



Title	Expression of circadian rhythms in clock gene in association with a novel behavior rhythm induced by methamphetamine in rats : an animal model of human sleep-wake cycles
Author(s)	夏堀, 晃世
Description	配架番号 : 2064
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11156号
Issue Date	2013-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11156
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/54963
Type	doctoral thesis
File Information	Akiyo_Natsubori.pdf



学 位 論 文

Expression of circadian rhythms in clock gene in association
with a novel behavior rhythm induced by methamphetamine
in rats : an animal model of human sleep-wake cycles

(メタンフェタミン投与ラットにおける新奇行動リズムと
時計遺伝子概日リズムの発現に関する研究：
ヒト睡眠覚醒リズムの動物モデル)

2013 年 12 月

北 海 道 大 学

夏 堀 晃 世

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
1. 緒言	4 頁
2. 略語表	10 頁
3. 実験方法	11 頁
4. 実験結果	25 頁
5. 考察	45 頁
6. 総括および結論	50 頁
7. 謝辞	52 頁
8. 引用文献	53 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Akiyo Natsubori, Ken-ichi Honma, Sato Honma. Clock gene *Per2* expressions in discrete brain areas receive dual regulation from the circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus and methamphetamine-induced oscillator in rats. *Eur. J. Neurosci.*, in press.
2. Akiyo Natsubori, Ken-ichi Honma, Sato Honma. Differential responses of circadian *Per2* rhythms in cultured slices of discrete brain areas from rats showing internal desynchronisation by methamphetamine. *Eur. J. Neurosci.*, **38**, 2566-2571 (2013).
3. Akiyo Natsubori, Ken-ichi Honma, Sato Honma. Differential responses of circadian *Per2* expression rhythms in discrete brain areas to daily injection of methamphetamine and restricted feeding in rats. *Eur. J. Neurosci.*, **37**, 251-258 (2013).
4. 夏堀 晃世, 本間 研一, 本間 さと. Best articles of the year: ラット脳内各部位の時計遺伝子発現リズムはメタンフェタミン投与と制限給餌に異なる反応を示す. 北海道医学雑誌, **88** 巻, 92 (2013).
5. 本間 研一, 橋本 聡子, 夏堀 晃世. 睡眠リズムの分子生物学. *Clinical Neuroscience*, 中外医学社, **31** 巻, 152-156 (2013).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

国際学会

(口頭発表)

1. Sato Honma, Akiyo Natsubori, Yujiro Yamanaka, Atsuhito Toyomaki, Takeshi Inoue, Ken-ichi Honma. Circadian rhythm disturbances in bipolar disorder: approaches using animal models. Symposium “Molecular mechanisms of bipolar disorder”, 16th Annual Conference of the International Society for Bipolar Disorders, Seoul, Mar. 2014, 演題提出.

2. Sato Honma, Akiyo Natsubori, Ken-ichi Honma. Multi-oscillator System of Mammalian Circadian Clock. Symposium “Molecular and cellular mechanisms of circadian clock and sleep”, Asian Society for Sleep Research, Taipei International Convention Center, Taipei, Nov. 2012.
3. Akiyo Kameyama, Ken-ichi Honma, Sato Honma. Animal models of human sleep-wake cycle: non-SCN circadian behavior rhythms in rodents. Worldslepp2011, Kyoto, Oct. 2011.

(ポスター発表)

1. Akiyo Natsubori, Ken-ichi Honma, Sato Honma. Methamphetamine-induced behavior rhythm and the brain oscillatory systems in rats. European Biological Rhythms Society, Munich, Aug. 2013.
2. Akiyo Kameyama, Ken-ichi Honma, Sato Honma. Animal models of human sleep-wake cycle: non-SCN circadian behavior rhythms in rodents. Worldslepp2011, Kyoto, Oct. 2011.
3. Akiyo Kameyama, Ken-ichi Honma, Sato Honma. Two types of non-SCN circadian behavior rhythms in rodents. Internal Symposium on Photonic Bioimaging Satellite Symposium of Worldslepp 2011 on Human Circadian Clock, Sapporo, Oct. 2011.
4. Akiyo Kameyama, Ken-ichi Honma, Sato Honma. Bioluminescence monitoring of circadian gene expression rhythms in the multiple brain tissues of *Period2-luciferase* transgenic rat. The 9th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care Structural Biology and Drug Discovery, Sapporo, Sep. 2011.

国内学会

(口頭発表)

1. 本間 さと, 亀山 晃世, 本間 研一. 活動・睡眠・摂食リズムと視交叉上核外概日振動体. 第 84 回日本生化学会大会, 京都, 2011 年 9 月.
2. 亀山 晃世, 本間 研一, 本間 さと. 2 つの行動リズムを駆動するラット視交

又上核外振動メカニズム. 第 91 回北海道医学大会生理学系分科会, 札幌, 2011 年 8 月.

(ポスター発表)

1. 夏堀 晃世, 本間 研一, 本間 さと. 周期的メタンフェタミン制限投与によるラット行動リズムを支配する脳内振動機構の検討. 第 20 回日本時間生物学会学術大会, 大阪, 2013 年 11 月.
1. 夏堀 晃世, 本間 研一, 本間 さと. ヒト睡眠覚醒リズムの動物モデルーメタンフェタミン投与ラットにおける脳内振動機構とサーカディアンリズム. 第 36 回日本神経科学大会, 京都, 2013 年 6 月.
2. 本間 さと, 夏堀 晃世, 本間 研一. メタンフェタミン慢性飲水中投与によるラット脳内振動機構の部位特異的变化. 第 36 回日本神経科学大会, 京都, 2013 年 6 月.
3. 夏堀 晃世, 本間 研一, 本間 さと. メタンフェタミン依存性行動リズムーヒト睡眠覚醒リズムの動物モデル解析. 第 90 回日本生理学会大会, 東京, 2013 年 3 月.
4. 夏堀 晃世, 本間 研一, 本間 さと. 行動リズムを駆動するメタンフェタミン誘導性振動体の機構について. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 2012 年 9 月.
5. 夏堀 晃世, 本間 研一, 本間 さと. 行動リズムを駆動するメタンフェタミン誘導性振動:制限 給水法による検討. 第 19 回日本時間生物学会学術大会, 札幌, 2012 年 9 月.
6. 鈴木 陽子, 夏堀 晃世, 本間 研一, 本間 さと. メタンフェタミン慢性投与マウス行動リズムへの炭酸リチウムの影響. 第 19 回日本時間生物学会学術大会, 札幌, 2012 年 9 月.
7. 亀山 (夏堀) 晃世, 本間 研一, 本間 さと. メタンフェタミン誘導性振動の発現はメタンフェタミンの投与条件により異なる. 第 89 回日本生理学会大会, 松本, 2012 年 3 月.

1. 緒言

地球上のほぼ全ての生物は、睡眠覚醒、体温、自律神経機能などの生理機能に約 24 時間周期の内因性リズム（概日リズム）を示す。概日リズムの生理的意義は、昼夜変化や季節変動などの環境周期に同調し、各生体機能の最適化を図るとともに、その時間的秩序を維持することにある。この機能に関わる機構を比喩的に生物時計という。ヒトを含め、哺乳類の概日リズム発振中枢は、視床下部視交叉上核（SCN: suprachiasmatic nucleus）に存在する。一方、視交叉上核外の脳内や全身の臓器、組織も独自の概日振動体が存在し、末梢時計（末梢振動体）と総称される。視交叉上核の概日振動体（中枢時計）は末梢振動体を支配し、生物時計は階層的振動体構造をもつと考えられている（図 1A）¹。視交叉上核や各組織を構成する個々の細胞では、*Clock*、*Bmal1*、*Period (Per)*、*Cryptochrome (Cry)* の 4 種類の時計遺伝子とタンパク産物が転写翻訳フィードバックループを形成し、約 24 時間周期で自律振動を発振しているとの説が有力である（図 1B）^{2, 3}。恒常条件下での内因性振動をフリーランリズムと言う。視交叉上核は網膜からの光入力を受け、内因性リズムを外界の明暗サイクルに同調させ、液性因子や神経性因子を介して他の組織、器官に概日リズム振動を伝え、体温、ホルモン、睡眠覚醒リズム等、個体の生理リズムを発現する。

一方、ヒトの概日リズム機構は、他の哺乳類と異なるいくつかの特徴を示す。その一つに生体リズムの内的脱同調がある。ヒトが時刻の手掛かりのない時間隔離下で生活すると、ヒトの深部体温リズムや血中メラトニンリズムは約 25 時間周期でフリーランする一方、睡眠覚醒リズムは約 33 時間の長周期を示し、体温や血中メラトニンリズムから乖離する^{4, 5}。この現象から、ヒトの概日リズム機構は 2 つの振動体により駆動されるという 2 振動体仮説が提唱されている（図 2）^{6, 7}。この 2 つの振動体は、24 時間の明暗周期下では同一周期を示すが、時間隔離等何らかの原因により乖離し、内的脱同調をもたらすと考えられる。内的脱同調下では、不眠や覚醒時の眠気、様々な自律神経症状が出現し、睡眠相位相後退症候群や非 24 時間睡眠覚醒症候群などの睡眠覚醒リズム障害の病態との関連が示唆されている^{8, 9}。また日常生活でも内的脱同調は生じる。時差旅行やシフトワーク時に睡眠覚醒リズムを現地時刻に合わせても、メラトニンや深部体温リズムの再同調が遅れ、両者に一時的な脱同調が生じる^{9, 10}。

深部体温、血中メラトニン等の概日リズムは高照度光に同調することから、視交叉上核にある振動体に支配されていると考えられる。一方睡眠覚醒リズムは、明暗サイクルのない条件下でも非光因子に同調するため¹¹、睡眠覚醒リズムを制御する振動体は視交叉上核外にあると考えられるが、その局在は明らか

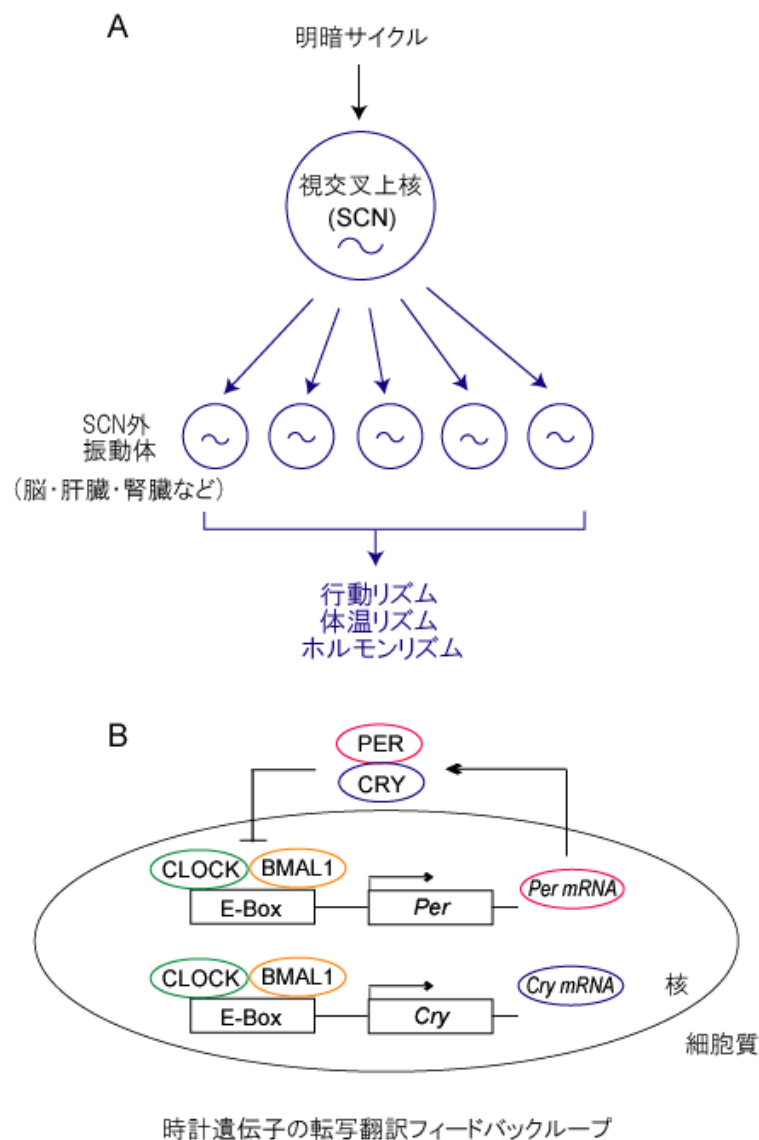


図1 哺乳類の概日リズム機構

(A) 哺乳類の概日リズム機構の模式図。中枢振動体としての視交叉上核(SCN)と脳や全身組織の振動体による階層的リズム支配機構が、統一された個体の生理機能リズムを生み出す。(B) 概日リズム発現の分子機構。個々の細胞内で、時計遺伝子(*Clock*、*Bmal1*、*Cry*、*Per*)とそのタンパク産物が転写翻訳フィードバックループを形成し、約 24 時間周期で自律振動を発振している。

でない。したがって、ヒトの概日リズム機構を明らかにするには、内的脱同調を示す動物モデルによる研究が必要である。

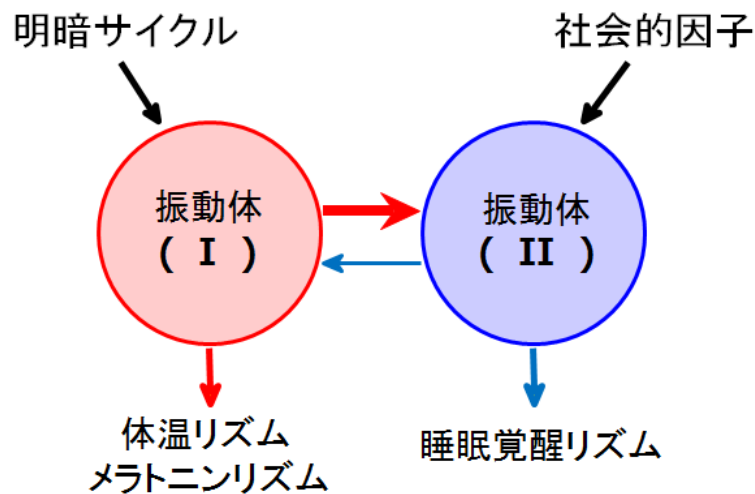


図2 ヒト概日リズム機構の2振動体仮説のモデル図

ヒトの概日リズム機構は2つの振動体により支配される。第1の振動体(外界の明暗サイクルに同調)と第2の振動体(非光因子に同調)は通常は相互に共役し、個体のリズムを統一して制御する。何らかの原因により2振動体間の共役が外れると、体温リズムやメラトニンリズムと睡眠覚醒リズムの間に内的脱同調が生じる。文献7より改変。

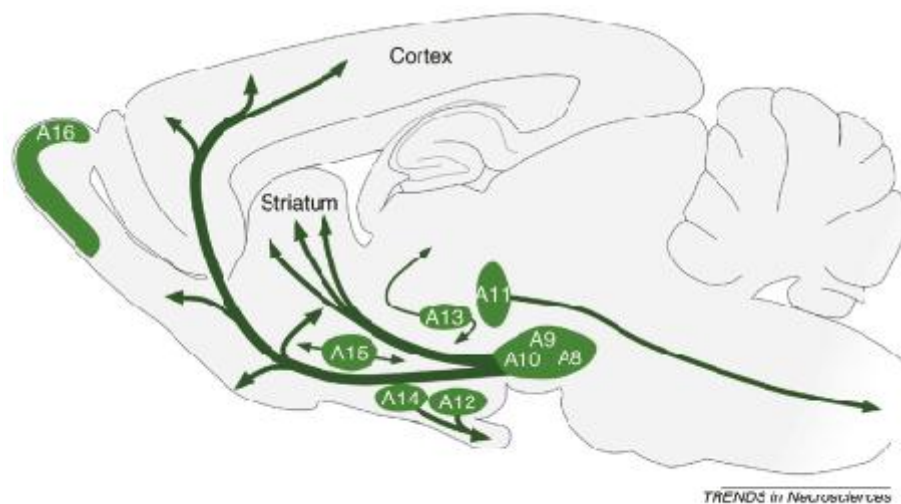
内的脱同調は、ヒト以外の動物では報告されていない。本間らはラットに中枢神経刺激薬メタンフェタミンを慢性投与することにより、睡眠と覚醒が集約化し、行動リズムが内的脱同調を起こすことを報告している¹²。メタンフェタミン投与ラットの行動リズムは、ヒト睡眠覚醒リズムと共通の特徴を示す。すなわち、明暗サイクル下にあっても行動リズムがフリーランし、血中メラトニンリズムや視交叉上核の時計遺伝子発現リズムから脱同調する^{12, 13}。また、ヒトの睡眠覚醒リズムは社会生活スケジュールなどの非光因子へ同調することが知られているが^{6, 14}、メタンフェタミン投与ラットの行動リズムも食餌などの非光因子に同調する^{15, 16}。さらに、ヒトの睡眠覚醒リズムは約48時間の周期をもつサーカビディアンリズム (circabidian rhythm) を示すことがあるが¹⁷、メタンフェタミン投与ラットもサーカビディアンリズムを示す¹⁸。このように、メタンフェタミン投与ラットの行動リズムは、ヒトの睡眠覚醒リズムの特徴を再現することから、2振動体仮説に基づくヒト睡眠覚醒リズムの動物モデルとして用いることができる。本研究の目的は、メタンフェタミン投与動物モデルを用い、ヒトの睡眠覚醒リズムが内的脱同調を起こす機序を明らかにし、睡眠覚醒リズムを直接制御する脳内振動体の局在と振動機序を解明することにある。

ヒト睡眠覚醒リズムの動物モデルを用いた先行研究では、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、メタンフェタミン水溶液慢性投与ラットの線条体と頭頂皮質の時計遺伝子発現リズムが行動リズムと並行して位相変化することを報告している¹³。しかし *in situ* ハイブリダイゼーション法により観察された遺伝子発現量の変化は、脳内各部位における自律的な概日リズム振動なのか、動物の行動による二次的応答かを区別することができない。

メタンフェタミンの主な作用機序は、ドパミン神経終末のトランスポーターにおけるドパミン再取り込み阻害である¹⁹。それによりシナプス間隙のドパミン濃度を上昇させ、シナプス後ドパミン受容体を活性化する。メタンフェタミン慢性投与ラットの行動リズム周期はメタンフェタミン用量依存的に延長する²⁰。またメタンフェタミン慢性投与ラットの行動リズムは、ドパミン受容体拮抗剤 (haloperidol) 投与により位相反応を起こすことが知られている²¹。このことから、メタンフェタミン誘導性振動体 (MAO: methamphetamine-induced oscillator) は、ドパミン神経系との関連が強く予想されている。睡眠覚醒とドパミン神経系の関連性については、これまでも動物実験で示されている^{22, 23, 24}。またパーキンソン病や統合失調症などの疾患では、入眠困難、睡眠維持障害、日中眠気などの睡眠障害が高率に合併することが報告されており^{25, 26}、ヒトの睡眠覚醒とドパミン神経系との関連性が示唆されている²⁷。本研究では MAO の局在機序同定を目指すにあたり、脳内ドパミン神経系に焦点をあてて研究を行った。

ドパミン神経系は主に、黒質緻密部のドパミンニューロンが線条体へ投射する黒質線条体系、腹側被蓋野から側坐核と大脳皮質へ投射する中脳辺縁系と中脳皮質系から構成される (図 3)²⁸。また嗅球にもドパミンニューロンが存在する²⁹。嗅球は、時計遺伝子発現や匂い刺激への反応に明瞭な概日リズム振動がみられることが報告されている³⁰。本研究は、ドパミンニューロン存在部位とその投射先である嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質 (黒質緻密部、黒質網様部、腹側被蓋野を含む) の 4 箇所を対象とした。また、これら脳部位の概日振動の指標として時計遺伝子 *Per2* の概日リズムを用いた。すなわち、時計遺伝子の発光レポータートランスジェニックラットを用い、脳内各部位のスライス培養組織で発現する *Per2* 発現リズムを、数日間にわたり光学的に測定した。

また、ラットやマウスへ一日一定時刻のみ給餌する制限給餌を行うと、給餌時刻の直前に行動や血中コルチコステロン等のピークが出現する^{31, 32}。この給餌前ピークは概日リズムの特徴を示し、また視交叉上核を破壊しても出現することから、その中枢は視交叉上核外にあると想定されている。この食餌性概日リズムを支配する振動機構を食餌性振動体 (FEO: food-entrainable oscillator) と呼ぶが³³、その局在は明らかにされていない。MAO と FEO は共に視交叉上



引用: Bjorklund & Dunnett. (2007) *TRIN*

図 3 げっ歯類のドーパミン神経分布

成獣げっ歯類の脳(矢状断)のドーパミン神経分布。A8 から A16 はドーパミン細胞集団の古典的分類を表す。矢印は細胞集団の投射先を表す。A9とA10がそれぞれ黒質緻密部と腹側被蓋野、A16 が嗅球に対応する。文献 28 より引用。

核外振動体であり^{20, 31}、脳内カテコラミンの関与^{18, 20, 33, 34}など共通の特徴をもち、同一の振動機構であると考えられてきたが、フリーラン周期などの相違点もある^{20, 35}。

本研究は以下の 3 つの実験から成る。実験 1 では、ラットへメタンフェタミン水溶液を飲水として自由摂取させることにより、MAO 支配を受ける行動リズムを発現させた。MAO 行動リズムが、明暗サイクルから脱同調し位相逆転したときに脳組織を採取し、視交叉上核振動体から脱同調した時の脳内振動体の動態を解析した。その結果、ドーパミン神経組織の概日リズムが視交叉上核概日振動体から脱同調することを初めて明らかにした。

実験 2 では、ドーパミン神経組織の概日リズムが、視交叉上核概日振動体と MAO の二重支配を受けている可能性を検証するため、視交叉上核を電氣的破壊したラットを用い、メタンフェタミン投与による各脳組織の概日リズム変化を正常ラットと比較した。この実験では、MAO による各脳組織のリズム位相変化をより明瞭に示すため、一日一定時刻にメタンフェタミンを飲水投与し、MAO の位相を一定時刻に固定した。それにより、各ドーパミン神経組織の概日リズムは、それぞれ異なる程度で視交叉上核と MAO の二重のリズム支配を受けていることが明らかとなった。このことから、MAO は複数の脳組織に存在する概日リズム

ム振動体から構成される複合振動体である可能性が示唆された。

実験 3 では、MAO と同一振動機構である可能性が示唆されている食餌性振動体（FEO）との相違を検討した。ラットへ一日一定かつ同一時刻のメタンフェタミン投与または制限給餌を行い、行動リズムと各脳組織の *Per2* 発現概日リズム変化を比較した。その結果、ほぼ同じ時刻に行動の亢進が認められたにもかかわらず、制限給餌では線条体と黒質の概日リズムが有意に位相前進したのに対し、メタンフェタミン腹腔内投与では測定した 4 部位で位相後退し、異なる結果を示した。この結果から、MAO と FEO が異なる振動機構である可能性が示唆された。

2. 略語表

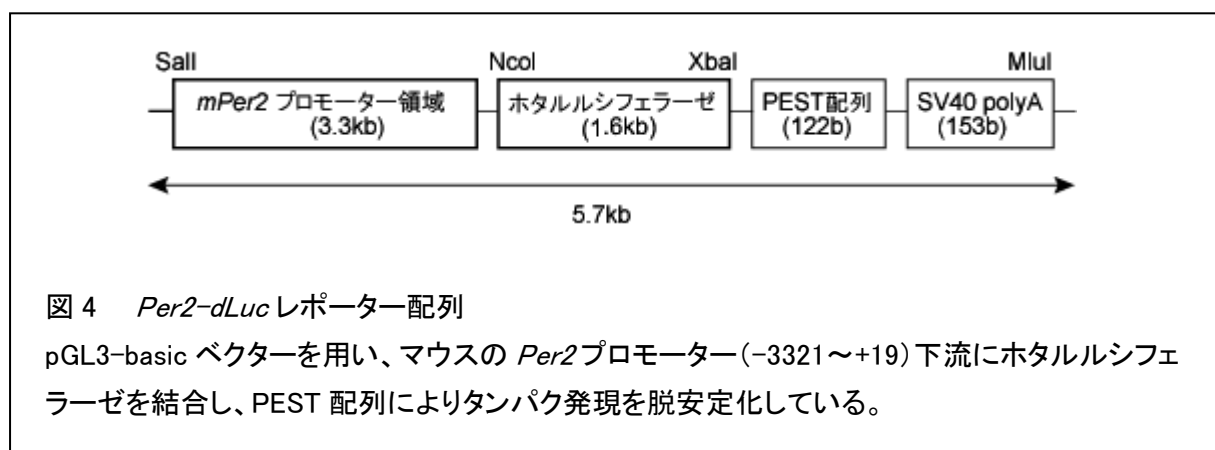
本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ATP	adenosine triphosphate
AMP	adenosine monophosphate
CT	circadian time
<i>Cry</i>	<i>Cryptochrome</i>
FEO	food-entrainable oscillator
Fisher's PLSD	Fisher's Protected Least Significant Difference
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
MAO	methamphetamine-induced oscillator
<i>Per</i>	<i>Period</i>
<i>Per2-dLuc</i>	<i>Period2-destabilized Luciferase</i>
SCN	suprachiasmatic nucleus
WEO	water-entrainable oscillator

3. 実験方法

(1) 実験動物

時計遺伝子の一つである *Per2* のプロモーター (3.3 kb) 下流に、脱安定化したホタルルシフェラーゼを発現する *Per2-destabilized Luciferase* (*Per2-dLuc*) を挿入したトランスジェニックラット (Wistar 系) を用いた (図 4)。トランスジェニックラットは山之内製薬の橋本博士により作成され、近畿大学の重吉康史先生より譲渡された。実験には、10-20 世代トランスジェニックラット同士で交配したものを用いた。ただし繁殖性を維持するため、年に一度、日本チャールズリバー社の野生型ラット (Wistar 系) と交配した。



レポーター導入の確認は、発光タイピングにより行った。生後 10 日までのラットの尻尾の先端を約 0.1 mm 切り出し、これを 1 個体ずつ 96 穴プレートに入れ、50 μ L のルシフェラーゼレポーターアッセイ用発光試薬 (ピッカジーン発光キット、PGL2000、東洋インキ) を添加し、ルミノメーター (Luminescencer JNR、Atto 社) により発光量を 20 秒間測定した。発光値の高い個体 (発光値が 5 桁以上) をトランスジェニックと判定した。

Per2-dLuc トランスジェニックラットの行動リズムは、恒常暗におけるフリーラン周期と光に対する位相反応性に関して野生型ラットと有意差を認めなかった (表 1)。

ラットは 12 時間ごとの明暗サイクル (明期: 6-18 時、明期の照度: 約 100 lux)、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ の条件下で繁殖飼育した。新生ラットは生後 3 週目で離乳し、以後はラットケージ (ポリカーボネート製、 $24 \times 30 \times 17.5$ cm) に 3-4 匹ずつ集団飼育した。また、ラットは特に記載しない限り、固形飼料 (オリエンタル MF) と給水瓶に入った水道水を自由摂取させた。実験には全て 2-3 カ

表 1. *Per2-dLuc*トランスジェニックラットの行動リズム特性

	フリーラン周期(時間)	光パルス位相反応(時)	
		CT 15	CT 23
<i>Per2-dLuc</i> (n = 7)	24.3 ± 0.0	-1.9 ± 0.4	0.7 ± 0.3
野生型 (n = 7)	24.4 ± 0.0	-1.0 ± 0.3	1.1 ± 0.2

2, 3 カ月齢の雄ラットを測定に用いた。括弧内の数字は個体数を表す。フリーラン周期は、恒常暗下での内因性の行動リズム周期を表す。Circadian Time (CT)は、内因性リズムの位相を特定するための時刻であり、1 CT = フリーラン周期 / 24 時間を表す。CT12 は行動リズム開始時刻を表す。各個体の CT 15 または CT 23 に該当する時刻にそれぞれ 30 分間の光パルスを与え、パルス前 10 日間とパルス後 10 日の行動リズム開始位相の差から、行動リズム位相の変位(位相反応)を算出した。マイナス表示は位相後退、プラス表示は位相前進を表す。データは平均±SEM。*Per2-dLuc* と野生型ラット間にいずれも有意差を認めなかった(独立 t 検定)。

月齢の雌ラットを用い、前記明暗サイクル下で行った。実験に使用したラット個体数の内訳は、表 2 に示した。

全ての実験は、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程第 7 条第 1 項の規定に基づき、総長より承認をうけた動物実験計画「視交叉上核外概日振動メカニズムの検討」(承認番号：08-0278)、「感情障害への概日機構の関与：モデル動物を用いた感情障害における概日機構の関与」(承認番号：12-0064)の一環として行われ、「北海道大学動物実験に関する規定」と「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定」に従って実施した。

(2) メタンフェタミン処置

メタンフェタミンは飲水に溶かすか、腹腔内に注射して投与した。飲水投与では、塩酸メタンフェタミン(大日本製薬)を純水に溶解したストック溶液(0.1%)を作成し、実験に際して 0.005%または 0.01%メタンフェタミン水溶液を調整し、給水瓶に入れラットに投与した。腹腔内投与の場合、メタンフェタミンを生理食塩水に溶解したストック溶液(10 mg/mL)を作成し、1 mg/mLメタンフェタミン溶液を用時調整し、2 mg/kg b.w.をラットにツベルクリン注射器で投与した。

表 2. 実験に使用したラット個体数(匹)

実験 1

	対照群	メタンフェタミン群	測定項目
正常ラット	15	12	行動・発光リズム

実験 2

	対照群 (制限給水群)	メタンフェタミン 制限投与群	測定項目
正常ラット	6	6	行動リズム
	9	9	行動・発光リズム
視交叉上核破壊 ラット	8	12	行動リズム
	9	10	行動・発光リズム

実験 3

メタンフェタミン腹腔内投与実験

	対照群	メタンフェタミン群	測定項目
正常ラット	12	12	行動・発光リズム

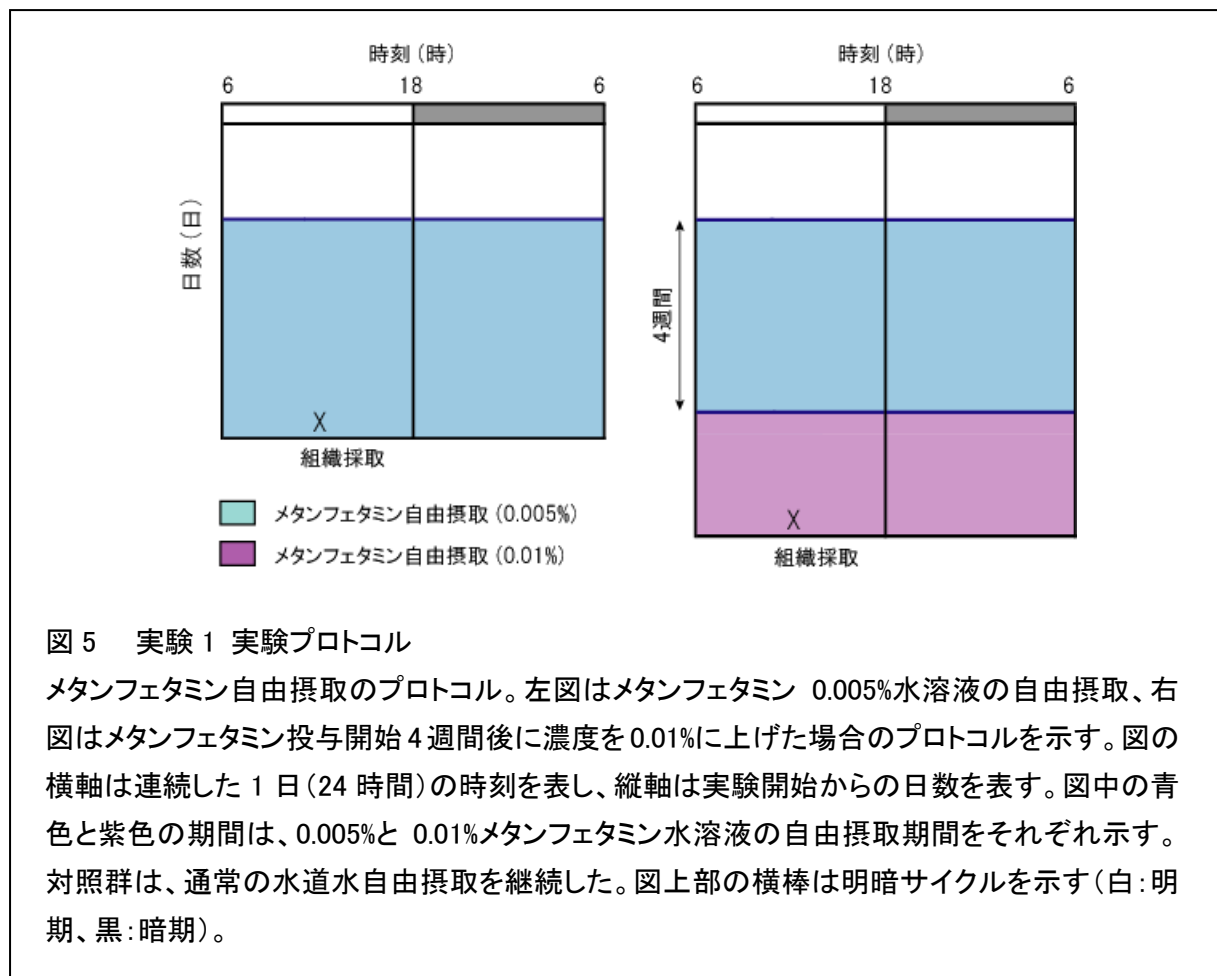
制限給餌実験

	対照群	制限給餌群	測定項目
正常ラット	8	8	行動・発光リズム

(3) 実験プロトコル

実験 1：メタンフェタミン水溶液自由摂取下のラット脳内 *Per2-dLuc* リズム変化

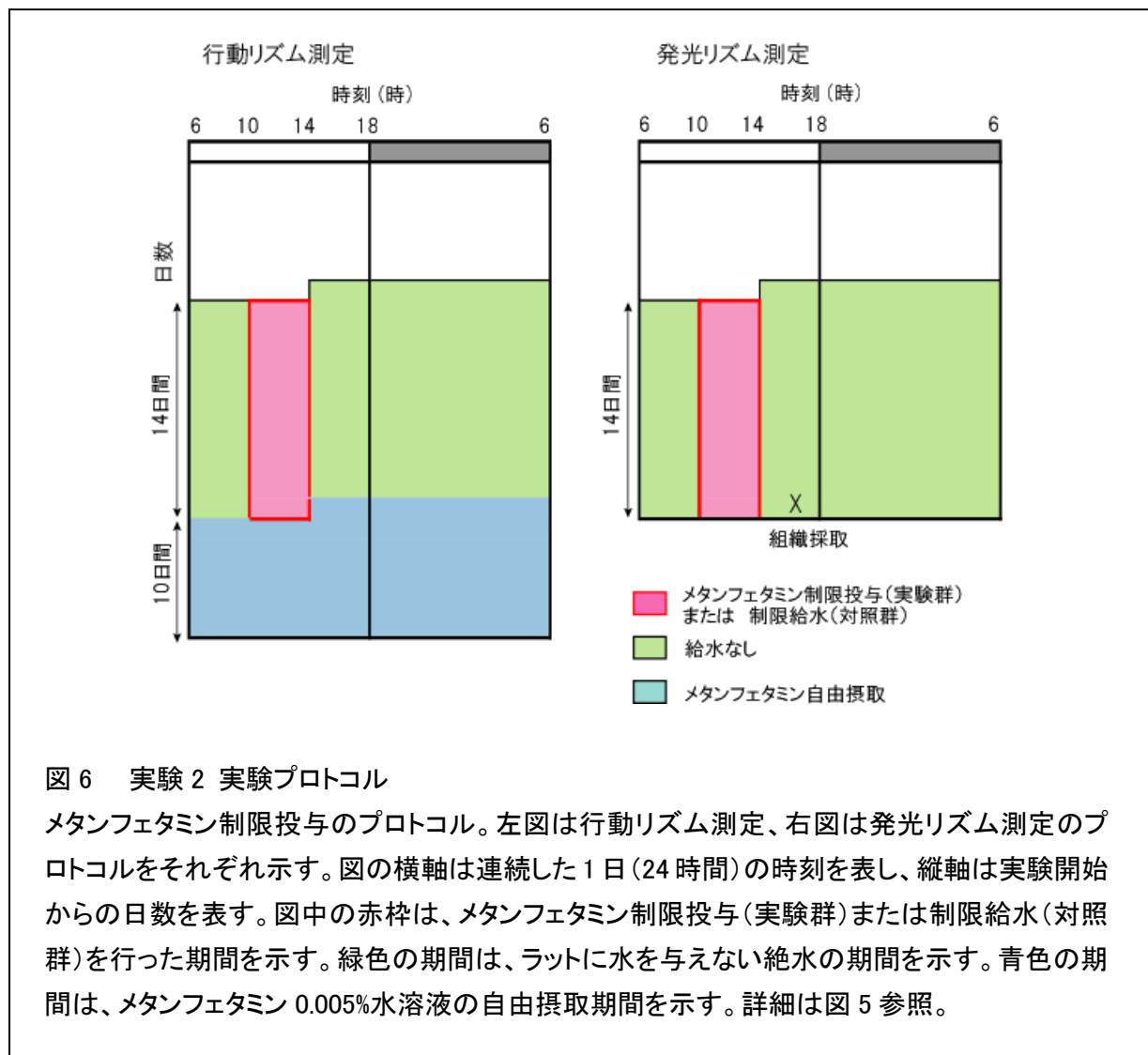
実験群 12 匹、対照群 15 匹、計 27 匹の *Per2-dLuc* ラットを実験に用いた（表 2）。ラットを個別ケージに移し、行動リズム測定開始 2 週間後、10 時から 15 時の間に、飲水をメタンフェタミン 0.005% 水溶液に代え、実験群ラットに自由摂取させた（図 5）。ラットの行動リズムが明暗サイクルから脱同調して完全に逆転し、行動開始位相が明期開始時刻（6 時）前後 3 時間となった日の 12 時前後にラットを断頭し、脳組織を採取した。メタンフェタミン投与開始 4 週間後行動リズムが脱同調しなかったラットについては、メタンフェタミン投与濃度を 0.01% に上げて自由摂取を持続した。対照群ラットには水道水を摂取させ、12 時前後に断頭し脳組織を採取した。



実験2：メタンフェタミン水溶液制限投与による脳内リズム変化と視交叉上核の影響

計30匹の *Per2-dLuc* ラットと計39匹の視交叉上核破壊 *Per2-dLuc* ラットを実験に用いた(表2)。視交叉上核破壊ラットは両側視交叉上核の電氣的破壊後、行動リズム消失を確認のうえ実験に用い、終了後、組織学的に破壊を確認した。

ラットの行動リズム測定開始7-10日後より、メタンフェタミン0.005%水溶液を10時から14時まで4時間のみラットに与えるメタンフェタミン制限投与を、14日間行った(図6)。制限投与以外の時刻には、ラットに水を与えなかった。なお、実験中は全て自由摂食とした。対照群のラットには、10時から14時までの4時間のみ水道水を与える制限給水を14日間行った。制限投与14日目の14時より、実験群、対照群ラットともにメタンフェタミン0.005%水溶液の自由摂取を開始し、その後10日間の行動リズムを測定した(図6左)。発光リズム測定群では、ラットにメタンフェタミン制限投与または制限給水を同様に行い、14日目の15時から18時の間に断頭し、脳組織を採取した(図6右)。

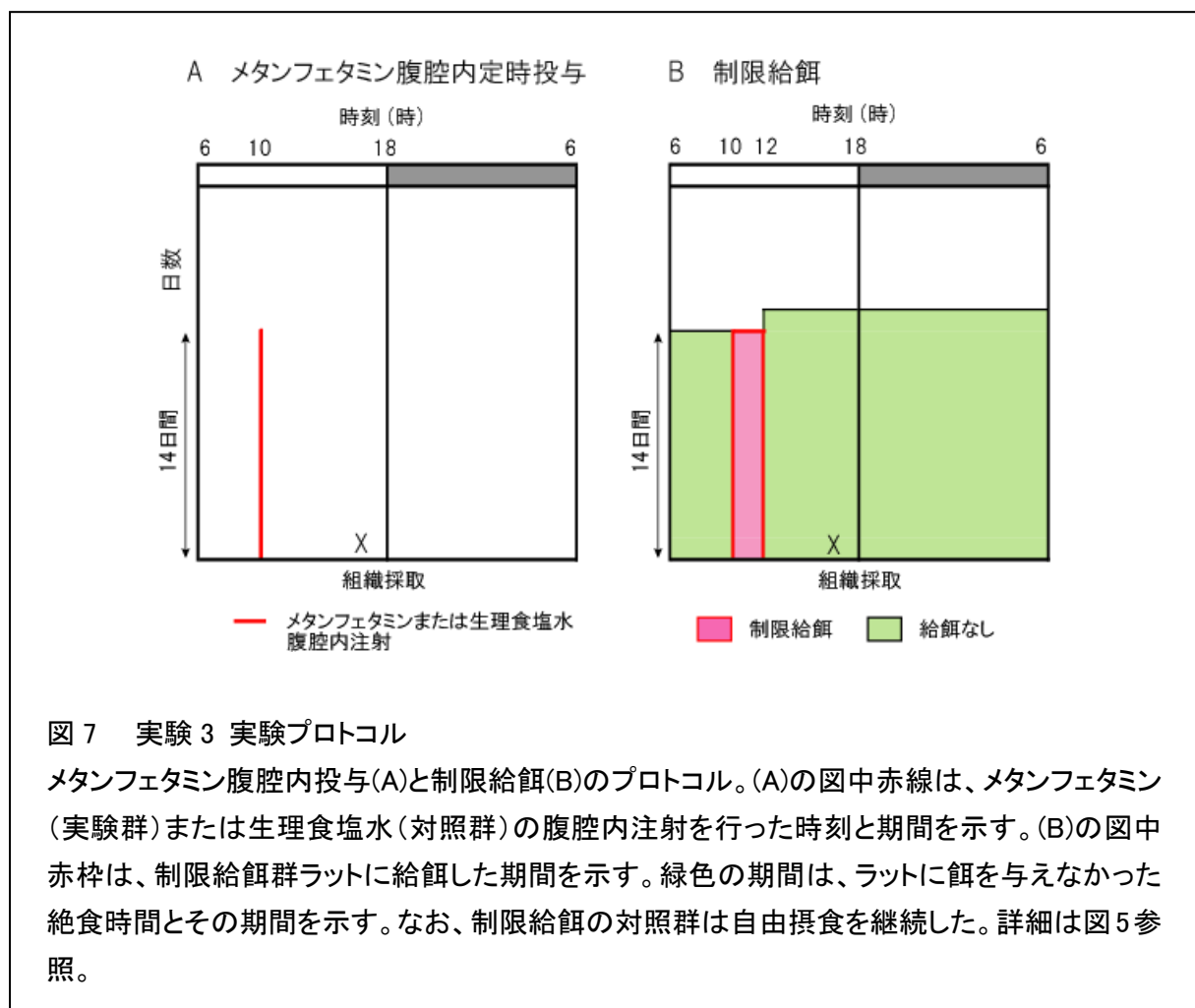


実験 3：メタンフェタミン腹腔内定時投与による脳内リズム変化と食餌性リズムの比較

メタンフェタミン腹腔内投与実験には、実験群 12 匹、対照群 12 匹、計 24 匹の *Per2-dLuc* ラットを用いた (表 2)。行動リズム測定開始 7-10 日後より、メタンフェタミン (2 mg/kg b.w.) の腹腔内注射を毎日 10 時に、14 日間連続して行った (図 7A)。対照群のラットは、体重当たり同量の生理食塩水の腹腔内注射を同一時刻、同一期間行った。両群とも、腹腔内投与 14 日目の 15 時から 18 時の間に断頭し、脳組織を採取した。

制限給餌実験には、実験群 8 匹、対照群 8 匹、計 16 匹の *Per2-dLuc* ラットを用いた。制限給餌群のラットには、行動測定開始の 7-10 日後より、10 時から 12 時までの 2 時間の給餌を 14 日間連続で行った (図 7B)。この間、飲水は自由摂取とした。制限給餌 14 日目の 15 時から 18 時の間にラットを断頭し、脳組

組織を採取した。対照群のラットは自由摂食とし、15時から18時の間に断頭し、脳組織を採取した。



(4) 行動リズム測定

ラットの自発行動量を、行動測定ボックスの天井に設置した感熱式赤外線センサーにより 1 分毎に連続測定した (The Chronobiology kit, Stanford Software Systems) (図 8)。感熱式赤外線センサーは、生体からの熱 (赤外線) 放射エネルギーの変化分を検知し、変化量を 5V のオンオフ信号に変換してコンピュータに送る³⁶。

行動リズム測定は、実験 1 では、40×45×30 cm の大きさの行動測定ボックス内に 24×30×17.5 cm のラットケージ (ポリカーボネート製) を置き、ラットを個別飼育し行動リズムを測定した。実験 2 と実験 3 では、60×60×60 cm の行動測定ボックス内に直径 30 cm の回転輪が入った 24×30×35 cm のラット

ケージ（ポリカーボネート製）を置き、ラットを個別飼育し行動リズムを測定した。ボックス内の理想条件は、照度約 300 lux、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ である。

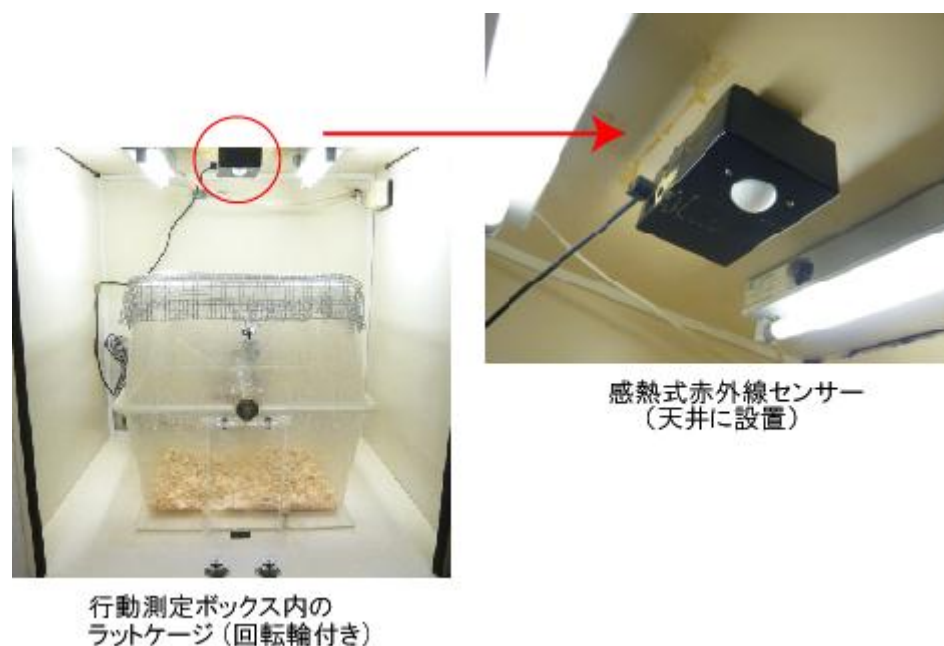


図 8 ラットの行動リズム測定

天井に設置した感熱式赤外線センサーにより、ラットの自発行動量を連続測定した。

(5) 発光（*Per2-dLuc*）リズム測定

1) 測定原理

Per2 転写活性を、ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応による生物発光の光学的測定により定量計測した（図9A）。*Per2* プロモーターの活性化に引き続きレポーターである不安定化ルシフェラーゼ destabilized luciferase (dLuc) が合成され、その酵素作用によりあらかじめ培養液中に添加したルシフェリンが細胞内で酸化されオキシルシフェリンとなる。励起状態にあるオキシルシフェリンが基底状態に遷移するときに発光が生じる。各組織が放出する光子量を光電子増倍管により増幅し、ルミノメーターで連続測定した。

2) 培養スライス脳組織作成、発光リズム測定法

断頭後、脳を素早く取り出し、氷冷Hanks緩衝液に入れた。マイクロスライ

サー (D.S.K.社) を用いて嗅球 (Bregmaから6.7 mm)、線条体と頭頂皮質 (Bregmaから1.7 mm)、視交叉上核 (Bregmaから-1.4 mm)、黒質 (Bregmaから-5.2 mm) をそれぞれ含む4枚の冠状断スライス (300 μ m厚) を作成した。なお黒質は黒質緻密部、黒質網様部、腹側被蓋野を含む。ラット脳アトラス³⁷ を参照し、片側の嗅球 (2.5 $\times$ 4.0 mm)、片側の背側線条体 (正中から側方3.0 mm・上から 4.0 mm、2.0 $\times$ 3.0 mm)、片側の頭頂皮質 (6層全層、正中から側方3.0 mm・上から 2.0 mm、2.0 $\times$ 2.0 mm)、両側の視交叉上核 (正中から0 mm・上から 9.0 mm、1.5 $\times$ 1.5 mm)、片側の黒質 (正中から側方2.0 mm・上から 9.0 mm、2.0 $\times$ 3.5 mm) の5箇所を、氷冷Hanks緩衝液内で外科用メスを用いて実体顕微鏡下に切り出した (図9B)。各組織切片は直径35 mmのペトリ皿内で培養膜 (Millicell-CM、Millipore社、孔径0.4 μ m) に載せ、1.3 mLの培養液を加え、パラフィルムで蓋をシールしたうえ、大気下、37°Cで気水界培養を行った (図9C)。

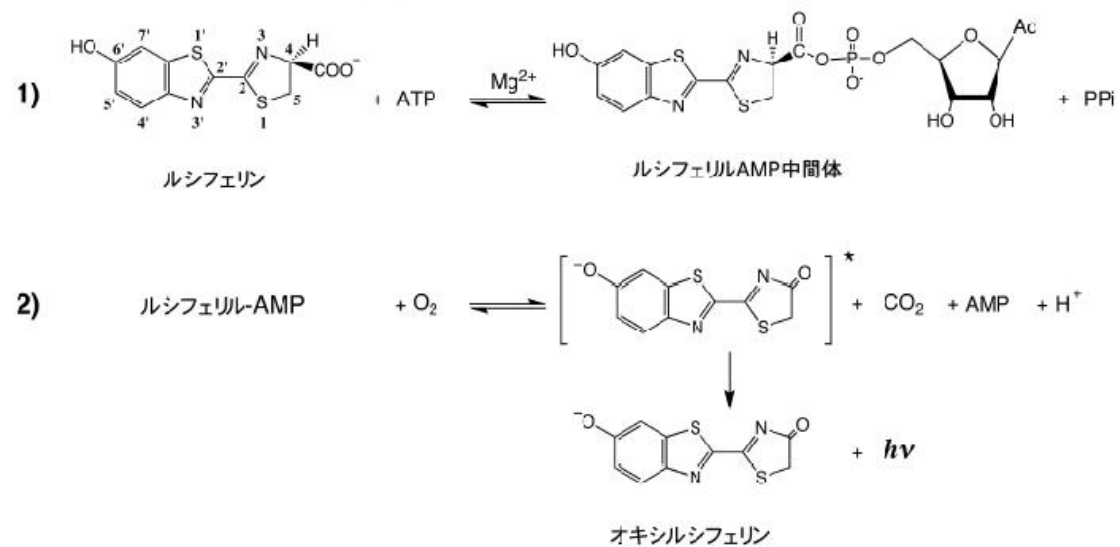
培養液は0.1 mM D-Luciferin K salt (DOJINDO社) 含有のDulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen社) に、10 μ M HEPES、2.7 mM NaHCO₃、20 mg/L kanamycin (Gibco社)、100 μ g/mL apo-transferrin (Sigma社)、5 μ g/mL insulin (Sigma社)、100 μ M putrescine (Sigma社)、20 nM progesterone (Sigma社)、30 nM sodium selenite (Gibco社) を添加して用いた。

各培養組織からの発光量は、光電子増倍管を用いたディッシュ型ルミノメーター (Lumicycle、Actimetrics社またはKronos、Atto社) により10分毎に1分間、5日間の連続測定を行った。

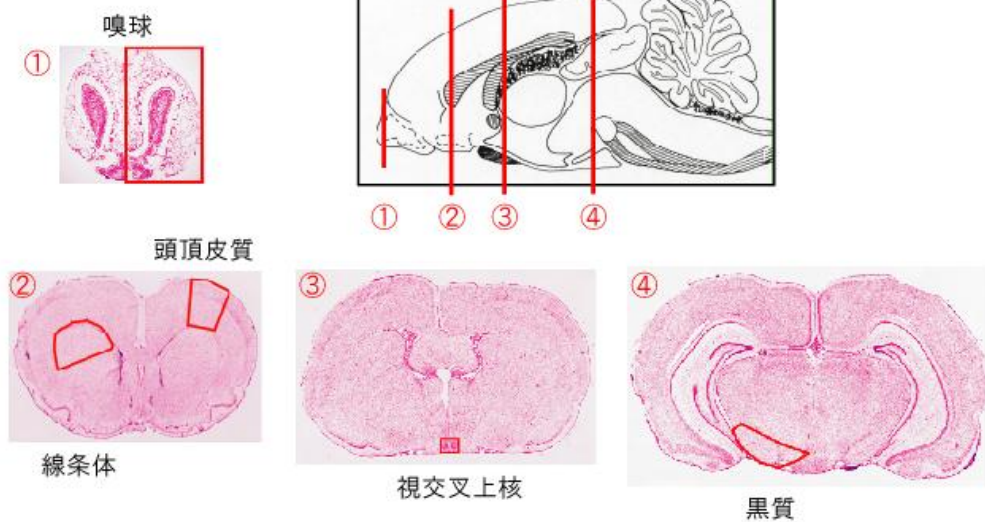
(6) 視交叉上核破壊

ラットを 50 mg/kg b.w.のペントバルビタール麻酔下で脳定位固定装置 (ナリシゲ、SR-5M) に固定し、直径 0.4 mm、先端露出 0.1 mm のエポキシコーティングステンレス電極 (ユニークメディカル社) を用い、Bregma 後方 2.0 mm、正中より左右 0.35 mm、脳底より 0.5 mm 上に電極を下ろし、3.0 mA の直流電流を片側 28 秒間ずつ流して両側視交叉上核の電氣的破壊を行った。視交叉上核破壊術後から 4 週間以上、明暗サイクル下で自発行動量の連続測定を行い、カイ 2 乗ペリオドグラム (後述) により行動リズムを解析し、概日周期成分が消失した個体を実験に用いた。さらに実験終了後、視交叉上核破壊を組織学的に確認した (図 10)。視床下部を含む脳冠状断スライスを 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 4°Cにて 1 週間固定し、30%スクロース含有 0.1 M リン酸緩衝液に 3 日間浸透させた。ドライアイス凍結後、クリオスタット (Leica 社、CM1850) を用いて 50 μ m 厚の連続切片を作成し、クレ

A ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応



B 発光リズム測定部位



C ディッシュ型ルミノメーターによる発光リズム測定

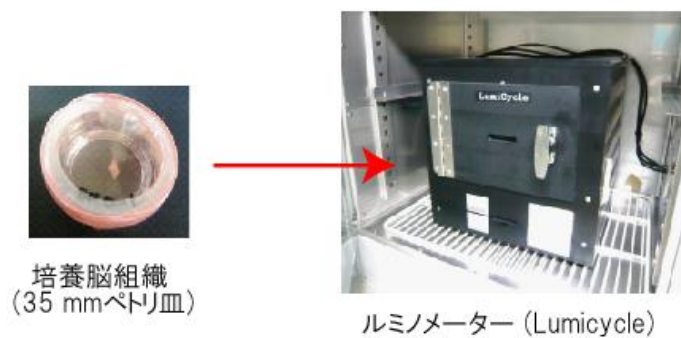


図9 ラット脳組織の発光リズム測定

(A) ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応による生物発光。*Per2-dLuc* ラットの脳組織内で、*Per2* 遺伝子の転写翻訳に引き続き合成されるルシフェラーゼにより、2 段階の発光反応が進行する。発光基質ルシフェリンのカルボキシ基が ATP の α 位のリン酸基を攻撃し、ルシフェリル AMP 中間体を生成し、ピロリン酸 (PPi: pyrophosphoric acid) が放出される。次いで酸素がこの中間体と反応し、AMP、 CO_2 とともに励起状態のオキシルシフェリンを生成し、これが基底状態へ移動するとき、差分のエネルギーが光 ($h\nu$ 、最大波長 562 nm) として放出される。文献 38 より引用。(B) 発光リズム測定を行った脳組織。4 枚の冠状断脳スライスから、5 箇所 of 脳組織を図中の赤枠で示した通りに切り出した。(C) ディッシュ型ルミノメーターによる発光リズム測定。切り出した個々のスライス脳組織を培養用ペトリ皿に入れ、パラフィルムで蓋をシールし、37°C で気水界培養を行いながら発光量をルミノメーターで連続測定した。

シルバイオレット染色を行った。組織学的に視交叉上核破壊が不完全であった個体は解析から除外した。視交叉上核破壊術の成功率は 36.8% であった。

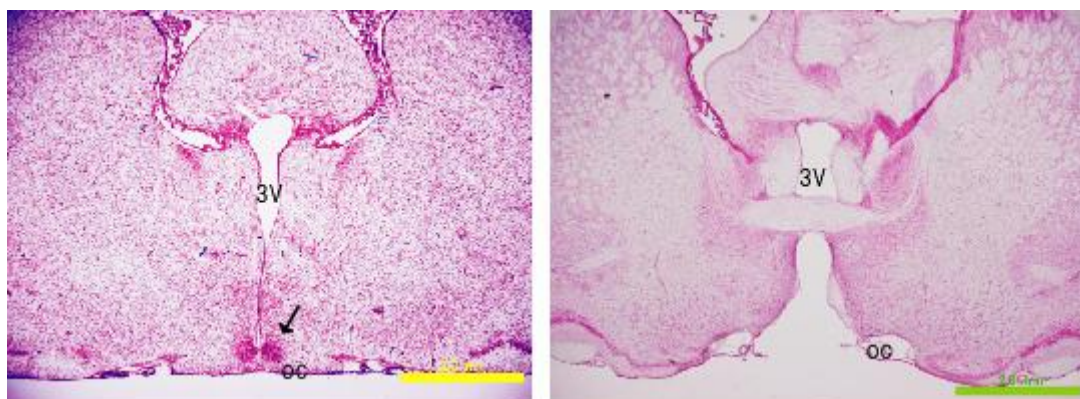


図10 ラットの視交叉上核破壊代表例

視交叉上核(左、矢印)と視交叉上核破壊(右)のクレシルバイオレット染色像。冠状断切片で、破壊の中心部分を示す。oc: optic chiasm(視交叉)、3V: 3rd ventricle(第3脳室)。右下の線はスケール: 2.0 mm。

(7) データ解析・統計手法

1) 行動リズム解析

ラットの自発行動リズムは、ダブルプロット法(実験1、実験3)またはシン

グルプロット法（実験 2）により表示した。シングルプロット法は横軸が 24 時間の時間表示、ダブルプロット法は連続した 48 時間表示であり、いずれも縦軸は測定日数を表す（図 11A）。

概日リズムの有無の判定と周期計算は、5 分毎の行動量データ（5-10 日間）を用い、リズム解析プログラム ClockLab（Actimetrics 社）によるカイ二乗ペリオドグラムを用いて行った（10-40 時間範囲、 $P < 0.01$ ）（図 11A）³⁹。カイ二乗ペリオドグラムの Qp 値（Y 軸値に相当）は、以下の式で計算される。

$$Qp = \frac{K \sum_{h=1}^j (\bar{X}_h - \bar{X})^2}{\bar{X}}$$

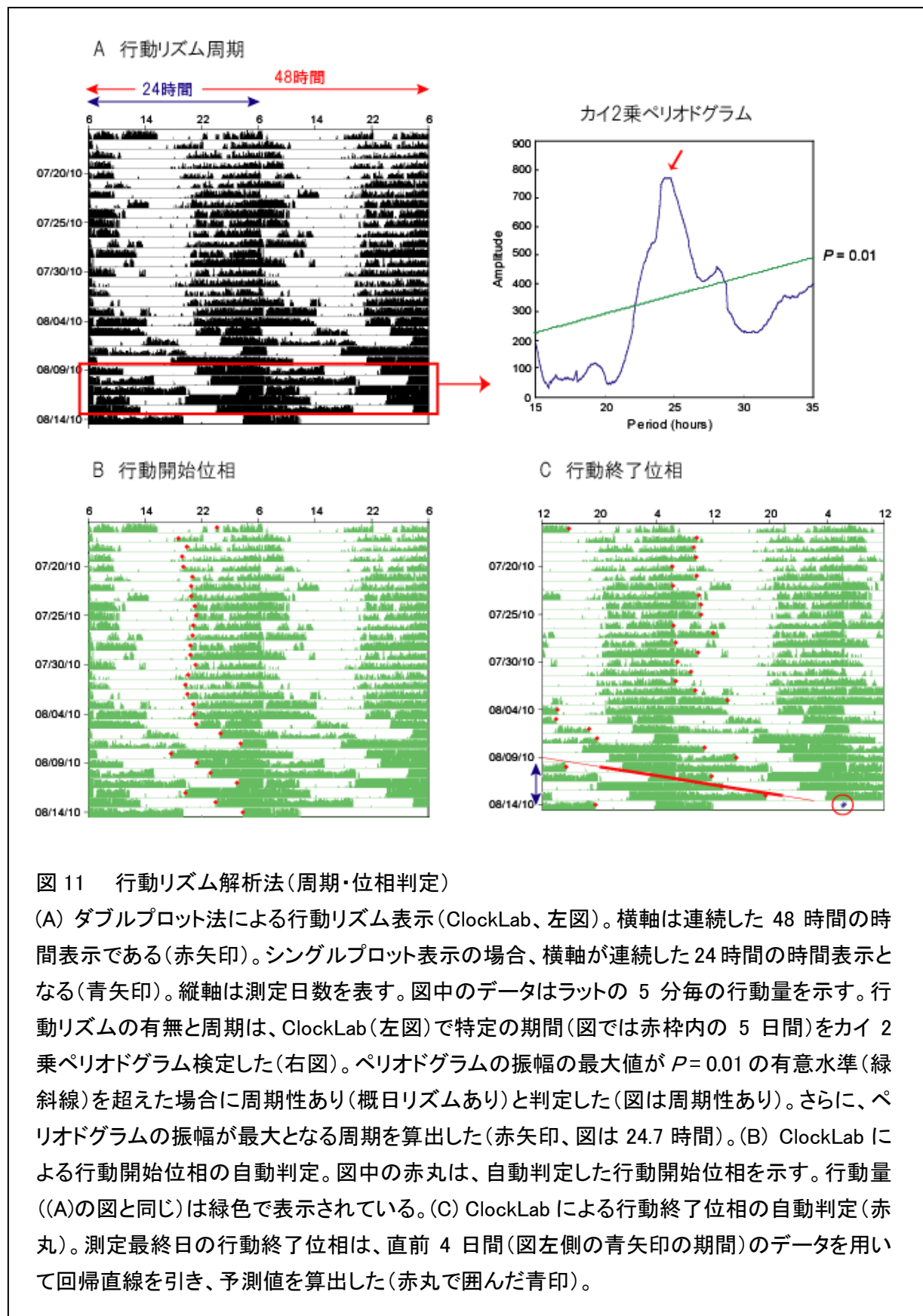
行動量の時系列データを j 列の配列としたとき、 K は対応する行数を表し、 $\bar{X}_h$ は h 列の値(X_i)の平均値を表す。 $\bar{X}$ はすべてのデータポイントの平均である。 Qp 値が χ^2_{j-1} より大きいとき、時系列データは統計的に有意な周期性ありと判定される。ペリオドグラムより、 Qp 値が最大となる周期 j （X 軸値に相当）をリズム周期とした。

特定の日の行動開始と終了位相は、ClockLab により自動判定した（図 11B・C）。行動時間帯（activity band）の中点位相は、行動開始と終了位相より計算した。脳組織サンプリングにより行動終了時刻が不明な場合、直前 4 日間のデータを用いた回帰直線を外挿し、サンプリング当日の行動終了位相を予測した。行動リズム周期、位相の群間差は、独立 t 検定（エクセル統計）により判定した。

実験 2 および実験 3 における 24 時間の行動パターンは、1 時間毎の平均行動量により表した。メタンフェタミン投与または制限給餌開始直前の 2 日または 3 日間の平均行動量と、投与中の 2 日間（12、13 日目）の平均行動量を各個体について計算し、各群の平均値を算出した。解析該当日が性周期の発情期に当たった場合は、前日のデータを用いて計算した。24 時間行動パターンの群間差は、重複測定分散分析法と Fisher's Protected Least Significant Difference (PLSD) 法の多重比較検定により判定した。ラットの飲水量、摂食量、体重変化は、重複測定分散分析法と Fisher's PLSD 法の多重比較検定により判定した。データは全て、平均 $\pm$ SEM で表した。

2) 発光 (*Per2-dLuc*) リズム解析

発光 (*Per2-dLuc*) リズムの解析は、10 分間隔で得られる発光値（1 分間の発光量）の時系列より、前後 12 時間の平均値を差し引く「24 時間デトレンド法」を用いて基線レベルのトレンドを補正した（図 12A）⁴⁰。得られたデトレンド値を 5 点移動平均法によりさらに平滑化した。発光リズム測定開始から 48 時間以内に出現する最初の発光リズムピークを第 1 ピークとし、中点 2 点法（図



12B) を用いてピーク位相を算出した。5 日間の測定中に明らかなピークが出現しなかった組織標本は、解析から除外した。各群の平均第 1 ピーク位相は横軸 24 時間表示のグラフにプロットし、二元配置分散分析法と Fisher's PLSD 法の多重比較検定により解析した。

発光リズムの振幅は、発光測定機器の感度によるばらつきの影響を除くため、測定開始後の 48 時間以内の最高発光値（第 1 ピーク）と、これに続く第 1 最低値の差を求め、この値を測定値の第 1 ピーク（実験 1、2）または第 1 最低値（実験 3）で割ることで、標準化されたリズム振幅値を算出した（図 12C）。発光リズム周期は、リズムの第 1 ピークと第 2 ピーク位相の時間間隔から求めた（図 12D）。概日リズムの急速な減衰により、明らかな第 2 ピークが認められなかった標本については、周期の解析から除外した。各組織の振幅、周期の群間比較は、二元配置分散分析法と Fisher's PLSD 法の多重比較検定により行った。

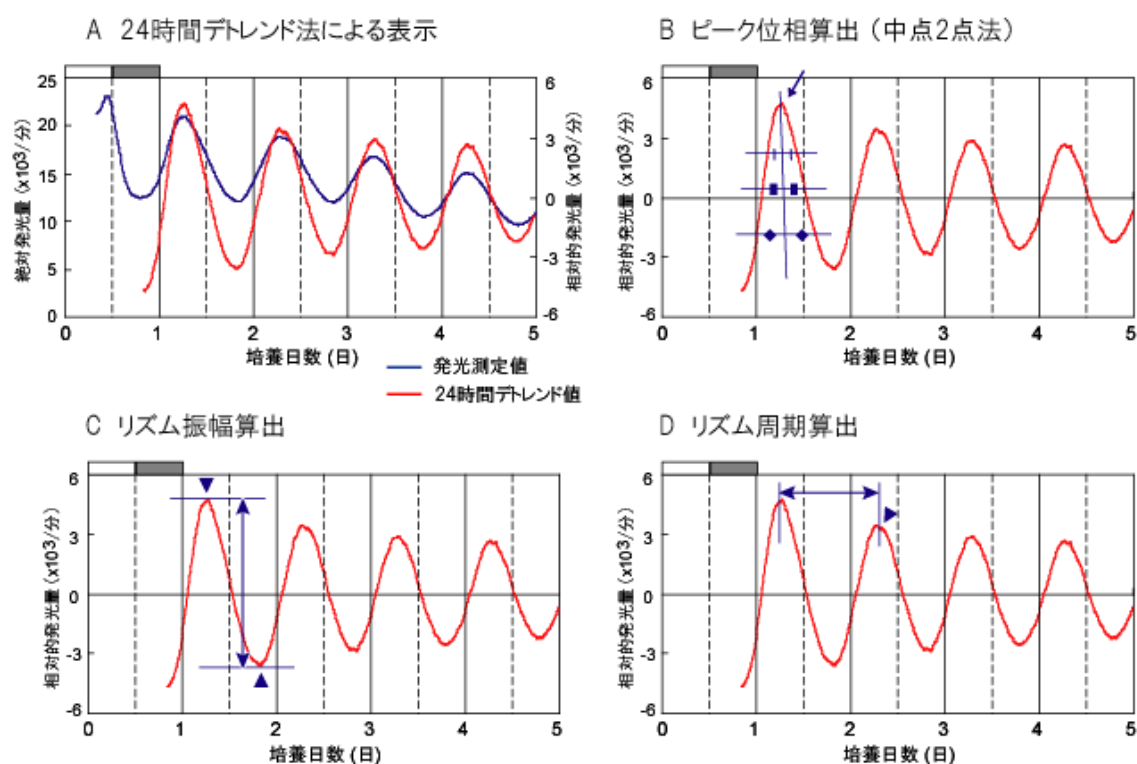


図 12 発光 (*Per2-dLuc*) リズム表示と解析法

(A) 測定した発光値(青線)と、対応する 24 時間デトレンド値(赤線)を同一図に示す(図は視交叉上核の発光リズム)。いずれも 5 点移動平均法による平滑化処理を行っている。Y 軸の第 1 軸(左側)は測定した絶対発光量、第 2 軸(右側)は 24 時間デトレンド値の相対的発光量に対応する。X 軸は培養開始からの日数を表し、垂直実線と破線はそれぞれ 6 時と 18 時を

示す。図左上の横棒は測定開始日の明暗サイクルを示す（白：明期、黒：暗期）。(B) 中点 2 点法による第 1 ピーク位相算出法。解析には、平滑化処理した 24 時間デトレンド値を用いた。グラフの X 軸と並行に複数の直線を引き、発光値との 2 つの交点の中点をそれぞれ求め、これらの中点を結ぶ線と発光値の交点（矢印）の位相を X 軸から読み取った。(C) リズム振幅の算出法。第 1 ピーク（最高発光値、矢頭）とこれに続く第 1 最低値（矢頭）の差を求め（矢印）、これを測定値の第 1 ピークまたは第 1 最低値で割った。(D) リズム周期の算出法。リズムの第 1 ピーク位相とこれに続く第 2 ピーク位相（矢頭）の時間間隔（矢印）を算出した。

4. 実験結果

実験 1：メタンフェタミン水溶液自由摂取下のラット脳内 *Per2-dLuc* リズム変化

(1) 行動リズム

メタンフェタミン投与による行動リズムの位相逆転（内的脱同調）を確認するため、明暗サイクル下でメタンフェタミン自由摂取中のラット自発行動リズムを測定した。

明暗サイクルに同調し、暗期に自発行動の亢進がみられていたラット行動リズムは、メタンフェタミン 0.005%水溶液の自由摂取開始後、数週間で明暗サイクルに対し徐々に位相後退した（図 13A）。さらに日が進むと、行動リズムは明暗サイクルから完全に脱同調し、24 時間より長い周期でフリーラン様の変化をみせた。しかし、行動が暗期にかかるとう行動リズム周期が短くなり、明期にかかるとう周期が長くなる、いわゆる相対的協調（relative coordination）がみられることから、行動リズムはメタンフェタミンのみではなく、明暗サイクルあるいはそれに同調した視交叉上核の影響も同時に受けていると考えられる。投与開始 4 週間後からメタンフェタミン投与濃度を 0.01%に上げると、行動リズムの周期はメタンフェタミンの用量に依存して延長した（図 13B）。メタンフェタミン投与濃度を 0.01%に上げたラットは 12 匹中 7 匹であった。メタンフェタミン投与最終 5 日間の行動リズム周期は、 30.4 ± 0.9 時間（平均 $\pm$ SEM）であった。一方、対照群ラットの行動リズムは 24 時間周期を示した（図 13C）。脳組織採取を行った日の行動リズム開始時刻は、それぞれ 4.3 ± 0.3 時（メタンフェタミン群）と 17.9 ± 0.0 時（対照群）であり、行動リズムの位相逆転を確認した（ $P < 0.01$ 、図 13D）。脳組織採取日までのメタンフェタミン平均投与期間は 41 ± 7 日であった。

(2) メタンフェタミン摂取量と体重変化

メタンフェタミン摂取量を飲水量から推定した。またメタンフェタミンは食欲減弱作用を有することから、その効果を確認する目的で体重を測定した。

メタンフェタミン投与開始後、はじめの 1 週間のラットの平均メタンフェタミン摂取量は 1 日あたり 6.7 ± 0.8 mg/kg b.w.であった。メタンフェタミン投与最終 1 週間のラットの平均メタンフェタミン摂取量は、1 日あたり 10.2 ± 1.5 mg/kg b.w.であった。そのうち、0.005%メタンフェタミン投与を継続したラットの最終メタンフェタミン摂取量は 6.5 ± 1.8 mg/kg b.w.であり、投与開始 4 週

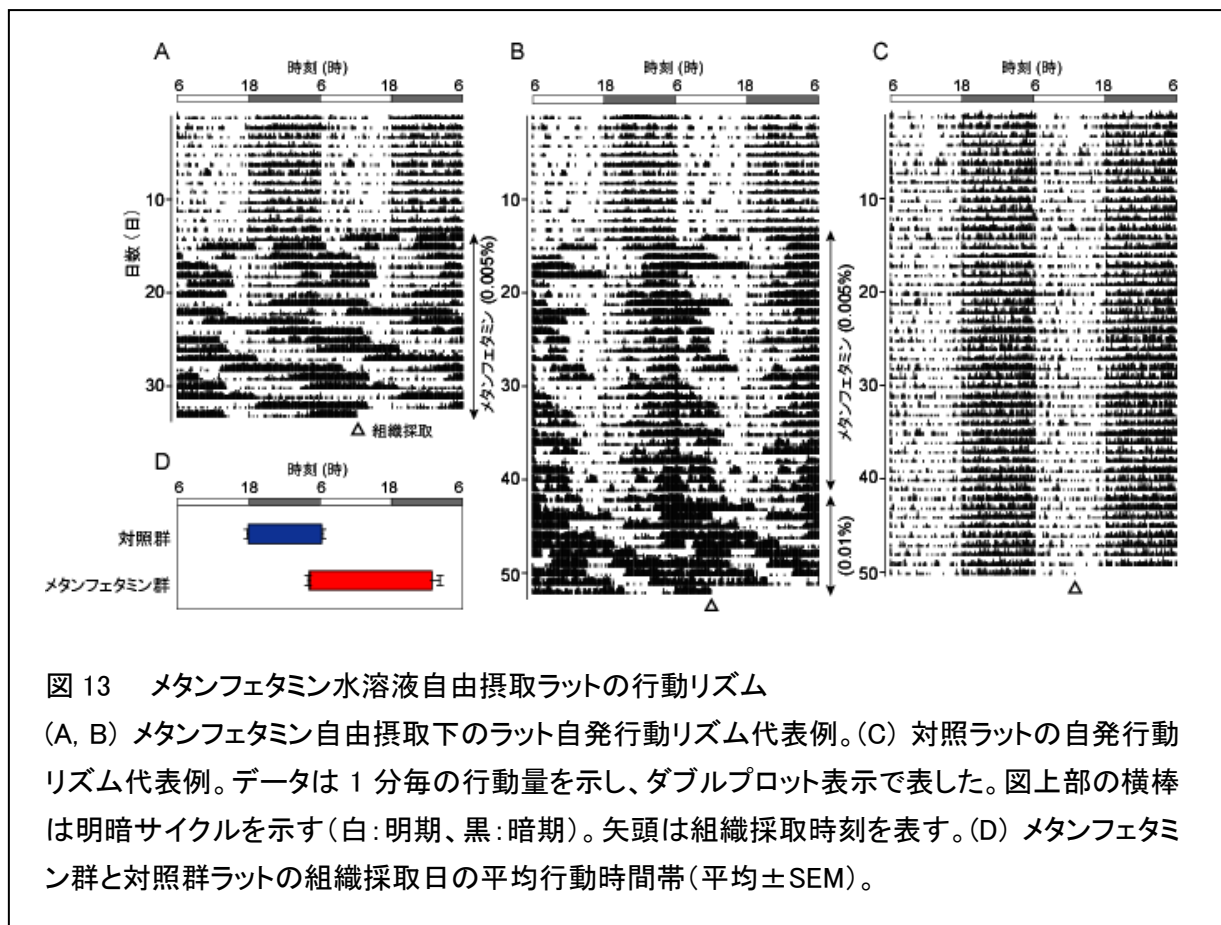


図 13 メタンフェタミン水溶液自由摂取ラットの行動リズム

(A, B) メタンフェタミン自由摂取下のラット自発行動リズム代表例。(C) 対照ラットの自発行動リズム代表例。データは 1 分毎の行動量を示し、ダブルプロット表示で表した。図上部の横棒は明暗サイクルを示す(白: 明期、黒: 暗期)。矢頭は組織採取時刻を表す。(D) メタンフェタミン群と対照群ラットの組織採取日の平均行動時間帯(平均 $\pm$ SEM)。

間後から濃度を 0.01% に上げたラットの最終メタンフェタミン摂取量は 12.8 ± 4.5 mg/kg b.w. であった (重複測定分散分析法・Fisher's PLSD 法、 $P < 0.01$)。しかし、ラットの飲水量は両群とも投与期間中の有意な変化はなく、また両群に有意差を認めなかった (メタンフェタミン投与開始直後の飲水量: 142.9 ± 26.5 g/kg b.w. (0.005% 群)、 126.5 ± 19.3 g/kg b.w. (0.01% 群) ; 投与最終 1 週間の飲水量: 130.3 ± 17.5 g/kg b.w. (0.005% 群)、 127.5 ± 18.9 g/kg b.w. (0.01% 群))。

ラットの体重は、メタンフェタミン投与期間中に 1.2 ± 13.0 g 増加した。一方、対照ラットの体重は 67.2 ± 40.0 g 増加し、両群の差は有意であった ($P < 0.01$)。このことから、メタンフェタミンの体重抑制作用が飲水投与によっても確認された。

(3) 脳組織の *Per2-dLuc* リズム

メタンフェタミン投与による行動リズム位相逆転時の、各脳組織の概日リズム振動の位相変化を解析するため、培養脳組織における発光 (*Per2-dLuc*) リズムを測定した。

メタンフェタミン群と対照群ラットから採取した、視交叉上核、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質のスライス培養組織の全てから発光リズムが観察された (図 14)。視交叉上核のリズムは、振幅が大きく明瞭なリズムが数サイクル以上持続した。一方、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質のリズムは数サイクルで減衰した。また線条体、頭頂皮質、黒質のリズムは振幅が小さく、ノイズ様小スパイクの重畳が多くみられた。これらの発光リズムの特徴は、メタンフェタミン群と対照群の両方に認められた。

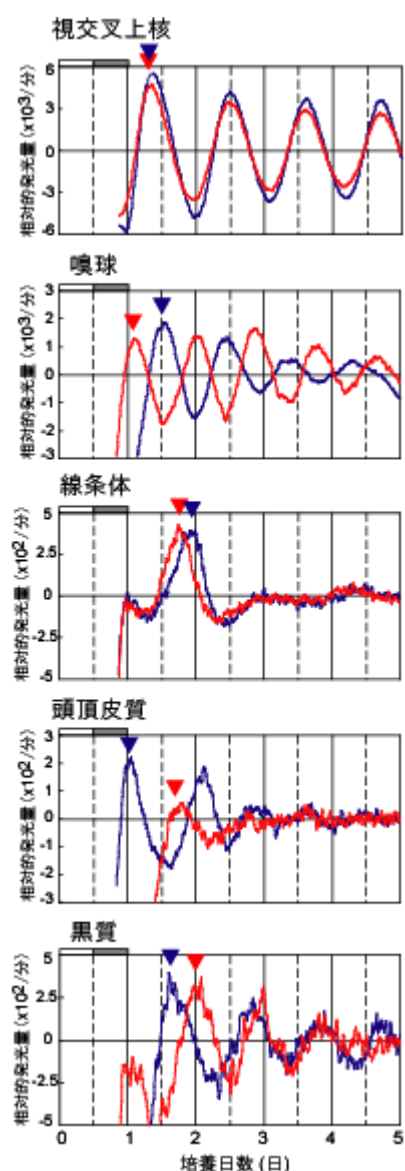


図 14 ラットの脳組織の発光 (*Per2-dLuc*) リズム

視交叉上核、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質の発光リズム代表例。データは 24 時間デトレン

ド値で、5 点移動平均法による平滑化処理を行っている。赤線はメタンフェタミン群、青線は対照群の代表例をそれぞれ示す。矢頭は各発光リズムの第 1 ピークを示す。詳細は図 12 参照。

測定した 135 組織標本のうち、明らかなピークが認められなかった 35 標本を除く、100 標本をリズム解析に用いた。メタンフェタミン群と対照群の発光リズムの第 1 ピーク位相を比較すると、視交叉上核では有意差を認めなかった。一方、嗅球ではメタンフェタミン群が対照群に対し 8.5 時間の位相前進を認めた ($P < 0.01$)。また線条体、頭頂皮質、黒質でそれぞれ 4.5 時間 ($P < 0.05$)、7.6 時間 ($P < 0.01$)、4.9 時間 ($P < 0.05$) の位相後退を認めた (図 15)。

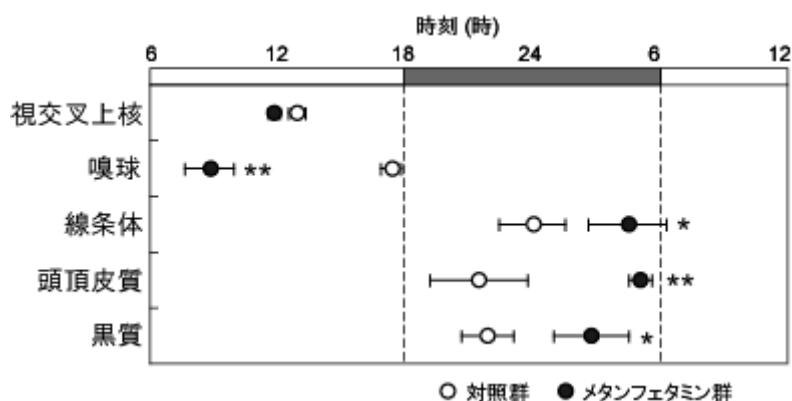


図 15 メタンフェタミン水溶液自由摂取ラットの *Per2-dLuc* リズム位相変化

メタンフェタミン自由摂取下での視交叉上核、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質の *Per2-dLuc* リズムの第 1 ピーク位相変化。データは平均 $\pm$ SEM。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ vs. 対照群 (二元配置分散分析法・多重比較検定 Fisher's PLSD 法)。各図上部の横棒は明暗サイクルを示す (白: 明期、黒: 暗期)。標本数は以下の通り。視交叉上核 (対照群 14、メタンフェタミン群 11)、嗅球 (対照群 12、メタンフェタミン群 12)、線条体 (対照群 13、メタンフェタミン群 8)、頭頂皮質 (対照群 5、メタンフェタミン群 5)、黒質 (対照群 11、メタンフェタミン群 9)。

Per2-dLuc リズムの振幅は測定した脳組織ごとに異なり ($P < 0.01$)、視交叉上核で最大の振幅を示した。しかし、メタンフェタミン群と対照群の間に有意差はみられなかった (表 3)。また、*Per2-dLuc* リズムの周期は脳組織間で有意に異なり ($P < 0.01$)、線条体で最長周期を示した。しかし、メタンフェタミン群と対照群の間に有意差はみられなかった。

表 3. 脳組織の *Per2-dLuc* リズム振幅と周期

	標準化振幅	
	対照群	メタンフェタミン群
視交叉上核	0.77 ± 0.29 (n = 14)	0.57 ± 0.21 (n = 11)
嗅球	0.28 ± 0.03 (n = 12)	0.25 ± 0.04 (n = 12)
線条体	0.15 ± 0.02 (n = 13)	0.15 ± 0.03 (n = 8)
頭頂皮質	0.10 ± 0.01 (n = 5)	0.15 ± 0.05 (n = 5)
黒質	0.11 ± 0.02 (n = 11)	0.09 ± 0.01 (n = 9)

	周期(時間)	
	対照群	メタンフェタミン群
視交叉上核	24.2 ± 0.4 (n = 12)	24.9 ± 0.2 (n = 11)
嗅球	22.5 ± 0.5 (n = 12)	22.4 ± 0.5 (n = 11)
線条体	26.3 ± 1.2 (n = 8)	26.7 ± 2.3 (n = 4)
頭頂皮質	22.0 ± 1.3 (n = 3)	23.0 ± 1.4 (n = 4)
黒質	22.2 ± 1.2 (n = 9)	21.5 ± 1.0 (n = 8)

結果を平均±SEM で示した。括弧内の数字は解析に用いた標本数を表す。二元配置分散分析法により振幅、周期ともに組織間に有意差が存在するが ($P < 0.01$)、メタンフェタミン群と対照群間に有意差はない。

このことは、行動リズムの位相逆転時、概日リズムの変化は組織によって異なり、また行動リズムを反映しないことから、MAO による異なる作用を受けたとも考えられるが、むしろこれらの脳組織の概日振動体が MAO を構成していることを強く示唆する。

実験 2: メタンフェタミン水溶液制限投与による脳内リズム変化と視交叉上核の影響

複数のドパミン神経組織の概日リズム振動が MAO と視交叉上核概日振動体から受ける影響を明らかにするため、視交叉上核を電氣的破壊したラットを実験に用いた。また MAO を一定の時刻に固定するため、ラットへメタンフェタミン投与を一日一定時刻に行った。

(1) 行動リズム

10時から4時間のみメタンフェタミン 0.005%水溶液をラットに与える制限投与を14日間行ったところ、メタンフェタミン投与時間中の行動量が著しく増加した ($P < 0.01$ 、図 16 右・18A 右)。暗期の行動量は一部のラットで抑制されたが、群全体では投与前値と比較し有意な変化がみられなかった。制限投与終了後のメタンフェタミン自由摂取下で、制限投与時刻にみられた行動は速やかに位相後退した (図 16 右)。しかしこの位相後退は、約 7 日後、行動開始時刻が暗期の半ばを過ぎた頃に減速した。一方、対照群ラットは、制限給水時刻の直前に有意の行動増加を認めた ($P < 0.05$ 、図 16 左・図 18A 左)。しかしメタンフェタミンを自由摂取にすると、行動時間帯は給水制限時刻からは開始せず、暗期の行動量が増加しわずかに位相後退した。メタンフェタミン制限投与群では自由摂取下での行動リズムが制限時刻から位相後退したことにより、行動リズムを支配する振動体 MAO が制限投与時刻に同調して成立したことが示された。

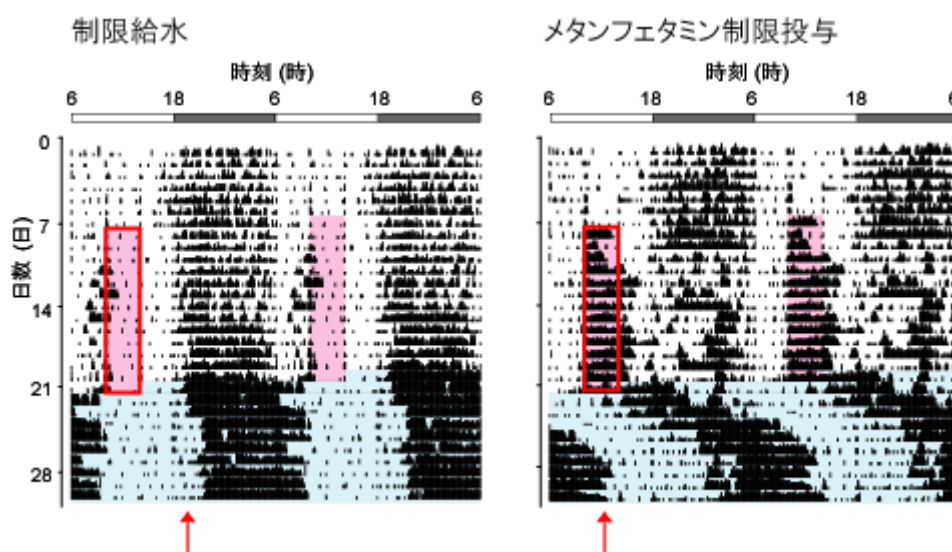


図 16 メタンフェタミン水溶液制限投与下のラット行動リズム

制限給水(対照群:左)とメタンフェタミン制限投与(右)下の代表例の自発行動リズムを示す。図中の赤枠は10時から14時までの水(左)またはメタンフェタミン 0.005%水溶液(右)の制限投与時間帯とその期間を表す。青の網掛け部分はスケジュール終了後のメタンフェタミン 0.005%水溶液の自由摂取期間を表す。矢印は自由摂取開始日の行動開始位相を示す。このメタンフェタミン制限投与例(右)では、メタンフェタミン自由摂取開始6日目より位相後退速度が24時間に近づいている。詳細は図 13 参照。

一方、両側視交叉上核をあらかじめ電気破壊したラットでは、明暗サイクル下で行動リズムは消失したが、メタンフェタミン制限投与により投与時間中の著しい行動量の増加を認めた ($P < 0.01$ 、図 17 右・図 18B 右)。対照の制限給水ラットは投与時間中の行動量増加を認めなかったが、制限投与最後の数日間、制限投与直前の時刻に有意の行動量増加を認めた (図 17 左・図 18B 左)。メタンフェタミン制限投与ラットでは、メタンフェタミン自由摂取下で制限投与時刻にみられた行動が同様に位相後退したが、明暗サイクルに影響されず、約 25 時間周期でフリーランした。一方、制限給水ラットは、メタンフェタミン自由摂取下で、制限給水時刻の直後から開始する約 24 時間周期の行動リズムを形成した。制限給水群では、メタンフェタミン自由摂取下でメタンフェタミン制限投与群とは異なる周期の行動リズムがみられたことから、MAO とは異なる振動機構 (WEO: water-entrainable oscillator) が形成された可能性がある。

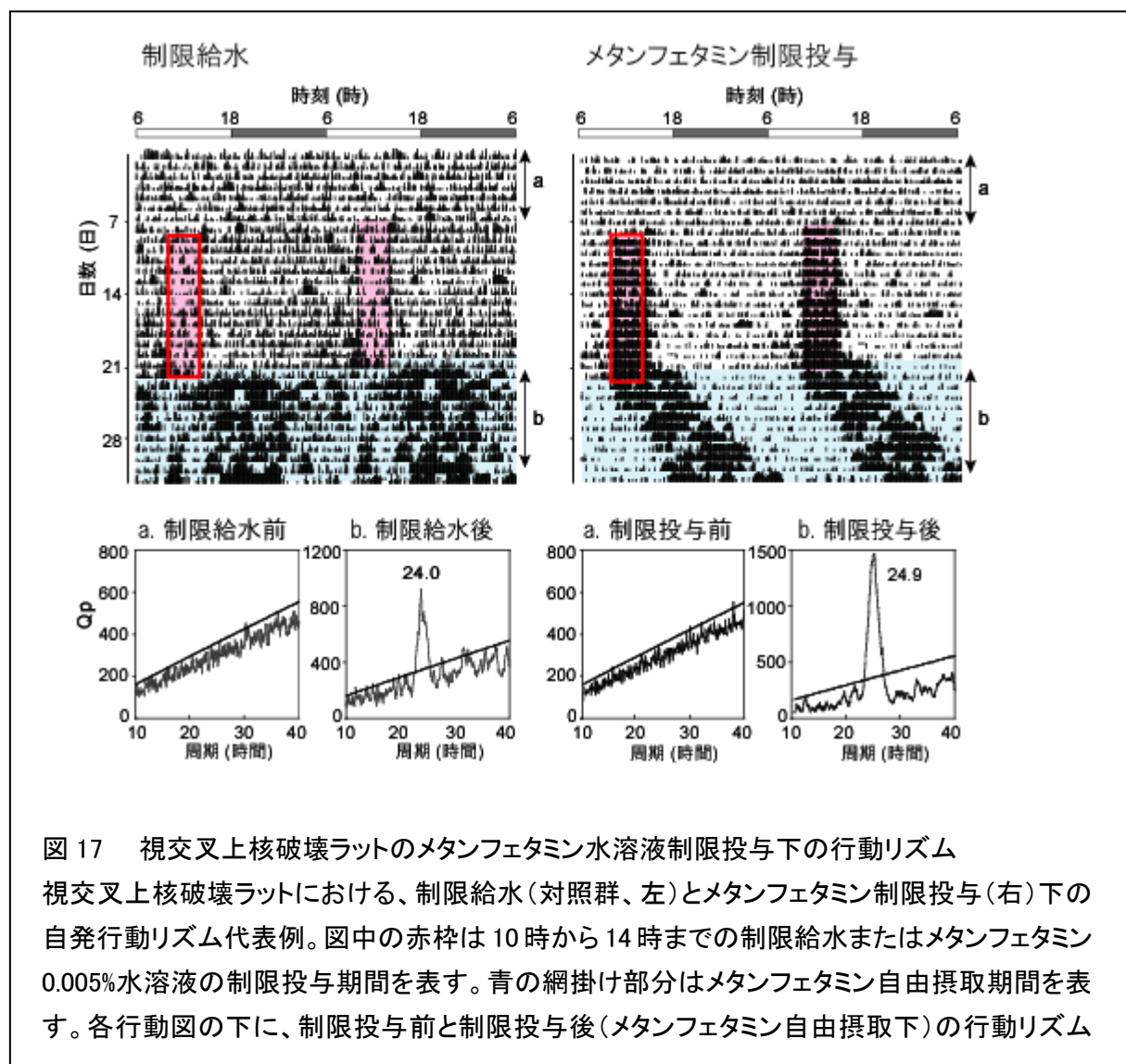


図 17 視交叉上核破壊ラットのメタンフェタミン水溶液制限投与下の行動リズム

視交叉上核破壊ラットにおける、制限給水(対照群、左)とメタンフェタミン制限投与(右)下の自発行動リズム代表例。図中の赤枠は 10 時から 14 時までの制限給水またはメタンフェタミン 0.005% 水溶液の制限投与期間を表す。青の網掛け部分はメタンフェタミン自由摂取期間を表す。各行動図の下に、制限投与前と制限投与後(メタンフェタミン自由摂取下)の行動リズム

周期(ペリオドグラム)を示す。カイ2乗ペリオドグラム解析を行った期間は、行動図の右端の2本の矢印で表した。ペリオドグラム内の斜線は、 $P=0.01$ の有意水準を表し、ペリオドグラム内の数字は判定した周期を表す。詳細は図13参照。

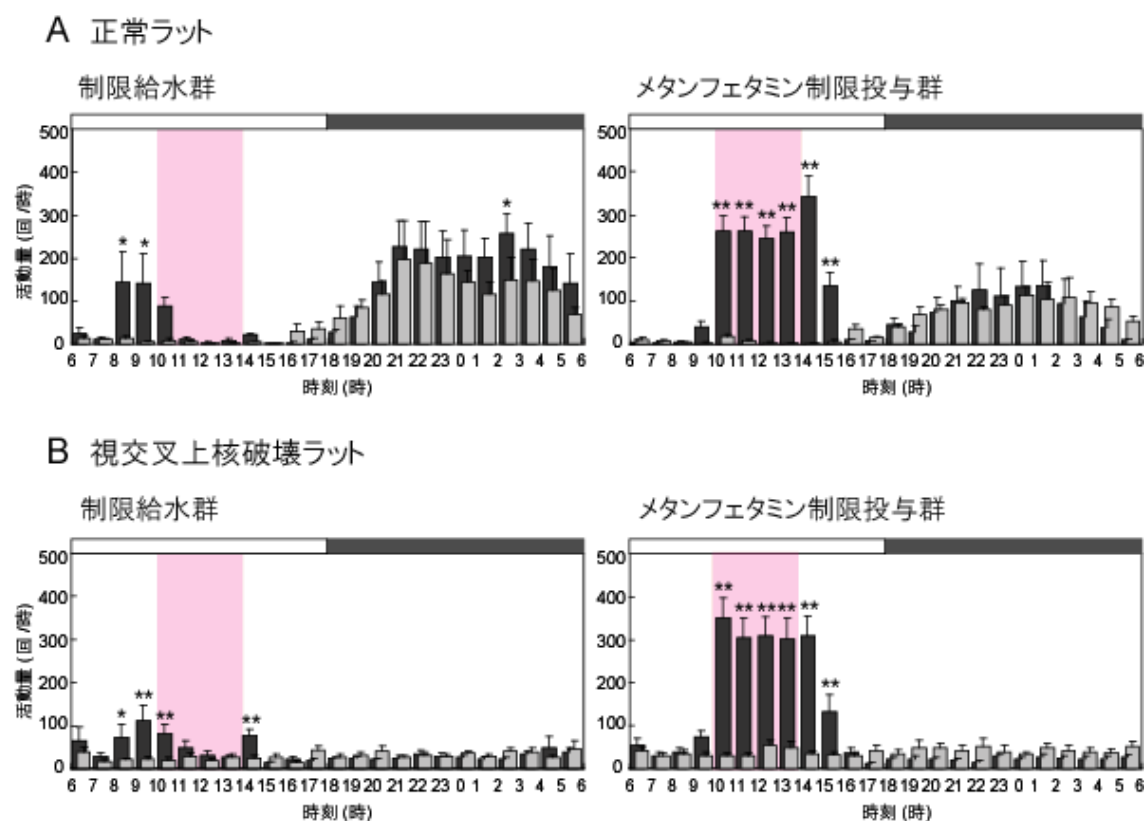


図18 メタンフェタミン水溶液制限投与による24時間行動パターン変化

(A) 正常ラットにおける、制限給水群(左)とメタンフェタミン制限投与群(右)の制限投与スケジュール前(灰色)と制限投与スケジュール中(黒)の24時間行動パターン比較。図中の赤枠は制限投与時刻を表す。(B) 視交叉上核破壊ラットにおける、制限給水群(左)とメタンフェタミン制限投与群(右)の制限投与スケジュール前(灰色)と制限投与スケジュール中(黒)の24時間行動パターン比較。各図上部の横棒は明暗サイクルを示す(白: 明期、黒: 暗期)。データは平均±SEM。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ vs. 制限投与前(重複測定分散分析法・多重比較検定 Fisher's PLSD 法)。

メタンフェタミン自由摂取の初日の行動リズム位相を比較すると、正常ラットでは両群とも行動時間帯の中心は暗期に位置していたが、メタンフェタミン

制限投与群が制限給水群よりも位相前進していた ($P < 0.01$ 、図 19A)。視交叉上核破壊ラットでは、両群とも行動時間帯の中心は明期後半から暗期開始頃に位置していたが、メタンフェタミン制限投与群が制限給水群に対し位相前進していた ($P < 0.05$)。正常ラットと視交叉上核破壊ラットの行動リズムを比較すると、メタンフェタミン制限投与群、制限給水群ともに、視交叉上核破壊ラットが正常ラットに対して大きく位相前進していた ($P < 0.01$)。

正常ラットにおいて、メタンフェタミン自由摂取開始後 5 日間の行動リズム位相後退速度を比較すると (図 19B)、メタンフェタミン制限投与群が制限給水群よりも有意に速かった (2.4 ± 0.7 時間/日 vs. 0.2 ± 0.1 時間/日、平均 $\pm$ SEM、 $P < 0.05$)。視交叉上核破壊ラットでは、メタンフェタミン自由摂取開始後 10 日間の行動リズム位相後退速度を比較すると、メタンフェタミン制限投与群が制限給水群よりも有意に速かった (1.3 ± 0.2 時間/日 vs. 0.2 ± 0.2 時間/日、 $P < 0.01$)。視交叉上核破壊ラットのメタンフェタミン群の行動リズム周期は 25.3 ± 0.2 時間、制限給水群は 24.2 ± 0.2 時間であった。視交叉上核破壊ラットの結果から、メタンフェタミン制限投与と制限給水による行動リズムのフリーラン周期は異なることが示された。一方、正常ラットと視交叉上核破壊ラット間の位相後退速度には、メタンフェタミン制限投与群、制限給水群のどちらも有意差を認めなかった。

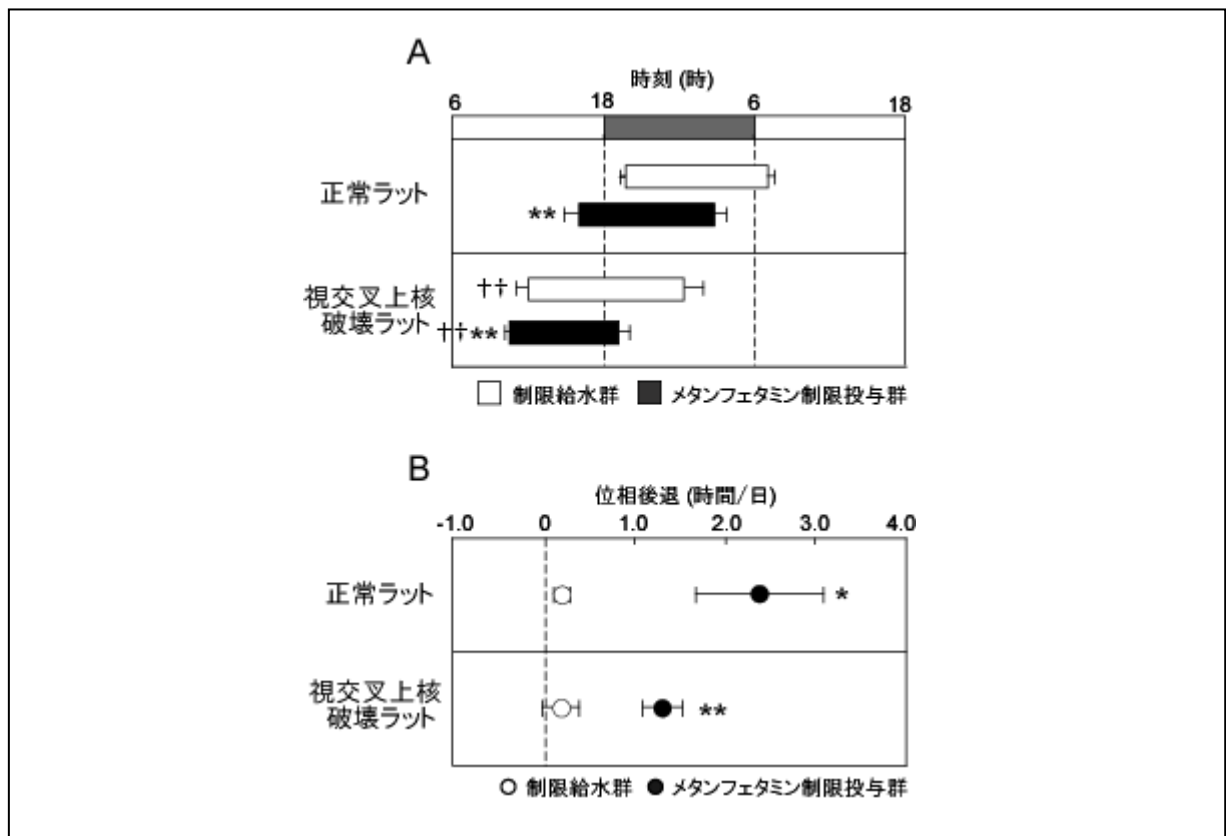


図 19 メタンフェタミン水溶液制限投与直後の行動リズム位相

(A) 正常ラットと視交叉上核破壊ラットにおける、制限給水またはメタンフェタミン制限投与終了後、メタンフェタミン自由摂取の初日の行動時間帯を示す。行動開始と終了時刻をそれぞれ平均±SEM で示す。図上部の横棒は明暗サイクルを示す(白:明期、黒:暗期)。行動時間帯中点の統計は以下の通り。*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ vs. 制限給水群。††: $P < 0.01$ vs. 対応する正常ラット(独立 t 検定)。(B) 正常ラットと視交叉上核破壊ラットにおける、メタンフェタミン自由摂取下の 1 日当たりの行動リズム位相後退速度を示す。平均±SEM。*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ vs. 制限給水群(独立 t 検定)。解析に用いた個体数は以下の通り。正常ラット(メタンフェタミン制限投与群 6、制限給水群 6)、視交叉上核破壊ラット(メタンフェタミン制限投与群 7、制限給水群 12)。

以上の結果から、MAO、WEO とともに視交叉上核概日振動体の強い影響を受けていることが明らかとなった。

(2) メタンフェタミン制限投与と制限給水による飲水量、摂食量、体重変化

メタンフェタミン摂取量の経日変化およびメタンフェタミンの食欲減弱効果を確認する目的で、飲水量、摂食量、体重変化を測定した。

メタンフェタミン制限投与または制限給水により、正常ラットと視交叉上核破壊ラットの 1 日の飲水量はともに減少したが(重複測定分散分析法、 $P < 0.01$)、正常ラットと視交叉上核破壊ラット間の有意差は認めなかった(図 20A)。一方、メタンフェタミン制限投与群と制限給水群を比較すると、正常ラットと視交叉上核破壊ラットはどちらも、制限給水よりもメタンフェタミン制限投与により 1 日飲水量が減少した($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

正常ラットと視交叉上核破壊ラットの 1 日摂食量は、メタンフェタミン制限投与によりともに減少したが(重複測定分散分析法、 $P < 0.01$)、正常ラットと視交叉上核破壊ラット間の有意差は認めなかった(図 20B)。一方、制限給水下での 1 日摂食量は、正常ラットでは制限投与初期にわずかに減少したが(3-4 日目、Fisher's PLSD 法、 $P < 0.05$)その後回復した(12-13 日目)。

14 日間のメタンフェタミン制限投与により、ラットの体重は制限投与開始前と比較して、正常ラットは 32.3 ± 4.2 g 減少し、視交叉上核破壊ラットは 27.8 ± 6.9 g 減少した(図 20C)。一方、14 日間の制限給水による体重変化は、制限投与開始前と比較して、正常ラットは 15.9 ± 3.0 g 減少し、視交叉上核破壊ラットは 14.4 ± 2.7 g 増加した($P < 0.01$)。メタンフェタミン制限投与群と制限給水群を比較すると、正常ラットと視交叉上核破壊ラットどちらも、メタンフェタミン制限投与群で有意な体重減少を示した($P < 0.01$)。

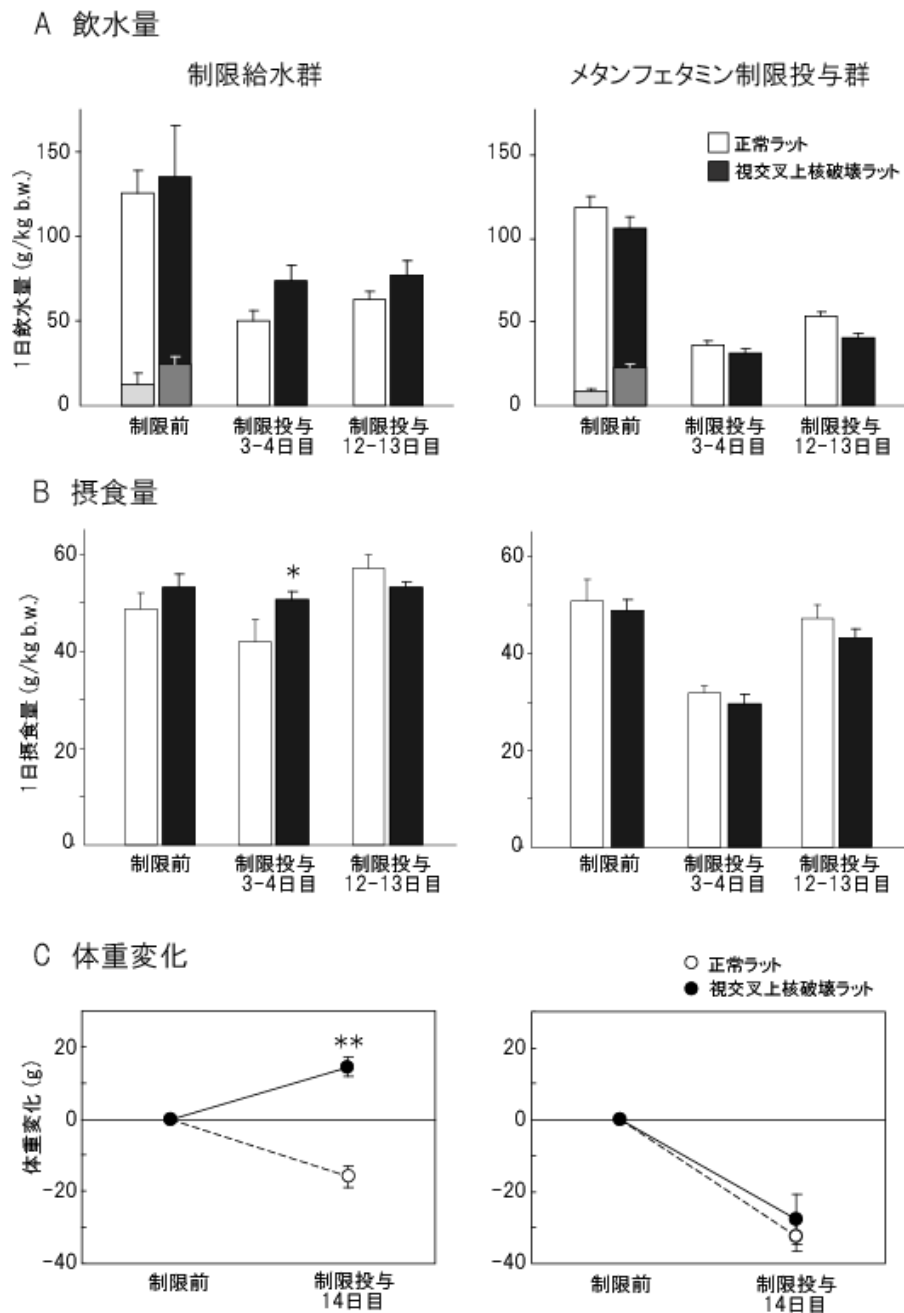


図20 制限給水とメタンフェタミン水溶液制限投与によるラットの飲水量、摂食量、体重変化 (A) 制限給水(左)またはメタンフェタミン制限投与(右)下での、正常ラットと視交叉上核破壊ラットの1日あたりの飲水量。制限前の棒グラフに重複した灰色の棒グラフは、同じグループの同一日の10時から14時の4時間の飲水量を示す。解析に用いた個体数は以下の通り。制限給水群(正常ラット13、視交叉上核破壊ラット10)、メタンフェタミン制限投与群(正常ラット13、視交叉上核破壊ラット19)。(B) 制限給水(左)またはメタンフェタミン制限投与(右)下での、正常ラットと視交叉上核破壊ラットの1日あたりの摂食量。解析に用いた個体数は以下の通り。

通り。制限給水群(正常ラット 8、視交叉上核破壊ラット 9)、メタンフェタミン制限投与群(正常ラット 8、視交叉上核破壊ラット 18)。(C) 制限給水(左)またはメタンフェタミン制限投与(右)下での、正常ラットと視交叉上核破壊ラットの体重変化。制限投与開始前日からの増減を示す。解析に用いた個体数は以下の通り。制限給水群(正常ラット 9、視交叉上核破壊ラット 9)、メタンフェタミン制限投与群(正常ラット 9、視交叉上核破壊ラット 10)。データは平均±SEM。
: $P < 0.05$ 、: $P < 0.01$ (重複測定分散分析法・多重比較検定 Fisher's PLSD 法)。

メタンフェタミン制限投与中の 1 日あたりメタンフェタミン摂取量は、正常ラットが 2.3 ± 0.1 mg/kg b.w.、視交叉上核破壊ラットが 2.0 ± 0.1 mg/kg b.w. であった ($P < 0.05$)。その後のメタンフェタミン自由摂取下での 1 日あたりメタンフェタミン摂取量は、正常ラットが 3.9 ± 0.4 mg/kg b.w. (メタンフェタミン制限投与群) と 4.7 ± 0.5 mg/kg b.w. (制限給水群)、視交叉上核破壊ラットがそれぞれ 3.2 ± 0.2 mg/kg b.w. と 2.6 ± 0.3 mg/kg b.w. であった。メタンフェタミン制限投与群は、正常ラットと視交叉上核破壊ラット間のメタンフェタミン自由摂取量に差を認めなかったが、制限給水群は両群で有意差を認めた ($P < 0.01$)。

以上の結果から、MAO は時刻制限投与により、少量のメタンフェタミンで発現することが判明した。また制限給水による摂食量、体重の減少が概日リズムを変化させる可能性は否定できた。

(3) 脳組織の *Per2-dLuc* リズム

正常ラットと視交叉上核破壊ラットにおける、メタンフェタミン制限投与または制限給水下の各脳組織の *Per2-dLuc* リズムを測定し比較検討した。正常ラットの視交叉上核、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質からは、メタンフェタミン制限投与群、制限給水群ともに発光リズムが観察された。また、視交叉上核破壊ラットの嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質からは、正常ラットと同じ特徴をもつ発光リズムが観察された (図 21)。メタンフェタミン制限投与群、制限給水群ともに、各組織のリズムは数サイクルで徐々に減衰し、また線条体、頭頂皮質、黒質のリズムは振幅が小さく、ノイズ様スパイクが重畳していた。なお、メタンフェタミン制限投与群の正常ラットの頭頂皮質は、1 標本を除き標本の発光が迅速に減衰しリズムが観察されなかったため、その後の解析から除外した。測定した標本のうち明瞭なピークが観察され解析に用いた標本数は、正常ラット 39/45 (メタンフェタミン制限投与群) と 35/45 (制限給水群)、視交叉上核破壊ラット 34/36 (メタンフェタミン制限投与群) と 35/40 (制限給水群) である。

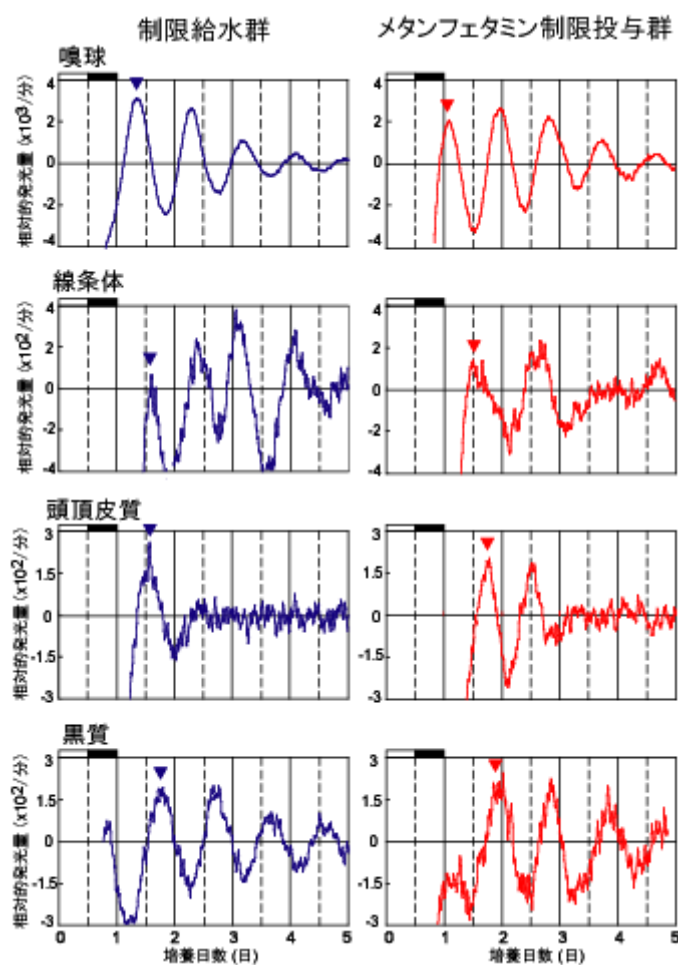


図 21 視交叉上核破壊ラットの脳組織の発光(*Per2-dLuc*)リズム

視交叉上核破壊ラットの嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質の発光リズム代表例。データは 24 時間デトレンド値で、5 点移動平均法によるスムージング処理済。矢頭は発光リズムの第 1 ピークを示す。詳細は図 12 参照。

正常ラットの視交叉上核のリズム第 1 ピーク位相は、メタンフェタミン制限投与群と制限給水群間で差を認めなかった (図 22A(a))。これに対し、嗅球、線条体、黒質の 3 領域のリズムは、全体で有意な位相差を認めた (二元配置分散分析法、 $P < 0.01$)。一方、視交叉上核破壊ラットは、メタンフェタミン制限投与群と制限給水群間で嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質の 4 領域のリズムに有意な位相差を認めた ($P < 0.05$ 、図 22A(b))。線条体では制限給水群が有意に位相前進し、黒質ではメタンフェタミン制限投与群が位相後退した (Fisher's PLSD 法、 $P < 0.01$)。

さらにメタンフェタミン制限投与群について、正常ラットと視交叉上核破壊

ラット間の3領域(嗅球、線条体、黒質)のリズム位相を比較すると(図 22A(c))、両群は有意に異なっていた ($P < 0.01$)。正常ラットと比較し、視交叉上核破壊により嗅球ではリズム位相前進、黒質では位相後退をそれぞれ認めた ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。また制限給水群について、正常ラットと視交叉上核破壊ラット間の4領域(嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質)のリズム位相を比較すると(図 22A(d))両群は有意に異なっていた ($P < 0.01$)。正常ラットと比較し、視交叉上核破壊により線条体と頭頂皮質で位相前進を認めた ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。

正常ラットの *Per2-dLuc* リズム振幅は脳組織間で有意に異なったが(二元配置分散分析法、 $P < 0.01$)、メタンフェタミン制限投与群と制限給水群間に有意差はみられなかった(図 22B 左)。一方、視交叉上核破壊ラットでは、リズム振幅は脳組織間で有意に異なり ($P < 0.01$)、嗅球と頭頂皮質においてメタンフェタミン制限投与群のリズム振幅が増加していた(Fisher's PLSD 法、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、図 22B 右)。また、正常ラットと視交叉上核破壊ラット間でリズム振幅を比較すると、メタンフェタミン制限投与下では両群に有意差を認めなかった。一方、制限給水下では両群に差がみられ ($P < 0.01$)、視交叉上核破壊ラットの嗅球のリズム振幅が有意に低下していた ($P < 0.01$)。

以上の結果から、測定した複数の組織の概日リズムは MAO と視交叉上核の影響を同時に受けており、その程度は組織により異なることが示された。また、視交叉上核破壊ラットへのメタンフェタミン制限投与と制限給水では、関与するドパミン神経組織が異なり、脳内振動機構は異なることが示唆された。

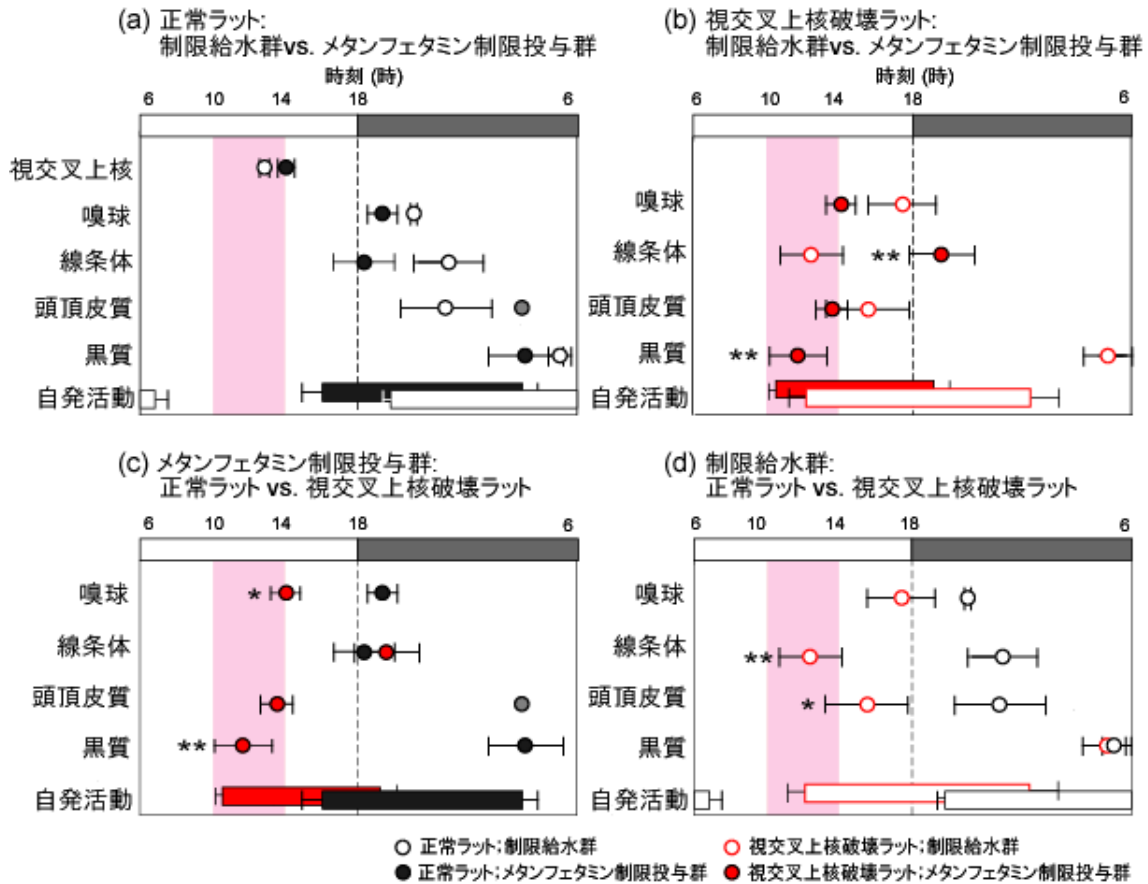
実験 3：メタンフェタミン腹腔内定時投与による脳内リズム変化と食餌性リズムの比較

本実験では、MAO と FEO の振動機構の異同を明らかにする目的で、制限給餌およびメタンフェタミン定時投与下の脳内概日振動体の位相変化を調べた。

(1) 行動リズム

10 時のメタンフェタミン (2 mg/kg b.w.) 腹腔内投与により、投与直後から数時間にわたりラットの行動量は著しく増加した(図 23A)。対照群ラットは同一時刻の生理食塩水の腹腔内投与により、投与直後にわずかな行動量の増加を認めた。一方、10 時より 2 時間の制限給餌を行ったラットは、日が進むにつれ給餌時刻直前の行動量増加を認めた(図 23B)。ラットの 24 時間行動パターンは、メタンフェタミン腹腔内投与により投与開始前と比較して有意に変化し(重複測定分散分析法、 $P < 0.01$ 、図 24A 左)、生理食塩水投与群とも異なるパターンとなった ($P < 0.01$ 、図 24A 右)。特に、メタンフェタミン投与後の 10 時か

A



B

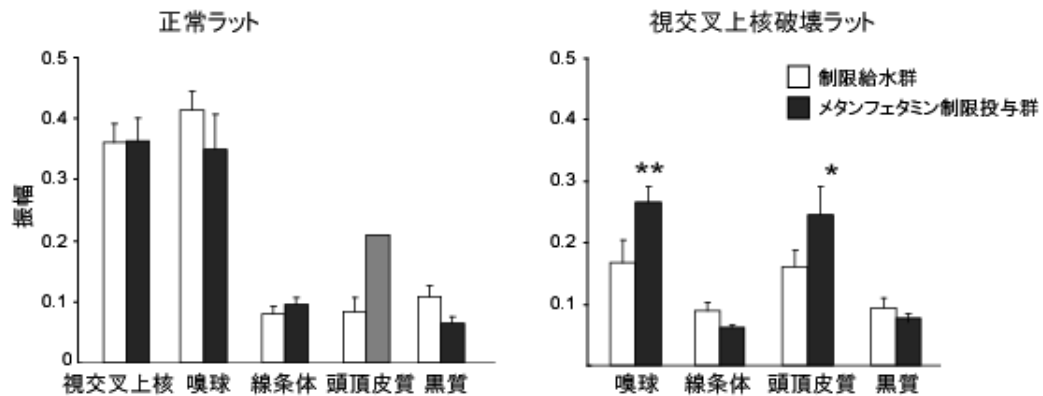


図 22 メタンフェタミン水溶液制限投与ラットの *Per2-dLuc* リズム位相と振幅

(A) 正常ラット(a)と視交叉上核破壊ラット(b)における、制限給水またはメタンフェタミン制限投与下の各脳組織の *Per2-dLuc* リズムの第1ピーク位相比較。また同じデータを用いた、メタンフェタミン制限投与(c)と制限給水(d)下の正常ラット、視交叉上核破壊ラット間の *Per2-dLuc* リズム第1ピーク位相比較。図中の赤枠は制限投与時刻を表す。各図上部の横棒は明暗サイクルを示す(白:明期、黒:暗期)。(B) 正常ラット(左)と視交叉上核破壊ラット(右)における、

制限給水またはメタンフェタミン制限投与下の各脳組織の *Per2-dLuc* リズムの振幅。データは平均±SEM。*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ vs. 同一図中の対照群(二元配置分散分析法・多重比較検定 Fisher's PLSD 法)。正常ラットの標本数は以下の通り。視交叉上核(制限給水群 9、メタンフェタミン制限投与群 9)、嗅球(制限給水群 9、メタンフェタミン制限投与群 9)、線条体(制限給水群 7、メタンフェタミン制限投与群 8)、頭頂皮質(制限給水群 5、メタンフェタミン制限投与群 1)、黒質(制限給水群 9、メタンフェタミン制限投与群 8)。視交叉上核破壊ラットの標本数は以下の通り。嗅球(制限給水群 9、メタンフェタミン制限投与群 10)、線条体(制限給水群 8、メタンフェタミン制限投与群 9)、頭頂皮質(制限給水群 8、メタンフェタミン制限投与群 8)、黒質(制限給水群 9、メタンフェタミン制限投与群 8)。メタンフェタミン制限投与群の正常ラットの頭頂皮質は 1 例のため、位相と振幅のデータに SEM がない。

ら 14 時の間に著しい行動量の増加を認めた。一方、制限給餌によりラットの 24 時間行動パターンは開始前と比較して有意に変化し ($P < 0.01$ 、図 24B 左)、自由摂食群とも異なるパターンとなった ($P < 0.01$ 、図 24B 右)。特に、給餌時刻直前の 8 時から 10 時に著しい行動量増加を認めた。また、暗期のはじめの数時間にも行動量増加を認めた。

これらの結果から、メタンフェタミン腹腔内定時投与および制限給餌により、投与時刻前後の顕著な行動の亢進が生じることが示された。

(2) 制限給餌による摂食量、体重変化

ラットの 1 日摂食量は制限給餌により有意に変化し、制限給餌初期に減少し後半は回復傾向を示した ($P < 0.01$ 、図 25A)。この制限給餌によるラットの 1 日摂食量は、実験 2 における正常ラットのメタンフェタミン制限投与や制限給水下の摂食量(図 20B のデータ)と比較して、いずれも有意差を認めなかった。また 14 日間の制限給餌により、ラットの体重は開始前と比較して 25.6 ± 7.9 g 減少した。一方、自由摂食群は同じ 14 日間で 15.5 ± 6.3 g 増加した ($P < 0.01$ 、図 25B)。この制限給餌によるラットの体重変化は、実験 2 における正常ラットのメタンフェタミン制限投与と制限給水による体重変化(図 20C のデータ)と比較して、いずれも有意差を認めなかった。

(3) 脳組織の *Per2-dLuc* リズム

同一時刻のメタンフェタミン投与と制限給餌による各脳組織のリズム変化を比較検討した。視交叉上核、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質のほとんどのスライス培養組織から、発光リズムが観察された。測定した標本のうち、リズム解析に用いた標本数は 106/120 (メタンフェタミン腹腔内投与)、75/80 (制限給餌)

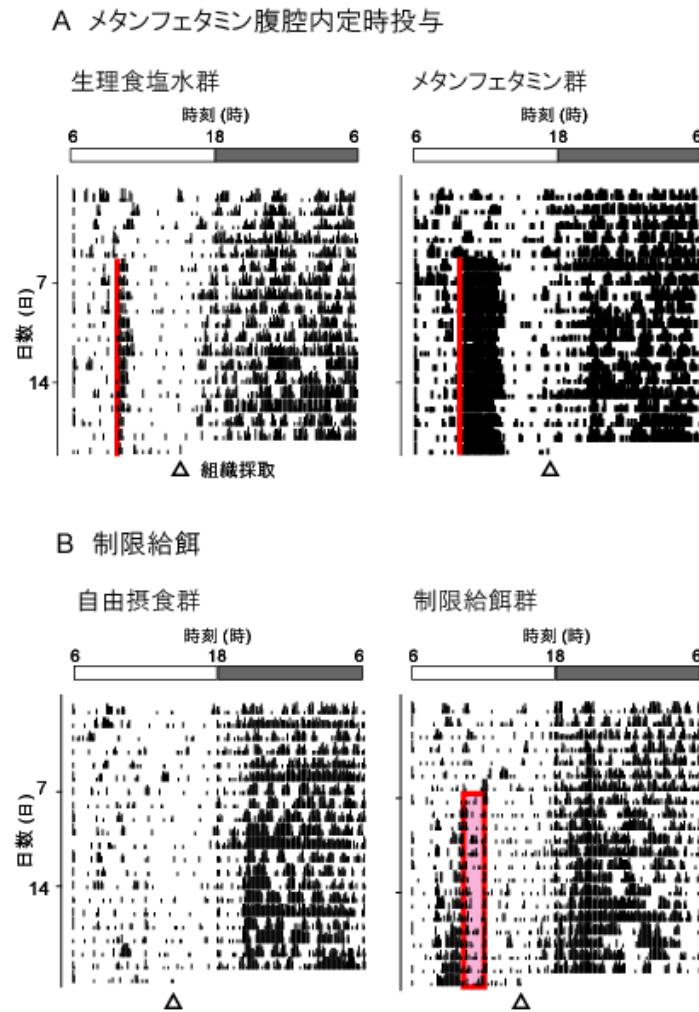


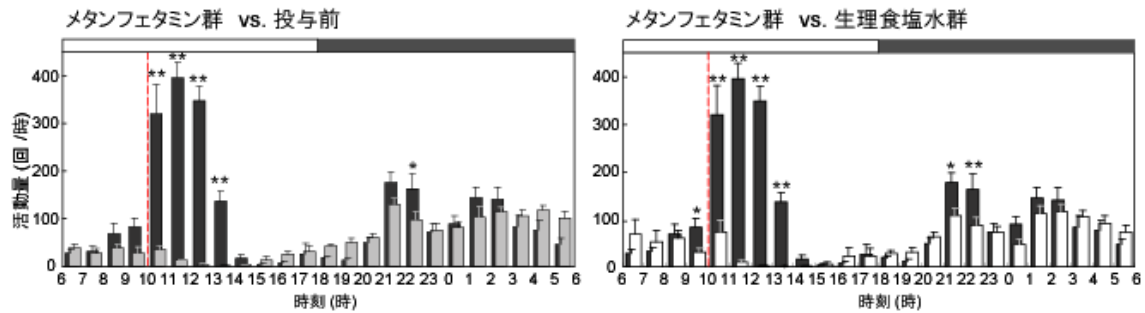
図 23 メタンフェタミン腹腔内定時投与と制限給餌下の行動リズム

(A) メタンフェタミン腹腔内投与におけるラットの行動リズム代表例(シングルプロット表示)。左図が対照群(生理食塩水投与)、右図がメタンフェタミン投与ラットの行動リズムを示す。図中の赤線は 10 時の投与時刻を示す。(B) 制限給餌におけるラットの行動リズム代表例。左図が対照群(自由摂食)、右図が制限給餌ラットの行動リズムを示す。図中の赤枠は 10 時から 12 時までの制限給餌時刻を表す。詳細は図 13 参照。

である。

メタンフェタミン腹腔内投与、制限給餌ともに、リズム振幅は脳組織ごとに異なったが(二元配置分散分析法、 $P < 0.01$)、実験群と対照群の間に有意差はみられなかった(図 26A)。リズムの第 1 ピーク位相を比較すると(図 26B)、視交叉上核はメタンフェタミン投与により変化を認めなかった。一方、視交叉上核外の 4 領域(嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質)のリズムは、メタンフェタ

A メタンフェタミン腹腔内投与実験



B 制限給餌実験

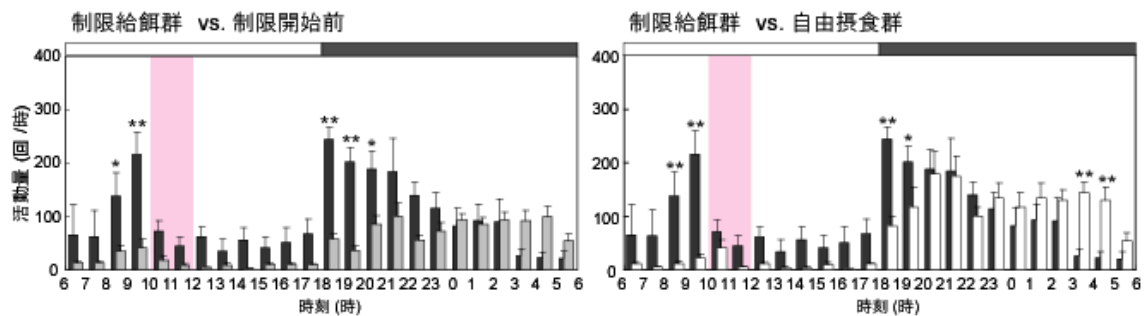


図 24 メタンフェタミン腹腔内定時投与と制限給餌による 24 時間行動パターン変化

(A) メタンフェタミン腹腔内投与による 24 時間行動パターン変化。左図:メタンフェタミン群の投与スケジュール中(黒)と投与スケジュール前(灰色)の行動リズム比較。右図:メタンフェタミン群(黒)と対照群(生理食塩水群、白)の投与期間中の行動リズム比較。図中赤色破線は腹腔内投与時刻を示す。(B) 制限給餌による 24 時間行動パターン変化。左図:制限給餌群の制限スケジュール中(黒)と制限スケジュール前(灰色)の行動リズム比較。右図:制限給餌群(黒)と対照群(自由摂食群、白)の制限スケジュール中の行動リズム比較。図中赤枠は制限給餌時刻を示す。データは平均±SEM。*: $P < 0.05$ 、**: $P < 0.01$ (重複測定分散分析法・多重比較検定 Fisher's PLSD 法)。詳細は図 18 参照。

ミン投与により平均 1.9 ± 0.6 時間の位相後退を認めた(二元配置分散分析法、 $P < 0.05$)。また、制限給餌により視交叉上核のピーク位相は変化しなかったが、視交叉上核外の 4 領域は平均 6.3 ± 2.0 時間の位相前進を認めた($P < 0.01$)。なかでも、線条体と黒質のリズム位相が大きく前進した(多重比較検定 Fisher's PLSD 法、 $P < 0.01$)。メタンフェタミン群と制限給餌群のリズムピーク位相を比較すると、両群は有意に異なっていた($P < 0.01$)。両群の視交叉上核外 4 領域の平均位相差は 6.6 時間であり、特に線条体(6.5 時間)、黒質(12.0 時間)の有意な位相差を認めた($P < 0.01$)。

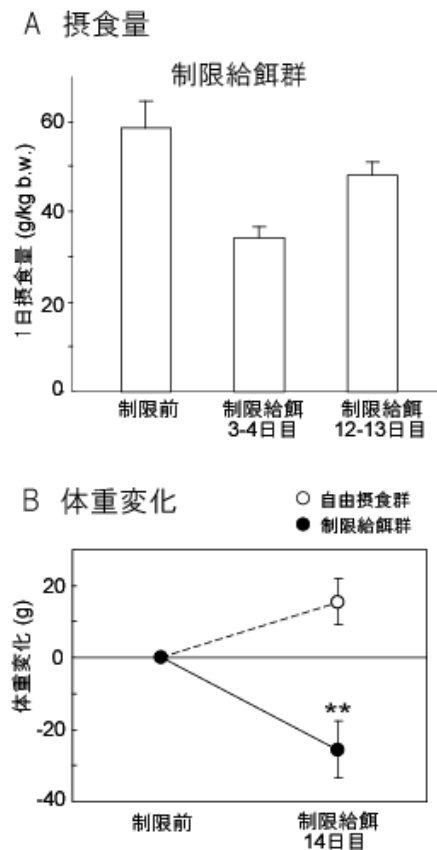


図 25 制限給餌ラットの摂食量、体重変化

(A) 制限給餌下でのラットの1日摂食量。(B) 制限給餌下でのラットの体重変化。制限給餌開始前日の体重からの増減を示す。データは平均±SEM。**: $P < 0.01$ (重複測定分散分析法・多重比較検定 Fisher's PLSD 法)。解析に用いた個体数は、自由摂食群 8、制限給餌群 8。

これらの結果は、メタンフェタミン投与と制限給餌によりほぼ同じ位相に行動リズムが出現するにもかかわらず、脳内組織の概日振動体は異なる反応を示し、振動体 MAO と FEO は異なる可能性を示した。

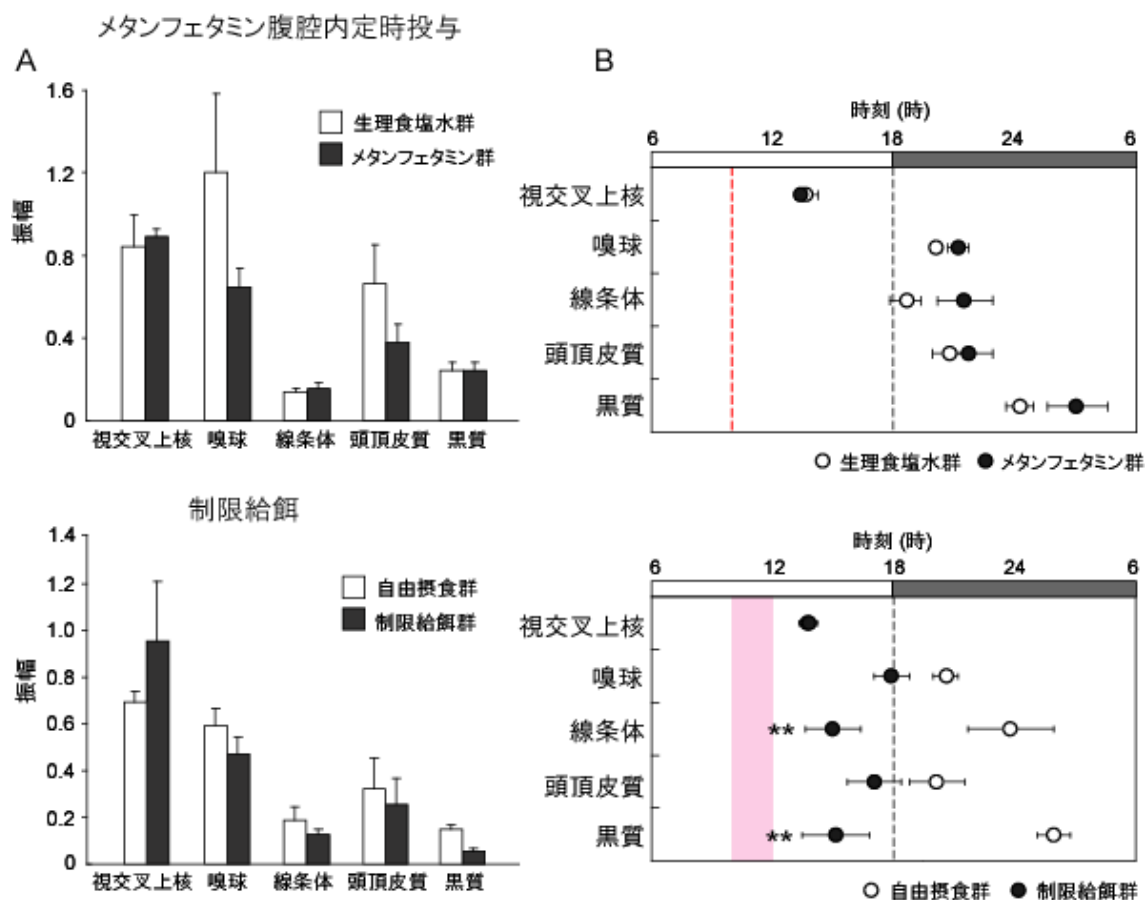


図 26 メタンフェタミン腹腔内定時投与、制限給餌ラットの *Per2-dLuc* リズム振幅と位相変化

(A) メタンフェタミン腹腔内投与(上)と制限給餌(下)における視交叉上核、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質の *Per2-dLuc* リズムの振幅。データは平均±SEM。(B) メタンフェタミン腹腔内投与(上)と制限給餌(下)における視交叉上核、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質の *Per2-dLuc* リズムの位相変化。図中の赤線は10時の腹腔内投与時刻を示す。赤枠は10時から12時までの制限給餌時刻を表す。データは平均±SEM。*: $P < 0.01$ vs. 対照群 (二元配置分散分析法・多重比較検定 Fisher's PLSD 法)。メタンフェタミン腹腔内投与の標本数は以下の通り。視交叉上核(生理食塩水群 12、メタンフェタミン群 12)、嗅球(生理食塩水群 12、メタンフェタミン群 11)、線条体(生理食塩水群 12、メタンフェタミン群 11)、頭頂皮質(生理食塩水群 7、メタンフェタミン群 7)、黒質(生理食塩水群 12、メタンフェタミン群 10)。制限給餌の標本数は以下の通り。視交叉上核(自由摂食群 8、制限給餌群 8)、嗅球(自由摂食群 8、制限給餌群 8)、線条体(自由摂食群 8、制限給餌群 8)、頭頂皮質(自由摂食群 6、制限給餌群 5)、黒質(自由摂食群 8、制限給餌群 8)。

5. 考察

ラットへのメタンフェタミン投与により、視交叉上核外に新たな脳内振動機構（MAO）が形成されることが示されている。先行研究で、MAO の支配を受けたラットの行動リズムは長周期となり、明暗サイクルに同調した視交叉上核のリズム支配から内的脱同調する¹²。この行動リズムは、2 振動体仮説に基づくヒトの睡眠覚醒リズムと共通の特徴を示す唯一の動物モデルであり、ヒトの睡眠覚醒リズムを駆動する脳内振動体の機序解明に用いることができる。しかし、MAO の局在や振動機序はこれまで未解明であった。脳の各組織には独自の概日振動体（末梢時計）があり、これらの末梢振動体が候補の一つである。

実験 1：メタンフェタミン水溶液自由摂取下のラット脳内 *Per2-dLuc* リズム変化

メタンフェタミン自由摂取下で、ラット行動リズムが長周期となり、視交叉上核リズムから脱同調した。この行動リズムはメタンフェタミン投与により誘導された MAO に支配され、視交叉上核概日振動体の支配から脱したものと考えられる。なぜなら、この状況においても、視交叉上核 *Per2* 発現リズムは対照群と同じく明暗サイクルに同調しているからである。行動リズムが完全に位相逆転したとき、嗅球、頭頂皮質、黒質における時計遺伝子 *Per2* 発現リズムは、本来の位相からそれぞれ異なる方向、大きさに位相変化した（図 15）。このことは、複数のドパミン神経組織の概日リズム振動が視交叉上核リズム支配から内的脱同調することを示すと同時に、組織により MAO から受ける影響は異なることを示す。この事実は、これらの組織の概日リズム振動が MAO の支配下にあるというより、これらの振動体の複合体が MAO を形成していることを示唆する。

一方、メタンフェタミン投与ラットの概日リズム周期は、いずれの脳組織においても対照群と差がなく、行動リズム周期と解離していた（表 3）。各組織のリズム振動は培養条件下では MAO の周期を反映せず、固有の内因性周期を示す。このことも、MAO は視交叉上核のように 1 箇所神経核に局在するのではなく、メタンフェタミン投与下で複数の脳領域の概日振動体から構成される振動機構であることを示唆しており、メタンフェタミンの影響が消失した培養条件下では、各組織の概日振動はリズム位相を除き速やかに本来の概日リズムに戻ると考えられる。しかし、MAO は今回測定したいずれの脳領域にも局在しないが、これらの領域の概日リズム振動に影響を与えている可能性は完全には否定できない。

実験 2：メタンフェタミン水溶液制限投与による脳内リズム変化と視交叉上核の影響

一日一定時刻のメタンフェタミン制限投与により投与位相に一致して発現した行動リズムは、視交叉上核の有無にかかわらず、メタンフェタミン自由摂取下でその位相からフリーランした。これは、行動リズムが MAO に支配され、メタンフェタミン制限投与時刻に同調して発現したことを示している。ヒトでは、光同調が起こらない低照度下（10 lux 以下）で 8 時間位相前進した強制睡眠スケジュールを課すと、睡眠覚醒リズムはこのスケジュールに同調するが、血中メラトニンリズムは同調せず、2 つのリズムが内的脱同調を起こすことが報告されている¹¹。さらに、強制睡眠スケジュール終了後のフリーラン条件下で、睡眠覚醒リズムは同調位相から位相シフトして、血中メラトニンリズムと再同調する。実験 2 でのメタンフェタミン投与ラットの行動リズムは、このヒトの睡眠覚醒リズムと全く同じ動態を示した（図 16）。すなわち、メタンフェタミン定時投与は強制的覚醒と同じ効果を行動リズムに対して与えた。

しかし、メタンフェタミン制限投与下での脳組織の概日リズム位相の変化は、正常ラットでは平均 2.7 時間とわずかであった（図 22A(a)）。一方、視交叉上核破壊ラットの脳組織の概日リズムは大きく位相変化した（図 22A(c)）。このことから、測定したドパミン神経組織の概日リズム振動は、視交叉上核と MAO から二重の影響を受けることが示された。

正常ラットの脳内概日リズム変化は、行動リズムが完全に位相逆転したときの嗅球、頭頂皮質、黒質の大きなリズム位相変化（実験 1、図 15）と異なっていた。このことは、2 振動体の共役と位相関係の特徴により説明できる。すなわち、実験 1 では視交叉上核と MAO の 2 つの振動体の位相が 180 度離れており（図 13D）、視交叉上核から MAO を構成する各脳組織のリズム振動への影響が小さくなるが、実験 2 のメタンフェタミン制限投与では、行動リズムがより暗期に近い位相に位置しているため（図 19A）、視交叉上核からの影響が実験 1 よりも強くなることが予測される。視交叉上核破壊ラットのメタンフェタミン制限投与下の各脳組織のリズム位相変化は、実験 1 の正常ラットのメタンフェタミン自由摂取下での MAO 逆転時のリズム変化と概ね一致している。このことから、視交叉上核振動体の強い影響がうかがい知れる。

メタンフェタミン自由摂取ラットでは、行動リズムの位相逆転に関連して線条体の概日振動が有意な位相変化をみせたのに対し、メタンフェタミン制限投与では、制限給水群に対し全体としては有意な変化を認めたものの、交互作用は認められなかった（図 23A(a)）。一方、視交叉上核破壊により、線条体概日振動はむしろ制限給水群で大きな位相変化を示した。メタンフェタミン制限投与実験では、対照群として自由摂食摂水ラットを用いていないために、メタンフ

エタミン制限投与の線条体に対する作用が必ずしも明確でない。そこで、参考として実験 3 の制限給餌の対照群（自由摂食摂水ラット）とメタンフェタミン制限投与群の位相を比較した（図 27）。その結果、視交叉上核破壊ラットでは 4 箇所（視交叉上核、嗅球、線条体、頭頂皮質）の脳組織のリズム位相は、いずれも自由摂食摂水ラットと有意差を認めた（二元配置分散分析法・Fisher's PLSD 法、 $P < 0.05$ ）。このことから、線条体の概日振動がメタンフェタミン制限投与の影響を受けている可能性があり、さらなる検討が必要である。

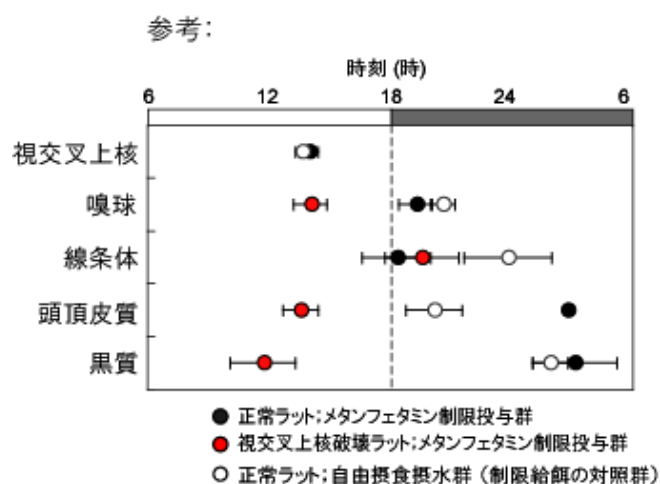
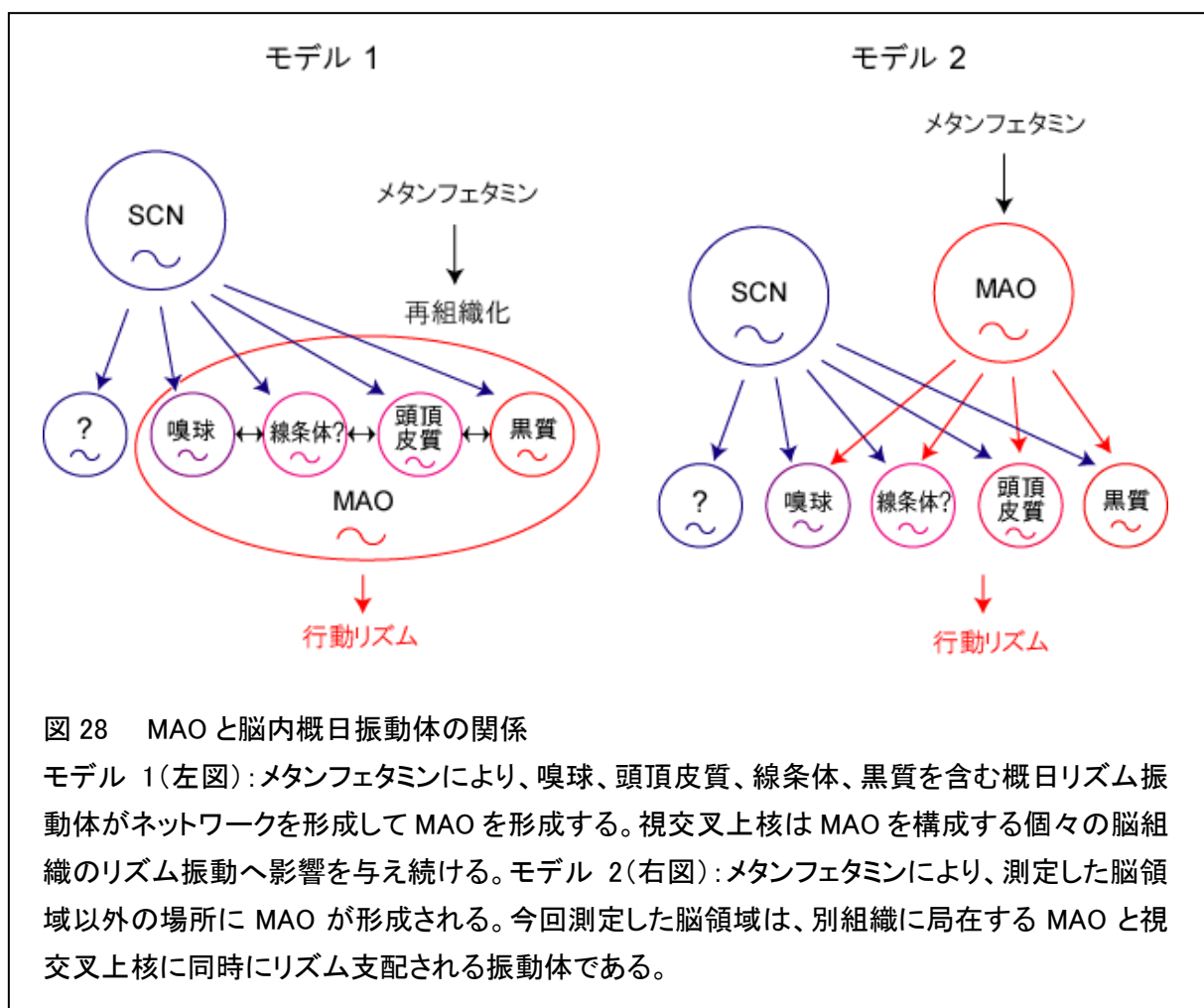


図 27 メタンフェタミン水溶液制限投与ラットと自由摂食摂水ラットの *Per2-dLuc* リズム位相 (参考)

正常ラットと視交叉上核破壊ラットのメタンフェタミン制限投与群 (実験 2) と自由摂食摂水ラット (制限給餌 (実験 3) の対照群) の *Per2-dLuc* リズム位相を同一の図に示す。データは平均 ± SEM。各図上部の横棒は明暗サイクルを示す (白: 明期、黒: 暗期)。

今回リズム測定したドパミン神経組織は、メタンフェタミンによる影響を最も受け¹⁹、振動体 MAO の局在候補部位と考えられる。一方、一定時刻のメタンフェタミン投与による各組織の概日リズムの位相変化の方向と程度は、組織により異なっていた。このことは、これらの組織の概日リズム振動が視交叉上核の影響を受けながら、メタンフェタミン投与下でネットワークを形成し一つの振動体 (MAO) を構成するとした実験 1 の仮説を支持する (図 28、モデル 1)。すなわち、振動体 MAO はそれぞれ異なる位相を示す複数の脳内振動体を含み、これらのネットワークにより構成される複合振動体である可能性が高い。一方で、今回測定した脳領域はいずれも MAO の構成振動体を含む部位ではなく、別組織に局在する MAO の支配を受ける下位振動体であることは否定できない。

が、その可能性は低いと思われる（モデル 2）。この場合、測定した全ての脳組織のリズム振動は MAO の支配を受けて同じ方向、程度に位相変化することが予想されるが、事実是这样でないからである。



本実験では、メタンフェタミン制限投与の対照として制限給水群を用いた。視交叉上核破壊ラットでは、制限給水後のメタンフェタミン自由摂取下で、制限給水直後から開始し約 24 時間周期でフリーランする行動リズムがみられた（図 17）。このリズム周期は MAO の周期とは異なっており、むしろ FEO の周期と類似している³⁵。この行動リズムの背後に存在する振動機構を **water-entrainable oscillator (WEO)** と名付ける。ラットへの制限給水により、行動や血中コルチコステロンに給水時刻前のピークが生じることはこれまでも報告されている^{41, 42}。この給水時刻前ピークは、二次的に生じた摂食変化により引き起こされる可能性が指摘され、制限給餌によるリズムとの異同が論議されてきた^{43, 44}。しかし本研究では、制限給水下で食餌量が変化しないにもか

かわらず(図 20)、線条体と頭頂皮質の概日リズム位相が有意に変化していた(図 22A(d)、視交叉上核破壊ラット)。興味深いことに、同一期間、同一時刻に開始した制限給水と制限給餌による複数脳組織の概日リズム位相は異なっていた(図 22A(d)と図 26B の比較、 $P < 0.01$)。このことから、制限給水と制限給餌による行動リズムをそれぞれ支配する WEO と FEO は、異なる振動機構である可能性が示唆された。

実験 3：メタンフェタミン腹腔内定時投与による脳内リズム変化と食餌性リズムの比較

同一時刻のメタンフェタミン投与と制限給餌により、行動の著しい亢進がほぼ同じ時刻に発現したにもかかわらず(図 24)、脳組織の概日リズムは異なる方向、程度で位相変化した(図 26B)。制限給餌では、線条体と頭頂皮質の *Per2* リズム位相が前進し、これはマウスを用いた先行研究と一致していた^{45, 46}。脳組織の概日リズムの反応が部位により異なっていたことから、振動体 MAO と FEO は異なる機構であることが示された。この結果は、MAO と FEO は共通の振動機構であるという従来の定説^{47, 48}を覆すものである。

まとめ

本研究により、MAO の局在候補部位として複数のドパミン神経組織が示唆された。これらの組織の概日振動体は、それぞれ異なる程度に MAO と視交叉上核の二重のリズム支配を受け、視交叉上核のリズム支配から脱同調することが示された。また一定時刻のメタンフェタミン投与下で脳組織ごとに概日リズム位相変化が異なることから、MAO はこれらの複数脳領域の振動体から構成される複合振動体である可能性が示唆された。行動リズム位相が大きくシフトしていることから、今回測定した以外の脳部位が MAO を形成する複合振動体に含まれる可能性もある。メタンフェタミン投与下で、各脳組織の概日リズム振動体はネットワークを形成し互いに共役して、行動リズムを支配する MAO を形成する可能性が考えられる。また本研究により、MAO と、制限給餌により形成される振動体 FEO、制限給水による WEO は異なる振動機構であることが示唆された。

6. 総括および結論

本研究から得られた新知見は以下の通りである。

1. メタンフェタミン水溶液自由摂取下で、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質のスライス培養組織における *Per2-dLuc* 概日リズムは、視交叉上核に支配された本来のリズムから脱同調し、組織によりそれぞれ異なる方向、程度の位相変化を示した。
2. メタンフェタミン自由摂取下で、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質のスライス培養組織中の *Per2-dLuc* 概日リズムは、いずれも行動リズム周期とは異なる固有のリズム位相と周期を示した。
3. 一日一定時刻のメタンフェタミン水溶液制限投与により、MAO が制限投与時刻に同調して成立した。
4. メタンフェタミン制限投与への MAO の同調時、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質の *Per2-dLuc* 概日リズムは、視交叉上核の有無により組織ごとに異なる位相変化を示した。
5. 視交叉上核破壊ラットへの同一時刻のメタンフェタミン制限投与と制限給水により、脳内複数組織の *Per2-dLuc* 概日リズムは異なる位相変化を示した。
6. 同一時刻のメタンフェタミン投与と制限給餌により、行動リズムはほぼ同一時刻に出現したのに対し、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質の培養組織中の *Per2-dLuc* 概日リズムは異なる位相変化を示した。
7. 同一時刻の制限給餌と制限給水により、嗅球、線条体、頭頂皮質、黒質の *Per2-dLuc* 概日リズムは異なる位相変化を示した。

本研究は、メタンフェタミン投与ラットの行動リズムの背後にある脳内概日リズム振動機構を明らかにし、その局在と振動機序についてのモデルを示した。すなわち、振動体 MAO は複数のドパミン神経組織の概日リズム振動体から構成される複合振動体である可能性が高い。MAO を形成する各脳組織の振動体は視交叉上核概日振動体の影響を同時に受けながら、ネットワークを形成し一つの振動体として機能する。また本研究は、MAO が制限給餌により形成される脳内振動体 FEO とは異なる機構である可能性を示し、往年の議論に一石を投じた。また MAO は、制限給水により出現する脳内振動体 WEO と異なる機構である可能性を示した。

本研究結果の最も強調される意義は、ヒトの睡眠覚醒リズムの特徴を示す動物モデルを用いて、その脳内振動機構の解明に道筋をつけたことである。これ

まで、ヒト睡眠覚醒のモデルはいくつか提唱されているが、その多くはヒトの睡眠覚醒リズムの現象論に基づいており、モデル検証は極めて難しいか、不可能に近い。また、ラットやマウスの実験結果からモデルが作成されているが、その行動リズム（睡眠覚醒リズム）は様々な点でヒトのそれと大きく異なる。今回研究に用いたメタンフェタミン投与ラットの行動リズムは、内的脱同調、概 48 時間リズム（サーカビディアンリズム）、集約化した睡眠と覚醒、非光同調など、ヒト睡眠覚醒リズムの主要な特徴を全て模倣し、現時点でモデル動物としては最も優れたものである。メタンフェタミンの強力な覚醒作用により、それまで分断されていたラット行動期がヒト型の持続する覚醒相を示すようになり、同時に休息期も一続きのヒト型睡眠相を示すようになった。このことからメタンフェタミン投与ラットは、進化の過程で大脳新皮質が発達し、持続的な覚醒の維持が可能になったヒト睡眠覚醒リズムのモデルとしての進化論上の合理性も併せもつ。

さらに本研究は、時差飛行や勤務に伴う脱同調症候群や非 24 時間睡眠覚醒症候群などの睡眠覚醒リズム障害の病態生理を理解することが可能であり、これら睡眠覚醒障害に随伴する自律神経症状や代謝内分泌異常、双極性障害などの気分障害の発現機序にも迫ることのできる意義をもつ。また脳科学において、脳機能の理解に概日リズム振動ネットワークの概念を導入し、新しい研究方法論を提示したことも、大きな意義と考える。

今後の課題としては、各脳部位の振動体がネットワークを形成し一つの振動体 MAO として機能するとしたモデルを検証するため、黒質—線条体など複数の脳領域を含む組織切片の培養系により MAO を解析することが必要である。さらには *in vivo* で各脳部位の時計遺伝子発現リズムを計測し、メタンフェタミンによる変化を解析することも追求しなければならない。

複数脳領域の振動体がネットワークを形成し一つの振動体 MAO として機能するようになる背景には、メタンフェタミンによるドパミン神経系の何らかの機能変化が関与していることが考えられる。しかし現時点で、メタンフェタミンによる複数の振動を共役させるような神経性、液性機構は同定されておらず、今後の課題と考えられる。

7. 謝辞

本研究を行うにあたり、研究の機会を与えて頂き、学位論文作成の御指導を頂きました吉岡充弘教授に篤く御礼申し上げます。また、直接御指導下さいました本間研一教授と本間さと教授に心より御礼申し上げます。また実験を行う際、数多くの助言と協力を頂きました北海道大学大学院医学研究科 時間医学講座、旧時間生理学分野、旧光イメージング部門のスタッフと関係者の方々に心より感謝申し上げます。

本実験に使用した *Per2-dLuc* トランスジェニックラットはアステラス製薬の橋本博士、近畿大学の重吉先生より提供頂きました。また本研究は、文部科学省脳科学研究戦略推進プログラム（課題 F：「精神・神経疾患の克服を目指す脳科学研究」、本間研一教授・本間さと教授）、文部科学省の科研費（No. 20249010、本間研一教授）による助成を受けました。

最後に、いかなるときも私を支え続けてくれた夫、遠方より常に見守って下さった両親に、心より感謝致します。

8. 引用文献

1. Reppert, S.M. & Weaver, D.R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, **418**, 935-941 (2002).
2. Gekakis, N. *et al.* Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, **280**, 1564-1569 (1998).
3. Darlington, T.K. *et al.* CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science*, **280**, 1599-1603 (1998).
4. Aschoff, J. Circadian rhythms in man. *Science*, **148**, 1427-1432 (1965).
5. Honma, K., Hashimoto, S., Endo, T. & Honma, S. Light and plasma melatonin rhythm in humans. *Biol. Signals*, **6**, 307-312 (1997).
6. Wever, R.A. *The Circadian System of Man*. Springer-Verlag, New York (1979).
7. Honma, K., Hashimoto, S., Endo, T. & Honma, S. Internal desynchronization of the human circadian system. In, *Circadian Clocks and Entrainment* (Honma, K. & Honma, S., eds.), Hokkaido University Press, Sapporo, pp. 101-113 (1998).
8. Nakamura, K., Hashimoto, S., Honma, S. & Honma, K. Daily melatonin intake resets circadian rhythms of a sighted man with non-24-hour sleep-wake syndrome who lacks the nocturnal melatonin rise. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, **51**, 121-127 (1997).
9. Hashimoto, S., Nakamura, K., Honma, S. & Honma, K. Free-running circadian rhythm of melatonin in a sighted man despite a 24-hour sleep pattern: a non-24-hour circadian syndrome. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, **51**, 109-114 (1997).
10. Eastman, C.I. The circadian rhythm of temperature in humans during a 26-hr sleep-wake schedule. *Physiol. Behav.*, **40**, 17-23 (1987).
11. Hashimoto, S., Nakamura, K., Honma, S. & Honma, K. Non-photoc entrainment of human rest-activity cycle independent of circadian pacemaker. *Sleep Biol. Rhythms*, **2**, 29-36 (2004).
12. Honma, K., Honma, S. & Hiroshige, T. Disorganization of the rat activity rhythm by chronic treatment with methamphetamine. *Physiol. Behav.*, **38**, 687-695 (1986).
13. Masubuchi, S. *et al.* Clock genes outside the suprachiasmatic nucleus involved in manifestation of locomotor activity rhythm in rats. *Eur. J.*

- Neurosci.*, **12**, 4206-4214 (2000).
14. Aschoff, J. *et al.* Human circadian rhythms in continuous darkness: entrainment by social cues. *Science*, **171**, 213-215 (1971).
 15. Honma, S., Honma, K. & Hiroshige, T. Methamphetamine induced locomotor rhythm entrains to restricted daily feeding in SCN lesioned rats. *Physiol. Behav.*, **45**, 1057-1065 (1989).
 16. Honma, S., Honma, K. & Hiroshige, T. Entrainment of Methamphetamine-induced activity rhythm to feeding cycles in SCN lesioned rats. *Physiol. Behav.*, **52**, 843-850 (1992).
 17. Aschoff, J., Gerecke, U. & Wever, J. Desynchronization of human circadian rhythms. *Jpn. J. Physiol.*, **17**, 450-457 (1967).
 18. Honma, K. & Honma, S. The SCN-dependent clocks, methamphetamine and food restriction. *Eur. J. Neurosci.*, **30**, 1707-1717 (2009).
 19. Howell, L.L. & Kimmel, H.L. Monoamine transporters and psychostimulant addiction. *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 196-217 (2008).
 20. Honma, K., Honma, S. & Hiroshige, T. Activity rhythms in the circadian domain appear in suprachiasmatic nuclei lesioned rats given methamphetamine. *Physiol. Behav.*, **40**, 767-774 (1987).
 21. Honma, S. & Honma, K. Phase-dependent phase shift of methamphetamine-induced circadian rhythm by haloperidol in SCN-lesioned rats. *Brain Res.*, **674**, 283-290 (1995).
 22. Wisor, J.P. *et al.*, Dopaminergic role in stimulant-induced wakefulness. *J. Neurosci.*, **21**, 1787-1794 (2001).
 23. Isaac, S.O. & Berridge, C.W. Wake-promoting actions of dopamine D1 and D2 receptor stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307**, 386-394 (2003).
 24. Qu, W.M. *et al.*, Essential role of dopamine D2 receptor in the maintenance of wakefulness, but not in homeostatic regulation of sleep, in mice. *J. Neurosci.*, **30**, 4382-4389 (2010).
 25. Garcia-Borreguero, D., Larrosa, O. & Bravo, M. Parkinson's disease and sleep. *Sleep Med. Rev.*, **7**, 115-129 (2003).
 26. Chouinard, S., Poulin, J., Stip, E. & Godbout, R. Sleep in untreated patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr. Bull.*, **30**, 957-967 (2004).
 27. Finan, P.H. & Smith, M.T. The comorbidity of insomnia, chronic pain, and depression: Dopamine as a putative mechanism. *Sleep Med. Rev.*, **17**,

- 173-183 (2013).
28. Bjorklund, A & Dunnett, S.B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.*, **30**, 194-202 (2007).
 29. Cave, J.W. & Baker, H. Dopamine systems in the forebrain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **651**, 15-35 (2009).
 30. Granados-Fuentes, D. Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 898-906 (2004).
 31. Krieger, D.T., Hauser, H. & Krey, L.C. Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science*, **197**, 398-399 (1977).
 32. Stephan, F.K., Swann, J.M. & Sisk, C.L. Anticipation of 24-hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav. Neural Biol.*, **25**, 346-363 (1979).
 33. Mistlberger, R.E. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **18**, 171-195 (1994).
 34. Honma, K., Noe, Y., Honma, S. & Hiroshige, T. Roles of paraventricular catecholamines in feeding-associated corticosterone rhythm in rats. *Am. J. Physiol.*, **262**, 948-955 (1992).
 35. Yoshihara, T., Honma, S., Mitome, M. & Honma, K. Independence of feeding associated circadian rhythm from light conditions and meal intervals in SCN lesioned rats. *Neurosci. Lett.*, **222**, 95-98 (1997).
 36. Shirakawa, T. & Oikawa, K. An actograph sensing thermal radiation from animals. Abst. *3rd Sapporo Symposium on Biological Rhythms*, p. 39 (1988).
 37. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates 2nd edn.*, Academic Press, San Diego (1986).
 38. 加藤博章, 中津亨. ホタルの発光色を制御する仕組み. -発光酵素ルシフェラーゼの結晶構造とメカニズム. 京都大学低温物質科学研究センター誌, **11**, 44-51 (2007).
 39. Sokolove, P.G. & Bushell, W.N. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J. Theor. Biol.*, **72**, 131-160 (1978).
 40. Abe, M. *et al.* Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci.*, **22**, 350-356 (2002).
 41. Johnson, J.T. & Levine, S. Influence of water deprivation on adrenocortical rhythms. *Neuroendocrinology*, **11**, 268-273 (1973).
 42. Dhome, R. A. & Gogate, M.G. Water as entrainer of circadian running

- activity in rat. *Physiol. Behav.*, **28**, 431-436 (1982).
43. Mistlberger, R.E. & Rechtschaffen, A. Periodic water availability is not a potent zeitgeber for entrainment of circadian locomotor rhythms in rats. *Physiol. Behav.*, **34**, 17-22 (1985).
 44. Honma, K. *et al.* Food ingestion is more important to plasma corticosterone dynamics than water intake in rats under restricted daily feeding. *Physiol. Behav.*, **37**, 791-795 (1986).
 45. Wakamatsu, H., *et al.* Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of *mPer1* and *mPer2* mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur. J. Neurosci.*, **13**, 1190-1196 (2001).
 46. Abe, H., Honma, S. & Honma, K. Daily restricted feeding resets the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus of CS mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **292**, 607-615 (2007).
 47. Rusak, B. & Bina, K.G. Neurotransmitters in the mammalian circadian system. *Annu. Rev. Neurosci.*, **13**, 387-401 (1990).
 48. Davidson, A.J., Tataroglu, O. & Menaker, M. Circadian effects of timed meals (and other rewards). *Methods Enzymol.*, **393**, 509-523 (2005).