

## 緒 言

精神分裂病陽性症状の発現時には、中脳腹側被蓋野(A<sub>10</sub>)から前頭皮質、あるいは辺縁系に投射するドパミン神経において機能の亢進がしばしば認められることから<sup>1-3)</sup>、臨床では、ドパミン神経シナプス後膜に存在するドパミンD<sub>2</sub>受容体(D<sub>2</sub>R)に対して遮断作用を有する抗精神病薬(定型抗精神病薬)が繁用されている<sup>4-7)</sup>。しかし、一方でドパミン神経には中脳黒質緻密部(A<sub>9</sub>)から線条体に投射する経路が存在し、本経路は生体における運動機能の調節に関わっていることから<sup>8-10)</sup>、定型抗精神病薬の使用によるその遮断は錐体外路系副作用(運動機能障害)の発現に関与する可能性があり、精神分裂病治療上の問題となる<sup>11,12)</sup>。特に抗精神病薬の長期投与により惹起される遅発性ジスキネジア等の遅発性運動機能障害<sup>13-16)</sup>には有効な治療法が存在しないことから、抗精神病薬の開発やその後の投与設計を考える上で、本副作用の発現機序を明らかにすることが強く望まれている。

現在までに、種々の放射性リガンドを用いて、動物<sup>17-20)</sup>およびヒト<sup>21,22)</sup>における抗精神病薬投与時での脳内ドパミン神経伝達機能の定量解析が行われてきた。しかし、動物を用いた*in vitro*, *ex vivo*の検討では何れも薬物の投与期間が十分に長いとは言えないこと、定量したデータを比較する上で副作用の発現に関する個体差を考慮していないこと、さらに、こうした従来の手法では神経伝達機能の変化をある一時点でしか評価できないことが問題となっている。一方、ヒトを対象とした*in vivo*の検討では精神分裂病に伴うドパミン神経活動の変化や抗精神病薬投与の影響を無視できないことから、遅発性運動機能障害に対するドパミン神経系の関与の詳細は依然として明確にされていない。

そこで、本研究では、抗精神病薬として治療効果が大きいために臨床で繁用されるが、その一方で遅発性ジスキネジアを始めとする種々の錐体外路系副作用の発現頻度も高いことが知られているD<sub>2</sub>Rアンタゴニスト、ハロペリドール<sup>23-27)</sup>を十分に長期間投与した実験動物を作製し、個々の個体について運動機能障害の発現を行動薬理学的に観察した。これと並行し、生体機能を同一個体において、*in vivo*で非侵襲的に繰り返し測定できる核医学的手法を用い、継続的にドパミン神経伝達機能の変化を測定することにより、遅発性運動機能障害の発現に対するドパミン神経系の関与を詳細に検討することを計画した。

実験動物には、錐体外路系副作用を惹起する抗精神病薬の種類がヒトと類似しているとの報告があるコモンマーモセット<sup>28)</sup>を使用した。これにハロペリドールを6ヶ月間経口投与し、その間、運動機能障害の発現頻度を観察すると同時に、ドパミン神経シナプス前膜に存在するドパミントランスポーター(DAT)、およびシナプス後膜に存在するD<sub>2</sub>Rにそれぞれ結合する[<sup>123</sup>I]-2β-carbomethoxy-3β-(4-iodophenyl)tropane ([<sup>123</sup>I]β-CIT)<sup>29,30)</sup>, [<sup>123</sup>I]-(S)-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidiny)methyl]-2-hydroxy-3-iodo-6-methoxybenzamide ([<sup>123</sup>I]IBZM)<sup>31,32)</sup>の脳内各部位への集積量を、動物用シングルフォトン断層撮像装置(動物用SPECT装置)を用いて一定期間ごとに測定した。その結果、線条体への[<sup>123</sup>I]IBZMの特異的集積量は投与開始1ヶ月以降で有意に増加したのに対し、[<sup>123</sup>I]β-CITの集積量は有意に減少した。また、遅発性運動機能障害の指標となる行動の異常は投与開始2~3ヶ月後から観察され始め、その頻度は6ヶ月の投与期間において増加し続けた。一方、遅発性運動機能障害の発現頻度が低いスルピリド投与群ではこのような変化は認められなかった。さらに、ハロペリドールを6ヶ月間投与することにより運動機能障害を発現した群についてその投与を中止し、引き続きドパミン神経伝達機能の測定を継続したところ、休薬8ヶ月後には線条体[<sup>123</sup>I]IBZM集積量の増加度が大きく低減したのに対し、[<sup>123</sup>I]β-CIT集積量の減少は持続した。遅発性ジスキネジアを始めとする遅発性運動機能障害がしばしば不可逆的に進行するという臨床的知見<sup>33-35)</sup>に加え、本研究における別の検討例では、ハロペリドールを投与しても症状の発現を認めなかった個体において、線条体への[<sup>123</sup>I]IBZMの集積量が症状を発現した個体と同様に増加し、その一方で[<sup>123</sup>I]β-CITの集積量は変化しなかったことから、ハロペリドールの長期投与による遅発性運動機能障害の発現には、ドパミン神経シナプス前部、すなわち線条体に投射する黒質-線条体路ドパミン神経系の変性が関与している可能性が示唆された。

この神経変性の原因について、ハロペリドールの代謝物の一つである4-(4-chlorophenyl)-1-[4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl]pyridinium ion (HPP<sup>+</sup>)がパーキンソン病誘発物質になる可能性があるとの*in vitro*実験での報告<sup>36,37)</sup>に着目し、HPP<sup>+</sup>の関与を明らかとする目的で、その毒性および体内動態を検討した。その結果、HPP<sup>+</sup>が培養ドパミン神経細胞に対して強い毒性を有することを認めると同時に、ハロペリドールを投与したコモンマーモセットの脳内からHPP<sup>+</sup>を検出し、SPECTにて確認したドパミン神経系の経時的な変化が、本化合物により惹起されたものである可能性が示唆された。また、体内動態の評価から、HPP<sup>+</sup>は生体内では主に肝臓で生成すること、さらに脳移行性を有することを見出した。一方、HPP<sup>+</sup>の培養ドパミン神経細胞への取込みはDAT阻害薬である

GBR12909<sup>38)</sup>により阻害されず、そのドパミン神経細胞毒性はDATを介した細胞への選択的な取り込みによるものではないことが示された。そこで、HPP<sup>+</sup>のドパミン神経細胞に対する特異的な毒性発現機序を明らかとするために、ドパミン神経に豊富に存在するメラニンに着目し、HPP<sup>+</sup>のメラニンへの結合を検討した。その結果、HPP<sup>+</sup>はメラニンに対して親和性を有し、かつその結合は可逆的であることを見出した。以上の結果から、ハロペリドールを長期投与した場合に認められるドパミン神経系の障害は、肝臓で生成したHPP<sup>+</sup>が脳内へ移行し、さらにメラニンと結合してドパミン神経細胞内に高く蓄積することにより発現する可能性が示された。

以上、本研究は、ハロペリドールの長期投与による遅発性運動機能障害の発現に、線条体におけるドパミン神経シナプス前部の変性が関与することを*in vivo*で明らかにし、また、この変性にはハロペリドールの代謝物、HPP<sup>+</sup>のドパミン神経細胞に選択的な毒性が関与する可能性を示したものであり、本知見は新しい抗精神病薬の開発研究に有益な情報を与えるものと考えられる。

これらの結果について、以下に詳述する。

# 第1章

## 核医学的手法によるハロペリドール長期投与での 脳内ドパミン神経伝達機能変化のインビボ評価

抗精神病薬の投与に伴う急性ジストニア、パーキンソン症候群、アカシジア等の錐体外路系副作用には線条体D<sub>2</sub>Rの遮断が主に関与していると考えられており、これら急性の運動機能障害は、投与量の減量や力価の低い薬物への変更、あるいは抗コリン薬やB型モノアミン酸化酵素阻害薬の併用等により、症状の改善が認められる<sup>39,40</sup>。しかし、抗精神病薬を長期間投与した場合に発現する遅発性ジスキネジア等の遅発性運動機能障害にはこれらの対症療法が奏功せず<sup>41</sup>、臨床において有効な治療法が確立されていない。

これまでの研究から、遅発性運動機能障害の発現には抗精神病薬投与後の長期に及ぶD<sub>2</sub>R遮断に起因する受容体の過感受性と、それに基づくシナプス後神経の過活動が関与していると考えられてきた<sup>42-44</sup>。しかし、一方で線条体D<sub>2</sub>R密度と本副作用の発現との間に相関性を認めないとの報告もあり<sup>45-47</sup>、その機構については明らかとなっていない。そこで本章では、抗精神病薬の長期投与時における脳内ドパミン神経伝達機能の変化が、遅発性運動機能障害の発現に与える影響について詳細に検討した。

遅発性運動機能障害の発現に関与する神経伝達機能の変化は緩徐に進行することが予想されるため、適切な実験動物の選択と長期間の投薬、さらに神経伝達機能の評価手段が病態の発現機構を解明する上で重要となる。本章では、まず錐体外路系副作用を発現させる抗精神病薬の種類がヒトとよく類似しているコモンマーモセット<sup>28</sup>)を使用し、かつ抗精神病薬を十分に長い期間投与することで薬物性運動機能障害モデルの作製を試みた。薬物には、D<sub>2</sub>R遮断作用が強力であるために精神分裂病の急性期に非常に有効である一方で、遅発性運動機能障害を含めた種々の錐体外路症状を高頻度に発現させるハロペリドールを選択した。また、比較のため、ハロペリドールと同様にD<sub>2</sub>R遮断作用を有するが、遅発性運動機能障害の発現頻度が低いことが知られるスルピリドを選択し、これらを実験動物に投与した。さらに抗精神病薬投与による錐体外路系副作用の発現の程度には個体差が大きいことを考慮し、モデル動物での運動機能障害の発現を行動薬理学的に観察すると同時に、シングルフォトン断層撮像法(SPECT)を用い、ドパミン神経伝達機能を

一定期間ごとに測定することで、それぞれの抗精神病薬が惹起するドパミン神経系の変化と遅発性運動機能障害の発現との関係を経時的に比較した。

## 1. 1. 1. 実験方法

### 試薬・機器

[<sup>123</sup>I]NaIは日本メジフィジックス社より譲渡され、[<sup>3</sup>H]GBR12935 および[<sup>3</sup>H]スピペロンはNEN Life Science Products社より購入した。<sup>123</sup>Iの放射能は、CAPINTEC社製キュリーメータ(CRC-7B)またはPackard社製NaI(Tl)シンチレーションカウンタ(Packard Auto-Gamma 500)を用いて測定した。<sup>3</sup>Hの放射能はPackard社製液体シンチレーションカウンタ(Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer)を用いて測定した。薄層クロマトグラフィー(TLC)にはMerck社製シリカゲルプレート(Merck Art 105553)を使用した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は島津社製定速ポンプ(LC-6A)に分光光度検出器(SPD-6A UV)およびAloka社製のオンラインNaI(Tl)シンチレーション検出器(Aloka NDW-351D)を接続した系を用いた。SPECTによる画像の収集は、日立メディコ社製動物用SPECT装置(SPECT2000H-40)を用いて行い、データの処理には同社の解析装置(RW-3000)を使用した。核磁気共鳴断層撮像(Magnetic Resonance Imaging: MRI)はVarian社製NMR装置(UNITY plus 300WB)にて施行した。試薬は全て特級試薬を使用した。

### 抗精神病薬投与による遅発性運動機能障害モデル動物の作製

被検動物には日本EDM社より供給されたコモンマーモセット(*Callithrix jacchus*) (Figure 1-1A)を用いた。実験開始時における月齢は17 ~ 41ヶ月、体重は340 ~ 410 gであった。各個体には1.25 mg/kgのハロペリドール(Research Biochemicals International社) (Figure 1-2A)あるいは120 mg/kgのスルピリド(Sigma Chemical社) (Figure 1-2B)を0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、週2回経口投与した。この投与量は、錐体外路系副作用の急性運動機能障害の一つであるジストニア症状を確実に惹起させる目的で、Fukuokaらの報告<sup>28)</sup>をもとに、それぞれの臨床用量の10倍量に設定した。また、同一齢のコモンマーモセットを対照群とし、0.5%メチルセルロース溶液を同様に投与した。投与は6ヶ月間継続した。

## 運動機能障害の行動薬理的評価

コモンマウスセットの行動の観察は薬物投与直前と、投与 2 時間, 4 時間, 6 時間, 8 時間および 24 時間後に行った。全ての個体について、観察時間は 5~7 分であった。

次に掲げる行動観察基準に基づき、各個体の錐体外路症状の発現頻度を記録した。すなわち錐体外路症状は異常歩行(よろめく、ぎこちない等), 異常行動(壁、床、天井に頭を押しつける等), 異常姿勢(捻転、逆立ち等), 四肢の異常行動(物を上手く掴めない、脱力等), 四肢の伸展, 頸-頭部の異常(斜頸等), 頭部の異常運動(振る等), 口腔周囲の異常(舌の突出、湾曲、ケージを噛む等: Figure 1-1B)の項目に細分類した。症状のスコア付けは、0: 徴候なし, 1: 観察時間中に 1 回症状が発現, 2: 観察時間中に繰り返し症状が発現, 3: 観察時間中に継続して症状が発現、とした。

他の行動薬理的な神経症状として、振戦, カタレプシー, 流涎, 閉眼, 自発運動の有無, 観察者への反応も同時に観察した。

## $[^{123}\text{I}]\beta\text{-CIT}$ と $[^{123}\text{I}]\text{BZM}$ の標識合成

### $[^{123}\text{I}]\beta\text{-CIT}$

DATリガンドの $[^{123}\text{I}]\text{-}2\beta\text{-carbomethoxy-}3\beta\text{-(4-iodophenyl)tropane}$  ( $[^{123}\text{I}]\beta\text{-CIT}$ )は、Zea-Ponceらの方法<sup>48)</sup>を参考に、 $[^{123}\text{I}]\text{NaI}$ 水溶液に前駆体の  $2\beta\text{-carbomethoxy-}3\beta\text{-(4-trimethylstannylphenyl)tropane}$  (Research Biochemicals International社)  $50\ \mu\text{g}/150\ \mu\text{l}$ エタノール溶液,  $1\ \text{M}$  リン酸水溶液  $100\ \mu\text{l}$ ,  $0.6\%$ 過酸化水素水  $100\ \mu\text{l}$ を順次添加し、30 分間室温にて反応させることにより得た (Scheme 1-1A)。 $[^{123}\text{I}]\beta\text{-CIT}$ の精製は、反応混合液をWaters 社製Sep-Pak  $\text{C}_{18}$ カートリッジに通じ、これを精製水で洗浄した後、エタノールで $[^{123}\text{I}]\beta\text{-CIT}$ を溶出することで行った。放射化学的純度は順相TLCおよび逆相HPLCにて測定した。TLCの展開溶媒は 1-ヘキサン:ジエチルエーテル:トリエチルアミンを混合(60:40:3.5)することで作製し(Rf値 0.88)、また、HPLC逆相カラムにはケムコ社製Chemco Pak LICHROSORB RP-18-5(300×7.5 mm)を、移動相には0.2%のトリエチルアミンを含むメタノールと精製水の75:25(v/v)混合溶液を使用した。流速は1.5 ml/min、カラム温度は30°Cとし、分光光度検出器の検出波長は254 nmに設定した(溶出時間30分)。

(A)

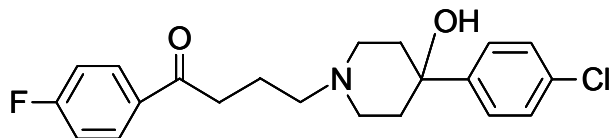


(B)

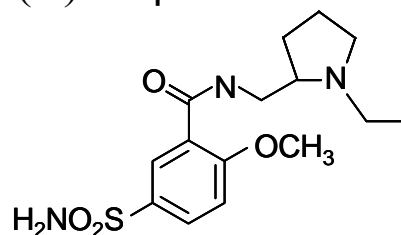


**Figure 1-1.** Common marmosets (*Callithrix jacchus*) (A) used for experimental animal model to evaluate tardive motor dysfunction caused by antipsychotics. Under lengthy treatment with haloperidol, animals exhibit symptoms like oral dyskinesia, an abnormal tongue protrusion as shown in (B)<sup>28</sup>.

## (A) Haloperidol



## (B) Sulpiride



**Figure 1-2.** Chemical structures of antipsychotics: (A) haloperidol, a potent D<sub>2</sub>R blocker in clinical use that elicit extrapyramidal syndrome with high frequency, and (B) sulpiride, a more moderate D<sub>2</sub>R blocker with lower frequency of adverse effect.

### [<sup>123</sup>I]IBZM

D<sub>2</sub>Rリガンドの [<sup>123</sup>I]-(S)-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-2-hydroxy-3-iodo-6-methoxybenzamide ([<sup>123</sup>I]IBZM) は、Kungらの方法<sup>49)</sup>に従い、 [<sup>123</sup>I]NaI水溶液に前駆体のBZM (Research Biochemicals International社) 50 μg/50 μlエタノール溶液とchloramine T 60 μg/100 μl 0.4M リン酸緩衝液 (pH 3.0)を順次添加し、2分間室温にて反応させることにより得た (Scheme 1-1B)。反応停止後に酢酸エチルで [<sup>123</sup>I]IBZMを含む画分を抽出し、メタノールに再分配した後、ナカライテスク社製逆相カラムCOSMOSIL 5C18-300 (250×10 mm)を用いてHPLCで精製した。移動相には0.2%のトリエチルアミンを含むメタノールと精製水の 70:30 (v/v) 混合溶液を使用し、流速は 3.0 ml/min、カラム温度は 30°Cとした (溶出時間 12.5 分)。放射化学的純度は、展開溶媒をクロロホルム:エタノール:28%アンモニア水 (80:20:2)とするTLC (Rf値 0.19)、およびナカライテスク社製逆相カラムCOSMOSIL 5C18-AR-300 (150×4.6 mm)を用いたHPLC (流速 1.0 ml/min、他は精製と同一条件)にて測定した (溶出時間 6.2 分)。

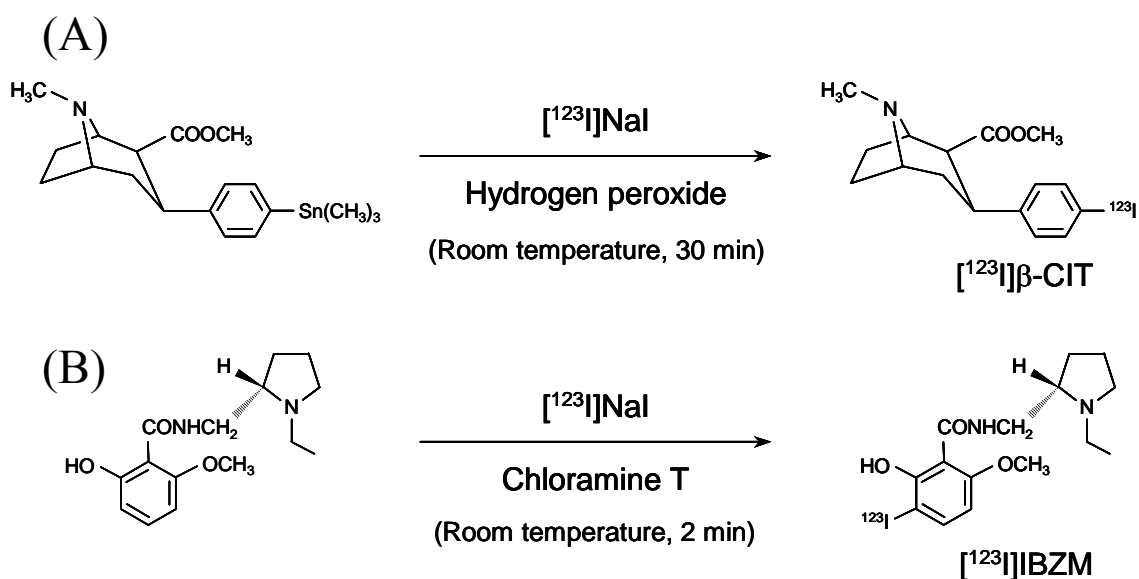
[<sup>123</sup>I]β-CITと [<sup>123</sup>I]IBZM は静脈内投与に際し、何れも 5%エタノールを含む生理食塩水に溶解させた。

## SPECT 撮像

### Dynamic imaging

薬物を投与した個体群と同月齢のコモンマーモセットに、ケタミン-キシラジン混合溶液 (各 20 mg/kg, 3 mg/kg)を筋肉内投与し、次いで 20 mg/kgのペントバルビタールを腹腔内投与することで麻酔した。その後、 [<sup>123</sup>I]β-CITあるいは [<sup>123</sup>I]IBZMそれぞれ 150 MBqを伏在静脈からbolus投与





**Scheme 1-1.**  $^{123}\text{I}$ -Radioiodination of (A)  $\beta$ -CIT and (B) IBZM.  $^{123}\text{I}$  $\beta$ -CIT prepared by reaction of the precursor with  $^{123}\text{I}$ NaI and hydrogen peroxide.  $^{123}\text{I}$ IBZM prepared by using chloramine T as oxidant.

し、この時点より動物用SPECT装置を用い、頭部放射能分布画像の撮像 (40 sec/frame  $\times$  32 frames) を連続的に行った。得られた画像について、別に撮像したMR断層像をもとに、錐体外路系運動に関わるドーパミン神経の終末部が高密度に存在する線条体と、対照としてドーパミン神経系が乏しい小脳<sup>50-52</sup>)に関心領域を設定し (Figure1-3)、各領域における放射能の集積量 $A_{c_{st}}$  (左右線条体での平均値, % Injected dose/ml),  $A_{c_{ce}}$  (小脳, % Injected dose/ml) の経時的变化を測定した。これをもとに、線条体DATあるいは $D_2R$ へのリガンド結合能をBinding Ratio (BR) にて算出した<sup>53</sup>)。

$$BR = \frac{A_{c_{st}} - A_{c_{ce}}}{A_{c_{ce}}} = \frac{A_{c_{st}}}{A_{c_{ce}}} - 1$$

### Static imaging

抗精神病薬長期投与に伴うドーパミン神経伝達機能の変化は、投薬開始前、および投薬開始1ヶ月、2ヶ月、6ヶ月後に、それぞれの薬物を一時退薬した上でSPECT撮像を行うことにより測定した。dynamic imagingと同様の操作によりコモンマーマウスを麻酔した後、まず 150 ~ 200 MBqの $^{123}\text{I}$  $\beta$ -CITを伏在静脈からbolus投与し、投与240分後に40 sec/frame  $\times$  32 framesのSPECT撮像を行い、頭部の放射能分布画像を得た。その1週間後、体内からの放射能の消失を確認した上で同様に150 ~ 200 MBqの $^{123}\text{I}$ IBZMを投与し、投与60分後にSPECT画像を収集した。

それぞれのデータから、 $^{123}\text{I}$  $\beta$ -CITおよび $^{123}\text{I}$ IBZMのBRを算出した。



**Figure 1-3.** Representative images of common marmoset brain. (A) Sagittal SPECT image from dynamic scan post administration of 150 MBq of [<sup>123</sup>I]β-CIT (229 to 251 min). (B) MR image for defining regions of interest (ROIs) in the striatum (St) and cerebellum (Ce). (C) SPECT image (A) superimposed to MR image (B). Striatal uptake clearly depicted as indicated by arrow head (▷). Similar images were obtained after [<sup>123</sup>I]IBZM injection.

### *In vitro* バインディングアッセイ

#### シナプス画分の調製

ハロペリドールの投与を 6 ヶ月間継続したコモンマーモセットより脳を摘出し、尾状核, レンズ核, および小脳を単離した。また、対照群として用意した同一齢のコモンマーモセットについても同様の操作を施し、得られた組織を-80°Cで凍結保存した。Bergerらの方法<sup>54)</sup>に従い、解凍後の各組織

に組織重量 20 倍容の 0.32 M スクロース溶液を添加し、氷冷下 Potter-Elvehjem ホモジナイザーにて破碎した。これを 1,000 g で 10 分間遠心分離し、得られた上清をさらに 25,000 g, 20 分間の遠心分離操作にかけた。沈渣に 100 倍容のトリス-塩酸緩衝液 (50 mM Tris, 120 mM NaCl, pH 7.7) を加え、氷冷下 Polytron で再懸濁し、 $-80^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存した。最終含有タンパク濃度の調製は Lowry らの方法<sup>55)</sup> に基づく定量操作後に行い、各組織ともに 500  $\mu\text{g}$  protein/ml をバインディングアッセイに使用した。

### Saturation assay

DAT 密度の測定は、Janowsky らの方法<sup>56)</sup> に従った。すなわち、0.2 ~ 8 nM の [ $^3\text{H}$ ]GBR12935 とタンパク量にして 50  $\mu\text{g}$  に相当するシナプス画分を含むトリス-塩酸緩衝液 (50 mM Tris, 120 mM NaCl, 0.01% BSA, pH 7.7) を  $25^{\circ}\text{C}$  で 45 分間インキュベートした。その後、氷冷緩衝液で反応を停止し、Whatman 社製 GF/B フィルター上に吸引濾取、洗浄した。このフィルターに Amersham 社製 ACS II を加えて一晩放置した後、液体シンチレーションカウンタにて放射能を測定した。 [ $^3\text{H}$ ]GBR12935 の非特異的結合に基づく放射能は、50  $\mu\text{M}$  の GBR12909 (Research Biochemicals International 社) を同時に加えることで測定した。

D<sub>2</sub>R 密度の測定は、Farfel らの方法<sup>57)</sup> に従った。すなわち、0.1 ~ 8 nM の [ $^3\text{H}$ ]スピペロンとタンパク量にして 50  $\mu\text{g}$  に相当するシナプス画分、および [ $^3\text{H}$ ]スピペロンのセロトニン 5-HT<sub>2</sub> 受容体に対する結合を阻害する目的で 10  $\mu\text{M}$  のミアンセリン (Research Biochemicals International 社) を含む緩衝液を  $37^{\circ}\text{C}$  で 45 分間インキュベートした。 [ $^3\text{H}$ ]スピペロンの非特異的結合に基づく放射能は、10  $\mu\text{M}$  のスルピリドを同時に加えることで測定した。

得られたデータを Scatchard 解析し、各放射性リガンドの最大結合量 ( $B_{\text{max}}$ ) と解離定数 ( $K_d$ ) を算出した。

### 統計

データは平均 ± 標準偏差で表した。有意差検定は、SPECT では薬物投与開始前と投与開始後の各群について paired Student's *t*-test を施行した。また、アッセイでは unpaired independent Student's *t*-test を行い、危険率 *P* 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

## 1. 1. 2. 結果

### 抗精神病薬投与後の錐体外路系副作用の発現

薬物投与後の観察から、ハロペリドールとスルピリドの何れを投与したコモンマーマウスでも、ドパミンD<sub>2</sub>受容体の遮断に基づくと考えられる急性運動機能障害(振戦やカタレプシー)の発現が認められた。この副作用は投薬実験開始直後より、投薬後に毎回観察された。

一方、運動機能障害の指標として用意した基準のうち、急性症状以外の幾つかの項目についてはハロペリドール投与群において、投与回数を重ねることで発現を認めるようになった。これに関しては SPECT 実験の結果と併せて記述する(Figure 1-5)。

### [<sup>123</sup>I]β-CITと[<sup>123</sup>I]IBZMの標識合成

[<sup>123</sup>I]β-CITは収率 55%, 放射化学的純度 95%以上にて得られた。また、比放射能は 0.185 TBq/μmol以上であった。

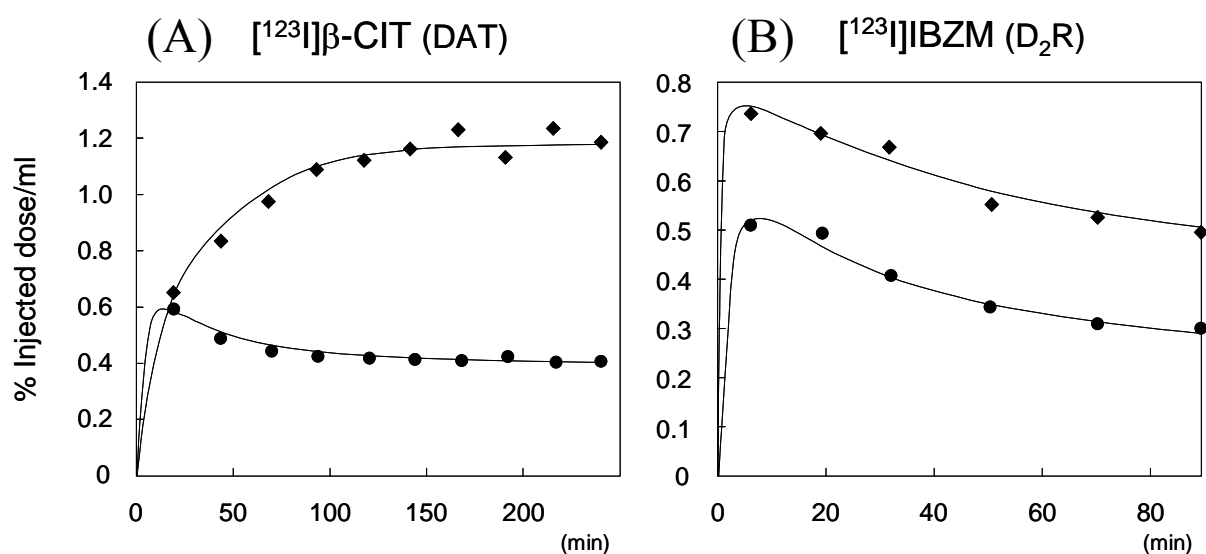
[<sup>123</sup>I]IBZMは収率 30%, 放射化学的純度 95%以上にて得られた。比放射能の理論値は 8.88 TBq/μmolであった。

### 放射性リガンドの脳内動態

線条体および小脳における各放射性リガンド集積の経時的変化について、一例をFigure 1-4 に示す。[<sup>123</sup>I]β-CIT (A)の線条体への集積量(Ac<sub>st</sub>)は投与後、緩やかに増加したが、小脳への集積量(Ac<sub>ce</sub>)は初期に上昇した後、徐々に消失した。一方、[<sup>123</sup>I]IBZM (B)は何れの領域においても投与後の取込みから緩徐な消失を認めたが、相対的に線条体へ高く集積した。

[<sup>123</sup>I]β-CITと[<sup>123</sup>I]IBZMのBinding Ratio (BR)について、各計測時間での値を求めた結果、[<sup>123</sup>I]β-CITでは投与 240 分後、[<sup>123</sup>I]IBZMでは投与 60 分後にその値が一定となることを確認した。従って、以降の実験では各リガンドの投与後これらの時間にSPECTを撮像し、BRを算出することとした。

投薬開始前における[<sup>123</sup>I]β-CIT, [<sup>123</sup>I]IBZMそれぞれのAc<sub>st</sub>, Ac<sub>ce</sub>およびBR値をTable 1-1 に掲載する。なお、放射性リガンドの線条体への集積量に左右差は認められなかったため、Ac<sub>st</sub>は左右の線条体の平均値を用いた。



**Figure 1-4.** Time-activity curves of brain regional accumulation in normal common marmoset. SPECT imaging acquisitions performed repeatedly from 15 min to 240 min (<sup>123</sup>I]β-CIT) or to 80 min (<sup>123</sup>I]IBZM) after injection with a dose of 150 MBq each. (A) [<sup>123</sup>I]β-CIT accumulation increased in the striatal region (◆), and washed out fast from cerebellar region (●). (B) [<sup>123</sup>I]IBZM accumulated immediately after injection, with gradual decreases in both regions of interest (ROIs), striatal (◆) and cerebellar (●) region, defined in Figure 1-3.

**Table 1-1.** Accumulation profiles to striatum ( $Ac_{st}$ ) and cerebellum ( $Ac_{ce}$ ).

	$Ac_{st}$ (%ID/ml) <sup>a</sup>	$Ac_{ce}$ (%ID/ml) <sup>a</sup>	BR <sup>a</sup>
[ <sup>123</sup> I]β-CIT (240 min post-injection)	1.06 ± 0.23	0.28 ± 0.06	2.84 ± 0.41
[ <sup>123</sup> I]IBZM (60 min post-injection)	0.59 ± 0.14	0.34 ± 0.07	0.76 ± 0.18

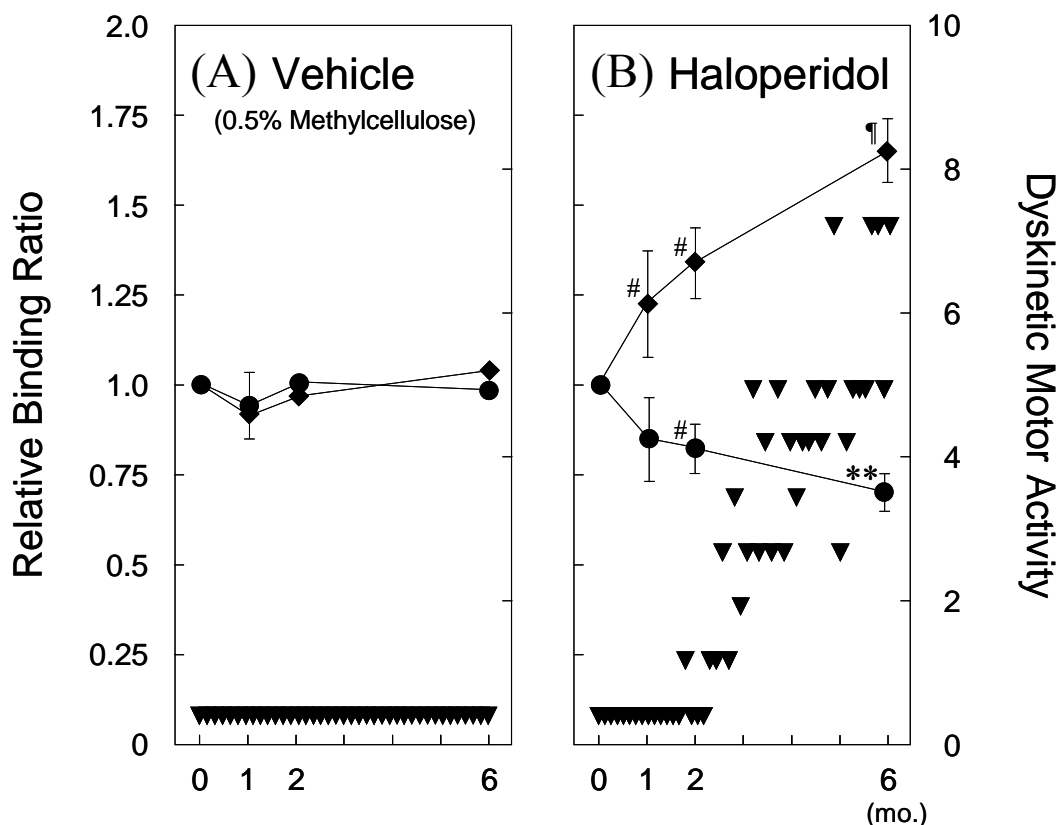
<sup>a</sup> Each value measured at 240 min or 60 min post-injection. Mean ± S.D. of fifteen common marmosets.

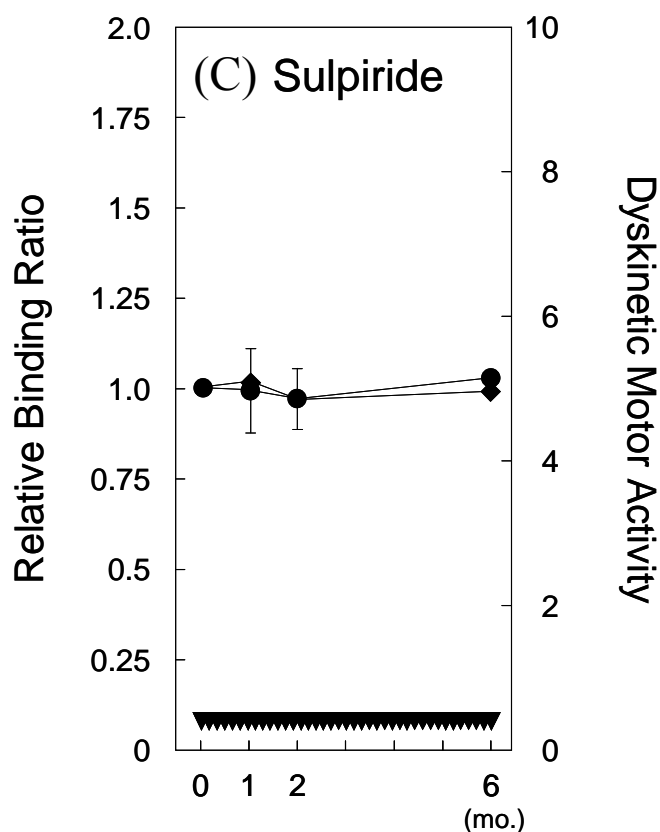
## 抗精神病薬の長期投与に伴う遅発性運動機能障害の発現と線条体へのリガンド集積量の経時的変化

Figure 1-5 には投薬開始1ヶ月、2ヶ月および6ヶ月後のBRについて、各個体の投薬開始前との相対値(Relative Binding Ratio: RBR)を縦軸左の値で示す。また、行動薬理学的にスコア付けした運動機能障害の発現頻度(平均値)も重ね合わせて表示した。

投与した2種の抗精神病薬について、ハロペリドール投与群(B)においてのみ顕著な変化が認められ、 $[^{123}\text{I}]\beta\text{-CIT}$ のRBRは投与開始2ヶ月後で $0.82\pm 0.07$ 、6ヶ月後で $0.70\pm 0.05$ と、投与開始前と比較してそれぞれ有意に低い値であった。一方、 $[^{123}\text{I}]\text{IBZM}$ のRBRは投与開始2ヶ月後で $1.33\pm 0.10$ 、6ヶ月後で $1.66\pm 0.11$ となり、投与開始前よりも有意に増加した。さらに、これと並行して行った行動薬理学的評価では、投与開始の2~3ヶ月後から、投与後における急性症状に加え、遅発性運動機能障害(機能亢進症)が観察され始めた。その頻度は投薬の継続とともに上昇し続け、実験の後期ではハロペリドールの投与後、常に発現を認めるに至った。

ハロペリドールとは異なり、スルピリド投与群(C)では、急性の錐体外路症状は確認されたが、遅発性運動機能障害は観察されず、また、ドパミン神経系の変化も認められなかった。なお、0.5%メチルセルロースのみを投与した対照群(A)については、行動とドパミン神経伝達機能、何れの変化も確認されなかった。





**Figure 1-5.** Relationship between functional changes of brain dopaminergic neuronal transmission expressed as Relative Binding Ratio (RBR) and locomotor activity expressed as Dyskinetic Motor Activity, as described under method. Common marmosets treated perorally with (A) 1 ml/kg of 0.5% methylcellulose as vehicle alone (n=6), (B) 1.25 mg/kg haloperidol (n=5) and (C) 120 mg/kg sulpiride (n=3) twice a week each. Neuronal activity measured by SPECT using [<sup>123</sup>I]β-CIT (●) and [<sup>123</sup>I]IBZM (◆) at pre- (0 month) and 1, 2 and 6 months after commencement of treatment. Left ordinate: RBR (relative values to 0 month). Right ordinate: dyskinetic motor activity scoring (▼). #  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.005$ , ¶  $P < 0.001$ , compared with 0 month.

### *In vitro* バインディングアッセイ

DATとD<sub>2</sub>Rのそれぞれに結合する放射性リガンドを用いたバインディングアッセイの結果、ハロペリドール投与群では線条体の尾状核、およびレンズ核に存在するDATへのリガンド最大結合量 (B<sub>max</sub>) が対照群と比較して有意に減少しており、一方、D<sub>2</sub>Rでは有意な増加を認めた (Table 1-2)。小脳ではこのような変化は認められなかった。また、解離定数 (K<sub>d</sub>) を求めた結果、ハロペリドールの投与により、各リガンドの親和性は変化していなかった。

Table 1-2. *In vitro* binding assay.

Bmax (pmol/mgprotein) <sup>a</sup>				
	DAT ([ <sup>3</sup> H]GBR12935)		D <sub>2</sub> R ([ <sup>3</sup> H]Spiperone)	
	Control	Haloperidol	Control	Haloperidol
Caudate N.	5.20±0.82	3.80±0.15 #	0.43±0.01	0.57±0.04 #
Lentiform N.	4.29±0.12	3.40±0.20 *	0.44±0.02	0.54±0.02 *

<sup>a</sup> Mean ± S.D. of three common marmosets. # *P*<0.05; \* *P*<0.01, compared with control.

#### ハロペリドール休薬後のリガンド集積量の変化

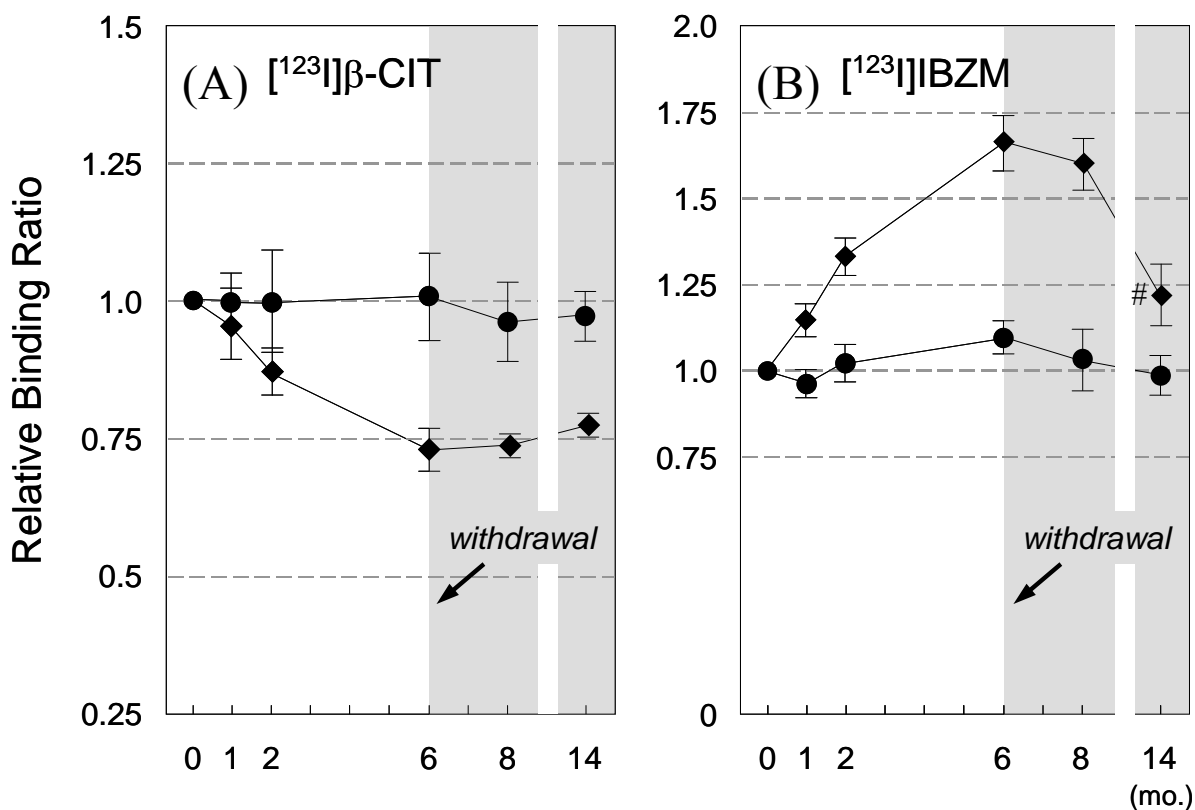
ハロペリドールの長期投与によりDAT、およびD<sub>2</sub>Rで認められた変化を詳細に検討する目的で、休薬が[<sup>123</sup>I]β-CITと[<sup>123</sup>I]IBZM、それぞれのBRに及ぼす影響を調べた (Figure 1-6)。

前記と同様の方法にてハロペリドールを投与したコモンマーモセットについて、6ヶ月目以降は投与を中止し、引き続きSPECT撮像を行った結果、[<sup>123</sup>I]β-CIT(A)のRBRは投与中止の8ヶ月間で変化がなかった(連続投与6ヶ月後:0.73±0.03, 休薬開始8ヶ月後:0.79±0.01)のに対し、[<sup>123</sup>I]IBZM(B)のRBRは連続投与6ヶ月の時点と比較して、投与中止8ヶ月後ではその値が有意に低下した(連続投与6ヶ月後:1.66±0.08, 休薬開始8ヶ月後:1.21±0.10)。

### 1. 1. 3. 考察

遅発性運動機能障害の発現に対するドパミン神経系の影響を検討する目的で、コモンマーモセットに投与する抗精神病薬には、臨床における遅発性運動機能障害の発現頻度が異なる2種のD<sub>2</sub>R遮断薬、ハロペリドールとスルピリドを選択した。K<sub>i</sub>値の比較より、D<sub>2</sub>Rに対するハロペリドールの親和性の強さはスルピリドの約13倍だが<sup>58-60</sup>、今回ハロペリドールとスルピリドの何れを投与した場合でも急性錐体外路症状の発現が認められたことから、受容体はそれぞれの薬物で十分に遮断されていたものと考えられる。その上で薬物の投与を6ヶ月間継続し、行動の観察とSPECTを用いたドパミン神経伝達機能の測定を行った結果、遅発性運動機能障害の発現およびBinding Ratio (BR)の経時的な変化を確認できたのはハロペリドール投与群のみであった (Figure 1-5)。





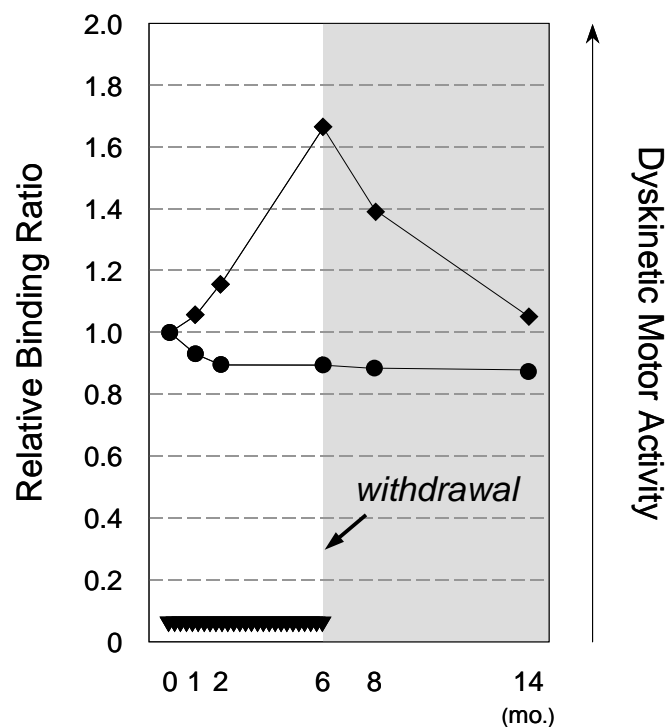
**Figure 1-6.** Haloperidol withdrawal effects on brain dopaminergic neuronal activity measured by (A) [<sup>123</sup>I]β-CIT and (B) [<sup>123</sup>I]IBZM. Common marmosets treated perorally with 1 ml/kg of 0.5% methylcellulose as a vehicle (●; n=3) or 1.25 mg/kg haloperidol (◆; n=3) twice a week, and at 6 months after initial treatment drug withdrawn. SPECT studies performed with [<sup>123</sup>I]β-CIT and [<sup>123</sup>I]IBZM. Relative Binding Ratio, relative value to 0 month, calculated as described under method. #  $P < 0.05$ , compared with 6 month.

SPECT撮像実験において定量した線条体および小脳における放射エネルギー、 $Ac_{st}$ と $Ac_{ce}$ は、それぞれ線条体でのリガンドの遊離量+全結合量、および小脳でのリガンドの遊離量+非特異的結合量と考えられる。ここで、線条体でのリガンドの遊離量および非特異的結合量を、小脳におけるそれらの濃度と等しいと仮定すれば、 $Ac_{st}-Ac_{ce}$ は線条体DATあるいは $D_2R$ に対するリガンドの特異的結合量として求められる。従って、BRは線条体における各リガンドの特異的結合量と遊離量+非特異的結合量の比となり<sup>61)</sup>、これはBinding Potential ( $B_{max}/K_d$ )に比例する<sup>62-66)</sup>。すなわち、BRはDATや $D_2R$ 密度、もしくは各リガンドの親和性の指標と考えられる。なお、<sup>123</sup>Iβ-CITはセロニントランスポーターにも親和性を有するが、線条体領域でのセロニントランスポーターの密度はDAT密度よりもはるかに低く、<sup>123</sup>Iβ-CITの線条体への特異的集積量はドパミントランスポーターへの結合を示しているものと仮定した<sup>67)</sup>。

ハロペリドール投与群で認められたBRの経時的な変化が $B_{max}$ あるいは $K_d$ の何れの変化を示すものかを明らかにするため、一連の実験終了後にコモンマーモセットから脳を摘出し、*in vitro*バインディングアッセイを行った (Table 1-2)。その結果、DATあるいは $D_2R$ に対する $B_{max}$ に変化が認められ、一方、 $K_d$ は変化していなかったことから、SPECTにて得られた結果もまた、リガンドの親和性の変化ではなくDATや $D_2R$ 密度の変化を評価しているものと考えられた。

さらにハロペリドールの体薬が各リガンドの集積量に及ぼす影響を検討したところ (Figure 1-6)、 $[^{123}I]IBZM$ の集積の増加が可逆的であったことから、シナプス後部における変化は、従来示唆されている、ハロペリドールの強力な $D_2R$ 遮断による受容体のup-regulationを示すものと考えられた。一方で $[^{123}I]\beta-CIT$ の集積量はハロペリドールの投与中止により回復しなかったことから、線条体に投射するドパミン神経に何らかの変化が生じていると推察された。

また、Figure 1-7 にはハロペリドールを投与しても遅発性運動機能障害を発現しなかった例を示す。 $[^{123}I]\beta-CIT$ のRelative Binding Ratio (RBR)は投与期間を通じてほとんど変化しなかったのに対し、IBZMのRBRは障害を発現した個体群と同程度まで増加し、投与中止 8 ヶ月後ではほぼ投与前の値に戻った。



**Figure 1-7. A case with absence of Dyskinetic Motor Activity: DAT related?** Changes of brain dopaminergic neuronal activity of a common marmoset measured by  $[^{123}I]\beta-CIT$  (●) and  $[^{123}I]IBZM$  (◆) as in figure 1-6, but with absence of dyskinetic behavior (▼).

これらの結果は、遅発性運動機能障害の発現に対し、変化量の大きなドパミン神経シナプス後部だけでなく、シナプス前部の変化もまた関与している可能性を示している。

今回の検討で、スルピリド投与群ではD<sub>2</sub>Rのup-regulationが認められなかった。薬物と受容体との解離定数K<sub>d</sub>は、

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

で表される。k<sub>on</sub>, k<sub>off</sub>はそれぞれ薬物-受容体間の結合速度定数, 解離速度定数であるが、抗精神病薬のk<sub>on</sub>値は薬物の種類によらずほぼ一定であり、K<sub>d</sub>はk<sub>off</sub>に依存することが報告されている<sup>68)</sup>。ハロペリドールのK<sub>d</sub>値はスルピリドよりも小さく<sup>69,70)</sup>、従ってスルピリドはD<sub>2</sub>Rから速やかに解離すると考えられるが、これがスルピリド投与により受容体の遮断効果(急性運動機能障害の発現)は得られているもののD<sub>2</sub>Rのup-regulationを生じなかったことに関与している可能性がある。

以上の検討より、ハロペリドールの長期経口投与により遅発性運動機能障害を発現したコモンマーモセットにおいて、従来提示されてきた線条体D<sub>2</sub>R密度の増加に加え、DAT密度の減少により支持される黒質-線条体路ドパミン神経の変化を認め、これらの変化により遅発性運動機能障害が発現することが示唆された。

なお、詳細は第2章で述べるが、本研究におけるDAT密度の変化はドパミン神経の不可逆的な傷害を示唆する。BRの変化より全体の70~80%程度のドパミン神経細胞が生存していると仮定すると、今回の検討例ではDATの減少によるドパミン取込み速度の低下等から、シナプス間隙のドパミン濃度は傷害される前と同程度に保たれていると考えられる<sup>71,72)</sup>。一方、DATの減少はドパミンの拡散範囲を広げ、これがシナプス後部の神経の過活動を促進させることで遅発性運動機能障害が発現する可能性も考えられる。

## 第2章

# ハロペリドールの脳内ドパミン神経細胞に対する 傷害機構に関する検討

第1章では、ハロペリドールの長期投与による遅発性運動機能障害の発現に対し、従来示唆されてきたドパミン神経シナプス後膜に存在する線条体D<sub>2</sub>R密度の増加に加え、シナプス前膜のDAT密度が減少することを見出した。これらはドパミン神経伝達機能の変化を示しているが、一方、スルピリドを投与した個体群ではこのような経時的変化を認めなかったことから、ハロペリドールが引き起こしたドパミン神経系の変化と、それに追隨した運動機能の障害には、本化合物の特性に由来する何らかの原因が存在すると考えられる。

さらに、ハロペリドールの長期投与で認められた線条体における[<sup>123</sup>I]β-CIT集積量の減少が休薬により回復しなかったことを考慮すると、黒質—線条体路ドパミン神経に不可逆的な変化が生じている可能性がある。以上の観点のもと、本章ではハロペリドールの代謝物が有するドパミン神経細胞毒性に着目し、神経変性との関連を考察することを目標とした。

ハロペリドールには幾つかの代謝経路が知られている<sup>73)</sup>。主なものにはN-脱アルキル化、カルボニル基の還元、抱合反応等が存在するが、一部はピペリジン環の酸化的芳香族化反応により4-(4-chlorophenyl)-1-[4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl]pyridinium ion (HPP<sup>+</sup>)を生ずる。HPP<sup>+</sup>はパーキンソン病誘発物質の候補化合物として、ドパミン神経細胞に対する急性毒性が*in vitro*で報告されているが<sup>74)</sup>、*in vivo*におけるドパミン神経系への影響、さらに運動機能障害への関与については明確となっていない。そこで、ハロペリドール長期投与時にHPP<sup>+</sup>が脳内ドパミン神経系の変化を惹起する可能性について、HPP<sup>+</sup>の動態を中心に検討した。

## 第1節

### ハロペリドールの長期投与により惹起される 脳内ドパミン神経変化に対するHPP<sup>+</sup>の関与

パーキンソン病誘発物質であるMPP<sup>+</sup>はDATを介して細胞に集積し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I のNADH脱水素酵素を阻害することで特異的にドパミン神経を傷害する<sup>75)</sup>。一方、ハロペリドールは生体内で酸化的に代謝され、ピリジニウムイオンのHPP<sup>+</sup>へと変換されるが、このHPP<sup>+</sup>は分子内にMPP<sup>+</sup>と同一の構造を有するため、MPP<sup>+</sup>同様の機構を介して神経細胞毒性を発現する可能性が示されている。

本節では、まずHPP<sup>+</sup>負荷によりドパミン神経細胞が傷害されることを*in vitro*で追試し、その上でハロペリドール投与後のコモンマーモセット脳におけるHPP<sup>+</sup>の存在を確認することにより、第1章で認められたドパミン神経の変化に対するHPP<sup>+</sup>毒性の関与を検討した。

#### 2. 1. 1. 実験方法

##### 試薬・機器

<sup>1</sup>H-NMRはJNM-EX270 (JEOL社)を用い、テトラメチルシランを内部標準物質として測定した。質量分析はJMS-HX/HX100 A model (JEOL社)を用いて測定した。細胞の免疫化学染色用の抗体にはマウスanti-microtubule associated protein 2 (2a+2b) (MAP2) antibody (Sigma社) およびウサギanti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (Chemicon社)を、ビオチン修飾二次抗体にはbiotinylated anti-rabbit IgG(H+L)およびbiotinylated anti-mouse IgG(H+L) (Vector Laboratories社)を、また免疫ペルオキシダーゼ染色には同社のVECTASTAIN ABC KITをそれぞれ使用した。HPLCは島津社製定速ポンプ (LC-10AD) に紫外可視分光光度計検出器 (SPD-10A)、および分光蛍光検出器 (RF-10Axl) を接続した系を用いた。試薬は全て特級試薬を使用した。

##### 4-(4-Chlorophenyl)-1-[4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl]pyridinium ion (HPP<sup>+</sup>) の合成

HPP<sup>+</sup>は、Gorrodらの方法<sup>76)</sup>に従って合成した。すなわち、まず精製トルエン中でハロペリドール 1.0 gと35%塩酸 10 mlを混和し、3.5時間還流した。反応後、溶液を中和、トルエン層を回収し、溶

媒を減圧留去した。残渣をクロロホルム:メタノール(8:1)を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーに付し、中間体である 4-(4-chlorophenyl)-1-[4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl]-1,2,3,6-tetrahydropyridineの白色結晶を得た(823 mg:収率 86.5%)。本化合物を塩酸塩処理し、その 510 mgと白金/活性炭 300 mgとを精製メタノール中、アルゴン気流下 72 時間室温にて攪拌した。反応溶液を濾過し、濾液を減圧留去後、残渣をクロロホルム:メタノール(5:1)を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィーに付し、HPP<sup>+</sup>の黄色針状結晶を得た(401 mg:収率 79.4%)。

mp 208~210°C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 9.73 (bs, 2H), 7.01~8.29 (m, 10H), 5.14 (bs, 2H), 3.33 (bs, 2H), 2.50 (bs, 2H); FAB-MS 計算値 C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>ClFN<sup>+</sup>O *m/z* 354, 測定値 354; 元素分析 計算値 C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>ClFN<sup>+</sup>O·Cl<sup>-</sup> C: 64.63 H: 4.65 N: 3.59, 測定値 C: 62.59 H: 4.76 N: 3.44.

## HPP<sup>+</sup>のドパミン神経細胞毒性

### 中脳ドパミン神経細胞の培養

胎齢 16 日目のWistar/STラット胎仔より中脳腹側部を分離し、トリプシン 0.1%を含むHanks'緩衝液中で 37°C, 20 分間処理した。これに 40%ウシ胎仔血清含有Eagle's培地を添加して酵素反応を停止させた後、組織断片を 1,000 gで 5 分間遠心分離した。沈渣を洗浄後、10%ウシ胎仔血清含有Eagle's培地中で分散し、100 μmのcell strainerで濾過した。これを 0.1%ポリエチレンイミンにて処理したカバースリップに 2.0×10<sup>6</sup> cells/mlの密度で播種し、37°C, 5% CO<sub>2</sub>環境下で培養した。培養開始 4 日目以降は 10%ウマ血清含有Eagle's培地に変更し、播種後 8 日目の細胞を以下の毒性判定実験に用いた。

### HPP<sup>+</sup>の毒性判定

塩化HPP<sup>+</sup>あるいはハロペリドールをジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解した後、これを培地中に添加し、10~120 μMの濃度に調製した。培養開始 8 日目の細胞にそれぞれを 1 時間負荷、洗浄後に培地を交換し、さらに 3 日間培養を継続した。

3 日後、培地を除去し、4%ショ糖-パラホルムアルデヒド溶液を用いて細胞を 4°C で 30 分間固定した。その後、10 mMリン酸緩衝塩化ナトリウム水溶液(PBS)で洗浄し、0.2% Triton X-100 PBS 溶液を 4°C で 30 分間作用させた。ここでスリップ上に一次抗体として anti-MAP2 抗体あるいは anti-TH 抗体を添加し、4°C で 18 時間静置した。PBS で洗浄後、それぞれの二次抗体として biotinylated anti-mouse IgG および biotinylated anti-rabbit IgG を室温で 1 時間反応させた。PBS

洗浄後、ABC キット反応液を室温で 1 時間作用させ、これを 50 mM Tris 緩衝塩化ナトリウム水溶液 (TBS) で洗浄、さらに DAB 溶液 (3,3'-diaminobenzide tetrahydrochloride と硫酸ニッケルアンモニウム含有 TBS) を 5~10 分間反応させることで神経細胞、あるいはドパミン神経細胞を染色した。各スリップはエタノールで脱水処理後、ENTELLAN (Merck 社) にて封入し、鏡検用試料を作製した。

光学顕微鏡を用いて試料単位面積あたりの免疫陽性細胞数、MAP2<sup>(+)</sup>とTH<sup>(+)</sup>を計数し、ドパミン神経細胞の生存率を算出した。

$$\text{Survival} = \frac{\text{TH}^{(+)}}{\text{MAP2}^{(+)} - \text{TH}^{(+)}}$$

#### ハロペリドール投与コモンマーモセットからのHPP<sup>+</sup>の検出

1.25 mg/kgのハロペリドールを経口投与したコモンマーモセットから、3 時間後に採血、さらに脳および肝臓を摘出し、Igarashiらの方法<sup>77)</sup>を参考に代謝物を抽出、定量分析した。すなわち、まず血液は 2,500 g で 30 分間遠心分離した。また、各組織には重量 2 倍容の 1.15% 塩化カリウム水溶液を加え、Polytronで組織を破碎した。これら操作で得られた血漿およびホモジネートにそれぞれ 2 倍容の 2%酢酸メタノール溶液を加えてvortexした。これを 13,000 g で 10 分間遠心分離し、得られた上清を逆相HPLCにて分析した。逆相カラムにはワイエムシ社製YMC-Pack Pro C18 (150×4.6 mm)を、移動相にはアセトニトリルと 5 mMの 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを含む 10 mMリン酸緩衝液 (pH 3.0) の 40:60 (v/v) 混合溶液を使用した。流速は 1.0 ml/min、カラム温度は 30°Cとした。また、分光光度計検出器の検出波長は 248 nm、分光蛍光検出器では励起波長を 302 nm、検出波長を 372 nmにそれぞれ設定した (溶出時間 8.5 分)。

#### 統計

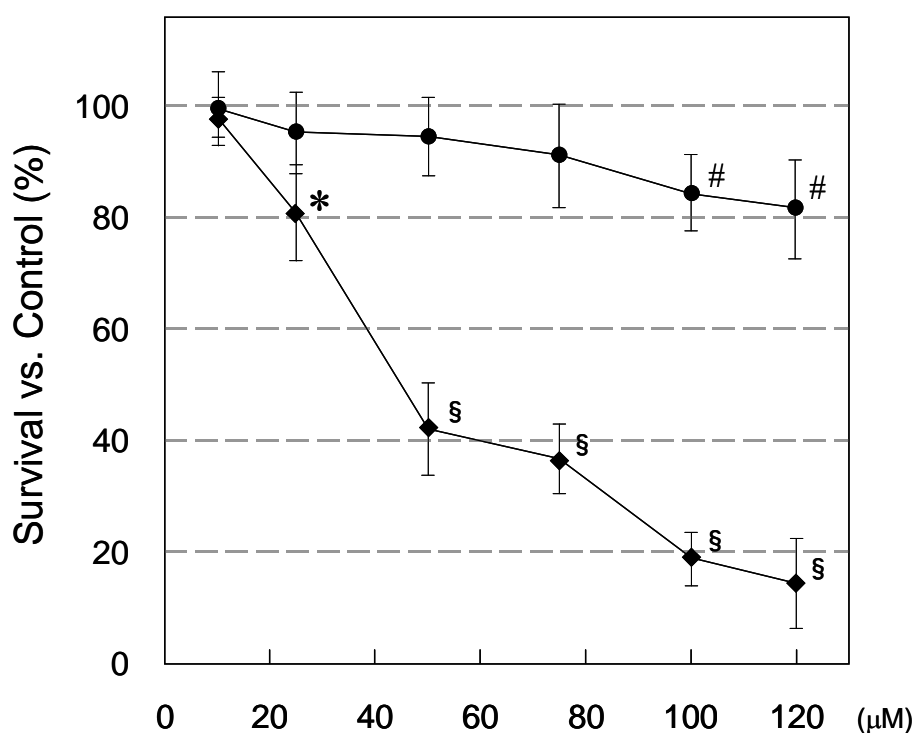
コントロール群と比較した薬物負荷群ドパミン神経細胞の相対生存率は、平均±標準偏差で表した。有意差検定は unpaired independent Student's *t*-test を使用し、危険率 *P* 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

## 2. 1. 2. 結果

### ドパミン神経細胞に対するHPP<sup>+</sup>の毒性

ラット胎仔の中脳より作製した培養細胞系に塩化HPP<sup>+</sup>を負荷したところ、ドパミン神経細胞に対する選択的な毒性が発現し、その生存率はHPP<sup>+</sup>非添加のコントロールと比較して 50  $\mu$ Mの濃度では42.1 $\pm$ 8.2%、100  $\mu$ Mでは18.8 $\pm$ 3.8%と濃度依存的に低下した (Figure 2-1-1)。また、生き残ったドパミン神経細胞においても、その多くで神経突起の退縮を認めた (Figure 2-1-2B)。

対照として用意したハロペリドールのドパミン神経細胞に対する毒性はHPP<sup>+</sup>と比べて低く、コントロールとの相対生存率は 50  $\mu$ Mでは 94.4 $\pm$ 6.9%、100  $\mu$ Mでも 84.2 $\pm$ 6.6%まで保たれ、何れも同濃度のHPP<sup>+</sup>負荷群と比較してそれぞれ有意に高かった ( $P<0.0001$ )。



**Figure 2-1-1.** Toxicity effect of haloperidol metabolite, HPP<sup>+</sup> on dopaminergic neurons. Mesencephalic cell cultures exposed to 10 to 120  $\mu$ M of HPP<sup>+</sup> (◆) for 1 hr. Haloperidol used as reference (●). Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of four experiments and is expressed as survivability relative to control (%). #  $P<0.05$ ; \*  $P<0.01$ ; §  $P<0.0001$ , compared with control.



(A) Control



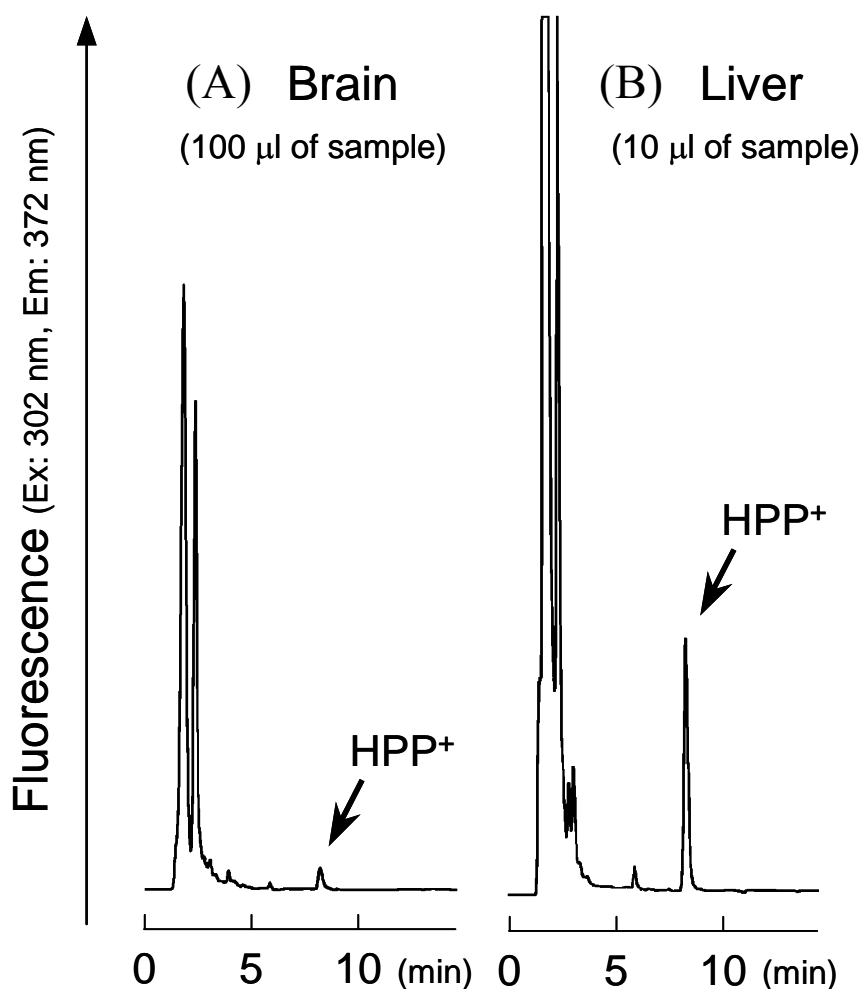
(B) + 120  $\mu$ M HPP<sup>+</sup>



**Figure 2-1-2.** Tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity in cultured mesencephalic neurons: (A) control and (B) post-treated with 120  $\mu$ M HPP<sup>+</sup> for 1 hr. After HPP<sup>+</sup> exposure, many of the dopaminergic neuronal axons appeared to be shortened and distorted as in (B) (arrow).

#### HPP<sup>+</sup>の定量分析

逆相HPLCを用い、1.25 mg/kgのハロペリドールを経口投与したコモンマーマウセツト 3 時間後の脳よりHPP<sup>+</sup>を検出した (Figure 2-1-3A)。また、定量の結果、HPP<sup>+</sup>は他の多くの組織や血液、尿中からも検出されたが、特に肝臓において非常に高濃度に存在していた (Figure 2-1-3B, Table 2-1-1)。



**Figure 2-1-3.** HPLC profiles of (A) brain and (B) liver extracts prepared from tissue sample of common marmoset perorally treated with 1.25 mg/kg haloperidol for 3 hr. HPP<sup>+</sup> detected by on-line spectrofluorometry (Ex: 302 nm, Em: 372 nm, t<sub>R</sub> = 8.5 min). Notice differential sample volume and high HPP<sup>+</sup> generation in liver.

**Table 2-1-1. Determination of HPP<sup>+</sup> levels in tissues of haloperidol treated common marmoset.**

Tissue	ng/g(wet tissue) <sup>a</sup>
Brain	8.4
Liver	600.0
Blood	24.4

<sup>a</sup> Spectrofluorometrical measurement from Figure 2-1-3.

## 2. 1. 3. 考察

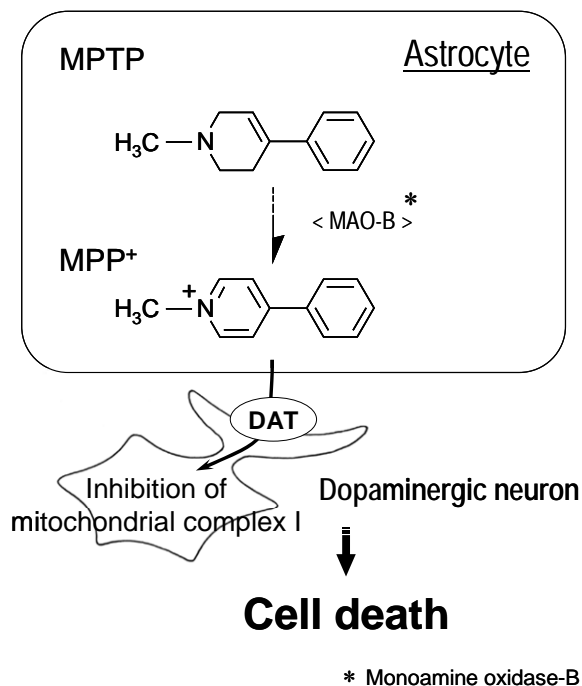
1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)はドパミン神経毒の前駆物質であり、その投与によって病理学的、行動学的にパーキンソン病様の症状を動物に惹起させることが知られている<sup>78-80)</sup>。すなわち、MPTPは脳内毛細血管を透過した後、アストロサイトでB型モノアミン酸化酵素(MAO-B)による代謝を受け、さらに非酵素的に酸化されて 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>)となる。このMPP<sup>+</sup>が神経終末のDATを介してドパミン神経細胞に選択的に取り込まれ、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I のNADH脱水素酵素を阻害することで神経毒性を発現する<sup>75,81)</sup>(Scheme 2-1-1A)。現在までに、本化合物と類似した構造を持つ様々な物質による、ドパミン神経毒性発現機構の解明が進められてきた。

一方、生体に投与されたハロペリドールは主にN-脱アルキル化反応による代謝を受けるが、一部は酸化的に代謝され、ピリジニウムイオンのHPP<sup>+</sup>に変化することが報告された<sup>73,82)</sup>。HPP<sup>+</sup>はMPP<sup>+</sup>と同一の構造を分子内に有するため、本分子はMPP<sup>+</sup>同様に生体でドパミン神経を傷害する可能性が示唆されている<sup>74,83)</sup>(Scheme 2-1-1B)。

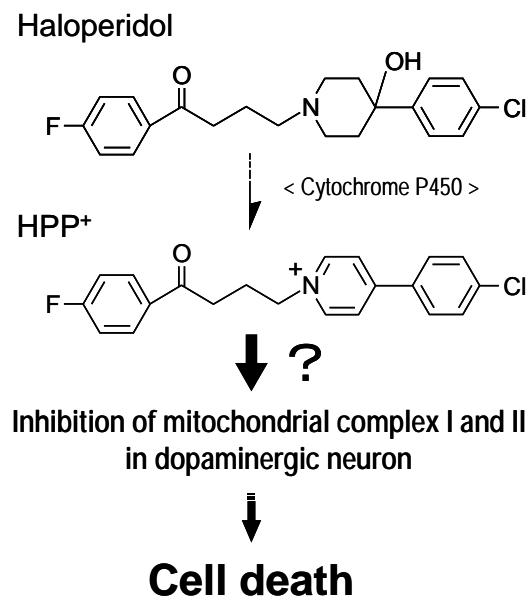
今回の検討においても従来の報告と同じく、HPP<sup>+</sup>の負荷によってドパミン神経細胞が傷害されることを証明し(Figure 2-1-1, Figure 2-1-2)、さらに、ハロペリドールを経口投与したコモンマーモセットの脳からHPP<sup>+</sup>を検出した(Figure 2-1-3, Table 2-1-1)。すなわち、第1章の結果と併せ、ハロペリドール長期投与後のコモンマーモセットにおける運動機能障害の発現には、それに先行した脳内ドパミン神経伝達機能の経時的変化が関与すること、さらに、この中脳-線条体路ドパミン神経の変化はHPP<sup>+</sup>を介して不可逆的に惹起されている可能性が示された。

ハロペリドールはシトクロームP450(CYP450)2D6 および 3A4 により代謝され、HPP<sup>+</sup>となる<sup>84-86)</sup>。本節ではHPP<sup>+</sup>が肝臓に多く存在することを明らかとしたが、これは肝臓における高いCYP450活性を示しているものと考えられる。ハロペリドールからHPP<sup>+</sup>への代謝は主代謝経路の酸化的N-脱アルキル化と競合するため、HPP<sup>+</sup>はハロペリドールの主代謝物ではない。しかし、ハロペリドールを投与した動物、あるいは精神分裂病患者の脳や血液、尿からのHPP<sup>+</sup>の検出は過去にも多く検討されている<sup>87-90)</sup>。ハロペリドールの脳内濃度の治療域はおおよそ 10 ~ 200 ng/gであり<sup>91)</sup>、一方でハロペリドールを長期間投与された患者死後脳より検出されたHPP<sup>+</sup>の組織中濃度は 0.5 ~ 2.1 ng/gという報告があるが<sup>92)</sup>、これは*in vitro*での検討よりも低い濃度にて長時間HPP<sup>+</sup>に曝されることにより、生体においてもドパミン神経系の変性が緩徐に進行し得ることを示唆しており、本研究第1章の結果を支持するものである。

(A)



(B)



**Scheme 2-1-1. Dopaminergic toxicity of haloperidol: a proposal.** Dopaminergic neurotoxicity of haloperidol via the pyridinium metabolites: (A) Model mechanism of MPTP metabolism by monoamine oxidase type B (MAO-B), and generation of pyridinium metabolite, MPP<sup>+</sup> by non-enzymatic oxidization in the astrocyte. MPP<sup>+</sup> transported selectively into dopaminergic neuronal cells by nerve terminal DAT, induced toxicity by inhibition of NADH dehydrogenase of complex I in the mitochondrial electron-transport chain<sup>75,81</sup>. (B) Proposed neuronal mechanism of haloperidol toxicity induced by cytochrome P450 catalysis, with biotransformation to the corresponding pyridinium metabolite, HPP<sup>+</sup>. As with MPP<sup>+</sup>, HPP<sup>+</sup> might inhibit mitochondrial respiration leading to neuronal cell death<sup>36,73,74</sup>.

## 第2節

### HPP<sup>+</sup>の脳移行性

前節のHPLCを用いた検討から、ハロペリドールを投与したコモンマーマウスより摘出した組織間の比較において、HPP<sup>+</sup>は肝臓に非常に高濃度に存在することが明らかとなった。この結果はシトクロームP450 酵素の発現量の差に起因しているものと考えられるため、HPP<sup>+</sup>はその大部分が肝臓で生成することが示唆された。従って、脳内ドパミン神経を傷害するHPP<sup>+</sup>には、肝臓にてハロペリドールより代謝され、そこから血液脳関門を透過した分子が含まれている可能性がある。

本節では、まずHPP<sup>+</sup>の 1-オクタノール/リン酸緩衝液系での分配係数を測定することでその脂溶性を検討し、さらに動物を用いてHPP<sup>+</sup>の末梢から脳への移行性を直接評価した。

#### 2. 2. 1. 実験方法

##### 試薬・機器

[<sup>3</sup>H]ハロペリドールはNEN Life Science Products社より、[<sup>14</sup>C]ブタノールはAmersham Radiolabeled Chemicals社より、それぞれ購入した。本節における他の試薬、機器は、第1章および第2章第1節と同じものを使用した。

##### ハロペリドールからHPP<sup>+</sup>への変換効率の*In Vitro*測定

##### 脳および肝臓からのミクロソーム画分の調製

Wistarラットの脳、あるいは肝臓からのミクロソーム画分はGorrodらの方法<sup>93)</sup>を用い、氷冷下に調製した。すなわち、24時間絶食させたラットを断頭後、脳を摘出した。また、肝臓は生理食塩水を灌流することで脱血処理した後に小葉を切り出した。各組織に1.15%の塩化カリウム水溶液(pH 7.4)を2.0 ml/g tissueで添加し、Potter-Elvehjemホモジナイザーにて破碎した。これを10,000 gで20分間遠心分離し、上清をさらに140,000 gで80分間の遠心操作にかけた。沈渣を塩化カリウム水溶液で洗浄し、再び140,000 gで60分間遠心分離した後、塩化カリウム水溶液中に0.26 g original tissue/500 μlの濃度でPolytronにて懸濁し、-80°Cで凍結保存した。

## マイクロソーム画分を使用したハロペリドールの代謝

脳および肝臓から調製したマイクロソーム画分を用いたHPP<sup>+</sup>の生成は、Fangらの方法<sup>94)</sup>に基づいて行った。βニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸一ナトリウム(NADPNa) 2 μmol, D-グルコース6リン酸一ナトリウム(G6PNa) 10 μmol, グルコース6リン酸脱水素酵素(G6PD) 5 units, 塩化マグネシウム 20 μmolを含む2.0 mlのリン酸緩衝液(pH 7.4)を37°Cで5分間プレインキュベートし、ここにハロペリドール 100 μg/10 μl DMSO溶液と0.25 g original tissue相当のマイクロソーム画分を添加した。30分後、3.0 mlのアセトニトリルにて反応を停止し、4°Cで30分間静置した後、1,500 gで15分間遠心分離した。第2章第1節の代謝物分析の項に記載したHPLCと同じ系にて上清を分析し、HPP<sup>+</sup>を定量した。

## [<sup>3</sup>H]HPP<sup>+</sup>の合成

[<sup>3</sup>H]HPP<sup>+</sup>は、非標識HPP<sup>+</sup>の場合と同様に、酵素的に合成した。すなわち、NADPNa 2 μmol, G6PNa 10 μmol, G6PD 10 units, 塩化マグネシウム 20 μmolを含むリン酸緩衝液(pH 7.4)系に [<sup>3</sup>H]ハロペリドールと肝臓より調製したマイクロソーム画分を添加し、37°Cで2時間反応させた。反応停止後に反応溶液を減圧下濃縮し、逆相HPLCを用いて [<sup>3</sup>H]HPP<sup>+</sup>を精製した。HPLC装置は第1章と同じものを使用した。逆相カラムにはワイエムシ社製YMC-Pack Pro C18(150×4.6 mm)を、移動相にはアセトニトリルと5 mMの1-オクタンスルホン酸ナトリウムを含む10 mMリン酸緩衝液(pH 3.0)の37:63(v/v)混合溶液を使用した。流速は1.0 ml/min、カラム温度は30°Cに設定した(溶出時間:ハロペリドール12.5分, HPP<sup>+</sup>18.0分)。溶出液を30秒間隔で分取し、その一部を液体シンチレーションカウンタで測定、放射能クロマトグラムを作製した。ここで [<sup>3</sup>H]HPP<sup>+</sup>に対応する画分を回収、濃縮し、展開溶媒をクロロホルム:メタノール(5:1)とするTLC(Rf値 0.30)にて放射化学的純度を算出した。

## 1-オクタノール/水分配係数の測定

分配係数の測定はSajiらの方法<sup>95)</sup>に従った。各2.0 mlの1-オクタノールと0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0, 7.4, 8.0)が入った試験管に5 μlの [<sup>3</sup>H]HPP<sup>+</sup>を含む溶液を加え、1分間×3回のvortex後、25°Cで20分間静置する操作を3回繰り返し、1,000 gで5分間遠心分離した。各層から800 μlずつを採取した後、それぞれの放射能を測定し、1-オクタノール/緩衝液の放射能比から分配係数を求めた。

## Brain uptake index (BUI)の測定

Brain uptake index (BUI)は、Oldendorfの方法<sup>96)</sup>を参考に測定した。すなわち、ペントバルビタール麻酔下、Wistarラットの一方の総頸動脈より 14.8 KBqの<sup>14</sup>C]ブタノールと 11.1 KBqの<sup>3</sup>H]HPP<sup>+</sup>を混合した生理食塩水 200  $\mu$ lをbolus投与し、投与 15 秒後に断頭、投与と同側の脳皮質頭頂一側頭部を速やかに採取した。組織片をアルカリ処理で溶解後、液体シンチレーションカウンタを用いて<sup>14</sup>Cと<sup>3</sup>Hの放射能を同時計測し、次式にてBUIを算出した。

$$\text{BUI (\%)} = \frac{({}^3\text{H}/{}^{14}\text{C}) \text{ dpm in brain tissue}}{({}^3\text{H}/{}^{14}\text{C}) \text{ dpm in injectate}} \times 100$$

## 末梢投与したHPP<sup>+</sup>の脳への取込み

ddYマウスの尾静脈から 0.5  $\mu$ g (~1.3 nmol) の塩化HPP<sup>+</sup>を、生理食塩水 100  $\mu$ lに溶解させて投与し、一定時間経過後に断頭した。血液および脳を採取し、重量を測定後、HPLC分析用の試料を作製した。操作は、第2章第1節に示したコモンマーモセット組織からの代謝物抽出方法に従った。また、HPLCも第2章第1節と同一の条件にて施行し、HPP<sup>+</sup>を定量した。

## 統計

分配係数、BUIの測定データは平均±標準偏差で表した。有意差検定は unpaired independent Student's *t*-test を使用し、危険率 *P* 値が 0.05 未満の場合に有意差ありとした。

## 2. 2. 2. 結果

### HPP<sup>+</sup>の *in vitro* 合成

ラット脳、あるいは肝臓より作製したミクロソーム画分を用いた *in vitro* の合成において、ハロペリドールからHPP<sup>+</sup>への変換率に大きな差を認めた (Table 2-2-1)。すなわち、30 分間の反応により 100  $\mu$ g (0.27  $\mu$ mol) のハロペリドールから得られたHPP<sup>+</sup>は、脳ミクロソーム画分を用いた場合で 0.10  $\mu$ g (0.28 nmol)、肝臓ミクロソーム画分では 4.6  $\mu$ g (13.0 nmol) であった。

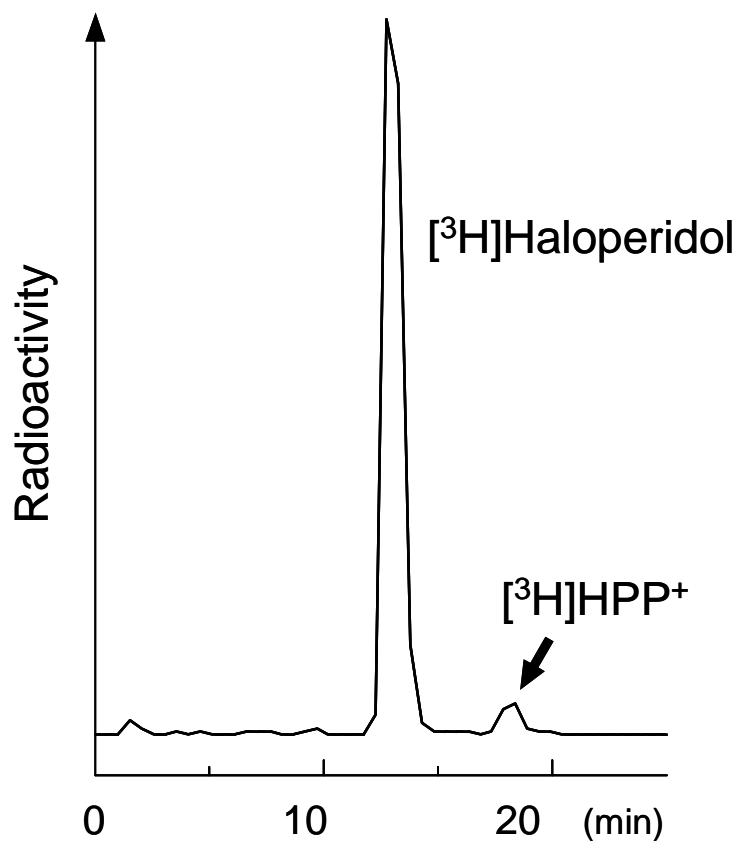
**Table 2-2-1. Differential haloperidol-HPP<sup>+</sup> biotransformation efficiency yield (%).**

Tissue	Yield (%)
Brain <sup>a</sup>	0.1
Liver <sup>a</sup>	4.8

<sup>a</sup> microsomal fraction.

### [<sup>3</sup>H]HPP<sup>+</sup>の合成

ラット肝臓ミクロソーム画分を用いて[<sup>3</sup>H]ハロペリドールを酵素的に処理した結果、[<sup>3</sup>H]HPP<sup>+</sup>を収率4.1%で得た(Figure 2-2-1)。放射化学的純度は95%以上であった。[<sup>3</sup>H]HPP<sup>+</sup>は4°Cで1週間保管しても安定に存在していた。



**Figure 2-2-1.** Preparative HPLC radiochromatogram of biosynthesized [<sup>3</sup>H]HPP<sup>+</sup>. [<sup>3</sup>H]HPP<sup>+</sup> prepared from [<sup>3</sup>H]haloperidol in a manner similar to that describe for non-radioactive HPP<sup>+</sup> ( $t_R =$  [<sup>3</sup>H]haloperidol: 12.5 min, [<sup>3</sup>H]HPP<sup>+</sup>: 18.0 min).



## 1-オクタノール/水分配係数

脂溶性の指標として算出した分配係数の対数値をTable 2-2-2 に示す。 $[^3\text{H}]\text{HPP}^+$ の値は $[^3\text{H}]\text{ハロペリドール}$ と比較して低かったが、この値は本化合物の脂溶性を示唆する範囲にあった。

**Table 2-2-2. Comparative partition coefficient (PC) data, at variable pH.**

	PC <sup>a</sup>		
	pH 7.0	pH 7.4	pH 8.0
$[^3\text{H}]\text{HPP}^+$	$0.67 \pm 0.03$ §	$0.81 \pm 0.04$ §	$0.95 \pm 0.01$ §
$[^3\text{H}]\text{Haloperidol}$	$1.27 \pm 0.00$	$1.37 \pm 0.01$	$1.36 \pm 0.00$

<sup>a</sup> 1-Octanol/0.1 M phosphate buffer partition coefficients (logarithmic value). Mean  $\pm$  S.D. of three experiments. §  $P < 0.0001$ , compared with  $[^3\text{H}]\text{haloperidol}$ .

## HPP<sup>+</sup>の脳移行性

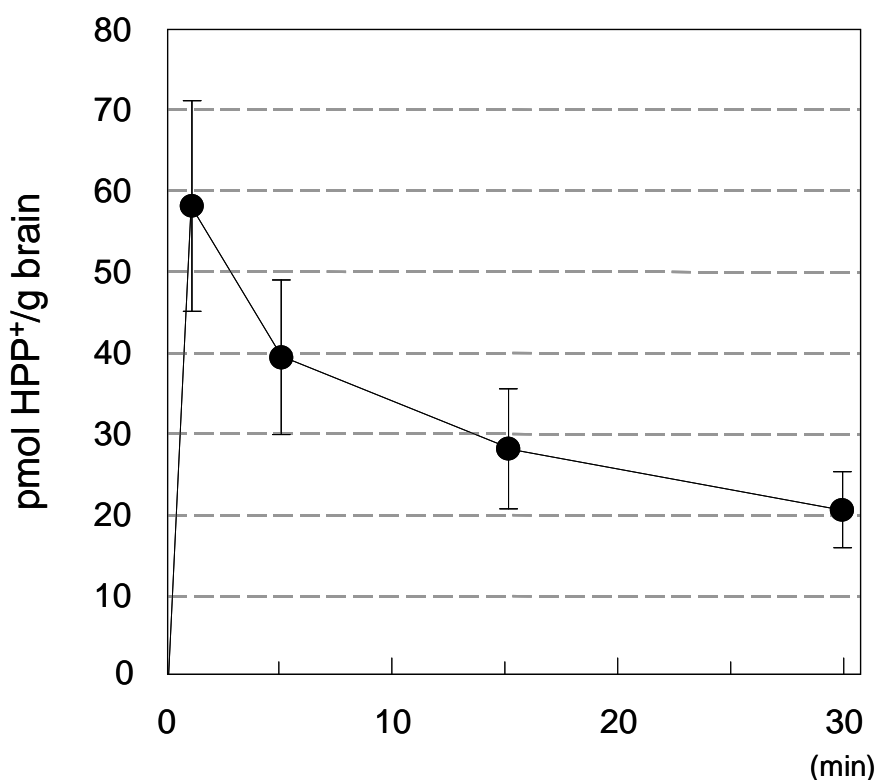
ラットBUI測定の結果、 $[^3\text{H}]\text{ハロペリドール}$ よりは有意に低いものの、 $[^3\text{H}]\text{HPP}^+$ が脳へ取り込まれることを認めた (Table 2-2-3)。

また、1.3 nmolの塩化HPP<sup>+</sup>をマウス尾静脈より投与した後、HPLCを用いて脳内HPP<sup>+</sup>を定量した結果をFigure 2-2-2 に示す。HPP<sup>+</sup>は速やかに脳へと移行し、投与 1 分後では  $57.8 \pm 13.2$  pmol/g brainの取込みを示した。また、その後は経時的に減少し、投与 30 分後における集積量は  $20.5 \pm 4.8$  pmol/g brainにまで低下した。

**Table 2-2-3. Brain uptake index (BUI) of  $[^3\text{H}]\text{HPP}^+$  and  $[^3\text{H}]\text{haloperidol}$ .**

	BUI <sup>a</sup>
$[^3\text{H}]\text{HPP}^+$	$9.0 \pm 2.1$ §
$[^3\text{H}]\text{Haloperidol}$	$97.1 \pm 6.5$

<sup>a</sup> Uptake into the brain relative to  $[^{14}\text{C}]\text{butanol}$ . Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of four experiments. §  $P < 0.0001$ , compared with  $[^3\text{H}]\text{haloperidol}$ .



**Figure 2-2-2.** Time course of HPP<sup>+</sup> in the mouse brain. Mice injected via the tail vein with 0.5 μg/100 μl saline (~ 1.3 nmol/100 μl saline) of HPP<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, and then decapitated at 1, 5, 15 or 30 min post-injection. HPP<sup>+</sup> accumulation determined by HPLC analysis of brain tissue extract. Each time point represents the mean ± S.D. of five mice.

### 2. 2. 3. 考察

シトクロームP450 (CYP450)は脳を含めた広範な組織中にその存在を認めるが、特に肝臓における発現量が高い。そこで、前節の結果を検証するために、まずラットの脳および肝臓ホモジネートより調製したCYP450を含むミクロソーム画分を用い、*in vitro*でハロペリドールに作用させてHPP<sup>+</sup>の生成量を比較したところ、ハロペリドールからHPP<sup>+</sup>への変換効率には肝臓の方が脳よりもおよそ50倍高いことが明らかとなった (Table 2-2-1)。系に添加したミクロソーム画分の量はどれも単位組織重量あたりに換算して調製したので、この生成量の差はP450発現量の相違を示しているものと考えられる。実際、脳におけるP450の発現量は肝臓の1~10%程度との報告があり<sup>97)</sup>、今回の結果は、これとよく一致するものであった。

MPP<sup>+</sup>は末梢から脳への移行性が乏しい<sup>98,99)</sup>。従って、MPP<sup>+</sup>と同じピリジニウムイオンであるHPP<sup>+</sup>もまた血液脳関門を透過できないと推察されており、HPP<sup>+</sup>の起源に関しては脳内でハロペリ

ドールから代謝されたものに由来すると考えられてきた。しかし、ここに示したようにHPP<sup>+</sup>の主生成部位が肝臓であること、またHPP<sup>+</sup>は逆相HPLCカラムによく保持されたこと (Figure 2-1-3) を考慮し、本分子は有機カチオンであるものの脂溶性を有し、末梢より脳へ送達される可能性があると考え、以下に検討した。

血液pH付近、すなわちpH 7.4 における1-オクタノール/リン酸緩衝液系に対し、HPP<sup>+</sup>分配係数の対数値は0.81であったが (Table 2-2-2)、これはMPP<sup>+</sup>で報告された値、 $-1.23^{36)}$ よりも高いものだった。また、化合物が血液脳関門を自由に透過し得る指標として0.9 ~ 2.5 という値が示されている<sup>100)</sup>ことを考慮すると、HPP<sup>+</sup>はある程度の脂溶性を有し、脳へ移行する可能性が示された。HPP<sup>+</sup>の構造を考えた場合、ピリジン環窒素原子上の孤立電子対は芳香族性に無関係なので、ピリジニウムイオンとなっても分子全体としては芳香族としての特性が高く保たれている。さらにHPP<sup>+</sup>は分子内にベンゼン環を2つ有するために、カチオンにも拘わらず比較的高い脂溶性を保持しているものと考えられる。

これに続き、より直接的にHPP<sup>+</sup>の脳移行性を評価するため、 $[^{14}\text{C}]$ ブタノールを基準物質として brain uptake index (BUI) を測定した結果から、 $[^3\text{H}]$ HPP<sup>+</sup>の脳への取込み率は  $9.0 \pm 2.1\%$  となり、これは脳移行性に乏しい $[^3\text{H}]$ マンニトールにおける値、 $1.6 \pm 0.3\%$ <sup>101)</sup>よりもはるかに高い値であった。また、非標識体を末梢よりマウスに投与した実験でもHPP<sup>+</sup>は脳から検出され、実際、投与量に対する脳への取込み率を算出したところ、別に検討した放射性ヨウ素標識血清アルブミン ( $[^{131}\text{I}]$ RISA<sup>102)</sup>) と比較して高い脳移行性を示した (投与5分後での取込み率: HPP<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>  $3.4 \pm 0.8\%$  Injected dose/g,  $[^{131}\text{I}]$ RISA  $0.64 \pm 0.05\%$  Injected dose/g)。これらの結果から、HPP<sup>+</sup>は血中から脳へと移行することが示された。

以上、本節では、ハロペリドールが肝臓でHPP<sup>+</sup>に代謝された後、このHPP<sup>+</sup>が脳へと移行する可能性について検討した。その結果、HPP<sup>+</sup>を末梢より投与した場合、脳へ速やかに取り込まれることが明らかとなり、ハロペリドール投与後、脳内においてドパミン神経に傷害を与えるHPP<sup>+</sup>の一部が末梢から血液脳関門を透過した分子に由来することが示唆された。

## 第3節

### ドパミン神経選択的なHPP<sup>+</sup>毒性の発現機序

本章におけるこれまでの研究結果から、ハロペリドールを生体に投与した場合、その代謝物の一つであるHPP<sup>+</sup>が脳へ集積し、ドパミン神経細胞に対する傷害性を示すこと、および、その少なくとも一部には末梢から脳へと移行した分子が含まれる可能性があることを見出した。そこで、本節では、さらにHPP<sup>+</sup>の毒性がドパミン神経細胞に選択的に発現する機構を明らかにすることを計画した。

まず、HPP<sup>+</sup>と同じピリジニウムイオンのMPP<sup>+</sup>がDATを介して細胞内へ集積することによりドパミン神経細胞選択的な毒性を発現することから、HPP<sup>+</sup>も同様にDATを介してドパミン神経細胞に集積し得るかを検討した。

さらに、ドパミン神経にはニューロメラニンが豊富に存在すること、また、有機カチオンである抗マリア薬のクロロキンがメラニンに結合するとの報告<sup>103)</sup>があることに着目し、HPP<sup>+</sup>がニューロメラニンに結合してドパミン神経細胞内に蓄積する可能性についても検討を行った。

#### 2. 3. 1. 実験方法

##### 試薬・機器

細胞実験には第2章第1節と同じ試薬を使用した。溶液中のハロペリドール、およびHPP<sup>+</sup>は、日立社製分光光度計(U-2001)と島津社製分光蛍光光度計(RF-5300PC)を用いてそれぞれ定量した。試薬は全て、第2章前節までと同じ特級試薬を使用した。

##### DAT阻害薬によるHPP<sup>+</sup>細胞毒性の保護作用

第2章第1節と同様に作製したドパミン神経細胞初代培養系に、DAT阻害薬のGBR12909を1 μMで30分間作用させ、ここに引き続き塩化HPP<sup>+</sup>を1時間負荷した。その後は再び同様の操作を施し、ドパミン神経細胞の生存率を求めた。

## 合成メラニンに対するHPP<sup>+</sup>の結合性

### HPP<sup>+</sup>結合量の時間依存性

1.0 mlのリン酸緩衝液(67 mM, pH 7.0)中、10 μMの塩化HPP<sup>+</sup>と100 μgの合成メラニン(Sigma Chemical社)を37°Cでインキュベートした。一定時間が経過した後、反応液をコスモナイスフィルターW(0.45 μm: ナカライテスク社)に通じ、濾液中のHPP<sup>+</sup>濃度を蛍光光度計にて測定した。

### Saturation assay

1.0 mlのリン酸緩衝液中、 $5.0 \times 10^{-8}$  ~  $1.0 \times 10^{-5}$  Mの塩化HPP<sup>+</sup>と10 μgの合成メラニンとを混合し、37°Cで1時間インキュベートした。反応液を2,500 gで10分間遠心分離し、上清に含まれるHPP<sup>+</sup>の濃度を、蛍光光度計を用いて測定した。ここで得られたデータから、Scatchard解析にてHPP<sup>+</sup>の解離定数( $K_d$ )を算出した。また、 $1.5 \times 10^{-6}$  ~  $1.0 \times 10^{-4}$  Mのハロペリドールについても同様の操作を行い、3時間インキュベーション後の溶液中濃度を分光光度計で定量した。

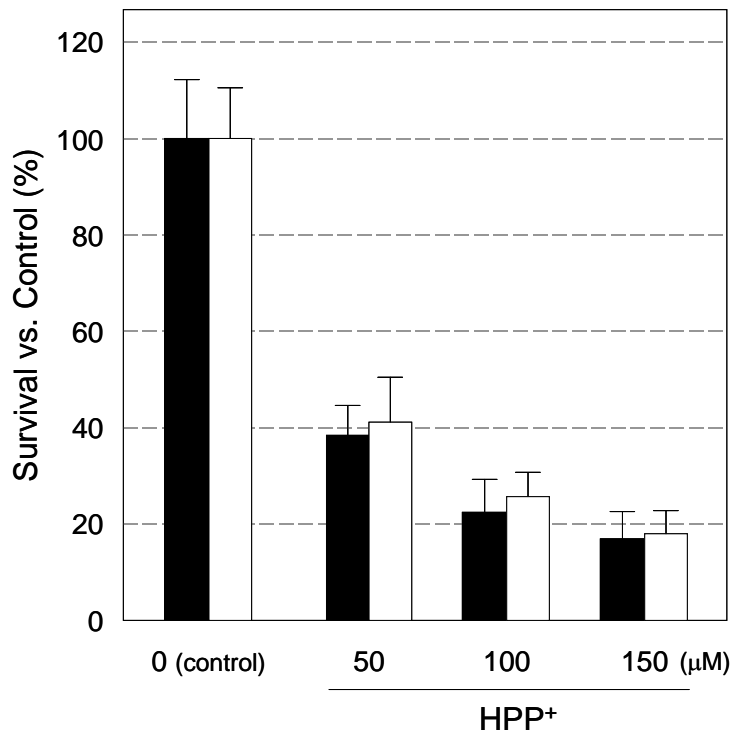
### メラニン-HPP<sup>+</sup>複合体からのHPP<sup>+</sup>の溶出

Stepieńらの方法<sup>103)</sup>に従い、メラニンに結合したHPP<sup>+</sup>について種々の溶媒への回収を試みた。1.0 mlのリン酸緩衝液中、10 μMの塩化HPP<sup>+</sup>と100 μgの合成メラニンを37°Cで1時間インキュベートしてメラニンにHPP<sup>+</sup>を結合させた後、反応液をCorning社製再生セルロースフィルター(0.20 μm)に通じた。ここに67 mMのリン酸緩衝液を5.0 mlずつ通じ、それぞれの濾液中のHPP<sup>+</sup>濃度を蛍光光度計で測定した。HPP<sup>+</sup>の溶出が認められなくなったところで溶出液を4 M塩化ナトリウム水溶液に変更した。さらに同様の操作後、エタノールでHPP<sup>+</sup>を溶出し、初めにメラニンと結合していたHPP<sup>+</sup>に対する各溶出液画分への回収率を求めた。

## 2. 3. 2. 結果

### HPP<sup>+</sup>のドパミン神経細胞毒性に対するDAT阻害薬の影響

DAT阻害薬であるGBR12909の存在下、培養細胞へのHPP<sup>+</sup>の負荷を行ったが、第2章第1節と同等の範囲のHPP<sup>+</sup>濃度では、GBR12909添加/非添加群間でドパミン神経細胞の生存率に有意差は認められなかった(Figure 2-3-1)。

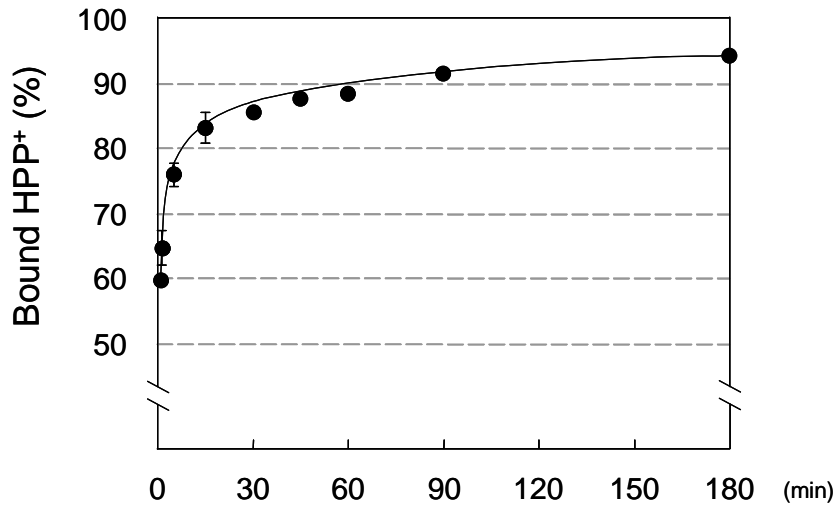


**Figure 2-3-1.** Effect of DAT inhibitor on HPP<sup>+</sup> toxicity to dopaminergic neurons. Mesencephalic cell cultures pre-treated with 1 μM GBR12909 (DAT inhibitor) for 30 min, and then exposed to 50 ~ 150 μM HPP<sup>+</sup> together with GBR12909 for 1hr. Each value represents ( ■ ) GBR12909 (-) and ( □ ) GBR12909 (+) the mean ± S.D. of eight to twelve experiments and is expressed as survivability relative to control (%).

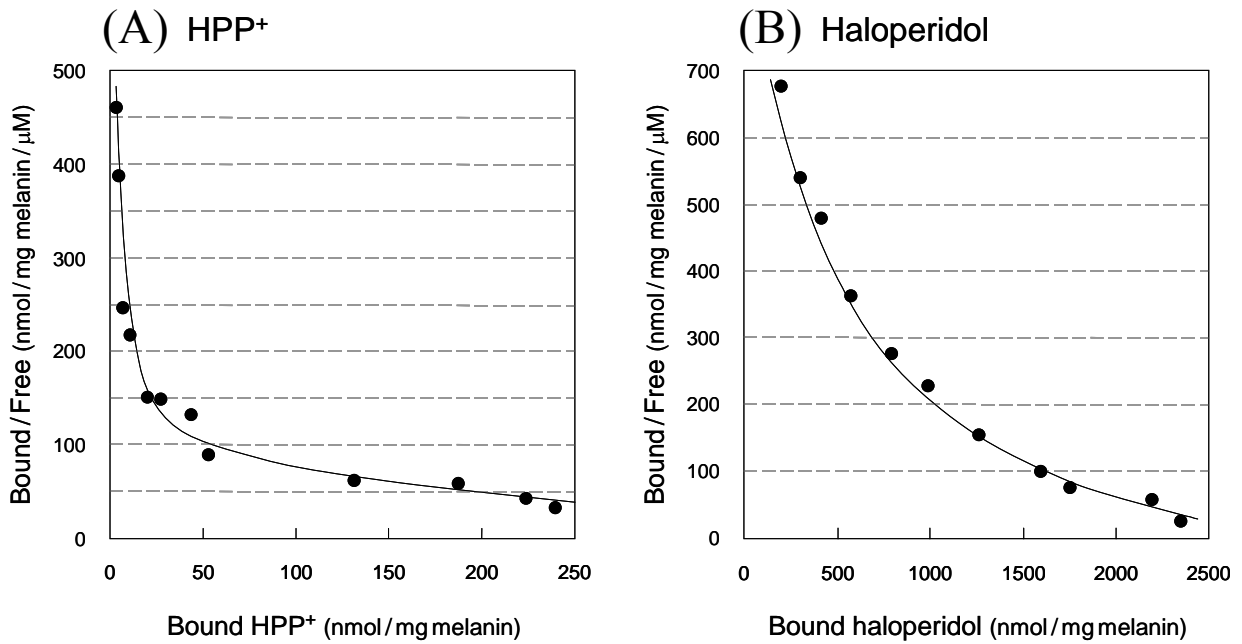
#### 合成メラニンに対するHPP<sup>+</sup>の結合

Figure 2-3-2 には、メラニンへのHPP<sup>+</sup>の結合に対するインキュベーション時間の影響を示す。メラニン-HPP<sup>+</sup>間の結合は速やかに進行し、インキュベーション開始60分後にはほぼ平衡に達したことから、以降の実験ではインキュベーション時間を60分と定めた。

HPP<sup>+</sup>のバイディングアッセイより得た値をもとに作製したScatchard曲線は二相性を示した (Figure 2-3-3A)。各座標軸付近の曲線の傾きを直線近似し、解離定数を求めたところ、HPP<sup>+</sup>の高親和性結合におけるK<sub>d</sub>値は20.2±5.0 nM、低親和性結合では4.0±1.2 μMであった。なお、比較のためハロペリドールについてもアッセイを行ったが、ここでも同様に二相性のScatchard曲線を得た (Figure 2-3-3B)。解離定数は高親和性/低親和性結合においてそれぞれ1.44±0.36 μM, 12.6±0.80 μMであり、HPP<sup>+</sup>の方がはるかに強い親和性を有することが示された。



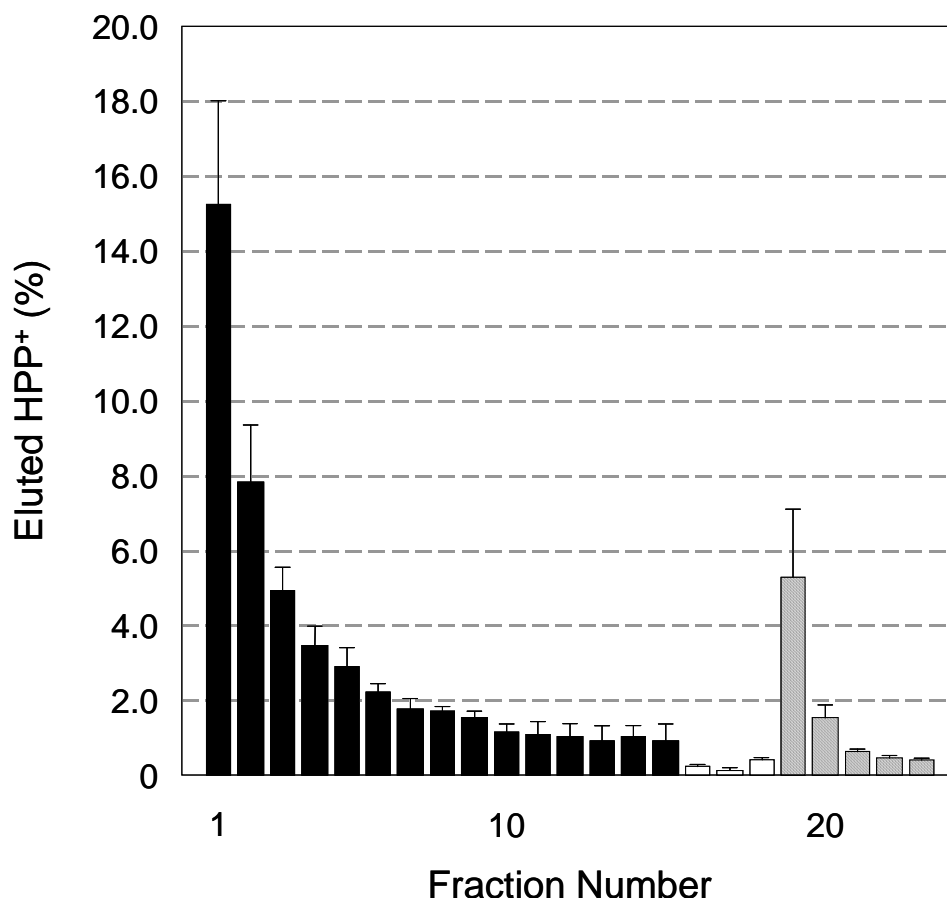
**Figure 2-3-2.** Effect of HPP<sup>+</sup> binding onto synthetic melanin. 100  $\mu\text{g}$  of melanin incubated with 1 ml of 10  $\mu\text{M}$  HPP<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> solution (67 mM phosphate buffer, pH 7.0). Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments.



**Figure 2-3-3.** Scatchard plot of (A) HPP<sup>+</sup> and (B) haloperidol binding to synthetic melanin. Concentrations of HPP<sup>+</sup> ranged from  $5.0 \times 10^{-8}$  to  $1.0 \times 10^{-5}$  M and haloperidol from  $1.5 \times 10^{-6}$  to  $1.0 \times 10^{-4}$  M. The abscissa represents bound HPP<sup>+</sup> in 1.0 ml with 10  $\mu\text{g}$  melanin or bound haloperidol in 1.5 ml with 5  $\mu\text{g}$  melanin.

## メラニン-HPP<sup>+</sup>複合体からのHPP<sup>+</sup>の溶出

1時間のインキュベーションによりメラニンと結合したHPP<sup>+</sup>の量に対し、3種類の溶媒で順次洗い出すことで各溶出液画分に回収されたHPP<sup>+</sup>の割合を求めた(Figure 2-3-4)。最終的には全体で56.7%のHPP<sup>+</sup>が回収されたが、全回収量に占める各溶出液によるHPP<sup>+</sup>の溶出量は、リン酸緩衝液:84.1%, 塩化ナトリウム水溶液:1.2%, エタノール:14.7%であり、溶出液間で回収率に大きな差を認めた。



**Figure 2-3-4.** Release of melanin-bound HPP<sup>+</sup> after washings with ( ■ ) 67 mM phosphate buffer, ( □ ) 4 M sodium chloride and ( ▒ ) ethanol. Each value represents the mean ± S.D. of three experiments and is expressed as the proportions of eluted HPP<sup>+</sup> to that initial melanin binding.

## 2. 3. 3. 考察

DAT阻害薬はMPP<sup>+</sup>のドパミン神経細胞毒性を低減させることが知られている<sup>104,105</sup>)。そこで

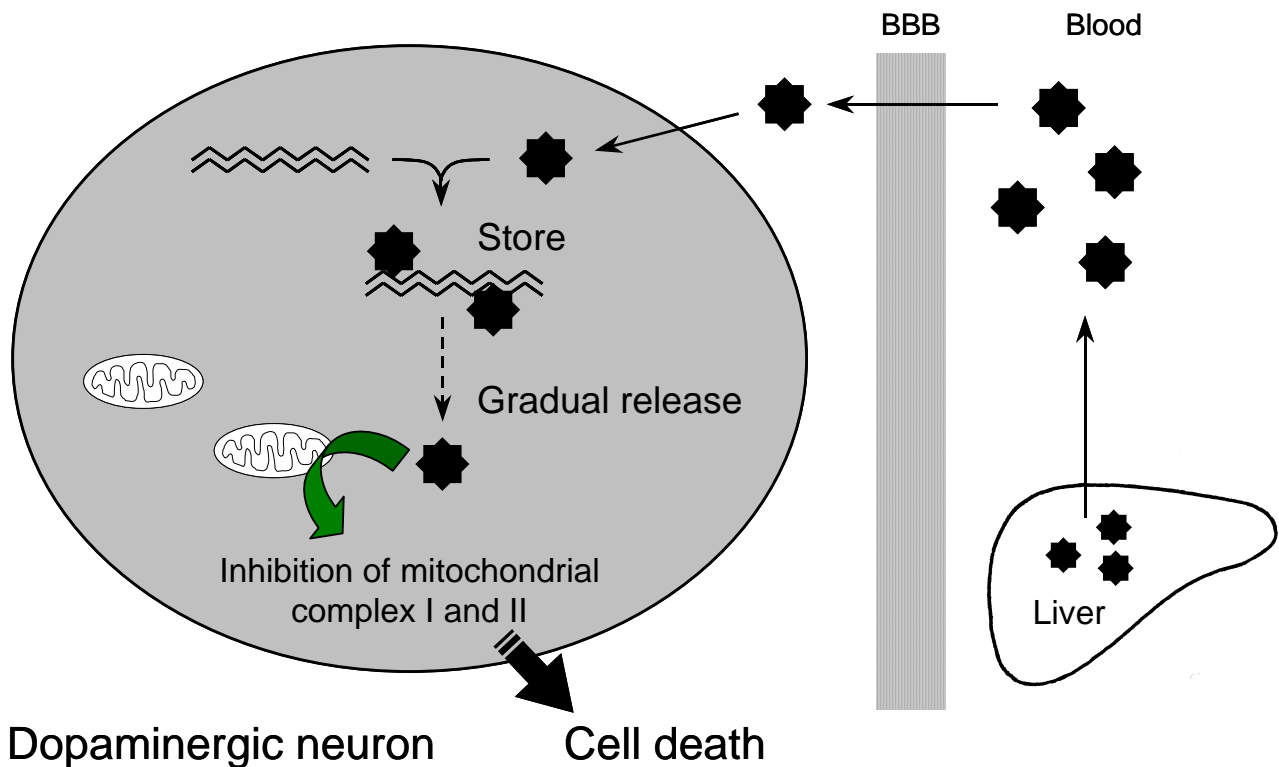


MPP<sup>+</sup>同様、HPP<sup>+</sup>によるドパミン神経選択的な毒性の発現がDATを介した細胞内への集積に依存する可能性を調べるため、DAT阻害薬のGBR12909 処理がHPP<sup>+</sup>負荷時のドパミン神経細胞の生存に及ぼす影響を検討した。しかし、本法ではドパミン神経細胞の生存率は変化しなかったことから(Figure 2-3-1)、HPP<sup>+</sup>はDATによりドパミン神経細胞に取り込まれることはないと考えられた。この結果は、HPP<sup>+</sup>がモノアミン作動性神経への神経伝達物質の取込みを阻害するが<sup>106)</sup>、それ自体は基質として細胞へ取り込まれない<sup>107)</sup>という過去の報告と一致する。

従って、HPP<sup>+</sup>毒性のドパミン神経細胞への選択性は、細胞への取込み以降の過程において発現すると考えられる。ここで、ドパミン神経にはニューロメラニンが豊富に存在することが知られており、また有機カチオンであるクロロキン、あるいはMPP<sup>+</sup>がメラニンに結合するとの報告があることから<sup>103, 108-111)</sup>、HPP<sup>+</sup>がこれに結合して細胞内に蓄積する可能性を考え、合成メラニンをを用いたHPP<sup>+</sup>の結合実験を行った。過去に検討されている薬物は、メラニンに対し2種類の結合親和性を有することが示されているが、本節でも作製したScachard曲線が二相性を示したことから(Figure 2-3-3A)、HPP<sup>+</sup>もまた、少なくとも異なる2種の結合を介してメラニンに保持されることが示唆された。高親和性結合の解離定数は20.2±5.0 nMであったが、この値は同様にハロペリドールで求めた解離定数と比較して少なくとも50倍以上の高い親和性を示しており、HPP<sup>+</sup>の毒性発現には、ハロペリドールとして細胞に保持され、そこからHPP<sup>+</sup>へと代謝されることよりも、HPP<sup>+</sup>分子としてドパミン神経細胞に集積することの関与が大きいと考えられる。

HPP<sup>+</sup>の細胞毒性はミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖複合体のIとIIを阻害することにより発現すると考えられているが<sup>36)</sup>、そのためにはミトコンドリア外膜を透過せねばならない。ミトコンドリア外膜は低分子やイオンは自由に通過するが、高分子であるメラニンの透過は不可能と予想されることから、その毒性の発現には、メラニンとの結合が解離した後にHPP<sup>+</sup>がミトコンドリアに作用する必要がある。そこで、洗い出し実験によりHPP<sup>+</sup>とメラニンとの結合の種類を検討した(Figure 2-3-4)。すなわち、リン酸緩衝液、塩化ナトリウム水溶液、エタノールでの洗い出しにより、それぞれ分子間力による結合、イオン結合、疎水性結合の関与を調べたが、HPP<sup>+</sup>はリン酸緩衝液やエタノールで容易に洗い出されたことを考慮し、その結合の少なくとも一部は分子間力や疎水性結合が関与するあまり強力ではないもので、一度メラニンと結合してもHPP<sup>+</sup>は可逆的に解離し得ることが示された。

以上、本章をまとめ、HPP<sup>+</sup>が脳内ドパミン神経細胞を選択的に傷害する機構をScheme 2-3-1に掲載する。



**Scheme 2-3-1. Plausible model for dopaminergic neuronal haloperidol toxicity.** HPP<sup>+</sup> molecules in the brain originated from partial haloperidol biotransformation in the liver, presumably enter dopaminergic neurons by passive diffusion due to HPP<sup>+</sup> lipophilicity. There, HPP<sup>+</sup> (●) reach toxic concentrations in dopaminergic neurons due to its high affinity binding to and slow release from neuromelanin (~~~~~). Thus, long-term treatment with haloperidol might induce lengthy exposure to HPP<sup>+</sup> leading to selective lesion of dopaminergic neurons, considered responsible for tardive motor dysfunction.

すなわち、脳に存在するHPP<sup>+</sup>は脳内でハロペリドールから代謝されたもの以外に、末梢、特に肝臓において生成し、血液脳関門を透過した分子に由来する可能性がある。このHPP<sup>+</sup>はドパミン神経細胞に多く存在するニューロメラニンに結合する。このため、他の細胞においては細胞外への放出、あるいは代謝によりHPP<sup>+</sup>が消失した後も、ドパミン神経細胞ではニューロメラニンからHPP<sup>+</sup>が徐々に放出され続け、細胞内のHPP<sup>+</sup>がある一定の濃度に保たれる。こうして長時間HPP<sup>+</sup>に曝されることでドパミン神経細胞が選択的な傷害を受け、ハロペリドールを長期投与した際の脳内ドパミン神経系の変性、さらには遅発性運動機能障害の発現へと結びつくものと考えられる。

## 結 語

本研究では、抗精神病薬ハロペリドールの長期投与により惹起される遅発性運動機能障害の発現機構の解明を目的として、ドパミン神経伝達機能の*in vivo*での変化、およびハロペリドールの代謝物の一つである 4-(4-chlorophenyl)-1-[4-(4-fluorophenyl)-4-oxobutyl]pyridinium ion (HPP<sup>+</sup>) を介したドパミン神経選択的な傷害の発現機序に関する検討を行い、以下の知見を得た。

1. コモンマーモセットにハロペリドールを長期間経口投与し、錐体外路系副作用の発現を行動薬理学的に観察すると同時に、同一個体における脳内ドパミン神経伝達機能を、*in vivo*核医学的診断法 (SPECT) を用いて経時的に測定した。その結果、遅発性運動機能障害の発現に対して従来提示されている線条体ドパミンD<sub>2</sub>受容体密度の有意な増加を認めるとともに、ドパミントランスポータ密度の有意な減少を新たに見出した。特に、トランスポータで認められた変化は不可逆的であり、運動機能障害の発現とよく相関したことから、黒質-線条体路ドパミン神経の変性が、本副作用の発現に強く関与している可能性が示された。

2. ハロペリドールの一代謝物であるHPP<sup>+</sup>がドパミン神経細胞に対して毒性を有するとの報告をもとに、その体内動態を検討した。まず、ハロペリドールを投与した動物の組織中代謝物の分析、およびマイクロソームを用いた比較検討から、HPP<sup>+</sup>が脳内で検出されること、生体内では主に肝臓において生成することを見出した。そこでHPP<sup>+</sup>の分配係数を測定した結果、HPP<sup>+</sup>はある程度の脂溶性を有することが明らかとなり、また、HPP<sup>+</sup>を末梢から投与した動物において本分子は脳へと移行することを確認した。さらに脳内では、HPP<sup>+</sup>はニューロメラニンとの結合を介しドパミン神経細胞内に長時間保持されること、そこからの緩徐な放出によりドパミン神経細胞に対して選択的な毒性を惹起することが、両者を用いた結合実験により示唆された。

これらの研究成果から、HPP<sup>+</sup>が脳内ドパミン神経を選択的に変性させることにより、ハロペリドールの長期投与時において遅発性運動機能障害が発現する可能性が示された。

これに加え、運動機能障害が発現する以前にドパミン神経伝達機能の変化を認めた本研究の結果は、抗精神病薬の創薬段階における、核医学的手段を用いた錐体外路系副作用発現

予測の可能性を示唆しており、今後の新しい抗精神病薬の開発研究でのスクリーニングに有益な手法を提供し得ると考えられる。

## 引用文献

- 1) Seeman P., Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia., *Synapse*, **1**, 133–152 (1987).
- 2) McKenna P. J., Pathology, phenomenology and the dopamine hypothesis of schizophrenia., *Br. J. Psychiatry*, **151**, 288–301 (1987).
- 3) Breier A., Wolkowitz O. M., Doran A. R., Roy A., Boronow J., Hommer D. W. and Pickar D., Neuroleptic responsivity of negative and positive symptoms in schizophrenia., *Am. J. Psychiatry*, **144**, 1549–1555 (1987).
- 4) Farde L., Wiesel F-A., Halldin C. and Sedvall G., Central D<sub>2</sub>-dopamine receptor occupancy in schizophrenic patients treated with antipsychotic drugs., *Arch. Gen. Psychiatry*, **45**, 71–76 (1988).
- 5) Baron J. C., Martinot J. L., Cambon H., Boulenger J. P., Poirier M. F., Caillard V., Blin J., Huret J. D., Loc'h C. and Maziere B., Striatal dopamine receptor occupancy during and following withdrawal from neuroleptic treatment: correlative evaluation by positron emission tomography and plasma prolactin levels., *Psychopharmacology*, **99**, 463–472 (1989).
- 6) Farde L., Nordström A-L., Wiesel F-A., Pauli S., Halldin C. and Sedvall G., Positron emission tomographic analysis of central D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects., *Arch. Gen. Psychiatry*, **49**, 538–544 (1992).
- 7) Seeman P. and Talletico T., Antipsychotic drugs which elicit little or no parkinsonism bind more loosely than dopamine to brain D<sub>2</sub> receptors, yet occupy high levels of these receptors., *Mol. Psychiatry*, **3**, 123–134 (1998).
- 8) Bogerts B., Hantsch J. and Herzer M., A morphometric study of the dopamine-containing cell groups in the mesencephalon of normals, Parkinson patients, and schizophrenics., *Biol. Psychiatry*, **18**, 951–969 (1983).
- 9) Schultz W., Recent physiological and pathophysiological aspects of Parkinsonian movement disorders., *Life Sci.*, **34**, 2213–2223 (1984).
- 10) Scherman D., Desnos C., Darchen F., Pollak P., Javoy-Agid F. and Agid Y., Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging., *Ann. Neurol.*, **26**, 551–557 (1989).
- 11) Baldessarini R. J. and Tarsy D., Relationship of the actions of neuroleptic drugs to the

- pathophysiology of tardive dyskinesia., *Int. Rev. Neurobiol.*, **21**, 1–44 (1979).
- 12) Kuenstler U., Juhnhold U., Knapp W. H. and Gertz H. J., Positive correlation between reduction of handwriting area and D<sub>2</sub> dopamine receptor occupancy during treatment with neuroleptic drugs., *Psychiatry Res.*, **90**, 31–39 (1999).
  - 13) Kane J. M. and Smith J. M., Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959–1979., *Arch. Gen. Psychiatry*, **39**, 473–481 (1982).
  - 14) Miller C. H., Simioni I., Oberbauer H., Schwitzer J., Barnas C., Kulhanek F., Boissel K. E., Meise U., Hinterhuber H. and Fleischhacker W. W., Tardive dyskinesia prevalence rates during a ten-year follow-up., *J. Nerv. Ment. Dis.*, **183**, 404–407 (1995).
  - 15) Latimer P. R., Tardive dyskinesia: a review., *Can. J. Psychiatry*, **40**, 549–554 (1995).
  - 16) Adityanjee, Aderibigbe Y. A., Jampala V. C. and Mathews T., The current status of tardive dystonia., *Biol. Psychiatry*, **45**, 715–730 (1999).
  - 17) Laruelle M., Jaskiw G. E., Lipska B. K., Kolachana B., Casanova M. F., Kleinman J. E. and Weinberger D. R., D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor modulation in rat striatum and nucleus accumbens after subchronic and chronic haloperidol treatment, *Brain Res.*, **575**, 47–56 (1992).
  - 18) Lidow M. S. and Goldman-Rakic P. S., A common action of clozapine, haloperidol, and remoxipride on D<sub>1</sub>- and D<sub>2</sub>-dopaminergic receptors in the primate cerebral cortex., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 4353–4356 (1994).
  - 19) Szczepanik A. M. and Wilmot C. A., Effects of ritanserin on haloperidol-induced dopamine (D<sub>2</sub>) receptor up-regulation in the rat., *Neurosci. Lett.*, **231**, 91–94 (1997).
  - 20) Reader T. A., Ase A. R., Huang N., Hébert C. and Van Gelder N. M., Neuroleptics and dopamine transporters., *Neurochem. Res.*, **23**, 73–80 (1998).
  - 21) Klemm E., Grunwald F., Kasper S., Menzel C., Broich K., Danos P., Reichmann K., Krappel C., Rieker O., Briele B., Hotze A. L., Möller H. J. and Biersack H. J., [<sup>123</sup>I]IBZM SPECT for imaging of striatal D<sub>2</sub> dopamine receptors in 56 schizophrenic patients taking various neuroleptics., *Am. J. Psychiatry*, **153**, 183–190 (1996).
  - 22) Silvestri S., Seeman M. V., Negrete J. C., Houle S., Shammi C. M., Remington G. J., Kapur S., Zipursky R. B., Wilson A. A., Christensen B. K. and Seeman P., Increased dopamine D<sub>2</sub> receptor binding after long-term treatment with antipsychotics in humans: a clinical PET study., *Psychopharmacology*, **152**, 174–180 (2000).
  - 23) Wysowski D. K. and Baum C., Antipsychotic drug use in the United States, 1976–1985., *Arch. Gen. Psychiatry*, **46**, 929–932 (1989).
  - 24) Baldessarini R. J., “The Pharmacological Basis of Therapeutics,” 8<sup>th</sup> ed. by Goodman A. G.,

- Rall T. W., Nies A. S. and Taylor P., Pergamon Press, New York, 383–435 (1991).
- 25) Gerlach J. and Casey D. E., Tardive dyskinesia., *Acta. Psychiatr. Scand.*, **77**, 369–378 (1988).
  - 26) Chakos M. H., Mayerhoff D. I., Loebel A. D., Alvir J. M. J. and Lieberman J. A., Incidence and correlates of acute extrapyramidal symptoms in first episode of schizophrenia., *Psychopharmacol. Bull.*, **28**, 81–86 (1992).
  - 27) Beasley C. M., Dellva M. A., Tamura R. N., Morgenstern H., Glazer W. M., Ferguson K. and Tollefson G. D., Randomised double-blind comparison of the incidence of tardive dyskinesia in patients with schizophrenia during long-term treatment with olanzapine or haloperidol., *Br. J. Psychiatry*, **174**, 23–30 (1999).
  - 28) Fukuoka T., Nakano M., Kohda A., Okuno Y. and Matsuo M., The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model for neuroleptic-induced acute dystonia., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **58**, 947–953 (1997).
  - 29) Baldwin R. M., Zea-Ponce Y., Zoghbi S. S., Laurelle M., al-Tikriti M. S., Sybirska E. H., Malison R. T., Neumeier J. L., Milius R. A., Wang S., Stabin M., Smith E. O., Charney D. S., Hoffer P. B. and Innis R. B., Evaluation of the monoamine uptake site ligand [<sup>123</sup>I]methyl 3β-(4-iodophenyl)tropane-2β-carboxylate ([<sup>123</sup>I]β-CIT) in non-human primates: pharmacokinetics, biodistribution and SPECT brain imaging coregistered with MRI., *Nucl. Med. Biol.*, **20**, 597–606 (1993).
  - 30) Seibyl J. P., Marek K. L., Quinlan D., Sheff K., Zoghbi S., Zea-Ponce Y., Baldwin R. M., Fussell B., Smith E. O., Charney D. S., Hoffer P. B. and Innis R. B., Decreased single-photon emission computed tomographic [<sup>123</sup>I]β-CIT striatal uptake correlates with symptom severity in Parkinson's disease., *Ann. Neurol.*, **38**, 589–598 (1995).
  - 31) Seibyl J. P., Woods S. W., Zoghbi S. S., Baldwin R. M., Dey H. M., Goddard A. W., Zea-Ponce Y., Zupal G., Germine M., Smith E. O., Heninger G. R., Charney D. S., Kung H. F., Alavi A., Hoffer P. B. and Innis R. B., Dynamic SPECT imaging of dopamine D2 receptors in human subjects with iodine-123-IBZM., *J. Nucl. Med.*, **33**, 1964–1971 (1992).
  - 32) Verhoeff N. P., Kapucu O., Sokole-Busemann E., Van Royen E. A. and Janssen A. G., Estimation of dopamine D2 receptor binding potential in the striatum with iodine-123-IBZM SPECT: technical and interobserver variability., *J. Nucl. Med.*, **34**, 2076–2084 (1993).
  - 33) Kovacic B. and Domino E. F., A monkey model of tardive dyskinesia (TD): evidence that reversible TD may turn into irreversible TD., *J. Clin. Psychopharmacol.*, **2**, 305–307 (1982).
  - 34) Casey D. E., Tardive dyskinesia: reversible and irreversible., *Psychopharmacology Suppl.*, **2**, 88–97 (1985).

- 35) Ryan P.M., Epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of schizophrenia., *Am. J. Hosp. Pharm.*, **48**, 1271–1280 (1991).
- 36) Rollema H., Skolnik M., D'Engelbronner J., Igarashi K., Usuki E. and Castagnoli N. Jr., MPP<sup>+</sup>-like neurotoxicity of a pyridinium metabolite derived from haloperidol: *in vivo* microdialysis and *in vitro* mitochondrial studies., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 380–387 (1993).
- 37) Bloomquist J., King E., Wright A., Mytilineou C., Kimura K., Castagnoli K. and Castagnoli N. Jr., 1-Methyl-4-phenylpyridinium-like neurotoxicity of a pyridinium metabolite derived from haloperidol: cell culture and neurotransmitter uptake studies., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 822–830 (1994).
- 38) Andersen P. H., The dopaminergic uptake inhibitor GBR 12909: selectivity and molecular mechanism of action., *Eur. J. Pharmacol.*, **166**, 493–504 (1989).
- 39) Fleischhacker W. W., Roth S. D. and Kane J. M., The pharmacologic treatment of neuroleptic-induced akathisia., *J. Clin. Psychopharmacol.*, **10**, 12–21 (1990).
- 40) Rapoport A., Stein D., Schwartz M., Levin J., Stier S., Elizur A. and Rabey J. M., A trial of L-Deprenyl for the treatment of neuroleptic-induced parkinsonism., *J. Neural Transm.*, **106**, 911–918 (1999).
- 41) Marsden C. D., Tarsy D. and Baldessarini R. J., “Psychiatric Aspects of Neurologic Disease”, ed. by Benson D. F. and Blumer D., Grunne and Stratton, New York, 216–266 (1975).
- 42) Dewey K. J. and Fibiger H. C., The effects of dose and duration of chronic pimozide administration on dopamine receptor supersensitivity., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **322**, 261–270 (1983).
- 43) Jenner P., Rupniak N. M. and Marsden C. D., Differential alteration of striatal D-1 and D-2 receptors induced by the long-term administration of haloperidol, sulpiride or clozapine to rats., *Psychopharmacology Suppl.*, **2**, 174–181 (1985).
- 44) Ben-Shachar D., Livne E., Spanier I., Zuk R. and Youdim M. B., Iron modulates neuroleptic-induced effects related to the dopaminergic system., *Isr. J. Med. Sci.*, **29**, 587–592 (1993).
- 45) Kornhuber J., Riederer P., Reynolds G. P., Beckmann H., Jellinger K. and Gabriel E., <sup>3</sup>H-spiperone binding sites in post-mortem brains from schizophrenic patients: relationship to neuroleptic drug treatment, abnormal movements, and positive symptoms., *J. Neural Transm.*, **75**, 1–10 (1989).
- 46) Blin J., Baron J. C., Cambon H., Bonnet A. M., Dubois B., Loc'h C., Maziere B. and Agid Y.,



- Striatal dopamine D<sub>2</sub> receptors in tardive dyskinesia: PET study., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **52**, 1248–1252 (1989).
- 47) Knable M. B., Hyde T. M., Egan M. F., Tosayali M., Wyatt R. J. and Kleinman J. E., Quantitative autoradiography of striatal dopamine D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> and re-uptake sites in rats with vacuous chewing movements., *Brain Res.*, **646**, 217–222 (1994).
  - 48) Zea-Ponce Y., Baldwin R. M., Laruelle M., Wang S., Neumeyer J. L. and Innis R. B., Simplified multidose preparation of iodine-123-β-CIT: a marker for dopamine transporters., *J. Nucl. Med.*, **36**, 525–529 (1995).
  - 49) Kung M. P. and Kung H. F., Peracetic acid as a superior oxidant for preparation of [<sup>123</sup>I]IBZM: a potential dopamine D-2 receptor imaging agent., *J. Labeled Compd. Radiopharm.*, **27**, 691–700 (1989).
  - 50) Palacios J. M., Camps M., Cortés R. and Probst A., Mapping dopamine receptors in the human brain., *J. Neural Transm. Suppl.*, **27**, 227–235 (1988).
  - 51) De Keyser J., De Backer J. P., Ebinger G. and Vauquelin G., [<sup>3</sup>H]GBR 12935 binding to dopamine uptake sites in the human brain., *J. Neurochem.*, **53**, 1400–1404 (1989).
  - 52) Brücke T., Kornhuber J., Angelberger P., Asenbaum S., Frassine H. and Podreka I., SPECT imaging of dopamine and serotonin transporters with [<sup>123</sup>I]β-CIT. Binding kinetics in the human brain., *J. Neural Transm. Gen. Sect.*, **94**, 137–146 (1993).
  - 53) Asenbaum S., Brücke T., Pirker W., Podreka I., Angelberger P., Wenger S., Wöber C., Müller C. and Deecke L., Imaging of dopamine transporters with iodine-123-beta-CIT and SPECT in Parkinson's disease., *J. Nucl. Med.*, **38**, 1–6 (1997).
  - 54) Berger P., Janowsky A., Vocci F., Skolnick P., Schweri M. M. and Paul S. M., [<sup>3</sup>H]GBR-12935: a specific high affinity ligand for labeling the dopamine transport complex., *Eur. J. Pharmacol.*, **107**, 289–290 (1985).
  - 55) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J., Protein measurement with the folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275 (1951).
  - 56) Janowsky A., Berger P., Vocci F., Labarca R., Skolnick P. and Paul S. M., Characterization of sodium-dependent [<sup>3</sup>H]GBR-12935 binding in brain: a radioligand for selective labelling of the dopamine transport complex., *J. Neurochem.*, **46**, 1272–1276 (1986).
  - 57) Farfel G. M., Kleven M. S., Woolverton W. L., Seiden L. S. and Perry B. D., Effects of repeated injections of cocaine on catecholamine receptor binding sites, dopamine transporter binding sites and behavior in rhesus monkey., *Brain Res.*, **578**, 235–243 (1992).
  - 58) Andersen P. H., Comparison of the pharmacological characteristics of [<sup>3</sup>H]raclopride and

- [<sup>3</sup>H]SCH 23390 binding to dopamine receptors in vivo in mouse brain., *Eur. J. Pharmacol.*, **146**, 113–120 (1988).
- 59) Levant B., Grigoriadis D. E. and DeSouza E. B., Characterization of [<sup>3</sup>H]quinpirole binding to D<sub>2</sub>-like dopamine receptors in rat brain., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**, 929–935 (1992).
- 60) Tsuchihashi H., Sasaki T., Kojima S. and Nagatomo T., Binding of [<sup>3</sup>H]haloperidol to dopamine D<sub>2</sub> receptors in the rat striatum., *J. Pharm. Pharmacol.*, **44**, 911–914 (1992).
- 61) Asenbaum S., Brücke T., Pirker W., Podreka I., Angelberger P., Wenger S., Wöber C., Müller C. and Deecke L., Imaging of dopamine transporters with iodine-123-beta-CIT and SPECT in Parkinson's disease., *J. Nucl. Med.*, **38**, 1–6 (1997).
- 62) Laruelle M., Wallace E., Seibyl J., Baldwin R., Zea-Ponce Y., Zoghbi S., Neumeyer J., Charney D., Hoffer P. and Innis R., Graphical, kinetic, and equilibrium analyses of in vivo [<sup>123</sup>I]β-CIT binding to dopamine transporters in healthy human subjects., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **14**, 982–994 (1994).
- 63) Laruelle M., Abi-Dargham A., Van Dyck C. H., Rosenblatt W., Zea-Ponce Y., Zoghbi S. S., Baldwin R. M., Charney D. S., Hoffer P. B., Kung H. F. and Innis R. B., SPECT imaging of striatal dopamine release after amphetamine challenge., *J. Nucl. Med.*, **36**, 1182–1190 (1995).
- 64) Malison R. T., McCance E., Carpenter L. L., Baldwin R. M., Seibyl J. P., Price L. H., Kosten T. R. and Innis R. B., [<sup>123</sup>I]β-CIT SPECT imaging of dopamine transporter availability after mazindol administration in human cocaine addicts., *Psychopharmacology*, **137**, 321–325 (1998).
- 65) Laruelle M., Abi-Dargham A., Van Dyck C., Gil R., D'Souza D. C., Krystal J., Seibyl J., Baldwin R. and Innis R., Dopamine and serotonin transporters in patients with schizophrenia: an imaging study with [<sup>123</sup>I]β-CIT., *Biol. Psychiatry*, **47**, 371–379 (2000).
- 66) Anand A., Verhoeff P., Seneca N., Zoghbi S. S., Seibyl J. P., Charney D. S. and Innis R. B., Brain SPECT imaging of amphetamine-induced dopamine release in euthymic bipolar disorder patients., *Am. J. Psychiatry*, **157**, 1108–1114 (2000).
- 67) Laruelle M., Baldwin R. M., Malison R. T., Zea-Ponce Y., Zoghbi S. S., Al-Tikriti M. S., Sybirski E. H., Zimmermann R. C., Wisniewski G., Neumeyer J. L., Milius R. A., Wang S., Smith E. O., Roth R. H., Charney D. S., Hoffer P. B. and Innis R. B., SPECT imaging of dopamine and serotonin transporters with [<sup>123</sup>I]β-CIT: pharmacological characterization of brain uptake in nonhuman primates., *Synapse*, **13**, 295–309 (1993).
- 68) Kapur S. and Seeman P., Antipsychotic agents differ in how fast they come off the dopamine D<sub>2</sub> receptors. Implications for atypical antipsychotic action., *J. Psychiatry Neurosci.*, **25**,

- 161–166 (2000).
- 69) Chivers J. K., Hall M. D., Kelly E., Jenner P. and Marsden C. D., Dopamine receptor binding sites in the rat superior colliculus., *J. Pharm. Pharmacol.*, **36**, 484–488 (1984).
  - 70) Komulainen H., Anttonen P., Tuomisto J. and Tuomisto L., Effect of transition or heavy metals on [<sup>3</sup>H]haloperidol binding in rat striatal membranes in vitro., *Eur. J. Pharmacol.*, **114**, 113–119 (1985).
  - 71) Robinson T. E., Mocsary Z., Camp D. M. and Whishaw I. Q., Time course of recovery of extracellular dopamine following partial dopamine to the nigrostriatal dopamine system., *J. Neurosci.*, **14**, 2687–2696 (1994).
  - 72) Garris P. A., Walker Q. D. and Wightman R. M., Dopamine release and uptake rates both decrease in the partially denervated striatum in proportion to the loss of dopamine terminals., *Brain Res.*, **753**, 225–234 (1997).
  - 73) Usuki E., Van der Schyf C. J. and Castagnoli N. Jr., Metabolism of haloperidol and its tetrahydropyridine dehydration product HPTP., *Drug Metab. Rev.*, **30**, 809–826 (1998).
  - 74) Bloomquist J., King E., Wright A., Mytilineou C., Kimura K., Castagnoli K. and Castagnoli N. Jr., 1-Methyl-4-phenylpyridinium-like neurotoxicity of a pyridinium metabolite derived from haloperidol: cell culture and neurotransmitter uptake studies., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **270**, 822–830 (1994).
  - 75) Tipson K. F. and Singer T. P., Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds., *J. Neurochem.*, **61**, 1191–1206 (1993).
  - 76) Gorrod J. W. and Fang J., On the metabolism of haloperidol., *Xenobiotica*, **23**, 495–508 (1993).
  - 77) Igarashi K. and Castagnoli N. Jr., Determination of the pyridinium metabolite derived from haloperidol in brain tissue, plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection., *J. Chromatograph.*, **579**, 277–283 (1992).
  - 78) Chiueh C. C., Burns R. S., Markey S. P., Jacobowitz D. M. and Kopin I. J., Primate model of parkinsonism: selective lesion of nigrostriatal neurons by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine produces an extrapyramidal syndrome in rhesus monkeys., *Life Sci.*, **36**, 213–218 (1985).
  - 79) Di Monte D. A., McCormack A., Petzinger G., Janson A. M., Quik M. and Langston W. J., Relationship among nigrostriatal denervation, parkinsonism, and dyskinesias in the MPTP primate model., *Mov. Disord.*, **15**, 459–466 (2000).
  - 80) Bezard E., Dovero S., Prunier C., Ravenscroft P., Chalon S., Guilloteau D., Crossman A. R., Bioulac B., Brotchie J. M. and Gross C. E., Relationship between the appearance of symptoms

- and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease., *J. Neurosci.*, **21**, 6853–6861 (2001).
- 81) Saporito M. S., Heikkila R. E., Youngser S. K., Nicklas W. J. and Herbert M. G., Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium analogs in cultured neurons: relationship to the dopamine uptake system and inhibition of mitochondrial respiration., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**, 1400–1409 (1991).
- 82) Subramanyam B., Woolf T. and Castagnoli N. Jr., Studies on the in vitro conversion of haloperidol to a potentially neurotoxic pyridinium metabolite., *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 123–128 (1991).
- 83) Halliday G. M., Pond S. M., Cartwright H., McRitchie D. A., Castagnoli N. Jr. and Van der Schyf C. J., Clinical and neuropathological abnormalities in baboons treated with HPTP, the tetrahydropyridine analog of haloperidol., *Exp. Neurol.*, **158**, 155–163 (1999).
- 84) Igarashi K., Kasuya F., Fukui M., Usuki E. and Castagnoli N. Jr., Studies on the metabolism of haloperidol (HP): the role of CYP3A in the production of the neurotoxic pyridinium metabolite HPP<sup>+</sup> found in rat brain following ip administration of HP., *Life Sci.*, **57**, 2439–2446 (1995).
- 85) Usuki E., Pearce R., Parkinson A. and Castagnoli N. Jr., Studies on the conversion of haloperidol and its tetrahydropyridine dehydration product to potentially neurotoxic pyridinium metabolites by human liver microsomes., *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 800–806 (1996).
- 86) Fang J., Baker G. B., Silverstone P. H. and Coutts R. T., Involvement of CYP3A4 and CYP2D6 in the metabolism of haloperidol., *Cell. Mol. Neurobiol.*, **17**, 227–233 (1997).
- 87) Subramanyam B., Rollema H., Woolf T., Whiteford H. A., Fouda H. G. and Castagnoli N. Jr., Identification of potentially neurotoxic pyridinium metabolite of haloperidol in rats., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 238–244 (1990).
- 88) Avent K. M., Usuki E., Eyles D. W., Keeve R., Van der Schyf C. J., Castagnoli N. Jr. and Pond S. M., Haloperidol and its tetrahydropyridine derivative (HPTP) are metabolized to potentially neurotoxic pyridinium species in the baboon., *Life Sci.*, **59**, 1473–1482 (1996).
- 89) Subramanyam B., Pond S. M., Eyles D. W., Whiteford H. A., Fouda H. G. and Castagnoli N. Jr., Identification of potentially neurotoxic pyridinium metabolite in the urine of schizophrenic patients treated with haloperidol., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 573–578 (1991).
- 90) Avent K. M., Riker R. R., Fraser G., Van der Schyf C. J., Usuki E. and Pond S. M., Metabolism of haloperidol to pyridinium species in patients receiving high doses intravenously: is HPTP an intermediate?, *Life Sci.*, **61**, 2383–2390 (1997).

- 91) Kornhuber J., Schultz A., Wiltfang J., Meineke I., Gleiter C. H., Zöchling R., Boissl K-W., Leblhuber F. and Riederer P., Persistence of haloperidol in human brain tissue., *Am. J. Psychiatry*, **156**, 885–890 (1999).
- 92) Eyles D. W., Avent K. M., Stedman T. J. and Pond S. M., Two pyridinium metabolites of haloperidol are present in the brain of patients at post-mortem., *Life Sci.*, **60**, 529–534 (1997).
- 93) Gorrod J. W., Temple D. J. and Beckett A. H., The metabolism of *N*-ethyl-*N*-methylaniline by rabbit liver microsomes: the measurement of metabolites by gas-liquid chromatography., *Xenobiotica*, **5**, 453–463 (1975).
- 94) Fang J. and Gorrod J. W., Dehydration is the first step in the bioactivation of haloperidol to its pyridinium metabolite., *Toxicol. Lett.*, **59**, 117–123 (1991).
- 95) Saji H., Tokui T., Nakatsuka I., Saiga A., Magata Y., Shiba K., Yoshitake A. and Yokoyama A., Evaluation of *N*-alkyl derivatives of radioiodinated spiperone as radioligands for *in vivo* dopamine D<sub>2</sub> receptor studies: effects of lipophilicity and receptor affinity on the *in vivo* biodistribution., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 165–169 (1992).
- 96) Oldendorf W. H., Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard., *Brain Res.*, **24**, 372–376 (1970).
- 97) Strobel H. W., Thompson C. M. and Antonovic L., Cytochrome P450 in brain: function and significance., *Curr. Drug Metab.*, **2**, 199–214 (2001).
- 98) Riachi N. J., LaManna J. C. and Harik S. I., Entry of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine into the rat brain., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **249**, 744–748 (1989).
- 99) Shimizu K., Ohtaki K., Matsubara K., Aoyama K., Uezono T., Saito O., Suno M., Ogawa K., Hayase N., Kimura K. and Shiono H., Carrier-mediated processes in blood–brain barrier penetration and neural uptake of paraquat., *Brain Res.*, **906**, 135–142 (2001).
- 100) Dischino D. D., Welch M. J., Kilbourn M. R. and Raichle M. E., Relationship between lipophilicity and brain extraction of C-11-labeled radiopharmaceuticals., *J. Nucl. Med.*, **24**, 1030–1038 (1983).
- 101) Woltman T. A., Hulce M. and Reidelberger R. D., Relative blood-brain barrier permeabilities of the cholecystokinin receptor antagonists devazepide and A-65186 in rats., *J. Pharm. Pharmacol.*, **51**, 917–920 (1999).
- 102) Crispell K. R., Porter B. and Nieset R. T., Studies of plasma volume using human serum albumin tagged with radioactive iodine., *J. Clin. Invest.*, **29**, 513–516 (1950).
- 103) Stępień K. B. and Wilczok T., Studies of the mechanism of chloroquine binding to synthetic dopa-melanin., *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3359–3365 (1982).

- 104) Pileblad E. and Carlsson A., Studies on the acute and long-term changes in dopamine and noradrenaline metabolism in mouse brain following administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)., *Pharmacol. Toxicol.*, **62**, 213–222 (1988).
- 105) González-Polo R. A., Mora A., Clemente N., Sabio G., Centeno F., Soler G. and Fuentes J. M., Mechanisms of MPP<sup>+</sup> incorporation into cerebellar granule cells., *Brain Res. Bull.*, **56**, 119–123 (2001).
- 106) Siebert G. A., Pond S. M. and Bryan-Lluka L. J., Further characterization of the interaction of haloperidol metabolites with neurotransmitter transporters in rat neuronal cultures and in transfected COS-7 cells., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **361**, 255–264 (2000).
- 107) Fang J., Zuo D. and Yu P. H., Comparison of cytotoxicity of a quaternary pyridinium metabolite of haloperidol (HP<sup>+</sup>) with neurotoxin N-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) towards cultured dopaminergic neuroblastoma cells., *Psychopharmacology*, **121**, 373–378 (1995).
- 108) Lydén A., Bondesson U., Larsson B. S. and Lindquist N. G., Melanin affinity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine, an inducer of chronic parkinsonism in humans., *Acta. Pharmacol. Et. Toxicol.*, **53**, 429–432 (1983).
- 109) D'Amato R. J., Benham D. F. and Snyder S. H., Characterization of the binding of N-methyl-4-phenylpyridine, the toxic metabolite of the parkinsonian neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, to neuromelanin., *J. Neurochem.*, **48**, 653–658 (1987).
- 110) D'Amato R. J., Alexander G. M., Schwartzman R. J., Kitt C. A., Price D. L. and Snyder S. H., Evidence for neuromelanin involvement in MPTP-induced neurotoxicity., *Nature*, **327**, 324–326 (1987).
- 111) Herrero M. T., Hirsch E. C., Kastner A., Ruberg M., Luquin M. R., Laguna J., Javoy-Agid F., Obeso J. A. and Agid Y., Does neuromelanin contribute to the vulnerability of catecholaminergic neurons in monkeys intoxicated with MPTP?, *Neuroscience.*, **56**, 499–511 (1993).

## 謝 辞

本研究の終わりに臨み、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 佐治 英郎 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

同時に、本研究において懇切なる御指導と御教示を戴きました京都大学医学部附属病院 飯田 靖彦 助手に心から厚く御礼申し上げます。

本研究全般にわたり、多くの有益なご助言を戴きました浜松医科大学 間賀田 泰寛 教授、京都大学大学院薬学研究科 ホリウチ スズキ カズコ 助手、京都大学大学院医学研究科 向高弘 助手、京都府立医科大学 清野 泰 助手、千葉大学大学院薬学研究院 荒野 泰 教授、福井医科大学 藤林 靖久 教授にそれぞれ謹んで御礼申し上げます。

さらに、コモンマーモセットを用いた実験を進めるに当たり多大なる御協力を戴きました加藤 弘太 修士、住友化学工業株式会社 福岡 俊文 修士、祝迫 隆行 学士並びに生物環境研究所 応用生物グループ大動物トキシコロジーチームの方々、細胞実験について御助言を戴きました衣斐 督和 博士に謹んで感謝の意を表します。

また、共に実験を進め、御協力を戴きました中川 雅喜 修士、小川 美香子 修士、北村 陽二 修士、上田 真史 学士、金川 直樹 学士、富永 亜希子 学士、討論に参加して戴きました京都大学大学院薬学研究科病態機能分析学分野の方々、 $^{123}\text{I}]\text{NaI}$ を提供して戴きました日本メジフィジックス社、質量分析を施行して戴きました秋元 直茂 博士、元素分析を施行して戴きました京都大学微量元素分析センターの方々にそれぞれ深く感謝致します。