

Fig. 2 HPLCによるDNS-MAPの典型的チャートと検量線

量し、蛋白結合能を評価した。

C. 研究結果

血漿中および脳灌流液中のMAP濃度はアセトニトリルで除蛋白および抽出操作を行い、アルカリ性条件下でDNS化し、DNS-MAPの蛍光発色強度を測定した(図1)。

図2Aに示すようにMAPは約9分に単一のシャープなピークを示し、図2Bの血漿のみのチャートと比較すると判るように、そのピークは他の血漿中成分の影響を受

けなかった。MAP濃度は約5分にピークを示すDNS-PEAのピーク高さ比から求めることが可能であり、図2Cに示すようにDNS-MAPは $0.09 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ まで良好な直線関係を示した。また、検出ノイズより推定したその理論上の検出限界は約 0.5 ng/ml であった。なお、図には示さないが、脳灌流液におけるMAPおよびPEAのピークおよび検量線の性状は血漿中のそれとほぼ同じであった。

MAP静脈内投与後、経時的に採血し、そのMAP濃度を測定したデータを図3に示す。MAPの血中濃度-時間推移は2-コンパートメントモデルに従う消失過程を示し、MAP (5 mg/kg)投与時の消失相の半減期は17.3時間、薬物分布容積は 4.12 liters/kg であった。

限外濾過法より算出したMAPの蛋白結合率は濃度依存的に減少するものの約50%で、その高い脂溶性にもかかわらず

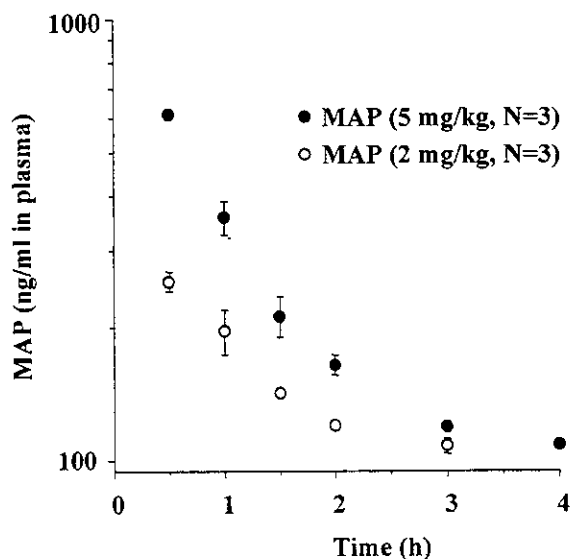


Fig. 3 MAP静脈内投与後の血漿中MAP濃度-時間推移

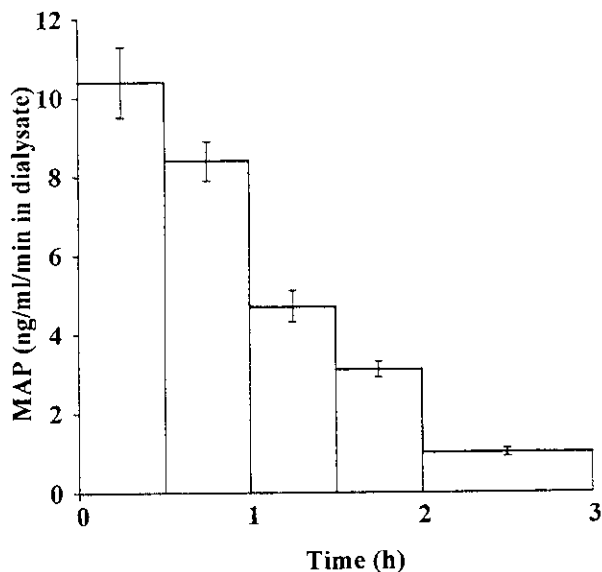


Fig. 3 MAP静脈内投与後の脳組織中MAP濃度-時間推移 (N=4)

ず、蛋白結合率は低かった(図 4)。

MAP (5 mg/kg)投与後の脳組織内濃度は投与直後にピークを示し、その後、時間経過とともに減少した(図 5)。

ゼロから3時間におけるMAPの血中濃度-時間推移を血漿中濃度に最も近い濃度であるMAP (0.098 $\mu\text{g/ml}$)の蛋白結合率 (53.9 %)で補正した血漿中の遊離型薬物濃度-時間曲線下面積 ($\text{AUC}_{\text{free-plasma}}$)とマイクロダイアリシス法によって得られたMAP脳組織内濃度-時間推移を透析膜を介した回収率 (17.3 %)で補正した脳組織内遊離型薬物濃度-時間曲線下面積 ($\text{AUC}_{\text{free-brain}}$)の比は0.171となり、投与量の約17%が脳組織内に移行していることが明らかになった(図 6)。

D. 考察

血漿あるいは脳透析液のMAP濃度を、DNSによりダンシル化したDNS-MAPの

蛍光強度としてHPLCを用いて測定を試みた。DNS-MAPは濃度に依存してその蛍光強度を増し、既知濃度のMAPを含む血漿あるいは脳透析液による検量線により、血漿あるいは脳透析液中のMAP濃度を測定できることが明らかとなった。また、同時に抽出し、ダンシル化したPEAは約5分に安定したシングルピークを発現し、本品を内部標準物質として使用できることが明らかとなった。PEAを内部標準物質とした場合のMAPの用量依存曲線は直線性を示し、その理論上の検出限界は約0.5 ng/mlであった。これらの結果より、本法によって従来行われてきたGC-MS法やLC-MASS法とほぼ同等あるいはそれ以上の高感度でMAPを測定できることが明らかとなった。

上記の方法により血漿中のMAP濃度を測定し、その薬物動態を解析したところそのVdは4.12 liters/kgであった。脳を含む組織に全く移行せず、血中からそのすべてが腎臓を経て排泄されるイヌリンのVdは約0.3 liters/kgであるが、MAPのVdはイヌリンのそれに比して明らかに大きい。これは、MAPが脳、脂肪、筋肉およびその他の組織に広く分布することを示唆

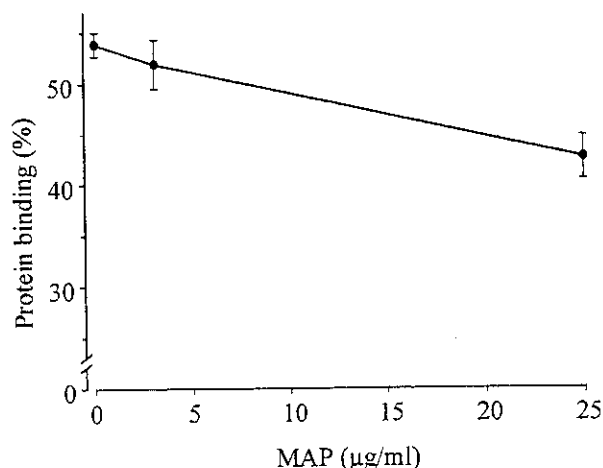


Fig. 5 血漿中MAP濃度に対するMAP蛋白結合率の変化

$$\frac{AUC_{\text{brain-free}}}{AUC_{\text{plasma-free}}} = 0.17$$

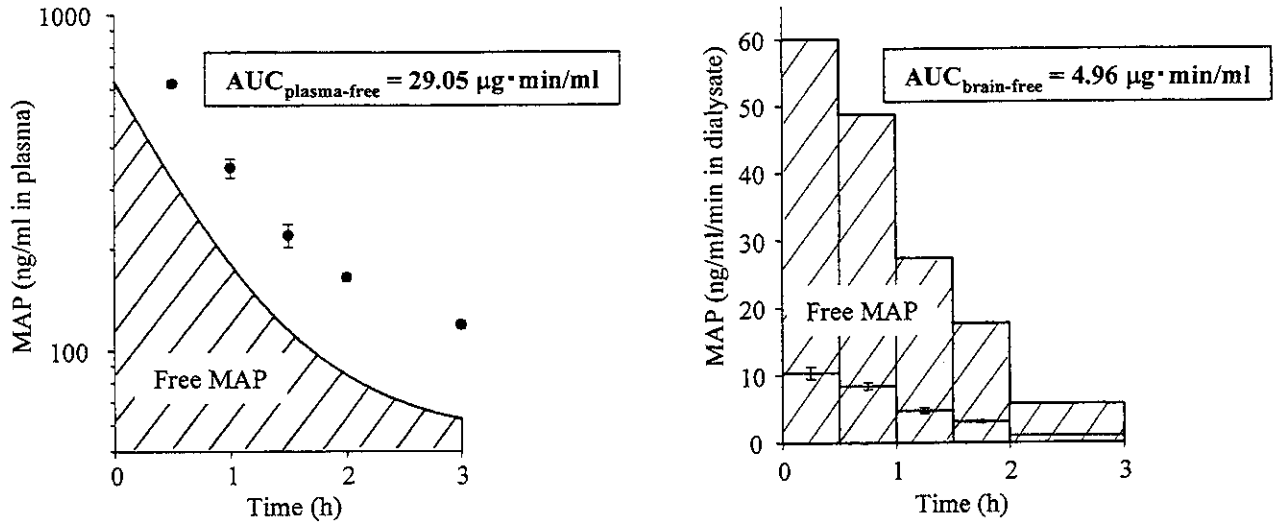


Fig. 6 蛋白結合能とダイアリシス回収率より推定したMAPの脳移行率

するものである。

MAPはその投与量のほとんどが肝臓で代謝されるといわれている⁸⁾。すなわち、肝薬物代謝酵素P450によってヒトの場合は主に脱メチル化、ラットにおいては主に芳香環のパラ位が水酸化されて代謝され、尿中に排泄される未変化体の量は数%にとどまるといわれている。このことはMAPの体内動態は肝機能に依存していることを示唆している。したがって、肝機能障害時のMAP体内動態を検討する必要があると思われる。

薬物は、血漿中蛋白に結合していない遊離型の薬物のみが組織に分布(組織移行)し、代謝を受ける。一般に脂溶性の高い薬物の蛋白結合率は高いといわれている。そこで我々はMAPの蛋白結合率を限外濾過法によって算出した。その結果、MAPの蛋白結合率は約50%であり、MAPの血液以外の組織への移行に対する蛋白結合率の寄与は小さく、その脂溶

性の関与が大きいことが示唆された。また、この結果はMAPが塩基性薬物であるために酸性薬物の結合蛋白であるアルブミンと結合できなかった可能性を示唆している。一般に、塩基性薬物は炎症時などに血中で増加する α_1 -酸性糖蛋白質(AAG)と結合するといわれており、MAPの体内動態は炎症時に変化することが考えられる。この点についても更なる検討が必要であると思われる。

マイクロダイリシス法は脳組織内の神経伝達物質などの微量物質の測定に繁用されるが、今回我々はMAP末梢投与時の脳組織内濃度の測定にこれを使用した。MAP(5 mg/kg)を静脈内投与すると、その脳組織内濃度は投与直後にピークを示し、その後、時間経過とともに減少した。この結果より、投与直後より血中の遊離型MAPがその高い脂溶性によって血液脳関門を通過し、脳へ移行していることが示唆された。

今回の結果は MAP がほぼ 3 時間程度で血中および脳組織内から消失することを示している。従来の MAP に関する行動薬理的検討もその多くは観察を 3 時間以内に終了しており、薬物動態学的検討と行動薬理的検討⁴⁾は比較的よく一致している。しかしながら、我々が示したように、MAP の血中半減期は非常に長く、依存症モデルを作成する場合に用いる MAP 反復投与では体内に MAP が蓄積される可能性があることを示唆している。また、MAP や脱メチル体のアンフェタミンは生体内でニトロソ化合物を形成し、P450 と不可逆な複合体を形成して 450 活性を低下させることがすでに報告されている⁸⁾。これは MAP 反復投与時には肝薬物代謝酵素活性が低下し、MAP の血漿中や脳内濃度が上昇しやすくなることを示唆している。したがって、依存症モデルの評価には適当な休薬期間をおいて体内の MAP が完全に消失した後に行う必要があると共に、依存症克服薬の研究においてはそれが MAP の体内動態に与える影響についても検討する必要があると思われる。

F. 結論

本実験において

- 1) 血漿中および脳組織内の MAP 濃度の測定・評価が可能であること
 - 2) MAP は血中ではその約 50 % が遊離型として存在していること、
 - 3) MAP はその高い脂溶性により投与直後より、脳組織内に移行し、時間経過と共にその濃度が減少すること、
- が示唆された。

今年度の結果を基に依存症モデルと考えられているラットにおける MAP 連続投与による異所行動性亢進時に MAP の血中および脳組織内濃度が変化するか、血液脳関門に MAP 取り込み機構または排出機構が存在するかどうかを確認することが今後の検討課題となった。

[参考文献]

- 1) Cordon-Cardo C., O'Brien J. P., and Casals D.: Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86: 695-698, 1989.
- 2) Hayakawa K., Hasegawa K., and Imaizumi N.: Determination of amphetamine-related compounds by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence and fluorescence detections. *J. Chromatogr.*, 464: 343-352, 1989.
- 3) Kitaichi K., Hori T., and Srivastava L. K.: Antisense oligodeoxynucleotides against the muscarinic m_2 , but not m_4 , receptor supports its role as autoreceptors in the rat hippocampus. *Mol. Brain Res.*, *in press*.
- 4) Kodama M., Akiyama K., and Ujike H.: A robust increase in expression of *arc* gene, an effector immediate early gene, in the rat brain after acute and chronic methamphetamine administration. *Brain Res.*, 796: 273-283, 1998.
- 5) Pardridge W. M.: CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. *J. Neurochem.*, 70: 1781-1792, 1998.

- 6) Paxinos G., and Watson D.: The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, New York, 1987.
- 7) Schinkel A. H., Smit J. J., and Van Tellingen O.: Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, 77: 491-502, 1994.
- 8) Testa B., and Jenner P.: Inhibitors of Cytochrome P-450s and their mechanism of action. *Drug Metab. Rev.*, 12: 1-117, 1981.

分担研究報告書

Prepulse inhibition および working memory に対する

規制薬物の反復投与の影響

分担研究者	山本経之	九州大学薬学部薬理学教室	助教授
研究協力者	三原良介		同上
	藪内健一		同上
	山口 拓		同上
	渡辺繁紀		同上
			教授

[研究要旨]

本研究はまず作業記憶（遅延見本合わせ課題）に及ぼす覚醒剤 methamphetamine（MAP）の反復投与による影響を調べた。その結果、MAP 反復投与によって作業記憶は著しく障害され、再 challenge を重ねてもその障害は軽減されることなく重篤であった。MAP 反復投与によってレバー押し行動そのものも抑制されたが、この作用は軽減される傾向にあった。

次に、覚醒剤乱用者にみられる“めっちゃ打ち（binge/runs）”を考慮に入れ、MAP の escalating dose 投与時の prepulse inhibition（PPI）に及ぼす影響を cocaine および morphine のそれと比較検討した。MAP による PPI 抑制作用は locomotor activity や stereotyped behavior の増加作用とは異なり、明確な逆耐性が形成されないことがわかった。しかし①MAP 休薬 1 日目でも PPI 障害が持続した点、②再 challenge では少なくとも作用が減弱することなく出現した点で、escalating dose で時の PPI に対する作用態度は従来の規則的な反復投与スケジュールでのそれにと異なることが明らかとなった。一方、morphine の休薬により著しい PPI の障害ならびに startle response の低下が認められた。このことから morphine 退薬症候時には感覚刺激に対する応答性が著しく障害されている可能性が示唆された。

A. 研究目的

覚醒剤などの乱用薬物の長期連用によって分裂病様症状のみならず、健忘や痴呆および持続的な認知障害を引き起こすことが知られている⁵⁾。これらの症状は薬物摂取

に伴う二次性脳障害の結果であると言われているが、その詳細なメカニズムは明らかではない。しかし、小動物を用いて知的機能、特に作業記憶（短期記憶）に焦点を当てた詳細な研究はあまりなされてい

ない。そこで本研究の第一の目的として、覚醒剤の反復投与によるラットの作業記憶に及ぼす影響を検討した。

これとは別に、methamphetamine (MAP) のような興奮性薬物の乱用では、薬物の摂取パターンに一定の方向性があることが知られている¹⁾。すなわち、①低用量から徐々に高用量に上げてゆく“漸増投与 (escalating dose regimen)”に続いて、②“めっちゃ打ち (binge/runs)”、すなわち高用量の薬物を1日数回にわたり頻用する投与方法に移行する。臨床的にはこのパターンの乱用が分裂病状態、特に妄想型分裂病につながりやすいと考えられている¹⁾。しかしながら、動物を用いての規制薬物の薬理作用を追究する点で、この臨床知見を念頭においた実験スケジュールを施行している研究はきわめて少ない。

一方、外来刺激に対する脳内の情報処理過程における sensorymotor motor gating のモデルとして prepulse inhibition (PPI) が知られている⁹⁾。この PPI は精神分裂病患者で著しく抑制される。一連の規制薬物の escalating dose スケジュールを用いての prepulse inhibition に及ぼす影響を調べた研究は皆無である。そこで本研究の第二の目的として音刺激に基づく PPI に対する規制薬物 MAP、cocaine および morphine の escalating dose 投与による影響を明らかにせんとした。

B. 実験方法

1. 使用動物 : 実験動物は、Wistar/ST 系雄性ラット(体重 200~250 g)を用いた。

2. 使用薬物 : methamphetamine (大日本製薬)、cocaine (武田薬品)、morphine-HCl (武田薬品)、naloxone-HCl (Sigma) を用いた。薬物は全て生理食塩水に溶解した。MAP、cocaine、naloxone は腹腔内に、morphine は皮下に 1 ml/kg 投与した。

本実験で用いた MAP、cocaine および morphine の escalating dose スケジュールを Table 1 に示した。

methamphetamine (mg/kg, i.p.)

number of injection	day						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1.0	4.0	7.0	10.0	13.0	15.0	15.0
2	2.0	5.0	8.0	11.0	14.0	15.0	—
3	3.0	6.0	9.0	12.0	15.0	15.0	—

cocaine (mg/kg, i.p.)

number of injection	day						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	5.0
2	1.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	—
3	—	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	—
4	—	—	—	3.0	4.0	5.0	—

morphine (mg/kg, s.c.)

number of injection	day						
	1	2	3	4	5	6	7
1	10	20	40	80	100	150	150
2	10	20	40	80	100	150	—

Table 1 The schedule of escalating dose injection.

3. 遅延見本合わせ (Delayed matching-to-sample ; DMTS) 課題^{10,15)} : 実験開始時のラットの体重が餌自

の lever が提示される(選択提示)。ラットが3秒前の見本提示 lever を選択し、3回続けて押せば餌 pellet が再度得られる(test trial)。sample および test trial を pair として 15 試行/1日行い、学習完成は3日間連続して餌獲得数 13 個以上とした。

4. PPI 法⁹⁾: PPI 実験には、SR-LAB 驚愕反応測定装置 (San Diego Instruments 製) を用いた。音刺激に対するラットの驚愕反応は、振動センサーを介して amplitude として測定した。実験中は、外界からの音を遮断する目的で 65 dB の background noise を常時負荷した。本 pulse (118 dB) の単独

負荷時の驚愕反応 (A) 及び prepulse (80 dB) 提示 100 msec 後の本 pulse による驚愕反応 (B) を 12~18 sec の不定間隔で 18 回測定した。実験はラットを測定用ホルダーにいれ 5 分後から開始した。PPI は $(A - B) / A \times 100 (\%)$ として算出した。

C. 実験結果

1. 遅延見本合わせ課題

MAP 1 mg/kg の 7 日間反復投与では、遅延見本合わせ課題での作業記憶は変化がなかった。2 mg/kg の反復投与により、作業記憶は 1-2 日目では変化がなかったが、3日目より著明に障害された。その作用は投与回数に依存して

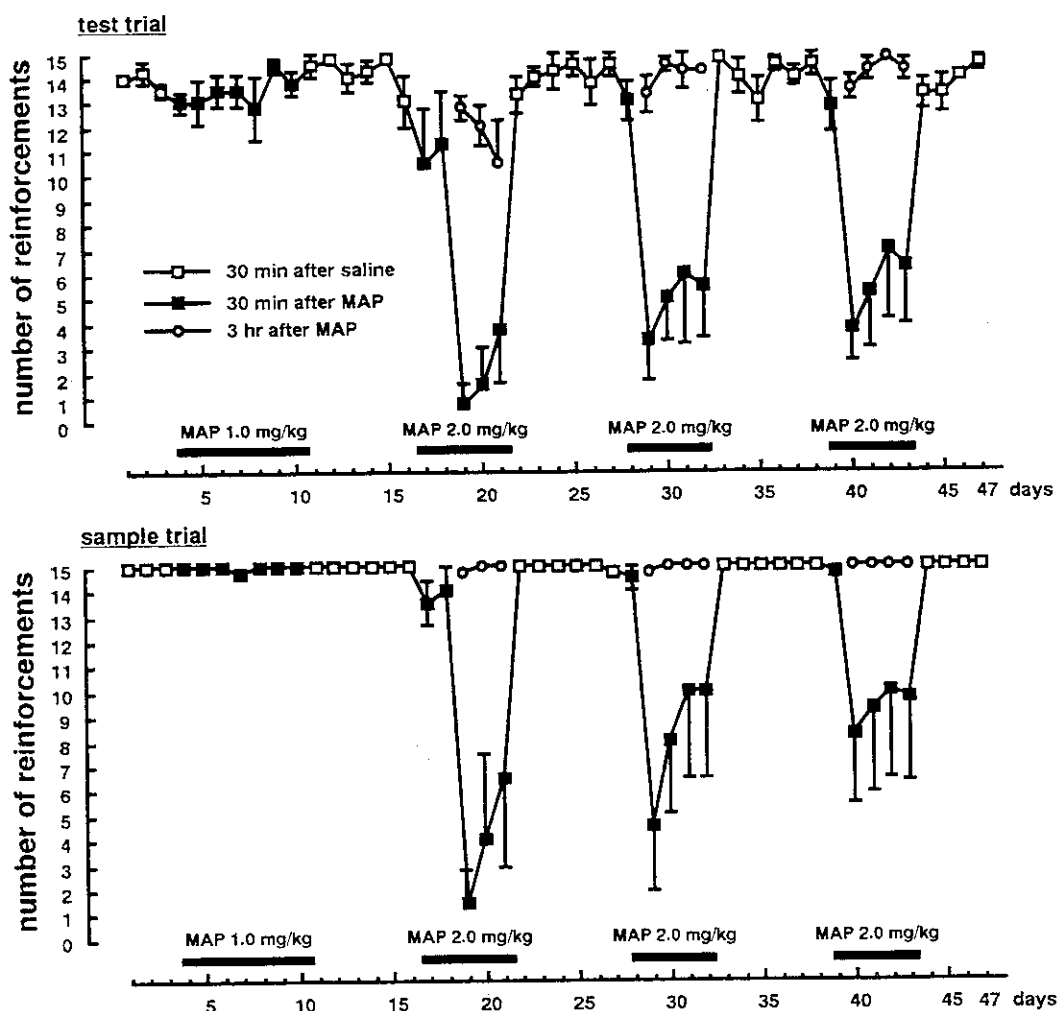


Fig.1 Effects of repeated methamphetamine (MAP) on delayed-matching-to-sample performance in rats

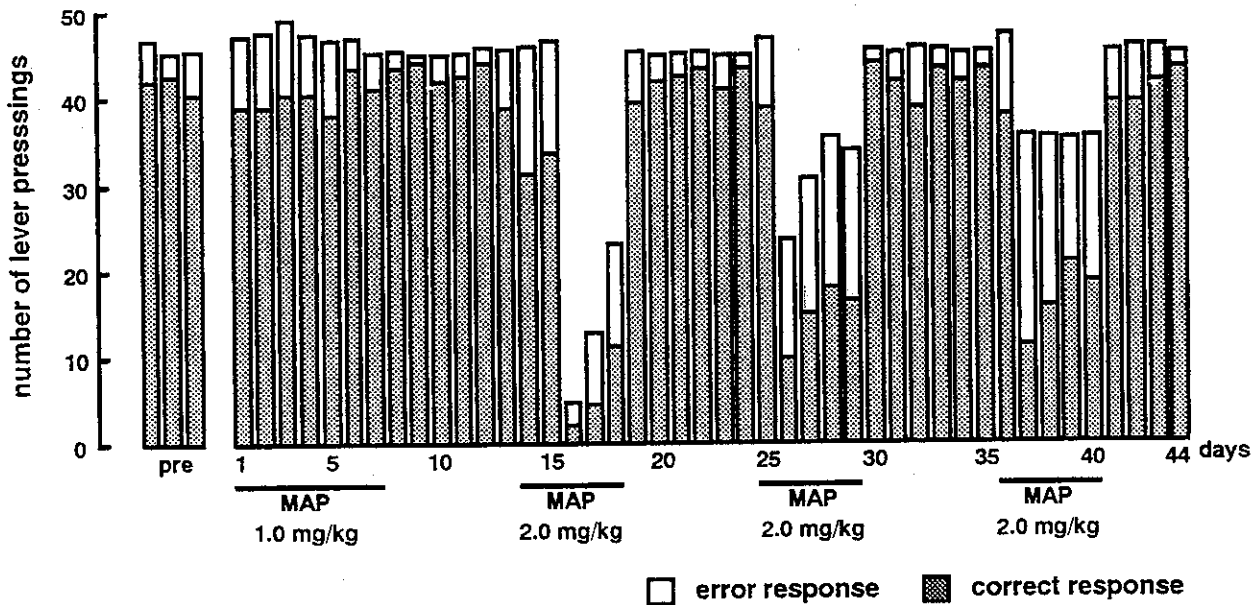


Fig. 2 Effect of repeated methamphetamine (MAP) on lever pressings in test trial

増強された (Fig. 1-2)。しかし、この時 sample trial (1 レバー提示) でも著明に抑制されていることから、MAP (2 mg/kg) 反復投与によりレバー押し行動そのものが抑制されていることがわかる (Fig. 2)。

MAP によるこの作業記憶の障害は、休薬により直ちに正常レベルに戻った。その後 レバー押し行動そのものは再 challenge 毎に改善される傾向が認められた。しかし作業記憶は MAP を再 challenge すると 2 日目から著しく障害され、再 challenge を重ねてもその障害は重篤であった (餌獲得数は chance level の 5 個以下であった; Fig. 1-2)。

2. PPI 法

a) MAP

PPI は MAP 1mg/kg 単回投与で有意に抑制された (Fig. 3)。escalating dose を用いてもこの抑制作用は認められたが、単回投与時の抑制作用よりさらに増強されることはなかった (Fig.

4)。一方、118 dB の monopulse 時での驚愕反応 (startle response) は MAP 1mg/kg 単回投与では変化なかったが、escalating dose に従って増強される傾向が認められた (Fig. 3)。

MAP による PPI 抑制作用は休薬 1 日目でも認められたが、休薬 3 日目で

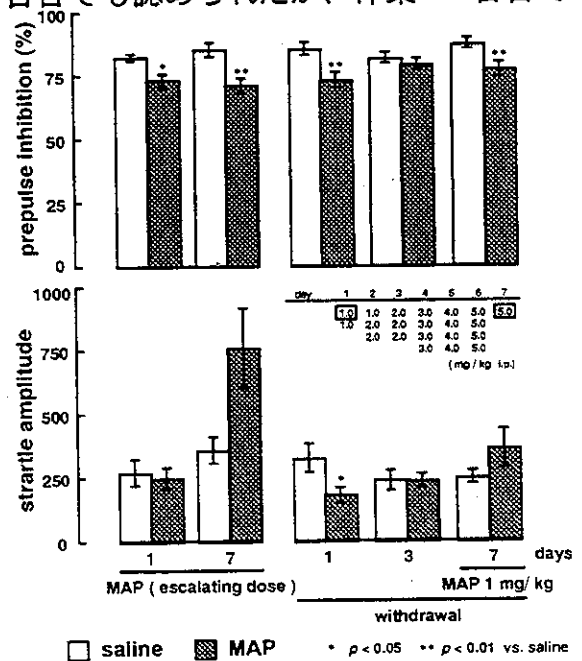


Fig.3 Effects of repeated methamphetamine (MAP : escalating dose) on PPI and startle amplitude in rats

はコントロールレベルまで戻った。休薬 7 日目に MAP 1mg/kg を再 challenge すると PPI は抑制されたが、単回投与時および反復投与 7 日目のそれと差はなかった (Fig. 3)。startle response は休薬 1 日目では、逆に著しく減弱した。7 日目に MAP 1mg/kg を再 challenge しても startle response には、コントロール群に比べ差はなかった。

MAP の自発運動量増加作用に逆耐性を起こす 1 mg/kg/day の 7 日間投与では、MAP の PPI 抑制作用には逆耐性が認められなかった (Fig. 4)。

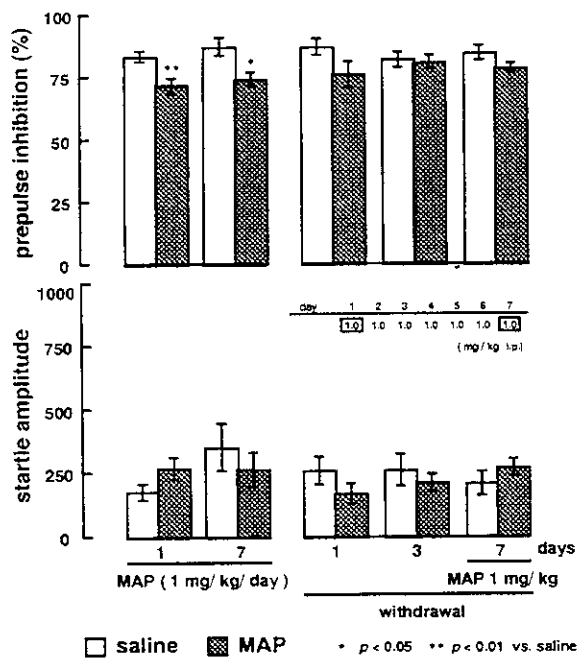


Fig. 4 Effects of repeated methamphetamine (MAP) on PPI and startle amplitude in rats.

b) cocaine

本実験に用いた cocaine の escalating dose 投与では、PPI には全く影響がなかった。さらに休薬時および休薬後の再 challenge を行っても PPI は変化がなかった (Fig.5)。startle response は反復投与によ

て増強されたが、休薬および再 challenge では変化なかった (Fig.5)。

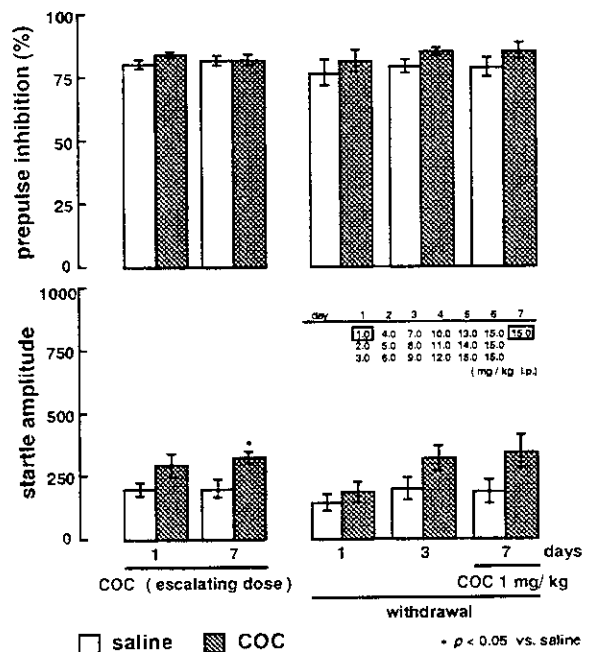


Fig.5 Effects of repeated cocaine (COC : escalating dose) on PPI and startle amplitude in rats

c) morphine

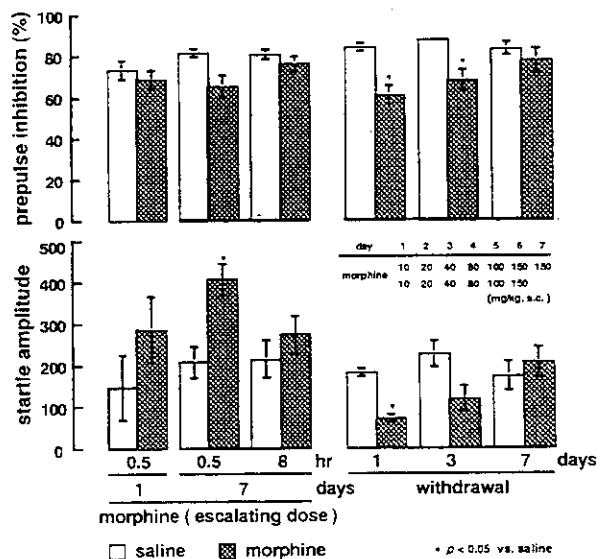


Fig. 6 Effects of repeated morphine (escalating dose) on PPI and startle amplitude in rats

鎮痛作用の耐性形成が認められる morphine の escalating dose を用いても、PPI には著明な変化がなかった (Fig.6)。しかし、休薬 1 日目では、PPI は著しく抑制された (Fig.6)。この PPI 抑制作用は休薬 3 日目まで持続した。

startle response は escalating dose に依存して著しく増加した (Fig.6)。しかし休薬 1 日目では、startle response はコントロール群に比べて逆に著しく抑制された (Fig.6)。この抑制作用は休薬 3 日目では認められなかった。

D. 考察

乱用性薬物はヒトや実験動物において健忘を引き起こすことが種々の課題で報告されている⁵⁾。記憶の中でも作業記憶は、海馬が最も重要な役割を演じていることが知られている^{4,6)}。これとは別に分裂病患者は幻覚や攻撃性などの陽性症状だけでなく注意機能障害や記憶障害などの知的機能にも異常が認められる。近年、Lipska や Weinberger⁷⁾ および Chambers³⁾ らは幼若期のラットの腹側海馬を破壊したラットの反応性が分裂病患者のそれと類似している点に着目し、分裂病の動物実験モデルとして妥当性があることを報告している。

MAP 投与により 3-lever operant 装置を用いての作業記憶は、本実験から著しく障害されることがわかった。12-方向性放射状迷路装置を用いてのラット²⁾ や operant 装置を用いてのサル¹²⁾ での作業記憶 (DMTS 課題) も MAP によって障害されている。実験装置に相違があっても、少なくとも DMTS 課題での作業記憶は MAP によって一様に障害されるようであ

る。さらに、MAP によるこの障害作用は反復投与に依存して増強され、レバー押し行動そのものが抑制される行動毒性を呈することがわかった。この行動毒性は MAP の再 challenge 毎に軽減される傾向が認められたが、MAP による作業記憶障害作用には減弱する傾向はなかった。

MAP 1 mg/kg の反復投与により、MAP の locomotor activity 亢進作用はその反復投与によって著明な逆耐性が形成されることが知られている¹³⁾。しかし、MAP による PPI 抑制作用は同様の投与スケジュールを用いても逆耐性が形成されず、むしろ減弱される傾向であった。また、escalating dose を用いての実験でも MAP の PPI 抑制作用が認められたが、この作用も逆耐性は観察されなかった。この点では大麻の主要活性成分である tetrahydrocannabinol も作業記憶を障害する¹⁰⁾ が、その作用には逆耐性が形成される点で、MAP のそれと若干異なっている。

MAP の escalating dose 投与や高用量の反復投与で、MAP の神経毒性としての dopamine 枯渇が起こることが報告されている¹¹⁾。本実験での escalating dose 投与時での PPI 抑制作用に逆耐性が認められなかったのは、dopamine 神経終末で dopamine が枯渇している可能性が示唆される。しかしながら、同様の escalating dose スケジュールを用いての locomotor activity 実験では初回投与時よりも最終投与時のほうが、自発運動量が亢進していること (未発表) から、少なくともこの escalating dose スケジュールでは dopamine 神経が dopamine 枯渇状態にあるとは考え難い。これらのことから考えると、MAP で誘発される中枢神経作用が一様に逆耐性を起こすわけではない

ことを示している。

Cocaine の 1 – 56 mg/kg の単回投与では PPI は障害されなかった（一部未発表）。また、ヒトの heavy user の 1 回あたりの使用量とされる 15 mg/kg⁸⁾ を最終用量とした本 escalating dose 反復投与によっても、PPI は障害されなかった。

このように MAP と同様の間接的なドーパミンアゴニストである cocaine の PPI に対する作用は、MAP のそれと異なっていた。この結果はコカイン乱用による精神病が MAP のそれに比べ起こりにくい知見と考え合わせると興味深い。

一方、鎮痛作用の耐性形成が成立する morphine の escalating dose 投与では startle response そのものが増大したことから、音刺激による感覚刺激に対する応答性が亢進していることが考えられる。さらに休薬により著しい PPI 抑制と startle response の低下が認められた。直接的あるいは間接的に dopamine 受容体を賦活する薬物は一様に PPI を抑制する事が知られている。この事から考えると morphine 休薬時には dopamine 神経が興奮されている可能性がある。しかし、Suchandra¹⁴⁾ らは morphine 休薬時ににより脳内 dopamine 遊離が著しく減少することを報告している。従って morphine による PPI の抑制作用には少なくとも dopamine 神経の関連性は低いと考えられる。これらの行動変容は外来刺激に対する脳内情報処理過程（sensory motor gating）の異常を意味するものであり、従来までの weight loss や jumping などの withdrawal sign と共に知的機能に係わる morphine の withdrawal sign として応用・検索できそうである。

PPI および startle response に対す

る morphine と MAP の投与時および休薬時の作用の相違は、薬物が有する身体依存性および精神依存性に起因している可能性がある。今後この点を含め、escalating dose (“binge/runs”) によって誘発される知的機能障害の特性を明らかにし、臨床とより相関性の高い依存症モデルの作成を試みたい。

E. 結論

3-lever operant 装置を用いての遅延見本合わせ（DMTS）課題において MAP 反復投与によって作業記憶は著しく障害され、再 challenge を重ねてもその障害は軽減されることなく重篤であった。MAP 反復投与によってレバー押し行動そのものも抑制されたが、この作用は軽減される傾向にあった。

MAP による PPI 抑制作用は locomotor activity や stereotyped behavior の増加作用とは異なり、明確な逆耐性が形成されないことがわかった。

しかし ① MAP 休薬 1 日目でも PPI 障害が持続した点、② 再 challenge では少なくとも作用が減弱することなく出現した点で、binge/runs 適用時の PPI に対する作用は従来の規則的な反復投与スケジュールでのそれに比べ異なる可能性が示唆された。

身体依存性を有する morphine escalating dose 投与後の休薬により著しい PPI の障害ならびに startle response の低下が認められた。このことから morphine 退薬症候時には感覚刺激に対する応答性が著しく障害されていることが分かった。

[参考文献]

- 1) Angrist B. : Psychosis-inducing : clinical variations of the syndrome., pp 387-414. Amphetamine and its analogs (Cho AK, Segal DS, eds) San Diego Academic, 1994
- 2) Buresova O. and Bures J.: Radial maze as a tool for assessing the effect of drugs on the working memory of rats. *Psychopharmacology.*, 77: 268-271, 1982.
- 3) Chambers R. A., Moore J., Mcevoy J. P., et al.: Cognitive Effects of Neonatal Hippocampal Lesions in a Rat Model of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.*, 15: 587-594, 1996.
- 4) Furuya Y., Yamamoto T., Yatsugi S., et al.: A new method for studying working memory by using the three-panel runway apparatus in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 46: 183-188, 1988.
- 5) Hutchings D. E. and Dow-Edwards D. : Animal models of opiate, cocaine, and cannabis use. *Clin. Perinatol.*, 18: 1-22, 1991.
- 6) Jarrard L. E.: On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol.*, 60: 9-26, 1993.
- 7) Lipska B. K., Jaskiw G. E. and Weinberger D. R.: Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: A potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.*, 9: 67-75, 1993.
- 8) Li H., George V. K., Bianco F. J. Jr., et al.: Histopathological changes in the testes of prepubertal male rats after chronic administration of cocaine. *J. Envir. Pathol., Toxicol. Oncol.*, 16: 67-71, 1997.
- 9) Mark A. G., Neal R. S., Robert S. M. et al. : Startle Response Models of Sensorimotor Gating and Habituation Deficits in Schizophrenia., *Brain Res. Bull.*, 25 : 485-498, 1990
- 10) Miyamoto A., Yamamoto T. and Watanabe S. : Effect of repeated administration of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on delayed matching-to-sample performance in rats. *Neurosci. Lett.*, 201: 139-142, 1995.
- 11) Ricaurte G. A., Seiden L. S. and Schuster C. R.: Further evidence that amphetamines produce long-lasting dopamine neurochemical deficits by destroying dopamine nerve fibers. *Brain Res.*, 303: 359-364, 1984.
- 12) Schulze G. E. and Paula M. G.: Acute effects of d-amphetamine in a monkey operant behavioral test battery. *Pharmacol Biochem Behav.*, 35: 759-765, 1990.
- 13) Sibata S., Ono M., Fukuhara M., et al. : Involvement of dopamine , N-methyl-D-aspartate and sigma receptor mechanisms in methamphetamine-induced anticipatory activity rhythm in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 274: 688-

694, 1995.

14) Suchandra G., Amrish H. P., Michael C. et al. : Different effects of opiate withdrawal on dopamine turnover, uptake, and release in the striatum and nucleus accumbens. *Neurochem. Res.*, 23: 875-885, 1998.

15) Yamamoto T., Kitajima I., Hironaka K., et al.: Olfactory bulbectomy leads to learning/memory impairments in 3-panel runway and 3-lever operant tasks. *Jpn. J. Psychopharmacol.*, 14: 279-290, 1994.

演題名 依存性薬物の連用による薬物動態の変化と依存強度の解析

分担研究者 五味田 裕（岡山大学医学部附属病院薬剤部）
共同研究者 荒木 博陽（岡山大学医学部附属病院薬剤部）
末丸 克矢（岡山大学医学部附属病院薬剤部）
川上 賢哉（岡山大学医療薬学専攻臨床薬剤学）

要約：依存性薬物の連用による薬物動態の変化を検討するにあたり、すでに種々薬物の薬物動態に影響を与えることがわかっているニコチンを投与し、ニコチン自身が行動薬理的にどのような変化を惹起するかについてまず検討した。ニコチンは反復投与することにより明らかな逆耐性現象を惹起した。また、覚醒剤である methamphetamine の作用を増強した。このことは脳内ドパミン神経系に対して増強作用を有していることを意味している。今後、ニコチンと依存性薬物、とくに morphine との関連についてそのメカニズムを検討する際に、ドパミン神経系への作用を指標の1つとして考えていく必要がある。依存強度を検討するのに適した評価系を確立するために、基礎的検討を行ったところ、morphine の依存性については、naloxone による退薬症候としての jumping 行動（マウス）および place aversion 試験（ラット）が適していると考えられた。今後はこの系を用いてニコチンあるいはタバコ喫煙による退薬症候に対する効果について脳内ドパミン神経系および薬物動態学的検討を実施する。

A. 目的

麻薬をはじめとする薬物乱用・依存の問題は古来より指摘されているにもかかわらず、依然として極めて深刻な社会問題となっている。近年、我が国では依存性薬物の乱用が急増し、それに伴う犯罪も多発している。乱用薬物としてはヘロイン、コカイン等の麻薬の他、覚醒剤、大麻、シンナーなどの有機溶媒、睡眠薬、抗不安薬等多種にわたる。この薬物依存の発症メカニズムは長年の研究にもかかわらず、未だ解明されていないのが現状である。我々は嗜好品であるタバコ喫煙およびタバコの主成分であるニコチンについての研究を行ってきた。タバコはどちらかという精神依存の性質が強く、離脱症状は心理的反応が主で、身体的症状ははっきりしない。このようなニコチンやタバコ喫煙が種々薬物の体内動態に影響を与えることに関しては、種々の薬

物についてすでに発表してきた^{2-4, 11)}。しかし、ニコチンやタバコ喫煙が麻薬・覚醒剤投与後の薬理効果および体内動態に及ぼす影響については未だ明確となっておらず、薬物動態学的に依存性形成との関連について明らかにしていくことは興味あることである。そこで、ニコチンを投与した際の行動変容を十分認知したうえで、麻薬である morphine による身体依存発現に対する作用を明らかにすることを目的とし、今年度はニコチン投与時の行動変容の解明および morphine 退薬症候評価法の確立について検討した。

B. 方法

1. 実験動物

実験には実験開始時の体重が 180-370g の Wistar 系雄性ラット（日本チャールズリバ

一)、および体重 20-24 g の ddY 系雄性マウス (日本チャールズリバー) を使用した。

2. 実験手法

2-1. ニコチン投与による自発運動量の測定

一般行動の観察ならびに自発運動量の測定は Hall の open-field 装置を用いて行った。本装置は床面の直径が 60 cm、壁の高さが 50 cm および壁の上端の直径が 80 cm の円形のバケツ状のものがある。床面は黒線ではほぼ等面積の 19 区画に分けられている。本装置の床面の中心上 80 cm に 100 W の白色ランプを置き、底面に影ができないように照明した。実験開始前に 15 分間 open-field 装置に順応させた後、ニコチン (0.5 mg/kg) を皮下投与し、3 分間毎の床面の区切りを横切った回数 (locomotor activity) を測定した。なお、測定時間は 15 分間とした。

2-2. 常同行動の測定

methamphetamine を動物に投与すると首振り行動 (head movement)、臭い嗅ぎ行動 (sniffing)、ケージをなめる行動 (licking)、またはケージを咬む行動 (biting) などの連続的な目的のない異常行動、すなわち常同行動が発現する。今回、methamphetamine 5 および 10 mg/kg を腹腔内投与して 30 分ごとに常同行動を測定した。常同行動の測定は、動物を個別の金網ケージに入れ、以下の採点基準により 5 段階に分類し評価した。

score 0: 異常行動の出現なし

score 1: 非連続的 sniffing および head movement の出現

score 2: 連続的 sniffing の出現

score 3: 連続的 sniffing および非連続的 licking または biting の出現

score 4: 連続的 licking または biting の出現

2-3. morphine 依存マウスの jumping 行動観察

マウスに morphine 25, 50, 100 mg/kg を 1 日 3 回 (9:00, 13:00, 17:00)、3 日間皮下投与した。4 日目の 9:00 に最終投与を行い、その 2 時間後に naloxone 5 mg/kg を腹腔内投与して、その直後から jumping 行動の回数を測定した。

2-4. place aversion 試験

ラットを 1 日目、床にサンドペーパーあるいは金網を敷いた 2 つの部屋 (各部屋 30x47x29cm) を有する観察箱の中のどちらか一方に 30 分間放置した。2 日目にはホームケージ内で morphine 10 mg/kg あるいは生理食塩水を皮下投与した。3 日目に naloxone 1 mg/kg あるいは生理食塩水を皮下投与し、1 日目と異なる床の観察箱に 30 分間放置した。5 日目には 2 つの部屋の壁を取り払い、ラットを自由に動ける状況に置き、それぞれの床の部屋に滞在する時間を計測した。

3. 使用薬物

実験に使用した薬物のうち、ニコチン純液 (日本タバコ産業) は生理食塩水に希釈して動物の体重 100g 当たり 0.1 mL となるように調整した。morphine (武田薬品工業) は生理食塩水に溶解し、ラットでは体重 100g 当たり 0.1 mL、マウスでは体重 100g 当たり 1 mL となるように調整した。

4. 統計学的検討

自発運動量ならびに常同行動は Mann-Whitney U-test、jumping 行動は one-way ANOVA 後 Dunnett テスト、また place aversion 試験は one-way ANOVA 後 Tukey テストで統計解析した。

C. 結果

1. ニコチン投与による自発運動量の変化

ニコチン 0.5 mg/kg の連日投与により、自発運動は初回投与時から対照群と比較して高値を示し、4日目、14日目ではさらに増強された (Fig. 1)。中でもニコチン投与直後から6分間の増加が顕著であった。この経日的変化を15分間の総運動量で見ると第1日目に107回であった自発運動量は4日目では157回、14日目には255回に増加した。このようにニコチン投与では、投与を繰り返すことで自発運動量が有意に増加し、いわゆる逆耐性現象が観察されることが確認できた。

2. methamphetamine による常同行動に対するニコチン投与の影響

methamphetamine による常同行動は投与1~2時間後で最大となり、4時間後においても認められた。methamphetamine 5 mg/kg による常同行動はニコチン群の方が対照群より高値を示し、30, 60, 90分後において有意差が認められた。しかし、10 mg/kg の投与では常同行動の score が最大値に近づいたため両群間に差異は認められなかった (Fig. 2)。

3. morphine 依存マウスの naloxon 投与による jumping 行動の発現

最終投与の2時間後に naloxone 5 mg/kg を腹腔内投与して、その直後から jumping 行動回数を測定したところ、いずれの morphine 投与群 (25, 50, 100 mg/kg) でも naloxone 投与直後から顕著な jumping 行動が観察された (Fig. 3)。

4. place aversion 法を用いた morphine 身体依存の検討

生理食塩水だけの投与ではサンドペーパーおよび金網側のいずれかに居住時間が偏ることはなかった。一方、morphine + naloxone 群では明らかに naloxone を投与された時に滞在した床を有する部屋と反対側の部屋にほとんどの時間滞在する事が確認でき、place aversion

を検討する方法として適していると考えられた (Fig. 4)。

D. 考察

一般に、薬物作用はその作用点における薬物濃度および作用点における感受性によって規定されると考えられる。その薬物効果は薬物側の影響因子と共に生体側の諸因子によっても影響される。我々はこれまでに、狭心症治療薬、気管支拡張薬、抗潰瘍薬および抗てんかん薬等の薬物動態に対するニコチンあるいはタバコ喫煙の影響を検討してきた^{2-4, 11)}。とくに吸収相への影響が認められる薬物が多く、血中濃度も低く抑えられる傾向が認められる。

一方、ニコチンが自発運動量に及ぼす影響は、動物の種類、投与量および投与後の時間により異なることが知られている。少用量のニコチンを動物に投与すると自発運動量は増加し、反対に高用量になると運動障害 (ataxia) の出現により減少する。反復投与により高用量での運動障害には耐性が生じるが、少用量による運動亢進はさらに増強される⁶⁾。本実験で使用した 0.5 mg/kg での結果は、すでに報告されている少量投与の結果と類似したものであった。このニコチン反復投与による反応性増大の機序については、ニコチン受容体の増加が関与していることが示唆されている。また、ドパミン神経細胞体の存在する腹側被蓋野およびその神経終末部位の側坐核に直接ニコチンを微量注入すると自発運動量が増加し、その作用は同脳部位への連日注入によりさらに増強されることも報告されている⁷⁾。すなわち、ニコチンによる自発運動の増加に大脳辺縁系のドパミン神経が関与していることが示唆されている¹⁾。methamphetamine を反復投与しても反応性が増大する逆耐性現象が生じることは良く知られており⁸⁾、ニコチンの少量投与時の結果と類似している。その機序についてはまだ不明な点もあるもの

の、ドパミン神経系の増強作用であろうと考えられている。これらのことと今回の methamphetamine 反応性がニコチン投与により増大された結果は、ニコチン投与による自発運動量の増加がドパミン神経の感受性の増大と関与しているものと考えられた。

薬物の乱用は単一の因子で確立されるものではなく、むしろ数多くの因子に基づいた複合的な現象である。ニコチン投与によりドパミン神経機構が変化している状況下でいろいろな依存性薬物、とくにドパミン神経系と関連した薬物を投与し、反応性の違いを検討することは興味深い。そればかりでなく、ニコチンあるいはタバコ喫煙時の依存性薬物の薬物動態的变化を検討し、作用機序との関連を考察することも興味ある点である。我々は依存性薬物の中でまず、morphine を取り上げ、検討することとした。 μ 受容体刺激薬であるオピオイド類は腹側被蓋野のドパミン神経を持続的に抑制している神経を抑制することが知られている。強化効果は脳内の腹側被蓋野に由来し、側坐核と結合して、さらには直接あるいは間接的に辺縁系、腹側淡蒼球および大脳皮質前頭葉と結合するドパミン系に対する作用が関与しているとされている。従って、morphine とドパミン神経系との関連で今後検討を進めていくことが肝要であろうと考えられる。

morphine は反復投与を中断したり、適量の naloxone などの麻薬拮抗剤を依存動物に与えると、さまざまな異常症状が直ちに出現し、ヒトが依存症に陥った後の離脱症状を思わせる。マウスでは麻薬の身体依存における退薬症状として脱糞、排尿、運動量亢進、体重減少、振戦、けいれん、繰り返しのジャンプ等が認められる¹⁰⁾。そのなかでも繰り返しのジャンプは麻薬の身体依存の良い指標として検討されてきた。今回、morphine を3日間投与し、4日目の最終投与後 naloxone を投与して行動観察したところ、morphine 25mg/kg 投与

群で顕著な jumping 行動が観察された。Zarringdast と Farzin は morphine 依存マウスにおける naloxone による jumping 行動に対してニコチンは用量依存的に jumping 回数を抑制し、この作用が中枢性であること、またニコチンの抑制作用がドパミン D1 受容体拮抗薬で軽減されることを報告している¹²⁾。このことはニコチン受容体を介したドパミン神経系が morphine 身体依存に関与していることを示唆するものである。

オピオイドによる身体依存は一般的には慢性的な薬物投与によって惹起されると言われているが、拮抗薬による退薬症候は急性のオピオイド投与後数時間で惹起されることが種々の動物で報告され、急性身体依存として知られている。慢性的な投与による身体依存と急性身体依存後の退薬症候を比較した報告によると、強さと持続は慢性的な投与時の方が強いが、発症する症状自身は双方で質的な差はない。この現象はヒトでも報告され、morphine はその初回投与時の効果を持続し、身体的に、また生化学的に慣れの変化が長期間持続されることが推察されている⁵⁾。この慣れの変化は明らかに aversion であり、morphine の初期の快楽的な効果に拮抗する効果である。最近、place-conditioning paradigm を用いた検討において、naloxone による place aversion は morphine 1回投与により顕著に増強されることが報告された⁹⁾。これは急速な退薬症候が aversive な動機付け行動を起こしたものと解釈されている。今回、place aversion 法で同様な検討を行ったところ、報告と同様、aversive な行動が観察され、morphine の退薬症候を観察する評価系として検討する価値のあるものであろうと考えられた。

今後はこれらの系を用いて、ニコチンやタバコ喫煙負荷動物を用いて、morphine による退薬症候がどのように変化するかをドパミン神経系との関係で検討すると共に、薬物動態学的観点から血中濃度の測定および解析を行

い、morphine 依存性の機序解明に迫りたい。

E. 結論

ニコチン投与により自発運動量は増加し、ニコチンを反復投与することにより、効果は増強された。methamphetamine 投与による常同行動はニコチン反復投与動物では増強された。このことからニコチン投与がドパミン神経系に何らかの影響を与えていることが示唆された。morphine 投与マウスに naloxone を投与すると顕著な jumping 行動が認められ、退薬症候の1つと考えられた。本作用はドパミン神経系との関与が示唆されていることから、今後、ニコチン投与動物を用いた検討を行う。また、morphine 1 回投与は naloxone による place aversion を増強した。今後は本作用に対するニコチンあるいはタバコ喫煙の影響について、その機序を解明するために脳内ドパミン神経系との関連および薬物動態学的検討を行う。

【参考文献】

- 1) Clarke P.B.S., Fu D.S., Jakubovic, A and Fibiger, H.C.: Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies the locomotor stimulant action of nicotine in rats., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 246: 701-708, 1988.
- 2) Gomita Y., Furuno K. and Araki Y.: Influences of standard and nicotine-reduced cigarette smoke on plasma concentrations of isosorbide dinitrate and its metabolites in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 43: 811-812, 1991.
- 3) Gomita Y., Eto K., Furuno K. and Araki Y.: Effects of exposure to standard and nicotine-reduced cigarette smoke on pharmacokinetics of theophylline and cimetidine in rats., *J. Pharmaceutical Sci.*, 81: 1132-1135, 1992.
- 4) Gomita Y., Eto K., Furuno K., Mimaki Y. and Araki Y.: Influences of exposure to cigarette smoke on concentration of nicorandil in plasma of rats., *J. Pharmaceutical Sci.*, 81: 228-231, 1992.
- 5) Heishman S.J., Stitzer M.L., Bigelow G.E. and

Liebson I.A.: Acute opioid physical dependence in postaddict humans: Naloxone dose effects after brief morphine exposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 248: 127-134, 1988.

6) 喜多大三、中嶋敏勝：自発運動活性を指標としたニコチンの作用の耐性と逆耐性、*日薬理誌*、94: 103-112, 1989.

7) Kita T., Okamoto M. and Nakashima T., Nicotine-induced sensitization to ambulatory stimulant effect produced by daily administration into the ventral tegmental area and the nucleus accumbens in rats. *Life Sci.*, 50: 583-590, 1992.

8) 小山 司：覚醒剤精神病と精神分裂病、*精神医学*、32: 629-635, 1990.

9) Parker L.A. and Joshi A., Naloxone-precipitated morphine withdrawal induced place aversions: Effect of naloxone at 24 hours postmorphine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 61: 331-333, 1998.

10) Wiley J.N. and Downs D.A.: Naloxone-precipitated jumping in mice pretreated with acute injections of opioids. *Life Sci.*, 25: 797-802, 1979.

11) Yoshida T., Gomita Y. and Oishi R.: Effect of cigarette smoke on pharmacokinetics of oral, intracranial or intravenous indomethacin in rats. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.*, 344: 500-504, 1991.

12) Zarrindast M.-R. and Farzin D.: Nicotine attenuates naloxone-induced jumping behavior in morphine-dependent mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 298: 1-6, 1996.

Effect of daily administration of nicotine on locomotor activity in rats

