

インビボ・ボルタメトリーによるペンチレンテトラゾール 誘発発作中の脳内神経伝達物質の 経時的変動に関する研究

岡山大学医学部附属脳代謝研究施設機能生化学部門（主任：森 昭胤教授）

山 本 昌 司

（昭和61年10月23日受稿）

Key words : *in vivo* voltammetry, dopamine release,
serotonin release, caudate nucleus,
pentylentetrazol induced convulsions,
EEG

はじめに

ペンチレンテトラゾール (PTZ) が、痙攣を誘発することは古くより知られており、痙攣発現のために必要とされる PTZ の量や、その潜時を指標として、各種の抗痙攣薬や抗てんかん薬の効力を検討するために広く使用されている。PTZ の痙攣誘発機構については、多岐にわたって研究が行なわれており、多くの知見が集積されてきた¹⁾ が、特に脳内モノアミン、すなわちノルエピネフリン (NE) やセロトニン (5-HT) などのアミン系神経伝達物質が、関与していることが注目されている。NE に関しては脳内 NE 量を減少させると、PTZ により誘発される痙攣の強さや持続時間が増加すること²⁾、 β 遮断剤投与により痙攣に対する PTZ の閾値が低下すること³⁾、脳内 NE 量⁴⁾ を増加させると、閾値は逆に上昇することなどが知られており、さらに、PTZ が NE の代謝経路にも影響を及ぼすことも知られている⁵⁾。また、5-HT に関しては、脳内 5-HT 量の減少は、PTZ 誘発痙攣の閾値を低下させることなどが明らかにされている³⁾。これに対して、ドーパミン (DA) 神経伝達系に関しては、DA 量を増加させると、PTZ 誘発痙攣閾値が上昇するという報告⁶⁾ はあるが、他には、PTZ 誘発痙攣への、DA による神経伝達系の関与には、否定的な研究成果が多い。しかし、

その研究の多くは、脳内の DA 含有量を変化させたり、DA レセプターに拮抗すると考えられている物質を使用して行なわれた^{3,4,6,7)} ものである。以上のごとく、PTZ により誘発される痙攣の発現機構に対する、アミン系神経伝達の関与に関する研究は、脳内アミン系神経伝達物質の含量、及びそのレセプターに働くと考えられている薬物を使用して、神経伝達を変化させることにより行なわれた。しかし、アミン系神経伝達物質の放出量に対する PTZ の作用を調べたものは少なく、さらに、同一個体内での放出の変化を、経時的に調べた報告はまだない。

インビボ・ボルタメトリー (IVV) は、特徴ある各種の検出用電極の処理法の発展とともに近年急速に発達してきた⁸⁻¹¹⁾。IVV は、酸化電位で神経伝達物質の同定を、そして酸化の際に流れる電流量で定量が可能のため、脳内神経伝達物質の放出量を、経時的に測定できるという特徴をもっている。炭素線維の表面を希硫酸で電解処理した電極 (ETCF 電極) を、動物の脳内に植え込むことにより、現段階では、DA 放出量を、その代謝産物である 3, 4-ジヒドロキシフェニール酢酸 (DOPAC) 量から、また 5-HT 放出量を、その代謝産物である 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) 量から、推定することができる^{12,13)}。

本研究では、ETCF 電極と微分パルス-IVV

を使用し、ラット尾状核内での DA 及び 5-HT 放出量に対する PTZ の影響を、無麻酔、無拘束の条件下 (慢性実験) に、及びサクシニルコリン (SCC) で非動化した条件下 (急性実験) に、経時的に連続して調べた。

また、慢性実験において、抗痙攣薬であるジアゼパム (DZP)、フェノバルビタール (PB) 投与における、ラット尾状核内の DA 放出量の変動についてもあわせて検討した。

実験方法

1. ETCF 電極

実験に用いた ETCF 電極は、センサー部分 (直径 $7\mu\text{m}$ 、長さ $200\mu\text{m}$) の炭素線維の表面を電気化学的に処理したカーボンファイバー電極 WM-100 (塩野義製薬社製) を使用した。酸化電流のモニターには、*In Vivo* Voltammetry DPV-5 (東海医理科社製) を使用した。

2. 実験動物及びその手術法

実験には、雄 SD ラット (日本チャールス・リバー社より購入) $300\text{--}350\text{g}$ を使用した。実験に際し、神経伝達物質放出量の日内リズムを考慮し、ラットは予め、1 週間以上、 25°C で 12 時間周期の明暗 (7 時~19 時: 明) の部屋で飼育した。また、慢性実験の際には、電極刺入後、上記の条件で実験まで飼育した。

1) 慢性実験

ラットをエーテル麻酔下で脳定位固定装置に固定し、Pilegrino, Cushman のラット脳図譜¹⁴⁾ に基づいて、ETCF 電極を挿入する位置を決めた。今回の実験で用いた挿入部位は、基準点より前へ 7.8mm 、横へ 3mm 、深さ 2.5mm の尾状核とし、ETCF を刺入した。白金線を用いた参照電極、及び銀線を用いた通電用補助電極は ETCF 電極から 10mm 以内の、前頭部脳硬膜上に置き固定した。

2) 急性実験

エーテル麻酔下に気管内挿管を施し、SCC で非動化したラットを使用し、3 種類の電極をそれぞれ慢性実験時と同位置に刺入し、固定した。また、脳波は、右後頭部に固定した脳硬膜外ビス電極より記録した。

3. アミン系神経伝達物質放出量の測定法

In Vivo Voltammetry DPV-5 を次の様に設定

した。

酸化電位の走査電圧: $-200\text{mV} \sim +400\text{mV}$

酸化電位の走査速度: 50mV/s

制御パルス電圧: 50mV

制御パルス周波数: 12Hz

パルス duty: 50% (図 1)

1) 慢性実験

電極の刺入手術の 5~7 日後に、予め数回の通電を繰り返して、得られるボルタモグラムのピーク高が安定していることを確認した後に、実験を開始した。各測定時には、アスコルビン酸の酸化により生じるピークを減少させ、DOPAC の酸化により生じるピークを鮮明にさせるために、予め 2 分間、ETCF 電極と参照電極とをシャントし¹²⁾、その後、酸化電流モニターを作動させ、ボルタモグラムを得た。15 分間隔で数回測定し、各ピークの高さを平均して PTZ 投与前の値とした。次に生理食塩水に溶解した PTZ (Sigma Chemical, St Louis) (60mg/kg) をラットの腹腔内に投与し、強直性痙攣が起きた時に第 1 回目の測定を行ない、その後 15 分間隔で、強直性痙攣発現後 3 時間半にわたり、尾状核中の DOPAC 及び 5-HIAA 量の変化を調べた。生理食塩水を腹腔内に投与したラットから得た DOPAC 及び 5-HIAA 量の変化を対照とした。

尾状核中へのアミン系神経伝達物質放出量に対する抗痙攣薬の影響の検討には、DZP (ホリゾン注射液、山之内製薬) (10mg/kg , i.p.) 及び PB (10%フェノバルビタール注射液、三共株式会社) (10mg/kg , i.p. 及び 80mg/kg , i.p.) を使用し、投与後 15 分毎の DOPAC 量を、3 時間半にわたり測定した。

2) 急性実験

今回測定に使用した ETCF 電極は、慢性実験の場合には測定のために 15 分間のインターバルを必要とするが、急性実験の場合には 2~3 分間隔でも測定可能である¹²⁾。そこで、PTZ 誘発発作前後の DA 及び 5-HT 放出量の速い変化を観察するためには、人工呼吸下に SCC で非動化したラットを使用し、PTZ により誘発される発作波を指標とし調べた。

手術 2 時間後より脳波の観察下に 3 分毎に 10 数回ボルタモグラムを記録し、その安定性を確

認した後、60~90mg/kgのPTZをラット腹腔内に投与し、5~6時間にわたり連続して、3分間隔でボルタモグラムを記録した。なお、ボルタモグラム記録中は、その測定のために50mVの制御パルスを使用しているため、脳波は記録できなかった。また、脳波記録中には脳内のアスコルビン酸を酸化除去するためにETCF電極と参照電極とをシャントしておいた¹²⁾(図2)。

線条体でのDA放出量には、日内変動のあることが、IVVを用いた研究からも報告されてい

る¹⁵⁾。このため急性、慢性実験ともに、薬物の投与は午前10時前後に行なった。

実験成績

無麻酔、無拘束ラットの尾状核より記録されたボルタモグラムには、2つのピークが見られた(図3)。電解電圧130mV付近に現われたピークP₂は、DOPACの酸化によるものであり、電解電圧300mV付近の低いピークP₃は、5-HIAAの酸化によるピークと一致した(図1右参照)。

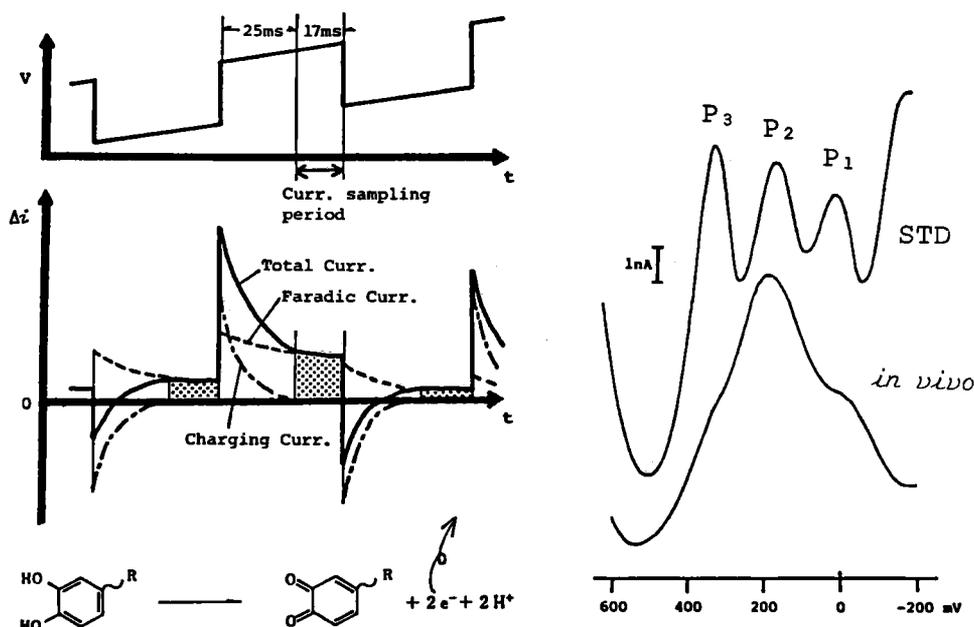


図1 微分パルス・ボルタメトリーの原理と得られるボルタモグラム

左上段；通電用の補助電極から通電する波形

左中段；電気化学的に処理した炭素線維電極に流れる電流の変化

左下段；電解反応

直線的に増加する電圧に、制御パルスを重畳する(左上段)。電圧が特定の物質の酸化電圧に達すると、物質は酸化され、電子を放出する(左下段)。これがFaradic Currentとなる。パルスが与えられると、回路の浮遊容量を充電するためにCharging Currentが流れるが、このCharging Currentが終了した後には流れている電流(酸化反応によるFaradic Current)(左中段着色部分)を積分し、ボルタモグラムが得られる。各々の物質は、特定の酸化電位をもつので、通電する電圧でその定性が、また、流れるFaradic Current量は物質の量に比例するため、物質の定量が可能となる。

右；得られたボルタモグラム

STD；5-HIAA (10 μ M)、DOPAC (100 μ M)、及びアスコルビン酸 (500 μ M) の混合溶液より得られたボルタモグラム

In Vivo；無麻酔、無拘束のラット尾状核より得られたボルタモグラム

ピークP₁はアスコルビン酸の、ピークP₂はDOPACの、またピークP₃は5-HIAAの酸化に起因すると同定された。

横軸；電解電圧

縦軸；電解電流強度

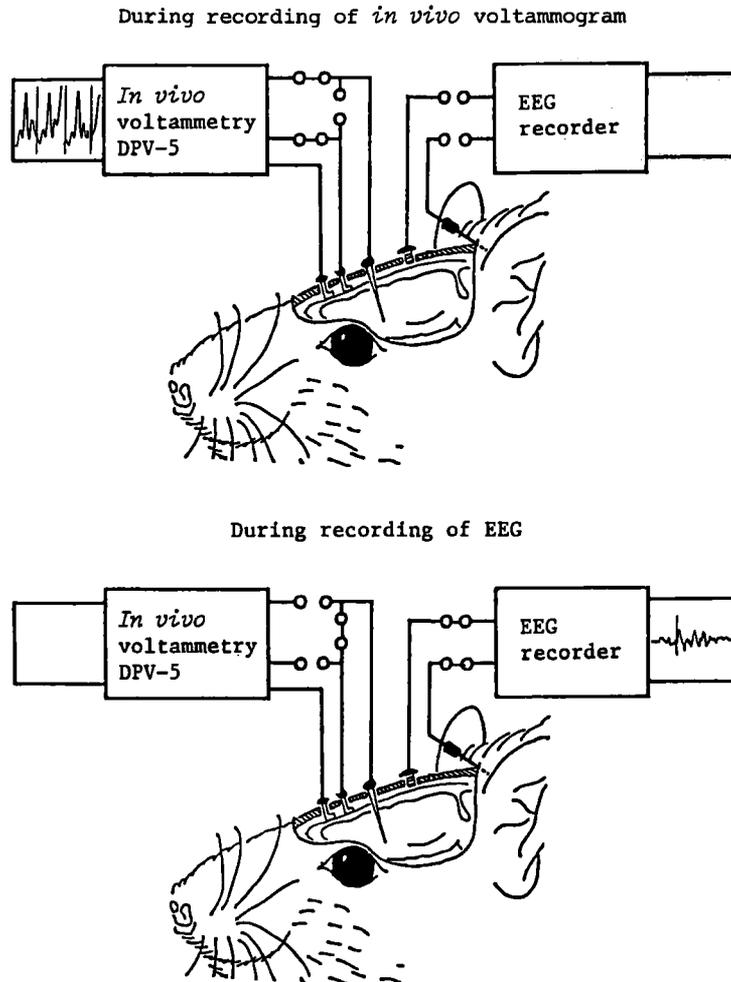


図2 電極の配置とボルタモグラム、及び脳波の記録法
 上図：ボルタモグラム記録中、測定に50 mVの制御パルスを使用しているため、後頭部の脳硬膜外ビス電極より導出している脳波は記録していない。
 下図：各ボルタモグラム記録の間、脳波が記録された。このとき、電気化学的に処理した炭素線維電極と、通電電圧の帰還制御用参照電極は、短絡されている。
 頭蓋骨内に刺入している電極は、左より、通電用補助電極、参照電極、ETCF電極、及び脳波用脳硬膜外ビス電極。

PTZ (60 mg/kg) の腹腔内投与約10分後に、ラットは強直性痙攣を15～30秒示したのちに、間代性痙攣を数分間示した。6匹中1匹のラットは、強直性痙攣の15分後にも、弱い間代性痙攣を残していた。

図3-(B)は、強直性痙攣中に得たボルタモグラムの1例で、DOPACの酸化に由来するピークP₂の高さは、PTZ投与前のピークP₂ (図3

-(A))と比較して低かった。強直性痙攣発現後165分には、ピークP₂の高さはPTZ投与前の高さに回復していた (図3-(C))。また、このときには、ラットはいかなる痙攣をも示していなかった。

PTZ投与前のピークP₂の高さを100%とし、PTZ (60 mg/kg) 投与による強直性痙攣発現後、ピークP₂の高さの変化を15分毎に、3時間半に

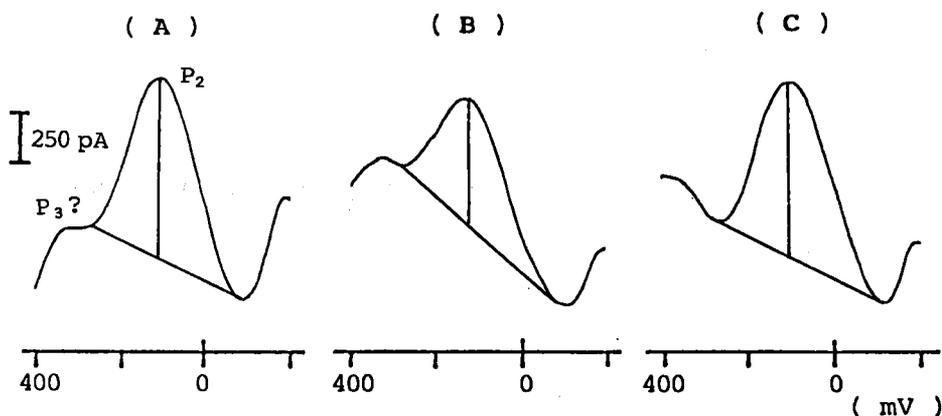


図3 無麻酔、無拘束のラット尾状核より記録されたボルタモグラム

- (A) ペンチレンテトラゾール (PTZ) 投与前の記録。電解電圧 130 mV 付近に、DOPAC の電解に起因するピーク P_2 が、また、電解電圧 300 mV 付近に 5-HIAA の電解に起因するピーク P_3 が記録された。
- (B) PTZ (60 mg/kg) を投与し、強直性痙攣が発現した時のボルタモグラム。ピーク P_2 は減高している。
- (C) PTZ により誘発された強直性痙攣が発現してから、165 分後に得られたボルタモグラム。ピーク P_2 の高さは、PTZ 投与前の高さにほぼ回復している。

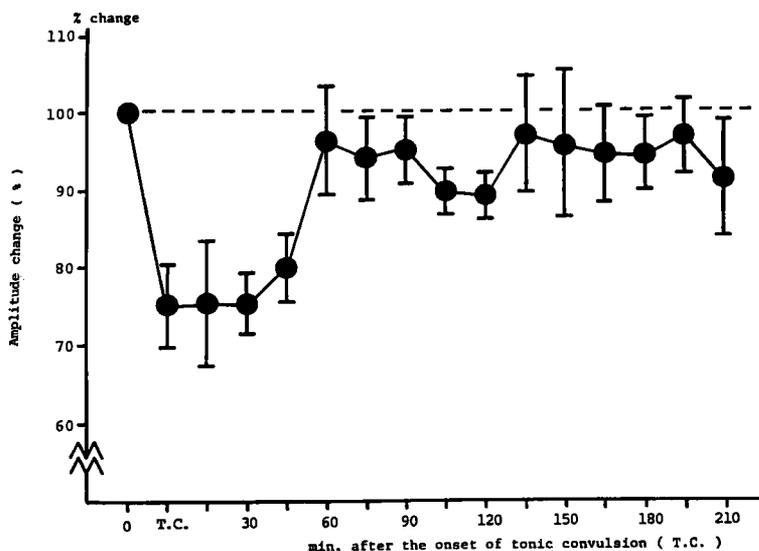


図4 無麻酔、無拘束ラットの尾状核内の DOPAC 量に及ぼすペンチレンテトラゾール (PTZ) の影響

PTZ (60 mg/kg) が腹腔内に投与され、強直性痙攣時に第 1 回目のボルタモグラムを記録し、その後 15 分毎に測定した。結果は PTZ 投与前のピーク P_2 の高さに対する比で表わした。強直性痙攣中には、DOPAC の電解に起因するピーク P_2 の高さは減少した ($P < 0.05$, ANOVA による)。各々の点は、6 匹のラットにより得られた値の平均を、また垂線は標準誤差を示す。強直性痙攣終了後の第 1 回目の測定時に、1 匹のラットは弱い間代性痙攣を示した。このため体動の影響がボルタモグラムに重積され、ピーク高の測定が不能となり、データ数が 5 例となった。

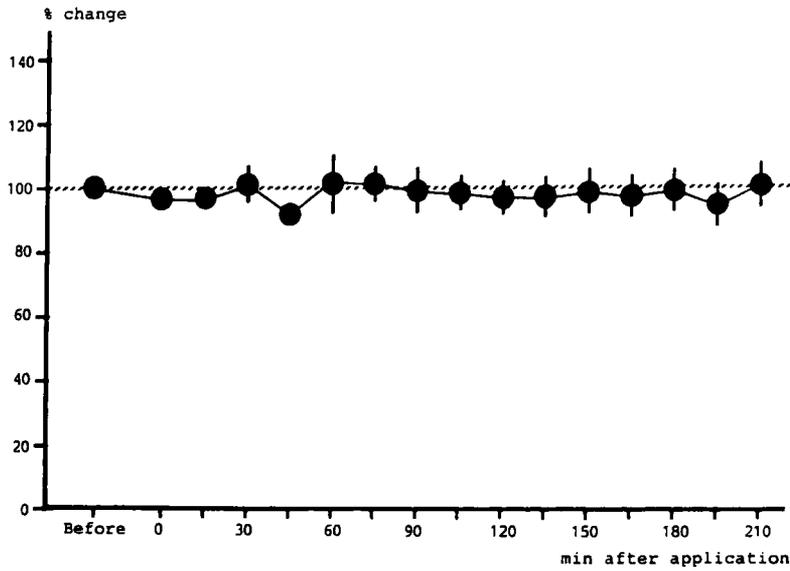


図5 無麻酔，無拘束ラットの尾状核内のDOPAC量に及ぼす生理食塩水の影響
生理食塩水（1 ml）が腹腔内に投与され，その直後より15分毎にボルタモグラムが記録された。DOPACの電解に起因するピークP₂の高さは，生理食塩水投与後3時間半にわたって変化は見られなかった。各々の点は，5匹のラットより得られた値の平均値，垂線は標準誤差を示す。垂線が円内に含まれる測定点もあった。

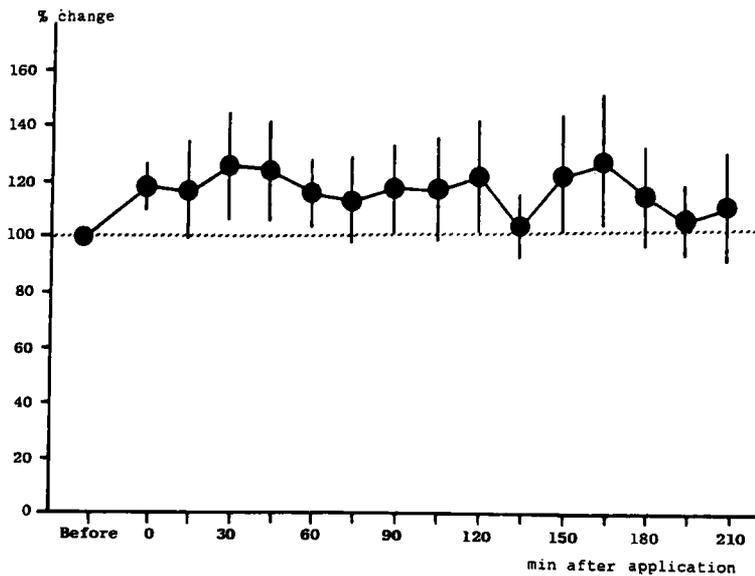


図6 無麻酔，無拘束ラットの尾状核内のDOPAC量に及ぼすジアゼパム(DZP)の影響

DZP (10 mg/kg) が腹腔内に投与され，その直後より15分毎にボルタモグラムが記録された。DOPACの電解に起因するピークP₂の高さは，投与後3時間半の間にわたって変化は見られなかった(ANOVAによる)。各々の点は6匹のラットより得られた値の平均値，垂線は標準誤差を示す。

わたり、経時的に観察した。強直性痙攣中にはピーク P_2 の高さは約75%に低下し、約30分程続き、その後次第に回復して、1時間～1時間半後には、PTZ投与前の値に回復した(図4)。これに対し、生理食塩水を腹腔内に投与したラットで測定されたピーク P_2 の高さは3時間半にわたる測定中、常にほぼ一定であった(図5)。

PTZ投与によるピーク P_3 への影響は、その高さが低いため、明らかに検出されなかった(図3)。

以上の結果は、強直性痙攣中にDAの放出量は約75%に減少し、その終了後1時間～1時間半で回復することを示している。

抗痙攣薬のDZPを10mg/kg投与すると、投与後10分後には、ラットは鎮静した。しかし、ピーク P_2 の高さに変化は見られなかった(図6)。また、ピーク P_3 を増高することもなかった。

抗痙攣薬のPBを10mg/kg投与すると、投与後約10分後には、ラットはDZP投与時と同様に、

鎮静したが、ピーク P_2 の高さに変化は認められなかった。また、PBを80mg/kg投与すると、ラットは深い睡眠状態となり、一部死亡するラットもあらわれた。しかし、ピーク P_2 の高さに変化は見出されなかった(図7)。また、ピーク P_3 を増高することもなかった。

以上の結果は、抗痙攣薬のDZP、PBともに、ラット尾状核のDAの放出量には変化を与えないこと、及びこの両薬剤ともに、5-HTの放出量に影響を与えないことを示している。

90mg/kgのPTZをSCCで非動化したラットに投与すると、3～6分後に後頭より導出した脳波にスパイクが出現し始め、約30分後より、postictal depression (PID) を伴った seizures pattern (SP) も繰り返し出現した。また、何匹かのラットには連続したSPが出現した。PTZ (60mg/kg) を投与すると約10分後より、スパイクが脳波に出現し、次第にPIDを伴ったSPが出現した。しかし、連続したSPを示す

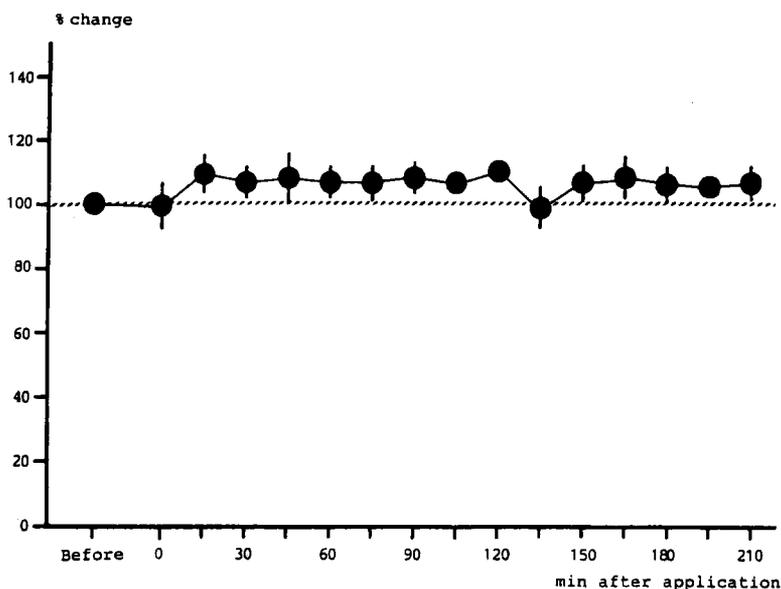


図7 無麻酔、無拘束ラットの尾状核内のDOPAC量に及ぼすフェノバルビタール(PB)の影響

PB (80mg/kg) が腹腔内に投与され、その直後より15分毎に、ボルタモグラムが記録された。DOPACの電解に起因するピーク P_2 の高さは、投与後3時間半の間にわたり、投与前と変化は見られなかった(ANOVAによる)。各々の点は6匹のラットより得られた値の平均値、垂線は標準誤差を示す。垂線が円内に含まれる測定点もあった。

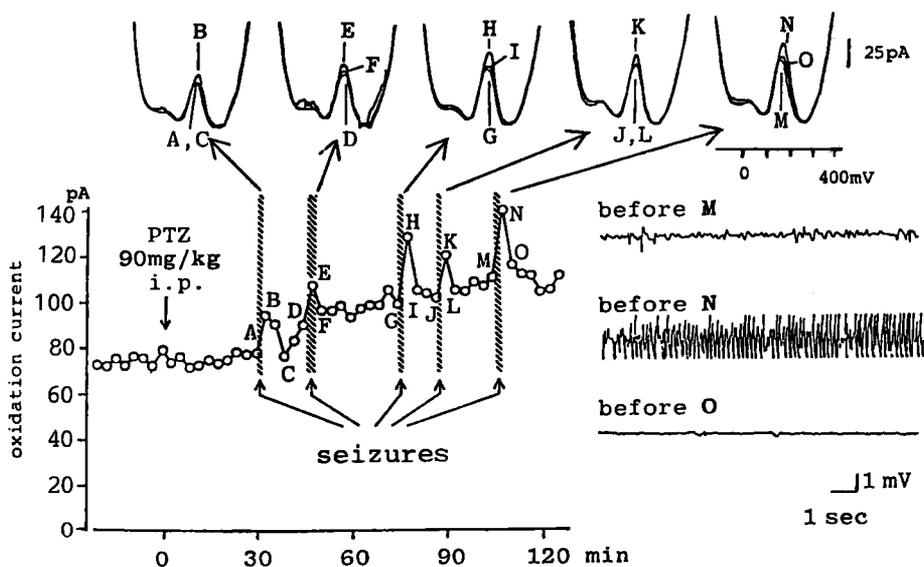


図8 サクシニルコリン非動化ラットの尾状核内のDOPAC量に及ぼすペンチレンテトラゾール (PTZ) の影響

上段; 5組のトレイスは, seizures pattern (SP) が脳波に出現する前, 中, 後に得られたボルタモグラム3枚を, スーパーインポーズしたもの. 各々のトレイスの電解電圧130 mVのピーク高は, SP出現中のボルタモグラム (B, E, H, K, 及びN) で最高であった.

下段左; 電解電圧130 mVのピーク高の変化.

PTZ (90 mg/kg) は0分に腹腔内に投与された. 斜線は脳波記録にSPが現われた期間を示す. 横軸: PTZを投与してからの時間. 縦軸: 電解電流.

下段右; ボルタモグラムM, N, Oを記録直前に, それぞれ記録された脳波. 脳波“before M”はinterictal spikesの, “before N”はseizuresの, また“before O”はpostictal depressionの各patternを示している.

例は, 90 mg/kg投与の時より少なかった. 尾状核より得られたボルタモグラムには, ピークP₂が認められ (図8, ボルタモグラムA~O), ピークP₃の認められる例もあった.

図8は, ラットに90 mg/kgのPTZを投与した時の脳波変化にピークP₂の高さの変化, 及びそれぞれの点のボルタモグラムを示し, ボルタモグラムは比較のために, 脳波にSPが出現する前, SP出現中または終了直後, 及びSP終了後の3つのボルタモグラムを重ね合わせてある. 脳波“before M”はボルタモグラムMの記録直前に記録されたもので, interictal spikesのpatternを示し, 脳波“before N”はボルタモグラムNの, また脳波“before O”はボルタモグラムOの記録の直前に記録されたもので, それぞれSP, PIDのパターンを示している. さらに, ボルタモグラムEは激しい脳波活動の

ために影響を受け, その電解電流の変化は平滑さを欠いている. ピークP₂の高さの変化を示す左下のグラフの斜線の部分は, 脳波にSPが観察される期間を示す. A~C, D~F, G~I, J~L, 及びM~Oの各期間のいずれにおいてもSPが見られるときにはDOPAC量が増加し, SP終了後には, SP前の値に回復していることが観察された.

次に, PTZ投与後, 脳波にSPが出現している時期 (During), 出現の直前 (Before), 及びその終了数分後 (After) におけるピークP₂の高さを比較すると, PTZ (60 mg/kg~90 mg/kg) 投与により脳波にSPが出現している期間には, DOPAC量は有意に増加し, SP終了数分後には, SP出現前のレベルに回復していることがわかった. (有意差の検定は, 素データを使用したpaired t-testによる) (図9)

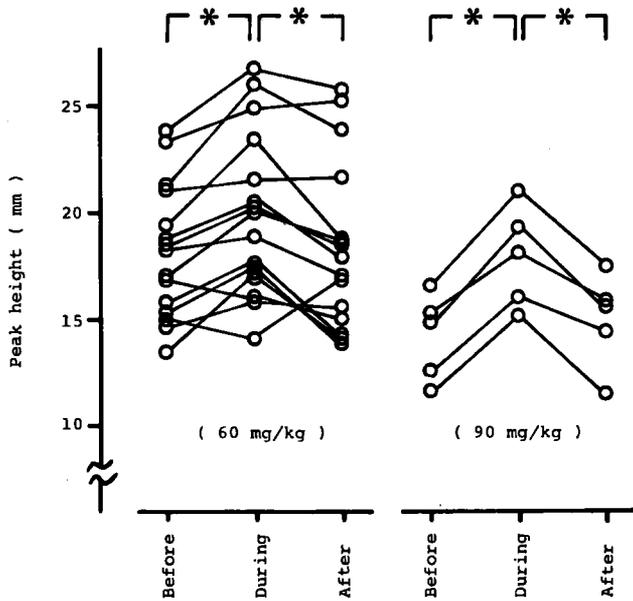


図9 サクシニルコリン非動化ラットの尾状核内DOPAC量に及ぼすベンチレンテトラゾール(PTZ)の影響

60mg/kg (左), 及び90mg/kg (右)のPTZが腹腔内に投与された。

Before; 脳波にseizures pattern(SP)が出現する直前に記録されたボルタモグラム中の電解電圧130 mVピークP₂のピーク高。

During; SP出現中あるいは終了直後のピーク高。

After; SP終了後のピーク高。この時脳波は postictal depression, あるいは interictal spikes の patternを示した。

縦軸; 電解電圧130mVのピークP₂の高さ。

*P<0.005 (paired t-testによる)

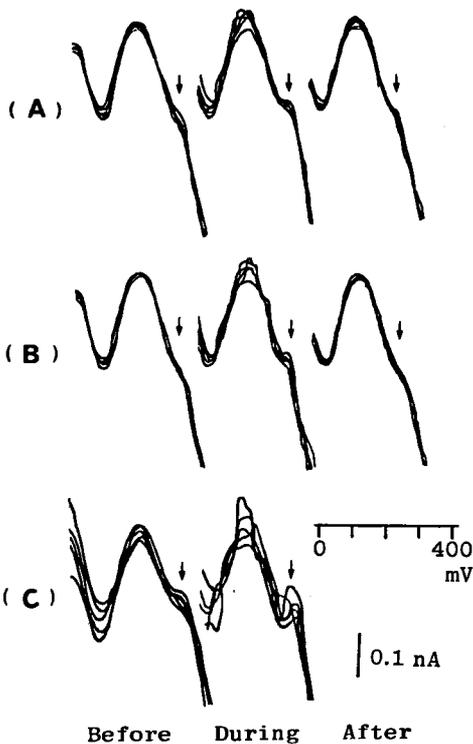


図10 サクシニルコリン非動化ラットの尾状核の5-HIAA量に及ぼすベンチレンテトラゾール(PTZ)の影響

60mg/kgのPTZが腹腔内に投与された。

BeforeとAfter; 脳波にseizures pattern(SP)が出現する前, 及び終了後に連続して得られたボルタモグラム10例を, それぞれスーパーインポーズ。During; SP出現中のボルタモグラムをスーパーインポーズ。

(C)のラットは, SP終了後に死亡。

矢段; 5-HIAAの電解に起因するピークP₃。

図10に示すボルタモグラムはSPが長時間連続した3匹のラットより得たものである。BeforeとAfterは, 脳波にSPが出現する前と終了後に連続して得られたボルタモグラムを, それぞ

れ10例スーパーインポーズし, DuringはSP出現中に記録したボルタモグラムを, スーパーインポーズしたもので, PTZにより発作波が誘発されている間には, 5-HIAAの電解によるピ

ーク P_3 の明らかな出現と上昇が認められた。

考 察

脳内に存在するある種の神経伝達物質は、特定の電位で酸化されることが、*in vitro* の実験より知られている¹⁶⁾。例えばカテコール核を有する神経伝達物質に、ある特定の電圧をかけると、カテコール核から水素イオンと電子が放出され O -キノン体となり、その結果カテコール核の酸化反応による酸化電流 (Faradic current) が発生する¹⁷⁾。今回使用した微分パルス法は、基本電位にパルスを重積し、その際流れる Charging current が終了した後に、まだ存在する電流すなわち酸化による Faradic current をサンプリングし、積分するものである (図 1)。このようにして、IVV では、脳内神経伝達物質を酸化電位と酸化電流でモニターし、ポルタモグラムを得、酸化電位から定性が、酸化電流の大きさから定量が行なわれる。今回使用した方法により検出される電解電圧 -50 mV に出現するピーク P_1 はアスコルビン酸の酸化によるもの、電解電圧約 130 mV に出現するピーク P_2 は DOPAC の酸化によるもの⁵⁾、また電解電圧約 300 mV に出現するピーク P_3 は 5-HIAA の酸化により流れる電流と同定されている¹²⁾。このため、DOPAC 量の変化は DA の放出量の、また 5-HIAA 量の変化は 5-HT の放出量の変化を示すものと考えられる。炭素円板状電極^{18,19)} や無処理の炭素線維電極と normal pulse voltammetry を組み合わせた方法²⁰⁾ や、ステアリン酸で処理した黒鉛ペースト電極を使用した chronoamperometric 計測法を使用²¹⁾ すると、DA の電解による電流が直接測定できることが報告されているが、本研究で使用した方法では、DA 放出量を DOPAC の電解電流量で推定している。

無麻酔、無拘束のラットを使用した慢性実験において、PTZ により誘発される強直性痙攣中には、尾状核中より得られるポルタモグラムに現われるピーク P_2 の高さ、つまり DOPAC 量は減少し、その後 1 時間～1 時間半で回復することを見出した。ラット線条体において放出される DA 量は、日内変動を有し、暗期間にはその極大値を、また明期間には極小値をとるこ

とが、IVV によっても確認されている¹⁵⁾。しかし、その変化速度は緩慢であり、本研究で強直性痙攣中及びその後を観測されたような急激なものではない。以上の結果より、PTZ により誘発された DOPAC 量の変化は、その日内変動に起因するものではなく、PTZ により、尾状核内で DA の放出量が減少したことに起因していることが示唆された。無麻酔、無拘束のラットを使用した実験では、5-HIAA の酸化に起因する電解電圧約 300 mV のピーク P_3 は、著明にはモニターされなかったが、PTZ が誘発する強直性痙攣中にピーク P_3 が認められた例もあった。しかし、このピーク P_3 については、低ピークのために検討しなかった。

さらに、抗痙攣薬である DZP 及び PB を使用して、それぞれ投与前と投与後の DOPAC 量の変化を検討してみたが、DZP の場合は全体的には増加傾向がみられたが、ばらつきが大きく PB 双方とも DOPAC 量に有意な変化は認められなかった。また Westerink らは、ラット線条体中の DOPAC、及びホモバニリン酸 (HVA) を調べ、ペントバルビタール、及び DZP は、HVA 量を増加させるが、DOPAC 量には変化を与えないことを報告している²²⁾。これらの点より、DZP 及びバルビタール系薬物は、尾状核中の DOPAC 量へは影響しないものと思われる。

無麻酔、無拘束のラットの尾状核中では、PTZ により誘発された痙攣中に、DOPAC 量が減少していたが、SCC により非動化したラットを使った急性実験では、逆に脳波に SP が出現中には DOPAC 量が明らかに増加し、SP 終了後数分で、SP 出現前の量に回復することを認めた。SP が脳波に出現している時に、実験動物は強直性、間代性痙攣を示していることが報告されている²³⁾。つまり急性実験において脳波に SP が出現している期間は、無麻酔、無拘束ラットを使用した慢性実験において、強直性、間代性痙攣が出現した期間と一致していることとなる。このため SCC で非動化したラットの尾状核中での DA 放出量は、PTZ 誘発による痙攣中に増加したこととなり、PTZ 誘発痙攣中の DA 放出量の変化は、非動化により逆転したこととなる。同様の逆転現象は、Clemens と Phebus により報告されて

いる²⁴⁾。彼らは、グラファイトペースト電極を使用した半微分ボルタメトリーで、強力な DA アゴニストである²⁵⁾ ペルゴライド投与により、脳内のアスコルビン酸が、無麻酔、無拘束ラットでは減少し、抱水クロラールで麻酔したラットでは増加したことを報告し、アスコルビン酸が、DA の神経伝達に何らかの役割を担っているものと結論した。今回実験に使用した ETCF 電極は、脳内アスコルビン酸の酸化に起因するピークと、DOPAC の酸化に起因するピークとを明瞭に区別しうる (図 1 右)。また、電解電圧約 130mV の変化は、実験操作によりアスコルビン酸を電解後に検出しているため、彼らのようなアスコルビン酸に起因する変化ではないと考えられる。しかし、本研究でみられた逆転現象に、非動化に使用した SCC が関与しているのかもしれないという疑問は否定しえない。無麻酔ラットの青斑核内の DOPAC 量は、拘束ストレスにより増加すること²⁶⁾、また無麻酔、無拘束ラットの線条体内の DOPAC 量は、尾への電気刺激や低温刺激により一過性の急激な増加を示すこと、さらに、ラットの尾の圧迫が尾状核内の DA 放出量を増加させることなど²⁷⁾、DA 放出量に対するストレスの影響が、いろいろな検出用電極を使用した IVV を使い報告されている。今回観察された逆転現象も、SCC によりラットが非動化されたため、PTZ により SP が誘発された時にある種のストレスがラットに加わり、DA の放出量が逆転増加したのかもしれない。

SCC で非動化したラットを使用した急性実験において、脳波に SP が出現した時期に、ボルタモグラム上に 5-HIAA の電解に起因するピーク P₃ の出現と上昇がみられた。つまり PTZ により痙攣が誘発されている時には、5-HT の放出量が尾状核中で増加していることが示唆された。尾状核から得られたボルタモグラム中に、5-HIAA の酸化に起因するピークが存在することは、すでに報告されている。池田らは、今回の実験に使用したものと同種の ETCF 電極と IVV を用いて、Wistar 系ラットの尾状核 (基準点より前方 8.62mm, 側方 2.5mm, 深さ 0mm) において、5-HIAA の酸化に起因するピーク P₃ を記録している¹²⁾。Cespuglio らも、今回使用

したものと同種の電極と IVV 記録法を用いて、OFA ラットの尾状核 (前方 8.92mm, 側方 2mm, 深さ 0mm, 及び前方 7.02mm, 側方 3mm, 深さ 1mm の 2 点) に、5-HIAA のピーク P₃ を観測している^{28,29)}。さらに、Brazell らは、グラファイトペースト電極を用いた IVV で、Wistar 系ラットの尾状核 (前方 7.4mm, 側方 3mm, 深さ 3.6mm) から、5-HIAA のピークを得ている³⁰⁾。本研究で使用した位置では、DOPAC に起因するピークは明瞭であったが、5-HIAA の酸化に起因するピークは明瞭には観測されなかった。ラットの広義の線条体中に、5-HT は約 3% 程度しか含有されていないこと^{31,32)}、さらにラットの尾状核中では、5-HT は一様に分布せず、部分的に差があることが報告されている³³⁾。さらに、IVV で物質を検出できる範囲は ETCF 電極の周囲 100 μ m 程度であることが報告されている¹⁹⁾。以上の点より、今回使用した部分の尾状核では 5-HT を放出する神経終末が少なかったものと思われる。

全身、及び局所麻酔薬は、痙攣や DOPAC 量に影響を及ぼすことが知られている。全身麻酔薬で、抗痙攣作用も有する抱水クロラールは、ラットの新線条体で DOPAC の電解電流を減少させ、アスコルビン酸の電解電流を増加させることが報告されている³⁴⁾。また、全身麻酔薬のハロセンは、ラットの線条体の DOPAC 含量を増加させることが報告されている²²⁾。さらに、局所麻酔薬であるリドカインを、15~60mg/kg 筋肉内に投与すると、電激痙攣は抑制されるが、75mg/kg の投与では、脳波に痙攣発作波が出現することも報告されている³⁵⁾。以上の様な全身、及び局所麻酔薬の作用を考慮に入れ、今回の急性実験の手術の際には、エーテル麻酔のみを使用し、局所麻酔薬は使用しなかった。さらに、脳波の観測の下に、約 2 時間エーテルよりの回復を待ち、実験に使用した。この方法により、麻酔薬の影響は少なくできたが、SCC の影響は無くすることはできず、PTZ 誘発痙攣中に尾状核内での DA 放出量は、無麻酔無拘束ラットと、SCC で非動化したラットでは異なっていた。

結 論

1. 電気化学的に表面処理した炭素線維電極と微分パルス・インピボ・ボルタメトリーを使用し、ペンチレンテトラゾール (PTZ) 誘発痙攣中のドーパミン (DA) の放出量の変化を調べるとともに、抗痙攣薬の効果も調べた。
2. 無麻酔、無拘束ラットの尾状核の 3, 4-ジヒドロキシフェニール酢酸 (DOPAC) 量は、PTZ により誘発される強直性痙攣の間、約 75% に減少し、それが約 60 分間続いた。これは、PTZ 誘発痙攣中に尾状核内で、DA の放出が減少していることを示唆している。
3. サクシニルコリンで非動化したラットの尾状核では、PTZ 投与により seizures pattern (SP) が脳波に出現しているとき、つまり行動的には痙攣を発現しているときには、DOPAC 量、及び 5-ヒドロキシインドール酢酸量は増加

していた。これは脳波上発作波を示しているときに、DA、及びセロトニン放出量は増加していることを示唆する。

4. 無麻酔、無拘束ラットに、ジアゼパム、及びフェノバルビタールを投与しても、尾状核中の DA 放出量に変化は見られなかった。
5. 以上の結果より、PTZ により誘発される痙攣の発現機序に、尾状核における DA 放出機構が関与している可能性のあることが示唆された。

謝 辞

終わりにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました森 昭胤教授、ならびに直接御指導御協力いただきました横井功助手に深く感謝の意を捧げます。また、実験遂行にあたりましては終始快く御協力下さいました研究室の皆様にも、心から御礼申し上げます。

文 献

1. Woodbury DM: Convulsants : Convulsant drugs: Mechanisms of action. in Antiepileptic Drugs Mechanisms of Action, Glaser, Penry and Woodbury eds (Advances in Neurology Vol. 27), Raven Press, New York, (1980) pp. 249-303.
2. Mason ST and Corcoran ME: Forebrain noradrenaline and metrazol-induced seizures. Life Sci (1978) 23, 167-172.
3. Kilian M and Frey H-H: Central monoamines and convulsive thresholds in mice and rats. Neuropharmacol (1973) 12, 681-692.
4. Dadkar VN, Dahanukar SA and Sheth NK: Role of dopaminergic and noradrenergic mechanisms in metrazole convulsions in mice. Ind J Med Res (1979) 70, 492-494.
5. Doteuchi M and Costa E: Pentylentetrazole convulsions and brain catecholamine turnover rate in rats and mice receiving diphenylhydantoin or benzodiazepines. Neuropharmacology (1973) 12, 1059-1072.
6. Lazarova MB and Roussinov KS: On certain effects of dopaminergic agents in pentylentetrazol convulsions. Bulgarian Acad Sci (1978) 4, 50-55.
7. Kleinrok Z, Czuczwar S, Wójcik A and Przegaliński E: Brain dopamine and seizure susceptibility in mice. Pol J Pharmacol (1978) 30, 513-519.
8. Lane RF, Hubbard A T, Fukunaga K and Blanchard R J: Brain catecholamines: detection *in vivo* by means of differential pulse voltammetry at surface-modified platinum electrodes. Brain Res (1976) 114, 346-352.
9. Gonon F, Buda M, Cespuglio R, Jouvet M and Pujo J-F: *In vivo* electrochemical detection of catechols in the neostriatum of anaesthetized rats: Dopamine or DOPAC? Nature (1980) 286, 902-904.

10. Broxterman HJ and Mos J: Dopamine hypoactivity measured by *in vivo* voltammetry. *Eur J Pharmacol* (1980) **68**, 389–391.
11. Plotsky PM: Differential voltammetric measurement of catecholamines and ascorbic acid at surface-modified carbon filament microelectrodes. *Brain Res* (1982) **235**, 179–184.
12. Ikeda M, Miyazaki H, Mugitani N and Matsushita A: Simultaneous monitoring of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) levels in the brain of freely moving rats by differential pulse voltammetry technique. *Neurosci Res* (1984) **1**, 171–184.
13. Nagai Y, Narumi S, Nagaoka A and Nagawa Y: *In vivo* electrochemical detection of 5-hydroxyindoles in the dorsal hippocampus of anesthetized rats treated with idebenone (CV-2619). *Jpn J Pharmacol* (1985) **37**, 222–225.
14. Pellegrino LJ, Pellegrino AS and Cushman AJ: *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*, Plenum Press, New York (1979).
15. Curzon G and Hutson PH: Monitoring striatal dopamine related circadian changes by automated *in vivo* voltammetry. *Proc Physiol Soc March*, (1981) 30p–31p.
16. Ponchon J -F, Cespuglio R, Gonon F, Juvet M and Pujol J -F: Normal pulse polarography with carbon fiber electrodes for *in vitro* and *in vivo* determination of catecholamines. *Anal Chem* (1979) **51**, 1483–1486.
17. Lane RF and Hubbard AT: Differential double pulse voltammetry at chemically modified platinum electrodes for *in vivo* determination of catecholamines. *Anal Chem* (1976) **48**, 1287–1293.
18. Kuhr WG, Ewing AG, Caudill WL and Wightman RM: Monitoring the stimulated release of dopamine with *in vivo* voltammetry. I: Characterization of the response observed in the caudate nucleus of the rat. *J Neurochem* (1984) **43**, 560–569.
19. Ewing AG and Wightman RM: Monitoring the stimulated release of dopamine with *in vivo* voltammetry. II: Clearance of released dopamine from extracellular fluid. *J Neurochem* (1984) **43**, 570–577.
20. Ewing AG, Wightman RM and Dayton MA: *In vivo* voltammetry with electrodes that discriminate between dopamine and ascorbate. *Brain Res* (1982) **249**, 361–370.
21. Conti JC, Strobe E, Adams RN and Harsden CA: Voltammetry in brain tissue: Chronic recording of stimulated dopamine and 5-hydroxytryptamine release. *Life Sci* (1978) **23**, 2705–2716.
22. Westerink BHC, Lejeune B, Korf J and Van Praag HM: On the significance of regional dopamine metabolism in the rat brain for the classification of centrally acting drugs. *Eur J Pharmacol* (1977) **42**, 179–190.
23. Ayala GF, Matsumoto H and Gumnit RJ: Excitability changes and inhibitory mechanisms in neocortical neurones during seizures. *J Neurophysiol* (1970) **33**, 73–85.
24. Clemens JA and Phebus LA: Changes in brain chemistry produced by dopaminergic agents: *in vivo* electrochemical monitoring reveals opposite changes in anesthetized vs unanesthetized rats. *Brain Res* (1983) **267**, 183–186.
25. Fuller RW, Clemens JA, Kornfeld EC, Snoddy HD, Smalstig EB and Bach NJ: Effects of (8 β)-8-[(methylthio)-methyl]6-propylergoline on dopaminergic function and brain dopamine turnover in rats. *Life Sci* (1979) **24**, 375–382.
26. Gonon F, Buda M, De Simoni G and Pujol J -F: Catecholamine metabolism in the rat locus coe-

- ruleus as studied by *in vivo* differential pulse voltammetry. II. Pharmacological and behavioral study. *Brain Res* (1983) 273, 207-216.
27. Keller Jr RW, Stricker EM and Zigmond MJ: Environmental stimuli but not homeostatic challenges produce apparent increases in dopaminergic activity in the striatum: An analysis by *in vivo* voltammetry. *Brain Res* (1983) 279, 159-170.
 28. Cespuglio R, Faradji H, Ponchon JL, Buda M, Riou F, Gonon F, Pujol J-F and Jouvét M: Differential pulse voltammetry in brain tissue. I. Detection of 5-hydroxyindols in the rat striatum. *Brain Res* (1981) 223, 287-298.
 29. Cespuglio R, Faradji H, Riou F, Buda M, Gonon F, Pujol J-F and Jouvét M: Differential pulse voltammetry in brain tissue. II. Detection of 5-hydroxyindolacetic acid in the rat striatum. *Brain Res* (1981) 223, 299-311.
 30. Brazell MP and Marsden CA: Differential pulse voltammetry in the anaesthetized rat: Identification of ascorbic acid, catechol and indoleamine oxidation peaks in the striatum and frontal cortex. *Br J Pharmacol* (1982) 75, 539-547.
 31. Hefti F, Melamed E, Maher T and Wurtman RJ: *In vivo* voltammetry: Studies of dopamine release in the rat striatum after administration of L-DOPA. *Soc Neurosci Abstr* (1980) 6, 141.
 32. Lorens AS and Guldberg HC: Regional 5-hydroxytryptamine following selective midbrain raphe lesions in the rat. *Brain Res* (1974) 78, 45-56.
 33. Ternaux JP, Hery F, Bourgoin S, Adrien J, Glowinski J and Hamon M: The topographical distribution of serotonergic terminals in the neostriatum of the rat and the caudate nucleus of the rat. *Brain Res* (1977) 121, 311-326.
 34. Gonon F, Buda M, Cespuglio R, Jouvét M and Pujol J-F: Voltammetry in the striatum of chronic freely moving rats: Detection of catechols and ascorbic acid. *Brain Res* (1981) 223, 69-80.
 35. Campos CJR and Cavalheiro EA: The paradoxical effect of lidocaine on an experimental model of epilepsy. *Arch Int Pharmacodyn* (1980) 243, 66-73.

**Effect of pentylenetetrazol and anticonvulsants on neurotransmitter
release into the caudate nucleus of rats: *In vivo*
differential pulse voltammetric study**

Masashi YAMAMOTO

Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology, Okayama University Medical School

(Director: Prof. A. Mori)

The release of indoleamine and catecholamine within the caudate nucleus of freely moving and immobilized rats during convulsions induced by pentylenetetrazol (PTZ) was investigated by *in vivo* differential pulse voltammetry. In voltammograms obtained from the caudate nucleus, there were two distinct oxidation peaks: one at 130 mV (peak P₂) and the other at 300 mV (peak P₃). Their potentials are characteristic of the oxidation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), respectively. During tonic convulsions induced by 60 mg/kg of PTZ i.p., the amplitude of peak P₂ obtained from the caudate nucleus of freely moving rats significantly decreased to 75% of the peak height recorded prior to the injection of PTZ, and recovered to normal within 60 min of the end of tonic convulsions. The amplitude of peak P₃ showed almost no change during and after tonic convulsions. These results suggest that the release of dopamine (DA) in this region of freely moving rats during tonic convulsions is induced by PTZ. The heights of peaks P₂ and P₃ were not influenced by phenobarbital (10-80 mg/kg, i.p.) or diazepam (10 mg/kg, i.p.) administration. In voltammograms from the caudate nucleus of immobilized rats, the amplitude of peak P₂ significantly increased during seizures. The increase lasted for 3 to 6 min after the seizures induced by PTZ (60-90 mg/kg, i.p.). This data suggests that DA release was increased in this region of immobilized rats during EEG-verified convulsions induced by PTZ. As the height of peak P₃ increased somewhat during seizures, so the release of serotonin increased during convulsions induced by PTZ. Although the changes in the DA release during convulsions were opposite in freely moving and immobilized rats, changes in DA and serotonin release in the caudate nucleus might participate in the development of convulsions induced by PTZ.