

# 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) を用いたパーキンソニズム・モデルマウスにおける脳内神経ペプチドに関する研究

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門 (指導: 森 昭胤教授)

河 田 牧 男

(平成 2 年 11 月 13 日受稿)

**Key words :** MPTP, parkinsonism, neuropeptide, somatostatin, levodopa, dementia

## 緒 言

従来は、ヒトの特発性パーキンソン病に相当する動物実験モデルを作成することは困難であるとされてきたが、1-methy-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) が特発性パーキンソン病と酷似した生化学的、病理組織学的、治療反応的な病態をヒトに惹起することが明らかにされてから<sup>1)</sup>、サルを用いた実験的パーキンソニズムの研究が始まった<sup>2)3)4)5)6)</sup>。

当初、MPTP は、ヒトやサル以外の下等動物にはパーキンソニズムを惹起できないとされていたが<sup>7)8)</sup>、その後、マウスで生化学的にパーキンソニズムに相当する変化をもたらすことが明らかにされ<sup>9)10)</sup>、小動物に MPTP を投与する生化学的パーキンソニズム・モデルの研究も盛んになっている。小動物の中でも、ラットやモルモットでは MPTP によってパーキンソニズムが生じにくいとされているが、*in vitro* の生化学的実験には、ラットの脳もしばしば用いられている。

本研究においては、マウスを用いて MPTP 投与後のドーパミン、ノルアドレナリンの変化を経時的に追及するとともに、アミン蛍光組織化学的検討も行い、加えて MPTP 投与マウスの行動薬理学的な検討も行った。その上で、この MPTP 投与を受けたマウスの脳内の神経ペプチドが経時的にどのように変化するかを検討し、さらに、それらの変化に及ぼす levodopa 投与

の影響を検討したので報告する。

## 材 料 と 方 法

### 1. 材 料

MPTP は、Research Biochemicals, Inc. (MA, USA) より、somatostatin (SOM), substance P (SP), cholecystokinin-octapeptide (CCK-8), thyrotropin releasing hormone (TRH) は、Protein Research Foundation (Osaka, Japan) より購入した。また <sup>125</sup>I-SP, <sup>125</sup>I-CCK-8, <sup>125</sup>I- [Tyr<sup>1</sup>]-SOM は Amersham 社より、<sup>125</sup>I-TRH は New England Nuclear 社より、それぞれ購入した。

### 2. 動物と処置

実験動物として、体重 22 g の雄性 C57BL マウスを用いた。MPTP 30mg/kg を 1 日 2 回、5 日間、腹腔内注射し<sup>11)</sup>、注射終了 1 週間後、2 週間後および 6 週間後に、マウス頭部をマイクロウェーブ照射 (3 kW, 0.2 秒) で固定し、脳を取り出して 7 部位に分けた<sup>12)</sup>。levodopa 投与の影響は、MPTP 注射終了後 4 週間を経た後、levodopa (200mg/kg) 腹腔内投与を 1 日 1 回 14 日間続け、その最終 levodopa 注射の 24 時間後、すなわち MPTP 注射終了 6 週後に脳を摘出し、同じく脳を 7 部位に分けた<sup>12)</sup>。

### 3. モノアミンの定量

コントロール・マウスおよび MPTP 注射終了 1, 2, 6 週後のマウス頭部をマイクロウェーブ照射 (3 kW, 0.2 秒) により固定し、脳を

Glowinski と Iversen の方法<sup>12)</sup>に従って7部位に分けた。ドーパミン (DA) とノルアドレナリン (NA) の影響は、Murayama らの方法<sup>13)</sup>に従って HPLC で定量した。

#### 4. 神経ペプチドの抽出

神経ペプチドの測定のためには、上記と同様の時期にマウスをそれぞれ断頭し、同様に脳を取り出して7部位に分けた<sup>12)</sup>。それぞれの脳部位は10倍容量の氷冷した酸・エタノール (0.1 N 塩酸:エタノール=1:1) の中でホモゲナイズし、12,000×g で20分間遠心し、その上清を窒素ガス下で乾固した<sup>14)</sup>。この乾燥した抽出物を radioimmunoassay (RIA) 用緩衝液、すなわち 0.14 M リン酸緩衝液 (2 mM EDTA, 0.5% 牛血清アルブミンを含む, pH 7.4) によって再溶解し、これを RIA 用のサンプルとして用い、神経ペプチドを定量した。

#### 5. Radioimmunoassay (RIA)

4種類の神経ペプチド、SOM, SP, CCK-8, TRH を特異的な RIA 法で測定した。合成 SOM, SP, CCK-8 に対する特異的な家兎抗血清は、 $\beta$ -endorphin に対する抗血清の作成と同様の方法<sup>15)</sup>、それぞれの神経ペプチドと牛血清アルブミンとを結合させて作成した。また、抗 TRH 家兎血清は、同じく TRH に特異的なものである<sup>16)</sup>。

SOM の濃度はすでに報告された RIA 法にほぼ準じて行った<sup>17)</sup>。すなわち、最終希釈150,000倍の抗 SOM 家兎血清と <sup>125</sup>I-(Tyr<sup>1</sup>)-SOM (10,000 cpm) と標準 SOM を用いて行った。結合型と遊離型の <sup>125</sup>I-(Tyr<sup>1</sup>)-SOM の分離は、dextran coated charcoal 法によって行った。

SP の濃度は SOM 濃度の測定とほぼ同様にして行った<sup>18)</sup>。すなわち、最終希釈75,000倍の抗 SP 家兎血清と、<sup>125</sup>I-SP (15,000 cpm) と標準 SP とを用いて RIA を行った。結合型と遊離型の <sup>125</sup>I-SP の分離には dextran coated charcoal 法を用いた。

TRH 濃度は既報の方法に従った<sup>14)</sup>。すなわち、最終希釈10,000倍の抗 TRH 家兎血清と、<sup>125</sup>I-TRH (15,000 cpm) と、標準 TRH とを用いて RIA を行い、結合型と遊離型の <sup>125</sup>I-TRH の分離には二抗体法を用いた。

CCK-8 の定量は、TRH の定量と同様にして

行った。すなわち、最終希釈20,000倍の抗 CCK-8 家兎血清と、<sup>125</sup>I-CCK-8 (20,000 cpm) と標準 CCK-8 を用いて行い、結合型と遊離型の <sup>125</sup>I-CCK-8 の分離には、同様に二抗体法を用いた<sup>19)</sup>。

#### 6. ゲル濾過

正常対照群と MPTP 処置群のそれぞれの線条体の酸・エタノール抽出物をプールしておき、Sephadex G-25カラム (1.2×42cm) に適用し、0.3 N 酢酸で 4 °C, 20ml/h の速度で溶出した。2 ml 分画を採取し、-20 °C で SOM の RIA まで保存した。

#### 7. アミン蛍光法

実験動物を pentobarbital で麻酔し、開胸して左心室より 1% glyoxylic acid, 0.02% paraformaldehyde, 15% sucrose を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 3.2) にて灌流した後、中性にした 0.5% glyoxylic acid, 15% sucrose を含む 0.1 M リン酸緩衝液でさらに灌流した。すばやく脳を取り出し、凍結し、線条体を含む凍結前額切片 (12  $\mu$ m) を作製し、無蛍光スライドガラスに載せ、0.5% glyoxylic acid と 30% sucrose を含むリン酸緩衝液に 4 °C で20分間反応させ、80 °C で5分間加熱して乾燥させ Entellan で封入して、アミン蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。

#### 8. Bradykinesia の定量

マウスの bradykinesia の定量には、pole test<sup>20)</sup>を用いた。すなわち、MPTP 注射2週間後に、直径 8 mm, 長さ 55cm の、表面が粗の鉄棒を垂直に立て、その上端に上向きにマウスを掴ませ、完全に下向きになるまでの時間 ( $T_{turn}$ ) と、下の床に降りるまでの時間 ( $T_{LA}$ ) を測定した。さらに、levodopa をはじめとして各種の薬剤を投与した後、60分後に同様のテストを施行し、治療効果を観察した。

#### 9. その他

蛋白質の定量には、Lowry 法<sup>21)</sup>を用い、推計学的な有意差検定は one-way ANOVA を用いて行った。

## 結 果

### 1. DA と NA 量の変化

図1に、C 57 BL マウスに MPTP を注射した後の脳部位別 DA 量を経時的に測定した結果

をまとめた。

MPTP 注射終了 1～2 週目には、DA は線条体で著減した。すなわち、1 週後では対照群の 22%，2 週後では対照群の 30% にまで減少した。しかし、6 週間後には対照の 50% にまで回復した。また、中隔野では MPTP 処置 1 週間後には DA 量は対照の 47% に減少したが、6 週間後には対照レベルにまで回復した。その他の脳部位の DA 濃度は、MPTP 投与により微減ないしは不変であった。DA レベルは長期間経つと回復する傾向があるものの、線条体、海馬、大脳皮質では MPTP 処置 6 週間後においてもなおコントロールに比較して有意な減少が続いていた。

NA は、MPTP 注射後 1～2 週目で、線条体、視床+中脳、中隔野で減少したのみであり (図 2)、その減少率は DA より遙かに小さく、もっとも減少率の大きかった中隔野でも、対照群の 50% にすぎず、しかもその減少は一過性であった。しかし、6 週間後も線条体と視床+中脳においては絶対値としては僅かであるが、有意な減少が続いていた。

## 2. アミン蛍光染色による観察

図 3 にアミン蛍光染色の結果を示すが、正常

コントロール群では線条体において著明なアミン蛍光が観察されるのに対して (図 3-a)，MPTP 投与群 (MPTP 処置 6 週間後) では著しいアミン蛍光の減弱が観察された (図 3-b)。さらに、この MPTP 処置マウスに levodopa (200mg/kg) を注射した後 1 時間目のアミン蛍光染色では (図 3-c)、ほぼ正常と同様の強いアミン蛍光が観察された。

## 3. bradykinesia の定量

MPTP 処置マウスでは、pole test による  $T_{turn}$  が 2 倍以上に延長し、 $T_{LA}$  も有意に延長しており、bradykinesia の存在が示された (図 4)。これらの変化は levodopa 注射で用量反応的に改善した。さらに、少量の塩酸 amantadine によつては MPTP 処置マウスの bradykinesia は変化はなく、大量の塩酸 amantadine によつて bradykinesia は軽度改善したのみであった。効果のないほど少量の塩酸 amantadine (2-5 mg/kg) と、効果のないほどの少量の levodopa (100 mg/kg) とを併用した場合には、著しい bradykinesia の改善効果が認められた (図 4)。すなわち、これらの薬剤は相互に相乗効果が認められた。このように、MPTP 処置マウスは brady-

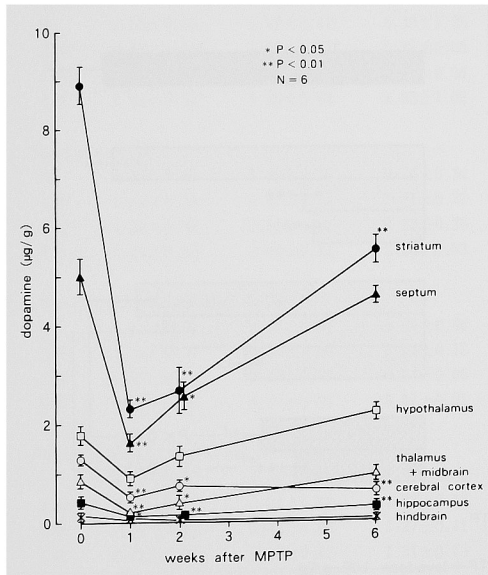


図 1 MPTP 処置後のマウス脳内部位別ドーパミン (DA) 濃度の経時変化 (0 週は対照群の値を示す)

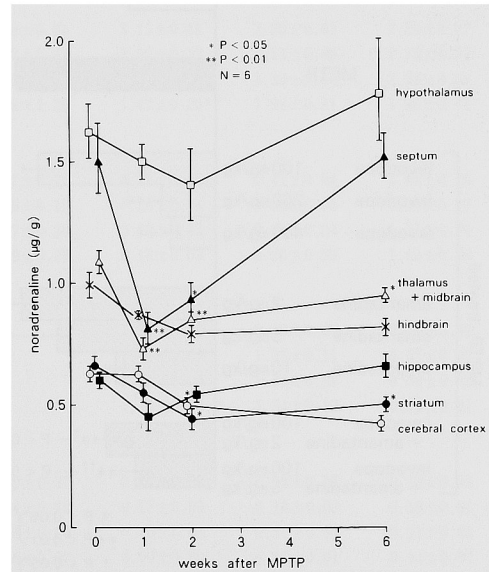


図 2 MPTP 処置後のマウス脳内部位別ノルアドレナリン (NA) 濃度の経時変化 (0 週は対照群の値を示す)

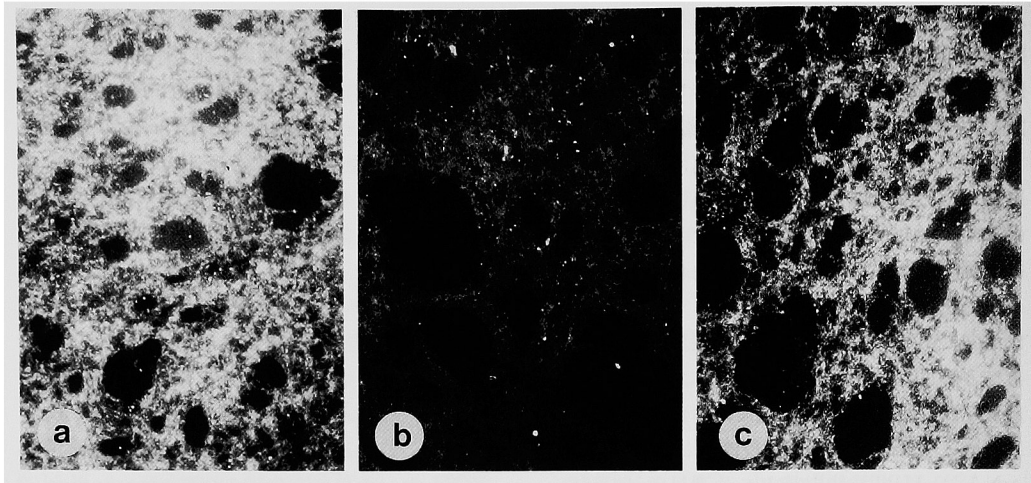


図3 線条体のアミン蛍光組織写真

- a : C57BL コントロールマウスの蛍光組織写真(線条体線維束以外の部分に強力なアミン蛍光がみられる)。
- b : MPTP 処置 6 週間後の線条体蛍光組織写真 (蛍光がほとんど消失している)。
- c : MPTP 処置 6 週間後のマウスに levodopa (200mg/kg) を腹腔内注射し, 1 時間後の線条体蛍光組織写真 (アミン蛍光が著明に回復している)。

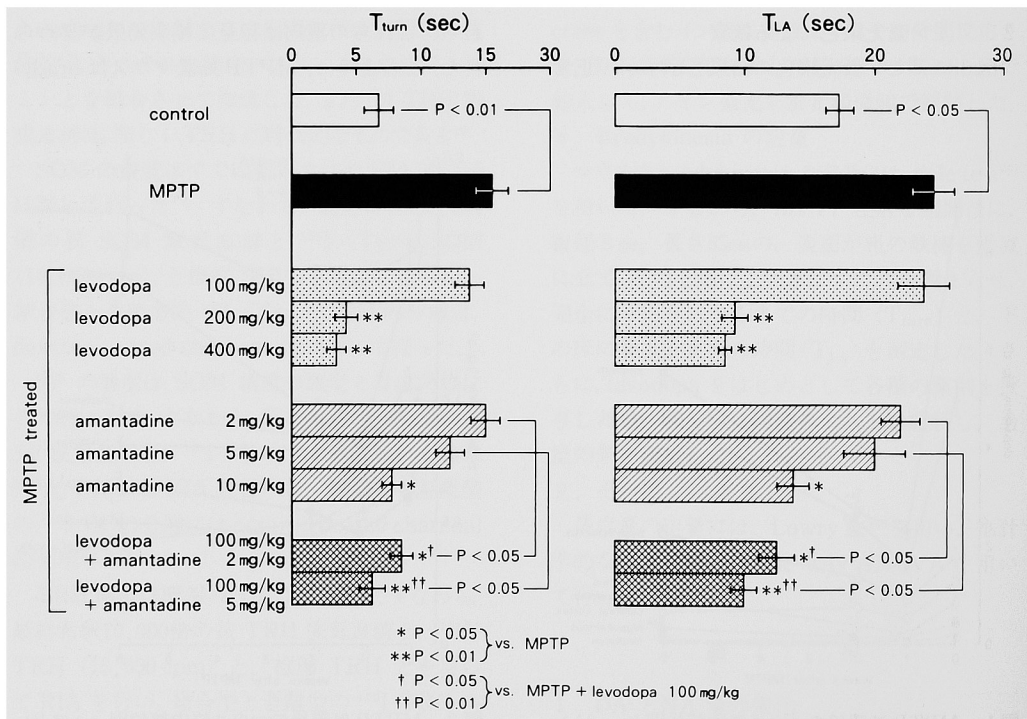


図4 Pole test を用いた MPTP 処置マウスの bradykinesia の定量と, levodopa と塩酸 amantadine の治療効果

kinesia を示し、しかも抗パーキンソン薬に反応した。

#### 4. 神経ペプチド量の経時変化 (表1)

神経ペプチドのうち DA と関係の深い SP, CCK-8, TRH は, MPTP 注射後 6 週目まで有意な変動はみられなかった。一方, SOM は, MPTP 注射後 1 週後では線条体と視床+中脳で増加するが, その後減少し, 6 週後には線条体と海馬で著しい減少が認められた。このように, MPTP 処置マウスの線条体で DA, NA が早期に著減するのに対して, SOM の減少は時間を経たから生じた。

対照群と MPTP 処置群のマウス線条体の酸・エタノール抽出物をゲル濾過して各分画の SOM を測定したところ (図 5), SOM 免疫活性は単一のピークとして認められ, その溶出部位は SOM-14 の部位に一致していた。すなわち, SOM の変動は SOM-14 の増減を表していることが判明した。

#### 5. SOM 量に及ぼす levodopa 慢性投与の影響

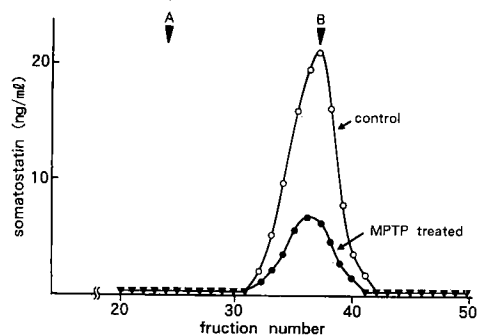


図5 対照群 (○) と MPTP 処置 6 週後 (●) のマウス線条体の酸・エタノール抽出物中の somatostatin の Sephadex G-25 によるゲル濾過像  
A : somatostatin-28 の溶出部位  
B : somatostatin-14 の溶出部位  
▼ : 測定感度以下

表1 MPTP 処置後のマウス脳内部位別神経ペプチド濃度の経時変化

	striatum	thalamus +midbrain	hypothalamus	septum	hippocampus	cerebral cortex	hindbrain
<i>Somatostatin (SOM)</i>							
0	2.85±0.46	2.07±0.41	5.39±1.28	3.98±0.84	3.11±0.41	3.80±0.61	2.29±0.27
1 W	4.87±0.51*	3.63±0.17*	5.88±0.59	3.92±0.48	3.00±0.38	4.13±0.83	2.75±0.53
2 W	2.30±0.21	2.36±0.48	3.45±0.54	2.85±0.80	2.36±0.39	3.20±0.64	2.09±0.58
6 W	1.44±0.32*	1.95±0.24	4.83±1.02	1.99±1.26	1.47±0.20**	1.98±0.81	1.85±0.71
<i>Substance P (SP)</i>							
0	1.30±0.18	1.89±0.19	2.76±0.34	1.47±0.22	0.22±0.03	0.41±0.04	1.84±0.15
1 W	1.60±0.14	1.83±0.12	2.81±0.22	1.16±0.19	0.26±0.04	0.54±0.04	1.64±0.19
2 W	1.27±0.08	1.61±0.45	2.23±0.26	1.17±0.30	0.20±0.02	0.43±0.04	1.31±0.71
6 W	1.24±0.45	2.04±0.41	2.36±0.93	1.49±0.29	0.18±0.03	0.36±0.09	1.62±0.29
<i>Cholecystokinin-octapeptide (CCK-8)</i>							
0	1.17±0.07	0.47±0.07	0.24±0.06		1.70±0.06	1.40±0.07	0.04±0.02
1 W	1.24±0.07	0.53±0.06	0.34±0.12		1.61±0.08	1.55±0.11	0.07±0.02
2 W	1.17±0.07	0.47±0.07	0.24±0.06		1.37±0.06	1.40±0.07	0.04±0.02
6 W	0.97±0.06	0.47±0.02	0.17±0.01		1.47±0.06	1.34±0.13	0.04±0.01
<i>Thyrotropin releasing hormone (TRH)</i>							
0	0.27±0.03	0.33±0.05	1.58±0.36	0.99±0.27	0.22±0.06	0.18±0.02	0.18±0.03
1 W	0.33±0.03	0.33±0.02	1.33±0.18	0.94±0.25	0.17±0.09	0.18±0.02	0.19±0.01
2 W	0.39±0.04	0.43±0.05	1.27±0.11	1.03±0.26	0.16±0.03	0.21±0.03	0.21±0.03
6 W	0.22±0.05	0.41±0.07	1.31±0.13	0.86±0.07	0.09±0.09	0.16±0.01	0.14±0.07

MPTP は方法の項に述べたように, 30mg/kg を 1 日 2 回 5 日間腹腔内に注射した。

数値は各群 6 ~ 8 匹の mean±SEM (ng/mg protein) で示した。

\* : p<0.05, \*\* : p<0.01 (いずれも対照群に対する有意水準)

0 : 対照群, 1 W : MPTP 処置終了 1 週間後, 2 W : 同 2 週間後, 6 W : 同 6 週間後。

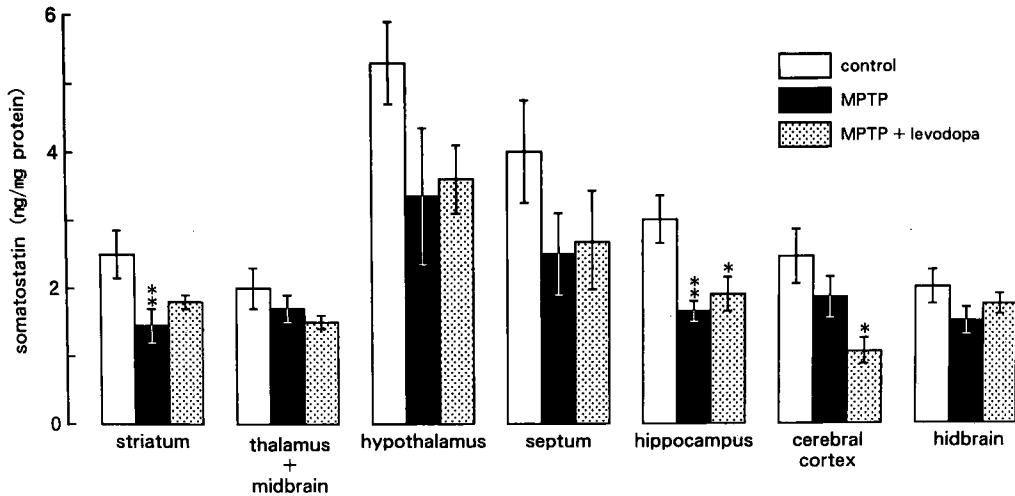


図6 MPTP 処置 6 週間後のマウス脳部位別の somatostatin 濃度の変化と、それらに及ぼす levodopa 投与の影響

成績は対照群10匹, MPTP処置群6匹, MPTP処置+levodopa 投与群6匹のmean±SEMで示した。

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.025$  (対照群に対する有意水準)

脳内の神経ペプチドの中で SOM が MPTP 処置後の時間の経過とともに有意に変化していたことから、この SOM の濃度に及ぼす levodopa 慢性投与の影響を検討した。その結果 (図 6)、6 週間後に著しく減少する線条体の SOM は、levodopa 2 週間投与によって正常化した。一方、同じく MPTP によって減少する海馬の SOM は、levodopa の 2 週間投与にもかかわらず減少したままであった。興味あることに、大脳皮質の SOM は MPTP 投与後有意な変化を示さなかったにもかかわらず、2 週間の levodopa 投与によって有意に減少した。これら以外の脳部位においては、levodopa の慢性投与は脳内 SOM の濃度に何ら影響を及ぼさなかった (図 6)。

### 考 察

MPTP の発見まではヒトの特発性のパーキンソン病に相当する動物実験モデルを作成することは生化学的にも行動薬理学的にも困難とされてきた。しかし、MPTP が発見されてから<sup>1)</sup>、動物を用いたパーキンソニズム・モデルの研究が盛んになった。当初、MPTP は小動物にはドーパミン神経細胞障害作用を持たないとされて

いたが<sup>7)8)</sup>、まもなくマウスにおいて MPTP 投与によって DA が減少することが明らかにされた<sup>9)10)</sup>。小動物が実験に使用できれば便利であるので、今回マウスを用いて実験を行った。MPTP は、生体内でその酸化物、MPP<sup>+</sup>に変換されてから<sup>22)</sup>、ミトコンドリアの電子伝達系酵素の障害を起こし、最終的にドーパミン神経を障害するものと考えられている<sup>23)24)25)26)</sup>。

MPTP 注射後のマウスの線条体の DA 濃度は、最初正常対照群の22%にまで減少するにもかかわらず、6 週後には正常対照群の50%にまで回復した。Hallman ら<sup>27)</sup>も、MPTP によるマウス線条体の DA の減少が時間とともに回復し、5 週後には約50%にまで戻ることを報告しており、マウスにおける DA の減少は、ヒトやサルに MPTP を投与した場合に非可逆性であるのとは異なって、ある程度の可逆性があった。しかし、最近、老齢マウスに MPTP を投与すると、若年マウスの場合とは異なって、DA 濃度の減少が回復しないことも報告され<sup>28)29)</sup>、ドーパミン神経細胞の障害には生体側の要因も重要であることが明らかにされている。

NA は、MPTP 注射後の慢性期でも脳部位に

よっては減少がみられた。これは、マウスにおいては MPTP によって NA ニューロンが障害されることを示しており、すでに報告された同様の知見<sup>10)30)</sup>を追認できた。このマウスにおける MPTP による NA ニューロンの障害は NA ニューロンが MPTP によって障害されないヒトやサル<sup>2)31)32)</sup>と対照的である。このようにアミン系に関してはいくつかの点で MPTP に対する感受性が、ヒト、サルとマウスとは異なっていた。

サルに MPTP を投与した場合の症状は、無動、固縮、体位振戦、前屈姿勢、眼瞼閉鎖、嚔下障害、発声減少などで<sup>2)</sup>、MPTP を注射したヒトに酷似しているばかりでなく、特発性パーキンソン病ともよく似ている。MPTP を注射されたサルは動作緩慢で、運動量は減少するが、levodopa (DCI の併用) の経口投与により運動量が著しく回復することが報告されている<sup>2)</sup>。

一方、齧歯類では、従来からパーキンソン症状を定量的に観察することが困難であるとされてきた。MPTP マウスも同様で、行動上の変化は著明でなく、漠然とした行動の鈍化が一過性に認められるのみであるとされている。しかし、著者は open field で locomotor activity を予備的に調べたところ、正常よりもむしろ MPTP 2 週間後のマウスのほうがやや活動性が高いことを知った。同様の結果を Wills と Donnan も報告している<sup>33)</sup>。したがって、たとえマウスに MPTP を投与してもこの観察方法では、パーキンソニズム症状を客観的に捕えることができないので、pole test<sup>20)</sup>を用いて観察した。

pole test を用いると、MPTP 処置マウスでは  $T_{turn}$  が 2 倍以上に延長し、 $T_{LA}$  も有意に延長しており、bradykinesia の存在が確認された。これらの変化は levodopa 注射で用量反応的に改善した (図 4)。図 3-c に示したように、levodopa 注射 1 時間後には、線条体でアミン蛍光の著しい増加がみられており、また、図示していないが、大脳皮質などその他の脳部位でもアミン蛍光が増加していたので、投与された levodopa が脳内に到達してドーパミンに変換されて、MPTP 処置マウスの bradykinesia を改善したものと考えられる。脳内 DA が運動量に

関与していることはよく知られていることであり<sup>34)</sup>、levodopa による運動量増加は、主に脳内 DA 量の増加に由来していることがすでに報告されている<sup>35)</sup>。また図 4 に示したように、低用量の塩酸 amantadine は、単独では bradykinesia 改善効果は認められなかったにもかかわらず、治療効果を示さないほどの少量の levodopa と少量の塩酸 amantadine を併用すると、著しく bradykinesia は改善し、塩酸 amantadine には levodopa の治療効果増強作用があることが判明した。塩酸 amantadine はアミンの再取り込みを抑制してアミンの利用率を高める薬剤なので levodopa との併用によってその薬理作用を相乗的に高めたものと考えられた。

MPTP 処置動物における神経ペプチドの変化に関する報告はわずかしかなないが<sup>36)37)</sup>、ヒトの特発性パーキンソン病における神経ペプチドの変化とは少し異なっている。MPTP 処置マーモセットやマウスにおいては、1, 2 週間後に黒質、大脳皮質 (前頭葉)、海馬において著しく SOM の増加が認められる<sup>36)37)</sup>。一方、パーキンソン病患者の黒質においては SOM の変化は認められず、痴呆を有するパーキンソン病患者の前頭葉と海馬において SOM の減少が報告されている<sup>38)</sup>。今回の著者の成績では、線条体と視床+中脳において、MPTP 注射 1 週間後に SOM 濃度は増加するものの、慢性期になれば逆に減少することを明らかにした。このことは、従来の MPTP 処置動物における比較的早期の神経ペプチドの変化<sup>38)</sup>との報告に差異のみられることと合致するものであり、MPTP 処置動物における神経ペプチドの定量には、パーキンソン病のモデルとして用いるという目的であるならば、慢性期において神経ペプチドを定量するべきだと考えられる。MPTP 処置 6 週間後のマウスの線条体と海馬において SOM が著しく減少することは、ヒトのパーキンソン病の脳における変化と同様であった。しかも、この線条体において減少した SOM 濃度は、levodopa の慢性投与によって回復し、海馬においては回復傾向がみられた。

Weiss と Chesselt は、非可逆的な D2 レセプター拮抗薬を投与し、線条体における SOM 前駆体の mRNA レベルが減少することから、線

糸体の SOM が DA 系の制御下にあることを報告している<sup>39)</sup>。このことから、MPTP 処置 1 週間後の線糸体における SOM の増加は、おそらくは破壊された DA ニューロンからのドーパミンの漏出によるドーパミンの一過性の増加によるものと考えられる。また、MPTP 処置 6 週間後における線糸体の SOM の減少とヒトのパーキンソン病における SOM の低下は、おそらくは DA ニューロンの変性による慢性的な DA の減少による二次的な変化と考えられる。

levodopa の慢性投与によって SOM 値が正常レベルに回復したことは、線糸体における DA の減少が SOM の減少に大きく関わっていたことをさらに明確にしたものと考えられる。MPTP 処置後 6 週目のマウス線糸体の DA 量は、正常対照群の 50% まで回復しているにもかかわらず SOM レベルが低下しているのは、この程度の DA レベルでは SOM レベルを回復させるには不十分であるためと考えられる。

一方、興味あることには、マウスの大脳皮質においては、MPTP 処置後いかなる時期においても SOM 値は変化がないにもかかわらず、levodopa 慢性投与後には SOM 値が有意に減少したことである。levodopa 治療によって種々の精神症状などの副作用が出現することはよく知られている。慢性的に levodopa 治療を受けているヒトのパーキンソン病患者においては、睡眠障害や幻覚が生じ<sup>40)41)</sup>、大量の levodopa 投与は記憶障害をもたらすことも報告されている<sup>42)</sup>。さらに痴呆を伴うパーキンソン病患者の大脳皮質と海馬において、SOM 値が有意に減少していることも報告されている<sup>38)43)</sup>。加えて、Alzheimer 型痴呆患者の大脳皮質や海馬においても SOM の減少が知られている<sup>44)45)</sup>。したがって、今回の著者の成績は、levodopa 治療と大脳皮質における SOM 減少と、痴呆症状との三者の間に強い関連のあることを実験的に明確にしたものである。

## 結 論

マウスに MPTP を注射してパーキンソニズムのモデルを作成し、経時的に生化学的変化、ことに神経ペプチドの変化を脳部位別に検討して以下の結果を得た。

1. ドーパミン濃度の減少は MPTP 処置後 1 週で最も大きく、線糸体では対照の 22% にまで減少したが、6 週間には対照の 50% にまで回復した。その他の脳部位では変化は軽微であった。
2. ノルアドレナリン濃度の減少はドーパミンに比較するとはるかに軽微であった。
3. アミン蛍光組織学的検討からも、MPTP 処置マウスの慢性期には線糸体のアミンが著しく減少していること、さらに levodopa の腹腔内注射によって線糸体のアミン蛍光が著明に回復すること、すなわち投与された levodopa が脳内でアミンに変換されることを明らかにした。
4. 慢性期の MPTP 処置マウスは pole test によって bradykinesia を証明することができ、しかも levodopa や塩酸 amantadine 投与によってこの bradykinesia を改善させることができ、パーキンソニズムのよいモデルであることを行動薬理的にも証明した。
5. 神経ペプチドのうち、somatostatin は MPTP 処置後二相性の変化を示した。すなわち、早期には線糸体と視床+中脳で増加するものの、慢性期には線糸体と海馬で減少し、さらに、levodopa の慢性投与で線糸体では回復するものの、大脳皮質では逆に低下した。このように脳内の somatostatin はドーパミン系の制御下にあることを明らかにした。
6. その他の神経ペプチド、substance P, cholecystokinin-octapeptide, thyrotropin releasing hormone は MPTP 処置後のいかなる時期においても、また、いかなる脳部位においても変化は認められなかった。

稿を終わるに臨み、終始御懇篤なる御指導ならびにご校閲を賜った森 昭胤教授ならびに直接御指導御協力頂きました小川紀雄助教授に深く感謝の意を捧げます。さらに、実験遂行にあたり終始快く御協力下さいました研究室の皆様へ心から御礼申し上げます。また、アミン蛍光組織化学的検討に御協力下さいました岡山大学第一解剖学教室水川公直講師に感謝致します。

本研究の要旨は第 31 回日本生化学会中国四国地方会 (平成 2 年 4 月 7 日、岡山) において発表した。



## 文 献

- 1) 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.
- 2) Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM and Kopin IJ : 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.
- 3) Langston JW, Forno LS, Rebert CS, Irwin I : Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 5, 6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res* (1984) **292**, 390—394.
- 4) Burns RS, Markey SP, Phillip JM and Chiveh CC : The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine in the monkey and man. *Can J Neurol Sci* (1984) **11**, 166—168.
- 5) Chiueh CC, Burns RS, Markey SP, Jacobowitz DM and Kopin IJ : Primate model of parkinsonism : Selective lesion of nigrastratial neurons by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine produces an extrapyramidal syndrome in rhesus monkeys. *Life Sci* (1985) **36**, 213—218.
- 6) Doudet D, Gross C, Lebrun-Grandie P and Bioulac B : MPTP primate model of Parkinson's disease : a mechanographic and electromyographic study. *Brain Res* (1985) **335**, 194—199.
- 7) Walters A, Jakson-Lewis V, Sadik A and Fahn S : Failure to produce chronic parkinsonism with MPTP in rats. *Biog Amines* (1984) **1**, 297—302.
- 8) Perry TL, Young VW, Ito M, Jones K, Wall RA, Foulks JG, Wright JM and Kish SJ : 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) does not destroy nigrostriatal neurons in the scorbutic guinea pig. *Life Sci* (1985) **36**, 1233—1238.
- 9) Heikkila RE, Hess A and Duvoisin RC : Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 5, 6-tetrahydropyridine in mice. *Science* (1984) **224**, 1451—1453.
- 10) Hallman H, Lange J, Olson L, Stromberg I and Jonsson G : Neurochemical and histochemical characterization of neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. *J Neurochem* (1985) **44**, 117—127.
- 11) Mizukawa K, Ogawa N, Sora YH and Sora I : Alterations of the muscarinic cholinergic (mACh) receptors in the striatum of the MPTP-induced autoradiographical analysis. *Neurosci Lett* (1987) **81**, 105—110.
- 12) Glowinski J and Iversen LL : Regional studies of catecholamines in the rat brain I. The disposition of [<sup>3</sup>H] norepinephrine, [<sup>3</sup>H] dopamine and [<sup>3</sup>H] dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* (1966) **13**, 655—669.
- 13) Maruyama Y, Iida N, Kusaka M, Horikawa A, Mori J and Muneki K : Application of a newly developed electrochemical detector for liquid chromatography to the assay of brain catecholamines. *Prog Neuro-Psychopharmacol* (1978) **2**, 73—78.
- 14) Ogawa N, Kabuto H, Hirose Y, Nukina I and Mori A : Up-regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors in rat spinal cord after codepletion of serotonin and TRH. *Regl Pept* (1985) **10**, 85—90.
- 15) Ogawa N, Panerai AE, Lee S, Forsbach G, Havlicek V and Friesen HG : Beta-endorphin concentration in the brain of intact and hypophysectomized rats. *Life Sci* (1979) **25**, 317—326.

- 16) Utsumi M, Takeiwa M, Makimura H, Yamada A, Mori H, Kusaka T, Sakoda M and Baba S : Diurnal variation of the human urinary TRH exertion measured by radioimmunoassay. *Endocrinol Jpn* (1975) **22**, 509—516.
- 17) Ogawa N, Thompson T, Friesen HG, Martin JB and Brazeau P : Properties of soluble somatostatin-binding protein. *Biochem J* (1977) **165**, 269—277.
- 18) Ogawa N, Hirose Y and Nomura M : Biochemical and functional aspects of neuropeptides and their receptors in aged-rat brain ; in *Recent Research on Neurotransmitter Receptors*, Yoshida ed, Excerpta Medica, Amsterdam (1986) pp 56—68.
- 19) Pongdhana K, Ogawa N, Hirose Y, Ono T, Kosaka F and Mori A : Effects of ketamine on the cholecystikinin, somatostatin, substance P and thyrotropin releasing hormone in discrete regions of rat brain. *Neurochem Res* (1987) **12**, 73—77.
- 20) Ogawa N, Hirose Y, Ohara S, Ono T and Watanabe Y : A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* (1985) **50**, 435—441.
- 21) Lowry N, Resebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* (1951) **193**, 265—275.
- 22) Chiba K, Trevor AJ and Castagnoli NJ : Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* (1984) **120**, 574—578.
- 23) Javitch JA and Snyder SH : Uptake of MPP<sup>+</sup> by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur J Pharmacol* (1985) **106**, 455—456.
- 24) Nicklas WJ, Vyas I and Heikkila RE : Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *Life Sci* (1985) **36**, 2503—2508.
- 25) Mizuno Y, Sone N and Sitoh T : Dopaminergic neurotoxins, MPTP and MPP<sup>+</sup>, inhibit mitochondrial NADH-ubiquinone oxido-reductase activity. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sct* (1986) **62**, 261—263.
- 26) Ramsay RR and Singer TP : Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* (1986) **261**, 7585—7587.
- 27) Hallman H, Olson L and Jonsson G : Neurotoxicity of the meperidine analogue N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. *Eur J Pharmacol* (1984) **97**, 133—136.
- 28) Ricaurte GA, DeLanney LE, Irwin I and Langston JW : Older dopaminergic neurons do not recover from the effects of MPTP. *Neuropharmacology* (1987) **26**, 97—99.
- 29) Sitoh T, Nijima K and Mizuno Y : Long-term effect of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) on striatal dopamine content in young and mature mice. *J Neurol Sci* (1987) **77**, 229—235.
- 30) Gupta M, Felten DL and Gash DM : MPTP alters central catecholamine neurons in addition to nigrostriatal system. *Brain Res Bull* (1984) **13**, 737—742.
- 31) Burns RS, Lewitt PA, Ebert MH, Pakkenberg H and Kopin IJ : The clinical syndrome of striatal dopamine deficiency : parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). *New Engl J Med* (1985) **312**, 1418—1421.
- 32) Jacobowitz DM, Burns RS, Chuang CC and Kopin IJ : N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) causes destruction of the nigrostriatal but not the mesolimbic dopamine system in the monkey. *Psychopharmacol Bull* (1984) **20**, 416—422.

- 33) Willis GL and Connan GA : Histochemical, biochemical and behavioral consequences of MPTP treatment in C-57 black mice. *Brain Res* (1987) **402**, 269—274.
- 34) Kelly PH : Drug-induced motor behavior ; in *Handbook of Psychopharmacology*. vol 8, Iversen and Snyder eds, Plenum Press, New York (1977) pp 295—331.
- 35) Benkert O, Gluba H and Matussek N : Dopamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in relation to motor activity, fighting and mounting behavior. *Neuropharmacology* (1973) **12**, 177—186.
- 36) Allen JM, Cross-AJ, Yeats JC, Ghatei MA, McGregor GP, Close SP, Pay S, Marriott AS, Tyers MB, Crow TJ and Bloom SR : Neuropeptides and dopamine in the marmoset. Effect of treatment with 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine : and animal model for Parkinson's disease? *Brain* (1986) **109**, 143—157.
- 37) Radke J, Cumming R and Vincent SR : Effects of MPTP poisoning on central somatostatin and substance P levels in the mouse. *Eur J Pharmacol* (1987) **134**, 105—108.
- 38) Rinne UK, Rinne JO, Rinne JK, Laakso K and Lonnberg P : Brain neurotransmitters and neuropeptides in Parkinson's disease. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* (1984) **34**, 287.
- 39) Weiss LT and Chesselet MF : Regional distribution and regulation of preprosomatostatin messenger RNA in the striatum, as revealed by in situ hybridization histochemistry. *Mol Brain Res* (1989) **5**, 121—130.
- 40) Nausieda PA, Weiner WJ, Kaplan LR, Weber S and Klawans HL : Sleep disruption in the course of chronic levodopa therapy : an early feature of levodopa psychosis. *Clin Neuropharmacol* (1982) **5**, 183—194.
- 41) Klawans HL : Psychiatric side effects during the treatment of Parkinson's disease. *J Neural Transm* (1988) **27** (Suppl) 117—122.
- 42) Huber, SJ, Shulman HG, Paulson GW and Shuttleworth EC : Dose-dependent memory impairment in Parkinson's disease. *Neurology* (1989) **39**, 438—440.
- 43) Epelbaum J, Ruberg M, Moyses E, Agid FJ, Dubois B and Agid Y : Somatostatin and dementia in Parkinson's disease. *Brain Res* (1983) **278**, 376—379.
- 44) Davies P, Katzman R and Terry RD : Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementia. *Nature* (1980) **288**, 279—280.
- 45) Rossor MN, Emson PC, Mountjoy CQ, Roth M and Iversen LL : Reduced amounts of immunoreactive somatostatin in the temporal cortex in senile dementia of Alzheimer type. *Neurosci Lett* (1980) **20**, 373—377.

## Alterations of neuropeptides in MPTP-treated mouse brain

Makio KAWATA

Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. A. Mori)

1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6,-tetrahydropyridine (MPTP) has been shown to destroy the nigrostriatal dopaminergic system, inducing biochemical and histopathological changes resembling Parkinson's disease. Biochemical changes, especially changes of neuropeptides were determined 1, 2 or 6 weeks after MPTP treatment in various regions of the mice brain.

The dopamine (DA) concentration decreased to 22% of the control level in the striatum 1 week after MPTP treatment, but recovered to 50% of the control level 6 weeks after MPTP treatment. The decrease in the noradrenaline concentration was less than that of DA. Amine fluorescence histochemistry revealed, markedly decreased amine fluorescence in the striatum 6 weeks after MPTP treatment, and this decrease in amine fluorescence was recovered after levodopa treatment. The results of a pole test revealed the bradykinesia of MPTP-treated mice and it was attenuated by levodopa and amantadine hydrochloride treatments.

Among the neuropeptides tested, somatostatin (SOM) increased 1 week after MPTP treatment in the striatum and the thalamus+midbrain but decreased 6 weeks after MPTP treatment in the striatum and the hippocampus. In the striatum the decreased SOM recovered with levodopa treatment. Thus, the SOM might be regulated by a dopaminergic system. On the other hand, in the cerebral cortex, while no changes appeared in the SOM concentration after MPTP treatment, the concentration decreased significantly with levodopa treatment. Other neuropeptides such as substance P, cholecystokinin-octapeptide and thyrotropin releasing hormone did not show any significant changes up to 6 weeks after MPTP treatment.