

# ニコチンによる急性毒性と加齢の 影響について

奈良県立医科大学薬理学教室

岡本雅人

## STUDIES ON ACUTE TOXICITY OF NICOTINE AND AGING

MASATO OKAMOTO

*Department of Pharmacology, Nara Medical University*

Received September 29, 1992

*Summary*: The mechanisms in the brain for acute toxicity of nicotine were investigated in rats. Age-related changes in acute toxicity of nicotine were also studied. An acute intraperitoneal (i. p.) or intracerebroventricular (i. c. v.) injection of nicotine intensified convulsions and death dose-dependently. But those convulsive responses induced by nicotine (i. c. v.) were more rapid and shorter than those induced by nicotine (i. p.). Acute toxic effects of nicotine were dose-dependently antagonized by mecamylamine (i. p. or i. c. v.), but not by hexamethonium (i. p.). Nicotine (10 or 24.5 mg/kg, i. p.) significantly increased dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid in striatum. Furthermore, electrical lesion of striatum suppressed acute toxicities of nicotine. Pretreatment of SCH-23390, but not of haloperidol or sulpiride, blocked nicotine-induced convulsions and death. Pretreatment of phenobarbital, diazepam or MK-801 also prevented acute toxicity of nicotine.

Nicotine levels in the blood and cortex after an acute i. p. injection of nicotine (24.5 mg/kg) were significantly higher in old rats than in young rats. Hepatic metabolisms of nicotine decreased age-relatedly. Also, nicotine (24.5 mg/kg, i. p.)-induced lethality tended to increase in old rats. On the other hand, nicotine (24.5 mg/kg, i. p.) did not change monoamine levels in any brain regions in old rats.

These results indicate that acute toxic effects of nicotine can be attributed to a central site. Acute toxicity of nicotine may be related to dopaminergic neurons, especially in the nigrostriatal system, as well as GABAergic and glutamatergic neurons. Furthermore, stimulation of D1 receptors in the central dopaminergic system may be concerned with the propagation of acute toxic effects of nicotine. Also, acute toxicity of nicotine in old rats may be involved in two significant decreases, in hepatic metabolism of nicotine and in brain sensitivity to nicotine.

### Index Terms

nicotine, acute toxicity, dopaminergic neurons, aging, hepatic metabolism

## 緒 言

ニコチンはタバコ葉に含まれる主アルカロイドであり、生体内では極めて短時間にニコチンの標的器官である副腎および中枢神経系へ高濃度に分布する<sup>1)</sup>ので、種々の末梢および中枢作用を生じる。この中枢作用に関する報告は多岐にわたり、自発運動活性の抑制または増加効果、各種条件回避反応の学習の促進、抗侵害作用および体温低下作用などの効果が知られている<sup>2-9)</sup>。また、生化学的および神経化学的アプローチにより、ニコチンの中枢作用との関連に関する研究が進められている<sup>7-9)</sup>。

一方、タバコは多くの人によって喫煙されているため、乳児にでも手の届くような身近な場所に置かれていることが多い。また、日本も長寿国となり老人性痴呆の人々も年々多くなっている。そのため、喫煙量の増加あるいは誤飲を生じることが多くなった。ニコチンはそれ自体毒性が強く、喫煙量の増加あるいはタバコの誤飲によりニコチンの急性中毒が引き起こされる可能性も少なくはない。しかし、高用量のニコチンによる急性毒性作用に関する報告は、低用量で発現する上述の作用の研究に比べ、極めて少ない。著者ら<sup>10)</sup>はニコチンによる振戦および痙攣に注目し、ニコチン(5 mg/kg, i. p.)による振戦および痙攣は中枢のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChRs)を介して発現することおよびその連日投与により速やかに耐性が生じることをすでに報告した。

ニコチンによる痙攣には、脳内のカテコールアミン神経系の関与、とくにドーパミン(DA)神経系との関連が報告されている<sup>11)</sup>。しかし、ニコチンは副腎髄質からカテコールアミンを遊離する作用があり<sup>7)</sup>、高用量の場合には、呼吸筋の神経筋接合部遮断による呼吸抑制が引き起こされる<sup>2,12)</sup>。そこで、ニコチンの脳室内投与による急性毒性を指標として、全身的に投与した場合と比較検討した。さらに、ニコチンによる急性毒性と中枢神経系との関係を明らかにするため、ニコチン急性投与後の脳内モノアミン含量の変化、ニコチンによる急性毒性におよぼす各種アンタゴニストの影響についてそれぞれ検討した。

一方、近年疫学的研究において、喫煙者にアルツハイマーおよびパーキンソン症候群の発症が少ないという報告が注目を集めている<sup>13,14)</sup>。さらに、中枢のnAChRs数が加齢に伴い減少することが報告されている<sup>15,16)</sup>ので、老齢時におけるニコチンの急性毒性を検討することも、急性毒性と中枢神経系の関連を調べる上で一助になると考えた。

また、喫煙により吸収されたニコチンの中枢への移行は、ニコチンの生体内動態の変化により影響を受け、そ

れに伴い生理反応も異なる。ニコチン代謝の研究により、肝のニコチン代謝酵素活性およびその変動に種差および系統差が認められることが示されている<sup>17,18)</sup>が、加齢に伴うニコチンの代謝および体内動態に関する報告は乏しい。そこで、老齢時のニコチンによる急性毒性を若齢時と比較するとともに加齢によるニコチンの体内動態の変化についても比較検討した。

## 実験材料と方法

### 1) 実験動物および飼育条件

実験動物は紀和実験動物研究所より購入した6週齢(若齢)、1年齢(中間齢)および2年齢(老齢)の雄性Wistar系ラットを使用した。これらのラットにオリエンタル固形飼料(MF)と水を自由に与えて飼育室内の個別ケージ内で1週間の予備飼育の後、実験を開始した。実験開始日における体重範囲はそれぞれ180-200, 450-550および700-900 gであった。飼育室内の照明は午前6時点灯、午後6時消灯の12時間:12時間の明暗サイクルとした。また、飼育室内の温度は23-27°Cの範囲にあり、湿度は50-70%の範囲にあった。

### 2) 使用薬物

(一)ニコチン(丸若化学)、塩酸メカミラミン(Sigma)、塩酸ヘキサメソニウム(Sigma)、フェノバルビタール(東京化成)、ジアゼパム(セルシン®注射用、武田薬品)、ハロペリドール(セレネース®注射用、大日本製薬)、スルピリド(Sigma)、SCH-23390(Research Biochemicals Inc.)およびMK-801(Research Biochemicals Inc.)を用いた。投与容量は腹腔内投与の場合1 ml/kg体重、脳室内投与の場合1側につき1-2  $\mu$ lとなるように用時調製した。ニコチンの急性毒性は日内変動を示すことが明らかにされている<sup>19)</sup>ため、ニコチンの投与はすべて午前10時から午後2時の間に行った。

### 3) ラットの側脳室へのガイド管の植え込みと薬物の脳室内投与の方法

6週齢のラットをベントバルビタールナトリウム(40 mg/kg, i. p.)による麻酔下で脳定位固定装置に保定した。そしてラットの側脳室に23ゲージのガイド管を両側性に植え込んだ。側脳室の位置はPaxinos and Watsonの脳図譜<sup>20)</sup>に従って、目的とする部位の1 mm上方の位置にガイド管の先端が到達するように植え込み、ガイド管を固定用のスクリューポストとともに頭蓋骨に歯科用セメントで固定した。

このラットを7日間飼育した後、実験に使用した。薬物の投与はマイクロシリンジを用いて、ガイド管よりも1 mm長い30ゲージの内筒針を挿入し、右側から左側の

順に緩徐に行なった。実験終了後、エーテル深麻酔下でガイド管より薬物投与時と同容量のトリパンブルー溶液を投与し、投与部位を組織学的に確認した。

4) ニコチンによる振戦、痙攣および致死効果の測定  
ニコチンの投与30分前に、ラットを透明アクリル樹脂性測定用ケージ(37×21×15 cm)の中に入れ、腹腔内または脳室内へ急性投与した後、その効果を観察した。ニコチンの投与用量は腹腔内投与では1-30 mg/kg 体重、脳室内投与では20-1000  $\mu\text{g}/\text{side}$  を用いた。ニコチン投与後、用量別に振戦、間代性および強直性痙攣の発現時間、後肢の麻痺からの回復時間および死亡時間をストップウォッチにて測定した。

5) ニコチンによる痙攣および致死効果におよぼす諸種薬物の作用の観察

メカミラミン、ヘキサメソニウム、フェノバルビタール、ジアゼパムまたはハロペリドールの腹腔内投与15分後に、ニコチン(450  $\mu\text{g}/\text{side}$ )の脳室内投与を行って、振戦・間代性痙攣・強直性痙攣および致死の発現率を測定した。

また、メカミラミン、ジアゼパム、ハロペリドール、スルピリド、SCH-23390 または MK-801 を側脳室に投与し、5分後にニコチン(24.5 mg/kg)の腹腔内投与を行って、その急性効果を上述と同様に観察した。

6) ニコチン濃度の測定

ラットにニコチン(10 または 24.5 mg/kg)を腹腔内投与し、生存例においては、脳内のニコチン濃度が最高値を示す15分後<sup>21)</sup>に断頭し、速やかに採血ならびに氷上にて脳の摘出を行った。また、15分までに死亡したラッ

トは死亡後直ちに採血ならびに脳の摘出を行った。脳は Glowinski and Iversen の方法<sup>22)</sup>に準拠して、大脳、中脳、小脳、延脳、視床下部、海馬および線条体の7つの部位に分けた。それらを秤量後直ちに液体窒素にて凍結し、-100°Cで測定日まで保存した。ニコチン濃度の測定は当教室既報の方法<sup>10)</sup>に準拠し、高感度窒素検出器ガスクロマトグラフィー(Model 163, 日立)により行った。

7) 脳内アミン含量の測定

ラットにニコチンまたは生理的食塩水を腹腔内投与し、ニコチン濃度測定の場合と同様に作成した視床下部、海馬および線条体を用いて、ノルアドレナリン(NA)、ドーパミン(DA)、セロトニン(5-HT)および代謝物である3, 4-ジヒドロフェニル酢酸(DOPAC)、ホモバニリン酸(HVA)、5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)の含量を、Mayer and Shoup の方法<sup>23)</sup>を1部改良した方法で測定した<sup>24)</sup>。

8) 線条体の電氣的破壊

線条体の破壊は、直径0.7 mm のステンレス製 TM 型電極を備えた RFG-4A 型 Lesion Generator(室町機械)を用いて行った。ラットを脳定位固定装置に保定した後、線条体の位置にあたる頭蓋の両側部位に骨窓を作成した。破壊部位は Paxinos and Watson の脳図譜<sup>20)</sup>に従い、TM 電極の電流約 5 mA・損傷組織の温度 65°C・通電時間 2 分の条件で破壊した。また電流を流さないものを対照群とした。このように作成したラットを7日間飼育した後、実験に使用した。実験終了後、破壊を行なった部位を組織学的に確認した。

9) 肝のニコチン代謝酵素活性およびチトクローム P

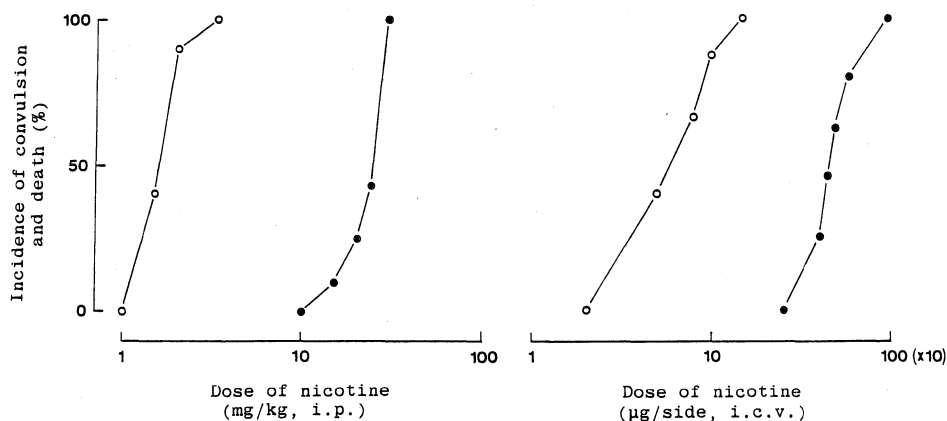


Fig. 1. Incidence of convulsion and death after an acute intraperitoneal (left panel) or intracerebroventricular (right panel) injection of nicotine in young rats. Six to twenty-one rats were tested at each dose. ○: Incidence of nicotine-induced convulsion, ●: Incidence of nicotine-induced death.

## -450 の測定

若齢, 中間齢, 老齢ラットに, 生理的食塩水を投与した後, 15 分後に断頭し, 開腹後直ちに肝を摘出した。肝は秤量後, 氷冷した生理的食塩水にて灌流し, 4 倍量の 1.15% KCl 0.2 M Phosphate buffer (pH 7.4) を加えて, 氷冷したテフロンヘッド付ガラスホモジナイザーにてホモジナイズした。この肝ホモジネートを 0°C, 10,000 xg で 15 分間遠心分離し, その上清の一部をニコチン酸化酵素活性の測定に, 残りをさらに 105,000 xg, 60 分, 0°C にて分離し, そのマイクロソームのペレットをフラビン含有モノオキシゲナーゼ活性およびチトクローム P-450 含量の測定に用いた。ニコチン酸化酵素活性の測定は当教室既報の如く Hucker<sup>25)</sup>らの方法を一部改良して行なった<sup>17)</sup>。また, フラビン含有モノオキシゲナーゼ活性およびチトクローム P-450 含量の測定は, それぞれ Pettit and Ziegler<sup>26)</sup>, Omura and Sato<sup>27)</sup>の方法に準拠した。また, 蛋白質量の測定は Lowry ら<sup>28)</sup>の方法に準拠した。

## 10) 統計処理

計量データはすべて平均値±標準誤差で示した。群間比較による薬物投与群の有意差検定には, 一元配置分散分析 (ANOVA) を用いた。また, 対照群との比較において, 計量データは Student's *t*-test にて, 計数データは  $\chi^2$ -test にて行った。いずれも危険率 5% 未満を有意とした。LD<sub>50</sub> 値および CD<sub>50</sub> 値は Litchfield-wilcoxon の方法により算出した。

## 結 果

## 1) ニコチンの腹腔内投与または脳室内投与による急性毒性の発現率

ニコチンを腹腔内または脳室内へ急性投与した時の痙攣発現率および致死率を Fig. 1 に示す。ニコチンによる痙攣および致死効果は, いずれの投与においても用量依存的に増強された。腹腔内投与における CD<sub>50</sub> 値および LD<sub>50</sub> 値はそれぞれ 1.58 mg/kg (1.37-1.84), 22.5 mg/kg (19.5-26.1) となり, 脳室内投与では, それぞれ 59.0  $\mu$ g/side (42.3-82.2), 479.98  $\mu$ g/side (425.62-541.28) であった。

## 2) ニコチンの腹腔内投与または脳室内投与後の振戦・間代性痙攣・強直性痙攣の発現時間, 間代性・強直性痙攣の持続時間および回復時間

ニコチンの腹腔内投与または脳室内投与後の振戦・間代性痙攣・強直性痙攣の発現時間, 間代性・強直性痙攣の持続時間および回復に要する時間を Fig. 2 に示す。ニコチンの脳室内投与によって観察される急性効果は腹腔内投与による場合と同様であった。すなわち, ラットは

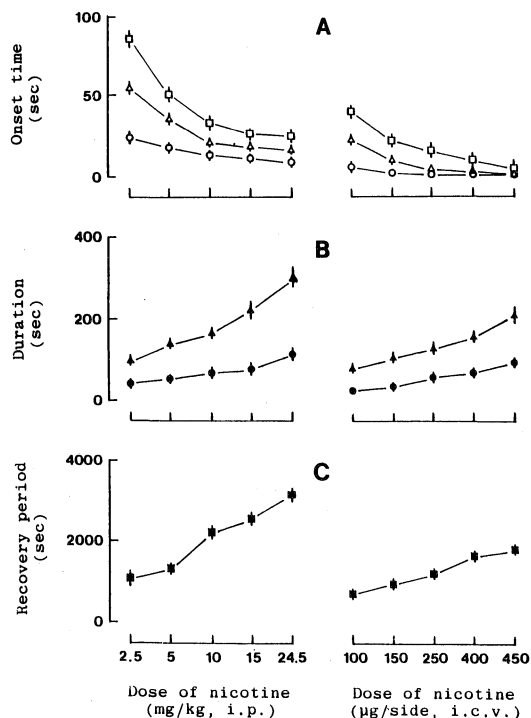


Fig. 2. Dose-response curves for nicotine-induced convulsant effects in young rats. Rats received an acute intraperitoneal (left panels) or intracerebroventricular (right panels) injection of nicotine. A: Onset times of tremor (○), clonic convulsion (△) and tonic convulsion (□), B: durations of clonic convulsion (▲) and tonic convulsion (●), C: Recovery period from the paralysis of rat hind legs (■). Each point represents the mean ± S. E. M. of 6-12 rats. The results of the one-way analyses of variance were: F(4, 42)=10.54,  $P < 0.01$ , F(4, 25)=7.83,  $P < 0.01$  (onset time of tremor), F(4, 42)=29.03,  $P < 0.01$ , F(4, 25)=20.18,  $P < 0.01$  (onset time of clonic convulsion), F(4, 42)=13.67,  $P < 0.01$ , F(4, 25)=42.98,  $P < 0.01$  (onset time of tonic convulsion), F(4, 42)=25.76,  $P < 0.01$ , F(4, 25)=12.64,  $P < 0.01$  (duration of clonic convulsion), F(4, 42)=16.7,  $P < 0.01$ , F(4, 25)=45.64,  $P < 0.01$  (duration of tonic convulsion) and F(4, 42)=85.86,  $P < 0.01$ , F(4, 25)=27.61,  $P < 0.01$  (recovery period) after an i. p. or i. c. v. injection of nicotine, respectively.

平伏した後、振戦が引き起こされ、さらに症状が進行すると間代性痙攣および強直性痙攣が観察された。いずれの投与方法においても、振戦、間代性および強直性痙攣の

発現時間は、用量依存的に短縮した。一方、痙攣の持続時間および回復に要する時間は用量依存的に延長した。しかし、脳室内投与による場合は腹腔内投与に比べ、振

Table 1. Effects of acute nicotine injection on monoamine levels in striatum of rats

Monoamines	Saline	Nicotine		
		1 mg/kg	10 mg/kg	24.5 mg/kg
Young				
NA	88±4	86±9	98±4	109±6*
DA	8446±216	8460±336	8992±190*	9691±300**
DOPAC	1142±45	1118±53	1504±101**	1934±39**
HVA	549±33	507±21	711±40*	808±33**
5-HT	341±34	376±13	398±36	449±49*
5-HIAA	229±21	232±34	284±15	274±33
(DOPAC+HVA)/DA	0.20±0.01	0.19±0.01	0.25±0.01**	0.28±0.01**
5-HIAA/5-HT	0.75±0.12	0.63±0.05	0.89±0.13	0.85±0.07
Old				
NA	64±5**			82±7
DA	6281±286**			6374±246
DOPAC	912±39**			1052±68
HVA	458±23**			455±21
5-HT	176±9**			205±17
5-HIAA	142±17*			189±42
(DOPAC+HVA)/DA	0.22±0.01			0.24±0.01
5-HIAA/5-HT	0.79±0.05			0.75±0.12

All rats received an acute intraperitoneal injection of nicotine or saline 15 min before sacrifice. All data represent the mean ± S. E. M. of 5-10 rats. \* P<0.05, \*\* P<0.01 : compared to saline-treated young rats.

Table 2. Effects of acute nicotine injection on monoamine levels in hypothalamus of rats

Monoamines	Saline	Nicotine		
		1 mg/kg	10 mg/kg	24.5 mg/kg
Young				
NA	1399±51	1176±66*	1309±86	1384±114
DA	1067±68	1164±65	973±31	1089±63
DOPAC	185±13	276±14**	253±24*	250±12**
HVA	82±7	103±12	88±7	90±9
5-HT	732±58	803±20	783±52	778±46
5-HIAA	341±12	295±13*	357±25	355±41
(DOPAC+HVA)/DA	0.26±0.02	0.33±0.02*	0.35±0.03*	0.32±0.02
5-HIAA/5-HT	0.50±0.05	0.43±0.04	0.52±0.07	0.58±0.08
Old				
NA	1036±128			1022±45
DA	816±176			829±55
DOPAC	108±19**			119±5
HVA	64±9			58±6
5-HT	536±67			511±32
5-HIAA	309±29			401±34
(DOPAC+HVA)/DA	0.24±0.04			0.22±0.01
5-HIAA/5-HT	0.66±0.15			0.69±0.07

All rats received an acute intraperitoneal injection of nicotine or saline 15 min before sacrifice. All data represent the mean ± S. E. M. of 5-10 rats. \* P<0.05, \*\* P<0.01 : compared to saline-treated young rats.

Table 3. Effects of acute nicotine injection on monoamine levels in hippocampus of rats

Monoamines	Saline	Nicotine		
		1 mg/kg	10 mg/kg	24.5 mg/kg
Young				
NA	217±14	145±14**	198±20	215±20
DA	75±4	89±11	77±6	109±3**
DOPAC	22±2	34±3*	36±6	57±8*
HVA	22±1	22±4	29±5	50±6*
5-HT	260±11	311±48	297±28	317±43
5-HIAA	231±14	177±35	256±29	270±37
(DOPAC+HVA)/DA	0.63±0.08	0.71±0.14	0.89±0.13	0.99±0.06*
5-HIAA/5-HT	0.90±0.06	0.74±0.29	0.95±0.13	0.86±0.13
Old				
NA	157±12*			168±11
DA	34±6**			36±4
DOPAC	9±2**			8±3
HVA	17±4			18±4
5-HT	193±14**			218±20
5-HIAA	199±32			242±51
(DOPAC+HVA)/DA	0.75±0.07			0.69±0.08
5-HIAA/5-HT	1.01±0.11			1.16±0.24

All rats received an acute intraperitoneal injection of nicotine or saline 15 min before sacrifice. All data represent the mean ± S. E. M. of 5-10 rats. \* P<0.05, \*\* P<0.01: compared to saline-treated young rats.

戦、間代性及び強直性痙攣の発現は非常に速く、また痙攣の持続時間および回復に要する時間も短かった。

3) ニコチンの急性投与による脳内モノアミン含量の変化

ニコチン(1, 10 または 24.5 mg/kg)を若齢ラットに腹腔内投与し、15分後の生存例における脳内モノアミン含量を測定した結果を Table 1, 2, 3 に示す。

ニコチンの急性投与により、線条体、視床下部・海馬において、DA, DOPAC および HVA の増加または増加傾向が観察され、とくに 10 mg/kg 投与群の線条体、24.5 mg/kg 投与群の線条体・海馬において著明な増加が認められた。このようなニコチンによる DA またはその代謝物(DOPAC・HVA)の含量の著明な増加に対し、NA および 5-HT 含量の変化を示した部位は少なかった。また、DOPAC+HVA に対する DA 含量の割合は、線条体では 10 および 24.5 mg/kg 投与群で、視床下部では 1 および 10 mg/kg 投与群で、海馬では 24.5 mg/kg 投与群でそれぞれ増加を示した。一方、5-HIAA に対する 5-HT 含量の割合は、いずれの部位においても変化は認められなかった。

4) ニコチンによる痙攣および致死効果に対する各種薬物の効果

ニコチンの腹腔内投与または側脳室内投与によって引き起こされる痙攣および致死効果に対する各種薬物の効

果を Table 4, 5 に示す。

メカミラミンの前処置により、ニコチンの急性毒性は用量依存的に抑制された。とくに腹腔内へ 5 mg/kg または側脳室内へ 100 μg/side を前投与した場合、すべてのニコチンによる急性毒性効果が拮抗された。一方、ヘキサメソニウムの腹腔内への前投与による効果は認めなかった。フェノバルビタールまたはジアゼパムの前投与により、ニコチンの急性毒性効果は用量依存的に抑制された。ハロペリドールの腹腔内または脳室内への前投与、スルピリドの脳室内への前投与は、いずれもニコチンによる急性効果に影響を与えなかった。しかし、SCH-23390 の脳室内への前投与により、ニコチンによる痙攣および致死効果は著明に抑制された。さらに、MK-801 の脳室内への前投与により、ニコチンによる痙攣および致死効果は抑制された。

5) ニコチンによる痙攣および致死効果におよぼす線条体の破壊の効果

線条体を破壊したラットにおけるニコチン(5 または 24.5 mg/kg)の腹腔内投与後の痙攣または致死効果を Table 6 に示す。線条体の破壊によりニコチンによる振戦および間代性痙攣の発現は遅れ、間代性痙攣の持続は短くなり、強直性痙攣の発現は抑制された。また、線条体破壊により、ニコチン(24.5 mg/kg, i. p.)による致死効果は抑制された。

Table 4. Effects of intraperitoneal pretreatment of various agonists or antagonists on nicotine-induced convulsion and death in rats

Drugs	Dose (mg/kg, i. p.)	Tremor (/n)	Convulsion		Death (/n)
			Clonic (/n)	Tonic (/n)	
—	—	13/13	13/13	13/13	6/13
Mecamylamine	2.5	3/5	2/5*	2/5*	1/5
	5	0/11**	0/11**	0/11**	0/11*
Hexamethonium	5	11/11	11/11	11/11	5/11
	10	5/5	5/5	4/5	2/5
Phenobarbital	30	4/5	4/5	2/5*	2/5
	50	3/11**	1/11**	0/11**	0/11*
Diazepam	2.5	2/3	1/3*	1/3*	0/3
	5	5/11**	3/11**	0/11**	0/11*
Haloperidol	5	4/4	4/4	4/4	3/4
	10	8/8	7/8	6/8	2/8

All drugs were pretreated intraperitoneally 15 min before an intracerebroventricular injection of nicotine (450  $\mu$ g/side). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; compared to control group by  $\chi^2$ -test. n : number of rats.

Table 5. Effects of intracerebroventricular pretreatment of various agonists or antagonists on nicotine-induced convulsion and death in rats

Drugs	Dose ( $\mu$ g/side, i. c. v.)	Tremor (/n)	Convulsion		Death (/n)
			Clonic (/n)	Tonic (/n)	
—	—	11/11	11/11	11/11	6/11
Mecamylamine	20	3/3	3/3	1/3*	1/3
	50	2/8**	2/8**	0/8**	0/8*
	100	0/6**	0/6**	0/6**	0/6*
Diazepam	10	6/6	1/6**	0/6**	0/6*
	30	3/6*	0/6**	0/6**	0/6*
Haloperidol	10	8/8	8/8	7/8	6/8
	30	3/3	3/3	3/3	2/3
Sulpiride	10	6/6	6/6	5/6	4/6
SCH-23390	5	4/4	3/4	1/4**	1/4
	10	8/8	4/8*	2/8**	0/8*
MK-801	20	3/3	3/3	1/3*	0/3
	40	8/8	2/8**	0/8**	0/8*

All drugs were pretreated intracerebroventricularly 5 min before an intraperitoneal injection of nicotine (24.5 mg/kg). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; compared to control group by  $\chi^2$ -test. n : number of rats.

6) 老齢ラットにおけるニコチンの急性毒性, 血液中および脳内ニコチン濃度およびニコチンの脳内モノアミン含量におよぼす効果

a) 老齢ラットにおけるニコチンの腹腔内投与後の振戦の発現時間, 痙攣の発現および持続時間, 致死率を Table 7 に示す。ニコチン(5 mg/kg, i. p.)による老齢ラットの間代性痙攣および強直性痙攣の持続時間は, 若齢

Table 6. Effects of striatal lesion on nicotine-induced convulsion and death

	Dose of nicotine (mg/kg)	Tremor		Clonic convulsion		Tonic convulsion		Death (/n)
		Onset (sec)	Onset (sec)	Duration (sec)	Duration (sec)	Onset (sec)	Duration (sec)	
Sham-operated	5	19 $\pm$ 1	34 $\pm$ 4	146 $\pm$ 23	5/5	0/5	5/5	0/5
	24.5	10 $\pm$ 1	14 $\pm$ 2	272 $\pm$ 31	5/5	4/5	5/5	4/5
Striatal lesion	5	56 $\pm$ 12*	73 $\pm$ 11*	70 $\pm$ 15*	1/6*	0/6	1/6*	0/6
	24.5	38 $\pm$ 13*	35 $\pm$ 9*	151 $\pm$ 30*	1/5*	0/5*	1/5*	0/5*

Nicotine (5 or 24.5 mg/kg) was injected intraperitoneally at 7-th day after striatal lesions or sham-operation. The values of onset time and duration represent the mean  $\pm$  S. E. M. of 5-6 rats. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; compared to sham-operated rats. n : number of rats.

Table 7. Effect of age on onset times of tremor and convulsions, durations of convulsions and lethality induced by nicotine

Age	Dose of nicotine (mg/kg)	Tremor		Clonic convulsion		Tonic convulsion		Death (/n)
		Onset (sec)	Onset (sec)	Duration (sec)	Duration (sec)	Onset (sec)	Duration (sec)	
Young	5	12 $\pm$ 1	24 $\pm$ 2	145 $\pm$ 6	50 $\pm$ 5	52 $\pm$ 4	0/10	
	24.5	8 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	299 $\pm$ 23	23 $\pm$ 2	82 $\pm$ 7	9/21	
Old	5	17 $\pm$ 3	30 $\pm$ 6	99 $\pm$ 17*	63 $\pm$ 9	34 $\pm$ 6*	0/5	
	24.5	11 $\pm$ 3	20 $\pm$ 3	248 $\pm$ 41	26 $\pm$ 5	63 $\pm$ 8	12/16	

All rats received an acute intraperitoneal injection of nicotine (5 or 24.5 mg/kg). The values of onset times and durations represent the mean  $\pm$  S. E. M. of 4-10 rats. \*  $p < 0.05$ ; compared to young rats.

Table 8. Blood and cortex nicotine levels in young and old rats

Age	Nicotine levels		Time to death (sec)	
	Blood ( $\mu$ g/ml)	Cortex ( $\mu$ g/g)		
Young	Alive	5.23 $\pm$ 0.37	23.23 $\pm$ 1.52	—
	Dead	1.91 $\pm$ 0.45	6.49 $\pm$ 1.93	260 $\pm$ 63
Old	Alive	8.36 $\pm$ 0.49**	31.77 $\pm$ 1.27**	—
	Dead	5.66 $\pm$ 0.43**	20.97 $\pm$ 1.35**	601 $\pm$ 47**

All rats received an acute intraperitoneal injection of nicotine (24.5 mg/kg) 15 min before sacrifice. The dead rats after nicotine injection were rapidly decapitated at death. The values represent the mean  $\pm$  S. E. M. of 4-12 rats. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; compared to young rats.

ラットより減少した。振戦および痙攣の発現は老齢ラットでは遅れる傾向があった。ニコチン(24.5 mg/kg, i. p.)による致死率は, 若齢ラットに比べて老齢ラットの方が高い傾向があった( $\chi^2 = 2.625$ ).

b) 老齢ラットにニコチン(24.5 mg/kg, i. p.)を急性投与し、生存例において投与後 15 分時の、死亡例においては死亡時の血液および大脳皮質のニコチン濃度を Table 8 に示す。15 分時の血液および大脳皮質のニコチン濃度は若齢より老齢の方が高く、致死時の血液および大脳皮質のニコチン濃度は老齢ラットの方が高かった。死亡するまでの時間は老齢ラットの方が長かった。

c) ニコチン(24.5 mg/kg)または生理的食塩水を老齢ラットに腹腔内投与した後、15 分での脳内モノアミン含量を、Table 1, 2, 3 に示す。生理的食塩水投与群において、老齢ラットは若齢に比べ、線条体のすべてのモノアミン含量、視床下部の DOPAC 含量、海馬の NA・DA・DOPAC・5-HT 含量が減少していた。しかし、いずれの部位においても、ニコチン(24.5 mg/kg, i. p.)によるモノアミン含量の変化は認めなかった。老齢ラットの DOPAC+HVA に対する DA 含量および 5-HIAA に対する 5-HT 含量の割合は、対照群において若齢との違いは認められなかった。また、これらの割合はニコチンの急性投与後も変化しなかった。

7) 加齢による肝のニコチン代謝酵素活性およびチトクローム P-450 含量の変化。

若齢、中間齢および老齢ラットにおける肝のニコチン酸化酵素活性、フラビン含有モノオキシゲナーゼ活性およびチトクローム P-450 含量を Table 9 に示す。代謝酵素活性および P-450 含量はいずれも若齢に比べ、老齢では有意に低下しており、中間齢では減少する傾向を認めた。

## 考 察

高用量ニコチンのラット側脳室内投与によって引き起

Table 9. Effects of aging on content of cytochrome P-450 and specific activities of nicotine oxidase and flavin-containing monooxygenase in rat liver

Age	Cytochrome P-450 content (nmole/mg protein)	Nicotine oxidase activity (nmole/min/mg protein)	Flavin-containing monooxygenase activity (nmole/min/mg protein)
Young (n=14)	0.634±0.025	184.8±9.0	19.566±2.169
Middle-aged (n=6)	0.596±0.015	163.2±9.0	18.601±0.796
Old (n=5)	0.265±0.031##	85.0±10.8##	4.903±0.647##

All rats received an acute intraperitoneal injection of saline at 15 min before sacrifice. The values represent the mean ± S. E. M. \*\* P<0.01, compared to young rats; ##P<0.01, compared to middle-aged rats. n: number of rats.

こされる急性毒性は、腹腔内投与による場合と同様の経過をたどった。すなわち、平伏・振戦が観察された後、速やかに間代性および強直性痙攣へと移行した。これら一連のニコチンによる急性毒性は両投与方法において、用量依存的に増強された。また、ニコチンの側脳室内投与による急性毒性は腹腔内投与による場合より、それらの発現は速まり、作用の持続は短かった。一方、ニコチンは副腎髄質からカテコールアミンの遊離を生ずることが知られている<sup>7)</sup>。また、副腎を摘出したラットではニコチンによる痙攣効果は減弱されること、アドレナリンまたは NA の前投与により、痙攣効果は増強されることが報告されている<sup>29)</sup>。さらに、ニコチンの体内動態から考察しても、側脳室内に投与されたニコチンは、いずれ循環系を介し末梢へ移行するが、その速度は遅く、その代謝速度からもほとんど末梢作用は現われないことが知られている<sup>3)</sup>。したがって、両投与方法の間に認められたニコチンの急性毒性の相違の原因の一つには、脳室内投与の場合、ニコチンによる末梢作用、とくに副腎髄質からのカテコールアミン遊離を免れたことが考えられる。

また、ニコチンの側脳室内投与により引き起こされる一連の急性毒性は、メカミラミンの腹腔内投与により用量依存的に抑制され、ヘキサメトニウムの腹腔内投与では拮抗されなかったことから、中枢を介するものと考えられた。

高用量のニコチンの急性腹腔内投与により、脳内の DA またはその代謝物の含量は、5-HT・5-HIAA・NA 含量に比べ著明に変化し、脳内のいずれの部位においても、増加または増加傾向を示した。ニコチンの神経化学的研究において、ラットの線条体・側坐核および他のいくつかの部位からのニコチンによる DA の遊離が確認されている<sup>30,31)</sup>。そのため、ニコチンによる DA の遊離作用はこれらの部位に局在する nAChRs を介し、間接的にドーパミンを遊離していることが示唆されている<sup>5,9)</sup>。したがって、ニコチンの急性毒性には中枢の nAChRs を介する DA 遊離作用の関与が考えられる。低用量のニコチンを用いた行動薬理学的研究においても、その急性投与による移所運動促進効果と中枢の DA 遊離作用との関連が報告されており、とくに中脳辺縁系 DA 神経系の関与が示唆されている<sup>9,32,33)</sup>。しかし、高用量のニコチンを用いた本研究において、DA 含量の増加がとくに線条体において著明であることより、ニコチンによる急性毒性には中脳辺縁系 DA 神経系のみならず黒質一線条件 DA 神経系の関与も考えられる。

このニコチンによる急性毒性はドーパミン D1 受容体アンタゴニストの前投与により抑制された。しかし、ド



ーパミン D2 受容体アンタゴニストの前投与による効果は認められなかった。このことより、ニコチンの急性毒性にはドーパミン D1 受容体の関与が大きい可能性が示唆される。しかし、その詳細なメカニズムは未だ不明な点が多い。神経化学的研究により、ドーパミン D1 受容体は黒質および線条体に豊富であることが認められている<sup>34)</sup>ので、著者は、ニコチンによる痙攣および致死効果と黒質一線条体 DA 神経系との関係を検討するため、その終末である線条体の電氣的破壊を行い、ニコチンによる急性毒性におよぼす影響を調べた結果、ニコチンによる痙攣および致死効果が抑制された。したがって、ニコチンによる急性毒性の伝播には、黒質一線条体 DA 神経系の関与が考えられる。

さらに、非選択的 NMDA 受容体アンタゴニストである MK-801 の前投与により、ニコチンの急性効果は著明に抑制された。最近、MK-801 が DA 神経系に影響を及ぼすことが示唆され<sup>35)</sup>、また神経薬理学的研究により、MK-801 は nAChRs のイオンチャンネルを遮断することが明らかにされている<sup>36)</sup>。MK-801 によるニコチンの急性毒性の抑制は、DA 神経系を介するか、あるいは nAChRs のイオンチャンネルに作用しているのか、さらに今後の検討が必要であると考えられる。

ニコチン(24.5 mg/kg, i. p.)による致死率は、若齢ラットに比べ、老齢では高い傾向がみられた。また、老齢ラットの血液および大脳のニコチン濃度は若齢ラットに比べ著明に増加していた。この老齢ラットにおけるニコチン濃度の増加は、肝のニコチン代謝能の著しい低下によるものと考えられる。一般に、加齢にともない2年齢付近の老齢ラットでは、薬物代謝能は低下すると考えられている<sup>37)</sup>。また薬物の急性毒性効果と加齢の関連について、加藤ら<sup>38)</sup>は、ストリキニーネによる急性毒性は老齢ラットでは増加し、肝の代謝酵素活性の低下の関与を報告している。したがって、老齢ラットにおけるニコチン代謝能の低下は、急性毒性に影響を及ぼすことが考えられる。

一方、老齢ラットでは、脳内ニコチン濃度が高いにもかかわらず、ニコチンによる脳内モノアミン含量の増加を、脳内のいずれの部位においても認めなかった。また、脳内の nAChRs と加齢との関連において、脳内の nAChRs 数は加齢にともない減少することが報告されている<sup>17,18)</sup>。以上のことを考え合わせると、老齢ラットにおいて、脳内の nAChRs 数の減少によるニコチンに対する感受性の低下が示唆される。

以上より、ニコチンの急性毒性には中枢神経系の nAChRs を介する DA および GABA 神経系の関与、特

に黒質一線条体 DA 神経系の関与が示唆された。ことに、老齢ラットでのニコチン急性毒性は、肝の代謝能低下および中枢 nAChRs を介する感受性低下の相互の影響が指摘される。

## 結 語

1) ニコチンの急性毒性において、腹腔内投与による CD<sub>50</sub>値および LD<sub>50</sub>値は、それぞれ 1.58 mg/kg(1.37-1.84)、22.5 mg/kg(19.5-26.1)となり、脳室内投与によるそれぞれの値は、59.0 μg/side(42.3-82.2)、479.98 μg/side(425.62-541.28)であった。また、その急性毒性の経過は両投与方法で類似していたが、側脳室内投与では、毒性発現は早く、持続時間および回復時間は短かった。さらに、ニコチンの急性毒性はメカミラミンの前投与により拮抗され、ヘキサメソニウムの腹腔内への前投与により抑制されなかった。これらのことより、ニコチンの急性毒性は中枢を介して発現することを明らかにした。

2) ニコチンの急性毒性の発現時において、線条体の DA 含量の著明な増加が認められ、線条体の電氣的破壊よりニコチンによる痙攣が抑制された。またニコチンの急性毒性の発現はドーパミン D2 受容体アンタゴニストであるハロペリドールおよびスルピリドの前投与では拮抗されず、選択的ドーパミン D1 受容体アンタゴニストである SCH-23390 の前投与により、著明に抑制された。これらのことより、ニコチンによる急性毒性は黒質一線条体 DA 神経系が関係し、また、その伝播過程においてドーパミン D1 受容体の関与が大きいことが示唆された。

3) GABA 受容体作用薬および NMDA 受容体拮抗薬の前処置により、ニコチンによる急性毒性が抑制されたことより、GABA 神経系および興奮性アミノ酸神経系の関与が示唆された。

4) 老齢ラットにおけるニコチン急性毒性は、肝のニコチン代謝物とニコチンに対する中枢感受性の低下の相互の影響が指摘された。

本研究の要旨は、第 78 回(1990)日本薬理学会近畿部会(高松)、第 64 回(1991)日本薬理学会総会(神戸)、第 80 回(1991)日本薬理学会近畿部会(神戸)、第 65 回(1992)日本薬理学会総会(仙台)において発表した。また、本研究の一部は、平成元、2、3 年度文部省科学研究費一般研究 C(研究課題番号 01570112)の援助を受けた。

稿を終える臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜った中嶋敏勝教授に深甚の謝意を捧げると共に、御校閲を賜った第 2 生理学榎 泰義教授、口腔外科学杉村正仁

教授に深謝致します。また、本研究を行うにあたり多大な御援助を頂いた教室の諸兄に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 中嶋敏勝：アカゲザルとイヌにおける $^3\text{H}$ -Nicotineの組織分布. 日薬理誌. 68: 29, 1972.
- 2) Silvette, H., Hoff, E. C., Larson, P. S. and Haag, H. B. : The actions of nicotine on central nervous system functions. Pharmacol. Rev. 14: 137, 1962.
- 3) 辻本 明：脳の薬理学. 医歯薬出版, 東京, p543, 1975.
- 4) Hall, G. H. : Pharmacological responses to the intracerebral administration of nicotine. Pharmacol. Ther. 15: 223, 1982.
- 5) Sershen, H. : Nicotine. in Handbook of Neurochemistry (Lajitha, A., ed.). 2nd. ed., Vol. 10, Plenum press, New York, p263, 1985.
- 6) Clarke, P. B. S. : Nicotine and smoking: a perspective from animal studies. Psychopharmacology 92: 135, 1987.
- 7) Grenhoff, J. and Svensson, T. H. : Pharmacology of nicotine. Br. J. Add. 84: 477, 1989.
- 8) 喜多大三, 中嶋敏勝：自発運動活性を指標としたニコチン作用の耐性と逆耐性. 日薬理誌. 94: 103, 1989.
- 9) Pomerleau, O. F. and Rosecrans, J. : Neuroregulatory effects of nicotine. Psychoneuroendocrinology 14: 407, 1989.
- 10) Okamoto, M., Kita, T., Okuda, H. and Nakashima, T. : Tolerance to the convulsions induced by daily nicotine treatment in rats. Japan. J. Pharmacol. 59: 449, 1992.
- 11) Yamamoto, I., Nagai, K. and Inoki, R. : The contents of dopa and catecholamines in several rat tissues and nicotine-induced convulsions. Japan. J. Pharmacol. 16: 295, 1966.
- 12) Sloan, J. W., Martin, W. R. and Bostwick, M. : Mechanisms involved in the respiratory depressant actions of nicotine in anesthetized rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 34: 559, 1989.
- 13) Godwin-Austen, R. B., Lee, P. N., Marmot, M. G. and Stern, G. M. : Smoking and Parkinson's disease. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 45: 577, 1982.
- 14) von Duijin, C. M. and Hofman, A. : Relation between nicotine intake and Alzheimer's disease. Br. Med. J. 302: 1491, 1991.
- 15) Araujo, D. M., Lapchak, P. A., Meaney, M. J., Collier, B. and Quirion, R. : Effects of aging on nicotinic and muscarinic autoreceptor function in the rat brain: relationship to presynaptic cholinergic markers and binding sites. J. Neurosci. 10: 3069, 1990.
- 16) Zhang, X., Wahlstrom, G. and Nordberg, A. : Influence of development and aging on nicotinic receptor subtypes in rodent brain. Int. J. Devl. Neurosci. 8: 715, 1990.
- 17) 中嶋敏勝, 仲西安正, 田中洋子, 黒河内寛：各種動物における Nicotine 代謝酵素活性の相違に関する研究 (3)ニコチン前処置動物の代謝酵素活性ならびにチトクローム P-450 含量について. 奈医誌. 31: 212, 1980.
- 18) 中嶋敏勝, 仲西安正, 山中雅世, 中山 均, 黒河内寛：各種動物における Nicotine 代謝酵素活性の相違に関する研究 (4)ニコチン前処置マウスの代謝活性ならびにチトクローム P-450 含量について. 奈医誌. 32: 17, 1981.
- 19) 仲西安正：ニコチン投与ラットにおける自発運動量, 薬物代謝活性および急性毒性の日周リズムに関する研究. 奈医誌. 35: 766, 1984.
- 20) Paxinos, G. and Watson, C. : The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd. ed., Academic Press, New York, 1986.
- 21) Kita, T., Nakashima, T., Shirase, M., Asahina, M. and Kurogouchi, Y. : Effects of nicotine on ambulatory activity in mice. Japan. J. Pharmacol. 46: 141, 1988.
- 22) Glowinski, J. and Iversen, L. L. : Regional studies of catecholamines in the rat brain-I, The disposition of [ $^3\text{H}$ ] norepinephrine, [ $^3\text{H}$ ] dopa in various regions of the brain. J. Neurochem. 13: 655, 1966.
- 23) Mayer, G. S. and Shoup, P. E. : Simultaneous multiple electrode liquid chromatographic-electrochemical assay for catecholamines, indoleamines and metabolites in brain tissue. J. Chromatogr. 255: 533, 1983.
- 24) 喜多大三：ニコチン連日投与によるラットの移所運動量増加効果の上昇に関する研究. 奈医誌. 39: 782,

- 1988.
- 25) **Hucker, L. B., Gillette, J. R. and Brodie, B. B.** : Enzymatic pathway for the formation of cotinine, a major metabolite of nicotine in rabbit liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **129** : 94, 1960.
- 26) **Pettit, F. H. and Ziegler, D. M.** : The catalytic demethylation of N, N-demethylaniline N-oxide by liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **13** : 193, 1963.
- 27) **Omura, T. and Sato, R.** : The carbon monoxide-binding-pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **239** : 2370, 1964.
- 28) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** : Protein measurement with Foline phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265, 1951.
- 29) **Laurence, D. R. and Stacey, R. S.** : Mechanism of the prevention of nicotine convulsions by hexamethonium and by adrenaline blocking agents. *Br. J. Pharmacol.* **8** : 62, 1953.
- 30) **Giorguieff - Chesselet, M. F., Kémel, M. L., Wandscheer, D. and Glowinski, J.** : Regulation of dopamine release by presynaptic nicotinic receptors in rat striatal slices : Effect of nicotine in a low concentration. *Life Sci.* **25** : 1257, 1979.
- 31) **Rowell, P. P., Carr, L. A. and Garner, A. C.** : Stimulation of [<sup>3</sup>H] dopamine release by nicotine in rat nucleus accumbens. *J. Neurochem.* **49** : 1449, 1987.
- 32) **Clarke, P. B. S.** : Dopaminergic mechanisms in the locomoter stimulant effects of nicotine. *Biochem. Pharmacol.* **40** : 1427, 1990.
- 33) **Kita, T., Okamoto, M. and Nakashima, T.** : Nicotine-induced sensitization to ambulatory stimulant effect produced by daily administration into the ventral tegmental area and the nucleus accumbens in rats. *Life Sci.* **50** : 583, 1991.
- 34) **Dawson, T. M., Barone, P., Sidhu, A., Wamsley, J. K. and Chase, T. N.** : The D1 dopamine receptor in the rats brain: quantitative autoradiographic localization using an iodinated ligand. *Neuroscience* **26** : 83, 1988.
- 35) **Shoib, M. and Stolerman, I. P.** : MK-801 attenuates behavioural adaptation to chronic nicotine administration in rats. *Br. J. Pharmacol.* **105** : 514, 1992.
- 36) **Amador, M. and Dani, J. A.** : MK-801 inhibition of nicotinic acetylcholine receptor channels. *Synapse* **7** : 207, 1991.
- 37) **Schmucker, D. L.** : Aging and drug disposition : an uptake. *Pharmacol. Rev.* **37** : 133, 1985.
- 38) **Kato, R. and Takanaka, A.** : Metabolism of drugs in old rats(II) : metabolism *in vivo* and effect of drugs in old rats. *Japan. J. Pharmacol.* **18** : 389, 1968.