットは視覚手がかりを用いた逃避課題では統制群と同等の遂行を示した。またオープンフィールドテストにおける中心区画での滞在時間や立ち上がり回数などにも差がなかったことなどから、水迷路における学習障害は、活動性や感覚障害により副次的に生じたものではなく、新たな空間情報の獲得の遅延が主要な原因であると彼らは結論している。彼らは MK-801 処置を受けたラットの海馬 CA1 細胞における NMDA 誘導性活動がこの領域への AP5 投与によって著しく減弱することも報告しており (Gorter et al., 1992b)、海馬における NMDA 受容体の機能失調が学習障害の原因であることが示唆される。新生仔期 NMDA 受容体遮断によるモリス水迷路学習障害については、複数のグループから同様の報告がなされている。Sircar (2003) は、生後 5~15 日にラットに PCP を投与し、思春期 (35 日齢) および成体期 (60 日齢) にモリス水迷路課題を行った。新生仔期に PCP を投与されたラットは思春期と成体期の両方において水迷路課題の遂行障害を示した。Andersen & Pouzet (2004) は、モリス水迷路を用いて、成体期 (8 週齢) の空間参照記憶、逆転学習、空間作業記憶に対する生後 7、9、および 11 日齢での PCP 投与の効果について調べた。新生仔期 PCP 投与による空間参照記憶の障害は軽度であったが、逆転学習および作業記憶課題の学習は著しく阻害された。これらの障害は毎日の訓練の 30 分前に D-serine を投与することによって回復した。新生仔期 PCP 処置ラットの遊泳軌跡は、他者中心性定位 (allocentric orientation) が障害されることで知られる背側海馬損傷ラットの示す遊泳軌跡と類似したことから、PCP 処置による空間学習障害は他者中心性方略の獲得が阻害されたことによるものと解釈された (Andersen & Pouzet, 2004)。

水迷路のみならず放射状迷路課題を用いた研究においても、新生仔期 NMDA 受容体遮断が空間認知機能の障害を生じることが示されている。標準的な放射状迷路課題では、装置中央のプラットフォームから放射状に複数のアームが伸びており、各アームの先端に報酬として餌が置かれる。ラットは装置周辺に設置された空間手がかりを利用して課題を遂行し、試行内ですでに進入したアームに入らずに全ての餌を効率よく取ることが求められる。放射状迷路の遂行においてラットは当該試行で一度入ったアームを記憶し、そのアームを再度選択することを避けなければならない、これには作業記憶能力が必要であるとされる。Kawabe et al. (2007) は、新生仔期に MK-801 を慢性投与したラットが、成体期に標準的な放射状迷路課題の遂行の著しい障害を示すことを報告した。またモリス水迷路課題を用いた研究では、新生仔期 MK-801 投与ラットは訓練の後に最終的に統制群と同等の遂行成績に到達するが、放射状迷路課題においては 20 日間訓練した後でも改善を示さなかった (Kawabe et al., 2007)。放射状迷路課題においてより重篤な遂行障害が示されたのは、おそらくこの課題が作業記憶の要素を多分に含むものであり、新生仔期処置によって作業記憶能力が強く影響を受けるためであると考えられる。この考えと一致するように、遅延位置非見本合わせ課題においても新生仔期 NMDA 受容体遮断による障害が報告されており、MK-801 や CGP40116 など投与されたラットでは見本走行とテスト走行との間に挿入された遅延時間が長くなるほど正答率が低下した (Kawabe & Miyamoto, 2008; Wedzony et al., 2008)。

新生仔期 NMDA 受容体拮抗薬投与の学習および記憶能力に及ぼす影響に関する報告は、その多くが空間学習・空間記憶課題についてのものであるが、非空間課題においてもいくつかの報告がなされている。

Kocahan et al. (2013) は、生後 7～10 日の MK-801 投与 (0.25 mg/kg を 1 日に 2 回) が 35～40 日齢時の受動的回避学習テストに及ぼす影響について検討したが、条件づけセッションと 24 時間後のテストのいずれにおいても群間で差は認められず、新生仔期 MK-801 投与は青年期の認知機能には影響しないと彼らは結論した。一方で、Elhardt et al. (2010) は、生後 3～17 日に、0.1 mg/kg という比較的低用量の MK-801 を投与されたマウスは、恐怖条件づけ課題において条件づけ訓練の 1 時間後に保持テストを行った場合に、聴覚手がかりに対して統制群より高いフリージング率を示すことを報告した。情動記憶について検討したこの 2 つの研究の結果は一貫していないが、これはそれぞれの研究で用いられた動物種や、新生仔期処置のプロトコルの違いによるものと考えられる。現時点では回避学習課題や恐怖条件づけへの新生仔期 NMDA 拮抗薬投与の影響について検討した研究は少なく、同処置が後の情動記憶にどのような変化をもたらすのかは明確になっていない。また物体再認課題を用いた研究では、新生仔期 MK-801 処置は、成体期の物体再認記憶に影響しないという結果が得られており (Baier et al., 2009; Stefani & Moghaddam, 2005)、同処置が物体そのものの記憶に与える影響は小さいと思われる。

以上のように、出生初期の NMDA 受容体遮断が学習および記憶に与える影響については、空間学習・空間記憶を中心として研究されており、その他の種類の学習においてはあまり検討されてこなかった。新生仔期 NMDA 受容体遮断は、広範な脳領域に変化をもたらしていると考えられ、様々なタイプの学習・記憶はそれぞれに特異的な脳領域を中心として処理がなされるという見方からすれば、空間記憶・空間学習のみならず多様な課題において検討を行うことが重要である。

## 2. 情動行動

オープンフィールドテストや高架式十字迷路 (elevated plus maze; EPM) テストを使用して、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの情動性について調べた研究をいくつか挙げるができる。新生仔期 MK-801 投与ラットはオープンフィールドテストにおいて、17、28 日齢時に統制群より低い移動活動量を示し、また 27 および 28 日齢時に立ち上がり回数 of 著しい減少を示した。また、40 日齢時に EPM テストを行ったところ、オープンアームへの進入回数および立ち上がり回数が統制群と比較して有意に多く、不安レベルの低下が示唆された (Latysheva & Rayevsky, 2003)。オープンフィールドにおけるフリージング反応がみられないことや、EPM における不安レベルの低さから、移動活動量の減少は不安の上昇によるものではないようである。Latysheva & Rayevsky (2003) では、生後 7 日から 49 日までにわたり処置を継続しているため、MK-801 急性投与の即時的な効果によって不安レベルが低下した可能性は排除できない。Kocahan et al. (2013) も生後 7~10 日の MK-801 投与が、EPM におけるオープンアームでの滞在時間の増加、進入潜時の減少などを生じること示したが、青年期ラットの結果であり、成体期ラットでの検討はなされていない。一方で、Stefani & Moghaddam (2005) は、オープンフィールドにおける移動区画数、立ち上がり回数、そして不安レベルの指標とされる中心区画への進入回数、中心滞在時間について MK-801 投与ラットと統制群との間に有意な差は認められず、新生仔期 MK-801 投与は情動性に影響しないことを示唆した。また新生仔期の NMDA 受容体遮断が不安レベルを亢進させるという報告もある。Wedzony et al. (2008) は、生後 1 日~21 日の NMDA 受容体競合的拮抗薬 CGP40116 投与が、EPM におけるオープンアームでの滞在時間およ

びそこへの進入回数を減少させることを示した。以上のように、出生後早期の NMDA 受容体遮断による不安レベルへの影響に関しては現在のところ一貫した結果が得られていない。

成体期の不安レベルに対する新生仔期 NMDA 受容体遮断の効果は、被験体として用いた動物の性別や系統によって異なるとする報告もある。Amani et al. (2013) は、新生仔期 PCP 投与は雄マウスにおいてストレス誘発性の血中コルチコステロンを増加させ、EPM や明暗選択テストにおける不安関連行動を増加させたが、雌マウスではオープンアームへの進入や明るい部屋での滞在が増加し、むしろ不安レベルが減少していることが示唆された。さらに雄マウスでは PCP 処置により強制水泳テスト中の無動時間が増加し、うつ様の行動がみられた。また新生仔期 MK-801 投与は BALB/c マウスでは探索行動と不安関連行動を減少させたのに対し、C57BL/6 マウスではこれらの行動を増加させ、新生仔期 NMDA 受容体遮断の効果は遺伝的要因によって異なることが示唆される (Akillioglu et al., 2012)。

### 3. 注意機能

新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの注意機能については、プレパルス抑制 (prepulse inhibition; PPI) テストを用いた検討がなされている。PPI テストは感覚運動ゲーティング機能を評価するためのテストである。聴覚刺激を利用した PPI テストでは、突然提示される強い音刺激 (パルス) に対する驚愕反応がその音刺激に先行する弱い音刺激 (プレパルス) の提示によって減弱する。これは生体が外界の必要な情報に注意を向け、重要でない情報をフィルタリングする能力を反映していると考えられている。新生仔期に NMDA 受容体拮抗薬を投与された動物では、



PPI が低下し、プレパルス提示によるパルスに対する驚愕反応の抑制が小さくなることが知られている。Wang et al. (2003) は、生後 7、9、11 日のラットに PCP 10 mg/kg を投与すると、24～26 日齢時において PPI が障害されることを示した。Wedzony et al. (2008) は、CGP40116 の新生仔期投与が 60 日齢以降の PPI の障害を生じることを報告した。また Uehara et al. (2010) は、生後 7～11 日の MK-801 投与は性成熟後にのみ PPI を障害し、性成熟前にはこの効果はみられないことを示した。このように PPI の障害が成熟前にみられるという報告と成熟前にはみられないという報告があるものの、全体として性成熟以降には PPI が障害されるという点では一致するようである。

新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの注意機能について検討した先行研究では、PPI パラダイムを用いたものがほとんどであるが、セットシフティング課題を用いた研究をいくつか挙げる事ができる。セットシフティング課題では 2 つの物理的特性（例えば色とテクスチャー）を備えた弁別刺激を複数用意し、まず最初に刺激の色（セット 1）を手がかりとして弁別訓練を行う。この時テクスチャー（セット 2）は無視されなければならない。セット 1 での弁別が習得されたら、次にセット 2 での弁別訓練に移行する。このときラットは以前には有効であった色手がかりを無視し、テクスチャーに注意を向ける必要がある。注意を向ける対象を切り替える能力が障害されている場合、セット 1 の手がかりに固執して起こるエラーが増加する。セットシフティング課題における遂行障害（固執エラーの増加）は注意機能を制御する中央実行系の障害や、行動の柔軟性の障害を反映すると考えられている。Stefani & Moghaddam (2005) は、十字迷路を用いてアームの床の明暗（セット 1）を手がかりとした弁別訓練から、明暗にかかわらず床のテクスチャー

(セット2)を手がかりとした弁別訓練へと弁別手がかりのセットが変更されるセットシフティング課題において、新生仔期 MK-801 投与ラットはセット1の手がかりに固執し、セット2の獲得が遅いことを示した。このことより彼らは、比較的短期間であっても新生仔期の特定の時期に NMDA 受容体が遮断されることによって、セットシフティングの能力が障害されることを示唆した。同様に生後初期に PCP を投与されたラットもセットシフティングの障害を示した (Broberg et al., 2008, 2009)。ラットを用いた実験においては、内側前頭前皮質の損傷 (Birrel & Brown, 2000) や薬理的処置 (Floresco, 2013; Floresco et al., 2006) がセットシフティングを障害することが示されており、新生仔期 NMDA 受容体遮断動物において内側前頭前皮質の機能が低下していることが推測される。

#### 4. 社会行動

成体期の社会行動に新生仔期の NMDA 受容体遮断がどのような影響をもたらすかについての報告は、現時点では非常に限られている。また数少ない報告の中でも新生仔期処置の影響があるとするものと影響がないとするものがあり、一貫した結果は得られていない。齧歯類の社会行動の測定には、レジデント・イントルーダーテストが利用される。このテストでは、しばらくの期間ひとつのケージで雄の個体が飼育される (レジデント)。続いて、そのケージに別の雄の個体 (イントルーダー) が投入され、その際に表出される攻撃行動を含む様々な社会的相互作用が記録される。Wedzony et al. (2008) は、生後 1~21 日の CGP40116 の投与は、非攻撃的社会行動を減少させ、攻撃的社会行動に費やした時間を増加させることを報告した。一方で、Latysheva & Rayevsky (2003) は、

生後 7 日～49 日の長期間にわたり MK-801 をラットに投与し、16 週齢時のレジデント-イントルーダーテストにおけるこのラットの行動には統制群と差がないことを報告した。しかし Latysheva & Rayevsky (2003) では、0.05 mg/kg という低用量の MK-801 で処置を行っている。この程度の用量では、少なくとも社会行動には影響を与えないのかもしれない。より高用量の MK-801 で処置を行えば Wedzony et al. (2008) と同様の結果が得られる可能性もある。いずれにしても、先行研究の少なさから、出生後早期の NMDA 受容体遮断が後の社会行動に及ぼす影響についてはほとんど未解明の状態であり、今後の研究が待たれるところである。

## 5. 活動性

多くの先行研究が新生仔期 NMDA 受容体遮断の活動性に及ぼす影響について調べており、そのほとんどは移動活動量を中心として検討を行っている。Latysheva & Rayevsky (2003) は低用量 (0.05 mg/kg) の MK-801 で新生仔期処置を行い移動活動量を測定したが、55 日齢のラットにおいて MK-801 群と統制群の間に移動活動量の差はみられなかった。Boctor & Ferguson (2010) は、生後 42 日目の移動活動量に差はなかったものの、72～77 日齢時において新生仔期 PCP 投与群は明期あるいは暗期に関わらず高いランニングホイール活動を示すことを報告した。Facchinetti et al. (1993) は、MK-801 あるいは CGP39551 を投与したラットの移動活動量は、28、35、48、60 日齢時のいずれの日齢においても統制群と比較して有意に高いことを示した。Wedzony et al. (2008) は、CGP40116 を投与したラットが成体期に探索行動の増加を示すことを報告した。以上のように、新生仔期 NMDA 受容体遮断は後の活動性に

影響しないという報告と、後の活動性を増加させるという報告があるが、このような食い違いには、テスト時のラットの日齢や処置に用いた薬物の用量が影響しているようである。例えば、Schiffelholz et al. (2004) は、新生仔期 MK-801 投与は 30 日齢時の移動活動量を増加させたものの、その効果は 60 日齢以降に逆転し、90、120、180 日齢時の移動活動量を減少させることを見出した。また、0.25 mg/kg の MK-801 で処置を行った場合、著しい移動活動量の増加がみられたが (Facchinetti et al., 1993)、0.12 mg/kg では移動活動量は変化せず、0.2 mg/kg ではむしろ減少を示した (Uehara et al., 2009)。

齧歯類において、ドーパミン作用薬や NMDA 受容体拮抗薬など、ある種の薬物は移動活動量や常同行動を亢進させる。新生仔期の NMDA 受容体遮断は、このような活動性亢進作用を持つ薬物に対する感受性を変化させることが示されている。Dall'Olio et al. (1994) は、新生仔期 CGP39551 投与ラットは、ドーパミン D2 受容体作用薬 LY171555 の移動活動量亢進作用に感受性が高く、D1 および D2 受容体作用薬 apomorphine 投与時に観察された常同行動の頻度も統制群より有意に多いことを示した。Facchinetti et al. (1994) は、CGP39551 慢性投与による自発的活動量の増加は、統制群のラットにおいては効果がみられない程度の少用量のドーパミン D1 受容体あるいは D2 受容体の拮抗薬投与によって抑制されることを報告した。Methamphetamine、amphetamine および D2 受容体作用薬 quinpirole に対しても同様に感受性の増加が認められることが、CGP40116 投与ラットや MK-801 投与ラットにおいて報告されている (Wedzony et al., 2005; Uehara et al., 2010)。また新生仔期 NMDA 受容体遮断は、成体期の NMDA 受容体拮抗薬誘発性過活動を亢進させることも示されている。生後 7、9、11 日

に PCP を投与されたラットは、PCP 急性投与の移動活動量亢進作用に対して統制群より高い感受性を示した (Boctor & Ferguson, 2010)。

新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの示す薬物誘発性過活動の亢進は、この動物における中枢神経系の神経化学的な変化を反映しているものと思われる。実際、新生仔期に NMDA 受容体拮抗薬を投与されたラットでは、チロシン水酸化酵素、DOPAC/ドーパミン比の増加、ドーパミン D2 受容体や NMDA 受容体結合数の増加などが観察されている (Dall'Olio et al., 1994; Gorter et al., 1992; Sircar, 2003)。このように、新生仔期 NMDA 受容体遮断動物において観察される神経化学的な変化と薬理学的操作に対する行動学的な鋭敏さとはよく相関しているように見える。このことを考慮すると、活動性の変化を指標として各種薬物への感受性について検討することは、新生仔期 NMDA 受容体遮断によって生じた神経化学的な変化を推測するうえで有効であると考えられる。

## 第 2 章 本研究の目的と一般的方法

### 第 1 節 本研究の目的

ヒトにおいて周産期は中枢神経の発達において重要な時期であり、この時期に神経伝達物質の機能を妨げられると、後の行動に重篤な障害が生じる可能性がある。特にグルタミン酸 NMDA 受容体は神経の発達に深く関与しているため、妊娠女性の NMDA 受容体拮抗薬の娯楽目的での使用や、臨床場面での麻酔薬としての利用が、胎児の神経発達の異常、ひいては行動の異常をもたらすことが示唆される。実際、脳の成長スパークが観察されるという点において、ヒトの妊娠第 3 三半期から生後 2、3 年の期間に相当する新生仔期のラットに NMDA 受容体拮抗薬を投与すると、中枢神経系に神経化学的、神経解剖学的、神経生理学的な変化が生じ、この影響は長期間にわたって持続することが知られている。しかし新生仔期の NMDA 受容体遮断が後の行動に及ぼす影響に関しては、十分には解明されていない。周産期の NMDA 受容体遮断が中枢神経系の発達に及ぼす影響を明らかにするには、神経系の変化だけでなく、中枢神経系の機能の最終的なアウトプットである行動にどのような変化が現れるのかを広範に調べ記述する必要がある。この観点から、本研究では、新生仔期の NMDA 受容体遮断が後の行動に及ぼす影響に関して新たな知見を加えることを目的とし、中でも新生仔期 MK-801 慢性投与が成体期の薬物誘発性過活動と、連合学習に及ぼす影響について検討を行った。

新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットが示すドーパミン受容体作用薬あるいは NMDA 受容体拮抗薬誘発性過活動の増強は、この動物において観察されるドーパミン神経系および NMDA 受容体を介した神経伝達の機

能的变化とも相関することが示されてきた。このことは一つの問題を提起する。新生仔期 NMDA 受容体遮断によって、活動量亢進作用を持つその他の薬物に対しても感受性の変化が生じているのかという問題である。序論（第 1 章）で述べたように、新生仔期 NMDA 受容体遮断は NMDA 受容体を介する神経伝達のみならず、非常に広範な影響を神経伝達システムに及ぼしていると考えられる。特に、新生仔期 NMDA 受容体遮断により前頭前皮質や海馬におけるムスカリン受容体発現が変化することが報告されている (du Bois et al., 2009b)。しかし、このようなムスカリン受容体の変化が新生仔期 MK-801 投与ラットの示す行動特性にどのように関与しているのかは明らかでなく、また前頭前皮質や海馬を除いたその他の脳領域におけるムスカリン受容体機能の変化についてはほとんど検討されていない。ムスカリン受容体は様々な種類の行動の調節に関与しているため、新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断ラットの行動異常は、この受容体を介した神経伝達の変化に起因している可能性がある。ムスカリン受容体の機能変化を調べることは新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの行動異常の生理的基盤を理解する上で重要である。ムスカリン受容体拮抗薬である scopolamine は、ラットやマウスにおいて移動活動量を増加させることが知られている。薬物誘発性過活動の亢進と神経化学的観察の結果とがよく相関するようにみえることから、移動活動量の変化を指標として各種薬物への感受性について検討することは、新生仔期 NMDA 受容体遮断によって生じた神経化学的变化を推測するうえで有効であると考えられる。そこで第 3 章では、新生仔期 NMDA 受容体遮断がムスカリン受容体および NMDA 受容体機能に及ぼす影響について調べるため、ラットに生後 7 日から 20 日までの 14 日間にわたって NMDA 受容体拮抗薬である MK-801 を慢性的に投与し、このラットが成

体期に達した後に、MK-801 誘発性過活動およびムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬 scopolamine 誘発性過活動について検討を行った。

また序論で述べたように、新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断ラットが空間学習課題・空間記憶課題において障害を示すことはよく確立されている。しかしこれらの課題と比べると、ラットの学習・記憶能力の測定によく用いられる条件づけパラダイムを利用して新生仔期 NMDA 受容体遮断の効果を検討した研究は非常に少なく、そもそも新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断ラットが、単純な刺激と刺激との連合を獲得し利用することができるのかが明らかでない。例えば、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットは放射状迷路課題や遅延交替反応課題などの餌を報酬とした学習・記憶課題において障害を示すことが報告されているが、これは新生仔期 NMDA 受容体遮断によって特定の刺激と報酬との連合が障害されていることによるものである可能性も考えられる。連合学習は、学習の最も基本的な形態であり、様々な行動の基礎をなしていると考えられる。そのため、連合学習能について調べることは新生仔期 NMDA 受容体遮断の行動への影響を記述する上で重要であろう。そこで、第 4 章では、新生仔期 NMDA 受容体遮断が特定の刺激と報酬との連合に及ぼす影響について調べるために、新生仔期に MK-801 を投与したラットが成体に達した後に、強い報酬特性を持つ methamphetamine を用いて条件性場所選好テストを行った。また、報酬性の連合に対する NMDA 受容体遮断の効果が、新生仔期に処置を行った場合のみに特異的なものであるのか否かを明らかにするために、成体期のラットに同じく 14 日間にわたって同用量の MK-801 を慢性投与し、後に methamphetamine 誘発性条件性場所選好について検討を行った。また第 5 章では、新生仔期 NMDA 受容体遮断が特定の刺激と嫌悪刺激との連合にどのような影響を及ぼすの



かを明らかにするために、新生仔期のラットに MK-801 を投与し、成体に達したのちに文脈恐怖条件づけおよび聴覚刺激を用いた手がかり恐怖条件づけテストを行った。

## 第 2 節 本研究における一般的方法

### 1. 新生仔期 MK-801 処置

出生日を 0 日齢として、7 日齢から 20 日齢にわたってラットに薬物投与を行った。7 日齢時に仔ラットの雌雄を判別し、1 ケージあたり最大 10 匹となるように仔ラットの匹数を調整した。雄のラットを MK-801 投与群と溶媒 (SAL) 投与群とに無作為に割り振った。グルタミン酸 NMDA 受容体の拮抗薬である MK-801 を生理食塩水に溶解し、0.4 mg/ml の MK-801 溶液を作成し、MK-801 投与群には 0.4 mg/kg の MK-801 を、SAL 投与群には同量の SAL を投与した。薬物を投与する際、100  $\mu$ l のマイクロシリンジ (Hamilton, 米国) を用いて、頸部皮下に刺入し、ゆっくりと薬物を注入してから数秒間留置した後に針を抜き去った。薬物処置は 1 日に 2 回とし、それぞれの処置は最低 8 時間以上の間隔をおいて行った。仔ラットが 28 日齢に達した時点で離乳し、3~4 匹を 1 ケージで飼育した。ラットには餌、水を自由に摂取できるように与えた。飼育室の明暗周期を 12 時間 (8:00~20:00 が明期) で維持し、行動実験はすべて明期に行った。本研究における実験はすべて、筑波大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

### 2. 成体期 MK-801 処置

成体期 MK-801 投与の実験 (実験 2、5) では、10 週齢に達した時点で

ラットを無作為に 2 群に分け、12 週齢に達するまでの 14 日間にわたって、MK-801 (0.4 mg/kg) または SAL を頸部皮下に 1 日 2 回、8 時間以上の間隔を空けて投与した。薬物の投与に 1 ml のシリンジを使用したことを除き、処置の手続きは新生仔期処置に準じて行われた。

### 3. 移動活動量の測定

**装置** 塩化ビニール製のオープンフィールド装置 (90×90×45 cm) を使用した。装置の壁は黒色で、床は灰色であった。装置の真上の天井には、白熱電球 4 灯が設置されており、装置中心の床面の照度は約 90 lux であった。また、装置の直上にはビデオカメラが備え付けられ、装置の隣におかれたコンピューターに接続されていた。各個体のテストが終わる度に、次亜塩素酸ナトリウムを希釈した水道水を含ませたタオルを用いて、装置の内壁および床面を清掃した。

**手続き** 行動テストに先立って、5 分間のハンドリングを 1 日 1 回、3 日間行った。行動テストでは、まずラットをホームケージのまま飼育室から出し、体重を測定した後に実験室へと運び、実験室に慣れさせるために 30 分以上留置した。MK-801 急性投与のテストにおいて、まずラットをホームケージから出し、MK-801 0.2 mg/kg あるいは SAL を腹腔内投与した。薬物を投与した直後にラットをオープンフィールドの中心に置き、その後 40 分間自由に装置内を探索させ、その間の移動活動量を記録・測定した。薬物条件は被験体内条件であり、すべての個体をすべての薬物条件 (MK-801 あるいは SAL) でテストした。各個体で MK-801 と SAL のテストのどちらを先に行うかは、群内でカウンターバランスした。薬物テストは 1 日に 1 回行い、前のテストから少なくとも 48 時間

の間隔を空けて次の薬物のテストを行った。移動活動量の分析には、NIH Image (米国 National Institutes of Health において作製されたフリーウェア; <http://rsb.info.nih.gov/ij> より入手可能) をもとに作られた Image OF (小原医科産業(株)) を使用した。Scopolamine 急性投与のテストにおいては、ラットに SAL に溶解した scopolamine 0.4 mg/kg、2.0 mg/kg あるいは SAL を腹腔内投与した。テストした薬物を除いて、手続きは MK-801 急性投与の場合と同様であった。

#### 4. 条件性場所選好

**薬物** Methamphetamine (MAP、大日本住友製薬) を SAL に溶解し、1 mg/ml の MAP 溶液を作製した。

**装置** 装置として 3 部屋から成る場所選好テスト箱 (MED Associates、米国) 2 基を使用した。装置の壁はアクリル板でできており、左右の白色、黒色の部屋と中央の小さい灰色の部屋から構成されていた。装置は全体で 23×78×27 cm で、白色および黒色部屋は 21×28×27 cm、中央の灰色部屋は 21×12×27 cm であった。それぞれの部屋は、開閉可能なギロチンドアによって仕切ることができた。白色の部屋の床は 1.5×1.5 cm の金網からなっており、黒色の部屋の床は 2 cm 間隔のステンレス製グリッドであった。灰色の中央部屋の床部は同色のアクリル板でできていた。各個体のベースライン測定、条件づけセッション、選好テストが終わるごとに次亜塩素酸ナトリウムを希釈した水道水を含ませたタオルを用いて、装置の内壁および床面を清掃した。装置の真上にビデオカメラを設置し、ベースライン測定時および選好テスト時のラットの行動を撮影・記録し、後の解析に使用した。

ハンドリングおよび装置馴化 条件性場所選好の訓練に先行して、5分間のハンドリングを1日1回、3日間行った。ハンドリング終了の翌日から3日間、装置馴化を行った。装置馴化では、ラットを中央の部屋から装置へ入れ、直後に2つのギロチンドアを開き、10分間自由に探索させた。

条件性場所選好テスト 以下の3つの期間で構成された。

(1) ベースライン測定 装置馴化が終了した後に、条件づけを行う前のラットの各部屋に対する選好を調べるため15分間のベースライン測定を行った。テストでは、ラットを中央の部屋（灰色）から装置へ入れ、直後にギロチンドアを開き、15分間自由に探索させた。ビデオカメラを用いて記録した映像をもとに、ラットの各部屋における滞在時間を測定した。ラットが各部屋に進入したと判断する基準は、四肢全てが当該の部屋に入ることとした。ベースライン測定における滞在時間をもとに、各個体の白色および黒色部屋に対する選好率 [ 白色あるいは黒色部屋での滞在時間 / (白色部屋での滞在時間 + 黒色部屋での滞在時間) ] × 100 (%) を算出した。

(2) 条件づけ訓練 条件づけでは、ラットに MAP 1 mg/kg あるいは溶媒を腹腔内投与し、直後に白色あるいは黒色の部屋に入れ 30 分間留置した。MAP と溶媒は毎日交互に投与し、それぞれを 2 回ずつ行い、合計 4 日間条件づけを行った。各個体において白黒どちらの部屋を MAP と対提示するかについては、その部屋に対するベースライン時の選好率が各群でほぼ 50% となるように調整した。条件づけセッションを MAP と溶媒のどちらから先に行うかに関しては、新生仔期処置の各群内でカウンターバランスした。

(3) 選好テスト 条件づけ期終了の翌日、ベースライン測定と同様の

手続きで選好テストを行った。ビデオカメラを用いて記録した映像をもとにラットの各部屋における滞在時間を測定し、条件づけ訓練において MAP と対提示された部屋に対する選好率 [ MAP と対提示された部屋の滞在時間 / (MAP と対提示された部屋での滞在時間 + 溶媒と対提示された部屋での滞在時間) ] × 100 (%) を算出した。

## 5. 恐怖条件づけ

**装置** 恐怖条件づけには、防音箱（室町機械（株）、70×60×60 cm）とその内部に置かれた条件づけ箱（25×20×30 cm、小原医科産業（株）製）を使用した。条件づけ箱の壁面および上部は透明アクリル板でできており、床はステンレス製のグリッドになっていた。また手がかり恐怖条件づけの消去には、33×27.5×32 cm（小原医科産業（株）製）の三角柱の消去用箱を使用した。消去用箱の床面および1面の壁は黒色アクリル板でできており、その他の2面の壁および天井部分は透明アクリル板でできていた。防音箱内部の上面にはビデオカメラが備え付けられ、コンピューターに接続されており、箱の中のラットの映像を記録することができた。また防音箱内部の上面にはスピーカーが設置されていた。条件づけおよび消去セッション中、背景ノイズとして 50 dB のホワイトノイズを提示した。条件づけ箱の中央床面の照度は 200 lux であった。条件づけおよび消去セッション中のラットの行動の解析には、Image J（米国 National Institutes of Health において作製されたフリーウェア；<http://rsb.info.nih.gov/ij> より入手可能）をもとに作られた Image J FZ1（小原医科産業（株））を使用した。

### 第 3 章 新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの薬物誘発性過活動

#### 第 1 節 新生仔期 MK-801 慢性投与が MK-801 および scopolamine 誘発性過活動に及ぼす影響【実験 1】

##### 目的

新生仔期にグルタミン酸 NMDA 受容体を慢性的に遮断されたラットは、成体期において、移動活動量を亢進させる作用を持つ薬物に対して高い感受性を示すことが数々の先行研究によって示されてきた。特に、新生仔期に NMDA 受容体拮抗薬を投与されたラットは amphetamine や quinpirole、LY171555 などのドーパミン受容体作用薬や、PCP などの NMDA 受容体拮抗薬により誘発される移動活動量が統制群と比較して有意に高い。新生仔期 NMDA 受容体遮断動物において、ドーパミン D2 受容体や NMDA 受容体の増加、ドーパミン合成酵素やドーパミンの代謝産物の増加が観察されており、このような神経化学的变化は、この動物が示す薬物誘発性移動活動量の亢進とよく相関しているようにみえる。このことを考慮すると、移動活動量の変化を指標として各種薬物への感受性について検討することは、新生仔期 NMDA 受容体遮断によって生じた神経化学的变化を推測するうえで有効であると考えられる。これまで新生仔期 NMDA 受容体遮断が成体期における薬物誘発性移動活動量亢進に及ぼす影響について検討した研究は、ドーパミン受容体作動薬および NMDA 受容体拮抗薬の効果について調べたものが主であり、同じように移動活動量亢進作用を持つその他の薬物に関してはほとんど検討が行われていない。例えば、ムスカリン性アセチルコリン受容体の拮抗薬である scopolamine は移動活動量を増加させることが知られているが、

scopolamine 誘発性過活動に対する新生仔期 NMDA 受容体遮断の影響についてはこれまで報告されていない。ムスカリン性アセチルコリン受容体は多様な認知機能および行動の調節に関与しているため、この受容体の機能的変化について検討することは、新生仔期 NMDA 受容体遮断によって生じる行動異常の神経学的基盤を明らかにするためにも重要である。先行研究から、新生仔期 NMDA 受容体遮断が、中枢神経系におけるムスカリン受容体の発現を変化させることが報告されているが (du Bois et al., 2009b)、このようなムスカリン受容体の変化が、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの行動調節に関与しているのかどうかは明らかではなかった。そこで実験 1 では、ムスカリン受容体および NMDA 受容体を介した神経伝達の変化が新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの行動調節に関与している可能性について検討を行った。そのために、生後 7 日から 20 日にわたってラットに MK-801 を投与し、このラットが成体に達した時点で、NMDA 受容体拮抗薬である MK-801 またはムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬である scopolamine を急性投与し、投与直後 40 分間の移動活動量をオープンフィールドを用いて測定を行った。

## 方法

### 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 35 匹を使用した。MK-801 急性投与のテストでは、新生仔期 SAL 処置群 10 匹、新生仔期 MK-801 処置群 9 匹を使用した。Scopolamine 急性投与のテストにおいては、新生仔期 SAL 処置群 9 匹、新生仔期 MK-801 処置群 7 匹を使用した。実験開始時に 14～16 週齢であった。3、4 匹ずつプラスチックケージで飼育し、実験期間中、餌および水を自由に摂取させた。

## 統計的検定

40 分間の行動テストにおける移動活動量について、新生仔期処置を群間要因、急性投与した薬物と 5 分毎のブロックのそれぞれを個体内要因とした 3 要因分散分析を行った。分散分析の結果、有意差が認められた場合、Bonferroni 法を用いて多重比較を行った。

## 結果

MK-801 あるいは SAL 急性投与後 40 分間の移動活動量の変化および総移動活動量を Fig. 3-1 に示した (Fig. 3-1A, B)。新生仔期処置の両群において、SAL 急性投与後の移動活動量は時間とともに徐々に減少した。一方で、MK-801 急性投与は両群の移動活動量を増大させたが、その効果は特に新生仔期 MK-801 群において著しく、またより速やかに現れた。MK-801 急性投与の効果に関して、繰り返しのある 3 要因分散分析 (新生仔期処置 × 薬物 × ブロック) を行ったところ、新生仔期処置の主効果 ( $F(1,17)=87.83, p<.01$ ) と薬物の主効果 ( $F(1,17)=20.33, p<.01$ ) が有意であった。また、薬物と新生仔期処置 ( $F(1,17)=6.36, p<.05$ )、薬物とブロック ( $F(7,119)=30.98, p<.01$ )、ブロックと新生仔期処置 ( $F(7,119)=2.64, p<.05$ ) の交互作用がいずれも有意であった。多重比較を行ったところ、SAL 急性投与時の新生仔期 MK-801 処置群の移動活動量は新生仔期 SAL 処置群と比較して有意に高かった ( $p<.05$ )。また MK-801 急性投与によって、新生仔期 MK-801 処置群および SAL 処置群の移動活動量は SAL 急性投与時と比較して有意に増加した。MK-801 急性投与時の新生仔期 MK-801 処置群の移動活動量は新生仔期 SAL 処置群と比較して有意に高く ( $p<.01$ )、MK-801 急性投与の移動活動量亢進作



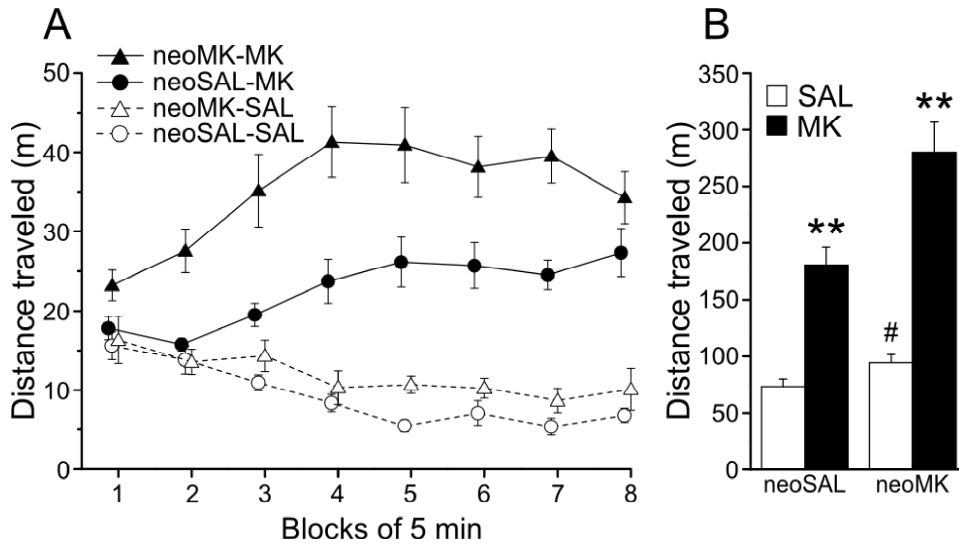


Fig. 3-1 新生仔期 MK-801 投与ラットおよび SAL 投与ラットの移動活動量に及ぼす MK-801 (MK, 0.2 mg/kg) 急性投与の効果。A: 薬物の急性投与直後の 40 分間における新生仔期 MK-801 投与ラット (neoMK) と SAL 投与ラット (neoSAL) の移動活動量の変化。B: 薬物急性投与直後の 40 分間における新生仔期 MK-801 投与ラット (neoMK) および SAL 投与ラット (neoSAL) の総移動活動量。値は平均値、バーは標準誤差を表す。\*\* SAL 急性投与条件と比較して 1%水準で有意。# neoSAL と比較して 5%水準で有意。

用は新生仔期 MK-801 処置群においてより顕著であった。

Scopolamine あるいは SAL 急性投与後 40 分間の移動活動量の変化および総移動活動量を Fig. 3-2 に示した (Fig. 3-2A, B, C)。新生仔期処置の両群において、SAL 急性投与後の移動活動量は時間とともに徐々に減少した。一方、scopolamine 急性投与後の移動活動量の変化は新生仔期の処置によって異なり、新生仔期 MK-801 群では 40 分間を通して移動活動量が減少しなかったが、新生仔期 SAL 群では SAL 急性投与時と同様に徐々に減少していった。Scopolamine 急性投与の効果について、繰り返しのある 3 要因分散分析 (新生仔期処置 × 薬物 × ブロック) を行ったところ、新生仔期処置の主効果 ( $F(1,14)=23.56, p<.01$ )、薬物の主効果 ( $F(2,28)=15.50, p<.01$ )、ブロックの主効果 ( $F(7,98)=17.41, p<.01$ ) が有意であった。また、薬物と新生仔期処置 ( $F(2, 28)=6.58, p<.01$ )、薬物とブロック ( $F(14,196)=8.56, p<.01$ )、薬物とブロックと新生仔期処置の交互作用 ( $F(14,196)=4.73, p<.01$ ) が有意であった。多重比較を行ったところ、SAL 急性投与後の新生仔期 MK-801 処置群の移動活動量は、新生仔期 SAL 処置群の移動活動量と比較して有意に高かった ( $p<.01$ )。さらに、新生仔期 SAL 処置群において、SAL 急性投与時と 0.4mg/kg あるいは 2.0mg/kg の scopolamine 急性投与時の移動活動量との間に有意な差はみられなかった。しかし、新生仔期 MK-801 処置群において、0.4mg/kg あるいは 2.0mg/kg の scopolamine 急性投与は SAL 急性投与時と比較して有意に移動活動量を増加させた (ともに  $p<.01$ )。

### 考察

本実験の結果、薬物無投与下 (急性 SAL 投与時) において、新生仔期 MK-801 ラットは SAL 群よりも有意に高い活動量を示した。また急性

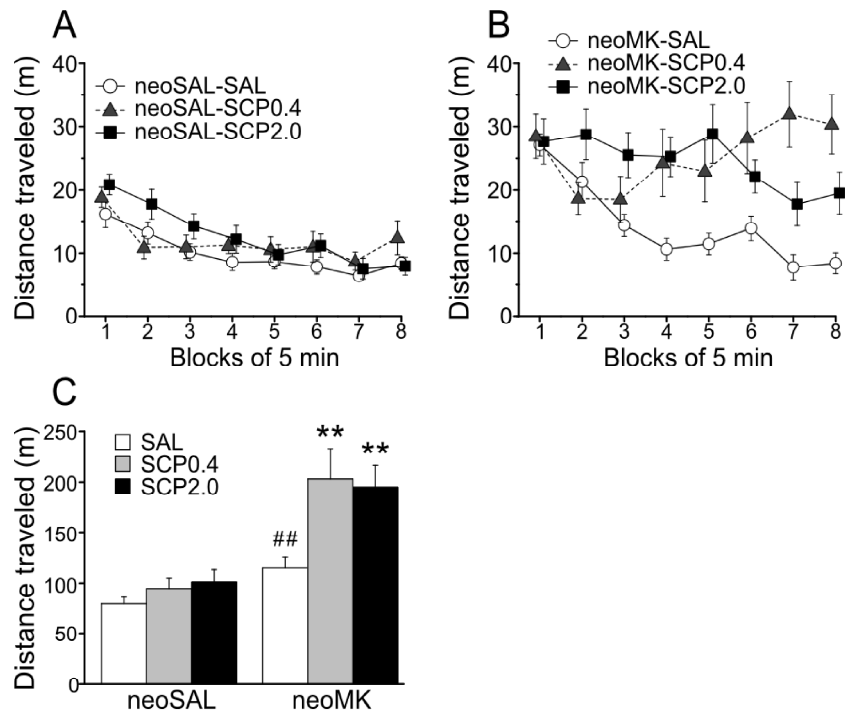


Fig. 3-2 新生仔期 MK-801 投与ラット (neoMK) および SAL 投与ラット (neoSAL) の移動活動量に及ぼす scopolamine (SCP, 0.4, 2.0 mg/kg) 急性投与の効果。薬物の急性投与直後の 40 分間における新生仔期 SAL 投与ラット(A) と MK-801 投与ラット(B) の移動活動量の変化。C: 薬物急性投与直後の 40 分間における新生仔期 MK-801 投与ラット (neoMK) および SAL 投与ラット (neoSAL) の総移動活動量。平均値および SEM を示す。 \*\* SAL 急性投与条件と比較して 1%水準で有意。 ## neoSAL と比較して 1%水準で有意。

MK-801 投与は新生仔期処置の両群において移動活動量を亢進させ、その効果は新生仔期 MK-801 群においてより顕著であった。一方、急性 scopolamine 投与は新生仔期 SAL 群の移動活動量を変化させなかったものの、新生仔期 MK-801 群においては有意に移動活動量を増加させた。

本実験において、新生仔期 MK-801 慢性処置は、成体期における急性 MK-801 による移動活動量亢進作用に対する感受性を増大させた。新生仔期 NMDA 受容体遮断によって生じる成体期の NMDA 拮抗薬に対する感受性の増加は、神経生理学的データによっても示されている。例えば、Gorter et al. (1992b) は、新生仔期に MK-801 を慢性投与された成体ラットにおいて、競合的 NMDA 受容体拮抗薬 AP5 の LTP 抑制作用が増大していることを示した。このことは、新生仔期に NMDA 受容体が慢性的に遮断されることによって、成体期において NMDA 受容体の感受性が亢進することを示唆している。この考えを支持する証拠が、いくつかの先行研究によって示されている。先行研究において、新生仔期に NMDA 受容体拮抗薬を投与されたラットでは、成体期に前頭前皮質 (PFC) を含むいくつかの脳領域における NMDA 受容体の結合数が増加していることが報告されている (du Bois et al., 2009a; Sircar, 2003)。PFC への NMDA 受容体拮抗薬の局所投与によって移動活動量が増加する (Del Alco et al., 2008; Feenstra et al., 2002; Jentsch et al., 1998) ことから、本実験において観察された急性 MK-801 投与に対する感受性の増加は、部分的には PFC における NMDA 受容体のアップレギュレーションを反映している可能性が考えられる。新生仔期 NMDA 受容体遮断によって生じる NMDA 受容体の感受性亢進における他の脳部位の関与に関しては、今後さらなる検討が必要である。NMDA 受容体拮抗薬が過活動を誘発するメカニズムは完全には解明されていないが、NMDA 受容体拮抗薬がドー

パミン放出を生じ、これにより移動活動量が増加するとの見方がある。この見方からすると、新生仔期 MK-801 投与ラットにみられた MK-801 誘発性過活動の亢進は、NMDA 受容体の機能的変化が原因ではなく、ドーパミン神経系の変化に起因する可能性も考えられる。しかし、マイクロダイアリシスを用いた研究により、NMDA 受容体拮抗薬投与後のドーパミン放出量の推移と移動活動量の推移とが完全には一致しないこと (Feenstra et al., 2002; Takahata & Moghaddam, 2003) や、ドーパミン作動性神経において選択的にチロシン水酸化酵素が不活性化されドーパミン合成が阻害されたマウスにおいても NMDA 受容体拮抗薬投与により過活動が生じること (Chartoff et al., 2005) から、本実験で観察された MK-801 誘発性過活動の亢進は、ドーパミン神経系の変化のみでは説明できないと考えられる。

本実験の結果とは異なり、いくつかの先行研究において、新生仔期 NMDA 受容体遮断が、成体期における NMDA 受容体拮抗薬の移動活動量亢進作用に対する感受性を変化させない、あるいは感受性を低下させることが報告されている (Facchinetti et al., 1993; Sircar & Soliman, 2003)。これらの先行研究の結果と本研究の結果との間の不一致を生じさせた原因として、2つの可能性が挙げられる。まず1つは、成体期における NMDA 受容体の感受性亢進は、新生仔期 NMDA 受容体遮断をいつ行ったかに依存するかもしれないということである。この仮説は、生後 7, 9, 11 日における 10 mg/kg の PCP 投与は、その後の急性 PCP 投与による移動活動量亢進作用を増強させるのに対して、生後 7 日目にのみ 20 mg/kg の ketamine を 6 回投与しても、後の ketamine 誘発性移動活動量亢進には影響を与えないという報告に基づいている。彼女らの研究で新生仔期処置に用いられた PCP と ketamine の用量は、どちらも投与

翌日において神経変性が観察されるのに十分な用量 (Ikonomidou et al., 1999) であり、NMDA 受容体に対する拮抗作用が不十分であったとは考えにくい。2 つ目の可能性は、成体期における NMDA 受容体感受性の亢進の生起には、新生仔期処置に用いられる薬物の用量が重要な要素であるということである。実際のところ、1~5 mg/kg という比較的低用量での PCP 処置は、後の急性 PCP 投与による移動活動量亢進に対して影響を及ぼさなかった (Sircar & Soliman, 2003)。このように、新生仔期 NMDA 受容体遮断により引き起こされる、成体期における NMDA 受容体感受性の変化は、新生仔期処置が行われた時期と新生仔期処置に用いられた薬物の用量に依存することが示唆された。

本実験において、新生仔期 MK-801 慢性処置は、成体期における急性 scopolamine 投与の移動活動量亢進作用に対する感受性を増加させた。このことは、新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断によって成体期におけるムスカリン受容体の感受性が増加することを示唆している。新生仔期の NMDA 受容体拮抗薬投与が後のムスカリン受容体を介した神経伝達に及ぼす影響について調べた研究は非常に少ないが、du Bois (2009b) は、生後 7, 9, 11 日の PCP 投与によって、成体期の前頭前皮質におけるムスカリン M1/4 受容体の結合数が増加することを報告している。du Bois (2009b) の研究で検討されたのは前頭前皮質と海馬におけるムスカリン受容体についてのみであるが、本研究の結果は、前頭前皮質や海馬だけでなく、その他の脚橋被蓋核 (PPT) や背外側被蓋核 (LDT) のような移動活動量の調節に関与する部位 (Chapman et al, 1997; Mathur et al., 1997) におけるムスカリン受容体の感受性が増加している可能性を示唆する。PPT と LDT のコリン作動性神経は、それぞれドーパミン神経の起始核である黒質と腹側被蓋野に投射しており、PPT あるいは LDT の

電氣的刺激はそれぞれ線条体と黒質でのドーパミン放出を引き起こす (Foster & Blaha, 2000, 2003)。黒質－線条体系および中脳－辺縁系ドーパミン神経系は活動性の調節に関与する部位と目され、ムスカリン受容体拮抗薬の PPT および LDT への局所投与は、PPT と LDT のコリン作動性神経の細胞体に存在する抑制性ムスカリン自己受容体を不活性化することにより線条体と側坐核におけるドーパミン放出を増加させ (Chapman et al., 1997)、その結果、過活動を生じさせると考えられる (Mathur et al., 1997)。しかしながら、scopolamine に対する感受性亢進におけるこれらの脳部位の関与については現在のところ明らかではない。

急性 scopolamine 投与による移動活動量の亢進は、よく知られた現象である。しかし本実験の結果では、予想とは異なり急性 scopolamine 投与は統制群 (新生仔期 SAL 群) の移動活動量を変化させなかった。特定の環境において繰り返し scopolamine のテストを受けたマウスは、scopolamine の移動活動量亢進作用に対する耐性を速やかに獲得する (Kuribara & Tadokoro, 1983; Fujii et al., 1990) ことが報告されており、同一のラットがすべての薬物条件を同一の環境で繰り返しテストされるという本実験の実験デザインが、急性 scopolamine 投与の移動活動量亢進効果に影響した可能性が考えられる。

結論として、本実験は、新生仔期における NMDA 受容体の慢性的な遮断は、その新生仔期処置が特定の時期に行われ、またその処置に用いられた薬物の用量が十分であった場合に、成体期の NMDA 受容体の感受性を増加させることを示唆している。さらに、NMDA 受容体のみならず、新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断は、処置の終了から長期間経過した後でさえも、ムスカリン性アセチルコリン受容体の感受性亢進を生じさせる

ことが示唆された。そしてこれらの受容体を介した神経伝達の変化が新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの行動調節に影響している可能性が示唆された。



## 第 2 節 成体期 MK-801 慢性投与が MK-801 誘発性過活動に及ぼす影響

### 【実験 2】

#### 目的

実験 1 の結果より、新生仔期 MK-801 慢性投与ラットは、処置から長期間が経過した後であっても、その後の MK-801 誘発性過活動の亢進を示し、新生仔期処置によって成体期の NMDA 受容体の感受性が増加していることが示唆された。このことは、新生仔期という脳の発達において重要な期間における NMDA 受容体の機能阻害が、その後の当該受容体を介した神経伝達の異常を引き起こし、その影響は長期にわたって持続するものであることを意味している。しかし、このような NMDA 受容体慢性遮断の効果は、新生仔期に処置を行った場合に特有のものであるのか、あるいは成体期において同様の処置を行った場合にも同様の効果がみられるのかについては明らかではない。そこで実験 2 では、成体期のラットに MK-801 を慢性投与し、後に MK-801 を急性投与した際の移動活動量の変化について調べることによって、成体期の NMDA 受容体慢性遮断が、その後の NMDA 受容体を介した神経伝達に及ぼす影響について検討した。

#### 方法

##### 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 21 匹を使用した。成体期 SAL 処置群は 11 匹、成体期 MK-801 処置群は 10 匹であった。ラットの実験開始時の週齢は約 16 週齢であった。3、4 匹ずつプラスチックケージで飼育し、実験期間中、餌および水を自由に摂取させた。

## 統計的検定

40 分間の行動テストにおける移動活動量について、成体期処置を群間要因、急性投与した薬物と 5 分毎のブロックのそれぞれを個体内要因とした 3 要因分散分析を行った。分散分析の結果、有意差が認められた場合、Bonferroni 法を用いて多重比較を行った。

## 結果

MK-801 あるいは SAL 急性投与後 40 分間の移動活動量の変化および総移動活動量を Fig. 3-3 に示した (Fig. 3-3A, B)。MK-801 急性投与の効果に関して、繰り返しのある 3 要因分散分析 (成体期処置 × 薬物 × ブロック) を行ったところ、薬物の主効果 ( $F(1,38)=61.91, p<.01$ ) およびブロックの主効果 ( $F(7,266)=3.41, p<.05$ ) が有意であった。また、薬物とブロックの交互作用 ( $F(7,266)=28.09, p<.01$ ) が有意であった。成体期処置の主効果は有意ではなく、SAL 急性投与時の移動活動量について成体期 MK-801 処置群と成体期 SAL 処置群との間で有意な差はなかった。また MK-801 急性投与によって、成体期 MK-801 処置群および SAL 処置群の移動活動量は SAL 急性投与時と比較して有意に増加した。MK-801 急性投与時の成体期 MK-801 処置群の移動活動量は成体期 SAL 処置群と同等であり、両群における MK-801 急性投与の移動活動量亢進作用に差はみられなかった。

## 考察

成体期 MK-801 投与ラットは、ベースラインにおいて統制群と同等の移動活動量を示した。また、MK-801 の急性投与によって、成体期 MK-801 群と成体期 SAL 群はともに移動活動量の増加を示し、その効果に両群間

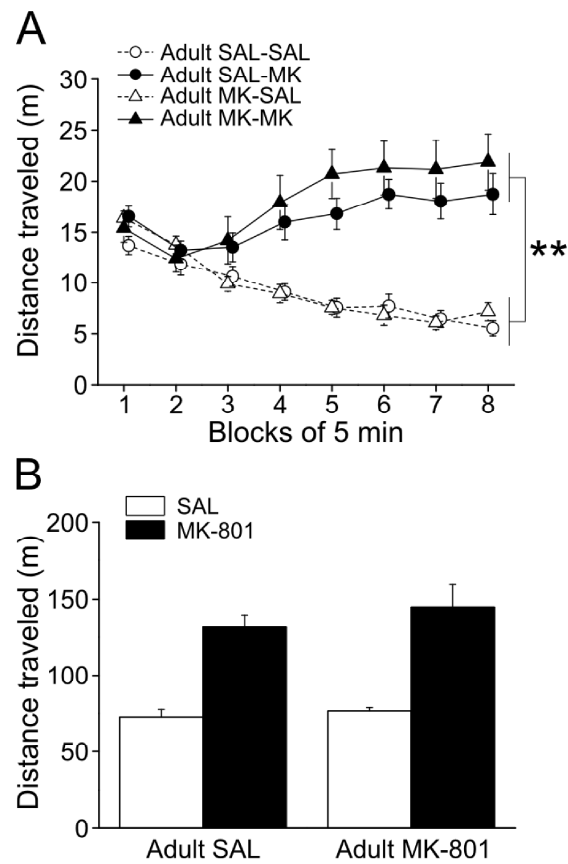


Fig. 3-3 成体期 MK-801 投与ラットおよび SAL 投与ラットの移動活動量に及ぼす MK-801 (0.2 mg/kg) 急性投与の効果。A: 薬物の急性投与直後の 40 分間における成体期 MK-801 投与ラット (neoMK) と SAL 投与ラット (neoSAL) の移動活動量の変化。B: 薬物急性投与直後の 40 分間における成体期 MK-801 投与ラット (Adult MK-801) および SAL 投与ラット (Adult SAL) の総移動活動量。値は平均値、バーは標準誤差を表す。 \*\* SAL 急性投与条件と比較して 1%水準で有意。

で差はみられなかった。

成体期 MK-801 投与ラットは、MK-801 急性投与の移動活動量亢進作用に対して、統制群と同等の感受性を示した。このことは、成体期の NMDA 受容体慢性遮断は、その後の NMDA 受容体を介した神経伝達に影響しないことを示唆する。本実験の結果とは異なり、NMDA 受容体拮抗薬の反復投与が、後の単回投与による移動活動量亢進作用への鋭敏化をもたらすという報告もある。MK-801 に類似の非競合的 NMDA 受容体拮抗薬である PCP は、MK-801 と同様に急性投与することによってラットの移動活動量を亢進させ、また PCP の反復投与は、この薬物の移動活動量亢進作用に対する鋭敏化を生じさせる (Johnson et al., 1998; Phillips et al., 2001)。本実験の結果と PCP 反復投与の結果との不一致は、おそらくこの 2 つの薬物の薬理作用の違いに起因するものと考えられる。PCP は NMDA 受容体への作用とは独立して、ドーパミントランスポーターに作用しドーパミンの再取り込みを阻害する働きを持つ (Johnson & Snell., 1985; Vignon et al., 1988) ことから、PCP 反復投与による単回投与への鋭敏化は、ドーパミン伝達の変化を介したものであると推測される。事実、PCP の反復投与は d-amphetamine の移動活動量亢進作用に対する感受性を増加させるが、NMDA 受容体に対してより選択的に作用する MK-801 の反復投与は d-amphetamine に対する感受性を変化させない (Saillier & Giuffrida, 2009)。以上のことから、成体期における NMDA 受容体のより選択的な慢性遮断は、後の NMDA 受容体の感受性の変化には影響しないことが示唆される。

新生仔期 MK-801 慢性投与が後の NMDA 受容体の感受性を変化させたのに対して、成体期の MK-801 慢性投与はその後の NMDA 受容体の感受性を変化させなかった。このような新生仔期処置と成体期処置の効

果の違いには、発達の時期的による NMDA 受容体の感受性の違いが影響しているものと考えられる。McDonald & Johnston (1990) は成体期と比べて生後 2~4 週間の間は、NMDA 受容体の感受性が高い状態にあることを報告している。また最近、新生仔期の NMDA 受容体は NMDA 受容体拮抗薬の作用に対してより敏感であることが電気生理学的な手法によって明らかにされている。生後 7 日齢のラットと 3~4 週齢のラットから採取した脳スライスにおいて、パッチクランプ法を用いて興奮性シナプス後電流 (excitatory post synaptic current; EPSC) を記録したところ、ベースラインの EPSC の振幅には差がなかったが、非競合的 NMDA 受容体拮抗薬 ketamine による EPSC の減弱作用の程度は 7 日齢の脳でより大きく、またこの作用は ketamine のウォッシュアウト後 6 時間にわたって持続した (Jin et al., 2013)。未成熟な脳における NMDA 受容体の感受性の高さが、どのようなメカニズムを背景として生じているのかは完全には解明されていないものの、NMDA 受容体慢性遮断の効果が、成体期よりも新生仔期に処置を行った際に、より深刻な影響をその後の行動に及ぼすことを説明するものと考えられる。

総合すると、成体期の NMDA 受容体遮断は、新生仔期に処置を行った場合とは異なり、その後の MK-801 誘発性過活動を亢進させることはなかった。本実験より、成体期 NMDA 受容体遮断はその後の NMDA 受容体を介した神経伝達に影響を及ぼさないことが示され、生後の神経発達における NMDA 受容体の重要性がより強調されることとなった。

## 第 4 章 新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの条件性場所選好

### 第 1 節 新生仔期 MK-801 慢性投与が成体期の **methamphetamine** による条件性場所選好に及ぼす影響【実験 3】

#### 目的

新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断ラットが空間学習課題・空間記憶課題において障害を示すことはよく確立されている。しかし、条件づけパラダイムを利用して新生仔期 NMDA 受容体遮断の効果を検討した研究は非常に少なく、そのため新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断ラットにおいて、単純な刺激と刺激との連合が正常に行われているのかは不明であった。新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットは餌を報酬とした学習・記憶課題において障害を示すことが報告されているため、新生仔期 NMDA 受容体遮断によって特定の刺激と報酬との連合が障害されているという可能性も考えられる。そこで本実験では、新生仔期 NMDA 受容体遮断が特定の刺激と報酬との連合に及ぼす影響について調べるために、新生仔期に MK-801 を投与したラットが成体に達した後に、強い報酬特性を持つ MAP を用いて条件性場所選好テストを行った。

#### 方法

##### 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 17 匹を使用した。新生仔期 SAL 処置群は 9 匹、新生仔期 MK-801 処置群は 8 匹であった。実験開始時に約 16 週齢であった。

## 統計的検定

ベースライン測定時の白色および黒色部屋における滞在時間から、各個体のそれぞれの部屋に対する選好を調べ、選好される部屋とそうでない部屋での滞在時間を各新生仔期処置群で平均し、新生仔期処置を群間要因、部屋を個体内要因として、2 要因の分散分析を行った。ベースライン測定と条件づけ後の選好テストにおける条件づけ期に MAP と対提示された部屋に対する選好率については、t 検定を用いて、それぞれを理論的なチャンスレベル (50%) と比較した。また各部屋間を移動した回数について、ベースライン測定時と選好テストをそれぞれ別個に、新生仔期処置群間で t 検定を用いて比較を行った。

## 結果

ベースライン測定時での各新生仔期処置群で選好の高い部屋と選好の低い部屋における滞在時間を Fig. 4-1 に示した。新生仔期処置×部屋の 2 要因分散分析の結果、部屋の主効果が有意であった ( $F(1,15)=20.89$ ,  $p<.01$ )。新生仔期処置の主効果は有意ではなかった。ベースライン測定において、各新生仔期処置群は特定の部屋に対する選好を示し、白色および黒色部屋における総滞在時間に群間で差はみられなかった。

ベースライン測定および選好テストにおける部屋間の平均移動回数を Fig. 4-2 に示した (Fig. 4-2A, B)。t 検定の結果、ベースライン測定時の新生仔期 MK-801 群の移動回数は、新生仔期 SAL 群と比較して有意に多かった ( $t(15)=2.43$ ,  $p<.05$ )。また選好テストにおいても同様に、新生仔期 MK-801 群の移動回数は、新生仔期 SAL 群と比較して有意に多かった ( $t(15)=3.88$ ,  $p<.01$ )。

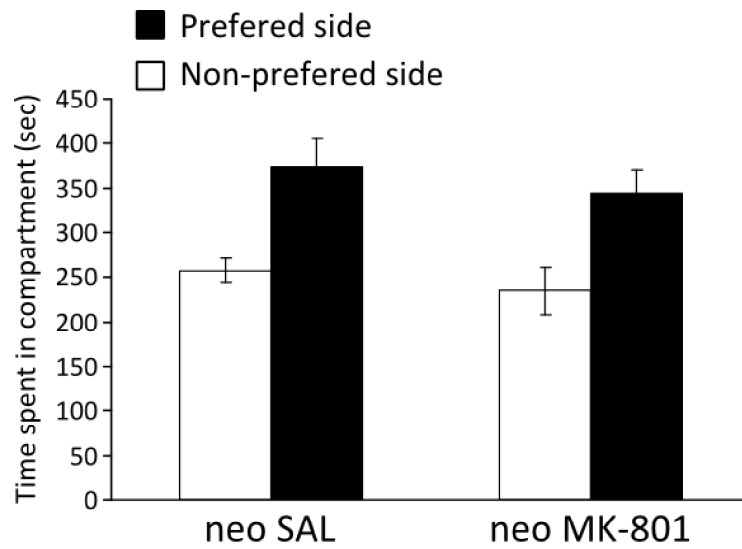


Fig. 4-1 15分間のベースライン測定において新生仔期 MK-801 処置群と新生仔期 SAL 処置群の各個体が選好を示した条件づけコンパートメント (Prefered side) とその逆側の条件づけコンパートメント (Non-prefered side) における平均滞在時間 ( $\pm$ SEM)。



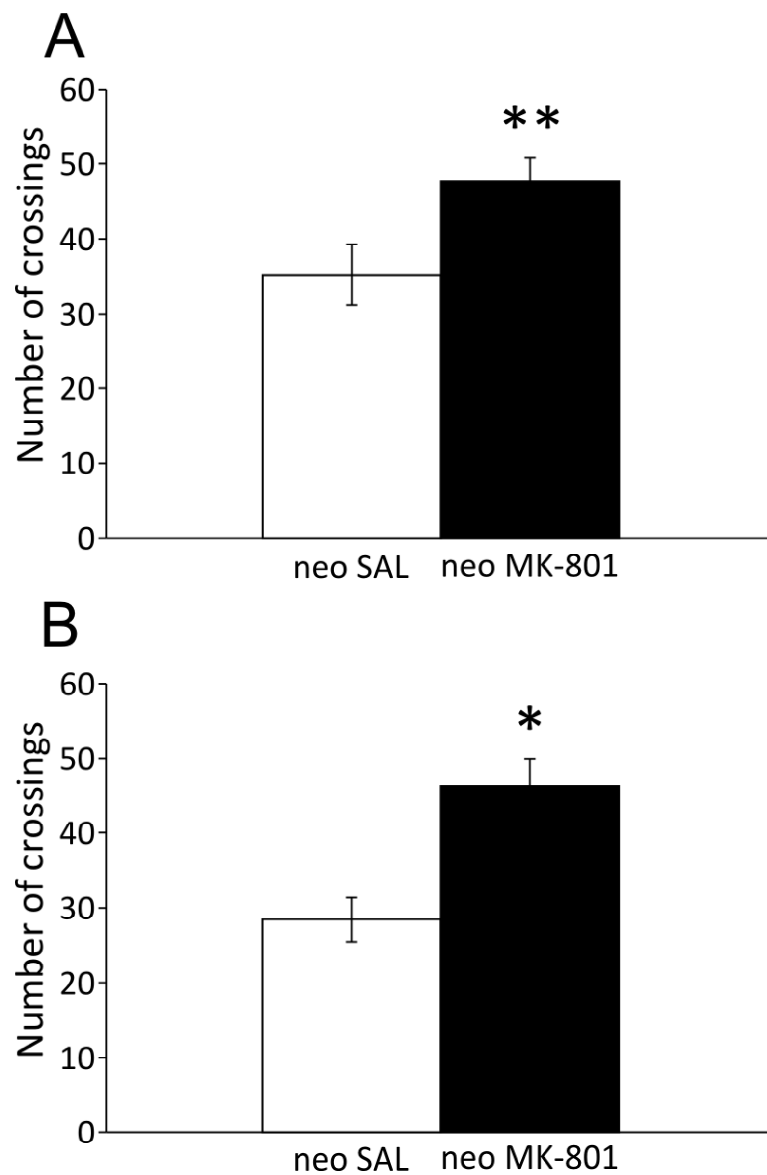


Fig. 4-2 新生仔期 MK-801 投与ラット (neo MK-801) および新生仔期 SAL 投与ラット (neo SAL) のベースライン測定 (A) と条件づけ後の選好テスト (B) における各コンパートメント間の平均移動回数 (±SEM)。SAL 急性投与条件と比較して\* 5%水準、 \*\* 1%水準で有意。

ベースライン測定および選好テストにおける、条件づけ時に MAP と対提示された部屋に対する平均選好率を Fig. 4-3 に示した。各群の平均選好率をチャンスレベルと比較した結果、ベースライン測定時の選好率は新生仔期 MK-801 群と新生仔期 SAL 群の両群においてチャンスレベルとの間に有意な差はみられなかった。しかし条件づけ後の選好テストにおける選好率は、新生仔期 SAL 群においてはチャンスレベルより有意に高かった ( $t(8)=3.75, p<.01$ )。一方で、新生仔期 MK-801 群においてはチャンスレベルとの間に有意な差はみられなかった。

#### 考察

条件づけ後の選好テストにおいて、新生仔期 SAL 処置群は条件づけ期に MAP と対提示された部屋に対して選好を示し、条件性場所選好の成立が示された。一方で、新生仔期 MK-801 処置ラットは MAP と対提示された部屋に対して選好を示さなかった。また新生仔期 MK-801 群はベースライン測定と選好テストのいずれにおいても新生仔期 SAL 群より有意に高い移動回数を示した。

本実験の結果、新生仔期に MK-801 を慢性的に投与されたラットは MAP と繰り返し対提示された部屋に対して選好を示さず、新生仔期 NMDA 受容体遮断によって成体期の MAP による条件性場所選好が障害されることが示された。条件性場所選好が阻害された原因として、いくつかの可能性が挙げられる。その 1 つ目は、新生仔期 NMDA 受容体遮断が報酬特性への感受性を減少させたというものである。しかし、新生仔期 MK-801 投与ラットは、放射状迷路課題において餌報酬を得るために統制群よりも有意に高い走行速度を示すため (Kawabe et al., 2007)、このラットは好ましい刺激の持つ報酬性に対する感受性を保持しており、

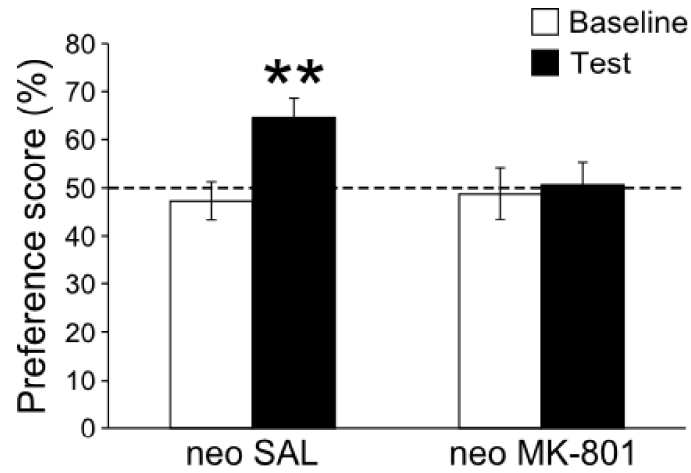


Fig. 4-3 条件づけ期に MAP と対提示されたコンパートメントに対する新生仔期 MK-801 投与ラット (neo MK-801) および新生仔期 SAL 投与ラット (neo SAL) の平均選好率 (±SEM)。\*\* チャンスレベル (50%) と比較して 1%水準で有意。

また快刺激に接近しようとする動機づけも備えていることが示唆される。このように、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットにおいて報酬性に対する感受性が減少している可能性は低いと思われるものの、これまで直接的な検討は行われていない。学習などを必要としない手法を用いて直接検討を行う必要がある。2 つ目の解釈として、新生仔期 NMDA 受容体遮断によって、特定の刺激と報酬性とを連合する能力が障害されることが考えられる。条件性場所選好の成立の基礎として、条件づけに用いられる薬物によって引き起こされる心地よい内的状態と、その薬物が投与された環境との連合が生じていると考えられている (Bardo & Bevins, 2000)。上述のように、新生仔期 MK-801 投与ラットにおいて、報酬性の感受性低下や動機づけの減少は生じていないと推測されるため、このラットにおいて条件性場所選好の成立が阻害されたのは、報酬性と環境とを連合する能力が障害されたことによるとする解釈が有力であると思われる。刺激と刺激との連合は最も基礎的な学習様式の一形態と考えられるため、報酬性の連合の失敗はこの動物における様々な行動に影響を及ぼしているものと考えられる。

条件性場所選好における報酬と文脈との連合は、複数の脳部位によって仲介されている。一つには前頭前皮質 (PFC) が挙げられる。PFC の神経毒損傷は、コカインによる条件性場所選好の獲得を阻害する (Isaac et al., 1989)。新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの PFC において、ドパミン伝達の亢進を示唆する DOPAC/ドパミン比の増加が観察されていることを考えると、新生仔期 MK-801 投与は条件性場所選好を促進する可能性も予想されたものの、実際にはむしろ条件性場所選好の減少が示された。新生仔期の NMDA 受容体遮断は、成体期において PFC の機能低下を生じることが報告されている。新生仔期に MK-801 を投与された

ラットは、セットシフティング課題遂行の障害を示す (Stefani & Moghaddam, 2005)。セットシフティング課題の遂行は PFC の損傷や同部位へのドーパミン作用薬および拮抗薬の投与によって阻害されることが報告されている (Birrel & Brown, 2000; Floresco, 2013; Floresco et al., 2006)。新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットにおける条件性場所選好の障害には、ドーパミン伝達の異常による PFC の機能失調が関与している可能性がある。PFC の他に条件性場所選好の成立に寄与する部位として海馬が挙げられる。Ito et al. (2006) は、両側海馬損傷がスクロースによる条件性場所選好を阻害することを報告している。新生仔期に PCP を投与されたラットの海馬では、NMDA 受容体や GABA 受容体の受容体結合数が増加するなどの神経化学的異常が観察されており (du Bois et al., 2009a; Sircar, 2003)、海馬依存である空間学習課題の障害もみられる。以上のように、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットにおいて、PFC や海馬の機能が障害されており、条件性場所選好の障害はこれらの脳部位の機能失調によるものであると推測される。ただし、報酬性の連合学習には、PFC と海馬の他に多数の脳領域が関与しており、これらの領域の機能的連結が条件性場所選好の成立に必要であることも示されている。新生仔期 NMDA 受容体遮断による条件性場所選好の障害にいずれの脳部位の変化が関与しているのかについては今後の詳細な検討が必要である。

選好テストにおいて、新生仔期 MK-801 投与ラットは、高い移動回数を示した。このラットの示す条件性場所選好の障害は、この活動性の増加によって、薬物と条件づけられた部屋にとどまろうとする行動が妨げられたことが原因である可能性も考えられる。実際、新生仔期 NMDA 受容体遮断は一般的に活動性を増加させる。しかしベースライン測定において、このラットは選好テストと同様に高い移動回数を示しているも

のの、それぞれの個体は特定の部屋に対する選好を持っており、選好の低い部屋よりも多くの時間そこに滞在している。このことから、新生仔期 MK-801 投与ラットにおいて、活動性の増加は場所選好の表出を阻害していないことが示唆される。

結論として、新生仔期 MK-801 慢性投与は、成体期における MAP による条件性場所選好の成立を阻害したことから、新生仔期の慢性的な NMDA 受容体遮断が、後の報酬性の連合を障害する可能性が示唆された。ただし、新生仔期 NMDA 受容体遮断が報酬性への感受性に及ぼす影響に関しては改めて検証する必要がある。本実験で確認された新生仔期 MK-801 投与ラットの条件性場所選好障害には、このラットで異常が報告されている PFC や海馬などに加え、これらの部位と協調して条件性場所選好成立に貢献する脳領域の変化も関与する可能性が考えられ、そのような変化を特定することは、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの示す種々の行動異常の神経基盤を明らかにするうえで重要な知見をもたらすものと思われる。

## 第 2 節 新生仔期 MK-801 慢性投与が成体期のスクロース選好に及ぼす影響【実験 4】

### 目的

実験 3 において、新生仔期 MK-801 処置ラットは MAP による条件性場所選好の障害を示し、新生仔期の NMDA 受容体慢性遮断によって、成体期における報酬と文脈との連合学習が阻害されることが示唆された。しかし、新生仔期 MK-801 処置ラットが示した条件性場所選好の障害は、新生仔期 NMDA 受容体遮断によって、薬物の持つ報酬性とその薬物と対提示された部屋との連合を獲得できないことによるものであるのか、あるいは薬物のもつ報酬性に対する感受性が減少したことによって生じたものであるのかについては、明らかにすることはできなかった。そこで実験 4 では、新生仔期の NMDA 受容体遮断が成体期における報酬性に対する感受性を低下させた可能性について検証するために、新生仔期に MK-801 を投与されたラットが成体に達した後に、スクロース溶液に対する選好を 2 瓶法を用いて測定した。通常、ラットは甘味のする食物や液体を好んで摂取し、これらの刺激は強化子として機能するため、もし新生仔期 NMDA 受容体遮断によって報酬性に対する感受性が低下しているのであれば、新生仔期 MK-801 処置ラットのスクロース溶液に対する選好の減少が観察されることが予測できる。

### 方法

#### 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 20 匹を使用した。新生仔期 SAL 処置群は 11 匹、新生仔期 MK-801 処置群は 9 匹であった。スクロース選好の

実験開始時に 18 週齢であった。実験期間中ラットは個別ケージにて飼育された。実験開始前から実験期間中にかけてラットに摂水制限は施さず、ラットは自由に水を飲むことができた。

## 手続き

**ベースライン測定** スクロース溶液に対する選好を調べるのに先立って、ベースラインにおける 24 時間中の水の摂取量を 3 日間測定した。金属製の飲み口の付いた水瓶に水道水を入れ、ケージ上部に開けられた穴を通してラットに提示した。提示前と提示から 24 時間後、48 時間後、72 時間後の水瓶の重さを計測し、1 日ごとの水の摂取量を算出した。

**スクロース溶液選好テスト** ベースライン測定の翌日から 3 日間、スクロース溶液に対する選好を調べた。選好テストは 2 瓶法にて行い、水道水に溶解した 1、5、10 %のスクロース溶液を各個体につき約 200ml ずつ用意し、水道水の入った瓶とスクロース溶液の入った瓶の 2 つを同時提示した。ケージ上部に開けられた 2 つの穴のうち、どちらの穴からスクロース溶液を提示するかに関しては、各個体ごとに毎日ランダムとなるように決定した。テストは濃度の低いものから順に行い、ベースライン測定の時と同様に、提示前と提示から 24 時間後の水瓶の重さを測定し、24 時間中の水とスクロース溶液の摂取量をそれぞれ算出した。また、水道水とスクロース溶液の摂取量をもとにして、各濃度のスクロース溶液に対する選好率  $[\text{スクロース溶液の摂取量} / (\text{水道水の摂取量} + \text{スクロース溶液の摂取量})] \times 100 (\%)$  を算出した。



## 統計的検定

ベースライン測定における水道水の摂取量に関して、新生仔期処置を群間要因、測定日を個体内要因とする 2 要因の分散分析を用いて検定を行った。選好テストにおけるスクロース溶液選好率について、新生仔期処置を群間要因、スクロース溶液の濃度を個体内要因とする 2 要因分散分析を行った。また、スクロース溶液選好テストにおける溶液摂取量については、新生仔期処置条件を群間要因、溶液の種類とスクロース溶液の濃度を個体内要因とした 3 要因の分散分析を用いて検定を行った。分散分析の結果、有意差が認められた場合、Bonferroni 法を用いて多重比較を行った。

## 結果

3 日間のベースライン測定における水道水の摂取量を Fig. 4-4 に示す。新生仔期処置×測定日の 2 要因分散分析を行った結果、いずれの主効果、交互作用も認められず、新生仔期 SAL 群と新生仔期 MK-801 群の間に有意な差はみられなかった。

選好テストにおけるスクロース溶液に対する選好率を Fig. 4-5 に示す。新生仔期処置の条件に関わらず、ラットは水道水よりスクロース溶液を好んで摂取し、いずれのスクロース濃度においても 90% を超える選好率を示した。新生仔期処置×スクロース溶液濃度の 2 要因分散分析の結果、スクロース溶液濃度の主効果のみ有意であり ( $F(2,36)=3.77, p<.05$ )、スクロース溶液の濃度が高くなるのに従って選好率が上昇した。新生仔期処置の主効果は有意ではなかったものの、新生仔期 MK-801 群の選好率は新生仔期 SAL 群よりも高い傾向があった ( $p=.08$ )。選好テストにおける水道水およびスクロース溶液の摂取量を Fig. 4-6 に示す。新生仔期処

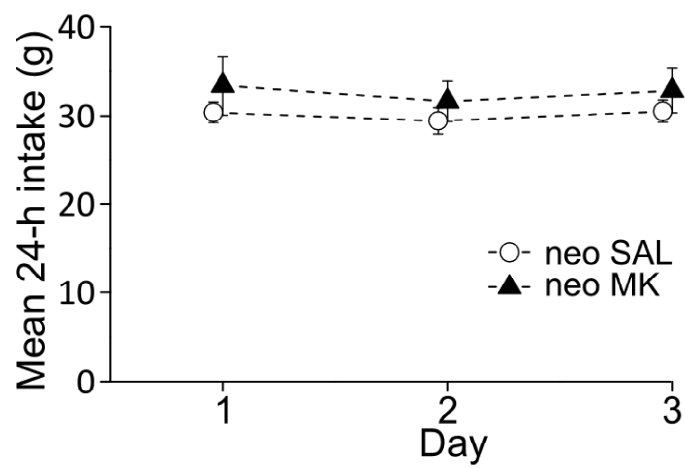


Fig. 4-4 新生仔期 MK-801 投与ラット (neo MK) および新生仔期 SAL 投与ラット (neo SAL) の 3 日間のベースライン測定における 24 時間あたりの平均水道水摂取量 ( $\pm$ SEM)。

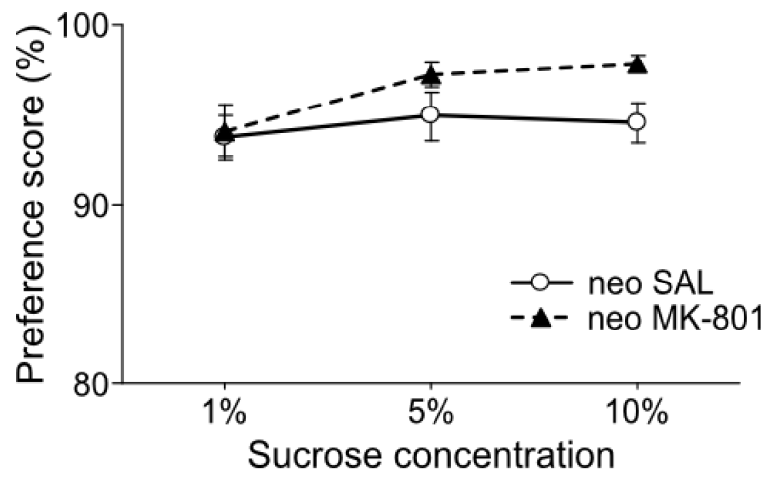


Fig. 4-5 新生仔期 MK-801 投与ラット (neo MK) および新生仔期 SAL 投与ラット (neo SAL) の選好テストにおけるスクロース溶液の平均選好率 (±SEM)。

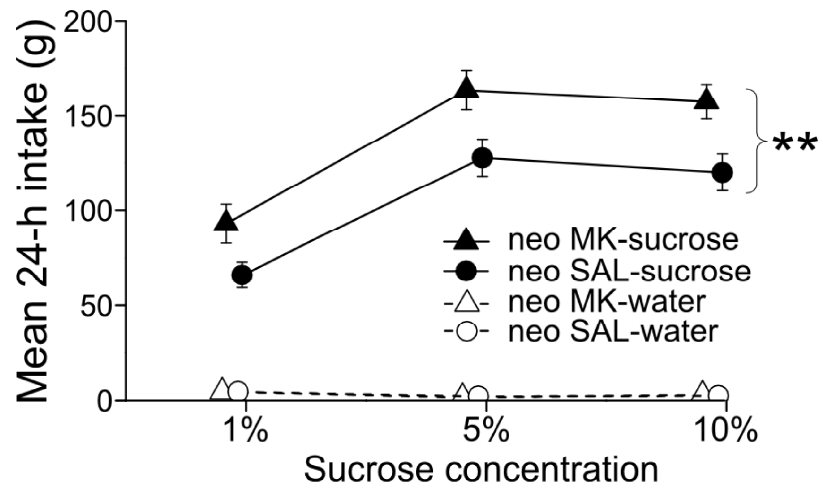


Fig. 4-6 新生仔期 MK-801 投与ラット (neo MK) および新生仔期 SAL 投与ラット (neo SAL) の選好テストにおけるスクロース溶液の平均摂取量 (±SEM)。\*\* neoSAL と比較して 1%水準で有意。

置×溶液の種類×スクロース濃度の 3 要因分散分析を行ったところ、新生仔期処置の主効果 ( $F(1,18)=9.66, p<.01$ )、およびスクロース濃度の主効果 ( $F(2,17)=87.79, p<.01$ )、溶液の種類の主効果 ( $F(1,18)=556.48, p<.01$ ) が有意であった。また、溶液の種類とスクロース濃度 ( $F(2,36)=77.83, p<.01$ )、溶液の種類と新生仔期処置 ( $F(1,18)=11.04, p<.01$ ) の交互作用が有意であった。多重比較の結果、新生仔期 SAL 処置群と新生仔期 MK-801 処置群の両群で、水道水摂取量よりスクロース溶液摂取量が有意に高く、また水道水の摂取量に両群間で差はみられなかったものの、新生仔期 MK-801 群のスクロース溶液摂取量は新生仔期 SAL 群より有意に高かった (すべて  $p<.01$ )。

#### 考察

本実験の結果、ベースライン時における水道水の摂取量は、新生仔期 MK-801 処置群と溶媒処置群との間で同等であり、有意な差はみられなかった。その後のスクロース溶液選好テストにおいて、新生仔期処置の両群はともにスクロース溶液に対して高い選好を示した。スクロース溶液の摂取量を比較したところ、新生仔期 MK-801 群のスクロース溶液の摂取量はいずれの濃度においても新生仔期 SAL 群より有意に高く、新生仔期 MK-801 処置ラットがスクロース溶液に対してより強い選好を持つことが示された。新生仔期に MK-801 を慢性的に投与されたラットは、成体期において高いスクロース選好を示した。3 日間に渡るベースライン測定における水道水の摂取量に群間で差はみられなかったため、新生仔期 MK-801 慢性投与により水分摂取量が増加したためにスクロース溶液摂取量も増加したという可能性は排除することができる。新生仔期 MK-801 処置群の示す高いスクロース選好から、新生仔期の NMDA 受容

体慢性遮断は、成体期において報酬性への感受性を減少させることはなく、むしろ増加させることが示唆される。このことから、放射状迷路課題や遅延見本合わせ課題などのような餌報酬を用いた課題において観察された新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの遂行障害は、報酬性への感受性の低下によって生じたものではないと考えることができる。同様に、実験 3 で観察された条件性場所選好の障害は、MAP の持つ報酬性への感受性低下に起因するものではないと考えられるが、スクロース溶液選好テストでは甘味という自然報酬に対する選好を測定しているのに対し、条件性場所選好では MAP という薬物によって生じる報酬を利用している。スクロースのような自然な報酬と薬物による報酬とでは、媒介する神経機構が異なる可能性も考えられるため、スクロース選好の高さと薬物によってもたらされる報酬に対する感受性の高さとは一致しない可能性もある。しかし、スクロースに対する選好が MAP に対する選好の予測因子となりうるという報告もある。DeSousa et al. (2000) は、スクロースを強化子としたオペラント条件づけにおけるレバー押し回数を指標として、その回数の多寡によりラットをそれぞれ高反応群と低反応群に分け、その後の静脈内 MAP 投与を強化子とした際のレバー押し回数を比較した。その結果、高反応群は MAP に対しても高いレバー押し反応を示し、スクロースに対するレバー押し反応と MAP に対するレバー押し反応の間には正の相関が認められた (DeSousa et al., 2000)。このように、スクロースに対する選好の高さから MAP に対する選好の高さを予測できるようであり、したがって、本実験において高いスクロース選好を示した新生仔期 MK-801 ラットにおいて MAP の報酬性に対する感受性は保たれていると推測される。ただし、実際には MAP の報酬性に対する感受性について直接的な検討を行っていないため、より確実な証

拠を得るためには、スクロースを用いた条件性場所選好においても MAP と同様の結果が得られるかどうか、あるいは MAP 溶液を経口摂取させた際の摂取量に変化がみられるか否かを検証する必要があると思われる。

新生仔期 MK-801 処置群の示したスクロース溶液摂取量の増加に関しては、新生仔期 NMDA 受容体遮断によって、代謝機能の変化が生じたことによる可能性も考えられる。もし新生仔期 MK-801 群の示したスクロース溶液の摂取量の増加が、スクロースの持つ報酬性への感受性の上昇によるものではなく、代謝機能の変化による必要なエネルギー量の増加に伴うものであるのならば、平常時の食餌量も増加しているものと推測される。本実験においては、平常時の食餌量について直接測定を行っていないものの、もし食餌量が増加していれば、それに伴って飲水量も増加するものと考えられる (Watts, 1998)。しかし実際には、ベースライン時における飲水量に群間で差はみられなかったことから、新生仔期 MK-801 処置群の食餌量は統制群と同等であったと推測できる。また、スクロース溶液の摂取量の増加が代謝の変化などによる必要エネルギーの増加を補うものであるとするならば、濃度の低いスクロース溶液ほど摂取量が多くなり、スクロースの濃度が上昇するにつれて摂取量は減少すると考えられるが、本実験の結果では、スクロース溶液の濃度が上昇するにしたがって摂取量も増加しているため、新生仔期 MK-801 処置群のスクロース溶液に対する高い選好は代謝機能の異常による必要エネルギーの増加に起因するものという可能性は否定されるであろう。

結論として、新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断はスクロース溶液に対する選好を増加させた。このことは新生仔期 NMDA 受容体遮断が報酬性に対する感受性を減少させず、むしろ感受性を増加させることを示唆している。このことから、新生仔期 NMDA 受容体遮断動物において観察され

る、餌を報酬として用いた学習課題における障害は、新生仔期処置が成体期において報酬性に対する感受性を減少させるために生じたわけではないと考えられる。また、実験 3 において示された新生仔期 MK-801 ラットの条件性場所選好の障害も報酬性への感受性低下によるものではなく、むしろ報酬と文脈との連合を獲得できないことが原因である可能性が高いと推測される。



### 第 3 節 成体期 MK-801 慢性投与が後の methamphetamine による条件性場所選好に及ぼす影響【実験 5】

#### 目的

実験 3 において、新生仔期 MK-801 投与ラットは MAP による条件性場所選好の障害を示し、このことから新生仔期 NMDA 受容体遮断が成体期における報酬と特定の刺激との連合を阻害する可能性が示された。一方、成体期の NMDA 受容体慢性遮断がその後の条件性場所選好に及ぼす影響について検討した研究はほとんどなく、慢性的な NMDA 受容体遮断による報酬性の連合の障害が新生仔期に処置を行った場合に特有のものであるのか、それとも成体期に同様の処置を行った場合にも後の報酬性の連合が障害されるのかは明らかではない。そこで実験 5 では、成体期の NMDA 受容体慢性遮断がその後の報酬と文脈との連合に及ぼす影響について検討するため、成体期のラットに 14 日間にわたって MK-801 を慢性投与し、処置からおよそ 2 週間経過した後に MAP による条件性場所選好のテストを行った。

#### 方法

##### 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 21 匹を用いた。実験開始時におよそ 14 週齢であった。3、4 匹を 1 つのプラスチックケージで飼育した。実験期間中、餌および水は自由に摂取させた。ベースライン測定時に、ビデオカメラの操作の問題により 15 分間の撮影が行えなかった個体が 2 匹いたため（成体期 SAL 群 1 匹、成体期 MK-801 群 1 匹）、この 2 匹のデータについては以後の分析から除外した。

## 統計的検定

ベースライン測定と条件づけ後の選好テストにおける条件づけ期に MAP と対提示された部屋に対する選好率については、t 検定を用いて、それぞれを理論的なチャンスレベル (50%) と比較した。また各部屋間を移動した回数について、ベースライン測定時と選好テストをそれぞれ別個に、成体期処置群間で t 検定を用いて比較を行った。

## 結果

ベースライン測定および選好テストにおける部屋間の平均移動回数を Fig. 4-7 に示した (Fig. 4-7A,B)。t 検定の結果、ベースライン測定時の成体期 MK-801 群の移動回数は成体期 SAL 群の移動回数と比較して高い傾向がみられた ( $t(17)=1.58$ ,  $p=.079$ )。選好テストにおける移動回数については、成体期 MK-801 群と成体期 SAL 群との間に有意な差はみられなかった。

ベースライン測定および選好テストにおける、条件づけ時に MAP と対提示された部屋に対する平均選好率を Fig. 4-8 に示した。各群の平均選好率をチャンスレベルと比較した結果、ベースライン測定時の選好率は成体期 MK-801 群と成体期 SAL 群の両群においてチャンスレベルとの間に有意な差はみられなかった。しかし条件づけ後の選好テストにおける選好率は、成体期 MK-801 群と成体期 SAL 群の両群においてチャンスレベルより有意に高く ( $t(9)=3.78$ ,  $p<.01$ ;  $t(8)=4.35$ ,  $p<.01$ )、MAP と対提示された部屋に対する選好が確認された。

## 考察

条件づけ後の選好テストにおいて、成体期 MK-801 群と成体期 SAL

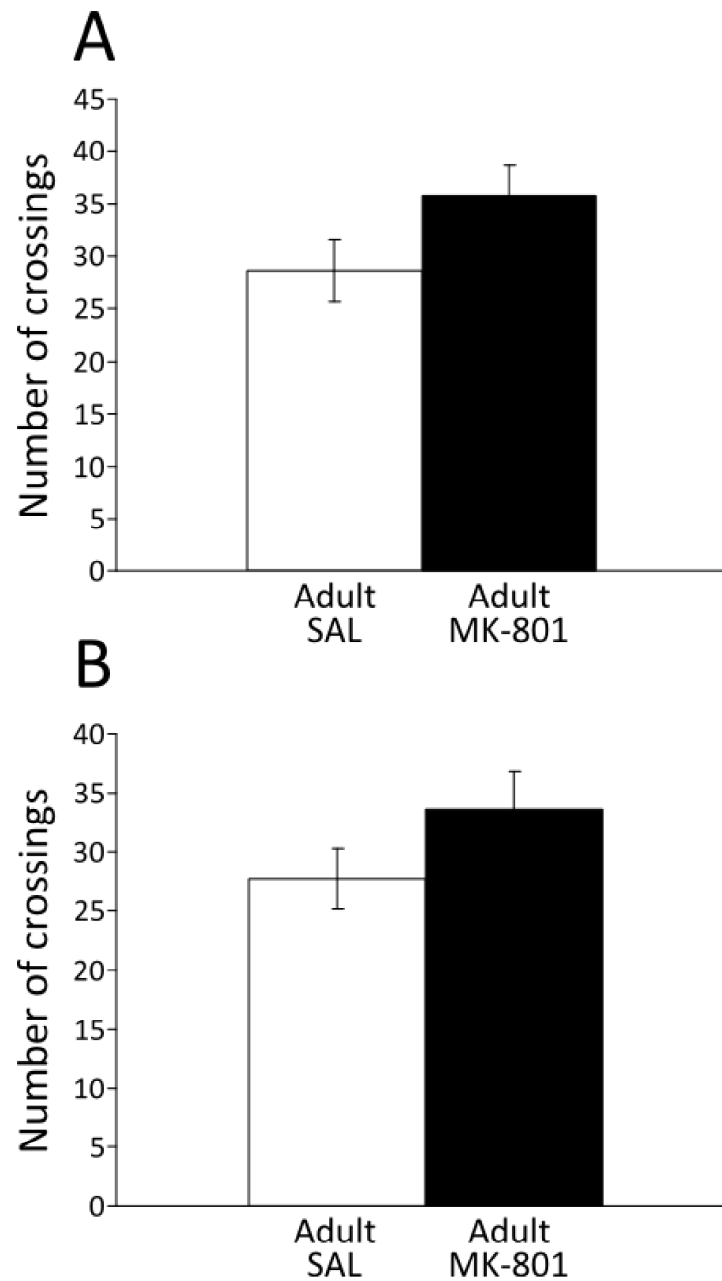


Fig. 4-7 成体期 MK-801 投与ラット (Adult MK-801) および成体期 SAL 投与ラット (Adult SAL) のベースライン測定 (A) と条件づけ後の選好テスト (B) における各コンパートメント間の平均移動回数 (± SEM)。

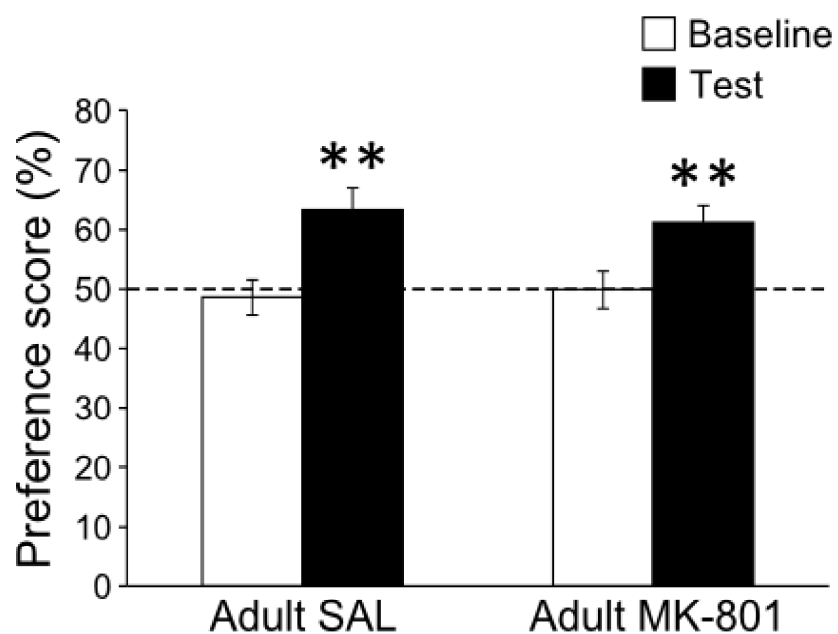


Fig. 4-8 条件づけ期に MAP と対提示されたコンパートメントに対する成体期 MK-801 投与ラット (MK-801) および成体期 SAL 投与ラット (SAL) の平均選好率 (±SEM)。\*\* チャンスレベル (50%) と比較して 1%水準で有意。

群はともに、条件づけ期に MAP と対提示された部屋により長時間滞在し、両群において条件性場所選好の成立が確認された。

新生仔期 MK-801 投与ラットが条件性場所選好の障害を示したこと(実験 3)とは対照的に、成体期 MK-801 投与ラットは MAP による条件性場所選好の障害を示さなかった。このことは、新生仔期の NMDA 受容体慢性遮断が長期にわたって報酬性の連合に影響を及ぼすのに対して、成熟した脳における NMDA 受容体の慢性遮断は、その後の報酬性の連合に及ぼす影響は小さいことを示唆する。このような処置を行った時期の違いによる NMDA 受容体慢性遮断の効果の差は、生後初期の脳においては成熟した脳と比較して NMDA 受容体の感受性がより高い状態にあるためと考えられる。しかし、NMDA 受容体慢性遮断が条件性場所選好の成立に何ら影響を及ぼさなかった本実験の結果とは異なり、成体期 NMDA 受容体慢性遮断がその後の学習障害を引き起こすという報告も先行研究においては見られる。例えば、成体期の 14 日間にわたって 12 時間毎に MK-801 (0.2mg/kg) を投与されたラットはモリス水迷路学習の障害を示した (O'Donnel et al., 2003)。水迷路学習と条件性場所選好ではその課題において要求される要素が異なるため直接比較はできないものの、O'Donnel et al. (2003) が報告したような学習の障害が本実験においてみられなかったことには、処置から行動テスト開始までに挿入された退薬期間が関係していると考えられる。本実験では、行動テストは処置から 2 週間後に開始されたが、O'Donnel et al. (2003) は処置を行っている期間からすでに水迷路訓練を開始しており、最後に薬物注入を行った時点から 4 日後には、処置による水迷路遂行阻害効果は消失した。本実験と同様に、Kawabe et al. (2007) は処置から行動テスト開始までの間に 2 週間の退薬期間を設け、成体期の MK-801 投与は後の放射

状迷路学習になんら影響しないことを示した。本実験の結果とこれらの先行研究の結果を総合すると、処置期間中あるいは処置の終了から間もない頃には、NMDA 受容体慢性遮断の有害な影響があるものの、退薬期間の間にその影響からの回復が起こるため、処置から長期間経過した後には行動への影響は減弱するものと考えられる。

本実験では、成体期の NMDA 受容体慢性遮断が新生仔期に処置を行った場合と同様に後の条件性場所選好の成立を阻害するかを検討した。成体期 MK-801 投与ラットは条件性場所選好の成立を示し、このことから成体期に NMDA 受容体を慢性的に遮断してもその後の報酬性の連合には影響を及ぼさないことが示唆された。第 3 章の結果と合わせて考えると、成熟した脳とは異なり、未成熟の脳における NMDA 受容体慢性遮断は、後の行動により重篤な障害を及ぼし、その効果は長期にわたって持続することが示唆される。

## 第 5 章 新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの恐怖条件づけ

### 第 1 節 新生仔期 MK-801 慢性投与が文脈恐怖条件づけに及ぼす影響

#### 【実験 6】

#### 目的

第 4 章において、新生仔期 MK-801 投与ラットは MAP による条件性場所選好の障害を示し、新生仔期 NMDA 受容体遮断により成体期の報酬と文脈との連合が阻害される可能性が示された。一方で、同じく文脈との連合であっても、新生仔期 NMDA 受容体遮断が嫌悪刺激と文脈との連合に及ぼす影響については明らかではない。現在のところ、新生仔期 NMDA 受容体拮抗薬投与の恐怖条件づけの成立に及ぼす影響に関する知見は限られている。そこで実験 6 では、新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断が成体期の嫌悪性の連合に及ぼす影響について検討するため、新生仔期のラットに MK-801 を慢性投与し、成体に達した後に、文脈を条件刺激 (CS) とした恐怖条件づけを行った。

#### 方法

##### 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 17 匹を使用した。新生仔期 SAL 処置群は 9 匹、新生仔期 MK-801 処置群は 8 匹であった。実験開始時に約 16 週齢であった。3、4 匹ずつプラスチックケージで飼育し、実験期間中、餌および水を自由に摂取させた。

## 手続き

ハンドリング 文脈恐怖条件づけ訓練に先立って、5 分間のハンドリングを 1 日 1 回、3 日間行った。

文脈恐怖条件づけ ラットが 16 週齢に達した時点で、文脈恐怖条件づけ訓練を行った。条件づけセッションは 180 秒であった。ラットを恐怖条件づけ装置に入れてから 120 秒後と 180 秒後に足への電撃 (0.3 mA, 1 秒間) を提示し、2 回目の電撃の提示直後にラットを装置から取り出し、ホームケージに戻した。条件づけ訓練中、呼吸を除いてラットが動かない状態が 2 秒以上続いた場合、フリージング反応と判断し、その持続時間を計測し、30 秒ごとのフリージング率を算出した。1 匹終わるごとに、70%エタノールを用いて条件づけ箱内を清掃し、乾燥させた。

消去訓練 条件づけ訓練の約 24 時間後から、7 日間にわたって 1 日 1 回消去訓練を行った。消去訓練では、条件づけ訓練時に用いたものと同じの装置を利用し、電撃を提示せずにラットを 300 秒間装置に曝露し、その間のフリージング反応を記録、フリージング率を算出した。条件づけと同様、1 匹終わるごとに 70%エタノールを用いて条件づけ箱内を清掃し、乾燥させた。

## 統計的検定

文脈恐怖条件づけ訓練中の 30 秒のブロック毎のフリージング率について、新生仔期条件を群間要因、ブロックを個体内要因とした 2 要因の分散分析を用いて検討を行った。また消去訓練中のフリージング率について、新生仔期処置を群間要因、訓練セッションを個体内要因とした 2



要因分散分析を行った。

## 結果

文脈恐怖条件づけ訓練中の新生仔期 SAL および MK-801 処置群のフリージング率の推移を Fig. 5-1 に示した。2 要因（新生仔期処置 × ブロック）の分散分析を行ったところ、ブロックの主効果が有意であった ( $F(5,75)=78.65, p<.01$ )。新生仔期処置の主効果およびブロックと新生仔期処置の交互作用は有意でなく、電撃提示によるフリージング反応に新生仔期処置の影響はみられなかった。

7 日間の消去訓練における新生仔期 SAL および MK-801 処置群のフリージング率の変化を Fig. 5-2 に示した。2 要因（新生仔期処置 × セッション）の分散分析を行ったところ、セッションの主効果のみ有意であり ( $F(6,90)=65.74, p<.01$ )、他のいかなる主効果も交互作用も有意ではなかった。新生仔期投与の違いに関わらず、両群とも条件づけの翌日に高いフリージング率を示し、消去訓練が進行するのにしたがい減少した。新生仔期 MK-801 群のフリージング率は SAL 群と比較してやや高いものの、統計的に有意な差はみられなかった。

## 考察

文脈恐怖条件づけの訓練において、新生仔期 MK-801 投与ラットは統制群と同程度のフリージング反応を示した。また条件づけの約 24 時間後の消去セッション中、新生仔期処置の両群は高いフリージングを示し、これは消去訓練を重ねることで減少していった。恐怖条件づけ訓練および消去訓練を通して、群間でフリージング率に差はなかった。

文脈恐怖条件づけの訓練において、新生仔期 MK-801 群のフリージン

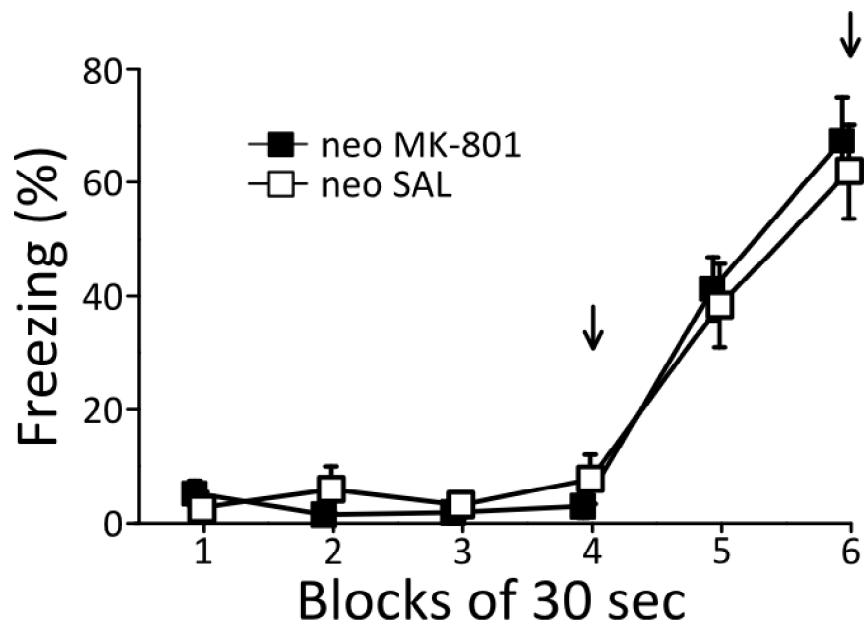


Fig. 5-1 文脈恐怖条件づけ訓練中の新生仔期 SAL (neo SAL) および MK-801 投与ラット (neo MK-801) の平均フリージング率 ( $\pm$ SEM) の推移。図中の下向き矢印は、電撃が提示された時点を示す。

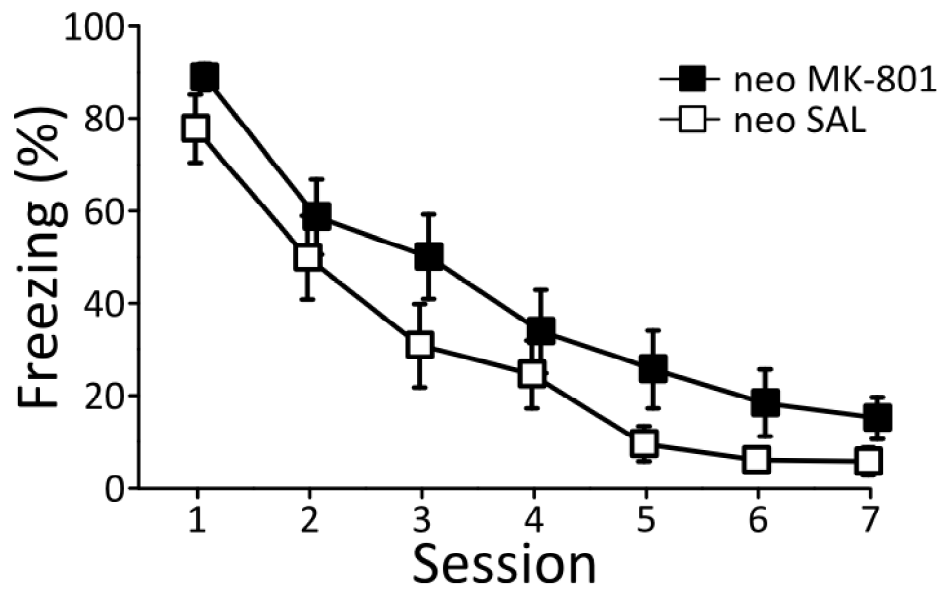


Fig. 5-2 文脈恐怖条件づけ消去訓練セッションにおける新生仔期 SAL (neo SAL) および MK-801 投与ラット (neo MK-801) の平均フリージング率 (±SEM) の推移。

グ率は SAL 群と変わらなかったことから、このラットが電撃に対する恐怖反応として、フリージング反応を表出する能力を有していることが確認され、侵害刺激に対して表出する反応の様式は正常なラットが示す反応と異なることが示された。条件づけから 24 時間後に行った消去セッションのフリージング率は、文脈恐怖記憶を保持する能力を反映しているが、この時点で新生仔期処置の違いによるフリージング率の差はなく、新生仔期 MK-801 投与ラットの文脈恐怖の記憶保持能力は正常であると考えられる。また消去訓練の繰り返しによるフリージング率の減少も MK-801 群と SAL 群とで同等であり、新生仔期 MK-801 投与による文脈恐怖条件づけの消去への影響はないことが示唆された。以上のように、本実験によって、新生仔期 NMDA 受容体遮断は、嫌悪刺激と文脈との連合の産物である文脈恐怖記憶の獲得、保持、表出およびその消去に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

新生仔期に NMDA 受容体を慢性的に遮断されたラットの示す成体期の空間学習障害はよく確立された事実である。空間学習は海馬の機能に依存する。新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットは海馬の神経生理学的な異常を示すことから、この処置に伴う海馬の機能低下が空間学習障害の原因と考えられる。空間学習と同様に、文脈恐怖条件づけには海馬の働きが必要であり、条件づけ前の海馬損傷は文脈に対するフリージング反応を抑制し (Phillips & Ledoux, 1992)、条件づけ後に損傷を行った場合には、文脈恐怖記憶の逆行性健忘を生じる (Anagnostaras et al., 1999; Kim & Fanselow, 1992)。新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの示す海馬の異常と文脈恐怖条件づけにおける海馬の役割からすると、このラットにおいて文脈恐怖条件づけが障害されている可能性も考えられたが、実際には新生仔期処置の影響はまったく確認できなかった。前述のように

文脈恐怖条件づけにおける海馬の重要性は広く認められているが、実際には、文脈恐怖条件づけの獲得における海馬の役割に関しては、一貫した結果が得られているわけではなく、海馬を損傷されたラットは空間学習課題において著しい遂行障害を示した一方で、文脈恐怖条件づけにおいては偽損傷群と同等の成績を示したという報告もある (Cho et al., 1999)。この説明として、海馬の機能低下を大脳皮質等その他の脳部位が補償している可能性が示唆されている。このような海馬の機能を補償する部位として嗅周囲皮質などが想定されているが、新生仔期 MK-801 投与ラットではこれらの部位の機能は正常に保たれているのかもしれない。さらに海馬損傷後の正常な文脈恐怖の獲得は条件づけ時の電撃の提示回数に依存しており、3 回の提示では正常に獲得できるが、電撃提示が 1 回のみである場合、後の文脈暴露におけるフリージング率は統制群より有意に低い結果となった (Wiltgen et al., 2006)。本実験では、電撃を 2 回提示しているため、存在していた文脈恐怖獲得の障害が観察されなかった可能性もあり、電撃の提示回数を減らした場合に今回と同様の結果となるのか今後検討する必要はあるものの、少なくとも新生仔期 MK-801 投与ラットは、2 回の対提示の経験によって文脈と嫌悪刺激との連合を獲得可能であることが示された。

本実験の結果より、新生仔期 MK-801 投与ラットは、条件づけ後の文脈暴露の際に統制群と同等のフリージングを示し、電撃の提示をせずに文脈への曝露を繰り返すことでフリージングの減少を示した。このことから、新生仔期の NMDA 受容体慢性遮断は成体期における文脈と嫌悪刺激との連合に及ぼす影響は少なく、また獲得された文脈恐怖の消去についても新生仔期処置による影響を受けないことが明らかとなった。

## 第 2 節 新生仔期 MK-801 慢性投与が手がかり恐怖条件づけに及ぼす影響【実験 7】

### 目的

前節では、新生仔期 MK-801 投与ラットは成体期の文脈恐怖条件づけにおいて統制群と同様に電撃と条件づけられた文脈に対して恐怖反応を表出し、新生仔期 NMDA 受容体遮断が後の嫌悪性の連合に影響を及ぼさないことが示唆された。しかし、嫌悪刺激と文脈との連合と、嫌悪刺激と光や音などの明確な手がかりとなる刺激との連合とでは、共通する神経基盤をもつものの完全には一致しておらず、それぞれに特異的に関連する脳領域が存在する。条件刺激が文脈であるのか明確な手がかりとなる刺激であるのかによって、関与する脳部位が異なるため、文脈恐怖条件づけの結果をもとに間接的に手がかり条件づけの結果を推測するのは適切ではない。そこで実験 7 では、新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断が成体期の手がかり恐怖条件づけに及ぼす影響について検討するため、新生仔期のラットに MK-801 を慢性投与し、成体に達した後にトーン音を手がかりとする恐怖条件づけを行った。また、新生仔期 MK-801 投与が電撃に対する感受性を変化させた可能性について検討するため、恐怖条件づけとその消去をテストした後に、flinch-jump テストを行った。

### 方法

#### 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 18 匹を使用した。新生仔期 SAL 処置群は 9 匹、新生仔期 MK-801 処置群は 9 匹であった。実験開始時に 7 週齢であった。3、4 匹ずつプラスチックケージで飼育し、実験期間中、餌お

よび水を自由に摂取させた。

## 手続き

**恐怖条件づけ** ラットを条件づけ箱に入れて 120 秒経過後, 10 秒間のトーン音 (10 kHz) を条件刺激 (CS) として提示し, CS 提示開始の 9 秒後に、足への電撃 (0.3 mA) を無条件刺激 (US) として 1 秒間提示した。さらに 60 秒経過した後に条件づけ箱から取り出した。条件づけ訓練中、呼吸を除いてラットが動かない状態が 2 秒以上続いた場合、フリージング反応と判断し、その持続時間を計測し、20 秒ごとのフリージング率を算出した。1 匹終わるごとに、70%エタノールを用いて箱内を清掃し、乾燥させた。

**消去訓練** 条件づけ訓練の翌日から 6 日間、消去訓練を行い、フリージング率を測定した。テストは 360 秒であった。消去訓練では、条件づけ箱とは特徴の異なる消去用箱を使用した。訓練ではラットを消去用箱に入れた 120 秒後から 60 秒間のトーン音を 60 秒おきに 2 回提示し、さらに 60 秒経過した後にラットを箱から取り出した。テストにおける 1 回目のトーン音を提示する前の 120 秒間のフリージング率と、トーン音提示中のフリージング率をそれぞれ算出した。

**Flinch-jump** テスト 消去訓練終了後、電撃への感受性について調べるために、flinch-jump テストを行った。テストには条件づけに用いたものと同じの条件づけ箱を使用した。ラットを箱に入れて 60 秒後から 30 秒おきに電撃を提示した。電撃強度を 0.05 mA から 0.8 mA まで 0.05 mA ずつ上昇させ、flinch, vocalization, jump の各反応が初めて観察

された電撃強度を記録した。Flinch は電撃提示後に観察者によって検出可能な何らかの反応があること、vocalization は実験者の可聴域の範囲での発声があること、jump は四肢のうち 3 肢以上が床より離れることとした。テストはラットが flinch、vocalization、jump の 3 つの反応すべてが観察された時点で終了とし、それ以上の電撃強度でのテストは行わなかった。

### 統計的検定

手がかり恐怖条件づけ訓練中の 20 秒のブロック毎のフリージング率について、新生仔期処置を群間要因、ブロックを個体内要因とした 2 要因の分散分析を用いて検討を行った。また消去訓練のトーン音提示前の 120 秒間のフリージング率とトーン音提示中のフリージング率について、新生仔期処置を群間要因、訓練セッションを個体内要因とした 2 要因分散分析を行った。Flinch-jump テストで記録された flinch、vocalization、jump の各閾値について、新生仔期処置を群間要因、反応の種類を個体内要因として 2 要因分散分析を行った。

### 結果

手がかり恐怖条件づけ訓練中の新生仔期 SAL および MK-801 処置群のフリージング率の推移を Fig. 5-3 に示した。2 要因（新生仔期処置 × ブロック）の分散分析を行ったところ、ブロックの主効果が有意であった ( $F(12,192)=46.03, p<.01$ )。新生仔期処置の主効果およびブロックと新生仔期処置の交互作用は有意でなく、電撃提示によるフリージング反応に新生仔期処置の影響はみられなかった。

6 日間の消去訓練におけるトーン音提示前の新生仔期 SAL および



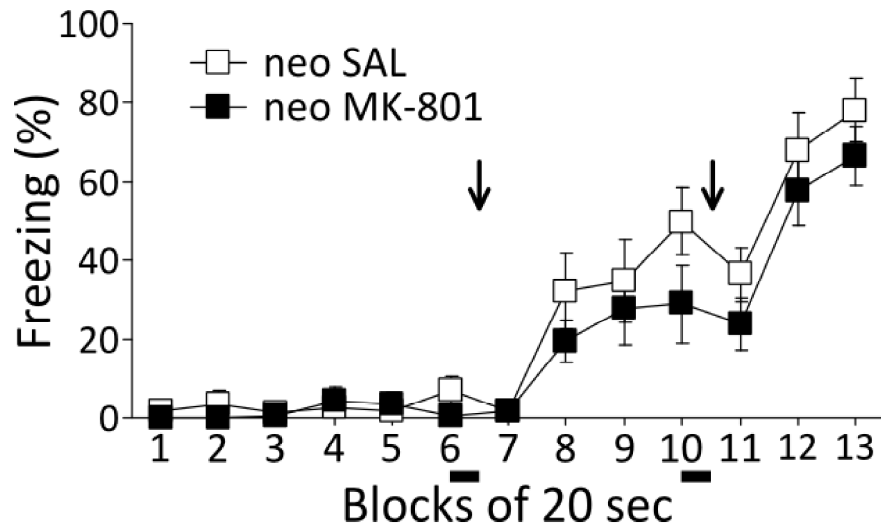


Fig. 5-3 手がかり恐怖条件づけ訓練中の新生仔期 SAL (neo SAL) および MK-801 投与ラット (neo MK-801) の平均フリージング率 (±SEM) の推移。図中の下向き矢印は、電撃が提示された時点を示す。図中の横軸下部の線はトーン音が提示された期間を示す。

MK-801 処置群フリージング率の変化を Fig. 5-4 に示した。2 要因（新生仔期処置 × セッション）の分散分析を行ったところ、セッションの主効果のみ有意であり（ $F(5,80)=38.50$ ,  $p<.01$ ）、他のいかなる主効果も交互作用も有意ではなかった。新生仔期投与の違いに関わらず、両群とも条件づけの翌日に高いフリージング率を示し、消去訓練が進行するのにしたがい減少した。新生仔期 MK-801 群のフリージング率は SAL 群と比較してやや高いものの、統計的に有意な差はみられなかった。

6 日間の消去訓練におけるトーン音提示中の新生仔期 SAL および MK-801 処置群フリージング率の変化を Fig. 5-5 に示す。2 要因（新生仔期処置 × セッション）の分散分析を行ったところ、セッションの主効果（ $F(6,90)=88.59$ ,  $p<.01$ ）、および新生仔期処置の主効果（ $F(1,16)=4.72$ ,  $p<.05$ ）が有意であった。新生仔期投与の違いに関わらず、両群とも条件づけの翌日に高いフリージング率を示し、消去訓練が進行するのにしたがい減少した。ただし、訓練を通して新生仔期 MK-801 群のフリージング率は SAL 群と比較して有意に低かった。

Flinch-jump テストにおいて各新生仔期処置群でそれぞれの反応を誘発した電撃強度の閾値を Fig.5-6 に示した。2 要因（新生仔期処置×反応の種類）の分散分析の結果、反応の種類の主効果（ $F(2,32)=83.23$ ,  $p<.01$ ）、新生仔期処置の主効果（ $F(1,16)=4.87$ ,  $p<.05$ ）が有意であり、新生仔期処置と反応の種類の交互作用が有意傾向であった（ $F(2,32)=3.36$ ,  $p=0.84$ ）。新生仔期 MK-801 群は、新生仔期 SAL 群よりも低い電撃強度で各反応を表出したといえる。

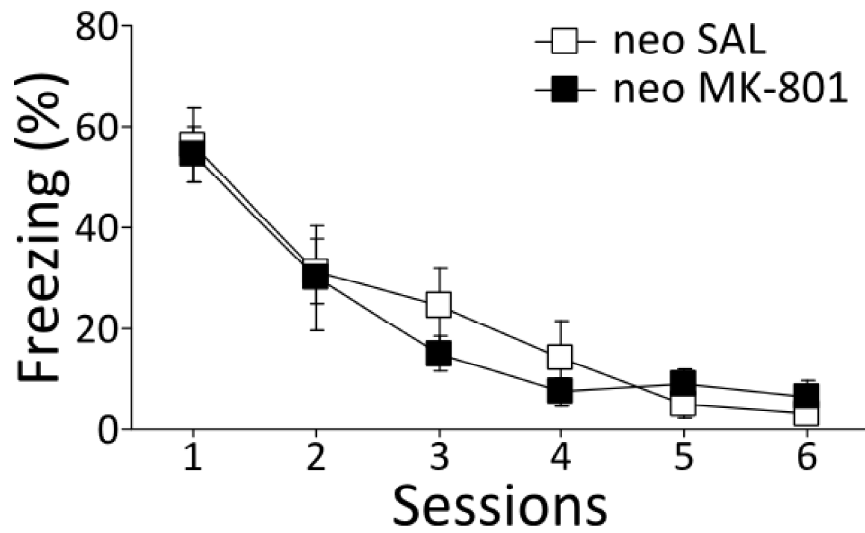


Fig. 5-4 手がかり恐怖条件づけ消去訓練セッションにおけるトーン音提示前120秒間の新生仔期SAL (neo SAL) およびMK-801投与ラット (neo MK-801) の平均フリージング率 (±SEM) の推移。

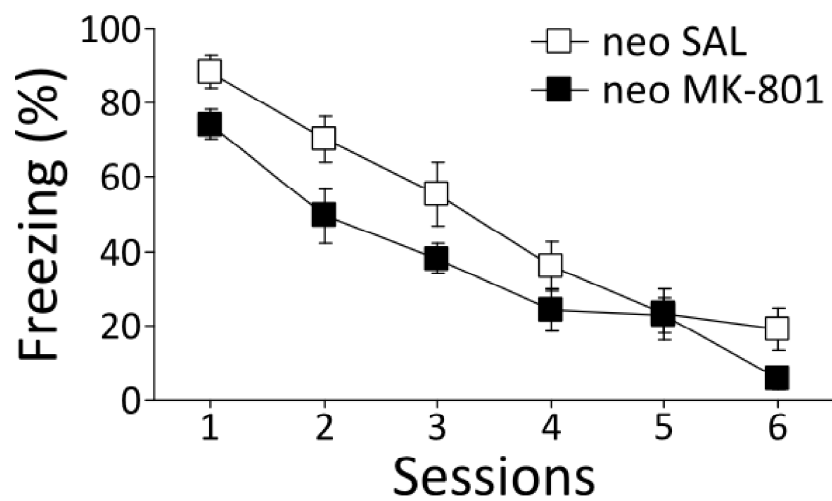


Fig. 5-5 手がかり恐怖条件づけ消去訓練セッションにおけるトーン音提示中の新生仔期 SAL (neo SAL) および MK-801 投与ラット (neo MK-801) の平均フリーズング率 ( $\pm$ SEM) の推移。

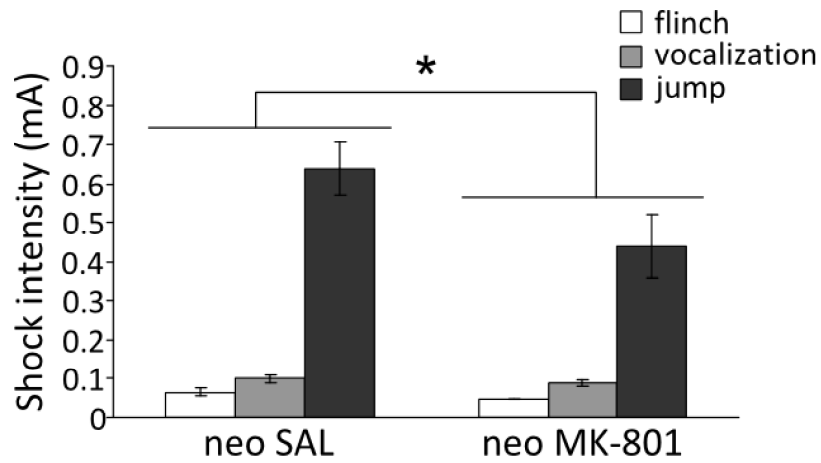


Fig. 5-6 Flinch-jump テストにおいて新生仔期 SAL (neo SAL) および MK-801 投与ラット (neo MK-801) の flinch、vocalization、jump の各反応が最初に観察された平均電撃強度 ( $\pm$ SEM)。\* 5%水準で有意。

## 考察

条件づけ後のテストにおいて、新生仔期 MK-801 投与ラットのトーン音提示に対するフリージング率は SAL 群よりも有意に低かった。しかし、テストにおけるトーン音提示前の 120 秒間のフリージング率は群間に差はみられなかった。保持テストの終了後に行った flinch-jump テストにおいて、新生仔期 MK-801 群がより低い電撃強度で flinch、vocalization、jump の各反応を表出することが示された。

条件づけ期において、電撃提示によって表出されたフリージング率に、新生仔期処置の違いによる差はみられず、新生仔期 MK-801 投与ラットが生得的な嫌悪刺激に対して統制群と同様の反応を示すことが実験 6 に引き続き確認された。条件づけ翌日から開始された保持テストにおいて、トーン音提示前の 120 秒間のフリージング率に新生仔期処置による影響はなかった。保持テストでは条件づけ期とは異なる文脈を使用したがる、各新生仔期処置群は 50% 以上と比較的高いフリージング率を示した。このことはラットが条件づけ時の文脈とテスト時の文脈を弁別していないかあるいは 2 つの文脈の間で般化が生じていることを示唆する。いずれにしても、新生仔期 MK-801 群は電撃と対提示された文脈と類似の文脈に対して恐怖反応を示し、これはこのラットが文脈と嫌悪刺激との連合が可能であることを示唆している。この結果は文脈恐怖条件づけについて直接検討した実験 6 の結果と一致するものである。一方、テスト時のトーン音提示中、新生仔期 MK-801 群の示すフリージング率は統制群よりも有意に低く、新生仔期 NMDA 受容体遮断が音手がかり恐怖条件づけに障害をもたらすことが示された。このことは同処置が成体期における音手がかり刺激と嫌悪刺激との連合を阻害する可能性を示唆する。トーン音提示中のフリージング率の低下については、新生仔期 NMDA 受容体遮

断が成体期の電撃感受性を減少させた可能性も考えられた。そのため、保持テスト後に **flinch-jump** テストを行い電撃感受性について検討したが、新生仔期 **MK-801** 群はいずれの反応についても統制群より弱い電撃強度で反応を表出し、電撃感受性はむしろ高まっていることが示唆された。つまり、新生仔期の **NMDA** 受容体慢性遮断は後の侵害刺激に対する感受性を変化させないか、あるいは亢進させるため、**CS** 提示中のフリージング率低下は電撃感受性の低下に起因するものではないといえる。

新生仔期 **MK-801** 投与ラットが正常な文脈恐怖条件づけの成立を示すことから、同ラットは手がかり恐怖条件づけにおいても障害を示さないという可能性も考えられたが、結果はその予想に反するものとなった。一般的に、恐怖条件づけには扁桃体が中心的な役割を果たしており、文脈恐怖条件づけの成立には扁桃体に加え海馬が関わっていると考えられている。損傷実験や薬物の局所投与を用いた実験より、文脈恐怖条件づけは海馬あるいは扁桃体の機能障害によって障害されるが、手がかり恐怖条件づけは扁桃体損傷によって障害されるものの海馬損傷の影響を受けないことが報告されている (**Phillips & LeDoux, 1992**)。扁桃体が文脈恐怖と手がかり恐怖の両方の成立に関与していることからすると、文脈恐怖条件づけに異常がないことから扁桃体の機能は正常に保たれていることが予想され、手がかり恐怖条件づけにおいても異常はみられないとするのが妥当な予測と考えられた。このような文脈条件づけの結果から得られた予想と本実験の結果との乖離は、扁桃体下位領域間の恐怖条件づけにおける機能差によって説明できるかもしれない。**LeDoux (2000)** は恐怖条件づけの神経解剖学的な基盤における扁桃体亜核の機能差について論じている。聴覚性入力は、内側膝状体および聴覚皮質を経由して主に扁桃体外側核 (**lateral amygdaloid nuclei; LA**) に到達し

ている。LA の細胞の中には、侵害刺激の入力と聴覚刺激の入力の両方に応答するものがあり (Romanski et al., 1993)、この部位で CS と US の情報が収束していることが示唆される。この部位を破壊すると、聴覚手がかりを用いた恐怖条件づけが阻害される。一方、文脈恐怖条件づけにおいては海馬と扁桃体の連絡が必要である。扁桃体基底外側核 (basolateral amygdaloid nuclei; BLA) は LA と同じく侵害刺激の情報を入力を受け取っているが、聴覚系からの入力を受けておらず、かわりに海馬からの入力を受けている (Canteras & Swanson, 1992)。文脈の表象は海馬において形成され、この表象は BLA へと入力され、侵害刺激の情報と統合されると考えられる。LA と BLA はともに扁桃体中心核 (central amygdaloid nuclei; CeA) に投射しており、CeA の損傷が恐怖反応の表出を妨げることからこの部位が最終的な条件性恐怖反応の出力を調節していると考えられる。BLA の選択的な損傷あるいは薬理的な不活性化が手がかり条件づけには影響を与えず文脈条件づけのみを阻害し、LA の選択的損傷が手がかり条件づけを阻害することからも、恐怖条件づけにおいてこれらの扁桃体亜核に機能差があることが支持される (Calandreau et al., 2005; Nader et al., 2001)。このような扁桃体亜核の機能分離を考慮すると、新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断は、どのような機序によってかは不明であるものの、それぞれの亜核の機能に異なる影響を及ぼし、正常な文脈恐怖条件づけの成立と手がかり恐怖条件づけの障害という結果をもたらした可能性が考えられる。現在のところ、新生仔期 NMDA 受容体遮断が扁桃体の機能に及ぼす影響について検討した研究はほとんどなく、今後の進展が期待される。

CS に対するフリージングの低下の原因としては、新生仔期 MK-801 投与ラットの易刺激性についても検討する必要がある。MK-801 投与ラ



ットの日常的な観察から、この動物が外部刺激に対して過敏に反応することを経験的に確認している。また新生仔期に NMDA 受容体拮抗薬を投与されたラットは統計的には有意ではないものの、聴覚刺激に対してより大きな驚愕反応を示す傾向が見受けられる。新生仔期 MK-801 投与ラットの示す易刺激性を考慮すると、保持テストにおけるトーン音の提示は、フリージングと競合する音源定位反応などの非特異的な行動を誘発したために、CS 提示中のフリージングの表出が妨げられたのかもしれない。この可能性を排除するためには、フリージング反応ではなく、CS 提示後の回避行動を指標とする能動的回避課題での検討が必要であろう。

新生仔期の MK-801 慢性投与は、聴覚刺激を条件刺激とした手がかり恐怖条件づけを阻害した。このことから、新生仔期 NMDA 受容体遮断が成体期における手がかり刺激と嫌悪刺激との連合を阻害することが示唆された。実験 6 の結果と合わせて考えると、文脈恐怖条件づけと手がかり恐怖条件づけとの間でそれぞれを担う神経経路が異なることから、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットにおいて、BLA を含む文脈恐怖条件づけに必要な神経回路の機能は比較的正常に保たれているのに対し、LA を含む手がかり恐怖条件づけを担う神経回路の機能に異常が生じている可能性が考えられた。

## 第 6 章 総合的考察

本研究では、出生後早期のグルタミン酸 NMDA 受容体の慢性的遮断によって生じた、ムスカリン性アセチルコリン受容体および NMDA 受容体を介した神経伝達の変化が行動の調節に影響を及ぼしている可能性と、新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断が成体期の刺激と刺激の連合学習に及ぼす影響について検討することを目的とした。そのために、新生仔期のラットに NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 を慢性的に投与し、ラットが成体に達した後に、MK-801 および scopolamine によって誘発される過活動と、報酬性の連合を必要とする条件性場所選好、そして嫌悪性の連合学習である恐怖条件づけについて調べた。

第 3 章より、新生仔期 MK-801 ラットは成体期において、MK-801 および scopolamine の持つ移動活動量亢進作用に対して高い感受性を示した。新生仔期 NMDA 受容体遮断が NMDA 受容体拮抗薬やドーパミン作用薬に対する感受性を高めることはすでに報告されているが、本研究は同処置がムスカリン受容体拮抗薬の持つ移動活動量亢進作用に対して感受性を高める可能性を初めて示した。先行研究において、新生仔期 NMDA 受容体遮断が脳内の複数の部位において NMDA 受容体の発現を増加させたことからすると (du Bois et al., 2009a; Sircar, 2003)、MK-801 急性投与に対する反応性の亢進は、受容体の増加を含めた NMDA 受容体感受性の上昇を反映していると考えられる。同様に、scopolamine 急性投与に対する反応性の増加も、新生仔期 NMDA 受容体遮断によってムスカリン受容体の感受性が亢進したことを示すものと考えられる。これは新生仔期 PCP 投与ラットにおいて PFC や海馬などのムスカリン受容体結合数が増加していること、特に PFC では恒常的な結

合数の増加がみられること (du Bois et al., 2009b) からも支持される。新生仔期 NMDA 受容体遮断がどのような機序でムスカリン受容体の機能を変化させるのかは現時点では明らかではないが、NMDA 受容体の刺激はアセチルコリン放出を引き起こすことから (Feuerstein, 1994)、NMDA 受容体とアセチルコリンとの相互作用が関係しているものと推測される。これまで新生仔期 NMDA 受容体遮断によるムスカリン受容体の機能的変化については報告がほとんどなく、数少ない報告においても、PFC と海馬のみに焦点が絞られていた。本研究の結果は、PFC、海馬のみならず、scopolamine 誘発性過活動に関与する脚橋被蓋核や背外側被蓋核などにおいてもムスカリン受容体の機能的変化が生じている可能性を示唆する。しかし、本研究ではこれらの部位のムスカリン受容体の変化について直接的な検討を行っていない。今後はムスカリン受容体拮抗薬の脳内局所投与や、末梢投与後の最初期遺伝子発現の変化について調べ、scopolamine 誘発性過活動の亢進にいずれの脳部位のムスカリン受容体関わっているのかを明らかにしていく必要がある。いずれにしても、本研究は、新生仔期 NMDA 受容体遮断によるムスカリン受容体機能の変化が、同処置によって生じた行動異常に寄与しうることを明らかにした。これまでの研究では、新生仔期の NMDA 受容体遮断がコリン系神経伝達に及ぼす影響に着目したものは少なく、またムスカリン受容体を介した神経伝達に関しても、脳内での発現数の変化が報告されているのみであり、ムスカリン受容体の機能変化が新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットにおいて実際に行動の調節に関与しているのか否かは明らかでなかった。しかし本研究は、ムスカリン受容体の変化が新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの行動、特に活動性の調節に影響している可能性を示した。

本研究は、第 4 章において、新生仔期 NMDA 受容体遮断が methamphetamine 誘発性の条件性場所選好の成立を阻害することを初めて示した。新生仔期 MK-801 投与ラットは、スクロース溶液選好テストにおいて統制群より多くスクロース溶液を摂取したため、報酬性に対する感受性が低下している可能性は低いと考えられた。このことからすると、条件性場所選好の障害は、報酬と刺激、とりわけ文脈との連合が阻害されたことによるものと考えられ、新生仔期の NMDA 受容体遮断が、報酬性の連合の障害を引き起こす可能性が示された。このような報酬性の連合の障害が新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの行動にどのような影響を与えているのかについては、さらなる検討が必要である。特に報酬を用いた学習・記憶課題を行う際には、結果を慎重に解釈すべきであることが指摘できる。

第 5 章では、新生仔期 MK-801 投与が恐怖条件づけに及ぼす影響について検討した。新生仔期 MK-801 投与ラットは文脈条件づけにおいて統制群と同等の成績を示した一方で、手がかり条件づけにおいては、条件刺激に対するフリージング率は統制群より有意に低く、手がかり恐怖条件づけの障害を示した。この結果は、新生仔期の NMDA 受容体遮断は嫌悪性の条件づけにおいて、嫌悪刺激と文脈との連合には影響しないものの、嫌悪刺激と明確な手がかり刺激との連合を阻害することを示唆している。先行研究において BLA の選択的な不活性化が手がかり条件づけには影響を与えず文脈条件づけのみを阻害し、LA の選択的損傷が手がかり条件づけを阻害したことから (Nader et al., 2001; Calandreau et al., 2005)、文脈恐怖条件づけと手がかり恐怖条件づけにおける結果の相異は、新生仔期 NMDA 受容体遮断が扁桃体の機能に与える影響が各下位領域によって異なることによるという可能性が考えられた。新生仔期

NMDA 受容体遮断ラットは海馬依存の学習・記憶課題において障害を示すため、同じく海馬依存である文脈恐怖条件づけにおいても障害を示すことが予想されたが、実際には障害はみられなかった。これはこのラットの海馬機能の低下を海馬周辺の皮質領域が補償しているためかもしれない。海馬損傷の文脈恐怖条件づけ阻害作用は、嫌悪刺激の提示が単回であった時に顕著になるため、そのような条件で条件づけを行った際にどのような結果が得られるのか改めて調べてみる必要がある。また実験者の観察による所見から、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットは聴覚刺激に対して敏感に反応する傾向が見受けられたため、このことが原因でフリージング反応が低下した可能性も考えられた。この可能性を排除するためには、フリージング反応を指標とする恐怖条件づけではなく、能動的回避学習課題による検討が有効だと考えられる。

以上の結果をまとめると、本研究の結果より、新生仔期の NMDA 受容体慢性遮断は、成体期において NMDA 受容体およびムスカリン受容体の感受性を増加させ、この神経化学的変化が後の行動調節に影響を及ぼしうること、報酬性の連合、特に報酬と文脈との連合を阻害すること、そして嫌悪性の連合、特に嫌悪刺激と明確な手がかり刺激との連合を阻害することが明らかとなった。新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断によって生じたムスカリン受容体の機能的変化を含む広範な神経化学的変化が認知機能に何らかの影響を及ぼしている可能性は高いと考えられ、本研究で確認された連合学習の障害も少なくとも部分的にはこれらの神経化学的変化を反映したものであろうと推測できる。先行研究によって、新生仔期の NMDA 受容体遮断がムスカリン M1/M4 受容体の発現を変化させることが報告されている (du Bois et al., 2009b) が、ラット脳に発現するムスカリン受容体のほとんどは M1、M2、M4 受容体であり、特に M1

受容体は大脳皮質や海馬に豊富に存在することからも (Levey et al., 1991)、ムスカリン受容体の機能的変化が学習・記憶を含む認知機能の障害に関与しうると考えられ、新生仔期 MK-801 慢性投与ラットの連合学習障害にもムスカリン受容体の機能的変化が寄与している可能性がある。新生仔期 MK-801 投与ラットに対して施行したいくつかの行動テストについては、成体期に同様の処置を行ったラットでもテストを行った。その結果、成体期 MK-801 投与は行動テストの結果に影響しなかった。このことは、新生仔期の未成熟な脳が NMDA 受容体遮断に対してより鋭敏であり、生後初期の脳発達における NMDA 受容体の重要性をより強調するものといえる。以上のことから、発達中の脳における NMDA 受容体という単一の受容体の機能阻害が、グルタミン酸を含めた各種の神経伝達システムに長期にわたって多大な影響を及ぼし、おそらくはこのような神経化学的变化を介して、生体の行動の基礎にある刺激と刺激の連合という基本的な能力に重篤な影響を与える可能性が示された。

脳重量の著しい増加が観察されるという点において、ラットの生後数週間はヒトの妊娠第 3 三半期～生後 2、3 年の時期に相当すると考えられている。この *brain growth spurt* の時期は様々な外的刺激に対して特に脆弱な時期であり、この時期のラットに神経成長を妨げるような処置を加えると後にヒトの精神疾患に類似の行動異常を生じ (Baier et al., 2009; Fredriksson & Archer, 2003)、この影響は成体期に同様の処置を行った際に現れるものよりも重篤であることが多い。このような事実から、ラットにとって生後数週間の時期は、後の正常な行動の基礎をなす中枢神経系の形成において決定的な時期であることが示唆される。特にラットにおいて生後 7 日目はちょうど脳重量増加のピークにあたり、この時点での腹側海馬損傷や前頭皮質損傷が成体期の行動異常を引き起こ

すことから (Tseng et al., 2009; Rezvani et al., 2008)、この 7 日齢という時期は神経発達においてとりわけ重要であると推測される。ラットを対象としたこれらの基礎研究の結果は、ラットの新生仔期に相当するヒトの胎児期～乳幼児期における神経発達の妨害が、成長後の行動障害の一因となる可能性を示している。新生仔期ラットへの NMDA 受容体拮抗薬投与も、ヒトの精神疾患とよく似た行動異常を引き起こすことが知られ、ヒトの精神疾患・発達障害の症例との比較から、本研究において観察された新生仔期 MK-801 慢性投与ラットの示す薬物誘発性過活動の亢進および連合学習の障害も、ヒトの統合失調症において報告されてきた事例やある種の発達障害の特徴と共通する点があるものと思われた。

例えば、ヒトにおいて ketamine や PCP、scopolamine が健常者に統合失調症様の症状を引き起こし、統合失調症患者では症状を悪化させることが知られている (Javitt & Zukin, 1991; Krystal et al., 1994; Lahti et al., 1995; Tandon et al., 1991; Halpern, 2004)。本研究で観察された、新生仔期 MK-801 慢性投与ラットの示す scopolamine および MK-801 に対する感受性の亢進は、ヒトを対象としたこれらの観察と類似するようみえる。新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットは、統合失調症の生物学的な指標とされる PPI の障害を示すが (Wang et al., 2003; Uehara et al., 2010)、近年 scopolamine が PPI を阻害し、clozapine がこの PPI 障害を改善することが報告されている (Singer & Yee, 2012)。Clozapine は非定型抗精神病薬の 1 つであり、ムスカリン M4 受容体の部分的作用薬として作用することが知られる (Zorn et al., 1994; Zeng et al., 1997)。これらの事実は、新生仔期の NMDA 受容体遮断によって生じた行動異常にムスカリン受容体を介した神経伝達の異常が関与していることを示唆するとともに、新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断ラットが統合失調症のモ

デルとなりうる可能性を示している。

また刺激と刺激との連合学習は生体の多くの行動の基礎をなしており、連合学習の障害は多様な行動の側面に影響を及ぼし、ある状況において適切な行動をとるという適応的な反応を生体が表出するのを困難にする。ヒトでは、発達障害において連合学習の障害がみられることがあり、注意欠陥多動性障害や失読症の児童では視覚刺激と対応した音との対連合に障害がみられることが報告されている (Chang et al., 1999; Gutowski & Chechile, 1987; Li et al., 2009; Rudel et al., 1976)。このようなヒトの対連合学習と動物を対象とした条件づけとは実際には異なる点も多いと考えられるものの、両者の間に共通する生理的基盤が存在することも予想される。これらの発達障害の原因の一部として、妊娠中の母体の疾患や薬物の摂取、環境有害物質への曝露などが挙げられているが、本研究は周産期の NMDA 受容体拮抗薬投与がこれらの発達障害の原因となる可能性を示唆する。

本研究は、成体期の正常な行動を支える神経回路網の発達にはグルタミン酸 NMDA 受容体が正常に機能することが必要不可欠であり、周産期に外因性の物質 (NMDA 受容体拮抗薬) によってこの受容体の働きが阻害されると、グルタミン酸を含め、ドーパミン、アセチルコリンなどの神経伝達物質の機能も著しい影響を受け、このような神経系の変化が広範囲にわたって行動に影響を及ぼすことを示唆する。さらに本研究は、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットにおける行動異常はヒトの精神疾患や行動障害に類似するものであり、周産期における NMDA 受容体の機能阻害がこれらの疾患に関与する可能性を示唆し、妊娠期の母体の NMDA 受容体拮抗薬の濫用の危険性を改めて強調するとともに、臨床場面における周産期の NMDA 受容体拮抗薬の利用も慎重に検討されるべきであ



ることを示唆するものである。

## 要約

哺乳類にとって出生前後の期間は初期の神経発達において非常に重要な時期であり、神経の成長を制限するような事象に対して脆弱な時期であると考えられている。とりわけ、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸とその受容体の1種である N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体は、初期の脳発達において非常に重要な役割を果たし、拮抗薬投与による周産期の NMDA 受容体遮断が神経の発達異常を生じることが示されてきた。NMDA 受容体拮抗薬の嗜癖性薬物としての濫用は社会的な問題となっている。また、NMDA 受容体拮抗薬は臨床場面で麻酔薬として利用される。そのため、周産期の NMDA 受容体遮断が神経発達にどのような効果を及ぼすのかを明らかにすることは、社会的にも、臨床的にも重要な問題である。ただし、神経系の発達異常は必ずしも行動レベルでの異常と一致するものではないため、中枢神経系の活動の最終的なアウトプットである行動に焦点を当て、周産期の NMDA 受容体遮断の影響を様々な行動指標で検討することが重要であると考えられる。

新生仔期のラットに NMDA 受容体拮抗薬を投与すると、中枢神経系に神経化学的、神経解剖学的、神経生理学的な変化が生じ、この影響は長期間にわたって持続することが知られている。しかし新生仔期の NMDA 受容体遮断が後の行動に及ぼす影響に関しては、完全には解明されていない。そのため本研究では、新生仔期の NMDA 受容体遮断が後の行動に及ぼす影響に関して新たな知見を加えることを目的とし、新生仔期 MK-801 慢性投与が成体期の薬物誘発性過活動と、連合学習に及ぼす影響について検討を行った。

新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットはドーパミン作用薬や NMDA 受容

体拮抗薬などが持つ移動活動量亢進作用に対し鋭敏であり、この薬物誘発性過活動の亢進と神経化学的観察とがよく相関することから、移動活動量の変化を指標として各種薬物への感受性について検討することは、新生仔期 NMDA 受容体遮断によって生じた神経化学的变化を推測するうえで有効であると考えられた。ムスカリン性アセチルコリン受容体は様々な種類の行動の調節に関与しており、その拮抗薬である *scopolamine* は、ラットの移動活動量を増加させることが知られている。新生仔期 NMDA 受容体遮断は、中枢神経系におけるムスカリン受容体の発現を変化させることが報告されているが (du Bois et al., 2009b)、このようなムスカリン受容体の変化が、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの行動調節に関与しているのかどうかは明らかではなかった。そこで本研究では、ムスカリン受容体を介した神経伝達の変化が新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットの行動調節に関与している可能性について検討を行うため、新生仔期のラットに NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 を慢性投与し、ラットが成体に達した後に *scopolamine* 誘発性過活動について検討した (第 3 章)。また新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断ラットが空間学習課題・空間記憶課題において障害を示すという報告は多いが、ラットの学習・記憶能力の測定によく用いられる条件づけパラダイムを利用して新生仔期 NMDA 受容体遮断の効果を検討した研究は非常に少なく、新生仔期 NMDA 受容体慢性遮断ラットが、刺激と刺激との連合を獲得し利用することができるのかが明らかでなかった。そこで本研究では新生仔期 NMDA 受容体遮断が連合能力に及ぼす影響について調べるため、新生仔期 MK-801 慢性投与ラットを用いて報酬性の連合を要する条件性場所嗜好と嫌悪性の連合を要する恐怖条件づけを利用して検討を行った。

第 1 章では、発達中の脳における NMDA 受容体遮断が神経発達に及

ばす影響と成体期の脳および行動に及ぼす影響について概説し、第 2 章では本研究の目的を述べるとともに、本研究で用いた一般的方法について記述した。

第 3 章では、新生仔期 MK-801 投与が、MK-801 および scopolamine の持つ移動活動量亢進作用に対する感受性を増加させることが示された (第 1 節)。この結果より、本研究は、同処置がドーパミン作用薬や NMDA 受容体拮抗薬のみならず、ムスカリン受容体拮抗薬の持つ移動活動量亢進作用に対しても感受性を高めることを初めて示した。新生仔期 NMDA 受容体遮断が脳内の複数の部位において NMDA 受容体の発現を増加させたことからすると (du Bois et al., 2009a; Sircar, 2003)、MK-801 急性投与に対する反応性の亢進は、NMDA 受容体感受性の上昇を反映していると考えられた。同様に、scopolamine 急性投与に対する反応性の増加も、新生仔期 NMDA 受容体遮断によってムスカリン受容体の感受性が亢進したことを示すものと考えられた。これまで新生仔期 NMDA 受容体遮断によって前頭前皮質と海馬におけるムスカリン受容体発現が変化することが報告されていたが (du Bois et al., 2009b)、本研究の結果は、移動活動量の調節に関与する脚橋被蓋核や背外側被蓋核などにおいてもムスカリン受容体の機能的変化が生じている可能性を示唆した。また成体期のラットに慢性的に MK-801 を投与しても、MK-801 急性投与による移動活動量亢進の程度は変化しなかったことから (第 2 節)、成熟後の脳における NMDA 受容体慢性遮断がその後の神経化学的な特性に及ぼす影響は小さいことが示された。

第 4 章では、新生仔期 NMDA 受容体遮断が、後の methamphetamine 誘発性条件性場所選好に及ぼす影響について検討した。その結果、新生仔期 MK-801 投与ラットは、methamphetamine 誘発性条件性場所選好

の障害を示した（第 1 節）。このラットはスクロース溶液に対して高い選好を示し（第 2 節）、報酬性の感受性が低下している可能性は低いと判断されたため、条件性場所選好の障害は、新生仔期 NMDA 受容体遮断によって、報酬と刺激、とりわけ文脈との連合が障害されることを示すものと考えられた。また成体期のラットに慢性的に MK-801 を投与しても、その後の methamphetamine 誘発性条件性場所選好は障害されず（第 3 節）、成体期の NMDA 受容体慢性遮断はその後の報酬性の連合に影響しないことが明らかとなった。

第 5 章では、新生仔期 NMDA 受容体遮断が恐怖条件づけとその消去に及ぼす影響について検討した。新生仔期 MK-801 投与ラットは文脈条件づけにおいて統制群と同等の成績を示した（第 1 節）。一方で、手がかり条件づけにおいては、条件刺激に対するフリージング率は統制群より有意に低く、手がかり恐怖条件づけの障害を示した（第 2 節）。この結果から、新生仔期の NMDA 受容体遮断は嫌悪性の条件づけにおいて、嫌悪刺激と文脈との連合には影響しないものの、嫌悪刺激と明確な手がかり刺激との連合を阻害することが示唆された。

本研究より、新生仔期の NMDA 受容体慢性遮断は、後の NMDA 受容体およびムスカリン受容体の感受性を増加させること、報酬と文脈との連合を阻害すること、そして嫌悪刺激と明確な手がかり刺激との連合を阻害することが強く示唆された。新生仔期 MK-801 投与ラットに対して施行したいくつかの行動テストについては、成体期に同様の処置を行ったラットでもテストを行った。その結果、成体期 MK-801 投与は行動テストの結果に影響しなかった。このことは、新生仔期の未成熟な脳が NMDA 受容体遮断に対してより鋭敏であり、生後初期の脳発達における NMDA 受容体の重要性をより強調するものといえる。新生仔期 MK-801

投与ラットの示した scopolamine に対する感受性の増加は、scopolamine が健常者に精神症状を生じさせ、統合失調症患者の症状を悪化させるという報告に類似する。また、新生仔期 MK-801 投与ラットにおいて観察された連合学習の障害は、ヒトの学習障害・発達障害にみられる連合学習の障害と関連する可能性がある。本研究は、成体期の正常な行動を支える神経回路網の発達には、グルタミン酸 NMDA 受容体が正常に機能することが必要不可欠であり、周産期に外因性の物質によってこの受容体の働きが阻害されると、グルタミン酸を含め、ドーパミン、アセチルコリンなどの神経伝達物質の機能も著しい影響を受け、このような神経系の変化が広範囲にわたって行動に影響を及ぼすことを示唆する。さらに本研究は、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットにおける行動異常はヒトの精神疾患や行動障害に類似するものであり、周産期における NMDA 受容体の機能低下がこれらの疾患に関与する可能性を示唆し、妊娠期の母体の NMDA 受容体拮抗薬の濫用の危険性を改めて強調するとともに、臨床場面における周産期の NMDA 受容体拮抗薬の利用も慎重に検討される必要があることを示唆するものである。

## 引用文献

- Abraham, W.C., and Mason, S.E. (1988). Effects of the NMDA receptor/channel antagonists CPP and MK801 on hippocampal field potentials and long-term potentiation in anesthetized rats. *Brain Res.* *462*, 40-46.
- Akillioglu, K., Binokay, S., and Kocahan, S. (2012). The effect of neonatal N-methyl-D-aspartate receptor blockade on exploratory and anxiety-like behaviors in adult BALB/c and C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.* *233*, 157-161.
- Amani, M., Samadi, H., Doosti, M.-H., Azarfarin, M., Bakhtiari, A., Majidi-Zolbanin, N., Mirza-Rahimi, M., and Salari, A.-A. (2013). Neonatal NMDA receptor blockade alters anxiety- and depression-related behaviors in a sex-dependent manner in mice. *Neuropharmacology* *73*, 87-97.
- Anagnostaras, S.G., Maren, S., and Fanselow, M.S. (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J. Neurosci.* *19*, 1106-1114.
- Andersen, J.D., and Pouzet, B. (2004). Spatial memory deficits induced by perinatal treatment of rats with PCP and reversal effect of D-serine. *Neuropsychopharmacology* *29*, 1080-1090.
- Del Arco, A., Segovia, G., and Mora, F. (2008). Blockade of NMDA receptors in the prefrontal cortex increases dopamine and acetylcholine release in the nucleus accumbens and motor activity.

- Psychopharmacology *201*, 325–338.
- Baier, P.C., Blume, A., Koch, J., Marx, A., Fritzer, G., Aldenhoff, J.B., and Schiffelholz, T. (2009). Early postnatal depletion of NMDA receptor development affects behaviour and NMDA receptor expression until later adulthood in rats--a possible model for schizophrenia. *Behav. Brain Res.* *205*, 96–101.
- Bardo, M.T., and Bevins, R.A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl.)* *153*, 31–43.
- Barnes, C.A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* *93*, 74–104.
- Barnes, C.A., and McNaughton, B.L. (1985). An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. *Behav. Neurosci.* *99*, 1040–1048.
- Bauer, E.P., Schafe, G.E., and LeDoux, J.E. (2002). NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *J. Neurosci.* *22*, 5239–5249.
- Birrell, J.M., and Brown, V.J. (2000). Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J. Neurosci.* *20*, 4320–4324.
- Bey, T., and Patel, A. (2007). Phencyclidine Intoxication and Adverse Effects: A Clinical and Pharmacological Review of an Illicit Drug.



- Cal. J. Emerg. Med. 8, 9–14.
- Bliss, T.V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)* 232, 331–356.
- Boctor, S.Y., and Ferguson, S.A. (2010). Altered adult locomotor activity in rats from phencyclidine treatment on postnatal days 7, 9 and 11, but not repeated ketamine treatment on postnatal day 7. *Neurotoxicology* 31, 42–54.
- Du Bois, T.M., Hsu, C.-W., Li, Y., Tan, Y.Y., Deng, C., and Huang, X.-F. (2008). Altered dopamine receptor and dopamine transporter binding and tyrosine hydroxylase mRNA expression following perinatal NMDA receptor blockade. *Neurochem. Res.* 33, 1224–1231.
- Du Bois, T.M., Deng, C., Han, M., Newell, K.A., and Huang, X.-F. (2009a). Excitatory and inhibitory neurotransmission is chronically altered following perinatal NMDA receptor blockade. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 19, 256–265.
- Du Bois, T.M., Newell, K.A., Han, M., Deng, C., and Huang, X.-F. (2009b). Perinatal PCP treatment alters the developmental expression of prefrontal and hippocampal muscarinic receptors. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 37–40.
- Broberg, B.V., Dias, R., Glenthøj, B.Y., and Olsen, C.K. (2008). Evaluation of a neurodevelopmental model of schizophrenia--early postnatal PCP treatment in attentional set-shifting. *Behav. Brain*

Res. 190, 160–163.

- Broberg, B.V., Glenthøj, B.Y., Dias, R., Larsen, D.B., and Olsen, C.K. (2009). Reversal of cognitive deficits by an ampakine (CX516) and sertindole in two animal models of schizophrenia--sub-chronic and early postnatal PCP treatment in attentional set-shifting. *Psychopharmacology (Berl.)* 206, 631–640.
- Calandrea, L., Desmedt, A., Decorte, L., and Jaffard, R. (2005). A different recruitment of the lateral and basolateral amygdala promotes contextual or elemental conditioned association in Pavlovian fear conditioning. *Learn Mem* 12, 383–388.
- Canteras, N.S., and Swanson, L.W. (1992). Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 324, 180–194.
- Castro, C.A., Silbert, L.H., McNaughton, B.L., and Barnes, C.A. (1989). Recovery of spatial learning deficits after decay of electrically induced synaptic enhancement in the hippocampus. *Nature* 342, 545–548.
- Chang, H.T., Klorman, R., Shaywitz, S.E., Fletcher, J.M., Marchione, K.E., Holahan, J.M., Stuebing, K.K., Brumaghim, J.T., and Shaywitz, B.A. (1999). Paired-associate learning in attention-deficit/hyperactivity disorder as a function of hyperactivity-impulsivity and oppositional defiant disorder. *J Abnorm Child Psychol* 27, 237–245.
- Chartoff, E.H., Heusner, C.L., and Palmiter, R.D. (2005). Dopamine

- is not required for the hyperlocomotor response to NMDA receptor antagonists. *Neuropsychopharmacology* *30*, 1324-1333.
- Chapman, C.A., Yeomans, J.S., Blaha, C.D., and Blackburn, J.R. (1997). Increased striatal dopamine efflux follows scopolamine administered systemically or to the tegmental pedunculo-pontine nucleus. *Neuroscience* *76*, 177-186.
- Cho, Y.H., Friedman, E., and Silva, A.J. (1999). Ibotenate lesions of the hippocampus impair spatial learning but not contextual fear conditioning in mice. *Behav. Brain Res.* *98*, 77-87.
- Coleman, L.G. Jr., Jarskog, L.F., Moy, S.S., and Crews, F.T. (2009). Deficits in adult prefrontal cortex neurons and behavior following early postnatal NMDA antagonist treatment. *Pharmacol Biochem Behav* *93*, 322-330.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J., and McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* *334*, 33-46.
- Dall'Olivo, R., Facchinetti, F., Contestabile, A., and Gandolfi, O. (1994). Chronic neonatal blockade of N-methyl-D-aspartate receptor by CGP 39551 increases dopaminergic function in adult rat. *Neuroscience* *63*, 451-455.
- Davis, S., Butcher, S.P., and Morris, R.G. (1992). The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J. Neurosci.* *12*,

21–34.

Dargan, P.I., and Wood, D.M. (2012). Recreational drug use in the Asia Pacific region: improvement in our understanding of the problem through the UNODC programmes. *J Med Toxicol* 8, 295–299.

DeSousa, N.J., Bush, D.E.A., and Vaccarino, F.J. (2000). Self-administration of intravenous amphetamine is predicted by individual differences in sucrose feeding in rats. *Psychopharmacology* 148, 52–58.

Dobbing, J., and Sands, J. (1973). Quantitative growth and development of human brain. *Arch. Dis. Child.* 48, 757–767.

Dobbing, J., and Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* 3, 79–83.

Elhardt, M., Martinez, L., and Tejada-Simon, M.V. (2010). Neurochemical, behavioral and architectural changes after chronic inactivation of NMDA receptors in mice. *Neurosci. Lett.* 468, 166–171.

Facchinetti, F., Ciani, E., Dall’Olio, R., Virgili, M., Contestabile, A., and Fonnum, F. (1993). Structural, neurochemical and behavioural consequences of neonatal blockade of NMDA receptor through chronic treatment with CGP 39551 or MK-801. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 74, 219–224.

Facchinetti, F., Dall’Olio, R., Ciani, E., Sparapani, M., Virgili, M., and Contestabile, A. (1994). Long-lasting effects of chronic neonatal blockade of N-methyl-D-aspartate receptor through the

- competitive antagonist CGP 39551 in rats. *Neuroscience* *60*, 343–353.
- Feenstra, M.G.P., Botterblom, M.H.A., and van Uum, J.F.M. (2002). Behavioral arousal and increased dopamine efflux after blockade of NMDA-receptors in the prefrontal cortex are dependent on activation of glutamatergic neurotransmission. *Neuropharmacology* *42*, 752–763.
- Floresco, S.B. (2013). Prefrontal dopamine and behavioral flexibility: shifting from an “inverted-U” toward a family of functions. *Front Neurosci* *7*, 62.
- Floresco, S.B., Magyar, O., Ghods-Sharifi, S., Vexelman, C., and Tse, M.T.L. (2006). Multiple dopamine receptor subtypes in the medial prefrontal cortex of the rat regulate set-shifting. *Neuropsychopharmacology* *31*, 297–309.
- Forster, G.L., and Blaha, C.D. (2000). Laterodorsal tegmental stimulation elicits dopamine efflux in the rat nucleus accumbens by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci.* *12*, 3596–3604.
- Forster, G.L., and Blaha, C.D. (2003). Pedunculopontine tegmental stimulation evokes striatal dopamine efflux by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the midbrain and pons of the rat. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 751–762.
- Foster, A.C., and Fagg, G.E. (1987). Neurobiology. Taking apart NMDA receptors. *Nature* *329*, 395–396.
- Fredriksson, A., and Archer, T. (2003). Hyperactivity following

- postnatal NMDA antagonist treatment: reversal by D-amphetamine. *Neurotox Res* 5, 549-564.
- Fujii, W., Kuribara, H., and Tadokoro, S. (1990). Cross interaction between methamphetamine and scopolamine by means of ambulatory activity in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 52, 533-539.
- Gorter, J.A., and de Bruin, J.P. (1992). Chronic neonatal MK-801 treatment results in an impairment of spatial learning in the adult rat. *Brain Res.* 580, 12-17.
- Gorter, J.A., Botterblom, M.H., Feenstra, M.G., and Boer, G.J. (1992a). Chronic neonatal NMDA receptor blockade with MK-801 alters monoamine metabolism in the adult rat. *Neurosci. Lett.* 137, 97-100.
- Gorter, J.A., Veerman, M., and Mirmiran, M. (1992b). Hippocampal neuronal responsiveness to NMDA agonists and antagonists in the adult rat neonatally treated with MK-801. *Brain Res.* 572, 176-181.
- Gutowski, W.E., and Chechile, R.A. (1987). Encoding, storage, and retrieval components of associative memory deficits of mildly mentally retarded adults. *Am J Ment Defic* 92, 85-93.
- Halpern, J.H. (2004). Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States. *Pharmacol. Ther.* 102, 131-138.
- Harris, L.W., Sharp, T., Gartlon, J., Jones, D.N.C., and Harrison, P.J. (2003). Long-term behavioural, molecular and morphological effects of neonatal NMDA receptor antagonism. *Eur. J. Neurosci.*

18, 1706–1710.

- Heale, V., and Harley, C. (1990). MK-801 and AP5 impair acquisition, but not retention, of the Morris milk maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 36, 145-149.
- Hebb, D.O. (1949). *The organization of behavior*. New York: Wiley
- Hirai, K., Yoshioka, H., Kihara, M., Hasegawa, K., Sakamoto, T., Sawada, T., and Fushiki, S. (1999). Inhibiting neuronal migration by blocking NMDA receptors in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 114, 63–67.
- Hirasawa, T., Wada, H., Kohsaka, S., and Uchino, S. (2003). Inhibition of NMDA receptors induces delayed neuronal maturation and sustained proliferation of progenitor cells during neocortical development. *J. Neurosci. Res.* 74, 676–687.
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovskaja, V., Turski, L., and Olney, J.W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283, 70–74.
- Isaac, W.L., Nonneman, A.J., Neisewander, J., Landers, T., and Bardo, M.T. (1989). Prefrontal cortex lesions differentially disrupt cocaine-reinforced conditioned place preference but not conditioned taste aversion. *Behav. Neurosci.* 103, 345–355.
- Ito, R., Robbins, T.W., McNaughton, B.L., and Everitt, B.J. (2006). Selective excitotoxic lesions of the hippocampus and basolateral amygdala have dissociable effects on appetitive cue and place conditioning based on path integration in a novel Y-maze

- procedure. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 3071–3080.
- Javitt, D.C., and Zukin, S.R. (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* *148*, 1301–1308.
- Jentsch, J.D., Tran, A., Taylor, J.R., and Roth, R.H. (1998). Prefrontal cortical involvement in phencyclidine-induced activation of the mesolimbic dopamine system: behavioral and neurochemical evidence. *Psychopharmacology (Berl.)* *138*, 89–95.
- Jin, J., Gong, K., Zou, X., Wang, R., Lin, Q., and Chen, J. (2013). The blockade of NMDA receptor ion channels by ketamine is enhanced in developing rat cortical neurons. *Neuroscience Letters* *539*, 11–15.
- Johnson, J.W., and Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* *325*, 529–531.
- Johnson, K.M., and Snell, L.D. (1985). Effects of phencyclidine (PCP)-like drugs on turning behavior, 3H-dopamine uptake, and 3H-PCP binding. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *22*, 731–735.
- Johnson, K.M., Phillips, M., Wang, C., and Kevetter, G.A. (1998). Chronic phencyclidine induces behavioral sensitization and apoptotic cell death in the olfactory and piriform cortex. *J. Neurosci. Res.* *52*, 709–722.
- Kawabe, K., and Miyamoto, E. (2008). Effects of neonatal repeated MK-801 treatment on delayed nonmatching-to-position responses in rats. *Neuroreport* *19*, 969–973.
- Kawabe, K., Ichitani, Y., and Iwasaki, T. (1998a). Effects of



- intrahippocampal AP5 treatment on radial-arm maze performance in rats. *Brain Res.* *781*, 300–306.
- Kawabe, K., Yoshihara, T., Ichitani, Y., and Iwasaki, T. (1998b). Intrahippocampal D-cycloserine improves MK-801-induced memory deficits: radial-arm maze performance in rats. *Brain Res.* *814*, 226–230.
- Kawabe, K., Iwasaki, T., and Ichitani, Y. (2007). Repeated treatment with N-methyl-D-aspartate antagonists in neonatal, but not adult, rats causes long-term deficits of radial-arm maze learning. *Brain Res.* *1169*, 77–86.
- Kelso, S.R., Ganong, A.H., and Brown, T.H. (1986). Hebbian synapses in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *83*, 5326–5330.
- Kihara, M., Yoshioka, H., Hirai, K., Hasegawa, K., Kizaki, Z., and Sawada, T. (2002). Stimulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors inhibits neuronal migration in embryonic cerebral cortex: a tissue culture study. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *138*, 195–198.
- Kim, J.J., and Fanselow, M.S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* *256*, 675–677.
- Kocahan, S., Akillioglu, K., Binokay, S., Sencar, L., and Polat, S. (2013). The effects of N-Methyl-D-Aspartate receptor blockade during the early neurodevelopmental period on emotional behaviors and cognitive functions of adolescent Wistar rats. *Neurochem. Res.* *38*, 989–996.
- Komuro, H., and Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration

- by NMDA receptors. *Science* 260, 95–97.
- Krystal, J.H., Karper, L.P., Seibyl, J.P., Freeman, G.K., Delaney, R., Bremner, J.D., Heninger, G.R., Bowers, M.B., Jr, and Charney, D.S. (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 199–214.
- Kuribara, H., and Tadokoro, S. (1983). Development of tolerance to ambulation-increasing effect of scopolamine dependent on environmental factors in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 33, 1041–1048.
- Lahti, A.C., Koffel, B., LaPorte, D., and Tamminga, C.A. (1995). Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13, 9–19.
- Latysheva, N.V., and Rayevsky, K.S. (2003). Chronic neonatal N-methyl-D-aspartate receptor blockade induces learning deficits and transient hypoactivity in young rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 787–794.
- LeDoux, J.E. (2000). Emotion Circuits in the Brain. *Annual Review of Neuroscience* 23, 155–184.
- Levey, A.I., Kitt, C.A., Simonds, W.F., Price, D.L., and Brann, M.R. (1991). Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* 11, 3218–3226.
- Li, H., Shu, H., McBride-Chang, C., Liu, H.Y., and Xue, J. (2009). Paired associate learning in Chinese children with dyslexia.

- Journal of Experimental Child Psychology *103*, 135–151.
- Mathur, A., Shandarin, A., LaViolette, S.R., Parker, J., and Yeomans, J.S. (1997). Locomotion and stereotypy induced by scopolamine: contributions of muscarinic receptors near the pedunculopontine tegmental nucleus. *Brain Res.* *775*, 144–155.
- Mayer, M.L., and Westbrook, G.L. (1985). The action of N-methyl-D-aspartic acid on mouse spinal neurones in culture. *J Physiol* *361*, 65-90.
- McDonald, J.W., and Johnston, M.V. (1990). Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *15*, 41–70.
- McNaughton, B.L., Barnes, C.A., Rao, G., Baldwin, J., and Rasmussen, M. (1986). Long-term enhancement of hippocampal synaptic transmission and the acquisition of spatial information. *J. Neurosci.* *6*, 563–571.
- Monaghan, D.T., and Cotman, C.W. (1985). Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *J. Neurosci.* *5*, 2909-2919.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* *12*, 529-540.
- Moretti, R., Torre, P. (2008). Memantine: potential and demonstrated effects of a new drug. *Hot Topics in Neurology and Psychiatry.* *1*,

7- 20.

Morris, R.G. (1989). Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J. Neurosci.* *9*, 3040–3057.

Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* *319*, 774–776.

Nader, K., Majidishad, P., Amorapanth, P., and LeDoux, J.E. (2001). Damage to the Lateral and Central, but Not Other, Amygdaloid Nuclei Prevents the Acquisition of Auditory Fear Conditioning. *Learn. Mem.* *8*, 156–163.

O'Donnell, J., Stemmelin, J., Nitta, A., Brouillette, J., and Quirion, R. (2003). Gene expression profiling following chronic NMDA receptor blockade-induced learning deficits in rats. *Synapse* *50*, 171–180.

荻田喜代一・米田幸雄 (1991). NMDA レセプター複合体の新しいアンタゴニスト. *神経精神薬理* *13*, 817–828.

Olney, J.W., Farber, N.B., Wozniak, D.F., Jevtovic-Todorovic, V., and Ikonomidou, C. (2000). Environmental agents that have the potential to trigger massive apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Environ. Health Perspect.* *108* Suppl 3, 383–388.

Olney, J.W., Wozniak, D.F., Jevtovic-Todorovic, V., Farber, N.B.,

- Bittigau, P., and Ikonomidou, C. (2002). Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol.* *12*, 488-498.
- Peet, N.M., Grabowski, P.S., Laketic-Ljubojevic, I., and Skerry, T.M. (1999). The glutamate receptor antagonist MK801 modulates bone resorption in vitro by a mechanism predominantly involving osteoclast differentiation. *FASEB J.* *13*, 2179-2185.
- Phillips, R.G., and LeDoux, J.E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* *106*, 274-285.
- Phillips, M., Wang, C., and Johnson, K.M. (2001). Pharmacological characterization of locomotor sensitization induced by chronic phencyclidine administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *296*, 905-913.
- Reiprich, P., Kilb, W., and Luhmann, H.J. (2005). Neonatal NMDA receptor blockade disturbs neuronal migration in rat somatosensory cortex in vivo. *Cereb. Cortex* *15*, 349-358.
- Rezvani, A.H., Eddins, D., Slade, S., Hampton, D.S., Christopher, N.C., Petro, A., Horton, K., Johnson, M., and Levin, E.D. (2008). Neonatal 6-hydroxydopamine lesions of the frontal cortex in rats: persisting effects on locomotor activity, learning and nicotine self-administration. *Neuroscience* *154*, 885-897.
- Romanski, L.M., Clugnet, M.C., Bordi, F., and LeDoux, J.E. (1993). Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behav. Neurosci.* *107*, 444-450.

- Rudel, R.G., Denckla, M.B., and Spalten, E. (1976). Paired associate learning of Morse code and Braille letter names by dyslexic and normal children. *Cortex* *12*, 61-70.
- Sastry, B.R., Goh, J.W., and Auyeung, A. (1986). Associative induction of posttetanic and long-term potentiation in CA1 neurons of rat hippocampus. *Science* *232*, 988-990.
- Schiffelholz, T., Hinze-Selch, D., and Aldenhoff, J.B. (2004). Perinatal MK-801 treatment affects age-related changes in locomotor activity from childhood to later adulthood in rats. *Neuroscience Letters* *360*, 157-160.
- Seeburg, P.H. (1993). The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* *16*, 359-365.
- Seillier, A., and Giuffrida, A. (2009). Evaluation of NMDA receptor models of schizophrenia: divergences in the behavioral effects of sub-chronic PCP and MK-801. *Behav. Brain Res.* *204*, 410-415.
- Shanthanelson, M., Arvanian, V.L., and Mendell, L.M. (2009). Input-specific plasticity of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic responses in neonatal rat motoneurons. *Eur. J. Neurosci.* *29*, 2125-2136.
- Sircar, R. (2003). Postnatal phencyclidine-induced deficit in adult water maze performance is associated with N-methyl-D-aspartate receptor upregulation. *Int. J. Dev. Neurosci.* *21*, 159-167.
- Singer, P., and Yee, B.K. (2012). Reversal of scopolamine-induced disruption of prepulse inhibition by clozapine in mice. *Pharmacol.*

- Biochem. Behav. *101*, 107-114.
- Sircar, R., Follesa, P., and Ticku, M.K. (1996). Postnatal phencyclidine treatment differentially regulates N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA expression in developing rat cerebral cortex. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *40*, 214-220.
- Sircar, R., and Li, C.S. (1994). PCP/NMDA receptor-channel complex and brain development. *Neurotoxicol Teratol* *16*, 369-375.
- Sircar, R., and Soliman, K.F.A. (2003). Effects of postnatal PCP treatment on locomotor behavior and striatal D2 receptor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *74*, 943-952.
- Stefani, M.R., and Moghaddam, B. (2005). Transient N-methyl-D-aspartate receptor blockade in early development causes lasting cognitive deficits relevant to schizophrenia. *Biol. Psychiatry* *57*, 433-436.
- Tandon, R., Greden, J.F., and Haskett, R.F. (1993). Cholinergic hyperactivity and negative symptoms: behavioral effects of physostigmine in normal controls. *Schizophr. Res.* *9*, 19-23.
- Thompson, B.L., Levitt, P., and Stanwood, G.D. (2009). Prenatal exposure to drugs: effects on brain development and implications for policy and education. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 303-312.
- Tseng, K.Y., Chambers, R.A., and Lipska, B.K. (2009). The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* *204*, 295-305.
- Uehara, T., Sumiyoshi, T., Seo, T., Itoh, H., Matsuoka, T., Suzuki, M.,

- and Kurachi, M. (2009). Long-term effects of neonatal MK-801 treatment on prepulse inhibition in young adult rats. *Psychopharmacology (Berl.)* *206*, 623–630.
- Uehara, T., Sumiyoshi, T., Seo, T., Matsuoka, T., Itoh, H., Suzuki, M., and Kurachi, M. (2010). Neonatal exposure to MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, enhances methamphetamine-induced locomotion and disrupts sensorimotor gating in pre- and postpubertal rats. *Brain Res.* *1352*, 223–230.
- Venable, N., and Kelly, P.H. (1990). Effects of NMDA receptor antagonists on passive avoidance learning and retrieval in rats and mice. *Psychopharmacology (Berl.)* *100*, 215–221.
- Vignon, J., Pinet, V., Cerruti, C., Kamenka, J.M., and Chicheportiche, R. (1988). [<sup>3</sup>H]N-[1-(2-benzo(b)thiophenyl)cyclohexyl]piperidine ([<sup>3</sup>H]BTCP): a new phencyclidine analog selective for the dopamine uptake complex. *Eur. J. Pharmacol.* *148*, 427–436.
- Wang, C., McInnis, J., West, J.B., Bao, J., Anastasio, N., Guidry, J.A., Ye, Y., Salvemini, D., and Johnson, K.M. (2003). Blockade of phencyclidine-induced cortical apoptosis and deficits in prepulse inhibition by M40403, a superoxide dismutase mimetic. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *304*, 266–271.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., and Mishina, M. (1992). Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* *3*, 1138–1140.
- Watts, A.G. (1998). Dehydration-Associated Anorexia: Development and Rapid Reversal. *Physiology & Behavior* *65*, 871–878.



- Wedzony, K., Fijał, K., and Chocyk, A. (2005). Blockade of NMDA receptors in postnatal period decreased density of tyrosine hydroxylase immunoreactive axonal arbors in the medial prefrontal cortex of adult rats. *J. Physiol. Pharmacol.* *56*, 205–221.
- Wedzony, K., Fijał, K., Mackowiak, M., Chocyk, A., and Zajaczkowski, W. (2008a). Impact of postnatal blockade of N-methyl-D-aspartate receptors on rat behavior: a search for a new developmental model of schizophrenia. *Neuroscience* *153*, 1370–1379.
- Wiltgen, B.J., Sanders, M.J., Anagnostaras, S.G., Sage, J.R., and Fanselow, M.S. (2006). Context Fear Learning in the Absence of the Hippocampus. *J. Neurosci.* *26*, 5484–5491.
- Wozniak, D.F., Olney, J.W., Kettinger, L., 3rd, Price, M., and Miller, J.P. (1990). Behavioral effects of MK-801 in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* *101*, 47–56.
- Zeng, X.P., Le, F., and Richelson, E. (1997). Muscarinic m4 receptor activation by some atypical antipsychotic drugs. *European Journal of Pharmacology* *321*, 349–354.
- Zhang, W.N., Bast, T., and Feldon, J. (2001). The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnesias of fear after infusion of N-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist MK-801 into the ventral hippocampus. *Behav. Brain Res.* *126*, 159–174.
- Zorn, S.H., Jones, S.B., Ward, K.M., and Liston, D.R. (1994). Clozapine is a potent and selective muscarinic M4 receptor

agonist. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* 269, R1-R2.