HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	オートラジオグラフィー法を用いた非定型抗精神病薬によるラット脳内 dopamine, serotonin 受容体のin vivoにおける占有率の測定
Author(s)	松原, 良次; 松原, 繁廣; 小山, 司 他
Citation	北海道大学医療技術短期大学部紀要, 5, 71-78
Issue Date	1992-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/37541
Type	departmental bulletin paper
File Information	5_71-78.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

オートラジオグラフィー法を用いた非定型抗精神病薬によるラット脳内 dopamine, serotonin 受容体の *in vivo* における占有率の測定

松原　良次，松原　繁廣*，小山　　司*，山下　　格*

Mesurement of *in vivo* dopamine and serotonin receptor occupancy by atypical antipsychotic drugs using autoradiography

Ryoji Matsubara, Shigehiro Matsubara*,
Tsukasa Koyama* and Itaru Yamashita*

Abstract

In vivo occupancy by typical or atypical antipsychotic drugs of dopamine D-1 receptors (striatum, nucleus accumbens, substantia nigra), D-2 receptors (striatum, nucleus accumbens) and serotonin($5\text{-HT})_2$ receptors (frontal cortex) in rat brain was measured using quantitative autoradiography. The occupancy by all tested drugs of D-1 receptors was minimal with the exception of clozapine which showed 30% occupancy in substantia nigra. Chlorpromazine (10 mg/kg) and haloperidol (1 mg/kg) occupied predominantly D-2 receptors in striatum and nucleus accumbens. On the other hand, atypical antipsychotic drugs, clozapine (10 mg/kg) and risperidone (1 mg/kg), occupied mainly 5-HT_2 receptors in frontal cortex. These results confirmed and extended our previous findings that there was a certain group of atypical antipsychotic drugs characterized by high occupancy of 5-HT_2 receptors and low or minimum occupancy of D-2 receptors. Although we could find no clear regional differences in receptor occupancies by these antipsychotic drugs, futher study should be needed to elucidate this issue.

要　　旨

定型的および非定型抗精神病薬の *in vivo* におけるラット脳内 dopamine D-1，D-2，serotonin（$5\text{-HT})_2$各受容体占有率を，EEDQ を用い脳切片でオートラジオグラフィー法により測定した。線条体，側坐核，黒質の D-1 受容体については，clozapine が黒質において若干の占有率を示した以外にはいずれの薬物も認めるべき占有率を示さなかった。定型的抗精神病薬の chlorpromazine, haloperidol は線条体，側坐核の D-2 受容体の占有率が高く，前頭葉皮質の 5-HT_2 受容体の占有率は低かった。一方，非定型抗精神病薬の clozapine，risperidone は線条体，側坐核の D-2 受容体より前頭葉皮質の 5-HT_2 受容体の占有率が高かった。以上より，

北海道大学医療技術短期大学部作業療法学科
＊北海道大学医学部精神医学教室
Department of Occupational Therapy, Hokkaido University College of Medical Technology
*Department of Psychiatry and Neurology, Hokkaido University School of Medicine

今回の脳切片を用いた検討でも，非定型抗精神病薬の中には相対的に強い抗5-HT_2作用を有する一群が存在するという膜標品を用いた結果と同様の所見が確認された。部位差については方法論的問題などから明らかな結論は得られなかった。

はじめに

精神分裂病の治療に広く使用されている定型的抗精神病薬は，それに随伴する錐体外路系の副作用が大きな問題となっている。一方，錐体外路症状の少ない抗精神病薬は非定型抗精神病薬と呼ばれ，精神分裂病のいわゆる陰性症状に対する有効性が指摘されているものもある。これらの非定型抗精神病薬の薬理学的特性を明らかにするために，我々はこれまでに，ラットの脳膜標品を用いた受容体結合実験を行い，まず，*in vitro* での dopamine D-1，D-2，serotonin (5-HT)$_2$ 各受容体に対する抗精神病薬の親和性を検討し，次に，*in vivo* におけるこれらの受容体に対する抗精神病薬の占有率を，D-1，D-2，5-HT_2 各受容体に非可逆的に結合することが知られている N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1，2-dihydroquinoline (EEDQ)[2)8)10)13)]を用いて検討してきた。その結果，非定型抗精神病薬は定型的抗精神病薬と比較し，5-HT_2 受容体に対する作用が強く D-2 受容体に対しては相対的に作用が弱いことを報告してきた[6)7)9)]。

これまでの我々の検討では 5-HT_2 受容体については大脳皮質を，D-1，D-2 受容体には線条体を用いてきたが，抗精神病作用は黒質，線条体系ではなく，中脳辺縁系，皮質系の抗 dopamine 作用によるといった報告[3)]や，非定型抗精神病薬は腹側被蓋野 (A 10) の dopamine ニューロンの発火頻度のみを，定型的抗精神病薬は腹側被蓋野，黒質 (A 9) 双方の dopamine ニューロンの発火頻度を抑制するといった報告[14)]などがあり，電気生理学的にも行動薬理学的にも，作用の部位差を指摘するものが少なくない。

そこで，本研究では，これまでと同様に EEDQ を利用し，定型的抗精神病薬および非定型抗精神病薬の D-1，D-2，5-HT_2 各受容体に対する *in vivo* における占有率を，脳切片を用い，オートラジオグラフィー法により側坐核，黒質などの部位も含めて測定した。

対象と方法

実験には Wistar 系雄性ラット (130－180 g) を用いた。定型的抗精神病薬として chlorpromazine (10 mg/kg)，haloperidol (1 mg/kg)，非定型抗精神病薬として clozapine (10 mg/kg)，risperidone (1 mg/kg) を腹腔内投与，その1時間後に，EEDQ (8 mg/kg) を腹腔内投与した。対照群には，各々，同量の溶媒を投与した。EEDQ 投与の 24 時間後に断頭，脳を取り出し，Paxinos と Watson[11)] のアトラスにしたがい，クリオスタットで厚さ 10 μm の脳切片を作成，受容体結合実験に供した。

[^{3}H]SCH 23390 (2 nM)，[^{3}H]spiperone (1 nM)，[^{3}H]ketanserin (2 nM) により標識される部位を，各々，D-1，D-2，5-HT_2 受容体とし，1 μM の cis-flupenthixol，1 μM の (+) butaclamol，1 μM の methysergide 存在下での結合量を非特異的結合量とした。なお，D-1，D-2 各受容体結合実験は 50 nM の ketanserin 存在下で行った。各受容体結合実験は切片を preincubation 後，標識化合物と 25℃で1ないし2時間 incubation し，incubation buffer および蒸留水中で洗浄，乾燥後，^{3}H 感受性フィルムに2週間ないし1か月間感光させた。現像したフィルムの線条体，側坐核の D-1，D-2 受容体数，黒質の D-1 受容体数，前頭葉皮質の 5-HT_2 受容体数を画像解析装置 (カナダイメージングリサーチ社製，定量的オートラジオグラフィーシステム MCID 型) により定量的に解析した。

前処置した抗精神病薬が結合した受容体はその後に投与するEEDQによる不活化を免れることになり，この部分を定量し，EEDQ投与により減少した受容体数に対する割合を受容体占有率とし，次の式により算出した；受容体占有率（%）＝（薬物前処置群－EEDQ群）÷（薬物単独群－EEDQ群）×100。

各抗精神病薬の投与量についてはその臨床用量を考慮して設定した。

統計学的解析には，分散分析を用い，Duncanの方法による多重比較を行った。

結　　果

定型的抗精神病薬であるchlorpromazineの前処置は，線条体，側坐核でのEEDQによるD-2受容体数の減少（それぞれ対照群の79.2%，73.7%）を，62.4%，64.5%の減少にまで抑止し，受容体占有率は28.7%，18.7%であった。前頭葉皮質の5-HT_2受容体数はEEDQ群とchlorpromazine前処置群との間に有意な差は認められず，線条体，側坐核，黒質のD-1受容体数の減少も有意に抑止されなかった（図1）。また，haloperidolの前処置は，線条体と側坐核におけるEEDQによるD-2受容体数の減少を各々，対照群の81.9%から47.1%，86.6%から65.1%まで抑止し，60.8%，168.4%の受容体占有率となったが，前頭葉皮質における5-HT_2受容体数はEEDQ群と有意な差は認められず，線条体，側坐核，黒質のD-1受容体数の減少にも影響しなかった（図2）。

一方，非定型抗精神病薬のclozapineの前処置は，EEDQによる線条体，側坐核のD-2受容体数の減少を有意に抑止しなかったが，前頭葉皮質の5-HT_2受容体数は，対照群の51.2%の減少から17.3%の減少にまで抑止し，受容体占有率は133.5%と算出された。線条体，側坐核のD-1受容体数の減少には有意な影響を示さず，黒質でのみEEDQによる80.1%の減少が53.5%まで抑止された（図3）。また，risperidoneの前処置により，EEDQによる線条体と側坐核のD-2受容体数の減少（対照群の81.9%，86.6%）はそれぞれ，72.5%，71.8%となり若干の抑止傾向が見られたが，前頭葉皮質の5-HT_2受容体数は対照群の42.0%から18.2%の減少にまで抑止され，84.0%の受容体占有率を示した。D-1受容体数の減少には影響しなかった（図4）。

以上の結果を受容体占有率としてまとめたものを表に示した。

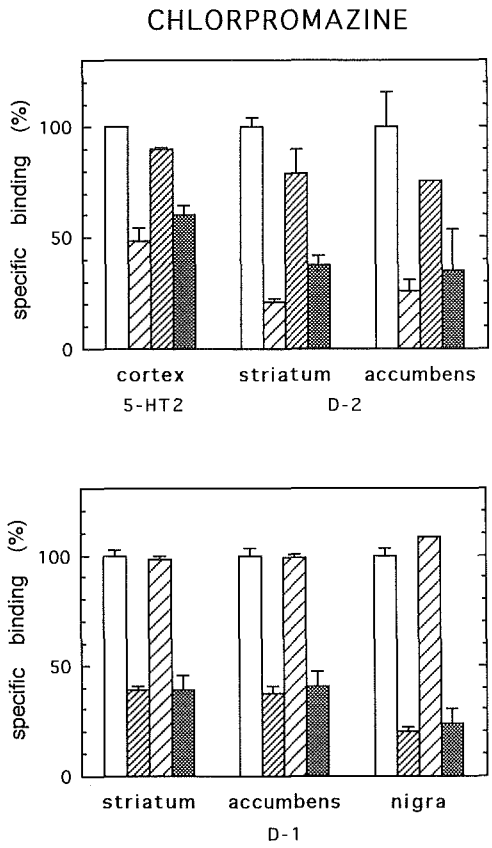

図1　Chlorpromazine（10 mg/kg）のラット脳内各部位のD-1、D-2、5-HT_2各受容体に対する影響。対照群に対する割合の平均値±標準誤差を示す（n＝3－4）。□：対照群、▨：EEDQ群、▨：chlorpromazine単独群、▩：chlorpromazine前処置群。

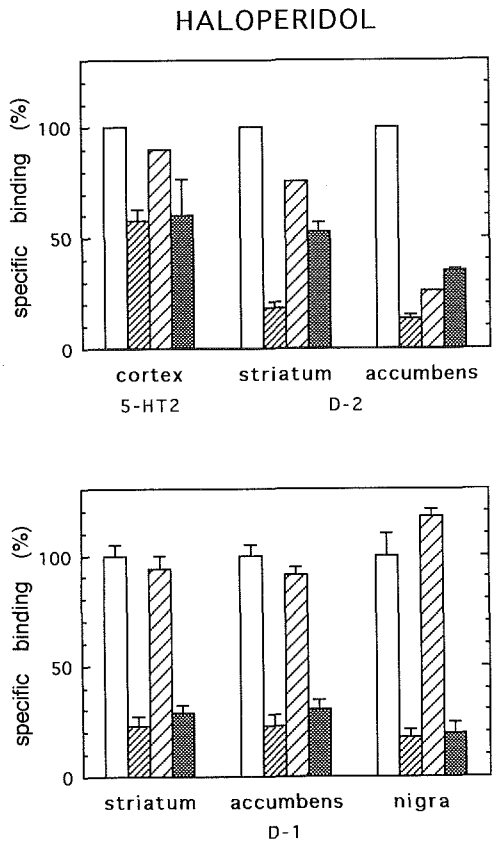

図2　Haloperidol(1 mg/kg)のラット脳内各部位のD-1、D-2、5-HT_2各受容体に対する影響。対照群に対する割合の平均値±標準誤差を示す（n=3−4)。□：対照群、▨：EEDQ群、▨：haloperidol単独群、■：haloperidol前処置群。

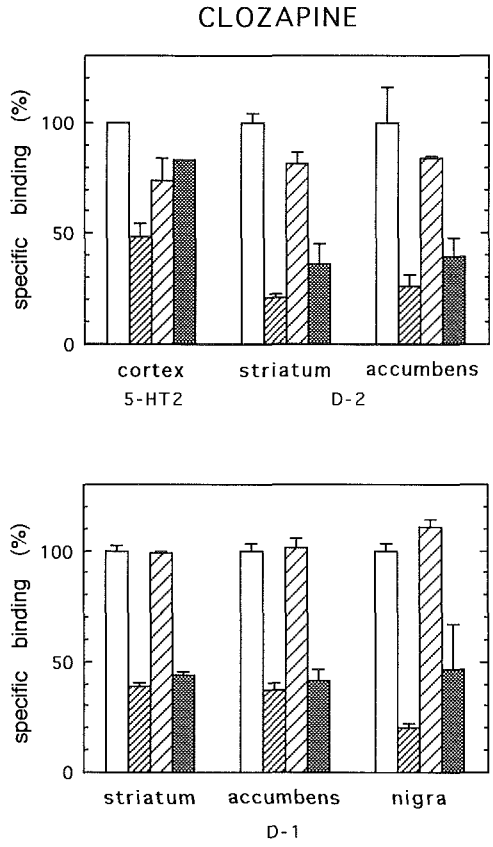

図3　Clozapine(10 mg/kg)のラット脳内各部位のD-1、D-2、5-HT_2各受容体に対する影響。対照群に対する割合の平均値±標準誤差を示す（n=3−4)。□：対照群、▨：EEDQ群、▨：clozapine単独群、■：clozapine前処置群。

考　　察

定型的抗精神病薬のchlorpromazine, haloperidolの線条体，側坐核におけるD-2受容体占有率は前頭葉皮質での5-HT_2受容体占有率と同等あるいはそれ以上であり，非定型抗精神病薬のclozapine, risperidoneはD-2受容体より5-HT_2受容体の占有率が高く，これまでの膜標品を用いた実験と同様の結果[6]が得られた。線条体，側坐核，黒質のD-1受容体については，clozapineが黒質で29.3%の占有率を示した以外にはいずれの薬物も認めるべき占有率を示さなかった(表)。

今回のオートラジオグラフィー法による結果は，膜標品を用いたこれまでの結果[6]とは次のようないくつかの異なる点がみられた。EEDQによる前頭葉皮質の5-HT_2受容体数の減少の割合が，膜標品を用いた場合に比較して小さくなっていることと，特にchlorpromazineによる5-HT_2，D-2受容体の占有率がこれまでの検

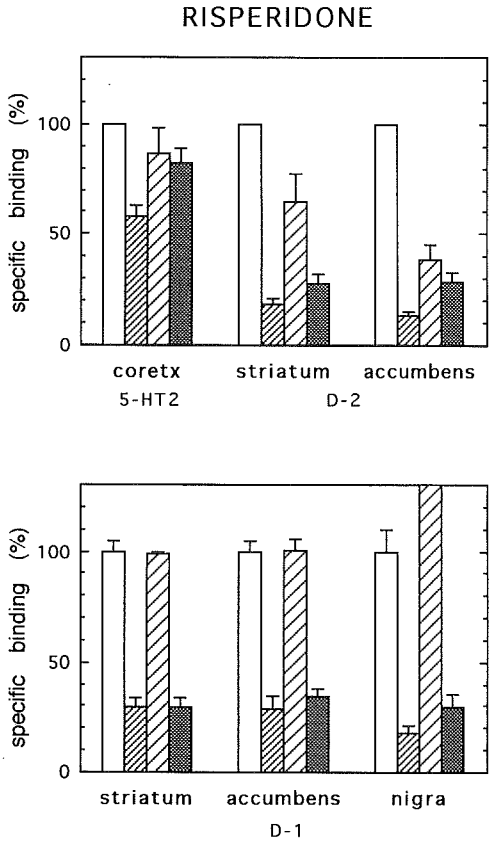

図4 Risperidone(1 mg/kg)のラット脳内各部位のD-1、D-2、5-HT_2各受容体に対する影響。対照群に対する割合の平均値±標準誤差を示す（n=3−4)。□：対照群、▨：EEDQ群、▨：risperidone単独群、▩：risperidone前処置群。

討で得られた結果に比べ低値であったことである(表)。

大脳皮質における5-HT_2受容体の分布は，層構造によって異なっていることが知られているが[12]，今回の検討では前頭葉皮質の各層を区別せずに定量しており，このためEEDQによる5-HT_2受容体不活化の検出感度が悪くなったのかもしれない。また，オートラジオグラフィー法による今回の検討では，D-2受容体の占有率が全般に低値であった。たとえば，haloperidol(1 mg/kg)の線条体でのD-2受容体の占有率は，膜標品を用いた検討では約87%であった[6]のに対し，今回の結果は約61%となった。chlorpromazineによる占有率が特に低かったが，解析の際の定量性を含めた測定法の特殊性による可能性が考えられた。

抗精神病薬のdopamine系における作用の部位差に関しては，Köhlerら[5]が，*in vivo*での受容体結合実験により，20 mg/kgのsulpirideは[^{3}H]spiperone結合を嗅結節，中隔，黒質では阻害したが側坐核と線条体では阻害せず，他方，0.1 mg/kgおよび1 mg/kgのhaloperidolはいずれの部位でもほぼ同程度に阻害したと報告している。また，Altarら[1]はオートラジオグラフィー法を用いた脳切片での受容体結合実験により，*in vitro*でのD-2受容体に対する親和性

表 定型的抗精神病薬、非定型抗精神病薬のラット脳内各部位のD−1、D−2、5−HT_2各受容体に対する受容体占有率。受容体占有率(%)＝(薬物前処置群-EEDQ群)÷(薬物単独群-EEDQ群)×100。

	dose	5-HT2	D-1			D-2	
	(mg/kg)	cortex	striatum	accumbens	nigra	striatum	accumbens
typical							
chlorpromazine	10	28.1	0.2	5.7	4.7	28.7	18.7
haloperidol	1	8.9	0.0	2.7	1.1	60.8	168.4
atypical							
clozapine	10	133.5	8.5	6.8	29.3	25.7	22.7
risperidone	1	84.0	0.8	7.5	9.6	20.3	59.5

を部位別に検討し，haloperidolが線条体のD-2受容体に親和性が高く，辺縁系のD-2受容体には低親和性であるのに対し，clozapineは線条体より側坐核，嗅結節においてより高い親和性を示したとしている。CostallとNaylor[3]は，線条体，側坐核，嗅結節へのdopamine局所注入による運動量増加に対する抗精神病薬の阻害作用を比較し，clozapineやsulpirideなどの非定型抗精神病薬では，その作用が線条体に対して弱く辺縁系により強力であると述べている。

このように，受容体結合実験だけではなく行動薬理学的にも，非定型抗精神病薬は辺縁系のdopamine受容体に対する作用が強いとの指摘があるが，今回の我々の検討では，D-1，D-2いずれの受容体についても辺縁系と黒質，線条体系において定型，非定型抗精神病薬を区別するような明確な傾向は認められなかった。

今回の検討では，haloperidolとrisperidoneの側坐核でのD-2受容体占有率は，線条体に比べ明らかに高値であったが(表)，これは薬物単独投与群での[^{3}H]spiperone結合量が線条体では，各々，対照群の75.4%，64.5%であったのに対し，側坐核では26.2%，38.3%と大きく減少しているために，受容体占有率算出式での分母（薬物単独群－EEDQ群）が小さくなり，占有率が大きく算出されたことによると考えられた(図2，図4)。占有率を対照群に対する割合でみると，haloperidolの線条体，側坐核でのD-2受容体占有率はそれぞれ34.8%，21.5%，risperidoneは，各々，9.4%，14.8%となり部位差はみられない。

薬物単独投与群での[^{3}H]spiperone結合量の減少は，切片を用いた受容体結合実験では洗浄が十分行えないために投与した薬物が残存しており，[^{3}H]spiperone結合に影響していることによると思われるが，線条体に比べ側坐核により多くの薬物が残存する原因は明らかではない。chlorpromazine，clozapineの単独投与によっても[^{3}H]spiperone結合量は対照群の約80%に減少していたが，これらの薬物では線条体と側坐核とで[^{3}H]spiperone結合量の減少に差はなかった(図1，図3)。したがって，残存薬物の影響のみでは，haloperidolとrisperidoneの結果の説明は十分でなく，他の要因が関与している可能性も考えられる。いずれにしても，部位差の問題をより明かにするためには残存薬物の影響を避けるべきであり，脳切片の洗浄方法の工夫や，断頭の時間についての検討が今後必要であると思われる。

Fuxeら[4]は我々と同様にオートラジオグラフィー法により，EEDQによるD-2受容体数減少に対するsulpiride前処置の影響を，嗅結節，側坐核，線条体などの部位別に検討した。200 mg/kgの(±)sulpiride前処置は，EEDQによる[^{3}H]spiperone結合量の減少をいずれの部位においてもほぼ完全に抑止すると報告しており，今回の我々の結果と同じく，部位差については否定的な結果であると考えられる。しかし，用いたsulpirideの量が上述のKöhlerら[5]の検討に比べ大量であるため，部位による違いが検出できなかった可能性も考えられる。

D-1受容体については，clozapineが黒質におけるD-1受容体に対し約30%の占有率を示した以外はどの薬物も影響しなかった(表)。黒質のD-1受容体はdopamineニューロンの細胞体上に存在しており，clozapineの慢性投与は，定型的抗精神病薬と異なり黒質dopamineニューロンの発火頻度の抑制をおこさないとされているが[14]，このような性質に，そのD-1阻害作用が関与しているのかもしれない。ただ，占有率自体が約30%と低値であったことに加え，実験結果にはかなりのばらつきが見られ，clozapineが黒質のD-1受容体に部位特異的に作用するかどうかについては再確認が必要であると思われた。

これまで述べてきた部位以外にも，前頭葉皮質のD-1，D-2受容体，黒質のD-2受容体，縫線核の5-HT_2受容体などの測定も試みたが，

いずれも特異的結合量が少なく，画像解析装置の定量性の限界もあり本方法では解析が困難であった。今回我々の用いた標識化合物より放射活性の高いものを用いることなどにより，これらの部位における測定も可能になるかもしれない。

以上のように，今回のオートラジオグラフィー法による脳切片を用いた*in vivo*における検討でも，膜標品を用いた*in vitro*，*in vivo*での結果と同様に，非定型抗精神病薬の中にはclozapineやrisperidoneなどのように，定型的抗精神病薬と比較して，D-2受容体より5-HT_2受容体に対して相対的に高い占有率を有する一群が存在することが確認された。なお，部位差の問題については，本方法では残存薬物の影響などが考えられ明らかな結論は得られず，方法論的問題も含め，今後さらに検討の必要があると思われた。

文　献

1）Altar, C.A., Wasley, A.M., Neale, R.F. et al. : Typical and atypical antipsychotic occupancy of D_2 and S_2 receptors : an autoradiographic analysis in rat brain, Brain Res. Bull., 16 : 517－527, 1986.

2）Battaglia, G., Norman, A.B., Newton, P.L. et al. : In vitro and in vivo irreversible blockade of cortical S_2 serotonin receptors by N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1, 2-dihydroquinoline : a technique for investigating S_2 serotonin receptor recovery, J. Neurochem., 46 : 589－593, 1986.

3）Costall, B. and Naylor, R.J. : A comparison of the abilities of typical neuroleptic agents and of thioridazine, clozapine, sulpiride and metoclopramide to antagonize the hyperactivity induced by dopamine applied intracerebrally to areas of the extrapyramidal and mesolimbic systems, Eur. J. Pharmacol., 40 : 9－19, 1976.

4）Fuxe, K., Meller, E., Goldstein, M. et al. : Analysis of [^{3}H]spiperone binding sites in the rat striatum and frontoparietal cortex by means of quantitative receptor autoradiography after inactivation of dopamine receptors by N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1, 2-dihydroquinoline in vivo : selective protection by sulpiride in the striatum, Neurosci. Lett., 64 : 163－168, 1986.

5）Köhler, C., Ögren, S-O., Haglund, L. et al. : Regional displacement by sulpiride of [^{3}H] spiperone binding in vivo. Biochemical and behavioural evidence for a preferential action on limbic and nigral dopamine receptors, Neurosci. Lett., 13 : 51－56, 1979.

6）松原良次，松原繁廣，小山司 他：非定型抗精神病薬によるラット脳内dopamine，serotonin受容体の*in vivo*における占有率，神経精神薬理，14：145－153，1992.

7）松原繁廣，松原良次，小山司 他：定型および非定型抗精神病薬の抗ドーパミン D_1，D_2，抗セロトニン 5-HT_2 作用，精神医学，33：117－123，1991.

8）Meller, E., Bohnmaker, K, Goldstein, M. et al.: Inactivation of D_1 and D_2 dopamine receptors by N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1, 2-dihydroquinoline in vivo : selective protection by neuroleptics, J. Pharmacol. Exp. Ther., 233 : 656－662, 1985.

9）Meltzer, H.Y., Matsubara, S. and Lee, J-C. : Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1,D-2 and serotonin$_2$ pKi values, J. Pharmacol. Exp. Ther., 251 : 238－246, 1989.

10）Nowak, G., Arnt, J, and Hyttel, J. : EEDQ, a tool for ex vivo mesurement of occupancy of D-1 and D-2 dopamine receptors, Eur. J. Pharmacol., 153 : 309-311, 1988.

11）Paxinos, G. and Watson, C. : The rat brain in stereotaxic coordinates, 1986, Academic Press Australia, North Ryde.

12）Pazos, A., Cortés, R. and Palacios, J.M. : Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in rat brain. II. Serotonin-2 receptors, Brain Res., 346 : 231－249, 1985.

13）Saller, C.F., Kraemer, L.D., Adamovage, L.A.

et al.: Dopamine receptor occupancy in vivo: measurement using N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1, 2-dihydroquinoline (EEDQ), Life Sci., 45 : 917－929, 1989.

14) White, F.J. and Wang, R.Y.: Differential effects of classical and atypical antipsychotic drugs on A9 and A 10 dopamine neurons, Science, 221 : 1054－1057, 1983.