

Paroxetine によるラット脳内側前頭前野の セロトニン神経機能変化

東京慈恵会医科大学精神医学講座

和久津 直美 中山 和彦

(受付 平成 14 年 6 月 10 日)

PAROXETINE INDUCED CHANGES IN THE NEUROLOGICAL FUNCTION OF SEROTONIN IN THE RAT MEDIAL PREFRONTAL CORTEX

Naomi WAKUTSU and Kazuhiko NAKAYAMA

Department of Psychiatry, The Jikei University School of Medicine

Using unrestrained, nonanesthetized rats and *in vivo* microdialysis, we performed a basic study of the antidepressant paroxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, by simultaneously measuring the extracellular concentrations of 5-hydroxytryptamine (5-HT), its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), and dopamine in the medial prefrontal area, into which central serotonergic neurons project. Although simultaneously determining levels of 5-HT and 5-HIAA has been considered difficult, we sequentially measured the increase in 5-HT caused by paroxetine and the decrease in 5-HIAA, reflecting the decrease of the 5-HT content in presynaptic neurons. After a single (acute) application of paroxetine at a relatively low dose, 5-HT increased significantly. This increase may be associated with a relatively early manifestation of the clinical effect of this drug. Inhibiting reuptake of 5-HT by paroxetine increases the extracellular 5-HT concentration and also increases the dopamine concentration. This increase in dopamine may be the result of binding of the increased 5-HT to 5-HT₃ receptors on dopaminergic neurons, which suggests that the antidepressant effect of paroxetine both facilitates 5-HT function and affects dopamine function. These results suggest that paroxetine, with its potent inhibition of 5-HT reuptake, enhances the antidepressant effect by increasing the dopamine concentration via 5-HT₃.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2002; 117: 303-14)

Key words: selective serotonin reuptake inhibitor, paroxetine, 5-hydroxytryptamine, dopamine, *in vivo* microdialysis

I. 緒 言

気分障害の生物学的病因論は神経伝達物質の量的減少に原因を求めるモノアミン仮説¹⁾⁻⁴⁾に始まり、現在では脳内モノアミン受容体の調節機能の障害と考える受容体仮説⁵⁾⁶⁾が重要視されている。最近では受容体結合後のセカンドメッセンジャーまで含めたシナプス伝達機構の変容と抗うつ効果

との関連が注目されている⁷⁾。

そのなかで最近導入された抗うつ薬に選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor; 以下 SSRI と略す) がある。本薬物は気分障害のみならずパニック障害や強迫性障害, 社会恐怖などの不安障害などにも有効である。そのため現在では, 気分障害の第一選択薬として広く使用され始めている⁸⁾⁻¹⁰⁾。このように

臨床薬理的にはその特性が明らかになってきているが、その背景にある基礎薬理的プロフィールの検討は、十分とは言えない。これまでの報告では毒性試験や行動薬理学的実験が大部分で、抗うつ薬としての神経生化学的評価、特に *in vivo* の検討は乏しいのが現状である。本薬物の最大の特徴である選択的なセロトニン再取り込み阻害作用も実際には *in vitro* での受容体結合実験 (IC₅₀) によって得られた結果に基づいている。これは必ずしもセロトニン以外のモノアミンに *in vitro* において作用がないことを実証しているわけではない。そこで筆者らは SSRI の薬理特性を *in vivo* で再評価して、抗うつ作用の作用機序との関連について検討することにした。

まず標的部として、中枢 5-HT 細胞の投射する内側前頭前野を選んだ。その理由として前頭葉、特に前頭前野は最大の連合皮質であり、その機能は運動、行動の企画などのほか、感情、意欲、思考、判断力などの高次の精神機能に関連していると考えられている。そのため気分障害では前頭前野、特に内側前頭前野の機能障害が注目されているためである。そこで本研究では、内側前頭前野における細胞外 5-HT、その代謝産物の 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) また DA 濃度の変化を脳内透析法 (*in vivo* microdialysis 法) を用いて測定し、抗うつ作用に関する基礎的検討を行った。

現在 SSRI は citalopram, fluoxetine, fluvoxamine, sertraline および paroxetine の 5 種類あるが、我が国では fluvoxamine と paroxetine のみが使用されている。筆者らはこのなかでセロトニンに対してより選択性が強いとされる paroxetine を被験薬とした。Paroxetine はフェニルピペリジン系化合物で、化学的に (-)-*trans*-4-(4'-fluorophenyl)-3-(3',4'-methylenedioxyphenoxy)methyl)piperidine hydrochloride で、Fig. 1 に示すような構造を有している。

Paroxetine が、実際に 5-HT の再取り込みを阻害しているかどうかは、*in vivo* で 5-HT 濃度が上昇していることの確認だけでなく、その代謝産物である 5-HIAA 濃度の変動を同時にとらえる必要がある。しかし従来の方法では、5-HT の脳内濃度が微量であるのに対し、5-HIAA の濃度が

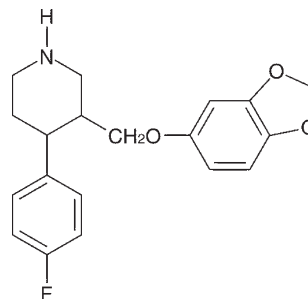


Fig. 1. Structural formula of paroxetine [(-)-*trans*-4-(4'-fluorophenyl)-3-(3',4'-methylenedioxyphenoxy)methyl)piperidine]

高い濃度を示すため、5-HT と 5-HIAA 濃度の同時測定は、困難とされてきた。本研究では、まずその同時測定を可能にし、実際に 5HT の代謝にどのような変化がみられるかを検討した。次に気分障害の病態生理において最近あらためて注目されているドパミン (dopamine: DA) を 5HT とともに同時測定し、そのメカニズムと抗うつ作用との関連について考察した。

II. 実験材料および方法

1. 実験動物

実験動物は Wistar 系雄性ラット (日本クレア, 東京), 体重 200 g~330 g を使用した。ラットは恒温恒湿のケージ内で飼育し、明暗周期は 12 時間で、飲水、摂食は自由摂取とした。また脳内透析法は明期に行った。動物の飼育および実験については全て東京慈恵会医科大学動物実験指針に従って行われた。

2. 使用薬物

5-HT, 5-HIAA および DA はシグマ社製 (USA) を, sodium pentobarbital (Nembutal) は大日本製薬製 (東京) を用いた。Paroxetine (Paxil) は、グラクソ・スミスクライン社 (UK) から提供された。Paroxetine は 1% carboxymethyl cellulose (CMC) にて懸濁し、実験の直前に調整した。

3. 手術

手術は 6 から 8 週齢 (体重 200-330 g) 時に、透析実験 7 日前に行った。Sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) による麻酔下にラットを脳定位固定装置に固定し、頭皮を正中切開し、頭蓋骨を

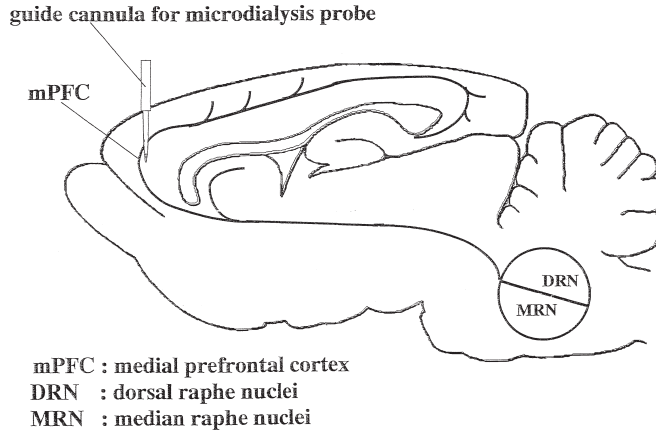


Fig. 2. Serotonergic neurons in brain

露出させた。次に正中より外側 2 mm, bregma より尾側 6 mm の両側にドリルで直径 1 mm の穴をあけ、ステンレス製ネジを挿入した。これはガイドカニューレを十分に固定するためのものである。次に Paxinos, G. and Watson, C. の脳図譜¹¹⁾に従って、ear bar を基準にし bregma より前方 3.2 mm, 左側方 0.9 mm, にドリルで直径 1 mm の穴をあけ、前頭皮質の内側前頭前野である深さ 3.0 mm まで透析用のガイドカニューレ (AG-8, エイコム, 京都) を植え込んだ (Fig. 2)。その後すでに装着してあるステンレス製ネジとともにデンタルアクリルで固定した。ガイドカニューレが完全

に固定されたことを確認し、それと同じ長さのダミーカニューレを挿入し、頭皮を縫合した。

また実験終了後に、ラットは sodium pentobarbital の深麻酔下で断頭し、脳を取り出し氷水にて洗浄し、プローベ挿入部位に沿って脳切片を作成した。その断面を肉眼的に解剖学的に前頭皮質に透析プローブが挿入されていたかどうか確認した。

4. 脳内透析法 (Fig. 3)

透析実験の 18 時間前にダミーカニューレを取り外し、直管型脳透析用プローブ (A-I-8-02; 透析膜長 2 mm, 分画分子量 5000, エイコム, 京都)

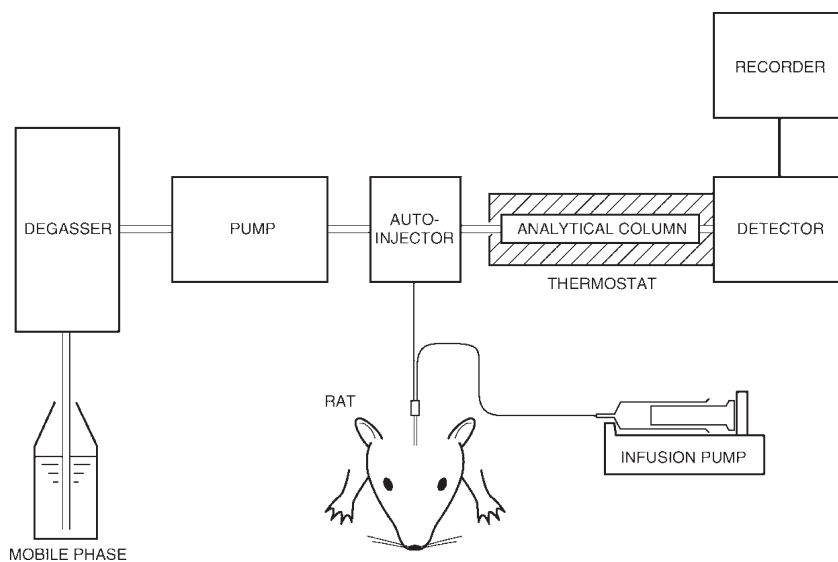


Fig. 3. Diagram of on-line microdialysis coupled to the HPLC-ED system

をガイドカニューレに沿って挿入した。ラットは無麻酔で、自由に行動できる状態であり、また装着している透析プローベ内にリンゲル液 (NaCl 147 mM, KCl 4.0 mM, CaCl₂ 2.3 mM) をマイクロインフュージョンポンプを用いて、2 μ l/min で灌流させた。その透析液を 20 分間隔で 40 μ l 回収した。回収された透析液中の透析物質を電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー (ECD-300, エイコム, 京都) にて測定した。電気化学検出器の印加電圧は +450 mV (Ag/AgCl 電極) に設定し、分析用カラムは逆相カラム (Eicom pak CA-5 ODS, エイコム, 京都) を用いた。

5. 実験方法

- 1) 実験 1: paroxetine 投与におけるラット脳内側前頭前野の細胞外 5-HT と 5-HIAA 濃度の同時測定

移動相は 100 mg/l sodium 1-pentanesulfonate, 50 mg/l EDTA-2Na および 5% methanol を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いた。リンゲル液の灌流を開始してから約 140 分後、5-HT および 5-HIAA 濃度の基礎値の安定を確認し、0.5 mg/kg, 2 mg/kg, および 8 mg/kg の paroxetine, また対照群として 1% CMC を腹腔内投与した。その後 180 分間、内側前頭前野における細胞外 5-HT とその代謝産物である 5-HIAA 濃度を同時連続測定した。

- 2) 実験 2: paroxetine 投与におけるラット内側前頭前野の細胞外 5-HT と DA 濃度の同時測定

移動相は、500 mg/l sodium 1-octanesulfonate, 50 mg/l EDTA-2Na および 20% methanol を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いた。リンゲル

液の灌流を開始してから約 120 分後、5-HT および DA 濃度の基礎値の安定を確認し、対照群として 1% CMC を、また 4 mg/kg, 8 mg/kg の paroxetine をそれぞれ腹腔内投与した。その後 180 分間、内側前頭前野における細胞外 5-HT および DA 濃度を同時連続測定した。

6. 統計学的検討

薬物投与前の 5-HT, 5-HIAA あるいは DA 濃度を 4 回 (実験 1), また 3 回 (実験 2) 加算平均して基礎値とし、全ての測定値をこの基礎値に対する百分率として算出した。薬物投与によって生じた透析物質濃度の変化について、薬物の効果と薬物投与後の時間経過による効果の 2 要因を繰り返しのある二元配置の分散分析により解析した。薬物の効果と時間の交互作用の両者で有意差が認められた場合は、各経過時間での薬物投与群と対照群との差異を評価するため、Dunnett の多重比較検定を行った。危険率 5% ($p < 0.05$) で有意差ありとした。

III. 結 果

1. 実験 1: paroxetine 投与におけるラット脳内側前頭前野の細胞外 5-HT と 5-HIAA 濃度

1) 5-HT および 5-HIAA 濃度の基礎値

Table 1 に対照群 (1% CMC) と、paroxetine 0.5 mg/kg 群, 2 mg/kg 群および 8 mg/kg 群の投与前における 4 回の測定の平均実測値と投与 180 分後までの 9 回の連続測定における 5-HT および 5-HIAA 濃度の平均実測値を示した。5-HT 濃度では、対照群の基礎値は 0.132 ± 0.024 pg/40 μ l (mean \pm SE; $n=5$, 以下同様), paroxetine 0.5 mg/kg 群 (以下 0.5 mg/kg 群と略す) では

Table 1. Effects of paroxetine on extracellular 5-HT and 5-HIAA concentrations in the rat medial prefrontal cortex

Compound	Dose (mg/kg i.p.)	No. of Animals	5-HT concentration (mean \pm SEM, pg/40 μ l)		5-HIAA concentration (mean \pm SEM, pg/40 μ l)	
			Predose	Average of the 9 samples after administration	Predose	Average of the 9 samples after administration
Vehicle (1% CMC) Paroxetine	0	5	0.132 \pm 0.024	0.183 \pm 0.035	304.2 \pm 90.2	299.1 \pm 88.7
	0.5	5	0.145 \pm 0.019	0.367 \pm 0.085	450.7 \pm 34.0	375.0 \pm 29.1
	2	5	0.147 \pm 0.052	0.474 \pm 0.109	311.2 \pm 35.5	249.9 \pm 23.2
	8	5	0.135 \pm 0.018	0.610 \pm 0.105	426.2 \pm 77.5	339.6 \pm 61.5

0.145±0.019 pg/40 μl, 2 mg/kg 群では 0.147±0.052 pg/40 μl, 8 mg/kg 群では 0.135±0.018 pg/40 μl であり, 各群に大きな隔たりはなかった。また, 5-HIAA 濃度の基礎値は, それぞれ 304.2±90.2 pg/40 μl, 450.7±34.0 pg/40 μl, 311.2±35.5 pg/40 μl, 426.2±77.5 pg/40 μl であった。また, paroxetine 投与後 180 分間の 5-HT と 5-HIAA 濃度の平均実測値は Table 1 に示している。以下 5-HT および 5-HIAA 濃度変化は, それぞれの基礎値に対する百分率で示した。

2) 内側前頭前野の細胞外 5-HT 濃度の変化

連続した 5-HT 濃度の変化を Fig. 4 に示した。まず対照群では全実験経過中に有意な変化はなかった。0.5 mg/kg 群においては, 投与 140 分後に約 310% までの 5-HT 濃度の上昇が認められたが, 有意差は認められなかった。2 mg/kg 群では, 投与 40 分後に有意な上昇を示し, その後 160 分後また 180 分後には約 480% までの有意な上昇を認めた ($p < 0.05$)。8 mg/kg 群においては, 投与 40 分後に有意な上昇を示し, 80 分値を除く全ての時間において有意な上昇を示した ($p < 0.05$)。なかでも 180 分後に約 560% までの上昇を認めた。以上より paroxetine による 5-HT 濃度の上昇は用量依存性的であると考えられた。

3) 内側前頭前野の細胞外 5-HIAA 濃度

連続した 5-HIAA 濃度の変化を Fig. 5 に示した。まず対照群では全実験経過中に有意な変化は

なかった。0.5 mg/kg 群においては, 投与後 160 分後に 76% までの 5-HIAA 濃度の有意な減少が認められた ($p < 0.05$)。2 mg/kg 群においては, 投与 140 分後に 75% までの有意な減少を認めた ($p < 0.05$)。8 mg/kg 群においては, 投与 120 分後から 160 分後に 70% までの 5-HIAA 濃度の有意な減少を認めた ($p < 0.05$)。しかし用量依存性の有無については明確ではなかった。

2. 実験 2: paroxetine 投与におけるラット内側前頭前野の細胞外 5-HT と DA 濃度の同時測定

1) 5-HT および 5-HIAA 濃度の基礎値

Table 2 に対照群 (1% CMC) と, paroxetine 4 mg/kg 群および 8 mg/kg 群の投与前における 3 回の測定の平均実測値と投与 180 分後までの 9 回の連続測定における 5-HT および DA 濃度の平均実測値を示した。5-HT 濃度では, 対照群の基礎値は 1.803±0.298 pg/40 μl (mean±SE; $n = 10$, 以下同様), paroxetine 4 mg/kg 群 (以下 4 mg/kg 群と略す) では, 1.324±0.419 pg/40 μl, 8 mg/kg 群で 1.480±0.615 pg/40 μl であり, 各群に大きな隔たりはなかった。また DA 濃度の基礎値は, それぞれ 0.482±0.190 pg/40 μl, 0.478±0.249 pg/40 μl, 0.494±0.201 pg/40 μl であった。また, paroxetine 投与後の 5-HT と DA 濃度の平均実測値も Table 2 に示している。5-HT の基礎値は実験 1 とほぼ同等であり, 分析方法が違って本

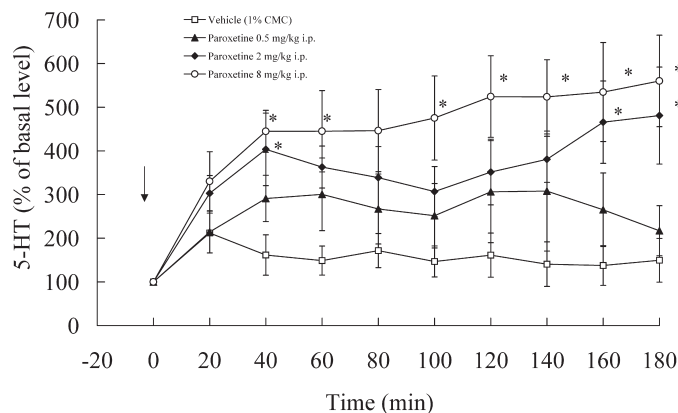


Fig. 4. Time course of effects of paroxetine on extracellular 5-HT concentration in the rat medial prefrontal cortex

Data are expressed as percentages of the mean amount of 5-HT in the 4 samples preceding drug injection. The arrow indicates the time of injection. Each point represents the mean±SEM ($n = 5$). *: Significantly different from the vehicle control group at $p < 0.05$ (Dunnett's test).

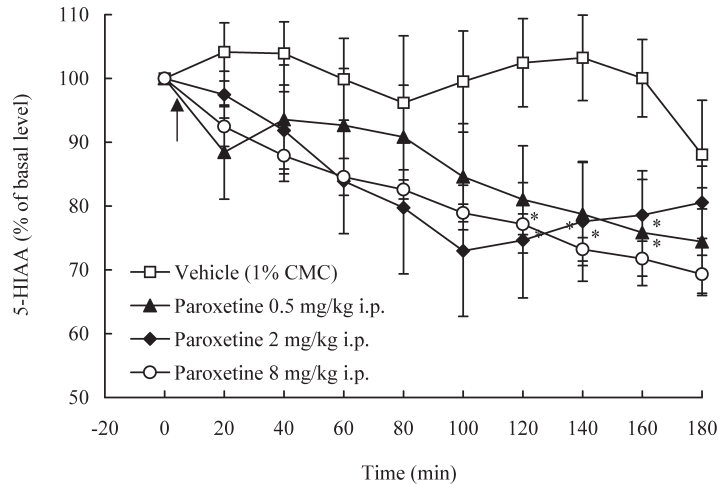


Fig. 5. Time course of effects of paroxetine on extracellular 5-HIAA concentration in the rat medial prefrontal cortex
Data are expressed as percentages of the absolute baseline of 5-HIAA immediately preceding drug injection. The arrow indicates the time of injection. Each point represents the mean \pm SEM ($n = 5$). *: Significantly different from the vehicle control group at $p < 0.05$ (Dunnett's test).

Table 2. Medial prefrontal cortex

Compound	Dose (mg/kg i.p.)	No. of Animals	5-HT concentration (mean \pm SEM, pg/40 μ l)		DA concentration (mean \pm SEM, pg/40 μ l)	
			Predose	Average of the 10 samples after administration	Predose	Average of the 10 samples after administration
Vehicle (1% CMC)	0	10	1.803 \pm 0.298	1.287 \pm 0.415	0.482 \pm 0.190	0.545 \pm 0.198
Paroxetine	4	10	1.324 \pm 0.419	2.046 \pm 0.833	0.478 \pm 0.249	0.755 \pm 0.440
	8	10	1.480 \pm 0.615	3.020 \pm 1.242	0.494 \pm 0.201	1.088 \pm 0.530

実験の測定精度に問題がないことを示している。以下5-HTおよびDA濃度変化は、それぞれの基礎値に対する百分率で示した。

2) 内側前頭前野の5-HT濃度の変化

連続した5-HT濃度の変化をFig. 6に示した。まず対照群では全実験経過中に有意な変化はなかった。4 mg/kg群においては、投与40分後に約220%までの5-HT濃度の有意な上昇が認められ ($p < 0.05$)、180分後までの全ての測定時間において有意な上昇が持続した ($p < 0.01$)。8 mg/kg群においても、投与20分後に既に有意に上昇し、40分後には約360%までの上昇を認め、それ以後全ての測定時間において有意な上昇を維持した ($p < 0.01$)。4 mg/kg群および8 mg/kgとも有意な上昇であるが、8 mg/kg群での5-HT濃度は投

与後1回目の測定時間(20分後)より有意に上昇し、その作用は180分後まで持続していたことおよび8 mg群での5-HT濃度が全ての測定時間において4 mg群より高かったことから、paroxetineによる細胞外5-HT濃度の上昇は、実験1と同様に用量依存的であることが示された。

3) 内側前頭前野の細胞外DA濃度の変化

連続したDA濃度の変化をFig. 7に示した。まず対照群では全実験経過中に有意な変化はなかった。4 mg/kg群においては、投与60分後に約170%までの有意な上昇 ($p < 0.05$) が認められ、180分後まで有意な上昇を維持した ($p < 0.01$)。8 mg/kg群においては、投与40分後に約250%までの有意な上昇を認め、180分後まで有意なDA濃度の上昇が持続した ($p < 0.01$)。このDAの上昇

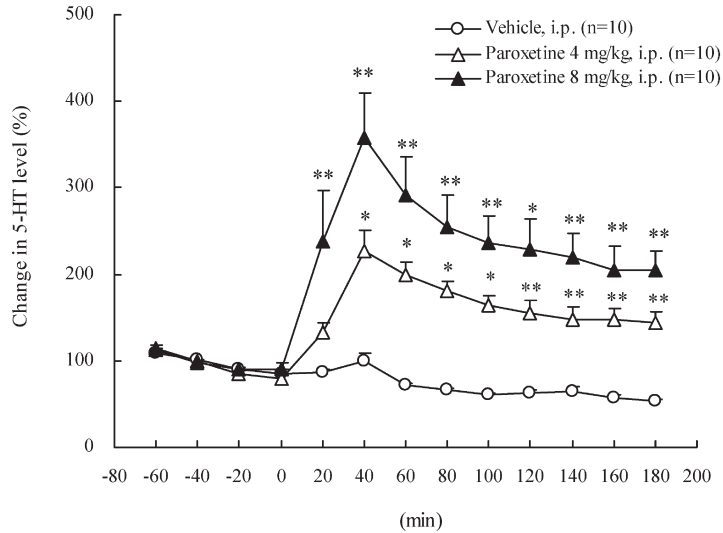


Fig. 6. Time course of effect of paroxetine on extracellular 5-HT concentration in the rat medial prefrontal cortex
 Data are expressed as percentages of the absolute baseline of 5-HT immediately preceding drug injection. The arrow indicates the time of injection. Each point represents the mean \pm SEM ($n=10$). *: Significantly different from the vehicle control group at $p<0.05$ (Dunnet's test). **: Significantly different from the vehicle control group at $p<0.01$ (Dunnet's test).

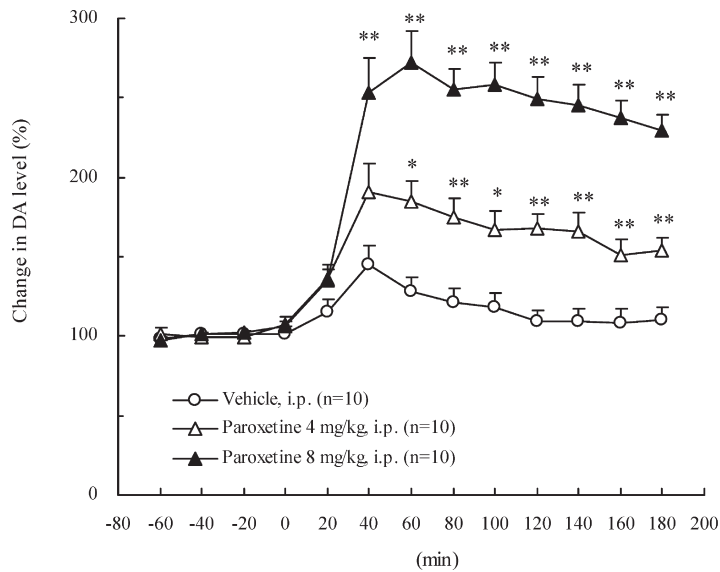


Fig. 7. Time course of effect of paroxetine on extracellular DA concentration in the rat medial prefrontal cortex
 Data are expressed as percentages of the absolute baseline of DA immediately preceding drug injection. The arrow indicates the time of injection. Each point represents the mean \pm SEM ($n=10$). *: Significantly different from the vehicle control group at $p<0.05$ (Dunnet's test). **: Significantly different from the vehicle control group at $p<0.01$ (Dunnet's test).

も 5-HT 同様、用量依存的であることが認められた。

IV. 考 察

1. 実験 1: paroxetine 投与におけるラット内側前頭前野の細胞外 5-HT と 5-HIAA 濃度の同時測定について

1) 5-HT と 5-HIAA 濃度の同時分析法について

本研究では、5-HT と 5-HIAA 濃度をできるだけ短い回収時間で同時測定することが重要な点であった。従来の方法から本研究で用いた新しい分析方法によってどのような違いがあるのかは次の通りである。

① 分析カラムの種類

カラムは同じ逆相カラム octadylsilane (ODS) をシリカゲルに化学結合させた充填剤が使用されている MA-5ODS 使用されていたが、本研究では CA-5ODS カラムに変更した。この違いはシリカゲルの純度にあった。すなわち後者のほか純度が高く、前者には微量の金属イオンが含まれているため、pH が塩基に傾くと、特にアミン類のクロマトの形状が悪くなるという欠点がある。そのため移動相の pH を 4.0 以下にすることで測定精度を上げていた。その結果代謝産物のカルボン酸 (5HIAA, HVA など) は酸性のためイオン化しにくくなり、溶出時間が長くなってしまふ。それに対して CA-5ODS は pH 6.0 でも十分クロマトの形状を鋭利に保つこと出来る充填剤の純度を持っている。この条件であればカルボン酸類はイオン化しやすくなり、5HIAA の溶出時間が短縮され front peak として現れる。

② イオンペア剤について

イオンペア剤の役割はアミン類 (5HT, DA など) の溶出時間を遅らせ、代謝産物の peak と重ならないように分離させることである。従来法では sodium octanesulfonate (SOS) を用いた。この方法ではモノアミンとその代謝産物の分析を可能にしたが、カラムの性質上、pH を低くする必要があり C (炭素) が 8 つ付いている SOS によってアミン類の吸着力も強いいため全体として分析時間が長くなっていた。ちなみに 5HIAA と 5-HT の retention time (RT) がそれぞれ約 15 分と約 40

分前後も必要であった。もし同時測定できたとして約 1 時間に一回しかサンプルを回収できない。それに対して本実験では前述のカラムを使用して pH 6.0 で 5HIAA を前進させ、イオンペア剤に sodium 1-pentanesulfonate を使用した。これは C が 5 つで前者に比して少ない。炭素が少ないと水に溶けやすくなり、吸着力が低下しアミン類の溶出が早くなる。この性質を利用して 5-HIAA の RT が約 8 分、5-HT の RT は約 13 分に短縮することができた。結果としてサンプルを 20 分ごとに回収することが可能になった。

2) 5-HT と 5-HIAA 濃度の同時測定精度

5-HT 濃度の基礎値の安定を基準にしたため、どうしても濃度の高い 5-HIAA の基礎値にはばらつきが見られた。特に 0.5 mg/kg 群と 8 mg/kg 群の基礎値が他の群に比して上昇していた。これは同じ大脳皮質でも、個体差によって濃度が異なったためと推定された。濃度の低い 5-HT を同じチャート上に導くため濃度の高いものほど、その傾向が出現する。しかし統計学的には各群の 5-HIAA の基礎値には有意差はなく、概ね今回の実験方法では、5-HT と 5-HIAA 濃度の関係进行分析できる結果といえる。特に高用量の 8 mg/kg 群では 5-HT の上昇と 5-HIAA の減少が明確にとらえられている。低用量の 0.5 mg/kg 群では変化がなく、2 mg/kg 群ではある程度、その傾向をとらえているが、ばらつきが多かった。このことから 5-HIAA の減少を明確に観察するには、もう少し投与量を増量する必要があったと考えられた。そのため実験 2 では、4 mg/kg 群と 8 mg/kg 群を用いることにした。

3) 5-HT と 5-HIAA の変動の相互関係

本研究によって paroxetine の単回 (急性) 投与によって、ラット内側前頭前野での細胞外 5-HT 濃度の上昇と、5-HIAA 濃度の減少を *in vivo* で確認した。この理由は 5-HT の代謝酵素である MAO は細胞間隙には存在しないためである。すなわち paroxetine が 5-HT の再取り込みを阻害することによって、内側前頭前野における細胞外 5-HT が上昇するが、前シナプス内の 5-HT が減少するので、シナプス内での 5-HIAA への代謝が減少する。脳内透析法でとらえられる細胞外 5-HIAA 濃度は、前シナプスより流出してきたもの

と考えられるので、細胞間隙の 5-HIAA 濃度は減少して測定されることになる。

4) 単回 (急性) 投与による 5-HT の上昇について

伝統的な抗うつ薬の作用仮説は急性投与と慢性投与実験に分けて考えられていた。これは臨床効果発現に 1 から 2 週間を要するため、特に受容体の down regulation が生ずるのには慢性的に投与する必要があるとしていた。しかし現在では特に SSRI は down regulation は必ずしも示さないとされている。Paroxetine に関してもそれを示す研究結果は見あたらない。そのためか各種 SSRI の単回投与と実験の結果は報告によって違いがある。Fuller および Briley らは、SSRI の単回投与でも、起始核の縫線核およびその投射部位の線条体、黒質などでは 5-HT 濃度が上昇することを *in vivo* microdialysis 法で測定し報告している¹²⁾⁻¹³⁾。一方、大脳皮質においても軽度上昇する、または変化しないとの報告もあって一定していない¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。Invernizzi らによると¹⁷⁾、低用量 (1 mg/kg) の citalopram では大脳皮質での細胞外 5-HT 濃度の上昇はみられないが、高用量 (10 mg/kg) では大脳皮質と背側縫線核の両部位で細胞外 5-HT 濃度を上昇させることを報告している。これは単回投与の場合、縫線核の 5-HT 神経細胞の樹状突起から遊離され、再取り込み阻害作用により上昇した 5-HT が樹状突起周辺に蓄積され、細胞体に存在するオートレセプターである 5-HT_{1A} レセプター (somatodendritic autoreceptor) が活性化されて 5-HT 作動性神経の活動を抑制させるため、投射部位の大脳皮質においては、5-HT 神経終末からの 5-HT 遊離はむしろ抑制されると指摘している¹⁸⁾⁻²⁰⁾。今回の実験において、0.5 mg/kg 群では上昇しなかったが、比較的低用量と考えられる 2 mg/kg 群、また実験 2 における 4 mg/kg 群においても、内側前頭前野における細胞外 5-HT 濃度の上昇を示していることは注目すべき結果である。Paroxetine の 5-HT 再取り込み阻害作用 (IC₅₀) は、TCA や他の SSRI に比して強いことが報告されている²⁰⁾⁻²²⁾。今回の結果は、paroxetine が低用量においても、5-HT 神経終末領域で強力な再取り込み阻害作用を示し、その作用が細胞体の 5-HT_{1A} レセプターを介し

た 5-HT 遊離抑制作用を上回った可能性を示唆している。

2. 内側前頭前野の細胞外 5-HT と DA 濃度の同時測定

脳内物質の *in vivo* での同時測定は前述の 5-HT と 5-HIAA に限らず、重要な意義を持っている。すなわち実験 1 のような代謝回転を知ることができるだけでなく、他のニューロンとの相互作用、ネットワークによる機能変化を考察することができるからである。実験 2 では実験 1 で確認された paroxetine による 5-HT 濃度上昇作用が、DA 神経に如何なる影響を与えるかを検討することができた。

1) 5-HT と DA 濃度の測定値の変化の特徴

5-HT 濃度の上昇とともに、DA 濃度も上昇したが、その変化には次のような特徴がみられた。まず、実験 1 では観察されないが、5-HT にとってより感度の高い方法である実験 2 では、比較的高用量の 8 mg/kg 群で投与直後の 20 分後から 5-HT 濃度は有意に上昇し、40 分後で最高値を示した後、急速に減少していく傾向があった。しかし有意な上昇は維持しているため、あくまで実験上観察された特徴である。4 mg/kg 群では 40 分後に初めて有意な上昇を示し、その後は 8 mg/kg 群に比較して穏やかに減少した。5-HT 濃度変化に対して DA 濃度は 8 mg/kg 群でも 20 分後では、有意な上昇は示さず、40 分後で、また 4 mg/kg 群では、60 分後で初めて有意な上昇を示した。このような 5-HT と DA 濃度の上昇が同期せず、ずれているこの現象から、5-HT 濃度上昇の機序とは別の機序によって DA 濃度が上昇しているのではないかと推測された。

2) DA 濃度上昇の作用仮説

DA 濃度が上昇する理由はいくつか考えられるが、そのなかで有力と思われる次の 4 点について考察をする。

(1) DA 再取り込み阻害作用

一般に SSRI は、5-HT トランスポーターに結合し、放出された 5-HT の再取り込みを抑制する選択性の高い薬剤であるが、SSRI という名称にもかかわらず多少ではあるが、*in vitro* ではノルアドレナリン (NA) および DA トランスポーターに対しても結合能を示し、それらの再取り込みを

抑制する^{8,21)-24)}。このことから paroxetine の DA 濃度上昇作用に DA 再取り込み阻害作用が関与する可能性が考えられた。しかし, paroxetine は DA トランスポーターに対する結合能は極めて弱く, DA 再取り込み阻害作用は非常に弱いことから, この作用による細胞外 DA 濃度の上昇は考えにくい²¹⁾⁻²²⁾。また前述のように DA 濃度の上昇が, 5-HT 濃度の上昇と同期せず, 遅れていることから同じ再取り込み阻害作用によって上昇したものではないと考えられる。

(2) NA 再取り込み阻害作用

NA が高濃度で存在する皮質では, シナプス間隙の DA は NA トランスポーターにより取り込まれることがわかっている²⁵⁾⁻²⁶⁾。すなわち paroxetine が NA トランスポーターを抑制して細胞外 DA 濃度を上昇させる可能性が考えられる。しかし, 実際には paroxetine の NA トランスポーターに対する結合能は弱く, paroxetine による NA 再取り込み阻害作用は非常に弱い²¹⁾²²⁾ ことから NA トランスポーターの抑制を介した DA 濃度の上昇も考えにくい。

(3) 5-HT₃ を介した作用

G. Tanda ら²⁷⁾ は SSRI のひとつである fuloxetine が大脳皮質の細胞外 DA 濃度を用量依存的に上昇させたことを報告しており, これはシナプス間隙に増加した 5-HT が DA 神経末端の 5-HT₃ 受容体に作用して DA 神経からの DA 遊離を増加させた可能性を示唆している。さらに, 5-HT が細胞外 DA 濃度を上昇させ, 5-HT₃ 受容体アンタゴニストがその作用に拮抗することも報告されている²⁸⁾⁻³⁰⁾。これらのことから, 5-HT₃ 受容体を介した細胞外 DA 濃度の上昇作用が現在のところ最有力である。

(4) その他の仮説

SSRI の細胞外 DA 濃度の上昇に関する最近の研究では, 5-HT_{1B/1D} レセプターおよび 5-HT₆ レセプターを介して DA 遊離を促進している可能性が指摘されており³¹⁾, これらの可能性も否定できない。

V. ま と め

5-HT の選択的な再取り込み阻害作用を有すとされる paroxetine による, 中枢 5-HT 神経細胞

の投射する内側前頭前野の細胞外 5-HT, その代謝産物の 5-HIAA また DA 濃度の変化を脳内透析法 (*in vivo* microdialysis 法) を用いて測定し, 抗うつ作用に関する基礎的検討を行った。

1. 従来困難とされていた 5-HT と 5-HIAA の同時濃度測定を可能とし, paroxetine による 5-HT 濃度の上昇と前シナプス内の 5-HT 濃度の減少を反映する 5-HIAA 濃度の減少を継時的にとらえた。

2. Paroxetine の単回 (急性) 投与で, 比較的低用量でありながら, 5-HT 濃度の有意な上昇が認められた。

3. Paroxetine は 5-HT 再取り込み阻害作用により細胞外 5-HT 濃度を上昇させるだけでなく, DA 濃度も上昇させた。これは DA 神経上に存在する 5-HT₃ 受容体に増加した 5-HT が結合した結果と考えられる。このことは paroxetine の抗うつ作用発現には 5-HT 機能の促進のみならず DA 機能も関わっている可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり, 直接の御指導を賜りました精神医学講座, 主任教授の牛島定信先生に深謝いたします。さらに同講座の薬理生化学研究班の勝久寿先生をはじめ教員諸兄から終始御指導および御助言いただきましたことに感謝いたします。

尚, 本研究の一部は平成 10 年度, 11 年度文部省科学研究奨励研究 (A) 「セロトニン選択的再取り込み阻害剤の抗うつ効果に関する研究」によった。

また本論文の内容の一部は, 第 11 回ヨーロッパ精神神経学会 (European College of Neuropsychopharmacology: ECNP, Paris 1998) において発表した。

文 献

- 1) Bunney WE, Jr, Davis JM. Norepinephrine in depressive reactions: a review. *Arch Gen Psychiat* 1965; 13: 483-94.
- 2) Coppen A. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 1967; 113: 1237-64.
- 3) Charney DS, Menkes DB, Heninger GR. Receptor sensitivity and the mechanism of action of antidepressant treatment: implications for the etiology and therapy of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1981; 38: 1160-80.
- 4) Schildkraut JJ. The catecholamine hypothe-

- sis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 1965; 122: 509-22.
- 5) 竹林 実, 山脇成人. うつ病とセロトニン. *臨床精神薬理* 1999; 2: 711-9.
 - 6) 井上 猛, 小山 司. セロトニン. 笠原 嘉, 松下正明, 岸本英爾 編. 感情障害—基礎と臨床. 東京: 朝倉書店; 1997. p. 259-63.
 - 7) 笹 征史, 石原熊寿. SSRI の薬理—電気生理学的側面から. *神経精神薬理* 1995; 17: 4: 223-8.
 - 8) 村崎光邦. SSRI への期待. *臨床精神薬理* 1999; 2: 691-710.
 - 9) Glassman AH. Optimizing clinical use of SSRIs: theory and practice. *J Clin Psychiatry* 1998; 59: 3.
 - 10) 石郷岡純. SSRI の効果. *臨床精神薬理* 1999; 2: 727-46.
 - 11) Paxios G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1986.
 - 12) Fuller RW. Uptake inhibitors increase extracellular serotonin concentration measured by brain microdialysis. *Life Sci* 1994; 55: 163-7.
 - 13) Briley M, Moret C. Neurobiological mechanisms involved in antidepressant therapies. *Clin Neuropharmacol* 1993; 16: 387-400.
 - 14) Gardier AM, Malagie I, Trillat AC, Jacquot C, Artigas F. Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from *in vivo* microdialysis studies. *Fundam Clin Pharmacol* 1996; 10: 16-27.
 - 15) Adell A, Artigas F. Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex: an *in vivo* brain microdialysis study. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1991; 343: 237-44.
 - 16) Bel N, Artigas F. Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: an *in vivo* microdialysis study. *Eur Pharmacol* 1992; 229: 101-3.
 - 17) Invernizzi R, Belli S, Samanin R. Citalopram's ability to increase the extracellular concentrations of serotonin in the dorsal raphe prevents the drug's effect in the frontal cortex. *Brain Res* 1992; 584: 322-4.
 - 18) Invernizzi R, Belli S, Samanin R. An increase of extracellular serotonin in the dorsal raphe masks the effect of sertraline in the frontal cortex. In: Rollema H, Westerink BHC, Driehout WJ, editors. *Monitoring Molecules in Neuroscience*. Groningen: The Netherlands University Center for Pharmacy; 1991. p. 253-55.
 - 19) 山中教造, 鈴木恵子, 岡本佳子. マウスの marble-burying 行動に及ぼすセルトラリン反復投与の影響. *神経精神薬理* 1997; 19: 387-93.
 - 20) Invernizzi R, Bramante M, Samanin R. Role of 5-HT_{1A} receptors in the effects of acute and chronic fluoxetine on extracellular serotonin in the frontal cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54: 143-7.
 - 21) Thomas DR, Nelson DR, Johnson AM. Biochemical effects of the antidepressant paroxetine, a specific 5-hydroxytryptamine uptake inhibitor. *Psychopharmacology* 1987; 93: 193-200.
 - 22) Hyttel J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Int Clin Psychopharmacol* 1994; 9 (suppl 1): 19-26.
 - 23) Hyttel J, Arnt J, Sanchez C. The pharmacology of citalopram. *Rev Contemp Pharmacother* 1995; 6: 271-85.
 - 24) 笹 征史. SSRI の薬効・薬理. *臨床精神薬理* 1999; 2: 721-7.
 - 25) Carboni E, Tanda GL, Frau R, Chiara GD. Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up *in vivo* by noradrenergic terminals. *J Neurochem* 1990; 55: 3: 1067-70.
 - 26) Kihara T, Ikeda M. Effects of duloxetine, a new serotonin and norepinephrine uptake inhibitor, on extracellular monoamine levels in rat frontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 177-83.
 - 27) Tanda G, Carboni E, Frau R, Chiara GD. Increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex: a trait of drugs with antidepressant potential? *Psychopharmacology* 1994; 115: 285-8.
 - 28) Costall B, Domeney AM, Naylor RJ, Tyers MB. Effects of the 5-HT₃ receptor antagonist, GR38032F, on raised dopaminergic activity in the mesolimbic system of the rat and marmoset brain. *Br J Pharmacol* 1987; 22:

- 881-94.
- 29) Carboni E, Acquas E, Frau R, Chiara GDi. Differential inhibitory effects of a 5-HT₃ antagonist on drug-induced stimulation of dopamine release. *Eur J Pharmacol* 1989; 164: 515-9.
- 30) Tanda G, Frau R, Chiara GDi. Local 5HT₃ receptors mediate fluoxetine but not desipramine-induced increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex. *Psychopharmacology* 1995; 119: 15-9.
- 31) Matsumoto M, Togashi H, Mori K, Ueno K, Miyamoto A, Yoshioka M. Characterization of endogenous serotonin-mediated regulation of dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1999; 383: 39-48.