

# 線条体内スルピリド濃度変化とカタレプシーとの関係

— In vivo voltammetry を用いた研究 —

新潟大学大学院医学研究科分子神経生物学分野（指導者：那波宏之教授）

堀川 洋

Close Correlation with  
Changes in Intrastratial Concentration of Sulpiride and in Catalepsy  
as Studied by In Vivo Electrochemistry

Hiroshi P.M. HORIKAWA

*Department of Molecular Neurobiology, Brain Research  
Institute, Niigata University  
(Supervisor: Prof. Hiroyuki NAWA)*

To investigate the relationship between striatal dopaminergic function and behavior, we simultaneously examined the intrastratial kinetics of the dopamine antagonist sulpiride and cataleptic behavior using in vivo voltammetry. First, we confirmed that sulpiride, a D2 antagonist, could be measured in vitro with this technique. Sulpiride current intensity was measured when the potential was increased from 750 to 850 mV. Then sulpiride was administered into the striatum of freely moving rats. Sulpiride levels increased and remained high for more than 3 h. Cataleptic behavior also continued for 3 h. The duration of cataleptic behavior correlated well with that increase in sulpiride. Sulpiride kinetics was compared with that of dopamine and 1-methyl-1, 4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>). Dopamine and MPP<sup>+</sup> were administered intrastratially and were taken up into dopaminergic neurons within 1 h after the end of injection. These findings suggest that sulpiride is not taken up or metabolized.

---

Key words: In vivo voltammetry, dopamine, rat, striatum, D2 antagonist, behavior

ドーパミン, ラット, 線条体, D2 拮抗薬, 行動

---

Reprint requests to: Hiroshi P.M. HORIKAWA,  
Department of Molecular Neurobiology,  
Brain Research Institute, Niigata University,  
1 Asahimachi, Niigata 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町  
新潟大学脳研究所分子神経生物学分野  
堀川 洋

## I. はじめに

ドーパミン (DA) 作動性ニューロンは、線条体、中間皮質、嗅結節下垂体領域の主に3領域に投射しているが、ヒトにおいて黒質線条体系 DA ニューロンに変性をきたすと、パーキンソン病において見られる様な運動の緩慢さを引き起こす。これと類似した症状が、DA 特異的神経毒を投与した動物において観察されている<sup>1)-3)</sup>。また DA 拮抗薬も、ヒトにおいてパーキンソン病様の症状を起し、齧歯類においてはこの薬物がカタレプシー様症状を引き起こすことが知られている<sup>4)-6)</sup>。マイクロダイアリシスを用いた実験によると、DA 拮抗薬の1つであるスルピリドがカタレプシーを引き起こし、線条体における DA の放出と、それに引き続く DA 代謝物である3, 4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) の濃度が上昇することが報告されている<sup>4)</sup>。いかなるメカニズムでスルピリド誘導性のカタレプシーが引き起こされるのか、それは細胞に対するスルピリド自身の直接的効果であろうか、それとも DA や DOPAC の放出に関係した間接的な効果なのであろうか。in vivo レベルにおけるスルピリド自身の薬物動態は、これまで計測された報告はなかった。また、カタレプシー行動と線条体細胞外に投与されたスルピリドの濃度との関係についても調べられていなかった。

そのため本研究においては、In vivo voltammetry 法を用いて、まずスルピリドが in vitro において計測可能であるかどうかを検討し、そして in vivo において、ラット線条体にスルピリドを投与し、細胞外液中スルピリド濃度の経時変化とカタレプシー変化の関係を比較検討した。

## II. 材料と方法

### 1) 動物の準備

被験動物作成は、以前に報告している方法に従った<sup>8)</sup>。まず、オスの Sprague-Dawley ラット ( $n=10$ , 350~450 g) を、pentobarbital 麻酔下 (50 mg/kg, 腹腔内注射) で、脳定位固定装置に固定した。測定電極は炭素繊維 (直径 7  $\mu\text{m}$ ) をブレンダーで引いたガラス管に挿入して作成したもので、右側の線条体 (bregma より吻側へ 0.5 mm, 外側へ 3.0 mm, 硬膜下 5.0 mm) に刺入しセメント固定した。参照電極 (Ag/AgCl) は硬膜上に固定し、修飾電極 (ねじ) は、頭蓋骨に固定した。薬物注入用ステンレス製のカニューラ (外径 0.6 mm) は、記録電極と同側の約 1 mm 前方で5度傾けて脳表より 2.5

mm 挿入した。手術後、少なくとも4週間の回復を待ってから薬物投与実験が行われた。

### 2) 電気化学的計測

Cyclic voltammetry (-400 mV から 1000 mV, 25 mV ステップ) によりスルピリドに特異的な酸化電位を調べた (図 1)。その結果からスルピリド濃度を決定するため以下のように電圧が加えられた。まず三角波 ( $\pm 1350$  mV, 傾き 10 V/s) により前処理され、2秒後に3段階のステップ状パルスを加えた (図 2)。第1ステップは、550 mV から 650 mV へ 660 ms 間電圧を上昇させその結果生ずる電流変化を測定した。第2ステップは、750 mV を 1160 ms, そして第3ステップは、850 mV を 162 ms 与えた。スルピリドはこの最後のパルスで 2 ms 後に 160 ms 間電流測定し、それを加算平均した。

DA と DOPAC 濃度は、以前に報告されたように、それぞれ 150 mV から 250 mV と 250 mV から 350 mV への電位変化で決定された<sup>9)</sup>。ホモバニリン酸 (HVA) 濃度は、電位を 350 mV から 450 mV 変化させた時に計測し、MPP<sup>+</sup> に関しては、550 mV から 650 mV への段階において決定された。それぞれの物質濃度は3分毎に測定した。なおこれらの測定電圧が神経活動には影響を与えないことはすでに報告されている<sup>10)</sup>。

### 3) 薬物投与

スルピリド (藤沢薬品), DA (Sigma), 1-methyl-1, 4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), ノミフェンシン (RBI) は、窒素ガスで置換した生理食塩水に最終濃度  $10^{-3}$  M になるように溶解した。すべての薬物は記録電極から約 1 mm の場所に固定したカニューラを通して投与された。注入された薬物は、記録電極に到達するまでにおよそ 1,000 倍に希釈され、結果的に記録電極では、 $10^{-6}$  モル濃度レベルで測定された。薬物注入用カニューラ内筒は、ステンレス管 (外径 0.3 mm) にシリカチューブ (外径 0.15 mm) を挿入して作成した。その長さは、脳にすでに挿入されている外筒の長さに合わせて、シリカチューブをステンレスカニューラの前端から 2.5 mm 突出させた。薬物投与はダミーの内側カニューラを取り除いた後に、少なくとも薬物投与の30分以上前に内筒を挿入した。7.5  $\mu\text{l}$  の薬物を、自動注入装置を用いて線条体内に30分かけて注入した。

### 4) 行動観察

カタレプシー変化はバーテストによって観察し、その継続時間を計測した。水平に底面から 10 cm の所にバーのかかったアクリル製のケージ (25×30×25 cm) にあらかじめ移されている動物の前肢をバーの上に静かに置

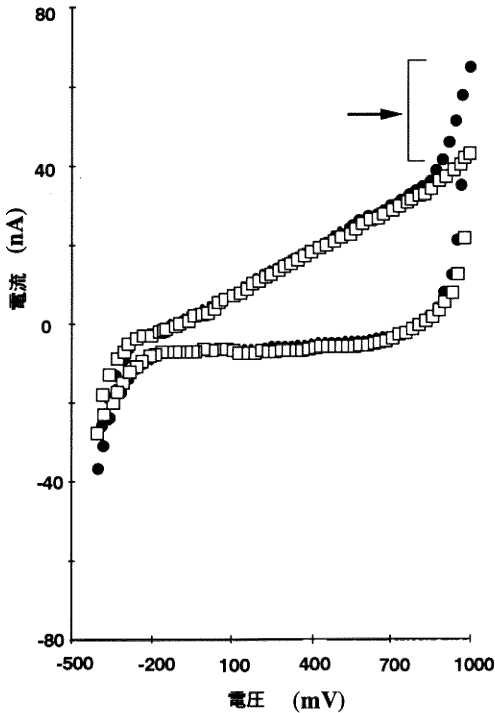


図 1  $10^{-4}$  M のスルピリド (●) と PBS (□) の Cyclic voltammogram.

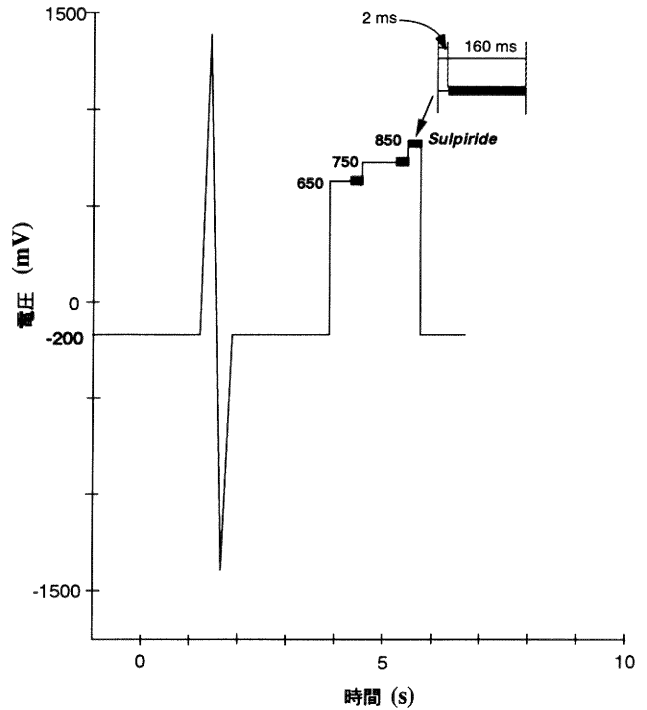


図 2 スルピリド濃度を測定するために与えた電圧と時間の図解. 電流強度は、太線によって示されている時間に測定した.

き、動物のこの姿勢の持続時間を計測した。行動の評価は、Imperato and Di Chiara (1985) の方法に従ったが、その評価は4段階に分けられ、0 = 0~14秒, 1 = 15~29秒, 2 = 30~59秒, 3 = 60秒以上とした。

### Ⅲ. 結 果

#### 1) In vitro におけるスルピリドの電気化学的測定

Cyclic voltammogram より、775 mV 以上の電圧をかけた時にスルピリドは酸化され、電流変化が測定できた (図 1)。図 3 に示したように in vitro において、スルピリドの電流強度は、加えられたスルピリドの濃度に依存してほぼ直線的に増大し、最小 10 nM のスルピリドが測定できることを確認した。DOPAC と HVA 電流強度はスルピリドの存在に影響を受けず濃度依存的に増加した (図 4, 図 5)。これに対し、DA の電流強度はスルピリドの存在によって影響を受け、スルピリド存在下では DA の電流強度の正確な測定を妨げた (データ示さず)。

#### 2) スルピリドの線条体内における薬物動態

$10^{-3}$  M のスルピリドを 7.5  $\mu$ l, 30分間かけてラットの線条体に注入した。スルピリドの濃度は、注入終了後約20分 ( $21 \pm 3$ 分,  $n=5$ ) でピークに達し3時間から5時間後に投与前のレベルに戻った (図 6)。この回復までの時間は、線条体内に注入した DA や MPP<sup>+</sup> では1時間で回復するのに比較すると明らかに長時間にわたっていた (図 7,  $P < 0.005$ ,  $t$ 検定)。また、 $10^{-3}$  M の MPP<sup>+</sup> と、この取り込み阻害薬であるノミフェンシンを線条体内に同時に注入したところ、MPP<sup>+</sup> 濃度は2時間以上に渡って前値を越えていた (図 8)。この時の回復時間は、MPP<sup>+</sup> 単独の時 (< 1時間;  $n=5$ ) よりも有意に長時間であった ( $P < 0.01$ )。

#### 3) スルピリドの細胞外濃度とカタレプシーとの関係

$10^{-3}$  M のスルピリドを線条体内に注入するとカタレプシー変化が出現した。この持続時間は、細胞外液中のスルピリド濃度との間に相関関係が認められた。カタレ

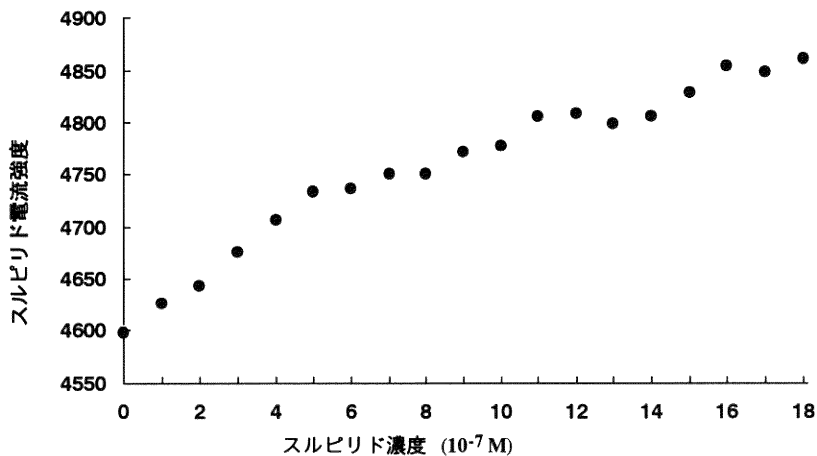


図3 in vitro においてスルピリド電流強度変化は、濃度変化を示した。

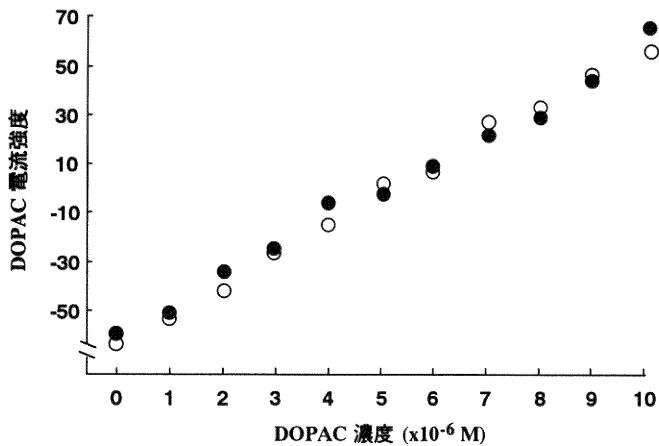


図4 DOPAC 電流強度は、スルピリドの存在によって影響を受けない。PBS中(○)もしくは、 $10^{-4}$  M のスルピリド(●) の存在中で、DOPAC 濃度は  $10^{-6}$  M から  $10^{-5}$  M まで、濃度依存的に増加した。

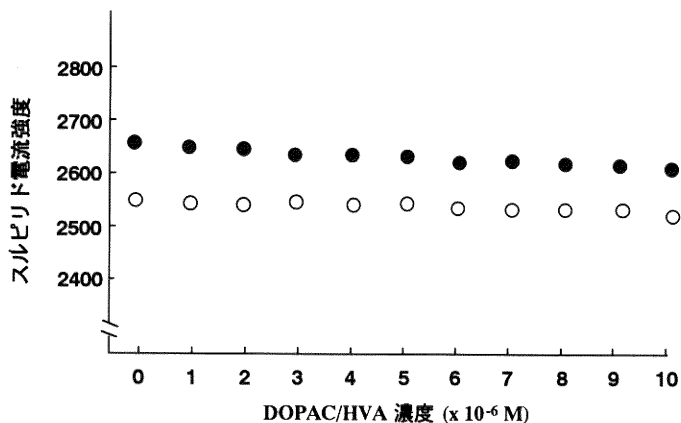


図5 スルピリド電流強度に対する DOPAC と HVA の影響。スルピリド電流強度は DOPAC (○) や HVA (●) の存在によって影響を受けない。

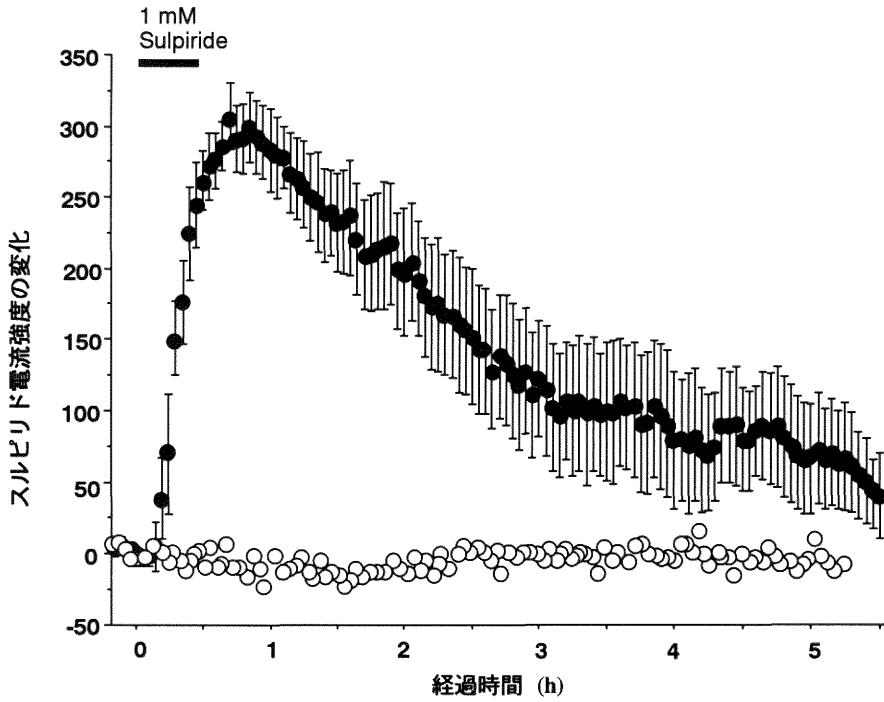


図 6  $10^{-3}$  M のスルピリド (●) または、生理食塩水 (○) を線条体内に投与した時 (太線) に測定したスルピリド電流強度の変化の平均値.

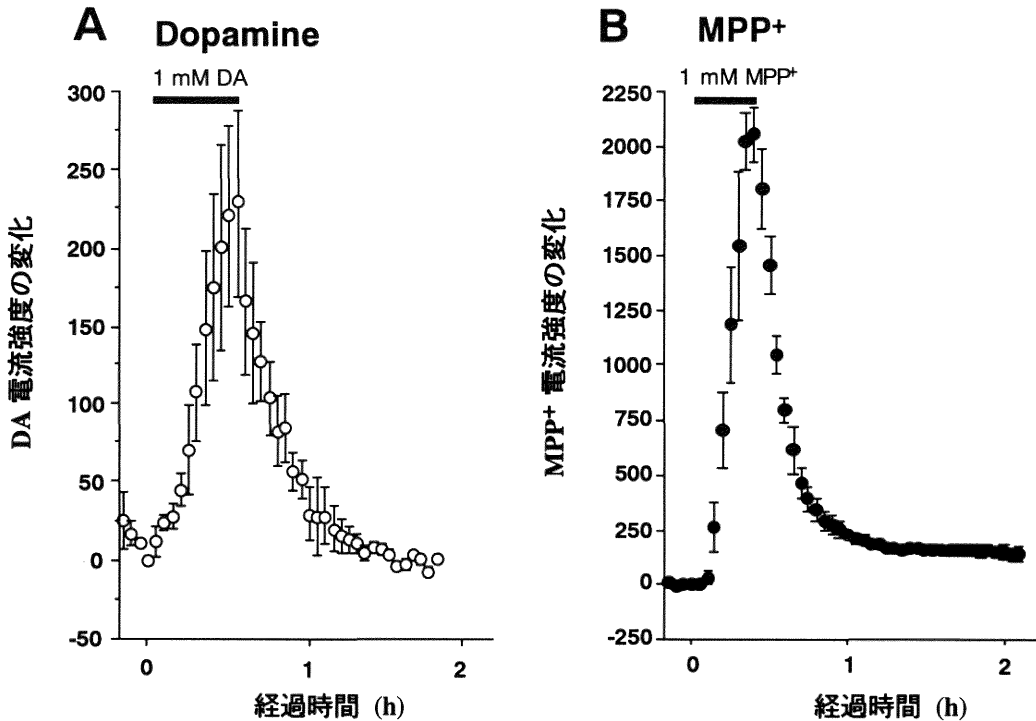


図 7  $10^{-3}$  M の DA (A) または MPP<sup>+</sup> (B) を線条体内に投与した時 (太線) に測定したそれぞれの電流強度変化の平均値.

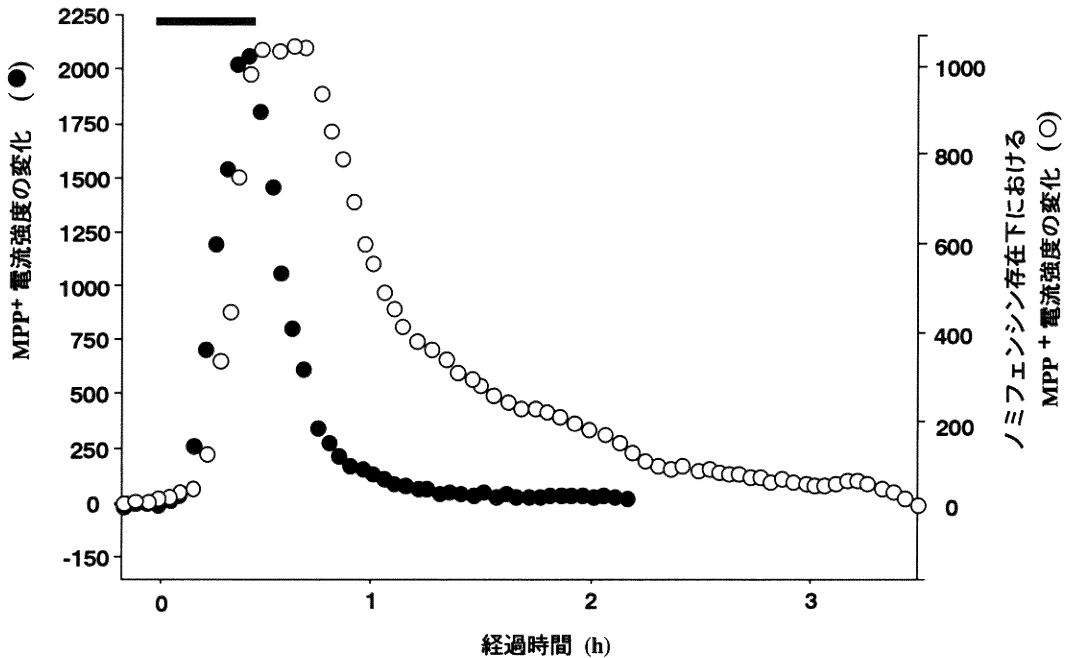


図 8 MPP<sup>+</sup> のみ (●) と、MPP<sup>+</sup> とノミフェンシン (○) を線条体内に同時投与した時 (太線) との、MPP<sup>+</sup> 電流強度変化の比較.

ブシーは、注入開始後約45分 ( $45 \pm 15$  min) で現れ、注入終了後約60分から90分後にピークに達した。カタレブシー変化は、このスルピリド濃度が投与前のレベルにもどるまで保持されていた (図 9)。図 10 に示されたようにカタレブシー変化の持続時間は、細胞外液中のスルピリド濃度の変化によく相関していた ( $r=0.984$ ,  $P < 0.001$ ; Pearson's 相関係数)。

#### IV. 考 察

本実験で *in vitro* において、スルピリドが本システムにより測定可能であり、それが DOPAC や HVA の存在には影響を受けず測定できることがわかった。そこで、スルピリドを線条体内に注入し、スルピリドの薬物動態について検討し、スルピリドによって引き起こされたカタレブシーの時間変化との関係について比較、検討を行った。図 8 に示したように、ラットにおけるカタレブシー変化は線条体に投与したスルピリドの細胞外液中における濃度に有意に相関して変化していることがわかった。また、スルピリド投与による生体内 DOPAC 濃度の変化についても調べたが、DOPAC の合成は認められたものの、カタレブシーとの相関は認められなかつ

た (データ示さず)。このことはカタレブシーがスルピリドの直接的な受容体への阻害によって引き起こされたことが推測された。しかしここで、カタレブシーはスルピリド濃度の上昇から約30分遅れて出現していることに疑問が生ずるかもしれない。この遅れの原因として、注入されたスルピリドの拡散の時間による影響が考えられる。おそらく投与されたスルピリドは、注入部位の近傍では直ちに上昇するが、スルピリドが行動に効果を及ぼすためには十分広範囲にわたって拡散し続ける必要があり、またこれらの部位に十分な濃度の上昇が必要なために、この時間の遅れが生じたと考えられた。

また、図 6 に示したように線条体内に注入したスルピリドは、開始後すぐに増加し長時間にわたって細胞外液中に存在し続けた。この特異的な時間経過のメカニズムを調べるために細胞内へ取り込まれ、代謝も受ける DA と、取り込みのみ行なわれる MPP<sup>+</sup> を注入してそれぞれの時間経過を調べた。これらの細胞外液中濃度は注入終了後、両者とも直ちに減少していった<sup>8)11)13)</sup>。これらの結果から、スルピリドが細胞外液中に長時間存在し続ける事理由として以下のようなことが考えられた。まず投与された薬物が細胞外液中から除去される機構には、

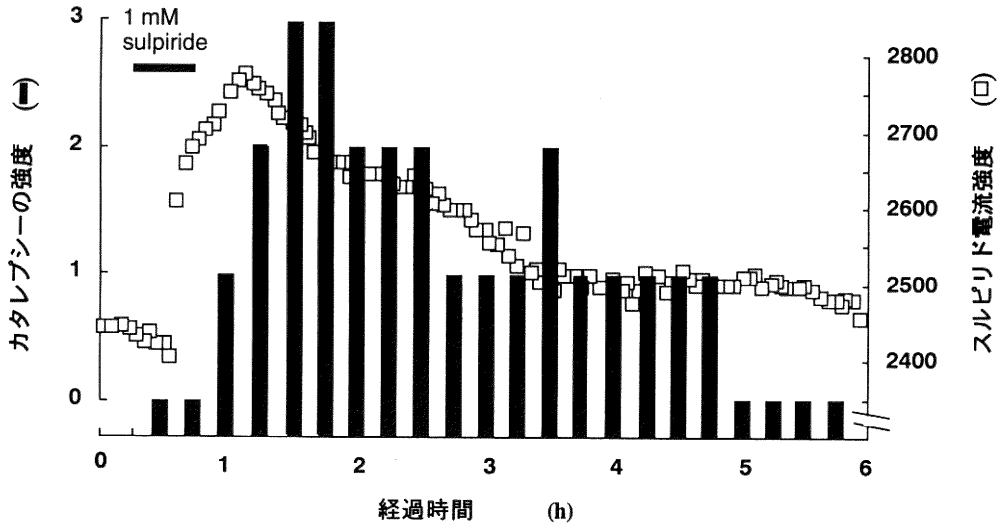


図 9 カタレプシー持続時間と細胞外スルピリド濃度変化.

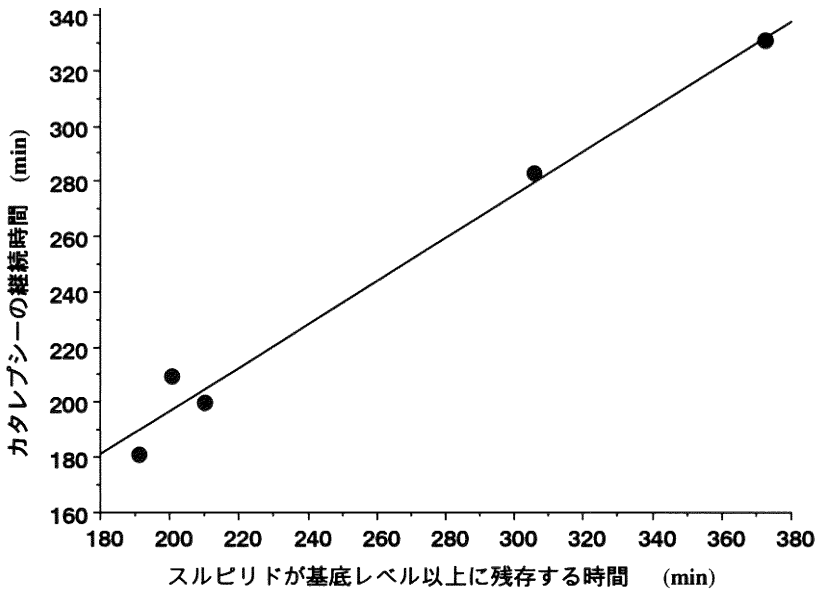


図 10 カタレプシー持続時間と基底値以上のスルピリド濃度が持続している時間との相関.

拡散，代謝，細胞内への取り込みの3つの機構が必要である。DA や MPP<sup>+</sup> はドーパミントランスポーターによって取り込まれることが知られている<sup>(11)(13)–15)</sup>。一方，スルピリドは細胞内への取り込みがなく，また，代謝もされないことが報告されている<sup>16)</sup>。本実験では最終代謝物である MPP<sup>+</sup> を取り込み阻害薬であるノミフェン

シンと同時に注入した場合，MPP<sup>+</sup> 単独で注入した場合と比べて細胞外液中に有意に長く残存し続けることが示された。これらのことより，スルピリドの濃度は，それ自身が代謝もされず，また細胞内にも取り込みを受けないため，そのほとんどが細胞外液中に維持されて長時間存在し続けたのではないかと考えられた。

モノアミン神経系は、様々な行動に対して重要な役割を担っているが、このシステムの機能低下は、パーキンソン病などの運動障害を引き起こし、また分裂病、鬱病といった多くの精神疾患の原因にも関与していると考えられている。そのため多くの DA 作動薬や阻害薬は、これらの症状に効果的である。しかしながら、臨床研究において、これらの薬物が種々の脳内部位の細胞外液中において、いかなる濃度及び時間経過を示すかほとんど調べられていない。これらの細胞外液中の濃度を調べることは実際の薬理学的効果を追究する上で極めて重要である。ホモジェネート脳を用いた測定では行動変化との関係を調べるうえで問題が残る。本実験では In vivo voltammetry を用いてスルピリドのような取り込みも代謝もされない薬物は、極めて長時間にわたって脳内細胞外液中に残存し続け、またこの物質は行動変化と強い相関を示すことがわかった。現在、種々の DA 拮抗剤が臨床上使用されているが、実際にその脳内細胞外液中濃度を動物実験で調べることは、薬理作用の解明や新薬開発に重要であり、今後とも十分検討されるべき方法であろう。

#### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、御校閲いただきました那波宏之教授、また直接御指導、御助言をいただきました順天堂大学・医・第一生理、中里泰三博士、彦坂興秀教授に心から感謝いたします。

#### 参 考 文 献

- 1) Heikkila, R.E., Manzino, L., Cabbat, F.S. and Duvoisin, R.C.: Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 5, 6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature*, **311**: 467~469, 1984.
- 2) Langston, J.W., Irwin, I. and Langston, E.B.: Pargylin prevents MPTP-induced Parkinsonism in primates. *Science*, **225**: 1480~1482, 1984.
- 3) Bradbury, A.J., Costall, B., Domeney, A.M., Jenner, P., Kelly, M.E., Mersden, C.D. and Naylor, R.J.: 1-Methyl-4-phenylpyridine is neurotoxic to the nigrostriatal dopamine pathway. : *Nature*, **319**: 56~57, 1986.
- 4) Fujiwara, H.: Comparative studies of sulpiride and classical neuroleptics on induction of catalepsy, locomotor activity, and brain dopamine metabolism in mice. : *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **41**: 301~308, 1992.
- 5) Ossowska, K., Karcz-Kubicha, M., Wardas, J., Krezolek, A. and Wolfarth, S.: Zona incerta-lateral hypothalamus as an output structure for impulses involved in neuroleptic drug-induced catalepsy. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **347**: 415~420, 1993.
- 6) Matsubara, S., Matsubara, R., Kusumi, I., Koyama, T. and Yamashita, I.: Dopamine D1, D2 and serotonin 2 receptor occupation by typical and atypical antipsychotic drugs in vivo. *J. pharmacol. Exp. Ther.*, **265**: 498~508, 1993.
- 7) Horikawa, H.P.M., Nakazato, T. and Hikosaka, O.: Close correlation between intrastriatal concentration of sulpiride and catalepsy as studied by in vivo voltammetry. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **21**: 1132, 1995.
- 8) Nakazato, T. and Akiyama, A.: In vivo voltammetric study of 6-hydroxydopamine-induced neuronal degradation. *J. Neurochem.*, **51**: 1007~1013, 1988.
- 9) Nakazato, T. and Akiyama, A.: Decarboxylation of exogenous L-3, 4-dihydroxy-phenyl-alanine in rat striatum as studied by in vivo voltammetry. *J. Neurochem.*, **58**: 121~127, 1992.
- 10) Nakazato, T., Hosoda, S. and Akiyama, A.: A triangular conditioning voltage wave does not influence spontaneous neuronal activity in the rat striatum. *J. Neurosci. Meth.*, **46**: 69~72, 1993.
- 11) Nakazato, T. and Akiyama, A.: Kinetics of MPTP administered into the rat striatum: Measurement of MPTP and MPP<sup>+</sup> by in vivo voltammetry. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **19**: 407, 1993.
- 12) Imperato, A. and Di Chiara, G.: Dopamine release and metabolism in awake rats after systemic neuroleptics as studied by trans-striatal dialysis. *J. Neurosci.*, **5**: 297~306, 1985.
- 13) Cass, W.A., Zahniser, N.R., Flach, K.A. and Gerhardt, G.A.: Clearance of exogenous dopamine in rat dorsal striatum and nucleus accumbens: role of metabolism and effects of locally applied uptake inhibitors. *J. Neurochem.*,



- 61: 2269~2278, 1993.
- 14) **Valchar, M. and Hanbauer, I.:** Comparison of [<sup>3</sup>H] WIN 35, 428 binding, a marker for dopamine transporter, in embryonic mesencephalic neuronal cultures with striatal membranes of adult rats. *J. Neurochem.*, **60**: 469~476, 1993.
- 15) **Shimada, S., Kitayama, S., Lin, C.L., Patal, A., Nanthakumar, E., Gregor, P., Kuhar, M. and Uhl, G.:** Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science*, **254**: 576~578, 1991.
- 16) **Bressolle, F., Bres, J., Blanchin, M.D. and Gomeni, R.:** Sulpiride pharmacokinetics in humans after intramuscular administration at three dose levels. *J. Pharm. Sci.*, **73**: 1128~1136, 1984.
- (平成8年12月27日受付)
-