

## 神経伝達物質遊離機構に対する電位依存性 Ca<sup>2+</sup> channel subtype の機能：線条体 dopamine と DOPA 遊離を指標にした検討

兼子 直\* 岡田 元宏\*  
 河田 祐子\* 千葉 丈司\*  
 扇谷 一朗\* 水野 和久\*  
 和田 一丸\* 桐生 一宏\*  
 田崎 博一\*

抄録：線条体 dopamine, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) 遊離に対する電位依存性 Ca<sup>2+</sup> channel subtype の機能を検討する目的で、線条体 dopamine, DOPA の基礎遊離, Ca<sup>2+</sup> 及び K<sup>+</sup> 依存性遊離に対する, N-, P-, Q-type Ca<sup>2+</sup> channel antagonist, ω-conotoxin GVIA (GVIA), ω-agatoxin IVA (IVA), ω-conotoxin MVIIC (MVIIC) の効果を *in vivo* microdialysis を用いて検討した。線条体 dopamine, DOPA の基礎遊離, Ca<sup>2+</sup> 依存性遊離は N-type Ca<sup>2+</sup> channel により規定されており, K<sup>+</sup> 依存性 dopamine, DOPA 遊離は P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel により規定されていた。しかし, DOPA の基礎遊離, Ca<sup>2+</sup> 依存性遊離の N-type Ca<sup>2+</sup> channel の感受性は dopamine よりも低く, 逆に K<sup>+</sup> 依存性 DOPA 遊離の P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel に対する感受性は dopamine よりも高かった。以上の結果から線条体 DOPA 遊離は神経伝達物質様であり, しかも dopamine とは異なる遊離機序を有している可能性が示唆された。

精神薬療基金研究年報 第29集：116～126, 1998

**Key words** : 3,4-Dihydroxyphenylalanine, Dopamine, Microdialysis, Voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel, ω-Agatoxin IVA, ω-Conotoxin GVIA, ω-Conotoxin MVIIC.

### 緒 言

神経伝達物質 dopamine の前駆物質, L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) の Parkinsonism (PD), neuroleptic malignant syndrome (NMS) に対する有効性は既に報告され<sup>1)17)</sup>, 臨床的に広く使用されている<sup>19)</sup>。この L-DOPA の臨床効果発現機序は, L-DOPA から dopamine への代謝によ

る dopamine 系機能の亢進によるものと考えられている<sup>19)</sup>。すなわち, L-DOPA は dopamine の前駆物質であり, L-DOPA 自体には薬理活性がないものと考えられてきた。しかし, 近年 dopamine receptor agonist (DRA) の PD に対する薬物療法が確立し, DRA と L-DOPA の PD に対する長期投与時の臨床効果と, 副作用の相違性が確認され<sup>19)</sup>, しかも, 基礎的な検討から, L-DOPA 自体が神経伝達物質様遊離

\* 弘前大学医学部神経精神医学講座；〒036 弘前市在府町5

\* Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Hirosaki University, 5 Zaifu-cho, Hirosaki 036, Japan.

形式を有し、興奮性効果を示す可能性も知られている<sup>4)5)6)25)</sup>。

抗精神病薬 (dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist) が細胞外 DOPA および dopamine 濃度を増加し<sup>24)</sup>、てんかん及び感情障害に対し効果を示す carbamazepine (CBZ), zonisamide (ZNS) も同様に細胞外 DOPA 濃度を増加する<sup>8)9)13)</sup>。

神経精神疾患に用いられる薬剤が、細胞外 DOPA 濃度を増加していることから、L-DOPA が神経伝達物質、あるいは神経伝達修飾物質の可能性があり、しかも DOPA 系神経伝達機構が神経精神科領域における疾患の病態発現機序に関与している可能性もある。

本報告では、L-DOPA の神経伝達物質様遊離の確認と、神経伝達物質様遊離規定機構として注目されている N-, P-, Q-type Ca<sup>2+</sup> channel<sup>3)18)20)21)</sup> の細胞外 dopamine 及び DOPA 濃度に対する効果を *in vivo* microdialysis を用いて、線条体で検討した。

## 方 法

### 1. *In vivo* microdialysis system

体重 250-300 g の雄性 Wistar 系ラットの線条体 (A=0.2, L=3.4, V=3.0 mm from bregma), ジエチルエーテル麻酔下で I-type 透析プローベ (0.22 mm diameter, 3.0 mm expose membrane, EICOM) を挿入した。プローベ挿入 24-36 hr 後に、1 µL/min の流量で透析液灌流を開始し、細胞外 dopamine 及び DOPA を回収した。Na<sup>+</sup> (145.0 mM), K<sup>+</sup> (2.7 mM), Ca<sup>2+</sup> (1.2 mM), Mg<sup>2+</sup> (1.0 mM) を含有し、磷酸緩衝液 (2.0 mM) 及び Tris 緩衝液 (1.1 mM) により pH 7.4 に調整した修正リング液 (MRS) を透析液として用いた<sup>10)14)</sup>。透析液は 20 min 間隔で回収し、ECD-HPLC system を用いて細胞外 dopamine, DOPA 濃度を測定した<sup>9)13)</sup>。

線条体 dopamine 及び DOPA 遊離刺激には、Ca<sup>2+</sup> (3.4 mM : CMRS) 及び K<sup>+</sup> (50 mM : KMRS) 含有修正リング液を 20 min 灌流し刺激とした。また、dopamine 合成系に対する Ca<sup>2+</sup> 及び K<sup>+</sup> の効果を検討するため、aromatic amino acid decarboxylase (AADC) 阻害薬 NSD1015 (1 or 10 µM) 含有修正リング液 (1 NMRS, 10 NMRS), そして Ca<sup>2+</sup> を除去し内因性 Ca<sup>2+</sup> antagonist である

Mg<sup>2+</sup> を 40 mM 含有した (FCMRS) を作成した<sup>10)</sup>。

### 2. ECD-HPLC system

HPLC system には、ポンプ EP-100 (EICOM) を用いた。電極は graphite carbon 電極 EC-100 (EICOM) を用い、過電圧は +600 mV に設定した。分析カラムは prosper RP-18 (70 mm×4 mm, 粒子径 5 µm, Cica-Merck) を用い、カラム温度は 25°C に設定した。移動相は 3% メタノール, 130 mg/L sodium octasulfonate, 0.1 mM EDTA-2Na を含んだ 0.2 M citrate/0.02 M sodium acetate 緩衝液 (pH 2.5) を用いた<sup>11)12)</sup>。

### 3. Chemical agents

N-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker : ω-conotoxin GVIA (GVIA), P-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker : ω-agatoxin IVA (IVA), Q-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker : ω-conotoxin MVIIC (MVIIC) を、MRS, CMRS, KMRS に、それぞれ 10 pM-10 µM 溶解し灌流した。

### 4. Study Design

4 回の測定値の平均を標準偏差で割ったものを CV 値として、CV < 5% を確認後、各種 Ca<sup>2+</sup> channel antagonist 含有修正リング液灌流、あるいは各種刺激を施行した。

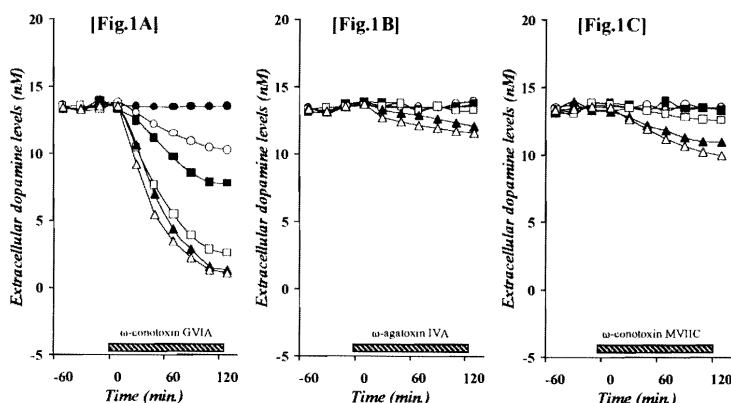
実験 1) 線条体細胞外 dopamine 及び DOPA 濃度基礎値に対する Ca<sup>2+</sup> channel blocker の効果。MRS 灌流を開始し、dopamine 及び DOPA の測定値の CV < 5% を確認後、GVIA (10 pM-10 µM), IVA (10 pM-10 µM), MVIIC (10 pM-10 µM) 含有 MRS を 120 min 間灌流した。

実験 2) Ca<sup>2+</sup> 依存性線条体 dopamine 及び DOPA 遊離に対する Ca<sup>2+</sup> channel blocker の効果。

GVIA (10 pM-10 µM), IVA (10 pM-10 µM), MVIIC (10 pM-10 µM) 含有 MRS 灌流を開始し、dopamine, DOPA の測定値 CV < 5% 確認後、同濃度の Ca<sup>2+</sup> channel blocker 含有した CMRS を 20 min 間灌流し、再び同濃度の Ca<sup>2+</sup> channel blocker 含有 MRS を灌流した。

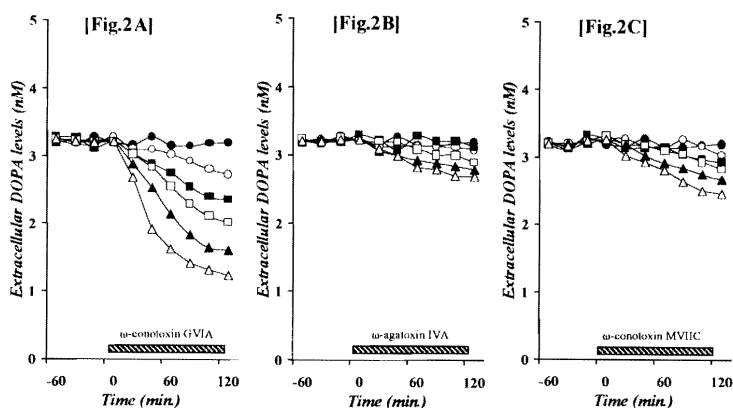
実験 3) K<sup>+</sup> 依存性線条体 dopamine 及び DOPA 遊離に対する Ca<sup>2+</sup> channel blocker の効果。

GVIA (10 pM-10 µM), IVA (10 pM-10 µM), MVIIC (10 pM-10 µM) 含有 MRS 灌流を開始し、dopamine, DOPA の測定値 CV < 5% 確認後、同濃度の Ca<sup>2+</sup> channel blocker 含有した



**Fig. 1** Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists on striatal basal dopamine release.

The extracellular dopamine level was measured in striatal perfusate for 60 min during the pre-drug period, and for 120 min during perfusion with modified Ringer's solution containing 0 (●: control), 1 (○), 10 (■), 100 (□), 1000 (▲) and 3000 (△) nM  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists. The effects of an N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -conotoxin GVIA (A), a P-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -agatoxin IVA (B) and a Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -conotoxin MVIIC (C) on striatal basal dopamine release were examined. The ordinate indicates the mean ( $n=6$ ) of estimated extracellular dopamine level (nM) and the abscissa indicates the time in minutes (min). Standard deviations were excluded for the purpose of simplicity of the figure.



**Fig. 2** Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists on striatal basal DOPA release.

The extracellular DOPA level was measured in striatal perfusate for 60 min during the pre-drug period, and for 120 min during perfusion with modified Ringer's solution containing 0 (●: control), 1 (○), 10 (■), 100 (□), 1000 (▲) and 3000 (△) nM  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists. The effects of an N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -conotoxin GVIA (A), a P-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -agatoxin IVA (B) and a Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -conotoxin MVIIC (C) on striatal basal DOPA release were examined. The ordinate indicates the mean ( $n=6$ ) of estimated extracellular DOPA level (nM) and the abscissa indicates the time in minutes (min). Standard deviations were excluded for the purpose of simplicity of the figure.

KMRS を 20 min 間 灌 流 し、再 び 同 濃 度 の  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker 含 有 MRS を 灌 流 し た。  
実 験 4)  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  の tyrosine hydroxylase 活 性

に 対 す る 効 果。

実 験 1)-3) で 検 討 し た 細 胞 外 DOPA 濃 度 が tyrosine hydroxylase (TH) 活 性 の 影 響 を 受 け た 結

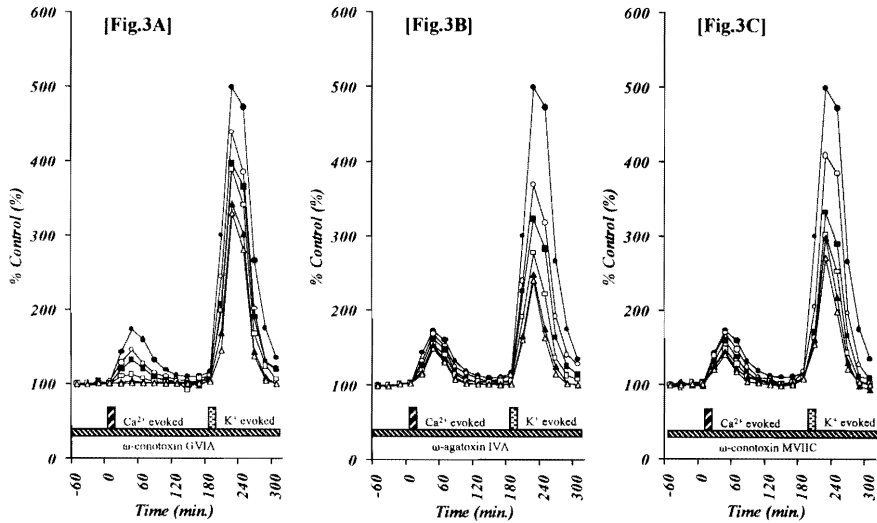


Fig. 3 Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists on striatal  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -evoked dopamine release.

Extracellular dopamine level was measured in striatal perfusate for 60 min during perfusion with 0 (●: control), 1 (○), 10 (■), 100 (□), 1000 (▲) and 3000 (△) nM of  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists contained in modified Ringer's solution (control). The high  $\text{Ca}^{2+}$  (3.4 mM: from 0 to 20 min) and high  $\text{K}^{+}$  (50 mM: from 180 to 200 min) containing modified Ringer's solution was perfused for 20 min specified in figures. The effects of an N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -conotoxin GVIA (A), a P-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -agatoxin IVA (B) and a Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -conotoxin MVIIC (C) on striatal  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -evoked dopamine release were examined. The ordinate indicates the mean ( $n=6$ ) extracellular dopamine level (% control) and the abscissa indicates the time in minutes (min). Standard deviations were excluded for the purpose of simplicity of the figure.

果であるか否を検討するために、1 NMRS あるいは 10 NMRS を用いて、AADC 活性を抑制した環境下での細胞外 DOPA 濃度に対する FCMRS, CMRS, KMRS 灌流刺激を行った。

#### 5. $\text{Ca}^{2+}$ channel blocker の透析膜透過率の測定

各  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker の  $\text{IC}_{50}$  算出のため、透析膜から透析プローブ外への透過率を測定した。透過率測定には、dopamine 及び serotonin の回収率測定法<sup>15)</sup>を透過率測定用に一部改変して行った。GVIA, IVA, MVIIC の濃度測定には UV-HPLC system を用い、ポンプ L-4000 (Yanaco)、検出器 UV-970 (Jusco) を用い 210 nm に設定した。分析カラムは prosper RP-18 (125 mm×4 mm, 粒子径 5  $\mu\text{m}$ , Cica-Merck) を用い、カラム温度は 25°C に設定した。移動相は 30% アセトニトリルを含んだ 0.1 M sodium chloride buffer (pH 2.4) を用いた。

#### 6. 統計解析

$\text{Ca}^{2+}$  channel blocker の各種線条体 dopamine, DOPA 遊離に対する効果の検討には、logistic con-

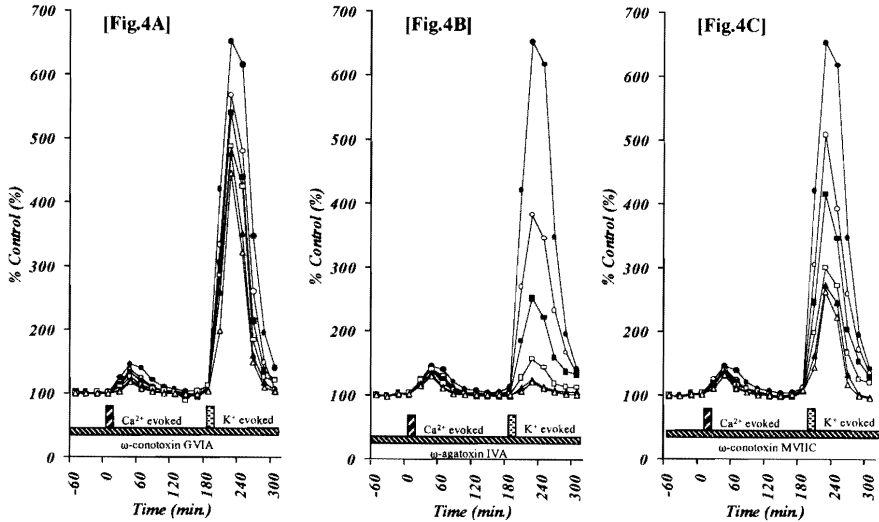
centration-response curves を用い用量反応曲線を作成し  $\text{IC}_{50}$  を算出した。

## 結 果

線条体細胞外 dopamine 濃度は  $51.8 \pm 6.9$  fmol/20  $\mu\text{L}$ 、回収率は  $19.2 \pm 3.6\%$  であったことから、線条体における細胞外 dopamine の基礎濃度は  $13.5 \pm 2.2$  nM と推測された。一方、線条体細胞外 DOPA 濃度は  $11.4 \pm 0.7$  fmol/20  $\mu\text{L}$ 、回収率は  $17.7 \pm 4.8\%$  であり、線条体細胞外 DOPA 基礎濃度は  $3.2 \pm 0.3$  nM と推測された。一方 CMRS ( $\text{Ca}^{2+}$  3.4 mM 含有) 20 min 間灌流刺激時の線条体細胞外 dopamine 及び DOPA 濃度の増加率はそれぞれ、 $172.8 \pm 20.53\%$  及び  $145.3 \pm 11.78\%$  であった。KMRS ( $\text{K}^{+}$  50 mM 含有) 20 min 間灌流刺激時の線条体細胞外 dopamine, DOPA 濃度の増加率は、それぞれ  $499.5 \pm 56.7\%$ 、 $653.2 \pm 83.5\%$  であった。

#### 1. $\text{Ca}^{2+}$ channel blocker 透過率

GVIA, IVA, MVIIC の透過率は  $1.02 \pm 0.31$ ,



**Fig. 4** Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists on striatal  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -evoked DOPA release.

Extracellular DOPA level was measured in striatal perfusate for 60 min during perfusion with 0 (●: control), 1 (○), 10 (■), 100 (□), 1000 (▲) and 3000 (△) nM of  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists contained in modified Ringer's solution (control), and the high  $\text{Ca}^{2+}$  (3.4 mM: from 0 to 20 min) and high  $\text{K}^{+}$  (50 mM: from 180 to 200 min) containing modified Ringer's was perfused for 20 min specified in figures. The effects of an N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -conotoxin GVIA (A), a P-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -agatoxin IVA (B) and a Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist,  $\omega$ -conotoxin MVIIC (C) on striatal  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^{+}$ -evoked DOPA release were examined. The ordinate indicates the mean ( $n=6$ ) extracellular DOPA level (% control) and the abscissa indicates the time in minutes (min). Standard deviations were excluded for the purpose of simplicity of the figure.

$0.68 \pm 0.29$ ,  $0.92 \pm 0.44$  %であった。これらの結果から、本実験で用いた  $10 \text{ pM}$ - $10 \text{ }\mu\text{M}$  濃度範囲の灌流投与による脳実質への GVIA, IVA, MVIIC の移行濃度は、それぞれ  $1.02 \times 10^{-4}$ - $102 \text{ nM}$ ,  $0.68 \times 10^{-4}$ - $68 \text{ nM}$ ,  $0.92 \times 10^{-4}$ - $92 \text{ nM}$  と予想された。

## 2. 線条体 dopamine, DOPA 基礎遊離量に対する $\text{Ca}^{2+}$ channel blocker の効果

線条体 dopamine, DOPA 基礎遊離に対する N-, P-, Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel subtype の効果を Fig. 1, 2, 5 に示した。

GVIA は線条体 dopamine ( $\text{IC}_{50}=0.48 \text{ nM}$ ), DOPA ( $\text{IC}_{50}=9.55 \text{ nM}$ ) 基礎遊離を濃度依存性に抑制した。しかし、IVA 及び MVIIC は効果がなかった。

## 3. $\text{Ca}^{2+}$ 依存性線条体 dopamine, DOPA 基礎遊離量に対する $\text{Ca}^{2+}$ channel blocker の効果

$\text{Ca}^{2+}$  依存性線条体 dopamine, DOPA 遊離に対する N-, P-, Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel subtype の効果を Fig. 3, 4, 6 に示した。

GVIA は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性線条体 dopamine ( $\text{IC}_{50}=0.40 \text{ nM}$ ), DOPA ( $\text{IC}_{50}=10.51 \text{ nM}$ ) 遊離を濃度依存性に抑制した。しかし、IVA 及び MVIIC は効果がなかった。

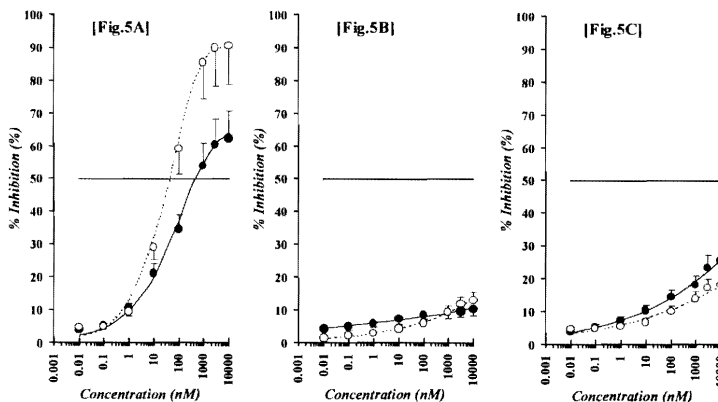
## 4. $\text{K}^{+}$ 依存性線条体 dopamine, DOPA 基礎遊離量に対する $\text{Ca}^{2+}$ channel blocker の効果

$\text{K}^{+}$  依存性線条体 dopamine, DOPA 遊離に対する N-, P-, Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel subtype の効果を Fig. 3, 4, 7 に示した。

IVA は  $\text{K}^{+}$  依存性線条体 dopamine ( $\text{IC}_{50}=2.65 \text{ nM}$ ), DOPA ( $\text{IC}_{50}=0.15 \text{ nM}$ ) 遊離を濃度依存性に抑制した。MVIIC も IVA 同様に  $\text{K}^{+}$  依存性線条体 dopamine ( $\text{IC}_{50}=12.54 \text{ nM}$ ), DOPA ( $\text{IC}_{50}=3.05 \text{ nM}$ ) 遊離を抑制した。しかし、GVIA は効果がなかった。

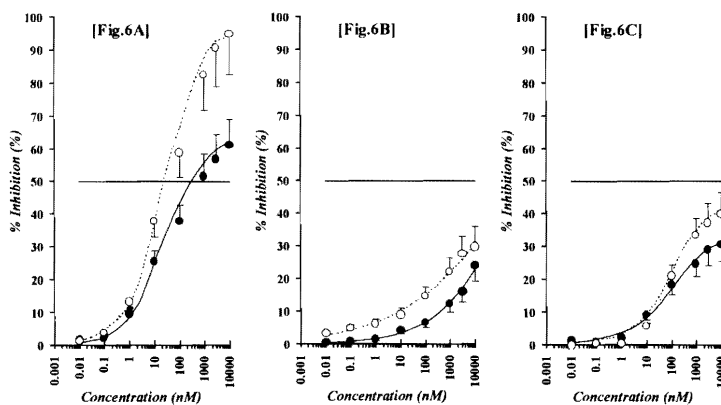
## 5. TH 活性に対する $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{K}^{+}$ の効果

Dopamine 合成系に対する細胞外  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  濃度の効果を検討するために、dopamine 合成系の律速段階である TH 活性に対する  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  の効果を検討



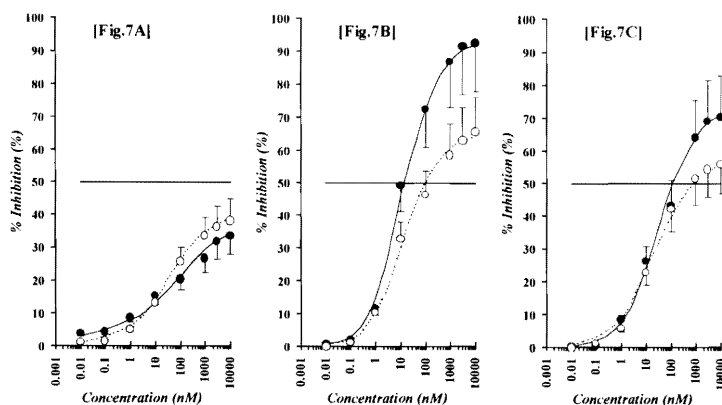
**Fig. 5** Inhibition of the basal levels of striatal dopamine and DOPA release by  $\omega$ -conotoxin GVIA,  $\omega$ -agatoxin IVA and  $\omega$ -conotoxin MVIIC.

The ordinate indicates the basal levels of striatal dopamine ( $\circ$ :  $n=48$ ) and DOPA ( $\bullet$ :  $n=48$ ) release (nM), which were determined between 100 and 120 min after addition of a  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist to the perfusion medium, and the abscissa shows the logarithmic concentration of the antagonist. The concentration-effect relationships of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers on striatal basal dopamine and DOPA release were analyzed by logistic concentration-response curves.  $\omega$ -Conotoxin GVIA (A) decreased the basal levels of striatal dopamine as well as DOPA release, in a concentration-dependent manner ( $P < 0.01$ ). The  $\text{IC}_{50}$  values for  $\omega$ -conotoxin GVIA inhibition of the basal levels of striatal dopamine and DOPA release were 0.48 nM and 9.55 nM, respectively. Neither  $\omega$ -agatoxin IVA (B) nor  $\omega$ -conotoxin MVIIC (C) affected the basal levels of striatal dopamine or DOPA release.



**Fig. 6** Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked striatal dopamine and DOPA release by  $\omega$ -conotoxin GVIA,  $\omega$ -agatoxin IVA and  $\omega$ -conotoxin MVIIC.

The ordinate indicates the percentage of the control value (pre- $\text{Ca}^{2+}$  stimulation) of  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked striatal dopamine ( $\circ$ :  $n=48$ ) and DOPA ( $\bullet$ :  $n=48$ ) release, which were determined between 20 and 40 min after  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked stimulation, and the abscissa shows the logarithmic concentration of the antagonist. The concentration-effect relationships of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers on striatal  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked levels of striatal dopamine and DOPA release were analyzed by logistic concentration-response curves.  $\omega$ -Conotoxin GVIA inhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked striatal dopamine and DOPA release, in a concentration-dependent manner ( $P < 0.01$ ). The  $\text{IC}_{50}$  values for  $\omega$ -conotoxin GVIA (A) inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked striatal dopamine and DOPA release were 0.40 nM and 10.51 nM, respectively. Neither  $\omega$ -agatoxin IVA (B) nor  $\omega$ -conotoxin MVIIC (C) affected  $\text{Ca}^{2+}$ -evoked striatal dopamine or DOPA release.



**Fig. 7** Inhibition of  $K^+$ -evoked striatal dopamine and DOPA release by  $\omega$ -conotoxin GVIA,  $\omega$ -agatoxin IVA and  $\omega$ -conotoxin MVIIC.

The ordinate indicates the percentage of the control value (pre- $K^+$  stimulation) of  $K^+$ -evoked striatal dopamine ( $\circ$ :  $n=48$ ) and DOPA ( $\bullet$ :  $n=48$ ) release, which were determined between 20 and 40 min after  $K^+$ -evoked stimulation, and the abscissa shows the logarithmic concentration of the antagonist. The concentration-effect relationships of the  $Ca^{2+}$  channel blockers on striatal  $K^+$ -evoked level of striatal dopamine and DOPA release were analyzed by logistic concentration-response curves.  $\omega$ -Conotoxin GVIA (A) did not affect  $K^+$ -evoked striatal dopamine or DOPA release.  $\omega$ -Agatoxin IVA (B) inhibited  $K^+$ -evoked striatal dopamine as well as DOPA release, in a concentration-dependent manner ( $P<0.01$ ). The  $IC_{50}$  values for  $\omega$ -agatoxin IVA inhibition of  $K^+$ -evoked striatal dopamine and DOPA release were 2.65 nM and 0.15 nM, respectively.  $\omega$ -Conotoxin MVIIC (C) inhibited  $K^+$ -evoked striatal dopamine as well as DOPA release, in a concentration-dependent manner ( $P<0.01$ ). The  $IC_{50}$  values for  $\omega$ -conotoxin MVIIC inhibition of  $K^+$ -evoked striatal dopamine and DOPA release were 12.54 nM and 3.05 nM, respectively.

した。細胞外 DOPA 濃度は 1 NMRS 灌流時により  $379.6 \pm 76.4$  nM に、10 NMRS 灌流時は  $1.41 \pm 0.14$   $\mu$ M に増加した (Fig. 8A)。しかし、NSD1015 灌流環境下では、FCMRS 灌流により細胞外 DOPA 濃度の減少は生じず (Fig. 8B)、同様に CMRS 灌流刺激でも細胞外 DOPA 濃度の増加は確認できなかった (Fig. 8C)。KMRS 灌流刺激では、NSD1015 の有無に関わらず細胞外 DOPA 濃度は増加したが、その増加率は、NSD1015 濃度依存性に減弱した (Fig. 8D)。

## 考 察

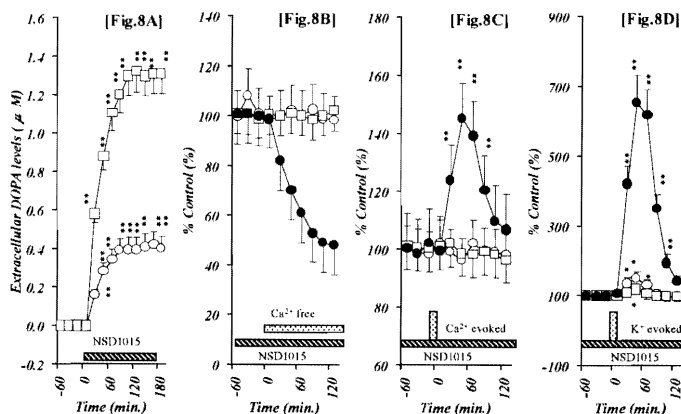
細胞外  $Ca^{2+}$  そして  $K^+$  濃度の増加による神経伝達物質遊離の増加は、すでに多くの報告で確認されているが<sup>1)8)10)22)23)</sup>、その感受性は各神経伝達物質により、異なることが報告されている<sup>2)</sup>。

近年、DOPA の遊離が神経伝達物質様遊離基準である  $Ca^{2+}$ -dependent,  $K^+$ -sensitivity, TTX-sen-

sitivity を満たしていることが明らかになった<sup>5)6)</sup>。本研究からも  $Ca^{2+}$ -dependent,  $K^+$ -sensitivity は確認された。しかし FCMRS 灌流時には、線条体細胞外 dopamine 濃度は基礎遊離量の 10% 以下に減少したのに対して、線条体細胞外 DOPA 濃度は 40% 程度にしか減少していない。すなわち、線条体細胞外 DOPA 濃度の 40% は、少なくとも  $Ca^{2+}$  非感受性成分が含まれているものと推察される。

$Ca^{2+}$ ,  $K^+$  が TH 活性に影響することも知られているが<sup>7)</sup>、今回の検討では、 $Ca^{2+}$  濃度 1.2 mM から 3.4 mM へ、そして  $K^+$  濃度 2.7 mM から 50 mM への細胞外濃度増加では TH 活性には影響がなかった。以上の実験結果から、少なくとも細胞外  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  濃度の増加による細胞外 DOPA 濃度の増加は遊離性成分の増加によるものと考えられる。

線条体 dopamine, DOPA の基礎、 $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  依存性遊離遊離は、N-, P-, Q-type  $Ca^{2+}$  channel により規定されていたが、dopamine と DOPA では



**Fig. 8** Effects of an increase in extracellular levels of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  on tyrosine hydroxylase activity *in vivo*. (A) shows the effects of 1 (○) and 10 (□)  $\mu\text{M}$  NSD1015 on striatal extracellular DOPA levels (DOPA accumulation). The extracellular DOPA level was measured in striatal perfusate for 60 min before the addition of NSD1015 (control) and for 180 min during perfusion with NSD1015. The ordinate indicates the mean  $\pm$  s.e. ( $n=6$ ) estimated extracellular DOPA level ( $\mu\text{M}$ ) and the abscissa indicates the time in minutes (min). The mean values obtained before and during perfusion with NSD1015 were compared by repeated measurements one-way analysis of variance with a randomized blocked design and Dunnett's multiple comparison test (\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ). (B) shows the effects of  $\text{Ca}^{2+}$ -free modified Ringer's solution containing 40 mM  $\text{Mg}^{2+}$  on striatal DOPA accumulation, in the presence of 0 (●), 1 (○) or 10 (□)  $\mu\text{M}$  NSD1015. The ordinate indicates the mean  $\pm$  s.e. ( $n=6$ ) of extracellular DOPA level (% control) and the abscissa indicates the time in minutes (min). The mean values obtained before and during perfusion with  $\text{Ca}^{2+}$ -free modified Ringer's solution containing 40 mM  $\text{Mg}^{2+}$  were compared by repeated measurements one-way analysis of variance with randomized blocked design and Dunnett's multiple comparison test (\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ). The effects of  $\text{Ca}^{2+}$ - (C) and  $\text{K}^{+}$ -evoked (D) stimulation on striatal DOPA accumulation, in the presence of 0 (●), 1 (○) or 10 (□)  $\mu\text{M}$  NSD1015 were examined ( $n=6$ ). The mean values obtained before and after  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  stimulation were compared by repeated measurements one-way analysis of variance with a randomized blocked design and Dunnett's multiple comparison test (\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ).

差異が認められた。

線条体 dopamine, DOPA の基礎遊離及び  $\text{Ca}^{2+}$  依存性遊離はともに N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel により規定されていたが,  $\text{K}^{+}$  依存性遊離は P/Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel により規定されていた。しかし, 基礎遊離および  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の DOPA 遊離の N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel に対する感受性は dopamine の基礎遊離,  $\text{Ca}^{2+}$  依存性遊離に対する感受性に比較的低いが, 逆に  $\text{K}^{+}$  依存性 DOPA 遊離の P-, Q-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel に対する感受性は dopamine よりも高かった。

これまで, glutamate などの興奮性アミノ酸と dopamine, serotonin, acetylcholine などの古典的神経伝達物質はその遊離形式が異なる可能性が示唆されてきているが<sup>37)</sup>, DOPA の遊離形式は, 興奮性ア

ミノ酸と古典的神経伝達物質の両遊離形式の中間的特徴を有している可能性を本実験結果は示唆している。この DOPA 遊離形式が, DOPA 遊離機構自体が中間的特徴を有することによるのか, あるいは, 古典的神経伝達物質遊離類似機構と興奮性アミノ酸遊離類似機構で構成される複数の遊離形式を有するためなのかは今後詳細に検討する必要がある。

緒言でも述べたが, dopamine  $\text{D}_2$  receptor antagonist である多くの抗精神病薬, 情動安定化作用を有する carbamazepine, zonisamide などの抗てんかん薬は細胞外 DOPA 濃度を増加することが知られており<sup>9)13)24)</sup>, 今後 dopamine の前駆物質としてだけでなく, 神経伝達物質としての L-DOPA の作用を神経精神医学領域で検討する必要がある。

以上, 本報告を要約する。



- 1) 線条体 dopamine, DOPA 基礎遊離は N-type  $Ca^{2+}$  channel により規定されていた。N-type  $Ca^{2+}$  channel に対する感受性は dopamine が DOPA よりも高かった。
- 2)  $Ca^{2+}$  依存性線条体 dopamine, DOPA 遊離は N-type  $Ca^{2+}$  channel により規定されていた。N-type  $Ca^{2+}$  channel に対する感受性は dopamine が DOPA よりも高かった。
- 3)  $K^{+}$  依存性線条体 dopamine, DOPA 遊離は P/Q-type  $Ca^{2+}$  channel により規定されていた。P/Q-type  $Ca^{2+}$  channel に対する感受性は DOPA が dopamine よりも高かった。
- 4) 以上より、線条体 DOPA は N-, P-, Q-type  $Ca^{2+}$  channel に規定された、神経伝達物質様遊離 ( $Ca^{2+}$ ,  $K^{+}$  感受性遊離) 機構を有していることが明らかになった。

#### 文 献

- 1) Augustine GJ, Charlton MP and Smith SJ. Calcium action in synaptic transmitter release. *Ann. Rev. Neurosci.* 1987; 10: 633~693.
- 2) Harvey J, Wedley S, Findlay JD, Sidell MR and Pullar IA.  $\omega$ -Agatoxin IVA identifies a single calcium channel subtype which contributes to the potassium-induced release of acetylcholine, 5-hydroxytryptamine, dopamine,  $\gamma$ -aminobutylic acid and glutamate from rat brain slices. *Neuropharmacology*, 1996; 35: 385~392.
- 3) Hillyard DR, Monje VD, Mintz IM, Bean BP, Nadasdi L, Ramachandran J, Miljanich G, Azimi-Zoonooz A, McIntosh JM, Cruz LJ, Imperial JS and Olivera BM. A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic  $Ca^{2+}$  channels. *Neuron*, 1992; 9: 69~77.
- 4) Misu Y and Goshima Y. Is L-dopa an endogenous neurotransmitter? *Trends Pharmac. Sci.* 1993; 14: 119~123.
- 5) Misu Y, Ueda H and Goshima Y. Neurotransmitter-like actions of L-DOPA. *Adv. Pharmacol.* 1995; 32: 427~459.
- 6) Misu Y, Yue JL and Goshima Y. L-DOPA systems for blood pressure regulation in the lower brainstem. *Neurosci. Res.* 1995; 23: 147~158.
- 7) Nestler EJ and Greengard P. Protein phosphorylation and the regulation of neuronal function. In: *Basic Neurochemistry*, fifty edition, Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW and Molinoff PB (Eds), Raven Press, New York, 1994: 449-490.
- 8) Okada M, Kaneko S, Hirano T, Ishida M, Kondo T, Otani K and Fukushima Y. Effects of zonisamide on extracellular levels of monoamine and its metabolites, and on  $Ca^{2+}$  dependent dopamine release. *Epilepsy Res.* 1992; 13: 113-119.
- 9) Okada M, Kaneko S, Hirano T, Mizuno K, Kondo T, Otani K and Fukushima Y. Effects of zonisamide on dopaminergic system. *Epilepsy Res.* 1995; 22: 193-205.
- 10) Okada M, Mizuno K, Okuyama M and Kaneko S. Magnesium ion augmentation of inhibitory effects of adenosine on dopamine release in the rat striatum. *Psychiatry and Clin. Neurosci.* 1996; 50: 147~156.
- 11) Okada M, Mizuno K, Okuyama M and Kaneko S. Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. *Neurosci. Lett.* 1996; 212: 53~56.
- 12) Okada M, Kiryu K, Kawata Y, Mizuno K, Wada K, Tasaki H and Kaneko S. Determination of the effects of caffeine and carbamazepine on striatal dopamine release by in vivo microdialysis. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; 32: 181~188.
- 13) Okada M, Hirano T, Mizuno K, Chiba T, Kawata Y, Kiryu K, Wada K, Tasaki H and Kaneko S. Biphasic effects of carbamazepine on the dopaminergic system in rat striatum and hippocampus. *Epilepsy Res.* 1997; 28: 143~153.
- 14) Okada M, Kawata Y, Kiryu K, Mizuno K, Wada K, Inomata H and Kaneko S. Effects of non-toxic and toxic concentrations of phenytoin on monoamine levels in rat brain. *Epilepsy Res.* 1997; 28: 155~163.
- 15) Okada M, Kawata Y, Kiryu K, Mizuno K, Wada K, Tasaki H and Kaneko S. Effects of adenosine receptor subtypes on hippocampal extracellular serotonin level and serotonin reuptake activity. *J. Neurochem.* 1997; 69: 2581~2588.
- 16) Otani K, Mihara K, Kondo T, Okada M, Kaneko S and Fukushima Y. Treatment of neuroleptic malignant syndrome with levodopa. *Hum. Psychopharmacology*, 1991; 7: 21~221.
- 17) Otani K, Mihara K, Okada M, Kaneko S and

- Fukushima Y. Crossover reaction between haloperidol and amoxapine for NMS. *Br. J. Psychiatry*, 1991; 159: 889.
- 18) Randall A and Tsien RW. Pharmacological dissection of multiple types of  $Ca^{2+}$  channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J. Neurosci*, 1995; 15: 2995~3012.
- 19) Standaert DG and Young AB. Treatment of central nervous system degenerative disorders. In: Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics, Hardman JG and Limbird LE (Eds), Health Professions Division, New York, 1996: 503-519.
- 20) Takahashi T and Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature*, 1993; 336: 156~158.
- 21) Turner TJ, Adams ME and Dunlap K. Multiple  $Ca^{2+}$  channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 9518~9522.
- 22) Westerink BHC, Hofsteede HM, Damsma G and DeVries JB. The significance of extracellular calcium for the release of dopamine, acetylcholine and amino acids in conscious rats, evaluated by brain microdialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*, 1988; 337: 373~378.
- 23) Westerink BHC, Hofsteede RM, Tuntler J and de Vries JB. Use of calcium antagonism for the characterization of drug-evoked dopamine release from the brain of conscious rats determined by microdialysis. *J. Neurochem*, 1989; 52: 722~729.
- 24) Westerink BHC, de Vries JB and Duran R. Use of microdialysis for tyrosine hydroxylase activity in the brain of conscious rats. *J. Neurochem*, 1990; 54: 381~387.
- 25) Yue JL, Goshima Y and Misu Y. Transmitter-like L-3,4-dihydroxy-phenylalanine tonically functions to mediate vasodepressor control in the caudal ventrolateral medulla of rats. *Neurosci. Lett*, 1993; 159: 103~106.

## ABSTRACT

**Effects of Ca<sup>2+</sup> channel antagonists on striatal dopamine and DOPA releases, studied by *in vivo* microdialysis.**

Sunao Kaneko\*, Motohiro Okada\*, Yuko Kawata\*, Takeshi Chiba\*, Ichiro Ogiya\*, Kazuhisa Mizuno\*, Kazumaru Wada\*, Kazuhiro Kiryu\*, and Hiroichi Tasaki\*

\*Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Hirosaki University, 5 Zaifu-cho, Hirosaki 036, Japan

To elucidate the mechanisms regulating the release of striatal dopamine and its precursor, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), we determined the effects of various Ca<sup>2+</sup> channel antagonists, an N-type Ca<sup>2+</sup> channel antagonist,  $\omega$ -conotoxin GVIA, a P-type Ca<sup>2+</sup> channel antagonist,  $\omega$ -agatoxin IVA, and a Q-type Ca<sup>2+</sup> channel antagonist,  $\omega$ -conotoxin MVIIC, on the basal and Ca<sup>2+</sup>- and K<sup>+</sup>-evoked release of striatal dopamine and DOPA, using *in vivo* microdialysis.  $\omega$ -Conotoxin GVIA strongly inhibited striatal basal dopamine release (IC<sub>50</sub>=0.48 nM), whereas this toxin only weakly modulated basal striatal DOPA release (IC<sub>50</sub>=9.55 nM). Neither  $\omega$ -agatoxin IVA nor  $\omega$ -conotoxin MVIIC affected the basal striatal release of dopamine and DOPA.  $\omega$ -Conotoxin GVIA strongly inhibited Ca<sup>2+</sup>-evoked striatal dopamine release (IC<sub>50</sub>=0.40 nM), whereas Ca<sup>2+</sup>-evoked striatal DOPA release only was weakly modulated (IC<sub>50</sub>=10.51 nM). Neither  $\omega$ -agatoxin IVA nor  $\omega$ -conotoxin MVIIC affected the Ca<sup>2+</sup>-evoked release of striatal dopamine and DOPA. Both  $\omega$ -agatoxin IVA and  $\omega$ -conotoxin MVIIC inhibited the K<sup>+</sup>-evoked release of striatal dopamine (IC<sub>50</sub> of  $\omega$ -agatoxin IVA=2.65 nM; IC<sub>50</sub> of  $\omega$ -conotoxin MVIIC=12.54 nM) and DOPA (IC<sub>50</sub> of  $\omega$ -agatoxin IVA=0.15 nM; IC<sub>50</sub> of  $\omega$ -conotoxin MVIIC=3.05 nM), whereas  $\omega$ -conotoxin GVIA had no effect on the K<sup>+</sup>-evoked release of striatal dopamine and DOPA. An increase in the extracellular Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> concentrations (Ca<sup>2+</sup>- and K<sup>+</sup>-evoked stimulation) did not affect tyrosine hydroxylase activity *in vivo*. These findings suggest that striatal DOPA release is neurotransmitter-like and that, unlike the mechanisms of striatal dopaminergic transmission, this striatal DOPA transmission is at least partly regulated by voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels.

(Ann. Rep. Pharmacopsychiat. Res. Found. 1998, 29 : 116~126)