

カルシウムチャンネル阻害剤 verapamil の中枢 モノアミン伝達物質の放出ならびに代謝に及ぼす作用 : methamphetamine および reserpine との比較

岡山大学医学部脳代謝研究施設病態生化学部門 (主任: 庄盛敏彦教授)

池 田 正 明

(昭和62年 3月25日受稿)

Key words : Verapamil
Ca²⁺-channel
Methamphetamine
Reserpine
Monoamine release

はじめに

カルシウムチャンネル阻害剤の主なものは、その構造から大きく4種類に分類されており、papaverine 誘導体、dihydropyridine 誘導体、benzothiazepine 誘導体および piperazine 誘導体がある。それらの末梢における作用機序は¹⁾、平滑筋や心筋へのカルシウム流入を阻害することによって脱分極状態を減弱させ、その結果末梢血管等を弛緩させるものと考えられており、臨床的には降圧薬、虚血性心疾患治療薬あるいは抗不整脈薬としてすでに広く使用されている。

脳組織にはカルシウムチャンネル阻害剤結合部位があり²⁾、選択的にカルシウムチャンネルを阻害していることが知られている。中枢神経系におけるカルシウムチャンネルは、シナプス前部に存在すると想定される電位依存性カルシウムチャンネルと、シナプス後部に存在すると想定される受容体作動性カルシウムチャンネルに大別されているが、その詳細は不明の点が多い。脳シナプトゾームを用いたカルシウム拮抗薬による KCl 誘導カルシウム取り込みに対する阻害実験では、末梢組織に比べてその阻害能は低いとされている³⁾。また、カルシウムチャンネル

阻害剤は末梢組織では電位依存性カルシウムチャンネルを阻害しているが⁴⁾、脳組織では dihydropyridine 系カルシウムチャンネル阻害剤に属する nitrendipine 結合部位は直接電位依存性カルシウムチャンネルと関連していないとする報告⁵⁾もあり、末梢とは異なった作用機構の存在が示唆されている。一方、カルシウムチャンネル阻害剤の神経伝達物質の放出に対する影響を検討した *in vitro* 実験では、その結果は報告者によって一様でなく⁶⁻⁸⁾、カルシウムチャンネルに数種類のサブクラスやサブユニットが存在する可能性も想定されている⁹⁾。しかし、カルシウムチャンネル阻害剤の中枢薬理作用に関しては、なお不明な点が多く、特に *in vivo* における作用機序の点から解明が待たれるところである。

そこで本研究では、papaverine 誘導体に属し、神経伝達物質放出に抑制的に関与すると考えられているカルシウムチャンネル阻害剤である verapamil (以下 [V]) を、中枢モノアミン放出作用を有する methamphetamine ([M]) および reserpine ([R]) と比較することによって、その中枢薬理作用について検討を加えた。

材料および方法

1. 実験動物

ウィスター系雄性ラット(チャールズリバー)を、12時間毎の明暗周期(午前6時点灯)、恒温、恒湿、自由摂食、自由摂水の条件下で飼育した。行動量測定用ラットはケージあたり1匹、またモノアミンおよびGABA測定用ラットは3匹とした。実験群として、無投薬群([C]群)、[V](100 mg/l)投与群([V]群)、[M](100 mg/l)投与群([M]群)、[R](4 mg/l)投与群([R]群)、ならびにそれら3種の薬物のうち2剤を組み合わせた3組の併用投与群の合計7群を作成した。薬物はすべて飲水中に溶かして7週齢より投与した。モノアミン測定用実験動物は各群それぞれ6匹とした。

2. ラット脳微小部位の採取

2週間の薬物投与が完了した時点で午前9時より11時の間に液体窒素で急速にラット頭部を冷却し、断頭後すみやかに全脳を採取し、ドライアイス上で凍結したのち -80°C で保存した。脳微小部位は、 -20°C に調節したプレート上で全脳を1 mm厚で前額断し、ラット脳アトラス¹⁰⁾を参考にして、各部位の大きさ・形状に合わせた注射針で、側坐核(N. ACC)、線条体(STR)、視交叉上核(SCN)、視床下部外側領野(LH)、視床下部腹内側領野(VMH)、扁桃体腹側領野(AMY)、黒質(SN)および背側縫線核(RD)の8部位をパンチアウトすることにより得た。以上により得た脳組織は、約20倍量のトリス塩酸緩衝液(pH 7.5, 50 mM)を含むエッペンドルフ型マイクロチューブ内で、チューブの内部形状に合うように形成したプラスチック棒を用いてホモジナイズした。その一部で蛋白量を測定し、15000×gで10分間遠心して得られた上清でモノアミンとその代謝物およびGABAの測定を行った。

3. モノアミンとGABAの測定条件

ドパミン(DA)、セロトニン(5HT)、3, 4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC)、homovanillic acid(HVA)、5-hydroxyindoleacetic acid(5HIAA)は、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー(医理化学工業、京都)に、

方法2より得た上清10 μl を直接注入して一斉に分析した。移動相は0.087 M 磷酸第一カリウム(pH 3.4)に13% (v/v) アセトニトリル, 54 μM Na_2EDTA , 3.6 mM オクタンサルフォネートを含む溶媒を用いた。カラムは、内径4 mm、長さ250 mmのLichrosorb RP-18、粒径5 μm (逆相系シリカ ODS)を使用した。設定加電圧は、0.85 V vs. Ag/AgClとし、流速は0.9 ml/minで測定した。GABAは、GABASEを用いた酵素サイクル法¹¹⁾により、また蛋白量はLowryの方法¹²⁾により測定した。

4. 行動量測定

行動量は、光遮断方式行動量測定装置(医理化学工業)により薬物投与4日前より4日間、投与開始2日目より4日間および2週間の薬物投与終了日より4日間において、1時間毎の積算値として、それぞれの群で測定した。

5. 統計的解析

Smirnofの棄却検定を行った。一元配置分散分析を行った後、各群の比較は同一部位内で分散のときDuncan's multiple comparisonを、また不等分散のとき比較対象の2群間が分散のときStudent's t-testを、不等分散のときCochran-Cox testを用いた。

6. 薬物

± verapamilとreserpineはSigmaより、methamphetamineは大日本製薬から入手した。

結 果

1. 薬物投与量

2週間の全投薬期間における各群のラットに対する一日薬物投与量の平均値はキログラム当たり、[V]群:[V]10.4 mg, [M]群:[M]10.2 mg, {[V]+[M]}群:[V]10.7 mg, [M]10.7 mg, [R]群:[R]0.42 mg, {[V]+[R]}群:[V]11.1 mg, [R]0.44 mg, {[M]+[R]}群:[M]10.4 mg, [R]0.41 mgであった。

2. モノアミン代謝とGABA量に対する影響

表1、2、3、4および5は、各々の薬物を2週間投与したラットにおける、脳8部位の測定結果を示している。各群間の比較は、(1)[C]群に対し各群、(2){[V]+[M]}群に対し[V]お

Table 1 Dopamine metabolism in the rat brain nuclei after chronic treatment with verapamil (V), methamphetamine (M), verapamil with methamphetamine (V+M), reserpine (R), verapamil with reserpine (V+R) and the control (C).

Brain region	Treatment	n	DA	DOPAC	HVA	DOPAC+HVA	DA+DOPAC+HVA	[DOPAC+HVA]/[DA+DOPAC+HVA]
N. ACC	C	5	191±16 ---	163±6 ---	30±3 ---	193±9 ---	384±18 ---	0.61±0.03 ---
	V	6	102±13 D*D	159±15 *DD	28±3 *D*	187±17 *DD	290±26 D**	0.65±0.03 DDD
	M	5	112±11 DD-	182±8 **-	36±3 **-	218±9 **-	330±17 **-	0.66±0.02 DD-
	V+M	5	60±7 D--	217±27 *--	38±2 *--	255±29 D--	315±24 D--	0.80±0.04 D--
	R	5	67±10 D-*	179±11 *-*	22±1 D-D	201±11 *-*	267±9 D-*	0.75±0.04 D-*
	V+R	6	72±10 D--	226±23 D--	32±3 *--	259±26 D--	331±27 *--	0.78±0.03 D--
STR	C	5	479±31 ---	281±13 ---	55±5 ---	336±15 ---	815±38 ---	0.42±0.01 ---
	V	5	406±42 *DD	242±14 ***	56±1 **T	298±15 ***	704±33 DDD	0.43±0.04 *DD
	M	6	331±35 DD-	295±14 **-	61±6 **-	356±18 **-	687±50 DD-	0.53±0.02 DD-
	V+M	5	205±18 D--	302±35 *--	55±2 *--	358±37 *--	563±30 D--	0.63±0.04 D--
	R	5	249±29 D-*	318±17 *D	58±3 *T	377±17 *D	625±39 D-D	0.61±0.03 D-*
	V+R	5	215±27 D--	245±20 *--	47±2 *--	292±21 *--	506±25 D--	0.58±0.04 D--
SCN	C	6	8.3±1.3 ---	7.7±1.4 ---	6.3±1.4 ---	13.9±2.8 ---	22.2±3.6 ---	0.62±0.04 ---
	V	5	3.0±0.5 T**	4.6±0.8 ***	3.1±0.5 *Tt	7.7±1.1 *t*	10.7±1.1 ct*	0.71±0.05 *D*
	M	6	12.2±4.7 **-	10.5±2.9 **-	5.9±1.3 *c-	16.4±4.1 *c-	28.5±8.6 **-	0.62±0.04 **-
	V+M	5	3.0±0.2 C--	3.6±0.5 C--	1.2±0.2 C--	4.5±0.5 C--	7.5±0.6 C--	0.59±0.03 *--
	R	5	2.5±0.3 C-*	5.7±1.1 *-*	2.2±0.2 C-*	7.9±1.2 *-*	10.4±1.4 t-*	0.75±0.02 D-*
	V+R	6	3.0±0.6 T--	4.5±0.6 *--	1.5±0.3 C--	6.0±0.7 C--	8.9±1.2 C--	0.68±0.03 *--
AMY	C	5	3.1±1.2 ---	0.9±0.2 ---	1.3±0.4 ---	2.1±0.2 ---	5.2±1.2 ---	0.48±0.09 ---
	V	5	1.8±0.4 ***	0.9±0.3 ***	1.1±0.1 **T	2.0±0.2 ***	3.8±0.5 ***	0.54±0.06 ***
	M	6	1.3±0.2 **-	1.5±0.2 **-	1.1±0.1 **-	2.5±0.3 **-	3.8±0.4 **-	0.67±0.03 D**
	V+M	5	1.0±0.2 *--	1.2±0.3 *--	1.1±0.1 *--	2.2±0.2 *--	3.2±0.4 *--	0.71±0.04 D--
	R	5	0.7±0.1 *-*	1.4±0.2 *-*	1.0±0.2 *T	2.4±0.3 *D	3.2±0.4 *-*	0.77±0.02 D-*
	V+R	5	1.2±0.5 *--	1.2±0.2 *--	0.5±0.1 *--	1.6±0.2 *--	2.8±0.5 *--	0.62±0.09 *--

All drugs were administered from the drinking bottle (p.o.). The mean doses, through 2 weeks treatment, of verapamil, methamphetamine and reserpine were about 10.7, 10.4 and 0.43 mg/kg/day, respectively. Values are given as pmoles/mg protein (mean±SEM), except the ratio of [DOPAC+HVA]/[DA+DOPAC+HVA]. The left symbols represent the significant differences from the control. The median symbols represent the significant differences from the V+M group. The right symbols represent the significant differences from the V+R group. D: p<0.01, Duncan's multiple comparison. T: p<0.01, t: p<0.05, Student's t-test. C: p<0.01, c: p<0.05, Cochran-Cox test. *: not significant. -: not compared.

および[M]群, また(3){[V]+[R]}群に対し[V]および[R]群について行った。({[M]+[R]}群の結果は示さず。)

1) DA代謝に及ぼす影響 (Table 1, 2)

a. [V]投与群

DA量はN. ACCとSCNの2つの神経核で有意な低下がみられ, STR, AMYおよびSNにおいても低下の傾向が認められた。DOPACはRDのみで低下したが, HVAには全ての領域で変化が認められなかった。SCNではDOPACおよびHVAに低下の傾向がみられたが, 統計的には有意ではなかった。DOPACおよびHVAの両者をモル濃度で加算して得た[DOPAC+HVA]値にも変化は認められなかった。一方, DA, DOPACおよびHVAの含量を加算して得られた[DA+DOPAC+HVA]値には, N.

ACC, STR, SCN および VMH で低下が認められ, [DOPAC+HVA]/[DA+DOPAC+HVA]比は, N. ACC および SN で上昇を示した。

b. [M]投与群

DA量は, N. ACC, STR および VMH で低下した。DOPACとHVAの量は共に変化が認められず, また両者の和である[DOPAC+HVA]値も同様に変化はみられなかった。[DA+DOPAC+HVA]値は, STR および VMH で有意な低下が認められる一方, [DOPAC+HVA]/[DA+DOPAC+HVA]比はN. ACC, STR, AMY, VMH および SN において上昇を示した。

c. [R]投与群

DA量は, N. ACC, STR および SCN で有意に低下した。DOPAC量は, LHのみで増加を示し, HVA量は, N. ACCとSCNで低下を,

Table 2 Dopamine metabolism in the same rat brain specimen as indicated in Table 1., after treatment of the same dosage schedule as sited in Table 1.

Brain region	Treatment	n	DA	DOPAC	HVA	DOPAC+HVA	DA+DOPAC+HVA	(DOPAC+HVA)/[DA+DOPAC+HVA]
LH	C	6	4.9±0.5---	3.8±0.3---	1.2±0.2---	5.0±0.3---	9.8±0.7---	0.51±0.03---
	V	6	4.5±0.7*DD	3.1±0.5*Cc	1.1±0.2*DD	4.2±0.6*Cc	8.7±1.2*cc	0.49±0.03*DD
	M	5	7.5±1.2**	6.4±1.4**	1.9±0.2**	8.3±1.6**	15.8±2.5**	0.52±0.05*D-
	V+M	6	9.4±2.1D-	10.1±1.5C-	2.3±0.3D-	12.4±1.8c-	21.8±3.5c-	0.62±0.01D--
	R	5	9.6±1.9D-	12.6±1.4C-	2.8±0.1D-	15.4±1.5C-	25.0±2.9C-	0.63±0.04D-*
	V+R	6	8.8±1.4*-	14.6±2.9c-	2.2±0.3D-	16.8±3.2c-	25.6±4.4c-	0.65±0.02D--
VMH	C	6	5.2±0.6---	2.7±0.4---	0.9±0.2---	3.6±0.4---	8.8±0.7---	0.41±0.03---
	V	5	3.5±0.6*t*	2.3±0.2*Tc	0.5±0.1**c	2.8±0.2*Tc	6.3±0.7*t*	0.46±0.04*DD
	M	5	2.0±0.2T-	2.9±0.4**	0.5±0.1**	3.5±0.5**	5.4±0.4T*	0.63±0.04D*-
	V+M	5	1.5±0.2T-	3.8±0.2t-	0.7±0.2*-	4.5±0.3*-	6.0±0.4T--	0.75±0.03D--
	R	6	7.5±2.1*-	12.4±3.9*-	2.2±0.7*-	14.6±4.5*-	22.0±6.2*-	0.67±0.05D*-
	V+R	6	3.3±0.5t-	5.9±1.3*-	1.8±0.4t-	7.8±1.3c-	11.0±1.4*-	0.69±0.05D--
SN	C	6	15.0±3.6---	16.1±1.6---	3.9±0.5---	20.0±2.1---	35.1±5.5---	0.60±0.04---
	V	6	9.8±2.0***	17.1±3.4***	5.4±0.5**D	22.4±3.8**D	32.3±5.7***	0.70±0.03t*c
	M	6	10.7±1.1**	19.7±3.1**	4.8±0.7**	24.5±3.7**	35.2±4.8**	0.69±0.02t*-
	V+M	6	10.7±1.2*-	20.8±2.3*-	3.8±0.7*-	24.6±2.4*-	34.6±3.5*-	0.71±0.01c-
	R	6	7.3±0.8*-	22.4±2.6*-	7.1±1.1D-	29.4±3.2*-	36.8±3.8*-	0.80±0.01C-*
	V+R	6	9.3±0.8*-	25.3±1.7D-	7.8±0.4D-	33.1±2.0D-	42.5±7.7*-	0.78±0.00C--
RD	C	5	2.1±0.4---	1.6±0.2---	1.2±0.2---	2.8±0.3---	4.8±0.7---	0.58±0.04---
	V	6	1.9±0.4**c	0.5±0.1D**	1.5±0.1**D	2.0±0.2***	3.9±0.5**D	0.53±0.05***
	M	6	2.2±0.6**	1.2±0.2**	1.7±0.2**	2.9±0.3**	5.1±0.7**	0.60±0.05**
	V+M	6	2.2±0.2*-	1.0±0.3D-	2.0±0.3D-	2.9±0.5*-	5.1±0.5*-	0.56±0.05*-
	R	5	1.4±0.2*-t	1.3±0.1*-	1.6±0.2*-D	3.0±0.1*-D	4.4±0.2*-D	0.68±0.03*-
	V+R	4	0.7±0.1c-	0.8±0.2D-	0.7±0.2*-	1.5±0.4D-	2.2±0.3D-	0.64±0.09*-

The same legents as sited in Table 1.

Table 3 Serotonin metabolism in the same rat brain specimen as indicated in Table 1., after treatment of the same dosage schedule as sited in Table 1.

Brain region	Treatment	n	5HT	SHIAA	5HT+SHIAA	SHIAA/[5HT+SHIAA]
N. ACC	C	6	9.5±0.6---	21.9±1.3---	31.4±1.3---	0.70±0.02---
	V	6	6.5±0.5DDD	20.7±2.1D*	27.2±2.4D*	0.76±0.02DDD
	M	6	4.4±0.3D*	23.7±2.7D-	28.0±2.9**	0.84±0.01D*-
	V+M	6	3.6±0.4D-	30.8±1.7D-	34.4±1.7*-	0.89±0.01D-
	R	5	4.4±0.4D*-	31.2±0.5D*-	35.6±1.0*-	0.88±0.01D*-
	V+R	6	4.0±0.5D-	27.1±2.1*-	31.2±1.9*-	0.87±0.02D--
STR	C	5	6.8±0.2---	23.5±1.5---	30.3±1.8---	0.77±0.01---
	V	6	5.3±0.3***	23.2±2.5**D	28.5±2.7***	0.81±0.01DDD
	M	5	4.5±0.4D*	25.6±1.5**	30.1±1.8**	0.85±0.01D*-
	V+M	6	4.3±0.5D-	27.7±2.8**	32.1±3.0*-	0.87±0.01D-
	R	6	6.1±0.9*-D	36.3±2.7D*-	42.4±3.6D*-	0.86±0.01D-D
	V+R	6	3.6±0.7D-	31.5±2.0D-	35.2±2.5*-	0.90±0.01D--
SCN	C	6	15.2±1.4---	37.1±2.9---	52.3±4.1---	0.71±0.01---
	V	6	9.3±1.2T*t	31.7±3.5***	40.9±3.6D**	0.77±0.03***
	M	6	10.6±1.9**	33.7±2.0**	44.2±3.2**	0.77±0.03**
	V+M	6	6.9±0.7T-	34.3±1.8*-	41.2±2.5D-	0.83±0.01T--
	R	6	5.6±0.2C*-	32.3±1.3*-	37.8±1.3D*-	0.86±0.01T*-
	V+R	6	6.2±0.7T--	28.8±2.7D-	35.0±2.5D-	0.85±0.01T--
AMY	C	6	13.8±0.9---	21.4±2.1---	35.2±2.5---	0.60±0.02---
	V	6	10.4±0.8DDD	19.4±2.5***	29.8±2.1D*D	0.64±0.04*cT
	M	6	7.5±0.6DD-	16.4±1.6**	23.9±1.5D*	0.68±0.03*c-
	V+M	6	5.5±0.5D-	19.6±1.5*-	25.1±1.9D-	0.77±0.01C-
	R	6	4.8±0.7D*-	19.0±0.8*-	23.8±0.5D*-	0.80±0.03T*-
	V+R	6	4.0±0.6D-	17.7±1.2*-	21.6±1.6D-	0.82±0.02C--

The same legents as sited in Table 1.

また LH と SN で増加を示した。[DOPAC+HVA]値は LH において増加が認められ、[DA+DOPAC+HVA]値は N. ACC, STR および SCN で低下し、また LH で上昇を示した。[DOPAC+HVA]/[DA+DOPAC+HVA]比の上昇が、RD を除く 7 部位で認められた。

d. [V] と [M] の併用投与群

[V]群に対して {[V]+[M]} 群では、STR と VMH において DA 量の低下がみられ、LH では逆に増加した。DOPAC 量は、N. ACC, VMH および LH において増加し、HVA 量は、N. ACC と LH で増加を、SCN で減少を示した。[DOPAC+HVA]値は N. ACC, LH および VMH で上昇し、SCN では低下を示した。[DA+DOPAC+HVA]値は、STR と SCN の 2 部位で低下し、LH では増加を示した。[DOPAC+HVA]/[DA+DOPAC+HVA]比は SCN では低下し、N. ACC, STR, LH および VMH では上昇した。

[M]群に対して {[V]+[M]} 群では、DA 量

は N. ACC と STR において低下した。DOPAC 量は全部位で変化がなかったが、HVA 量および [DOPAC+HVA]値は SCN で低下がみられた。[DA+DOPAC+HVA]値は、STR において低下した。[DOPAC+HVA]/[DA+DOPAC+HVA]比は、STR と LH において上昇した。

e. [V] と [R] の併用投与群

[V]群に対して {[V]+[R]} 群では、DA 量は N. ACC, STR および RD で低下を示し、LH において増加を示した。DOPAC 量は、N. ACC, LH および VMH で増加した。HVA 量は、STR, SCN, AMY および RD において低下を、LH, VMH および SN において増加を示した。[DOPAC+HVA]値は N. ACC, LH, VMH および SN において上昇が認められた。[DA+DOPAC+HVA]値には、STR と RD において低下が、LH と VMH において上昇が認められた。[DOPAC+HVA]/[DA+DOPAC+HVA]比は、N. ACC, STR, LH, VMH および SN においては上昇した。

Table 4 Serotonin metabolism in the same rat brain specimen as indicated in Table 1., after treatment of the same dosage schedule as sited in Table 1.

Brain region	Treatment	n	5HT	5HIAA	5HT+5HIAA	5HIAA/ [5HT+5HIAA]
LH	C	6	7.4±1.0---	28.6±0.7---	36.0±1.7---	0.80±0.02---
	V	6	6.9±0.9***	25.5±3.0*ct	32.4±3.5*D*	0.78±0.02**D
	M	6	8.7±0.7**	32.8±3.6**	41.6±3.4**	0.78±0.03**
	V+M	6	7.2±0.8**	36.7±0.9T-	44.0±1.6**	0.84±0.01**
	R	6	5.7±0.7**	34.2±1.8T*	40.0±2.1**	0.86±0.01**
	V+R	5	5.7±0.4**	34.5±1.8T-	39.6±1.9**	0.86±0.01**
VMH	C	6	11.1±1.1---	23.4±3.6---	34.5±4.3---	0.67±0.02---
	V	6	8.9±1.0***	26.3±1.8***	35.3±1.8***	0.75±0.03DDD
	M	6	6.4±0.4D*	26.6±2.1**	33.0±2.3**	0.81±0.01D*
	V+M	6	5.9±0.9D-	32.8±2.1D-	38.7±2.8**	0.85±0.01D-
	R	6	11.6±1.7*D	41.7±3.8D-D	53.4±5.1D-D	0.79±0.02D*
	V+R	6	7.1±0.8D-	32.9±3.2D-	39.9±3.3**	0.82±0.02D-
SN	C	6	19.5±3.9---	55.5±5.1---	75.0±8.7---	0.75±0.02---
	V	6	13.4±1.5*tt	55.2±6.6***	68.6±7.8***	0.80±0.01D*D
	M	6	12.2±0.9*tt	56.5±4.9**	68.7±5.6**	0.82±0.01D*
	V+M	6	9.6±0.6**	56.5±3.1**	61.0±3.3**	0.84±0.01D-
	R	5	9.4±1.3**	51.4±6.5**	70.3±7.7**	0.87±0.01D*
	V+R	5	8.5±0.8c-	60.9±2.0**	74.7±4.3**	0.89±0.01D-
RD	C	6	36.2±0.8---	56.1±1.1---	92.3±1.7---	0.61±0.01---
	V	6	33.2±1.6*tc	49.9±1.4Tt*	83.1±2.3T**	0.60±0.01*TT
	M	5	31.8±1.2Tt-	61.3±1.6Tt*	92.4±2.3*tc-	0.66±0.01T*
	V+M	6	25.2±2.3C-	57.4±2.0**	82.6±3.0tc-	0.70±0.02T-
	R	5	17.5±0.7T-c	58.2±2.2**	75.7±2.6T-*	0.77±0.01T-*
	V+R	5	15.4±0.2C-	57.7±4.8**	71.3±5.5c-	0.78±0.01T-

The same legends as sited in Table 1.

[R]群に対して {[V]+[R]} 群では, DA量はRDのみで低下が認められた。DOPAC量は, STRにおいて低下し, HVA量は, STR, AMYおよびRDにおいて低下を, N. ACCにおいては増加を示した。[DOPAC+HVA]値は, STR, AMYおよびRDにおいて低下が認められ, [DA+DOPAC+HVA]値は, STRとRDにおいて低下を示した。[DOPAC+HVA]/[DA+DOPAC+HVA]比は, いずれの部位においても変化は認められなかった。

2) 5HT代謝に及ぼす影響 (Table 3, 4)

a. [V]投与群

[V]群においては, N. ACC, SCNおよびAMYにおいて5HT量の有意な低下が認められた。5HIAAは, RDのみで低下を示した。5HTと5HIAAをモル濃度で加算して得られた[5HT+5HIAA]値には, SCN, AMYおよびRDにおいて低下が認められた。また[5HIAA]/[5HT+5HIAA]比は, N. ACC, STR, VMHおよびSNにおいて上昇した。

b. [M]投与群

[M]群においては, 5HT量は, N. ACC, STR, AMY, VMH, RDの5部位において5HT量の低下が認められた。5HIAA量は, RDにおいてのみ増加した。[5HT+5HIAA]値は, AMYにおいて低下した一方, [5HIAA]/[5HT+5HIAA]比は, N. ACC, STR, VMH, SN, RD

の5部位において上昇した。

c. [R]投与群

[R]群においては, N. ACC, SCN, AMYおよびRDにおいて5HT量が減少した。これに対し5HIAA量には, N. ACC, STR, LHおよびVMHにおいて増加が認められた。[5HT+5HIAA]値は, STRとVMHにおいて上昇し, SCN, AMYおよびRDにおいては低下を示し, [5HIAA]/[5HT+5HIAA]比は, LHを除く全ての部位で上昇した。

d. [V]と[M]の併用投与群

[V]群に対して {[V]+[M]} 群では, 5HT量はN. ACC, AMY, SNおよびRDの各部位において低下した。5HIAA量には, N. ACC, LH, RDの3部位で増加が認められた。[5HT+5HIAA]値は, N. ACCおよびLHにおいて上昇し, [5HIAA]/[5HT+5HIAA]比は, N. ACC, STR, AMY, VMHおよびRDにおいて上昇した。

[M]群に対して {[V]+[M]} 群では, 5HT量はAMY, SNおよびRDにおいて低下を示した。5HIAA量は, N. ACCにおいて増加が認められた。[5HT+5HIAA]値はRDのみにおいて低下し, [5HIAA]/[5HT+5HIAA]比は, AMYにおいて上昇した。

e. [V]と[R]の併用投与群

[V]群に対して {[V]+[R]} 群では, N. ACC,

Table 5 GABA contents in the same rat brain specimen as indicated in Table 1., after treatment of the same dosage schedule as sited in Table 1.

Treatment	n	Brain region			
		N. ACC	STR	SCN	AMY
C	6	42.4±0.8---	35.4±1.0---	65.8±1.3---	26.4±0.9---
V	6	46.2±1.5t**	37.6±1.6***	65.5±1.5*DD	24.3±0.5*t*
M	6	41.3±3.7**	39.4±1.0***	66.3±2.8*D	22.3±1.1t*
V+M	6	51.3±4.4*--	40.9±1.7D--	58.1±1.2D--	20.8±1.1T--
R	6	49.4±1.6T-*	39.2±2.0*--	59.9±0.9D-*	18.1±0.6T-*
V+R	6	50.0±4.0*--	40.1±0.6D--	57.3±1.8D--	21.2±1.4t--
		LH	VMH	SN	RD
C	6	52.2±1.9---	51.3±1.4---	66.2±5.3---	23.5±1.1---
V	6	47.2±2.5***	54.4±3.2***	64.4±7.9***	21.4±1.0*DD
M	6	53.7±3.3**	53.3±3.1**	75.7±3.2**	18.9±1.3D*
V+M	6	54.0±1.6*--	51.1±0.8*--	73.3±3.1*--	16.4±0.6D--
R	6	48.7±3.0*--	52.4±1.3*--	69.0±3.0*--	15.7±0.9D*
V+R	6	51.1±0.7*--	50.3±3.3*--	73.8±1.6*--	16.3±1.1D--

The same legends as sited in Table 1, except the values. (nmoles/mg protein)

SCN, AMY, SN および RD において 5HT 量は低下を示した。5HIAA 量は, STR と LH において増加した。[5HT+5HIAA] 値は AMY において減少したが, [5HIAA]/[5HT+5HIAA] 比は, SCN 以外の全ての部位において上昇が認められた。

[R] 群に対して {[V]+[R]} 群では, 5HT 量は STR, VMH, RD の 3 部位において低下し, 5HIAA 量は VMH において低下した。[5HT+5HIAA] 値は, やはり VMH で低下を示した。[5HIAA]/[5HT+5HIAA] 比は, STR において上昇した。

3) GABA に対する影響 (Table 5)

[V] 投与によって N. ACC における GABA 量は増加した。[M] 投与によって AMY および RD において GABA 量の低下が認められた。[R] 投与によって N. ACC において GABA 量が増加したが, SCN, AMY および RD において低下した。

[M] 群に対して {[V]+[M]} 群では, SCN において GABA 量の低下が認められた。

3. 行動量とリズム

[V] 投与による行動量の変化は, 今回の投与量では観察されなかった。また [V] 投与によって, ラットにおける生物リズムのオシレーターと考えられている SCN において, DA と 5HT 量の低下が認められたものの行動リズムは変化しなかった。[M] は動物を過活動状態にすることが知られている¹³⁾ が, 今回の実験でも対照群に対して 301% の行動量増加が認められた。[M] と [V] を併用投与すると, 投与開始 5 日目より 24 時間にわたる活動の亢進 (対照群の 571%), すなわち [M] 作用の [V] による増強作用が示された。一方, [R] 投与によっては, [V] と同様に行動量の変化は認められず, [M] による過活動に対しても影響はみられなかった。

考 察

本研究では, [V] の慢性投与による主として中枢モノアミン代謝に及ぼす影響を検討した結果, N. ACC と SCN の 2 部位を中心にモノアミンの減少がみられ, [V] が中枢モノアミン代謝に作用を及ぼすこと, およびその作用には脳部

位選択性があることが示された。Doran ら¹⁴⁾ はヒトに [V] を経口投与した際には, [V] とその活性代謝物である norverapamil の各血中および髄液中濃度間に相関がみられることから, 脳内移行の存在を示唆している。[V] は脂溶性物質であることから, 本研究の結果は [V] の中枢に対する直接作用と考えることが出来る。

従来の薬理的知見から, [V] は電位依存性カルシウムチャンネルの阻害作用を有し, その結果モノアミン神経伝達物質の放出阻害作用があると推測されている。一方, [M] および [R] はカルシウムチャンネルに関与しないそれぞれ特徴的なモノアミン放出作用を有することが知られている。[V] の作用はこのような [M] および [R] と比較した結果, 脳部位により相違はあるものの, これらとは明らかに異なっていることが示された。すなわち, 3 薬物に共通してモノアミン量低下作用が認められたが, 代謝産物は, [M] 投与によって増加を示した脳部位があり, [R] 投与では 5HIAA 量は増加を示す部位が認められた。一方, [V] 投与では RD において HVA と 5HIAA の両者に減少がみられた。すなわち [M] の作用はモノアミンの放出利用の促進, [R] の作用はモノアミン貯蔵の阻害と関係していることを裏付ける結果であった。他方, [V] の投与によって, 脳部位選択的にモノアミン放出利用の低下と, 生合成低下を伴うモノアミン貯蔵量の低下が起こったと推定することができた。

[M] 投与が [V] の DA 代謝に及ぼす影響は, [M] 群に対し {[V]+[M]} 群を比較することにより検討すると, DA, DOPAC および HVA の量がそれぞれ低下を示す部位が認められた。これは [V] による DA の放出抑制と合成抑制作用の結果と考えられた。同様に [R] 併用投与が [V] の DA 代謝に及ぼす影響は, RD において DA 量の低下と, HVA の STR など 3 部位における低下がみられ, DA 放出と合成の抑制であることが示唆された。これらの結果から, [M] や [R] の [V] との併用投与は, [V] 単独投与と比較し, DA 放出抑制が主に起こったことを示す可能性が考えられた。

[V] の *in vitro* における作用に関しては Yarom

ら¹⁵⁾が、培養脳細胞において、脱分極によって誘発された DA 放出が [V] 添加によって濃度依存的に抑制を受けることを報告している。また、大脳皮質シナプトソームを用いた 60 mM KCl 誘導カルシウム取り込み実験において、[V] の添加が、カルシウムの取り込みを抑制したとする報告¹⁶⁾もある。これらは急性実験の結果であるが、今回得られた慢性実験の結果も [V] の放出抑制作用の結果と考えられた。

[DA+DOPAC+HVA] 値は、ある一定の期間において生成され代謝された DA の総和として捉え、DA 神経活動の主に生合成の総量の指標と考えることが可能である。DA 合成量は律速酵素であるチロシン水酸化酵素活性に依存しているが、[V] 投与により [DA+DOPAC+HVA] 値が低下した部位が認められたことは、それらの部位でチロシン水酸化酵素にネガティブフィードバックがかかり、DA 合成が抑制された可能性が示唆された。一方、[DOPAC+HVA]/[DA+DOPAC+HVA] 比を、断頭処理から一定時間さかのぼって集積された [放出された DA 量]/[ある一定期間において生成され代謝された DA の総和] と考え、DA の合成量や代謝産物の髄液ないし血液への移行速度が一定であると仮定すると、この比は DA の放出率の指標になりうると考えられる。[V] 投与群ではこの値が、N. ACC および SN で上昇したが、合成量の低下から、この値が増加したものと考えられた。5HT についても DA と同様に [5HT+5HIAA] 値は生合成量の指標と考えられる。[V] 投与によって SCN, AMY および RD においてこの値が低下を示したことから、これらの部位で 5HT の生合成量が低下した可能性が示唆された。

カルシウム拮抗薬のモノアミン生合成に対する作用に関しては、Arita ら¹⁷⁾が、視床下部スライスを用いて脱分極誘導 3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) 合成が [V] によって抑制されたことを報告している。一方、*in vivo* におけるモノアミン生合成に対する作用を検討した報告は少ない。Pileblad ら¹⁸⁾は、dihydropyridine 誘導体に属するカルシウムチャンネル阻害剤である nimodipine の急性投与実験にお

いて、チロシン水酸化酵素活性を推定するため NSD1015 投与による L-芳香族アミノ酸脱炭酸酵素阻害条件で脳内 DOPA 蓄積量を測定し、その値が有意に減少したことから、nimodipine に DA 合成抑制作用が存在する可能性を報告している。本実験は nimodipine とは異なる種類に属する [V] を使用し、しかも慢性投与実験であったが、彼らの結果と同様に、DA 合成の低下を示唆する結果と考えられた。

これら諸家の成績と本研究の結果を総合すると、[V] には、DA および 5HT の放出抑制と生合成の抑制作用の両者があり、これによって DA および 5HT 神経活動を抑制する方向に働いている可能性が考えられる。しかしながら、今回の実験結果のうちで、脳部位によってはモノアミンの低下が認められたが、それが [V] の直接作用の結果なのか、従来から言われている放出抑制の二次的作用の結果なのか今回の実験結果からは確定できなかった。

[V] 投与による DA の低下は N. ACC と SCN において、また 5HT の低下は N. ACC, SCN および AMY でみられ、その作用に脳部位選択性がみられ、カルシウムチャンネルの分布に相違がある可能性を示唆する結果であった。カルシウムチャンネル阻害剤の脳結合部位の分布は、血管の分布とは全く一致しないとされており、dihydropyridine 系カルシウムチャンネル阻害剤に属する nitrendipine をリガンドにしたオートラジオグラフィーの結果では、その結合部位は、シナプスの豊富な部位と一致する分布を示したとする報告¹⁹⁾もある。それに対して今回得られた [V] によるモノアミン代謝の脳部位による相違は、各神経核における神経細胞 (特にシナプス) の種類による [V] 結合部位の相違 (モノアミン放出抑制あるいは合成抑制のいずれに関与するかの相違) と、[V] 結合部位の分布量の相違、あるいは [V] 非感受性のモノアミン放出に関与するカルシウムチャンネルの存在等で説明することが可能と考えられた。

in vitro において [V] は GABA に対して、Na⁺ 依存性 GABA 取り込みを阻害するとする報告がある。しかし *in vivo* における [V] の GABA に対する影響を検討した報告はない。本

研究においては, [V] 慢性投与による GABA の増加が N. ACC で認められた。これは同部位で観察された DA と 5HT の減少と正反対の変化である。この変化は [V] の GABA に対する直接作用か,あるいは神経回路を通じて二次的に起こったものか不明である。

[V] の行動量に及ぼす影響は, 今回の投与量では観察されなかったが, [M] との併用投与時に, 24 時間にわたる過活動を惹起させた。[M] は生物リズムのオシレーターより下位の中枢に作用して, 行動リズムを変化させる²⁰⁾と考えられているが, 今回の結果は, [V] が生物リズムのオシレーターからの信号を, モノアミン代謝の抑制によって遮断し, [M] のリズム変調作用を促進した可能性が示唆された。カルシウムチャンネル阻害剤の行動に及ぼす影響を検討した報告は少ないが, Pileblad ら¹⁸⁾は, マウスに nimodipine を投与した際に, パージリン投与による過活動が抑制されたと述べている。

[V] の臨床応用は, 従来主に心血管系に対するものであったが, 最近そう病²¹⁾, 片頭痛²²⁾ など中枢神経疾患に対する応用も試みられるようになってきている。Dubovsky らはそう病に [V] を用いた治験を行い, 有効であったとしている。そう病の病因は, 諸説あるが, セロトニン仮説や, ノルアドレナリン仮説などモノアミンに関連した異常も想定されている。今回の実験から, [V] が中枢モノアミン活動の抑制剤としての可能性が示され, しかもその作用に脳部位選択性

がみられたことから, さらに確実なそう病への有効性が証明されれば, そう病の病因への接近や, さらに有効なそう病治療薬または新しい中枢作用薬の開発への道が開かれる可能性がある。

結 語

[V] 慢性投与時のラット神経核レベルにおけるモノアミンの代謝に及ぼす影響を, [M], [R] と比較して以下の結果を得た。

1) [V] は, 脳部位により作用に相違がみられ, 脳部位選択性があることが示された。[V] にこのような選択性があることから, モノアミンの放出に関与するカルシウムチャンネルは, 他方に, [V] 非感受性のサブクラスの存在の可能性も示唆された。

2) [V] の中枢モノアミン代謝に対する作用は, [M] および [R] の作用と比較することによって, 脳部位選択性がある点, 伝達物質放出の抑制ならびに生合成の抑制までに至る場合が多い点などの薬理作用の特徴と相違が示された。

謝 辞

稿を終るにあたり御懇切な御指導御校閲を賜りました庄盛敏廉教授に深甚なる謝意を表するとともに, 直接研究の懇篤なる御指導をいただいた盛政忠臣講師に深謝します。

また御助言をいただいた小林清史助教授はじめ実験に御協力をいただいた諸先生, 教室員の皆様に感謝します。

文 献

1. Braunwald E: Mechanism of action of calcium-channel-blocking agents. *N Engl J Med* (1982) 307, 1618-1627.
2. Marangos PJ, Patel J, Miller C and Martino AM: Specific calcium antagonist binding sites in brain. *Life Sci* (1982) 31, 1575-1585.
3. Daniell LC, Barr EM and Leslie SW: $^{45}\text{Ca}^{2+}$ Uptake into rat whole brain synaptosomes unaltered by dihydropyridine calcium antagonists. *J Neurochem* (1983) 41, 1455-1459.
4. van Breemen C, Aaronson P and Loutzenhiser R: Sodium-calcium interactions in mammalian smooth muscle. *Pharmacol Rev* (1978) 30, 167-208.
5. Wei JW and Chaing DH: Studies of [^3H]nitrendipine binding and KCl-induced calcium uptake in rat cortical synaptosomes. *Gen Pharmacol* (1985) 16, 211-216.
6. Miller RJ and Freedman SB: Are dihydropyridine binding sites voltage sensitive calcium channels?

- Life Sci (1984) 34, 1205-1221.
7. Takahashi M and Ogura A: Dihydropyridines as potent calcium channel blockers in neuronal channels. Fed Eur Biochem Soc (1983) 152, 191-195.
 8. Nördstrom Ö, Braesh-Andersen S and Bartfai T: Dopamine release is enhanced while acetylcholine release is inhibited by nimodipine (Bay e 9736). Acta Physiol Scand (1986) 126, 115-119.
 9. Gould RJ, Murphy KMM and Snyder SH: Studies on voltage-operated calcium channels using radioligands; in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology vol. XLVIII Molecular Neurobiology. Cold Spring Harbor, New York (1983) pp 355-362.
 10. Pellegrino LJ, Pellegrino AS and Cushman AJ: A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain. Plenum Press, New York (1979).
 11. Okada Y, Nitsch-hassler C, Kim JS, Bak IJ and Hassler R: Role of γ -aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system. 1. Regional distribution of GABA in rabbit, rat, guinea pig and baboon CNS. Exp Brain Res (1971) 13, 514-518.
 12. Lowry OH, Rosebroun NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem (1951) 193, 265-275.
 13. 池田正明, 盛政忠臣, 金行孝雄, 庄盛敏廉: ラット行動量ならびにホルモンのサーカディアンリズムに対するメトアンフェタミンの作用. 脳研究会誌 (1984) 10, 100-101.
 14. Doran AR, Narang PK, Meigs CY, Wolkowitz OM, Roy A, Breier A and Pickar D: Verapamil concentrations in cerebrospinal fluid after oral administration. N Engl J Med (1985) 312, 1261-1262.
 15. Yarom M, Zurgil N and Zisapel N: Calcium permeability changes and neurotransmitter release in cultured brain neurons. J Biol Chem (1985) 260, 16294-16302.
 16. Wei JW and Chiang DH: Effects of calcium antagonists on KCl-evoked calcium uptake by rat cortical synaptosomes. Gen Pharmacol (1986) 17, 261-265.
 17. Arita J and Kimura F: In vitro dopamine biosynthesis in the median eminence of rat hypothalamic slice: involvement of voltage-dependent Ca^{2+} channels. Brain Res (1985) 347, 299-305.
 18. Pilebald E and Carlsson A: *In vivo* effects of the Ca^{2+} -antagonist nimodipine on dopamine metabolism in mouse brain. J Neural Transm (1986) 66, 171-187.
 19. Gould R, Murphy KM and Snyder SH: Autoradiographic localization of calcium channel antagonist receptors in rat brain with [3H]nitrendipine. Brain Res (1985) 330, 217-223.
 20. 池田正明, 盛政忠臣, 岡田尚志郎, 庄盛敏廉: Freerun 条件下ラットに対するメトアンフェタミンの masking 作用. 脳研究会誌 (1985) 11, 228-229.
 21. Dubovsky SL, Franks RD, Allen S and Murphy: Calcium antagonists in mania: A double-blind study of verapamil. Psychiatry Res (1986) 18, 309-320.
 22. 後藤文男: BAY e 9736 (nimodipine) の片頭痛に対する臨床的有用性の検討. 医学のあゆみ (1986) 137, 331-351.

Chronic effects of the Ca⁺⁺ channel blocker verapamil on monoamine release and metabolism in discrete rat brain regions: Comparison with the effects of methamphetamine and reserpine

Masaaki IKEDA

Department of Clinical Neurochemistry, Institute for Neurobiology,

Okayama University Medical School

(Director: Prof. T. Shohmori)

The effects of chronic treatment with verapamil(VP) on monoamine release and metabolism in rat brain in vivo were compared with the effects of methamphetamine(MAP) and reserpine(RES). These drugs were administered to rats in drinking water for two weeks. The contents of monoamines(DA and 5HT) and their major metabolites(DOPAC, HVA and 5HIAA) in eight discrete brain regions were measured by HPLC-ECD.

After treatment with VP, DA levels decreased in the nucleus accumbens(N.ACC) and the suprachiasmatic nucleus(SCN), but no significant changes were demonstrated in the metabolites(DOPAC, HVA). 5HT levels decreased in the N.ACC, SCN and amygdala(AMY), and 5HIAA levels decreased in the raphe dorsalis(RD). GABA contents were increased in the N.ACC.

After treatment with MAP, DA levels decreased in the N.ACC, striatum(STR) and ventro-medial hypothalamic regions(VMH). No significant change was shown in the metabolites. 5HT contents decreased in the N.ACC, STR, AMY, VMH and RD. 5HIAA contents decreased significantly in the RD.

After treatment with RES, DA levels decreased in the N.ACC, STR and SCN. HVA contents decreased in the N.ACC and SCN, though they increased in the LH and SN. 5HT levels decreased in the N.ACC, SCN, AMY and RD. High 5HIAA concentrations were found in the N.ACC, STR, LH and VMH.

DA, DOPAC and HVA levels were reduced more in several regions by co-administration of VP and MAP than by MAP treatment alone.

DA was lowered more in the RD and HVA was lowered more in several regions by co-administration of VP and RES than by RES treatment alone.

The well known locomotor hyperactivity induced by MAP was enhanced by VP.

The present study suggests that there are at least two classes of voltage-gated calcium channels in the central nervous system related to the release of monoamines, one sensitive to VP and other not. In addition, chronic VP treatment may have an inhibitory effect on the release and synthesis of monoamines.