

## ラット脳線条体からのモノアミン放出におよぼす $\delta$ -Guanidinovaleric acid 及び GABA 受容体作動薬の 影響に関する研究

岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設神経情報学部門 (指導: 森 昭胤教授)

岩 谷 和 夫

(平成 6 年 4 月 7 日受稿)

Key words :  $\delta$ -Guanidinovaleric acid, GABA<sub>A</sub> receptor, GABA<sub>B</sub> receptor,  
Serotonin, Dopamine

### 緒 言

$\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)は哺乳類の脳内に遊離の状態を高濃度に存在している。中枢神経系においては、主要な抑制性神経伝達物質であると考えられ<sup>1)</sup>、てんかんあるいはけいれんのメカニズムにも深く関係している<sup>2-6)</sup>。小脳のプルキンエ細胞、海馬のバスケット細胞、新線条体、網膜、大脳皮質、嗅球などの介在神経、さらに線条体-黒質、淡蒼球-黒質間を連絡する神経などには、GABA を神経伝達物質として使用する神経情報伝達系が存在することが知られている<sup>7)</sup>。また GABA 受容体に対するいろいろな薬物の親和性や感受性、また情報を伝達される側の神経細胞の GABA 受容体に GABA が作用したときに引き起こされる反応様式の違いにより、GABA 受容体は GABA<sub>A</sub> 受容体と GABA<sub>B</sub> 受容体に分類されている<sup>8)</sup>。

さて、アミノ基にアミジン基の結合した構造を持つ化合物をグアニジン化合物と総称するが、生体内にも多数のグアニジン化合物が蛋白質に結合して、もしくは遊離の状態、その存在が確認されている<sup>9)</sup>。代表的なグアニジン化合物の1つであるアルギニン(Arg)は、尿素サイクルの構成メンバーとして、生体内からの窒素排出の役割を担っていることは広く知られている。またクレアチンは Arg とグリシンからグアニジン酢酸を経由して合成され、更にリン酸を結合す

ることにより高エネルギー化合物となり筋収縮にエネルギーを供給していることもよく知られている。更に、グアニジノコハク酸やメチルグアニジンなどは尿毒症の症状発現の一翼を担っていることも考えられている<sup>10)</sup>。

グアニジン化合物の中枢作用に関しては、古くよりけいれんに関して研究がなされてきたが、森は、ペンチレンテトラゾール誘発けいれん中に、脳内で  $\gamma$ -グアニジノ酪酸が増加することを明らかにすると共に<sup>11)</sup>、脳室内投与によりけいれんが誘発されることを報告した<sup>12)</sup>。また平松らは、ペンチレンテトラゾール誘発けいれん発作直前に脳内でグアニジノエタンスルホン酸が増加し、電気刺激けいれん中には逆に減少することを<sup>13)</sup>、さらに森らはコバルトによるてんかん焦点の脳組織内に  $\alpha$ -グアニジノグルタル酸がけいれん発作発現中にのみ増加することを報告している<sup>14)</sup>。さらにグアニジノエタンスルホン酸<sup>15)</sup>、 $\alpha$ -グアニジノグルタル酸<sup>16)</sup>はいずれもラットやウサギの脳内に注入すると、けいれん発作が発現することも知られ、グアニジン化合物が中枢神経系の異常興奮に関し何らかの役割を演じていることが示唆されている。

一方、Arg がリジンに代謝される際生じる NO は、神経細胞内においてグアニレートサイクラーゼを活性化すること<sup>17,18)</sup>、また Arg の誘導体である L-N<sup>G</sup>-モノメチルアルギニンや L-N<sup>G</sup>-ニトロアルギニンは NO 合成を抑制することなど

が近年報告され<sup>19,20)</sup>, グアニジノ化合物はセカンドメッセンジャーの基質やその阻害剤となるなど, 神経伝達機構に対して重要な役割を担っていることも明らかにされている。

さて,  $\beta$ -グアニジノバレリン酸(GVA)は Arg より  $\alpha$ 位のアミノ基のとれた構造をしており, けいれん誘発作用を持ち<sup>21)</sup>, GABA によるCl<sup>-</sup>の細胞内流入を抑制すること<sup>22)</sup>, 脳液による研究などから GABA 拮抗薬であると考えられている<sup>23)</sup>. 一方あらかじめ線条体内にドーパミン(DA)遮断薬を投与しておく, 興奮性アミノ酸受容体作動薬投与による運動量の増加が抑制されること<sup>24,25)</sup>, レセルピン投与により脳内モノアミンを枯渇させると, 電気刺激けいれんおよびペンチレンテトラゾール誘発けいれんの閾値が低下すること<sup>26)</sup>, けいれん発症モデルマウスでは GABA とモノアミンとが密接に関係していることなど<sup>27)</sup>, けいれんの発現とモノアミン神経系との関わりが示唆されている。

そこで本報告においては, 脳内透析法を用いて, 線条体における DA, セロトニン(5-HT)の放出に対する GVA の影響を検討した. また GVA の影響に対する GABA の効果, さらにその影響が GABA<sub>A</sub> 受容体を介するのか GABA<sub>B</sub> 受容体を介するのかを調べるため, GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬としてムシモルを, GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬としてバクロフェン<sup>8)</sup>を用いて検討したので報告する。

## 材 料 と 方 法

### 1. 実験動物

実験には Sprague Dawley (SD) 系雄性ラット(体重250-350 g, 日本チャールズリバー株式会社, 神奈川)を使用した. ラットは室温25°C, 湿度55%, 12時間の明暗サイクル(午前7時より午後7時までの明期)のもとで飼育した. 飼料はオリエンタル酵母社製固形飼料 MF を使用し, 水と共に自由に摂取させた.

### 2. 使用薬物

GVA は Weiss らの方法<sup>28)</sup>に従い当研究施設にて合成されたものを用い, 1 mM および10 mM となるように生理食塩水に溶解した. GABA (和光純薬工業株式会社, 大阪), ムシモル(Sigma

Chemical Company, USA), (-)-バクロフェン(日本チバガイギー株式会社, 宝塚)は, それぞれ10 mM となるように生理食塩水に溶解した. また GVA+GABA 混合溶液, GVA+ムシモル混合溶液, GVA+バクロフェン混合溶液は, どちらの薬物も10 mM となるように生理食塩水に溶解して使用した.

### 3. ラット線条体灌流液の採取

ラットにエーテル麻酔下で気管内挿管し, 人工呼吸下にサクシニルコリンにて非動化した後, 脳定位固定装置に固定した. Bregma から前方2 mm, 左側方3 mmの頭蓋骨に穴をあけ, Phebus ら<sup>29)</sup>の方法に従い, 自作した透析プローブを線条体内(脳硬膜から深さ4 mm)に挿入した. 透析プローブの中は生理食塩水で灌流(流速2  $\mu$ l/min)し, 各20分間の灌流液を集めて分析試料とした. 透析開始2時間後に GVA, GABA, ムシモル, バクロフェン, あるいは GVA と他の薬物との混合溶液を透析液として使用, 4時間投与し続け, その間, 試料を採取した. 対照群には薬物を投与せず, そのまま生理食塩水を灌流し続けた.

### 4. モノアミン及びその代謝産物量の測定

試料は採取後直ちに電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフ(HPLC-ECD)に直接注入し, その中に含まれるモノアミン及びその代謝産物量の測定を行った. HPLC-ECD の構成は, ポンプ(モデルL-4000W, 柳本, 京都), 分析カラム(LiChrospher RP-18, 250 mm  $\times$  4 mm, 関東化学, 東京), ガードカラム(LiChrosorb RP-18, 4 mm  $\times$  4 mm, 関東化学, 東京), および電気化学検出器(モデルEC-100, エイコム, 京都)とした. 移動相には0.1 M リン酸緩衝液(pH3.5)にメタノールを20%, オクタンスルホン酸ナトリウムを150 mg/l, EDTA を10 mg/l 加えたものを用い, 流速0.8 ml/min で展開した. また電気化学検出器にはカーボン電極を用い銀/塩化銀参照電極との間の電位差は700 mV とした<sup>30)</sup>.

### 5. 脳透析プローブのラット脳内挿入位置の確認

実験終了後, ラットを断頭し, 脳を取り出しスライスして, 透析プローブが線条体内に挿入されていることを確認した.

## 6. In vitro 条件下での脳透析プローブの回収率の測定

DA, ジヒドロキシフェニル酢酸(DOPAC), ホモバニリン酸(HVA), 5-HT, 5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)をそれぞれ500 ng/ml 含む37°Cの人工髄液中に脳透析プローブを挿入し, 生理食塩水にて流速2  $\mu$ l/min で灌流した灌流液中の添加薬物濃度を HPLC-ECD により測定して回収率を測定した。

## 7. 統計学的処理

経時的に測定したモノアミン及びその代謝産物量の値は薬物投与開始直前の値を100としてその変化をあらわし, 同時間における比較を U-test を用いて検定し, 5%以下の危険率をもって有意とした。

## 結 果

### 1. 回 収 率

DA, DOPAC, HVA, 5-HT および5-HIAA の回収率はそれぞれ $9.37 \pm 0.89$ ,  $8.62 \pm 0.72$ ,  $10.05 \pm 1.97$ ,  $9.15 \pm 0.41$  および  $10.02 \pm 0.50\%$  (mean  $\pm$  SEM) であった。

### 2. 各種薬物の線条体内 DA, 5-HT 及びその代謝産物への影響

各薬物の投与直前の DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA の透析液中の濃度は, それぞれ  $0.37 \pm 0.04$  ng/ml,  $65.2 \pm 5.23$  ng/ml,  $39.0 \pm 3.13$  ng/ml,  $0.25 \pm 0.04$  ng/ml,  $23.1 \pm 2.06$  ng/ml (mean  $\pm$  SEM) であった。

#### 1) GVA の影響

灌流液に GVA を投与(GVA 1mM 生理食塩水溶液)すると, 透析液中の DA 濃度は, 投与直後から60分後, 120分後から140分後に, 対照群に比べ有意に増加した後, 対照群との間に差のないレベルまで低下した。DOPAC, HVA 濃度には有意な変化は認められなかった。また高濃度の GVA (10mM GVA 生理食塩水溶液) を投与すると透析液中の DA 濃度は, 投与直後から約40倍にまで増加し, 1時間ほど継続した後, 徐々に減少した。しかし投与開始4時間後でも対照群および1mM 溶液投与群と比べ有意な増加が認められた。DOPAC は, 対照群に比べ投与20分後から60分後までのサンプル中で有

意な減少が認められたが, 投与開始60分以後には有意差はなくなった。HVA は, 時間の経過と共に減少し, 投与40分以後では対照群との間に有意差が認められた (Fig. 1)。

灌流液中に GVA (1mM または 10mM) を投与することにより, 5-HT は GVA を投与した直後から増加し, 実験を終了した4時間後においてもなお増加したままであった。その増加は GVA の濃度に依存していた。5-HIAA は, 灌流液を GVA 10mM 生理食塩水溶液としても, 対照群との間には有意な差は認められなかったが, 1mM 溶液投与群では, 投与開始3時間および4時間後に対照群と比較して有意な増加が観察された (Fig. 2)。

#### 2) GABA の影響

灌流液中に GABA を投与(GABA 10mM 生理食塩水溶液)すると, DA 及びその代謝産物である DOPAC および HVA は時間の経過と共に減少する傾向がみられ, DA は投与開始100分後から120分後, 及び160分後以後に集めたサンプル中で有意に減少していた。DOPAC は投与開始20分以降に, HVA は3時間以降に有意に減少した (Fig. 3)。

5-HT および5-HIAA は, GABA を灌流液に混合して投与しても, 対照群との間に有意な変化は認められなかった (Fig. 4)。

#### 3) GVA と GABA 同時投与の影響

GABA と GVA をどちらも10mM になるよう灌流液に混合しラット線条体内に投与すると, DA は, 投与直後より80分後, 140分後から160分後に, 対照群と比べ有意に増加した。しかし GVA のみを投与したときと比べその増加率は約1/8と小さく, かつ投与開始80分以後で対照群との間に有意差が認められたのは投与開始後160分のみであった。DOPAC および HVA は, GVA と GABA を共に投与すると, 投与開始直後より有意に低値を示し, 時間と共に減少し続けた (Fig. 3)。

5-HT は, GVA+GABA 混合投与直後より120分後, 140分後から220分後のサンプルにおいて, 有意に増加したが, その増加率は GVA のみを投与したときと比べ小さくなった。5-HIAA は投与開始1時間後から2時間後まで有意に減

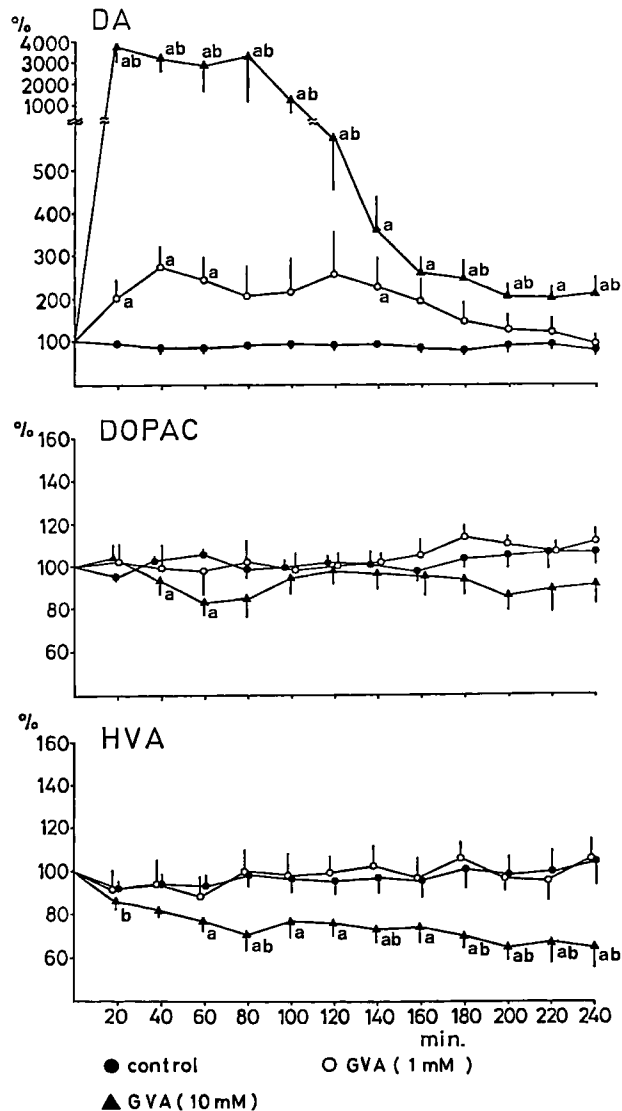


Fig. 1 Time-dependent changes (mean  $\pm$  SEM) in the levels of DA, DOPAC, and HVA after administration of GVA into the dialysate. Data are expressed as percent changes from the value of the sample taken just prior to the treatment. Statistical significance was tested by the use of U-test ( $p < 0.05$ , a: against control, b: against GVA (1 mM) administration groups).  $n = 6-12$ .

少しした (Fig. 4).

#### 4) ムシモルの影響

灌流液にムシモルを投与(ムシモル10 mM 生理食塩水溶液)すると, DA は実験終了時まで対照群との間に有意な変化は認められなかった. DOPAC は投与直後より120分後までに集めたサンプル中に有意に増加していた. HVA もまた,

投与直後のサンプル, 投与60分後から120分後に集めたサンプル, および投与180分以後に集めたサンプル中で有意に増加していた (Fig. 5).

5-HT はムシモル投与80分後から120分後に集めたサンプル中において有意な増加を示した. 5-HIAA は投与直後より有意に増加し, その後も増加し続けたが, 投与20分後から80分後に集

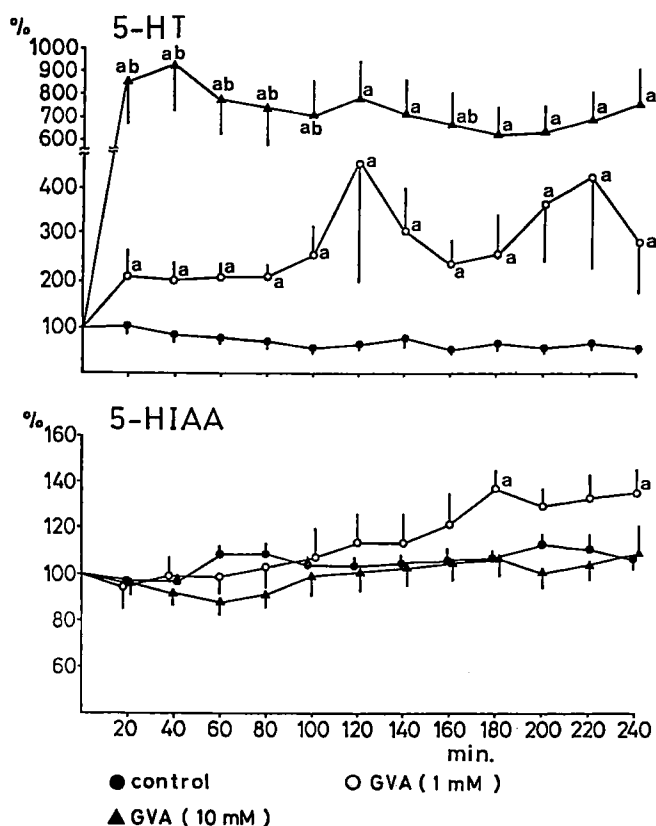


Fig. 2 Time-dependent changes (mean  $\pm$  SEM) in the levels of 5-HT and 5-HIAA after administration of GVA into the dialysate. Each symbol is the same as figure 1.

めたサンプルは対照群も高い値を示したため、有意な差は認められなかった (Fig. 6).

#### 5) GVA とムシモル同時投与の影響

ムシモルと GVA をどちらも 10 mM になるよう灌流液に混合しラット線条体内に投与すると、DA は投与直後より 180 分後までのサンプルおよび 200 分から 220 分までのサンプルにおいて対照群と比べ、有意に増加していた。しかし GVA のみを投与したときと比べその増加率は約 1/2 であった。DOPAC は、投与直後のサンプル中に増加していた他は対照群との間に有意な変化は認められなかった。HVA は時間の経過と共に増加傾向を示し、投与 100 分以後に集めたサンプルでは対照群に比べ有意に増加していた (Fig. 5)。

GVA + ムシモル混合投与直後より 40 分後のサンプルでは、5-HT は対照群の約 3 倍にまで増

加したが、分散が大きく有意差は認められなかった。投与 40 分後から 160 分後のサンプルでは、増加率の平均は低下したが、分散は小さくなり対照群と比べ有意な増加を示した。5-HIAA は、実験終了間際の 220 分後から 240 分後に集めたサンプルにおいてのみ有意な増加を示した (Fig. 6)。

#### 6) バクロフェンの影響

灌流液にバクロフェンを投与 (バクロフェン 10 mM 生理食塩水溶液) しても、DA は実験終了時まで対照群との間には有意な変化が認められなかった。DOPAC は、投与 20 分後から 40 分後までに集めたサンプル中でのみ有意に低下した。HVA は時間の経過と共に増加してゆき、バクロフェン投与 40 分後から 60 分後に集めたサンプル、および 80 分以後に集めたサンプル中においては対照群と比べ有意な高値を示した (Fig. 7)。5-HT

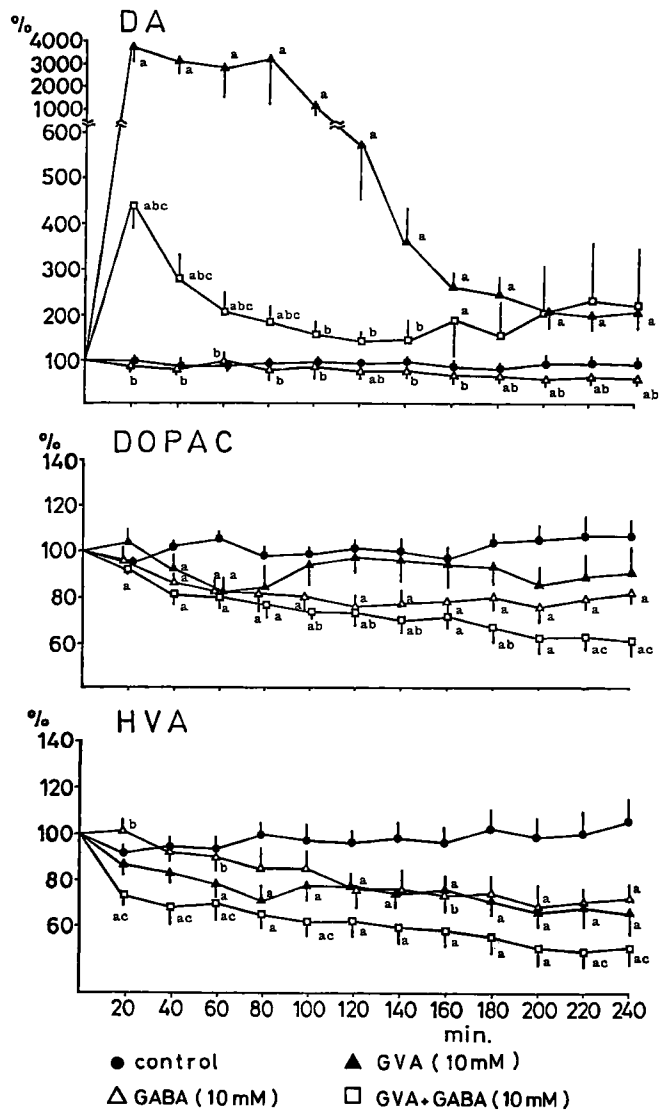


Fig. 3 Time-dependent changes (mean±SEM) in the levels of DA, DOPAC, and HVA after administration of GVA and GABA into the dialysate. Data are expressed as percent changes from the value of the sample taken just prior to the treatment. Statistical significance was tested by the use of U-test ( $p < 0.05$ , a: against control, b: against GVA, c: against GABA administration groups).  $n = 6-12$ .

はバクロフェン投与では有意な変化は示さず、5-HIAAは投与220分後から240分後のサンプル中のみ対照群と比べ有意な増加を示した(Fig. 8)。

7) GVA とバクロフェン同時投与の影響  
バクロフェンと GVA をどちらも10mMになる

ように灌流液に混合しラット線条体内に投与すると、DAは、投与直後より120分後までのサンプル中で対照群と比べ有意に増加した。しかしGVAのみを投与したときと比べその増加率は最高値である投与直後のサンプルでも約1/8にしかならず、GVAによるDA放出の増加をバクロ

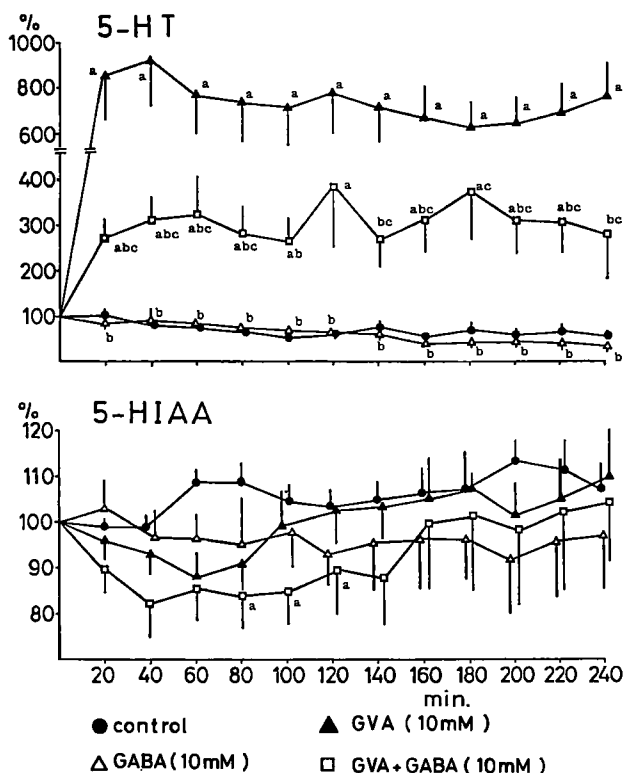


Fig. 4 Time-dependent changes (mean  $\pm$  SEM) in the levels of 5-HT and 5-HIAA after administration of GVA and GABA into the dialysate. Each symbol is the same as figure 3.

フェンは強く抑制した。DOPAC は投与後、時間の経過と共に増加し、投与20分後、および投与80分後のサンプル中で対照群と比べ有意な増加を示した。HVA はバクロフェンのみを投与したのとほぼ同様の変化を示し、時間の経過と共に増加し、投与以後の全てのサンプル中で対照群に比べ有意な高値を示した (Fig. 7)。

5-HT は、GVA+バクロフェン混合投与直後のサンプル中では対照群との間に有意な変化はみられないが、20分以後は大きく増加し、40分以後のサンプルにおいては GVA のみを投与したのとほぼ同様の変化を示した。5-HIAA は、投与直後および実験終了間際の220分後から240分後に集めたサンプルにおいてのみ有意な増加を示した (Fig. 8)。

#### 考 察

森らは  $\gamma$ -グアニジノ酪酸(GBA)はペンチレンテトラゾール静脈内投与により誘発されたけ

いれん中のウサギの脳組織中に増加し<sup>11)</sup>、さらに合成した GBA をウサギの大槽内に投与するといれんが誘発されると報告している<sup>12)</sup>。また Arg の構造類似体である  $\alpha$ -N-アセチルアルギニン<sup>31)</sup>、 $\alpha$ -ケト- $\delta$ -グアニジノバレリン酸<sup>32)</sup>、ホモアルギニン<sup>33)</sup>にもいれん誘発作用のあることが報告されている。GVA は、Arg から  $\alpha$ 位のアミノ基のとれた化合物であると共に、GBA よりも炭素直鎖の1つ長い化合物でもあるため、Arg のみならず GABA の構造類似体とも考えられる。横井らは57  $\mu$ M の GVA 溶液5  $\mu$ lをラット大脳皮質感覚運動領野上に投与すると脳波にスパイク放電が誘発されること、このスパイクは GABA を投与することにより抑制されるが、Arg 投与では影響されないことより、GVA は内在性の選択的 GABA 受容体拮抗薬であると報告している<sup>23)</sup>。今回灌流液中に GVA を10 mM となるよう加えることにより左側線条体内に GVA を投与した。使用した透析プローブの回収率が10

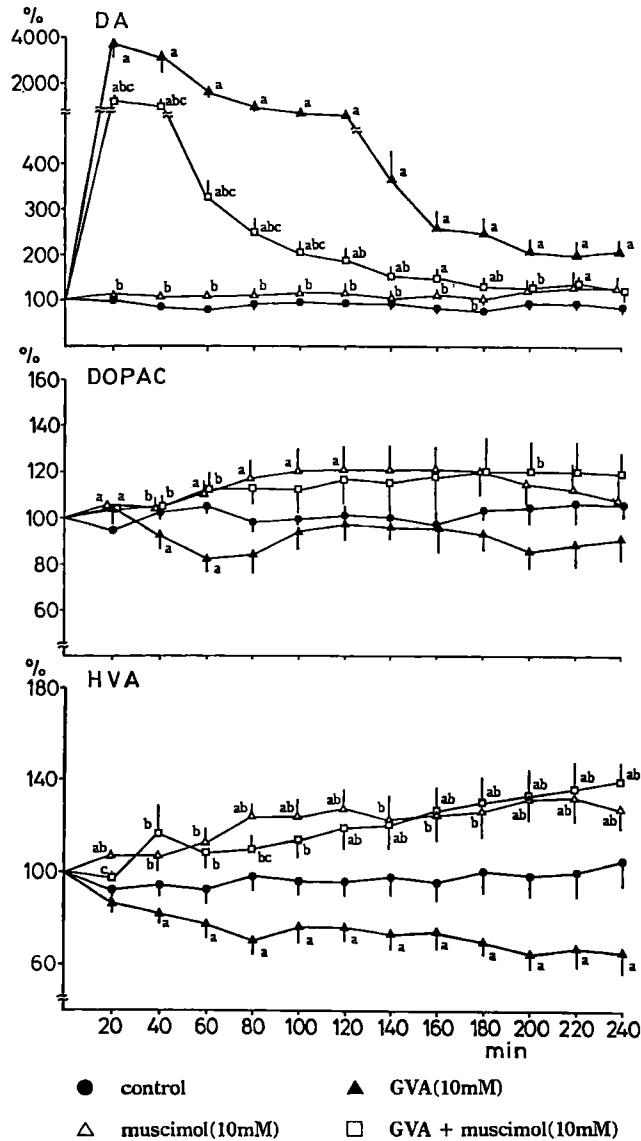


Fig. 5 Time-dependent changes (mean  $\pm$  SEM) in the levels of DA, DOPAC, and HVA after administration of GVA and muscimol into the dialysate. Data are expressed as percent changes from the value of the sample taken just prior to the treatment. Statistical significance was tested by the use of U-test ( $p < 0.05$ , a: against control, b: against GVA, c: against muscimol administration groups).  $n = 6-12$ .

%前後であることからプローブに接した部分では約 1 mM の濃度の GVA にさらされたものと推定され、GABA 受容体を遮断するには十分な GVA が供給されていると考えられる。

さて、線条体への DA 線維は主に黒質から投

射されているが、線条体—黒質 GABA 路も存在する<sup>34)</sup>(Fig. 9)。van den Pol らは<sup>35)</sup> GABA 線維が黒質緻密部に位置する DA ニューロンの樹条突起とシナプス結合することを明らかにしている。すなわち線条体—黒質 GABA ニュー



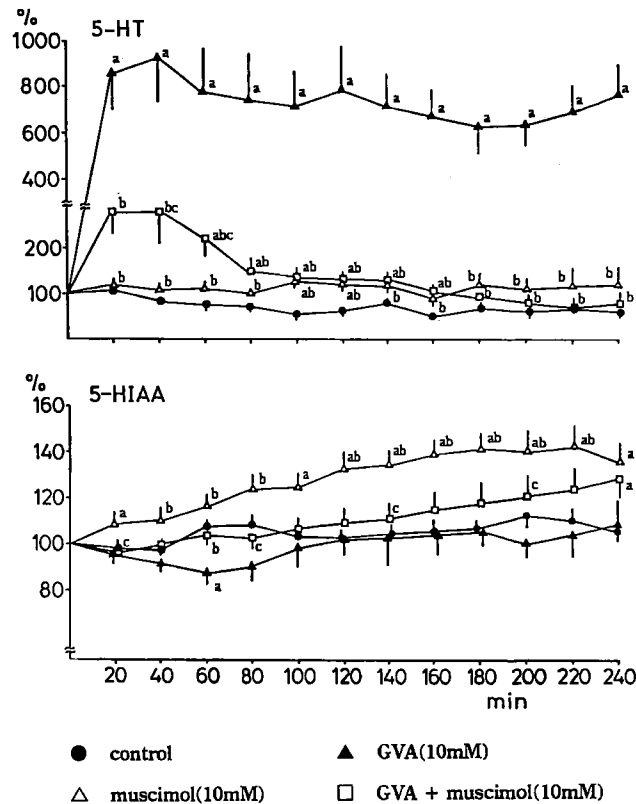


Fig. 6 Time-dependent changes (mean  $\pm$  SEM) in the levels of 5-HT and 5-HIAA after administration of GVA and muscimol into the dialysate. Each symbol is the same as figure 5.

ロンと黒質一線条体 DA ニューロンがシナプス結合を介し直接ループを形成している可能性が示唆される。また GABA は黒質一線条体 DA ニューロンを抑制するとの報告もある<sup>36)</sup>。5-HT 線維は背側縫線核からのものが最大と考えられているが、背側縫線核におけるグルタミン酸脱炭酸酵素は 5-HT 細胞内に 5-HT と共存するものの、線条体から直接背側縫線核にのびている GABA 線維は確認されていない<sup>34)</sup> (Fig. 9)。さらに GABA は投射型および内在型の両タイプの線条体ニューロンに含まれ、多様な働きをしていると考えられている<sup>37)</sup>。

GABA 受容体はその薬学的性質から GABA<sub>A</sub> 受容体と GABA<sub>B</sub> 受容体に分類されている<sup>8)</sup>。GABA<sub>B</sub> 受容体はシナプス前終末部とシナプス後細胞に存在する。シナプス前受容体の場合、GABA が神経終末部の Cl<sup>-</sup> の細胞内への流入量

を増加させ、その結果神経終末からの興奮性神経伝達物質の放出を抑制するというシナプス前抑制に関与していると考えられている。またシナプス前終末部に GABA 作動性のオートレセプターが存在することも知られている。シナプス後膜における GABA<sub>A</sub> 受容体は膜の Cl<sup>-</sup> コンダクタンスを増大させることにより過分極を引き起こすものであって、シナプス後抑制の機序に重要な役目を果たしている。一方 GABA<sub>B</sub> 受容体も、シナプス前終末部とシナプス後細胞に存在すると考えられている。前者の例としては、中枢神経系<sup>38)</sup> および末梢神経系<sup>39)</sup> において、ノルエピネフリン、DA などの神経伝達物質の放出を GABA およびバクロフェンが抑制し、その抑制作用はビククリンによって抑制されなかったという報告がある。また後者の例として、海馬の錐体細胞はバクロフェンによって直接過分

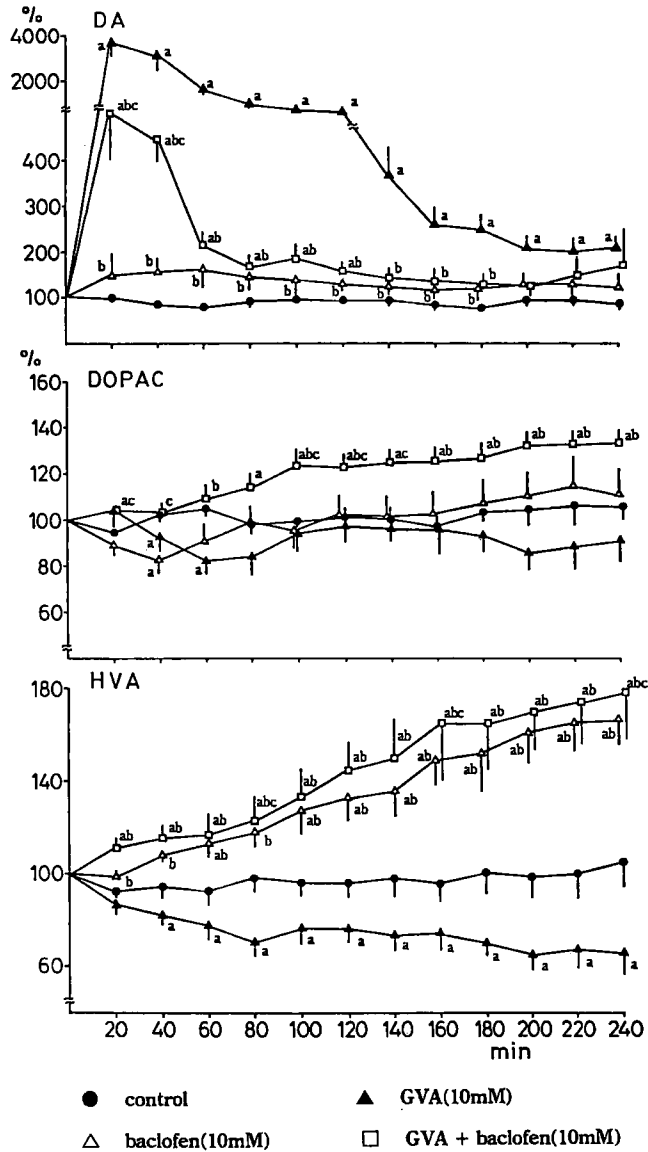


Fig. 7 Time-dependent changes (mean ± SEM) in the levels of DA, DOPAC, and HVA after administration of GVA and baclofen into the dialysate. Data are expressed as percent changes from the value of the sample taken just prior to the treatment. Statistical significance was tested by the use of U-test ( $p < 0.05$ , a: against control, b: against GVA, c: against baclofen administration groups).  $n = 6-12$ .

極電位が誘発されるという報告があり<sup>40)</sup>,これには  $K^+$ コンダクタンスの上昇が関与していると推察されている<sup>39)</sup>.すなわちシナプス前受容体には  $GABA_A$ ,  $GABA_B$  どちらのタイプも存在し, 神経伝達物質の放出を抑制すると考えられてい

る<sup>41)</sup>.

GVA を灌流液に加えることにより, 透析液中の DA および 5-HT 濃度は加えた GVA の濃度に依存して増加した. その際 DA の増加は一時的だったのに対して, 5-HT は投与期間中増

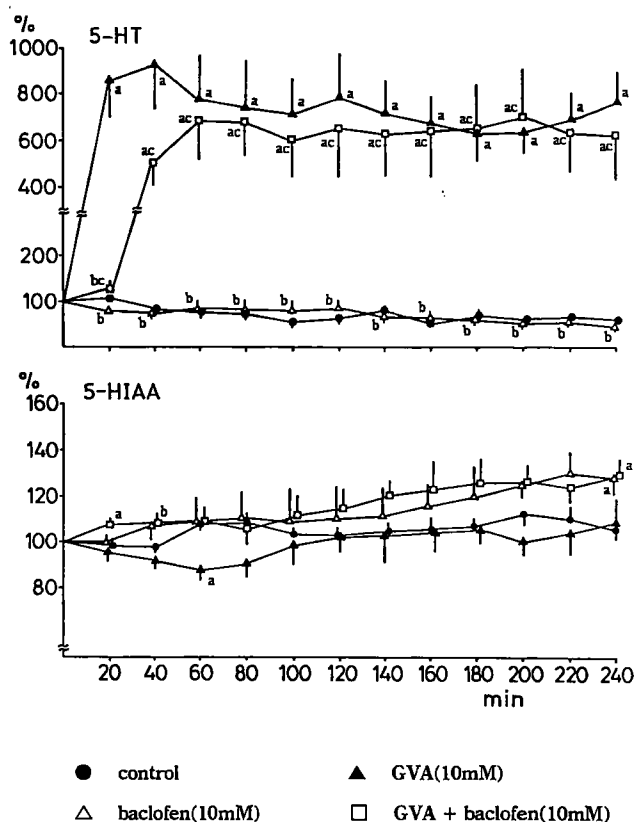


Fig. 8 Time-dependent changes (mean  $\pm$  SEM) in the levels of 5-HT and 5-HIAA after administration of GVA and baclofen into the dialysate. Each symbol is the same as figure 7.

加したままであった。この結果は、GVAの投与量に依存してDAおよび5-HTの放出は増加すること、またDAの放出は、投与直後には増加は著しいが、GVAを投与し続けると減少すること、5-HTの放出は増加したままであることを示唆する。すなわち、GABAによるシナプス前抑制がGVAを投与することにより遮断され、DAおよび5-HTの放出が高まるが、放出されたDAは黒質に投射されているGABA神経系を刺激し、黒質のDA神経系を抑制するため、GVAがシナプス前抑制を遮断し続けているにも関わらず線条体内におけるDAの放出が減少していくこと、5-HT神経系は直接的なフィードバック機構がないため増加したままであると考えられる。DAの代謝産物であるDOPACおよびHVAは1mMのGVA灌流液では変化はみられなかったが、10mMではDOPACは一時的に、

HVAは時間の経過と共に大きく減少した。5-HIAAは1mMのGVA投与により投与3時間以後で増加しているが、10mMの投与では有意な変化はみられなかった。一般にはDOPACやHVAあるいは5-HIAAの増加はそれぞれ対応するDAや5-HTの放出の増加を反映すると考えられている<sup>42,43</sup>。ZetterstromらはDOPACは新しく合成されて細胞内に貯蔵されているDAから代謝されたものであるために、細胞外DOPAC量の変化はDAの放出量ではなく合成量を反映していると報告している<sup>44</sup>。今回の実験においてはDAの放出が増加したにも関わらずその代謝産物が減少した。西嶋らはGVAはin vitroにおいてモノアミン酸化酵素(MAO)を抑制すると報告している<sup>45</sup>。今回の実験におけるこれらDAおよび5-HTの増加および代謝産物の減少は、このMAO抑制効果

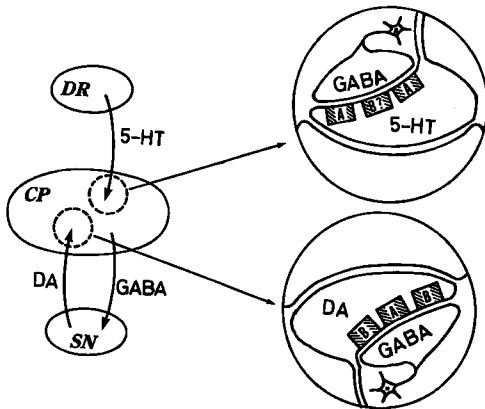


Fig. 9 DA, 5-HT and GABA interconnections of the basal ganglia presynaptic inhibition by GABA neuron. DR: dorsal raphe, CP: caudate-putamen, SN: substantia nigra, ▨: GABA-receptor.

によるものなのかもしれない。しかしながら MAO 活性に対する GVA の  $K_i$  は  $9.5 \text{ mM}$  と報告されており、抑制効果は弱いこと、ムシモルやバクロフェンを GVA と同時に投与すると、これら代謝産物は増加することなどから別の原因である可能性が高い。

DA や 5-HT の増加率が非常に大きいのに対して、DOPAC や HVA、5-HIAA の変化率は比較的小さいが、これは薬物投与前に検出された DA および 5-HT の濃度がそれぞれ  $0.73 \pm 0.04 \text{ ng/ml}$  および  $0.25 \pm 0.04 \text{ ng/ml}$  と少量なのに対して DOPAC、HVA、5-HIAA はそれぞれ  $65.2 \pm 5.23$ ,  $39.0 \pm 3.13$ ,  $23.1 \pm 2.06 \text{ ng/ml}$  と多量のためである。本研究に使用した脳内透析用プローブの *in vitro* による回収率は、測定した全ての薬物でほぼ同率であった。しかし透析液に回収される生理活性アミンがきわめて少量なのに対してその代謝産物は比較的多かった。これは、神経細胞外に放出された DA や 5-HT は速やかに再吸収されたり、MAO やカテコール-O-メチル転移酵素などにより分解されるため、細胞外濃度がきわめて微量になるのに対して、その代謝産物は代謝された後細胞外へ放出されるため、細胞外濃度が比較的高いためと考えられる。

GABA を灌流液に加えることにより、DA は時間と共に減少したが、DA の減少が対照群と比べ有意となったのは 2 時間以後であった。また 5-HT は有意な変化を示さなかった。このことは、DA の放出を減少させるためには、シナプス前抑制をかなり長期間増強しなくてはならないこと、5-HT の放出は GABA の灌流液への投与によっては影響を受けないことを示唆する。すなわち GVA 投与による DA および 5-HT の放出増加が著しかったことと考えあわせると、線条体における DA および 5-HT の放出は常に強くシナプス前抑制により調節を受けていることが示唆される。DOPAC や HVA もまた時間の経過と共に減少したが、DOPAC は投与 40 分以後のサンプルで有意に減少しているのに対して、HVA は DA の減少の後に有意に減少している。Zetterstrom らの報告<sup>44)</sup> と考えあわせると、GABA 投与によりまず DA の合成が抑制されたのに続いて DA の放出が抑制され、HVA が減少したとも考えられる。

灌流液に GVA と GABA を各々  $10 \text{ mM}$  とするように加えると、DA と 5-HT は共に増加したが、その増加量は GVA のみを投与したときに比べて、DA は  $1/10$  以下、5-HT は  $1/3$  程度であった。これは GVA が GABA に対して拮抗的に働いていることを示唆する。DOPAC および HVA は投与直後より有意に減少し時間の経過とともにその減少率は増加している。5-HIAA もまた一時的に有意な減少が観察された。この原因として DA および 5-HT の合成および蓄積量の低下、代謝抑制、フラッシュアウトの促進が考えられるが、いずれが主たる原因なのか、またなぜ起ったのかは不明である。

以上の結果、GVA による DA および 5-HT の放出増加は GABA により抑制されることが判明した。次に  $\text{GABA}_A$  受容体作動薬としてムシモルを、 $\text{GABA}_B$  受容体作動薬としてバクロフェンを使用して、GVA はどちらの受容体を抑制することにより DA および 5-HT の放出を促進するのかを検討した。

その結果ムシモル投与では DA には有意な変化はみられなかったが、その代謝産物である DOPAC および HVA は投与直後より一時的に

有意な増加がみられた。5-HT は投与80分以後で有意な変化が一時的にみられ、5-HIAA は投与直後より有意な増加がみられた。ムシモルは GABA<sub>A</sub> 受容体を持つ神経系を増強すると考えられるにも関わらず、かなり時間の経った後ではあるが、5-HT の放出増加を引き起こすこと、DA および 5-HT 代謝の増加を引き起こすことなど、DA および 5-HT 神経系の活動を促進している可能性が示唆される。ムシモルをラット脳内に投与するとけいれん発作波が出現することが報告されており<sup>23,46,47</sup>、ムシモルは GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬以外の何らかの働きを持ち、異常興奮を引き起こしている可能性が考えられる。さて、GVA とムシモルを混合投与すると DA の増加率は GVA のみを投与したときに比べ約 1/2 に、5-HT の増加率は約 1/3 に減少した。特に 5-HT は GVA とムシモル混合投与直後から 40 分後までに集めたサンプルでは、増加率の平均は 300% 近くあったものの分散が大きく、対照群との間に有意差はなく、投与 40 分後から 160 分後に集めたサンプルは有意差がたものの 50% 程度の増加率でしかなく、ムシモルのみを投与した時とはほぼ同様の値を示した。すなわちムシモルは、GVA の誘発する DA の放出増加に対してよりも、5-HT の放出増加に対してより強く抑制効果を持つと考えられる。

バクロフェン投与により、DA および 5-HT に有意な変化はみられなかったが、DA の代謝産物である DOPAC は一時的に低下し、HVA は時間の経過とともに大きく増加した。5-HIAA は実験終了直前の 240 分後のサンプルにおいてのみ有意に増加した。Zetterstrom らの報告<sup>40</sup>に従えば、バクロフェンの投与により DA の合成が一時的に低下し、放出、代謝が時間の経過とともに増加したことになるが、DA そのものは有意な変化はしておらず、バクロフェンが DA 神経系の機能にどのような影響を与えているかは不明である。しかし GVA とバクロフェンを混合して投与すると DA の増加率は GVA のみを投与したときに比べ約 1/8 に減少した。5-HT の GVA による増加は、混合投与直後には完全に抑制されたが、その後すぐに増加し、20 分以後のサンプルにおいては GVA のみを投与した時と

比べ変化が認められなかった。すなわちバクロフェンは GVA による DA の放出増加を抑制すること、5-HT の放出増加も抑制するが一過性であることが示唆された。DA の代謝産物である DOPAC および HVA は時間の経過とともに増加したが、これは DA の合成、分解の増加によるものか、フラッシュアウト機構の障害によるものか不明である。

ムシモルの [<sup>3</sup>H] GABA 結合を抑制する IC<sub>50</sub> は 0.015 μM であり、GABA は 0.14 μM であると報告されている<sup>41</sup>。また GABA の [<sup>3</sup>H] バクロフェン結合を抑制する IC<sub>50</sub> は 0.04 μM、(-)-バクロフェンは 0.04 μM と報告されている<sup>41</sup>。すなわち GABA<sub>A</sub> 受容体に対するムシモルの親和性は GABA よりも強く、GABA<sub>B</sub> 受容体に対するバクロフェンの親和性は GABA と同程度であると考えられる。にもかかわらず本研究ではバクロフェンの方が GVA による DA の放出をより強く抑制している。5-HT に対しては、バクロフェンは投与直後では GVA による放出増加を完全に抑制しているにもかかわらず、すぐにその抑制効果は消失している。これは GABA<sub>B</sub> 受容体に対する親和性も解離性もバクロフェンの方が GVA よりも高いため、投与直後では GVA よりも GABA<sub>B</sub> 受容体に速く結合したバクロフェンが、時間の経過とともに GVA に置き換わるためなのかもしれない。しかし GVA による DA の放出に対するバクロフェンの抑制作用は時間の経過と共に強くなっていることから、20 分以後でも GABA<sub>B</sub> 受容体に対して、バクロフェンと GVA は拮抗していると考えられ、このバクロフェンによる GVA 誘発 5-HT 放出に対する一時的な抑制作用は上記とは異なる理由によるものと考えられるが、その機構は不明である。一方ムシモルは GVA による 5-HT の放出増加を GABA と同程度抑制している。ムシモルの GABA<sub>B</sub> 受容体に対する親和性は極めて弱く、このムシモルの GVA 誘導性 5-HT 放出増加に対する抑制作用は GABA<sub>B</sub> 受容体を介するとは考えにくく、GVA は GABA<sub>A</sub> 受容体を遮断することにより 5-HT の放出増加を引き起こしていると考えられる。

以上の結果は、DA の放出は GABA<sub>A</sub> 受容体

を抑制したまま GABA<sub>B</sub> 受容体の抑制をある程度妨げると強く抑制されるが、GABA<sub>B</sub> 受容体を抑制したまま GABA<sub>A</sub> 受容体の抑制を妨げてもあまり強く抑制しないこと、すなわち線条体においては DA の放出は GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> 両方の受容体を介して調節されているが、GABA<sub>B</sub> 受容体により、より強く調節されていることを示唆する。5-HT の放出に対しては、GABA<sub>B</sub> 受容体を介して強く調節されている可能性も考えられるが、主に GABA<sub>A</sub> 受容体を介して調節されていると考えられる (Fig. 9)。

GVA による DA および 5-HT の放出増加は、ムシモルおよびバクロフェンのどちらの薬物によっても抑制されることから GVA は GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> どちらの受容体も抑制すると考えられるが、GVA のそれぞれの GABA 受容体に対する親和性は解明されておらず今後の研究が望まれる。

## 結 論

GVA を灌流液に混合することによりラット線条体に投与し、DA および 5-HT の放出の経時変化を脳透析法を用いて測定した。さらに GABA, ムシモルおよびバクロフェンを GVA と同時に投与し、GVA による DA および 5-HT 放出量の変化に対する GABA 受容体作動薬の影響を観察した結果、次のことを明らかにした。

1. 透析液中の DA 及び 5-HT の濃度は、透析液に加えた GVA 濃度に依存して増加した。その際 DA は一過性であったのに対して、5-HT の増加は投与期間中持続した。
2. 透析液に GABA を 10 mM となるように加えると、DA は時間の経過に従って減少した。5-HT には変化がみられなかった。
3. 透析液に GVA と GABA をそれぞれ 10 mM

となるように加えると、DA と 5-HT は共に増加したが、その増加量は GVA のみを加えた時に比べて、DA は 1/10 以下、5-HT は 1/3 程度となった。

4. 透析液にムシモルを 10 mM となるように加えると、DA には有意な変化がみられなかったが、5-HT には投与 80 分以後に一時的な増加がみられた。

5. 透析液にバクロフェンを 10 mM となるように加えても、DA と 5-HT のいずれにも有意な変化はみられなかった。

6. 透析液に GVA とムシモルをそれぞれ 10 mM となるように加えると、GVA による DA と 5-HT の増加率は減少した。特に 5-HT の増加率は GABA 投与時と同程度まで低下した。

7. 透析液に GVA とバクロフェンをそれぞれ 10 mM となるように加えると、GVA による DA の増加率は減少した。5-HT の増加率に対しては投与直後はその増加を抑制したものの、以後影響はみられなかった。

8. 以上の結果は、GVA をラット線条体に投与すると、線条体からの DA および 5-HT の放出が場加すること、GABA はその放出を抑制することを示唆する。さらに GVA は GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> のどちらの受容体に対しても拮抗的に働いていること、および線条体においてはドーパミン神経系は GABA<sub>B</sub> 受容体の影響を強くうけていることを示唆する。

稿を終るにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜りました森 昭胤教授、また直接御指導御協力いただきました横井 功助手、加太英明文部技官に深く感謝の意を捧げます。さらに、実験遂行にあたりましては終始快く御協力くださいました研究室の皆さまに心からお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Oja SS, Kontro P and Lahdesmaki P: Amino acid as inhibitory neurotransmitters. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. New York (1977).
- 2) Ribak CE, Harris AB, Vaughn JE and Roberts E: Inhibitory, GABAergic terminals decrease at sites of focal epilepsy. Science (1979) 205, 211-214.
- 3) Loscher W: Relationship between GABA concentrations in cerebrospinal fluid and seizure ex-

- citability. *J Neurochem* (1982) **38**, 293–295.
- 4) Wood JH, Hare TA, Glaeser BS, Ballenger CJ and Post RM : Low cerebrospinal fluid  $\gamma$ -aminobutyric acid content in seizure patients. *Neurology* (1979) **29**, 1203–1208.
  - 5) Van Gelder NM, Sherwin AL and Rasmussen T : Amino acid content of epileptic human brain : Focal versus surrounding regions. *Brain Res* (1972) **40**, 385–393.
  - 6) 森 昭胤 : 神経伝達物質の異常とけいれん発現機構. *神経進歩* (1985) **29**, 1003–1013.
  - 7) McGeer PL, Eccles JC and McGeer EG : *Molecular neurobiology of the mammalian brain*. Plenum Press, New York (1978) pp 119–231.
  - 8) Bowery NG, Price GW, Hudson AL, Hill DR, Wilkin GP and Turnbull MJ : GABA receptor multiplicity. *Neuropharmacology* (1984) **23**, 219–231.
  - 9) Robin Y and Marescau B : Natural guanidino compounds ; in *Guanidines*, Mori A, Cohen BD and Lowenthal A eds, Plenum Publishing Co., New York (1985) pp 383–438.
  - 10) Yokoi I, Edaki A, Watanabe Y, Shimizu Y, Toda H and Mori A : Effects of anticonvulsants on convulsive activity induced by 2-guanidinoethanol ; in *Guanidines 2*, Mori A, Cohen BD and Koide H eds, Plenum Publishing Co., New York (1989) pp 213–222.
  - 11) 森 昭胤 : 痙攣発現機構とアミノ酸. とくに  $\gamma$ -グアニジノ酪酸について. 第17回日本医学会講演集 (1967) **1**, 396–400.
  - 12) Jinnai D, Sawai A and Mori A :  $\gamma$ -Guanidinobutyric acid as a convulsive substance. *Nature* (1966) **212**, 617.
  - 13) 平松千明 : マウス脳 guanidino 化合物に関する研究. 第2編 けいれんにとまなう脳内 guanidino 化合物の変動について. *岡山医誌* (1980) **92**, 427–434.
  - 14) Mori A, Akagi M, Katayama Y and Watanabe Y :  $\alpha$ -Guanidinoglutamic acid in cobalt-induced epileptogenic cerebral cortex of cats. *J Neurochem* (1980) **35**, 603–605.
  - 15) Mizuno A, Mukawa J, Kobayashi K and Mori A : Convulsive activity of taurocyamine in cats and rabbits. *IRCS Med Sci* (1975) **3**, 385.
  - 16) Mori A, Watanabe Y, Shindo S, Akagi M and Hiramatsu M :  $\alpha$ -Guanidinoglutamic acid and epilepsy ; in *Urea Cycle Diseases*, Lowenthal A, Mori A and Marescau B eds, Plenum Press, New York (1982) pp 419–426.
  - 17) Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ and Moncada S : Formation of nitric oxide from L-arginine in central nervous system : A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) **86**, 5159–5162.
  - 18) Southam E, East SJ and Garthwaite J : Excitatory amino acid receptors coupled to the nitric oxide/cyclic GMP pathway in rat cerebellum during development. *J Neurochem* (1991) **56**, 2072–2081.
  - 19) Brecht DS and Snyder SH : Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) **86**, 9030–9033.
  - 20) East SJ and Garthwaite J : Nanomolar  $N^G$ -nitroarginine inhibits NMDA-induced cyclic GMP formation in rat cerebellum. *Eur J Pharmacol* (1990) **184**, 311–313.
  - 21) Shindo S, Tsuruta K, Yokoi I and Mori A : Synthesis of  $\delta$ -guanidinovaleric acid and its effect on EEG of rats. *Neurosciences* (1984) **10**, 177–182.
  - 22) Obata T, Mori A and Yamamura HI : Effect of guanidino compounds on GABA-stimulated chloride influx into membrane vesicles from rat cerebral cortex ; in *Guanidine 2*, Mori A, Cohen BD and Koide H eds, Plenum Publishing Co., New York (1989) pp 153–157.
  - 23) Yokoi I, Tsuruta K, Shiraga H and Mori A :  $\delta$ -Guanidinovaleric acid an endogenous and specific

- GABA-receptor antagonist : electroencephalographic study. *Epilepsy Res* (1987) **1**, 114—120.
- 24) Donzanti BA and Uretsky NJ : Effects of excitatory amino acids on locomotor activity after bilateral microinjection into the rat nucleus accumbens : Possible dependence on dopaminergic mechanisms. *Neuropharmacology* (1983) **22**, 971—981.
- 25) Nijima K and Yoshida M : Activation of mesencephalic dopamine neurons by chemical stimulation of the nucleus tegmenti pedunculopontinus pars compacta. *Brain Res* (1988) **451**, 163—171.
- 26) Chen G, Ensor CR and Bohner B : A facilitation action of reserpine on the central nervous system. *Proc Soc Exp Biol Med* (1954) **86**, 507—510.
- 27) Kabuto H, Yokoi I and Mori A : Effects of muscimol and baclofen on levels of monoamines and their metabolites in the El mouse brain. *Neurochem Res* (1988) **13**, 1157—1161.
- 28) Weiss S and Krommer H : Zur Guanylierung von Aminen mit O-Methyl-isoharnstoff-sulfat. *Chemiker-Zeitung* (1974) **98**, 617—618.
- 29) Phebus LA, Perry KW, Clemens JA and Fuller RW : Brain anoxia releases striatal dopamine in rats. *Life Sci* (1986) **38**, 2447—2453.
- 30) Kabuto H, Yokoi I and Mori A : Monoamine metabolites, iron induced seizures, and the anticonvulsant effect of tannins. *Neurochem Res* (1992) **17**, 585—590.
- 31) Mori A and Ohkusu H : Isolation and identification of alpha-N-acetyl-L-arginine and its effect on convulsive seizure. *Adv Neurol Sci* (Tokyo) (1971) **15**, 303—306.
- 32) Marescau B, Hiramatsu M and Mori A :  $\alpha$ -Keto- $\delta$ -guanidinovaleric acid—induced electroencephalographic epileptiform discharges in rabbits. *Neurochem Pathol* (1983) **1**, 203—209.
- 33) Yokoi I, Toma J and Mori A : The effect of homoarginine on the EEG of rats. *Neurochem Pathol* (1984) **2**, 295—300.
- 34) 稲垣 忍 : 目で見る脳の構造と活性物質 : 神経伝導路と活性物質, 塩谷弥兵衛編, 厚生社, 大阪 (1985) pp 220—289.
- 35) Van den Pol AN, Smith AD and Powell JF : GABA axons in synaptic contact with dopamine neurons in the substantia nigra : double immunocytochemistry with biotin-proxidase and protein A- colloidal gold. *Brain Res* (1985) **348**, 146—154.
- 36) Scarnati E and Paciti C : Neuronal responses to iontophoretically applied dopamine, glutamate, and GABA of identified dopaminergic cells in the rat substantia nigra after kainic acid-induced destruction of the striatum. *Exp Brain Res* (1982) **46**, 377—382.
- 37) 遠山正彌, 窪田芳之, 稲垣 忍 : 化学的神経機能解剖学 ; 大脳基底核と黒質, 遠山正彌, 塩谷弥兵衛編, 厚生社, 大阪 (1987) pp 319—339.
- 38) Bowery NG, Hill DR, Hudson AI, Doble A, Middlemiss DN, Shaw J and Turnbull M : (–) Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature* (1980) **283**, 92—94.
- 39) Bowery NG, Doble A, Hill DR, Hudson AL, Shaw JS, Turnbull MJ and Warrington R : Bicuculline-insensitive GABA receptors on peripheral autonomic nerve terminals. *Eur J Pharmacol* (1981) **71**, 53—70.
- 40) Newberry NR and Nicoll RA : A bicucullin-resistant inhibitory post-synaptic potential in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J Physiol* (1984) **348**, 239—254.
- 41) 浅野富子 : 新脳のレセプター : GABA レセプター, 小川紀雄編, 世界保健通信社, 大阪 (1989) pp 254—280.
- 42) Commissing JW : Monoamine metabolites : Their relationship and lack of relationship to



- monoaminergic neuronal activity. *Biochem Pharmacol* (1985) **34**, 1127—1131.
- 43) Michael AC, Justice Jr JB and Neill DB : In vivo voltammetric determination of the kinetics of dopamine metabolism in the rat. *Neurosci Lett* (1985) **56**, 365—369.
- 44) Zetterstrom T, Sharp T, Collin AK and Ungerstedt U : In vivo measurement of extracellular dopamine and DOPAC in rat striatum after various dopamine-releasing drugs ; Implications for the origin of extracellular DOPAC. *Eur J Pharmacol* (1988) **148**, 327—334.
- 45) Nishizima Y, Hukuyama K, Kabuto H, Yokoi I and Mori A : Effects of guanidino compounds on monoamineoxidase and catechol-O-methyltransferase activity ; in *Guanidino compounds in biology and medicine*, De Deyn PP, Marescau B, Stalon V and Qureshi IA eds, John Libbey and Company Ltd, London (1992) pp 449—451.
- 46) Scotti de Carolis A, Lipparini F and Longo VG : Neuropharmacological investigations on muscimol, a psychotropic drug extracted from *Amanita muscaria*. *Psychopharmacologia (berl)* (1969) **15**, 186—195.
- 47) Shoulson I, Goldblatt D, Charlton M and Joynt RJ : Huntington's disease : treatment with muscimol, a GABA-mimetic drug. *Ann Neurol* (1978) **4**, 279—284.

**Effects of  $\delta$ -Guanidinovaleric acid and GABA agonists  
on monoamine release in rat striatum**

**Kazuo IWAYA**

**Department of Neuroscience,  
Institute of Molecular and Cellular Medicine,  
Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. A. Mori)**

$\delta$ -Guanidinovaleric acid (GVA) is an endogenous convulsant and is thought to be a specific GABA antagonist. In the present study, we examined the effects of GVA and GABA agonists, GABA, muscimol and baclofen, on dopamine and serotonin releases in rat striatum using a brain dialysis technique. GVA produced a significant increase in DA released transiently (1mM) and throughout the experiment (10mM) compared with the controls. It also produced a significant increase in 5-HT release in both concentrations throughout the experiment. GABA (10mM) inhibited DA and 5-HT releases induced by GVA. Muscimol (10mM) inhibited DA and 5-HT releases induced by GVA. Especially muscimol was more effective in the inhibition of 5-HT release. Baclofen (10mM) inhibited only DA release induced by GVA. These results suggest that the activation of GABA receptor inhibits the release of DA and 5-HT in the striatum, and that the DAergic system regulates the GABA-B receptor while the 5-HTergic system mainly regulates the GABA-A receptor.