Benzodiazepine 系薬物, Clonazepam の ラット中枢 dopamine 代謝におよぼす影響について

中村 和雄, 下川 好子, 及川由紀子, 中村 圭二

日本ロシュ研究所・薬理学部*

(昭和52年10月3日〔特〕)

要約: Clonazepam の中枢作用機作検索のため, 脳内 dopamine (DA) 代謝を中心に検討し以下の成績を得た. 1) 中枢 DA 含有神経の多いラットの尾状核ならびに大脳皮質において DA の主要代謝物である 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) 量の著しい減少と尾状核での DA 代謝率の抑制が認められた. 2) norepinephrine 代謝率の抑制が尾状核でのみ認められた. 3) これらの変化とともに serotonin ならびに 5-hydroxyindole acetic acid 量の減少が脳幹部でみられた. 4) apomorphine による常同行動 (stereotyped behavior) ならびに自発運動量の亢進を用量依存的に, また *d*-methamphetamine による常同行動 (stereotyped behavior) の亢進をそれぞれ増強した. さらに reserpine 前処置時においても apomorphine 効果を亢進した. 5) このとき apomorphine 単独投与で認められた尾状核の HVA 量ならびに大脳皮質の DOPAC, HVA 量の減少はさらに低下し, *d*-methamphetamine 単独投与による大脳皮質の DOPAC 量の減少も増強された. 6) *in vitro* で phosphodiesterase 活性を阻害しない濃度では, 尾状核ホモジネート中の DA-sensitive adenylate cyclase 活性に影響を示さず, 同時に *in vivo* においても cyclic AMP 量に変化を与えない. 7) 尾状核, 大脳皮質ホモジネートで phosphodiesterase 活性を抑制したが, *in vivo* における抑制は認められなかった. 8) 脳各部位の choline acetyltransferase, acetylcholinesterase 活性に対する作用は認められなかった. 以上より clonazepam には尾状核, 大脳皮質 DA 作働性神経の受容器の活性亢進が推定されるが, この機序には adenylate cyclase, phosphodiesterase の直接関与は少なく, おそらく線状体—黒質 γ -amino butyric acid (GABA) 作働性神経の活性上昇に起因するものと思われる. これらの結果は本薬物の中枢神経作用を解明する一助になると考えられる.

緒 言

静穏剤である benzodiazepine 系薬物中 clonazepam は実験動物において特に抗 Metrazol 作用が強く¹⁻³⁾, 臨床的には小発作型のでんかんに著効を示すことが報告されている^{4,5)}. しかしながら benzodiazepine 系薬物の中枢作用機序について, その作用部位を中枢の各種神経系—monoamine 作働性神経, γ -aminobutyric acid (GABA) 作働性神経, glycine 作働性神経—to求める研究が数多く為されているが未だ明解にされていない. 種々の誘発痙攣に対する reserpine, tetrabenazine⁶⁾ の閾値低下作用や *d*-amphetamine⁷⁾, imipramine⁸⁾ の発作閾値上昇作用, あるいはまた apomorphine⁷⁾, pyrogallol⁹⁾ 投与時の抗痙攣作用等々に示される如く, てんかん発作に中枢 monoamine の中でも dopamine (DA) 含有神経系が重要な役割を担っていることは明らかである. 一方 benzodiazepine 系薬物には DA 代謝を減少させる傾向がラット, マウスの新線状体¹⁰⁻¹³⁾や全脳¹⁴⁾で報告されており, また diazepam は *in vitro* における phosphodiesterase 阻害剤であり¹⁵⁾, adenosine や histamine による大脳皮質切片中の cyclic AMP の蓄積を亢進させることが知られている¹⁶⁾.

今回は benzodiazepine 系薬物の中枢 monoamine 代謝, 特に各種 DA 作働性神経系におよぼす影響について検討したので報告する.

実 験 方 法

1. 実験動物

実験には体重 250~350 g の雄性 Wistar 系ラット (埼玉実験動物供給所) を使用し, 温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 定時照明 (6:00 a.m., 6:00 p.m.) の恒温恒湿環境下で飼育した. 実験は特記する場合を除き全て 1 群 5~7 匹とし, ラットは実験日の早期より絶食させ実験に供した.

2. 実験方法

1) 薬物投与法

DA, norepinephrine (NE) 代謝率の測定では catecholamine 生合成を阻害するためラットに α -methyl-*p*-tyrosine methylester 200 mg/kg を静脈内投与し, 投与 2 時間後に 200 mg/kg を腹腔内に追加投与し, 静脈内投与 2, 4 時間後にそれぞれ断頭屠殺した. 被検薬物は初回の α -methyl-*p*-tyrosine methylester 投与 1 時間前 (但し chlorpromazine のみ 30 分前) に腹腔内投与し, 以後 2 時間間隔で投与を行なった. 代謝率の測定は Nakamura ら¹⁷⁾の方法に従い, DA, NE 生合成律速酵素である tyrosine hydroxylase を α -methyl-*p*-tyrosine methylester により阻害して投与 2, 4 時間後の各 amine 量より求められる減衰曲線より算出した.

Monoamine の主要代謝物の測定ならびに他の生化学実験においてはいずれの薬物とも 2 時間間隔で 2 回にわたって腹腔内投与し, clonazepam, diazepam 投与群は 2 回目の投与 1 時間後に, また chlorpromazine は 30 分後に屠殺した. なお以上の実験の際には薬物処置後の体温下降を防止するため, あらかじめ 30°C に保温された電気毛布上にラットケージを置いた.

自発運動量, 常同行動 (stereotyped behavior) の測定実験では clonazepam を 2 時間間隔で 2 回にわたって腹腔内投与後 10 分に, また chlorpromazine は単回投与後 10 分にそれぞれ apomorphine, *d*-methamphetamine を皮下投与し, 情動行動は Costall and Naylor¹⁸⁾ の採点法に従って, 自発運動量は Animex (Farad 社) を使用して 75 分間にわたり観察測定した. なお全ての実験で対照群には生理食塩水を投与した.

2) 分析定量法

ラットを断頭して速やかに全脳 (但し小脳は除去) を摘出し, Glowinski and Iversen¹⁹⁾ の方法により尾状核, 視床下部, 透明中隔, 嗅結節, 大脳皮質, 中脳ならびに橋-延髄に分割後, -70°C 以下のドライアイス-石油エーテル中にて瞬間凍結後秤量し, -20°C 以下の冷凍庫に保存した. Monoamine の内 DA と NE は Schillenberger and Gordon²⁰⁾ の方法に従い trihydroxyindole 法を用いて, また serotonin (5-HT), 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) は Curzon and Green²¹⁾ の方法によりそれぞれ蛍光分光光度計にて測定した. 一方 DA の主要代謝物である 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) は 3~5 匹のラットより得られた組織をプールし Murphy ら²²⁾の方法に従って, homovanillic acid (HVA) は 3~10 匹分の組織をプールして Andén ら²³⁾の方法により蛍光分光光度計を用いて測定した.

脳内 cyclic AMP 量の測定はオープン (日立製作所, MR-610 F 型, 600 W, 2,450 Hz) 内に固定したラットの頭部に電磁波を 20 秒間照射し, 速やかに致死させ氷冷後直ちに全脳を摘出し部位別に分割した¹⁹⁾. 定量は Brown ら²⁴⁾の方法に準拠した市販の「cyclic AMP assay kit」(The Radiochemical Centre) を使用し, ^3H -cyclic AMP-protein 結合物の放射能は 0.7% butyl PBD toluene-ethanol シンチレーター 15 ml を加えて液体シンチレーションカウンター (Packard, 3390 型) で計測した. Adenylate cyclase 活性は尾状核のホモジネートを用いて Keblanian ら²⁵⁾の方法により生成された cyclic AMP 量を, また phosphodiesterase 活性は cyclic AMP (最終濃度 $0.3 \mu\text{M}$) を基質として反応させた後の cyclic AMP 量をそれぞれ測定し, 活性値を算出した. なお組織中の蛋白質は Lowry ら²⁶⁾の方法に従い定量した.

Tyrosine hydroxylase 活性は Waymire ら²⁷⁾の方法により, $1\text{-}^{14}\text{C}$ -L-tyrosine (53.6 mCi/mmole , New England Nuclear) を用いて測定した. また choline acetyltransferase (ChAc), acetylcholinesterase (AChE) 活性は Fonnum^{28, 29)} の方法により, それぞれ acetyl coenzyme A [$\text{acetyl-1-}^{14}\text{C}$] (54 mCi/mmole , New England, Nuclear), $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetylcholine chloride (17.6 mCi/mmole , The Radiochemical Centre) を用いて測定した.

3. 使用薬物

本実験で使用した薬物は次の通りである。すなわち clonazepam (Roche), diazepam (Roche), flunitrazepam (Roche), flurazepam (Roche), chlorpromazine hydrochloride (コントミン, 吉富製薬), α -methyl-*p*-tyrosine methylester (Regis), *d*-methamphetamine hydrochloride (大日本製薬), apomorphine hydrochloride (Breon Lab. Incorp.), reserpine (アポロン, 第一製薬), theophylline (和光純薬) であり, これらの薬物の内, 水溶性のものは生理食塩液に希釈溶解し, 難溶性のものは 1% carboxy methylcellulose に懸濁して使用した。なおいずれも文中では塩を略して表記した。

実験結果

1. DA 代謝におよぼす影響

Clonazepam (1 mg/kg i.p.×2), diazepam (5 mg/kg i.p.×2) ならびに chlorpromazine (5 mg/kg i.p.×2) の DA 代謝におよぼす影響を検討した。なお benzodiazepine 両系薬物の投与量はいずれも有意に Metrazolone 痙攣を抑制し³⁾, chlorpromazine は典型的なカタレプシーを来す用量¹⁾である。結果は Table 1 に要約されるように, benzodiazepine 系静穏剤は尾状核において DOPAC, HVA 量を有意に減少させ, 同時に DA 代謝率を抑制した。このときの抑制の程度は DOPAC 量で clonazepam 投与群34%, diazepam 投与群22%, HVA 量

Table 1. Effects on DA and its metabolite contents and DA turnover in regions of rat cerebrum.

Regions	Treatments	Dose mg/kg i.p.×2	DA content ng/g	DOPAC ng/g	HVA ng/g	DA turnover rate ng/g/hr	Tyrosine hydroxylase activity pmole of ¹⁴ CO ₂ formed/hr/mg protein
Caudatus	control	0	4,601±267	978±35	785±64	1,822±72	60±10
	clonazepam	1	5,557±610	649±34 ^c	349±35 ^a	1,234±90 ^b	46±14
	diazepam	5	4,311±258	759±51 ^b	487±62 ^a	1,384±69 ^b	—
	chlorpromazine	5	4,501±509	2,582±213 ^c	2,420±98 ^c	2,407±173 ^b	—
Olfactory tubercle	control	0	4,681±309	954±67	154±56	1,890±81	—
	clonazepam	1	4,225±449	712±92	156±23	1,789±125	—
	diazepam	5	4,510±380	766±96	166±34	—	—
	chlorpromazine	5	5,004±401	1,769±148 ^c	988±245 ^b	2,693±140 ^b	—
Cortex	control	0	210±29	85±4	42±3	33±2	5±1
	clonazepam	1	250±27	55±6 ^b	9±1 ^a	—	6±2
	diazepam	5	194±17	71±4 ^a	51±4	26±5	—
	chlorpromazine	5	274±21	143±9 ^c	85±15 ^a	41±3 ^a	—
Septum	control	0	1,404±129	664±22	—	—	—
	clonazepam	1	1,502±68	497±91	—	—	—
	diazepam	5	1,450±48	644±60	—	—	—
	chlorpromazine	5	1,024±175	958±75 ^a	—	—	—
Hypothalamus	control	0	451±32	177±28	—	144±7	—
	clonazepam	1	402±70	180±32	—	142±11	—
	diazepam	5	440±31	151±18	—	120±15	—
	chlorpromazine	5	448±47	212±31	—	142±6	—

The animals were given an i.p. administration of each drug twice at 2 hr intervals and sacrificed 1 hr after the last dose of benzodiazepines and 0.5 hr after that of chlorpromazine. Tyrosine hydroxylase activity was assayed by measuring ¹⁴CO₂ formed from 1-¹⁴C-L-tyrosine. Values are means±s.e. obtained from 7 animals for DA, 6 samples (3 pooled tissues/sample) for DOPAC, 5 samples (3~10 pooled tissues/sample) for HVA determination. a; a significant difference from control values, p<0.05, b; p<0.01, c; p<0.01.

ではそれぞれ56%, 38%と clonazepam 投与群で著るしく, tyrosine hydroxylase 活性も抑制傾向が認められた. またこれら薬物は脳皮質でも DOPAC 量を有意に減少させ, clonazepam 投与群で35%と diazepam 投与群 (16%) のほぼ2倍の強さであった. 一方 HVA 量の減少は clonazepam 投与群においてのみ著明に (79%) 認められた. なおラットは clonazepam, diazepam のこの投与量では自発運動量の抑制と極めて軽度な後肢の弛緩を示したのみであった. これに対してカタレプシーと鎮静症状をひきおこした chlorpromazine 投与群では DOPAC, HVA 量の増加が視床下部を除く全ての DA 含有神経組織で認められ, DOPAC 量の増加率は尾状核で164%と最も著るしく, 次いで嗅結節の85%, 以下脳皮質の68%, 透明中隔の31%の順であった. また HVA 量については嗅状核の548%が著明に高く, 尾状核の208%, 脳皮質の102%がこれに続いた. さらに chlorpromazine はこれら同部位の DA 代謝率を亢進させた. なお視床下部の DA, DOPAC 量ならびに DA 代謝率はいずれも各薬物による影響は認められなかった (Table 1).

2. NE 代謝におよぼす影響

NE 代謝に対する成績は Table 2 に要約されるように, benzodiazepine 系薬物は尾状核の代謝率を clonazepam 投与群63%, diazepam 投与群49%と有意に抑制した. 一方 chlorpromazine 投与群では橋一延髄, 脳皮質においてそれぞれ63%, 122%の亢進が認められた (Table 2).

Table 2. Effects on NE content and NE turnover in regions of rat cerebrum.

Regions	Treatments	Dose mg/kg i.p. × 2	NE content		NE turnover rate	
			ng/g	%	ng/g/hr	%
Olfactory tubercle	control	0	765 ± 49		80 ± 15	
	clonazepam	1	795 ± 83		74 ± 12	
	diazepam	5	—		—	
	chlorpromazine	5	802 ± 95		131 ± 28	
Hypothalamus	control	0	1,566 ± 67		287 ± 19	
	clonazepam	1	1,747 ± 114		260 ± 37	
	diazepam	5	1,614 ± 124		229 ± 37	
	chlorpromazine	5	1,566 ± 88		240 ± 27	
Pons-medulla	control	0	474 ± 25		73 ± 7	
	clonazepam	1	494 ± 55		82 ± 16	
	diazepam	5	399 ± 45		52 ± 13	
	chlorpromazine	5	530 ± 38		119 ± 10 ^b	+63
Caudatus	control	0	307 ± 20		49 ± 6	
	clonazepam	1	259 ± 31		18 ± 10 ^a	-63
	diazepam	5	287 ± 15		25 ± 6 ^a	-49
	chlorpromazine	5	278 ± 20		35 ± 6	
Midbrain-thalamus	control	0	290 ± 19		31 ± 7	
	clonazepam	1	279 ± 25		27 ± 9	
	diazepam	5	—		—	
	chlorpromazine	5	308 ± 33		44 ± 10	
Cortex	control	0	190 ± 15		32 ± 5	
	clonazepam	1	219 ± 31		31 ± 11	
	diazepam	5	269 ± 44		38 ± 7	
	chlorpromazine	5	267 ± 27 ^a	+41	71 ± 7 ^b	+122

The animals were given an i.p. administration of each drug twice at 2 hr intervals and sacrificed 1 hr after the last dose of benzodiazepines and 0.5 hr after that of chlorpromazine. Values are means ± s.e. for 7 animals. a; a significant difference from control values, $p < 0.05$, b; $p < 0.01$.

3. 5-HT 代謝におよぼす影響

脳内 5-HT, 5-HIAA 量に対する作用は Table 3 に示すように, clonazepam, diazepam 等 benzodiazepine 系薬物投与群で視床下部, 中脳—視床ならびに橋—延髄において 5-HIAA 量の著明な減少と視床下部, 中脳—視床での 5-HT 量の有意な減少が認められた. このときの両薬物による抑制は脳部位に関係なくほぼ同等であった. これに反して chlorpromazine 投与群は橋—延髄で 5-HT 量27%, 5-HIAA 量76%とともに増加させた. 脳幹部以外の部位では被検薬物による影響はほとんど認められなかった (Table 3).

4. DA 代謝におよぼす DA 作動薬との併用効果

Benzodiazepine 系薬物によって観察された DA 代謝の抑制は前シナプス性の効果によるものか, 後シナプス性の結果なのか, この点を明解にするため DA 作動薬でも後シナプス性に作用するとされる apomorphine (1 mg/kg s.c.), 前シナプス性に作用するとされる *d*-methamphetamine (3 mg/kg s.c.) を用いて, clonazepam

Table 3. Effects on 5-HT and 5-HIAA contents in regions of rat cerebrum.

Regions	Treatments	Dose mg/kg i.p. × 2	5-HT content		5-HIAA content	
			ng/g	%	ng/g	%
Olfactory tubercle	control	0	1,462 ± 140		392 ± 34	
	clonazepam	1	1,635 ± 60		368 ± 38	
	diazepam	5	1,531 ± 48		321 ± 40	
	chlorpromazine	5	1,072 ± 79		479 ± 47	
Hypothalamus	control	0	1,280 ± 33		554 ± 26	
	clonazepam	1	1,049 ± 22 ^c	−18	419 ± 32 ^b	−24
	diazepam	5	1,109 ± 13 ^b	−13	391 ± 40 ^b	−29
	chlorpromazine	5	1,320 ± 51		582 ± 31	
Midbrain-thalamus	control	0	1,168 ± 42		692 ± 28	
	clonazepam	1	1,060 ± 81		557 ± 42 ^a	−20
	diazepam	5	1,044 ± 7 ^a	−11	577 ± 17 ^b	−17
	chlorpromazine	5	1,403 ± 72 ^a	+20	832 ± 61	
Caudatus	control	0	912 ± 32		622 ± 16	
	clonazepam	1	941 ± 34		620 ± 23	
	diazepam	5	978 ± 30		549 ± 35 ^a	−12
	chlorpromazine	5	833 ± 24		645 ± 40	
Pons-medulla	control	0	915 ± 26		508 ± 30	
	clonazepam	1	914 ± 61		319 ± 20 ^c	−37
	diazepam	5	945 ± 67		331 ± 40 ^b	−35
	chlorpromazine	5	1,158 ± 30 ^c	+27	895 ± 64 ^c	+76
Septum	control	0	835 ± 71		296 ± 27	
	clonazepam	1	927 ± 116		215 ± 45	
	diazepam	5	1,177 ± 158		278 ± 3	
	chlorpromazine	5	808 ± 52		822 ± 6	
Cortex	control	0	669 ± 23		297 ± 15	
	clonazepam	1	654 ± 29		280 ± 10	
	diazepam	5	661 ± 24		288 ± 10	
	chlorpromazine	5	682 ± 43		346 ± 23	

The animals were given an i.p. administration of each drug twice at 2 hr intervals and sacrificed 1 hr after the last dose of benzodiazepines and 0.5 hr after that of chlorpromazine. Values are means ± s.e. for 6 animals. a; a significant difference from control values, $p < 0.05$, b; $p < 0.01$ c; $p < 0.001$.

(1 mg/kg i.p.×2) ならびに chlorpromazine (5 mg/kg i.p.×2) との併用効果を検討した. 被検薬物は2時間間隔で2回にわたって投与し, 2回目の投与1時間後(chlorpromazine は30分後)に各 DA 作働薬を投与した後1時間目に屠殺して脳内各部の DOPAC, HVA 量を測定した.

Fig. 1 は各薬物の単独投与効果を示しており, apomorphine 投与群で HVA, DOPAC 量の有意な減少が尾状核で認められた他, DOPAC 量の減少が大腦皮質, 嗅結節にみられた. また *d*-methamphetamine 投与群では HVA, DOPAC 量の減少が尾状核で, DOPAC 量の減少のみが嗅結節, 透明中隔で認められた (Fig. 1, Table 4). Apomorphine と clonazepam の併用効果は尾状核の HVA 量ならびに大腦皮質の HVA, DOPAC 量の減少をさらに亢進し, chlorpromazine 併用時には apomorphine による DOPAC 量減少作用を尾状核, 嗅結節ならびに大腦皮質で有意に抑制した (Table 4). 一方 *d*-methamphetamine と clonazepam との併用による DOPAC 量の減少増強作用は大腦皮質のみに認められた. なお chlorpromazine 併用時には *d*-methamphetamine 投与による変化は大腦皮質を除いた全ての部位で拮抗された (Table 4).

Fig. 1. Effects of clonazepam, chlorpromazine and DA agonists on HVA and DOPAC contents in regions of rat cerebrum. Clonazepam and chlorpromazine were injected i.p. twice at 2 hr intervals and the animals were sacrificed 1 hr after the last dose of clonazepam and 0.5 hr after that of chlorpromazine. Apomorphine and *d*-methamphetamine were given 1 hr before sacrifice. The data indicate means±s.e. obtained from 5~7 samples for DOPAC (3 pooled tissues/sample) and HVA (3~10 pooled tissues/sample) determinations. The symbols ▼ represent a significant difference from saline controls, $p < 0.05$.

Table 4. Effects on apomorphine- or *d*-methamphetamine-induced changes in DOPAC and HVA contents in regions of rat cerebrum.

Regions	Treatments	Dose mg/kg i.p. × 2	DOPAC content (ng/g)			HVA content (ng/g)		
			without DA agonists	Apomorphine 1 mg/kg s.c.	<i>d</i> -Metham- phetamine 3 mg/kg s.c.	without DA agonists	Apomor- phine 1mg/kg s.c.	<i>d</i> -Metham- phetamine 3mg/kg s.c.
Caudatus	control	0	789 ± 36	557 ± 14 ^c	605 ± 38 ^b	574 ± 28	127 ± 23 ^c	239 ± 64 ^b
	clonazepam	1	557 ± 14 ^c	521 ± 19	582 ± 21	359 ± 74 ^a	73 ± 22*	425 ± 26*
	chlorpromazine	5	2,232 ± 109 ^c	1,316 ± 41***	1,204 ± 65***	—	—	—
Olfactory tubercle	control	0	943 ± 46	650 ± 27 ^c	787 ± 42 ^a	—	—	—
	clonazepam	1	822 ± 34	689 ± 37	1,057 ± 54**	—	—	—
	chlorpromazine	5	1,861 ± 63 ^c	1,134 ± 175**	1,290 ± 82***	—	—	—
Cortex	control	0	74 ± 5	29 ± 4 ^c	76 ± 5	45 ± 13	28 ± 6	36 ± 4
	clonazepam	1	32 ± 7 ^c	18 ± 1**	44 ± 4**	9 ± 1 ^a	12 ± 6*	30 ± 10
	chlorpromazine	5	95 ± 4 ^a	46 ± 3**	56 ± 5*	—	—	—
Septum	control	0	472 ± 40	430 ± 27	330 ± 17 ^a	—	—	—
	clonazepam	1	377 ± 21	427 ± 27	360 ± 24	—	—	—
	chlorpromazine	5	681 ± 53 ^a	—	445 ± 3***	—	—	—

The animals were given a s.c. administration of each DA agonist 1 hr after clonazepam and 0.5 hr after chlorpromazine pretreatments and were sacrificed 1 hr later. Values are means ± s.e. obtained from 5~7 samples for DOPAC (3 pooled tissues/sample) and HVA (3~10 pooled tissues/sample) determinations. a, b, c; significant differences from control values, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively. *, **, ***; significant differences from corresponding DA agonist alone, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively.

5. 常同行動 (stereotyped behavior), 自発運動量におよぼす DA 作動薬との併用効果

Clonazepam (0.3, 1 mg/kg i.p. × 2), chlorpromazine (5 mg/kg i.p.) の投与10分後に apomorphine 1mg/kg, *d*-methamphetamine 3 mg/kg をそれぞれ皮下投与し, 投与直後より 15 分間隔で 75 分間にわたって常同行動 (stereotyped behavior), 自発運動量を測定した。

Fig. 2 は apomorphine の効果を経時的に示しており, ラットは apomorphine 単独投与 2, 3 分後より sniffing, gnawing, rearing を絶えまなく開始し, 続いて床の licking 行動が加わるようになる。Clonazepam 前処置群ではこれらの常同行動 (stereotyped behavior) の内 sniffing, licking の著しい増強が認められた。さらに apomorphine により誘起された常同行動 (stereotyped behavior) は Animex でも計測され, この計測値の有意な増強が clonazepam 前処置群で用量依存的に認められた。なお clonazepam 単独投与群では自発運動量は軽度抑制され, chlorpromazine 前処置群では完全に消失しないが著しく抑制された (Fig. 2)。さらに脳内 DA 含量を減少させる reserpine 2 mg/kg を 18 時間前に腹腔内投与し, apomorphine 作用に対する clonazepam の効果を検討したところ, Fig. 3 に示されるように reserpine の前処置により apomorphine の常同行動 (stereotyped behavior) に抑制は認められず, むしろ増加傾向にあり, また clonazepam による apomorphine 作用の増強に対しても同様に著しい変化を与えなかった (Fig. 3)。

一方 *d*-methamphetamine 単独投与群では投与数分後より探索行動が活発化し, 続いて sniffing, restless が順次出現し, apomorphine の場合よりもより持続的な常同行動 (stereotyped behavior) を示した。これに対し clonazepam 前処置群では sniffing が強まり gnawing と licking が新たに出現して有意な増強が認められたが, 自発運動量に対する影響はみられなかった。なお chlorpromazine 併用群では *d*-methamphetamine 投与により誘起された行動変化が拮抗された (Fig. 4)。

6. 脳内 cyclic AMP 系におよぼす影響

1) 脳内 cyclic AMP 含量におよぼす影響

Benzodiazepine 系薬物である clonazepam (1 mg/kg i.p. × 2) と flunitrazepam (1 mg/kg i.p.) を投与し,

Apomorphine

Fig. 2. Effects of clonazepam and chlorpromazine on apomorphine-induced stereotyped behavior and locomotor activation. The data represented show means $\pm$ s.e. obtained from 5 animals. Closed circles, apomorphine hydrochloride (1 mg/kg s.c.) controls; open circles, plus clonazepam (1 mg/kg i.p. $\times$ 2); half-closed circles, plus clonazepam (0.3mg/kg i.p. $\times$ 2); closed squares, chlorpromazine (5mg/kg i.p.) controls; open squares, plus chlorpromazine; closed triangles, clonazepam (1 mg/kg i.p. $\times$ 2) controls; open triangles, saline controls. s; a significant difference from apomorphine controls, $p < 0.05$.

Table 5. Effects of benzodiazepines on cyclic AMP content in regions of rat cerebrum.

Treatments	Dose mg/kg i.p.	pmole of c-AMP /mg protein				
		Caudatus	Cortex	Olfactory tubercle	Midbrain	Pons-medulla
Control	0	5.2 $\pm$ 0.4	9.7 $\pm$ 0.9	—	10.3 $\pm$ 0.7	7.0 $\pm$ 0.4
Clonazepam	1 $\times$ 2	4.6 $\pm$ 0.4	9.9 $\pm$ 0.3	—	9.7 $\pm$ 0.6	6.7 $\pm$ 0.6
Control	0	3.6 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 1.2	3.5 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 0.8	5.8 $\pm$ 0.6
Flunitrazepam	1	3.7 $\pm$ 0.2	6.4 $\pm$ 1.2	4.1 $\pm$ 0.4	9.3 $\pm$ 0.8	5.7 $\pm$ 0.6

The animals were given an i.p. administration of clonazepam 1mg/kg twice at 2 hr intervals and their heads were exposed to microwave irradiation for 20 sec 60 min after the last dose. c-AMP contents were assayed by measuring the formation of the labelled c-AMP-protein complex. Values are means $\pm$ s.e. for 5 animals.

Fig. 3. Effects of reserpine pretreatment on clonazepam enhancement of apomorphine-induced stereotyped behavior. Apomorphine 1 mg/kg s.c. was administered 18 hr after reserpine 2 mg/kg i.p. and 10 min after clonazepam 1 mg/kg i.p. $\times 2$.

Table 6. Effects of benzodiazepines on phosphodiesterase activity in the rat caudatus and cortex *in vitro* and *in vivo*.

Addition	Concentration M	Caudatus	Cortex
		pmole of c-AMP hydrolysed/mg protein/min	
None	—	794.0 $\pm$ 20.6	318.4 $\pm$ 7.0
Clonazepam	3×10^{-9}	814.9 $\pm$ 44.5	—
	3×10^{-8}	856.7 $\pm$ 23.0 ^a	—
	10^{-6}	658.9 $\pm$ 22.3 ^b	318.2 $\pm$ 11.1
	10^{-5}	627.8 $\pm$ 30.4 ^b	318.8 $\pm$ 11.0
	10^{-4}	565.4 $\pm$ 30.0 ^c	203.8 $\pm$ 4.4 ^c
Diazepam	10^{-6}	742.3 $\pm$ 37.2	262.4 $\pm$ 15.8 ^a
	10^{-5}	656.8 $\pm$ 22.1 ^b	224.5 $\pm$ 7.6 ^c
	10^{-4}	244.2 $\pm$ 40.8 ^c	137.5 $\pm$ 14.6 ^c
Theophylline	2×10^{-3}	376.1 $\pm$ 49.2 ^c	—
	10^{-2}	262.9 $\pm$ 21.6 ^c	—
Treatment	Dose mg/kg i.p.	Caudatus	Cortex
		pmol of c-AMP hydrolysed/mg protein/min	
Control	0	800.0 $\pm$ 20.7	297.1 $\pm$ 6.8
Clonazepam	1×2	827.4 $\pm$ 47.2	282.3 $\pm$ 9.0

In the experiment *in vitro*, clonazepam was suspended into 0.1 N HCl in a ultrasonicator and pH was adjusted to 7.4. The animals were given an i.p. administration of clonazepam 1mg/kg twice at 2 hr intervals and sacrificed 1 hr after the last dose. Values are means $\pm$ s.e. obtained from 6 samples for the assay *in vitro* and 5 animals for *in vivo*. a, b, c; significant differences from control values, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, respectively.

Fig. 4. Effects of clonazepam and chlorpromazine on *d*-methamphetamine-induced stereotyped behavior and locomotor activation. The data represented show means $\pm$ s.e. obtained from 5 animals. Closed circles, *d*-methamphetamine (3 mg/kg s.c.) controls; open circles, plus clonazepam (1 mg/kg i.p. $\times$ 2); half-closed circles, plus clonazepam (0.3 mg/kg i.p. $\times$ 2); open squares, plus chlorpromazine (5 mg/kg i.p.); open triangles, saline controls. s; a significant difference from *d*-methamphetamine controls, $p < 0.05$.

それぞれ投与1時間後に電磁波照射を行ない、脳内の adenylate cyclase, phosphodiesterase 両酵素を不活性化した後 cyclic AMP 量を測定した。

結果は Table 5 に示したように、clonazepam, flunitrazepam とともに測定したいずれの部位（尾状核、大脳皮質、嗅結節、中脳、橋—延髄）においても、cyclic AMP 含量に対する影響は認められなかった (Table 5)。

2) DA-sensitive adenylate cyclase 活性におよぼす影響

DA 代謝に対する clonazepam の抑制効果が最も著しく認められた尾状核のホモジネートを用いて、その adenylate cyclase 活性に対する効果を *in vitro* で検討した。Clonazepam は水に不溶性のため Sonifier (Banson 社, B-12型) により 0.1 N HCl に懸濁溶解し、蒸留水で希釈後 pH を 7.4 に調整し適用した。一方 flurazepam は蒸留水に溶解後適用した。

調整した薬物賦形液は adenylate cyclase 活性に対しそれ自体有意な抑制 (36%) を示すため、DA の刺激効果ならびに clonazepam 添加の影響を検討する場合、必ず賦形液を添加して対照群とした (Fig. 5)。Phosphodiesterase 活性阻害作用が認められない濃度 (Table 6) である 3×10^{-9} , 3×10^{-8} M の clonazepam 単独効果はこの賦形液に比較してみられないが、DA は $3 \times 10^{-6} \sim 3 \times 10^{-5}$ M の濃度範囲において用量に依存して adenylate cyclase 活性を直線的に増加した。しかしながらこの DA 効果に対し、clonazepam は有意な影響は示さなかつ

Fig. 5. Effects of clonazepam and flurazepam on DA-sensitive adenylate cyclase activity in rat caudate homogenates. The data represented show means $\pm$ s.e. obtained from 6 samples. s; a significant difference from corresponding untreated controls, $p < 0.05$.

た。また水溶性 benzodiazepine 系薬物の flurazepam $10^{-9} \sim 10^{-8} \text{ M}$ も単独適用時ならびに DA ($3 \times 10^{-6}, 10^{-5} \text{ M}$) 併用時、いずれの場合も著しい変化を示さなかった (Fig. 5)。

3) Phosphodiesterase 活性におよぼす影響

尾状核ならびに大脳皮質のホモジネートを用いて clonazepam の phosphodiesterase 活性に対する効果を *in vitro* で diazepam, theophylline と比較検討するとともに、clonazepam (1 mg/kg i.p. $\times 2$) の *in vivo* における作用を検討した。Clonazepam は上述の如く調整し、diazepam は 0.1 N HCl に溶解・希釈後 pH を 7.4 に調整し適用した。

結果は Table 6 に示したように、尾状核ホモジネートで clonazepam ($10^{-6} \sim 10^{-4} \text{ M}$)、diazepam ($10^{-6} \sim 10^{-4} \text{ M}$) ならびに theophylline ($2 \times 10^{-3}, 10^{-2} \text{ M}$) とともにほぼ用量依存的に phosphodiesterase 活性を抑制したが、その程度は 10^{-4} M で diazepam 69% に対し clonazepam 29% と弱く、diazepam の約 40% の効力であった。なお DA-sensitive adenylate cyclase 活性に有意な影響をおよぼさなかった $3 \times 10^{-9}, 3 \times 10^{-8} \text{ M}$ の clonazepam には phosphodiesterase 活性抑制作用は認められなかった。また大脳皮質ホモジネートでもほぼ同様の傾向がみられ、 10^{-4} M の適用で diazepam 57%, clonazepam 36% の抑制が認められた。しかしながら clonazepam の腹腔内投与では尾状核、大脳皮質ともに有意な影響は認められなかった (Table 6)。

7. 脳各部位の ChAc, AChE 活性におよぼす影響

中枢 DA 作働性神経と ACh 作働性神経との相互作用については既に数多くの研究が為されている。Clonazepam による尾状核、大脳皮質 DOPAC, HVA 量の減少作用が ACh 作働性神経を経由するか否かについて検討した。

Clonazepam 0.3, 3.0 mg/kg をラットに経口投与し 1 時間後に屠殺し、脳各部位の ChAc, AChE 活性を測

Table 7. Effects of clonazepam on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in regions of rat cerebrum and spinal cord.

Treatments	Dose mg/kg p.o.×2	Caudatus	Cortex	Medulla	Pons	Midbrain	Olfactory tubercle	Hypothalamus	Spinal
Choline acetyltransferase activity (nmole of ACh formed/h/mg protein)									
Control	0	88.0±2.1	24.0±0.73	48.9±1.8	46.2±1.6	24.4±1.0	104.5±12.8	17.6±1.09	15.5±1.30
Clonazepam	0.3	84.7±2.0	23.3±0.78	46.2±2.4	47.4±2.5	22.5±1.8	113.7±6.7	15.8±0.33	13.9±0.89
Clonazepam	3	82.4±5.1	22.2±1.25	51.9±1.9	42.8±1.1	21.6±1.0	108.7±9.3	15.2±0.95	14.8±0.62
Acetylcholinesterase activity (nmole of acetate formed/h/mg protein)									
Control	0	127.7±6.5	44.6±1.0	114.6±2.7	200.3±7.8	57.8±2.4	331.0±21.1	42.4±2.9	29.4±2.5
Clonazepam	0.3	133.6±4.9	42.0±2.1	118.6±1.9	214.5±7.0	57.9±4.0	288.3±9.2	43.2±2.8	24.9±1.9
Clonazepam	3	146.2±5.9	47.3±1.6	125.6±6.1	233.1±14.1	55.4±1.7	288.8±16.5	45.6±2.0	27.1±0.56

Male Wistar rats were given two doses of each clonazepam 0.3 and 3mg/kg at 2 hr intervals and sacrificed 1 hr after the last dose. Values are means±s.e. obtained from 5 animals.

定した結果、両用量ともに有意な影響は認められなかった (Table 7).

考 察

近年になり中枢 DA 作働性神経経路が明解にされ、精神分裂病治療薬の作用部位として黒質—線状体経路に続き、中脳の nuc. interpedunculus の背側部両側に DA 細胞群を有し (A-10 細胞群)、嗅結節, nuc. accumbens, nuc. amygdaloideus centralis に神経終末している中脳—辺縁系経路が判明してきた^{30,31)}。さらに中脳の A-9, A-10 細胞群に DA 細胞体をもち、大脳皮質に神経終末している中脳—皮質経路も新しい作用部位として考えられている³²⁾。また精神分裂病治療薬の抗精神効果ならびに錐体外路系症状はそれぞれ辺縁系と線状体における DA 量の欠乏によって誘起されることが報告されている³³⁾。Benzodiazepine 系薬物の中枢作用部位に関しては chlordiazepoxide, diazepam による線状体 DA 代謝率の低下^{11,12)}、または線状体刺激により黒質から誘導される活動電位に対する bicuculline の抑制に diazepam が拮抗すること³⁴⁾などから黒質—線状体経路に影響をおよぼすものと考えられている。

Benzodiazepine 系静穏剤 clonazepam, diazepam の投与は黒質—線状体 DA 作働性神経経路が終末する尾状核で DOPAC, HVA 量を有意に減少させ、DA 代謝率も抑制した。同様な傾向は大脳皮質でも認められたが HVA 量に対する両薬物の作用に相似性がみられないことから、benzodiazepine 系薬物は黒質—線状体経路の DA 代謝に主要な作用部位が存在するように思われる¹²⁾。一方 chlorpromazine による DA 主要代謝物の増加程度は DOPAC 量：尾状核>嗅結節>大脳皮質、透明中隔、HVA 量：嗅結節>尾状核>大脳皮質の順であった。このような精神分裂病治療薬においてみられる DA 代謝率の亢進は DA 受容器遮断による代償的な影響であり³⁵⁾、negative feedback 説を benzodiazepine 系薬物による DA 代謝率の抑制機構に適用するならば、DA 作働性神経の後シナプス部受容器の刺激とともに前シナプス部受容器の遮断が仮定される¹²⁾。また GABA 作働性神経の活性亢進³⁴⁾に起因する DA 作働性神経の活性低下、後シナプス感受性亢進の過程も想定されよう。

この点を明解にするため第 1 に常同行動 (stereotyped behavior)、自発運動量に対する apomorphine ならびに *d*-methamphetamine との併用効果を検討した。Clonazepam はこれら DA 作働薬によって誘起された常同行動 (stereotyped behavior) をほぼ用量依存的に亢進するとともに、reserpine 前処置による apomorphine 効果の増強をさらに亢進した。一方 chlorpromazine は常同行動 (stereotyped behavior) を逆に抑制した。一般に apomorphine^{19,36)} や *d*-amphetamine³⁷⁾ による常同行動 (stereotyped behavior) は中脳—辺縁系経路³⁸⁾あるいは黒質—線状体経路³⁹⁾に依存すると報告されている。

第 2 に DA 作働薬と clonazepam 併用時の DOPAC, HVA 量におよぼす影響を検討したところ、各薬物単独投与時の DOPAC 量減少程度は尾状核ではほぼ同等、嗅結節では apomorphine > *d*-methamphetamine > clonazepam、また大脳皮質においては apomorphine = clonazepam であった。HVA 量に対しては尾状核で apo-

morphine > *d*-methamphetamine > clonazepam, 大脳皮質においては clonazepam が著しい減少作用を示した。なお前シナプスからの DA 放出を主作用とする *d*-methamphetamine に、本実験で DA 主要代謝物の軽度ながら減少が逆に認められたことは後シナプス部位における直接作用を示唆するものである。一方 clonazepam と DA 作働薬との併用効果は尾状核、大脳皮質で apomorphine に著効を認めた。なお apomorphine が DA 受容器を直接刺激することは多くの研究者の一致するところであり、*d*-amphetamine の DA 放出促進作用⁴⁰⁾ならびに再取り込み抑制作用⁴¹⁾もまた広く知られた事実である。従ってこれら DA 作働薬処置後の行動上、神経化学的变化に対する clonazepam の増強効果から、さらには前シナプス DA 量を枯渇させる reserpine 投与下においても apomorphine 常同行動 (stereotyped behavior) の亢進が認められることから、benzodiazepine 系薬物による DA 作働性神経代謝の抑制は後シナプス性におこる DA 受容器の活性化によるものと推定される¹²⁾。

従って次に DA-sensitive な受容器活性の指標とされる脳内 cyclic AMP 量におよぼす影響を検討したが flunitrazepam, clonazepam とともに有意な変化は認められなかった。一方 DA-sensitive adenylate cyclase 活性は *in vitro* で apomorphine²⁵⁾, *d*-amphetamine⁴²⁾, l-DOPA⁴³⁾, neuroleptics^{25, 44)} を用いた実験より DA 受容器としての性格をもつことが明らかになっている。そこで尾状核のホモジネートを用いてこの adenylate cyclase 系に対する作用を調べてみたが、phosphodiesterase 活性阻害作用のない濃度の clonazepam は単独適用時、DA 併用時いずれも著変を示さなかった。しかしながら、phosphodiesterase 活性に対してこれを 50% 抑制する diazepam 相当量¹⁵⁾の clonazepam は尾状核、大脳皮質両ホモジネートで有意な抑制作用を示した。しかし *in vivo* 実験における本酵素の抑制は認められなかった。以上より clonazepam の DA 作働性神経の受容器に対する興奮作用には cyclic AMP 系の直接関与が少ないものと考えられる。これに対し Haefely ら³⁴⁾, Da Prada and Pletscher³⁵⁾ は、benzodiazepine 系薬物の線状体 DA 代謝低下作用を線状体—黒質 GABA 作働性抑制系神経の亢進による DA 作働性神経の活性低下の結果、受容器の感受性亢進を来たすものと説明している。しかしながら、Steiner ら⁴⁵⁾は逆に benzodiazepine 系薬物と GABA との間には拮抗関係があるとしている。

5-HT 代謝に対する作用は benzodiazepine 系薬物が視床下部、中脳—視床、橋—延髄等脳幹部の 5-HT, 5-HIAA 量を減少させる一方、chlorpromazine は橋—延髄の 5-HT, 5-HIAA 量を有意に増加させた。Lidbrink ら¹⁰⁾は tryptophan hydroxylase を dopacetamide で抑制後大脳皮質での 5-HT の消失率が chlordiazepoxide で抑制されるとしており、また diazepam も脳内 5-HT 代謝率を低下させることが知られている⁴⁶⁾。しかし逆に diazepam により 5-HIAA 量の軽度な増加も認められている⁴⁷⁾。また clonazepam によるマウス head twitch 惹起作用は抗 5-HT 薬の cyproheptadine により抑制されると言う⁴⁸⁾。5-HT 合成の短期調節は後シナプス部位からの feedback control を含むものであり⁴⁹⁾、benzodiazepine 系薬物は脳幹部の神経活性を逆に亢進させた結果、本実験で認められる脳幹部の 5-HIAA 量の減少が生じたものと推測される。

NE 代謝に対しても 5-HT 代謝とはほぼ同様な傾向が尾状核、橋—延髄、大脳皮質で認められた。Benzodiazepine 系薬物のこのような NE 代謝率抑制作用は他の研究者達によっても報告されている。すなわちラットの脳幹部以外の他の脳部位における NE 代謝の diazepam による抑制⁵⁰⁾、また 6-hydroxydopamine のラット側脳室注入によりみられる情動亢進ならびに脳幹部以外の部位における NE 代謝亢進の diazepam, chlordiazepoxide による抑制¹⁷⁾、ストレス負荷時のラット脳の NE 代謝亢進の両薬物による抑制⁵¹⁾などが認められている。

各種脳内神経系の内いずれがてんかん発作に関与しているのかは別として、monoamine の脳内含量を減少させると発作はおこりやすくなり、逆に増加させると発作はおこりにくくなるという事実がある⁵²⁾。電激痙攣閾値と尾状核 DA 量との間に相関関係のあることも見出されている⁵³⁾。またてんかん患者において脳脊髄液 HVA⁵⁴⁾, 5-HIAA⁵⁵⁾ 量、血清 monoamine oxidase 活性⁵⁶⁾、dopamine β -hydroxylase 活性⁵⁷⁾の低下がそれぞれ報告されており、脳内 DA 代謝の低下が存在することが推定されている。またてんかん患者髄液中には tyramine と octopamine が検出され、catecholamine 代謝の全般的な異常が想定されている⁵⁸⁾。

以上より clonazepam の投与時にみられる尾状核、大脳皮質の DOPAC, HVA 量の減少は、cyclic AMP 生成系の関与が少ない、おそらくは線状体—黒質 GABA 作働性神経の活性上昇に起因する DA 作働性神経の受容体レベルの活性亢進に由来するものであり、本薬物の抗痙攣作用の発現に関与するものと考えられる。

文 献

- 1) 中村圭二, ツビンデン, G., ランドール, L. O.: 向精神薬の薬理, p. 159, 朝倉書店, 東京 (1971)
- 2) VON BLUM, J. E., HAEFELY, W., JALFRE, M., POLC, P. and SCHÄRER, K.: *Arzneim. -Forsch.* **23**, 377 (1973)
- 3) 矢島 孝, 瓜谷克子, 青木理恵, 鈴木 勉, 中村圭二: 日薬理誌, **72**, 763 (1976)
- 4) HANSON, R. A. and MENKENS, J. H.: *Develop. Med. Child Neurol.* **14**, 3 (1972)
- 5) GASTAUT, H., COURJON, J., POIRÉ, R. and WEBER, M.: *Epilepsia* **12**, 197 (1971)
- 6) AZZARO, A. J., WENGER, G. R., CRAIG, C. R. and STITZEL, R. E.: *J. Pharmacol. exp. Ther.* **180**, 558 (1972)
- 7) MCKENZIE, G. M. and SOROKO, F. E.: *J. Pharm. Pharmacol.* **24**, 696 (1972)
- 8) PIETTE, Y., DELAUNOIS, A. L., DE SCHAEPPDRYVER, A. F. and HEYMANS, C.: *Archs int. Pharmacodyn. Thér.* **144**, 293 (1963)
- 9) LEHMANN, A.: *Life Sci.* **6**, 1423 (1967)
- 10) LIDBRINK, P., CORRODI, H., FUXE, K. and OLSON, L.: *The Benzodiazepines*, Edited by Garattini, S., Mussini, E. and Randall, L. O., p. 203, Raven Press, New York (1973)
- 11) BARTHOLINI, G., KELLER, H., PIERI, L. and PLETSCHER, A.: *The Benzodiazepines*, Edited by Garattini, S., Mussini, E. and Randall, L. O., p. 235, Raven Press, New York (1973)
- 12) 中村圭二: *Neuropsychopharmacol.* **1**, 27 (1975)
- 13) SEDVALL, G., BJERKENSTEDT, L., HÄRNRYD, H., NYBÄCK, H. and WIESEL, F.-A.: *Neuropsychopharmacology*, Edited by Boissier, J. R., Hippus, H. and Pichot, P., p. 459, American Elsevier, New York (1975)
- 14) CORRODI, H., FUXE, K., LIDBRINK, P. and OLSON, L.: *Brain Res.* **29**, 1 (1971)
- 15) BEER, B., CHASIN, M., CLODY, D. E., VOGEL, J. R. and HOROVITZ, Z. P.: *Science* **176**, 428 (1972)
- 16) SCHULTZ, J.: *Pharmacol. Res. Commun.* **6**, 335 (1974)
- 17) NAKAMURA, K., GEROLD, M. and THOENEN, H.: *Arch. Pharmacol.* **268**, 125 (1971)
- 18) COSTALL, B. and NAYLOR, R. J.: *Europ. J. Pharmacol.* **24**, 8 (1973)
- 19) GLOWINSKI, J. and IVERSEN, L. L.: *J. Neurochem.* **13**, 655 (1966)
- 20) SCHLLENBERGER, M. K. and GORDON, J. H.: *Analyt. Biochem.* **39**, 356 (1971)
- 21) CURZON, G. and GREEN, A. R.: *Brit. J. Pharmacol.* **39**, 653 (1970)
- 22) MURPHY, G. F., ROBINSON, D. and SHARMAN, D. F.: *Brit. J. Pharmacol.* **36**, 107 (1969)
- 23) ANDÉN, N. E., ROOS, B. E. and WERDINIUS, B.: *Life Sci.* **3**, 149 (1963)
- 24) BROWN, B. L., ALBANO, J. D. M., EKINS, R. P. and MERZI, A. M.: *Biochem. J.* **121**, 561 (1971)
- 25) KEBABIAN, J. W., PETZOLD, G. L. and GREENGARD, P.: *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 2145 (1972)
- 26) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
- 27) WAYMIRE, J. C., BJUR, R. and WEINER, N.: *Analyt. Biochem.* **43**, 588 (1971)
- 28) FONNUM, F.: *J. Neurochem.* **24**, 407 (1975)
- 29) FONNUM, F.: *Biochem. J.* **115**, 465 (1969)
- 30) DAHLSTRÖM, A. and FUXE, K.: *Acta physiol. scand. Suppl.* **232**, 1 (1964)
- 31) UNGERSTEDT, U.: *Acta physiol. scand. Suppl.* **367**, 1 (1971)
- 32) THIERRY, A. M., STINUS, L., BLANC, G. and GLOWINSKY, J.: *Brain Res.* **50**, 230 (1973)
- 33) ANDÉN, N. E. and STOCK, G.: *J. Pharm. Pharmacol.* **25**, 346 (1973)
- 34) HAEFELY, W., KULISAR, W. A., MÖHLER, H., PIERI, L., POLC, P. and SCHAFFNER, R.: *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, Edited by Costa, E. and Greengard, P., p. 131, Raven Press, New York (1975)
- 35) DA PRADA, M. and PLETSCHER, A.: *J. Pharm. Pharmacol.* **18**, 628 (1975)
- 36) UNGERSTEDT, U., BUTCHER, L. L., BUTCHER, S. G., ANDÉN, N. E. and FUXE, K.: *Brain Res.* **14**, 461 (1969)
- 37) TAYLOR, K. M. and SNYDER, S. H.: *Brain Res.* **28**, 295 (1971)
- 38) MCKENZIE, G. M.: *Psychopharmacol.* **23**, 212 (1972)
- 39) CREESE, I. and IVERSEN, S. D.: *Psychopharmacol.* **39**, 345 (1974)
- 40) GAUCHY, C., BICULAC, B., CHERAMY, A., BESSON, M. J., GLOWINSKY, J. and VINCENT, J. D.: *Brain Res.* **77**, 257 (1974)
- 41) HARRIS, J. E. and BALDESSARINI, R. J.: *Neuropharmacol.* **12**, 669 (1973)
- 42) COSTA, E., CARENZI, A., GUIDOTTI, A. and REVUELTA, A.: *Frontiers in Catecholamine Research*, Edited by Usdin, E. and Snyder, S., p. 1003, Pergamon Press, London (1973)
- 43) GARELIS, E. and NEFF, N. H.: *Science* **183**, 532 (1974)
- 44) CLEMENT-CORMIER, Y. C., KEBABIAN, J. W., PETZOLD, G. L. and GREENGARD, P.: *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 1113 (1974)
- 45) STEINER, F. A. and FELIX, D.: *Nature* **260**, 346 (1976)

- 46) STEIN, L., WISE, C. D. and BELLUZZI, J. D.: *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, Edited by Costa, E. and Greengard, P., Vol. 14, p. 29, Raven Press, New York (1975)
- 47) FERNSTROM, J. D., SHABSHLOWITZ, H. and FALLER, D. V.: *Life Sci.* 15, 1577 (1974)
- 48) NAKAMURA, M. and FUKUSHIMA, H.: *Psychopharmacol.* 49, 259 (1976)
- 49) COSTA, E. and MEEK, J. L.: *A. Rev. Pharmacol.* 14, 491 (1974)
- 50) TAYLOR, K. M. and LAVERTY, R.: *Europ. J. Pharmacol.* 8, 296 (1969)
- 51) CORRODI, H., FUXE, K., LIDBRINK, P. and OLSON, L.: *Brain Res.* 29, 1 (1971)
- 52) MAYNERT, E. W.: *Epilepsia* 10, 145 (1969)
- 53) BILLIET, M., BERNARD, P., DELAUNOIS, A. and DE SCHAEFDRYVER, A.: *Archs int. Pharmacodyn. Thér.* 188, 396 (1970)
- 54) 小林清史, 岸川秀実, 森 昭胤, 高坂睦年: 医学のあゆみ 93, 577 (1975)
- 55) SHAYWITZ, B. A., COHEN, D. J. and BOWERS, M. B. Jr.: *Neurology* 25, 72 (1975)
- 56) 高坂睦年, 森 昭胤, 小林清史, 白壁武博: 精神薬療基金研究年報 5, 48 (1973)
- 57) MIRAS-PORTUGAL, M. T., AUNIS, D., MANDEL, P., WATER, J. M., COQUILLAT, G. and KURTZ, D.: *Psychopharmacol.* 41, 75 (1975)
- 58) 岸川秀実: 岡山医誌 87, 451 (1975)

Abstract—Kazuo NAKAMURA, Yoshiko SHIMOKAWA, Yukiko OIKAWA and Keiji NAKAMURA (Department of Pharmacology, Nippon Roche Research Center, Kamakura 247, Japan). Influence of clonazepam, an anticonvulsant benzodiazepine drug, on the rat brain monoamine containing neurons especially on dopaminergic neurons. *Folia pharmacol. japon.* 74, 251~265 (1978).

Clonazepam at two doses of 1 mg/kg i.p. significantly decreased 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) contents in the rat caudatus and cortex but no so in the olfactory tubercle, septum and hypothalamus. The drug decreased dopamine (DA) turnover rate in the caudatus, but did not inhibit tyrosine hydroxylase activity. The drug significantly enhanced stereotyped behavior induced by apomorphine and *d*-methamphetamine. Clonazepam enhanced apomorphine-induced decrease in striatal HVA, and cortical DOPAC and HVA contents, and *d*-methamphetamine-induced decrease in cortical DOPAC content. Reserpine pretreatment did not affect apomorphine-induced stereotypy and its enhancement with clonazepam. The drug did not activate adenylate cyclase nor DA-sensitive adenylate cyclase in the striatal homogenates and did not change cyclic AMP content in the caudatus. The drug inhibited phosphodiesterase activity in caudate and cortical homogenates but not *in vivo*. Clonazepam did not alter ChAc and AChE activities in the caudatus, 6 other cerebral regions and the spinal area. Clonazepam also decreased NE turnover in the caudatus and 5-HIAA contents in the brainstem area. These neurochemical and behavioral effects of clonazepam indicate probable postjunctional DA stimulation in the striatum and cortex of the type not linked with adenylate cyclase and phosphodiesterase but probably due to activation of inhibitory γ -amino butyric acid (GABA) neurons on the strio-nigral pathway.