

セロトニン遊離薬 *p*-chloromethamphetamine および fenfluramine による雄ラットの性機能誘発効果

米澤 章彦, 善積 克, 蛸子 学, 木村 行雄*, 櫻田 忍

*十和田泌尿器科

Penile erection and ejaculation induced by the serotonin releasers in male rats

Akihiko YONEZAWA, Masaru YOSHIZUMI, Manabu EBIKO, Yukio KIMURA* and Shinobu SAKURADA

*Towada Urology

(Received November 22, 2004)

Methodological shortcomings present in elicitation of penile erection and ejaculation in anesthetized rats. The present study has demonstrated that intraperitoneal (i.p.) injection of *p*-chloromethamphetamine (PCMA; 1-10 mg/kg) and fenfluramine (FEN; 1-10 mg/kg), the serotonin (5-HT) releasing drugs, elicited dose-dependently both penile erection and ejaculation in anesthetized rats. PCMA (10 mg/kg) and FEN (10 mg/kg) caused an intermittent cluster of genital responses consisting of glans erections and penile cups, which closely resembles the response observed during the ex copula tests in unanesthetized rats. PCMA and FEN also caused frequent ejaculations and the weighing of ejaculates accumulated over 60 min were almost equivalent between both drugs. Pretreatment with a 5-HT synthesis inhibitor *p*-chlorophenylalanine (150 mg/kg \times 3, i.p.) and a selective 5-HT reuptake inhibitor citalopram (1 and 3 mg/kg, i.p.) significantly inhibited the expression of both PCMA- and FEN-induced penile erection and ejaculation, while acute spinal transection (T₈₋₉) did not affect the responses. These results indicate that PCMA- and FEN-induced penile erection and ejaculation in anesthetized rats are mainly elicited by the release of 5-HT which may be limited to the peripheral sites. Furthermore, the sexual responses of male rats can be easily and reliably elicited by the administration of PCMA and FEN, which may be useful for the study of the mechanisms underlying sexual functions.

Key words — penile erection, ejaculation, serotonin (5-HT) releasing drugs, anesthetized rats

緒 言

Amphetamineやmethamphetamineのハロゲン化誘導体が誘導本体に比べて強力なserotonin (5-HT) 遊離作用を有し, 5-HT作動性神経や血小板などから5-HTを遊離することが明らかにされて以来, 5-HTの生理的役割を解明する手段として広く応用されている¹⁻⁴⁾. 先に我々も, 雄の性機能発現における5-HTの役割を明確にするため, 陰茎勃起ならびに射精機能に及ぼす *p*-

chloroamphetamine (PCA) の影響について検討を加え, 幾つかの興味ある知見を得た^{5, 6)}. すなわち, PCAの全身性投与により麻酔下ではこれまで誘発が困難であったラット特有の亀頭部勃起 (*glans erection* および *penile cup*) や精液の射出現象 (*ejaculation*) を誘発すること, またこの性機能誘発効果には末梢部位での5-HT遊離が関与する可能性があることなどである. 上述したごとく, PCAは麻酔下の動物において陰

茎勃起や射精を誘発することから覚醒下では検討できない外科的処置を必要とする実験への応用が期待されている^{7,8)}。

そこで今回は、PCAと同様に5-HT遊離作用を有する2種類のハロゲン化誘導体*p*-chloromethamphetamine (PCMA) およびfenfluramine (FEN) の性機能誘発効果を検討し、性機能発現における5-HTの役割を調べるとともに両誘導体の性機能研究への応用の可能性を検討した。

実験方法

1. 使用動物

Wistar-ST系雄性ラット(体重330~440 g, SLC)を使用した。動物は室温23±1℃, 湿度55±5%, 照明時間9:00~21:00の一定環境のもとで飼育し、水と固形飼料(CE-2, 日本クレア)は自由に摂取させた。なお、本実験は東北薬科大学動物実験指針に従って実施された。

2. 使用薬物および投与方法

実験に使用した薬物は、*p*-chloromethamphetamine

(PCMA, Sigma), fenfluramine (FEN, 藤沢薬品工業株式会社提供), *p*-chlorophenylalanine (PCPA, Sigma), citalopram (ゼリア新薬株式会社提供)である。これらの薬物は生理食塩液に溶解し、腹腔内(i.p.)に投与した。なお、PCPAは24時間間隔で3回投与し、最終投与24時間後にPCMAまたはFENを投与した。citalopramは、PCMAまたはFEN投与15分前に処理した。

3. 陰茎勃起と射精の観察

性機能の観察は、前報⁶⁾に従った。すなわち、pentobarbital Na (50 mg/kg i.p.) 麻醉下にラットを背位に固定し、陰茎勃起ならびに射精の観察を容易にするため陰茎を包皮から露出した状態で行った。PCMAまたはFEN投与は陰茎を露出する直前に行い、陰茎(亀頭部および陰茎体部)の変化ならびに外尿道口からのseminal materialの射出を60分間注意深く観察した。

測定した項目は、①glans erection (陰茎体部および亀頭部は膨張するが、亀頭部のトランペット状の変化は認められない; 図1) の発現およびその潜時、②penile cup (陰茎体部および亀頭

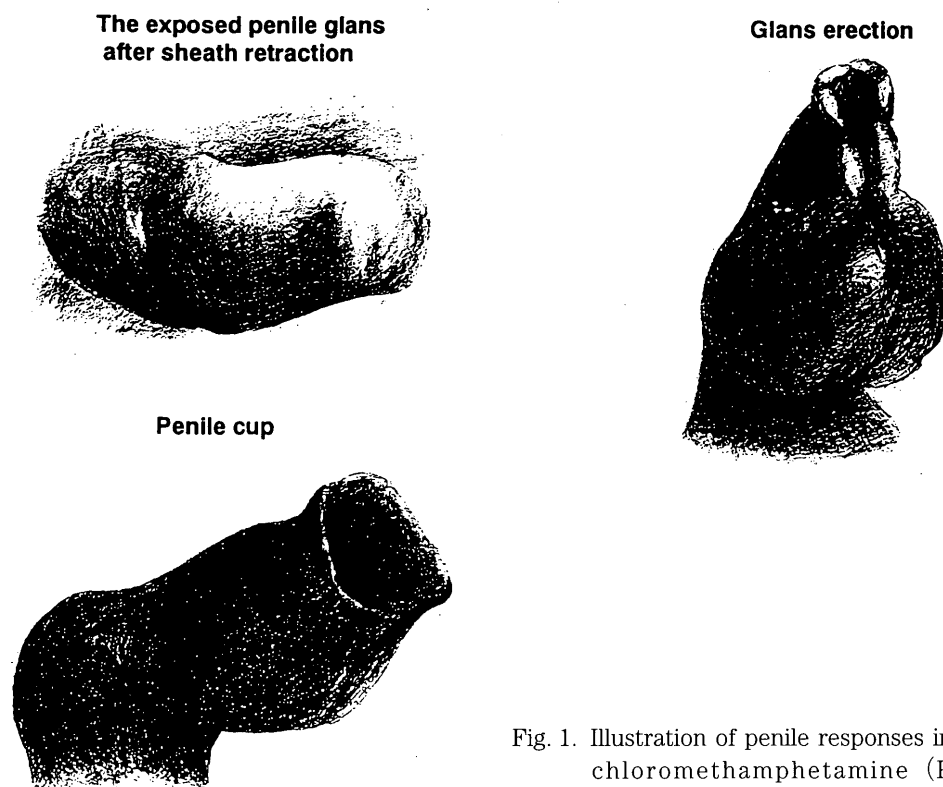


Fig. 1. Illustration of penile responses induced by *p*-chloromethamphetamine (PCMA) and fenfluramine (FEN) in anesthetized rats.

部が十分に膨張し、さらに亀頭部先端がトランペット状に広がる；図1)の発現、③ejaculation (seminal materialの外尿道口からの射出)の発現およびその潜時と重量で、それぞれの発現回数ならびに潜時の測定にはイベントレコーダー(CIF-E12, 東洋産業株式会社)を用いた。

4. 脊髄切断

pentobarbital Na (55 mg/kg, i.p.) 麻酔下にラットを腹位に固定し、第9胸椎を目印に前後約1cm程度皮膚を切開し、周辺の筋肉を注意深く取り除き胸椎を露出した。その後、脊髄を損傷しないよう注意しながら椎弓切除を行い、第8胸椎から第9胸椎 (T₈₋₉) にかけて脊髄を露出した。露出した脊髄は先端を鈍角にした27G注射針を用いて切断し、切断部には出血を防ぐ目的で止血用ゼラチンスポンジ (スポンゼル；山之内製薬) を挿入した。必要に応じてpentobarbital Na (5mg/kg) で追加麻酔を施し、薬物処理は切断後約20分程度経過してから行った。なお、対照群

(sham群)には上記と同様の外科的処置を施し脊髄を露出させたが、切断処理は行わなかった。

5. 統計処理

実験結果は、平均値±標準誤差 (mean ± S.E.) で示した。有意差検定はMann-Whitney U検定を用いて行ない、 $p < 0.05$ の場合有意差ありと判定した。

実験結果

1. PCMAおよびFENによる性機能誘発効果

PCMAおよびFENによる陰茎勃起 (glans erection) ならびに射精 (seminal plugの射出)の発現率を図2に示した。両薬物ともに3 mg/kg以上の用量で全例に陰茎勃起 (glans erection) を誘発した。射精の発現率はPCMAでは用量依存的に増加し、10 mg/kgで全例にその発現を認めた。また、FENにおいては3 mg/kg以上の用量で全例に射精が認められた。

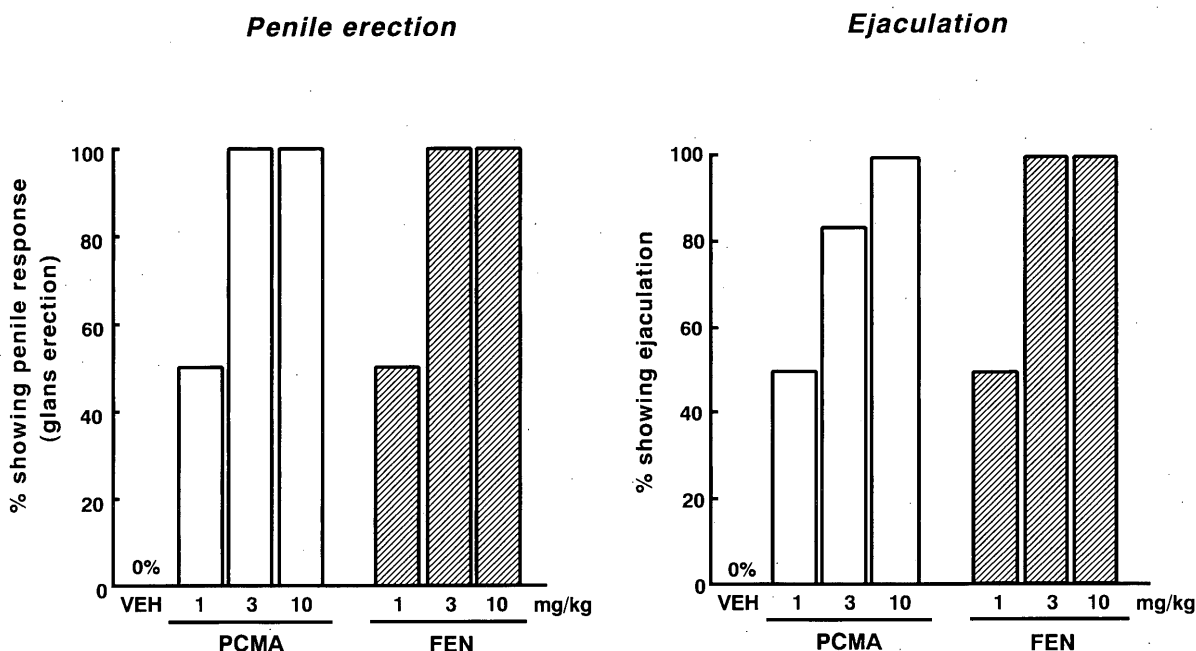


Fig. 2. Incidence of penile erection and ejaculation induced by *p*-chloromethamphetamine (PCMA) and fenfluramine (FEN) in anesthetized rats. The expression of glans erection and the ejection of the seminal materials from the external urethra were defined as erection and ejaculation, respectively. Each drug was administered i.p. immediately before the penile sheath retraction and the responses were observed for 60 min. N=6~8

2. PCMAおよびFEN誘発性陰茎勃起ならびに射精の特徴

PCMAおよびFENによる性功能発現の特徴を明確にするため, 両薬物 (10 mg/kg, i.p.) により誘発される各種の性的現象をイベントレコーダーを用いて解析した. 図3に示したように,

PCMAならびにFENは陰茎勃起 (glans erection) の発現に先行して射精を誘発した. 両薬物とも glans erectionは約30回, penile cupは約10回とほぼ同程度の発現を認め, 特に麻酔下では誘発が困難であった penile cupを高頻度に発現するという特徴が明らかとなった. 射精は断続的な

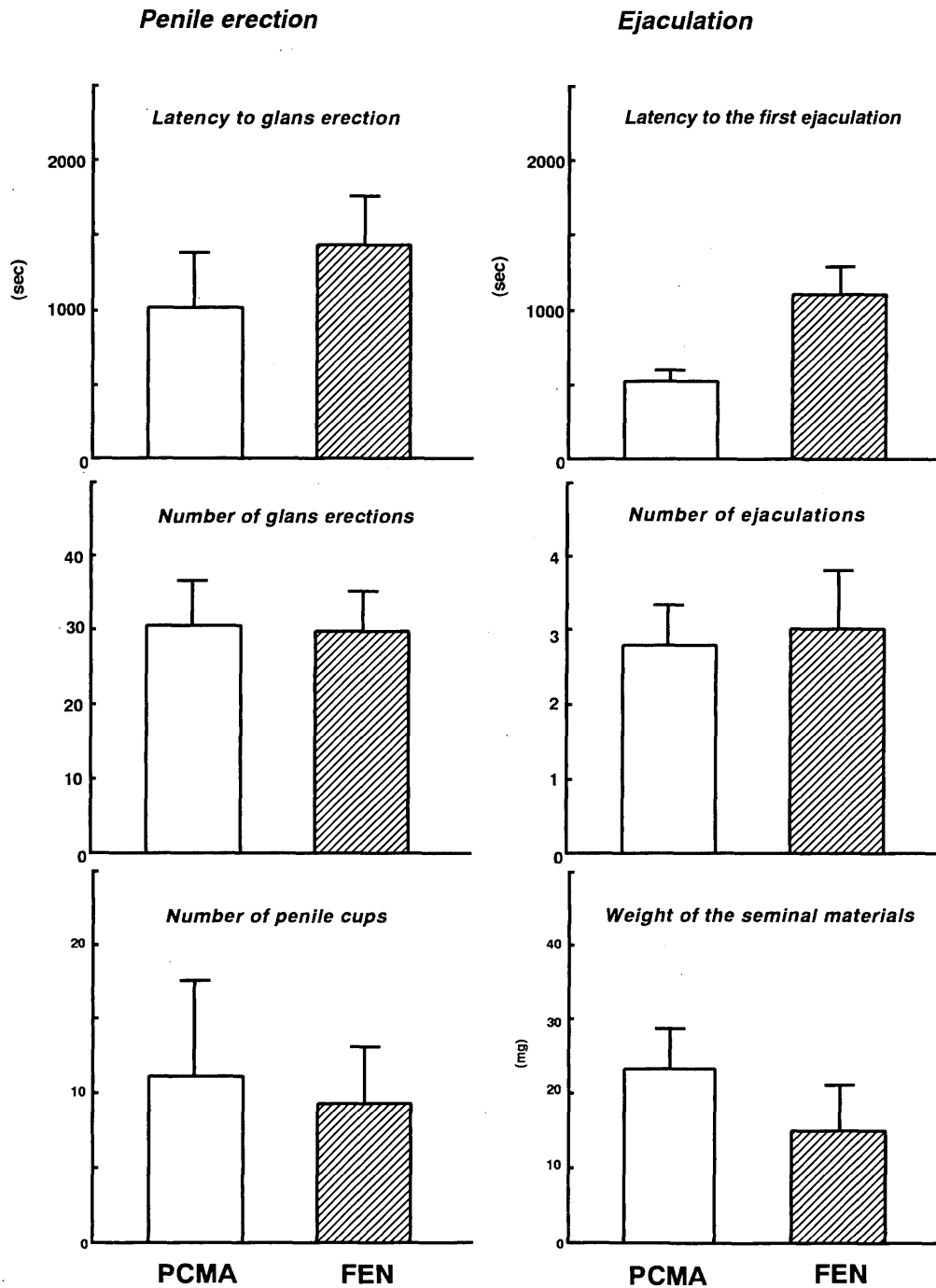


Fig. 3. Characterization of penile erection and ejaculation induced by *p*-chloromethamphetamine (PCMA; 10 mg/kg) and fenfluramine (FEN; 10 mg/kg) in anesthetized rats. N=6

発現を認め、その発現回数ならびに射精量も両薬物はほぼ同程度の効果を示した。また、これら性機能とともに5-HT 症候群の一つである wet-dog shake の発現⁹⁾ が認められた。

3. PCPA および citalopram の影響

PCMA および FEN 誘発性陰茎勃起ならびに射精発現における5-HT の関与について検討した。

図4に示したように、5-HT 合成阻害薬である PCPA (150 mg/kg × 3, i.p.) の前処理により PCMA および FEN による陰茎勃起ならびに射精の発現は有意にかつ著明に抑制された。同様に、選択的5-HT 取り込み阻害薬 (SSRI) である citalopram (1 および 3 mg/kg, i.p.) 前処理も PCMA および FEN 誘発性陰茎勃起ならびに射精をそれぞれ用量依存的に抑制した (表1)。

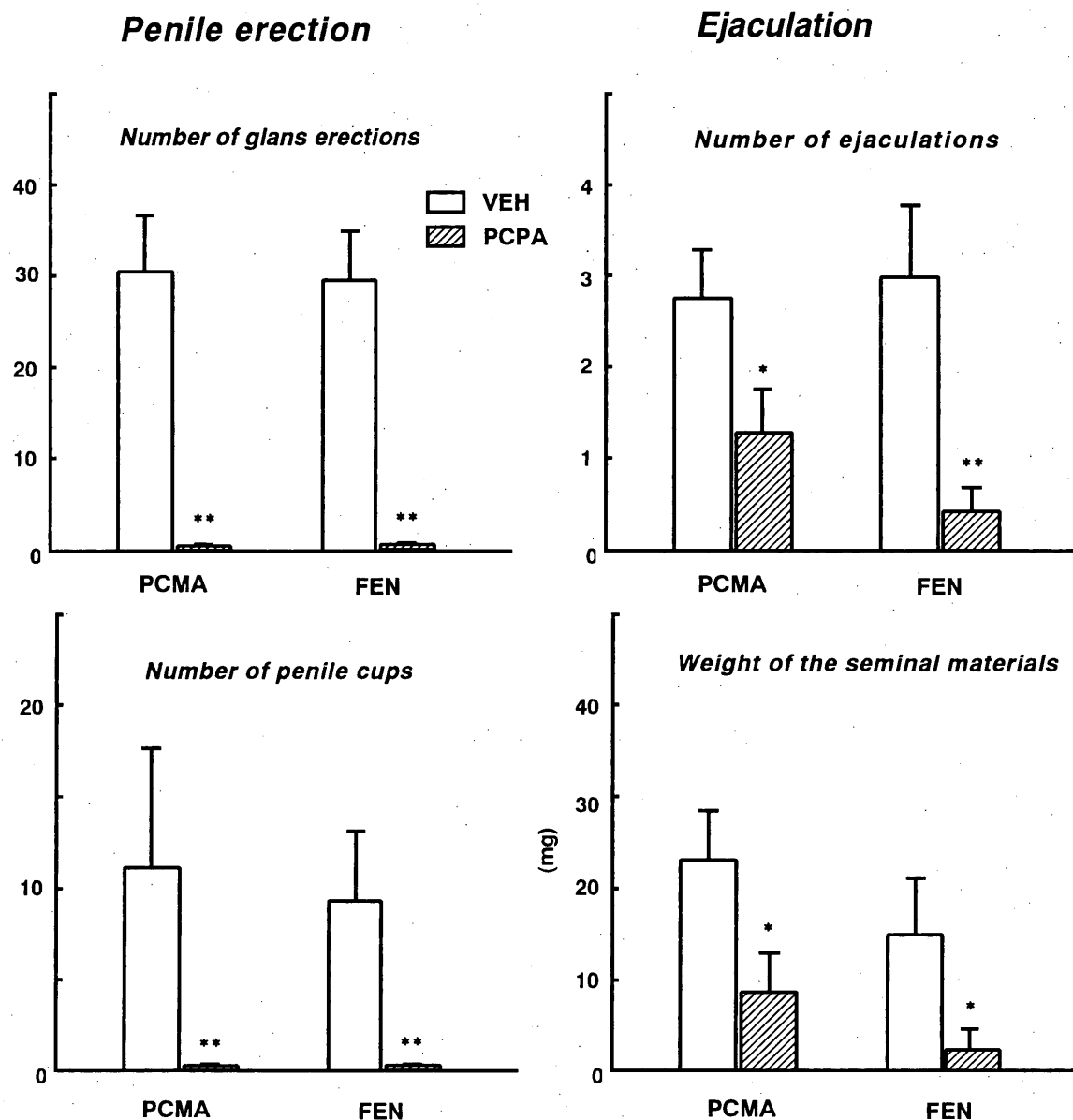


Fig. 4. Effect of *p*-chlorophenylalanine (PCPA) on the expression of *p*-chloromethamphetamine (PCMA)- and fenfluramine (FEN)-induced sexual responses in anesthetized male rats. PCPA (150mg/kg) was administered i.p. 24, 48 and 72 hr before the testing. The expression of the sexual responses were observed for 60 min after the administration of PCMA (10 mg/kg) and FEN (10 mg/kg). N=8 **p*<0.05, ***p*<0.01 compared with control animals (vehicle+PCMA, vehicle+FEN)

Table 1. Effect of a selective 5-HT uptake inhibitor citalopram on PCMA- and FEN-induced sexual responses in anesthetized male rats.

Treatment (mg/kg)	Penile response		Ejaculatory response	
	Number of glans erections	Number of penile cups	Number of ejaculations	Weight of the seminal materials (mg)
VEH + PCMA (10)	29.8 ± 5.5	11.8 ± 6.2	2.8 ± 0.5	23.7 ± 5.1
Citalopram (1) + PCMA	22.9 ± 9.6	9.1 ± 4.5	2.3 ± 0.6	15.8 ± 5.7
(3) + PCMA	13.8 ± 6.5 *	3.1 ± 1.7 *	1.1 ± 0.3 *	10.0 ± 3.8 *
VEH + FEN (10)	31.5 ± 9.6	9.1 ± 3.2	3.0 ± 0.7	16.7 ± 4.5
Citalopram (1) + FEN	20.8 ± 7.2	1.0 ± 0.66 **	1.5 ± 0.6	5.8 ± 2.1 *
(3) + FEN	0.5 ± 0.3 **	0 **	0.4 ± 0.2 **	1.1 ± 0.7 **

p<0.05, ** p<0.01 compared with control animals (VEH + PCMA, VEH + FEN).

4. 脊髄切断の影響

FEN誘発性陰茎勃起ならびに射精に対する脊髄切断の影響を検討した。その結果、図5に示したように、FEN (10 mg/kg, i.p.)により誘発される陰茎勃起ならびに射精の発現回数は脊髄(T₈₋₉)切断処理を行ってもsham群との間に差は全く認められなかった。

考 察

前報⁶⁾において、我々はamphetamineのハロゲン化誘導体で強力な5-HT遊離作用を有するPCAが、麻酔下ではこれまで誘発が困難であったラット特有の勃起現象 (glans erectionならびにpenile cup) や射精 (外尿道口からのseminal plugの射出) を誘発することを明らかにした。これにより、覚醒下にテレメトリーシステムのような特殊な方法¹⁰⁾を用いなければ測定できなかったglans erectionやpenile cup発現時の陰茎海綿体や尿道海綿体内圧の測定が可能となり、亀頭部勃起時の血流動態や海綿体の役割を解明するために用いられている^{6,7)}。また、この誘発方法は覚醒状態では検討することのできない外科的処置を必要とする実験系にも応用されている^{6,8)}。今回は、PCAと同様に5-HT遊離作用を有する¹¹⁾2種類のハロゲン化誘導体PCMAおよびFENの性機能に対する影響を検討し、両誘導

体の性機能研究への応用の可能性を探るとともに性機能発現における5-HTの役割について検討を加えた。

本実験において、PCMAおよびFENはそれぞれ10 mg/kg投与で麻酔ラットの全例に勃起と射精を発現し、特に覚醒ラットに特徴的な亀頭部の勃起現象であるglans erectionやpenile cupを用量依存的に誘発した。従来、麻酔ラットを用いた勃起機能の研究には、骨盤神経や海綿体神経などの自律神経¹²⁾や脊髄の電気刺激¹³⁾、あるいは尿道の機械的刺激^{14,15)}などの誘発方法が用いられてきた。しかしながら、前者による陰茎海綿体内圧の上昇は軽度であり、ラット特有の亀頭部勃起を発現するまでには至らず、また後者では亀頭部勃起が脊髄切断時にのみ単発的にしか発現しない。本実験で用いたPCMAおよびFENは麻酔下のラットに高頻度に亀頭部勃起を誘発し、さらに射精も断続的に発現するという特徴を有することから性機能発現における神経系、海綿体ならびに会陰部筋群などの役割を検討する際に有用な手法になると考えられる。

PCMAおよびFENは麻酔ラットに性機能を誘発する同時に5-HT症候群の一つであるwet-dog shakes⁹⁾を発現した。この行動は5-HT前駆物質である5-hydroxytryptophan (5-HTP)の単独投与、あるいは末梢性の芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素阻害薬またはMAO阻害薬と5-HTPの併用に

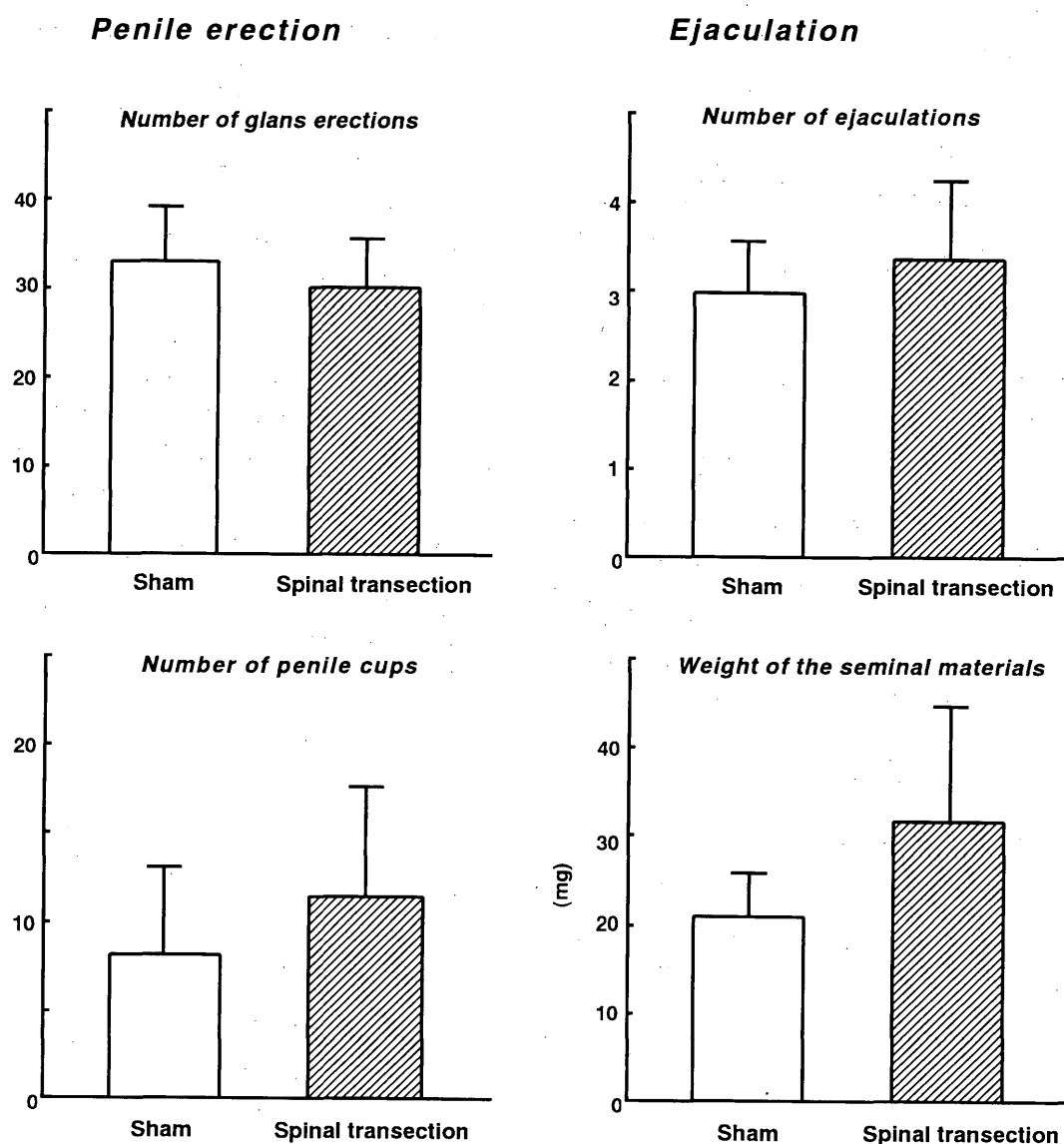


Fig. 5. Effect of spinal cord transection on the expression of fenfluramine (FEN)-induced sexual responses in anesthetized male rats. N=6

よる中枢5-HT量の増加により高頻度に発現することが知られている¹⁶⁾。我々も性機能誘発効果を発現する用量のFENおよびPCMAが覚醒ラットに5-HT症候群を惹起することを確認しており、両誘導体による勃起や射精発現時に急激な5-HT遊離が惹起されると考えられる。

事実、本実験においてPCMAおよびFENの性機能誘発効果は5-HT合成阻害薬であるPCPAの前処理により著明に抑制された。また、SSRIの一つで強力かつ選択的な5-HT取り込み阻害作用を有するcitalopram¹⁷⁾によっても両誘導体の効

果は抑制された。これらの結果はFENおよびPCMAの性機能誘発効果が、1) 5-HT遊離に基づく間接的な作用であること、また、2) FENおよびPCMAの5-HT遊離機構には5-HTトランスポーターを介した両誘導体の5-HT作動性神経内あるいは5-HT含有細胞内への取り込みが必須であることを示唆している。

一方、勃起ならびに射精は脳および脊髄からの支配を受け、特に脊髄では腰髄から仙髄にかけて性機能に関連する神経核群が存在し、これらの活動は脳からの下行性制御（興奮性あるい

は抑制性)を受けることが知られている¹⁸⁾。胸髄レベルにおける脊髄切断はこの下行性制御を解除するための、また性機能誘発効果を有する薬物の作用点を探る際の有用な手段となる¹⁹⁾。本実験において、FENの性機能誘発効果は胸髄(T8-9)を切断しても対照群(sham)との間に差を全く認めなかった。このことは、FENの作用点が上位中枢ではなく、主に切断部より下位の脊髄(腰髄から仙髄)あるいは末梢部位、またはその両者に存在する可能性を示唆している。

PCAなどのハロゲン化誘導体は、脳脊髄液ならびに血漿中の5-HTレベルを上昇し、中枢ならびに末梢の広範囲な領域で5-HTを遊離することが報告されている。上述した胸髄レベルの脊髄切断によって、脳幹部から脊髄に投射する下行性5-HT作動性神経は切断されることから脊髄レベルにおける5-HT遊離の関与は少ないものと考えられる。また通常、中枢での5-HT量の増加は性機能に対して抑制的な作用を発現することから²⁰⁻²³⁾、脳での5-HT遊離の増加によるものと考えにくい。興味深いことに、低用量(約半数のラットに射精を誘発する用量)のハロゲン化誘導体と5-HTの体性投与(i.p.)を併用したラットでは5-HT用量に依存した射精発現率と射精量の増加が認められる(未発表)。末梢から投与された5-HTは血液脳関門を通過しない。したがって、上述した脊髄切断の結果と考え合わせると、PCMAおよびFENの性機能誘発効果は主に末梢で起こる5-HT遊離が引き金となって発現する脊髄反射としての要素が大きいものと考えられる。おそらく、この末梢性刺激はPCMAおよびFEN投与で同時に起こる中枢5-HT遊離の増加による抑制作用を上回る強さなのであろう。末梢においては、尿道粘膜のパラクリン細胞に含まれる5-HTが性反射の調節に関与すること^{24, 25)}や末梢5-HT受容体が主に自律神経系に存在し、放電調節や求心性知覚神経の修飾に関係する²⁶⁾ことが報告されており、ハロゲン化誘導体の性機能誘発効果とこれらの関連については興味を持たれるところである。

謝辞: 稿を終わるにあたり、fenfluramineをご提供下さいました藤沢薬品工業株式会社ならびにcitalopramをご提供下さいましたゼリア新薬株式会社に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Hardman, J.G., Limbird, L.E., "Goodman and Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTIC" 9th ed., McGraw-Hill, New York, 1995.
- 2) Fuller, R.W., *Neurochem. Res.* **17**, 449-456 (1992)
- 3) Berensen, H. H. G., Jenck, F., Broekkamp, C. L. E. *Psychopharmacology* **101**, 57-61 (1990)
- 4) Renyi, L., *Neuropharmacology* **24**, 697-704 (1985)
- 5) Yonezawa, A., Watanabe, C., Kawamura, S., Ando, R., Furuta, S., Tadano, T., Sakurada, S., Sakurai, E., Kimura, Y. *The Autonomic Nervous System* **33**, 452-458 (1996)
- 6) Yonezawa, A., Watanabe, C., Ando, R., Furuta, S., Sakurada, S., Yoshimura, H., Iwanaga, T., Kimura, Y., *Life Sci* **67**, 3031-3039 (2000)
- 7) Ishizuka, T., Yamamoto, Y., Ishikura, F., Yamatodani, A., Beppu, S., *Jpn. J. Impotence Res.* **15**, 51 (2000)
- 8) Yonezawa, A., Kutsuwa, M., Imai, M., Yamamoto, M., Kimura, Y., Sakurada, S., *Jpn. J. Impotence Res.* **18**, 135-136 (2003)
- 9) Koshikawa, N., Mocaer, E., Stephenson, J. D., *Eur. J. Pharmacol.* **198**, 51-57 (1991)
- 10) Bernabe, J., Rampin, O., Giuliano, F., Benoit, G., *Physiol. Behav* **157**, 837-841 (1995)
- 11) Martin, F., Artigas, F., *J. Neurochem.* **59**, 1138-1144 (1992)
- 12) Giuliano, F., Rampin, O., Bernabe, J., Rousseau, J. P., *J. Auton. Nerv. Syst.* **55**, 36-44 (1995)
- 13) Finberg, J. P. M., Vardi, Y., *Br. J. Pharmacol.* **101**, 698-702 (1990)
- 14) McKenna, K. E., Chung, S. K., McVary, K. T., *Am. J. Physiol.* **261**, R1276-R1285 (1991)
- 15) Chung, S. K., McVary, K. T., McKenna, K. E., *Neurosci Lett* **94**, 343-348 (1998)

- 16) Barnes, N. M., Sharp, T., *Neuropharmacology* **38**, 1083-1152 (1999)
- 17) Hyttel, J., *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat* **6**, 277-295 (1982)
- 18) de Groat, W.C. and Booth, A.M., "Nervous Control of the Urogenital System" ed. by Maggi, C.A., Harwood academic, Chur, 1993, pp. 467-524.
- 19) Mas, M., Zahradnik, M.A., Martino, V., Davidson, J.M., *Brain Res.* **342**, 128-134 (1985)
- 20) Kimura, Y., Miyamoto, A., Urano, S., Yonezawa, A., Tadano, T., Kisara, K., *Andrologia* **15**, 222-227 (1983)
- 21) Kimura, Y., Kisaki, N., Sakurada, S., Tadano, T., *Andrologia* **9**, 50-54 (1977)
- 22) Marson, L., McKenna, K.E., *Exp. Brain. Res.* **88**, 313-320 (1992)
- 23) Marson, L., McKenna, K.E., *Pharmacol. Biochem. Behav.* **47**, 883-888 (1994)
- 24) Iwanaga, T., Han, H., Hoshi, O., Kanazawa, H., Adachi, I., Fujita, T., *Biol Signals* **3**, 259-270 (1994)
- 25) McKenna, K.E., Knight, K.C., Mayers, R., *Pharmacol. Biochem. Behav* **40**, 151-156 (1991)
- 26) 吉岡充弘, 齋藤秀哉, *日薬理誌* **100**, 183-191 (1992)