無拘束ラット脳内への微量薬物反復注入法と神経薬理学への応用

池本 聡

要約: 動物の行動を中断しないでナノリッター量の薬物または化学物質を脳に直接注入する方法は、脳部位特有の神経伝達物質系機能を行動レベルで解析するうえで重要な役割がある。コンピューター操作のモーター技術を使った脳内微量反復注入法と応用例を紹介する。この方法は得に脳報酬回路の解明に目覚ましい役割を果たしている。

1. はじめに

特定の神経伝達物質系に作用する化学物質や薬物を脳のある部位に直接注入し、行動の変化を観察する方法は、脳と行動の関係を研究する上で重要な応用性がある。特に動物の自然な行動を阻害せず、微量ドラッグを繰り返し脳内に注入する方法は、報酬系の神経化学物質回路またはネットワークを解明するのに有用性がある。

1958年に初めて脳内反復注入法を用いての行動研究が出版されて以来ほぼ45年になるが(1)、この実験法を用いての出版文献数は50本未満にすぎない。この方法での研究が少ないのは、簡単に使え、確実に微量のドラッグを繰り返し導入する方法が確立されていないからだと思われる。注射ポンプをテストケージの外に設置し、チューブでポンプとラットを繋ぎ、注入する方法は、ラットが動くにつれすぐにチューブが絡み合ってしまう。チューブの絡みをなくすため液体用の回り継ぎ手をポンプとラットの間に付けると、ナノリッター量のドラッグを確実に注入できない。最も良く使われた脳内反復注入法は、電解を利用した小型ポンプによる方法(2)である。ポンプをラットの頭上に取り付けるため、チューブや液体回り継ぎ手を必要としないが、使うのが簡単でなく、どれぐらい正確にドラッグ

を注入できるのかははっきり示されていない。

2. ステップモーター反復注入法

近年のコンピューターテクノロジーの発達により、専門の技術や知識なしでも精巧な実験装置の工作が可能になり、コンピューター操作のモーター技術を利用した微量導入ポンプ装置のデザインが考案されている(3,4)(図1)。小型のモーターの使用により、ラットの頭上に取り付けられ、長いチューブや液体回り継ぎ手を不要とした。

ステップモーター(図1H)のシャフト(G)を回転させると、ネジ山部分のシャフトがドラッグを入れた容器(E)に挿入されていく。シャフト挿入の圧迫により、容器中のドラッグがチューブ(D)を通して、その先に取り付けてある注射カニューレ(F)より最終的に押し出される。行動実験をするためには、手術によりまずラットの頭がい骨に補助カニューレとベDESTAL(C)を取り付ける。そして、その補助カニューレとベDESTAL(C)に微量導入ポンプ(B)をコネクター(I)で、実験直前に取り付ける。そのポンプは、自在に曲がる電線で電気回り継ぎ手(A)を経て、モータードライバーに繋がれているため、ラットの行動への影響は最小限ですみ、行動を中断せずドラッグの注入を繰り返すことができる(J)。従来の電解反復注入法と比べ、より簡単に扱え、より正確に注入でき、より低コストでできる。

3. 脳内反復注入法による脳報酬系研究

脳内反復注入法を使用した研究を重ねている唯一の分野は、おそらく脳報酬系研究だろう。ラットを反復注入装置に取り付け、ラットが偶然にレバースイッチを押したとき、すぐさまドラッグを脳の特定の部位に微量注入する。この操作を繰り返すうちに、レバー押しが頻繁になり、これをオペラント学習または自己注入法による報酬効果と言う。この方法を使いこれまでに、人間に報酬(「快感」)効果のあるドラッグが、脳のどの部位で実際に報酬効果を導いているのかが解ってきた。モルヒネなどのオピオイド(5~7)

キーワード: 報酬, 道具的条件づけ, 正の強化
米国国立衛生研究所薬物依存研究行動神経科学グループ
(Behavioral Neuroscience Branch, National Institute
on Drug Abuse, National Institutes of Health, 5500
Nathan Shock Drive, Baltimore, Maryland 21224, USA)
e-mail: sikemoto@intram.nih.gov
原稿受領日: 2003年1月15日, 企画教育委員会依頼原稿

J

やアルコール(8)は ventral tegmental area (VTA) で、アンフェタミン(39)やコカイン(10)などの覚せい剤は ventral striatum で報酬効果が出る(図2)。

脳内自己注入法で面白いのは、全身的投与では報酬効果が全くないドラッグではっきりした報酬効果が得られることだ。その上、脳部位1ミリ間隔の近さで全く反対の効果があったりする。ギャバ拮抗薬は VTA の後部ではなく前部(11)で、ギャバ作動薬は VTA の前部ではなく後部(12)で報酬効果が得られる。コリナージック作動薬のカルバコールやコリンエステラーゼ阻害薬のニオスチグミン(図3)も VTA の後部(13)や ventral striatum (14)で報酬効果が得られる。ドパミンアゴニストが ventral striatum で報酬効果があるのはいろいろな方法で解っているが、反復注入法により ventral striatum のなかでも accumbens core ではなく shell において報酬効果があると解った(15)。しかも D1 アゴニストだけ、または D2 アゴニストだけの注入では報酬効果がでず、D1 アゴニストと D2 アゴニストを混ぜ合わせることで報酬効果がでる。すなわち、D1 と D2 レセプターが同時に刺激されることで報酬効果をもたらすと解った。

このように現在までほとんどの物質の報酬効果は、ドパミン細胞の cell body がある VTA または axon terminal がある ventral striatum で発見されたが、最近 posterior hypothalamic area でも報酬効果がでることが解った。興奮性アミノ酸のアンパ、またはギャバ拮抗薬が posterior hypothalamic area、特に supramammillary nucleus で強い報酬効果があることがわかっている(16,17)。

このよに神経解剖学的詳細を考慮し、選別された神経化学物質を使用した報酬行動の研究方法で、現在、細部にわたる報酬の神経伝達物質回路の解明が進んでいる。

4. おわりに

本稿で説明した微量導入ポンプは、以前の導入ポンプと比べ、より簡単で使いやすく、より確実に注入できるようだ。脳報酬回路研究がこの微量導入ポンプで、いっそうの解明発達を促すと期待される。

ここで紹介した微量導入ポンプを他の分野で使用する場

Fig. 1 The micropump-injection unit. A cross-sectional view of the micropump-injection assembly is shown in B. Key parts consisting of the micropump-injection assembly are shown in D-I. Electrical swivel (4 channels) (A) relays power and signals to a step motor (H). To attach the unit to a rat, a guide cannula and solid pedestal are fixed onto the skull with dental cement (C). A rat attached with a micropump-injection unit in an operant chamber is shown in J.

合考慮する点がある．この微量導入ポンプはユニラテラル（脳の片方だけの）注入法であるため，オペラント行動などの行動を刺激または誘発する研究には良いが，ラットが

Fig. 2 Sagittal drawing (18) showing key brain regions that mediate rewarding effects of various drugs. VTA, ventral tegmental area.

自然に起こしている行動，例えば摂食や性行動，またはすでに取得した記憶行動などを薬物で妨害しようとする場合には問題がある．脳のほとんどの部位は脳の両側にある（バイラテラルの）ため，それらの部位と機能の関係を研究する場合バイラテラル注入法を用いたほうが，結果の解釈がしやすい．したがって，この微量導入ポンプを他の分野に応用する場合，使用目的を十分踏まえた上で試みる必要がある．

文 献

- 1) Olds J and Olds ME: Positive reinforcement produced by stimulating hypothalamus with iproniazid and other compounds. *Science* **127**, 1175-1176 (1958)
- 2) Criswell HE: A simple chronic microinjection system for use with chemitrodes. *Pharmacol Biochem Behav* **6**, 237-238 (1977)
- 3) Ikemoto S and Sharpe LG: A head-attachable device for injecting nanoliter volumes of drug solutions into brain sites of freely moving rats. *J Neurosci Methods* **110**, 135-140 (2001)

Fig. 3 An example of intracranial self-administration. Rats self-administered the cholinergic agonist carbachol or the cholinesterase inhibitor neostigmine into the posterior ventral tegmental area (VTA). Each session lasted 90 min or until 80 infusions were obtained. Each infusion (75 nl) was delivered over 5 s. (A) depicts mean infusion rates ($\pm$ S.E.M.) ($n = 6$) of 1 mM carbachol (CARB) and 1, 0.3, 0.1 and 1 mM neostigmine (NEO), examined in this sequence. Effects of the drug treatments were compared with preceding vehicle (VEH) treatments, using paired t -tests. * $P < 0.05$, compared to vehicle. (B) depicts event records showing self-administration of a representative rat. Each vertical line on the horizontal line indicates the time point of an infusion. The number just right of the horizontal line indicates total infusions in that session. Infusions of 1 mM carbachol or neostigmine maintain fast, stable self-administration.

- 4) 池本 聡: 自然行動しているラットに微量ドラッグを繰り返し注入する方法. 実験医学 **20**, 1339-1343 (2002)
- 5) Bozarth MA and Wise RA: Intracranial self-administration of morphine into the ventral tegmental area in rats. Life Sci **28**, 551-555 (1981)
- 6) Devine DP and Wise RA: Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. J Neurosci **14**, 1978-1984 (1994)
- 7) Zangen A, Ikemoto S, Zadina JE and Wise RA: Rewarding and psychomotor stimulant effects of endomorphin-1: anteroposterior differences within the ventral tegmental area and lack of effect in nucleus accumbens. J Neurosci **22**, 7225-7233 (2002)
- 8) Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Crile RS, Murphy JM and McBride WJ: Regional heterogeneity for the intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of female Wistar rats. Psychopharmacology (Berl) **149**, 217-224 (2000)
- 9) Hoebel BG, Monaco AP, Hernandez L, Aulisi EF, Stanley BG and Lenard L: Self-infusion of amphetamine directly into the brain. Psychopharmacology (Berl) **81**, 158-163 (1983)
- 10) Rodd-Henricks ZA, McKinzie DL, Li TK, Murphy JM and McBride WJ: Cocaine is self-administered into the shell but not the core of the nucleus accumbens of wistar rats. J Pharmacol Exp Ther **303**, 1216-1226 (2002)
- 11) Ikemoto S, Murphy JM and McBride WJ: Self-infusion of GABAA antagonists directly into the ventral tegmental area and adjacent regions. Behav Neurosci **111**, 369-380 (1997)
- 12) Ikemoto S, Murphy JM and McBride WJ: Regional differences within the rat ventral tegmental area for muscimol self-infusions. Pharmacol Biochem Behav **61**, 87-92 (1998)
- 13) Ikemoto S and Wise RA: Rewarding effects of the cholinergic agents carbachol and neostigmine in the posterior ventral tegmental area. J Neurosci **22**, 9895-9904 (2002)
- 14) Ikemoto S, Glazier BS, Murphy JM and McBride WJ: Rats self-administer carbachol directly into the nucleus accumbens. Physiol Behav **63**, 811-814 (1998)
- 15) Ikemoto S, Glazier BS, Murphy JM and McBride WJ: Role of D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens in mediating reward. J Neurosci **17**, 8580-8587 (1997)
- 16) Ikemoto S, Witkin BM and Wise RA: Rats self-administer the glutamate agonist AMPA directly into the posterior hypothalamic area but not the ventral tegmental area. 2002 Abstracts Viewer/Itinerary Planner: Society for Neuroscience, Washington DC, USA, Program No. 876.9. (2002)
- 17) Ikemoto S: Microinjections of the GABAA Antagonists Picrotoxin or Bicuculline into the Posterior Hypothalamus are Rewarding. 36th Annual Winter Conference on Brain Research (Snowbird, UT), in press (2003)
- 18) Paxinos G and Watson C: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego (1997)

Abstract - Intermittent microinjection method in freely-moving rats and its application to neuropharmacology. Satoshi IKEMOTO (Behavioral Neuroscience Branch, Intramural Research Program, National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health, 5500 Nathan Shock Drive, Baltimore, Maryland 21224, USA). *Folia Pharmacol. Jpn.* (Nippon Yakurigaku Zasshi) **121**, 264 ~ 267 (2003)

Intermittent delivery of drugs into a discrete brain region has proven to be a useful technique. Described here is a micro-pump injection unit with miniature step-motors. This injection system is reliable, easy to operate and inexpensive to construct. The application of intermittent injection systems to study reward neurochemical circuits is discussed.

Keywords: reward; reinforcement; instrumental; operant behavior

著者プロフィール

池本 聡 (いけもと さとし)

米国国立衛生研究所薬物依存研究行動神経科学部門, リサーチフェロー.

1987年南イリノイ大学心理学卒業. '93年ボーリング・グリーン大学院実験心理学 Ph.D.. 同年よりインディアナ大学精神科学研究所ポスドク. '96年よりルイジアナ大学薬学科ポスドク. '98年より現職.

研究テーマ: 脳報酬回路.

主な著書: Ikemoto S, Panksepp J: The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. Brain Res Rev **31**, 6-41 (1999)