

二重及び複素パルス系に対する
Erlang 符号の影響

1991

筑波大学大学院修士課程
工学研究科
竹田 英 彦

寄	贈
村 田 美 穂 氏	平成 年 月 日

筑波大学

博士(医学)学位論文

血中及び脳内ドパミン系に対する
L-dopa 投与の影響

1991年

筑波大学大学院博士課程医学研究科

村田美穂

目 次

第1章 パーキンソン病	1
I. パーキンソン病の概要	2
1. 研究史	2
2. 病理	3
3. 生化学	3
4. 臨床症状	5
5. 若年性パーキンソン病	6
II. 治療とその問題点	7
1. 薬物治療の歴史	7
2. 治療薬の種類とその作用点	7
3. L-dopa 長期治療中の問題点	10
III. 最近のトピックス	13
1. MPTP によるパーキンソニズム	13
2. ドパミン受容体の新しい展開	14
IV. 第1章の参考文献	20
V. 第1章の図	28
第2章 パーキンソン病患者における血漿 L-dopa 濃度測定	29
I. 目的及び対象	30
II. L-dopa 負荷試験	31
1. 方法	31
2. 結果	31
3. 考察	33
III. L-dopa 日内変動測定	35
1. 方法	35
2. 結果	36
3. 考察	38
IV. 第2章の参考文献	39
V. 第2章の図表	42

第3章	ラット線条体ドーパミン系に対する長期 L-dopa 投与の影響	60
I.	はじめに	61
II.	方法	63
III.	結果	67
IV.	考察	69
V.	第3章の参考文献	73
VI.	第3章の図表	77
第4章	ドーパミン受容体の“supersensitive response”についての Northern blotting hybridization による検討	83
I.	はじめに	84
II.	方法	85
III.	結果	87
IV.	考察	87
V.	第4章の参考文献	90
VI.	第4章の図表	92
終章		96
	謝辞	100

第 1 章

パーキンソン病

1. パーキンソン病の概要

1. パーキンソン病の研究史

パーキンソン病は、我が国における有病率は人口10万人当たり50人前後とされており[1]、神経変性疾患のなかでは最も多い疾患の一つである。

ところでそのパーキンソン病は、1817年に James Parkinson の著書 “An essay of shaking palsy” により初めて疾患として記載された。彼はその著書の中で、50才前後以降に発病し、体の一部が震えがちとなり、手足が思うように動かせないことが緩徐に進行し、次第に日常動作が障害され最終的には臥床状態に陥り、死亡すると、記載している[2]。70年後の1888年、Charcot はサルペトリエール病院の講義のなかで“パーキンソン病”と呼ぶことを提唱し、さらに彼自身の発見した徴候として固縮を付け加えた[3]。

さらに1919年 Tretiakoff は黒質の変性がパーキンソン病の特徴的な病理所見であることを報告した[4]。彼はまた、本疾患に特徴的な所見であるLewy 小体が（すでに1913年に Lewy により substantia innominata に見出されていたが）黒質のメラニン含有細胞にも見られることを示した。

1959年になると Carlsson が動物脳で[5]、Sano ら[6]がヒトの脳において黒質線条体ニューロンがドパミンを神経伝達物質としていることを発表した。さらに翌1960年には佐野[7]、Ehringer & Hornykiewicz[8]によりパーキンソン病患者の脳で黒質線条体ニューロンのドパミンが著しく減少していることが発見され、ここにパーキンソン病は黒質線条体系ドパミンニューロンの変性によるドパミン欠乏症であることが判明した。ドパミンは血液脳関門を通過しないため、その前駆物質である L-dopa を投与する治療法が考案された。この L-dopa 療法は1969年までには確立し、パーキンソン病に対して劇的な効果をもたらした。

さらに1982年に Langston らにより l-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetra-

hydropyridine (MPTP) によるパーキンソニズムが発見された[9]。MPTP投与動物によりパーキンソン病の病態や原因の追及のために精力的に研究がなされ、現在は内因性に MPTP 様物質が生成されるかどうかの問題になっている。

ごく最近では、パーキンソン病を考える上で避けては通れないドパミン受容体の、クローニングが相次いでいる[10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17]。これにより今まで結合能でしかわからなかった受容体が分子として扱えるようになり、パーキンソン病の研究はさらに新しい局面を迎えている。

2. パーキンソン病の病理 [4]

パーキンソン病における中心病変は、黒質緻密層、青斑核のメラニン含有神経細胞の脱落と Lewy 小体の出現である。黒質の変化に対応する、投射系である線条体の変化については特異的なものは見出されていない。Lewy 小体は通常のヘマトキシリン-エオジン染色でエオジンに染まる細胞内封入体である。球状または桿状の構造物で周囲に halo を伴い、時に同心円状の輪状構造を示す。多くは細胞質内に見られるが細胞外にも出現し、これは神経突起中のものとされている。Lewy 小体は黒質以外にも青斑核、迷走神経背側核などのメラニン含有細胞のみならず、Meynert 基底核、大脳皮質にも認められる[18]。Lewy 小体はパーキンソン病において特徴的な所見であり、ヒトにのみ認められる変化であるがその本態はまだ不明である。

3. パーキンソン病の生化学

パーキンソン病における主要な生化学的变化は、黒質線条体系ドパミンニューロンにおけるドパミンの欠乏である。このドパミンの減少は剖検脳でドパミン合成系の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) が対照脳の 5-10% に著減していたことから、分解の亢進ではなくドパミン合成の

低下によるとされている[19]。さらに TH のみならず TH の補酵素であるピオプテリンも TH 活性と高い相関をもって対照脳に比べて有意に低下していることが報告されている[20]。

一方、ドパミン受容体についての研究も1970年後半より剖検脳でなされている。一般に神経伝達物質が減少すると代償機構としてその神経伝達物質の受容体が増加する (supersensitivity) とされており、パーキンソン病の脳においてもこのような変化が起こるかどうかを受容体結合実験により検討された。ドパミン受容体についてはごく最近まで分子としての実態がわからず、結合能のみで検討されていたために様々な分類があったが、アデニリール・サイクレーズを活性化する D1 受容体と活性を抑制する D2 受容体が存在する[21]ことについては広く受け入れられている。D2 受容体に対するアゴニスト薬剤の作用力は抗パーキンソン病治療効果と平行し、アンタゴニスト薬剤の親和性は抗精神病効果と平行するため、ハロペリドールやスピロペリドールをリガンドとして D2 受容体の結合能が調べられた。パーキンソン病で L-dopa を使用していない患者では多くが B_{max} の増加 (受容体数の増加) を示したが、中には減少している例もあった[22, 23]。L-dopa 治療を受けた患者の B_{max} は変化しない、ないしは減少しているとされており[21, 23, 24]、Rinne らは減少している患者では運動障害がより高度で L-dopa 治療に反応しなかったと報告している[25]。一方、D1 受容体についての研究は比較的遅れており、その機能については D2 受容体の活性を修飾する[26]、ニューロンの分化、成長を調節する[27]等の報告があるが、不明な点が多い。特異的アンタゴニストである SCH 23390 が発見されたのも比較的最近で[28, 29]、それまではアデニリール・サイクレーズ活性の測定により D1 の変化を見ていた。D1 の B_{max} についても結果は様々で L-dopa 投与の影響やパーキンソン病の進行病期の相異、パーキンソン病の病型の相異などがその理由として考えられている[30, 31, 32, 33]。

4. パーキンソン病の臨床症状 [1]

固縮、振戦、無動が古典的な3主徴で、最近はこれに姿勢反射障害を加えて4大徴候と言われる。一側手指の振戦で発症することが多く、どのような症状で始まっても初期にはある程度の左右差があることがむしろ特徴的である。

1) 固縮 (rigidity) : 関節を他動的に動かした場合に出現する抵抗により検出される。固縮には終始一様である鉛管現象 lead pipe phenomenon と、ガクガクした断続的な歯車現象 cogwheel phenomenon がある。四肢、体幹のいずれにも認められるが、特に手関節、足関節、頸部に出現しやすい。

2) 振戦 (tremor) : パーキンソン病ではあらゆるタイプの振戦が出現しうるが、特に安静時の、主動筋と拮抗筋が4-7Hzで律動的に相反性に収縮する交代性振戦が特徴的で、その姿は丸薬を丸めるような (pill rolling) などと形容される。四肢の他、下顎、口唇、舌にもしばしば認められる。

3) 無動 (akinesia) : 本症ではあらゆる動作やその切り替えが緩慢で、自発運動が極端に乏しい。このような運動の緩慢さ、少なさとは別に無動を構成するもう一つの要素としてすくみ現象 freezing phenomenon がある。歩行の開始時や方向転換時、狭い場所を通るときなど足が床についてしまい踏み出しができなくなるすくみ足 frozen gait は最も良く見られるすくみ現象の一つである。この場合、床に線や障害物など視標となるものがあると容易に踏み出しができるようになる。すくみ現象は歩行時のみならず、すくみ言語、小字症 micrographia など、言語や書字などにも認められる。無動には固縮による二次的な部分もあるが、L-dopa 治療により固縮が完全に消失してもなお残存する、すくみ現象を主体とする無動があり、最近これはノルアドレナリンの欠乏によると考えられている。

4) 姿勢調節障害 : 立位で前後左右におされると姿勢をたて直すこと

ができず、押された方向に突進してしまったり、そのまま棒のように倒れてしまう (pulsion)。とくに方向転換などが不安定になり日常生活を著しく障害される。

これらの4大徴候の他、特徴的な歩行姿勢即ち、上肢の振りの少ない前傾、小刻み歩行や、仮面様顔貌 masked face、自律神経症状として、脂顔、流涎、起立性低血圧などがしばしば見られる症状である。

5. 若年性パーキンソニズム

40才以前に発症するパーキンソニズムを呈する症例群を若年性パーキンソニズムと呼んでいる[34]。様々な症例を含んでいるが、一般的には20才以降に発症する「早期発症パーキンソン病」と呼ぶべき症例群をさすことが多いのでここではこれについて説明する。

臨床的には安静時振戦は目立たず、固縮や固縮に伴う無動が症状の前景にたつことが多い。下肢や体幹のジストニアをともなうことが多いとされている。薬理的には L-dopa に対する感受性が極めて高いことがその特徴である。少量で時には劇的な、効果を得られる一方、治療早期より L-dopa によるジスキネジアや“wearing-off”、“on-off”現象(後述)が高い頻度で出現する。

若年性パーキンソニズムの病理及び生化学的検討は少ないが、病変は比較的純粋に黒質線条体系のドパミン代謝障害に限局しているとされている[35]。

II. 治療とその問題点

1. 薬物治療の歴史

パーキンソン病の治療は、1867年 Charcot & Ordenstein がその臨床経験から本症患者における副交感神経の亢進状態を想定して、ベラドンナアルカロイドを使い始めたのが最初であるとされている[1]。その後抗コリン作用のある抗ヒスタミン剤、更に1949年からは合成副交感神経抑制剤として trihexyphenidyl HCl (artane[®]) の使用が始まった[2]。更に1960年に本症における線条体ドパミン含有量の減少が明らかにされた後は、不足したドパミンを補充するため、ドパミンの前駆物質で血液脳関門を通過しうるアミノ酸である L-dopa が治療の中心となり、また、dopa 脱炭酸酵素阻害剤 (DCI) の併用により L-dopa 投与量の減量や副作用の軽減が可能となった。一方、1969年には抗ウィルス剤である amantadine[3]が、また1974年にはドパミン受容体刺激剤 (DA agonist) である bromocriptine[4]が使用されるようになった。DA agonist としては lisuride, pergolide も本邦においても近く使用可能になる見込みである。更に、近年特に陳旧例におけるノルアドレナリン合成能の低下に対してその補充療法として L-threo-DOPS が試みられ[5]、これまでの L-dopa 療法における問題点であった無動、特にすくみ現象に対する効果が認められている。その他ドパミンの生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) の補酵素であるピオプテリン (BP) もパーキンソン病では著減を呈し、BP の低下と TH 活性の低下が相関すること[6]から合成テトラヒドロピオプテリンの投与も試みられ[7]、ある程度の効果を認めている。

2. 治療薬の種類とその作用点

パーキンソン病では黒質のメラニン含有細胞の変性、脱落に伴い、ドパミン産生が著減し、ドパミン系とアセチルコリン系との間のバランスがく

ずれ、アセチルコリン系が優位となる。線条体におけるドパミンは80%程度の減少までは代償されるがそれ以上の減少になるとパーキンソン病として発症し、次第に機能障害が進行する。従って、線条体におけるドパミン系を賦活するか、あるいはアセチルコリン系を抑制することにより両者のバランスを回復させることがパーキンソン病の薬物療法の基本となる。図1-1にパーキンソン病の治療薬の作用点をまとめた。

1) 抗コリン剤

最も頻用されているのは trihexyphenidyl HCl で、古典的であるが現在も重要な薬剤の一つである。固縮と振戦には有効であるが無動にはやや、その効果は劣るとされており、比較的軽症で特に振戦が前景にたっている場合に良い適応となる。副作用としては口渇が最も多く、食思不振、悪心、便秘、心悸亢進等の他、高齢者では幻覚、妄想、錯乱状態を来すことも少なくない。また、注意力低下、記銘力低下等も生じることが知られており、アルツハイマー病の痴呆とアセチルコリン系の障害との関連から注目されている。

2) L-dopa, L-dopa + DCI

ドパミンは血液脳関門を通過できないが、その前駆物質である L-dopa は脳内に入り、黒質-線条体ドパミンニューロンに取り込まれ、脱炭酸過程を経てドパミンとなる。この過程を触媒する dopa 脱炭酸酵素は胃腸壁、肝、血管内皮細胞などに広く存在するために、内服した L-dopa の多くはそれらにより脱炭酸されてしまい、実際に脳内に到達する L-dopa は内服量の1%以下といわれている。従って、線条体で不足したドパミンを治療として補充するためには2-3g/日程度の大量を要する。L-dopa はパーキンソン病の3徴候の総てに有効で、本症の治療の中心となる薬剤であるが、消化器症状（悪心、嘔吐、食思不振等）、循環器症状（動悸、高血圧等）、精神症状（焦躁感、抑鬱、幻覚等）などの副作用のために十分量の投与が続けられないことも少なくない。これらのうち、消化器症状や循環

器症状などのように末梢で L-dopa がドパミンに転換したために生じる副作用を減じ、服用した L-dopa が効率的に脳内に移行するために、末梢における dopa 脱炭酸反応を抑制する dopa 脱炭酸酵素阻害剤 (DCI) と L-dopa の合剤が開発された。これにより末梢性のドパミンによる副作用が著明に減少したばかりでなく、L-dopa の内服量も単剤の場合の1/4-1/5に減量することが可能になった。従って、現在の L-dopa 療法は合剤によるものが主体であるが、DCI の併用により中枢性の副作用、即ち精神症状や L-dopa induced dyskinesia などは逆に出現しやすくなったといえる。特に若年性パーキンソニズムでは L-dopa に対する反応が良好で、ジスキネジアが出現しやすいことから L-dopa 単剤から治療を開始することが多い。L-dopa 及びその合剤の出現により、パーキンソン病患者の日常生活は著しく改善したが、一方で約20年の経過の中で後に述べるような種々の問題点が生じて来た。

3) DA agonist

L-dopa の長期投与中の問題点に対して、L-dopa とは作用点の異なる薬剤としてドパミン受容体を直接刺激する DA agonist が開発された。現在我が国で市販されているのは bromocriptine のみである。bromocriptine の効果は L-dopa と同様、固縮、無動、振戦のいずれにも認められるが、単独で十分な効果を得るためには大量を要し、投与方法が漸増法であることもあり、効果の発現が緩徐である。一方、長期 L-dopa 療法による不随意運動や“wearing-off”現象(後述)を予防する効果が期待されており、L-dopa 療法の初期から比較的少量の bromocriptine を併用する方法の効果が検討されている。副作用としては消化器症状と精神症状が比較的多い。

4) L-threo-DOPS

パーキンソン病脳では TH のみならずドパミンからノルアドレナリンに到る生合成過程を触媒するドパミン-β-水酸化酵素 (DBH) も著明に低下しており、また青斑核のノルアドレナリンニューロンにも強い変性を認め

ることが知られている。一方、L-dopa の長期治療中の患者では一般的には良くコントロールされているにもかかわらず、すくみ現象が不釣り合いに強く前景に出てくる患者が少なくない。これらのことを端緒にして、楢林らはノルアドレナリンの前駆物質である L-threo-DOPS がすくみ現象や純粹無動と呼ばれる病態に有効であることを見出した[42]。副作用は軽い消化器症状等で従来の抗パーキンソン剤に比べて比較的安全性が高いとされている。すべてのすくみ現象に効果があるわけではないが、特に純粹無動には著効を示すことがある。また、ノルアドレナリンの前駆物質であることからパーキンソン病でよく認める起立性低血圧にも効果を示す。

5) Amantadine-HCl

軽度の振戦、固縮に効果がある場合があり、また L-dopa との併用により L-dopa の効果を増強すると言われている。副作用としては不安、幻覚等の精神症状、狭心症様発作、動悸、不眠等が知られている。

6) モノアミン分解酵素 B 阻害剤 (MAO・B-I)

(1) 実験的にパーキンソニズムを起し得る MPTP が MAO・B により MPP に変換され、毒性を示すようになるため MAO・B-I はこの毒性を阻害することができる、(2) ドパミンの MAO による代謝段階で細胞毒性をもつ酸化物を産生する可能性があり、MAO・B-I はこれを阻害する、という2点から一時はパーキンソン病の予防あるいは進行抑制効果を期待され、注目された。進行抑制効果についてはあるという報告[43]と明らかでないという報告[44]があるがどちらかというとな否定的である。しかしながらドパミン分解酵素阻害薬としての効果（L-dopa 投与後、脳内でドパミンとしての効果を延長させる）は期待される。

3. L-dopa 長期治療中の問題点

1) “wearing-off” 現象

“wearing-off” 現象とは薬効時間の短縮による、パーキンソン症状の

日内変動をいう。L-dopa 内服後一旦症状の改善を見るものの、2-3時間で血中濃度の低下とともに症状が増悪し、日常生活は著しく障害される。“wearing-off”現象の出現率は治療年数の経過とともに増加し、本邦では欧米に比べるとやや頻度は低いものの、4年後に30%、8年後には40%、11年後には46%に達するという報告[45]がある。発生機序についてはまだ十分判明していないが、L-dopa 長期投与による L-dopa の吸収や代謝の変化[46]や、パーキンソン病そのものの進行によるドパミンニューロンのドパミン保持能の低下[47]などが考えられている。症状が L-dopa の血中濃度変化ときわめて良く対応することから、血中濃度がなるべく一定になるようにL-dopa の投与量、方法を変更することや、DA agonist の併用により対応する。

2) “on-off” 現象

“on-off”現象は L-dopa の服用時間、血中濃度に関係のない、あたかも電気のスイッチを入れたり切ったりした時のように急激な症状の変化を示す現象である。off の時間は数分と短いものから 2-3時間に及ぶものまでである。頻度は“wearing-off”現象に比較するとはるかに少なく10%程度である。発生機序については L-dopa 長期投与によるドパミン受容体の感受性の変化[48]が推測されている。対策としては、L-dopa を徐々に減量して1-2週間中止する drug holiday や DA agonist への切り替えなどが試みられているが、“wearing-off”現象に比べてより機序が複雑であり、対応策もいずれもあまり有効ではない。

3) 不随意運動

L-dopa による不随意運動は、舞踏病様、バリスム様、ジストニア様等、様々なタイプのものであり、これらが顔面、頸部、躯幹、四肢のいずれにも出現しうる。L-dopa の単純な過剰投与の場合は治療開始後早期でも出現しうるが、一般には投与期間が長くなってから出現することが多く、更には治療量に達しないうちに不随意運動が出現するようになることも稀で

ない。若年発症者では四肢に、高齢発症者では口舌、下顎、頸部等に出現し易い傾向にある。L-dopa 服用時間との関係で、peak dose dyskinesia (L-dopa 服用後 1 - 2 時間後の血中濃度がピークに達した時に出現する) と biphasic dyskinesia (内服直後の血中濃度上昇期に出現し、濃度の上昇とともに一旦消失するが下降期に再び出現する) の他、early morning dyskinesia (早朝、L-dopa 濃度の最も低い時期に出現する) などがある。ジスキネジア出現時にはまず L-dopa の 1 回投与量を減量し、血中濃度が上昇し過ぎないようにコントロールし、他剤との併用を試みる。時には D 2 ドパミン受容体遮断剤の tiapride などを試みる。

5) 精神症状 [49]

L-dopa 投与量が過量の場合には治療初期から出現しうるが、通常は長期投与に至って出現頻度が高くなる。幻覚、妄想、異常行動などが多く、特に幻視は特徴的で生き生きとした鮮やかな色彩を伴う小動物が多く、脳脚幻覚に類似している。本人が幻覚であることを自覚していることが多いのも特徴的である。痴呆合併例、脳波異常を伴う例に出現しやすい。放置すると重篤なせん妄状態に陥ったり、痴呆化を促進することがある。出現機序は黒質の一部及び中脳腹側被蓋野から大脳皮質、側坐核、扁桃核、海馬などに広く投射している mesocortical dopaminergic system におけるドパミン過剰と考えられる。症状が比較的軽度の場合は抗パーキンソン剤は同量のまま benzodiazepine 製剤などの投与で改善することもあるが、効果が不十分な場合には抗パーキンソン剤を減量し、ドパミン受容体遮断剤を併用しなければならないことが多い。

Ⅲ. 最近のトピックス

1. MPTP によるパーキンソニズム

1982年、Langston らは 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydro-pyridine (MPTP) によりパーキンソニズムが発症することを報告した[9]。MPTP は合成麻薬の副産物で、4日以上連続して静注した後、パーキンソニズムが出現した。症状は安静時振戦が比較的少ないことと症状の左右差が少ないこと以外はパーキンソン病にほぼ典型的なものであった。l-dopa 治療に対する反応も極めて良好で、全体像としては若年性パーキンソニズムと区別がつかない臨床像であったという。一方、病理学的には、ヒトの剖検例は1例のみで、黒質緻密層のドパミンニューロンの選択的細胞脱落を認めたが、青斑核には病変は認めなかった[50]。その後、サルに MPTP を投与することにより、ヒトの MPTP パーキンソニズムをほぼ完全に再現することに成功した[51]。その上、高齢のサルに MPTP を少量長期反復投与することにより、臨床的に安静時振戦を認め[52]、病理学的にも黒質とともに青斑核の細胞脱落と、さらに Lewy 小体類似の好酸性封入体 (MPTP 小体) を認めた[53]。以上のことから、サルの MPTP パーキンソニズムはヒトのパーキンソン病のきわめて良いモデルであるといえる。

ところで MPTP が黒質線条体ドパミンニューロンを選択的に死滅させ、パーキンソン病類似の病態を出現させることから、当然、MPTP の神経毒性の発現機序に興味をもたれる。ドパミンニューロンへの取り込みに関しては、主にグリア細胞のB型モノアミン酸化酵素 (MAO-B) により MPTP は MPP^+ にかわり、これがドパミン神経末端の再取り込み機構により選択的に取り込まれ、蓄積されるとされている[54]。さらに神経細胞の変性機序についてはいくつかの説があるが、現在のところ、 MPP^+ がミトコンドリアに取り込まれ、complex I と α -ケトグルタル酸脱水素酵素を阻害して、energy crisis を生じ、その結果ドパミンニューロンが変性死すると

いう energy crisis 説[55]が最も有力である。

MPTP によるパーキンソニズムはパーキンソン病の極めて良いモデルであるが、パーキンソン病そのものではないことは明らかである。従って、現在は MPTP と類似の構造体でしかもドパミン代謝を阻害する内因性神経毒の探求が精力的になされている。これに関して Nagatsu ら[56]は線条体スライスのチロシン水酸化酵素活性に対する阻害効果の検討から、内因性に生成される可能性のある MPTP 類似物質として、N-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinolin (N-MeTIQ), 1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinolin (TIQ) を提示した。TIQ は正常ヒト脳、パーキンソン病患者剖検脳で検出されている。パーキンソン病患者脳での TIQ 含量は増加しているという報告と変化していないという報告がある[57, 58]。Nagatsu らはサルに TIQ を投与することによりパーキンソニズム類似の症状を発現させ、黒質でドパミン、ヒオプテリン、チロシン水酸化酵素の減少を見ている[59]。一方、Ohta らはパーキンソン病患者脳での 1 MeTIQ の低下に注目し、TIQ 等により徐々に神経細胞が障害を受けていく過程に、1 MeTIQ が防御因子として働いている可能性を示唆している[58]。実際に Tasaki らは MPTP 投与マウスの脳内において TIQ 含量は対照と比較して有意差がないのに対し、1 MeTIQ は有意に低下していることを示し、さらに、1 MeTIQ を前投与したマウスでは、MPTP 及び TIQ の投与によるパーキンソニズムの症状の出現が完全に予防されたと報告し、1 MeTIQ がパーキンソニズムの発症抑制において重要な役割を占めていることを示した[60]。1 MeTIQ に関する研究からパーキンソン病の発症機構の解明、及び新しい抗パーキンソン薬の開発が期待される。

2. ドパミン受容体の新しい展開

1) ドパミン受容体遺伝子のクローニング

パーキンソン病の理解のためにはドパミンが実際に作用する場である受

容体についての理解が不可欠である。これまでは多くの研究がドパミンアンタゴニストをリガンドとした受容体結合実験により、受容体の実態を類推していたため、用いるリガンドにより、受容体の分類は様々であった。最近ではそのような研究の中からアデニリール・サイクレースを活性化し、ドパミンとの親和性は比較的低いD1受容体と、アデニリール・サイクレースを抑制し、ドパミンとの親和性の高いD2受容体とがあることは広く受け入れられるようになった。

ところでカテコールアミン受容体は、7回膜貫通型ペプチド鎖をもつ蛋白質で単量体構造をなし、セカンドメッセンジャーの産生にはGTP-結合性蛋白質(G-蛋白)の存在を必要とする、G蛋白結合性受容体であり、相互に高い相同性をもつことが知られている[61]。この相同性を利用して1988年 Bunzow ら[10]はすでに報告されていたハムスターの β_2 アドレナリン受容体遺伝子の塩基配列の一部をプローブとして、ラットのゲノミックライブラリーから緩いハイブリダイゼーションの条件でD2受容体遺伝子をクローニングすることに成功し、ここに結合能としてしかわからなかったドパミンレセプターの、分子としての実態を明らかにした。脳内では、D2 messenger RNA (以下mRNAと略す)は黒質、線条体、側坐核、下垂体などに豊富に認め、これまでの結合実験の結果を裏付けていた。

さらに翌年には、このD2受容体に2つのアイソフォーム、D2A(444)とD2B(415)が存在することが明らかにされた[62]。この2つは細胞内第3ループに29個のアミノ酸の挿入があるものとないものである。2つのサブタイプが何を示しているのかが精力的に検討されたが、今のところその薬理学的特性に差異は認められていない[63]。

一方、1990年9月に3つのグループがそれぞれのストラテジーを用いてD1受容体遺伝子のクローニングに成功した。即ち、Deary ら[11]はD2受容体の一部をプローブとしてヒト網膜のcDNAライブラリーから緩いハイブリダイゼーションの条件でD1受容体をつり上げた。また、Zhou

ら[12]はD₂、アドレナリン受容体などの膜貫通ドメインの一部をプライマーとし、ラット線条体のcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行い、増幅されたDNA断片をクローニングするとともに塩基配列を決定し、D₁受容体遺伝子を得た。さらにSunaharaら[13]はG蛋白結合受容体をコードする遺伝子の一部として彼らがすでに得ていた450塩基対を用い、ヒト全ゲノムライブラリーからこの遺伝子の全長を得て、塩基配列を決定した。これら3つのグループが得た遺伝子は総て同一の塩基配列を持ち、イントロンを持たないことを特徴とする、446個のアミノ酸をコードする1338塩基対からなる遺伝子であった。D₁ mRNAは線条体、側坐核には認めるが、黒質には全く出現していなかった。

更にこの1週間後、Sokoloffらは新しいドパミン受容体(D₃)をクローニングしたと発表した[14]。ドパミン受容体はD₁とD₂については共通認識が得られていたが、しかしそれのみではすべては説明できないということも共通した認識であった。例えば同じD₂アンタゴニストと呼ばれる一群のものでリガンドにより結合実験の結果は様々であることや、また、特に精神分裂病の陰性症状に効果があり、その効果に比較して副作用の錐体外路症状が極めて少ないクロザピンの存在などが第3、第4のドパミン受容体の存在を示唆していた。Sokoloffらはこのような考えに基づき、D₂受容体の塩基配列の一部をプローブとしてラット脳cDNA、ゲノミックライブラリーをスクリーニングし、逆転写とPCRを組み合わせ、D₃受容体遺伝子をクローニングした。446個のアミノ酸から成り、D₂Aとは全塩基配列で52%、リガンドの認識にかかわると思われる膜貫通ドメインのみに限ると75%という高い相同性を示した。脳内分布では嗅結節、側坐核など線条体の辺縁系に多く、背側線条体にはごくわずかであることからこの受容体が認識、情動機能に関与していることが示唆される。薬理的にはアポモルフィン、プロモクリプチンのD₃に対する親和性はD₂とほぼ同じであったが、自己受容体選択性リガンドと考えられている

パーゴライド、キンピロールのD3親和性はD2に対するものよりはるかに高かった。一方、抗精神病薬ではハロペリドールなどはD2親和性の方がD3親和性より20-30倍も高かったが、「非定型精神病薬」といわれるクロザピン、スルピライドはD2とD3に対する親和性の差は僅かであった。これらの結果からD3受容体はシナプス後受容体のみならず、自己受容体の機能を持つことと、認識、情動機能に関与している可能性が示された。

1991年には、D1, D2受容体のクローニングにかかわっていたグループも同様の考えに基づいてD4, D5受容体の存在を発表した[15, 16]。D4受容体はD2との相同性から見出されたもので、387個のアミノ酸から成り、D2, D3との相同性はそれぞれ41%、39%であった。薬理的性質はD2, D3とよく似ているがクロザピンに対する親和性がD2, D3の10倍以上あることがその特徴である。前頭葉、中脳、扁桃体に多く、基底核には少ない。

一方、D5受容体はD1との相同性から見出された。477個のアミノ酸からなり、D1同様イントロンを持たない構造である。D1との相同性は50%、膜貫通ドメインのみでは80%ときわめて高い。D1同様アデニリール・サイクレーズを活性化し、SCH 23390を用いた結合実験の結果もD1と良く似ているが、ドパミンに対する親和性がD1に比較して10倍以上高いことがその特徴である。脳内の分布は前頭葉、線条体、海馬、視床下部にはほぼ同様に認められ、特に線条体に多いD1とは異なる分布を示した。

Sunahara らのD5受容体の報告にやや遅れて、Tiberi らはD1受容体と50%の相同性を持ち、アデニリール・サイクレーズを活性化するD1B受容体を発表した[17]。やはりイントロンを持たない、475個のアミノ酸から成る受容体であった。D5との異同が問題になるが、Tiberi らはD1B mRNAは線条体、側坐核、嗅結節、前頭葉には殆ど認められず、海馬、乳頭体核等これまでのD1結合実験で殆ど結合の認められなかった

部位に存在しており、線条体と辺縁系にほぼ均等に分布しているD5とは異なるとしている。また、この遺伝子は4番染色体の短腕(4p 16.3)に存在することから、この部位にローカスがあるとされているハンチントン舞蹈病とのかかわりが興味を持たれる。

2) D1及びD2受容体の局在

以上のように多くのドパミン受容体遺伝子がクローニングされたが、背側線条体において最も重要なものはやはりD1とD2受容体である。これらが個々のニューロンにどのように存在しているかについて *in situ* hybridization histochemistry の手法を用いて検討がなされている[64, 65, 66, 67]。それらによると、淡蒼球、上丘、下丘、乳頭体、黒質にはD2 mRNAは存在するがD1 mRNAは存在しない。特に黒質緻密層ではD2 mRNAはすべての大型細胞に認められたがD1 mRNAは全く認められなかった。このことから黒質線条体ニューロンのシナプス前受容体にはD1受容体は存在しないものと考えられる。一方、線条体のニューロンのうち、48%はD1 mRNAの、43%はD2 mRNAの発現をみているが、D1とD2の共存は認められていない。D1 mRNAを発現している細胞は中型で、サブスタンスP(SP) mRNAを発現している細胞であった。一方、SP mRNA陽性のニューロンのうち15-20%はD1 mRNA陰性であった。プレプロエンケファリン(PP)についてはD1 mRNAとの共存は全く無く、D2 mRNAとの共存が見られた。以上から線条体からの投射系のうち、 γ -アミノ酪酸(GABA)、SPを含む線条体黒質ニューロンはD1 mRNAを、GABA、エンケファリンを含む線条体淡蒼球ニューロンはD2 mRNAを発現しており両者にオーバーラップはないとされている。

これまでD1受容体の生理機能については不明な点が多く、線条体におけるD1受容体の重要性が過小評価されてきた可能性がある。今回、このような投射系による受容体の役割分担の存在が示されたことはD1受容体

機能解明の糸口になり、ひいては基底核機能の解明にもつながるものと期待される。

なお、in situ hybridization histochemistry 法は mRNA を検出する方法であるので、実際の受容体蛋白の存在部位とは当然のことながら一致しない。受容体蛋白の存在部位を調べるために、すでにアミノ酸配列が明らかになっていることから、抗体を作成し免疫組織学的アプローチをすることを考え、筆者も試みてみたが今のところ成功していない。世界中で多くの研究者が試みているようだが現在までにドパミン受容体の免疫組織学の報告はなく、抗体作成の成功が待たれる。

IV. 第1章の参考文献

1. 水野美邦 “パーキンソン病” 初版, 1984, 星和書店.
2. Parkinson J. “An essay on the shaking palsy” Sherwood, Neely and Jones, London, 1817, 豊倉康雄, 萬年 徹, 高須俊明, 岩田 誠 “パーキンソン病の原著と全訳” 初版, 1974, 三共
3. Charcot JM. “Leçon sur les maladies du système nerveux” 4me ed. Tome Premier, Paris. 1880, p.155-188.
4. Oppenheimer DR. Diseases of the basal ganglia, cerebellum and motor neuron. In Greenfield's Neuropathology, ed by Adams JH, Corsellis JAN, and Duchon LW. Edward Arnold, London. 1984. p. 699-747
5. Carlsson A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. Pharmacol Rev 1959;11:490-493
6. Sano I, Gamo T, Takimoto Y, et al. Distribution of catechol compounds in human brain. Biochim Biophys Acta 1959;32:586-587
7. 佐野 勇 錐体外路系の生化学 神経進歩 1960;5:42-48
8. Ehringer H, and Hornykiewicz O. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. Klin Wschr 1960;38:1236-1239
9. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, and Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science 1983;219:979-980
10. Bunzow JR, Van Tol HHHM, Grandy DK, et al. Cloning and expression of a rat D₂ dopamine receptor cDNA. Nature 1988;336:783-

11. Dearry A, Ginglich JA, Falardeau P, et al. Molecular cloning and expression of the gene for a human D₁ dopamine receptor. *Nature* 1990;347:72-76
12. Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, et al. Cloning and expression of human and rat D₁ dopamine receptors. *Nature* 1990;347:76-80
13. Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM, et al. Human dopamine D₁ receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* 1990;347:80-83
14. Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, and Schwartz JC. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics. *Nature* 1990;347:146-151
15. Van Tol HHM, Bunzow JR, Guan HC et al. Cloning of the gene for a human dopamine D₄ receptor with high affinity for the anti-psychotic clozapine. *Nature* 1991;350:610-614
16. Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, et al. Cloning of the gene for a human dopamine D₅ receptor with higher affinity for dopamine than D₁. *Nature* 1991;350:614-619
17. Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, et al. Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D₁ dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7491-7495
18. Jager WAdH, and Bethlem J. The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1960;23:283-290

19. Nagatsu T, Kato T, Numata(Sudo) Y, et al. Phenylethanolamine N-methyltransferase and other enzymes of catecholamine metabolism in human brain. *Clinica Chimica Acta* 1977;75:221-232
20. Nagatsu T, Yamaguchi T, Kato T, et al. Biopterin in human brain and urine from controls and parkinsonian patients: application of a new radioimmunoassay. *Clinica Chimica Acta* 1981; 109:305-311
21. Keibadian JW, and Calne DB. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 1979;277:93-96
22. Lee T, Seeman P, Rajput A, Farley IJ, and Hornykiewicz O. Receptor basis for dopaminergic supersensitivity in Parkinson's disease. *Nature* 1978;273:59-61
23. Quik M, Spokes EG, Mackay AVP, and Bannister R. Alteration in [³H] spiperone binding in human caudate nucleus, substantia nigra and frontal cortex in the Shy-Drager syndrome and Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1979;43:429-437
24. Reisine TD, Fields JZ, Yamamura HI, et al. Neurotransmitter receptor alterations in Parkinson's disease. *Life Sci* 1977;21: 335-344
25. Rinne U, Lonnberg P, and Koskinen V. Dopamine receptors in the Parkinsonian brain. *J Neural Transm* 1981;51:97-106
26. Zetterstrom T, Sharp T, and Ungerstedt U. Effect of dopamine D-1 and D-2 receptor selective drugs on dopamine release and metabolism in rat striatum in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1986;334:117-124
27. Lankford KI, DeMello FG, and Klein WL. D₁-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons:

- evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:4567-4571
28. Iorio LC, Barnett A, Leitz FH, Houser VP, and Korduba CA. SCH 23390, a potential benzazepine antipsychotic with unique interactions on dopaminergic systems. J Pharmacol Exp Ther 1983;226:462-468
 29. Hyttel J. SCH 23390 - the first selective dopamine D-1 antagonist. Eur J Pharmacol 1983;91:153-154
 30. Nagatsu T, Kanamori T, Kato T, Iizuka R, and Narabayashi H. Dopamine-stimulated adenylate cyclase activity in the human brain: changes in Parkinsonism. Biochem Med 1978;19:360-365
 31. Rinne JO, Rinne JK, Laakso K, Lonnberg P, and Rinne UK. Dopamine D-1 receptors in the Parkinsonian brain. Brain Res 1985;359:306-310
 32. Pierot L, Desnos C, Blin J, et al. D1 and D2-type dopamine receptors in patients with Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. J Neurol Sci 1988;86:291-306
 33. 永津俊治 パーキンソン病 蛋白質 核酸 酵素 1984;29:1801-1813
 34. 横地正之 若年性パーキンソン病 I - 臨床的特徴 - 神経進歩 1979; 23:1048-1059
 35. Narabayashi H, Yokochi M, Iizuka R, and Nagatsu T. Juvenile parkinsonism. In Handbook of Clinical neurology eds by Vinken PJ, Bruyn GW, and Klawans HL. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1986, p.153-165
 36. Ordenstein L. Sur la paralysie agitante. Vol.32. Martinet, Paris. 1867

37. Corbin KB. Trihexyphenidyl; Evaluation of the new agent in the treatment of Parkinsonism. JAMA 1949;141:377-382
38. Schwab RS, England ACJr, Poskanzer DC, et al. Amantadine in the treatment of Parkinson's disease. JAMA 1969;208:1168-1170
39. Calne DB, Teychenne PF, Claveria LE, et al. Bromocriptine in parkinsonism. Br Med J 1974;4:442-444
40. Narabayashi H, Kondo T, Hayashi A, et al. L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine treatment for akinesia and freezing of parkinsonism. Proc Japan Acad 1981;58B:351-354
41. Narabayashi H, Kondo T, Nagatsu T, et al. Tetrahydrobiopterin administration for parkinsonian symptoms. Proc Japan Acad 1982 58B:283-287
42. 榎林博太郎 パーキンソン病薬物療法の展望 精神神経薬理 1985;7 713-728
43. The Parkinson study group. Effect of deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. N Engl J Med 1989;321:1364-1371
44. Elizan Ts, Yahr MD, Moros DA, et al. Selegiline use to prevent progression of Parkinson's disease: experience in 22 de novo Patients. Arch Neurol 1989;46:1275-1279
45. 加瀬正夫, 新城之介, 安藤一也ら Parkinson 病の levodopa 療法による12年間の治療経過の解析。—Carbidopa・levodopa 長期投与例調査小委員会からの報告— 神経進歩 1984;28:681-691
46. Nutt JG, Woodward WR, Hammerstad JP, et al. The "on-off" phenomenon in Parkinson's disease. Relation to levodopa absorption and transport. N Engl J Med 1984;310:483-488

47. Fabbrini G, Mouradian MM, Juncos JL, et al. Motor fluctuation in Parkinson's disease: central pathophysiological mechanisms, part I. *Ann Neurol* 1988;24:366-371
48. Mouradian MM, Juncos JL, Fabbrini G, et al. Motor fluctuations in Parkinson's disease: central pathophysiological mechanisms, part II. *Ann Neurol* 1988;24:372-378
49. 堀口 淳, 稲見康司, 西松央一, 助川鶴平 抗パーキンソン剤による精神障害. *精神神経薬理* 1988;10:67-75
50. Davis GC, Williams AC, Markey SP, et al. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiat Res* 1979;1:249-254
51. Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, et al. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:4546-4550
52. Tetrad JW, Langston JW, Redmond DE Jr, et al. MPTP-induced tremor in human and non-human primates. *Neurology* 1986;36(suppl.1):308
53. Forno LS, Langston JW, DeLanney LE, Irwin I, and Ricaurte GA. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol*. 1986;20:449-455
54. Snyder SH, and D'Amato RJ. MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. The 1985 George C. Cotzias lecture. *Neurology* 1986;36:250-258
55. Mizuno Y, Sone N, and Saitoh T. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropteridinium ion on activities of the enzymes

- in the electron transport system in mouse brain. *J Neurochem* 1987;48:1781-1793
56. 永津俊治 パーキンソン病攻略のストラテジー. “脳とパーキンソン病 その攻略のストラテジー” 平凡社 1988 p. 11-22
57. Niwa T, Takeda N, Kaneda N, Hashizume Y, and Nagatsu T. Presence of tetrahydroisoquinoline and 2-methyl-tetrahydroisoquinoline in parkinsonian and normal human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;144:1084-1089
58. Ohta S, Kohno M, Makino Y, Tachikawa O, and Hirobe M. Tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-tetrahydroisoquinoline are present in the human brain : relation to Parkinson's disease. *Biomed Res* 1987;8:453-456
59. Nagatsu T, and Yoshida M. An endogenous substance of the brain, tetrahydroisoquinoline, produces parkinsonism in primates with decreased dopamine, tyrosine hydroxylase and bipterin in the nigrostriatal regions. *Neurosci Lett* 1988;87:178-182
60. Tasaki Y, Makino Y, Ohta S, and Hirobe M. 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, decreasing in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mouse, prevents parkinsonism-like behavior abnormalities. *J Neurochem* 1991 in press.
61. Lefkowitz RJ, and Caron MG. Adrenergic receptors : models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J Biol Chem* 1988;263:4993-4996
62. Chio CL, Hess GF, Graham RS, and Huff RM. A second molecular form of D₂ dopamine receptor in rat and bovine caudate nucleus. *Nature* 1990;343:266-269
63. Snyder SH. The dopamine connection. *nature* 1990;347:121-122

64. Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, et al. Distribution of D₂ dopamine receptor mRNA in rat brain. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:7625-7628
65. Mengod G, Martinez-Mir MI, Vilaro MT, and Palacios JM. Localization of the mRNA for the dopamine D₂ receptor in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:8560-8564
66. Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, et al. D₁ and D₂ dopamine receptor mRNA in rat brain. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:1859-1863
67. Le Moine C, Normand E, and Bloch B. Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:4205-4209

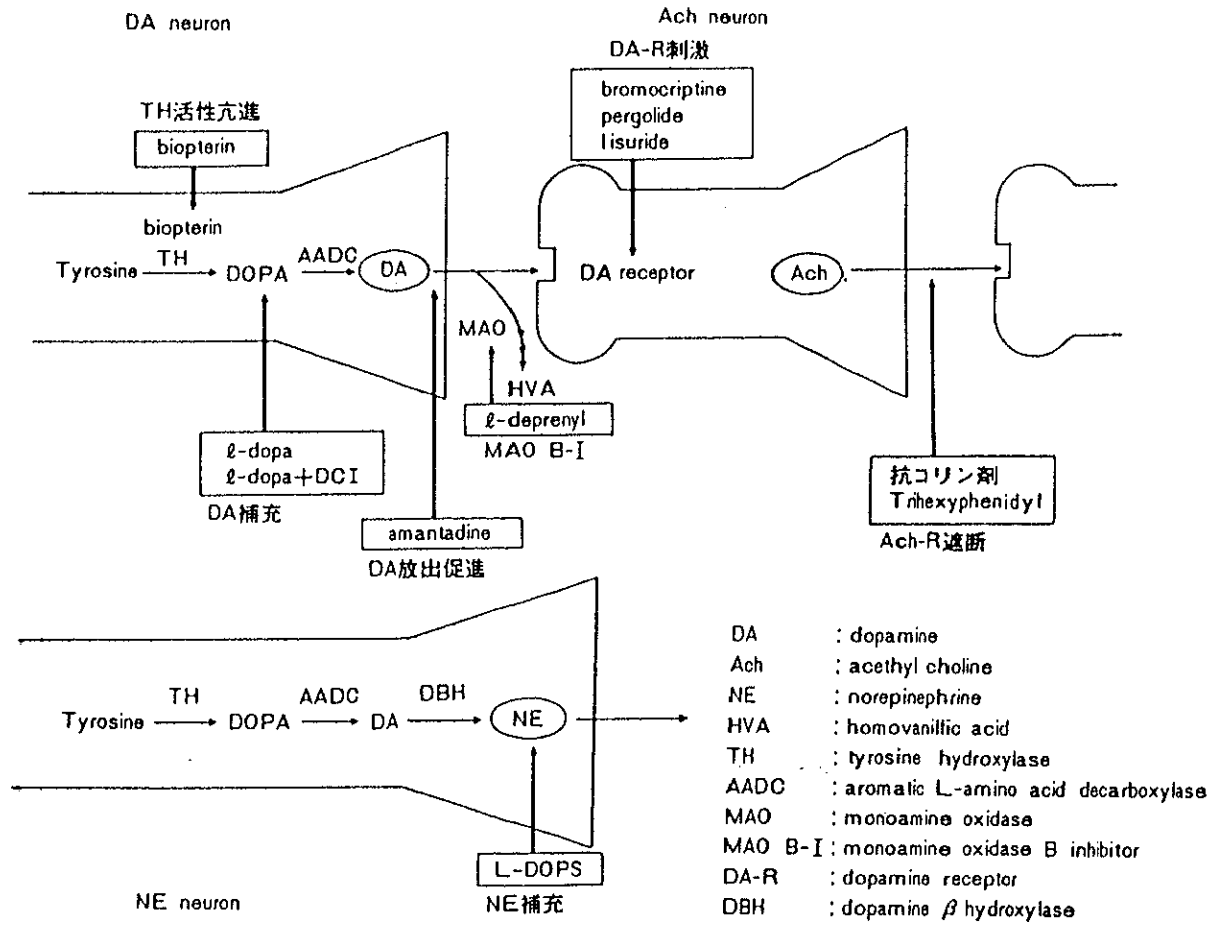


図 1 - 1 パーキンソン病治療薬の作用部位を示すシェーマ

第 2 章

パーキンソン病患者における 血漿 L-dopa 濃度測定

I. 目的及び対象

L-dopa 製剤はパーキンソン病治療における中心的薬剤であるが、治療初期には安定した効果を示すにもかかわらず、長期治療中に次第に症状の著明な日内変動 (“wearing-off” 現象, “on-off” 現象) や、ジスキネジアなどが出現してくることが知られている。このうち特に “wearing-off” 現象は、頻度も多くまた患者の日常生活上の障害も強いため、パーキンソン病の治療上、重大な問題点となっている。この問題点の原因について、Fabbrini ら[1, 2]、Mouradian ら[3]はパーキンソン病の患者で L-dopa の持続静注中、及び中止後の症状の変化などの検討から “wearing-off” 現象の原因は疾患そのものの進行によって脳内のドパミン合成、再取り込みや、貯蔵能力が低下するためであると報告した。一方、疾患の重症度、罹患期間、L-dopa 治療期間などとの多変量解析から、“wearing-off” 現象の発現は L-dopa 治療期間と最も相関が高いとしている報告もあり[4, 5, 6]、まだ十分解明されていない。ところで、“wearing-off” 現象やジスキネジアの出現はある程度、血漿 L-dopa 濃度と相関するとされている[7, 8]ことから、これらの問題点の原因のひとつとして、長期治療中に血漿 L-dopa 濃度変動パターンが変化している可能性が考えられる。一方、L-dopa 製剤の効果出現までの時間、効果持続時間、効果の程度には個人差があり、また、同一個人であっても投与時刻や食事などにより異なる[9, 10, 11]ことが知られている。従って、血漿 L-dopa 濃度変動パターンと臨床症状の変化を同時に調べる事により、各々の患者にとって最も適切な L-dopa 製剤の投与量及び投与回数を見出し、症状の安定化をはかることが可能であると考えられる。

以上のことより、著者は “wearing-off” 現象の原因を探り、治療に結び付けるために、パーキンソン患者の血漿 L-dopa 濃度測定を行った。本研究では、まず血漿 L-dopa 濃度変動パターンと食事、治療期間、及び、

臨床症状変動との関係を検討するために L-dopa 負荷試験を行い、さらに“wearing-off”現象の出現している患者については、L-dopa 製剤の投与時刻と血漿濃度との関係、血中濃度変動パターンと症状の関係、効果出現のための閾値を検討し、症状の安定化をはかる目的で L-dopa 濃度日内変動測定を行った。

対象は表 2-1 に示したようにパーキンソン病と診断された患者 15 人（男 4 人、女 11 人）、平均年齢 60.4 才（54-68 才）、パーキンソン病罹患期間平均 12.9 年（4-26 年）、脱炭酸酵素阻害剤を含む L-dopa 製剤（以下 L-dopa 合剤と略す）服用期間平均 7.8 年（1-14 年）重症度は Hoehn-Yahr 分類（表 2-2 参照）で III-IV であった。各々の患者には検査の趣旨を説明し了解を得た上で施行した。

II. L-dopa 負荷試験

1. 方法

検査当日は服用中の薬剤はすべて中止し、朝食止めとした。尚、3 例については食事の影響を検討するために朝食後に全く同様に検査を施行した。

午前 8 時に空腹状態で EC ドパール[®] (L-dopa 100mg + benserazide 25 mg) を 1 錠服用させ、服用直前、服用後 15 分、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間後に採血及び、臨床症状の評価を行った。採血はヘパリン採血で各回 2cc とし、臨床症状については表 2-3 に従って評価し、表 2-4 に示す用紙に記載した。血液は速やかに氷冷し、血漿分離した。血漿 500 μ l に 60% 過塩素酸 50 μ l を加え、良く攪拌した後、4 $^{\circ}$ C、14,000rpm で 20 分間遠心した。上清を濾過した後、高速液体クロマトグラフィー (Neurochem, ESA) [12] にて L-dopa 濃度を測定した。

2. 結果

1) 治療期間と血漿 L-dopa 濃度変動パターンとの関係

血漿 L-dopa 濃度変動パターンは個人によりばらつきがあるが、L-dopa 合剤治療期間により明らかに二つの群に分けることができた。治療歴 7年以下の患者では図 2-1 A に示すように投与 1-2 時間後にピークとなりピーク値は 4-6 nmol/ml で比較的緩徐な経過であるのに対し、治療歴 8年以上の患者では（図 2-1 B）投与 30 分以内に 10 nmol/ml 以上に上昇し、その後速やかに低下し 4 時間後にはほぼ前値に戻る、極めて急峻な変化を示した。また、投与後 4 時間までの時間-dopa 曲線下の面積は治療歴 8 年以上の患者の平均値は 7 年以下の患者のその約 170% と増加していた。なお、治療歴 8 年以上の患者は、全員 “wearing-off” 現象が出現していた。

2) 食事と血漿 L-dopa 濃度変動パターンとの関係

食後投与群の血漿 L-dopa 濃度変動パターンを、空腹時投与群と比較した。治療歴 7 年以下の患者は 1 例のみであるが食前投与群のパターンとは明らかに異なっていた（図 2-2 A）。即ち、食後投与群では投与後の上昇がきわめて遅く、食前投与群の多くの例がピークとなる投与 2 時間後を過ぎてから血漿濃度の上昇が始まり、4 時間後にも有意に高い濃度を保っており、食前投与群に比較して L-dopa 濃度の上昇が遷延していた。治療歴 8 年以上の症例では食前投与と食後投与のパターンの差はより明らかで、食後投与例では L-dopa 濃度の上昇は遷延しているがピーク値は食前投与群の 50% 以下であった。図 2-2 C は同一症例の食前投与と食後投与の濃度変動を比較したものである。この症例ではピーク時間が異なるのみならず、食後投与のピーク値は 3 nmol/ml で食前投与の 20% 以下であった。またこの症例では食後投与では血漿濃度が二峰性ともいえるパターンを呈していた。

3) 症状の変動と血漿 L-dopa 濃度との関係

個々の患者について血漿 L-dopa 濃度と臨床症状との対応を検討したところ次ぎのような3群に分類することができた。

①血漿濃度と症状が極めて良く対応している群。(図2-3A)

②血漿濃度と症状はある程度相関しているが血漿濃度の変化に比べ、症状の変化が比較的少ないと考えられる群。(図2-3B)

③血漿濃度と症状が全く対応せず、血漿濃度の上昇にもかかわらず、症状がほとんど変化しない群。(図2-3C)

それぞれ代表的な症例を図に示した。

①に属する症例はすべて“wearing-off”現象が出現している患者であった。合剤治療歴7年以下の症例はすべて②または③に属していた。また、血漿濃度と最もよく対応する症状は患者により異なっていたが、アキネジアの指標とした「起き上がり時間」や、「すくみ現象」、及び両者の要素を含んでいる「歩行時間」と対応する場合が多かった。

3. 考察

1) 治療期間と血漿 L-dopa 濃度変動パターンとの関係

L-dopa 合剤治療歴8年以上の症例の血漿 L-dopa 濃度変動パターンは治療歴7年以下の症例とは明らかに異なっていた。本研究では残念ながら L-dopa 製剤の初回投与例はいなかったが、Rinne らの報告[13]では L-dopa 200mg+benserazide 50mg の投与でピークは1-2時間後、ピーク値は6-7 nmol/ml と本研究における7年以下の群とよく一致している。L-dopa 長期治療中の患者では治療初期群に比較して血漿 L-dopa 濃度が急峻な変動を示し、かつピーク値も時間-dopa 曲線下の面積も増大していた。この事実についてはドパ脱炭酸酵素阻害剤(dopa decarboxylase inhibitor; DCI)を含まない L-dopa 単剤のみで治療をしていた時代にすでに指摘されていた[14]が、L-dopa 単剤の長期投与中に肝臓のドパ脱炭

酸酵素が低下することからこれが原因であると考えられていた[15, 16, 17]。しかし本研究では脱炭酸酵素阻害剤を十分量含む[18] L-dopa 合剤を用いていることよりドパ脱炭酸酵素の枯渇では説明できず、長期 L-dopa 治療により L-dopa の小腸からの吸収が促進されたと考えるのが妥当であろう。いずれも“wearing-off”現象の認められる治療歴 8年以上の患者で血漿 L-dopa 濃度変動パターンの変化を認めており、長期 L-dopa 投与による小腸からの L-dopa 吸収の変化が“wearing-off”現象の原因の一つとなっている可能性が高い。なお、パーキンソン病罹患期間と血漿 L-dopa 濃度変動パターンとの間には相関は見出せなかった。罹患期間が必ずしも脳内ドパミンニューロンの障害の程度と相関するわけではないので、疾患そのものにより“wearing-off”現象が出現する可能性を否定することはできない。しかし少なくとも、長期 L-dopa 投与が“wearing-off”現象の原因の一つである可能性が示された。

2) 食事と血漿 L-DOPA 濃度変動パターンとの関係

血漿 L-dopa 濃度変動パターンは Nutt ら[11]の報告と同様に、食事により強く影響されていた。即ち、L-dopa 製剤の食後投与は、食前投与に比べ血漿濃度の上昇が遅れるとともに、多峰性のピークを示すような変則的な吸収の原因となると考えられる。

L-dopa は上部小腸より large neutral amino acid system を介して吸収される[19]。従って食後、ロイシン、フェニルアラニンなど芳香族及び分枝鎖アミノ酸が小腸に豊富に存在すると L-dopa の吸収が阻害されるものと考えられる。また、E C ドパール[®] は DCI を含んでいるが、L-dopa のドパミンへの変換を完全には阻害するわけではない。L-dopa は胃粘膜でも脱炭酸されるため、食後胃内停滞時間が長いとドパミンへの変換が促進される可能性がある。これも L-dopa 吸収が食事により影響を受けることの原因の一つと考えられる。

同一症例での検討は 1 例のみで、“wearing-off”現象が明らかな症例

であった。この症例では食後投与では、食前投与に比べて L-dopa の効果が明らかに少なく、血漿濃度が治療閾値に達していなかった可能性がある。投与方法の違いによりこれほど血漿濃度の上昇に差が生じる症例が存在することは銘記すべきであろう。

以上より、特に“wearing-off”現象が出現している患者では、症状安定化のための L-dopa 製剤の投与方法を考える際に、食事は重要な因子となると考えられる。

3) 症状の変動と血漿 L-dopa 濃度との関係

“wearing-off”現象が明らかな症例では、症状と血漿 L-dopa 濃度とが極めてよく対応しており、血漿 L-dopa 濃度が脳内のドパミン濃度と良く相関しているものと考えられた。これに対して治療初期群では血漿濃度が低下した後も症状の改善はある程度持続していることが注目された。この効果の持続の要因としては線条体におけるドパミン保持能力やドパミン受容体の感受性が関与しているものと考えられ、“wearing-off”現象を認める症例ではこれらの機能が低下していることが考えられる。また、血漿濃度と症状の対応から、症状改善のためには血漿濃度にある閾値が存在することが示唆された。一方、血漿濃度がある程度上昇しているにもかかわらず症状が全く改善しない群については、ドパミンニューロンのみならずドパミン受容体の障害も存在する可能性を推定した。

Ⅲ. L-dopa 日内変動測定

1. 方法

検査当日は食事、服用薬剤ともすべて通常通りとした。検査当日の朝、最初の合剤服用時刻の直前から服用後15分、30分、1時間後、以後最終服用の後まで1時間毎に採血と臨床症状の評価を行った。採血方法、症状の評価、血液の処理はすべて L-dopa 負荷試験と同様に行った。

2. 結果

図2-4に個々の患者の L-dopa 濃度の日内変動を示した。血漿濃度の変動パターンは個人差のみならず、同一個人に同量の L-dopa 合剤を投与しても、服用時刻によって著しく異なっていた。この差違は食事の影響のみでは説明がつかなかった。早朝空腹時に L-dopa 製剤を服用した場合は、朝食後に L-dopa を服用しても血漿濃度の上昇が悪く、9時から11時頃まで有効濃度を保てない傾向があった。

図2-5に“wearing-off”現象の著明な4症例についての L-dopa 濃度と症状の日内変動を示した。

Aの症例は“wearing-off”現象とジスキネジアを伴う典型的なパーキンソン病の L-dopa 長期治療例である。午前中と夕食時の症状の増悪が問題点であった。血漿濃度のピーク時刻と症状の変動を検討すると、症状は血漿濃度の変動から30分ないし1時間遅れてこれを極めて良く反映していると言える。この事実を考慮に入れ、この患者では治療閾値は 2 nmol/ml と推定した。一方ジスキネジアについては、血漿濃度の急峻な変化に比べて比較的出現時間が長いといえるが、これはジスキネジアの消失閾値は出現閾値よりも低いことが多いとされている[20]ことで説明できる。この患者では出現閾値は 5.5 nmol/ml 消失閾値は 2 nmol/ml と推定した。

以上の結果より、症状の安定化を図るために EC ドパール[®] 5錠 5X(6時, 10時, 14時, 16時, 19時) から 6錠 6X(6時, 8時, 10時, 12時, 16時, 18時) と変更し、再度 L-dopa 日内変動測定を行った。尚、患者本人がジスキネジアをほとんど気にしておらず、むしろ動き易い方を望んだため、ジスキネジアについてはあまり考慮しなかった。また、この患者では歩行時間及び、方向転換の円滑さが症状の変動を最もよく表していたため、この二つの項目を図に示した(図2-5B)。右図に示すように血漿濃度が効果閾値の 2 nmol/ml以下となるのは12時と17時の2点のみで off の持続時間が短くなり、全体として日常生活動作(ADL)は著明に改善し

た。

図2-5Cは症状の変動が極めて急速かつ著明で、1日に数回ごく短時間のうちに全く動けなくなってしまう時間がある一方で調子の良い時にはほぼ正常に歩行できる患者の結果である。この患者では症状の変動が極めて急速であることから、臨床症状の観察からは“on-off”現象の可能性も考えられた。しかし、血漿濃度測定の結果、濃度変動は急速であるが、血漿濃度と症状の変動は極めて良く対応し、“wearing-off”現象であることが明らかとなった。治療閾値は5 nmol/mlと推定した。この患者ではすでにECドパール[®]が7錠と日本人としては大量に投与されていることと67才という年齢を考慮して、L-dopa 合剤の総量はふやさずに血漿濃度の変動をできるだけ少なくすることで症状の安定化を図ることにした。血漿濃度上昇の持続時間の延長を期待して食後投与も試みたが、効果発現までに1時間以上かかり効果も不十分であった。そのため、特に午後のADLを改善するために昼食を13時30分とし、7錠 4X（6時；2錠，12時；1.5錠，17時；2錠，20時30分；1.5錠）から7錠 5X（7時；1.5錠，10時；1錠，13時；2錠，16時30分；1.5錠，20時；1錠）に変更した。その結果、10時に off の時間があるものの午後の off の時間は消失し、良好なADLを保つことが可能となった。

図2-5Dの症例ではL-dopa 合剤服用後3-4時間で効果が減弱しており、治療閾値は2 nmol/mlと推定した。一方、ジスキネジアはある程度血漿濃度と対応はするものの持続的に出現しており、ジスキネジア出現閾値は効果出現閾値より低値であると考えられた。

図2-5Eの症例も図2-5Dと似た傾向にあり、昼食後服用のL-dopa の効果が夕まで持続しないために18時頃に症状が悪化している。この患者では症状の改善及びジスキネジアの出現とも血漿濃度のピークと1時間程度のずれを認めた。効果閾値は1.5 nmol/ml、ジスキネジアの出現閾値は4 nmol/mlと推定した。

3. 考察

図2-4に示したように血漿 L-dopa 濃度の変動は個人差のみならず、同一個人であっても服用時間により著明に異なる。この変動の原因としては食事の影響も大きいですがそれのみでは説明がつかず、他の因子の存在を示唆している。他の因子としては服用時の血漿濃度が L-dopa の吸収効率に影響を及ぼす可能性や他の併用薬剤の影響などが考えられる。

L-dopa 血漿濃度の治療閾値については欧米では 3-15 nmol/ml、多くは 5-8 nmol/mlと報告されている[23, 24]。本研究ではそれぞれ 1.5 nmol/ml (レボドパ合剤300mg服用中), 2(300mg), 2.5(500mg), 5(700mg)と欧米の報告に比べやや低い値であった。欧米では一般に L-dopa 合剤投与量が1000mg 前後と多く、これが閾値が高いことに関与していると考えた。パーキンソン病の長期罹患者では脳内線条体のドパミン保持能が低下しているとされている[25]。長期 L-dopa 治療中に血漿濃度の上昇が急峻になることから、ドパミン保持能が低下した線条体では1回投与量が多いと大量のドパミンが間欠的にドパミンレセプターを刺激するようになり、閾値が上昇していくものと考えた。

なお、ジスキネジアの出現閾値は個人により著明な差があり、血漿 L-dopa 濃度が効果閾値以下で出現する患者もいるが、10 nmol/ml を越えても出現しない患者もいた。この事実から Fabbri ら[2]も指摘しているように、ジスキネジアの発生原因には L-dopa 濃度のみならず、受容体の感受性などが関与しているものと考えられた。

IV. 第2章の参考文献

1. Fabbrini G, Juncos J, Mouradian MM, Serrati C, and Chase TN. Levodopa pharmacokinetic mechanisms and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1987;21:370-376
2. Fabbrini G, Mouradian MM, Juncos JL, et al. Motor fluctuations in Parkinson's disease: central pathophysiological mechanisms, Part I. *Ann Neurol* 1988;24:366-371
3. Mouradian MM, Juncos JL, Fabbrini G, et al. Motor fluctuations in Parkinson's disease: pathogenetic and therapeutic studies. *Ann Neurol* 1987;22:475-479
4. Horstink MWIM, Zijlmans JCM, Pasman JW, et al. Which risk factors predict the levodopa response in fluctuating Parkinson's disease? *Ann Neurol* 1990;27:537-543
5. de Jong GJ, Meerwaldt JD, and Schmitz PIM. Factors that influence the occurrence of response variations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1987;22:4-7
6. Lesser RP, Fahn S, Snider SR, et al. Analysis of the clinical problems in Parkinsonism and the complications of long-term levodopa therapy. *Neurology* 1979;29:1253-1260
7. Torosa ES, Martin WE, Cohen HP, and Jacobson RL. Patterns of clinical response and plasma dopa levels in Parkinson's disease. *Neurology* 1975;25:177-183
8. Papavasiliou PS, McDowell FH, Wang YY, Victoria Rosal RN, and Miller ST. Plasma DOPA and growth hormone in parkinsonism: oscillations in symptoms. *Neurology* 1979;29:194-200
9. Morgan JP, Bianchine JR, Spiegel BH, et al. Metabolism of

- levodopa in Patients with Parkinson's disease. : radioactive and fluorometric assays. Arch Neurol 1971;25:39-44
10. Andersson I, Granerus A, Jagenburg R, and Svanborg A. Intestinal decarboxylation of orally administered L-dopa: influence of pharmacological preparation, dose magnitude, dose sequence and food intake. Acta med scand 1975;198:415-420
 11. Nutt JG, Woodward WR, Hammerstad JP, Carter JH, and Anderson JL. The "on-off" phenomenon in Parkinson's disease. : relation to Levodopa absorption and transport. N Engl J Med 1984;310:483-488
 12. Svendsen CN, Froimowitz M, Iirbek C, et al. Receptor affinity, neurochemistry and behavioral characteristics of the enantiomers of thioridazine: evidence for different stereoselectivities at D1 and D2 receptors in rat brain. Neuropharmacology 1988;27:1117-1124
 13. Rinne UK and Molsa P. Levodopa with benserazide or carbidopa in Parkinson disease. Neurology 1979;29:1584-1589
 14. Muentzer MD, and Tyce GM. L-dopa therapy of Parkinson's disease: plasma L-dopa concentration, therapeutic response, and side effects. Mayo Clin Proc 1971;46:231-239
 15. Dairman W, Christenson JM, and Udenfriend S. Decrease in liver aromatic L-amino-acid decarboxylase produced by chronic administration of L-dopa. Proc Natl Acad Sci USA 1971;68:2117-2120
 16. Tate SS, Sweet R, McDowell FH, and Meister A. Decrease of the 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) decarboxylase activities in human erythrocytes and mouse tissues after administration of

- DOPA. Proc Natl Acad Sci USA 1971;68:2121-2123
17. Tanaka M, Oshima T, Hayashi S, Ishibashi C, and Kobayashi S. Enhancement of the pharmacological action of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) and reduction of DOPA decarboxylase activity in rat liver after chronic treatment with L-DOPA. Eur J Pharmacol 1973;22:360-362
 18. Preziosi TJ, Bianchine JR, Hsu TH, and Messiha FS. L-methyl-dopa hydrazine (MK-486) and L-DOPA: a double blind study in Parkinsonism. Trans Am Neurol Assoc 1972;97:321-322
 19. Wade DN, Mearrick PT, and Morris JL. Active transport of L-dopa in the intestine. Nature 1973;242:463-465
 20. Sage JI, Mark MH, McHale DM, et al. Benefits of monitoring plasma levodopa in Parkinson's disease patients with drug-induced chorea. Ann Neurol 1991;29:623-628
 21. Nutt JG and Woodward WR. Levodopa pharmacokinetics and pharmacodynamics in fluctuating parkinsonian patients. Neurology 1986;36:739-744
 22. Muentner MD, Sharpless NS, Tyce GM, et al. Patterns of dystonia ("I-D-I" and "D-I-D") in response to L-dopa therapy for Parkinson's disease. Mayo Clin Proc 1977;52:163-74
 23. Leenders KL, Palmer AJ, Quinn N, et al. Brain dopamine metabolism in patients with Parkinson's disease measured with positron emission tomography. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1986;49:853-860

pt.No.	Name	Age, Sex	duration of PD	duration of L-dopa+DCI	dose of L-dopa+DCI	Yahr	wearing-Off phenomenon
1	N.F.	56M	13 (years)	1 (years)	100 (mg)	III	-
2	S.H.	68F	18	2	250	III	-
3	M.O.	60F	8	3	250	IV	-
4	N.Y.	60F	4	4	600	III	-
5	K.S.	55M	6	5	300	III	-
6	M.M.	60M	13	6	500	IV	-
7	S.S.	58F	10	7	150	IV	-
8	K.T.	54F	15	8	300	IV	+
9	F.K.	60F	10	8	500	IV	+
10	H.K.	60F	12	10	500	IV	+
11	K.N.	60F	12	12	600	IV	+
12	S.H.	59F	15	12	600	IV	+
13	M.I.	67M	16	12	700	IV	+
14	K.F.	65F	26	12	300	IV	+
15	T.N.	64F	16	14	300	IV	+

表2-1 対象患者リスト

表 2-2 Hohen & Yahr の重症度分類

- Stage I 一側性障害, ほとんど機能障害はない。
- Stage II 両側性または体幹障害を伴う。
- Stage III 姿勢反射障害がある。方向転換の不安定や突進現象が見られる。日常生活は自分でできるが、労働能力は軽度ないし中等度に低下。
- Stage IV 起立、歩行など日常生活動作は著しく障害され、労働力は著しく低下。
- Stage V 介助による車椅子移動または寝たきり状態。

表 2-3 臨床症状の評価方法

1. 固縮、振戦は最強部位で評価した。
2. 起き上がり時間はベッド上臥位からベッド脇に立つまでの時間をストップウォッチで測定し、これをアキネジアの指標とした。
3. 歩行時間は5メートル2往復にかかった時間をストップウォッチで測定した。この時同時に「すくみ足」の評価を行った。
4. それぞれの項目の0-4の評価は下記に従って行った。
 - 1) 固縮
 0. 症状なし
 1. 誘発を加えなくとも軽い固縮が認められる。
 2. 中等度の固縮があるが関節は十分伸展できる。
 3. 中等度の固縮で関節を十分伸展するのはかなりの力を要する。
 4. 固縮が強く関節を十分伸展できない。
 - 2) 振戦
 0. 症状なし。
 1. 振幅の小さい安静時振戦が出たり消えたりする。又は姿勢振戦のみ。
 2. 振幅の小さい安静時振戦が持続的に見られる。又は中等度の振幅の安静時振戦が出たり消えたりする。
 3. 中等度の安静時振戦が持続的に見られる。
 4. 大きな振幅の安静時振戦が持続的に見られる。
 - 3) 指タック
 - 障害の強い側の上肢で示指により母指をできるだけはやく、3 cm以上はなしてたたく。
 0. 正常
 1. 正常より遅いが大きさは保たれている。

2. 遅く、大きな動きは最初しかできず、すぐ小さくなってしまう。
3. 初めから1 cm以下の小さい動きしかできない。
4. 指は細かくふるえるのみで、ほとんど動かない。

4) すくみ足

0. 症状なし。
1. 診察中には見られない。病室では時々見られるのみ。
2. すくみ足が見られるが検査中5回以下。
3. すくみ足が6回以上見られる。
4. すくみ足が6回以上見られ、時に足が全く出せなくなるか、支えないと倒れそうになる。

5) 後方突進

0. 正常
1. 後方突進があるが自分で立ち直れる。
2. 後方突進し支えないと転倒する。
3. 立たせたのみで後方に転倒する。
4. 起立不能

6) ジスキネジア

0. 症状なし。
1. 軽微（不確実）、安静時には見られない。随意運動、歩行、精神的緊張などで誘発される。
2. 軽度、小さな不随意運動が間欠的に見られる。
3. 中等度、小さな不随意運動がほぼ持続的に見られるか、大きな不随意運動が間欠的に出現する。
4. 高度、大きな不随意運動が持続的に出現している。

5. 1症例については特に方向転換の円滑さが症状の良い指標となったため、次ぎのように評価した。

0. スムーズに方向転換ができる。
1. ややスムーズに方向転換ができる。
2. 方向転換がややぎこちない。
3. 方向転換はなんとかできるがかなりぎこちない。
4. 方向転換をすることができない。

患者名: _____ 年齢: _____ ID: _____ 日付 _____ 主治医名 _____

時刻	8:00	8:15	8:30	9:00	10:00	11:00	12:00
採血							
評価項目	1	2	3	4	5	6	7
ECG-MI錠服用							
固縮	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4
振戦	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4
起き上がり時間	秒	秒	秒	秒	秒	秒	秒
指タツプ	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4
歩行時間	秒	秒	秒	秒	秒	秒	秒
すくみ足	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4
後方突進	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4
ジスキネジア	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4	0・1・2・3・4
On-off 現象	-・・+	-・・+	-・・+	-・・+	-・・+	-・・+	-・・+
自覚症状							

現在投与中の薬剤

表2-4 評価表

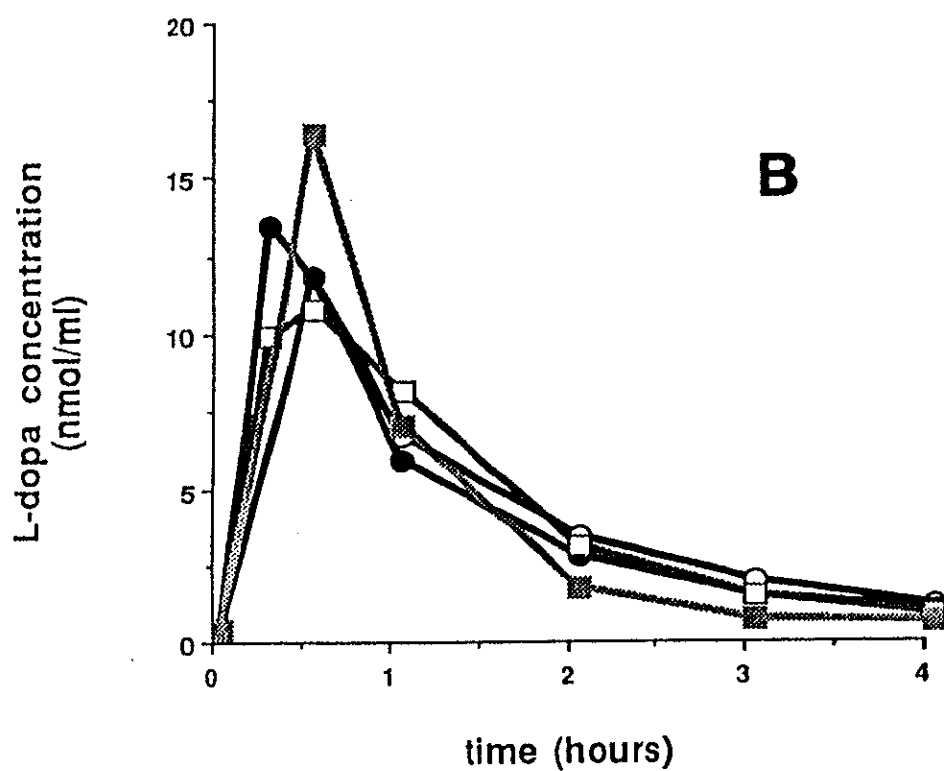
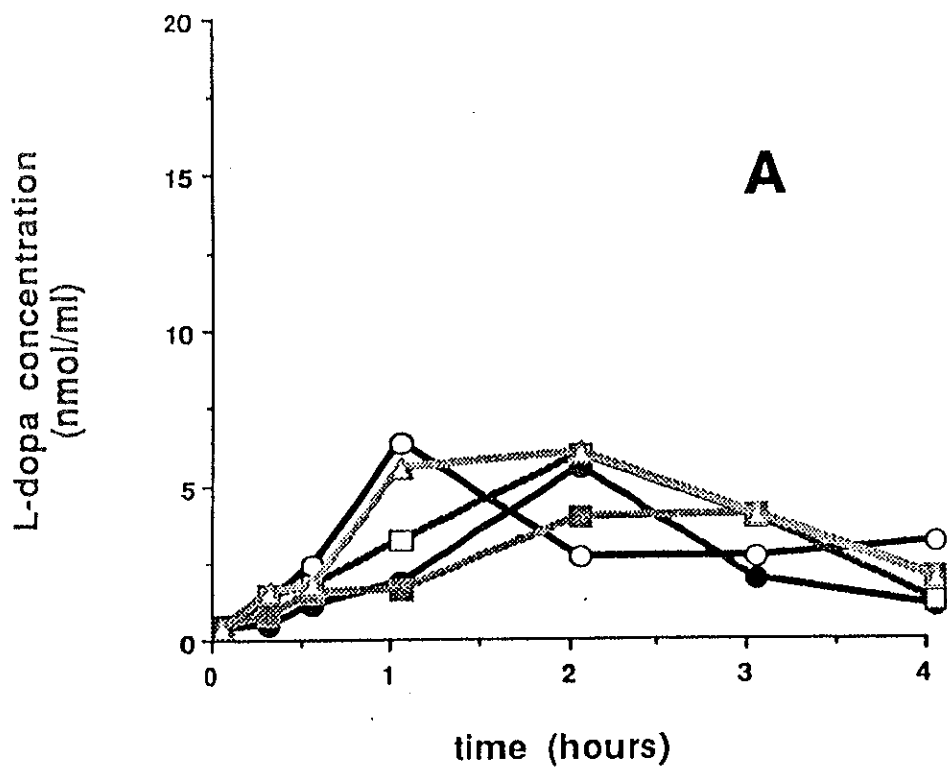


図2-1 治療期間と血漿 L-dopa 濃度変動パターンとの関係
 空腹時に L-dopa 100mg+benserazide 25mg 投与後の血漿 L-dopa 濃度の
 変化を示した。Aは L-dopa 合剤治療歴7年以下の症例、Bは8年以上の
 症例である。

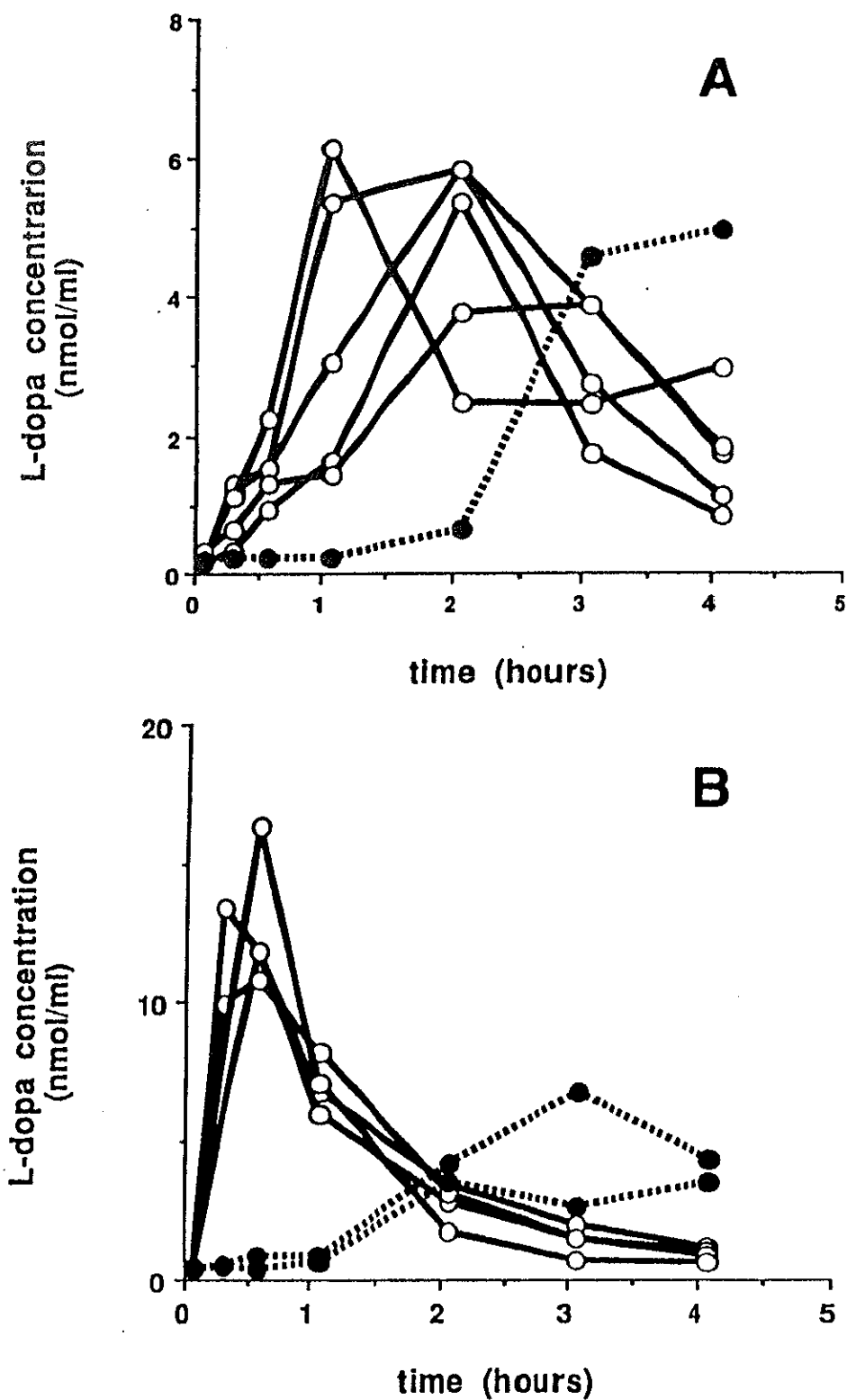


図 2-2 食事と血漿 L-dopa 濃度変動パターンとの関係
 Aは L-dopa 合剤治療歴 7 年以下、Bは 8 年以上の症例について示してある。両図とも —○— は L-dopa 合剤食前投与、⋯●⋯ は食後投与における負荷試験の結果を示した。

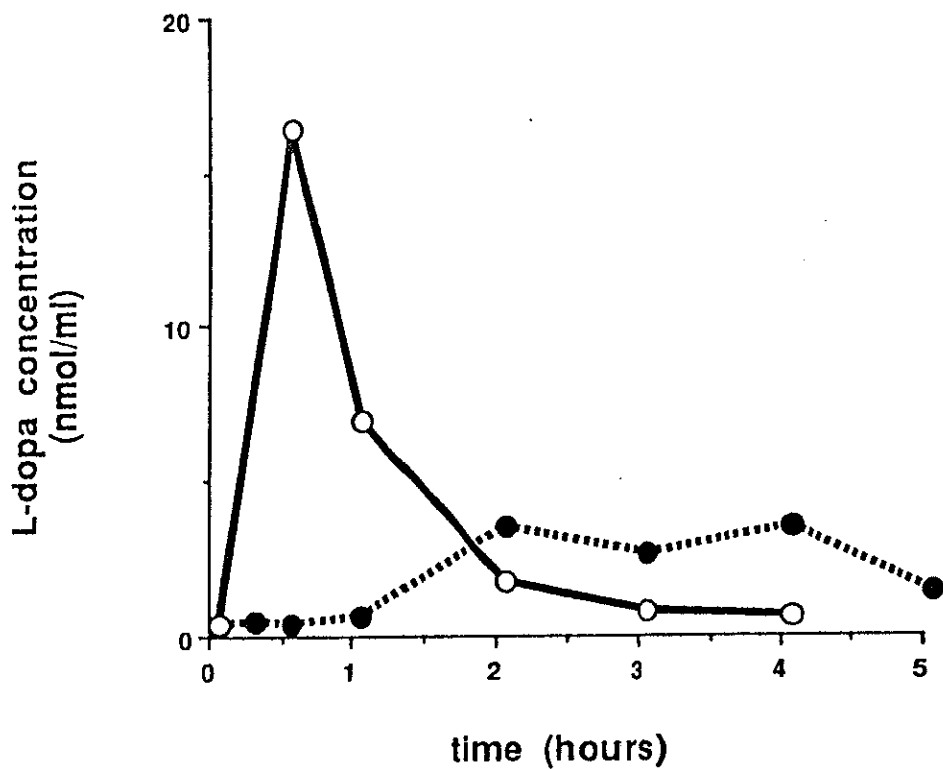


図2-2C 食事と血漿 L-dopa 濃度変動パターンの関係 (同一症例)
 同一症例について L-dopa 合剤食前投与 **—○—** と食後投与 **…●…** の
 L-dopa 濃度変動パターンを示した。なお、提示した症例は Pt. No. 8 の治
 療歴 8 年の患者である。

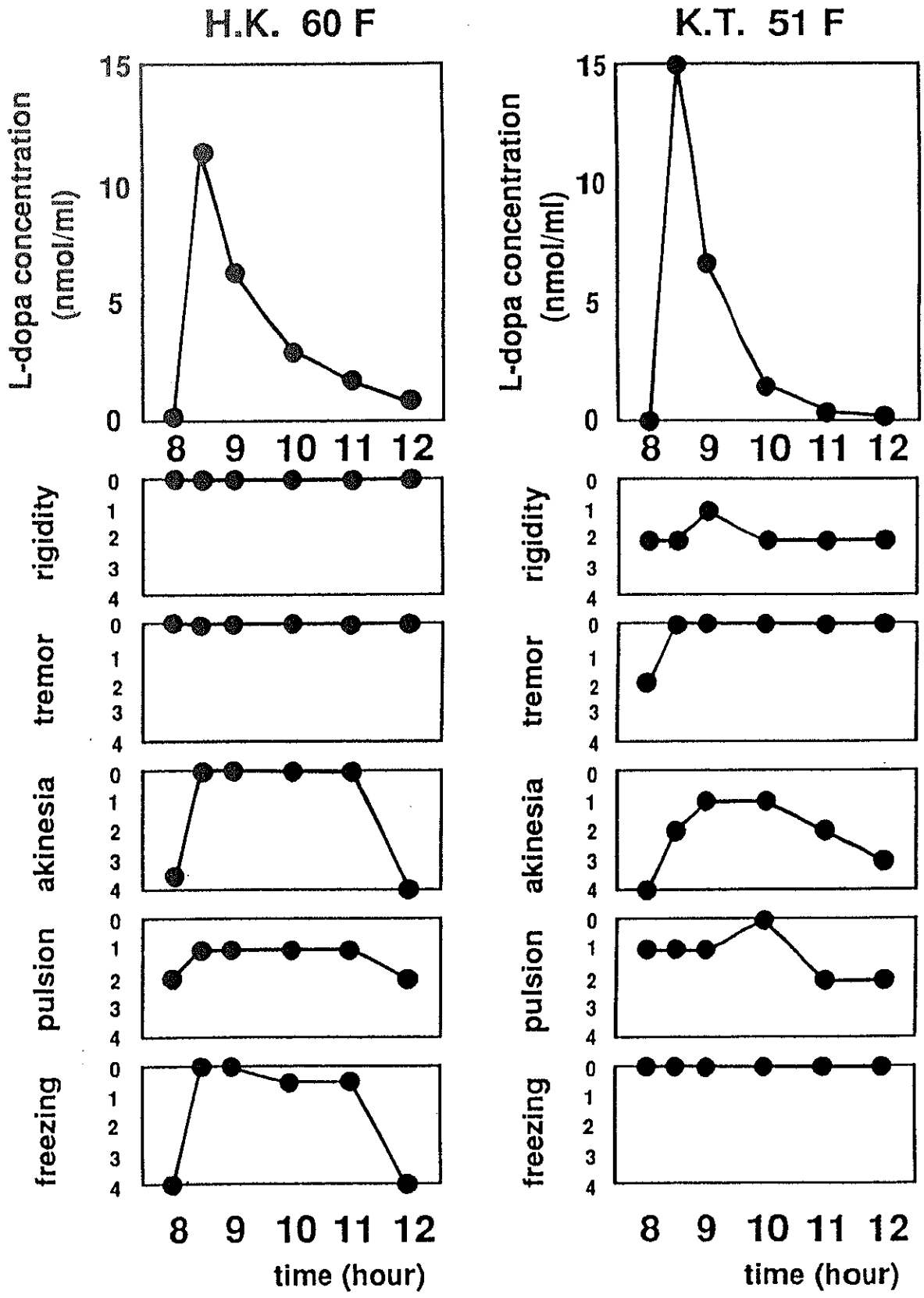


図2-3 A L-dopa 負荷試験における血漿濃度と症状の変動 (1)

① 血漿濃度と症状の変動がよく対応している例

いずれも L-dopa 合剤治療歴 8 年以上の症例である。

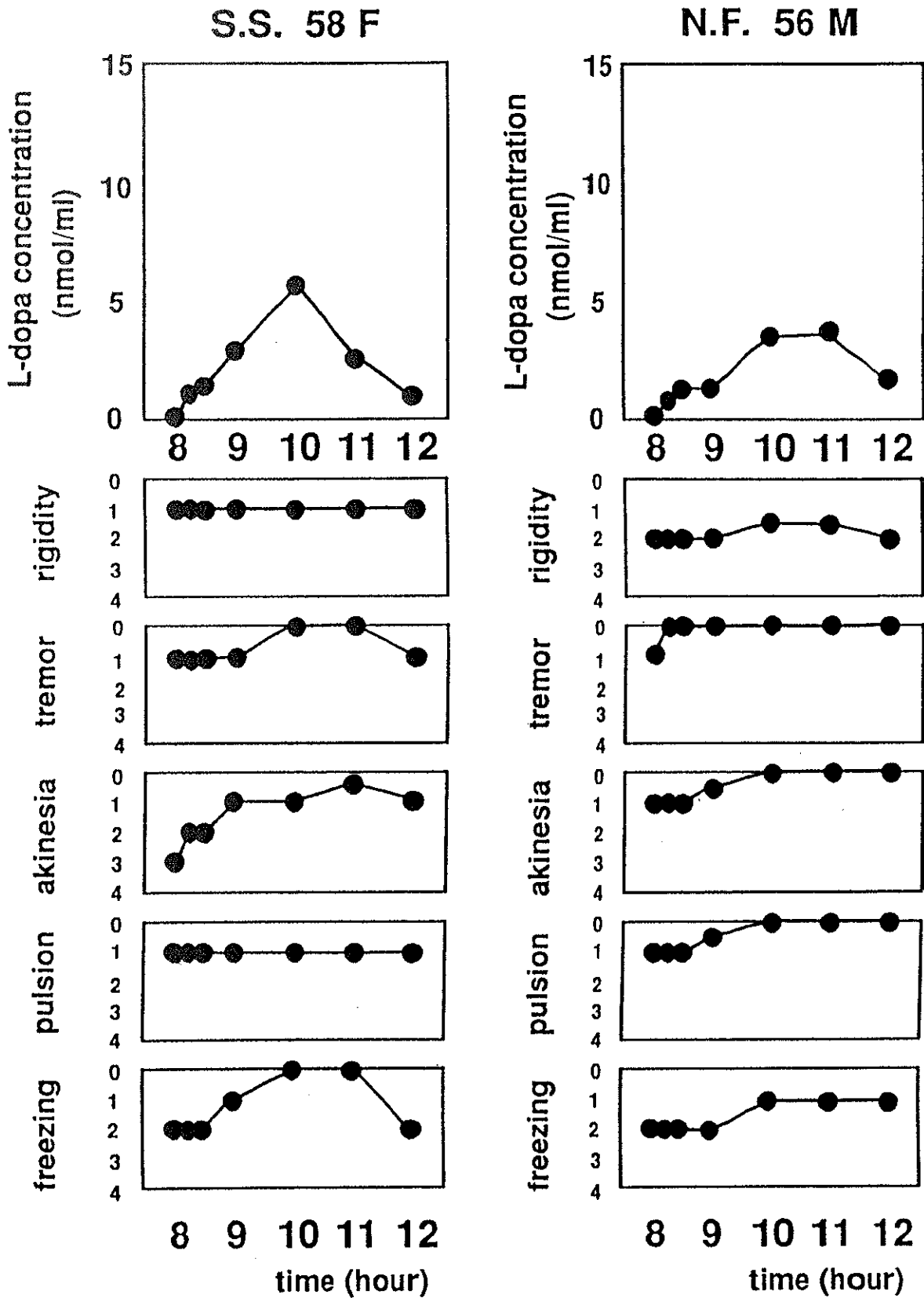


図2-3B L-dopa 負荷試験における血漿濃度と症状の変動 (2)

② 血漿濃度と症状がある程度対応している例

いずれも L-dopa 合剤治療歴7年以下の症例である。

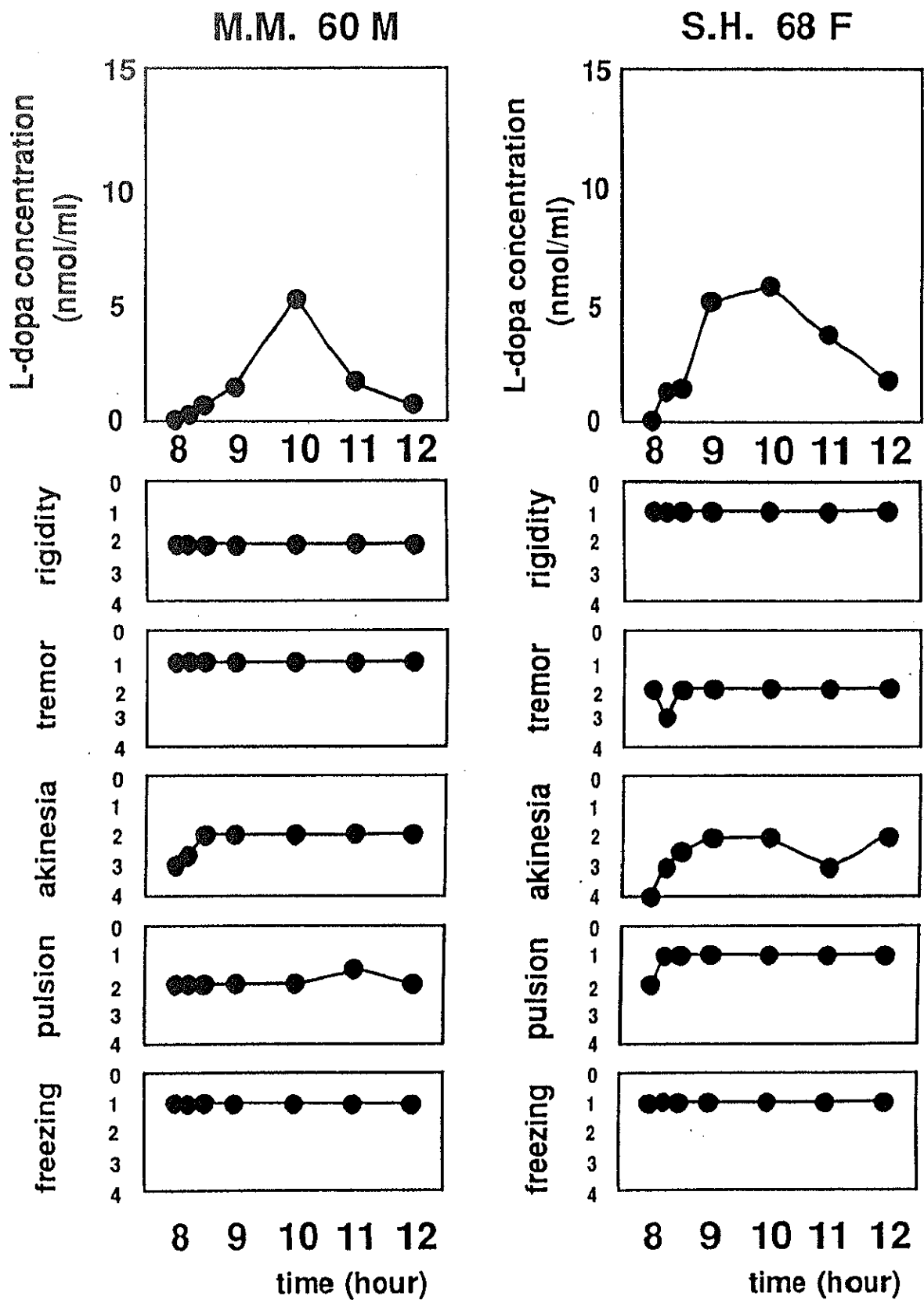


図2-3C L-dopa 負荷試験における血漿濃度と症状の変動 (3)

③ 血漿濃度の上昇にもかかわらず症状が殆ど変化しない例

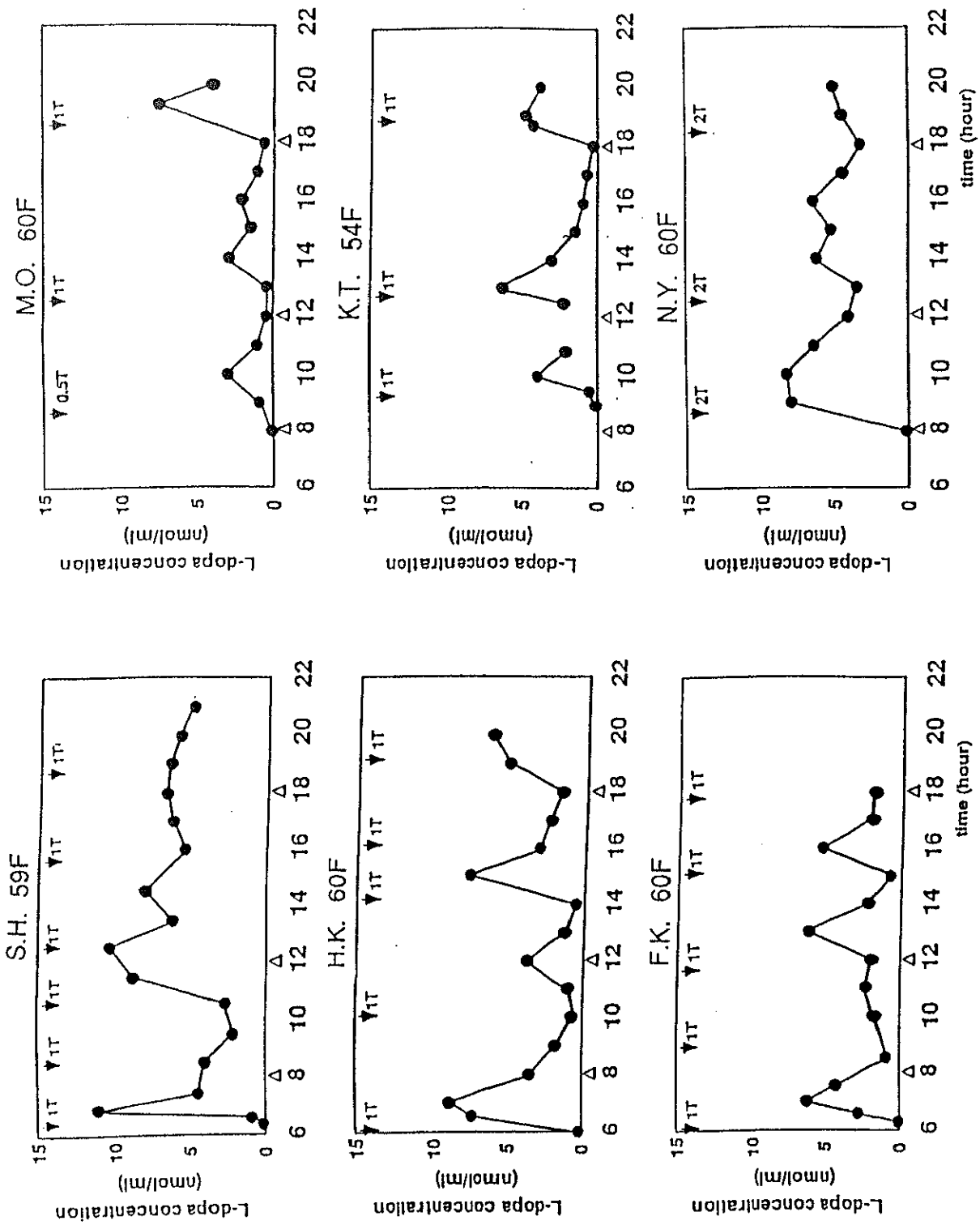


図2-4 L-dopa 濃度日内変動 ▼は L-dopa 合剤投与を、△は食事を示す。

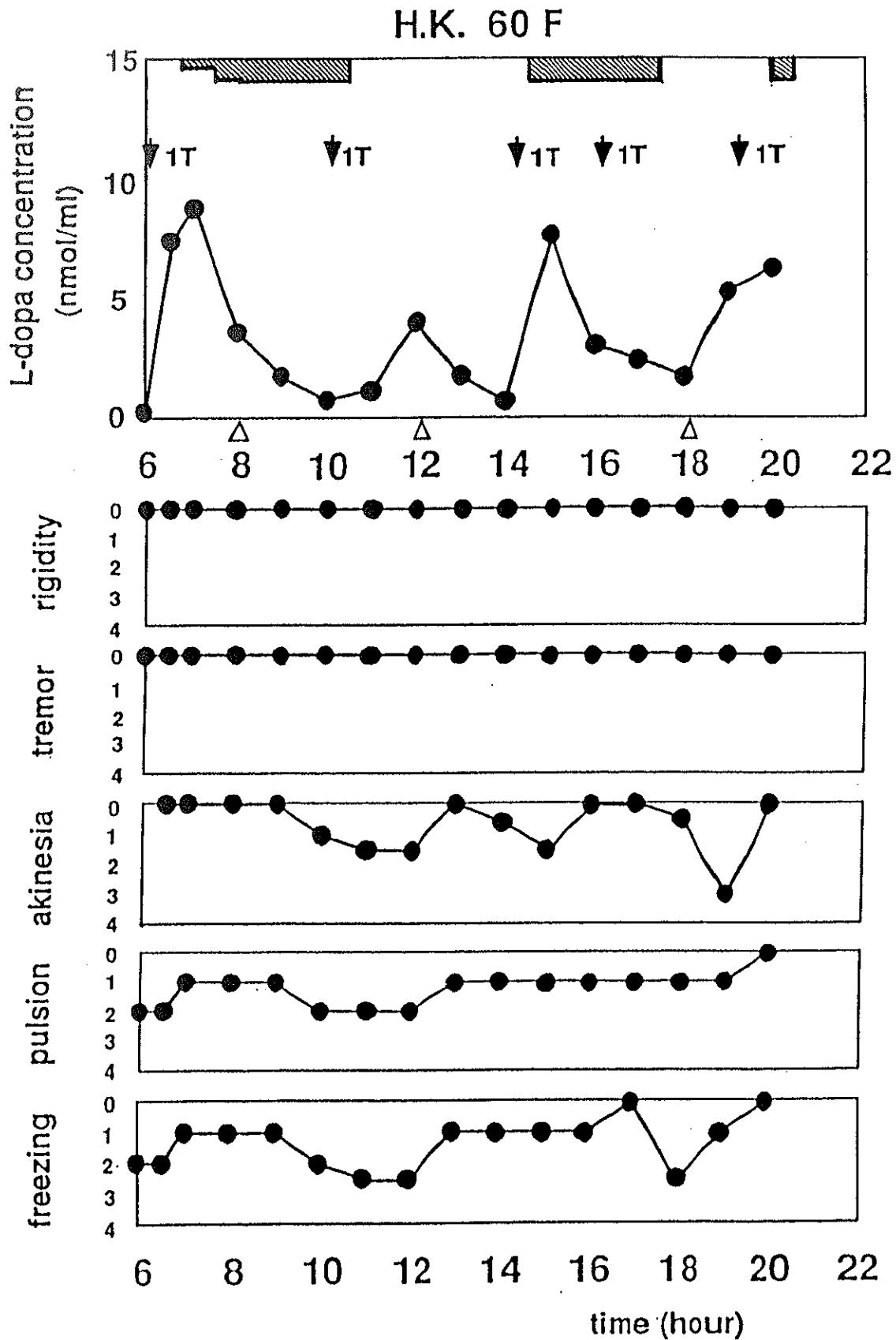


図2-5A L-dopa 濃度と症状の日内変動 (1)
 ▼ は L-dopa 合剤投与を、△ は食事を、▨ はジスキネジアを示す。症例は罹患歴12年、L-dopa 合剤治療歴10年の患者である。

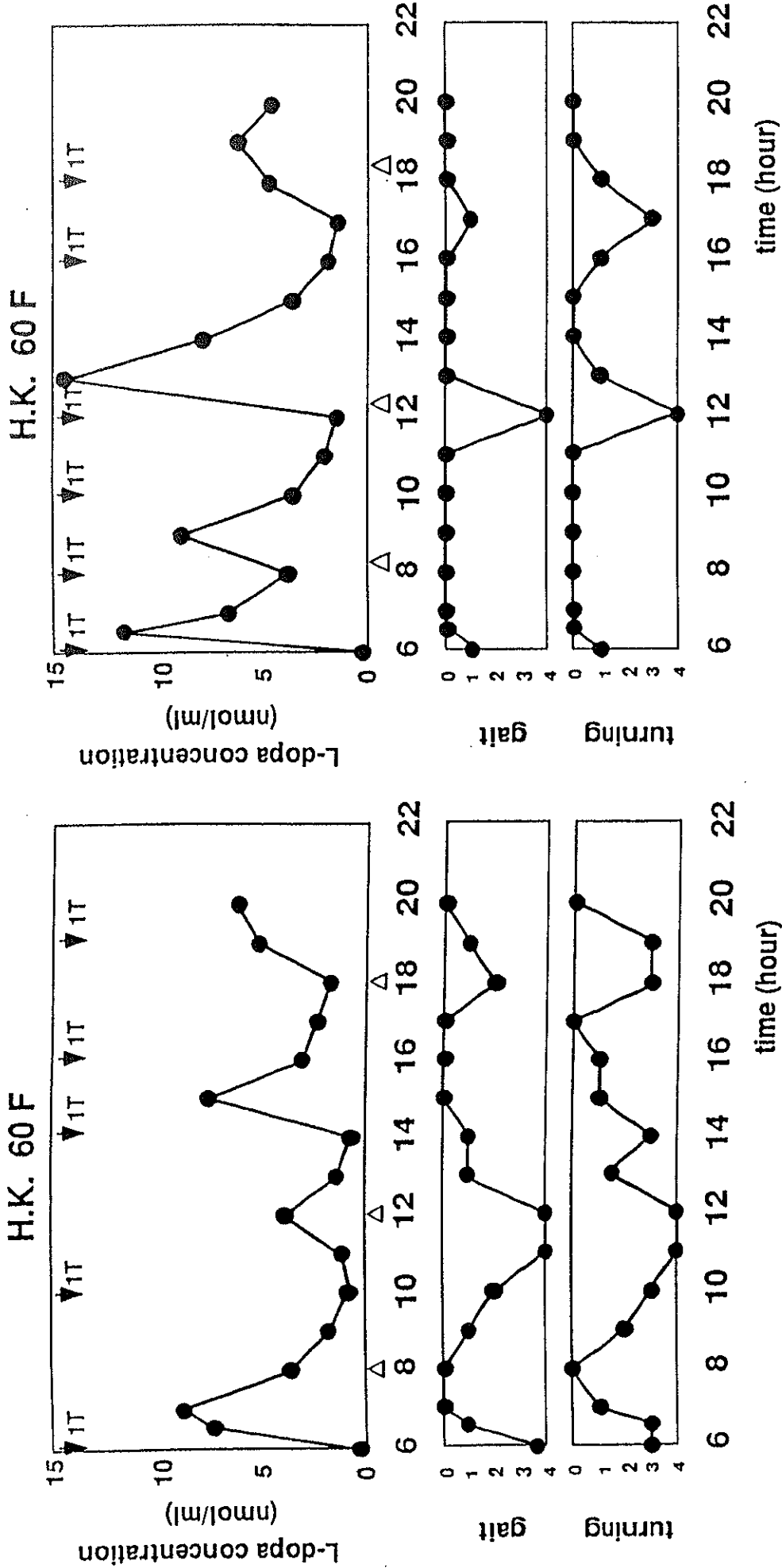


図2-5 B 薬剤の投与量及び、投与回数の変更による症状改善例
 左図の結果を検討し、投与方法を変更することで症状の改善に成功した(右図)。

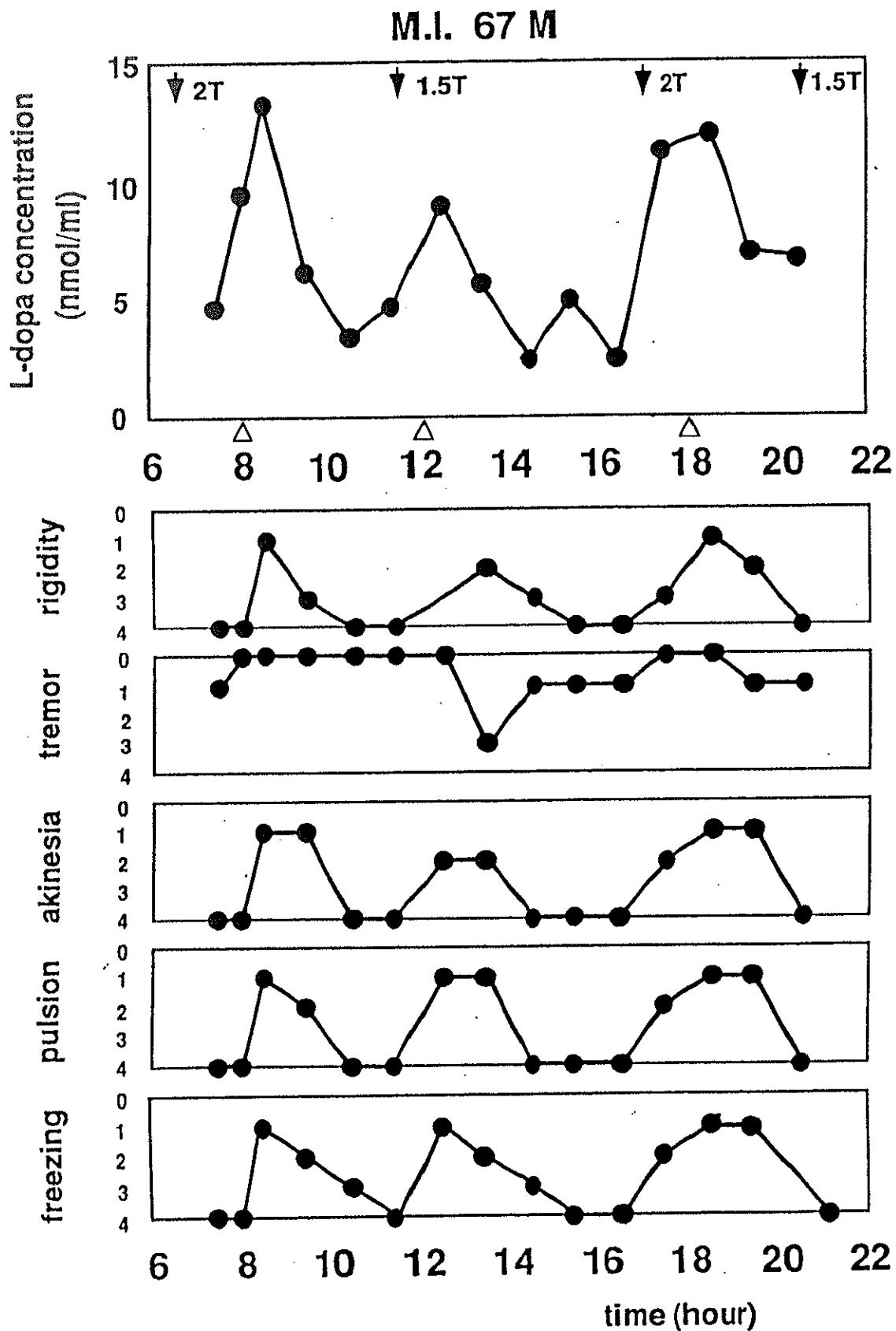


図2-5C L-dopa 濃度と症状の日内変動 (2)
 罹患歴16年、治療歴12年の患者で、ジスキネジアは認めないが著
 明な“wearing-off”現象を示した。

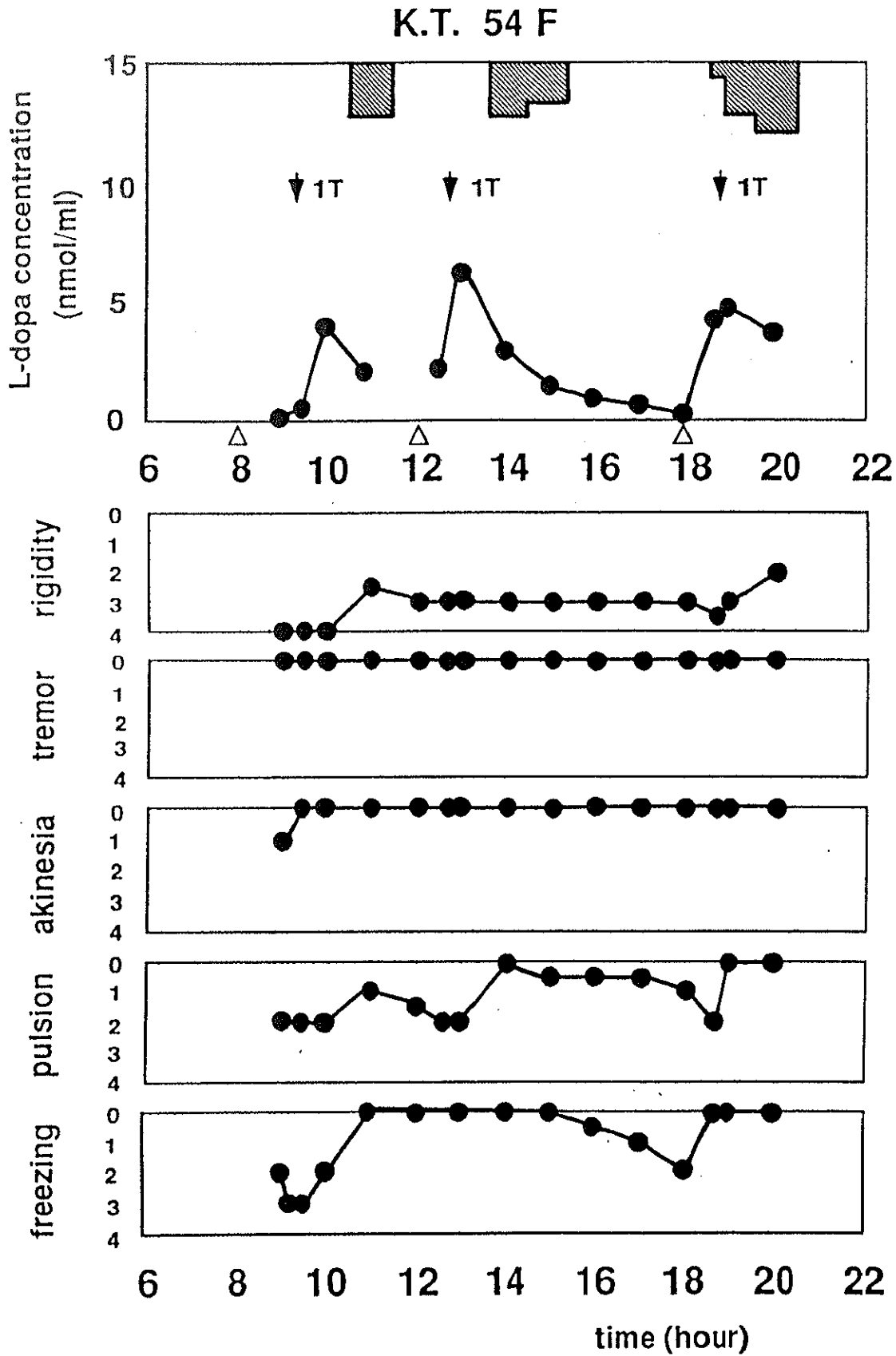


図2-5D L-dopa 濃度と症状の日内変動(3)
 “wearing-off”現象とジスキネジアが著明な若年性パーキンソニズムの患者である。

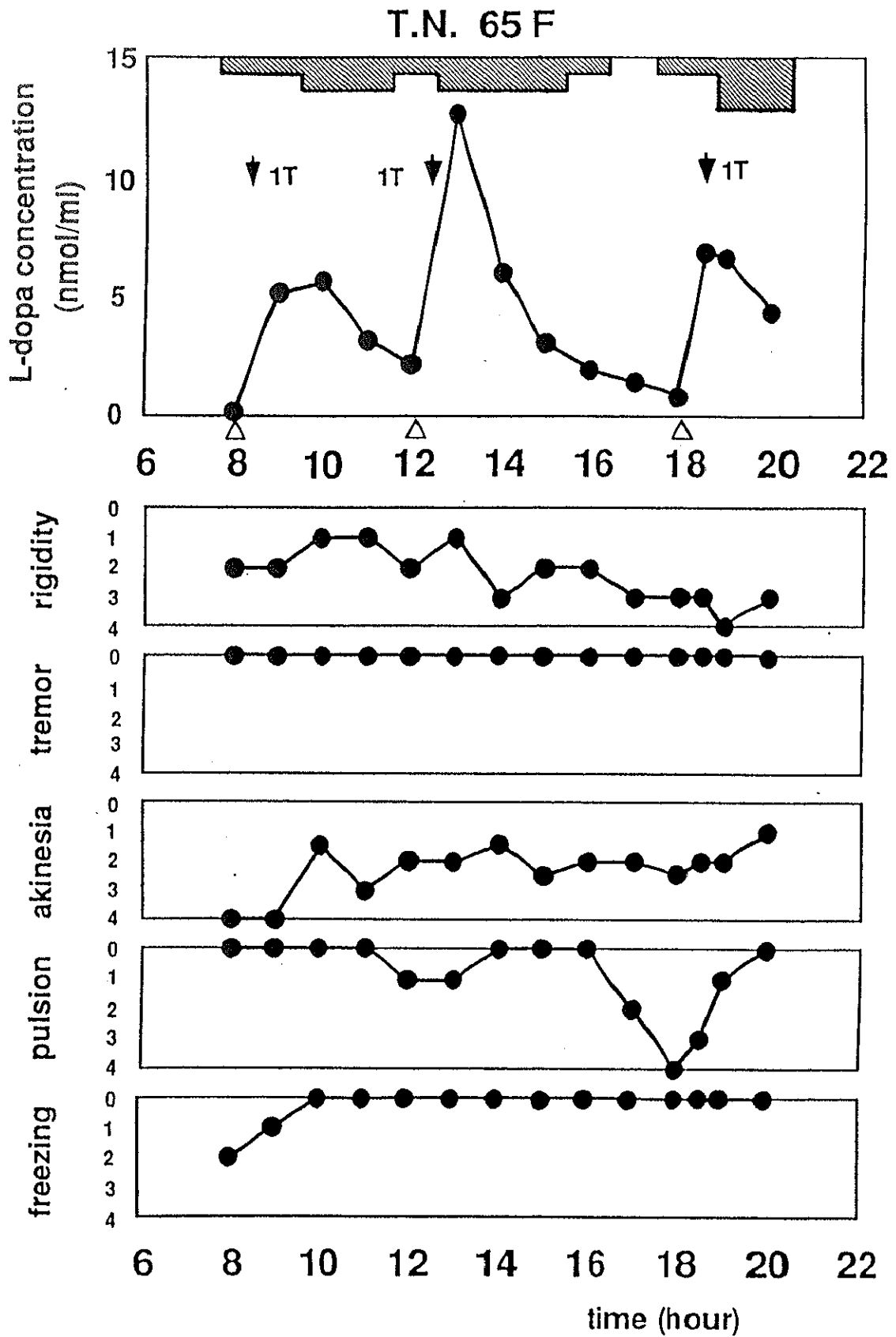


図 2-5 E L-dopa 濃度と症状の日内変動 (4)
 罹患歴 16 年、治療歴 14 年でジスキネジアがほぼ 1 日中出現している症例である。

第 3 章

ラット線条体ドパミン系に対する 長期 L-dopa 投与の影響

1. はじめに

第2章の結果から、長期 L-dopa 治療による小腸からの L-dopa 吸収の促進に起因する血漿 L-dopa 濃度変動パターンの変化が“wearing-off”現象の原因である可能性が示された。しかし、血漿濃度と症状との関係から、L-dopa 投与の効果が血漿濃度の変動のみでは説明できないことは明らかである。長期 L-dopa 投与は末梢で小腸からの吸収の変化をもたらすのみならず、中枢のドパミン系にも影響を及ぼす可能性が高い。脳内ドパミン系としては1) 血液脳関門における L-dopa の輸送、2) 脳内でのドパミン合成、放出、再取り込み、3) ドパミン代謝及び脳内からの消失過程、4) ドパミン受容体の総結合量及び親和性、などの因子が考えられ、長期 L-dopa 投与により、これらのうちどこにどのような変化が生じるのかを調べる必要がある。また、第2章では治療初期群では血漿濃度が低下した後も症状の改善が持続することが注目された。その原因として線条体のドパミン保持能力や受容体の感受性の関与を考察し、長期 L-dopa 治療後はこれらの機能が低下している可能性があると考えた。

このような可能性については、これまでも長期 L-dopa 投与後のラット脳内のドパミン含量やドパミン受容体の変化を調べた報告があるが、ほとんどは最終 L-dopa 投与後1-3日後の一時点のみにおける検討で、ドパミン量については変化がなく[1, 2]、受容体については増加する[3]、減少する[2]、変化しない[1, 4, 5, 6, 7]など様々である。わずかに Melamedら[8]、Takashimaら[9]の報告は L-dopa 28日間投与後のラット線条体の dopa, dopamine, DOPAC(3,4-dihydroxyphenylacetic acid), HVA(homovanillic acid) を経時的に測定し、dopamine 量の減少を指摘しているが、最終投与後3時間後までのみであり、受容体についての検討はなされていない。

本研究では初期治療群と長期治療群の L-dopa 投与後の症状変動の差に対応した脳内ドパミン系の変化を検討し、長期 L-dopa 投与の影響を明ら

かにする目的で次ぎのような実験を行った。即ち、ラットに1回ないし28日間連続で L-dopa を経口投与し、投与後の血中及び線条体の dopa, dopamine 及びその代謝産物、チロシン水酸化酵素 (tyrosine hydroxylase; TH)、カテコール-o-メチル基転移酵素 (catechol-o-methyltransferase; COMT)、D1 及び D2 ドパミン受容体の総結合量、親和性を投与直後から12時間後まで経時的に測定し、1回投与群と長期投与群とで比較した。なお、第2章でパーキンソン病そのものの進行がなくても L-dopa 長期投与のみで、ドパミン系が変化する可能性を見出したことから、疾患そのものの影響を除外した上で長期 L-dopa 投与の影響を検討するために正常ラットを用いて実験を行った。

II. 方法

1. L-dopa 投与

実験動物には Wistar 系雄性ラット104匹（実験開始時：体重 195 ± 5 g）を用いた。飼育条件は、室温 $21-23^{\circ}\text{C}$ で、昼間点灯（8:00-20:00）、夜間消灯（20:00-8:00）とした。飼料は実験動物用標準飼料（オリエンタルMF）とし、飲料水とともに自由摂取させた。

L-dopa 投与群には L-dopa 25mg + benserazide 6.25mg を1ml の水に溶解し、経口投与し、対照群には水1ml を経口投与した。

ラットは長期投与群（48匹）、1回投与群（48匹）、対照群（8匹）に分け、長期投与群は28日間毎日1回 L-dopa を投与し、1回投与群は27日目までは対照群と同様にし、28日目のみに L-dopa を投与した。対照群は28日間毎日水1mlを経口投与し、最終投与後断頭した。なお、3群とも27日目の20時以降最終投与まで絶食とした。長期投与及び、1回投与群のラットは L-dopa 最終投与後0.5時間、1時間、1.5時間、3時間、6時間、12時間後に断頭した。断頭後、速やかに全脳を摘出し、氷で十分冷やした金属板上で両側線条体部を切り出し、測定まで -80°C で冷凍保存した。なお断頭時、同時に頸動脈より1ml 採血し、速やかに遠心分離した後血清は測定まで -80°C で凍結保存した。

2. 脳組織のサンプリング

線条体における部位による測定誤差を生じさせないために、ピノキュラー下 -18°C のコールドボックス内で、凍結させた線条体をナイフで $0.5 \times 0.5 \times 0.5\text{mm}$ 程度の細粒にして、良く混合した。この細粒を、dopa 代謝産物、TH 活性、及び COMT 活性測定のためにそれぞれ5mg ずつ用い、残りの線条体組織は2匹分ずつ合わせてD1及びD2ドパミン受容体結合実験に用いた。

3. 血清の dopa 及び 3-O-methyldopa (3-OMD) の測定

血清500 μ l に60%過塩素酸50 μ l を加え、良く攪拌した後、4 $^{\circ}$ C、14,000 rpm で20分間遠心した。上清を濾過した後、高速液体クロマトグラフィー (Neurochem, ESA) [10]にて dopa, 及び 3-OMD 濃度を測定した。

4. 線条体の dopa 及びその代謝産物の測定

各試料は100 μ l の0.1M 過塩素酸、0.1mM EDTA、0.4mM メタ重亜硫酸ナトリウム中で超音波細胞破壊装置 (Branson sonic power Co.) にてホモジナイズし、4 $^{\circ}$ C、14,000rpm で10分間遠心した。上清を濾過した後、血清と同様に高速液体クロマトグラフィーにて dopa, dopamine, DOPAC, HVA 濃度を測定した。

5. チロシン水酸化酵素 (TH) 活性測定

TH 活性の測定には Hendry と Iversen [12]の変法を用いた。即ち、各試料に0.1% Triton X-100 含有 5mM Tris HCl (pH 7.4) を加え、デンタルドリルを用いてホモジナイズした。ホモジネート 5 μ l に 2.4mM 6,7-dimethyltetrahydropteridine, 0.6M β -mercaptoethanol, 0.1mM tyrosine, 0.32mM [3 H] tyrosine (1.85 TBq/mmol; Amersham)を含む0.36M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 5 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C、10分間インキュベーションした後、0.2 μ g の L-dopa を含む0.4M 過塩素酸 0.1ml を加えて反応を停止させた。0.25% EDTA と 0.075M NaOH を含む 0.05M Tris 緩衝液 1.9ml を加え、pH を8.6に合わせ、アルミナカラムを通した。カラムを5mM Tris 緩衝液 (pH 8.6) 40ml で洗浄した後、1M 酢酸 1.5ml で [3 H] dopa を溶出し、その放射活性を測定した。

6. カテコール o-メチル基転移酵素 (COMT) 活性

COMT 活性の測定は Rivettらの方法[13]を用いた。即ち各試料に0.5 mM dithiothreitol を含む10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 100 μ l を加え、デンタルドリルを用いてホモジナイズした。ホモジネート10 μ l に2.5mM MgCl₂, 85 μ M S-adenosyl-L-methionine, 1mM Pargyline, 45pmol dopamine, 7.3 pmol [³H] dopamine (1.517 TBq/mmol; Amersham) 含有50mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 490 μ l を加え、37°C, 30分間インキュベートした後、0.5M potassium borate (pH 10.0) 1mlを加えて反応を停止させた。o-メチル化誘導体はトルエン、イソアミルアルコール混合液 (容量比 3:2) 5ml を加え、十分に攪拌した後、800g で5分間遠心して抽出し、有機層1ml の放射活性を測定した。

7. D 1 及び D 2 ドパミン受容体結合実験

D 1 及び D 2 ドパミン受容体結合実験には Listと Seeman[11]の変法を用いた。即ち、線条体組織 (60-70mg) に20ml の冷却蒸留水を加え、テフロンホモジナイザーにてホモジナイズ後、4°C、50,000g で20分間遠心した。沈渣を120mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂ を含有した50mM Tris HCl 緩衝液 (pH 7.4) にて懸濁した後、4°C、50,000g で20分間遠心した。さらに同一緩衝液で懸濁し、37°Cで10分間インキュベートした後、再び遠心分離し、沈渣を12ml の同一緩衝液で懸濁して膜標品とした。D 1 受容体には [³H] SCH 23390 (2.96 TBq/mmol; Amersham) (0.3-10nM) を、D 2 受容体には [³H] spiperone (2.58 TBq/mmol; Amersham)(0.025-0.8 nM) をそれぞれ標識リガンドとして用いた。標識リガンドと膜標品 (最終蛋白濃度 100-200 μ g/ml) を25°Cで60分間インキュベートした後、ガラスフィルター (Whatmann GF/B) 上で、冷却した50mM Tris HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用いて吸引濾過し、フィルター上に残った放射活性を測定した。総結合量のうち、D 1 受容体については1 μ M の SCH 23390 (Re-

search Biochemical Inc.)の、またD2受容体については10 μ Mの sulpiride (Sigma) の存在により置換された放射活性を特異的結合とした。データは Scatchard plot を用いて解析し、最大結合量 (Bmax) と見かけの解離定数 (Kd) を得た。

8. 蛋白定量

各試料の蛋白量は Lowry らの方法[14]を用いて定量した。

9. 統計学的解析

各々のデータの統計学的解析は Mann-Whitney test によった。

III. 結果

1. 血清 dopa 濃度 (図3-1A)

長期投与群のピーク濃度は1回投与群の約150%で、有意に高値を示した。時間-dopa 曲線下の面積で比較した場合でも、長期投与群の面積は1回投与群の面積の約150%であった。

2. 線条体の dopa 濃度 (図3-1B)

長期投与群の線条体 dopa 濃度の時間経過は1回投与群に比べ、はるかに急峻な変化を示した。長期投与群では、ピーク値は1回投与群の約4倍で、時間-dopa 曲線下の面積は約2.8倍であった。

3. 線条体の dopamine 濃度 (図3-2)

1回投与群では、L-dopa 投与後30分後にはまだ線条体内の dopamine 濃度の有意な上昇は認められず、30分以降に上昇し1時間後にピークとなるが、3時間後まではほぼ同程度の濃度で維持されていた。これに対し、長期投与群では投与直後から dopamine 濃度が上昇し、1時間後にピークとなりその後速やかに濃度が低下した。1回投与群の線条体内 dopamine の半減期は約3時間 (L-dopa 投与後約4時間) であるのに対して、長期投与群の半減期は約1.5時間 (L-dopa 投与後約2.5時間) であった。

4. 線条体の DOPAC 及び HVA 濃度 (図3-3A, B)

長期投与群では DOPAC 及び HVA のピーク時間が1回投与群に比べてやや早くなっていた。特に HVA ではピーク時間が早いのみならずピーク後の濃度低下も急速で、6時間後の値は1回投与群の50%以下になっており、長期投与により dopamine 代謝産物の線条体からの消失が促進されていることを示していた。また、28日間投与群の時間-DOPAC 曲線、及び時間-

HVA 曲線下の面積はいずれも1回投与群に比べて減少しており、それぞれ1回投与群の80.8%、64.6%であった。

5. 血清 3-O-methyldopa (3-OMD) 濃度 (図3-4)

1回投与群における血清3-OMDはL-dopa投与直後より濃度が上昇し、6時間後をピークとしてその後ゆっくり低下した。長期投与群では、0時間の濃度(27日間L-dopa投与後24時間後の値)が高いために濃度上昇は緩徐であるが、ピーク値は1回投与群とほぼ同じであった。

6. TH 活性及び COMT 活性 (表3-1)

TH 活性及び COMT 活性は1回投与、長期投与のいずれの群においても実験中どの時点の値も対照値と有意な差は認めなかった。

7. D1 及び D2 ドパミン受容体結合実験 (図3-5 A, B)

1回投与群ではD1受容体の最大結合量(B_{max})はL-dopa投与直後に著明な上昇を認め、3時間後にやや低下するものの12時間後まで有意な上昇を維持していた。これに対して長期投与群ではどの時点でも対照値と比較して有意な変化は認めなかった。1回投与群ではD2受容体についても軽度ながら投与直後の B_{max} の上昇を認めたが、D1受容体と異なりこの B_{max} の上昇は持続せず、投与3時間以後は対照値と有意差はなかった。長期投与群ではD2受容体においても、実験中どの時点にも対照値との有意差は見い出せなかった。なお、D1及びD2受容体の解離定数(K_d)は1回投与群、長期投与群のいずれも実験中どの時点においても対照値と有意差は認めなかった。

IV. 考察

以上の結果から、1) 脳内への L-dopa の輸送、2) 線条体におけるドパミン代謝、3) ドパミン受容体の最大結合量の3点が、長期 L-dopa 投与により影響を受けることが明らかとなった。よって、この3点について順次考察する。

まず、末梢における L-dopa の輸送については、第2章での考察を裏付ける結果を得た。即ち、長期投与群の血清 dopa 濃度は、ピーク値においても時間-dopa 曲線下の面積においても1回投与群に比較して有意に高値を示し、ドパミンニューロンの障害がなくても、長期の L-dopa 投与により小腸からの dopa の吸収が促進されることが明らかになった。

線条体においても、長期投与群では dopa 濃度のピーク値も時間-dopa 曲線下の面積も1回投与群に比較して有意に高い値を示した。さらに長期投与群と1回投与群の dopa 濃度の比率を血清と線条体で比較したところ、線条体の方がはるかに比率が高かった。これらの事実から、小腸のみならず血液脳関門においても、長期 L-dopa 投与により dopa の取り込みが促進されると考えた。dopa は小腸壁及び血液脳関門のどちらにおいても large neutral amino acid 輸送システム (Lシステム) を介して取り込まれるとされている[15,16]ことから、長期 L-dopa 投与によりLシステムが活性化されるものと考えられた。Takashima ら[9]は線条体の dopa 集積には長期 L-dopa 投与は全く影響を及ぼさないとしている。この結果の違いの原因は Takashima らは L-dopa を腹腔内投与しているのに対し、本研究では経口投与であることによると考えた。

3-OMD は L-dopa の主要代謝産物の一つであるが、血中半減期が15時間と長く[17]、また血液脳関門において dopa と同様にLシステムを介して取り込まれる[18]ことが知られている。従って、L-dopa 長期投与中に3-OMD が L-dopa の脳内への取り込みになんらかの影響を及ぼす可

能性も考えられる[19, 20]。しかしながら本研究の結果から、血中の3-OMD濃度はL-dopa長期投与後も1回投与と有意な差はなく、Nuttらの報告[21]と同様、3-OMDがL-dopaの脳内への取り込みに影響を及ぼす可能性はほとんどないと考えた。

次に線条体におけるドパミン代謝について考察する。線条体における時間-dopa曲線下の面積の長期投与群/1回投与群の比率は2.8であるのに対し、時間-dopamine曲線下の面積比は1.4と小さく、これは、長期投与群では脳内に取り込まれたdopaのdopamineへの変換が、1回投与群に比較して減少したことを示している。即ち、L-dopa長期投与により線条体におけるドパミン合成が抑制されたと考えられる。この点についてはTanakaら[22]やTakashimara[9]は長期L-dopa投与によりdopaをdopamineに変換するdopa-decarboxylase (DDC)の活性が低下することを報告しており、本研究の結果を裏付けている。一方、線条体のdopamineの半減期は長期投与群では1回投与群の約2分の1に短縮しており、さらに長期投与群ではdopamineの主要代謝産物であるDOPAC及びHVAの線条体からの消失が促進していた。これらの結果は、長期L-dopa投与が線条体のドパミン保持能力の低下とドパミン代謝の亢進をもたらすことを示唆しており、これらは“wearing-off”現象の原因になりうると考えられる。ところでFabbriniらは臨床研究から、パーキンソン病による進行性のドパミンニューロンの変性、消失の結果、脳におけるドパミンの合成、再取り込み、貯蔵の能力が低下しドパミンを保持できなくなることが“wearing-off”現象の原因であると考察している[23]。これに対して、本研究においては、疾患自体の影響を除外するために正常のラットを用いて検討して同様の結果を得ており、従って本研究の結果からはドパミンニューロンの変性がなくとも、長期L-dopa治療そのものにより線条体のドパミン保持能力は低下し得るといえる。

長期L-dopa投与により線条体のドパミン代謝が亢進することの原因と

しては次ぎの二つの可能性が考えられる。第1の可能性は長期 L-dopa 投与がドパミン代謝の主要分解酵素であるモノアミン酸化酵素 (MAO) 及び COMT を活性化することである。この点に関しては、脳内の MAO 活性は長期 L-dopa 投与により変化しないことがすでに報告されている[24]。一方、本研究により線条体の COMT 活性は長期 L-dopa 投与によりなんら影響を受けないことが示された。従って、第1の可能性は否定的である。第2の可能性は長期 L-dopa 投与がドパミン及びその代謝産物の脳内からの消失過程を促進することである。本研究の結果はこの可能性を支持しているが、消失過程の促進を直接証明することはできなかった。しかしこれについて、Peaston らは L-dopa 長期治療中のパーキンソン病の患者では L-dopa 初回投与の患者に比べて、L-dopa 投与後の尿中への dopa 代謝産物の排泄速度が促進されている傾向にあることを示しており[25]、第2の可能性を示唆している。

TH は内因性ドパミン合成の key enzyme である。TH の活性は副腎のみならず脳においても最終産物によりフィードバックコントロールを受けていることが *in vitro* の実験で報告されている[28]。このフィードバック機構は非常に有名であり、長期 L-dopa 治療において TH 活性がなんらかの影響をうけることが予想された。ところが Dairman らは、ラットに 7 日間 L-dopa (1000mg/日) を投与した後 TH 活性を測定したところ、副腎では対照の50%に低下していたが脳では変化がなかったことを報告している[29]。さらに Ponzio ら[2]や Takashima ら[9]も、長期 L-dopa 投与後に線条体の TH 活性が変化しないことを示した。本研究の結果もこれまでの報告と同様に長期 L-dopa 治療が線条体における TH 活性に影響を及ぼさないことを示唆していた。

D1 ドパミン受容体の B_{max} は、1回投与群では L-dopa 投与直後に著明な上昇を示し、その後も軽度ではあるが上昇が維持された。なおこの B_{max} の上昇は24時間後も持続しており、72時間後には消失していた(予

備実験)。D2ドパミン受容体でも軽度ではあるが一過性の B_{max} の上昇を認めた。このような受容体の“supersensitive response”は長期投与群ではD1受容体、D2受容体とも消失していた。これらの結果から、長期 L-dopa 投与後のドパミン受容体の“supersensitive response”の消失は“wearing-off”現象の原因の一つになり得ると考えた。Jenner ら [26]もその総説の中で、長期 L-dopa 投与によるドパミン受容体のなんらかの変化が“wearing-off”現象の原因の一つである可能性を指摘していたが、これを裏付ける実験はまだ報告されていなかった。その理由は、長期 L-dopa 投与後の受容体の変化についてはこれまでに多くの報告があるが[1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]、いずれも L-dopa 最終投与後1-3日後のある一時点における検討で、本研究のように臨床的に L-dopa の効果が出現していると思われる時間に経時的に検討したものがなかったためであると思われる。

ところで L-dopa の血中半減期が約1.5時間[27]であるにもかかわらず、パーキンソン病の L-dopa 治療初期においては1日2回の投与でも極めて安定した効果を得られることはよく経験される。本研究の1回投与群においてD1受容体の B_{max} の上昇が長時間(24時間以上)にわたり持続していたことは、治療初期にこのような安定した効果を得られる理由の一つと考えられる。

V. 第3章の参考文献

1. Hall MD, Cooper DR, Fleminger S, et al. Behavioural and biochemical alterations in the function of dopamine receptors following repeated administration of L-DOPA to rats. *Neuropharmacology* 1984;23:545-553
2. Ponzio F, Cimino M, Achilli G, et al. In vivo and in vitro evidence of dopaminergic system down regulation induced by chronic L-dopa. *Life Sci* 1984;34:2107-2116
3. Reches A, Wagner HR, Jiang D, Jackson V, and Farn S. The effect of chronic L-DOPA administration on supersensitive pre- and postsynaptic dopaminergic receptors in rat brain. *Life Sci* 1982;31:37-44
4. Jackson DM, Jenkins OF, Malor R, Christie MJ, and Gregory P. Chronic L-DOPA treatment of rats and mice does not change the sensitivity of post-synaptic dopamine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1983;324:271-274
5. Wilner KW, Butler IJ, Seifert WE, and Clement-Cormier YC. Biochemical alterations of dopamine receptor responses following chronic L-DOPA therapy. *Biochem Pharmacol* 1980;29:701-706
6. Pycock C, Dawbarn D, and O'Shaughnessy C. Behavioural and biochemical changes following chronic administration of L-DOPA to rats. *Eur J Pharmacol* 1982;79:201-215
7. Jenner P, and Marsden CD. Chronic pharmacological manipulation of dopamine receptors in brain. *Neuropharmacology* 1987;26:931-940
8. Melamed E, Globus M, Friedlender E, and Rosenthal J. Chronic

- L-dopa administration decreases striatal accumulation of dopamine from exogenous L-dopa in rats with intact nigro-striatal projections. *Neurology* 1983;33:950-953
9. Takashima H, Tsujihata M, Niwa M, and Nagataki S. Effects of chronic administration of L-dopa and bromocriptine on the dopaminergic metabolism in the rat striatum. *Biogenic Amines* 1987;4:15-22
 10. Svendsen CN, Froimowitz M, Hrbek C, et al. Receptor affinity, neurochemistry and behavioral characteristics of the enantiomers of thioridazine: evidence for different stereoselectivities at D1 and D2 receptors in rat brain. *Neuropharmacology* 1988;27:1117-1124
 11. List SJ, and Seeman P. Resolution of dopamine and serotonin receptor components of [³H]spiperone binding to rat brain regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:2620-2624
 12. Hendry IA, and Iversen LL. Effect of nerve growth factor and its antiserum on tyrosine hydroxylase activity in mouse superior cervical sympathetic ganglion. *Brain Research* 1971;29:159-162
 13. Rivett AJ, Eddy BJ, and Roth JA. Contribution of sulfate conjugation, deamination, and O-methylation to metabolism of dopamine and norepinephrine in human brain. *J Neurochem* 1982;39:1009-1016
 14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275
 15. Wade DN, Mearrick PT, and Morris JL. Active transport of

- L-dopa in the intestine. *Nature* 1973;242:463-465
16. Wade LA, and Katzman R. Synthetic amino acids and the nature of L-dopa transport at the blood-brain barrier. *J Neurochem* 1975;25:837-842
 17. Kuruma I, Bartholini G, Tissot R, and Pletscher A. The metabolism of L-3-O-methyldopa, a precursor of dopa in man. *Clin Pharmacol Ther* 1971;12:678-682
 18. Wade LA, and Katzman R. 3-O-methyldopa uptake and inhibition of L-dopa at the blood-brain barrier. *Life Sci* 1975;17:131-136
 19. Reches A, and Farn S. 3-O-methyldopa blocks dopa metabolism in rat corpus striatum. *Ann Neurol* 1982;12:267-271
 20. Gervas JJ, Muradas V, Bazan E, Aguado EG, and de Yebenes JG. Effects 3-OM-dopa on monoamine metabolism in rat brain. *Neurology* 1983;33:278-282
 21. Nutt JG, Woodward WR, Gancher ST, and Merrick D. 3-O-methyldopa and the response to levodopa in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1987;21:584-588
 22. Tanaka M, Oshima T, Hayashi S, Ishibashi C, and Kobayashi S. Enhancement of the pharmacological action of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) and reduction of dopa decarboxylase activity in rat liver after chronic treatment with L-DOPA. *Eur J Pharmacol* 1973;22:360-362
 23. Fabbrini G, Juncos J, Mouradian MM, Serrati C, and Chase TN. Levodopa pharmacokinetic mechanisms and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1987;21:370-376
 24. Lyles GA, and Callingham BA. Short-and long-term effects of L-dopa treatment upon monoamine oxidase: a comparative study in

- several rat tissues. Eur J Pharmacol 1980;61:363-372
25. Peaston MJT, and Bianchine JR. Metabolic studies and clinical observations during L-dopa treatment of Parkinson's disease. Br Med J 1970;1:400-403
 26. Jenner P, Boyce S, and Marsden CD. Effect of repeated L-DOPA administration on striatal dopamine receptor function in the rat. In Recent developments in Parkinson's disease, eds by Fahn S, Marsden CD, Jenner P, and Teychenne P. Raven press, New York. 1986, p.189-203
 27. Dunner D, Brodie HKH, and Goodwin FK. Plasma DOPA response to levodopa administration in man: effects of a peripheral decarboxylase inhibitor. Clin Pharmacol Ther 1971;12:212-217
 28. Nagatsu T, Levitt M, and Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. J Biol Chem 1964;239:2910-2917
 29. Dairman W, and Udenfriend S. Decrease in adrenal tyrosine hydroxylase and increase in norepinephrine synthesis in rats given L-dopa. Science 1971;171:1022-1024

表3-1 1回ないし長期 L-dopa 投与群のTH及びCOMT活性

酵素	グループ	酵素活性 (pmol/min/mg prot)			
		対照値	1.5 h	6 h	12 h
TH	1回投与群	50.5±1.33	51.7±6.17	53.3±1.33	46.8±7.83
	長期投与群	61.5±8.33	65.7±6.17	58.0±7.33	64.5±0.41
COMT	長期投与群	0.31±0.02	0.29±0.04	0.30±0.02	0.30±0.02

値はそれぞれ n = 4, mean ± SEM

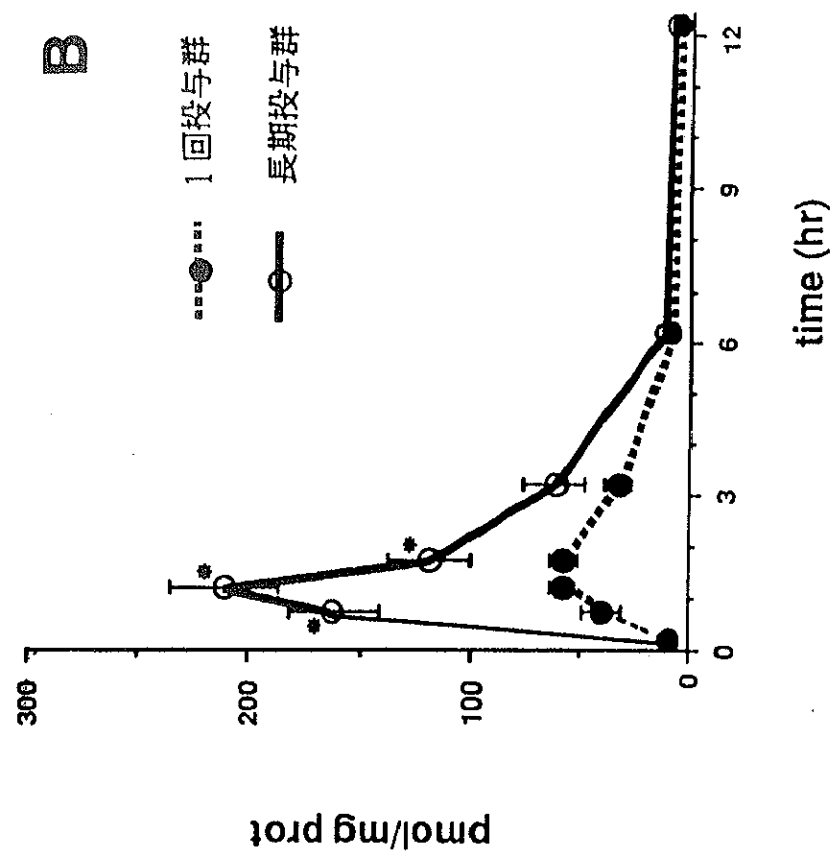
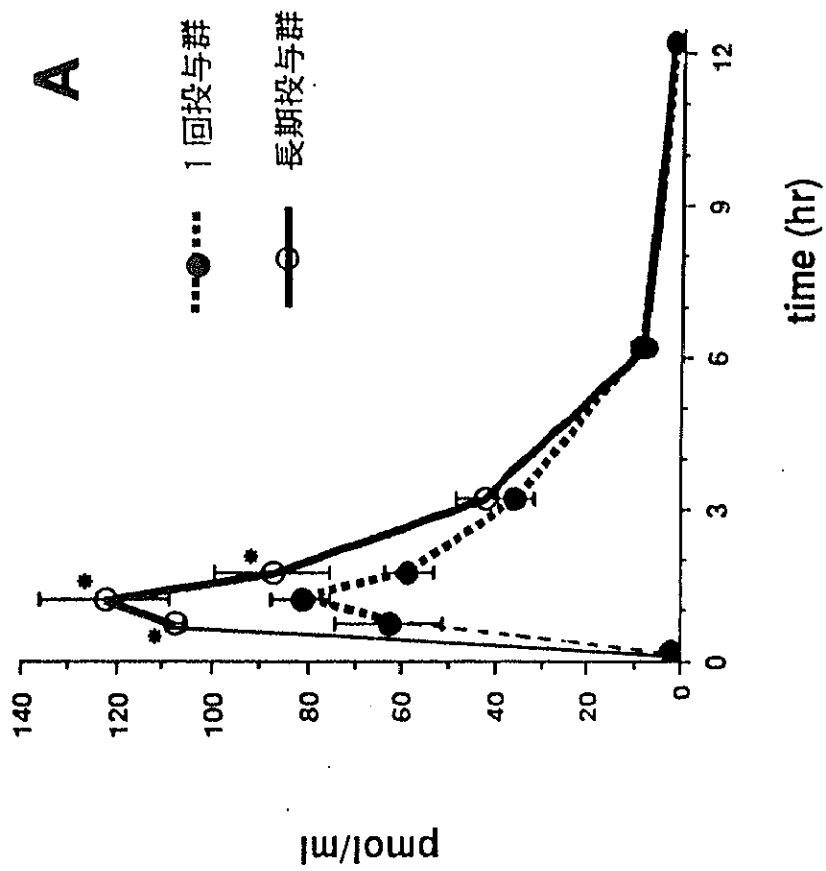


図3-1 血清 (A) 及び線条体 (B) の dopa 濃度

L-dopa 投与後の血清 (pmol/ml) 及び線条体 (pmol/mg prot) の dopa 濃度の経時的変化を示した。血清、線条体とも長期投与群では1回投与群と比較して有意に高いピーク値を示した。対照群は time 0 に示した。なお、長期投与群の time 0 は本来、27日間 L-DOPA 投与後24時間後の値であるが、この値は対照値と等しい(予備実験)ことから対照群の値と0.5時間後の値を細線で結んだ。値は平均値±SEM で示し、統計学的解析は Mann-Whitney test によった。(* = $p < 0.05$. 1回投与群の対応する時刻の値に対する長期投与群の値と比較した。)

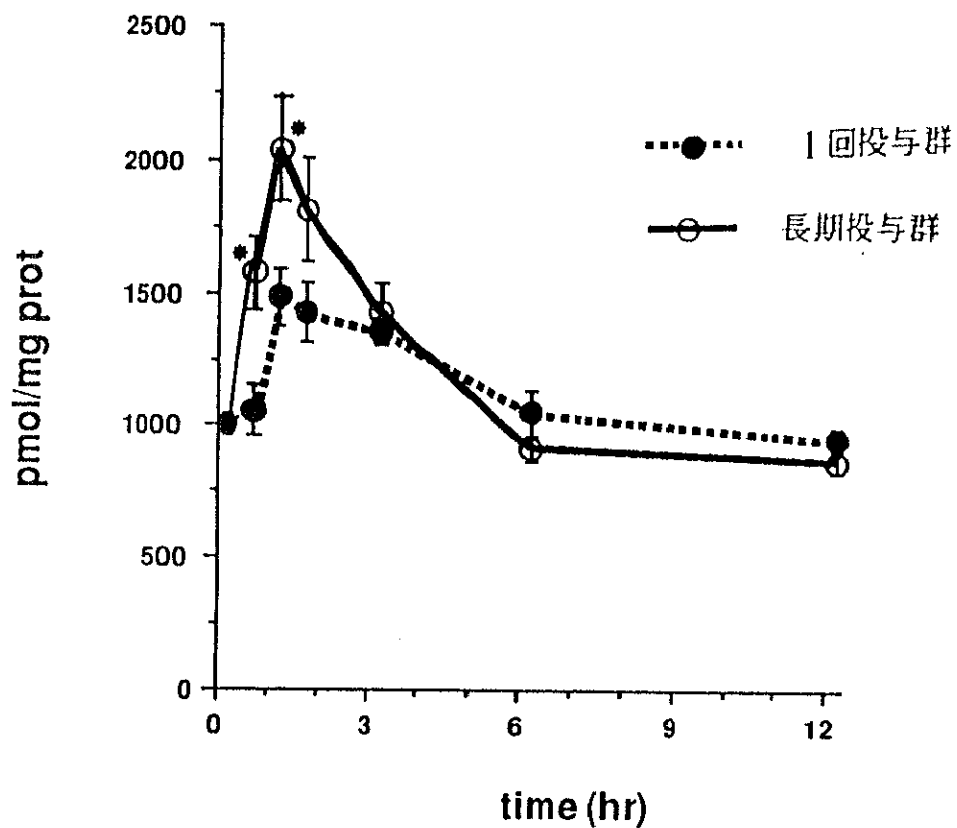


図3-2 線条体 dopamine 濃度

L-dopa 投与後の線条体 dopamine 濃度の経時的変化を示した。長期投与群では投与直後から濃度が上昇し、急峻な濃度変動を示したのに対し、1回投与群では比較的緩徐な経過を示した。その他の図の説明は図3-1参照。

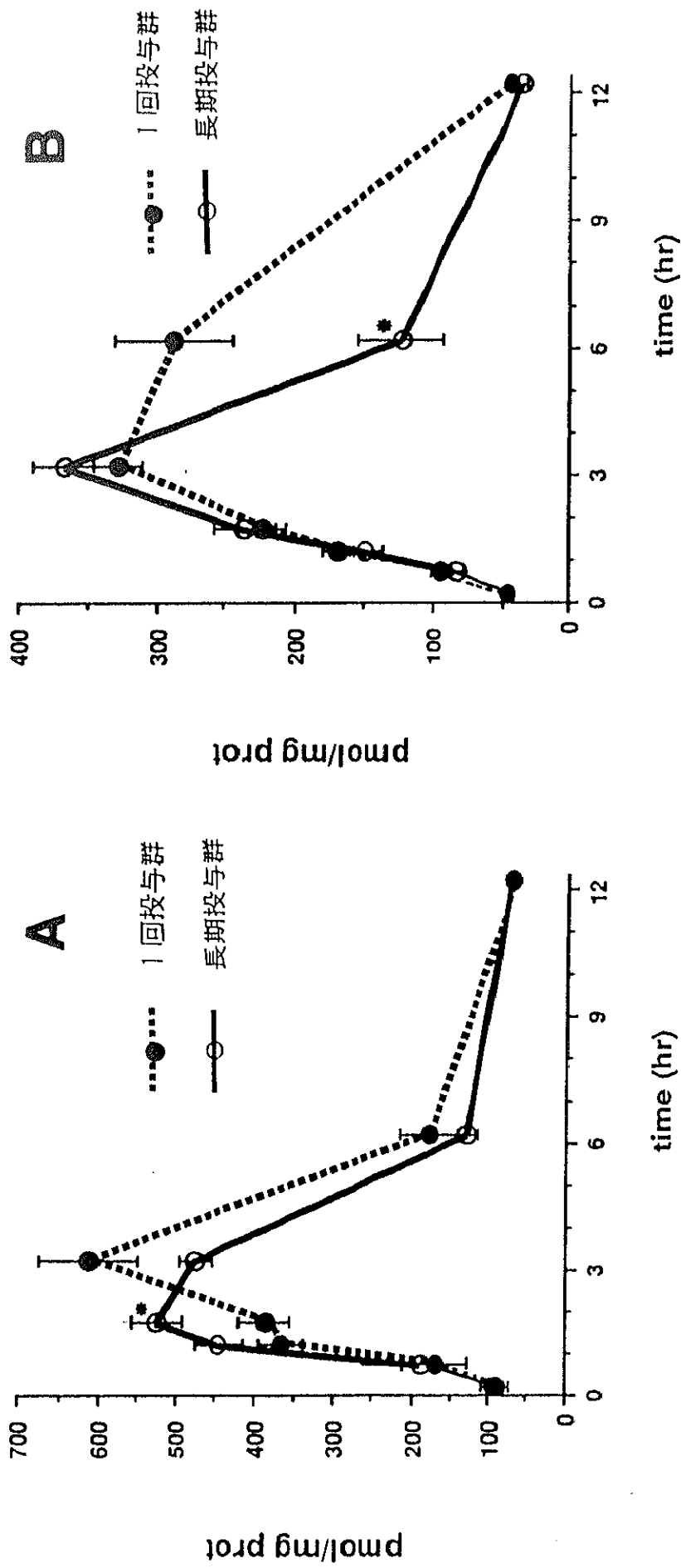


図3-3 線条体の DOPAC (A) 及び、HVA (B) 濃度

L-dopa 投与後の線条体の DOPAC, HVA 濃度の経時的変化を示した。長期投与群の時間-DOPAC 曲線は1回投与群に比較して、左方に偏倚していた。HVA はピークに達した後、1回投与群では比較的緩徐に濃度が低下したのに対し、長期投与群では急速に低下した。その他の図の説明は図3-1参照。

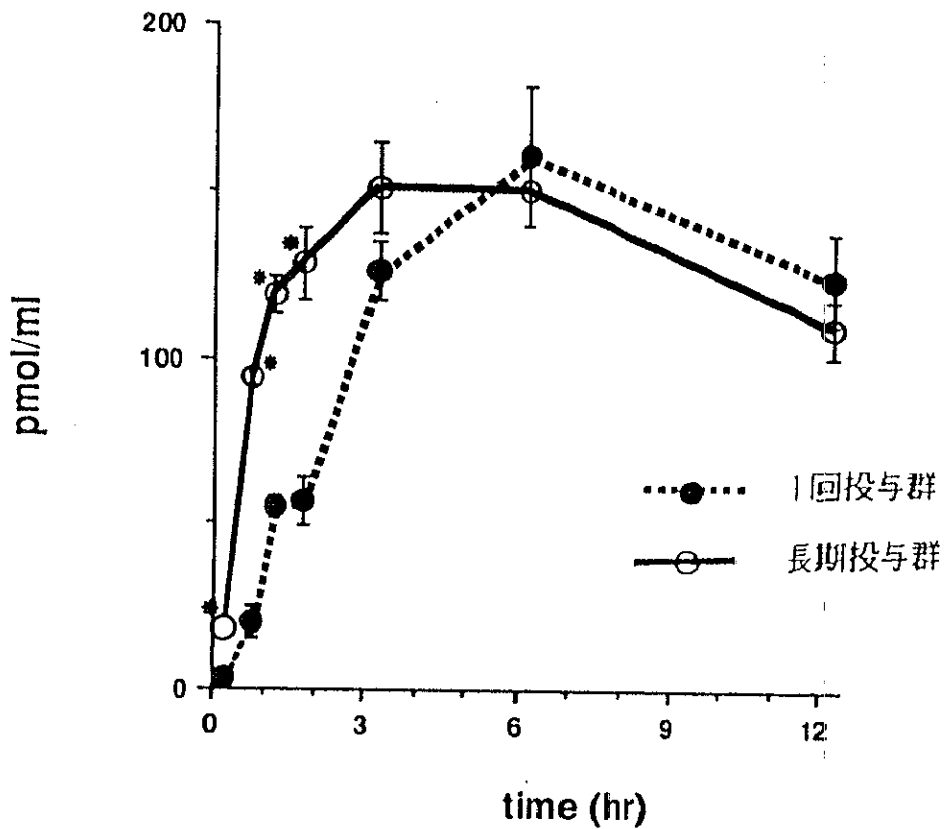


図3-4 血清3-O-methyldopa (3-OMD) 濃度

L-dopa 投与後の血清3-OMD濃度の経時的変化を示した。長期投与群のピーク値と1回投与群のピーク値に有意な差は認めなかった。長期投与群のtime 0 値は最終投与後24時間後の値(予備実験)を用いた。その他の図の説明は図3-1 参照。

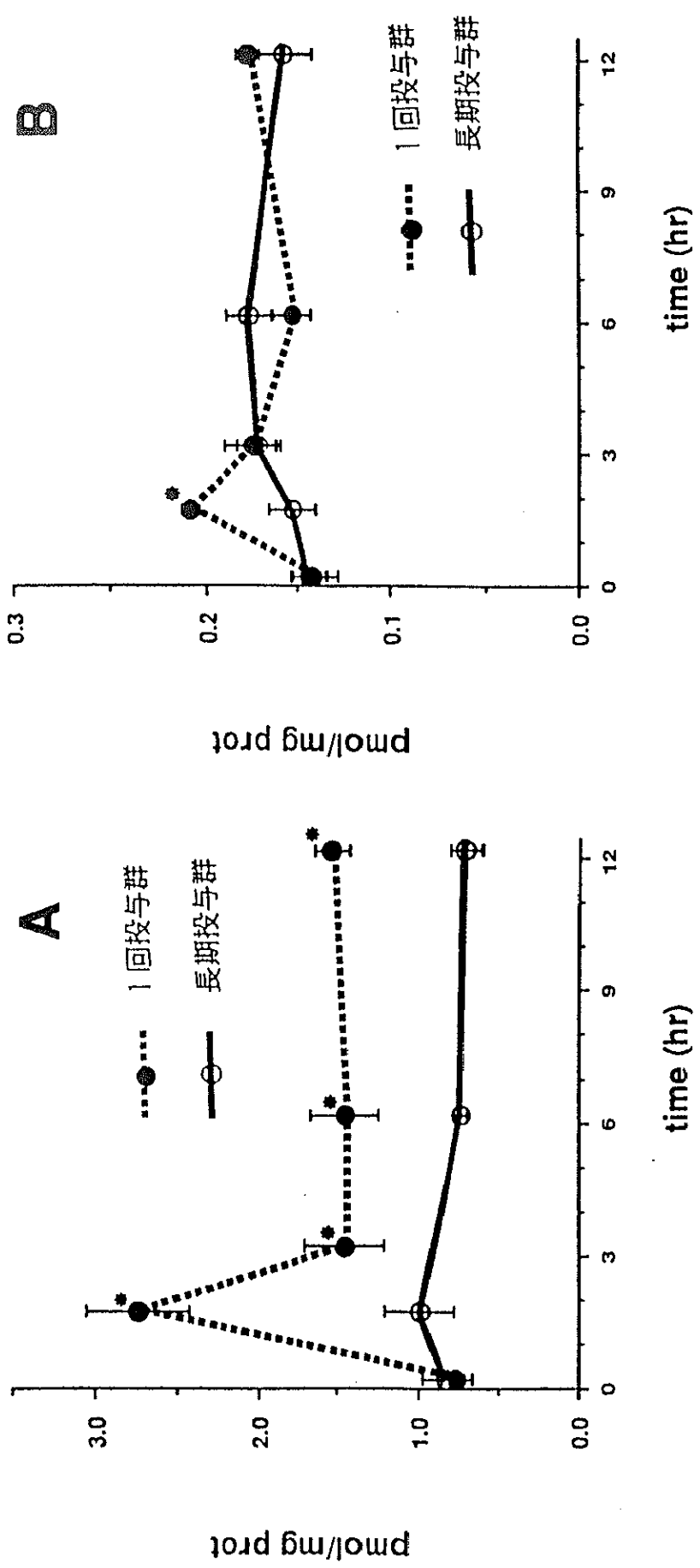


図3-5 D1 (A) 及びD2 (B) ドパミン受容体の総結合量 (B_{max})
 L-dopa 投与後のドパミン受容体のB_{max}を示した。対照群は time 0 に示した。D1受容体では1回投与群で投与直後の著明な上昇とその後軽度ながら持続するB_{max}の上昇を認め、D2受容体では投与直後のみに軽度ながら有意なB_{max}の上昇を認めた。これらの変化は長期投与群ではいずれも消失していた。値は平均値±SEMで示し、各値と対照値との間でMann-Whitney testを用いて、統計学的解析を行った。 (* = p < 0.05)

第 4 章

ドパミン受容体の

“supersensitive response”についての

Northern blotting hybridization

による検討

I. はじめに

第3章でドパミン受容体の最大結合量 (B_{max}) が L-dopa 1回投与後 1.5時間後に増加し、3時間後にはかなり減少することを示した。これにより、ドパミン受容体においては予想外に早い速度でその B_{max} (受容体の数を示すと解釈されている[1]) が変化することが明らかになった。神経伝達物質による受容体の調節機構については、ある一定期間薬物を投与し、最終投与後1-数日後の受容体結合実験の結果から、高濃度の神経伝達物質が作用すると受容体の数が減少する (down-regulation) ことが知られていた[2]。しかし、意外にもこれまで薬物投与直後の受容体の結合能は調べられておらず、受容体がこのように速いタイムスケールでしかも一過性ではあるが “supersensitive response” と呼ぶべき変化を示すことは、知られていなかった。今回得られた L-dopa 投与後のドパミン受容体の B_{max} の増加の機構としては、1) 転写の活性化による新たな受容体蛋白合成の増加、2) 転写後の変化—例えば、すでに合成された「結合能を持たない形で貯蔵されている」受容体があり、これがドパミン刺激を受けることにより活性化され、「活性型」とも言うべき結合能を持つ受容体に変化すること—が考えられる。

ところで、刺激を受けてから蛋白質が合成されるまでの時間は、一般的には例えば、IEG (immediate early gene)[3]と呼ばれる c-fos などは刺激を受けてから数分以内に転写が活性化され[4]、30分以内には蛋白質として存在することが知られている[5]。しかも c-fos mRNA は、実験系により異なるが、刺激を受けた後1-2時間で消失するとされている[4, 6]。しかしながら、このように速い変化を示す蛋白質はむしろ稀であり、多くはより緩徐な変動を示すものと考えられていた。従って著者も当初、このドパミン受容体の B_{max} の変化について「転写後の変化」による可能性が高いと考えていた。

ところが、1988年にD2ドパミン受容体[7]が、さらに1990年にはD1ドパミン受容体[8, 9, 10]のクローニングがなされ、実際にmRNA量を測定することが可能となった。そこで著者は、D1及びD2ドパミン受容体のシーケンスの一部をプローブとして、ラット線条体で Northern blotting hybridization を行い、L-dopa 投与後のドパミン受容体の “supersensitive response” に対する転写機構の関与を検討した。

II. 方法

1. 実験動物

Wistar 系雄性ラット(体重250-300mg) 56匹に L-DOPA 25mg+benserazide 6.25mg を1ml の水に溶解し、経口投与した。投与後0.5時間, 1時間, 1.5時間, 2時間, 3時間, 6時間, 9時間, 12時間後(各群 n=7) に断頭した。対照群(n=7)には水のみ1ml を経口投与し、投与後断頭した。断頭後、速やかに全脳を摘出し、氷で十分冷却した金属板上で両側線条体を切り出した。

2. RNA 抽出

RNA の抽出は Auffray C. と Rougeon F. の方法[11]によった。即ち、摘出した線条体は3M LiCl, 6M urea 1ml 中でマイクロホモジナイザー(Tokai Co.)にて0°Cで2分間ホモジナイズした。ホモジネイトは氷上に一昼夜静置した後、0°C、16,000rpm で30分間遠心し、沈渣に3M LiCl, 6M urea 1ml を加え、良く攪拌した後、同様に遠心した。さらに沈渣に0.5% sodium dodecyl sulfate(SDS), 1mM EDTA 含有10mM Tris HCl(pH 7.4)0.4 ml を加え、20°C、16,000rpm で2分間遠心した。上清に phenol/chloroform/isoamylalcohol (25/24/1;v/v/v) 0.4ml を加え、良く攪拌した後、20°C、16,000rpm で2分間遠心し、この操作を 3回繰り返した。最終遠心

後、水層に3M sodium acetate 50 μ l, 冷却エタノール 1ml を加え、 -80°C に1時間静置した後、 4°C , 16,000rpm 30分間遠心しこの沈渣を60 μ lの 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 7.4) に溶解した。

3. Northern blotting hybridization

プローブとして、D1 ドパミン受容体については下記の3種類のアンチセンスオリゴヌクレオチド (5'-CAGGAAACAGGCCGTGAGGATGCGAAAGGAGAAATCCCTCTCGGC-3', 5'-CAGGGAGGTAATAATTGCCATCCAAGGCCCATGTGGGCTTTGCCTT-3', 5'-GTGTGTGACAGGTTGGATCTTTTCTAGAGAGACATCGGTGTCATA-3') の混合液 (農林水産省生物資源研究所に合成依頼) を、D2 ドパミン受容体については NEP-569 Dopamine D2 Receptor Mixture (Rat)(NEN) を用いた。また、対照として、 β アクチンオリゴプローブ (NEN) を用いた。それぞれのプローブは terminal deoxynucleotidyl transferase (宝酒造) を用いて 3'末端標識法で [^{32}P] dATP ($>3000\text{Ci}/\text{mmol}$; Amersham) にて標識した。1%アガロース・ホルムアルデヒドゲルに各レーンにRNA 2 μg ずつをのせ、電気泳動した後、ナイロン膜 (Hybond N⁺; Amersham) にブロッティングした。ナイロン膜はハイブリダイゼーション液 (0.5M Na-P 緩衝液 (pH 7.2), 7% SDS, 1mM EDTA, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Herring sperm DNA) 中で 65°C で3時間プレハイブリダイゼーションを行い、その後、標識したD1 ドパミン受容体のプローブを加えたハイブリダイゼーション液と交換し、 65°C , 16時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、0.5% SDS 含有 2XSSC (SSC; standard saline citrate) 中で室温で10分、2回、その後 55°C で15分洗い、 -80°C で48時間、増感紙とともにX線フィルムに暴露した。

フィルム現像後、ナイロン膜を沸騰させた0.1% SDS 含有0.1XSSC 中で洗浄し、結合したプローブを剥離し、D2, 次いで β アクチンのプローブを用いて、同様に再度ハイブリダイゼーションを行った。

デンシトメトリーはコンピューター画像解析装置 (Macintosh, NIH image) を用いて行い、 β アクチンの mRNA 量で修正した上で、各時刻の mRNA 量とした。

統計学的解析は two sample t test を用いた。

III. 結果

図4-1にラット線条体における D1 及び、D2 ドパミン受容体の Northern blotting hybridization のオートラジオグラムを示し、各時刻の mRNA 量を同一オートラジオグラム上の対照値に対するパーセントで、表4に示した。なお、第3章の実験で得られた L-dopa 1回投与群の線条体の dopamine 及びその代謝産物の含量と受容体の B_{max} の経時的変化を mRNA 量の変化との関係を示すために同時に図4-2に示した。D1 mRNA 量は L-dopa 投与直後の 0.5時間後に $130.7 \pm 5.6 \%$ ($p < 0.05$) と有意な上昇を示し、1時間後には減少し対照値にもどるが、2時間後に $119.5 \pm 5.8 \%$ ($p < 0.1$) と再び上昇の傾向を示した。一方、D2 mRNA 量は L-dopa 投与 0.5時間後のみに $119.3 \pm 12.6 \%$ と統計学的に有意差は認めないものの上昇の傾向を示した。

IV. 考察

この結果はドパミン受容体遺伝子は、ドパミンによる刺激を受けてから30分以内に転写機構が活性化され、1時間後にはすでに平常状態にもどっていることを示しており、これはドパミン受容体 mRNA が c-fos mRNA に比肩する極めて速いタイムスケールで発現量の調節がなされたことを意味している。L-dopa 投与後 0.5時間後の dopamine 含量は対照値と有意差はないが、dopamine の代謝産物である DOPAC, HVA が同時

刻にすでに増加していることからシナプス間隙への dopamine 放出はすでに増加して、受容体への有効刺激となっていたと考えられる。

これまで薬物投与後のドパミン受容体の mRNA 量の変化については、次の2つの報告があるのみである。即ち、van Tol ら[12]はラットに raclopride, haloperidol をそれぞれ21日間腹腔内投与し、D₂ B_{max} の上昇を確かめたが、D₂ mRNA 量には変化がなかったと報告している。一方、Rogue ら[13]は同じくラットに15日間 haloperidol, sulpiride を腹腔内投与し、いずれも D₂ B_{max} とともに D₂ mRNA 量が有意に上昇したとし、ドパミン受容体の結合量の変化に転写過程が重要な役割を果たしていると報告している。また、6-hydroxydopamine による線条体の除神経後の、D₂ 受容体の B_{max} の上昇時にも D₂ mRNA 量が増加していることが報告されている[14]。しかしながらこれらはいずれも、数日単位の長いタイムスケールでの mRNA 量の変化である。さらに、神経伝達物質の受容体としては比較的研究の進んでいるアセチルコリン受容体 (AChR) についても、Merlie ら[15]が骨格筋表面で坐骨神経切断後1日目からわずかながら AChR mRNA の増加があり、3日後には100倍に増加していることを報告しているのみで、今回明らかになったような、受容体 mRNA 量の速い変化についての記載はない。しかし、従来知られていないような1回毎の薬物投与に対しては、除神経や長期刺激に対する対応とは別の、より早いタイムスケールでの調節機構が存在する可能性は十分に考えられる。

本研究により、第3章で示したドパミン受容体の B_{max} の増加に、転写機構が関与することが明らかになった。L-dopa 投与後3時間後以降は mRNA 量の増加は認めていないので、12時間後まで持続する D₁ ドパミン受容体の B_{max} の上昇には「転写後の変化」が関与しているものと考えた。この L-dopa 投与直後の著明な B_{max} の上昇において、転写機構の活性化と転写後の調節のどちらが主であるのかはこの実験系からは不明で

ある。しかしながら、このような早い B_{\max} の変化に転写レベルが関与しているという事実は重要であろう。

また、D2 mRNA 量の変化がD1に比較して明らかでなかったことについては、mRNAレベルに変化が生じるためにはある程度以上 B_{\max} が変化するような強い刺激が必要であるとされている[13]ことから、D2の B_{\max} の変化がD1に比較して少ないことがその理由の一つと考えられる。一方、D1受容体遺伝子とD2受容体遺伝子の1次構造の最も大きい違いの一つは細胞内第3ループの長さであり、この部分は受容体の感受性にかかわる部位とされ[16]、 B_{\max} の調節に影響する可能性が示唆されている[17]。このことから、D1とD2が全く異なる転写制御機構に基づいて B_{\max} を変化させている可能性も考えられよう。

V. 第4章の参考文献

1. 広瀬由紀子 Radiolabeled receptor assay の解析法. 脳のレセプター - 小川紀雄 編, 世界保健通信社, 大阪, 1986, p30-41
2. Ogawa N, Mizuno S, Nukina I, Tsukamoto S, and Mori A. Chronic thyrotropin releasing hormone (TRH) administration on TRH receptors and muscarinic cholinergic receptors in CNS. *Brain Res* 1983;263:348-350
3. Sheng M, and Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 1990;4:477-485
4. Greenberg ME, and Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 1984;311:433-438
5. Kruijer W, Cooper JA, Hunter T, and Verma IM. Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fos gene and protein. *Nature* 1984;312:711-716
6. Greenberg ME, Greene LA, and Ziff EB. Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J Biol Chem* 1985;260:14101-14110
7. Bunzow JR, Van Tol HHM, Grandy DK, et al. Cloning and expression of a rat D₂ dopamine receptor cDNA. *Nature* 1988;336:783-787
8. Dearth A, Gingrich JA, Falardeau P, et al. Molecular cloning and expression of the gene for a human D₁ dopamine receptor. *Nature* 1990;347:72-76

9. Zhou Q, Grandy DK, Thambi L, et al. Cloning and expression of human and rat D₁ dopamine receptors. *Nature* 1990;347:76-80
10. Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM, et al. Human dopamine D₁ receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* 1990;347:80-83
11. Auffray C, and Rougeon F. Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur J Biochem* 1980;107:303-314
12. van Tol HHM, Riva M, Civelli O, and Creese I. Lack of effect of chronic dopamine receptor blockade on D₂ dopamine receptor mRNA level. *Neurosci Lett* 1990;111:303-308
13. Rogue P, Hanauer A, Zwiller J, Malviya AN, and Vincendon G. Up-regulation of dopamine D₂ receptor mRNA in rat striatum by chronic neuroleptic treatment. *Eur J Pharmacol* 1991;207:165-168
14. Neve KA, Neve RL, Fidal S, Janowsky A, and Higgins GA. Increased abundance of alternatively spliced forms of D₂ dopamine receptor mRNA after denervation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2802-2806
15. Merlie JP, Isenberg KE, Russell SD, and Sanes JR. Denervation supersensitivity in skeletal muscle: analysis with a cloned cDNA probe. *J Cell Biol* 1984;99:332-335
16. Lefkowitz RJ, and Caron MG. Adrenergic receptors : models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J Biol Chem* 1988;263:4993-4996
17. Strange PG. Aspects of the structure of the D₂ dopamine receptor. *TINS* 1990;13:373-378

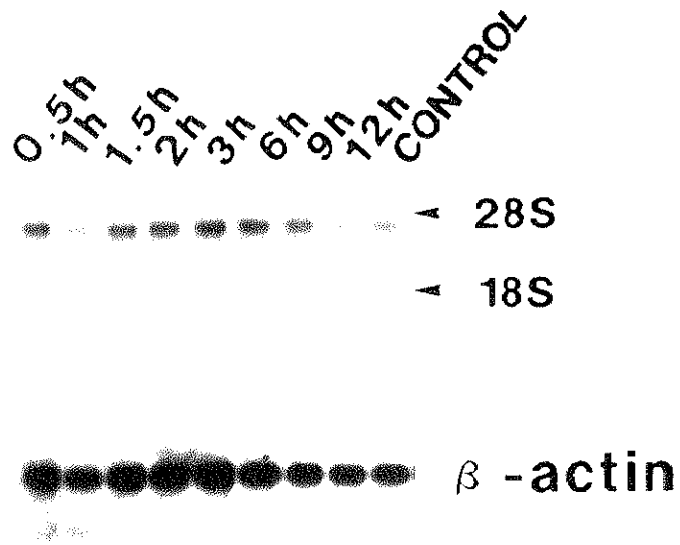
表4-1 L-dopa 投与後のD1及びD2 mRNA量の経時的変化

L-dopa 投与後時間		1h	1.5h	2h	3h	6h	9h	12h
D1mRNA量 (%control)	130.7±5.6*	94.4±10.1	91.3±6.0	119.5±5.8*	102.8±8.1	105.9±10.5	100.8±12.9	90.7±7.5
D2mRNA量 (%control)	119.3±12.6	110.0±19.5	104.8±5.5	109.5±11.5	101.3±7.4	98.7±10.6	93.9±14.4	89.6±10.3

(n=7, mean + SEM)

(* = p < 0.05, * = p < 0.1, vs control, two sample t test)

D1 mRNA



D2 mRNA

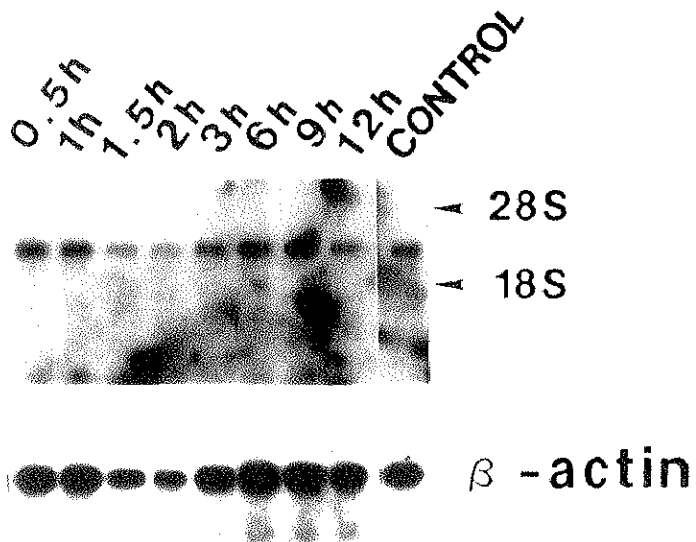


図4-1 L-dopa投与後のD1（上段）及びD2（下段）mRNA量の変化

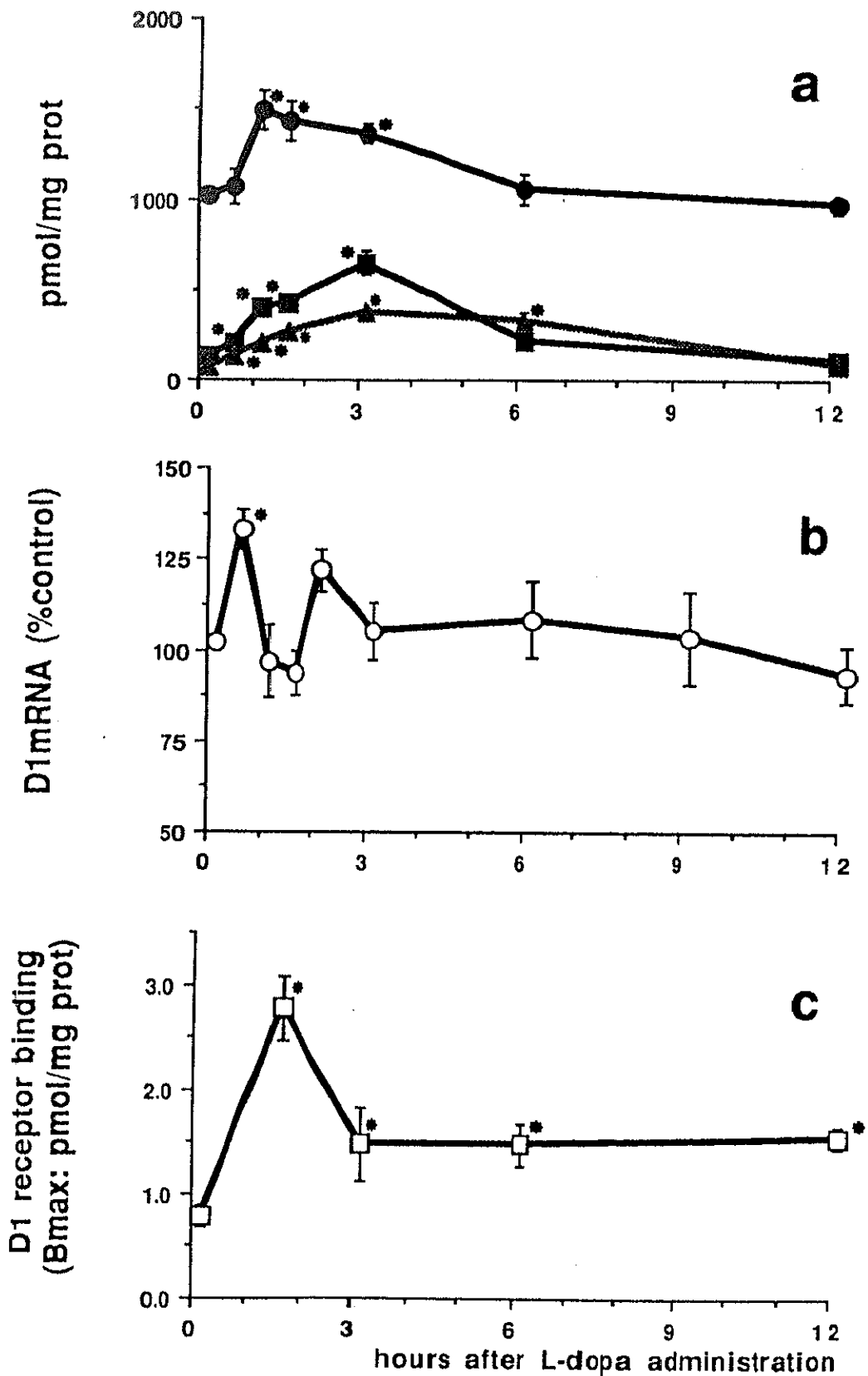


図4-2A L-dopa投与後の線条体 dopamine, DOPAC, HVA 含量 (a) D1mRNA量 (b), D1受容体 B_{max} (c)の経時変化 dopamine ● DOPAC ■ HVA ▲ で示した。時刻0で示した対照値とそれぞれの時刻の値をmRNA量については two sample t test で、その他については Mann-Whitney test で検定した。(* = $p < 0.05$)

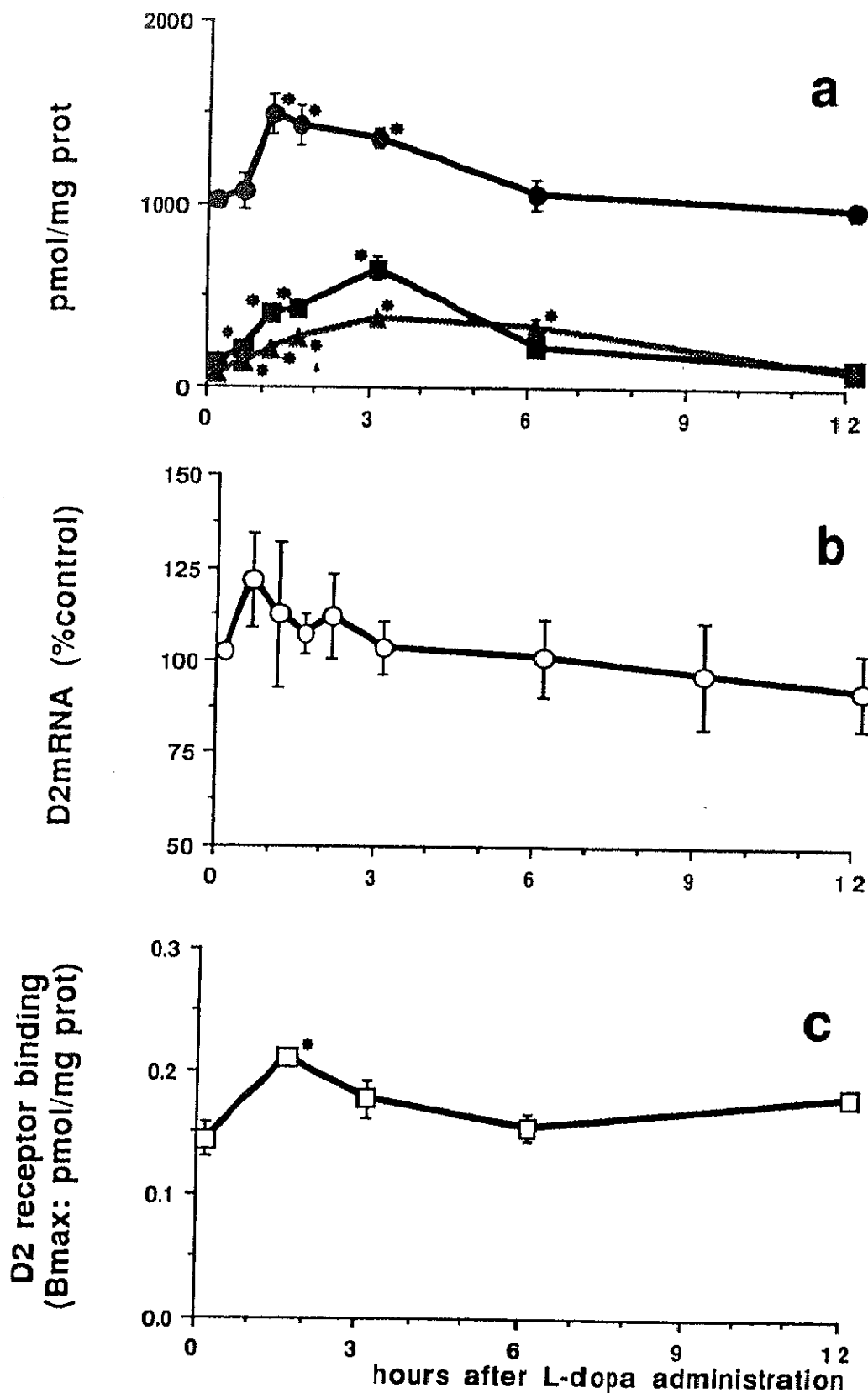


図4-2B L-dopa投与後の線条体 dopamine, DOPAC, HVA 含量 (a) D2mRNA量 (b), D2受容体B_{max} (c)の経時変化
dopamine ● DOPAC ■ HVA ▲ で示した。時刻0で示した対照値とそれぞれの時刻の値をmRNA量については two sample t test で、その他については Mann-Whitney test で検定した。(* = p < 0.05)

終章

パーキンソン病は50才前後に発症し、固縮、振戦、無動、姿勢調節障害を4大徴候とする神経変性疾患である。黒質線条体ニューロンの変性によりドパミン合成が障害され、線条体において神経伝達物質であるドパミンが欠乏することがこの疾患の原因である。神経変性疾患のなかでは比較的病態の解明が進んでいる疾患の一つではあるが、まだまだ解決すべき問題が山積している。これに対し1980年初頭の MPTP によりパーキンソニズムが発症したという報告は、パーキンソン病の研究に大きな波紋を投げかけた。MPTP によるパーキンソニズムはあくまでもモデルであってパーキンソン病そのものではないが、これを用いた精力的な研究により本疾患の病態の解明が進んでおり、現在は内因性の MPTP 様物質や、これに関連して内因性のパーキンソン病発症の抑制因子についての研究も進んでいる。さらに1990年代に入り、分子生物学の目覚ましい発展の中でドパミン受容体のクローニングが相次ぎ、これまで結合能でしかわからなかった受容体が分子として扱える時代になった。

このような時代のなかで治療については、ドパミンの前駆物質で、血液脳関門を通過可能な L-dopa を投与することによりドパミンを補充する、L-dopa 療法の確立により、パーキンソン病患者の日常生活、予後は劇的に改善した。しかし、このドパミン補充は一生必要であるために治療が長期になるにつれ、様々な問題点が出現してきた。なかでも L-dopa の薬効時間の短縮によりパーキンソン症状の日内変動が生じる“wearing-off”現象は頻度も多く、患者にとっての日常生活の障害も大きく、対策に苦慮する重要な問題である。

著者はこの“wearing-off”現象の原因を探り、治療に結び付けるために、まず臨床的なアプローチを試みた。即ち、パーキンソン病の患者で血漿 L-dopa 濃度の変動を測定し、長期間の L-dopa 投与により小腸からの L-dopa 吸収が促進され、血漿濃度変動パターンが変化することが、

“wearing-off”現象の原因の一つであると考えた。また、食事が L-dopa

血漿濃度変動に大きい影響を与えることを示した。さらに個々の患者について L-dopa 濃度と症状の関係を検討することにより、その患者にとっての治療閾値、ジスキネジア出現閾値を見出した。その結果、より安定した血漿濃度を保てるよう投与量、方法を変更することにより、症状を安定化し患者の日常生活を改善することができた。

長期 L-dopa 投与のドパミン代謝に対する影響は、臨床的に知ることができた末梢での変化のみならず、中枢にも及ぼされている可能性が高い。これを明らかにするためにラットに28日間、L-dopa を経口投与し、臨床的に L-dopa の効果が出現していると思われる投与直後0.5時間から12時間後までについて線条体内のドパ、ドパミン及びその代謝産物の含量、チロシン水酸化酵素、カテコール-O-メチル基転移酵素の活性、D1 及びD2 ドパミン受容体の結合能を測定し、これを L-dopa 1 回投与のものと比較することにより、L-dopa 長期投与が脳内ドパミン系に及ぼす影響を検討した。その結果、長期 L-dopa 投与により、1) L-dopa の血液脳関門における脳内への取り込みが促進される、2) 線条体内でのドパミン及びその代謝産物の wash out が促進される、3) L-dopa 投与により出現した“supersensitive response”が長期投与により消失する、ことを見出した。これらはいずれも“wearing-off”現象の原因となり得る現象である。ドパミンニューロンが保たれていても、L-dopa 長期投与そのものでこのような末梢及び中枢のドパミン系の変化が起こり、“wearing-off”現象が出現してくるものと考えられた。

ところで一般に、長期に大量に神経伝達物質が供給されると受容体はその数を減らす (down regulation) ことが知られている。しかしながらこれはかなりゆっくりしたタイムスケールの調節で、本研究で示されたような神経伝達物質投与によるごく早い一過性の受容体数 (B_{max}) の変化はこれまでには知られていなかった。このような変化が転写機構を介しているのかどうかを知るために、L-dopa 投与後のD1 及びD2 mRNAの経

時的变化を Northern blotting hybridization 法を用いて検討した。その結果、D 1 m R N A は L-dopa 投与後 0.5時間後にすでに有意に上昇し、しかも1時間後には対照値に戻るといふ、きわめて早い変動を示した。D 2 m R N A も同様の傾向を認めた。これまで受容体の変化については除神経、ないしは長期の刺激後の結果をみている報告がほとんどであるために、受容体 m R N A がこのように早い速度で変化するという報告はない。しかし1回の薬物投与時には、除神経や長期刺激に対する対応とは別の、より早いタイムスケールの調節機構が存在する可能性は十分に考えられる。

今回示した B max の変化について転写機構の活性化によるものと転写後の調節のどちらが主であったのかは、この実験系からは不明である。しかしながら受容体のこのような早い B max の変化に転写レベルが関与しているという事実は重要であると考えた。

謝 辞

ここに稿を終えるに臨み、終始たゆまぬ御指導と御鞭撻を賜った筑波大学臨床医学系神経内科 金澤一郎教授（現 東京大学脳研神経内科）に心から感謝の意を表します。

本研究は数多くの方々の著者に対する御指導と御援助なくしてはなしえなかったものです。とくに Northern blotting hybridization 法を御教授下さった筑波大学医科学修士 岡野 清氏（現 東レ基礎研究所）に深く感謝いたします。また、受容体結合実験に御助力いただいた筑波大学医科学修士 米田健治氏（現 日本ハイボックス）、さらに L-dopa 濃度測定に御協力下さった筑波大学付属病院レジデントの皆様に感謝いたします。

また、著者の研究に対し、終始御指導と御助力を賜った筑波大学基礎医学系 漆谷徹郎講師に深く感謝いたします。

最後に日常の研究の多方面にわたり御援助下さった筑波大学医学系研究協力課 新里寿美子技官に深く感謝いたします。

筑波大学附属図書館



1 00950 03807 5

本学関係