

ニコチン長期投与による
副腎カテコールアミン代謝への影響

西 古 靖

①

ニコチン長期投与による
副腎カテコールアミン代謝への影響

西 吉 靖

研究目的

従来まで、褐色細胞腫の循環系の管理には、 α 及び β 遮断剤が用いられてきた。これらの薬剤で十分に管理できない症例に対しては、近年アデノシン三リン酸(ATP)あるいは、Ca拮抗剤が用いられ臨床効果があげられている¹⁾²⁾。しかし、これらの薬剤は生理学的、薬理的に血管拡張作用が解明されている一方で、カテコールアミン代謝に対する作用は不明点が多い。また褐色細胞腫モデルにおける検討はいまだなされていない。今後、動物実験の結果をふまえて、その正しい投与法を確立すべき時期に来ていると思われる。

現在のところ、副腎褐色細胞腫の動物モデルについては、NE DHラット由来の褐色細胞腫であるPC12細胞の移植モデルが報告されているのみである^{3) 6)}。一方、ニコチンを長期間ラットに投与すると副腎髄質に過形成が引き起こされることは古くから知られており^{7) 10)}、これが副腎褐色細胞腫のモデルにならないかと考えた。現在まで、この実験については、適切なラットの系、ニコチンの投与期間、及びカテコールアミン代謝への詳細な検討はなされていない。そこで、実験Ⅰでは、4系のラットにニコチンを12週間連日投与し副腎重量、副腎組織内カテコールアミン濃度を測定し、適当なラットの系、ニコチンの投与期間を検討した。さらに、実験Ⅱとして、実験Ⅰの結果よりラットの系として適切と思われたWistarラットにニコチンを投与し、副腎重量、副腎組織内カテコールアミン濃度、尿中カテコールアミン、およびその代謝産物の排泄量を測定した。また、組織学的には摘出副腎をヘマトキシリン-エオジン染色、抗proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体免疫染色にて観察し、電子顕微鏡的には形態計測を行いニコチンによる副腎髄質細胞の変化を検討し、カテコールアミン代謝への影響と褐色細胞腫のモデルとしての適否を検討した。

1. 実験 I

研究方法

動物：実験動物としては6週齢、雄、Wistarラット（日本クレア）、Sprague-Dawley(SD)ラット（日本クレア）、Long-Evansラット（日本チャールズリバー）、体重200gのFisherラット（日本生材）を用いた。

ニコチン投与：ニコチン（関東科学）は、0.9%生理食塩水に1ml 中2~4mg溶解し各系ラット15頭ずつに週6回皮下投与を行った。投与時間は午後6時とし、投与量は、第1週：2mg/kg/day、第2週：3mg/kg/day、第3週以降：4mg/kg/dayとした。コントロール群には生理食塩水を投与した(Fig. 1)。この様にニコチンを漸増したのは、初めから幼若ラットに4mg/kg/dayの量を投与すると急性中毒のためにラットが死亡してしまうからである。このことは小型のラットであるWistar、Fisherラットに多く見られ、そのため最も小型であるFisherラットは当初6週齢よりニコチンを投与する予定であったが200g程度に成長するまで実験を延期した。

体重、血圧、心拍数の測定：各群ラットは5頭ずつ6週、9週、12週に体重測定後、血圧、心拍数をManometer(Natume KN-210-1)にて測定した。尚、測定日には急性期の影響を考慮してニコチンは投与しなかった。各測定は3回ずつ施行しその平均を測定値とした。

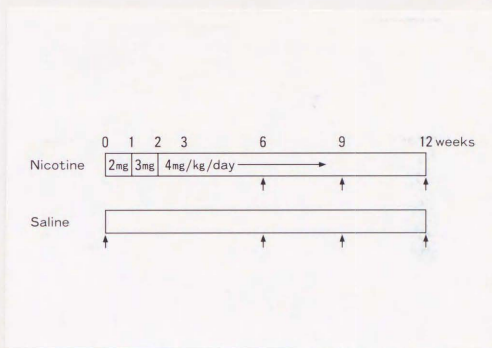


Fig. 1: Experimental design.

Nicotine was administered subcutaneously 6 times per week.

↑: 5 rats were sacrificed at each point.

副腎組織内カテコールアミンの測定：各群ラットは5頭ずつ6週、9週、12週に副腎を摘出した。重量を測定した後検体は-20℃にて保存し、Special Reference Laboratory(SRL)社にてHigh Performance Liquid Chromatography(HPLC)法にて以下のように組織内カテコールアミン(2分画)を測定した¹¹⁾。各検体は、裁断後、0.4N過塩素酸(HClO₄)を加えホモジネートし、遠心分離後、上清に、2%エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA2Na)、2N HCl₀、活性アルミナ、5Nアンモニア緩衝液を加え転倒混和した。アルミナを洗浄後、水分を除去し、0.5M酢酸にて溶出後、溶出液を分析装置にて蛍光強度を測定した。

統計：統計処理はStudentのt-テストを用い有意水準は5%とした。

結果

一般状態及びラット体重：すべての系でニコチン投与群はコントロール群と比較し体重の増加は不良であり、特にWistar, Fisher ラットでは6週よりコントロール群との差が認められた(Fig. 2)。また、ニコチン投与によりすべての系でその急性中毒症状と思われる痙攣、呼吸停止、心停止が認められ、ラットの死亡は、Wistar, SD, Long-Evans, Fisher ラットでそれぞれ、2頭、3頭、2頭、0頭であった。Fisherラットで死亡数が0頭であったのは体重が200gに増加するまで実験を延期したためと思われる。

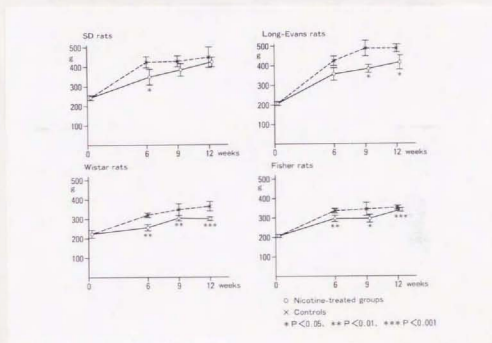


Fig. 2: Body weights.

血圧・心拍数：血圧はSDラットにおいて12週で、Wistarラットで6週でニコチン投与群とコントロール群との間に差が認められたのみで、どのラットもニコチン長期投与による明らかな血圧の上昇もしくは下降は認められなかった(Fig.3)。心拍数も各系ラットともに投与群とコントロール群との間に差は認められなかった(Fig.4)。

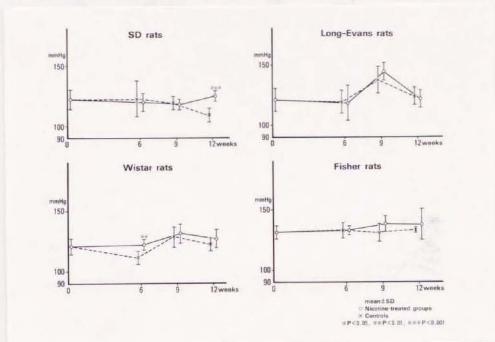


Fig. 3: Blood pressure.

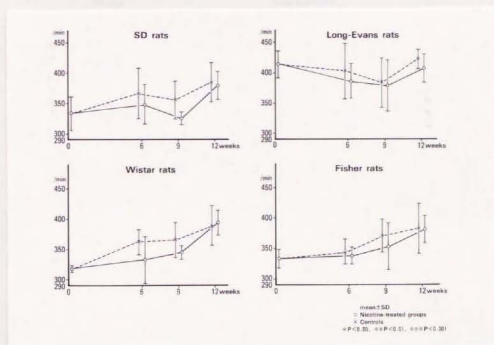


Fig. 4: Heart rate.

副腎重量：副腎重量は体重あたりの重量を比較した。各系ともコントロール群で6週には副腎重量は減少していた。これは、この時期にラット体重が急激に増加したためと思われる。副腎重量はWistarラットにおいて体重あたりの増加が認められた。また、Fisherラットにおいても投与群とコントロール群の間に差が認められた(Fig.5)。

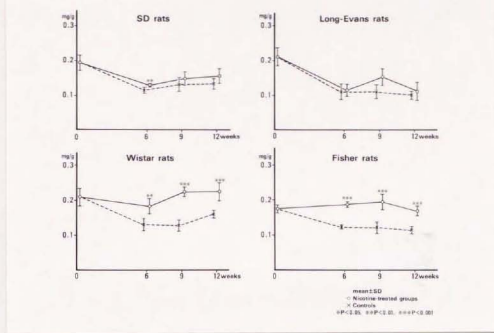


Fig. 5: Adrenal weights.

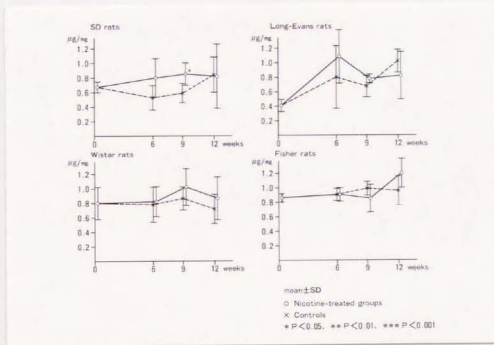


Fig. 6: Epinephrine content in the adrenal gland.

副腎組織内カテコールアミン濃度：エビネフィリンの組織内濃度はニコチン投与による顕著な影響は認められなかった(Fig. 6)。ノルエビネフィリン組織内濃度はニコチン投与群に増加が認められ、特にWistarラットでは6週より一定した増加が認められた(Fig. 7)。

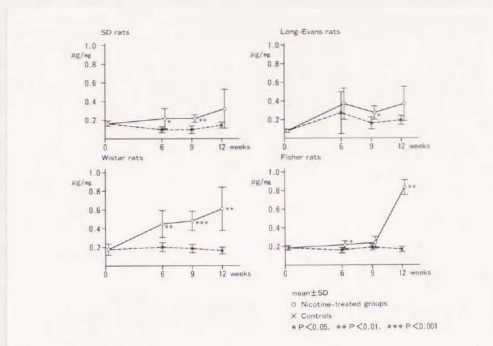


Fig. 7: Norepinephrine content in the adrenal gland.

考察：4系のラットではWistarラット、Fisherラットで副腎重量、副腎組織内カテコールアミン濃度の有意差が認められ、SDラット、Long-Evansラットでは前2者ほど差は認められなかった。WistarラットとFisherラットとの比較ではWistarラットにおいて体重あたりの副腎重量の増加が9週より認められ副腎組織内カテコールアミン濃度の増加も安定して得られることよりWistarラットへの9週間のニコチン投与が実験モデルとして適していると思われた。

またこの様に、ニコチン投与による副腎髄質への作用にラット間に差が認められたことについてはまず、ニコチンの代謝酵素である酸化酵素活性の系による差が報告されており¹²⁾、我々の実験動物でもSD、Long-Evansラットにて酵素活性が高くニコチンが速やかに代謝されることが推測される。また、カテコールアミン合成酵素であるTyrosine-Hydroxylase¹³⁾、Phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT)¹⁴⁾にもラット系による差が報告されており、ニコチン長期投与によりWistar、Fisherラットにおいて酵素活性が上昇していたことも考えられ今後の検討すべき課題と思われた。

2 実験 II

研究方法

動物：実験動物は6週齢Wistarラット、雄、(日本クレア)を用いた。

ニコチン投与：Wistarラット30頭にニコチンの連続皮下投与を行った。投与量は、実験 I と同様第1週：2mg/kg/day、第2週：3mg/kg/day、第3週以降：4mg/kg/dayと漸増した。3、6、9、11週に各6頭を用いて6N塩酸中に24時間尿を蓄尿した後、副腎を摘出した。また、残りの6頭はニコチンを9週間投与した後2週間無処置とし11週に屠殺した。

副腎組織内カテコールアミン濃度測定：抽出した副腎は-20℃にて保存し実験 I と同様 SRL社でHPLC法にて副腎組織内カテコールアミン(3分画)を測定した。

尿中カテコールアミン及びその代謝産物の測定：各ラットは屠殺前にメタボリックケージに6N塩酸0.1mlを加え24時間蓄尿した。各検体は-20℃で保存しSRL社にてHPLC法により、尿中カテコールアミン(3分画)、尿中メタネフィリン(2分画)排泄量¹⁵⁾を測定した。

組織学的検索：ニコチン9週投与群のラットの副腎を摘出後ホルマリン固定しヘマトキシリン-エオジン(HE)染色にてコントロール群と比較した。

抗PCNA抗体免疫染色：副腎標本のパラフィン切片を用い酵素抗体法を用いた。一次抗体(NCL-PCNA Mouse Monoclonal-Antibody, Novocastra社製)は磷酸緩衝液(PBS)で50倍に希釈し、4℃で一晩、二次抗体(Affinity isolated Antibody-Horseradish Peroxidase, Tago社製)は室温で1時間順次反応させ、発色にはDiaminobenzidine, tetrahydrochloride(DAB)を用いた。

副腎髓質細胞の形態計測：ニコチン投与群(9週)及びコントロール群ラットの副腎髓質より組織ブロックを採取した。組織ブロックはカルノフスキー液にて前固定後、2%オスミウム酸にて後固定し、アルコール上昇系列にて脱水、プロビレンオキサライドにて置換後、EPON812にて包埋し、ダイヤモンドナイフにて600Åの超薄切片を作成した。標本は酢酸ウラン、鉛にて二重染色後、透過型電子顕微鏡(日立H-700)にて観察し過去の報告により^{16) 17)}カテコールアミン顆粒の性状によりエビネフィリン細胞、ノルエビネフィリン細胞を判別しながら各50個ずつなるべく中心部の割面と思われるところを抽出し写真撮影を行った。各細胞は、画像解析装置(Luzex3, ニコン社)にて、細胞面積、細胞内カテコールアミン顆粒数、カテコールアミン顆粒平均面積、カテコールアミン顆粒密度(顆粒数/細胞質面積)を測定した。

統計：統計処理はStudentのt-テストを用い有意水準は5%とした。

結果

ニコチン投与により、実験 I と同様ニコチンの急性中毒と思われる症状がみられ30頭中9頭のラットが投与中に死亡した。

体重：体重は、ニコチン投与群で増加不良であり9週よりコントロール群との差が認められた(Fig. 8)。

副腎重量：体重あたりの副腎重量は両群とも減少が認められた。このことは、副腎重量の増加に比してラットの体重増加が著しいためと思われた。両群の間には6週より有意差が認められた(Fig. 9)。

副腎組織内カテコールアミン濃度：副腎組織内エビネフィリン濃度は投与群で9週にてコントロール群との間に差が認められた。副腎組織内ノルエビネフィリン濃度も9週にてコントロ

ル投与群との間に差が認められた。ドーパミン組織内濃度ではニコチン投与による変化は認められなかった(Fig. 10)。

尿中カテコールアミン排泄量：尿中エピネフィリン排泄量はニコチン投与で6週より増加が認められた。尿中ノルエピネフィリン排泄量は9週で差が認められたもののエピネフィリン排泄量ほどの増加は認められなかった。尿中ドーパミン排泄量は投与群とコントロール群との間に大きな差は認められなかった(Fig. 11)。

尿中代謝産物排泄量：尿中代謝産物排泄量はメタネフィリンは9週で増加が認められ、尿中エピネフィリン排泄量と同様な動態を示した。尿中ノルメタネフィリン排泄量は投与群とコントロール群との間に差は認められなかった(Fig. 12)。

薬剤投与の中止：薬剤の投与中止により、2週後には(11週)には、副腎重量はコントロールのレベルまで及ばないものの低下し、副腎組織内カテコールアミン濃度、尿中カテコールアミン排泄量、尿中代謝産物排泄量はコントロールのレベルまで低下した(Fig. 9, 10, 11, 12)。

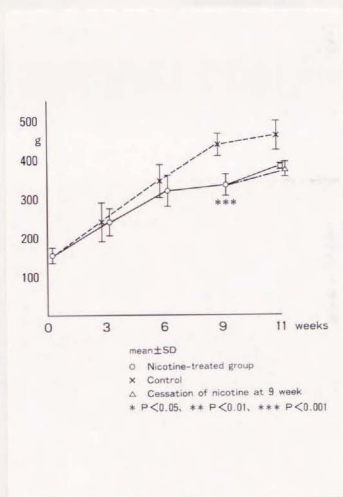


Fig. 8: Body weights.

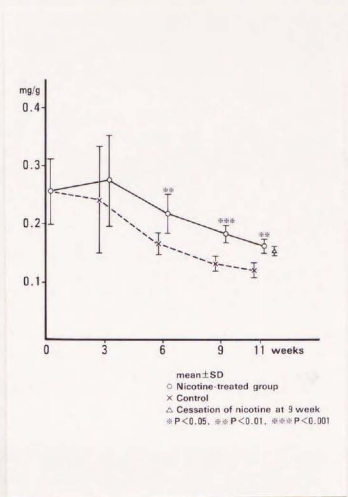


Fig. 9: Adrenal weights

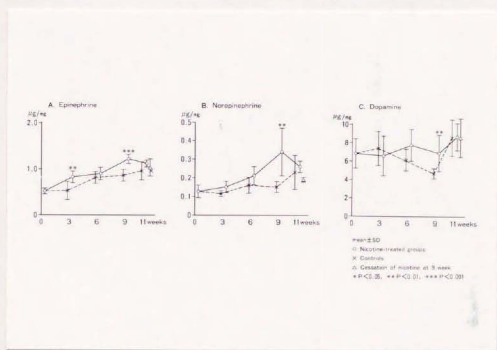


Fig. 10: Catecholamine content in the adrenal gland.

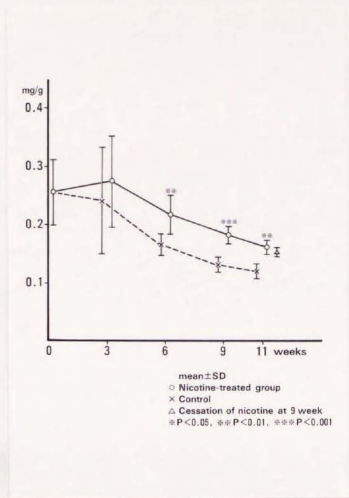


Fig. 9: Adrenal weights

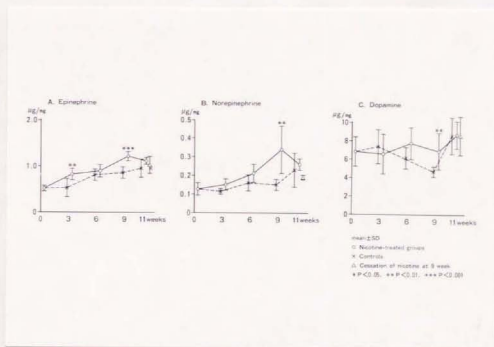


Fig. 10: Catecholamine content in the adrenal gland.

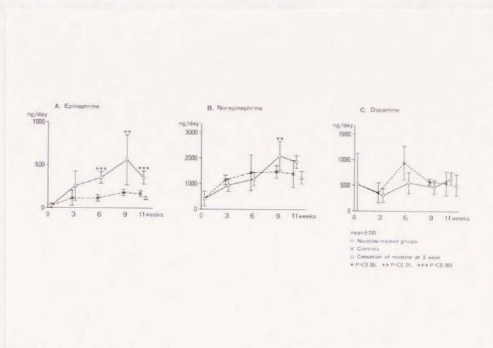


Fig. 11: Urinary excretion of catecholamines.

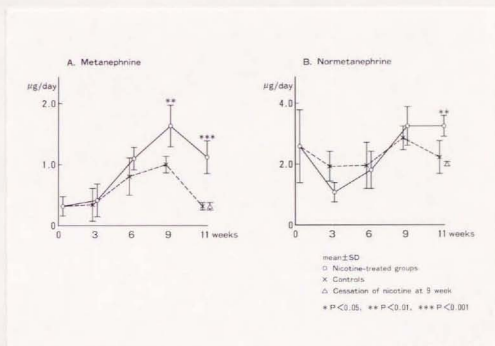


Fig. 12: Urinary excretion of catecholamine metabolites.

組織学的所見：ニコチン投与群では、正常副腎髄質組織で観察される束状構造(Fig.13)が不明瞭になっており、静脈内の鬱血が認められ、個々の細胞では、細胞質の空胞化が認められた(Fig.14)。抗PCNA抗体免疫染色では、ニコチン投与群およびコントロール群とも陽性細胞は認められなかった。

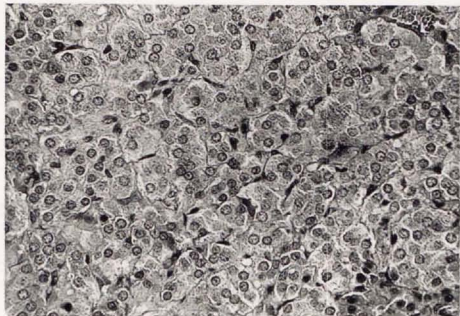


Fig. 13: Adrenal medulla-control. (HE×1405)

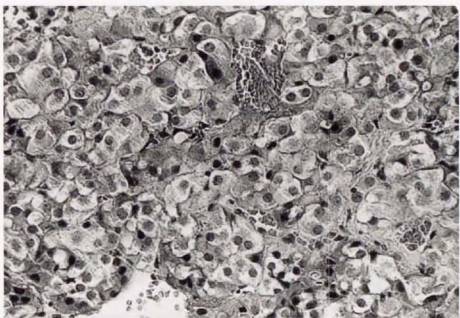


Fig. 14: Adrenal medulla-nicotine treated group. (HE×1405)

電顕的には、エピネフィリン細胞、ノルエピネフィリン細胞とも、ニコチン投与群 (Fig. 16) (Fig. 18) では、コントロール群 (Fig. 15) (Fig. 17) と比較して肉眼的に明らかな細胞内顆粒数の増加が認められ、粗面小胞体、ゴルジ装置の発達が著しかった。



Fig. 15: Epinephrine cell (EM) - control.
正常細胞では、やや電子密度の高い、ほぼ球形をした分泌顆粒が認められる。

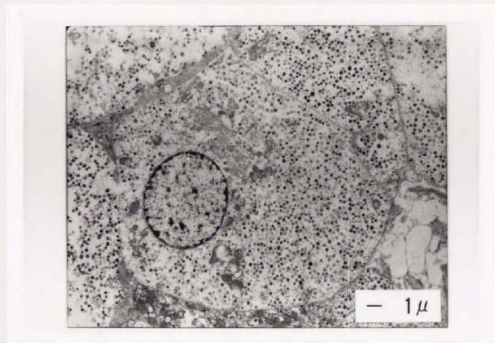


Fig. 16: Epinephrine cell (EM) - nicotine
treated group.
ニコチン投与群では、分泌顆粒の増加と、粗面小胞体、ゴルジ装置の発達が認められる。

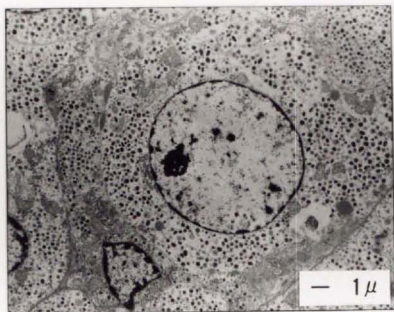


Fig. 17: Norepinephrine cell (EM) - control.
 正常細胞では、電子密度のかなり高い、球形～楕円形をした分泌顆粒が認められる。

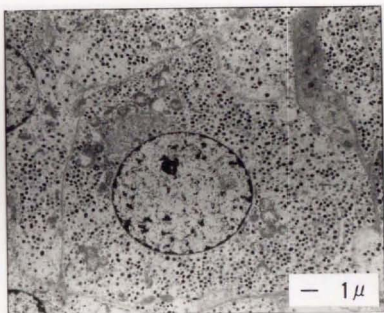


Fig. 18: Norepinephrine cell (EM) - nicotine
 treated group.
 ニコチン投与群では、分泌顆粒の増加と、粗面小胞体、ゴルジ装置の発達が認められる。

形態計測：エピネフィリン細胞では、細胞面積、カテコールアミン顆粒平均面積の変化が認められなかったが、細胞内カテコールアミン顆粒数、顆粒密度の増加が認められた。ノルエピネフィリン細胞では、それらの変化がより著明となりあわせて、細胞面積の増大、顆粒平均面積の増加が認められた。即ち、ノルエピネフィリン細胞は、エピネフィリン細胞と比較してニコチン投与による影響が大きかった(Table1)。

	細胞面積 (μm^2)	顆粒数	顆粒平均面積 (μm^2)	顆粒密度 顆粒数/細胞面積(μm^2)
エピネフィリン細胞				
ニコチン投与群 (n=50)	204.45±43.34	428.20±144.56*	3.5115±1.0013 ($\times 10^3$)	2.6464±0.6174*
コントロール群 (n=50)	198.92±35.13	334.24±106.45	3.3574±0.6226 ($\times 10^3$)	2.1878±0.5272
ノルエピネフィリン細胞				
ニコチン投与群 (n=50)	163.74±27.76*	324.38±113.23*	3.1389±0.5262 ($\times 10^3$)*	2.6076±0.8356*
コントロール群 (n=50)	138.20±27.47	132.42±96.88	2.3390±0.3384 ($\times 10^3$)	1.2956±0.6374

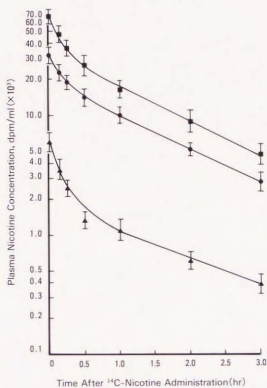
mean±SD

*P<0.05

Table 1: Morphometric analysis of chromaffin cells.

考察

ニコチンは、Nicotina属植物アルカロイドであり、薬理学的には自律神経作動薬に属し自律神経、中枢神経、ならびに骨格筋に作用し興奮、後に麻痺をきたすとされている。体内に入ったニコチンは80~90%は主に肝臓で代謝されコチニンとして、一部は未変化のまま尿中に排泄される。大量接種した場合でも16~24時間以内に完全に排泄される^{2) (21)}。したがって我々の投与方法の場合、Millerら²²⁾、Kyerematenら²³⁾の報告のごとく投与後速やかに血中ニコチン濃度は上昇するものの翌日までには完全に代謝、排泄されると思われる(Fig. 19)。



Semilogarithmic plots of nicotine plasma concentration (mean±SE) as a function of time following administration of [¹⁴C] nicotine in doses of 0.1 mg/kg (▲, N=5), 0.5 mg/kg (●, N=4), and 1.0 mg/kg (■, N=4).

Fig. 19: Plasma Nicotine Concentration.

23) Kyerematen 6, 1980

実験 I, II を通じて全ての系で 6~9 週でニコチン投与群とコントロール群の間で体重差が認められた。ラットへの長期ニコチン投与により体重もしくはその増加率が減少することは多く報告されている^{281, 289}。その原因としてニコチン投与による食餌摂取の減少をあげるものもあるが^{277, 281}その他の原因として、血中インスリン低下による脂肪、蛋白、グリコーゲン代謝の亢進²⁹³、アミノ酸代謝の変化³⁰¹、基礎代謝の亢進³¹¹をあげるもある。

ニコチンによる急性期の交感神経刺激効果はよく言われているが、長期投与による心血管系への影響の検討は数少なくその見解も様々である^{321, 338}。我々の実験では、4 系のラット全てに心拍数、血圧の変化は認められなかった。このことは Hizgendal ら³⁵¹、Aceto ら³⁶³の報告とも一致している。一方、Wezel ら³⁷⁷、Westfall³⁸¹は長期投与により血圧は上昇しているとしている。

副腎髄質機能に関しては、ニコチンを長期間ラットに投与することにより、カテコールアミン合成酵素である Tyrosine-Hydroxylase 活性の上昇³⁹¹、Dopamine-β-Hydroxylase 活性の上昇⁴⁰¹が認められ、カテコールアミン合成が促進されることも報告されている。我々の実験でもニコチン投与群においてノルエピネフィリン細胞、エピネフィリン細胞の電子顕微鏡写真で粗面小胞体、ゴルジ装置が発達しているのが観察されておりニコチンの長期投与によりカテコールアミン合成が促進していると思われた。交感神経系については我々は検討しなかったが Illus ら⁴¹¹はニコチン 1mg/kg を一日 4 回皮下投与しカテコールアミンの合成酵素である Tyrosine-Hydroxylase の上昇が副腎髄質のみならず上頸部、星状、腹腔神経節などで認められたとしている。

実験 I、II とも、副腎組織内カテコールアミン濃度の増加は、エピネフィリンに比べノルエピネフィリンで顕著であった。尿中カテコールアミン排泄量についてはエピネフィリン及びその代謝産物であるメタネフィリンがニコチンの投与と共に増加したのに対して、ノルエピネフィリン及びノルメタネフィリンの排泄量は 9~11 週にかけてわずかに増加しているのみであった。このことは、Boersterli⁹¹、Westfall⁴²¹の観察とも一致しており、また電子顕微鏡写真の形態計測上、細胞内の分泌顆粒や顆粒面積の増大及び細胞の腫大がノルエピネフィリン細胞に優位にみられたこととも一致する。また、Lishajko ら⁴³¹によると、カテコールアミン顆粒のうちエピネフィリン顆粒は浸透圧変化によりノルエピネフィリン顆粒に比べて容易に壊れるとされている。以上の事実から次のことが示唆される。即ちニコチン投与によりカテコールアミンの合成は促進されるが、エピネフィリンは副腎組織内にとどまらずに多くは血液中に放出されメタネフィリンに代謝されて尿中に排泄される。一方、ノルエピネフィリンはニコチン投与により合成は促進されるが比較的細胞内にとどまるとのであろう。また、尿中ノルエピネフィリン排泄については交感神経由来のものも含まれると思われ長期投与により合成が促進され 9~11 週における増加に関与していると思われる。

ニコチンの長期投与により、実験 II では 6 週で実測値上副腎重量の増加が認められている。ホルモン測定値では副腎組織内カテコールアミン濃度の増加が、形態計測では細胞内カテコールアミン顆粒数、顆粒密度の増加がエピネフィリン細胞、ノルエピネフィリン細胞両者に認められ、細胞面積の増大がノルエピネフィリン細胞に認められた。以上より、ニコチン投与により細胞あたりのカテコールアミンの産生の増大に加え、一部の細胞では肥大が引き起こされて

いると思われた。副腎髄質細胞については、Boelsterliら⁹⁾はニコチン長期投与後のラット副腎髄質の形態計測により増加しているとしているが、我々の実験ではPCNA陽性細胞が認められなかったことよりニコチン投与による細胞増殖性の変化は示唆されず副腎重量の増加は細胞の肥大が大きな要因と考えられた。

組織所見では、HE染色でニコチン投与群では正常副腎髄質で見られる束状構造の不鮮明化、個々の細胞の空胞化が認められた。束状構造の不鮮明化は、形態計測により個々の細胞が腫大していることと関係があると考えられる。また、細胞質の空胞化は、標本の固定、染色の過程でカテコールアミン顆粒が失われたためと思われる。

以上我々の作製したモデルでは、副腎重量の増加、尿中カテコールアミン、およびその代謝産物の排泄量の増加が認められたことより、褐色細胞腫にかなり近い病態が得られたと思われる。しかし、薬剤の投与中止により、各測定値がほぼコントロールレベルまで回復し、また、組織所見でも副腎髄質内カテコールアミン顆粒が増加していたこと以外には正常組織所見と著しく異ならなかった。従って、ニコチン投与による副腎髄質の変化は腫瘍の形成ではなく薬剤に対する反応と考えられた。

まとめ

副腎褐色細胞腫動物モデル作成のため、4系(Wistar, Sprague-Dawley, Long-Evans, Fisher)ラットに4mg/kg/dayのニコチンの12週間連続皮下投与を行い、Wistar系ラットに9週で副腎重量の増加、副腎組織内カテコールアミン濃度の増加が認められモデルとして適していることが分かった。さらに、Wistarラットに4mg/kg/dayのニコチンを9週間連続皮下投与を行い副腎重量、副腎組織内、尿中カテコールアミン、及び、その尿中代謝産物を測定した。ラット体重あたりの副腎重量は6週より差が認められ、副腎組織内カテコールアミン濃度は9週より増加が認められた。尿中排泄はカテコールアミン、及びその代謝産物の増加も認められ、各々、エピネフィリン、メタネフィリンで顕著であった。また、ラット副腎髄質細胞の形態計測を行いニコチンの作用を詳細に検討した。ニコチン9週投与群、コントロール群の副腎髄質を電子顕微鏡下に観察しエピネフィリン細胞、ノルエピネフィリン細胞を50個ずつ抽出しその写真撮影を行った。各細胞は、画像解析装置(Luzex3, ニコン社)により細胞面積(割面)、細胞内カテコールアミン顆粒数、カテコールアミン顆粒平均面積、顆粒密度(カテコールアミン顆粒数/細胞質面積)を測定したところ、エピネフィリン細胞、ノルエピネフィリン細胞で、カテコールアミン顆粒数、顆粒密度の増加が認められ、細胞面積、顆粒平均面積の増加はノルエピネフィリン細胞で顕著であった。以上のことより、ニコチンの投与によりカテコールアミンの合成、代謝が促進することが、ホルモン測定値、細胞の形態計測の両面より明らかになり、褐色細胞腫同様な病態が得られる事が分かった。

- 1) Aso, Y., Kanbayashi, T., Tajima, A., Mituhashi, T., Suzuki, K., Ikeda, K. and Ohmi, Y.: Intraoperative blood pressure control by ATP in pheochromocytoma. *Urology*, 27, 512-520, 1986.
- 2) Aso, Y., Nakano, M., Ohta, N., Tajima, A. and Ikeda, K.: Usefulness of ATP and calcium channel blockade to control the cardiovascular state in patients with pheochromocytoma. *Endocrine Surgery*, 6, 41-47, 1989.
- 3) Warren, S. and Chute, R. N.: Pheochromocytoma. *Cancer*, 29, 327-331, 1972.
- 4) Greene, L. A. and Tischler, A. S.: Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2424-2428, 1976.
- 5) Murphy, G. P., Williams, P. D., Sufrin, G. S. and Mirand, E. A.: Studies of transplantable rat pheochromocytoma. *Oncology*, 33, 114-115, 1976.
- 6) Burroughs, V., Goldstein, H. and Shenkman, L.: Pheochromocytoma-an animal model. *Hormon Res.*, 13, 174-179, 1980.
- 7) Erinkö, O.: Nodular hyperplasia and increase of noradrenarine content in the adrenal medulla of nicotine-treated rats. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, 36, 210-218, 1955.
- 8) Bhagat, B. and Rane, M. W.: Effect of chronic administration of nicotine on the concentration of adrenal enzymes involved in the synthesis and metabolism of adrenaline. *Br. J. Pharmacol.*, 43, 250-251, 1971.
- 9) Boelsterli, U. A., Cruz-Orive, L. M. and Zbinden, G.: Morphometric and biochemical analysis of adrenal medullary hyperplasia induced by nicotine in rats. *Arch. Toxicol.*, 56, 113-116, 1984.
- 10) Sullivan, J. M. and Rana, M. W.: Effect of nicotine on norepinephrine metabolism in female rat adrenal medulla. *IRCS. Med. Sci.*, 9, 612, 1981.
- 11) Chatteraji, S. C. and Watts, N. B.: Catecholamines and metabolites. *Textbook of Clinical Chemistry*. Edited by N. W. Tietz. Philadelphia Saunders Company, pp1136-1155, 1986.
- 12) Kuroguchi, Y., Nakashima, T., Nakanishi, Y., Inoki, M. and Morita, N.: Studies on nicotine metabolism in various animals. *J. Nara Med. Ass.*, 29, 677-682, 1978.
- 13) Park, D. H., Park, H. S., Joh, T. H., Anwar, M. and Ruggiero D. A.: Strain difference between albino and pigmented rats in monoamine-synthesizing enzyme activities of brain, retina and adrenal gland. *Brain Reserch*, 508, 301-304, 1990.
- 14) Park, D. H., Ehrlich, M., Evinger, M. J. and Joh, T. H.: Strain differences in distribution of phenylethanolamine N-methyltransferase activity from rat brain and adrenal gland. *Brain Reserch*, 372, 185-188, 1986.
- 15) Shoup, R. E. and Kissinger, P. T.: Determination of urinary normetanephrine.

- retanephrine, and 3-methoxytyramine by liquid chromatography, with amperometric detection. *Clin. Chem.*, 23-7, pp1268-1274, 1977.
- 16) Tramezzani, J. H., Chiopocchio, S. and Wasserman, G. F.: A technique for light and electron microscopic identification of adrenaline- and noradrenaline-storing cells. *J. Histochem. and Cytochem.*, 12, 890-899, 1964.
- 17) Elfin, L. G.: The fine structure of the cell surface of chromaffin cells in the rat adrenal medulla. *J. Ultrastr. Res.*, 12, 263-286, 1965.
- 18) Coupland, R. E. and Hopwood, D.: The mechanism of the differential straging reaction for adrenaline- and noradrenaline- storing granules in tissues fixed in glutaraldehyde. *J. Anat.*, 100-2, 227-243, 1966.
- 19) Brown, W. J., Barajas, L. and Latta, H.: The ultrastructure of human adrenal medulla with comparative studies of white rat. *Anat. Res.*, 169, 173-184, 1970.
- 20) 盛 千恵子, 遠藤容子, 磯村千鶴, 後藤京子, 新谷 茂: 最近のタバコ中毒. *中毒研究* 3, 293-296, 1990.
- 21) 津田治巳: タバコ中毒. *救急医学* 3, 1328-1333, 1976.
- 22) Miller, R. P., Rotenberg, K. S. and Adir, J.: Effect of dose on the pharmacokinetics of intravenous nicotine in the rat. *Drug Metab. Dispos.*, 5, 436-443, 1977.
- 23) Kyerematen, G. A., Taylor, L. H., Bethizy, J. D. and Vessel, E. S.: Pharmacokinetics of nicotine and 12 metabolites in the rat application of a new radiometric high performance liquid chromatography assay. *Drug Metab. Dispos.*, 16, 125-129, 1987.
- 24) Levin, E. D., Morgan, M. M., Galves, C. and Ellison, G. D.: Chronic nicotine and withdrawal effects on body weight and food and water consumption in female rats. *Physiol. Behav.*, 39, 441-444, 1987.
- 25) Morgan, M. M. and Ellison, G.: Different effects of chronic nicotine treatment regimens on body weight and tolerance in rats. *Psychopharmacol.*, 91, 236-238, 1987.
- 26) Schechter, M. D. and Cook, P. P.: Nicotine-induced weight loss in rats without effect on appetite. *J. Pharmacol.*, 38, 63-69, 1976.
- 27) Grunberg, N. E., Bowen, D. J. and Mores, D. E.: Effect of nicotine on body weight and food consumption in rats. *Psychopharmacol.*, 83, 93-98, 1984.
- 28) McNair, E. and Bryson, R.: Effects of nicotine on weight change and food consumption in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18(3), 341-344, 1983.
- 29) Grunberg, N. E., Popp, K. A., Bowen, D. J., Nespor, S. M., Winders, S. E. and Eury, S. E.: Effect of chronic nicotine administration on insulin, glucose, epinephrine, and norepinephrine. *Life Science*, 42, 161-170, 1988.
- 30) Passay, R. D., Elison, L. A. and Lewis, P. A. Tobacco smoke and growth rate. *British Empire Cancer Campaign Annual Report.*, 37, 89, 1959.
- 31) Perkins, K. A., Epstein, L. H., Sexton, J. E., Stiller, R. L. and Jacob, R. G.: Effect of dose, gender, and level of physical activity on acute metabolic response to nicotine.

Pharmacol. Biochem. Behav., 40(2), 203-208, 1991.

- 32) 三須良実, 久保孝夫, 松村郁延, 藤原元始: ニコチンと末梢性心血管系調節機構. 醫學のあゆみ, 133-9, 573-580, 1985.
- 33) 柳田知司. : ニコチンおよび喫煙の薬理. 診断と治療, 46-6, 29-33, 1971.
- 34) 三須良実, 久保孝夫. : 喫煙と心血管系疾患. 日本医師会雑誌, 92, 1977-1988, 1984.
- 35) Häggendal, J. and Henning, M.: Effect of chronically administered nicotine on axonal transport of dopamine- β -hydroxylase in peripheral adrenergic neurons and on blood pressure and heart rate in the rat. Acta. Physiol. Scand., 479, 35-38, 1980.
- 36) Aceto, M. D., Tunker, S. M., Hinson, J. R. and Ferguson, G. S.: Chronic nicotine exposure, studies on water intake, body weight, blood pressure and behavior. Natal. Inst. Drug. Abuse, Res. Monogr. Ser., 76, 327-333, 1987.
- 37) Wenzel, D. G. and Azmeh, N.: Chronically administered nicotine and blood pressure of normotensive and renal hypertensive rats. Arch. Int. Pharmacodyn., 187, 367-376, 1970.
- 38) Westfall, T. C.: Influence of nicotine administration on blood pressure and heart norepinephrine turnover. Eur. J. Pharmacol., 10, 19-24, 1970.
- 39) Partrick, R. L. and Krisher, N.: Effect of stimulation on the level of tyrosine, dopamine- β -hydroxylase, and catecholamines in intact and denervated rat adrenal glands. Mol. Pharmacol., 7, 87-96, 1971.
- 40) Schneider, F. H.: Secretion from the cortex-free bovine adrenal medulla. Brit. J. Pharmacol., 37, 371-379, 1969.
- 41) Ulus, I. H. and Wurtman, R. J.: Selective response of rat peripheral sympathetic nervous system to various stimuli. J. Physiol., 293, 513-523, 1979.
- 42) Westfall, T. C.: Effect of nicotine and nicotine analogues on tissue and urinary catecholamines in rats. Acta. Physiol. Scand., 63, 77-83, 1965.
- 43) Lishajko, F.: Osmotic factors determining the release of catecholamines from isolated chromaffin cell granules. Acta. Physiol. Scand., 79, 64-75, 1970.

