

無麻酔非拘束ラットの側坐核の神経ペプチド受容体を
介した **dopamine** 放出機構の研究

日本大学大学院松戸歯学研究科

川 島 央 暉

(指導：三枝 禎教授)

目 次

概 要	・・・・・・・・・・	1
第 1 章		
緒 言	・・・・・・・・・・	4
材料および方法	・・・・・・・・・・	8
結 果	・・・・・・・・・・	12
考 察	・・・・・・・・・・	25
第 2 章		
緒 言	・・・・・・・・・・	30
材料および方法	・・・・・・・・・・	33
結 果	・・・・・・・・・・	36
考 察	・・・・・・・・・・	49
総 括	・・・・・・・・・・	54
引用文献	・・・・・・・・・・	55
参考論文	・・・・・・・・・・	73

概 要

側坐核は中脳腹側被蓋野を起始核とした中脳辺縁系 dopamine 神経の主たる投射部位である。側坐核には食餌摂取，エネルギー恒常性，睡眠・覚醒などに関与することが知られている神経ペプチドの orexin-A または B を放出する orexin 神経が入力しており，これらの orexin 類が結合する orexin 受容体のサブタイプである OX₁ および OX₂ 受容体も分布している。ラットを用いた行動学実験から側坐核の orexin 受容体は，同部位の dopamine 神経活動に依存した移所行動を促進する働きがあることが示されている。しかしながら，側坐核の OX₁ および OX₂ 受容体が同部位の dopamine 神経終末からの dopamine 放出の制御において果たす役割は明らかでない。

側坐核には，endomorphin 類， β -endorphin, dynorphin などの神経ペプチドが結合する opioid 受容体も分布している。Opioid 受容体には μ , δ , κ 受容体サブタイプがあり，これらを非選択的に刺激するアゴニストには強力な鎮痛作用を示す opioid 鎮痛薬の morphine がある。一方，nandrolone は，世界アンチドーピング機構の使用禁止リストに含まれているタンパク同化ステロイドのひとつである。Nandrolone は，筋力の強化を要する競技スポーツの場だけでなく，骨格筋の発達と自らの外見の向上を追求する青少年の間での乱用が懸念される化学物質であるにも関わらず，効果が最も顕著で公衆衛生上の注意喚起を行うべき時期として，成長期のうちの思春期から青年期のどの期間が特に重要かに関しては詳細な検討に基づいた情報がほとんどない。また，nandrolone はそれ自体で依存を形成する可能性が示唆されているほか，morphine を含む opioid はタンパク同化ステロイドと最も頻繁に併用して乱用される化学物質であるとする疫学調査結果もある。乱用される薬物は中脳辺縁系 dopamine 神経の活動を促進することが知られているが，nandrolone の反復投与が側坐核の基礎的な dopamine 放出と，morphine が誘発する側坐核の

dopamine 放出促進作用に及ぼす影響は明らかでない。

そこで本論文では Sprague-Dawley 系雄性ラットを用い、第 1 章では、orexin 受容体リガンドの側坐核への局所投与が同部位の細胞外 dopamine 量に及ぼす影響を指標とし、側坐核の基礎的な dopamine 放出の制御において OX₁ および OX₂ 受容体が果たす役割について *in vivo* 脳微小透析法により検討した。第 2 章でははじめに、成長期のうち思春期に相当する 6 から 10 週齢と、青年期に相当する 10 から 14 週齢において、筋力の指標のひとつである握力に対する nandrolone の反復投与の効果と体重に対する効果と比較して系統的に分析を行った。次に、nandrolone の反復投与が側坐核の基礎的な dopamine 放出と、morphine の投与が惹起した側坐核の dopamine 放出に及ぼす影響について *in vivo* 脳微小透析法により検討を加えた。

第 1 章では、orexin 受容体リガンドの側坐核への局所投与が、同部位の dopamine 量に及ぼす影響を観察したが、各リガンドの投与は、側坐核に留置した微小透析膜の近傍に配置した薬物投与用微小ニードルを通じて行った。その結果、OX₁ および OX₂ 受容体の非選択的なアゴニストである orexin-A、OX₂ 受容体の選択的なアゴニストの orexin-B (500.0 pg, 5.0 ng) は、側坐核の dopamine 量に目立った変化を起こさなかったが、OX₁ および OX₂ 受容体の非選択的アンタゴニストの MK-4305 (suvorexant, 500.0 pg, 2.5 または 5.0 ng) は dopamine 放出を促進させた。微小透析膜を介した 2 時間に亘る tetrodotoxin の側坐核の灌流投与または orexin-A (500.0 pg) の併用は、MK-4305 (5.0 ng) が誘発した側坐核の dopamine 放出を強く抑制した。OX₂ 選択的アンタゴニストの EMPA (90.0 または 900.0 pg, 9.0 ng) は dopamine 放出を増加させた。この EMPA (9.0 ng) が誘発した側坐核の dopamine 放出は、同部位への tetrodotoxin の灌流投与により消失した。OX₁ 受容体の選択的アンタゴニストの SB-334867 の投与では dopamine 放出に変化が認められなかった。Orexin-B の併用投与は、EMPA または MK-4305 が誘発した dopamine 放出を抑制した。一方、MK-4305

(10.0 mg/kg) を腹腔投与したところ、側坐核の dopamine 放出に目立った変化は見られなかった。これらの実験から、側坐核においては OX₁ ではなく OX₂ 受容体が基礎的な dopamine 放出を抑制的に制御していることと、無麻酔非拘束ラットの側坐核の OX₂ 受容体の遮断は同部位の dopamine 放出を促進することを示す神経薬理的な証拠が *in vivo* の条件下で提供できた。

第 2 章では、はじめに 6 週齢および 10 週齢のラットに nandrolone の反復投与を 4 週間行い、この投与が成長に伴う握力と体重の増加に及ぼす影響を観察した。即ち、nandrolone (5.0 mg/kg s.c.) または溶媒の sesame oil は、1 日 1 回 1 週間のうち 6 日の連続投与を 3 週に亘り行った後、1 日 1 回 4 日連続して投与した。その結果、nandrolone は 10 週齢ではなく 6 週齢のラットで成長に伴う握力の増大を促進したが、いずれの週齢のラットでも体重の増加には目立った影響を及ぼさなかった。6 週齢のラットに 4 週間の nandrolone を投与したのちに *in vivo* 脳微小透析実験を行ったところ、側坐核の基礎 dopamine 放出に変化はなかったが morphine (1.0 mg/kg s.c.) の急性投与が誘発した dopamine 放出の促進作用は低下した。以上のことから、nandrolone の反復投与が体重増加に影響を与えずに筋力の増加を促進する臨界期のひとつは思春期である証拠を *in vivo* の実験条件下で示すことができた。この思春期の時期の nandrolone の反復投与は、*in vivo* で検出した中脳辺縁系 dopamine 神経活動は活性化しないものの、nandrolone と最も併用して乱用される薬物である opioid によるこの神経活動の賦活化を低下させることが示された。

以上の第 1 章および第 2 章の研究から、側坐核の OX₂ 受容体は同部位の dopamine 放出を抑制的に制御することが示された。また、opioid 受容体刺激を介した側坐核の dopamine 放出の促進は、思春期に相当する時期にタンパク同化ステロイドの nandrolone を反復投与すると減弱するという特徴が示された。

第 1 章

In vivo 脳微小透析実験により明らかにされた無麻酔非拘束ラットの側坐核における OX₁ ではなく OX₂ 受容体の遮断が起こす同部位の dopamine 放出の促進

緒 言

Orexin-A と B は hypocretin-1 と 2 とも呼ばれる神経ペプチドで、食餌摂取、エネルギー恒常性、睡眠・覚醒に関与している (de Lecea et al., 1998; Li et al., 2014; Sakurai et al., 1998; Wang et al., 2018)。Orexin-A と B のいずれかまたは両方を含有する神経細胞は、視床下部外側野から中枢神経系に広く投射している (Date et al., 1999; Nambu et al., 1999)。さらに、薬理的に 2 つのサブタイプに分類されるこれらのペプチドに対する受容体である OX₁ および OX₂ 受容体は、脳内に広く分布している (Marcus et al., 2001)。Orexin-A は OX₁ と OX₂ 受容体に同程度の親和性を示すのに対し、orexin-B は OX₂ に比べ OX₁ 受容体への親和性が低い (Sakurai et al., 1998; Wang et al., 2018; Winrow & Renger, 2014)。

行動学的研究から orexin-A は食餌摂取とエネルギー恒常性の制御において促進的な効果を誘発することが明らかにされている (Arrigoni et al., 2019; Sakurai et al., 1998)。また orexin-A は、ラットの側脳室に投与すると、自発運動を増加させることが知られているが、この増加は脳内の dopamine 受容体の活性化を介して誘発されたことが示唆されている (Nakamura et al., 2000)。これは、この効果が選択的な D₂ 受容体アンタゴニストの haloperidol の全身投与によって抑制されたためである。

中脳腹側被蓋野を起始核とする中脳辺縁系 dopamine 神経は、脳内の主要な dopamine 神経投射のひとつである。この神経系には、中脳腹側被蓋野から側坐核や前頭皮質へ投射する dopamine 含有神経が含まれている。中脳腹側被蓋

野には、視床下部外側野から orexin 神経の投射があり (Balcita-Pedicino & Sesack, 2007; Srinivasan et al., 2012), ラットの脳室内への orexin-A の投与により、側坐核ではなく前頭皮質の細胞外 dopamine 量が増加する (Vittoz & Berridge, 2006)。脳室内に投与された orexin-A のこれらの効果は中脳腹側被蓋野における orexin 受容体の刺激を介して起きたことが考えられる。これは中脳腹側被蓋野への orexin-A の投与は、側坐核の dopamine 放出に変化を及ぼさなかったが、前頭皮質の dopamine 放出を促進したためである。さらにこの前頭皮質での dopamine 量の増加は、覚醒と毛繕い行動の発現と同時に起きていた (Vittoz & Berridge, 2006)。

側坐核にも視床下部外側野からの orexin 神経投射があり (Marcus et al., 2001), 側坐核には OX₁ と OX₂ の両受容体が分布することが報告されている (Martin et al., 2002)。*In vitro* の電気生理学的実験の結果から、orexin-A と B が OX₂ 受容体を刺激することでラットの側坐核の神経細胞に脱分極を起こせることが示されている (Mukai et al., 2009)。遺伝子改変マウスを使用した近年の光遺伝学実験から、側坐核から出力している神経の間で orexin-A と B のいずれか一方または両方は、側坐核の出力神経のうち D₂ 受容体を発現した神経細胞を選択的に脱分極できることが明らかにされている (Blomerley et al., 2018)。これら知見は、orexin-A と B による側坐核の orexin 受容体の活性化は、側坐核からの dopamine 受容体刺激を介した出力を促進しうることを示唆している。Orexin-A の側坐核への局所投与は、側坐核の dopamine 神経の活動性と関連する食餌摂取と運動活性の増大に関わることが知られているラットの行動変化を誘発できることは上述の知見と一致するものである (Thorpe & Kotz, 2005)。

行動薬理学的研究からは、OX₂ 受容体の刺激は後シナプスの dopamine 神経活動性を促進できることも示唆されている。すなわち、OX₁ と OX₂ の両受容体を刺激する orexin-A, OX₂ 受容体を選択的に刺激する orexin-B の側坐核へ

の併用投与は、側坐核の後シナプス dopamine 受容体刺激依存性のラットの回転行動の発現を促進するが、orexin-A と B はいずれも単独投与では回転行動を誘発しなかった (Kotani et al., 2008)。側坐核において orexin 受容体は dopamine 神経終末上か、dopamine 神経と機能的に相互作用する非 dopamine 神経上のいずれかまたはその両方に存在することが考えられる。このことは、各 orexin 受容体サブタイプの同時または選択的刺激により dopamine 神経終末から放出された dopamine 受容体を刺激する dopamine を測定することにより確認できる可能性がある。また、側坐核に発現している orexin 受容体サブタイプが基礎的な dopamine 放出の制御において果たしている役割の詳細は明らかではない。

これらの側坐核の dopamine 神経機構に関して残された不明な点の解明は、摂食行動と睡眠障害だけではなく、この dopamine 神経機構の関与が明らかになりつつある多くの神経精神疾患においても治療の対象として注目されている脳内 orexin 神経機構の理解の促進につながる (Berhe et al., 2020; Berteotti et al., 2021; James et al., 2021; James & Aston-Jones, 2020; Khairuddin et al., 2020)。また、乱用されやすい薬物の多くは実験動物では側坐核に投射する中脳辺縁系 dopamine 神経活動性を高めるので (Di Chiara et al., 2004; Koob & Volkow, 2016; Li & Jasanoff, 2020)、こうした作用を orexin 受容体リガンドも示すかについても明らかにする必要がある。このため本研究では、無麻酔非拘束ラットの側坐核における基礎的な dopamine 放出の制御において OX₁, OX₂ 受容体が果たす役割を検討するために *in vivo* 脳微小透析実験を実施した。

OX₁, OX₂ 受容体の非選択的刺激の効果を分析するため、orexin-A の側坐核への投与が同部位の基礎 dopamine 放出に及ぼす効果をはじめに検討した。比較のため、OX₂ 受容体を選択的に刺激する orexin-B の側坐核の基礎 dopamine 放出に対する影響についても検討を加えた。これらの処置が目立った効果を示さなかったため、suvorexant (Winrow & Renger, 2014) として知られる OX₁

と OX₂ 受容体の非選択的アンタゴニストの MK-4305 (Cox et al., 2010) の側坐核への投与が同部位の dopamine 放出に及ぼす効果について解析した。さらに OX₁ 受容体アンタゴニストの SB-334867 (Smart et al., 2001), または, OX₂ 受容体アンタゴニストの EMPA (Malherbe et al., 2009a) の側坐核への投与も行い, 同部位の dopamine 放出に対する効果を比較した。Orexin-A, B とアンタゴニストの併用投与実験も合わせ, 本研究を通じて側坐核の dopamine 放出の制御における orexin 受容体サブタイプの役割の解明に取り組んだ。

材料および方法

動物

実験開始時の体重が 200～220 g の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット（高杉実験動物）を用いた。飼育は、恒温恒湿（ $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ， $55 \pm 5\%$ ），午前 7 時点灯，12 時間明暗サイクルの飼育室で行い，飼育期間中ラット・マウス用 MF 固形飼料（オリエンタル酵母工業）と水道水を自由に摂取させた。

手術

ラットに isoflurane（3%）で全身麻酔を施し，脳定位固定装置に装着した。通法（Aono et al., 2017; Watanabe et al., 2018）に従い，マニピュレータに装着した専用のステレオ用ガイドに取り付けたガイドカニューレを，アトラス（Paxinos and Watson, 1998）を参考に左側の側坐核のわずかに上方（両側耳間線から antero-posterior 10.6 mm, medio-lateral 1.5 mm, dorso-ventral 4.0 mm）に側脳室の損傷を避けるため正中より 18° の側方傾斜を付与して植立し，接着剤（アロンアルファ A; 三共）と歯科用常温重合レジンを用いて，脳を圧迫しない深さに植立した維持用ステンレス製ビスと共に頭蓋骨表面に堅固に固定した。被験動物は手術後 7～10 日の回復期間をおいた後，透析実験に使用した。ガイドカニューレには血液および滲出液で閉塞しないようにステンレス製のダミープローブを挿入し，キャップナットで固定した。各被験動物は，1 回のみ透析実験に使用した。

実験は日本大学松戸歯学部動物実験委員会の承認の下，動物実験指針に従って行い，実験動物の苦痛軽減および使用動物数の低減に努めた。

透析実験

これまでの報告（Aono et al., 2017; Watanabe et al., 2018）と同様の方法で下

記の通り透析実験を行った。

セルロース製透析膜（長さ 2 mm, 直径 0.22 mm, カットオフ分子量約 5 万）の近傍に薬物脳内局所投与用微小ニードルを配置した直管型の透析プローブ（MIA-4-02; エイコム: Saigusa et al., 2009）を用いた。薬物投与用微小ニードル（フューズドシリカ製, 外径 150 μm , 内径 75 μm ）は, その先端が透析膜の中央の表面の真上（40 μm 以内）に位置するように取り付けた。本実験で使用したプローブの最大径はおよそ 400 μm であった。

あらかじめ挿入しておいたダミープローブをガイドカニューレから取り除き, 透析プローブをガイドカニューレの先端より透析膜のみが脳内に留置されるように挿入し, キャップナットでラットの頭部に固定した。灌流実験は, 被験動物を測定用透明アクリルケージ（30 cm \times 30 cm \times 35 cm）内に収容し, 簡易シーベルに取り付けたテフロンチューブを透析プローブの inlet および outlet にそれぞれ接続して行った。改良リンゲル液（NaCl: 147 mM, KCl: 4 mM, CaCl₂: 1.2 mM, MgCl₂: 1.1 mM; pH 7.4）灌流液に用い, 流速 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ で透析プローブに灌流した。Outlet 側のテフロンチューブは高速液体クロマトグラフィシステム（HTEC-500; エイコム）に接続した。Dopamine は PP-ODS column（粒子サイズ 2 μm , カラムサイズ 4.6 \times 30 mm; エイコム）にて分離した。移動相には decanesulfonic acid（2.0 mM）, EDTA（0.13 mM）, 1% methanol を含有した 0.1 M リン酸緩衝液（pH 6.0）を用い, 流速を 0.5 ml/min とした。Dopamine の分離に用いたカラムは 25 $^{\circ}\text{C}$ に設定した恒温槽に収容して使用した。Dopamine の定量には, 設定加電圧を+400 mV（Ag vs AgCl）とした電気化学検出器を用いた。本システムの dopamine の検出限界はシグナル:ノイズ比 2:1 でおおよそ 0.02 pg/sample であった。透析プローブの *in vitro* の条件下での上述の amine の回収率は約 12%であった。本報告では, この回収率に基づいた *in vivo* の条件下での amine 量の補正は行わなかった。これはこの補正が正確さを欠くとされているためである（Benveniste et al., 1989 ; Lindefors et al., 1989）。

試料の灌流液は 5 分毎に回収し、dopamine を定量した。クロマトグラムはパーソナルコンピュータに接続したインテグレータ (Power Chrom: AD Instruments, NSW, Australia) を用いて描出した。薬物の脳内への灌流投与または全身投与は、プローブ挿入後 4 時間以上経過してから行った。基礎 dopamine 量は、薬物投与直前 12 回に回収された灌流液中に含まれる dopamine 量の平均とした。

薬物

被験薬物として、orexin-A (Pyr-Pro-Leu-Pro-Asp-Cys-Cys-Arg-Gln-Lys-Thr-Cys-Ser-Cys-Arg-Leu-Tyr-Glu-Leu-Leu-His-Gly-Ala-Gly-Asn-His-Ala-Ala-Gly-Ile-Leu-Thr-Leu-NH₂, Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan), orexin-B (Arg-Pro-Gly-Pro-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Ala-Asn-Gly-Asn-His-Ala-Ala-Gly-Ile-Leu-Thr-Met-NH₂, Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan), MK-4305 (suvorexant: [(7R)-4-(5-Chloro-1,3-benzoxazol-2-yl)-7-methyl-1,4-diazepan-1-yl][5-methyl-2-(2H-1,2,3-triazol-2-yl)phenyl], ChemScene, LLC, NJ, USA), SB-334867 (N-(2-Methyl-6-benzoxazolyl)-N'-1,5-naphthyridin-4-yl urea, Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA), EMPA (N-Ethyl-2-[(6-methoxy-3-pyridinyl)](2-methylphenyl)sulfonylamino]-N-(3-pyridinylmethyl)-acetamide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Tetrodotoxin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いた。脳内局所投与に用いた薬物は、灌流液に溶解し、透析膜を介した逆透析で 4 時間に亘り灌流投与した tetrodotoxin (2 μM) を除き、溶媒 (生理食塩液または微量の dimethyl sulfoxide を添加した生理食塩液) に溶解し、側坐核へマイクロシリンジ (Hamilton) で 30 秒間かけて投与した。注入薬液量は 0.5 μl とした。マイクロシリンジは、薬液の拡散を妨げぬように投与終了から 30 秒後に取り外した。Orexin-A および B は生理食塩液に、MK-4305, SB-334867, EMPA は微量 (0.1%未満) の dimethyl sulfoxide を添加した生理食塩液にそれぞれ溶解し

た。Orexin 関連薬物の用量は、ラットの脳内の orexin 受容体サブタイプの機能の分析に関わる過去の行動薬理学的研究の結果（orexin-A および B: Yazdi-Ravandi et al., 2014; MK-4305: Gentile et al., 2018; SB-334867: Ahmadi-Soleimani et al., 2014; EMPA: Malherbe et al., 2009b）を参考にして設定するとともに、*in vitro* の実験（Yamaguchi et al., 2020）での経験に基づき各リガンドとその溶媒の浸透圧による非特異的な効果を最小限にするよう努めた。tetrodotoxin の用量は過去の報告（Saigusa et al., 2012a; Saigusa et al., 2012b）に基づいて選択した。全身投与実験で EMPA は、過去の報告（Gentile et al., 2018）に合わせた用量で dimethyl sulfoxide（0.1 mg/kg）に溶解した。

透析プローブ挿入位置の組織学的確認

実験終了後、過量の Na pentobarbital（80 mg/kg, i.p.）による深麻酔を行ない 10%ホルマリン液を経心臓灌流した。脳を摘出して厚さ 50 μm の前額断の連続組織標本を作製し、cresyl violet で染色を施し、透析プローブの挿入位置を組織学的に確認した。

統計処理

データはすべて基礎 dopamine 量に対する百分率と標準誤差（S.E.M.）で表した。これらの基礎値は、分散分析を時間（time）の因子について行い、連続して回収したサンプル間において統計学的に有意な差が認められなかった場合に限り決定した。経時的なデータの比較では処置（treatment）と time の因子について繰り返しのある二元配置分散分析法（two-way ANOVA）を用いた後、post hoc 検定として Scheffé's test を必要に応じて行った。有意水準はいずれも $P < 0.05$ とした。

結 果

透析プローブ挿入位置の組織学的確認

組織学的検索の結果、薬物脳内局所投与用微小ニードルと透析プローブは、Fig. 1 に示した通りいずれも Paxinos and Watson によるラットの脳のアトラス (1998) の 10.00 から 10.70 の範囲の側坐核に認められた。本実験で使用した透析膜 (膜長 2 mm) では側坐核の core 部と shell 部を明確には区別できなかった。本研究で使用した 162 例のラットのうち、プローブの位置が目的の範囲外にあったものは 38 例であった。プローブが目的位置にあった 129 例の結果のみを解析した。Fig. 2 にプローブが側坐核に位置している典型的な脳切片を提示したが、プローブの周囲組織には目立った傷害は認められなかった。

側坐核における基礎的な細胞外 dopamine 量

側坐核から回収されたサンプル中の薬物処理前の基礎的な dopamine 量は、 0.74 ± 0.04 pg (= 9.66 ± 0.52 nM) /5 min であった (mean \pm S.E.M.; $n = 129$)。

Orexin-A および B ではなく MK-4305 の側坐核への局所投与が誘発した同部位の dopamine 放出促進効果

溶媒 (dimethyl sulfoxide を 0.1%含む生理食塩液 0.5 μ l) のみを側坐核に局所投与したところ、試料中の dopamine 量は増加する傾向をごく短時間示したのち、各薬物の効果の分析を行った 240 分間の実験期間に亘り緩徐かつ持続的に減少した (Fig. 3 upper panel, $n = 6$)。

OX₁, OX₂ 受容体の非選択的なアゴニストの orexin-A (500.0 pg: $n = 6$; 5.0 ng: $n = 8$) または OX₂ 受容体の選択的なアゴニストの orexin-B (500.0 pg: $n = 6$; 5.0 ng: $n = 6$) の側坐核への局所投与は、側坐核の dopamine 放出に目立った変化を起さなかった (Fig. 4)。

これに対して OX₁, OX₂ 受容体の非選択的アンタゴニストの MK-4305 (500.0 pg, 2.5 および 5.0 ng) の側坐核への投与は, 同部位の細胞外への dopamine 量の放出を用量依存的に増加させた (Fig. 3 upper panel, two-way ANOVA, 5-240 min, treatment: $F_{(3, 937)} = 10.99, P < 0.001$; time: $F_{(45, 937)} = 10.45, P < 0.001$; no time \times treatment interaction)。Scheffé test の結果, 5.0 ng の MK-4305 投与群と, vehicle, 500.0 pg の MK-4305, 2.5 ng の MK-4305 の各投与群の間にそれぞれ有意差が認められた ($P < 0.01$)。

MK-4305 の側坐核への局所投与が誘発した同部位の dopamine 放出促進の神経活動依存性

Tetrodotoxin (2 μ M) を側坐核へ 2 時間に亘り透析膜を介して逆透析で灌流投与したところ, 基礎的な dopamine 量はおよそ 71% 減少した (Fig. 3 middle panel)。この tetrodotoxin の灌流投与は, MK-4305 が誘発した側坐核の dopamine 放出の増加を完全に抑制した (two-way ANOVA, 5-240 min, treatment: $F_{(1, 447)} = 234.51, P < 0.001$; time: $F_{(45, 447)} = 5.67, P < 0.001$; no time \times treatment interaction)。

MK-4305 の側坐核への局所投与が誘発した同部位の dopamine 放出促進に対する orexin-A の抑制効果

単独では基礎的な dopamine 放出に影響を与えなかった orexin-A (500.0 pg) を MK-4305 (5.0 ng) と側坐核へ併用投与したところ, MK-4305 の側坐核への投与によって誘発された同部位の dopamine 放出の増加は抑制された (Fig. 3 lower panel; two-way ANOVA, 5-240 min, treatment: $F_{(3, 892)} = 10.53, P < 0.001$; time: $F_{(45, 892)} = 9.77, P < 0.001$; no time \times treatment interaction)。

Orexin-B および SB-334867 ではなく EMPA の側坐核への局所投与が誘発した同部位の dopamine 放出促進効果

OX₂ 受容体の選択的アンタゴニストである EMPA (90.0 および 900.0 pg, 9.0 ng) の側坐核への投与により側坐核の細胞外 dopamine 放出は、用量依存的に促進した (Fig. 5 upper panel; two-way ANOVA, 5-100 min, treatment: $F_{(3, 380)} = 4.39, P < 0.05$; time: $F_{(19, 380)} = 16.80, P < 0.001$; time \times treatment interaction: $F_{(57, 380)} = 2.01, P < 0.001$)。tetrodotoxin の側坐核への灌流は、この EMPA による dopamine 放出の増大を溶媒による効果と同程度まで抑制した (Fig. 5 lower panel; two-way ANOVA, 5-100 min, treatment: $F_{(1, 470)} = 318.65, P < 0.001$; time: $F_{(47, 470)} = 8.11, P < 0.001$; time \times treatment interaction: $F_{(47, 470)} = 1.55, P < 0.05$)。OX₁ 受容体の選択的なアンタゴニストの SB-334867 (10.0 ng: $n = 6$; 20.0 ng: $n = 6$) の側坐核への投与は同部位の dopamine 量には目立った影響は与えなかった (Fig. 6)。

EMPA または MK-4305 の側坐核への局所投与が誘発した同部位の dopamine 放出促進に対する orexin-B の抑制効果

EMPA (Fig. 7 upper panel; two-way ANOVA, 5-100 min, treatment: $F_{(1, 190)} = 261.63, P < 0.001$; time: $F_{(19, 190)} = 5.66, P < 0.001$; time \times treatment interaction: $F_{(19, 190)} = 2.36, P < 0.01$)、または、MK-4305 (Fig. 7 lower panel; two-way ANOVA, 5-240 min, treatment: $F_{(1, 447)} = 29.59, P < 0.001$; time: $F_{(45, 447)} = 7.74, P < 0.001$; no time \times treatment interaction) の投与による側坐核の dopamine 放出の増加は、それ自体では dopamine 放出に目立った影響を及ぼさない用量の orexin-B (500.0 pg) の併用投与により抑制された。

MK-4305 の全身投与が側坐核の dopamine 放出に及ぼす影響

溶媒の腹腔投与は、側坐核から回収した試料中の dopamine 量に 240 分間に亘りほとんど変化は起こさなかった ($n = 6$)。また、MK-4305 (10.0 mg/kg: $n = 6$) の腹腔投与を行っても側坐核の dopamine 放出に目立った変化が認めら

れなかった (Fig. 8)。

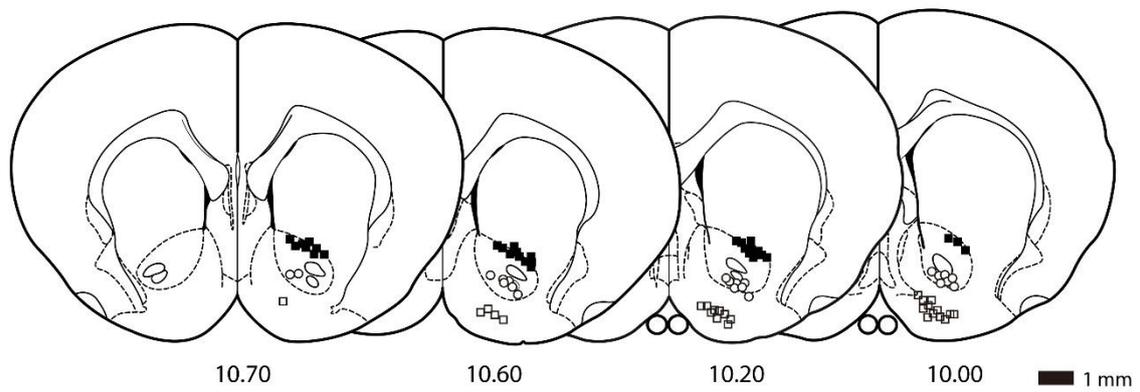


Fig. 1
 Schematic illustration showing locations of the injection sites (open circles), beginning (closed squares) and tip (open squares) of the membrane of microdialysis probes in the nucleus accumbens. The planes are taken from the atlas of Paxinos and Watson (1998) and an approximate coordinate indicated is in mm anterior to the interaural line.



Fig. 2
An image of a typical brain section with correct probe insertion, indicating no material tissue damage around the probe. The horizontal bar indicates 1 mm.

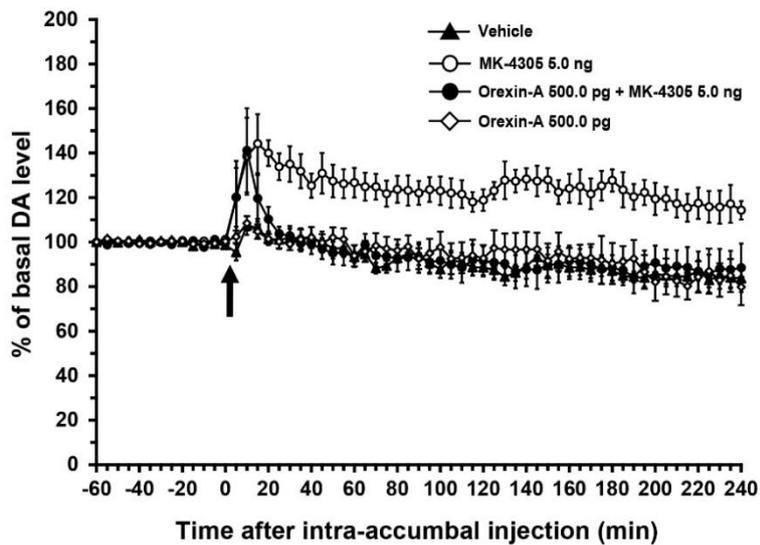
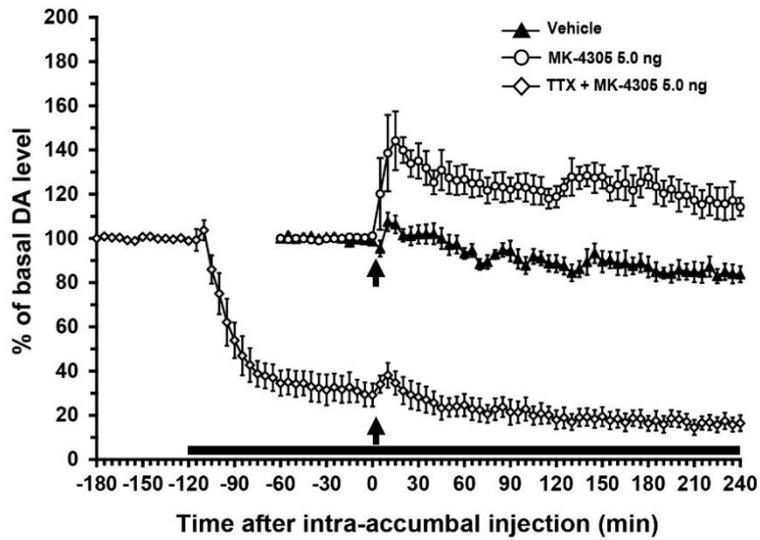
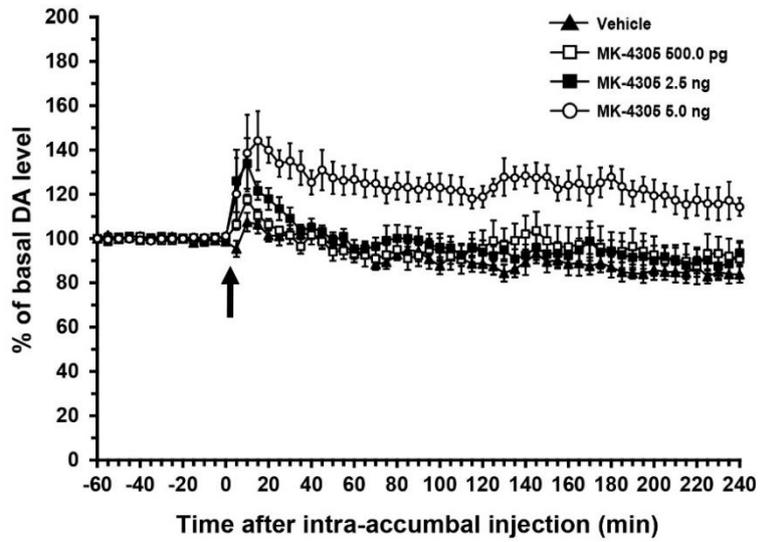


Fig. 3

Upper panel: Effects of intra-accumbal administration of MK-4305 (500.0 pg, $n = 6$, open squares; 2.5 ng, $n = 7$, closed squares; 5.0 ng, $n = 6$, open circles) on basal extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after intra-accumbal injection of MK-4305. Vertical bars indicate S.E.M. The arrow above the abscissa indicates the timing of intra-accumbal injection of vehicle or MK-4305. Middle panel: Effects of perfusion of tetrodotoxin (TTX: 2 μ M) on the intra-accumbal injection of MK-4305 (5.0 ng)-induced increase in dopamine (DA) levels in the nucleus accumbens ($n = 6$, open diamonds). Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after intra-accumbal injection of MK-4305. Vertical bars indicate S.E.M. The arrow above the abscissa indicates the timing of intra-accumbal injection of MK-4305. Lower panel: Effects of co-administration of orexin-A (500.0 pg) on the intra-accumbal injection of MK-4305 (5.0 ng)-induced increase in dopamine (DA) levels in the nucleus accumbens ($n = 6$, closed circles). Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after intra-accumbal injection of MK-4305. Vertical bars indicate S.E.M. The arrow above the abscissa indicates the timing of intra-accumbal injection of compounds or vehicle, which comprised 50% of saline to dissolve orexin-A and 50% of saline with a small amount of dimethyl sulfoxide (<0.1%) to dissolve MK-4305.

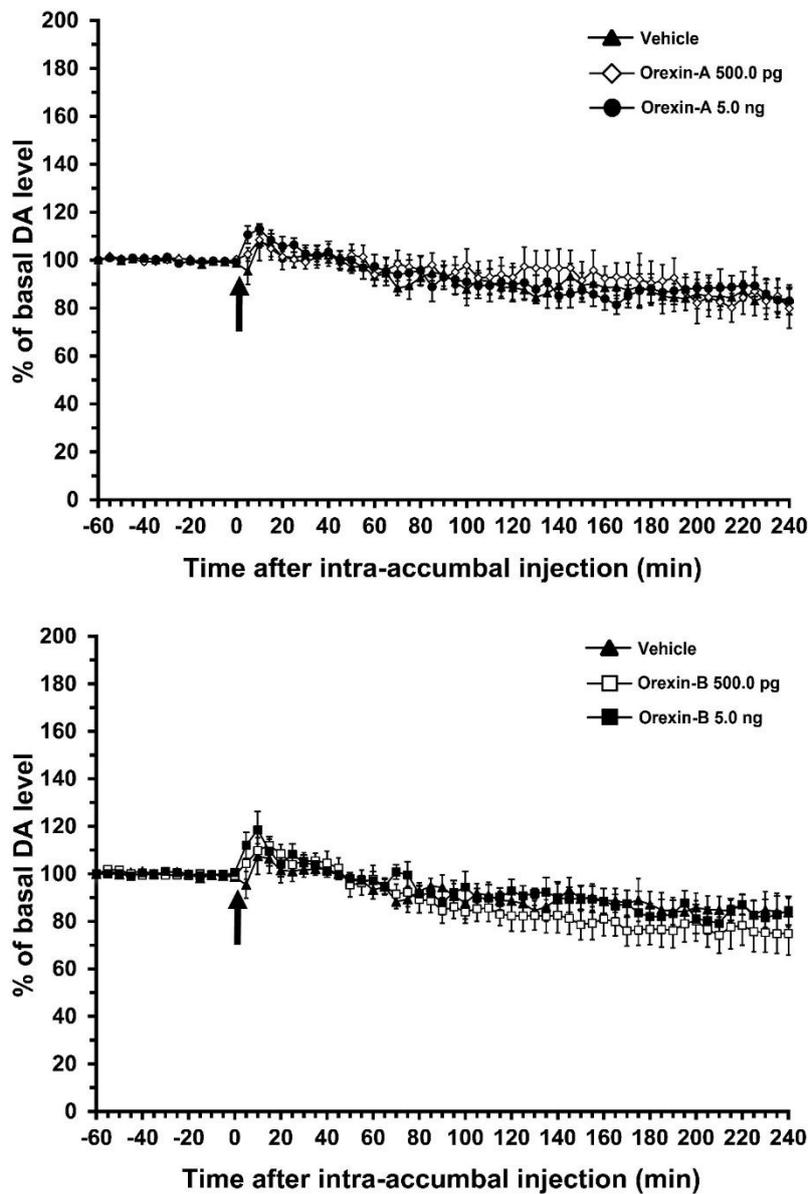


Fig. 4

Intra-accumbal administration of neither the non-selective OX₁ and OX₂ receptor agonist orexin-A (500.0 pg: $n = 6$, open diamonds; 5.0 ng: $n = 8$, closed circles: upper panel) nor the preferential OX₂ receptor agonist orexin-B (500.0 pg: $n = 6$, open squares; 5.0 ng: $n = 6$, closed squares: lower panel) altered dopamine (DA) efflux in accumbal dialysates.

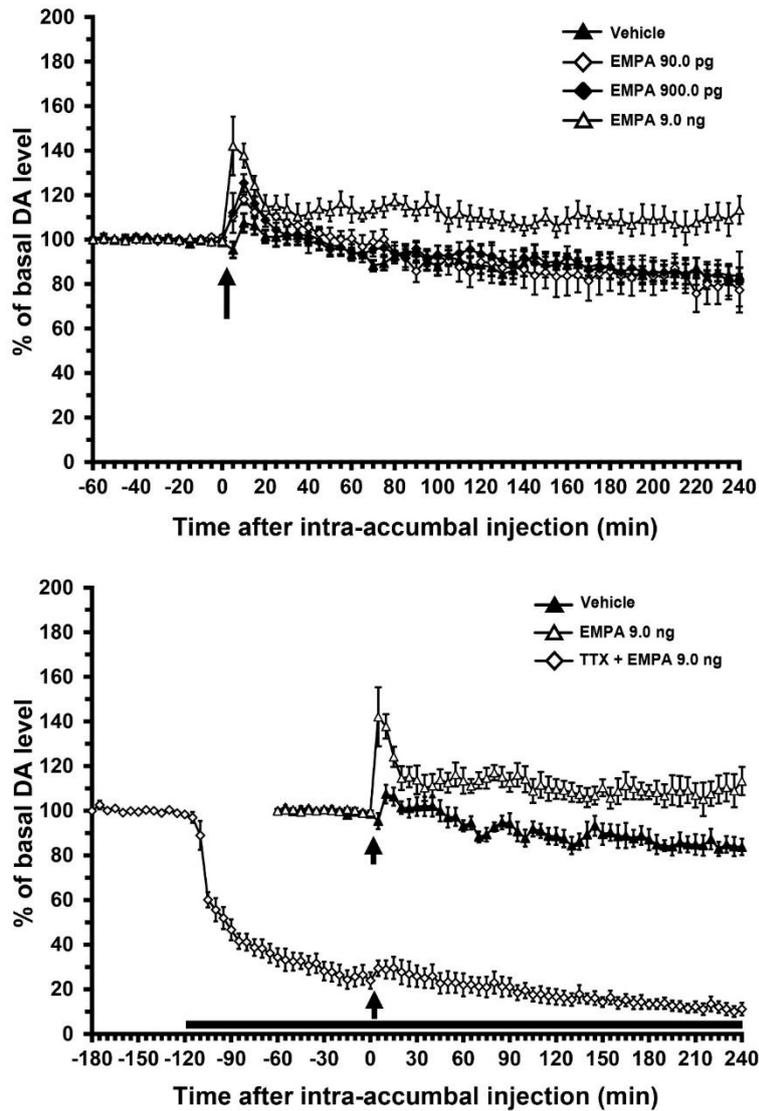


Fig. 5

Upper panel: Effects of intra-accumbal administration of EMPA (90.0 pg, $n = 6$, open diamonds; 900.0 pg, $n = 6$, closed diamonds; 9.0 ng, $n = 6$, open triangles) on basal extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after intra-accumbal injection of EMPA. Vertical bars indicate S.E.M. The arrow above the abscissa indicates the timing of intra-accumbal injection of vehicle or EMPA. Lower panel: Effects of perfusion of tetrodotoxin (TTX; 2 μ M) on the intra-accumbal injection of EMPA (9.0 ng)-induced increase in dopamine (DA) levels in the nucleus accumbens ($n = 6$, open diamonds). Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after intra-accumbal injection of EMPA. Vertical bars indicate S.E.M. The arrow above the abscissa indicates the timing of intra-accumbal injection of EMPA.

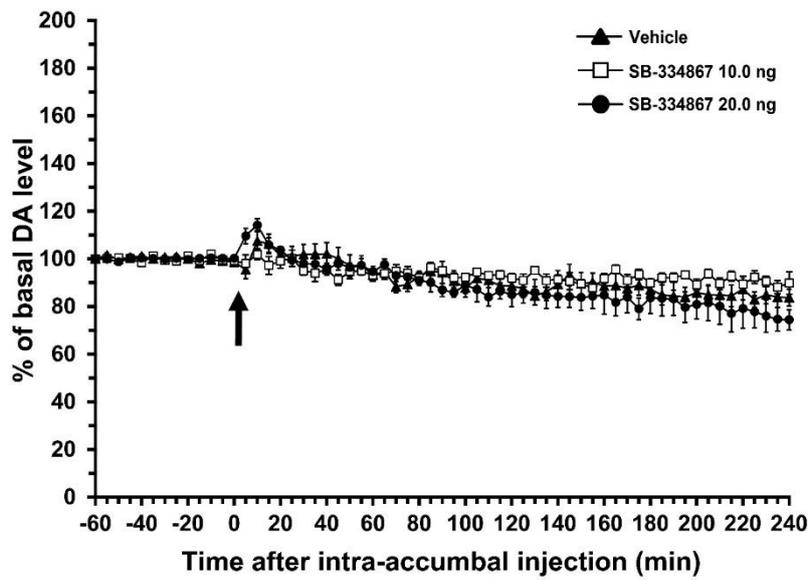


Fig. 6
Intra-accumbal administration of the selective OX₁ receptor antagonist SB-334867 (10.0 ng: *n* = 6, open squares; 20.0 ng: *n* = 6, closed circles) did not affect dopamine (DA) levels in accumbal dialysates.

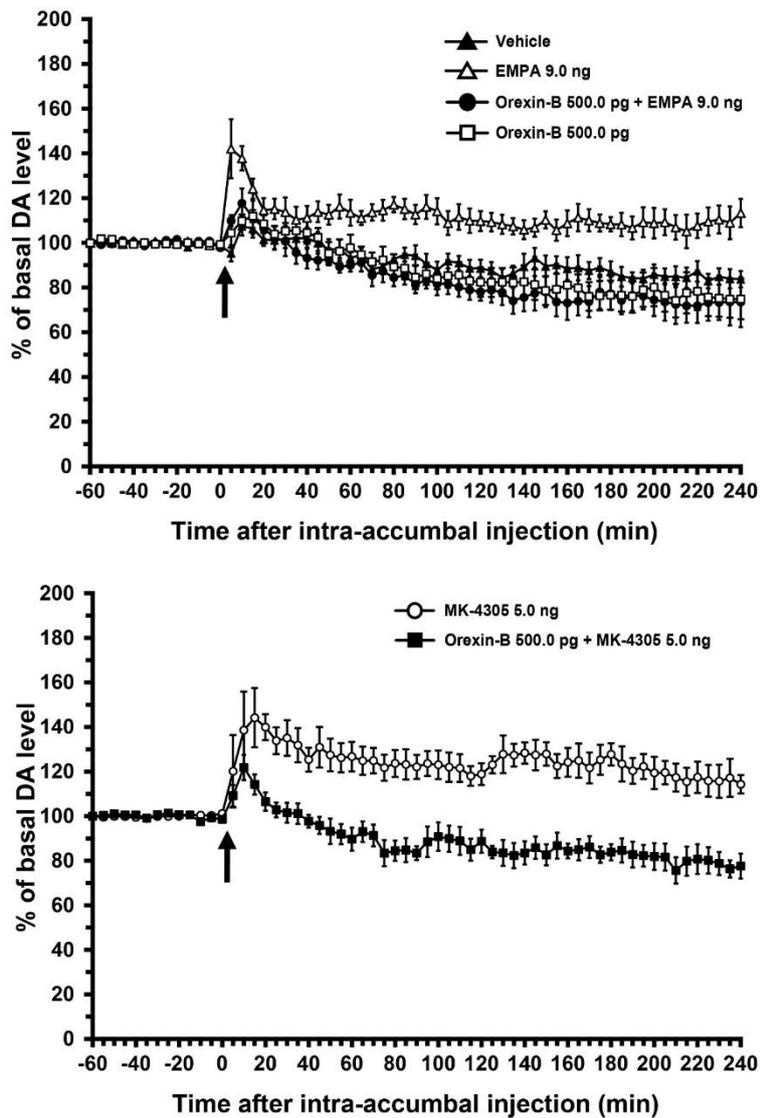


Fig. 7

Upper panel: Effects of co-administration of orexin-B (500.0 pg) on the intra-accumbal injection of EMPA (9.0 ng)-induced increase in dopamine (DA) levels in the nucleus accumbens ($n = 6$, closed circles). Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after intra-accumbal injection of EMPA. Vertical bars indicate S.E.M. The arrow above the abscissa indicates the timing of intra-accumbal injection of compounds or vehicle, which comprised 50% of saline to dissolve orexin-B and 50% of saline with a small amount of dimethyl sulfoxide (<0.1%) to dissolve EMPA. Lower panel: Effects of co-administration of orexin-B (500.0 pg) on the intra-accumbal injection of MK-4305 (5.0 ng)-induced increase in dopamine (DA) levels in the nucleus accumbens ($n = 5$, closed squares). Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after intra-accumbal injection of MK-4305. Vertical bars indicate S.E.M. The arrow above the abscissa indicates the timing of intra-accumbal injection of compounds or vehicle, which comprised 50% of saline to dissolve orexin-B and 50% of saline with a small amount of dimethyl sulfoxide (<0.1%) to dissolve MK-4305.

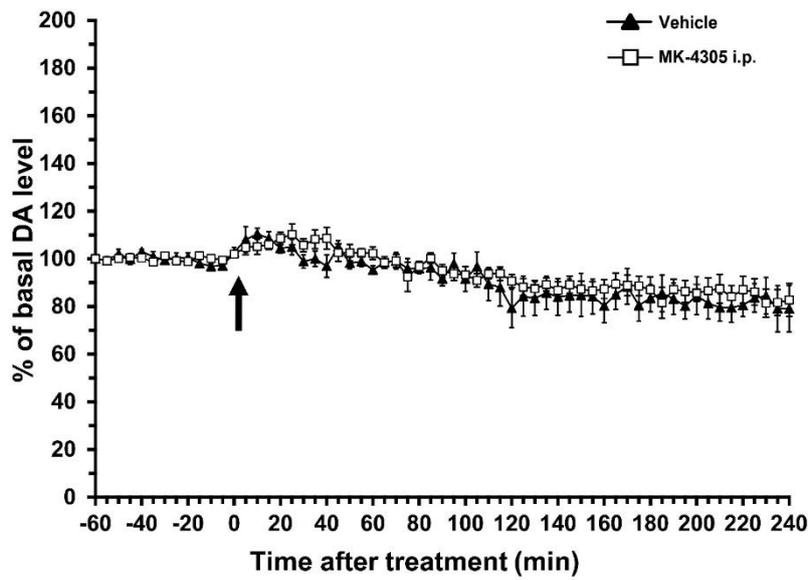


Fig. 8

Intraperitoneal injection of vehicle did not alter basal DA levels in accumbal dialysates for a period of 240 min ($n = 6$, closed triangles) and intraperitoneal injection of MK-4305 (10.0 mg/kg) was without effect on accumbal DA efflux ($n = 6$, open squares).

考 察

すでに報告されているように (Saigusa et al., 2001), 本実験条件下で側坐核より回収された透析試料から基礎的に検出された dopamine 量のうち, 70%以上は tetrodotoxin の灌流投与に感受性を示した (Di Chiara et al., 1996)。したがって本研究で測定対象とした基礎的な dopamine は, 神経発火により放出されたとみなすことができた。

OX₁, OX₂ の両受容体のアゴニストの orexin-A, または, OX₂ 受容体の選択的なアゴニストの orexin-B の側坐核への局所投与は, 側坐核から回収した透析液中の基礎的な dopamine 放出には目立った影響を及ぼさなかった。これに対し, orexin-A とは異なり OX₁, OX₂ の両受容体の非選択的アンタゴニストの MK-4305 は側坐核から回収した透析液中の dopamine 量を用量依存的に増大させた (Fig. 3 upper panel)。この MK-4305 が誘発した dopamine 量の増加は, tetrodotoxin の側坐核への灌流投与により消失したため, 神経発火により細胞外へ放出された dopamine 量を反映していることが考えられた。この MK-4305 が誘発した dopamine 放出の促進は, それ自体では基礎的な dopamine 放出に影響を及ぼさない低用量の orexin-A の併用投与により抑制された (Fig. 3 lower panel)。

側坐核には, OX₁, OX₂ の両受容体が存在していることから (Martin et al., 2002), これらのいずれのまたは両方の受容体が MK-4305 の誘発した側坐核の dopamine 放出の増加に関与しているのかについては, 上述の実験の結果では判然としない。しかしながら, OX₁ 受容体アンタゴニストの SB-334867 とは異なり, OX₂ 受容体アンタゴニストの EMPA は側坐核へ局所投与すると用量依存的な同部位の dopamine 放出の促進を誘発した (Fig. 5 upper panel and Fig. 6)。これらのことから, OX₁ よりも OX₂ 受容体の遮断を介して MK-4305 による dopamine 放出の増加が起きたことが考えられる。またこの EMPA の効

果は、側坐核への tetrodotoxin の灌流投与によって打ち消されたことから神経発火により細胞外へ放出された dopamine を反映していたことが推察される。さらに側坐核への orexin-B の局所投与は、EMPA または MK-4305 が誘発した側坐核の dopamine 放出の促進をいずれも抑制した。これらの実験結果も、側坐核では OX₁ よりも OX₂ 受容体の遮断が同部位の dopamine 放出の制御で重要な影響を及ぼすことを裏付けている。

興味深いことに OX₂ 受容体アンタゴニストが側坐核の dopamine 放出を増加させたのに対し、OX₂ 受容体アゴニストは単独投与では無効であったものの OX₂ 受容体アンタゴニストの効果は抑制できた。これらのことは、生理的条件下では、OX₂ 受容体は基礎的状态ではアゴニストで容易に刺激できないほど高く活性化されているいわゆる天井効果を起こしていることを示している。さらにこれらの知見は、OX₂ 受容体の基礎的な活性化の生理的機能は、側坐核の dopamine 放出の抑制であることを示している。

側坐核における OX₂ 受容体のシナプスレベルでの局在と同部位における dopamine 放出を抑制するメカニズムの詳細は不明であるが、実験に基づく証拠は集積しつつあると考えられる。即ち、細胞レベルでの実験からは PC12 細胞における dopamine の合成を orexin-A および B は抑制し、この細胞への Ca²⁺ の流入には影響を与えずに dopamine 遊離は抑制することが示唆されている (Nanmoku et al., 2000)。我々の研究グループでもラットにおいて、慢性疼痛モデル由来の C 線維様の神経細胞の興奮を orexin-A は OX₂ 受容体刺激を介して抑制することを報告している (Ishikawa et al., 2017; Yamaguchi et al., 2020)。したがって、側坐核の dopamine 神経終末に発現している OX₂ 受容体への刺激が神経発火に依存した dopamine 放出を直接抑制した可能性が考えられる。Orexin-A と B は、ラットの脳スライス標本上で側坐核の神経細胞を興奮させる可能性が考えられるが (Mori et al., 2011, Muraki et al., 2009)、これらのことは側坐核から採取した細胞でのパッチクランプ記録で得られた電気生理学的

証拠と一致している。これらのことは、orexin-A と B の投与は神経終末からの dopamine 放出の減少を誘発する後シナプス性の NMDA 電流の低下と GABA 電流の上昇を起こすことを示している (Martin et al., 2002)。

さらに微小透析実験において我々は、側坐核 dopamine の放出は、同部位の dopamine 神経終末へ入力する GABA 神経によって持続的に抑制されていることを報告している (Aono et al., 2008; Saigusa et al., 2008; Saigusa et al., 2012a, Saigusa et al., 2021)。興味深いことに、中脳腹側被蓋野の神経細胞の電気生理学的解析から、orexin-A および B は GABA 神経を興奮させることが明らかにされている (Korotkova et al., 2003)。したがって今後の研究では、側坐核の GABA 神経に発現する OX_2 受容体の刺激が dopamine 神経発火を抑制するか、さらにこうした OX_2 受容体を遮断した場合に側坐核の dopamine 放出を脱抑制により増加させるか否かについても検討する必要がある。

免疫組織学的研究から側坐核を含む脳の多くの領域で、orexin 神経と noradrenaline 神経の間で機能的な相互作用が存在することが示されている (Baldo et al., 2003)。我々は側坐核の noradrenaline 神経細胞は、同部位の α 受容体を介して dopamine 神経の活性化を抑制することを報告してきた (Aono et al., 2013; Saigusa et al., 2012b)。したがって側坐核の noradrenaline 神経上に発現している OX_2 受容体が、同部位の dopamine 神経終末上にある α 受容体を介して dopamine 神経活動を抑制する可能性がある。このため将来の研究において、側坐核の noradrenaline 神経終末の OX_2 受容体の選択的な遮断が同部位の noradrenaline 量を増加させるかについて検討する必要がある。

以上のことをまとめると、内因性の orexin-A および B は、(1) dopamine 神経終末に分布する dopamine 神経活動を抑制する働きのある OX_2 受容体か、(2) GABA または noradrenaline 神経といった dopamine 神経以外の神経細胞上に分布する dopamine 神経活動を抑制する働きのある OX_2 受容体のいずれかまたは両方の活性化を介して基礎的な dopamine 放出を制御する可能性が示

唆された。

これまで報告された行動学的研究と本神経化学研究の結果から、無麻酔非拘束ラットの側坐核の dopamine 神経活動の制御における同部位の OX₂ 受容体の役割には二つあることが推察された。第一は後シナプスの dopamine 受容体刺激依存性の神経活動を促進する可能性である (Kotani et al., 2008; Nakamura et al., 2000)。第二は dopamine 神経終末における前シナプスレベルでの基礎的な dopamine 神経活動の抑制である。さらに視床下部外側野からは、側坐核だけでなく中脳辺縁系 dopamine 神経系の神経投射に関わる細胞体を含む中脳腹側被蓋野にも orexin 神経が多く投射している。この orexin 神経投射は、中脳腹側被蓋野では神経細胞とあまりシナプスを形成しないとの報告があるため、中脳腹側被蓋野の orexin 神経伝達にはシナプス間隙よりも広範囲の拡散が関わるということが推察されている (Balcita-Pedicino & Sesack, 2007; Liu et al., 2020)。側坐核においても orexin 神経と dopamine 神経の局在の詳細とこれらの神経の相互作用を同定するため、今後更なる検討が必要である。

Orexin 受容体サブタイプの非選択的アンタゴニストの MK-4305 は、suvorexant として知られる不眠症の治療に用いる承認薬のひとつである。米国では Controlled Substances Act (規制物質法) により臨床で使用する薬物が医療上の用途の目的と乱用または潜在的な依存性に基づいて、5 種類のスケジュールに分類されている。前臨床研究に基づくと suvorexant はヒトで乱用される危険性は低いと考えられるが (Born et al., 2017)、この化合物は当初ベンゾジアゼピン系などの薬物と同じスケジュールIVに位置づけられていた。乱用されやすい薬物は、実験動物では側坐核に投射する中脳辺縁系 dopamine 神経の活動性を高める (Di Chiara et al., 2004; Koob & Volkow, 2016; Li & Jasanoff, 2020)。本実験条件下でMK-4305の全身投与はラット側坐核の細胞外 dopamine 放出を増加させなかったが、MK-4305の側坐核への局所投与は同部位の基礎 dopamine 放出を有意に増加させた。すでに述べたように、側坐核における

dopamine 放出を抑制する OX₂ 受容体の持続的な活性化の程度は高い可能性がある（天井効果；考察の第 4 段落参照）。Orexin-A の脳室内投与により，側坐核の dopamine 放出は影響を受けないが，前頭皮質の dopamine 放出は促進することが示されているほか（Vittoz & Berridge, 2006），本研究で示されたように orexin-A の局所投与は側坐核の dopamine 量を変化させなかった。したがって，MK-4305 を無麻酔非拘束ラットに全身投与した場合，dopamine 放出を調節する側坐核の OX₂ 受容体における本薬物の濃度は，この受容体を介した orexin 神経伝達を阻害するのに十分なレベルに達しなかったことが考えられる。

以上のことをまとめると，側坐核の OX₁ ではなく OX₂ 受容体が同部位の基礎的な dopamine 放出を抑制的に制御し，この OX₂ 受容体の遮断は無麻酔非拘束ラットの側坐核における dopamine 放出を促進することを示す *in vivo* での神経薬理学的な証拠が本研究より提供できた。MK-4305 やほかの orexin 受容体アンタゴニストが側坐核において示した生理的な作用と治療効果や有害作用との関連性を明らかにするため，更なる検討が必要である。

第2章

無麻酔非拘束ラットの側坐核の **dopamine** 放出を指標として示された、単独または **morphine** との併用による依存性との関連から見た **nandrolone** の筋力増強作用発現の臨界期としての思春期

緒言

タンパク同化ステロイドを含む運動能力を向上させる薬物は、スポーツ選手の間での乱用は少なくない (Mazzeo, 2018; McDuff et al., 2019)。タンパク同化ステロイドは、世界アンチドーピング機構の禁止薬物リストに含まれているが、これは運動能力の促進だけでなく健康面で有害作用も示すためである。Nandrolone は、テストステロンに比べ男性ホルモンとしての作用は弱く、タンパク同化作用が強いタンパク同化ステロイドのひとつである (Patanè et al., 2020)。この薬物は臨床でも使用されており、例えば閉経期の女性の骨粗しょう症の治療のほか、慢性腎不全、悪性腫瘍、外科手術、外傷、火傷、AIDS による消耗症候群の患者に投与される (Patanè et al., 2020)。これまで、黒質を起始核とした黒質線条体 dopamine 系と中脳腹側被蓋野を起始核とした中脳辺縁系 dopamine 神経系を含む脳内の dopamine 神経伝達の過程に対する nandrolone の効果に関する検討が行われてきた。これは nandrolone には依存を形成する疑いがあることと (Kanayama et al., 2010; Bontempi & Bonci, 2020)、乱用される薬物は中脳辺縁系 dopamine 神経を活性化することが知られているためである。

動物実験からは nandrolone が dopamine 受容体の発現と (Kindlundh et al., 2001; Martinez-Rivera et al., 2015)、脳内の dopamine 神経活動に影響を及ぼすことが示されている。例えば、マウスに対する nandrolone の単回投与は中脳腹側被蓋野では、この領域における dopamine 神経細胞の興奮性制御を促進す

ることにより dopamine 神経の発火を亢進できる (Bontempi & Bonci, 2020)。無麻酔非拘束ラットの中脳辺縁系 dopamine 神経活動は, amphetamine や cocaine といった依存を誘発する薬物により促進されることが知られている (amphetamine: Birrell & Balfour, 1998; Cadoni et al., 1995; Danielsson et al., 2021; cocaine: Danielsson et al., 2021; Frank et al., 2008; Panos & Baker, 2010)。ラットへの投与の結果, amphetamine と cocaine はいずれも中脳辺縁系 dopamine 神経の主たる投射先のひとつである側坐核の dopamine 放出を促進する (amphetamine: Kurling et al., 2008; Kurling-Kailanto et al., 2010; cocaine: Kurling-Kailanto et al., 2010)。

Morphine のラットへの全身投与も側坐核の dopamine 放出を促進することが知られている (Cadoni & Di Chiara, 2007; Corongiu et al., 2020; Danielsson et al., 2021)。さらに morphine の抗侵害受容作用は, nandrolone の長期投与により抑制される (Philipova et al., 2003)。その上, morphine の依存性の指標のひとつである morphine の誘発するマウスの条件付け場所嗜好性を nandrolone の慢性投与は減弱させる (Célérier et al., 2003)。しかしながら, 側坐核における基礎的な dopamine 放出および morphine が誘発した dopamine 放出の増大に nandrolone の慢性投与が及ぼす影響については明らかでない。

Nandrolone は, 筋力の強化を要する競技スポーツの場だけでなく (Patanè et al., 2020), 骨格筋の発達と自らの外見の向上を追求する青少年の間での乱用が懸念される化学物質のひとつである (Denham, 2006; Kindlundh et al., 1999; Piacentino et al., 2022)。しかしながらこの nandrolone の効果が最も顕著で公衆衛生上の注意喚起を行うべき時期として, 成長期のうちの思春期から青年期のどの期間が特に重要かに関しては系統的な情報がほとんどない。同様に, nandrolone を単独もしくは nandrolone の使用と関連する乱用化学物質と同時摂取する場合, nandrolone への依存の形成の上でどの期間が臨界期に相当するかも明らかでない。このため本章では, 若齢ラットの成長期のうち, 二つの

特に重要な時期である思春期を反映した 6 から 10 週齢と青年期を反映した 10 から 14 週齢 (Spear, 2000, 2015) において, 筋力の指標のひとつである握力に対する nandrolone の反復投与の効果について体重の変化と比較して系統的に検討を行った。さらに *in vivo* 脳微小透析法を用い, 依存性の実験モデルのひとつとして nandrolone の反復投与が側坐核の dopamine 放出に及ぼす効果について nandrolone の効果発現の臨界期として同定した期間において検討を加えた。Opioid はタンパク同化ステロイドと最も頻繁に併用して乱用される化学物質なので (Kanayama et al., 2003, 2010), nandrolone は単独もしくは morphine と併用して投与した。

材料および方法

動物

実験開始時に 6 週齢（体重 205～215 g）または 10 週齢（体重 335～365 g）の Sprague-Dawley（SD）系雄性ラット（高杉実験動物）を用いた。飼育は、第 1 章と同じ条件で行った。

握力測定

ラットの握力測定には、デジタルフォーストランスデューサーに金網を取り付けた市販の実験動物用握力測定装置（GPM-100; メルクエスト）を用いた。測定者はラットを金網に載せ、四肢で金網を把持させたのち尻尾を静かに後方に引いて四肢が金網から離れた際にデジタルフォーストランスデューサーへかかった荷重（g）を握力とした。この測定は連続して 3 回行い、得られた荷重の平均値を実験的に測定した握力とした。全ての測定は、13 時から 14 時の間に行った。装置の校正は、開発した企業が定期的に行った。握力の測定は、nandrolone または溶媒の投与直前（day 1）、nandrolone または溶媒の投与後は週 1 回（day 6, 13, 20, 27）に行った。さらに、4 週間に亘る実験期間中に nandrolone 処置が体重の増加へ及ぼす効果を観察した（Fig. 9; 薬物も参照）。

手術

第 1 章の記載と同様に、脳微小透析実験のためのガイドカニューレの植立手術を行った。この手術は day 11 または 12（Fig. 9）に行い、14～15 日の回復期をおいたのちに day 26 に脳微小透析実験を行った。

脳微小透析実験

薬物脳内局所投与用微小ニードルが配置されていない直管型の脳微小透析プローブ（A-I-6.5-02; エイコム）を用い，morphine の皮下投与をこの透析プローブ挿入の 20 時間後に行ったことを除き，第 1 章の記載と同様に行った。

薬物

被験薬物として，nandrolone（nandrolone decanoate: FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan）と morphine（morphine hydrochloride hydrate: Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Japan）を用いた。Nandrolone は sesame oil（Sigma-Aldrich, MO, USA）に，morphine は生理食塩液にそれぞれ溶解し，体重 100 g 当たり 0.1 ml を皮下投与した。

Nandrolone（5.0 mg/kg）の皮下投与は，毎週 1 日 1 回 6 日連続して 3 週に亘って行った後，4 週目に 1 日 1 回 4 日連続して行った（Fig. 9）。同じスケジュールで溶媒の sesame oil を対照となる動物に投与した。すなわち，薬物または溶媒の反復投与は，day 1-6, day 8-13, day 15-20, day 22-25 の 14 時から 15 時の間に行った。側坐核の dopamine 放出に対する morphine（1.0 mg/kg s.c.）の全身投与の効果は，day 25 に nandrolone の最終投与を行ってから約 24 時間後の day 26 に観察した（Fig. 9）。

Nandrolone（5.0 mg/kg s.c.）またはその溶媒の単回投与は，morphine 処置（1.0 mg/kg s.c.）の 24 時間前に行った。Morphine またはその溶媒は，脳微小透析プローブの挿入から 20 時間以上経過してから投与した。

Nandrolone の反復投与の用量と間隔，morphine の投与量はいずれも過去の報告に基づいて選択した（nandrolone: Breuer et al., 2001; Zotti et al., 2014; morphine: Cadoni & Di Chiara, 2007; Corongiu et al., 2020）。

透析プローブ挿入位置の組織学的確認

第 1 章の記載と同様に行った。

統計処理

データはすべて平均値±標準誤差 (S.E.M.) で表した。握力測定実験では、握力 (g) と基礎値に対する百分率の両方の分析を行った。この基礎値には、nandrolone または溶媒の投与開始直前の握力を採用した。脳微小透析実験では、データはすべて基礎 dopamine 量に対する百分率と標準誤差 (S.E.M.) で表した。Morphine 投与直前の 12 個の試料に含まれる dopamine 量の平均を基礎 dopamine 量とした。これらの基礎 dopamine 量は、分散分析を時間 (time) の因子について行い、連続して回収したサンプル間において統計学的に有意な差が認められなかった場合に限り決定した。

経時的なデータの比較では処置 (treatment) と time の因子について繰り返しのある二元配置分散分析法 (two-way ANOVA) を用いた後、post hoc 検定として Scheffé's test を必要に応じて行った。Nandrolone または溶媒処置群の間の基礎 dopamine 量の比較には、Student's *t*-test を用いた。有意水準はいずれも $P < 0.05$ とした。

結 果

Nandrolone の反復投与が 6 および 10 週齢ラットの体重増加に及ぼす影響

Nandrolone の反復投与開始前の 6 週齢ラットの体重は、対照群で 205.7 ± 2.9 g ($n=6$), nandrolone 処置群で 209.5 ± 2.7 g ($n=6$) であった (Fig. 10A left and right)。Nandrolone (5.0 mg/kg s.c.) または溶媒 (sesame oil) の 4 週間に亘る反復投与により (投与スケジュールの詳細は Fig. 9 参照) 体重は、対照群では 413.2 ± 8.2 g ($n=6$), nandrolone 処置群では 416.2 ± 6.5 g ($n=6$) までそれぞれ増加した。4 週間の反復投与期間中の体重の増加率は、対照群では $203.7 \pm 3.2\%$ ($n=6$), nandrolone 処置群では $198.6 \pm 3.1\%$ ($n=6$) であった。即ち、6 週齢ラットの体重増加に対しては nandrolone の反復投与は効果が認められなかった (Fig. 10A left and right; two-way ANOVA, weeks 1-4: time, $F_{(3,30)} = 820.61$, $P < 0.001$; treatment, $F_{(1,30)} = 1.45$, NS; time \times treatment interaction, $F_{(3,30)} = 1.30$, NS)。

Nandrolone の反復投与開始前の 10 週齢ラットの体重は、対照群で 359.8 ± 3.2 g ($n=5$), nandrolone 処置群で 360.3 ± 1.6 g ($n=4$) であった (Fig. 10B left and right)。Nandrolone (5.0 mg/kg s.c.) または溶媒 (sesame oil) の 4 週間に亘る反復投与により (投与スケジュールの詳細は Fig. 9 参照) 体重は、対照群では 478.2 ± 1.4 g ($n=5$), nandrolone 処置群では 475.3 ± 6.3 g ($n=4$) までそれぞれ増加した。4 週間の反復投与期間中の体重の増加率は、対照群では $132.9 \pm 0.4\%$ ($n=5$), nandrolone 処置群では $132.9 \pm 1.8\%$ ($n=4$) であった。即ち、10 週齢ラットの体重増加に対しても nandrolone の反復投与は影響を及ぼさなかった (Fig. 10B left and right; two-way ANOVA, weeks 1-4: time, $F_{(3,21)} = 588.18$, $P < 0.001$; treatment, $F_{(1,21)} = 2.02$, NS; time \times treatment interaction, $F_{(3,21)} = 0.77$, NS)。

Nandrolone の反復投与が 6 および 10 週齢ラットの握力の増大に及ぼす影響

Nandrolone の反復投与開始前の 6 週齢ラットの握力は、対照群で 972.7 ± 62.9 g ($n=6$), nandrolone 処置群で 1053.3 ± 43.5 g ($n=6$) であった (Fig. 10C left and right)。Nandrolone (5.0 mg/kg s.c.) または溶媒 (sesame oil) の 4 週間に亘る反復投与により (投与スケジュールの詳細は Fig. 9 参照) 握力は、対照群では 1447.9 ± 77.5 g ($n=6$), nandrolone 処置群では 1866.3 ± 69.2 g ($n=6$) までそれぞれ増加した。4 週間の反復投与期間中の握力の増加率は、対照群では $147.5 \pm 10.9\%$ ($n=6$), nandrolone 処置群では $177.2 \pm 6.6\%$ ($n=6$) であった。即ち、6 週齢ラットの握力の増加を nandrolone の反復投与は促進した (Fig. 10C left and right; two-way ANOVA, weeks 1-4: time, $F_{(3, 30)} = 22.37$, $P < 0.001$; treatment, $F_{(1, 30)} = 20.82$, $P < 0.01$; time \times treatment interaction, $F_{(3, 30)} = 5.83$, $P < 0.01$)。Nandrolone 投与ラットは溶媒処置ラットに比べ、握力が week 3 ($P < 0.05$) と week 4 ($P < 0.01$) の時点において有意に増大していた。

Nandrolone の反復投与開始前の 10 週齢ラットの握力は、対照群で 1585.7 ± 50.9 g ($n=5$), nandrolone 処置群で 1618.4 ± 78.1 g ($n=4$) であった (Fig. 10D left and right)。Nandrolone (5.0 mg/kg s.c.) または溶媒 (sesame oil) の 4 週間に亘る反復投与により (投与スケジュールの詳細は Fig. 9 参照) 握力は、対照群では 2561.9 ± 59.5 g ($n=5$), nandrolone 処置群では 2739.8 ± 67.6 g ($n=4$) までそれぞれ増加した。4 週間の反復投与期間中の握力の増加率は、対照群では $161.6 \pm 2.3\%$ ($n=5$), nandrolone 処置群では $169.3 \pm 2.5\%$ ($n=4$) であった。即ち、10 週齢ラットの握力の増大に対しては nandrolone の反復投与は影響を及ぼさなかった (Fig. 10D left and right; two-way ANOVA, weeks 1-4: time, $F_{(3, 21)} = 19.87$, $P < 0.001$; treatment, $F_{(1, 21)} = 0.41$, NS; time \times treatment interaction, $F_{(3, 21)} = 0.84$, NS)。

Nandrolone の反復投与が 6 週齢の無麻酔非拘束ラットの基礎的な dopamine 放出に及ぼす影響

6 週齢ラットに 4 週間に亘り溶媒 (sesame oil) を投与したのちに回収した試料中の基礎的な dopamine 量は 0.55 ± 0.10 pg /5-min sample (3.59 ± 0.65 fmol; $n = 6$)であったのに対し, nandrolone (5.0 mg/kg s.c.) を投与したのちに回収した試料中の基礎的な dopamine 量は, 0.70 ± 0.10 pg/5-min sample (4.57 ± 0.65 fmol; $n = 5$)であり, 溶媒処置群と nandrolone 処置群の試料中の基礎的な dopamine 量の間には統計学的な有意差は認められなかった ($t_{(9)} = 1.28$, NS)。これらの 2 群において, nandrolone の 4 週間に亘る反復投与は, 体重の増加に対しては影響を及ぼさなかったが (Fig. 11 left and right), 握力の増大は促進した (Fig. 12 left and right; two-way ANOVA, weeks 1–4: time: $F_{(3, 30)} = 28.55$, $P < 0.001$; treatment: $F_{(1, 30)} = 30.51$, $P < 0.001$; time \times treatment interaction, $F_{(3, 30)} = 8.33$, $P < 0.001$)。

無麻酔非拘束ラットにおいて morphine が誘発した側坐核の dopamine 放出の促進へ nandrolone の単回および反復投与が及ぼす効果

Morphine が誘発した側坐核の dopamine 放出の促進へ nandrolone の反復投与が及ぼす効果を検討する前に, nandrolone 処置を行っていない個体の側坐核の基礎 dopamine 量へ morphine の全身投与が及ぼす効果の用量反応性について分析した。

この実験に用いたラットの体重の平均値は, 溶媒処置群では 283.8 ± 4.5 g ($n = 6$), morphine 0.5 mg/kg s.c.処置群では 291.9 ± 4.7 g ($n = 7$), morphine 1.0 mg/kg s.c.処置群では 298.3 ± 3.9 g ($n = 7$)であった。また, 側坐核の基礎 dopamine 量の平均値は, 溶媒処置群では 0.53 ± 0.15 pg ($= 3.46 \pm 0.98$ fmol; $n = 6$), morphine 0.5 mg/kg s.c.処置群では 0.50 ± 0.10 pg ($= 3.26 \pm 0.65$ fmol; $n = 7$), morphine 1.0 mg/kg s.c.処置群では 0.50 ± 0.06 pg ($= 3.26 \pm 0.39$ fmol; $n = 7$)で

あった。各群の基礎 dopamine 量は 4 時間の実験期間中に亘り安定していた (Fig. 13)。

Morphine 0.5 または 1.0 mg/kg の全身投与は、240 分間に亘り側坐核の細胞外 dopamine 放出を用量依存的に増加させた (Fig. 13; two-way ANOVA, 5-240 min: treatment, $F_{(2, 790)} = 81.82, P < 0.001$; time, $F_{(47, 790)} = 9.12, P < 0.001$; time \times treatment interaction, $F_{(94, 790)} = 5.95, P < 0.001$)。Scheffé's test の結果、統計学的な有意差が morphine 0.5 mg/kg 処置群と溶媒処置群の効果との間 ($P < 0.01$) のほか、morphine 1.0 mg/kg 処置群と morphine 0.5 mg/kg 処置群または溶媒処置群の効果との間にそれぞれ認められた (いずれも $P < 0.01$)。

6 週齢ラットに 4 週間に亘り nandrolone (5.0 mg/kg s.c.) を投与したところ、morphine (1.0 mg/kg s.c.) の全身投与によって誘発された側坐核の dopamine 放出の増加は、溶媒を投与した場合に比べ有意に減弱していた (Fig. 14; two-way ANOVA, 10-240 min: treatment, $F_{(1, 395)} = 14.30, P < 0.01$; time, $F_{(46, 395)} = 15.91, P < 0.001$; time \times treatment interaction, $F_{(46, 395)} = 3.92, P < 0.001$)。

比較のため、実験開始時に 6 週齢で nandrolone または溶媒を 4 週に亘り投与したことに相当する 10 週齢ラットを用いて、nandrolone の単回投与を morphine (1.0 mg/kg s.c.) 処置の 24 時間前に行い、この nandrolone 処置が morphine の誘発した側坐核の dopamine 放出の促進へ及ぼす影響についても分析した。この実験に用いたラットの体重の平均値は、溶媒処置群では 409.5 ± 5.2 g ($n = 6$)、nandrolone 処置群では 418.0 ± 4.8 g ($n = 6$) であった。また、側坐核の基礎 dopamine 量の平均値は、溶媒処置群では 0.53 ± 0.06 pg (= 3.46 ± 0.39 fmol; $n = 6$)、nandrolone 処置群では 0.56 ± 0.04 pg (= 3.66 ± 0.26 fmol; $n = 6$) であった。溶媒処置群と nandrolone 処置群の試料中の基礎的な dopamine 量の間には統計学的な有意差は認められなかった ($t_{(10)} = 0.67, NS$)。Nandrolone の単回投与の結果、morphine の全身投与によって誘発された側坐核の dopamine 放出の増大はやや減弱する傾向が認められたものの、これらの変化

に統計学的有意差はなかった (Fig. 15; two-way ANOVA, 5-240 min: time, $F_{(47, 408)} = 20.43, P < 0.001$; treatment, $F_{(1, 408)} = 2.42, \text{NS}$; time \times treatment, $F_{(47, 408)} = 0.66, \text{NS}$)。

Week	Day	GST	NDL
0	1	+	+
	2		+
	3		+
	4		+
	5		+
1	6	+	+
	7		
	8		+
	9		+
	10		+
	11		+
2	12		+
	13	+	+
	14		
	15		+
	16		+
	17		+
	18		+
	19		+
3	20	+	+
	21		
	22		+
	23		+
	24		+
	25		+
4	26		Microdialysis
	27	+	

Fig. 9

Time schedule for the grip strength test (GST), repeated administration of nandrolone (NDL) or vehicle and microdialysis experiments (Microdialysis). GST was performed on five occasions during the experimental period, i.e. on days 1, 6, 13, 20 and 27. NDL or vehicle were administered subcutaneously on days 1-6, 8-13, 15-20, and 22-25. Body weight was measured on days 1, 6, 13, 20 and 27 when GST was performed. Results for GST on day 1, 6, 13, 20 and 27 are also at week 0, 1, 2, 3 and 4. The final GST on day 27 was carried out approximately 40 h after the final NDL or vehicle treatment. All other GST were performed immediately prior to administration of NDL or vehicle. We also monitored the effects of NDL on increases in body weight and grip strength in rats used for microdialysis experiments. Guide cannula implantation for microdialysis experiments was performed on day 11 or 12 and microdialysis experiments were carried out on day 26. The final GST was performed on the day following microdialysis experiments, i.e. day 27.

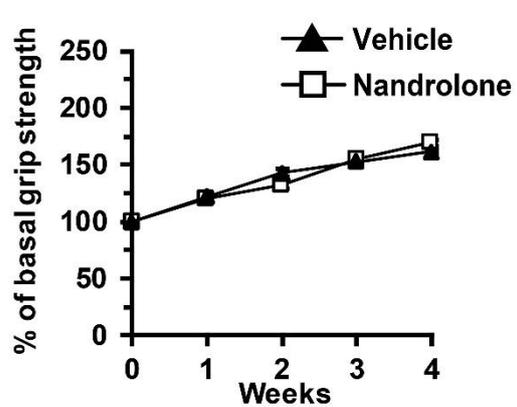
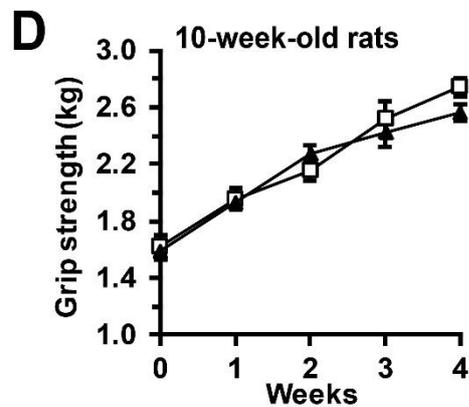
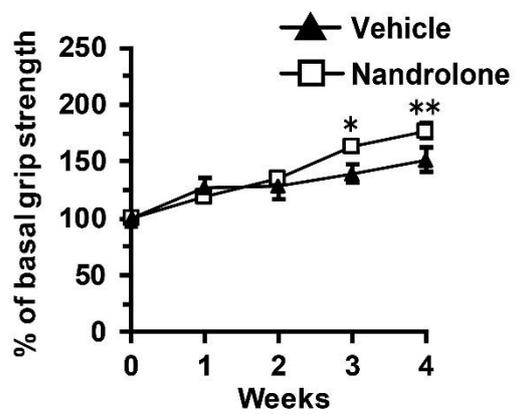
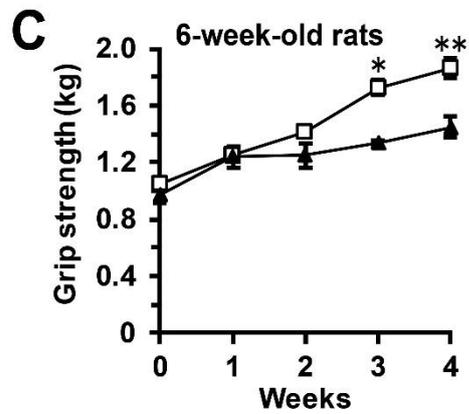
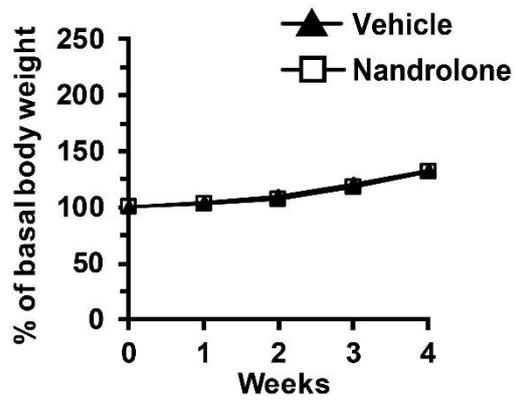
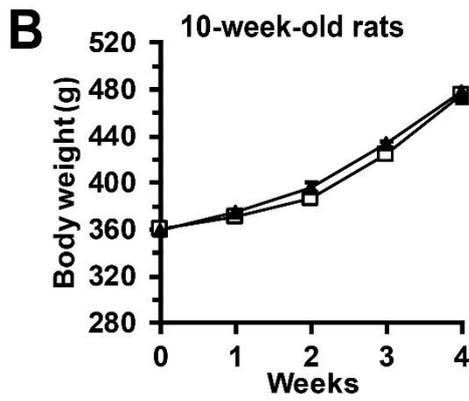
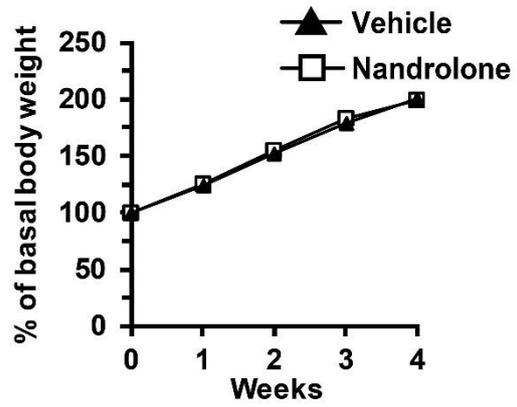
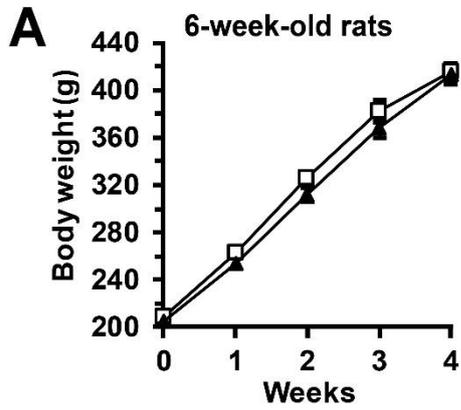


Fig. 10

A. Effects of repeated administrations of nandrolone (5.0 mg/kg s.c., $n = 6$, open squares) or vehicle (sesame oil s.c., $n = 6$, closed triangles) on (left panel) increases in mean body weight (g) and (right panel) mean change from basal body weight (%) of 6-week-old rats at the start of experiments. B. Effects of repeated administrations of nandrolone (5.0 mg/kg s.c., $n = 4$, open squares) or vehicle (sesame oil s.c., $n = 5$, closed triangles) on (left panel) increases in mean body weight (g) and (right panel) mean change from basal body weight (%) of 10-week-old rats at the start of experiments. C. Effects of repeated administrations of nandrolone (5.0 mg/kg s.c., $n = 6$, open squares) or vehicle (sesame oil s.c., $n = 6$, closed triangles) on (left panel) mean increases in grip strength (kg) and (right panel) mean change from basal grip strength (%) of 6-week-old rats at the start of experiments. D. Effects of repeated administrations of nandrolone (5.0 mg/kg s.c., $n = 4$, open squares) or vehicle (sesame oil s.c., $n = 5$, closed triangles) on (left panel) mean increases in grip strength (kg) and (right panel) mean change from basal grip strength (%) of 10-week-old rats at the start of experiments. Vertical bars indicate S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle.

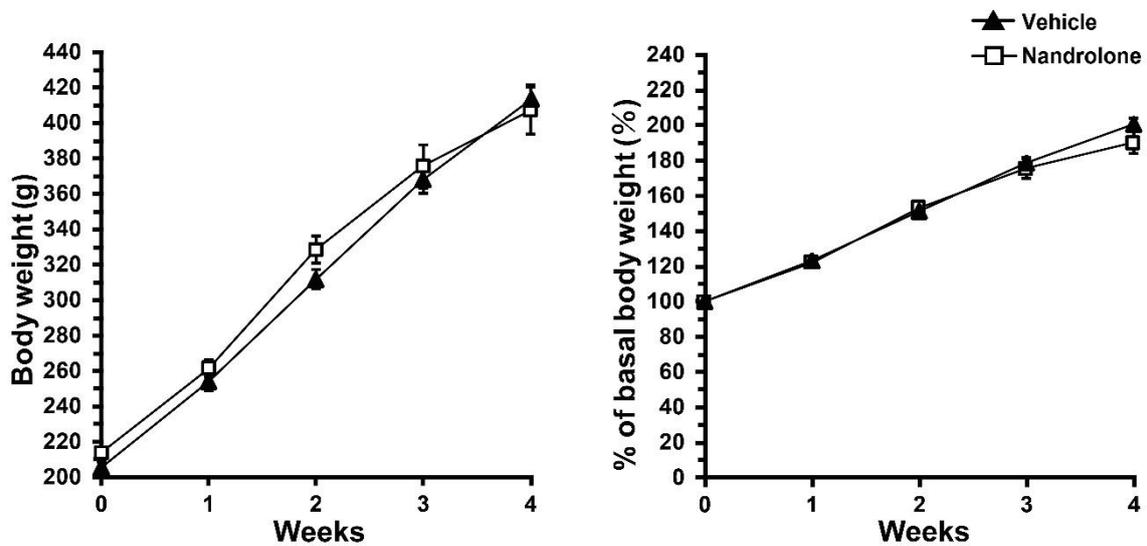


Fig. 11

Left panel: Effects of repeated administrations of nandrolone (5.0 mg/kg s.c., $n = 6$, open squares) or vehicle (sesame oil s.c., $n = 6$, closed triangles) on increases in mean body weight (g) of 6-week-old rats subsequently used in microdialysis experiments. Vertical bars indicate S.E.M. Right panel: Effects of repeated administrations of nandrolone (5.0 mg/kg s.c., $n = 6$, open squares) or vehicle (sesame oil s.c., $n = 6$, closed triangles) on increases in body weight of 6-week-old rats subsequently used in microdialysis experiments. Data are expressed as mean change from basal body weight (%). Vertical bars indicate S.E.M.

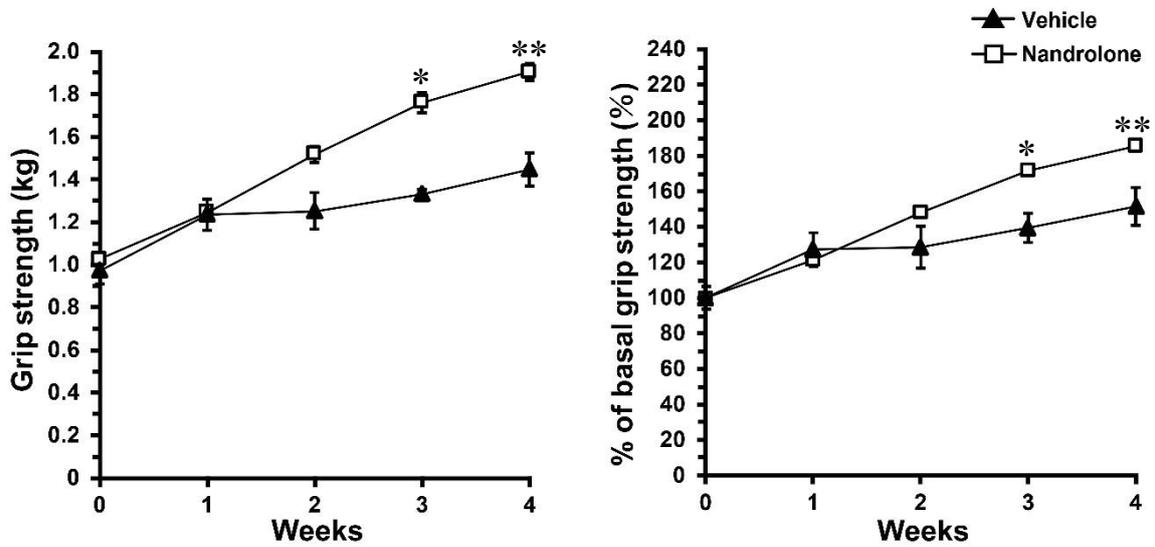


Fig. 12

Left panel: Effects of repeated administrations of nandrolone (5.0 mg/kg s.c., $n = 6$, open squares) or vehicle (sesame oil s.c., $n = 6$, closed triangles) on mean increases in grip strength (kg) of 6-week-old rats subsequently used in microdialysis experiments. Vertical bars indicate S.E.M. Right panel: Effects of repeated administrations of nandrolone (5.0 mg/kg s.c., $n = 6$, open squares) or vehicle (sesame oil s.c., $n = 6$, closed triangles) on increases in grip strength of 6-week-old rats subsequently used in microdialysis experiments. Data are expressed as mean change from basal grip strength (%). Vertical bars indicate S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle.

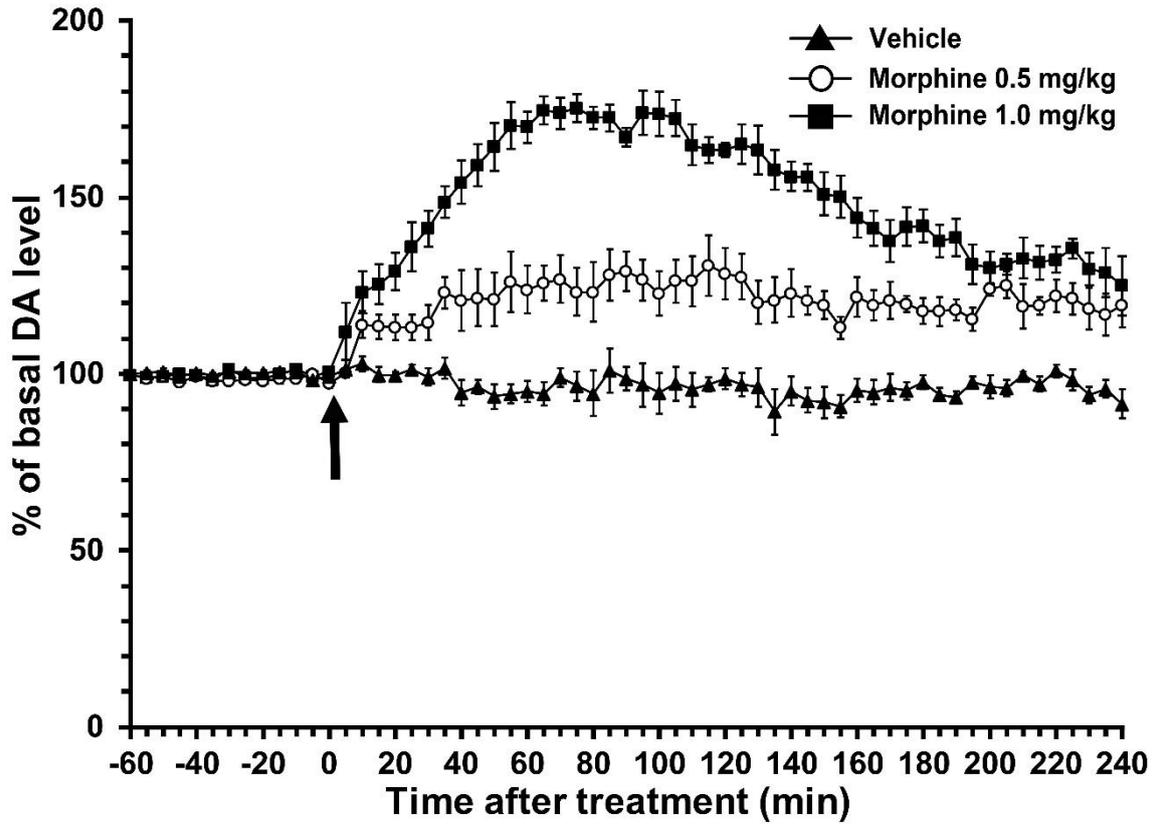


Fig. 13 Effects of subcutaneous injection of morphine (0.5 mg/kg, $n = 7$, open circles; 1.0 mg/kg, $n = 7$, closed squares) or vehicle (saline s.c., $n = 6$, closed triangles) on basal extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after subcutaneous injection of morphine. Vertical bars indicate S.E.M. Arrow above the abscissa indicates the timing of subcutaneous injection of morphine or vehicle.

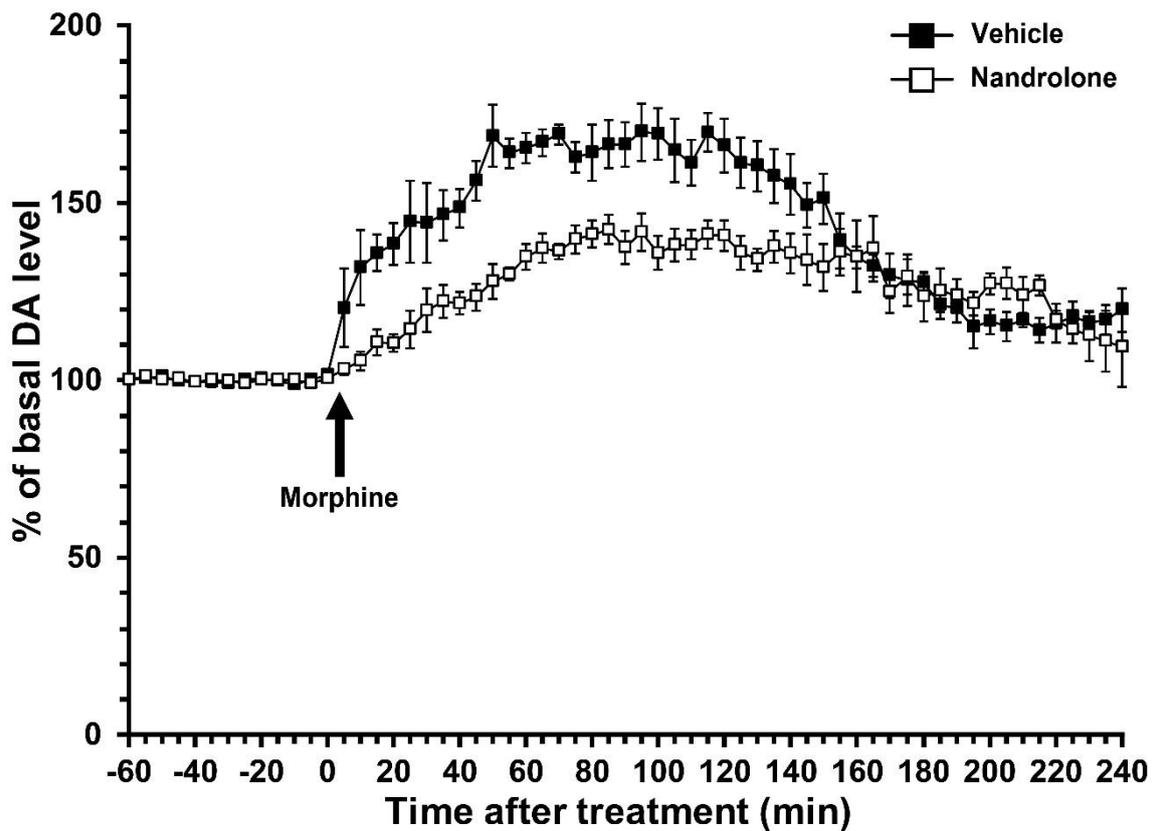


Fig. 14
 Effects of repeated administrations of nandrolone (5.0 mg/kg s.c., $n = 6$, open squares) or vehicle (sesame oil s.c., $n = 6$, closed squares) on morphine (1.0 mg/kg s.c.)-induced increases in extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens in 6-week-old rats at the start of experiments. Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after subcutaneous injection of morphine. Vertical bars indicate S.E.M. Arrow above the abscissa indicates the timing of subcutaneous injection of morphine.

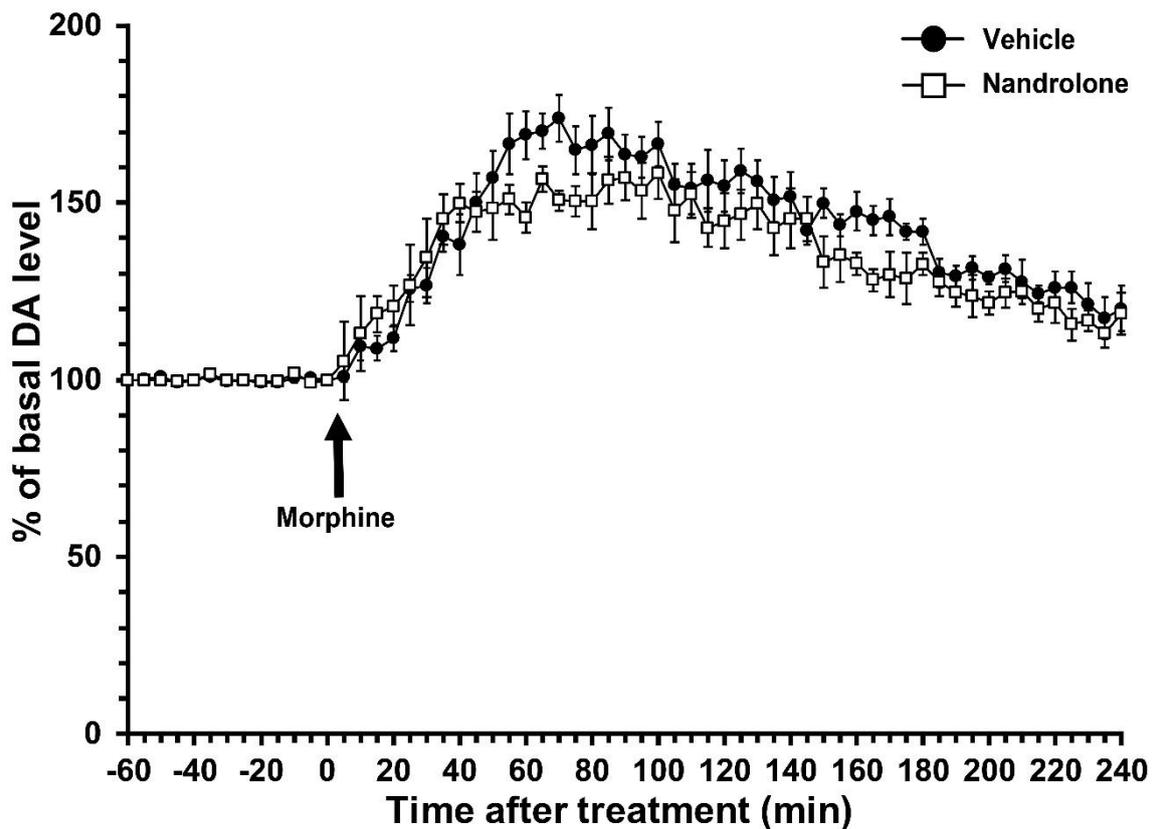


Fig. 15
 Effect of a single administration of nandrolone (5.0 mg/kg s.c., $n = 6$, open squares) or vehicle (sesame oil s.c., $n = 6$, closed squares) on morphine (1.0 mg/kg s.c.)-induced increases in extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens. Nandrolone was given 24 h before morphine. Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after subcutaneous injection of morphine. Vertical bars indicate S.E.M. Arrow above the abscissa indicates the timing of subcutaneous injection of morphine.

考 察

様々な投与期間により多様な週齢のラットに対し行った nandrolone (Johansson et al., 2000; Kurling et al., 2005; Takahashi et al., 2004; Yu-Yahiro et al., 1989) と他のタンパク同化ステロイド (Tsutsui et al., 2011) の反復全身投与の研究の中には、体重増加の抑制に関する報告が含まれている。これらの体重増加の低下のメカニズムとしては、食餌摂取の減少 (Lindblom et al., 2003; Tsutsui et al., 2011) または体脂肪消費の促進 (Yu-Yahiro et al., 1989) が示唆されている。本研究はこれらの報告には反するものの、他の報告 (Kurling et al., 2005; Zotti et al., 2014) と一致して、nandrolone の反復投与は思春期または青年期に始めたとしても 4 週間に亘る実験期間中の体重の増加には目立った影響を及ぼさないことを示している。

内因性のテストステロンを減少させるため精巣を摘出したマウスでは、nandrolone の反復投与は握力の低下を打ち消すことが報告されている (White et al., 2013)。本研究の 4 週間の実験期間中に 6 および 10 週齢のラットの握力はいずれも約 150%増加した。成長に伴うこれらの握力の増大は、10 週齢ではなく 6 週齢のラットへの 4 週間に亘る nandrolone の反復投与により促進した。つまり、筋力の上昇を促進するうえで nandrolone の反復投与は、ホルモンが急激に増加し生理的な可塑性が高い思春期が青年期に比べて重要な時期であることが明らかになった。

疫学的な研究からタンパク同化ステロイドの乱用者は、このステロイドと特に opioid を含むほかの乱用物質に対する依存の両方を形成する可能性が示唆されている (Kanayama et al., 2003, 2010)。さらに、薬物の依存形成能の評価に用いる行動実験であるラットの条件付け場所嗜好試験による知見からは、nandrolone の慢性処置が morphine への依存形成を促進することが示されている (Huang et al., 2016)。これらの結果に基づき、4 週間に亘る nandrolone 投

与の開始時に 10 週齢ではなく 6 週齢のラットを用いて以降の神経化学実験を行った。この実験では、nandrolone の反復投与が無麻酔非拘束ラットの側坐核の基礎および morphine が誘発した dopamine 放出に及ぼす効果について脳微小透析法により検討した。

側坐核の dopamine 量に対する nandrolone の反復投与の効果は、様々な用量と投与期間のもとで *in vitro* と全身麻酔下もしくは無麻酔非拘束のラットを用いた *in vivo* の実験手法により筋力の評価はない条件で検討されてきた (Birgner et al., 2007; Kurling et al., 2005, 2008; Kurling-Kairanto et al., 2010; Zotti et al., 2014)。 *In vivo* で行った本研究から、側坐核の基礎的な細胞外 dopamine 量は、同じく *in vivo* で並行して測定した筋力は増大させることができた 6 週齢ラットに対する 4 週間に亘る nandrolone の反復投与による影響は受けないことが示された。しかしながら nandrolone 処置を行っていない条件下では、morphine の全身投与は側坐核の dopamine 放出を用量依存的に促進したのに対し、nandrolone の反復投与はこの morphine が誘発した側坐核の dopamine 放出の促進を抑制した。アンドロゲンおよびエストロゲン受容体は脳内に広く分布しており、ほかの結合部位と共に中枢神経系に対する nandrolone の効果発現に関与しているとみなされている (Wood, 2008)。本研究とこれまでの知見に基づくと、nandrolone の効果の発現には下記の機序が関与していることが推察される。

第一は、nandrolone の反復投与の結果、側坐核の dopamine 放出を増大させる opioid 受容体のサブタイプに対する morphine の有効性が低下した可能性である。これはラットにおいて、nandrolone の反復投与は側坐核へ投射する dopamine 神経の起始核がある中脳腹側被蓋野で μ , δ 受容体の内因性アゴニストのひとつである β -endorphin の発現を促進することが示されているためである (Johansson et al., 1997)。また、急性投与した nandrolone はマウスの中脳腹側被蓋野の μ 受容体を刺激できることも示されている (Bontempi & Bonci,

2020)。このような中脳腹側被蓋野の opioid 受容体サブタイプに対して起こる, nandrolone が誘発した競合的に作用する内因性アゴニストの増大と, 外因性の nandrolone の刺激の両方あるいはいずれか一方により, morphine によるこれらの受容体への刺激が低下する可能性がある。

第二は, nandrolone の反復投与が側坐核の dopamine 放出を制御する opioid 受容体のサブタイプ間の機能的なバランスに影響を与えた可能性である。側坐核の dopamine 放出の制御において, μ および δ 受容体は促進的な役割を果たすのに対して (Aono et al., 2008, 2017; Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2008; Saigusa et al., 2021; Spanagel et al., 1992; Watanabe et al., 2018), κ 受容体は抑制的な役割を果たす (Spanagel et al., 1992) ことが報告されている。Nandrolone の反復投与により morphine を投与した際には dopamine 放出を促進する μ および δ 受容体と dopamine 放出を抑制する κ 受容体のバランスがすでに変化していた可能性が考えられる。なぜならば (1) 側坐核において μ 受容体の内因性リガンドの β -endorphin と κ 受容体の内因性リガンドの dynorphin の発現には強い正の相関があるが, (2) これらの μ または κ 受容体をそれぞれ刺激する β -endorphin と dynorphin の発現の間にみられる相関が, nandrolone の反復投与後には消失するためである (Johansson et al., 2000)。

第三は, nandrolone の反復投与により薬物代謝酵素の誘導が起きて morphine の代謝が亢進したことにより, morphine の opioid 受容体サブタイプにおける濃度が減少した可能性である。Uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) のひとつの UGT2B7 (Strahm et al., 2013) は nandrolone を含むアンドロゲンの抱合に関わるが, この酵素は morphine の M3G および M6G への代謝にも関与することが知られている (De Gregori et al., 2012)。この酵素の活性の促進が, 側坐核の dopamine 放出を増加させる opioid 受容体における morphine の量を減少させた可能性がある。

上記のいずれかのメカニズムだけではなくその組合せが関与する可能性があるとはいえ、本研究で示されたタンパク同化ステロイドと opioid の相互作用は、ヒトにおける化学物質の乱用に関わるとされてきたタンパク同化ステロイドと opioid の相互作用 (Kanayama et al., 2003, 2010) の発現を補完していることが考えられる。例えばタンパク同化ステロイドの乱用者は、中脳辺縁系 dopamine 神経活動の増加を介した効果を得るため、通常よりも多量の morphine の摂取が必要であることを本研究は示唆している。

本研究には、今後解明が必要な課題が残されている。例えば、本研究と同じ実験条件を用いることで基礎的な dopamine 量の 70%以上が tetrodotoxin 感受性であることが確認されている (Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2012)。したがって、本実験条件下で検出した無麻酔非拘束ラットの側坐核の基礎 dopamine 放出はそのほとんどが神経発火に基づいて放出されたものとみなすことができる (Di Chiara et al., 1996 参照)。しかしながら、本研究で報告した薬物の効果の発現における側坐核の core および shell 領域の役割について明らかにするためには今後も検討が必要である。さらに本研究で側坐核の基礎的な dopamine 放出に対して nandrolone は morphine の効果を観察した際に効果が認められなかったが、側坐核の dopamine 神経伝達に対して nandrolone が投与直後に急性の効果を示す可能性は必ずしも否定できない。したがってこのことも将来の研究でさらなる検討が必要である。

Nandrolone の反復投与は、青年期よりも思春期に開始することによって体重の増加に影響を与えることなく成長に伴う筋力の増大を促進することを *in vivo* の行動実験による証拠に基づいて本研究は示すことができた。つまり、有害事象に関する公衆衛生上の警告を発する上で、あらゆる世代のうちでこの期間を対象にすることが最も適していると考えられる。依存形成との関連では、思春期における nandrolone の反復投与は中脳辺縁系 dopamine 神経活動を *in vivo* の条件下では刺激しないものの、morphine による中脳辺縁系

dopamine 神経活動の促進を低下させることを示す神経薬理的な証拠を本研究は提供している。このことは薬物の乱用と治療での使用において、タンパク同化ステロイドと **opioid** の相互作用は、これら 2 つの系に働く薬物の併用に関わる作用に変化を起こす可能性があることを示すものである。

総 括

側坐核は中脳腹側被蓋野に起始核を有する中脳辺縁系 dopamine 神経の主な投射先のひとつである。本研究は、ラットを用いた *in vivo* 脳微小透析法により、側坐核の細胞外 dopamine 量に対する orexin または opioid 受容体を作用点とする薬物の作用の特徴の解明に取り組んだ。第 1 章および第 2 章の無麻酔非拘束ラットを用いた研究から、側坐核の OX₁ ではなく OX₂ 受容体が同部位の dopamine 放出を抑制的に制御することが示された。また、morphine による側坐核の opioid 受容体刺激を介した dopamine 放出の促進は、思春期に相当する時期にタンパク同化ステロイドの nandrolone を反復投与すると減弱することが示された。

神経薬理学実験から、側坐核に投射する中脳辺縁系 dopamine 神経活動の亢進は薬物への精神依存の形成に関与すると考えられている。本研究は、不眠症の新規治療薬の suvorexant と麻薬性鎮痛薬の morphine が側坐核の dopamine 放出に及ぼす作用に焦点を当て、orexin 受容体と opioid 受容体を介した側坐核の dopamine 放出の特徴について、関与する受容体サブタイプとタンパク同化ステロイドの反復投与の影響を強く受ける時期に関する新たな知見を提供するものである。

引用文献

Ahmadi-Soleimani, S. M., Ghaemi-Jandabi, M., Azizi, H., & Semnanian, S. (2014). Orexin type 1 receptor antagonism in Lateral Paragigantocellularis nucleus attenuates naloxone precipitated morphine withdrawal symptoms in rats. *Neuroscience Letters*, 558, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.10.064>

Aono, Y., Kiguchi, Y., Watanabe, Y., Waddington, J. L., & Saigusa, T. (2017). Stimulation of accumbal GABA_A receptors inhibits delta2-, but not delta1-, opioid receptor-mediated dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *European Journal of Pharmacology*, 815, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.019>

Aono, Y., Saigusa, T., Mizoguchi, N., Iwakami, T., Takada, K., Gionhaku, N., Oi, Y., Ueda, K., Koshikawa, N., & Cools, A. R. (2008). Role of GABA_A receptors in the endomorphin-1-, but not endomorphin-2-, induced dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *European Journal of Pharmacology*, 580, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.10.020>

Aono, Y., Saigusa, T., Taguchi, H., Uchida, T., Takada, K., Koshikawa, N., & Cools, A. R. (2013). Synergistic, but not separate, stimulation of accumbal β 1- and β 2-adrenoceptors alters the accumbal dopamine efflux in freely moving rats. *European Journal of Pharmacology*, 715, 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.04.035>

Arrigoni, E., Chee, M. J. S., & Fuller, P. M. (2019). To eat or to sleep: That is a lateral hypothalamic question. *Neuropharmacology*, 154, 34–49.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.017>

Balcita-Pedicino, J. J., & Sesack, S. R. (2007). Orexin axons in the rat ventral tegmental area synapse infrequently onto dopamine and gamma-aminobutyric acid neurons. *Journal of Comparative Neurology*, 503, 668–684. <https://doi.org/10.1002/cne.21420>

Baldo, B. A., Daniel, R. A., Berridge, C. W., & Kelley, A. E. (2003). Overlapping distributions of orexin/hypocretin- and dopamine-beta-hydroxylase immunoreactive fibers in rat brain regions mediating arousal, motivation, and stress. *Journal of Comparative Neurology*, 464, 220–237. <https://doi.org/10.1002/cne.10783>

Benveniste, H., Hansen, A. J., & Ottosen, N. S. (1989). Determination of brain interstitial concentrations by microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, 52, 1741–1750. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb07252.x>

Berhe, D. F., Gebre, A. K., & Assefa, B. T. (2020). Orexins role in neurodegenerative diseases: From pathogenesis to treatment. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 194, 172929. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.172929>

Berteotti, C., Liguori, C., & Pace, M. (2021). Dysregulation of the orexin/hypocretin system is not limited to narcolepsy but has far-reaching implications for neurological disorders. *European Journal of Neuroscience*, 53, 1136–1154. <https://doi.org/10.1111/ejn.15077>

Birgner, C., Kindlundh-Högberg, A.M., Nyberg, F., & Bergström, L. (2007). Altered

extracellular levels of DOPAC and HVA in the rat nucleus accumbens shell in response to sub-chronic nandrolone administration and a subsequent amphetamine challenge. *Neuroscience Letters*, 412, 168–172. [https://doi: 10.1016/j.neulet.2006.11.001](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.11.001)

Birrell, C.E., & Balfour, D.J. (1998). The influence of nicotine pretreatment on mesoaccumbens dopamine overflow and locomotor responses to D-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)*, 140, 142–149. [https://doi: 10.1007/s002130050751](https://doi.org/10.1007/s002130050751)

Blomeley, C., Garau, C., & Burdakov, D. (2018). Accumbal D2 cells orchestrate innate risk-avoidance according to orexin signals. *Nature Neuroscience*, 21, 29–32. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0023-y>

Bontempi, L., & Bonci, A. (2020). μ -Opioid receptor-induced synaptic plasticity in dopamine neurons mediates the rewarding properties of anabolic androgenic steroids. *Science Signaling*, 13, eaba1169. [https://doi: 10.1126/scisignal.aba1169](https://doi.org/10.1126/scisignal.aba1169)

Born, S., Gauvin, D. V., Mukherjee, S., & Briscoe, R. (2017). Preclinical assessment of the abuse potential of the orexin receptor antagonist, suvorexant. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 86, 181 - 192. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.03.006>

Breuer, M. E., McGinnis, M. Y., Lumia, A. R., & Possidente B. P., (2001). Aggression in male rats receiving anabolic androgenic steroids: effects of social and environmental provocation. *Hormones and Behavior*, 40, 409–418. [https://doi: 10.1006/hbeh.2001.1706](https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1706).

Cadoni C, & Di Chiara G. (2007). Differences in dopamine responsiveness to drugs of abuse in the nucleus accumbens shell and core of Lewis and Fischer 344 rats. *Journal of Neurochemistry*, 103(2), 487–499. [https://doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04795.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04795.x)

Cadoni, C., Pinna, A., Russi, G., Consolo, S., & Di Chiara, G. (1995). Role of vesicular dopamine in the in vivo stimulation of striatal dopamine transmission by amphetamine: evidence from microdialysis and Fos immunohistochemistry. *Neuroscience*, 65, 1027–1039. [https://doi: 10.1016/0306-4522\(94\)00507-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00507-2)

Célérier, E., Yazdi, M.T., Castañé, A., Ghosland, S., Nyberg, F., & Maldonado, R. (2003). Effects of nandrolone on acute morphine responses, tolerance and dependence in mice. *European Journal of Pharmacology*, 465, 69–81. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01462-6](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01462-6)

Corongiu, S., Dessì, C., & Cadoni, C. (2019). Adolescence versus adulthood: Differences in basal mesolimbic and nigrostriatal dopamine transmission and response to drugs of abuse. *Addiction Biology*, 25, e12721. <https://doi.org/10.1111/adb.12721>

Cox, C. D., Breslin, M. J., Whitman, D. B., Schreier, J. D., McGaughey, G. B., Bogusky, M. J., Roecker, A. J., Mercer, S. P., Bednar, R. A., Lemaire, W., Bruno, J. G., Reiss, D. R., Harrell, C. M., Murphy, K. L., Garson, S. L., Doran, S. M., Prueksaritanont, T., Anderson, W. B., Tang, C., Shane, R., Cabalu, T. D., Cui, D., Hartman, G. D., Young, S. D., Koblan, K. S., Winrow, C. J., Renger, J. J., & Coleman, P. J. (2010). Discovery of the dual orexin receptor antagonist [(7R)-4-(5-chloro-1,3-benzoxazol-2-yl)-7-methyl-1,4-diazepan-1-yl][5-methyl-2-(2H-1,2,3-

triazol-2-yl)phenyl] methanone (MK-4305) for the treatment of insomnia. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 5320–5332. [https://doi.org/ 10.1021/jm100541c](https://doi.org/10.1021/jm100541c)

Danielsson, K., Stomberg, R., Adermark, L., Ericson, M., & Söderpalm, B. (2021). Differential dopamine release by psychosis-generating and non-psychosis-generating addictive substances in the nucleus accumbens and dorsomedial striatum. *Translational Psychiatry*, 11, 472. [https://doi: 10.1038/s41398-021-01589-z](https://doi:10.1038/s41398-021-01589-z)

Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., Sakurai, T., Yanagisawa, M., & Nakazato, M. (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 96, 748–753.

De Gregori, S., De Gregori, M., Ranzani, G.N., Allegri, M., Minella, C., & Regazzi, M. (2012). Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metabolic Brain Disease*, 27, 1-5. [https://doi: 10.1007/s11011-011-9274-6](https://doi:10.1007/s11011-011-9274-6).

de Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P. E., Danielson, P. E., Fukuhara, C., Battenberg, E. L., Gautvik, V. T., Bartlett, F. S. 2nd, Frankel, W. N., van den Pol, A. N., Bloom, F. E., Gautvik, K. M., & Sutcliffe, J. G. (1998). The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95, 322–327.

Denham, B.E. (2006). The anabolic steroid control act of 2004: a study in the political economy of drug policy. *Journal of Health & Social Policy*, 22, 51–78. [https://doi: 10.1300/J045v22n02_04](https://doi:10.1300/J045v22n02_04).

Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S., De Luca, M. A., Spina, L., Cadoni, C., Acquas, E., Carboni, E., Valentini, V., & Lecca, D. (2004). Dopamine and drug addiction: The nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 47(Suppl 1), 227–241.

Di Chiara, G., Tanda, G., & Carboni, E. (1996). Estimation of in-vivo neurotransmitter release by brain microdialysis: the issue of validity. *Behavioural pharmacology*, 7, 640–657.

Frank, S.T., Krumm, B., & Spanagel, R. (2008). Cocaine-induced dopamine overflow within the nucleus accumbens measured by in vivo microdialysis: a meta-analysis. *Synapse*, 62, 243–252. [https://doi: 10.1002/syn.20489](https://doi.org/10.1002/syn.20489)

Gentile, T. A., Simmons, S. J., Barker, D. J., Shaw, J. K., España, R. A., & Muschamp, J. W. (2018). Suvorexant, an orexin/hypocretin receptor antagonist, attenuates motivational and hedonic properties of cocaine. *Addiction Biology*, 23, 247–255. <https://doi.org/10.1111/adb.12507>

Huang, E.Y., Chen, Y.H., Huang, T.Y., Chen, Y.J., & Chow, L.H., (2016). Chronic administration of nandrolone increases susceptibility to morphine dependence without correlation with LVV-hemorphin 7 in rats. *Neuropeptides*, 59, 63–69. doi: 10.1016/j.npep.2016.05.005

Ishikawa, M., Aono, Y., & Saigusa, T. (2017). Role of orexin receptor subtypes in the inhibitory effects of orexin-A on potassium chloride-induced increases in intracellular calcium ion levels in neurons derived from dorsal root ganglion of carrageenan-treated

rats. *Journal of Oral Science*, 59, 557–564. <https://doi.org/10.2334/josnugd.16-0759>

James, M. H., & Aston-Jones, G. (2020). Introduction to the special issue: “Making orexin-based therapies for addiction a reality: What are the steps from here?”. *Brain Research*, 1731, 146665. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.146665>

James, M. H., Fragale, J. E., O’Connor, S. L., Zimmer, B. A., & Aston-Jones, G. (2021). The orexin (hypocretin) neuropeptide system is a target for novel therapeutics to treat cocaine use disorder with alcohol coabuse. *Neuropharmacology*, 183, 108359. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108359>

Johansson, P., Lindqvist, A., Nyberg, F., & Fahlke, C. (2000). Anabolic androgenic steroids affects alcohol intake, defensive behaviors and brain opioid peptides in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67, 271–279. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00365-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00365-8)

Johansson, P., Ray, A., Zhou, Q., Huang, W., Karlsson, K., & Nyberg, F. (1997). Anabolic androgenic steroids increase beta-endorphin levels in the ventral tegmental area in the male rat brain. *Neuroscience Research*, 27, 185–189. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(96\)01141-8](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(96)01141-8)

Kanayama, G., Cohane, G.H., Weiss, R.D., & Pope, H.G. (2003). Past anabolic-androgenic steroid use among men admitted for substance abuse treatment: an underrecognized problem? *Journal of Clinical Psychiatry*, 64, 156–160. <https://doi.org/10.4088/jcp.v64n0208>

Kanayama, G., Hudson, J.I., & Pope, H.G. Jr. (2010). Illicit anabolic-androgenic steroid use. *Hormones and Behavior*, 58, 111-121. [https://doi: 10.1111/j.1521-0391.2010.00093.x](https://doi.org/10.1111/j.1521-0391.2010.00093.x)

Khairuddin, S., Aquili, L., Heng, B. C., Hoo, T. L. C., Wong, K. H., & Lim, L. W. (2020). Dysregulation of the orexinergic system: A potential neuropeptide target in depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 118, 384–396. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.07.040>

Kindlundh, A.M., Isacson, D.G., Berglund, L. & Nyberg, F. (1999). Factors associated with adolescent use of doping agents: anabolic–androgenic steroids. *Addiction*. 94, 543–553. <https://doi: 10.1046/j.1360-0443.1999.9445439.x>

Kindlundh, A.M., Lindblom, J., Bergström, L., Wikberg, J.E., & Nyberg, F. (2001). The anabolic-androgenic steroid nandrolone decanoate affects the density of dopamine receptors in the male rat brain. *European Journal of Neuroscience*, 13, 291–296. doi: 10.1046/j.0953-816x.2000.01402.x

Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: A neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry*, 3, 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)

Korotkova, T. M., Sergeeva, O. A., Eriksson, K. S., Haas, H. L., & Brown, R. E. (2003). Excitation of ventral tegmental area dopaminergic and nondopaminergic neurons by orexins/hypocretins. *Journal of Neuroscience*, 23, 7–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-01-00007.2003>

Kotani, A., Ikeda, H., Koshikawa, N., & Cools, A. R. (2008). Role of orexin receptors in the nucleus accumbens in dopamine-dependent turning behaviour of rats. *Neuropharmacology*, 54, 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.11.006>

Kurling, S., Kankaanpää, A., Ellermaa, S., Karila, T., & Seppälä, T. (2005). The effect of sub-chronic nandrolone decanoate treatment on dopaminergic and serotonergic neuronal systems in the brains of rats. *Brain Research*, 1044, 67–75. [https://doi: 10.1016/j.brainres.2005.02.071](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.02.071)

Kurling, S., Kankaanpää, A., & Seppälä, T. (2008). Sub-chronic nandrolone treatment modifies neurochemical and behavioral effects of amphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in rats. *Behavioural Brain Research*, 189, 191–201. [https://doi: 10.1016/j.bbr.2007.12.021](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.12.021)

Kurling-Kailanto, S., Kankaanpää, A., Hautaniemi, J., & Seppälä, T. (2010). Blockade of androgen or estrogen receptors reduces nandrolone's ability to modulate acute reward-related neurochemical effects of amphetamine in rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 95, 422–427. [https://doi: 10.1016/j.pbb.2010.02.020](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.02.020)

Li, J., Hu, Z., & de Lecea, L. (2014). The hypocretins/orexins: Integrators of multiple physiological functions. *British Journal of Pharmacology*, 171, 332–350. <https://doi.org/10.1111/bph.12415>

Li, N., & Jasanoff, A. (2020). Local and global consequences of reward-evoked striatal dopamine release. *Nature*, 580, 239–244. <https://doi.org/10.1038/s41586-020->

2158-3

Lindblom, J., Kindlundh, A.M., Nyberg, F., Bergström, L., & Wikberg, J.E. (2003). Anabolic androgenic steroid nandrolone decanoate reduces hypothalamic proopiomelanocortin mRNA levels. *Brain Research*, 986, 139–147. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)03223-2](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)03223-2)

Lindfors, N., Amberg, G., & Ungerstedt, U. (1989). Intracerebral microdialysis: I. Experimental studies of diffusion kinetics. *Journal of Pharmacological Methods*, 22, 141–156. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(89\)90011-9](https://doi.org/10.1016/0160-5402(89)90011-9)

Liu, J. J., Mirabella, V. R., & Pang, Z. P. (2020). Cell type- and pathway-specific synaptic regulation of orexin neurocircuitry. *Brain Research*, 1731, 145974. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.10.003>

Malherbe, P., Borroni, E., Gobbi, L., Knust, H., Nettekoven, M., Pinard, E., Roche, O., Rogers-Evans, M., Wettstein, J. G., & Moreau, J. L. (2009). Biochemical and behavioural characterization of EMPA, a novel high-affinity, selective antagonist for the OX₂ receptor. *British Journal of Pharmacology*, 156, 1326–1341. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00127.x>

Malherbe, P., Borroni, E., Pinard, E., Wettstein, J. G., & Knoflach, F. (2009). Biochemical and electrophysiological characterization of almorexant, a dual orexin 1 receptor (OX₁)/orexin 2 receptor (OX₂) antagonist: Comparison with selective OX₁ and OX₂ antagonists. *Molecular Pharmacology*, 76, 618–631. <https://doi.org/10.1124/mol.109.055152>

Marcus, J. N., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Chemelli, R. M., Saper, C. B., Yanagisawa, M., & Elmquist, J. K. (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 435, 6–25. <https://doi.org/10.1002/cne.1190>

Martin, G., Fabre, V., Siggins, G. R., & de Lecea, L. (2002). Interaction of the hypocretins with neurotransmitters in the nucleus accumbens. *Regulatory Peptides*, 104, 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(01\)00354-8](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(01)00354-8)

Mazzeo, F., 2018. Anabolic Steroid use in Sports and in Physical Activity: Overview and Analysis. *Sport Mont*, 16, 113–118. <https://doi.org/10.26773/smj.181020>

Martinez-Rivera, F.J., Natal-Albelo, E.J., Martínez, N.A., Orozco-Vega, R.A., Muñoz-Seda, O.A., & Barreto-Estrada, J.L. (2015). The effect of the anabolic steroid, nandrolone, in conditioned place preference and D1 dopamine receptor expression in adolescent and adult mice. *Behavioural Processes*, 113:81–85. doi: 10.1016/j.beproc.2015.01.008.

McDuff, D., Stull, T., Castaldelli-Maia, J.M., Hitchcock, M.E., Hainline, B., & Reardon, C.L. (2019). Recreational and ergogenic substance use and substance use disorders in elite athletes: a narrative review. *British Journal of Sports Medicine*, 53, 754–760. <https://doi: 10.1136/bjsports-2019-100669>.

Mori, K., Kim, J., & Sasaki, K. (2011). Electrophysiological effects of orexin-B and dopamine on rat nucleus accumbens shell neurons in vitro. *Peptides*, 32, 246–252.

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.10.023>

Mukai, K., Kim, J., Nakajima, K., Oomura, Y., Wayner, M. J., & Sasaki, K. (2009). Electrophysiological effects of orexin/hypocretin on nucleus accumbens shell neurons in rats: An in vitro study. *Peptides*, 30, 1487 - 1496. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.04.018>

Nakamura, T., Uramura, K., Nambu, T., Yada, T., Goto, K., Yanagisawa, M., & Sakurai, T. (2000). Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Research*, 873, 181–187. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02555-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02555-5)

Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., & Goto, K. (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Research*, 827, 243–260. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01336-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01336-0)

Nanmoku, T., Isobe, K., Sakurai, T., Yamanaka, A., Takekoshi, K., Kawakami, Y., Ishii, K., Goto, K., & Nakai, T. (2000). Orexins suppress catecholamine synthesis and secretion in cultured PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 274, 310–315. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3137>

Okutsu, H., Watanabe, S., Takahashi, I., Aono, Y., Saigusa, T., Koshikawa, N., & Cools, A.R. (2006). Endomorphin-2 and endomorphin-1 promote the extracellular amount of accumbal dopamine via nonopioid and mu-opioid receptors, respectively. *Neuropsychopharmacology*, 31, 375–383. [https://doi: 10.1038/sj.npp.1300804](https://doi:10.1038/sj.npp.1300804)

Panos JJ, & Baker LE. (2010). An in vivo microdialysis assessment of concurrent MDMA and cocaine administration in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 209, 95–102. [https://doi: 10.1007/s00213-009-1774-2](https://doi.org/10.1007/s00213-009-1774-2)

Patanè, F.G., Liberto, A., Maria Maglitto, A.N., Malandrino, P., Esposito, M., Amico, F., Cocimano, G., Li Rosi, G., Condorelli, D., Di Nunno, N., & Montana, A. (2020). Nandrolone Decanoate: Use, Abuse and Side Effects. *Medicina (Kaunas)*, 56, 606. [https://doi: 10.3390/medicina56110606](https://doi.org/10.3390/medicina56110606).

Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.). Academic Press.

Piacentino, D., Sani, G., Kotzalidis, G.D., Cappelletti, S., Longo, L., Rizzato, S., Fabi, F., Franti, P., Fineschi, V., & Leggio, L. (2022). Anabolic androgenic steroids used as performance and image enhancing drugs in professional and amateur athletes: Toxicological and psychopathological findings. *Human psychopharmacology*, 37, e2815. doi: 10.1002/hup.2815

Philipova, T., Ivanova, T., Pavlova, E., Kasakov, L., & Vlaskovska, M. (2003). Nandrolone modulates the non-opioid and opioid analgesia and tolerance/dependence: role of sexual dimorphism. *Archives of physiology and biochemistry*, 111, 429–436. <https://doi.org/10.3109/13813450312331342283>

Saigusa, T., Aono, Y., Mizoguchi, N., Iwakami, T., Takada, K., Oi, Y., Ueda, K., Koshikawa, N., & Cools, A. R. (2008). Role of GABA_B receptors in the endomorphin-1-, but not endomorphin-2-, induced dopamine efflux in the nucleus accumbens of

freely moving rats. *European Journal of Pharmacology*, 581, 276–282.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.008>

Saigusa, T., Aono, Y., Sekino, R., Uchida, T., Takada, K., Oi, Y., Koshikawa, N., & Cools, A. R. (2009). Contribution of vesicular and cytosolic dopamine to the increased striatal dopamine efflux elicited by intrastriatal injection of SKF38393. *European Journal of Pharmacology*, 624, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.10.005>

Saigusa, T., Aono, Y., Sekino, R., Uchida, T., Takada, K., Oi, Y., Koshikawa, N., & Cools, A. R. (2012). In vivo neurochemical evidence that newly synthesised GABA activates GABA_B, but not GABA_A, receptors on dopaminergic nerve endings in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuropharmacology*, 62, 907–913.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.09.021>

Saigusa, T., Aono, Y., Uchida, T., Takada, K., Verheij, M. M., Koshikawa, N., & Cools, A. R. (2012). The α 1-, but not α 2-, adrenoceptor in the nucleus accumbens plays an inhibitory role upon the accumbal noradrenaline and dopamine efflux of freely moving rats. *European Journal of Pharmacology*, 688, 35–41.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.05.005>

Saigusa, T., Aono, Y., & Waddington, J. L. (2021). Integrative opioid-GABAergic neuronal mechanisms regulating dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving animals. *Pharmacological Reports*, 73, 971–983.
<https://doi.org/10.1007/s43440-021-00249-9>

Saigusa, T., Fusa, K., Okutsu, H., & Koshikawa, N. (2001). Monitoring of

extracellular dopamine levels in the dorsal striatum and the nucleus accumbens with 5-minute on-line microdialysis in freely moving rats. *Journal of Oral Science*, 43, 129–134. <https://doi.org/10.2334/josnusd.43.129>

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., Arch, J. R., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., Bergsma, D. J., & Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92, 573–585. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80949-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80949-6)

Smart, D., Sabido-David, C., Brough, S. J., Jewitt, F., Johns, A., Porter, R. A., & Jerman, J. C. (2001). SB-334867-A: The first selective orexin-1 receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 132, 1179–1182. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703953>

Spanagel, R., Herz, A., & Shippenberg, T.S. (1992). Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 2046–2050. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.6.2046>.

Spear, L.P. (2015). Adolescent alcohol exposure: Are there separable vulnerable periods within adolescence? *Physiology & behavior*, 148, 122–130. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.01.027.

Spear, L. (2000). Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol research and health*, 24, 115–123.

Srinivasan, S., Simms, J. A., Nielsen, C. K., Lieske, S. P., Bito-Onon, J. J., Yi, H., Hopf, F. W., Bonci, A., & Bartlett, S. E. (2012). The dual orexin/hypocretin receptor antagonist, almorexant, in the ventral tegmental area attenuates ethanol self-administration. *PLoS ONE*, 7, e44726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044726>

Strahm, E., Sjöberg, U., Garle, M., Rane, A., & Ekström, L. (2013). Implication of Human UGT2B7, 2B15, and 2B17 in 19-Norandrosterone Metabolism. *Frontiers in endocrinology*. 4, 75. <https://doi: 10.3389/fendo.2013.00075>.

Takahashi, M., Tatsugi, Y., & Kohno, T. (2004). Endocrinological and pathological effects of anabolic-androgenic steroid in male rats. *Endocrine journal*, 51, 425–434. <https://doi.org/10.1507/endocrj.51.425>

Thorpe, A. J., & Kotz, C. M. (2005). Orexin A in the nucleus accumbens stimulates feeding and locomotor activity. *Brain Research*, 1050, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.045>

Tsutsui, K.T., Wood, R.I., & Craft, R.M. (2011). Anabolic-androgenic steroid effects on nociception and morphine antinociception in male rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99, 500–508. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.04.023>

Vittoz, N. M., & Berridge, C. W. (2006). Hypocretin/orexin selectively increases dopamine efflux within the prefrontal cortex: Involvement of the ventral tegmental

area. *Neuropsychopharmacology*, 31, 384–395.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300807>

Wang, C., Wang, Q., Ji, B., Pan, Y., Xu, C., Cheng, B., Bai, B., & Chen, J. (2018). The orexin/receptor system: Molecular mechanism and therapeutic potential for neurological diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 220.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00220>

Watanabe, Y., Aono, Y., Komiya, M., Waddington, J. L., & Saigusa, T. (2018). Stimulation of accumbal GABA_B receptors inhibits delta1- and delta2-opioid receptor-mediated dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *European Journal of Pharmacology*, 837, 88–95.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.003>

White, J.P., Gao, S., Puppa, M.J., Sato, S., Welle, S.L., & Carson, J.A. (2013). Testosterone regulation of Akt/mTORC1/FoxO3a signaling in skeletal muscle. *Molecular and cellular endocrinology*, 365, 174–186.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.10.019>

Winrow, C. J., & Renger, J. J. (2014). Discovery and development of orexin receptor antagonists as therapeutics for insomnia. *British Journal of Pharmacology*, 171, 283–293. <https://doi.org/10.1111/bph.12261>

Wood, R.I. (2008). Anabolic-androgenic steroid dependence? Insights from animals and humans. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29, 490–506. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2007.12.002>

Yamaguchi, M., Ishikawa, M., Aono, Y., & Saigusa, T. (2020). OX₂ receptors mediate the inhibitory effects of orexin-a on potassium chloride-induced increases in intracellular calcium ion levels in neurons derived from rat dorsal root ganglion in a chronic pain model. *Neuropsychopharmacology Reports*, 40, 30–38. <https://doi.org/10.1002/npr2.12094>

Yazdi-Ravandi, S., Razavi, Y., Haghparast, A., Goudarzvand, M., & Haghparast, A. (2014). Orexin a induced antinociception in the ventral tegmental area involves D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 126, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.08.009>

Yu-Yahiro J.A., Michael R.H., Nasrallah D.V., & Schofield B. (1989). Morphologic and histologic abnormalities in female and male rats treated with anabolic steroids. *The American journal of sports medicine*, 17, 686–689. <https://doi.org/10.1177/036354658901700517>

Zotti, M., Tucci, P., Colaianna, M., Morgese, M.G., Mhillaj, E., Schiavone, S., Scaccianoce, S., Cuomo, V., & Trabace, L. (2014). Chronic nandrolone administration induces dysfunction of the reward pathway in rats. *Steroids*, 79, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2013.10.005>

参考論文

本論文は、主となる参考論文 "*In vivo* microdialysis reveals that blockade of accumbal orexin OX₂ but not OX₁ receptors enhances dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats, European Journal of Neuroscience 55. 733–745, 2022" および 副となる参考論文 "Adolescence as a critical period for nandrolone-induced muscular strength in relation to abuse liability, alone and in conjunction with morphine, using accumbal dopamine efflux in freely moving rats, Synapse, in press" をまとめたものである。