ベンゾジアゼピン受容体作動性抗不安薬の 青斑核—大脳皮質前頭前野ノルエピネフリン神経系への作用

高 瀬 豊 和

九州歯科大学歯科麻酔学講座 (指導: 仲西 修教授)

平成 13 年 8 月 24 日受理

Effects of Benzodiazepine Receptor Agonistic Anxiolytics on the
Locus Coeruleus—prefrontal Cortex Norepinephrine Neurons

Toyokazu Takase

Department of Dental Anesthesiology (Director: Prof. Osamu Nakanishi)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

In this study the effects of benzodiazepine receptor agonistic anxiolytics were examined on the locus coeruleus (LC)—prefrontal cortex (PFC) norepinephrine neurons of freely moving rats, and on stress-induced increase in extracellular norepinephrine in the PFC. While benzodiazepine receptor agonistic anxiolytics were infused via a microdialysis probe in the vicinity of the right LC, the extracellular content of norepinephrine was recorded in the ipsilateral PFC with another microdialysis probe. The differential types of benzodiazepine receptor agonistic anxiolytics midazolam (benzodiazepine receptor full agonist, 10^{-4} M and 5×10^{-4} M) and Y-23684 (benzodiazepine receptor partial agonist, 10^{-4} M and 5×10^{-4} M) were used. While infusions of Y-23684 (5×10^{-4} M) decreased extracellular norepinephrine in the PFC, midazolam was not effective for the basal values. Next, rats were gently handled for 10 min during infusion of these drugs. The infusion of midazolam (5×10^{-4} M) and Y-23684 (5×10^{-4} M) inhibited the handling stress-induced increase in extracellular norepinephrine in the PFC. Benzodiazepine receptor antagonist flumazenil (10^{-4} M) attenuated these effects. These indicate that benzodiazepine receptors agonistic anxiolytics play a major role in suppressing stress responses, by acting via benzodiazepine receptors.

Key words: Benzodiazepine receptor agonistic anxiolytics / Norepinephrine / Locus coeruleus / Prefrontal cortex / Dual probe microdialysis

緒 言

歯科治療時の患者ストレスを軽減する方法の一つである静脈内鎮静法に、ベンゾジアゼピン (以下、BZP) 系薬が使用されるようになって久しい。BZP 系薬の作用発現

機構については、1970 年代後半より γ -アミノ酪酸 A (以下、GABA_A) 受容体と密接な関係を持つことや^{1,2)}、さらに Cl イオンチャネル型の GABA_A 受容体のなかに BZP 結合部位である BZP 受容体が存在することが明らかとなった³⁻⁵⁾。現在では、「BZP 系薬は、BZP 受容体に

結合し GABA_A 受容体を介した Cl⁻ イオンの神経細胞内流入をさらに増加させることで、GABA による神経性抑制を賦活化してその中枢神経系薬理作用を発現する」と広く認められている^{6,7)}。

現在、精神鎮静法で汎用されているミダゾラム、ジアゼパム、フルニトラゼパムは、BZP 系に分類される薬物である。これらの BZP 系薬は、精神鎮静法本来の目的に有用な抗不安、鎮静作用や、健忘作用だけでなく、筋弛緩や呼吸抑制作用など GABA 神経の関係する中枢神経系作用を広く発現する⁸⁾。精神鎮静法を行うにあたっては、筋弛緩作用に起因する舌根沈下や呼吸抑制に対して、管理能力を持つことが必要であるが、これは現在用いられている精神鎮静法薬が、BZP 系薬であるからに他ならない。

1980 年代後半より、従来の BZP 系薬に比べて、抗不安作用や鎮静作用に選択性が高く、筋弛緩作用や呼吸抑制作用の少ない薬物の開発が進められ、それらの薬物のひとつとしてベンゾチエピノピリダジン系薬である Y-23684 が合成された⁹⁾。Y-23684 は行動薬理学的研究から、鎮静、催眠、筋弛緩、健忘などの作用が少ないにもかかわらず強力な抗不安作用をもつことが報告されている⁹⁻¹²⁾。

本研究は、これら BZP 受容体作動性抗不安薬の中枢神経系作用発現機構を明らかにすることを目的として行った。すなわち、BZP 受容体完全作動薬である BZP 系薬物ミダゾラムと、それに対して部分作動薬と称される Y-23684 を用い、その作用発現機構を脳内神経活動から検討した。検索対象とする脳内神経系は、ストレスの認知や、不安、恐怖などの情動発現に関連の深い¹³⁻¹⁷⁾、青斑核（以下、LC）—大脳皮質前頭前野（以下、PFC）ノルエピネフリン神経系とし、その神経活動に対する両薬物の影響をデュアルプローブ・マイクロダイアリシス¹⁸⁻²⁵⁾を用いて検討した。

デュアルプローブ・マイクロダイアリシスは、ノルエピネフリン神経の細胞体側である LC 側プローブから透析膜を介して薬物を投与、神経終末側である PFC 側プローブから回収した神経伝達物質を定量する研究方法である。薬物投与前後の神経伝達物質細胞外量の変動を観察することで、細胞体と樹状突起上の受容体存在の機能的な検討と、細胞体による神経終末部神経活動の制御機構を検討することが可能となっている。本研究では、BZP 受容体作動性抗不安薬の投与を自由行動状態だけでなくストレス負荷状態でも行い、LC-PFC ノルエピネフリン神経活動への作用について検討を行った。

実験方法

I. 実験動物および準備操作

雄性 Wistar 系ラット（8-9 週齢、280-320 g）42 匹を実験動物として用いた。明/暗 12 時間（8:00-20:00）、室温 24±0.5℃、固形飼料および飲料水は自由に摂取できる環境で飼育した。実験終了後、ラットは 40% 抱水クロラル腹腔内投与により安楽死させた。なお、動物の飼育ならびに実験は、九州歯科大学動物実験委員会の承認を得て、「九州歯科大学における動物実験に関する指針」に従って行った。

内径 0.25 mm、外径 0.285 mm の透析膜（PAN-17、旭メディカル）を用いて透析長 2.0 mm と 4.0 mm の直管型マイクロダイアリシスプローブを実体顕微鏡下にあらかじめ作成しておき、透析長 2.0 mm のプローブを LC に、透析長 4.0 mm のプローブを PFC 植込に用いた。ラットをペントバルビタール全身麻酔下（40 mg/kg 腹腔内投与）に脳定位固定装置（KOPF Model 957, David Kopf Instruments）につけ、ラット脳図譜²⁶⁾に従い右側 LC と右側 PFC にそれぞれマイクロダイアリシスプローブを植込した。すなわち、LC 側プローブ透析膜の先端部は、lambda の後方 3.3 mm、側方 1.3 mm の位置から矢状方向に 15° の角度で、硬膜から 8.3 mm の深さに、PFC 側プローブ透析膜の先端部は、bregma から前方 2.5 mm 側方 2.0 mm の位置から外側方向に 14° の角度で、硬膜から 6.0 mm の深さに、それぞれアンカービス（直径 2.0 mm、長さ 4.0 mm）と歯科用即時重合レジン（ジーシー、UNIFAST II）を用いて頭蓋に固定した。

II. ノルエピネフリン定量

プローブの植込、固定後、ラットをアクリル製ケージ（縦×横×高さ、35 cm×35 cm×40 cm）に移し、24 時間以降に灌流液（NaCl 140.0, KCl 3.0, CaCl₂ 1.2, MgCl₂ 1.0 mM）の灌流を、マイクロダイアリシスシンジポンプ（EICOM EP-60, Eicom）を用いて、流速 4 μl/min で LC と PFC 双方のプローブに開始した。

PFC に植込したプローブから回収した灌流液を 10 分間毎に、オンラインインジェクター（EICOM AS-10, Eicom）を用いて高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出器に注入して細胞外ノルエピネフリンの定量を行った。高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出器は、移動相（リン酸ナトリウム二水和物 16.4 g, sodium dodecyl sulfate 600 mg, EDTA 8.3 g, トリエチルアミン 140 μl, 水 1400 ml, メタノール 300 ml, アセトニ

トリル 300 ml; もしくは, クエン酸ナトリウム 8.2 g, EDTA 25 mg, 水 1780 ml, メタノール 220 ml), 逆相系カラム (COSMOSIL, ナカライテスク), 送液ポンプ (LC-10AD, 島津製作所), 電気化学検出器 (Coulchem II, ESA; 印加電圧: 第一電極電圧 200 mV, 第二電極電圧 -150 mV), およびデータ解析装置 (Chromleon, DIONEX) で構成した。

ノルエピネフリン量は, 他のマイクロダイアリスによる研究と同じく^{18-21, 23, 25, 27)}, 受容体作動薬投与前, あるいはハンドリング前 30 分間の各ノルエピネフリン量平均値に対して, 各時点のノルエピネフリン量を%変換して示した。統計学的分析は二元配置分散分析後, 多重比較を Dunnett's multiple comparison test で行い, $p < 0.05$ を有意差とした。

III. 投与薬物及び投与方法

A. 投与薬物

α_2 受容体作動薬クロニジン (シグマ), BZP 系薬ミダゾラム (シグマ), BZP 受容体部分作動薬 Y-23684 ($[(\pm)-2-(4\text{-chlorophenyl})-5,6\text{-dihydro-[1]benzothiepin-}[5,4\text{-c]pyridazin-3(2H)-one-7-oxide}]$, ウェルファイド), BZP 受容体拮抗薬フルマゼニル (山之内) の 4 種薬物を用いた。これら薬物のうち, クロニジンとミダゾラムは溶媒として超純水, Y-23684 とフルマゼニルは溶媒としてジメチルスルフォキシド (ナカライテスク) を用いて 10^{-3}M 溶液を予め調製し, クロニジンとミダゾラムは -30°C , Y-23684 とフルマゼニルは常温で保存した。投与時には灌流液で上記製液を目的の濃度に希釈して用いた。また薬物の溶解に使用した上記溶媒を 100 倍に希釈した灌流液を vehicle として LC に投与した。

B. 投与方法

1. 無拘束, 自由行動状態

プローブが適正な位置に植入されているかどうかを確認するために, 本研究では Kawahara ら^{18, 19)} の手法に従い, α_2 受容体作動薬クロニジン 10^{-4}M を LC 側のプローブ灌流液に添加し, 透析膜を介して LC に局所投与した。クロニジン LC 投与により, 細胞外ノルエピネフリン量に減少が認められたラットのみを LC 近傍にプローブが植入されているものと判定し, 以下の実験に供した。判定の基準となる減少量は従来の報告に従い 30 % 以下とした^{18, 19, 27)}。このようにして LC へのプローブ植入が確認されたラットに対して, 次にミダゾラム, Y-23684, フルマゼニルをそれぞれ灌流により LC に局所投与した。投与時間及び観察時間は, あらかじめ 20 分間

観察した後に 20 分間の灌流投与を行い, その後の 60 分間の観察時間をあわせて 100 分間とした。

2. ストレス状態

ミダゾラムまたは Y-23684 を LC に持続灌流投与し, 人の手による緩和な保定を 10 分間行うことによるハンドリングストレス^{20, 21)} をラットに負荷し, 100 分間観察した。両薬物とも投与濃度は 10^{-4}M , $5 \times 10^{-4}\text{M}$ とした。

また BZP 受容体作動性抗不安薬投与の効果をより客観的に検討するために, BZP 受容体に対して特異的な拮抗作用をもつ^{28, 29)} フルマゼニルをミダゾラムおよび Y-23684 にそれぞれ混合した灌流液についても同様に持続投与, ハンドリングストレスの負荷を行った。LC に被験薬物を投与せず, 灌流液のみを灌流している状態でハンドリングストレスを負荷したものをコントロールとした。

結 果

I. 自由行動下における PFC ノルエピネフリン細胞外量

回収した PFC マイクロダイアリス灌流液中のノルエピネフリン量は, $13.4 \pm 0.4 \text{ fmol}$ であった ($n=42$)。

II. クロニジン投与

α_2 受容体作動薬, クロニジン (10^{-4}M , 20 分灌流) の LC への投与により, PFC ノルエピネフリン細胞外量は, 投与前基準値の 30 % 以下にまで減少した。この減少は, クロニジン投与後 60 分間について投与前基準値に対して有意差 (**: $p < 0.01$) が認められた。またこの減少は, vehicle に対しては投与後 40 分間について有意差 (**: $p < 0.01$) が認められた (Fig. 1)。

III. ミダゾラム投与

BZP 系薬, ミダゾラム (10^{-4}M , 20 分灌流) の LC への投与では, PFC ノルエピネフリン細胞外量に投与前との変化は認められなかった (Fig. 2)。同様に, ミダゾラム濃度を $5 \times 10^{-4}\text{M}$ とした場合でも, PFC ノルエピネフリン細胞外量には変化が認められなかった (Fig. 2)。

IV. Y-23684 投与

BZP 受容体部分作動薬, Y-23684 (10^{-4}M , 20 分灌流) の LC への投与では, PFC ノルエピネフリン細胞外量に投与前との変化は認められなかった (Fig. 3)。投与終了後 20 分時の PFC ノルエピネフリン細胞外量について, vehicle との間で有意差 (: $p < 0.05$) が認められた (Fig. 3)。

BZP 受容体部分作動薬, Y-23684 ($5 \times 10^{-4}\text{M}$, 20 分灌流) の LC への投与では, PFC ノルエピネフリン細胞外

Fig. 1 α_1 受容体作動薬クロニジンの LC 投与による PFC ノルエピネフリン細胞外量の変動.

●: クロニジン 10^{-4} M (n=42) ○: Vehicle (n=6)

黒バー: 投与時間

**: p<0.01 対基準値, ##: p<0.01 対 Vehicle

Fig. 3 BZP 受容体部分作動薬 Y-23684 の LC 投与による PFC ノルエピネフリン細胞外量の変動.

□: 10^{-4} M (n=5) ■: 5×10^{-4} M (n=5) ○: Vehicle (n=6)

黒バー: 投与時間

**: p<0.01 対基準値, ##: p<0.01, #: p<0.05 対 Vehicle

Fig. 2 BZP 系薬ミダゾラムの LC 投与による PFC ノルエピネフリン細胞外量の変動.

△: 10^{-4} M (n=7) ▲: 5×10^{-4} M (n=8) ○: Vehicle (n=6)

黒バー: 投与時間

Fig. 4 BZP 受容体拮抗薬フルマゼニルの LC 投与による PFC ノルエピネフリン細胞外量の変動.

●: フルマゼニル 10^{-4} M (n=6) ○: Vehicle (n=6)

黒バー: 投与時間

量は投与開始 10 分後 73.6 %, 投与終了時 73.8 % に減少し, いずれも投与前基準値に対して有意差 (**: p<0.01) が認められた. この減少は vehicle との間でも有意差 (**: p<0.01) が認められた (Fig. 3).

V. フルマゼニル投与

BZP 受容体拮抗薬, フルマゼニル (10^{-4} M, 20 分灌流) の LC への投与では, PFC ノルエピネフリン細胞外量に投与前との変化は認められなかった (Fig. 4).

VI. ストレス負荷による PFC ノルエピネフリン細胞外量

ハンドリングストレス負荷により PFC ノルエピネフリン細胞外量は, ハンドリング直後, 182.9 % まで有意 (**: p<0.01) に増加し, 10 分後は 140.9 % に減少した. (Fig. 5)

VII. ミダゾラム投与 (ストレス負荷)

ミダゾラム (10^{-4} M) を LC に持続灌流投与しながらハンドリングストレスを負荷したところ, PFC ノルエピネフリン細胞外量はハンドリング直後 174.4 %, 10 分後 191.6 % まで増加した. この増加はハンドリング前基準値に対して有意差 (**: p<0.01) が認められた

(Fig. 6).

ミダゾラム (5×10^{-4} M) を LC に持続灌流投与しながらハンドリングストレスを負荷した際、PFC ノルエピネフリン細胞外量に有意な変化は認められなかった。ハンドリング直後の PFC ノルエピネフリン細胞外量について、コントロールとの間に有意差 (**: $p < 0.01$) が

認められた (Fig. 6).

VIII. ミダゾラム, フルマゼニル投与 (ストレス負荷)

ミダゾラム (5×10^{-4} M) にフルマゼニル (10^{-4} M) を混合した灌流液を LC に持続灌流投与しながらハンドリングストレスを負荷したところ、PFC ノルエピネフリン細胞外量はハンドリング直後 170.0 % まで増加し、ハン

Fig. 5 ハンドリングストレスによる PFC ノルエピネフリン細胞外量の変動.

○: コントロール ($n=7$) 白バー: ハンドリング時間

**: $p < 0.01$ 対基準値

Fig. 6 ミダゾラムの LC への持続灌流投与中にハンドリングストレスを負荷した際の PFC ノルエピネフリン細胞外量の変動.

△: 10^{-4} M ($n=7$) ▲: 5×10^{-4} M ($n=8$) ○: コントロール ($n=7$) 白バー: ハンドリング時間

**: $p < 0.01$ 対基準値, #: $p < 0.01$ 対コントロール

Fig. 7 ミダゾラムにフルマゼニルを混合した灌流液を LC へ持続灌流投与中にハンドリングストレスを負荷した際の PFC ノルエピネフリン細胞外量の変動.

(a) ミダゾラム 5×10^{-4} M との比較.

◇: ミダゾラム 5×10^{-4} M + フルマゼニル 10^{-4} M ($n=6$) ▲: ミダゾラム 5×10^{-4} M ($n=8$) 白バー: ハンドリング時間

**: $p < 0.01$ 対基準値

(b) コントロールとの比較.

◇: ミダゾラム 5×10^{-4} M + フルマゼニル 10^{-4} M ($n=6$) ○: コントロール ($n=7$) 白バー: ハンドリング時間

**: $p < 0.01$ 対基準値

ドリリング前基準値に対して有意差 (**: $p < 0.01$) が認められた (Fig. 7a). コントロールとの間に有意差は認められなかった (Fig. 7b).

IX. Y-23684 投与 (ストレス負荷)

Y-23684 (10^{-4} M) を LC に持続灌流投与しながらハンドリングストレスを負荷したところ, PFC ノルエピネ

Fig. 8 Y-23684 の持続灌流投与中にハンドリングストレスを負荷した際の PFC ノルエピネフリン細胞外量の変動.

□: 10^{-4} M ($n=7$) ■: 5×10^{-4} M ($n=6$) ○: コントロール ($n=7$) 白バー: ハンドリング時間

**: $p < 0.01$ 対基準値, #: $p < 0.01$ 対コントロール

フリン細胞外量はハンドリング直後 161.1%, 10 分後 173.3% まで増加し, ハンドリング前基準値に対して有意差 (**: $p < 0.01$) が認められた (Fig. 8).

Y-23684 (5×10^{-4} M) を LC に持続灌流投与しながらハンドリングストレスを負荷した際, PFC ノルエピネフリン細胞外量に有意な変化は認められなかった. ハンドリング直後の PFC ノルエピネフリン細胞外量について, コントロールとの間に有意差 (**: $p < 0.01$) が認められた (Fig. 8).

X. Y-23684, フルマゼニル投与 (ストレス負荷)

Y-23684 (5×10^{-4} M) にフルマゼニル (10^{-4} M) を混合した灌流液を LC に持続灌流投与しながらハンドリングストレスを負荷したところ, PFC ノルエピネフリン細胞外量はハンドリング直後 172.8%, 10 分後 164.7% まで増加し, ハンドリング前基準値に対して有意差 (**: $p < 0.01$) が認められた. またこのハンドリング直後及び 10 分後の PFC ノルエピネフリン細胞外量について, Y-23684 (5×10^{-4} M) を持続灌流しながらハンドリングストレスを負荷した際の PFC ノルエピネフリン細胞外量との間に有意差 (**: $p < 0.01$) が認められた (Fig. 9a). コントロールとの間に有意差は認められなかった (Fig. 9b).

Fig. 9 Y-23684 にフルマゼニルを混合した灌流液を LC へ持続灌流投与中にハンドリングストレスを負荷した際の PFC ノルエピネフリン細胞外量の変動.

(a) Y-23684 5×10^{-4} M との比較.

◆: Y-23684 5×10^{-4} M + フルマゼニル 10^{-4} M ($n=6$) ■: 5×10^{-4} M ($n=6$) 白バー: ハンドリング時間

**: $p < 0.01$ 対基準値, #: $p < 0.01$ 対 Y-23684 5×10^{-4} M

(b) コントロールとの比較.

◆: Y-23684 5×10^{-4} M + フルマゼニル 10^{-4} M ($n=6$) ○: コントロール ($n=7$) 白バー: ハンドリング時間

**: $p < 0.01$ 対基準値

考 察

I. LC-PFC ノルエピネフリン神経系

本研究の主目的である BZP 受容体の LC に関する検討を行う前に、 α_2 受容体作動薬であるクロニジンの LC 投与によって、PFC ノルエピネフリン細胞外量が基礎値の 30 % 以下にまで減少した。この結果より LC ノルエピネフリン神経細胞体や樹状突起上に α_2 受容体が存在し、LC ノルエピネフリン神経活動の抑制により、LC の投射部位のひとつである PFC ではシナプス間隙へのノルエピネフリン遊離が減少することを再確認した^(8,19,27,28)。このことから α_2 受容体はストレスなどによって引き起こされる LC-PFC ノルエピネフリン神経活動の過剰な亢進を調節する役目を果たしていると考えられている⁽¹⁹⁾。また、クロニジンの LC 投与によって行動学的にラットに鎮静作用、催眠作用がみられ、 α_2 受容体拮抗薬の LC 投与により覚醒作用がみられるとされ、 α_2 受容体が覚醒-睡眠のサイクルを調節しているという報告もある⁽³¹⁾。 α_2 受容体にはサブタイプとして現在のところ α_{2A} 、 α_{2B} 、 α_{2C} の 3 種類が確認され、LC のノルエピネフリン神経活動を機能的に調節しているのは α_{2A} サブタイプとされている。しかし、 α_{2B} 、 α_{2C} も同様の役割を果たしているという報告もあり議論は分かれている⁽²⁷⁾。

II. BZP 受容体作動性抗不安薬

マイクロダイアリシスプローブが LC 近傍に位置しているラットに無拘束、自由行動下で BZP 系薬であるミダゾラムと BZP 受容体部分作動薬である Y-23684 を灌流投与した結果、ミダゾラムでは 10^{-4} M、 5×10^{-4} M 灌流のいずれにおいても PFC ノルエピネフリン細胞外量の変化は観察されなかった。これに対して Y-23684 の場合は、 10^{-4} M では変化は観察されなかったが、 5×10^{-4} M では PFC ノルエピネフリン細胞外量が軽度ではあるが減少した。以上から BZP 受容体を介した Y-23684 の作用により、LC-PFC ノルエピネフリン神経活動が抑制され、LC の投射部位のひとつである PFC のシナプス間隙へのノルエピネフリン遊離が減少することが示唆された。

GABAA 受容体作動薬ムシモールおよび GABAA 受容体拮抗薬ピククリンを LC に灌流投与したデュアルプローブ・マイクロダイアリシス研究によって、LC に GABAA 受容体が存在することがすでに明らかとなっており⁽¹⁹⁾、本研究の結果より、さらに LC に BZP 受容体が存在し、BZP 受容体作動性抗不安薬の作用発現に関与することが示唆された。

III. ストレス下での BZP 受容体作動性抗不安薬の LC への作用

次にストレス下で、ラットの LC-PFC ノルエピネフリン神経活動への BZP 受容体作動性抗不安薬の影響を検討した。

ラットに対してヒトの手による 10 分間のハンドリングストレスを負荷したところ、PFC ノルエピネフリン細胞外量は 180 % 程度にまで増加することが観察された。過去の報告から、自由行動状態では GABA 作動性の抑制が働いているが、ストレス下ではそれが働かなくなっているか、もしくは減弱されているために LC-PFC ノルエピネフリン神経活動の亢進がおこり、PFC ノルエピネフリン細胞外量が増加するとされており⁽¹⁹⁻²¹⁾、本研究の結果からもそれが確認された。

次に、BZP 受容体作動性抗不安薬のミダゾラムおよび Y-23684 をそれぞれ LC に持続灌流投与しながらハンドリングストレスを負荷したところ、 10^{-4} M 灌流ではどちらもストレスによる PFC ノルエピネフリン細胞外量の増加を抑制しなかったが、 5×10^{-4} M 灌流ではミダゾラムと Y-23684 の両方で PFC ノルエピネフリン細胞外量の増加を抑制した。また、ミダゾラムあるいは Y-23684 の 5×10^{-4} M にフルマゼニル 10^{-4} M を混合した灌流液をそれぞれ LC に持続灌流投与しながらハンドリングストレスを負荷したところ、どちらもストレスによる PFC ノルエピネフリン細胞外量の増加を抑制しなかった。これは BZP 受容体を介したミダゾラムあるいは Y-23684 の作用に対してフルマゼニルが拮抗したことを示している。以上の結果から BZP 受容体作動性抗不安薬はストレスによって引き起こされた LC-PFC ノルエピネフリン神経活動の亢進を、BZP 受容体を介して抑制することが示唆された。

これまでのストレスに関する研究で、視床下部から放出される物質のうち、CRF (corticotropin releasing factor) はストレスホルモンとも呼ばれストレス負荷時の LC-PFC ノルエピネフリン神経活動を亢進させることが報告されている⁽³²⁻³⁴⁾。また CRF 拮抗薬である CP-154,526 や α -helical CRF の LC 投与によりストレス下における LC-PFC ノルエピネフリン神経活動の亢進が抑制されることから^(21,35-37)、CRF 受容体が LC に存在し、ストレス下での LC-PFC ノルエピネフリン神経活動に大きな影響を及ぼしていると考えられている^(21,32-37)。

以上のことから、ストレス下において、BZP 受容体作動性抗不安薬は LC 上の BZP 受容体を介した GABAA 作動性の抑制作用によって、LC ノルエピネフリン神経

活動の亢進を抑制することで、LC 投射路のひとつである視床下部神経活動も抑制することが推測される。また、LC から上行性に投射するノルエピネフリン神経は神経束を形成し、視床、海馬、帯状回、扁桃体、中隔、大脳皮質に広く投射している¹⁴⁻¹⁶⁾。視床下部神経活動が抑制されれば、亢進した CRF の放出も抑えられ、結果として脳全体でストレス状態を減弱するように働くことが推測される。また、脳内神経伝達物質として知られるドーパミン、セロトニンや興奮性アミノ酸が、LC や扁桃体、視床下部の間でノルエピネフリンとともに、複雑なニューラルネットワークをつくり情動発現に関与するとされている^{38, 39)}。さらに LC におけるドーパミン神経活動とストレスに関する研究から²⁰⁾、ストレス下で PFC のドーパミン細胞外量が増加するとされ、BZP 受容体作動性抗不安薬は LC-PFC 神経活動を抑制することで、これらの神経系シナプス間における神経伝達物質放出の増加も抑制するものと推測される。

本研究において用いた BZP 受容体作動性抗不安薬のうちミダゾラムは BZP 系薬⁹⁾、Y-23684 は部分作動薬として知られており、先に述べたように Y-23684 は鎮静、催眠、筋弛緩、健忘などの作用が少ないにもかかわらず強力な抗不安作用をもつとされている⁹⁻¹²⁾。ミダゾラムと Y-23684 がストレス下の LC-PFC ノルエピネフリン神経活動の亢進を同程度抑制したという本研究結果から、Y-23684 はミダゾラムと同等の抗不安作用を持つことが示唆された。

現在 BZP 受容体のサブタイプとして BZP₁、BZP₂ の 2 つのサブタイプが知られており⁴⁰⁻⁴²⁾、共軛する GABAA 受容体には α 、 β 、 γ 、 δ 、 ρ の 5 つのサブユニットがありさらにそれぞれのサブユニットには、 α_{1-6} 、 β_{1-4} 、 γ_{1-3} 、 δ 、 ρ_{1-2} のサブタイプが存在することが知られている⁴³⁻⁴⁷⁾。これら BZP 受容体のサブタイプと GABAA 受容体のサブユニットの組み合わせによって BZP 受容体作動薬の薬理作用が決定されるものと推測され⁴³⁻⁴⁷⁾、これまでのところ BZP₁ サブタイプは α_1 サブユニットと共軛し主に鎮静、催眠作用の発現に関与するとされ^{12, 45, 47)}、BZP₂ サブタイプは α_2 、 α_3 もしくは α_5 サブユニットと共軛し主に筋弛緩作用の発現に関与するとされている^{12, 47)}。BZP₂ サブタイプは抗不安作用にも関与するという報告⁴⁶⁾もあるが十分明らかにされていない。

ミダゾラムはベンゾジアゼピン系薬として最初に見出されたジアゼパムに類似した薬理作用を持ち、ベンゾジアゼピン系薬が持つ薬理作用の全てを発現するといわれている⁹⁾。ミダゾラムは BZP₁ と BZP₂ のサブタイプに対

して等しく親和性を持つとされる⁴⁸⁾。

Y-23684 も BZP₁ と BZP₂ のサブタイプに対して同じような親和性をもつとされる¹²⁾。Y-23684 が LC 上の BZP 受容体に対して、様々なサブユニットの組み合わせのうち具体的にどのような組み合わせの複合体に対して作用するのかは明らかではないが、Y-23684 の選択性の高い薬理作用は従来の BZP 系薬とは異なったサブユニットの組み合わせにより発現されることが示唆された。

LC は中脳運動神経系領域とともに運動神経系にも関与するといわれている⁴⁹⁾。Y-23684 に関して、LC-PFC ノルエピネフリン神経活動から薬理作用を検討したのは本研究が初めてである。その筋弛緩作用が少ないといわれる点についても、Y-23684 を含めた BZP 受容体作動性抗不安薬と筋弛緩作用の関係が LC 神経活動の検討によって明らかにされるものと思われる。

以上の結果から、LC-PFC ノルエピネフリン神経活動において、ストレス下では働かなくなっているか、もしくは減弱されている GABA 作動性の抑制を BZP 受容体作動性抗不安薬が賦活化することが確認された。また、LC-PFC ノルエピネフリン神経活動の抑制が BZP 受容体作動性抗不安薬の作用発現に関与することが示唆された。

結 論

LC-PFC ノルエピネフリン神経活動における BZP 系薬の作用発現機構を明らかにするため無拘束、自由行動下及びストレス下でのラット PFC ノルエピネフリン細胞外量の変動を、デュアルプローブ・マイクロダイアリスを用いて検討した。その結果、無拘束、自由行動下では、BZP 系薬であるミダゾラムは PFC ノルエピネフリン細胞外量を変化させなかったが、BZP 受容体部分作動薬 Y-23684 は PFC ノルエピネフリン細胞外量を基準値に対して最大 26.4 % 減少させた。またストレス下では、ミダゾラム、Y-23684 とともに、180 % まで増加した PFC ノルエピネフリン細胞外量を 125 % 程度に抑制した。

以上のことから、BZP 系薬が LC 上の BZP 受容体を介して作用を発現すること、抗不安作用が LC-PFC ノルエピネフリン神経活動の抑制に関与することが示唆された。また、LC-PFC ノルエピネフリン神経活動が関与するストレスに対して、Y-23684 は BZP 系薬であるミダゾラムと同等の抗不安作用を持つことが示唆された。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なご指導を賜った恩師仲西 修先生、ならびに本研究に直接のご助言とご協力を賜った九州歯科大学歯科麻酔学講座河原 博先生に心から感謝の意を表します。また、本研究に種々ご協力いただきました九州歯科大学歯科麻酔学講座教室員各位にお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Mohler, H. and Okada, T.: Benzodiazepine receptor demonstration in the central nervous system. *Science* 198: 849-851, 1977.
- 2) Braestrup, C. and Squires, R. F.: Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity [3 H]diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74: 3805-3809, 1977.
- 3) Tallman, J. F., Thomas, J. W. and Gallager, D. W.: GABAergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity. *Nature* 274: 383-385, 1978.
- 4) Karobath, M. and Sperk, G.: Stimulation of benzodiazepine receptor binding by γ -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 76: 1004-1006, 1979.
- 5) Olsen, R. W. and Snowman, A. M.: Chloride-dependent enhancement by barbiturates of γ -aminobutyric acid receptor binding. *J. Neurosci.* 2: 1812-1823, 1982.
- 6) Enna, S. J.: Regional variation and characteristics of GABA-receptors in the mammalian CNS. *Adv. Exp. Med. Biol.* 123: 323-337, 1979.
- 7) Enna, S. J.: GABA receptor pharmacology. Functional considerations. *Biochem. Pharmacol.* 30: 907-913, 1981.
- 8) Pieri, L., Schaffner, R., Scherschlicht, R., Polc, P., Sepinwall, J., Davidson, A., Mohler, H., Cumin, R., Da Prada, M., Burkard, W. P., et al.: Pharmacology of midazolam. *Arzneimittelforschung* 31: 2180-2201, 1981.
- 9) Nakao, T., Obata, M., Kawakami, M., Morita, K., Tanaka, H., Morimoto, Y., Takehara, S., Yakushiji, T. and Tahara, T.: Studies on the synthesis of condensed pyridazine derivatives. IV. Synthesis and anxiolytic activity of 2-aryl-5,6-dihydro-(1)benzothiepin[5,4-c]pyridazin-3(2H)-ones and related compound. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 39: 2556-2563, 1991.
- 10) Yasumatsu, H., Morimoto, Y., Yamamoto, Y., Takehara, S., Fukuda, T., Nakao, T. and Setoguchi, M.: The pharmacological properties of Y-23684, a benzodiazepine receptor partial agonist. *Br. J. Pharmacol.* 111: 1170-1178, 1994.
- 11) Griebel, G., Perrault, G. and Sanger, D. J.: Differences in anxiolytic-like profile of two novel non-benzodiazepine BZ(ω) receptor agonists on defensive behaviors of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62: 689-694, 1999.
- 12) Griebel, G., Perrault, G., Tan, S., Schoemaker, H. and Sanger, D. J.: Comparison of the pharmacological properties of classical and novel BZ- ω receptor ligands. *Behav. Pharmacol.* 10: 483-495, 1999.
- 13) Nakane, H., Shimizu, N. and Hori, T.: Stress-induced norepinephrine release in the rat prefrontal cortex measured by microdialysis. *Am. J. Physiol.* 267: R1559-1566, 1994.
- 14) Aston-Jones, G., Shipley, M. T., Chouvet, G., Ennis, M., van Bockstaele, E., Pieribone, V., Shiekhhattar, R., Akaoka, H., Drolet, G., Astier, B. et al.: Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Prog. Brain Res.* 88: 47-75, 1991.
- 15) Hamon, M.: Neuropharmacology of anxiety: perspectives and prospects. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 36-39, 1994.
- 16) Aston-Jones, G., Rajkowski, J., Kubiak, P., Valentino, R. J. and Shipley, M. T.: Role of the locus coeruleus in emotional activation. *Prog. Brain Res.* 107: 379-402, 1996.
- 17) Tassin, J. P.: NE/DA interactions in prefrontal cortex and their possible roles as neuromodulators in schizophrenia. *J. Neural Transm. Suppl.* 36: 135-162, 1992.
- 18) Kawahara, H., Kawahara, Y. and Westerink, B. H. C.: The noradrenaline-dopamine interaction in the rat medial prefrontal cortex studied by multi-probe microdialysis. *Eur. J. Pharmacol.* 418: 177-186, 2001.
- 19) Kawahara, Y., Kawahara, H. and Westerink, B. H. C.: Tonic regulation of the activity of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of the conscious rat studied by dual-probe microdialysis. *Brain Res.* 823: 42-48, 1999.
- 20) Kawahara, Y., Kawahara, H. and Westerink, B. H. C.: Comparison of effects of hypotension and handling stress on the release of noradrenaline and dopamine in the locus coeruleus and medial prefrontal cortex of the rat. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 360: 42-49, 1999.
- 21) Kawahara, H., Kawahara, Y. and Westerink, B. H. C.: The role of afferents to the locus coeruleus in the handling stress-induced increase in the release of noradrenaline in the medial prefrontal cortex: a dual-probe microdialysis study in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 387: 279-286, 2000.
- 22) Santiago, M. and Westerink, B. H. C.: 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, 1992.
- 23) Westerink, B. H. C., Kwint, H. F. and deVries, J. B.:

- The pharmacology of mesolimbic dopamine neurons: a dual-probe microdialysis study in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of the rat brain. *J. Neurosci.* 16: 2605-2611, 1996.
- 24) Moor, E., de Boer, P., Beldhuis, H. J. and Westerink, B. H. C.: A novel approach for studying septo-hippocampal cholinergic neurons in freely moving rats: a microdialysis study with dual-probe design. *Brain Res.* 648: 32-38, 1994.
 - 25) Enrico, P., Bouma, M., Bouma, M. and Westerink, B. H. C.: The role of afferents to the ventral tegmental area in the handling stress-induced increase in the release of dopamine in the medial prefrontal cortex: a dual-probe microdialysis study in the rat brain. *Brain Res.* 779: 205-213, 1998.
 - 26) Paxinos, G. and Watson, C.: The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. Academic Press, Sydney, 1986.
 - 27) Mateo, Y. and Meana, J. J.: Determination of the somatodendritic α_2 -adrenoceptor subtype located in rat locus coeruleus that modulates cortical noradrenaline release in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 379: 53-57, 1999.
 - 28) van Veldhuizen, M. J., Feenstra, M. G., Heinsbroek, R. P. and Boer, G. J.: *In vivo* microdialysis of noradrenaline overflow: effects of α -adrenoceptor agonists and antagonists measured by cumulative concentration-response curves. *Br. J. Pharmacol.* 109: 655-660, 1993.
 - 29) Polc, P., Laurent, J. P., Scherschlicht, R. and Haefely, W.: Electrophysiological studies on the specific benzodiazepine antagonist Ro 15-1788. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 316: 317-325, 1981.
 - 30) Polc, P., Bonetti, E. P., Schaffner, R. and Haefely, W.: A three-state model of the benzodiazepine receptor explains the interactions between the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788, benzodiazepine tranquilizers, β -carbolines, and phenobarbitone. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 321: 260-264, 1982.
 - 31) De Sarro, G. B., Ascoti, C., Froio, F., Libri, V. and Nistico, G.: Evidence that locus coeruleus is the site where clonidine and drugs acting at α_1 - and α_2 -adrenoceptors affect sleep and arousal mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 90: 675-685, 1987.
 - 32) Butler, P. D., Weiss, J. M., Stout, J. C. and Nemeroff, C. B.: Corticotropin-releasing factor produces fear-enhancing and behavioral activating effects following infusion into the locus coeruleus. *J. Neurosci.* 10: 176-183, 1990.
 - 33) Smagin, G. N., Swiergiel, A. H. and Dunn, A. J.: Corticotropin-releasing factor administered into the locus coeruleus, but not the parabrachial nucleus, stimulates norepinephrine release in the prefrontal cortex. *Brain Res Bull.* 36: 71-76, 1995.
 - 34) Schulz, C. and Lehnert, H.: Activation of noradrenergic neurons in the locus coeruleus by corticotropin-releasing factor. A microdialysis study. *Neuroendocrinology.* 63: 454-458, 1996.
 - 35) Emoto, H., Koga, C., Ishii, H., Yokoo, H., Yoshida, M. and Tanaka, M.: A CRF antagonist attenuates stress-induced increases in NA turnover in extended brain regions in rats. *Brain Res.* 627: 171-176, 1993.
 - 36) Shimizu, N., Nakane, H., Hori, T. and Hayashi, Y.: CRF receptor antagonist attenuates stress-induced noradrenaline release in the medial prefrontal cortex of rats. *Brain Res.* 654: 145-148, 1994.
 - 37) Smagin, G. N., Zhou, J., Harris, R. B. and Ryan, D. H.: CRF receptor antagonist attenuates immobilization stress-induced norepinephrine release in the prefrontal cortex in rats. *Brain Res. Bull.* 42: 431-434, 1997.
 - 38) Tanaka, M.: Emotional stress and characteristics of brain noradrenaline release in the rat. *Ind. Health.* 37: 143-156, 1999.
 - 39) Singewald, N. and Philippu, A.: Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Prog. Neurobiol.* 56: 237-267, 1998.
 - 40) Pritchett, D. B., Luddens, H. and Seeburg, P. H.: Type I and type II GABA_A-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science* 245: 1389-1392, 1989.
 - 41) Sieghart, W. and Karobath, M.: Molecular heterogeneity of benzodiazepine receptors. *Nature* 286: 285-287, 1980.
 - 42) Dennis, T., Dubois, A., Benavides, J. and Scatton, B.: Distribution of central ω_1 (benzodiazepine) and ω_2 (benzodiazepine) receptor subtypes in the monkey and human brain. An autoradiographic study with [³H]flunitrazepam and the ω_1 selective ligand [³H]zolpidem. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 309-322, 1988.
 - 43) Knoflach, F., Drescher, U., Scheurer, L., Malherbe, P. and Mohler, H.: Full and partial agonism displayed by benzodiazepine receptor ligands at recombinant γ -aminobutyric acid receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 385-391, 1993.
 - 44) Graham, D., Faure, C., Besnard, F. and Langer, S.: Pharmacological profile of benzodiazepine site ligands with recombinant GABA_A receptor subtypes. *Euro. Neuropsychopharmacology* 6: 119-125, 1996.
 - 45) Benke, D., Honer, M., Michel, C. and Mohler, H.: GABA_A receptor subtypes differentiated by their γ -subunit variants: prevalence, pharmacology and subunit architecture. *Neuropharmacology* 35: 1413-1423, 1996.
 - 46) Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brunig, I., Benson, J. A., Fritschy, J. M., Martin, J. R., Blueth-

- mann, H. and Mohler, H.: Benzodiazepine actions mediated by specific γ -aminobutyric acid receptor subtypes. *Nature* 401: 796-800, 1999.
- 47) McKernan, R. M., Rosahl, T. W., Reynolds, D. S., Sur, C., Wafford, K. A., Atack, J. R., Farrar, S., Myers, J., Cook, G., Ferris, P., et al: Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA_A receptor α_1 subtype. *Nat. Neurosci.* 3: 587-592, 2000.
- 48) Faure-Halley, C., Graham, D., Arbilla, S. and Langer, S. Z.: Expression and properties of recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ and $\alpha_5\beta_2\gamma_2$ forms of the rat GABA_A receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 246: 283-287, 1993.
- 49) Mileykovskiy, B. Y., Kiyashchenko, L. I., Kodama, T., Lai, Y. Y., and Siegel, J. M.: Activation of pontine and medullary motor inhibitory regions reduces discharge in neurons located in the locus coeruleus and the anatomical equivalent of the midbrain locomotor region. *J. Neurosci.* 20: 8551-8558, 2000.