

生 物 試 験 部 門

| | | |
|-------|---------|--------|
| 教 授 | 渡 辺 裕 司 | (薬学博士) |
| 助 教 授 | 松 本 欣 三 | (薬学博士) |
| 助 手 | 東 田 道 久 | (薬学博士) |
| 文部技官 | 村 上 孝 寿 | (薬学修士) |

本部門では、和漢薬の新しい薬効評価法を確立するための基礎研究、和漢薬の中枢作用を定量的に評価すると共にその作用本体を追究する研究、それらの作用機序を分子レベルで明らかにするための研究を行っている。

本年の主な研究課題と成果は下記の通りである。

I. 和漢薬の新しい薬効評価法の確立のための基礎研究

1) 学習障害モデル動物としての両側内頸動脈永久結紮ラット

同結紮ラットでは、慢性的に脳血流量が減少し、受動回避行動および八方向放射状迷路における学習能力が徐々に低下することを認め、痴呆モデル動物として有用であることを示した。

2) 各種モデル動物を用いた和漢薬の抗痴呆効果に関する研究

スコポラミン誘発学習障害に対して改善作用を示した四物湯および人参の作用を、両側総頸動脈永久結紮ラットを用いて検討し、四物湯が脳組織障害を保護する作用を有すること、人参が神経症状・異常行動を改善する可能性のあることを示した。また芍薬成分 paeoniflorin は前脳基底核破壊ラットの学習行動を改善すること、およびその類縁体もスコポラミン誘発学習障害に有効であることを見出した。

3) 興奮性アミノ酸受容体の学習行動への関与の解明

スコポラミン投与による学習障害モデル動物を用い、NMDA 受容体遮断薬が障害を増強するが、AMPA 受容体遮断薬は関与しないことを示した。

II. 中枢作用薬の神経薬理学的研究

1) 長期隔離飼育マウスの攻撃行動発症機序の解明

長期隔離ストレスによってマウスのペントバルビタール睡眠時間が短縮するが、この作用にはニューロステロイドおよびベンゾジアゼピン作動性内因性物質による GABA_A 受容体活性が関与することを見出した。

2) 脳線条体アセチルコリン遊離機序の解明

マイクロダイアリシス法により、線条体内でのアセチルコリン遊離抑制に、シナプス前 M2 ムスカリン受容体ならびに、ドパミンによるムスカリンオートレセプター制御機構が関与することを示した。

III. 遺伝子発現変化を指標とした薬物作用機序の解明と和漢薬作用

1) 抗うつ薬および補中益気湯連投によるセロトニン 2C 受容体 (5-HT_{2C}) mRNA 量の増大

イミプラミンを経口投与すると、投与日数、用量に依存して、脳内の 5-HT_{2C} mRNA 量が増大することを見出した。また、補中益気湯でも同様の作用が見られた。

2) 抗うつ薬連投により誘導される遺伝子の単離

イミプラミン連投により誘導される遺伝子 DRF24 を differential display 法により単離した。

IV. 新規リード化合物の検索を目指した各種民族薬の薬理作用の解明

1) ベトナム人参の抗ストレス作用

ベトナム人参およびその主成分である Majonoside R2 は、心理的ストレスによって生ずる抗侵害受容効果、ペントバルビタール睡眠短縮、胃潰瘍を抑制することにより、抗ストレス作用を有することを示した。

2) タイ薬用植物 *mitragyna speciosa* の成分 mitragynine の抗侵害受容作用とその作用機序

Mitragynine には抗侵害受容（鎮痛）作用があり、その機序に下行性ノルアドレナリン、およびセロトニン神経系、ならびに δ opioid 受容体が関与することを見い出した。

3) タイ薬用植物の薬理作用

Pluchea indica 根エキスが隔離飼育によって短縮した睡眠を回復させること、*Hunteria zeylanica* 葉エキ스가睡眠増強（抑制性）と痙攣増強（興奮性）の相反する作用を持つこと、ならびに *Pandanus odoratus* には血糖低下作用のあることを明らかにした。

4) *Harmala alkaloid* のセロトニンシンドロームおよび体温調節に及ぼす作用

Harmaline はセロトニン取り込み阻害作用の他に、pargyline による MAO 阻害に対する拮抗作用も有する可能性を示した。

I. 和漢薬の新しい薬効評価法の確立のための基礎研究

1. 学習障害モデル動物としての両側内頸動脈永久結紮ラット

1) Permanent Occlusion of Bilateral Internal Carotid Arteries Produces Cognitive Deficits in Two Learning Behavior Tasks

We investigated the effects of permanent bilateral occlusion of the internal carotid arteries (2ICAO) on the learning and memory performances in rats to evaluate the permanent 2ICAO rats as a model for vascular dementia (Fig. 1). The learning and memory performance was tested by a step-through passive avoidance task and an 8-arm radial maze task. Permanent 2ICAO decreased cerebral blood flows in the cortex and hippocampus by 46.3 ± 3.3 and 21.1 ± 4.6 %, respectively, when measured at 15 min after occlusion. In the passive avoidance task, the 2ICAO rats showed no impairment of learning or of memory retention when tested 1 h after learning trial, while they showed a shorter latency than sham-operated rats when tested 24 h after learning trial. In the radial maze learning task, the non-pretrained 2ICAO rats showed impairment. The pretrained 2ICAO rats had no deficit in the radial maze retention task but they showed impair-

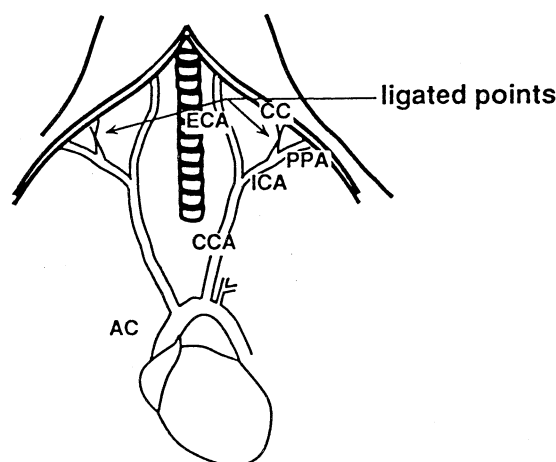


Fig. 1 Schematic drawing of the surgical operation to ligate internal carotid artery. Arrows indicate the parts of ligation. AC : arcus aortae ; CC : carotid canal ; CCA : common carotid artery ; ECA : external carotid artery ; ICA : internal carotid artery ; PPA : pterygo-palatine artery.

ed performance when a 3-min delay was interposed in the task (Fig. 2) These results suggest that permanent 2ICAO is a useful animal model for studying vascular dementia.

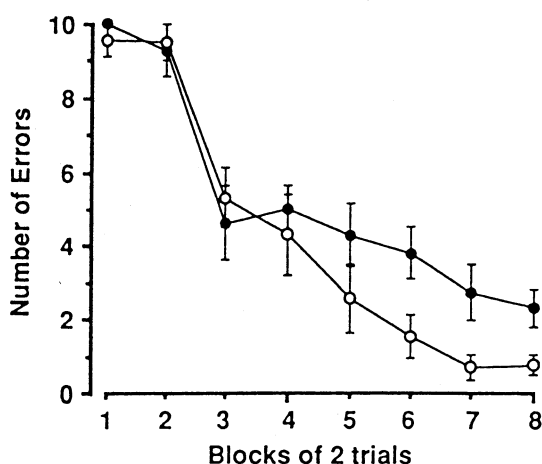


Fig. 2 The effect of permanent 2ICAO on the learning in an 8-arm radial maze task. The learning test were started 3 days after the operation. Each datum represents as the mean \pm SEM. Open and closed circles represent the data observed from sham (n=7) and 2ICAO operated rats (n=10), respectively.

2. 各種モデル動物を用いた和漢薬の抗痴呆効果に関する研究

1) 慢性脳虚血ラットの学習行動障害に対する四物湯の影響

四物湯には補血作用があり、血虚の状態にある冷え性などの婦人病治療薬として使用されている。一方、脳血管性記憶障害の発症には慢性的な脳血流量の低下が関与することが示唆されており、補血作用を有する方剤による改善効果が期待される。そこで、慢性脳虚血モデルを用い、四物湯の本モデル動物の学習障害に対する効果を検討した。Wistar 系雄性ラット (13週齢) を用い、ペントバルビタール麻酔下で両側総頸動脈を永久結紮した。四物湯 (0.3, 1.0 g/kg/day) は手術の3日前から実験終了まで給水瓶で投与した。8方向放射状迷路課題：最初の誤選択を犯すまでの正選択数 (初期正反応数) と試行終了までに犯した誤選択数を指標として、課題習得に対する影響を検討した。自発運動量測定：床を17セクションに区切ったオープンフィールドを使用し、15分間の観察時間中に各セクションを横切った回数及び立ち上がり行動数を測定した。強制水泳試験：水の入った円筒容器にラットを入れて5分間強制的に水泳させ、ラットの不動時間を測定した。脳組織学的観察：行動試験終了後、脳組織切片を作製し、脳組織観察を行った。その結果、手術後1~2ヶ月で、虚血群には偽手術群と比べ著明な課題習得障害が誘発された。しかし、虚血群に四物湯 0.3-1.0 g/kg を

投与しても習得障害は改善されなかった。虚血群の運動量及び立ち上がり行動は偽手術群に比べて有意に高い値を示した。しかし、四物湯投与は脳虚血群の運動量及び立ち上がり行動数に有意な影響は与えなかった。虚血群では偽手術群と比べ不動時間の延長が認められなかった。脳虚血群に対する四物湯の影響は、現在検討中である。手術4ヶ月後に観察された虚血群の脳器質的障害に対する四物湯の保護作用が弱いながら認められた。

2) 両側総頸動脈永久結紮ラットの学習行動と脳組織に対する薬用人参の影響

今日、情動・記憶障害を伴う老年期痴呆症は社会問題として深刻化している。痴呆症患者では記憶・学習に重要な役割を果たしている中枢コリン神経系の著しい障害が認められる。薬用人参は scopolamine 誘発の学習障害を改善する報告があり、コリン神経系の関与が考えられる。そこで、本実験では脳血管性痴呆の動物モデルとして両側総頸動脈永久結紮ラット (2VO モデル) を用いて、薬用人参とコリンエステラーゼ阻害剤 tetrahydroaminoacridine (THA) の学習記憶障害に対する作用を放射状迷路課題を用いて検討した。また、2VO モデルの行動及び脳組織学的変化に対する薬用人参の影響も併せて検討した。

2VO 手術：Wistar 系雄性ラット (13週齢) をペントバルビタール麻酔下で左右の総頸動脈を永久結紮した。8方向放射状迷路課題：試験の指標として試行毎の誤選択数を用いた。薬用人参熱水抽出エキス (GIN) は毎日飲水として与え、THA は迷路行動試験の30分前に腹腔内投与した。4-アーム餌置き法：8本のアーム中、ラット毎に固定した4本のアームにのみ餌を置いた。ラットが試行内で既に餌を取ったアームに入る誤選択を「作業記憶のエラー」、いつも餌を置いていないアームに入る誤選択を「参照記憶のエラー」とし、各々のエラー数を試験の指標とした。THA は迷路行動試験の30分前に腹腔内投与した。オープンフィールド試験：直径125 cmの正八角形フィールドを17区画に分け、その中央にラットを置き15分間行動観察した。分割線を横切る行動と立ち上がり行動を記録した。脳組織観察：結紮2ヶ月後にラットの脳を灌流固定し、14 μ mの脳切片を作製した。この切片を0.5% cresyl violet で染色後、光学顕微鏡で観察した。

8方向放射状迷路課題では2VO群のエラー数は sham 群に比べて有意に多かった。THA (0.1, 0.3 mg/kg) は2VO群のエラー数を有意に低下させたが、GIN (2, 4 g/kg) に有意な作用は認められなかった。4-アーム餌置き法では2VO群のエラー数は sham 群に比

べて有意に多かった。THA (0.3 mg/kg) は2VO 群の作業記憶エラー数を有意に低下させたが、参照記憶エラー数は改善しなかった。2VO 群の自発運動量はsham 群に比べて有意に多く、GIN (2, 4 g/kg) はこの増加した自発運動量を減少させる傾向を示した。2VO 群では特に大脳皮質、線条体及び海馬に細胞の萎縮などの組織学的変化が認められたが、GIN (2, 4 g/kg) はこのような組織学的変化に影響しなかった。

本実験で用いた2VO モデルにみられる学習記憶障害にも中枢コリン神経系が関与し、THA によりコリン神経系が賦活されたと考えられる。薬用人参にはscopolamine 誘発の学習障害を改善する報告があるが、今回の2VO モデルでは学習障害及び組織変性の改善作用は認められなかった。その理由として、成分あるいは代謝物の脳組織への移行能が低いことが考えられる。また、薬用人参は虚血に伴う神経症状や異常行動を改善する可能性が考えられる。

3) 前脳基底核破壊ラットの明暗弁別学習障害に対する paeoniflorin の作用

先に我々は8方向放射状迷路課題を用い、芍薬成分のペオニフロリン (PAE) が抗コリン薬およびラット前脳基底核 (nBM) 片側性破壊によって生じる空間認知障害を改善することを報告した。そこで今回は非空間学習課題としてオペラント明暗弁別学習課題を用い、片側 nBM を破壊したラットにおける明暗弁別学習障害とそれに対する PAE の作用を調べ、併せて抗痴呆薬タクリン (THA) と比較検討した。

実験には Wistar 系雄性ラット (体重 320-420 g) を用いた。オペラント実験箱内でレバーを押して餌を取る行動 (FR10) を充分習得させた後、nBM 破壊手術を行った。1週間後、再び FR10 でレバー押し行動をさせ、安定した行動が再現されることを確認後、明暗弁別学習課題を開始した。本課題は3分毎に実験箱内の照明を点灯する明期と消灯する暗期を繰り返し、暗期をレバーを押しても餌がでない無効反応期とした。1試行は24分間とし、1日1試行を行った。無効反応期のレバー押し回数と総レバー押し回数との比率 (無効反応率) を弁別行動習得の指標とした。PAE (0.01 及び 0.1 mg/kg) は毎試行の90分前に、また THA (0.3 mg/kg) は60分前に nBM 破壊群に経口投与した。nBM 破壊手術: イボテン酸 (7.5 mg/0.5 μ l) を前脳基底核 (P1.3, L2.4, V7.4 mm) に注入した。偽手術群には溶媒のみを注入した。

その結果、nBM 破壊群では習得訓練開始前期 (1~5 日) の無効反応率は対照群に比べて高値を示し、有意な習得遅延が認められた。しかし最終習得到達レベル

は両群で差がなかった。THA (0.3 mg/kg/day) 投与群の無効反応率は破壊対照群に比べ有意に低下した。PAE (0.1 mg/kg/day) 投与群も THA と同様に有意に無効反応率を低下させたが、PAE (0.1 mg/kg/day) 投与群では破壊対照群に比べて無効反応率に有意な差は認められなかった。以上の結果より nBM 片側破壊によって起こる非空間的学習障害に対しても低用量の PAE が有効であることが明らかとなった。

4) Effects of paeoniflorin and paeonifloin-related glycosides on scopolamine-induced disruption of radial maze performance in rats

Effects of glycoside constituents of peony root, paeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin and albiflorin, on scopolamine-induced spatial cognitive impairment were investigated using an eight-arms radial maze task in rats. Paeoniflorin (0.01-0.1 mg/kg, *p.o.*), oxypaeoniflorin (0.01-0.1 mg/kg, *p.o.*) and benzoylpaeoniflorin (0.3-3 mg/kg, *p.o.*), constituent which have a cage-like skeleton with acetal and hemiketal structure, dose-dependently attenuated the scopolamine (0.3 mg/kg, *i.p.*)-induced decrease in the choice accuracy. The ameliorative effects of these constituents decreased at large doses. On the other hand, albiflorin (0.01-1 mg/kg, *p.o.*), which has a lactone ring in the pinane skeleton, had no effect on the maze performance disrupted by scopolamine. These results suggest that not only paeoniflorin but also oxypaeoniflorin and benzoylpaeoniflorin ameliorate spatial cognitive impairment, and that a pinane skeleton including acetal and hemiketal structure may play an important role in the ameliorating effect.

スコポラミンで誘発したラットの空間認知障害に対する芍薬中の配糖体成分の影響について、8方向放射状迷路課題を用いて検討した。Pinane 骨格上にアセターおよびヘミケター構造をもつペオニフロリン (0.01-0.1 mg/kg, *p.o.*), オキシペオニフロリン (0.01-0.1 mg/kg, *p.o.*), およびベンゾイルペオニフロリン (0.3-3 mg/kg, *p.o.*) は用量依存的にスコポラミン誘発の迷路行動障害に拮抗したが、高用量では拮抗作用の減弱が認められた。一方、Pinane 骨格にラクトン環を有するアルビフロリンは (0.01-0.1 mg/kg, *p.o.*) はこの迷路行動障害に影響を与えなかった。以上の成績はペオニフロリンのみならず、オキシペオニフロリンおよびベンゾイルペオニフロリンにも空間認知障害改善作用があること、およびこれらの成分中のアセター

ルおよびヘミケタール構造を有する“cage-like“ pinane 骨格が改善効果発現に重要であることが示唆された。

3. 興奮性アミノ酸受容体の学習行動への関与機構の解明

NMDA-but not AMPA-receptor antagonists augment scopolamine-induced spatial cognitive deficit of rats in a radial maze task

The effect of NMDA and AMPA receptor antagonists on a scopolamine-induced spatial cognitive deficit was investigated in rats using an 8-arm radial maze. The NMDA antagonists, MK801 and CGS19755, robustly augmented scopolamine-induced deficits but had no effect on spatial cognition when administered alone. In contrast, augmentation of the scopolamine-induced deficits was not observed when the selective AMPA antagonist, YM90K, was administered with scopolamine. These results suggest that the NMDA but not AMPA subtypes of the ionotropic glutamate receptors play important roles in regulation of the central cholinergic function related to the spatial learning and memory processes.

文 献

- 1) Matsumoto, K., Ohta, H., Ni, J. W., Nishi, K., Shimizu, M. and Watanabe, H. (1996) Ameliorating effects of peony and its major constituent, paeoniflorin, on spatial cognitive deficits in a radial maze task in rats. *Int. Acad. Biomed. Drug Res.*, 11, 259-264.
- 2) Ni, J. W., Matsumoto, K. and Watanabe, H. (1996) Tetramethylpyrazine improves spatial cognitive impairment induced by chronic mild ischemia and by scopolamine in rats. *Int. Acad. Biomed. Drug Res.*, 11, 227-231.
- 3) Watanabe, H., Ni, J. W., Sakai, Y., Matsumoto, K., Murakami, Y. and Tohda, M. (1996) Permanent occlusion of bilateral internal carotid arteries produces cognitive deficits in two learning behavior tasks. *Jan. J. Psychopharmacol.*, 16, 19-24.
- 4) Li, H. B., Matsumoto, K., Tohda, M., Yamamoto, M. and Watanabe, H. (1996) NMDA-but not AMPA-receptor antagonists augment scopolamine-induced spatial cognitive deficit of rats in a radial maze task. *Brain Res.*,

725, 268-271.

- 5) Akazawa K., Matsumoto K., Shimizu M., Ichiki H., Maruno M. and Watanabe H. (1996) Effects of paeoniflorin and paeoniflorin-related glycosides on scopolamine-induced disruption of radial maze performance in rats. *J. Trad. Med.*, 13, 243-247.
- 6) 渡辺裕司 (1996) 老齢ラットの学習行動障害に対する薬用人参の影響. 漢方と最新治療, 5, 281-286.

学会発表

- 1) 松本欣三, 赤澤康平, 村上孝寿, 清水岑夫, 一木宏之, 丸野政雄, 渡辺裕司: 前脳基底核破壊ラットの明暗弁別学習障害に対する paeoniflorin の作用. 第13回和漢医薬学会大会, 1996, 8, 富山.
- 2) 酒井啓之, 村上孝寿, 東田道久, 松本欣三, 渡辺裕司: 慢性脳虚血ラットの学習行動障害に対する四物湯の影響. 第13回和漢医薬学会大会, 1996, 8, 富山.

II. 中枢作用薬の神経薬理学的研究

1. 長期隔離飼育マウスの攻撃行動発症機序の解明

1) ストレスと薬物誘発睡眠の変化

今日, 社会の急速な発展に伴い様々な物理的・心理的なストレスに晒される機会が増大している。こうしたストレスは心身症や神経症の発症に深く関わっていることが知られているが, その発症メカニズムは不明である。我々はこれまでマウスに長期隔離飼育ストレスを負荷すると pentobarbital (PB) で誘発した睡眠時間が短縮し, この短縮に中枢ノルアドレナリン神経系及び CRF 神経系の活動変化が関与することを明らかにしてきた。一方, 脳内には GABA_A 受容体に作用するニューロステロイドや内因性 benzodiazepine (BZD) 受容体結合物質の存在が報告されている。そこで隔離飼育ストレスによる PB 睡眠短縮にこれらニューロステロイド及び内因性 BZD 受容体作用物質が関与する可能性を検討した。

実験動物: ddY 系雄性マウス (4 週齢) を飼育ケージに 5~6 週間, 隔離飼育または 1 ケージ (24×17×12 cm) 当たり 5 匹で群居飼育したものをそれぞれ隔離群及び群居群として実験に用いた。また一部のマウスには副腎摘出術を施し, その 1 週間後に実験に用いた。**PB 誘発睡眠:** 実験時に PB-Na (PB) 50 mg/kg を腹腔内投与した後, 正向反射が消失している時間を PB 誘発睡眠時間として測定した。他の試験薬は PB 投与の 30 分前に脳室内投与または 60 分前に腹腔内投与した。**GABA 誘発 ³⁶Cl⁻ uptake とそれに対する PB 及び**

diazepam (DZ) の影響：群居飼育及び隔離飼育マウスの小脳を除く全脳から常法に従ってシナプトニューロソーム (SNS) を調製した。SNS を $^{36}\text{Cl}^-$ (0.2 μCi) 及び GABA (0.6–200 μM) と 30°C で 3 秒間インキュベート後、濾過法により $^{36}\text{Cl}^-$ uptake を停止した。PB 及び DZ の影響を検討する場合は SNS を予めこれらの薬液と 3 分間プレインキュベートした後、0.5 μM GABA 及び $^{36}\text{Cl}^-$ (0.2 μCi) を添加して反応を開始した。

ニューロステロイドの影響：隔離群における PB 誘発睡眠時間は群居群に比べ著しく短かった。副腎摘出は隔離飼育ストレスによる PB 睡眠の短縮に影響を及ぼさなかった。GABA_A 作動性ニューロステロイドとして tetrahydrodeoxycorticosterone (THDOC) 及び allotetrahydrodeoxycorticosterone を腹腔内投与あるいは脳室内投与した場合、隔離群の PB 睡眠のみを用量依存的に延長した。一方、GABA_A 拮抗性ニューロステロイド pregnenolone sulfate (PS) は逆に群居群の PB 睡眠のみを用量依存的に短縮し、隔離群の睡眠には無効であった。群居群の PB 睡眠に対する PS の効果は群居群には影響しない用量の THDOC の併用により拮抗された。従って隔離飼育ストレスによる PB 睡眠の短縮に副腎ステロイドホルモンは関与しないこと、並びに本ストレス負荷によって GABA_A 受容体機能を抑制するニューロステロイドが増加、又はそれを促進するニューロステロイドが減少し、その結果、PB の催眠作用が低下するものと考えられた。

内因性 BZD 受容体逆作動性物質関与の可能性：DZ (0.1–0.8 mg/kg, i.p.) は用量依存的に群居群及び隔離群の PB 誘発睡眠を延長したが、BZD 受容体逆作動薬 FG7142 (5–10 mg/kg, i.p.) は群居群の睡眠時間のみを短縮した。一方、BZD 受容体拮抗薬 flumazenil (16–33 nmol, i.c.v.) は隔離群の PB 誘発睡眠のみを用量依存的に群居群レベルまで延長した。また flumazenil は隔離群の PB 睡眠を延長した用量 (33 nmol, i.c.v.) で群居群における DZ 及び FG7142 の効果を完全に抑制した。群居飼育及び隔離飼育したマウスの脳 SNS への $^{36}\text{Cl}^-$ uptake は GABA により濃度依存的に増加した (Fig. 4)。 $^{36}\text{Cl}^-$ uptake に対する GABA の促進効果は群居群に比べ、隔離群の脳 SNS で低下していた。DZ 及び PB は GABA で刺激した $^{36}\text{Cl}^-$ uptake を濃度依存的に促進したが、それらの効果は両群で差がなかった。

以上の成績から隔離飼育ストレスによる PB 睡眠の短縮に BZD 受容体逆作動性の内因性物質も関与する可能性が示唆された。

2) Neurosteroidal modulation of social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep in mice

Stressful manipulations are known to change the level of neurosteroids capable of interacting with GABA_A receptor in the brain. To clarify the involvement of these neurosteroids in social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep in mice, we examined the effects of 3 β -hydroxy-5-pregnen-20-one-3-sulfate (pregnenolone sulfate, PS), a steroidal GABA_A antagonist, and 3 α , 21-dihydroxy-5 α -pregnan-20-one (allo-THDOC) and 3 α , 21-dihydroxy-5 β -pregnan-20-one (THDOC), positive allosteric modulators of the GABA_A receptor, on the hypnotic activity of pentobarbital in socially isolated mice. Pentobarbital (50 mg/kg, i.p.)-induced sleep was significantly shorter in isolated mice than in group-housed mice and adrenalectomy had no effect on the decrease of pentobarbital sleep following social isolation. PS (5–10 mg/kg, i.p. or 12–24 nmol, i.c.v.) decreased pentobarbital sleep in group-housed mice in a dose-dependent manner without affecting the sleep in socially isolated mice (Fig. 3). In contrast, allo-THDOC (14.9–37.4 nmol, i.c.v.) and THDOC (5–12.5 mg/kg, i.p. or 14.9–37.4 nmol, i.c.v.) reversed the pentobarbital sleep decreased by social isolation to the level in group-housed mice (Fig. 3). These steroids had no effect on the pentobarbital sleep in group-housed mice. Such a reversing effect of THDOC in isolated mice was significantly blocked by PS (24 nmol, i.c.v.). Moreover, i.c.v. injection of yohimbine (30 nmol), methoxamine (200 nmol) and CRF (2.1 nmol) significantly decreased pentobarbital sleep in group-housed mice but not that in isolated mice. The effects of these drugs on pentobarbital sleep in group-housed mice were significantly attenuated by THDOC (12.5 mg/kg, i.p.). These results suggest that changes in the level of neurosteroids with ability to modulate GABA_A receptor function are involved in social isolation-induced decrease in the hypnotic activity of pentobarbital in mice.

3) Influence of benzodiazepine receptor ligands on pentobarbital-induced sleep in socially isolated mice.

To clarify whether the GABA_A/benzodiazepine receptor (BZR) system is involved in a decrease in

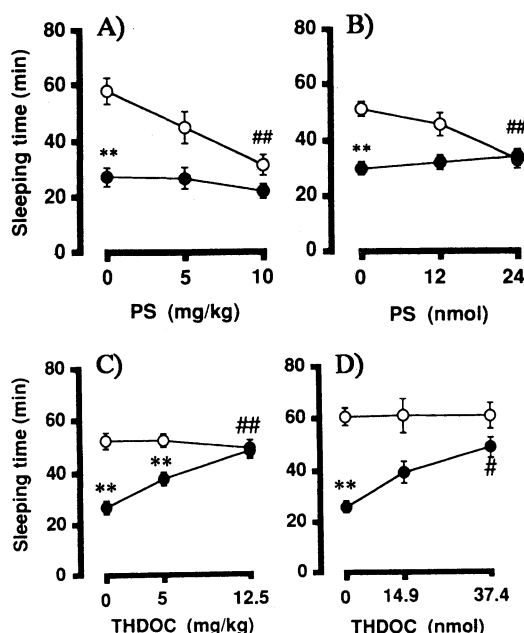


Fig. 3 Effects of pregnenolone sulfate (PS), 3α , 21-dihydroxy- 5β -pregnan-20-one on pentobarbital-induced sleep in group-housed and isolated mice. Animals were either isolated (closed circles) or group-housed (open circles) for 7 weeks before the experiments. Pregnenolone sulfate was injected i.p. (A: 5–10 mg/kg) and i.c.v. (B: 12–24 nmol/mouse) 60 and 30 min before pentobarbital injection, respectively. C, D: THDOC was injected i.p. (C: 5–12.5 mg/kg) and i.c.v. (D: 14.9–37.4 nmol/mouse) 60 and 30 min before pentobarbital injection, respectively. After injecting pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), the sleeping time was measured. Each point represents the mean \pm S.E.M. of 8–10 mice. $**p < 0.01$ compared with group-housed mice. $\#p < 0.05$ and $##p < 0.01$ compared with respective vehicle-treated group.

the hypnotic activity of pentobarbital (PB) by social isolation stress, we examined the effects of BZR ligands on the PB-induced sleep in group-housed (GM) and socially isolated mice (IM). Moreover, we tested whether social isolation stress changes the efficacy of GABA to stimulate $^{36}\text{Cl}^-$ uptake into synaptoneurosomes prepared from mouse brain. Social isolation stress significantly decreased PB-induced sleeping time in mice. The BZR agonist diazepam (0.1–0.8 mg/kg, i.p.) dose-dependently prolonged PB sleep in both GM and IM, however, IM exhibited less sensitivity to diazepam than GM, in terms of PB sleep. In contrast, FG7142 (5–10 mg/kg, i.p.), a BZR inverse agonist, shortened the sleep in GM but not in IM. Flumazenil (16.5–33 nmol/mouse, i.c.v.), a selective BZR antagonist, not only antagonized the effects of diazepam and FG7142 on PB sleep in GM, but also reversed the shortened PB sleep in IM to the level of GM. Though, social isolation stress decreased the effect of GABA (0.1–3 μM) on $^{36}\text{Cl}^-$ uptake into synaptoneurosomes, it had no influence on PB- and diazepam-induced enhancement of GABA-stimulated $^{36}\text{Cl}^-$ uptake. These results suggest that endogenous substance(s) resembling an inverse BZR agonist is partly involved in a decrease in PB sleep following social isolation stress.

4) Flumazenil reverses the social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep: The possible involvement of endogenous benzodiazepine receptor ligands

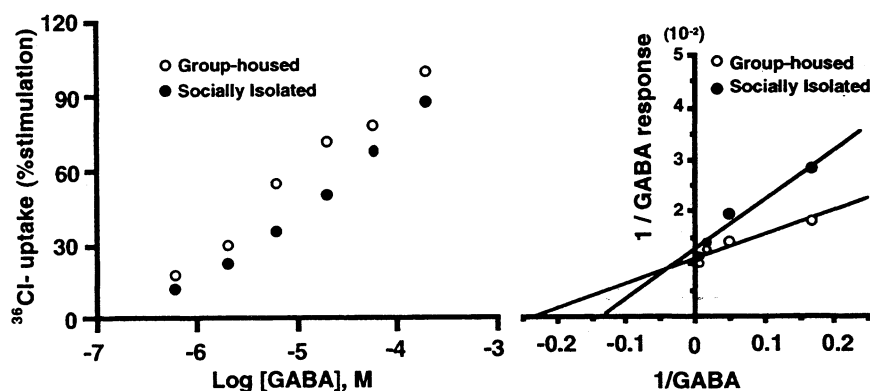


Fig. 4 Effect of social isolation stress on GABA-induced $^{36}\text{Cl}^-$ uptake into mouse synaptoneurosomes. Each point represents the mean value of 4 independent experiments.

Long-term social isolation stress has been shown to cause a decrease in pentobarbital (PB)-induced sleeping time in mice. In the present study, to clarify whether the GABA_A/benzodiazepine (BZD) receptor system is involved in this decrease in the hypnotic activity of PB by social isolation stress, we examined the effects of BZD receptor ligands on the PB-induced sleep in group-housed and socially isolated mice. Moreover, we also tested whether social isolation stress affects the ability of GABA to stimulate ³⁶Cl⁻ uptake or the modulatory effect of diazepam and PB on GABA-induced stimulation of ³⁶Cl⁻ uptake into synaptoneurosomes prepared from mouse brain.

Male ddY mice (4-weeks old) were either housed in groups of 5-6 per cage or isolated for 5-6 weeks before starting the experiments. PB-Na (50 mg/kg) was injected i.p. and PB-induced sleep in group-housed and isolated mice was measured as previously reported. Test drugs were injected i.p. or i.c.v. 60 or 30 min before PB injection, respectively.

Social isolation stress significantly decreased the PB-induced sleeping time in mice. The BZD receptor agonist diazepam (0.1-0.8 mg/kg, i.p.) dose-dependently prolonged PB sleep in group-housed and isolated mice, but the effect was weaker in isolated mice. In contrast, FG7142 (5-10 mg/kg, i.p.), a BZD receptor inverse agonist, shortened the sleep in group-housed but not in isolated mice. Flumazenil (16.5-33 nmol, i.c.v.), selective BZD receptor antagonist, caused PB sleep in isolated mice to return to the level of group-housed mice, at the dose that antagonized the effects of diazepam and FG7142 on PB sleep in group-housed mice. However, this antagonist alone produced no effect on PB sleep in group-housed mice. Social isolation stress decreased the ability of GABA (0.1-3 μ M) to stimulate ³⁶Cl⁻ uptake into synaptoneurosomes but this stress had no effect on PB- and diazepam-induced enhancement of GABA-stimulated ³⁶Cl⁻ uptake. These results suggest that endogenous substance(s) with an inverse BZD receptor agonist-like property and the changes in the ability of GABA to stimulate chloride ion channels are involved in the decrease in the hypnotic activity of pentobarbital following social isolation stress.

5) 長期隔離飼育マウスのペントバルビタール誘発睡眠と闘争行動に対する四物湯及びその構成生薬の作用

四物湯が、身体的侵襲を伴う低温下振盪ストレス負荷によって短縮された pentobarbital (PB) 誘発睡眠を回復させることが報告されている。しかし、ヒトにおけるストレスとしては、心理的なものが主である。そこで、今回、1つの情動ストレスを負荷する目的で、マウスを長期隔離飼育し、本動物における四物湯の抗ストレス作用について検討した。また、その構成生薬の1つである当帰についても同様に検討した。

実験には4週齢 ddY 雄性マウスを4-8週間、隔離飼育もしくは群居飼育したものを用い、薬物は測定の前1時間前に経口投与した。PB 誘発睡眠の測定：PB-Na (45 mg/kg ; i.p.) を投与し、マウスの正向反射が消失してから回復するまでの時間を睡眠時間として測定した。闘争行動の測定：隔離飼育マウス2匹を20分間同一小ケージに入れ、闘争行動 (biting attack or wrestling) の発現時間を測定した。自発運動量の測定：マウスを運動量測定装置 (SCANET-SV10) に入れ、30分間測定した。

1) 長期隔離飼育により、マウスの PB 誘発睡眠は著明に短縮された。当帰 (6.1 g/kg)、川芎 (5.8 g/kg) は、隔離群の睡眠群の睡眠時間を群居群レベルまで回復させた。2) 四物湯 (2.5-5 g/kg) は、用量依存的に攻撃時間を減少させた。当帰 (0.625-6 g/kg) は、攻撃時間を減少させる傾向を示したが、その効果は有意ではなかった。3) 隔離飼育したマウスでは、著明な自発運動量の増加が認められた。四物湯 (2.5 g/kg)、当帰 (6 g/kg) は、隔離群の自発運動量のみに影響し、群居群レベルまで回復させた。

隔離飼育による PB 誘発睡眠短縮に対し、四物湯では回復効果がなかったことから、当帰、川芎の効果が地黄や芍薬によって抑制されている可能性がある。また、四物湯の闘争行動抑制効果には、当帰以外の生薬が寄与していると考えられた。

四物湯と当帰は、PB 誘発睡眠と闘争行動に対する作用が異なるが、その作用は、いずれも情動ストレス負荷動物にのみ認められた。

2. 脳線条体内アセチルコリン遊離機序の解明

1) Effects of Oxotremorine and Pilocarpine on Striatal Acetylcholine Release as Studied by Brain Dialysis in Anesthetized Rats

The effects of oxotremorine and pilocarpine on striatal acetylcholine (ACh) release were investigated using brain microdialysis techniques in

urethan-anesthetized rats. Oxotremorine (0.1 and 0.5 mg/kg, IV), a preferential M₂ agonist, dose-dependently decreased ACh release in the striatum. On the other hand, pilocarpine, at 5 mg/kg (IV), showed a tendency to decrease ACh release in the striatum but, at 7.5 and 10 mg/kg (IV), significantly enhanced release in a dose-dependent manner. The effect of oxotremorine was blocked by scopolamine (0.1 mg/kg, IV) but not by pirenzepine (10 mg/kg, IV), a selective M₁ antagonist. Pilocarpine (10 mg/kg, IV) enhancement of striatal ACh release was not affected by 10 mg/kg pirenzepine, but 5 mg/kg pilocarpine significantly ACh release in scopolamine (0.1 mg/kg)-pretreated rats without affecting the release by itself. These results suggest that oxotremorine-induced decrease in striatal ACh release is due to stimulation of presynaptic M₂ autoreceptor, and that the increase of striatal ACh release by pilocarpine is mediated by mechanism(s) other than effects on muscarinic ACh receptors.

2) Pilocarpine-Induced Acetylcholine Release in the rat Striatum : an in vivo Dialysis Study

This study was undertaken to investigate the mechanism of ACh release induced by pilocarpine in the striatum of rats under anesthesia using microdialysis method. Intravenous injection of pilocarpine, a muscarinic partial agonist, tended to decrease ACh release at 5 mg/kg, while it increased the release at doses more than 7.5 mg/kg. Scopolamine, a muscarinic (M) antagonist, significantly increased the ACh release at doses of 0.1 and 0.3 mg/kg, i.v. A M₁ antagonist, pirenzepine (10 mg/kg, i.v.), significantly increased the ACh release. Pretreatment with scopolamine (0.1 mg/kg) synergistically enhanced the ACh release induced by pilocarpine (10 mg/kg). Pretreatment with pirenzepine (10 mg/kg) also showed a tendency to enhance the pilocarpine effect. Oxotremorine, a M receptor agonist, decreased ACh release at doses more than 0.1 mg/kg and the effect was blocked by scopolamine (0.1 mg/kg) but not by pirenzepine (10 mg/kg). Application of pilocarpine (0.1 to 10 mM) to the striatum via a dialysis tube increased the ACh release in a concentration dependent manner. The effect of pilocarpine was also enhanced by dopamine depletion with reserpine and α -methyl-p

-tyrosine in the striatum. These results suggest that high dose of pilocarpine increases ACh release after blocking the M autoreceptors and that dopamine modulates ACh release mechanism mediated by M autoreceptor stimulation in the rat striatum.

文 献

- 7) Matsumoto, K., Ojima, K. and Watanabe, H. (1996) Neurosteroidal modulation of social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep in mice. *Brain Res.*, 708, 1-6.
- 8) Tohda, M., Murayama, T., Nogiri, S. and Nomura, Y. (1996) Influence of aging on rolipram-sensitive phosphodiesterase activity and [³H] rolipram binding in the rat brain. *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 300-302.
- 9) Matsumoto, K., Asakura, W. and Watanabe, H. (1996) REM sleep deprivation-induced functional changes in the central catecholamine system and antidepressant-like action in experimental animals. *Meth. Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 18, 99-106.
- 10) Murakami, Y., Matsumoto, K., Ohta, H. and Watanabe, H. (1996) Effects of oxotremorine and pilocarpine on striatal acetylcholine release as studied by brain dialysis in anesthetized rats. *General Pharmacol.*, 27, 833-836.
- 11) 渡辺裕司 (1996) パーキンソン病治療薬「薬理学」(上), 高折修二, 福田英臣編, 484-494, 廣川書店.

学会発表

- 3) 松本欣三：ストレスと薬物誘発睡眠の変化。第2回行動薬理研究会ならびに神経行動薬理若手研究者の集い5周年記念シンポジウム, 1996, 3, 福岡.
- 4) 生島一真, 松本欣三, 東田道久, 渡辺裕司：隔離飼育ストレス負荷マウスの pentobarbital 誘発睡眠に対するベンゾジアゼピン受容体作用薬の影響。第69回日本薬理学会年会, 1996, 3, 長崎.
- 5) 松本欣三, 生島一真, 渡辺裕司：情動ストレスと睡眠薬の薬理。日本薬学会第116年会, 1996, 3, 金沢.
- 6) Watanabe, H., Murakami, Y. and Matsumoto, K. : Pilocarpine-induced acetylcholine release in the rat striatum : An in vivo dialysis study. 第11回ヨーロッパ神経化学会, 1996, 6, Groningen.
- 7) 河野慎一, 村上孝寿, 東田道久, 松本欣三, 渡辺裕司：長期隔離飼育マウスのペントバルビタール誘発睡眠と闘争行動に対する四物湯及びその構成

生薬の作用. 第13回和漢医薬学会大会, 1996, 8, 富山.

- 8) Matsumoto, K., Ojima, K. and Watanabe, H.: Flumazenil reverses the social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep: the possible involvement of endogenous benzodiazepine receptor ligands. 第18回日韓合同薬理セミナー, 1996, 11, Seoul,

III. 遺伝子発現変化を指標とした薬物作用機序の解明と和漢薬作用

1. 抗うつ薬および補中益気湯連投による5-HT_{2C}サブタイプ受容体 mRNA 量の増大

1) Imipramine-induced increase in 5-HT_{2C} receptor mRNA level in the rat brain

Repeated oral administration of 20 mg/kg imipramine elevated the level of 5-HT_{2C} mRNA in the rat brain. Hybridization signals in nearly all regions stained by digoxigenin-labeled antisense cRNA probe, such as the hippocampus, choroid plexus, habenular nucleus, and dorsomedial hypothalamic nucleus, were more intense following imipramine treatment (Table I). These results suggest that long-term treatment with imipramine stimulates 5-HT_{2C} receptor gene expression.

2) 補中益気湯によるセロトニン 2C mRNA 発現促進作用

和漢薬ならびに抗うつ薬はともにその効力を現わすには長期間の投与が必要とされていることから、遺伝

子発現変化が薬物作用に関与していることも考えられる。最近我々は、抗うつ薬 imipramine がラット脳内セロトニン 2C サブタイプ受容体 (5-HT_{2C}) mRNA を増大させることを報告した。今回、強制水泳試験法の結果より抗うつ作用を有することが期待されている補中益気湯の 5-HT_{2C} mRNA 量に及ぼす影響を検討した。

補中益気湯は、構成生薬全 98 g に 900 ml の蒸留水を加え、100°C 90 分間抽出した後、ろ液を凍結乾燥して用いた。薬物は Wistar 系雄性ラット (8 週齢, 投与前 248-262 g) に 1 日 1 回午後 3 時頃に経口投与した。最終投与 1 時間後に断頭、脳を取り出し、厚さ 16 μ m のスライス切片を作成、in situ hybridization 法により脳内各部位での 5-HT_{2C} mRNA 量を検討した。プローブとして、5-HT_{2C} の第 III 細胞内ループ配列 (1393-1629) を全て含む、全長 283nt (ベクター部を含む) のジゴキシゲニン標識 antisense cRNA を用いた。プローブとの結合は発色法により検出し、強度を NIH Image により定量した。

Imipramine による 5-HT_{2C} mRNA 誘導様式について検討したところ、脈絡叢において、濃度 (1-20 mg/kg) ならびに投与日数 (1-14 日間) に依存した誘導が見られた。mRNA 誘導は 4 日間でピークに達し、その後一定のレベルを維持した。補中益気湯 4 日間投与における 5-HT_{2C} mRNA 誘導を検討したところ、生薬換算量 5.7 g/kg において、対照群の約 1.4 倍に増大した。0.57 g/kg では無効であった (Fig. 5)。

強制水泳試験において、抗うつ効果を有することが示唆されている補中益気湯は、imipramine と同様にヒトの常用量の約 10 倍の用量で、ラット脳内の mRNA 量を増大させた。5-HT_{2C} はそれ自体が形質転換活性を有することが示されており、それに基づき新たな抗うつ関連因子の誘導も予想されるが、5-HT_{2C} mRNA 増大の生理的意義については、今後の検討が必要である。

2. 抗うつ薬連投により誘導される遺伝子の単離

1) Effects of imipramine and Bu Zhong Yi Qi Tang (補中益気湯) on 5-HT_{2CR} and a novel depression related gene (DRF 24) mRNA expression.

We previously reported that some antidepressants act as serotonin 2C subtype receptor (5-HT_{2C}) antagonists and Bu Zhong Ti Qi Tang has antidepressive effect. Here, we examined the influences of antidepressants on 5-HT_{2C} mRNA and a novel type of gene expression in the rat brain.

Table I Effects of repeated treatment with imipramine on 5-HT_{2C} mRNA expression in rat brain

| | Vehicle | Imipramine |
|-------------------------------------|------------------|-------------------|
| Blank | 100 \pm 1.2 | 100 \pm 2.2 |
| Choroid plexus of lateral ventricle | 181.0 \pm 10.4 | 236.0 \pm 3.6** |
| CA3 region of hippocampus | 153.6 \pm 3.1 | 165.8 \pm 2.1* |
| Medial habenular nucleus | 146.8 \pm 4.3 | 163.8 \pm 4.5* |
| Lateral habenular nucleus | 133.2 \pm 1.4 | 153.3 \pm 3.1** |
| Dorsomedial hypothalamic nucleus | 124.4 \pm 2.6 | 146.2 \pm 5.0** |

Imipramine (20 mg/kg) or vehicle (water) was administered once a day for 4 days. The staining densities were quantified using an NIH Image scanner. Values represent the means \pm S.E.M. percent of the blank (the area not labeled by 5-HT_{2C} probe) of four individual experiments (4 rats). Differences were analyzed for significance by Student's *t*-test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 compared with vehicle treatment.

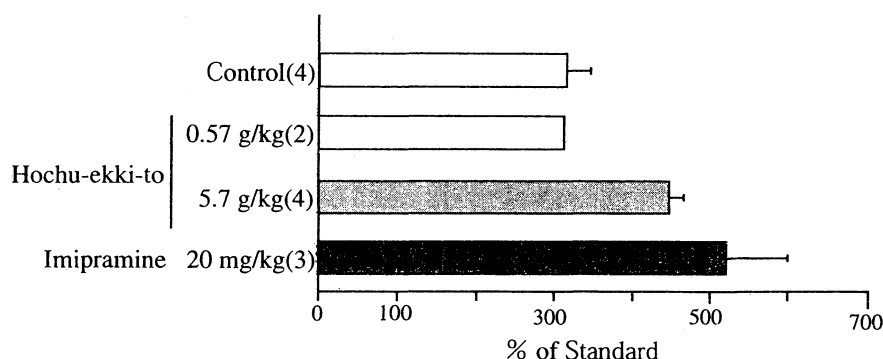


Fig. 5 補中益気湯による 5-HT_{2C} mRNA 発現量の変化
補中益気湯（生薬換算量 0.57 および 5.7 g/kg）および imipramine を 1 日 1 回 4 日間経口投与した際のラット脈絡叢内での発現強度の変化を定量した。例数は（ ）内に示した。

Imipramine was orally administered to male Wistar rats (8w, 220-250 g) once daily for 4 days. The 5-HT_{2C} mRNA expression in the brain was detected by in situ hybridization methods using the digoxigenin-labeled antisense cRNA probe coding the third intracellular loop. Imipramine treatment produced more intense hybridization signals in nearly all regions stained, such as the hippocampus, choroid plexus, habenular nucleus and dorsomedial hypothalamic nucleus, than the control in a dose- (2-20 mg/kg) and a time- (1-14 days) dependent manner. Mianserin (20 mg/kg) and desipramine (20 mg/kg) also extended the 5-HT_{2C} mRNA expression but nomifensine (20 mg/kg) was ineffective. These findings corresponded with the antagonistic effects of antidepressants to 5-HT_{2C}. Bu Zhong Yi Qi Tang treatment (5.7 g/kg p.o. estimated as galenical weight, once daily for 4 days) also increased the 5-HT_{2C} mRNA level in brain. Since the 5-HT_{2C} gene has been suggested to act as a protooncogene, we also searched for genes newly expressed after imipramine treatment by the differential display methods. We found a novel gene (DRF24) and read the sequence: DRF24 is 160 bp which may be a partial sequence. DRF24's mRNA existed in the basolateral amygdaloid nucleus of the imipramine-treated rat brain. We are now studying the whole sequence of the gene and its functions.

文 献

- 12) Tohda, M. and Watanabe, H. (1996) Imipramine-induced increase in 5-HT_{2C} receptor

mRNA level in the rat brain. *Neurosci. Res.*, 24, 189-193.

学会発表

- 9) 東田道久, 中村智, 野村靖幸, 渡辺裕司: 補中益気湯によるセロトニン 2C mRNA 発現促進作用. 第13回和漢医薬学会大会, 1996, 8, 富山.
- 10) Tohda, M. and Watanabe, H.: Effect of imipramine and Bu Zhong Yi Qi Tang (補中益気湯) on 5-HT_{2C} and a novel depression related gene (DRF24) mRNA expression. The 4th Japan-China Joint Meeting on Pharmacology, 1996, 9, Fukuoka.
- 11) Tohda, M., Nomura, Y. and Watanabe, H.: Effects of imipramine on 5-HT_{2C} mRNA and a novel depression related gene (DRF24) expression. 第26回北米神経科学会, 1996, 11, Washington DC.

IV. 新規リード化合物の検索を目指した各種民族薬の中枢薬理作用の解明

1. ベトナム人參の抗ストレス作用

- 1) Effects of Vietnamese Ginseng on opioid agonist- and conditioned fear stress-induced antinociception

We investigated the effects of Vietnamese ginseng (VG) extract, VG saponin and the VG major saponin constituent majonoside-R2 on opioid receptor agonist-induced antinociception using the tail-pinch and hot-plate tests in mice and on conditioned fear stress-induced antinociception using the tail-flick test in rats. VG extract (50-100 mg/kg, p.o.),

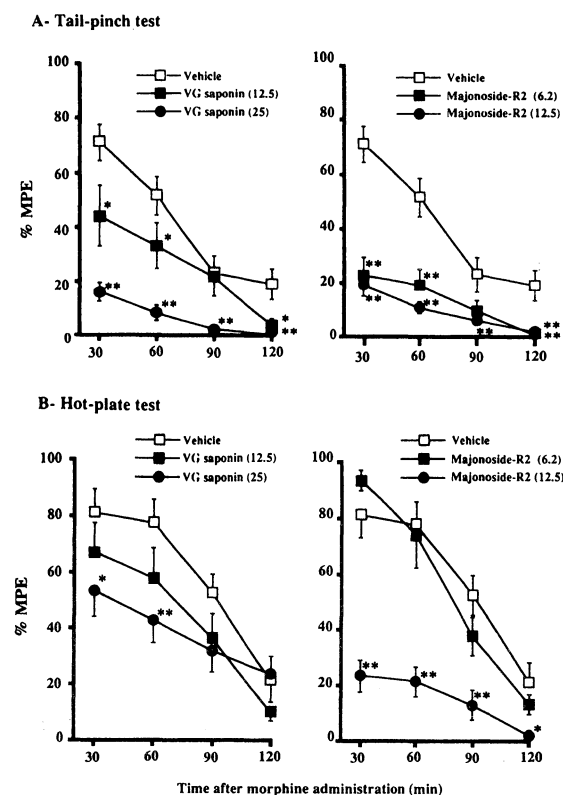


Fig. 6 Effects of *Vietnamese ginseng* saponin (VG saponin) and majonoside-R2 on the morphine-induced antinociception in the tail-pinch (A) and hot-plate tests (B) in mice. After recording the basal nociceptive responses in each test, morphine (5 mg/kg, s.c.) was administered. After morphine administration, the latency of nociceptive response was measured every 30 min over a 120-min observation period. VG saponin and majonoside-R2 were administered p.o. 30 min before morphine. The numbers in parenthesis indicate the dose (mg/kg). Each point represents the mean % MPE \pm S.E.M. ($n=10-15$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs vehicle groups (Dunnett's test).

VG saponin (12.5-25 mg/kg, p.o.) and majonoside-R2 (6.2-12.5 mg/kg, p.o.), as well as *Panax ginseng* extract, (PG extract, 50-100 mg/kg, p.o.), dose-dependently attenuated the μ -opioid agonist morphine-induced antinociception in the tail-pinch and hot-plate tests (Fig. 6). Moreover, repeated administration of VG saponin and majonoside-R2 suppressed the development of morphine tolerance in the tail-pinch test. VG extract (100-200 mg/kg, p.o.) also dose-dependently blocked the antinociceptive effects of the selective κ -opioid agonist U-50,488H in the tail-pinch and hot-plate tests, while PG

extract (100-200 mg/kg, p.o.) dose-dependently attenuated the U-50,488H-induced antinociception in the hot-plate test but not in the tail-pinch test. VG saponin (6.2-25 mg/kg, p.o.) blocked the U-50,488H-induced antinociception in the tail-pinch test but not in hot-plate test. Furthermore, VG saponin (25 mg/kg, i.p.) and majonoside-R2 (6.2 mg/kg, i.p.), as well as naloxone (2 mg/kg, i.p.), reversed the tail-flick latency increased by conditioned fear stress in rats. These results indicate that VG and its major saponin constituent, majonoside-R2, attenuate the antinociception caused by opioid agonists and conditioned fear stress.

2) ベトナム人参のオピオイド及び恐怖条件付けにより誘発した抗侵害受容反応に対する影響

ベトナム人参 (VG) は人参サポニンの他に majonoside-R2 (MR2) などの ocotillol-type のサポニン含有することが知られている。先に我々は VG エキス (VGE), VG サポニン分画 (VGS) 及び MR2 が心理的ストレスで誘発した抗侵害受容効果を抑制することを報告した。今回, オピオイド及び恐怖条件付けで惹起される抗侵害受容効果に対する VG の影響を検討した。

オピオイド誘発抗侵害受容作用: ddY 系雄性マウス (28-30 g) を用い, tail-pinch (TP) 及び hot-plate (HP) 試験により侵害受容反応を測定した。Morphine (MOR; 5 mg/kg) は試験の 30 分前に, 選択的 κ -オピオイド作動薬 U-50,488H (UH; 15 mg/kg) は 50 分前に皮下投与した。また試験薬は MOR 投与の 30 分前または UH 投与の 1 時間前に経口投与した。恐怖条件付け誘発抗侵害受容作用: Wistar 系雄性ラット (220-250 g) を用いた。ラットを電気ショック (ES) 負荷用箱に入れ, 1 日 30 分間, 合計 5 日間 ES を与えた。最終 ES 負荷の 24 時間後, ES を負荷せずに再び同箱に 15 分間入れた後, tail-flick 法 (TF) により侵害受容反応を測定した。試験薬は最終 ES 負荷の 15 分前に腹腔内投与した。また naloxone (NAL) を比較薬として用いた。

TP 及び HP 試験における MOR の抗侵害受容効果は VGE (50-100 mg/kg), VGS (12.5-25 mg/kg) 及び MR2 (6.2-12.5 mg/kg) により用量依存的に抑制された。両試験における UH の抗侵害受容効果も VGE (100-200 mg/kg) により抑制されたが, HP における UH の作用は VGS (6.2-25 mg/kg) では抑制されなかった。恐怖条件付けしたラットでは侵害受容反応閾値の上昇が認められたが, NAL (2 mg/kg), VGS (25

mg/kg) 及び MR2 (6.2 mg/kg) はこの閾値の上昇を抑制した。以上の結果, VG はオピオイド及び恐怖条件付け誘発抗侵害受容作用を抑制することが明らかとなった。

3) Effects of Majonoside-R2 on Pentobarbital Sleep and Gastric Lesion in Psychologically Stressed Mice

The effects of Vietnamese ginseng (VG) and its major constituent majonoside-R2 on pentobarbital-induced sleep and gastric lesion in psychologically stressed mice were examined. Psychological stress exposure for 30 min significantly decreased the duration of pentobarbital (50 mg/kg, IP)-induced sleep in mice. VG extract (50 mg/kg, PO), VG saponin (25 mg/kg, PO), and majonoside-R2 (3.1–12.5 mg/kg, PO and IP) had no effect on pentobarbital sleep in unstressed control mice, but these drugs significantly recovered pentobarbital sleep decreased by psychological stress to the level of unstressed control animals (Table II). On the other

hand, Panax ginseng (PG) extract (50–100 mg/kg, PO) failed to affect pentobarbital sleep in psychologically stressed mice. The effect of majonoside-R2 on psychological stress-induced decrease in the hypnotic activity of pentobarbital was significantly blocked by flumazenil (1 mg/kg, IV), a selective benzodiazepine antagonist. Diazepam (0.1 mg/kg, IP) significantly prolonged pentobarbital sleep in unstressed and psychologically stressed groups, and the effect of diazepam was significantly attenuated by the same dose of flumazenil. Naloxone (0.5–5 mg/kg, IP), an opioid antagonist, had no effect on pentobarbital sleep in unstressed or psychologically stressed animals. Psychological stress exposure for 16 h caused gastric lesion in mice. VG extract (25–50 mg/kg, PO) and majonoside-R2 (6.2–12.5 mg/kg, PO), as well as diazepam and naloxone, produced the protective action on gastric lesion in psychologically stressed mice. These results suggest that VG and its major constituent majonoside-R2 have the

Table II Effects of VG extract, VG saponin, and its major constituent majonoside-R2 on psychological stress-induced decrease in the hypnotic activity of pentobarbital in mice

| Drugs | Dase (mg/kg) | Sleeping (min) | | |
|----------------|-----------------|----------------|------------|-------------------------------------|
| | | Unstressed | Stressed | Interaction Between Stress and Drug |
| Experiment I | | | | |
| Vehicle | | 73.0±1.9 | 56.2±2.3* | |
| VG extract | 25 | 65.4±3.0 | 56.5±3.1 | $F(3, 169) = 5.696, p < 0.01$ |
| | 50 | 70.3±4.5 | 79.5±5.3** | |
| | 100 | 77.7±6.3 | 72.0±4.3 | |
| PG extract | 50 | 76.7±3.6 | 65.2±4.3 | $F(2, 136) = 4.693, p < 0.05$ |
| | 100 | 64.3±4.5 | 65.8±3.5 | |
| Experiment II | | | | |
| Vehicle | | 70.2±1.6 | 56.9±1.9* | |
| VG saponin | 12.5 | 68.9±2.6 | 65.0±2.8 | $F(2, 118) = 4.064, p < 0.05$ |
| | 25 | 75.5±4.0 | 71.3±4.7** | |
| Majonoside-R2 | 6.2 | 73.4±2.0 | 80.0±6.3** | $F(2, 118) = 4.105, p < 0.05$ |
| | 12.5 | 76.4±4.0 | 69.9±4.0§ | |
| Experiment III | | | | |
| Vehicle | | 73.1±2.9 | 58.3±2.2† | |
| Majonoside-R2 | 3.1 | 71.6±3.7 | 80.7±4.2** | $F(3, 101) = 5.523, p < 0.01$ |
| | 6.2 | 66.9±2.8 | 72.2±1.5§ | |
| | 12.5 | 74.5±4.3 | 74.6±4.1§ | |

Mice were divided into two groups and only the one group was exposed to psychological stress for 30 min. Test drugs were administered PO 1 h before stress exposure except for Experiment III. In Experiment III, majonoside-R2 was injected IP 30 min before stress exposure. Each datum represents the mean ± SEM of 12–15 mice. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$ compared with respective unstressed group. † $p < 0.01$ and § $p < 0.05$ compared with respective vehicle treatment (Tukey's test).

protective effects on the psychological stress-induced pathophysiological changes and that benzodiazepine receptors are partly implicated in the effects of majonoside-R2.

4) The Possible Involvement of GABA_A Systems in the Antinarcotic Effect of Majonoside-R2, a Major Constituent of Vietnamese Ginseng, in Mice

The effect of majonoside-R2 on morphine- and U-50,488H-induced antinociception was examined by the tail-pinch test in mice and compared with that of diazepam. Majonoside-R2 and diazepam inhibited the morphine- and U-50,488H-induced antinociception, and the actions were antagonized by the benzodiazepine receptor antagonist flumazenil and the GABA-gated Cl⁻ channel blocker picrotoxin. Diazepam but not majonoside-R2 exhibited a protective activity against convulsion caused by the GABA_A antagonists bicuculline and picrotoxin. These results indicate that GABA_A systems are involved in the effect of majonoside-R2 on the opioid-induced antinociception and suggest that the mechanisms of action of majonoside-R2 may differ from those of diazepam.

5) Effect of Vietnamese ginseng Extract and its Major Constituent, Majonoside-R2, on Emotional Stress in Mice

Vietnamese ginseng (VG) as well as *Panax ginseng* (PG) has been used as a tonic and/or panacea in Vietnam. VG contains the same saponins as PG, but the ocotillol-type saponin such as majonoside-R2 exists only in VG. Although the effect of PG on the central nervous system has been extensively investigated, few reports are available on pharmacological actions of VG. Thus, the effects of VG and its major constituent majonoside-R2 on emotional stress responses were examined in mice.

Emotional stress exposure for 30 min significantly decreased the duration of pentobarbital (50 mg/kg, i.p.)-induced sleep. VG extract (50 mg/kg, p.o.), VG saponin (25 mg/kg, p.o.) and majonoside-R2 (3.1-12.5 mg/kg, p.o. and i.p.) had no effect on pentobarbital sleep in unstressed control mice, while these drugs significantly recovered pentobarbital sleep shortened by emotional stress to the level of control animals. On the other hand, PG extract (50

-100 mg/kg, p.o.) failed to affect pentobarbital sleep in stressed mice. The effect of majonoside-R2 on stress-induced decrease in the hypnotic activity of pentobarbital was significantly blocked by flumazenil (1 mg/kg, i.v.), a selective benzodiazepine antagonist. Diazepam (0.1 mg/kg, i.p.) significantly prolonged pentobarbital sleep in unstressed and stressed groups, and the effect of diazepam was significantly attenuated by the same dose of flumazenil. Naloxone (0.5-5 mg/kg, i.p.), an opioid antagonist, had no effect on pentobarbital sleep in both unstressed and stressed animals. Emotional stress exposure for 16 h caused gastric lesion in mice. VG extract (25-50 mg/kg, p.o.) and majonoside-R2 (6.2-12.5 mg/kg, p.o.), as well as diazepam and naloxone, produced the protective action on gastric lesion in stressed mice.

These results suggest that VG and its major constituent majonoside-R2 have the protective effect on emotional stress-induced pathophysiological changes and that benzodiazepine receptors are partly implicated in the effects of majonoside-R2.

2. タイ薬用植物 *mitragyna speciosa* の成分 mitragynine の抗侵害受容作用とその作用機序

1) タイ薬用植物由来の成分 mitragynine の抗侵害受容作用 — 上位中枢オピオイド系の関与 —

タイ薬用植物 *Mitragyna speciosa* Korth. ("Kratom") の葉部エキ스는ヒトにおいて麻薬様の作用を有することが知られている。更に、本エキスの主要アルカロイド成分である mitragynine は末梢投与により抗侵害受容作用を示すことが報告されているが、その作用機序は明らかでない。そこで今回、mitragynine の作用機序を明らかにする目的で、mitragynine の抗侵害受容作用における上位中枢オピオイド系の関与について検討した。実験には ddY 系雄性マウス (5-6 週令) を用いた。Mitragynine は 1% 酢酸に溶解し、1N NaOH で pH4.7 とした後、腹腔内投与 (i.p.) または脳室内投与 (i.c.v.) した。Mitragynine 投与後、tail-pinch 法および hot-plate 法によりマウスが侵害受容反応を示すまでの潜時を測定した。オピオイド受容体拮抗薬 naloxone は mitragynine 投与の直前に皮下投与 (s.c.)、または mitragynine 投与と同時に i.c.v. 投与した。

1) Mitragynine を i.p. 投与 (3-30 mg/kg) または i.c.v. (1-10 µg) 投与することにより、tail-pinch 法お

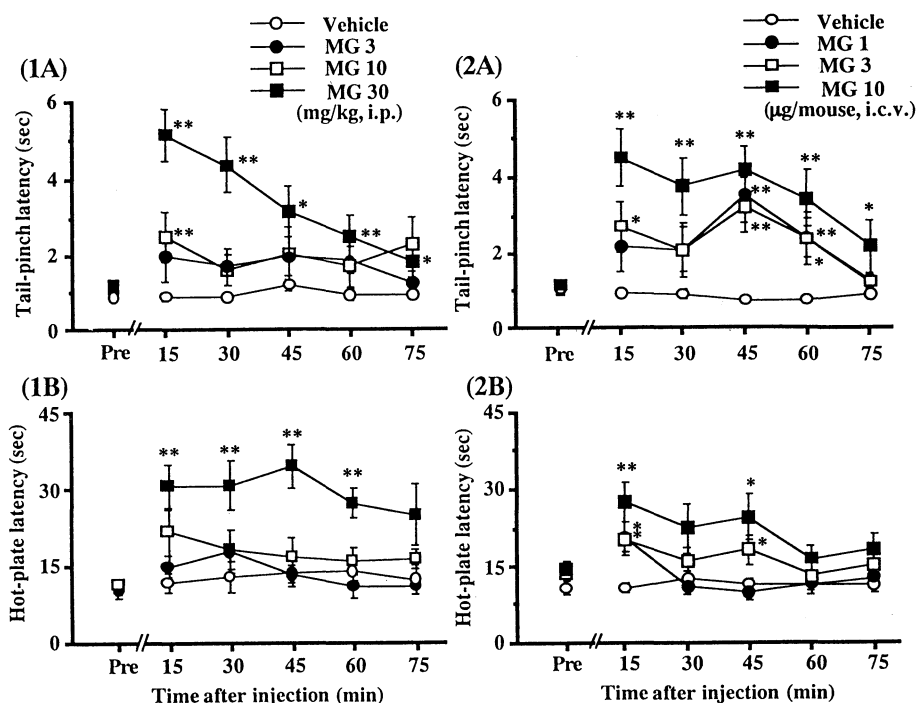


Fig. 7 Effect of naloxone on the mitragynine-induced antinociception in the tail-pinch and hot-plate tests:

Antinociceptive actions of i.p. and i.c.v. administered mitragynine (MG) in the tail-pinch (A) and hot-plate (B) tests in mice. After measuring the basal nociceptive response, mitragynine was administered i.p. (3–30 mg/kg; A1 and B1) or i.c.v. (1–10 µg/mouse; A2 and B2). After 15 min, the latency of the nociceptive response was measured every 15 min over a 75-min period. Each point represents the mean \pm S.E.M. of 10 mice. * P < 0.05 and ** P < 0.01 compared with the predrug nociceptive latency (Pre).

よび hot-plate 法におけるマウスの侵害受容反応の潜伏時は用量依存的に延長した (Fig. 7)。2) この抗侵害受容効果は mitragynine 投与15分後に最大となった。3) 本アルカロイドには morphine のような興奮作用や Straub tail reaction を惹起する作用は認められなかった。4) 両試験法における mitragynine (30 mg/kg, i.p.) の抗侵害受容効果は naloxone を s.c. 投与 (2 mg/kg) または i.c.v. 投与 (3–10 µg) することにより用量依存的に抑制された。5) 更に mitragynine (10 µg) を i.c.v. 投与したときの抗侵害受容効果も naloxone (10 µg) の i.c.v. 投与によって完全に抑制された。以上の結果から, mitragynine 自体が脳内で作用して抗侵害受容作用を発現しうること, およびその作用には少なくとも一部, 上位中枢オピオイド系が関与することが明らかとなった。

2) Antinociceptive Action of mitragynine in mice : Evidence for the involvement of Spinal Opioid Receptors

Mitragynine is a major alkaloidal constituent extracted from the young leaves of *Mitragyna speciosa* Korth. (Rubiaceae). We investigated an antinociceptive activity of intraperitoneal (i.p.) and intracerebroventricular (i.c.v.) injection of this alkaloid by the tail-pinch and hot-plate tests in mice, and evaluated the mechanisms of the action using naloxone, an opioid receptor antagonist. Mitragynine (5.0–30 mg/kg, i.p. and 1.0–10 µg/mouse, i.c.v.) exerted a dose-dependent antinociceptive activity which was maximal at 15–45 min after injection in the tail-pinch and hot-plate tests, but it did not induce a morphine-like behavioral change (Fig. 7). The antinociceptive actions of i.p. mitragynine were completely abolished by both s.c. (2 mg/kg) and i.c.v. (10 µg/mouse) naloxone. The action of i.c.v. mitragynine (10 µg/mouse) was also antagonized by i.c.v. naloxone (10 µg/mouse).

These results indicate that mitragynine itself can induce antinociception by acting in the brain, and that the supraspinal opioid systems are at least partly involved in the antinociceptive action of mitragynine in mice.

3) Suppressive effect of mitragynine on 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine-induced head twitch responses in mice.

The leaves of *Mitragyna speciosa* Korth. ('kratom') are known to produce a narcotic-like action when smoked, chewed or drunk as an infusion. We investigated the effects of mitragynine (MG), a major alkaloidal constituent of this plant, on 5-HT₂ receptor-mediated head twitch response in mice. MG (5-30 mg/kg, i.p.), as well as the selective 5-HT₂ receptor antagonist ritanserin, inhibited 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5MeODMT; 16 mg/kg, i.p.)-induced head twitch response in a dose-dependent manner but it did not affect head-weaving response caused by 5MeODMT or spontaneous motor activity. Pretreatment with reserpine (5 mg/kg), p-chlorophenylalanine (300 mg/kg × 3 times) or 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 50 µg/mouse) + nomifensine (5 mg/kg) did not change the suppressing effect of MG (20 mg/kg, i.p.) on head-twitch response caused by 5MeODMT. The α₂-adrenoceptor antagonists yohimbine (0.5 mg/kg, i.p.) and idazoxan (0.2 mg/kg, i.p.) attenuated the suppressing effect of MG but the antagonistic effect of idazoxan on MG suppression of head twitch response did not change following lesion of central noradrenergic systems. These results suggest that stimulation of α₂-adrenoceptor and/or blocking of 5-HT₂-receptor is involved in suppression of 5-HT₂-receptor-mediated head-twitch response by MG.

4) Mitragynine の抗侵害受容作用における下行性ノルアドレナリン及びセロトニン神経系の関与

タイ民間薬成分 mitragynine (MG) は末梢投与により抗侵害受容作用を示すことが知られているが、その作用機序は明らかではない。そこで今回、MG 脳室内投与 (i.c.v.) により発現する抗侵害受容作用に対するノルアドレナリン (NA) 及びセロトニン (5-HT) 枯渇の影響を調べ、併せて morphine (MOR) と比較検討した。MG 及び MOR は試験の15分前に i.c.v. 投与し、tail-pinch (TP) 法及び hot-plate (HP) 法によ

りマウスの抗侵害受容反応を測定した。Reserpine (RES, 5 mg/kg, i.p.), 6-OHDA (50 µg, i.c.v.), p-CPA (300 mg/kg × 3, i.p.) 前処置の MG 及び MOR に対する影響を検討した後、大脳皮質・脳幹・脊髄のモノアミン含量を測定した。

両試験法において MG は用量依存的な抗侵害受容作用を示した。TP 法における MG の効果は RES, 6-OHDA, p-CPA 処置及び idazoxan (i.p. または i.t.) 投与により低下した。本法における MOR の抗侵害受容作用も 6-OHDA 処置により抑制されたが p-CPA 処置では影響されなかった。HP 法では RES, 6-OHDA 処置及び idazoxan (i.t.) 投与により MG の効果は低下したが、p-CPA 処置では変わらなかった。6-OHDA 及び p-CPA 処置は何れも MOR の作用に影響しなかった。RES 及び p-CPA 処置は各部位でのモノアミン含量を顕著に減少させた。一方、6-OHDA 処置は大脳皮質及び脊髄の NA 含量を著明に減少させたが、脳幹部での減少は軽度であった。以上の結果、1) MG の抗侵害受容作用には圧刺激では下行性 NA 及び 5-HT 神経系が、熱刺激では下行性 NA 神経系がそれぞれ関与すること、2) 圧刺激に対する MOR の抗侵害受容作用には下行性 NA 神経系が関与するが、熱刺激では両神経系の寄与が低いことが明らかとなり、MG の作用機序は MOR と異なることが示唆された。

5) Central antinociceptive effects of mitragynine in mice: contribution of descending noradrenergic and serotonergic systems

Mitragynine is a major alkaloidal constituent of young leaves of *Mitragyna speciosa* Korth, that is known to exhibit narcotic-like activity. In this study, we investigated the roles of central monoaminergic systems in the antinociceptive action of mitragynine by means of the tail-pinch and hot-plate tests in mice. Mitragynine (1.0-10 µg) injected i.c.v. exerted a dose-dependent antinociceptive activity in both tests. The activity of mitragynine (10 µg, i.c.v.) in the tail-pinch test was antagonized by reserpine, 6-hydroxydopamine plus nomifensine, and p-chlorophenylalanine treatment, whereas the antinociceptive activity of morphine (3 µg) given i.c.v. in this test was attenuated by 6-hydroxydopamine plus nomifensine but not by p-chlorophenylalanine treatment (Fig. 8) Moreover, the activity of i.c.v. mitragynine was also antagonized by the α₂-adrenoceptor antagonist, idazoxan (10 µg), and cyproheptadine (1 µg) administered

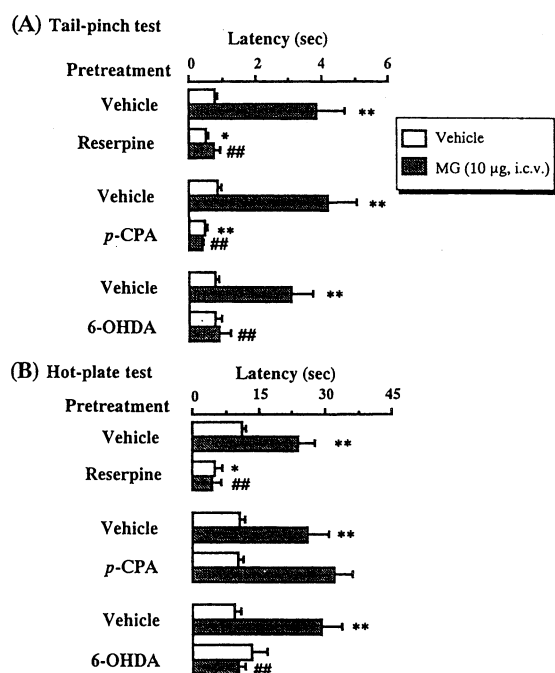


Fig. 8 Effects of reserpine, *p*-chlorophenylalanine and 6-hydroxydopamine treatment on the mitragynine-induced antinociception in the tail-pinch and hot-plate tests. Animals were pretreated with reserpine, *p*-chlorophenylalanine (*p*-CPA) or 6-hydroxydopamine (6-OHDA) as described in the text. Fifteen minutes after i.c.v. injection of mitragynine (MG, 10 µg), the nociceptive latency in the tail-pinch (A) and hot-plate tests (B) was measured. Each column represents the mean latency \pm S.E.M. ($n=7-9$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the respective vehicle control. ## $P<0.01$ compared with the group treated with mitragynine alone.

intrathecally (i.t.) On the other hand, the antinociceptive action of i.c.v. mitragynine (10 µg) in the hot-plate test was abolished by reserpine and 6-hydroxydopamine plus nomifensine, but not by *p*-chlorophenylalanine treatment (Fig. 8). This action was also antagonized by i.t. injection of idazoxan (10 µg). These results suggest that both descending noradrenergic and serotonergic systems are involved in the antinociceptive activity of supraspinally administered mitragynine on the mechanical noxious stimulation, while the descending noradrenergic system predominantly contributes to the effect of supraspinal mitragynine on the thermal noxious stimulation. The mechanisms underlying the suppressive action of mitragynine on

the nociceptive response may differ from those of morphine in mice.

6) The involvement of delta-opioid receptors in the antinociceptive action of mitragynine : *in vivo* and *in vitro* studies

Mitragynine is a major alkaloidal constituent extracted from the young leaves of *Mitragyna speciosa* Korth. that is known to exhibit a narcotic-like activity. We investigated the role of delta-opioid systems in the antinociceptive activity of intrathecally (i.t.) and intraventricularly (i.c.v.) administered mitragynine by the tail-pinch test in mice using a non-selective opioid receptor antagonist naloxone and a delta opioid receptor antagonist naltrindole. We also examined the effect of mitragynine on cyclic AMP (cAMP) formation in cultured NG108-15 cells which are known to express delta-opioid receptors coupled with Gi proteins. The nociceptive response in the tail-pinch test was measured according to Haffner's method. Mice were pretested by pinching their tails with hemostatic forceps and only the mice that showed nociceptive responses such as biting the forceps within 2 sec were used for the experiments. A cut-off time of 6 sec was selected. Mitragynine was administered 15 min before the start of experiments. When administered i.t. or i.c.v., mitragynine (1.0-10 µg) exhibited a dose-dependent antinociceptive activity in the tail-pinch test. The effects of i.t. and i.c.v. mitragynine were antagonized by naloxone (1 µg, i.t. or 3 µg, i.c.v.). The antinociceptive action of mitragynine (10 µg, i.t. or i.c.v.) was also blocked by co-administration of naltrindole (5 ng, i.t. or i.c.v.). In the *in vitro* study, the NG108-15 cells were incubated with 10 µM forskolin plus various concentration of test drugs for 10 min and the cAMP levels were measured by radioimmunoassay. Mitragynine (0.1-30 µM), as well as morphine (0.1-100 µM), attenuated forskolin (10 µM)-induced cAMP formation in a concentration-dependent manner. The inhibitory effect of mitragynine on the cAMP formation was significantly antagonized by naloxone. These results suggest that direct stimulation of the spinal and supraspinal delta-opioid receptors by mitragynine is at least partly involved in the antinociceptive action of this alkaloid in the tail

-pinch test.

3. タイ薬用植物の薬理作用

1) Neuropharmacological Actions of *Pluchea indica* LESS Root Extract in Socially Isolated Mice

The effects of *Pluchea indica* LESS root extract (PI-E) on locomotor activity and pentobarbital-induced sleep, social isolation-induced aggressive behavior, motor coordination in the rotarod test, pentylenetetrazole-induced convulsion and nociceptive responses in the tail-pinch test were examined in mice. Socially isolated mice showed higher locomotor activity and shorter duration of pentobarbital sleep than group-housed mice. PI-E (50 - 100 mg / kg, *p.o.*) significantly decreased locomotor activity and prolonged pentobarbital sleep in a dose-dependent manner in isolated mice but not in group-housed mice. At a large dose (400 mg/kg, *p.o.*), PI-E not only decreased locomotor activity but also prolonged pentobarbital sleep in group-housed mice. The reference drug diazepam, at 0.5 mg/kg, also suppressed the locomotor activity in isolated mice but not in group-housed mice. Moreover, diazepam, at 0.1 and 0.5 mg/kg, significantly prolonged pentobarbital sleep in both isolated mice and group-housed mice. The effects of PI-E and diazepam on pentobarbital sleep in isolated mice were significantly attenuated by flumazenil (1 mg/kg, *i.v.*). PI-E (50-100 mg/kg), as well as diazepam (0.5-5 mg/kg, *p.o.*), dose-dependently suppressed social isolation-induced aggressive behavior, but it had no effect on pentylenetetrazole-induced convulsion, motor coordination in the rotarod test, or nociceptive response in the tail pinch test in group-housed mice. These results suggest that PI-E attenuates pathophysiological changes caused by social isolation stress in mice, and that the GABAergic system is partly involved in the action of PI-E on a social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep.

2) Behavioral Studies on Alkaloids Extracted from the Leaves of *Hunteria zeylanica*

The effects of a crude methanol extract, butanol- and chloroform-fractions, and a pure compound, corymine, extracted from the leaves of *H. zeylanica* on locomotor activity and rearing, pentobarbital-

induced sleep, and drug-induced convulsions were studied in mice. The methanol extract dose-dependently decreased rearing without a significant effect on locomotor activity at doses of 15, 60 and 120 mg / kg. It did not significantly prolong the sleeping time but potentiated the convulsions induced by strychnine, but not that by either picrotoxin or pentylenetetrazole, at a dose of 120 mg/kg. The butanol-fraction significantly prolonged sleeping time at a dose of 125 mg/kg but did not affect either of the convulsive drugs. The chloroform fraction prolonged sleeping time at doses of 62.5 and 125 mg / kg and potentiated the convulsions induced by either strychnine or picrotoxin, but not that by pentylenetetrazole, at doses of 15, 30, 60 and 120 mg / kg. Corymine did not significantly prolong sleeping time, but potentiated the convulsions induced by either strychnine or picrotoxin, not by pentylenetetrazole, at doses of 2, 8 and 15 mg/kg. These results suggest that crude alkaloidal extracts of *H. zeylanica* leaves produce biphasic effects on the central nervous system (CNS), depression and stimulation, while the pure compound, corymine, has a unique central stimulatory effect in mice.

3) Hypoglycemic Effect of Water Extract of the Root of *Pandanus odoratus* RIDL.

Hypoglycemic effect of water extract of the root of *Pandanus odoratus* RIDL. (Thai name: Toei-hom, Pandanaceae) was examined in normal and streptozotocin-diabetic rats. In the hypoglycemic test without glucose load, an administration of the extract at doses of 0.125-0.5 g/kg *p.o.* did not affect significantly the plasma glucose level in normal rats, whereas the extract significantly lowered the plasma glucose level at a dose of 0.5 g/kg *p.o.* in diabetic rats. In oral glucose tolerance test, an administration of the extract at a dose of 0.5 g/kg *p.o.* significantly lowered the plasma glucose level in normal rats. The extract at doses of 0.5 and 1.0 g / kg *p.o.* also significantly lowered the plasma glucose level in diabetic rats. A reference drug, glibenclamide at a dose of 5 mg/kg *p.o.* showed a significant hypoglycemic effect in both normal and diabetic rats.

Repeated administration of the extract at doses of 0.25 and 0.5 g/kg *p.o.* for 7 d produced a signifi-

cant hypoglycemic effect in diabetic rats. Glibenclamide (5 mg/kg *p.o.*) also caused a significant hypoglycemia in the diabetic rats.

LD₅₀ (95 % confidence limit) after intraperitoneal injection was 1.87 (1.26-2.76) g/kg in male and female rats and 1.62 (1.18-2.24) g/kg in male and female mice, respectively. The LD₅₀ after oral administration was over 8 g/kg in both sexes of rat and mice.

4. Harmala alkaloid のセロトニンシンドロームおよび体温調節におよぼす作用

Facilitatory and Inhibitory Effects of Harmaline on the Tryptophan-Induced 5-Hydroxytryptamine Syndrome and Body Temperature Changes in Pargyline-Pretreated Rats

The effects of harmaline on tryptophan-induced 5-hydroxytryptamine (5-HT) syndrome and body temperature changes in pargyline-pretreated rats were investigated. When administered *i.p.* 60 min after pargyline treatment (50 mg/kg, *i.p.*), tryptophan, at 100 mg/kg but not 10 mg/kg, induced the 5-HT syndrome. Tryptophan at 100 mg/kg also produced hypothermia followed by hyperthermia in pargyline pretreated rats. Administration of harmaline (10 mg/kg, *i.p.*) 30 min after pargyline not only potentiated the 100 mg/kg tryptophan-induced 5-HT syndrome and body temperature changes, but also produced the syndrome following administration of 10 mg/kg tryptophan in pargyline-pretreated rats. In contrast, when administered 30 min before pargyline, 10 mg/kg harmaline completely suppressed the syndrome and body temperature changes caused by 100 mg/kg tryptophan. Tryptophan (100 mg/kg, *i.p.*) administration significantly increased 5-HT levels and decreased 5-hydroxyindole acetic acid levels and 5-HT turnover in the brain of pargyline-pretreated rats. Harmaline administration 30 min after pargyline did not significantly affect the tryptophan-induced changes in 5-HT levels and 5-HT turnover, whereas when administered 30 min before pargyline, harmaline significantly blocked the effect of tryptophan. These results suggest that mechanisms underlying the inhibitory action of harmaline on the tryptophan-induced 5-HT syndrome and body temperature changes in pargyline-pretreated rats differ from

those by which harmaline potentiates the effects of tryptophan.

文 献

- 13) Huong, H.T.T., Matsumoto, K., Yamasaki, K. and Watanabe, H. (1996) Vietnamese ginseng and its major saponin constituent majonoside-R2 attenuate the psychological stress-induced antinociception. *Int. Acad. Biomed. Drug Res.*, 11, 265-269.
- 14) Huong, N.T.T., Matsumoto, K., Yamasaki, K., Nguyen, M.D., Nguyen, T.N. and Watanabe, H. (1996) Effects of majonoside-R₂ on pentobarbital sleep and gastric lesion in psychologically stressed mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 53, 957-963.
- 15) Huong, N.T.T., Matsumoto, K., Yamasaki, K., Duc, N.M., Nham, N.T. and Watanabe, H. (1996) Effects of Vietnamese Ginseng on opioid agonist- and conditioned fear stress-induced antinociception. *Phytomedicine*, 3, 33-39.
- 16) Huong, N.T.T., Matsumoto, K., Yamasaki, K., Duc, N.M., Nham, N.T. and Watanabe, H. (1996) The possible involvement of GABA_A systems in the antinarcotic effect of majonoside-R₂, a major constituent of Vietnamese Ginseng, in mice. *Jan. J. Pharmacol.*, 71, 345-349.
- 17) Matsumoto, K., Mizowaki, M., Thongpraditchote, S., Takayama, H., Sakai, S., Aimi, N. and Watanabe, H. (1996) Antinociceptive action of mitragynine in mice: Evidence for the involvement of supraspinal opioid receptors. *Life Sci.*, 59, 1149-1155.
- 18) Matsumoto, K., Mizowaki, M., Thongpraditchote, S., Murakami, Y., Takayama, H., Sakai, S., Aimi, N. and Watanabe, H. (1996) Central antinociceptive effects of mitragynine in mice: contribution of descending noradrenergic and serotonergic systems. *Eur. J. Pharmacol.*, 317, 75-81.
- 19) Peungvicha, P., Thirawarapan, S.S. and Watanabe, H. (1996) Hypoglycemic effect of the root of *Pandanus odoratus* RIDL. *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 364-366.
- 20) Thongpraditchote, S., Matsumoto, K., Temsiririrakkul, R., Tohda, M., Murakami, Y. and Watanabe, H. (1996) Neuropharmacological

actions of *Pluchea indica* LESS root extract in socially isolated mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 379-383.

- 21) Leewanich, P., Tohda, M., Matsumoto, K., Subhadhirasakul, S., Takayama, H. and Watanabe, H. (1996) Behavioral studies on alkaloids extracted from the leaves of *Hunteria zeylanica*. *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 394-399.
- 22) Abdel-Fattah, A.F.M., Matsumoto, K., Murakami, Y., Elhady, K.A.W., Mohamed, M.F. and Watanabe, H. (1996) Facilitatory and inhibitory effects of harmaline on the tryptophan-induced 5-hydroxytryptamine syndrome and body temperature changes in pargyline-pretreated rats. *Jan. J. Pharmacol.*, 72, 39-47.

学会発表

- 12) 松本欣三, 溝脇万帆, 高山廣光, 坂井進一郎, 相見則郎, 渡辺裕司: 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine 誘発のマウス head twitch 行動に対する mitragynine の作用. 第69回日本薬理学会年会, 1996, 3, 長崎.
- 13) 渡辺裕司, Huong, NTT., 松本欣三, 山崎和男: Majonoside-R2 の morphine 及び U-50, 488H の抗侵害作用に対する影響. 第69回日本薬理学会年会, 1996, 3, 長崎.
- 14) Huong, NTT., 松本欣三, 渡辺裕司, 山崎和男: ベトナム人参のオピオイド及び恐怖条件付けにより誘発した抗侵害受容反応に対する影響. 日本薬学会第116年会, 1996, 5, 金沢.
- 15) 溝脇万帆, Thongpraditchote, S., 村上孝寿, 松本欣三, 渡辺裕司, 高山廣光, 坂井進一郎, 相見則郎: Mitragynine の抗侵害受容作用における下行性ノルアドレナリン及びセロトニン神経系の関与. 日本薬学会第116年会, 1996, 3, 金沢.
- 16) Watanabe, H., Huong, NTT., Matsumoto, K., Yamasaki, K., Nguyen, M.D. and Nguyen, T.N.: Effect of Vietnamese ginseng extract and its major constituent, majonoside-R2, on emotional stress in mice. Second International Congress on Phytomedicine, 1996, 9, München.
- 17) Huong, NTT., Matsumoto, K., Yamasaki, K. and Watanabe, H.: Vietnamese ginseng and its major saponin constituent majonoside - R2 improve psychological stress-induced pathophysiological changes. Second Japan - Russia Joint Symposium on Traditional Medicine and Homeostasis, 1996, 10, Toyama.
- 18) Thongpraditchote, S., Mizowaki M., Matsumoto K., Tohda, M., Takayama, H., Sakai, S.-I., Aimi, N. and Watanabe, H.: The involvement of delta-opioid receptors in the antinociceptive action of mitragynine: in vivo and in vitro studies. First Pan Asian Oceanic Congress of Neuroscience, 1996, 10, Pattaya.
- 19) Watanabe, H., Mizowaki, M., Thongpraditchote, S., Matsumoto, K., Takayama, H. and Aimi, N.: Analgesic effect of mitragynine extracted from *Mitragyna Speciosa*, a Thai medicinal plant. First Pan Asian Oceanic Congress of Neuroscience, 1996, 10, Pattaya.
- 20) 松本欣三, 溝脇万帆, Thongpraditchote, S., 高山廣光, 坂井進一郎, 相見則郎, 渡辺裕司: タイ薬用植物由来の成分, mitragynine の抗侵害受容作用—上位中枢オピオイド系の関与—. 第26回日本神経精神薬理学会年会, 1996, 10, 東京.