Morphine 混入飼料適用によるマウスの自発運動変化

鈴木 勉, 吉井 利郎, 柳浦 才三

星薬科大学薬理学教室*

河 合 貞 子

星薬科大学心理学教室*

(昭和57年12月6日〔特〕)

要約: 薬物混入飼料 (DAF) 法により morphine を適用したマウスに, morphine の反復投与を行って, morphine の適用条件と morphine の反復投与による自発運動促進作用変化について検討した. 実験には ICR 系マウスを用い, 自発運動の測定は tilting 法により行った. 普通飼料を与えたマウスでは, morphine 10 mg/kg を3~4日に1度の割合で反復皮下投与すると, 自発運動促進作用の増強すなわち逆耐性現象が観察された. これに対して, morphine 混入飼料 1 mg/g food を適用した条件で, 同様に morphine を反復皮下投与しても, 自発運動促進作用の増強は観察されなかった. したがって, DAF 法による適用のように, 少量であっても常に morphine に動物が暴露されている適用条件では, この自発運動促進作用の増強 (逆耐性) は生じないものと考えられる. さらに, morphine 混入飼料を 1~3 mg/g food に漸増適用する条件では同様に morphine の反復投与を行っても自発運動促進作用の増強はみられず, むしろ自発運動促進作用の抑制が観察された. また, morphine 混入飼料を漸増適用したマウスに morphine を単回皮下投与した場合においても, 同様に自発運動促進作用の抑制が観察された. この morphine 混入飼料の漸増適用は, マウスに強い身体依存を形成する適用方法である. 一般に, morphine の中枢抑制作用には耐性が生ずるが, 中枢興奮作用に対しては耐性が起こらず, 逆耐性が生じると報告されている. したがって, DAF 法による morphine の漸増適用のように, morphine をマウスに連続的に適用し, 身体依存を形成させるような適用条件下では, morphine の中枢興奮作用である自発運動促進作用にも, 耐性が生じることが示唆された.

緒 言

morphine には, 鎮痛や呼吸抑制などの中枢抑制作用, および, 自発運動促進などの中枢興奮作用の, 2つの作用が知られている^{1,2)}. morphine の慢性適用によってこれらの作用のうち, 抑制作用に対しては耐性を生じるが, 興奮作用に対しては耐性はみられず, むしろ興奮作用の増強, すなわち逆耐性が生じることが報告されている^{2,3)}. この逆耐性現象は, morphine の他にも methamphetamine⁴⁾ や cocaine⁵⁾ などの中枢興奮薬で認められている. また, この現象の出現には, 薬物の投与条件および環境因子が大きく影響すると考えられている⁴⁾.

一方, Yanaura ら⁶⁾ は薬物混入飼料 (DAF) 法を開発し, 小動物における薬物依存について報告している⁷⁾. この DAF 法は, 動物に薬物を常に暴露できる方法であり, マウスに morphine を適用した場合, 強い身体依存を獲得できる方法である⁸⁾. しかし, DAF 法を用いた研究は依存性が中心であり, DAF 法による薬物慢性適用時の種々の効果については, ほとんど検討されていない. これに対し, Shuster ら⁹⁾ は morphine を注射により慢性処置したマウスにおいて, morphine の自発運動促進作用の増強を報告している. また, Babbini and Davis¹⁰⁾ もラットで同様の報告を行っている. そこで, DAF 法により morphine を適用したマウスに, morphine の反復投与を行って自発運動を測定し, morphine の適用条件と morphine の自発運動促進作用の変化, 特に逆耐性の出現について検討を行った.

実験方法および材料

実験動物

実験には ICR 系雄性マウス（日本チャールス・リバー）を5週令で購入し、1週間の予備飼育の後、1群16~20匹として使用した。

使用薬物

morphine hydrochloride（三共）を使用した。

DAF 法では morphine を粉末飼料（日本クレア；CA-1）に、1、2または3 mg/g food の濃度に混入して、マウス用粉末給餌器（日本チャールス・リバー）により適用した。皮下注射では、morphine を生理食塩液に溶解し、マウス 10 g あたり 0.1 ml の割合で投与した。

飼育条件

マウスは透明アクリル製ケージ（143×293×148 mm）に3~4匹ずつ入れ、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の恒温恒湿室で飼育した。飼料および飲料水は自由摂取とし、明暗条件は8:30点燈、20:30消燈の12時間サイクルとした。

自発運動量の測定

平林ら¹⁰⁾の開発した自発運動測定装置（小原医科産業；アンビュロメーター）を使用した。すなわち、マウスを洗面器型ケージに入れ、マウスの動きにともなうケージの傾きをカウントし、運動量として測定した。

測定操作は、まず morphine 投与前30分にマウスを1匹ずつ測定装置に入れ、新しい環境に適應させた後、morphine 10 mg/kg を皮下投与して、自発運動量を10分間隔で120分間連続的に記録した。また、morphine の反復投与はすべて3~4日に1度、つまり1週間に2回の間隔で行った。なお、自発運動の測定は、すべて13:00~14:00の間に開始した。

実験1. morphine 混入飼料適用による影響

morphine 10 mg/kg s.c. を1回投与して自発運動を測定したマウスに、morphine 混入飼料 1 mg/g food

Fig. 1 Experimental schedule of morphine administration. [Diagonal lines]: morphine-admixed food (1 mg/g food), [Horizontal lines]: morphine-admixed food (2 mg/g food), [Solid black]: morphine-admixed food (3 mg/g food), [White]: normal food, ★: morphine injection (10 mg/kg s.c.). Morphine injection was repeated at 3-4 day intervals in the A, B and C groups.

を適用し、再び morphine を 6 回反復投与（3 週間）して、それぞれ自発運動量を測定した。その後、morphine 混入飼料を普通飼料に換えて、さらに 5 回 morphine を反復投与し自発運動量を測定した。また、対照として、普通飼料群に morphine を 7 回反復投与して自発運動量を測定し、その後、morphine 混入飼料 1 mg/g food に換え、さらに 5 回自発運動量を測定した。

なお、実験スケジュールを Fig. 1 に示した。

実験 2. morphine 混入飼料の漸増適用による影響

morphine 10 mg/kg s.c. を 1 回投与して自発運動を測定した後、morphine 混入飼料 1, 2 および 3 mg/g food を Fig. 1-C に示すように漸増適用し、1 mg/g food 適用時に 1 回、2 mg/g food 適用時に 1 回、3 mg/g food 適用時に 2 回、合計 5 回 morphine を反復投与して、自発運動量を測定した。

また、別に morphine 混入飼料 1, 2 および 3 mg/g food をそれぞれ 3 日間ずつ 9 日間漸増適用した動物に、morphine 10 mg/kg s.c. を単回投与して、無処置群に単回投与したものと自発運動量を比較検討した (Fig. 1-D and E)。

また、自発運動量の有意差検定は、morphine 投与後 120 分間の値について、 t 検定を用いて行った。

実験結果

1. morphine 混入飼料適用による影響

普通飼料群では、morphine の反復投与により、自発運動促進作用の増強がみられた (Fig. 2)。また、morphine 投与後 120 分間における total の自発運動量についても、初回の morphine 投与時に比べ、4 回目の反復

Fig. 2 Ambulation-increasing patterns obtained by repeated s.c. administration of 10 mg/kg morphine at 3-4 day intervals in mice treated with morphine-admixed food as expressed in Fig. 1, the A-group. The figures near each curve denote ordinal numbers of administration. Each point represents the mean counts for a 10 min period of 16 determinations.

投与以後, 有意な自発運動量の増大を示した (Fig. 5). これに対して, morphine 混入飼料 1 mg/g food 適用群では, 同様に morphine の反復投与を行っても, 自発運動促進作用の有意な増強はみられなかった (Figs. 3 and 5).

また, 自発運動促進作用の増強が観察された普通飼料群に morphine 混入飼料を適用しても, この自発運動促進作用の増強は維持された (Fig. 2). しかし, 自発運動促進作用の消失が速くなっているため, 120 分間の total の自発運動量としては, 減少傾向を示した (Fig. 5). これに対し, 自発運動促進作用の増強がみられなかった morphine 混入飼料適用群では, 普通飼料に換え morphine の反復投与で行うと, 自発運動促進作用の増強が観察された (Figs. 3 and 5).

Fig. 3 Ambulation-increasing patterns obtained by repeated s.c. administration of 10 mg/kg morphine at 3-4 day intervals in mice treated with morphine-admixed food as expressed in Fig. 2, the B-group. The figures near each curve denote ordinal numbers of administration. Each point represents the mean counts for a 10 min period of 16 determinations.

2. morphine 混入飼料の漸増適用による影響

morphine 混入飼料を 1~3 mg/g food と漸増適用した場合, morphine の反復投与により自発運動促進作用の明らかな抑制がみられ, morphine 投与後120分間の total 自発運動量についても, morphine 混入飼料 2 mg/g food 適用時以後では, 初回の morphine 投与時に比べ有意な減少を示した (Figs. 4 and 5).

また, morphine 混入飼料を漸増適用した動物に morphine を単回投与したもの比べ, 著しい自発運動促進作用の抑制が観察された (Fig. 6). morphine 投与後120分間の total の自発運動量についても, 無処置群に morphine を単回投与した動物では $2,690 \pm 203$ counts であったのに対し, morphine 混入飼料を漸増適用した動物に morphine を単回投与した場合には, 203 ± 41 counts と有意に ($P < 0.01$) 低い値を示した.

Fig. 4 Ambulation-increasing patterns obtained by repeated s.c. administration of 10 mg/kg morphine at 3-4 day intervals in mice treated with morphine-admixed food as expressed in Fig. 1, the C-group. The figure near each curve denote ordinal numbers of administration. Each point represents the mean counts for a 10 min period of 20 determinations.

Fig. 5 Comparisons of the total activity for 120 min among the repeated s.c. administration of 10 mg/kg morphine at 3-4 day intervals under the three conditions as expressed in Fig. 1, groups A, B and C. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 16-20 animals. +: significantly different from the activity of the first administration ($P < 0.05$). ++: significantly different from the activity of the first administration ($P < 0.01$).

Fig. 6 Ambulation-increasing patterns after s.c. administration of 10 mg/kg morphine following the pretreatment with morphine-admixed food or normal food as expressed in Fig. 1, D- and E-groups. Each point represents the mean counts $\pm$ S.E. for a 10 min period of 20 determinations.

考 察

morphine 反復投与による自発運動促進作用に対する, morphine 混入適用の影響について検討した.

morphine や methamphetamine, cocaine などの薬物は, 反復投与により自発運動促進作用の増強, すなわち行動における逆耐性現象が知られている³⁻⁵⁾. この行動の逆耐性の出現には, 薬物の反復投与時の投与量, 投与間隔が大きく影響すると報告されており⁴⁾, 本実験においてマウスに morphine 10 mg/kg を1週間に2回の割合で反復投与した場合, 明らかな自発運動促進作用の増強が観察された. この結果は, 田所ら¹¹⁾の1週間隔で morphine を反復投与した報告と一致するものである.

一方, DAF 法による morphine の適用は, マウスに morphine を常に暴露できる方法であり, morphine の血漿中濃度はマウスの morphine 混入飼料の摂取パターンに対応した日内変化を示すが, 常に一定レベル以上を維持している⁸⁾. この morphine 混入飼料 1 mg/g food を適用したマウスでは, 適用中同時に morphine の反復投与を行っても逆耐性が出現しなかったが, この 1 mg/g food の用量は少量であり, マウスに適用した後休薬しても, 明らかな退薬症候は出現しない用量である. したがって, DAF 法による適用のように少量であっても morphine が常にマウスの体内にある条件下では, この逆耐性は生じないものと考えられる.

これに対し, morphine の反復投与によって自発運動促進作用の増強がみられたマウスに, morphine 混入飼料を適用しても, morphine の反復投与による自発運動促進作用のピーク値に軽減はみられず, この逆耐性は維持されている. しかし, 逆耐性が観察されなかった morphine 混入飼料適用群では, 普通飼料に換え morphine の反復投与を再び行うと逆耐性が発現する. つまり, この逆耐性の形成には, morphine 反復投与時に一定の morphine 休止期間が必要であると思われる. しかし, 一度形成された逆耐性は, この休止期間がない状態でも維持されており, この逆耐性は不可逆的であるとも考えられる. この行動における逆耐性の不可逆性については, Babbini ら¹²⁾がラットで, morphine 反復投与後, この逆耐性は8カ月にわたって消失が認められず, 不可逆的であると報告しており, この報告は上記の結果と一致するものである.

また, 逆耐性を形成したマウスに morphine 混入飼料を適用して morphine の反復投与を行った場合, 自発運動のピークは変化していないが, 消失が速くなっている. 従来, morphine の代謝速度は, 慢性投与を行っ

た場合にも変化しないと報告されている¹³⁾。しかし、自発運動促進作用の消失が速くなっていることより、DAF 法による morphine の慢性適用時には、morphine の感受性変化のほかに、morphine の代謝速度が速くなっている可能性も考えられる。

さらに、morphine 混入飼料を漸増適用し、同様に morphine の反復投与を行うと、自発運動促進作用の抑制、すなわち、morphine の自発運動に対する耐性が観察された。この morphine 混入飼料の漸増適用は、マウスに強い身体依存を形成する適用方法である⁸⁾。Seevers and Deneau²⁾ は morphine の作用のうち、中枢抑制作用に対しては耐性が生じるが、中枢興奮作用には耐性がおこらないと報告している。一方、morphine の慢性投与による自発運動変化の報告の多くは、1日1回またはそれ以上の間隔で反復投与を行っているものが多く^{3,9,11)}、身体依存を形成するようなスケジュールで morphine を反復投与した報告は非常に少ない。つまり、身体依存を形成するような morphine の連続的な適用スケジュールでは、morphine の反復投与により、morphine の中枢興奮作用にも耐性が生じるものと考えられる。また、morphine 混入飼料を漸増適用したマウスに morphine を単回投与した場合においても、同様に自発運動促進作用の抑制が観察され (Fig. 6)、morphine 混入飼料の適用だけでも、自発運動に対する耐性が獲得されている。また、morphine 混入飼料 1 mg/g food 適用群において、morphine 反復投与 2 回目、および 3 回目に自発運動量の有意な減少が観察されており (Fig. 5)、morphine 混入飼料 1 mg/g food 適用時においても耐性が生じていることが考えられる。その後、morphine の反復投与を続けると、4 回目には、すでに有意差がなくなっているのは、morphine の反復投与によって、逆耐性が生じたためとも考えられる。すなわち、morphine 混入飼料 1 mg/g food 適用により耐性が生じ、この自発運動量に対して、morphine の反復投与により逆耐性が生じて、結果的には自発運動促進作用に変化がみられないものと考えられる。

また、morphine の自発運動に対する逆耐性の発現機序として、Kuschinsky and Hornykiewicz¹⁴⁾ はラットおよびマウスにおいて、dopamine 神経系での dopamine の turnover および代謝変化を報告している。また、Babbini ら¹⁵⁾ もラットでこれを支持する報告を行っている。一方、morphine 依存動物では、このような dopamine 神経系での変化に耐性が生じるとの報告がある¹⁶⁾。したがって、DAF 法による持続的な morphine の適用条件では、この dopamine 神経系での変化に耐性が生じ、そのために逆耐性が生じないことも考えられる。しかし、マウスでの morphine の自発運動促進作用には、dopamine 神経系と同時に norepinephrine 神経系も強く関与しているとの報告が多く^{14,17)}、この逆耐性の形成には、dopamine 神経系以外の他の神経系の関与も強いものと思われる。

以上、DAF 法による morphine 適用のように、常に morphine が動物の体内にある状態では、morphine の自発運動促進作用に対する逆耐性はみられず、また、morphine 混入飼料の用量によっては、morphine の中枢興奮作用である自発運動促進作用にも耐性が生じることが示唆された。

文 献

- 1) SEEVERS, M. H. AND DENEAU, G. A.: *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **140**, 514 (1962)
- 2) SEEVERS, M. H. AND DENEAU, G. A.: *Physiological Pharmacology*, Edited by ROOT, W. S. AND HOFMAN, E. G., Vol. 1, p. 565, Academic Press, New York (1963)
- 3) RABBINI, M. AND DAVIS, W. M.: *Br. J. Pharmacol.* **46**, 213 (1972)
- 4) HIRABAYASHI, M. AND ALAM, M. R.: *Pharmacol. Biochem. Behav.* **15**, 925 (1981)
- 5) TATUM, A. L. AND SEEVERS, M. H.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **36**, 401 (1929)
- 6) YANAURA, S., TAGASHIRA, E. AND SUZUKI, T.: *Japan. J. Pharmacol.* **25**, 453 (1975)
- 7) SUZUKI, T., FUKUMORI, R., YOSHII, T., YANAURA, S., SATOH, T. AND KITAGAWA, H.: *Psychopharmacology* **71**, 91 (1980)
- 8) SUZUKI, T., YOSHII, T. AND YANAURA, S.: *J. Pharmacobiodyn.* **5**, s-48 (1982)
- 9) SHUSTER, L., WEBSTER, G. W. AND YU, G.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **192**, 64 (1975)
- 10) 平林 牧三, 飯塚 正博, 田所作太郎: 日薬理誌 **74**, 629 (1978)
- 11) 田所作太郎, 小川 治克, 柴崎 道子, 大橋 京一, 代田美智子, 平林 牧三, 飯塚 正博: 日薬理誌 **71**, 68P (1975)
- 12) RABBINI, M., GAIARDI, M. AND BARTOLETTI, M.: *Neuropharmacology* **14**, 611 (1975)
- 13) WOODS, L. A.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **112**, 158 (1954)
- 14) KUSCHINSKY, K. AND HORNYKIEWICZ, O.: *Eur. J. Pharmacol.* **26**, 41 (1974)
- 15) BABBINI, M., GAIARDI, M. AND BARTOLETTI, M.: *Neuropharmacology* **17**, 979 (1978)
- 16) PURI, S. K. AND LAL, H.: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **282**, 155 (1974)
- 17) SLATER, P. AND BLUNDELL, C.: *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **312**, 219 (1980)

Abstract—Tsutomu SUZUKI, Toshio YOSHII, Teiko KAWAI* and Saizo YANAURA (Department of Pharmacology and *Department of Psychology, School of Pharmacy, Hoshi University, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan). Motility effects of morphine in morphine-tolerant mice by the DAF method. *Folia pharmacol. japon.* **81**, 227~234 (1983)

Effects of repeated administration of morphine on ambulatory activity were studied in mice treated with morphine-admixed food. The ambulatory activity was determined by the tilting cage method. Morphine injection (10 mg/kg s.c.) was repeated at 3-4 day intervals. The ambulatory activity was enhanced progressively when morphine was repeatedly given to mice. However, the enhancing effect was not observed in mice treated with morphine-admixed food (1 mg/g food). These results suggested that the reverse tolerance to morphine did not develop under the condition of exposure to morphine by DAF (drug-admixed food) method. In case of treatment with morphine-admixed food of increasing concentration (1, 2 and 3 mg/g food), the ambulatory activity of morphine was decreased. According to the studies done so far, tolerance development to the stimulant effects was not observed. This study demonstrates that the tolerance develops to the stimulant effects of morphine on the schedule of treatment with morphine of increasing doses by the DAF method.