The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	新規非定型抗精神病薬ルラシドンに関する薬理学研究
Author(s)	堀澤, 智子
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34396
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

新規非定型抗精神病薬ルラシドンに関する薬理学研究

2013 年

堀　澤　　智　子

目次

緒言　・・・

緒言

統合失調症は、一般人口の約 1%に発症する精神疾患の一つである。統合失調症の主な症状として、陽性症状（興奮、幻覚、妄想など）、陰性症状（自発性減退、感情鈍麻、社会性の低下など）、認知障害（注意記憶障害、実行機能障害など）が見られ、うつ・不安などの気分障害を併発することが知られている [1, 2] 。治療の中心は薬物療法となっているが、いまだに発症メカニズムが解明されておらず、治療効果や副作用の点から治療を中断せざるを得なくなるなど問題も多い。

1950 年代においてクロルプロマジンが統合失調症患者の精神症状を改善したことがきっかけとなり、陽性症状の改善にはドパミン D_2 受容体拮抗作用が重要であることが判明した [3, 4] 。その後、数多くの D_2 受容体拮抗作用を有する治療薬が第一世代抗精神病薬として開発されてきた。しかし、第一世代抗精神病薬（定型抗精神病薬）は、統合失調症の陽性症状には奏功するものの、陰性症状に対する有効性は弱い [5] 。さらに、運動中枢のひとつである線条体において D_2 受容体を強力に拮抗することによりパーキンソニズム、アカシジア、ジスキネジアなどの錐体外路症状（extrapyramidal symptoms, EPS）を高頻度に誘発することや、下垂体での D_2 受容体拮抗作用により高プロラクチン血症を発症することがあり、これらの副作用が臨床において問題とされてきた [6] 。

その後、脳内のセロトニン（5-hydroxytryptamine, 5-HT）$_{2A}$ 受容体の遮断が統合失調症の陰性症状を改善し、第一世代抗精神病薬による錐体外路症状を軽減するとの知見が報告され [7, 8] 、D_2 受容体拮抗作用に加えて強い 5-HT_{2A} 受容体拮抗作用を持つ第二世代抗精神病薬の開発が相次いだ。第二世代抗精神病薬（非定型抗精神病薬）は、陽性症状の改善に加えて陰性症状や認知障害にもある程度有効性を示し、EPS や高プロラクチン血症等の副作用が軽減され、現在使用されている治療薬の主流となっている。しかしながら、依然として陰性症状や認知障害の治療効果は十分でなく [9, 10] 、また第二世代抗精神病薬の中には体重増加や糖尿病発症リスクの増加を引き起こすものがあり、新たな問題となっている[11]。さらに、これらの治療薬の中にはヒスタミン H_1 受容体、アドレナリン α_1 受容体、ムスカリン性アセチルコリン M_1 受容体などに対する遮断作用を併せ持つものがあり、これらの受容体を介した副作用も問題となっている [12] 。

このような背景において、一般名：ルラシドン塩酸塩(3a*R*,4*S*,7*R*,7a*S*)-2-{(1*R*,2*R*)-2-[4-(1,2-benzisothiazol-3-yl)piperazin-1-ylmethyl]cyclohexylmethyl}hexahydro-4,7-methano-2*H*-isoindole-1,3-dione hydrochloride, SM-13496）（以下、ルラシドン）（Fig. 1）は有効性の向上と副作用の軽減を目指して創製された新規の抗精神病薬である。本研究では、ルラシドンの薬理学的特性を明らかにし、その特長について前臨床レベルで検証した。第一章では *in vitro* および *in vivo* の両面からルラシドンの薬理学的特性について検討を行った。第二章では、ルラシドンが高い結合親和性を示す 5-HT_7 受容体の脳内分布について *in vitro* オートラジオグラフィー法を用いて検討を行った。そして、第三章においては、統合失調症治療におい

て、未だに有効な治療法が確立されていない認知障害に着目し、統合失調症の動物モデルとして利用されている N-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体アンタゴニスト（MK-801）投与動物での学習記憶障害に対するルラシドンの作用および 5-HT_7 受容体の関与について検討を行った。

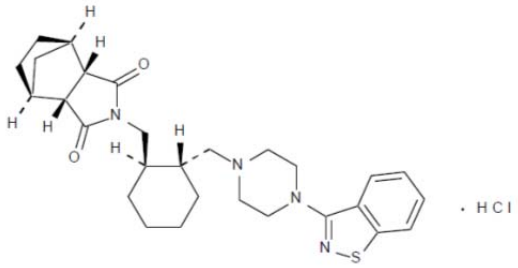

Fig. 1 Chemical structure of lurasidone.

本論

第一章　ルラシドンの薬理特性

ルラシドンは、大日本住友製薬株式会社で研究開発された新しい抗精神病薬で、2011 年より米国にて販売されている。本章では、ルラシドンの研究開発において明らかにした薬理特性についての研究成果をまとめた。第一節では、*in vitro* の薬理特性について、第二節では、*in vivo* の薬理特性に関する研究成果をまとめた。

第一節　ルラシドンの *in vitro* 薬理特性

統合失調症治療薬は様々な受容体に結合してその薬理特性を発揮していることから、治療薬の薬理特性を考察する上で、受容体結合特性を調べることは有用である[13]。そこで、ルラシドンの各種神経伝達物質受容体に対する結合親和性を検討し、既存の抗精神病薬と比較した。ルラシドンが結合親和性を示したドパミン D_2 受容体、セロトニン 5-HT_7 受容体および 5-HT_{1A} 受容体については、その結合がアゴニスト活性なのかアンタゴニスト活性なのかを追究するため *in vitro* での機能評価を行った。D_2 受容体には細胞内第 3 ループにある 29 アミノ酸の有無によって D_{2L} 受容体と D_{2S} 受容体が存在する。D_{2L} 受容体および 5-HT_{1A} 受容体は Gi 蛋白共役型受容体であり、アゴニストが受容体に結合することにより [^{35}S]GTPγS 結合が増加する。そこで、D_{2L} 受容体発現細胞膜を用いて、ルラシドンの [^{35}S]GTPγS 結合に対する作用および内因性のアゴニストであるドパミン（DA）による [^{35}S]GTPγS 結合増加に対するルラシドンの拮抗作用を検討した。同様に、5-HT_{1A} 受容体発現細胞膜を用いて、ルラシドンの[^{35}S]GTPγS 結合に対する作用を検討した。一方で、5-HT_7 受容体は Gs 蛋白共役型受容体であり、アゴニストが cAMP 産生を増大させる。そこで、5-HT_7 受容体発現細胞を用いて、ルラシドンの cAMP 産生に対する作用および内因性のアゴニストである 5-HT による cAMP 産生増加に対する拮抗作用を検討した。また、抗精神病薬による脳内の D_2 受容体遮断に伴い、その代償反応としてドパミンの代謝回転が亢進し、中脳（腹側被蓋野および黒質）からのドパミン神経の投射先である前頭皮質や線条体において、代謝物が増加することが知られている。そこで、ルラシドン投与による脳内ドパミンおよびその代謝物含量に及ぼす影響についてハロペリドール、クロザピンの作用と比較検討した。

実験方法

1. 実験動物

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット（6 週齢）（日本 SLC 株式会社）を入手し、約 1 週間の馴化期間を経た後、実験に使用した。動物は 12 時間の明暗サイクル、自由摂餌 CE-2（日本

クレア株式会社)、自由飲水で飼育した。すべての動物の取り扱いは、大日本住友製薬株式会社研究本部飼育管理手順書に従って行った。

2. 使用薬物

ルラシドンおよび対照薬（ハロペリドール、リスペリドン、オランザピン、クロザピン）は大日本住友製薬株式会社にて合成した。スピペロン、8-hydroxy-2-(di-N-propylamino)tetralin hydrobromide (8-OH-DPAT), ケタンセリン酒石酸塩 、ドパミン塩酸塩、セロトニン塩酸塩、プラゾシン塩酸塩、 WB4101 (2-[2-(2,6-dimethoxyphenoxy)ethylaminomethyl]-1,4-benzodioxane), トリプロリジン塩酸塩、オキソトレモリンセスキフマル酸塩は Sigma Aldrich Japan より入手した。GTPγS は Calbiochem より入手した。各薬物はジメチルスルホキシド（DMSO）で溶解・希釈した（終濃度 0.5%）。[^{3}H]spiperone, [^{3}H]ketanserin, [^{3}H]8-OH-DPAT, [^{3}H] 5-CT (5-carboxamidotryptamine), [^{3}H]prazosin, [^{3}H]pyrilamine, [^{3}H]QNB (quinuclidinyl benzilate), [^{3}H]MK-912 ((2*S*,12b*S*)-1',3'-dimethylspiro[1,3,4,5',6,6',7,12b-octahydro-2*H*-benzo[b]furo[2,3-a] quinolizine-2,4'-pyrimidin]-2'-one) は GE Healthcare（Little Chalfont, Buckinghamshire, UK）または PerkinElmer Life and Analytical Sciences（Waltham, MA, USA）から入手した。ドパミンおよび代謝物含量測定においては、ルラシドンおよび対照薬は 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、5 mL/kg で経口投与した。

3. *In vitro* 受容体結合実験

ルラシドンおよび他の抗精神病薬の各種受容体（D_2、5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_7、アドレナリン α_1, α_{2A}, α_{2C}、ヒスタミン H_1、ムスカリン受容体）に対する結合親和性を *in vitro* における受容体結合実験により検討した。実験は標準的なプロトコールを用いて行った [14, 15] 。受容体膜標品として使用した材料、^{3}H 標識リガンドなどの実験条件は Table 1 にまとめた。

Table 1 Conditions for receptor binding assays

Receptor	Preparation	[^{3}H]Ligand (nM)	Displacer (μM)	Incubation Temperature and Time	Reference No.
Dopamine D_2	Rat striatum	[^{3}H]spiperone (0.5)	Spiperone (10)	37°C, 10 min	14
5-HT_{1A}	Rat hippocampus	[^{3}H]8-OH-DPAT (0.15)	8-OH-DPAT (1)	25°C, 30 min	15
5-HT_{2A}	Rat cortex	[^{3}H]ketanserin (1)	Ketanserin (10)	37°C, 30 min	14
5-HT_7	Human recombinant	[^{3}H]5-CT (1)	5-HT (1)	Room temperature, 2 h	16
Noradrenaline α_1	Rat cortex	[^{3}H]prazosin (0.5)	Prazosin (1)	25°C, 30 min	15
Noradrenaline α_{2A}	Human recombinant	[^{3}H]MK-912 (0.7)	WB4101 (10)	27°C, 60 min	17
Noradrenaline α_{2C}	Human recombinant	[^{3}H]MK-912 (0.2)	WB4101 (10)	27°C, 60 min	17
Histamine H_1	Guinea pig whole brain	[^{3}H]pyrilamine (0.4)	Triprolidine (2)	25°C, 40 min	18
Muscarinic	Rat cortex	[^{3}H]QNB (0.15)	Oxotremorine (100)	25°C, 60 min	19

5-CT, 5-carboxamidotryptamine; MK-912, (2*S*,12b*S*)-1',3'-dimethylspiro[1,3,4,5',6,6',7,12b-octahydro-2*H*-benzo[b]furo[2,3-a] quinolizine-2,4'-pyrimidin]- 2'-one; QNB, quinuclidinyl benzilate.

4. D_{2L} 受容体および 5-HT_{1A} 受容体機能の測定

組み換え型ヒト D_{2L} 受容体または 5-HT_{1A} 受容体を発現させた Chinese Hamster Ovary（CHO）細胞から、膜標品を作製し、G 蛋白非水解アナログリガンドである[^{35}S]GTPγS の結合実験を籔内らの方法 [20] に準じて行った。D_{2L} 受容体機能測定においては、ドパミン（3 μM）とルラシドン（0.03－100 nM）は、0.05 nM [^{35}S]GTPγS および D_{2L} 受容体発現 CHO 細胞膜標品とともに、室温で 20 分間インキュベーションした。また、5-HT_{1A} 受容体機能測定においては、ルラシドン（3 nM－10 μM）または 5-HT（10 μM）は、0.2 nM [^{35}S]GTPγS および 5-HT_{1A} 受容体発現 CHO 細胞膜標品とともに、室温で 20 分間インキュベーションした。インキュベーション後、反応液をガラスフィルター上に減圧ろ過し、フィルターを氷冷した緩衝液（20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1.1 μM GDP, 1 mM dithiothreitol）で洗浄した。フィルター上に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。非特異的結合は、放射ラベルされていない 20 μM（D_{2L} 受容体）または 10 μM（5-HT_{1A} 受容体）の GTPγS を添加した時の膜標品への[^{35}S]GTPγS 結合とした。EC_{50} 値、ルラシドンの IC_{50} 値およびルラシドンの *Emax* 値は Statistical Analysis System（SAS, SAS Institute Japan Ltd.）の Dx 計算（ロジスティック曲線回帰）を用いて算出した。ルラシドンの抑制作用の K_B 値は Cheng-Prusoff の計算式 K_B = ルラシドンの IC_{50} 値/(1 + (ドパミン濃度/ドパミンの EC_{50} 値)) を用いて計算した。

5. 5-HT_7 受容体機能の測定

組み換え型ヒトセロトニン 5-HT_7 受容体を発現させた CHO 細胞を用いて cAMP 産生を homogeneous time resolved fluorescence（HTRF）アッセイにより測定した。96 穴プレートに 1×10^4 個/ウェルで 5-HT_7 受容体発現細胞を播種し、24 時間後に PBS で洗浄後、反応用緩衝液（Hanks' buffer, 20 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM ascorbic acid, 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine）に交換した。37°C で 15 分間プレインキュベーションした後、5-HT（100 nM）およびルラシドン（0.1－300 nM）を添加して、37°C で 30 分間反応させた。産生された細胞内 cAMP 量は、cAMP HiRange kit (Cisbio Bioassays, Bedford, MA)を用いて定量した。5-HT の EC_{50} 値およびルラシドンの IC_{50} 値は SAS の Dx 計算（ロジスティック曲線回帰）を用いて算出した。ルラシドンの抑制作用の K_B 値は Cheng-Prusoff の計算式 K_B = ルラシドンの IC_{50} 値/(1 + (5-HT 濃度/5-HT の EC_{50} 値)) を用いて計算した。

6. ドパミンおよび代謝物含量の測定

ラットにルラシドン（0.3 – 30 mg/kg）、ハロペリドール（0.1 – 10 mg/kg）、クロザピン（10 – 300 mg/kg）を経口投与し、2 時間後に断頭して前頭皮質および線条体を摘出した。ドパミンおよびその代謝物である dihydroxyphenylacetic acid（DOPAC）の測定は龍野らの方法 [21] に従って行った。すなわち、前頭皮質は 5 倍量、線条体は 9 倍量の 5 mM EDTA および内部標準物質として 200 ng/mL のイソプロテレノールを含む 0.1 N 過塩素酸溶液でホモジナイ

ズし、10,000×g で 20 分間遠心分離して上清を得た。上清を 0.22 μm のフィルターでろ過したサンプルを HPLC システムに注入し、逆相カラム（Eicompak MA-ODS, 4.6 F×250 mm）でドパミン、DOPAC を分離し、電気化学検出器（加電圧 750 mV）で検出した。キャリヤーとしては 0.1 mM EDTA, 150 mg/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウム (SOS) および 10～15%メタノールを含む 0.1 M クエン酸―リン酸緩衝液（pH3.7）を流速 1.3 mL/min で用いた。DOPAC/DA のデータは、一元配置分散分析（one-way analysis of variance, one-way ANOVA）を行い、溶媒投与群と各用量群における比較には Dunnett テスト、各薬剤の各用量における前頭皮質および線条体間の比較には Student's t テストを用いた。

実験結果

1. *In vitro* 受容体結合実験

結果を Table 2 に示した。

ルラシドンは D_2 受容体と 5-HT_{2A} 受容体に同程度の高い結合親和性を示した。他の抗精神病薬と比べて、ルラシドンは 5-HT_7 受容体、5-HT_{1A} 受容体、α_{2C} 受容体に対しても高い結合親和性を有していた。一方で、ルラシドンの α_1 受容体および α_{2A} 受容体に対する結合親和性は低かった。また、ヒスタミン H_1 受容体やムスカリン受容体に対して 1000 nM まで親和性を示さなかった。一方、オランザピンおよびクロザピンは α_1 受容体、H_1 受容体およびムスカリン受容体に高い親和性を示し、リスペリドンは α_1 受容体および H_1 受容体に高い親和性を示した。ハロペリドールもまた α_1 受容体に高い親和性を示した。D_2 受容体の *K*i 値に対する比を Table 2 のカッコ内に示した。この結果は、ルラシドンが D_2 受容体に加えて 5-HT_7 受容体、5-HT_{2A} 受容体、5-HT_{1A} 受容体にも作用することを示唆する。

Table 2 Comparison of receptor binding profiles between lurasidone and other antipsychotic agents

Receptor	Binding Affinity, *K*i [a] (nM)				
	Lurasidone	Risperidone	Olanzapine	Clozapine	Haloperidol
Dopamine D_2	1.68±0.09	2.91±0.16	14.4±3.2	108±27	3.28±0.42
5-HT_{1A}	6.75±0.97 (4.0)	262±21 (90)	>1000[b] (>69)	123±5 (1.1)	>1000[b] (>300)
5-HT_{2A}	2.03±0.46 (1.2)	0.205±0.066 (0.070)	5.78±0.89 (0.40)	9.17±1.46 (0.085)	84.7±13.1 (26)
5-HT_7	0.495±0.090 (0.29)	2.72±0.42 (0.93)	n.t.	42.2±12.0 (0.39)	>1000[b] (>300)
Noradrenaline α_1	47.9±7.8 (29)	1.42±0.09 (0.49)	22.1±7.7 (1.5)	17.5±5.0 (0.16)	17.9±1.5 (5.5)
Noradrenaline α_{2A}	40.7±7.7 (24)	13.7±1.1 (4.7)	n.t.	147±14 (1.4)	>1000[b] (>300)
Noradrenaline α_{2C}	10.8±0.64 (6.4)	11.0±1.4 (3.8)	n.t.	15.6±2.0 (0.14)	>1000[b] (>300)
Histamine H_1	>1000[b] (>590)	3.46±0.17 (1.2)	3.83±0.52 (0.27)	2.02±0.20 (0.019)	330±22 (100)
Muscarinic	>1000[b] (>590)	>1000[b] (>340)	7.6±1.3 (0.53)	4.9±2.0 (0.045)	>1000[b] (>300)

Values are means ± standard error of the mean (SEM) of three or more separate experiments.
n.t., not tested.
[a] Each number in parentheses is indicated as relative potency ratio of *K*i value of receptors to that of dopamine D_2 receptor.
[b] IC_{50} value.

2. D_{2L} 受容体および 5-HT_{1A} 受容体機能に対する作用

ルラシドン（10 μM）は単独で D_{2L} 受容体発現細胞膜での[^{35}S]GTPγS 結合に影響を与えなかった（data not shown）。ルラシドンはドパミン 3 μM による[^{35}S]GTPγS 結合増加に対して濃度依存的に拮抗し、その K_B 値は 2.8 ± 1.1 nM であった（Fig. 2A）。ルラシドンは 5-HT_{1A} 受容体を発現させた CHO 細胞膜標品に対する[^{35}S]GTPγS 結合を濃度依存的に増加し、その EC_{50} 値（カッコ内は 95%信頼区間）は 30 (19 – 60) nM、*Emax* 値は 10 μM 5-HT による反応の 33 ± 3 %であった（Fig. 2C）。

3. 5-HT_7 受容体機能に対する作用

ルラシドン（300 nM）は単独で 5-HT_7 受容体を発現させた CHO 細胞内 cAMP 量に影響を与えなかった（data not shown）。ルラシドンは 100 nM 5-HT による細胞内の cAMP 蓄積に対して濃度依存的に拮抗し、その K_B 値は 2.6 ± 0.6 nM であった（Fig. 2B）。

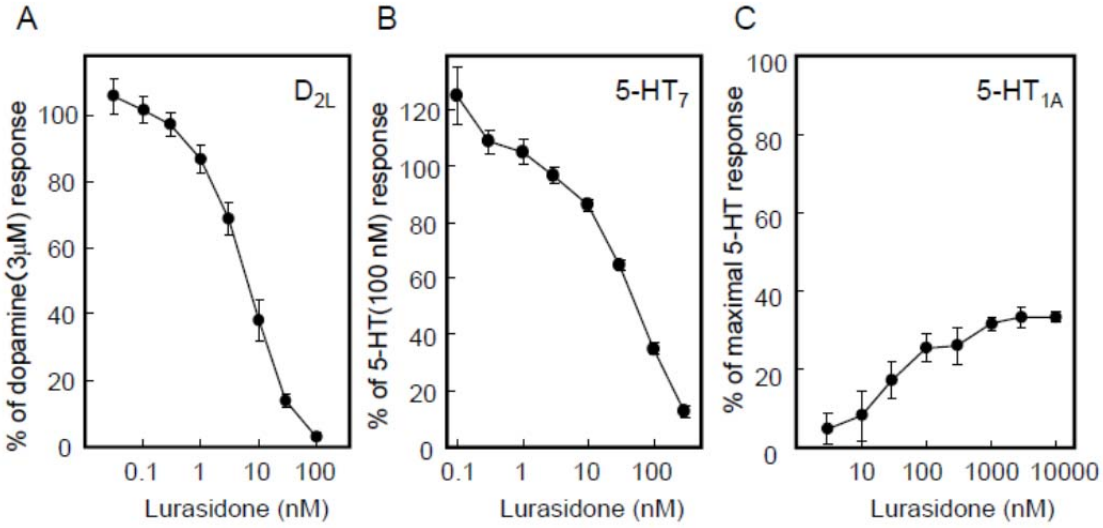

Fig. 2 Functional activity of lurasidone for human dopamine D_{2L}, 5-HT_7, and 5-HT_{1A} receptors. A, antagonism of 3 μM dopamine-stimulated [^{35}S]GTPγS binding at human dopamine D_{2L} receptor. [^{35}S]GTPγS binding is expressed as a percentage of stimulation of dopamine. B, antagonism of 100 nM 5-HT-stimulated cAMP accumulation in CHO cells expressing 5-HT_7 receptors. Results are expressed as a percentage of stimulation of 5-HT. C, agonism of lurasidone at human 5-HT_{1A} receptors. Each point shown indicates the mean of three to four independent experiments. Error bars indicate SEM.

4. ドパミンおよび代謝物含量

ルラシドンのドパミン代謝回転に対する作用は、前頭皮質および線条体でのドパミンに対する DOPAC の比を取り、ハロペリドールおよびクロザピンと比較した（Fig. 3）。ルラシドンは両脳領域において用量依存的に DOPAC/ドパミン比を増加させた。その作用は高用量においては線条体と比べて前頭皮質でより強かった。クロザピンはルラシドンと同様の作用を示した。一方で、ハロペリドールは、前頭皮質と比べて線条体に強い作用を示した。

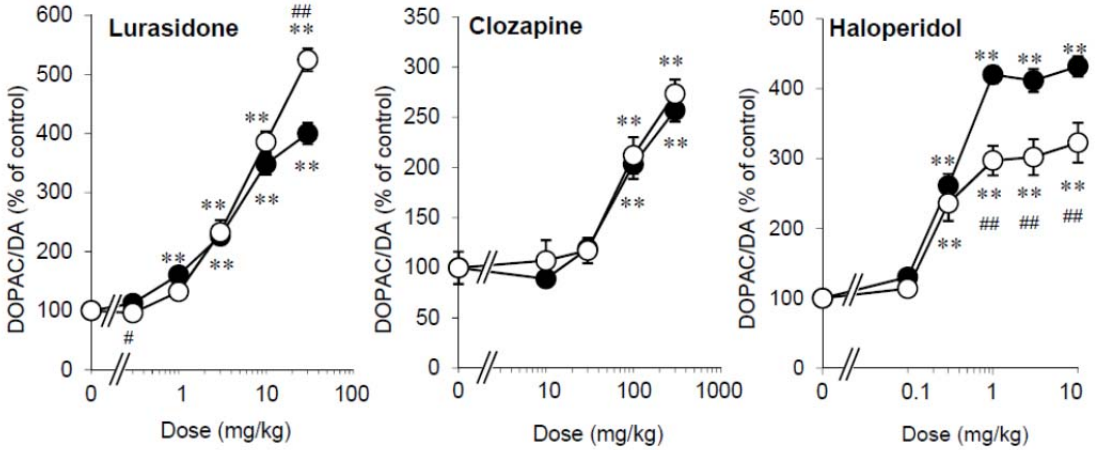

Fig. 3 Effect of lurasidone and other antipsychotics on dopamine turnover in rats: comparison in the frontal cortex and striatum. The ratios of DOPAC, a dopamine metabolite, to dopamine (DA) after administration of lurasidone (left), clozapine (center), and haloperidol (right) are represented as the points (○: frontal cortex; ●: striatum) with vertical bars (mean±SEM of six rats). $^{**}P<0.01$: significantly different from vehicle control (Dunnett's test). $^{\#}P<0.05$; $^{\#\#}P<0.01$: significantly different from the value in the striatum (Student's t test).

考察

本節では、ルラシドンの受容体親和性について *in vitro* 受容体結合実験で検討し、その薬理特性を明らかにした。本研究で用いた受容体結合実験では、対照薬として評価した化合物の *K*i 値は以前の報告 [22] とほぼ一致しており、評価系は妥当であると考えられた。

ルラシドンは主作用部位と考えられる D_2 受容体と 5-HT_{2A} 受容体にほぼ同程度の高い結合親和性を示した。非定型抗精神病薬であるオランザピン、リスペリドン、クロザピンは D_2 受容体よりも 5-HT_{2A} 受容体に高い結合親和性を有することを特徴とするが、ルラシドンはこれらの受容体に対して同程度の親和性を示した。ルラシドンは、5-HT_7 受容体、5-HT_{1A} 受容体、α_{2C} 受容体にも高い結合親和性を示し、これらの受容体に対する作用が本薬の薬効発現に寄与していることが考えられた。また、ルラシドンは、 D_1 受容体および 5-HT_{2C} 受容体へ低い結合親和性を示し(K_i= 262 および 415 nM)、5-HT_3、5-HT_4 受容体、アドレナリン β_1、β_2 受容体、アデノシン A_1、A_2 受容体、コレシストキニン CCK_A、CCK_B 受容体、γ -aminobutyric acid type A ($GABA_A$) 受容体、α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 受容体、カイニン酸受容体、NMDA 受容体、グルタミン酸受容体、ベンゾジアゼピン受容体、ニコチン受容体、オピオイド受容体、シグマ受容体、L 型 Ca チャネル、N 型 Ca チャネル、5-HT 取り込み部位、ドパミン取り込み部位には結合親和性を示さないことを確認している[23]。

また、D_{2L} 受容体および 5-HT_7 受容体機能の評価では、ルラシドン単独では両受容体に対して作動活性を示さず、それぞれの内因性アゴニストのドパミンおよび 5-HT の作用を濃度依存的に拮抗したことから、両受容体に対して競合的なアンタゴニストとして働くことが示された。また、5-HT_{1A} 受容体機能の評価では、*E*max=33%の部分アゴニストであることが示された。5-HT_{1A} 受容体アゴニスト、5-HT_7 受容体アンタゴニスト、α_{2C} 受容体アンタゴニストは不安やうつ症状に関与していることが報告されていることから [24, 25, 26, 27] 、ルラシドンは、うつ・不安の改善といった作用スペクトルを有する可能性が示された。

一方で、ルラシドンは他の第二世代抗精神病薬と異なり、H_1 受容体、ムスカリン受容体に対して結合親和性を示さず、また 5-HT_{2C} 受容体に対する親和性は低かった。オランザピン、リスペリドン、クロザピンは H_1 受容体に高い結合親和性を示し、オランザピンおよびクロザピンはムスカリン受容体に対しても結合親和性を有する。H_1 受容体、5-HT_{2C} 受容体は非定型抗精神病薬の体重増加作用との関連が示唆されており [22, 28] 、ルラシドンのこれらの受容体結合特性は体重増加の副作用が少ないことを示唆する。この点は、近年の臨床試験の結果においても確認されている [29] 。また、ムスカリン M_1 受容体拮抗作用は認知障害との関連が示唆されており、高齢者などで特に重篤な問題となる可能性がある [30] 。さらに、α_1 受容体拮抗作用は起立性低血圧などの循環器系副作用につながると考えられている [31] 。ルラシドンの α_1 受容体に対する結合親和性は今回検討した抗精神病薬の中では最も低く、D_2 受容体への結合親和性との比においても最も乖離しており、α_1 受容体を介

した副作用の軽減が示唆される。

抗精神病薬による錐体外路症状（extrapyramidal symptoms, EPS）は、黒質線条体ドパミン神経を介して惹起されると考えられている [32] 。ドパミンおよび代謝物含量の検討において、ヒトで EPS を強く引き起こすハロペリドールは前頭皮質よりも線条体においてドパミン代謝回転を強く亢進し、EPS が弱いクロザピンは線条体と前頭皮質で同程度にドパミン代謝回転を亢進する結果であった。ルラシドンはクロザピンと同様に、線条体と前頭皮質で同程度にドパミン代謝回転を亢進させたことから、ハロペリドールのような定型抗精神病薬と比べて EPS が軽減されることが示唆される。また、5-HT_{1A}受容体アゴニストは、動物モデルにおいて D_2受容体アンタゴニストによるカタレプシー惹起作用を軽減するとの報告がある[24]。5-HT_{1A}受容体に部分アゴニストとして働くルラシドンの作用特性は EPS の軽減にも寄与することが期待される。

第二節　ルラシドンの *in vivo* 薬理特性

統合失調症の病態成因にはドパミン神経の過活動があるとするドパミン仮説に基づき、D_2受容体拮抗作用が陽性症状の改善に関与していることが示唆されている。そこで、D_2受容体拮抗作用を評価できるモデルとして報告されているメタンフェタミン誘発運動過多、アポモルヒネ誘発常同行動、アポモルヒネ誘発よじ登り行動および条件回避反応を用いて、ルラシドンおよび他の抗精神病薬の評価を行った。

また、セロトニン神経系は脳内に広範に分布し、気分、情動などの精神活動を調節する役割を担っており、統合失調症の病態との関連も示唆されている。そこで、5-HT_2受容体拮抗作用を評価できるモデルとして報告されているトリプタミン誘発けいれんおよび *p*-CAMP 誘発体温上昇を用いて、ルラシドンおよび他の抗精神病薬の評価を行った。

また、統合失調症における臨床特徴として陽性症状や陰性症状だけでなく、不安、緊張、抑うつといった情緒障害も認められる。ルラシドンの抗不安作用・抗うつ様作用を条件付け行動による評価系である抗コンフリクト試験、生得的な行動である社会相互行動および嗅球摘出モデルにより検討した。

一方で、カタレプシー、ブラジキネジア、ジストニアといった錐体外路症状（extrapyramidal symptoms, EPS）は統合失調症の治療における重要な問題点であり、患者のコンプライアンス低下の主要な原因と考えられている。ルラシドンおよび他の抗精神病薬の EPS の評価は、ラットおよびマウスを用いたカタレプシー試験、マウスポールテストおよびラットポーテストを用いて評価した。

また、中枢抑制副作用評価として、自発運動量抑制作用、眠気の指標と考えられているヘキソバルビタール麻酔増強作用、筋弛緩作用、抗精神病薬によるふらつきなど運動機能低下の指標と考えられている協調運動抑制作用についてルラシドンおよび他の抗精神病薬の作用を検討した。さらに、アドレナリンα_1受容体拮抗作用を評価するために眼瞼下垂惹起作用、抗ムスカリン作用を評価するためにオキソトレモリン（ムスカリン受容体アゴニスト）誘発振せん抑制作用について検討した。

実験方法

1. 実験動物

雄性 SD ラット（6 週齢）（日本 SLC 株式会社および日本チャールス・リバー株式会社）、Lister Hooded ラット（6 週齢）（日本動物株式会社）、雄性 Wistar ラット（日本チャールス・リバー株式会社）（8 週齢）および雄性 ddY マウス（日本 SLC 株式会社）（4 週齢）を入手し、約 1 週間の馴化期間を経た後、実験に使用した。動物は 12 時間の明暗サイクル、自由摂餌 CE-2（日本クレア株式会社）、自由飲水で飼育した。すべての動物の取り扱いは、大日本住友製薬株式会社　研究本部　飼育管理手順書に従って行った。

2. 使用薬物

ルラシドン、他の抗精神病薬（ハロペリドール、リスペリドン、オランザピン、クロザピン）およびメタンフェタミン塩酸塩は大日本住友製薬株式会社にて合成した。アポモルヒネ塩酸塩は Sandoz （現 Novartis）または Sigma Aldrich Japan より入手した。パラクロロアンフェタミン塩酸塩（*p*-CAMP）、オキソトレモリンセスキフマル酸塩は Sigma Aldrich Japan より、トリプタミン塩酸塩はナカライテスク株式会社、ヘキソバルビタールは東京化成工業株式会社より入手した。ルラシドンおよび他の抗精神病薬は 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、5 mL/kg で投与した。

3. 抗精神病様作用

3.1. ドパミン受容体に対する作用

3.1.1. メタンフェタミン誘発運動過多抑制作用

ルラシドン（0.3 – 6 mg/kg）、リスペリドン（0.3 – 3 mg/kg）、オランザピン（1 – 10 mg/kg）、クロザピン（30 – 300 mg/kg）、ハロペリドール（0.3 – 3 mg/kg）あるいは溶媒を SD ラットに経口投与し、1 時間後（ルラシドンのみ 1, 2, 4 および 8 時間後）にメタンフェタミン塩酸塩(1 mg/kg) を腹腔内投与した。メタンフェタミン投与の 10 分後から 80 分間の運動量を Automex 装置（Columbus Instruments）を用いて運動量を測定した。1 群 6～13 匹の 4 または 5 群で評価を行い、各用量における運動過多抑制率より ED_{50} 値および 95%信頼区間を算出した。

3.1.2. アポモルヒネ誘発常同行動に対する作用

ルラシドン（1 – 10 mg/kg）、リスペリドン（3 – 30 mg/kg）、オランザピン（1 – 10 mg/kg）、クロザピン（100 – 400 mg/kg）、ハロペリドール（1 – 3 mg/kg）あるいは溶媒を SD ラットに経口投与し、1 時間後に塩酸アポモルヒネ (1.25 mg/kg) を静脈内投与し、金網ケージに個別に入れた。アポモルヒネ投与直後から 30 分間の常同行動を観察し、常同行動のスコアを記録した。アポモルヒネによる常同行動の licking または biting が消失した場合、常同行動の「抑制作用あり」と判定した。1 群 6～12 匹の 3 または 4 群で評価を行い、50%の動物で抑制作用を示す用量 ED_{50} 値および 95%信頼区間を算出した。

3.1.3. アポモルヒネ誘発よじ登り行動に対する作用

ルラシドン（1 – 10 mg/kg）、リスペリドン（0.1 – 1 mg/kg）、オランザピン（1 – 10 mg/kg）、クロザピン（3 – 30 mg/kg）、ハロペリドール（0.1 – 1 mg/kg）あるいは溶媒をマウスに経口投与し、1 時間後に塩酸アポモルヒネ (1 mg/kg) を皮下投与し、円柱形の金属製柵ケージに個別に入れた。アポモルヒネ投与直後から 20 分間のよじ登り行動をスコア付けした（よじ登り行動のスコアの基準 : 0: なし; 1: 弱い; 2: 中程度; 3: 顕著）。1 群 5 匹の 4 または 5 群で

評価を行い、ED_{50}値および95%信頼区間は平均値を用いて回帰分析により算出した。

3.1.4. 条件回避反応抑制作用

2つのコンパートメントからなるシャトルボックス(メディカルエイジェント製)を用いて1日1回の訓練（6.5分×13試行）を行い、SDラットに条件回避反応を習得させた。各々の試行では、5秒間の警告音と光刺激（conditioned stimulus, CS）に続いて床の金属グリッドより5秒間の電気ショック（unconditioned stimulus, US）がラットに負荷される。条件回避反応は、ラットが電気ショックを回避するため、CS-US間（5秒間）に他方のコンパートメントに移動する行動である。一方、電気ショックの負荷後に他方のコンパートメントに移動する行動を逃避反応とした。1日の訓練（13試行）のうち初めの3試行を除く10試行において条件回避反応数を測定し、10試行中9回以上で条件回避反応を示した動物のみを実験に使用した。条件回避反応の測定は連続して2日行い、初日の値を対照値とし、2日目の測定の1時間前にルラシドン（1 – 20 mg/kg）、リスペリドン（0.3 – 10 mg/kg）、クロザピン（10 – 100 mg/kg）、ハロペリドール（0.3 – 3 mg/kg）あるいは溶媒を経口投与し、2日目の試行における条件回避反応数の対照値に対する抑制率を求めた。1群7～16匹の3～5群で評価を行い、これら反応を50%抑制する用量（ED_{50}値）および95%信頼区間を算出した。なお、動物は約1週間の休薬期間をおいて、くり返し実験に使用した。

3.2. セロトニン受容体に対する作用

3.2.1. トリプタミン誘発けいれん抑制作用

ルラシドン（3 – 10 mg/kg）、リスペリドン（0.03 – 0.3 mg/kg）、オランザピン（1 – 10 mg/kg）、クロザピン（1 – 10 mg/kg）、ハロペリドール（3 – 30 mg/kg）あるいは溶媒をSDラットに経口投与し、1時間後にトリプタミン塩酸塩（40 mg/kg）を静脈内投与した。その直後から5分間に見られる前肢間代性けいれんの有無を観察した。けいれんの認められなかった動物を「抑制作用あり」と判定した。1群6匹の3群で評価を行い、各薬物について50%の動物でトリプタミン誘発けいれんを抑制する用量ED_{50}値および95%信頼区間を算出した。

3.2.2. p-CAMP誘発体温上昇に対する作用

ルラシドン（1 – 30 mg/kg）、リスペリドン（0.03 – 1 mg/kg）、オランザピン（0.3 – 3 mg/kg）、クロザピン（1 – 30 mg/kg）、ハロペリドール（1 – 30 mg/kg）あるいは溶媒をラットに経口投与し、同時に*p*-CAMP (4 mg/kg) を皮下投与した。*p*-CAMP投与前と投与1時間後での直腸温の上昇度を測定した。1群10匹の4または5群で評価を行い、各薬物が*p*-CAMP誘発体温上昇を50%抑制する用量ED_{50}値および95%信頼区間を算出した。

4. 気分安定作用

4.1. 抗コンフリクト作用

清水らの方法 [25] に従って行った。SD ラットを 24 時間絶水した後、コンフリクト試験箱に入れ、電気ショックを与えずに水飲みを行い 3 分間の滴下数が 300-400 回以上の動物を選別した。さらに 24 時間絶水した後、コンフリクト試験箱に入れて水飲みを行い、20 滴下数毎に 1 回の電気刺激 (0.35 mA, 0.5 秒) が負荷される条件で 3 分間の滴下数が 260 回以下の動物を選別した。選別された動物にルラシドン（0.3 – 30 mg/kg）あるいは溶媒を経口投与し、1 時間後に上記と同じ電気刺激負荷条件下で 3 分間の被ショック数を測定した。

4.2. 社会相互行動

坂本らの方法 [33] に従って行った。Lister Hooded ラットはテスト試行の前 2 日間を単独飼育し、十分なハンドリングを行った。互いに出会ったことのないラット 2 匹にルラシドン（0.1 – 6 mg/kg）あるいは溶媒を経口投与し、1 時間後に 2 匹のラットを床に 16.6cm 四方の印付けをした灰色の塩化ポリビニル製の観察箱（50×50×35cm）に入れ、10 分間の社会相互行動をビデオテープレコーダーに記録した。照度は白色ライトで約 1200 ルクスに設定し、観察箱内の温度はファンを用いて一定に保った。後日、能動的社会相互行動、すなわち相手に対する臭い嗅ぎ、相手に対する身繕い、相手の下に潜り込んだり、上によじ登ったりする行動、追尾行動、尻の臭い嗅ぎの累積時間を手動で計測した。また、受動的行動、すなわち互いの身体を単に摺り寄せただけの状態、および攻撃的行動、すなわちレスリング様行動、ボクシング様行動、相手を蹴る行動、相手を噛む行動は計測しなかった。自発運動量として、床に記した線を横断した回数と立ちあがり回数を計測した。以前の検討 [33] で、抗不安薬のジアゼパム（5 mg/kg, p.o.）が有意な社会相互行動時間の増加作用を示すことを報告している。

4.3. 嗅球摘出モデル

Kelly らの方法 [34] に従って行った。Wistar ラットにペントバルビタールナトリウム（50 mg/kg, i.p.）麻酔下で脳定位固定装置（株式会社 成茂科学器械研究所）に固定した。頭蓋を切開し、吸引ポンプを用いて嗅球摘出手術を行った。偽手術ラットには嗅球摘出以外の同様の手術を行った。1 週間の回復期間をおき、情動スコアを指標に群分けを行い、ルラシドン（3 mg/kg）を 14 日間またはイミプラミン（10 mg/kg）を 7 日間経口投与した。最終投与 1 時間後に、オープンフィールド装置を用いて自発運動量を 5 分間の線を横断した回数によって測定した。

5. 錐体外路系副作用

5.1. カタレプシーに対する作用

SD ラットおよび ddY マウスの両前肢をそれぞれ高さ 9 cm および 5cm の水平ステンレス棒上に、後肢を床に置く不自然な姿勢を繰り返し 3 回強制し、そのままの姿勢を 30 秒以上保持した場合にカタレプシー陽性と判断した。ラットではルラシドン（30 – 1000 mg/kg）、

リスペリドン（10 – 60 mg/kg）、オランザピン（10 – 100 mg/kg）、クロザピン（100 – 300 mg/kg）、ハロペリドール（5 – 30 mg/kg）、マウスではルラシドン（30 – 1000 mg/kg）、リスペリドン（0.3 – 10 mg/kg）、オランザピン（3 – 30 mg/kg）、クロザピン（10 – 30 mg/kg）、ハロペリドール（1 – 10 mg/kg）を測定の 1 時間前に経口投与した。ラットでは 1 群 6 匹の 3～5 群で、マウスでは 1 群 10 匹の 3～5 群で評価を行い、各用量における試験動物数とカタレプシー陽性動物数より ED_{50} 値および 95%信頼区間を算出した。

5.2. ブラジキネジアに対する作用（ポールテスト）

実験は大野らの方法 [35] に従って行った。ルラシドン（100 – 1000 mg/kg）、リスペリドン（0.3 – 10 mg/kg）、オランザピン（3 – 10 mg/kg）、クロザピン（10 – 30 mg/kg）、ハロペリドール（0.3 – 10 mg/kg）あるいは溶媒を経口投与し、1 時間後に垂直に立てた 45cm の棒（直径 8 mm）に ddY マウスを上向きに置いた。マウスが下向きに回転し床に下りるまでの時間（Ttotal）を測定した。最大測定時間は 90 秒とした。1 群 14～30 匹の 3～5 群で評価を行い、溶媒投与群と比べて有意に Ttotal を増加させる最小有効用量（minimum effective dose, MED）を算出した。

5.3. 筋固縮に対する作用（ポーテスト）

実験は Ellenbroek らの方法 [36] に従って行った。Wistar ラットにルラシドン（30 – 1000 mg/kg）、リスペリドン（1 – 30 mg/kg）、オランザピン（3 – 100 mg/kg）、クロザピン（10 – 300 mg/kg）、ハロペリドール（1 – 30 mg/kg）あるいは溶媒を経口投与し、1 時間後にポーテスト用観察ステージの穴にラットの四肢を入れ、どちらか一方の前肢を引き抜くまでの時間 (forepaw retraction time, FRT) を測定した。1 群 12 匹の 5 群で評価を行い、FRT を溶媒投与群と比べて有意に増加させる MED を算出した。

6. 中枢抑制作用

6.1. ヘキソバルビタール麻酔増強作用

ddY マウスにルラシドン（3 – 1000 mg/kg）、リスペリドン（0.1 – 3 mg/kg）、オランザピン（3 – 30 mg/kg）、クロザピン（3 – 30 mg/kg）、ハロペリドール（3 – 30 mg/kg）あるいは溶媒を経口投与し、その 1 時間後にヘキソバルビタール (70 mg/kg) を腹腔内投与し、正向反射の消失時間（最大 3 時間まで）を測定した。溶媒投与群の正向反射の消失時間の平均値の 2 倍を越える正向反射の消失時間を示したマウスを「麻酔増強作用あり」とした。1 群 9 または 10 匹の 4 または 5 群で評価を行い、50%の動物で麻酔増強作用を示す用量 ED_{50} 値を算出した。

6.2. 筋弛緩作用

ddY マウスにルラシドン（3 – 1000 mg/kg）、リスペリドン（3 – 30 mg/kg）、オランザピン

（1 – 30 mg/kg）、クロザピン（10 – 70 mg/kg）、ハロペリドール（10 – 50 mg/kg）を経口投与し、その 1 時間後に懸垂行動の時間を測定した。マウスの両前肢を高さ 30cm の水平に張った針金に掛けて、懸垂試験を行った。試行は連続して 3 回行い、15 秒以内に後肢を針金に掛けられない試行が 2 回以上あった動物は「筋弛緩作用あり」と判定した。1 群 10 匹の 3 または 4 群で評価を行い、筋弛緩の出現率より、50%の動物で筋弛緩作用を示す用量 ED_{50} 値を算出した。

6.3. 協調運動抑制作用

試験前日に回転棒（直径 3 cm,　6 rpm）上に回転方向と逆に ddY マウスを乗せ、棒上に 2 分間以上留まることができたマウスを選別し、さらに試験当日に棒上に 1 分間以上留まることができたマウスを試験に用いた。ルラシドン（100 – 700 mg/kg）、リスペリドン（1 – 30 mg/kg）、オランザピン（1 – 30 mg/kg）、クロザピン（3 – 30 mg/kg）、ハロペリドール（1 – 10 mg/kg）あるいは溶媒を経口投与し、1 時間後に回転棒に乗せ、1 分間以上留まることができなかった場合に、「協調運動抑制作用あり」と判定した。1 群 10 匹の 3 または 4 群で評価を行い、協調運動抑制作用の出現率より、50%の動物で抑制作用を示す用量 ED_{50} 値を算出した。

6.4. アドレナリン神経系に対する作用（眼瞼下垂惹起作用）

ddY マウスにルラシドン（100 – 1000 mg/kg）、リスペリドン（0.1 – 1 mg/kg）、オランザピン（3 – 30 mg/kg）、ハロペリドール（1 – 10 mg/kg）あるいは溶媒を経口投与し、その 1 時間後に眼瞼下垂の程度を測定した。左右の眼について 5 段階のスコア（0：全開、1：3/4 開眼、2：1/2 開眼、3：1/4 開眼、4：全閉）で判定した。1 群 10 匹の 3 または 4 群で評価を行い、両眼の平均スコアが 2 以上の動物を「眼瞼下垂あり」と判定し、50%の動物に眼瞼下垂を誘発する用量 ED_{50} 値を算出した。

6.5. アセチルコリン神経系に対する作用（オキソトレモリン誘発振せん抑制作用）

ddY マウスにルラシドン（600 – 1000 mg/kg）、ハロペリドール（3 – 30 mg/kg）、オランザピン（1 – 10 mg/kg）あるいは溶媒を経口投与し、1 時間後にオキソトレモリン（0.5 mg/kg）を皮下投与した。オキソトレモリン投与直後から 10 分間の振せんの有無を 3 段階（0：なし、1：中程度、2：強い）にスコア付けした。1 群 10 匹の 3 または 4 群で評価を行い、溶媒投与群の振せんのスコアを 50%低減する用量 ED_{50} 値を算出した。

7. 統計解析

データは MED または ED_{50} 値と 95%信頼区間で表した。ED_{50} 値は Litchfield と Wilcoxon の方法 [37] を用いて算出した。他群との有意差検定には、2 群間の比較には Student’s t テストを、多群の比較には one-way ANOVA の後、Dunnett テストを行った。

実験結果

1. 抗精神病様作用

1.1. ドパミン受容体に対する作用

ルラシドンおよび他の抗精神病薬は、ラットのメタンフェタミン誘発運動過多およびアポモルヒネ誘発常同行動、マウスのアポモルヒネ誘発よじ登り行動といった D_2 受容体を介する行動を用量依存的に抑制した（Table 3）。これらの実験において、ルラシドンの ED_{50} 値は 2.3 – 5.0 mg/kg, p.o.であり、オランザピン（ED_{50} 値 = 1.1 – 5.1 mg/kg, p.o.）と同等であり、クロザピン（ED_{50} 値 = 9.5 – 290 mg/kg, p.o.）よりは強く、ハロペリドール（ED_{50} 値 = 0.44 – 1.7 mg/kg, p.o.）よりはやや弱かった。リスペリドンは、ルラシドンと比べて、マウスのアポモルヒネ誘発よじ登り行動抑制作用は強く、メタンフェタミン誘発運動過多抑制作用は同等で、アポモルヒネ誘発常同行動抑制作用は弱かった。

ルラシドンのメタンフェタミン誘発運動過多抑制作用は投与後 8 時間以上持続し、1, 2, 4, 8 時間後での ED_{50} 値はそれぞれ 2.3, 0.87, 1.6, 5.0 mg/kg, p.o.であった。

ルラシドンは 1 – 10 mg/kg, p.o. において、用量依存的に条件回避反応を抑制し、その ED_{50} 値は 6.3 mg/kg であった。一方で、ルラシドンのこれらの用量における逃避行動の抑制作用は弱かった（data not shown）ことから、選択的に条件回避反応を抑制することが示唆された。条件回避反応試験での各薬物の作用強度は、他の D_2 受容体を介した行動の抑制作用と概ね一致した。すなわち、ルラシドンはハロペリドール、リスペリドンよりはやや弱く、クロザピンよりは強かった。

Table 3 Dopamine D_2 receptor blocking actions of lurasidone and other antipsychotics

Drugs	ED_{50} (mg/kg, p.o., 95% Confidence Limits)			
	MAP-induced hyperlocomotion	APO-induced stereotypy	APO-induced climbing behavior	Conditioned avoidance
Lurasidone	2.3 (0.89–6.1)	5.0 (3.6–6.9)	4.1 (2.0–8.4)	6.3 (3.4–12)
Risperidone	1.8 (0.86–3.6)	11 (6.2–18)	0.14 (0.047–0.40)	1.5 (0.89–2.4)
Olanzapine	3.3 (1.5–7.3)	5.1 (2.6–10)	1.1 (0.35–3.2)	–
Clozapine	65 (29–140)	290 (170–480)	9.5 (3.8–24)	38 (17–83)
Haloperidol	0.88 (0.42–1.8)	1.7 (1.2–2.5)	0.44 (0.20–1.0)	0.89 (0.48–1.7)

ED_{50} values and 95% confidence limits in parentheses were obtained 1 h after drug administration.
MAP, methamphetamine; APO, apomorphine.

1.2. セロトニン受容体に対する作用

ルラシドンは用量依存的にラットのトリプタミン誘発けいれんおよび *p*-CAMP 誘発体温上昇を抑制し、その作用の ED_{50} 値はそれぞれ 5.6 および 3.0 mg/kg, p.o.であった（Table 4）。リスペリドン、オランザピンおよびクロザピンも用量依存的に抑制作用を示した。ルラシドンの作用強度は、ハロペリドールより強く、リスペリドン、オランザピンより弱かった。

Table 4 Serotonin 5-HT_2 receptor blocking actions of lurasidone and other antipsychotics

	ED_{50} (mg/kg, p.o. , 95% Confidence Limits)	
Drugs	TRY-induced clonic forepaw seizure	*p*-CAMP-induced hyperthermia
Lurasidone	5.6 (3.4–9.3)	3.0 (1.5–5.8)
Risperidone	0.16 (0.044–0.62)	0.098 (0.039–0.25)
Olanzapine	1.4 (0.59–3.3)	0.62 (0.31–1.2)
Clozapine	5.1 (2.6–10)	5.0 (2.7–9.5)
Haloperidol	14 (6.8–27)	>30

ED_{50} values and 95% confidence limits in parentheses were obtained 1 h after drug administration.
TRY, tryptamine; *p*-CAMP, *para*-chloroamphetamine.

2. 気分安定化作用

2.1. 抗コンフリクト作用

コンフリクト行動は、欲求と罰に対する不安・恐怖を組み合わせて葛藤状態にあることをいう。一般的に抗不安薬は本コンフリクト行動を抑制することが知られ、薬物の抗不安作用を検出できるモデルとして頻繁に使用されてきた。Vogel 型コンフリクトテストにおいて、ルラシドン（0.3 – 30 mg/kg, p.o.）は用量依存的に被ショック数を増加し、最小有効用量は 10 mg/kg であった（P <0.01）（Fig. 4A）。また、ルラシドン（3 –100 mg/kg, p.o.）は電気ショックを負荷せずに行った別の実験において、自発的な水飲み回数に影響を与えなかった（data not shown）。

2.2. 社会相互行動

ルラシドン（0.1 – 6 mg/kg, p.o.）は社会相互行動時間を増加し、1 および 3 mg/kg において有意であった（それぞれ P < 0.01 および P < 0.05）（Fig. 4B）。また、ルラシドンは検討した用量において自発運動量に影響を与えなかった（data not shown）。

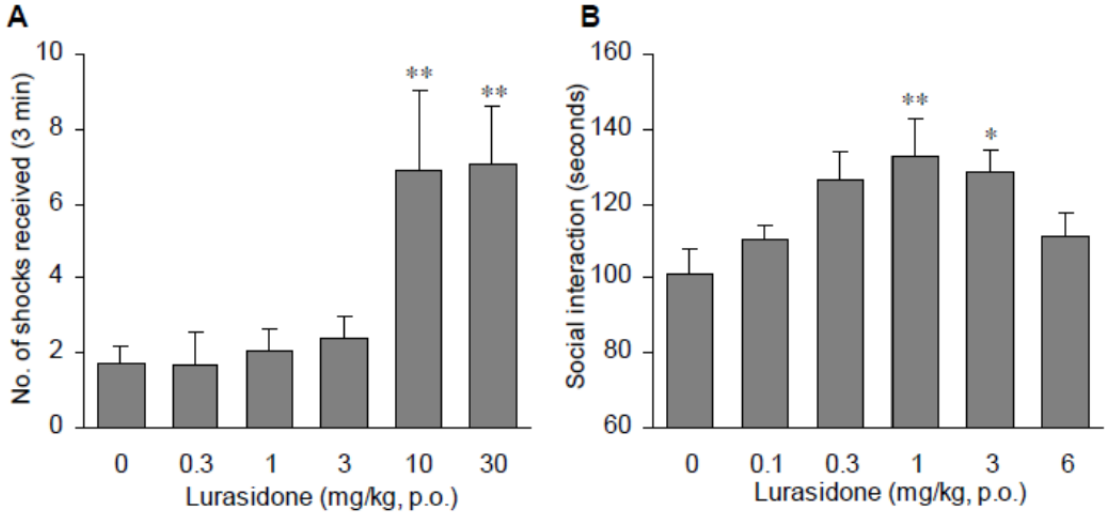

Fig. 4 Anxiolytic-like activities of lurasidone in the Vogel conflict test (A) and social interaction test (B). A, effect on the number of shocks in Vogel's test. Each column shows mean±SEM of 11 to 22 rats. B, effect on social interaction in Lister hooded rats. Each column represents mean±SEM of 10 pairs of rats. *P<0.05; **P< 0.01: significantly different from vehicle group (Dunnett's test).

2.3. 嗅球摘出モデル

ラットの嗅球摘出モデルは抗うつ様作用を検出する評価系として知られている。嗅球摘出処置により Sham-ope ラットと比較して 5 分間のラインクロス数は有意に増加し（$P < 0.01$ または $P < 0.001$）、ルラシドン（3 mg/kg, p.o.）14 日間投与およびイミプラミン（10 mg/kg, p.o.）7 日間投与により嗅球摘出処置により増加したラインクロス数は有意に減少した（それぞれ $P < 0.001$ および $P < 0.01$）（Fig. 5）。ルラシドン（3 mg/kg, p.o.）およびイミプラミン（10 mg/kg, p.o.）は Sham-ope ラットのラインクロス数には影響を与えなかった。

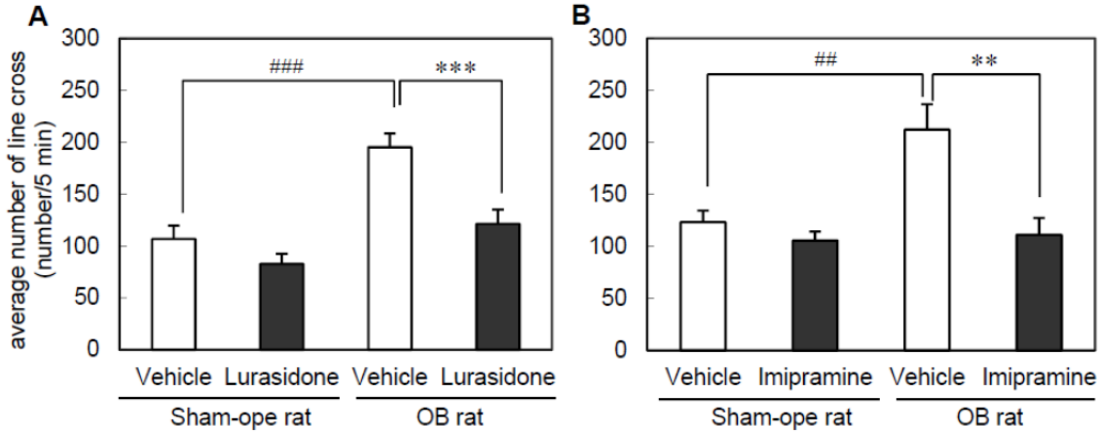

Fig. 5 Effect of lurasidone on olfactory bulbectomy-induced hyperactivity. A, repeated treatment of lurasidone (3 mg/kg/day p.o., 2 weeks) significantly reduced olfactory bulbectomy-induced hyperactivity, but did not affect the activity in sham-operated rats. B, similar efficacy was seen in the repeated treatment of imipramine (10 mg/kg/day p.o., 1 week). Each column represents mean± SEM of 7 to 14 rats. $^{##}P<0.01$; $^{###}P< 0.001$: significantly different from vehicle treatment in sham-operated (Sham-ope) rat (Student's t test). $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$: significantly different from vehicle treatment in olfactory bulbectomy (OB) rat (Student's t test).

3. 錐体外路系副作用

3.1. カタレプシーに対する作用

カタレプシーに対する作用の結果を Table 5 に示した。ルラシドンは 1000 mg/kg までラットおよびマウスにおいてカタレプシーを惹起しなかった。一方、ハロペリドール、リスペリドンおよびオランザピンは用量依存的にカタレプシーを惹起し、その惹起作用はルラシドンと比べて非常に強かった。クロザピンはラットにおいて 300 mg/kg までカタレプシーを惹起せず、これ以上の用量は筋弛緩作用のため評価ができなかった。マウスにおいても同様の理由で、クロザピンおよびオランザピンはそれぞれ 30 mg/kg および 10 mg/kg より高用量での評価ができなかった。

Table 5 EPS liability of lurasidone and other antipsychotics (1)

Drugs	Catalepsy test in rats		Catalepsy test in mice	
	ED_{50} (mg/kg)	Ratio[a]	ED_{50} (mg/kg)	Ratio[a]
Lurasidone	>1000	>430	>1000	>240
Risperidone	20 (9.3–43)	11	0.85 (0.44–1.6)	6.1
Olanzapine	28 (11–74)	8.5	>10	>9.0
Clozapine	>300	>4.6	>30	>3.1
Haloperidol	12 (6.8–23)	14	2.0 (1.1–3.5)	4.5

ED_{50} values and 95% confidence limits in parenthesis were obtained 1 hr after drug administration.
[a] Ratio is calculated as the potency ratio of EPS measure to that of D_2 antagonism (i.e., inhibition of methamphetamine hyperactivity in rats and of apomorphine climbing behavior in mice).

3.2. ブラジキネジアに対する作用

マウスでのポールテストの結果を Table 6 に示した。ルラシドンは 1000 mg/kg までブラジキネジアを惹起しなかった。リスペリドン（0.3 – 10 mg/kg）、オランザピン（3 – 10 mg/kg）およびハロペリドール（0.3 – 10 mg/kg）は用量依存的に Ttotal を延長し（data not shown）、MED はそれぞれ 3, 10 および 1 mg/kg であった。クロザピンは 30 mg/kg まで Ttotal を延長せず、高用量では筋弛緩や協調運動抑制により評価ができなかった。

3.3. 筋固縮に対する作用

ラットでのポーテストの結果を Table 6 に示した。本試験においては、抗精神病薬を投与後、ポーテスト用観察ステージの穴にラットの四肢を入れた時に、前肢の引き抜き時間（FRT）の延長（前肢の硬直作用）を錐体外路症状の指標とした。ルラシドンは 300 mg/kg まで FRT を延長せず、1000 mg/kg において少し延長したが有意な作用ではなかった（data not shown）。

リスペリドン（1 – 30 mg/kg）、オランザピン（3 – 100 mg/kg）、クロザピン（10 – 300 mg/kg）およびハロペリドール（1 – 30 mg/kg）は用量依存的に FRT を延長し、MED はそれぞれ 30, 30, 300 および 1 mg/kg であった。

Table 6 EPS liability of lurasidone and other antipsychotics (2)

Drugs	Paw test in rats		Pole test in mice	
	MED (mg/kg)	Ratio[a]	MED (mg/kg)	Ratio[a]
Lurasidone	>1000	>430	>1000	>240
Risperidone	30	17	3	21
Olanzapine	30	9.1	10	9.1
Clozapine	300	4.6	>30	>3.1
Haloperidol	1	1.1	1	2.3

MED values were obtained 1 hr after drug administration.
[a] Ratio is calculated as the potency ratio of EPS measure to that of D_2 antagonism (i.e., inhibition of methamphetamine hyperactivity in rats and of apomorphine climbing behavior in mice).

3.4. 安全域

Table 5 および Table 6 に錐体外路症状を惹起する用量と D_2 受容体拮抗活性（ラットではメタンフェタミン誘発運動亢進の抑制作用、マウスではアポモルヒネ誘発クライミング行動の抑制作用）の用量比を算出してまとめた。ルラシドンの比はラットでは 430 より大、マウスでも 240 より大であったが、他の抗精神病薬では 1.1～21 の間（ED_{50} または MED が算出できなかった評価系での結果を除く）であった。

4. 中枢抑制作用

4.1. ヘキソバルビタール麻酔増強作用

ルラシドンは高用量（700 – 1000 mg/kg）において用量依存的にヘキソバルビタールによる正向反射の消失時間を延長する傾向を示した（data not shown）。しかしながら、1000 mg/kg においても 10 匹中 4 匹の動物しか溶媒投与群の 2 倍以上の麻酔時間を示さなかったため、ED_{50} 値は 1000 mg/kg よりも高かった（Table 7）。一方、他の抗精神病薬は低用量から麻酔増強作用を示し、その ED_{50} 値はリスペリドンで 1.5 mg/kg、オランザピンで 8.3 mg/kg、クロザピンで 8.2 mg/kg、ハロペリドールで 11 mg/kg であった（Table 7）。

4.2. 筋弛緩作用

ルラシドンは 1000 mg/kg 投与でもほとんど筋弛緩作用を示さなかった（10 例中 1 例；ED_{50} 値>1000 mg/kg）（Table 7）。一方、他の抗精神病薬は用量依存的にマウスに筋弛緩を引き起こし、その ED_{50} 値はリスペリドンで 11 mg/kg、オランザピンで 11 mg/kg、クロザピンで 32 mg/kg、ハロペリドールで 33 mg/kg であった（Table 7）。

4.3. 協調運動抑制作用

ルラシドンは比較的高用量（100 – 700 mg/kg）の範囲で用量依存的に協調運動抑制作用を示し、ED_{50} 値は 250 mg/kg であった（Table 7）。一方、他の抗精神病薬は低用量から協調運動抑制作用を示し、その ED_{50} 値はリスペリドンで 1.8 mg/kg、オランザピンで 5.2 mg/kg、クロザピンで 8.7 mg/kg、ハロペリドールで 2.7 mg/kg であった（Table 7）。

Table 7 CNS depressive actions of lurasidone and other antipsychotics in mice (1)

Drugs	ED_{50} (mg/kg)		
	Potentiation of Hexobarbital-Induced Anesthesia	Muscle Relaxation	Impairment of Motor Coordination
Lurasidone	>1000	>1000	250 (150–430)
Risperidone	1.5 (0.67–3.3)	11 (6.8–19)	1.8 (1.1–3.0)
Olanzapine	8.3 (3.8–18)	11 (6.8–19)	5.2 (2.9–9.3)
Clozapine	8.2 (4.9–14)	32 (20–50)	8.7 (4.7–16)
Haloperidol	11 (5.8–20)	33 (26–43)	2.7 (1.4–5.2)

ED_{50} values and 95% confidence limits in parenthesis were obtained 1 hr before drug administration.

4.4. アドレナリン神経系に対する作用（眼瞼下垂惹起作用）

ルラシドンは比較的高用量（100 – 1000 mg/kg）の範囲で用量依存的に眼瞼下垂を誘発し、1000 mg/kg における発現率は 10 例中 5 例であった。このため正確な ED_{50} 値は算出できなかったが、約 1000 mg/kg と推定された（Table 8）。一方、リスペリドン、オランザピン、ハロペリドールは低用量から眼瞼下垂を誘発し、ED_{50} 値はそれぞれ 0.68, 9.2 および 6.3 mg/kg であった（Table 8）。

4.5. アセチルコリン神経系に対する作用（オキソトレモリン誘発振せん抑制作用）

ルラシドンは検討した最大用量 1000 mg/kg においても、オキソトレモリン誘発振せんに影響を与えなかった（Table 8）。一方、オランザピンは有意なオキソトレモリン誘発振せん抑制作用を示し、ED_{50} 値は 4.9 mg/kg であった。ハロペリドールもまた抑制作用を示したが、活性は比較的低く、その ED_{50} 値は 23 mg/kg であった（Table 8）。

Table 8 CNS depressive actions of lurasidone and other antipsychotics in mice (2)

	ED_{50} (mg/kg)	
Drugs	Ptosis	Inhibition of Oxotremoline-Induced Tremor
Lurasidone	ca. 1000	>1000
Risperidone	0.68 (0.31–24)	n.t.
Olanzapine	9.2 (5.5–15)	4.9 (3.0–7.8)
Clozapine	n.t.	n.t.
Haloperidol	6.3 (3.5–11)	23 (10–52)[a]

ED_{50} values and 95% confidence limits in parenthesis were obtained 1 hr before drug administration.
n.t.; not tested
[a] Data quoted from Hirose (1990)

考察

本節では、ルラシドンの薬理特性について *in vivo* で検討した。抗精神病薬の評価に一般的に用いられている評価系を用いてルラシドンおよび他の抗精神病薬の D_2 受容体拮抗活性を評価した。今回の検討で対照として評価した他の抗精神病薬の ED_{50} 値は以前の報告 [38, 39] とほぼ一致した。ルラシドンの D_2 受容体拮抗強度（ED_{50} 値）はおよそ 2 – 5 mg/kg の範囲にあり、オランザピンと概ね同等、ハロペリドールの 1/10 程度であった。また、臨床での抗精神病作用の予測に適するモデルとして報告されている [40] 条件回避反応試験においても、ルラシドンは逃避反応に影響を与えず、選択的に条件回避反応のみを抑制した。これらの結果は、ルラシドンが D_2 受容体を拮抗することにより、既存の抗精神病薬と同様に、統合失調症の病態、特に陽性症状を改善することを示唆するものである。

一方で、非定型抗精神病薬の主な特徴は 5-HT_2 受容体拮抗活性である。ルラシドンおよび他の抗精神病薬の 5-HT_2 受容体拮抗活性を評価した結果、対照として評価した抗精神病薬の ED_{50} 値は以前の報告 [38, 39] とほぼ一致した。ルラシドンの 5-HT_2 受容体拮抗強度（ED_{50} 値）はおよそ 3 – 6 mg/kg の範囲にあり、D_2 受容体拮抗活性とほぼ同程度であった。同様に、5-HT_2 受容体拮抗活性を評価するモデルである 5-hydroxytryptophan 誘発 wet dog shake 行動や 5-methoxytryptamine 誘発 head twitch の抑制作用を検討した結果、ルラシドンの ED_{50} 値はそれぞれ 2.4 および 3.4 mg/kg であった（data not shown）。これらの結果から、5-HT_2 受容体拮抗作用がルラシドンの薬効に寄与し、他の非定型抗精神病薬と同様に、ルラシドンが陰性症状に有効で錐体外路系副作用の少ない薬効プロファイルを示すことが考えられる。

臨床において非定型抗精神病薬は大うつ病や双極性障害患者の治療に用いられているが、動物モデルを用いて非定型抗精神病薬の抗うつ薬様作用を検出するのは難しいとされてきた。実際、学習性無力試験（Learned Helplessness test）を用いた報告では、ハロペリドール、リスペリドン、オランザピン、アリピプラゾールではうつ様行動を増悪し、クエチアピンでは効果がなかった [41] 。この結果から、学習性無力試験は抗精神病薬が誘発する dysphoria（抑うつ、情動不安）を評価できるかもしれないが、抗うつ薬様作用を評価することはできないことが示唆された。他の抗うつ様作用評価モデルである強制水泳試験では、抗うつ薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬（SSRI）とアリピプラゾールの併用効果は検出できるが、アリピプラゾール単独の薬効は検出できないことが報告されている [42]。本研究では、運動量の低下を抗うつ様作用の指標とする嗅球摘出モデルでルラシドンの作用を検討した。その結果、ルラシドンが、三環系抗うつ薬イミプラミンと同様の抗うつ様作用を有していることが示された。本研究では既存の非定型抗精神病薬の評価をしておらず、この作用がルラシドンの差別化になるかは不明であり、また、ルラシドンの抗うつ様作用自身についても他の評価系での検討が必要であると思われる。

さらに、ルラシドンは Vogel 型コンフリクト試験や社会相互行動試験において抗不安作用を示した。ルラシドンが動物モデルで抗不安・抗うつ様作用を示した機序については明ら

かとなっていないが、以下のエビデンスから、一つの可能性としてルラシドンの 5-HT_7受容体拮抗作用が考えられる。5-HT_7受容体ノックアウトマウスが尾懸垂試験および強制水泳試験において抗うつ様作用行動を示すこと [43] 、SB-269970 などの選択的 5-HT_7受容体アンタゴニストが尾懸垂試験、強制水泳試験や Vogel 型コンフリクト試験において、抗うつ・抗不安様効果を示すことなどが報告されている [26] 。また、5-HT_7受容体は情動に関連する海馬や扁桃体に多く発現しており [44] 、ルラシドンはこれらの脳領域において 5-HT_7受容体拮抗作用を介して抗不安作用を発揮していることが考えられる。一方で、5-HT_{1A}受容体アゴニストがげっ歯類やヒトにおいて抗うつ・抗不安様作用を示すこと [24] 、α_{2C}受容体がうつに関連すること [27] が報告されており、ルラシドンは 5-HT_{1A}受容体部分アゴニスト（Emax=33%）であり、5-HT_7, 5-HT_{1A}受容体の他にα_{2C}受容体にも結合親和性を有する（*K*i= 10.8 nM）ことから、これらの活性が抗うつ・抗不安様作用につながっている可能性も考えられる。

錐体外路症状（extrapyramidal symptoms, EPS）は統合失調症治療における臨床上重大な問題となっており、薬物治療のコンプライアンスを低下させる重要な因子である [45]。今回の検討では、ルラシドンは全ての評価系において 1000 mg/kg まで EPS を惹起しなかった。これに対して、ハロペリドールやリスペリドンは比較的低用量において EPS を発現した。さらに、安全係数（EPS 評価での ED_{50}/D_2受容体拮抗活性 ED_{50}）においてもルラシドンは他の抗精神病薬と比較して、非常に高い値を示した。この結果は、ルラシドンの EPS 惹起作用は非常に弱い可能性を示すものである。ルラシドンがげっ歯類において EPS 惹起作用が非常に弱かった詳細なメカニズムは明らかとなっていない。5-HT_2受容体拮抗作用は抗精神病薬による EPS を軽減することが報告されており [35, 46]、一つの可能性として考えられる。しかしながら、ルラシドンの 5-HT_2受容体拮抗作用は他の非定型抗精神病薬リスペリドンやオランザピンと比較して弱く、これらの薬剤はカタレプシーを惹起したことから、他のメカニズムの関与が示唆される。また、5-HT_{1A}受容体アゴニストが D_2受容体アンタゴニストによる EPS を軽減することが報告されており [24]、ルラシドンの 5-HT_{1A}受容体部分作動活性が EPS 低減に寄与しているかもしれない。

EPS に加えて、今回評価したルラシドンの麻酔増強作用、筋弛緩作用、眼瞼下垂作用、協調運動抑制作用などの中枢抑制作用は他の抗精神病薬と比較して非常に弱かった。これらの行動変化はヒスタミン H_1受容体拮抗作用やα_1受容体拮抗作用などを介していると考えられている [47]。これらの結果は、受容体結合実験において、ルラシドンのα_1受容体に対する結合親和性が低く、H_1受容体に対して親和性を示さなかった結果と一致するものである。オキソトレモリン振戦抑制作用は、抗ムスカリン作用の薬理学的マーカーであり、ルラシドンが作用を示さなかった（ED_{50}> 1000 mg/kg）ことは、本薬が健忘や口渇といった抗コリン性の副作用を引き起こさないことを示唆する。以上の *in vivo* の成績は、ルラシドンが第二世代抗精神病薬と同様の抗精神病作用を有しているが、従来の抗精神病薬と比べ中枢抑制性副作用リスクが低い抗精神病薬であることを示唆するものである。

小括

（１）ルラシドンは D_2, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_7 受容体に対して高い親和性を示し、ヒスタミン H_1、ムスカリン受容体には親和性を示さなかった。また、*in vitvo* での受容体機能評価において、ルラシドンがドパミン D_{2L} 受容体およびセロトニン 5-HT_7 受容体に対して同程度のアンタゴニストとして作用し、セロトニン 5-HT_{1A} 受容体に対して部分アゴニストとして働くことを示した。

（２）ルラシドンは既存の抗精神病薬と同様に *in vivo* においてドパミン D_2 受容体拮抗作用および 5-HT_{2A} 受容体拮抗作用を示した。また、ルラシドンは抗不安・抗うつ様作用も示した。

（３）ルラシドンの錐体外路系副作用および中枢抑制作用は既存の抗精神病薬と比べて非常に弱かった。

第二章　ラット脳内5-HT_7受容体分布およびルラシドンの5-HT_7受容体結合活性

ルラシドンは他の抗精神病薬と比べ5-HT_7受容体に対して高い結合親和性を示した。この薬理特性は、ルラシドンの特長となることが考えられる。そこで、本章ではルラシドンの5-HT_7受容体に対する作用について、ラットおよびヒト5-HT_7受容体発現細胞での結合親和性、そして、*in vitro* [^{3}H]SB-269970オートラジオグラフィーによるラット脳内の5-HT_7受容体分布と脳内5-HT_7受容体に対するルラシドンの作用を検討した。また、種差の確認を目的として、ヒトD_{2L}受容体、5-HT_{1A}および5-HT_{2A}受容体への結合親和性もあわせて検討した。

実験方法

1. 実験動物

6週齢の雄性SD ラット（日本チャールス・リバー株式会社）を入手し、1週間の馴化期間を経た後、実験に使用した。動物は12時間の明暗サイクル、自由摂餌CE-2（日本クレア株式会社）、自由飲水で飼育した。すべての動物の取り扱いは、大日本住友製薬株式会社　研究本部　飼育管理手順書に従って行った。

2. 使用薬物

ルラシドン、オランザピンおよび選択的5-HT_7受容体アンタゴニストSB-656104-Aは大日本住友製薬株式会社にて合成した。5-HT塩酸塩、スピペロン、8-OH-DPATはSigma Aldrich Japanより入手した。ミアンセリン塩酸塩はICN Biomedicals (Irvine, CA, USA)より入手した。[^{3}H]Spiperone, [^{3}H]8-OH-DPAT および [^{3}H]KetanserinはPerkinElmer（Waltham, MA, USA）から入手した。 [^{3}H]SB-269970はGE Healthcare UK（Buckinghamshire, UK）より入手した。各薬物はDMSOに溶解し、反応液中のDMSOの最終濃度が0.5%となるように希釈した。

3. *In vitro* 受容体結合実験

ラット5-HT_7受容体またはヒト5-HT_{2A} 受容体を発現したCHO細胞からの膜標品調製は籔内らの報告 [20] に従って行った。ヒトD_{2L}, 5-HT_{1A}, 5-HT_7受容体膜標品はPerkinElmerから購入した。

5-HT_7受容体結合実験はThomasらの方法 [48] を改変して行った。すなわち、5-HT_7受容体膜標品は4 mM $CaCl_2$、1 mM アスコルビン酸、0.1 mM パルギリンを含む50 mM Tris-HCl緩衝液（pH7.4）中で[^{3}H]SB-269970（結合阻害実験では終濃度2 nM、飽和結合実験では終濃度0.25～8 nM）とともに37℃で60分間インキュベーションした。D_{2L}, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}受容体結合実験は石橋らの方法 [23] を改変して行った。すなわち、D_{2L}受容体膜標品は50 mM Tris-HCl緩衝液（pH7.4）中で[^{3}H]Spiperone（終濃度0.5 nM）とともに27℃で60分間インキュベーションした。5-HT_{1A}受容体膜標品は、4 mM $CaCl_2$を含む50 mM Tris-HCl緩衝液（pH7.4）

中で[^{3}H]8-OH-DPAT（終濃度 0.5 nM）とともに 25℃で 30 分間インキュベーションした。5-HT_{2A}受容体膜標品は 50 mM Tris-HCl 緩衝液（pH7.6）中で[^{3}H]Ketanserin（終濃度 0.8 nM）とともに 37℃で 15 分間インキュベーションした。5-HT_{2A}受容体結合実験では、非特異的結合を算出する場合には 1 μM ミアンセリンを添加した。反応はガラス繊維濾紙上に急速濾過することにより停止し、濾紙を氷冷した 50 mM Tris-HCl 緩衝液で 3 回洗浄した。濾紙上の放射活性は液体シンチレーションカウンターで測定した。*K*d 値はスキャッチャードプロットから算出した。*K*i 値は Cheng-Prusoff の式 $Ki=IC_{50}/1+$(ラジオリガンド濃度/*K*d)より計算した。IC_{50}値は Stat Preclinica（タクミインフォメーション）の Dx 計算（ロジスティック曲線回帰）により算出した。実験は duplicate で 3 回行い、結果を平均値±標準誤差で表示した。

4. *In vitro* [^{3}H]SB-269970 オートラジオグラフィー

実験は Varnäs らの方法 [49] に準じて行った。すなわち、ラットを断頭して脳を採取し、凍結保存した。クリオスタット（Leica 社製 CM1850）を用いて 20 μm 厚の凍結脳切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた。室温で乾燥させ、結合実験まで－80℃で保存した。結合実験では、最初に脳スライスを 4 mM $CaCl_2$、1 mM アスコルビン酸を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液（pH7.4）に室温で 15 分間浸し、内因性の 5-HT を除くためのプレインキュベーションを行った。次に、室温で[^{3}H]SB-269970（終濃度 4 nM）、4 mM $CaCl_2$、1 mM アスコルビン酸、0.1 mM パルギリンを含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液（pH7.4）に 2 時間浸し、インキュベーションを行った。非特異的結合を算出する場合には 10 μM 5-HT を添加した。受容体発現分布を検討するために 3～4 匹のラットから目的とする bregma からの距離ごとに冠状切片を作製し、全結合と非特異的結合測定に各個体から 1 枚ずつ使用した。結合阻害実験用には 3 匹のラットを用いて bregma から－2.4 mm 付近の連続冠状切片を作製し使用した。ルラシドン、SB-656104-A は 10, 100, 1000 nM、オランザピンは 100, 1000, 10000 nM における[^{3}H]SB-269970 結合阻害作用を検討した。脳スライスはインキュベーション後、氷冷した 4 mM $CaCl_2$、1 mM アスコルビン酸を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液（pH7.4）で 10 分ずつ 3 回洗浄し、最後に氷冷した蒸留水に浸して緩衝液を洗い流し、室温で風乾させた。脳スライスはイメージングプレート（富士フィルム社製, BAS-TR2040）とともにカセッテに封入し、自然放射線から守るためシールドボックスに入れて 8 週間露光させた。[^{3}H]SB-269970 結合量はフルオロイメージアナライザー（富士フィルム社製 FLA7000）を用いて測定し、Multi Gauge 3.0 を用いて解析した。測定された光輝尽発光（photostimulated luminescence, PSL）は ^{3}H-micro-scales（GE Healthcare UK）を用いてラジオリガンド結合量（fmol/mg tissue）に変換した。ラット脳地図 [50] を用いて脳部位を特定し、各部位における受容体密度を全結合から非特異的結合を引いて算出した。ルラシドン、SB-656104-A、オランザピンの結合阻害活性評価では、各濃度での海馬での結合量から特異的結合阻害率を算出し、SAS の非線形回帰分析により IC_{50} 値を算出した。

実験結果

1. *In vitro* 受容体結合実験

ルラシドンはヒト D_{2L} 受容体、5-HT_{2A}, 5-HT_{1A} および 5-HT_7 受容体に対して高い結合親和性を示した（Table 9、10）。これらの親和性は第一章でも示したラット受容体への親和性と同等で、種差はほとんど認められなかった。ルラシドン、SB-656104-A、オランザピンはラットおよびヒト 5-HT_7 受容体に対して結合親和性を示した。ルラシドンの結合親和性は、オランザピンと比べて高く、SB-656104-A よりもやや低かった。ルラシドンのヒト 5-HT_7 受容体に対する結合親和性（*K*i= 2.10 nM）は、ラジオリガンドに[^{3}H]5-CT を用いて得られた値（*K*i= 0.495 nM）よりも低かった。

Table 9 Binding profile of lurasidone for rat and human D_2, 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A} and 5-HT_7 receptors

	Species	[^{3}H]radioligand	*K*i (nM)
D_{2L}	Human	Spiperone	0.994 ± 0.157
D_2	Rat		1.68 ± 0.09 [a]
5-HT_{2A}	Human	Ketanserin	0.470 ± 0.052
	Rat		2.03 ± 0.46 [a]
5-HT_{1A}	Human	8-OH-DPAT	6.38 ± 0.571
	Rat		6.75 ± 0.97 [a]
5-HT_7	Human	5-CT	0.495 ± 0.090 [a]

[a] Data quoted from Ishibashi et al. (2010).
Values are means ± SEM of three separate experiments

Table 10 Binding affinities of lurasidone, SB-656104-A and olanzapine for rat and human 5-HT_7 receptors in an *in vitro* [^{3}H]SB-269970 binding assay

Drug	*K*i (nM)	
	rat	human
Lurasidone	1.55 ± 0.13	2.10 ± 0.193
SB-656104-A	0.658 ± 0.012	1.10 ± 0.07
Olanzapine	465 ± 78	329 ± 10

Values are means ± SEM of three separate experiments

2. 受容体結合の脳内分布

結果を Fig. 6 および Table 11 に示した。最も[^{3}H]SB-269970 結合量が高かったのは、視床室傍核（paraventricular thalamic nucleus）で 83 fmol/mg tissue（n=4）であった。他の領域で結合量が高かったのは、順に視床（thalamus）＞分界条床核（bed nucleus）＞視床下部（hypothalamus）＞背側縫線核（dorsal raphe nucleus）≥海馬 CA3（CA3 region of the hippocampus）≥ 外側中隔（lateral septum）≥上丘（superior colliculus）＞水道周囲灰白質（periaqueductal gray）≥扁桃体（amygdala）で 21 – 47 fmol/mg tissue（n=4）であった。中程度の結合が見られたのは嗅内皮質 (entorhinal cortex)、 脳梁膨大後皮質（retrosplenial granular cortex）、帯状皮質（cingulate cortex）、前頭皮質（frontal cortex）、嗅球（olfactory bulb）で 11 – 17 fmol/mg tissue（n=3 または 4）であった。大脳皮質では内層よりも外層に強い結合が見られた。一方、黒質（substantia nigra）、尾状核被殻（caudate putamen）、淡蒼球（globus pallidus）で 4 – 6 fmol/mg tissue（n=4）と低く、橋（pontine）や小脳（cerebellum）では 0～1 fmol/mg tissue（n=3 または 4）と非常に低かった。

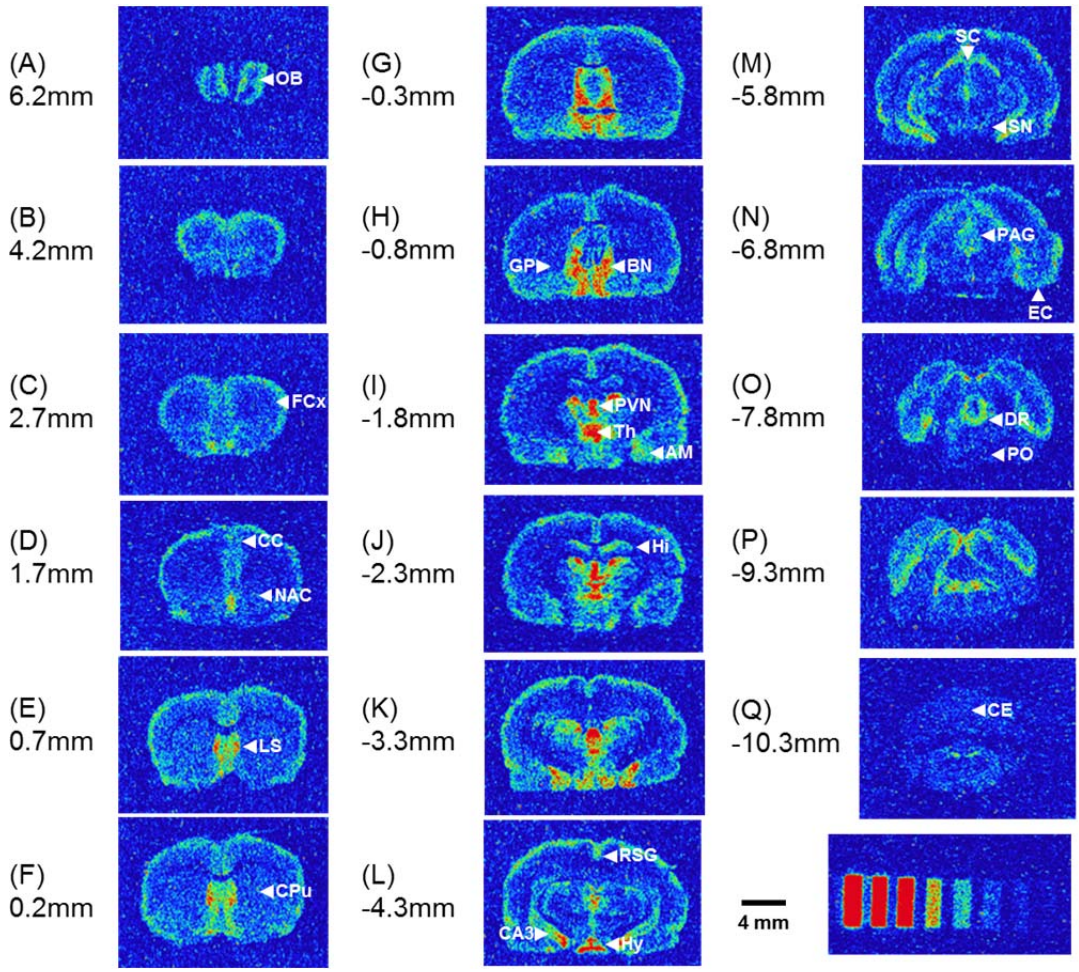

Fig.6 [^{3}H]SB-269970 binding to the 5-HT$_7$ receptors in the rat brain. Brain slices of (A) 6.2 mm, (B) 4.2 mm, (C) 2.7 mm, (D) 1.7 mm, (E) 0.7 mm, (F) 0.2 mm, (G) -0.3 mm, (H) -0.8 mm, (I) -1.8 mm, (J) -2.3 mm, (K) -3.3mm, (L) -4.3 mm, (M) -5.8 mm, (N) -6.8 mm, (O) -7.8 mm, (P) -9.3 mm and (Q) -10.3 mm from bregma. Radioscales are presented in lower right part, and each strip corresponds to 482, 238, 148, 61, 30, 15, 8 and 3 fmol/mg tissue respectively from the left. Abbreviations: AM: amygdala; BN: bed nucleus; CA3: hippocampus CA3; CC: cingulate cortex, CE: Cerebellum; CPu caudate putamen (striatum); DR: dorsal raphe nucleus, EC: Entorhinal cortex; FCx: frontal cortex, Hi: hippocampus; Hy: hypothalamus; GP: Globus Pallidus; LS: lateral septum; NAC: nucleus accumbens; OB: olfactory bulb, PAG: periaqueductal gray; PO: pontine; PVN: paraventricular thalamic nucleus; RSG: retrosplenial granular cortex; SC: superior colliculus; SN: substantia nigra; Th: thalamus.

Table 11 Autoradiographic distribution of [^{3}H]SB-269970 binding sites in the rat brain

		Specific binding in fmol/mg tissue
Brain region	n	Mean±SE
Olfactory system		
Olfactory Bulb	4	12±1
Cortex		
Frontal Cortex	3	11±1
Cingulate Cortex	4	12±1
Retrosplenial Granular Cortex	4	14±1
Entorhinal Cortex	4	17±1
Basal ganglia		
Caudate Putamen	4	4±1
Nucleus Accumbens	4	6±1
Globus Pallidus	4	4±2
Hippocampus and septum		
Lateral Septum	4	27±4
Hippocampus	4	14±2
CA3 Field	4	29±4
Amygdaloid body		
Amygdala	4	21±2
Bed Nucleus	4	41±3
Thalamus		
Thalamus	4	47±5
Paraventricular Thalamic Nucleus	4	83±10
Hypothalamus		
Hypothalamus	4	36±6
Brain stem and cerebellum		
Dorsal Raphe Nucleus	4	30±1
Periaqueductal Gray	4	23±2
Superior Colliculus	4	26±1
Substantia Nigra	4	6±0
Pontine	4	1±1
Cerebellum	3	0±0

3. 結合阻害実験

ルラシドン、SB-656104-A、オランザピンの[^{3}H]SB-269970 特異的結合に対する阻害作用を検討した（Fig. 7、Table 12）。[^{3}H]SB-269970 特異的結合はルラシドン、SB-656104-A、オランザピンにより濃度依存的に抑制された。その IC_{50} 値（カッコ内は 95%信頼区間）はそれぞれ 90 (37 – 220)、49 (23 – 110)、5,200 (520 – 52,000) nM であった。

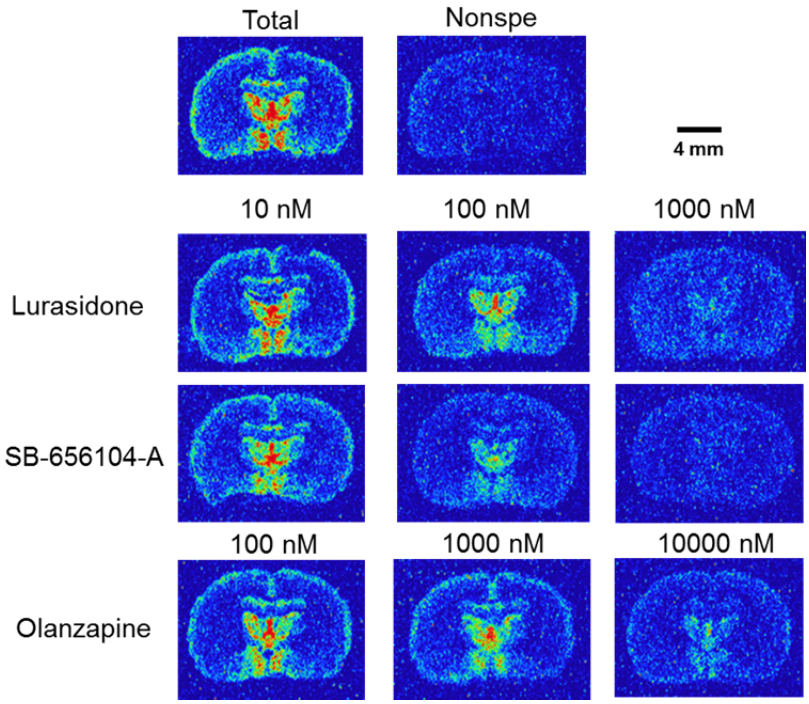

Fig. 7 Inhibition of specific [^{3}H]SB-269970 binding by SB-656104-A, lurasidone and olanzapine in brain slices at around -2.4 mm from bregma.

Table 12 Binding affinity of lurasidone, SB-656104-A and olanzapine for 5-HT$_7$ receptors in the rat brain (autoradiography experiment)

Drug	IC_{50} nM (95% confidence Interval)
Lurasidone	90 (37 – 220)
SB-656104-A	49 (23 – 110)
Olanzapine	5200 (520 – 52,000)

n=3 per group.

考察

[^{3}H]SB-269970 オートラジオグラフィーについては、ヒト死後脳を用いた検討が報告されているが [49] 、ラットでは受容体発現量がヒトと比べて低いため報告されていない [48] 。そこで、予備検討を行い、ラット脳スライスへの[^{3}H]SB-269970 結合量を液体シンチレーションカウンターで測定して推定された受容体発現量とイメージングプレートに露光した ^{3}H-micro-scales の PSL 値から定量に必要な露光時間を予測した。その結果、イメージングプレートへの露光時間を 4 週間 [49] から 8 週間へ延長し、自然放射線から防護するためのシールドを利用することにより、ラット脳スライスの [^{3}H]SB-269970 結合画像を得ることができた。イメージングプレートの測定から得られた PSL シグナルは 5-HT（10 μM）や SB-656104-A（1 μM）によりほぼ完全に消失 したことから、特異的な[^{3}H]SB-269970 結合によるものであると考えられた。すなわち、本研究は、ラット脳での[^{3}H]SB-269970 オートラジオグラフィーを初めて示したものである。

[^{3}H]SB-269970 結合の脳内分布は、非特異的ラジオリガンドを用いた報告 [51] や *in situ* ハイブリダイゼーションにより検討した報告 [52] と一致していた。例えば、海馬の CA3 における強い結合は、*in situ* ハイブリダイゼーションにより検討した報告 [52, 53] 、5-$HT_{1A/1B}$ ノックアウトマウスで 5-$HT_{1A/7}$ 受容体ラジオリガンドである [^{3}H]8-OH-DPAT を用いたオートラジオグラフィー [54] 、10 μM ピンドロール（5-$HT_{1A/1B}$ 受容体結合阻害薬）と 1 μM GR-127935（5-HT_{1D} 受容体結合阻害薬）存在下での [^{3}H]5-CT オートラジオグラフィーや 10 μM ピンドロールと 1 μM RX-821002（α_2 受容体結合阻害薬）存在下での [^{3}H]8-OH-DPAT オートラジオグラフィー [55] の報告と一致した。これらのオートラジオグラフィーの結果は、非特異的ラジオリガンドが結合する 5-HT_7 受容体以外の受容体を他の化合物により阻害することにより、5-HT_7 受容体分布を調べたものである。この手法では、5-HT_7 受容体以外の受容体へのラジオリガンド結合を完全には除くことができない可能性が考えられる。例えば、30 nM PAPP (*p*-Aminophenethyl-m-trifluoromethylphenyl piperazine)（5-$HT_{1A/1D\alpha}$ 受容体結合阻害薬）、160 nM (－)-ピンドロール（5-HT_{1B} 受容体結合阻害薬）および 1 μM GR-127935（5-HT_{1D} 受容体結合阻害薬）存在下での [^{3}H]5-CT オートラジオグラフィーでは、[^{3}H]SB-269970 オートラジオグラフィーでは結合量が少なかった黒質と淡蒼球にはっきりと結合が見られた [52]。また、5-$HT_{1A/1B}$ ノックアウトマウスでの[^{3}H]5-CT オートラジオグラフィーにおいて、10 μM SB-269970 は完全には[^{3}H]5-CT 結合を阻害せず、この結合は 1 μM SB-216641（選択的 5-$HT_{1B/1D}$ 受容体結合阻害薬）により消失したことが報告されている [54]。さらに、10 μM ラクロプリド（D_2 受容体結合阻害薬）と 0.8 μM DOI（5-$HT_{2A/2C}$ 受容体結合阻害薬）存在下での[^{3}H]Mesulergine オートラジオグラフィーでは尾状核被核に強い結合が見られたが、 [^{3}H]SB-269970 オートラジオグラフィーでは同部位に強い結合は見られていない [49]。これらの結果は 5-HT_7 受容体の非常に低い発現を検出するのは難しいことを示唆しており、選択的ラジオリガンドを用いた本手法はより確実な受容体分布の検

討を可能にしているかもしれない。

視床、視床下部、海馬、扁桃体において 5-HT_7受容体の発現が高いことはヒトとラットで共通であった。種差が見られたのは中程度から低い発現量の部位であった。例えば、ヒトでは前頭皮質において内層で外層よりも高い結合が見られたが [51]、今回のラットでの結果は逆であった。また、ヒトでは黒質に高い結合が見られたが [49, 51]、ラットでの結果は低かった。黒質での結合はヒトの[^{3}H]SB-269970 オートラジオグラフィーにおいても高かったことから、検出方法の差ではなく、種差であることが考えられる。

本検討では、[^{3}H]SB-269970 オートラジオグラフィーでのルラシドン、SB-656104-A、オランザピンの IC_{50} 値は *in vitro* 受容体結合実験の *K*i 値と比べてかなり大きかった。計算式が示す通り、IC_{50} 値は通常 *K*i 値と比べて大きい値を取るが、その他にもラジオリガンドの濃度など実験条件の違いが影響しているかもしれない。

また、[^{3}H]SB-269970 オートラジオグラフィーでのルラシドン、SB-656104-A、オランザピンの結合阻害作用の IC_{50} 値は海馬のほかに、視床、扁桃体、脳梁膨大後皮質でも算出したが、阻害活性に部位差は見られなかった（data not shown）。

今回、ルラシドンは脳内の辺縁系に豊富に存在する 5-HT_7受容体に結合することが示された。辺縁系は情動や認知に関連する脳部位であり [56, 57, 58]、5-HT_7受容体がこれらの役割に関与していることが示唆される。ルラシドンがげっ歯類において気分安定化作用や認知機能改善作用を示す結果が得られており、これらの薬理作用に 5-HT_7受容体が関与することが解明されるには更なる研究が必要である。

小括

（１）*In vitro* 受容体結合実験の結果、ルラシドンはラットおよびヒトの D_2, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_7 受容体に結合親和性を示し、その親和性にラットとヒトでほとんど差は見られなかった。

（２）ラット脳内の 5-HT_7受容体結合を[^{3}H]SB-269970 オートラジオグラフィーにより、検討した。その結果、視床、視床下部、中隔、海馬、扁桃体といった辺縁系に高い結合が見られた。

（３）ルラシドンはラット脳内の 5-HT_7受容体に対しても結合活性を有することが示された。その結合阻害活性はオランザピンと比べて強かった。

第三章　学習記憶障害に対するルラシドンおよび 5-HT_7 受容体アンタゴニストの作用

認知障害は統合失調症患者に見られ、社会的、職業的、日常生活に密接に関連する主症状の一つに位置づけられている。統合失調症における認知障害の原因の一つとして NMDA 受容体の機能低下が考えられている [59] 。この仮説は、統合失調症患者で見られる症状に非常に近い精神症状や記憶障害を非選択的な NMDA 受容体アンタゴニストであるフェンシクリジンやケタミンが健常人において惹起することから支持されている。この仮説に基づいて、NMDA 受容体アンタゴニストを投与した動物モデルが統合失調症患者で見られる認知障害の動物モデルとして広く用いられている。本章では、NMDA 受容体アンタゴニスト MK-801 によって惹起される学習記憶障害に対する作用について受動的回避試験およびモリス型水迷路試験を用いて検討した。また、5-HT_7受容体アンタゴニストの MK-801 による学習記憶障害に対する改善作用の機序について神経化学的検討を行った。

実験方法

1. 実験動物

雄性 Wistar ラットを日本チャールス・リバー株式会社より 6〜8 週齢で入手し、約 1 週間の馴化期間を経た後、実験に使用した。動物は 12 時間の明暗サイクル、自由摂餌 CE-2、日本クレア株式会社)、自由飲水で飼育した。すべての動物の取り扱いは、大日本住友製薬株式会社　研究本部　飼育管理手順書に従って行った。

2. 使用薬物

ルラシドンおよび SB-656104-A は大日本住友製薬株式会社にて合成した。AS19 は Tocris Biosciences、(+)-MK-801 マレイン酸水素塩、S(−)-ラクロプリド酒石酸塩およびケタンセリン酒石酸塩 は Sigma Aldrich Japan より入手した。ルラシドンおよび SB-656104-A は、0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、5 mL/kg で経口投与した。また、ルラシドンおよび SB-656104-A の静脈内投与実験では、ポリエチレングリコールに溶解後、蒸留水でポリエチレングリコール濃度が 25%となるように希釈し、1 mL/kg で投与した。MK-801 は生理食塩液に溶解し、5 mL/kg で皮下投与または 10 mL/kg で腹腔内投与した。ラクロプリドおよびケタンセリンは、生理食塩液に溶解して混合し、5 mL/kg で皮下投与した。AS19 は DMSO に溶解し、生理食塩液で DMSO 濃度が 1%となるように希釈し、5 mL/kg で皮下投与した。

3. ラット受動的回避試験における学習および記憶に対する作用

ラット受動的回避試験は石山らの方法 [60] に従って行った。すなわち、ステップ・スルー装置（小原医科産業製、スライド扉で仕切られた明室（200×250×200 mm）および暗室

（200×150×200 mm）からなる）を用い、ラットを明室に入れてから 10 秒間の探索行動をさせた後、スライド扉を開け、ラットが暗室へ移動するまでの時間を測定した。訓練時にはラットが暗室に入るとすぐに扉を閉め、3 秒後に逃避不可能な電気ショック（0.5 mA, 3 秒）を床のグリッドから負荷した。24 時間後に電気ショック負荷を除いて訓練時と同様にテスト試行を行った。訓練試行、テスト試行ともに暗室へ移動するまでの時間（ステップスルー潜時）は最大 300 秒まで測定した。MK-801 誘発学習記憶障害は訓練試行およびテスト試行の 30 分前に MK-801（0.05 mg/kg あるいは 0.075 mg/kg）を皮下投与することで作製した。

ルラシドン（0.3, 1, 3, 10 mg/kg）および SB-656104-A（1, 3, 10, 30 mg/kg）は訓練試行の 1 時間前にそれぞれ経口投与、腹腔内投与した。なお、訓練試行後投与の検討では、ルラシドン（0.3 mg/kg）、SB-656104-A（0.1, 0.3 mg/kg）は訓練試行の 10 分後にそれぞれ静脈内投与した。5-HT_7受容体アゴニスト AS19 （0.3, 1, 3, 10 mg/kg）は訓練試行の 30 分前に皮下投与した。D_2受容体アンタゴニストであるラクロプリド（0.1 mg/kg）および 5-HT_{2A}受容体アンタゴニストであるケタンセリン（1 mg/kg）は訓練試行の 30 分前に皮下投与した。

4. モリス型水迷路試験における 5-HT_7受容体アンタゴニストの作用

モリス型水迷路試験は榎本らの方法 [61] に従って行った。すなわち、直径 150cm、高さ 45cm の円形プール（ニューロサイエンス社製）の周辺にいくつかの手ががりを置いた。プールには約 22℃の水道水を高さ 27cm まで満たし、透明な直径 12cm の円形プラットフォームを四部円の一つの中央の水面下 1cm に設置した。プラットフォームの場所は試験中変更しなかった。ラットは 1 日 4 試行を 5 日間行った。MK-801（0.15 mg/kg）は生理食塩液に溶解し、各日の最初の施行の 30 分前に腹腔内投与した。SB-656104-A は各日の最初の施行の 1 時間前に腹腔内投与した。各試行では、3 カ所の開始場所の一つから壁側に向けてプールに入れ、放した。ラットが 60 秒以内にプラットフォームにたどり着けなかった場合には、実験者が手動でプラットフォームまで導いた。各試行の間の 30 秒間はラットをプラットフォーム上で休息させた。ラットの行動はビデオ撮影し、エソビジョンビデオ解析システム（ノルダス社製）を用いて解析した。各試行において、ラットがプラットフォームへ到達するまでの時間、水泳距離、水泳速度を測定した。合わせて、走触性（Thigmotaxis, 水泳時間のうち、プールの壁面から 12cm 以内の空間に居た割合）および飛び込み行動（各試行間にプラットフォームからプールへ飛び込む行動）を測定した。モリス型水迷路試験では、ラットはプール壁から離れてプラットフォームを探し、その上に乗りつづけることが唯一の水から逃れる方法であることを学習する必要がある [62]。それ故に、走触性や飛び込み行動は学習を評価する上で有用な指標であると考えられる。NMDA 受容体アンタゴニストは走触性や飛び込み行動を増加させることが知られている。

5. *In vivo* マイクロダイアリシス

実験は吾郷らの方法 [63] に従って行った。すなわち、ラットはペントバルビタールナトリウム（40 mg/kg, i.p.）で麻酔した後，脳定位固定装置（株式会社 成茂科学器械研究所）に固定した。頭皮を切開し，歯科用ドリル（ミニター株式会社）を用いて頭蓋骨に小穴を開け, 大脳皮質前頭葉（ブレグマより2.6 mm 前方、0.7 mm 右側方、頭蓋表面より深さ1.5 mm）にガイドカニューレを挿入した。術後疼痛緩和のため、ブプレノルフィン（0.1 mg/kg, i.p.）を投与した。術後2日目に透析プローブ（膜長3 mm、株式会社エイコム）を挿入し，リンゲル液（147.2 mM NaCl、4.0 mM KCl、2.2 mM $CaCl_2$、pH6.4）（扶桑薬品工業株式会社）を流速1 μL/min で灌流した。サンプルは20分単位で回収し，直ちに高速液体クロマトグラフィー／電気化学検出器（HPLC/ECD）システムに連続自動インジェクションし、5-HT、DA、ノルアドレナリン（NA）を測定した。薬物投与はプローブ挿入後3時間灌流し遊離量が安定した後に行った。HPLC／ECD での測定は、カラムにはEicompak CAX（2.0 mm i.d.×200 mm）、HPLC の移動相には30 mM 硫酸ナトリウム、134 μM EDTA、30% メタノールを含む100 mM 酢酸アンモニウム緩衝液（pH 6.0）を用いて、ECD の加圧電圧は450 mV とし、参照電極にはAg/AgCl 電極、作用電極にはグラファイト標準電極を用いた。

6. 統計解析

受動的回避試験では、データはステップスルー潜時を中央値と四分位範囲で表記した。ステップスルー潜時の群間での比較には Wilcoxon テストまたは Steel テストを行った。水迷路試験では、プラットフォームへ到達するまでの時間、水泳距離は 5 日間の全試行を合計して解析に用いた。水泳速度および走触性は平均値を用いた。溶媒投与群と MK-801 投与群の比較または MK-801 投与群と SB-656104-A 投与群との比較には unpaired t テストを用いて比較した。飛び込み行動は全試行中の合計数を chi-square テストを用いて比較し、Bonferoni の補正を行った。解析には Stat Preclinica（株式会社タクミインフォメーションテクノロジー）を用いた。

実験結果

1. ラット受動的回避試験における学習および記憶に対する作用

初めに、ルラシドンおよび 5-HT_7受容体アンタゴニスト SB-656104-A の MK-801 誘発学習記憶障害に対する作用について検討した。MK-801（0.05 mg/kg, s.c.）の投与により有意にステップスルー潜時が減少した（Fig. 8）。ルラシドン（3, 10 mg/kg, p.o.）および 5-HT_7受容体アンタゴニスト SB-656104-A（10, 30 mg/kg, i.p.）は MK-801 によるステップスルー潜時の減少を有意に抑制した（Fig. 8）。

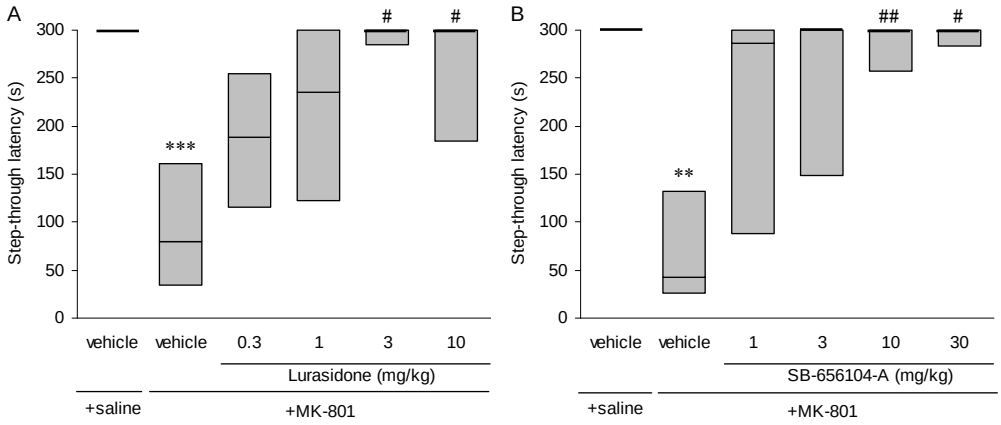

Fig. 8 Effects of pre-training administration of lurasidone (A) and SB-656104-A (B) on the MK-801-induced reduction of step-through latency in the test session performed 1 day after training. Lurasidone (0.3–10 mg/kg, p.o.) and SB-656104-A (1–30mg/kg, i.p.) was administered 1 h before the training session, respectively. Injection of MK-801 (0.05mg/kg, s.c.) before the training and test session significantly reduced step-through latency (**P<0.01, ***P<0.001 vs. vehicle+saline group). Both drugs reversed the effect of MK-801 ($^{\#}P$<0.05, $^{\#\#}P$<0.01 vs. vehicle+MK-801 group). Each bar and box indicates the median and interquartile range. N= 8–10 per group.

次に、SB-656104-A および 5-HT_7受容体アゴニスト AS19 の単独作用について検討を行った。SB-656104-A（3 – 30 mg/kg, i.p.）および AS19（1 – 10 mg/kg, s.c.）はステップスルー潜時を減少させず、学習および記憶を障害する作用はなかった（Fig. 9）。

そこで、ルラシドンおよび SB-656104-A の MK-801 誘発学習記憶障害改善作用に対する AS-19 の作用を検討した。その結果、MK-801（0.075 mg/kg, s.c.）によるステップスルー潜時の減少に対するルラシドン（3 mg/kg, p.o.）の改善作用は、AS19（3 mg/kg, s.c.）により有意に抑制された（Fig. 10）。同様に、MK-801 によるステップスルー潜時の減少に対する SB-656104-A（10 mg/kg, i.p.）の改善作用も、AS19（3 mg/kg, s.c.）により有意に抑制された（Fig. 10）。

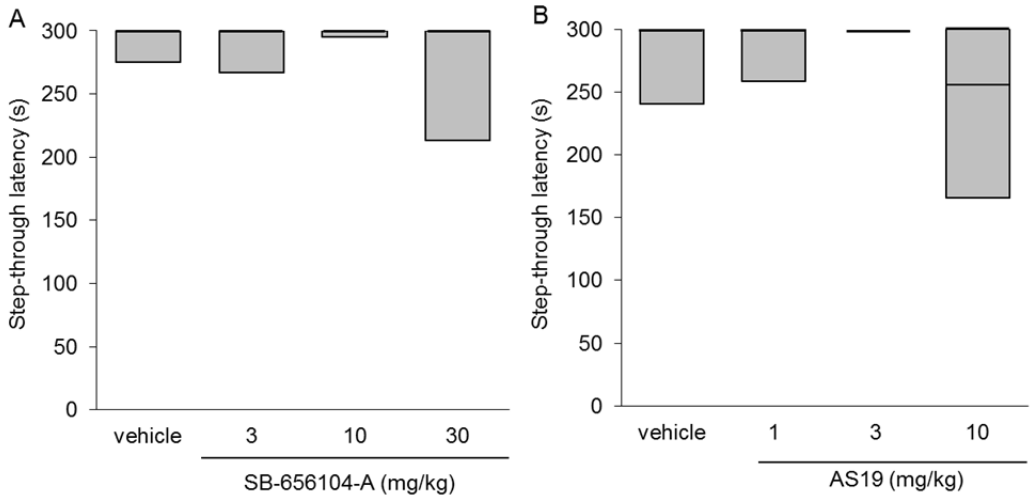

Fig. 9 Effects of pre-training administration of SB-656104-A (A) and AS19 (B) on the step-through latency in the test session performed 1 day after training. SB-656104-A (3–30 mg/kg, i.p.) or AS19 (1–10 mg/kg, s.c.) was administered 1 h or 30 min before the training session, respectively. Each bar and box indicates the median and interquartile range. N= 8 per group.

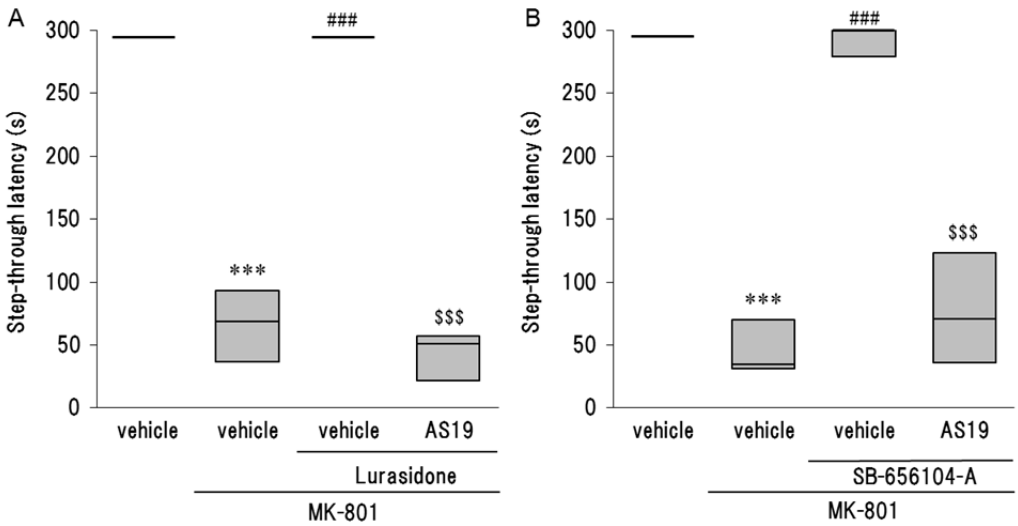

Fig.10 Effects of the pre-training administration of lurasidone (A) and the 5-HT_7 antagonist, SB-656104-A (B) with AS19 in MK-801-treated rats. Injection of MK-801 (0.075 mg/kg, s.c.) before the training and test sessions significantly reduced the step-through latency (***$P < 0.001$ vs. vehicle group). Lurasidone (3 mg/kg, p.o.) and SB-656104-A (10 mg/kg, i.p.) significantly reversed MK-801-induced learning and memory deficits ($^{###}P < 0.001$ vs. vehicle+MK-801 group). AS19 (3 mg/kg, s.c.) blocked the reversal effect of lurasidone and SB-656104-A ($^{\$\$\$}P < 0.001$ vs. lurasidone or SB-656104-A+MK-801 group). All the above two groups were compared using the Wilcoxon test. Each bar and box indicates the median and interquartile range, respectively (n = 8 per group).

さらに、ルラシドンの作用を模倣する目的で、SB-656104-A と D_2 受容体アンタゴニストおよび 5-HT_{2A} 受容体アンタゴニストとの併用効果について検討した。その結果、MK-801（0.075 mg/kg, s.c.）による学習記憶障害は、D_2 受容体アンタゴニストのラクロプリド（0.1 mg/kg, s.c.）および 5-HT_{2A} 受容体アンタゴニストのケタンセリン（1 mg/kg, s.c.）の併用投与では改善されなかったが、SB-656104-A（10 mg/kg, i.p.）による改善作用はラクロプリドおよびケタンセリン存在下においても認められた（Fig. 11）。

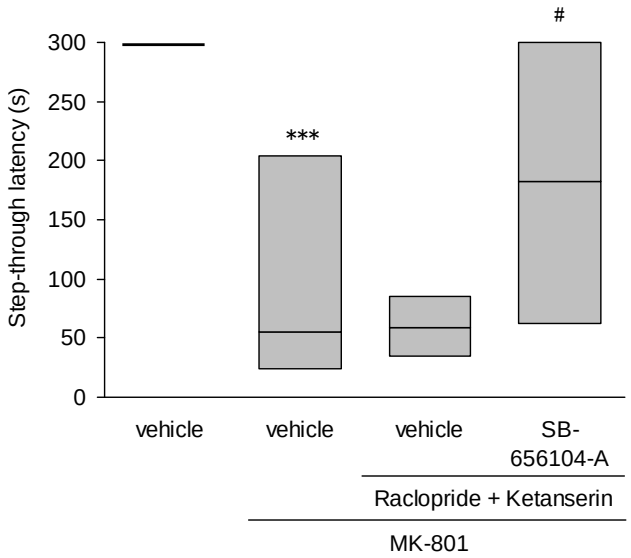

Fig. 11 Effects of the pre-training administration of SB-656104-A in combination with raclopride and ketanserin in MK-801-treated rats. Injection of MK-801 (0.075 mg/kg, s.c.) before the training and test sessions significantly reduced the step-through latency (***P < 0.001 vs. vehicle group). Co-administration of raclopride (0.1 mg/kg, s.c.) and ketanserin (1 mg/kg, s.c.) did not reverse MK-801-induced learning and memory deficits. On the other hand, SB-656104-A (10 mg/kg, i.p.) in combination with raclopride and ketanserin significantly reversed this deficit ($^{\#}P$ < 0.05 vs. vehicle+MK-801 group). All the above two groups were compared using the Wilcoxon test. Each bar and box indicates the median and interquartile range, respectively (n = 16 per group).

また、ルラシドンおよび SB-656104-A が MK-801 による学習記憶障害のどの過程に作用して改善効果を発揮するのか検討する目的で、訓練試行後の投与について検討した。MK-801（0.05 mg/kg, s.c.）の投与により、有意にステップスルー潜時が減少し、学習記憶障害が認められた（Fig. 12）。ルラシドン（0.3 mg/kg, i.v.）および SB-656104-A（0.3 mg/kg, i.v.）は訓練試行後の投与においても、有意に MK-801 によるステップスルー潜時の減少を抑制した（Fig. 12）。

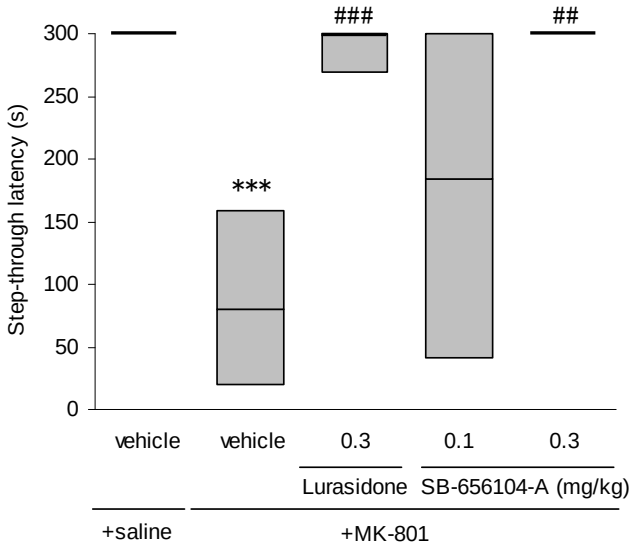

Fig. 12 Effects of post-training administration of lurasidone and SB-656104-A on the MK-801-induced impairment of passive avoidance response. Lurasidone or SB-656104-A was administered intravenously 10 min after the training session. Injection of MK-801 (0.05 mg/kg, s.c.) before the training and test session significantly reduced step-through latency (***P < 0.001 vs. vehicle + saline group). Lurasidone and SB-656104-A significantly reversed the effect of MK-801 in the test session ($^{\#\#}P$ < 0.01, $^{\#\#\#}P$ < 0.001 vs. vehicle + MK-801 group). Each bar and box indicates the median and interquartile range. N = 7–10 per group.

2. モリス型水迷路試験における 5-HT_7受容体アンタゴニストの作用

榎本らは[61] 、MK-801 投与ラットにおいて、ルラシドン(1, 3 mg/kg, p.o.)が有意にプラットフォームへ到達するまでの時間および水泳距離を減少させ、水泳速度には影響を与えないことを報告している。今回、MK-801（0.15 mg/kg, i.p.）は以前の結果と同様に、有意にプラットフォームへ到達するまでの時間および水泳距離を増加させた（Fig. 13A and data not shown）。本研究では MK-801 投与ラットにおいて、5-HT_7受容体アンタゴニストの作用を検討した。SB-656104-A（3 mg/kg, i.p.）は有意にプラットフォームへ到達するまでの時間および水泳距離を減少させた（Fig. 13A and data not shown）。MK-801 は水泳速度には影響を与えなかったが、走触性や飛び込み行動を増加させた（Fig. 13B, C, D）。SB-656104-A は水泳速度には影響を与えることなく、走触性や飛び込み行動を有意に減少させた（Fig. 13B, C, D）。

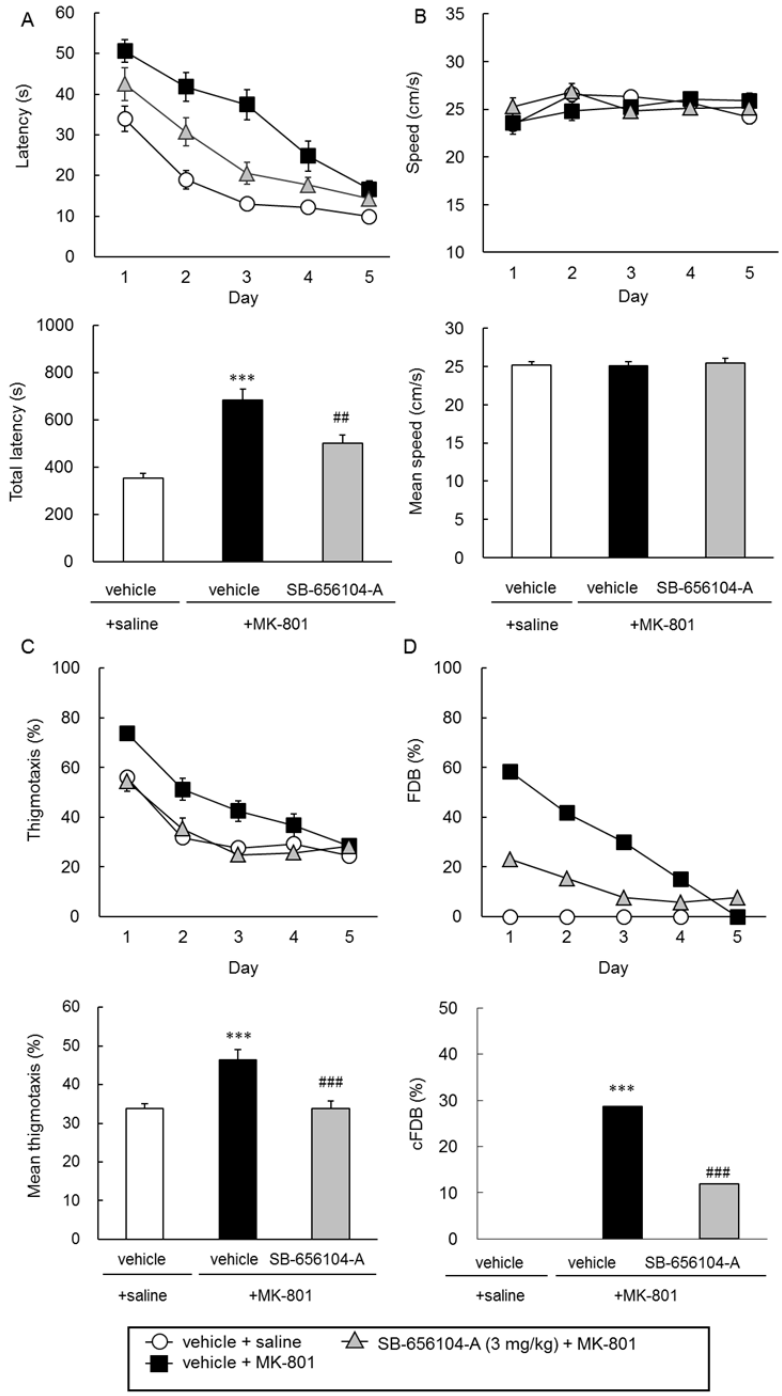

Fig. 13 Effects of SB-656104-A on escape latency, swimming speed, thigmotaxic swimming, and diving behavior in the Morris water maze test. SB-656104-A (3 mg/kg, i.p.) or vehicle, and MK-801 (0.15 mg/kg, i.p.) or saline were daily administered 1 h and 30 min before the first trial of the day, respectively. Mean escape latency on each day (A upper) and on 5 days (A lower) are shown. Mean swimming speed on each day (B upper) and on 5 days (B lower) are shown. Mean thigmotaxic swimming on each day (C upper) and on 5 days (C lower) are shown. Frequency of diving behavior (FDB) on each day (D upper) and cumulative FDB (cFDB) on 5 days (D lower) are shown. Values correspond to mean ± SEM (n = 13–15). $^{***}P < 0.001$ vs. vehicle + saline-treated group (unpaired t-test). $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ vs. vehicle + MK-801-treated group (unpaired t-test).

3. *In vivo* マイクロダイアリシス

MK-801 障害モデルでの 5-HT$_7$受容体アンタゴニストの改善作用の神経化学的基盤を追究するため、前頭皮質でのモノアミン遊離について検討した。MK-801（0.1 mg/kg, i.p.）は前頭葉の 5-HT、DA、NA の遊離増加を引き起こしたが、SB-656104-A（3 mg/kg, i.p.）は MK-801 による 5-HT、DA、NA の遊離に影響を与えなかった（Fig. 14）。

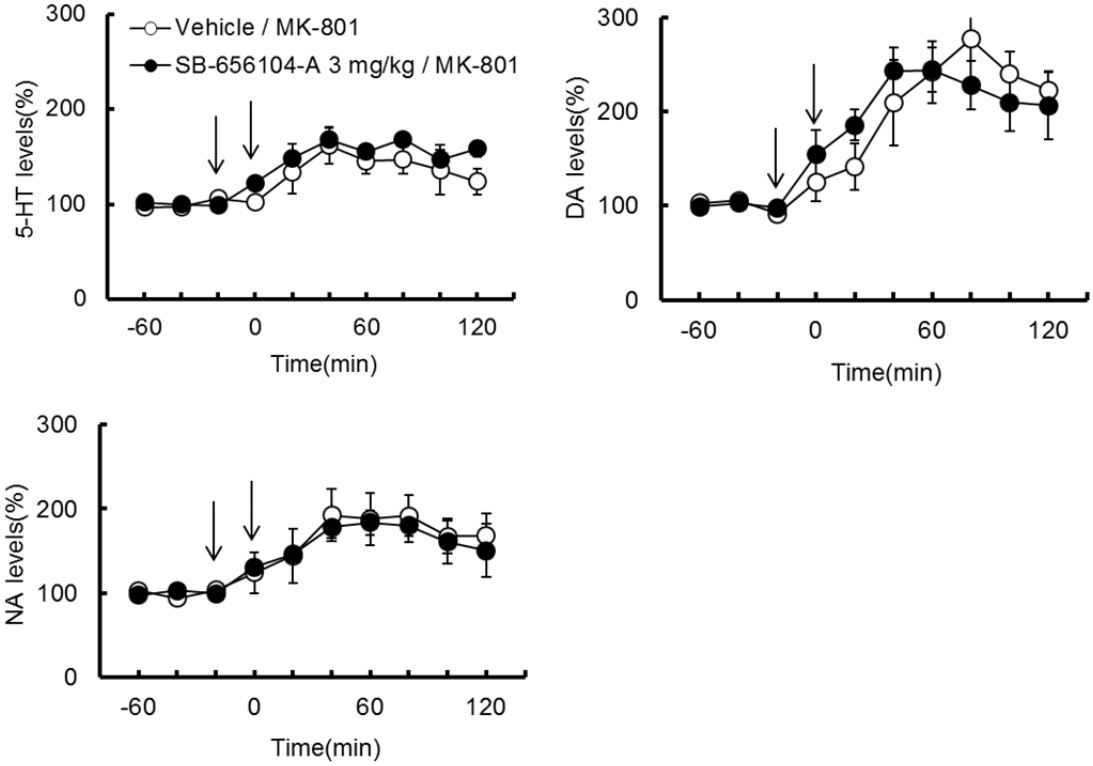

Fig. 14 Effects of SB-656104-A on MK-801-induced extracellular 5-HT, dopamine and noradrenaline levels in the prefrontal cortex of rats. SB-656104-A (3 mg/kg)/vehicle and MK-801 (0.1 mg/kg)/vehicle were intraperitoneally injected at －20 and 0 min (the first and second arrows, respectively). Results are expressed as a percentage of control. Each point shown indicates the mean of four independent experiments, and error bar indicates SEM.

考察

本研究では、受動的回避試験で MK-801 により誘発された学習記憶障害をルラシドンが改善することを示した。同様の成績は、モリス型水迷路試験でも報告されている[61]。ルラシドンの MK-801 誘発学習記憶障害改善作用は D_2 受容体拮抗作用と同程度の用量で認められたが、他の抗精神病薬では有意な改善作用が見られないことが報告されている [60, 61]。第一章において、ルラシドンは 5-HT_7 受容体に高い結合親和性を有していることを示したが、本章では、この点を考えてルラシドンの学習記憶障害改善作用に 5-HT_7 受容体が関わっていることを追究するため、選択的 5-HT_7 受容体アンタゴニスト SB-656104-A の両評価系における効果を検討した。

受動的回避試験において、MK-801 による記憶の獲得および固定の障害に対してルラシドンおよび SB-656104-A はともに改善作用を示した。また、モリス型水迷路試験では、プラットフォームへ到達するまでの時間および水泳距離といった空間記憶に関連する指標とともに、走触性や飛び込み行動といった学習戦略に関連する指標も測定し、MK-801 が全てのパラメーターを障害し、SB-656104-A がルラシドンと同様にその障害を改善することを示した。これらの結果は、MK-801 による文脈的、空間的、戦略的学習の障害に対するルラシドンの作用に 5-HT_7 受容体が関与していることを示唆するものである。ルラシドンの MK-801 誘発学習記憶障害の改善作用に 5-HT_7 受容体が関わっていることは、その作用が 5-HT_7 受容体アゴニスト AS19 により完全に抑制されたことから支持される。AS19 は SB-656104-A の改善作用もほぼ完全に抑制した。

本研究では、ルラシドンの作用を模倣する目的で D_2 受容体アンタゴニストおよび 5-HT_{2A} 受容体アンタゴニストと 5-HT_7 受容体アンタゴニストの併用効果を検討した。D_2 受容体アンタゴニストであるラクロプリドおよび 5-HT_{2A} 受容体アンタゴニストであるケタンセリンの用量は動物モデルでの報告 [64, 65] から各受容体を適度に拮抗する高すぎない用量を設定した。その結果、ラクロプリドおよびケタンセリンの併用のみでは MK-801 による学習記憶障害を改善せず、5-HT_7 受容体アンタゴニストの改善作用はラクロプリドおよびケタンセリンの存在下においても見られた。これらの結果は、5-HT_7 受容体に対する結合親和性が低い抗精神病薬オランザピンおよびクエチアピンが受動的回避試験において MK-801 による学習記憶障害を有意に改善しなかった結果 [60] と一致するものである。一方で、5-HT_7 受容体に対する結合親和性が高い抗精神病薬リスペリドン、クロザピンおよびアリピプラゾールも受動的回避試験において MK-801 による学習記憶障害を有意に改善しなかった[60] ことから、ルラシドンの各種受容体に対する結合親和性の絶妙なバランスが強い改善作用につながっている可能性が考えられる。

最近になり、急速に 5-HT_7 受容体アンタゴニストの認知機能改善作用を示した報告が増えている[66, 67, 68, 69, 70] 。一方で、5-HT_7 受容体がマウスにおいて学習記憶に必須であるとの報告もある [71, 72]。今回 5-HT_7 受容体アゴニスト AS19 は受動的回避反応において正常

ラットおよび MK-801 投与ラット（data not shown）でのステップスルー潜時に影響を与えなかった。これらの結果は新奇物体認識試験における結果と一致するものであった [66]。一方で、autoshaping Pavlovian/instrumental learning task において、AS19 は記憶形成を促進し、MK-801 による記憶障害を改善するとの報告がある [73]。これらの相反する結果は動物モデルの相違によるものと考えられるが、詳細は不明である。

また、前頭皮質において MK801 がグルタミン酸遊離を増加し、この増加が 5-HT_7 アンタゴニストで抑制されることが報告されている [67]。本研究では、MK-801 障害モデルでの 5-HT_7 受容体アンタゴニストの改善作用の神経化学的基盤を追究するため、前頭皮質でのモノアミン遊離について検討した。その結果、MK801 は 5-HT、DA、NA の遊離も引き起こすが、これらのモノアミン遊離に対して SB-656104-A は影響を与えないことが示された。今後、5-HT_7 受容体によるグルタミン酸遊離の調節機構の詳細の追究から 5-HT_7 受容体の創薬的意義が明らかにされることが期待される。

小括

（1）5-HT_7受容体アンタゴニスト SB-656104-A はルラシドンと同様に、NMDA 受容体アンタゴニスト MK-801 による学習記憶障害に対して改善作用を示した。

（2）ルラシドンおよび SB-656104-A の MK-801 誘発学習記憶障害に対する改善作用が 5-HT_7受容体アゴニスト AS19 により完全に抑制された。

（3）MK-801 誘発学習記憶障害は D_2 受容体アンタゴニストであるラクロプリドおよび 5-HT_{2A}受容体アンタゴニストであるケタンセリンだけでは改善されず、5-HT_7受容体アンタゴニスト SB-656104-A による改善作用はラクロプリドおよびケタンセリン存在下においても認められた。

（4）以上から、ルラシドンの MK-801 誘発学習記憶障害改善作用が 5-HT_7受容体を介していることが示された。

総括

今日の統合失調症の治療の主流となっている非定型抗精神病薬は、陽性症状の改善に加えて陰性症状や認知障害にもある程度有効性を示し、錐体外路症状（extrapyramidal symptoms, EPS）や高プロラクチン血症等の副作用が軽減されているが、依然として陰性症状や認知障害の治療効果は十分でなく、様々な副作用が見られ、新たな治療薬が求められている。このような状況下で有効性の向上と副作用の軽減を目指して創製された新規の非定型抗精神病薬ルラシドンについて、本研究において、薬理学的特性を明らかにし、特長について前臨床レベルで検証した。

第一章では *in vitro* および *in vivo* の両面からルラシドンの薬理学的特性について検討を行った。その結果、ルラシドンは D_2, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_7 受容体に対して高い親和性を示し、ヒスタミン H_1、ムスカリン受容体には親和性を示さなかった。ルラシドンは既存の抗精神病薬と同様に D_2 受容体拮抗作用および 5-HT_{2A} 受容体拮抗作用を示した。さらに、ルラシドンは抗不安・抗うつ様作用も示した。一方で、ルラシドンの EPS および中枢抑制作用は既存の抗精神病薬と比べて非常に弱かった。

第二章では、ルラシドンが高い結合親和性を示す 5-HT_7 受容体の脳内分布について *in vitro* オートラジオグラフィー法を用いて検討を行った。ラット脳内の 5-HT_7 受容体結合は、視床、視床下部、中隔、海馬、扁桃体といった辺縁系で高かった。また、ルラシドンはラット脳内の 5-HT_7 受容体に対しても結合阻害活性を有することが示され、その活性はオランザピンと比べて強かった。さらに、*in vitro* ラジオリガンド結合実験により、ルラシドンのラットおよびヒトの D_2, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_7 受容体に結合親和性を検討したところ、その親和性にラットとヒトで差はほとんど見られなかった。

第三章においては、統合失調症治療のアンメット・メディカル・ニーズである認知障害に着目し、統合失調症の動物モデルとして利用されている NMDA 受容体アンタゴニスト MK-801 投与動物での学習記憶障害に対するルラシドンの作用および 5-HT_7 受容体の関与について検討を行った。5-HT_7 受容体アンタゴニスト SB-656104-A はルラシドンと同様に、MK-801 による学習記憶障害に対して改善作用を示した。また、ルラシドンおよび SB-656104-A の MK-801 誘発学習記憶障害に対する改善作用は 5-HT_7 受容体アゴニスト AS19 により完全に抑制された。さらに、ルラシドンの薬理作用を模する目的で、D_2 受容体アンタゴニストのラクロプリドおよび 5-HT_{2A} 受容体アンタゴニストのケタンセリンと SB-656104-A の併用実験を行った。その結果、MK-801 誘発学習記憶障害はラクロプリドとケタンセリンのみでは改善されず、SB-656104-A による改善作用はラクロプリドとケタンセリン存在下においても認められた。以上から、MK-801 誘発学習記憶障害に対するルラシドンの改善作用に 5-HT_7 受容体が関与している可能性が示唆される。

以上の結果から、動物モデルにおいて、ルラシドンは既存の非定型抗精神病薬と同様に D_2 受容体拮抗作用および 5-HT_{2A} 受容体拮抗作用を有し、その結果として強い抗精神病作

用と EPS の軽減が見られた。また、既存の非定型抗精神病薬と異なり α_1, H_1、ムスカリン受容体に親和性が低く、中枢抑制作用は弱かった。さらに、5-HT_7受容体拮抗作用を介すると考えられる学習記憶障害改善作用が認められた。本研究において、ルラシドンは、既存の抗精神病薬と比べて、副作用である EPS と中枢抑制作用が少なく、陽性症状・陰性症状改善作用、気分安定化作用、認知障害の改善といった主薬効スペクトルの広い治療薬になることが示唆された。ルラシドンの陽性症状および陰性症状の強い改善作用、体重増加や眠気といった副作用が軽減されていることは臨床試験においても検証されている [74, 75, 76, 77]。現在、霊長類を用いた検討や臨床での検討により、認知機能障害に対するより高次な評価が進められており [78, 79]、今後の研究の進展により解明されていくものと思われる。

結論

（１） 動物モデルにおいて、ルラシドンは既存の非定型抗精神病薬と比べて同等の抗精神病作用を示し、錐体外路症状や中枢抑制作用が軽減されていた。

（２） ラット脳 5-HT_7受容体に対して、ルラシドンが結合活性を示した。

（３） ルラシドンの認知障害改善作用は 5-HT_7受容体遮断作用を介すると考えられた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始、御高配と御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科教授　松田敏夫先生に厚く御礼申し上げます。また、本稿をまとめるにあたり、御高配を賜りました恩師、兵庫医療大学学長　馬場明道先生、本研究の機会を与えて頂きました大日本住友製薬株式会社 執行役員 研究本部副本部長　泰地睦夫博士ならびに御懇切な御指導、御鞭撻を賜りました同先端創薬研究所長　石山健夫博士に深甚なる謝意を表します。更に、本研究を進めるにあたり、御指導を賜りました大阪大学大学院薬学研究科准教授　田熊一敞先生ならびに助教　吾郷由希夫先生、本研究にご協力を賜りました大日本住友製薬株式会社研究本部の諸氏および大阪大学大学院薬学研究科　平松直樹修士ならびに藤田和美氏に感謝致します。

参考文献

1. Meltzer HY (1999) Treatment of schizophrenia and spectrum disorders: pharmacotherapy, psychosocial treatments, and neurotransmitter interactions. *Biol Psychiatry* 46: 1321–1327.
2. Capuano B, Crosby IT, and Lloyd EJ (2002) Schizophrenia: Genesis, receptorology and current therapeutics. *Current Med Chem* 9:521–548.
3. Delay J, Deniker P, and Harl JM (1952) Traitement des états d'excitation et d'agitation par une méthode médicamenteuse dérivé de l'hibernothérapie. *Ann Méd Psychol* 110:267–273
4. Seeman P. and Lee T (1975) Antipsychotic drugs : Direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science*, 188 :1217–1219.
5. Lieberman JA (1993) Understanding the mechanism of action of atypical antipsychotic drugs. A review of compounds in use and development. *Br J Psychiatry* 163:7–18.
6. Casey DE (1996) Extrapyramidal syndromes and new antipsychotic drugs: findings in patients and non-human primate models. *Br J Psychiatry* Suppl 29:32–39.
7. Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, and Ichikawa J (2003) Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol *Biol Psychiatry* 27:1159–1172.
8. Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, and Davis JM (2009) Second generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a metaanalysis. *Lancet* 373:31–41.
9. Green MF, Nuechterlein KH, Gold JM, Barch DM, Cohen J, Essock S, FentonWS, Frese F, Goldberg TE, Heaton RK, Keefe RS, Kern RS, Kraemer H, Stover E, Weinberger DR, Zalcman S, and Marder SR (2004) Approaching a consensus cognitive battery for clinical trials in schizophrenia: the NIMH-MATRICS conference to select cognitive domains and test criteria. *Biol Psychiatry* 56, 301–307.
10. Harvey PD, Green MF, Keefe RS, and Velligan DI (2004) Cognitive functioning in schizophrenia: a consensus statement on its role in the definition and evaluation of effective treatments for the illness. *J Clin Psychiatry* 65, 361–372.
11. Haddad P (2005) Weight change with atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *J Psychopharmacol* 19:16–27.
12. Casey DE (1997) The relationship of pharmacology to side effects. *J Clin Psychiatry* 58 (Suppl 10):55–62.
13. Kim DH., Maneen MJ., Stahl SM. (2009) Building a better antipsychotic: receptor targets for the treatment of multiple symptom dimensions of schizophrenia. Neurotherapeutics. 6(1):78–85
14. Hirose A, Kato T, Ohno Y, Shimizu H, Tanaka H, Nakamura M, and Katsube J (1990) Pharmacological actions of SM-9018, a new neuroleptic drug with both potent 5-hydroxytryptamine$_2$ and dopamine$_2$ antagonistic actions. *Jpn J Pharmacol* 53: 321–329.
15. Kato T, Hirose A, Ohno Y, Shimizu H, Tanaka H, and Nakamura M (1990) Binding profile of

SM-9018, a novel antipsychotic candidate. *Jpn J Pharmacol* 54: 478–481.

16. To ZP, Bonhaus DW, Eglen RM, and Jakemen LB (1995) Characterization and distribution of putative 5-ht7 receptors in guinea-pig brain. *Br J Pharmacol* 115; 107–116.
17. Uhlén S, Dambrova M, Näsman J, Schiöth HB, Yuchen G, Wikberg-Matsson A, and Wikberg JES (1998) [^{3}H]RS79948-197 binding to human, rat, guinea pig and pig α_{2A}-, α_{2B}- and α_{2C}-adrenoceptors. Comparison with MK912, RX821002, rauwolscine and yohimbine. *Eur J Pharmacol* 343: 93–101.
18. Chang RS, Tran VT, and Snyder SH (1979) Heterogeneity of histamine H_1-receptors: species variations in [^{3}H]mepyramine binding of brain membranes. *J Neurochem* 32: 1653–1663.
19. Yamamura HI and Snyder SH (1974) Muscarinic cholinergic binding in rat brain. *Proc Nat Acad Sci USA* 71: 1725–1729.
20. Yabuuchi K, Tagashira R, and Ohno Y (2004) Effects of tandospirone, a novel anxiolytic agent, on human 5-HT_{1A} receptors expressed in Chinese hamster ovary cells (CHO cells). *Biogenic Amines* 18:319–28.
21. Tatsuno T, Shimizu H, Hirose A, Tanaka H, Kumasaka Y, and Nakamura M (1989) Effect of SM-3997 on central monoaminergic systems. *Pharmacol Biochem Behav* 32: 1049–1055.
22. Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA, Renock SM, Steinberg S, Ernsberger P, Jayathilake K, Meltzer HY, and Roth BL (2003) H1-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology* 28: 519–526.
23. Ishibashi T, Horisawa T, Tokuda K, Ishiyama T, Ogasa M, Tagashira R, Matsumoto K, Nishikawa H, Toma S, Ueda Y, et al. (2010) Pharmacological profile of lurasidone, a novel antipsychotic agent with potent 5-hydroxytryptamine 7 (5-HT_7) and 5-HT_{1A} receptor activity. *J Pharm Exp Ther* 334: 171–81.
24. Millan MJ (2000) Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin (5-HT)1A receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 853–861.
25. Shimizu H, Hirose A, Tatsuno T, Nakamura M, and Katsube J (1987). Pharmacological properties of SM-3997: A new anxioselective anxiolytics candidate. *Jpn J Pharmacol* 45: 493-500.
26. Wesolowska A, Nikiforuk A, Stachowicz K, and Tatarczynska E (2006) Effect of the selective 5-HT_7 receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology* 51: 578–586.
27. Sallinen J, Hogound I, Engstrom M, Lehtimaki ., Virtanen R, Sirvio J, Wurster S, Savola JM, and Haapalinna A (2007) Pharmacological characterization and CNS effects of a novel highly selective alpha2C-adrenoceptors antagonist JP-1302. *Br J Pharmacol* 150: 391–402.
28. Reynolds GP, Hill MJ, and Kirk SL (2006) The 5-HT_{2C} receptor and antipsychotic-induced weight gain – mechanisms and genetics. *J Psychopharmacol* 20(4 Suppl): 15–18.

29. Meyer JM, Loebel AD, and Schweizer E (2009) Lurasidone: a new drug in development for schizophrenia. *Expert Opin Investig Drugs* 18: 1–12.
30. Terry AV Jr, and Mahadik SP (2007) Time-dependent cognitive deficits associated with first and second generation antipsychotics: cholinergic dysregulation as a potential mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 961–968.
31. Leung JY, Barr AM, Procyshyn RM, Honer WG, and Pang CC (2012) Cardiovascular side-effects of antipsychotic drugs: The role of the autonomic nervous system. *Pharmacol Ther* 135:113–122
32. Burki HR (1986) Effects of fluperlapine on dopaminergic systems in rat brain. *Psychopharmacology* 89: 77–84.
33. Sakamoto H, Matsumoto K, Ohno Y, and Nakamura M (1998) Anxiolytic-like effects of perospirone, a novel serotonin-2 and dopamine-2 antagonist (SDA)-type antipsychotic agent. *Pharmacol Biochem Behav* 60: 873–878.
34. Kelly JP, Wrynn AS, and Leonard BE (1997) The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: An update. *Pharmacol Ther* 74: 299–316.
35. Ohno Y, Ishida K, Ikeda K, Ishibashi T, Okada K, and Nakamura M (1994) Evaluation of bradykinesia induction by SM-9018, a novel 5-HT_2 and D_2 receptor antagonist, using the mouse pole test. *Pharmacol Biochem Behav* 49:19–23.
36. Ellenbroek BA, Peeters BW, Honig WM, and Cools AR (1987) The paw test: a behavioural paradigm for differentiating between classical and atypical neuroleptic drugs. *Psychopharmacology* 93: 343–348.
37. Litchfield JT and Wilcoxon F (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 96: 99–113.
38. Moore NA, Tye NC, Axton MS, and Risius FC (1992) The behavioral pharmacology of olanzapine, a novel “atypical” antipsychotic agent. *J Pharmacol Exp Ther* 262:545–551
39. Rigdon GC, Norman MH, Cooper BR, Howard JL, Boncek VM, Faison WL, Nanry KP, and Pollard GT (1996) 1192U90 in animal tests that predict antipsychotic efficacy, anxiolysis, and expyramidal side effects. *Neuropsychopharmacology* 15: 231–242.
40. Arnt J (1982) Pharmacological specificity of conditioned avoidance response inhibition in rats: inhibition by neuroleptics and correlation to dopamine receptor blockade. *Acta Pharmacol Toxicol* 51: 321–329.
41. Ballard ME, Basso AM, Gallagher KB, Browman KE, Fox GB, Drescher KU, Gross G, Decker MW, Rueter LE, and Zhang M (2007) The drug-induced helplessness test: an animal assay for assessing behavioral despair in response to neuroleptic treatment. *Psychopharmacology* 190:1–11.
42. Bourin M, Chenu F, Prica C, and Hascoët M (2009) Augmentation effect of combination therapy

of aripiprazole and antidepressants on forced swimming test in mice. *Psychopharmacology* 206:97–107.

43. Hedlund PB, Huitron-Resendiz S, Henriksen SJ, and Sutcliffe JG (2005) 5-HT_7 receptor inhibition and inactivation induce antidepressant like behavior and sleep pattern. *Biol Psychiatry* 58: 831–837.
44. Hedlund PB and Sutcliffe JG (2004) Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT_7 receptor research. *Trends Pharmacol Sci* 25: 481-486.
45. Barnes TR and McPhillips MA (1998) Novel antipsychotics, extrapyramidal side effects and tardive dyskinesia. *Int Clin Psychopharmacol* 13 (Suppl 3): S49–57.
46. Bersani G, Grispini A, Marini S, Pasini A, Valducci M, and Ciani N (1990) 5-HT_2 antagonist ritanserin in neuroleptic-induced parkinsonism: a double-blind comparison with orphenadrine and placebo. *Clin Neuropharmacol* 13: 500–506.
47. Skibell BC, Harvey JH, Oestreicher JH, Howarth D, Gibbs A, Wegrynowski T, Wing T, and DeDangelis DD (2007) Adrenergic receptors in the ptotic human eyelid. *Ophthalm Plastic Reconstruct Surg* 23: 367–371.
48. Thomas DR, Atkinson PJ, Hastie PG, Roberts JC, Middlemiss DN, and Price GW (2002) [^{3}H]SB-269970 radiolabels 5-HT_7 receptors in rodent, pig and primate brain tissues. *Neuropharmacology* 42:74–81.
49. Varnäs K, Thomas DR, Tupala E, Tiihonen J, and Hall H (2004) Distribution of 5-HT_7 receptors in the human brain: a preliminary autoradiographic study using [^{3}H]SB-269970. *Neuroscience Lett* 367:313–6.
50. Paxinos G and Watson C (2007) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6th edition. *London: Academic Press.*
51. Martín-Cora FJ and Pazos A (2004) Autoradiographic distribution of 5-HT_7 receptors in the human brain using [^{3}H]mesulergine: comparison to other mammalian species. *Br J Pharmacol* 141:92–104.
52. Gustafson EL, Durkin MM, Bard JA, Zgombick J, and Branchek TA (1996) A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-ht7 receptor in rat brain. *Br J Pharmacol* 117:657–66.
53. Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM, and Brownfield M (2001) Localization of 5-HT_7 receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization and agonist stimulated cFos expression. *J Chem Neuroanat* 21:63–73.
54. Bonaventure P, Nepomucero D, Kwok A, Chai W, Langlois X, Hen R, Stark K, Carruthers N, and Lovenberg TW (2002) Reconsideration of 5-Hydroxytryptamine $(5\text{-HT})_7$ Receptor Distribution Using [^{3}H]5-Carboxamidotryptamine and [^{3}H]8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetraline: Analysis in Brain of 5-HT_{1A} Knockout and 5-$HT_{1A/1B}$ Double-Knockout Mice. *J*

Pharm Exp Ther 302:240–8.

55. Bonaventure P, Nepomucero D, Hein L, Sutcliffe JG, Lovenberg T, and Hedlund PB (2004) Radioligand binding analysis of knockout mice reveals 5-hydroxytryptamine$_7$ receptor distribution and uncovers 8-hydroxy-2-(di-N-propylamino)tetralin interaction with α_2 adrenergic receptors. *Neuroscience* 124:901–11.
56. Jafari-Sabet M (2006) NMDA receptor antagonists antagonize the facilitatory effects of post-training intra-basolateral amygdala NMDA and physostigmine on passive avoidance learning. *Eur J Pharmacol* 529:122–8.
57. Jafari-Sabet M (2006) NMDA receptor blockers prevents the facilitatory effects of post-training intra-dorsal hippocampal NMDA and physostigmine on memory retention of passive avoidance learning in rats. *Behav Brain Res* 169:120–7.
58. Mullins UL, Gianutsos G, and Eison AS (1999) Effects of Antidepressants on 5-HT$_7$ Receptor Regulation in the Rat Hypothalamus. *Neuropsychopharmacology* 21:352–67.
59. Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, and Hoffman R (2003) NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology* 169:215–33.
60. Ishiyama T, Tokuda K, Ishibashi T, Ito A, Toma S, and Ohno Y (2007) Lurasidone (SM-13496), a novel atypical antipsychotic drug, reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the rat passive avoidance test. *Eur J Pharmacol* 572: 160–170.
61. Enomoto T, Ishibashi T, Tokuda K, Ishiyama T, Toma S, and Ito A (2008) Lurasidone reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the Morris water maze and radial-arm maze test in rats. *Behav Brain Res* 186: 197–207.
62. Cain DP. (1998) Testing the NMDA, long-term potentiation, and cholinergic hypotheses of spatial learning. *Neurosci Biobehav Rev* 22:181–93.
63. Ago Y, Tanaka T, Kita Y, Tokumoto H, Takuma K, and Matsuda T (2012) Lithium attenuates methamphetamine-induced hyperlocomotion and behavioral sensitization via modulation of prefrontal monoamine release. *Neuropharmacology* 62: 1634–1639
64. Harvey JA, Welsh SE, Hood H, and Romano AG (1999) Effect of 5-HT$_2$ receptor antagonists on a cranial nerve reflex in the rabbit: evidence for inverse agonism. *Psychopharmacology* 141:162–8.
65. Millan MJ, Newman-Tancredi A, Brocco M, Gobert A, Lejeune F, Audinot V, Rivet JM, Schreiber R, Dekeyne A, Spedding M et al. (1998) S18126 ({2-[4-(2,3-dihydrobenzo[1,4] dioxin-6-yl)piperazin-1-ylmethyl]indan-2-yl}), a potent, selective and competitive antagonist at dopamine D$_4$ receptors: an in vitro and in vivo comparison with L745,870 (3-(4-[4-chlorophenyl]piperazin-1-yl)methyl-1H-pyrrolo[2,3b] pyridine) and raclopride. *J Pharm Exp Ther* 287:167–86.

66. Horiguchi M, Huang M, and Meltzer HY (2011) The Role of 5-Hydroxytryptamine 7 Receptors in the Phencyclidine-Induced Novel Object Recognition Deficit in Rats. *J Pharm Exp Ther* 338:605–14.
67. Bonaventure P, Aluisio L, Shoblock J, Boggs JD, Fraser IC, Lord B, Lovenberg TW, and Galici R (2011) Pharmacological blockade of serotonin 5-HT_7 receptor reverses working memory deficits in rats by normalizing cortical glutamate neurotransmission. *PLoS One* 6:1–7.
68. Gasbarri A, CIfariello A, Pompili A, and Meneses A (2008) Effect of 5-HT_7 antagonist SB-269970 in the modulation of working and reference memory in the rat. *Behav Brain Res* 195 164-170.
69. Horisawa T, Ishibashi T, Nishikawa H, Enomoto T, Toma S, Ishiyama T, and Taiji M (2011) The effects of selective antagonists of serotonin 5-HT_7 and 5-HT_{1A} receptors on MK-801-induced impairment of learning and memory in the passive avoidance and Morris water maze tests in rats: Mechanistic implications for the beneficial effects of the novel atypical antipsychotic lurasidone. *Behav Brain Res* 220:83–90.
70. Waters KA, Stean TO, Hammond B, Virley DJ, Upton N, Kew JNC, and Hussain I (2012) Effects of the selective 5-HT_7 receptor antagonist SB-269970 in animal models of psychosis and cognition. *Behav Brain Res* 228:211–8.
71. Roberts AJ, Krucker T, Levy CL, Slanina KA, Sutcliffe JG, and Hedlund PB (2004) Mice lacking 5-HT_7 receptors show specific impairments in contextual learning. *Eur J Neurosci* 19:1913–22.
72. Sarkisyan G and Hedlund PB (2009) The 5-HT_7 receptor is involved in allocentric spatial memory information processing. *Behav Brain Res* 202:26–31.
73. Pérez-García GS and Meneses A (2005) Effects of the potential 5-HT_7 receptor agonist AS19 in an autoshaping learning task. *Behav Brain Res* 163:136–40.
74. Loebel A, Cucchiaro J, Sarma K, Xu L, Hsu C, Kalali AH, Pikalov A, and Potkin SG (2013) Efficacy and safety of lurasidone 80 mg/day and 160 mg/day in the treatment of schizophrenia: A randomized, double-blind, placebo- and active-controlled trial. *Schizophrenia Res* 145:101–109.
75. Meltzer HY, Cucchiaro J, Silva R, Ogasa M, Phillips D, Xu J, Kalali AH, Schweizer E, Pikalov A, and Loebel A (2011) Lurasidone in the treatment of schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo and olanzapine-controlled study. *Am J Psychiatry* 168:957–967
76. Nakamura M, Ogasa M, Guarino J, Phillips D, Severs J, Cucchiaro J, and Loebel A (2009) Lurasidone in the treatment of acute schizophrenia: a double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry* 70: 829-836.
77. Ogasa M, Kimura T, Nakamura M, and Guarino J (2013) Lurasidone in the treatment of schizophrenia: a 6-week, placebo-controlled study. *Psychopharmacology* 225:519-530.

78. Harvey PD, Ogasa M, Cucchiaro J, Loebel A, and Keefe RSE (2011) Performance and interview-based assessments of cognitive change in a randomized, double-blind comparison of lurasidone vs. ziprasidone. *Schizophr Res* 127:188–94.
79. Murai T, Nakako T, Ikejiri M, Ishiyama T, Taiji M, and Ikeda K (2013) Effects of lurasidone on executive function in common marmosets. *Behav Brain Res* 246:125–131.