

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-501265

(P2006-501265A)

(43) 公表日 平成18年1月12日(2006.1.12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 5 5
A 6 1 K 31/44 (2006.01)	A 6 1 K 31/44	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/24 (2006.01)	A 6 1 P 25/24	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/30 (2006.01)	A 6 1 P 25/30	
A 6 1 P 25/32 (2006.01)	A 6 1 P 25/32	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 101 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-535478 (P2004-535478)	(71) 出願人	597011463
(86) (22) 出願日	平成15年9月10日 (2003. 9. 10)		ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成17年4月19日 (2005. 4. 19)		スイス国、4 0 5 6 バーゼル、リヒトシ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2003/010061		ユトラーセ 3 5
(87) 国際公開番号	W02004/024150	(71) 出願人	593052785
(87) 国際公開日	平成16年3月25日 (2004. 3. 25)		ザ スクリップス リサーチ インスティ
(31) 優先権主張番号	60/409, 867		テュート
(32) 優先日	平成14年9月10日 (2002. 9. 10)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2
(33) 優先権主張国	米国 (US)		0 3 7 ラ ジョラ ノース トーリー
			パインズ ロード 1 0 5 5 0
		(74) 代理人	100062144
			弁理士 青山 稔
		(74) 代理人	100067035
			弁理士 岩崎 光隆
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 嗜癮および鬱病を含むMGLUレセプターに関連する疾患を処置するためのMGLUレセプター
アンタゴニスト

(57) 【要約】

少なくとも二つの異なるグループに属するmGluRの少なくとも二つを同時に阻害することによる、mGlu受容体に関連する疾患の処置法を提供する。一つの実施態様において、mGluR2、mGluR3、およびmGluR5を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を必要とする対象に投与することを含む、mGlu受容体2、3および5に関連する疾患の処置法を提供する。本方法により処置される疾患は、例えば、ニコチン嗜癖、コカイン嗜癖、および鬱病を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

代謝型グルタミン酸疾患の処置法であり、処置を必要とする対象に、代謝型 (metabotropic) グルタミン酸受容体 2、代謝型グルタミン酸受容体 3 および代謝型グルタミン酸受容体 5 を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、それにより疾患を処置することを含む、方法。

【請求項 2】

代謝型グルタミン酸疾患の処置法であり、処置を必要とする対象に、代謝型グルタミン酸受容体 2 および代謝型グルタミン酸受容体 5 を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、それにより疾患を処置することを含む、方法。

10

【請求項 3】

代謝型グルタミン酸疾患の処置法であり、処置を必要とする対象に、代謝型グルタミン酸受容体 3 および代謝型グルタミン酸受容体 5 を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、それにより疾患を処置することを含む、方法。

【請求項 4】

疾患が嗜癮障害である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

嗜癮障害がニコチン嗜癮、アルコール嗜癮、アヘン剤嗜癮、アンフェタミン嗜癮、メタンフェタミン嗜癮またはコカイン嗜癮である、請求項 4 記載の方法。

20

【請求項 6】

嗜癮障害がニコチン嗜癮である、請求項 4 記載の方法。

【請求項 7】

嗜癮障害がコカイン嗜癮である、請求項 4 記載の方法。

【請求項 8】

疾患が鬱病である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

アンタゴニストが 2-メチル-6-(フェニルエチニル)-ピリジンである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

(a) 代謝型グルタミン酸受容体 2 アンタゴニストおよび代謝型グルタミン酸受容体 3 アンタゴニストから選択される少なくとも一つの活性成分、および (b) 少なくとも一つの代謝型グルタミン酸受容体 5 アンタゴニスト (活性成分はいずれの場合も遊離形または薬学的に許容される塩形で存在する) と、所望により少なくとも一つの薬学的に許容される担体を含む；同時、別々または連続的使用のための組み合わせ。

30

【請求項 11】

(a) 代謝型グルタミン酸受容体 2 および代謝型グルタミン酸受容体 3 に対する拮抗作用を示す少なくとも一つの活性成分、および (b) 少なくとも一つの代謝型グルタミン酸受容体 5 アンタゴニスト (活性成分はいずれの場合も遊離形または薬学的に許容される塩形で存在する) と、所望により少なくとも一つの薬学的に許容される担体を含む；同時、別々または連続的使用のための組み合わせ。

40

【請求項 12】

(a) 少なくとも一つの代謝型グルタミン酸受容体 2 アンタゴニストおよび (b) 代謝型グルタミン酸受容体 3 および代謝型グルタミン酸受容体 5 に対する拮抗作用を示す少なくとも一つの活性成分 (活性成分はいずれの場合も遊離形または薬学的に許容される塩形で存在する) と、所望により少なくとも一つの薬学的に許容される担体を含む；同時、別々または連続的使用のための組み合わせ。

【請求項 13】

(a) 少なくとも一つの代謝型グルタミン酸受容体 3 アンタゴニストおよび (b) 代謝型グルタミン酸受容体 2 および代謝型グルタミン酸受容体 5 に対する拮抗作用を示す少なくとも一つの活性成分 (活性成分はいずれの場合も遊離形または薬学的に許容される塩形で存

50

在する)と、所望により少なくとも一つの薬学的に許容される担体を含む；同時、別々または連続的使用のための組み合わせ。

【請求項 1 4】

組み合わせ製剤または医薬組成物である、請求項 1 0 から 1 3 のいずれかに記載の組み合わせ。

【請求項 1 5】

嗜癮障害または鬱病の処置における、同時、別々または連続的使用のための、請求項 1 0 から 1 3 のいずれかに記載の組み合わせ。

【請求項 1 6】

嗜癮障害または鬱病に罹患している温血動物の処置法であり、動物に請求項 1 0 から 1 3 のいずれかに記載の組み合わせを、嗜癮障害または鬱病に対して併用療法で有効な量で投与することを含む、方法(ここで、化合物はまたその薬学的に許容される塩の形で存在できる)。

【請求項 1 7】

併用療法で嗜癮障害または鬱病に対して有効な量の請求項 1 0 から 1 3 のいずれかに記載の薬学的組み合わせと、少なくとも一つの薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項 1 8】

嗜癮障害または鬱病の処置用医薬の製造における、請求項 1 0 から 1 3 のいずれかに記載の組み合わせの使用。

【請求項 1 9】

請求項 1 0 から 1 3 のいずれかに記載の組み合わせを、嗜癮障害または鬱病の処置における、同時、別々または連続的使用のための指示書と共に含む、商業用包装物。

【請求項 2 0】

物質濫用の処置法であり、処置を必要とする対象に、有効量の m G l u R 2、m G l u R 3 および m G l u R 5 を調節する少なくとも一つのアンタゴニスト、または請求項 1 0 から 1 3 のいずれかに記載の組み合わせを投与することを含む方法(ここで、有効量是对象における物質に対する欲望および／または消費を減少させ、阻害し、または排除するのに十分な量である)。

【請求項 2 1】

物質がニコチン、アルコール、アヘン剤、アンフェタミン、メタンフェタミンまたはコカインである、請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

L Y 3 4 1 4 9 5 および 2 -メチル-6-(フェニルエチニル)-ピリジンを対象に投与する、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

非ヒト哺乳類の脳内自己刺激(I C S S)閾値を少なくとも部分的に正常化する既知阻害剤の能力を改善する薬剤のスクリーニング法であり：

a)対象の I C S S 閾値に影響を与え；

b)対象に、単独でまたは他の阻害剤と組み合わせで投与した場合 I C S S 閾値を少なくとも部分的に正常化する既知阻害剤の十分量を投与し、ここで、既知阻害剤が m G l u R 2、m G l u R 3 および m G l u R 5 の少なくとも一つのアンタゴニストであり；

b)非ヒト哺乳類対象に有効量の試験薬を投与し、ここで、試験薬は m G l u R 2、m G l u R 3 および m G l u R 5 の少なくとも一つの既知のまたは推測されるアンタゴニストであり；そして

c)試験薬が I C S S 閾値を少なくとも部分的に正常化する既知阻害剤の能力を改善するか否かを測定し、それにより、薬剤が I C S S 閾値を少なくとも部分的に正常化する既知阻害剤の能力を改善するかを同定することを含む、方法。

【請求項 2 4】

10

20

30

40

50

方法が、試験薬を、鬱病または嗜癮障害の処置に有用な薬剤として同定する、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

既知阻害剤が L Y 3 4 1 4 9 5 または 2-メチル-6-(フェニルエチニル)-ピリジンである、請求項 23 記載の方法。

【請求項 26】

試験薬が、常習性物質に対する欲望および／または消費を阻害する既知阻害剤の能力を改善する、請求項 23 記載の方法。

【請求項 27】

嗜癮障害の処置法であり：

10

a) 処置を必要とする対象に、第 1 期間は m G l u R 2、3 および 5 の少なくとも一つを調節する少なくとも一つのアンタゴニストを投与し、ここで第 1 期間は、対象が習慣的に常習性物質を使用する環境にすることが期待される、またはこの物質の存在下に刺激にさらされる期間であり；そして

b) 第 2 期間は m G l u R 2 および／または 3 の少なくとも一つを調節する少なくとも一つのアンタゴニストを投与し、ここで、第 2 期間は、対象が離脱および／または鬱病に苦しんでいる期間であること

を含む、方法。

【請求項 28】

2-メチル-6-(フェニルエチニル)-ピリジンおよび L Y 3 4 1 4 9 5 の一方または両方を第 1 期間に投与し、L Y 3 4 1 4 9 5 を第 2 期間に投与する、請求項 27 記載の方法。

20

【請求項 29】

鬱病の抑鬱症状および不安症状を処置する方法であり、処置を必要とする対象に、代謝型グルタミン酸受容体 2、代謝型グルタミン酸受容体 3 および代謝型グルタミン酸受容体 5 を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、それにより鬱病の抑鬱症状および不安症状を処置する、方法。

【請求項 30】

代謝型グルタミン酸受容体 2 および代謝型グルタミン酸受容体 3 のアンタゴニストを対象が鬱症状を示したときに投与し、代謝型グルタミン酸受容体 5 のアンタゴニストを対象が不安症状を示したときに投与する、請求項 29 記載の方法。

30

【請求項 31】

L Y 3 4 1 4 9 5 および 2-メチル-6-(フェニルエチニル)-ピリジンを対象に投与する、請求項 30 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

40

本発明は、一般に、代謝型 (metabotropic) グルタミン酸受容体に関連する疾患の処置法、より特には代謝型グルタミン酸受容体 2、3 および 5 に関連する疾患の処置法に関する。

【0002】

技術背景

グルタミン酸受容体は多くの神経、神経変性的、精神病学的および心理的疾患に役割を担い、多くの哺乳類の疾患状態がこれらのレセプターの異常な活性に関連する。グルタミン酸受容体は“イオンチャネル型 (ionotropic)” または“代謝型” のいずれかに分類されている。イオンチャネル型受容体は、神経の細胞膜におけるカチオンチャネルの開口部に直接結合している。代謝型受容体は、G-プロテイン-結合受容体のファミリーに属し、

50

ホスホノイノシチド加水分解の増強、ホスホリパーゼDの活性化、cAMP形成の増加または減少そしてイオンチャネル機能の変化を導くシステムと結合する。

【0003】

代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)は、アミノ酸配列相同性、伝達(transduction)機構および結合選択性に基づいて3グループ:グループI、グループIIおよびグループIIIに分類される。グループIは代謝型グルタミン酸受容体1および5(mGluR1およびmGluR5)を含み、グループIIは代謝型グルタミン酸受容体2および3(mGluR2およびmGluR3)を含み、そしてグループIIIは代謝型グルタミン酸受容体4、6、7、および8(mGluR4、mGluR6、mGluR7およびmGluR8)を含む。各mGluRタイプともいくつかのサブタイプが見られ得る。例えば、mGluR1のサブタイプは、mGluR1a、mGluR1bおよびmGluR1cを含む。

【0004】

研究者が各mGluRグループに関する生理学的役割を解明し始めたのは最近である。例えば、mGlu2およびmGlu3受容体を含むグループII代謝型グルタミン酸受容体(mGluII)は、哺乳類の脳を通してグルタミン酸作動性求心性神経に主に位置する阻害性自己受容体であり、哺乳類脳で興奮性グルタミン酸伝達を減少させる(CartmellおよびSchoepp, J. Neurochem 75: 889-907, 2000)。mGluII受容体と密接な構造および機能相同性を共有するGABA_B受容体(Schoepp, J. Pharmacol. Exp. Ther., 299: 12-20, 2001)もまたグルタミン酸伝達を負に調節する。近年、mGluIIおよびGABA_B受容体の活性化が腹側被蓋領域(VTA)および側坐核(NAcc)における興奮性グルタミン酸伝達を減少することが示され(Bonci et al., Eur. J. Neurosci., 9: 2359-2369, 1997; Xi et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 300: 162-171, 2002; Erhardt et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 365: 173-180, 2002)、これらの受容体が脳の報酬回路(reward circuitry)の活性を制御し得ることを示唆する。したがって、各々mGluIIおよびGABA_B受容体のアゴニストであるLY314582およびCGP44532が、薬剤非投与ラットにおける脳内自己刺激(ICSS)報酬閾値を上昇させることが示され(Macey et al., Neuropharmacology, 40: 676-685, 2001; Harrison et al., Psychopharmacology, 160: 56-66, 2002)、mGluIIおよびGABA_B受容体が脳報酬性機能を負に制御することを証明する。

【0005】

さらにmGluIIおよびGABA_B受容体の機能が、薬剤依存性の発症の間に増加することを示す証拠が増えている。例えば、長期のモルヒネ、コカインまたはアンフェタミン処置は、VTAおよびNAccに位置するmGluIIおよびGABA_B受容体によるグルタミン酸の阻害性制御を増加させる(ManzoniおよびWilliams, J. Neurosci., 19: 6629-6636, 1999; Xi et al., Soc. Neurosci., Abstr 27: 2596, 2001; Giorgetti et al., Neuroscience, 109: 585-595, 2002)。

【0006】

グループI mGluR受容体の生理学的役割を明らかにする試みは、これらの受容体の活性化が神経性の興奮を誘発することを示唆する。証拠はこの興奮が、シナプス後mGluRの直接の活性化によるものであることを示唆するだけでなく、シナプス前mGluRsの活性化が起こり、神経伝達物質の放出の増加をもたらすことも示唆する(Baskys, Trends Pharmacol. Sci. 15: 92, 1992, Schoepp, Neurochem. Int. 24: 439, 1994, Pin et al., Neuropharmacology 34: 1, 1995)。したがって、グループI mGluRのアンタゴニストは、老人性痴呆、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンティングトン舞蹈病、疼痛、癲癇および頭部外傷のような神経的疾患の処置に有用であり得る。

【0007】

しかしながら、異なるグループに属するmGluRの同時の拮抗によりもたらされると理解され得る可能性のある治療的利点に関してほとんど知られていない。さらに、mGluRのアンタゴニストが、物質濫用および鬱病のような疾患の処置に有用であるか否かほとんど知られていない。本発明はこれらの論争に取り組み、さらに関連する利点を提供す

る。

【0008】

本発明の要約

本発明は、少なくとも二つの異なるグループに属する少なくとも二つのmGluRを同時に阻害することによる、代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)に関連する疾患の処置法を提供する。一つの実施態様において、必要とする対象に、mGluR2、mGluR3、およびmGluR5を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与することを含む、代謝型グルタミン酸疾患の処置法を提供する。

【0009】

別の実施態様において、本発明は、必要とする対象に、mGluR2およびmGluR5を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、それにより疾患を処置することを含む、代謝型グルタミン酸疾患の処置法を提供する。 10

【0010】

さらに別の実施態様において、本発明は、処置を必要とする対象に、mGluR3およびmGluR5を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、それにより疾患を処置することを含む、代謝型グルタミン酸疾患の処置法を提供する。

【0011】

さらに別の実施態様において、本発明は、物質濫用の処置法を提供する。一つの態様において、この実施態様にしたがう方法は、mGluR2、mGluR3、およびmGluR5を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与することを含む(ここで、有効量は該対象における該物質に対する欲望および／または消費を減少させ、阻害し、または排除するのに十分な量である)。 20

【0012】

さらに別の実施態様において、本発明は、必要とする対象にmGluR2、mGluR3および／またはmGluR5を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、それにより鬱病を処置することを含む、鬱病の処置法を提供する。鬱病は、薬剤誘発性または非薬剤誘発性鬱病のいずれかであり得る。

【0013】

他の実施態様において、本発明は、非ヒト哺乳類対象の脳内自己刺激(ICSS)閾値に反映される、脳報酬機能の欠損を少なくとも部分的に正常化するmGluR2、mGluR3、および／またはmGluR5アンタゴニストの能力を改善する薬剤のスクリーニング法を提供する。この方法は： 30

a)対象のICSS閾値に影響を与える；

b)対象に、単独でまたは他の阻害剤と組み合わせて投与した場合ICSS閾値を少なくとも部分的に正常化する既知阻害剤の十分量を投与するし、ここで、既知阻害剤がmGluR2、mGluR3およびmGluR5の少なくとも一つのアンタゴニストである；

b)非ヒト哺乳類対象に有効量の試験薬を投与し、ここで、試験薬はmGluR2、mGluR3およびmGluR5の少なくとも一つの既知のまたは推測されるアンタゴニストである；そして

c)試験薬がICSS閾値を少なくとも部分的に正常化する既知阻害剤の能力を改善するか否かを測定し、それにより、薬剤がICSS閾値を少なくとも部分的に正常化する既知阻害剤の能力を改善するかを同定することを含む。 40

【0014】

一つの態様において、方法は、LY341495のようなmGluR2および／またはmGluR3阻害剤を、mGluR5のアンタゴニストであることが既知のまたは推測される薬剤と同時に投与することを含む。他の態様において、方法は、MPEPのようなmGluR5阻害剤を、mGluR2および／またはmGluR3のアンタゴニストであることが既知のまたは推測される薬剤と同時に投与することを含む。

【0015】

図面の簡単な説明

図1は、腹側被蓋領域における注射部位の組織学的再構築を示す、ラット脳からの頭頂セクションの図式的提示である(ブレグマから5.30-6.72mm後ろ、PaxinosおよびWatson, 1986の図解書にしたがう)。黒丸はVTA内に位置する注射チップの位置を示し、統計的分析に包含される。VTAの外に位置する注射部位から得たラットからのデータは、分析から除いた。

【0016】

図2A-2Bは、ニコチン処置ラットおよびコントロールラットにおける、ICSS閾値と反応潜時におけるLY314582の効果を説明する。図2A、データは、基底閾値からの平均(±SEM)変化率として示す。図2B、データは、基底反応潜時からの平均(±SEM)変化率として示す。* $P < 0.01$ 、賦形剤注射後のニコチン-処置ラットとの差。[#] $P < 0.01$ 、同量のLY314582注射後のコントロールラットとの差。

【0017】

図3A-3Bは、ニコチン処置ラットおよびコントロールラットにおける、ICSS閾値と反応潜時における腹側被蓋領域内(intra-ventral tegmental area)LY314582の効果を説明する。図3A、データは、基底閾値からの平均(±SEM)変化率として示す。図3B、データは、基底反応潜時からの平均(±SEM)変化率として示す。*** $P < 0.001$ 、賦形剤注射後のニコチン-処置ラットとの差。[#] $P < 0.01$ 、[#] $p < 0.05$ 、同量のLY314582注射後のコントロールラットとの差。

【0018】

図4A-4Bは、自発的ニコチン離脱を行っているラットにおける、ICSS閾値の上昇におけるLY341495の効果を説明する。図4A、データは、ニコチン離脱を行っているラットの基底閾値からの平均(±SEM)変化率として示す。図4B、データは、コントロールラットの基底閾値からの平均(±SEM)変化率として示す。ICSS閾値および反応潜時を、ニコチン(図3A)または賦形剤(図3B)を送達する浸透圧性ミニポンプの外科的除去12時間、18時間、24時間、36時間、48時間および72時間後に試験した。ラットに、LY341495(1mg/kg)または賦形剤を18時間の時点(黒矢印で示す)の30分前に1回注射した。*** $P < 0.001$ 、18時間の時点の30分前の、賦形剤で処置したニコチン離脱を行っているラットとの差。

【0019】

図5は、ニコチン処置ラットおよびコントロールラットにおける、ICSS閾値および反応潜時におけるNBQXの効果を説明する。A、データは基底閾値からの平均(±SEM)変化率として示す。B、データは、基底反応潜時からの平均(±SEM)変化率として示す。* $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、賦形剤注射後のニコチン-処置ラットとの差。[#] $P < 0.05$ 、[#] $p < 0.01$ 、同量のNBQX注射後のコントロールラットとの差。

【0020】

図6は、ラットにおける、ニコチンおよび食物維持反応におけるMPEPの効果を説明する。データは、基底反応のパーセントとして示す(平均±SEM)。アスタリスクは、各強化系(reinforcer)のコントロール条件からの有意差を示す(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。

【0021】

図7A-7Dは、異なる投与量のMPEPでの前処置後に得られたニコチン用量反応曲線を説明する(平均±SEM)。この図のグラフは、0(図7A)、5(図7B)、10(図7C)および20(図7D)mg/kg MPEPで前処置した後に得られたニコチン用量反応曲線を記載する。黒丸は生理食塩水コントロールから得られた結果(同じデータを全4個のパネルに繰り返している)および白四角がMPEP処置対象から得られた結果である。アスタリスク(*)は、生理食塩水と比較した、異なる利用可能なニコチン投与量に関する、R基準値における有意差($p < 0.05$)である。ポンド記号(#)は、生理食塩水前処置と比較した、各MPEP投与量(5、10および20mg/kg)に関する0.048 μg/infニコチン投与量の自己投与からの有意差を示す($p < 0.05$)。

10

20

30

40

50

【0022】

図8A-8Bは、DBA/2Jマウスにおける0.048 μ g/infニコチンの静脈内自己投与におけるMPEP投与の効果を説明する(平均 $\pm$ SEM)。パネルA(左パネル)は、この確実な自己投与量におけるMPEP前処置の効果を記載する(0.048 Tg/infニコチン)。パネルB(右パネル)は、MPEP(0、5、10および20mg/kg)での前処置後に0.048 μ g/infニコチンが入手可能である場合の、ニコチン全自己注射ニコチン投与量を示す。アスタリスク(*)は、生理食塩水前処置と比較した、各MPEP投与量(5、10および20mg/kg)後の有意差を示す($p < 0.05$)。

【0023】

図9A-9Bは、Short Access(SHA)およびLong Access(LGA)で反応するラットにおける、MPEP投与の効果を説明する。図9Aは、LGAラットにおけるコカイン摂取増加の進展を示す；データはそのままの値で示す。図9Bは、SHAおよびLGAラットにおけるMPEPの効果を、基底反応のパーセントとして示す(平均 $\pm$ SEM)。パネルCは、コカイン自己投与におけるMPEPの効果を示す(データは、SHAおよびLGAラットを組み合わせた基底反応からのパーセントとして示す(平均 $\pm$ SEM))。アスタリスクは、各強化系に対するコントロール条件からの有意差を示す(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

【0024】

図10は、強化系の漸増スケジュール下の、コカイン-、ニコチン-および食物維持反応におけるMPEPの効果を示す。データは、MPEP前処置後に獲得した($\pm$ SEM)注入/餌ペレットの数を示す(左の序数の軸)。右の序数の軸は、到達した対応する最終比率(すなわち、中止点)を示す。

【0025】

図11は、コカイン誘発のICSS報酬閾値低下の大きさにおける(a)および同じ方法での反応潜時における(b)MPEP投与の効果を示す。データは基底のパーセントとして示す(平均 $\pm$ SEM)。* $P < 0.05$ コントロールから；同量のMPEPで同様に処置しているが、コカインを投与されていないラットと比較して*** $p < 0.001$ ；# $p < 0.05$ 。

【0026】

図12は、コカイン誘発のICSS報酬閾値の期間中の(a)および反応潜時における(b)MPEP投与の効果を説明する。データは基底のパーセントとして示す(平均 $\pm$ SEM)。*** $p < 0.001$ 、コントロールから。

【0027】

図13は、ラットにおけるニコチン反応における、LY341495(0.1-5mg/kg)投与の効果を説明する。データは、基底反応のパーセントとして示す(平均 $\pm$ SEM)。

【0028】

図14は、ラットのニコチン反応における、LY341495(0.5mg/kg)単独、または先にそれ自体コカイン消費に効果がないことが示された(上記図13)MPEP(1mg/kg)の投与量との組み合わせ投与の効果を説明する。データは、基底反応のパーセントとして示す(平均 $\pm$ SEM)。

【0029】

図15は、ラットのニコチン反応における、LY341495(1mg/kg)とMPEP(1mg/kg)の組み合わせの効果を説明する。データは、基底反応のパーセントとして示す(平均 $\pm$ SEM)。

【0030】

図16は、物質摂取行動のモチベーションを反映する強化系(reinforcement)の漸増率下の、LY341495(1mg/kg)およびLY341495とMPEP(各々1mg/kgおよび9mg/kg)の薬剤組み合わせの、中止点(すなわち右y軸に記載した達成した最高常率)および獲得したニコチン注射の数(左y軸に記載)における効果を説明する。MPEPは、LY341495により誘発された中止点減少を増強する。データは、薬剤処置後に獲

得した輸液の数の平均(±SEM)として示す(左の序数軸)。右序数軸は、到達した対応する最終比率(すなわち、中止点)を示す。

【0031】

図17A-17Bは、脳報酬閾値(A)および反応潜時(B)における、選択的セロトニン再取り込み阻害剤であるパロキセチンの効果を説明する(平均±SEM)。

【0032】

図18A-18Bは、脳刺激報酬閾値(A)および反応潜時(B)におけるセロトニン-1A受容体アンタゴニストであるp-MPPI、およびp-MPPI+パロキセチンの組み合わせの効果を説明する(平均±SEM)。アスタリスク(*)は、統計的に有意な直線傾向を示す($p < 0.05$)。

【0033】

図19A-Cは、報酬閾値(A)、反応潜時(B)および体重(C)における慢性アンフェタミン投与の効果を説明する(平均±SEM)。アスタリスク(*)は、生理食塩水暴露コントロール動物との統計的有意差を示す($p < 0.05$)。ポンド記号(#)は、各薬剤グループ内の投薬1日目(任意の薬剤投与前；基底日)との統計的有意差を示す($p < 0.05$)。十字(+)は、各薬剤グループ内の投薬2日目との有意差を示す。(%)は、各薬剤グループ内の投薬3日目との有意差を示す($p < 0.05$)。黒四角は生理食塩水処置ラットからのデータを示す。白丸はアンフェタミン処置ラットからのデータを示す。

【0034】

図20A-Fは、アンフェタミン離脱誘発報酬欠損におけるセロトニン作用性処置の効果を説明する。図20A-20Cは、種々の処置で急性に処置した生理食塩水暴露対象における閾値を説明する；明らかにするために、生理食塩水-暴露賦形剤-処置コントロールグループを各パネルで示した。図20D-20Fは、アンフェタミン-暴露対象における閾値を説明する；同じアンフェタミン-暴露賦形剤-処置グループを各図で示した。→は、急性薬剤処置を投与した時点を示す。アスタリスク(*)は、薬剤組み合わせ処置グループと生理食塩水-処置グループの間の統計的有意差を示す($p < 0.05$)(三角)。ポンド記号(#)は、生理食塩水-暴露賦形剤-処置ラットからの有意差を示す($p < 0.05$)(四角)。

【0035】

図21は、反応潜時におけるアンフェタミン離脱およびセロトニン作用性処置の効果を説明する(平均±SEM)。矢印は、急性薬剤処置を投与した時点を示す。アスタリスク(*)は、賦形剤コントロールグループとの統計的有意差を示す($p < 0.05$)。四角は賦形剤-処置ラットからのデータを示す($n = 22$)。三角はp-MPPI処置ラットからのデータを示す(3 mg/kg ； $n = 22$)。黒丸はパロキセチン処置ラットからのデータを示す(1.25 mg/kg ； $n = 21$)。白丸はパロキセチンおよびp-MPPIで処置したラットからのデータを示す($n = 24$)。

【0036】

図22A-22Dは、体重におけるアンフェタミン離脱およびセロトニン作用性処置の効果を説明する(平均±SEM)。矢印は、急性薬剤処置を投与した時点を示す。アスタリスク(*)は生理食塩水-およびアンフェタミン-暴露グループとの統計的有意差を示す($p < 0.05$)。ポンド記号(#)は、各薬剤グループ内の、12時間時点(慢性処置後かつ急性処置前)での統計的有意差を示す($p < 0.05$)。黒四角は生理食塩水-処置グループおよび白四角はアンフェタミン-処置グループを示す。生理食塩水-処置グループに関して、図22A(賦形剤処置)、 $n = 11$ ；図22B(p-MPPI(3 mg/kg)処置)、 $n = 10$ 、図22C(パロキセチン(1.25 mg/kg)処置)、 $n = 10$ ；および図22D[p-MPPI(3 mg/kg)およびパロキセチン(1.25 mg/kg)処置]、 $n = 12$ 。

【0037】

図23は、脳報酬閾値における抗鬱剤ブプロピオンでの急性処置の効果を説明する。ブプロピオンは、脳報酬機能の促進の指標である賦形剤-処置動物と比較したとき、試験した全投与量で($n = 8$)および 40 mg/kg まで用量依存的形態で脳報酬閾値の減少をもたら

10

20

30

40

50

した。すべての棒は、平均値を、垂直の線は1 S E Mを示す。＊は、賦形剤－処置動物と統計的に有意差のあるグループを示す； $P < 0.05$ 。白棒は賦形剤である；水平線の模様の棒は10 mg/kgであり、上左から下右に線を引いた棒は、20 mg/kgである；左下から上右に線を引いた棒は30 mg/kgである；斜交平行模様の棒は40 mg/kgである；そして垂直模様の棒は60 mg/kgである。

【0038】

図24は、ニコチン(0.25 mg/kg)誘発した脳報酬機能の促進における抗鬱剤ブプロピオンの効果を説明する。ブプロピオン投与(10および20 mg/kg)は、脳報酬閾値の低下をもたらした($n = 10$)。ニコチン処置は、報酬閾値の同様の減少をもたらした。このニコチンの報酬効果は、ブプロピオン(5 mg/kg)前処置により完全に打ち消され、これは10
S E Mを示す。＊は、関連賦形剤条件と有意に異なる閾値を示す； $P < 0.05$ 。＃は、対応する生理食塩水共処置コントロールと有意に異なるグループを示す； $P < 0.05$ 。棒の左のグループは生理食塩水－処置ラットからである。棒の右のグループは、ニコチン(0.25 mg/kg)処置ラットからである。白抜き棒は賦形剤である；上左から右下に線を引いた棒は5 mg/kgである；左下から右上に線を引いた棒は10 mg/kgである；斜交平行模様の棒は20 mg/kgである。

【0039】

図25は、脳報酬閾値におけるニコチン連続注入(3.16 mg/kg遊離塩基/日を7日間)の効果を説明する。ニコチン投与($n = 38$)は、生理食塩水ポンプで処置した動物($n = 38$)と比較して、脳報酬閾値を時間依存的に低下させた。ピーク閾値低下効果は3日目であった。閾値は7日目までに基底レベルに戻った。すべてのデータ点は平均値を示し、垂直の線は1 S E Mを示す。挿入図：濃度曲線下面積分析は、ニコチンで処置した動物が、7日間の処置にわたり有意に低い閾値であることを明らかに示す。すべての棒は平均値を、垂直の線は1 S E Mを示す。＊は、生理食塩水－処置動物と有意に異なる閾値を示す； $P < 0.05$ 。白抜き棒および白四角は、生理食塩水－処置ラットを示す。黒棒および黒四角はニコチン－処置ラットを示す。

【0040】

図26A－26Bは、慢性ニコチン投与(3.16 mg/kg/日を7日間)または生理食塩水投与からの離脱に続く脳報酬閾値における抗鬱剤ブプロピオンの効果を示す。図26A
に説明するように、生理食塩水前処置動物において、賦形剤－処置対象($n = 12$)と比較して、ブプロピオン処置はすべての投与量(10 mg/kg、 $n = 8$ ；20 mg/kg、 $n = 8$ ；40 mg/kg、 $n = 10$)で脳報酬閾値の低下をもたらした。この閾値低下は、すべての動物が6時間後である次の試験時点で基底閾値に戻っていたため、一時的であった。全ニコチン－前処置動物は、離脱12時間後に上昇した閾値を示した。18時間の時点の前のブプロピオン処置は、ニコチンに暴露した賦形剤－処置対象($n = 11$)と比較して、試験したすべての投与量で(10 mg/kg、 $n = 9$ ；20 mg/kg、 $n = 9$ ；40 mg/kg、 $n = 9$)脳報酬閾値の低下をもたらした。この閾値上昇の改善は、先にニコチンで処置した最高ブプロピオン投与量(40 mg/kg)で処置した動物で有意に延長した；これらの動物は、生理食塩水－処置ニコチン離脱対象よりも24時間離脱時点(ブプロピオン投与6.5時間後)で40
有意に低い閾値を示した。すべてのデータ点は平均値を、垂直な線は1 S E Mを示す。＊は、対応する賦形剤処置動物と有意に異なるグループを示す； $P < 0.05$ 。＃は関連する慢性生理食塩水－前処置コントロールと有意に異なるグループを示す； $P < 0.05$ 。白四角は賦形剤を示す；上向き矢印は10 mg/kgブプロピオンを示す；下向き矢印は20 mg/kgブプロピオンを示す；丸は40 mg/kgブプロピオンを示す。図26Bは、濃度曲線下面積分析がまたニコチンで前処理した動物がニコチン投与の停止(すなわち離脱)後に上昇した脳報酬閾値を有することを示すことを説明する。さらに、この分析はブプロピオン(40 mg/kg)での急性の処置がこの閾値の上昇を改善することを明らかに証明する。すべての棒は平均値を、垂直な線は1 S E Mを示す。＊は、対応する賦形剤－処置動物と有意に異なるグループを示す； $P < 0.05$ 。＃は関連慢性生理食塩水前処置コントロー

10

20

30

40

50

ルと有意に異なるグループを示す； $P < 0.05$ 。白抜き棒は賦形剤である；上左から右下に線を引いた棒は 10 mg/kg である；左下から上右に線を引いた棒は 20 mg/kg である；斜交平行模様の棒は 40 mg/kg である。

【0041】

図27A-Bは、慢性ニコチン処置(3.16 mg/kg/日 6.75日間)からの離脱12時間後の、抗鬱剤ブプロピオンの身体兆候における効果を説明する。図27Aに説明するように、慢性ニコチン投与6時間後に、禁断の総合的全身的兆候の値は有意に増加した。離脱12時間後の時点の30分前のブプロピオン処置は、賦形剤処置($n = 6$)と比較して、身体的兆候の発現の改善をもたらした(5 mg/kg , $n = 8$ ； 10 mg/kg , $n = 7$ ； 20 mg/kg , $n = 7$ ； 40 mg/kg , $n = 8$)。図27Bは、ミニポンプ除去12時間後の離脱の兆候の個々の群におけるブプロピオンの効果を説明する。すべての棒は平均値を、垂直な線は1 S E Mを示す。＊は、賦形剤一処置動物と有意に異なるグループを示す； $P < 0.05$ 。＃は、基底(離脱の開始6時間後)レベルから有意に異なるグループを示す； $P < 0.05$ 。白抜き棒は賦形剤である；水平模様の棒は 5 mg/kg ブプロピオンである；上左から右下に線を引いた棒は 10 mg/kg である；左下から上右に線を引いた棒は 20 mg/kg である；斜交平行模様の棒は 40 mg/kg である。

10

【0042】

発明の詳細な説明

本発明は、以下の発見に基づく：

a) mGlu2およびmGlu3受容体の、mGluR2およびmGluR3のアンタゴニスト(本明細書ではまた“mGlu2/3受容体アンタゴニスト”とも呼ぶ)による、例えばmGlu2/3受容体アンタゴニストLY341495の投与による遮断が、ラットにおけるニコチン離脱の鬱病様側面を減弱する；

b) MPEPのようなmGlu5受容体アンタゴニストでの処置が、ラットおよびマウスにおけるコカインおよびニコチン消費を減少させる；

20

【0043】

c) LY341495のようなmGlu2およびmGlu3受容体のアンタゴニストでの処置が、ラットにおけるニコチン消費を減少させる；

d) 1 mg/kg のMPEPのような、コカインまたはニコチン自己投与に効果がない投与量のmGlu5受容体アンタゴニストが、ニコチン自己投与におけるLY341495(0.5 mg/kg または 1 mg/kg)のようなmGlu2/3受容体アンタゴニストの阻害効果を増強する；そして

e) 単独で投与した場合、コカインまたはニコチン自己投与のいずれも減少しない濃度のmGlu5受容体アンタゴニスト、例えば、 9 mg/kg MPEPと、 1 mg/kg LY341495のような単独で投与した場合ニコチン自己注射を減少させる用量のmGlu2/3受容体アンタゴニストの組み合わせは、任意の一つの薬剤よりもニコチン自己投与の減少に有効である。

30

【0044】

この発見に基づき、本発明は、必要とする対象に、mGluR2、mGluR3、およびmGluR5を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、それにより疾患を処置することを含む、代謝型グルタミン酸疾患の処置法を提供する。他の実施態様において、必要とする対象に、mGluR2およびmGluR5を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、それにより疾患を処置することを含む、代謝型グルタミン酸疾患の処置法が提供される。さらに別の実施態様において、必要とする対象に、mGluR3およびmGluR5を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、それにより疾患を処置することを含む、代謝型グルタミン酸疾患の処置法が提供される。さらに別の実施態様において、必要とする対象に、mGluR2およびmGluR

40

50

3を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、それにより、疾患を処置することを含む、代謝型グルタミン酸疾患の処置法を提供する。mGluR1とmGluR5(両方ともグループIに属する)の既知の類似性のために、本発明の任意の方法において、mGluR1のアンタゴニストを、mGluR5アンタゴニストの代わりに使用できる。

【0045】

本発明のいくつかの実施態様において、代謝型グルタミン酸受容体2、3および5の同時拮抗が、必要とする対象に、全3つの受容体の阻害剤として作用する一つのアンタゴニストを投与することにより達成される。あるいは、アンタゴニストの組み合わせが、受容体2、3および5の阻害の達成に使用できる。例えば、mGluR2およびmGluR3のアンタゴニストと、mGluR5のアンタゴニストとの組み合わせ投与が本発明のいくつかの態様で使用され、mGluR2、3および5の阻害を達成する。例えば、mGluR2およびmGluR3アンタゴニストLY341495と、mGluR5アンタゴニストMPEPとの組み合わせを、対象に投与できる。

10

【0046】

さらに、本発明は以下のものを提供する

- ・(a)代謝型グルタミン酸受容体2アンタゴニストおよび代謝型グルタミン酸受容体3アンタゴニストから選択される少なくとも一つの活性成分、および(b)少なくとも一つの代謝型グルタミン酸受容体5アンタゴニスト(活性成分はいずれの場合も遊離形または薬学的に許容される塩形で存在する)と、所望により少なくとも一つの薬学的に許容される担体を含む；とりわけ嗜癮障害または鬱病の処置における同時、別々または連続的使用のための組み合わせ；

20

- ・(a)代謝型グルタミン酸受容体2および代謝型グルタミン酸受容体3に対する拮抗作用を示す少なくとも一つの活性成分、および(b)少なくとも一つの代謝型グルタミン酸受容体5アンタゴニスト(活性成分はいずれの場合も遊離形または薬学的に許容される塩形で存在する)と、所望により少なくとも一つの薬学的に許容される担体を含む；とりわけ嗜癮障害または鬱病の処置における同時、別々または連続的使用のための組み合わせ；

- ・(a)少なくとも一つの代謝型グルタミン酸受容体2アンタゴニスト、および(b)代謝型グルタミン酸受容体3および代謝型グルタミン酸受容体5に対する拮抗作用を示す少なくとも一つの活性成分(活性成分はいずれの場合も遊離形または薬学的に許容される塩形で存在する)と、所望により少なくとも一つの薬学的に許容される担体を含む；とりわけ嗜癮障害または鬱病の処置における同時、別々または連続的使用のための組み合わせ；および

30

- ・(a)少なくとも一つの代謝型グルタミン酸受容体3アンタゴニスト、および(b)代謝型グルタミン酸受容体2および代謝型グルタミン酸受容体5に対する拮抗作用を示す少なくとも一つの活性成分、活性成分はいずれの場合も遊離形または薬学的に許容される塩形で存在する、所望により少なくとも一つの薬学的に許容される担体を含む；とりわけ嗜癮障害または鬱病の処置における同時、別々または連続的使用のための組み合わせ。

【0047】

上記の組み合わせは、組み合わせ製剤または医薬組成物の形で適用される。

40

【0048】

さらに、本発明は以下の態様に関する：

嗜癮障害または鬱病に罹患している温血動物の処置法であり、動物に併用療法で嗜癮障害または鬱病に対して有効な量の上記で定義の組み合わせ(ここで、化合物はまたその薬学的に許容される塩の形で存在できる)を投与することを含む、方法；

併用療法で嗜癮障害または鬱病に対して有効な量の上記で定義の薬学的組み合わせと、少なくとも一つの薬学的に許容される担体を含む医薬組成物；

嗜癮障害または鬱病の処置用医薬の製造のための上記で定義の組み合わせの使用；そして上記で定義の組み合わせを、嗜癮障害または鬱病の処置における同時、別々または連続的使用のための指示書と共に含む、商業用包装物。

50

【0049】

本明細書で使用する“組み合わせ製剤”なる用語は、上記の第1および第2活性成分が別々に投与でき、または、成分の別々の量の異なる固定された組み合わせの使用により、すなわち、同時にまたは異なる時点で投与できる点で、とりわけ“複数の部分のキット”と定義する。複数の部分のキットは、次いで、例えば、同時に、または時間的に交互に、すなわち任意の複数の部分のキットに関して異なる時点に、同じまたは異なる間隔で投与できる。非常に好ましくは、部分の組み合わせ使用による処置疾患における効果が、活性成分の任意の一つのみの使用により得られる効果よりも大きくなるように選択する。組み合わせ製剤で投与すべき活性成分1の活性成分2に対する比率は、例えば、処置する患者の亜集団の必要性に沿うために、または、患者の年齢、性別、体重などために起こり得る異なる必要性を有する一人の患者の必要性に沿うために、変えることができる。好ましくは、少なくとも一つの利点が、例えば、第1および第2活性成分効果の相互増強、例えば特に相乗効果、例えば、相加効果以上の効果、さらなる有利な効果、少ない副作用、第1および第2活性成分の非有効投与量で組み合わせ治療効果、および特に、第1および第2成分の強い相乗効果がある。

【0050】

上記の組み合わせの薬理学的活性は、例えば、それ自体既知の前臨床試験において、例えば、実施例に記載のものと類似の方法に置いて明らかにし得る。

【0051】

上記の組み合わせの薬理学的活性は、例えば、臨床試験でも証明し得る。このような臨床試験は、好ましくは嗜癮障害または鬱病の患者における無作為、二重盲、臨床試験である。このような試験は、上記の組み合わせの活性成分の、特に相乗効果を証明する。嗜癮障害または鬱病における利点は、直接これらの試験の結果を介して、またはそれ自体当業者に既知の試験の変化により直接証明できる。

【0052】

mGlu受容体のアンタゴニストおよびアゴニストは当分野で既知である。いくつかの既知のアンタゴニストおよびアゴニストを、次段落の後記表に記載する。アゴニストは非選択的アゴニスト：1S,3R-ACPD；1S,3S-ACPD；L-CCG-Iを含む。アンタゴニストは(S)-MCPGのような広域、非選択的アンタゴニストを含む。本発明の教示に基づき、事実上任意のmGluR1、2、3、および／または5アンタゴニストを本発明の方法で使用できる。しかしながら、本発明のために好ましくは、mGluR1、R2、R3および／またはR5に選択的なアンタゴニストを使用する。mGluR2のアンタゴニストは当分野で既知であり、例えば、米国特許第6,407,094号に記載の化合物(Adam et al., (2002)、本明細書に引用してその全体を包含する)および1-[(Z)-2-シクロヘプチルオキシ-2-(2,6-ジクロロフェニル)-ビニル]-1H-[1,2,4]トリアゾール(Kolczewski et al. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999, 9, 2173-2176)である。mGluR2およびmGluR3の両方のアンタゴニストは当分野で既知であり、例えば、LY341495(Kingston et al. Neuropharm. 1998, 37, 1-12)、LY366457(O'Neill M.F., et al., Neuropharmacology, 45(5): 565-74(2003))、(2S)-アルファ-エチルグルタミン酸(EGLU)(例えば、Neto, F. L., et al., Neurosci. Lett. 15; 296(1): 25-8(2000)参照)および(2S,4S)-アミノ-4-(2,2-ジフェニルエチル)ペンタン二酸(Escribano, A., et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 7; 8(7): 765-70(1998))を含む。mGluR5のアンタゴニストは当分野で既知であり、例えば、MPEP(2-メチル-6-(フェニルエチニル)-ピリジン)およびMTEP(3-(2-メチル-チアゾール-4-イルエチニル)-ピリジン(Cosford, N.D., et al., J. Med. Chem., 46(2): 204-6(2003))を含む。mGluR1のアンタゴニストは、例えば、3-メチル-アミノチオフエンニカルボン酸(3-MATIDA)、(Moroni, F., Neuropharmacology, 42(6): 741-51(2002))を含む。mGluR1およびmGluR5のアンタゴニスト(グループIアンタゴニスト)は、例えば、1-アミノインダン-1,5-ジカルボン酸(AIDA)(例えば、Renaud, J., et al., Epilepsia, 43(11): 1306-17(2002)参照)、(3aS

, 6 a S)-6 a-ナフタレン-2-イルメチル-5-メチリデン-ヘキサヒドロ-シクロペンタ[c]フラン-1-オン(BAY 36-7620)(例えば、De Vry, J., et al., Eur. J. Pharmacol. 5; 428(2): 203-14(2001)参照)、およびシクロブチルグリシン(+/-)-2-アミノ-2-(3-cisおよびtrans-カルボキシシクロブチル-3-(9-チオキサントール)プロピオン酸)(LY393053)(Chen, U., et al., Neuroscience, 95(3): 787-93(2000))を含む。本発明で利用できる他のmGluRアンタゴニストは、WO 99/08678 (本明細書に引用してその全体を包含する)に記載のものを含む。

【0053】

一般名または商品名により特定した活性剤の構造は、標準概論“The Merck Index”の現版またはデータベース、例えばPatents International(例えばIMS World Publications)から得られ得る。それらの対応する内容は、本明細書に引用して包含させる。当業者は活性成分の特定が完全に可能であり、同様に、これらの参考文献に基づいて製造でき、インビトロおよびインビボの両方の標準試験モデルにおいて薬学的適応および特性を試験できる。

【0054】

【表 1】

mGluRアゴニストおよびアンタゴニストの表

グループ	受容体サブタイプ	受容体アゴニスト	受容体アンタゴニスト	
グループ I	mGlu1	(S)-3,5-DHPG	LY 367385	
		Quisqualate	(S)-4-CPG CPCCOEt	
	mGlu5	(S)-3,5-DHPG (RS)-CHPG Z-CBQA Quisqualate	MPEP (S)-4-CPG MTEP	10
グループ II	mGlu2	LY354740 LY379268 (2R,4R)-APDC DCG-IV	LY341495 ADED EGlu MSOP	
	mGlu3	LY354740 LY379268 (2R,4R)-APDC DCG-IV	LY341495 ADED	20
グループ III	mGlu4	L-AP4 LY379268 L-SOP (RS)-PPG	DCG-IV MAP4 MSOP MPPG CPPG	
	mGlu6	L-AP4 L-SOP (RS)-PPG (S)-HomoAMPA	DCG-IV	30
	mGlu7	L-SOP (RS)-PPG	DCG-IV MPPG	
	mGlu8	L-AP4 LY354740 LY379268 L-SOP (RS)-PPG	DCG-IV MAP4	40

【0055】

MPEPは、WO99/02497に記載の化学法にしたがい合成でき、またはTocris, Ballwin, M0から購入できる。LY341495(2S-2-アミノ-2-(1S,2S-2-カルボキシシクロプロパン-1-イル)-3-(キサント-9-イル)プロピオン酸)は、Tocris(Ballwin, M0)から購入できる。NBQXジナトリウム(2,3-ジオキソ-6-ニトロ-1,2,3,4-テトラヒドロベンゾ(f)キノキサリン-7-スルホンアミドジナトリウム)は、Tocris, Ballwin, M0から購入できる。

【0056】

本明細書で使用する限り、アンタゴニストの“有効量”なる用語は、対象における mGluR 受容体 2、3、または 5 の正常活性を調節する量である。mGluR 受容体の“正常”活性は、mGluR 関連疾患に罹患していない細胞または対象における活性のレベルを意味し、当分野で既知の方法で測定でき、そのいくつかを本明細書に記載する。例えば、LY341495 は、約 0.1 – 50 mg/kg の濃度で、いくつかの態様では 0.1 から 5 mg/kg の範囲で投与できる。本発明のいくつかの態様において、LY341495 の有効量は少なくとも 0.5 mg/kg、例えば、0.5 mg/kg から約 10 mg/kg、または 0.5 mg/kg から約 5 mg/kg である。本発明のいくつかの態様において、LY341495 は約 0.5 mg/kg または 1 mg/kg の濃度で投与する。

【0057】

MPBP は、本発明のいくつかの態様において、約 0.01 から 25 mg/kg 体重の量で投与する。いくつかの態様において、MPBP は 1 mg/kg と同等かそれ以上の濃度で、例えば約 3 から約 20 mg/kg の間で投与する。他の態様において、MPBP は約 5 から約 15 mg/kg の間の濃度で投与する。他の態様において、MPBP は約 7 から約 12 mg/kg の間、例えば 9 mg/kg で投与する。

【0058】

本発明の一つの態様において、2 種またはそれ以上のアンタゴニストを有効量以下で、1 種またはそれ以上のアンタゴニストがそれら自体で疾患を処置するのに有効である量より下で投与する。例えば、mGluR 5 アンタゴニストを有効量以下で、かつ mGluR 2 / mGluR 3 アンタゴニストを有効量で投与でき、またはその逆も可能である。MPBP を 1 mg/kg またはそれ以下で投与でき、LY341495 を上記のような有効濃度で投与できる。例えば、MPBP を 0.1 – 3 mg/kg で投与し、LY341495 を 0.5 – 5 mg/kg で投与できる。実施例 3 に説明する一つの態様において、MPBP を 1 mg/kg で投与し、LY341495 を 0.5 mg/kg で投与する。加えて、本発明の他の具体的態様は、1 mg/kg LY341495 および 1 mg/kg MPBP；および 1 mg/kg LY341495 および 9 mg/kg MPBP の組み合わせを含む。実施例 3 に説明するように、組み合わせで使用する場合、mGluR 5 アンタゴニストは、mGluR 2 / R 3 アンタゴニストのニコチン嗜癖のような嗜癖障害の処置における有効性を増強する。また実施例 3 に説明するように、組み合わせで使用する場合、mGluR 2 / 3 アンタゴニストは、mGluR 5 アンタゴニストのニコチン嗜癖のような嗜癖障害の処置における有効性を増強する。本発明は、ヒトにおける厳密な有効量を測定するために、ヒトにおけるさらなる試験の基礎を提供することは理解されるべきである。実施例セクションで齧歯類試験で使用している投与量は、ヒトおよび他の哺乳類のために本明細書で指示される投与量の範囲の基礎を提供する。

【0059】

本発明のいくつかの態様において、例えば、コカインまたはニコチンのような常習性物質への欲望を減少し、阻害または排除するのに十分な量の 1 個またはそれ以上の mGluR 2、3、および / または 5 アンタゴニストを投与する。さらに、いくつかの態様において、コカインまたはニコチンのような常習性物質の強化特性 (reinforcing properties) を減少し、阻害または排除するのに十分な量の mGluR 2、3、および / または 5 アンタゴニストを投与する。さらに、いくつかの態様において、コカインまたはニコチンのような常習性物質の離脱に関連する鬱病、または薬剤使用に関連する鬱病、またはいかなる薬剤の使用にも関連しない鬱病のような鬱病を減少し、阻害または排除するのに十分な量の mGluR 2 および / または 3 アンタゴニストを投与する。本発明の方法が標的とする疾患の任意のこれらの特性の減少、阻害、および / または排除は、代謝型グルタミン酸疾患の有効な処置を示唆する。

【0060】

mGluR 2、3 および 5 の活性の調節により有効に処置できる疾患は、本明細書では代謝型グルタミン酸疾患と呼んでいるが、嗜癖障害および鬱病を含む。代謝型グルタミン酸疾患は、グループ I 代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の 1 つまたは両方およびグ

10

20

30

40

50

ループII mGluRの一つまたは両方が関与する疾患を含む。嗜癮代謝型グルタミン酸疾患は、例えば、ニコチン嗜癮、アルコール嗜癮、アヘン剤嗜癮、アンフェタミン嗜癮、コカイン嗜癮、メタンフェタミン嗜癮などを含む。

【0061】

実施例セクションにコカインおよびニコチンのようないくつかの濫用性物質に関して提供しているデータは、同様に他の濫用性物質にも当てはまることは理解されよう。すべての重要な濫用性物質への依存性は、同じ神経生物学的および行動的機構により介在されることは広く仮説として取り上げられている(Markou et al. 1998; Markou A & Kenny PJ 2002 Neuroadaptations to chronic exposure to drugs of abuse: Relevance to depressive symptomatology seen across psychiatric diagnostic categories, Neurotoxicity Research, 4(4), 297-313.; Koob & Le Moal, Neuropsychopharmacology, 24(2): 97-129 2001; Barr, A.M., Markou, A.およびPhillips, A.G. (2002)A “crash” course on psychostimulant withdrawal as a model of depression, Trends in Pharmacological Sciences, 23(1), 475-482、引用してその全体を本明細書に包含させる; Cryan, J.F., Markou, A.およびLucki, I. (2002)Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developmentsおよびfuture needs, Trends in Pharmacological Sciences, 23(5), 238-245)。したがって、一つの物質嗜癮の処置に有効な化合物は、他の嗜癮の処置にも有効であるようであると期待される。例えば、選択的セロトニン再取り込み阻害剤フルオキセチン+セロトニン-1A受容体アンタゴニストp-MPPIの共投与によるセロトニン作用性神経伝達の増加は、アンフェタミンおよびニコチン離脱の両方の鬱病様側面を改善する(Harrison, Liem & Markou, Neuropsychopharmacology 2001; 引用してその全体を本明細書に包含させる)。さらに、すべての重要な濫用性物質(ニコチン、コカイン、アンフェタミン、アルコール、アヘン剤、フェンシクリジン)からの離脱は、鬱病様状態を反映する脳報酬閾値の上昇をもたらす(レビューの文献Markou et al. 1998; Markou & Kenny 2002; Barr et al. 2002; Cryan et al. 2002; およびフェンシクリン(phencycline)の元の研究文献: Spieglewoy, C. & Markou, A. 2003, Withdrawal from chronic treatment with phencyclidine induces long-lasting depression in brain reward function, Neuropsychopharmacology, 28, 1106-1116およびコカイン: Ahmed et al. 2002)。したがって、物質依存および離脱の鬱病様側面の処置は、人々が物質使用を絶つのを助け得る。

【0062】

一つの態様において、嗜癮障害はニコチン嗜癮である。他の態様において、嗜癮障害はコカイン嗜癮である。他の態様において、嗜癮障害はアルコール嗜癮である。他の態様において、嗜癮障害はアヘン剤嗜癮である。他の態様において、嗜癮障害はメタンフェタミン嗜癮である。他の態様において、嗜癮障害はアンフェタミン嗜癮である。

【0063】

他の態様において、代謝型グルタミン酸疾患は鬱病である。実施例1は、mGluR2/3受容体の遮断が、ニコチン離脱の負の感情(鬱病様)側面の改善に反映されるように、抗鬱剤特性を有することを説明する。このように、mGluR2およびmGluR3の遮断は、物質離脱中に観察される鬱病様症状およびおそらく物質依存中に観察される鬱病を改善する(Ahmed, S.H., et al. Nature Neuroscience, 5: 625-626(2002)、引用してその全体を本明細書に包含させる)。したがって、mGluR2およびmGluR3のアンタゴニストの有効量の投与は、薬剤および非薬剤誘発鬱病を介在する既知の神経生理学的類似性に基づいて、非薬剤誘発鬱病の処置に有効であるようである(Markou et al. 1998、引用してその全体を本明細書に包含させる; Barr et al., 2002、引用してその全体を本明細書に包含させる; Cryan et al., 2002; 引用してその全体を本明細書に包含させる; Harrison et al., Neuropsychopharmacology, 25: 55-71(2001)、引用してその全体を本明細書に包含させる; Markou AおよびKenny PJ 2002, Neuroadaptations to chronic exposure to drug of abuse: Relevance to depressive symptomatology seen across psychiatric diagnostic categories, Neurotoxicity Research, 4(4), 297-313; 引用してその全体を本明細書に包含させる)。

【0064】

さらなる観点は、常習性物質の離脱の鬱病様症状に関する実施例1に提示した結果をさらに支持し、mGluR2および／またはmGluR3のアンタゴニスは非薬剤誘発鬱病の有効な処置と同様に使用できることを確認する。第一に、臨床的に立証された抗鬱剤処置である選択的セロトニン再取り込み阻害剤フルオキセチンおよびセロトニン-1A受容体アンタゴニストp-MPPIの共投与が、ニコチンおよびアンフェタミン離脱の両方の鬱病様側面を改善する(Harrison et al., (2001); 引用してその全体を本明細書に包含させる)。第二に、実施例4に示すように、臨床的に立証された別の抗鬱剤処置である選択的セロトニン再取り込み阻害剤パロキセチンおよびセロトニン-1A受容体アンタゴニストp-MPPIの共投与がまたアンフェタミン離脱を改善する。第三に、臨床的に立証された別の抗鬱剤処置であるブプロピオンが、ニコチン離脱の鬱病様側面を改善する(Cryan, J.F., et al., Psychopharmacology, 168, 347-358(2003); 実施例5)。したがって、臨床的に立証された抗鬱剤処置は、実施例1および4に提示したモデルにおける物質離脱の鬱病様側面を改善する。したがって、モデルにおける閾値を正常化する処置(例えば、mGluR2/3アンタゴニスト)が臨床的に有効な処置であると推測できる。さらに、同じ抗鬱剤処置によるアンフェタミンおよびニコチン離脱の両方の改善は、鬱病誘発機構および／または濫用性物質の主要な作用部位(ニコチンのニコチン受容体、アンフェタミンのモノアミン作動性トランスポーター)と無関係に、種々のタイプの鬱病における共通性があることを示唆する。

【0065】

本発明は、別の実施態様において、鬱病の抑鬱症状および不安症状を処置する方法を提供する。方法は、必要とする対象に、mGluR2、mGluR3、およびmGluR5を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、それにより抑鬱症状および不安症状を改善することを含む。本発明のこの実施態様の別の態様において、mGluR2および／またはR3の少なくとも一つのアンタゴニストを鬱の時期に投与し、一方mGluR5アンタゴニストを対象が不安の症状を経験した時に投与する。鬱病は、抑鬱症状と不安症状の両方により特徴付けられる。このように、本発明では抑鬱症状を軽減するmGluR2/3拮抗作用を有する有効な抗鬱剤と、不安症状を軽減するmGluR5アンタゴニストとのmGluR2/3/5の組み合わせ処置を提供する。したがって、この実施態様は、mGluR2/3アンタゴニストの抗鬱特性とmGluR5アンタゴニストの不安緩解特性の利点を有する(例えば、Cosford, N.D., et al., J. Med. Chem. 16; 46(2): 204-6(2003); Brodtkin J., et al., Eur. J. Neurosci., 16(11): 2241-4(2002); およびBrodtkin J., et al., Pharmacol. Biochem. Behav. 73(2): 359-66(2002)参照)。不安が鬱病の全体的症候群の主要な症状であることが既知であるため、本発明のこの実施態様は、鬱病の不安症状の処置に有効である。

【0066】

抑鬱症状および不安症状は当分野で既知である。本発明のこの実施態様の方法は、鬱病の1個またはそれ以上の症状と不安の1個またはそれ以上の症状を処置する。鬱病の症状は、例えば、以下のものを含むが、これらに限定されない：永続する悲しみ、不安または“空しい”気分；不眠または過眠；食欲の減少と体重の減少、または食欲の増加と体重の増加；かつて楽しんでいた行動における興味または楽しみの損失；情動不安または短気；処置に反応しない永続する身体的症状(例えば、頭痛、慢性疼痛、または便秘および他の消化管疾患)；集中、記憶または決断の困難さ；疲労またはエネルギーの損失；罪悪感、絶望感または無気力感；および死または自殺の考え。

【0067】

不安の症状は以下のものを含むが、これらに限定されない：一日以上起こり、数ヶ月続く、例えば少なくとも6ヶ月間続く過剰な心配；仕事または学校および／または健康のような多くの事柄または活動に関する理由のない心配；心配がコントロールできない；情動不安、興奮した気分または気が立っている；疲れ；集中力に問題；短気；筋緊張；および入眠困難または眠れない、または落ち着かなく、眠りが不十分

。

【0068】

本発明の実施態様のある態様は代謝型グルタミン酸疾患の処置法に関し、対象は、例えば代謝型グルタミン酸受容体疾患、例えばニコチン嗜癖、コカイン嗜癖、または鬱病に罹患している哺乳類対象、例えばヒトである。本明細書の実施例は、齧歯類における本発明の方法を説明する。しかしながら、この方法は、嗜癖障害および鬱病の生理学(Markou et al. 1998; MarkouおよびKenny 2002、引用してその全体を本明細書に包含させる)、およびmGlu受容体の構造(Schoepp et al. Neuropharm. 1999, 38, 1431-1476; Schoepp D D(2001), J Pharmacol Exp Ther 299: 12-20)における齧歯類とヒトの類似性のため、ヒト対象で同様に有効であることが予測されることが理解されよう。

10

【0069】

2個またはそれ以上のアンタゴニストの“同時投与”は、その各々のmGlu受容体標的を調節するために、各アンタゴニストの十分な濃度が対象内に存在するように、アゴニストを十分に短い時間で投与することである。したがって、同時投与として示されるアンタゴニストの投与の最大時間差は、投与したアンタゴニストの半減期、投与したアンタゴニストの量、およびアンタゴニストを投与した方法および部位に、例えば依存することは認識されよう。

【0070】

本発明のこの態様のいくつかの方法に関して、アンタゴニストを週、月、年単位の期間、および、おそらく物質使用を絶つことに失敗したまたは物質使用に無関係のまたは物質使用により誘発された、本明細書に示唆する方法なしでは本質的に軽減できない慢性鬱病の対象には明確でない。

20

【0071】

他の実施態様において、本発明は、物質摂取行動の障害、鬱病の処置および／または物質使用および依存性に関連する(Ahmed et al., 2002、引用してその全体を本明細書に包含させる)、または常習性物質の離脱に関連する鬱病様状態の処置法を提供し、それは、mGluR2および／またはmGluR3を調節する少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を必要とする対象に投与し、それにより常習性物質の消費、鬱病、または常習性物質依存または物質離脱状態の鬱病様状態の処置を含む。この実施態様は、LY341495のようなmGlu2/3受容体のアンタゴニストが常習性物質(例えば、ニコチン)消費をラットで減少させる実施例3に提供した実験的証拠、ならびにLY341495のようなmGlu2/3受容体アンタゴニストが物質離脱に関連する鬱病様状態を改善する実施例1に提供した証拠に基づく。常習性物質は、例えば、ニコチンまたはコカインである。いくつかの態様において、少なくとも一つのアンタゴニストの有効量を投与し、ニコチン消費を減少させる。例えば、一つの態様において、LY341495のようなmGluR2およびmGluR3のアンタゴニストを投与し、ニコチン消費を減少させる。本発明のいくつかの態様において、mGluR2および／またはmGluR3の阻害剤を、対象が離脱を経験している間投与する。本発明の他の態様において、mGluR2および／またはmGluR3の阻害剤を、対象が常習性物質を積極的に使用している時期の間投与する。本発明の他の態様において、mGluR2および／またはmGluR3の阻害剤を、対象が物質使用に関連するまたは物質使用に関連しない鬱病を活動性に経験している時期に投与する。

30

40

【0072】

本発明は、他の実施態様において、mGluR2、mGluR3、およびmGluR5の少なくとも二つを拮抗する方法を提供し、その方法は、必要とする対象に、mGluR2、mGluR3、およびmGluR5の少なくとも二つを調節する少なくとも二つのアンタゴニストを同時に投与することを含む。各アンタゴニストの量は、その標的mGluRの調節に十分である。この量は、単独で投与した場合のアンタゴニストの有効量よりも少なくともよい。しかしながら、これらの実施態様で投与する用量は、アンタゴニストの組み合わせが代謝型疾患の処置に有効な量となるものが十分である。いくつかの態様にお

50

いて、各アンタゴニストを代謝型グルタミン酸疾患の処置に有効な量で提供する。いくつかの態様において、対象は鬱病、ニコチン嗜癖、またはコカイン嗜癖に苦しんでいる。いくつかの態様において、mGluR2およびmGluR3を調節するアンタゴニストを、mGluR5を調節するアゴニストと共に投与する。例えば、MPEPの有効量を、LY341495の有効量と共に投与できる。他の実施態様において、MPEPの有効量以下の用量を、LY341495の有効量と投与する。別の実施態様において、MPEPの有効量を、LY341495の有効量以下の用量と投与する。別の実施態様において、MPEPの有効量以下の用量を、LY341495の有効量以下の用量と投与する。

【0073】

別の実施態様において本発明は、本明細書ではまた物質濫用とも呼ぶ嗜癖障害の処置法を提供し、その方法は、必要とする対象に、第1期間はmGluR2、3および5の少なくとも一つを調節するアンタゴニストを投与し、続いて第2期間はmGluR2および／または3の少なくとも一つを調節する少なくとも一つのアンタゴニストを投与することを含む。第1期間は、例えば、対象が習慣的に常習性物質を使用する環境にすることが期待される、またはこの物質の存在下に刺激にさらされる期間、または対象が積極的に常習性物質を使用している期間である。第2期間は、例えば、対象が離脱および／または鬱病に苦しんでいる期間である。本発明のこの実施態様の一つの態様は、例えば、第1期間のMPEPおよび／またはLY341495の投与、および離脱または鬱病期間のLY341495の投与を含む。

【0074】

この実施態様は、mGluR5のアンタゴニストおよび／またはmGluR2／3のアンタゴニストの投与が、ニコチンまたはコカインのような常習性物質の自己投与を減少させるという、本明細書の実施例に提示した発見に基づく。さらに、この実施態様は、mGluR2／3のアンタゴニストの投与が、ニコチン離脱の負の影響の少なくともいくつかを改善するという発見に基づく。この実施態様の一つの態様において、mGluR5のアンタゴニストおよびmGluR2および／またはmGluR3のアンタゴニストを投与し、物質依存および離脱の鬱病様症状をモニターする。離脱症状または鬱病症状が強くなりすぎた場合、mGluR5アンタゴニストの投与を少なくとも一時的に中止でき、一方mGluR2／3アンタゴニストの投与は継続できる。

【0075】

本発明のいくつかの実施態様において、嗜癖障害または鬱病は、対象へのAMPA/Kainate受容体アゴニストまたは部分的アゴニストの投与により処置する。この実施態様のいくつかの態様において、AMPA/Kainate受容体ならびにmGluR2、mGluR3、およびmGluR5受容体の少なくとも一つを調節する1個またはそれ以上のアゴニストまたは部分的アゴニストを対象に投与する。典型的に、AMPA/Kainate受容体の一つのアゴニストまたは部分的アゴニストを、mGluR2、mGluR3、および／またはmGluR5の少なくとも一つのアンタゴニストと投与する。いくつかの実施態様において、AMPA/Kainate受容体を調節する1個またはそれ以上のアゴニストまたは部分的アゴニストおよびmGluR5を調節するアンタゴニストを、例えばAMPA/Kainateアゴニストまたは部分的アゴニストおよびMPEPの投与により投与する。他の実施態様において、AMPA/Kainate受容体を調節する1個またはそれ以上のアゴニストまたは部分的アゴニストを、mGluR2および／またはmGluR3を調節する1個またはそれ以上のアンタゴニストと共に投与する。

【0076】

AMPA/Kainate受容体アゴニストまたは部分的アゴニストは、例えば、CPCCOet(7-ヒドロキシイミノシクロプロパン[b]クロメン-1-カルボン酸エチルエステル(Litschig S., et al., Molecular Pharmacology 55(3): 453-561(1999))を含む。AMPA/Kainate受容体部分的アゴニストの使用は、部分的アゴニストが一般的に良好な副作用特性を有するため、AMPA/Kainateアゴニストの使用よりも有利である。

【0077】

10

20

30

40

50

本発明の方法で使用するアンタゴニストまたはアゴニストの送達経路は、具体的な疾患により決定する。アンタゴニストまたはアゴニストは、経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、経鼻、および皮内で送達し得、ならびに、経皮送達(例えば、皮膚に置く皮膚パッチ中の脂溶性担体と共に)、または胃腸送達(例えば、カプセルまたは錠剤で)でさえ送達し得る。さらに、本発明の方法で使用するアンタゴニストまたはアゴニストは、いくつかの態様において直接脳にまたは脳のある領域に直接送達し、脳の別の部位の受容体を阻害または活性化することなく所望の効果を産生する特異的な脳の部位の受容体を活性化または阻害し、それにより前述の部位(複数もある)により介在される優れた治療的作用を打ち消す望ましくない副作用または作用を避ける。投与量は上記のように単独でまたは組み合わせでアンタゴニストの有効な量を提供するのに十分でなければならない。投与量のいくつかの変化は、処置する患者の状態に依存して必ず変化し、医師は、いずれにしても個々の患者に対して適当な投与量を決定できる。投与量は、数ある中でも体重、生理学および選択した投与レジメに依存する。

10

【0078】

本発明の方法で用いるアンタゴニストは、単独でまたは1回量または複数回量の薬学的に許容される担体と組み合わせて投与する。適当な薬学的担体は、不活性固体希釈剤または充填剤、滅菌水溶液、および種々の非毒性有機溶媒を含む。1個またはそれ以上のアンタゴニストと薬学的に許容される担体の組み合わせにより製剤した医薬組成物は、次に錠剤、ロゼンジ、シロップ、注射用溶液のような種々の投与形で容易に投与される。薬学的担体は、望ましい場合、香味剤、結合剤、賦形剤などのさらなる成分を含んでもよい。このように、経口投与の目的で、錠剤はクエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、およびリン酸カルシウムのような種々の賦形剤を含む錠剤を、澱粉、好ましくはジャガイモまたはタピオカ澱粉、アルギン酸、およびある複合体珪酸塩のような種々の崩壊剤と、ポリビニルピロリドン、シュークロース、ゼラチン、およびアカシアのような結合剤と共に用いる。さらに、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム、およびタルクのような滑剤が、錠剤を作る目的でしばしば有用である。類似のタイプの固体組成物を充填剤として用い、軟質および硬質ゼラチンカプセルに充填し得る。この目的に好ましい物質は、ラクトースまたは乳糖および高分子量ポリエチレングリコールを含む。

20

【0079】

エリキシル剤の水性懸濁液が経口投与のために望まれる場合、アンタゴニストを種々の甘味剤または香味剤、着色物質または色素、そして所望により、乳化剤または懸濁剤を、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリンおよびこれらの組み合わせのような希釈剤と共に組み合わせ得る。非経腸投与のために、ゴマ油またはピーナッツ油または水性プロピレングリコールのような製剤の溶液を用い得、同様に、先に記載の対応する水溶性の薬学的に許容される金属塩の滅菌水性生理食塩水薬学的を用いる。このような水性溶液は必要に応じて適当に緩衝化され、液体希釈剤は最初に十分な生理食塩水またはグルコースで等張性にする。これは、水性溶液がとりわけ静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内注射に適する場合に当てはまる。用いる滅菌水性媒体は当業者に既知の標準法により容易に得られる。

30

【0080】

別の実施態様において、本発明は、非ヒト哺乳類対象の脳内自己刺激(ICSS)閾値を少なくとも部分的に正常化する既知阻害剤の能力を改善するおよび／または常習性物質の消費を阻害する既知阻害剤の能力を改善する薬剤のスクリーニング法を提供する。この方法は：

40

a)対象のICSS閾値に影響を与え；

b)対象に、単独でまたは他の阻害剤との組み合わせで、常習性物質の消費を阻害するおよび／またはICSS閾値を少なくとも部分的に正常化する既知阻害剤の十分量を投与し、ここで、既知阻害剤はmGluR2および／またはmGluR3および／またはmGluR5のアンタゴニストであり；

c)対象に、有効量の試験薬を投与し、ここで、試験薬はmGluR2および／または

50

m G l u R 3 および／または m G l u R 5 の既知のまたは推測されるアンタゴニストであり；そして

d) 試験薬が I C S S 閾値を少なくとも部分的に正常化する、および所望により 1 個または両方の常習性物質の消費を阻害する既知阻害剤の能力を改善するか否かを測定し、それにより、薬剤が I C S S 閾値を部分的に正常化する既知阻害剤の能力を改善するおよび／または常習性物質の消費を阻害する既知阻害剤の能力を改善するかを同定するか、または、別法として、試験薬が既知阻害剤の能力を、少なくとも常習性物質の消費を減少させる能力を改善し、所望により、I C S S 閾値を部分的に正常化させる能力を改善するか、または両方であることを測定し、それにより薬剤が常習性物質の消費を阻害するおよび／または I C S S 閾値を正常化する既知阻害剤の能力を改善することを同定することを含む 10

【0081】

脳内自己刺激 (I C S S) 閾値は、代謝型グルタミン酸疾患によりもたらされる I C S S 閾値の上昇または減少が、少なくとも一部阻害(すなわち、代謝型グルタミン酸疾患に苦しんでいない対象の I C S S 閾値に調節して戻す)された場合、少なくとも一部正常化する。例えば、慢性ニコチン投与からの離脱(Kenny et al., 2003)またはコカインの慢性自己投与からの離脱(Ahmed et al. 2002、引用してその全体を本明細書に包含させる)は、I C S S 閾値を上昇させることが既知である(例えば、Kenny et al. 2003参照)。したがって、コカイン投与中またはニコチン離脱中の I C S S 閾値の部分的正常化は、通常慢性コカイン投与中またはニコチン離脱中に見られる鬱状態を反映する上昇した閾値からの、I C S S 閾値の低下であり、正常対象に近づく。したがって、本発明のこの実施態様の方法は、常習性物質(例えば、コカイン)の慢性投与または常習性物質(例えば、ニコチン)の投与の中止を、既知の阻害剤および試験薬の投与前および投与中に I C S S 閾値に影響える(すなわち、非正常化)ために、利用することができる。常習性物質の急性投与は典型的に I C S S 閾値を低下させ、一方常習性物質の慢性投与および／または常習性物質の投与の中止は典型的に I C S S 閾値を上昇させる。 20

【0082】

上記の方法に加えて、I C S S 閾値は他の既知の方法により影響され得る。例えば、慢性の緩和なストレス産生は、抗鬱剤処置により可逆性の閾値上昇をもたらす(Moreau J. L., Bos M., Jenck F., Martin J. R., Mortas P. および Wichmann J. (1996), Eur Neuropsychopharmacology, 6, 169-175; Moreau J. L., Bourson A., Jenck F., Martin J. R. および Mortas P. (1994), J Psychiatry Neurosci 19, 51-56; Moreau J. L., Jenck F., Martin J. R., Mortas P. および Haefely W. E. (1992), Eur Neuropsychopharmacology, 2, 43-49)。 30

【0083】

常習性物質の自己投与法および I C S S の分析法は実施例セクションに記載する。本発明の方法は既知の阻害剤の効果の改善に有効な薬剤の同定だけでなく、実施例に説明し、さらに以下の段落に記載するような、物質濫用または離脱に関与するなどの特徴／症状／側面が試験薬により影響されるかの決定にも使用できる。

【0084】

常習性物質の消費を分析する方法は、強化系の自己投与常率スケジュールの下で、または強化系の漸増スケジュール下で行うことができ、その例は実施例 2 および 3 に提供する。常率スケジュールにおいて、動物は物質注入のための活性レバーの‘固定’回数で反応する。強化系の常率(F R)スケジュールは、物質が強化するか否かの重要な情報を提供する。対照的に、強化系の漸増率(P R)スケジュール下で、各時間動物は薬剤を注入するために活性レバーで反応し、動物が次の注入を受けるために続いて反応しなければならない回数は徐々に増加する。動物が物質注射をどれほど強く願っているかを測定するために、総摂取を限定しながら、P R スケジュールは蓄積物質投与量の可能性のある満足効果と物質消費のモチベーションのよい分離を可能にする(Stafford et al. 1998)。 40

【0085】

これらの特徴は、強化系の F R スケジュールと比較した P R における物質探求および物質摂取行動を制御する理論的に異なる因子の解釈を導く。例えば、何人かの研究者は、F R スケジュールは薬剤の満足または快楽効果を測定し (McGregor および Roberts 1995; Mendrek et al. 1998)、一方 P R スケジュールは物質を得る誘引または ‘モチベーション’ の良好な測定であると示唆している (Markou et al., 1993)。上記のような F R スケジュール下のコカインまたはニコチン自己投与の獲得後、ラットまたはマウスのような齧歯類を P R 強化スケジュールに代え (ここで、レバーを押す回数の連続的増加が、ニコチンまたはコカインのような常習性物質の各々のその後の注入を受けるのに必要である)、または P R スケジュールで最初から訓練する。例えば、5、10、17、24、32、42、56、73、95、124、161、208 などのレバーを押す回数が、強化の漸増率スケジュールの下で、次の注入を受けるために必要であり得る。ある態様において、試験薬を、非ヒト対象に、対象を強化セッションの P R または F R スケジュールに置く、例えば、15分、30分、45分、1時間前に投与できる。セッションは決められた時間行うことができる (例えば、1時間、2時間、3時間、4時間など)。中止点は各セッションで決定する。中止点は、セッションが終わる前に達成された最大比率として定義する (すなわち、許可した時間、通常最後の注射をしてから1時間内の物質注入のために成されたレバーを押した最高の数)；セッションは、対象が1時間の間に物質注入を獲得することに失敗したときに終了する。

【0086】

本発明のスクリーニング法は、試験薬がコカインの快楽行動を減少するかの決定にも使用できる。コカインが誘発する I C S S 閾値の低下は、コカインの快楽および多幸感作用の正確な指標である。このように、試験薬がコカインの快楽作用を減弱するとの仮説を試験するために、コカインが誘発する I C S S 閾値の低下における試験薬の効果を測定できる。コカインを I C S S 閾値を低下させるのに十分な量、I C S S 過程における能力に影響することなく、例えば 10 mg/kg 使用できる (Kenny et al., 2002b; Markou & Koob 1992)。

【0087】

さらに、離脱および物質依存の鬱病様症状を、常習性物質の投与中止後および物質消費中 (または直前および／または直後のような密接に時間的に関わっている) に起こる、I C S S 報償閾値の増加の測定により測定できる。したがって、試験薬が鬱病様症状を阻害する能力は、試験薬が、物質使用中または離脱中に起こる I C S S 報償閾値を少なくとも部分的に阻害するか否かの測定により測定できる (すなわち、閾値の正常化)。I C S S 閾値の測定法は当分野で既知であり、実施例セクションに記載する。したがって、本発明のこの実施態様のスクリーニング法は、既知の阻害剤による阻害を改善する薬剤を同定するだけでなく、また試験薬により改善される嗜癖の具体的特徴 (例えば、物質の快楽効果、物質摂取の動機、物質依存に関連するおよび／または物質離脱に続く鬱病) の同定に使用できる。

【0088】

この実施態様のいくつかの態様において、m G l u R 2 および／または m G l u R 3 を拮抗することが既知のまたは疑われる試験薬を、m G l u R 5 のアンタゴニストである既知の阻害剤と組み合わせて分析する。逆に、この実施態様の他の態様において、m G l u R 5 を拮抗することが既知のまたは疑われる試験薬を、m G l u R 2 および／または m G l u R 3 のアンタゴニストである既知の阻害剤と組み合わせて分析する。いくつかの態様において、既知の阻害剤は M P E P であり、試験薬は m G l u R 2 および／または m G l u R 3 のアンタゴニストであることが既知のまたは疑われるものである。他の態様において、既知の阻害剤は L Y 3 4 1 4 9 5 であり、試験薬は m G l u R 5 のアンタゴニストであることが既知のまたは疑われるものである。

【0089】

本発明のスクリーニングの実施態様に関して、対象は非ヒト哺乳類、例えば霊長類またはマウスもしくはラットのような齧歯類である。非ヒト対象は、代謝型グルタミン酸受容

体疾患、例えばニコチン嗜癖、コカイン嗜癖、または鬱病に苦しんでいる。疾患は、実施例に説明するように、または疾患を発症する危険性が増大していることが既知の生物の系統を使用することにより同分野で既知の方法を使用して誘導できる。

【0090】

本明細書で使用する“試験薬”なる用語は、既知の阻害剤が常習性物質の消費を阻害するかまたはICSS閾値を正常化する能力を改善する能力を試験する任意の薬剤を意味する。方法は、一般に鬱病またはコカイン嗜癖またはニコチン嗜癖のような嗜癖障害の治療剤として作用できる分子の同定のためのスクリーニングアッセイに使用する。上記のように、試験薬は、mGluR2、mGluR3、および／またはmGluR5を阻害することが既知の薬剤であり得る。さらに、本発明のスクリーニング法は、試験薬がmGluR2、mGluR3、および／またはmGluR5を拮抗する能力を分析するための他の方法と組み合わせ得る。例えば、細胞ベースのハイスループットアッセイを、mGluR2、mGluR3、および／またはmGluR5のアンタゴニストである試験薬のスクリーニングに使用でき、当分野で既知の方法を使用する。mGluR2、mGluR3、および／またはmGluR5のアンタゴニストとして同定された試験薬は、次いで、本発明の実施態様により提供されるスクリーニング法において分析し、試験薬が既知の阻害剤の常習性物質を阻害する能力、またはICSS報酬閾値に影響する能力のいずれを改善するか測定する。

【0091】

試験薬は、投与された対象に治療的利点を提供する薬剤である、治療剤として作用する能力を試験したいと望む、例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、ポリヌクレオチド、または小有機分子を含む任意のタイプの分子であり得る。

【0092】

他の実施態様において、本発明は、本発明の方法の実施に有用なキットを提供する。キットの構成要素は、キットにより行うことが意図される具体的方法に依存する。例えば、キットは、代謝型グルタミン酸疾患の処置法を行うのに有用であり得る。この態様において、キットは少なくとも代謝型グルタミン酸受容体2(mGluR2)、mGluR3、および／またはmGluR5を調節するアンタゴニストを含む、少なくとも一つのコンテナを含み得る。一つの態様において、キットは、mGluR5の阻害剤の第1コンテナと、mGluR2および／またはmGluR3の阻害剤の第2コンテナを含む。一つの態様において、キットはMPEPのコンテナとLY341495のコンテナを含む。試験キットに包含されるアンタゴニストは、対象に有効量の投与を可能にするのに十分な量および形で提供する。キットは、例えば、物質濫用および鬱病の処置におけるアンタゴニストの有効な使用に関する指示書も含み得る。キットは、いくつかの態様において鬱状態の個体または嗜癖に苦しんでいる個体に一般的に有用な情報を含む。

【0093】

他の態様において、キットは、常習性物質の消費を阻害するかまたは脳内自己刺激閾値を少なくとも部分的に正常化する既知阻害剤の能力を改善する薬剤のスクリーニングに有用であり得る。この態様において、キットは例えば、既知阻害剤を含むコンテナを含む。さらに、キットは、非ヒト哺乳類対象に投与する常習性物質のコンテナを含み得る。

【0094】

本発明は、他の実施態様において嗜癖障害の処置法を提供し、この方法は必要とする対象に、第1期間は有効量または有効量以下のブプロピオンを投与し、第2期間はブプロピオンを投与することを含む。第1期間は、例えば、対象が習慣的に常習性物質を使用する環境にすることが期待される、またはこの物質の存在下に刺激にさらされる期間、または対象が積極的に常習性物質を使用する期間である。第2期間は、例えば、対象が離脱および／または鬱病に苦しんでいる期間である。この実施態様の一つの態様において、第1期間にブプロピオンを第2期間より少ない用量で投与する。

【0095】

この実施態様は、低用量の、実際有効量以下(5mg/kg)のブプロピオンが、急性ニコチ

ン投与の閾値低下作用の遮断に有効であり、高用量(10-40 mg/kg)のブプロピオン投与が、ニコチン投与および／または離脱で影響されるICSS閾値を正常化した、実施例5に示す発見に基づく。有効量以下のブプロピオンは、それ自体脳報酬閾値を低下しないが、急性ニコチンの報酬発生効果を完全に改善できる用量である。

【0096】

本発明のこの実施態様の別の態様において、本発明は常習性物質依存性および／または離脱および／または物質使用もしくは物質離脱に関連する鬱病の処置法を提供し、この方法は、必要とする対象に有効量のパロキセチンのような選択的セロトニン再取り込み阻害剤およびセロトニン-1A受容体アンタゴニストを投与することを含む。セロトニン-1A受容体アンタゴニストは、本発明のいくつかの態様においてp-MPPIである。使用
10
できる他のセロトニン-1A受容体アンタゴニストは、ピンドロールである。この実施態様は、実施例4に示す結果に基づく。

【0097】

他の実施態様において、本発明は嗜癮障害の処置法を提供し、この方法は、必要とする対象に、有効量のパロキセチンのような選択的セロトニン再取り込み阻害剤、セロトニン-1A受容体アンタゴニスト、および／またはブプロピオンを投与し、対象に有効量のmGluR2、mGluR3、および／またはmGluR5のアンタゴニストを投与することを含む。mGluR5アンタゴニストを投与するこの実施態様のいくつかの態様において、対象が離脱に苦しんでいる期間は、mGluR5投与を中止する。いくつかの態様において、選択的セロトニン再取り込み阻害剤、5-HT1A受容体アンタゴニスト、およ
20
び／またはブプロピオンの投与を、対象が離脱に苦しんでいる期間に開始する。

【0098】

本発明を下記の非限定的実施例を参照してより詳細に記載する。

【0099】

実施例1

グループII代謝型およびAMPA/KAINATEグルタミン酸受容体は、ラットにおけるニコチン離脱に関連する脳報酬機能の欠損を制御する

この実施例は、mGluR2およびmGluR3受容体のアンタゴニストおよびおそらくAMPA/Kainateグルタミン酸受容体のアゴニストが、ラットにおけるニコチン離脱と関連する脳報酬機能における欠損を低下できることを説明する。ニコチン離脱は、喫煙
30
者における禁煙症候群に起き、禁煙中の喫煙癮の継続および逆戻りに関与するモチベーションの重要な源を提供するとの仮説が立てられている(KennyおよびMarkou, 2001)。この実施例に提供するデータは、mGluRII受容体の活性化が、ニコチン依存ラットにおけるICSS閾値上昇を、自発的ニコチン離脱中に観察されるのと同程度起こすことにより証明されるように、グループII代謝型グルタミン酸受容体がニコチン離脱に関連する報酬欠損を産生することを強く示唆する。さらに、VTAにおけるmGluRII受容体の活性は、ニコチン依存ラットにおける閾値を上昇し、報酬経路におけるニコチンの作用の介在にVTAが重要な役割を担うことのさらなる支持を提供する。上記と一致して、mGluRII受容体の遮断は、自発的ニコチン離脱に付されているラットにおける報酬欠損を減弱する。最後に、この実施例のデータはまた、AMPA/kainate受容体が、ニコチン依存ラット
40
におけるICSS閾値上昇を、自発的ニコチン離脱中に観察されるのと同程度起こすことにより証明されるように、AMPA/Kainate代謝型グルタミン酸受容体の、ニコチン離脱に関連する報酬欠損の産生に重要な役割を担うことを強く示唆する。

【0100】

材料および方法

対象

対象は149匹の雄Wistarラットであり、各試験開始時は体重300-320 gであった。ラットをCharles River Laboratories(Raleigh, NC)から得、餌と水を自由に摂取できるようにして飼育した。動物を、温度制御した飼育ケースで、12時間明／暗サイクルで維持した(10:00 amに消灯)。ラットを実験の設計にしたがった時点で試験した自
50

発的ニコチン離脱実験以外、いずれの場合も動物を明／暗サイクルの暗い時期に試験した。

【0101】

薬剤

(-)ニコチン水素酒石酸塩((-)-1-メチル-2-(3-ピリジル)ピロリジン)および(+)-MK-801水素マレエート(5R,10S)-(+)-5-メチル-10,11-ジヒドロ-5H-ジベンゾ(a,d)シクロヘプテン-5,10-イミン水素マレエート)をSigma Chemical Co., St. Louis, MOから購入した; LY341495(2S-2-アミノ-2-(1S,2S-2-カルボキシシクロプロパン-1-イル)-3-(キサント-9-イル)プロピオン酸)およびNBQXジナトリウム(2,3-ジオキソ-6-ニトロ-1,2,3,4-テトラヒドロベンゾ(f)キノキサリン-7-スルホンアミドジナトリウム)をTocris, Ballwin, MOから購入した。LY314582(LY354740((+)-2-アミノビスクロ(3.1.0)ヘキサン-2,6-ジカルボン酸)のラセミ体混合物)およびMPEP(2-メチル-6-(フェニルエチニル)-ピリジン)を合成した。CGP44532(3-アミノ-2-(S)-ヒドロキシプロピル-メチル-ホスフィン酸)は、Novartis Pharma AGから提供された。薬剤を各投与直前に調製した。全身投与のために、すべての薬剤を滅菌水に溶解し、実験セッションの30分前に、腹腔内注射により1ml/kg体重で投与した。直接VTA内投与のために、LY314582を以下の組成の人工脳脊髄液(aCSF)に溶解した(mMで): 126.6 NaCl、27.4 NaHCO₃、2.4 KCl、0.5 KH₂PO₄、0.89 CaCl₂、0.8 MgCl₂、0.48 Na₂HPO₄ および7.1 グルコース、pH 7.4。ラットに実験セッションの開始の直前にVTA内注射した。特記しない限り、薬剤の用量は塩形である。

【0102】

装置

脳内自己刺激訓練および試験を、16個のPlexiglasオペラントチャンバー内で行った(25×31×24cm)(Med Associates, St. Albans, VT)。一つの壁は、四分の一回転させるのに0.2N力を必要とする金属ホイールマニピュランダムを含んだ。ホイール(幅5cm)は、壁から~3cm出ていた。頭蓋内刺激は、一定電気刺激により送達した。対象をチャンバーの上にマウントされた金接触スイベルに結合した柔軟性の双極性鉛を通して刺激回路に接続した。刺激パラメータ、データ収集およびすべての試験セッション関数はマイクロコンピュータで制御した。

【0103】

手術

電極およびカニューレの設置。ラットを酸素中1-3%ハロタンの吸入により麻酔し、定位フレームに置いた(Kopf Instruments, Tujunga, CA)。門歯バーを耳内線の5mm上に調節し、頭蓋を暴露した。ステンレススチール双極子電極(長さ11mm)を、後部外側視床下部にインプラントした(AP: プレグマから-0.5mm; ML: ±1.7mm; DV: 硬膜から8.3mm)。VTA注入試験のために、双性ステンレススチールガイドカニューレを、VTAの3mm上にインプラントし(AP: プレグマから-3.2mm; ML: ±1.7mm; DV: 頭蓋表面から5.3mm; 中線から10°の角度)、同時にICSS電極をインプラントした。カニューレを14mm長ステンレススチール探り針(30ゲージ)を使用して開いたままにした。動物を、ICSSパラダイム訓練前に手術から少なくとも7日回復させた。

【0104】

浸透性ミニポンプ手術。

ラットを酸素中の1-3%ハロタンの吸入により麻酔し、皮下(背骨と平行の背中)に置いたAlzet浸透性ミニポンプで準備した(モデル2ML4(28日); Alza Corporation, Palo Alto, CA)。ポンプに生理食塩水またはニコチン塩溶液のいずれかを充填した。ニコチン塩溶液の濃度は動物の体重にしたがって調節し、9mg/kg/日(3.16mg/kg、遊離塩基)の送達となるようにした。ニコチンのこの投与量は、タバコ約30本/日消費しているヒト喫煙者で得られるのと同様な、安定した血漿レベル(~44ng/ml)を提供する(Ben

owitz, 1988, N Engl J Med 319: 1318-1330)。ミニポンプインプラント(または除去)に続き、手術の傷を9mmステンレススチール創傷クリップで閉じ、局所的抗生物質(Bacitracin)軟膏で処置した。

【0105】

脳内自己刺激報酬閾値法

動物を、KornetskyおよびEsposito(Fed Proc 38: 2473-2476, 1979)の個別試験電流閾値法の変法に従い訓練し、この方法は以前記載されている(MarkouおよびKoob, 1992 Physiol Behav 51: 111-119)。簡単に、訓練を非偶発的電流刺激で開始した。この電氣的強化系は500msの訓練期間であり、50-100Hzの周波数で送達される0.1ms方形カソードパルスから成った。送達される電流強度は各動物で調節し、典型的に50から200 μ Aの間であった。非偶発的電流刺激の送達から7.5秒以内の1/4ホイール回転は、訓練を開始する非偶発的刺激と全パラメータで同じである電気刺激をもたらした。可変性の訓練内インターバル(7.5-12.5秒、平均10秒)の後、非偶発的電気刺激の送達で別の試験を開始した。7.5秒以内の非偶発的刺激への反応の失敗は、訓練内インターバルの開始をもたらした。訓練内インターバルの間の反応は、次の訓練の開始を12.5秒に遅らせた。電流レベルを下降および上昇シリーズで変化させた。各電流強度に、3つの訓練セットが存在した。電流強度を5 μ Aステップで変えた。各試験セッションにおいて、4つの別の下降-上昇シリーズが存在した。各シリーズの閾値を、“陽性スコア”(動物が少なくとも3回の訓練中2回反応した)をもたらした二つの連続的電流強度と、“陰性スコア”(動物が3回の訓練中に2回以上反応しなかった)をもたらした二つの連続的電流強度の間の中点と定義した。セッションの全体的閾値を、4つの個々のシリーズの閾値の平均として定義した。各試験セッションは~30分の時間であった。非偶発的刺激の発生と陽性反応の間の潜時を、反応潜時として記録した。各試験セッションの反応潜時は、陽性反応が起きた全訓練の平均反応潜時と定義した。安定なICSS報酬閾値の確立後、ラットを実験設計にしたがった時点で試験する自発的ニコチン離脱以外、ラットで一日1回ICSS法で試験した。

【0106】

大脳内注射法

すべての注射を、17mmインジェクターを通して、66秒にわたり、0.5 μ l/側の用量で両側に投与した。インジェクターを、薬剤溶液を前充填し、VTA内のカニューレの3mm下にはみ出した、目盛り付きポリエチレン-10試験管に接続した。注入後、インジェクターをさらに60秒その位置を保ち、薬剤拡散をさせた。インジェクターを次いで除き、14mmワイヤ探り針に変え、次いで動物を直接ICSS試験装置に入れた。注入は、Harvardマイクロインフュージョン(Model 975)を使用して行った。

【0107】

実験設計

全身投与実験。これらの実験は、ICSS閾値の上昇で測定して、mGluII受容体(LY314582)、GABA_B受容体(CGPA44532)のアゴニスト、またはmGlu5のアンタゴニスト(MPEP)、NMDA(MK-801)またはAMPA/Kainate(NBQX)グルタミン酸受容体の全身投与により、ニコチン離脱が、ニコチン-処置ラットで起こるかを試験した。各試験薬に関して、ラットを安定な基底反応が達成されるまでICSSパラダイムで試験し、これは3連続日に関して閾値の $\leq 10\%$ の変化と定義し、毎日の試験で約14日必要とした。各場合、薬剤非投与ラットを、グループ間で平均基底ICSS閾値または体重に差がないように二つの別々のグループに割り当てた。一つのグループは、次いで、賦形剤を送達する浸透性ミニポンプおよび第2グループは9mg/kg/日ニコチン水素酒石酸塩(3.16mg/kg/日ニコチン遊離塩基)を送達する浸透性ミニポンプで準備した。ミニポンプインプラントから最小7日間のインターバルがあり、その間ICSS報酬閾値を毎日測定し続け、その後、任意の全身投与した薬剤の報酬閾値における効果を評価した。この期間は、ニコチン処置における確固とした閾値の上昇をもたらすのに十分であったが、賦形剤-処置ラットで突然のミニポンプの除去(すなわち自発的離脱)

またはニコチン受容体アンタゴニストの投与(すなわち離脱の発生)では見られなかった(Malin et al., 1992, Pharmacol Biochem Behav 43: 779-784; Malin et al., 1994, Psychopharmacology 115: 180-184; Hildebrand et al., 1997, Psychopharmacology 129: 348-356; Hildebrand et al., 1999, Neuropsychopharmacology 21: 560-574; Epping-Jordan et al., 1998, Nature 393: 76-79; Watkins et al., 2000, J Pharmacol Exp Ther 292: 1053-1064)。ニコチン-処置ラットの別々のグループおよびその対応するニコチン非投与コントロールグループに次いでmGluII受容体アゴニストLY314582(0、2.5、0.5、7.5 mg/kg; n = 9ニコチン、n = 11コントロール)、GABA_B受容体アゴニストCGP44532(0、0.065、0.125、0.25、0.5 mg/kg; n = 5ニコチン、n = 5コントロール)、mGlu5受容体アンタゴニストMPEP(0、0.01、0.05、0.1 mg/kg; n = 8ニコチン、n = 7賦形剤または0、0.5、1、2、3 mg/kg; n = 13ニコチン、n = 13賦形剤)、NMDA受容体アンタゴニストMK-801(0、0.01、0.05、0.1、0.175、0.2 mg/kg; n = 10ニコチン、n = 9コントロール)またはAMPA/Kainate受容体アンタゴニストNBQX(0、0.01、0.025、0.05、0.075、0.1、0.5、1 mg/kg; n = 10ニコチン、n = 12コントロール)を、対象内ラテン方陣にしたがい腹腔内に注射し、30分後にICSS閾値を評価した。最小48時間を、ラテン方陣設計における各注射の間に置き、その間ICSS閾値を測定し続けて、ICSS閾値が基底に戻るのを確認した。LY314582およびMPEPの投与量は、 ≥ 10 mg/kg LY314582および ≥ 3 mg/kg MPEPが、薬剤非投与ラットにおけるICSS閾値を上昇させることを証明した先の試験に基づいて選択した(Harrison et al., 2002, Psychopharmacology 160: 56-66)。CGP44532の投与量は、 ≥ 0.25 mg/kgが薬剤非投与ラットにおけるICSS閾値を上昇させることを証明した先の試験に基づいて選択した(Macey et al., 2001, Neuropsychopharmacology 40: 676-685)。相互作用効果の可能性のある証明のために、基底条件下に閾値を変えない試験薬の投与量を包含させることが重要である。

【0108】

腹側被蓋領域内LY314582実験。

安定な基底ICSS反応が達成された後(3連続日で閾値の $\leq 10\%$ の変化)、VTAに向かった両側カニューレを付けたラット(n = 15)を、平均基底報酬閾値または体重がグループ間で差がないように二つのグループに割り当てた。一つのグループは、賦形剤を送達する皮下浸透性ミニポンプ、第2のグループはニコチン(3.16 mg/kg/日ニコチン遊離塩基)を送達するミニポンプで準備した。動物は、再びISCCパラダイムについて薬剤処置前7日間毎日試験した。ラットの両方のグループに、次いで上記のようにVTA内に直接LY314582(0、10、50および100 ng/側; n = 7ニコチン、n = 8コントロール)を対象内ラテン方陣設計にしたがい投与し、ICSS報酬閾値を注射後直ぐに評価した。各注射の間に最小48時間のインターバルがあり、その間ICSS閾値を測定し続け、閾値がさらなる薬剤試験前に基底レベルに回復させた。実験の最後にすべての動物を麻酔し、脳を除去し、直ぐに氷の上に置いた。脳を50 μ mセクションに切断し、インジェクターと電極の位置を試験した(注射部位の組織学的検査に関して図1参照)。注射チップがVTA内に位置するラットのみを統計的分析に包含させた。

【0109】

自発的ニコチン離脱実験。

浸透性ミニポンプを、ニコチン-処置ラット(n = 15)(少なくとも7日3.16 mg/kg/日ニコチン遊離塩基を送達するミニポンプで準備したラットと定義)または対応するコントロールラット(n = 17; 賦形剤含有ミニポンプで準備したラット)から外科的に除いた。次いで、すべてのラットで、浸透性ミニポンプ除去後12、18、24、36、48および72時間にICSS法で試験した。これらの時点は、ニコチン送達浸透性ミニポンプの除去後の、自発的ニコチン離脱の先に観察された閾値上昇の時間経過に基づいて選択した(Harrison et al., 2001, Neuropsychopharmacology 25: 55-71; K.L.)。12時間の時点で得られたICSS報酬閾値に基づき、ニコチン離脱ラットを、各グループで報酬閾

値上昇の大きさに差がないように割り当てた(117.67±3.1%、n=8; 119.93±3.5%、n=7)。同様に、コントロールラットを、各グループで平均報償閾値に差がないように割り当てた(106.45±5.2%、n=7; 103.63±3.6%、n=10)。18時間の時点で開始する試験の30分前、ニコチン離脱グループの一つおよびコントロールラットのグループの一つにLY341495(1mg/kg)を注射した; 残りのラットに賦形剤を注射した。

【0110】

統計的分析

自発的ニコチン離脱以外のすべての実験に関して、基底報償閾値からの変化率を、前日の閾値(すなわち、無薬剤基底閾値)のパーセンテージとして、閾値スコアに影響する薬剤を示すことにより計算した。これらの基底スコアのパーセンテージを、処置薬剤投与量を対象内因子として、ポンプ含量(ニコチンまたはコントロール)を対象間因子として、2因子反復測定分散分析(ANOVA)に付した。自発的ニコチン離脱実験に関して、基底報償閾値からの変化率を、ミニポンプ除去の直前の日における各ラットの閾値のパーセントとして、離脱間の各時点で得た閾値スコアとして示すことにより計算した。これらの基底スコアのパーセンテージは3因子反復測定ANOVAに付した。対象内因子は、ミニポンプ除去後の時間であり、二つの対象間因子はポンプ含量(ニコチンまたは賦形剤)および急性薬剤処置(LY314582または賦形剤)であった。全実験に関して、反応潜時データを閾値データと同様の方法で分析した。ANOVAで統計的に有意に異なる効果の後、平均の間のpost-hoc比較をフィッシャーのLSD検定で行った。

10

20

【0111】

結果

mGluII受容体アゴニストLY314582(2.5-7.5mg/kg)の腹腔内投与は、ニコチン処置ラットでICSS報償閾値を上昇させたが、コントロールラットではしなかった。この効果は統計的に有意な効果のグループ($F_{(1,18)}=7.43$ 、 $p<0.05$)、有意な効果の投与量($F_{(3,54)}=5.02$ 、 $p<0.005$)、および有意なグループ×投与相互作用($F_{(3,54)}=2.79$ 、 $p<0.05$)に反映された。Post-hoc分析は、最高投与量のLY314582(7.5mg/kg)が、ニコチン処置ラットにおける報償閾値を賦形剤処置よりも($p<0.01$)、および同じ投与量のコントロールラットよりも($p<0.01$)上昇させることを確認した(図2A)。報償閾値におけるその効果と逆に、LY314582は試験した投与量で、ニコチン処置またはコントロールラットの反応潜時に影響がなかった($F_{(3,54)}=0.59$ 、NS)(図2B)。

30

【0112】

表1に示すように、選択的GABA_B受容体アゴニストCGP44532は、試験した最低投与量(0.065-0.25mg/kg)でニコチン処置ラットにおける報償閾値上昇を起こさず、一方試験した最高投与量でCGP44532(0.5mg/kg)はニコチン処置およびコントロールラットにおける報償閾値を上昇させた($F_{(4,32)}=16.62$ 、 $p<0.001$)。ニコチン処置におけるCGP44532は、コントロールラットと比較して効果に差はなかった(グループ×用量相互作用： $F_{(4,32)}=0.05$ 、NS)。CGP44532はまた試験した濃度で反応潜時に効果がなかった($F_{(4,32)}=0.30$ 、NS)。

40

【0113】

【表 2】

表 1. ニコチンーおよび賦形剤ー処置ラットの I C S S 閾値および反応潜時における、G A B A_B受容体アゴニスト C G P 4 4 5 3 2 の効果

CGP44532 (mg/kg)	賦形剤		ニコチン	
	閾値	潜時	閾値	潜時
	n = 5		n = 5	
0	96.79±2.8	95.51±2.2	99.93±4.1	100.31±4.6
0.065	96.28±3.1	97.31±3.8	96.37±3.2	106.02±8.1
0.125	106.76±3.2	102.34±2.8	103.88±7.2	98.15±5.3
0.25	109.14±5.1	105.03±3.1	109.98±5.4	99.05±3.1
0.5	148.43±16.6***	106.13±6.5	146.83±14.3***	98.11±5.4

10

データ(平均±S E M)は、基底 I C S S 閾値および反応潜時のパーセントとして示す。アスタリスクは C G P 4 4 5 3 2 と賦形剤処置の間の統計的有意差を示す。反復測定に関する二元配置 A N O V A の後***P<0.001。

【0114】

20

図 3 に示すように、直接 V T A への L Y 3 1 4 5 8 2 (10-100 ng/側)の両側マイクロインフュージョンは、ニコチン処置ラットの報償閾値を上昇させたが、コントロールラットではしなかった。また、有意な効果のグループ($F_{(1,13)}=4.81$, $p<0.05$)、投与量($F_{(3,39)}=4.77$, $p<0.01$)、および有意なグループ×投与量相互作用($F_{(3,39)}=3.82$, $p<0.05$)があった。Post-hoc分析は、50および100 ng/側 L Y 3 1 4 5 8 2 が、コントロールラットの閾値に影響せずに、ニコチンー処置ラットの報償閾値を上昇させるのに十分であることを確認した。L Y 3 1 4 5 8 2 は、V T A 投与後、ニコチン処置またはコントロールラットにおける反応潜時に影響しなかった($F_{(3,39)}=1.94$, N S)(図 3 B)。

【0115】

30

図 4 に示すように、慢性ニコチン処置からの離脱は、コントロールラットと比べて、確固たる I C S S 閾値上昇を産生した($F_{(1,27)}=15.3$, $p=0.0006$)。有意なグループ×投与量×時間相互作用の分析($F_{(5,135)}=3.3$, $p=0.01$)は、下記のことを解明した：賦形剤を注入されたニコチンー処置ラットは、確固たる報償閾値上昇を示し、ミニポンプ除去 24 時間後にピークに達した(図 4 A)。しかしながら、18 時間の時点の 30 分前の L Y 3 4 1 4 9 5 投与は、ニコチンー離脱ラットにおける報償閾値の上昇を($p<0.001$)(図 4 A 参照)、コントロールラットにおける閾値に影響をもたらすことなく減弱した(図 4 B)。L Y 3 4 1 4 9 5 は、注射後の任意の時点で反応潜時に影響しなかった($F_{(1,27)}=0.43$, N S)。

【0116】

40

表 2 に説明するように、M K - 8 0 1 (ジズシリピン)(0.01-0.2 mg/kg)は、ニコチン処置およびコントロールラットにおける報償閾値を低下させた($F_{(6,66)}=7.5$, $p<0.0001$)。

【0117】

【表 3】

表 2. ニコチンーおよび賦形剤ー処置ラットの I C S S 閾値および反応潜時における NMDA 受容体アンタゴニスト MK-801 の効果

MK-801 (mg/kg)	賦形剤		ニコチン	
	閾値	潜時	閾値	潜時
	n=9		n=10	
0	102.72±3.9	99.04±1.7	103.65±1.7	93.73±2.7
0.01	95.99±3.3	100.00±2.5	98.20±6.1	95.41±2.3
0.03	92.54±2.6	103.14±2.1	93.09±3.9	94.64±3.6
0.1	88.48±5.6**	98.97±3.9	89.42±3.6	106.14±4.4
0.15	87.14±4.6**	101.60±2.0	76.24±4.7***	93.65±3.6
0.175	93.64±3.4*	119.22±11.9**	82.26±3.7**	93.56±4.2
0.2	82.47±4.3***	119.21±9.4**	84.29±3.0*	105.14±1.9

データ(平均±SEM)は基底 I C S S 閾値および反応潜時のパーセントとして示す。アスタリスクは、MK-801 と賦形剤処置の間の有意差を示す。反復測定に関する二元配置 ANOVA の後 * $P < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

【0118】

MK-801 は報償閾値をニコチン処置およびコントロールラットと同程度低下させ、グループ×投与量相互作用はなかった($F_{(6,66)} = 1.2$, NS)。MK-801 ≥ 0.2 mg/kg の投与量は、ラットが自己刺激にもはや反応しないように両方のグループにおける I C S S パラダイムにおいてパフォーマンスを混乱させ、したがって、0.2 mg/kg より多い投与量は試験しなかった。さらに、MK-801 は、ニコチンー処置ラットにおける報償閾値の離脱様上昇を、試験した投与量で起こさなかった。MK-801 は反応潜時を有意に増加させなかった($F_{(6,72)} = 2.9$, $p < 0.05$)。Post-hoc 分析は、MK-801 の投与量を増やすにつれ、特にコントロールラットにおいて同様に反応潜時を増加することを証明したため、MK-801 の高投与量ではパフォーマンスが徐々に損なわれることを示唆した。

【0119】

表 3 に示すように、低用量の MPEP (0.01–0.1 mg/kg) はニコチン処置またはコントロールラットの報償閾値($F_{(3,39)} = 2.3$, NS)または反応潜時($F_{(3,39)} = 0.4$, NS)に影響しなかった。高用量の MPEP (0.5–3 mg/kg) は、ニコチン処置およびコントロールラットで報償閾値を上昇させた($F_{(4,96)} = 8.4$, $P < 0.0001$)。しかしながら、両方のラットのグループで MPEP が上昇させた I C S S 閾値は同じ程度であり、グループ×投与量相互作用はなかった($F_{(4,96)} = 0.7$, NS)。MPEP (0.5–3 mg/kg) はいずれのグループにおいても反応潜時に影響しなかった($F_{(4,96)} = 1.4$, NS)。

【0120】

【表 4】

表 3. ニコチンーおよび賦形剤ー処置ラットの I C S S 閾値および反応潜時における m G l u 5 受容体アンタゴニスト M P E P の効果

MPEP (mg/kg)	賦形剤		ニコチン		
	閾値	潜時	閾値	潜時	
	n=7		n=8		
0	97.67±2.0	104.78±1.1	95.68±3.5	101.79±5.2	10
0.01	98.75±3.5	99.75±3.4	93.86±6.0	101.50±2.2	
0.05	101.27±4.1	104.87±3.3	94.11±2.6	103.48±4.2	
0.1	105.13±3.2	105.13±4.8	103.84±1.2	102.54±1.5	
	n=13		n=13		
0	99.91±1.8	99.41±1.9	100.62±3.3	100.76±2.3	20
0.5	103.01±2.7	103.20±4.4	104.02±2.2	99.47±1.9	
1	103.70±3.0	100.72±2.1	105.81±3.3	99.12±1.7	
2	111.21±2.3**	107.60±2.6	121.17±6.2**	101.31±2.2	
3	111.52±4.8**	103.58±2.3	119.11±5.5**	102.22±3.6	

データ(平均±S E M)は基底 I C S S 閾値および反応潜時のパーセントとして示す。アスタリスクは、M P E P と賦形剤処置の間の統計的有意差を示す。**P<0.01 反復測定に関する二元配置 A N O V A の後。

【0121】

図 5 に説明するように、A M P A / Kainate 受容体アンタゴニスト N B Q X (0.01-1 mg/kg)は、ニコチン処置ラットの I C S S 報償閾値を有意に変えるが、コントロールラットでは変えなかった。この効果は、統計的に有意な効果のグループ($F_{(1,20)}=10.82$ 、 $p<0.005$)、有意な効果の投与量($F_{(7,140)}=2.8$ 、 $p<0.01$)、および有意なグループ×投与量相互作用($F_{(7,140)}=2.11$ 、 $p<0.05$)に反映された。Post-hoc分析はN B Q Xの、ニコチンー処置ラットの報償閾値における二方式の作用を証明した。低用量N B Q X (0.025-0.1 mg/kg)はニコチンー処置ラットにおける報償閾値を上昇させ、一方高用量N B Q X (0.5-1 mg/kg)は効果が低く、賦形剤処置と比較して優位に閾値を上昇させなかった(図 5 A)。N B Q Xは、試験した投与量でニコチン処置またはコントロールラットの反応潜時に影響しなかった($F_{(7,140)}=0.31$ 、N S)(図 5 B)。

【0122】

本データは、m G l u II受容体の活性化が、ニコチン離脱の間に観察されるのと同程度ニコチンー処置ラットにおける報償欠損を起こすことを証明することにより、ニコチン離脱に関する脳報償機能の欠損の制御における、グループII代謝型グルタミン酸受容体の役割の強い証拠を提供する。さらに、V T Aに存在するm G l u II受容体の活性化は、またニコチン処置ラットにおける離脱様報償欠損を起こし、脳の報償経路のニコチンの作用の介在におけるV T Aの重要な役割のさらなる証拠を提供した(Hildebrand et al., 1999; MansvelderおよびMcGehee, 2000; Mansvelder et al., 2002)。最後に、m G l u II受容体の遮断は、自発的ニコチン離脱を行っているラットで観察される脳報償機能における欠損を減弱した。以前、m G l u II受容体アゴニスト L Y 3 5 4 7 4 0 が自発的ニコチン離脱中に観察される増加した聴覚性驚愕を減弱することが示された(Helton et al., 1997)。これらの観察の一つの可能性のある説明は、脳の異なる部位に位置するm G l u II受容体が、ニコチン離脱の種々の側面を異なって制御し得るということである。

【0123】

考察

本発明は、ニコチン離脱に関連する報償欠損の介在におけるmGluIIおよびGABA_B受容体の作用の役割と可能性のある機構に関する、実施例に示す実験的結果に基づく。GABA_B受容体アゴニストCGP44532(0.065–0.5 mg/kg)ではなく、選択的mGluII受容体アゴニストLY314582(2.5–7.5 mg/kg)の全身投与が、ニコチン依存ラットで、報償機能の感受性の尺度である脳内自己刺激(ICSS)報償閾値における離脱様上昇を起こしたが、コントロールラットでは起こさなかった。LY314582は、ICSSパラダイムのパフォーマンスの尺度である反応潜時に影響しなかった。腹側被蓋領域(VTA)へのLY314582(10–100 ng/側)の両側マイクロインフュージョンは、ニコチン依存ラットで閾値上昇を起こしたが、コントロールラットでは起こさなかった。さらに、mGluII受容体アンタゴニストLY341495(1 mg/kg)の一回注射は、自発的ニコチン離脱に付されているラットにおける報償閾値の上昇を減弱した。最後に、mGluII受容体の活性化がグルタミン酸伝達を減少させるため、後シナプスグルタミン酸受容体の遮断は、ニコチン依存ラットにおける離脱様報償欠損をまた起こすと仮説を立てた。したがって、選択的AMPA/Kainate(α-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオネート/Kainate)受容体アンタゴニストであるNBQX(0.001–1 mg/kg)は、ニコチン依存ラットでICSS閾値の離脱様上昇を起こしたが、コントロールラットでは起こさず、各々mGlu5(代謝型グルタミン酸5)およびNMDA(N-メチル-D-アスパルテート)受容体のアンタゴニストであるMPEP(0.01–3 mg/kg)およびMK-801(0.01–0.125 mg/kg)は起こさなかった。全体に、これらのデータは、VTAに位置するmGluII受容体による脳報償機能の阻害的制御がニコチン依存ラットで上昇し、それが、ニコチン離脱に関連する報償欠損に関与していることを証明した。さらに、AMPA/Kainate受容体におけるグルタミン酸伝達の減少がまたニコチン離脱-誘発報償欠損に関与しているようである。

【0124】

理論に縛られずに、本発明は一部以下の考えに基づく。ニコチン禁断の期間に観察される嫌悪症候群が、タバコ嗜癖に関与するという強い証拠が現在ある(KennyおよびMarkou, 2001, Pharmacol Biochem Behav 70: 531-549)。実際、ニコチン離脱は、近年、脳内自己刺激(ICSS)報償閾値の上昇で測定して、脳報償機能における欠損を起こすことが示されており、その大きさと期間は、ラットが他の重要な常習性物質の離脱に付されているときに観察されるのと類似である(Epping-Jordan et al., 1998 Nature 393: 76-79; Harrison et al., 2001 Neuropsychopharmacology 25: 55-71)。さらに、この脳報償機能における欠損は、ヒト喫煙者におけるタバコ消費への切望、回帰および継続に関与する重大な動機因子として提案されている(Epping-Jordan et al., 1998)。しかしながら、ニコチンがその報償効果を産生する機構に関する徹底的な試験とは逆に(PicciottoおよびCorrigall, 2002 J Neurosci 22: 3338-3341参照)、ニコチン離脱に関連する報償欠損を介在する機構に関してはほとんど知られていない。

【0125】

ニコチンを含む常習性物質の共通の特性は、メソアカンバンス報償経路(mesoaccumbens reward pathway)におけるドーパミン伝達を増加させる能力であり、それにより脳報償機能を促進する(Pontieri et al., 1996; Picciotto, 1998; Di Chiara, 2000)。ニコチンは、これを、一部、VTAにおける興奮性グルタミン酸伝達の活性化により達成すると考えられている(Schilstroem et al., 1998; MansvelderおよびMcGehee, 2000; Mansvelder et al., 2002)。したがって、VTAに位置するmGluII受容体が、グルタミン酸伝達を減少させる前シナプス自己受容体であるため(Bonci et al., 1997; WigmoreおよびLacey, 1998; ManzoniおよびWilliams, 1999)、ニコチン-処置ラットにおけるVTAに位置するmGluII受容体の増加した感受性が、この脳部位におけるニコチンによる興奮性グルタミン酸伝達の長期の活性化のパターンに反応して起こるようである。

【0126】

ニコチン離脱中、興奮性グルタミン酸伝達におけるニコチンの刺激効果がもはや存在しない場合、V T Aにおける増加したm G l u II受容体の機能はグルタミン酸伝達の減少を予期し、それにより脳報酬系の活性を減少させる。電気生理学的およびインビボ微小透析試験は、この仮説と一致する。例えば、ManzoniおよびWilliams(1999)は、長期のアヘン剤処置が、V T Aドーパミンニューロンにおける興奮性グルタミン酸電流における、m G l u II受容体アゴニストの阻害効果を増加させることを証明した。同様に、反復コカイン処置は、N A c cにおけるm G l u II受容体の含量および二量体化を増加させ、それにより、この脳の部位のグルタミン酸効果におけるm G l u II受容体の阻害効果を増加させる(Xi et al., 2001)。類似の試験が、アヘン剤およびアンフェタミンでの反復処置後にV T AにおけるG A B A_B受容体機能の増加も報告していることは興味深い(ManzoniおよびWilliams, 1999; Giorgetti et al., 2002)。しかしながら、我々は、G A B A_B受容体による脳報酬機能の制御は、コントロールと比較してニコチン処置ラットで変化しないことを発見し、G A B A_B受容体はおそらくニコチン離脱に関連する報酬欠損の介在に関与しないことを示唆した。

【0127】

先の試験は、m G l u II受容体アゴニストL Y 3 5 4 7 4 0が、自発的ニコチン離脱を行っているラットにおける増加した聴覚性驚愕反応を軽減することを発見した(Helton et al., 1997)。同様に、m G l u II受容体におけるアゴニストは、アヘン剤離脱を行っているラットにおける、禁断症状の身体的兆候を減少させる(FundytusおよびCoderre, 1997; VandergriffおよびRasmussen, 1999)。これらの観察は、選択的m G l u II受容体アゴニストの全身的およびV T A内投与が、ニコチン処置ラットにおける離脱様報酬欠損を起こし、この受容体の遮断が自発的ニコチン離脱を覆すという本明細書に提示のデータと反する可能性があるように見える。

【0128】

しかしながら、種々の物質離脱におけるグルタミン酸伝達の異なる役割に関する証拠が蓄積されている。例えば、特に青斑(L C)および小脳扁桃(Zhang et al., 1994; Rasmussen, 1995; Taylor et al., 1997)における増加したグルタミン酸伝達が、アヘン剤離脱症候群の‘身体的’側面の発現に重要な役割を担うと考えられ、一方中側坐報酬系におけるグルタミン酸伝達の減少が、アヘン剤および他の常習性物質からの脱離中に現れる報酬および動機的欠失に関与すると考えられている(Keys et al., 1998; LuおよびWolf, 1999; ManzoniおよびWilliams, 1999; Giorgetti et al., 2002)。実際、Shaw-Lutchmanと共同研究者(2002)は、細胞性活性のマーカーであるc A M P反応エレメント(C R E)介在転写が、急激なモルヒネ離脱を行っているラットのL Cおよび小脳扁桃で上昇し、V T Aで減少していることを証明し、この部位の活性が、モルヒネ離脱中に逆の方法で変化することを示唆した。これらの観察に基づき、同様の解離がまたニコチン離脱の異なる側面の介在におけるグルタミン酸の役割に関しても存在しているようである。しかしながら、物質離脱の感情的側面、および特に脳報酬機能における欠失が、物質離脱の他の症状と比較して、物質の依存性の維持にもっとも有用であると考えられることは注目すべきである(Markou et al., 1998; KennyおよびMarkou, 2001; Ahmed et al., 2002)。

【0129】

グルタミン酸伝達、中側坐ドーパミンニューロンにおける興奮性を制御し、報酬経路の基底活性の介在に必須の役割を担う(KalivasおよびStewart, 1991; Suaud-Chagny et al., 1992; Kalivas, 1993)。上記のように、m G l u II受容体はV T Aにおける前シナプス自己受容体として作用し、そこでそれらはグルタミン酸伝達を抑制する。したがって、m G l u II受容体は、ニコチン離脱ラットにおける報酬閾値を、少なくとも一部、グルタミン酸伝達の減少により上昇させ、後シナプスグルタミン酸受容体でのグルタミン酸伝達の遮断は、自発的ニコチン離脱に付されているラットと同程度、ニコチン処置ラットにおける報酬閾値上昇を起こすと仮説を立てた。

【0130】

したがって、低用量でA M P A/Kainate受容体アンタゴニストN B Q Xは、ニコチン

10

20

30

40

50

処置ラットにおける報償閾値の上昇を起こすが、コントロールラットでは起こさない。この観察は、AMPA/Kainate受容体における減少したグルタミン酸伝達がニコチン離脱に関連する報償欠損に関与することを示唆する。これらのデータは、また、長期のニコチン処置が、NACCおよびVTAでAMPA受容体免疫反応性を減少させることを証明した最近の発見と一致する(Lee et al., 2001)。正常条件下で、AMPA/Kainate受容体は中側坐報償経路を介した興奮性グルタミン酸伝達の主要なレギュレーターである(Pennartz et al., 1990; HuおよびWhite, 1996)。したがって、mGluII受容体機能の増加と類似して、ニコチン処置ラットにおけるAMPA受容体発現の減少は、中側坐ドーパミン伝達を減少し、それによりこのシステムでニコチンの長期刺激効果を打ち消すように作用すると期待される。

10

【0131】

興味深いことに、ニコチン処置ラットにおけるNMDA受容体の遮断は報償閾値を上昇させず、代わりに閾値を減少させ、ニコチン処置およびコントロールラットの両方における報償活性を反映する。NMDA受容体が、中側坐ドーパミン伝達におけるニコチンの刺激効果を介在する重要な役割を担うというかなりの証拠がある(Schilstroem et al., 1998; Fu et al., 2000; MansvelderおよびMcGehee, 2000)。したがって、mGluII受容体の増加した感受性のような長期ニコチン処置中に起こる対抗対応的過程である、NMDA受容体の拮抗作用による報償経路のニコチンの刺激効果の遮断が、ICSS閾値の上昇を起こすことが予測される。

20

【0132】

これらのデータに関する我々の説明は、NMDA受容体の多くの集団が脳の報償回路を通して存在し、おそらく脳報償機能と逆に作用することである。実際、NMDA受容体におけるアンタゴニストは、それ自体報償性であり、直接VTA内投与後ICSS閾値を低下させることが示されている(David et al., 1998)。mGlu5受容体の遮断はまたニコチン離脱を起こさなかったが、代わりに、コントロールおよびニコチン処置ラットにおけるICSS閾値を上昇させた。これらのデータは、mGlu5受容体遮断が、両方のグループのラットで同じ程度脳報償機能を減少させることを証明する。

【0133】

実施例1に記載の引用文献：

- Ahmed SH, Kenny PJ, Koob GF, Markou A (2002), *Nat Neurosci* 5: 625-626. 30
- Benowitz NL (1988), *N Engl J Med* 319: 1318-1330.
- Bonci A, Grillner P, Siniscalchi A, Mercuri NB, Bernardi G (1997), *Eur J Neurosci* 9: 2359-2369.
- Cartmell J, Schoepp DD (2000), *J Neurochem* 75: 889-907.
- Chiamulera C, Epping-Jordan MP, Zocchi A, Marcon C, Cottiny C, Tacconi S, Corsi M, Orzi F, Conquet F (2001), *Nat Neurosci* 4: 873-874.
- David V, Durkin TP, Cazala P (1998), *Eur J Neurosci* 10: 1394-1402.
- Di Chiara G (2000), *Eur J Pharmacol* 393: 295-314.
- Epping-Jordan MP, Watkins SS, Koob GF, Markou A (1998), *Nature* 393: 76-79.
- Erhardt S, Mathe JM, Chergui K, Engberg G, Svensson TH (2002), *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 365: 173-180. 40
- Fu Y, Matta SG, Gao W, Brower VG, Sharp BM (2000), *J Pharmacol Exp Ther* 294: 458-465.
- Fundytus ME, Coderre TJ (1997), *Br J Pharmacol* 121: 511-514.
- Giorgetti M, Hotsenpiller G, Froestl W, Wolf ME (2002), *Neuroscience* 109: 585-595.
- Harrison AA, Liem YT, Markou A (2001), *Neuropsychopharmacology* 25: 55-71.
- Harrison AA, Gasparini F, Markou A (2002), *Psychopharmacology* 160: 56-66.
- Helton DR, Tizzano JP, Monn JA, Schoepp DD, Kallman MJ (1997), *Neuropharmacology* 36: 1511-1516. 50

- Hildebrand BE, Nomikos GG, Bondjers C, Nisell M, Svensson TH (1997), *Psychopharmacology* 129: 348-356.
- Hildebrand BE, Panagis G, Svensson TH, Nomikos GG (1999), *Neuropsychopharmacology* 21: 560-574.
- Hu XT, White FJ (1996), *Synapse* 23: 208-218.
- Kalivas PW (1993), *Brain Res Brain Res Rev* 18: 75-113.
- Kalivas PW, Stewart J (1991), *Brain Res Brain Res Rev* 16: 223-244.
- Kenny PJ, Markou A (2001), *Pharmacol Biochem Behav* 70: 531-549.
- Keys AS, Mark GP, Emre N, Meshul CK (1998), *Synapse* 30: 393-401.
- Kornetsky C, Esposito RU (1979), *Fed Proc* 38: 2473-2476. 10
- Lee KJ, Kim DH, Shim IS, Choi SH, Min BH, Chun BG, Shin KH (2001), *Soc Neurosci Abstr* 27: 599.
- Lu W, Wolf ME (1999), *Synapse* 32: 119-131.
- Macey DJ, Froestl W, Koob GF, Markou A (2001), *Neuropharmacology* 40: 676-685.
- Malin DH, Lake JR, Newlin-Maultsby P, Roberts LK, Lanier JG, Carter VA, Cunningham JS, Wilson OB (1992), *Pharmacol Biochem Behav* 43: 779-784.
- Malin DH, Lake JR, Carter VA, Cunningham JS, Hebert KM, Conrad DL, Wilson OB (1994), *Psychopharmacology* 115: 180-184
- Mansvelder HD, McGehee DS (2000), *Neuron* 27: 349-357.
- Mansvelder HD, Keith JR, McGehee DS (2002), *Neuron* 33: 905-919. 20
- Manzoni OJ, Williams JT (1999), *J Neurosci* 19: 6629-6636.
- Markou A, Koob GF (1992), *Physiol Behav* 51: 111-119.
- Markou A, Kosten TR, Koob GF (1998), *Neuropsychopharmacology* 18: 135-174.
- Paxinos G, Watson CH (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London Academic Press, London, UK.
- Pennartz CM, Boeijinga PH, Lopes da Silva FH (1990), *Brain Res* 529: 30-41.
- Picciotto MR (1998), *Drug Alcohol Depend* 51: 165-172.
- Picciotto MR, Corrigall WA (2002), *J Neurosci* 22: 3338-3341.
- Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G (1996), *Nature* 382: 255-257.
- Rasmussen K (1995), *Neuropsychopharmacology* 13: 295-300. 30
- Schilstroem B, Nomikos GG, Nisell M, Hertel P, Svensson TH (1998), *Neuroscience* 82: 781-789.
- Schoepp DD (2001), *J Pharmacol Exp Ther* 299: 12-20.
- Shaw-Lutchman TZ, Barrot M, Wallace T, Gilden L, Zachariou V, Impey S, Duman RS, Storm D, Nestler EJ (2002), *J Neurosci*. 22: 3663-3672.
- Suaud-Chagny MF, Chergui K, Chouvet G, Gonon F (1992), *Neuroscience* 49: 63-72.
- Taylor JR, Punch LJ, Elsworth JD (1997), *Psychopharmacology* 138: 133-142.
- Vandergriff J, Rasmussen K (1999), *Neuropharmacology* 38: 217-222.
- Watkins SS, Stinus L, Koob GF, Markou A (2000), *J Pharmacol Exp Ther* 292: 1053-1064. 40
- Wigmore MA, Lacey MG (1998), *Br J Pharmacol* 123: 667-674.
- Xi Z, Baker DA, Shen H; Carson DS, Kalivas PW (2002), *J Pharmacol Exp Ther* 300: 162-171.
- Xi Z, Shen H, Carson D, Baker DA, Kalivas PW (2001), *Soc Neurosci Abstr* 27: 2596.
- Zhang T, Feng Y, Rockhold RW, Ho IK (1994), *Life Sci* 55: PL25-PL31.

【 0 1 3 4 】

実施例 2

m G l u R 5 アンタゴニスト M P E P は、ラットおよびマウスにおけるニコチン自己投与を減少させる

この実施例は、mGluR5の遮断がラットおよびマウスの両方におけるニコチン自己投与を減少し、コカイン自己投与におけるmGluR5の役割を示す発見と一致することを説明する。ラットによるニコチン自己投与は、ニコチンの報償効果を反映すると考えられ、ドーパミン作用性(Corrigall & Coen 1991; PicciottoおよびCorrigall 2002)、コリン作用性(Watkins et al. 1999; Corrigall et al. 2002; PicciottoおよびCorrigall 2002)およびK-アミノ酪酸(GABA)-作用性(Dewey et al. 1999; PatersonおよびMarkou 2002; PicciottoおよびCorrigall 2002)神経伝達の調節に感受性であることが示されている。さらなる試験で、ニコチンの報償効果の介在におけるグルタミン酸の役割の可能性が示唆されている(McGehee et al. 1995; Schilstrom et al. 2000; Reid et al. 2000)。具体的に、神経化学試験は、全身性ニコチン投与が腹側被蓋領域(VTA)および側坐核(NAcc)におけるグルタミン酸レベルの有意な増加をもたらすことを示唆した(Reid et al. 2000; Schilstrom et al. 2000)。さらに、近年のMansvelderと共同研究者(2002)による電気生理学的は、GABA-作用性およびグルタミン作用性の複雑な相互作用が、中脳にドーパミンニューロンに、喫煙者の脳と類似の濃度および期間のニコチンレベルに暴露されたスライス(VTA)のレベルでインプットされることを示唆した。要約すると、ニコチンは、その報償効果を中枢神経系における複数の神経伝達物質の複雑な相互作用により発揮すると考えられている。その中でも重要なのは中位辺縁系(mesolimbic)ドーパミン作用性システムであるが、近年グルタミン酸も重要な役割を担うことが示されている。

10

【0135】

代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)の8つのサブタイプは、アミノ酸配列相同性、二次メッセンジャー系および薬理学に基づいて3つのグループに分けられている(ConnおよびPin 1997)。グループI mGluRは代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ5(mGluR5)およびmGluR1から成り、ホスホリパーゼCの刺激を介して作用する(ConnおよびPin 1997)。mGluR5の分布は詳細に特徴付けられ、ラット脳のNAcc、線条体および海馬に非常に分布していることが示唆された(Shigemoto et al. 1993; Tallakssen-Greene et al. 1998)。代謝型グルタミン酸受容体は神経伝達物質放出の調節(CartmellおよびSchoepp 2000; Schoepp 2001)、シナプス可塑性および学習(Holscher et al. 2001)、神経保護(Battaglia et al. 2001, 2002)、ドーパミン依存性運動行動(レビューのためにVezinaおよびKim 1999参照)および疼痛(レビューのためにSpooren et al. 2001参照)に関与することが示されている。

20

30

【0136】

近年、そして本研究にもっとも関連して、mGluR5を欠くマウスは、静脈内コカイン自己投与を獲得しないことが示されている(Chiamulera et al. 2001)。加えて、特異的mGluR5アンタゴニスト2-メチル-6-(フェニルエチニル)-ピリジン(MPEP; Gasparini et al. 1999)の投与が、食物に対する反応に影響せずに、コカイン自己投与の用量依存的減少をもたらした(Chiamulera et al. 2001)。さらに、1週間にわたる反復コカイン投与が、側坐核シェルおよび背面線条体におけるGluR5 mRNA発現を有意に増加させ、それはコカイン投与中止後3週間継続することが示された(Ghasemzadeh et al. 1999)。コカイン自己投与への効果に加えて、MPEPは実験動物における種々の行動パラダイムにいくつかの効果を有することが示されている。先の試験は、齧歯類へのMPEPの投与が、有意な不安緩解-および抗鬱様効果を有することを示唆した(Spooren et al. 2000b; Tatarczynska et al. 2001)。加えて、MPEPは、齧歯類における恐れの状態を遮断し(Schulz et al. 2001)、抗パーキンソン様効果を示し(Ossowska et al. 2001; Breysse et al. 2002)、抗痙攣活性を有する(Chapman et al. 2000)。要約すると、MPEPは、齧歯類における多くの異なる行動パラダイムに種々の広範囲の効果を示し、mGluR5はコカイン自己投与におよびおそらくコカインの長期効果に関与することが示されている。

40

【0137】

コカインの報償効果の介在におけるmGluR5受容体の役割(Chiamulera et al., 2001)、およびまたニコチンの報償効果の介在におけるグルタミン酸の役割を示す上記に要

50

約した先の発見に基づき、本試験は、二つの投与量(0.03および0.01 mg/kg/注入)の一つを定常的にニコチンを自己投与するラットにおける静脈内ニコチンの強化効果におけるMPEPの役割を測定にするため、および薬剤非投与マウスにおける静脈内ニコチンの強化効果におけるMPEPの役割を測定するために設定した。加えて、ラットの食物持続反応におけるMPEPの効果を、MPEPの効果の特異性を測定するために試験した。さらに、本明細書で使用したマウス自己投与法は、薬理学的操作の非特異的効果の評価を可能にする、くびきコントロールマウス(yoked control mice)を用いた。

【0138】

材料および方法

対象

研究室に到着時体重300-350 gの雄Wistarラット(Charles River, Raleigh, NC)を、温度および湿度制御飼育器で、12時間逆明-暗サイクル(10 amに点灯)で、試験中以外、自由に水を飲み、ニコチン自己投与行動獲得後は20 g/日に餌を制限して、グループで飼育した(ケージあたり2匹)。研究室に到着時、10-12週齢の雄DBA/2Jマウス(Harlan Laboratories, Indianapolis, IN)を、温度および湿度制御飼育器で、12時間逆明-暗サイクル(6 amに点灯)で、試験中以外、餌と水を自由に摂取させ、グループで飼育した(ケージあたり4匹)。すべての行動試験は、明-暗サイクルの暗相で行った。すべての対象は、国際実験動物管理公認協会(AAALAC)にしたがって処置し、飼育し、使用した。

【0139】

薬剤

(一)ニコチン水素酒石酸塩をSigma(St. Louis, MO)から購入し、生理食塩水に溶解し、pHを水酸化ナトリウムで7.0(±0.5)に調節した。溶液を、次いで滅菌目的で0.22 μmシリンジフィルター(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA 15219)を通して濾過した。ニコチン投与量は、遊離塩基濃度に基づいて報告する。MPEPは、Novartis Pharma AGから寄贈され、0.9%塩化ナトリウムに溶解し、腹腔内にラットおよびマウスで各々1または10 ml/kgの濃度で、30分または15分の前処置時間で投与した。

【0140】

装置

ラット自己投与および食物反応オペラント箱

静脈内ニコチン自己投与および食物維持反応は、各々先に記載のように音響減衰箱に入れた12個のPlexiglasオペラントチャンバーで行った(MarkouおよびPaterson 2001)。

【0141】

マウス自己投与オペラント箱

マウスにおけるすべてのニコチン自己投与は、4つの同じ試験ケージ(8×8×8 cm)からなる装置(San Diego Instruments, San Diego, CA)で行い、2組のマウスの同時の試験を可能にした(Semenova et al. 1995, 1999; Kuzmin et al. 1996a, 1997参照)。箱は透明プラスチックから成り、二つの開口部を含んだ：一つは鼻先、他方は尾固定用。すべての試験セッションの関数およびデータはコンピューターで制御し、記録した。

【0142】

ラット自己投与および食物維持反応

食物訓練およびニコチン自己投与の獲得

頸静脈へのカテーテルで準備した(MarkouおよびPaterson 2001参照)約1週間後、ラットに、ニコチン自己投与(MarkouおよびPaterson 2001参照)を2つの投与量(0.01 [n=9]および0.03 [n=9] mg/kg/inf; 遊離塩基)を、FR5 TO20秒スケジュールで訓練した。ラットの二つの別のグループを、食物(45 mg Noyes餌ペレット)にFR5 TO20秒(n=10)、およびFR5 TO210秒(n=10)スケジュールで反応するようにした。二つの異なるスケジュールを用いて、ニコチンと同じ強化スケジュール下(FR5 TO20秒)、および、食物とニコチンで見られる反応率を同じにする強化スケジュール下(FR5 TO210)、食物に対する反応におけるMPEPを試験した。活性

10

20

30

40

50

レバーにおける反応が、1秒間の0.1 ml/注入の用量でのニコチンの送達をもたらした(Razel Scientific Instruments Inc, Stamford, CT)、一方休止レバーへの反応は何ももらさなかった。ラットは、活性レバーを、休止レバーを押す2倍の回数で押し、1時間のセッション中最小6回の注入または90個のペレットを受け、セッションあたり獲得した強化系の数が20%以下の変動である場合、安定なオペラント反応を獲得したとみなした。ラットは、オペラント反応の安定した割合を確立するのに約2週間かかった。すべての試験セッションを1日1時間、1週間5日行った。

【0143】

マウスにおける静脈内自己投与

ニコチンの急性自己投与は、先に記載の方法を使用して行った(Semenova et al. 1995, 1999; Kuzmin et al. 1996a, 1997)。マウスの尾を試験セッション中装置の表面に固定し、薬剤送達を可能にした；尾の固定は、マウスが全四肢、頭および体全体を動かすのを可能にした。薬剤または賦形剤(1.6 μ l/infを1秒間にわたり送達)を、ペアの両方のマウスに、尾側面静脈を介して投与し、ペアあたりの各動物が鼻を突き出すことを条件とした(能動的マウス)。薬剤または賦形剤の送達に関連する唯一の手がかりは、ポンプのノイズである。マウスを1回または2回試験し、各試験の間約1ヶ月開けた。2回目の試験は、元々のマウスのセットのサブセットでのみ行った(各元々のグループから、2-7対のマウス)。これは、対象/条件の数を増やすために行い、これらのマウスを元の試験と異なる条件のセット下に無作為に割り当て、試験した(すなわち、異なるニコチンおよび/またはMPEP投与量)。限定されたマウスのサブセットの二つの試験の間の1ヶ月のインターバルを考慮して、反復試験が結果に影響したとは考えにくい。

【0144】

実験法

実験1：ラットにおける強化系の定率スケジュールにおけるニコチン自己投与および食物持続反応の割合におけるMPEP投与の効果

0.01 mg/kg/注入(n=9)または0.03 mg/kg/注入(n=9)のいずれかの安定したニコチン自己投与、またはFR5 TO 20秒スケジュール(n=10)またはFR5 TO 210秒スケジュール(n=10)における安定した食物維持反応獲得後、薬剤試験を開始した。ラテン方陣設計にしたがって、MPEP(0、1、3および9 mg/kg)をセッションの30分前に投与し、試験投与の間、少なくとも6日間開けた。薬剤は、動物が前3日間に、毎日の能力が20%より少ない変化と定義される安定な自己投与を示したときにのみ投与した。

【0145】

実験2：薬剤非投与マウスのニコチン自己投与におけるMPEP投与の効果

生理食塩水または4つのニコチン投与量の一つ(0.016、0.048、0.16、0.48 μ g/inf)を、動物の異なるグループで利用可能とした。各グループは、9-17対のグループから成り、少なくとも1ヶ月前に一つの試験セッションを先に受けた2-7マウスをグループあたり含んだ(上記参照)。MPEP(0、5、10、20 mg/kg腹腔内)での前処置を、試験セッションの開始15分前に行った。

【0146】

データ分析

実験1

データを二元配置ANOVAを使用して、MPEP投与量を対象内因子として(4レベル)および強化系を対象間因子として分析した(4レベル：0.01および0.03 mg/kg/infニコチン、および餌ペレット、FR5 TO 20秒およびFR5 TO 210秒スケジュールで利用可能)。データを基底のパーセントとして示し(前の3日の平均と定義する；活性レバーデータ)、またレバーを押す回数として示した(休止レバーデータのみ)。有意差を $p < 0.05$ と設定した。

【0147】

実験2

40

50

データ分析は、各ペアにおける能動的および受動的なマウスの鼻の突き出しの比較に基づき、以下の式を利用した： $R = \log(A_T / P_T) - \log(A_{BL} / P_{BL})$ 、(式中、 (A_T / P_T) は、30秒の試験の間の能動的対受動的なマウスの鼻の突き出しの合計数であり、 (A_{BL} / P_{BL}) は、試験前10分間の能動的対受動的なマウスの鼻の突き出しの合計数である)。薬剤の効果は、 R が0より高い、等しいまたは低い場合に、強化系、中立、嫌悪とみなした。いくつかのデータ点(マウスの9/237対)を、それらがその特異的条件を意味するグループの2標準分散内にあるかないかを基にして、最終分析から除いた。生理食塩水前処置後に得たニコチン自己投与データは、一元配置ANOVAを使用して、ニコチン(4レベル)を対象間因子と定義して分析した。 R -基準データを、二元配置ANOVAを使用して、MPEP投与量(4レベル)およびニコチン投与量(4レベル)を対象間因子と定義して分析した。予め計画した R -基準データ分析を、一元配置ANOVAを、自己投与ニコチンおよび生理食塩水の利用可能な用量に関して使用し、MPEP投与量(4レベル)を対象間因子と定義して分析した。適当な個々の比較は、Student-Newman-Keuls post hoc検定を使用して行った。分析が $0.048 \mu\text{g}/\text{inf}$ ニコチンがマウスによる信頼できる唯一の投与量であることを示唆したため(結果参照)、 $0.048 \mu\text{g}/\text{inf}$ ニコチンの合計自己注射投与量を一元配置ANOVAを使用して、MPEP投与量を対象間因子として分析した。さらに、信頼できる自己投与の用量であるニコチン($0.048 \mu\text{g}/\text{inf}$)の生の鼻を突き出す反応の割合をまた二元配置ANOVA分析に付し、能動的/受動的マウスを一つの因子として、MPEP投与量を第2の因子として用いた。体重および試験前の鼻を突き出す行動レベルを三元配置ANOVA(ニコチン投与量、MPEP投与量およびマウス、すなわち、能動的/受動的、を対象間因子として定義)で分析した。

【0148】

結果

実験1：ラットの強化系の定率スケジュールにおけるニコチン自己投与および食物維持反応におけるMPEP投与の効果

有意なMPEP×強化系相互作用[$F(9, 102) = 4.22$ 、 $p < 0.001$]が、MPEPがニコチン自己投与および食物維持反応に異なる影響を与えることを示唆した(図6；表4)。さらに、MPEP投与量($F[3, 102] = 23.33$ 、 $p < 0.001$)および強化系($F[3, 34] = 14.07$ 、 $p < 0.001$)(図7)における有意な主作用があった。Newman-Keuls post-hoc検定は、3および9mg/kg MPEPが、 0.01 mg/kg 注入ニコチン投与量の自己投与を、賦形剤条件に対して有意に減少させるが、一方 0.03 mg/kg の自己投与は、9mg/kgでしか減少しないことを示した。ニコチン-維持反応と対照的に、FR5 TO20秒またはFR5 TO210秒スケジュール下の食物維持反応は、投与したMPEPの投与量では有意に減少しなかった。休止レバーデータの分析は、MPEP投与の主効果の欠失により示されるように、任意の強化系で、休止レバーを押すことにおけるMPEPの作用はないことを示した。休止レバーを押すことにおける強化系の効果はあったが[$F(3, 34) = 4.47$ 、 $p < 0.01$]、有意なMPEP×強化系相互作用はなかった。

【0149】

【表 5】

表4：全1時間のセッションのラットニコチン自己投与および食物維持反応中に獲得した強化系の数。データは基底条件下の全実験対象に見られる生の値の範囲として、およびまたMPEP(0、1、3および9mg/kg)前処置後の獲得した強化系の平均±SEMとして示す。

強化系	スケジュール	0mg/kgMPEP	1mg/kgMPEP	3mg/kgMPEP	9mg/kgMPEP
0.01mg/kg/inf nic	FR5T020秒	18.9±2.8	21±3.1	11±2.7	9.1±3.0
0.03mg/kg/inf nic	FR5T020秒	12.9±1.2	13±1.9	11.4±1.2	4.8±1.5
45mg餌ペレット	FR5T020秒	122.7±6.0	131.3±8.2	122.2±7.4	109±12.98
45mg餌ペレット	FR5T0210秒	16.1±0.4	16.3±0.3	15.2±0.5	15.2±0.6

10

【0150】

実験2：薬剤非投与マウスのニコチン自己投与におけるMPEPの効果

R-基準データの統計的分析は、薬剤非投与マウスが、ニコチンの有意な主効果により示されるようにニコチン自己投与を獲得したことを示した[$F(4, 71) = 3.4$ 、 $p < 0.05$]。Post-hoc比較は、 $0.048 \mu\text{g}/\text{inf}$ ニコチン投与量が、生理食塩水投与と有意に異なることを示唆した(図8)。R-基準データの統計的分析は、MPEP×ニコチン投与量の有意な相互作用の傾向を示した[$F(3, 90) = 1.89$ 、 $p = 0.056$]。各ニコチン投与量におけるMPEPの効果について予め計画した比較に基づき、一元配置ANOVAは、MPEPが $0.048 \mu\text{g}/\text{inf}$ ニコチン投与量の自己投与のみに有意な効果があり[$F(3, 46) = 3.53$ 、 $p < 0.05$]、これが実際信頼できる自己投与とした唯一のニコチン投与量であった。Post-hoc比較はmMPEPが試験したすべての投与量でニコチン自己投与を減少させることを示した(図8)。興味深いことに、図8Aは、 $20 \text{mg}/\text{kg}$ MPEPがR-基準を0以下に下げる傾向を示すように見え、おそらく、MPEPのこの投与量が、この試験条件下でニコチンを嫌悪とすることを示唆する。分析は、MPEPが総自己注射ニコチン投与量に有意な効果がないことを示唆した(図8B)。それにもかかわらず、MPEPは、マウス(能動的対受動的)×MPEP相互作用効果で示されるように、能動的マウスで鼻を突き出す反応を有意に減少させた[$F(3, 96) = 3.46$ 、 $p < 0.05$]。試験前の鼻を突き出す行動に関して実験グループで差はなかった。加えて、有意な3方向相互作用の欠失により示されるように、異なる条件間で体重の有意差はなかった。表5は、各マウスのグループの生データを記載し、試験前および自己投与セッション中、能動的および受動的マウスの両方で測定した、分あたり鼻を突き出す回数を示す。

20

30

【0151】

【表 6】

表5：マウス自己投与実験の生データ。表のデータは、各条件のサンプルサイズ(マウスの対の数で示す)、および能動的および受動的対象の両方に関する、全条件下の試験前および試験セッション中に記録した鼻を突き出す反応の割合(分あたりの平均反応 $\pm$ SEMで示す)を含む。0.048 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{inf}$ ニコチン投与量に関して、マウスの因子(能動的対受動的)およびMPEP因子の間に有意差があり、MPEPが、能動的および受動的マウスにおいて、鼻を突き出す割合に異なって影響することを示唆する。

ニコチン ($\mu\text{g}/\text{inf}$)	MPEP (mg/kg)	n	能動的試験前	能動的試験	受動的試験前	受動的試験
0	0	15	8.79 $\pm$ 0.98	4.62 $\pm$ 1.05	9.37 $\pm$ 1.11	4.05 $\pm$ 0.82
0	5	10	8.19 $\pm$ 1.03	4.99 $\pm$ 1.17	8.38 $\pm$ 0.96	6.41 $\pm$ 1.38
0	10	10	7.95 $\pm$ 0.99	4.92 $\pm$ 1.1	8.00 $\pm$ 1.06	5.86 $\pm$ 1.56
0	20	10	6.98 $\pm$ 1.18	5.96 $\pm$ 1.69	8.50 $\pm$ 1.43	6.33 $\pm$ 1.66
0.016	0	13	8.0 $\pm$ 1.22	3.88 $\pm$ 0.46	8.85 $\pm$ 1.25	4.56 $\pm$ 0.86
0.016	5	11	7.86 $\pm$ 0.87	2.62 $\pm$ 0.49	8.01 $\pm$ 0.91	3.46 $\pm$ 0.74
0.016	10	13	7.79 $\pm$ 0.83	6.48 $\pm$ 1.05	8.22 $\pm$ 0.87	4.26 $\pm$ 0.94
0.016	20	10	7.10 $\pm$ 0.87	5.48 $\pm$ 1.09	7.35 $\pm$ 0.85	8.77 $\pm$ 1.85
0.048	0	17	8.04 $\pm$ 0.89	5.42 $\pm$ 1.19	8.50 $\pm$ 1.07	3.06 $\pm$ 0.68
0.048	5	12	9.13 $\pm$ 1.37	3.43 $\pm$ 0.67	8.93 $\pm$ 1.36	4.45 $\pm$ 1.06
0.048	10	11	7.43 $\pm$ 0.98	3.92 $\pm$ 1.18	8.06 $\pm$ 1.39	5.83 $\pm$ 1.72
0.048	20	10	8.36 $\pm$ 1.07	3.56 $\pm$ 1.04	8.31 $\pm$ 1.28	5.29 $\pm$ 1.11
0.16	0	16	7.58 $\pm$ 0.77	3.63 $\pm$ 0.58	7.69 $\pm$ 0.88	3.9 $\pm$ 0.69
0.16	5	14	8.32 $\pm$ 0.94	4.67 $\pm$ 0.95	8.48 $\pm$ 3.31	4.32 $\pm$ 2.37
0.16	10	11	7.12 $\pm$ 0.66	4.19 $\pm$ 0.81	7.20 $\pm$ 0.69	4.62 $\pm$ 0.82
0.16	20	10	7.50 $\pm$ 1.25	5.06 $\pm$ 1.52	7.56 $\pm$ 1.32	7.97 $\pm$ 1.76
0.48	0	15	6.50 $\pm$ 0.90	2.29 $\pm$ 0.25	6.77 $\pm$ 0.87	3.28 $\pm$ 0.5
0.48	5	9	8.12 $\pm$ 1.17	3.04 $\pm$ 0.73	8.58 $\pm$ 1.38	3.25 $\pm$ 0.88
0.48	10	10	7.49 $\pm$ 0.86	3.58 $\pm$ 0.73	7.48 $\pm$ 0.88	3.81 $\pm$ 0.47
0.48	20	10	7.31 $\pm$ 0.98	4.67 $\pm$ 1.22	7.08 $\pm$ 0.94	4.35 $\pm$ 0.98

【0152】

考察

本試験の結果は、ラットにおいてMPEP投与が選択的にニコチン自己投与を減少させ、少ない利用可能なニコチン投与量で増加した効果を有し、用いた強化系の食物維持スケジュールの二つのいずれでも食物維持反応に影響しないことを示唆した。加えて、薬剤非投与マウスにおけるMPEP投与は、信頼できる自己注射であることが示された(0.048 $\mu\text{g}/\text{inf}$ ニコチン)ニコチン投与量に自己投与を抑制した。これらのデータは、MPEP前処置が二つの異なる齧歯類種で自己投与した静脈内ニコチンの強化効果を減少させることを示す。

【0153】

ラットにおいて、一つはニコチンで見られるのと同定度の反応率である二つの強化系のスケジュールのいずれでも食物に対する高いレベルの反応の維持により示されるように、ニコチン自己投与における減少に関与する可能性のある明白な運動抑制効果はなかった。マウス実験において、鼻を突き出す行動に、M P E P 投与の効果はなかった。先の試験は、一般に、M P E P が齧歯類における運動活動に影響がないことを示唆している。ラットにおいて、2.5 - 10 mg/kg の投与量の M P E P を、腹腔内 (i.p.) 投与して、ラットにおける探索運動行動に影響がなかったが (Tatarczynska et al. 2001; Henry et al. 2002)、他の試験では、より高い投与量の M P E P が自発的運動行動を阻害することを示唆する；しかし、非常に高い投与量でも回転棒 (rotarod) 能力に影響はない (Spooren et al. 2000a)。同様にマウスにおいて、Tatarczynska と共同研究者 (2001) は、30 mg/kg M P E P (i.p.) が回転棒能力に影響を与えないことを証明しているが、他の試験 (Spooren et al. 2000a) は、M P E P のより高投与量が垂直行動を減少させることを示す。要約すると、ラットにおける先の試験および食物維持反応の本データは、本試験で使用した M P E P の投与量では、非特異的運動効果をニコチン自己投与の減少に考慮しなくてもよいようであることを示唆する。さらに、M P E P のニコチン-対食物維持反応における観察される効果の差は、F R 5 T O 2 1 0 秒 スケジュールが、M P E P が食物への反応に影響しない条件下でさえ、ニコチンと同程度の反応率を提供したため、率依存的効果に帰するものではない。

【0154】

本試験で使用したマウス自己投与法で、マウスは、広範囲のニコチン投与量にわたる 5 つの試験投与量の一つで自己投与を証明した。薬剤非投与マウスにおけるこの自己投与法は、モルヒネ (Semenova et al. 1995, 1999; Kuzmin et al. 1996a, 1997)、コカイン (Kuzmin et al. 1996b; 1997)、エタノール (Kuzmin et al., 1999)、ニコチン (Stolerman et al. 1999; Fattore et al. 2002)、アンフェタミン (Cossu et al., 2001) およびガンマーヒドロキシ酪酸 (Martellota et al. 1998) の自己投与試験に使用されている。広範囲のニコチン投与量を、使用した D B A / 2 J マウスにおける見込みのある自己投与ニコチン投与量範囲が不確かであるため、かつ M P E P 前処置後のニコチン投与量-反応曲線における大きなシフトを可能にするために用いた。自己投与薬剤の一つの単位投与量を使用した試験では限定された結論のみしか導かれないが、本マウスデータは、ラットにおける広範囲の自己投与研究の内容において、およびそれに加えて提示される。マウス法で使 30 した部分的拘束が、物質自己投与行動を増加させたかもしれないが (Piazza et al. 1990; Shaham et al. 1993; Ramsey および Van Rees 1993)、身体的ストレス (すなわち、足ショック) は、この方法を使用したモルヒネの自己投与に影響しないことが先に示されている (Kuzmin et al., 1996)。マウス法と比較して、本試験のラットの実験で用いた方法は、ニコチンの二つの異なる単位投与量での自己投与行動を試験し、ニコチン自己投与の獲得よりもむしろ維持を試験した。さらに、ラットの試験は、強化系の二つの食物持続スケジュールを含み、その一つのスケジュール (F R 5 T O 2 0 秒) は、ニコチン自己投与試験に使用したのと同じであり、他方のスケジュール (F R 5 T O 2 1 0 秒) は、ニコチンおよび食物に反応するレベルを平衡化するために使用した。マウス実験から得られた結果に関して、M P E P は、R 基準で測定して、0.048 μ g/inf ニコチン投与量の自己投与の 40 有意な減少を示した。対照的に、M P E P の総ニコチン摂取における効果の傾向はあるが、有意ではなかった。それにもかかわらず、生の鼻の突き出しのデータの二元配置 A N O V A は、0.048 μ g/inf ニコチン投与量で、能動的対受動的マウスにおける M P E P 前処理の異なる効果を明らかに示し、能動的マウスは M P E P 投与後に鼻を突き出す割合が明らかに減少した。要約すると、本試験でマウス実験から得られたデータは、隔離を考慮して、M P E P のニコチン自己投与における限定した証拠しか提供しないが、ラット実験において提供されたより完全で説得力のあるデータの収束した証拠を提供する。

【0155】

齧歯類での M P E P のニコチン自己投与における効果は、マウスにおけるコカイン自己投与で先に見られたものと一致する (Chiamulera et al. 2001)。m G l u R 5 欠失を有す 50

る変異マウスは、野生型コントロールで有効な投与量である任意の投与量でコカイン自己投与を獲得しないが、食物維持反応には影響しないことが示された。mGluR5欠失の効果は、野生型マウスへのMPEPにより確認され、それでは食物維持反応に影響することなく、コカイン自己投与を投与量依存的に減少させた。興味深いことに、著者らは、コカイン投与が、変異および野生型マウスの両方でNAccにおけるドーパミンレベルを増加させ、おそらく、増加した中脳ドーパミンレベル単独ではコカイン自己投与の維持に不十分であることを示唆する。この仮説は、ドーパミン(D2)受容体ノックアウトマウスがコカイン自己投与し(Caine et al. 2002)、ドーパミン(D1)受容体ノックアウトが、コカイン誘発条件付け場所嗜好性を獲得する(Miner et al. 1995)ことを示唆する最近の発見により支持される。それにもかかわらず、mGluR5ノックアウトと野生型マウスで絶対NAccドーパミンレベルに差はないが、これらのレベルにNAccドーパミンレベルが増加するのに必要な時間は明白に差があった。おそらく、この差が、野生型と同型接合型mGluR5欠失変異マウスの間のコカイン自己投与とコカイン誘発過剰運動における観察される差をもたらす。

【0156】

急性ニコチンの報償効果に関して、近年の試験(Harrison et al. 2002)は、脳報償刺激法で測定した、ニコチン報償におけるMPEP投与の効果を試験した。MPEP投与は、0.25 mg/kgニコチンの報償低下効果に影響しなかったが(Harrison et al. 2002)、MPEP単独で脳報償閾値を上昇させた。結果におけるこの矛盾は、先の試験で(実験者により)投与された高投与量のニコチン(0.125および0.25 mg/kg i.p.)を、反復して、静脈内に投与された0.03または0.01 mg/kg/infニコチンの効果と比較しているためであろう。重要なことに、側面視床下部外側自己刺激および静脈内ニコチン自己投与の基礎をなす神経生理学的基質はわずかに違う可能性があり(Harrison et al. 2002)、二つの試験におけるMPEPの異なる効果の基礎をなすのはこの違いであり得る。

【0157】

多くの試験が、線条体およびNAccにおけるmGluRのドーパミン神経伝達の調節における役割を示唆しており、一般的に、グループI mGluR(mGluR5およびmGluR1)は、後シナプス反応の調節に関与すると考えられている(Schoepp 2001)。興味深いことに、近年、グループI mGluRアンタゴニストの投与が、D-1受容体アゴニストの運動活性化効果を遮断することが判明した(DavidおよびAbraini 2001)。上記のように、先に、mGluR5はNAccに非常に濃縮しており、その場所でニコチンの投与後の細胞外ドーパミンの有意な上昇が見られることが示されている。加えて、マウスにおけるmGluR5の欠失は、コカイン自己投与およびコカイン誘発活動亢進をもたらさず、NAccドーパミンにおけるコカイン誘発増加は、まだ相対的に変化していなかった(Chiamulera et al. 2001)。MPEPのニコチン自己投与における効果を示す本発見を一緒に考えて、一つの説明は、mGluR5がNAccにおける薬剤誘発ドーパミン放出の後シナプス反応における調節的役割を担い、それによりニコチン自己投与を減少させるものであるということである。あるいは、ニコチン(Watkins et al. 2000)およびコカイン(Zhang et al. 2001)の両方の報償効果の介在におけるグルタミン酸の役割を考慮して、ドーパミンは、精神刺激剤の報償効果の介在において、しばしば仮説で言われるよりも少ない重要な役割を担う可能性がある。

【0158】

MPEPの不安緩解様効果は、そのニコチンおよびコカインの自己投与における効果と関連し得る。ニコチンは、高投与量で不安発生性(anxiogenic)であり得るが(File et al. 1998; Irvine et al. 2001)、低投与量ではまた不安緩解も示す(File et al. 1998; Szyndler et al. 2001)。アンフェタミン、コカインおよびニコチンの投与は、すべて、実験動物でストレスホルモンの血漿レベルを上昇させる(レビューのために、Sarnyai et al. 2001参照)。ラットでのニコチンの慢性自己投与における不安発生性効果は、ニコチン自己投与の維持に役割を担い得るとの仮説が立てられている(Irvine et al. 2001)。不安緩解剤ベンゾジアゼピン化合物での前処置は、ラットにおいて、食物維持行動に影響するこ

となく、コカイン維持反応を選択的に減少させる (Goeders et al. 1989; 1993; Goeders 1997)。先の試験は、齧歯類における M P E P の不安緩解様作用を示唆している (Spooren et al. 2000b; Tatarczynska et al. 2001)。このように M P E P の不安緩解効果は、ニコチンにより誘発される緩和に強められた不安レベルを遮断し、したがって、その報償効果の部分を遮断し得ることが可能である。

【0159】

要約すると、本試験は、M P E P 前処置が、任意の運動抑制活性なしに、ラットおよび薬剤非投与マウスにおける食物維持反応に影響することなく、ニコチン自己投与を有意に減少させることを示唆する。M P E P 投与が、中央辺縁系回路の末端野におけるドーパミンレベルのニコチン誘発増加への後シナプス応答を調節するという仮説が立てられる。それにもかかわらず、m G l u R 5 の厳密な位置および機能に関する本実験と現在の知識の限界を考慮して、N A c c 以外の部位でのおよび／または不安緩解一様効果を介した M P E P の作用の形態は、無視できない。この結果は、抗喫煙、およびより一般的に、抗濫用薬物利用の新規な治療標的を示唆し得る。

10

【0160】

実施例 2 の引用文献

- Battaglia G, Bruno V, Pisani A, Centonze D, Catania MV, Calabresi P, Nicoletti F (2001), *Mol Cell Neurosci* 17: 1071-1083
- Battaglia G, Fornai F, Busceti CL, Aloisi G, Cerrito F, De Blasi A, Melchiorri D, Nicoletti F (2002), *J Neurosci* 22(6): 2135-2141
- Breysse N, Baunez C, Spooren W, Gasparini F, Amalric M (2002), *J Neurosci* 22(13): 5669-5678
- Caine SB, Negus SS, Mello NK, Patel S, Bristow L, Kulagowski J, Vallone D, Saiardi A, Borrelli E (2002), *J Neurosci* 22(7): 2977-2988
- Cartmell J, Schoepp DD (2000), *J Neurochem* 75: 889-907
- Chapman AG, Nanan K, Williams M, Meldrum BS (2000), *Neuropharmacology* 39: 1567-1574
- Chiamulera C, Epping-Jordan MP, Zocchi A, Marcon C, Cottiny C, Tacconi S, Corsi M, Orzi F, Conquet F (2001), *Nature Neurosci* 4(9): 873-874
- Conn PJ, Pin J-P (1997), *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-37
- Corrigall WA, Coen KM (1991), *Psychopharmacology* 104: 171-176
- Corrigall WA, Coen KM, Zhang J, Adamson L (2002), *Psychopharmacology* 160: 198-205
- Cossu G, Ledent C, Fattore L, Imperato A, Bohme GA, Parmentier M, Fratta W (2001), *Behav Brain Res* 118(1): 61-5
- David HN, Abbraini JH (2001), *Eur J Neurosci* 13: 2157-2164
- Dewey SL, Brodie JD, Gerasimov M, Horan B, Gardner EL, Ashby CR Jr. (1999), *Synapse* 31: 76-86
- Fattore L, Cossu G, Martellotta MC, Fratta W (2002), *Alcohol* 37(5): 495-498
- File SE, Kenny PJ, Ouagazzal A-M (1998), *Behav Neurosci* 112: 1423-1429
- Gasparini F, Lingenhohl K, Stoehr N, Flor PJ, Heinrich M, Vranesic I, Biollaz M, Allgeier H, Heckendorn R, Urwyler S, Varney MA, Johnson EC, Hess SD, Rao SP, Saacaan AI, Santori EM, Velicelebi G, Kuhn R (1999), *Neuropharmacology* 38: 1493-1503
- Ghasemzadeh MB, Nelson LC, Lu X-Y, Kalivas PW (1999), *J Neurochem* 72: 157-165
- Goeders NE, McNulty MA, Mirkis S, McAllister KH (1989), *Pharmacol Biochem Behav* 33: 859-866
- Goeders NE, McNulty MA, Guerin GF (1993), *Pharmacol Biochem Behav* 44: 471-474
- Goeders NE (1997), *Psychoneuroendocrinology* 22(4): 237-259
- Harrison AA, Gasparini F, Markou A (2002), *Psychopharmacology* 160: 56-66

20

30

40

50

- Henry SA, Lehmann-Masten V, Gasparini F, Geyer MA, Markou A (2002), *Neuropharmacology*. 投稿中.
- Holscher C, Gigg J, O'Mara SM (2001), *Neurosci Biobehav Rev* 23: 399-410
- Irvine EE, Bagnalasta M, Marcon C, Motta C, Tessari M, File SE, Chiamulera C (2001), *Psychopharmacology* 153: 315-320
- Kuzmin A, Semenova S, Zvartau EE, van Ree JM (1996a), *Eur Neuropsychopharmacol* 6: 63-68
- Kuzmin A, Semenova S, Ramsey NF, Zvartau EE, van Ree JM (1996b), *Eur J Pharmacol* 295: 19-25
- Kuzmin AV, Semenova S, Gerrits MA, Zvartau EE, van Ree JM (1997), *Eur J Pharmacol* 321(3): 265-271 10
- Kuzmin A, Semenova S, Zvartau E, De Vry J (1999), *Eur Neuropsychopharmacol* 9: 197-203
- Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS (2002), *Neuron* 33(6): 905-919
- Markou A, Paterson NE (2001), *Nic Tob Res* 3: 361-373
- Martellotta MC, Cossu G, Fattore L, Gessa GL, Fratta W (1998), *Eur Neuropsychopharmacol* 8(4): 293-296
- McGehee DS, Heath MJS, Gelber S, Devay P, Role LW (1995), *Science* 269: 1692-1696
- Miner LL, Drago J, Chamberlain PM, Donovan D, Uhl GR (1995), *Neuroreport* 6(17): 2314-2316 20
- Ossowska K, Konieczny J, Wolfarth S, Wieronska J, Pilc A (2001), *Neuropharmacology* 41: 413-420
- Paterson NE, Markou A (2002), *Synapse* 44: 252-253
- Piazza PV, Deminiere JM, Le Moal M, Simon H (1990), *Brain Res* 514: 22-26
- Picciotto MR, Corrigall WA (2002), *J Neurosci* 22(9): 3338-3341
- Ramsay NF and Van Ree JM (1993), *Brain Res.* 608: 216-22
- Reid MS, Fox L, Ho LB, Berger SP (2000), *Synapse* 35(2): 129-136
- Sarnyai Z, Shaham Y, Heinrichs SC (2001), *Pharmacol Rev* 53(2): 209-243
- Schilstrom B, Fagerquist MV, Zhang X, Hertel P, Panagis G, Nomikos GG, Svensson TH (2000), *Synapse* 38(4): 375-383 30
- Schoepp DD (2001), *J Pharmacol Exp Ther* 299: 12-20
- Schulz B, Fendt M, Gasparini F, Lingenhohl K, Kuhn R, Koch M (2001), *Neuropharmacology* 41: 1-7
- Semenova S, Kuzmin A, Zvartau E (1995), *Pharmacol Biochem Behav* 50(1): 17-21
- Semenova S, Danysz W, Bessalov A (1999), *Eur J Pharmacol* 378(1): 1-8
- Shaham Y, Alvares K, Nespor SM and Grunberg NE (1992), *Pharmacol Biochem Behav* 41: 615-619
- Shigemoto R, Nomura S, Ohishi H, Sugihara H, Nakanishi S, Mizuno N (1993), *Neurosci Lett* 163(1): 53-57
- Spooren WPJM, Gasparini F, Bergmann R, Kuhn R (2000a), *Eur J Pharmacol* 406: 403-410 40
- Spooren WPJM, Vassout A, Neijt HC, Kuhn R, Gasparini F, Roux S, Porsolt RD, Gentsch C (2000b), *J Pharmacol Exp Ther* 295: 1267-1275
- Spooren WPJM, Gasparini F, Salt TE, Kuhn R (2001), *Trends Pharmacol Sci* 22(7): 331-337
- Stolerman IP, Naylor C, Elmer GI, Goldberg SR (1999), *Psychopharmacology* 141(3): 297-306.
- Szyndler J, Sienkiewicz-Jarosz H, Maciejak P, Siemiakowski M, Rokicki D, Czlonkowska AI, Plaznik A (2001), *Pharmacol Biochem Behav* 69: 511-518
- Tatarczynska E, Klodzinska A, Chojnacka-Wojcik E, Palucha A, Gasparini F, Kuhn R 50

, Pilc A (2001), Br J Pharmacol 132: 1423-1430
Tallaksen-Greene SJ, Kaatz KW, Romano C, Albin RL (1998), Brain Res 780: 210-217
Vezina P, Kim J-H (1999), Neurosci Biobehav Rev 23: 577-589
Watkins SS, Koob GF, Markou A (2000), Nicotine Tob Res. 2(1): 19-37
Zhang Y, Loonam TM, Noailles PA, Angulo JA (2001), Ann N Y Acad Sci 937: 93-120.

【0161】

実施例3

物質嗜癖および鬱病の処置における、代謝型グルタミン酸5および代謝型グルタミン酸2／3受容体の同時遮断の利用性のための補足的証拠

この実施例は、mGlu5および／またはmGlu2／3受容体でのグルタミン作用性伝達の遮断が、コカインおよびニコチンの強化特性を減少することを説明し(本発明のデータ; Paterson et al. 2003)、これらの受容体の同時の遮断が、物質摂取行動の阻害に付加的効果を有することを示唆する。ほとんどの濫用性物質は、脳報酬回路を通して興奮性グルタミン作用性伝達を増加することが示されている(KalivasおよびDuffy, 1998; MansvelderおよびMcGehee, 2000; Ungless et al., 2001; Wolf, 2003)。脳報酬回路における興奮性グルタミン作用性伝達の厳密な役割はまだ明らかではないが、興奮性グルタミン作用性伝達の増加が、濫用性物質の強化特性に関与する。実際、グルタミン作用性伝達の遮断が、コカインおよび他の常習性物質の報酬作用を減少することが示されている(HarrisおよびAston-Jones, 2003; Lavioletteおよびvan der Kooy, 2003)。

【0162】

Chiamuleraと共同研究者(2001)の、mGlu5受容体の遺伝子が欠失したマウスはコカイン自己投与行動を獲得しないことを証明した観察に基づき、代謝型グルタミン酸5(mGlu5)受容体の、常習性物質の報酬効果の制御における役割に近年興味を持たれている。しかしながら、食物自己投与の獲得は、これらのマウスで影響されないことから、これらのマウスにおけるコカインの消費は、学習工程の欠失に二次的なものではないことを証明した(Chiamulera et al., 2001)。上記と一致して、選択的mGlu5受容体アンタゴニストMPEPは、野生型コントロールマウスでコカイン自己投与を減少させた(Chiamulera et al., 2001)。同様に、上記実施例2に示されるように、MPEPはラットおよびマウスの両方でニコチン自己投与を減少し、コカインーおよびモルヒネー誘導条件付け場所嗜好性を減弱した(McGeehanおよびOlive, 2003; PopikおよびWrobel, 2002)。より最近、代謝型グルタミン酸2／3(mGlu2／3)受容体の遮断が、多くの濫用性物質の行動的作用を減弱することが示されている(DavidおよびAbraïn, 2003)。加えて、実施例1に説明するように、mGlu2／3受容体アンタゴニストLY341495は、自発的ニコチン離脱(鬱病様兆候)を行っているラットにおいて観察されるICSS報酬閾値の上昇で測定して、脳報酬機能の欠損を軽減する。一緒に考えて、これらのデータは、mGlu5およびmGlu2／3受容体が、コカインおよびニコチンを含む種々の濫用性物質の行動的作用の制御、および物質嗜癖および非薬剤誘発鬱病の両方で見られる抑鬱症状に重要な役割を担うことを示唆する。

【0163】

急性コカイン投与は、脳内自己刺激(ICSS)閾値を減少させることが示されている(Esposito et al., 1978; Frank et al., 1988; Kenny et al., 2003a; Kenny et al., 2003b; KokkinidisおよびMcCarter, 1990; MarkouおよびKoob, 1992)。ICSSが脳報酬回路を直接活性化するため(OldsおよびMillner, 1954)、ICSS閾値は脳報酬機能の操作上の尺度を提供すると考えられている。したがって、コカイン投与後に観察されるICSS閾値の低下は、コカインの多幸感を引き起こす効果の根底におそらく存在する脳報酬機能の増加を反映する。このコカイン消費に関連する脳報酬機能の上昇は、コカイン自己投与行動の確立および持続と関連するとみなされている(Kenny et al., 2003b; Stewart et al., 1984)。

【0164】

本試験の第一の目的は、ラットにおけるニコチン自己投与および、コカイン自己投与の

毎日のアクセスに対する二つの異なるスケジュール(1および6時間)でのラットにおけるコカイン自己投与におけるMPEPの効果の調査であった。次に、我々は、MPEPが、コカインまたはニコチンを得る‘モチベーション’を減少させるかを、MPEPが、強化の漸増率スケジュール下でのコカインまたはニコチンに対する反応を減少させるかを試験することにより調べた。次いで、我々は、MPEPがコカイン消費に関連する正の感情状態を低下させるかを、MPEPが、ICSS閾値におけるコカインの急性投与の低下作用を減弱するかを試験することにより調べた。次に、我々は、先にニコチン離脱の減弱作用を示した(Kenny et al., 2003c)mGlu2/3受容体アンタゴニストLY341495の、ラットのニコチン自己投与における効果を試験した。最後に、我々は、mGlu5およびmGlu2/3受容体の、MPEPおよびLY341495の組み合わせによる同時遮断が、ニコチン自己投与行動における付加的阻害効果を有するかを試験した。 10

【0165】

材料および方法

(i)対象

対象は、研究室に到着時に300-320gの体重であったWistarラットであった。ラットは、Charles River Laboratories(Raleigh, NC)から得、ケージあたり2匹または3匹で、餌と水は自由に取れるようにして飼育した。動物を、温度制御飼育器で、12時間明/暗サイクル(10:00 amに消灯)で維持した。各例において、動物を明/暗サイクルの暗時の間に試験した。すべての動物は、国立衛生研究所の動物の世話の原則に関するガイドラインにしたがって処置した。動物の施設および実験プロトコールは、実験動物管理公認協会にしたがった。 20

【0166】

薬剤

コカイン塩酸塩および(-)ニコチン水素酒石酸塩はSigma Chemical Co., St. Louis, MOから購入した。2-メチル-6-[フェニルエチニル]-ピリジンは、当分野で既知の方法で合成した。LY341495はTocrisから得た。薬剤を各投与の直前に調製した。全身のコカイン投与のために、コカインを滅菌0.9%(w/v)生理食塩水に溶解し、ICSS実験セッションの10分前に1ml/kg体重の用量で腹腔内(i.p.)注射して投与した。全身のMPEP投与のために、MPEPを滅菌水に溶解し、ICSSまたは自己投与セッション30分前に1ml/kg体重の用量で腹腔内注射して投与した。全身のLY341495投与のために、LY341495を滅菌生理食塩水に溶解し、自己投与セッションの30分前に3ml/kg体重の用量で腹腔内注射により投与した。 30

【0167】

装置

脳内自己刺激訓練および試験は、16個のPlexiglasオペラントチャンバーで行った(25×31×24cm)(Med Associates, St. Albans, VT)。オペラントチャンバーの床は1.25cm離れた平行アルミニウム棒から形成された。一つの壁は、4分の1回転させるのに0.2N力が必要な金属ホイールマニユプランダムを含んだ。ホイール(幅5cm)は、壁から~3cm出ていた。各試験チャンバーを光および音響減衰チャンバー内に入れた(62×63×43cm)。頭蓋内刺激は一定電流刺激により送達した(Stimtech model 1200; San Diego Instruments, San Diego, CA)。対象をチャンバーの上にマウントされた金接触スイベルに結合した柔軟性の双極性鉛(Plastics One, Roanoke, VA)を通して刺激回路に接続した。刺激パラメータ、データ収集およびすべての試験セッション関数はマイクロコンピュータで制御した。 40

【0168】

コカインおよびニコチン自己投与は、16個のPlexiglas、音響減衰オペラントチャンバー(29×24×19.5cm)で行った。各チャンバーにおいて、一つの壁は、床から2.5cm上にマウントされ、押すのに0.1N力を必要とする金属引き込み式レバーを含んだ。動物を、シリンジに接続するプラスチックスイベルは、Razelポンプにより操作し、それは薬剤を送達した。データ収集およびすべてのプログラミング関数は、IBM-互換性 50

マイクロコンピュータで制御した。

【0169】

手術

静脈内カテーテルで準備されたラットを、酸素中1-3%イソフランの吸入により麻酔し、先に記載のように頸静脈にインプラントした(Caine et al., 1993)、シラスティックカテーテルで準備した。カテーテルを、動物の背中にマウントされたポリエチレンアッセンブリまで皮下を通した。このアッセンブリはエポキシを伴うmarlexメッシュの4cm²の切片に結合したガイドカニューレ(Plastic One Co., Roanoke VA)からなった。marlexメッシュは、動物の背中の皮膚の下に置いた。手術後、カテーテルを毎日0.15mlのヘパリン化生理食塩水(30 USP単位/ml)およびTimentin(100mg/ml; SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Philadelphia, Pa.)からなる滅菌抗生物質溶液で毎日流した。ICSS電極で準備したラットを酸素中1-3%イソフランの吸入により麻酔し、定位フレームに置いた(Kopf Instruments, Tujunga, CA)。門歯バーを耳内線の5mm上に調節し、頭蓋を暴露した。Pellegrino et al. (1979)の図解書にしたがい、ステンレススチール双極子電極(長さ11mm)を、後部外側視床下部にインプラントした(AP: ブレグマから-0.5mm; ML: ±1.7mm; DV: 硬膜から8.3mmで、耳内線の5mmに門歯バーを伴う)。4つのくぼみをねじを入れるために頭蓋に作り、それは歯科用アクリルの適用と共に、電極を固定した。動物を、ICSSまたは自己投与法前に手術から少なくとも7日回復させた。

【0170】

静脈内コカイン自己投与法

ラット(n=14)の餌を制限し、自由に食べた状態で得られる正常体重の85%を維持し、その後強化系の定率5(FR5)スケジュールで45mg餌ペレットのレバーを押すように訓練した。食物強化に対する安定な反応を達成すると、ラットは、9日間、毎日1時間のセッションの間、強化のFR5スケジュールでコカイン自己投与に関して試験し、そのとき、レバーへの5回の反応が1コカイン注射(250μg/注射、0.1mlの滅菌0.9%生理食塩水に溶解; 4秒にわたり送達)の送達をもたらし、20秒タイムアウト(TO)期間が開始し、レバーの上に位置する光の合図により合図され、その間、レバーへの反応は結果を伴わなかった。このように、強化系のFR5 TO20秒スケジュールを使用した。

【0171】

静脈内ニコチン自己投与法

上記でコカインに関して記載したのと類似に、頸静脈内へのカテーテルの準備から約1週間後、ラット(n=8)にニコチン(0.03mg/kg/注入、遊離塩基)の自己注射をFR5 TO20秒スケジュールで訓練した。活性レバーへの反応は、0.1ml/注入の用量の1秒にわたるニコチン溶液の送達をもたらし(Razel Scientific Instruments Inc., Stamford, Conn., USA)、一方休止レバーへの反応は何ももたらさなかった。ラットは、活性レバーを休止レバーを押すよりも2倍の数押し、1時間のセッションあたり最小6回の注入または90ペレットを受け、セッションあたり獲得した強化系の数の20%未満の変化である場合、安定なオペラント反応を獲得したとみなした。ラットは、オペラント反応の安定な割合を確立するのに約2週間かかった。すべての試験セッションは、1日1時間、週に5日行った。

【0172】

脳内自己刺激(ICSS)報償閾値法(MarkouおよびKoob, 1991; 1993)

ラット(n=9)を、KornetskyおよびEsposito(1979)の個別試験電流閾値法の変法にしたがって反応に対して訓練した。簡単に、訓練を非偶発電気刺激の送達により開始した。この電気強化系は、500msの訓練期間と、0.1msecの方形カソードパルスから成り、50-100Hzの周波数で送達された。刺激の周波数は個々の動物で選択し、各対象の基底電流強度閾値が50-200μAの範囲内になるようにし、閾値上昇と低下の両方が検出できるようにした。周波数は、実験を通して一定に保った。非偶発電気刺激の送達から

7.5 秒以内のホイールマニユプランダムの 1 / 4 回転が、試験を通して同じである非偶発刺激とすべてのパラメーターで同一の電気刺激の送達をもたらす。種々の試験内インターバル(7.5 - 12.5 秒、平均 10 秒)の後、さらなる試験を、非偶発電気刺激の送達で開始した。非偶発刺激への 7.5 秒以内の反応の失敗が、試験内インターバルの開始をもたらした。試験内インターバル中の反応は、12.5 秒まで次の試験の開始を遅らせた。電流レベルを下降および上昇シリーズで変えた。3 試験のセットを各電流強度で行った。電流強度を 5 μ A ステップで変えた。各試験セッションにおいて、4 つの別の下降 - 上昇シリーズを行った。各シリーズの閾値を、“陽性スコア”(動物が、3 試験のうち少なくとも 2 つに反応する)を生ずる二つの連続的電流強度と、“陰性スコア”(動物が 3 試験のうち 2 つまたはそれ以上に反応しない)を生ずる二つの連続的電流強度の間の中点として定義した。セッションの全体的閾値を、4 つの別々のシリーズの閾値の平均として定義した。各試験セッションは ~ 30 分の時間であった。非偶発刺激の発生と陽性反応の間の時間を反応潜時として記録した。各試験セッションの反応潜時は、陽性反応が起きるすべての試験の平均反応潜時として定義した。安定な ICSS 報酬閾値の確立後、ラットで、ラットを実験設計にしたがった時点で試験した場合の、ICSS 閾値におけるコカインの期待される経時的低下作用以外、一日 1 回、ICSS 法で試験した。

10

【0173】

実験 3.1 : 強化系の定率スケジュール下のコカイン自己投与における MPEP 投与の効果

上記のような、強化系の定率(FR)スケジュール下でのコカイン自己投与パラダイムの訓練後、二つのラットのバランスのとれたグループを、基底条件下でコカイン自己注射の割合が異ならないように形成した。10 日目以降(‘漸増’期間)、コカイン自己投与へのアクセスを、ラットの一つのグループにおいて一日のセッションあたり 1 時間から 6 時間に増加させた(Long Accessまたは LgA ラット; $n = 7$)。先の試験は、このコカイン自己投与へのアクセスのスケジュールは、毎日のコカイン消費の漸進的増加または‘漸増’をもたらすことを示している(Ahmed および Koob, 1997; Ahmed et al. 2001)。他のグループ(Short Accessまたは ShA ラット; $n = 7$)において、コカイン自己投与へのアクセスを 1 日 1 時間に維持した。先の試験は、この毎日のコカイン自己投与へのアクセスのスケジュールは、一日コカイン消費の安定なレベルを維持することを示す。コカイン自己投与への 1 時間(ShA)または 6 時間(LgA)のアクセスをして 22 日後、ラットの両方のグループに最初の MPEP 注射をした。LgA および ShA ラットに MPEP(0、1、3 または 9 mg/kg)を、対象内ラテン方陣設計にしたがい注射し、毎日のコカイン自己投与セッションを 30 分後に開始した。ラテン方陣設計内の各注射の間を最低 48 時間開け、その間 LgA および ShA ラットはその毎日のコカイン自己投与セッションを受け、コカインへの反応率が、次の MPEP 投与前に注射前の基底に戻ることを確実にした。ラテン方陣の完了後、すべてのラットに MPEP(6 mg/kg)を注射し、毎日のコカイン自己投与セッションを 30 分後に開始した。

20

30

【0174】

実験 3.2 : 強化系の漸増率スケジュール下のコカインおよびニコチン自己投与における MPEP の効果

40

上記のように、強化系の定率スケジュール下では、動物は薬剤注入を得るために、活性レバーに‘固定’回数反応する。強化系の定率(FR)スケジュールは、薬剤が強化系であるか否かの重要な情報を提供する。対照的に、強化系の漸増率(PR)スケジュール下で、動物が薬剤注入を受けるために活性レバーに反応する度に、動物が次の注入を得るためにしなければならない続く反応が漸増する。総摂取量を限定しながら、動物がどのように強く薬剤の働きを願っているかを測定することにより、PR スケジュールは蓄積的薬剤投与量の可能性のある飽和効果から、薬剤消費のモチベーションを良く離すことを可能にする(Stafford et al. 1998)。このような特徴は、FR と比べて、PR で、薬剤探索行動を制御する因子の理論的に異なる解釈をもたらす。例えば、ある研究者は、FR スケジュールは薬剤の満足または快楽効果の指標であり(McGregor および Roberts 1995; Mendrek et al

50

．1998)、P Rスケジュールは、薬剤を得るための刺激または‘モチベーション’の指標を提供すると最近示唆している(Markou et al., 1993)。上記のようなF Rスケジュール下のコカインまたはニコチン自己投与の獲得後、ラットをP R強化スケジュールに変え、以下のような連続したレバーを押す回数をニコチンまたはコカインの各連続注入に必要とした：5、10、17、24、32、42、56、73、95、124、161、208など。ラットにM P E P (0、1、3または9 mg/kg)をP Rセッションの30分前に注射した。すべての対象は3時間以内に中止点に到達した。中止点は、セッションが終わる前に達成された最大比率として定義する；セッションは、対象が1時間の間に薬剤注入を獲得することに失敗したときに終了する。

【0175】

10

実験3.3：I C S S 閾値のコカイン誘発低下におけるM P E P の効果

M P E P は、F R 下でラットおよびマウスにおけるニコチン自己投与を減少させることを、実施例3.2で示した。本実施例における試験(結果は下記)は、M P E P がF R 下のラットにおけるコカインおよびニコチン自己投与を減少させ(マウスにおけるニコチンも)、強化系のP R スケジュール下、ラットにおけるコカインおよびニコチン自己投与を減少させることを証明した。M P E P がコカイン自己投与行動を低下し得る一つの可能性のある機構は、コカインの快楽作用の減少によるものである。I C S S 閾値のコカイン誘発低下は、コカインの快楽および多幸感を引き起こす作用の正確な指標である。このように、M P E P がコカインの快楽作用を減弱するという仮説を試験するために、我々は、M P E P がI C S S 閾値のコカイン誘発低下を遮断するか否かを試験した。本試験に用いたコカインの投与量(10 mg/kg)は、このコカイン投与量が、先の試験に使用したI C S S 法における能力に影響せずに、最大の閾値低下をもたらすという先の試験の結果と(Kenny et al., 2002b; Markou & Koob 1992)、コカイン自己投与に毎日1時間接近している間のS h A ラットにより消費されるコカインの量と同等であることに基づき選択した。ラット(n=9)にI C S S 電極を上記のように準備し、I C S S 法を安定な閾値が達成されるまで訓練した(5連続日にわたり閾値の $\leq 10\%$ の変化)。M P E P がコカインの閾値低下効果を減弱させるかの測定のために、ラットにM P E P (0、3、6または9 mg/kg)を対象内ラテン方陣設計にしたがい、I C S S セッションの開始30分前に注射した。すべてのラットに次いで20分後、すなわち、I C S S セッションの開始10分前に生理食塩水を注射した。72時間の期間を、ラテン方陣設計における各注射日の間に開け、その間毎日のI C S S 閾値を、I C S S 閾値が次の薬剤投与前に注射前基底に戻っていることを確実にするために評価し続けた。ラテン方陣の終了後、すべてのラットにM P E P (1 mg/kg)を、I C S S セッションの30分前に注射し、生理食塩水をI C S S セッションの開始10分前に注射した。この処置レジメの後、ラットに再びM P E P (0、3、6または9 mg/kg)を対象内ラテン方陣設計にしたがい、I C S S セッションの30分前に注射した。次いで、20分後に、すなわちI C S S セッションの開始10分前にすべてのラットにコカイン(10 mg/kg)注射を生理食塩水の代わりに行った。72時間の期間を、ラテン方陣設計における各注射日の間に開け、その間毎日のI C S S 閾値を、I C S S 閾値が次の薬剤投与前に注射前基底に戻っていることを確実にするために評価し続けた。ラテン方陣の完了後、すべてのラットにM P E P (1 mg/kg)をI C S S セッションの開始30分前に投与し、コカイン(10 mg/kg)注射をI C S S セッションの開始10分前に行った。

20

30

40

【0176】

M P E P が、コカインの閾値低下効果の期間を減弱するかを測定するために、ラットに最初に滅菌水またはM P E P (3 mg/kg)を注射し、次いで20分後、すなわち最初のI C S S セッションの開始10分前に生理食塩水またはコカイン(10 mg/kg)を注射した。ラットはすべての注射を対象内ラテン方陣設計にしたがって受け、各ラットが4つの可能性のある薬剤組み合わせ(水-生理食塩水；水-コカイン；M P E P -生理食塩水；M P E P -コカイン)を投与されるようにした。I C S S 閾値を、次いで第2の(生理食塩水またはコカイン)注射後10、40、70および100分に評価した。2時間の期間を、ラ

50

テン方陣設計における各注射日の間に開け、その間毎日の I C S S 閾値を、I C S S 閾値が次の薬剤投与前に注射前基底に戻っていることを確実にするために評価し続けた。

【0177】

実験3.4：定率スケジュール下のニコチン自己投与における m G l u R 2 / 3 アンタゴニストの効果。

先に、グループII代謝型グルタミン酸受容体アンタゴニスト L Y 3 4 1 4 9 5 は、ラットにおける自発的ニコチン離脱中の I C S S 閾値の上昇の減少により測定して、ニコチン離脱を減弱することが示された (Kenny et al., 2003c)。m G l u 2 / 3 受容体がニコチンの強化系効果を制御する役割を担うか否かを測定するために、我々は、L Y 3 4 1 4 9 5 が強化系の F R スケジュール下のニコチン自己投与を減少させるかを試験した。上記のようなニコチン自己投与パラダイムの訓練後、ラットに L Y 3 4 1 4 9 5 (0、0.1、0.5、1、3 または 5 mg/kg) を対象内ラテン方陣設計にしたがい注射し、毎日のニコチン自己投与セッションを 30 分後に開始した。ラテン方陣設計の各注射の間に最小 48 時間開け、その間、ラットはその毎日のニコチン自己投与セッションを行い、ニコチンに対する反応の割合が次の L Y 3 4 1 4 9 5 投与の前に注射前基底に戻っていることを確認した。

10

【0178】

実験3.5：F R スケジュール(消費を評価)および P R スケジュール(薬剤投与のモチベーションを評価)下のニコチン自己投与における L Y 3 4 1 4 9 5 および M P E P 薬剤組み合わせの効果

20

先に、M P E P は、ラットおよびマウスにおいて F R スケジュール下のニコチン自己投与を減少させることが示された (Paterson et al., 2003)。本試験は、L Y 3 4 1 4 9 5 が、ラットにおいて F R スケジュール下のニコチン自己投与を同様に減少させることを証明した(結果は下記)。したがって、我々は、各々 M P E P および L Y 3 4 1 4 9 5 による m G l u 5 および m G l u 2 / 3 受容体の同時阻害が、ラットのニコチン自己投与における相加的阻害効果を有し得ると仮説を立てた。ここで、我々は、L Y 3 4 1 4 9 5 (0.5 mg/kg) がニコチン自己投与を 35 % まで減少させることを示した(結果は下記)。したがって：1) 我々はラットにこの投与量の L Y 3 4 1 4 9 5 (0.5 mg/kg) を、先にニコチン (Paterson et al., 2003) またはコカイン(本明細書に報告する実験1の結果)自己投与に効果がないことが先に示された M P E P の投与量 (1 mg/kg) と組み合わせて注射し、強化系の F R スケジュール下のニコチン自己投与行動を評価した(30 分前処置)；2) ラット(30 分前処置)にまた単独で投与した場合にはニコチン自己投与に効果がないことが示されている投与量の L Y 3 4 1 4 9 5 (1 mg/kg) を、1 mg/kg M P E P と組み合わせて注射し(この M P E P の投与量はまた単独で投与した場合、ニコチン自己投与に効果がない)、ニコチン自己投与におけるこの薬剤組み合わせ処置の効果を評価した；および 3) 最後に、我々はラットに 1 mg/kg L Y 3 4 1 4 9 4 および 9 mg/kg M P E P (M P E P の投与量は、それ自体投与した場合、ニコチン自己投与を減少させる；Paterson et al. 2003) の薬剤組み合わせ処置を注射し、強化系の漸増率スケジュール下、ニコチン自己投与における効果を試験した(30 分前処置)。

30

【0179】

40

統計的分析

コカイン自己投与実験の増加相中、最初の M P E P 注射後 23 日の S h A および L g A ラットにおけるコカイン反応の数を、2 因子反復測定分散分析 (A N O V A) により分析した。M P E P 処置相中、コカイン反応の基底数からの変化率を、M P E P 処置後のコカイン反応数を、コカイン反応の基底数のパーセントとして示すことにより計算した。I C S S 実験に関して、平均の生の閾値および反応潜時 (± S E M) を、結果のセクションにおいて各実験で提示した。全 I C S S 実験に関して、基底報酬閾値からの変化率を、薬剤が影響する閾値スコアを、基底閾値の割合として示すことにより計算した。基底閾値は、最初の M P E P 注射の前 3 日間に得られた閾値の平均であった。最初の I C S S 実験 (M P E P のコカイン誘発閾値低下における効果) に関して、基底スコアの割合を、2 因子反復

50

測定分散分析 A N O V A に付し、M P E P 投与量 (1 - 9 mg/kg) およびコカイン投与量 (0 または 10 mg/kg) を二つの対象内因子とした。第 2 の I C S S 実験 (M P E P のコカイン誘発閾値低下の期間の減少における効果) に関して、基底スコアの割合を 3 因子反復測定分散分析 A N O V A に付し、M P E P (0 または 3 mg/kg)、コカイン (0 または 10 mg/kg) および第 2 の注射後の時間 (10、40、70 および 100 分) を 3 つの対象内因子とした。全 I C S S 実験に関して、反応潜時データを、閾値データと同じ方法で分析した。ニコチン反応の基底数は、最初の L Y 3 4 1 4 9 5 注射の前 5 日間のニコチン反応の平均数であった。L Y 3 4 1 4 9 5 処置相の間、ニコチン反応の変化率を、ニコチン反応の基底数の割合としての L Y 3 4 1 4 9 5 処置後のニコチン反応の数を示すことにより計算した。漸増率データは、達成された最高の割合 (すなわち、中止点) または獲得した注入の数 (データは生の値として示した) として示した。A N O V A で統計的に有意な効果の後、平均値の Post-hoc 比較をフィッシャーの L S D 検定で行った。有意のレベルを .05 と設定した。

【0180】

結果

実験 3.1 : 強化系の定率スケジュール下のコカイン自己投与における M P E P 投与の効果

図 9 A に見られるように、コカイン反応の数は、S h A ラットと比較して L g A ラットで、上昇相の間漸増した。この効果は、統計的に有意な毎日のアクセスの主効果 (1 または 6 時間) ($F_{(1, 21)} = 10.96$, $p < 0.01$)、処置の日の有意な主効果 ($F_{(1, 252)} = 10.96$, $p < 0.001$)、および有意なアクセス × 日相互作用 ($F_{(1, 252)} = 1.69$, $p < 0.05$) に反映された。M P E P (1 - 9 mg/kg) は、コカイン自己投与を S h A および L g A ラットにおいて減少させた ($F_{(4, 48)} = 9.34$, $p < 0.001$) (図 9 B)。Post-hoc 分析は 3 ($p < 0.05$)、6 ($p < 0.01$) および 9 ($p < 0.001$) mg/kg M P E P が S h A ラットにおけるコカイン反応を有意に減少させることを証明した (図 9 B)。Post-hoc 分析は M P E P の最高投与量 (9 mg/kg) のみが L g A ラットにおけるコカイン反応を有意に減少させることを証明した ($p < 0.01$) (図 9 B)。しかしながら、投与量 × アクセス相互作用はなかった ($F_{(1, 252)} = 0.97$, N.S.)。S h A および L g A ラットにおけるコカイン反応をなくした場合、M P E P はコカイン反応を有意に減少させ ($F_{(4, 52)} = 9.36$, $p < 0.001$) (図 9 C)、Post-hoc 分析は 3 ($p < 0.01$)、6 ($p < 0.01$) および 9 ($p < 0.001$) mg/kg M P E P が崩壊性のグループにおけるコカイン反応を有意に減少することを証明した (図 9 C)。

【0181】

実験 3.2 : 強化系の漸増率スケジュール下のコカインおよびニコチン自己投与における M P E P の効果。

二つの因子としての M P E P 投与量および強化系での二元配置 A N O V A は、二つの因子の有意な相互作用 [$F_{(6, 48)} = 3.95$, $p < .01$]、M P E P の主作用 [$F_{(3, 48)} = 3.95$; $p < .01$] および強化系の有意ではない主作用を確認した [$F_{(2, 16)} = 1.41$, $p = 0.27$]。図 10 に見られるように、M P E P (1 - 9 mg/kg) は、強化系の漸増率スケジュール下で、コカイン (全体的 A N O V A における有意な相互作用後の、一元配置フォローアップ A N O V A における M P E P の有意な効果: $F_{(3, 15)} = 12.76$; $p < .001$) およびニコチン (全体的 A N O V A における有意な相互作用後の、一元配置フォローアップ A N O V A における M P E P の有意な効果: $F_{(3, 18)} = 11.28$; $p < .001$) に対する反応を減少させ、一方食物に対する反応に統計的有意差はなかった (全体的 A N O V A における有意な相互作用後の、一元配置フォローアップ A N O V A における M P E P の食物反応における有意な効果なし: $F_{(3, 15)} = 2.84$; $p = 0.07$)。強化系の漸増率スケジュールは、動物の薬剤を得る 'モチベーション' の測定を提供するため、これらのデータは、M P E P がコカインまたはニコチンを得るためのラットのモチベーションを、その食物に対するモチベーションに影響することなく減少させることを証明し、したがって効果の特異性を証明する。

【0182】

実験3.3：ICS S 閾値のコカイン誘発低下におけるMPEPの効果

図11Aに見られるように、コカイン(10 mg/kg)はICS S 閾値を有意に減少させた($F_{(1,8)} = 98.21$, $p < 0.001$)。対照的に、MPEPはICS S 閾値を有意に上昇させ($F_{(4,32)} = 8.22$, $p < 0.001$)、Post-hoc分析は、6 ($p < 0.05$)および9 ($p < 0.01$)mg/kg MPEPがICS S 閾値を有意に上昇させることを証明した。コカイン×MPEP相互作用はなかった($F_{(4,32)} = 0.75$, N.S.)。我々の推測的な仮説に基づいたさらなる分析は、ICS S 閾値が、先にMPEP(9 mg/kg)を投与されたコカイン-処置ラットにおいて、賦形剤注射を受けたコカイン-処置ラットよりも有意に上昇することを確認した($p < 0.05$)(図11A)。しかしながら、先にMPEP(9 mg/kg)を投与されたコカイン-処置ラットにおけるICS S 閾値は、賦形剤で前処置された生理食塩水-処置ラットよりもまだ有意に低かった($p < 0.001$)。コカイン(10 mg/kg)はICS S 反応潜時を有意に減少させた($F_{(1,8)} = 42.13$, $p < 0.001$)(図11B)。対照的に、MPEPは反応潜時を有意に上昇させた($F_{(4,32)} = 2.8$, $p < 0.05$)。さらなる分析は、MPEPの最高投与量(9 mg/kg)のみが反応潜時($p < 0.05$)を有意に上昇させることを証明した(図11B)。コカイン×MPEP相互作用はなかった($F_{(4,32)} = 2.16$, N.S.)。

【0183】

図12Aに見られるように、コカイン(10 mg/kg)はICS S 閾値を有意に減少させた($F_{(1,8)} = 62.73$, $p < 0.001$)。ICS S 閾値のこのコカイン-誘発減少は、時間依存的であった；コカイン×時間相互作用($F_{(3,24)} = 30.75$, $p < 0.001$)。Post-hoc分析は、賦形剤で前処置されたコカイン-処置ラットにおけるICS S 閾値が、コカイン注射後10分($p < 0.001$)および40分($p < 0.001$)で、賦形剤で前処置された生理食塩水-処置ラットと比較して有意に減少していることを証明した。MPEP(3 mg/kg)は、任意の時点でICS S 閾値に影響せず($F_{(1,8)} = 0.002$, N.S.)、コカイン×MPEP×時間相互作用はなかった($F_{(3,24)} = 1.02$, N.S.)。Post-hoc分析は、ICS S 閾値が、MPEPで前処置したコカイン-処置ラットにおいて、コカイン注射後10分($p < 0.001$)および40分($p < 0.001$)に、賦形剤-生理食塩水-処置ラットと比較して有意に減少していることを証明した。コカインはICS S 反応潜時を有意に減少させた($F_{(1,8)} = 12.65$, $p < 0.01$)(図12B)。反応潜時におけるこのコカイン-誘発減少もまた時間依存的であった；コカイン×時間相互作用($F_{(3,24)} = 6.62$, $p < 0.01$)。Post-hoc分析は、反応潜時が賦形剤で前処置されたコカイン-処置ラットで、コカイン注射後10分($p < 0.001$)に、賦形剤で前処置された生理食塩水-処置ラットと比較して有意に減少することを証明した。MPEP(3 mg/kg)は、任意の時点で反応潜時に影響せず($F_{(1,8)} = 2.67$, N.S.)、コカイン×MPEP×時間相互作用はなかった($F_{(3,24)} = 0.14$, N.S.)。Post-hoc分析はICS S 閾値が、MPEPで前処置されたコカイン-処置ラットで、コカイン注射後10分($p < 0.001$)に、賦形剤-生理食塩水-処置ラットと比較して有意に減少することを証明した。

【0184】

実験3.4：定率スケジュール下のニコチン自己投与におけるmGluR2/3アンタゴニストの効果。

図13に見られるように、LY341495(0.1-5 mg/kg)はFRスケジュール下でニコチン自己投与を減少させた($F_{(5,35)} = 3.75$, $p < 0.01$)。Post-hoc分析は、0.1 ($p < 0.01$)、0.5 ($p < 0.05$)、3 ($p < 0.01$)および5 ($p < 0.01$)mg/kg LY341495が、ニコチン反応を有意に減少させることを証明した(図13)。

【0185】

実験3.5：FRスケジュールおよびPRスケジュール下のニコチン自己投与におけるLY341495およびMPEP薬剤組み合わせの効果。

10

20

30

40

50

図14に見られるように、LY341495 (0.5 mg/kg)と、上記実施例2でニコチン(またPaterson et al., 2003参照)またはコカイン自己投与における効果がないことが示された投与量のMPEP (1 mg/kg)の組み合わせは、ニコチンに対する反応を有意に減少させた($F_{(2, 17)} = 8.6$ 、 $p < 0.01$)。

【0186】

Post-hoc分析はLY341495 (0.5 mg/kg)単独($p < 0.05$)、およびLY341495 (0.5 mg/kg)とMPEP (1 mg/kg)の組み合わせ($p < 0.01$)が、ニコチン自己投与を有意に減少させることを証明した。LY341495 (0.5 mg/kg)とMPEP (1 mg/kg)の組み合わせは、ニコチン自己投与をLY341495 (0.5 mg/kg)単独よりもより大きく減少させるが、この効果はちょうど統計的に有意に到達しなかった($p = 0.053$)。同様に、LY341495 (1 mg/kg)の投与量と、MPEPの行動的に不活性な投与量 (1 mg/kg)の組み合わせはまたニコチン自己投与を減少させた(図15)。最後にさらなるデータ(図16)は、9 mg/kg MPEPと1 mg/kg LY341494が、強化系の漸増率スケジュール下でニコチン自己投与を有意に減少させることを示唆した。

【0187】

考察

我々の研究室で最近示された観察は、コカイン自己投与への反復した長期の(6時間)アクセスは、LgAラットの毎日のコカイン消費の漸進的増加または‘漸増’をもたらすことを示している(Ahmed and Koob, 1998; Ahmed et al., 2002)。対照的に、コカイン自己投与への限定された(1時間)アクセスのShAラットは、毎日のコカイン消費の安定したパターンを維持した。本発明のデータは、mGlu5受容体アンタゴニストMPEPが、ShAおよびLgAラットのラットにおいて同様にコカイン消費を減少させ、mGluR5受容体の遮断が、薬剤依存および非薬剤依存個体の両方における薬剤使用を減少させることを示唆する。先に、MPEPは、野生型コントロールマウス(Chiamulera et al., 2001)および、コカイン自己投与行動の獲得に失敗したmGlu5が欠失した遺伝子修飾マウスで、これらのマウスで食物強化に対する反応がたとえ変わらなくても(Chiamulera et al., 2001)コカイン自己投与行動を減少させることが示された。同様に、上記実施例2は、MPEPがラットおよびマウスにおけるニコチン自己投与を減少させることを説明する。このように、この実施例のデータは、物質依存および非物質依存個体の両方におけるコカインおよびニコチン自己投与行動の制御におけるmGlu5受容体の重要な役割と一致する。しかしながら、MPEPは、ShAおよびLgAラットの両方でコカイン消費を類似の大きさで減少させた。このように、LgAラットで観察されたコカイン摂取の漸増が、コカイン自己投与行動におけるmGlu5受容体制御の変化と関連していることはありそうにない。

【0188】

コカインの快楽作用は、コカイン自己投与行動の確立および維持に重要な役割を担うと考えられている(Stewart et al., 1984; Kenny et al., 2003a)。ICSS閾値のコカイン誘発減少は、コカインの快楽作用の正確な指標とみなされている。興味深いことに、コカイン自己投与を減少させる投与量のMPEP (1–9 mg/kg)は、全身のコカイン投与後に観察されたICSS閾値の低下の大きさを減弱しなかった。同様に、MPEP (3 mg/kg)は、コカインがICSS閾値を低下させる期間を減弱しなかった。コカイン誘発性ICSS閾値の低下が、脳報酬機能のコカイン誘発促進の正確な指標であるため、これらの観察は、MPEPが、コカインの快楽的影響力がそのままであるにも関わらず、コカイン消費を減少させることを示唆する。MPEPの高投与量 (6–9 mg/kg)単独ではICSS閾値が上昇し、mGlu5受容体が基底脳報酬機能を正に制御することは注目に値する。しかしながら、ICSS閾値に単独では影響しないMPEPの低投与量 (3 mg/kg)は、コカイン自己投与行動を有意に減少させる。このように、MPEPが、コカイン自己投与行動を基底脳報酬機能の減少により減少させ、それにより嫌悪行動状態を誘発することはありそうにない。全体に、この実施例のデータは、MPEPがコカイン自己投与(すなわち、消費)を、コカインの快楽作用と無関係の機構により減少させることを示唆する

。

【0189】

上記の観察における一つの可能性のある説明は、MPEPはラットのコカイン自己投与における‘モチベーション’を減少させるが、脳報酬機能におけるコカイン誘発上昇(すなわち、コカイン誘発多幸)を変えないということである。この可能性を試験するために、我々は、MPEPが強化系の漸増率(P R)スケジュール下で、コカインおよびニコチンへの反応を減少させるか否かを試験した。P Rスケジュールは、濫用性物質を得るための動物の‘モチベーション’の指標を提供する。興味深いことに、MPEPは、強化系のP Rスケジュール下で、コカインおよびニコチンに対する中止点を減少させた。この観察は、MPEPが、ラットがコカインおよびニコチンを得るためのモチベーションを減少させ、したがって、物質消費の減少を導くことを示唆する。 10

【0190】

次に、我々は、mGlu2/3受容体の遮断が、ラットのニコチン自己投与を、mGlu5受容体の遮断と同程度減少させるかを試験した。上記実施例1は、mGlu2/3受容体アンタゴニストLY341495の投与によるmGlu2/3受容体の遮断が、ラットにおけるニコチン離脱の鬱病様側面を減弱することを説明する。本発明のデータは、mGlu2/3受容体のアンタゴニストであるLY341495がラットにおけるニコチン消費を減少させ、mGluR2/3受容体の遮断がニコチンの強化効果を減少させることを示唆する。もっとも興味深いことに、コカインまたはニコチン自己投与に効果のない投与量のMPEP(1 mg/kg)の共投与が、ニコチン自己投与におけるLY341495(0.5 mg/kgまたは1 mg/kg)の阻害効果を促進する。さらに、単独で投与した場合コカインまたはニコチン自己投与のいずれかを減少させる9 mg/kg MPEPを、1 mg/kg LY341495と組み合わせた場合、また強化系の漸増率スケジュール下のニコチン自己投与を減少させ、その効果は任意の薬剤単独よりも大きく、これらの効果が増すことを明らかに証明する。この観察は、mGlu2/3およびmGlu5受容体の同時の遮断が、いずれかの受容体サブタイプ単独の遮断よりも物質嗜癖の処置に有効な効果を有し得、mGlu2/3およびmGlu5受容体のこのような同時の遮断が、薬剤消費および薬剤摂取行動にをさせる動機の両方を減少する。 20

【0191】

さらに、上記実施例1に説明するようにmGluR2/3受容体の遮断は、ニコチン離脱の鬱病様側面を改善させる。このように、mGlu2および/またはmGluR3、およびmGlu5受容体でのデュアルアンタゴニスト作用での薬理的処置は：1)ニコチンおよびコカインのような濫用性物質の消費を、いずれかの受容体単独の遮断よりも大きな程度減少させ、そして2)物質離脱の感情的側面、およびおそらく物質依存性を改善させる。物質消費および物質離脱の両方におけるこれらの効果が、喫煙者、物質使用者および耽溺者の自制の増加に関与し得る。最後に、3)mGlu2/3およびmGlu5受容体で作用するデュアルアンタゴニストでの薬理的処置は、非薬剤誘発鬱病の有効な処置でもあり得る。 30

【0192】

実施例3に記載の引用文献

Chiamulera, C., Epping-Jordan, M.P., Zocchi, A., Marcon, C., Cottiny, C., Tacconi, S., Corsi, M., Orzi, F., Conquet, F., 2001, Nat Neurosci, 4, 873-874.

Esposito, R.U., Motola, A.H., Kornetsky, C., 1978, Pharmacol Biochem Behav, 8, 437-439.

Frank, R.A., Martz, S., Pommering, T., 1988, Pharmacol Biochem Behav, 29, 755-758.

Harris, G.C., Aston-Jones, G., 2003, Neuropsychopharmacology, 28, 73-76.

Harrison, A.A., Liem, Y.T. and Markou, A. (2001), Neuropsychopharmacology, 25, 55-71.

Kalivas, P.W., Duffy, P., 1998, J Neurochem, 70, 1497-1502.

40

50

- Kenny, P.J., Polis, I., Koob, G.F., Markou, A., 2003b, *Eur J Neurosci*, 17, 191-195.
- Kenny PJ, Gasparini F, Markou A. (2003c), *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Jun 12 [Epub ahead of print].
- Kokkinidis, L., McCarter, B.D., 1990, *Pharmacol Biochem Behav*, 36, 463-471.
- Laviolette, S.R., van der Kooy, D., 2003, *Psychopharmacology (Berl)*, 166, 306-313.
- Mansvelder, H.D., McGehee, D.S., 2000, *Neuron*, 27, 349-357.
- Markou, A. and Kenny, P.J. (2002), *Neurotoxicity Research*, 4(4), 297-313.
- Markou, A., Koob, G.F., 1992, *Physiol Behav*, 51, 111-119.
- Markou, A. and Koob, G.F. (1993) Intracranial self-stimulation thresholds as a measure of reward. In: A. Sahgal (Ed.), *Behavioural Neuroscience: A Practical Approach*, vol. 2, IRL Press, Oxford, pp. 93-115.
- Markou, A., Kosten, T.R. and Koob, G.F. (1998), *Neuropsychopharmacology*, 18(3), 135-174.
- McGeehan, A.J., Olive, M.F., 2003, *Synapse*, 47, 240-242.
- Popik, P., Wrobel, M., 2002, *Neuropharmacology*, 43, 1210-1217.
- Stewart, J., de Wit, H., Eikelboom, R., 1984, *Psychol Rev*, 91, 251-268.
- Ungless, M.A., Whistler, J.L., Malenka, R.C., Bonci, A., 2001, *Nature*, 411, 583-587.
- Wolf, M.E., 2003, *Methods Mol Med*, 79, 13-31.

10

20

30

40

50

【0193】

実施例 4

選択的セロトニン再取り込み阻害剤パロキセチンとセロトニン(5-HT)1A受容体アンタゴニストの組み合わせが、ラットでアンフェタミン離脱中に観察される報償欠損を改善する

この実施例は、5-HT1A受容体アンタゴニスト p-MPPI および選択的セロトニン再取り込み阻害剤パロキセチンの共投与が、アンフェタミン離脱-誘発報償欠損の大きさを減少させ、期間を短くすることを説明する。

【0194】

原理：報償刺激における“減少した興味または喜び”は、アンフェタミン離脱の感情的症状であり、鬱病の中心の症状である。この症状の操作的指標は、物質離脱中の脳刺激報償閾値の上昇である。データは、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)フルオキセチンおよびセロトニン-1A受容体アンタゴニスト p-MPPI の共投与によるセロトニン神経伝達物質の増加が、物質離脱中に観察される報償欠損を改善することを示唆する(Harrison et al. 2001、本明細書に引用してその全体を包含する)。目的：我々は、増加したセロトニン作用性神経伝達が、アンフェタミン離脱のこの感情的症状を、フルオキセチンよりも、より選択的 SSRI であるパロキセチンを使用して軽減するという仮説をさらに試験した。

【0195】

方法：個別試験電流閾値自己刺激法を、脳報償機能の評価に使用した。パロキセチンおよび p-MPPI 単独および組み合わせの効果を、非物質離脱動物で評価した。我々は、パロキセチンおよび p-MPPI 単独および組み合わせの、アンフェタミン離脱に関する報償欠損における効果を評価した。結果：パロキセチンまたは p-MPPI 単独では閾値に効果はないが、p-MPPI とパロキセチンの共投与は、非離脱ラットにおける閾値を上昇させた。アンフェタミン離脱は閾値上昇をもたらした。p-MPPI とパロキセチンの共投与は、アンフェタミン離脱誘発報償欠損の期間を減少させた。

【0196】

結論：増加したセロトニン作用性神経伝達は、非離脱ラットにおける脳報償機能を減少させるが、同じ処置は、アンフェタミン離脱に関する報償欠損を改善した。セロトニント

ランスポーターに対するパロキセチンのフルオキセチンと比較した大きな選択性を考慮して、これらの結果は、アンフェタミン離脱の感情的症状が、非薬剤誘発鬱病と同様に、一部、セロトニン作用性神経伝達の減少を介して介在され得ることを示唆する。

【0197】

アンフェタミン投与の停止後に経験する離脱症候群は、報酬刺激における“減少した興味または喜び”を含む感情的症状により特徴付けられる(American Psychiatric Association 1994; MarkouおよびKenny 2002)。“減少した興味または喜び”の症状は、鬱病の中心症状および精神分裂病の負の症状である(American Psychiatric Association 1994)。脳報酬閾値は、それが報酬性電気刺激に対する感受性の減少を反映するため、この症状の操作上の指標である。ラットにおいて、ニコチン(Epping-Jordan et al.1998; Harrison et al. 2001)、アンフェタミン(LeithおよびBarrett 1976; Lin et al. 1999; Paterson et al. 2000; Harrison et al. 2001)、コカイン(MarkouおよびKoob 1991)、モルヒネ(Schultheis et al. 1994)、エタノール(Schultheis et al. 1995)およびフェンシクリジン(SpielewoyおよびMarkou 2003)を含む、異なった薬剤クラスに属する、種々の濫用性物質からの離脱は、ラットにおける脳刺激報酬閾値を上昇させた。

【0198】

減少したセロトニン作用性神経伝達は、非薬剤誘発鬱病の病因に関与している。この仮説を支持する証拠は、セロトニン作用性抗鬱処置の有効性の証明、セロトニン代謝物の脳脊髄液レベルの減少、減少したセロトニン作用性神経伝達を反映する内分泌測定、および鬱病患者におけるセロトニン枯渇後に見られる鬱様症状の悪化を含む(レビューのために Caldecott-Hazard et al. 1991; Markou et al. 1998)。近年の鬱病の処置における利益は、ピンドロールの共投与が、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI)の抗鬱作用の遅い発現を加速することを示唆する(Rickels et al. 1989; Blierおよびde Montigny, 1999; Bordet et al. 1998; Zanardi et al. 1998; McAskill et al. 1998)。SSRIの抗鬱作用の発生の加速は、ピンドロールの5-HT_{1A}受容体アンタゴニスト作用を介してであり得るが、この薬剤は、5-HT_{1A}、5-HT_{1B}、および α -アドレナリン作用性受容体での作用(AssieおよびKoek 1996; Bourin et al. 1998; GobertおよびMillan 1999)および α -アドレナリン作用性受容体での部分的アゴニスト作用(Clifford et al. 1998; GobertおよびMillan 1999; PauwelsおよびPalmier 1994)を介した広範囲な効果を有する。インビボ微小透析試験は、5-HT_{1A}受容体アンタゴニストと一緒にSSRIの急性共投与は、脳セロトニン透析レベルを、急性SSRI単独処置後に見られるレベルを超えて前脳セロトニン透析レベルを上昇させることを証明する(AuerbachおよびHjorth 1995; Hjorth 1993; KreissおよびLucki 1995; Artigas et al 1996; Blierおよびde Montigny 1994; しかしながらCremers et al. 2000も参照)。

【0199】

我々は、最近5-HT_{1A}受容体アンタゴニストである4-(2'-メトキシフェニル)-1-[2'-(n-(2"-ピリジニル)-p-ヨードベンズアミド)-エチル-ピペラジン(p-MPPI)、(Kung et al. 1994)、およびSSRIであるフルオキセチン(Wong et al. 1995)の共投与が、ニコチンまたはアンフェタミン離脱のいずれかの間に観察される報酬欠損(すなわち、上昇した報酬)を、ニコチン離脱の身体的兆候に影響することなく改善することを報告した(Harrison et al. 2001)。これらのデータは、セロトニン作用性神経伝達の促進が、物質離脱の感情的症状を選択的に改善し得ることを示唆する。さらに、上記の結果と関連する試験のセットと一緒にして、脳報酬機構におけるセロトニン作用性マニュプレーションの効果が、対象の快樂状態に依存することを証明する(Harrison et al. 2001; HarrisonおよびMarkou 2001)。

【0200】

フェニルピペリジン化合物であるパロキセチンは、選択的セロトニン再取り込み阻害剤として働き、フルオキセチン、セルトラリン、クロミプラミンおよびフルボキサミンのような他のSSRIと、化学的および薬物動態的に異なり、セロトニン再取り込みのより選択的でより強力な阻害をする(TullochおよびJohnson 1992)。SSRIは、セロトニン作

10

20

30

40

50

用性伝達の促進を介して鬱病の症状を軽減すると仮説が立てられている(Tignol 1993; Borurin et al. 2001)。しかしながら、フルオキセチンのようなSSRIはノルアドレナリントランスポーターにも作用を示す；ノルアドレナリンは鬱病に関連する別の伝達物質系である(Caldecott-Hazard et al. 1991; Markou et al. 1998)。このように、本試験の目的は、フルオキセチンでの我々の先の発見を、より選択的で化学的に異なるSSRIであるパロキセチンがまた物質離脱の感情的側面を軽減することを証明することにより広げ、これらの効果におけるセロトニン作用性関与をさらに証明することである。

【0201】

要約すると、以下の証拠に基づく：1) 5-HT_{1A} 受容体アンタゴニストでの前処置は、パロキセチン投与により誘発される前脳セロトニンレベルの上昇を増強する(Romero et al. 1996)；2) ピンドロールとパロキセチンの共投与は、ヒトにおけるパロキセチンの抗鬱効果発生を加速する(Bordet et al. 1998; Zanardi et al. 1998)、および3) フルオキセチンと5-HT_{1A} 受容体アンタゴニストの組み合わせはアンフェタミン離脱を改善するという我々の先の発見であり、5-HT_{1A} 受容体アンタゴニストp-MPPIとパロキセチンの共投与が、ラットにおけるアンフェタミン離脱-誘発報酬欠損を改善するとの仮説を本発明で立てた。したがって、実験のこのシリーズは以下のものを評価する：1) パロキセチンの基底条件下の脳報酬閾値における効果；2) p-MPPI および、p-MPPI + パロキセチン共投与の、基底条件下の閾値における効果；および3) これらの薬剤の、アンフェタミン離脱により誘発される報酬欠損の処置における効果。

【0202】

材料および方法

対象

雄Wistarラット(Charles River, Hollister, CA)(実験開始時300-320g)を、2匹ずつ温度および湿度制御環境中、12時間の明/暗サイクルで飼育した。餌と水は自由に摂取させた。対象の異なるセットを、各実験で使用した。すべての対象を、国立衛生研究所“動物の世話の原則に関するガイドライン”にしたがい処理し、動物の施設および実験プロトコルは、実験動物管理公認協会にしたがった。ほとんどの行動試験は、行動パラメーターの経時的評価のために実験設計により違うように指示している以外、対象の明/暗サイクルの明相の間に行った。

【0203】

装置

実験装置は、音響減衰箱(San Diego Instruments, San Diego, CA)に入れられた16個のPlexiglasチャンバー(30.5×30×17cm)(Med Associates Inc., St. Albans, VT)から成った。各オペラントチャンバーは、ステンレススチール格子の床と、一つの壁に位置した4分の1回転させるのに0.2N力必要な金属ホイールマニュプランダムを含んだ。金接触スイベル整流子および双曲性鉛で、動物を刺激回路に接続した(Plastics One, Roanoke, VA)。脳刺激は、一定電流刺激により適用した(Stimtek 1200, San Diego Instruments, San Diego, CA)。

【0204】

手術法

ラットに、後部視床下部への(APブレグマから-0.5mm；L+1.7mm；DV硬膜から-8.3mm、耳内線の5mmに門歯バーを伴う；Pellegrino et al. 1979、ハロタン麻酔下(1-1.5%ハロタン/酸素混合物)11mmステンレススチール双極性電極(Plastics One；直径=0.25mm)により、準備した。対象を、任意の行動試験前、少なくとも7日間回復させた。電極の半分が右半球に、残りの半分が左半球に位置し、脳非対称性の可能性を相殺した。

【0205】

薬剤

パロキセチン塩酸塩(SmithKline Beecham, Worthing, West Sussex, U.K.より提供)を、数滴のポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(tween 80)(Sigma, St. Louis, M

0)を含む生理食塩水に溶解し、0.05 M NaOHを使用してpHを約6.5にした。パロキセチンを4 ml/kgの用量で腹腔内に投与した。4-(2'-メトキシフェニル)-1-[2'-(n-(2"-ピリジニル)-p-ヨードベンズアミド)-エチル-ピペラジン塩酸塩p-MPPI](Research Biochemicals Inc., Natick, MA)を滅菌水に溶解し、加熱した水浴中10-20分超音波処理し、0.1 M NaOHでpHを約5.2にした。p-MPPIを1 ml/kgの用量で皮下投与した。d-アンフェタミンサルフェート(National Institute on Drug Abuse, Bethesda, MDから得た)を生理食塩水に溶解し、1 ml/kgの用量で腹腔内に投与した。

【0206】

脳内自己刺激行動法

ICSS個別試験電流閾値法は、最初にKornetskyと共同研究者(KornetskyおよびEsposito, 1979)により開発された方法の変法である(詳細に関して、MarkouおよびKoob 1992; HarrisonおよびMarkou 2001参照)。対象を最初に、強化系の定率1スケジュールのホイールマニピュランダム回転に関して訓練した。電氣的強化系は、500 msecの訓練時間と、100 Hzの周波数で送達される0.1 ms方形カソードパルスから成った。送達される電流強度は各動物で調節し、典型的に100から200 μ Aの間であった。この方法での好結果の習熟の後(100強化系の2セッションが20分より短い)、ラットを個別試験、電流閾値法で徐々に訓練した。

【0207】

各試験の開始時、ラットは非偶発電気刺激を受けた。その後の制限時間である7.5秒以内に、対象がホイールマニピュランダムを4分の1回転することにより反応した場合(陽性反応)、最初の非偶発刺激と同一の第2回の、偶発刺激を受けた。陽性反応直後の2秒間、さらになる反応を余分の反応として記録するが、結果は何もなかった。制限時間である7.5秒の間に反応が起きなかった場合、陰性反応を記録した。制限時間に続く試験内インターバル(ITI)は、平均時間10秒であった(7.5-12.5秒の間)。ITI中に起きた反応を時間外反応として記録し、次の試験の開始までさらに12.5秒の遅れをもたらした。反応強度は、伝統的精神物理学極限法に従い変化した。対象は、上昇および下降電流強度の4つの別のシリーズを、下降シリーズから開始して受けた。各シリーズ内で、刺激強度は5 $\square$ A段階で、試験の各セットの間に変えた(セットあたり3試験)。上記方法で訓練後、ラットは、安定な基底閾値が達成されるまで試験した(5日の期間にわたり $\pm 10\%$)。薬剤試験を、典型的に毎日の基底試験で2から3週間後に起こる、能力が安定化した後にのみ始めた。各試験セッションは典型的に30分続き、行動評価に関する二つの独立した可変値を提供した：

閾値：各下降シリーズの電流閾値を、好結果で完了した試験のセット刺激(3試験中2つ以上の陽性応答)および最初の試験のセットの刺激強度、動物が3試験中2つまたはそれ以上で陽性の応答をしなかった二つの連続セットの間の刺激強度として定義した。上昇シリーズ中、改善状況が閾値を定義した。このように、各セッション中、4つの電流閾値を記録し、これらの値の平均を各試験セッションの各対象の電流閾値として取った。

反応潜時：非偶発刺激と陽性反応の間の潜時を反応潜時として記録した。各試験セッションに関する反応潜時は、陽性反応が起こっているすべての試験の間の平均反応潜時として記録した。

【0208】

実施例4.1：脳刺激報酬におけるパロキセチンの効果

SSRIパロキセチン(0、1.25、2.5、5、10 mg/kg; n=13)を、試験セッション120分前に対象内ラテン方陣設計にしたがい投与し、薬剤注射中最低7日間開け、次の薬剤試験前に基底レベルに戻ることを確認した。

【0209】

実施例4.2：p-MPPIおよびp-MPPI+パロキセチンの組み合わせの脳刺激報酬における効果

p-MPPI単独、およびパロキセチンの2つの投与量と組み合わせた脳刺激報酬にお

10

20

30

40

50

ける効果を、階乗的実験設計を使用して評価した。p-M P P I の投与量(0、1、3、10 mg/kg)は対象内因子であり、パロキセチンの投与量(0、1.25または5 mg/kg; n = 9; 各々11および14)は対象間因子であった。p-M P P I を、試験135分前に投与し、パロキセチンを試験120分前に試験した。パロキセチンを投与したとき、薬剤注射の間に最小7日間置き、p-M P P I 単独を投与した場合、薬剤注射の間に最小3日置き、薬剤試験前の基底閾値レベルに戻ることを確認した。

【0210】

実施例4.3: パロキセチン、p-M P P I および p-M P P I + パロキセチンの組み合わせの、アンフェタミン離脱中の報償欠損における効果

使用したアンフェタミン投与レジメは、LeithおよびBarrett(1976)により使用されたの
10
の変法であり、Lin et al. (1999)およびHarrison et al. (2001)が使用したのと同じで
あった。d-アンフェタミンスルフェートを腹腔内に4日間、1日3回(6:00 A.M.
、12:00 P.M.、6:00 P.M.)、1 mg/kgから開始し、5 mg/kgで安定化させる
増加投与レジメで投与した(すなわち、1、2、3、4、5、5、5、5、5、5、5、
5 mg/kg; 合計投与量 = 50 mg/kg; n = 46; 4実験グループ、n = 11-12/グル
ープ)。ラットの他のセット(n = 43; 4実験グループ、n = 10-12/グル
ープ)に同じ時点で生理食塩水を注射した。体重、脳内自己刺激報償閾値および反応潜時を、この
慢性薬剤投与相中、アンフェタミンまたは生理食塩水の最初の毎日の注射直前(すなわち
、5:30 A.M.)から毎日測定した。脳内自己刺激報償閾値および反応潜時を次いで最
20
後のアンフェタミンまたは生理食塩水注射後12、36、42、60、84、108、1
32および156時間に測定した。最終のアンフェタミンまたは生理食塩水注射12時間
後の動物のパフォーマンスに基づいて、対象を処置グループに関して、閾値上昇における
元々の離脱効果が、グループ間で同等になるように割り当てた。体重を最終のアンフェ
タミンまたは生理食塩水注射12、36、60、84、108、132および156時間後
に測定した。賦形剤、p-M P P I (3 mg/kg)、パロキセチン(1.25 mg/kg)、または
p-M P P I (3 mg/kg) + パロキセチン(1.25 mg/kg)の急性投与を、36時間目の試
験セッションの前に行った。この時点は、先のアンフェタミン離脱中に観察された閾値上
昇の時間経過に基づいて選択した(Lin et al. 1999; Paterson et al. 2000; Harrison e
t al. 2001)。パロキセチンおよびp-M P P I の量は、実験1および2の結果に基づい
て選択した。p-M P P I を試験135分前に投与し、パロキセチンを試験120分前に
30
投与した。

【0211】

データ分析

実施例4.1および4.2において、報償閾値および反応潜時を、各薬剤処置前の3日間に
評価した平均値の割合として示した。実施例4.1からのデータを、一元配置反復測定
分散分析(ANOVA)および直線傾向分析として分析した。実施例4.2のデータを、二
元配置混合因子ANOVAで分析し、p-M P P I の投与量を対象内因子として、パロキ
セチンの投与量を対象間因子とした。p-M P P I + パロキセチン薬剤組み合わせが報償
閾値を上昇させるという(HarrisonおよびMarkou 2001)強い推測的な仮説のため、さら
に投与量-反応曲線の分析を直線傾向分析を使用して行った(Hinkle et al. 1998)。実施
40
例4.3において、報償閾値および反応潜時データは、最初のアンフェタミンまたは生理食
塩水注射の直前5日間の平均基底値の割合として示した。体重データは、最初のアン
フェタミンまたは生理食塩水注射の直前の重さの割合として示した。慢性薬剤処置中に集めた
データを、二元配置混合因子ANOVAで分析した。対象内因子は、処置の日であり、対
象間因子は慢性薬剤処置(生理食塩水またはアンフェタミン)であった。アンフェタミン(
または生理食塩水)離脱中に集めたデータを、三元配置混合因子ANOVAで分析した。
対象内因子はアンフェタミンまたは生理食塩水処置後の時間、および二つの対象間因子は
離脱中に投与した慢性薬剤処置(アンフェタミンまたは生理食塩水)および急性薬剤処置で
あった。統計的に有意な相互作用が、Post-hoc Newman-Keulsの後に存在した。有意のレ
ベルを $p < 0.05$ に設定した。すべての統計的分析を、BMDP統計的ソフトウェアパ
50

ッケージを使用して行った(BMDP Statistical Software Inc., CA)。

【0212】

結果

基底閾値および反応潜時

実施例4.1および実施例4.2を、一元配置ANOVAを使用して分析し、基底能力の可能性のある流れを評価した。閾値または反応潜時に、任意の実験で有意差はなかった。

実施例4.1：平均閾値の範囲：110.62–123.52 μ A；平均反応潜時の範囲：3.17–3.34秒。実施例4.2：p-MPPI+賦形剤：平均閾値の範囲：110.29–113.73 μ A；平均反応潜時の範囲：3.15–3.26秒；p-MPPI+パロキセチン(1.25 mg/kg)：平均閾値の範囲：130.22–132.28 μ A；平均反応潜時の範囲：3.25–3.27秒；p-MPPI+パロキセチン(5 mg/kg)：平均閾値の範囲：129.19–134.39 μ A；平均反応潜時の範囲：3.29–3.37秒。実施例4.3：生理食塩水“離脱”グループに割り当てた対象(n=43)[平均閾値+SEM：139.18+5.46 μ A；平均反応潜時+SEM：3.46+0.06秒；平均体重+SEM：508.83+7.40 g]およびアンフェタミン離脱グループに割り当てた対象(n=46)[平均閾値+SEM：133.17+4.97 μ A；平均反応潜時+SEM：3.41+0.06秒；平均体重+SEM：513.99+7.13 g]で平均基底閾値、反応潜時または体重に統計的有意差はなかった。最終アンフェタミンまたは生理食塩水注射後12時間のパフォーマンスに基づいて、対象を処置グループに分け、閾値上昇における元々の離脱効果がグループ間で等しくなるようにした。

10

20

【0213】

実施例4.1：パロキセチンの脳刺激報償における効果

パロキセチンは、本試験で投与した投与量で、閾値[F(4, 48)=1.77、n.s.]または反応潜時[F(4, 48)=2.16、n.s.]に影響しなかった。(図17Aおよび17B)。直線傾向分析は有意ではなかった(p>.05)。

【0214】

実施例4.2：p-MPPIおよびp-MPPI+パロキセチンの組み合わせの脳刺激報償における効果

閾値データの分析は、パロキセチンの主効果[F(2, 31)=22.22、p<0.01]およびp-MPPIの主効果[F(3, 93)=5.65、p<0.05]を確認したが、二つの薬剤の間に有意な相互作用はなかった[F(6, 93)=0.33、n.s.]。p-MPPI+フルオキセチン投与(HarrisonおよびMarkou 2001)の先の発見に基づいたp-MPPI+パロキセチンの投与が閾値を上昇させるという先の仮説は、これらのデータのさらなる分析を可能にした。各投与量–反応曲線の直線傾向分析は、p-MPPI投与単独では報償閾値に効果がなく[F(1, 5)=3.748、n.s.]、一方パロキセチン(1.25 mg/kgまたは5 mg/kg)と組み合わせたp-MPPI投与は、p-MPPI投与量–関連的に閾値を上昇させることを確認した[パロキセチンの二つの投与量に関して各々F(1, 7)=7.75、p<0.05およびF(1, 10)=7.95、p<0.05](図18A)。反応潜時データの分析は、パロキセチンが反応潜時を上昇させるが[F(2, 31)=9.41、p<0.01]、一方p-MPPIは反応潜時に影響せず[F(3, 93)=0.17、n.s.]、反応潜時においてパロキセチンと相互作用がない[F(6, 93)=1.28、n.s.](図18B)ことを証明した。

30

40

【0215】

実施例4.3：パロキセチン、p-MPPIおよびp-MPPI+パロキセチンの組み合わせの、アンフェタミン離脱中の報償欠損における効果

慢性アンフェタミン：慢性アンフェタミン投与(4日処置)は、最初の毎日の注射の直前(前回のアンフェタミンまたは生理食塩水注射の12時間後)に行った試験中の生理食塩水暴露動物の閾値と比較して、閾値を有意に上昇させた[F(1, 87)=117.95、p<0.01]。有意な処置の日×慢性薬剤処置相互作用[F(3, 261)=50.81、p<0.01]の分析は、アンフェタミン–暴露動物の閾値が、処置期間関連方法で上昇し、有意

50

な上昇が薬剤1日目(最初の注射の前;基底)と2日目の間、および薬剤2日目と3日目の間で見られるが、薬剤3日目と4日目の間では見られないことを証明した。アンフェタミン-暴露動物の閾値は、生理食塩水-暴露動物よりも、薬剤2日目、3日目および4日目で有意に高かった。生理食塩水-暴露ラットの閾値は、この実験の相の間安定なままであった(図19A)。

【0216】

反応潜時データの分析は、有意な処置の日×薬剤処置相互作用を確認した[$F(3, 261) = 2.82$ 、 $p < 0.05$]。アンフェタミン-暴露動物の反応潜時は、薬剤1日目(処置前日;基底)と比較したとき2日目で有意に遅延しているが、生理食塩水-暴露動物の反応潜時は処置中安定なままであった。それにもかかわらず、アンフェタミン-暴露ラットの反応潜時は、慢性薬剤処置中の任意の段階の生理食塩水-暴露ラットと有意に異ならなかった(図19B)。

【0217】

慢性アンフェタミン投与は、動物の体重を、生理食塩水-暴露コントロールの対象と比べて有意に減少させた[$F(1, 87) = 282.5$ 、 $p < 0.01$]。有意な処置の日×薬剤処置相互作用[$F(3, 261) = 209.77$ 、 $p < 0.01$]は、アンフェタミン-暴露ラットの体重が処置期間依存的方法で減少し、前の日と比べて体重の有意な減少が慢性アンフェタミン処置の各日に観察された。対照的に、生理食塩水-暴露動物の体重は、薬剤2日目と3日目の間に有意に増加した。アンフェタミン-暴露動物の体重は、生理食塩水-暴露動物よりも、薬剤2日目、3日目および4日目で有意に低かった(図19C)。

【0218】

アンフェタミン離脱：アンフェタミン-暴露動物は、最終アンフェタミン注射後、生理食塩水-暴露ラットと比較して上昇した閾値を示した[$F(1, 81) = 84.88$ 、 $p < 0.01$]。有意な時間×慢性処置×急性処置相互作用[$F(21, 567) = 1.63$ 、 $p < 0.05$]の分析は、以下のことを確認した。賦形剤で処置した生理食塩水-暴露ラットと比較して、36時間の時点前に賦形剤で処置したアンフェタミン-暴露ラットが、離脱時間12、36、42、60および84で上昇した閾値を示し、最終アンフェタミン注射108時間後に基底レベルに戻った(図20Aおよび20D)。パロキセチン(図4Aおよび4D)もp-MPPI(図20Bおよび20E)も、生理食塩水-暴露動物の閾値に影響しなかった。しかしながら、パロキセチン(図20D)およびp-MPPI(図20E)の両方が、アンフェタミン-離脱非薬剤-処置ラットの24時間前に基底報酬閾値レベルに戻ることにより示されるように、報酬欠損の期間を短くした(生理食塩水-暴露賦形剤-処置ラットとの有意差はないと定義)。p-MPPI+パロキセチンの共投与は、薬剤投与直後の36時間の時点および60時間の時点の閾値をアンフェタミン-暴露賦形剤-処置ラットと比較して有意に上昇させた(図20F)。この組み合わせ処置は、アンフェタミン-離脱非薬剤-処置ラットの48時間前に基底の報酬閾値レベルに戻ることにより示されるように、報酬欠損の時間を短くした(生理食塩水-暴露賦形剤-処置ラットと有意差はないと定義)(図20F)。同じ組み合わせ処置は、生理食塩水-暴露賦形剤-処置ラットと比較して、生理食塩水-暴露ラットで有意な効果がなかった(図20C)。しかしながら、この処置で、薬剤投与直後の36時間の時点で、同じグループの後の作業と比較して(すなわち、84、108、132、および156時間の時点;図20C)、閾値上昇の傾向が誘発される傾向があった。

【0219】

離脱中の反応潜時の分析は、有意な時間×急性処置相互作用を確認した[$F(21, 567) = 4.00$ 、 $p < 0.01$]。急性賦形剤またはp-MPPI処置は反応潜時に影響しなかった。しかしながら、パロキセチンの反応潜時、およびp-MPPI+パロキセチン-処置動物の反応潜時は、最終アンフェタミンまたは生理食塩水注射36時間後の賦形剤またはp-MPPI処置ラットと比較して、有意に遅かった(図21)。

【0220】

アンフェタミン-暴露動物は、最終アンフェタミン注射後、生理食塩水-暴露ラットと

比較して体重の割合が低かった [$F(1, 81) = 427.12$, $p < 0.01$; 図 2 2]。有意な時間×慢性処置×急性処置相互作用 [$F(18, 486) = 1.69$, $p < 0.05$] の分析は、以下のことを確認した。賦形剤で処置した生理食塩水－暴露およびアンフェタミン－暴露ラットは、最終注射後 12 時間と 132 時間の時点の間の有意に増加した体重により証明されるように、慢性薬剤投与の中止後の体重の有意な増加をもたらした(図 2 2 A)。p-MPPI 単独で処置したアンフェタミン－暴露ラットは、賦形剤－処置ラットと同様に体重が増加するように見えた(図 2 2 B)。パロキセチン単独で処置したアンフェタミン－暴露ラットは、離脱中に体重が増加しなかった(図 2 2 C)。もっとも興味深いことに、薬剤組み合わせで処置したアンフェタミン－暴露ラットは、その各々のコントロール(すなわち、p-MPPI + パロキセチンで急性に処置された生理食塩水－暴露ラット)よりも早く体重増加し始めた(図 2 2 D)。

10

【0 2 2 1】

考察

SSRI であるパロキセチンの急性投与は、試験した投与量で報酬閾値または反応潜時に有意な効果はなかった(図 1 7 A および 1 7 B)。しかしながら、報酬閾値のわずかな有意でない上昇が、 1.25 mg/kg を超える投与量の投与に続き見られ、一方パロキセチンは反応潜時と一致した効果はほとんどなかった。SSRI の投与は報酬閾値および反応潜時にわずかに効果があるか (10%) または効果がなかった (Harrison および Markou 2001; Harrison et al. 2001; Lin et al. 1999; Lee および Kornetsky 1998; Katz および Carroll 1977)。SSRI 投与により得られるこの報酬閾値のわずかな上昇は、これらの薬剤の運動能力における非特異的效果と関連し得るか、セロトニン作用性神経伝達の薬理的促進に由来する減少した報酬に関連し得る。

20

【0 2 2 2】

5-HT_{1A} 受容体アンタゴニストである p-MPPI の投与は、単独で投与した場合、脳報酬閾値または反応潜時に影響しなかった。対照的に、p-MPPI + パロキセチン (1.25 mg/kg または 5 mg/kg) (パロキセチンの投与量は単独で投与した場合、閾値に効果がない投与量である) の共投与は、p-MPPI 投与量－関連法で閾値を有意に上昇させた。これらの薬剤組み合わせは反応潜時に効果がなく、オペラント反応を行うに対する動物の能力を変えることではなく、むしろ脳刺激報酬におけるパロキセチンの効果の p-MPPI－誘発増強を示唆する。これらのデータは、p-MPPI による 5-HT_{1A} 受容体拮抗が、単独で投与した場合脳刺激報酬に効果がないが、他の SSRI、フルオキセチンの報酬－減少効果をまだ増強するという先の報告と一致する (Harrison et al. 2001; Harrison および Markou 2001)。5-HT_{1A} 受容体アンタゴニストおよび SSRI の共投与の報酬減少効果は、おそらく、パロキセチンが引き起こした細胞外セロトニン上昇の、p-MPPI－誘発増加のためである (Bel および Artigas 1993; Blier および de Montigny 1994; Hjorth 1993)。p-MPPI が、能刺激報酬におけるパロキセチン (1.25 mg/kg) の効果を増強することを示唆するこれらの結果に基づき、パロキセチンのこの投与量は、単独または p-MPPI (3 mg/kg) と組み合わせ、アンフェタミン離脱－誘発報酬欠損を軽減する試みで投与された。

30

【0 2 2 3】

慢性薬剤処置中、脳刺激報酬閾値を、アンフェタミンまたは生理食塩水の最初の毎日の注射日に測定した (薬剤 2 日目、3 日目および 4 日目; この試験は、前日の最後の注射の 12 時間後に行った)。アンフェタミン－暴露動物の報酬閾値は、薬剤 2 日目、3 日目および 4 日目に、生理食塩水－暴露ラットと比較して有意に上昇した。アンフェタミン－暴露動物の報酬閾値は、処置期間依存方法で増加し、この報酬閾値の測定で、各日のこの時間で、アンフェタミン離脱－誘発報酬欠損の漸増的形成の評価が可能であることを示唆した。しかしながら、これらの報酬欠損の形成の漸増的性質は限定的であった。これは、アンフェタミン投与 2 日後 (薬剤 3 日目) の報酬欠損の大きさが、処置 3 日後 (薬剤 4 日目) と比較して増加していないことにより示唆される (図 1 9 A)。この結果は、種々のアンフェタミン投与レジメの後の報酬閾値上昇の程度の限界に関する先の報告と一致する (Lin et

40

50

al. 1999; Paterson et al. 2000)。慢性アンフェタミン投与は、生理食塩水コントロール動物と比較して反応潜時に影響せず、報償閾値の上昇が、報償における特異的な効果のためであり、オペラント反応を行う動物の能力の変化と関連しないことを示唆した。

【0224】

慢性アンフェタミン投与は、処置期間依存的体重減少をもたらした。体重の進行性の減少が、毎日のアンフェタミン処置後に観察された。比較して、慢性の生理食塩水で処置した動物は、実験のこの相間で体重が増加した(図18C参照)。これらのデータは、アンフェタミンの食欲不振効果の報告と一致する(Caul et al. 1988)。アンフェタミン投与中に観察される体重の減少とは対照的に、慢性ニコチン投与は体重増加を抑制し、期間中体重が増加した生理食塩水－暴露コントロールと比較して、ニコチン投与期間中の体重を変化させない(Harrison et al. 2001)。本発明は、体重減少の原因に取り組んでいないが、アンフェタミン投与が食物消費、代謝速度および脂肪代謝を変えることにより、体重を減少し得ることが報告されている(Caul et al. 1988; Jones et al. 1992)。あるいは、本試験で慢性アンフェタミン投与中に観察される体重の減少は、一日複数回のアンフェタミン注射により増強されると報告されている薬剤誘発常同症のための行動の崩壊によるものであり得る(Segal et al. 1980)。

【0225】

アンフェタミン離脱中、動物は生理食塩水－暴露コントロールラットと同じ割合で体重が増加した(図22A)。これらのデータは、アンフェタミン－離脱および生理食塩水－コントロールラットの体重における同様の増加に関する先の報告と一致する(Mucha et al. 1990)。急性パロキセチン処置は、アンフェタミン離脱7日間の体重増加を防止した。ラットにおいて、1回の高投与量のパロキセチン(120－300 mg/kg)の経口投与が、体重および食物消費の減少をさせるという報告がある(Ryan et al. 2001)。したがって、パロキセチン－処置動物が、アンフェタミン離脱中に体重が増加しないのは、パロキセチン処置によるこの食欲不振効果の結果であり得る。対照的に、パロキセチン＋p-MPPIの共投与は、非離脱動物および賦形剤処置アンフェタミン－離脱動物と比較してアンフェタミン離脱中の早い体重増加をもたらした。これらのデータは、5-HT_{1A}受容体アンタゴニストとパロキセチンの共投与が、アンフェタミン離脱－誘発体重減少の改善を促進し、一方パロキセチン単独の投与は、アンフェタミン離脱中の体重増加を抑制(7日間)または遅延することを示唆する。

【0226】

先の発見の追試で、アンフェタミン離脱は報償欠損をもたらし、生理食塩水－暴露ラットおよび薬剤前基底閾値と比較した脳報償閾値の上昇に反映された(LeithおよびBarrett 1976; KokkinidisおよびZacharko 1980; Harrison et al. 2001; Lin et al. 1999; Paterson et al. 2000)。急性p-MPPIまたはパロキセチン投与は、離脱－誘発報償欠損に一致した効果はないが、パロキセチンはアンフェタミン－および生理食塩水－暴露ラットの両方の反応潜時を増加した。p-MPPI＋パロキセチンの急性急性投与は離脱－誘発報償欠損の期間を48時間まで減少し、アンフェタミン－離脱動物における報償電気刺激の感受性の急速な回復を示唆する。アンフェタミン－離脱誘発報償欠損の急速な軽減と対照的に、同じ組み合わせ薬剤処置が、アンフェタミン－離脱賦形剤－処置ラットと比較して、報償閾値の上昇により示されるように、アンフェタミン－離脱報償欠損を36時間(組み合わせ薬剤処置2時間後)の試験セッション中上昇させた。同様に、この組み合わせ処置は生理食塩水－暴露ラットで36時間の試験中報償閾値のわずかな、かつ一過性の上昇(すなわち、報償の減少)をもたらした。

【0227】

急性パロキセチンおよびp-MPPI＋パロキセチン処置は、アンフェタミン－および生理食塩水－離脱ラットの両方における薬剤処置2時間後の試験セッション中の反応の速度を減少した。パロキセチン－処置動物の場合、この反応の速度の減少はアンフェタミン－離脱または生理食塩水コントロール動物の報償閾値に影響しているようには見えなかった。しかしながら、薬剤組み合わせで処置した生理食塩水－暴露動物のアンフェタミン離

脱一誘発欠損およびの増加および報償閾値の上昇(すなわち減少した報償)は、行動的課題のパフォーマンスにおけるこの薬剤処置の非特異的効果と関連し得る。先の発見が、報償閾値がパフォーマンスマニピュレーションにほとんど影響しない報償の価値があり、信頼できる指標であることを示唆したが(MarkouおよびKoob, 1992)、報償閾値の上昇が反応の速度の減少(すなわち、増加した反応潜時)と関連している場合、これらの結果は、脳報償機能の変化よりむしろ能力の崩壊に関連することが可能である。

【0228】

本発明のデータは、他のSSRIであるフルオキセチンの、同じ実験法における効果と著しく類似している(Harrison et al. 2001; HarrisonおよびMarkou 2001)。両方の場合、SSRIの急性投与が報償閾値のアンフェタミン離脱一誘発上昇を24時間まで減少し、その効果は、5-HT_{1A}受容体アンタゴニストとSSRIの共投与により劇的に増強された。さらに、アンフェタミン離脱中に観察された報償欠損の急激な軽減とは対照的に、いずれかのSSRIおよび5-HT_{1A}受容体アンタゴニストの組み合わせは、コントロール動物の報償電気刺激に対する感受性を減少させた。これらの試験の間の一つの差は、報償欠損の軽減に使用したSSRIの投与量である。単独で投与した場合、5 mg/kgフルオキセチンは報償欠損の期間を減少させたが、2.5 mg/kgフルオキセチンはしなかった。p-MPPIといずれかの投与量のフルオキセチンの共投与は、アンフェタミン離脱中に観察される報償欠損を改善した。本試験において、1.25 mg/kgパロキセチンが5 mg/kgフルオキセチンと同等の結果をもたらした。しかしながら、臨床的实施において、これらの薬剤の類似の投与量が鬱病処置で処方されており、ヒトにおけるこれら2つの薬剤の類似の抗鬱効果を示唆する(Tignol 1993; Nemeroff 1993; DunnerおよびDunbar 1992; Chouinard et al. 1999; Wagstaff et al. 2002)。本データは、アンフェタミン離脱に関連する報償欠損の改善において、パロキセチンがフルオキセチンよりも有効であり得ることを示唆する。これらのデータと、パロキセチンがフルオキセチンよりもより選択的で強力なセロトニン再取り込み阻害剤であるという結果をまとめて(TullochおよびJohnson, 1992)、減少したセロトニン作用性伝達が、精神刺激薬離脱一誘発報償欠損の介在において役割を担うことを示唆する。この仮説は、濫用性物質からの離脱中のセロトニン作用性伝達の減少を示唆するインビボ微小透析データと一致する(Parsons et al. 1995; Weiss et al. 1996)。これらのデータは、精神刺激薬離脱に関連する報償欠損におけるノルアドレナリン作用性伝達の役割を除外しないが、本データは、セロトニン作用性仮説を強く支持するデータを提供する。

【0229】

パロキセチンまたはフルオキセチンと5-HT_{1A}受容体アンタゴニストの共投与に続いて観察される電気刺激に対する感受性の急速な復元は、前頭葉、海馬および線条体のような前脳構造における増加したセロトニン作用性伝達に帰す可能性がある(BelおよびArtigas 1993; Dreshfield et al. 1996; 1997; Invernizzi et al. 1994; GobertおよびMillan 1999)。これらのデータは、ピンドロールと組み合わせた場合のSSRIの臨床的抗鬱活性の急速な発現が(Bordet et al 1998; Tome et al 1997a; 1997b; Zanardi et al 1998; しかしながらBerman et al 1999も参照)、一部ピンドロールの5-HT_{1A}受容体アンタゴニスト特性に帰するという仮説と一致する。しかしながら、5-HT_{1B}およびα-アドレナリン作用性受容体のような他の受容体が、ピンドロールのSSRI抗鬱剤効果の増強にまた関与し得る(導入部参照)。

【0230】

典型的に急性薬剤処置である薬剤処置の組み合わせ後の、コントロールラットにおける報償閾値の短時間の上昇と対照的に、これらの急性処置は、離脱一誘発報償欠損を永久に改善した。この結果は、おそらく、フルオキセチン処置後よりも急性パロキセチン処置後でより驚くべきことである。その活性代謝物ノルフルオキセチンをために長い半減期を有するフルオキセチンと異なり、パロキセチンは約24時間の半減期である(Lemberger et al. 1985; PrakashおよびFoster 1999)。したがって、離脱一誘発報償欠損の改善におけるこれらの急性処置の効果は、離脱一誘発報償欠損の限られた期間と関連し得る。このよ

うに、急性薬剤処置により誘発される経時的に減少するセロトニン作用性神経伝達は、離脱症状が軽減するにつれ、報酬閾値が基底レベルに徐々に回復することと同時に起こり得る。さらに、これらの実験における報酬欠損は、健康対象における薬剤マニプレーション(アンフェタミン離脱)により一過性に誘発された。このように、急性処置は、脳報酬システムの慢性の不均衡に関連する類似の欠損と比較して、健康対象におけるこのような報酬欠損の改善により有効であり得る。

【0231】

SSRIおよび5-HT_{1A}受容体アンタゴニストの共投与後の生理食塩水-暴露コントロールラットにおける報酬閾値の上昇は、抗鬱処置によるセロトニン作用性伝達の上昇が、鬱个体の気分を高め、報酬欠損を軽減するという仮説と矛盾するように見える(本発明のデータ; Harrison et al. 2001; HarrisonおよびMarkou 2001)。この見かけ上の不一致は、本データでもまたアンフェタミン-離脱ラット脳報酬機能の脳報酬機能におけるこのような処置の効果(報酬の上昇)とコントロールラット(報酬の減少)の間でまた観察される。これらのデータは、脳報酬機能における上昇したセロトニン作用性伝達の効果は、処置するときの対象の“快楽”状態に依存することを示唆する(AhmedおよびKood 1998; Koo 10 bおよびLeMoal 1997; Harrison et al. 2001; HarrisonおよびMarkou 2001)。

【0232】

要約すると、本発明のデータは、5-HT_{1A}受容体アンタゴニストとパロキセチンの共投与が、“正常”対象におけるSSRIの脳刺激報酬-減少効果を増強することを示唆する。“正常”対象におけるパロキセチンおよび5-HT_{1A}受容体アンタゴニスト共投与により誘発される報酬-減少効果とは対象的に、同じ薬剤組み合わせが、アンフェタミン離脱中(無快感対象における増加した報酬)に観察される脳刺激報酬欠損を軽減する。パロキセチンでのこれらのデータは、フルオキセチンでの先のデータを、セロトニントランスポーターに高い選択性を有する化学的および薬物動態的に異なる第2のSSRIが、アンフェタミン離脱に関連する報酬欠損を改善することを示唆することにより広げた。このように、これらのデータは、鬱病のモデルとしてのアンフェタミン離脱-誘発報酬閾値の上昇の予測される価値を増強する。さらに、これらのSSRIデータ(本発明のデータ; Harrison et al. 2001)は、セロトニン作用性伝達の減少が、アンフェタミン離脱に見られる“減少した興味または喜び”の症状の根本を成す神経生物学的以上の一つであり得るとの仮説を支持する(American Psychiatric Association 1994; Markou et al. 1998; Harrison et al. 2001)。さらに、減少したセロトニン作用性伝達が、非薬剤誘発鬱病と関連することを示唆する実質的な証拠を考慮して、本データは、薬剤誘発および非薬剤誘発鬱病の両方における神経生物学的類似性を示唆し得る(Markou et al. 1998; MarkouおよびKenny 2002; Barr et al. 2002)。具体的に、減少したセロトニン作用性伝達は、両方のタイプの鬱病の“減少した興味または喜び”の感情的症状の根底に一部ある可能性がある。 20 30

【0233】

実施例4に記載の引用文献

Ahmed S, Koob GF (1998) Transition from moderate to excessive drug intake: Change in hedonic set point. Science 282: 298-300

American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed. American Psychiatric Press, Washington DC 40

Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P (1996) Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. Trends Neurosci 19: 378-383

Assie MB, Koek W (1996) (-)-pindolol and (+)-tertatolol affect rat hippocampal 5-HT levels through mechanisms involving not only 5-HT_{1A} but also 5-HT_{1B} receptors. Neuropharmacology 35: 213-222

Auerbach SB, Hjorth S (1995) Effect of chronic administration of the selective serotonin (5-HT) uptake inhibitor citalopram on extracellular 5-HT and apparent autoreceptor sensitivity in rat forebrain in vivo. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Phar 50

macol 352: 597-606

Barr AM, Markou A, Phillips AG (2002) A "crash" course on psychostimulant withdrawal as a model of depression. *Trends Pharmacol Sci* 23: 475-482

Bel N, Artigas F (1993) Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in the frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse* 15: 243-245

Berman RM, Anand A, Cappiello A, Miller HL, Hu XS, Oren DA, Charney DS (1999) The use of pindolol with fluoxetine in the treatment of major depression: Final results from a double-blind, placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry* 45: 1170-1177

Blier P, de Montigny C (1994) Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* 15: 220-226 10

Blier P, de Montigny C (1999) Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive disorder and panic disorders. *Neuropsychopharmacology* 21(2 Suppl): 91S-98S

Bordet R, Thomas P, Dupuis B (1998) Effect of pindolol on onset of action of paroxetine in the treatment of major depression: Intermediate analysis of a double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry* 155: 1346-1351

Bourin M, Chue P, Guillon Y (2001) Paroxetine: a review. *CNS Drug Rev* 7: 25-47

Bourin M, Redrobe JP, Baker GB (1998) Pindolol does not act only on 5-HT_{1A} receptors in augmenting antidepressant activity in the mouse forced swimming test. *Psychopharmacology* 136: 226-234 20

Caldecott-Hazard S, Morgan DG, DeLeon-Jones M, Overstreet DH, Janowsky D (1991) Clinical and biochemical aspects of depressive disorders: II. Transmitter/receptor theories. *Synapse* 9: 251-301

Caul WF, Jones JR, Barret RJ (1988) Amphetamine's effects on food consumption and body weight: The role of adaptive processes. *Behav Neurosci* 102: 441-450

Chouinard G, Saxena B, Belanger MC, Ravindran A, Bakish D, Beauclair L, Morris P, Vasavan Nair NP, Manchanda R, Reesal R, Remick R, O'Neill MC (1999) A Canadian multicenter, double-blind study of paroxetine and fluoxetine in major depressive disorder. *J Affect Disord* 54: 39-48 30

Clifford EM, Gartside SE, Umbers V, Cowen PJ, Hajos M, Sharp T (1998) Electrophysiological and neurochemical evidence that pindolol has agonist properties at the 5-HT_{1A} autoreceptor in vivo. *Br J Pharmacol* 124: 206-212

Cremers TI, Wiersma LJ, Bosker FJ, den Boer JA, Westerink BH, Wikstrom HV (2000) Is the beneficial antidepressant effect of coadministration of pindolol really due to somatodendritic autoreceptor antagonism? *Biol Psychiatry* 50: 13-21

Dreshfield LJ, Rocco VP, Wong DT (1997) Greater effects of fluoxetine and its combination with (-)-pindolol in elevating hypothalamic serotonin in rats during dark hours. *Chin J Physiol* 40: 57-61

Dreshfield LJ, Wong DT, Perry KW, Engleman EA (1996) Enhancement of fluoxetine-dependent increase of extracellular serotonin (5-HT) levels by (-)-pindolol, an antagonist at 5-HT_{1A} receptors. *Neurochem Res* 21: 557-562 40

Dunner DL, Dunbar GC (1992) Optimal dose regimen for paroxetine. *J Clin Psychiatry* 53(Suppl): 21-26

Epping-Jordan MP, Watkins SS, Koob GF, Markou A (1998) Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature* 393: 76-79

Gobert A, Millan MJ (1999) Modulation of dialysate levels of dopamine, noradrenaline, and serotonin (5-HT) in the frontal cortex of freely-moving rats by (-)-pindolol alone and in association with 5-HT reuptake inhibitors: Comparative roles of β -adrenergic, 5-HT_{1A}, and 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology* 21: 268 50

-284

- Harrison AA, Liem YT, Markou A (2001) Fluoxetine combined with a serotonin-1A receptor antagonist reversed reward deficits observed during nicotine and amphetamine withdrawal in rats. *Neuropsychopharmacology* 25: 55-71
- Harrison AA, Markou A (2001) Serotonergic manipulations both potentiate and reduce brain stimulation reward in rats: Involvement of serotonin-1A receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 316-325
- Hinkle DE, Weirsmas W, Jurs SG (1998) Applied statistics for the behavioral sciences. Houghton Mifflin Co., Boston, pp 405-410
- Hjorth S (1993) Serotonin 5-HT_{1A} autoreceptor blockade potentiates the ability of the 5-HT reuptake inhibitor citalopram to increase nerve terminal output of 5-HT in vivo: A microdialysis study. *J Neurochem* 60: 776-779
- Invernizzi R, Bramante M, Samanin R (1994) Chronic treatment with citalopram facilitates the effect of a challenge dose on cortical serotonin output: Role of presynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Pharmacol* 260: 243-246
- Jones JR, Caul WF, Hill JO (1992) The effects of amphetamine on body weight and energy expenditure. *Physiol Behav* 51: 607-611
- Katz RJ, Carroll BJ (1977) Intracranial reward after Lilly 110140 (fluoxetine HCL): evidence for an inhibitory role for serotonin. *Psychopharmacology* 51: 189-193
- Kokkinidis L, Zacharko RM (1980) Response sensitization and depression following long-term amphetamine treatment in a self-stimulation paradigm. *Psychopharmacology* 68: 73-76
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278: 52-58
- Kornetsky C, Esposito RU (1979) Euphorogenic drugs: Effects on the reward pathways of the brain. *Federation Proc* 38: 2473-2476
- Kreiss DS, Lucki I (1995) Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 866-876
- Kung HF, Kung M-P, Clarke W, Maayani S, Zhuang Z-P (1994) A potential 5-HT_{1A} receptor antagonist: p-MPPI. *Life Sci* 55: 1459-1462
- Lee K, Kornetsky C (1998) Acute and chronic fluoxetine treatment decreases the sensitivity of rats to rewarding brain stimulation. *Pharmacol Biochem Behav* 60: 539-544
- Leith NJ, Barrett RJ (1976) Amphetamine and the reward system: Evidence for tolerance and post-drug depression. *Psychopharmacologia* 46: 19-25
- Lemberger L, Bergstrom RF, Wolen RL, Farid NA, Enas GG, Aronoff GR (1985) Fluoxetine: Clinical pharmacology and physiologic disposition. *J Clin Psychiatry* 46: 14-19
- Lin D, Koob GF, Markou A (1999) Differential effects of withdrawal from chronic amphetamine or fluoxetine administration on brain stimulation reward in the rat: Interactions between the two drugs. *Psychopharmacology* 145: 283-294
- Markou A, Kenny PJ (2002) Neuroadaptations to chronic exposure to drugs of abuse: relevance to depressive symptomatology seen across psychiatric diagnostic categories. *Neurotox Res* 4: 297-313
- Markou A, Koob GF (1991) Postcocaine anhedonia: An animal model of cocaine withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 4: 17-26
- Markou A, Koob GF (1992) Construct validity of a self-stimulation threshold paradigm: Effects of reward and performance manipulations. *Physiol Behav* 51: 111-119

- Markou A, Kosten TR, Koob GF (1998) Neurobiological similarities in depression and drug dependence: A self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 18: 135-174
- McAskill R, Mir S, Taylor D (1998) Pindolol augmentation of antidepressant therapy. *Br J Psychiatry* 173: 203-208
- Mucha RF, Walker MJK, Fassos FF (1990) Parker and Radow test of drug withdrawal aversion: Opposite effect in rats chronically infused with sufentanil or amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 35: 219-224
- Nemeroff CB (1993) Paroxetine: An overview of the efficacy and safety of a new selective serotonin reuptake inhibitor in the treatment of depression. *J Clin Psychopharmacol* 13: 10S-17S 10
- Parsons LH, Koob GF, Weiss F (1995) Serotonin dysfunction in the nucleus accumbens of rats during withdrawal after unlimited access to intravenous cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 1182-1191
- Paterson NE, Myers C, Markou A (2000) Effects of repeated withdrawal from continuous amphetamine administration on brain reward function in rats. *Psychopharmacology* 152: 440-446
- Pauwels PJ, Palmier C (1994) Differential functional activity of 5-hydroxytryptamine receptor ligands and beta adrenergic receptor antagonists at 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor sites in Chinese hamster lung fibroblasts and opossum renal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 938-945 20
- Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ (1979) A stereotaxic atlas of the rat brain, 2nd ed. Plenum Press, New York.
- Prakash A, Foster RH (1999) Paroxetine: a review of its use in social anxiety disorder. *CNS Drugs* 12: 151-169
- Rickels K, Amsterdam J, Clary C, Fox I, Schweizer E, Weise C (1989) A placebo-controlled, double-blind, clinical trial of paroxetine in depressed outpatients. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 350: 117-123
- Romero L, Bel N, Artigas F, de Montigny C, Blier P (1996) Effect of pindolol on the function of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors: In vivo microdialysis and electrophysiological studies in the rat brain. *Neuropsychopharmacology* 15: 349-360 30
- Ryan PM, Kelly JP, Chambers PL, Leonard BE (2001) The toxicity profile of a single dose of paroxetine: An alternative approach to acute toxicity testing in the rat. *Pharmacol Toxicol* 88: 59
- Schultheis G, Markou A, Gold LH, Stinus L, Koob GF (1994) Relative sensitivity to naloxone of multiple indices of opiate withdrawal: A quantitative dose-response analysis. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 1391-1398
- Schultheis G, Markou A, Cole M, Koob GF (1995) Decreased brain reward produced by ethanol withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5880-5884 40
- Segal DS, Weinberger SB, Cahill J, McCunney SJ (1980) Multiple daily amphetamine administration: Behavioral and neurochemical alterations. *Science* 207: 905-907
- Spielewoy C, Markou A (2003) Withdrawal from chronic phencyclidine treatment induces long-lasting depression in brain reward function. *Neuropsychopharmacology* 28: 1106-1116
- Tignol J (1993) A double-blind, randomized, fluoxetine-controlled, multicenter study of paroxetine in the treatment of depression. *J Clin Psychopharmacol* 13(6 Suppl. 2): 18S-22S
- Tome MB, Cloninger CR, Watson JP, Isaac MT (1997a) Serotonergic autoreceptor blockade in the reduction of antidepressant latency: Personality variables and response 50

- onse to paroxetine and pindolol. J Affect Disord 44: 101-109
- Tome MB, Isaac MT, Harte R, Holland C (1997b) Paroxetine and pindolol: A randomized trial of serotonergic autoreceptor blockade in the reduction of antidepressant latency. Int Clin Psychopharmacol 12: 81-89
- Tulloch IF, Johnson AM (1992) The pharmacologic profile of paroxetine, a new selective serotonin reuptake inhibitor. J Clin Psychiatry 53(Suppl 2): 7-12
- Wagstaff AJ, Cheer SM, Matheson AJ, Ormrod D, Goa KL (2002) Spotlight on paroxetine in psychiatric disorders in adults. CNS Drugs 16: 425-434
- Weiss F, Parsons LH, Schulteis G, Hyytia P, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF (1996) Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. J Neurosci 16: 3474-3485
- Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA (1995) Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: Twenty years since its first publication. Life Sci 57: 411-441
- Zanardi R, Franchini L, Gasperini M, Lucca A, Smeraldi E, Perez J (1998) Faster onset of action of fluvoxamine in combination with pindolol in the treatment of delusional depression: A controlled study. J Clin Psychopharmacol 18: 441-446

【0234】

実施例5

ブプロピオンはラットのニコチン離脱における脳報酬機能を促進し、感情的および身体的側面を改善する

この実施例は、抗鬱剤ブプロピオンが、ラットのニコチン離脱における脳報酬機能を促進し、感情的および身体的側面を改善することを説明する。

【0235】

原理：ブプロピオンは非定型抗鬱剤であり、禁煙のために承認されている唯一の非ニコチンベースの治療である。その使用は、非ニコチンベースの薬剤がどのように禁煙を助けることができるかの多くの討論を起こしている。

【0236】

目的：我々は、ラットにおける基底状態下の脳報酬機能および続く慢性ニコチン投与からの離脱におけるブプロピオンの効果を評価した。方法：基底条件下および続く慢性ニコチンからの続く離脱(3.16 mg/kg/日、7日間、浸透性ミニポンプを介して)のラットにおける報酬の指標である電流強度閾値を提供する、個別試験脳内自己刺激パラダイム法を使用した。身体的兆候は、ニコチンから離脱している動物におけるニコチン禁断兆候のチェックリストに基づいて記録した。結果：ブプロピオン(10-60 mg/kg)は投与量依存的に非離脱対象における報酬閾値を低下し、報酬の増加を示唆する。興味深いことに、ブプロピオンの有効量以下の用量(5 mg/kg)が、急性ニコチン(0.25 mg/kg)の閾値低下効果を完全に遮断した。慢性ニコチンから離脱している動物は、離脱の身体的兆候と上昇した脳報酬閾値を示し、これは報酬刺激における“減少した興味または喜び”(すなわち無快感)の指標である。ブプロピオン(10-40 mg/kg)は、報酬欠損および身体的兆候の両方を改善させ、最高投与量(40 mg/kg)では、閾値上昇の長期の改善を誘発した。

【0237】

結論：ブプロピオンは離脱の身体的兆候の発現の減少に加えて、様々なレベルでニコチンにより影響を受けた脳報酬回路に作用する。第一に、ブプロピオンは、他の抗鬱剤と異なり、非離脱対象の基底条件下の脳報酬機能を上昇させる。第二に、低投与量で、ブプロピオンはニコチンの報酬効果を遮断する。第三に、ブプロピオンは、ニコチン離脱の負の感情的側面を改善する。このような作用は、ブプロピオンの抗喫煙特性の介在と協調して作用するようである。

【0238】

導入

タバコの喫煙は世界中の主要な社会的健康問題である。タバコに関連した死亡の概算は、先進国の全死亡の20%の割合を占める(Peto et al. 1992)。蓄積された証拠が、ニコチンが、ニコチンがタバコ嗜癖に導き、それを維持するタバコの煙中の活性成分の一つであることを示す(StolermanおよびJarvis 1995)。40%もの多くの喫煙者が毎年禁煙を試みている事実にもかかわらず、禁煙の持続に成功しているのはわずか約6%である(Jorenby et al. 1999)。したがって、ニコチン嗜癖および現在禁煙プログラムに使用されている治療の根底をなす神経生物学的機構を理解するために非常に大きな励みとなる。

【0239】

二つのタイプの薬学的治療が、米国の食品医薬品局により禁煙のために認可されている(Hughes et al. 1999; GloverおよびGlover 2001)。第一は、喫煙者がタバコからのニコチンを、チューインガム、経皮パッチまたは吸入のような他のより安全なニコチン製剤に置き換えることを可能にする、ニコチン代替治療である(Hughes et al. 1999)。非ニコチンベースの第二の治療は、非定型抗鬱剤ブプロピオンである(Hurt et al. 1997; Jorenby et al. 1999; Hays et al. 2001; Tashkin et al. 2001; Ahluwalia et al. 2002; George et al. 2002)。ニコチン代替治療の使用の根本原理は直感的であるが、なぜブプロピオンがこの適用で有効であるかは不透明なままである。ブプロピオンの利用性は、最初に。喫煙を減少した投薬中の鬱病患者での臨床的観察により、思いがけなく認識された(Balfor et al. 2001)。ブプロピオンの効果の可能性のある原理は、負の感情と喫煙の傾向および禁煙の困難さの強い関係を示す多くの臨床試験から提案される(Breslau et al. 1992; 1998; Lipkus et al. 1994; Laje et al. 2001)。実際、喫煙者の間で、ニコチン依存の症状は感情的鬱の総合的症状の大きさと相関している(Anda et al. 1990; Glassman et al. 1990)。しかしながら、近年の試験は、ブプロピオンが大鬱病の病歴と無関係に等しく有効であることを証明し、この治療効果はその抗鬱特性と無関係であるか、またはそれだけに止まらないことを示唆する(Hayford et al. 1999)。さらに、禁煙におけるブプロピオンの効果を評価した最初の試験は、鬱病の患者を除外した(例えば、Jorenby et al. 1999)。さらに、三環式ノルトリプチリン(nortriptyline)は除外される可能性があるが、選択的セロトニン再取り込み阻害剤を含む他の抗鬱剤は、非鬱喫煙者の禁煙率にむしろ影響しないことが示されている(Kotlyar et al. 2001参照)。したがって、ブプロピオン投与の独特な神経化学的および行動的結果が、その抗喫煙効果を生ずる抗鬱効果以外に存在し得る。

【0240】

濫用性物質からの離脱に関連する報償欠損は、構造的、収束的、そして予測的価値を有する物質離脱誘発または非薬剤誘発鬱病の両方の特徴である“減少した興味または喜び”の症状を測定するための動物モデルとして使用できる(GeyerおよびMarkou 1995; Barr et al. 2002; Cryan et al. 2002; 2003)。脳内自己刺激(ICSS)の使用は、物質投与の中止(すなわち、物質離脱)後の脳報償におけるこのような変化を評価する信頼できる行動的読み出しを研究者に提供している(LeithおよびBarrett 1976; MarkouおよびKoob 1991; Epping Jordan et al. 1998; Cryan et al. 2002; SpielowoyおよびMarkou 2002)。このパラダイムを使用して、我々は、以前、慢性ニコチンからの離脱が、脳報償閾値の上昇により反映されるような、脳報償機能の劇的な減少を誘発することを示した(Epping-Jordan et al. 1998; Harrison et al. 2001a; SemenovaおよびMarkou 2003)。この閾値上昇は、ニコチン離脱症候群の感情的側面の数個の操作的測定の一つである(KennyおよびMarkou 2001)。感情的症状に加えて、ヒトにおけるニコチン離脱はまた徐脈、不眠、胃腸不快感および食欲亢進などの身体的症状により特徴付けられる(Hughes et al. 1991)。これらの症状は、離脱動物における視覚的評価に基づいて分析できる(Malin et al. 1992; Malin 2001)。中枢機構を介して介在される脳刺激報償閾値の上昇の神経解剖学的部位と、中枢および末梢の両方が介在するように見える身体的離脱兆候の部位の間の明確な分離が近年証明された(Hildebrand et al. 1999; Watkins et al. 2000)。感情的兆候は、ニコチン使用に逆戻りし、継続することに関与する大きな動機的意義であると仮定されている(Markou et al. 1998)。さらに、ニコチン離脱の身体的兆候も喫煙行動に関与し得る。このよ

うに、ニコチン離脱の感情的および身体的側面の動物モデルは、ニコチン依存の神経生理学的基本の理解と、ニコチン禁断を促進する有効な処置戦略の開発に重要なツールである(KennyおよびMarkou 2001; Malin 2001)。本試験は、基底条件下のおよび続く慢性ニコチンからの離脱下の脳報酬機能におけるブプロピオンの効果を試験する。加えて、離脱の身体的兆候におけるブプロピオンの効果も評価する。

【0241】

材料および方法

動物

到着時に275-350 gの雄Wistarラット(Charles River, Raleigh-Durham, N.C., USA)を、試験中以外、温度および湿度制御飼育器(21°C)中、2匹ずつ飼育し、食物と水は自由に摂取させた。ラットを、1800時に点灯する12時間逆明/暗サイクルに維持した。すべての実験法は暗サイクル中に行い、The Scripps Research Instituteの動物実験委員会にしたがった。動物は少なくとも少なくとも任意の方法の開始1週間前に新しい環境に慣れさせ、その間少なくとも2回手に取った。

【0242】

ICSS装置

すべての訓練および試験は、別々に大きな音響減衰箱(San Diego Instruments, San Diego, Calif., USA)に入れた16個のPlexiglas試験チャンバーで行った(25×31×24 cm; Med Associates, Georgia, Vt., USA)。各オペラントチャンバーの側壁の中心には金属ホイールマニュプランダム(幅5 cm)があり、4分の1回転するのに0.2 N力が必要であった。脳刺激を、一定電流刺激を使用して送達した(Stimtech model 1200; San Diego Instruments)。対象を、チャンバー上にマウントされた金接触スイベルコンピューター(モデルSL2C; Plastics One)に接続した双極性鉛を介して刺激回路に接続した(Plastics One, Roanoke, Va., USA)。刺激パラメーター、データ収集およびすべての試験セッション関数は、マイクロコンピューターで制御した。

【0243】

手術

ICSS電極埋め込み

対象が最低325 gの体重に到達したとき、11 mmの長さに切った直径0.25 mmのステンレススチール双極性電極(モデルMS303/2; Plastics One)を、後側部348視床下部のレベルで、中央前脳束(medial forebrain bundle)にインプラントした。この領域の短い電気刺激は、ラットが電氣的刺激を得るために、オペラントを実行する(ホイールを回す)という事実により示されるように、強化系である(MarkouおよびKoob 1992)。個別試験ICSS法を、報酬の指標である電流強度閾値を提供するために使用した(MarkouおよびKoob 1992)。多くの濫用性物質が、ICSS閾値の減少により示されるように脳報酬機能を上昇させるが、濫用性物質からの離脱は、閾値の上昇により示されるように脳報酬を減少させる。

【0244】

対象をイソフルラン/酸素蒸気混合物(1-3%イソフルラン)で麻酔し、耳内線の5 mm上に門歯バーを伴う定位フレームに固定した(David Kopf Instruments, Tujunga, Calif., USA)。電極を、以下の座標にしたがってインプラントした：APブレグマから-0.5 mm；ML ±1.7 mm；およびDV硬膜から-8.3 mm。対象の半分は能の右側に電極を、半分は左側に電極を入れ、可能性のある脳非対称性を相殺した。歯科用アクリル酸(Teetsメチルメタクリル酸義歯材料；CoOral-Lite Mfg. Co., Diamond Springs, Calif., USA)で、頭蓋骨に埋め込まれた4つのステンレススチールねじに電極を固定した。手術の傷を生理食塩水に溶解した13.3 mg/ml硫酸ゲンタマイシンの溶液で洗い流し、シルク糸で閉じ、ポビドン-ヨウ素殺菌軟膏で覆った。手術後、行動訓練前に動物を少なくとも7日間回復させた。

【0245】

浸透性ポンプ埋め込みおよび除去

10

20

30

40

50

対象をイソフルラン／酸素蒸気混合物(1－3%イソフルラン)で麻酔し、皮下浸透性ミニポンプ[Alzetモデル2ML1(7日); Alza Corporation, Palo Alto, Calif., USA]を背面に、背骨と平行に、後ろを向いた流量計と共に準備した。ポンプに生理食塩水またはニコチン溶液のいずれかを満たした。後者の濃度は、動物の体重とポンプの速度にしたがって調節し、 3.16 mg/kg/day (9 mg/kg/day ニコチン水素酒石酸塩)の投与量が送達されるようにした。傷をステンレススチール創傷クリップで閉じ、ポビドン－ヨウ素殺菌軟膏で覆った。ポンプを7日後にイソフルラン麻酔下で外科的に除去し、傷を再びクリップし、殺菌軟膏で処置した。

【0246】

脳刺激報酬閾値法(ICSS)

10

対象を、最初に強化系の定率1(FR1)スケジュールでホイールマニユプランダムを回すように訓練した。各4分の1回転について、対象は500ms訓練で、100Hzの周波数で送達される0.1ms方形カソードパルスを受けた。割り当てられた時間内(通常<20分)で200回連続強化系と定義される、反応の十分な獲得後、対象に、MarkouおよびKoob(1992)により先に記載されたような、KornetskyおよびEsposito個別訓練電流閾値法(KornetskyおよびEsposito 1979)の変法で試験した。

【0247】

訓練を電気刺激で開始し、その後に7.5秒反応窓が続き、その間に動物は最初の非偶発刺激と同じ第2の偶発刺激を受けるための反応をすることができる。この7.5秒窓中の反応は陽性反応とみなし、一方反応の欠失は陰性反応とみなした。陽性反応直後の2秒間のさらなる反応は結果をもたらさなかった。陽性反応後または反応窓の終了(陰性反応の場合)のいずれかに続く訓練内インターバル(ITI)は、7.5から12.5秒であり、平均10秒の期間であった。ITI間に起きた反応は、続く訓練の開始前にさらに12.5秒の遅れをもたらした。個別試験法における訓練中、ITIの期間およびタイムアウト反応遅延は、動物が固定した刺激強度で一定に行動するまで徐々に増加した。対象を、次いで、電流閾値法で試験し、ここで、刺激強度は5mAのステップサイズで、4つの下降および上昇シリーズの間変化した。3つの試験の遮断が、各電流段階で、予備訓練の最後に計算した対象個々の基底閾値から30－40mA上で、最初の下降シリーズセットを提供した。下降シリーズは、3訓練のうち少なくとも2つで陽性反応に失敗した2連続ブロックの訓練の後、または15連続減少が存在した後に終了した。上昇シリーズは、3訓練のうち少なくとも2つで陽性反応した2連続ブロックの訓練の後、または15連続漸増が存在した後に終了した。4つの交互のシリーズからの4つの電流閾値の平均を、このセッションにおける対象のICSS閾値として定義した。シリーズを15刺激増加(または減少)が起きた後、またはシリーズの閾値の決定後(下記参照)に終了した。各試験セッションは典型的に30分で終了した。

20

30

【0248】

閾値

各下降シリーズの電流閾値を、動物が3試験中2またはそれ以上で陽性応答をしなかった2連続セットの、正常終了した試験のシリーズ(3試験中2つまたはそれ以上の陽性応答)と試験の最初のセットの刺激強度の間の刺激強度と定義した。上昇シリーズ中、電流閾値を、動物が3試験中2またはそれ以上で陽性応答した2連続セットの、不成功に終了した試験のシリーズ(3試験中2つまたはそれ以上の陰性応答)と試験の最初のセットの刺激強度の間の刺激強度と定義した。このように、各試験セッション中、4つの閾値を測定し、これらの値の平均を各対象の閾値として取った。上記脳刺激報酬法における訓練後、ラットに、安定な基底閾値が達成されるまで試験した(5日の期間にわたり $\pm 10\%$)。薬剤試験は、能力が安定した後にのみ開始し、これは通常基底試験の2－3週間後であった。基底閾値への回復が、薬剤注射の間に必要であった。

40

【0249】

離脱症候群の身体的兆候の評価

ラットを、個々に透明なプラスチックの円筒状容器(30×38cm)に入れ、その中では

50

自由に動けた。最初の試験セッションの前に対象を容器に、毎日10分、3日間にわたり慣れさせた。試験セッション中、ラットを10分、盲検的に経験を有する観察者が観察し、以下の兆候の頻度を、ニコチン禁断兆候のチェックリストに基づいて記録した(Hildebrand et al. 1999; Watkins et al. 2000; Malin 2001): 体の震え、咀嚼、頬の振戦、脱走の試み、瞬き、足を嘗めること、あえぎ、生殖器を嘗めること、首振り、眼瞼下垂、ひっかくこと、歯をガタガタ鳴らす、身もだえおよびあくび。任意の兆候の複数回の連続計数は、事象の間の明確な休止を必要とした。眼瞼下垂が連続して起こった場合、1分あたり1回のみ計数した。統計的分析のために、身体的兆候の合計数を、上記の離脱兆候の個々の発症の合計として定義した。さらに、“腹部収縮”は、あえぎと身もだえを含んだ; “顔面繊維束収縮”は、頬振戦、咀嚼、および歯をガタガタ鳴らすことを含んだ; そして“雑多な他の兆候”は、ふるえ、脱走の試み、嘗めること、ひっかくこと、およびあくびを含んだ。 10

【0250】

薬剤

(一)ーニコチン水素酒石酸塩(Sigma, St Louis, Mo., USA)を滅菌生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム)に溶解した。ブプロピオン塩酸塩はGlaxo-SmithKline, Research Triangle Park, N.C., USAから提供され、滅菌蒸留水に溶解した。ニコチン投与量は遊離塩基として示し、ブプロピオン投与量は塩として示す。すべての注射は、1 ml/kgの用量で投与した。

【0251】

実験1: 基底条件下のICSS報酬閾値における急性ブプロピオン処置の効果 20

ブプロピオン(0、10、20、30 mg/kg、IP、n=8)を、対象内ラテン方陣設計にしたがい投与し(30分前処置)、最小3日を連続薬剤処置の間に開けた。基底値に戻った後、すべての動物にブプロピオン(40 mg/kg、IP)を注射し、その後少なくとも3日後に60 mg/kgブプロピオンIPをさらに注射した。このふたつの最高ブプロピオン投与量を、高ブプロピオン投与量の可能性のある長期効果を避けるために最後に投与した。それにもかかわらず、このような効果は観察されなかった。本試験で使用した投与量は、ヒトにおいて推奨される一日量より高いが(300 mg/day)[Zyban(ブプロピオン塩酸塩)徐放性製剤2002におけるGlaxoSmithKline製品情報参照、us.gsk.com/products/assets/us_zyban.pdfでインターネットから入手可能]、このような比較は、異なる種での薬剤の薬物動態および代謝の差から、このような比較はせいぜい概略である。使用したブプロピオンの濃度が、齧歯類で強い抗鬱様行動を生む範囲であり(例えばCryan et al. 2001)、細胞外ドーパミンおよびノルエピネフリンの視床下部濃度を上昇させる濃度範囲である(Li et al. 2002)ことは注意すべきである。 30

【0252】

実験2: ICSS閾値の急性ニコチン誘発低下における急性ブプロピオンの効果

別々の薬剤投与していない動物のグループに、対象内ラテン方陣設計にしたがい、ニコチン(0、0.25 mg/kg、SC; 15分前処置)と共にブプロピオン(0、5、10、20 mg/kg、IP、n=10)を投与し(30分前処置)、連続薬剤処置の間に最小3日開けた。ニコチンの投与量は、この投与量で急性ニコチンの最大報酬効果を示す(Harrison et al. 2002)ことが示された我々の研究室での先の用量反応試験から選択し、ブプロピオンの投与量は上記の実験1の結果に基づいて選択した。 40

【0253】

実験3: 慢性ニコチンまたは生理食塩水投与の離脱に続くICSS報酬閾値における急性ブプロピオン処置の効果

薬剤非投与動物を、個々のニコチン溶液(3.16 mg/kg/日、遊離塩基)または生理食塩水を含む浸透性ミニポンプで準備した。ニコチンの投与量は、先の広範な用量反応試験に基づいて選択し、そこで、この投与量への7日間の暴露は、ICSS(脳報酬閾値の上昇)および離脱の身体的兆候(Epping-Jordan et al. 1998; Harrison et al. 2001a; Malin 2001)の両方で評価して、強固で再現性のある離脱症候群をもたらすことが示された。 50

この投与量は、毎日30本のタバコを消費する喫煙者で報告されている(40–42 ng/ml)のと同等の安定な血漿ニコチンレベル(44 ng/ml)を維持する(Epping-Jordan et al. 1998)。ミニポンプのインプラント後、閾値をその後毎日評価し、報酬閾値における慢性ニコチンの影響を評価した。ポンプ挿入後7日間(正確に7回の24時間の期間)ポンプをニコチン離脱症候群を起こすために除去した。ICSS閾値をポンプ除去後12、18、24、36、48および72時間に測定した。動物にブプロピオン(0、10、20、40 mg/kg IP; n = 8–11)を18時間の時点の30分前に注射した。この時点は、最大離脱–誘発欠損(脳報酬閾値の上昇)が先の実験で観察された時点であるため、選択した(Epping-Jordan et al. 1998; Harrison et al. 2001a; SemenovaおよびMarkou 2003)。

10

【0254】

実験4：慢性ニコチン投与からの離脱に続く身体的兆候における急性ブプロピオン処置の効果

別々の薬剤非投与ラットを、生理食塩水に溶解したニコチン(3.16 mg/kg/日、7日間)を含む浸透性ミニポンプで準備した。上記のように、ニコチンのこの投与量は、広範な用量–反応試験に基づき選択し、かつ、ラットにおいて強固な離脱症候群をもたらすものである(Malin et al. 1992; Epping-Jordan et al. 1998; Harrison et al. 2001a; Malin 2001; SkjeiおよびMarkou 2003)。さらに、このニコチン投与量は、ブプロピオンのニコチン離脱中に観察される身体的兆候(本実験4)と報酬閾値上昇(上記実験3)における効果の直接の比較を可能にするために選択した。ニコチン離脱の身体的兆候を誘発するために、ミニポンプをインプラント後6日と18時間後に除去した。行動観察を、ミニポンプの除去6、12および24時間後に行った。ラットにブプロピオン(0、5、10、20、40 mg/kg、IP; n = 6–8)を12時間の時点の30分前に注射した。この時点の選択は、ニコチン暴露の終了後の身体的兆候発現の経時変化に基づいた(Epping-Jordan et al. 1998; Harrison et al. 2001a; SemenovaおよびMarkou 2003; SkjeiおよびMarkou 2003)。

20

【0255】

データ分析および統計

閾値データを、各薬剤マニュプレーションまたはミニポンプのインプラントの前3から5日の基底値の割合として示した。パーセント値は、個々のラットの生の電流強度閾値値が、電極配置および他のほとんど理解されていない個々の対象の因子によるわずかな変化のため、変動するために、閾値データの統計分析に使用した。我々の研究室での広範な先の試験は、この明細書に記載された通りの対象内設計を使用し、任意のマニュプレーションの実施前の安定な基底閾値のパーセントとしての閾値データの表現が、脳報酬機能の変化の評価のために、信頼でき、価値のある方法であることを示唆している(MarkouおよびKoob 1992参照)。すべてのデータを、適当な対象内、および混合設計ANOVAを使用して分析した。統計的有意な効果は、フィッシャーの個々の比較検定で適当な場合、続いた。有意のレベルを $P < 0.05$ と設定した。

30

【0256】

結果

実験1：基底条件下のICSS報酬閾値における急性ブプロピオン処置の効果

急性ブプロピオン処置は、脳報酬閾値に明白な低下を誘発し[$F(5, 35) = 7.445$ 、 $P < 0.001$]、これは、脳報酬機能の増加の指標であった(図23)。Post-hoc分析は、ブプロピオンが、試験したすべての投与量で、および40 mg/kgまで投与量依存的方法で(40 mg/kgは、10 mg/kgブプロピオン–処置動物と有意に異なる)、脳報酬閾値を賦形剤条件と比較して低下させることを示した。生の平均3日の基底閾値は、128.19–143.63 mAの範囲であった。

40

【0257】

実験2：ICSS閾値の急性ニコチン誘発低下における急性ブプロピオンの効果

実験1と同様に、ブプロピオン(5 mg/kgではなく、10および20 mg/kg)は、生理食

50

塩水で共処置した動物における脳報酬閾値を低下させた[$F(3, 54) = 7.822$ 、 $P < 0.001$](図24)。同様に、ニコチン処置は、脳報酬閾値の低下をもたらした[$F(1, 18) = 11.550$ 、 $P < 0.003$]、これは先の発見と一致した(Harrison et al. 2002; SkjeiおよびMarkou 2003)。ANOVAは、ニコチンおよびブプロピオンの因子の間の有意な相互作用の強い傾向を示した[$F(3, 54) = 2.405$ 、 $P = 0.077$]。計画した比較は、それ自体では効果のない投与量(5 mg/kg)のブプロピオンが、急性ニコチンの報酬促進効果を完全に改善したことを示唆した。しかしながら、高ブプロピオン投与量(10および20 mg/kg)とニコチンとの組み合わせが、ニコチン投与単独により誘発されるのと有意には異ならない閾値低下をもたらした。生の平均3日基底閾値は、111–133.26 mAの範囲であった。

10

【0258】

実験3：慢性ニコチンまたは生理食塩水投与の離脱に続くICSS報酬閾値における急性ブプロピオン処置の効果

ニコチンのミニポンプを介した投与は、小さいが、有意な脳報酬閾値の減少をもたらした[$F(1, 74) = 5.75$ 、 $P < 0.05$]、最大効果は投与3日目に見られた。しかしながら、閾値は、7日目のポンプ除去時には基底レベル($P > 0.8$)に戻り、生理食塩水一処置動物のものと異ならなかった($P > 0.1$)。この結果のパターンは、ニコチンの緩和な閾値低下効果に耐性ができることを示唆した(図25参照)。ポンプのインプラント前の生の平均5日の基底値は生理食塩水一処置動物で119.75 mAであり、ニコチン含有ミニポンプで準備した動物では120.08 mAであった。

20

【0259】

ニコチン離脱の脳報酬閾値における効果を評価するため、ミニポンプの除去後の閾値を、ミニポンプのインプラント前の基底条件下で評価した5日基底閾値の割合として示した。このように、離脱期間に関して報告されたこれらの割合の変化は、基底脳報酬閾値からの変化を反映し、閾値がニコチンの影響下で変わっている可能性がある場合、ニコチン暴露中の閾値からの変化ではない。それにもかかわらず、上記のように、ニコチン一処置ラットの閾値は、ニコチンへの7日の暴露で基底閾値レベルに戻った。予測されるように、慢性ニコチン投与からの離脱は脳報酬閾値を、生理食塩水一前処置動物動物の閾値と比較して有意に上昇させた[$F(1, 68) = 22.219$ 、 $P < 0.001$]。加えて、ANOVAは、閾値の経時的な有意な変化が存在することを示した[$F(5, 340) = 23.047$ 、 $P < 0.001$]。さらに、前処置(ニコチンまたは賦形剤)と時間の因子の間[$F(5, 340) = 5.731$ 、 $P < 0.001$]、および処置(ブプロピオンまたは賦形剤)と時間の因子の間[$F(15, 340) = 13.568$ 、 $P < 0.001$]に有意な相互作用があった。

30

【0260】

計画した比較は、ニコチン離脱が、離脱後36時間までの試験したすべての時点で、生理食塩水注射動物における報酬閾値の有意な上昇をもたらすことを示した。48時間および72時間の時点で、離脱一誘発欠損は正常化した。ブプロピオン(離脱後17.5時間)投与30分後、動物がニコチンで前処置されているかされていないかに関わらず、すべての投与量で報酬閾値の有意な、用量依存的低下があった。さらに、ブプロピオン(40 mg/kg)の注射後、生理食塩水で前処置された動物とニコチンで前処置された動物の間にもはや有意差は存在しなかった。さらに、生理食塩水前処置動物において、閾値のこの低下は一時的であり、すべての動物で次の試験時点(24時間)には完全に戻っており、これは実験1の結果と類似した。興味深いことに、しかしながら、ニコチンで前処置し、40 mg/kgブプロピオンを注射された動物は、生理食塩水を注射されたニコチン前処置動物と比較して、報酬閾値の有意な($P < 0.001$)減少をまだ示した(図26A参照)。

40

【0261】

閾値データの曲線下面積の分析(全72時間の離脱期間にわたる)は、ニコチン前処置の有意な効果を証明した[$F(1, 68) = 13.705$ 、 $P < 0.001$]。薬剤(ブプロピオン)処置、または薬剤×ポンプ相互作用の全体的に統計的に有意な効果はなかった。計画した比較は、ニコチンで前処置した動物が、生理食塩水で前処置した対応する動物と比較し

50

て高い曲線下面積閾値レベルを有することを示唆した。この上昇は、試験した最高投与量のブプロピオン(40 mg/kg)で完全に改善した(図26B参照)。生の平均5日基底閾値は、108.69-131.83 mAの範囲であった。

【0262】

実験4：慢性ニコチン投与からの離脱に続く身体的兆候における急性ブプロピオン処置の効果

ニコチン含有ミニポンプの除去6時間後かつ任意の薬剤マニュレーション前に、禁断の総身体的兆候の量の有意な増加があった。これらの兆候はまた、12時間観察時点の前に賦形剤で処置されたニコチン暴露ラットで離脱後12時間に見られるのと同程度であることが判明した。ブプロピオン処置と時間の有意な相互作用があった[$F(4, 31) = 23.76$ $P < 0.001$]。Post hoc比較は、ブプロピオン(20-40 mg/kg)の12時間の離脱時点の30分前の投与が、総身体的兆候の発現を、ブプロピオン投与前6時間の時点で同じ動物が示した身体的兆候(対象内比較)および、またニコチン離脱に付されている賦形剤-処置ラットのもの(対象間比較)と比較して改善することを示した(図27A参照)。最後に、ブプロピオン投与前(ポンプ除去後6時間；図27A参照)または処置後数時間(ポンプ除去後24時間およびブプロピオン投与後12.5時間； $P > 0.05$ ；賦形剤 = 20.7 ± 7.3 ；ブプロピオン 5 mg/kg = 18.6 ± 4 ；ブプロピオン 10 mg/kg = 17.1 ± 4.6 ；ブプロピオン 20 mg/kg = 14.1 ± 2.2 ；ブプロピオン 40 mg/kg = 14.6 ± 2.6)の身体的兆候の総数のグループ間の有意差がないことは注意すべきである。これらのデータは、生理食塩水およびブプロピオン-処置ラット(ポンプ除去後12時間)の間の差が基底の差によるものではなく、ブプロピオンの急性処置が、ニコチン離脱の身体的兆候の発現に長期(12.5時間)の効果を有しないことを示す。

【0263】

一元配置ANOVAを使用して、離脱後12時間の時点のブプロピオンの個々の身体的兆候における効果を試験した。腹部収縮(あえぎと身もだえ)はブプロピオン投与で有意に減少したが[$F(4, 31) = 4.037$ $P < 0.01$]、他の兆候ではしなかった。計画した比較は、ブプロピオン(10-40 mg/kg)が、腹部収縮における離脱誘発上昇を改善することを示した(図27B参照)。

【0264】

考察

本試験は、ブプロピオンがニコチンにより影響された脳報酬回路に作用するという強い証拠を提供する。第一に、ブプロピオンは、基底条件下で脳報酬機能を上昇させる。第二に、低投与量で、急性ニコチンにより誘発される報酬促進効果を遮断する。第三に、報酬欠損として示されるニコチン離脱の負の感情的側面と、離脱の身体的兆候の両方を改善する。ICSS閾値の低下により示されるように、ブプロピオンが基底条件下の脳報酬機能を上昇させる能力は、ICSSを使用した他の抗鬱剤で得た我々のおよび他の先のデータと全く対照的である。このような試験は、デシプラミン、パロキセチンまたはフルオキセチンのような抗鬱剤の急性投与が、基底状態下の閾値に影響しないか、上昇を誘発することを示した(Atrens et al. 1977; KatzおよびCarroll 1977; Binks et al. 1979; Hall et al. 1990; Markou et al. 1992; LeeおよびKornetsky 1998; Lin et al. 1999; Harris et al. 2001a; 2001b; CryanおよびMarkou、未発表の観察)。ブプロピオンのこの異なる効果は、禁煙において他の抗鬱剤よりも優れていることの根底をなし得る。対照的に、Mc-CarterおよびKokkinidis(1988)は、ブプロピオンでの28日処置は、ICSSに関して反応の割合に影響しないことを証明した。これらの二つのデータセットの比較を行うのは困難であるが、McCarterおよびKokkinidis法が操作的に我々のものと異なり、ただ一つのブプロピオン投与量(20 mg/kg)を使用しているためであろう。鬱患者を含む精神病集団の喫煙率の高さを考慮して(Leonard et al. 2001)、喫煙者はニコチンを鬱病の総合的症状の自己治療にニコチンを使用している可能性があることを示唆されている(Glassman et al. 1990; Markou et al. 1998; MarkouおよびKenny 2002)。実際、これらの大規模な易学的観察が最近神経化学的に確認されており、青斑α2ノルアドレナリン作用性受容体が、

喫煙者で、抗鬱剤投薬で先に報告されたのと同程度下方制御されていることが示された(Klimeck et al. 2001)。さらに、ニコチンからの離脱は、多くの情動障害で観察されるのと同程度の脳報酬機能の欠損をもたらした(MarkouおよびKenny 2002)。一緒に考えて、これらの観察が、抗鬱剤投薬が、根本を成す鬱病の総合的症状を処置するため、喫煙率を減らす処置に有効であり得ることを示唆する。しかしながら、選択的セロトニン再取り込み阻害剤のような抗鬱剤は、たとえあったとしても、鬱患者のある集団のニコチン摂取のみを減少し得、非鬱患者には限定された効果しかない可能性があるとの証拠が増えている(Kotlyar et al. 2001)。対照的に、ブプロピオンは健康なおよび精神病の集団に等しく有効であり、したがって、その効果の程度はその抗鬱特性を超えている(Hayford et al. 1999)。我々は、本明細書で、ブプロピオンの、抗喫煙効果は、他の抗鬱剤と重なっていない効果である、基底非離脱レベルでさえ、脳報酬機能においてさらなる効果を有することに起因し得ることを示唆する。 10

【0265】

ブプロピオンの作用の根本にある神経化学的機構はまだ十分に解明されていない。近年のデータは、ブプロピオンの行動的効果は、そのノルアドレナリン作用性系への効果によるものであり得ることを示唆する(Ascher et al. 1995; Cryan et al. 2001; DongおよびBlier 2001)。それにも関わらず、多くの抗鬱剤と異なり、それはまたドーパミン再取り込み阻害剤としての働き(マイクロモル範囲にもかかわらず)(Ascher et al. 1995)、微小透析試験は、本試験で脳報酬閾値を減少させた濃度範囲のブプロピオンの急性投与が、細胞外ドーパミンを上昇させることを示している(Nomikos et al. 1989; Li et al. 2002) 20。ドーパミンシステム長が脳報酬機能と関連していることを考慮して、ブプロピオンのこの特性は、その報酬促進効果に関与し得る。ドーパミン作動性機構はまたニコチンの報酬側面とニコチン離脱症候群の顕示の両方に関与している(Hildebrand et al., 1998, 1999; KennyおよびMarkou 2001; Ferrari et al. 2002; Mansvelder et al. 2002; PicciottoおよびCorrigall 2002)。しかしながら、近年の試験は、側坐核ドーパミン濃度の上昇がICSS反応が起こるのに必須であるが、それらはICSSの一時的力学と平行していないことを示している(Garris et al. 1999)。したがって、ドーパミンは報酬のいくつかの側面に関与しているが(おそらく、新規または見込み)、他の相互の神経化学的機構は、自己刺激の報酬“快楽”側面の持続のために補充されている(WiseおよびStein 1969; Herberg et al. 1976; Garris et al. 1999)。このように、視床下部外側のレベルでICSSを 30使用して、我々は、報酬の介在に排他的ではないが強く関与し、したがって、非ドーパミン作用性神経伝達物質調節の検出を可能にする側坐核のような辺縁系領域における経シナプス調製の指標を得ることができた。このような調節は、ブプロピオンがドーパミン作用性およびノルアドレナリン作用性トランスポーターの両方に有効であるため、電流試験と関連する。実際、最近の電気生理学的データは、持続したブプロピオン処置(ミニポンプで2日間)が、青斑核ノルアドレナリン作用性ニューロンの放出(firing)を変え、それより少ない程度でセロトニン作用性縫線ニューロンを変えるが、ドーパミン作用性腹側被蓋領域ニューロンは変えないことを示唆する(DongおよびBlier 2001)。さらに、近年のヒトでの造影試験は、ブプロピオンの治療的有效量は、ドーパミントランスポーターでわずかに22%の占有率であることを証明し(Meyer et al. 2002)、ブプロピオンの効果がお 40そらく単にドーパミン介在だけではないことを示唆する。

【0266】

さらに、近年の証拠は、ブプロピオンが、ニューロンのニコチン様アセチルコリン受容体で機能的アンタゴニストとして作用し得ることを示唆する(FryerおよびLukas 2002; Slommer et al. 2000; Miller et al. 2002)。それ自体無効である投与量のブプロピオンによるニコチンの急性報酬効果の遮断を示した我々のデータは、この仮説を支持する。高投与量で、脳報酬機能の促進におけるブプロピオンの独立した効果は明らかとなり、その可能性のあるニコチン様アンタゴニスト効果の究明を困難にした。それにも関わらず、我々の観察はまたニコチン禁断前のブプロピオン治療の開始の臨床的实施に対する神経化学的信用を提供した(Hughes et al. 1999)。ブプロピオンがニコチンの報酬効果の減弱に急 50

性に作用し得るようであり、したがって、中止の増加を起こすようである。実際、古典的ニコチン様受容体アンタゴニストであるメカミラミンは、ニコチンパッチと組み合わせて使用したとき、禁煙の助けとして有効であることが示されてる(Rose et al. 1994)。興味深いことに、ブプロピオンは、薬剤個別パラダイムでニコチンを一般化する。しかしながら、ニコチンの個別特性と異なり、ブプロピオンのそれはメカミラミンの遮断に非感受性であり、ブプロピオンとニコチンの個別の合図を介在する作用の異なる機構を示唆する(YoungおよびGlennon 2002; Wiley et al. 2002)。

【0267】

本明細書で試験したすべての投与量のブプロピオン(10、20および40 mg/kg)による離脱の感情的側面の改善は、さらに、報酬系におけるその効果がその治療効果と関連していることを示唆する。さらに、我々のデータは、ニコチン前処置動物の報酬閾値における、生理食塩水処置コントロールと比較したブプロピオンの異なる効果を明らかに示す。後者の場合、ブプロピオンは次の試験時点までに基底に戻る閾値の一時的な低下を誘発し、これは我々の最初の用量設定試験の結果と一致する。慢性ニコチンで前処置された動物では、先に示されたように、連続ニコチン暴露中は閾値のわずかな減少を示すが、ニコチン投与の中止により著しい閾値の上昇を示す(Epping-Jordan et al. 1998)。試験したブプロピオンの最高投与量(40 mg/kg)は、これらの離脱欠損の長期の改善を示し、二回目の注射後試験時点(ブプロピオン後6.5時間)にニコチンで予め処置された賦形剤チャレンジした動物よりもまだ有意に低かった。さらに、報酬閾値の全72時間にわたる分析は、ニコチン離脱に付し、ブプロピオン(40 mg/kg)を注射された動物と、離脱に付されていない動物で差がないことを示した。低ブプロピオン投与量(10および20 mg/kg)の投与はまた報酬欠損を改善するが、この効果は、40 mg/kgブプロピオンの投与後に見られるほど長くなかった。これらの発見は、ブプロピオンが、基底条件下の報酬機能におけるその効果とは異なる、報酬欠損の改善を誘発することを示唆する。この離脱-誘発報酬欠損の減弱の延長は、離脱の感情的側面がさらなる物質使用の動機付けの重要な因子であると考えられているため、ブプロピオンの抗喫煙特性にもっとも重大であるようである(KennyおよびMarkou 2001)。これらのデータは、単独で投与した場合、離脱症候群の負の感情的側面をほとんど変えなかった抗鬱剤フルオキセチンおよびパロキセチンでの先のデータと対照的である(Harrison et al 2001a, 2001b)。しかしながら、報酬機能におけるこのような欠損は、選択的セロトニン再取り込み阻害剤を、セロトニン1A自己受容体アンタゴニストと共に投与した場合打ち消された(Harrison et al 2001a; 2001b)。これらの発見は、ニコチン離脱のいくつかの感情的側面の介在におけるセロトニン作用性背面縫線核の役割を証明する近年のデータと一致する(Cheeta et al. 2000)。さらに、Rasmussenと共同研究者(1997;2000)は、5-HT1A受容体アンタゴニストが、ラットでニコチン離脱中に観察される聴覚性驚愕反射の増大を改善することを示している。

【0268】

ニコチン離脱の感情的要素の打ち消しに加えて、ブプロピオンはまた自発的ニコチン離脱症候群における身体的側面も改善する。この観察は、ブプロピオンがニコチン離脱の身体的兆候を改善することを報告した予備試験と一致する(Malin 2001)。この改善の根本の機構は明らかではない。減少したドーパミン作用性シグナル伝達が、ニコチン離脱の身体的兆候の顕在化の重要な因子であると考えられているため(Hildebrand et al. 1999)、おそらくブプロピオンのドーパミン系への直接の効果がこの欠損を打ち消し得るのであろう。しかしながら、ブプロピオンの、ノルアドレナリン作用性およびセロトニン作用性系のような他の経路への効果が、これらがまた身体的兆候の発現の介在に関与しているため除外できない(KennyおよびMarkou 2001; Malin 2001)。ニコチン離脱の感情的および身体的兆候の両方の改善がまた、禁断の負の感情がタバコ喫煙癖に関与していると仮定されるため、ブプロピオンの禁煙における著しい効果を解説し得る(Glassman et al. 1990; Breslau et al. 1992; Laje et al. 2001)。実際、近年の臨床試験は、負の感情がブプロピオンの禁煙における効果の有意なメディエーターであることを証明した(Shiffman et al. 2000; Lerman et al. 2002)。

【0269】

本試験におけるブプロピオンのすべての効果が、急性投与に続いて試験したため、このような効果が慢性投与で継続するか否かはまだ判らないことは注意すべきである。ブプロピオンの脳報酬機能における以前の唯一の試験は、基底条件下の慢性投与であった(McCarterおよびKokkinidis 1988)。この試験は、ブプロピオンでの28日の処置が、ICSSの反応の割合に効果がないことを証明した。これらの二つのデータセットの比較は困難であるが、しかしながら、McCarterおよびKokkinidisは、ブプロピオンの効果を基底条件下でのみ試験し、彼らの方法は操作的に我々のと異なるためであろう。一つのブプロピオン投与量のみ(20 mg/kg)を試験に使用し、急性試験を行っていないという事実が、このような負の効果が本データと関連するか否かの評価をさらに難しくする。ヒトにおける類似の10
効果の指標として、ラットのニコチン離脱における脳報酬閾値および身体的兆候を使用する重要な欠点の一つは、これらの離脱の側面が相対的に一時的であり、2-3日の範囲であることである(KennyおよびMarkou 2001)。したがって、この短い時間が、可能性のある治療の慢性投与の効果の試験をより困難にしている。それにもかかわらず、この2-3日の窓は、新しい処置の可能性のある治療効果の検出をするのに十分であり得、他の精神病と類似であり(例えば、Geyer et al. 2001; Lucki 2001; Cryan et al. 2002; Seong et al. 2002)、したがって、予測的妥当性のあるモデルをもたらす(GeyerおよびMarkou 1995)。さらなる試験が、これらの問題を明らかにし、ニコチン離脱の種々の側面における慢性ブプロピオン投与の効果を評価するための根拠となる。

【0270】

20

結論として、これらのデータは、ブプロピオンの禁煙の助けとしての利用性は、おそらく、急性ニコチンの報酬側面を変化させる能力と、ニコチン離脱症候群の負の感情的および身体的側面を改善させる能力によるものであり得ることを証明する。非ニコチン離脱条件下でさえブプロピオンが誘発する脳報酬機能の上昇は、また喫煙者の動機特性のシフトに寄与し得、したがってタバコ消費の減少を導く。さらなる試験が、脳報酬およびニコチン離脱における慢性ブプロピオン処置の効果の評価に必要であろう。

【0271】

実施例5に記載の引用文献

- Ahluwalia JS, Harris KJ, Catley D, Okuyemi KS, Mayo MS (2002) Sustained-release bupropion for smoking cessation in African Americans: a randomized controlled trial. JAMA 288: 468-474 30
- Anda RF, Williamson DF, Escobedo LG, Mast EE, Giovino GA, Remington PL (1990) Depression and the dynamics of smoking. A national perspective. JAMA 264: 1541-1545
- Ascher JA, Cole JO, Colin JN, Feighner JP, Ferris RM, Fibiger HC, Golden RN, Martin P, Potter WZ, Richelson E et al. (1995) Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. J Clin Psychiatry 56: 395-401
- Atrens DM, Ungerstedt U, Ljungberg T (1977) Specific inhibition of hypothalamic self-stimulation by selective reuptake blockade of either 5-hydroxytryptamine or noradrenaline. Psychopharmacology 52: 177-80
- Balfour DJ (2001) The pharmacology underlying pharmacotherapy for tobacco dependence: a focus on bupropion. Int J Clin Pract 55: 53-57 40
- Barr AM, Markou A, Phillips AG (2002) A "crash" course on psychostimulant withdrawal as a model of depression. Trends Pharmacol Sci 23: 475-482
- Binks SM, Murchie JK, Greenwood DT (1979) A reward-reduction model of depression using self stimulating rats: an appraisal. Pharmacol Biochem Behav 10: 441-443
- Breslau N, Kilbey M, Andreski P (1992) Nicotine withdrawal symptoms and psychiatric disorders: findings from an epidemiological study of young adults. Am J Psychiatry 149: 464-469
- Breslau N, Peterson EL, Schultz LR, Chilcoat HD, Andreski P (1998) Major depression and stages of smoking. A longitudinal investigation. Arch Gen Psychiatry 55: 50

161-166

- Cheeta S, Irvine EE, Kenny PJ, File SE (2001) The dorsal raphe nucleus is a crucial structure mediating nicotine's anxiolytic effects and the development of tolerance and withdrawal responses. *Psychopharmacology* 155: 78-85
- Cryan JF, Dalvi A, Jin SH, Hirsch BR, Lucki I, Thomas SA (2001) Use of dopamine-beta-hydroxylase-deficient mice to determine the role of norepinephrine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 651-657
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23: 238-45
- Cryan JF, Hoyer D, Markou A (2003) Withdrawal from chronic amphetamine induces depression-like behavioural effects in rodents. *Biol Psychiatry* 23: 238-245
- Dong J, Blier P (2001) Modification of norepinephrine and serotonin, but not dopamine, neuron firing by sustained bupropion treatment. *Psychopharmacology* 155: 52-57
- Epping-Jordan MP, Watkins SS, Koob GF, Markou A (1998) Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature* 393: 76-9
- Ferrari R, Le Novere N, Picciotto MR, Changeux JP, Zoli M (2002) Acute and long-term changes in the mesolimbic dopamine pathway after systemic or local single nicotine injections. *Eur J Neurosci* 15: 1810-1818
- Fryer JD, Lukas RJ (1999) Noncompetitive functional inhibition at diverse, human nicotinic acetylcholine receptor subtypes by bupropion, phencyclidine, and ibogaine. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 88-92
- Garris PA, Kilpatrick M, Bunin MA, Michael D, Walker QD, Wightman RM (1999) Dissociation of dopamine release in the nucleus accumbens from intracranial self-stimulation. *Nature* 398: 67-9
- George TP, Vessicchio JC, Termine A, Bregartner TA, Feingold A, Rounsaville BJ, Kosten TR (2002) A placebo controlled trial of bupropion for smoking cessation in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 52: 53-61
- Geyer MA, Markou A (1995) Animal models of psychiatric disorders. In: Bloom RE, Kupfer DJ (eds) *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. Raven Press, New York, pp 787-798
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR (2001) Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology* 156: 117-154
- Glassman AH, Helzer JE, Covey LS, Cottler LB, Stetner F, Tipp JE, Johnson J (1990) Smoking, smoking cessation, and major depression *JAMA* 264: 1546-1549
- Glover E D, Glover PN (2001) Pharmacologic treatments for the nicotine dependent smoker. *Am J Health Behav* 25: 179-182
- Hall FS, Stellar JR, Kelley AE (1990) Acute and chronic desipramine treatment effects on rewarding electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav* 37: 277-281
- Harrison AA, Liem YT, Markou A (2001a) Fluoxetine combined with a serotonin-1A receptor antagonist reversed reward deficits observed during nicotine and amphetamine withdrawal in rats. *Neuropsychopharmacology* 25: 55-71
- Harrison AA, Chevrette J, Hoyer D, Markou A (2001b) Paroxetine combined with a 5-HT1A receptor antagonist reversed amphetamine withdrawal-induced anhedonia in rats. *Soc Neurosci Abstr Program Number* 665.15
- Harrison AA, Gasparini F, Markou A (2002) Nicotine potentiation of brain stimulation reward reversed by DHE and SCH 23390, but not by eticlopride, LY 314582 or MPEP in rats. *Psychopharmacology* 160: 56-66

- Hayford KE, Patten CA, Rummans TA, Schroeder DR, Offord KP, Croghan IT, Glover E D, Sachs DP, Hurt RD (1999) Efficacy of bupropion for smoking cessation in smokers with a former history of major depression or alcoholism. *Br J Psychiatry* 174: 173-178
- Hays JT, Hurt RD, Rigotti NA, Niaura R, Gonzales D, Durcan MJ, Sachs DP, Wolter TD, Buist AS, Johnston JA, White JD (2001) Sustained-release bupropion for pharmacologic relapse prevention after smoking cessation. A randomized, controlled trial. *Ann Int Med* 135: 423-433
- Herberg LJ, Stephens DN, Franklin KB (1976) Catecholamines and self-stimulation: evidence suggesting a reinforcing role for noradrenaline and a motivating role for dopamine. *Pharmacol Biochem Behav* 4: 575-582 10
- Hildebrand BE, Nomikos GG, Hertel P, Schilstrom B, Svensson TH (1998) Reduced dopamine output in the nucleus accumbens but not in the medial prefrontal cortex in rats displaying a mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome. *Brain Res* 779: 214-225
- Hildebrand BE, Panagis G, Svensson TH, Nomikos, GG (1999) Behavioral and biochemical manifestations of mecamylamineprecipitated nicotine withdrawal in the rat: role of nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 21: 560-574
- Hughes JR, Gust SW, Skoog K, Keenan RM, Fenwick, JW (1991) Symptoms of tobacco withdrawal. A replication and extension. *Arch Gen Psychiatry* 48: 52-59 20
- Hughes JR, Goldstein MG, Hurt RD, Shiffman S (1999) Recent advances in the pharmacotherapy of smoking. *JAMA* 281: 72- 76
- Hurt RD, Sachs DP, Glover ED, Offord KP, Johnston JA, Dale LC, Khayrallah MA, Schroeder DR, Glover PN, Sullivan CR et al (1997) A comparison of sustained-release bupropion and placebo for smoking cessation. *N Engl J Med* 337: 1195-1202
- Jorenby DE, Leischow SJ, Nides MA, Rennard SI, Johnston JA, Hughes AR, Smith SS, Muramoto ML, Daughton DM, Doan K, Fiore MC, Baker TB (1999) A controlled trial of sustained-release bupropion, a nicotine patch, or both for smoking cessation. *N Engl J Med* 340: 685-691 30
- Katz RJ, Carroll BJ (1977) Intracranial reward after Lilly 110140 (fluoxetine HCl): evidence for an inhibitory role for serotonin. *Psychopharmacology* 51: 189-193
- Kenny PJ, Markou A (2001) Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. *Pharmacol Biochem Behav* 70: 531-549
- Klimek V, Zhu MY, Dilley G, Konick L, Overholser JC, Meltzer HY, May WL, Stockmeier CA, Ordway GA (2001) Effects of long-term cigarette smoking on the human locus coeruleus. *Arch Gen Psychiatry* 58: 821-827
- Kornetsky C, Esposito RU (1979) Euphorogenic drugs: effects on the reward pathways of the brain. *Fed Proc* 38: 2473-2476
- Kotlyar M, Golding M, Hatsukami DK, Jamerson BD (2001) Effect of nonnicotine pharmacotherapy on smoking behavior. *Pharmacotherapy* 21: 1530-1548 40
- Laje RP, Berman JA, Glassman AH (2001) Depression and nicotine: preclinical and clinical evidence for common mechanisms. *Curr Psychiatry Rep* 3: 470-476
- Lee K, Kornetsky C (1998) Acute and chronic fluoxetine treatment decreases the sensitivity of rats to rewarding brain stimulation. *Pharmacol Biochem Behav* 60: 539-544
- Lerman C, Roth D, Kaufmann V, Audrain J, Hawk L, Liu A, Niaura R, Epstein L (2002) Mediating mechanisms of the impact of bupropion in smoking cessation treatment. *Drug Alcohol Depend* 67: 219-223
- Leith NJ, Barrett RJ (1976) Amphetamine and the reward system: evidence for tolerance 50

- rance and post-drug depression. *Psychopharmacology* 46: 19-25
- Leonard S, Adler LE, Benhammou K, Berger R, Breese CR, Drebing C, Gault J, Lee M J, Logel J, Olincy A, Ross RG, Stevens K, Sullivan B, Vianzon R, Virnich DE, Wal do M, Walton K, Freedman R (2001) Smoking and mental illness. *Pharmacol Biochem Behav* 70: 561-570
- Li SX, Perry KW, Wong DT (2002) Influence of fluoxetine on the ability of buprop ion to modulate extracellular dopamine and norepinephrine concentrations in thre e mesocorticolimbic areas of rats. *Neuropharmacology* 42: 181-190
- Lin D, Koob GF, Markou A (1999) Differential effects of withdrawal from chronic amphetamine or fluoxetine administration on brain stimulation reward in the rat- 10
interactions between the two drugs *Psychopharmacology* 145: 283-294
- Lipkus IM, Barefoot JC, Williams RB, Siegler IC (1994) Personality measures as p redictors of smoking initiation and cessation in the UNC Alumni Heart Study. *Hea lth Psychol* 13: 149-155
- Lucki I (2001) A prescription to resist proscriptions for murine models of depre ssion. *Psychopharmacology* 153: 395-398
- Malin DH (2001) Nicotine dependence: studies with a laboratory model. *Pharmacol Biochem Behav* 70: 551-559
- Malin DH, Lake JR, Newlin-Maultsby P, Roberts LK, Lanier JG, Carter VA, Cunningh am JS, Wilson OB (1992) Rodent model of nicotine abstinence syndrome. *Pharmacol* 20
Biochem Behav 43: 779-784
- Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS (2002) Synaptic mechanisms underlie nicotine -induced excitability of brain reward areas. *Neuron* 33: 905-919
- Markou A, Kenny PJ (2002) Neuroadaptations to chronic exposure to drug of abuse: Relevance to depressive symptomatology seen across psychiatric diagnostic categ ories. *Neurotox Res* 4: 297- 313
- Markou A, Koob GF (1991) Postcocaine anhedonia. An animal model of cocaine withd rawal. *Neuropsychopharmacology* 4: 17-26
- Markou A, Koob GF (1992) Construct validity of a self-stimulation threshold para digm: effects of reward and performance manipulations. *Physiol Behav* 51: 111-119 30
- Markou A, Hauger RL, Koob GF (1992) Desmethylinipramine attenuates cocaine withd rawal in rats *Psychopharmacology* 109: 305-314 357
- Markou A, Kosten TR, Koob GF (1998) Neurobiological similarities in depression a nd drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 18: 13 5-174
- McCarter BD, Kokkinidis L (1988) The effects of long-term administration of anti depressant drugs on intracranial selfstimulation responding in rats. *Pharmacol B iochem Behav* 31: 243-247
- Meyer JH, Goulding VS, Wilson AA, Hussey D, Christensen, BK, Houle S (2002) Bupr opion occupancy of the dopamine transporter is low during clinical treatment. *Ps* 40
ychopharmacology 163: 102-105
- Miller DK, Sumithran SP, Dwoskin LP (2002) Bupropion inhibits nicotine-evoked [(3)H]overflow from rat striatal slices preloaded with [(3)H]dopamine and from rat hippocampal slices preloaded with [(3)H]norepinephrine. *J Pharmacol Exp Ther* 30 2: 1113-1122
- Nomikos GG, Damsma G, Wenkstern D, Fibiger HC (1989) Acute effects of bupropion on extracellular dopamine concentrations in rat striatum and nucleus accumbens s tudied by in vivo microdialysis. *Neuropsychopharmacology* 2: 273-279
- Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C Jr (1992) Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet* 50

339: 1268-1278

- Picciotto MR, Corrigall WA (2002) Neuronal systems underlying behaviors related to nicotine addiction: neural circuits and molecular genetics. *J Neurosci* 22: 3338-3341
- Rasmussen K, Kallman MJ, Helton DR (1997) Serotonin-1A antagonists attenuate the effects of nicotine withdrawal on the auditory startle response. *Synapse* 27: 145-152
- Rasmussen K, Calligaro DO, Czachura JF, Dreshfield-Ahmad LJ, Evans DC, Hemrick-Luecke SK, Kallman MJ, Kendrick WT, Leander JD, Nelson DL, Overshiner CD, Wainwright DB, Wolff MC, Wong DT, Branchek TA, Zgombick JM, Xu YC (2000) The novel 5-hydroxytryptamine(1A) antagonist LY426965: effects on nicotine withdrawal and interactions with fluoxetine. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 688-700
- Rose JE, Behm FM, Westman EC, Levin ED, Stein RM, Ripka GV (1994) Mecamylamine combined with nicotine skin patch facilitates smoking cessation beyond nicotine patch treatment alone. *Clin Pharmacol Ther* 56: 86-99
- Semenova S, Markou A (2003) Clozapine treatment attenuated somatic and affective signs of nicotine and amphetamine withdrawal in subsets of rats that exhibited hyposensitivity to the initial effects of clozapine. *Biol Psychiatry* (投稿中)
- Seong E, Seasholtz AF, Burmeister M (2002) Mouse models for psychiatric disorders. *Trends Genet* 18: 643-650
- Shiffman S, Johnston JA, Khayrallah M, Elash CA, Gwaltney CJ, Paty JA, Gnys M, Evoniuk G, DeVeau-Geiss J (2000) The effect of bupropion on nicotine craving and withdrawal. *Psychopharmacology* 148: 33-40
- Skjedi KL, Markou A (2003) Effects of repeated withdrawal episodes, nicotine dose, and duration of nicotine exposure on the severity and duration of nicotine withdrawal in rats. *Psychopharmacology* (DOI 10.1007/s00213-003-1414-1)
- Slemmer JE, Martin BR, Damaj MI (2000) Bupropion is a nicotinic antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 321-327
- Spielewoy C, Markou A (2002) Withdrawal from chronic phencyclidine treatment induces long-lasting depression in brain reward function. *Neuropsychopharmacology* (投稿中)
- Stolerman IP, Jarvis MJ (1995) The scientific case that nicotine is addictive. *Psychopharmacology* 117: 2-10
- Tashkin D, Kanner R, Bailey W, Buist S, Anderson P, Nides M, Gonzales D, Dozier G, Patel MK, Jamerson B. (2001) Smoking cessation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* 357: 1571-1575
- Watkins SS, Stinus L, Koob GF, Markou A (2000) Reward and somatic changes during precipitated nicotine withdrawal in rats: centrally and peripherally mediated effects. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 1053-1064
- Wiley JL, Lavecchia KL, Martin BR, Damaj MI (2002) Nicotineline discriminative stimulus effects of bupropion in rats. *Exp Clin Psychopharmacol* 10: 129-135

【0272】

本発明をある好ましい態様を引用して詳述しているが、本明細書および特許請求の範囲に記載した精神および範囲内で、修飾および変形が可能であることは理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0273】

【図1】腹側被蓋領域における注射部位の組織学的再構築を示す、ラット脳からの頭頂セクションの図式的提示である(ブレグマから5.30-6.72mm後ろ、PaxinosおよびWatson, 1986の図解書にしたがう)。黒丸はVTA内に位置する注射チップの位置を示し、統計的分析に包含される。VTAの外に位置する注射部位から得たラットからのデータは、

分析から除いた。

【図2】ニコチン処置ラットおよびコントロールラットにおける、ICSS閾値と反応潜時におけるLY314582の効果を説明する。図2A、データは、基底閾値からの平均(±SEM)変化率として示す。図2B、データは、基底反応潜時からの平均(±SEM)変化率として示す。 $^{**}P < 0.01$ 、賦形剤注射後のニコチン処置ラットとの差。 $^{##}P < 0.01$ 、同量のLY314582注射後のコントロールラットとの差。

【図3】ニコチン処置ラットおよびコントロールラットにおける、ICSS閾値と反応潜時における腹側被蓋領域内(intra-ventral tegmental area)LY314582の効果を説明する。図3A、データは、基底閾値からの平均(±SEM)変化率として示す。図3B、データは、基底反応潜時からの平均(±SEM)変化率として示す。 $^{***}P < 0.001$ 、賦形剤注射後のニコチン処置ラットとの差。 $^{##}P < 0.01$ 、 $^{#}p < 0.05$ 、同量のLY314582注射後のコントロールラットとの差。

【図4】自発的ニコチン離脱を行っているラットにおける、ICSS閾値の上昇におけるLY341495の効果を説明する。図4A、データは、ニコチン離脱を行っているラットの基底閾値からの平均(±SEM)変化率として示す。図4B、データは、コントロールラットの基底閾値からの平均(±SEM)変化率として示す。ICSS閾値および反応潜時を、ニコチン(図3A)または賦形剤(図3B)を送達する浸透圧性ミニポンプの外科的除去12時間、18時間、24時間、36時間、48時間および72時間後に試験した。ラットに、LY341495(1mg/kg)または賦形剤を18時間の時点(黒矢印で示す)の30分前に1回注射した。 $^{***}P < 0.001$ 、18時間の時点の30分前の、賦形剤で処置したニコチン離脱を行っているラットとの差。

【図5】ニコチン処置ラットおよびコントロールラットにおける、ICSS閾値および反応潜時における、NBQXの効果を説明する。A、データは基底閾値からの平均(±SEM)変化率として示す。B、データは、基底反応潜時からの平均(±SEM)変化率として示す。 $^{*}P < 0.05$ 、 $^{**}p < 0.01$ 、賦形剤注射後のニコチン処置ラットとの差。 $^{#}P < 0.05$ 、 $^{##}p < 0.01$ 、同量のNBQX注射後のコントロールラットとの差。

【図6】ラットにおける、ニコチンおよび食物維持反応におけるMPEPの効果を説明する。データは、基底反応のパーセントとして示す(平均±SEM)。アスタリスクは、各強化系(reinforcer)のコントロール条件からの有意差を示す($^{*}p < 0.05$ 、 $^{**}p < 0.01$)。

【図7】異なる投与量のMPEPでの前処置後に得られたニコチン用量反応曲線を説明する(平均±SEM)。この図のグラフは、0(図7A)、5(図7B)、10(図7C)および20(図7D)mg/kg MPEPで前処置した後に得られたニコチン用量反応曲線を記載する。黒丸は生理食塩水コントロールから得られた結果(同じデータを全4個のパネルに繰り返している)および白四角がMPEP処置対象から得られた結果である。アスタリスク(*)は、生理食塩水と比較した、異なる利用可能なニコチン投与量に関する、R基準値における有意差($p < 0.05$)である。ポンド記号(#)は、生理食塩水前処置と比較した、各MPEP投与量(5、10および20mg/kg)に関する0.048μg/infニコチン投与量の自己投与からの有意差を示す($p < 0.05$)。

【図8】DBA/2Jマウスにおける0.048μg/infニコチンの静脈内自己投与におけるMPEP投与の効果を説明する(平均±SEM)。パネルA(左パネル)は、この確実な自己投与量におけるMPEP前処置の効果を記載する(0.048Tg/infニコチン)。パネルB(右パネル)は、MPEP(0、5、10および20mg/kg)での前処置後に0.048μg/infニコチンが入手可能である場合の、ニコチン全自己注射ニコチン投与量を示す。アスタリスク(*)は、生理食塩水前処置と比較した、各MPEP投与量(5、10および20mg/kg)後の有意差を示す($p < 0.05$)。

【図9】Short Access(SHA)およびLong Access(LGA)で反応するラットにおける、MPEP投与の効果を説明する。図9Aは、LGAラットにおけるコカイン摂取増加の進展を示す；データはそのままの値で示す。図9Bは、SHAおよびLGAラットにおけるMPEPの効果を、基底反応のパーセントとして示す(平均±SEM)。パネルCは、コカ

イン自己投与におけるMPEPの効果を示す(データは、SHAおよびLGAラットを組み合わせた基底反応からのパーセントとして示す(平均±SEM))。アスタリスクは、各強化系に対するコントロール条件からの有意差を示す(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)。

【図10】強化系の漸増スケジュール下の、コカインー、ニコチンーおよび食物維持反応におけるMPEPの効果を示す。データは、MPEP前処置後に獲得した(±SEM)注入／餌ペレットの数を示す(左の序数の軸)。右の序数の軸は、到達した対応する最終比率(すなわち、中止点)を示す。

【図11】コカイン誘発のICSS報酬閾値低下の大きさにおける(a)および同じ方法での反応潜時における(b)MPEP投与の効果を示す。データは基底のパーセントとして示す(平均±SEM)。* $P < 0.05$ コントロールから；同量のMPEPで同様に処置して

10

いるが、コカインを投与されていないラットと比較して*** $p < 0.001$ ；# $p < 0.05$ 。

【図12】コカイン誘発のICSS報酬閾値の期間中の(a)および反応潜時における(b)MPEP投与の効果を説明する。データは基底のパーセントとして示す(平均±SEM)。

*** $p < 0.001$ 、コントロールから。

【図13】ラットにおけるニコチン反応における、LY341495(0.1–5mg/kg)投与の効果を説明する。データは、基底反応のパーセントとして示す(平均±SEM)。

【図14】ラットのニコチン反応における、LY341495(0.5mg/kg)単独、または先にそれ自体コカイン消費に効果がないことが示された(上記図13)MPEP(1mg/kg)の投与量との組み合わせ投与の効果を説明する。データは、基底反応のパーセントとして示す(平均±SEM)。

20

【図15】ラットのニコチン反応における、LY341495(1mg/kg)とMPEP(1mg/kg)の組み合わせの効果を説明する。データは、基底反応のパーセントとして示す(平均±SEM)。

【図16】物質摂取行動のモチベーションを反映する強化系(reinforcement)の漸増率下の、LY341495(1mg/kg)およびLY341495とMPEP(各々1mg/kgおよび9mg/kg)の薬剤組み合わせの、中止点(すなわち右y軸に記載した達成した最高常率)および獲得したニコチン注射の数(左y軸に記載)における効果を説明する。MPEPは、LY341495により誘発された中止点減少を増強する。データは、薬剤処置後に獲得した輸液の数の平均(±SEM)として示す(左の序数軸)。右序数軸は、到達した対応する

30

【図17】脳報酬閾値(A)および反応潜時(B)における、選択的セロトニン再取り込み阻害剤であるパロキセチンの効果を説明する(平均±SEM)。

【図18】脳刺激報酬閾値(A)および反応潜時(B)におけるセロトニン-1A受容体アンタゴニストであるp-MPPI、およびp-MPPI+パロキセチンの組み合わせの効果を説明する(平均±SEM)。アスタリスク(*)は、統計的に有意な直線傾向を示す($p < 0.05$)。

【図19】報酬閾値(A)、反応潜時(B)および体重(C)における慢性アンフェタミン投与の効果を説明する(平均±SEM)。アスタリスク(*)は、生理食塩水暴露コントロール動物との統計的有意差を示す($p < 0.05$)。ポンド記号(#)は、各薬剤グループ内の投薬1日目(任意の薬剤投与前；基底日)との統計的有意差を示す($p < 0.05$)。十字(+)は、各薬剤グループ内の投薬2日目との有意差を示す。(%)は、各薬剤グループ内の投薬3日目との有意差を示す($p < 0.05$)。黒四角は生理食塩水処置ラットからのデータを示す。白丸はアンフェタミン処置ラットからのデータを示す。

40

【図20】アンフェタミン離脱誘発報酬欠損におけるセロトニン作用性処置の効果を説明する。図20A–20Cは、種々の処置で急性に処置した生理食塩水暴露対象における閾値を説明する；明らかにするために、生理食塩水-暴露賦形剤-処置コントロールグループを各パネルで示した。図20D–20Fは、アンフェタミン-暴露対象における閾値を説明する；同じアンフェタミン-暴露賦形剤-処置グループを各図で示した。→は、急性薬剤処置を投与した時点を示す。アスタリスク(*)は、薬剤組み合わせ処置グループと生

50

理食塩水－処置グループの間の統計的有意差を示す($p < 0.05$)(三角)。ポンド記号(#)は、生理食塩水－暴露賦形剤－処置ラットからの有意差を示す($p < 0.05$)(四角)。

【図21】反応潜時におけるアンフェタミン離脱およびセロトニン作用性処置の効果を説明する(平均±SEM)。矢印は、急性薬剤処置を投与した時点を示す。アスタリスク(*)は、賦形剤コントロールグループとの統計的有意差を示す($p < 0.05$)。四角は賦形剤－処置ラットからのデータを示す($n = 22$)。三角はp-M P P I 処置ラットからのデータを示す(3 mg/kg ; $n = 22$)。黒丸はパロキセチン処置ラットからのデータを示す(1.25 mg/kg ; $n = 21$)。白丸はパロキセチンおよびp-M P P I で処置したラットからのデータを示す($n = 24$)。

【図22】体重におけるアンフェタミン離脱およびセロトニン作用性処置の効果を説明する(平均±SEM)。矢印は、急性薬剤処置を投与した時点を示す。アスタリスク(*)は生理食塩水－およびアンフェタミン－暴露グループとの統計的有意差を示す($p < 0.05$)。ポンド記号(#)は、各薬剤グループ内の、12時間時点(慢性処置後かつ急性処置前)での統計的有意差を示す($p < 0.05$)。黒四角は生理食塩水－処置グループおよび白四角はアンフェタミン－処置グループを示す。生理食塩水－処置グループに関して、図22A(賦形剤処置)、 $n = 11$ ；図22B(p-M P P I (3 mg/kg)処置)、 $n = 10$ 、図22C(パロキセチン(1.25 mg/kg)処置)、 $n = 10$ ；および図22D[p-M P P I (3 mg/kg)およびパロキセチン(1.25 mg/kg)処置]、 $n = 12$ 。

【図23】、脳報酬閾値における抗鬱剤ブプロピオンでの急性処置の効果を説明する。ブプロピオンは、脳報酬機能の促進の指標である賦形剤－処置動物と比較したとき、試験した全投与量で($n = 8$)および 40 mg/kg まで用量依存的形態で脳報酬閾値の減少をもたらした。すべての棒は、平均値を、垂直の線は1 SEMを示す。*は、賦形剤－処置動物と統計的に有意差のあるグループを示す； $P < 0.05$ 。白棒は賦形剤である；水平線の模様の棒は 10 mg/kg であり、上左から下右に線を引いた棒は、 20 mg/kg である；左下から上右に線を引いた棒は 30 mg/kg である；斜交平行模様の棒は 40 mg/kg である；そして垂直模様の棒は 60 mg/kg である。

【図24】ニコチン(0.25 mg/kg)誘発した脳報酬機能の促進における抗鬱剤ブプロピオンの効果を説明する。ブプロピオン投与(10 および 20 mg/kg)は、脳報酬閾値の低下をもたらした($n = 10$)。ニコチン処置は、報酬閾値の同様の減少をもたらした。このニコチンの報酬効果は、ブプロピオン(5 mg/kg)前処置により完全に打ち消され、これは単独で与えた場合、報酬閾値における効果はない。すべての棒は平均値を、垂直の線は1 SEMを示す。*は、関連賦形剤条件と有意に異なる閾値を示す； $P < 0.05$ 。#は、対応する生理食塩水共処置コントロールと有意に異なるグループを示す； $P < 0.05$ 。棒の左のグループは生理食塩水－処置ラットからである。棒の右のグループは、ニコチン(0.25 mg/kg)処置ラットからである。白抜き棒は賦形剤である；上左から右下に線を引いた棒は 5 mg/kg である；左下から右上に線を引いた棒は 10 mg/kg である；斜交平行模様の棒は 20 mg/kg である。

【図25】脳報酬閾値におけるニコチン連続注入(3.16 mg/kg 遊離塩基/日を7日間)の効果を説明する。ニコチン投与($n = 38$)は、生理食塩水ポンプで処置した動物($n = 38$)と比較して、脳報酬閾値を時間依存的に低下させた。ピーク閾値低下効果は3日目であった。閾値は7日目までに基底レベルに戻った。すべてのデータ点は平均値を示し、垂直の線は1 SEMを示す。挿入図：濃度曲線下面積分析は、ニコチンで処置した動物が、7日間の処置にわたり有意に低い閾値であることを明らかに示す。すべての棒は平均値を、垂直の線は1 SEMを示す。*は、生理食塩水－処置動物と有意に異なる閾値を示す； $P < 0.05$ 。白抜き棒および白四角は、生理食塩水－処置ラットを示す。黒棒および黒四角はニコチン－処置ラットを示す。

【図26】慢性ニコチン投与(3.16 mg/kg /日を7日間)または生理食塩水投与からの離脱に続く脳報酬閾値における抗鬱剤ブプロピオンの効果を示す。図26Aに説明するように、生理食塩水前処置動物において、賦形剤－処置対象($n = 12$)と比較して、ブプロピオン処置はすべての投与量(10 mg/kg , $n = 8$ ； 20 mg/kg , $n = 8$ ； 40 mg/kg ,

n = 10)で脳報酬閾値の低下をもたらした。この閾値低下は、すべての動物が6時間後である次の試験時点で基底閾値に戻っていたため、一時的であった。全ニコチン-前処置動物は、離脱12時間後に上昇した閾値を示した。18時間の時点の前のブプロピオン処置は、ニコチンに暴露した賦形剤-処置対象(n = 11)と比較して、試験したすべての投与量で(10 mg/kg、n = 9; 20 mg/kg、n = 9; 40 mg/kg、n = 9)脳報酬閾値の低下をもたらした。この閾値上昇の改善は、先にニコチンで処置した最高ブプロピオン投与量(40 mg/kg)で処置した動物で有意に延長した;これらの動物は、生理食塩水-処置ニコチン離脱対象よりも24時間離脱時点(ブプロピオン投与6.5時間後)で有意に低い閾値を示した。すべてのデータ点は平均値を、垂直な線は1 S E Mを示す。*は、対応する賦形剤処置動物と有意に異なるグループを示す; $P < 0.05$ 。#は関連する慢性生理食塩水-前処置コントロールと有意に異なるグループを示す; $P < 0.05$ 。白四角は賦形剤を示す; 上向き矢印は10 mg/kgブプロピオンを示す; 下向き矢印は20 mg/kgブプロピオンを示す; 丸は40 mg/kgブプロピオンを示す。図26Bは、濃度曲線下面積分析がまたニコチンで前処理した動物がニコチン投与の停止(すなわち離脱)後に上昇した脳報酬閾値を有することを示すことを説明する。さらに、この分析はブプロピオン(40 mg/kg)での急性の処置がこの閾値の上昇を改善することを明らかに証明する。すべての棒は平均値を、垂直な線は1 S E Mを示す。*は、対応する賦形剤-処置動物と有意に異なるグループを示す; $P < 0.05$ 。#は関連慢性生理食塩水前処置コントロールと有意に異なるグループを示す; $P < 0.05$ 。白抜き棒は賦形剤である; 上左から右下に線を引いた棒は10 mg/kgである; 左下から上右に線を引いた棒は20 mg/kgである; 斜交平行模様の棒は40 mg/kgである。 10 20

【図27】慢性ニコチン処置(3.16 mg/kg/日6.75日間)からの離脱12時間後の、抗鬱剤ブプロピオンの身体兆候における効果を説明する。図27Aに説明するように、慢性ニコチン投与6時間後に、禁断の総合的全身的兆候の値は有意に増加した。離脱12時間後の時点の30分前のブプロピオン処置は、賦形剤処置(n = 6)と比較して、身体的兆候の発現の改善をもたらした(5 mg/kg、n = 8; 10 mg/kg、n = 7; 20 mg/kg、n = 7; 40 mg/kg、n = 8)。図27Bは、ミニポンプ除去12時間後の離脱の兆候の個々の群におけるブプロピオンの効果を説明する。すべての棒は平均値を、垂直な線は1 S E Mを示す。*は、賦形剤-処置動物と有意に異なるグループを示す; $P < 0.05$ 。#は、基底(離脱の開始6時間後)レベルから有意に異なるグループを示す; $P < 0.05$ 。白抜き棒は賦形剤である; 水平模様の棒は5 mg/kgブプロピオンである; 上左から右下に線を引いた棒は10 mg/kgである; 左下から上右に線を引いた棒は20 mg/kgである; 斜交平行模様の棒は40 mg/kgである。 30

【図 1】

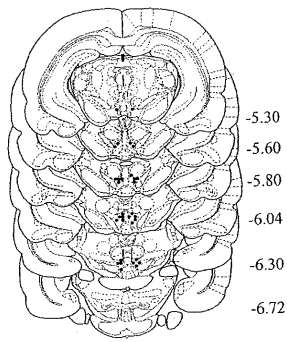


FIGURE 1

【図 2】

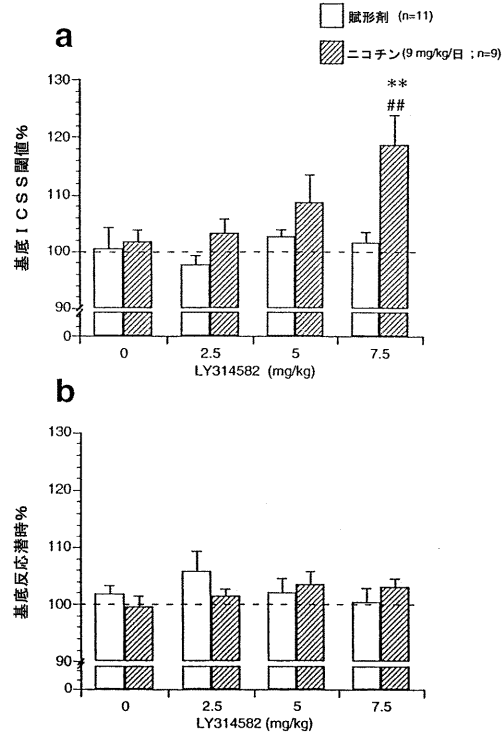


FIGURE 2

【図 3】

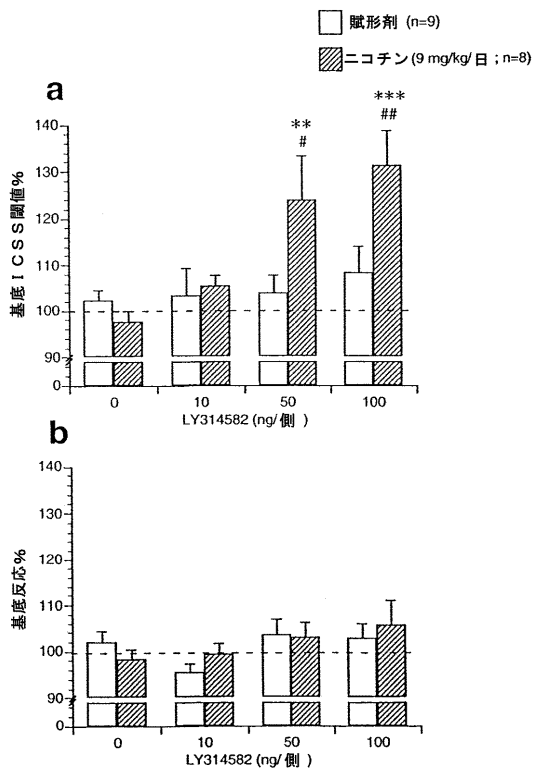


FIGURE 3

【図 4】

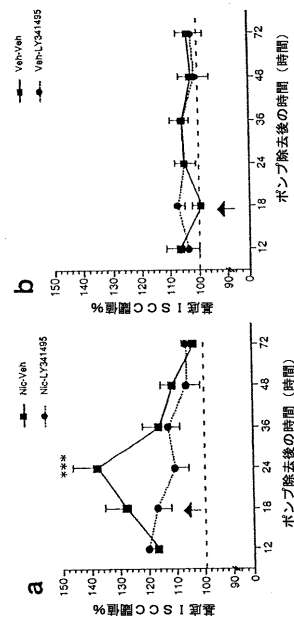


FIGURE 4

【図 5】

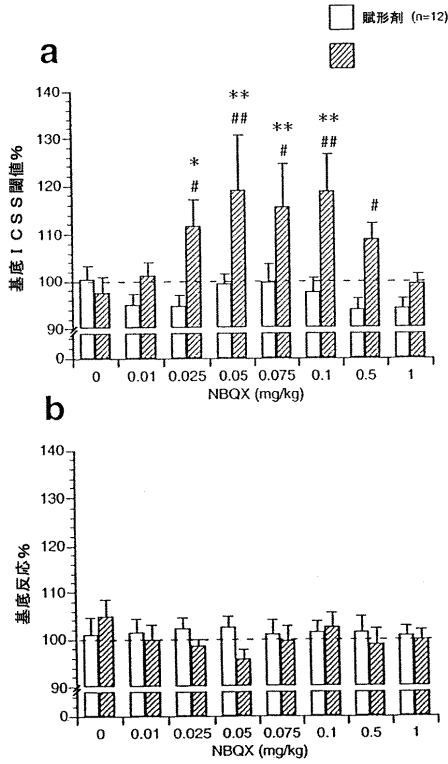


FIGURE 5

【図 6】

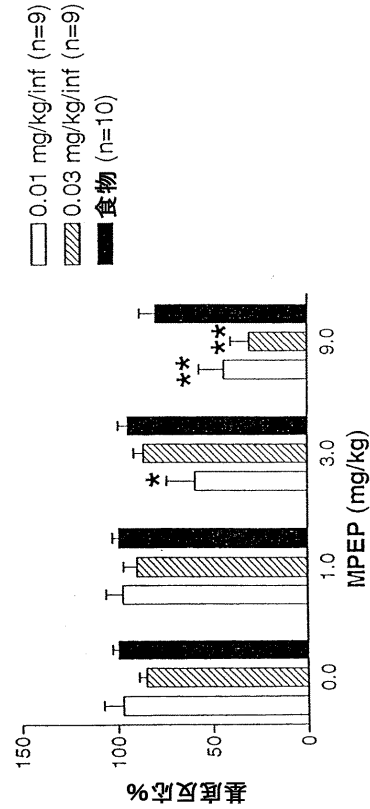


FIGURE 6

【図 7】

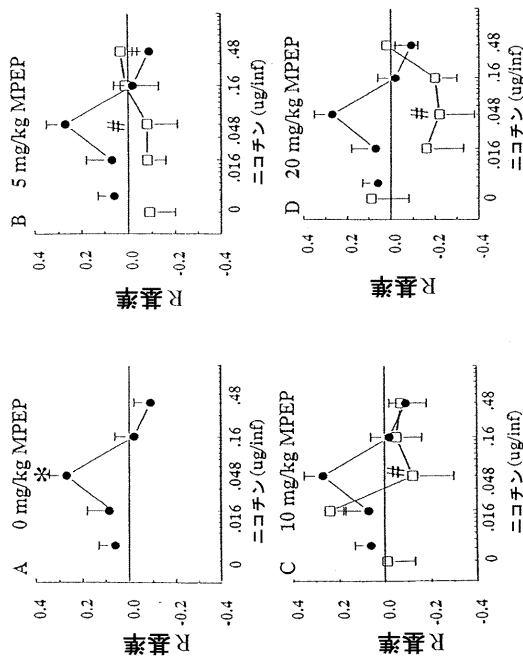


FIGURE 7

【図 8】

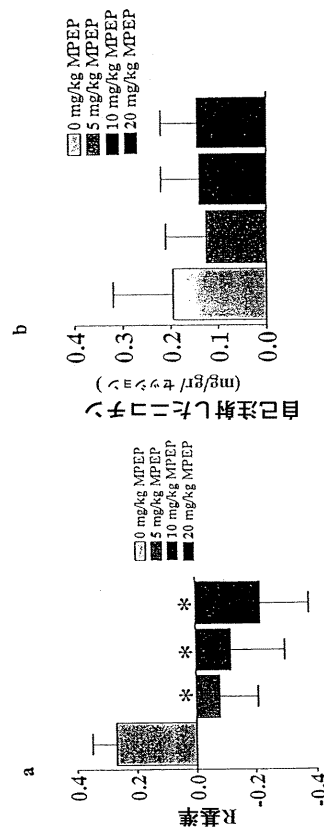


FIGURE 8

【図 9】

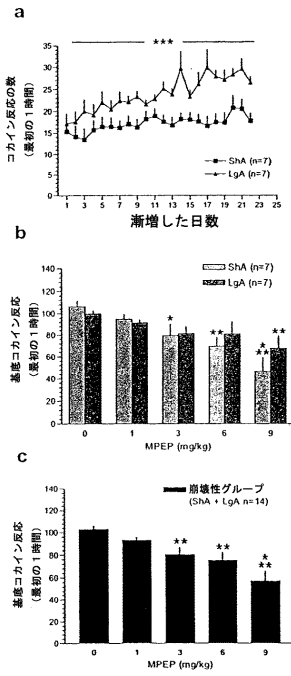


FIGURE 9

【図 10】

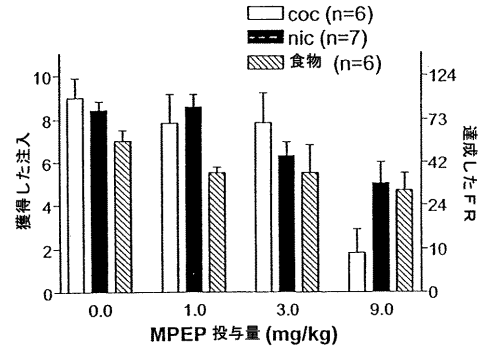


FIGURE 10

【図 11】

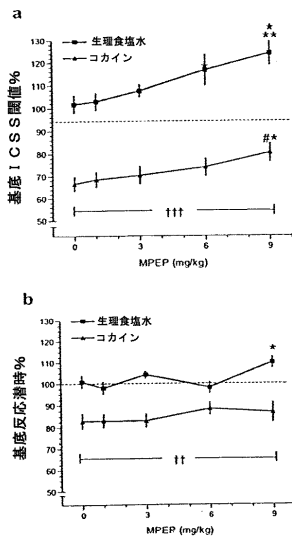


FIGURE 11

【図 12】

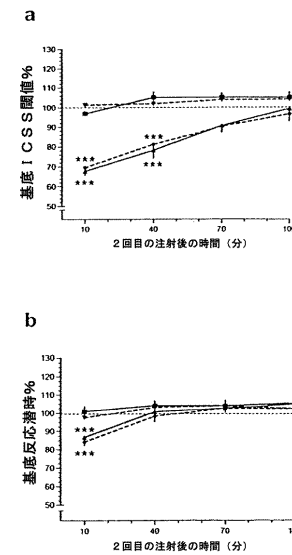


FIGURE 12

【図 13】

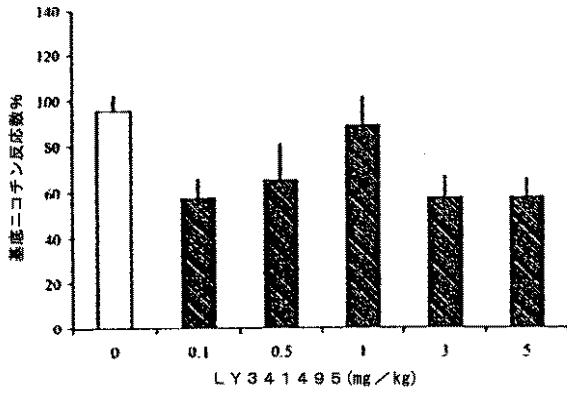


FIGURE 13

【図 14】

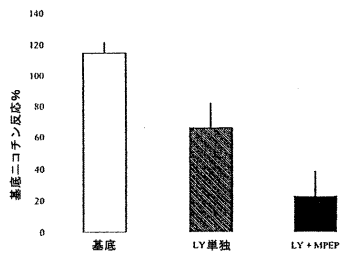


FIGURE 14

【図 16】

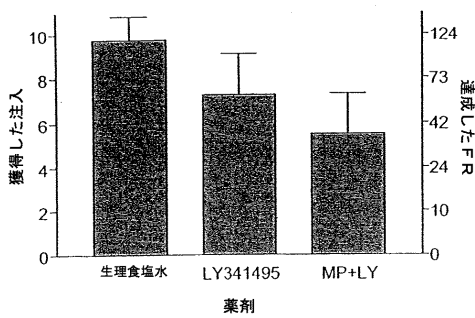


FIGURE 16

【図 15】

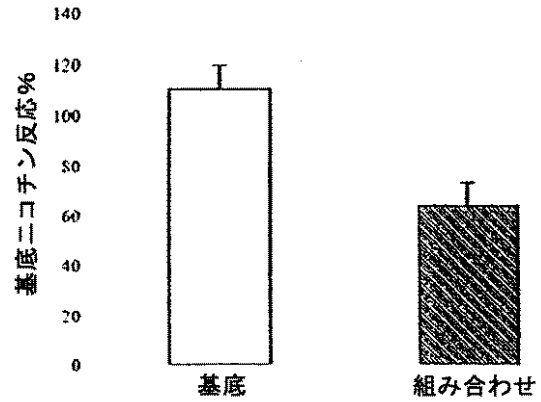


FIGURE 15

【図 17】

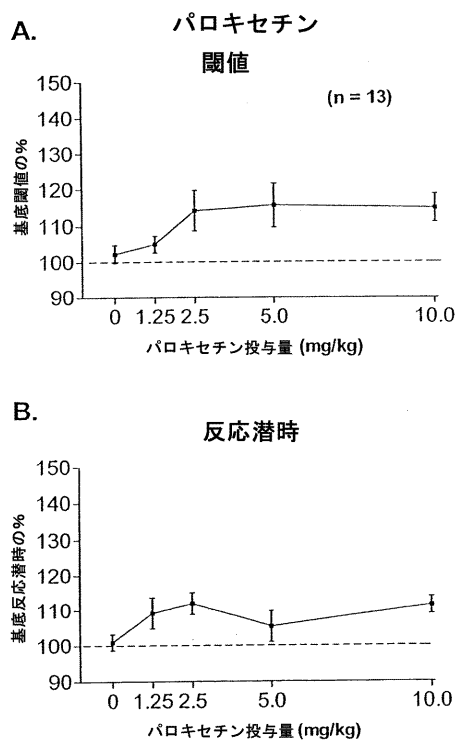


FIGURE 17

【図 18】

p-MPPI + パロキセチン

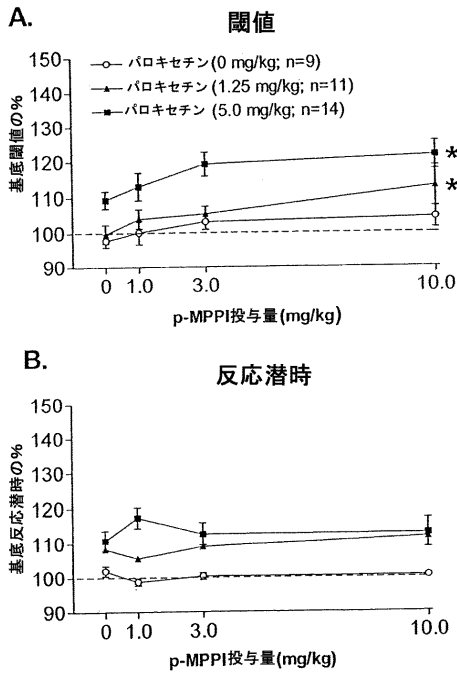


FIGURE 18

【図 19】

慢性アンフェタミン処置

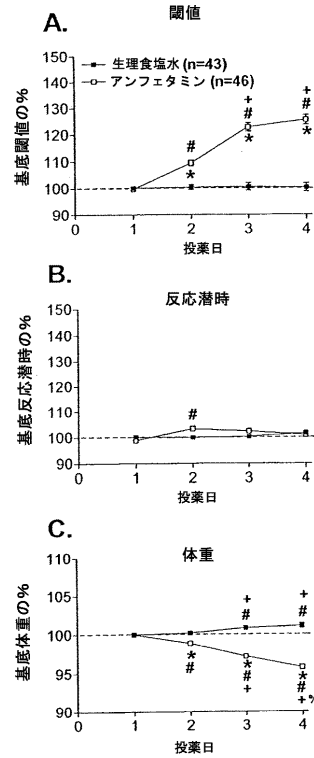


FIGURE 19

【図 20】

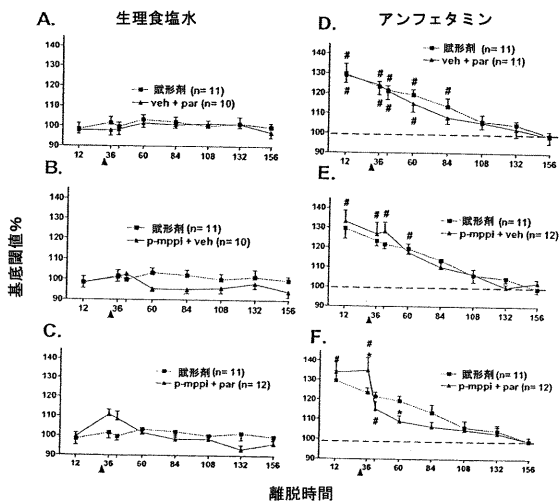


FIGURE 20

【図 21】

アンフェタミン離脱

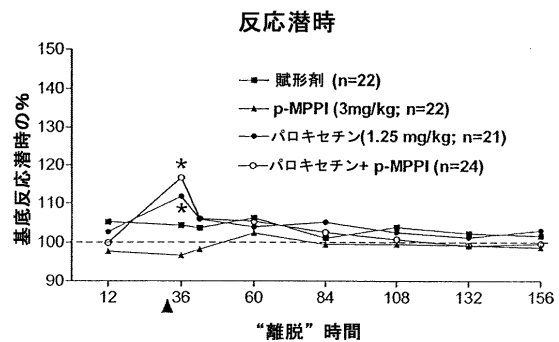
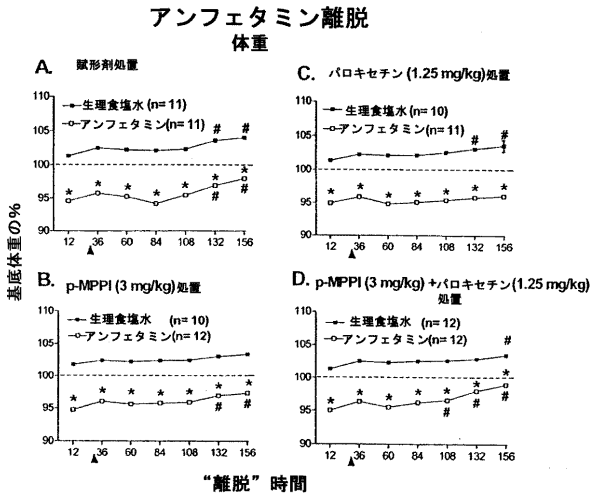


FIGURE 21

【図 2 2】



【図 2 3】

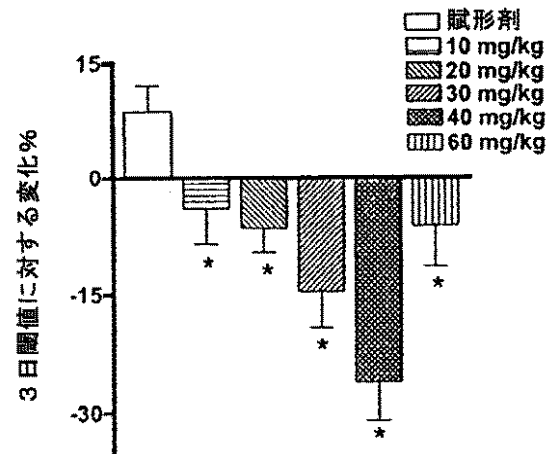


FIGURE 23

【図 2 4】

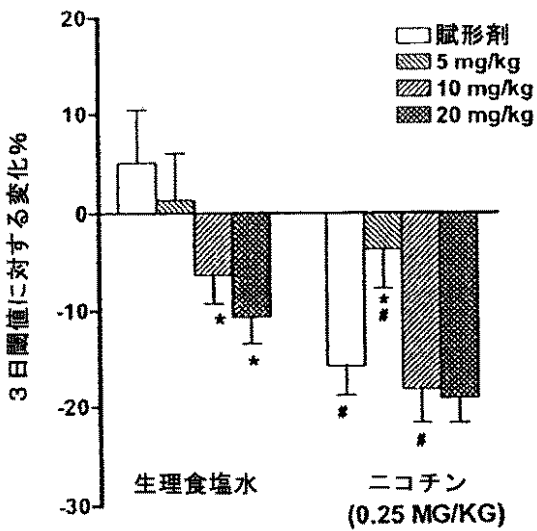


FIGURE 24

【図 2 5】

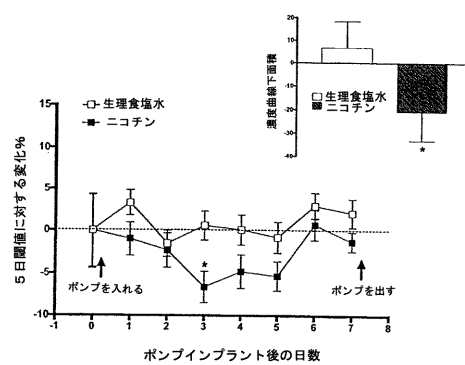


FIGURE 25

【図 26】

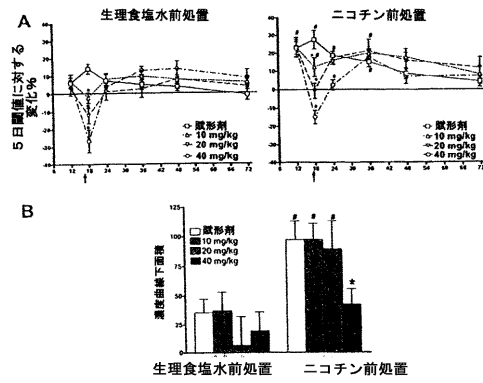


FIGURE 26

【図 27】

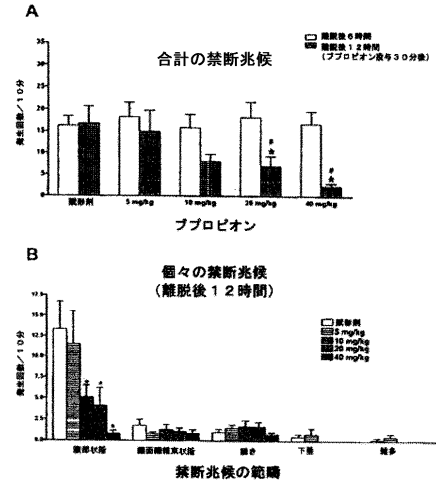


FIGURE 27

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/10061

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/44 A61K31/352 A61P25/24 A61P25/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPQ-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
----------	--	-----------------------

X	FUNDYTUS ET AL.: "Attenuation of morphine withdrawal symptoms by subtype-selective metabotropic glutamate receptor antagonists" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 120, 1997, pages 1015-1020, XP002267683 page 1015, right-hand column page 1017; figures 1B,1C page 1018, right-hand column ----- -/--	1-5, 10-18, 20,21
---	---	-------------------------

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 2004

Date of mailing of the international search report

22 JAN 2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Trifilieff-Riolo, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/10061

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHIAMULERA ET AL.: "Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice" NATURE NEUROSCIENCE, vol. 4, no. 9, 2001, pages 873-874, XP002267684	1-7, 9, 20, 21
Y	page 873	6, 22, 28, 31
X	SCHULZ ET AL.: "The metabotropic glutamate receptor antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) blocks fear conditioning in rats" NEUROPHARMACOLOGY, vol. 41, 2001, pages 1-7, XP002267685 page 6, right-hand column	1-3, 8, 9, 29
X	FUNDYTUS ET AL.: "Effect of activity at metabotropic as well as ionotropic (NMDA) glutamate receptors on morphine dependence" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 1113, 1994, pages 1215-1220, XP009023674 the whole document	1-5, 10-18, 20, 21
Y	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 2001, WATERHOUSE ET AL.: "In vivo evaluation of the mGluR antagonist (8H) LY341495" XP002267686 retrieved from BIOSIS Database accession no. PREV200200003805 abstract & WATERHOUSE ET AL.: "In vivo evaluation of the mGluR antagonist (8H) LY341495" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 27, no. 2, 2001, page 2358,	6, 22, 28, 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/10061

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-22, 27-31

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP 03/10061

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-22, 27-31

2. claims: 23-26

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/34 (2006.01)	A 6 1 P 25/34	
A 6 1 P 25/36 (2006.01)	A 6 1 P 25/36	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 D 213/16 (2006.01)	C 0 7 D 213/16	

(81)指定国 EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,I
E,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,D
M,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LT,LU,LV,MA,MD,MK,MN,MX,NI
,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SE,SG,SK,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,UA,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100064610

弁理士 中嶋 正二

(74)代理人 100072730

弁理士 小島 一晃

(72)発明者 アティナ・マルコウ

アメリカ合衆国 9 2 0 1 4 カリフォルニア州デル・マー、コルデロ・ロード 2 2 8 4 番

(72)発明者 ポール・ケニー

アメリカ合衆国 9 2 1 1 7 カリフォルニア州サンディエゴ、アイドルワイルド・ウェイ 3 5 0 4 番

(72)発明者 ニール・ペイターソン

アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア州エンシニタス、ナンバー・ディ、ノース・バルカン・
アベニュー 1 3 5 3 番

(72)発明者 スヴェトラナ・セメノワ

アメリカ合衆国 9 2 0 0 8 カリフォルニア州カールスバッド、アパートメント 2 5 6、ホスプ・ウ
エイ 2 3 1 2 番

F ターム(参考) 4C055 AA01 BA03 BA05 BA06 CA01 DA01

4C084 AA17 NA14 ZA122 ZC022 ZC392

4C086 AA01 AA02 BC17 MA01 MA04 NA14 ZA12 ZC02 ZC39