

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：安非他命濫用：以動物模型研究其生理與心理的機制—
安非他命：誘因值評估方法與阻斷上癮 (II)

計畫編號：NSC88-2413-H-002-019

執行期限：中華民國 87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：徐嘉宏 國立台灣大學心理學系

中文摘要：

本計畫的執行成果，好消息是終於「製造」出會自行按桿注射安非他命的老鼠，壞消息是成功的機率尚未達到可以進行議題研究的地步。不過，就技術層面而言，已經改進到幾乎可以利用的地步了。

關鍵詞：自我注射、安非他命。

英文摘要：

Experiments were carried out in order to develop the technique on self-administration of amphetamine in this project. Good news is that there were three rats capable to press a bar to get amphetamine injection. Bad news is that the success rate was still too low to be useful for issue-oriented studies. However, success is near.

Keywords: self-administration, amphetamine.

本計畫的執行成果，好消息是終於「製造」出會自行按桿注射安非他命的老鼠，壞消息是成功的機率尚未達到可以進行議題研究的地步。因此，本報告並未達到可以用發表論文的格式來撰寫的地步。以下的報告方式是先交代所嘗試過的實驗，然後再將有效的方法與技術呈現於後。

各實驗簡報

各個實驗均以嘗試的立場，尋求可行性與可改進之處，因此，方法上的細節能省則省，只陳述要點。成形的版本才於下一節報告。

實驗一：Progressive ratio paradigm 的驗試

本實驗室未曾使用過 Progressive ratio paradigm。為了瞭解這種 paradigm 會得到什麼實際資料，並據之評估執行正式實驗時之可行性，乃將老鼠每天剝奪水 23 小時之後，令其在史基那箱(Skinner box)進行學習按桿得水喝，每天最多一小時；隨後即進行 Progressive ratio paradigm 的驗試，共用老鼠 5 隻，天天驗試 21 天。每天所用的 reinforcement schedule 之 fixed ratio(FR)，視老鼠已經有的表現，每天實驗之前再決定。

用 FR1 訓練到第四天，5 支老鼠學會按桿得水喝。但是，到了第六天或第七天，有兩隻的按桿次數，不升反降兩天。第九、十、十一天，改用 FR10，按桿數均增加，最高增加了四倍。第十二、十三天，表現較好的四隻改用 FR20，其中一隻的表現下降。之後，FR 值每天增加 10，到第十八天的 FR70；這幾天的按桿表現，偶有起伏，但是，大致說來，這四隻的按桿數，最高點都在 FR60。值得注意的是，FR70 再測兩天之後，第廿一天改回 FR60 時，三隻老鼠的按桿表現大幅下降到幾乎得不到一次喝水酬賞！此外，在 FR20 時按桿數下降的那一隻老鼠，在 FR40 時按桿數忽然增加三倍！

Progressive ratio paradigm 的基本理念是，FR 值漸增至某值，按桿數會漸增到最高點，FR 值再增加，按桿數反而開始下降；按桿數最高時的 FR 值是 breaking point 可用來當誘因值的指標。但是，使用這種方法的前提是，在某一 FR 值的條件下，老鼠的按桿表現應該平穩。本實驗的結果並非完全支持這個前提。如此一來，斷定 breaking point 必須另增判斷標準。

實驗二：按桿自我注射安非他命初探

本實驗改進之處：新設計的「導管基座」製造標準化。

六隻老鼠先進行按桿得水的訓練，並嘗試在 FR1 時按桿數達到 100 後，就直接進入 Progressive ratio paradigm；大致說來，按桿數達最高點時，FR30 的有三隻，FR10、FR20、FR40 的各一隻。如實驗一，按桿表現的起起伏伏，也是存在。

做完靜脈導管手術後，只剩一隻導管暢通。先確定該隻手術後的按桿能力。兩天 FR1 的按桿得水表現均大於 100 次，與手術前相當。第三天即變為按桿得安非他命的注射 (0.25 mg/kg/injection)，如此測試五天，按桿數都近乎零。再改回按桿得水，按桿數又恢復到 151 次。之後，改成按桿有機會得水喝，也有機會同時得到安非他命注射。起先，按桿就有水喝，按第十、廿、或卅次時就同時得到安非他命注射；如此七天之後，在改為每按五次，同時得水與得到安非他命注射，測試了五天。這個階段 (12 天) 的表現，

雖然也有起伏，而且大致上不遜於手術前的水準，但是，最後兩天按桿數低於 100。

雖然這隻老鼠按桿後可得安非他命注射，但是，老鼠可能是預期得水才按桿，因此不能斷定該鼠已經會自我注射安非他命。另外，在 FR1 的條件下，按桿得水的表現都高於 100；而得安非他命時都近乎零，這很難用因為預期得水卻沒得到 (extinction) 來解釋——消除速率不可能那麼快。較可能的原因是安非他命注射使老鼠不舒服，源於諸如注射液太冷、安非他命濃度過高、安非他命刺激了血管等等。

實驗三：逕行用安非他命當酬賞物 (I)

本實驗改進之處：安非他命的濃度降低為 0.01 mg/kg/injection，且事先升溫至室溫。

除了改進前一個實驗的可能缺失外，並嘗試直接逕行用安非他命當酬賞物，省掉用水當酬賞物來訓練按桿行為的階段。若能成功，則在正式研究時就可以省很多時間。

六隻接受導管手術後的老鼠逕行接受 FR1 的訓練。到了第二天時，其中三隻的導管阻塞；剩下的三隻繼續訓練，共八天，成績最佳的一隻是有一天按了三次。實驗失敗。可能的原因是：在老鼠活動機率較低的白天訓練、導管不夠順暢。

實驗四：逕行用安非他命當酬賞物 (II)

本實驗改進之處：導管從頭到尾均用 TDMAC-Heparin 處理過、改在夜晚訓練、利用 Brevital 速效麻醉劑測試導管暢通與否。

六隻老鼠接受導管手術後，休息一週；再測試導管暢通與否，一隻阻塞，一隻沒通過麻醉測試。剩下的四隻在 FR1 的條件下進行訓練廿一天，每天一小時。有一隻在第二天就按桿 36 次，最高曾經一天按 84 下。另外一隻到第三天時就按 30 下，最高一天 62 下。雖然按桿表現有起伏，前一隻到了第十九天仍有 58 次按桿的成績，後一隻到第十一天仍有 40 次的成績（之後，按桿數均低於 15，麻醉測試顯示，導管暢通）。所以，終於有兩隻老鼠學會按桿得到安非他命注射！其他兩隻雖各有一天按桿十幾次，但是，應該判定為沒訓練成功。

實驗五：每回測試裡就含 Progressive ratio paradigm (I)

檢視先前實驗的資料，發現每一隻老鼠的按桿行為都有起伏的跡象，若一定要達到穩定後才將 FR 值升一級，必然非常耗時；而且，安非他命的累積量也會因而加大，可能形成一個混淆變項。另闢蹊徑之法是每回 (天) 的測試裡就進行 Progressive ratio paradigm，即，一完成某 FR 值所需的按桿數之後，FR 值立即升一級；如此，每天都可以得到一個 breaking point 的值。由於 FR 值上升甚速，每天注射的安非他命量不至於太多，減少累積量的問題。

三隻導管手術後的老鼠有兩隻因導管阻塞出局。剩下的一隻先用 FR1 訓練按桿得到安非他命注射，隨後讓老鼠經驗 FR2、FR3 的條件，整個過程費時十一天。之後，每天的測試都進行 Progressive ratio paradigm，共七天；所得每天的 breaking point 依序為 20、25、40、32、95、50、9。顯然，這些 breaking points 數據呈現出不小的變異。

實驗六：每回測試裡就含 Progressive ratio paradigm (II)

為了進一步知悉 breaking points 的變異情形，將前一個實驗重複做一次。這次用四隻老鼠，有一隻導管阻塞，剩下的三隻在訓練按桿階段，經過一週，都沒有學習的跡象；有一隻曾有 42 下的佳績，但只是曇花一現。因此，宣告失敗、中斷實驗。最可能的敗因是老鼠體重過重 (超過 600 克)。

總檢討：

導管阻塞的問題，經改進後，實驗四到六用了十三隻老鼠，有四隻阻塞，亦即，成功率接近 70%。雖然看似還不錯，但若將「最後有幾隻會自我注射」的因素考慮進去，九隻導管暢通的老鼠只有三隻學會，也就是說，在這個層面的耗損率甚高。因此，仍應該繼續努力減少阻塞的機率。可改進之處為：與導管相連的鋼管也須經過 heparin 處理。

按桿行為的不穩定是 Progressive ratio paradigm 的一個隱憂。實驗五所採用的方法應該是較可取的方式。雖然仍有 breaking points 數據呈現出不小變異的問題，但是，有了一組數據之後就有機會用統計方法來求其估計值 (如，平均值)，或者找出一套標準化的程序，從中選出代表值。

總之，這個技術已經改進到接近可以利用的程度，雖然「仍須努力」。

實驗方法

茲將實驗五的實驗方法陳述如下，因為它是本研究發展至目前的最佳版本。

製作靜脈導管

材料與工具：

製作靜脈導管

材料與工具：

基座模具(參見附圖)、25 gauge 鋼管(長 14 mm)、小螺絲釘、縫線、牙粉、牙粉水、TDMAC-heparin、silastic tubing (內徑: 0.3 mm, 外徑: 0.64 mm, Dow coming)、Bard mesh (Bard Inc, Ireland)、凡士林、尖嘴鉗、電鑽、竹籤

製作過程：

1. 將 TDMAC-heparin 注入 10 公分長的 silastic tubing 中，等待約十五秒後推出，放置 24 小時令其自然乾燥。其作用是使管內壁形成抗凝血保護膜，降低阻塞的機率。
2. 於鋼管 A 端約 5mm 處，以尖嘴鉗將之折成 90 度的圓角，小心避免壓扁鋼管。將 silastic tubing 插入鋼管的這一端，並越過圓角處約 3~5 mm，再用縫線在圓角兩側綁牢數個死結，把 silastic tubing 固定在鋼管上。
3. 在基座模具的表面塗上一層凡士林。把鋼管 B 端插入模具中央的小孔，然後將牙粉與牙粉水攪拌後倒入。待其乾燥凝固後，以一小片 Bard mesh 覆於其上，再加一些牙膠固定之。注意保持表面的平滑與邊緣的工整，以避免磨擦動物背部時造成傷害。等其凝固後即可將做好的半球形基座倒出來。
4. 壓扁鋼管。將 silastic tubing 插入鋼管的這一端，並越過圓角處約 3~5 mm，再用縫線在圓角兩側綁牢數個死結，把 silastic tubing 固定在鋼管上。
5. 在基座模具的表面塗上一層凡士林。把鋼管 B 端插入模具中央的小孔，然後將牙粉與牙粉水攪拌後倒入。待其乾燥凝固後，以一小片 Bard mesh 覆於其上，再加一些牙膠固定之。注意保持表面的平滑與邊緣的工整，以避免磨擦動物背部時造成傷害。等其凝固後即可將做好的半球形基座倒出來。
6. 在基座的球面部分靠近鋼管附近鑽好四個小孔，鎖上小螺絲釘，再於接縫處覆加牙膠固定之。螺絲釘之目的是作為藥物注射管線與基座連接時的錨釘。
7. 在一小段 silastic tubing(約 7-10 mm)的一端以縫線綁牢死結 注意避免過於用力而使管子斷裂，然後將管子套於鋼管上，再於死結處用牙膠封住，待其凝固後就是一個可以阻止血液流出的保護套，用來套在鋼管 B 端。由於保護套極易耗損，最好大量製作以備不時之需。

靜脈導管埋植手術

材料與工具：

靜脈導管、優碘、酒精、棉花或紗布、縫線、heparin、3M 組織膠、Mersilene mesh (Ethicon LTD, UK)、atropine、麻醉藥(somontal)、剪毛機、手術刀、手術剪、止血鉗、鑷子、針、持針器、iris scissors、動物手術固定盤及繩索、18 gauge 針頭

手術步驟：

1. 手術前先將所有器械以高溫滅菌法消毒。而靜脈導管則以 70%酒精沖洗後陰乾，再充滿 heparin 於其中。
2. 注射 1ml/kg atropine 到老鼠(SD, 約 400-500 克)體內，經過 15~20 分鐘後，再注射 0.6 ml/kg 的麻醉藥。待老鼠進入麻醉狀態後，將兩肩與所夾之背部、以及頸部的毛髮理除(小心避免剪到鬍鬚)。
3. 將老鼠綁在手術固定盤中，以酒精或優碘擦拭剛理除過毛髮的皮膚，然後用手術刀沿脊椎線由前往後切開約 2.5~3.0 公分，以手術剪或止血鉗進行鈍剝(blunt dissect)，將皮膚與肌肉分離，置入導管的基座。翻轉老鼠使其右側朝上，以酒精或優碘擦拭其頸部，以指尖觸摸尋找頸部的脈搏位置，約在心臟與右肩之間，切開約 2.5 公分，非常小心地切開皮膚與皮下，避毳傷到血管。然後手持鑷子由此傷口穿入，經由皮下往肩部的傷口穿出，再將導管夾住，抽回到頸部的傷口。
4. 以鈍剝法將外頸靜脈(external jugular vein)找出，並仔細除去附於其上的結締組織。它的外觀看起來是直徑約 1 mm 的白色半透明血管，內含深紫黑色的血液。以彎頭鑷子小心地將其勾起來，露出約 1.5~2 公分的長度。
5. 仔細地把傷口擦乾，準備將導管插入靜脈中。先以縫線在頸靜脈靠近心臟的那端打一個活結但先不綁緊，而在遠離心臟的那端打一個死結並綁緊。用 iris scissors 在頸靜脈上剪一個小洞，左手持著針尖折彎 90 度的針頭，插入洞口、挑起。而右手用鑷子夾著導管插入洞口，深入約 4~5 公分。然後將剛才的活結綁緊，並再用縫線多打幾個結加以固定。再將傷口擦乾，尤其是靜脈附近。以 mersilene mesh 覆於洞口，並滴上組織膠加以固定。等其完全乾燥後再將頸部的傷口縫合。
6. 將基座下的 Bard mesh 四角牢牢地與肌肉縫合。再將皮膚傷口縫合，僅露出基座及其上的鋼管，最後用優碘再次擦拭兩處傷口，以 0.2~0.3 ml 的 heparin 灌流導管後，用保護套蓋緊鋼管 B 端，結束手術。

靜脈導管的維護與測試

手術後數天內，每天以 heparin 灌流靜脈導管兩次，之後每天一次即可。在每次實驗進行前後，都要以 0.05~0.1 ml 灌流之。若要測試導管的作用，可注射 0.1~0.2 ml 的 1% methohexital (Brevital, Lilly)，它為超短效麻醉藥，若導管作用良好，則老鼠可在 5 秒內完全失去肌肉張力。若藥效較慢出現，則可能導管尖端的位置不良，或有滲漏的現象，雖然動物仍可進行實驗，但其表現可能稍微異常。若完全無法麻醉，則靜脈導管應已失效。使用 Brevital 的優點是麻醉作用時間短，動物可在數分鐘內恢復正常，若實驗進行中發現某隻大白鼠有異常按桿行為，可以立刻測試導管的效果，然後放回去繼續進行實驗。

實驗儀器：

本研究使用「工具行為訓練儀」(Med Associates Inc.)進行大白鼠藥物自我注射的實驗。此儀器主要由 8 組史金納箱(skinner box)，藥物注射幫浦(infusion pump)，控制模組以及一台 IBM PC 相容的 486 電腦所構成。史金納箱長 30 公分，寬 24 公分，高 24 公分，底部由 18 條金屬棒組成，史金納箱的其中一面中央有一凹陷的水槽(離地板 2 公分)，可以盛裝由上方滴落的水滴。同一面離底部 8 公分處的左側或右側皆有槓桿(寬 3.8 公分，深 2.2 公分)，可依實驗需求安裝或移除。槓桿上方 3 公分處各有直徑 2.5 公分的圓形燈，其明滅狀態可作為視覺刺激。在槓桿對面的那面牆上，有一更小的燈泡(house light)位於中央靠上方 2 公分處，並有燈罩將光線向上方投射，提供微弱的照明效果。史金納箱的上方安置一活動旋轉系統(swivel system)，由一懸臂固定旋轉基台，其上接連到注射針筒，其下接注射管線，穿過直徑 5 公分的圓孔進入箱內，接到鼠的基座。活動旋轉系統的功用是避免藥物注射管線被大白鼠扯入箱中，另一方面以同步旋轉的方式抵消大白鼠活動對管路的扭力，保持液體注射暢通。

藥物注射管線由三個部分組成，最內部為 silastic tubing，負責連接動物的靜脈導管及活動旋轉系統；最外部為彈簧鋼管，保護內部管路不致被大白鼠咬壞，尾端並有一只鱷魚夾，可夾住靜脈導管基座上的螺絲釘，避免老鼠活動時拉扯到 silastic tubing 與靜脈導管之鋼管的連接處導致滲漏；而內外層的中間另有一層較厚的矽膠管(tygon tubing)，避免彈簧鋼管彎曲時壓迫到最內部的 silastic tubing 造成阻塞。而活動旋轉系統與藥物注射針筒之間則僅以 polyethelene tubing (PE20)連接，因為此部分位於史金納箱外，不必考慮保護措施。

藥物注射針筒(Hamilton, No.81620)為 10 ml 氣密式玻璃針筒。非氣密式的針筒在推進時可能會有氣泡進入，而造成精確度上的問題，而且如果沒有置於完全水平狀態時，由於重力的因素使推進桿下滑，造成非預期性的注射。因此不得不使用昂貴的氣密式針筒。藥物注射幫浦(PHM-100, Med Associates)為簡易型定速推進系統，其推進速度為 0.018 ml/sec，啟動與否可由電腦程式控制。由於推進速度固定，使得注射時間與藥量較無彈性，因而於本年度新購可變速注射幫浦(PHM-100VSDT, Med Associates)，但仍在測試階段，尚未正式使用於實驗中。

控制模組內含數個輸入輸出介面(DIG-712, DIG-726, MEI) associates)，負責將動物在史金納箱中的反應(如按壓槓桿)傳入電腦中，或傳遞電腦的命令控制史金納箱內的設備(如燈光或給水系統)及藥物注射幫浦。電腦除了記錄動物的反應外，並依照不同的實驗程序驅動不同的設備，而這些實驗程序是由自行撰寫的程式所定義。由於 MED associates 並未公開這些設備的技術資料，必須依賴它的專屬程式語言(MedState Notation, version 2.11)來撰寫程式，並由 Turbo Pascal 7.0 程式語言編譯器將之轉換成 MS-DOS 下的應用程式。實驗的原始碼請參見附錄。

藥物製備

安非他命(amphetamine, Sigma)是溶於含有 heparin 的生理食鹽水中，劑量為 0.25 或 0.01 mg/kg/injection。由於每隻大白鼠體重不同，製備時必須「量身訂做」。先配好 0.5 mg/kg 安非他命，再依其體重取 1 ml/kg 放入注射針筒中，再加入生理食鹽水使總量達到 10 ml，得到劑量 0.05 mg/kg/ml 的安非他命。由於每次注射為 0.2 ml，故注射劑量為 0.01 mg/kg/injection。為避免注入血管內的藥物過於冰冷引起不必要的嫌惡反應，所使用的生理食鹽水都是處於室溫或隔水加熱至 30°C 以上。

實驗程序

在訓練老鼠按桿喝水的實驗中，老鼠被置於工具行為訓練儀中一個小時，若按桿則可在凹陷的水槽中得到一小滴水。在固定比率程序(Fix-Ratio Schedule)的實驗中，大白鼠要按槓桿固定次數以獲得一滴水，例如 FR1 是每次按桿都可得到水，而 FR10 必須按 10 次才有一滴水，依此類推。

大白鼠接受靜脈導管埋植手術一週後，開始進行藥物自我注射的實驗，每天一次長達 4 小時的訓練階段。大白鼠在進入工具行為訓練儀之前，先以 0.05 ~ 0.1 ml heparin 灌流靜脈導管，連接已裝妥藥物的注射管，然後放入史金納箱中。一開始先無條件給予一次安非他命的注射(0.2 ml)，目的是形塑(shaping)自我注射的行為並提示實驗開始。其後大白鼠反應不佳時再依情況給予此種「免費」的注射。老鼠要學會的是，按壓槓桿以獲取藥物注射作為酬賞。在固定比率程序(Fix-Ratio Schedule)的實驗中，大白鼠要按槓桿固定次數以獲得一次藥物注射，例如按一次就可得到一次注射，或按三次才有一次注射。而漸增比率程序(Progressive-Ratio Schedule)的實驗中，老鼠一開始按一次就可得到藥物注射，但每次得到酬賞後必須要按更多次才能再得到一次注射。例如，第二次注射必須按 2 次，第三次必須再按 4 次，第四次必須再按 6 次等等。老鼠的「付出一酬賞」比率是逐步增加的，其數列如下：1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, 268, 328, 402, 492, 603, 737, 901。

在一般狀態下(沒有注射時)，位於槓桿對面牆上的小燈(house light)是處於點亮的狀態，而開始注射藥物時，house light 熄滅，而槓桿上方的圓燈被點亮，直到為時 11 秒的注射階段結束為止，才又恢復一般狀態。在藥物注射階段時，老鼠按桿的行為雖有記錄，但不能得到酬賞，注射完畢後才開始計算按桿次數以得到下一次酬賞，故注射時按桿只是「做白工」而已。為避免老鼠注射過量的藥物，每天注射上限為 40 次。到達注射上限或 4 小時後，自動結束訓練階段，並熄滅所有燈光。隨後將老鼠移出，並再次以 0.05 ~ 0.1 ml heparin 灌流靜脈導管，並蓋回保護套。

資料分析

每次實驗後，所有資料在電腦中儲存為純文字檔，包含老鼠的基本資訊、按桿次數、酬賞次數及其時間等等。早期實驗以 SoftCR for DOS (MED associates) 製作反應累進記錄圖(cumulative recording graph)，但此程式有明顯的錯誤，它會將圖表上緣的反應次數重覆計算，導致愈後面的資料會有愈大的誤差。由於此程式並未附有原始程式碼可供修正，筆者只好利用 Visual Basic for Application in Excel 97(Microsoft)的程式語言，自行開發了相容於 SoftCR for DOS 格式的軟體，稱爲 SoftCR_VBA，以便製作沒有誤差的圖表。

計畫自我評估

雖然自我注射的技術已經使用了好幾十年，但是，文獻上所載的技術層面的信息均不夠詳細。本研究一路摸索、改進，終於能使老鼠自我注射，可謂得之不易。雖然所習得的技術尚不足以用於正式的研究，但是，我們將繼續努力，期使此方法達到可用的地步。遺憾的是，由於技術層面尚未全部解決，研究計畫中的具議題性的實驗都無法開展，只好說抱歉了。

方法之參考文獻

Caine, S. B, Lintz, R., & Koob, G. F. (1993). Intravenous drug self-administration techniques in animals. In A. Sahgal (Ed.), *Behavioural Neuroscience: A practical approach, Volume II*. Oxford: IRL Press.

附圖

