Tsukuba Psychological Research
1996, **18**, 29-35

新生仔期6-hydroxydopamine処置ラットにおける脳内モノアミン系伝達物質の測定[1)]

筑波大学大学院(博)心理学研究科　岡内　　隆

筑波大学心理学系　岩崎　庸男

Measurement of brain monoamine transmitters in neonatal 6-hydroxydopamine treated rats

Takashi Okauchi and Tsuneo Iwasaki *(Institute of Psychology, University of Tsukuba, Tsukuba 305, Japan)*

We measured the tissue contents and the in vivo extracellular levels of brain monoamine transmitters and their metabolites in neonatal 6-hydroxydopamine treated rats. The data of the tissue contents indicated selective and profound reduction of brain dopamine (DA) and its metabolites in the whole brain regions. On the other hand, the results of microdialysis in striatum and nucleus accumbens suggested that the remaining presynaptic DA terminals extensively changed so that the DA system maintained relatively high extracellular concentrations of DA following neonatal damage.

Key words: 6-hydroxydopamine, brain transmitters, tissue contents, in vivo microdialysis, striatum, nucleus accumbens, neonates, rats.

脳内の主要な伝達物質であるドーパミン(dopamine; DA)は，パーキンソン病やハンチントン舞踏病といった神経疾患や精神分裂病のような精神疾患に深く関わる物質として注目されてきた．そして数多くの研究の中から，生まれて間もないラットの脳内に6-hydroxydopamine (6-OHDA)というDAの外因性神経毒を処置することにより，人間に見られる注意欠陥障害症候群(Attention Deficit Disorder)の症状に共通する学習障害や多動といった行動異常が発現することが明らかとなった(Shaywitz et al., 1976)．我々はこのような6-OHDA処置ラットの行動異常の発生原因について行動薬理学的検索を行ってきた．本稿では，その一連の研究から得られた生化学的結果について報告する．

1)本研究の一部は，科学研究費補助金(課題番号：06451015)の援助を受けた。

1．新生仔期6-OHDA処置による脳内物質含量の変化

脳内伝達物質は神経細胞内で合成・貯蔵される．また主要な伝達物質のうち今回報告するDAやノルアドレナリン(noradrenaline; NA)，セロトニン(5-hydroxytryptamine; 5-HT)といったモノアミン類は，その合成・代謝系が特定の神経細胞内にしか存在しない．つまり動物の死後脳から得られる組織含量は，それらの伝達物質を含む特定の神経細胞の分布状態を表す指標にもなる．

6-OHDAはNAの構造異性体であるため，その単独投与ではDA系よりむしろNA系の損傷が大きくなる．したがってNA取り込み阻害薬であるデシプラミン(desmethylimipramine)を前処置してから6-OHDAを処置すると，脳内NA系には影響を受けずにDA系ニューロンのみが選択的に破壊される(Breese & Traylor, 1971)．

我々は以上の3種の伝達物質以外にDAの代謝物質であるジヒドロキシフェニル酢酸(3,4-dihydroxyphenyl acetic acid; DOPAC), ホモバニリン酸(homovanillic acid; HVA), 5-HTの代謝物質であるヒドロキシインドール酢酸(5-hydroxyindole-3-acetic acid; 5-HIAA)についても同時に定量している. これらの物質は伝達物質の代謝活性の指標となる.

1.1　新生仔期6-OHDA処置手術

1.1.1　被験体

筑波大学心理学系動物実験棟において飼育・維持しているFischer系ラットの雌雄を用いた.

1.1.2　手続き

生後2日齢および4日齢時に, デシプラミン(20mg/kg)を頚部皮下に投与し, その1時間後ラットの側脳室内に6-OHDA(片側35μg)または溶媒(片側3μl)を投与した. 投与は生後2日齢で右脳室に, 4日齢で左脳室に行った.

1.2　脳内物質含量の測定

1.2.1　被験体

新生仔期に6-OHDAあるいは溶媒の脳内処置を受けた被験体のうち, 成体期にいたり行動実験を終えてから1週間以上経過したラットを用いた.

1.2.2　手続き

【脳組織の分割】断頭後取り出された脳を, 氷冷したステンレス板上で側坐核, 海馬, 中脳, 線条体, 前頭皮質の5部位に分割した. 各組織はドライアイス上で急速凍結させた. 以上の作業は5分以内に行った. その後各組織の湿重量を測定し, 物質含量の定量分析まで−70℃にて保存した.

【分析装置】各組織中に含まれる伝達物質(DA・NA・5-HT)およびそれらの代謝物質(DOPAC・HVA・5-HIAA)を電気化学検出器と組み合わせた高速液体クロマトグラフ(High Performance Liquid Chromatograph with Electrochemical Detector; HPLC-ECD, EICOM 100 series)を用いて定量した. HPLC-ECDの作業条件は以下の通りであった. 電気化学検出器の印加電圧は750mVとした. 移動相の流速は0.8ml/minであった. 移動相の構成は16%(v/v)のメタノールおよび140mg/lのsodium 1-octane-sulfonate, 6 mg/lのdisodium ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA-2Na), 70mMのクエン酸(一水和物), 100mMの酢酸ナトリウムであった(pH3.9).

【脳内物質の定量】各組織サンプルに1mlの過塩素酸水溶液(0.1N；100μMのEDTA-2Naを含む)を加え, その後20秒間ホモジネートしてから遠心分離(15,000rpm×15min, 0℃)を行った. 上清40μlをHPLC-ECDの分析に用いた. その結果得られた各物質のクロマトグラム面積より各組織1gあたりの物質含量を求めた.

1.2.3　結果と考察

新生仔期に6-OHDAまたは溶媒を脳室内処置されたラットの脳内モノアミン(Fig.1)およびそれらの代謝産物(Fig.2)を測定した結果を, 新生仔期処置を要因とした1要因の分散分析を行ったところ, 6-OHDA投与群は統制群に比べて5カ所すべての脳部位でDAレベルが半分以下に低下していた. 特に線条体では統制群レベルの14.6%にまで涸渇していた. このことから新生仔期6-OHDA脳室内投与によって脳内DAが脳全体にわたって有意に減少していることがわかった. またDAの代謝産物であるDOPACやHVAも, 内側前頭皮質のDOPACレベルを除いて, すべて6-OHDA投与群の方が統制群に比べて有意に低い値を示した.

NAレベルに関しては海馬において6-OHDA投与群で減少がみられたが, 全体として6-OHDA処置による有意な変化はなかった. これは6-OHDAによるNA系破壊を防止するために行ったデシプラミン前処置の効果が現れたことによるものと考えられる.

5-HTおよびその代謝物である5-HIAAは, 線条体以外の組織では溶媒群と差はなかったが, 線条体においてのみ6-OHDA処置によって5-HTは1.5倍

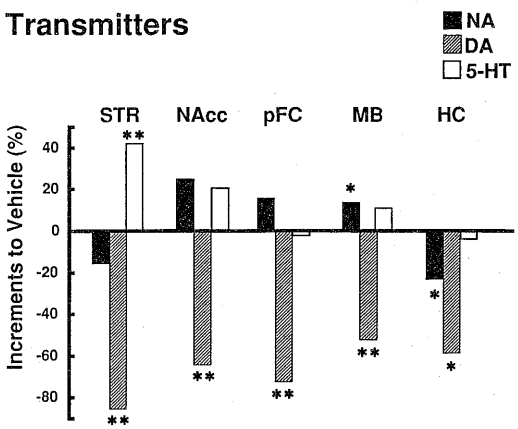

Fig. 1　Tissue contents of brain noradrenaline (closed column), dopamine (hatched column) and serotonin (open column) in neonatal 6-OHDA (70μg, icv) treated rats. STR: striatum, NAcc: nucleus accumbens, pFC: prefrontal cortex, MB: midbrain, HC: hippocampus

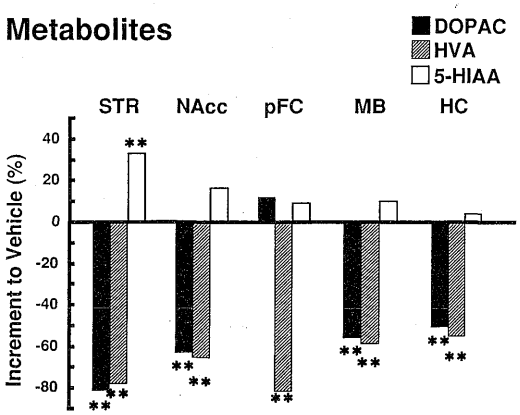

Fig. 2　Tissue contents of brain 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (closed column), homovanillic acid (hatched column) and 5-hydroxyindoleacetic acid (open column) in neonatal 6-OHDA (70 μg, icv) treated rats. STR: striatum, NAcc: nucleus accumbens, pFC: prefrontal cortex, MB: midbrain, HC: hippocampus

に，5-HIAAは1.3倍に増加した．この現象は新生仔期6-OHDA処置に特異なもので，かつこの部位に限られていることが数多くの研究から知られている(cf. Radja et al., 1993).

以上のことから，新生仔期6-OHDA処置によりNA系神経細胞には影響することなく全脳にわたってDA系が選択的に破壊されたことがわかった．またこれまでの多くの知見に一致して，5-HTの含量が線条体でのみ溶媒処置群に比べて有意に増加していた．

2．新生仔期6-OHDA処置による細胞外伝達物質濃度の変化

6-OHDAによる脳内DAの選択的涸渇は，その処置時期が成体期であろうと新生仔期であろうと非常に重篤なものとなる．6-OHDAを成体期の動物の黒質－線条体系に投与すると運動障害・カタレプシーといったパーキンソン病様症状が現れる．しかし新生仔期に6-OHDAを処置した場合，発育障害は見られるもののそのような錐体外路系障害は見られない．Castañedaら(1990)はこの現象から，新生仔期DA系損傷動物においてはDA系のシナプス前部においてDA神経伝達を増強するような作用が生じているのではないかと考えた．つまり成体期では6-OHDAの急性処置により，DAの神経伝達が急激に減少するため運動障害が生じるが，新生仔期処置ではその後の神経発達の過程で，欠損したDA機能を補うような機能が働いていることが予想された．そこで彼らは脳内微小透析法を用いて，線条体DA神経末端からシナプス間に放出された遊離DAを測定した．その結果，新生仔期6-OHDA処置によりDAの線条体組織含量は統制群の1％以下に減少していたにもかかわらず細胞外DAの濃度は統制群の12～54％であった．したがって新生仔期DA涸渇後も細胞外DA濃度を比較的高く維持するように，6-OHDAによる損傷を免れたDA系終末が補償的に作用していることが示唆された．

そこで我々も以上の知見を確認するとともに，含量では増加していた線条体5-HTの細胞外濃度の変化を明らかにするために，DAおよび5-HTの線条体細胞外濃度を脳内微小透析法を用いて測定した．また同様に中枢DA系のもう一つの主要な経路である中脳－辺縁系の投射先である側坐核における遊離DA・5-HT濃度を測定した．側坐核はラットの行動表出に深く関与しているといわれており，新生仔期6-OHDA処置により認められる様々な学習障害または行動異常に側坐核の神経伝達機能変化が関与している可能性も考えられる．

2.1　脳内微小透析法

脳内微小透析法(マイクロダイアリシス・in vivo microdialysis)は近年行動薬理学・生化学の分野で多用されるようになってきた技法で，脳内の細胞間隙に遊離している化学物質の動態を被験体が覚醒した状態で検索することができる技法である．

脳内微小透析法の原理・使用法については中原ら(1991)が詳しく述べているので参照されたい．脳内微小透析法によって得られる物質のうちモノアミンなどの電気的に活性な物質についてはHPLC-ECDにより高感度分析が容易に行える．アセチルコリンやアミノ酸などの電気的に不活性な物質については酵素反応や化学反応によって電気化学的に活性な物質に誘導化すればHPLC-ECDによる測定が可能となる．

2.2　線条体DA・5-HTの細胞外濃度

2.2.1　被験体

新生仔期に6-OHDAあるいは溶媒の脳内処置を受けた雄性成体Fischer系ラットを用いた．

2.2.2　手続き

【外科的手術】被験体をペントバルビタール(50mg/kg, i.p.)麻酔下で脳固定装置におき，頭蓋を露出させた後ブレグマから前側へ1.0mm，外側へ3.0mmの地点に穴をあけてプローブ刺入のための

ガイドカニューレを挿入した(硬膜下3.1mm). ガイドカニューレをデンタルセメントで固定した後, 被験体に回復期間を1週間以上与えた.

【脳内微小透析】線条体にガイドカニューレを介してダイアリシスプローブを挿入した(Fig.3). プローブにはインフュージョンポンプに繋がるダイアリシスチューブを介して人工脳脊髄液を毎分1 μlの流速で灌流した. プローブの組織侵襲による微小出血の影響を除去するため3時間放置した後, 透析液の回収を開始した. サンプリングに並行して, 得られたサンプル中に含まれるDAおよび5-HTの定量をHPLC-ECDを用いて行った. 細胞外液中の遊離DA・5-HT濃度の同定はLonnrothら(1987)の方法に従った. つまり, あらかじめ人工脳脊髄液中にDA・5-HTを一定の濃度で溶解しておき, 回収後のそれらの物質の濃度の増減から濃度勾配曲線を導き, 透析膜の内外を伝達物質が見かけ上移動しない等張濃度を算出した.

2.2.3　結果と考察

線条体細胞外DAの等張濃度は溶媒処置群では25.3nM, 6-OHDA処置群では8.88nMと概算された(Fig.4). 6-OHDA処置群のDA濃度は溶媒処置群の約35%であった. 線条体のDA組織含量が約10%であったことを考えると, 新生仔期DA系損傷後, 線条体DA系には細胞間隙中のDA濃度を高く維持するような補償機構が考えられ, Castañedaら(1990)の仮説を支持する結果となった.

同様の手続きで細胞外5-HT濃度は, 溶媒処置群では6.25nM, 6-OHDA処置群では4.44nMと概算され両群間に差がなかった. 5-HTの組織含量は溶媒処置群より有意に増加していたが, 細胞外濃度では差がなかったことから逆に細胞間隙における5-HTの遊離量を溶媒処置群と同じ程度に維持しようとする抑制機構が働いているのかもしれない. この結果について, Jackson & Abercrombie (1992)は, 新生仔期6-OHDA処置による5-HT系線維の過剰連絡に伴う5-HT放出の増大は, 再取り込み能力の増強によって打ち消されると報告している.

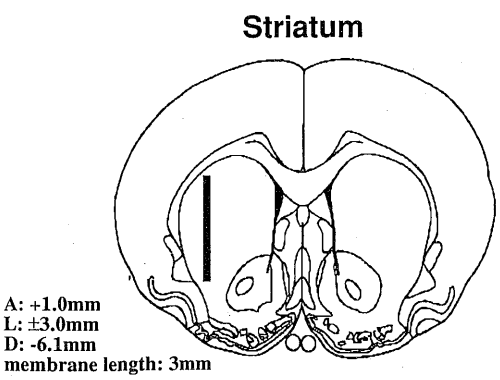

Fig. 3　Location of microdialysis probe in striatum. Bar indicates membrane tract. The coordinates for probe: AP +1.0mm, LM ±3.0mm from bregma, DV −3.1mm from dura. The membrane length: 3mm.

2.3　側坐核DA・5-HTの細胞外濃度

2.3.1　被験体

新生仔期に6-OHDAあるいは溶媒の脳内処置を受けた雄性成体Fischer系ラットを用いた.

2.3.2　手続き

【外科的手術】ガイドカニューレの挿入位置以外はすべて2.2.2の手続きに従った. ガイドカニューレはブレグマから前側へ1.6mm, 外側へ1.8mmの地点に穴をあけ挿入した(硬膜下4.8mm).

【脳内微小透析】手術から1週間おいた被験体の側坐核にダイアリシスプローブを挿入した(Fig.5). それ以外は2.2.2の手続きに従った.

2.3.3　結果と考察

側坐核細胞外DAの等張濃度は溶媒処置群では3.33nM, 6-OHDA処置群では7.44nMと概算された(Fig.6). 6-OHDA処置群のDA濃度は溶媒処置群の約223.4%であった. 側坐核のDA組織含量が約

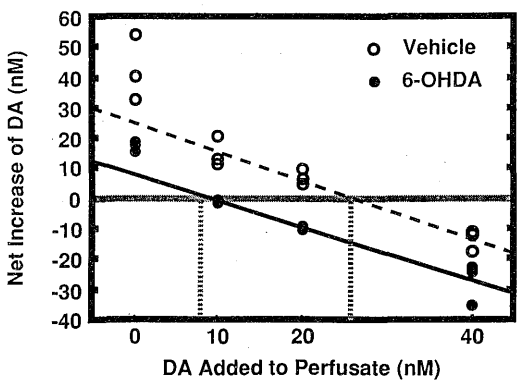

Fig. 4　The curve for estimating dialysis recovery of striatal DA. The ordinate indicates net increase of the DA concentration in the dialysate. The abscissa indicates the DA concentration added previously in perfusate. The intercept of the regression curve on the equilibrium level (zero value of the ordinate) of DA indicates estimated DA concentration at equilibrium with surrounding medium.

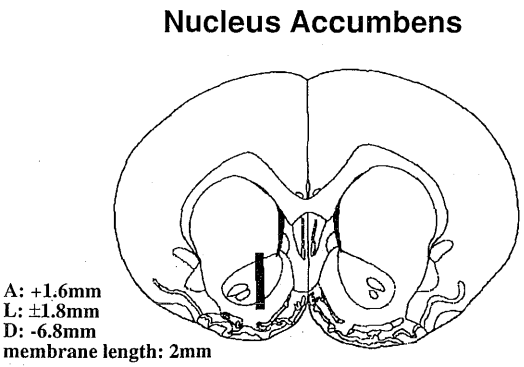

Fig. 5　Location of microdialysis probe in nucleus accumbens. Bar indicates membrane tract. The coordinates for probe: AP ＋1.6mm, LM ±1.8mm from bregma, DV －4.8mm from dura. The membrane length: 2mm.

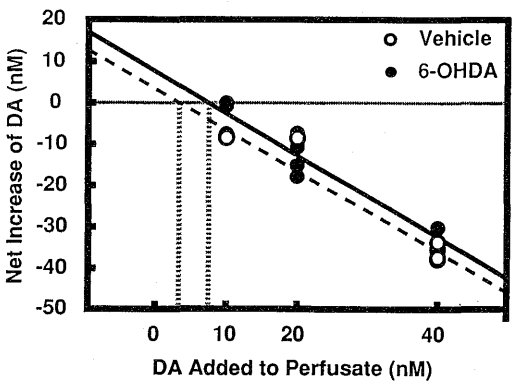

Fig. 6　The curve for estimating dialysis recovery of DA in nucleus accumbens. The ordinate indicates net increase of the DA concentration in the dialysate. The abscissa indicates the DA concentration added previously in perfusate. The intercept of the regression curve on the equilibrium level (zero value of the ordinate) of DA indicates estimated DA concentration at equilibrium with surrounding medium.

35％で，線条体含量と比較すれば6-OHDAによるDA系の損傷規模は小さいが，細胞外には過剰なDA遊離が生じており，このことが新生仔期6-OHDA処置ラットに見られる行動障害発現の関与している可能性も考えられる．

細胞外5-HT濃度については，溶媒処置群では8.63nM，6-OHDA処置群では9.79nMと概算され，両群間に差がなかった．

2.4　線条体および側坐核DOPACの細胞外濃度

DAの多くはモノアミン酸化酵素により代謝されてDOPACとなる．新生仔期6-OHDA処置により残存したDA系はDAによる情報伝達を補強するような働きを示すが，DAの代謝系にもなんらかの変化が生じている可能性が考えられる．そこでFig. 7に線条体および側坐核におけるDOPACの細胞外濃度を示した．ここで示したデータはDA濃度の同定に用いた手続きによるものとは異なり，何も負荷しない状態で採取された透析液中に含まれるDOPACの絶対量から得られたものである．溶媒処置群に対する6-OHDA処置群のDOPAC濃度の比率は線条体においては2.1％，側坐核では27.7％であった．

この結果から，DAの放出が増強される一方でその代謝能力は減少している可能性が示唆された．

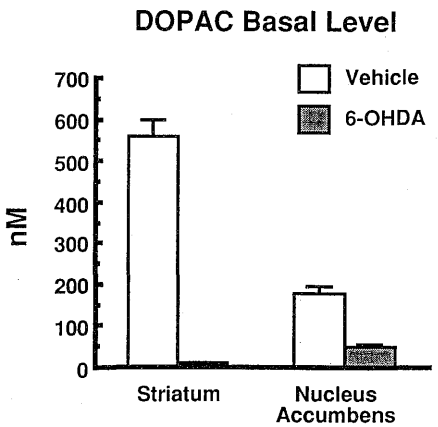

Fig. 7　The basal extracellular DOPAC concentration in striatum and nucleus accumbens.

3．全体的考察

組織含量の検索結果では，新生仔期の6-OHDA処置により中枢DA系は重篤に損傷されていた．それにもかかわらず，マイクロダイアリシスの結果から細胞間隙に存在するDAレベルは比較的高く維持されていることが分かった．このことによってDA系神経伝達が補強されていると考えられる．このため成体期6-OHDA損傷時に見られるカタレプシーのような行動障害が新生仔期処置によっては生起しないものと思われる．

脳内DA系の活性を高く維持しようとするDA系のシナプス前部における機能の変化としては，(1)オートレセプターの機能低下，(2)モノアミン代謝酵素(MAO)の活性低下，(3)DA再取り込み部位の

活性低下が考えられる。

第一のDA系シナプス前部にあるオートレセプターの機能低下については以下のように考えられる．黒質線条体系および中脳辺縁系DA系にはシナプス前部にオートレセプターがあり，細胞外遊離DAに対するフィードバック型の抑制を行っている。オートレセプターの機能を低下させることにより細胞外へのDA放出抑制を減弱させ，結果として細胞間隙におけるDA濃度を高くする．

第二に6-OHDA処置によるシナプス前部の機能変化としてMAOの活性低下が考えられる．MAOによるDA酸化代謝を抑えることによって細胞間隙におけるDA濃度を高くする．

第三に予想されるのはDA取り込み部位の活性低下である．オートレセプターと同じくシナプス前部にはDA取り込み部位があり，一旦細胞外へ放出されたDAを再び細胞内へ取り込む．これにより細胞外のDA濃度は一定の水準に保たれているが，この部位の機能が低下することで一定に保たれる水準が高く設定される可能性が考えられる．以上の可能性については薬理学的な手法を用いて現在検索中である．

ところで正常なDA神経伝達を維持する働きとは別に，実際には新生仔期6-OHDA処置ラットには過活動・学習障害といった行動障害が認められる．これらの発生原因については現在でも明らかになっていない．Erinoffら(1984)は，黒質－線条体系および中脳－辺縁系の両DA系における相互の機能的不均衡が行動障害に関与していると考えた．我々が得た結果も両部位においてDAの含量と細胞外濃度との数値的な格差が存在することを示している．また今回は示さなかったが，中枢興奮薬であるメタンフェタミン(methamphetamine; MAP)を投与した際の細胞外DA濃度の変化を測定した結果では，新生仔期6-OHDA処置ラットではMAP投与後線条体における細胞外DA濃度に大きな増加は見られないというDA系の低反応性が認められている(岡内ら，1992)．つまり新生仔期6-OHDA処置ラットに認められる行動障害は，その個体の覚醒状態を亢進するような(ショックや新奇場面といった)刺激を与えることによって，平常状態よりも多くのDA系神経伝達が必要とされる事態において，バランスのとれたDA系の反応がとれなくなっていることに由来している可能性が示唆される．

要 約

新生仔期6-hydroxydopamine処置したラットの脳内のモノアミン伝達物質およびそれらの代謝物質について組織含量と細胞外濃度を測定した．組織含量の結果からは全脳にわたってドーパミン(DA)およびその代謝物質が選択的かつ著明に減少していることがわかった．一方，微小脳透析法を用いて測定した線条体および側坐核における細胞外DA濃度の数値からは，新生仔期処置後損傷を免れたDA系神経細胞のシナプス前部において細胞外DA濃度を比較的高く維持しようとする補償的な変化が生じていることが示唆された．

引 用 文 献

Breese, G.R., & Traylor, T.D. 1971 Depletion of brain noradorenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine. *British Journal of Pharmacology,* **42**, 88-99.

Castañeda, E., Whishaw, I.Q., Lermer, L, & Robinson, E.T. 1990 Dopamine depletion in neonatal rats: Effects on behavior and striatal dopamine release assessed by intracerebral microdialysis during adulthood. *Brain Research,* **508**, 30-39.

Erinoff, L., Kelly, P.H., Basura, M., & Snodgrass, S.R. 1984 Six-hydroxydopamine induced hyperactivity: neither sex differences nor caffeine stimulation are found. *Pharmacology Biochemistry & Behavior,* **20**, 707-713.

Jackson, D., & Abercrombie, E.D. 1992 In vivo neurochemical evaluation of striatal serotonergic hyperinnervation in rats depleted of dopamine at infancy. *Journal of Neurochemistry,* **58**, 890-897.

Lonnroth, P., Jansson, P.-A., & Smith, U. 1987 A microdialysis method allowing characterization of intracellular water space in humans. *American Journal of Physiology* **253**, E228-E231.

中原大一郎・尾崎紀夫・永津俊治 1991 マイクロダイアリシス法における基本的問題．薬物・精神・行動，**11**，1-16.

岡内 隆・岩崎庸男・中原大一郎 1992 新生仔期6-hydroxydopamine処置ラットの過活動に及ぼすmethamphetamineの効果．薬物・精神・行動，**12**，305.

Radja, F., Descarries, L., Dewar, K.M., & Reader, T.A. 1993 Serotonin 5-HT1 and 5-HT2 receptors in adult rat brain after neonatal destruction of nigrostriatal dopamine neurons: A quantitative autoradiographic study. *Brain Research,* **606**, 273-285.

Shaywitz, B.A., Yager, R.D., & Klopper, J.H. 1976 Selective brain dopamine depletion in developing rats: An experimental model of minimal brain dysfunction. *Science,* **191**, 305-308.

—1995．9．30受稿—