

側坐核の δ 受容体を介した **dopamine** 放出および
基礎 **acetylcholine** 放出において **GABA_B** 受容体が果たす役割

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

渡 邊 由 梨 子

(指導：小宮 正道教授，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	11
考察	20
第2章		
緒言	25
材料および方法	28
結果	32
考察	43
総括	47
引用文献	49
参考論文	61

概 要

側坐核は、中脳腹側被蓋野を起始核とする中脳辺縁系 dopamine 神経の主たる投射領域である。Opioid 受容体のひとつである δ 受容体には δ_1 , δ_2 の 2 種類の subtype が存在するが、側坐核の δ_1 または δ_2 受容体の選択的活性化は、いずれも同部位の dopamine 放出を促進することが知られている。これらの δ 受容体は、側坐核では GABA 介在神経に発現している。側坐核において GABA_B 受容体は dopamine 放出を抑制的に調節するので、 δ_1 または δ_2 受容体の刺激による側坐核の dopamine 放出促進の一因に GABA_B 受容体を介した抑制性神経伝達の低下が想定される。したがって、 δ_1 または δ_2 受容体 agonist による dopamine 放出の促進はいずれも GABA_B 受容体刺激で打ち消されることが考えられる。しかしながら、この仮説を支持する神経化学的な証拠はない。一方、側坐核において GABA_B 受容体は GABA_A 受容体と同様に acetylcholine 介在神経に発現している。側坐核の acetylcholine 神経と dopamine 神経は密接な機能的相互作用を示す可能性があるが、GABA_B 受容体の刺激が、同部位の dopamine 放出に及ぼす効果は不明である。

そこで第 1 章の研究では、 δ_1 および δ_2 受容体刺激を介した側坐核の dopamine 放出に対する GABA_B 受容体 agonist の baclofen の効果について、第 2 章の研究では、baclofen が側坐核の acetylcholine および dopamine 放出に及ぼす効果について、いずれも無麻酔非拘束ラットを用いた *in vivo* 脳微小透析法により検討した。第 2 章では、比較の目的で GABA_A 受容体 agonist の muscimol の効果も解析した。

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 dopamine および acetylcholine は、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より分離し定量した。第 2 章の研究では、基礎 acetylcholine

の検出のため灌流液に低濃度の physostigmine (50 nM) を添加した。使用した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。Physostigmine を除く薬物の投与量は、灌流期間中に投与された薬物の総量 (mol) で示した。

その結果、第 1 章の実験では、基礎 dopamine 量に影響を与えない用量の baclofen (2.5, 5.0 nmol) は、 δ_1 受容体 agonist の DPDPE (5.0 nmol) が誘発した dopamine 放出の増大を抑制した。また baclofen (2.5, 5.0 nmol) は、 δ_2 受容体 agonist の deltorphin II (25.0 nmol) が誘発した dopamine 放出の促進も抑制した。この baclofen (5.0 nmol) による DPDPE (5.0 nmol) または deltorphin II (25.0 nmol) が誘発した dopamine 放出に対する抑制効果は、基礎 dopamine 放出に影響を及ぼさない低用量の GABA_B 受容体 antagonist の 2-hydroxysaclofen (100.0 pmol) により打ち消された。第 2 章の実験では、GABA_A 受容体 agonist の muscimol (3.0, 30.0 pmol) は、側坐核の細胞外 acetylcholine 放出を用量依存的に抑制した。また、GABA_B 受容体 agonist の baclofen (30.0, 300.0 pmol) も側坐核の細胞外 acetylcholine 放出を用量依存的に低下させた。基礎 acetylcholine 量に目立った影響は及ぼさない用量の GABA_A 受容体 antagonist の bicuculline (60.0 pmol) は、muscimol (30.0 pmol) の誘発した基礎 acetylcholine 量の減少を打ち消した。基礎 acetylcholine 量に著しい影響がない用量の GABA_B 受容体 antagonist の 2-hydroxysaclofen (12.0 nmol) は、baclofen (300.0 pmol) による基礎 acetylcholine 量の低下を打ち消した。一方、基礎 acetylcholine 量を減少させた muscimol (30.0 pmol) および baclofen (300.0 pmol) は、基礎 dopamine 量には目立った影響を与えなかった。同様に、bicuculline (60.0 pmol) および 2-hydroxysaclofen (12.0 nmol) も、基礎 dopamine 量に影響を及ぼさなかった。

以上の第 1 章および第 2 章の実験結果から、 δ_1 または δ_2 受容体を介した側坐核の dopamine 放出の増大は、いずれも GABA_B 受容体刺激により抑制され

ることが示された。また、側坐核の GABA 介在神経の細胞体または神経終末のいずれかあるいは両方に発現している δ_1 および δ_2 受容体の活性化は GABA 放出を減少させ、dopamine 神経終末の GABA_B 受容体を介した抑制的制御を低下させることで dopamine 放出を促進することが示唆された。さらに、側坐核において GABA_A および GABA_B 受容体は acetylcholine 神経活動の調節において抑制的な役割を果たすことが示された。また、側坐核の acetylcholine 放出を減少させる条件での GABA_A または GABA_B 受容体刺激は、dopamine 放出には影響を与えないことが示された。

行動学実験から、側坐核の dopamine 神経活動の亢進は opioid に対する精神依存の発現に関与すると考えられているほか、側坐核の acetylcholine 神経活動の抑制は記憶を含む認知機能を低下させると想定されている。本研究は、opioid を用いた疼痛制御の安全性の向上につながる GABA_B 受容体の機能に関する基礎的な知見を提供するものである。

第 1 章

側坐核の GABA_B 受容体刺激は同部位の δ_1 および δ_2 受容体を介した dopamine 放出を抑制する

緒 言

側坐核と線条体には、それぞれ中脳腹側被蓋野と黒質を起始核とする中脳辺縁系および黒質線条体系 dopamine 神経が投射している。これらの領域には、GABA 受容体が発現した有棘および無棘の 2 種類の GABA 含有神経細胞が認められる (Schwarzer et al., 2001)。この GABA 神経細胞のうち、前者は出力神経 (Chang and Kitai, 1985)、後者は介在神経 (Bolam et al., 1983; Kita and Kitai, 1988) であるとされている。

脳内の多くの領域と同様に、側坐核には GABA 受容体 subtype の GABA_A と GABA_B 受容体が分布している (Matsumoto, 1989)。行動学的実験から側坐核の GABA_B 受容体は同部位の dopamine 神経活動の制御において抑制的な役割を果たすことが示唆されている。即ち、側坐核の dopamine 受容体の刺激により実験動物の移所行動は促進するが (Pijnenburg and van Rosum, 1973)、側坐核の GABA_B 受容体の刺激は移所運動の抑制を起こすことが示されている (Wong et al., 1991)。神経化学的実験からは、GABA_B 受容体は cocaine が誘発した側坐核の dopamine 放出を調節することが可能であるほか (Ashby et al., 1999)、側坐核の GABA_B 受容体の遮断は同部位の dopamine 放出を促進することが示されている (Rahman and McBride, 2002)。これらの神経薬理学的研究の結果は、側坐核の GABA 介在神経が GABA_B 受容体を介して抑制的な役割を果たすことを強く示唆している。

これまでの研究から、側坐核への GABA_B 受容体 antagonist の

2-hydroxysaclofen の灌流投与は同部位の dopamine 放出を促進するが、GABA_B 受容体 agonist の baclofen は側坐核の dopamine 放出に影響を与えないことが示されている (Saigusa et al., 2008)。側坐核の基礎的な dopamine 量には影響を及ぼさない低用量の baclofen は 2-hydroxysaclofen が誘発した側坐核の dopamine 放出の促進を抑制したので、この 2-hydroxysaclofen の効果は GABA_B 受容体を介したものと考えられる。これらの結果は、中脳辺縁系 dopamine 神経系の神経終末上の GABA_B 受容体の遮断はこの神経に対する抑制的な制御を低下させることで側坐核の dopamine 放出を促進することを裏付けるものである。さらに、側坐核には有効に機能しうる GABA_B 受容体が分布していることと、GABA_B 受容体 antagonist は効果を示したことを考え合わせると、GABA_B 受容体 agonist が無効であったのは GABA 性のトーンズが高いことを反映していると推察される。

側坐核には opioid 受容体 subtype のひとつである δ 受容体が分布していることが知られている (Mansour et al., 1987; Gouarderes et al., 1993; Svingos et al., 1998)。 δ 受容体は単一遺伝子によりエンコードされるが (Evans et al., 1992)、薬理的に分類可能な δ_1 , δ_2 の 2 種類の受容体 subtype が存在することが知られている (Dietis et al., 2011)。 δ_1 受容体 agonist の DPDPE と δ_2 受容体 agonist の deltorphin II の側坐核への灌流投与は、いずれも同部位の dopamine 放出を促進することがすでに報告されている (Aono et al., 2017; Fusa et al., 2005)。これらの δ 受容体 agonist の効果は δ_1 受容体 antagonist の BNTX または δ_2 受容体 antagonist の naltriben により打ち消されたことから、 δ_1 および δ_2 受容体の選択的な刺激を介したものと考えられる (Aono et al., 2017)。

ラットを用いた免疫組織学的研究から側坐核の δ 受容体は、GABA を含有している神経細胞および神経終末の細胞膜上に発現していることが示されている (Svingos et al., 1998)。この δ 受容体の局在の特徴から、これらの受容体は前シナプス受容体として機能することが示唆されている (Svingos et al.,

1998)。 δ_1 受容体 agonist の DPDPE と δ_2 受容体 agonist の deltorphin II が誘発した側坐核の dopamine 放出の発現において $GABA_A$ 受容体が果たす役割に関するこれまでの研究から、 $GABA$ 介在神経の細胞体または神経終末のどちらか一方または両方に発現している δ_1 ではなく δ_2 受容体の刺激により $GABA$ 放出が減少し、dopamine 神経終末上に対する $GABA_A$ 受容体を介した抑制性制御が低下して dopamine 放出が促進することが示唆されている (Aono et al., 2017)。本研究は、この神経伝達の過程において $GABA_B$ 受容体が果たす役割に焦点を当てた。

免疫組織化学的分析から側坐核において δ 受容体は同部位の抑制性神経伝達を低下させる可能性が示されている (Svingos et al., 1998)。 $GABA_B$ 受容体は dopamine 放出を抑制する働きがあるので、 δ 受容体刺激を介した側坐核の dopamine 放出の一因に $GABA_B$ 受容体刺激の低下が考えられる。したがって、 δ 受容体の活性化による dopamine 放出は $GABA_B$ 受容体刺激により抑制されることが考えられる。しかしながら、神経薬理学の面からこの仮説を支持する直接的証拠はなかった。このため本研究では、無麻酔非拘束ラットを用いた *in vivo* 脳微小透析法により、 δ_1 および δ_2 受容体 agonist が誘発した側坐核の dopamine 放出に対する $GABA_B$ 受容体 agonist の効果について検討した。

本研究では、はじめに DPDPE または deltorphin II が誘発した側坐核の dopamine 放出に対する $GABA_B$ 受容体 agonist の baclofen の効果の用量依存性について解析した。つぎに $GABA_B$ 受容体 antagonist の 2-hydroxysaclofen を用い、baclofen の側坐核の dopamine 放出に対する効果の受容体特異性を検討した。本研究ではこれらの $GABA_B$ 受容体 ligand は、これまでの報告 (Saigusa et al., 2008, 2012) に基づき、基礎的な細胞外 dopamine 量には影響を与えないものの側坐核の $GABA_B$ 受容体特異的な効果は誘発できる低用量を採用した。

材料および方法

動物

実験開始時の体重が 200～220 g (6 週齢) 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 isoflurane (3%) で全身麻酔を施し, 脳定位固定装置に装着した。通法 (Aono et al., 2013, 2015, 2017; Saigusa et al., 2012) 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

これまでの報告 (Aono et al., 2017; Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2001, 2008, 2012) と同様の方法で下記の通り透析実験を行った。

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) を透析実験に用いた。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) 内に收容し, 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。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 で透析プローブへ灌流し, 高速液体クロマトグラフシステム (HTEC-500; エイコム) にテフロンチューブを接続した。

Dopamine は PP-ODS column (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 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を用い, 流速を 0.5 ml/min とした。Dopamine の分離に用いたカラムは 25°C に設定した恒温槽に收容して使用した。Dopamine 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 dopamine の検出限界はシグナル:ノイズ比 2:1 でおよそ 0.02 pg/sample であった。透析プローブの *in vitro* の条件下での上述の amine 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 amine 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 dopamine 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 dopamine 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 (Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2001, 2012)。

試料の灌流液は 5 分毎に回収し、dopamine 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、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 dopamine 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 dopamine 量の平均とした。

薬物

被験薬物として、DPDPE (D-[Pen2,5]-enkephalin hydrate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), deltorphin II ([D-Ala2]-deltorphin II, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), baclofen (R(+)-baclofen hydrochloride; R(+)- β -(aminomethyl)-4-chlorobenzenepropanoic acid hydrochloride; Sigma-Aldrich, MO, USA), 2-hydroxysaclofen (2-hydroxysaclofen; 3-amino-2-(4-chlorophenyl)-2-hydroxypropanesulfonic acid, Sigma-Aldrich, MO, USA) を用いた。DPDPE, deltorphin II, baclofen, 2-hydroxysaclofen はいずれも改良リンゲル液に溶解した。これらの薬物のうち、DPDPE, deltorphin II, baclofen は 25 分間、2-hydroxysaclofen は 50 分間に亘り、いずれも微小透析膜を介して側坐核へ灌流投与した。ただし、DPDPE または deltorphin II の投与開始の 25 分前に baclofen, 50 分前に 2-hydroxysaclofen の灌流投与を開始した。被験薬物の投与量は、DPDPE と deltorphin II (Aono et al., 2017; Hirose et al., 2005), baclofen (Klitenick et al., 1992; Santiago and Westerink 1992; Saigusa et al., 2012; Smolders et al., 1995), 2-hydroxysaclofen (Saigusa et al., 2012; Santiago and Westerink 1992) を用いた過去の報告に基づいて設定した。

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（pmol または nmol）で示した（DPDPE, 25 分間: 5.0 nmol/50 μ l; deltorphin II, 25 分間: 25.0 nmol/50 μ l; baclofen, 25 分間: 2.5–5.0 nmol/50 μ l; 2-hydroxysaclofen, 50 分間: 100.0 pmol/100 μ l）。

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.）による深麻酔を行ない 10%ホルマリン液を経心臓灌流した。脳を摘出して厚さ 50 μ m 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、基礎値を決定した。経時的なデータの比較では処置（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，側坐核において透析プローブはいずれも A10.60（耳間線から前方 10.60 mm の断面）を通過しており，その先端は耳間線から前方 10.00～10.95 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かった。本研究で使用した 110 例のラットのうち，プローブの位置が目的の範囲外にあったものは 15 例であった。プローブが目的位置にあった 95 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 dopamine 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 dopamine 量は， 0.52 ± 0.04 pg（ $= 0.34 \pm 0.02$ nM）/5 min であった（mean \pm S.E.M.; $n = 95$ ）。

Baclofen による DPDPE 誘発側坐核 dopamine 放出の抑制効果

測定期間中，側坐核から得られた基礎 dopamine 量は安定していた（Fig. 2）。低用量の baclofen の 25 分間の灌流投与（2.5, 5.0 nmol）は基礎的な側坐核の dopamine 量に影響を及ぼさなかった（Fig. 2）。側坐核へ DPDPE（5.0 nmol）を 25 分間灌流投与したところ，同部位の細胞外 dopamine 放出は灌流後 25 から 55 分にかけて増加した[Fig. 2; two-way ANOVA, treatment \times time interaction: $F_{(6, 63)} = 2.61, P < 0.05$]。側坐核へ baclofen（2.5, 5.0 nmol）を 25 分間灌流投与したところ，DPDPE（5.0 nmol）が誘発した同部位の細胞外 dopamine 放出の増大は 60 分にわたり用量依存的に抑制された[Fig. 2; two-way ANOVA, interaction: $F_{(30, 189)} = 1.60, P < 0.05$]。Scheffé's test の結果，2.5 または 5.0 nmol baclofen と 5.0 nmol DPDPE の併用投与群と 5.0 nmol DPDPE の単独投与群の

間にそれぞれ有意差が認められた (2.5 nmol baclofen: $P < 0.05$; 5.0 nmol baclofen: $P < 0.05$)。

Baclofen による deltorphin II 誘発側坐核 dopamine 放出の抑制効果

側坐核へ deltorphin II (25.0 nmol) を 25 分間灌流投与したところ、同部位の細胞外 dopamine 放出は灌流後 5 から 70 分にかけて増加した[Fig. 3; two-way ANOVA, interaction: $F_{(13, 161)} = 4.34, P < 0.001$]。側坐核へ baclofen (2.5, 5.0 nmol) を 25 分間灌流投与したところ、deltorphin II (25.0 nmol) が誘発した同部位の細胞外 dopamine 放出の増大は 60 分にわたり用量依存的に抑制された[Fig. 3; two-way ANOVA, interaction: $F_{(65, 447)} = 3.17, P < 0.001$]。Scheffé's test の結果、2.5 nmol baclofen と 25.0 nmol deltorphin II の併用投与群と 25.0 nmol deltorphin II の単独投与群の間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。また、5.0 nmol baclofen と 25.0 nmol deltorphin II の併用投与群と 25.0 nmol deltorphin II の単独投与群の間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。さらに、2.5 nmol baclofen と 25.0 nmol deltorphin II の併用投与群と 5.0 nmol baclofen と 25.0 nmol deltorphin II の併用投与群の間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。

Baclofen による DPDPE 誘発側坐核 dopamine 放出の抑制効果を 2-hydroxysaclofen は打ち消す

2-hydroxysaclofen の 50 分間の灌流投与 (100.0 pmol) は、基礎的な側坐核の dopamine 量に影響を及ぼさなかったが、baclofen (5.0 nmol) による DPDPE (5.0 nmol) 誘発側坐核 dopamine 放出の抑制効果をは打ち消した[Fig. 4; two-way ANOVA, interaction: $F_{(30, 186)} = 1.81, P < 0.001$]。Scheffé's test の結果、50 分間の 2-hydroxysaclofen の灌流投与 (100.0 pmol) は、DPDPE (5.0 nmol) の基礎 dopamine 放出に対する効果には統計学的に有意な影響を及ぼしていなかった。また、2-hydroxysaclofen, baclofen, DPDPE の併用投与群と baclofen

と DPDPE の併用投与群の間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。

Deltorphan II 誘発側坐核 dopamine 放出の baclofen による抑制効果を 2-hydroxysaclofen は打ち消す

基礎的な側坐核の dopamine 量に影響を及ぼさない用量の 2-hydroxysaclofen の 50 分間の灌流投与 (100.0 pmol) は, baclofen (5.0 nmol) による deltorphan II (25.0 nmol) 誘発側坐核 dopamine 放出の抑制効果を打ち消した [Fig. 5; two-way ANOVA, interaction: $F_{(65, 412)} = 3.14, P < 0.001$]. Scheffé's test の結果, 50 分間の 2-hydroxysaclofen の灌流投与 (100.0 pmol) は, deltorphan II (25.0 nmol) の基礎 dopamine 放出に対する効果には統計学的に有意な影響は及ぼさなかった。また, 2-hydroxysaclofen, baclofen, deltorphan II の併用投与群と baclofen と DPDPE の併用投与群の間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。

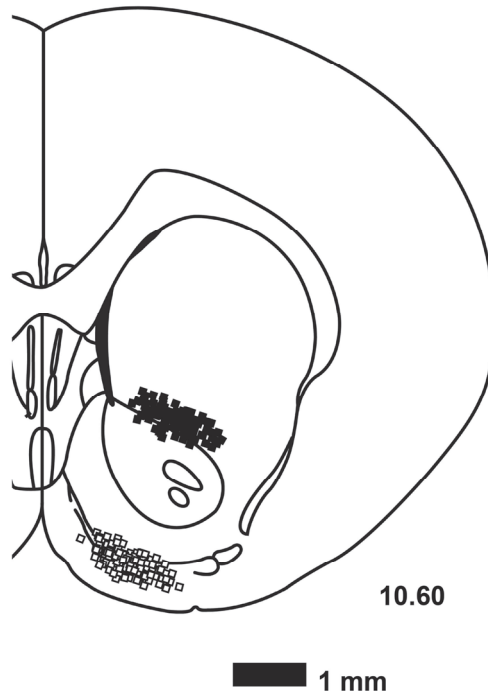


Fig. 1. Schematic illustration showing locations of the beginning (closed squares) and tip (open squares) of the membrane of microdialysis probes in the nucleus accumbens for all 95 successfully placed probes. The plane is taken from the atlas of Paxinos and Watson (1998) and the approximate coordinate indicated is mm anterior to the interaural line.

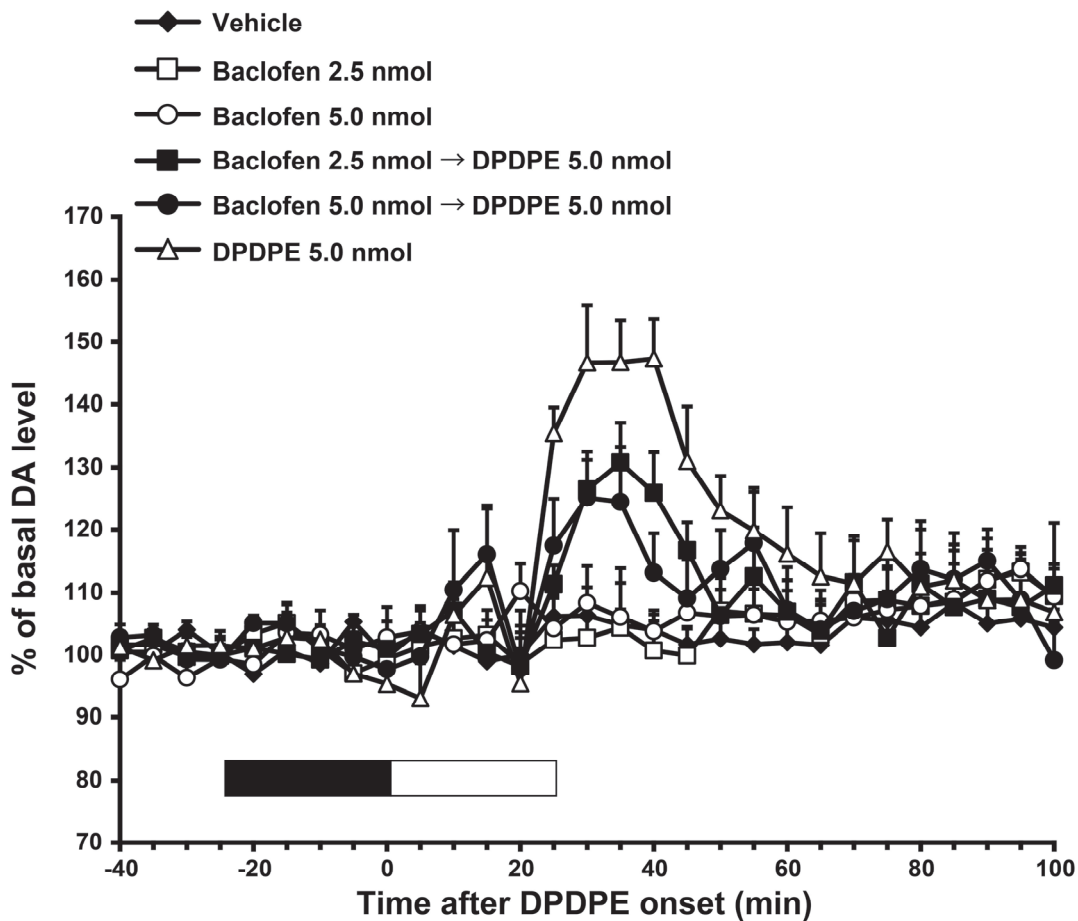


Fig. 2. Effects of 25 min-infusions of vehicle ($n = 7$, closed diamonds), baclofen (2.5 nmol, $n = 7$, open squares; 5.0 nmol, $n = 6$, open circles) and DPDPE (5.0 nmol, $n = 6$, open triangles) on basal extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens. Inhibitory effects of baclofen (2.5 and 5.0 nmol) on the DPDPE-induced increase in dopamine (DA) level in the nucleus accumbens (2.5 nmol, $n = 5$, closed squares; 5.0 nmol, $n = 7$, closed circles). Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after onset of a 25-min infusion of DPDPE (5.0 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of baclofen (25 min). The open bar above the abscissa indicates the period of DPDPE perfusion (25 min).

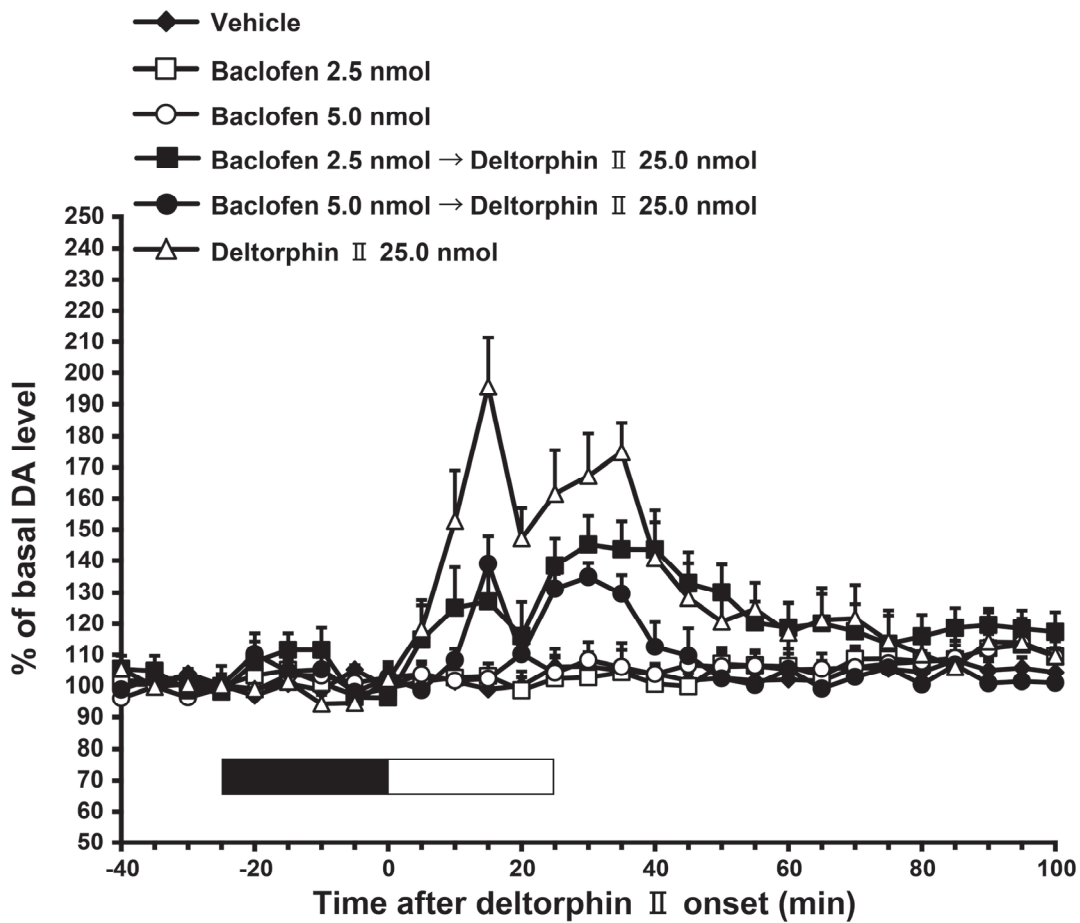


Fig. 3. Effects of 25 min-infusions of vehicle ($n = 7$, closed diamonds), baclofen (2.5 nmol, $n = 7$, open squares; 5.0 nmol, $n = 6$, open circles) and deltorphin II (25.0 nmol, $n = 8$, open triangles) on basal extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens. Inhibitory effects of baclofen (2.5 and 5.0 nmol) on the deltorphin II-induced increase in dopamine (DA) level in the nucleus accumbens (2.5 nmol, $n = 7$, closed squares; 5.0 nmol, $n = 6$, closed circles). Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after onset of a 25-min infusion of deltorphin II (25.0 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of baclofen (25 min). The open bar above the abscissa indicates the period of deltorphin II perfusion (25 min).

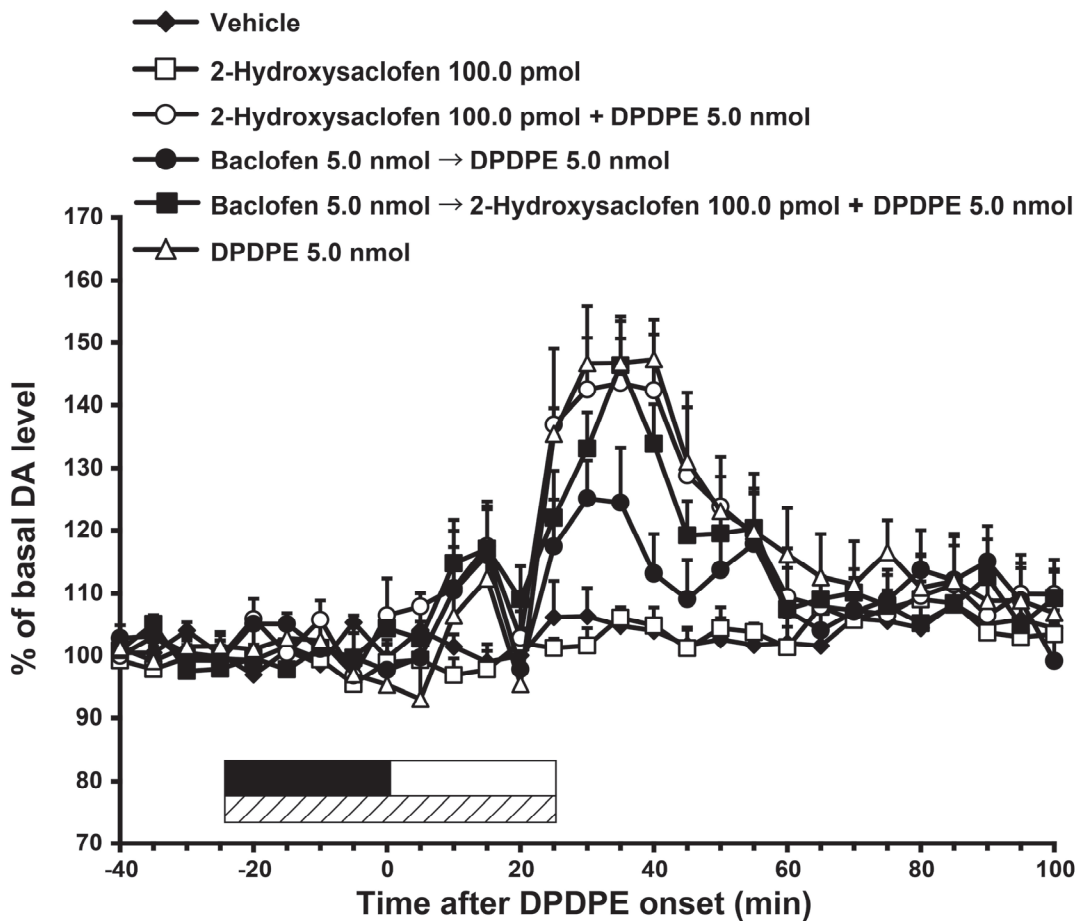


Fig. 4. Effects of a 50-min infusion of 2-hydroxysaclofen (100.0 pmol, $n = 6$, open squares), a 25-min infusion of DPDPE (5.0 nmol, $n = 6$, open triangles), or a 25-min-infusion of vehicle ($n = 7$, closed diamonds) on basal extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens. Inhibitory effect of 2-hydroxysaclofen (100.0 pmol) on the baclofen-induced reduction in DPDPE-induced increase in dopamine (DA) level in the nucleus accumbens ($n = 6$, closed squares). Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after onset of a 25-min infusion of DPDPE (5.0 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The hatched bar above the abscissa indicates the period of 2-hydroxysaclofen perfusion (50 min) that commenced 25 min before onset of DPDPE infusion. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of baclofen (25 min). The open bar above the abscissa indicates period of DPDPE perfusion (25 min).

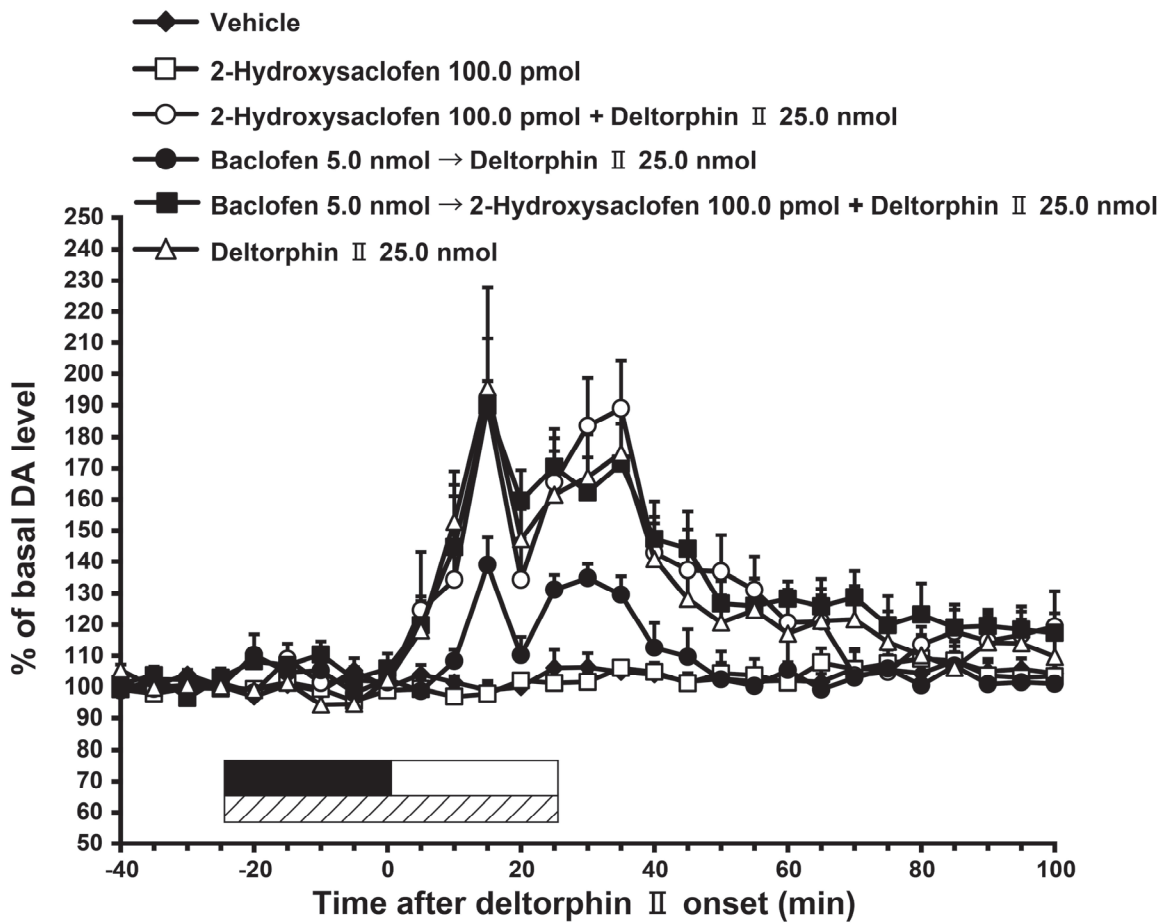


Fig. 5. Effects of a 50-min infusion of 2-hydroxysaclofen (100.0 pmol, $n = 6$, open squares), a 25-min infusion of deltorphin II (25.0 nmol, $n = 8$, open triangles), or a 25 min-infusion of vehicle ($n = 7$, closed diamonds) on basal extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens. Inhibitory effect of 2-hydroxysaclofen (100.0 pmol) on the baclofen-induced reduction in deltorphin II-induced increase in dopamine (DA) level in the nucleus accumbens ($n = 5$, closed squares). Data are expressed as mean change in 5 min observation periods after onset of a 25-min infusion of deltorphin II (25.0 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The hatched bar above the abscissa indicates the period of 2-hydroxysaclofen perfusion (50 min) that commenced 25 min before onset of deltorphin II infusion. The filled bar above the abscissa indicates the period of infusion of baclofen (25 min). The open bar above the abscissa indicates the period of deltorphin II perfusion (25 min).

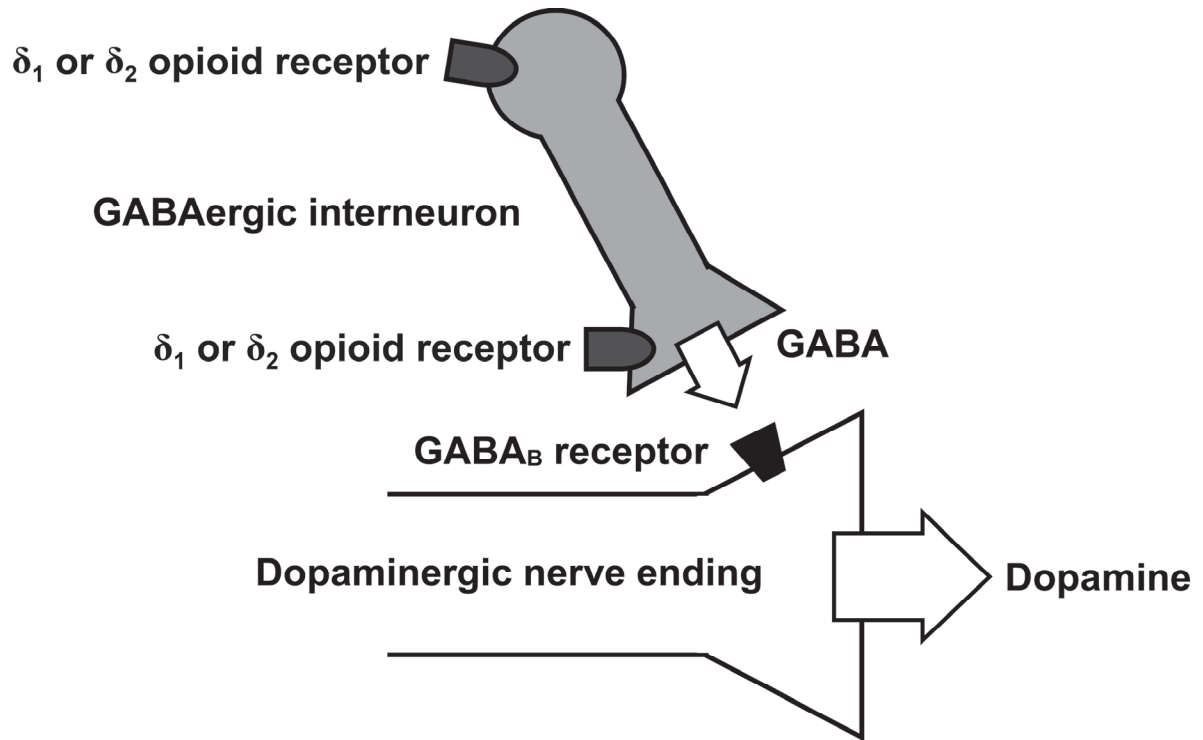


Fig. 6. A model indicating how GABAergic interneurons and dopaminergic neurons (dopaminergic nerve ending) interact in $GABA_B$ and delta1- and delta2- opioid receptor-mediated processes in the nucleus accumbens. Glial cells that may contribute to regulation of extracellular neurotransmitter levels are not included. The arrows indicate GABA and dopamine release from the respective nerve endings.

考 察

本研究と同様の実験条件で行なったこれまでの報告において (Okutsu et al., 2006; Saigusa et al., 2001, 2012), 側坐核から回収した灌流液に含まれている dopamine は 70%以上が tetrodotoxin 感受性 (Di Chiara et al., 1996) であった。したがって, 本研究で検出した側坐核の細胞外 dopamine は神経発火により放出されたものであると考えられた。

側坐核への δ 受容体 agonist の灌流投与は, 同部位の細胞外 dopamine 量を δ 受容体を介さない機構でも増加させることが知られている (Saigusa et al., 2017)。例えば側坐核への DPDPE の灌流投与は, 同部位の細胞外 dopamine 量を δ_1 受容体のみならず μ 受容体も介して増大させる (Hirose et al., 2005)。同様に側坐核への deltorphin II の灌流投与は, 同部位の細胞外 dopamine 量を naloxone 感受性の opioid 受容体の刺激を介さずに増加させることが示されている (Murakawa et al., 2004)。しかしながら, 本研究と同じ条件で DPDPE と deltorphin II が誘発した側坐核の dopamine 放出の促進は, δ_1 受容体 antagonist の BNTX と δ_2 受容体 antagonist の naltriben によりそれぞれ消失することが近年確認されている (Aono et al., 2017)。したがって, 本実験で側坐核へ灌流投与した DPDPE と deltorphin II による dopamine 放出の促進も, 同部位の δ_1 または δ_2 受容体の選択的な活性化が関与したものと考えられる。興味深いことに側坐核へ灌流投与した deltorphin II は, 同部位において二相性の dopamine 放出の増加を惹き起した。この deltorphin II の dopamine 放出に対する効果が, 神経細胞内の生化学的応答を含む側坐核の δ_2 受容体の機能と, deltorphin II の薬理作用のいずれによるものか, あるいは両方によるものかについては不明であり, 今後の更なる検討が必要である。

本研究結果は, 側坐核の $GABA_B$ 受容体刺激は δ_1 または δ_2 受容体刺激を介した同部位の dopamine 放出を抑制することを示している。これは (1) $GABA_B$

受容体 agonist の baclofen は, δ_1 受容体 agonist の DPDPE または δ_2 受容体 agonist の deltorphin II が誘発した dopamine 放出を抑制したこと, さらに (2) 基礎 dopamine 放出に影響を与えない GABA_B 受容体 antagonist の 2-hydroxysaclofen の併用投与は, DPDPE または deltorphin II が誘発した dopamine 放出に対する baclofen の抑制効果を打ち消したためである。またこれらの結果は, DPDPE または deltorphin II による dopamine 放出の増大には GABA_B 受容体を介した側坐核の dopamine 神経抑制の低下が関わることを示すものである。

これまでの研究から, 側坐核の GABA_A 受容体刺激は同部位の δ_1 ではなく δ_2 受容体を介した dopamine 放出の増大を抑制することが報告されている (Aono et al., 2017)。これらの以前の報告と本研究結果から, 側坐核では GABA_A とは異なり GABA_B 受容体への GABA 入力低下が同部位の δ_1 受容体を介した dopamine 放出の促進に関与することが示された。また, 側坐核の GABA_A または GABA_B 受容体への GABA 入力低下が同部位の δ_2 受容体を介した dopamine 放出の促進に関与することが示された。

δ_1 受容体 agonist と δ_2 受容体 agonist は異なる効果を誘発することが示されているが, これらの agonist の間で逆の効果が認められることもある (Mitchell et al., 2014)。例えば, δ_1 受容体 agonist は δ_2 受容体 agonist とは異なり, 側坐核の dopamine 神経活動に依存したメカニズムでラットの回転行動を誘発する (Matsuzaki et al., 2004)。また δ_1 受容体 agonist はアルコール依存の治療薬の候補であるが, δ_2 受容体 agonist はアルコール依存を促進する可能性があることがラットを用いた行動学的研究から示唆されている (Mitchell et al., 2014)。これに対し δ_1 , δ_2 受容体 agonist の側坐核への灌流投与は, いずれも dopamine 放出を促進することが示されている (Aono et al., 2017)。また, この δ_1 または δ_2 受容体 agonist による側坐核の dopamine 放出の促進では, GABA_A 受容体の果たす役割が異なることが指摘されている。即ち δ_2 受容体 agonist は δ_1 受容体 agonist とは異なり, GABA_A 受容体を介した神経機構により側坐核の

dopamine 放出を増大させた (Aono et al., 2017)。これらの報告とは異なり、本研究結果から δ_1 と δ_2 受容体の agonist はいずれも側坐核の GABA_B 受容体を介した神経機構により同部位の dopamine 放出を促進することが明らかに示された。

本研究および同様の条件で行なった最近の研究の結果は (Aono et al., 2017), 側坐核の δ_1 および δ_2 受容体が同部位の dopamine 放出を異なる組合せの GABA 受容体 subtype が関わる神経機構を介して促進することを裏付ける神経薬理的な証拠を示すものである。即ち, δ_1 受容体の活性化は GABA_A ではなく GABA_B 受容体に依存した神経機構を介して側坐核の dopamine 放出を増加させた。しかしながら, δ_2 受容体の活性化は GABA_A と GABA_B の両受容体に依存した神経機構を介して側坐核の dopamine 放出を促進した。このように GABA 受容体 subtype の関与様式に違いが認められた原因として, 側坐核の dopamine 放出の調節に関わる GABA 介在神経上での δ 受容体 subtype の発現が一様でないことが考えられた。例えば, δ_1 受容体は, dopamine 神経終末上の GABA_A 受容体ではなく GABA_B 受容体を介して dopamine 放出を調節する GABA 介在神経上に分布しているのに対して (Aono et al., 2017), δ_2 受容体は, dopamine 神経終末上の GABA_A 受容体だけではなく GABA_B 受容体も介して dopamine 放出を調節する GABA 介在神経上に分布していることが考えられる。側坐核の dopamine 放出の促進に関わる可能性が想定される δ 受容体と GABA_B 受容体の相互作用を介した神経機構について, 以下にさらなる考察を行なった。

Fig. 6 は, 側坐核において δ 受容体および GABA_B 受容体を介して GABA 介在神経と dopamine 神経終末がどの様に相互作用する可能性があるかについて示したものである。本章の緒言に述べた通り, 側坐核の GABA 介在神経には前シナプス性に δ 受容体が発現している。免疫組織化学的研究から, 側坐核の δ 受容体の活性化は同部位の抑制性神経伝達を低下させる可能性があるこ

とが示唆されている (Svingos et al., 1998)。側坐核の GABA_B 受容体は, DPDPE または deltorphin II が誘発した同部位の dopamine 放出促進作用の調節が可能であることが本研究結果から示された。GABA_B 受容体は, 自己受容体またはヘテロ前シナプス受容体として機能することが側坐核と (Xi et al., 2003), 他の脳の領域 (Bettler et al., 2004; Davis et al., 1997; Mougnot et al., 1998) においてそれぞれ報告されている。しかしながら, ラットの脳で GABA_B 受容体は GABA 合成酵素の glutamic acid decarboxylase 陽性神経細胞上には発現してしなかった (Margeta-Mitrovic et al., 1999)。この解剖学的特徴に関する報告に基づくと, DPDPE または deltorphin II が誘発した側坐核の dopamine 放出促進作用を調節する GABA_B 受容体は GABA 介在神経ではなく dopamine 神経終末に局在することが考えられる。介在神経として以外に側坐核の GABA 神経には, 軸索側枝を備えた出力線維, あるいは軸索側枝を欠く出力線維のほか, 腹側淡蒼球をはじめとする脳内の他の領域に起始核がある入力線維もある。これらの神経線維は glutamic acid decarboxylase 陽性と考えられる。したがって前述の Margeta-Mitrovic らによる免疫組織化学的研究 (1999) の結果に基づくと, 介在神経以外の側坐核の GABA 神経にも GABA_B 受容体は発現していない可能性がある。その上, これらの介在神経以外の側坐核の GABA 神経については, δ 受容体が発現しているか, また dopamine 神経終末からの dopamine 放出を調節可能であるか否かについては不明である。一方, 側坐核の GABA 介在神経には前シナプス受容体として働く δ 受容体が発現していることは明らかに示されている (Svingos et al., 1998)。

本研究から (1) 側坐核の GABA 介在神経上に発現している δ_1 または δ_2 受容体の DPDPE または deltorphin II による刺激は dopamine 神経終末上の GABA_B 受容体への GABA 入力を減少させること, さらに (2) dopamine 神経終末上に発現しこの神経を抑制しているこれらの GABA_B 受容体へ baclofen が作用する結果, 側坐核の dopamine 神経の抑制的制御が増大することがそれ

ぞれ示唆された。側坐核の δ_1 および δ_2 受容体の刺激前ではなく刺激後の dopamine 放出に対する baclofen の効果は、同部位の dopamine 神経終末上の GABA_B 受容体を介して発現していた可能性がある。この baclofen の効果については、側坐核の dopamine 神経終末に発現している GABA_B 受容体へ作用可能な内因性 agonist の GABA 量の変化によるものと考えられよう。即ち作用可能な内因性 agonist の GABA 量は、 δ 受容体 subtype の刺激前には多いが、 δ_1 または δ_2 受容体刺激後には減少したことが考えられる。このため受容体上での内因性 GABA との競合の低下に伴って、外因性 agonist の baclofen が δ 受容体の刺激前ではなく刺激後に側坐核の dopamine 神経終末上に分布している GABA_B 受容体と選択的に相互作用したと推察される。この点に関し、上記のメカニズムに基づくと側坐核の dopamine 神経終末上の GABA_B 受容体の遮断は δ_1 または δ_2 受容体を介した同部位の dopamine 放出を促進することが予想される。しかしながら 2-hydroxysaclofen は、DPDPE または deltrophin II の誘発した側坐核の dopamine 放出には影響を及ぼさなかった。この原因については、側坐核の dopamine 神経終末上に分布している GABA_B 受容体に作用可能な内因性 GABA 量の減少の面から説明できる。即ち、GABA 介在神経上の δ_1 または δ_2 受容体の選択的刺激は、GABA_B 受容体の遮断で dopamine 放出のさらなる脱抑制を誘発できないレベルまで内因性の GABA を減少させたことが考えられる。

本研究から、 δ_1 または δ_2 受容体を介した側坐核の dopamine 放出の増大には、同部位の dopamine 神経の GABA_B 受容体を介した抑制の低下が関わることを示された。また本研究から、側坐核の GABA 介在神経の細胞体または神経終末のいずれかあるいは両方に発現している δ_1 および δ_2 受容体の活性化は GABA 放出を減少させ、同部位の GABA_B 受容体を介した dopamine 神経終末の抑制的制御を低下させることで dopamine 放出を促進することが示された。

第 2 章

側坐核の GABA_A および GABA_B 受容体は同部位の dopamine 放出には影響を与えずに acetylcholine 放出を抑制する

緒 言

側坐核は、中脳腹側被蓋野に起始核がある中脳辺縁系 dopamine 神経の投射を受ける領域のひとつである。免疫組織化学的研究から側坐核全体には acetylcholine 介在神経が分布していることが示されている (Bolam et al., 1984; Meredith et al., 1989; Phelps et al., 1985)。また、側坐核の acetylcholine 神経活動の促進または抑制は、それぞれ移所運動 (Akiyama et al., 2000; Saigusa et al., 1995) と認知機能障害 (Laplante et al., 2011, 2012, 2013) を実験動物に惹き起こすことが知られている。

側坐核の acetylcholine 介在神経は、GABA 性出力神経 (Meredith and Chang, 1994) と中脳腹側被蓋野を含む他の脳領域からの GABA 性入力神経 (Brown et al., 2012) とシナプスを形成していることが示されている。また、側坐核の acetylcholine 介在神経には、GABA 性の制御を誘発するのに必要な GABA_A 受容体が発現していることも知られている (Gonzales and Smith, 2015; Rodríguez-Pallares et al., 2000)。ラットの脳切片を用いた研究では、当初 GABA は側坐核の acetylcholine 遊離には影響を与えないと考えられていたが (Stoof et al., 1979)、その後、GABA_A 受容体 agonist の muscimol は線条体の自発的な acetylcholine 放出を促進し (Login et al., 1998; Scatton and Bartholini 1980; Supavilai and Karobath 1984)、カリウム負荷が誘発した線条体の acetylcholine 放出は抑制することが示された (Supavilai and Karobath, 1985)。また無麻酔非拘束ラットでは、GABA_A 受容体 ligand は側坐核の細胞外 acetylcholine 量に影

響を与えることが明らかになった。即ち、GABA_A受容体 agonist の muscimol または GABA_A受容体 antagonist の bicuculline の側坐核への灌流投与は、同部位の acetylcholine をそれぞれ減少または増加させた (Rada et al., 1993)。

以上のことは、acetylcholine 神経発火を抑制する GABA_A受容体と GABA_A受容体 ligand が相互作用する可能性を一見示唆するかのようである。しかしながら muscimol と bicuculline の併用実験の結果は、muscimol が GABA_A受容体の活性化を介して側坐核の acetylcholine 放出を減少させたことを必ずしも示していない。なぜならばこの muscimol による側坐核の acetylcholine 放出の減少効果は、基礎 acetylcholine 放出を増加させる高い用量の bicuculline を併用したときにのみ消失することが示されているためである (Rada et al., 1993)。つまり、側坐核において muscimol が誘発した acetylcholine 神経活動の低下に同部位の GABA_A受容体が関与することを示す神経薬理学的証拠は *in vivo* の条件下では依然として得られていない。実際に側坐核に投与された muscimol は、側坐核の acetylcholine 神経依存性のラットの回転行動を GABA_A受容体 antagonist の bicuculline 非感受性の機構で減少させることも薬理行動学的研究から示されている。また muscimol は、bicuculline 非感受性の機構と関連する可能性がある GABA 取込み部位と相互作用をすることも示唆されている (Johnston, 1971, 2014)。そこで本研究では基礎 acetylcholine 量に影響を与えない低用量の bicuculline が、無麻酔非拘束ラットで muscimol が誘発した側坐核の acetylcholine 放出の減少に及ぼす効果について分析した。

側坐核には GABA_Aのみならず GABA_B受容体も分布し (Matsumoto et al., 1989)、同部位の acetylcholine 介在神経には GABA_B受容体が発現することが知られている (Yung et al., 1999)。GABA_B受容体 agonist の baclofen は側坐核の acetylcholine 神経活動に影響を与えることが示されている。例えばラットの脳切片を用いた電気生理学的研究からは、高周波刺激が誘発した側坐核の acetylcholine 介在神経の自発発火の抑制には GABA_Aではなく GABA_B受容体

が関与することが示されている (Xie et al., 2014)。In vivo 脳微小透析法による研究からは、無麻酔非拘束ラットの側坐核の GABA_B 受容体は同部位の細胞外 acetylcholine 量の制御において抑制的な役割を果たすことが示唆されてきた (Rada et al., 1993)。また行動薬理学的研究からは、側坐核の GABA_B 受容体刺激は側坐核の acetylcholine 神経に依存したラットの回転行動を抑制することが示されている (Akiyama et al., 2004)。このため、比較の目的で、自由運動下のラットの側坐核の基礎 acetylcholine 放出へ GABA_B 受容体 agonist の baclofen が及ぼす効果についても検討を加えた。この baclofen が acetylcholine 放出を減少させる作用に対して、基礎 acetylcholine 量に影響を与えない用量の GABA_B 受容体 antagonist の 2-hydroxysaclofen が及ぼす効果について解析した。

本研究ではさらに、GABA_A および GABA_B 受容体 ligand が基礎 dopamine 放出に及ぼす効果についても検討を加えた。これは脳微小透析実験により acetylcholine 放出を検出する上で灌流液に添加する低濃度の cholinesterase 阻害薬の physostigmine が (Noori et al., 2012)、GABA_A および GABA_B 受容体による側坐核の dopamine 神経活動の調節 (Aono et al., 2008; Saigusa et al., 2008) に影響を与える可能性が考えられるためである。側坐核の dopamine 放出に対する GABA 受容体 ligand の効果を分析するもうひとつの理由は、側坐核では acetylcholine 神経と dopamine 神経は密接な相互作用を示すことが報告されているためである。例えば側坐核を含む線条体領域では、acetylcholine 神経活動の変化は dopamine 神経活動に影響を及ぼすことが示されているほか (Exley et al., 2008; Exley and Cragg, 2008; Threlfell et al., 2012)、acetylcholine 神経活動は dopamine 神経活動の変化の影響を受けることも示されている (Wedzony et al., 1988; Consolo et al., 1999)。したがって、これらの acetylcholine 神経と dopamine 神経の相互作用は GABA 性の抑制の影響を受ける可能性が推測される。

材料および方法

動物

第 1 章と同じ条件で使用した動物を用いた。

手術

第 1 章の記載と同様に行なった。

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., 2017; Kiguchi et al., 2016) に従って行なった。

第 1 章と同じ透析プローブをラットの頭部に固定したのち、テフロンチューブを接続した。本研究で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 acetylcholine 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 に近い濃度を採用した (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。

Acetylcholine は Eicompak AC-GEL column (粒子サイズ 4 μm, カラムサイズ 2.0 × 150 mm; 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 (AC-ENZYM II; Eicom, Kyoto, Japan) を

用いて acetylcholine 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 acetylcholine 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。Acetylcholine 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 acetylcholine 量は、標準物質の acetylcholine と IPHC のピーク面積値を基に算出した。

第 2 章の研究で dopamine は、Eicompak CAX column (粒子サイズ 5 μ m, 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 μ l/min とした。Dopamine 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。Dopamine 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 dopamine 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。

本研究と同様の実験条件では、回収された acetylcholine と dopamine 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、80%以上が tetrodotoxin 感受性であったことから、測定されたほとんどの acetylcholine と dopamine 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 (acetylcholine: Kiguchi et al., 2016, dopamine: Saigusa et al., 2012)。Acetylcholine の定量に用いた試料は 15 分毎に、dopamine の定量に用いた試料は 20 分毎にそれぞれ回収した。第 1 章と同じく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、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 dopamine 量は、薬物投与直前 3 回に回収した試料に含まれる dopamine 量の平均とし、基礎 acetylcholine 量は、薬物投与直前 4 回に回収した試料に含まれる acetylcholine 量の平均とした。これらの基礎値の決定の際には、ANOVA を行った（統計処理参照）。

薬物

被験薬物として、muscimol (5-aminomethyl-3-hydroxyisoxazole; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), bicuculline (1(S),9(R)-(-)-bicuculline methobromide; [R-(R*,S*)]-5-(6,8-dihydro-8-oxofuro[3,4-e]-1,3-benzodioxol-6-yl)-5,6,7,8-tetrahydro-6,6-dimethyl-1,3-dioxolo[4,5-g]isoquinidinium bromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), baclofen (R(+)-baclofen hydrochloride; R(+)- β -(aminomethyl)-4-chlorobenzenepropanoic acid hydrochloride; Sigma-Aldrich, MO, USA), 2-hydroxysaclofen (2-hydroxysaclofen; 3-amino-2-(4-chlorophenyl)-2-hydroxypropanesulfonic acid, Sigma-Aldrich, MO, USA) を用いた。muscimol, bicuculline, baclofen, 2-hydroxysaclofen はいずれも改良リンゲル液に溶解した。これらの薬物のうち、muscimol, baclofen は 30 分間、bicuculline, 2-hydroxysaclofen は 60 分間に亘り、いずれも微小透析膜を介して側坐核へ灌流投与した。ただし、muscimol または baclofen の投与開始の 30 分前に bicuculline または 2-hydroxysaclofen の灌流投与を開始した。被験薬物の投与量は、muscimol (Aono et al., 2008, 2017; Ferraro et al., 1996; Yan, 1999; Yoshida et al., 1997), baclofen (Klitenick et al., 1992; Santiago and Westerink 1992; Smolders et al., 1995, Watanabe et al., 2018), bicuculline (Aono et al., 2008, 2017; Rahman and McBride, 2002; Yan, 1999), 2-hydroxysaclofen (Santiago and Westerink 1992, Watanabe et al., 2018) を用いた過去の報告に基づいて設定した。

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 (pmol または

nmol) で示した (muscimol, 30 分間: 3-30 pmol/30 μ l; baclofen, 30 分間: 30-300 nmol/30 μ l; bicuculline, 60 分間: 60 pmol/60 μ l; 2-hydroxysaclofen, 60 分間: 12 nmol/60 μ l)。

透析プローブ挿入位置の組織学的確認

第 1 章と同様に行なった。

統計処理

第 1 章と同様にデータはすべて基礎値に対する百分率で表した。第 2 章では、薬物処置直前に回収した 4 試料に含まれる acetylcholine 量の平均, 3 試料に含まれる dopamine 量の平均をそれぞれ基礎値として採用した (透析実験参照)。これらの基礎値の決定の際には, 連続して回収した試料中の acetylcholine または dopamine の量の間には統計学的に有意な差がなく, 安定していることを time の因子について繰り返しのある ANOVA を行って確認した。

経時的なデータの比較では, 第 1 章と同じく処置 (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，側坐核において透析プローブはいずれも A10.60（耳間線から前方 10.60 mm の断面）を通過しており，その先端は耳間線から前方 10.00～10.95 mm の範囲にあった（Fig. 7）。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かった。本研究で使用した 102 例のラットのうち，プローブの位置が目的の範囲外にあったものは 15 例であった。プローブが目的位置にあった 87 例（acetylcholine 定量の 57 例，dopamine 定量の 34 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 acetylcholine 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 acetylcholine 量は， 3.23 ± 0.26 pg/15 min (= 1.47 ± 0.12 nM) であった（mean \pm S.E.M.; $n = 53$ ）。

Muscimol または baclofen の側坐核への灌流投与は同部位の acetylcholine 放出を抑制する

測定期間中，側坐核から得られた基礎 acetylcholine 量は安定していた（Fig. 8）。側坐核へ muscimol（3.0, 30.0 pmol）を 30 分間灌流投与したところ，同部位の細胞外 acetylcholine 放出は 60 分にわたり用量依存的に抑制された[Fig. 8; two-way ANOVA, interaction: $F_{(6, 39)} = 4.57$, $P < 0.01$]。Scheffé's test の結果，3.0 pmol muscimol 投与群と vehicle 投与群の間，30.0 pmol muscimol 投与群と vehicle 投与群の間，30.0 pmol muscimol 投与群と 3 pmol muscimol 投与群の間にそれぞれ有意差が認められた（ $P < 0.05$ ）。側坐核へ baclofen（30.0, 300.0 pmol）を 30 分間灌流投与したところ，同部位の細胞外 acetylcholine 放出は 45

分にわたり用量依存的に抑制された[Fig. 9; two-way ANOVA, treatment: $F_{(2, 28)} = 14.46, P < 0.001$]. Scheffé's test の結果, 30.0 pmol baclofen 投与群と vehicle 投与群の間, 300.0 pmol baclofen 投与群と vehicle 投与群の間, 300.0 pmol baclofen 投与群と 30.0 pmol baclofen 投与群の間にそれぞれ有意差が認められた ($P < 0.05$).

Muscimol の側坐核 acetylcholine 放出抑制効果を bicuculline は打ち消す

Bicuculline の 60 分間の灌流投与 (60.0 pmol) は基礎的な側坐核の acetylcholine 放出に明らかな影響を及ぼさなかったが, muscimol (30.0 pmol) の誘発した側坐核の acetylcholine 放出の抑制効果を打ち消した[Fig. 10; two-way ANOVA, interaction: $F_{(9, 57)} = 7.52, P < 0.001$].

Baclofen の側坐核 acetylcholine 放出抑制効果を 2-hydroxysaclofen は打ち消す

2-Hydroxysaclofen の 60 分間の灌流投与 (12.0 nmol) は基礎的な側坐核の acetylcholine 放出に目立った影響を及ぼさなかったが, baclofen (300.0 pmol) の誘発した側坐核の acetylcholine 放出の抑制効果を打ち消した[Fig. 11; two-way ANOVA, treatment: $F_{(3, 40)} = 14.97, P < 0.001$].

側坐核における基礎的な細胞外 dopamine 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 dopamine 量は, 2.35 ± 0.15 pg/20 min (= 0.77 ± 0.05 nM) であった (mean \pm S.E.M.; $n = 34$).

側坐核の dopamine 放出は同部位への muscimol, baclofen, bicuculline, 2-hydroxysaclofen の灌流投与の影響を受けない

30 分間に亘る muscimol (30.0 pmol) または baclofen (300.0 pmol) の灌流投与は基礎的な側坐核の dopamine 放出には明らかな影響は及ぼさなかった

(Fig. 12; muscimol: $n = 8$; baclofen: $n = 7$)。また, muscimol が誘発した acetylcholine 放出の抑制を打ち消した 60 分間に亘る bicuculline (60.0 pmol) の灌流投与は, 基礎的な側坐核の dopamine 放出には著しい影響は及ぼさなかった (Fig. 13; $n = 5$)。さらに, baclofen が誘発した acetylcholine 放出の抑制を打ち消した 60 分間に亘る 2-hydroxysaclofen (12.0 nmol) の灌流投与は, 基礎的な側坐核の dopamine 放出には目立った影響を与えなかった (Fig. 13; $n = 6$)。

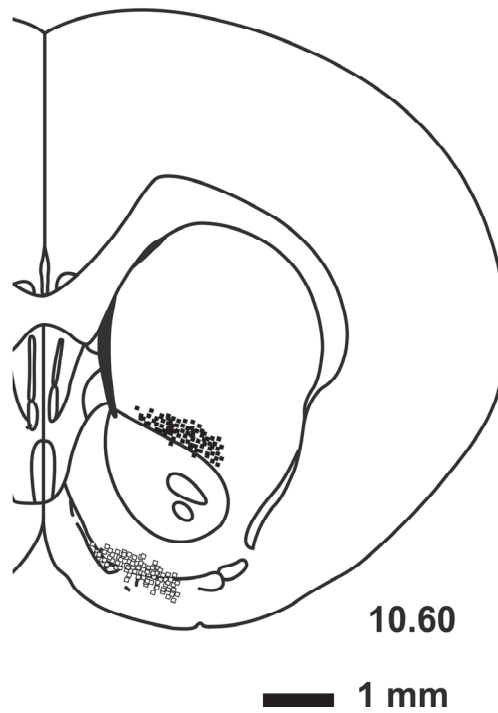


Fig. 7. Schematic illustration showing locations of the beginning (closed squares) and tip (open squares) of the membrane of microdialysis probes in the nucleus accumbens for all 87 successfully placed probes. The plane is taken from the atlas of Paxinos and Watson (1998) and the approximate coordinate indicated is mm anterior to the interaural line.

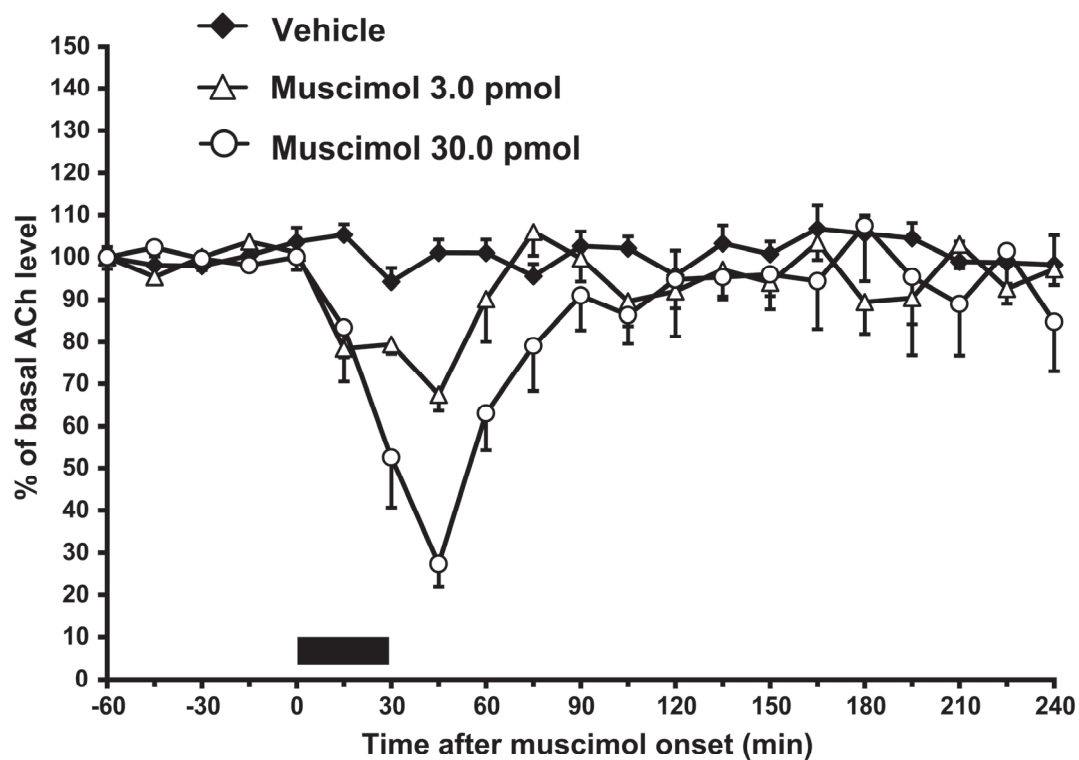


Fig. 8. Effects of 30-min infusions of vehicle ($n = 6$, closed diamonds) or muscimol (3.0 pmol, $n = 5$, open triangles; 30.0 pmol, $n = 5$, open circles) into the nucleus accumbens on basal extracellular efflux of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of muscimol infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the periods of infusion of vehicle or muscimol (30 min).

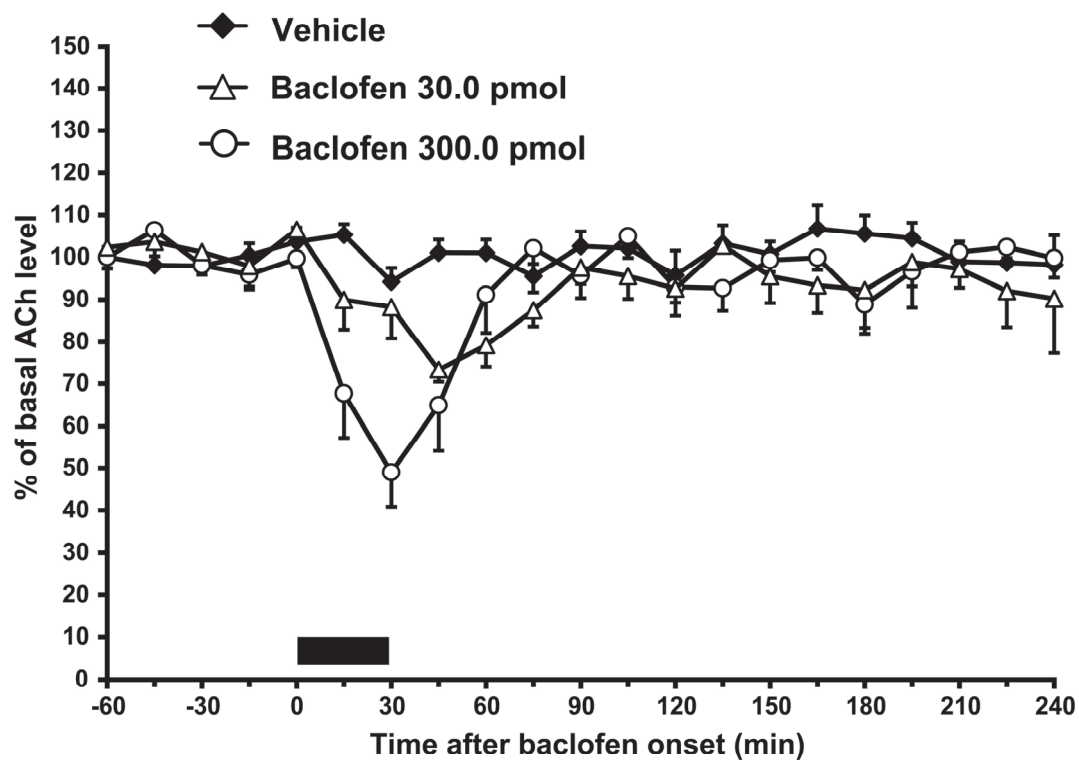


Fig. 9. Effects of 30-min infusions of vehicle ($n = 6$, closed diamonds) or baclofen (30.0 pmol, $n = 5$, open triangles; 300.0 pmol, $n = 6$, open circles) into the nucleus accumbens on basal extracellular efflux of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 15 min observation periods after onset of baclofen infusion. Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the periods of infusion of vehicle or baclofen (30 min).

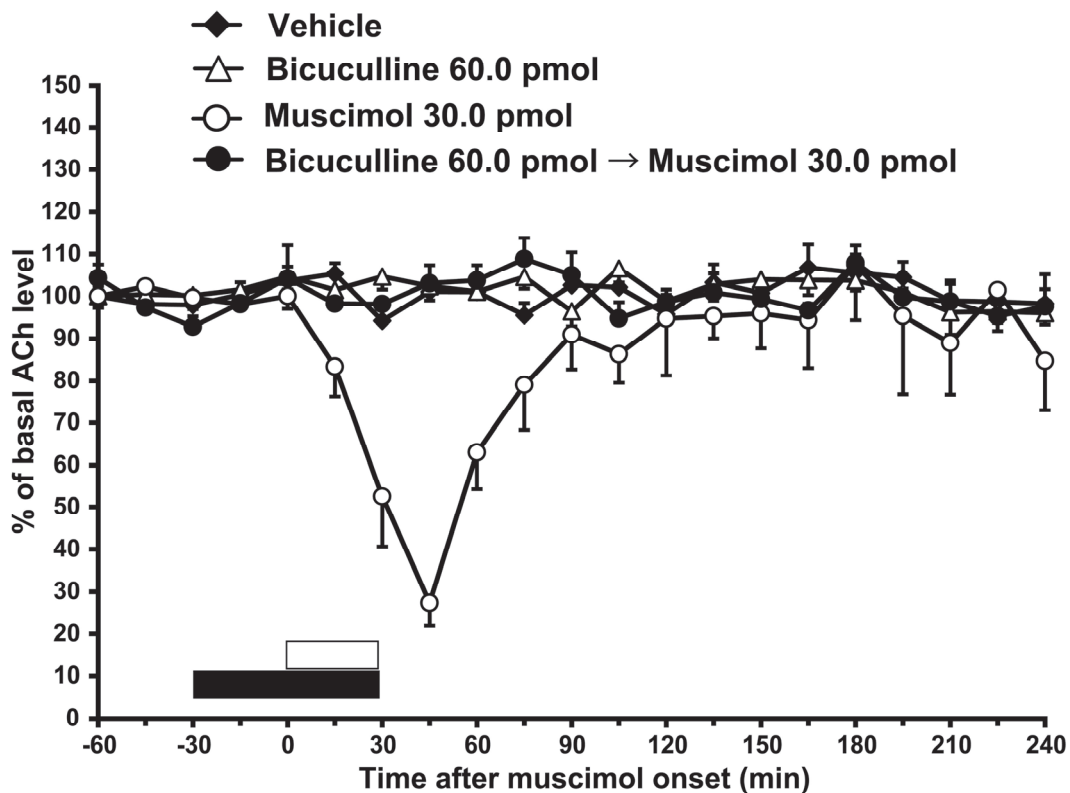


Fig. 10. Effects of infusions of vehicle ($n = 6$, closed diamonds), bicuculline (60.0 pmol, $n = 7$, open triangles) and muscimol (30.0 pmol, $n = 5$, open circles) on basal extracellular efflux of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. Bicuculline (60.0 pmol) inhibits the muscimol-induced reduction in basal acetylcholine (ACh) efflux 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 muscimol (30.0 pmol). Vertical bars indicate S.E.M. The filled bar above the abscissa indicates the period of bicuculline perfusion that commenced 30 min before onset of muscimol infusion. The open bar indicates the period of infusion of muscimol (30 min).

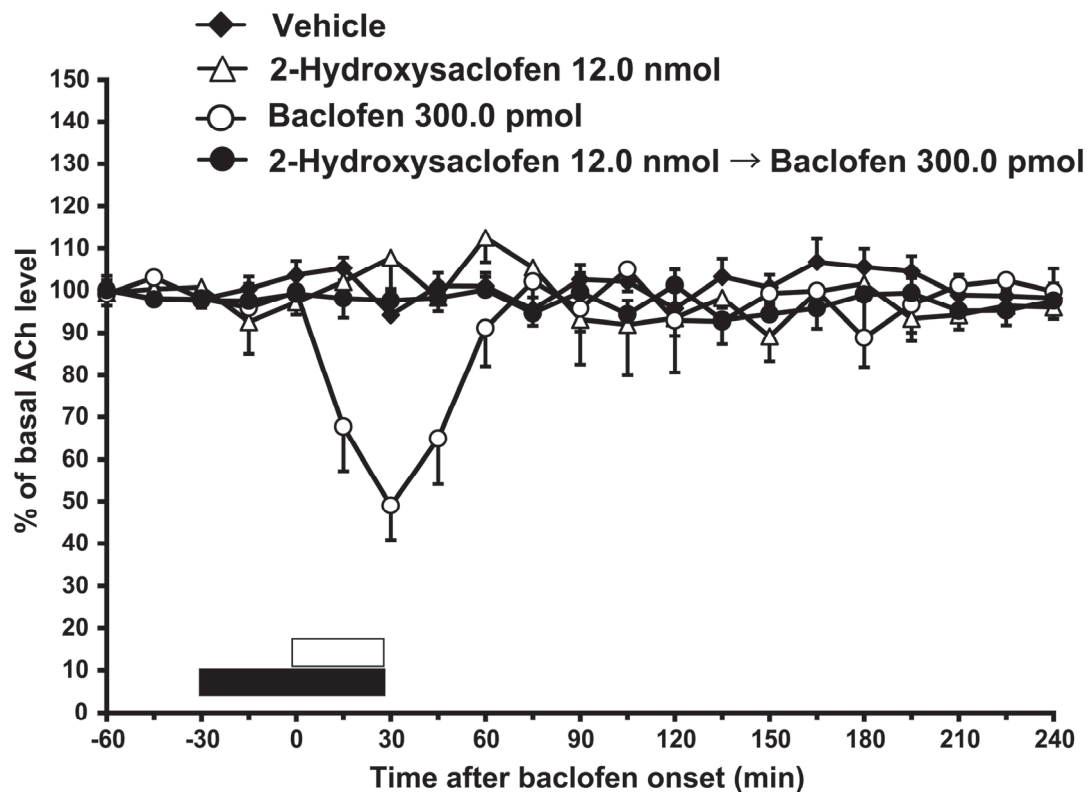


Fig. 11. Effects of infusions of vehicle ($n = 6$, closed diamonds), 2-hydroxysaclofen (12.0 nmol, $n = 5$, open triangles) and baclofen (300.0 pmol, $n = 6$, open circles) on basal extracellular efflux of acetylcholine (ACh) in the nucleus accumbens. 2-Hydroxysaclofen (12.0 nmol) inhibits the baclofen-induced reduction in basal acetylcholine (ACh) efflux 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 baclofen (300.0 pmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the period of 2-hydroxysaclofen perfusion that commenced 30 min before onset of baclofen infusion. The filled bar indicates the period of infusion of baclofen (30 min).

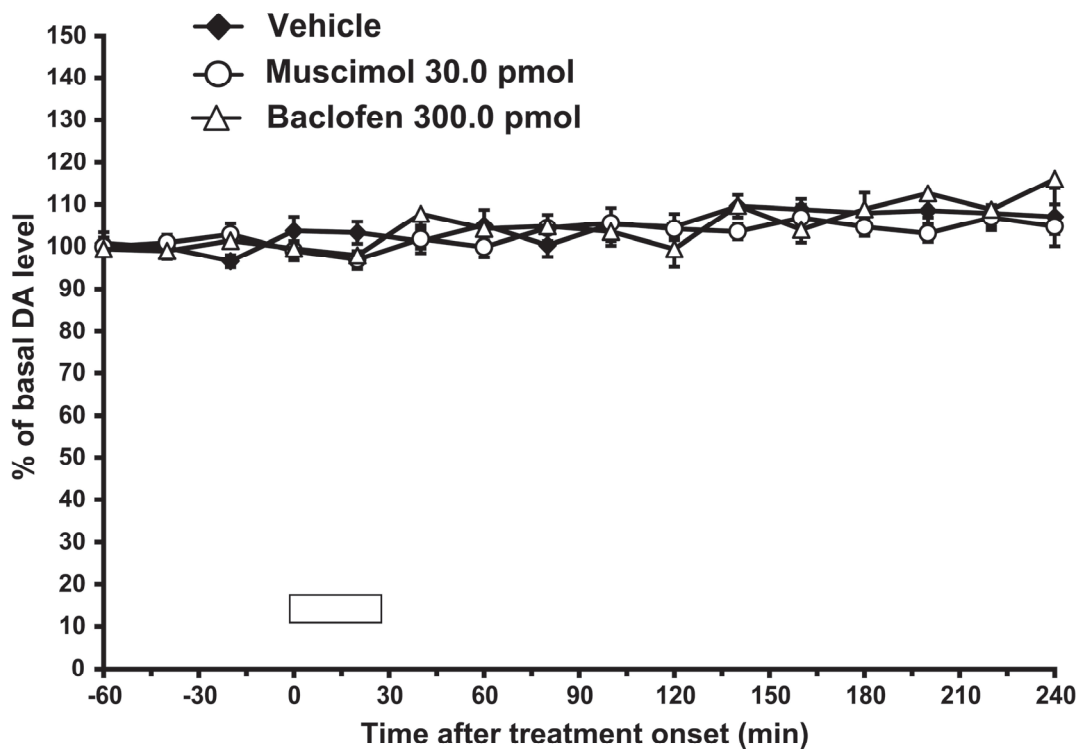


Fig. 12. Effects of 30 min-infusions of vehicle ($n = 5$, closed diamonds), muscimol (30.0 pmol, $n = 8$, open circles) and baclofen (300.0 pmol, $n = 7$, open triangles) on basal extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 20 min observation periods after onset of a 30-min infusion of muscimol (30.0 pmol) and baclofen (300.0 pmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar indicates the periods of infusion of vehicle, muscimol or baclofen (30 min).

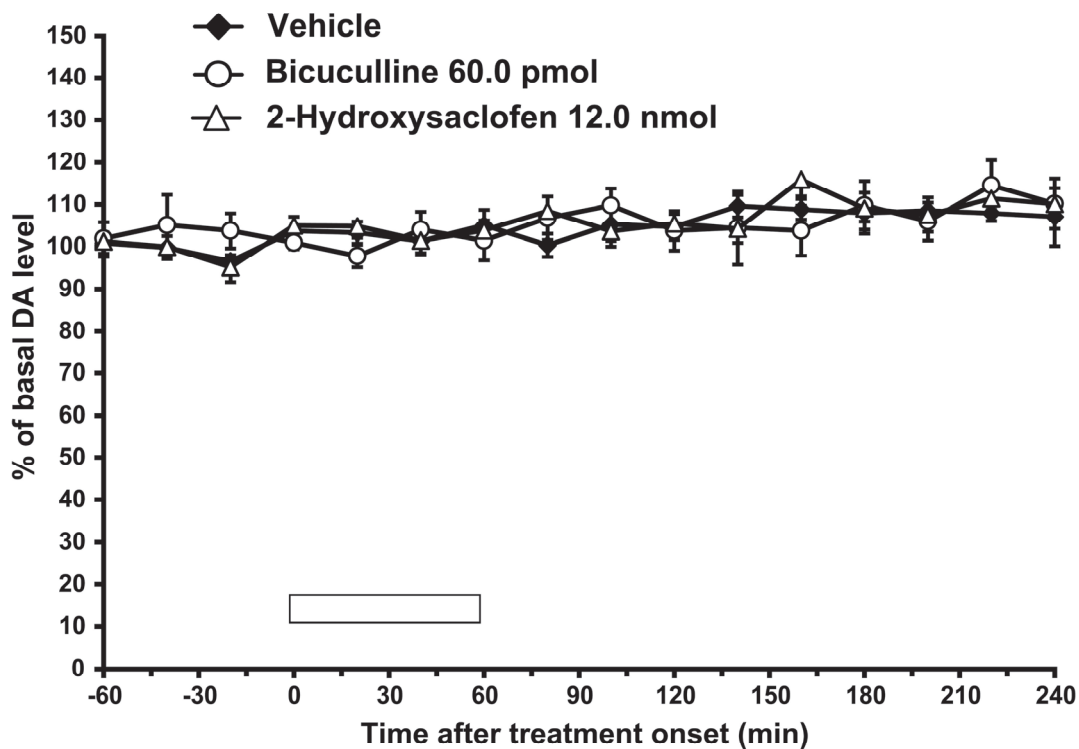


Fig. 13. Effects of 60 min-infusions of vehicle ($n = 5$, closed diamonds), bicuculline (60.0 pmol $n = 5$, open circles) and 2-hydroxysaclofen (12.0 nmol $n = 6$, open triangles) on basal extracellular efflux of dopamine (DA) in the nucleus accumbens. Data are expressed as mean change in 20 min observation periods after onset of a 60-min infusion of bicuculline (60.0 pmol) and 2-hydroxysaclofen (12.0 nmol). Vertical bars indicate S.E.M. The open bar above the abscissa indicates the periods of infusion of vehicle, bicuculline or 2-hydroxysaclofen (60 min).

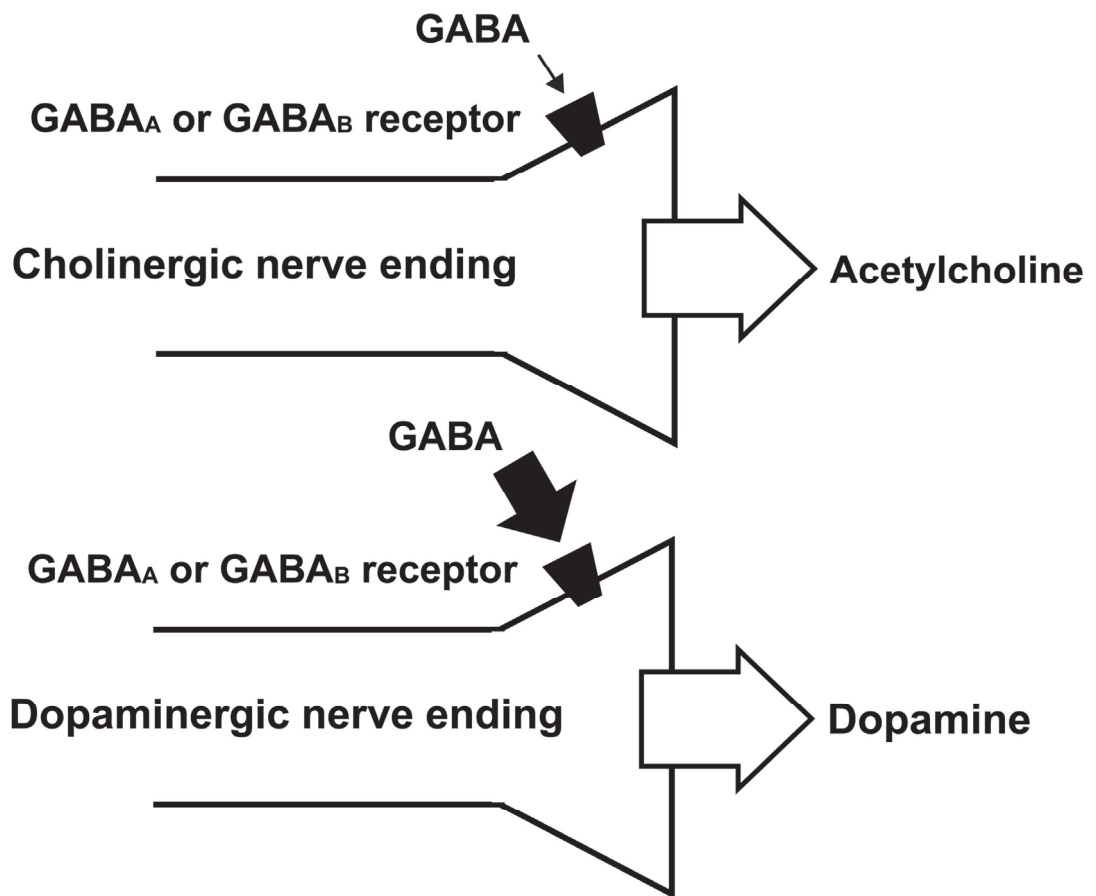


Fig. 14. A model indicating how endogenous GABA appears to interact with cholinergic neurons (cholinergic nerve endings) and dopaminergic neurons (dopaminergic nerve endings) through GABA_A and GABA_B receptors in the nucleus accumbens. Glial cells that may contribute to regulation of extracellular neurotransmitter levels are not shown. The filled arrows indicate strength of tonic GABAergic activity required to activate GABA_A or GABA_B receptors on cholinergic and dopaminergic nerve endings in the nucleus accumbens. The open arrows indicate acetylcholine and dopamine release from the respective nerve endings in the nucleus accumbens.

考 察

Acetylcholinesterase 阻害薬は, *in vivo* 脳微小透析法により回収された灌流液中の acetylcholine を検出するため細胞外 acetylcholine の酵素的代謝を低下させる目的で灌流液に添加される (Noori et al., 2012)。本研究では, neostigmine に比べて低濃度でも acetylcholine 神経へ強力に作用することが知られている physostigmine を含有した灌流液を使用した (Noori et al., 2012)。本研究と同じ実験条件で実施した以前の報告 (Kiguchi et al., 2016) において, 電位依存性 Na⁺チャネル阻害薬の TTX (Di Chiara et al., 1996) により側坐核の基礎的な acetylcholine は 80%以上が消失することが示されている。このため本研究で検出した基礎的な acetylcholine 放出は, 神経発火により誘発されたものであると考えられた。灌流液への physostigmine の添加を除き同じ実験条件で実施した以前の研究 (Aono et al., 2015) と本研究の結果を比較すると, 灌流液中の physostigmine により基礎 dopamine 量が受けた影響はごくわずかであった。

本研究から GABA_A 受容体 agonist の muscimol の側坐核への灌流投与は, 無麻酔非拘束ラットの側坐核の acetylcholine 放出を用量依存的に抑制することが示された。これらの知見は muscimol が実験動物の線条体切片からの自発的な acetylcholine 遊離を促進するという報告 (Login et al., 1998; Scatton and Bartholini 1980; Supavilai and Karobath 1985) とは異なるが, 側坐核に灌流投与された muscimol が無麻酔ラットの側坐核の基礎的な細胞外 acetylcholine 量を減少させることを示す神経薬理学的研究の結果 (Rada et al., 1993) とは一致するものであった。側坐核に投与された muscimol は, 同部位の acetylcholine 神経活動依存性の移所行動を GABA_A 受容体の活性化に依存しない機構を介して抑制できることが行動薬理学的研究から示されている。即ち muscimol の側坐核への投与は, 側坐核の acetylcholine 神経活動に依存したラットの回転行動を抑制するが, この muscimol の効果は GABA_A 受容体 antagonist の

bicuculline の影響は受けなかった (Akiyama et al., 2004)。実際に muscimol は、GABA_A 受容体以外に GABA 取込み部位とも相互作用することが知られている (Jonston, 1971, 2014)。しかしながら本研究で認められた muscimol の側坐核の acetylcholine 放出に対する効果の発現には、同部位の GABA_A 受容体刺激が関与している可能性が高い。これは muscimol の誘発した側坐核の acetylcholine 放出の減少は、GABA_A 受容体 antagonist の bicuculline で打ち消されたためである。高用量の bicuculline の側坐核への灌流投与は同部位の acetylcholine 放出を増大させる (Rada et al., 1993)。これらの結果は、側坐核の GABA_A 受容体は同部位の acetylcholine 神経活動制御において抑制的な役割を果たすことを示している。

本研究から、側坐核への GABA_B 受容体 agonist の baclofen の灌流投与は、無麻酔非拘束ラットの側坐核の acetylcholine 放出を減少させることが示された。この baclofen の効果は GABA_B 受容体 antagonist の 2-hydroxysaclofen の併用投与により消失したことから、baclofen の作用は側坐核の GABA_B 受容体の活性化を介したものであると考えられた。これらの結果は、側坐核の GABA_B 受容体が同部位の acetylcholine 神経活動の制御において抑制的な役割を果たすことを示している。即ち、本研究結果はこれまでの報告のうち、(1) 側坐核の acetylcholine 介在神経には、神経終末からの acetylcholine 放出を制御する GABA_B 受容体が発現しているとする免疫組織化学的研究 (Yung et al., 1999)、(2) 側坐核の acetylcholine 介在神経の自発的な神経発火の高周波刺激による抑制は GABA_B 受容体を介しているとする電気生理学的研究 (Xie et al., 2014)、(3) GABA_B 受容体 agonist の baclofen は側坐核の acetylcholine 放出を抑制するが、この効果は antagonist の 2-hydroxysaclofen で打ち消されるとする神経薬理学的研究の結果 (Rada et al., 1993) をいずれも支持するものであった。

興味深いことに、灌流開始から acetylcholine の最大減少が起こるまでの所

要時間は、muscimol では 45 分だったのに対し、baclofen では 30 分であった。この時間の違いが、(1) 各薬物の脂溶性をはじめとする透析プローブ周囲の薬物動態の相違、(2) agonist としての効力と最大有効性の相違、(3) 細胞内の生化学的応答を含むシグナル伝達機構の相違のいずれ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。

本研究結果は、GABA_A または GABA_B 受容体の活性化を介して acetylcholine 放出を低下させることができる低用量の muscimol (30.0 pmol) または baclofen (300.0 pmol) の側坐核への灌流投与は、同部位の dopamine 放出には影響を与えないことを示している。これらの結果は、GABA_A または GABA_B 受容体の側坐核の基礎的な dopamine 放出における調節的な役割を検討するため physostigmine を含有しない灌流液で行った *in vivo* 脳微小透析実験による研究の成果と一致するものであった (Aono et al., 2008; Saigusa et al, 2008)。これまでも報告されてきたように、本研究結果は (1) 低用量ではなく高用量においてのみ muscimol は基礎的な側坐核の dopamine 放出に影響を与えることができたこと (Aono et al., 2008)、(2) baclofen は基礎的な側坐核の dopamine 放出には影響を与えなかったこと (Saigusa et al., 2008) と一致した。側坐核を含む線条体領域では、acetylcholine 神経入力 of 減少が dopamine 神経活動に影響を与えることが知られている。例えば、ニコチン性 acetylcholine 受容体を介した acetylcholine 神経伝達の選択的抑制は、線条体における一過性の dopamine 放出の増加を抑制するほか (Lim et al., 2014)、側坐核の持続的 dopamine 放出は促進する (Exley et al., 2008; Rice and Cragg, 2004)。また条件付けが誘発した側坐核の dopamine 放出を、ムスカリンおよびニコチン性 acetylcholine 受容体 antagonist はそれぞれ抑制または促進できる (Collims et al., 2016)。これらの報告とは異なり、本研究は muscimol または baclofen が誘発した側坐核の acetylcholine 放出の減少は、同部位の dopamine 量の目立った変化を伴っていなかった。つまり、本研究は muscimol と baclofen は側坐核の

dopamine 放出に影響を与えずに acetylcholine 放出を低下させることができることを示している。

Fig. 14 は、側坐核の acetylcholine および dopamine 神経と同部位の内因性 GABA がどのように相互作用を示すかを表した模式図である。Muscimol と baclofen はそれぞれ側坐核において dopamine 量には影響を与えずに acetylcholine 量を減らしたという本研究結果は、acetylcholine 神経活動と dopamine 神経活動を抑制する GABA 受容体 subtype を介した GABA 性のトーンズの違いを示唆している可能性がある。つまり、dopamine 神経活動を抑制する GABA_A および GABA_B 受容体に比べ、acetylcholine 神経活動を抑制する GABA_A および GABA_B 受容体を刺激する内因性 GABA 量が少ないことが考えられる。換言すると acetylcholine 介在神経に発現する GABA_A および GABA_B 受容体よりも dopamine 神経終末に発現している GABA_A および GABA_B 受容体のトーンズが高い可能性がある。

以上の結果から、側坐核において GABA_A および GABA_B 受容体は同部位の acetylcholine 神経活動の調節において抑制的な役割を果たすことが示された。また本研究から、側坐核の GABA_A および GABA_B 受容体の刺激が無麻酔非拘束ラットの側坐核の dopamine 放出に影響を与えることなく acetylcholine の放出を減少させることを示す証拠を、*in vivo* の神経化学的実験に基づいて提供することができた。これらの側坐核の GABA_A および GABA_B 受容体が、移所行動 (Akiyama et al., 2004; Saigusa et al., 1995) や学習・記憶を含む認知機能 (Laplanche et al., 2011, 2012, 2013) といった脳内の複数の神経系に影響を及ぼすことが知られている acetylcholine の作用とどのように関係するかについては今後のさらなる検討が必要である。

総 括

側坐核は中脳腹側被蓋野を起始核とする中脳辺縁系 dopamine 神経の主たる投射領域である。本研究は、側坐核の δ 受容体 subtype を介した dopamine 放出の発現および基礎 acetylcholine 放出調節の神経機構を明らかにするため、側坐核に分布する GABA_B 受容体の役割に焦点を当ててラットを用いた *in vivo* 脳微小透析法による検討を行った。第 1 章では、 δ_1 または δ_2 受容体の刺激による側坐核の dopamine 放出促進の一因として同部位の GABA_B 受容体を介した抑制性神経伝達の低下を想定し、 δ_1 または δ_2 受容体 agonist による側坐核の dopamine 放出の促進を GABA_B 受容体 agonist の baclofen が打ち消すか否かについて検討した。第 2 章では、GABA_B 受容体 agonist の baclofen が側坐核の基礎的な acetylcholine および dopamine 放出に及ぼす効果について解析した。

これらの研究から、 δ_1 または δ_2 受容体を介した側坐核の dopamine 放出の増大は、いずれも同部位 GABA_B 受容体刺激により抑制されることが示された。また、側坐核の GABA 介在神経に発現する δ_1 および δ_2 受容体の活性化は GABA 放出を減少させ、同部位の dopamine 神経の GABA_B 受容体を介した抑制的制御を低下させることで dopamine 放出を促進することが示唆された。さらに、側坐核の acetylcholine 放出を低下させる GABA_B 受容体刺激は、同部位の dopamine 放出には影響を与えないことが示された。

本研究より側坐核の GABA_B 受容体は、同部位の δ_1 または δ_2 受容体刺激を介した dopamine 放出促進の発現に関与すること、さらに、基礎 dopamine 放出には影響を与えずに基礎 acetylcholine 放出を抑制することが示された。

行動学実験から、側坐核の dopamine 神経活動の亢進は opioid に対する精神依存の発現に関与すると考えられているほか、側坐核の acetylcholine 神経活動の抑制は記憶を含む認知機能を低下させると想定されている。本研究は、

opioid を用いた疼痛制御の安全性の向上につながる GABA_B 受容体の機能に関する基礎的な知見を提供するものである。

引用文献

Akiyama, G., Ikeda, H., Matsuzaki, S., Sato, M., Moribe, S., Koshikawa, N., Cools, A.R., 2004. GABA_A and GABA_B receptors in the nucleus accumbens shell differentially modulate dopamine and acetylcholine receptor-mediated turning behaviour. *Neuropharmacology* 46, 1082–1088.

Aono, Y., Kiguchi, Y., Watanabe, Y., Waddington, J.L., Saigusa, T., 2017. Stimulation of accumbal GABA_A receptors inhibits delta2-, but not delta1-, opioid receptor-mediated dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Eur. J. Pharmacol.* 815, 18–25.

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.

Ashby Jr., C.R., Rohatgi, R., Ngosuwan, J., Borda, T., Gerasimov, M.R., Morgan, A.E., Kushner, S., Brodie, J.D., Dewey, S.L., 1999. Implication of the GABA_B receptor in gamma vinyl-GABA's inhibition of cocaine-induced increases in nucleus accumbens dopamine. *Synapse* 31, 151–153.

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

Bettler, B., Kaupmann, K., Mosbacher, J., Gassmann, M., 2004. Molecular structure and physiological functions of GABA_B receptors. *Physiol. Rev.* 84, 835–867.

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 Golgistaining, autoradiography, and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* 213, 121–134.

Bolam, J. P., Wainer, B. H., Smith, A.D., 1984. Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combination of choline acetyltransferase immunocytochemistry, Golgi-impregnation and electron microscopy. *Neuroscience* 12, 711–718.

Brown, M. T., Tan, K. R., O'Connor, E. C., Nikonenko, I., Muller, D., Lüscher, C., 2012. Ventral tegmental area GABA projections pause accumbal cholinergic interneurons to enhance associative learning. *Nature* 492, 452–456.

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

Collins, A.L., Aitken, T.J., Greenfield, V.Y., Ostlund, S.B., Wassum, K.M., 2016. Nucleus accumbens acetylcholine receptors modulate dopamine and motivation. *Neuropsychopharmacology* 41, 2830–2838. .

Consolo, S., Caltavuturo, C., Colli, E., Recchia, M., Di Chiara, G., 1999. Different sensitivity of in vivo acetylcholine transmission to D1 receptor stimulation in shell and core of nucleus accumbens. *Neuroscience* 89, 1209–1217.

Davis, L.L., Trivedi, M., Choate, A., Kramer, G.L., Petty, F., 1997. Growth hormone response to the GABA_B agonist baclofen in major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology* 22, 129–140.

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.

Exley, R., Clements, M.A., Hartung, H., McIntosh, J.M., Cragg, S.J., 2008. Alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors dominate the nicotine control of

dopamine neurotransmission in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 33, 2158–2166.

Exley, R., Cragg, S.J., 2008. Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *Br. J. Pharmacol.* 153, 283–297.

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.

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.

Gonzales, K.K., Smith, Y., 2015. Striatal Cholinergic interneurons in the dorsal and ventral striatum: anatomical and functional considerations in normal and diseased conditions. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 1349, 1–45.

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.

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.

Johnston G.A., 1971. Muscimol and the uptake of gamma-aminobutyric acid by rat brain slices. *Psychopharmacologia* 22, 230–233.

Johnston G.A., 2014. Muscimol as an ionotropic GABA receptor agonist. *Neurochem. Res.* 39, 1942–1947.

Kiguchi, Y., Aono, Y., Watanabe, Y., Yamamoto-Nemoto, S., Shimizu, K., Shimizu, T., Kosuge, Y., Waddington, J.L., Ishige, K., Ito, Y., Saigusa, T., 2016. *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. *Eur. J. Pharmacol* 789, 402–410.

Kita, H., Kitai, S.T., 1988. Glutamate decarboxylase immunoreactive neurons in rat neostriatum: their morphological types and populations. *Brain Res.* 447, 346–352.

Klitenick, M.A., DeWitte, P., Kalivas, P.W., 1992. Regulation of somatodendritic dopamine release in the ventral tegmental area by opioids and GABA: an *in vivo* microdialysis study. *J. Neurosci.* 12, 2623–2632.

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.

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.

Lim, S.A., Kang, U.J., McGehee, D.S., 2014. Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Front. Synaptic. Neurosci* 6, 1-22.

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

Login, I. S., Pal, S. N., Adams, D. T., Gold, P.E., 1998. Muscimol increases acetylcholine release by directly stimulating adult striatal cholinergic interneurons. *Brain Res.* 779, 33–40.

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.

Margeta-Mitrovic, M., Mitrovic, I., Riley, R.C., Jan, L.Y., Basbaum, A.I., 1999. Immunocytochemical localization of GABA_B receptors in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 405, 299–321.

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.

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.

Meredith, G.E., Chang, H. T., 1994. Synaptic relationships of enkephalinergic and cholinergic neurons in the nucleus accumbens of the rat. *Brain Res.* 667, 67–76.

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.

Mouginot, D., Kombian, S.B., Pittman, Q.J., 1998. Activation of presynaptic GABA_B receptors inhibits evoked IPSCs in rat magnocellular neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 79, 1508–1517.

Murakawa, K., Hirose, N., Takada, K., Suzuki, T., Nagase, H., Cools, A.R., Koshikawa, N., 2004. Deltorphin 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.

Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edn. Academic Press, NY.

Phelps, P. E., Houser, C.R., Vaughn, J. E., 1985. Immunocytochemical localization of choline acetyltransferase within the rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study of cholinergic neurons and synapses. *J. Comp. Neurol.* 238, 286–307.

Pijnenburg, A.J., van Rossum, J.M., 1973. Stimulation of locomotor activity following injection of dopamine into the nucleus accumbens. *J. Pharm. Pharmacol.* 25, 1003–1005.

Rada, P.V., Mark, G.P., Hoebel, B.G., 1993. In vivo modulation of acetylcholine in the nucleus accumbens of freely moving rats: II. Inhibition by gamma-aminobutyric acid. *Brain Res.* 619, 105–110.

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.

Rice, M.E., Cragg, S.J., 2004. Nicotine amplifies reward-related dopamine signals in striatum. *Nat. Neurosci.* 7, 583–584.

Rodríguez-Pallares, J., Labandeira-García, J. L., Muñoz, A., Caruncho, H.J., 2000. Morphology and neurochemistry of two striatal neuronal subtypes expressing the GABA_A receptor alpha3-subunit in the rat. *Brain Res.* 876, 124–130.

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., 2012. *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., Waddington, J.L., 2017. Mechanisms underlying δ - and μ -opioid receptor agonist-induced increases in extracellular dopamine level in the nucleus accumbens of freely moving rats. *J. Oral Sci.* 59, 195–200.

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

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.

Santiago, M., Westerink, B.H., 1992. The role of GABA receptors in the control of nigrostriatal dopaminergic neurons: dual-probe microdialysis study in awake rats. *Eur. J. Pharmacol.* 219, 175–181.

Scatton, B., Bartholini, G., 1980. Modulation by GABA of cholinergic transmission in the striatum. *Brain Res.* 183, 211–216.

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

Smolders, I., De Klippel, N., Sarre, S., Ebinger, G., Michotte, Y., 1995. Tonic

GABA-ergic modulation of striatal dopamine release studied by in vivo microdialysis in the freely moving rat. *Eur. J. Pharmacol.* 284, 83–91.

Stoof, J. C., Den Breejen, E.J., Mulder, A.H., 1979. GABA modulates the release of dopamine and acetylcholine from rat caudate nucleus slices. *Eur. J. Pharmacol.* 57, 35–42.

Supavilai, P., Karobath, M., 1985. Modulation of acetylcholine release from rat striatal slices by the GABA/benzodiazepine receptor complex. *Life Science* 36, 417–426.

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.

Threlfell, S., Lalic, T., Platt, N.J., Jennings, K.A., Deisseroth, K., Cragg, S.J., 2012. Striatal dopamine release is triggered by synchronized activity in cholinergic interneurons. *Neuron* 75, 58–64.

Wedzony, K., Limberger, N., Späth, L., Wichmann, T., Starke, K., 1988. Acetylcholine release in rat nucleus accumbens is regulated through dopamine D2-receptors. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 338, 250–255.

Wong, L.S., Eshel, G., Dreher, J., Ong, J., Jackson, D.M., 1991. Role of dopamine and GABA in the control of motor activity elicited from the rat nucleus accumbens. *Pharm. Biochem. Behav.* 38, 829–835.

Xi, Z.X., Ramamoorthy, S., Shen, H., Lake, R., Samuvel, D.J., Kalivas, P.W., 2003. GABA transmission in the nucleus accumbens is altered after withdrawal from repeated cocaine. *J. Neurosci.* 23, 3498–3505.

Xie, Y., Heida, T., Stegenga, J., Zhao, Y., Moser, A., Tronnier, V., Feuerstein, T. J., Hofmann, U. G., 2014. High-frequency electrical stimulation suppresses cholinergic accumbens interneurons in acute rat brain slices through GABA_B receptors. *Eur. J. Neurosci.* 40, 3653–3662.

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.

Yung, K. K., Ng, T.K., Wong, C.K., 1999. Subpopulations of neurons in the rat neostriatum display GABA_BR1 receptor immunoreactivity. *Brain Res.* 830, 345–352.

参考論文

本論文は、主となる参考論文 "Stimulation of accumbal GABA_B receptors inhibits delta1-and delta2-opioid receptor-mediated dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats, European Journal of Pharmacology 837. 88-95, 2018" および 副となる参考論文 "*In vivo* neurochemical evidence that stimulation of accumbal GABA_A and GABA_B receptors each reduce acetylcholine efflux without affecting dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats, Synapse, in press" をまとめたものである。