

側坐核のアセチルコリンおよびドパミン放出制御における

δ および μ 受容体サブタイプの関与

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

木 口 友 里

(指導：清水 武彦教授，三枝 禎教授)

目次

概要	1
第1章		
緒言	4
材料および方法	7
結果	12
考察	31
第2章		
緒言	36
材料および方法	39
結果	42
考察	49
総括	53
謝辞	54
引用文献	55
参考文献	66

概 要

側坐核は中脳腹側被蓋野に起始核を有する中脳辺縁系ドパミン神経の投射領域のひとつである。側坐核には opioid 受容体の δ , μ 受容体が発現したコリン性介在神経が分布している。これらの受容体は、そのアセチルコリン神経における発現様式の特徴から側坐核のアセチルコリンの放出を前シナプス性に調節すると考えられてきた。 δ 受容体は δ_1 , δ_2 受容体, μ 受容体は μ_1 , μ_2 受容体の各サブタイプの存在が知られている。しかしながら、側坐核に分布するこれらの δ および μ 受容体のサブタイプが同部位のアセチルコリン放出の制御において果たす役割は明らかでない。一方、側坐核では $GABA_A$ 受容体が発現している $GABA$ 介在神経から放出された $GABA$ が、ドパミン神経終末に局在する $GABA_A$ 受容体を介してドパミン放出を抑制することが神経化学実験の結果から示唆されている。 δ_1 , δ_2 受容体のアゴニストの側坐核への灌流投与はいずれも同部位のドパミン放出をそれぞれ促進させるが、 δ 受容体は抑制性の神経伝達を低下させると想定されているため、側坐核の δ 受容体サブタイプの活性化が誘発したドパミン放出の発現には、同部位のドパミン放出を抑制的に調節する $GABA_A$ 受容体への $GABA$ による刺激の低下が関与することが考えられる。したがって δ 受容体の活性化による側坐核のドパミン放出の増加は、同部位の $GABA_A$ 受容体の刺激で抑制される可能性がある。しかしながら、この仮説を支持する神経薬理的な証拠がない。

そこで本研究では、側坐核のアセチルコリンおよびドパミン放出制御における同部位の δ および μ 受容体サブタイプの関与の特徴について明らかにするためラットを用いて *in vivo* 脳微小透析法による検討を行った。すなわち、第 1 章では側坐核の基礎的な細胞外アセチルコリンおよびドパミン量に δ および μ 受容体系薬物が及ぼす効果を指標として、側坐核のアセチルコリンおよびドパミン放出制御における同部位に分布する δ および μ 受容体サブタイ

プの役割について検討した。第 2 章では δ 受容体サブタイプのアゴニストが誘発した側坐核のドパミン放出促進に対する $GABA_A$ 受容体アゴニストの muscimol の効果を指標として、側坐核の δ 受容体サブタイプの選択的な活性化を介した同部位のドパミン神経活動亢進機構について $GABA_A$ 受容体への GABA 入力低下の関与の面から検討した。

アセチルコリンおよびドパミン放出の測定のため、側坐核に留置した脳微小透析プローブを介して回収した細胞外液中のアセチルコリンまたはドパミンを、電気化学検出器を組み合わせた高速液体クロマトグラフにて分離定量した。腹腔内投与した naloxonazine を除く各薬物はいずれも灌流液中に溶解し、脳微小透析プローブを介した逆透析で側坐核に局所灌流投与した。

その結果、第 1 章では、 δ_1 受容体アゴニストの DPDPE (3, 300 pmol) および δ_2 受容体アゴニストの deltorphin II (0.3, 3 pmol) は、用量依存的に基礎的なアセチルコリン量を減少させた。DPDPE (300 pmol) および deltorphin II (3 pmol) の誘発したアセチルコリンの減少は、 δ_1 受容体アンタゴニストの BNTX (0.6 pmol) および δ_2 受容体アンタゴニストの naltriben (15 pmol) によりそれぞれ打ち消された。 μ 受容体アゴニストの endomorphin-1 (6, 30 nmol) および endomorphin-2 (6, 30 nmol) は、用量依存的に基礎アセチルコリン量を減少させた。Endomorphin-1 および endomorphin-2 (30 nmol) が誘発したアセチルコリンの減少は μ 受容体アンタゴニストの CTOP (3 nmol) の前処置により抑制された。一方、endomorphin-1 (15 nmol) が誘発したドパミン放出の増加を打ち消した μ_1 受容体アンタゴニストの naloxonazine の前処置 (15 mg/kg i.p.) は endomorphin-1 (30 nmol) および endomorphin-2 (30 nmol) が誘発したアセチルコリンの減少には影響を与えなかった。第 2 章では、 δ_1 受容体アゴニストの DPDPE (0.5, 5 nmol) と δ_2 受容体アゴニストの deltorphin II (5, 25 nmol) は、側坐核のドパミン放出をいずれも用量依存的に増加させた。DPDPE (5 nmol) または deltorphin II (25 nmol) が誘発した側坐核のドパミン放出の増加

は、基礎ドーパミン量に影響がない用量の δ_1 受容体アンタゴニストの BNTX (0.15 nmol) または δ_2 受容体アンタゴニストの naltriben (1.5 nmol) の併用投与で抑制された。DPDPE (5 nmol) とは異なり deltorphin II (25 nmol) が誘発したドーパミンの増大は、基礎ドーパミン量に影響が認められない用量の muscimol (0.25 nmol) の併用投与により抑制された。

以上の第 1 章と第 2 章の結果から、側坐核では δ_1 , δ_2 受容体のほか、 μ_1 ではなく μ_2 受容体がアセチルコリン神経を抑制的に制御することを示す神経化学的証拠が *in vivo* の条件で得られた。また、 μ_1 受容体は側坐核のドーパミン神経活動制御において促進的な役割を果たすことが示された。さらに側坐核の GABA 介在神経に発現する δ_2 受容体の活性化により、この神経からの GABA 放出が減少することでドーパミン神経終末上の $GABA_A$ 受容体を介した抑制が低下して側坐核のドーパミン放出が促進されることが示唆された。

第 1 章

μ_1 受容体とは異なり δ_1 , δ_2 , μ_2 受容体は無麻酔非拘束ラットの側坐核のアセチルコリン放出を抑制的に制御する

緒 言

側坐核は中脳腹側被蓋野に起始核を有する中脳辺縁系ドパミン性ニューロンの投射領域のひとつである。免疫組織化学的研究から、側坐核にはコリン性介在神経が広く分布していることが示されている (Meredith et al., 1989)。側坐核のアセチルコリン神経活動の増加と減少は、それぞれ実験動物の移所運動の誘発 (Matsuzaki et al., 2004; Saigusa et al., 1995) と認知機能の障害 (Laplante et al., 2011, 2012, 2013) にそれぞれ関与することが報告されている。

側坐核には opioid 受容体サブタイプの δ , μ , κ 受容体が分布している。ラットの側坐核の神経細胞の免疫細胞化学的解析から、 δ 受容体は樹状突起および軸索終末に認められることが示されている (Svingos et al., 1998)。この δ 受容体の分布様式は、側坐核においてこれらの受容体が神経伝達物質の放出を前シナプス性に調節することを強く示唆するものである (Svingos et al., 1998)。ほかの免疫細胞化学研究からは、ラットの側坐核の μ 受容体がアセチルコリンを含む樹状突起および軸索終末の細胞膜上に局在していることも明らかにされている。この μ 受容体の局在様式はこれらの受容体が側坐核のコリン性神経細胞からのアセチルコリンの放出を調節することを示唆している (Svingos et al., 2001)。上記の解剖学的な知見と一致して、ラットの脳切片を用いた実験から δ および μ 受容体アゴニストは側坐核のアセチルコリン遊離を減少させることが示されている (Heijna et al., 1990, 1992)。In vivo 脳微小透析実験から δ および μ 受容体を含む opioid 受容体サブタイプを非特異的に刺

激する morphine の全身投与は、無麻酔非拘束ラットの側坐核のアセチルコリン遊離を減少させることも示されている (Rada et al., 1991a, b)。また側坐核のコリン性介在神経には δ および μ 受容体が発現することを示唆する電気生理学的研究もある (Britt and McGehee, 2008)。一方、 δ 受容体は薬理的に δ_1 , δ_2 受容体に (Dietis et al., 2011), μ 受容体も選択的 μ_1 受容体アンタゴニストの naloxonazine への感受性にに基づき μ_1 , μ_2 受容体にそれぞれ分類されている (Dietis et al., 2011; Pasternak and Wood, 1986)。しかしながら、側坐核に分布する δ および μ 受容体サブタイプが同部位のアセチルコリン放出の制御において果たす役割は明らかでない。そこで本研究では、 δ および μ 受容体サブタイプのアゴニストが無麻酔非拘束ラットの側坐核の細胞外アセチルコリン量に及ぼす効果について *in vivo* 脳微小透析法を用いて解析した。この側坐核アセチルコリンに対するアゴニストの効果の受容体特異性は、 δ および μ 受容体のアンタゴニストを用いて検討した。側坐核から回収した透析液中のアセチルコリン量の変化を詳細に評価するため、本研究は低用量の cholinesterase 阻害薬の physostigmine を含んだ灌流液を使用して行なった。

はじめに、試料中に検出されたアセチルコリンが神経発火により細胞外に放出されたものであることを確かめるため、側坐核から得た灌流液中のアセチルコリン量に対する電位依存性 Na^+ チャネル阻害薬の tetrodotoxin の効果について検討した。つぎに δ 受容体サブタイプがアセチルコリン放出制御へ関与する可能性を検討する目的で、異なる用量の δ_1 および δ_2 受容体アゴニストの側坐核のアセチルコリン量に対する効果を観察した。さらにこのアゴニストの側坐核アセチルコリンに対する効果の受容体特異性について δ_1 および δ_2 受容体アンタゴニストを併用投与して検討した。また μ 受容体の内因性アゴニスト候補物質の endomorphin 類の側坐核への灌流投与がアセチルコリンに及ぼす効果についても解析した。これまでの研究から、endomorphin-1 と endomorphin-2 の側坐核への灌流投与は、異なるメカニズムで側坐核のドパミ

ン放出を促進させることが示されている。すなわち endomorphin-1 は μ 受容体刺激を介して, endomorphin-2 は μ 受容体を含む naloxone 感受性の opioid 受容体刺激は介さずに, それぞれ側坐核のドーパミン放出を増加させることが報告されている (Aono et al., 2008; Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2008)。このため側坐核のアセチルコリン神経活動の制御における μ 受容体サブタイプの関与について検討する目的で, endomorphin 類の側坐核のアセチルコリン放出に対する作用に対して選択的 μ 受容体アンタゴニストの併用投与が及ぼす効果について解析した。本実験では, 内因性アセチルコリンの増加を介してドーパミン放出に影響を与える可能性がある physostigmine が低濃度ではあるが灌流液に添加してあるため (Di Chiara et al., 1996; Noori et al., 2012), endomorphin-1 および endomorphin-2 が誘発した側坐核のドーパミン放出への作用に対する前述の μ 受容体アンタゴニスト併用投与の効果についても検討を加えた。

材料および方法

動物

実験開始時の体重が 200～220 g の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット（高杉実験動物）を用いた。飼育は、恒温恒湿（ 23 ± 2 °C, $55 \pm 5\%$ ）、午前 7 時点灯、12 時間明暗サイクルの飼育室で行い、飼育期間中ラット・マウス用 MF 固形飼料（オリエンタル酵母工業）と水道水を自由に摂取させた。

手術

ラットに Na pentobarbital (50 mg/kg i.p.; ネンブタール, 大日本製薬) で全身麻酔を施し、脳定位固定装置に装着した。本研究室で行ってきた通法 (Aono et al., 2013, 2015; Saigusa et al., 2012b) に従い、マニピュレータに装着した専用のステレオ用ガイドに取り付けたガイドカニューレを、アトラス (Paxinos and Watson, 1998) を参考に左側の側坐核のわずかに上方（両側耳間線から antero-posterior 10.6 mm, medio-lateral 1.5 mm, dorso-ventral 4.0 mm）に側脳室の損傷を避けるため正中より 18° の側方傾斜を付与して植立し、接着剤（アロンアルファ A; 三共）と歯科用常温重合レジンを用いて、脳を圧迫しない深さに植立した維持用ステンレス製ビスと共に頭蓋骨表面に堅固に固定した。被験動物は手術後 7～10 日の回復期間をおいた後、透析実験に使用した。ガイドカニューレには血液および滲出液で閉塞しないようにステンレス製のダミープローブを挿入し、キャップナットで固定した。各被験動物は、1 回のみ透析実験に使用した。

実験は日本大学松戸歯学部動物実験委員会の承認の下、動物実験指針に従って行い、実験動物の苦痛軽減および使用動物数の低減に努めた。

透析実験

透析実験には、セルロース製透析膜（長さ 2 mm, 直径 0.22 mm, カットオフ分子量約 5 万）を先端部に有する市販の直管型の透析プローブ（A-I-6.5-02; エイコム）を用いた。あらかじめ挿入しておいたダミープローブを取り除き、透析プローブをガイドカニューレの先端より透析膜のみが脳内に留置されるように挿入し、キャップナットでラットの頭部に固定した。透析実験は被験動物を測定用透明アクリルケージ（30 cm × 30 cm × 35 cm）内に収容し、簡易シーベルに取り付けたテフロンチューブを透析プローブの inlet および outlet にそれぞれ接続して行った。灌流液として用いた改良リンゲル液（NaCl: 147 mM, KCl: 4 mM, CaCl₂: 1.2 mM, MgCl₂: 1.1 mM; pH 7.4）には、cholinesterase による代謝を低下させることで細胞外に放出されたアセチルコリンの定量を容易にするため、低濃度の physostigmine (50 nM; physostigmine hemisulfate, Tocris, Bristol, UK) を加えた。この physostigmine は、acetylcholinesterase の抑制における IC₅₀ に近い濃度を用いた (Noori et al., 2012)。テフロンチューブは高速液体クロマトグラフシステム (HTEC-500; エイコム) に接続し、上述の改良リンゲル液を流速 1.0 μl/min で透析プローブに灌流した。

アセチルコリンは Eicompak AC-GEL column (粒子サイズ 4 μm, カラムサイズ 2.0 × 150mm; エイコム) にて分離した。移動相には炭酸水素カリウム (50 mM), decanesulfonic acid (2.0 mM), EDTA (0.13 mM) を含有した炭酸緩衝液 (pH 8.2) を用い、流速を 150 μl/min とした。Acetylcholinesterase と choline oxidase を固定化した酵素リアクターを用いてアセチルコリンから産生させた過酸化水素は、設定加電圧を +450 mV (Ag vs AgCl) とした電気化学検出器により定量した。本システムのアセチルコリンの検出限界はシグナル:ノイズ比 2:1 でおよそ 5 fmol (0.7 pg) /sample であった。アセチルコリンの分離に用いたカラムと酵素リアクターはいずれも 33°C に設定した恒温槽に収容して使用した。試料としてオートインジェクター内に回収した灌流液には、酵素リアクターの活性と白金電極を用いた電気化学検出器の感度を確認する目的で内

部標準物質の isopropylhomocholine (IPHC) を三方活栓を用いて添加した。試料中のアセチルコリン量は, 標準物質のアセチルコリンと IPHC のピーク面積値を基に算出した。

ドパミンは Eicompak CAX column (粒子サイズ 5 μm , カラムサイズ 2.0 \times 200 mm; エイコム) にて分離した。移動相には硫酸ナトリウム (50 mM), EDTA (0.13 mM), 30% methanol を含有した 0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0) を用い, 流速を 250 $\mu\text{l}/\text{min}$ とした。ドパミンの定量には, 設定加電圧を +450 mV (Ag vs AgCl) とした電気化学検出器を用いた。ドパミンの分離に用いたカラムは 35°C に設定した恒温槽に収容して使用した。本システムのドパミンの検出限界はシグナル:ノイズ比 2:1 でおよそ 20 pmol (0.05 pg) /sample であった。

透析プローブの *in vitro* の条件下での上述のアミンの回収率は約 12% であった。本報告では, この回収率に基づいた *in vivo* の条件下でのアミン量の補正は行わなかった。これはこの補正が正確さを欠くとされているためである (Benveniste et al., 1989 ; Lindefors et al., 1989)。本研究と同様の実験条件では, 回収されたドパミンはプローブ挿入から 16 時間以降で回収量が概ね安定しており, 70% 以上が tetrodotoxin 感受性であったことから, この測定されたほとんどのドパミンは神経活動依存性に細胞外へ放出されたものであることが示されている (Saigusa et al., 2012a)。試料の灌流液は 15 または 20 分毎に回収し, アセチルコリンまたはドパミンの定量を行った。クロマトグラムはパーソナルコンピュータに接続したインテグレータ (Power Chrom: AD Instruments, NSW, Australia) を用いて描出した。

薬物はすべてプローブ挿入後 20 時間以上経過してから, 腹腔内または脳微小透析プローブを介した脳内局所への直接灌流により投与した。基礎アセチルコリン量は, 薬物投与直前 4 回に回収された灌流液中に含まれるアセチルコリン量の平均とした。基礎ドパミン量は, 薬物投与直前 3 回に回収された灌流液中に含まれるドパミン量の平均とした。

薬物

被験薬物として, tetrodotoxin (Sigma-Aldrich), DPDPE (D-[Pen^{2,5}]-enkephalin hydrate, Sigma-Aldrich), deltorphin II ([D-Ala²]-deltorphin II, Sigma-Aldrich), BNTX maleate salt hydrate, naltriben methanesulfonate hydrate, endomorphin-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂; ペプチド研究所), endomorphin-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂; ペプチド研究所), CTOP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Phe-Thr-NH₂; Sigma-Aldrich), naloxonazine (naloxonazine dihydrochloride, Sigma-Aldrich) を用いた。被験薬物の投与量は, tetrodotoxin (Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2012a), DPDPE (Fusa et al., 2005), BNTX (Hirose et al., 2005), deltorphin II (Fusa et al., 2005), naltriben (Hirose et al., 2005), endomorphin-1 および endomorphin-2 (Aono et al., 2008; Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2008), CTOP (Yoshida et al., 1999; Okutsu et al., 2006), naloxonazine (Piepponen and Ahtee, 1995; Okutsu et al., 2006) を用いた過去の報告に基づいて設定した。Tetrodotoxin, DPDPE, deltorphin II, BNTX, naltriben, endomorphin-1, endomorphin-2, CTOP はいずれも改良リンゲル液に溶解した。これらの薬物は, 微小透析膜を介して 180 分間 (tetrodotoxin) または 30 分間 (DPDPE, deltorphin II, BNTX, naltriben, endomorphin-1, endomorphin-2, CTOP) に亘り灌流投与した。被験薬物の投与量は, 灌流期間中に投与された薬物の総量 (nmol) で示した (tetrodotoxin, 180 分間: 480 pmol/180 μ l; DPDPE, 30 分間: 3-300 pmol/30 μ l; deltorphin II, 30 分間: 0.3-3 pmol/30 μ l; BNTX, 30 分間: 0.6 pmol/30 μ l; naltriben, 30 分間: 15 pmol/30 μ l; endomorphin-1 および endomorphin-2, 30 分間: 6-30 nmol/30 μ l; CTOP, 30 分間: 3 nmol/30 μ l)。

本研究の投与薬物のうち, DPDPE は 300 pmol, deltorphin II は 3 pmol, BNTX は 0.6 pmol, naltriben は 15 pmol, endomorphin-1 および endomorphin-2 は 30 nmol, CTOP は 3 nmol をそれぞれ超える用量は, クロマトグラム上でアセチルコリ

ンおよびドパミンのいずれか一方または両方の同定の妨げとなるシグナルを惹起したため使用しなかった。Naloxonazine は生理食塩液に溶解して endomorphin-1 および endomorphin-2 の灌流開始の 24 時間前に腹腔内投与した。

透析プローブ挿入位置の組織学的確認

実験終了後、過量の Na pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) による深麻酔下で 10% ホルマリン液を経心臓灌流した。脳を摘出して厚さ 50 μm の前額断の連続組織標本を作製し、cresyl violet で染色を施し、透析プローブの挿入位置を組織学的に確認した。

統計処理

データはすべて基礎値に対する百分率で表した。分散分析を時間 (time) の因子について行い、連続して回収した 3 つのサンプル間において統計学的に有意な差が認められなかった場合に限り、基礎値の決定を行った。経時的なデータ (0 から 240 分) の比較では処置 (treatment) と time の因子について繰り返しのある二元配置分散分析法 (two-way ANOVA) を用いた後、post hoc 検定として Scheffé's test を必要に応じて行った。有意水準はいずれも $P < 0.05$ とした。

結 果

透析プローブ挿入位置の組織学的確認

組織学的検索の結果，側坐核における透析プローブはいずれも A10.6（耳間線から前方 10.6 mm の断面）を通過し，その先端は耳間線から前方 10.0～10.9 mm の範囲にあった（Fig. 1）。本実験で使用した透析膜（膜長 2 mm）では側坐核の core 部と shell 部を明確には区別できないので，本実験の測定値は側坐核全体から得られたものと考えられる。本研究で使用した 199 例のラットのうち，プローブの位置が範囲外にあったものは 33 例であった。プローブが目的位置にあった 166 例の結果のみを解析した。

側坐核における基礎的な細胞外アセチルコリン量

側坐核から回収されたサンプル中の薬物処理前の基礎的なアセチルコリン濃度は， 3.65 ± 0.19 pg（ $= 1.66 \pm 0.08$ nM）/15 min であった（mean \pm S.E.M.; $n = 128$ ）。

Tetrodotoxin の側坐核への灌流投与が同部位のアセチルコリン量に及ぼす効果

測定期間中，側坐核から得られた基礎アセチルコリン量は安定していた（Fig. 2）。側坐核へ tetrodotoxin を 4 時間灌流投与（480 pmol）することにより，アセチルコリン量が約 80%減少した[Fig. 2; two-way ANOVA, treatment: $F_{(1, 154)} = 422.9, P < 0.001$]。

DPDPE および deltorphin II の側坐核への灌流投与が同部位のアセチルコリン放出に及ぼす効果

側坐核へ DPDPE（3 または 300 pmol）を 30 分間灌流投与したところ，同部

位の細胞外アセチルコリン放出は灌流後 240 分に亘り用量依存的に減少した [Fig. 3A; two-way ANOVA, treatment: $F_{(2, 263)} = 27.8, P < 0.001$]. Scheffé's test の結果, 3 pmol の DPDPE 投与群と溶媒投与群の間に有意差が認められた ($P < 0.05$). Scheffé's test の結果, 300 pmol の DPDPE 投与群と, 溶媒投与群, 3 pmol の DPDPE 投与群との間に有意差が認められた ($P < 0.05$).

側坐核へ deltorphin II (0.3 または 3 pmol) を 30 分間灌流投与したところ, 同部位の細胞外アセチルコリン放出は灌流後 45 から 135 分にかけて用量依存的に減少した [Fig. 3B; two-way ANOVA, treatment: $F_{(2, 119)} = 7.8, P < 0.01$]. Scheffé's test の結果, 3 pmol の deltorphin II 投与群と, 溶媒投与群, 0.3 pmol の deltorphin II 投与群との間に有意差が認められた ($P < 0.05$).

BNTX または naltriben が DPDPE または deltorphin II 誘発側坐核アセチルコリン放出減少に及ぼす効果

BNTX の 60 分間の灌流投与 (0.6 pmol) は基礎的な側坐核のアセチルコリン量に影響を及ぼさなかったが (Fig. 3C), DPDPE (300 pmol) の誘発した側坐核のアセチルコリン放出の抑制効果を打ち消した [Fig. 3C; two-way ANOVA, treatment: $F_{(3, 383)} = 54.1, P < 0.001$]. また naltriben の 60 分間の灌流投与 (15 pmol) は基礎的な側坐核のアセチルコリン量に影響を及ぼさなかったが (Fig. 3D), deltorphin II (3 pmol) の誘発した側坐核のアセチルコリン放出の抑制効果を打ち消した [Fig. 3D; two-way ANOVA, treatment: $F_{(3, 156)} = 5.7, P < 0.01$].

Endomorphin-1 および endomorphin-2 の側坐核への灌流投与が同部位のアセチルコリン放出に及ぼす効果

側坐核に endomorphin-1 (6 または 30 nmol) を 30 分間灌流投与したところ, 同部位の細胞外アセチルコリン放出は灌流後 90 から 240 分にかけて用量依存的に減少した [Fig. 4A; two-way ANOVA, interaction: $F_{(20, 160)} = 2.4, P < 0.01$].

側坐核へ endomorphin-2 (6 または 30 nmol) を 30 分間灌流投与したところ、灌流後 45 から 240 分にかけて同部位の細胞外アセチルコリン放出は用量依存的に減少した[Fig. 4B; two-way ANOVA, treatment: $F_{(2, 233)} = 12.2, P < 0.001$]。Scheffé's test の結果、30 nmol の endomorphin-2 投与群と、溶媒投与群、6 nmol の endomorphin-2 投与群との間にそれぞれ有意差が認められた ($P < 0.05$)。また Scheffé's test の結果、6 nmol の endomorphin-2 投与群と溶媒投与群の間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。

CTOP が endomorphin-1 および endomorphin-2 誘発側坐核アセチルコリン放出減少に及ぼす効果

CTOP の 30 分間の灌流投与 (3 nmol) は、基礎的な側坐核のアセチルコリン量に影響を及ぼさなかったが (Fig. 4C), endomorphin-1 (30 nmol) の誘発した側坐核のアセチルコリン放出の抑制効果を打ち消した[Fig. 4C; two-way ANOVA, treatment: $F_{(3, 210)} = 35.9, P < 0.001$]。この CTOP の灌流投与 (3 nmol) は、endomorphin-2 (30 nmol) の誘発した側坐核のアセチルコリン放出の抑制効果も打ち消した[Fig. 4D; two-way ANOVA, treatment: $F_{(3, 286)} = 25.6, P < 0.001$]。

側坐核における細胞外への基礎ドパミン放出

側坐核から回収されたサンプル中の薬物処置前の基礎ドパミン量は、 2.49 ± 0.24 pg ($= 0.81 \pm 0.08$ nM) /20 min (mean \pm S.E.M.; $n = 38$) であった。

CTOP が endomorphin-1 および endomorphin-2 誘発側坐核ドパミン放出増加に及ぼす効果

実験期間中、基礎的なドパミン量は安定していた (Fig. 5A)。側坐核に endomorphin-1 (15 nmol) を 30 分間灌流投与したところ、灌流後 40 から 100

分にかけて同部位の細胞外ドパミン放出は増加した。CTOP の 30 分間の灌流投与 (3 nmol) は、基礎的な側坐核のドパミン量に影響を及ぼさなかったが (Fig. 5A), endomorphin-1 (15 nmol) が誘発したドパミン放出の増加を抑制した [Fig. 5A; two-way ANOVA, treatment: $F_{(3, 53)} = 13.4, P < 0.001$]。側坐核に endomorphin-2 (30 nmol) を 30 分間灌流投与したところ、灌流後 30 から 60 分にかけて同部位の細胞外ドパミン放出は増加した。CTOP の灌流投与 (3 nmol) は、endomorphin-2 (30 nmol) が誘発したドパミン放出の増加には影響を与えなかった (Fig. 5B)。

Naloxonazine が endomorphin-1 誘発側坐核ドパミン放出増加, endomorphin-1 および endomorphin-2 誘発側坐核アセチルコリン放出減少に及ぼす効果

Naloxonazine の腹腔内投与 (15 mg/kg, endomorphin-1 の灌流投与 24 時間前) は、基礎的な側坐核のドパミン量には影響を及ぼさなかったが [2.18 ± 0.34 pg (= 0.71 ± 0.11 nM) /20 min (mean \pm S.E.M.; $n = 6$)], endomorphin-1 (15 nmol) の誘発した側坐核のドパミン放出の増加は抑制した [Fig. 6A; two-way ANOVA, treatment: $F_{(2, 233)} = 12.2, P < 0.001$]。この naloxonazine の腹腔内投与 (15 mg/kg, endomorphin-1 の灌流投与 24 時間前) は、基礎的な側坐核のアセチルコリン量にも影響を及ぼさなかった [3.16 ± 0.30 pg (= 1.44 ± 0.14 nM) /15 min (mean \pm S.E.M.; $n = 13$)]。この naloxonazine 処置では、endomorphin-1 (30 nmol: Fig. 6B) および endomorphin-2 (30 nmol: Fig. 6C) の誘発した側坐核のアセチルコリン放出の減少はいずれも目立った影響を受けなかった [Fig. 6A; two-way ANOVA, treatment: $F_{(2, 233)} = 12.2, P < 0.001$]。

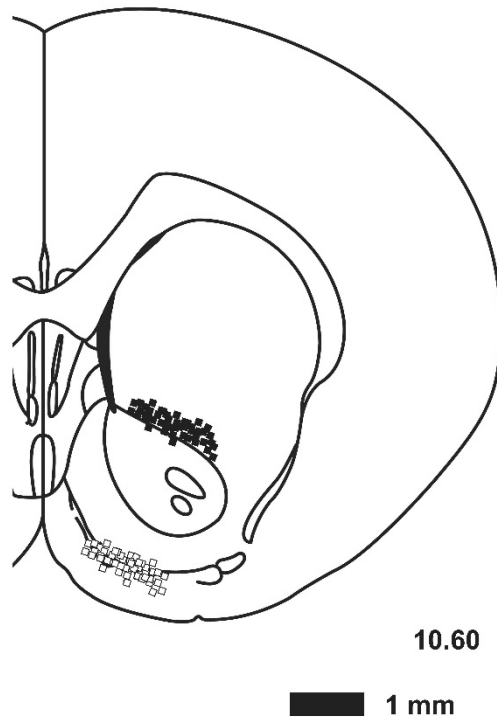


Fig. 1. Schematic illustration showing locations of the beginning (closed squares) and tip (open squares) of the membrane of microdialysis probes in the nucleus accumbens. The plane is taken from the atlas of Paxinos and Watson (1998) and an approximate coordinate indicated is in mm anterior to the interaural line.

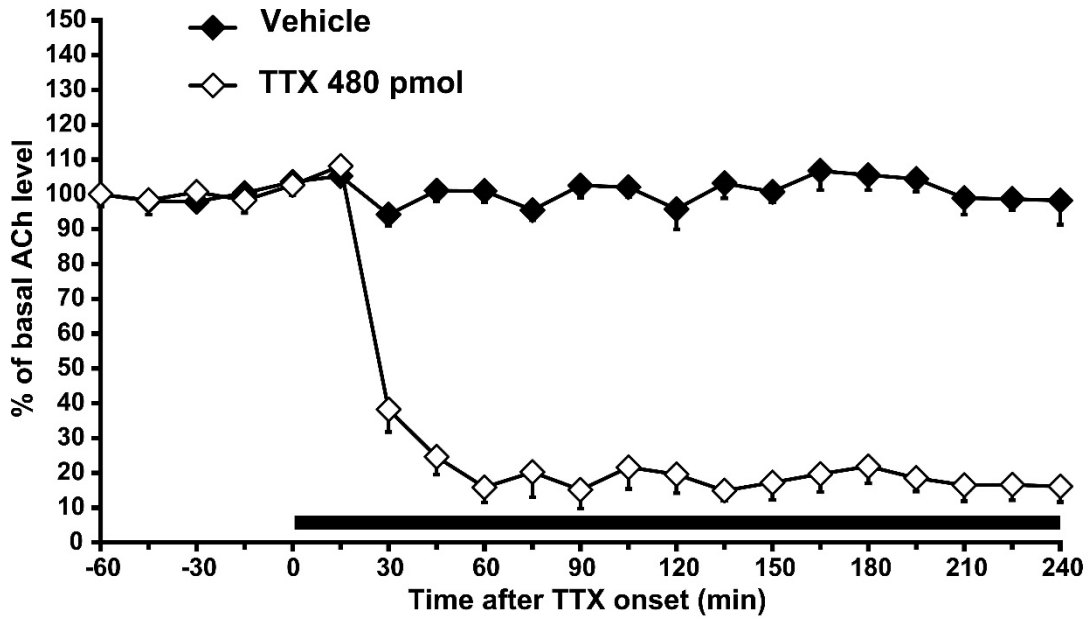


Fig. 2. Effects of 240 min-infusions of vehicle ($n = 7$, closed diamonds) or tetrodotoxin (TTX, 480 pmol; $n = 6$, open diamonds) into the nucleus accumbens on basal extracellular levels of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of Tetrodotoxin perfusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the 240 min period of tetrodotoxin infusion that commenced at 0 min.

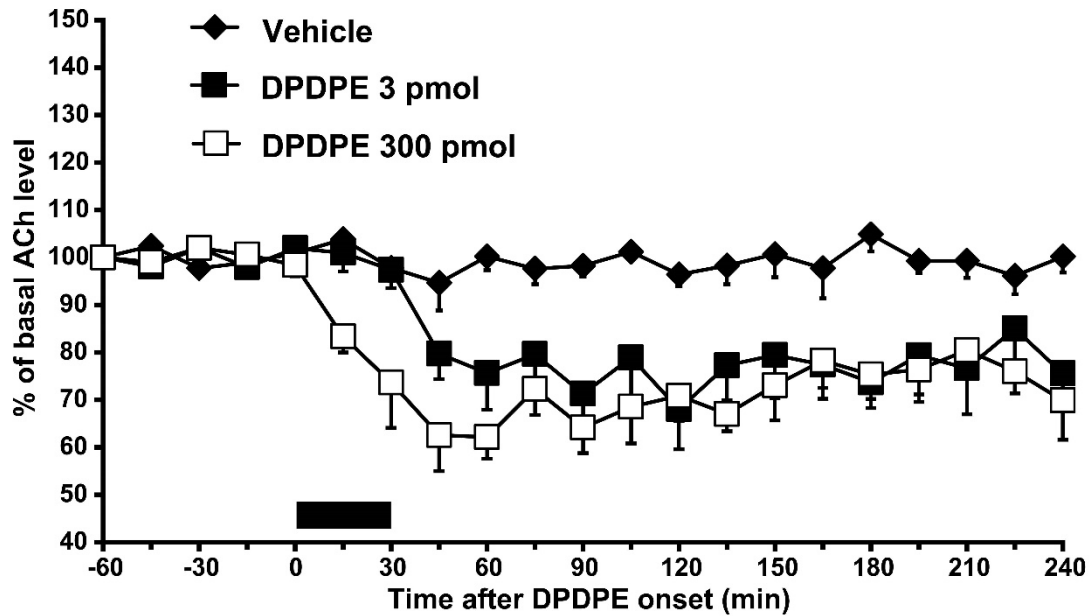


Fig. 3A. Effects of 30 min-infusions of vehicle ($n = 7$, closed diamonds) or DPDPE (3 pmol; $n = 6$, closed squares, 300 pmol; $n = 8$, open squares) into the nucleus accumbens on basal extracellular efflux of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of DPDPE infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of vehicle or DPDPE (30 min).

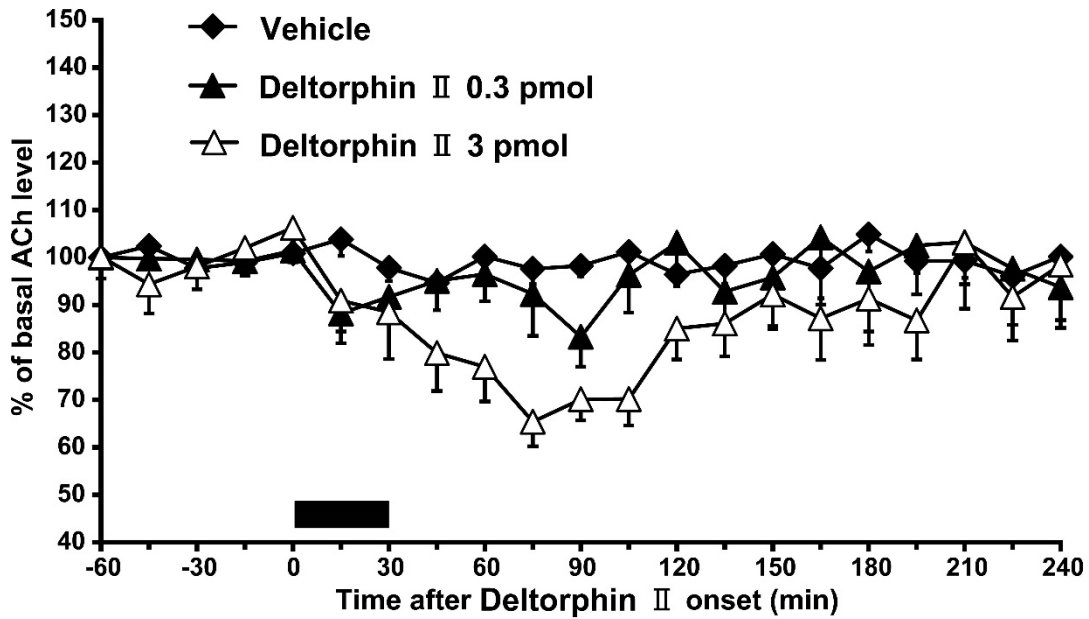


Fig. 3B. Effects of 30 min-infusions of vehicle ($n = 7$, closed diamonds) or deltorphin II (0.3 pmol; $n = 9$, closed triangles. 3 pmol; $n = 7$, open triangles) into the nucleus accumbens on basal extracellular efflux of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of deltorphin II infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of vehicle or deltorphin II (30 min).

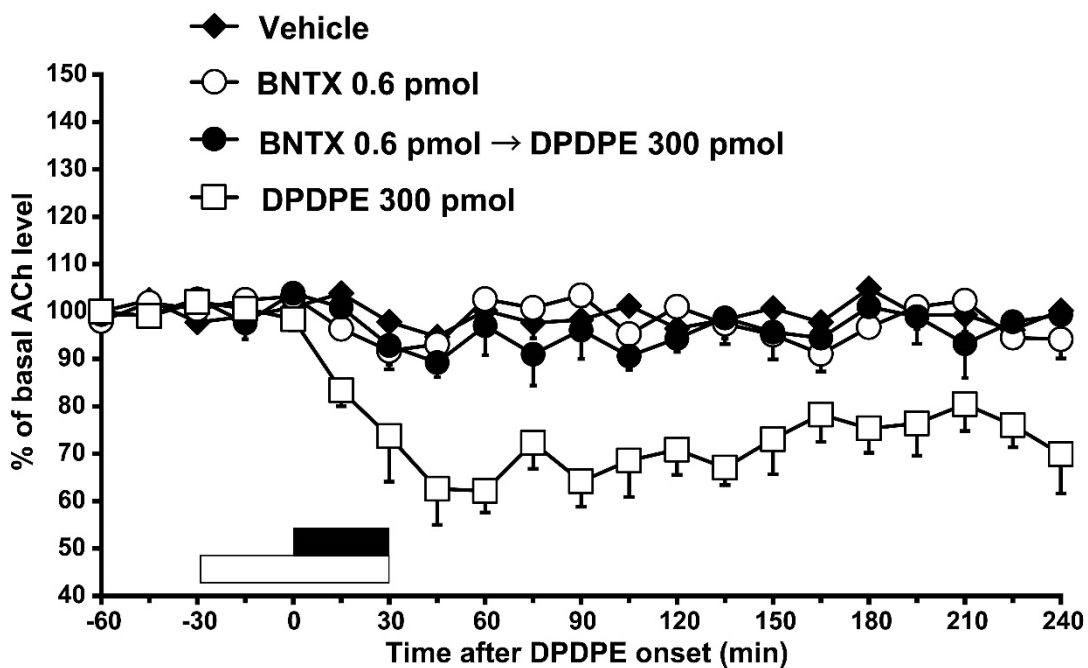


Fig. 3C. Effects of a 60 min-infusion of BNTX (0.6 pmol) on a 30 min-infusion of DPDPE (300 pmol)-induced decrease in acetylcholine (ACh) level in the nucleus accumbens ($n = 8$, closed circles). Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of DPDPE (300 pmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of BNTX perfusion that commenced 30 min before onset of DPDPE infusion. The filled bar indicates the period of infusion of DPDPE (30 min).

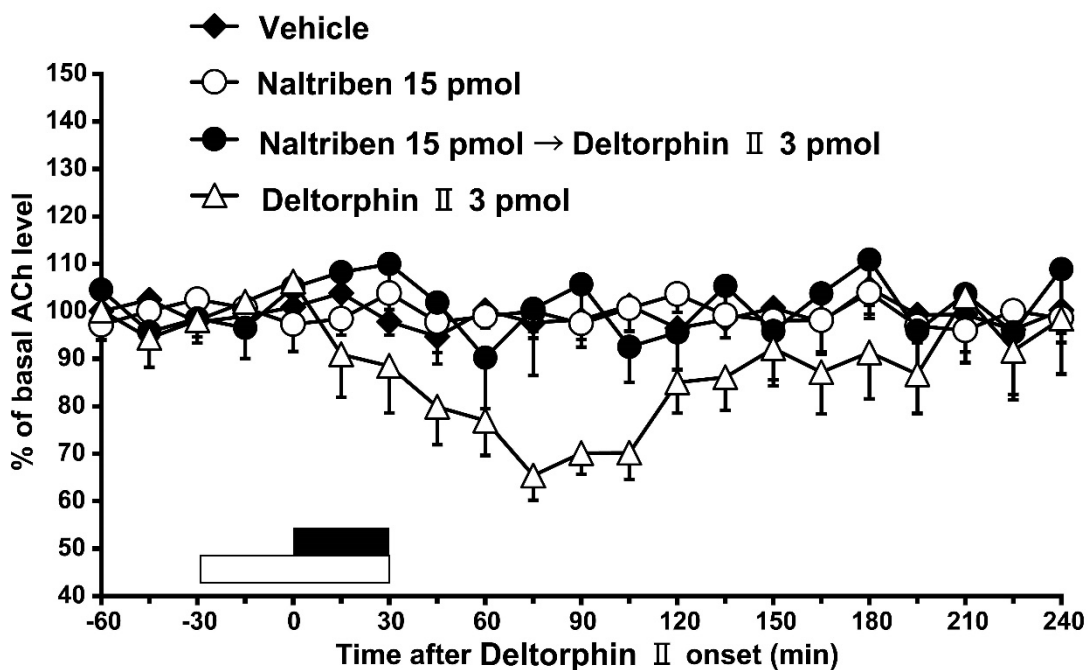


Fig. 3D. Effects of a 60 min-infusion of naltriben (15 pmol) on a 30min-infusion of deltorphin II (3 pmol)-induced decrease in acetylcholine (ACh) level in the nucleus accumbens ($n = 7$, closed circles). Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of deltorphin II (3 pmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of naltriben perfusion that commenced 30 min before onset of deltorphin II infusion. The filled bar indicates the period of infusion of deltorphin II (30 min).

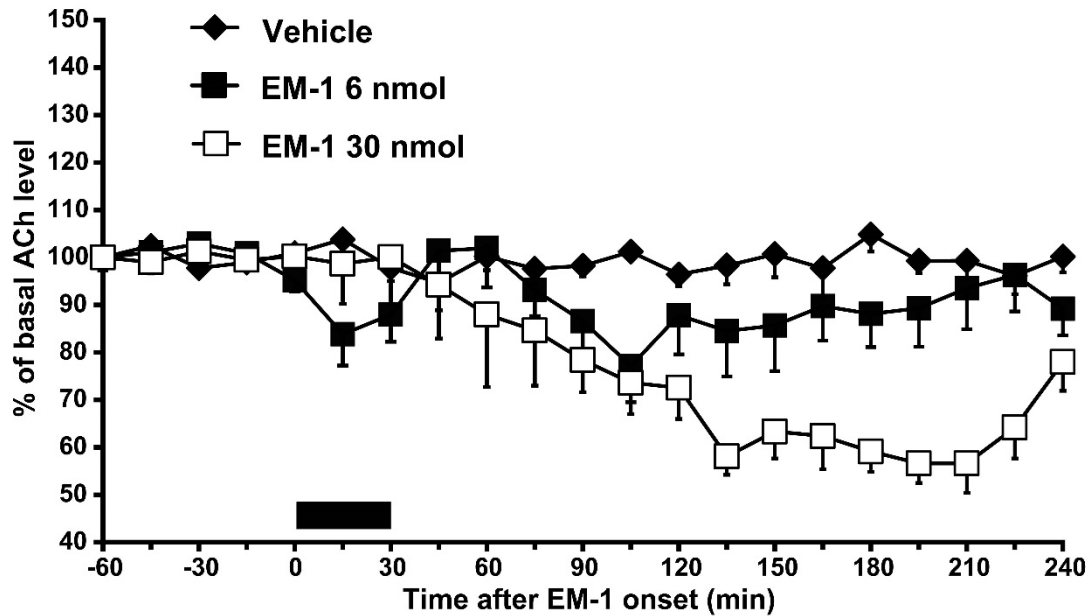


Fig. 4A. Effects of 30 min-infusion of vehicle ($n = 7$, closed diamonds) or endomorphin-1 (EM-1; 6 nmol; $n = 5$; closed squares, 30 nmol; $n = 7$, open squares) into the nucleus accumbens on basal extracellular efflux of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of endomorphin-1 infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of vehicle or endomorphin-1 (30 min).

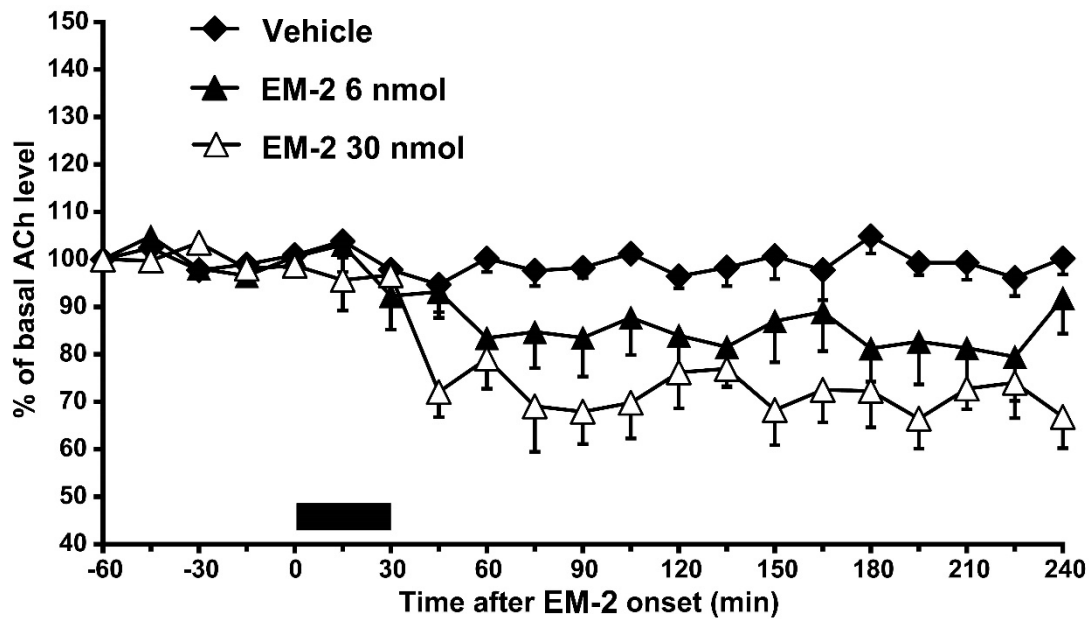


Fig. 4B. Effects of 30 min-infusions of vehicle ($n = 7$, closed diamonds) or endomorphin-2 (EM-2; 6 nmol; $n = 7$, closed triangles. 30 nmol; $n = 7$, open triangles) into the nucleus accumbens on basal extracellular efflux of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of endomorphin-2 infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of vehicle or endomorphin-2 (30 min).

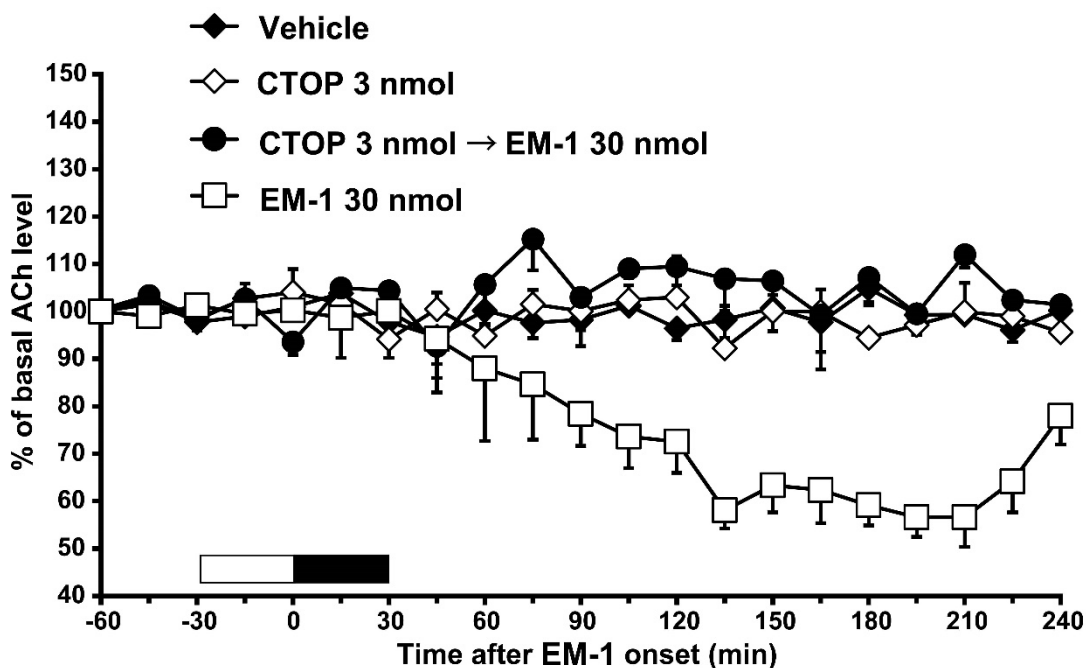


Fig. 4C. Effects of a 30 min-infusion of CTOP (3 nmol) on a 30 min-infusion of endomorphin-1 (EM-1; 30 nmol)-induced decrease in acetylcholine (ACh) level in the nucleus accumbens ($n = 5$, closed circles). Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-1 (30 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of CTOP perfusion that commenced 30 min before onset of endomorphin-1 infusion. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-1(30 min).

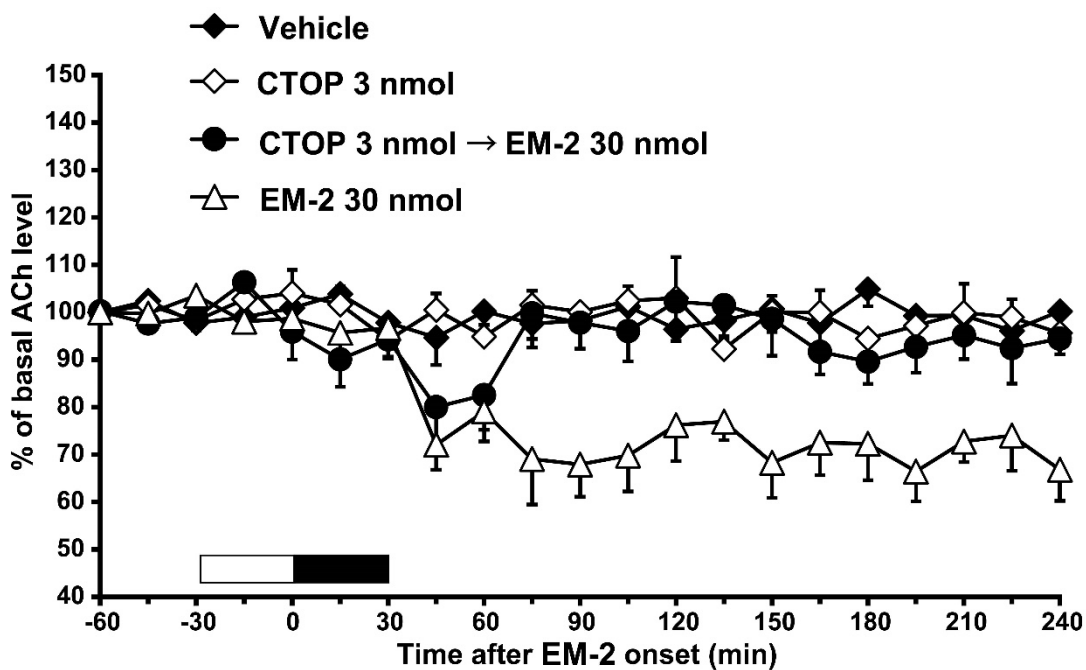


Fig. 4D. Effects of a 30 min-infusion of CTOP (3 nmol) on a 30 min-infusion of endomorphin-2 (EM-2; 30 nmol)-induced decrease in acetylcholine (ACh) level in the nucleus accumbens ($n = 6$, closed circles). Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-2 (30 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of CTOP perfusion that commenced 30 min before onset of endomorphin-2 infusion. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-2 (30 min).

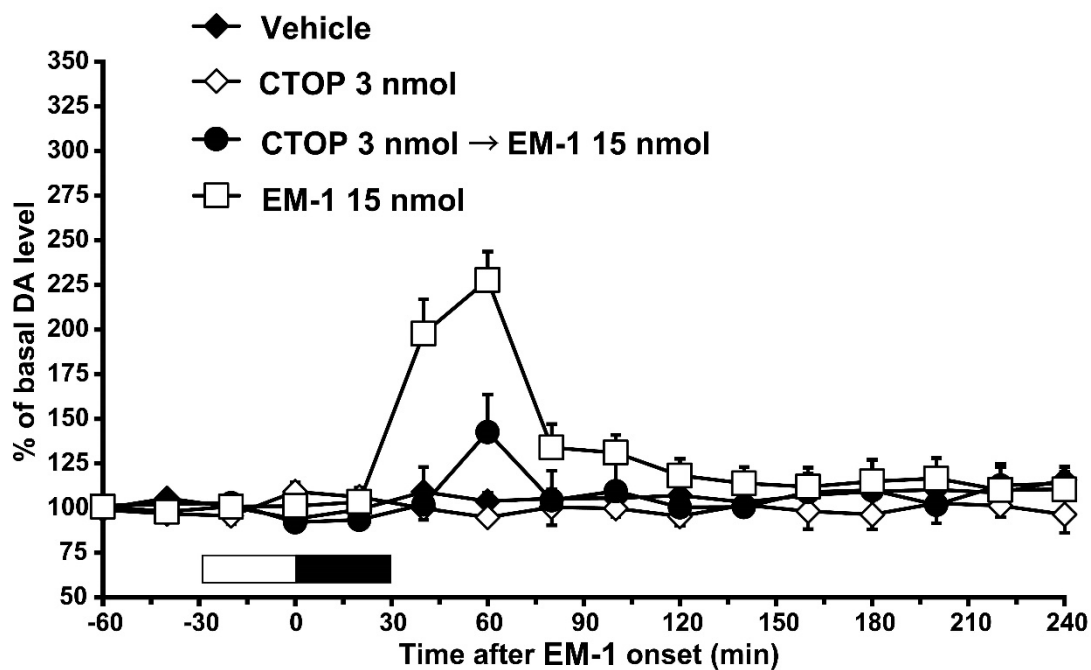


Fig. 5A. Effects of a 30 min-infusion of CTOP (3 nmol) on a 30 min-infusion of endomorphin-1 (EM-1; 15 nmol)-induced increase in dopamine (DA) level in the nucleus accumbens ($n = 5$, closed circles). Data are expressed as mean change in 20 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-1 (15 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of CTOP perfusion that commenced 30 min before onset of endomorphin-1 infusion. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-1 (30 min).

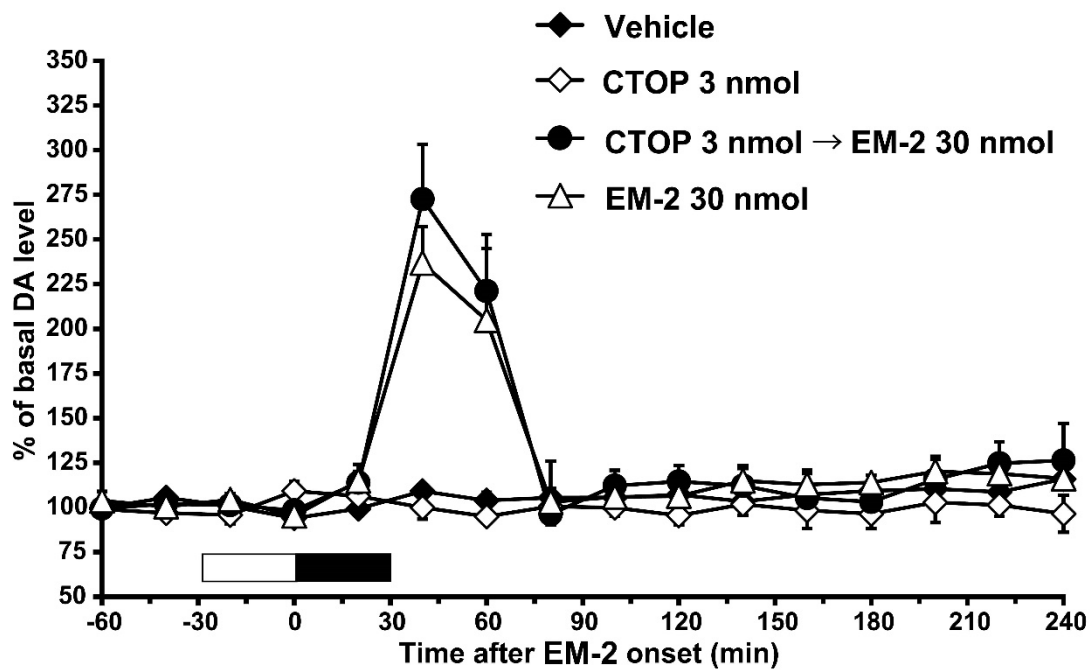


Fig. 5B. The 30 min-infusion of CTOP (3 nmol) failed to alter the 30 min-infusion of endomorphin-2 (EM-2; 30 nmol)-induced increase in dopamine (DA) level in the nucleus accumbens ($n = 5$, closed circles). Data are expressed as mean change in 20 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-2 (30 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of CTOP perfusion that commenced 30 min before onset of endomorphin-2 infusion. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-2 (30 min).

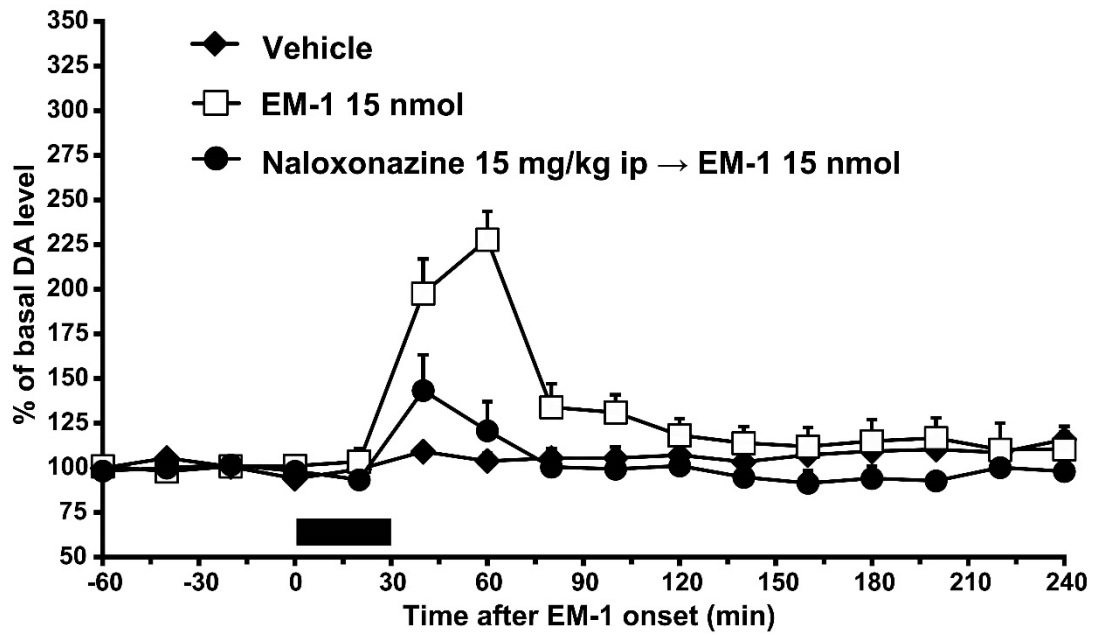


Fig. 6A. Effects of intraperitoneal administration of naloxonazine (15 mg/kg, 24 h before on set of EM-1 infusion) on a 30 min-infusion of endomorphin-1(EM-1; 15 nmol)-induced increase in dopamine (DA) level in the nucleus accumbens ($n = 6$; closed circles). Data are expressed as mean change in 20 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-1 (15 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-1 (30 min).

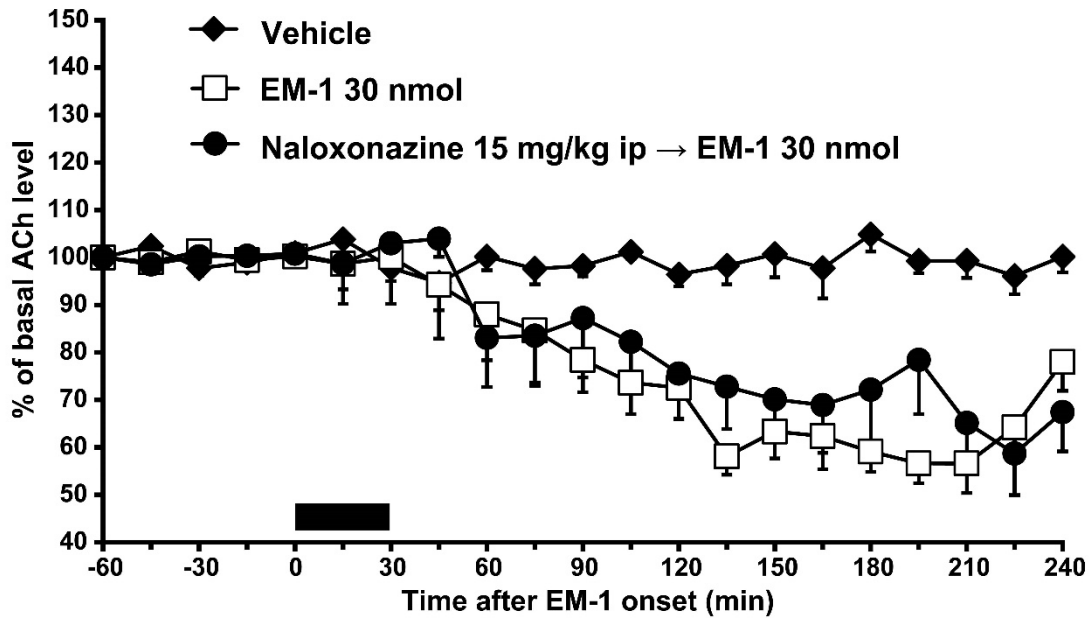


Fig. 6B. Intraperitoneal administration of naloxonazine (15 mg/kg, 24 h before onset of EM-1 infusion) failed to alter the 30 min-infusion of endomorphin-1 (EM-1; 30 nmol)-induced decrease in acetylcholine (ACh) level in the nucleus accumbens ($n = 6$, closed circles). Data are expressed as mean change in 20 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-1 (30 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-1 (30 min).

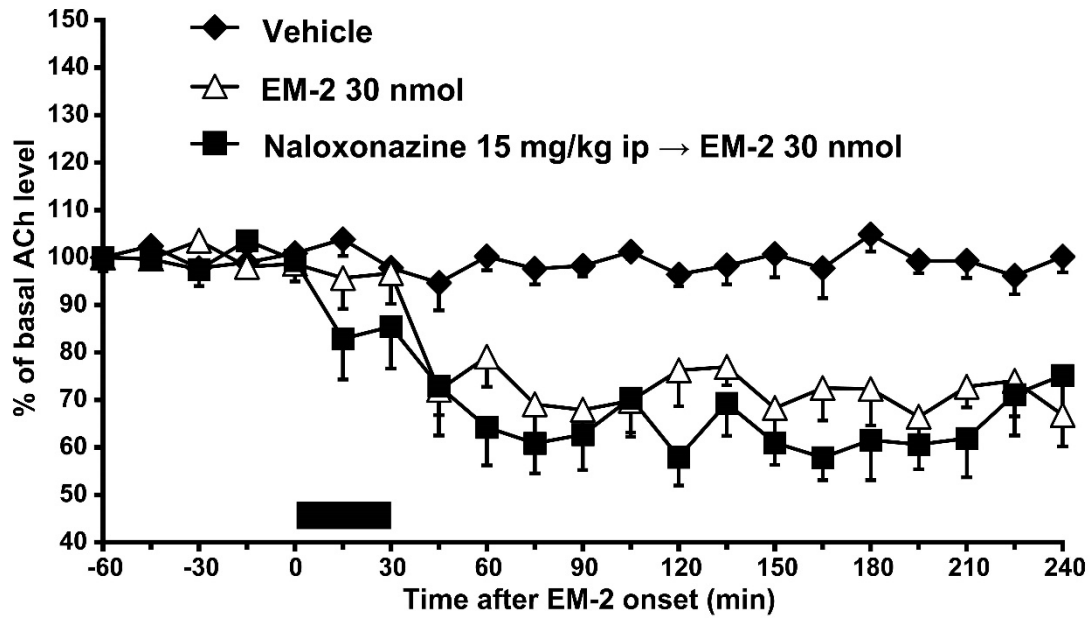


Fig. 6C. Intraperitoneal administration of naloxonazine (15 mg/kg, 24 h before onset of EM-2 infusion) failed to alter the 30 min-infusion of endomorphin-2 (EM-2; 30 nmol)-induced decrease in acetylcholine (ACh) level in the nucleus accumbens ($n = 7$, closed squares). Data are expressed as mean change in 20 min observation periods after onset of a 30 min-infusion of endomorphin-2 (30 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar indicates the period of infusion of endomorphin-2 (30 min).

考 察

In vivo 脳微小透析法実験によるアセチルコリン放出の測定では、細胞外アセチルコリンの酵素的不活性化を低下させる目的で cholinesterase 阻害薬を灌流液に添加する (Noori et al., 2012)。本研究では、灌流液に低濃度の physostigmine を添加した。これは physostigmine は neostigmine に比べ低濃度でも細胞外アセチルコリン濃度への効果が強いことが示唆されているからである (Noori et al., 2012)。本実験条件下で得られた側坐核のアセチルコリンの基礎的な量のうち、80%以上は tetrodotoxin 灌流投与で消失した (Di Chiara et al., 1996)。したがって本研究で検出した側坐核のアセチルコリンは、神経発火により放出されたものであることが示された。

δ_1 受容体アゴニストの DPDPE または δ_2 受容体アゴニストの deltorphin II の無麻酔非拘束ラットの側坐核への灌流投与は、同部位のアセチルコリン放出を減少させた。この DPDPE および deltorphin II が誘発したアセチルコリン放出の減少は、それぞれ δ_1 受容体アンタゴニストの BNTX または δ_2 受容体アンタゴニストの naltriben の併用投与により抑制されたため、これらアゴニストの効果は δ_1 , δ_2 受容体の活性化を介して発現したものと考えられた。これらの結果は側坐核の δ_1 , δ_2 受容体はそれぞれ同部位のアセチルコリン神経活動を抑制的に制御することを明らかに示している。この結果は、(1) 神経終末からのアセチルコリン放出を調節する δ 受容体が側坐核には分布しているとする組織化学的研究に基づく指摘 (Svingos et al., 1998), (2) δ 受容体アゴニストは、線条体の脳切片からのアセチルコリン放出には影響を与えないが (Lapchak et al., 1989), 側坐核の脳切片からのアセチルコリン放出は減少させるとの報告 (Heijna et al., 1990, 1992), さらに、(3) 神経終末からのアセチルコリン放出を抑制しうる δ 受容体を備えたコリン性介在神経が側坐核には分布しているとする電気生理学的研究に基づく指摘 (Britt and McGehee, 2008)

をそれぞれ支持するものであった。

本研究より、 μ 受容体の内因性アゴニスト候補物質である endomorphin-1 および endomorphin-2 (Zadina et al., 1997) の側坐核への投与はそれぞれ無麻酔非拘束ラットの側坐核のアセチルコリン放出を減少させることが明らかになった。これらの endomorphin 類の効果は選択的 μ 受容体アンタゴニストの CTOP の併用で打ち消された。これらの結果から側坐核へ局所灌流された endomorphin 類が μ 受容体刺激を介して同部位のコリン性神経活動を抑制することが明らかに示された。本研究の結果は、神経終末からのアセチルコリン放出を抑制しうる μ 受容体を備えたコリン性介在神経が側坐核には分布しているとする電気生理学的研究に基づく指摘 (Britt and McGehee, 2008) と一致するものである。また本研究の結果は、(1) μ 受容体アゴニストは、側坐核を含む脳切片からのアセチルコリン放出は減少させるとする神経薬理学的研究 (Heijna et al., 1990, 1992) および (2) μ 受容体を含む opioid 受容体サブタイプを非特異的に刺激するモルヒネの全身投与は、無麻酔非拘束ラットの側坐核のアセチルコリン遊離を減少させるとする *in vivo* 脳微小透析実験の結果 (Rada et al., 1991a, b) をそれぞれ支持するものであった。

興味深いことに DPDPE, endomorphin-1, endomorphin-2 は, deltorphin II よりも長時間にわたる側坐核のアセチルコリン量の減少を誘発した。これらの作用時間の違いが、細胞内の生化学的応答を含む opioid 受容体サブタイプの機能と、実験に使用した δ または μ 受容体アゴニストの効力のいずれか一方あるいは両方の違いにより起きたものかについては、さらなる検討が必要である。

Endomorphin-1 とは異なり endomorphin-2 の側坐核への投与は μ 受容体を含む opioid 受容体の刺激を介さない機構で同部位のドパミンを増加させることはすでに報告されている (Aono et al., 2008; Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2008)。すでに述べた通り、本研究結果から、側坐核へ投与された

endomorphin-1 と endomorphin-2 はいずれも同部位のアセチルコリンを μ 受容体刺激を介して減少させることが示された。*In vivo* 脳微小透析実験では、cholinesterase 阻害薬のひとつである neostigmine の灌流液の濃度は、ドパミン系薬物の線条体のアセチルコリン放出に対する効果に影響を与えることが知られている (Di Chiara et al., 1996)。本研究では低濃度の physostigmine を添加している灌流液を使用した。 μ 受容体アンタゴニストの CTOP の側坐核への灌流投与は、同部位の endomorphin-1 誘発ドパミン放出を抑制したものの、endomorphin-2 誘発ドパミン放出は抑制できなかった。これらの結果は、endomorphin-1 とは異なり endomorphin-2 の側坐核への投与は μ 受容体を含む opioid 受容体を介さない機構で同部位のドパミンを増加させるとする以前の報告 (Okutsu et al., 2006) をさらに支持するものであった。この endomorphin-2 の側坐核への局所投与は神経発火に依存した側坐核のドパミン放出を増やすが、同部位の opioid 受容体の刺激と GABA 神経の抑制は関与しない可能性が示されている (Aono et al., 2008; Saigusa et al., 2008)。Endomorphin-2 の局所投与がどのようにしてドパミン放出を促進するのかについて、詳細なメカニズムを解明するためにはさらなる研究が必要である。

μ 受容体は μ_1 受容体選択的アンタゴニストの naloxonazine への感受性に基つき μ_1 , μ_2 受容体に分類されている。以前の実験結果 (Okutsu et al., 2006) と同様に、naloxonazine は本実験条件下で側坐核への endomorphin-1 の灌流投与が誘発したドパミン放出を抑制できることが明らかとなった。これらの結果は、endomorphin-1 誘発側坐核ドパミン放出には側坐核の μ_1 受容体刺激が関与するとするこれまでの報告 (Okutsu et al., 2006) を支持するものである。本実験とこれまでの研究の結果 (Okutsu et al., 2006) は、側坐核では μ_2 ではなく μ_1 受容体が同部位のドパミン神経活動を促進的に制御することを示している。これに対して本研究では、endomorphin-1 と endomorphin-2 が誘発したアセチルコリン放出の減少はいずれも μ_1 受容体アンタゴニストの naloxonazine

の影響を受けなかった。これらの結果は endomorphin-1 と endomorphin-2 の側坐核への投与は μ_2 受容体刺激を介して同部位のアセチルコリンを減少させたことを示している。またこの結果は、側坐核では μ_1 ではなく μ_2 受容体が同部位のアセチルコリン神経活動を抑制的に制御することも示唆するものである。

本研究からは、側坐核において endomorphin-1 が誘発したドパミン放出の増加には μ_1 受容体、アセチルコリン放出の減少には μ_2 受容体が関与することが示された。これらの本研究結果は endomorphin-1 が μ_1 , μ_2 両受容体を刺激しうるとするこれまでの報告と一致するものであった。すなわち *in vitro* の条件下の研究から、endomorphin-1 が誘発した CHO 細胞におけるカルシウム応答 (Fichna et al., 2007), 脊髄標本での多シナプス性反射 (Tao et al., 2005), 結腸の運動 (Yu et al., 2007) にいずれも μ_1 受容体刺激が関与することが示されている。マウスを用いた *in vivo* の研究からも、endomorphin-1 が誘発した抗侵害作用 (Goldberg et al., 1998; Kamei et al., 2000) と抗アロディニア効果 (Huang et al., 2004), プレパルス抑制の改善 (Ukai and Okuda, 2003), 受動回避学習の阻害 (Ukai and Lin, 2002), スコポラミンが誘発した短期記憶の阻害の改善 (Ukai et al., 2001) はそれぞれ μ_1 受容体を介していることが示されている。また *in vitro* 実験から、endomorphin-1 の誘発した線条体ドパミン遊離 (Bagosi et al., 2009) および脊髄レベルでの抗侵害作用 (Jinsmaa et al., 2006) に μ_2 受容体が関与することが示されている。

本研究からは、endomorphin-2 が誘発した側坐核のアセチルコリン放出の減少には μ_2 受容体が関与することも示唆された。このことは、endomorphin-2 は μ_2 受容体刺激を介してマウスの鎮咳効果を誘発するという指摘 (Kamei et al., 2003) と一致するものであった。本研究結果とこれまでの報告 (Aono et al., 2008; Saigusa et al., 2008) を合わせると、側坐核のドパミン放出を抑制的に制御する同部位の GABA 神経上に発現している μ_1 受容体を endomorphin-1 が刺激したことが示唆された。また endomorphin-1 と endomorphin-2 は、側坐核の

アセチルコリン性神経上に発現するアセチルコリン放出を抑制的に制御する μ_2 受容体を刺激したことが示唆された。

興味深いことにラットの側坐核のアセチルコリン性介在神経の減少は、認知障害を誘発することが示されている (Laplante et al., 2011, 2012, 2013)。認知障害は opioid 鎮痛薬の副作用のひとつとしても知られているので、今後は記憶を含む認知機能への側坐核の δ および μ 受容体の関与に関して行動薬理学的解析を行なう必要があると考えられた。また、側坐核のドーパミン放出を促進する δ および μ 受容体サブタイプの間には密接な相互作用が存在することが示されている (Hirose et al., 2005)。側坐核のアセチルコリン放出を制御する δ および μ 受容体サブタイプの間にも同様の相互作用が存在するか更なる研究が必要である。

本研究から側坐核では δ_1 , δ_2 受容体のほか、 μ_1 ではなく μ_2 受容体がアセチルコリン神経を抑制的に制御することを示す神経化学的証拠が *in vivo* の条件で得られた。さらに本研究から μ_1 受容体は側坐核のドーパミン神経活動制御において促進的な役割を果たすのに対して、 μ_2 受容体は側坐核のアセチルコリン神経活動制御において抑制的な役割を果たすことが示唆された。

第 2 章

δ 受容体刺激が誘発した無麻酔非拘束ラットの側坐核のドパミン放出に対する muscimol の効果

緒 言

側坐核には、GABA 受容体が発現している有棘 GABA 神経細胞と無棘 GABA 神経細胞の 2 種類の GABA 含有細胞がある (Schwarzer et al., 2001)。このうち、有棘 GABA 神経細胞は出力神経であり (Chang and Kitai, 1985)、無棘 GABA 神経細胞は介在神経であることがそれぞれ示されている (Bolam et al., 1983; Kita and Kitai, 1988)。側坐核には GABA_A と GABA_B の 2 種類の GABA 受容体サブタイプが分布している (Matsumoto, 1989)。側坐核では GABA_A 受容体が発現している GABA 介在神経から放出された GABA が、ドパミン神経終末に局在する GABA_A 受容体を介してドパミン放出を抑制することが神経化学実験の結果から示唆されている (Aono et al., 2008)。

麻薬性鎮痛薬が示す精神依存の発現には、これらの薬物の opioid 受容体への刺激による中脳辺縁系ドパミン神経の賦活化が関与すると想定されている。このため、opioid 受容体を介した中脳辺縁系ドパミン神経の促進機構に焦点を当てた薬物依存発現のメカニズムに関する神経薬理的な研究が行われてきた。

側坐核には opioid 受容体サブタイプのひとつである μ 受容体が分布している。内因性 μ 受容体アゴニスト候補物質の endomorphin-1 (Zadina et al., 1997) を側坐核へ灌流投与すると、 μ 受容体の活性化により同部位のドパミン放出が増加することがこれまでの研究から示されてきた (Aono et al., 2008; Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2008)。ラットの側坐核において μ 受容体は、GABA

神経を含む神経細胞の細胞膜と神経終末に局在することが免疫組織学的研究から明らかにされている (Svingos et al., 1997)。また, opioid 受容体の活性化は中脳辺縁系ドパミン神経への GABA 神経の基礎的な抑制性の入力を低下させ, このドパミン神経の脱抑制を起こすことが電気生理学的研究から示されている (Gysling and Wang, 1983; Matthews and German, 1984)。さらに, ラットの側坐核の μ 受容体の活性化を介したドパミン放出の増加は, 同部位の GABA 介在神経の脱抑制により惹起されることが示唆されている (Aono et al., 2008; Saigusa et al., 2008)。実際に GABA_A 受容体アゴニストの muscimol は, μ 受容体と GABA_A 受容体を備えた側坐核のドパミン放出を抑制的に調節する GABA 介在神経を抑制することで側坐核への endomorphin-1 の灌流投与が誘発したドパミン放出を促進させる (Aono et al., 2008)。

側坐核には, μ 受容体のほかに δ 受容体も分布している (Svingos et al., 1997; Mansour et al., 1987; Gouarderes et al., 1993)。 δ 受容体は単一の遺伝子でエンコードされているが (Evans et al., 1992), 第 1 章に述べた通り薬理的には δ_1 , δ_2 受容体の少なくとも 2 種類に分類されており (Dietis et al., 2011), δ_1 , δ_2 受容体のアゴニストの側坐核への灌流投与はいずれも同部位のドパミン放出をそれぞれ促進させることが示されている (Fusa et al., 2005)。 δ 受容体は側坐核において抑制性の神経伝達を低下させることが免疫組織化学的研究の結果から示唆されている (Svingos et al., 1997)。このため側坐核の δ 受容体の活性化が誘発したドパミン放出の発現には, 同部位のドパミン放出を抑制的に調節する GABA_A 受容体への刺激の低下が関与した可能性が考えられる。つまり δ 受容体の活性化による GABA_A 受容体を介した側坐核のドパミン放出の抑制的な制御の低下は, 側坐核の GABA_A 受容体の刺激で抑制される可能性がある。しかしながら, この仮説を支持する神経薬理的な証拠がない。そこで本研究では, δ_1 および δ_2 受容体アゴニストが誘発した側坐核のドパミン放出に対する GABA_A 受容体アゴニストの muscimol の効果について *in vivo* 脳微小透析

法を用いて解析した。

はじめに δ_1 受容体アゴニストの DPDPE が誘発した側坐核のドパミン放出の促進作用の発現における同部位の δ_1 受容体の役割を、 δ_1 受容体アンタゴニストの併用実験により確認した。また DPDPE が誘発した側坐核のドパミン放出に対する効果の発現における μ 受容体の関与についてもこの受容体のアンタゴニストを用いて検討した。これは、側坐核への DPDPE の灌流投与は δ_1 受容体のみならず μ 受容体刺激も介して同部位のドパミン放出を促進させることが報告されているためである (Hirose et al., 2005)。つぎに δ_2 受容体アゴニストの deltorphin II が誘発した側坐核のドパミン放出促進作用の発現における同部位の δ_2 受容体の関与について δ_2 受容体アンタゴニストの併用実験を行って検討した。これは deltorphin II の側坐核への灌流投与は、naloxone に感受性を示す opioid 受容体の活性化を介さずにドパミン放出を促進することが指摘されているためである (Murakawa et al., 2004)。最後に DPDPE および deltorphin II が誘発した側坐核のドパミン放出の増加に対する $GABA_A$ 受容体アゴニストの muscimol の効果について検討した。さらに比較のため endomorphin-1 の灌流投与が誘発した側坐核のドパミン放出の増加に対する muscimol の効果についても検討を加えた。

材料および方法

動物

第 1 章と同じ条件で飼養した動物を用いた。

手術

全身麻酔に isoflurane (3%; 動物用イソフルラン, マイラン製薬株式会社) を用いた以外, 第 1 章の記載と同様に行った。

透析実験

透析実験はこれまでの研究で採用されてきた方法 (Aono et al., 2008; Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2001, 2008, 2012) に従って行った。

第 1 章と同じ透析プローブに接続したテフロンチューブは高速液体クロマトグラフシステム (HTEC-500; エイコム) につなぎ, 改良リンゲル液 (NaCl: 147 mM, KCl: 4 mM, CaCl₂: 1.2 mM, MgCl₂: 1.1 mM; pH 7.4) を流速 2.0 μl/min で透析プローブに灌流した。ドパミンは Eicompak PP-ODS II (粒子サイズ 2 μm, カラムサイズ 4.6 × 30 mm; エイコム) にて分離した。移動相には decanesulfonic acid (2.0 mM), EDTA (0.13 mM), 1% methanol を含有した pH 6.0 の 0.1 M リン酸緩衝液を用い, 流速を 0.5 ml/min とした。ドパミンの定量には, 設定加電圧を +400 mV (Ag vs AgCl) とした電気化学検出器を用いた。本システムのドパミン検出限界はシグナル:ノイズ比 2:1 で 0.02 pg/sample であった。灌流液は 5 分毎に回収し, ドパミンの定量を行った。薬物はすべてプローブ挿入後 20 時間以上経過してから, 脳微小透析プローブを介して脳内に直接灌流投与した。基礎ドパミン量は, 薬物投与直前 12 回に回収された灌流液中に含まれるドパミン量の平均とした。薬物の脳内局所灌流投与が誘発したドパミンの増加率の最大値 (%) を各薬物の効果の指標とした。

薬物

被験薬物として、第1章で採用した DPDPE, deltorphin II, BNTX, naltriben, CTOP, endomorphin-1 のほか muscimol (5-aminomethyl-3-hydroxyisoxazole; Sigma-Aldrich) を用いた。DPDPE, deltorphin II, BNTX, naltriben, muscimol および endomorphin-1 はいずれも改良リンゲル液に溶解した。Deltorphin II, DPDPE および endomorphin-1 は透析膜を介して 25 分に亘り灌流投与した。Muscimol は 25 分間, naltriben, BNTX は 50 分間灌流投与 (いずれも DPDPE, deltorphin II および endomorphin-1 の投与 25 分前に灌流開始) した。

被験薬物の投与量は, DPDPE および deltorphin II (Hirose et al., 2005), naltriben および BNTX (Hirose et al., 2005), CTOP (Okutsu et al., 2006; Yoshida et al., 1999), muscimol (Aono et al., 2008; Ferraro et al., 1996; Yan, 1999; Yoshida et al., 1997), endomorphin-1 (Okutsu et al., 2006) を用いた過去の報告に基づいて設定した。側坐核への灌流投与時間は被験薬物により異なり, 各薬物の投与量は灌流期間中に投与された薬物の総量 (nmol) で示した (DPDPE, 25 分間: 0.5-5 nmol/50 μ l; deltorphin II, 25 分間: 5-25 nmol/50 μ l; BNTX, 50 分間: 0.15 nmol/100 μ l; naltriben, 50 分間: 1.5 nmol/100 μ l; CTOP, 50 分間: 3 nmol/100 μ l; muscimol, 25 分間: 0.25 nmol/50 μ l; endomorphin-1, 50 分間: 25 nmol/100 μ l)。

透析プローブ挿入位置の組織学的確認

第1章の記載と同様に行った。

統計処理

データはすべて基礎ドパミン量に対する百分率で表した。各群間のドパミンの増加率の最大値の有意差の検定は, 一元配置分散分析法 (one-way ANOVA) を用いた後, post hoc 検定として Scheffé's test を必要に応じて行う

た。有意水準はいずれも $P < 0.05$ とした。

結 果

透析プローブ挿入位置の組織学的確認

組織学的検索の結果，側坐核における透析プローブの先端はいずれも両側耳間線から 10.0～10.9 mm の範囲に認められた。プローブが目的位置にあった 88 例の結果のみを解析した。

側坐核における細胞外への基礎ドパミン放出

側坐核から回収されたサンプル中の薬物処置前の基礎ドパミン量は， 0.6 ± 0.03 pg/5 min (mean \pm S.E.M; $n = 88$) であった。

DPDPE および deltorphin II による側坐核の細胞外へのドパミン放出促進効果

データは示していないが，基礎ドパミン量は測定期間中安定していた。側坐核に DPDPE を灌流投与 (0.5 または 5 nmol) することにより，側坐核ドパミン放出は用量依存的に有意に増大した (Fig. 7A; $F_{(2,16)} = 9.06$, $P < 0.005$)。Scheffé's test の結果，溶媒灌流群と高用量 (5 nmol) の DPDPE 投与群と，低用量 (0.5 nmol) の DPDPE 投与群と高用量 (5 nmol) の DPDPE 投与群の間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。側坐核に deltorphin II を灌流投与 (5 または 25 nmol) することにより，側坐核のドパミン放出は用量依存的に有意に増大した (Fig. 7B; $F_{(2,16)} = 23.8$, $P < 0.001$)。Scheffé's test の結果，溶媒灌流群と高用量 (25 nmol) の deltorphin II 投与群と，低用量 (5 nmol) の deltorphin II 投与群と高用量 (25 nmol) の deltorphin II 投与群の間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。

BNTX による DPDPE 誘発側坐核ドパミン放出の抑制効果

側坐核の基礎ドパミン放出に影響が認められない量 (0.15 nmol) の BNTX を併用投与することにより, DPDPE の灌流投与で誘発された側坐核のドパミン放出は抑制された (Fig. 8A; $F_{(3, 22)} = 7.80, P < 0.001$)。Scheffé's test の結果, DPDPE (5 nmol) 単独群と, BNTX (0.15 nmol) と DPDPE (5 nmol) 併用群との間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。データは示していないが, 側坐核の基礎ドパミン放出に影響が認められない量 (3 nmol: $n = 6$) の CTOP の併用投与は, DPDPE (5 nmol: $n = 7$) 誘発側坐核ドパミン放出には影響を与えなかった。

Naltriben による deltorphin II 誘発側坐核ドパミン放出の抑制効果

側坐核の基礎ドパミン放出に影響が認められない量 (1.5 nmol) の naltriben を併用投与することにより, deltorphin II の灌流投与で誘発された側坐核のドパミン放出は抑制された (Fig. 8B; $F_{(3, 23)} = 32.1, P < 0.001$)。Scheffé's test の結果, deltorphin II (25 nmol) 単独群と, naltriben (1.5 nmol) と deltorphin II (25 nmol) 併用群との間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。

Muscimol の DPDPE 誘発側坐核ドパミン放出促進に及ぼす効果

側坐核の基礎ドパミン放出に影響が認められない量 (0.25 nmol: $n = 6$) の muscimol の併用投与は, DPDPE (5 nmol: $n = 7$) 誘発側坐核ドパミン放出に影響を与えなかった (Fig. 9A)。

Muscimol による deltorphin II 誘発側坐核ドパミン放出の抑制効果

Deltorphin II (25 nmol) 誘発側坐核ドパミン放出は, 側坐核の基礎ドパミン放出に影響が認められない量 (0.25 nmol) の muscimol の併用投与により有意に抑制された (Fig. 9B; $F_{(3, 22)} = 35.4, P < 0.001$)。Scheffé's test の結果, deltorphin II (25 nmol) 単独群と, muscimol (0.25 nmol) と deltorphin II (25 nmol) 併用

群との間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。

Muscimol による endomorphin-1 誘発側坐核ドパミン放出の促進効果

側坐核に endomorphin-1 を灌流投与 (25 nmol) することにより、側坐核のドパミン放出は有意に増大した。Endomorphin-1 (25 nmol) 誘発側坐核ドパミン放出は、側坐核の基礎ドパミン放出に影響が認められない量の muscimol の併用投与 (0.25 nmol) により有意に促進された (Fig. 10; $F_{(3, 23)} = 6.33$, $P < 0.001$)。Scheffé's test の結果、endomorphin-1 単独群 (25 nmol) と、muscimol (0.25 nmol) と endomorphin-1 (25 nmol) 併用群の間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。

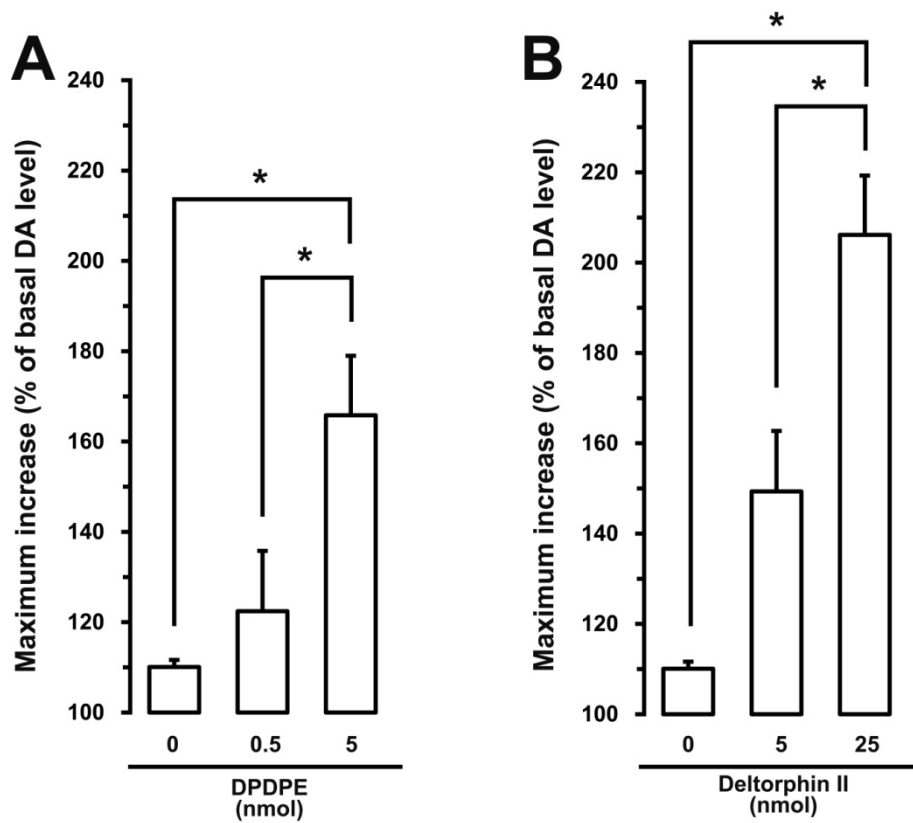


Fig. 7

A: DPDPE の灌流投与がドパミン (DA) 放出に及ぼす効果, B: Deltorphin II の灌流投与がドパミン (DA) 放出に及ぼす効果
 データは mean \pm S.E.M で示した (* $P < 0.05$)。

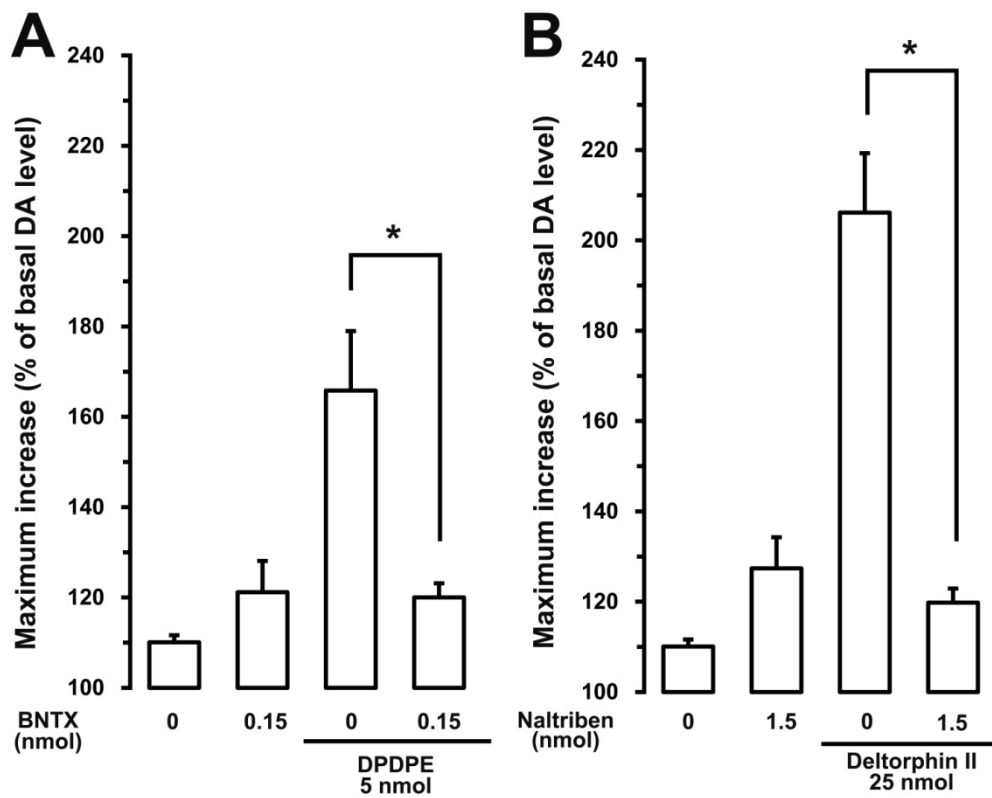


Fig. 8

A: DPDPE 誘発ドパミン (DA) 放出に BNTX が及ぼす効果, B: Deltorphin II 誘発ドパミン (DA) 放出に naltriben が及ぼす効果
 データは mean \pm S.E.M で示した (* $P < 0.05$)。

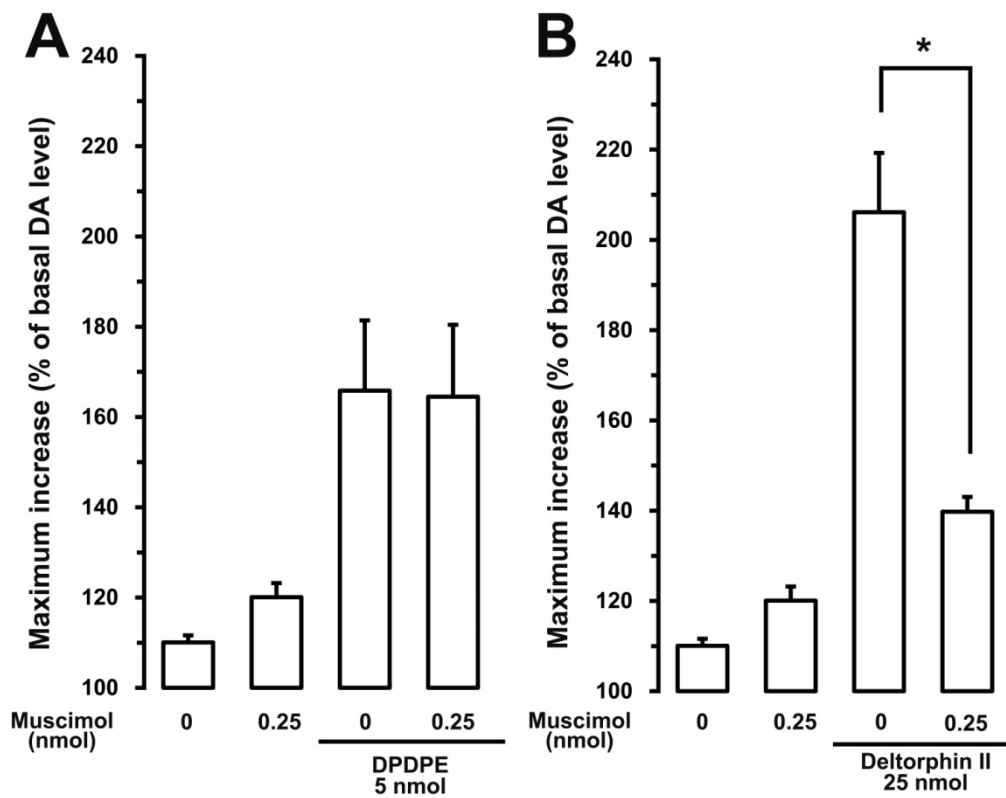


Fig. 9

A: DPDPE 誘発ドパミン (DA) 放出に muscimol が及ぼす効果, B: Deltorphin II

誘発ドパミン (DA) 放出に muscimol が及ぼす効果

データは mean \pm S.E.M で示した (* $P < 0.05$)。

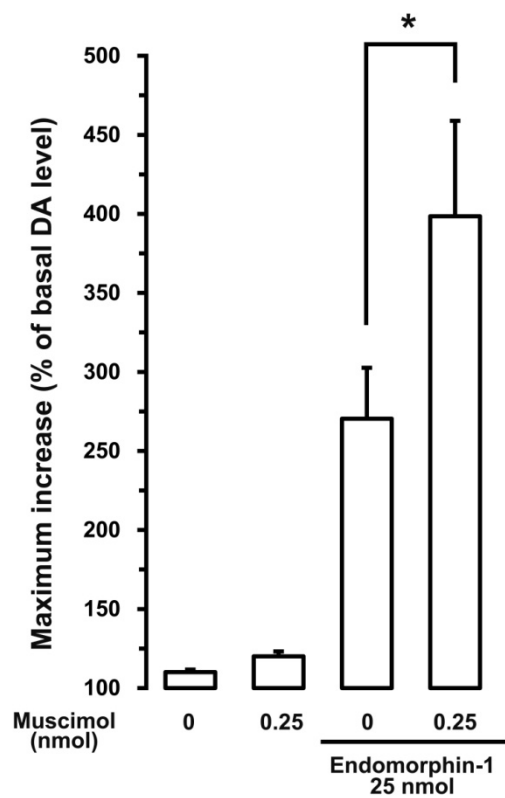


Fig. 10

Muscimol が endomorphin-1 誘発ドパミン (DA) 放出に及ぼす効果
 データは mean \pm S.E.M で示した (* $P < 0.05$)。

考 察

本研究と同様の実験条件下で側坐核から回収した透析試料中で検出された基礎的なドパミンは、その 70%以上が tetrodotoxin 感受性であった (Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2001)。したがって本研究で検出された側坐核の基礎的なドパミン放出は、神経発火に依存して細胞外へと放出されたものと考えられた (Di Chiara et al., 1996)。

麻薬性鎮痛薬が起こす精神依存には opioid 受容体の刺激による中脳辺縁系ドパミン神経の活性化が関与すると考えられている。このため opioid 受容体を介した中脳辺縁系ドパミン神経の促進機構の解明を目指した基礎研究が行われてきた。Opioid 受容体アゴニストは、GABA 神経の抑制によりドパミン神経を促進することが示唆されている。本研究では中脳辺縁系ドパミン神経の主たる投射領域の側坐核に分布する δ 受容体サブタイプに着目し、これらの受容体の選択的活性化が惹起した同部位のドパミン放出の促進メカニズムについて、GABA_A 受容体の関与の面から検討を行った。

これまでの研究から DPDPE 50 nmol の側坐核への灌流投与は δ_1 受容体刺激のみならず、 μ 受容体機能の賦活化も介してドパミン放出を促進することが知られている (Hirose et al., 2005)。本研究で DPDPE 5 nmol の側坐核への灌流投与が誘発したドパミン放出は δ_1 受容体アンタゴニストの BNTX で抑制されたが、 μ 受容体アンタゴニストの CTOP の影響は受けなかった。したがって、DPDPE 5 nmol の側坐核への灌流投与のドパミン放出に対する促進効果の発現には、 δ_1 受容体とは異なり μ 受容体は関与しないことが示された。一方、deltorphin II 50 nmol の側坐核への灌流投与は、naloxone 感受性 opioid 受容体の刺激は介さずにドパミン放出を促進する (Murakawa et al., 2004)。しかしながら、本研究における 25 nmol の deltorphin II のドパミン放出に対する効果は、 δ_2 受容体アンタゴニストの naltriben でほぼ消失した。したがってこの

deltorphan II の効果の発現には δ_2 受容体刺激が関与することが示された。これらの結果は、無麻酔非拘束ラットの側坐核への DPDPE 5 nmol または deltorphan II 25 nmol の灌流投与は、それぞれ同部位の δ_1 および δ_2 受容体の選択的活性化を介してドパミン放出を増加させたことを示している。

δ_1 受容体を介した側坐核のドパミン放出の発現には、同部位に分布する GABA 介在神経上とドパミン神経終末上のいずれか一方または両方に発現している GABA_A 受容体への入力低下は関与していないことが考えられた。これは本研究で muscimol は DPDPE 誘発ドパミン放出には影響を与えなかったためである。DPDPE には GABA_A 受容体の刺激により影響を受ける効果があることがこれまでの研究から示されている (Suh et al., 1995; Yajima et al., 2000)。これに対して本研究結果は、 δ_1 受容体アゴニストの KNT-127 の全身投与が誘発した側坐核のドパミン放出の増加に対して muscimol の側坐核への灌流投与は影響を与えないとする報告と一致するものであった (Tanahashi et al., 2012)。

本研究から側坐核の GABA_A 受容体刺激は、 δ_2 受容体を介した同部位のドパミン放出の増加を抑制することが示唆された。これは選択的 GABA_A 受容体アゴニストの muscimol が deltorphan II 誘発側坐核ドパミン放出を抑制したためである。また本研究結果は deltorphan II の示したドパミン放出の促進作用の発現には、側坐核の GABA_A 受容体への GABA 入力の減少が必要であることを示唆している。側坐核において、GABA_A 受容体は同部位のドパミン神経活動の制御において抑制的な役割を果たしており (Aono et al., 2008)、 δ 受容体は同部位の抑制性神経伝達を低下させることが免疫組織化学的研究から示唆されている (Svingos et al., 1998)。したがって deltorphan II は、側坐核で GABA 介在神経に発現している δ_2 受容体刺激により GABA のドパミン神経終末上に分布する GABA_A 受容体への刺激を低下させることで同部位のドパミン放出を促進させたことが考えられた。

δ_1 および δ_2 受容体リガンドは行動学的に正反対の効果を誘発することが知

られている (Mitchell et al., 2014)。たとえば δ_1 受容体とは異なり δ_2 受容体アゴニストは、側坐核のドパミン神経活動に依存した機構を介してラットの移所行動のひとつである旋回行動を誘発する (Matsuzaki et al., 2004)。 δ_1 受容体アゴニストはアルコール依存の治療薬として有望だが、 δ_2 受容体アゴニストはアルコール依存を促進する可能性がラットを用いた行動学研究から示唆されている (Mitchell et al., 2014)。これらに対して本研究は、側坐核に灌流投与した δ_1 および δ_2 受容体アゴニストはいずれも同部位のドパミン放出を促進したが、同部位の $GABA_A$ 受容体の役割が各アゴニストの誘発したドパミン放出において異なることを示している。すなわち本研究から、 δ_1 受容体とは異なり δ_2 受容体のアゴニストは側坐核の $GABA_A$ 受容体への GABA 刺激の低下を介した神経機構によりドパミン放出を増加させることが考えられた。

側坐核の μ 受容体の刺激は、同部位のドパミン放出を増加させることが示されてきた (Aono et al., 2008; Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2008)。これらの報告と同じく、本実験条件下でも endomorphin-1 は試料中のドパミン量を増大させた。興味深いことに本研究で deltorphin II が誘発したドパミン量の増加を抑制した側坐核への muscimol の灌流投与は、endomorphin-1 が誘発したドパミン量の増加を促進した。このことは、本研究と類似の実験条件で行った神経化学的研究の結果 (Aono et al., 2008) と一致した。つまり muscimol は、 δ_2 受容体を介したドパミン放出は抑制するが μ 受容体を介したドパミン放出は促進するという正反対の効果を示した。すでに緒言で述べた通り、側坐核において $GABA_A$ 受容体は、ドパミン神経とシナプス結合する GABA 介在神経上と、GABA 介在神経からの GABA 入力を受けるドパミン神経終末上に分布すると考えられる。 δ 受容体 (Svingos et al., 1998) および μ 受容体 (Svingos et al., 1997) は側坐核の GABA 介在神経の細胞体または神経終末上のいずれかまたは両方に発現する。本研究結果は、これらのことを支持するものである。すなわち、これまでの研究 (Aono et al., 2008) から示唆されているよう

に、(1) endomorphin-1 による側坐核の GABA 介在神経上の μ 受容体刺激によりドパミン神経終末上の GABA_A 受容体への GABA 入力は強く低下して一種の床効果が起きていたが、(2) このドパミン神経を抑制的に制御している GABA 介在神経上の GABA_A 受容体を muscimol は刺激することでドパミン神経の脱抑制を起こした。これに対して本研究では (1) deltorphin II による側坐核の GABA 介在神経上の δ_2 受容体刺激はドパミン神経終末上の GABA_A 受容体への GABA 入力を低下させるが、(2) このドパミン神経を抑制的に制御しているドパミン神経終末上の GABA_A 受容体を muscimol は刺激し、ドパミン神経に対する抑制を高めたことが考えられた。本研究で観察された muscimol の効果が GABA_A 受容体を介したものであることを確認するためには、選択的な GABA_A 受容体アンタゴニストの併用実験を行う必要がある (Rahman and McBride, 2002)。

本研究の結果から、側坐核の GABA 介在神経の細胞体と神経終末のいずれかまたは両方に発現している δ_1 ではなく δ_2 受容体の活性化により、この神経からの GABA 放出が減少することで、この GABA によるドパミン神経終末上の GABA_A 受容体を介した抑制が低下して側坐核のドパミン放出が促進される可能性が示された。

総 括

側坐核は中脳腹側被蓋野に起始核を有する中脳辺縁系ドパミン神経の主たる投射領域である。本研究では、側坐核のアセチルコリンおよびドパミン放出制御における同部位の δ および μ 受容体サブタイプの特異性について明らかにするためラットを用いて *in vivo* 脳微小透析法による検討を行った。すなわち、第 1 章では側坐核の基礎的な細胞外アセチルコリンおよびドパミン量に δ および μ 受容体系薬物が及ぼす効果を指標として、側坐核のアセチルコリンおよびドパミン放出制御における同部位に分布する δ および μ 受容体サブタイプの特異性について解析した。第 2 章では δ 受容体サブタイプのアゴニストが誘発した側坐核のドパミン放出促進に対する $GABA_A$ 受容体アゴニストの muscimol の効果を指標として、側坐核の δ 受容体サブタイプの特異的な活性化を介した同部位のドパミン神経活動亢進機構について $GABA_A$ 受容体への GABA 入力低下の特異性の面から検討した。

これらの研究から、側坐核では δ_1 , δ_2 受容体のほか、 μ_1 ではなく μ_2 受容体がアセチルコリン神経を抑制的に制御することを示す神経化学的な証拠が *in vivo* の条件下で得られた。また、 μ_1 受容体は側坐核のドパミン神経活動制御において促進的な役割を果たすことが示された。さらに、側坐核の GABA 介在神経に発現する δ_1 ではなく δ_2 受容体の活性化により、この神経からの GABA 放出が減少することでドパミン神経終末上の $GABA_A$ 受容体を介した抑制が低下して側坐核のドパミン放出が促進されることが示唆された。

本研究により、側坐核のアセチルコリンおよびドパミン神経活動に対して δ および μ 受容体サブタイプが果たす役割が明らかとなった。側坐核は麻薬性鎮痛薬の有害事象の認知機能障害や精神依存への関与が指摘されており、本研究の成果は、今後の疼痛治療における麻薬性鎮痛薬の安全な使用方法を解明するのに有用である。

謝 辞

本研究遂行にあたり，格別な御指導を賜りました清水武彦 教授，三枝 禎教授に謹んで心より感謝申し上げます。また，本研究に御協力を頂きました日本大学松戸歯学部小児歯科学講座の皆様には感謝いたします。

とりわけ，実験の遂行に直接御協力を頂いた，薬理学講座 青野悠里 先生，口腔外科学講座 渡邊由梨子 先生に深く感謝いたします。

最後に，大学院進学を可能にしてくれた家族に感謝します。

本研究の遂行にあたり，犠牲となった多くの動物の命に深く哀悼の意を表し，心より冥福を祈ります。

なお本研究の一部は，第 53 回日本小児歯科学会大会（平成 27 年 5 月 21-22 日，広島）および 25th Congress of the International Association of Paediatric Dentistry（平成 27 年 7 月 1-4 日，グラスゴー）において発表した。

引用文献

Aono, Y., Saigusa, T., Mizoguchi, N., Iwakami, T., Takada, K., Gionhaku, N., Oi, Y., Ueda, K., Koshikawa, N., Cools, A.R., 2008. Role of GABA_A receptors in the endomorphin-1-, but not endomorphin-2-, induced dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Eur. J. Pharmacol.* 580, 87–94.

Aono, Y., Saigusa, T., Taguchi, H., Uchida, T., Takada, K., Koshikawa, N., Cools, A.R., 2013. Synergistic, but not separate, stimulation of accumbal β_1 - and β_2 -adrenoceptors alters the accumbal dopamine efflux in freely moving rats. *Eur. J. Pharmacol.* 715, 363–369.

Aono, Y., Taguchi, H., Saigusa, T., Uchida, T., Takada, K., Takiguchi, H., Shirakawa, T., Shimizu, N., Koshikawa, N., Cools, A.R., 2015. Simultaneous activation of the α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} -adrenoceptor subtypes in the nucleus accumbens reduces accumbal dopamine efflux in freely moving rats. *Behav. Pharmacol.* 26, 73–80.

Bagosi, Z., Jaszberenyi, M., Telegdy, G., 2009. The effects of endomorphins on striatal [³H]GABA release induced by electrical stimulation: an in vitro superfusion study in rats. *Neurochem. Res.* 34, 905–908.

Benveniste, H., Hansen, A.J., Ottosen, N.S., 1989. Determination of brain interstitial concentrations by microdialysis. *J. Neurochem.* 52, 1741–1750.

Bolam, J.P., Clarke, D.J., Smith, A.D., Somogyi, P., 1983. A type of aspiny neuron

in the rat neostriatum accumulates [³H]gamma-aminobutyric acid: combination of Golgi-staining, autoradiography, and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* 213, 121–134.

Britt, J.P., McGehee, D.S., 2008. Presynaptic opioid and nicotinic receptor modulation of dopamine overflow in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 28, 1672–1681.

Chang, H.T., Kitai, S.T., 1985. Projection neurons of the nucleus accumbens: an intracellular labeling study. *Brain Res.* 347, 112–116.

Di Chiara, G., Tanda, G., Carboni, E., 1996. Estimation of in-vivo neurotransmitter release by brain microdialysis: the issue of validity. *Behav. Pharmacol.* 7, 640–657.

Dietis, N., Rowbotham, D.J., Lambert, D.G., 2011. Opioid receptor subtypes: fact or artifact? *Br. J. Anaesth.* 107, 8–18.

Evans, C.J., Keith, D.E., Morrison, H., Magendzo, K., Edwards, R.H., 1992. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258, 1952–1955.

Ferraro, L., Tanganelli, S., O'Connor, W.T., Antonelli, T., Rambert, F., Fuxe, K., 1996. The vigilance promoting drug modafinil increases dopamine release in the rat nucleus accumbens via the involvement of a local GABAergic mechanism. *Eur. J. Pharmacol.* 306, 33–39.

Fichna, J., Staniszewska, R., Poels, J., VandenBroeck, J., Janecka, A., 2007. μ -opioid

receptor ligands lack receptor subtype selectivity in the aequorin luminescence-based calcium assay. *Chem. Biol. Drug Des.* 70, 247–253.

Fusa, K., Takahashi, I., Watanabe, S., Aono, Y., Ikeda, H., Saigusa, T., Nagase, H., Suzuki, T., Koshikawa, N., Cools, A.R., 2005. The non-peptidic delta opioid receptor agonist TAN-67 enhances dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats via a mechanism that involves both glutamate and free radicals. *Neuroscience* 130, 745–755.

Goldberg, I.E., Rossi, G.C., Letchworth, S.R., Mathis, J.P., Ryan-Moro, J., Leventhal, L., Su, W., Emmel, D., Bolan, E.A., Pasternak, G.W., 1998. Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286, 1007–1013.

Gouarderes, C., Tellez, S., Tafani, J.A.M., Zajac, J-M., 1993. Quantitative autoradiographic mapping of delta-opioid receptors in the rat central nervous system using [¹²⁵I][D-Ala²]deltorphin-I. *Synapse* 13, 231–240.

Gysling, K., Wang, R.Y., 1983. Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain Res.* 277, 119–127.

Heijna, M.H., Padt, M., Hogenboom, F., Portoghese, P.S., Mulder, A.H., Schoffelmeer, A.N., 1990. Opioid receptor-mediated inhibition of dopamine and acetylcholine release from slices of rat nucleus accumbens, olfactory tubercle and frontal cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 181, 267–278.

Heijna, M.H., Hogenboom, F., Mulder, A.H., Schoffelmeer, A.N., 1992. Opioid receptor-mediated inhibition of ³H-dopamine and ¹⁴C-acetylcholine release from rat nucleus accumbens slices. A study on the possible involvement of K⁺ channels and adenylate cyclase. *Naunyn Schmiede. Arch. Pharmacol.* 345, 627–632.

Hirose, N., Murakawa, K., Takada, K., Oi, Y., Suzuki, T., Nagase, H., Cools, A.R., Koshikawa, N., 2005. Interactions among mu- and delta-opioid receptors, especially putative delta₁- and delta₂-opioid receptors, promote dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroscience* 135, 213–225.

Huang, E.Y., Chen, C.M., Tao, P.L., 2004. Supraspinal anti-allodynic and rewarding effects of endomorphins in rats. *Peptides* 25, 577–583.

Jinsmaa, Y., Marczak, E., Fujita, Y., Shiotani, K., Miyazaki, A., Li, T., Tsuda, Y., Ambo, A., Sasaki, Y., Bryant, S.D., Okada, Y., Lazarus, L.H., 2006. Potent in vivo antinociception and opioid receptor preference of the novel analogue [Dmt¹]endomorphin-1. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84, 252–258.

Kamei, J., Zushida, K., Ohsawa, M., Nagase, H., 2000. The antinociceptive effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 391, 91–96.

Kamei, J., Morita, K., Saitoh, A., Nagase, H., 2003. The antitussive effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 467, 219–222.

Kita, H., Kitai, S.T., 1988. Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat

neostriatum: their morphological types and populations. *Brain Res.* 447, 346–352.

Lapchak, P.A., Araujo, D.M., Collier, B., 1989. Regulation of endogenous acetylcholine release from mammalian brain slices by opiate receptors: hippocampus, striatum and cerebral cortex of guinea-pig and rat. *Neuroscience* 31, 313–325.

Laplante, F., Lappi, D.A., Sullivan, R.M., 2011. Cholinergic depletion in the nucleus accumbens: effects on amphetamine response and sensorimotor gating. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 501–509.

Laplante, F., Zhang, Z.W., Huppe-Gourgues, F., Dufresne, M.M., Vaucher, E., Sullivan, R.M., 2012. Cholinergic depletion in nucleus accumbens impairs mesocortical dopamine activation and cognitive function in rats. *Neuropharmacology* 63, 1075–1084.

Laplante, F., Dufresne, M.M., Ouboudinar, J., Ochoa-Sanchez, R., Sullivan, R.M., 2013. Reduction in cholinergic interneuron density in the nucleus accumbens attenuates local extracellular dopamine release in response to stress or amphetamine. *Synapse* 67, 21–29.

Lindfors, N., Amberg, G., Ungerstedt, U., 1989. Intracerebral microdialysis: I. Experimental studies of diffusion kinetics. *J. Pharmacol. Methods* 22, 141–156.

Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H., Watson, S.J., 1987. Autoradiographic differentiation of mu, delta and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J. Neurosci.* 7, 2445–2464.

Matsumoto, R.R., 1989. GABA receptors: are cellular differences reflected in function? *Brain Res. Rev.* 14, 203–225.

Matsuzaki, S., Ikeda, H., Akiyama, G., Sato, M., Moribe, S., Suzuki, T., Nagase, H., Cools, A.R., Koshikawa, N., 2004. Role of μ - and δ -opioid receptors in the nucleus accumbens in turning behaviour of rats. *Neuropharmacology* 46, 1089–1096.

Matthews, R.T., German, D.C., 1984. Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine. *Neuroscience* 11, 617–625.

Meredith, G.E., Blank, B., Groenewegen, H.J., 1989. The distribution and compartmental organization of the cholinergic neurons in nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience* 31, 327–345.

Mitchell, J.M., Margolis, E.B., Coker, A.R., Allen, D.C., Fields, H.L., 2014. Intra-VTA deltorphin, but not DPDPE, induces place preference in ethanol-drinking rats: distinct DOR-1 and DOR-2 mechanisms control ethanol consumption and reward. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 38, 195–203.

Murakawa, K., Hirose, N., Takada, K., Suzuki, T., Nagase, H., Cools, A.R., Koshikawa, N., 2004. Deltorphan II enhances extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens via opioid receptor-independent mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 491, 31–36.

Noori, H.R., Fliegel, S., Brand, I., Spanagel, R., 2012. The impact of acetylcholinesterase inhibitors on the extracellular acetylcholine concentrations in the adult rat brain: a meta-analysis. *Synapse* 66, 893–901.

Okutsu, H., Watanabe, S., Takahashi, I., Aono, Y., Saigusa, T., Koshikawa, N., Cools, A.R., 2006. Endomorphin-2 and endomorphin-1 promote the extracellular amount of accumbal dopamine via nonopioid and mu-opioid receptors, respectively. *Neuropsychopharmacology* 31, 375–383.

Pasternak, G.W., Wood, P.J., 1986. Multiple mu opiate receptors. *Life Sci.* 38, 1889–1898.

Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed. Academic Press, New York.

Piepponen, T.P., Ahtee, L., 1995. Effects of selective opioid receptor antagonists on morphine-induced changes in striatal and limbic dopamine metabolism. *Pharmacol. Toxicol.* 77, 204–208.

Rada, P., Mark, G.P., Pothos, E., Hoebel, B.G., 1991a. Systemic morphine simultaneously decreases extracellular acetylcholine and increases dopamine in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuropharmacology* 30, 1133–1136.

Rada, P., Pothos, E., Mark, G.P., Hoebel, B.G., 1991b. Microdialysis evidence that acetylcholine in the nucleus accumbens is involved in morphine withdrawal and its treatment with clonidine. *Brain Res.* 561, 354–356.

Rahman, S., McBride, W.J., 2002. Involvement of GABA and cholinergic receptors in the nucleus accumbens on feedback control of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area. *J. Neurochem.* 80, 646–654.

Saigusa, T., Koshikawa, N., Kitamura, M., Mizutani, K., Kobayashi, M., Cools, A.R., 1995. Dissimilarities between cholinergic and dopaminergic turning elicited by nucleus accumbens stimulation in freely moving rats. *Eur. J. Pharmacol.* 274, 213–220.

Saigusa, T., Fusa, K., Okutsu, H., Koshikawa, N., 2001. Monitoring of extracellular dopamine levels in the dorsal striatum and the nucleus accumbens with 5-minute on-line microdialysis in freely moving rats. *J. Oral Sci.* 43, 129–134.

Saigusa, T., Aono, Y., Mizoguchi, N., Iwakami, T., Takada, K., Oi, Y., Ueda, K., Koshikawa, N., Cools, A.R., 2008. Role of GABA_B receptors in the endomorphin-1-, but not endomorphin-2-, induced dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Eur. J. Pharmacol.* 581, 276–282.

Saigusa, T., Aono, Y., Sekino, R., Uchida, T., Takada, K., Oi, Y., Koshikawa, N., Cools, A.R., 2012a. *In vivo* neurochemical evidence that newly synthesised GABA activates GABA_B, but not GABA_A, receptors on dopaminergic nerve endings in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuropharmacology* 62, 907–913.

Saigusa, T., Aono, Y., Uchida, T., Takada, K., Verheij, M.M., Koshikawa, N., Cools, A.R., 2012b. The α_1 -, but not α_2 -, adrenoceptor in the nucleus accumbens plays an

inhibitory role upon the accumbal noradrenaline and dopamine efflux of freely moving rats. *Eur. J. Pharmacol.* 688, 35–41.

Schwarzer, C., Berresheim, U., Pirker, S., Wieselthaler, A., Fuchs, K., Sieghart, W., Sperk, G., 2001. Distribution of the major gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunits in the basal ganglia and associated limbic brain areas of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 433, 526–549.

Suh, H.W., Song, D.K., Kim, Y.H., Choi, Y.S., Yoo, J.S., Tseng, L.F., 1995. Differential modulation by muscimol and baclofen on antinociception induced by morphine, beta-endorphin, D-Pen2,5-enkephalin and U50,488H administered intracerebroventricularly in the mouse. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 352, 614–619.

Svingos, A.L., Moriwaki, A., Wang, J.B., Uhl, G.R., Pickel, V.M., 1997 mu-Opioid receptors are localized to extrasynaptic plasma membranes of GABAergic neurons and their targets in the rat nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 17, 2585–2594.

Svingos, A.L., Clarke, C.L., Pickel, V.M., 1998. Cellular sites for activation of δ -opioid receptors in the rat nucleus accumbens shell: relationship with Met⁵-enkephalin. *J. Neurosci.* 18, 1923–1933.

Svingos, A.L., Colago, E.E., Pickel, V.M., 2001. Vesicular acetylcholine transporter in the rat nucleus accumbens shell: subcellular distribution and association with mu-opioid receptors. *Synapse* 40, 184–192.

Tanahashi, S., Ueda, Y., Nakajima, A., Yamamura, S., Nagase, H., Okada, M., 2012. Novel δ 1-receptor agonist KNT-127 increases the release of dopamine and L-glutamate in the striatum, nucleus accumbens and median pre-frontal cortex. *Neuropharmacology* 62, 2057–2067.

Tao, P.L., Lai, Y.S., Chow, L.H., Huang, E.Y., 2005. Effects of morphine and endomorphins on the polysynaptic reflex in the isolated rat spinal cord. *Naunyn Schmiede. Arch. Pharmacol.* 371, 72–80.

Ukai, M., Lin, H.P., 2002. Involvement of μ_1 -opioid receptors and cholinergic neurotransmission in the endomorphins-induced impairment of passive avoidance learning in mice. *Behav. Brain Res.* 129, 197–201.

Ukai, M., Okuda, A., 2003. Endomorphin-1, an endogenous μ -opioid receptor agonist, improves apomorphine-induced impairment of prepulse inhibition in mice. *Peptides* 24, 741–744.

Ukai, M., Katoh, T., Mamiya, T., 2001. Endomorphin-1 improves scopolamine-induced impairment of short-term memory via μ_1 -opioid receptor in mice. *NeuroReport* 12, 3723–3727.

Yajima, Y., Narita, M., Takahashi-Nakano, Y., Misawa, M., Nagase, H., Mizoguchi, H., Tseng, L.F., Suzuki, T., 2000. Effects of differential modulation of mu-, delta and kappa-opioid systems on bicuculline-induced convulsions in the mouse. *Brain Res.* 862, 120–126.

Yan, Q. 1999. Focal bicuculline increases extracellular dopamine concentration in the nucleus accumbens of freely moving rats as measured by in vivo microdialysis. *Eur. J. Pharmacol.* 385, 7–13.

Yoshida, M., Yokoo, H., Nakahara, K., Tomita, M., Hamada, N., Ishikawa, M., Hatakeyama, J., Tanaka, M., Nagatsu, I., 1997. Local muscimol disinhibits mesolimbic dopaminergic activity as examined by brain microdialysis and Fos immunohistochemistry. *Brain Res.* 767, 356–360.

Yoshida, Y., Koide, S., Hirose, N., Takada, K., Tomiyama, K., Koshikawa, N., Cools, A.R., 1999. Fentanyl increases dopamine release in rat nucleus accumbens: involvement of mesolimbic mu- and delta-2-opioid receptors. *Neuroscience* 92, 1357–1365.

Yu, Y., Cui, Y., Wang, X., Lai, L.H., Wang, C.L., Fan, Y.Z., Liu, J., Wang, R., 2007. In vitro characterization of the effects of endomorphin 1 and 2, endogenous ligands for μ -opioid receptors, on mouse colonic motility. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1384–1393.

Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.J., Kastin, A.J., 1997. A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature* 386, 499–502.

参考論文

本論文は、主となる参考論文 "*In vivo* neurochemical evidence that delta1-, delta2- and mu2-opioid receptors, but not mu1-opioid receptors, inhibit acetylcholine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats, *European Journal of Pharmacology* 789. 402-410, 2016" および 副となる参考論文「 δ 受容体刺激が誘発した無麻酔非拘束ラットの側坐核のドーパミン放出に対する muscimol の効果」日大口腔科学, 掲載予定 をまとめたものである。