

## ニコチン投与とうつ様行動の関係性の解明

小川 真実・坂本 祐介\*・小川 琢未

松尾 由美・橋川 成美・橋川 直也

岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻

\*岡山県岡山市立岡輝中学校

(2014年8月26日受付、2014年11月6日受理)

多くの疫学研究により禁煙とうつ病は密接な関係があることが報告されているが、ニコチン投与がうつ様行動に及ぼす影響については不明な点が多い。今回、マウスにニコチンを投与し、強制水泳試験法を用いてうつ様行動の解析をすることによりニコチンとうつ様行動との関係を解析した。ニコチン投与方法は、2週間毎日2回皮下注射で投与方法と、ニコチンを充填した浸透圧ポンプをマウスの皮下に埋め一定量のニコチンを2週間投与方法の二つを用いて検討した。マウスにニコチンを皮下注射投与してもうつ様行動に有意な変化は見られなかったが、浸透圧ポンプによりニコチンを投与するとうつ様行動の低下が見られた。一般行動試験および学習・記憶行動試験では、どちらのニコチン投与群においてもコントロールと比較して有意な差はみられなかった。以上の結果より、ニコチン投与は一般行動、学習・記憶行動には影響を与えないが、ニコチンの持続的な摂取がうつ様行動を低下する可能性が示唆された。

### 1. 緒言

喫煙とうつ病が密接な関係にあることは、多くの疫学研究により指摘されている。疫学的事実として、喫煙者のうつ病の生涯発病率は非喫煙者よりも高い(Kendler et al., 1993)という報告や、うつ病の既往のある喫煙者は既往のない喫煙者よりも喫煙に対する依存の程度が高い(Breslau et al., 1998)という報告、更に禁煙を開始するとうつ病が発現しやすい(Tsoh et al., 2000)などの報告がされている。

ラットを用いた実験においてニコチン (4 mg/kg/day)を一日2回14日間腹腔内投与すると最終日投与後18時間後の強制水泳試験における不動時間が有意に減少した報告がある(Tizabi et al., 2010)。一方で、ニコチン (1.28 mg/kg/day)を一日2回15日間皮下注射したラットでは投与一月後の強制水泳試験における不動時間の有意な増加が見られ、また1% sucrose preference testにおいてもうつ様行動を示したという報告もある(Iñiguez et al., 2009)。このようにニコチン投与によりうつ様行動を誘発するという報告と改善するという報告の両方があり、ニコチン投与がうつ様行動に及ぼす影響については不明な点が多い。

今回、ニコチン投与によりうつ様行動が誘発されるか否か、また、ニコチン投与が一般行動および学習・記憶行動に影響を与えるか明らかにすることにした。

### 2. 実験材料及び実験方法

#### 2-1 実験動物

実験には、8週齢の雄性ICRマウスを用いた。動物はケージ内に4~6匹ずつ分けて2週間飼育した。自由給餌法にて飼育し、飲料水として水道水を与えた。

#### 2-2 薬物の投与方法

##### ・皮下注射

8週齢の雄性ICRマウスを用い毎日10:00と17:00に3 mg/kg/dayの投与量になるようNicotine hydrogen tartrate salt (Sigma-Aldrich JAPAN)を皮下注射(subcutaneous injection)により投与した。

##### ・浸透圧ポンプ

8週齢の雄性ICRマウスをpentobarbital-Na (50 mg/kg i. p.)麻酔下にて首周辺の毛を刈った後、首の皮膚を切ってポケットを作り、浸透圧ポンプ(ALZET CANADA)を埋め込み、切り口を縫ってヨードにより消毒した。浸透圧ポンプにはニコチン投与量が48 mg/kg/dayとなるよう調整したニコチン溶液を充填した。

#### 2-3 行動試験による評価

##### 【一般行動の評価】

Open-field test ; オープンフィールド試験

自発行動量や不安行動、探索行動などの一般的な行動を評価する方法である。円形上のオープンフィールド槽（直径57.5 cm、高さ32 cm）を用いた。床は19区画にほぼ等面積となるよう線で仕切り、2つの円（直径13.5 cm、35.5 cm）を槽の中央に描きその中央の円から18等分にするように放射状の線を引いた。この線を横切った回数を自発行動量（locomotor activity）とした。すべての区分は面積が大体直径13.5 cmの円と同じになるようにした。このオープンフィールドの中央にマウスを入れ3分間の行動を測定した。

測定項目は、区画を横切った回数（locomotor activity）と立ち上がり動作（探索行動, rearing）の2つを観察した。全ての動物の行動はビデオにて録画し、解析を二重盲検的にカウンターを用いて行った。

#### 【抑うつ様行動の評価】

##### Forced swim test; 強制水泳試験

うつ様行動の指標としてもっとも使用される方法である。マウスを28°Cの水を10 cmまで入れた1 Lビーカー（高さ15 cm、直径11.5 cm）に6分間つけ、1分後からの行動を5分間観察した。暴れることなく浮かんでいる時間（マウスが水から頭を出すのに必要なわずかな動きをしている時間も含む）を不動時間として記録した。

#### 【学習・記憶行動の評価法】

##### Y-maze test; Y字型迷路試験

短期記憶の行動評価法である。マウスをY字型の装置内を探索させた際に認められる自発的交替行動を短期記憶(空間作業記憶)として評価した。Y字型の装置は黒色のアクリル板にて作成した（幅15 cm、壁の高さ15 cm、アームの長さ45 cm）。またY字型アームの先端はマウスからの視界を遮らないように透明のアクリル板を用いて筒状とした。測定を行う前にY字の各アーム先端の外側に新規物を置き、マウスが方向を分かるようにした。測定は8分間行った。マウスをY字迷路のいずれかのアームの先端に置き、迷路内を自由に探索させ、進入したアームを順に記録し、マウスの行動量とした。また、3方向のアームに進入する順序を観察し3回連続して異なるアームへ進入した回数を空間作業記憶として評価した。

#### 2-4 統計学的解析

得られたデータ値は平均値±標準誤差(Mean ± S.E.M.)で表した。得られた結果は、Student's t検定(Student's t-test)を用いて統計学的処理を行った。いずれも有意水準5%以下を有意差ありと判定した。

### 3. 結果

#### 3-1 Open-field test; オープンフィールド試験

ニコチン投与によるマウスの行動変化を見るため、Open-field testを行った。皮下注射、浸透圧ポンプによるニコチン投与により自発行動量、立ち上がり行動に有意な変化は見られなかった(Fig. 1A, B, C, D)。

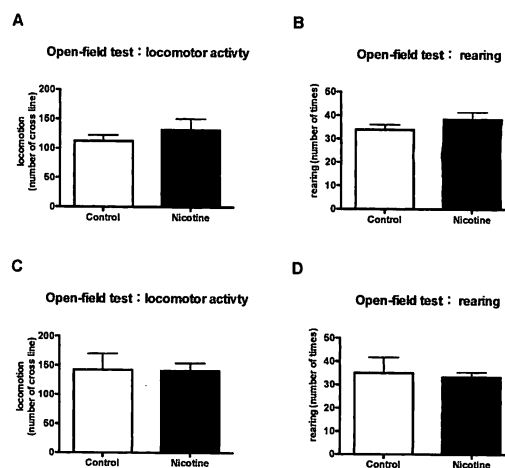


Fig. 1 Effect of 2 weeks of nicotine treatment (A, B; 3 mg/kg/day subcutaneous injection, C, D; 48 mg/kg/day osmotic pump) on locomotor activity (A) and rearing time (B) in the open filed test. Nicotine were administered by subcutaneous injection (A, B) or osmotic pump (C, D) for 15 days (n=3-9).

#### 3-2 Forced swim test; 強制水泳試験

ニコチン投与によるマウスの行動変化を見るため、Forced swim testを行った。皮下注射により3 mg/kg/day ニコチンを投与した群では不動時間に有意な変化は見られなかった(Fig. 2A)。しかし、浸透圧ポンプにより48 mg/kg/day ニコチンを投与した群では有意な不動時間の低下が見られた(Fig. 2B)。

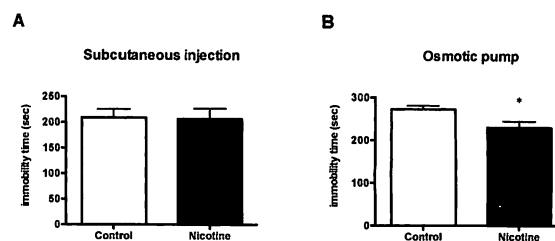


Fig. 2 Effect of 2 weeks of nicotine treatment (A; 3 mg/kg/day subcutaneous injection, B; 48 mg/kg/day osmotic pump) on immobility time during the forced swim test. Nicotine were administered by subcutaneous injection (A) or osmotic pump (B) for 15 days. \* $p < 0.05$  (t-test) (n=3-9).

### 3-3 Y-maze test; Y字型迷路試験

ニコチン投与によるマウスの短期記憶の変化をみるため、Y字型迷路試験を行った。皮下注射、浸透圧ポンプによるニコチン投与での短期記憶の変化はいずれにおいても見られなかった(Fig. 3A, B)。

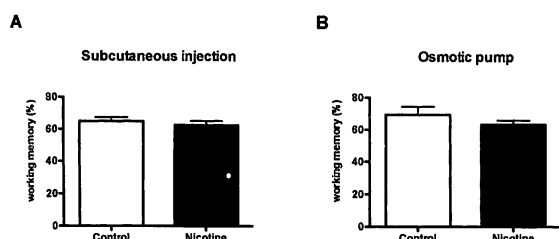


Fig. 3 Effect of 2 weeks of nicotine treatment (A; 3 mg/kg/day subcutaneous injection, B; 48 mg/kg/day osmotic pump) on the working memory. Nicotine were administered by subcutaneous injection (A) or osmotic pump (B) for 15 days (n=3-9).

## 4. 考察

8週齢の雄性ICRマウスを用い10:00と17:00に3 mg/kg/dayの投与量になるよう、Nicotine hydrogen tartrate saltを皮下注射により2週間毎日投与する方法と、ニコチン投与量が48 mg/kg/dayとなるよう調整したニコチン溶液を浸透圧ポンプに充填してマウスに埋め込むことで2週間連続投与する二つの方法を用い、ニコチンによる行動変化を検討した。皮下注射により3 mg/kg/day ニコチン投与した群ではOpen-field testにおける自発行動量、立ち上がり行動、Y-maze testにおける短期記憶のいずれの項目においても有意な変化は見られず、またForced swim testにおける不動時間にも有意な変化は見られなかった。一方、浸透圧ポンプにより48 mg/kg/day ニコチン投与した群ではOpen-field testにおける自発行動量、立ち上がり行動、Y-maze testにおける短期記憶のいずれの項目においても変化は見られなかったが、Forced swim testにおける有意な不動時間の減少が見られた。

ニコチンには神経伝達物質の一種であるアセチルコリンと化学構造が似ているため、喫煙後、数秒で脳に到達し脳内でアセチルコリンに成り代わってニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR)に結合し、ドーパミンなどの神経伝達物質の過剰放出を引き起こす働きがある。nAChR は中枢神経に広範囲に分布しているため、ニコチンは脳の広い範囲に影響を与える。また、ニコチンの低用量投与では自律神経節の刺激により、覚醒やリラックスが生じ、集中力や学習力の改善といった作用がある。一方、高用量投与では自律神経節の

遮断により低血圧や呼吸麻痺などの作用がある。ニコチンの致死量は成人で40-60 mg程度と言われている。

今回浸透圧ポンプによるニコチン投与でのみForced swim testにおける有意な不動時間の減少が見られ、水ストレスに対するうつ様行動の改善が観察された。皮下投与では10:00と17:00での間欠投与であるのに対し、浸透圧ポンプでは常に一定の量投与できるという特徴があり、Forced swim testにおける有意な不動時間の減少はニコチンの持続投与が中枢神経に作用し興奮状態を引き起こした可能性が考えられる。一方、禁煙時にストレスを受けるとうつ病が出現しやすいという報告もあり(Tsoh et al., 2000)、二回間欠投与ではニコチン摂取が連続的でないため、むしろニコチン非摂取時におけるニコチン脱作用のうつ状態を引き起こす可能性も考えられる。

ニコチン投与による記憶への影響として、ニコチンにはシナプス間の伝達速度の促進や長期記憶能力を促す働きがあるという報告がある(López-Hidalgo et al., 2012)。しかしながら、今回浸透圧ポンプ投与、皮下投与いずれもコントロールと比較してY-maze testの変化は見られず、ニコチンは短期記憶に影響を及ぼさないと考えられる。

今後更なる検討として、うつ病モデルマウスとして使用されているストレス負荷マウスにニコチンを投与し行動解析することで、ニコチンとうつ様行動との関係がより一層明らかになると考えられる。また、今回はForced swim testのみでうつ様行動の評価として用いたが、他のうつ様行動評価法であるTail suspension testや1% sucrose preference testでの検討も行う必要があると考えられる。更に今回得られたニコチンによる行動の変化がどのニコチン受容体を介して行われるのか解明が必要である。

## 5. 謝辞

本研究は平成24-25年度公益財団法人ウエスコ学術振興財団の研究助成を受けたものである。

## 参考文献

- 1) Breslau N., Peterson E. L., Schultz L. R., Chilcoat H. D., Andreski P. Major depression and stages of smoking. A longitudinal investigation. *Arch Gen Psychiatry*. 1998; 55: 161-166.
- 2) Iñiguez S. D., Warren B. L., Parise E. M., Alcantara L. F., Schuh B., Maffeo M. L., Manojlovic Z., Bolaños-Guzmán C. A. Nicotine exposure during adolescence induces a depression-like state in adulthood. *Neuropsychopharmacology*. 2009; 34: 1609-1624.

- 3) Kendler K. S., Neale M. C., MacLean C. J., Heath A. C., Eaves L. J., Kessler R. C. Smoking and major depression. A causal analysis. *Arch Gen Psychiatry*. 1993; 50: 36-43.
- 4) López-Hidalgo M., Salgado-Puga K., Alvarado-Martínez R., Medina A. C., Prado-Alcalá R. A., García-Colunga J. Nicotine uses neuron-glia communication to enhance hippocampal synaptic transmission and long-term memory. *PLoS One*. 2012; 7: e49998.
- 5) Tizabi Y., Hauser S. R., Tyler K. Y., Getachew B., Madani R., Sharma Y., Manaye K. F. Effects of nicotine on depressive-like behavior and hippocampal volume of female WKY rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010; 34: 62-69.
- 6) Tsoh J. Y., Humfleet G. L., Muñoz R. F., Reus V. I., Hartz D. T., Hall S. M. Development of major depression after treatment for smoking cessation. *Am J Psychiatry*. 2000; 157: 368-374.
- 7) Zago A., Leão R. M., Carneiro-de-Oliveira P. E., Marin M. T., Cruz F. C., Planeta C. S. Effects of simultaneous exposure to stress and nicotine on nicotine-induced locomotor activation in adolescent and adult rats. *Braz J Med Biol Res*. 2012; 45: 33-37.

## Relationship between nicotine administration and depression-like behavior

Mami OGAWA, Yusuke SAKAMOTO\*, Takumi OGAWA

Yumi MATSUO, Narumi HASHIKAWA and Naoya HASHIKAWA

*Graduate School of Science, Okayama University of Science  
1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

*\* Koki junior high school,*

*12-17 Oka-machi, Kita-ku, Okayama 700-0867, Japan*

(Received August 26, 2014; accepted November 6, 2014)

Many epidemiological studies have reported that there is a close relationship between smoking cessation and depression-like behavior. However, effects of nicotine administration on depression-like behavior remains unclear. In the present study, we have examined the influence of nicotine administration on mice depression-like behavior. Nicotine were administered to the 8-week-old ICR mice by subcutaneous injection (3 mg/kg/day) of two times in a day (AM 10:00 and PM 5:00) or by osmotic mini pump (48 mg/kg/day) for 15 days. Subcutaneous injection of nicotine did not affect depression-like behavior, but osmotic mini pump decreased immobility time of the forced swim test. General behavior in the open-field test and learning memory behavior in the Y-maze test did not change by nicotine administration (subcutaneous and osmotic mini pump) compared with control mice. These results suggest that consecutive intake of nicotine decrease depression-like behavior.

**Keywords:** nicotine; depression-like behavior; smoking cessation; behavior test.