

神経伝達物質に対するカフェインの影響 — マイクロダイアリシス法を応用した *in vivo* での測定

船木善仁・井戸達雄
(東北大学, サイクロトロン・RIセンター*)

Effect of Caffeine Administration on Brain Neurotransmitters

Yoshihito FUNAKI, Tatsuo IDO
Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University

Caffeine is the most widely consumed stimulant in the human. To determine whether caffeine has an effect on *in vivo* brain neurotransmitters, we measured the extracellular concentrations of acetylcholine (ACh) and monoamines using microdialysis system. Administration of caffeine (30-100mg/kg) increased the extracellular concentration of ACh in rat striatum. Chronic administration of caffeine (for a period of 14 days in dose of 50 or 100mg/kg ; i.p.) decreased the concentration of ACh to less than normal rat under usual conditions, and then, β_{max} value of ACh receptors increased.

Administration of caffeine also changed the extracellular concentration of monoamines. DA decreased and other metabolites (DOPAC, HVA and 5-HIAA) increased.

These results suggest that caffeine has an influence on *in vivo* brain neurotransmitters.

カフェインはチョコレートなどの食べ物, コーヒー, ココア, 茶, コーラなどの飲み物によく含まれ, アルコール, ニコチンと共に我々が日常よく摂取する薬物である。又, 食べ物, 飲み物以外にも薬剤として広く利用されているものでもある。

このカフェインの代表的な薬理作用として, ホスホジエステラーゼ阻害による中枢神経興奮作用が知られているが, 最近ではアデノシンレセプターの阻害薬であることも分かっている¹⁻³⁾。

このカフェインの *in vitro* における神経伝達物質への作用の報告はある^{4,5)}が, *in vivo* での作用における報告は1例のみ⁶⁾であり, 神経伝達物質に対する作用は未だ報告されていない。

そこで, 私どもは今回カフェインの *in vivo* における作用をマイクロダイアリシス法を用いて測定し, 神経伝達物質にどのような影響があるかを検討した。

*所在地: 仙台市青葉区荒巻字青葉 (〒980)

実験方法

1) ラットの飼育並びに慢性ラットの作成

実験には、Wistar 系ラット、雄、11週令を用いた。慢性ラットの作成は、上記ラットを用い、24時間毎に100mg/kg あるいは50mg/kg のカフェインを腹腔投与し、それを14日間行うことによって作成した。

2) ガイドカニューレ挿入手術

ラットをペントバルビタール (50mg/kg i.p.) で麻酔後、脳定位固定装置に頭部を固定後、ラット脳アトラス⁷⁾に基づいて、Bregma より前方0.7mm、正中より側方3.0mm にドリルで穴を開け、ガイドカニューレを脳表面より4.0mm の深さに挿入し、歯科用セメントで固定した。

3) マイクロダイアリスによるラット脳線条体細胞間神経伝達物質の測定

i) ACh の測定

脳内微小透析用プローブはエイコム社製の直管型を用い、ガイドカニューレより3 mm 突出した状態で使用した。測定は無麻酔、無拘束下で行い、透析液は、 10^{-4} M エゼリンを含むリンゲル液をマイクロインフュージョンポンプを用い、2 μ l/min の流速で15分間流したものを試料とした。ACh の定量には AC-GEL、酵素カラム、ECD 検出器、オートインジェクターを組み合わせたオンライン液体クロマトシステム (エイコム社) を用い、エチルホモコリンを内部標準とし、移動相として0.1M リン酸緩衝液 (pH8.5) にテトラメチルアンモニウムクロライドを65mg/l、デカンスルホン酸ナトリウムを200mg/l の濃度になるように溶かし、1.0ml/min の速さで分離し、ECD 検出器を使用し、白金電極+450mV で測定した。

ii) モノアミンの測定

上記とほぼ同じ方法であるが、透析液にはリンゲル液を用い、同じ流速で25分間流したものを試料とした。定量は、MA-50DS カラム (エイコム社) を用い、絶対検量線法によりその濃度を求めた。移動相は、0.1M クエン酸-0.1M 酢酸ナトリウム (pH3.9) : メタノール=87:13に1-オクタスルホン酸ナトリウムを160mg/l、EDTA を5 mg/l の濃度になるように溶かし、1.0ml/min の速さで分離し、ECD 検出器を使用し、グラファイト電極+650mV で測定した。

結果と考察

ラットに種々の濃度のカフェインを腹腔内投与したところ、いずれの濃度でもラット脳線条体において ACh の上昇が認められた (Fig. 1)。しかし、投与濃度によって若干の違いが見られ、100mg/kg 投与群では上昇後、速やかに ACh が減少するのに対し、30mg/kg 投与群と50mg/kg 投与群では ACh は減少せず、その作用は持続的だった。そこで、これ以後の実験では、異なった挙動を示した100mg/kg 投与群と50mg/kg 投与群について検討を行った。

次に、ラットに100mg/kg のカフェインを投与して測定後、3日後に同一ラットに同様の実験をしたところ (Fig. 2)、2回目の方がピークに達する時間は早いものの、その上昇率は1回目よりも低下していることが確認された。又、50mg/kg でも同じ様なことが確認された。このことより、カフェインに対して耐性が生じたと考えられたので、カフェインを毎日投与したカフェイン慢性ラットを作成した。

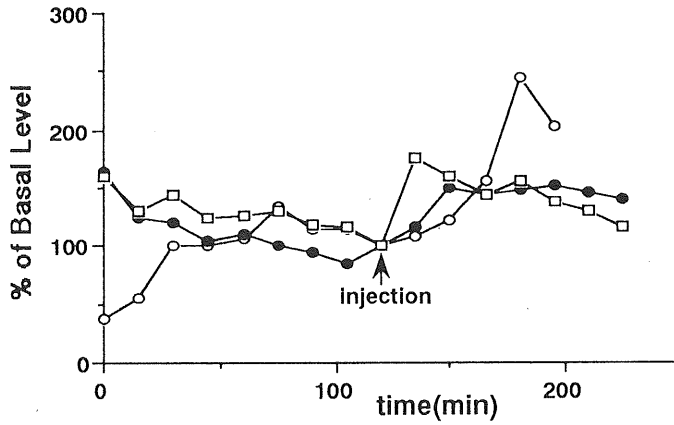


Fig. 1 Administration of caffeine 100mg/kg (○), 50mg/kg (●), 30mg/kg (□) in normal rats.

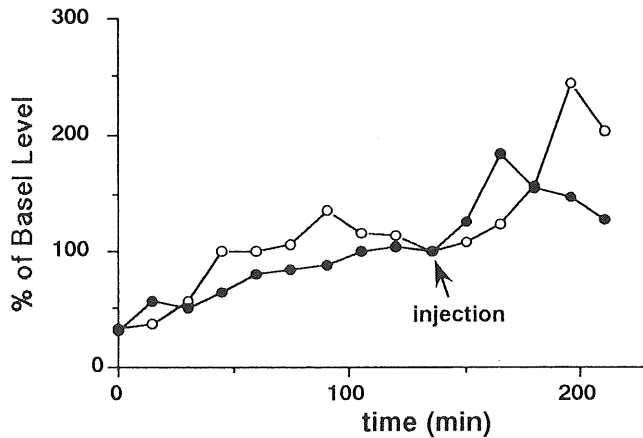


Fig. 2 Administration of caffeine (100mg/kg) in first (○) and second (●) experiment.

この慢性ラットの ACh を測定し、その経時的変化を Fig. 3 に示した。どちらの慢性ラットも Normal に比べて ACh の平常値が低下しており、その値は 100mg/kg 投与群よりも 50mg/kg 投与群の方がより低下することが確認された。なぜカフェイン低濃度投与群において ACh の平常値がより低くなるかはよく分からず、投与濃度による挙動の違いと関連して今後の検討課題であると思われる。

この両慢性ラットの ACh 減少がレセプター数の変化や親和性に関係があるのかを検討するために ³H-QNB を用いた Scatchard plot 解析を行った (Table. 1)。kd 値、β_{MAX} 値共にカフェイン投与 1 日目から Control 群に比べ変化し、3、5、7 日目でも変化は続いている。このことより、カフェイン慢性投与がレセプター数並びにその親和性に変化を与えることが確認された。しかし、Kd 値の逆数と β_{MAX} 値を掛け合わせた値、すなわち組織の ACh に対する親和性を表すが、この値が 100mg/kg 投与群では Control 群よりも大きくなり、50mg/kg 投与群では Control 群とほぼ変わらない値を示した。従って、慢性ラットにおける ACh 減少はレセプターサイトに影響があるのではなく、その後のプロセスに要因

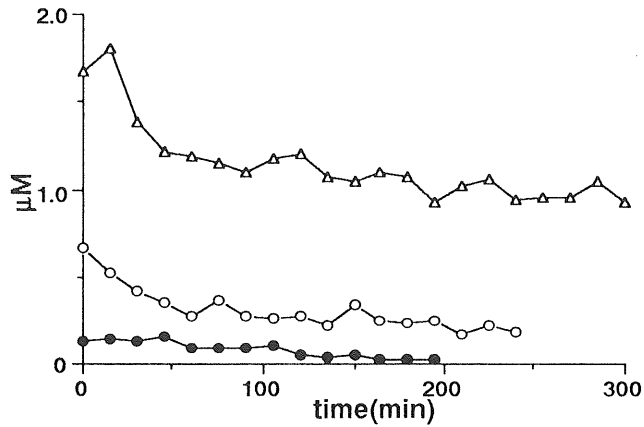


Fig. 3 Measurement of ACh in normal (Δ), 100mg/kg (○) and 50mg/kg (●) of chronic caffeine rats.

Table 1. Scatchard analysis of ³H-QNB binding in caffeine chronic rat striatum membrane

Concentration	Days	Kd (nM)	β _{max} (pmol/mg protein)	β _{max} /Kd
100mg/kg	1	0.295	1.073	3.630
	3	0.490	1.277	2.602
	5	0.853	0.777	0.910
	7	0.456	0.964	2.116
50mg/kg	1	0.763	1.149	1.506
	3	0.878	0.995	1.134
	5	0.657	0.811	1.235
	7	0.631	0.737	1.168
Control		0.454	0.473	1.040

がある可能性が示唆された。

最後に、同じくラット脳線条体においてカフェインを投与した際、モノアミンの量がどの様に変化するのか測定した (Fig. 4)。セロトニン並びに3-メトキシチラミンについてはカフェイン投与前も投与後も検出されなかったので省いた。これより、ドパミンは低下し、3, 4-ジヒドロキシフェニル酢酸, ホモバニリン酸, 5-ヒドロキシインドール酢酸は増加していることが確認され、その作用は100mg/kg 投与群よりも50mg/kg 投与群の方が顕著であることが確認された。しかし、投与後しばらく測定したところ、50mg/kg の方はその作用は一過性であったのに対し、100mg/kg の方は持続性であった。これは、前述の ACh とは全く逆の関係であり、興味深い点でもある。今後、MAO 阻害剤などを併用して測定する予定である。

以上の結果より、*in vivo* においてカフェイン急性投与が ACh 濃度を上昇させるのに対し、慢性投与では ACh の平常値を低下させる作用があり、又、モノアミンに対しては、カフェイン急性投与におい

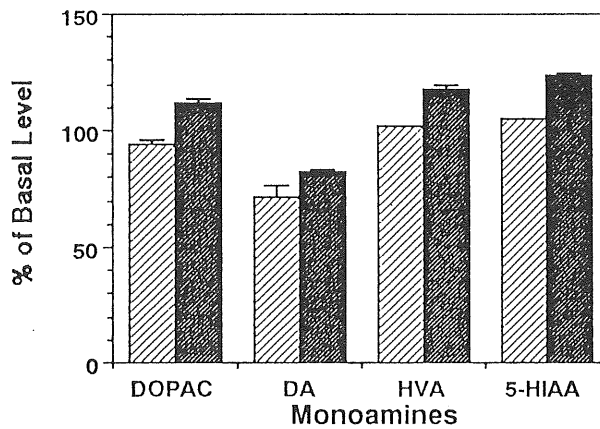


Fig. 4 Administration of caffeine [100mg/kg (▨), 50mg/kg (■)] in normal rats. Mean \pm s.d. % of monoamines. (DOPAC : 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DA : dopamine HVA : homovanillic acid, 5-HIAA : 5-hydroxyindoleacetic acid)

てドパミンが減少し、その代謝物は増加することが確認された。今後、低濃度慢性ラットでは ACh 並びにモノアミンの挙動がどうなるかを検討し、又、線条体以外の部位、例えば海馬ではこれらの変化がどうなるかも併せて検討する予定である。

文 献

- 1) SNYDER, S.H., J.J. KATIMS, A. ANNAU, R.F. BRUNS and J.W. DALY (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 78 : 3260-3264
- 2) DALY, J.W., R.F. BRUNS and S.H. SNYDER (1981) Life Sci. 28 : 2083-2097
- 3) SNYDER, S.H. and P. SKLAR (1984) J. Psychiatr. Res. 18 : 91-106
- 4) HADFIELD, M.G. and C. MILIO (1989) Life Sci. 45 : 2637-2644
- 5) KIRCH, D.G., T.R. TAYLOR, G.A. GERHARDT, N.L. BENOWITZ, C. STEPHEN and R.J. WYATT (1990) Neuropharmacol. 29 : 599-602
- 6) STAHL, L., S. SEGERSVARD and U. UNGERSTEDT (1991) Life Sci. 49 : 1843-1852
- 7) PAXINOS, G. and C. WATSON (1982) Syd. Acad. Press