マウスの自発運動に及ぼすカフェインの影響

夏野 義啓・稲田 七郎

財団法人 競走馬理化学研究所

(昭和47年3月8日受付)

著者らは、doping 効果をもつといわれている薬物が、実際に馬の運動能力にどのような影響を与えるかについて、実験を行なってきた^{4,5)}。しかし、野外で馬を用いて行なうこの種の実験には、多くの制約が付きまとい、十分な知見を得難い場合も多い。GENOVESE ら⁶⁾は、アンフェタミン誘導体の doping 効果に関する薬理学的実験の中で、doping に用いられる薬物の最も重要な特徴は、その薬物がマウス・ラット等の小動物で、調整のとれた自発運動を増加する性質をもつことであると述べている。勿論、ある薬物が小動物の自発運動に及ぼす影響と、スポーツや競馬においてその薬物が表わす doping 効果とが、常に強い相関を示すとは限らないとしても、それを推測したり、あるいは多数の薬物の doping 効果を分類・格付けする際に、自発運動に関する薬理学的

な知見は、補助的に役立つであろう。

著者らは、このような観点から、競走馬の doping に用いられる薬物について、自発運動に関する研究を意図した。このたび、doping 検査における陽性率の極めて高いカフェインが、マウスの自発運動に及ぼす影響を、主としてその量的な面から観察し、同時に、その質的な面の分析に役立つと考えられる機器を考案し、試用したので、ここにその概要を報告する。

実験材料および方法

実験動物: ddY-F (船橋農場産) 8~9 週令雄マウスを用いた。すなわち生後4週令で購入し、飼育ケージに10匹ずつ収容し、成熟週令¹¹⁾の8週令まで自由給餌(日本クレア CE-2 使用)、給水下で飼育した。なお、飼育室は時間点灯(7:00~

Fig. 1. Block Diagram of the Electronic Activity Level Counter Used

Original record

Remarks: The pen of the magnet recorder advances upward by 1 mm per count. The activity per minute is recorded as height. Measure cage: 10 by 10 by 10 cm in size, made of stainless steel wire mesh.

Fig. 2. Block Diagram of Load Cell for the Strain Gauge System

Original record

Remarks: A 250 g tension type load cell was used. Specifications are as follows.

Rated load ... 250 g
 Overload ... 150 %
 Output strain ... $1530 \times 10^{-6}/250 \text{ g}$
 Output voltage ... $0.765 \text{ mV/V}/250 \text{ g}$
 Linearity ... $1 \pm 0.5 \%$ full scale
 Hysteresis ... $1 \pm 0.3 \%$ full scale
 Input-output resistance ... $120 \Omega \pm 1 \%$
 Insulation resistance ... over $1000 \text{ M}\Omega$

Measure cage: 21 cm in diameter and 31.5 cm high, made of transparent plastic.

19:00) とし、室温は約 23°C とした。8週令において、体重 $20 \sim 31 \text{ g}$ (8週令の同系雄マウス 724 匹から求めた体重の 80% 変異幅に相当) のマウスから、必要数を無作為的に選抜し、単独飼育に切り替えた。

投与量の基準とするための LD_{50} の算出には、8週令マウス 309 匹 (用量の範囲を予測するための盲実験に 199 匹、本実験に 110 匹)、自発運動の実験では、同一個体を 8 および 9 週令の 2 回に使用して 55 匹 (電子管式動物自発運動計量装置による実験に 50 匹、歪測定装置の試用実験に 5 匹)、計 364 匹を使用した。

自発運動記録装置: 夏目製作所製電子管式動物自発運動計量装置を用いた。また歪測定装置を

考案し、試用した。

電子管式動物自発運動計量装置は、単独マウスの自発運動を、ある単位時間内のカウント数の総和として、棒グラフ状に記録するものである¹⁴⁾ (Fig. 1)。本実験では単位時間を 1 分間にとり、洗顔運動、身づくろいはカウントしない程度に感度を低くして使用した。すなわち全実験を通じて、bias は $150 \pm 20 \mu\text{A}$ 、標準値は $15 \sim 17 \pm 2 \text{ counts/min.}$ とした。

前述の装置は、単位時間内の自発運動を量的な積算値として記録するのみであって、その質的な変化は追跡できない。また測定ケージが 10 cm 四方の小型であるため、マウスの運動を妨げる場合があるし、測定ケージの感度調整用の校正装置に

良いものがないなどの欠点を有している。これらの欠点を多少なりとも補い、かつ自発運動に関する情報をふやす意味も含めて、自発運動を瞬時値として記録する歪測定装置を新しく試作した (Fig. 2)。

この装置は、総合計装製 TR 2002 K 型 250 g 荷重計を本体とし、直径 21 cm、高さ 30 cm、重量 300 g の硬質ビニール製の円筒型測定ケージを、荷重計の中心につり下げて使用した。なお、water damper をケージ下方に取り付けて、横振れおよび残振を最大限に防止した。この荷重計に組み込まれたストレインゲージを通して、単独マウスの自発運動による荷重変化を抵抗変換し、三栄測器製 6L4 型歪記録増幅器および 142-8 型ポリグラフで増幅し、8S13-5-A 型レクチグラフによって記録した。較正は数種類の上皿天秤用分銅を用いて行なった。

薬物：あらかじめカフェイン含量および安息香酸ナトリウム含量を、日本薬局方に規定された方法¹⁵⁾に従って定量した既知濃度の局方アンナカ注射液 (表示量 20%, 武田薬工) を使用した。別に供試注射液と同濃度の局方安息香酸ナトリウムを含む水溶液を作り、対照とした。また、生理食塩液を reference control として使用した。投与は、馬におけるカフェインの doping 効果に関する実験⁵⁾の場合と同様に、すべて皮下注射 (背部) によった。

投与量は、8週令単独マウスにおける LD₅₀ を基準として設定した。このため 1 用量について 10 匹ずつの単独マウス (8週令) を使用し、カフェイン実量 227~336 mg/kg の範囲で、用量比を 1.04 にとって、11段階の投与を行ない、FINNEY の図解法¹⁹⁾によって LD₅₀ を算出した (Fig. 3)。なお、生死の判定は 72 時間を限度とした。

このようにして求めたカフェインの LD₅₀ は 257 mg/kg であった。そこで、電子管式動物自発運動計量装置を用いた実験では、1 mg/kg (LD₅₀ の 1/256 量) から 129 mg/kg (1/2 量) までは、順次倍量ずつの 8 種と、193 mg/kg (3/4 量) の計 9 種の投与量とした。各投与量について 5 匹ずつ使用し、同一マウスにおいて、8週令で対照、9週令でカフェイン投与とした。なお reference control は、最大投与量である 193 mg/kg 相当の

Fig. 3. Finney's Graphic Approximate for the LD₅₀ of Caffeine

Remarks: Finney's graphic approximate method was employed.

{ LD₅₀: 257 mg/kg by the subcutaneous route.
{ 95 % confidence limits: 247~267 mg/kg.

場合についてのみ行なった。他方、歪測定装置の試用実験では、電子管式動物自発運動計量装置による実験、および肉眼的な自発運動の観察において、その変化が特徴的であった 1, 16, 32 および 193 mg/kg (以下では /kg を省略) の 4 種の投与とした。このうち 193 mg には 2 匹を使用した。その他の量は 1 匹ずつとし、いずれも 8 週令を対照、9 週令をカフェイン投与とした。

投与すべき薬液量の算出に当たっては、あらかじめ約 1 時間の絶食を行なって、できるだけ糞便を排泄させた後、体重を測定し、その基礎とした。その後、絶食の影響を取り除く意味で、ただちに飼料と水を与え、少なくとも 30 分経過した後、実験に移った。

記録：前述の 2 種類の装置を用いて、マウスを測定ケージに移した直後から、探索行動がほぼ退消するまでの 30 分間を薬物投与前の記録とし、マウスを一旦ケージ外に取り出し、薬物を投与した後、再び 3 時間にわたって連続記録した。また、自発運動の記録と同時に、行動を随時観察、記録した。さらに、カフェインの大量投与時にみ

られた痙攣様の筋収縮については、筋電図の記録を試みた（腹位保定，M. triceps surae，埋入電極による双極誘導）。

なお，LD₅₀ の算出に関するものも含めて，実験はすべて防音実験室において行なった。その室内は蛍光灯照明とし，室温は $23.2 \pm 1.0^\circ\text{C}$ に保った（湿度 $46.0 \pm 10.4\%$ ）。

実験結果

1. 電子管式動物自発運動計量装置による実験

カウント値ダイアグラム：自発運動の経時的变化をみるために，棒グラフの高さ，すなわち毎分ずつのカウント値を読みとり，ダイアグラムとした（Fig. 4）。自発運動は 1 mg ですでに増加し，投与量の増加につれて高いカウント値が出現し，また漸次その出現が持続的となった。しかし大量では，高いカウント値の出現は，投与後の初期を除いて，かえって目立たなくなった。

カウント値の出現率ヒストグラム：経時的な経過を考慮しないで，各カウント値の出現率（5例平均）を求め，ヒストグラムとした（Fig. 5）。対照では，reference control に比べて，零カウント出現率は全般的にやや低下したが，ほとんどの場合 80% 以上を占めた。すなわちこの実験で使った感度では，カウントされるほどの自発運動を示さない時期が，2時間以上を占めた。

これに対して，カフェイン投与では，ヒストグラムは投与量に比例して一定の傾向をもった変化を示し，16 mg 以下，32 mg，64 mg 以上の3型に大別された。すなわち零カウント出現率は，投与量の増加に伴って漸減したが，16 mg まではなお目立って高く，32 mg で最低となった。64 mg 以上で再び増加したが，投与量とは無関係にほぼ同程度であった。また 32 mg では，1 以上のカウント値の出現が，他の場合に比べてやや均等であった。さらに 64 mg 以上では，2 および 3 カウントの出現が高率を示した。

カウント値の変化率：個体が異なれば勿論のこと，たとえ同一個体であっても，投与前の自発運動の程度が，毎回同一に現われるとは限らず，測定ごとによりかなり変異するのが常である。従って実測値（カウント値）を直接的に相互に比較することは，あまり意味がない。このため，投与前30分間の総カウント値に対する投与後の30分間ごとの総カウント値の比率，いわば自発運動の変化率（5例平均）を求めた（Fig. 6）。対照では，ほとんどの場合，その比率は投与後1以下となり，かつ時間の経過に伴って漸減した。

これに対してカフェインは，1 mg ですでに明瞭な増加（投与後30分まで）が現われ，2 mg 以上では，いずれの投与量においても，1時間以内にピーク値が現われた。ピーク値は，16 mg まで投

Fig. 4. Diagrams of Counts

Remarks: The ordinate indicates the counts per minute and the abscissa the time. Doses of 1, 16, 32, and 193 mg/kg of caffeine correspond to 1/256, 1/16, 1/8, and 3/4 of the LD₅₀ (257 mg/kg), respectively. ↓: Drug administration.

Fig. 5. Histograms of Occurrence Rate of Counts Appeared during 3 Hours after Administration

Remarks: The means of five mice each are shown. The ordinate indicates the occurrence rate expressed as percentage, and the abscissa the counts per minute. The fraction in parentheses indicates the ratio of dose to LD_{50} . Reference control: physiological sodium chloride solution, equivalent in volume to a dose of 193 mg/kg of caffeine. w.: weeks.

与量の増加に伴って増大し、特に8および16 mgで飛躍的に大きくなり、16 mgで最大を示した。それ以上の投与量では、かえって著明に減少した。また8 mg、特に16および32 mgでは、他の投与量に比較して、ピークに達した後の比率の下降が遅れた。

2. 歪測定装置の試用実験

歪測定装置による記録上で、1 mgでは、明瞭な荷重変化の増加を指摘し難かった。16 mgでは投与後1時間まで、32 mgでは投与後3時間ま

で、引き続いて明瞭な増加が認められ、電子管式動物自発運動計量装置による実験結果とほぼ一致した (Fig. 7)。またそのパターンは、対照と変わりなく、単に密度や持続や大きさ (振幅) が、不規則に増大したに過ぎなかった。

これに対して、193 mgでは、荷重変化の増加よりも、むしろそのパターンの変化が目立った。すなわち投与後5~10分で、持続の短い荷重変化が著明となった。30分ごろには、周期10~20秒で現われる3~10個の群から成る一連の周期的荷重

Fig. 6. Relative Increase in Spontaneous Motor Activity

Remarks: The means of five mice each are shown. The ordinate indicates the ratio of total counts for every 30 minutes after administration to total counts for 30 minutes before administration. The abscissa indicates the time after administration. P: before administration (Predrug). ○—○: control. ●—●: Administered with caffeine. □—□ and ■—■: reference controls 8 and 9 weeks old, respectively. See Fig. 5.

Fig. 7. Spontaneous Motor Activity Recorded by Load Cell for the Strain Gauge System

Remarks: Control: control corresponding to a dose of 193 mg/kg of caffeine.

変化が、短い休止期間 (30秒~1分40秒) をおいて、間歇的に繰り返された。その後、周期も休止期間も漸次延長したが、この状態は3時間まで引き続いてみられた。

肉眼的な自発運動の観察によれば、1~32 mg で起こる変化は、通常みられる運動や動作の増加に過ぎないが、64~193 mg では、痙攣様の筋収縮や異常な運歩が出現し、全体としての自発運動のパターンは強い周期性を帯びた。このように、歪測定装置により瞬時値として記録された荷重変

化のパターンは、肉眼的に観察した自発運動のパターンともよく対応している。

さらに、痙攣様の筋収縮や異常な運歩などの異常な行動の個々に対応して、特徴的な荷重変化が示された (Fig. 8)。特に、痙攣様の筋収縮の場合、外見的にも筋電図的にも、極めて大きな変化 (Fig. 9) であったにもかかわらず、それに伴う荷重変化が、予想外に弱かったのは特徴的であった。また異常な運歩は、持続の短いバースト状の荷重変化として現われた。しかし、痙攣様の筋収縮と

Fig. 8. Typical Patterns of Load Variation Recorded by Load Cell for the Strain Gauge System Corresponding to Various Behavior

Fig. 9. Electromyographic Recording of Convulsion-like Muscular Activity

CONTROL

CAFFEINE

Remarks: Both records were taken 15 minutes after administration with caffeine at a dose of 193 mg/kg or its control. Fixation: ventricumbent position. Muscle: M. triceps surae. Electrode: bipolar; copper wire of 100 μ in diameter insulated all the length, except a portion 1 mm far from the tip.

異常な運歩が、踵を接して、しかも一定した前後関係をもたないで生起する場合が多いので、行動の同時観察を伴わない限り、異常な行動の種類を、一連の記録上のみで詳細に弁別することは困難であった。

考 察

多数の薬物の効果や影響を観察する場合、相互に比較ができるように、薬物の投与量を一定の基準に則って定めることが望ましい。これには LD₅₀, MLD などが考えられるが、ここでは LD₅₀ を基準とした。マウスにおけるカフェインの LD₅₀ については、若干の報告^{1,8,13,18} があるが、皮下注射を投与経路としたものは見当たらない。

また最近、動物の系統、投与経路などを同一にとっても、群居時と単独時との間で、毒性に差異を生ずると報告されている^{2,7,8,16}。著者らの自発運動に関する実験は、当面、単独マウスを対象として行なう計画であるため、LD₅₀ も同様な条件下で求めたが、その値は、腹腔内注射によった MULLER¹³ の値 (274.3 $\pm$ 5.4 mg) に近似している。

マウスの自発運動に及ぼすカフェインの影響を、量的に扱った報告は多い^{1,3,9,10,12,17,20-23}。なかでも BOISSIER ら¹⁾, DEWS³⁾, 亀山ら¹⁰⁾, 高木ら²⁰⁾ のものが、投与量の種類も多く、また系統的である。著者らの結果は、光学的な方法によった BOISSIER らのものに極めて類似しているが、

計測法が全く異なるにもかかわらず、ほぼ一致したのは興味深い。

自発運動の量とカフェインの投与量との関連については、2~5 mg のカフェインが自発運動に認むべき増加をもたらすと報告されている^{1,3,20)}。著者らも、1 mg, すなわち LD₅₀ の 1/256 という少量で、増加を認めた。また、10 mg²⁰⁾、16 mg¹⁾、あるいは 20 mg³⁾ のカフェイン投与後 1 時間以内^{1,20)} に、自発運動の最大の増加が起こるといわれている。本実験でも、16 mg で、投与後 30 分~1 時間に最大の増加を記録した。

このように、カフェインは自発運動を増加する。しかしその増加の程度は、必ずしも投与量と比例せず、ある量をこえるとかえって減少する^{1,3,10,20)}。その量的な点では、20 mg²⁰⁾、32 mg¹⁾、80 mg³⁾ あるいは 100 mg¹⁰⁾ など区々であり一定しない。著者らの結果は、BOISSIER ら¹⁾ と一致した。

以上、電子管式動物自発運動計量装置による実験結果に基づいて、自発運動の量的な面から文献的考察を行なった。ところで、薬物による自発運動の量的な変化のみならず、質的な変化もまた重要であり、その分析のために、従来種々の工夫が行なわれてきた^{9,10,20~23)}。たとえば、伯田⁹⁾ は極めて大掛かりな行動追跡装置を考案し、また露崎²²⁾、TSUYUSAKI ら²³⁾ は複雑な解析法を創案した。

この実験で使用した電子管式動物自発運動計量装置、歪測定装置とも、いずれも荷重変化を測定対象としたものである。前者では見だし難い自発運動の質的な変北は、後者によって直視的な記録としてとらえることができた。特に後者による荷重変化の連続記録は、doping 効果と関連をもつと考えられる調整のとれた自発運動と、異常な自発運動との弁別に、有用であると考えられる。

歪測定装置については、荷重変化のパターンを一層見易くするための積分回路、およびあらかじめ設定した閾値以上の荷重変化をパルス信号としてとり出し、かつ計数するための回路の増設を計画中である。勿論、自発運動はその内容が多種多様であるため、この装置に限らず、ただ一種類の測定機器のみで、その質的な面の全貌を明らかにすることは不可能である。たとえば、さらに運動

軌跡からの分析を加えるなど、その観測方法が原理的にも異なる幾種類かの装置を駆使して、カフェインその他の doping drugs といわれている薬物について、自発運動の質的な面からも、今後詳しく分析を進める考えである。

著者らは別の実験⁵⁾で、カフェインが、その常用量の半量程度（アンナカ 2.5 g/head、皮下注射、カフェイン実量で約 2.5 mg/kg）の投与によっても、馬の運動能力を著しく高めることをみた。他方マウスでも、LD₅₀ の 1/256 量、すなわち 1 mg の少量ですでに自発運動は増加し、2~4 mg で約 2 倍、16 mg では 12 倍にも及ぶ異常行動を伴わない自発運動の顕著な増加が現われた。この事実は、カフェインの doping 効果の強さを裏付けるに足る薬理学的な知見である。

要 約

ddY-F 雄 8~9 週令マウス（8 週令体重が 20~31 g のもの）を使用し、電子管式動物自発運動計量装置（夏目製作所）によって、doping 検査における陽性率の極めて高いカフェインが、単独マウスの自発運動に及ぼす影響を、主としてその量的な面から分析した。

カフェイン（定量済み局方アンナカ注射液使用）の投与量は、単独マウスに対する LD₅₀ をあらかじめ求め、それを基準として定めた。すなわちカフェイン実量として、1 mg/kg (1/256 LD₅₀)・2・4・8・16・32・64・129 および 193 mg/kg (3/4 LD₅₀) を、皮下注射によって投与した。なお、同一マウスにおいて、8 週令を対照（安息香酸ナトリウム水溶液）、9 週令をカフェイン投与とした。

記録はすべて 1 分間積算によって行なった。まず投与前 30 分間の自発運動を記録し、引き続いて投与後 3 時間にわたって行なった。

また、電子管式動物自発運動計量装置は、単位時間内の自発運動の積算値を記録するにとどまり、その質的な変化は追跡できないなどの欠点をもつ。そこで、自発運動に伴う荷重変化を、瞬時値として記録することができる歪測定装置を考案し、試用した。なお、同時に行動の観察も行ない、次の結果を得た。

1. FINNEY の図解法によって求めたカフェイン

の LD₅₀ (単独マウス, 皮下注射) およびその信頼限界 (信頼度 95%) は, それぞれ 257 mg/kg および 247~267 mg/kg であった.

2. 1 mg/kg を投与すると, 自発運動には認むべき増加が現われた. 16 mg/kg までは, 投与量の増加にしたがって, 自発運動は著明に増加した. 16 mg/kg では, 12倍にも及ぶ最大の増加を示した. 32 mg/kg 以上では, その増加の程度は, かえって減少した. なおいずれの投与量においても, 自発運動の増加は, 投与後 1 時間以内が最も顕著であった.

3. 64 mg/kg 以上を投与すると, 痙攣様の筋収縮や異常な運歩など, 異常な行動が現われるようになり, 自発運動のパターンは強い周期性を示した.

4. 歪測定装置によっても, ほぼ同様な結果を得た. またこの装置によって, 前述の自発運動の質的な変化を, 直視的な記録としてとらえることができた.

以上の結果について, 若干の文献的考察を行なった. カフェインによって起こる調整のとれた自発運動の顕著な増加は, その強い doping 効果を裏付けるに足る薬理学的知見である. また試作した歪測定装置の併用は, 自発運動の質的な変化をとらえるのに有用であると考察した.

謝 辞

カフェインの定量に協力いただいた当研究所検査部に対し, 謝意を表する.

文 献

- 1) BOISSIER, J. R. et SIMON, P. (1965): *Arch. int. Pharmacodyn.*, **158**, 212~221.
- 2) CHERNOV, H. I., FURNESS, P., PARTYKA, D. and PLUMMER, A. J. (1966): *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **154**, 346~349.
- 3) DEWS, P. B. (1953): *Brit. J. Pharmacol.*, **8**, 46~48.
- 4) 藤井, 稲田, 吉田, 草薨, 美馬, 夏野 (1970): 日獣誌, **32**, 307~317.
- 5) 藤井, 稲田, 吉田, 草薨, 美馬, 夏野 (1972): 日獣誌, **34**, 135~141.
- 6) GENOVESE, E. and MANTEGAZZA, P. (1970): *Med. Sport*, **23**, 326~334.
- 7) GEORGE, D. J. and WOLF, H. H. (1970): *J. Pharm. Pharmac.*, **22**, 947~949.
- 8) GREENBLATT, E. U. and OSTERBERG, A. C. (1961): *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **131**, 115~119.
- 9) 伯田, 前田, 樋口, 広瀬, 城山 (1964): *Ann. Rept. Shionogi Res. Lab.*, **14**, 109~125.
- 10) 亀山, 佐々木, 木皿 (1963): 東北薬大紀要, **10**, 49~56.
- 11) 小山 (1955): 動物実験手技, 149 頁, 東京, 協同医書出版社.
- 12) 桑田 (1956): 日薬理誌, **52**, 72 §.
- 13) MULLER, P. J. and VERNIKOS-DANELIS, J. (1969): *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **171**, 153~171.
- 14) NAKAO, T., YANAGIDA, T., SATO, S. and SUGITA, T. (1958): *Jikei med. J.*, **5**, 134~146.
- 15) 日本公定書協会編 (1965): 第 7 改正日本薬局方第 1 部解説書, 第 6 版, C-97~C-98 頁, 東京, 広川書店.
- 16) PETERSON, D. I. and HARDINGE, M. G. (1967): *J. Pharm. Pharmac.*, **19**, 810~814.
- 17) 佐藤 (1959): 慈恵医大薬理学教室論文集, **13**, 191~194.
- 18) SCOTT, C. C. and CHEN, K. K. (1944): *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **82**, 89~97.
- 19) 高木 (1955): 小立編, 推計学の化学及び生物学への応用, 第 2 集, Bioassay と推計学, 第 2 版, 45~53 頁, 東京, 南江堂.
- 20) 高木, 柴田, 渡辺, 斉藤 (1967): 薬誌, **87**, 837~843.
- 21) 高野 (1959): 北関東医学, **9**, 919~933.
- 22) 露崎 (1963): 日薬理誌, **59**, 40~49.
- 23) TSUYUSAKI, T. and KOBAYASHI, T. (1966): *J. Chiba med. Soc.*, **42**, 291~304.

INFLUENCE OF CAFFEINE UPON SPONTANEOUS MOTOR ACTIVITY IN MICE

Yoshihiro NATSUNO and Shichiro INADA

Laboratory of Racing Chemistry, 4-37-6 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158

(Received for Publication March 8, 1972)

Caffeine was examined for influence upon the spontaneous motor activity in isolated mice in relation to its doping effect by means of an electronic activity level counter (Natsume Seisakusho Co., Ltd.)¹⁴⁾ (Fig. 1).

The subjects used had been chosen at random from among 8-week-old male mice weighing 20 to 31 g (80% variance of body weight; this range was estimated from an experiment with 724 male mice.) of a closed colony of the ddY-F strain. Individual mice were used twice, or at 8 and 9 weeks of age, as control and test animals, respectively.

Based upon the LD₅₀ in isolated mice estimated prior to the experiment, caffeine was given subcutaneously at single doses of 1 mg/kg (1/256 of LD₅₀), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 129, and 193 mg/kg (3/4 of LD₅₀) in the form of caffeine and sodium benzoate which contained 9.48 or 9.90% of caffeine. Solutions of the same concentrations of sodium benzoate as those of the drug solutions served as controls.

Measurements were made on five isolated mice for each dose. The spontaneous motor activity was recorded for 30 minutes after a mouse had been first placed in the measure cage without any treatment. Subsequently, the mouse was replaced in this cage after having been removed for subcutaneous injection with the control or test drug. Then the spontaneous motor activity was recorded for 3 hours (room temperature: $23.2 \pm 1.0^\circ\text{C}$; humidity: $46.0 \pm 10.4\%$). Behavior was also observed during the period of recording. The results obtained are summarized as follows.

1. The LD₅₀ of caffeine in isolated mice (8 weeks of age) calculated by Finney's graphic approximate method¹⁹⁾ was 257 mg/kg by the subcutaneous route, and its 95% confidence limit ranged from 247 to 267 mg/kg (Fig. 3).

2. An appreciable increase occurred in spontaneous motor activity at as small a dose as 1 mg/kg and a peak activity appeared within 1 hour after administration with a dose of over 2 mg/kg of caffeine. There was a progressive increase in spontaneous motor activity with an increase in dose of caffeine up to 16 mg/kg. The highest activity was attained at a dose of 16 mg/kg. It was 12 times as high as the activity shown during the period of predrug. An increase in activity, however, was not so marked at a dose of more than 32 mg/kg (Figs. 4~6).

3. No abnormal behavior appeared even after administration with a dose of 32 mg/kg of caffeine. On the other hand, convulsion-like muscular activity and abnormal gait were seen after more than 64 mg/kg of caffeine had been given (Fig. 9).

4. The effect of caffeine upon spontaneous motor activity was measured by means of a "load cell for the strain gauge system" which had been developed by the authors (Fig. 2). Approximately the same results as mentioned above were obtained (Fig. 7). In addition, some qualitative characteristics of the spontaneous motility caused by caffeine were recorded by this apparatus (Fig. 8).

These results lend a positive pharmacological support to the marked doping effect of caffeine⁵⁾. Furthermore, it was demonstrated that the "load cell for the strain gauge system" was useful for finding out qualitative changes in the spontaneous motility.