

セルトラリン錠「明治」のマウスを用いた 抗うつ作用と抗不安作用の検討

大山昌代¹⁾ 中村美栄²⁾ 三國谷雄¹⁾
今西泰一郎¹⁾ 三浦哲也¹⁾

要 約

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発したセルトラリン錠「明治」(試験製剤)について、先発医薬品でうつ病・うつ状態、パニック障害治療剤であるジェイゾロフト[®]錠(ファイザー株式会社、標準製剤)を比較対照として、マウスを用いて抗うつ作用と抗不安作用を検討した。抗うつ作用は尾懸垂試験における不動時間を、抗不安作用については恐怖条件付け試験におけるすくみ行動を指標として評価した。

両製剤を磨砕後、懸濁液を調製し、セルトラリンとして10または30 mg/kgの用量でマウスに経口投与した。尾懸垂試験において、両製剤はともに10および30 mg/kgの両用量において不動時間を有意に短縮した。また、恐怖条件付け試験では、両製剤ともに30 mg/kgのみですくみ行動を有意に短縮した。

以上の結果より、マウスを用いた尾懸垂試験ならびに恐怖条件付け試験において、両製剤は同程度の抗うつ作用と抗不安作用を示すことが認められた。これより、試験製剤はヒトにおいても標準製剤と同等のうつ症状改善および不安症状改善効果を発揮することが期待される。

キーワード：セルトラリン，SSRI，尾懸垂試験，恐怖条件付け試験，後発医薬品

はじめに

塩酸セルトラリンは選択的セロトニン再取り込み阻害剤(Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, 以下、SSRIと記載する)である。経口投与後、良好に脳内移行し、セロトニン再取り込みを強力かつ選択的に阻害することにより、シナプス間隙のセロトニン量を高めてセロトニン作動性神経伝達を賦活化する¹⁾²⁾。

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発したセルトラリン錠「明治」(以下、試験製剤と記載する)

は、うつ病・うつ状態、パニック障害治療薬であるジェイゾロフト[®]錠(ファイザー株式会社、以下、標準製剤と記載する)と有効成分を同量含有する後発医薬品である。

マウスの尾懸垂試験はマウスの尾を固定して一定時間吊り下げた時に出現する不動状態を測定するもので、イミプラミンなど三環系抗うつ薬やフルボキサミンやパロキセチンなどのSSRIをあらかじめ投与しておく、不動状態が短縮されることから^{3)~5)}、抗うつ薬の評価系として汎用されている。一方、恐怖条件付け試験は、電気ショックを負荷された動物が再び同じ環境に置かれると、電気ショックが負荷されなくても、過去に電気ショックを受けた環境に対して強いストレスを感じて動けなくなる

1) Meiji Seika ファルマ株式会社

2) 株式会社日本バイオリサーチセンター

「すくみ行動」を指標とする⁶⁾。ベンゾジアゼピン系抗不安薬やSSRIがすくみ行動を短縮する^{7)~9)}ことから、抗不安効果を評価する動物モデルとして位置付けられている。

以上のことから、今回試験製剤の抗うつ作用についてマウスを用いた尾懸垂試験を、また抗不安作用についてはマウスの恐怖条件付け試験を用いて標準製剤と比較した。

I. 材料および実験方法

1. 使用薬剤と調製

試験製剤としてセルトラリン錠 100 mg「明治」を、標準製剤としてジェイゾロフト[®]錠 100 mgを使用した。両製剤は、濃度毎に必要な錠数をメノウ乳鉢に入れてよく磨砕後、0.5%メチルセルロース（以下、溶媒と記載する）で懸濁液を調製した。セルトラリンとして1ならびに3 mg/mLの2濃度の懸濁液を調製した。

2. 使用動物

尾懸垂試験ではICR系雄性マウス（日本チャールス・リバー株式会社）を用い、12週齢で入荷し、ステンレス製金網を敷いたプラスチック製ケージ（W 175 × D 245 × H 125 mm）を用いて個別飼育とした。恐怖条件付け試験ではC57BL/6NCrI系雄性マウス（日本チャールス・リバー株式会社）を用い、10週齢で入荷し、床敷（サンフレック、日本チャールス・リバー株式会社）を入れたプラスチック製ケージ（W 175 × D 245 × H 125 mm）を用いて1ケージ5匹までの群飼育とした。動物は5日間の検疫期間、その後2日間以上の馴化期間を設け、実験に用いた。設定温度：23℃（許容範囲：20.0～26.0℃）、設定湿度：55%（許容範囲：40.0～70.0%）、明暗各12時間（照明：午前6時～午後6時）、換気回数：12回/時（フィルターを通した新鮮空気）に維持された飼育室で動物を飼育した。固型飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社）および水道水は自由に摂取させた。

3. 試験方法

1) 尾懸垂試験

尾懸垂試験法は、Steruら（1985）¹⁰⁾の方法に準拠して行った。マウスの尾の先から約1 cmの位置にセロハンテープを貼り、ダブルクリップで尾部のセロハンテープを挟み、ダブルクリップの輪の部分で

尾懸垂装置（M's工房）に吊るして測定開始とし、マウスを7分間懸垂させた。マウスの尾懸垂時の動作をビデオカメラで撮影し、DVDレコーダーを用いてDVD-Rに録画した。DVD-Rの映像から、開始後1分間を除く6分間における静止状態を不動状態とし、その時間（秒）をストップウォッチで測定した。試験の2日前に1日2回（測定間隔を2時間以上空ける）測定し、2回目の不動時間が40秒以上示す個体を選別し、各群の不動時間および体重の平均がほぼ等しくなるように群分けして試験に用いた。試験製剤および標準製剤の懸濁液または溶媒は、試験開始1時間前に経口投与（10 mL/kg）した。なお、各群の例数は12匹とした。

2) 恐怖条件付け試験

恐怖条件付け試験は、マウスをフェアードコンディション計測装置（Acti Metrics社）の中に入れ、15秒毎に0.4 mA、1秒間の電気刺激負荷を4分間行い、条件付けした。条件付けの日を1日目とし、7日目にマウスを再びフェアードコンディション計測装置に入れ、電気刺激無しの条件で4分間のすくみ行動を測定した。すくみ行動は動物が動いた時のモニター画像のズレにより検出し、4分間中の%として算出した。試験製剤および標準製剤の懸濁液または溶媒は、1日目の条件付け刺激終了直後から1日1回、7日間反復経口投与（10 mL/kg）した。なお、7日目はすくみ行動測定1時間前に投与した。各群の例数は12匹とした。

4. 統計学的処理

データは平均値および標準誤差で示した。溶媒に対する試験製剤または標準製剤の有意差検定では、Bartlett検定による等分散性の検定後、Dunnett検定を行った。両製剤の同一用量間の検定には、Studentのt検定を用いた。有意水準は5%とした。なお、有意差検定には、統計プログラム（SASシステム；SAS Institute Japan株式会社）を使用した。

5. 動物倫理

本試験は、Meiji Seikaファルマ株式会社横浜研究所動物実験管理委員会および株式会社日本バイオリサーチセンター実験動物委員会が審査・承認された方法に従い、株式会社日本バイオリサーチセンター羽島研究所で実施した。

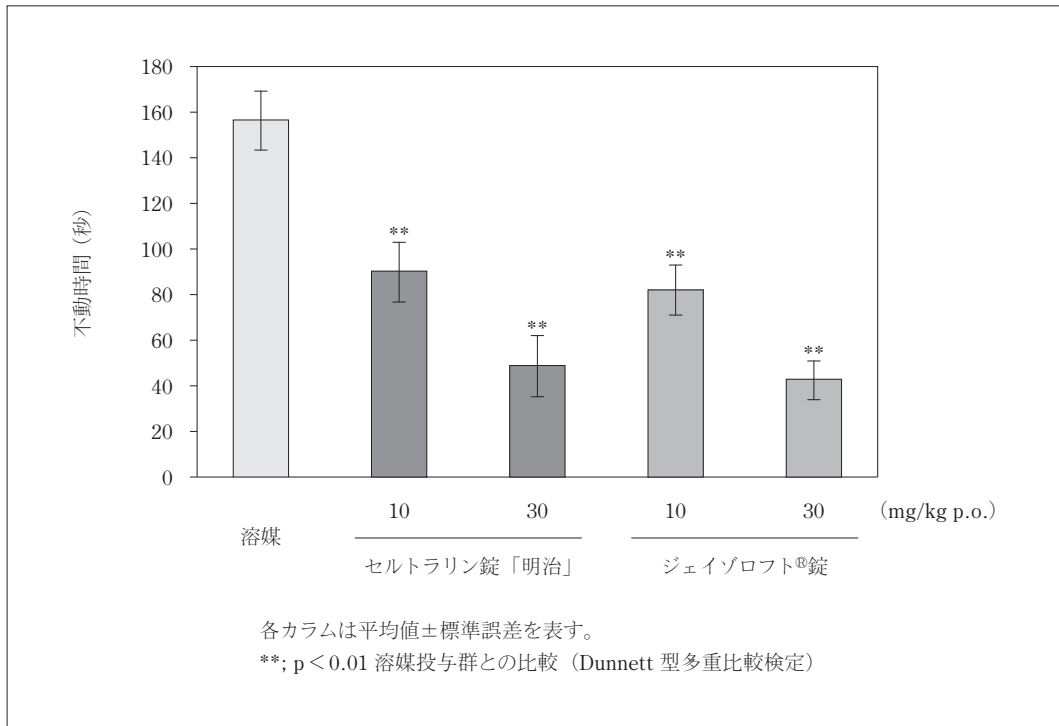


図1 試験製剤および標準製剤のマウス尾懸垂試験における効果

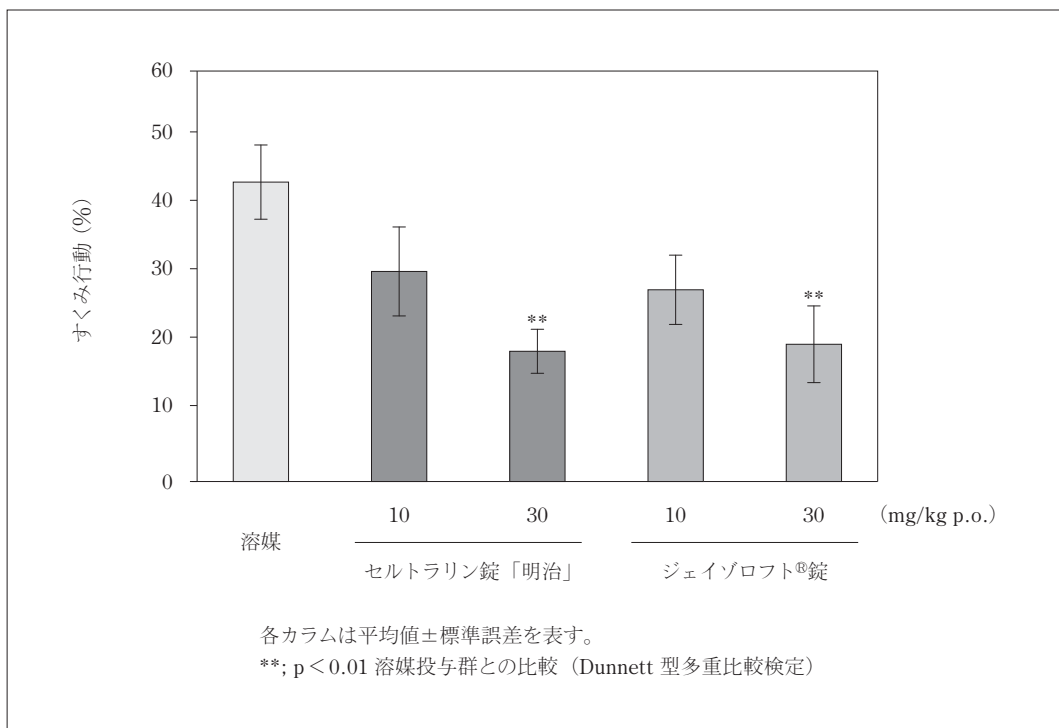


図2 試験製剤および標準製剤のマウス恐怖条件付け試験における効果

II. 結 果

試験製剤および標準製剤の尾懸垂試験の成績について図1に示した。両製剤は用量依存的に不動時間を短縮させ、いずれも10ならびに30 mg/kgで溶

媒投与群に比較して有意な短縮 (p < 0.01) が認められた。また、両製剤の同一用量間で比較したところ有意な差はなかった。

また、試験製剤および標準製剤の恐怖条件付け試験での成績について図2に示した。両製剤はすくみ

行動を用量依存的に減少させ、いずれも 30 mg/kg で溶媒投与群に比較して有意な減少が認められた ($p < 0.01$)。また、両製剤の同一用量間比較では有意な差は認められなかった。

III. 考 察

Meiji Seika ファルマ株式会社が開発したセルトラリン錠「明治」は、うつ病・うつ状態、パニック障害治療剤であるジェイゾロフト[®]錠の後発医薬品であり、「後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン」に従い製剤評価（溶出試験およびヒトでの生物学的同位試験）を実施し、先発医薬品と同等であることが認められ¹¹⁾、製造販売承認された医薬品である。本稿ではマウスの尾懸垂試験と恐怖条件付け試験を用いてセルトラリン錠「明治」と先発医薬品であるジェイゾロフト[®]錠の抗うつ作用と抗不安作用について比較検討した。

尾懸垂試験は 1985 年に Steru ら¹⁰⁾により提唱された抗うつ薬の評価方法で、マウスの尾を吊るした時の動物の動きを測定する方法である。マウスは尾を固定して逆さ吊りの状態にされると最初は激しく暴れるが、次第に活動量が低下するとともに不動状態が出現する。その後、野村ら³⁾が活動量の低下よりも不動状態が抗うつ薬の効果をより感度良く検出できることを示したことから、不動時間を指標とした尾懸垂試験は三環系や SSRI などの抗うつ薬の効果の簡便な評価系として汎用されるに至っている。

そこで著者らは、尾懸垂試験を用いて両製剤の抗うつ作用を検討した。その結果、両製剤とも 10 mg/kg 以上の投与で用量依存的に不動時間を短縮し、溶媒投与群に比べて有意差が認められた。また、両製剤の同一用量間で有意な差は認められなかった。以上の結果より、両製剤ともに同程度の抗うつ作用が期待されることが示唆された。

一方、恐怖条件付け試験は、電気ショックを負荷された動物が再び同じ環境に置かれると、電気ショックが負荷されなくても、過去に電気ショックを受けた環境に対して強いストレスを感じ動けなくなる行動、すなわちすくみ行動を指標とする⁶⁾⁷⁾。ラットを用いた恐怖条件付け試験において、ベンゾジアゼピン系抗不安薬やシタロプラム、フルボキサミンなどの SSRI、さらに 5-HT_{1A} 作動薬のプスピロンがすくみ行動を短縮することが報告されてい

る⁸⁾⁹⁾¹²⁾。またマウスを用いた同様の検討においてもベンゾジアゼピン系抗不安薬やフルボキサミンがすくみ行動を短縮する¹³⁾¹⁴⁾。以上のことから、不安障害を適応症とするセロトニン系の薬剤が有効性を示す不安障害モデルとしての有用性が示唆されている。

そこで、マウスの恐怖条件付け試験を用いて、両製剤の抗不安作用について検討した。両製剤とも 10 mg/kg ではすくみ行動に有意な影響を示さなかったが、30 mg/kg の投与では溶媒投与群に比べてすくみ行動を有意に短縮した。両製剤の同一用量間で有意な差は認められなかった。以上の結果より、両製剤ともに同程度の抗不安作用が期待されることが示唆された。

塩酸セルトラリンの原薬を用いたこれまでの論文で、抗うつ作用を評価するマウス強制水泳試験における有効用量範囲は 3.2 ~ 56 mg/kg の皮下投与、抗不安作用を評価するガラス玉覆い隠し行動試験では 5 ~ 30 mg/kg/ 日の 14 日間経口投与で用量依存的な効果が認められることが報告されている²⁾¹⁵⁾。今回の試験では、有効成分であるセルトラリンだけでなく、両製剤ともに添加剤も含む製剤を粉碎・懸濁して評価を実施したが、ほぼ同じ用量範囲で効果が示されたものと考えられる。

セロトニン神経系を活性化することにより、尾懸垂試験では不動時間の短縮、恐怖条件付け試験ではすくみ行動の短縮が認められるとされている。今回これらの評価系に対して両製剤の有効性が認められたことから、両製剤の SSRI 作用によりマウス脳内でセロトニン神経系が賦活化されたと考えられる。

以上より、マウス尾懸垂試験および恐怖条件付け試験において、試験製剤は標準製剤と同等の有効性を示したことから、セルトラリン錠「明治」はヒトにおいてジェイゾロフト[®]錠と同様の効果を示すことが期待される。

文 献

- 1) Sprouse J, Clarke T, Reynolds L, et al: Comparison of the effects of sertraline and its metabolite desmethylsertraline on blockade of central 5-HT reuptake in vivo. *Neuropsychopharmacology* 1996; **14**: 225-31.
- 2) Koe BK, Weissman A, Welch WM, et al: Sertraline, 1S,4S-N-methyl-4-(3,4-dichlorophenyl)-

- 1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthylamine, a new uptake inhibitor with selectivity for serotonin. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; **226**: 686-700.
- 3) 野村総一郎, 成瀬梨花, 岡田寿夫: 抗うつ薬のスクリーニング法(2)—尾懸垂試験. *薬物・精神・行動* 1992; **12**: 207-13.
- 4) Perrault G, Morel E, Zivkovic B, et al: Activity of litoxetine and other serotonin uptake inhibitors in the tail suspension test in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; **42**: 45-7.
- 5) Fujishiro J, Imanishi T, Onozawa K, et al: Comparison of the anticholinergic effects of the serotonergic antidepressants, paroxetine, fluvoxamine and clomipramine. *Eur J Pharmacol* 2002; **454**: 183-8.
- 6) Fanselow MS, Helmstetter FJ: Conditional analgesia, defensive freezing, and benzodiazepines. *Behav Neurosci* 1988; **102**: 233-43.
- 7) 斎藤顕宜, 山口和正, 村沢寛泰, 他: 動物モデルによる抗うつ薬の創薬「恐怖条件付けストレスモデル」および「嗅球摘出モデル」を用いた抗うつ薬創薬のアプローチ. *日本神経精神薬理学雑誌* 2003; **23**: 75-82.
- 8) Inoue T, Tsuchiya K, Koyama T: Serotonergic activation reduces defensive freezing in the conditioned fear paradigm. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; **53**: 825-31.
- 9) Li XB, Inoue T, Hashimoto S, et al: Effect of chronic administration of flesinoxan and fluvoxamine on freezing behavior induced by conditioned fear. *Eur J Pharmacol* 2001; **425**: 43-50.
- 10) Steru L, Chermat R, Thierry B, et al: The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1985; **85**: 367-70.
- 11) Meiji Seika ファルマ株式会社: 社内資料.
- 12) Kakui N, Yokoyama F, Yamauchi M, et al: Anxiolytic-like profile of mirtazapine in rat conditioned fear stress model: Functional significance of 5-hydroxytryptamine 1A receptor and alpha1-adrenergic receptor. *Pharmacol Biochem Behav* 2009; **92**: 393-8.
- 13) Miyamoto J, Tsuji M, Takeda H, et al: Characterization of the anxiolytic-like effects of fluvoxamine, milnacipran and risperidone in mice using the conditioned fear stress paradigm. *Eur J Pharmacol* 2004; **504**: 97-103.
- 14) Miyamoto J, Tsuji M, Takeda H, et al: Pretreatment with diazepam suppresses the reduction in defensive freezing behavior induced by fluvoxamine in the conditioned fear stress paradigm in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; **409**: 81-4.
- 15) 山中教造, 鈴木恵子, 岡本佳子: マウスの marble-burying 行動に及ぼすセルトラリン反復投与の影響. *神経精神薬理* 1997; **19**: 387-93.
-