

2012 年度

薬物依存の維持・再燃過程における薬物探索誘発因子の検討

指導教授 澤 幸祐

研究科 文学

専攻 心理学

氏名 板坂 典郎

目次

第1章

1. 薬物依存研究の背景.....	1
1.1 薬物依存とは.....	1
1.1.1 遺伝負因について.....	3
1.1.2 性差について.....	4
1.1.3 使用開始年齢について.....	5
1.1.4 環境要因について.....	6
1.2 薬物依存研究における学習心理学の応用.....	6
1.2.1 薬物自己投与行動.....	7
1.2.2 条件性場所選好行動.....	9
1.3 薬物依存の神経基盤.....	11
1.3.1 ドパミン神経と脳内自己刺激行動.....	12

第2章

2. 驚愕刺激による薬物摂取・探索行動への影響.....	14
2.1 背景と目的.....	14
2.2 方法.....	17
2.2.1 被験体.....	17
2.2.2 装置.....	18
2.2.3 手術.....	18
2.2.4 手続き.....	19
2.2.5 データ処理.....	21
2.3 結果.....	21
2.3.1 コカイン自己投与行動の形成.....	21
2.3.2 自己投与行動の維持における驚愕刺激提示の効果.....	22
2.3.3 生理食塩水置換時のコカイン探索行動における驚愕刺激の効果.....	24
2.3.4 餌強化による補足実験の結果.....	26
2.4 考察.....	27
2.4.1 聴覚性驚愕刺激によるコカイン自己投与行動への影響.....	27
2.4.2 聴覚刺激によるコカイン探索行動への影響.....	29

第3章

3. ニコチン-条件刺激による ICSS 行動の促進.....	31
3.1 背景と目的.....	31
3.2 方法.....	33
3.2.1 被験体.....	33
3.2.2 薬物.....	34
3.2.3 装置.....	34
3.2.4 手続き.....	36
3.2.5 データ処理.....	40
3.3 結果.....	41
3.3.1 ニコチン投与用量と報酬効果.....	41
3.3.2 ニコチン、条件づけ環境における ICSS 反応閾値.....	42
3.4 考察.....	46
3.4.1 ニコチンとその条件刺激による ICSS 閾値低下.....	46
3.4.2 条件刺激とドーパミン神経.....	47
3.4.3 条件刺激とニコチン依存.....	48
3.5 総括と今後の展望.....	50
引用文献.....	53

第1章

本章ではまず薬物依存全般について医学的な概要、特に、薬物依存研究における遺伝的負因や性差など、生物学的要因について、次に薬物依存研究における後天的要因として、環境因子について述べ、心理学(学習心理学)がいかなる役割を果たしたかを概説する。最後に本研究に至る背景として神経生物学的知見について述べる。これらのことは、本研究で紹介する2つの実験について、これまで科学的に実証されてきたことである。本研究で行った2つの実験は、いずれも、これまでに検討されたことがないため薬物依存研究において新たな知見となることが期待される。

1. 薬物依存研究の背景

1.1 薬物依存とは

薬物依存の問題は、犯罪ではなく精神科疾患である。これは1919年にアメリカの公衆衛生学者 Dr. Bishop ES(1919)が最初に提唱した。そして、1928年よりアメリカでは、薬物依存の社会問題について、盛んに学術会議が開かれるようになった。その中でも代表的な組織は、CPDD(The College on Problems of drug dependence)で、1929年より、毎年7月に学術会議が開かれている。このような経緯で、現在では、薬物依存症は精神科疾患として世界的に認知されるようになり、その診断基準は世界保健機構(World health organization: WHO)刊行の International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD)-10 や、アメリカ精神医学会(American psychiatric association: APA)刊行の Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)-IV-TR に記載されている。日本国内においても、これに従って精神科医師が薬

物依存の診断を行っている。なお、ICD-10 では、薬物依存は、「精神作用物質使用による精神および行動の障害」というセクションの中にあり、アルコール、アヘン類、大麻類、鎮静剤・睡眠剤、コカイン、カフェインなどの精神刺激剤、幻覚剤、タバコ、揮発性溶剤が含まれている。ICD-10 では、薬物依存は精神障害が精神作用物質の使用によって起こっている場合のみ適用され、依存症候群という符節で簡潔に診断ガイドラインが記述されている。一方、DSM では「物質関連障害」という枠組みの中で、アルコール;アンフェタミン類;カフェイン;大麻;コカイン;幻覚剤;吸入剤;ニコチン;アヘン類;フェンサイクリジン、鎮静薬、睡眠薬、抗不安薬の 11 種類の物質について解説されている。このように、依存性薬物には、覚醒剤、モルヒネからニコチン、カフェインまで様々なものが含まれている。これに加えて、日本では、平成 19 年以降、ケタミンやカンナビノイド類を含めた計 59 種類の物質が新たに麻薬として追加指定され、法律によって規制される対象となった。しかしながら、すべての物質、特に新しく規制された薬物については、種類が多様であるためにこれらが人の精神、身体にどのように影響を与えているのか、真に嗜癖的、依存的な症状を呈していくのか、現在までに十分な調査研究が行われているとは言えない(Every-Palmer, 2011)。

このような現状の中で、多様な薬物の中にも顕著に依存性があるものと、そうでないものがある。依存性という点において、タバコに含まれる依存性物質であるニコチン、コーヒーやお茶、そして市販されている飲料に含まれるカフェインは、覚せい剤やモルヒネと比較して、退薬症状(反復投与の後に休薬したときに出現する症状)も軽微であり、渴望(退薬のときに薬物の摂取に対して生じる強い欲求)の程度もまた高くはないことがヒトや

動物の研究から明らかとなっている(Miyata & Yanagita, 2001)。また、単に薬物依存といっても症状の重さは患者によっても異なる。

これらのことから、近年のヒトや動物を用いた薬物依存研究では、それぞれの依存性薬物に対してどういったプロファイルの持ち主が、依存性薬物を常習的に使用したときに、より重篤な依存に陥るのかを検索する研究が行われるようになってきた。現在では、遺伝負因、性差、使用開始年齢、そして環境要因が、薬物依存の進行や重症に至る生物学的要因となることが明らかとなってきている。

1.1.1 遺伝負因について

依存性薬物を投与することによって遺伝子の発現が誘発される。このときに誘発されるタンパク質については、現在まで多くの研究がなされており、特に、覚せい剤やフェンサイクリジンなどは、慢性的乱用の結果、発現する症状が統合失調症と類似していることから、生物学的精神医学の領域で盛んに研究が成されてきている。そのような研究から、依存性薬物に応答するような遺伝子には、遺伝子多型が存在することが分かってきた。

一方、慢性的な薬物使用は、様々な認知機能を低下させることが明らかとなっている。特に、薬物依存と関連の深いテーマとして、衝動性研究が挙げられる。これらの研究では、反応の抑制を必要とする課題、例えば、ストループ課題、GO/No-GO 課題、Stop Signal reaction time (SSRT)課題を衝動性の指標とし、Positron emission tomography (PET)や、functional Magnetic resonance imaging (fMRI)で脳の活動を測定することにより、衝動性と関連のある脳部位が同定されてきた。そして、薬物依存症の実験参加者では、健常者と比較してこれらの課題成績が低く、関連する脳部位の活動も低いことが報

告されている(Goldstein, & Volkow, 2011)。このように、従来は薬物の慢性的使用による行動の抑制的制御の障害を認知機能不全の代表例として捉えることが一般的な理解であった。しかしながら、近年、Ersche, Jones, Williams, Turton, Robbins, & Bullmore. (2012)の研究によって、このような一般的な理解に対する疑問が呈されている。この研究では、薬物依存症患者の生物学的な兄弟姉妹を実験参加者として、2親等以内の家族に薬物依存者がいない参加者を対照群とし、SSRT 課題を施行して課題遂行中の脳機能画像を測定した。その結果、患者群だけでなく、その兄弟姉妹までもが、SSRT 課題における行動抑制までの反応時間は対照群と比較して長く、また前頭前野の領域である Inferior Frontal gyrus(IFG)の活動も低かった。すなわち薬物依存症には発症の有無に関わらず、遺伝負因が存在する。このように、個人の有する遺伝子プロファイルと行動様式が、依存症に至るまでの過程に影響していることが実証されてきている。ニコチン、カフェインやアルコールを含めると、依存性薬物の摂取の機会是谁もが有しているが、薬物依存症への脆弱性は個人差が存在するため、薬物依存を薬物の慢性使用による精神毒性のみで理解しようとする試みには限界があるといえる。

1.1.2 性差について

薬物依存における性差の問題は、ヒトや動物を対象とした多くの研究がこれまでになされており、様々な報告がなされてきた。近年のヒトを対象とした臨床研究の 1 部では、アルコール、大麻、オピオイドにおいて、男性より女性の方が依存に至るまでの経過が早く(Hernandez-Avila, Rounsaville, & Kranzler, 2004)、コカインの最初の使用から 24 ヶ月以内にコカイン依存症になる人数は男性より女性の方が多いたことが報告されている(O'Brien, & Anthony, 2005)。このような性差の生物学的背景について、ラットを用いた

動物研究では、多くの研究において、雄ラットよりも雌ラットの方が、精神活性物質に対して感受性が高く、その1つの要因として女性ホルモンの1つであるエストラジオールが性差による依存性薬物の感受性の差異に関係しているということが示唆されている (Evans, 2007)。さらに、ニコチンに関しては、ラットにおいて比較的早い週齢から、ラットにニコチンを自己投与させると雄よりも雌の方が速やかなニコチン投与量の上昇を示すことが報告されている(Levin, Slade, Wells, Cauley, Petro, Vendittelli, Johnson, et al., 2011)

1.1.3 使用開始年齢について

若年期の依存性薬物使用は、近年、世界的に増加傾向にあり、社会的な問題として注目されている(Crowley, 2006)。ヒトの疫学的調査研究における代表的な報告の1つでは、アルコールに関して、15-18歳にかけてアルコール依存となる危険率が上昇し、その後25歳にかけて下降していくことが明らかとなっており、若年期の薬物使用が依存形成の危険因子として捉えられている(Li, Hewitt, & Grant, 2004)。

ラットを用いた動物行動薬理研究でも年齢(週齢)の影響が広く検討されている。ラットは、生後3週間で離乳し4週目では雌雄ともに生殖機能を有するようになる。そして、5週～7週齢にかけての青春期(Adolescence)と呼ばれる時期を経て8週齢以降、成熟したラットとなる。ラットもまた、ヒトと同様に青春期では、成熟したラットと比較してリスク選択行動、新奇刺激希求性が高く、薬物依存に関連する行動学的特徴が類似していることが知られている(Stansfield, Kirstein, 2006; Douglas, Varlinskaya, & Spear, 2003)。また、青春期ラットは依存性薬物の探索・摂取行動が、成熟したラットと比較して多く、また、依存性薬物の嫌悪的な薬理効果に鈍く、摂取様式は一時に多量を摂取する Binge Intake

と呼ばれる様式のものであることが多くの研究により明らかとなっている(Anker, Baron, Zlebnik, & Carroll, 2012)。現在では、依存性薬物が及ぼす中枢神経の発達への影響も懸念されており、胎児期の母親が摂取した薬物の影響から、青春期における薬物使用と精神病症状の発現の関係まで研究の幅が広がってきている(Mooney, & Miller, 2010; Casadio, Fernandes, Murray, & Di Forti, 2011)。

1.1.4 環境要因について

上述してきた要因は個体毎に重要性が異なるものであるが、これに対して環境要因は、すべてのヒトに等しく影響を与える問題である。薬物依存研究においては、特に薬物再使用の契機としてストレスと、薬物の薬理効果と連合した条件刺激とが挙げられ、これらは、薬物に対する渴望を生起させる。長期間薬物を使用しなかったとしても、再び薬物を使用した元依存症患者は薬物依存の症状を再燃させる。さらに、こればかりでなく近年の研究ではこれらの要因が生体に薬物の摂取を持続的にさせ過剰摂取にさせる因子となることが示唆されている。したがって、薬物の継続使用・過剰摂取や薬物再使用の過程を解明し、ヒトがより重篤な薬物依存症に陥ることを抑止し、依存症となった患者の薬物再使用を防止することが薬物依存症治療のゴールに繋がると言える。本論文では、薬物依存において、ストレスや依存性薬物に条件づけられた刺激がどのように薬物の継続的使用に作用するのかを中心に検討する。

1.2 薬物依存研究における学習心理学の応用

覚せい剤、コカイン、モルヒネを始め、合法的な薬物であるアルコール、カフェイン、ニコチンもまた、多くの動物種にとって、報酬となりうることで多くの動物行動研究により明

らかとなってきた。そして、これらの研究における主要な手法は、古典的条件づけやオペラント条件づけ、弁別学習に基づいている。古典的条件づけでは、薬物を無条件刺激(Unconditioned Stimulus; US)として提示し、光や音、そして、文脈を条件刺激(Conditioned Stimulus; CS)として訓練を行う。条件づけ後に、条件刺激の提示により誘発される薬物探索行動を条件反応(Conditioned Response)と定義する。オペラント条件づけでは、依存性薬物を強化子(Reinforcer)として、レバー押し行動やノーズポッキング(Nose poking)などを強化される行動(Response)とし、薬物によって行動が増加する場合、薬物が強化効果(reinforcing effect)を有すると考える。弁別学習では、薬物によって惹起された何らかの体験を弁別刺激とする。例えば、あるセッションでは被験体にコカインを投与し、左のレバーを押すと餌を獲得できるようにする。別のセッションでは生理食塩水を投与し、右のレバーを押すと餌を獲得できるようにする。このような弁別刺激訓練を続けることで、被験体は、コカインの主観的効果を手がかりとして、適切なレバーを選択するようになる。さらに、弁別学習では、コカインで弁別刺激訓練をした個体に、覚せい剤で般化テストを行うといったことが可能となる。逆に、コカインとともに、コカインの効果を打ち消すような薬剤を投与して、拮抗テストを行うことも可能である。このような手続きでテストを実施することにより、テスト刺激の主観的効果が弁別刺激と同一であったのかどうかを検証することができる。以下に、本研究で用いた薬物自己投与行動と条件性場所選好行動についてそれぞれの実験パラダイムにおける代表的な研究を紹介する。

1.2.1 薬物自己投与行動

薬物自己投与行動(Self-administration: SA)は、薬理活性物質をオペラント条件づけにおける強化子として扱う実験系であり、薬物依存研究の代表的な行動実験の1つであ

る。この実験では、最初に被検体に頸静脈内カテーテルを留置する手術を行う。1週間以上の回復期間をおいた後に、オペラント実験箱を装置として用い、依存性物質を強化子としたオペラント行動を観察する。通常、オペラント実験箱内には、レバーが設置されており、被験体がレバーを押すことにより、薬液を送るためのポンプが駆動し、カテーテルを通じて被験体の静脈内に薬液が注入されることになる。したがって、薬液を正の強化子、レバー押しを強化される反応としたオペラント行動として考えることができ、多くの依存性薬物が正の強化子として機能し、レバー押し行動を促進させることが明らかとなっている。薬物のこのような効果を「強化効果」と呼ぶ。また、サルを用いた実験では、各種の薬物間の「欲求の強さ」を比較することも行われた。この実験では、比率累進スケジュールを用い、1回の強化に必要なレバー押し回数を段階的に増やしていき、アカゲザルがレバー押し行動を止めたとき、最後に強化された試行における強化率を最終比率として、強化効果の強さを薬物間で比較する。この実験で、最も最終比率が高かった薬物はコカインで、その比率は1万回以上であり、最も低かったのは約2千回のニコチンであった(柳田, 1992)。

また、薬物の自己投与行動では、消去訓練によって減少したレバー押し行動が、ある実験的操作を加えたときに再び増加することがある。この現象は、多くの研究において薬物依存再燃の行動モデルとして用いられている。齧歯類や霊長類は、ヒトと同様に薬物関連刺激やストレスを提示すると、消去した後でもレバー押し行動が増加する (de Wit, & Stewart, 1981; de Wit, & Stewart, 1983)。また、ストレスを再燃因子とした行動実験では、ストレスによるレバー押し行動の再燃は、餌やショ糖水などのような自然報酬を正の強化子にした場合には起こらないことが明らかとなっている(Shaham, Shalev, Lu, De Wit, & Stewart, 2003)。したがって、ストレスによるレバー押しの再燃は、依存性薬物に

特異的な行動学的現象であり、薬物依存研究にとって重要な意義のあるモデルを提供しているといえる。

これらのストレス-依存再燃研究で用いられてきたストレッサーは、電気ショックや、電気ショックと連合した条件刺激などである。電気ショックストレスは、齧歯類にとって、Freezing を誘発する無条件刺激であるため、その条件刺激はストレス外傷後障害 (Posttraumatic stress disorder: PTSD) の行動モデルとしても利用されている (Milad, Rauch, Pitman, & Quirk, 2006)。しかしながら、ヒトの臨床場面において、薬物依存症の患者が、恐怖を誘発するほどのストレスイベントを誰しもが経験しているとは考え難く、齧歯類における恐怖条件刺激は、薬物依存症の患者が経験しうるストレスと比較して、相対的にストレス強度が高い可能性がある。したがって、ストレス再燃モデルにおいても、電気ショックと比較して、弱いストレッサーによる薬物依存の再燃を実証することが必要であると考えられる。本研究では、驚愕反応実験に利用される強度の白色雑音(聴覚性驚愕刺激)をストレッサーとして用い、動物の薬物摂取行動や薬物探索行動にどのような影響を与えるか検討した。第 2 章において、ラット-コカイン自己投与行動における聴覚性驚愕刺激の影響を検討した実験を紹介する。

1.2.2 条件性場所選好行動

薬物自己投与行動と並んで重要な研究方法は、条件性場所選好性実験 (Conditioned place preference : 以下 CPP) である (Spiraki, Fibiger, & Phillips, 1982)。

CPP は、古典的条件づけのパラダイムを用いた実験である。CPP に用いる装置は、自由に往来できる2つの異なった環境で構成されたボックスである (Fig.1.1)。このボックスは中央に間仕切りがあり、これを降ろすことで 2 つの独立した区画となる。被験体は、条

条件づけセッションにおいて、一方の区画内で依存性薬物を体験し、他方の区画で偽薬(生理食塩水)を経験する。この実験では、条件づけ訓練の前後に、装置の間仕切りを開放し、被験体が装置内を自由に行き来できる状態で、それぞれの区画に累積で何秒間滞在したかを指標とする。多くの依存性薬物では、被験体は依存性薬物の報酬効果

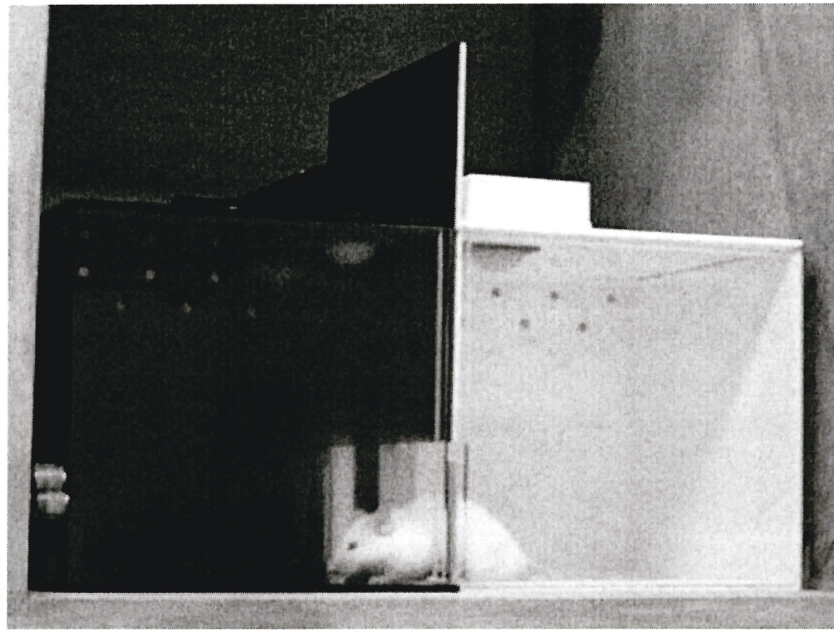


Fig1.1 2-区画条件性場所選好実験装置 写真はテスト時の仕様である。条件づけ時は中央の間仕切りを下ろし、それぞれ独立した環境となる。

を体験した結果、薬物側の環境に選好を示すため、滞在時間が条件づけ前と比較して増加する。また、CPP は、一度形成した後に、薬物側区画において偽薬を経験させるという消去訓練を行うことにより選好を消去することができる。消去された選好行動が、ストレスや低用量の依存性薬物再投与により再発現するため、薬物依存の再燃モデルとして妥当性が高く、薬物の依存性評価試験だけでなく、現在では様々な研究に広く用いられている(Schechter, & Calcagnetti, 1993)。また、US として依存性薬物の代わりに塩化リチウムなどの嫌悪刺激を使用する場合や、依存性薬物の過剰投与や拮抗薬による依存性薬物の退薬症状を US として用いることにより、CPP 装置の一方の区画に対す

る忌避傾向(条件性場所嫌悪行動:Conditioned Place Aversion, CPA)が観察される。すなわち、選好ばかりでなく、ある種の操作の嫌悪効果を評価できることもこの実験系の特徴である(Bardo, & Bevins, 2000)。

CPP 行動を用いた薬物探索行動の神経基盤の解明がこれまで盛んに行われてきた。特に扁桃体は CPP 行動に密接な関与があるとされている。ラットを用いた脳局所破壊実験では、条件づけ前の扁桃体破壊により形成が阻害され、条件づけ後の扁桃体破壊においても選好行動の発現が阻害される(Gremel, & Cunningham, 2008)。さらに扁桃体中心核破壊では電気ショックストレスによる選好行動の再燃が阻害されることが明らかとなっている(Wang, Takigawa, Hamada, Shiratani, & Takenouchi, 2002)。

1.3 薬物依存の神経基盤

コカインや覚せい剤を含む興奮性薬剤だけでなく、ケタミンやモルヒネなどを含む鎮静作用を有する薬剤やニコチン、カフェイン、アルコールなどの合法的な精神活性物質など、ほぼすべての依存性を有する薬剤は、腹側被蓋野(Ventral Tegmental Area; VTA)を起始核とし、内側前脳束(Medial forebrain Bundle; MFB)を経て、側坐核(Nucleus Accumbens; NAc)や内側前頭前野(Medial Prefrontal Cortex; mPFC)に投射される中脳辺縁系ドパミン作動性神経を活性化させることが明らかとなっている。動物を用いた行動薬理学的研究では、これらのドパミン機能を、例えば、6-ヒドロキシドパミンによるドパミン神経の脳局所破壊などの手段を用いて操作的に低下させることにより、報酬効果や強化効果を阻害するという多くの報告がある(Caine, & Koob, 1994; Koob, 2000)。反対に、これらの神経へ依存性薬物を局所注入することによって、

報酬効果や強化効果を発現することもまた実証されている(Carlezon, W. A., & Wise, 1996; David, Segu, Buhot, Ichaye, & Cazala, 2004)。一般的には中脳辺縁系ドーパミン作動性神経を、“快の中核”と捉え、「脳内報酬系」と呼ぶことが認められてきた。しかしながら、現在では被験体に不快な刺激を与えたることにより条件刺激を提示した場合にもドーパミン神経が興奮するため (Mirenowicz, & Schultz, 1996), この神経系を「脳内報酬系」と呼ぶことは差し控えられているが、少なくともドーパミン神経が依存性薬物の快体験生起に必要な不可欠な神経であることは一般的に理解されている。

1.3.1 ドーパミン神経と脳内自己刺激行動

興奮性の依存性薬物であるコカインや覚せい剤(メタンフェタミン)は、NAc におけるドーパミン神経前シナプスのドーパミントランスポーターなどに結合にして、シナプス間隙に放出されたドーパミンの再取り込みを阻害する。その結果、シナプス間隙のドーパミン量が増加するため、後シナプスへのシナプス伝達が増える。このような神経薬理効果は、脳内微小透析法(microdialysis)によって直接的に、脳内局所ドーパミン量を測定することによって観察できるが、サンプルの回収に時間を要するため、時間解像度は最高でも 5 分程度である。そのため、刺激提示や行動に伴う秒単位のドーパミン放出の変化を捉えるには不適切である。一方で、近年技術的に進歩を遂げたのが、電気化学的に秒単位のドーパミン放出を測定することを可能にした *in vivo* fast scan cyclic voltammetry である。この方法では時間解像度が 100 ミリ秒単位であるため、刺激、あるいは報酬提示における一過性のドーパミン放出を測定することが可能である。しかしながら、この方法では、刺激提示前のドーパミン量をベースラインとして刺激提示後のドーパミン増加量を測定することしかで

きないため、条件刺激が文脈の場合や、報酬提示時間が数分に及ぶ場合には適さない。これらの方法以外に、Olds, & Milner. (1954)によって最初に発見された脳内自己刺激行動(Intra cranial self-stimulation: ICSS) を、脳内のドーパミン神経機能を測定する手法として使うことができる。ICSS 行動は、脳内に刺激用電極を埋め込み、被験体のレバー押しに伴って電気刺激を標的部位に与えるという実験手続きであり、一定強度の電気刺激では高頻度のレバー押し行動をするが、ここで、電気刺激の強度を徐々に低くしていくことにより、被験体はレバー押し行動をしなくなっていくことが観察される。これまで、ICSS 行動が確認された脳部位は、中脳辺縁系ドーパミン神経を含む経路であり、ドーパミン神経を興奮させる依存性薬物を投与すると、生理食塩水投与下と比較してより低い強度の電気刺激でもレバー押し行動を持続させることが明らかとなっている。また、ドーパミン神経の D2 受容体拮抗薬であるハロペリドールを投与した場合には、生理食塩水投与下と比較してレバー押し行動を維持させるために必要な電気刺激の強度がより高くなる(Greenshaw, 1993)。これらの先行研究から、間接的ながら、ドーパミン神経の賦活レベルを ICSS の電気刺激閾値を指標にすることによって評価することができるといわれている。さらに、電気刺激の強度を細かく設定することにより、条件間の僅かなドーパミン神経賦活の差異も検討することが可能である。ICSS 行動は電極埋め込みの手術が比較的容易であるため、多くの先行研究があり、知見が豊富である。しかしながら、薬物依存研究においては、薬物の効果と連合した条件刺激によるドーパミン神経の活性変化を検討した報告は比較的少ない。本研究では、ニコチンが無条件刺激、環境を文脈性-条件刺激とし、ニコチンによって条件づけられた環境刺激下では自己刺激閾値が変化するかを検討した(第3章)。

第2章

2. 驚愕刺激による薬物摂取・探索行動への影響

2.1 背景と目的

ストレスは、薬物依存の形成・維持、および再燃の過程において、促進的な効果を有する。たとえば、形成については、連日のコカイン自己投与行動中に電気ショックの提示を繰り返すことにより、セッションを重ねるにつれて、1セッション当たりの薬物摂取行動はストレス提示をしない統制群と比較して増加する (Mantsch, & Katz, 2007)。また、条件性場所選好実験では、コカイン(生理食塩水)と環境の条件づけの前に強制水泳ストレスをマウスに与えることにより、統制群と比較して場所選好行動の増強が示される (McLaughlin, Marton-Popovici, & Chavkin, 2003; McLaughlin, Land, Li, Pintar, & Chavkin, 2006)。なお、強制水泳ストレスによる場所選好行動の増強は、無条件刺激としてエタノールやニコチンを使った場合にも生じる (Sperling, Gomes, Sypek, Carey, & McLaughlin, 2010; Smith, Schindler, Martinelli, Gustin, Bruchas, & Chavkin, 2012)。

次に維持については、ヘロインの探索行動が電気ショックストレスの提示で維持され、消去後も電気ショックによって再燃されたが、オピエート受容体の拮抗薬であるナルトレクソンを用いて薬理的に退薬症候を誘発した場合には、維持や再燃が起こらなことが明らかとなっている (Shaham, & Stewart, 1996)。退薬症候は不快な症候であり、生体にとってはストレスの一種と考えられるが、ストレスによる薬物探索行動の維持に、身体依存に基づく退薬症候に関連したストレス状態が関与しているという可能性は低いことが示唆される。すなわち、生体外の環境要因としてのストレスが依存性薬物の継続使用の維持に何らかの形で直接関与していることが考えられる。

薬物探索行動の再燃に関するストレスの促進的効果を調べた研究もまた多くの報

告がある。ラットの薬物自己投与実験では、様々な依存性薬物の自己投与行動が無強化による消去訓練後にストレス刺激を提示することによって、再発現する(Shaham et al., 2003)。このほかに、不安惹起効果を有するヨヒンビンの投与によっても、覚せい剤の自己投与行動が再燃する (Shepard, Bossert, Liu, & Shaham, 2004)。すなわち、不安はストレスによる薬物探索行動の再燃の1つであることが示唆される。このようなストレスによる薬物探索行動の再燃は退薬症候が比較的軽微なニコチンの自己投与行動においても観察される (Zislis, Desai, Prado, Shah, & Bruijnzeel, 2007)。すなわち、ストレスによる再燃には依存性薬物そのものの身体依存形成能はあまり関与していないことが示唆される。そしてこのような再燃現象は、餌を強化子とした自然報酬では起こらないため (Ahmed, & Koob, 1997)、ストレスによって再燃される薬物探索行動は依存性薬物に特異的な現象であるとされている。

しかしながら、薬物依存の形成・維持・再燃に対するストレスの効果を検討したこれまでの多くの研究では、主に電気ショックや、強制水泳など、げっ歯類にとって恐怖を誘発するほどの強いストレス刺激が用いられてきた。これらの先行知見と同様に、強度の異なる他の種類のストレスにおいても、薬物探索・摂取行動の増進効果が観察されるかどうかは明らかではなかった。そこで、ストレスの効果をヒトの薬物依存問題に拡張して考えるためには、ヒトが日常生活で体験するような緩和なストレスの効果についても検討する必要があると考えられた。本研究では、ストレスが薬物探索行動に及ぼす促進的な効果が、不安を惹起する程度の緩和なストレスである聴覚性驚愕刺激でも見られるかどうかを検討した。

聴覚性驚愕反応(Auditory startle response; ASR)は、突然の大きな音によって、様々な動物種で生起する反射である。このような聴覚性驚愕反応は、原始反射の1つと

して生理学的研究における生体防御機構の解明に広く利用されてきた。これまでに、驚愕刺激の繰り返し提示による馴化や、驚愕刺激に先行して刺激提示をすることによる先行刺激効果などが研究されており、単純な刺激-驚愕反応のメカニズムだけでなく、驚愕反応が多様な修飾を受けていることが知られている(Koch, & Schnitzler, 1997)。また、ストレスに関連した研究では、動物の不安の指標として、fear potentiated startle response が観察されている。この実験では、主としてラットやマウスなどげっ歯類を用い、事前に、環境を文脈条件刺激、電気ショックを無条件刺激とした古典的条件づけを動物に行う。その後、統制刺激、あるいは恐怖条件刺激下で聴覚性驚愕刺激を提示し、恐怖条件刺激下では驚愕反応の大きさが増大するかどうかを観察する。ここでは驚愕反応の増大を不安の指標として用いている(Davis, 1986; Davis, 1990)。

このように驚愕反応実験は、様々な分野で使用されてきたが、驚愕反応を誘発する刺激をストレス刺激として用いた研究は比較的少ない。しかしながら、驚愕刺激の提示そのものが不安を惹起することが、げっ歯類の Ultra Sonic Vocalization(USV)を用いた研究から明らかとなっている。げっ歯類は 105dB(SPL)以上、持続時間 50msec 以上の音刺激を提示されると、刺激提示から 4 秒以内に 22kHz の USV を発声する (Vivian, Farrell, Sapperstein, & Miczek, 1994)。この 22kHz 帯の鳴き声は、ラットが嫌悪的な情動状態にあるときに発声され、事態がより嫌悪的であれば、刺激から発声までの間隔が短くなり、発声回数が増加する (Tunstall, Beckett, & Mason, 2009)。なお、22KHz の USV は、抗不安薬投与により発声頻度が減少するという特徴から恐怖よりも不安の Index であることが示唆されている(Jelen, Soltysik, & Zagrodzka, 2003)。これらのことから、驚愕刺激もまた嫌悪的な刺激であり、聴覚性驚愕刺激がストレス刺激として利用できる可能性が示唆され、驚愕刺激は少なくとも電気ショックのような恐怖誘発刺激とは異なる

特徴を持ったストレス刺激と考えられる。

そこで本研究では、聴覚性驚愕刺激をストレスラーとして用いた場合、電気ショックと同じようにコカイン自己投与行動に対して促進的であるのか、さらに、薬液をコカインから生理食塩水に置換した無強化テストセッションにおいて薬物探索行動を維持させる効果を持つかどうかを検討する。なお、本研究では、薬物探索行動を消去訓練や再燃テストにおける無強化セッションにおける報酬探索行動とし、コカイン(強化子)が提示されるセッションを薬物自己投与行動と定義している。そして、このようなストレスによる報酬探索・摂取行動が、依存性薬物に特異的であるかを検証するため、別の薬物未経験の被験体を用いて餌を強化子とした実験を行った。この実験でもまた、コカイン自己投与行動と同様のストレス提示条件で実験を行うこととした。

2.2 方法

2.2.1 被験体

実験は、NTT 研究開発センタ内の下條潜在脳機能プロジェクト嗜癖行動研究グループ(独立行政法人科学技術進行機構戦略的創造研究推進事業)にて、同機構の動物実験委員会の承認の下に行われた。Sprague -Dawley 系雄性ラット(300-350g)を被験体として、8 時~20 時を明期とした明暗サイクルの飼育装置内で個別飼育した。飼育環境は、自由給水下で、餌は、実験開始以降、1日約 20g の固形飼料を実験終了後に与えることとし、予備飼育や術後の回復期間は自由摂取とした。被験体は、コカイン自己投与行動実験に 32 匹、餌自己摂取行動実験に 24 匹用いた。

2.2.2 装置

4台のラット用オペラント Box を用いた。これらは、それぞれ換気用のファンを備えた防音箱内に設置された。オペラント Box 内には、ラット行動反応用のレバーが1つ、セッション中は常時点灯するハウスライトが1つ、レバーの上部にタイムアウト時に消灯する Cue ライトが1つ、餌強化用の Food ディスペンサーと餌皿が1つ設けられていた(Fig.2.1)。コカインインジェクション用のシリンジポンプは、防音箱の上に設置し、シーベルを介して薬液注入ができるようにした。さらに、音刺激提示用のスピーカは、防音箱内に設置された。スピーカからは、115dB のホワイトノイズ(70dB の Beep 音)が提示できるようにした。また、防音箱内の背景音は、騒音計で測定し、40-50dB の範囲であった。

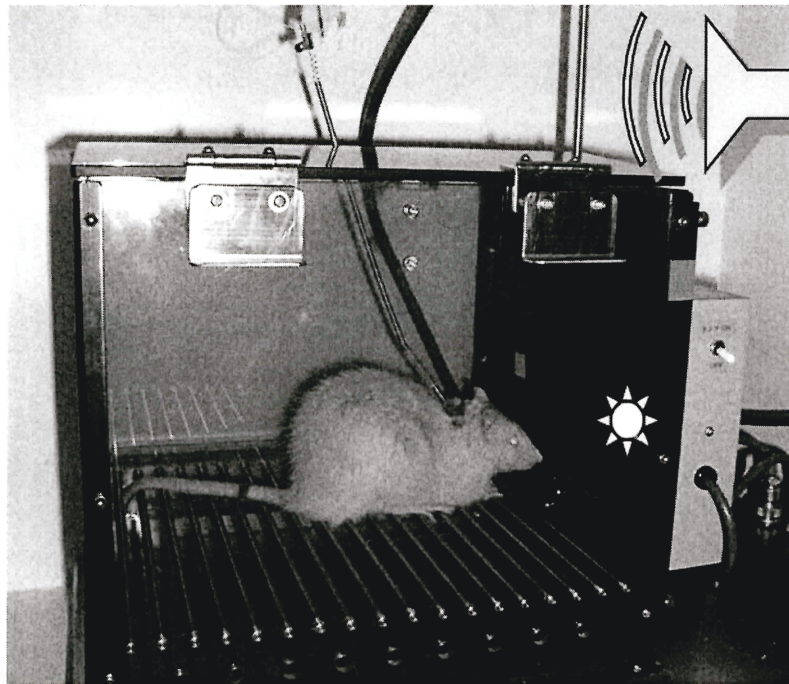


Fig.2.1 自己投与実験に用いた1レバーオペラントBox 被験体はレバーを押すことにより背部に繋がれたカテーテルより、薬液を注入される。驚愕音やbeep音の提示はBox外のスピーカより提示された。

2.2.3 手術

はじめに、ラットは、レバー押し行動の形成をする目的で、餌ペレットを強化子とした

連続強化スケジュールの訓練を 3 時間、2セッション受けた。その翌日に、ラットはペントバルビタール麻酔下(50mg/kg, intraperitoneal; i.p.)で、頸静脈内カテーテル留置の手術を受けた。カテーテル先端はラットの背部より露出させ、実験時にはコカイン投与用のチューブと接続出来るようにした。なお、実験時以外は、ステンレス製の金属線で栓をした。また、静脈カテーテルは、連日ヘパリン生理食塩水をカテーテルに注入することで、カテーテル内に血栓ができないようにメンテナンスをした。

2.2.4 手続き

1 週間の回復期間において、ラットは、コカイン(0.6mg/injection)を強化子とした固定比率スケジュール(Fixed Ratio; FR1, 20" time out; TO)で 12 時間の自己投与行動獲得セッションを設けた。この獲得セッションを設けることによって、訓練期間における薬物の総摂取量を全被験体で比較的均一にすることが可能となった。獲得セッションより 36 時間後から、FR5 のコカイン自己投与行動を形成させるため、連日2時間の自己投与訓練を開始した。自己投与訓練は、FR1スケジュールを 3 セッション、FR2 を 3 セッション、FR5 を5セッション行った(Fig.2.2)。FR5 における最後の3セッションのレバー押し反応が変動範囲 10%以内であることをコカイン自己投与行動の獲得基準とした。以降の音提示実験では、この基準を満たした個体を用いることとした。基準を満たした 23 匹のラットに番号を付し、ID が偶数の個体を驚愕刺激群、奇数の個体を統制刺激群に分けて次の実験に移行した。

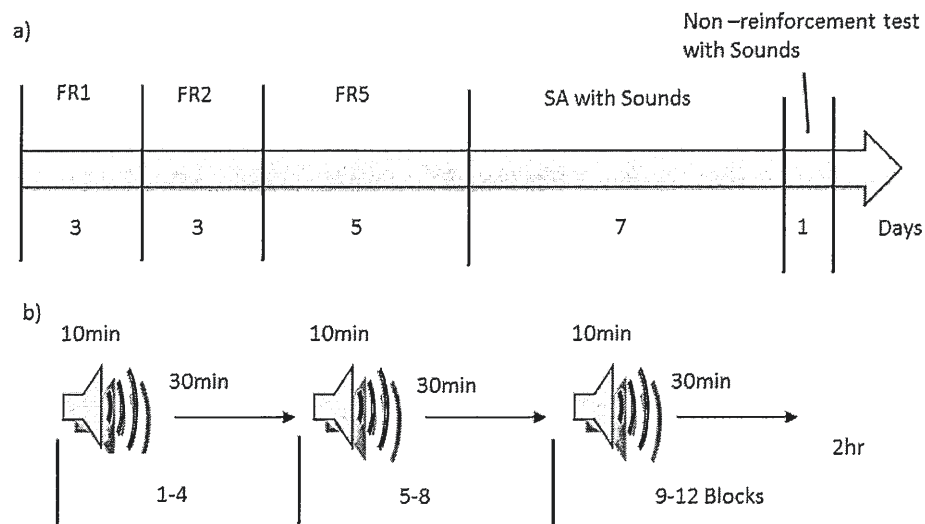


Fig.2.2 コカイン自己投与実験のスケジュール a) FR5自己投与行動(SA)獲得は11日間かけて行い、その後音提示の操作、無強化テストを連日行った。b) 1セッションにおける音提示期間は、1, 5, 9ブロック、各10分間であった。

驚愕刺激がコカイン自己投与行動に影響を与えるかを調べるため、FR5 自己投与訓練の翌日より、自己投与中に驚愕刺激を提示するセッションを行なった。2時間の自己投与セッションを10分ごとの12ブロックに分割し、1, 5, 9ブロックで驚愕刺激が提示された(Fig.2.2)。驚愕刺激群では、音提示ブロックの間、平均10秒に1回、ホワイトノイズ115dBを100ミリ秒間提示することとし、統制刺激群では、Beep音70dBを100ミリ秒間提示することとした。この音提示セッションは7回行い、長期にわたる自己投与行動の変化もまた観察することとした。

最後に、驚愕刺激の薬物探索行動への影響を調べるため、8セッション目にコカインを生理食塩水に置換することによる2時間の無強化セッションを設けた。なお、音刺激への馴化の影響を除くため、無強化セッションにおける驚愕刺激群の半数に驚愕刺激を、残り半数にbeep音を提示した。また、無強化セッションにおける統制刺激群についても同様に、半数に驚愕刺激を、残り半数にbeep音を提示した。

驚愕刺激の効果が、依存性薬物を強化子とした場合にのみ特異的であるのかを検討

するため、補足実験としてさらに新たなラットを用いて、餌を強化子とした音刺激提示実験も行なった。なお、この補足実験では、強化子を餌に変更したことを除き、手続きは自己投与実験と同様であった。

2.2.5 データ処理

本実験では、自己投与セッションにおけるレバー押し行動数を反応指標として解析を行なった。コカイン自己投与行動における驚愕刺激の効果は、驚愕刺激群と統制刺激群との群要因(2水準)、自己投与セッションを被験体内の要因(7水準)として、2要因混合計画分散分析を行なった。

コカイン探索行動における驚愕刺激の効果は、自己投与時の刺激要因(2水準)、無強化セッション時の刺激要因(2水準)、無強化セッション12ブロックの被験体内要因とする3要因混合計画分散分析を行なった。なお、探索行動時のレバー押し反応は、ブロック要因の水準間においては等分散性が仮定されない可能性がある。そのため、Mauchlyの球面性検定を行い有意水準20%未満の場合は、水準間が等分散でないとして、自由度はGreenhouse-Geisserの修正を行った。

2.3 結果

2.3.1 コカイン自己投与行動の形成

全ての被験体は、12時間のコカイン自己投与行動獲得セッションにおいて、レバー押し行動によるコカイン自己投与行動を形成した。また、いずれのラットにおいても、セッション開始より、3時間後からは一定頻度のレバー押し行動が観察された。コカイン自己投与行動の形成基準を満たした個体は、32匹中23匹であった。基準を満たしたラット

の訓練過程におけるレバー押し行動の平均値(±標準誤差)は Fig2.3 に示した。なお、基準を満たさなかった残り9匹の原因としては、カテーテルの損傷や、血栓によって詰まったことなどが挙げられた。

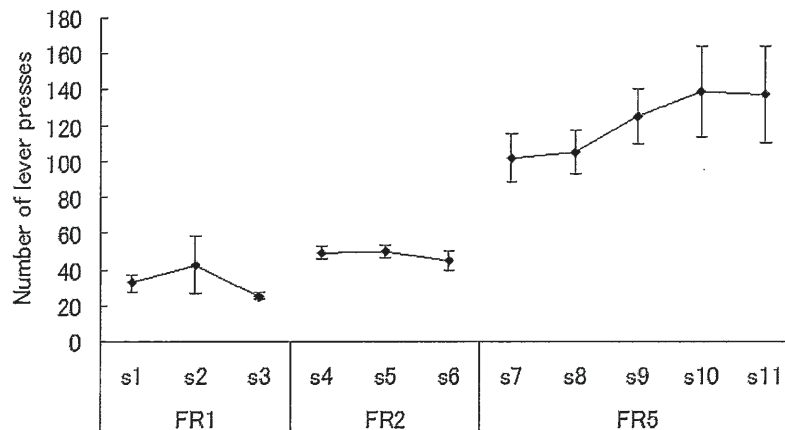


Fig.2.3 コカイン自己投与訓練におけるレバー押し反応回数の変化
反応比率をFR5まで上げるに従い全ての個体は、セッション2時間の総レバー押し回数は上昇した。全個体のレバー押し回数の平均値(±標準誤差)をグラフ化した。

2.3.2 自己投与行動の維持における驚愕刺激提示の効果

聴覚性驚愕刺激のコカイン自己投与行動への影響を検討するため、各群における自己投与セッションの総レバー押し回数の平均値を Fig2.4 に示した。7セッションを通して、連日の自己投与行動は各群ともに安定していた。また、セッションを通して、驚愕刺激提示群では、統制刺激群と比較してレバー押し回数が少なかった。この効果を分散分析によって解析した結果、セッションの要因主効果は有意ではなく($F(6,126)=1.24$, $p>.05$)、音刺激の要因主効果が有意であった($F(1,21)=5.72$, $p<.05$)。すなわち、驚愕刺激を提示した群は、統制刺激を提示した群よりも各セッションにおける自己投与行動が有意に少なかった。なお、セッションと音刺激との交互作用は認められなかった($F(6,126)=0.20$, $p>.05$)。

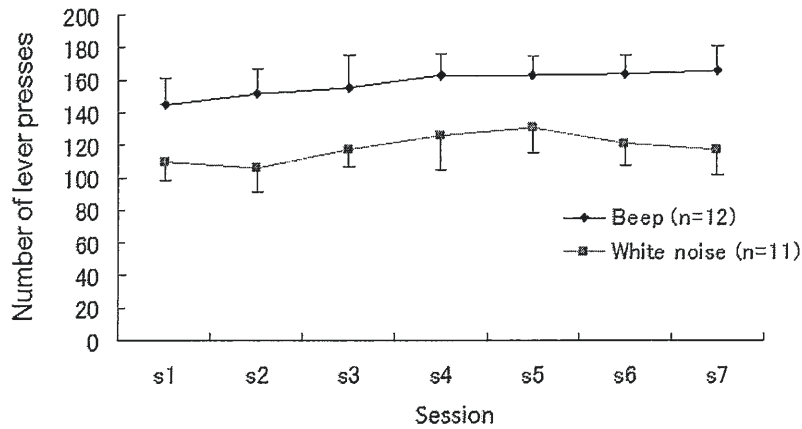


Fig. 2.4 コカイン自己投与セッションにおける驚愕刺激提示の効果 各群の自己投与セッション2時間におけるレバー押し回数平均値(±標準誤差)をグラフ化した。聴覚性驚愕刺激(White Noise)は、統制刺激(Beep)を提示された群と比較してコカイン自己投与行動が一貫して減弱した。

レバー押し回数の減少が、音提示期間に特異的であったのかどうかを検討するため、120分のセッションを10分毎の12ブロックに分割してレバー押し回数を算出し、セッション1,7に関して、音刺激の群要因(2水準)、ブロック要因(12水準)の2要因混合計画分散分析を行った。その結果、Fig2.5 に図示したセッション1におけるレバー押し回数では群要因の主効果が確認されず($F(1,21)=2.92, p>.05$)、ブロック要因の主効果、交互作用もまた確認されなかった($F(11,231)=0.92, F(11,231)=1.17, p>.05$)。

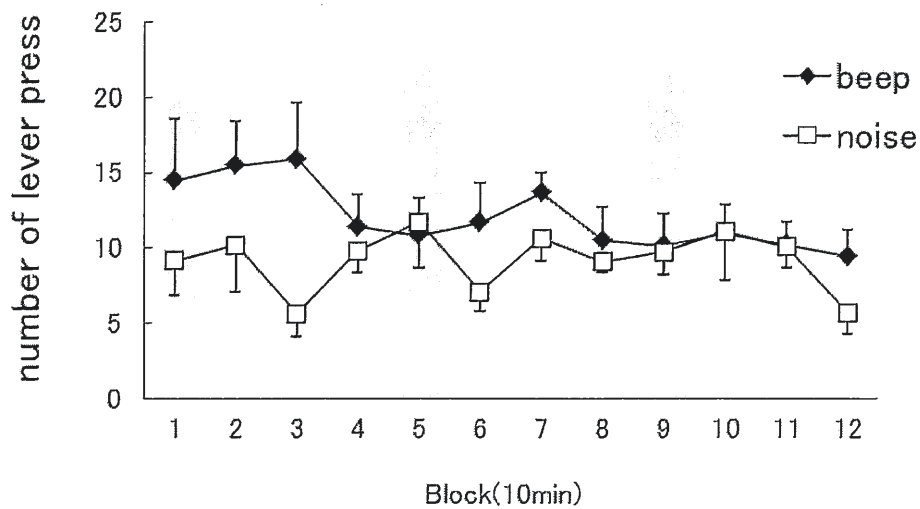


Fig.2.5 セッション1におけるレバー押し回数の変化 1セッションを12ブロックに分け各群の10分ごとのレバー押し回数の平均値(±標準誤差)をグラフ化した。ブロック1, 5, 9は音提示ブロックであった。驚愕刺激群(noise)と統制刺激(beep)群のコカイン自己投与行動の変化をそれぞれ示した。

セッション 7 においては、音刺激の群要因の有意な主効果が確認され($F(1,21)=5.34$, $p<.05$)、ブロック要因の主効果もまた有意であった($F(11, 231)=3.87$, $p>.05$)。交互作用は有意でなかったが($F(11, 231)=0.95$, $p>.05$)、音刺激要因における単純主効果の検定を行ったところ、ブロック 6, 8, 12 における音刺激要因において有意であることがわかった($F(1,21)=4.42$, $F(1,21)=5.84$, $F(1,21)=5.42$, $p<.05$)。これらのことから、一連の驚愕刺激提示によるコカイン自己投与行動の減少は、音の提示期間とは関連がなく、セッション 7 においては、セッションの後半にレバー押し行動の減少が起こっていることが確認された(Fig. 2.6)。

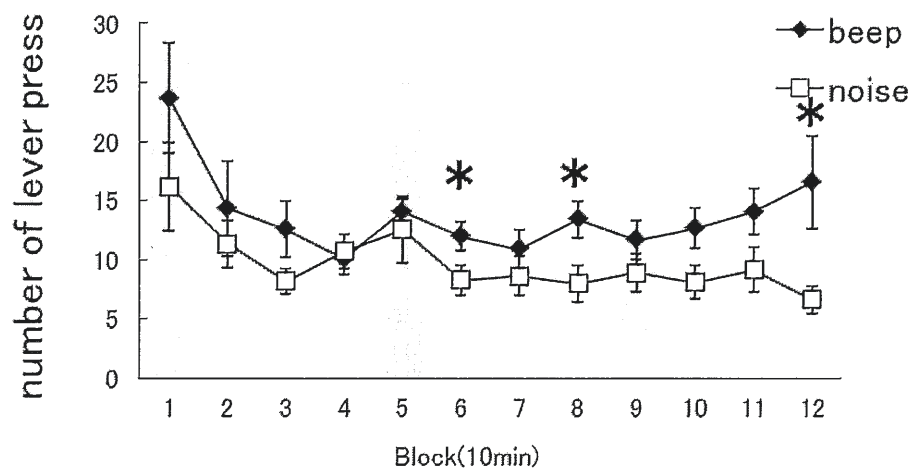


Fig.2.6セッション7におけるレバー押し回数の変化 1セッションを12ブロックに分け各群の10分ごとのレバー押し回数の平均値(±標準誤差)をグラフ化した。ブロック1, 5, 9は音提示ブロックであった。驚愕刺激(noise)の提示は、統制刺激(beep)と比較して、セッションの後半に自己投与行動を有意に減弱させた(*; $p<.05$)。

2.3.3 生理食塩水置換時のコカイン探索行動における驚愕刺激の効果

セッション 8、すなわちコカインを生理食塩水に置換した無強化セッションの結果は Fig.2.7 に図示した。ここでは、自己投与セッションで統制刺激(Beep; B)、無強化セッション時にも統制刺激(B)を経験した群は BB 群、無強化セッション時には驚愕刺激(White noise; W)を経験した群は BW 群というように刺激条件の接頭辞で群は表記された。分散

分析の結果、blockの主効果が有意であった($F(4.45, 93.5)=4.82, p<.01$)。すなわち、無強化セッションにおけるレバー押し行動は時間経過とともに有意に減少した。さらに、驚愕音提示期間である block5, 9 では、音刺激要因における単純主効果が有意であった ($F(1,21)=13.19, p<.01, F(1,21)=6.58, p<.05$)。したがって、無強化によってコカイン探索行動は時間が経過するにしたがい減少したが、驚愕音刺激の提示期間ではコカイン探索行動が beep 音刺激と比較して再び増加した。これらのことから、ストレスラーとして用いた驚愕音刺激が、コカイン探索行動を維持する効果があることが確認された。なお、自己投与時の刺激要因の主効果や、いずれの要因間の交互作用もまた有意ではなかった(ブロック要因×自己投与時音要因: $F(4.45, 93.5)=0.69$, ブロック要因×無強化テスト時音要因: $F(4.45, 93.5)=1.60$, 自己投与時音要因×無強化テスト時音条件: $F(1, 19)=0.01$, ブロック要因×自己投与時音要因×無強化テスト時音条件: $F(4.45, 93.5)=0.40, p>.05$)。

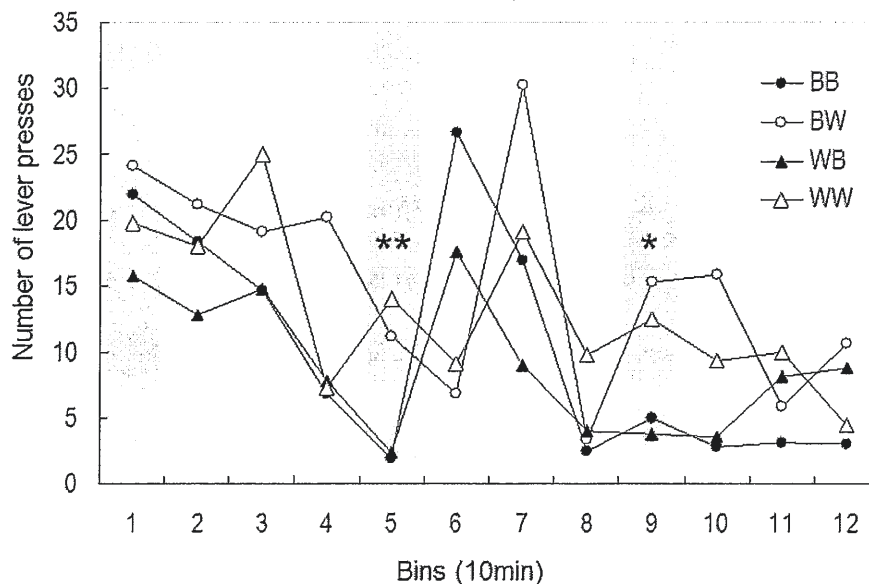


Fig.2.7 無強化セッションにおけるコカイン探索行動の変化 1セッションを12ブロックに分け各群の10分ごとのレバー押し回数の平均値(±標準誤差)をグラフ化した。ブロック1, 5, 9は音提示ブロックであった。セッション中の音刺激要因の単純主効果はブロック5, 9で有意であり、驚愕刺激(白)が統制刺激(黒)と比較して、音提示期にコカイン探索行動を有意に増加させた。($F(1,19)=11.5, p<.01$; **, $F(1,19)=5.89, p<.05$; *)

2.3.4 餌強化による補足実験の結果

上述のような驚愕刺激の効果は、強化子が自然報酬である餌ペレットの場合には観察されなかった。驚愕刺激提示群と統制刺激群の餌強化最終セッションであるセッション7の総レバー押し回数の平均値および標準誤差は、Fig2.8 に示した。

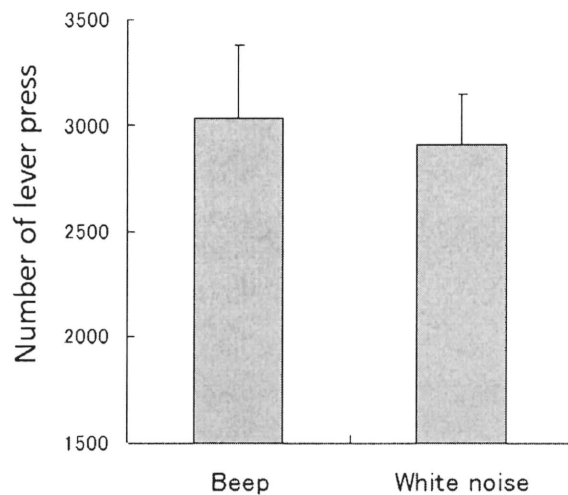


Fig.2.8 音提示セッション7における餌摂取反応回数
驚愕刺激 (White noise)は自然報酬に対しては影響せず、統制刺激(Beep)と同程度の餌摂取行動であった。

また、餌提示を止めた無強化セッションにおけるレバー押し回数は、驚愕刺激提示群と統制刺激群との間に有意な主効果はなかった($F(1,24)=.027, p>.05, \text{Fig2.9}$)。驚愕刺激提示群のブロック毎の反応数は、beep 音提示と比較しても反応数に差は無く、ブロック×音刺激条件の有意な交互作用は無いことから明らかであった($F(4.00, 96.1)=1.57, p>.05$)。ブロック要因の主効果が有意であったことから($F(4.00, 96.1)=62.0, p<.01$)、全体としてレバー押し反応は単調に減少する傾向があり、驚愕音刺激による探索行動の維持効果は見られなかった。なお、いずれの要因間の交互作用もまた、有意ではなかった(ブロック要因×自己投与時音要因: $F(4.00, 96.1)=2.038$, ブロック要因×無強化テスト時音要因: $F(4.00, 96.1)=1.57$, 自己投与時音要因×無強化テスト時音条件: $F(1,$

24)=.027, ブロック要因 × 自己投与時音要因 × 無強化テスト時音条件: $F(4.00, 96.1)=.865, p>.05$).

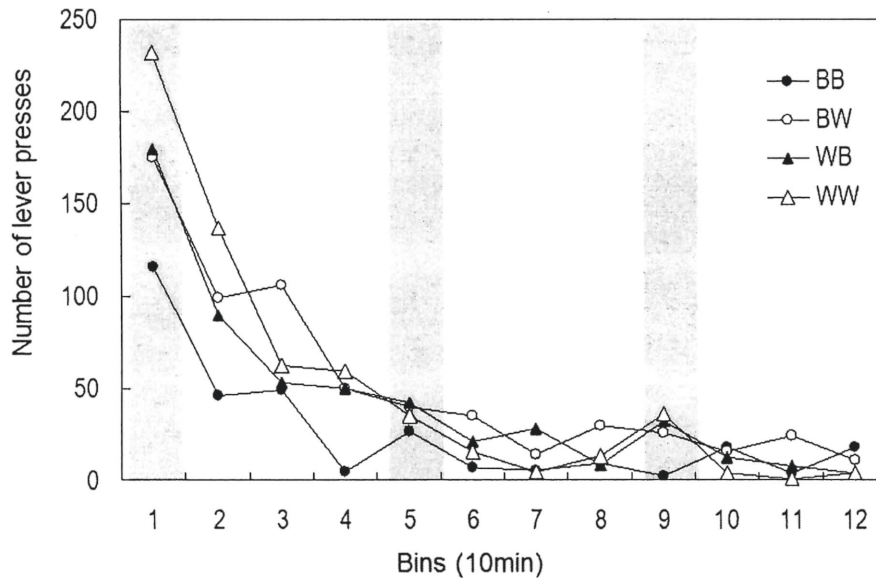


Fig.2.9 無強化セッションにおける餌探索行動の変化 1セッションを12ブロックに分け各群の10分ごとのレバー押し回数の平均値(±標準誤差)をグラフ化した。ブロック1, 5, 9は音提示ブロックであった。

2.4 考察

2.4.1 聴覚性驚愕刺激によるコカイン自己投与行動への影響

聴覚性驚愕刺激は、げっ歯類にとって不安を惹起させるストレス刺激である。本実験において、コカイン自己投与行動中の驚愕刺激提示は、セッション中の自己投与回数を有意に減少させた。また、このような現象は、いずれの自己投与セッションにおいても、音提示期間に関係なく起こっていた。さらに、7セッション目においては、セッションの後半に統制刺激群と比較して驚愕刺激提示群では、音提示期間ではなく、むしろ特にセッション後半に有意なコカイン自己投与回数の減少が示された。このことから、慢性的な不安惹起によってコカインの強化効果に対する感受性が変化したことが示唆される。こ

の変化の一要因として、被験体のストレスホルモンレベルの変化が考えられる。

いわゆるストレスホルモンとは、副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドのことである。ヒトではコルチゾールが優位であり、齧歯類ではコルチコステロンが代表的なものである。このストレスホルモンの分泌メカニズムは、まず、視床下部(Hypothalamus)よりコルチコトロピン放出因子(Corticotropin releasing factor: CRF)が分泌され、CRF が下垂体前葉(Anterior pituitary)に到達する。下垂体前葉には CRF 受容体があり、受容体の刺激を受けて、下垂体前葉から副腎皮質刺激ホルモン(Adrenocorticotrophic hormone: ACTH)が分泌される。ACTH が副腎皮質(Adrenal cortex)に到達し、ACTH 受容体が刺激されて、副腎皮質よりコルチコステロンが分泌される。この回路は HPA 軸と呼ばれ、この回路を通してストレスを受けた時の生体における内分泌反応が起こる。聴覚性驚愕刺激もまた、HPA 軸を活性化させ、ACTH やコルチコステロンレベルの上昇を引き起こすが、繰り返し提示することによって、この反応は次第に馴化していくことが明らかとなっている(Masini, Babb, Nyhuis, Day, & Campeau, 2012)。

一方で、副腎皮質を摘出したラットは、HPA 軸を介したストレスホルモン産生ができないが、このラットはいかなる用量のコカインにおいても自己投与行動を獲得できず、さらに別の実験ではコルチコステロンの産生を抑制するメチラポンを前処置することによりラットのコカイン自己投与行動が減弱することが報告されている(Goeders, & Guerin, 1996)。また、コカイン自己投与行動を獲得した後に副腎皮質を摘出され、代償的にコルチコステロンを注入されたラットにおいても、コカイン自己投与行動の減弱が観察され、同様の処置を受けたラットでは電気ショックストレスによるコカイン自己投与行動の促進も観察されないことが明らかとなっている(Mantsch, & Katz, 2007)。

本研究における聴覚性驚愕刺激の提示が、どの程度 HPA 軸を活性化させ、ストレスホ

ルモン分泌を変化させたのか、ストレス性の内分泌反応を直接測定していないため、現状では明らかではなく、今後さらなる検討が必要である。しかしながら、少なくとも驚愕刺激ストレスは、コカイン自己投与行動に対して抑制的に影響することから、電気ショックストレスとは異なった性質の修飾をコカイン自己投与行動に対して行っていることが示唆された。

2.4.2 聴覚刺激によるコカイン探索行動への影響

本研究では、音提示期間を設けたコカイン自己投与セッションを7日間行った翌日に、コカイン無しの無強化セッションを行った。無強化セッションでは、薬液をコカインから生理食塩液に置換する以外は、コカイン自己投与セッションと同様の手続きで行った。無強化セッションでは、ラットはレバー押し行動を何回行ってもコカインを獲得できないため、セッション初期には消去訓練初日によく観察されるレバー押し行動の増進(Extinction burst)が起こった。その後ブロックが進むにつれて、次第にレバー押し行動が減少していくことが確認された。しかしながら、音提示期間であるブロック5,9においては、驚愕刺激を提示された群の方が統制刺激提示群と比較して有意なレバー押し行動の増加が見られた。したがって、無強化セッション下における薬物探索行動は、驚愕刺激の提示によって一過性に促進されることが明らかとなった。さらに、この効果は補足実験である餌強化実験事態においては観察されなかったため、コカインを含む依存性薬物を強化子とした場合に特異的である可能性が示唆された。

薬物探索行動は、ヘロイン自己投与行動実験においても電気ショックの提示で維持されることがShaham, et al. (1996)によって報告されている。本研究の結果より、恐怖を誘発する電気ショックストレスと同様に、不安を誘発する聴覚性驚愕刺激によってもまた薬

物探索行動を維持させる効果があることが示された。不安による薬物探索行動維持の神経機構に関しては、まだ不明な点が多い。しかし、不安もしくは不快情動に関連の深い脳部位として扁桃体および「拡張された扁桃体 (extended amygdala)」が良く知られており、この領域には CRF 受容体が豊富に発現している。また、慢性的な薬物摂取の結果、腹側被蓋野から側坐核に投射する中脳-辺縁系ドパミン神経の機能が低下している。ストレスによって扁桃体領域が活性化され、この領域での細胞外 CRF 濃度は増加し、このこととドパミン神経機能の低下が相俟って、ストレス状況下で薬物探索行動が促進されるのではないかと考えられている (Koob, 2008)。近年、CRF がグルタミン酸を介して腹側被蓋野のドパミン神経の活動を活性化する可能性が示されており (Wise, & Morales, 2010)、今後はこのような物質の相互作用を検討することにより、不安およびストレスによる薬物探索行動促進のメカニズムが明らかになるものと期待される。

また、この知見は薬物依存の臨床に対して一定の意義を持つものと考えられる。すなわち、薬物依存の治療においては、薬物の自発的な摂取を抑制することが非常に重要であるが、このとき依存者がストレスフルなライフイベントを経験すると、摂取の抑制が困難になることが考えられる。本実験で用いた驚愕刺激は、電気ショックストレスとは異なり生体にとっての侵害効果はそれほど大きくない。このような緩和なストレスでも薬物探索行動の維持が生じることは、治療初期にある患者がストレスに暴露されないような配慮が必要であることを示している。

第3章

3. ニコチン-条件刺激による ICSS 行動の促進

3.1 背景と目的

依存性薬物の再使用は、薬物依存治療の臨床において現在でも最も重要な問題の1つである。タバコに含まれる主要な薬理活性物質であるニコチンもまた、こうした依存治療の対象であり、禁煙治療は日本でもすでに保険適用を受けることが可能なように、医学的に達成しなければならない目標でもある。多くの禁煙者は、適切な禁煙治療を受けて、一定期間の禁煙に成功するけれども、長期間の禁煙に失敗し再び喫煙してしまうことがこれまでの疫学的調査により報告されている(Martinez-Raga, Keaney, Sutherland, Perez-Galvez, & Strang, 2003; Ranney, Melvin, Lux, McClain, & Lohr, 2006; Rose, 2006)。このような再使用の主要な要因の1つとして、依存性薬物の薬理効果と連合した環境刺激(薬物関連刺激)が挙げられる(Chornock, Stitzer, Gross, & Leischow, 1992; Conklin, 2006)。喫煙においては、視覚的刺激としてタバコ、タバコの燃焼、紫煙、ライターや灰皿など多様な環境刺激が喫煙時に常に伴う。このような環境刺激が条件刺激となり、ニコチンの薬理効果は無条件刺激とした古典的条件づけが成立し、条件刺激が喫煙者に、多様な生理的、あるいは心的反応を誘発する特性を獲得することが考えられる(Epstein, Caggiula, Perkins, McKenzie, & Smith, 1991; Olausson, Jentsch, & Taylor, 2004; Bassareo, De Luca, & Di Chiara, 2007)。喫煙に対する渴望もまた、このような条件刺激によって誘発される反応の1つであることが示唆されている(Mucha, Geier, & Pauli, 1999; Miyata, & Yanagita, 2001; McClernon, Kozink, & Rose, 2008)。

覚せい剤やモルヒネなど他の依存性薬物と同様に、動物を用いた行動薬理学的研究では、ニコチンと連合した環境(文脈)によってニコチン探索行動の再燃現象を引き起こ

すことが実証されてきた(Bespalov, Dravolina, Sukhanov, Zakharova, Blokhina, Zvartau, Danysz, et al., 2005; Liu, Caggiula, Yee, Nobuta, Poland, & Pechnick, 2006; Paterson, Froestl, & Markou, 2005; Liechti, Lhuillier, Kaupmann, & Markou, 2007)。さらに、Cohen, Perrault, Griebel, & Soubrie. (2005)はラットのニコチン-自己投与行動において、ニコチン自己投与と随伴して提示され、条件刺激となった光および音刺激の提示のみで、その後、ニコチンの入っていない生理食塩液の自己投与行動が 3 か月にわたって維持されたことを報告している。

ヒトにおける脳イメージング研究では、タバコ関連刺激が、例えば、前部帯状皮質(Brody, Mandelkern, Lee, Smith, Sadeghi, Saxena, Jarvik, et al., 2004)、海馬傍回、一次運動野、運動前野(Smolka, Buhler, Klein, Zimmermann, Mann, Heinz, & Braus, 2006)、背外側前頭前野(McBride, Barrett, Kelly, Aw, & Dagher, 2006)など様々な脳領域を活性化させる。中脳辺縁系ドパミン神経路の主要な脳部位である腹側被蓋野や腹側線条体もまた、タバコ関連刺激によって活性化する(Due, Huettel, Hall, & Rubin, 2002; David, Segu, Buhot, Ichaye, & Cazala, 2004; David, Munafò, Johansen-Berg, Smith, Rogers, Matthews, & Walton, 2005)。これらの先行研究より、中脳辺縁系ドパミン神経はニコチンと連合した条件刺激が喫煙者に摂取欲求を惹起させるための主要な神経基盤であるとされる。しかしながら、ニコチン-条件刺激が実際に、ドパミン神経路を活性化しているのかどうかを検討した研究は現在まで十分に行われていない。

条件刺激の提示によるドパミン神経の活性を調べるためには、脳内自己刺激行動(ICSS)が有用である(Hayes, & Gardner, 2004)。この行動は、中脳辺縁系ドパミン神経路に直接電極を挿入・留置したラットを用い、レバー押しなどの行動に随伴してドパミン神経に電気刺激を与えることにより獲得・形成される(Carlezon Jr., W. A., & Chartoff.

(2007)。もし、ニコチンに条件づけられた環境刺激が、ドパミン神経を活性化させるのであれば、被験体の電気刺激に対する感受性が高まるため、自己刺激閾値は下がることが予測される(Carlezon Jr., W. A., & Chartoff, 2007; Sagara, Kitamura, Yae, Shibata, Suemaru, Sendo, Araki, et al., 2008)。反対に自己刺激閾値が上昇するのであれば、ドパミン神経が不活性化していることを意味する。ニコチン依存研究においては実際に、被験体の嫌悪的な状態とされるニコチン退薬時や、ニコチン退薬に条件づけられた文脈刺激によって自己刺激閾値が上昇する(Epping-Jordan, Watkins, Koob, & Markou, 1998; Kenny, & Markou, 2005; Miyata, Itasaka, Kimura, & Nakayama, 2011)。このほかに、コカインやモルヒネに条件づけられた刺激は、自己刺激閾値を低下させることが報告されている(Hayes, & Gardner, 2004)。しかしながら、ニコチンによって条件づけられた文脈刺激が自己刺激閾値を低下させるのかは明らかでない。

本研究では、ニコチンによって条件づけられた環境刺激が、中脳辺縁系ドパミン神経を活性化するかどうか、ICSS の自己刺激閾値を測定することによって検討した。なお、本研究で用いた環境刺激は、ニコチンの報酬効果がいくつかの研究で確認されている条件性場所選好実験で用いられる構成と類似させた。具体的には、環境刺激は、オペラント箱の床面(触覚刺激)と壁面(視覚刺激)とで構成された。また、本研究室の手続きによってニコチンと環境刺激の条件づけが成立することは、ニコチン-条件性場所選好行動(Conditioned place preference; CPP)を観察して確認した。

3.2 方法

3.2.1 被験体

本実験は、すべて慈恵会医科大学精神医学講座の実験室にて行われ、実験計画は

同大学の動物実験委員会承認の下で遂行された。被験体は、Sprague-Dawley 系雄性ラットを予備検討のニコチン条件性場所選好実験に 24 匹、ICSS 行動実験に 16 匹用いた。本実験ではいずれのラットも、7 週齢で入荷し、1 週間の予備飼育期間を於いて 8 週齢より実験を開始した。被験体は、室温 22-23°C、12 時間の明暗サイクル(明期 7:00～19:00)の小動物飼育施設内で飼育された。個別のケージで飼育され、飼育条件は、行動実験期間以外は自由給水、餌ペレット(CE-2, 日本クレア製)も自由摂取とした。また、実験期間は、体重増加が餌自由摂取時の 85%になるよう摂餌制限を設けて飼育された。なお、1 日の給餌は実験終了後とした。

3.2.2 薬物

ニコチン酒石酸と生理食塩液はそれぞれ、東京化成、大塚製薬より購入したものを使用した。ニコチン溶液は生理食塩液を溶媒として、CPP 実験に用量 0.4, 0.8 mg/kg、ICSS 行動実験に 0.4 mg/kg、投与容量 1mL/kg となるように調製した。これらは被験体に皮下投与した。ICSS 用電極埋め込み手術用の麻酔には、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)を 50mg/kg の用量で用い、被験体に腹腔内投与した。

3.2.3 装置

条件性場所選好実験 (CPP)

CPP 実験装置は夏目製作所より購入した。CPP-Box は 2 区画(30cm 四方×2)の異なる環境によって構成され、ギロチンドアを挿入することによって 2 区画に分離することが可能であった。1 つの区画は白色の壁とメッシュ状の床面とで構成されており、もう 1 つの区画は、黒色の壁と凹凸の無い平坦な床面とで構成されていた(Fig1.1)。選好テス

ト時は、ギロチンドアが図のように半分開けられ、区画の境界にプラットフォームが設置される。被験体はテスト開始時にプラットフォームに置かれ、床面に降りた後、自由に 2 区画を往来することができる仕様となる。なお、2 つの区画の往来は Box 上部に備え付けられた Photo ビームセンサによって感知され、区画への滞在時間は自動計測されパソコンに記録された。

脳内自己刺激行動 (ICSS)

オペラント実験装置(ENV-008)と ICSS 行動実験用の備品は米国の MED Associates 社製のものを使用した。オペラント Box には、前面の壁に 1 つのレバーとレバー上部に Cue ライト、後面の壁上部に House ライトが設置されていた(Fig.3.1)。

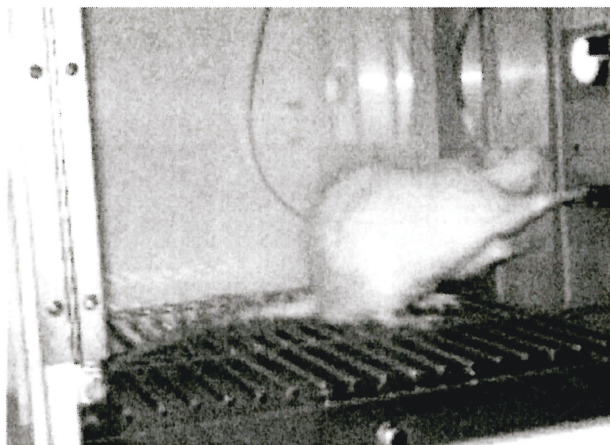


Fig.3.1 ICSS用オペラントBox Box内には、1レバー、Cueランプ、Houseライトが設置されていた。被験体はレバー押しをすることによって脳内にケーブルを通して直接電気刺激が与えられた。

ニコチン条件づけや閾値テストを行う場合は、前部のレバーと Cue ライトを取り外し、側面の壁にシートを貼り付け、床面にプラスチック製の板を敷いた。ICSS 実験では、Context A(黒色の壁+メッシュ状の床面)、Context B(白色の壁+平坦な床面)として文脈刺激の条件操作を行った(Fig.3.2)。なお、ICSS 訓練環境では、側面の壁は透明であり、

床面はグリッドという通常のオペラント Box と変わらないものであった(Fig.3.1)。さらに、ニコチン投与時の自発運動量を測定するため、オペラント Box の上部に自発運動量を測定するための赤外線検知センサ(NS-DAS-8, ニューロサイエンス社製)を設置した。

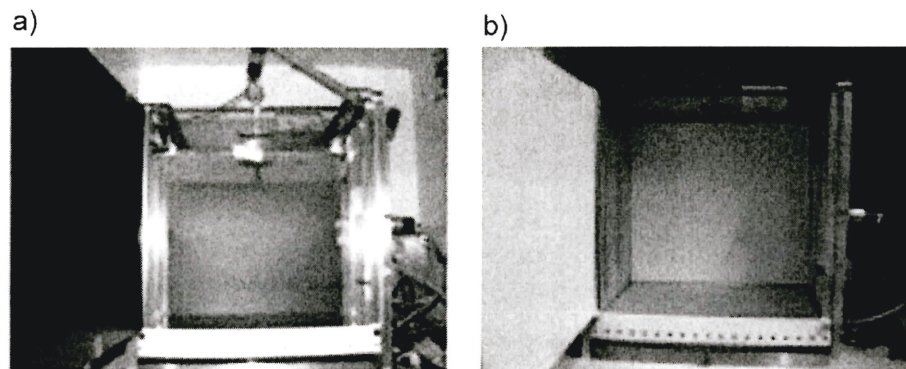


Fig.3.2 環境変更後のICSS用オペラントBox a)Context Aはニコチンと条件づけを行った。b)Context Bは、条件づけを行わない統制刺激として用いた。

3.2.4 手続き

条件性場所選好実験 (CPP)

CPP 実験では、まず初めにランダムに 24 匹の被験体をそれぞれニコチン 0.4mg/kg、0.8mg/kg、生理食塩液投与群の 3 群(各 8 匹)に分け、装置に馴れさせるための馴化セッションを行った。その翌日より条件づけ前における区画への選好を測定するプレテストを 2 回、2 日間行い、個体毎に両区画滞在時間の 2 日間の平均値を算出した。本実験では、2 区画のうち短い滞在時間の方を薬物側条件づけ区画、他方を溶媒側条件づけ区画とするバイアス法を用い、ニコチン条件づけ区画を個体毎に決定した。なお、馴化セッションとプレテストでは、被験体がプラットフォームから床面に降りたときをテスト開始とし 15 分間(900 秒間)滞在時間を測定した。

プレテストセッションの後、翌日より条件づけセッションを開始した。条件づけ期間では、

被験体はニコチン (生理食塩液)皮下投与を受けた後に、予め定められた区画に 50 分間置かれた。ニコチンと溶媒の条件づけ順序は交互に行うこととし、ニコチン投与群の個体の半数はニコチン条件づけから開始することとした。ニコチン条件づけセッションを 6 回、生理食塩水条件づけセッションを 6 回、計 12 日間かけて条件づけを終了した。条件づけ終了後の翌日に、各被験体の場所選好を測定するため、プレテストと同様の手続きでポストテストを 1 回行った。

脳内自己刺激実験 (ICSS)

電極埋め込み手術

ペントバルビタール(50mg/kg, 腹腔内投与)麻酔を受けて十分に麻酔が効いていることを確認した後に、被験体は、ラット用脳定位固定装置に固定され、開頭後に ICSS 用双極性電極(Plastic one 製)を挿入された。ラットの脳アトラスを参照して(Paxinos, & Watson, 1998)、標的部位は片側の外側視床下部とし、電極の先端が Bregma より前後に-3.8mm,左右(個体の半数は左)に +1.4mm, 深さ 8.4mm となるように埋め込み留置した。最後に、電極を固定するため、アンカービスを 3 つ頭蓋に埋め込み、デンタルセメントで開頭部を覆った。手術後は麻酔より覚醒することを確認した後に、被験体を速やかにホームケージに戻した。

ICSS 獲得訓練

ICSS 実験のスケジュールは Fig3.3 にまとめて示した。7 日間の回復期間をおいた後に ICSS 訓練は開始された。ICSS 訓練セッション中は、オペラント Box 内の House ライトと Cue ライトはどちらも点灯し、被験体がレバーを 1 回押すと同時に 1pulse を 1.5msec 間

の矩形波とする100Hzの電気刺激が150msec間、電極を通して与えられた。なお、訓練セッションでは電気刺激の電流値は120 μ Aに固定し、この電気刺激強度に対して1分間あたり30回以上のレバー押し行動が3日間続けて観察されることをICSS行動獲得の達成基準とした。1日の訓練時間は15~45分間とし、被験体は6~8日間の訓練を受けた。この基準を達成した個体は、ICSS-ニコチン条件づけ実験に用意した8匹のうち6匹、ICSS-統制刺激実験に用意した8匹のうち5匹であった。

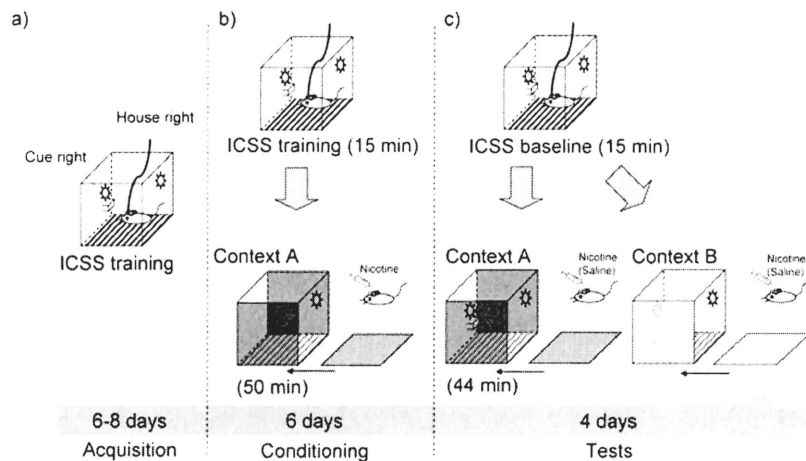


Fig.3.3 ICSS実験スケジュール 実験は連日行い、a) 訓練期間、b)条件づけ期間、c)ICSS閾値テスト期間と移行していった。

ICSS 閾値テスト

ICSS 閾値テストは、文脈条件(Context A, B)、薬物投与条件(ニコチン 0.4mg/kg. 溶媒)の組み合わせで4条件あり、施行順序をカウンターバランスして1日に1条件、合計4日間、被験体に施行した。また、それぞれ閾値テストを行う前に、電気刺激強度を120 μ Aに固定したICSS行動の再訓練を15分間行い、このときの各個体の強化回数を各テストにおけるベースラインとした。なお、ICSS-統制実験に用いた5匹の個体では、訓練環境、Context A、Context B条件の計3条件で閾値テストを施行した。

ベースライン観察後、被験体は1度ホームケージに戻され、その間にオペラント箱の環

境を Context A(B)条件に変更した。その後に、ニコチン(あるいは溶媒)を投与し、ただちに ICSS 閾値テストを開始した。閾値テストのスケジュールは、刺激強度を 120 μ A から 20 μ A まで 10 μ A ずつ下げていく下降系列スケジュールとし、各刺激強度について 3 分間、被験体に自由にレバー押しをさせた。各試行は 3 分間とし、各刺激強度における強化回数を記録した。なお、House ライトは閾値テストセッション中常時点灯し、Cue ライトは各試行中に点灯させ、試行間(1 分)のタイムアウト中は Cue ライトのみ消灯することとした。

ニコチン-条件づけセッション

ICSS-条件づけ実験に用いた 6 匹の被験体は、ニコチン 0.4 mg/kg と Context A との条件づけセッションを 6 回受けた。条件づけセッションは、ICSS 訓練最終日の翌日より開始された。条件づけ日では、最初に条件づけを行う前に、ICSS 行動の維持訓練を 15 分間行い、ICSS 反応回数が一定に保たれていることを観察した。維持訓練を終了した後、被験体は 1 度、ホームケージに戻された。その間に、オペラント Box 内の Cue ライトとレバーを取り外して、環境を Context A 条件に変更した。ラットは、ニコチン 0.4 mg/kg の皮下投与を受け、速やかにオペラント Box 内に置かれた。条件づけは 1 セッション 50 分間とし、全 6 セッション施行された。なお、条件づけ中は、ニコチンによる行動的増感現象を観察するため被験体の自発運動量を測定することとした。なお、ICSS-統制実験に用いた 5 匹の被験体には、このような条件づけセッションを省略した。

3.2.5 データ処理

ICSS 反応曲線

ICSS 反応曲線は個体ごとに、それぞれの条件別に算出をした。それぞれの刺激強度につき3分間の強化回数を1分間のICSS強化回数となるよう平均化した。各テスト日における再訓練15分間のICSS強化回数(1分間当たりの平均値)を100%として、刺激強度ごとのICSS強化回数(1分間当たりの平均値)を変化率に換算したものを電流値の下降系列に沿ってプロットし、S字曲線を求めた。

ICSS 閾値の算出

下降系列スケジュールで行った ICSS 反応曲線は、シグモイド曲線となるため、閾値の算出には Sigmoid-Gompertz モデルを用いた非線形回帰曲線の推定を行うこととした。回帰式は、 Y' を反応比率、 X を刺激強度、 a を天井の反応比率として、 b , c を曲線推定によって求められる定数とした(1)。

$$Y' = a/\exp(\exp(b-c*X)) \quad (1)$$

曲線推定されたそれぞれの回帰式より、天井反応比率の50%となる電気刺激強度($M50$)を次の式により求め、被験体ごとにそれぞれの条件における ICSS 閾値を算出した(2)。 $M50$ はCoulombe & Miliareisis (1987)によって、どのような回帰モデルでも比較的等しい値が算出されることが多いとされている。したがって本研究でも ICSS 閾値として $M50$ を採用した。

$$M50 = \{-\ln[-\ln(0.5)]-b\}/c \quad (2)$$

ニコチン投与時と溶媒投与時における条件づけ環境の ICSS 反応曲線に対する効果は、文脈要因(Context A, B; 2水準)、刺激強度要因(120-20 μ A; 11水準)の2要因被験

者内計画分散分析で解析した。また、交互作用が認められた場合は、文脈要因の単純主効果を下位検定として行った。ICSS 反応閾値に関しては、文脈要因(Context A, B; 2 水準)、薬物要因(ニコチン, 溶媒; 2 水準)の 2 要因被験者内分散分析を行った。なお、交互作用が認められなくても、溶媒投与時の Context B 文脈条件を統制条件として Dunnet't 法を用いた多重比較を行った。統制実験における ICSS 閾値に対する文脈刺激の効果は、訓練環境、Context A、Context B の 3 条件に関して 1 要因被験者内分散分析を行い条件間の差異を検討した。

3.3 結果

3.3.1 ニコチン投与用量と報酬効果

0.4 mg/kg 投与群の 1 個体のデータがポストテスト時の操作ミスによりデータが記録されなかったため、分析から除外した。6 回の条件づけによってニコチンに条件づけられた区画への滞在時間変化が確認されるかどうかを、条件づけ側環境の滞在時間についてセッション要因(プレテスト, ポストテスト)、投与群要因(0.4, 0.8mg/kg, 溶媒)の 2×3 混合計画分散分析を行った。その結果、投与群要因の主効果は有意でなかったが ($F(2,20)=0.00, p>.05$)、セッション要因について主効果 ($F(1, 20)=29.4, P<.01$)、セッション×投与群の交互作用が認められたため ($F(2,20)=5.40, P<.05$)。どの群において、ニコチン条件づけによる滞在時間の増加が認められたか、単純主効果の検定で検討を行った。その結果、0.4 mg/kg 投与群においてセッション要因における有意な単純主効果が確認された ($F(1,20)=33.8, p<.01$)。したがって、ニコチン 0.4 mg/kg 投与で 6 回にわたってニコチンと特定の区画との条件づけを行うことにより、有意なニコチン側区画への滞在時間増加を示すことが確認された (Table1.)。そのため、その後の ICSS 実験にはニコチン

0.4mg/kg を用いることとした。

Table 1 条件づけによるニコチン側区画への滞在時間変化

Group	Side	Pre	Post
Saline (n=8)	Saline	353.0 (24.0)	442.6 (40.9)
	Saline	546.3 (24.0)	457.4 (40.9)
Nicotine 0.4mg/kg (n=7)	Nicotine	275.6 (42.8)	512.3 (40.6)**
	Saline	623.4 (43.0)	387.6 (40.7)
Nicotine 0.8mg/kg (n=8)	Nicotine	354.8 (16.4)	431.8 (20.5)
	Saline	544.6 (16.5)	468.0 (28.0)

各群における区画への滞在時間平均値と、括弧内に標準偏差を示した。

** : $p < .001$ ニコチン側滞在時間におけるプレ、ポスト要因の単純主効果

3.3.2 ニコチン、条件づけ環境における ICSS 反応閾値

ICSS 訓練

手術後7日間の回復期間において、翌日よりICSS行動の獲得訓練を行った。ICSSレバー押し行動の基準(30回/min)を満たした個体は、ICSS-条件づけ群に用いた8匹のうち6匹であり、以降の条件づけや閾値テストにはこれらの個体を用いた。また、ICSS-統制実験では、訓練した個体8匹のうち5匹が基準を満たしたため、これらのラットを用いた。

ニコチン条件づけセッションにおける自発運動量

ICSS-ニコチン条件づけ実験に用いた6匹の個体について、ニコチン6回の繰り返し投与が行動的増感効果を示すかどうか検討するため、6セッションにおける自発運動量について1要因個体内分散分析を行った。その結果、セッションの主効果が有意であった ($F(5, 25) = 7.553, P < .01$)。すなわち、ニコチンの連投による自発運動量はセッション1における 1198.5 ± 191.9 から、セッション6における 1724.3 ± 126.8 (平均値 \pm 標準誤差)

へ有意に増加した。

生理食塩液処置下における ICSS 反応曲線

各テスト日の訓練時120 μA における1分間のレバー押し回数をベースラインとしたICSS強化回数の変化率を、Context A, B条件ごとにFig3.4に示した。いずれの文脈条件づけ下においても、電流が低くなるにしたがって、ICSS反応率は低下していった。しかしながら、Context A条件下におけるICSS反応率は、Context B条件下と比較して、いくつかの電流強度において差異があった。このことは、2要因混合計画分散分析の結果、電流強度要因の有意な主効果($F(10, 50) = 59.05, P < .01$)、環境要因の有意な主効果($F(1, 5) = 34.77, P < .01$)によって確認された。電流強度 \times 環境の交互作用が有意となったため($F(10, 50) = 4.353, P < .01$)、さらに環境要因の単純主効果を検討した。その結果、ICSS反応率は、Context B条件と比較してContext A条件の方が電流強度100, 90, 80, 30, μA の試行において有意に高かったことが確認された($F(1,5) = 9.87, F(1,5) = 24.14, F(1,5) = 23.78, F(1,5) = 20.28, P < .05$)。

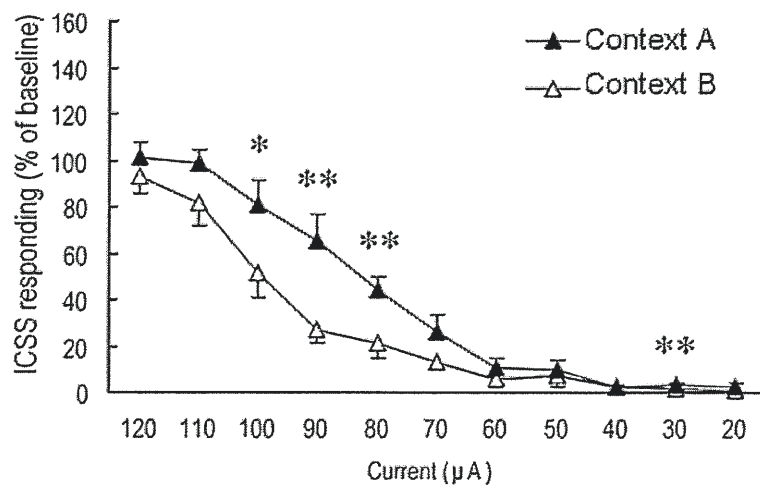


Fig.3.5 生理食塩液処置下におけるICSS反応曲線 ニコチン-条件づけ環境下(Context A)では、統制環境下(Context B)よりも低い電流値におけるICSS反応が高かった(*; $p < .05$, **; $p < .01$)

ニコチン投与下におけるICSS反応曲線

ニコチン投与下の各条件下におけるICSS反応曲線の平均値は、Fig3.5に示した。ニコチン投与によって、A, Bどちらの環境条件下でも電流強度120 μA と比較して、110, 100 μA の方がICSS反応率は高い傾向になり、90 μA 以降、単調減少する曲線となった。2要因混合計画分散分析においても、電流強度要因の主効果が有意であった($F(10, 50) = 72.54, P < .01$)。また、ニコチン投与条件下では、環境要因の有意な主効果は認められず、さらに電流強度 \times 環境の交互作用もまた有意ではなかった($F(10, 50) = 0.308, P > .05$)。

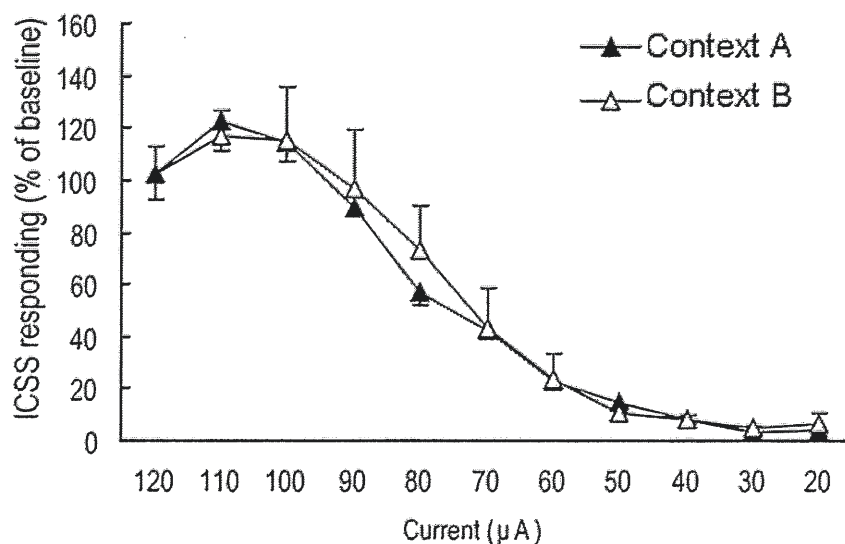


Fig.3.6 ニコチン処置下におけるICSS反応曲線

ニコチン条件づけ実験におけるICSS反応閾値

各条件におけるICSS反応の50%閾値を個体ごとにGompertzモデルの非線形回帰分析によって算出した。その平均値と標準誤差をFig3.7に示した。各条件間におけるICSS反応閾値の差異を検討するため、薬物投与要因と環境要因とにおける2要因個体内分散分析を行った。その結果、薬物投与要因において有意な主効果が認められ($F(1, 5) = 7.815, P < .05$)、環境要因においては有意な主効果が認められなかった($F(1, 5) = 3.252, P > .05$)。

また、薬物投与×環境要因の交互作用が有意となったため($F(1, 5) = 8.628, P < .05$)、生理食塩液投与処置におけるContext B環境下のICSS閾値を統制条件としたDunnnett's法による多重比較を行った。多重比較の結果より、統制条件と比較して、ニコチン投与はContext A, Bの両条件においても有意にICSS閾値を低下させ($P < .01, P < .01$)、さらに生理食塩液投与処置におけるContext A条件でもまた、ICSS閾値を有意に低下させることが明らかとなった($P < .05$)。したがって、ニコチンの投与処置だけでなく、ニコチンに条件づけられた環境刺激もまた、ICSS電気刺激に対して感受性を高めることが示された。

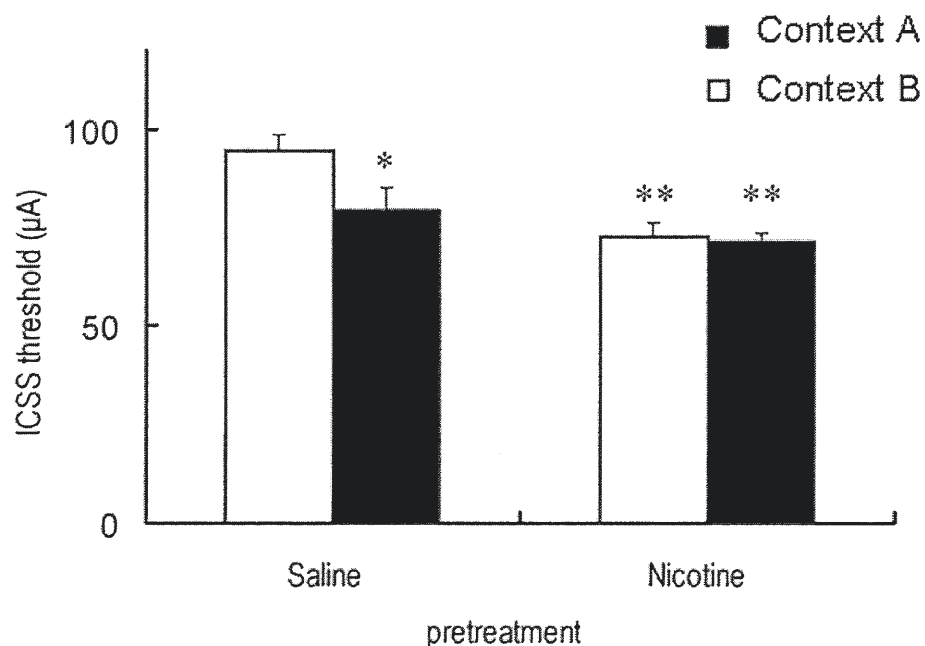


Fig.3.7 ICSS閾値におけるニコチン投与とニコチン-条件づけ環境提示の効果
生理食塩液投与下における統制刺激環境(Context B)と比較して、ニコチン条件づけ環境(Context A)、あるいは、ニコチン投与はICSS閾値を有意に下げた。
*, $p < .05$, **, $p < .01$ (vs Context B with saline treatment)

環境刺激の変更におけるICSS閾値

これまでに述べたようなContextの効果が、単にICSS訓練時とは異なる環境に動物を置いたため、新奇性の影響によって生じたのではないかという可能性があった。そのため、

環境刺激をICSS訓練時と変更しただけで、ICSS閾値が変動するかどうかを検討した。このICSS-統制実験では、薬物処置を受けたことがない5匹のラットを用いて、訓練環境下、Context A, B環境下におけるICSS閾値を測定した。ICSS閾値の平均値(標準誤差)はそれぞれ、訓練環境下において $93.0 \pm 8.21 \mu\text{A}$ 、Context Aにおいて $96.5 \pm 6.11 \mu\text{A}$ 、Context Bにおいて $101.2 \pm 4.74 \mu\text{A}$ であった。Context A, B、両条件におけるICSS閾値は訓練環境より上昇する傾向にあったが、1要因個体内分散分析では、条件間に有意な平均値の差を確認することはできなかった($F(2, 8) = 0.98, P > .05$)。したがって、環境刺激の変更のみではICSS閾値が変動しないことが明らかとなった。

3.4 考察

3.4.1 ニコチンとその条件刺激によるICSS閾値低下

外側視床下部は、脳内自己刺激に対して感受性の高い領域の1つである(Singh, Desiraju, & Raju, 1997)。また、解剖学的には中脳辺縁系ドパミン作動性神経の線維束である内側前脳束が外側視床下部の中を貫通している。したがって、本実験における被験体の安定したICSSは内側前脳束を刺激することによる行動であったと考えられる。

本実験において、ニコチンを処置しなくともニコチンに条件づけられた環境はICSS反応に対して促進的に働き、ICSSの電気刺激閾値を低下させた。このことは、中脳辺縁系ドパミン作動性神経がニコチン-条件づけ環境下で活性化されたことを示唆している。薬物-条件刺激によるICSS閾値の低下効果は、モルヒネ、コカインを用いた先行研究によっても報告されている(Hayes, & Gardner, 2004)。本実験より、ニコチンもまた、これらの薬物と同様に依存性薬物の特性を有することが明らかとなった。

本研究では、ICSS閾値は訓練環境でない環境下で測定された。したがって、オペラント

Boxの環境変更によってICSS閾値が変動しないかどうか確認する必要があった。新奇な環境はラットにおいて報酬的であり、この背景として中脳辺縁系ドーパミン機構の関与が示唆されている(Feenstra, & Botterblom, 1996)。さらに、新奇環境に対するラットの行動反応特性は依存性薬物の感受性にも関係するという報告がある(Chefer, Zakharova, Shippenberg, 2003)。そのためニコチンと条件づけをしなかった環境(Context B)、つまり被験体にとっては新奇な環境が統制刺激として適切であったかどうか、あるいは、両環境刺激そのものがICSS閾値を変化させうるのかを統制実験を行うことによって検討した。統制実験の結果、オペラントBox内の床面の形状、壁の色の変更のみでは訓練環境と比較してICSS閾値を変化させないことが明らかとなった。したがって、Context Aは確かにニコチンの条件づけによってICSS閾値を低下させたことが確認された。

3.4.2 条件刺激とドーパミン神経

薬物と条件づけられた環境がどのような神経機構を介して中脳-辺縁系のドーパミン神経路を活性化させるのか、正確なメカニズムは明らかではない。この問題を検討するには、環境刺激からの感覚入力がどのような経路を経て中脳辺縁系ドーパミン機構に作用するのかを同定することが必要である。ヒトにおける脳イメージング研究では、ニコチン関連刺激の提示によって扁桃体(McClernon, Hiott, Liu, Salley, Behm, & Rose, 2007)、前部帯状皮質(Brody, et al., 2004)、海馬傍回、一次運動野や運動前野(Smolka et al., 2006)、背外側前頭前野(McBride et al., 2006)が、活性化されることがわかっている。これに加えて、ニコチン-条件刺激ではドーパミン以外の神経伝達物質、例えばグルタミン酸やGABAが関連する(Bevins, Besheer, & Pickett, 2001)。動物の行動研究では、コカインによって条件づけられた環境が誘発する薬物探索行動には、前頭前野、基底外側扁桃体、背側海馬が重要

な役割を担っているとされる(Fuchs, Evans, Ledford, Parker, Case, Mehta, & See, 2005)。

ニコチンによって条件づけられた環境刺激がこれらの領域の神経をどのように活性化させるのかさらなる研究が必要である。

ニコチンの投与は、溶媒である生理食塩液の投与条件と比較してICSS閾値を低下させた。このようなニコチンによるICSS閾値低下効果は、Panagis, Kastellakis, Spyraiki, & Nomikos.(2000)の先行知見と一貫しており、腹側被蓋野のニコチン性アセチルコリン受容体が刺激され、側坐核内のドーパミン放出が促進されることによって起こる(Laviolette, & van der Kooy, 2003)。ニコチン投与によって、このような薬理効果が中脳辺縁系ドーパミン神経に起こっている場合には、ニコチンとの条件づけを行った環境(Context A)や新奇な環境(Context B)によるさらなるICSS閾値低下は観察されなかった。薬理的な刺激と非薬理的な刺激との相互作用によってニコチンの強化効果が増強されることは、ニコチンによる強化子促進効果(reinforcement-enhancing effect of nicotine)として知られているが(Chaudhri, Caggiula, Donny, Palmatier, Liu, & Sved, 2006)、先行研究と本実験との間には、ニコチンの投与条件(静脈内自己投与、と皮下投与)、条件刺激の提示条件(文脈刺激とDiscreteな刺激)などいくつかの手続きの違いがある。中脳辺縁系ドーパミン機構の活性化を検討するうえで、このようなニコチンによる感覚刺激への促進的効果はさらなる洗練された手続きで検討する必要がある。

3.4.3 条件刺激とニコチン依存

本実験では、ニコチンの用量や条件づけの手続きはCPP実験の結果によって決定された。なお、ニコチン0.4mg/kgの用量は、先行研究においてもCPPが形成されることが明らかとなっており(Le Foll, & Goldberg, 2005)、さらに、この用量では薬物弁別実験においても

有効な弁別刺激効果を示す用量であることがわかっている(Pratt, Stolerman, Garcha, Giardini, & Feyerabend, 1983; Palmatier, Wilkinson, Metschke, & Bevins, 2005)。したがって、今回観察されたような、ニコチンと条件づけた環境によるICSS閾値の低下効果は、ニコチンが報酬的であり、環境刺激が報酬性の条件刺激となった結果であることが示唆される。また、ニコチンの報酬性に密接に関連するとされる行動的増感効果が(Belluzzi, Lee, Oliff, & Leslie, 2004)、今回のICSS実験における条件づけにおいても観察された。誘因感作理論(incentive sensitization theory)によれば、依存性薬物の反復投与をすると、行動的増感を引き起こすばかりでなく、依存性薬物の誘因価の感作もまた引き起こすとし、薬物に対する摂取欲求が高まる(Robinson, & Berridge, 1993)。本実験においても、ニコチンと条件づけられた環境の誘因特性(接近行動を起こす特性)が増強された可能性があり、その結果としてICSS閾値が影響を受けたことも考えられる。

以上のように、本実験では、ニコチンの報酬効果によって条件づけられた環境刺激が中脳辺縁系ドパミン神経を活性化させ、薬物探索行動を誘発する可能性について示した。近年、ニコチン依存研究では文脈刺激が場面設定子(occasion setter)として機能し、喫煙のトリガーとして働いているということに焦点が当てられてきている(Crombag, Bossert, Koya, & Shaham, 2008)。場面設定子(Occasion setter)は、反応準備に関与しており、一方でDiscrete stimuliは目的指向行動(goal directed behavior)と関係するという点で、これらの機能はそれぞれ異なるとされている。実際、文脈性条件刺激による薬物探索行動の再燃は非常に強力である(Due, Huettel, Hall, & Rubin, 2002)。本実験によって、ニコチンによる条件性文脈刺激もまた、薬物探索行動を促進させることで喫煙の維持に重要な役割を担っていることが示された。

3.5 総括と今後の展望

本研究では、薬物依存の神経機構を理解し、より良い治療法の開発に資することを目的として、ラットを用いて薬物自己投与行動と脳内自己刺激行動を用いた実験を行った。前者は頸静脈薬液の注入、後者は外側視床下部への電気刺激を強化子としたオペラント条件づけを用いた行動であり、後者で用いたニコチンと環境の連合形成には古典的条件づけを用いている。このように、本研究は薬理学における学習心理学の貢献を示すものとなった。

具体的な実験は第2章と第3章に示した。第2章では、コカインの自己投与行動を用い、休薬時のコカイン探索行動維持におけるストレス刺激の影響について検討した。第3章では、脳内自己刺激行動を用いて、ニコチンに条件づけられた環境が中脳辺縁系ドパミン神経に与える影響について検討した。これらの実験で用いた依存性薬物は、コカイン、ニコチンとそれぞれ異なるが、依存性薬物の中では身体依存を起さず、退薬症候が比較的重篤でない物質である。そのため、たとえば第2章ではコカインの7日間自己投与後、薬液を生理食塩水に切り替えたときのレバー押し、第3章ではニコチンの連続投与を6日間受けた後の自己刺激行動には、身体依存に基づく退薬症候の影響を受けているとは考えにくい。これらの実験で身体依存を起さない中枢神経系興奮薬を用いたことは、身体依存の影響を排除するという観点では適切であったと考えられる。

ストレスや薬物関連刺激が誘発する薬物への渴望や強迫的探索行動は、生得的に決定されたものではなく、個々人の薬物体験の結果として生起する現象である。それゆえに、本研究で得られた「ストレス刺激による薬物探索行動の維持」、「依存性薬物の効果と条件づけられた環境における中脳辺縁系ドパミン神経の活性化」は、薬物依存者が薬物を使用する契機として一般性のあるものと考えられる。

第2章で紹介した聴覚性驚愕刺激は、これまで薬物依存研究においてストレス刺激として用いられたことはなかった。近年の研究では、げっ歯類にとって驚愕刺激の繰り返し提示が不安を惹起するという知見がある(Jelen, et al., 2003)。このことを考慮に入れると、薬物依存者が体験するストレスは何か、それによってどの程度の不安が惹起されているのかという点が、薬物依存の治療において、薬物使用の中断を継続させる上で重要であると言える。本研究の知見を臨床現場に生かすとすれば、依存症治療という枠組みの中で、患者の外的なストレスを軽減し、患者が抱えている不安を解消しつつ、社会環境の調整や生活の質(Quality of life; QOL)の向上を図って行くことが必要と考えられる。

第3章において紹介したニコチンと条件づけられた環境刺激の効果は、これまで様々な研究によってニコチンの探索・摂取行動の促進因子となることが実証されてきた。ニコチンと結びついた環境刺激の効果は、ニコチン依存研究における近年の主要なテーマである(Bevins, & Palmatier, 2004)。しかしながら、従来の研究ではもっぱらdiscreteな条件刺激が用いられてきた。本研究ではニコチンと連合した文脈的環境刺激(Context)の提示が、中脳辺縁系ドーパミン神経の活性変化を引き起こすことを見出した。Discreteな条件刺激とContextとでは、中脳辺縁系ドーパミン神経を活性化させるメカニズムが異なっている可能性があり(Robbins, Ersche, & Everitt, 2008)、本研究の知見は、条件刺激によって誘発される行動の神経基盤を解明する上で重要な知見と考えられる。

薬物依存症は、再燃率が非常に高い疾患である。適切に治療を受けたとしても退院後数日のうちに再使用してしまうものもいれば、数年に渡り休薬に成功したものでも、何らかのきっかけにより再び使用してしまうこともある。1度の再使用は、休薬の期間を問わず、患者を治療前の依存症状態に戻してしまうため、実際の治療では生涯に渡って休薬を継続

させる必要がある。薬物の再使用を防止するためには、どのような環境因子がどのような過程を経て薬物使用の引き金となるのかさらなる解明をしていく必要がある。第1章において述べたように現在では、薬物依存は非常に学際的な研究テーマとなった。学習・行動の領域においてもこのテーマに積極的に取り組んでいる研究室がある。洗練された心理学の手続きは、薬物依存研究におけるこれまでの知見の相違や矛盾点、さらには検証が困難な現象を解明する上で非常に強力なツールとなる。また、薬物依存研究において明らかとなった事実は、神経科学、行動科学、心理学においても新しい知見となる。そのため、今後この分野におけるさらに深化した研究が期待される。

引用文献

- Ahmed, S. H., & Koob, G. F. (1997). Cocaine- but not food-seeking behavior is reinstated by stress after extinction. *Psychopharmacology*, *132*(3), 289–95.
- Anker, J. J., Baron, T. R., Zlebnik, N. E., & Carroll, M. E. (2012). Escalation of methamphetamine self-administration in adolescent and adult rats. *Drug and alcohol dependence*, *124*(1-2), 149-53
- Bardo, M. T., & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl)*, *153*(1), 31–43.
- Bassareo, V., De Luca, M. A., & Di Chiara, G. (2007). Differential impact of pavlovian drug conditioned stimuli on in vivo dopamine transmission in the rat accumbens shell and core and in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*, *191*(3), 689–703.
- Belluzzi, J. D., Lee, A. G., Oliff, H. S., & Leslie, F. M. (2004). Age-dependent effects of nicotine on locomotor activity and conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology*, *174*(3), 389–95.
- Bespalov, A. Y., Dravolina, O. A., Sukhanov, I., Zakharova, E., Blokhina, E., Zvartau, E., Danysz, W., et al. (2005). Metabotropic glutamate receptor (mGluR5) antagonist

MPEP attenuated cue- and schedule-induced reinstatement of nicotine self-administration behavior in rats. *Neuropharmacology*, 49, 167–178.

Bevins, R. A., Besheer, J., & Pickett, K. S. (2001). Nicotine-conditioned locomotor activity in rats: dopaminergic and GABAergic influences on conditioned expression. *Pharmacol Biochem Behav*, 68(1), 135–145.

Bevins, R. A., & Palmatier, M. I. (2004). Extending the role of associative learning processes in nicotine addiction. *Behav Cogn Neurosci Rev*, 3(3), 143–158.

Brody, A. L., Mandelkern, M. A., Lee, G., Smith, E., Sadeghi, M., Saxena, S., Jarvik, M. E., et al. (2004). Attenuation of cue-induced cigarette craving and anterior cingulate cortex activation in bupropion-treated smokers: a preliminary study. *Psychiatry Res*, 130(3), 269–281.

Bishop, E. S. (1919). NARCOTIC DRUG ADDICTION: A PUBLIC HEALTH PROBLEM. *American journal of public health (New York, N.Y. : 1912)*, 9(7), 481–8.

Caine, S. B., & Koob, G. F. (1994). Effects of mesolimbic dopamine depletion on responding maintained by cocaine and food. *Journal of the experimental analysis of behavior*, 61(2), 213–21.

- Carlezon, W. A., & Wise, R. A. (1996). Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex. *The Journal of neuroscience*, *16*(9), 3112–22.
- Carlezon Jr., W. A., & Chartoff, E. H. (2007). Intracranial self-stimulation (ICSS) in rodents to study the neurobiology of motivation. *Nat Protoc*, *2*(11), 2987–2995.
- Casadio, P., Fernandes, C., Murray, R. M., & Di Forti, M. (2011). Cannabis use in young people: the risk for schizophrenia. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *35*(8), 1779–87.
- Chaudhri, N., Caggiula, A. R., Donny, E. C., Palmatier, M. I., Liu, X., & Sved, A. F. (2006). Complex interactions between nicotine and nonpharmacological stimuli reveal multiple roles for nicotine in reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)*, *184*(3-4), 353–366.
- Chefer, V. I., Zakharova, I., & Shippenberg, T. S. (2003). Enhanced responsiveness to novelty and cocaine is associated with decreased basal dopamine uptake and release in the nucleus accumbens: quantitative microdialysis in rats under transient conditions. *The Journal of neuroscience*, *23*(7), 3076–84.
- Chornock, W. M., Stitzer, M. L., Gross, J., & Leischow, S. (1992). Experimental model of smoking re-exposure: effects on relapse. *Psychopharmacology (Berl)*, *108*(4), 495–500.

- Cohen, C., Perrault, G., Griebel, G., & Soubrie, P. (2005). Nicotine-associated cues maintain nicotine-seeking behavior in rats several weeks after nicotine withdrawal: reversal by the cannabinoid (CB1) receptor antagonist, rimonabant (SR141716). *Neuropsychopharmacology*, 30(1), 145–155.
- Conklin, C. A. (2006). Environments as cues to smoke: implications for human extinction-based research and treatment. *Exp Clin Psychopharmacol*, 14(1), 12–19.
- Coulombe, D., & Miliaressis, E. (1987). Fitting intracranial self-stimulation data with growth models. *Behav Neurosci*, 101(2), 209–214.
- Crombag, H. S., Bossert, J. M., Koya, E., & Shaham, Y. (2008). Review. Context-induced relapse to drug seeking: a review. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1507), 3233–43.
- Crowley, T. J. (2006). Adolescents and substance-related disorders: research agenda to guide decisions on Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth edition (DSM-V). *Addiction*, 101, 115–24.
- David, S. P., Munafo, M. R., Johansen-Berg, H., Smith, S. M., Rogers, R. D., Matthews, P. M., & Walton, R. T. (2005). Ventral striatum/nucleus accumbens activation to smoking-related pictorial cues in smokers and nonsmokers: a functional magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry*, 58(6), 488–494.

- David, V., Segu, L., Buhot, M.-C., Ichaye, M., & Cazala, P. (2004). Rewarding effects elicited by cocaine microinjections into the ventral tegmental area of C57BL/6 mice: involvement of dopamine D1 and serotonin1B receptors. *Psychopharmacology*, *174*(3), 367–75.
- Davis, M. (1986). Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning using the fear-potentiated startle paradigm. *Behavioral neuroscience*, *100*(6), 814–24.
- Davis, M. (1990). Animal models of anxiety based on classical conditioning: the conditioned emotional response (CER) and the fear-potentiated startle effect. *Pharmacology & therapeutics*, *47*(2), 147–65.
- de Wit, H., & Stewart, J. (1981). Reinstatement of cocaine-reinforced responding in the rat. *Psychopharmacology*, *75*(2), 134–43.
- de Wit, H., & Stewart, J. (1983). Drug reinstatement of heroin-reinforced responding in the rat. *Psychopharmacology*, *79*(1), 29–31.
- Douglas, L. A., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2003). Novel-object place conditioning in adolescent and adult male and female rats: effects of social isolation. *Physiology & behavior*, *80*(2-3), 317–25.
- Due, D. L., Huettel, S. A., Hall, W. G., & Rubin, D. C. (2002). Activation in mesolimbic and visuospatial neural circuits elicited by smoking cues: evidence from functional magnetic resonance imaging. *Am J Psychiatry*, *159*(6), 954–960.

- Epping-Jordan, M. P., Watkins, S. S., Koob, G. F., & Markou, A. (1998). Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature*, *393*(6680), 76–79.
- Epstein, L. H., Caggiula, A. R., Perkins, K. A., McKenzie, S. J., & Smith, J. A. (1991). Conditioned tolerance to the heart rate effects of smoking. *Pharmacol Biochem Behav*, *39*(1), 15–19.
- Ersche, K. D., Jones, P. S., Williams, G. B., Turton, A. J., Robbins, T. W., & Bullmore, E. T. (2012). Abnormal brain structure implicated in stimulant drug addiction. *Science*, *335*(6068), 601–4.
- Evans, S. (2007). The role of estradiol and progesterone in modulating the subjective effects of stimulants in humans. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, *15*(5), 418–426.
- Every-Palmer, S. (2011). Synthetic cannabinoid JWH-018 and psychosis: an explorative study. *Drug and alcohol dependence*, *117*(2-3), 152–7.
- Feenstra, M. G., & Botterblom, M. H. (1996). Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty. *Brain research*, *742*(1-2), 17–24.
- Fuchs, R. A., Evans, K. A., Ledford, C. C., Parker, M. P., Case, J. M., Mehta, R. H., & See, R. E. (2005). The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral

amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology*, 30(2), 296–309.

Goeders, N. E., & Guerin, G. F. (1996). Effects of surgical and pharmacological adrenalectomy on the initiation and maintenance of intravenous cocaine self-administration in rats. *Brain research*, 722(1-2), 145–52.

Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2011). Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(11), 652–69.

Greenshaw, A. J. (1993). Differential effects of ondansetron, haloperidol and clozapine on electrical self-stimulation of the ventral tegmental area. *Behavioural pharmacology*, 4(5), 479–485.

Gremel, C. M., & Cunningham, C. L. (2008). Roles of the nucleus accumbens and amygdala in the acquisition and expression of ethanol-conditioned behavior in mice. *The Journal of neuroscience*, 28(5), 1076–84.

Hayes, R. J., & Gardner, E. L. (2004). The basolateral complex of the amygdala mediates the modulation of intracranial self-stimulation threshold by drug-associated cues. *Eur J Neurosci*, 20(1), 273–280.

- Hernandez-Avila, C. A., Rounsaville, B. J., & Kranzler, H. R. (2004). Opioid-, cannabis- and alcohol-dependent women show more rapid progression to substance abuse treatment. *Drug and alcohol dependence*, 74(3), 265–72.
- Jelen, P., Soltysik, S., & Zagrodzka, J. (2003). 22-kHz ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: behavioral and pharmacological modulation of affective state. *Behavioural brain research*, 141(1), 63–72.
- Kenny, P. J., & Markou, A. (2005). Conditioned nicotine withdrawal profoundly decreases the activity of brain reward systems. *J Neurosci*, 25(26), 6208–6212.
- Koch, M., & Schnitzler, H. U. (1997). The acoustic startle response in rats--circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behavioural brain research*, 89(1-2), 35–49.
- Koob, G. F. (2000). Neurobiology of addiction. Toward the development of new therapies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 909, 170–85.
- Koob, G. F. (2008). Hedonic Homeostatic Dysregulation as a Driver of Drug-Seeking Behavior. *Drug discovery today. Disease models*, 5(4), 207–215.
- Laviolette, S. R., & van der Kooy, D. (2003). Blockade of mesolimbic dopamine transmission dramatically increases sensitivity to the rewarding effects of nicotine in the ventral tegmental area. *Mol Psychiatry*, 8(1), 9,50–59.

- Le Foll, B., & Goldberg, S. R. (2005). Nicotine induces conditioned place preferences over a large range of doses in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *178*(4), 481–492.
- Levin, E. D., Slade, S., Wells, C., Cauley, M., Petro, A., Vendittelli, A., Johnson, M., et al. (2011). Threshold of adulthood for the onset of nicotine self-administration in male and female rats. *Behavioural brain research*, *225*(2), 473–81.
- Liechti, M. E., Lhuillier, L., Kaupmann, K., & Markou, A. (2007). Metabotropic glutamate 2/3 receptors in the ventral tegmental area and the nucleus accumbens shell are involved in behaviors relating to nicotine dependence. *J Neurosci*, *27*(34), 9077–9085.
- Li, T.-K., Hewitt, B. G., & Grant, B. F. (2004). Alcohol use disorders and mood disorders: a National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism perspective. *Biological psychiatry*, *56*(10), 718–20.
- Liu, X., Caggiula, A. R., Yee, S. K., Nobuta, H., Poland, R. E., & Pechnick, R. N. (2006). Reinstatement of nicotine-seeking behavior by drug-associated stimuli after extinction in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *184*(3-4), 417–425.
- Martinez-Raga, J., Keaney, F., Sutherland, G., Perez-Galvez, B., & Strang, J. (2003). Treatment of nicotine dependence with bupropion SR: review of its efficacy, safety and pharmacological profile. *Addict Biol*, *8*(1), 13–21.

- Masini, C. V., Babb, J. A., Nyhuis, T. J., Day, H. E. W., & Campeau, S. (2012). Auditory cortex lesions do not disrupt habituation of HPA axis responses to repeated noise stress. *Brain research, 1443*, 18–26.
- Mantsch, J. R., & Katz, E. S. (2007). Elevation of glucocorticoids is necessary but not sufficient for the escalation of cocaine self-administration by chronic electric footshock stress in rats. *Neuropsychopharmacology, 32*(2), 367–76.
- McBride, D., Barrett, S. P., Kelly, J. T., Aw, A., & Dagher, A. (2006). Effects of expectancy and abstinence on the neural response to smoking cues in cigarette smokers: an fMRI study. *Neuropsychopharmacology, 31*(12), 2728–2738.
- McClernon, F. J., Hiott, F. B., Liu, J., Salley, A. N., Behm, F. M., & Rose, J. E. (2007). Selectively reduced responses to smoking cues in amygdala following extinction-based smoking cessation: results of a preliminary functional magnetic resonance imaging study. *Addict Biol, 12*(3-4), 503–512.
- McClernon, F. J., Kozink, R. V., & Rose, J. E. (2008). Individual differences in nicotine dependence, withdrawal symptoms, and sex predict transient fMRI-BOLD responses to smoking cues. *Neuropsychopharmacology, 33*(9), 2148–2157.
- McLaughlin, J. P., Marton-Popovici, M., & Chavkin, C. (2003). Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. *The Journal of neuroscience, 23*(13), 5674–83.

- McLaughlin, J. P., Land, B. B., Li, S., Pintar, J. E., & Chavkin, C. (2006). Prior activation of kappa opioid receptors by U50,488 mimics repeated forced swim stress to potentiate cocaine place preference conditioning. *Neuropsychopharmacology*, *31*(4), 787–94.
- Milad, M. R., Rauch, S. L., Pitman, R. K., & Quirk, G. J. (2006). Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. *Biological psychology*, *73*(1), 61–71.
- Mirenowicz, J., & Schultz, W. (1996). Preferential activation of midbrain dopamine neurons by appetitive rather than aversive stimuli. *Nature*, *379*(6564), 449–51.
- Miyata, H., Itasaka, M., Kimura, N., & Nakayama, K. (2011) Decreases in brain reward function reflect nicotine- and methamphetamine-withdrawal aversion in rats. *Curr Neuropharmacol.* *9*(1), 63-7.
- Miyata, H., & Yanagita, T. (2001). Neurobiological mechanisms of nicotine craving. *Alcohol*, *24*(2), 87–93.
- Mucha, R. F., Geier, A., & Pauli, P. (1999). Modulation of craving by cues having differential overlap with pharmacological effect: evidence for cue approach in smokers and social drinkers. *Psychopharmacology (Berl)*, *147*(3), 306–313.
- Mooney, S. M., & Miller, M. W. (2010). Prenatal exposure to ethanol affects postnatal neurogenesis in thalamus. *Experimental neurology*, *223*(2), 566–73.

- O'Brien, M. S., & Anthony, J. C. (2005). Risk of becoming cocaine dependent: epidemiological estimates for the United States, 2000-2001. *Neuropsychopharmacology* : 30(5), 1006–18.
- Olausson, P., Jentsch, J. D., & Taylor, J. R. (2004). Nicotine enhances responding with conditioned reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)*, 171(2), 173–178.
- Olds, J., & Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of comparative and physiological psychology*, 47(6), 419–27.
- Palmatier, M. I., Wilkinson, J. L., Metschke, D. M., & Bevins, R. A. (2005). Stimulus properties of nicotine, amphetamine, and chlordiazepoxide as positive features in a pavlovian appetitive discrimination task in rats. *Neuropsychopharmacology*, 30(4), 731–41.
- Panagis, G., Kastellakis, A., Spyraiki, C., & Nomikos, G. (2000). Effects of methyllycaconitine (MLA), an alpha 7 nicotinic receptor antagonist, on nicotine- and cocaine-induced potentiation of brain stimulation reward. *Psychopharmacology (Berl)*, 149(4), 388–396.
- Paxinos, G., & Watson, C., (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York.

- Paterson, N. E., Froestl, W., & Markou, A. (2005). Repeated administration of the GABAB receptor agonist CGP44532 decreased nicotine self-administration, and acute administration decreased cue-induced reinstatement of nicotine-seeking in rats. *Neuropsychopharmacology*, *30*(1), 119–128.
- Pratt, J. A., Stolerman, I. P., Garcha, H. S., Giardini, V., & Feyerabend, C. (1983). Discriminative stimulus properties of nicotine: further evidence for mediation at a cholinergic receptor. *Psychopharmacology*, *81*(1), 54–60.
- Ranney, L., Melvin, C., Lux, L., McClain, E., & Lohr, K. N. (2006). Systematic review: smoking cessation intervention strategies for adults and adults in special populations. *Ann Intern Med*, *145*(11), 845–856.
- Robbins, T.W., Ersche, K.D., & Everitt, B.J. (2008) Drug addiction and the memory systems in the brain. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1141, 1-21.
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain research. Brain research reviews*, *18*(3), 247–91.
- Rose, J. E. (2006). Nicotine and nonnicotine factors in cigarette addiction. *Psychopharmacology (Berl)*, *184*(3-4), 274–285.
- Sagara, H., Kitamura, Y., Yae, T., Shibata, K., Suemaru, K., Sendo, T., Araki, H., et al. (2008). Nicotinic acetylcholine alpha4beta2 receptor regulates the motivational

- effect of intracranial self stimulation behavior in the runway method. *J Pharmacol Sci*, 108(4), 455–461.
- Schechter, M. D., & Calcagnetti, D. J. (1993). Trends in place preference conditioning with a cross-indexed bibliography; 1957-1991. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 17(1), 21–41.
- Shaham, Y., & Stewart, J. (1996). Effects of opioid and dopamine receptor antagonists on relapse induced by stress and re-exposure to heroin in rats. *Psychopharmacology*, 125(4), 385–91.
- Shaham, Y., Shalev, U., Lu, L., De Wit, H., & Stewart, J. (2003). The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology*, 168(1-2), 3–20.
- Shepard, J. D., Bossert, J. M., Liu, S. Y., & Shaham, Y. (2004). The anxiogenic drug yohimbine reinstates methamphetamine seeking in a rat model of drug relapse. *Biological psychiatry*, 55(11), 1082–9.
- Singh, J., Desiraju, T., & Raju, T. R. (1997). Dopamine receptor sub-types involvement in nucleus accumbens and ventral tegmentum but not in medial prefrontal cortex: on self-stimulation of lateral hypothalamus and ventral mesencephalon. *Behavioural brain research*, 86(2), 171–9.

- Smith, J. S., Schindler, A. G., Martinelli, E., Gustin, R. M., Bruchas, M. R., & Chavkin, C. (2012). Stress-induced activation of the dynorphin/ κ -opioid receptor system in the amygdala potentiates nicotine conditioned place preference. *The Journal of neuroscience*, *32*(4), 1488–95.
- Smolka, M. N., Buhler, M., Klein, S., Zimmermann, U., Mann, K., Heinz, A., & Braus, D. F. (2006). Severity of nicotine dependence modulates cue-induced brain activity in regions involved in motor preparation and imagery. *Psychopharmacology (Berl)*, *184*(3-4), 577–588.
- Sperling, R. E., Gomes, S. M., Sypek, E. I., Carey, A. N., & McLaughlin, J. P. (2010). Endogenous kappa-opioid mediation of stress-induced potentiation of ethanol-conditioned place preference and self-administration. *Psychopharmacology*, *210*(2), 199–209.
- Spyraki, C., Fibiger, H. C., & Phillips, A. G. (1982). Cocaine-induced place preference conditioning: lack of effects of neuroleptics and 6-hydroxydopamine lesions. *Brain research*, *253*(1-2), 195–203.
- Stansfield, K. H., & Kirstein, C. L. (2007). Chronic cocaine or ethanol exposure during adolescence alters novelty-related behaviors in adulthood. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *86*(4), 637–42.

- Tunstall, B., Beckett, S., & Mason, R. (2009). Ultrasonic vocalisations explain unexpected effects on pre-pulse inhibition responses in rats chronically pre-treated with phencyclidine. *Behavioural brain research*, 202(2), 184–91.
- Vivian, J. A., Farrell, W. J., Sapperstein, S. B., & Miczek, K. A. (1994). Diazepam withdrawal: effects of diazepam and gepirone on acoustic startle-induced 22 kHz ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology*, 114(1), 101–8.
- Wang, H. D., Takigawa, M., Hamada, K., Shiratani, T., & Takenouchi, K. (2002). A shift in information flow between prefrontal cortex and the ventral tegmental area in methamphetamine-sensitized rats. *Int J Psychophysiol*, 44(3), 251–259.
- Wise, R. A., & Morales, M. (2010). A ventral tegmental CRF-glutamate-dopamine interaction in addiction. *Brain research*, 1314, 38–43.
- Zislis, G., Desai, T. V., Prado, M., Shah, H. P., & Bruijnzeel, A. W. (2007). Effects of the CRF receptor antagonist D-Phe CRF(12-41) and the alpha2-adrenergic receptor agonist clonidine on stress-induced reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats. *Neuropharmacology*, 53(8), 958–66.
- 柳田知司 (1992). 薬物依存研究の展望-精神依存を中心に 日本薬理学雑誌 109:97-107, 1992.

参考文献

World health organization (1990) International Classification of Diseases; ICD-10

(融道男・中根允文・小宮山実(監訳) (1993) ICD-10 精神および行動の障害 医学書院)

American Psychiatric Association (2000) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision; DSM-IV-TR. Washington D.C., American Psychiatric Association.

(高橋三郎・大野裕・染谷俊幸(監訳) (2002) DSM-IV-TR 精神疾患の診断・統計マニュアル 医学書院)