

原 著

インターフェロン連続投与によるラット自発運動、摂食・摂水
行動の減少と脳幹縫線核セロトニン陽性ニューロンの減少¹⁾東京女子医科大学 精神医学教室 (主任: 田村敦子教授)²⁾同 第二生理学教室 (主任: 宮崎俊一教授)田中 利幸¹⁾・川上 順子²⁾・田中 朱美¹⁾田村 敦子¹⁾・宮崎 俊一²⁾

(受付 平成8年10月28日)

Effects of Repeated Administration of Interferon on Behavior and Serotonin Positive Neurons in the Raphe Nucleus in Rats**Toshiyuki TANAKA¹⁾, Yoriko KAWAKAMI²⁾, Akemi TANAKA¹⁾,
Atsuko TAMURA¹⁾ and Shunichi MIYAZAKI²⁾**¹⁾Department of Psychiatry (Director: Prof. Atsuko TAMURA)²⁾Department of Physiology II (Director: Prof. Shunichi MIYAZAKI)
Tokyo Women's Medical College

Recently, repeated administration of interferon (IFN) has been widely applied to the treatment of chronic active hepatitis C. This regimen does, however, have various potentially serious side effects. The untoward effects include psychiatric disorders, most notably depression, as suggested by several recent reports. A disorder involving serotonin metabolism or its receptors in the nervous system (CNS) has been suggested to be related to depression and depressive symptoms. Research into this subject has, however, been minimal in animal models.

We quantified the spontaneous behavioral activities of rats during an IFN administration protocol and examined the immunoreactivity of serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus.

Twelve male rats, 6~7 weeks old and weighing 203 ± 5 g, were intravenously injected with 1,000 units of IFN once a day for 12 days. Movements of each rat were monitored by Animex.

Cumulative spontaneous movements for an entire day began to decrease on the 1st day of IFN administration, and by the 3rd day, had declined to approximately 85% of those observed prior to administration ($p < 0.05$), whereas movements increased (to 110%) in rats injected with physiological saline (controls). Diurnal and nocturnal movements were approximately 90% and 70%, respectively, of the initial values on the 4th day of IFN administration. The decrease was maintained throughout the administration period.

The amount of food ingested per day had decreased to approximately 70% of the pretreatment volume by the 4th day ($p < 0.05$), and water ingestion declined steadily reaching approximately half the volume ingested by the saline control rats. The rate of increase in body weight was significantly reduced during IFN administration, as compared with control rats ($p < 0.05$).

After treatment with IFN or saline for 12 days, rats were sacrificed and the number of 5-HT positive neurons in the dorsal raphe nucleus was counted on microscope photographs.

The number of serotonin-positive neurons in IFN treated rats was decreased to approximate-

ly 1/3 that in the corresponding area of control rats ($p < 0.05$).

Thus, IFN effects manifested in rats as decreases in spontaneous movement and appetite, which were accompanied by a reduction in serotonin-positive neurons in the CNS. The present findings suggest that a reduction in serotonin-positive neurons in the CNS seem to relate with depressive disorder caused by IFN therapy.

緒 言

インターフェロン(IFN)は1950年代にウイルス増殖抑制物質として発見されたが¹⁾, 抗ウイルス効果のみならず, 細胞増殖抑制効果, 免疫機能調節効果など多くの生物学的活性を持つことが明らかになり, 悪性腫瘍やウイルス性疾患に対する有効な生物学的物質として, すでに多くの臨床的応用が実施されている. 特に1992年以後, C型慢性活動性肝炎の治療薬として, IFN投与症例数は急速に増加しており, 同時に, さまざまな副作用の報告がなされている²⁾.

IFN療法による副作用は, 投与開始後1週間以内にみられる初期症状(インフルエンザ様症状: 発熱, 頭痛・頭重感, 筋肉痛, 関節痛, 全身倦怠感, 食欲不振), 1~8週間にみられる中期症状(全身症状: 微熱, 倦怠感, 体重減少; 消化器症状: 食欲不振, 悪心, 下痢, 胃部不快感; 精神症状: うつ傾向, 不眠, 不安; 皮膚症状: 発疹, 紅斑), 8週間以後にみられる後期症状(脱毛, 乾性咳, 呼吸困難, 視力低下, 飛蚊症)に分けられる³⁾⁴⁾. これらの副作用の中でも精神神経症状は見逃されやすく, 抑うつ状態が自殺の原因となるなど危険な副作用である²⁾. 精神症状発現はIFNの種類による差がなく, 総投与量については用量依存性の傾向はあるものの, 少量でも発現例もみられることから, 個人差が大きいことが指摘されており, 個体側の生物学的素因が副作用発現の危険因子となりうるとの報告がある⁵⁾⁶⁾.

副作用としての精神神経症状は, わが国の報告例では抑うつ症状の出現頻度が最も高く, 精神症状の半数を占める⁷⁾. 逆に精神運動性興奮を示して躁状態の症状に陥る場合, 抑うつ状態を基盤として, 被害的となり, あるいは関係念慮をもって医師を含む周囲に対して疑念を抱いたり, 時には幻覚, 妄想のような症状をきたす場合もあり, 非常に多彩である⁸⁾.

感情障害の成因に脳内アミン系の異常が論議されており, その一つとしてセロトニン(5-hydroxytryptamine; 5-HT)代謝, 5-HTの取り込み能, 5-HT受容体機能などの脳内5-HT系の異常が想定されている⁹⁾. IFN投与によるうつ状態発症に, 5-HT系の異常が介在するかを調べた研究として, マウスへのIFN α の慢性投与によって脳内(全脳) indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)活性が上昇した報告がある¹⁰⁾. IDOはトリプトファンをキヌレニンに変換する酵素であるので, IFNによるIDO活性上昇によるトリプトファン減少が脳内で生じれば, 5-HTの量も変化している可能性がある. この結果は, IFN投与によって生じる5-HTの減少がIFN療法で生じるうつ症状の原因となる可能性を示唆している. 我々は, IFNによる精神症状のうち, 発生頻度の高いうつ症状に注目し, 動物実験によりIFN投与による行動異常が発現するかどうか, また同時にIFN投与時の脳内の5-HT動態について検索し, 両者の関連について検討した本実験では自発運動量, 摂食量, 飲水量を計測し, また脳幹背側縫線核の5-HT陽性ニューロンの数を免疫組織化学的に調べた. これらの指標はメタンフェタミン投与時に明らかに変化することが報告されているので¹¹⁾, 予備実験としてメタンフェタミン投与実験を行い, 本実験の手技の有効性を確認した.

対象および方法

1. 対象

本実験は, 5週齢のWistar系雄ラット(体重110~120g)を用い, 東京女子医科大学の動物実験に関する指針に準拠して実施した(東京女子医科大学動物実験倫理委員会許可番号95-149).

2. 方法

1) 飼育実験環境

ラットを実験開始前12日間飼育し, 馴化期間とした. 飼育環境は, 恒温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 恒湿 $40 \pm 10\%$ の

遮音された暗室で人工照明により、午前11時から午後11時の12時間の明期と、午後11時から午前11時の12時間を暗期とする周期を用い、ファンによる強制換気を常時行った。飼育室内に35×30×18 cmのポリプロピレン製のラットケージをおき、各ケージ内に1匹ずつ入れ、食餌（マウス、ラット、ハムスター用固形飼料 CE-2, 日本クレア社）および水は自由に摂食できるようにした。

2) 行動の観察

行動の指標として、①経時的運動量、②一日食餌摂取量、③一日飲水量、④体重の変化を測定した。運動量の計測は IFN あるいは生理食塩水投与の3日前より行い、食餌摂取量、飲水量、体重は、静注前は隔日に計測し、静注開始後は毎日計測した。

(1) 経時的運動量

経時的運動量は、小型動物運動量測定装置 (ANIMEX AUTO MK-110, 室町機械社) を用いて10分毎のカウント数で表示した自発運動量で数量化した。この装置は、測定面上に作られた電界の中に置かれた被測定物としての誘電体である動物が移動することによって、電界を作っている電極間の静電容量を変化させることを信号として検出する。自発運動量は動物がケージ内を移動することはもちろん、摂食行動や身づくろい行動などを含めた運動を感知対象としている。得られたデータは、コンピューター(PC-9801RS, NEC 社)に取り込み、運動量測定解析システム (CompACT, AMS 社) を用いて解析した。

(2) 食餌摂取量

一定重量の餌を食餌箱に入れ、減少した重量から1日の食餌摂取量を算出した。1日間の摂食量は計測日の前日の午後2時から当日の午後2時までの24時間の値である。

(3) 飲水量

一定量の水を吸水ビンに入れ、減少した容量から1日の飲水量を算出した。1日間の飲水量は計測日の前日の午後2時から当日の午後2時までの24時間の値である。

(4) 体重の変化

ラット固定器ごと計測し、計測値から固定器の

重量を差し引いて算出した。計測は午後2時に IFN 注射の直前に行った。1日間とは計測日の前日の午後2時から当日の午後2時までの24時間である。

3) 行動分析方法の検討のための対照実験

薬剤投与と本実験に先立ち、摂食量、飲水量、体重および運動量の測定を4匹のラットを用いて対照実験を行った。本実験と同じ環境のケージ内で37日間飼育し、運動量、飲水量、食餌摂取量および体重を記録した。

4) 薬物の投与方法および投与量

(1) 実験 I : メタンフェタミン投与方法および投与量

4匹の Wistar 系雄ラットを用いて、メタンフェタミン投与前3日間をコントロール値とし、経時的運動量、1日食餌摂取量、1日飲水量、体重を記録した後、午後2時に16mg/kgのメタンフェタミン0.25mlを5日間腹腔内投与して同様の項目について計測を行った。メタンフェタミン最終投与の90分後に脳組織の免疫組織学的検索のために灌流固定を行った。対照群として2匹に生理的食塩水0.25mlを腹腔内投与した。

(2) 実験 II : IFN 投与方法および投与量

メタンフェタミンと同様に、IFN 投与前3日間をコントロール値として、経時的運動量、1日食餌摂取量、1日飲水量、体重を記録した後、インターフェロン投与群(12匹)にはラット IFN 1,000 単位/0.1ml 生理食塩水/匹 (INTERFERONRAT Product No. I-5383, Sigma 社) を、対照群12匹には生理食塩水0.1mlを12日間、1日1回(午後2時)尾静脈より投与した。

運動量の有意差検定には、IFN 投与前後の値の比較と、IFN 投与群と生理食塩水投与群間の比較を行い、t 検定で危険率5%未満を有意水準とした。

5) 脳組織切片の免疫組織化学的観察

(1) 5-HT の免疫組織化学染色法

インターフェロンの最終投与3時間後にケタミン2.0mlを腹腔内投与し、開胸して左心室より生理食塩水で灌流し、続いて250mlの固定液(4%パラホルムアルデヒド+0.35%グルタルアルデヒド

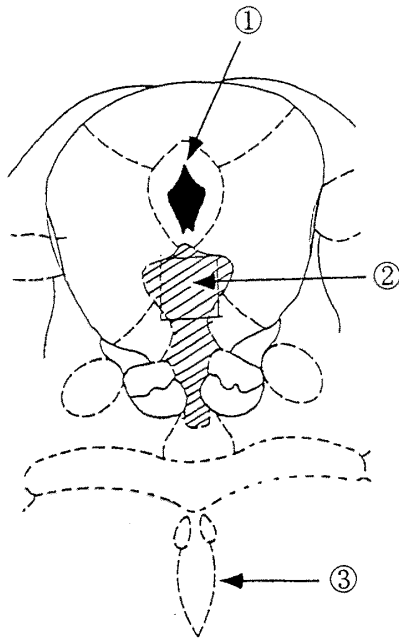


図1 ラット中脳縫線核と5-HT陽性ニューロン観察部位
①中脳水道、②背側縫線核(斜線部分)、③中心縫線核5-HT陽性ニューロン観察部位を四角枠(50×50 μ m)で示してある(Bregmaより-7.30mm)。文献41より引用。

ド)にて灌流固定した脳を摘出し同じ組織の固定液にて後固定(48時間)を行った。5-HT産生細胞のほとんどは中脳から延髄にかけて存在する縫線核群およびその近傍に存在するため、中脳から延髄にかけて縫線核を含む領域を前頭断に厚さ50 μ mの連続切片を作製し(図1)、抗5-HT抗体を用いてPAP法による免疫組織化学染色を以下の手順で行った。

① 標本を3% H_2O_2 で20分間処理し、内因性 peroxidase 活性を阻止した。

② 染色結果の特異性を高めるために蛋白ブロッキング試薬で室温で20分間処理した。

③ 0.2% tris buffered saline (TBS)で5分間洗浄した。

④ 一次抗体として、ラットで作製されたラット抗5-HT抗体(pH 7.62の0.2% TBSで1,000倍希釈)(Eugene Tech International Inc)を加え、4 $^{\circ}$ Cにて48時間反応させた。

⑤ 0.2% TBSで5分間洗浄。

⑥ 非標識二次抗体として、ヤギで作製された抗ラットIgG抗体(pH 7.62の0.2% TBSで500倍

希釈)(Kirkegaard & Perry Laboratories Inc)を用い、標本を4 $^{\circ}$ Cで48時間反応させた。

⑦ 0.2% TBSで5分間洗浄。

⑧ ペロキシダーゼと、ラットで作製された抗ペロキシダーゼ抗体の複合体(PAP, Lot No. 450457, Polysciences Inc)を0.2% TBSにて150倍に希釈し、標本を室温で6時間インキュベートした。

⑨ 0.2% TBSで5分間洗浄。

⑩ 発色させるために、標本をDAB \cdot H $_2$ O $_2$ 発色液[3,3'ジアミノベンチジン4塩酸(和光純薬)20mg+0.05M トリス緩衝液(pH 7.6)100ml+30% H $_2$ O $_2$]で室温で20分間反応させた。

⑪ 0.2% TBSで10分間洗浄。

⑫ 一昼夜乾燥。

⑬ マリノールで封入。

(2) 判定

PAP法により染色された連続切片標本を明視野下400倍で検鏡しながら写真に撮り、中脳水道直下の背側縫線核(50×50 μ m、図1の四角の枠の領域)に存在する5-HT陽性ニューロンの数を、(一次抗体の抗5-HT抗体無添加の標本と対照して)カウントした。各個体あたり同じ部位(Bregmaから-7.30~-7.64mmの範囲)から連続した4枚の標本について検索した5-HT陽性ニューロン数をIFN群と生理食塩水(対照)群に分け、両者間の差の統計学的検討はt検定を用い、危険率5%未満を有意水準とした。

結 果

1. 対照実験

1) 行動分析方法の検討のための対照実験

薬剤投与本実験に先立って行われたコントロール実験において、運動量を定量化するにあたり、個々のラットの10分間の運動量のカウント数を経時的に24時間でプロットしてみると、暗期に運動量が多く(カウント数22,016 \pm 4,100, 平均 \pm 標準誤差)、明期に少ない(4,035 \pm 149)というパターンが得られた(p<0.001)。しかしながら、個体間での運動量のばらつきが大きく、運動量のカウント数の数字で個体間の結果を比較検討することに困難があったため、本実験においては、個々のラッ

トの IFN 投与前 3 日間の運動量の平均値を 1 とし、その後の運動量の変化を相対値として計算し、IFN 投与群 12 匹、対照群 12 匹の平均値をとって結果を提示した。

図 2 に摂食量、飲水量、体重について、午後 2 時から翌日の午後 2 時までの 24 時間を 1 日分とし

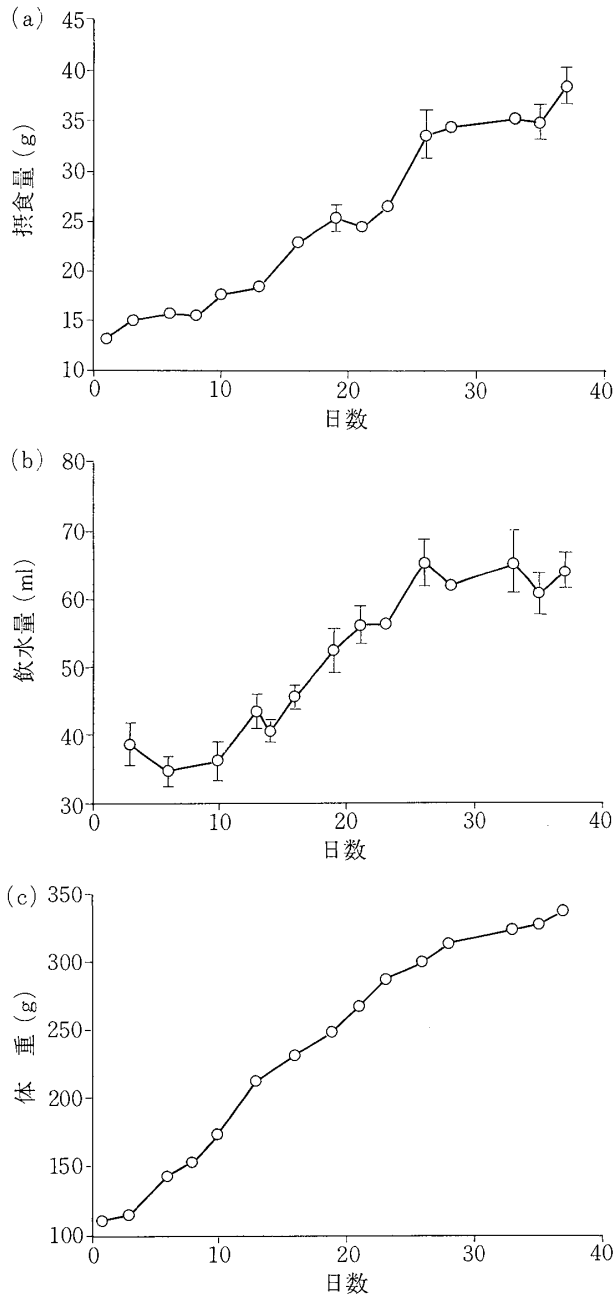


図 2 薬物投与前のコントロール実験

4 匹のラットを本実験と同じ飼育環境下に置き、摂食量、飲水量、および体重の変化を観察した結果を示してある (○: 平均 ± 標準誤差)。 (a) 摂食量 (餌 g), (b) 飲水量 (飲水量 ml), (c) 体重の変化 (体重 g)。

て、実験経過中の変化をプロットした。摂食量は経日的に増加傾向を示した (図 2a)。体重は 28 日ま

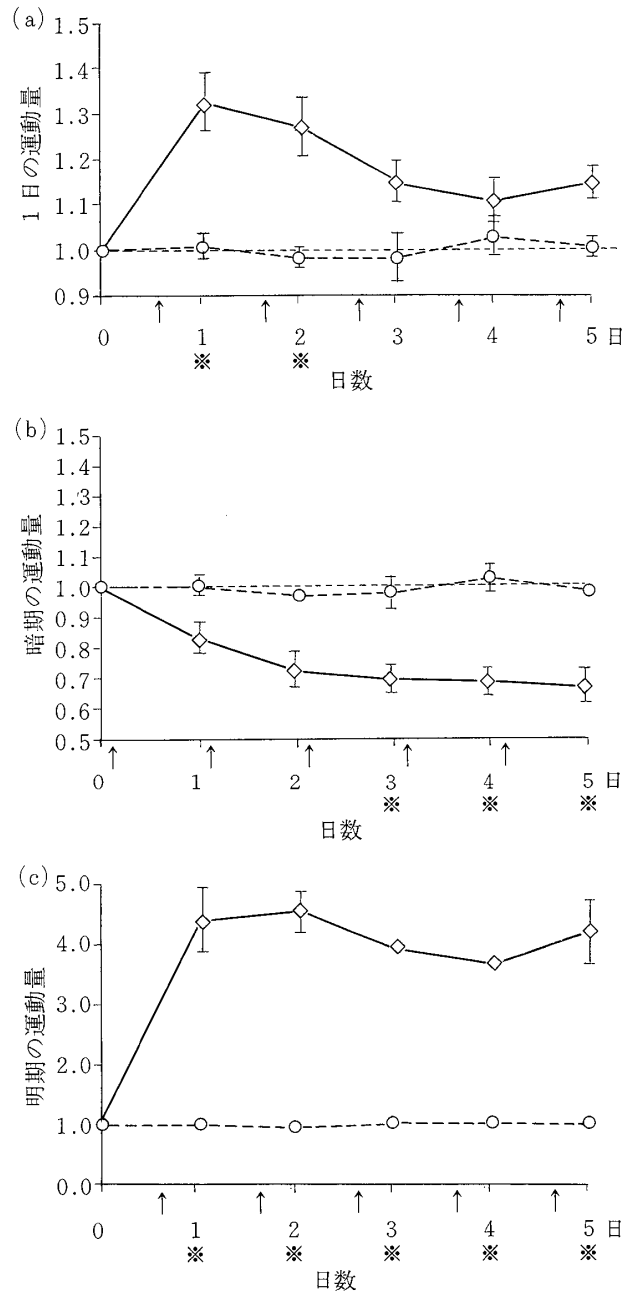


図 3 メタンフェタミン投与による自発運動量への影響

メタンフェタミンを 1 日 1 回 (午後 2 時) 5 日間腹腔内投与し、その間の運動量の変化を示している (平均 ± 標準誤差)。投与前 3 日間の平均値を 1.0 として 0 日のところにプロットしている。矢印は薬物注射を表わす。

(a) 1 日の運動量, (b) 暗期の運動量, (c) 明期の運動量。 ※印はメタンフェタミン投与群 (◇) の値が、生理食塩水投与群 (○) の同日の値に対して危険率 $p < 0.05$ ($n = 4$) で有意の差があることを示す。

で直線的に増加を示している(図2c). 飲水量は同一個体で日により変動が大きかったが, 12日目から28日目まではほぼ直線的に増加を示した(図2b). 従って摂食量, 飲水量, 体重の経日的変化も行動の指標として使用できる. 本実験におけるIFN投与期間は, 対照実験における13日から25日に相当し, 図2cからグラフ上で直線的に体重の増加が観察される時期にあたっている.

2) メタンフェタミン投与実験

1日の運動量(測定時間の詳細は次のIFN投与実験の項参照)は初回投与後に最も大きく増加し(投与前値の130%), 以後徐々に低下して, コント

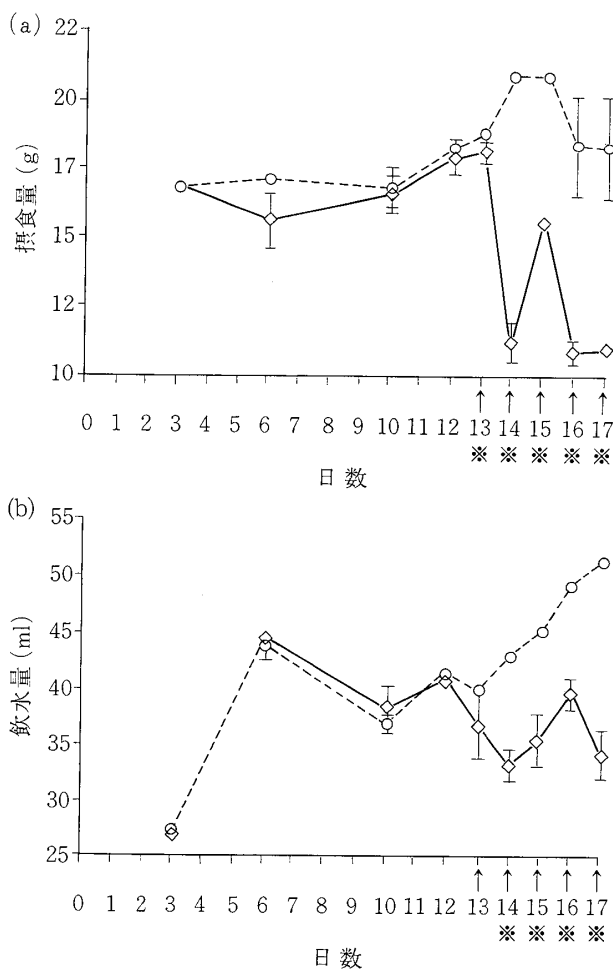


図4 メタンフェタミン投与が摂食量, 飲水量に与える影響

実験開始前12日間の馴化期間と, メタンフェタミン投与開始(13日目)以後5日間(矢印)の計測結果の平均を示してある. ※印はメタンフェタミン投与群(◇)と生理食塩水投与群(○)間の有意差($p < 0.05$)を示す.

ロール値の約115%まで戻ってきている(図3a). これを明期と暗期それぞれについて検索すると, 暗期の運動量は1日目から投与前の80%に減少し(図3b), 投与3日目より生理食塩水の対照群と比較して有意な減少が観察された. 一方, 明期では初回投与からコントロール値の4.5倍に増加し, この増加が実験終了日まで持続した(図3c). メタンフェタミン投与群では摂食量は投与後1日目から, 飲水量は投与後2日目から有意に減少した(図4a, b).

2. IFN投与実験

1) 1日の運動量の変化

個々のラットのIFN投与前3日間の運動量の平均値を1とし, その値を基準値としてIFN投与後の運動量の変化を表示した(図5). 1日の運動量は午後11時(暗期の開始)から翌日の午後11時(明期の終了)までの24時間を1日としてカウントしたグラフ上IFN投与1日目には, IFN投与前日の午後11時からIFN投与前日の午後11時までの24時間の運動量を示してある(図5a). 従って午後2時の注入時間を表す矢印は, 0と1日目の中間よりやや右に付してある.

IFN投与群は(図5a), IFN投与前と比較して1日目から減少傾向にあり, 3日目から有意な減少が観察されるようになった($p < 0.05$). この有意な減少は実験終了日まで持続していた. 一方, 対照群は投与前と比較して低値をとることはなかった(図5a). IFN投与群と生理食塩水投与群との比較では, 1日目から全実験経過を通して有意差が観察された.

2) 暗期の運動量の変化

暗期の運動量を1日運動量と同様に測定した. グラフ上暗期の1日目には, IFN投与前日の午後11時から翌日の午前11時までの12時間の運動量を示してある(図5b).

IFN投与群は, 投与1日目に投与前の約5%の運動量が減少し, 2日目以降では投与前の10%と減少量は少ないが, 有意の差が観察された(図5b). 一方, 対照群はIFN投与前とは反対に, 投与1日目から投与前より約10%の運動量の増加を示していた(図5b). IFN投与群と対照群を比較す

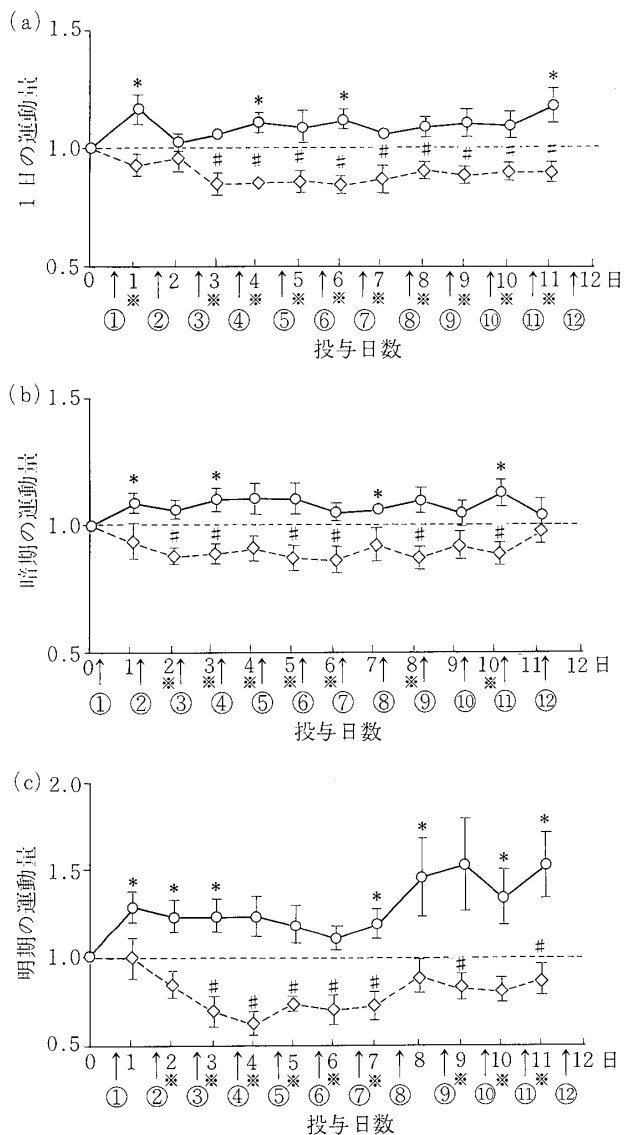


図5 IFNによる自発運動量への影響

(a) 1日の運動量, (b) 暗期の運動量, (c) 明期の運動量. IFN 1,000単位を1日1回(午後2時)尾静脈より投与し(◇, n=12), 運動量の変化の平均を示している. 対照として0.1ml生理食塩水を同様静注した(○, n=12). #と*印はそれぞれIFN, 生理食塩水投与群の値が投与前(1.0)に対して危険率 $p < 0.05$ (n=12) で有意差があることを示す. *印はIFNと生理食塩水群間の有意差 ($p < 0.05$) を示す.

ると, IFN投与群の運動量は減少し, それに比して対照投与群では実験期間を通じて増加傾向にあり, 両者間には明らかな差がみられた ($p < 0.05$).

3) 明期の運動量の変化

グラフ上明期の運動量の1日目にはIFN投与日の午前11時から同日の午後11時までの12時間の運動量をカウントした. IFN投与群は図5cに示

すように, 投与1日目には投与前と比べてほとんど運動量は変化がなかったが, 3日目から著明に減少し始め, 4日目には最も減少が激しく, 投与前の約40%の減少がみられた. 4日目を境に少しずつ運動量が増加した. 5日目から7日目の3日間が投与前の約30%減少の運動量で, 8日目以降は投与前の約20%減少の運動量となった. 一方, 生理食塩水投与群での運動量の増加は明らかであり, 投与前の最大150%に達したこの運動量の増加傾向は尾静脈よりの静注操作が影響したものと考えられる.

対照群との明期運動量の差は1日目を除く全経過で有意であった ($p < 0.05$).

4) 1日の運動量の変化

IFN投与1日前の運動量(図6)とIFN投与後1日目の運動量を比較するとIFN投与後1日目は注射時に一時的に運動量が増加するが全体的には大きな違いはみられない. IFN投与後11日目の運動量はIFN投与後1日目と同様, 注射時に一時的に運動量の増加がみられているが, 他と比較してみると, 全時間において運動量が減少している. IFN投与の経過日数がたつほどある特定の時間帯に運動量の減少がみられるのではなく全時間にわたって運動量の減少がみられている.

5) 摂食量の変化

IFN投与後, 摂食量は著しく減少した(図7a). 一方, 対照群では, 本実験前に施行した対照実験と同様な傾向を示した(図7a). IFN投与群と対照群との比較では, すでに投与2日目には有意差が出現し, 3日目以降はIFN投与群は対照群の約半分であった(図7a). この差は実験終了時まで続いた.

6) 飲水量の変化

IFN投与後飲水量は1日目から有意に減少した(図7b). この減少は経日的に増強し, 8日目以降は投与前の約50%まで減少した対照群の飲水量は, 日により変動があるものの, 投与開始前の値と比較して有意な変化はみられなかった. 両群間には有意の差があった(図7b).

7) 体重増加の変化

実験開始時の体重はIFN投与群で $203 \pm 5g$, 生

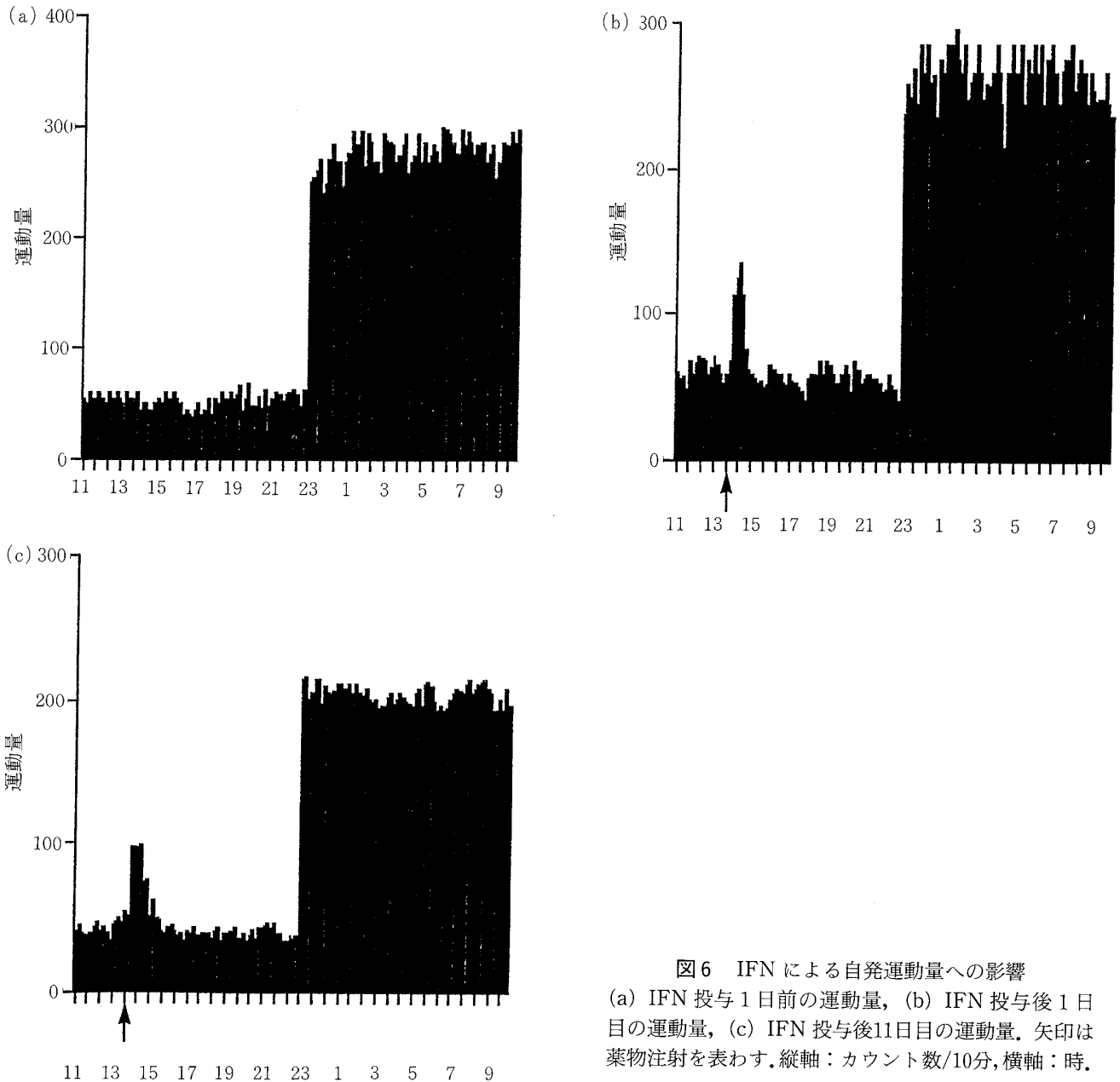


図6 IFNによる自発運動量への影響
 (a) IFN投与1日前の運動量, (b) IFN投与後1日目の運動量, (c) IFN投与後11日目の運動量. 矢印は薬物注射を表す. 縦軸: カウント数/10分, 横軸: 時.

理食塩水投与群で $207 \pm 5g$ で両者間に有意差はなかった. 対照群の体重はグラフ上で直接的に増加していき, 実験終了時では開始時の約2.5倍となった(図7c). 一方, IFN投与群では投与開始1日目よりグラフの勾配が緩やかとなり, 実験終了時の体重は開始時の約2.2倍となった. 両者間には5日目以降有意差がみられた ($p < 0.05$).

3. 5-HT陽性ニューロン

背側縫線核(Raphe核)の5-HT陽性ニューロンは, 対照(5-HT抗体なしの染色; 図8, 3a, 3b)との対比から明確に同定された. 生理食塩水投与

群では, 5-HT陽性ニューロンが主として背側縫線核で観察され(図8, 1a, 1b), 数は少ないが正中縫線核にも確認された. 背側縫線核にみられる5-HT陽性ニューロンの形態は, 主として小型から中型の円形, 紡錐型, 多角型であった(図8, 1b). 一方, IFN投与群では背側縫線核の中脳水道腹側部分に観察されるが, その数は対照群に比して少なく, 特に背側縫線核から腹側に張り出している部分には観察されなかった. さらに, 5-HT陽性ニューロンの染色濃度が全体に薄い傾向がみられた(図8, 2a, 2b). 背側縫線核の一部(50×50

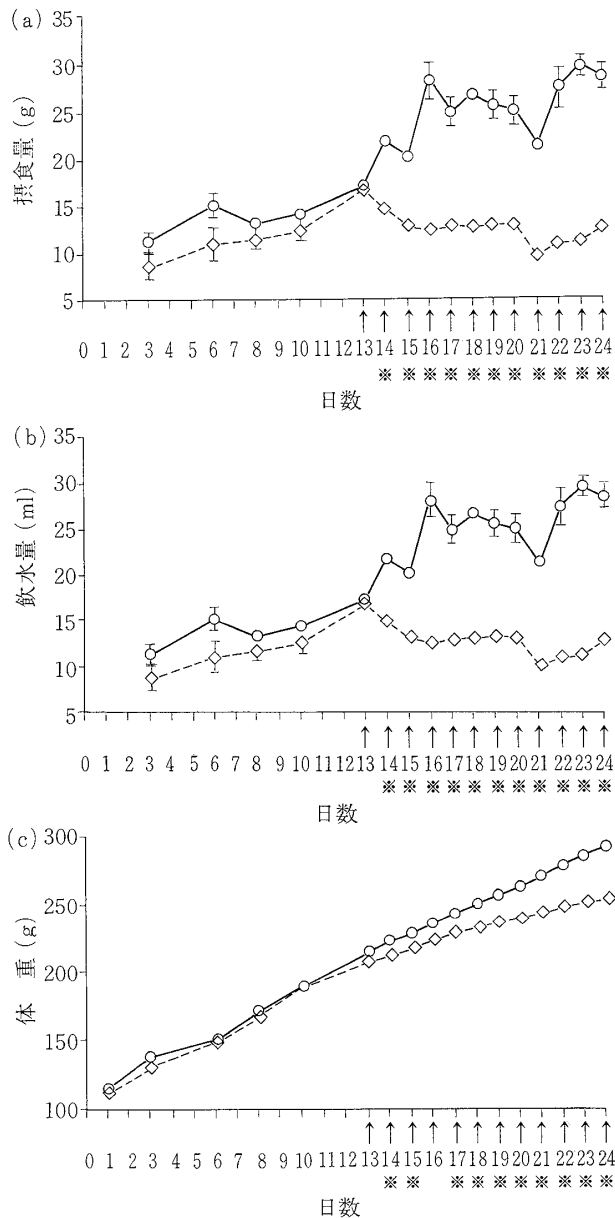


図7 IFN投与が摂食量、飲水量、および体重変化に与える影響
 (a) 摂食量(餌g), (b) 飲水量(飲水量ml), (c) 体重の変化(体重g)
 実験開始前12日間の馴化期間とIFN投与(◇)開始(13日目)以後12日間の計測結果の平均を示してある。*印はIFN、生理食塩水投与群(○)間の有意差($p < 0.05$)を示す。

μm の範囲、図1参照)で5-HT陽性ニューロンの数を数えると、生理食塩水投与群では 86.7 ± 3.7 (平均 \pm 標準誤差、動物数3匹、標本数12枚)であり、IFN投与群では 32.6 ± 1.4 (動物数6匹、標本数12枚)であり、有意な低下を示した(図9a) ($p < 0.05$)。

メタンフェタミン投与群においても5-HT陽性

ニューロンの減少がみられた(図8, 4a, 4b)。5-HT陽性ニューロンの染色濃度が全体に薄く、背側縫線核における数は対照群に比して有意に減少していた(図9b) ($p < 0.05$)。

考 察

行動量の測定

ラットの行動量は、測定機器により多少の差はあるが、暗期に活発で明期に少なく、その割合は約4:1であることが示されている¹²⁾。本実験に先立つ対照実験で、ラットの行動は約5:1になり、測定条件が適切であると考えられる。また体重の変化は(図2)、正常範囲にあり¹³⁾、これも実験の指標として使用できることを確認した。

この実験条件下で得られたIFN反復投与中の自発運動量の減少、摂食・摂水行動の減少は、IFN長期反復投与の副作用の一つであるうつ状態を反映する行動変化に対応するものととらえられる。

メタンフェタミン投与による行動の変化

対照実験としてメタンフェタミン投与による明期の運動量増加と暗期の運動量減少がとらえられた。メタンフェタミンは脳内神経終末でのカテコールアミンの放出促進と再取り込みの抑制を介して、強力な精神運動刺激作用を誘発することが知られ¹¹⁾、比較的大量投与によってラットでは嗅ぎ、首振り、舐め、咬み、後ずさり、旋回など、多彩な情動行動が誘発される¹¹⁾。今回メタンフェタミンの大量(16mg/kg)をラットに5日間にわたって5回投与した結果、明期の運動量は1日目から著明に増加した。投与は午後2時に行われたために明期自発運動が促進したが、メタンフェタミンの血漿中の半減期は1~2時間¹⁴⁾と比較的短いため、活動期である暗期にはその効力が低下し、本来安静期である明期の過剰な活動による疲労から、暗期では逆に運動量は減少したものと解釈される。

IFN投与による行動の変化

IFN治療に伴う種々の神経精神的副作用が報告されており^{15)~18)}、動物実験でIFN投与による行動や睡眠パターンの変化がラット¹⁹⁾、マウス^{20)~22)}、サル²³⁾、ウサギ²⁴⁾などで、投与量や方法を変えて観察されている。Crnicら²⁰⁾はマウス

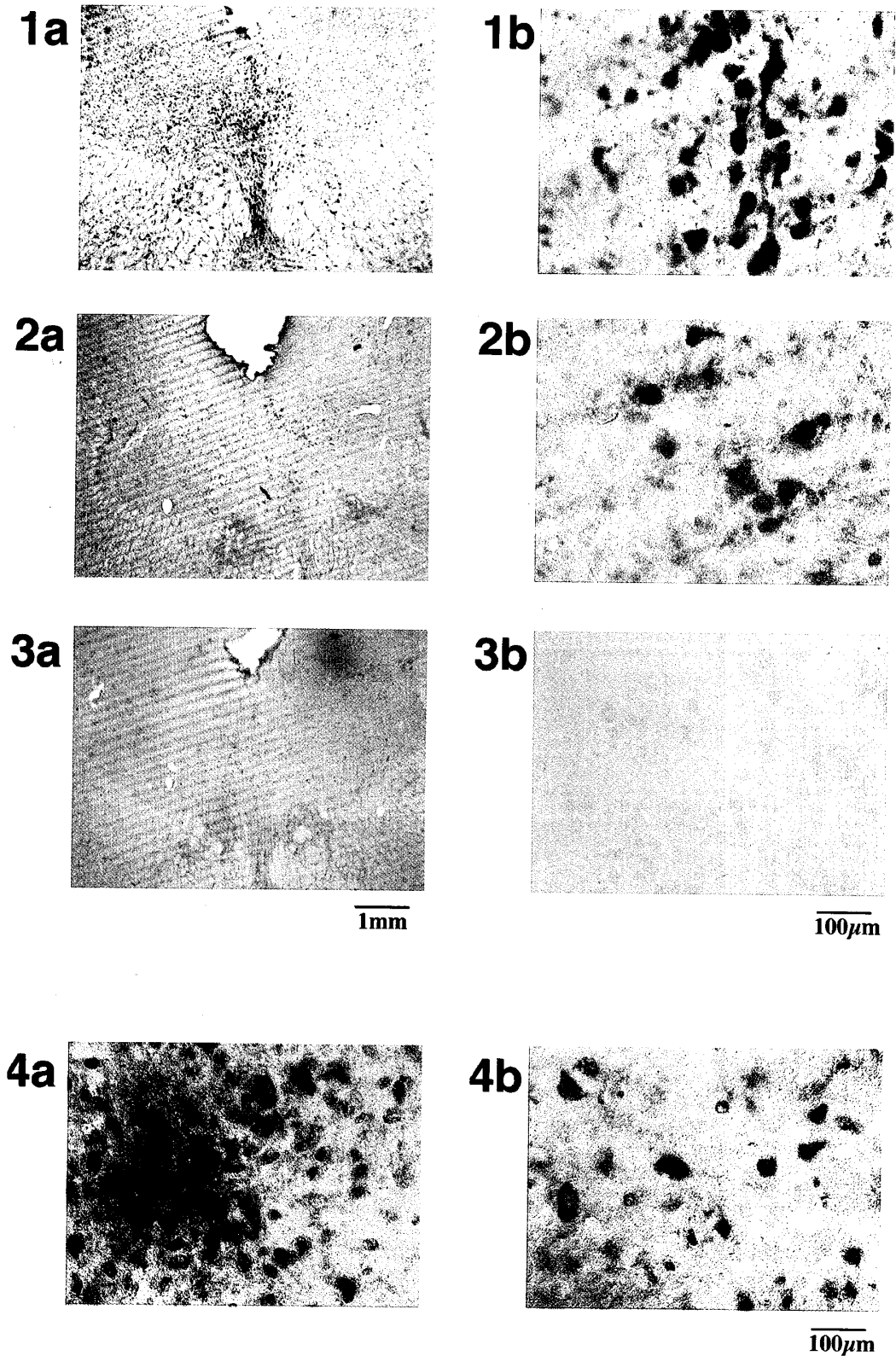


図8 薬物投与後のラット背側縫線核の5-HT免疫組織化学的染色像

1. 生理食塩水12日間連続投与後 a: 5-HT抗体 (+), b: 同一切片の強拡大.
2. IFN 12日間連続投与後 a: 5-HT抗体 (+), b: 同一切片の強拡大.
3. 生理食塩水12日間連続投与後 a: 5-HT抗体 (-), b: 同一切片の強拡大.
4. a: 生理食塩水5日間連続投与後5-HT抗体(+), b: メタンフェタミン5日間連続投与後5-HT抗体 (+).

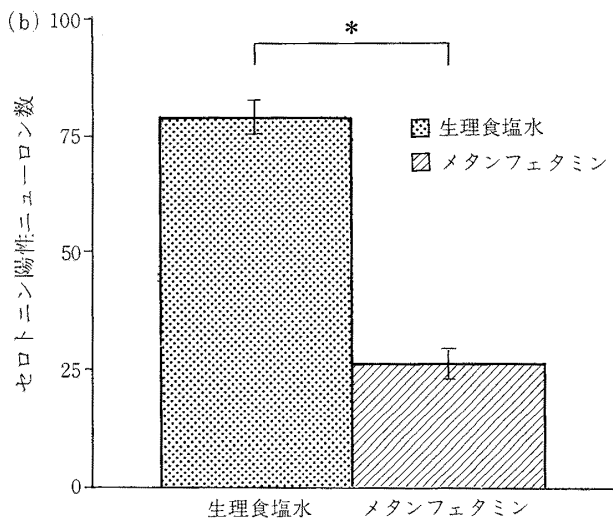
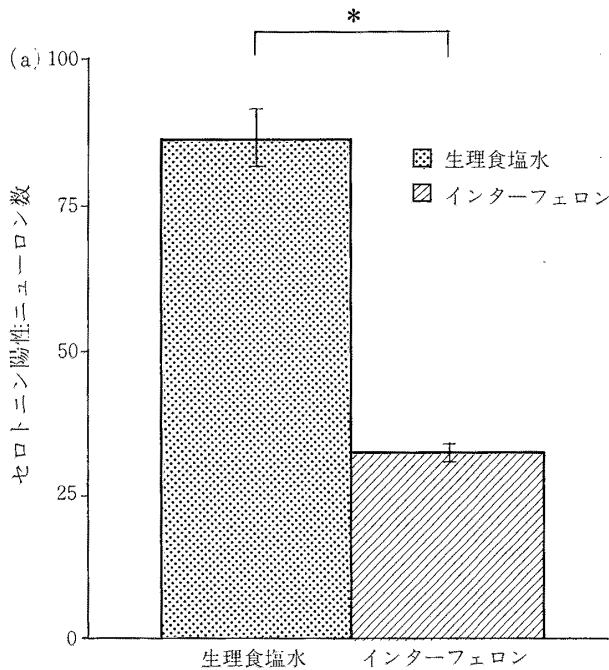


図9 背側縫線核の5-HT陽性ニューロン数

背側縫線核 ($50 \times 50 \mu\text{m}$, 図1の四角の枠の領域) に存在する5-HT陽性ニューロンの数を、 $50 \mu\text{m}$ の厚さの連続した4枚の標本についてカウントし、その平均±標準誤差を示してある。*: $p < 0.05$ の有意差。

(a) IFN, 生理食塩水12日間連続投与群間の比較, (b) メタンフェタミン, 生理食塩水5日間連続投与群間の比較。

IFN α 1,600U/gをマウスに1回だけ腹腔内投与し、投与後23時間の経過観察を行っている。運動量は注射後6時間で、摂食量と飲水量は2～6時

間で、対照に比べ減少し、6時間以降は対照と有意差がなくなると報告している。今回の実験で経静脈内反復IFN投与によって、自発運動量、摂食・摂水行動の持続的減少が定量的に示された。運動量減少の発現は早く、投与後1日で始まり、3日目にはすでに最低レベルに達する(図5a)。対照群の運動量(特に明期)の増加は尾静脈注射の影響と考えられるが、IFN注射がこの刺激効果を越えて運動抑制をもたらしていることを示している。自発運動量(1日, 暗期, 明期)におけるIFN投与群と生理食塩水投与群との比較では、1日目からほぼ全実験経過を通して有意差が観察されている。このことはIFNの運動量抑制作用には耐性がない可能性を示唆するものである。

IFNはサイトカインに属する。サイトカインは免疫系の調節因子として機能するだけでなく、中枢神経においてグリア細胞で産生され²⁵⁾²⁶⁾、ニューロンおよびグリア細胞の分化や生存維持に関わる重要な役割を果たしているとされている²⁷⁾。動物実験によりサイトカインの脳室内投与が自発運動の減少、摂食・摂水の抑制を惹起することが報告されている^{21)22)28)~30)}。このうちインターロイキン(IL)- 1β と腫瘍壊死因子(TNF)は、電気泳動法により視床下部外側野(摂食中枢)のグルコース感受性ニューロンに直接投与すると、その興奮活動を抑制することが示されており²⁹⁾、これらのサイトカインによる摂食抑制の少なくとも一部は視床下部外側野への直接作用によることが示唆されている。従って、視床下部外側野がIFNの想定作用部位の一つとして挙げられる。

IFNはまた、脳波や睡眠のパターンを変化させることが報告されている¹⁹⁾²³⁾²⁴⁾。

Brimannsら¹⁹⁾は少量のIFN α をラットの脳室内に投与すると、脳波上で覚醒-睡眠のサイクルや、睡眠パターンの変化が起こることを報告し、またShohamら³⁰⁾は、TNFおよびIL-1がウサギで徐波睡眠を増強し、REM睡眠を抑制することを報告している。サイトカインによる中枢神経症状発現の機序は不明であるが、睡眠や意識に関連がある5-HTを含む脳内モノアミンを通して作用

を発現させている可能性が示唆される³¹⁾。今回の実験でみられた運動量の減少が、ラットの睡眠期である明期でより著明であったことはIFN療法時にみられるうつ状態における睡眠障害との関連を考えると興味深い。

縫線核5-HT陽性ニューロンの減少

横谷ら¹⁰⁾はマウスに14日間IFN連続投与を行い、全脳で5-HT量が44%に減少したことを報告している。今回の我々の実験は、5-HT投射の起始核の一つである背側縫線核でIFN反復投与により5-HTの含有量が減少することを示している。5-HT陽性ニューロンの数の減少は、5-HT抗体で染色されないニューロンの存在が観察されることから(図7, 2b)、ニューロン自体の変性による消失ではないと考えられる。これらの結果から、IFNによる5-HT産生の抑制が推測される。また、IFN反復投与による5-HTの含有量の減少がメタンフェタミン投与時と同様の機序(放出の亢進)による可能性は残っている。

縫線核群を含め、脳幹モノアミン作働性ニューロンの上位中枢への広範囲な投射が、精神活動レベルや行動性との関連において注目されている。今回対象にした背側縫線核は、①その吻側部から内側前脳束外側部、外包を通り大脳皮質に至る投射、②その尾側から内側前脳束を上行し、対角帯に至ってから背側に上行し帯状回に入る投射、③外側膝状体を始めとする視床や視床下部など広範囲な間脳領域への投射、④ノルアドレナリン作働性ニューロンを含む青斑核や、ドーパミン作働性ニューロンを含む黒質への投射、などがある³²⁾。IFNがこれらの投射を介して自発運動量や摂食・摂水行動の減少をもたらすことが予想される。IFN投与後の発熱などの作用により、2次的に自発行動や摂食・摂水行動の低下がみられるのではとの推論もあるが、今後の研究による実証が待たれる。

脳内5-HTとうつ症状

モノアミンと精神活動との関連については膨大な論文があるが、概述すれば、一般にモノアミンレベルの上昇は精神活動や行動性の亢進、モノアミンレベルの低下は抑制という関係が、薬剤の作

用などを根拠として提示されている³³⁾³⁴⁾。メタンフェタミンは前者を増強する薬物であり、本実験でもその連続投与に対する初期の著明な自発行動の増加とその後の減少が示されている。同時にみられた背側縫線核5-HT陽性ニューロンの数の減少は、5-HTの過剰放出による枯渇と解釈され、後期の抑制に関連することが推論される。今回の実験で、明期の時間内のメタンフェタミン投与によって明期の運動量が増加し、暗期の運動量は減少している。背側縫線核5-HT陽性ニューロンの数の減少は活動期である暗期の運動量の減少と関連があるように考えられる。つまり安静期である明期と活動期である暗期の運動量の絶対量は約5倍の差があり暗期の運動量の減少は全体的な運動の抑制と考えることができる。つまりメタンフェタミンを長期にわたって繰り返し投与すると一時的な運動量の増加がみられた後にうつ状態と類似した状態がみられることが予測される。

中枢神経5-HT系はうつ状態、幻覚、不安、精神分裂病の陰性症状、睡眠障害などとの関連において注目されている³⁵⁾。5-HTの減少とうつ症状との関連についての知見は未だ断片的であるが、5-HTの前駆物質であるトリプトファンを減少させるとうつ状態を生じることが報告されている³⁶⁾。また、5-HT_{1A}受容体のアゴニストである8-OH-DPATの投与が抗うつ効果を示すという報告がある³⁷⁾³⁸⁾。抗うつ剤の作用も、その作用部位が多様であるため複雑ではあるが、5-HTとうつ病の関連性を示唆している。抗うつ剤、fluvoxamineは5-HTの取込み阻害作用をもち、シナプス間隙の5-HT量を高めてその作用を増強すると考えられている³⁹⁾。動物実験でfluvoxamineの連続投与により、マウス縫線核5-HT免疫反応陽性細胞の有意な増加がみられるという報告がある⁴⁰⁾。これは今回の我々の結果と相補的に、縫線核5-HT作働性ニューロンとうつ症状の関連性を裏付けている。

臨床の場合においてIFN治療時に出現するうつ症状と類似の行動変化が動物実験で観察され、それとともに脳幹縫線核ニューロンの5-HT含有量が減少するという本実験の結果は、IFNによるう

つ症状の副作用の少なくとも一部は、脳内5-HT系を介して発現するという説を支持するものである。

結 論

インターフェロン(IFN)連続投与療法の重要な副作用であるうつ状態の成因を解明するための手掛りとして、動物モデルにおいて行動量と脳内セロトニン(5-HT)含有ニューロンの変化を調べた。ラット(12匹)の尾静脈よりIFN 1,000単位を12日間連続投与し、自発運動量、摂食量、飲水量、体重増加を定量的に測定し、投与終了後に脳幹背側縫線核の5-HT陽性ニューロンを免疫組織化学的に観察して、以下の結果を得た。

(1) 1日の自発運動量はIFN投与1日目から減少し、3日目には投与前の約85%に低下した($p < 0.05$)。一方生理食塩水投与(対照)群は110%に増加した。IFN投与群の暗期、明期の運動量は投与1日目より減少し、4日目にはそれぞれ投与前の約90, 70%に減少した。IFN投与群の暗期、明期の運動量の減少は12日目まで持続した。対照群の暗期、明期の運動量はともに投与前より減少することはなかった。

(2) 平均1日摂食量、飲水量は4日目にそれぞれ対照群の約70, 50%に減少した($p < 0.05$)。体重の増加率は有意に減少した($p < 0.05$)。

(3) 背側縫線核5-HT陽性ニューロンの数は、IFN投与群では対照群の約1/3であった($p < 0.05$)。

このように、IFN反復投与によりラットに自発運動量と摂食・摂水行動の減少といううつ類似状態が観察されるとともに、縫線核ニューロンの5-HT含有量が減少するという結果が得られた。この結果は、IFNによるうつ症状の副作用の少なくとも一部は、脳内5-HT系を介して発現することを示唆する。この研究は、うつ状態の発生機序に関する今後の研究に対し、有用な基礎的動物実験として寄与するものと思われる。

稿を終えるにあたり、薬理学的実験技法に御示唆いただいた薬理学教室村木 篁教授、藤井恵美子助教に深く御礼申し上げます。実験データの解析・表示を

支援していただいた第二生理学教室白川英樹先生、小沼裕一氏、大平哲也氏、免疫組織化学標本の作製に多大の御助力をいただいた日隈小枝子さんに深謝致します。また研究全般にわたり御助言いただいた精神医学教室富高辰一郎先生、論文作成を応援して下さった坂元 薫先生、福永貴子先生、佐川正夫先生、花岡素美先生に心より御礼申し上げます。

この研究の研究費の一部は、日本学術振興会「私立大学大学院重点特別経費補助金」によるものである。

文 献

- 1) Isaacs A, Lindenmann J: Virus interference I. The interferon. Proc R Soc Lond 147: 258-267, 1957
- 2) 高木洲一郎: IFN療法中の精神症状. 精神医 37: 344-358, 1995
- 3) 三宅和彦, 荘司貞志, 山中正巳: IFN副作用. 「C型肝炎 up date 基礎から臨床まで」(鈴木 宏, 古田精市 編), pp199-207, 中外医学社, 東京(1993)
- 4) 松本正広, 松本裕子, 中尾国明ほか: IFNの副作用とその対策. 内科 72: 889-892, 1993
- 5) Adams F, Fernandez F, Mavlight G: Interferon-induced organic mental disorders associated with unsuspected pre-existing neurological abnormalities. J Neurooncol 6: 355-359, 1988
- 6) Jorge RQ, Moshe T, Adam R et al: Clinical toxicity of interferons in cancer patients. A review. J Clin Oncol 4: 1173-1179, 1994
- 7) 横山章光, 高木洲一郎, 仲村 洋ほか: IFNによるC型慢性肝炎の治療中にみられる精神症状. 日医新報 3638: 43-46, 1994
- 8) 飯塚禮二, 高橋 正: 精神科的副作用. 肝・胆・膵 27: 257-263, 1993
- 9) 小山 司: うつ病とモノアミン. 神精薬理 11: 311-319, 1989
- 10) Yokotani N, Katsumoto E, Ozaki T et al: Effect of interferon treatment on serotonergic system in brain. Neurosci Res 9(Suppl): S107, 1994
- 11) Trulsson ME, Jacobs BL: Long-term amphetamine treatment decrease brain serotonin metabolism: Implications for theories of schizophrenia. Science 205: 1295-1297, 1979
- 12) 田所作太郎, 栗原 久, 小林喜代三: 行動薬理学の実践—薬物による行動変化. pp64-68, 星和書店, 東京 (1991)
- 13) Roe FJC: Microbiological Standardisation of Laboratory Animals. Ellis Horwood Limited, West Sussex (1983)
- 14) 西 玲子, 福永栄子, 江村せい子ほか: 薬. 「毒物

- 中毒救急マニュアル」, pp154-155, 医薬ジャーナル社, 東京 (1995)
- 15) **Born J, Schwalbe S, Pietrowsky R et al:** Neurophysiological effect of recombinant interferon, interferon-gamma and -alpha in man. *Clin Physiol Biochem* 7 : 119-127, 1989
 - 16) **Jorge RQ, Moshe T, Adam R et al:** Clinical toxicity of interferons in cancer patients. *J Clin Oncol* 2 : 234-243, 1986
 - 17) **Mattson K, Nitranen A, Iivanainen M et al:** Neurotoxicity of Interferon. *Cancer Treat Res* 10 : 958-961, 1983
 - 18) 堀川直史, 山崎友子, 大和 央ほか: IFN- α 使用中に生じた精神障害—C型慢性肝炎の症例の集計から—. *精神科治療* 9 : 1103, 1994
 - 19) **Birmanns B, Saphier D, Abramsky O:** α -Interferon modifies cortical EEG activity: Dose dependence and antagonism by haloxone. *J Neurol Sci* 100 : 22-26, 1990
 - 20) **Crnic L, Segall M:** Behavioral effects of mouse interferons- α and - γ and human interferon- α in mice. *Brain Res* 590 : 277-284, 1992
 - 21) **Plata-Salaman CR:** Immunomodulators and feeding regulation. A humoral link between the immune and nervous system. *Brain Behav Immun* 3 : 193-213, 1989
 - 22) **Plata-Salaman CR:** Food intake suppression by immunomodulators. *Neurosci Res Comm* 3 : 159-165, 1988
 - 23) **Reite M, Laudenslager M, Jones J:** Interferon decreases REM latency. *Biol Psychiatry* 22 : 104-107, 1989
 - 24) **Krueger JM, Dinarello CA, Shoham S et al:** Interferon- α -2 enhances slow-wave sleep in rabbits. *Int J Immunopharmacol* 9 : 23-30, 1987
 - 25) **Lim R, Miller JF, Zaheer A et al:** Purification and characterization of glia maturation factor β : A growth regulator for neuron and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 3901-3905, 1989
 - 26) **Harald S, Werner R:** Differentiating and mature neurons express the acidic fibroblast growth factor gene during chick neural development. *Development* 11 : 1143-1154, 1991
 - 27) **Giulian D, Baker TJ:** Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 8 : 2163-2178, 1986
 - 28) **Dinarello CA:** Biology of Interleukin 1. *FASEB J* 2 : 108, 1988
 - 29) **Plata-Salaman CR, Oomura Y, Kai Y:** Tumor necrosis factor and interleukin-1 β : Suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res* 448 : 106-114, 1988
 - 30) **Shoham S, Davenne D, Cady AB et al:** Recombinant tumor necrosis factor and interleukin 1 enhance slow-wave sleep. *Am J Physiol* 253 : 142-149, 1987
 - 31) 堀 哲郎, 海塚安郎, 森 俊憲: 脳免疫系連関. *神経薬理* 12 : 5-19, 1990
 - 32) 伊藤正敏: 脳内ニューロン系とレセプター. 「脳の機能とポジトロンCT」(松浦啓一, 中尾弘之, 小嶋正治 編), pp24-41, 秀潤社, 東京 (1986)
 - 33) **Prange AJ Jr, Wilson IC, Lynn CW et al:** L-Tryptophan in mania — Contribution to a permissive hypothesis of affective disorders. *Arch Gen Psychiatry* 30 : 56-62, 1974
 - 34) 市川淳二: Methamphetamine 反復投与後のラットの行動と脳内モノアミン系の変化. *薬物・精神・行動* 8 : 389-403, 1988
 - 35) **Bonate PL:** Serotonin receptor subtypes. Functional, physiological, and clinical correlates. *Neuropharmacology* 14 : 1-16, 1991
 - 36) **Young SN, Smith SE, Pihl RO et al:** Tryptophan depletion causes a rapid lowering of mood in normal males. *Psychopharmacology* 87 : 173-177, 1985
 - 37) **Cervo L, Samanin R:** Potential anti depressant properties of 8-hydroxy-2 (di-*n*-propyl amino) tetralin, selective serotonin_{1A} receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 144 : 223-229, 1987
 - 38) **Dourish CT, Hutson PH, Curzon G:** Low doses of the putative serotonin agonist 8-hydroxy-2 (di-*n*-propyl amino) tetralin (8-OH-DPAT) elicit feeding in the rat. *Psychopharmacology* 86 : 197-204, 1986
 - 39) **Bel N, Artigas F:** Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: An in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 229 : 101-103, 1992
 - 40) 山岡功一, 笠原 嘉, 山岡久也: 抗うつ薬によるマウス縫線核内5-HT 免疫反応性の経時的変化. *精神薬療基金研年報* 26 : 86-92, 1995
 - 41) **Paxinos G, Watson C:** The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, Sydney (1986)