

# マウス視床下部モノアミン、アセチルコリンおよびギャバ神経系 に及ぼすフッ化ナトリウムの影響補遺 (マウス分割脳部位のモノアミン神経系に及ぼす影響)

菊 月 圭 吾

岩手医科大学歯学部歯科薬理学講座

(主任：伊藤忠信教授)

[受付：1992年 9月 11日]

[受理：1992年 11月 5日]

**Abstract** : The effects of oral and subcutaneous administration of sodium fluoride (NaF) on the monoaminergic systems at several discrete brain regions of mice were examined. The mice were sacrificed 30 min after oral or subcutaneous administration of NaF (1mg/kg). The levels of noradrenaline (NE), dopamine (DA), serotonin (5-HT), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in the seven brain regions were measured by high-performance liquid chromatography with an electrochemical detector. In the noradrenergic system, oral NaF increased the NE level in the midbrain (MB) and the MHPG levels in the hypothalamus (Hyp), stratum (Str) and MB. In the dopaminergic system, oral NaF increased the DA levels in the Str and hippocampus (Hip), and the DOPAC levels in the Hyp and Str. In the serotonergic system, oral NaF increased the 5-HIAA levels in the Hyp, Str, Hip and MB. Subcutaneous NaF increased the MHPG and DOPAC levels in the Hyp and the MHPG, DA and DOPAC levels in the Str. These results suggest that oral administration of NaF affects the activities of the monoaminergic systems over a wide area of the mouse brain. The mechanism of these actions of NaF may include the peripheral action of NaF.

**Key words** : sodium fluoride, monoaminergic system, mouse brain

## 緒 言

フッ化物は有効な蝕予防薬として、歯科臨床において広く利用されているが、フッ化物は蝕抵抗性増加作用以外にも、様々な生体作用を持つことが報告されている<sup>1-3)</sup>。

先に著者は、フッ化ソーダ (NaF) の経口投与により、マウスの視床下部のモノアミン神経系関連物質の含量に有意な変化が発現し、マウ

スの中枢神経系の活性に影響を与える可能性のあることを報告した<sup>4)</sup>。本実験は、NaFのこのような作用が、視床下部以外の脳部位においても認められるかどうかを明らかにするために行われた。また、最近、フッ化物を摂取した場合、消化管に対するフッ化物の直接作用により、消化管粘膜表面が損傷されることが報告されている<sup>5)</sup>。フッ化物のこのような作用の発現は、間接的原因として中枢神経系の活性に対して何らかの影

---

Influences of sodium fluoride on brain monoaminergic, cholinergic and gabaergic systems in the hypothalamus of mice.

— Effect of sodium fluoride on the monoaminergic systems in the discrete brain regions of mice. —

Keigo Kikuzuki

(Department of Pharmacology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020, Japan)

響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、本実験において、NaFの経口投与時の影響と比較するために、皮下投与時の影響についても検討した。

### 実験方法および材料

#### 使用動物

実験には、6週齢(体重30-35g)のddY系雄性マウス(Nihon SLC, 浜松)を1群8-9匹として4群用いた。

#### NaFの投与条件

NaF 1 mg/kgを蒸留水(経口投与)もしくは0.9%生理的食塩水(皮下投与)に溶解したのちマウスに投与し、それぞれの投与30分後にマイクロウェーブ照射(TMW-6402 A, 4 KW, 0.8 sec, 東芝)により屠殺後、直ちに全脳を摘出し、Glowinski and Iversen法<sup>6)</sup>に準じて、視床下部、線条体、大脳皮質、海馬、延髄、中脳、小脳の各部分を摘出した。なお対照群には、蒸留水もしくは0.9%生理的食塩水のみを等量(0.1 ml/10 g body weight)経口投与または背部皮下に投与した。

#### 測定試料の作製

摘出された脳組織は、0.1 mM EDTAを含む300-500  $\mu$ lの0.05 M 過塩素酸溶液中で超音波破碎し、遠心分離(12,000 g x 10 min, 4°C)した。上清は0.45  $\mu$ mフィルターで濾過し、-80°Cで測定時まで保存した。

#### モノアミン神経伝達物質および関連代謝物質の測定

noradrenaline(NE), dopamine(DA), serotonin(5-HT), 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 含量の測定は、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーを用いるSaitoらの方法<sup>7)</sup>により行った。使用した機器とクロマトグラフィー条件は以下の通りである。送液ポンプ(Model AS-4000, 日立), 分析用カラム(WH-C 18, 4.6 mm ID x 50 mm, 5  $\mu$ m 日立), 電気化学検出器(Model 5100 A Coulochem, Esa Inc., 米国),

model 5021 conditioning cell (設定電位+0.4 V, Esa Inc.), model 5011 dual electrode analytical cell (設定電位, cell 1: +0.02 V, cell 2: -0.3 V, Esa Inc.) Integrator (Model C-R 6 A, 島津), カラム温度調節ヒーター(Model UC-65, 東京理科機械), 8%メタノール, 0.042% ヘプタンスルホン酸ソーダおよび0.1 mM EDTAを含む0.02 M 酢酸ソーダ/0.0125 M クエン酸 buffer (pH 3.7, 流速2.4 ml/min, 35°C)。

#### 使用薬物

薬物, 試薬および溶媒は、すべて市販品を使用した。

#### 統計学的処理

測定結果は、平均値±標準誤差でTableに示した。結果の統計学的有意性は、Studentのt検定を用いて判定した。

### 実験結果

#### 1 NE神経系に及ぼすNaF経口投与の影響

測定した7脳部位において、中脳でNE含量の増加が、視床下部、線条体、中脳でMHPG含量の増加が認められた(Table 1)。

**Table 1** Effect of NaF administered orally on the noradrenergic system in the discrete brain regions of mice

Substrate	Region	Control	NaF
NE	Hyp	1390 ± 29	1391 ± 35
	Str	202 ± 9	221 ± 6
	Cor	258 ± 5	268 ± 12
	Hip	431 ± 7	454 ± 12
	MB	560 ± 12	618 ± 10**(+10.4%)
	MO	686 ± 25	726 ± 14
	Cer	383 ± 13	370 ± 7
MHPG	Hyp	117 ± 7	144 ± 5**(+23.1%)
	Str	39 ± 2	49 ± 2**(+25.6%)
	Cor	18 ± 2	20 ± 1
	Hip	19 ± 1	20 ± 1
	MB	51 ± 2	58 ± 1*(+13.7%)
	MO	68 ± 3	72 ± 2
	Cer	9 ± 1	9 ± 1

Mice were sacrificed 30 min after administration of NaF (1 mg/kg, p. o.).

Values represent the mean ± SEM (n = 8~9) and compound levels are expressed in ng/g tissue weight.

Hyp: hypothalamus, Str: striatum,

Cor: cerebral cortex, Hip: hippocampus,

MB: midbrain, MO: medulla oblongata,

Cer: cerebellum

\*p < 0.05 and \*\*p < 0.01 vs. controls (Student's t test).

**Table 2** Effect of NaF administered orally on the dopaminergic system in the discrete brain regions of mice

Substrate	Region	Control	NaF
DA	Hyp	668 ± 18	678 ± 17
	Str	11497 ± 204	12212 ± 230*(+6.2%)
	Cor	482 ± 22	446 ± 11
	Hip	78 ± 4	96 ± 4**(+23.1%)
	MB	285 ± 19	307 ± 10
	MO	92 ± 14	85 ± 5
	Cer	20 ± 1	20 ± 2
DOPAC	Hyp	166 ± 8	189 ± 5*(+13.9%)
	Str	667 ± 17	747 ± 22*(+12.3%)
	Cor	18 ± 2	20 ± 1
	Hip	19 ± 1	20 ± 1
	MB	51 ± 2	58 ± 1
	MO	68 ± 3	72 ± 2
	Cer	9 ± 1	9 ± 1
HVA	Hyp	255 ± 10	248 ± 10
	Str	1156 ± 21	1201 ± 32
	Cor	129 ± 5	114 ± 2
	Hip	19 ± 1	20 ± 1
	MB	51 ± 2	58 ± 1
	MO	68 ± 3	72 ± 2
	Cer	9 ± 1	9 ± 1

Mice were sacrificed 30 min after administration of NaF(1mg/kg, p. o.). Values represent the mean ± SEM (n = 8 ~ 9) and compound levels are expressed in ng/g tissue weight. Hyp : hypothalamus, Str : striatum, Cor : cerebral cortex, Hip : hippocampus, MB : midbrain, MO : medulla oblongata, Cer : cerebellum  
\*P <0.05 and \*\*p <0.01 vs. controls (Student's t test).

**Table 3** Effect of NaF administered orally on the serotonergic system in the discrete brain regions of mice

Substrate	Region	Control	NaF
5-HT	Hyp	1830 ± 31	1809 ± 27
	Str	978 ± 13	1038 ± 16
	Cor	524 ± 15	516 ± 12
	Hip	671 ± 14	689 ± 14
	MB	917 ± 18	980 ± 11
	MO	890 ± 27	850 ± 16
	Cer	241 ± 13	240 ± 14
5-HIAA	Hyp	592 ± 14	669 ± 20**(+13.0%)
	Str	343 ± 6	395 ± 11**(+15.2%)
	Cor	120 ± 3	132 ± 5
	Hip	293 ± 8	329 ± 6**(+12.3%)
	MB	331 ± 6	372 ± 8**(+12.4%)
	MO	68 ± 3	72 ± 2
	Cer	9 ± 1	9 ± 1

Mice were sacrificed 30 min after administration of NaF(1mg/kg, p. o.). Values represent the mean ± SEM (n = 8 ~ 9) and compound levels are expressed in ng/g tissue weight. Hyp : hypothalamus, Str : striatum, Cor : cerebral cortex, Hip : hippocampus, MB : midbrain, MO : medulla oblongata, Cer : cerebellum  
\*\*p <0.01 vs. controls (Student's t test).

**2 DA 神経系に及ぼす NaF 経口投与の影響**

線条体と海馬の DA 含量および視床下部と線条体の DOPAC 含量の増加が認められた (Table 2)。

**Table 4** Effect of NaF administered subcutaneously on the monoaminergic systems in the discrete brain regions of mice

Substrate	Region	Control	NaF
NE	Hyp	1845 ± 22	1872 ± 42
	Str	201 ± 8	204 ± 5
MHPG	Hyp	137 ± 7	157 ± 5*(+14.6%)
	Str	32 ± 1	35 ± 1*(+9.4%)
DA	Hyp	800 ± 22	852 ± 16
	Str	13808 ± 282	14711 ± 259*(+6.5%)
DOPAC	Hyp	193 ± 5	219 ± 9*(+13.5%)
	Str	786 ± 17	906 ± 50*(+15.3%)
HVA	Hyp	233 ± 9	234 ± 6
	Str	1249 ± 27	1215 ± 35
5-HT	Hyp	1528 ± 21	1559 ± 12
	Str	1020 ± 13	1053 ± 12
5-HIAA	Hyp	387 ± 9	405 ± 9
	Str	302 ± 6	314 ± 8

Mice were sacrificed 30 min after administration of NaF(1mg/kg, s.c.). Values represent the mean ± SEM (n = 8 ~ 9) and compound levels are expressed in ng/g tissue weight. Hyp : hypothalamus, Str : striatum, \*P <0.05 vs. controls (Student's t test).

**3 5-HT 神経系に及ぼす NaF 経口投与の影響**

視床下部, 線条体, 海馬, 中脳の 5-HIAA 含量の増加が認められた (Table 3)。

**4 NE, DA, 5-HT 神経系に及ぼす NaF 皮下投与の影響**

NaF 1 mg/kgの皮下投与により, 視床下部では MHPG と DOPAC 含量が増加し, 線条体では MHPG, DA, DOPAC 含量の増加が認められた (Table 4)。

**考 察**

前報<sup>9)</sup>において, 視床下部における 3 種類のモノアミン神経系全てに影響を及ぼした NaF の投与量は, 1 mg/kg以上であった。そこで本実験でも NaF 1 mg/kgの用量を用いて実験した。

本実験において測定した 7ヶ所の脳部位のうち, 視床下部と線条体では NE, DA, 5-HT 神経系すべてに, NaF 経口投与における影響が認められた。また, 大脳皮質, 海馬, 中脳でも, 複数のモノアミン神経系に関して, 明らかな影響が認められた。一方, 延髄および, 小脳では, いずれの神経系でも NaF の投与における影響

は認められなかった。視床下部におけるモノアミン神経系に対する NaF 1 mg/kg の効果は、前回の結果と比較した場合、各種物質の含量の増加率には相違はあるものの、増加を示した物質の種類は全く同一であった。以上の結果から、NaF は広範囲な脳部位のモノアミン神経系の活性に対して、影響を及ぼすこと、また、NaF に対する感受性には脳部位により差があることなどが示唆される。町田<sup>3)</sup>は、NaF (40 mg/kg) の静注によりウサギの体温下降が発現し、その機序として NaF による視床下部 NE 含量の減少を示唆している。この町田の知見は、NaF が中枢モノアミン神経系に対して影響を及ぼすことを示した本実験の結果を支持するものである。

最近、歯科臨床で使用される 0.42% fluoride gel の誤飲により、fluoride の直接作用に基づくと考えられる胃粘膜障害が起こることが報告されている<sup>9)</sup>。これらの知見から、本実験のように NaF を経口投与した場合には、胃粘膜障害が発現し、これがストレスラーとして間接的に中枢神経系の活性に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで本実験では、中枢モノアミン神経系に対する NaF の作用を非経口投与（皮下投与）でも検討した。その結果、NaF は皮下投与によっても、中枢モノアミン神経系に対して、明らかな影響を及ぼすことが認められた。しかし、経口投与群と比較した場合、皮下投与群における視床下部および線条体での MHPG 含量増加や 5-HIAA 含量増加の程度は明らかに低いものであった。従って、これらの結果より、NaF の経口投与時に認められるモノアミン神経系の活性変化の発現機序には、中枢神経系に対する直接作用以外の NaF の末梢作用も関与している可能性が考えられる。

## 結 語

マウスの分割脳部位のモノアミン神経系に及ぼす NaF (1 mg/kg) の経口投与および皮下投与の影響を検討し、以下の結果を得た。NaF の経口投与により、(1)NE 神経に関しては、NE 含

量の増加 (MB), MHPG 含量の増加 (Hyp, Str, MB) が認められた。(2)DA 神経に関しては、DA 含量の増加 (Str, Hip), DOPAC 含量の増加 (Hyp, Str) が認められた。(3)5-HT 神経に関しては、5-HIAA 含量の増加 (Hyp, Str, Hip, MB) が認められた。また、NaF の皮下投与によっても、MHPG 含量の増加 (Hyp, Str), DA 含量の増加 (Str), DOPAC 含量の増加 (Hyp, Str) などが認められた。

以上の結果から、NaF の経口投与は中枢モノアミン神経系の活性に影響を及ぼすが、それらの変化の発現機序には、中枢神経系に対する直接作用以外の NaF の末梢作用も関与している可能性が考えられる。

## 謝 辞

本研究にあたり、御指導を頂きました本学歯科薬理学講座伊藤忠信教授ならびに村井繁夫助教授に深謝致します。又、御協力頂きました教室員各位に感謝致します。

## 文 献

- 1) Haynes, R. C. Jr. : Agents affecting calcification : calcium, parathyroid hormone, calcitonin, vitamin D and other compounds. In "Goodman and Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics, 8th ed." (Gilman A, Rall T. W., Nies A. S. and Taylor P. Eds.), pp. 1496 - 1522. The MacMillan Company, New York, 1990.
- 2) 小山英子, 村井繁夫, 伊藤忠信: Sodium fluoride による dopamine- $\beta$ -hydroxylase 阻害作用, 岩医大歯誌, 6 : 48 - 55, 1981.
- 3) 町田 寛: ウサギ体温調節機構に関する研究 - フッ化ナトリウムの高用量による影響 - 歯科学報, 89 : 607 - 626, 1989.
- 4) 菊月圭吾: マウス視床下部モノアミン, アセチルコリンおよびギャバ神経系に及ぼすフッ化ナトリウムの影響, 岩医大歯誌, 16 : 57 - 64, 1991.
- 5) Whitford, G. M., Allman, D. W. and Shahed, R. : Topical fluoride : Effects on physiologic and biochemical process. *J. Dent. Res.* 66 : 1072 - 1078, 1987.
- 6) Glowinski, J. and Iversen, L. L. : Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [<sup>3</sup>H]-norepinephrine, [<sup>3</sup>H]-dopamine and [<sup>3</sup>H]-dopa in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13 : 655 - 669, 1966.
- 7) Saito, H., Murai, S., Abe, E., Masuda, Y. and

Itoh, T. : Rapid and simultaneous assay of monoamine neurotransmitters and their metabolites in discrete brain areas of mice by HPLC with coulometric detection. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42 : 351 - 356, 1992.