

## カフェインの脳神経伝達系への影響

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 on brain neurotransmitters

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

We reported that acute and chronic caffeine administration affected neurotransmitters in rat brain striatum.

We have measured extracellular acetylcholine (ACh) to investigate acute effect of caffeine in rat hippocampus and chronic effect of caffeine by changing chronic period in rat striatum. The concentration of ACh in the rat hippocampus was increased by the acute administration of caffeine (50 or 100mg/kg ; i. p.) whereas chronic administration of caffeine (for a period of 1, 3, 5, or 7 days in a dose of 50 or 100mg/kg ; i. p.) decreased the concentration of ACh. The similar effect was observed to the previous study.

We have synthesized  $^{11}\text{C}$ -labeled caffeines and examined the detail brain distribution of caffeine. Although the  $^{11}\text{C}$ -labeled caffeines distributed in the whole brain, considerably higher accumulation in the thalamus and hypothalamus was observed. The difference in the distribution of  $^{11}\text{C}$ -labeled caffeines was due to their higher specific activity than commercially available caffeines which give a uniform distribution.

These results suggest that the acute and chronic administrations of caffeine cause contrast, effect on *in vivo* extracellular ACh concentration.

これまで、我々はカフェインの脳神経伝達系の作用をマイクロダイアリシス法を用いて測定し、その結果、ラット脳線条体において急性投与では神経細胞間のアセチルコリン (ACh) 濃度を上昇させること、また、14日間カフェインを連続投与することによって得られた慢性ラットでは通常状態における ACh の濃度が減少していることなどを明らかにした<sup>1)</sup>。そこでカフェイン急性投与においてラット脳海馬における ACh 濃度への影響を調べるとともに、慢性ラットにおいて線条体において慢性期間を変化させた際の通常状態における ACh 濃度の変動ならびに慢性ラットの血清中カフェインおよびその代謝

物についても測定した。また、カフェインの脳内分布を調べる目的で、比放射能の高い $^{11}\text{C}$  標識カフェインを3種類合成し、それらを用いて標識位置の違いによる分布の差を検討した。

## 実験方法

### 1) ラットの飼育なら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1，3，5，7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<sup>2)</sup>に基づいて，目的とする部位（線条体：Bregma より前方0.7mm，正中より左側方3.0mm，頭骨より深さ0.4mm，海馬：Bregma より後方4.8mm，正中より左側5.0mm，頭骨より深さ3.5mm）にドリルで穴を開け，ガイドカニューレを挿入し，歯科用セメントで固定した。

### 3) マイクロダイアリシスによるラット脳神経細胞間 ACh の測定

透析用プローブは直管型（エイコム）を用い，ガイドカニューレより3mm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 $10^{-4}\text{M}$  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， $2\text{ }\mu\text{l}/\text{min}$  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）を用い，エチルホモコリンを内部標準とした内標準法によりその濃度を求めた。移動相として0.1M リン酸緩衝液（pH8.5）に塩化テトラメチルアンモニウムを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加え，流速1.0ml/min で溶出させた。検出にはECD 検出器を使用し，参照電極として白金電極，加電圧+450mV で測定した。

### 4) カフェインおよびその代謝物の測定

カフェイン最終投与より2時間30分後の血液を採取，遠心し，その上清を試料とした。定量はラジアルパック C-18カラム（Watars）を用い，絶対検量線法によりその濃度を求めた。移動相は，水：メタノール：酢酸=74：25：1を用い，流速3.0ml/min で溶出させた。検出にはUV 検出器を用い，波長254nm で測定した。

### 5) $^{11}\text{C}$ 標識カフェインの合成および脳内分布

$^{11}\text{C}$  標識カフェインの合成は文献<sup>3)</sup>にしたがって合成した。

得られた $^{11}\text{C}$  標識カフェイン200 $\mu\text{l}$ （約200 $\mu\text{Ci}$ ）を尾静脈より投与し，投与後，経時的に屠殺し，血液採集および脳，肝臓，腎臓を摘出し，脳については各部位に部位分け後，それらの放射能および質量を測定した。

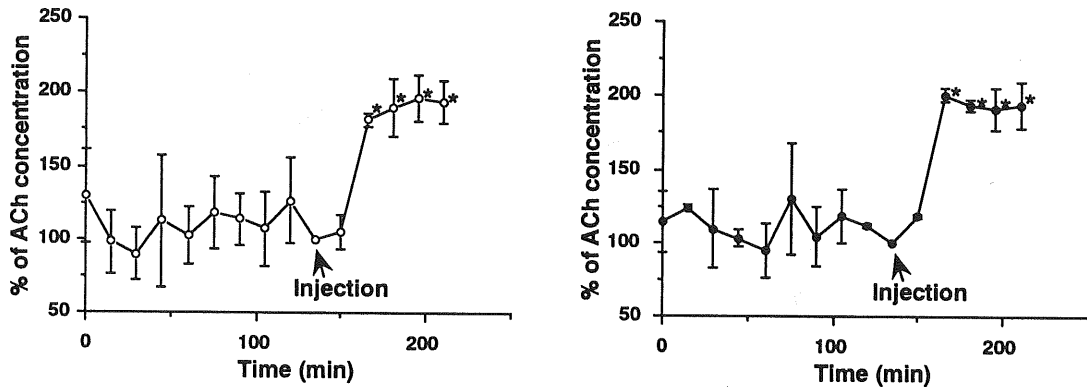
## 結果と考察

ラットにカフェイン（100 or 50mg/kg）を腹腔投与したところ，脳海馬において線条体と同様にACh上昇が認められた。（Fig.1）しかし，線条体においては投与濃度によってAChが異なる挙動をしたの

に対し、海馬では投与濃度による ACh の差異は観察されなかった。

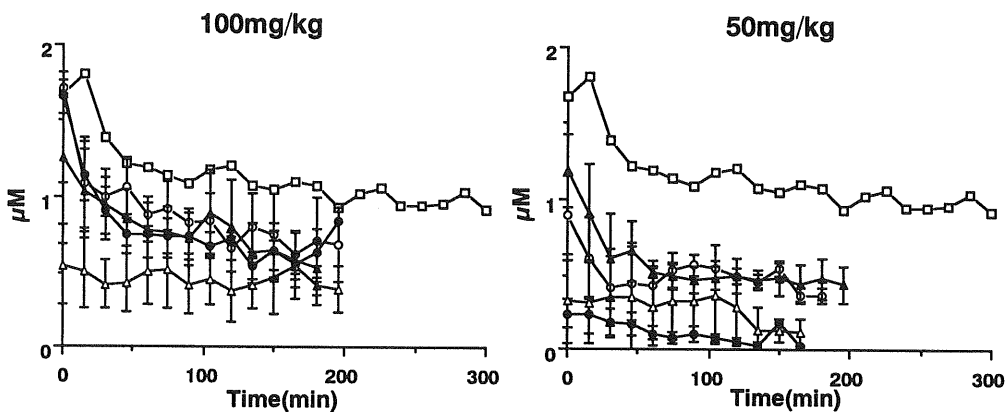
一方、慢性化は 1, 3, 5, 7 日について行い、それぞれの線条体における ACh 濃度の経時的变化を測定した。(Fig.2) いずれの慢性日数でも ACh の平常値は通常状態に比べ低下しており、その作用は 100mg/kg 投与群よりも 50mg/kg 投与群の方が顕著であった。

このように、カフェインは急性および慢性投与に対し、異なった作用をすることが明らかとなったが、この作用については次の様なことが考えられる。すなわち、前シナプス膜には ACh 放出抑制作用を持つアデノシンレセプターが存在するが、カフェインにはこのアデノシンレセプター阻害作用<sup>4-6)</sup>があるために ACh 放出に抑制がかからず ACh 濃度が増加したものと考えられる (Fig.3 左)。また、カフェイ



**Fig. 1.** Effect of caffeine injection [100mg/kg (○), 50mg (●)] vs ACh concentration in rat hippocampus. Means ( $N=3$ )  $\pm$  S. E. (bar) are expressed as % of ACh dialysate concentration just before caffeine injection.

\* $P<0.01$  compared with 100% ACh concentration.



**Fig. 2.** ACh concentration in normal (□) and 1 (○), 3 (●), 5 (△) and 7 (▲) days chronic caffeine rat brain striatum.

Data are mean  $\pm$  S. E. values from three rats.

ンの慢性作用としてアデノシンレセプターの up-regulation がある<sup>7-10)</sup>。そのため、ACh の放出抑制が通常以上にかかるため、ACh 濃度の平常値が低下したものと考えられる (Fig.3 右)。

次に、この慢性状態における血清中のカフェインおよびその代謝物の変化を測定した結果を Fig.4 に示す。100mg/kg 投与群では5日目までは血清中のカフェイン濃度は減少し、50mg/kg 投与群では3日目以降血清中カフェインの濃度は減少していた。また、主代謝物であるパラキサンチンの濃度も変化していた。これらのことより、慢性化においてはカフェインの代謝酵素である肝臓の P-450 が活性化されることが明らかとなった。またこの活性が投与濃度によって差があるのも非常に興味深い点である。

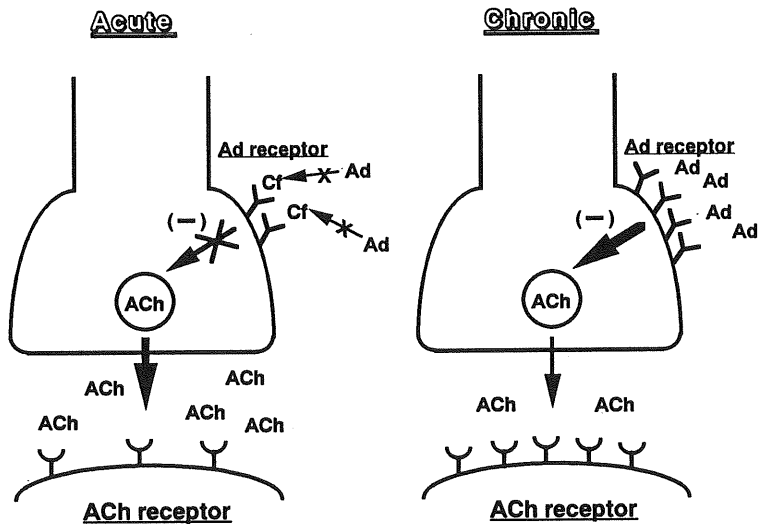


Fig. 3. Effect of caffeine on acute and chronic injection between neurons.  
ACh : acetylcholine Ad : adenosine Cf : caffeine

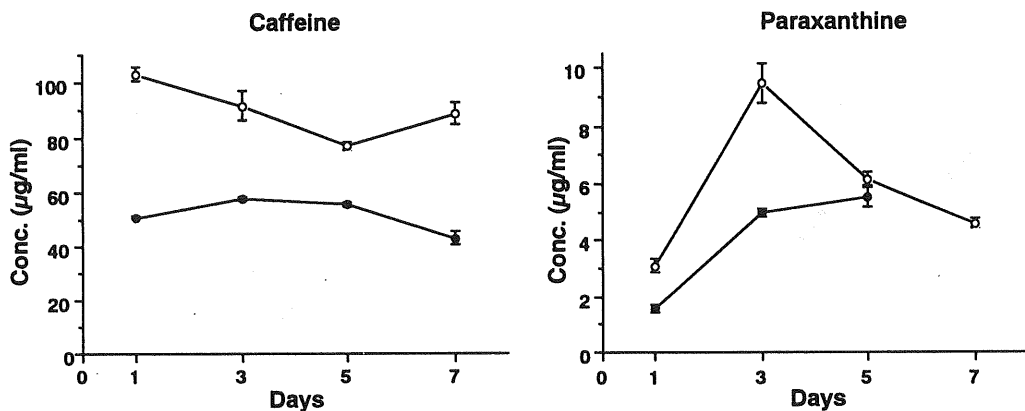


Fig. 4. Concentration of caffeine and paraxanthine in chronic caffeine [100mg/kg (○), 50mg/kg (●)] rat serum.  
Data are mean  $\pm$  S. E. values from four rats.

最後に,  $^{11}\text{C}$  標識カフェインを用いた脳内分布の検討であるが, 3種類のいずれのカフェインも速やかに脳に取り込まれることが明らかになった (Fig.5)。しかし, 標識位置の違いによって代謝速度は異なっており, 3位の位置に標識されたカフェインが一番代謝が早く, これはカフェインの主代謝物がパラキサンチンであるという結果と一致するものとなった。また, 15分における標識カフェインの分布をみると視床および視床下部に高い取込みがみられている (Fig.6)。これは,  $^{14}\text{C}$  標識カフェインを用いた実験ではわからなかったことであり新たな知見といえる。

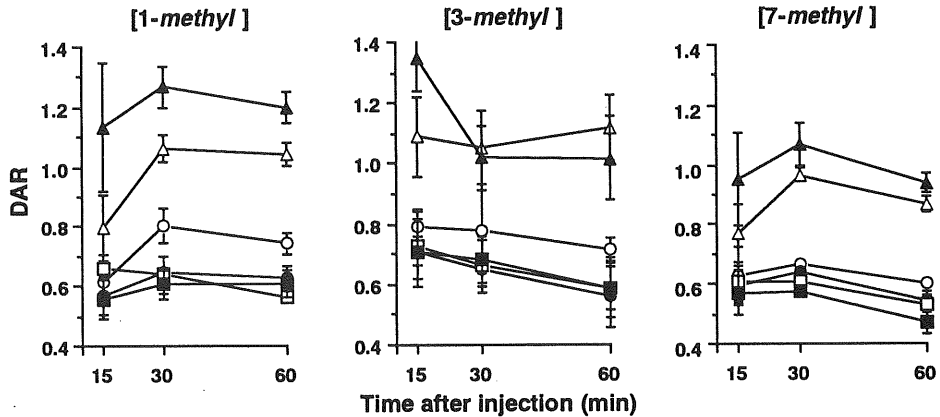


Fig. 5. Time course for DAR of  $^{11}\text{C}$  caffeines in blood (○), cortex (●), striatum (□), hippocampus (■), liver (△) and kidney (▲).

Data are mean  $\pm$  S. E (bars) values from four rats.

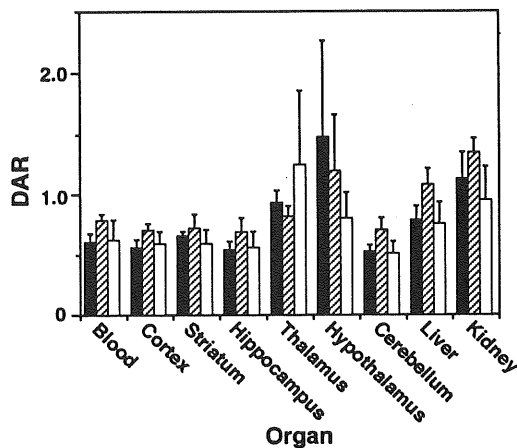


Fig. 6. Tissue distributions of  $^{11}\text{C}$  caffeines.

Data are mean  $\pm$  S. E (bars) values from four rats.

■ [1-methyl- $^{11}\text{C}$ ] caffeine  
 ▨ [3-methyl- $^{11}\text{C}$ ] caffeine  
 □ [7-methyl- $^{11}\text{C}$ ] caffeine

このように、カフェインの様々な *in vivo* における作用を検討してきたが、慢性化によって神経細胞間の神経伝達物質（今回は ACh）の濃度が変化することは非常におもしろいことである。すなわち、カフェインの投与濃度と投与期間を変化させることで自由に細胞間の ACh 濃度を決定できるということである。このことより、カフェイン慢性ラットは神経伝達系変成モデルとして大変有効な手段となり得る可能性があり、これからの高齢化社会における痴呆症の改善に大きな役割を果たすことを期待したい。

## 文 献

- 1) 船木善仁, 井戸達雄 (1992) 微量栄養素研究 9 : 47-51
- 2) PAXINOS, G. and C. WATSON (1982) Syd. Acad. Press
- 3) IWATA R., PASCALI C., YUASA M., YANAI K., TAKAHASHI T and IDO T. (1992) Appl. Radiat. Ist. 43 (9) : 1083-1088
- 4) MANTE S. and MINNEMAN K. P. (1990) Mol. Pharmacol. 38 : 652-659
- 5) WAYNE L. (1990) J. Pharmacol. Exp. Ther. 254 : 400-406
- 6) SNYDER S. H., KATIMS J. J., ANNAU A., BRUNS R. F. and DALY J. W. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 : 3260-3264
- 7) YONG Z. and JACK N. W. (1990) J. Pharmacol. Exp. Ther. 254 : 757-763
- 8) HOLTZMAN S. G., MANTE S. and MINNEMAN P. K. (1991) J. Pharmacol. Exp. Ther. 256 : 62-68
- 9) GREEN R. M. and STILES L. (1986) J. Clin. Invest. 77 : 222-227
- 10) LIN Y. and PHILLIS J. W. (1990) Brain res. 520 : 322-323