

## 〔実験手技〕

抗不安薬のスクリーニング法(6)——心理的ストレス  
反応を指標とした評価法

高橋正克\* 金戸洋\*

\*長崎大学薬学部薬物学教室

(1995年4月22日受理)

**要約:** マウスへの身体的侵襲を伴わない情動(心理的, PSY)ストレス負荷によって生じる抗侵害効果(PSY-SIA)や morphine 耐性形成の抑制作用に, ストレスによる不安, 恐怖など情動の関与が考えられることから, PSY ストレス効果に対する影響を指標とした新規抗不安薬の開発のためのスクリーニング法を考案し, その有用性を検討した. Communication box を用いた PSY ストレス負荷による抗侵害効果は, 臨床的および実験的に抗不安作用を示す DZP, methysergide, buspirone, ritanserin, Y-25,130 および ICS 205-930 によって用量依存的に抑制された. 一方, 抗不安作用のない(±)pindolol, imipramine は影響しなかった. PSY ストレスの morphine 耐性形成の抑制効果は, (±)pindolol を除くすべての被験薬の前処置によって消失し, morphine 耐性が形成された. 高架式十字迷路試験法(EPM)では, buspirone, Y-25,130 および ICS 205-930 に抗不安作用は認められたが, methysergide, ritanserin ではその作用がみられなかった. また, U-50,488H によっても morphine 耐性形成は抑制されるが, その抑制効果は, DZP, buspirone, Y-25,130, (±)pindolol で消失し, ritanserin は無影響であった. 以上の成績は, このストレスによって生じる不安に対する影響を指標とした独特なスクリーニング法が有用であることを示すもので, ストレスに起因する不安神経症に適した抗不安薬の開発が期待される.

**キーワード:** 心理的ストレス, 抗不安薬, 不安, モルヒネ耐性, ストレス鎮痛

不安神経症は, 個体が不安・恐怖など生体の警告反応に対して自己保存本能的な環境への適応を図ることができず, 現実的な危険とは無関係に, 状況にそぐわない病的な不安が表出する疾患で, 現代社会においては, 種々の環境ストレス要因も発病に大きく寄与しているものと考えられる.

各種のストレス負荷によって鎮痛効果が発現(ストレス誘発鎮痛, SIA)し, morphine 耐性形成が抑制されることが報告されており, これらの発現に, 内因性オピオイド系の関与する機構と介さない機構があるが (Izumi et al, 1983; Takahashi

et al, 1987, 1988a), そのほかにストレスによる不安, 恐怖など情動の関与も考えられる. 事実, われわれは身体的侵襲を伴わない情動(心理的, PSY)ストレス負荷によって鎮痛効果が誘発される耐性形成が抑制されること (Takahashi et al, 1988a), さらにこれらの反応がいずれも diazepam (DZP) やいくつかのセロトニン(5-HT)系抗不安薬で消失することを見い出している (Takahashi et al, 1988b; Tokuyama et al, 1989, 1993).

ところで, 医薬品開発において, スクリーニング法の選択が重要であることはいうまでもない.

\* 〒852 長崎市文教町1-14  
(別刷請求先: 高橋正克)

**略語** DZP: diazepam, EPM: elevated plus-maze, 高架式十字型迷路, 5-HT: serotonin, ICS 205-930: tropisetron, [(1 $\alpha$ H,5 $\alpha$ H)-8-methyl-8-azabicyclo[3,2,1]oct-3 $\alpha$ -carboxylate]·HCl, PSY: psychological, 心理的, SIA: stress-induced analgesia, ストレス誘発鎮痛, Y-25,130: (±)N-(1-azabicyclo[2,2,2]oct-3-yl)-6-chloro-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydro-1,4-benzoxazine-8-carboxamide·HCl

抗コンフリクト実験は、設定された実験的葛藤状況での動物の行動が benzodiazepine 系抗不安薬によって選択的に抑制されることから信頼性が高く、そのため最もよく用いられている抗不安薬スクリーニング法であるが、動物の訓練など操作が煩雑で時間がかかる欠点がある。また、最近開発が進められている 5-HT 系の抗不安薬はほとんど検出されないともいわれている。

そこで本稿では、さらにいくつかの抗不安薬の成績を加えて、この心理的ストレス負荷によって誘発される鎮痛効果および morphine 耐性形成の抑制効果に対する影響を指標としたユニークな抗不安薬スクリーニング法の有用性を検討したので紹介する。また、ここに確立した方法について、簡便な装置と方法からなり、新しい抗不安薬検定法として最近汎用されつつある高架式十字型迷路 (elevated plus-maze, EPM) 試験法 (Lister, 1987; Pellow et al, 1987) との比較検討も行った。

#### 実験方法

**動物：** ddY 系雄性マウス (体重 22~25 g) を用いた。

**薬物：** morphine-HCl (武田), diazepam (DZP, セルシン注, 武田), methysergide maleate (U. S. P. C.), buspirone-HCl (プリストルマイヤースクイブ), (±) pindolol, ICS 205-930 (サンド), ritanserin tartrate (ヤンセン-協和), Y-25,130 (吉富), imipramine-HCl (トフラニール注, 日本チバガイギー) を使用した。

薬物はすべて生理食塩水に溶解した。DZP と methysergide は 25% polyethylene glycol, ritanserin は 10% dimethyl sulfoxide にそれぞれ溶解した。

**心理的 (PSY) ストレス負荷：** 小川, 桑原の考案 (1966) による communication box を改変したものをを用いた (Takahashi et al, 1987)。すなわち、床がグリッドの 30 (L) × 30 (W) × 32 (H) cm のオペラントチャンバーを、透明のアクリル性の壁で縦、横等しい 9 区画に分け、中央および四隅の区画はグリッドにプラスチックの床を敷いた。グリッドを通じて電気刺激 (2 mA, 持続 1 sec, 0.2 Hz) を加えると、床を敷いた区画に置いた動物は直接の電気刺激を受けないが、周囲の動物が電気刺激を受けるたびに示す鳴き声のほか、跳躍などの行動異常がみえる情動ストレスに 5 分間曝露される (Fig. 1)。なお、この PSY ストレスではその負荷時間を延長 (最大 60 分間) しても SIA の増強はみられず、5 分間曝露とほぼ同程度の強度であった。

**抗侵害効果の測定：** PSY ストレスの負荷直後から 5 分間隔で 15 分まで、morphine 投与 30 分後から 15 分ごとに 90 分まで、いずれも tail pinch 法 (Takagi et al, 1966) で測定した。

**投与スケジュール：** ICS 205-930 は PSY ストレス負荷 60 分前に po 投与し、その他の被験薬はいずれも PSY ストレス負荷 30 分前に ip 注射した。Morphine との併用の場合、PSY ストレスは毎日の morphine 10 mg/kg, sc 投与 15 分後に 5 分間負荷した。被験薬は morphine 投与の 15 分前

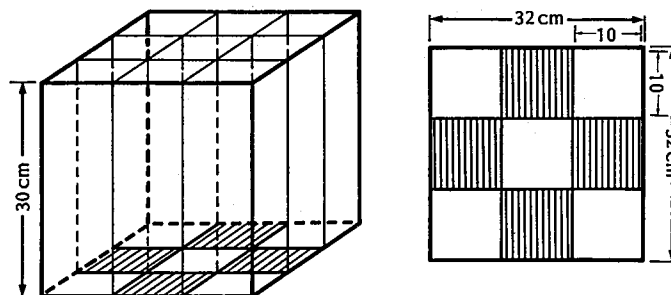


Fig. 1 The communication box to expose the mouse to psychological stress.

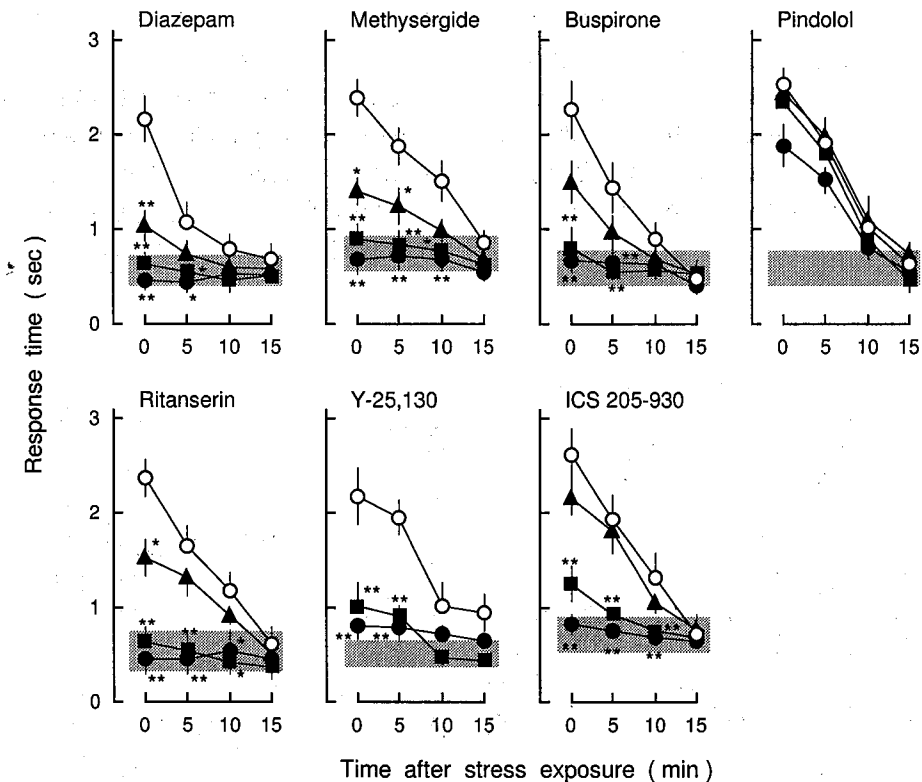
に処置した。耐性形成は、毎日の時間-反応曲線下面積 (AUC) を比較して判定した。

**高架式十字型迷路 (EPM) 試験:** 木製の 2 本の open arm (24×8 cm) と 2 本の enclosed arm (24×8×13 cm) からなり、床からの高さが 50 cm の高架式十字型迷路を用いた。壁のない open arm には、マウスの落下を防止するため、高さ 0.5 cm の透明アクリル製の枠をつけた。Enclosed arm の壁は透明アクリル製とした。Arm およびプラット

フォームの表面は黒色とした。

マウスを open arm の方向に、中央のプラットフォームに置き、5 分間の行動観察時間のうち、マウスの 4 肢とも open arm 内に入ることを指標として、open arm での滞在時間の合計を測定した。なお、マウスは本装置に未経験のものを用いた。

**統計処理:** 各成績は、一元配置もしくは繰り返しのある二元配置の分散分析後、群間の差を Dun-



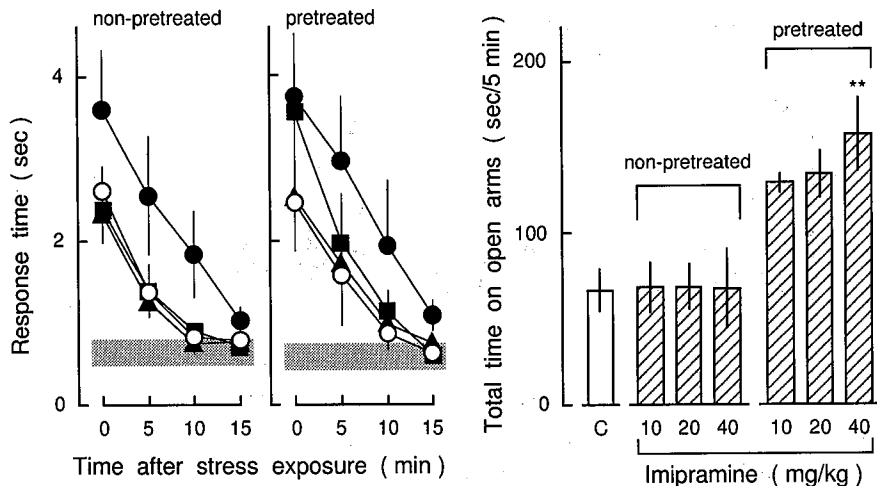
**Fig. 2** Effect of diazepam and 5-HT related compounds on psychological stress-induced analgesia. Mice were exposed to psychological (PSY) stress for 5 min. The antinociceptive effect was measured by tail-pinch method, every 5 min from immediately after the termination (0 min) of the PSY stress exposure. Each drug was given 30 or 60 min before the stress exposure. Diazepam 0.5 (▲), 1 (■), 2 (●) mg/kg, ip; methysergide, 2 (▲), 5 (■), 10 (●) mg/kg, ip; buspirone 1 (▲), 3 (■), 10 (●) mg/kg, ip; (±) pindolol, 0.5 (▲), 1 (■), 3 (●) mg/kg, ip; ritanserin, 1 (▲), 2 (■), 5 (●) mg/kg, ip; Y-25,130, 0.03 (■), 0.1 (●) mg/kg, ip; and ICS 205-930, 0.1 (▲), 1 (■), 10 (●) μg/kg, po. The control group (○) was treated with vehicle instead of the drug. The dotted area indicated response time before exposure to stress. Each point indicates the mean±SE (n=12-14). \* P<0.05, \*\* P<0.01, compared with the control group.

nettの方法および対応のあるt検定で求めた。

### 実験成績

#### 1. PSY ストレス誘発鎮痛に対する DZP, 5-HT系薬物および imipramine の影響

Communication box を用いた PSY ストレスの負荷によって、負荷直後をピークとし、15分以内に速やかに消失する抗侵害効果が発現した。DZP, 非選択的5-HT受容体拮抗薬 methysergide, 5-HT<sub>1A</sub>受容体部分作動薬 buspirone, 5-HT<sub>2</sub>受容体拮抗薬 ritanserin, 5-HT<sub>3</sub>受容体拮抗薬 Y-25,130 および ICS 205-930 はいずれも用量依存的に PSY-SIA を抑制した。一方、5-HT<sub>1B</sub>受容体拮抗薬 pindolol は PSY-SIA に影響を与えなかった (Fig. 2)。また、imipramine 10, 20 および 40 mg/kg, sc の単回投与あるいは5日間反復投与いずれによっても PSY-SIA は影響されなかった (Fig. 3, left)。



**Fig. 3** Effect of imipramine on psychological stress-induced analgesia and on the time spent on the open arms during a 5-min observation period in the elevated plus-maze test. Left: Imipramine 10 (▲), 20 (■) or 40 (●) mg/kg, ip was given 30 min before exposure to psychological stress, with or without pretreatment of mice daily with imipramine at the corresponding doses for 5 days. For other details, refer to Fig. 2. Right: Mice were given imipramine (10, 20 or 40 mg/kg) 60 min before the test, with or without pretreatment of mice daily with imipramine at the corresponding doses for 5 days. Scores are mean  $\pm$  SE ( $n=6-14$ ). \*\*  $P<0.01$ , compared with the groups treated with saline (C).

#### 2. PSY ストレス負荷による morphine 耐性形成の抑制に対する DZP, 5-HT系薬物および imipramine の影響

Morphine 10 mg/kg, sc の抗侵害効果は、1日1回5日間の連日投与によって徐々に減弱し、耐性が形成された。PSY ストレスとの連日併用負荷は morphine 耐性の形成を抑制した。この PSY ストレス併用負荷による耐性形成の抑制は、pindolol を除くすべての被験薬の前処置によって消失し、morphine 耐性が形成された (Fig. 4)。なお、imipramine はそれ自身、morphine 耐性の形成を抑制するので PSY ストレスによる抑制効果への影響は検討できなかった。

#### 3. 高架式十字迷路試験による DZP, 5-HT系薬物および imipramine の抗不安作用の検定

DZP, buspirone, Y-25,130 および ICS 205-930 はいずれも高架式十字迷路試験において、open arm での滞在時間が有意に増加し、抗不安作用が

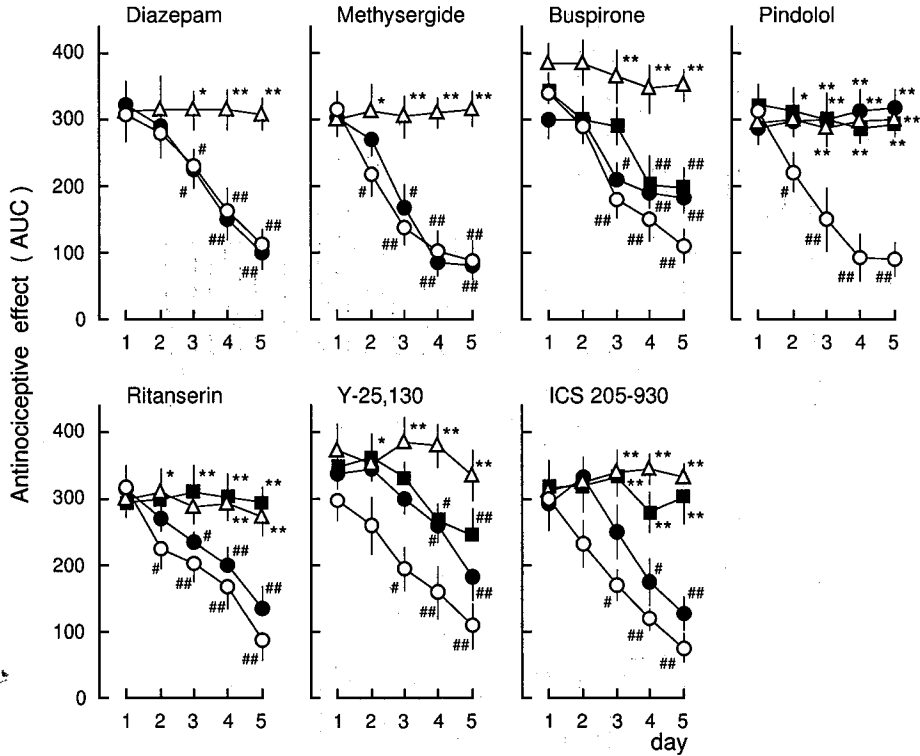


Fig. 4 Blockade by psychological stress of the development of antinociceptive tolerance to morphine and reversal of the effect by diazepam and 5-HT related compounds. Fifteen min after morphine, 10 mg/kg, mice were exposed to psychological (PSY) stress for 5 min. The antinociceptive effect was expressed as area under the curve (AUC). Mice were pretreated ip daily with diazepam 1 mg/kg (●); methysergide, 2 mg/kg (●); buspirone 1 (■), 3 (●) mg/kg; (±) pindolol, 1 (■), 3 (●) mg/kg; ritanserin, 1 (■), 2 (●) mg/kg; Y-25,130, 0.03 (■), 0.1 (●) mg/kg; and po daily with ICS 205-930, 0.1 (■), 1 (●) μg/kg, 15 or 45 min before morphine. The stressed control group (Δ) was treated with vehicle instead of the drug. Each point indicates the mean ± SE (n=12-14). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, compared with the non-stressed control group treated daily with morphine alone (○). # P < 0.05, ## P < 0.01, compared with the corresponding value on the 1st day.

認められたが、methysergide, pindolol および ritanserin は影響がみられなかった (Fig. 5)。なお, imipramine は単回投与では影響はみられなかったが, 40 mg/kg の 5 日間前処置群で open arm への滞在時間が有意に増加した (Fig. 3, right)。

考 察

代表的抗不安薬 DZP は benzodiazepine (BZP) 受容体を介し, 臨床的にすぐれた不安緩解作用を示すが, 筋弛緩作用, 傾眠作用のほか, 連用によ

る依存性が認められるため, 代替薬の開発が検討されている。最近, 5-HT 受容体を介して抗不安作用を発現する一連の薬物が開発されつつある。5-HT<sub>1A</sub> 受容体部分作動薬 buspirone がその代表であり, BZP 系抗不安薬のもつ副作用がないことから, 不安選択的抗不安薬と呼ばれている。しかし, 臨床的には作用発現が遅く, 特殊な症例にしか有効とされない。また, 5-HT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬は制吐剤として臨床応用されているが, 中枢作用として抗不安作用がある可能性が示唆されている。

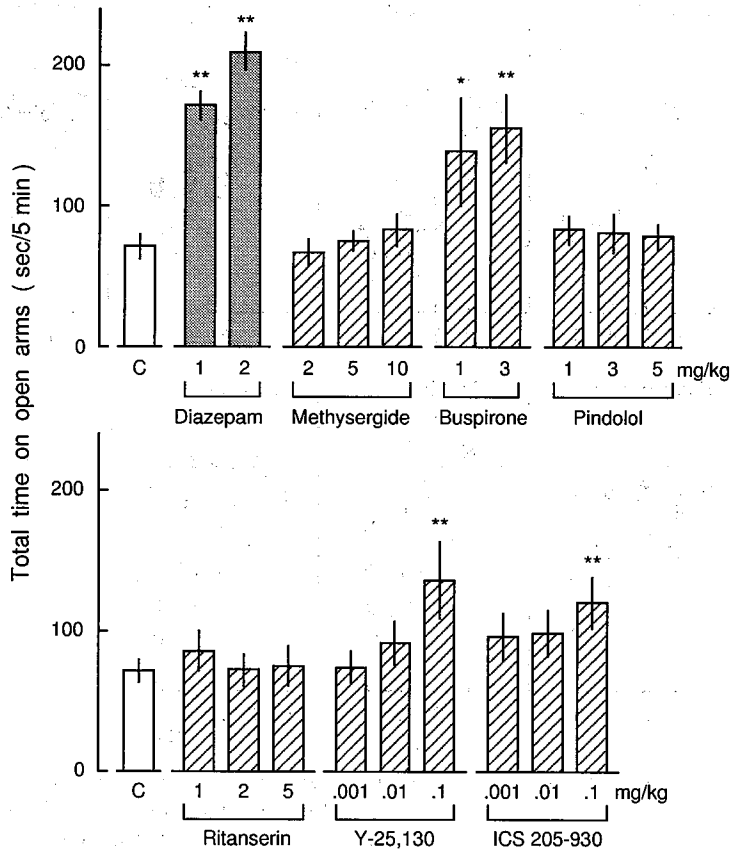


Fig. 5 The effect of diazepam and 5-HT related compounds on the time spent on the open arms during a 5-min observation period in the elevated plus-maze test. Mice were given ip diazepam (DZP, 1, 2 mg/kg), methysergide (2, 5, 10 mg/kg), buspirone (1, 3 mg/kg), ( $\pm$ ) pindolol (1, 3, 5 mg/kg), ritanserin (1, 2, 5 mg/kg) and Y-25,130 (1, 10, 100  $\mu$ g/kg), or given po ICS 205-930 (1, 10, 100  $\mu$ g/kg), 60 min before the test. Scores are mean  $\pm$  SE (n=6-30). \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, compared with the groups treated with saline (C).

Communication box を用いた PSY ストレス 負荷は、足ショックや強制水泳ストレスとは異なり、直接的な身体的侵襲を伴わないことから、その鎮痛発現には不安、恐怖などの情動のみ関与することが示唆される (Takahashi et al, 1988b)。一方、PSY ストレス負荷が morphine 連日投与による抗侵害効果に対する耐性形成を抑制し、DZP がこの PSY ストレスによる耐性形成抑制効果を消失させた (Tokuyama et al, 1989) ことから、耐性形成抑制における情動の関与も推察される。

本研究では、PSY ストレス負荷による抗侵害効

果ならびに morphine 耐性形成の抑制に対する DZP や 5-HT 系抗不安薬の影響を指標として、新しい抗不安薬の検定法としての可能性を吟味した。その結果、足ショックや強制水泳ストレスとは異なり、直接的な身体的侵襲を伴わない PSY ストレス誘発抗侵害効果は、抗不安薬 DZP のみならず、臨床のおよび実験的に抗不安作用が報告されている buspirone, Y-25,130, ICS 205-903, 抗うつ、抗不安作用を示す ritanserin によって消失した。また、これらの薬物は PSY ストレス連日負荷による morphine 耐性形成の抑制効果も、同様

に消失させた。一方、抗不安作用の認められていない pindolol, 臨床的には抗うつ薬として使用されている imipramine はいずれも、ストレスによって誘発されるこれらの反応に影響しなかった。本成績は、PSY ストレス負荷による諸反応が、共通して情動という機構に基づいており、そのため抗不安作用を有する薬物によってのみ特異的に抑制されたものと考えられる。したがって、本法は、従来の方法とは全く異なる新しい抗不安薬のスクリーニング法として有用であるとともに、ストレス負荷による諸反応に対する影響を指標とすることから、ストレスに起因する多様な不安神経症に有効な薬物の開発への応用も考えられる。

なお、現在まで、ここに示した PSY ストレスによる 2 つの反応に対する抗不安薬の抑制作用に相違は認められないことから、いずれかの反応を指標として抗不安薬を検定することは可能と考えられる。方法論的には PSY-SIA の検出は熟練を要するため、morphine 耐性形成の抑制に対する影響を指標とするほうが確実にやりやすい。いずれにしても、薬物自身に鎮痛効果があったり、morphine 耐性形成の抑制作用がある場合には、用量を再検討するほか、それぞれもう 1 つの方法を試みる必要がある。

医薬品開発において、抗不安薬スクリーニング法として最もよく用いられている抗コンフリクト実験 (Geller and Seifter, 1960; Vogel et al, 1971) は、その特異性から信頼性は高いとされるが、動物への電気刺激による葛藤状態をヒトの不安と同一視する評価法への疑問をはじめ、動物の訓練など操作が煩雑で時間がかかるなどの欠点がある。一方、最近汎用されている EPM 試験法 (Lister, 1987; Pellow et al, 1987) は、social interaction 試験法 (File, 1980), two compartment exploration 試験法 (Colpaert et al, 1985) などと同様、簡便な装置と方法で、かつ強化効果や学習・記憶の影響を考慮することなく、より自然な状態で発現する「不安」を指標とするところに特徴がある。しかし、EPM 試験法は 5-HT 系薬物の抗不安作用を検出しにくいとされており、ここでも buspirone, Y-25,130 および ICS 205-930 に抗不安作用

は認められたが、methysergide, ritanserin では作用がみられず、また、効果発現が認められた ICS 205-930 でも、ストレス反応の抑制に比べ、100 倍の用量を要した。さらに、imipramine 連日投与で抗不安作用が発現するなど、抗不安作用評価法としての限界も示された。事実、EPM 法での成績の不一致 (File et al, 1987; Critchley and Handley, 1987) も報告されており、装置を含めた条件設定や評価は難しい。

一方、方法の比較ではないが、U-50,488H が morphine 耐性形成を抑制し (Yamamoto et al, 1988), その抑制に PSY ストレスと一部共通した機構の関与が示唆されていることから (Takahashi et al, 1990), U-50,488H による morphine 耐性形成の抑制に対する各種抗不安薬の影響についても比較検討した。U-50,488H による抑制は DZP, buspirone, Y-25,130 で消失するほか、(±)pindolol でも消失し、反対に、ritanserin は無影響であるなど、PSY ストレスとの相違がみられた (投稿準備中)。両者の相違の作用機序の解明は今後の課題であるが、このことから、PSY ストレスの効果に対する影響を指標とするほうが、U-50,488H のそれより抗不安薬に対する検出能力は高いといえる。

#### おわりに

PSY ストレス負荷による抗侵害効果、morphine 耐性形成抑制に対する拮抗作用を指標に既知および開発中の抗不安薬を検定し、抗不安作用を有する薬物に PSY ストレスによるこれらの諸反応を抑制する作用が認められた。臨床的に、ストレスなど刺激負荷時に生じる不安発作に対して有用な抗不安薬が期待されていることから、ストレスによって生じる不安に対する影響を指標とした独特なスクリーニング法は、より現実的な方法と考えられる。しかし、これらのストレス反応は、例えば、抗不安作用がないと考えられる  $\kappa$  オピオイド受容体拮抗薬 nor-binaltorphimine (nor-BNI) によっても遮断される (Takahashi et al, 1990) など残された問題もある。

以上、PSY ストレス負荷による諸反応の抑制効

果を指標とした抗不安薬検定法を提唱し、その有用性を明らかにした。

本稿作成にご協力いただいた本学大学院生、中尾 薫君に感謝します。

#### 文 献

- Colpaert, F. C., Meert, T. F., Niemegeers, C. J. E. and Janssen, P. A. J. (1985) Behavioral and 5-HT antagonist effects on ritanserin: a pure and selective antagonist of LSD discrimination in rat. *Psychopharmacology*, 86: 45-54.
- Critchley, M. A. E. and Handley, S. L. (1987) 5-HT<sub>1A</sub> ligand effects in the X-maze anxiety test. *British Journal of Pharmacology*, 92: 660P.
- File, S. E. (1980) The use of social interaction as a method for detective anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *Journal of Neuroscience Methods*, 2: 219-238.
- File, S. E., Johnston, A. L. and Pellow, S. (1987) Effects of compounds activity at CNS 5-hydroxytryptamine systems on anxiety in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 90: 265P.
- Geller, I. and Seifter, J. (1960) The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and pro-mazine on experimentally induced conflict in the rat. *Psychopharmacologia*, 1: 482-492.
- Izumi, R., Takahashi, M. and Kaneto, H. (1983) Involvement of different mechanisms, opioid and non-opioid forms, in the analgesia induced by foot-shock (FS) and immobilized-water immersion (IW) stress. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 33: 1104-1106.
- Lister, R. G. (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 92: 180-185.
- 小川暢也, 桑原 寛 (1966) 情動のコミュニケーション. *精神身体医学*, 6: 352-357.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. and Briley, M. (1987) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149-167.
- Takagi, H., Inukai, T. and Nakama, M. (1966) A modification of Haffner's method for testing analgesics. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 16: 287-294.
- Takahashi, M., Tokuyama, S. and Kaneto, H. (1987) Implication of endogenous opioid mechanism in the production of the antinociceptive effect induced by psychological stress in mice. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 44: 283-291.
- Takahashi, M., Deguchi, Y. and Kaneto, H. (1988a) Blockade of the development of analgesic tolerance to morphine by concurrent treatment with opioid- but not non-opioid-mediated stress in mice. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 46: 1-5.
- Takahashi, M., Tokuyama, S. and Kaneto, H. (1988b) Distinctive implication of emotional factors in various types of stress-induced analgesia. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 46: 418-420.
- Takahashi, M., Senda, T., Tokuyama, S. and Kaneto, H. (1990) Further evidence for the implication of a  $\kappa$ -opioid receptor mechanism in the production of psychological stress-induced analgesia. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 53: 487-494.
- Tokuyama, S., Takahashi, M. and Kaneto, H. (1989) Blockade of the development of analgesic tolerance to morphine by psychological stress through benzodiazepine receptor mediated mechanism. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 51: 425-427.
- Tokuyama, S., Takahashi, M. and Kaneto, H. (1993) Involvement of serotonergic receptor subtypes in the production of antinociception by psychological stress in mice. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 61: 237-242.
- Vogel, R. J., Beer, B. and Clody, D. E. (1971) A simple and reliable conflict procedure for testing antianxiety agents. *Psychopharmacologia*, 21: 1-7.
- Yamamoto, T., Ohno, M. and Ueki, S. (1988) A selective  $\kappa$ -opioid agonist, U-50,488H, blocks the development of tolerance to morphine analgesia in rats. *European Journal of Pharmacology*, 156: 173-176.

**Abstract:** Masakatsu TAKAHASHI and Hiroshi KANETO (Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki, 852 Japan) *Assessment of anxiolytics (6) - A novel method in mice using psychological stress.* *Jpn. J. Psychopharmacol.*, 15: 375-383 (1995).

Both antinociception induced by psychological stress (PSY, using the communication box) and the suppression by the stress of the development of antinociceptive tolerance to morphine were completely extinguished by diazepam (DZP, 1-2 mg/kg), suggesting an essential role of emotional factors in the underlying mechanisms. Based on these findings, a simple and selective method for evaluating anxiolytics was designed. Treatment with methysergide (2-20 mg/kg, ip), buspirone (1-10 mg/kg, ip), ritanserin (1-5 mg/kg, ip), Y-25,130 (0.03-0.1 mg/kg, ip) and ICS 205-930 (1-100  $\mu$ g/kg, po), all of which reportedly possess anxiolytic activity, dose-dependently



suppressed both the production of PSY stress-induced antinociception (PSY-SIA) and the blockade of the development of morphine tolerance by PSY stress. In contrast to these compounds, ( $\pm$ )pindolol (up to 3 mg/kg) and imipramine, even after pretreatment daily with 40 mg/kg, ip, for 5 days, produced no such suppression. In an elevated plus-maze (EPM) method, frequently used as a simple method for detecting anxiolytic drugs, not only DZP, buspirone, Y-25,130 and ICS 205-930 but also imipramine (daily with 40 mg/kg for 5 days) increased the time spent on the open arms, while methysergide or ritanserin failed to augment the time, indicating that the EPM method is not selective for this purpose. Since U-50,488H suppresses the development of morphine tolerance, the utility of the compound for PSY stress was also examined; however, the suppressive effect was counteracted by ( $\pm$ )pindolol but not by ritanserin. Thus, we proposed a valid new method for screening anxiolytic drugs in mice, by testing the extinguishable effect of drugs on these parameters, i.e., PSY-SIA and suppression by PSY stress of the development of morphine tolerance.

**Key words:** Psychological stress, Stress-induced analgesia (SIA), Morphine tolerance, Anxiolytics, Anxiety  
(Reprint requests should be sent to M. Takahashi)