

断眠ストレス負荷時のニコチンが 条件付け場所嗜好性に与える影響

山川 亜寿花・山本 隆宣

要 約

本実験は、条件付け場所嗜好性試験（conditioned place preference ; CPP）に断眠ストレス負荷が及ぼす影響を調べたものである。環境の異なる2つのボックスを用意し、事前にラットのボックスに対する滞在時間からラットの嗜好性を測った。そのうち、滞在時間の短かったボックスでは条件付けを行うためにニコチンを投与し、また滞在時間の長かったボックスでは生理食塩水を投与する事を8日間繰り返した。その結果、ニコチンを投与して条件付けを行ったグループはボックスへの滞在時間が上昇した。しかし、断眠ストレスを伴う場合は、条件付けをおこなったボックスにおける滞在時間に上昇がみられなかった。

ニコチンはニコチン性アセチルコリン受容体に作用し、最終的には報酬系ドーパミン神経に働きかけ脳内のドーパミンを上昇させるという知見を考え合わせると、ニコチン依存は脳内のドーパミン機能を亢進と関係していることが推察される。さらに断眠ストレスによって嗜好性の低いボックスに対する滞在時間が上昇しなかったのはこれらのニコチンの作用に断眠ストレスが影響を及ぼしたことが伺える。

序 論

条件付け場所嗜好性試験（conditioned place preference ; CPP）は依存性薬物の評価法であり、薬物の報酬効果を簡便に評価できる方法として、依存性形成の検討で広く使われている。主な方法としては環境の異なる2つの部屋を用意し、薬物の条件付けを行うものであり、事前にラットに2つの部屋を自由に探索させる（preテスト）。そのうち滞在時間の短い方（条件付けボックス）では薬物を繰り返し投与し、滞在時間の長い方（嗜好性ボックス）では生理食塩水を繰り返し投与すると、薬物を投与せずに自由探索させた時（postテスト）に条件付けボックスへの滞在時間があがるというものである^{1) 2)}。

本実験ではCPPで使用する薬物としてニコチンを使用した。ニコチンはタバコに含まれてい

ることからよく知られているが、タバコが合法的に取り扱われていることから依存を起こす薬物として入手しやすく、タバコをやめたいと思ってもやめられないニコチン依存に陥っている人も多い。ニコチンが依存を引き起こすメカニズムはまだ完璧には分かっていないが、ほとんどの依存性薬物の形成過程には本質的な差異はないとされており、最終的には報酬系を司る脳内のドーパミンを増加させることで依存をひきおこすとされている³⁾。ニコチン依存の形成過程の最初の段階として、ニコチンはアセチルコリンのアゴニストであることから、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に作用する。nAChRは主に中枢神経および末梢に存在し、中脳の腹側被蓋野、側座核などの nAChR にニコチンが結合する。その後、グルタミン酸の作用を介してドーパミンの放出が促進される⁴⁾。図1に示すように、ドーパミン神経は中脳や黒質・腹側被蓋野に細胞体を有し、その軸索は尾状核、一部の前頭前野、扁桃体、線条体、側座核に投射している^{5) 6) 7)}。ドーパミン神経は報酬系と呼ばれ多幸福感や満足感を発現させ、正の強化効果をひき起こすとされており、なかでも中脳辺縁系のドーパミン神経が重要な役わりを果たしている³⁾。このようにニコチンの働きによりドーパミンの機能が亢進されることによって依存が形成されるとされている。

禁煙のための手段として、タバコ以外から少量のニコチンを摂取する方法や禁煙治療薬の使用などがあげられる。ブプロピオン (bupropion) は禁煙治療薬として使用されているが、米国では抗うつ薬として使用されており、脳内でノルアドレナリン及びドーパミンの機能を亢進させるものである⁴⁾。さらに、うつ病の治療の一つに断眠療法という治療法があり⁸⁾、断眠によっても脳内のドーパミンに上昇が見られるとされる⁹⁾ ことから、断眠ストレス負荷が、ニコチン依存の形成に影響を及ぼすと考えた。ラットにニコチン依存の形成を及ぼす方法としてCPPを行った。断眠ストレスに、禁煙治療薬と同じような効果があるならば断眠ストレスを及ぼしたラットはCPPにおいてニコチン依存が形成されないと考えられる。

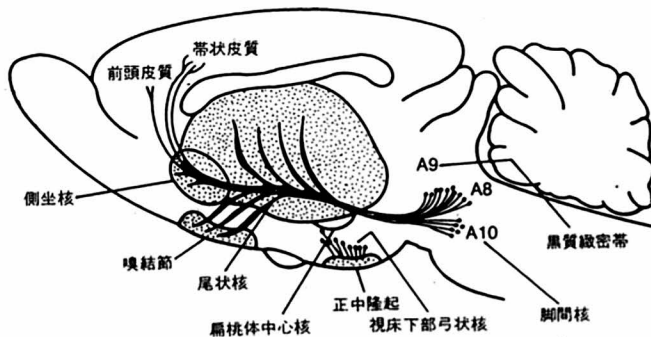


図1. ラット脳の主要ドーパミン経路。
腹側被蓋野 (A10付近) から側坐核を経て前頭皮質へ至る投射経路が報酬系では重要とされている。

方 法

飼育環境

被験体ラットは9週齢の雌Sprague-Dawleyラットを10匹用意した。統制群・断眠群の2つの群へ5匹ずつ振り分け、それぞれ群別に2匹と3匹にわけた2つのゲージで飼育した。12時間の明暗周期下（明時間08：00～20：00，暗時間20：00～08：00），室温23℃± 2℃で水道水と日本SLCの飼料（ラボMRストック）を自由に摂取できる環境で飼育した。

CPP装置

2ボックス（30（w）×60（l）×30（h）cm）になっており、一方のボックスが黒色で、他方のボックスが白色になっている。白黒の表裏になった仕切りを真ん中に入れることで白のボックスと、黒のボックスに分けることが出来る。中央の仕切りはアクリル板を使用し、ボックスには厚さ9mmのベニヤ板を使用した。また、ラットが直接上に乗るボックスの底にのみ、厚さ0.5mmのアクリル板を貼り付けた（図2）。

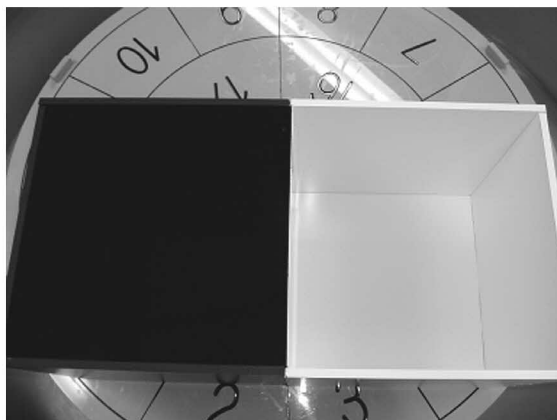


図2. CPP装置

薬物

薬物投与はすべて腹腔内投与により行った。ニコチンはSigma-aldrichの(-)-Nicotine hydrogen tartrate saltを使用した。生理食塩水・ニコチン共に投与量は1 mL/kgとし、ニコチンの濃度は0.5mg/kgとした¹⁰⁾。

CPP装置による行動観察

1日目に、仕切りを外した状態のCPP装置に15分間ラットをいれ、2つのボックスを自由に行き来させ白ボックスでの滞在時間を計り、これをpre値とした。

2日目からは、条件付けの期間として、ニコチンまたは生理食塩水を投与した後、仕切りをした状態のCPP装置にラットを40分間閉じ込めた。ニコチンを投与したラットは白ボックスに閉じ込め、生理食塩水を投与したラットは黒ボックスに閉じ込めた。ニコチンを投与する日と生理食塩水を投与する日の2日間を1セッションとし、4セッション（8日間）行った。ニコチンと生理食塩水の投与は1日毎の交互に行い、どちらを先に打つかについてはカウンターバランスをとった。最終日に、1日目と同じく仕切りを外した状態のCPP装置に15分間ラットをいれ、2つのボックスを自由に行き来させた。また、最終日の白ボックスの滞在時間をpost値とした。1日目と最終日にラットをCPP装置に入れる際に、ラットを白、黒ボックスのそれぞれの端に壁の方を向かせて入れ、白と黒のどちらのボックスから開始するかについてはカウンターバランスをとった。

断眠疲労モデル作成

CPP装置での行動観察における条件付けの8日目の18:30からpostテストを行う日の11:30まで17時間の断眠を行った。断眠群はゲージに水深1.5cmの水を張り、ラットが寝ると顔が水に浸かってしまう様にした。コントロール群はゲージの片側の下に台をいれゲージを傾いた状態（傾斜5度）にし、水を入れた。台を入れた方の端に約10cmほどの、水の無いスペースを作った。水深は最も深くなる場所を1.5cmとし、ゲージは（22（w）×38（l）×18（h）cm）で底の平らなものを使用した（図3）。



図3. 断眠操作時のコントロール群ゲージ

結 果

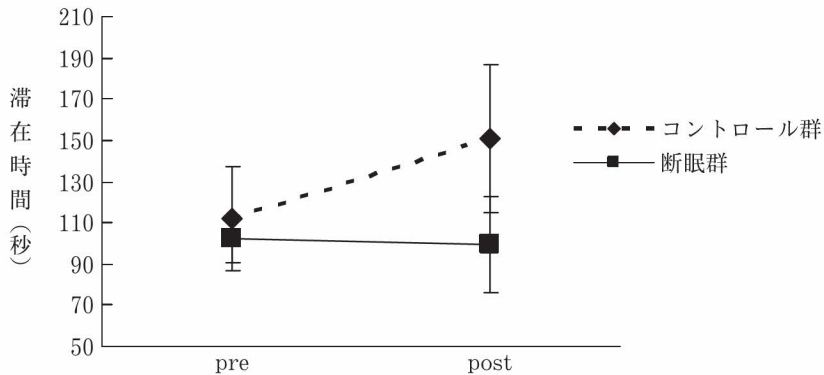


図4. 条件付けボックス滞在時間

ニコチンを投与して条件付けを行ったグループはボックスへの滞在時間が上昇した。このことを確認したうえで次に断眠ストレスを加えた。そしてコントロール群と断眠群の間、およびpre-post間に平均値の差がみられるかどうかを検討するため、二元配置分散分析を用いた統計解析を行った。断眠群とコントロール群の間は被験者間要因、pre-post間は被験者内要因の統計処理を行った。その結果、コントロール群と断眠群間の要因に主効果はみられなかった ($F(1.8) = 1.009$, $MSe = 4633.569$, *n.s.*)。また、pre-post間の要因にも主効果はみられなかった ($F(1.8) = 0.907$, $MSe = 1849.330$, *n.s.*)。

考 察

本実験は、ニコチンを使用した条件付け場所嗜好性試験 (conditioned place preference; CPP) を用いて、断眠ストレスがCPPに及ぼす影響を調べたものである。ニコチンの作用により、脳内のドーパミンが上昇することによってニコチン依存が形成されることが報告されている¹⁾。ところが断眠ストレス負荷を及ぼしたラットはニコチン依存が形成されないという結果を得た。禁煙治療薬では脳内のドーパミンを上昇させるが、断眠によっても同様に脳内のドーパミンが上昇するならばニコチン依存の形成は困難になるものと考えられた。

図4に示すように、pre-post間のコントロール群、postの断眠-コントロール群間においても有意な差はみられなかった。特にpre-post間のコントロール群において有意差がみられないことは、そもそもCPPにおいてニコチン依存の学習が形成されなかった可能性が示唆される。しかし、断眠操作を行わないCPPでは、pre-post間に差がみられており、コントロール群の作成の際に他の要因が影響したことが考えられる。本実験では、純粋な断眠の作用だけを見るた

めに、断眠群を作成する際、水を使用するので、コントロールのゲージにも水を加えCPPを行った。ドーパミンの上昇はストレスでも起こるとされるが¹¹⁾¹²⁾、ゲージへ水を加えたことがストレス刺激となりコントロール群のドーパミンニューロンに影響を及ぼしたことが考えられる。

今回の結果から、断眠などの行動により、ニコチンに対する依存を軽減させるかもしれないことが示唆された。しかし、本実験では、実際のドーパミンの動きをみるための生理指標をとっておらず、行動のみを観測している。そのため、ドーパミンの働きについては想像の域を出ることができなかった。今後の実験の課題としては、純粋な断眠ストレス負荷だけを見ることのできるさらなる工夫と、ドーパミンのアゴニストを用いるなどの研究を行う必要がある。

謝 辞

本論文を完成させるにあたり、多くのアドバイスをいただいた畦地裕統さん、福本敏宏さん、小澤弘希さん、神経生理学研究室の下瀬寛統さん、田宮早紀さん、西村直樹さん、共同研究室の山本真規子さんに感謝いたします。

引用文献

- 1) 船田正彦 2005 条件付け場所嗜好性試験による薬物報酬効果の評価：基礎と応用 日薬理誌 126 10-16
- 2) 鈴木勉 1999 薬物の報酬効果測定法—CPP (条件付け場所嗜好性) 試験について 日薬理誌 114 365-371
- 3) 松下正明 1999 薬物・アルコール関連障害 P351-355 中山書店
- 4) 宮里勝政 2001 ニコチン依存ならびに報酬効果に関する新展開 日本薬理学雑誌 117 27-34
- 5) Neil R. Carlson 泰羅雅登・中村克樹 (訳) 2008 第2版カールソン神経科学テキスト 一脳と行動— P121-122 丸善
- 6) Cooper, J.R., Bloom, F.E. & Roth, R.H. (1982). *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, 4th edn. Oxford University Press.
- 7) J.A.グレイ 八木欽治 (訳) 1991 ストレスと脳 P349 朝倉書店
- 8) 朝倉邦造 1994 睡眠学ハンドブック P137 朝倉書店
- 9) Brock JW, Hamdi A, Ross K, Payne S, Prasad C 1995 REM sleep deprivation alters dopamine D2 receptor binding in the frontal cortex.
- 10) Jennifer M. Brielmaier, Craig G. McDonald, Robert F. Smith 2008 Nicotine place preference in a biased conditioned place preference design *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 89 94-100
- 11) 吉田眞治 2000 からだの中からストレスをみる P89-90 学会出版センター
- 12) 上田裕・岡正樹・加藤裕彦・佐久間泰司・田村仁孝・古玉克平・森尚美・吉川洋史 1999 顎口腔領域の疼痛刺激が前頭皮質ドーパミン代謝に及ぼす影響 歯科医学 197-200