

学位論文題名

$\alpha_2$ 受容体によるラット海馬セロトニン放出調節機構  
—in vivo マイクロダイアリシス法による検討—

学位論文内容の要旨

I.研究目的

中枢神経系においてセロトニン(5-hydroxytryptamine:5-HT)は神経伝達物質として生理学的機能を担うのみならず、心身症や神経症の発生過程において重要な役割を果たしていることが示唆されており、その放出調節機構に対する関心が高まっている。 $\alpha_2$ アドレナリン受容体を介した5-HT放出調節機構の存在については脳スライスを用いたin vitroの実験で多くの報告があるものの、in vivoで $\alpha_2$ アドレナリン受容体作動薬を用いて5-HT放出調節機構を検討した報告はほとんどない。

本研究の目的は、in vivo マイクロダイアリシス(微小透析)法を用いて中枢神経系における $\alpha_2$ アドレナリン受容体を介した5-HT放出調節機構を薬理的に解明することである。第一に透析液中の5-HTが神経由来であるか否かをテトロドトキシン(TTX)、フルオキセチンを用いて検索した。次に $\alpha_2$ アドレナリン受容体作動薬であるUK14,304のカリウム( $K^+$ )刺激による脱分極性5-HT遊離に与える影響について検討した。最後に、 $\alpha_2$ アドレナリン受容体を介した5-HT放出調節機構と百日咳毒素感受性G蛋白との関連性を検討した。

## II. 対象と方法

Wistar系雄性ラット（8-12週令、280-350 g）を使用した。ケタミン100mg/kgの腹腔内投与で麻酔したのち、8mmのガイドカニユーラを脳定位固定装置を用いて海馬に埋め込んだ。手術より2日後、先端3mmのダイアリスス用プローブをガイドカニユーラを介して挿入し、実験を行った (probe tip: rostral-caudal -5.8mm, lateral -4.8 mm, ventral -7.0 mm from bregma and dura surface)。プローブは持続的にRinger溶液流速2  $\mu$ l/分で180分間灌流した後、20分間隔で透析液を採取した。回収された透析液は直ちにHPLC-ECDに注入し、5-HTとその主代謝産物である5-hydroxyindole-3-acetic acid(5-HIAA)を定量した。

### 実験 1

透析液中の5-HTが神経由来であることを確認するためにNaチャンネル阻害薬であるTTXと選択的5-HT再取り込み阻害薬であるフルオキセチンを透析液採取開始より60分後に灌流液中加入した。次に、5-HTの放出を促進するためにKClを60mMおよび120mMで各々2回灌流液中加入し、その効果を検討した。K<sup>+</sup>刺激後の透析液中の5-HTが神経由来であることを確認するため、2回目のK<sup>+</sup>刺激はカルシウムイオンの存在下と非存在下の両条件のもとで行った。

### 実験 2

$\alpha_2$  受容体作動薬であるUK14,304の5-HT放出に与える影響について検討した。UK14,304は2回目のK<sup>+</sup>刺激の際にRinger溶液とともに灌流した。1回目と2回目のK<sup>+</sup>刺激後の5-HT上昇比 ( $S_2/S_1$ )でUK14,304の効果を評価した。 $\alpha_2$  アドレナリン受容体拮抗薬のイダゾキサン (5mg/kg) は2回目K<sup>+</sup>刺激の20分前に腹腔内投与した。カテコラミン作動性神経を破壊するため、数例に6-hydroxydopamine(6-OHDA)をあらかじめ脳室内投与した。

### 実験 3

ある種のG蛋白を修飾する百日咳毒素(pertussis toxin: PTX)を投与した後、UK14,304の5-HT放出に及ぼす影響について検討した。PTXはpush-pullカニューラを用いて流速 $7\mu\text{l}/\text{分}$ で70分間海馬に局所投与した。それぞれの実験が終了した後、ラットの脳を摘出してプローブの位置を確認した。

## III. 結果

### 実験 1

TTX ( $10\mu\text{M}$ ) の60分間灌流により5-HTレベルは減少し、TTX投与の中止後徐々に回復した。一方フルオキセチン( $10\mu\text{M}$ )灌流により5-HTレベルは有意に上昇した。 $\text{K}^+$  (60および120mM)刺激によって5-HTレベルは濃度依存性に上昇した。5-HIAAレベルは $\text{K}^+$ 刺激により変化しなかった。一方、灌流液中のカルシウムをマグネシウムで置き換えた場合、 $\text{K}^+$ 刺激による脱分極性5-HT放出上昇は抑制された。

### 実験 2

UK14,304( $0.1\text{--}10\mu\text{M}$ )を灌流液中加入したところ、 $\text{K}^+$ 刺激性5-HT放出は濃度依存性に減少した。灌流液中のUK14,304 ( $10\mu\text{M}$ )の添加は5-HTレベルを37%まで減少させたが、これはイダゾキサン腹腔内投与により87%まで回復した。6-OHDAを脳室内投与したラットにおいても、UK14,304 ( $10\mu\text{M}$ ) は $\text{K}^+$ 刺激性5-HT放出を抑制した。

### 実験 3

実験 2 で得られたUK14,304による  $\text{K}^+$  刺激性5-HT放出の抑制は、PTXを前投与した群において認められなかった。

#### IV. 考察

本研究における一連の実験は、*in vivo* マイクロダイアリシス法で測定された無麻酔無拘束ラット海馬の5-HTが神経由来であり、脱分極性5-HT放出には5-HT作動性神経終末に存在する $\alpha_2$ アドレナリン受容体による放出調節機構が存在することを示唆するものである。

Naチャネル阻害薬であるTTXは、マイクロダイアリシス法において透析液中の神経伝達物質が神経由来であることを確認するために用いられてきた。本研究において自発的5-HT放出はTTX灌流により著明に減少した。また、選択的5-HT再取り込み阻害薬であるフルオキセチンは、透析液中の5-HT濃度を増加させた。これらの結果は透析液中の5-HTは神経由来であることを示唆する。

UK14,304は $K^+$ 刺激性5-HT放出を有意にかつ濃度依存性に抑制し、この作用はイダゾキサンの腹腔内投与によって拮抗された。UK14,304による5-HT放出抑制作用は、6-OHDAによりカテコラミン作動性神経を破壊した場合にも観察された。これらの所見は5-HT作動性神経終末に存在する $\alpha_2$ アドレナリン受容体が $K^+$ 刺激性5-HT放出の調節を担っていることを示唆するものである。

一方、PTXは受容体からセカンドメッセンジャーシステムを介する一連の反応におけるG蛋白の関わりを検出するのに有効であることが知られている。本研究において、UK14,304によって引き起こされた5-HT放出抑制はPTXを予め投与することで阻止された。

以上の結果より、*in vivo*においてラット海馬5-HT放出調節機構には5-HT作動性神経終末に存在する $\alpha_2$ 受容体が関与しており、さらにその情報伝達機構にはG蛋白が連関している可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 劔 物 修

副 査 教 授 本 間 研 一

副 査 教 授 齋 藤 秀 哉

## 学 位 論 文 題 名

### $\alpha_2$ 受容体によるラット海馬セロトニン放出調節機構

#### —in vivo マイクロダイアリシス法による検討—

中枢神経系においてはセロトニン(5-hydroxytryptamine:5-HT)は重要な役割を果たしており、その放出調節機構に対する関心が高まっている。 $\alpha_2$ アドレナリン受容体を介した5-HT放出調節機構の存在については脳スライスを用いたin vivoの実験で多くの報告があるが、in vitroで $\alpha_2$ アドレナリン受容体作動薬を用いて5-HT放出調節機構を検討した報告はほとんどない。本研究は、in vivo マイクロダイアリシス(微小透析)法を用いて、中枢神経系における $\alpha_2$ アドレナリン受容体を介した5-HT放出調節機構を、薬理学的に解明する目的で行った。

実験動物としてWistar系雄性ラットを使用した。海馬に挿入したダイアリシス用プローブを持続的にRinger溶液で灌流し、20分間隔で透析液を採取した。回収した透析液は直ちにHPLC-ECDに注入し、5-HTとその主代謝産物である5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA)を定量した。実験1では、透析液中の5-HTが神経由来であることを確認するために、Naチャンネル阻害薬であるテトロドキシン(TTX)と選択的5-HT再取り込み阻害薬であるフルオキセチンを灌流液に加えた。次に、5-HTの放出を促進するためにKClの60 mMおよび120 mMを各々2回灌流液に加え、それぞれの効果を検討した。K<sup>+</sup>刺激後の透析液中の5-HTが神経由来であることを確認するため、2回目のK<sup>+</sup>刺激はカルシウムイオンの存在下および非存在下の両条件のもとで行った。実験2では、 $\alpha_2$ 受容体作動薬であるUK14,304の5-HT放出に与える影響について検討した。UK14,304は2回目のK<sup>+</sup>刺激の際にRinger溶液とともに灌流した。 $\alpha_2$ アドレナリン受容体拮抗薬のイダゾキサンは2回目K<sup>+</sup>刺激の20分前に腹腔内投与した。カテコラミン作動性神経を破壊するため、数例に6-hydroxydopamine(6-OHDA)をあらかじめ脳室内投与した。実験3では、ある種のG蛋白を修飾する百日咳毒素(pertussis toxin:PTX)を投与した後、UK14,304の5-HT放出に及ぼす影響について検討した。

その結果、実験1ではTTXの灌流により5-HTレベルは減少し、投与中止後

徐々に回復した。一方、フルオキセチン灌流により5-HTレベルは有意に上昇した。K<sup>+</sup> (60および120 mM) 刺激によって5-HTレベルは濃度依存性に上昇した。5-HIAAレベルはK<sup>+</sup>刺激により変化しなかった。一方、灌流液中のカルシウムをマグネシウムで置き換えた場合には、K<sup>+</sup>刺激による脱分極性5-HT放出の増加は抑制された。したがって、透析液中の5-HTは神経由来であることが確認された。実験2で、UK14,304を灌流液中に加えると、K<sup>+</sup>刺激性5-HT放出は濃度依存性に減少し、イダゾキサンの腹腔内投与によって回復した。6-OH DAを脳室内投与したラットにおいても、UK14,304はK<sup>+</sup>刺激性5-HTの放出を抑制した。実験3においては、実験2で得られたUK14,304によるK<sup>+</sup>刺激性5-HT放出の抑制は、PTXを前投与した群においては認められなかった。

以上の結果より、*in vivo* においてラット海馬5-HT放出調節機構には、5-HT作動性神経終末に存在する $\alpha_2$ 受容体が関与しており、さらにその情報伝達機構にはG蛋白が連関している可能性が示唆された。

本研究は、*in vivo* において5-HT放出調節に及ぼす神経終末 $\alpha_2$ アドレナリン受容体の役割を詳細に検討し、異なる伝達物質間にcross talkが存在することを明らかにした点で有意義な研究と考えられ、学位、博士(医学)授与に値するものと判定する。