



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	覚醒剤精神病モデルラットにおけるgamma-aminobutyric acid(GABA) : benzodiazepine神経伝達系の役割について
Author(s)	伊藤, 耕一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第4661号
Issue Date	1999-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3151343
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51584
Type	doctoral thesis
File Information	000000336533.pdf



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

氏名 伊藤 耕一

学位論文題名

覚醒剤精神病モデルラットにおける gamma-aminobutyric acid (GABA) -benzodiazepine 神経伝達系の役割について

覚醒剤 (Methamphetamine : MA) を長期間乱用すると、次第に幻覚妄想状態などの精神分裂病に類似した精神症状が出現し、いったん出現すると薬物休止後も再発準備性が持続し、少量の覚醒剤再使用や、情動ストレス、環境変化などによって精神症状が再燃することが知られている。このような精神分裂病の幻覚妄想状態との横断面での類似性と、再燃、治療抵抗性との縦断面での類似性ことから、覚醒剤精神病は精神分裂病の病態モデルとして注目されている。

一方、覚醒剤を実験動物に反復投与すると運動増強作用や常同行動惹起作用が次第に増強し、休薬後にも過敏性が長時間持続し、覚醒剤再投与によって増強反応を示す。この現象は行動感作あるいは逆耐性 (Sensitization) と呼ばれ、コカインなど他の薬物や非特異的なストレスに対しても交差過敏性を示す。このような類似性から、動物における行動感作のメカニズムの研究は、覚醒剤精神病の解明に有益であり、さらには精神分裂病の理解にも寄与するものと期待される。

行動感作は脳内の可塑的变化を基盤に持つものと思われ、学習やキンドリングあるいは長期増強 (Long Term Potentiation) などと類似する側面を有する。すなわち、いずれの現象も反復刺激によって形成され、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受容体拮抗薬やムスカリン性アセチルコリン受容体阻害薬、タンパク合成阻害薬などによって形成が抑制される。このような現象的、薬理学的な共通性を考慮すると、学習やキンドリングに対して抑制的に働く薬剤が、どのような作用を示すかを検討することは意義のあることである。

抑制性神経伝達物質である GABA-benzodiazepine 作動薬は、学習やキンドリングに対し抑制的に働くことが知られている。臨床的にも精神分裂病の急性症状に対する鎮静作用や不安軽減効果を示すという報告や、慢性精神分裂病患者の死後脳研究において benzodiazepine 受容体に変化を認めたとする報告も認められ、精神分裂病の病態にも GABA-benzodiazepine 系はある程度関与していると推定される。本研究では、抑制性神経伝達物質である GABA-benzodiazepine 受容体複合体に作用点を持つ benzodiazepine 系薬剤を用い、精神分裂病のモデルでもある覚醒剤精神病モデル動物を対象に、運動増強作用を指標として行動感作に対する影響を検討した。

実験には 190~270g の Wistar-King 系雄性ラットを使用した。投与後の行動は視察的観察あるいは、赤外線センサーを用い運動量を測定した。視察的観察については、90 分間の各々のラットの行動評価点の合計点 (合計行動評価点) について、Kruskal-Wallis の検定を行い、有意差の認められる場合には Mann-Whitney の U 検定を行い各群間比較した ($P<0.05$)。赤外線センサーによる測定は 2 元配置分散分析 (two-way ANOVA) により各群と時間との交互作用をみた。交互作用が認められる場合、Duncan の方法による多重比較を行い有意差をみた ($P<0.05$)。さらに 1 元配置分散分析 (one-way ANOVA)

を行い、各時間ごとに Duncan らの方法による多重比較を行い各群間の比較を行った ($P < 0.05$)。使用薬剤としては、benzodiazepine 作動薬は clonazepam (CZP)、benzodiazepine 拮抗薬は flumazenil (Flu) を使用した。

はじめに、MA 行動感作獲得過程に及ぼす benzodiazepine 作動薬の影響について検討した。MA (1mg/kg) の投与を 10 日間反復して受けたラットは、生食反復処置を受けた群と比較して、7~8 日間の休薬期間において MA 1mg/kg を皮下投与した際の合計行動評価点が有意に増加していた。このことは行動感作が形成されていたことを示している。CZP を併用反復処置すると、CZP は行動感作獲得を用量依存性に抑制していた。

次に、MA 行動感作獲得過程に及ぼす benzodiazepine 拮抗薬の影響について検討した。Flu (10mg/kg) +MA 反復処置群について、7~8 日間の休薬期間において各群に MA (1mg/kg) を皮下投与した際の運動量の検討では、MA 反復処置群は生食反復処置群に対し有意に運動量が増加していた。Flu (10mg/kg) +MA 反復処置群でも運動量が増加しており、MA 反復処置群との間には有意な変化は認められなかった。また、急性投与実験において、Flu (10mg/kg) の投与量では MA の急性投与による運動増加に対しては影響を与えなかった。以上から Flu は MA 行動感作獲得過程は抑制しないと考えられる。

さらに、Benzodiazepine 作動薬の MA 行動感作獲得過程抑制効果に及ぼす拮抗薬併用投与の影響について検討した。MA 反復処置群は、生食反復処置群と比較して有意に運動量が増加し行動感作が形成されていた。一方、CZP (0.5mg/kg) +MA 反復処置群は生食反復処置群との間には有意な変化は認められず、CZP (0.5mg/kg) は行動感作獲得を抑制していた。さらに、FLU (10mg/kg) +CZP+MA 反復処置群は MA 反復処置群との間には有意な変化は認められなかった。これらの結果より、FLU (10mg/kg) は CZP (0.5mg/kg) の行動感作獲得抑制効果を阻止したと考えられる。

CZP は中枢性 benzodiazepine 受容体に高い親和性と選択性をもつことが知られており、Flu が CZP の効果を抑制する点を考えると、MA 行動感作獲得に対する CZP の抑制効果は benzodiazepine 受容体を介していることが示唆される。さらに、benzodiazepine 受容体は GABAA 受容体と複合体を形成し作用を発現する。そのため、GABAA 受容体を介した神経伝達系の促進が行動感作獲得の抑制に関連していると推測される。

腹側淡蒼球と側坐核の GABA 系神経は腹側被蓋野に投射しており、腹側被蓋野は中脳—皮質辺縁系ドーパミン神経系の細胞体が存在し、行動感作獲得について重要な役割をもつことが推測されている。しかし、腹側被蓋野のドーパミン神経細胞体には主に GABAB 受容体が存在していると考えられており、GABAB 受容体作動薬の腹側被蓋野への局所投与が行動感作獲得を抑制したという報告も認められる。そのため、CZP が直接的に腹側被蓋野に作用し行動感作獲得を抑制したとは考えにくい。

一つの可能性として、CZP は前頭葉皮質の GABA-benzodiazepine 受容体に作用し、行動感作獲得を抑制したと推測することが出来るかもしれない。GABAA 受容体作動薬である 4, 5, 6, 7-tetrahydroisoxazolo[5, 4-c]pyridin-3-ol (THIP) の前頭葉皮質への局所投与が、マウスにおける amphetamine 全身投与により生じる行動感作の獲得を抑制したと報告も認められている。しかし、THIP それ自身も線条体への局所注入では常同行動を生じ、線条体では GABAA 受容体拮抗薬の bicuculline 局所投与が、行動感作獲得を抑

制するとも報告されており、これらの知見から、GABA-benzodiazepine 受容体は脳のそれぞれの部位で異なった役割を果たしている可能性が推測される。いずれにしても、今後 CZP の脳内局所投与が正確な作用部位の推定に必要と考えられる。

最後に、MA 行動感作発現過程に及ぼす benzodiazepine 作動薬の影響について検討した。MA 反復処置群は生食反復処置群と比べ運動量が有意に増加していた。これは、行動感作が形成され、かつ MA 再投与時に行動感作が発現していることを示している。さらに、MA 反復処置群では MA 再投与時に CZP (1mg/kg) を前処置しても運動量の増加に有意な変化は認められなかった。つまり、CZP は MA 行動感作の発現は抑制しないと考えられる。

動物における行動感作の成立は、覚醒剤精神病の症状に対応する現象である。したがって、本研究の結果は覚醒剤乱用開始から精神症状の発現にいたる過程において、GABA-benzodiazepine 系の関与を示唆するものである。また他の報告をも考慮すれば、精神症状の発現にも複数の伝達物質系を含む神経回路網の変化を想定すべきかもしれない。現在、精神分裂病の生物学的仮説は、ドーパミン神経終末部に注目する初期の段階から、認知記憶障害や縦断面的経過を考慮に入れた、より精密なものが求められる段階となっている。動物モデルにおいて GABA-benzodiazepine 系の関与を示す本研究結果は、精神分裂病の理解にも示唆を与えるものと言えよう。

①
覚醒剤精神病モデルラットにおける gamma-aminobutyric acid (GABA)

-benzodiazepine 神経伝達系の役割について

伊藤 耕一

北海道大学大学院医学研究科 脳科学専攻 神経機能学講座 精神医学分野

(主任 小山 司教授)

The Role of Gamma-aminobutyric Acid (GABA) -Benzodiazepine Neurotransmission
in the Animal Model of Methamphetamine-induced Psychosis

Kouich ITO

Department of Psychiatry, Neural Function, Division of Neurological Science,
Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo 060-8638, Japan

①

覚醒剤精神病モデルラットにおける gamma-aminobutyric acid (GABA)

-benzodiazepine 神経伝達系の役割について

伊藤 耕一

北海道大学大学院医学研究科 脳科学専攻 神経機能学講座 精神医学分野

(主任 小山 司教授)

The Role of Gamma-aminobutyric Acid (GABA) -Benzodiazepine Neurotransmission
in the Animal Model of Methamphetamine-induced Psychosis

Kouich ITO

Department of Psychiatry, Neural Function, Division of Neurological Science,
Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo 060-8638, Japan

Repeated administration of amphetamine or methamphetamine (MA) results in an augmentation of its locomotor activating effects, a phenomenon known as behavioral sensitization. In humans, the chronic use of the drug elicits a progressive augmentation in paranoid symptoms that closely resemble schizophrenia. Behavioral sensitization has some common properties with other forms of neural plasticity such as kindling, learning and long-term potentiation (LTP). The present study examined whether behavioral sensitization would be blocked by GABA-benzodiazepine agonists, known to inhibit kindling, learning as well as LTP.

Rats (Male Wistar-King rats) treated with MA (1mg/kg, s.c.) for 10 days displayed significantly enhanced motor activity when tested with MA (1mg/kg) after a 7-8 day withdrawal, indicating the acquisition of behavioral sensitization. Pretreatment with clonazepam (CZP) (0.5 and 2.0mg/kg), a GABA-benzodiazepine agonists, prior to MA administration prevented the acquisition of the phenomenon. In contrast, pretreatment with flumazenil (Flu) (10mg/kg), a GABA-benzodiazepine antagonist, prior to MA administration has no influence on the acquisition of sensitization. However, pretreatment with Flu prior to CZP administration reversed the inhibitory effect of CZP. CZP showed no effect on the expression of sensitization in the sensitized rats when given prior to the MA readministration. These results suggest that stimulation of GABA-benzodiazepine receptors plays a role in the acquisition but not in the expression of behavioral sensitization.

Key words: Methamphetamine, Sensitization, Clonazepam, Flumazenil, Benzodiazepine, GABA

緒言

覚醒剤 (Methamphetamine) を長期間乱用すると、次第に幻覚妄想状態などの精神分裂病に類似した精神症状が出現し、いったん出現すると薬物休止後も再発準備性が持続し、少量の覚醒剤再使用や、情動ストレス、環境変化などによって精神症状が再燃することが知られている^{1) 2)}。このような精神分裂病の幻覚妄想状態との横断面での類似性と、再燃、治療抵抗性との縦断面での類似性から、覚醒剤精神病は精神分裂病の病態モデルとして注目されている。

一方、覚醒剤を実験動物に反復投与すると運動増強作用や常同行動惹起作用が次第に増強し、休薬後にも過敏性が長時間持続し、覚醒剤再投与によって増強反応を示す。この現象は行動感作あるいは逆耐性 (Sensitization) と呼ばれ、コカインなど他の薬物や非特異的なストレスに対しても交差過敏性を示す^{3) 4)}。このような類似性から、動物における行動感作のメカニズムの研究は、覚醒剤精神病の解明に有益であり、さらには精神分裂病の理解にも寄与するものと期待される。

行動感作の神経化学的基盤の検討は、これまでもっぱらドーパミン系を対象に行われた。覚醒剤の急性行動効果が、そのドーパミン放出促進作用に基づくためである。しかし、最近の知見では、他の神経伝達物質系の関与を示唆する報告が散見される。たとえば、グルタミン酸⁵⁻⁹⁾ やアセチルコリン系^{10) 11)} の関与を示唆する報告や一酸化窒素の関与を示唆する研究¹²⁾ も認められる。

行動感作は脳内の可塑的变化を基盤に持つものと思われ、学習やキンドリングあるいは長期増強 (Long Term Potentiation) などと類似する側面を有する。すなわち、いずれの現象も反復刺激によって形成され、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受容体拮抗薬¹³⁻¹⁵⁾ やムスカリン性アセチルコリン受容体阻害薬¹⁶⁻¹⁸⁾、タンパク合成阻害薬¹⁹⁻²¹⁾ などによって形成が抑制される。このような現象的、薬理学的な共通性を考慮すると、学習やキンドリングに対して抑制的に働く薬剤が、どのような作用を示すかを検討することは意義のあることである。

抑制性神経伝達物質である GABA-benzodiazepine 作動薬は、学習やキンドリングに対し抑制的に働くことが知られている²²⁻²⁴⁾。臨床的にも精神分裂病の急性症状に対する鎮静作用や不安軽減効果を示すという報告^{25) 26)} や、慢性精神分裂病患者の死後脳研究において benzodiazepine 受容体に変化を認めたとする

報告も認められ²⁷⁾、精神分裂病の病態にも GABA-benzodiazepine 系はある程度関与していると推定される。本研究では、抑制性神経伝達物質である GABAA-benzodiazepine 受容体複合体に作用点を持つ benzodiazepine 系薬剤を用い、精神分裂病のモデルでもある覚醒剤精神病モデル動物を対象に、運動増強作用を指標として行動感作に対する影響を検討した。

材料と方法

1. 実験動物

実験には 190~270g の Wister-King 系雄性ラットを使用した。ラットは 12 時間周期の明暗サイクル（明期；6：30~18：30）、室温 24℃、湿度 50% の恒温恒湿条件下で、摂食、飲水の自由にできる状態で、1 ケージに 1 頭ずつ飼育した。ラットは実験開始の少なくとも 4 日前より毎日ハンドリングを行った。動物実験は北海道大学医学部「動物実験に関する指針」に則った。

2. 使用薬物

使用薬剤は、methamphetamine hydrochloride については、大日本製薬より購入し、生食に溶解して使用した。Flumazenil については山之内製薬、clonazepam については Roche 社より各々提供を受け、Vehicle（0.5% sodium carboxymethylcellulose）に懸濁して使用した。全ての投与量は塩を含有した量として計算した。全ての注射処置は午前中に皮下投与した。

3. 行動評価方法

行動評価は次のいずれかの方法を用いた。

1) 視察的観察

投与後の行動は Ellinwood ら²⁸⁾の方法（Table1）に基づいて 10 分間隔で計 90 分間視察的に評価した（Fig 1~Fig 3）。評価は 2 名で行い、1 名は処置に blind とした。2 名の評価者の評価間信頼度（interscore reliability）は高値（0.9 以上）であったが、相違が認められる場合は 2 名の平均値を評価点とした（本研究の methamphetamine 投与量 1mg/kg では、初回投与では通常 4~5 点、行動感作獲得後では 6~7 点であり、8 点に達することはない）。

2) 赤外線センサーによる測定

投与後の行動は運動量を赤外線センサーを用いて測定した。実験開始の 2 時間前よりラットを観察室に移動し、十分な安静状態をはかった後に、赤外線セ

ンサー (Supermex: 室町機械株式会社、東京) 下において、ホームケージ内でのラットの水平方向の運動を 10 分間毎に 90 分間測定した (反復する立ち上がり行動などの垂直方向運動もカウントされるが、水平方向運動の測定に対し、有意な影響はもたらさない点が確認されている)。

4. 実験方法

(実験 1) Methamphetamine (MA) 急性投与、及び行動感作獲得過程に及ぼす benzodiazepine 作動薬 clonazepam (CZP) の影響

A) 急性投与実験

生食群 (1ml/kg)、CZP 群、MA 群 (1mg/kg)、CZP+MA 群の 4 群に分け皮下投与した。CZP は 0.125、0.5、2.0mg/kg それぞれの投薬量について検討した。CZP+MA 群では CZP を MA 投与 10 分前に前処置し、視察的に評価した。

B) 反復投与実験

生食反復処置群、CZP 反復処置群、MA 反復処置群、CZP+MA 反復処置群の 4 群に分けた。MA 反復処置群には、MA 1mg/kg を 1 日目から 10 日目まで 1 日 1 回皮下投与した。CZP 反復処置群には、CZP を同様のスケジュールで投与した。CZP+MA 反復処置群には、CZP 皮下投与 10 分後に MA 1mg/kg を同様に投与した。CZP は 0.125、0.5、2.0mg/kg 各々の投薬量について検討した。生食反復処置群には、生食 1ml/kg を同様に投与した。処置後 7~8 日間の休薬期間において上記 4 群に対して MA 1mg/kg を皮下投与し、視察的に評価した。

C) 反復処置中の経過

Vehicle+MA 反復処置群、CZP+MA 反復処置群の 2 群については、CZP 0.5mg/kg の場合の反復処置中の行動の変化を、1、6、10 日目及び 7~8 日間の休薬期間において MA 1mg/kg を皮下投与した際 (17 日目) に視察的に評価した。

(実験 2) MA 急性投与、及び行動感作獲得過程に及ぼす benzodiazepine 拮抗薬 flumazenil (Flu) の影響

生食反復処置群 (1ml/kg)、Flu 反復処置群 (10mg/kg)、MA 反復処置群 (1mg/kg)、Flu+MA 反復処置群の 4 群に分けた。生食反復処置群と MA 反復処置群には反復処置の 10 分前に Vehicle を皮下投与し、Flu+MA 反復処置群では Flu を MA 投与 10 分前に投与した。Flu 反復処置群には Flu 投与 10 分後に

生食を投与した。それぞれの処置を1日1回10日間行い、7～8日間の休薬期間において各群にMA (1mg/kg) を皮下投与し、Flu 併用が行動感作に与える影響をみた。運動量の測定には赤外線センサーを用い、測定は反復投与1日目 (a、急性投与への影響)、休薬期間後のMA再投与時 (b、行動感作獲得過程に及ぼす影響) に行った。

(実験3) MA 行動感作獲得過程に及ぼすCZPとFlu併用投与の影響

生食反復処置群、MA反復処置群、CZP (0.5mg/kg) +MA反復処置群、Flu+CZP+MA反復処置群の4群に分けた。FluはCZP投与5分前に前処置し、CZPはMA投与10分前に前処置した。CZP、Flu投与時に、その他の群にはVehicleの投与を行った。それぞれの処置を1日1回10日間行い、7～8日間の休薬期間において各群にMA (1mg/kg) を皮下投与した。行動量の測定は赤外線センサーを用い、実験2と同様に反復投与1日目及び、休薬期間後のMA再投与時に行った。

(実験4) MA 行動感作発現過程に及ぼすCZPの影響

生食 (1ml/kg) または、MA (1mg/kg) を1日1回10日間皮下投与し、7～8日間の休薬期間後にMA反復処置群の半数には、CZP (1mg/kg) 投与10分後に、残りの半数にはVehicleの投与10分後にMA (1mg/kg) を再投与した。生食反復処置群にはVehicleの投与10分後にMA (1mg/kg) を投与し、MA行動感作発現効果に対するCZPの影響について検討した。投与後の行動は運動量を赤外線センサーを用いて測定した。

5. 統計方法

視察的観察については、90分間の各々のラットの行動評価点の合計点 (合計行動評価点) について、Kruskal-Wallisの検定を行い、有意差の認められる場合にはMann-WhitneyのU検定を行い各群間比較した ($P<0.05$)。

赤外線センサーによる測定は2元配置分散分析 (two-way ANOVA) により各群と時間との交互作用をみた。交互作用が認められる場合、Duncanの方法による多重比較を行い有意差をみた ($P<0.05$)。さらに1元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、各時間ごとにDuncanらの方法による多重比較を行い各群間の比較を行った ($P<0.05$)。

結果

1. 実験 1

a) MA 急性投与に及ぼす CZP の影響

Fig.1 は MA の急性投与による運動量増加に対する CZP の影響について示した。結果は 90 分間の各々のラット行動評価点の合計点について、中央値 (median) と 4 分位間隔 (inter-quartile range) を用いて表示した。

CZP 各々の投与量において、CZP 併用投与群及び MA 単独投与群共に、生食投与群に対し、有意に合計行動評価点が増加していた (* $P<0.05$)。CZP 0.125mg/kg 併用投与群では MA 単独投与群と比較して合計行動評価点が増加していた (# $P<0.05$)。CZP0.5 及び 2.0mg/kg 併用投与群では MA 単独投与群との間に有意差は認められなかった。しかし、CZP2.0mg/kg 単独投与群は生食群と比較して有意に行動評価点が減少していた (** $P<0.05$)。

b) MA 行動感作獲得過程に及ぼす CZP の影響

Fig.2 は MA 行動感作獲得過程に及ぼす CZP の影響について示した。生食反復処置群、CZP 反復処置群、MA 反復処置群、CZP+MA 反復処置群の 4 群について、反復処置後 7~8 日間の休薬期間において上記 4 群に対して MA1mg/kg を皮下投与した際の合計行動評価点を、急性投与実験の方法に準じて表示した。

CZP0.125mg/kg において、CZP 併用反復処置群及び MA 単独反復処置群共に、生食反復処置群に対し有意に合計行動評価点が増加していた (* $P<0.05$)。しかし、CZP0.5 及び 2.0mg/kg では、MA 反復処置群は生食反復処置群に対し合計行動評価点が増加していたが (* $P<0.05$)、CZP 併用反復処置群は生食反復処置群との間に有意差は認められなかった。

(なお、CZP0.125mg/kg においては CZP 単独反復処置は省略した。より高用量の CZP 0.5、2.0mg/kg において生食反復処置群との間に有意な変化が認められなかったためである。)

c) MA 反復処置中の運動量の増加に対する CZP の影響

Fig.3 は Vehicle+MA 反復処置群と CZP+MA 反復処置群の反復処置 1 日目、6 日目、10 日目、さらに反復処置後 7~8 日間の休薬期間において上記 2 群に対し MA1mg/kg を皮下投与した際 (17 日目) の合計行動評価点を比較検討した。結果は急性投与実験に準じて表示した。Vehicle+MA 反復処置群は 10 日目、及び 17 日目において、1 日目と比較して有意に合計行動評価点が増加し

ていた (* $P<0.05$)。一方、CZP+MA 反復処置群、はどの時点においても 1 日目と比較して有意な変化は認められなかった。17 日目では、CZP+MA 反復処置群は Vehicle+MA 反復処置群と比較して有意に合計行動評価点が低かった (** $P<0.05$)。

2. 実験 2

a) MA 急性投与に及ぼす Flu の影響

Fig.4 は MA の急性投与による運動増加に対する Flu の影響について、赤外線センサーの測定値を 10 分間毎に 90 分間にわたって表示した。MA 投与群 (1mg/kg) は生食投与群に対し有意に運動量が増加していたが、Flu (10mg/kg) +MA 投与群との間には有意な変化は認められなかった。図には表示していないが、Flu の投薬量は 20mg/kg まで増量したが同様な結果を示した。

b) MA 行動感作獲得過程に及ぼす Flu の影響

Fig.5 は生食反復処置群、Flu 反復処置群、MA 反復処置群、Flu+MA 反復処置群について、7~8 日間の休薬期間をおいて各群に MA (1mg/kg) を皮下投与した際の運動量を 90 分間にわたって表示した。

MA 反復処置群は生食反復処置群に対し有意に運動量が増加していたが (* $P<0.05$)、Flu (10mg/kg) +MA 投与群との間には有意な変化は認められなかった。

3. 実験 3

MA 行動感作獲得過程に及ぼす CZP と Flu 併用投与の影響

生食反復処置群、MA 反復処置群、CZP (0.5mg/kg) +MA 反復処置群、Flu (10mg/kg) +CZP+MA 反復処置群の 4 群に分け、赤外線センサーの測定値を時間経過とともに表示した。Fig.6 は反復処置 1 日目 (急性投与実験) の運動量を表示した。MA 群、CZP+MA 群、FLU+CZP+MA 群の 3 群間には有意な変化は認められなかった。

Fig.7 はそれぞれの処置を 1 日 1 回 10 日間行い、7~8 日間の休薬期間をおいて各群に MA (1mg/kg) を皮下投与した際の運動量を表示した。MA 反復処置群は生食反復処置群と比較して有意に運動量が増加していた (* $P<0.05$)。一方、CZP (0.5mg/kg) +MA 反復処置群は生食反復処置群との間には有意な変化は認められなかった。FLU (10mg/kg) +CZP+MA 反復処置群は MA 反復処

置群との間には有意な変化は認められなかった。

4.実験 4

MA 行動感作発現過程に及ぼす CZP の影響

Fig.8 は休薬期間後に MA (1mg/kg) を投与した際の赤外線センサーの測定値を時間経過とともに表示した。

MA 反復処置群は、MA 再投与の 10 分前に Vehicle を処置した群も CZP を処置した群も同様に、生食反復処置群と比べ運動量が有意に増加していた (* $P<0.05$)。

考察

1.MA 行動感作獲得過程に及ぼす benzodiazepine 作動薬の影響

MA (1mg/kg) の投与を 10 日間反復して受けたラットは、生食反復処置を受けた群と比較して、7~8 日間の休薬期間において MA 1mg/kg を皮下投与した際の合計行動評価点が有意に増加していた。このことは行動感作が形成されていたことを示している。CZP を併用反復処置すると、少量 (0.125mg/kg) においては、生食反復処置群に対し MA 単独反復処置群と同様に有意に合計行動評価点が増加していたが、中等度以上の CZP (0.5、2.0mg/kg) 併用反復処置群は、生食反復処置群との間に有意差はなく行動感作は認められなかった (Fig.2)。この結果は CZP は行動感作獲得を用量依存性に抑制することを示している。

今回の結果と類似して、Weiss ら²⁹⁾ は benzodiazepine 作動薬である diazepam がコカインによる行動感作を抑制したと報告している。彼らは、1 日目に特定の環境下でコカインの投与を受けたラットに、2 日目にも同じ特定の環境において同量のコカインを投与した場合、環境依存性に行動感作が成立する (context-dependent sensitization) というモデルを用いている。彼らは 1 日目に diazepam を併用すると、cocaine 急性投与による運動の増加が抑制されたために、2 日目の行動感作の出現も抑制されたと説明している。しかし、今回の実験ではラットの MA ないし CZP の反復投与も休薬後の MA 再投与もホームケージにおいて行われており、行動感作の獲得のうえで環境依存性の要素は少ないと考えられる。また、行動感作の獲得を抑制する CZP の投与量 (0.5、2.0mg/kg) では、MA の急性投与による運動増加に対しては影響を与えないた

め (Fig.1)、Weiss らと同様の解釈は困難である。

Benzodiazepine 系薬剤は interoceptive stimulus property をもち state-dependent learning を生じる^{30) 31)}。しかし、反復処置経過中の運動量の増加に対する CZP の影響についての検討 (Fig.3) では、CZP (0.5mg/kg) +MA 反復処置群は 1 日目と 10 日目では運動量に有意な変化は認められなかった。一方、MA 反復処置群は 10 日目には 1 日目と比較して運動量は増加していた。このため、休薬期間において MA 1mg/kg を皮下投与した際に、CZP が併用投与されていないために CZP+MA 反復処置群の運動量が増加していないとは考えられない。つまり、CZP は MA の効果に関し interoceptive stimulus として働いていたとは考えられない。

2. MA 行動感作獲得過程に及ぼす benzodiazepine 拮抗薬の影響

Flu (10mg/kg) +MA 反復処置群について、7~8 日間の休薬期間において各群に MA (1mg/kg) を皮下投与した際の運動量の検討 (Fig.5) では、MA 反復処置群は生食反復処置群に対し有意に運動量が増加していた。Flu (10mg/kg) +MA 反復処置群でも運動量が増加しており、MA 反復処置群との間には有意な変化は認められなかった。また、急性投与実験 (Fig.4) において、Flu (10mg/kg) の投与量では MA の急性投与による運動増加に対しては影響を与えなかった。以上から Flu は MA 行動感作獲得過程は抑制しないと考えられる。

Britton ら³²⁾ は我々の結果と同様に、Flu (12mg/kg i.p.) は自発運動量に影響を与えず、かつ amphetamine (0.75mg/kg) の運動量増加作用にも影響を与えないと報告している。初期の動物実験では Flu の本質的な薬理作用について不明な点が多かったが、最近の知見では部分作動薬 (partial agonist) や逆作動薬 (inverse agonist) としての性質も合わせもつと推測されている³³⁾。しかし、Brogden ら³⁴⁾ は総説の中で、部分作動薬としての作用は通常 Flu の高用量 (30~50mg/kg) で認められ、一方、逆作動薬様作用は特定のテストや環境下において、極く低用量の場合に認められると述べている。そのため、今回の実験に用いた用量 (10mg/kg) では拮抗薬として作用していると考えられる。さらに、この用量において benzodiazepine 作動薬の行動学的あるいは薬理的な作用に拮抗したという報告も散見されている³⁵⁾。

内因性 benzodiazepine 作動薬あるいは逆作動薬の存在を示唆する報告も散見

される^{36) 37)}。今回の結果は、もし仮にそれらの内因性のリガンドが存在すると仮定すれば、それらは MA の急性投与による運動増加作用及び行動感作獲得過程には直接的に関与していないと推測される。

3. Benzodiazepine 作動薬の MA 行動感作獲得過程抑制効果に及ぼす拮抗薬併用投与の影響

CZP (0.5mg/kg)、Flu (10mg/kg) の用量は MA 急性投与による運動増加作用に対し影響しない量を用いた (Fig.6)。MA 反復処置群は、生食反復処置群と比較して有意に運動量が増加し行動感作が形成されていた。一方、CZP (0.5mg/kg) +MA 反復処置群は生食反復処置群との間には有意な変化は認められず、先の実験同様に CZP (0.5mg/kg) は行動感作獲得を抑制していた。さらに、FLU (10mg/kg) +CZP+MA 反復処置群は MA 反復処置群との間には有意な変化は認められなかった (Fig.7)。これらの結果より、FLU (10mg/kg) は CZP (0.5mg/kg) の行動感作獲得抑制効果を阻止したと考えられる。

CZP は中枢性 benzodiazepine 受容体に高い親和性と選択性をもつことが知られており^{38) 39)}、Flu が CZP の効果を抑制する点を考えると、MA 行動感作獲得に対する CZP の抑制効果は benzodiazepine 受容体を介していることが示唆される。さらに、benzodiazepine 受容体は GABAA 受容体と複合体を形成し作用を発現する⁴⁰⁾。そのため、GABAA 受容体を介した神経伝達系の促進が行動感作獲得の抑制に関連していると推測される。

GABA と benzodiazepine 受容体は中枢神経系においてドーパミンの放出を調整していることが知られている^{41) 42)}。側坐核でのドーパミン受容体刺激は、腹側淡蒼球での GABA の細胞外濃度を減少させる。これらのドーパミンと GABA の相互作用は精神刺激薬の急性行動効果に関係しているかも知れない。しかし、CZP (0.5、2.0mg/kg) では MA の急性効果を抑制することなく行動感作獲得を抑制したため、CZP が MA のドーパミンの放出作用を抑制したために行動感作獲得が抑制されたとは考えにくい。

腹側淡蒼球と側坐核の GABA 系神経は腹側被蓋野に投射しており、腹側被蓋野は中脳—皮質辺縁系ドーパミン神経系の細胞体が存在し、行動感作獲得について重要な役割をもつことが推測されている⁴³⁾。しかし、腹側被蓋野のドーパミン神経細胞体には主に GABAB 受容体が存在していると考えられており

⁴⁴⁾、GABAB 受容体作動薬の腹側被蓋野への局所投与が行動感作獲得を抑制したという報告も認められる⁴³⁾。そのため、CZP が直接的に腹側被蓋野に作用し行動感作獲得を抑制したとは考えにくい。

一つの可能性として、CZP は前頭葉皮質の GABA-benzodiazepine 受容体に作用し、行動感作獲得を抑制したと推測することが出来るかもしれない。最近の報告において Karlar ら⁴⁵⁾ は、GABAA 受容体作動薬である 4, 5, 6, 7-tetrahydroisoxazolo[5, 4-c]pyridin-3-ol (THIP) の前頭葉皮質への局所投与が、マウスにおける amphetamine 全身投与により生じる行動感作の獲得を抑制したと報告している。しかし、彼らは THIP それ自身も線条体への局所注入では常同行動を生じ、線条体では GABAA 受容体拮抗薬の bicuculline 局所投与が、行動感作獲得を抑制するとも報告している⁴⁶⁾。これらの知見から、GABA-benzodiazepine 受容体は脳のそれぞれの部位で異なった役割を果たしている可能性が推測される。いずれにしても、今後 CZP の脳内局所投与が正確な作用部位の推定に必要と考えられる。

4.MA 行動感作発現過程に及ぼす benzodiazepine 作動薬の影響

行動感作発現過程に対する影響についての検討 (Fig.8) では、MA 反復処置群は生食反復処置群と比べ運動量が有意に増加していた。これは、行動感作が形成され、かつ MA 再投与時に行動感作が発現していることを示している。さらに、MA 反復処置群では MA 再投与時に CZP (1mg/kg) を前処置しても運動量の増加に有意な変化は認められなかった。つまり、CZP は MA 行動感作の発現は抑制しないと考えられる。CZP の投与量については、急性投与実験において CZP (2mg/kg) は MA による運動量増加には有意な変化を与えないものの、自発運動量を有意に減少させるため今回の投与量を選択した。

行動感作発現過程の重要な脳内作用部位としては、側坐核あるいは線条体が推測されている。精神刺激薬を反復して全身投与を受けた動物において、それらの部位へ amphetamine を直接注入すると反応は増強している³⁾⁴⁷⁾。Bedingfield らは⁴⁸⁾、GABAA 受容体拮抗薬の bicuculline の線条体への局所投与が行動感作発現を抑制すると報告している。これらの知見をもとに今回の結果を考えると、GABA-benzodiazepine 神経伝達系の促進ではなく、抑制することが行動感作発現に関連すると推測される。

5. 行動感作成立の神経科学的基盤

緒言でも述べたが、行動感作にはドーパミン系やグルタミン酸系やアセチルコリン系、タンパク合成系など複数の神経伝達物質系の関与が報告されている。これらの行動感作は、脳内の可塑的变化を基盤に持つものと思われ、学習やキンドリングあるいは Long Term potentiation などと類似する側面を有する。すなわち、いずれの現象も反復刺激によって形成され、NMDA 受容体拮抗薬やムスカリン性アセチルコリン受容体阻害薬、タンパク合成阻害薬などによって形成が抑制される。これらの知見とともに、今回の GABA 系の関与を示す結果について考察すると、行動感作の成立には脳内の可塑的变化を基盤に持つ複数の伝達物質系を含む神経回路網の活動が想定され、それらは大脳辺縁系を中心とし前頭葉皮質や中脳被蓋野を含む可能性が考えられた。

動物における行動感作の成立は、覚醒剤精神病の症状に対応する現象である⁴⁹⁾。したがって、本研究の結果は覚醒剤乱用開始から精神症状の発現にいたる過程において、GABA-benzodiazepine 系の関与を示唆するものである。また上段に述べたように他の報告をも考慮すれば、精神症状の発現にも複数の伝達物質系を含む神経回路網の変化を想定すべきかもしれない。また現在、精神分裂病の生物学的仮説は、ドーパミン神経終末部に注目する初期の段階から、認知記憶障害や縦断面的経過を考慮に入れた、より精密なものが求められる段階となっている。動物モデルにおいて GABA-benzodiazepine 系の関与を示す本研究結果は、精神分裂病の理解にも示唆を与えるものと言えよう。

結語

覚醒剤精神病モデル動物において GABA-benzodiazepine 神経伝達系の関与について検討した。

GABA-benzodiazepine 作動薬の CZP により、覚醒剤行動感作発現は抑制されなかったが、行動感作獲得は抑制した。GABA-benzodiazepine 拮抗薬の Flu では行動感作獲得は抑制されなかったが、CZP の行動感作獲得抑制効果を抑制した。

これらから GABA-benzodiazepine 受容体の刺激が覚醒剤行動感作獲得に重要な役割を示していると考えられた。この結果は覚醒剤精神病の成立において GABA-benzodiazepine 系の関与を示唆するものである。

謝辞

本研究を行うにあたり終始懇切な御指導を頂きました北海道大学大学院医学研究科 脳科学専攻 神経機能学講座 精神医学分野 助教授 大森 哲郎先生に深謝いたします。多くの貴重な御助言と御討論を頂きました同講座助手 安部川 智浩先生をはじめ、精神薬理学研究室の諸先生方に深謝いたします。文献を集めて頂きました文献相互利用会事務局の諸氏に深謝いたします。また、試薬を御提供頂きました山之内製薬株式会社ならびに Roche 社に深謝いたします。

最後に、長年にわたり御指導と御鞭撻を賜り、本研究の機会を与えて下さいました北海道大学大学院医学研究科 脳科学専攻 神経機能学講座 精神医学分野 教授 小山 司先生に深謝致します。

文献

1. 小山 司 (1982) : 覚醒剤中毒の症候.精神科 Mook3 覚醒剤有機溶剤中毒、加藤伸勝編、金原出版、東京、pp36-47.
2. Sato M, Chen C, Akiyama K, Otsuki S (1983): Acute exacerbation of paranoid psychotic state after long term abstinence in patients with previous methamphetamine psychosis. Biol Psychiatry 18: 429-440.
3. Kalivas P W, Stewart J (1991): Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress- induced sensitization of motor activity. Brain Res Rev 16: 223-244.
4. Robinson T E, Becker J B (1986): Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. Brain Res Rev 11: 157-198.
5. Karler R, Calder L D, Chaudhry I A, Turkanis S T (1989): Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801. Life Sci 45: 599-606.

6. Karler R, Calder L D, Turkanis S T (1991): DNQX blockade of amphetamine behavioral sensitization. *Brain Res* 552: 295-300.
7. Ohmori T, Abekawa T, Koyama T (1994): Competitive and noncompetitive NMDA antagonists block sensitization to methamphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 48: 587-591.
8. Stewart J S, Druhan J P (1993): Development of both conditioning and sensitization of the behavioral activating effects of amphetamine is blocked by the non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801. *Psychopharmacol* 110: 125-132.
9. Wolf M E, Khansa M R (1991): Administration of MK-801 produces sensitization to its own stimulant effects but blocks sensitization to amphetamine. *Brain Res* 562: 164-168.
10. Ohmori T, Abekawa T, Koyama T (1995): Scopolamine prevents augmentation of stereotypy induced by chronic methamphetamine treatment. *Psychopharmacology* 121: 158-163.
11. Ohmori T, Abekawa T, Koyama T (1995): Scopolamine prevents the development of sensitization to methamphetamine. *Life Sciences* 56: 1223-1229.
12. Abekawa T, Ohmori T, Koyama T (1995): Effect of nitric oxide (NO) synthesis inhibition on the development of supersensitivity to stereotype and locomotion stimulating effects of methamphetamine. *Brain Res* 679: 200-204.
13. Dingledine R, McBain C J, McNamara J O (1990): Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trend Pharmacol Sci* 11: 334-338.

- 1 4. Mcentee W J, Crook T H (1993): Glutamate; its role in learning, memory and the aging brain. *Psychopharmacology* 111: 391-401.
- 1 5. Malenka R C, Nicoll R A (1993): NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity; multiple forms and mechanisms. *Trend Neurosci* 16: 521-527.
- 1 6. Elrod K, Buccafusco J (1988): An evaluation of mechanism of scopolamine-induced impairment in two passive avoidance protocols. *Biochem Behav* 29: 15-21.
- 1 7. Hirotsu I, Hori N, Katsuda N, Ishihara T (1989): Effect of anticholinergic drug on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res* 482: 194-197.
- 1 8. Westerberg Y, Corcoran M E (1987): Antagonism of central but not peripheral cholinergic receptors retards amygdala kindling in rats. *Exper Neurol* 95: 194-206.
- 1 9. Barondes S H (1970): Cerebral protein synthesis inhibitors block long-term memory. *Nit Rev Neurobiol* 12: 177-205.
- 2 0. Otani S, Roisin-Lallemant M P, Ben-Ari Y (1992): Enhancement of extracellular protein concentrations during long-term potentiation in the rat hippocampal slice. *Neuroscience* 47: 265-272.
- 2 1. Quinton E E, Kramarcy N R (1977): Memory impairment correlates closely with cycloheximide dose and degree of inhibition of protein synthesis. *Brain Res* 131: 184.
- 2 2. Baldy-Moulinier M, Lerner-Natoli M, Rondouin G, Privat A, Benattia M, Heaulme M, Chicheportiche R (1985): GABA and limbic system kindling. In:

- L.E.R.S. (vol 3), ed by Bartholini G Bossi L, Lloyd G K, Morselli P L, Raven Press, New York, pp 187-193.
- 2 3. James G, Barbee M D (1993): Memory, benzodiazepines, and anxiety: Integration of theoretical and clinical perspectives. *J Clin Psychiatry* 54: 10 (suppl): 86-97.
- 2 4. Nilsson A, Persson M P, Hartvig P (1988): Effects of the benzodiazepine antagonist flumazenil on postoperative performance following total intravenous anesthesia with midazolam and alfentanil. *Acta Anesthesia scand* 32: 441-446.
- 2 5. Altamura A, Mauri M, Mantero M, Brunetti M (1987): Clonazepam/haloperidol combination therapy in schizophrenia: a double-blind study. *Acta Psychiatr Scand* 76: 702-706.
- 2 6. Wolkowitz O M (1990): Benzodiazepine; Augmentation of neuroleptics. In: *The neuroleptic-nonresponsive patient; characterization and treatment* ed by Angrist B, Schulz C S, American Psychiatric Press, Washington D C, pp 89-108.
- 2 7. Kiuchi Y, Kobayashi T, Takeuchi J, Scimizu H, Ogata H, Toru M (1989): Benzodiazepine receptors: Increase in post-mortem brain of chronic schizophrenics. *Eur Arch Neurol Sci* 239:71-78.
- 2 8. Dougherty G G, Ellinwood Jr E H (1983): Influence of gamma-butyrolactone on behavior due to dopaminergic drugs. *Physiol. Behav.* 30: 607-612.
- 2 9. Weiss S R B, Post R M, Pert A, Woodward R, Murman D (1989): Context-Dependent cocaine sensitization: Differential effect of haloperidol on development versus expression. *Pharmacol Biochem Behav.* 34: 655-661.

- 3 0. Overton D A (1974): Experimental methods for the study of state-dependent learning. *Federation Proc* 33: 1800-1813.
- 3 1. Nakagawa Y, Iwasaki T, Ishima T, Kimura K (1993): Interaction between benzodiazepine and GABA-A receptors in state-dependent learning. *Life Sciences* 55: 1935-1945.
- 3 2. Britton K T, Lee G, Koob G F (1988): Corticotrophin releasing factor and amphetamine exaggerate partial agonist properties of benzodiazepine antagonist Ro15-1788 in the conflict test. *Psychopharmacology* 94: 306-311.
- 3 3. File S E, Pellow S (1986): Intrinsic actions of benzodiazepine receptor antagonist Ro 15-1788. *Psychopharmacology* 88: 1-11.
- 3 4. Brogden R N, Goa K L (1988): Flumazenil; A preliminary review of its benzodiazepine antagonist properties, intrinsic activity and therapeutic use. *Drugs* 35: 448-467.
- 3 5. Bonetti E P, Pieri L, Cumin R, Schaffner R, Pieri M, Gamzu E R, Müller R K M, Haefely W (1982): Benzodiazepine antagonist Ro 15-1788: neurological and behavioral effects. *Psychopharmacology* 78: 8-18.
- 3 6. Guidotti A, Forchetti C M, Corda M G (1983): Isolation, characterization and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 3531-3533.
- 3 7. Kavaliers M, Hirst M (1986): An octadecaneuropeptide (OND) derived from diazepam binding inhibitor increases aggressive interactions in mice. *Brain Research* 383: 343-349.

- 3 8. Martini C, Lucacchini A, Hrelia S, Rossi C A (1986): Central-and peripheral-type benzodiazepine receptors. In: GABAergic transmission and anxiety, ed by Biggio G, Costa E, Raven Press, New York, pp 1-10.
- 3 9. Mccarty R, Kopin I J (1978): Alterations in plasma catecholamines and behavior during acute stress in spontaneously hypertensive and wister-kyoto normotensive rats. *Life Science* 22: 997-1006.
- 4 0. Sato S, Malow B A (1995) Benzodiazepines. In: *Antiepileptic Drugs*, Fourth Edition, ed by Levy R H, Mattson R H, Meldrum B S, Raven Press, New York, pp 725-734.
- 4 1. Invernizzi R, Pozzi L, Samanin R (1991): Release of dopamine is reduced by diazepam more in the nucleus accumbens than in the caudate nucleus of conscious rats. *Neuropharmacology* 30: 575-578.
- 4 2. Scheel-krüger J (1986): Dopamine-GABA interaction: evidence that GABA transmits, modulates and mediates dopaminergic functions in the basal ganglia and the limbic system. *Acta Neural Scand Suppl* 302: 1-54.
- 4 3. Kalivas P W, Sorg B A, Hooks M S (1993): The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav Pharmacol* 4: 315-334.
- 4 4. Sugita S, Johnson S W, North R A (1992): Synaptic inputs to GABAA and GABAB receptors originate from discrete afferent neurons. *Neuroscience Letters* 134: 207-211.
- 4 5. Karler R, Bedingfield J B, Thai D K, Calder L D (1997): The role of the frontal cortex in the mouse in behavioral sensitization to amphetamine. *Brain Research* 757: 228-235.

- 4 6 . Bedingfield J B, Calder L D, Thai D K, Karler R (1997): The role of the striatum in the mouse in behavioral sensitization to amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 56: 305-310.
- 4 7 . Pierce R C, Kalivas R W (1997): A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Reviews* 25: 192-216.
- 4 8 . Bedingfield J B, Calder L D, Thai D K, Karler R (1997): The role of the striatum in the mouse in behavioral sensitization to amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 56: 305-310.
- 4 9 . 大森 哲郎、安部川 智浩、小山 司 (1995) : 覚醒剤精神病モデル動物における環境要因と認知機能の関与. *臨精医* 24: 1507-1516.

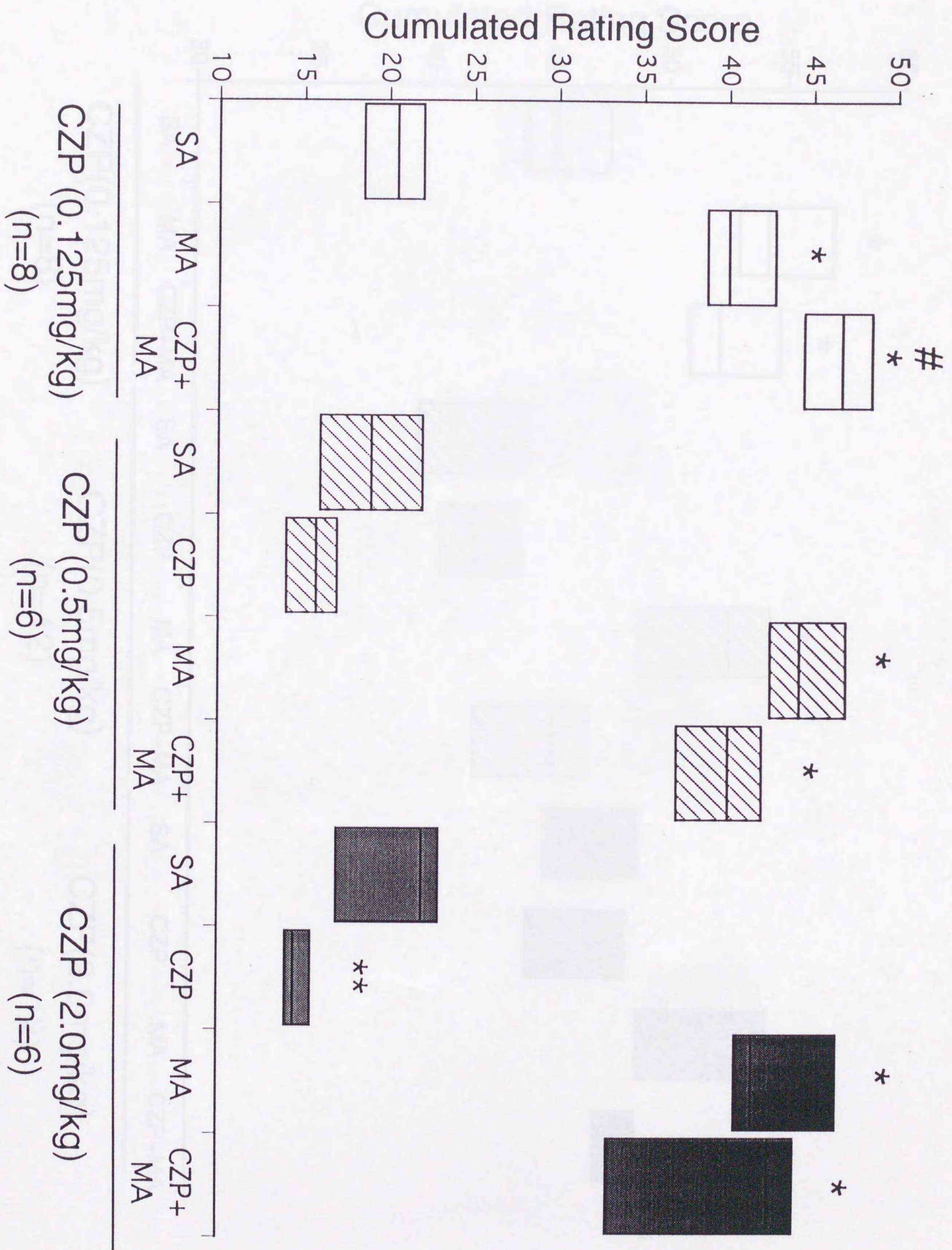


Figure1 伊藤 耕一

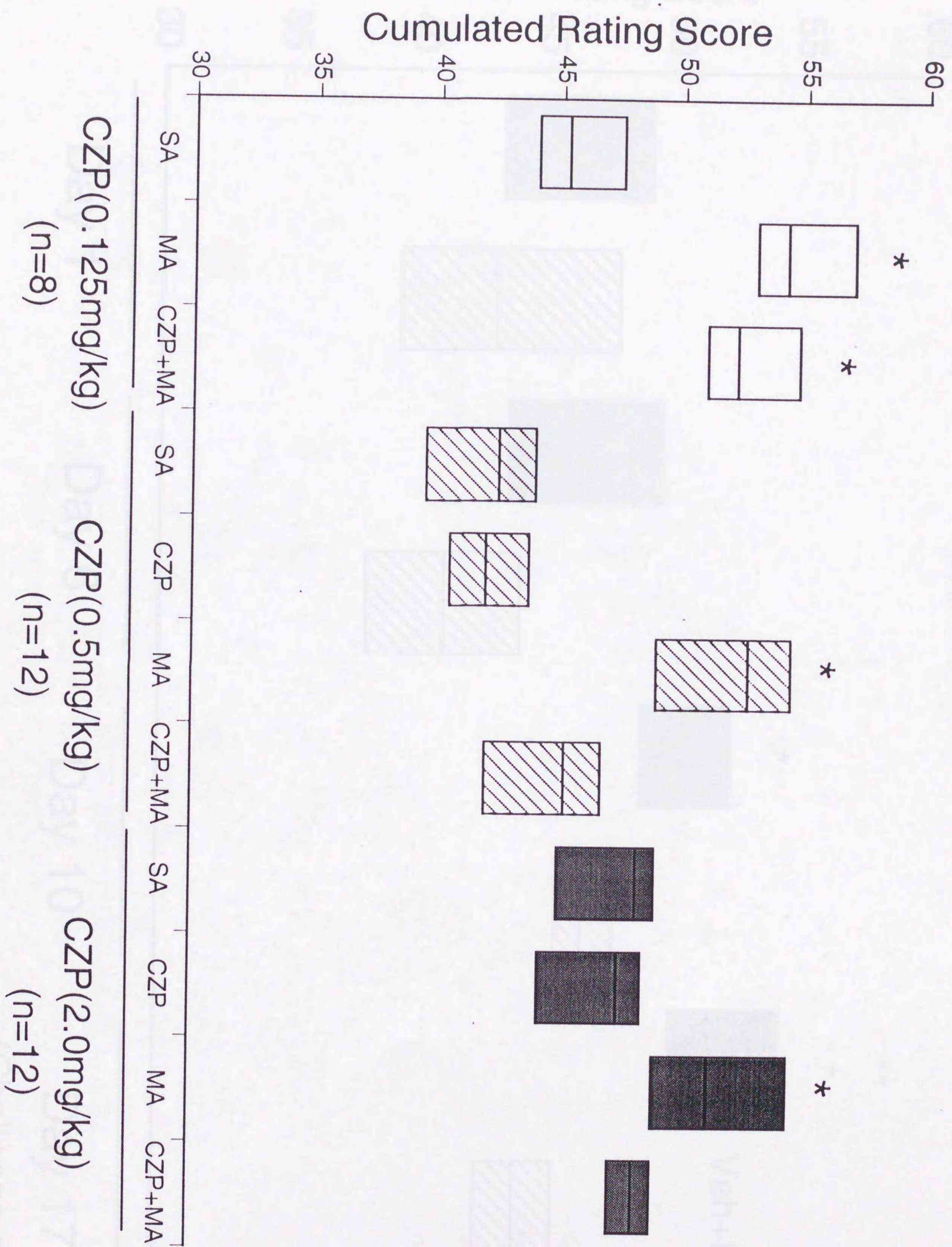


Figure2 伊藤 耕一

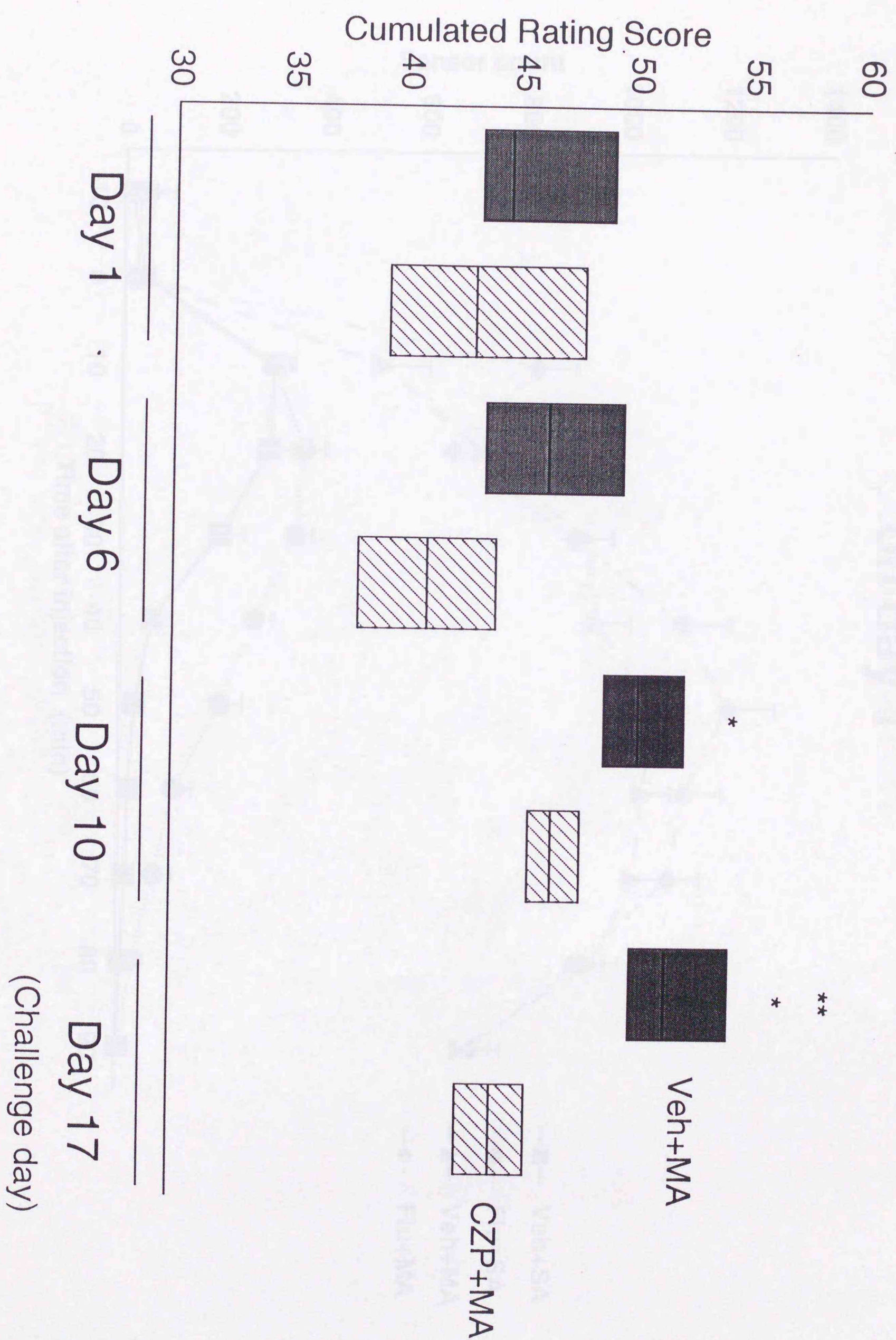


Figure3 伊藤 耕一

on day 1

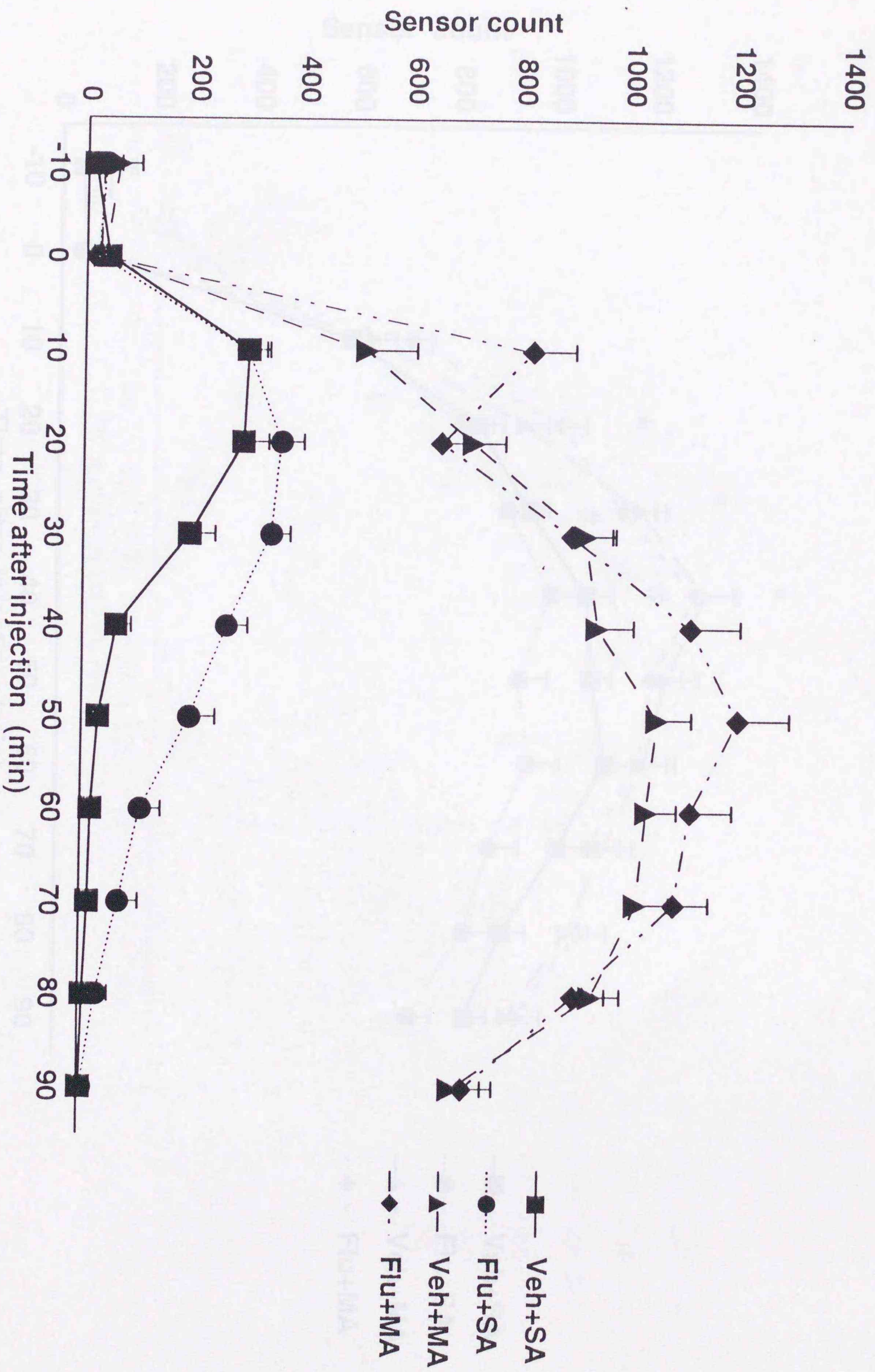
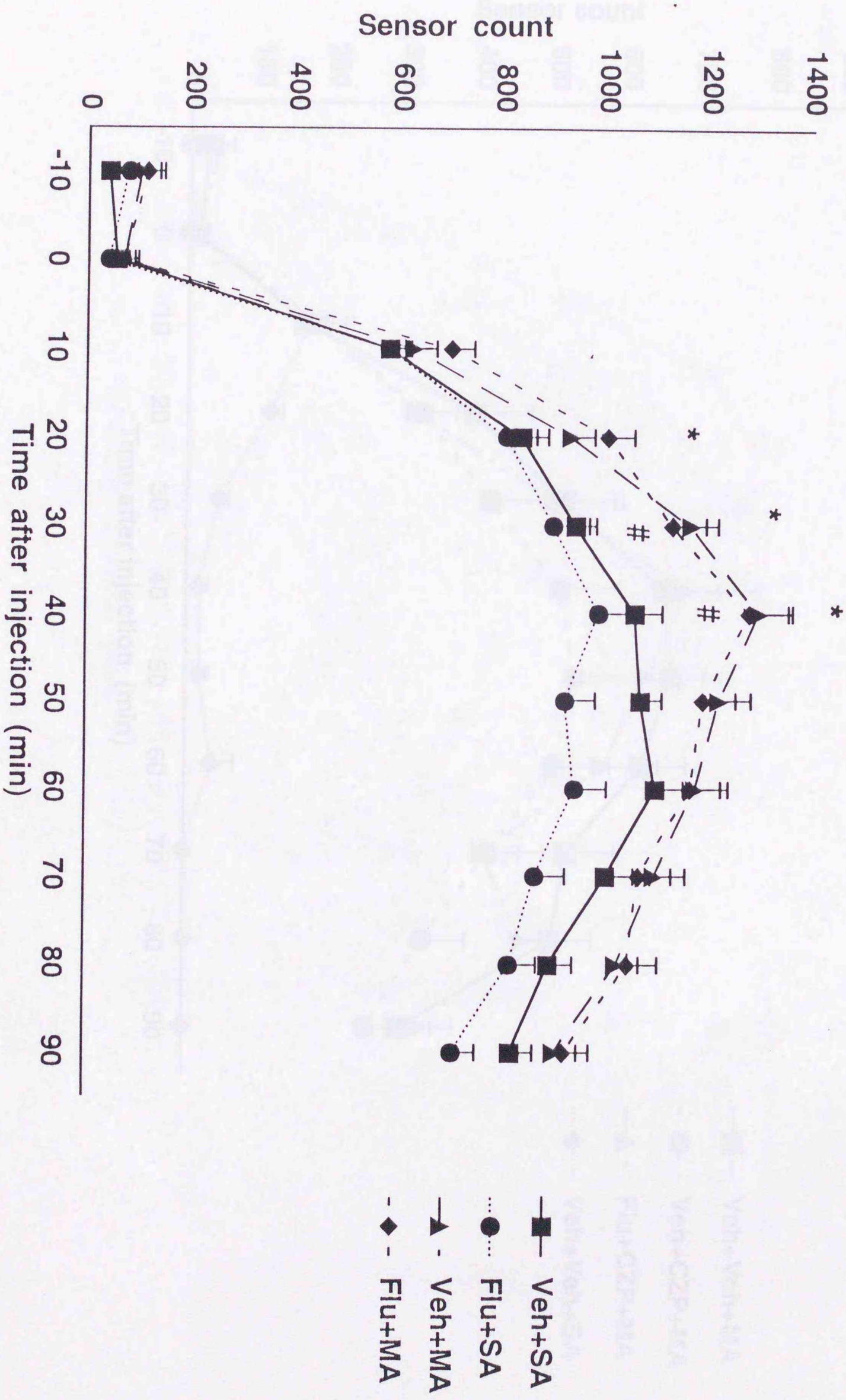


Figure4 伊藤 耕一

Challenge day



Figures5 伊藤 耕一

On day 1

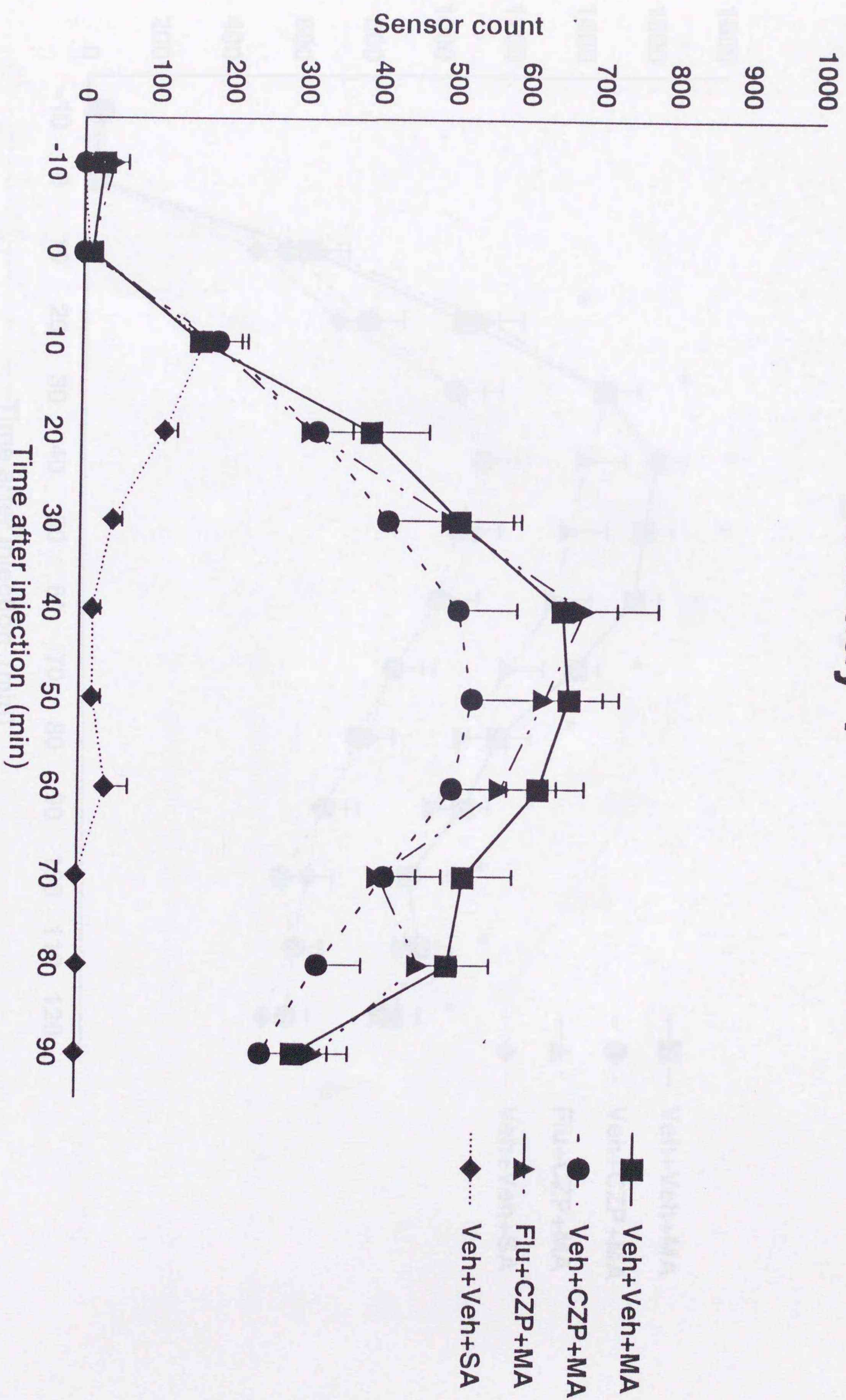


Figure6 伊藤 耕一

Challenge day

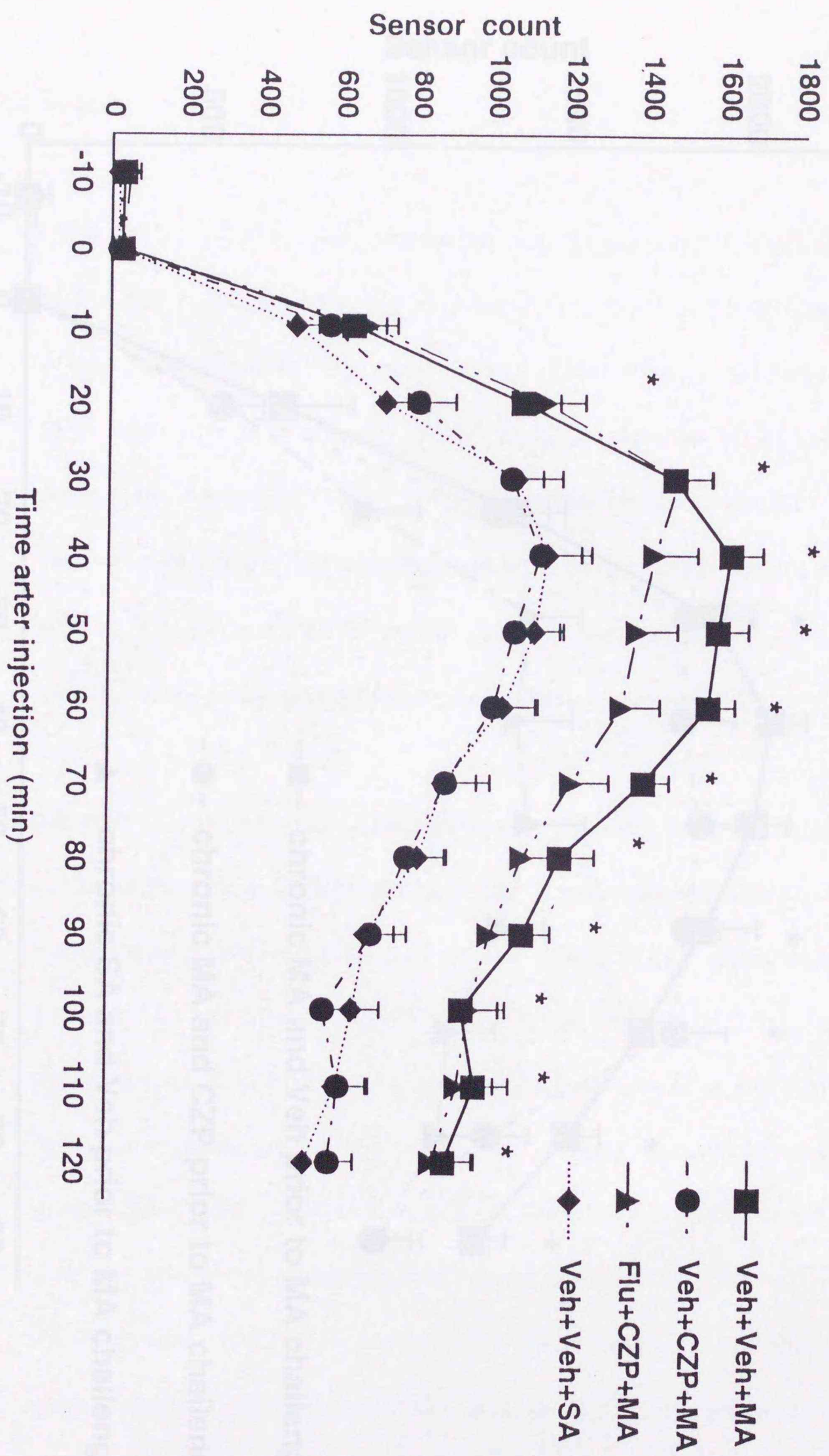


Figure7 伊藤 耕一

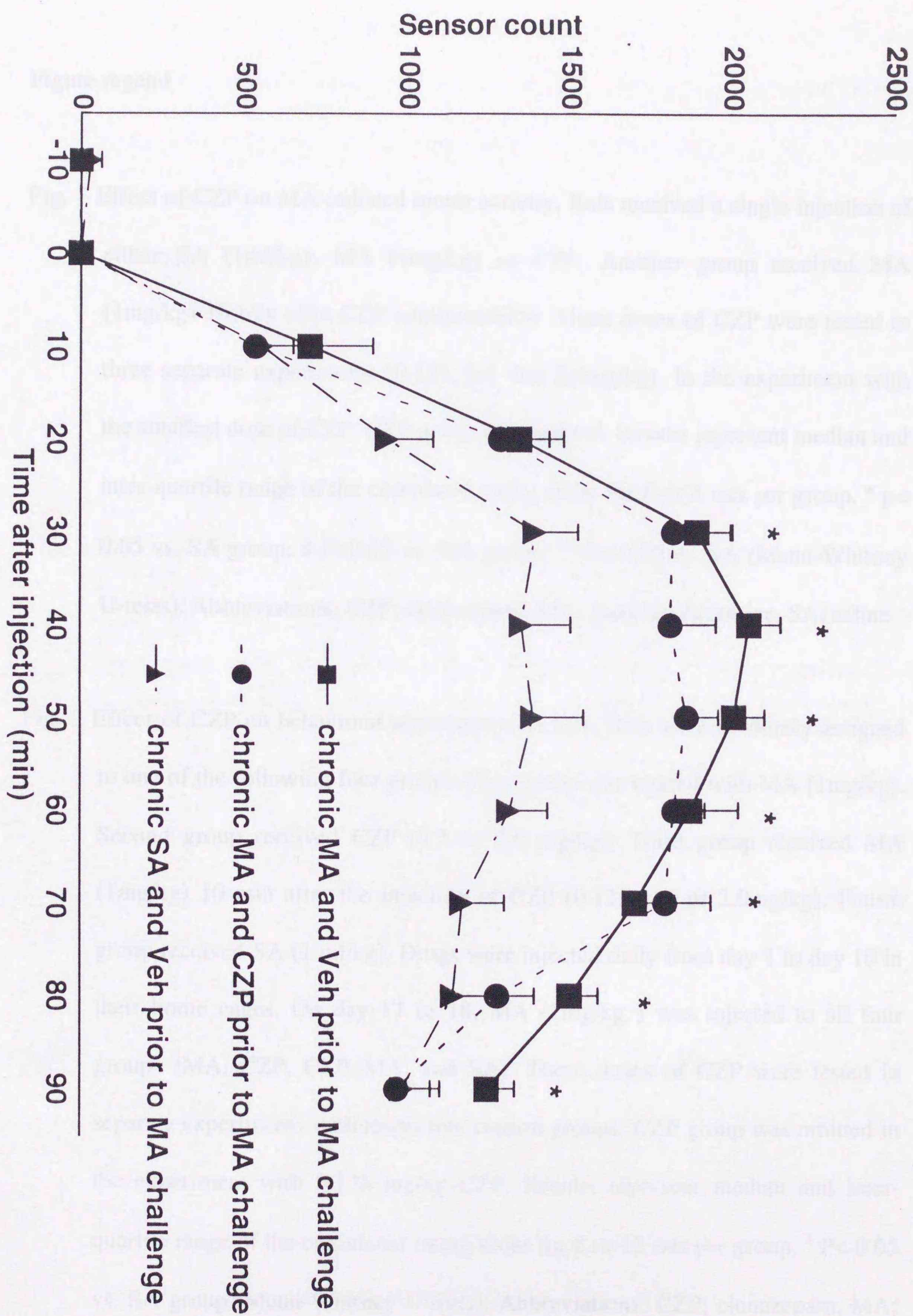


Figure8 伊藤 耕一

Figure legend

Fig. 1 Effect of CZP on MA-induced motor activity; Rats received a single injection of either SA (1ml/kg), MA (1mg/kg) or CZP. Another group received MA (1mg/kg) 10 min after CZP administration. Three doses of CZP were tested in three separate experiments (0.125, 0.5 and 2.0mg/kg). In the experiment with the smallest dose of CZP, CZP group was omitted. Results represent median and inter-quartile range of the cumulated rating score for 6 or 8 rats per group. * $p < 0.05$ vs. SA group; # $P < 0.05$ vs. MA group; ** $P < 0.05$ vs. SA (Mann-Whitney U-tests). Abbreviations: CZP; clonazepam, MA; methamphetamine, SA; saline

Fig. 2 Effect of CZP on behavioral sensitization to MA; Rats were randomly assigned to one of the following four groups. First group was treated with MA (1mg/kg). Second group received CZP (0.5 or 2.0 mg/kg). Third group received MA (1mg/kg) 10 min after the injection of CZP (0.125, 0.5 or 2.0mg/kg). Fourth group received SA (1 ml/kg). Drugs were injected daily from day 1 to day 10 in their home cages. On day 17 or 18, MA (1mg/kg) was injected to all four groups (MA, CZP, CZP+MA, and SA). These doses of CZP were tested in separate experiments with respective control groups. CZP group was omitted in the experiment with 0.125 mg/kg CZP. Results represent median and inter-quartile range of the cumulated rating score for 8 or 12 rats per group. * $P < 0.05$ vs. SA group (Mann-Whitney U-tests). Abbreviations: CZP; clonazepam, MA; methamphetamine, SA; saline

Fig. 3 Behavioral scores during the 10-day treatment phase and on the challenge day.

Veh+MA group received Veh (1ml/kg) and CZP+MA group received CZP (0.5 mg/kg) 10 min prior to MA injection (1mg/kg) from day 1 to day 10. Both groups were given MA (1mg/kg) on day 17. Behavior was scored on day 1, 6, 10 and 17. Results represent median and inter-quartile range of the cumulated rating score for 8 rats per group. * $P < 0.05$ vs. Veh+MA on day 1; ** $p < 0.05$ vs. CZP+MA on day 17 (Mann-Whitney U-tests). Abbreviations: Veh; vehicle, CZP; clonazepam, MA; methamphetamine

Fig. 4 Effects of Flu on MA-induced motor activity; Rats were randomly assigned to one of the following four groups. Each rat received two injections. First group was treated with Veh (1ml/kg)+MA (1mg/kg). Second group received Flu (10mg/kg)+ SA. Third group received Flu (10mg/kg)+MA (1mg/kg). Fourth group received Veh+SA. Each point represents the mean $\pm$ SEM at each time for 20-24 rats per group. There was no difference between Veh+MA group and Flu+MA group. Abbreviations: Veh; vehicle, MA; methamphetamine, Flu; flumazenil, SA; saline

Fig. 5 No effects of Flu on the acquisition of behavioral sensitization to MA; On day 17 or 18, MA (1mg/kg) was injected to all four groups (Veh+MA, Flu+SA, Flu+MA, and Veh+SA) in their home cages and motor activity was measured. Each point represents the mean $\pm$ SEM at each time in each group. Veh+MA group from 20 to 40 min (* $p < 0.05$) and Flu+MA group from 20 to 30 (# $p < 0.05$) showed a significant enhancement in sensor counts compared to Veh+SA group. There was no difference between Veh+MA group and Flu+MA group.

Abbreviations: Veh; vehicle, MA; methamphetamine, Flu; flumazenil, SA; saline

Fig. 6 Effects of Flu and CZP on MA-induced motor activity; Rats were randomly assigned to one of the four groups. Each rat received three injections. First group was treated with Veh+Veh+MA (1mg/kg). Second group received Veh+CZP (0.5mg/kg)+MA. Third group received Flu (10mg/kg)+CZP+MA. Fourth group received Veh+Veh+SA. Each point represents the mean $\pm$ SEM at each time for 16 rats per group. There was no difference among Veh+Veh+MA group, Veh+CZP+MA group and Flu+CZP+MA group. Abbreviations: Veh; vehicle, CZP; clonazepam, MA; methamphetamine, Flu; flumazenil, SA; saline

Fig. 7 CZP blocked the acquisition of sensitization to MA and Flu reversed the blockade; On day 17 or 18, MA (1mg/kg) was injected to all four groups (Veh+Veh+MA, Veh+CZP+MA, Flu+CZP+MA, and Veh+Veh+SA) in their home cages. Each point represents the mean $\pm$ SEM at each time in each group. Veh+Veh+MA group showed a significant enhancement in sensor counts compared to Veh+Veh+SA group from 20 to 120 min (* $p < 0.05$). There was no difference between either Veh+CZP+MA group and Veh+Veh+SA group, or Flu+CZP+MA group and Veh+Veh+MA group. Abbreviations: Veh; vehicle, CZP; clonazepam, MA; methamphetamine, Flu; flumazenil, SA; saline

Fig. 8 No effect of CZP on the expression of sensitization to MA; Rats received daily either MA (1mg/kg) or SA (1ml/kg) from day 1 to day 10 in their home cages.

On day 17 or 18 (challenge day), each rat received two injections. The second injection (MA) was given 10 min after the first injection. Those treated with MA were assigned to one of the two groups. First group received Veh (1ml/kg)+MA (1mg/kg) and second group received CZP (1mg/kg)+MA. Those treated with SA received Veh+MA. Motor activity was measured in the three groups after MA injection. Each point represents the mean $\pm$ SEM at each time for 8 rats per group. Both MA-treated rats showed enhance motor activity from 20 to 90 min compared to SA-treated rats (* $p < 0.05$). Abbreviations: Veh; vehicle, CZP; clonazepam, MA; methamphetamine, SA; saline

Table 1. Rating scale for the behavioral effects of psychomotor stimulants in rats.

Score	Definition	
1	Asleep	Lying Down , Eyes Closed
2	Inactive	Lying Down, Eyes Open
3	Normal in Place Activity	Normal Grooming or Chewing Cage Litter
4	Normal, Alert, Active	Sniffing or Rearing Intermittently
5	Hyperactive	Increased Locomotion, Jerky Movements
6	Slow Patterned	Nearly Continuous Sniffing, Gnawing, or Licking, Normal Level of Locomoter Activity, but Repetitive
7	Fast Patterned	Nearly Continuous Sniffing, Grawing, or Licking with Hyperactive, Repetitive Exploration of Cage
8	Restricted	Rapid, Intense,Continuous Head and/or Foreleg Activity Sniffing, Licking, or Gnawing in the Same Place
9	Dyskinetic-reactive	Backing Up, Jumping, Seizures, Abnormally Maintained Postures, Dyskinetic Movements

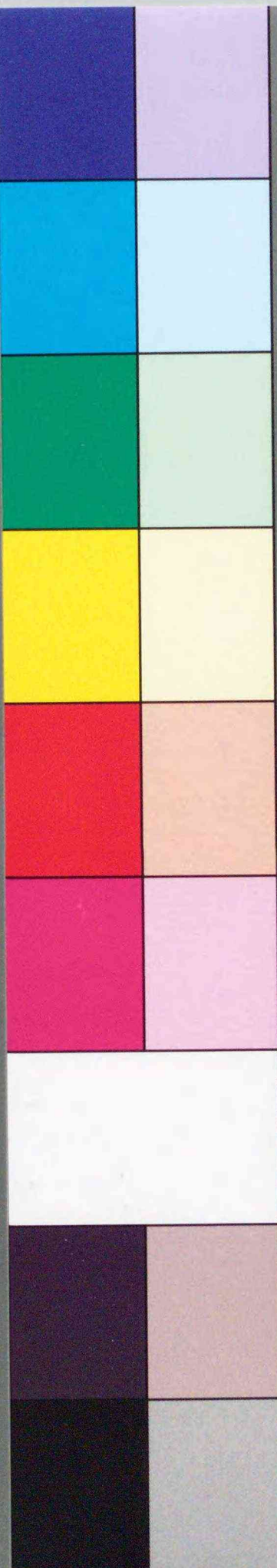


Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

