

新規医薬品開発における非臨床薬物依存性試験方法の確立 に関する研究

Study on establishment of procedures for nonclinical drug dependence studies
in new drug development

高崎健康福祉大学大学院薬学研究科

藤原 淳

目次

第1章 薬物依存性試験	5
1.1 薬物依存性試験の歴史と概要	5
1.2 新規医薬品開発における薬物依存性試験の位置づけ	10
第2章 薬物自己投与試験	14
緒論	14
材料及び方法	14
動物	14
実験装置	15
実験方法	15
薬物	18
統計解析	18
結果	19
考察	26
小括	29
第3章 薬物弁別試験	30
緒論	30
材料及び方法	31
動物	31
実験装置	31
実験方法	32
薬物	33
統計解析	34
結果	35
考察	40
小括	42
第4章 身体依存性試験	43
緒論	43
材料及び方法	44
動物	44
実験方法	44
薬物	45
統計解析	45
結果	46

考察.....	48
小括.....	51
総括.....	52
謝辞.....	53
参考文献	54

本学位論文は、以下の原著論文を基に作成され、高崎健康福祉大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Fujiwara A, Iino M, Sasaki M, Relationship between the dose to produce reinforcing effect and that of gross behavioral effects in rhesus monkeys.
Journal of Drug Abuse. 2016; 2(2): 24, 1-9, 2016.
2. Fujiwara A, Shimosawa M, Iino M, Sasaki M, Sato S, Shimoi A . Generalization tests using different dosing routes from those of drug discrimination training in rats.
The Journal Toxicological Sciences. 43(7):451-458. 2018.
3. Fujiwara A, Shimosawa M, Iino M, Sasaki M, Sato S. Physical dependence and plasma concentrations of morphine in rats.
Journal of Drug Abuse. 2(3):23, 1-5, 2016.

第 1 章 薬物依存性試験

1.1 薬物依存性試験の歴史と概要

薬物依存とは生体がある薬物に対して依存にある状態を示し、WHO の Technical Report (1969) ¹では「生体と薬物との相互作用の結果生じた特定の精神的、時に精神的及び身体的状態をいう。特定の状態とは、ある薬物の精神効果を体験するため、また、時には退薬による苦痛を逃れるため、その薬物を連続的あるいは周期的に摂取したいという強迫的欲求を常に伴う行動やその他の反応によって特徴づけられた状態を指す。」と定義されている ²。

薬物依存は精神依存と身体依存に分類され、いずれも生体の状態を示している。これらには統一された定義はないが、精神依存は精神的に薬物に頼り薬物への強い摂取欲求を示す状態であり、身体依存は生体がある薬物の影響下に適応した結果、その薬物が体内から消退して薬理作用が減弱もしくは消失すると精神的及び身体的な病的症候（退薬症候）が発現する状態である ²。精神依存と身体依存は密接に関わっており、古くは薬物を繰り返し反復摂取したために身体依存が形成され、その結果発現した退薬症候による苦痛から逃れるため、更に薬物を摂取して精神依存が形成されると考えられていた。しかし、アンフェタミンやコカインのような中枢神経系興奮薬、カンナビノイド、幻覚発現薬及び有機溶剤では身体依存が形成されない ³ (Table 1)。したがって、現在では薬物の摂取により精神依

Table 1 WHOによる依存形成成分の分類

タイプ	身体依存	精神依存	薬物の例
アルコール	+++	++	アルコール
アンフェタミン	-	+++	アンフェタミン, メタンフェタミン
バルビツレート	+++	++	バルビツール誘導体, ベンゾジアゼピン誘導体
カンナビノイド	-	++(+)	マリファナ
コカイン	-	+++	コカイン
幻覚発現薬	-	+++	LSD, メスカリン, サイロシビン
カート	-?	++	カート
オピオイド	+++	+++	モルヒネ, ヘロイン, コデイン, ペチジン, フェンタニル
有機溶剤	-	+	トルエン, シンナー, アセトン, エーテル, クロロホルム

文献3より一部を改変

存が形成され、さらに反復摂取することで一部の薬物では身体依存が形成されるという考

えが定着している。また、身体依存は精神依存を増強することもよく知られている。

薬物依存性は薬物の薬理作用特性であり、精神依存性及び身体依存性に分類される。これらを検索するための試験はそれぞれ精神依存性試験及び身体依存性試験と呼ばれ、さらにこれらを総称して薬物依存性試験という。精神依存性試験は薬物選択試験、薬物自己投与試験、条件付け場所嗜好性試験及び薬物弁別試験、身体依存性試験は身体依存形成試験及び交差身体依存性試験に大別される。

薬物依存性試験の種類及び特徴などを Table 2 に示す。

Table 2 薬物依存性試験

分類	試験種	概要	観察指標
精神依存性試験	薬物選択試験	薬物を混入した飼料や飲料水の嗜好性を観察。	強化効果
	薬物自己投与試験	レバー押しやノーズポークによって留置カテーテルを介して、又は経口的に薬物を摂取させる。	強化効果
	条件付け場所嗜好性試験	薬物で条件付けした場所への滞在時間を観察。	報酬効果
	薬物弁別試験	訓練薬物側レバーへの反応を観察。	弁別刺激特性
身体依存性試験	身体依存形成試験	薬物を反復処置後に休薬し、退薬症候発現を観察。	退薬症候
	交差身体依存性試験	身体依存を形成させた動物に退薬症候を発現させるか、または、抑制するかを観察。	退薬症候

薬物選択試験は、薬物を混入した飼料や飲料水を通常飼料や飲料水と併置して動物に摂取させる方法である。1956 年の Coppock ら⁴のラットを用いた報告以来多くの研究が行われたが、明らかな依存性薬物でも摂取されないことがあるため、未知の薬物への試験には適さない²。

薬物自己投与試験 (Fig. 1) は、動物のレバー押し行動やノーズポーク行動（レバーの代わりに穴に鼻先を入れる行動）によって留置カテーテルを介して、又は経口的に薬物を摂取させる方法であり薬物の精神依存性評価において、最も信頼性の高い方法である^{2,5}。1955 年の Headlee ら⁶のラットを用いた腹腔内自己投与実験が最初の報告で、その後 1962 年に Weeks⁷がラットの静脈内自己投与法を、さらに、1969 年に Deneau ら⁸がアカゲザルの静脈

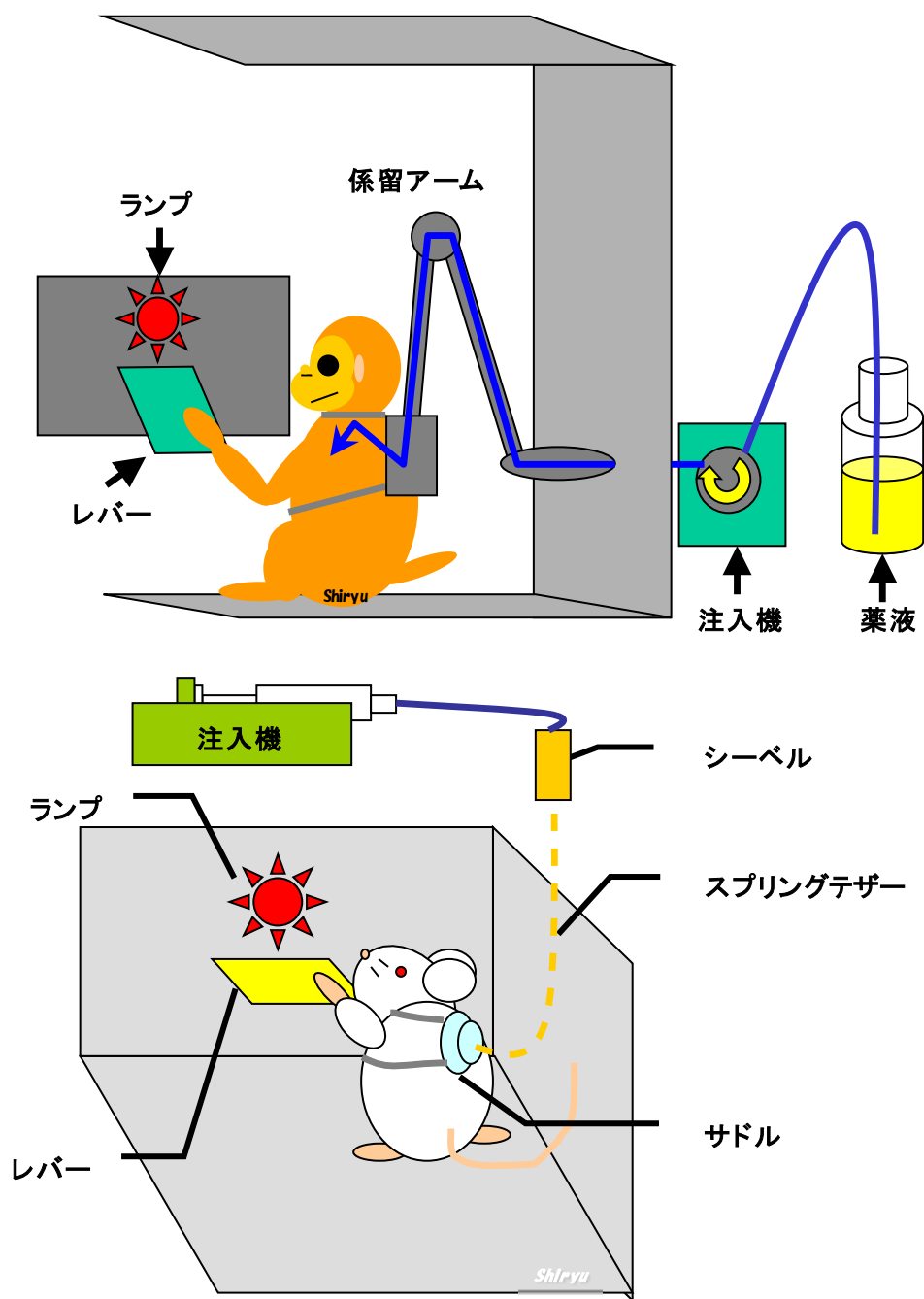


Fig. 1. アカゲザル及びラットの静脈内薬物自己投与試験

いずれの動物種も頸静脈又は大腿静脈にカテーテルを留置し、アームやスプリングテザーで係留する。レバー押しにより注入機が作動し、留置カテーテルを介して薬液が静脈内に注入される。

内自己投与法を報告した。その他、マウス⁹、ネコ¹⁰、イヌ¹¹、リスザル¹²、カニクイザル¹³、オマキザル¹⁴、ヒヒ¹⁵なども薬物自己投与実験に用いられている。薬物自己投与試験ではレ

バー押し行動やノーズポーク行動により薬物摂取の増加の有無を検索し、薬物摂取回数が増加した場合、その薬物は強化効果を有すると判定する。薬物自己投与試験における強化効果とは、薬物が正の強化子としての特性を有すること、すなわち薬物が生体に自身を摂取させるような性質である。動物において強化効果を示す薬物のほとんどがヒトにおいて精神依存性を発現するため、強化効果と精神依存性には密接な関係がある^{2, 16}。

条件付け場所嗜好性試験 (Fig. 2) は、薬物の感覚効果 (中枢神経作用) と環境刺激 (視覚刺激, 触覚刺激, 嗅覚刺激など) を結び付ける方法である¹⁷。1980 年の Phillips¹⁸ のラッ



Fig. 2. ラットの条件付け場所嗜好性試験

条件付けとして、動物に薬物又は媒体を投与し、白又は黒のBOXに一定時間入れる。翌日には薬物と媒体及びBOXの組み合わせを入れ替える。当該操作を数回繰り返す。条件付け終了の翌日に、投与はせず、白黒BOXの仕切りを外して、薬物側BOXの滞在時間を測定する。

トにおけるモルヒネの実験が最初の報告で、その後、マウス¹⁹、コモンマーモセット²⁰なども用いられている。条件付け場所嗜好性試験では、はじめに条件付けとして動物に薬物又は媒体を投与し、白又は黒のBOXに一定時間入れ、翌日に薬物と媒体及びBOXの組み合わせを入れ替える操作を数回繰り返す。条件付け終了の翌日には投与せず、白黒BOXの仕切りを外して薬物側BOXの滞在時間を測定する。薬物側滞在時間が媒体よりも長い場合には報酬効果を有する、一方、薬物側滞在時間が媒体よりも短い場合には嫌悪効果を有すると判定する。条件付け場所嗜好性試験の結果は薬物自己投与試験の結果とよく一致しており、また、簡便かつ短期間の実験で評価が可能のため、現在では、条件付け場所嗜好性

試験は広く用いられている。しかし、アルコール、ベンゾジアゼピン系薬物、バルビツール酸誘導体などの中枢抑制薬は条件付け場所嗜好性試験で報酬効果を確認できるとの報告と、できないとの両報告があることから、実験条件や環境条件には注意を払う必要がある^{5, 17}。

薬物弁別試験 (Fig. 3) は、薬物の摂取感覚効果 (弁別刺激) の有無や、摂取感覚効果が既知の依存性薬物と類似しているかを検索する方法である。1956 年に Blough²¹ がハトを用

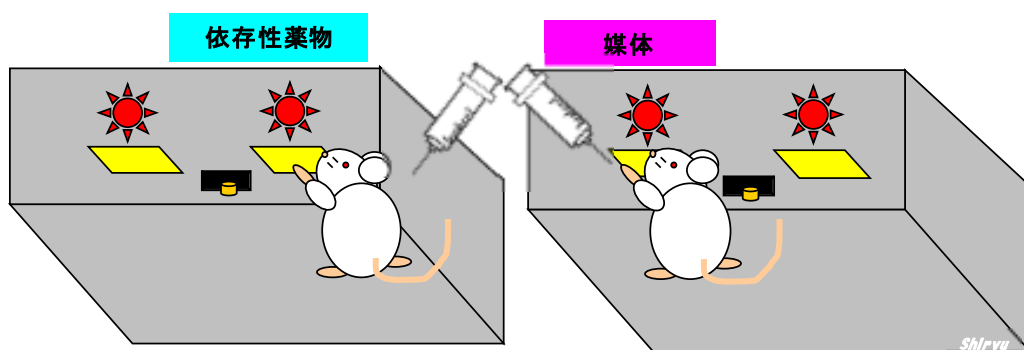


Fig. 3. ラットの薬物弁別試験

はじめに被験薬や既知の依存性薬物のような訓練薬(D)とその媒体(V)の弁別訓練を行う。DとVの弁別を獲得した後、依存性薬物のようなテスト薬物(T)の弁別刺激効果の類似性を検索するために、般化テストを行う。

いた薬物弁別試験を報告し、その後、1976 年の Colpaert ら²²のラットでの報告により、現在よく用いられている「2 レバーによる餌強化」の方法が確立された。ラットでの報告が多いが、マウス²³、リスザル²⁴、カニクイザル²⁵、アカゲザル²⁶、ヒヒ²⁷なども用いられている。薬物弁別試験では一般的に 2 レバーが設置されたオペラント実験箱が用いられる。はじめに被験薬や既知の依存性薬物のような訓練薬 (D) とその媒体 (V) の弁別訓練を行う。弁別訓練は、D 投与時には D 側レバー (例えば右側)、V 投与時には V 側レバー (例えば左側) のレバーを押せば餌が提示される条件で、D 投与時には D 側レバーを、V 投与時には V 側レバーをのみを安定して押すようになるまで継続する。D 及び V 投与時にそれぞれのレバーに対して安定したレバー押しがみられれば、動物は D と V の弁別を獲得したと判定する。なお、D に被験薬を用いた場合には、何らかの弁別刺激を有すると考えられる。その後、D と被験薬又は既知の依存性薬物のようなテスト薬物 (T) の弁別刺激の類似性を検索

するために、般化テストを行う。般化テストでは、D 側レバーを押せば T は D に般化したと判定し、それぞれの弁別刺激は類似していると評価する²⁸。

身体依存形成試験は、薬物を反復又は持続投与した後自然休薬又は拮抗薬の投与により、退薬症候の有無を検索する方法である。身体依存形成試験の歴史は古く、1928 年に Plant ら²⁹はイヌを、1929 年に Tatum ら³⁰はアカゲザル用いたモルヒネの身体依存性を報告している。その後、マウス³¹やラット³²を用いた方法が主体となったが、その他、ウサギ³³、モルモット³⁴、ネコ³⁵、カニクイザル³⁶、オマキザル³⁷又はヒヒ³⁸なども用いられている。身体依存形成試験ではさまざまな試験方法が開発されており、マウスやラットで用いられる主な方法として、被験薬を皮下投与や経口投与で連日投与した後に休薬する注射法^{32,39}、被験薬が含有された pellet を皮下に埋植し、pellet を外科的に除去又は拮抗薬を投与する pellet 法^{31, 40}、静脈内、皮下又は腹腔内にカテーテルを留置して被験薬を持続的又は間歇的に注入した後休薬する infusion 法^{41, 42}、薬物を混入した粉末飼料を動物に自由摂取させた後休薬する薬物混餌法^{43, 44}などがある。

交差身体依存性試験は、あらかじめモルヒネやバルビタール類のような既知の依存性薬物の反復処置によって身体依存を形成させた後、被験薬投与による退薬症候の発現の有無を検索 (substitution test) し、また、依存性薬物の反復処置後に休薬して発現した退薬症候を被験薬投与により抑制されるかを検索する (suppression test) 方法である²。マウス³⁹、ラット⁴⁵、イヌ⁴⁶、サル⁴⁷などが用いられるが、最近の報告は少ない。

1.2 新規医薬品開発における薬物依存性試験の位置づけ

薬物依存性試験に関わる主な指針は、現在以下の 4 指針である。日本では、厚生省薬務局麻薬・審査課長通知:「薬物依存性に関する動物実験と臨床観察の適用範囲と実施要領について」(1975 年 3 月 14 日付薬麻第 113 号)、米国では「Guidance for Industry: Assessment of Abuse Potential of Drugs」(FDA, 2017 年 1 月)、欧州では「Guideline on the Non-Clinical

Investigation of the Dependence Potential of Medicinal Products」(EMA, 2006 年 3 月), 日米欧三極共通として ICH-M3(R2)「Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3(R2)」(2009 年 6 月)である。これらの指針では, 非臨床薬物依存性試験は大規模な臨床試験の前には終了させる必要があり, すなわち臨床第 II 相試験と並行して実施される。

薬物依存性試験の実験方法には様々なバリエーションがある。最も新しく発効された米国のガイダンスでは, 一部, 実験方法が記載されたが詳細な方法は記載されておらず, 実験方法は各実施施設や研究者にゆだねられる。米国のガイダンスの概要を Table 3 に示す。

Table 3 FDAガイダンス(2017)における動物を用いた薬物依存性試験の概要

試験種	方法
薬物自己投与試験	<ul style="list-style-type: none"> ・強化スケジュール: FR10(レバー押し10回に対して1回の薬物注入)。 ・陽性対照(訓練薬): 同じ薬理学的クラス, 同じ治療クラスまたは類似の行動効果を生じる Controlled Substances Act (CSA)によりスケジュールされた薬物を用いる。 ・用量: ヒトの治療血中濃度の一部を含むように設定する。
条件付け場所嗜好性試験	<ul style="list-style-type: none"> ・自己投与ほどの感度と信頼性はない。 ・陽性対照: 同じ薬理学的クラスのCSAによりスケジュールされた薬物を用いる。 ・用量: ヒトの治療血中濃度以上, T_{max}により条件付け時間を設定する。
薬物弁別試験	<ul style="list-style-type: none"> ・強化スケジュール: FR10(レバー押し10回に対して1個の餌を提示)。 ・訓練薬: CSAによりスケジュールされた既知の依存性薬物を用いる。 ・弁別訓練完成基準: 訓練薬側及び媒体側レバー押しの正解率が80%以上。 ・般化テスト: 左右レバーを合計10回押した時点で終了する。報酬(餌)を与えない。 ・評価: 訓練薬側レバー押しに割合が, 「完全般化> 80%>部分般化>20%>般化なし」
身体依存性試験	<ul style="list-style-type: none"> ・用量: 治療の血漿レベルによる薬物の慢性投与が薬物中止時に退薬症状を生じるかを観察する。 ・実施期間: 投与期間を4週間, 休薬期間を7日間設定する。

その他の指針では詳しい実験方法の記載はなく, 実験の種類程度の記載である。したがって, 施設ごとに精度良く薬物依存性を検出できる方法を確立し, その方法の妥当性を検証しておく必要がある。また, 医薬品の開発では無用な実験や動物数の削減を考慮し, かつ, より短期間で信頼性の高い結果が求められる。

本論文では, 新規開発中の医薬品を対象として実施される主な薬物依存性試験である, 薬物自己投与試験, 薬物弁別試験及び身体依存性試験方法の確立を目的とし, 以下に得られた知見について報告する。

第2章 薬物自己投与試験では, 薬物自己投与試験の新規用量設定方法及び新規薬物自己

投与方法の確立を目的とした。用量設定方法では、米国のガイダンスには「ヒトの治療血中濃度の一部を含む用量を設定する」と記載されているが、ヒトの治療血中濃度が判明する以前の試験実施には適用できない。前述したとおり、薬物依存性試験は、新薬の承認申請用には臨床第 II 相試験と並行して実施されるが、新薬の開発初期においてもその依存性の有無により開発戦略を検討するために実施される場合がある。したがって、ヒトの治療血中濃度を指標とした以外の用量設定方法も必要である。そこで、これまで報告されていない累積用量法による一般状態に変化の発現する最低用量（効果発現最小用量）を指標とした薬物自己投与試験の用量設定方法を検討した。また、薬物自己投与方法では、欧米で良く用いられる substitution 法をより簡便にするための薬物自己投与方法の確立を目的とした。Substitution 法は、はじめに標準薬における摂取を高頻度で数日間維持させた後、標準薬を被験物質や媒体に交換して摂取回数を数日間観察するサイクルを複数回繰り返し、幅広い用量範囲を検索する自己投与方法である¹⁶。標準薬の直後から被験物質を自己投与させるため、標準薬と被験物質の薬理作用特性が大きく異なると被験物質の強化効果を検出できない場合（偽陰性）や、標準薬と被験物質の薬理作用特性の一部が類似している場合には、被験物質に強化効果がなくても、自己投与が増加し、その結果、被験物質は強化効果を有すると判定する場合（偽陽性）がある⁴⁸。ただし、米国では強い強化効果を有する薬物を検出できれば良いとの考えから⁴⁹、偽陰性及び偽陽性の改善に関する研究はほぼ行われていない。そこで本研究では、被験物質に対する標準薬の影響を減らすため、substitution 法のように被験物質直前に標準薬を自己投与させず、標準薬、媒体、被験物質を高用量から低用量の順に自己投与させる方法を検討した。

第 3 章 薬物弁別試験では、薬物弁別訓練における訓練薬物の投与経路とは異なる投与経路による般化テスト方法の確立を目的とした。新薬の承認申請では、臨床投与経路による般化テストの実施が推奨されている。しかし、薬物弁別訓練の投与経路は、通常、腹腔内又は皮下で実施される⁵⁰⁻⁵³ため、薬物弁別訓練と般化テストで投与経路が異なる可能性が高

い。しかし、薬物弁別訓練と般化テストで異なる投与経路による影響を検討した報告は少ない。そこで、本研究では、腹腔内投与によりモルヒネの弁別を獲得させたラットで、これまで報告の乏しいコデインの経口投与による般化テストを検討した。

第4章 身体依存性試験では、新規身体依存形成方法の確立を目的とし、モルヒネを用いて検討した。モルヒネの身体依存形成法及び退薬症候観察法には様々な種類があり、多くは投与用量を漸増しながら1日複数回の投与を実施している⁵⁴⁻⁶⁵。一方、開発中の薬物における身体依存性試験では、様々な方法により薬物の身体依存性を評価するのではなく、動物数や実施試験数の削減あるいは複数試験の実施を避けるため、ある程度統一された方法を用いて薬物の身体依存性を検出する必要がある。そこで、本研究ではこれまで報告されていない、用量を投与期間中に増量せず同じ用量を1日1回経口投与する身体依存形成法をモルヒネにより検討した。

第 2 章 薬物自己投与試験

緒論

薬物自己投与試験では，強化効果を有する薬物の用量-反応関係は，逆 U 字（ベル型）を示すことが知られている．薬物の用量が低すぎる場合には動物が薬物の効果を捉えられず，一方，用量が高すぎる場合にも毒性や過度の中枢抑制や興奮などが発現するため自己投与回数が増加しない．したがって，強化効果を適切に検出するためには，適切な用量が必要となる．Ator ら⁴⁸は，自己投与試験における用量は「溶解限界や毒性が発現する高用量から媒体と反応が変わらない程度の低用量まで」を設定すべきとしている．また，各種指針では，高用量を臨床有効濃度の数倍程度で設定することが示されている．しかし，これらの基準を満たすためには，前者では多くの実験をする必要があり，後者では臨床有効血中濃度決定後の実施となるため時間と費用を要する．そこで，我々は他の用量設定方法を検討するため，既知の依存性薬物の単回投与による一般状態観察において変化の発現する最低用量（効果発現最小用量）と自己投与回数のピークの用量の関係を調べ，効果発現最小用量を指標とした自己投与試験の用量設定方法を検討した．また，本研究で用いた薬物自己投与試験法が欧米で良く用いられる substitution 法と同程度に強化効果を検出できるかを検討した．

材料及び方法

動物

実験 1: 単回投与による一般状態観察では雄 2 匹及び雌 4 匹の中国産アカゲザル (*Macaca mulatta*, 日本クレア株式会社及び株式会社アニマルケア) を用いた．供試時の年齢は 6～18 歳，体重は 4.5～5.7 kg であった．これらのサルはステンレス・高圧メラミン化粧板製ケージ (68W × 86D × 86H cm) で個別に飼育した．

実験 2: 静脈内自己投与実験では雄 3 匹及び雌 4 匹のアカゲザルを用いた．供試時の年齢

は 9～13 歳，体重は 4.5～7.3 kg であった．すべてのサルは過去にコカイン，ペントバルビタール又はペンタゾシンを自己投与した経験があったが，ニコチン及びカフェインの自己投与経験はなかった．サルはステンレス製ケージ（75W×90D×100H cm）にステンレス製のアーム及びハーネスで係留した⁸．また，ペントバルビタール麻酔下で頸静脈又は大腿静脈にシリコン製カテーテル（外径 2 mm，内径 1 mm）を留置し，サルの背部から体外へ導出したカテーテルの端はアームの管腔を走行するチューブを介して自動注入機に接続した．

動物には，100～120 g のサル用飼料（PS，オリエンタル酵母工業株式会社）を 1 日 1 回与えた．水は市営上水道水を自動給水器から自由に摂取させた．飼育室の温度は $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，湿度は $60 \pm 20\%$ で制御し，照明は午前 7 時から午後 7 時までの 12 時間点灯した．

すべての実験は，AAALAC International の認証施設である株式会社イナリサーチの動物実験審査委員会で承認され実施した．

実験装置

自己投与実験はレバー及びその上部約 5 cm に赤色ランプを設置したホームケージで実施した．サルがケージ内に設置したレバーを押すと投与液が静脈内カテーテルを介して自動的に注入される薬物自己投与実験法を用い，実験の制御及びデータの記録は MED-PC（Med Associates Inc.）で実施した．

実験方法

実験 1: 単回投与による一般状態観察

1 薬物につき 2 匹のアカゲザルを用いた．サルをモンキーチェアに保定し，投与液を 2～4 回，15 分間隔の累積用量法で橈側皮静脈に静脈内投与した．投与用量は一般状態に変化がみられるまで増量した．一般状態観察は投与直後及び投与後 10 分に行った．薬物投与後にサルをホームケージに戻し，流涎，嘔気，嘔吐，運動持続，運動低下，うずくまり姿勢，

横臥及び観察者への攻撃，閉眼，観察者への反応の低下，観察者への怯え表情，瞳孔径，動作緩慢及び運動失調の各項目を観察した．各観察項目はあらかじめ設定した2～4段階スケールで観察し，瞳孔径は目測値で測定した．また，2匹中1匹でも変化がみられた用量を効果発現最小用量とした．投与薬物及び動物の情報をTable 4及び5に示す．

Table 4 一般状態観察における薬物の用量

薬物	累積用量 (mg/kg)			
	1回目	2回目	3回目	4回目
コカイン	0.25	0.5	1	2
ペントバルビタール	0.5	1	2	4
ペンタゾシン	1	2	-	-
ニコチン	0.063	0.13	0.25	0.5
カフェイン	1	2	4	8

—: 実施せず

Table 5 一般状態観察に供試したアカゲザルの情報及びテストスケジュール

アカゲザル	テストスケジュール	
	1回目	2回目
No. 32, 雄, 6歳	コカイン	ペンタゾシン
No. 1416, 雌, 11歳		
No. 9, 雌, 9歳	ペントバルビタール	-
No. 26, 雌, 8歳		
No. 1309, 雄, 18歳	ニコチン	カフェイン
No. 1314, 雌, 18歳		

—: 実施せず

1及び2回目のテストは1週間以上の間隔を空けて実施した．

実験 2: 静脈内自己投与実験

静脈内自己投与実験の概要を Fig. 4 に示す. 1 薬物につき 4~6 匹のアカゲザルを用いた. 自己投与実験は毎日 2 時間, 午前 11 時から午後 1 時に実施した. 強化スケジュールはサルがレバーを 5 回押すと投与液が 1 回注入される Fixed-ratio 5 (FR5) とした. 毎日の実験はレバーの上部に設置した赤色ランプを点灯して開始した. 投与液の注入中及び各注入後に設定した 1 分間のタイムアウト期間にはランプを消灯し, その期間中はレバー押しを無効とした.

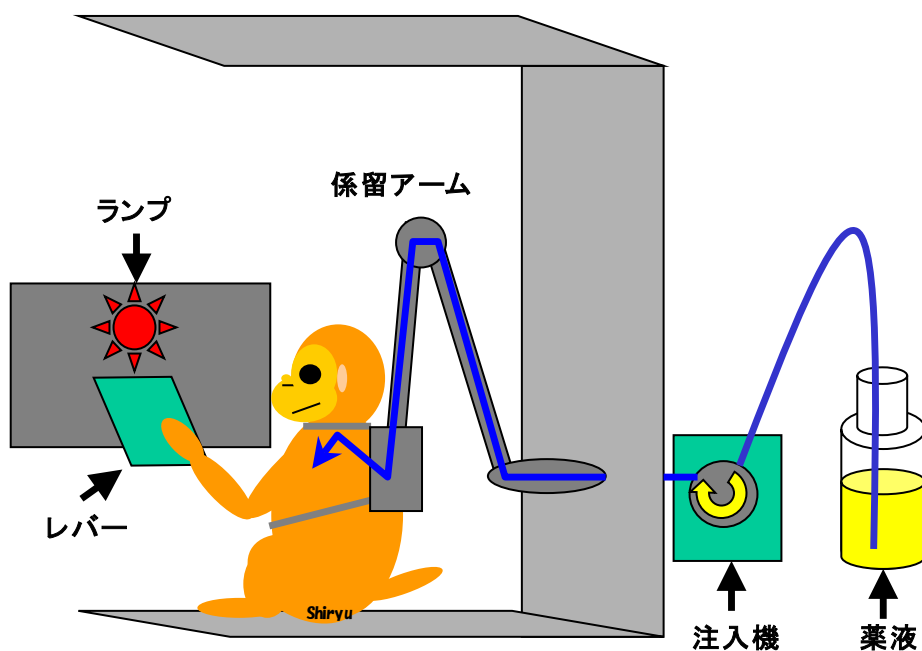


Fig. 4. アカゲザルの静脈内薬物自己投与試験
アカゲザルの頸静脈又は大腿静脈にカテーテルを留置し, アームで係留する. レバー押しにより注入機が作動し, 留置カテーテルを介して薬液が静脈内に注入される.

初めにコカインの 0.03 mg/kg/infusion の自己投与回数 (摂取回数) が 1 日 11 回以上で 3 日間連続することを確認した. コカインの摂取回数は過摂取を避けるため最大 1 日 20 回に制限した. 次いで, 生理食塩液の 0.25 mL/kg/infusion の摂取回数が 1 日 10 回以下で 3 日間連続することを確認した. コカイン及び生理食塩液の後, 各薬物の 3 から 6 用量を高用量

から順に, 1 用量を 4 日間自己投与させた. 自己投与実験のスケジュールを Table 6 に示す.

Table 6 自己投与実験に供試したアカゲザルの情報及びテストスケジュール

アカゲザル	テストスケジュール				
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目
No. 1, 雄, 9歳	コカイン	ペントバルビタール	-	-	-
No. 3, 雄, 9歳	ペンタゾシン	-	-	-	-
No. 5, 雄, 9歳	ペントバルビタール	コカイン	ペンタゾシン	ニコチン	カフェイン
No. 1396, 雌, 13歳	コカイン	ペンタゾシン	ペントバルビタール	ニコチン	カフェイン
No. 1398, 雌, 13歳	コカイン	ペントバルビタール	ペンタゾシン	ニコチン	カフェイン
No. 1405, 雌, 12歳	コカイン	ペントバルビタール	ペンタゾシン	ニコチン	カフェイン
No. 1414, 雌, 12歳	ペントバルビタール	-	-	-	-

ー:実施せず

各テストは2週間以上の間隔を空けて実施した.

薬物

コカイン (コカイン塩酸塩, 武田薬品工業株式会社), ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール, 大日本住友製薬株式会社), ペンタゾシン (ソセゴン, 丸石製薬株式会社), ニコチン ((-)-ニコチン, Sigma-Aldrich Co. LLC) 及びカフェイン (Sigma-Aldrich Co. LLC) を生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場) で溶解又は希釈して用いた.

統計解析

摂取回数は最後の 3 日間のデータを採用した. 強化効果は, 動物ごとに以下の基準を満たした場合に「有り」と判定した; 1) 「薬物のいずれかの用量における 3 日間の摂取回数の平均値が, 生理食塩液における平均値よりも高く, かつ, 摂取回数の個別値が生理食塩液と重なっていないこと⁴⁹⁾」, 及び 2) 「1) に該当する薬物の平均値が生理食塩液よりも統計学的に有意に高いこと」. 統計解析では, 薬物の用量が 1 用量の場合には Student t-test, 2 用量以上の場合には Dunnett test を実施した.

結果

実験 1: 単回投与による一般状態観察

効果発現最小用量は，コカインでは 1 mg/kg，ペントバルビタールでは 4 mg/kg，ペンタゾシンでは 2 mg/kg，ニコチンでは 0.25 mg/kg，カフェインでは 4 mg/kg であった．これら効果発現最小用量において，2 匹中 1 匹で，コカインでは運動持続及び素早い動作が，ペントバルビタールでは運動失調が，ペンタゾシンでは閉眼及び動作緩慢が，ニコチンでは立毛が，カフェインでは観察者への攻撃行動の増強及び怯え表情の減弱がみられた (Table 7)．

Table 7 アカゲザルの一般状態観察における効果発現最小用量

薬物	効果発現最小用量 (mg/kg)	一般状態変化
コカイン	1	運動持続 素早い動作
ペントバルビタール	4	運動失調
ペンタゾシン	2	閉眼 動作緩慢
ニコチン	0.25	立毛
カフェイン	4	観察者への攻撃行動の増強 観察者への怯え表情の減弱

薬物は15分間隔で累積用量法により静脈内に投与した．

実験 2: 静脈内自己投与実験

コカインでは 5 匹すべてのサルで強化効果を検出し、全頭で逆 U 字型の用量 - 反応曲線を示した。自己投与回数のピークの用量は 0.016 及び 0.064 mg/kg/infusion であった (Fig. 5)。

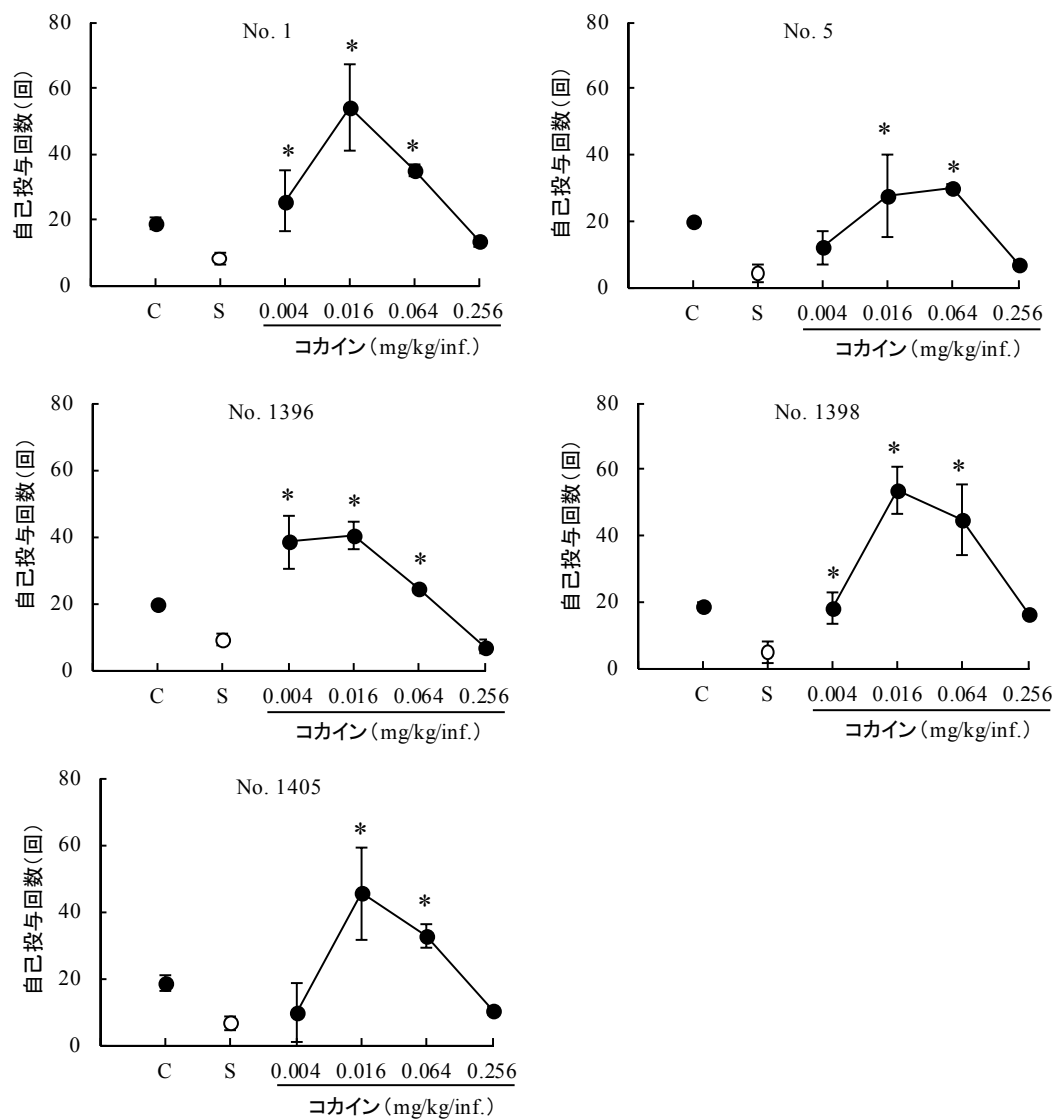


Fig. 5. コカインの静脈内自己投与

コカイン (0.03 mg/kg/infusion), 生理食塩液, テスト薬物の高用量から低用量の順に 1 日 2 時間, FR5 スケジュールでサルに自己投与させた。注入後には 1 分間のタイムアウト時間を設けた。各ポイントは最後の 3 日間の平均自己投与回数及び標準偏差を示す。

C: コカイン S: 生理食塩液 inf.: infusion

*: $p < 0.05$ vs. saline (強化効果ありと判定した用量)

ペントバルビタールでは1匹 (No. 1398) を除く6匹中5匹のサルで強化効果を検出し、その内の1匹 (No. 1) を除く5匹中4匹で逆U字型の用量 - 反応曲線を示した。自己投与回数のピークの用量は0.25及び0.5 mg/kg/infusionであった (Fig. 6)。

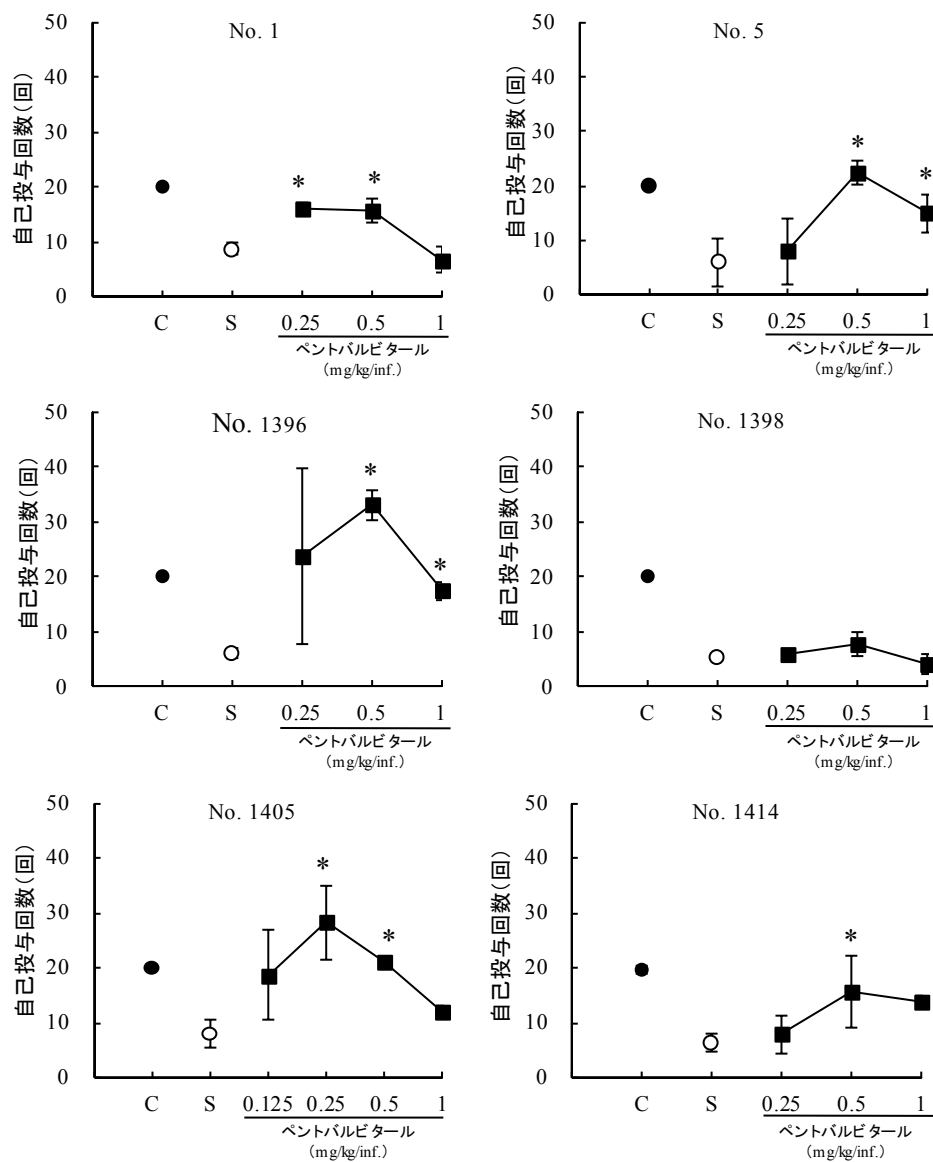


Fig. 6. ペントバルビタールの静脈内自己投与
詳細はFig. 5を参照.

ペンタゾシンでは2匹 (No.3 及び 5) を除く 5 匹中 3 匹のサルで強化効果を検出し、3 匹全例で逆 U 字型の用量 - 反応曲線を示した。自己投与回数のピークの用量は 0.016 及び 0.063 mg/kg/infusion であった (Fig. 7)。

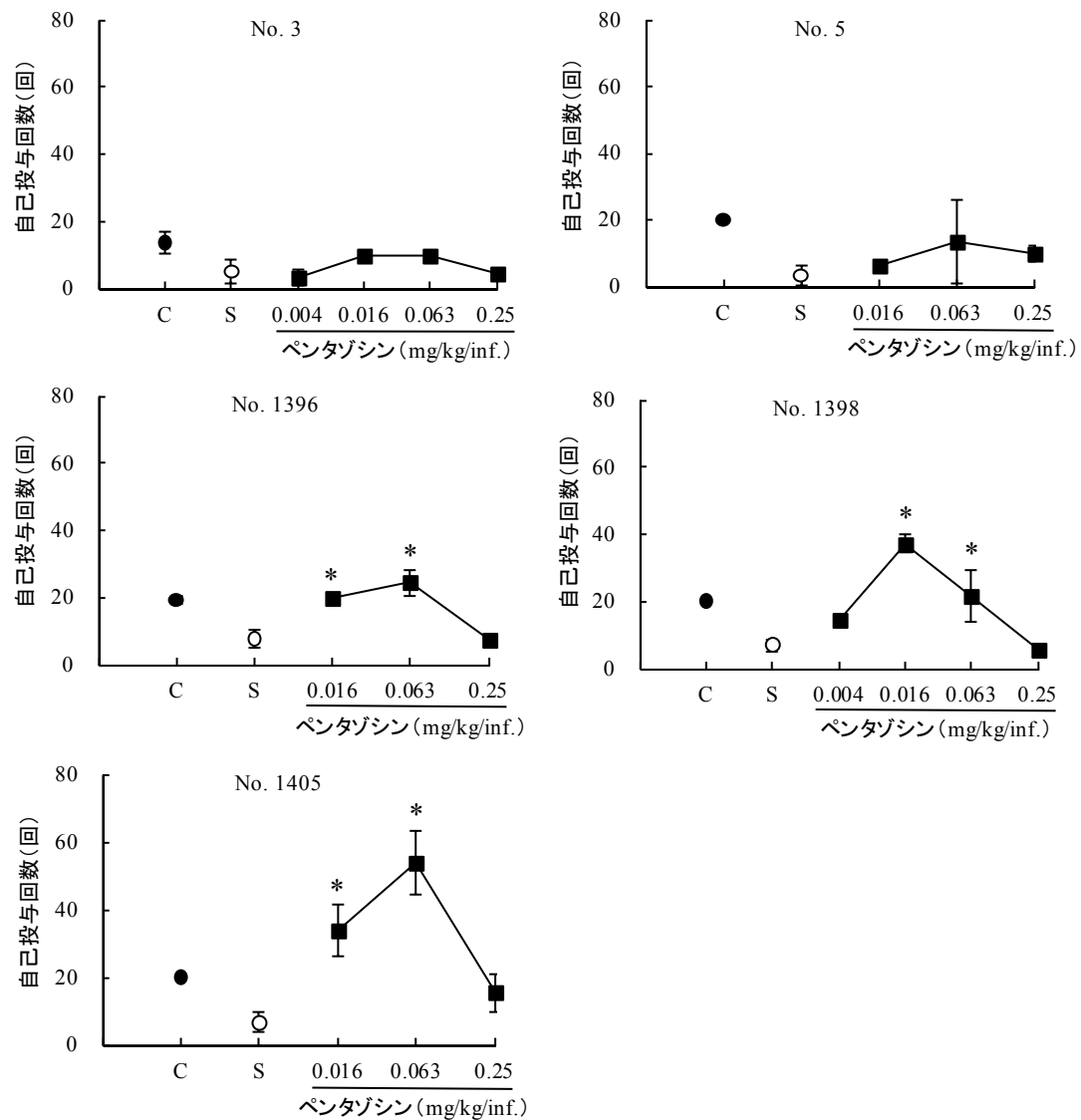


Fig. 7. ペンタゾシンの静脈内自己投与
詳細はFig. 5を参照.

ニコチンでは4匹中2匹 (No. 1396 及び 1405) のサルで強化効果を検出し、2匹ともに逆 U 字型の用量 - 反応曲線を示した。自己投与回数のピークの用量は 0.001 及び 0.004 mg/kg/infusion であった (Fig. 8)。

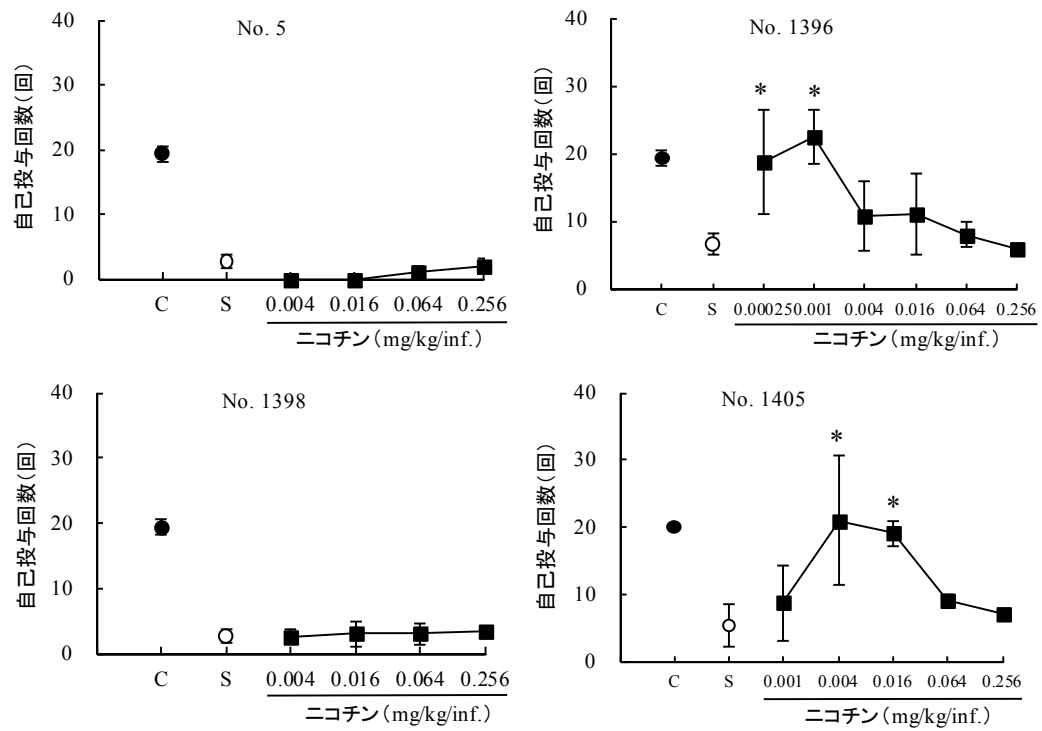


Fig. 8. ニコチンの静脈内自己投与
詳細はFig. 5を参照.

カフェインでは4匹中1匹 (No. 1398) のサルでのみ強化効果を検出し、逆U字型の用量-反応曲線を示した。自己投与回数のピークの用量は0.256 mg/kg/infusionであった (Fig. 9)。

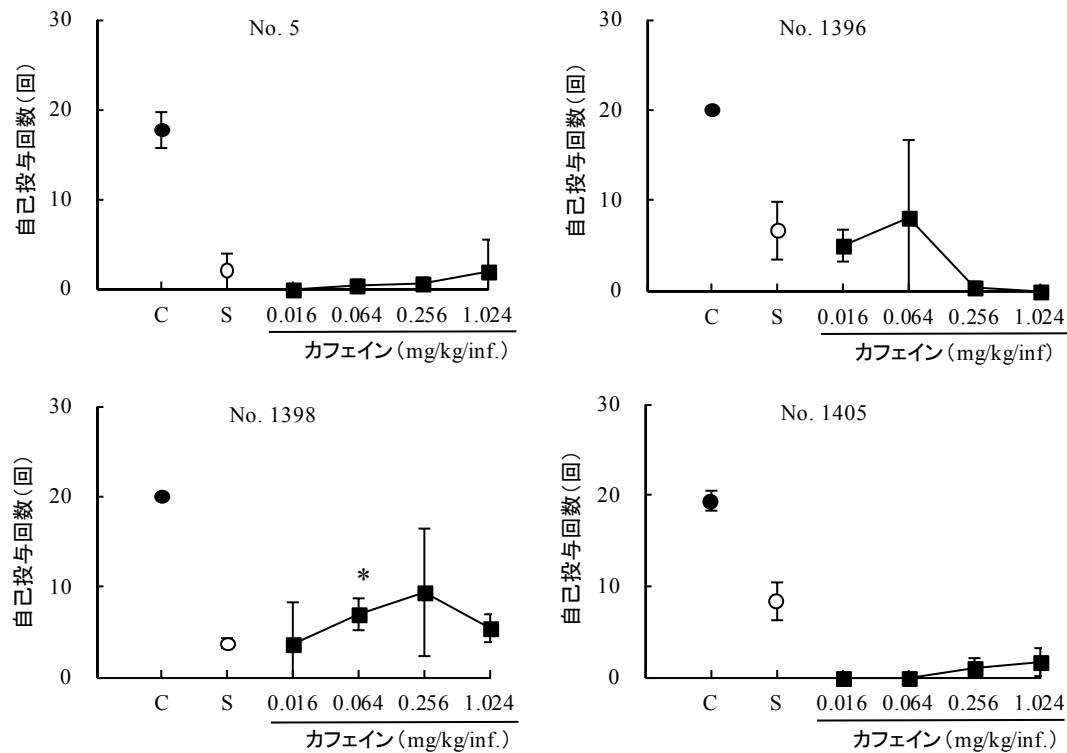


Fig. 9. カフェインの静脈内自己投与
詳細はFig. 5を参照.

各薬物における自己投与回数と平均摂取量を Table 8 に示す。強化効果を検出した用量は、コカインでは 0.004~0.064 mg/kg/infusion, ペントバルビタールでは 0.25~1 mg/kg/infusion, ペンタゾシンでは 0.016~0.063 mg/kg/infusion, ニコチンでは 0.00025~0.0016 mg/kg/infusion 及びカフェインでは 0.064 mg/kg/infusion であった。平均摂取量は動物ごとに異なっていたが、ほとんどの動物では、高用量において最大摂取量を示した。強化効果を検出した動物における平均最大摂取量は、コカインでは 1.7~4.2 mg/kg, ペントバルビタールでは 6.7~17.3 mg/kg, ペンタゾシンでは 1.8~3.8 mg/kg, ニコチンでは 1.5~1.8 mg/kg, カフェインでは 5.5 mg/kg であった。

Table 8 各薬物の自己投与回数の幅及び平均摂取量

コカイン

用量 (mg/kg/infusion)	アカゲザル									
	No. 1		No. 5		No. 1396		No. 1398		No. 1405	
	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake
0.004	15-33	0.1	7-17	0.05	29-43	0.2	14-23	0.1	2-19	0.04
0.016	45-69	0.9	15-40	0.4	36-44	0.6	47-61	0.9	32-60	0.7
0.064	33-36	2.2	29-31	1.9	24-26	1.6	38-57	2.9	30-37	2.1
0.256	12-15	3.4	6-8	1.7	5-9	1.8	16-17	4.2	9-11	2.6
生理食塩液	6-9	-	1-5	-	7-10	-	1-7	-	4-8	-

ペントバルビタール

用量 (mg/kg/infusion)	アカゲザル											
	No. 1		No. 5		No. 1396		No. 1398		No. 1405		No. 1414	
	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake
0.125	-	-	-	-	-	-	-	-	13-28	2.3	-	-
0.25	15-17	4.0	2-14	2.0	7-39	5.9	6	1.5	23-36	7.1	4-10	2.0
0.5	14-18	7.8	20-24	11.2	31-36	16.5	5-9	3.8	21	10.5	9-22	7.8
1	4-8	6.7	13-19	15.0	16-19	17.3	3-6	4.0	11-13	12.0	13-15	14.0
生理食塩液	8-10	-	1-9	-	5-7	-	5-6	-	5-10	-	5-8	-

ペンタゾシン

用量 (mg/kg/infusion)	アカゲザル									
	No. 3		No. 5		No. 1396		No. 1398		No. 1405	
	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake
0.004	1-6	0.01	-	-	-	-	14-16	0.1	-	-
0.016	9-10	0.2	5-7	0.1	19-20	0.3	34-39	0.6	27-42	0.5
0.063	9-11	0.6	5-28	0.9	20-28	1.5	13-28	1.4	46-64	3.4
0.25	4-5	1.2	7-11	2.4	6-9	1.8	5-6	1.4	9-20	3.8
生理食塩液	2-9	-	1-7	-	5-10	-	6-9	-	6-10	-

ニコチン

用量 (mg/kg/infusion)	アカゲザル							
	No. 5		No. 1396		No. 1398		No. 1405	
	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake
0.00025	-	-	10-25	0.005	-	-	-	-
0.001	-	-	18-26	0.02	-	-	5-15	0.01
0.004	0	0.0	5-15	0.04	2-4	0.01	15-32	0.1
0.016	0	0.0	5-17	0.2	1-5	0.05	17-21	0.3
0.064	0-2	0.1	6-9	0.5	2-5	0.2	8-10	0.6
0.256	1-3	0.5	6	1.5	3-4	0.9	7	1.8
生理食塩液	2-4	-	5-8	-	2-4	-	3-9	-

カフェイン

用量 (mg/kg/infusion)	アカゲザル							
	No. 5		No. 1396		No. 1398		No. 1405	
	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake	Range	Intake
0.016	0	0	3-6	0.1	1-9	0.1	0	0
0.064	0-1	0.02	2-18	0.5	5-8	0.4	0	0
0.256	0-1	0.2	0-1	0.1	3-17	2.4	0-2	0.3
1.024	0-6	2.0	0	0	4-7	5.5	0-3	1.7
生理食塩液	0-4	-	3-9	-	3-4	-	6-10	-

Range: 自己投与回数の幅(回) Intake: 平均薬物摂取量(mg/kg/2時間セッション) - : 実施せず
自己投与回数の幅及び平均薬物摂取量は各薬物の最後の3日間の値を集計した。

一般状態観察における効果発現最小用量（MED）と自己投与実験において生理食塩液以上の摂取がみられた用量（SAD）及び最大の摂取がみられた用量（PSAD）の比較を Table 9 に示す。SAD 及び PSAD は、それぞれ MED の 1/1000～1/4 及び 1/250～1/8 であった。

Table 9 一般状態観察における効果発現最小用量(MED)と生理食塩液を超える自己投与を示した用量(SAD)及び最も平均自己投与回数が高かった用量(PSAD)の関係

薬物	用量 (投与経路: 静脈内)						比			
	MED (mg/kg)	SAD (mg/kg/infusion)		PSAD (mg/kg/infusion)			MED/SAD		MED/PSAD	
コカイン	1	0.004	- 0.064	0.016	- 0.064		1/250	- 1/16	1/63	- 1/16
ペントバルビタール	4	0.25	- 1	0.25	- 0.5		1/16	- 1/4	1/16	- 1/8
ペンタゾシン	2	0.016	- 0.063	0.016	- 0.063		1/125	- 1/32	1/125	- 1/32
ニコチン	0.25	0.00025	- 0.016	0.001	- 0.004		1/1000	- 1/16	1/250	- 1/63
カフェイン	4	0.064		0.256			1/63		1/16	

考察

薬物自己投与法の目的は「薬物の強化効果の有無を調べる」ことであるが、その方法には複数のバリエーションがある。例えば、アカゲザルでは初期には連続自己投与法が用いられたが⁸、現在、欧米で良く用いられている方法は substitution 法である⁴⁹。連続自己投与法では実験時間を制限せず、24 時間、動物が好きな時にレバーを押して薬物を摂取することができる。一方、substitution 法では、はじめに標準薬における摂取を高頻度で数日間維持させた後、標準薬を被験物質や媒体に交換し摂取回数を数日間観察する。被験物質を複数用量で実施する場合には、このサイクルを複数回実施する（例えば、標準薬、媒体、標準薬、被験物質 1 用量目、標準薬、被験物質 2 用量目…）。本研究で用いた薬物自己投与法では、はじめに標準薬のコカインを頻回に摂取することを確認し、次に媒体である生理食塩液で摂取が減少することを確認した後に、最後に被験物質を高用量から低用量の順に自己投与させた。すなわち本研究で用いた薬物自己投与法では、substitution 法のように各用量の被験物質を自己投与させる前に標準薬を自己投与させる実験手続きを設けなかった。このように、いずれも実験手順が異なるため、本研究における薬物自己投与の結果の妥当性について検証した。

本研究において強化効果を検出したサルは、コカインでは 5 匹全頭、ペントバルビタールでは 6 匹中 5 匹、ペンタゾシンでは 5 匹中 3 匹、ニコチンでは 4 匹中 2 匹、カフェインでは 4 匹中 1 匹であった。これら本研究で用いたコカイン、ペントバルビタール、ペンタゾシン、ニコチン及びカフェインは、いずれも強化効果を有することが報告されている^{8, 49, 66, 67}。また、ペントバルビタール、ペンタゾシン、ニコチン及びカフェインの強化効果はコカインよりも弱いことが知られている⁶⁸⁻⁷⁰。Substitution 法を用いた実験においても、ペントバルビタール、ペンタゾシン及びニコチンは強化効果を有するが、実験したすべてのサルで強化効果を検出できるとは限らないことが報告されている⁷¹⁻⁷³。さらに、弱い強化効果を有すると考えられるメチレンジオキシメタンフェタミン (MDMA) 及び 2- β -プロパノイル-3- β -(4-トリル)-トロパン (PTT) は、アカゲザルでは強化効果は検出されない^{74, 75}。また、自己投与行動は、自己投与の経験や標準薬の影響を受けることが知られている⁷⁶。例えば、MK-801 は標準薬がフェンシクリジン (PCP) の場合には自己投与されるが、コカインでは自己投与されない⁴⁹。PCP、デキソキサドロール及びデキストロルファンは、標準薬がケタミンの場合には自己投与されるが、コデインでは自己投与されない⁷⁷。本試験では、標準薬としてコカインを用いたため、各薬物の自己投与回数はコカインの影響を受けている可能性がある。

本研究において、コカイン、ペントバルビタール及びペンタゾシンで最も自己投与回数が多かった用量は、他の報告と同程度であった。本研究における最も自己投与回数が多かった用量は、個別値として、コカインでは 0.016 及び 0.064 mg/kg/infusion、ペントバルビタールでは 0.25 及び 0.5 mg/kg/infusion、ペンタゾシンでは 0.016 及び 0.063 mg/kg/infusion であり、既報の個別値として、コカインでは 0.012 から 0.25 mg/kg/infusion⁷³、ペントバルビタールでは 0.062 から 0.5 mg/kg/infusion⁷³、ペンタゾシンでは 0.03 から 0.3 mg/kg/infusion⁷⁸であった。一方、本研究におけるニコチンでは 0.001 及び 0.004 mg/kg/infusion、カフェインでは 0.256 mg/kg/infusion であり、既報の個別値として、アカゲザルによるニコチンでは 0.01 から 0.03 mg/kg/infusion⁶⁶、ヒヒによるカフェインが 3.2 mg/kg/infusion⁷⁹であり、本研究の

用量は既報の 10 分の 1 程度であった。この違いの理由は不明であるが、Sekita ら⁸⁰は、我々と同様の方法で、カフェインにおける最も自己投与回数が多かった用量は個別値として 0.126 及び 0.504 mg/kg/infusion であることを報告している。したがって、この違いには、コカインを標準薬に用いた影響や薬物を高用量から自己投与させる本自己投与方法に特有の条件が関与している可能性がある。

以上の通り、本研究で用いた自己投与方法による結果は、他の自己投与方法とほぼ同じであったため、適切に強化効果を評価できると考えられた。

薬物自己投与において、薬物の注入速度は摂取回数に影響する。すなわち、薬物の血中濃度の増加速度とその最大濃度により摂取回数が決定される⁸¹。注入速度が速い場合には、一般状態の変化は早く発現するため、本研究では一般状態観察と薬物自己投与における投与経路及び投与速度は同一とした。また、本研究では累積用量法を用いたが、その効果発現最小用量は少なくともコカイン及びペントバルビタールの単回投与と同じであった。すなわち、アカゲザル各 2 匹にコカインの 0.5 及び 1 mg/kg、ペントバルビタールの 2 及び 4 mg/kg を単回静脈内投与した結果、コカインの 1 mg/kg では運動持続及び素早い動作が、ペントバルビタールの 4 mg/kg では運動失調がみられた。一方、コカインの 0.5 mg/kg 及びペントバルビタールの 2 mg/kg では一般状態に変化はみられなかった。したがって、単回静脈内投与による効果発現最小用量はコカインでは 1 mg/kg、ペントバルビタールでは 4 mg/kg であった。単回投与による一般状態観察では、動物を多数用いて複数用量を一度に投与する、もしくは、本研究の累積用量法と同様に 2 匹の動物を 1 週間程度のウォッシュアウト期間を設けて複数回実施する必要がある。一方、累積用量法では、1 日に複数用量を実施できるため、動物数の削減に貢献し実験期間も短縮することが可能である。

その他の薬物を用いた追加試験において、最も自己投与回数が多かった用量は一般状態観察における効果発現最小用量の、モルヒネでは 1/63～1/16、コデインでは 1/133～1/33 及びブトルファノールでは 1/32～1/8 であり、本研究で用いたペンタゾシンの 1/125～1/32 を

含めると、その用量範囲は $1/133 \sim 1/8$ であった。さらに、鎮静薬のミダゾラムでは $1/8 \sim 1/2$ 、麻酔薬のケタミンでは $1/8 \sim 1/4$ であり、本研究で用いたペントバルビタールの $1/16 \sim 1/8$ を含めるとその用量範囲は $1/16 \sim 1/2$ であった⁸²。このように他の薬物を用いた研究においても、最も自己投与回数が多かった用量は累積用量法による一般状態観察における効果発現最小用量よりも低かった。また、最も自己投与回数が多かった用量の範囲は、薬物の種類により異なる可能性も示唆された。したがって、本研究で用いた薬物自己投与法と同じ投与経路及び投与速度による累積用量法による一般状態観察は、薬物自己投与の適正な用量設定に有用である。

以上の通り、本研究で用いた一般状態観察法及び薬物自己投与法では、一般状態観察における効果発現最小用量の $1/250 \sim 1/8$ で頻回な自己投与がみられることを示した。したがって、薬物自己投与では一般状態観察における効果発現最小用量より低い用量を選択し、かつ $1/250 \sim 1/8$ を含む用量を設定することで、適切に強化効果の有無を判定できると考えられた。

小括

- 1) 累積用量法による一般状態観察における効果発現最小用量は、薬物自己投与試験の用量設定法として用いることができる。
- 2) 本研究で用いた薬物自己投与方法により、薬物の強化効果を適切に評価できる。
- 3) 薬物自己投与試験の用量範囲は、一般状態観察における効果発現最小用量の $1/250 \sim 1/8$ を含む用量を設定する必要がある。

第3章 薬物弁別試験

緒論

薬物弁別試験では、薬物弁別訓練と般化テストは、通常、同じ投与経路が用いられる。薬物弁別訓練では腹腔内及び皮下経路が多く用いられる⁵⁰⁻⁵³。しかし、いくつかのケースでは被験物質の溶解性の問題のため、般化テストにおいて異なる投与経路が用いられる^{83,84}。また、医薬品開発における非臨床試験では、臨床投与経路での試験が推奨されている⁸⁵。しかし、いくつかの医薬品は複数の臨床投与経路を有し、例えば、モルヒネでは経口、直腸、皮下、静脈内、硬膜外及び髄腔内、フェンタニルでは経皮、静脈内、硬膜外及び髄腔内経路がある。このような薬剤の場合には、臨床適用経路を網羅した薬物弁別訓練及び般化テストの実施は難しい。したがって、薬物弁別訓練では、より早く訓練薬の弁別を獲得する投与経路を選択し、般化テストを臨床適用経路で実施することが合理的である。医薬品開発における薬物弁別試験では、既知の依存性薬物を訓練薬とする場合が多いため、弁別訓練に適した投与経路は既報から選択することができる。一方、般化テストを臨床適用経路で実施する場合には弁別訓練時と投与経路が変わる可能性が高い。したがって、投与経路が異なる場合の般化テストへの影響を検討することは重要である。

ニコチン⁸⁶及びコカイン⁸⁷では弁別訓練と異なる投与経路を用いた般化テストが報告されている。一方、モルヒネを腹腔内投与で弁別訓練したラットでは、モルヒネの経口投与による般化テストは報告されているが⁸⁸、コデインの経口投与による般化テストの報告は乏しい。そこで、本研究ではモルヒネを腹腔内投与により弁別訓練したラットに、モルヒネを弁別訓練とは異なる経路で投与して般化テストを実施した。さらに、他の薬物を用いた般化テストを想定し、モルヒネを腹腔内投与により弁別訓練したラットにオピオイド類のコデインを腹腔内及び経口投与して般化テストを実施した。また、これらの結果から般化テストにおける用量設定について考察した。

材料及び方法

動物

60 匹の雄性ロングエバンスラット（日本チャールスリバー株式会社）を 7 又は 8 週齢で購入し、体重を 290 から 330 g で維持した。これらのラットは木製チップの床敷き（サンフレーク，日本チャールスリバー株式会社）を設置したステンレス製ワイヤーケージ（29W × 22D × 21H cm）で個別に飼育した。また，環境エンリッチメントとして齧り木を与えた。飼料はラット用飼料である CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社）を 15 ± 5 g/日を当日の実験終了後に与え，300 g 前後の体重を維持した。給水は自由摂取とした。飼育室の温度は $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ，湿度は $55 \pm 15\%$ に設定し，照明は午前 7 時から午後 7 時まで点灯した。すべての実験は，AAALAC International の認証施設である株式会社イナリサーチの動物実験審査委員会で承認され実施した。

実験装置

室内灯及び換気扇を備えた防音箱（670W × 600D × 560H mm）内に設置したオペラント実験箱（ENV-008，Med Associates Inc.，241W × 305D × 210H mm）を用いた。実験箱内の壁にはレバー，ランプ及び餌皿を設置した。実験箱の外側には 45 mg の餌ペレット用のペレットディスペンサーを設置した。実験の制御及びデータの記録には MED-PC（Med Associates Inc.）を用いた。

実験方法

薬物弁別実験の概要を Fig. 10 に示す.

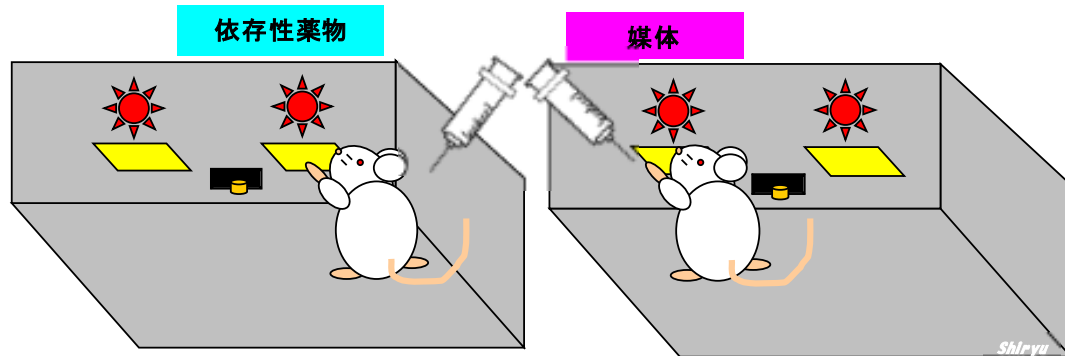


Fig. 10. ラットの薬物弁別試験

はじめに訓練薬のモルヒネとその媒体の生理食塩液の弁別訓練を行った。モルヒネと生理食塩液の弁別を獲得した後、モルヒネ及びコデインの般化テストを行った。

薬物弁別訓練

ラットにレバーを1回押すと餌ペレットが1個提示される Fixed-ratio 1 (FR1) による餌強化スケジュールでレバー押しを学習させた後、生理食塩液とモルヒネ 3 mg/kg の弁別訓練を行った。ラットは生理食塩液又はモルヒネを腹腔内投与した 15 分後に実験箱に移した。15 分経過後に左右ランプを点灯して左右レバーを設置し、レバー押しを開始した。約半数のラットではモルヒネ投与時には右側レバー、生理食塩液投与時には左側レバー押しを正反応とし餌ペレットを1個与えた。残りの半数のラットでは、それぞれ反対側を正反応とした。餌ペレットを与えた後、20 秒間のタイムアウト期間を設けランプを消灯した。タイムアウト期間中のレバー押しは無効とした。弁別訓練は餌ペレット 20 個を獲得するか又は開始から 15 分間経過した時点で終了し、これを1セッションとした。また、弁別訓練は各動物1日1セッションのみとし、投与順は2重交代（生理食塩液、生理食塩液、モルヒネ、モルヒネ、生理食塩液、生理食塩液、モルヒネ、モルヒネ・・・）とした。最初の FR 値を1とし、4セッションごとに FR 値を3及び5の順で増加させ最終的に FR10 とした。生理食塩液とモルヒネの弁別訓練は、以下の2つの基準を5連続セッションで満たすまで継続し

た; 1) FR10 で餌ペレットを 20 個獲得すること, 2) 各訓練日の最初の餌ペレットを獲得するまでのレバー押し回数及び総レバー押し回数の 80%以上が正反応であること. これらの基準を満たした場合, ラットは生理食塩液とモルヒネの弁別を獲得したと判断した. 弁別の平均訓練期間は 52 ± 12 セッション (幅: 28 から 74 セッション) であった.

般化テスト

般化テストは, モルヒネ弁別を獲得した 16 匹で開始した. 般化テスト期間においても生理食塩液とモルヒネの弁別を維持するため, 弁別訓練を継続した. 般化テストの実施基準は 3 連続セッション以上弁別訓練の基準を満たすこととした. 般化テストは基準を満たした翌日に実施した (例: 生理食塩液, 生理食塩液, モルヒネ, 般化テスト, モルヒネ, 生理食塩液, 生理食塩液, 般化テスト...). また, 般化テストは, 経口モルヒネ, 腹腔内コデイン, 経口コデイン及び皮下モルヒネの順序で行った. 般化テストは 1 日 1 回のみ実施した. 経口投与では 1 時間後, 腹腔内及び皮下投与では 30 分後に左右のランプを点灯し, 左右のレバーを設置してレバー押しを観察した. モルヒネ及び腹腔内投与のコデインの前処置時間は既報を基に設定した⁸⁹⁻⁹¹. また, 経口投与のコデインは経口投与のモルヒネと同じ前処置時間とした. モルヒネ及びコデインの投与後には, ラットはテスト開始 15 分前に実験箱に移した. 般化テストは動物が左右いずれかのレバー押しが 10 回に到達するか又は開始から 15 分間経過した時点で終了した. 般化テスト終了までの期間は 120 セッションであった.

薬物

モルヒネ (モルヒネ塩酸塩水和物, 武田薬品工業株式会社) 及びコデイン (コデインリン酸塩水和物, 武田薬品工業株式会社) は, 腹腔内及び皮下投与用の投与液では生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場) に溶解し, 経口投与では注射用水 (株式会社大塚製薬工場) に溶解した. 投与容量は, 腹腔内及び皮下投与用では 1 mL/kg, 経口投与では 10 mL/kg と

した.

統計解析

般化テストにおける, モルヒネ側レバー押しの割合 (%) 及び 1 分間のレバー押し速度 (回/分) を各ラットで算出した. また, これらの各群 11 匹から 16 匹の平均値及び標準誤差を算出した. 腹腔内モルヒネの訓練用量側へのレバー押しの群平均が 80% 以上の場合を完全般化, 20% 以下を般化無し, その間の 20~80% を部分般化とみなした. レバー押し速度は Dunnett's test で比較した (Fig. 11 及び 13). 腹腔内モルヒネの弁別刺激に般化した用量におけるモルヒネ側レバー押し及び反応速度は, Dunnett's test (Fig. 12) 又は Student t-test (Fig. 14) で比較した. また, 腹腔内モルヒネの弁別刺激に般化した動物数は, Chi-square test で比較した (Fig. 12 及び 14).

結果

経口投与によるモルヒネでは、モルヒネ側レバー押しが用量依存的に増加し、30 mg/kg で腹腔内投与によるモルヒネの弁別刺激に完全般化した。レバー押し速度は溶媒の注射用水と比較して有意ではなかったが、30 mg/kg で減少する傾向がみられた (Fig. 11)。

モルヒネ側レバー押しが80%以上のラットは、3、10及び30 mg/kg でそれぞれ16匹中4匹、16匹中9匹及び15匹中11匹であった。16匹中15匹では、経口投与によるモルヒネのいずれかの用量で、モルヒネ側レバー押しが80%以上であったが、1匹では、いずれの用量においてもモルヒネ側レバー押しが80%以上にならなかった。また、16匹中5匹ではモルヒネ側レバー押しの用量依存性が明らかではなかった。すなわち、10 mg/kg でモルヒネ側レバー押しが80%以上であった3匹では、30 mg/kg でモルヒネ側レバー押しが減少し、他の2匹では3及び30 mg/kg のみモルヒネ側レバー押しが80%以上であった (Table 10)。

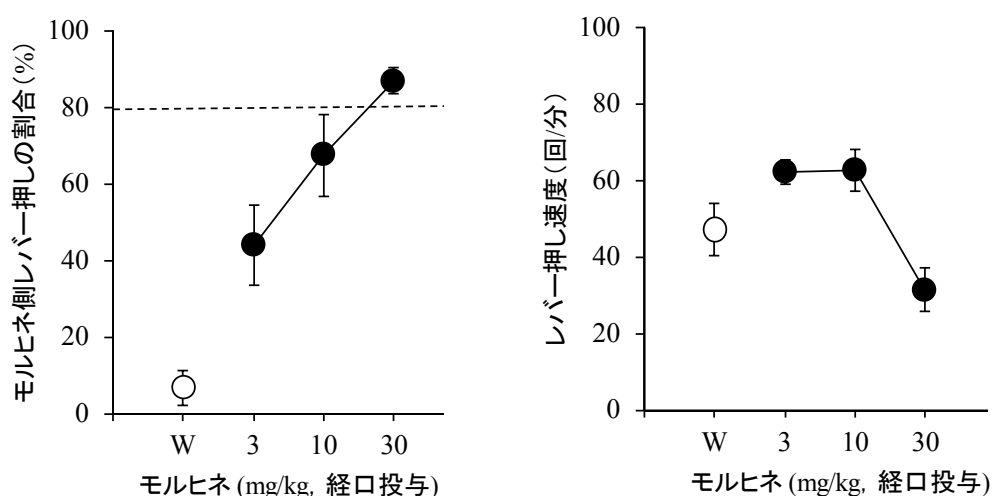


Fig. 11. 腹腔内投与によるモルヒネ3 mg/kgと生理食塩液の弁別訓練を実施したラットにおける経口投与のモルヒネの般化テスト
各ポイントは15又は16匹のラットにおけるモルヒネ側レバー押しの割合及びレバー押し速度の平均値及び標準誤差を示した。レバー押し回数が10回未満であったラットのモルヒネ側レバー押しの割合及びレバー押し速度は集計から除外した。
レバー押し速度の統計解析: 媒体である注射用水(W)投与時と比較して、モルヒネ投与時に有意差はなかった。

皮下投与のモルヒネ 3 mg/kg は腹腔内投与によるモルヒネの弁別刺激に完全般化し、12 匹中 10 匹において、モルヒネ側レバー押しが 80%以上であった。完全般化した群平均としてモルヒネ側レバー押しが 80%以上における腹腔内 (3 mg/kg)、皮下 (3 mg/kg) 及び経口投与 (30 mg/kg) の動物数及びモルヒネ側レバー押し反応率には有意差はなかった。経口投与時 (30 mg/kg) のレバー押し速度は、腹腔内投与時 (3 mg/kg) と比較して、有意に減少した (Fig. 12)。

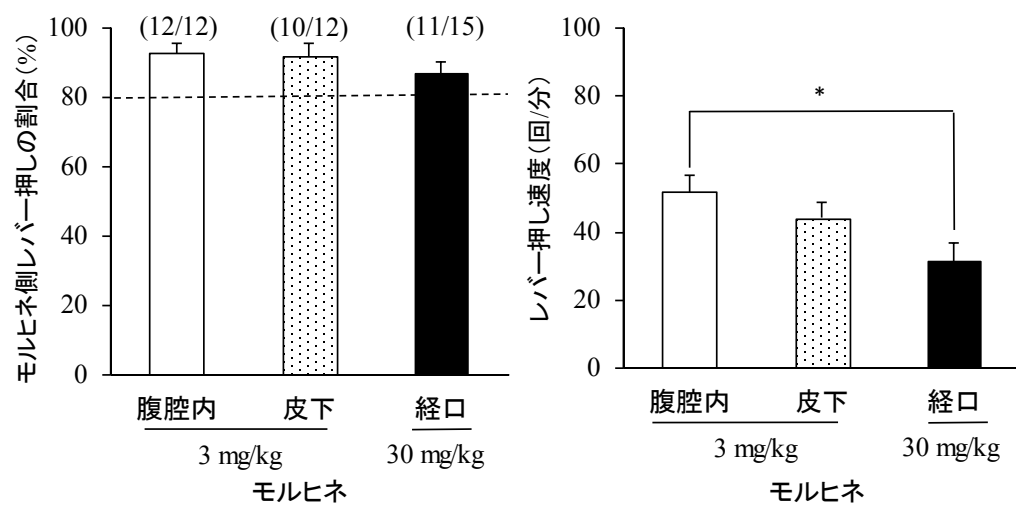


Fig. 12. 腹腔内投与によるモルヒネ 3 mg/kg と生理食塩液の弁別訓練を実施したラットにおける皮下及び経口投与のモルヒネの般化テスト
各カラムは 12 又は 15 匹のラットにおけるモルヒネ側レバー押しの割合及びレバー押し速度の平均値及び標準誤差を示した。括弧内の数値は 10 回のレバー押しを完了したラット中、モルヒネ側レバー押しの割合が 80% 以上であったラットの匹数を示した。
モルヒネ側レバー押しの割合及びモルヒネ側レバー押しの割合が 80% 以上であったラットの匹数の統計解析: モルヒネの腹腔内投与時と比較して有意差はなかった。
*: $P < 0.05$ vs モルヒネの腹腔内投与時のレバー押し速度

コデインの腹腔内及び経口投与では、モルヒネ側レバー押しが用量依存的に増加し、それぞれ 20 及び 60 mg/kg で腹腔内投与によるモルヒネの弁別刺激に完全般化した。レバー押し速度は溶媒の生理食塩液や注射用水と比較して有意ではなかったが、減少する傾向がみられた (Fig. 13)。

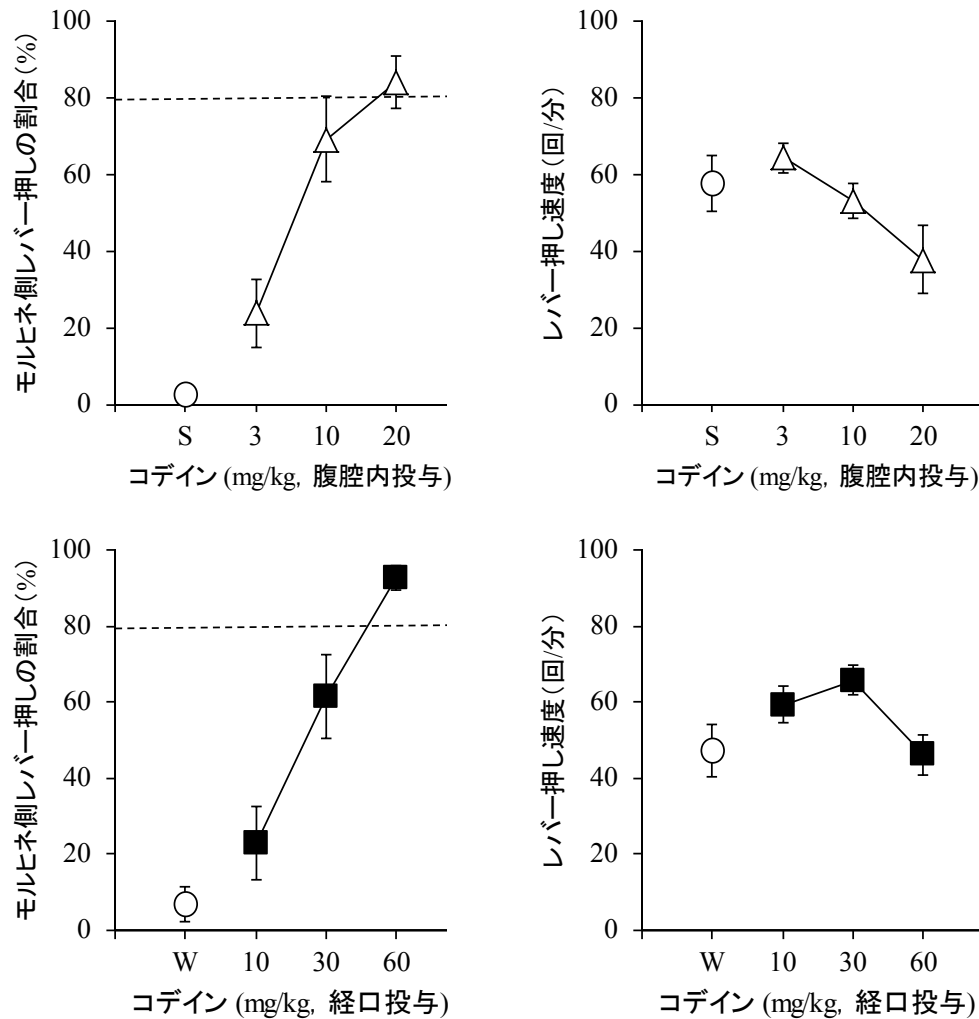


Fig. 13. 腹腔内投与によるモルヒネ3 mg/kgと生理食塩液の弁別訓練を実施したラットにおける腹腔内及び経口投与のコデインの般化テスト
各ポイントは15匹のラットにおけるモルヒネ側レバー押しの割合及びレバー押し速度の平均値及び標準誤差を示した。
レバー押し速度の統計解析: 媒体である生理食塩液(S)又は注射用水(W)投与時と比較して、コデイン投与時に有意差はなかった。

モルヒネ側レバー押しが 80%以上のラットは、腹腔内投与の 3, 10 及び 20 mg/kg ではそれぞれ 15 匹中 2 匹, 15 匹中 10 匹及び 13 匹中 11 匹であり, 経口投与の 10, 30 及び 60 mg/kg ではそれぞれ 15 匹中 2 匹, 8 匹及び 13 匹であった. いずれの投与経路においても 15 匹中 14 匹では, いずれかの用量でモルヒネ側レバー押しが 80%以上であったが, 1 匹では, いずれの用量においてもモルヒネ側レバー押しが 80%以上にならなかった. また, モルヒネの般化テスト時と同様に, コデインにおいてもモルヒネ側レバー押しの用量依存性が明らかではなかったラットがみられたが, 腹腔内及び経口投与で各 1 匹のみであった (Table 10). 完全般化した群平均としてモルヒネ側レバー押しが 80%以上のモルヒネ腹腔内 (3 mg), コデイン腹腔内 (20 mg/kg) 及びコデイン経口投与 (60 mg/kg) における動物数, モルヒネ側レバー押し反応率及びレバー押し速度には有意差はなかった (Fig. 14).

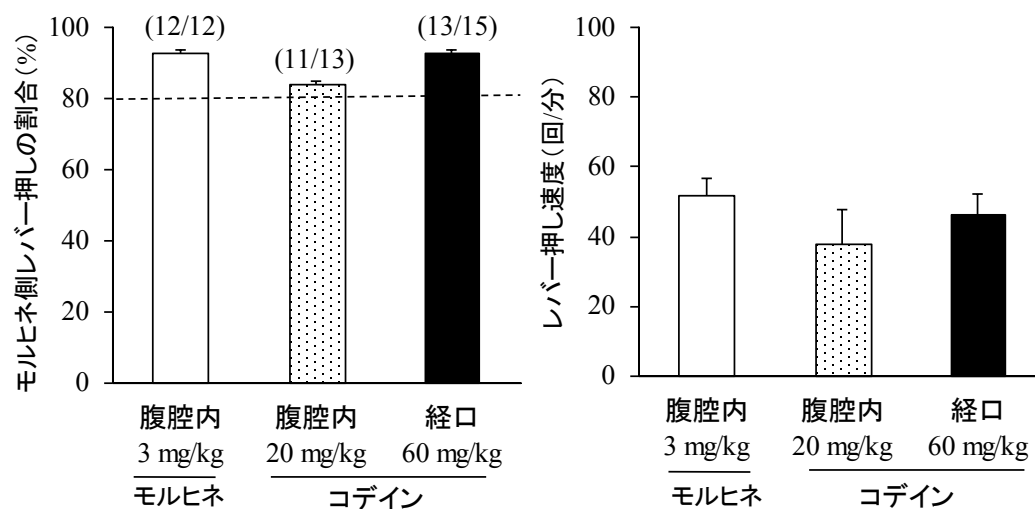


Fig. 14. 腹腔内投与によるモルヒネ 3 mg/kg と生理食塩液の弁別訓練を実施したラットにおける腹腔内及び経口投与のコデインの般化テスト
各カラムは 12~15 匹のラットにおけるモルヒネ側レバー押しの割合及びレバー押し速度の平均値及び標準誤差を示した. 括弧内の数値は 10 回のレバー押しを完了したラット中, モルヒネ側レバー押しの割合が 80% 以上であったラットの匹数を示した.
モルヒネ側レバー押しの割合, モルヒネ側レバー押しの割合が 80% 以上であったラットの匹数及びレバー押し速度の統計解析: モルヒネの腹腔内投与時とコデイン腹腔内又は経口投与時の比較, 及びコデイン腹腔内投与時と経口投与時を比較して, いずれも有意差はなかった.

Table 10 腹腔内投与によるモルヒネ3 mg/kgと生理食塩液の弁別訓練を実施したラットにおける経口投与のモルヒネ及び腹腔内及び経口投与のコデインの般化テスト

モルヒネ側レバー押しの割合(%)

動物 番号	薬物, 投与経路及び用量 (mg/kg)								
	モルヒネ(経口投与)			コデイン(腹腔内投与)			コデイン(経口投与)		
	3	10	30	3	10	20	10	30	60
4	0	100	76.9	0	0	100	9.1	0	100
10	66.7	90.9	66.7	0	90.9	66.7	0	16.7	76.9
11	23.1	100	100	100	100	83.3	0	100	90.9
12	9.1	71.4	90.9	9.1	0	9.1	0	0	83.3
20	9.1	0	83.3	9.1	100	E	0	9.1	90.9
26	33.3	100	100	0	0	83.3	16.7	47.4	90.9
33	100	100	E	28.6	83.3	E	0	100	100
34	100	0	90.9	0	100	90.9	0	100	100
36	76.9	100	71.4	9.1	100	100	16.7	55.6	100
37	100	100	100	0	100	100	100	100	100
38	9.1	37.5	90.9	58.8	9.1	83.3	0	90.9	100
50	0	0	58.8	NC	NC	NC	NC	NC	NC
51	100	9.1	100	0	90.9	90.9	23.1	90.9	100
54	0	100	90.9	0	100	100	76.9	100	100
55	0	100	100	83.3	100	100	100	100	55.6
60	76.9	71.4	83.3	58.8	62.5	83.3	0	9.1	100

レバー押し速度(回/分)

動物 番号	薬物, 投与経路及び用量 (mg/kg)								
	モルヒネ(経口投与)			コデイン(腹腔内投与)			コデイン(経口投与)		
	3	10	30	3	10	20	10	30	60
4	54.5	23.1	2.6	40.0	37.5	28.6	44.0	46.2	35.3
10	47.4	33.0	22.0	66.7	36.7	39.1	50.0	90.0	55.7
11	86.7	50.0	66.7	85.7	50.0	5.9	75.0	75.0	34.7
12	55.0	56.0	47.1	66.0	54.5	73.3	75.0	60.0	55.4
20	66.0	50.0	16.0	60.0	75.0	E	54.5	60.0	82.5
26	60.0	42.9	6.3	42.9	37.5	37.9	23.2	81.4	50.8
33	60.0	75.0	E	49.4	55.4	E	46.2	42.9	1.1
34	66.7	85.7	11.4	75.0	60.0	11.4	66.7	85.7	42.9
36	60.0	66.7	31.1	66.0	50.0	30.0	26.7	72.0	50.0
37	54.5	75.0	7.0	54.5	60.0	6.9	66.7	42.9	40.0
38	47.1	73.8	15.0	78.5	55.0	15.3	60.0	60.0	21.4
50	85.7	85.7	51.0	NC	NC	NC	NC	NC	NC
51	75.0	94.3	35.3	75.0	60.0	66.0	86.7	73.3	66.7
54	54.5	35.3	50.8	50.0	18.8	1.7	78.0	54.5	60.0
55	46.2	75.0	42.9	72.0	50.0	85.7	75.0	75.0	34.8
60	78.0	84.0	65.5	85.0	96.0	90.0	60.0	66.0	60.0

E: レバー押し回数が10回未満であったため, データを集計しなかった.

NC: モルヒネの経口投与による般化テストで, モルヒネの腹腔内投与のいずれの用量にも般化しなかったため, 実施せず.

考察

本研究において、腹腔内投与でモルヒネの弁別訓練をおこなったラットでは、皮下及び経口投与のモルヒネは、腹腔内投与のモルヒネ弁別刺激に完全般化した。皮下投与では訓練用量と同じ 3 mg/kg で、経口投与ではその 10 倍の 30 mg/kg で般化した。モルヒネ 3 mg/kg の皮下投与は、腹腔内投与と同様にモルヒネ弁別訓練でよく使用される投与経路である⁹²⁻⁹⁴。これは皮下投与のモルヒネ 3 mg/kg は十分な弁別刺激を有することを意味している。したがって、本研究では皮下投与のモルヒネは 3 mg/kg のみの 1 用量とし、結果として腹腔内投与のモルヒネに完全般化した。また、薬物弁別試験では、訓練用量が般化テストの結果に影響することが良く知られている⁹⁵⁻⁹⁷。生理食塩液とモルヒネ 10 mg/kg で弁別訓練を実施したラットでは、経口投与のモルヒネ 50 mg/kg で訓練用量のモルヒネに完全般化するが、経口投与の 10 及び 20 mg/kg では般化しない⁸⁸。したがって、般化した経口投与における本研究との用量の違いは、訓練用量の違いを反映していると考えられる。

ヒト及びラットにおけるモルヒネの主要な代謝物は、モルヒネ-3-グルクロニド (M3G) 及びモルヒネ-6-グルクロニド (M6G) である⁹⁸⁻¹⁰⁰。これらの代謝物は静脈内及び皮下投与時に血中で検出され、また、*in vitro* では肝ミクロソームで同様に産生される^{99, 101-103}。ラットでは M6G はモルヒネの弁別刺激に般化するが、M3G は般化しない⁹³。これはモルヒネの弁別刺激には代謝物である M6G も関与することを示している。したがって、モルヒネの弁別刺激には M6G も含まれている。すなわち、異なる投与経路では、吸収や代謝速度の違いはあるものの、本研究における腹腔、皮下及び経口投与には弁別刺激に及ぼす大きな違いはないと考えられた。

本研究では、モルヒネ 30 mg/kg の経口投与における反応速度に減少する傾向がみられた。モルヒネは、tail-flick 法において、経口投与では 30 mg/kg¹⁰⁴、腹腔内^{94, 105} 及び皮下投与¹⁰⁶ では 3 又は 10 mg/kg で十分な抗侵害刺激効果がみられており、これらの血中濃度は同程度であることが示唆される。モルヒネ 3 及び 10 mg/kg の腹腔内投与では反応速度がそれぞれ

80 及び 50%に減少したが, 0.3 及び 1 mg/kg では減少しないことが報告されている⁸⁹. また, 我々の研究において, モルヒネ 3 及び 10 mg/kg の腹腔内投与では数例のラットで軽度な鎮静がみられた. したがって, ラットにおける薬効用量ではモルヒネは反応速度を低下させると考えられた.

コデイン 20 mg/kg の腹腔内投与は, モルヒネ 3 mg/kg の弁別刺激に完全般化し, モルヒネ皮下投与と同程度に反応速度を低下させることが報告されている⁹¹. コデインの抗侵害刺激効果は tail immersion テストにおける腹腔内では 16 mg/kg¹⁰⁷, tail-flick テストにおける皮下投与では 25 mg/kg¹⁰⁸ で認められている. モルヒネと同様に, コデインがモルヒネの弁別刺激に般化した用量は薬効用量と同程度である. コデインの経口投与による抗侵害刺激効果の報告はないが, 上記の通り, コデインもラットでは薬効用量で行動抑止を起こす可能性がある.

本研究では, 経口投与のコデインもモルヒネの訓練用量に完全般化した. 本研究と同様に, 弁別訓練時と異なる投与経路での般化テストの結果が報告されている^{86, 87, 109}. 経口投与で生理食塩液からニコチンの弁別訓練を実施したラットでは, ニコチンの経口, 皮下, 腹腔内及び経皮投与で経口投与のニコチンの弁別効果に完全般化した⁸⁶. しかし, 経口, 皮下及び腹腔内投与では, 経口投与のニコチン側レバー押し反応は同様の用量 - 反応曲線を示したが, 経皮投与での用量 - 反応曲線は約 10 倍右方ヘシフトした⁸⁶. 経口, 皮下及び腹腔内投与では, ほぼ同様の弁別刺激を示したのに対し, 経皮投与では弁別刺激が比較的弱かった. その原因として, ニコチンの皮膚からの吸収が低かったこと⁸⁶が指摘されている. これは, 経皮投与における血中濃度が, 他の投与経路よりも低かったことを意味している. 筋肉内投与で生理食塩液からコカインの弁別訓練を実施したアカゲザルは, コカインの筋肉内及び静脈内投与では用量依存的なコカイン側レバー押し反応を示した⁸⁷. しかし, 経口投与ではコカイン側レバー押し反応がみられたが, 用量依存性は認められなかった⁸⁷. これは血中動態が制御できなかったことが原因と考えられている⁸⁷. 一方, 腹腔内投与で生理食

塩液からメサドンの弁別訓練を実施したラットでは、皮下投与のメサドン、ヘロイン及びモルヒネ、並びに、メサドンの光学異性体である (+) 及び (-) メサドンは、腹腔内投与のメサドンに完全般化したが、腹腔内投与のモルヒネ及びメサドンの異性体は般化しなかった¹⁰⁹。このケースでは、モルヒネ及びメサドン異性体は、弁別訓練と異なる投与経路である皮下投与によってのみ腹腔内投与のメサドンの弁別刺激に般化した。これらの結果も血中濃度の違いが般化テストの結果に影響していると考えられる。この事実は、般化テストでは、投与経路に関係なく血中濃度が重要であることを示しており、したがって、般化テストの用量設定では弁別訓練時と投与経路が異なる場合だけではなく、例えば同じ投与経路で実施する場合においても、血中濃度を考慮することが重要である。

本研究において、経口投与のモルヒネ、腹腔内及び経口投与のコデインによる般化テストでは、ほとんどのラットが 80%以上のモルヒネ側レバー押しを示した。しかし、経口投与のモルヒネでは 16 匹中 1 匹、腹腔内及び経口投与のコデインでは 15 匹中 1 匹でのモルヒネ側レバー押しは 80%未満であった。さらに、経口投与のモルヒネでは 15 匹中 6 匹、腹腔内及び経口投与のコデインではそれぞれ 15 匹中 1 匹が、モルヒネ側レバー押し反応における明らかな用量依存性を示さなかった。したがって、これらも弁別訓練と異なる投与経路による血中濃度の違いが影響した可能性がある。

以上の通り、モルヒネとコデインでは、弁別訓練と異なる投与経路においても、弁別刺激は同様であった。したがって、本研究の条件下では弁別訓練と異なる投与経路で般化テストを実施しても、適切な用量を設定した場合には弁別刺激を適切に評価できることを明らかにした。

小括

- 1) 薬物弁別訓練と般化テストは、必ずしも同一の投与経路を用いる必要はないことを明らかにした。

第4章 身体依存性試験

緒論

薬物の乱用能に関わる試験は、医薬品開発、特に中枢神経系作用薬では必須であり、身体依存性試験もその1つである^{85, 110-112}。モルヒネは身体依存性を有することがよく知られており¹¹³、ラットにおいて身体依存を形成する様々な方法が開発されている。例えば、持続投与方法では、ラットの静脈内にカテーテルを留置し、モルヒネ 4 mg/kg/h を持続的に、もしくは 2~8 mg/kg/回を 1 時間間隔で間歇的に 24~72 時間投与する^{54, 55}。また、ラットの皮下に浸透圧ポンプを埋植し、0.7 mg/kg/h で 72 時間投与する方法もある⁵⁶。皮下経路では、ラットにモルヒネ 15~55 mg/kg の用量を漸増しながら 1 日 1 回 5 日間⁵⁷、10 mg/kg を 1 日 2 回 5 日間⁵⁸ 又は 14 日間投与⁵⁹ する。腹腔内経路では、ラットにモルヒネ 1~32 mg/kg の用量を漸増しながら 1 日 1 回 6 日間⁶⁰、3 mg/kg を 1 日 1 回 28 日間⁶⁰、1~80 mg/kg の用量を漸増しながら 1 日 2 回 6 日間⁶¹ 投与する。さらに、経口経路では 3 種の方法がある。薬物混餌法では、ラットにモルヒネ 0.5~2 mg/g of food を混合した餌を 7 日間与える^{62, 63}。経口の自己投与では、ラットにモルヒネ 0.1~0.4 mg/mL を溶解させた水道水か 5% ショ糖溶液をモルヒネの用量を漸増しながら 3 週間与える⁶⁴。強制経口投与では、ラットにモルヒネ 50~150 mg/kg/day の用量を漸増しながら 1 日 2 回 40 日間投与する⁶⁵。退薬症候観察では、自然休薬^{58, 62} や拮抗薬であるレバロルフアン⁶³ やナロキソン^{54-57, 59-61, 64, 65} を用いた方法がある。

このように、モルヒネの身体依存形成法及び退薬症候観察法には様々な種類があり、多くは投与用量を漸増しながら、1 日複数回の投与を実施している。一方、開発中の薬物における身体依存性試験では、様々な方法により評価するのではなく、動物数や実施試験数の削減あるいは複数試験の実施を避けるため、ある程度統一された方法を用いる必要がある。そこで本研究では、これまで報告されていない、1 日 1 回の経口投与による身体依存形成方法を確立することを目的とし、モルヒネを用いた検討を行った。投与経路の選択について、

身体依存性試験では臨床投与経路での実施が推奨されている⁸⁵。モルヒネは経口、皮下、静脈内、硬膜外及び髄腔内のような様々な臨床投与経路で用いられるが、開発中の薬物において最も主要な投与経路は経口経路である。そこで本研究では経口投与を選択した。また、投与用量について、モルヒネの身体依存形成法は用量を短期間に漸増することが多く、投与期間中を通して同じ用量を投与している報告は少ない。そこで、本研究では用量を漸増せず、投与期間中を通して同じ用量を設定した。退薬症候観察では、臨床における条件と類似させるため自然休薬を選択した。さらに、身体依存の形成には中枢神経系への薬物の効果を維持することが必須であるため、モルヒネの血中濃度も測定した。また、用量設定に資するため身体依存形成時の血中濃度と臨床有効血中濃度を比較した。

材料及び方法

動物

5 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット（日本チャールスリバー株式会社）を購入し、6 週齢（体重 200～221 g）で実験を開始した。これらのラットはステンレス製ワイヤーケージ(29W × 22D × 21H cm) で個別に飼育した。飼料はラット用飼料である CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社）を、給水は上水道水を自由に摂取させた。飼育室の温度は $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $55 \pm 15\%$ に設定し、照明は午前 7 時から午後 7 時まで点灯した。すべての実験は、AAALAC International の認証施設である株式会社イナリサーチの動物実験審査委員会で承認され実施した。

実験方法

モルヒネによる身体依存形成及び退薬症候観察

1 群 10 匹のラットにモルヒネを 10 及び 30 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回 28 日間経口投与し、その後 7 日間休薬した。対照群のラットには注射用水を 10 mL/kg/day で投与した。投

与期間では、一般状態観察、体重及び摂餌量測定を3～4日間隔で実施し、休薬期間ではこれらを毎日実施した。一般状態観察では、ケージ内あるいはケージから取り出したラットについて、以下の観察項目における発現の有無を観察した；投与期間では、運動持続、姿勢（腹臥及び横臥）、立毛、操作に対する反応亢進及び反応低下、動作緩慢、運動失調、筋弛緩、軟便及び下痢（泥状便及び水様便）、休薬期間では立毛、頭部加振、激しい震え、跳躍行動、咀嚼、歯をガタガタさせる行動、舌なめずり、流涎、被刺激性の亢進、振戦、痙攣、軟便及び下痢（泥状便及び水様便）とした。

モルヒネの血中濃度測定

血漿を投与初日及び最終投与日の投与後0.5、1、2及び24時間に、モルヒネ投与群の同じ3匹から採取した。血漿中のモルヒネ濃度はLC-MS/MS（API4000, AB SCIEX Ltd）で測定した。

薬物

モルヒネ（モルヒネ塩酸塩水和物、武田薬品工業株式会社）を注射用水（株式会社大塚製薬工場）に溶解し、遮光容器に入れて冷蔵保存した。

統計解析

体重、摂餌量及び休薬期間中の体重増加率の平均値及び標準偏差を算出した。

休薬期間中の体重増加率は、以下の式で算出した：

$$\text{体重増加率 (\%)} = [(\text{各休薬日の値} - \text{投与28日の値}) / \text{投与28日の値}] \times 100$$

対照群とモルヒネ投与群の体重、摂餌量及び休薬期間中の体重増加率について、Bartlett法による分散の一樣性の検定（有意水準5%）を行った。分散が一樣な場合にはDunnett法、分散が一樣でない場合にはSteel検定を行った。

結果

投与期間

いずれの群においても，一般状態観察で変化はみられなかった．対照群と比較して，モルヒネ 10 及び 30 mg/kg/day 群では，体重及び摂餌量の有意な低下が投与 4 又は 8 日にかけてみられたが，10 mg/kg/day 群の摂餌量低下は，投与 15 日に回復した (Fig. 15)．

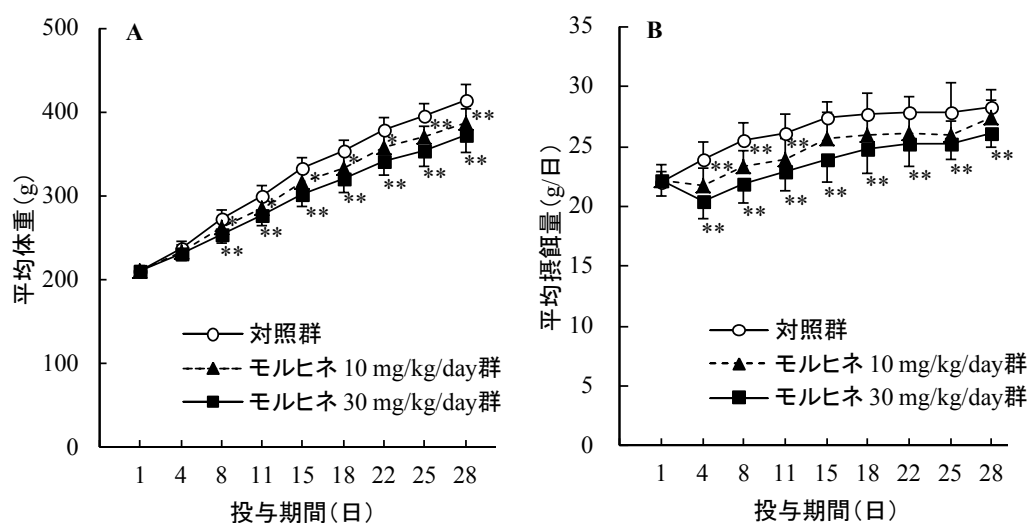


Fig. 15. ラットにおけるモルヒネ28日間経口投与における投与期間中の体重及び摂餌量
グラフA及びBはそれぞれ投与期間中の平均体重及び摂餌量を示した．各ポイント
は各群10匹における平均値及び標準偏差を示した．

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ vs 対照群

休薬期間

一般状態観察 (Fig. 16A) では，対照群に変化はみられなかった．モルヒネ 10 及び 30 mg/kg/day 群では，被刺激性の亢進及び立毛の発現数が用量依存的に増加した．また，下痢及び軟便も 30 mg/kg/day 群ではみられたが，10 mg/kg/day 群ではみられなかった．これらの症状のピークは休薬 3 日であった．

体重 (Fig. 16B) は，対照群と比較して，投与期間中に引き続きモルヒネ 10 及び 30 mg/kg/day 群で有意な低下が持続した．また，モルヒネ 30 mg/kg/day 群では休薬 2 及び 3 日をピークとする一過性の減少もみられた．

体重増加率 (Fig. 16C) は、対照群と比較して、モルヒネ 30 mg/kg/day 群でのみ休薬 2～6 日に有意に低下し、休薬 2 及び 3 日をピークとする一過性の減少がみられた。休薬期間中の体重増加率の最大減少は休薬 2 日で約 3.5%であった。

摂餌量 (Fig. 16D) は、対照群と比較して、モルヒネ 30 mg/kg/day 群でのみ休薬 2 及び 3 日に有意に低下し、休薬 2 日をピークとする一過性の減少がみられた。摂餌量の最大減少は休薬 2 日で約 13%であった。

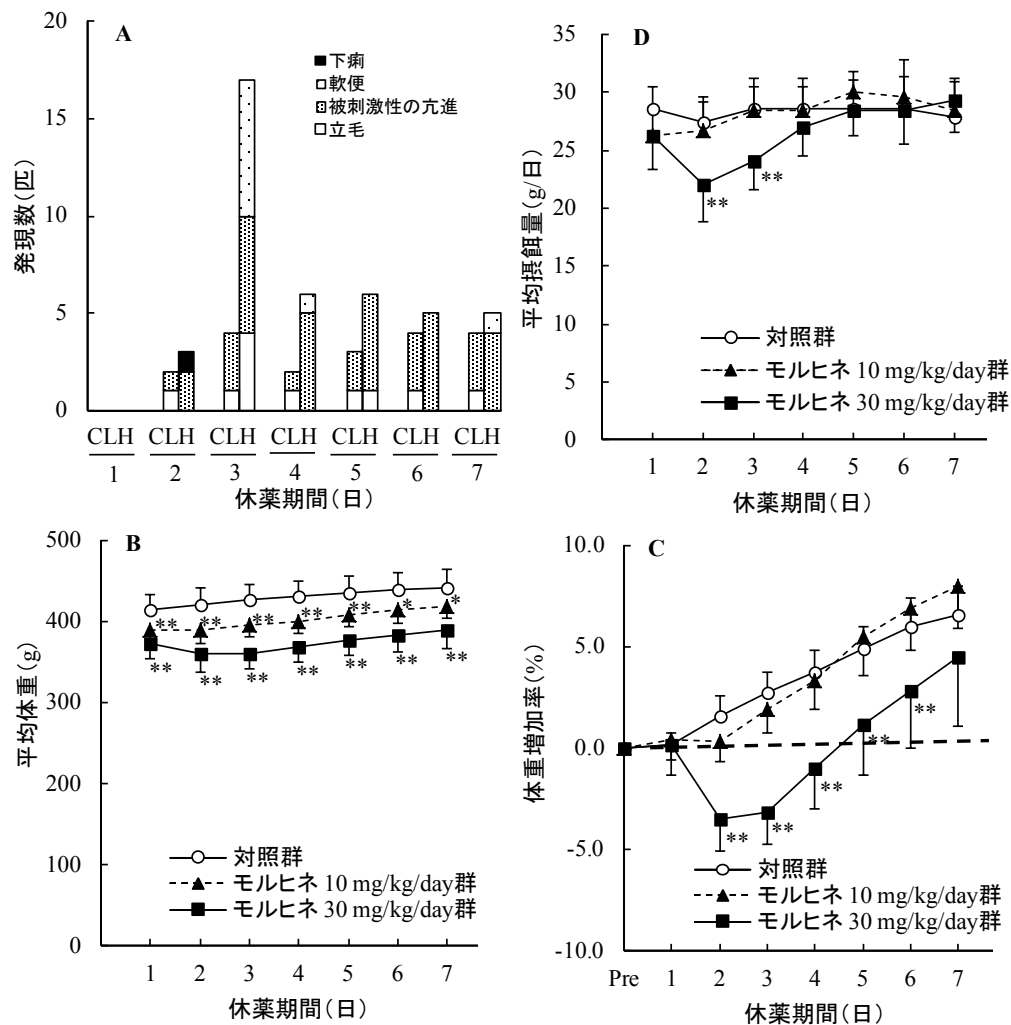


Fig. 16. ラットにおけるモルヒネ28日間経口投与後の退薬症候
 グラフA～Dはそれぞれ休薬期間中の一般状態変化, 体重, 体重増加率及び摂餌量を示した。
 グラフAのCは対照群, Lはモルヒネ 10 mg/kg/day群, Hはモルヒネ 30 mg/kg/day群を示した。グラフB～Cの各ポイントは各群10匹における平均値及び標準偏差を示した。

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ vs 対照群

血中濃度測定

モルヒネ 10 及び 30 mg/kg/day 群のモルヒネ血中濃度の C_{\max} は、投与初日（1 日）ではそれぞれ 58.9 及び 151 ng/mL、投与最終日（28 日）ではそれぞれ 112 及び 466 ng/mL であり、ほぼ用量比にあわせて増加した（Table 11）。また、 C_{24h} は投与初日及び最終日のモルヒネ 10 及び 30 mg/kg/day 群において、それぞれ 3.4, 3.9 及び 13.6, 20.3 ng/mL であり、すなわち、投与期間中、モルヒネ血中濃度はこれらの値以上を維持した。 C_{\max} 及び C_{24h} は投与初日より投与最終日で高かった。

Table 11 投与期間中のモルヒネ血漿中濃度

モルヒネ (mg/kg/day)	動物数	投与日	モルヒネ血漿中濃度		
			C_{\max} (ng/mL)	T_{\max} (h)	C_{24h} (ng/mL)
10	3	1	58.9 ± 15.2	1.0 ± 0.0	3.40 ± 1.03
		28	112 ± 21	1.0 ± 0.0	3.91 ± 0.76
30	3	1	151 ± 49	1.0 ± 0.0	13.6 ± 0.6
		28	466 ± 223	1.0 ± 0.0	20.3 ± 3.9

考察

本研究では、1 日 1 回の経口投与によるモルヒネの身体依存形成とその血中濃度の関係を調べた。

本研究では、モルヒネ 30 mg/kg/day の休薬期間に、被刺激性の亢進、軟便、下痢、体重及び摂餌量減少がみられたが、10 mg/kg/day では認められなかった。モルヒネの退薬症候は Yanaura ら⁶²により詳細に報告されている。この研究では、雄性 SD ラットに低用量としてモルヒネ 0.5 及び 1 mg/g of food を、高用量として 1 及び 2 mg/g of food を 1 週間、混餌で与えた後、通常飼料に交換してモルヒネ退薬症候を観察した。自然休薬期間では、低用量で下痢、軟便、体重減少（11.6%）及び摂餌量減少（67.6～70.5%）、高用量で激しい震え、被刺激性の亢進、体重減少（12.8%）及び摂餌量減少（91.7%）がみられた。したがって、本研究の実験条件下においても、モルヒネ 30 mg/kg/day による身体依存形成が確認された。

一方、本研究における体重及び摂餌量減少の程度は非常に軽度であった。身体依存形成には、投与用量、投与間隔及び期間のような投与方法の条件が重要である¹¹⁰。そして、その投与方法の条件は身体依存形成と退薬症候発現の程度に影響する。アカゲザルに 12 mg/kg/day でモルヒネを皮下投与した場合、3 mg/kg を 1 日 4 回、又は、6 mg/kg を 1 日 2 回投与した際の退薬症候は、12 mg/kg を 1 日 1 回投与した際よりも明らかに重度である。また、身体依存形成も 3 mg/kg を 1 日 4 回、又は、6 mg/kg を 1 日 2 回投与した場合のほうが 12 mg/kg を 1 日 1 回投与した場合より速い¹¹⁴。この結果は、モルヒネの効果を維持することで、より強い身体依存が形成されることを示している。また、このことはモルヒネ 12 mg/kg を 1 日 1 回投与した際のモルヒネの C_{max} は、3 mg/kg を 1 日 4 回、又は、6 mg/kg を 1 日 2 回投与した際よりも高いが、モルヒネの血中濃度の最低値は 3 mg/kg を 1 日 4 回、又は、6 mg/kg を 1 日 2 回投与した際のほうが高いことを示している。したがって、モルヒネ身体依存形成には、その C_{max} よりも最低値のほうが重要であることを示唆している。ラットでは、モルヒネ身体依存形成時のモルヒネ血中濃度が報告されている。モルヒネペレットを皮下に埋植した試験では、モルヒネの身体依存の程度は AUC 及び C_{max} ¹¹⁵、また、維持されたモルヒネ血中濃度¹¹⁶と直接的な相関がみられた。体重減少率が 5 及び 10%では、モルヒネの血中濃度はそれぞれ 100 及び 200 ng/mL であった¹¹⁶。薬物混餌法では、1 及び 2 mg/g of food でのモルヒネの C_{max} はそれぞれ約 400 及び 800 ng/mL であった。さらに、これらの用量では体重減少率は 10%及び摂餌量減少率は 60%であった¹¹⁷。薬物混餌法におけるモルヒネの血中濃度は摂餌のタイミングにより変化するが、血中濃度を 100 ng/mL 以上で維持した場合、モルヒネ身体依存が形成される¹¹⁸。したがって、モルヒネによる身体依存形成には、 C_{max} よりもある血中濃度以上に維持することが必須と考えられる。本研究では、経口投与を 1 日 1 回の投与スケジュールとしたため、薬物混餌法よりも血中濃度の変動が大きく、かつ、維持されたモルヒネ血中濃度が 13.6 及び 20.3 ng/mL 以上と低かった。これらが体重及び摂餌量減少の程度が小さかった原因と考えられた。

本研究におけるモルヒネ 10 mg/kg/day の投与初日及び最終日の C_{\max} はそれぞれ 58.9 及び 112 ng/mL, C_{24h} はそれぞれ 3.40 及び 3.91 ng/mL であり, モルヒネ 30 mg/kg/day の投与初日及び最終日の C_{\max} はそれぞれ 151 及び 466 ng/mL, C_{24h} はそれぞれ 13.6 及び 20.3 ng/mL であった. ヒトにおける鎮痛効果の最小臨床有効血中濃度は 15~65 ng/mL¹¹⁹ である. 本研究における投与初日及び最終日の C_{\max} は, モルヒネ 10 及び 30 mg/kg/day のいずれもヒトにおける最小臨床有効血中濃度の範囲内又は最小臨床有効血中濃度以上であった. しかし, モルヒネによる身体依存は 10 mg/kg/day では形成されず, 30 mg/kg/day では形成された. 一方, C_{24h} は 10 mg/kg/day ではヒトにおける最小臨床有効血中濃度以下であったのに対し, 30 mg/kg/day ではヒトにおける最小臨床有効血中濃度と同程度であった. したがって, 30 mg/kg/day では, モルヒネ投与期間中には少なくとも C_{24h} 以上の血中濃度を維持していたと考えられる. これらも上述したアカゲザル¹¹⁴ 及びラット¹¹⁸ の報告と同様に, モルヒネによる身体依存形成には, C_{\max} よりも最低値である C_{24h} が重要であることを示唆している. また, ヒトにおける臨床有効血中濃度を指標として身体依存を形成させた場合には, 弱い退薬症候しか発現しない可能性も示唆している. したがって, 臨床有効血中濃度を指標とする場合には, より高い用量まで検索する必要がある.

例えば, ラットでは, tail-flick 及び hot-plate テストにおいて, モルヒネは 100 ng/mL 以上の血中濃度で抗侵害効果を示す^{108, 120}. この血中濃度は上述した薬物混餌法による身体依存形成において維持された血中濃度と一致している¹¹⁸. したがって, ラットにおける鎮痛を示す血中濃度を指標に投与スケジュールを検討すれば, より強い退薬症候を発現させることが可能である.

さらに, ラットにジアゼパム 100 及び 300 mg/kg/day をモルヒネと同様の投与条件である 1 日 1 回 28 日間経口投与した追加実験において, ラットにおけるジアゼパムの血中濃度の C_{24h} とヒトにおける抗不安及び抗痙攣効果の臨床有効血中濃度も本研究と同様の関係を示した. すなわち, ジアゼパム 100 mg/kg/day では身体依存が形成されず, 300 mg/kg/day では

身体依存が形成された。また、ジアゼパム 100 及び 300 mg/kg/day における投与初日の C_{\max} はそれぞれ 430 及び 653 ng/mL, C_{24h} はそれぞれ 37.5 及び 374 ng/mL であった。したがって、いずれの用量の C_{\max} はヒトにおける臨床有効血中濃度である 300~600 ng/mL¹²¹ の範囲内であったのに対し、 C_{24h} は 100 mg/kg/day ではヒトにおける臨床有効血中濃度以下、300 mg/kg/day ではヒトにおけるその範囲内を維持していた¹²²。この結果も、身体依存形成には C_{\max} よりも C_{24h} が重要であることを示唆している。

以上の通り、モルヒネ 10 及び 30 mg/kg/day を 1 日 1 回 28 日間経口投与した結果、10 mg/kg/day では身体依存を形成しなかったのに対し、30 mg/kg/day では身体依存が形成された。モルヒネ投与期間中の C_{\max} はいずれの用量においてもヒトの最小臨床有効血中濃度の範囲内もしくはそれ以上であったが、 C_{24h} は 10 mg/kg/day ではヒトのその範囲以下であったのに対し、30 mg/kg/day ではヒトのその範囲を維持していた。したがって、ラットにおけるモルヒネの身体依存形成には、ラットの血中濃度をヒトの最小臨床有効血中濃度以上に維持する必要がある。

小括

- 1) 1 日 1 回 28 日間の経口投与で、投与期間中の投与量を増量しない投与条件で身体依存を形成できることをモルヒネにより明らかにした。
- 2) この条件における身体依存形成には、ラットの血中濃度をヒトの最小臨床有効血中濃度以上に維持できる投与経路、投与用量及び投与間隔を設定することが必要である。

総括

新規開発中の医薬品を対象として実施される主な薬物依存性試験である、薬物自己投与試験、薬物弁別試験及び身体依存性試験方法の確立について、以下の知見を得た。

薬物静脈内自己投与試験では、本研究で用いた薬物自己投与方法は、各用量の被験物質を自己投与させる前に標準薬を自己投与させる欧米で良く用いられる substitution 法の実験手続きを実施せずに簡便化したが、substitution 法と同様に薬物の強化効果を適切に評価できること、及び、薬物自己投与試験の用量設定には、本研究で用いた累積用量法による一般状態観察における効果発現最小用量を指標とした方法が利用できること、並びに、薬物自己投与試験の用量には効果発現最小用量の $1/250 \sim 1/8$ を含む用量を設定することで薬物の強化効果を適切に評価できること、を明らかにした。

薬物弁別試験では、薬物弁別訓練と般化テストは、必ずしも同一の投与経路を用いる必要はないことを、腹腔内投与によりモルヒネの弁別を獲得させたラットでコデインの経口投与による般化テストで明らかにした。

身体依存形成試験では、1日1回28日間の経口投与で、投与期間中の投与量を増量しない投与条件で身体依存を形成できること、及び、身体依存を形成するためには、ラットの血中濃度をヒトの最小臨床有効血中濃度以上に維持できる投与経路、投与用量及び投与間隔の設定が必要なことを明らかにした。

以上の通り、薬物自己投与試験では、substitution 法より簡便な新規自己投与方法及び自己投与試験の新規用量設定法を確立した。また、薬物弁別試験では、般化テストにおける投与経路の選択に関する新たな知見を得た。さらに、身体依存性試験では、新規身体依存形成法及び用量設定法を確立した。これらはいずれも効率的な薬物依存性試験実施に有用であり、無用な実験や動物数の削減に貢献し、さらに、新規医薬品開発における信頼性の高い結果の提供に寄与する。

謝辞

本学位論文をまとめるにあたり，ご指導ご鞭撻を賜りました，主査の高崎健康福祉大学薬学部教授 吉田真先生，副査の高崎健康福祉大学薬学部教授 阿部すみ子先生，副査の高崎健康福祉大学薬学部教授 中道範隆先生に深謝いたします。また，審査を受けるにあたり，きめ細やかにご対応いただいた高崎健康福祉大学薬学部教授 荻原琢男先生，並びに，審査を受ける機会を賜りました高崎健康福祉大学薬学部長 林正弘先生に深く感謝申し上げます。

本研究を実施するにあたり，薬物依存の基礎から実験まで全てにおいて厳しくも温かいご指導及びご助言を賜りました，東京慈恵会医科大学客員教授並びに株式会社イナリサーチ顧問 故 柳田知司博士，株式会社イナリサーチ 故 若狭芳男博士に深く感謝申し上げます。

本研究実施へのご理解及び学位取得の機会を賜りました株式会社イナリサーチ取締役試験研究センター長 佐藤伸一博士及び執行役員 営業企画担当兼事業開発担当 下井昭仁博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の実施において，共に実験を行っていただいた株式会社イナリサーチ 試験研究センター佐々木幹夫氏，飯野雅彦氏，大塚貴弘氏及び下澤美紀氏並びにその他全ての皆様に感謝の意を表します。

最後に，全てにおいて支援及び激励をしてくれた家族に感謝いたします。

参考文献

1. WHO Expert Committee on Drug Dependence. Sixteenth report. Geneva, World Health Organization, 1969 (WHO Technical Report Series, No. 407).
2. 柳田 知司 他. 毒性試験講座 8 薬物依存, 行動毒性. 株式会社地人書館. 1990. p1-25.
3. WHO Evaluation of dependence-producing drugs. Geneva, World Health Organization, 1964 (WHO Technical Report Series, No. 287).
4. Coppock HW, Headlee CP, Nichols JR. Drug addiction. I. Addiction by escape training. J Am Pharm Assoc . 1956 ;45(12):788-91.
5. 船田 正彦, 青尾 直也. 薬物依存性の評価法—条件付け場所嗜好性試験を中心に—. 日薬理誌. 2007;130:128-33.
6. Headlee CP, Coppock HW, NICHOLS JR. Apparatus and technique involved in a laboratory method of detecting the addictiveness of drugs. J Am Pharm Assoc. 1955;44(4):229-31.
7. Weeks JR. Experimental morphine addiction: method for automatic intravenous injections in unrestrained rats. Science. 1962;138(3537):143-4.
8. Deneau G, Yanagita T, Seevers MH. Self-administration of psychoactive substances by the monkey. Psychopharmacologia 1969;16:30-48.
9. Becker HC, Lopez MF. An Animal Model of Alcohol Dependence to Screen Medications for Treating Alcoholism. Int Rev Neurobiol. 2016;126:157-77.
10. Kilbey MM, Ellinwood EH Jr. Self-administration of morphine in the cat. Int J Addict. 1980 ;15(3):447-60.
11. Risner ME, Cone EJ. Intravenous self-administration of fencamfamine and cocaine by beagle dogs under fixed-ratio and progressive-ratio schedules of reinforcement. Drug Alcohol Depend. 1986;17(1):93-102.
12. Desai RI, Sullivan KA, Kohut SJ, Bergman J. Influence of experimental history on nicotine

- self-administration in squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016; 233(12):2253-63.
13. Beattie MC, Maldonado-Devincci AM, Porcu P, O'Buckley TK, Daunais JB, Grant KA, Morrow AL. Voluntary ethanol consumption reduces GABAergic neuroactive steroid (3 α ,5 α)3-hydroxypregnan-20-one (3 α ,5 α -THP) in the amygdala of the cynomolgus monkey. *Addict Biol*. 2015; 22(2):318-30.
 14. Telesford QK, Laurienti PJ, Davenport AT, Friedman DP, Kraft RA, Daunais JB. The effects of chronic alcohol self-administration in nonhuman primate brain networks. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015;39(4):659-71.
 15. Holtyn AF, Kaminski BJ, Wand GS, Weerts EM. Differences in extinction of cue-maintained conditioned responses associated with self-administration: alcohol versus a nonalcoholic reinforcer. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38(10):2639-46.
 16. 若狭 芳男, 佐々木 幹夫, 藤原 淳, 飯野 雅彦. 薬物自己投与実験による強化効果および中枢作用の検索. *日薬理誌*. 2005;126:5-9.
 17. 鈴木 勉. 薬物の報酬効果測定法—CPP(条件づけ場所嗜好性)試験について. *日薬理誌*. 1999;114:365-71.
 18. Phillips AG, LePiane FG. Reinforcing effects of morphine microinjection into the ventral tegmental area. *Pharmacol Biochem Behav*. 1980;12(6):965-8.
 19. Heinrichs SC, Martinez JL Jr. Modification of place preference conditioning in mice by systemically administered [Leu]enkephalin. *Behav Brain Res*. 1986;22(3):249-55.
 20. Valentinuzzi VS, Neto SP, Carneiro BT, Santana KS, Araújo JF, Ralph MR. Memory for time of training modulates performance on a place conditioning task in marmosets. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;89(4):604-7.
 21. Blough DS. Technique for studying the effects of drugs on discrimination in the pigeon. *Ann N Y Acad Sci*. 1956;65(4):334-44.

22. Colpaert FC, Niemegeers CJ, Janssen PA. Theoretical and methodological considerations on drug discrimination learning. *Psychopharmacologia*. 1976;46(2):169-77.
23. Thomsen M, Caine SB. Effects of dopamine D1-like and D2-like antagonists on cocaine discrimination in muscarinic receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol*. 2016;776:71-80.
24. Desai RI, Bergman J. Methamphetamine-like discriminative-stimulus effects of nicotinic agonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;348(3):478-88.
25. Helms CM, Grant KA. The effect of age on the discriminative stimulus effects of ethanol and its GABA(A) receptor mediation in cynomolgus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*. 2011;216(3):333-43.
26. Fujiwara A, Wakasa Y, Hironaka N, Sasaki M, Iino M, Yanagita T. Effects of ifenprodil on the discriminative stimulus effects of cocaine in rhesus monkeys. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 2007;27(1):29-33.
27. Ator NA. Relation between discriminative and reinforcing effects of midazolam, pentobarbital, chlordiazepoxide, zolpidem, and imidazenil in baboons. *Psychopharmacology (Berl)*. 2002;163(3-4):477-87.
28. 溝口 博之, 野田 幸裕, 鍋島 俊隆. 薬物弁別試験－依存性薬物の自覚効果と依存形成機構の解明－. *日薬理誌*. 2005;126:17-23.
29. Plant OH, Pierce IH. Studies of chronic morphine poisoning in dogs. I. General symptoms and behavior during addiction and withdrawal. *J Pharmacol Exp Therap*. 1928;33: 329–57.
30. Tatum AL, Seevers MH, Collins KH. Morphine addiction and its physiological interpretation based on experimental evidences. *J. Pharmacol, exp. Therap.*, 1929; 36:447-75.
31. Maggiolo C, Huidobro F. Administration of pellets of morphine to mice; abstinence syndrome. *Acta Physiol Lat Am*. 1961;11:70-8.
32. 細谷 英吉, 乙部 正治. 白ネズミにおいて薬物に対する Addiction に関する研究 (第 1

- 報) Morphine 反復投与白ネズミにおける禁断症状に就て. 日薬理誌, 1958;54(6):120§
33. 池田 良雄. 薬物の特殊毒性-2 薬物依存. 南江堂. 1978. p156-76.
 34. Cros J, Friebel H. Physical dependence in guinea pigs habituated to morphine. *Med Pharmacol Exp Int J Exp Med.* 1965;12:105-8.
 35. Huidobro F, Lewin J. Tolerance and physical dependence to morphine in the cat. *Acta Physiol Lat Am.* 1969;19(4):345-50.
 36. Aceto MD, Harris LS. Cynomolgus monkeys and morphine tolerance and dependence. *Drug Alcohol Depend.* 1985;15(1-2):15-8.
 37. Krystal JH, Redmond DE Jr. A preliminary description of acute physical dependence on morphine in the vervet monkey. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;18(2):289-91.
 38. Lukas SE, Griffiths RR. Precipitated diazepam withdrawal in baboons: effects of dose and duration of diazepam exposure. *Eur J Pharmacol.* 1984;100(2):163-71.
 39. 金戸 洋, 小井田 雅夫, 土江, 富美代, 宮川英一. マウスを用いる向精神薬の Barbitol 型身体的依存性の検定. 日薬理誌. 1973;69(5):729-38.
 40. Way EL, Loh HH, Shen FH. Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. *J Pharmacol Exp Ther.* 1969;167(1):1-8.
 41. Kaneto H, Koida M, Nakanishi H. Studies on physical dependence inducible by hours exposure of mice to morphine. *Jpn J Pharmacol.* 1972;22(6):755-66.
 42. Teiger DG. Induction of physical dependence on morphine, codeine and meperidine in the rat by continuous infusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1974;190(3):408-15.
 43. 柳浦 才三, 鈴木 勉, 田頭 栄治郎. ラットにおける薬物依存の研究-Substitution test およびラット体重の経時変化について-. 日薬理誌. 1974;70(4):649-58.
 44. Yanaura S, Tagashira E, Suzuki T. Physical dependence on morphine, phenobarbital and diazepam in rats by drug-admixed food ingestion. *Jpn J Pharmacol.* 1975;25(4):453-63.

45. Norton PR. The effects of drugs on barbiturate withdrawal convulsions in the rat. *J Pharm Pharmacol.* 1970;22(10):763-6.
46. Jones BE, Prada JA, Martin WR. A method for bioassay of physical dependence on sedative drugs in dog. *Psychopharmacology (Berl).* 1976;47(1):7-15.
47. Yanagita T, Takahashi S. Dependence liability of several sedative-hypnotic agents evaluated in monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 1973;185(2):307-16.
48. Ator NA, Griffiths RR. Principles of drug abuse liability assessment in laboratory animals. *Drug Alcohol Depend.* 2003; 70(3 Suppl):S55-72.
49. Beardsley PM, Hayes BA, Balster RL. The self-administration of MK-801 can depend upon drug-reinforcement history, and its discriminative stimulus properties are phencyclidine-like in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990;252: 953-59.
50. Chen Y, Evola M, Young AM. Memantine and dizocilpine interactions with antinociceptive or discriminative stimulus effects of morphine in rats after acute or chronic treatment with morphine. *Psychopharmacology (Berl).* 2013;225(1):187-99.
51. Harris AC, Mattson C, Shelley D, LeSage MG. Restraint stress attenuates nicotine's locomotor stimulant but not discriminative stimulus effects in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;124:92-100.
52. Eppolito AK, Kodeih HR, Gerak LR. Using drug combinations to assess potential contributions of non-GABAA receptors in the discriminative stimulus effects of the neuroactive steroid pregnanolone in rats. *Physiol Behav.* 2014;137:33-41.
53. Qiu Y, Zhang Y, Li JX. Discriminative stimulus effects of the imidazoline I2 receptor ligands BU224 and phenyzoline in rats. *Eur J Pharmacol.* 2015;749:133-41.
54. Nakaki T, Saito M, Nakadate T, Tokunaga Y, Kato R. Acute physical dependence induced by continuous intravenous infusion of morphine or meperidine in the rat. *Psychopharmacology*

- (Berl). 1981;73(3):215-8.
55. Wakasa Y, Kawaguchi T, Yanagita T. Withdrawal characteristics following frequent intravenous administration of several opioids in rats. *Arukoku Kenkyuto Yakubutsu Ison*. 1994;29(1):40-51.
 56. Thornton SR, Wang AF, Smith FL. Characterization of neonatal rat morphine tolerance and dependence. *Eur J Pharmacol*. 1997;340(2-3):161-7.
 57. Motaghinejad M, Motaghinejad O, Hosseini P. Attenuation of morphine physical dependence and blood levels of cortisol by central and systemic administration of ramelteon in rat. *Iran J Med Sci*. 2015;40(3):240-7.
 58. Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA. Attenuation of morphine tolerance, withdrawal-induced hyperalgesia, and associated spinal inflammatory immune responses by propentofylline in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2004;29(2):327-34.
 59. Hammami-Abrand Abadi A, Miladi-Gorji H, Bigdeli I. (2016) Effect of environmental enrichment on physical and psychological dependence signs and voluntary morphine consumption in morphine-dependent and morphine-withdrawn rats. *Behav Pharmacol*. 2016;27(2-3 Spec Issue):270-8.
 60. Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Hughes J, Horwell DC, Hökfelt T. CI988, a selective antagonist of cholecystokininB receptors, prevents morphine tolerance in the rat. *Br J Pharmacol*. 1992;105(3):591-6.
 61. Trang T, Sutak M, Quirion R, Jhamandas K. The role of spinal neuropeptides and prostaglandins in opioid physical dependence. *Br J Pharmacol*. 2002;136(1):37-48.
 62. Yanaura S, Tagashira E, Suzuki T. Physical dependence on morphine, phenobarbital and diazepam in rats by drug-admixed food ingestion. *Jpn J Pharmacol*. 1975;25(4):453-63.
 63. Yanaura S, Tagashira E, Izumi T. Studies on dependence of short acting drugs in rats. *Folia Pharmacy Japon*. 1975; 71:329-37.

64. Leung CM, Ogle CW, Dai S. Production of physical dependence in rats by drinking a morphine solution. *Pharmacol Biochem Behav.* 1986;25(5):1001-6.
65. Algate DR, Beard DJ. The physical dependence liabilities of oxybutynin and morphine in rats. *Arzneimittelforschung.* 1985;35(10):1577-9.
66. Slifer BL, Balster RL. Intravenous self-administration of nicotine: with and without schedule-induction. *Pharmacol Biochem. Behav.* 1985;22: 61-9.
67. Beardsley PM, Dance ME, Balster RL, Munzar P. Evaluation of the reinforcing effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR141716, in rhesus monkeys. *Eur J Pharmacol.* 2002; 435: 209-16.
68. Yanagita T. Overview of the progress in drug dependence studies-mainly focussing on psychic dependence-. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 1992;100: 97-107.
69. Briscoe RJ, Vanecek SA, Vallett M, Baird TJ, Holloway FA *et al.* Reinforcing effects of caffeine, ephedrine, and their binary combination in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998;60: 685-93.
70. Woolverton WL, Wang Z. Self-administration of cocaine-pentobarbital mixtures by rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend.* 2009;100: 272-6
71. Ator NA, Griffiths RR. Nicotine self-administration in baboons. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;19(6):993-1003.
72. Aigner TG, Balster RL. Rapid substitution procedure for intravenous drug self-administration studies in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav.* 1979;10: 105-12.
73. Woolverton WL, Hecht GS, Agoston GE, Katz JL, Newman AH. Further studies of the reinforcing effects of benztropine analogs in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;154: 375-82.
74. Beardsley PM, Balster RL, Harris LS. Self-administration of methylenedioxymethamphetamine

- (MDMA) by rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend.* 1986;18: 149-57.
75. Lile JA, Morgan D, Birmingham AM, Wang Z, Woolverton WL, et al. The reinforcing efficacy of the dopamine reuptake inhibitor 2beta-propanoyl-3beta-(4-tolyl)-tropane (PTT) as measured by a progressive-ratio schedule and a choice procedure in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303: 640-8.
 76. Ator NA, Griffiths RR. Principles of drug abuse liability assessment in laboratory animals. *Drug Alcohol Depend.* 2003;70: S55-72.
 77. Young AM, Woods JH. Maintenance of behavior by ketamine and related compounds in rhesus monkeys with different selfadministration histories. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981;218: 720-7.
 78. Balster RL, Lukas SE. Review of self-administration. *Drug Alcohol Depend.* 1985;14:249-61.
 79. Griffiths RR, Woodson PP. Reinforcing properties of caffeine: studies in humans and laboratory animals. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1988; 29: 419-27.
 80. Sekita K, Ochiai T, Ohno K, Murakami O, Wakasa Y, *et al.* Studies on reinforcing effects of methylephedrine, caffeine and their mixture with intravenous-self administration in rhesus monkeys. *Eisei Shikenjo Hokoku.* 1992;110: 15-22.
 81. Wakasa Y, Takada K, Yanagita T. Reinforcing effect as a function of infusion speed in intravenous self-administration of nicotine in rhesus monkeys. *Jpn. J. Psychopharmacol.* 1995;15: 53-9.
 82. Fujiwara A, Iino M, Sasaki M, Ootsuka T, Shimoi A, SatoS. Relationship between the Dose of Intravenous Self-administration and minimum effective dose of gross behavioral observation in CNS depressants in rhesus monkey. *J Toxicol Sci.* 2017;42(Supplement):S312.
 83. Carroll FI, Fox BS, Kuhar MJ, Howard JL, Pollard GT, Schenk S. Effects of dopamine transporter selective 3-phenyltropane analogs on locomotor activity, drug discrimination, and

- cocaine self-administration after oral administration. *Eur J Pharmacol.* 2006;553(1-3):149-56.
84. Heal DJ, Buckley NW, Gosden J, Slater N, France CP, Hackett D. A preclinical evaluation of the discriminative and reinforcing properties of lisdexamfetamine in comparison to D-amphetamine, methylphenidate and modafinil. *Neuropharmacology.* 2013;73:348-58.
 85. European Medicines Agency. Guideline on the non-clinical investigation of the dependence potential of medicinal products. 2006.
 86. Craft RM, Howard JL. Cue properties of oral and transdermal nicotine in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 1988;96(3):281-4.
 87. de la Garza R, Johanson CE. The discriminative stimulus properties of cocaine and d-amphetamine: the effects of three routes of administration. *Pharmacol Biochem Behav.* 1963;24(3):765-8.
 88. Gianutsos G, Lal H. Effect of loperamide, haloperidol and methadone in rats trained to discriminate morphine from saline. *Psychopharmacologia.* 1975;41(3):267-70.
 89. Morgan D, Cook CD, Picker MJ. Sensitivity to the discriminative stimulus and antinociceptive effects of mu opioids: role of strain of rat, stimulus intensity, and intrinsic efficacy at the mu opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289(2):965-75.
 90. Suzuki T, Mori T, Tsuji M, Misawa M. Interaction between discriminative stimulus effects of cocaine and morphine. *Jpn J Pharmacol.* 1995;67(4):341-7.
 91. Recker MD, Higgins GA. The opioid receptor like-1 receptor agonist Ro 64-6198 (1S,3aS-8-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-1H-phenalen-1-yl-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one) produces a discriminative stimulus in rats distinct from that of a mu, kappa, and delta opioid receptor agonist cue. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311(2):652-8.
 92. Nishida N, Hasegawa Y, Chiba S, Wakimasu M, Fujino M. Discriminative stimulus effects of enkephalin analogs, EK-209 and EK-399, in rats. *Eur J Pharmacol.* 1989;174(1):71-6.

93. Easterling KW, Holtzman SG. Comparison of the discriminative and antinociceptive effects of morphine and its glucuronide metabolites after central or systemic administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 1998;140(1):91-7.
94. Li JX, Shah AP, Patel SK, Rice KC, France CP. Modification of the behavioral effects of morphine in rats by serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor agonists: antinociception, drug discrimination, and locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013;225(4):791-801.
95. Sannerud CA, Ator NA. Drug discrimination analysis of midazolam under a three-lever procedure: I. Dose-dependent differences in generalization and antagonism. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;272(1):100-11.
96. Järbe TU, Lamb RJ, Makriyannis A, Lin S, Goutopoulos A. Delta9-THC training dose as a determinant for (R)-methanandamide generalization in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1998;140(4):519-22.
97. Grabus SD, Smurthwaite ST, Riley AL. Nalorphine's ability to substitute for morphine in a drug discrimination procedure is a function of training dose. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999;63(3):481-8.
98. Christrup LL. Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1977;41(1 Pt 2):116-22.
99. Ogura K. An active metabolite of morphine and the responsible glucuronosyltransferase for its formation. *Xenobio. Metabol and Dispos*. 2000;15(2):136-42.
100. De Gregori S, De Gregori M, Ranzani GN, Allegri M, Minella C, Regazzi M. Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metab Brain Dis*. 2012;27(1):1-5.
101. Kuo CK, Hanioka N, Hoshikawa Y, Oguri K, Yoshimura H. Species difference of site-selective glucuronidation of morphine. *J Pharmacobiodyn*. 1991;14(4):187-93.
102. Wu D, Kang YS, Bickel U, Pardridge WM. Blood-brain barrier permeability to morphine-6-glucuronide is markedly reduced compared with morphine. *Drug Metab Dispos*.

- 1997;25(6):768-71.
103. Van Crugten JT, Somogyi AA, Nation RL, Reynolds G. The effect of old age on the disposition and antinociceptive response of morphine and morphine-6 beta-glucuronide in the rat. *Pain*. 1997;71(2):199-205.
 104. Okura T, Ozawa T, Ito Y, Kimura M, Kagawa Y, Yamada S. Enhancement by Grapefruit Juice of Morphine Antinociception. *Biol. Pharm. Bull.* 2008;31(12) 2338-41.
 105. Unal M, Gursoy S, Altun A, Duger C, Kol IO, Kaygusuz K, Bagcivan I, Mimaroglu C. Ineffective doses of dexmedetomidine potentiates the antinociception induced by morphine and fentanyl in acute pain model. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2013;7(5):417-22.
 106. He L, Kim J, Ou C, McFadden W, van Rijn RM, Whistler JL. Methadone antinociception is dependent on peripheral opioid receptors. *J Pain*. 2009;10(4):369-79.
 107. Molina N, Vettore O, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The peripheral analgesic effect of morphine, codeine, pentazocine and d-propoxyphene. *Braz J Med Biol Res.* 1983;16(4):345-52.
 108. Chen SL, Huang EY, Chow LH, Tao PL. Dextromethorphan differentially affects opioid antinociception in rats. *Br J Pharmacol.* 2005;144(3):400-4.
 109. Vann RE, Wise LE, Varvel SA, Philibin SD, Walentiny DM, Porter JH. Route of administration influences substitution patterns in rats trained to discriminate methadone vs. vehicle. *Drug Alcohol Depend.* 2009;103(3):124-30.
 110. Ministry of Health and Welfare, Japan. Scope of Application and Guidelines for Animal Studies and Clinical Observations on Drug Dependence (Notification No. 113). 1975.
 111. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry, Assessment of Abuse Potential of Drugs. 2010.
 112. International conference on harmonization of technical requirements for registration of

- pharmaceuticals for human use. Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. 2009.
113. Suzuki T. Pharmacological studies on drug dependence in rodents: dependence on opioids and CNS depressants. *Jpn J Pharmacol.* 1990;52(1):1-10.
114. Yanagita T. An experimental framework for evaluation of dependence liability of various types of drug in monkeys, *Bull Narc.* 1973;25(4):57-64.
115. Bhargava HN, Villar VM. Tolerance-dependence and serum elimination of morphine in rats implanted with morphine pellets. *Gen Pharmacol.* 1991;22(6):1033-42.
116. Yoburn BC, Chen J, Huang T, Inturrisi CE. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous morphine pellets in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985;235(2):282-6.
117. van der Laan JW, Loeber JG, de Groot G, Sekhuis VM. The concentration of morphine in serum of rats made dependent using a drug-admixed food method. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988;31(1):123-8.
118. Suzuki T, Shimada M, Yoshii T, Yanaura S. Induction of physical dependence in rats by short treatment of morphine-admixed food. *Advances in Endogenous and Exogenous Opioids.* 1981;467-8. Edited by: Hiroshi Takagi and Eric J. Simon. Kodansha LTD., Tokyo.
119. Glare PA, Walsh TD. Clinical pharmacokinetics of morphine. *Ther Drug Monit.* 1991;13(1):1-23.
120. Cicero TJ, Nock B, Meyer ER. Sex-related differences in morphine's antinociceptive activity: relationship to serum and brain morphine concentrations. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 282(2):939-44.
121. 医薬品インタビューフォーム: ジアゼパム錠 2mg 「アメル」, 5mg 「アメル」, ジアゼパム散 1% 「アメル」, 共和薬品工業株式会社. 2018 年 6 月改訂 (第 8 版).
122. Fujiwara A, Shimosawa M, Okada M, Iino M, Sasaki M, Sato S. Physical dependence liability

and blood concentrations of diazepam in rats following oral administration. *J Toxicol Sci.* 2016;41(Supplement):S330.