ラットのオペラント条件行動に対する Methylprednisolone sodium succinate の作用

田 所 作太郎・樋 口 洋一郎・田 所 浪 子

群馬大学医学部行動医学研究施設・行動分析部門

(主任: 田所作太郎教授)

副腎皮質ステロイドは広範多岐にわたる臨床適応をもち、使い方によっては現在最も有用な対症療法薬になることができよう。反面本ステロイドが示す治療効果と重大な副作用とは残念ながら未だ不可分な関係にある。また各種の薬理作用およびその活性は、わずかな化学構造の相違により微妙に変化することが知られており、著者の一人田所(作)⁷⁾⁸⁾によっても詳しく総説されている。副腎皮質ステロイドの薬理学的用量をヒトに投与した際、しばしば不眠、興奮、精神病症状の増悪をきたすことは経験的事実であるが、動物実験レベルにおける本ステロイドの中枢作用については未だ不明の点が多い。また水溶性副腎皮質ステロイドは促効性のため緊急事態に際し比較的大量が非経口的に投与されることが多い。そこで、われわれは本ステロイドの中枢作用検索の手始めとして、今回水溶性製剤である methylprednisolone sodium succinate 投与がラットの各種オペラント行動に及ぼす急性効果について検討した。

実験動物および実験方法

実験動物としては、本学薬理学教室において、20余年間兄弟姉妹交配で繁殖育成された Wistar 系成熟雄性ラットを用いた。飼料は固形飼料MF(オリエンタル酵母株式会社)を与え、また水道水を任意に飲用せしめた。観察指標としては、定率および定時間隔食餌強化と、Sidman 型および弁別条件回避、合計4種の条件づけスケジュールの下で、十分訓練を繰り返した結果確立したオペラント行動を対象とし、1スケジュール5匹あてのラットを用いた。定率および定時間隔食餌強化スケジュールにおいては、それぞれを背景とした条件抑制反応についても観察した。ラットの訓練は生後100~150日、体重250g~350gで開始し、1日90~180分間の訓練を1セッションとし1~3日間隔で繰り返し、常時スケジュールに適合した反応を示し、

かつ行動基線が安定してから実験に供した。いずれのスケジュールにおいても行動基線確立までには20~30セッションの訓練を必要とした。実験箱 Skinner-box は防音箱中に納め、一定の照明下で温度は24℃前後に保った。行動制御用および反応計数用諸装置はすべて別室に設置し、防音箱の小窓を介したTVカメラからの映像によって肉眼的な行動観察を行った。

使用した薬物は、methylprednisolone sodium succinate、すなわち Solu-Medrol(Upjohn Co.) を使用直前に水溶液として用いた。薬物は投与前40~60分間の条件反応を検査したのち、条件回避2スケジュールでは20および40mg/kgを腹腔内に投与したが、残りの正強化2スケジュールにおいては予試験の結果しばしば生理的食塩水のみを腹腔内投与によって反応に変化がみられることが判明したため10, 20および40mg/kgを背部皮下に投下することにした。薬物投与は原則として1週1回とし投与前後のセッションには投与容量相当の生理的食塩水を投与し、それ以外は無処置時の反応をしらべ、常時行動基線に大きな乱れのないことを確認しつつ実験を進めた。

条件づけスケジュールの説明

条件づけスケジュールの詳細については既に田所ら⁹⁻¹¹⁾が報告しているので、ここでは概略を記載するに止める。また以後、反応数あるいはショック数については10分間の平均値として記載することにする。

1) 定率および定時間隔食餌強化スケジュールと条件抑制反応

あらかじめ、食餌禁制によって自由摂食時体重の80%に減量されたラットが Skinner-box 側壁にセットされたレバーを30回押すごとに約30mgの小食餌錠が1箇あて落下する定率食餌強化(FR30)と、1分ごとの最初のレバー押しに対してのみ食餌錠の強化が与えられその他の反応はすべて無駄押しとなる定時間隔

食餌強化 (FI 60sec.) の2スケジュールでまず十分ラットを学習せしめる。FR, FI 遂行行動確立後, FR30では5分間, FI 60sec. では10分間を安全期 safe component とし自由にレバー押しをさせ、つづいて両スケジュールともに5分間の警告期 warning component をもうけ、警告刺激 (CS) としては強い照明とスピーカーからのクリック音を提示した。この期間内におけるレバー押しに際しては食餌錠獲得と共に交流 100-150 V, 0.5mA の電気ショックが Skinner-box のグリットを介して0.5秒間送られるようにした。5分後には警告刺激は自動的に消えるが、この要素交代時に際しても回避不能の電気ショックが送られるようにした。このような2要素が反復するスケジュールの下で十分訓練すると安全期には規則的な高い反応を示すが警告刺激の提示と共にラットはレバーから離れ、実験箱の隅にうずくまったり、うろろうしたりし、反応は著明に抑制され条件抑制反応または条件情動反応 (CER) の成立を見る。安全期の再開と共にラットは再び安定した高いレバー押しを続行するようになる。

2) 条件回避スケジュール

ラットを Skinner-box に入れ一定間隔でグリットを介して瞬時の電気ショックを与える。電気ショックに対するラットの感受性には個体差があるため、ショックの強さについては通電時に悲鳴をあげてよろめいたり、飛び上ったりする程度に交流 150-250 V, 0.5mA の範囲内で各ラットごとに適宜調節する。Sidman 型条件回避スケジュールにおいてはボックス側壁のレバーをラットが押すと、そのつど次に発生するショックは20秒間だけ遅延されるが (R-S: 20秒)、無反応の場合には5秒ごとにショックが送られる (S-S: 5秒)。一方弁別条件回避スケジュールにおいては、無反応の場合ショックが20秒ごとに送られることは前スケジュールと同様であるが、ショック発生5秒前からパイロットランプが点灯すると共に、スピーカーからクリック音が流れる (試行間時間: 15秒)。この5秒間内にレバーを押せば、警告刺激はただちに消滅し、ショックの発生は振り出しにもどる。警告刺激提示期間以外の反応はすべて無駄押しとなるようにプログラムされている。このスケジュールでは有効反応数と条件刺激提示回数から正確な回避率および有効反応率を算出する。行動基線確立後の回避率は95~98%で反応数は Sidman 型回避反応に比し低い。

実験成績

1. 定率食餌強化行動と条件抑制反応に対する Solu-Medrol 皮下投与の影響について

一般に安全期における FR 反応数は高くラットは10分間当たり平均 600~700 回レバーを押し、20数箇の食餌錠を獲得したが、時間がたつにしたがい次第に減少し、100分後には500回前後となった。一方警告期の反応は著しく低く、安全期のわずか2~3%に過ぎず、条件抑制反応の確立を常時示していた。Solu-Medrol 10, 20 および 40 mg/kg 皮下投与後においてもラットの行動にはほとんど変化がみられなかった。図1は Solu-Medrol 投与時の反応数を24時間前と24時間後に生理的食塩水投与時の反応数と平均値で対比したものである。

2. 定時間隔食餌強化行動と条件抑制反応に対する Solu-Medrol 皮下投与の影響について

安全期における FI-反応数は FR-反応に比し明らかに低く、平均10分間当たり200前後レバーを押したが、時間の経過に従いわずかに低下する傾向を示した。一方警告期の反応は強く抑制され一般に10分間に2回以下であり、常時確実な条件抑制反応が成立していた。Solu-Medrol 10, 20 および 40 mg/kg を皮下投与した場合上記の反応パターンには著変が認められず、また肉眼的にもラットの行動には変化がなかった。図2は Solu-Medrol 皮下投与時の安全・警告両期における FI-反応の変化について平均値で図示したものである。薬物投与前後24時間には、生理的食塩水投与を行っているが薬物投与日をはさむ3~4日の実験は連続するセッションである。40 mg/kg 投与後安全期の反応数の一時的な増加を示した例があったが、すぐに基線に復帰した。これは注射による一時的な刺激に起因するものと考えられた。

3. Sidman 型条件回避行動におよぼす Solu-Medrol 腹腔内投与の影響

行動基線確立後の Sidman 型条件回避行動には、個体によって反応数に若干の差異があったが、同一個体においては比較的一定していた。すなわちラットは常時10分間あたり平均100~140回レバーを押し、電気ショックにかかるのは、わずかに2回以下であり見事な回避行動が成立していた。図3は Solu-Medrol 20mg/kg および 40 mg/kg を腹腔内投与した際の平均反応数およびショック数の経過を図示したものである。

図1 Solu-Medrol 10, 20 および 40 mg/kg 皮下投与時の安全期および警告期における FR 30-反応の変化 (5例平均値)

図2 Solu-Medrol 10, 20 および 40 mg/kg 皮下投与時の安全期および警告期における FI 60sec.-反応の変化 (5例平均値)

図3 Solu-Medrol 20 および 40 mg/kg 腹腔内投与時の Sidman 型条件回避反応の変化 (5例平均値)

図4 Solu-Medrol 20 および 40 mg/kg 腹腔内投与時の弁別条件回避反応の変化 (5例平均値)

本図で示されるように薬物投与によって反応数あるいはショック数はほとんど変化せずその影響は僅少と考えられた。Solu-Medrol 40 mg/kg投与直後ラットは一時ショックにかかりやすくなり電撃後 burst を示した

例が認められたが、30分～40分後には回復し、また投与24～48時間後においても著変がなかった。これは多分薬液による腹腔内刺激に起因する一時的な現象と考えられた。

4. 弁別条件回避行動におよぼす Solu-Medrol 腹腔内投与の影響

本スケジュールにおいては警告刺激提示数と有効な反応数が正確に記録できるため、反応数とともにショック回避率と有効反応率を算出することが可能である。すなわち警告刺激提示数に対する電撃回避数の百分率で示される回避率は通常 90~98%, 総レバー押し数に対する有効レバー押し数の百分率、すなわち有効反応率については若干の個体差や日差があったが平均 40~60% であった。反応数は 10 分間あたり 60~75 であり、実験初期に高く時間の経過に従い軽度低下し、いわゆる warming up 効果を示す傾向が認められた。

図 4 は Solu-Medrol 20 mg/kg および 40 mg/kg 腹腔内投与時の反応数、回避率および有効反応率の時間的推移を平均値で示したものである。20 mg/kg 投与により回避率には著変がなかったが、有効反応率は増加する傾向を示し、24 時間後には反応数の減少とともに有効反応率が明らかに上昇し、48 時間後にもその傾向が残存していた。40 mg/kg 投与時には直後に一時回避率減少が認められた例があったが間もなく回復し、有効反応率は急速に上昇した。このような時のラットのレバー押し行動はゆったりし、反応間隔が延長する傾向を示した。投与後 24 時間においては、この傾向が明らかで 48 時間以上持続していた。すなわち Solu-Medrol の投与によって無駄押しがなくなり有効反応率は 70% 以上の上昇を示すのである。

考 察

薬物が示す微妙な中枢作用を計量的に把握するため、あるいは向精神薬開発の有力な手段として、行動科学的方法が応用され始めたのは 1950 年代であるが、以後行動薬理学の急速の進展をみた¹²⁾。本実験で使用した正・負強化それぞれ 2 つあてのオペラント条件反応はその基礎的スケジュールである。すなわち一般に FR 一反応は高頻度の反応を示す行動の、FI 一反応は時間どり行動の観察に便利であり、両者とも食餌錠の報酬によって学習・確立される。条件抑制反応は正強化スケジュール中に警告刺激と対提示される嫌悪刺激を挿入することによって生ずるが、この方法は、不安・恐怖を計る最良の方法と考えられたこともあった。一方 Sidman 型および弁別条件回避両反応は、電気ショック回避を動因として確立された負強化行動であ

る。Sidman 型回避スケジュールにおいては、条件刺激の提示を欠くが、弁別条件回避スケジュールにおいては明瞭な警告刺激の提示とともに有効反応の期間が制限されている。これらのスケジュールによって生じた条件反応は、各種の向精神薬投与によってスケジュール特有の変化を鋭敏に示すこと、またそれぞれの組合せによって薬物の中枢作用の性格を推測し得る可能性や、正強化行動の方が負強化行動よりも薬物に対して一般に変化されやすいことなどについては既にわれわれ⁹⁻¹¹⁾ が報告したところである。

さて水溶性副腎皮質ステロイド製剤 Solu-Medrol 10~40 mg/kg 投与に際し比較的明瞭な変化が認められたのはわずかに弁別条件回避反応のみであり、この変化も投与後短時間内に発現するのではなく、むしろ 24~48 時間後の方が著明であった。水溶性ステロイドの吸収は速かなため、もし本製剤が直接中枢に作用するならば、その効果は比較的早くあらわれ、かつより鋭敏な FR や FI 一反応の方が著明に変化するものと最初期待された。しかしいずれのスケジュールにおいても投与後 90~150 分に著変が認められなかったのである。すなわち本製剤の 10~40 mg/kg 単独投与による直接的な中枢作用、特に臨床経験から予期された興奮様作用については、本実験方法では把握し得なかったのである。なお連続投与による再検討は残された今後の問題点となろう。

副腎皮質ステロイドの作用についてはその直接的な薬理作用の他に視床下部一下垂体—副腎皮質系に対する negative feed back を介しての作用をも考慮すべきである。行動と下垂体—副腎皮質系の関連性に関する従来の実験的研究のうち十分な訓練の結果確立した条件行動を指標としているものは少なく、むしろ学習や消去過程に対する影響を検討した業績が多い。すなわち Murphy and Miller⁶⁾ は ACTH はラットの条件回避反応の学習には直接影響しないが、その消去を著明に遅延せしめるといい、その後 Miller and Ogawa⁵⁾ の副腎摘出ラットを使用した実験から本作用は ACTH の副腎皮質刺激作用以外の効果に起因することが明らかにされた。その後 Bohus and de Wied¹⁾, de Wied²⁾ によって ACTH による条件回避消去の遅延効果は ACTH 分子の最初の 10 箇、特に 7 番位の Amino 酸配列に関係があることが指摘された。また Levine⁴⁾ は ACTH 投与によってラットの受動的回避反応が明らかに増強されること、さらに視床下部に

hydrocortisone を移植し ACTH の遊離を抑制すると、突然に高音を聞かせた際の驚愕行動に馴れが生じやすくなることを報告している。つまり Levine は恐怖や不安発生の原因物質の一つとして ACTH を暗示したのである。一方 Wertheim et al.¹³⁾ Endroczi³⁾ は条件回避行動と副腎皮質ステロイドあるいは ACTH 投与との間に何らかの関連性存在を認めてはいるものの学習程度や実験方法の相違などにより矛盾した結果が示されるところから、その解釈に複雑な仮説を提案している。

本実験において Solu-Medrol 20 mg/kg および 40 mg/kg 投与後 24 時間に軽度ながら明らかな弁別条件回避スケジュールにおけるレバーの無駄押し減少が生じ、有効反応率の上昇が認められたが、この結果は Wertheim et al.¹³⁾ が報告した Sidman 型条件反応に対する dexamethasone 投与時の作用と共通している。これは Solu-Medrol により ACTH 分泌が抑制されその結果、電気ショックに対する過度の恐怖や不安が減少した結果に起因するとも考えられる。それならば何故条件抑制反応や Sidman 型条件反応に変化が見られなかったのであろうか。またヒトに副腎皮質ステロイドを投与した際しばしば発現する興奮様の副作用はどう解釈すべきなのか。未解決の問題が残されているとはいえ、Solu-Medrol 単独投与によっては十分な訓練の結果確立した条件行動を破壊する程の強力な中枢作用を示さないことは明らかである。しかし副腎皮質ステロイドが行動制御に対し何らかの微妙な役割を果していることは否定できないので今後さらに検討を進める予定である。

総 括

十分な訓練の結果確立したラットの定率および定時間隔食餌強化行動ならびに Sidman 型および弁別条件回避行動に対する水溶性副腎皮質ステロイド methylprednisolone sodium succinate 10~40 mg/kg 投与の影響について検討した。また食餌強化スケジュールそれぞれを背景とし、警告刺激と電気ショックの対提示によって発現した条件抑制反応に対する影響もあわせて観察した。

これらのオペラント条件行動は本ステロイド投与によって著明な変化を示さなかったが、弁別条件回避スケジュールにおいてのみ軽度ながら反応数の低下とともに有効反応率の上昇が認められた。このような変化

は投与後短時間内よりむしろ 24 時間後の方が著明であり、本ステロイドの直接的な中枢作用によるより、ACTH 分泌抑制の結果に起因する可能性を暗示していた。

謝 辞

稿を終るに当たり、Solu-Medrol を提供された日本アップジョン株式会社に深謝する(特別掲載)。

文 献

- 1) Bohus, B. and D. de Wied : Inhibitory and facilitatory effect of two related peptides on extinction of avoidance behavior. *Science*, 153 : 318-320, 1966.
- 2) de Wied, D. : Inhibitory effect of ACTH and related peptides on extinction of conditioned avoidance behavior in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122 : 28-32, 1966.
- 3) Endroczi, E. : Pituitary-adrenocortical activity, exploration and avoidance behavior in the rat. *Steroid Hormones and Brain Function* (ed. by C.H. Sawyer and R.A. Gorski) : p.p. 59-66, Univ. Calif. Press. Berkeley, 1971.
- 4) Levine, S. : Stress and behavior. *Scientific American*, 224 : 26-31, 1971.
- 5) Miller, R.E. and N. Ogawa : The effect of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on avoidance conditioning in the adrenalectomized rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 55 : 211-213, 1962.
- 6) Murphy, J.V., and R.E. Miller : The effect of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) on avoidance conditioning in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 48 : 47-49, 1955.
- 7) 田所作太郎 : 化学構造から見た副腎皮質ステロイド剤の進歩, 北関東医学 14 : 283-288, 1964.
- 8) 田所作太郎 : 合成副腎皮質ステロイド, 臨床薬理学大系 (12 巻) p.p. 37-59, 中山書店, 東京, 1966.
- 9) 田所作太郎・田所浪子 : Diazepam の剤型および投与方法による行動薬理学的効果の相違について, 臨床薬理 2 : 5-13, 1971.
- 10) 田所作太郎・小川治克・大橋京一・金沢義彦・小西敏雄・村田稔 : Diazepam 連続投与時の問題

- 点, 臨床薬理2: 356-358, 1971.
- 11) 田所作太郎: 三環系化合物 Doxepin の行動薬理学的研究(1), 日薬理誌, 68: 536-547, 1972.
- 12) Thompson, T. and C.S. Schuster: Behavioral Pharmacology, 行動薬理学, 田所作太郎・安藤潔・柳田知司訳, 岩崎学術出版社, 東京, 1972.
- 13) Wertheim, G.A. and R.L. Conner, and S. Levine: Adrenocortical influences on free-operant avoidance behavior. J. Exp. Anal. Behav., 10: 555-563, 1967.

EFFECTS OF METHYLPREDNISOLONE SODIUM SUCCINATE
ON OPERANT BEHAVIORS IN RATS

SAKUTARO TADOKORO, YOICHIRO HIGUCHI
AND NAMIKO TADOKORO

Third Division of Behavior Research Institute
School of Medicine,
Gunma University, Maebashi, Japan.
(Director: Prof. Sakutaro Tadokoro)

Effects of methylprednisolone sodium succinate, a water soluble corticosteroid, on conditioned behaviors in fixed ratio (FR 30) and fixed interval (FI 60sec.) schedules of food reinforcement, as well as in Sidman's and discriminated avoidance schedules were investigated in rats.

The effects on conditioned suppression (CER) which was developed by warning stimulus associated with electric shock in FR and FI schedules, were also observed after the steroid.

These conditioned responses did not exhibit marked change following the administration of the steroid (10-40 mg/kg). However, correct response rate increased with decreasing of total responses in discriminated avoidance schedule. Such phenomena became rather prominent 24 hours after the administration; thus the mechanism was probably caused by the inhibition of ACTH-release rather than by the direct central-action of the steroid.