

パーキンソン病関連新規内在性脳内アミン
1-BnTIQ に関する神経化学的研究

古 武 弥一郎

博士論文

パーキンソン病関連新規内在性脳内アミン
1BnTIQに関する神経化学的研究

東京大学大学院 薬学系研究科 分子薬学専攻
薬品代謝化学教室

古武 弥一郎

目次

第1章 序論	1
第2章 1BnTIQの生体内からの検出及び定量	11
1 マウス脳内からの1BnTIQの検出	11
2 マウス脳内1BnTIQの定量	20
3 マウス脳内1BnTIQの光学異性体存在比の検討	20
4 ヒト脳脊髄液中からの1BnTIQの検出	24
5 パーキンソン病患者の脳脊髄液中1BnTIQの定量	
(1) 他の神経疾患の患者との比較	26
(2) Yahr stage、罹病期間、発症年齢との関係	30
6 ヒト脳脊髄液中からの1BnTIQ、1MeTIQと β -carbolineの同時定量	32
7 1BnTIQ連投サルの脳部位別1BnTIQの定量	35
8 まとめ	35
第3章 パーキンソン病治療薬アプレニルの効果	
1 1BnTIQ in vitro生合成の阻害	37
2 アプレニル連投マウスの脳内1BnTIQ、1MeTIQ量の変動	39
3 まとめ	42
第4章 1BnTIQのパーキンソン病関連in vitro生理活性の検討	
1 1BnTIQのドーパミン取り込み阻害活性	43
2 1BnTIQのミトコンドリア呼吸鎖阻害活性	47

3	1BnTIQのMK-801結合部位に対する親和性	5 0
4	まとめ	5 1
第5章 中脳線条体切片共培養系を用いた1BnTIQの毒性検討		5 4
1	培養液中LDH活性測定による条件検討	5 4
2	1BnTIQによる中脳、線条体ドーパミン量の変動	5 6
3	1BnTIQによる培養液中LDH活性の変動	5 9
4	免疫組織化学的検討	6 1
5	1BnTIQ神経毒性の不可逆性	6 1
6	AP5のドーパミン量減少に対する影響	6 4
7	1BnTIQ神経毒性の脳部位選択性	6 6
8	まとめ	6 8
第6章 1BnTIQのパーキンソニズム発症作用		
1	マウスを用いた行動薬理試験による検討	6 9
2	まとめ	7 4
第7章 まとめ		7 5
MATERIALS AND METHODS		7 8
REFERENCES		8 8
謝辞		9 1
論文目録		9 2

第1章 序論

脳研究は発展途上にあり、脳に対する関心は医学、生物学などの生命科学の分野にとどまらず、数学、物理学、工学といったさまざまな分野において研究対象となっているのが現状である。脳の機構や思考機能の理解は、医学的な、時には社会的な問題の解決策をもたらすものとして期待されている。更に、脳の複雑な情報処理機構の理解はニューロコンピュータを生み出す可能性を有している。脳研究の重要性については今さら述べるまでもなく、10年近く前にアメリカ合衆国では、当時のブッシュ大統領により20世紀最後の10年を脳の10年として脳研究を推進しようという主旨の声明が発表され、これを受けて日本でも21世紀を脳の世紀にしようという運動が盛り上がっている。

このような脳研究を推進しようという動きの裏側には、老人の増加に対する危惧が存在する。ヒトを初めとする生物は必ず老化する。老化とは、生物個体の時間的経過による生理学的或いは生化学的機能の不可逆的低下であるが、生物にとって老いることは余りに当たり前のことであり、また複雑すぎて研究の対象とするには困難であった。ところが高齢化社会を迎えるに当たって、先進国における生命科学の分野での最も大きな課題のひとつとして、老年者の増加に対する対策がクローズアップされ、それと同時に生命科学の進展により老化というものが科学的に捉えられるようになり、老化研究の科学的発展が期待されるようになってきた。寿命が延びるにつれて今までは存在しなかったか或いは存在してもほとんど注目されなかつたいわゆる老人病が増加し、特に脳の一部または全部が何らかの原因で障害を受けるケースが目立つようになった。神経細胞が障害を受けて死に至る病気を神経変性疾患と呼び、そのうちの代表的な一つがパーキンソン病である。

パーキンソン病は、1817年にイギリスの医師James Parkinsonによって初めて報告された振戦 (tremor)、固縮 (rigidity)、無動 (akinesia)、姿勢反射障害を4大症状とする運動性神経変性疾患であり (Parkinson, 1817)、その報告の時期がヨーロッパの重化学工業の黎

明期であったことから、当初は産業廃棄物による環境汚染によるのではないかといわれ、一酸化炭素、マンガン、二硫化炭素、水銀等の様々な物質が原因として疑われた。しかし、当時は寿命が短かったせいか患者も少なく、さほど注目されず、精力的な研究は行われなかった。

パーキンソン病の黒質病変が観察されたのは、パーキンソンによる最初の報告から約100年後の1919年のことである (Tretiakoff, 1919)。この少し前の1913年にLewyは大脳基底核 (basal ganglia) の無名質 (Meynert核) にガラス様の細胞内封入体を発見しており (Lewy, 1913)、この封入体は後にLewy小体と名付けられた。現在では、死後剖検で黒質 (substantia nigra) 細胞の欠落及びLewy小体の2点が認められることがパーキンソン病の定義となっている。これらの発見からパーキンソン病の神経病理学が始まったといつて良い。

それから約40年たった後、ドーパミンが脳内に存在し、錐体外路系に多いことが発見され (Carlsson et al., 1958)、ヒトのカテコールアミンの脳内分布を測定したところ、ノルエピネフリンの分布とドーパミンの分布が全く異なっていることがわかった (Sano et al., 1959)。当時、ドーパミンはノルエピネフリンの前駆体にすぎないと考えられていたもので、この結果は予想外であった。ドーパミンは尾状核 (caudate nucleus) と被核 (putamen) からなる線条体 (striatum) において高濃度に存在し、黒質、淡着球 (globus pallidus) にも多くあった。更に、パーキンソン病患者の死後脳のカテコールアミン量を調べたところ、ドーパミン量が多かった部位において減少がみられた (Sano, 1960)。後に、細胞体を黒質に持ち、線条体に投射しているドーパミンを神経伝達物質とする神経が存在し、この神経が高度に変性していることが明らかとなった。現在では黒質線条体のドーパミン神経は、神経終末のある線条体でアセチルコリン神経に投射している抑制性神経であることが知られている。

パーキンソン病における黒質の選択的変性の原因に関しては、環境汚染による中毒説の他、ウイルス説、遺伝説等があるが、最初の報告から200年近くたった今も原因解明に至る大きな手がかりは掴めていない。

今から15年ほど前に、カリフォルニアの化学を専攻する大学院生が合成麻薬メベリジン誘導体を密かに合成し、自分で注射していたところ、重度のパーキンソニズム（パーキンソン病様症状）を呈し、後に死亡した。調査の結果、メベリジン誘導体の精製を怠り、合成の際の副産物である1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) が混入したためであることがわかった (Langston et al., 1983)。MPTPは脂溶性が高く、血液脳関門を通過して、脳内のグリア細胞の一種であるアストロサイトのB型モノアミン酸化酵素 (MAO-B) によりMPDPを経て、1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) となり、dopamine transporterの基質となってドーパミン神経、ミトコンドリアに順に取り込まれて濃縮され、ミトコンドリア呼吸鎖のComplex Iを阻害し、ATP産生能を下げたドーパミン神経を死に至らしめる (Chiba et al., 1984a; idem, 1984b; Ramsay et al., 1984)。このスキームは一般にMPTPストーリーと呼ばれている (Fig. 1-1)。

MPTPがパーキンソニズムを発症することが知られて以来、MPTPに構造の類似した種々の内在性化合物がパーキンソン病発症物質として注目を集めてきた。パーキンソン病態において顕著に減少し、MPTPやMPP⁺によって阻害されるチロシン水酸化酵素活性を指標にスクリーニングを行い、1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (TIQ) 類が神経毒である可能性を見出した (Nagatsu and Hirata, 1987)。

我々のグループでは、覚醒剤アンフェタミンの代謝物の検索中にTIQ及び1-methyl-TIQ (1MeTIQ) をラット脳内から検出し (Kohno et al., 1986)、後にこれらの化合物は、ヒト、ネコ、ラット、マウスの、脳を含む種々の臓器にも存在することを示した (Ohta et al., 1987; Makino et al., 1990a; Tasaki et al., 1991)。その直後に丹羽らは、ヒト脳内TIQ量はパーキンソン病患者において上昇していると報告した (Niwa et al., 1987) が、我々のグループは、TIQ量はパーキンソン病患者と健常人の間に有意差はなかったが1MeTIQ量がパーキンソン病患者で有意に低いことを見出した (Fig. 1-2; Ohta et al., 1987)。丹羽らは、後に脳内TIQ量はサンプル間にばらつきがあり有意差はなかったと訂正している。また、1MeTIQは加齢によっても減少することが明らかとなった (Fig. 1-3; Ohta et al., 1987; Ayala et al., 1994)。1MeTIQは、パーキンソン病患者のみならず、前述のMPTPを投与したパー

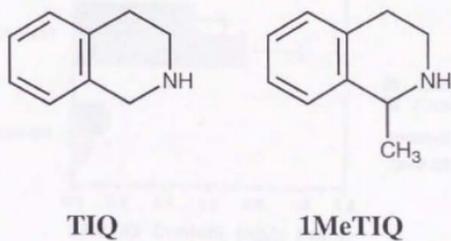
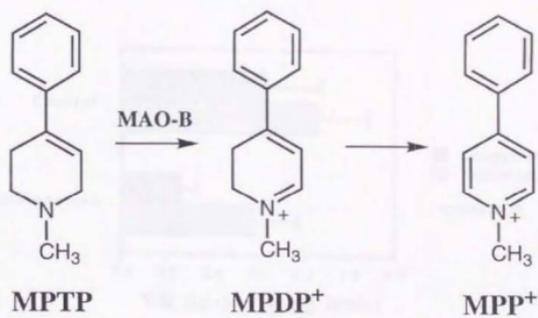


Fig. 1-1 Structures of MPTP and TIQ derivatives

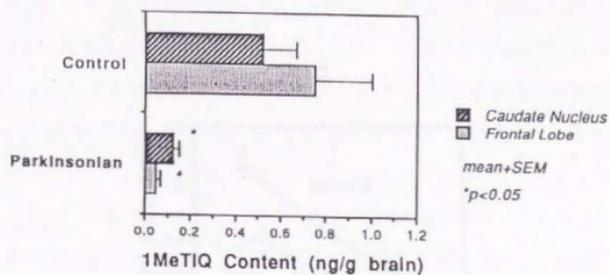
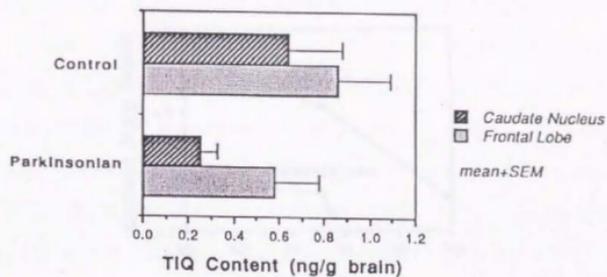
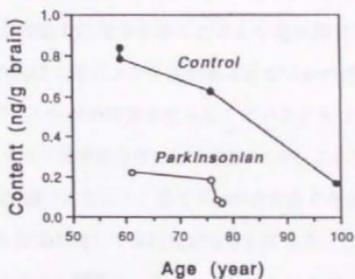


Fig. 1-2 TIQ and 1MeTIQ Contents in Human Brain.
 (Ohta et al., 1987)

1MeTIQ



TIQ

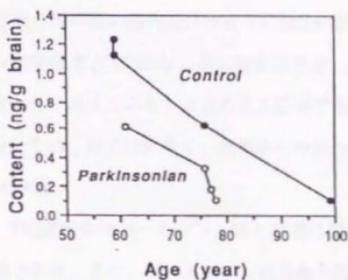


Fig. 1-3 Relationship between Aging and Contents of TIQs.
(Ohta et al., 1987)

キンソン病モデルマウスにおいても顕著な減少が認められた (Tasaki et al., 1991)。これらの結果から、1MeTIQはパーキンソン病発症を防御している可能性が考えられた。この仮説を証明するために行動薬理試験を行ったところ、MPTPやTIQの連投によるパーキンソニズムが、1MeTIQを前投与することにより完全抑制された (Fig. 1-4; Tasaki et al., 1991)。TIQと1MeTIQは1位にメチル基があるかないかの違いだけであるが、この構造上の僅かな差異が全く反対の効果を生み出していることは興味深い。1MeTIQは1位のメチル基の位置によって光学異性体として存在するが、この光学異性体存在比をヒト脳、ラット脳及び食品で調べたところ、全てS体の方が多く存在した (Makino et al., 1990a)。また、1MeTIQの生合成に関しても研究がなされており、フェネチルアミンとビルビン酸から1MeTIQを合成する酵素がミトコンドリア+シナプトゾーム画分に見出され、部分精製されている (Yamakawa et al., 1997)。

我々のグループは、TIQの主代謝物は4位の水酸化体であり、その代謝物はDAラットの雌が雄に比べて尿中で有意に減少していること、及びTIQが脳内や血漿中で有意に増加していることも見出している (Ohta et al., 1990)。DAラットの雌はデブリンソキンの poor metabolizer のモデル動物として知られており、デブリンソキンはTIQ骨格を有していることから、肝臓での解毒能の低い雌の脳内及び血漿中にTIQが蓄積していると考えられる。ヒトでデブリンソキン代謝酵素 (CYP2D6) の遺伝的欠損者が、パーキンソン病になりやすいというデータと合わせて考えてみると意義のある結果である。TIQ、1MeTIQは、カテコール骨格を持たないため、脂溶性が高く、末梢から中枢への移行も容易であると思われる (Kikuchi et al., 1990)。

以上の事実から、TIQ誘導体はパーキンソン病と非常に関係の深い化合物であり、更に進んだ研究が期待される。また、パーキンソン病患者の脳脊髄液の、分子量10,000以下の分画には、中脳ドーパミン神経の機能を阻害する物質が含まれているという報告もあり (Hao et al., 1995a)、パーキンソン病において神経毒性を有する内在性低分子化合物が注目されている。

先程述べたように、パーキンソン病発症物質候補であるTIQ、パーキンソン病防御物

Table 1-1 Dosage schedule for the pole test

Group	First treatment	Second treatment
A (n = 6)	None	None
B (n = 6)	1-MeTIQ 80 mg/kg/inj., 2 inj./day, 5 days	Saline 1 inj./day, 5 days
C (n = 7)	Saline 1 inj./day, 5 days	MPTP 30 mg/kg/inj., 1 inj./day, 4 days
D (n = 7)	1-MeTIQ 80 mg/kg/inj., 2 inj./day, 5 days	MPTP 30 mg/kg/inj., 1 inj./day, 4 days
E (n = 6)	Saline 2 inj./day, 4} days	TIQ 80 mg/kg/inj., 2 inj./day, 4} days
F (n = 6)	1-MeTIQ 80 mg/kg/inj., 2 inj./day, 4} days	TIQ 80 mg/kg/inj., 2 inj./day, 4} days

There was a 2 day interval between the first and the second treatments.

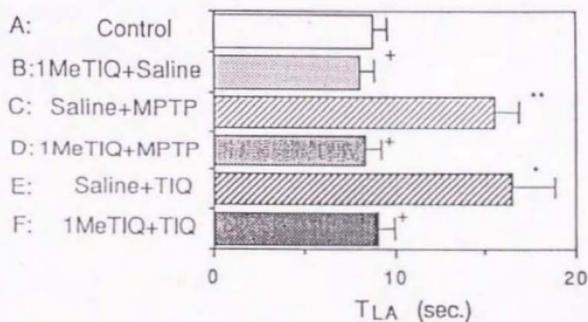
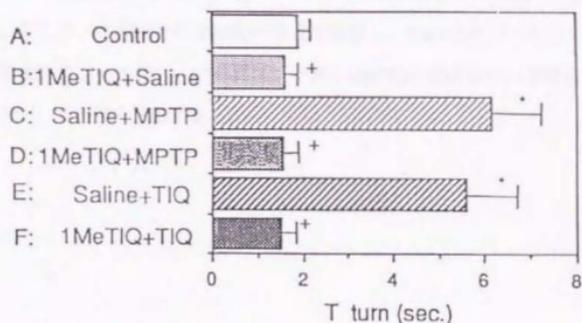


Fig. 1-4 Effect of TIQ and 1MeTIQ on parkinsonism (bradykinesia).
 +, not significantly different from control. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.
 (Tasaki et al., 1991)

質候補である1MeTIQは、フェネチルアミンとC1、C2ユニットからそれぞれ生合成される。一方、フェネチルアミンとフェニルアセトアルデヒドが環化縮合すると、1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1BnTIQ) が生成することが考えられる (Fig. 1-5)。フェニルアセトアルデヒドはフェネチルアミンのMAO-Bによる代謝物であり、このことから1BnTIQが内在性アミンである可能性が示唆されている。生体内に存在しているとすると、TIQ、1MeTIQと同様に、パーキンソン病発症と深い関連があることが予想される。そこで、生体内での1BnTIQの存在を確認し、1BnTIQのパーキンソン病態に於ける量的変動について調べ、パーキンソン病と1BnTIQの関係について明らかにしようというのが、本研究の目的である。



Fig. 1-5 Synthesis of 1BnTIQ from phenylethylamine and phenylacetaldehyde

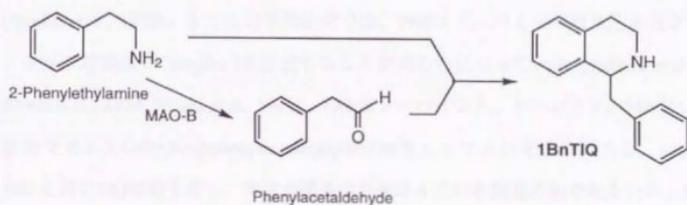
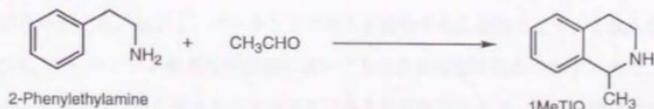


Fig. 1-5 Biosynthetic pathways of 1MeTIQ and 1BnTIQ

第2章 1BnTIQの生体内からの検出及び定量

TIQと1MeTIQは種々の霊長類や齧歯類から検出され、定量されている (Kohno et al., 1986; Niwa et al., 1987; Ohta et al., 1987; Makino et al., 1990a; Tasaki et al., 1991)。それらの実験結果から、両化合物はパーキンソン病発症において重要な役割を果たしている可能性がうかがえる。しかし、パーキンソニズムを誘発する化合物としてよく知られているTIQは、パーキンソン病患者死後脳においても有意な増加は認められず、また、自然発症のパーキンソン病を考える上で不可欠である黒質線条体のドーパミン神経の脱落は広範に研究されているが、未だ確認されていない。そこで、TIQにかわる神経細胞死を誘発しうる候補化合物として、TIQと比較して更に脂溶性の高い1BnTIQを新規神経毒として分子設計し、標品を合成してその内在性を検討した。1BnTIQと構造のよく似たTIQ誘導体としてtetrahydropapaveroline (THP) があり (Fig. 2-1)、この化合物は今から20年以上も前に、L-DOPA治療を施されていたパーキンソン病患者の尿中から検出されている (Sandler et al., 1973)。また生化学的研究では、THPはドーパミンの取り込み及びミトコンドリア呼吸鎖のComplex Iを阻害することが明らかになっている (Heikkila et al., 1971; Alpers et al., 1974; Suzuki et al., 1990)。THPはドーパミンと、ドーパミンのMAOによる代謝物である3,4-dihydroxyphenylacetaldehydeが縮合してできた化合物である。1BnTIQはTHPと同じTIQ骨格を有し、両者の構造の相違は4個の水酸基のみであるため、1BnTIQとTHPの生体内に存在する量、活性の差異も興味深い。

1 マウス脳内からの1BnTIQの検出

まず初めに、生体内に存在すると考えられる1BnTIQの、マウス脳内からの検出を行った。

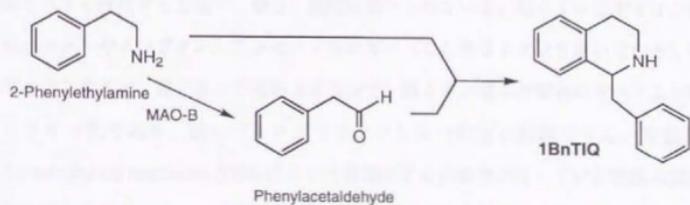
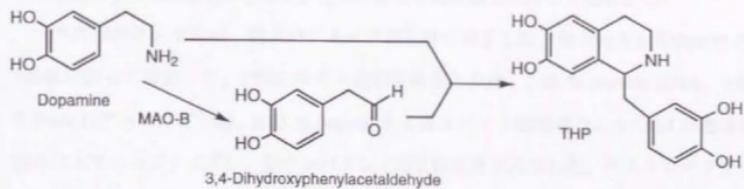


Fig. 2-1 Biosynthetic pathways of THP and 1BnTIQ

標品である1BnTIQの合成は、文献の方法(Gray et al., 1989)を一部改良して行った。フェネチルアミンとフェニルアセチルクロライドからアミドをつくり、五酸化二リンで環化してできたイミンを水素化ホウ素ナトリウムで還元して合成した(Fig. 2-2)。この1BnTIQは塩化水素飽和エーテルにて1BnTIQ塩酸塩とし、ジクロロメタンとアセトンから再結晶により精製を行い保存し、必要に応じて遊離塩基に戻して使用した。

マウス脳のサンプルは、我々のグループで以前に確立した方法(Fig.2-3; Kohno et al., 1986)に従って調整した。C57BLマウス全脳を摘出した後、0.05 % (wt/vol) EDTA、0.05 % (wt/vol) アスコルビン酸、0.02 % (wt/vol) セミカルバジド塩酸塩の入った0.4 M過塩素酸を加えてホモジナイズし、除タンパクして塩基性画分を抽出した。ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(GC-MS)により分析するため、標品とサンプルは共にヘプタフルオロ酪酸(HFB)無水物により誘導化し、1BnTIQ-HFB体として検出を行った。

陽イオン電子衝撃法、及び陰イオン化学イオン化法により得られたマススペクトルをFig. 2-4に示す。陽イオン電子衝撃法とは、電子により衝撃を与えて分子をイオン化させ、陽イオンを検出する方法で、最も一般的に用いられている。陰イオン化学イオン化法とは、メタンやイソブタン、アンモニア等のガス(ここではメタンを用いている)によってイオン化させ、陰イオンを検出する方法で、陽イオン電子衝撃法に比べてより穏やかなイオン化であり、低いバックグラウンドと高い感度が期待できる。定量には、GC-selected ion monitoring (SIM) 法という目的とする化合物が有している特定の質量数のみのピークをモニターして感度を向上させ、ノイズを少なくする方法を用いた。この方法により、GC-MSの数百倍から数千倍の感度が期待できる。定性分析は、 m/z 359、379、399に3本の特徴的なピークの得られる陰イオン化学イオン化法により行った。

結果をFig. 2-5に示す。陰イオン化学イオン化法において、1BnTIQ-HFB体の m/z 359、379、399の3本のピークが標品とマウス脳のサンプルの両方にみられ、マウス脳のサンプルの3本のピーク比並びに保持時間は標品のそれと一致した。また、標品とマウス脳のサンプルを一緒に注入したところ、ピークは重なることがわかった。

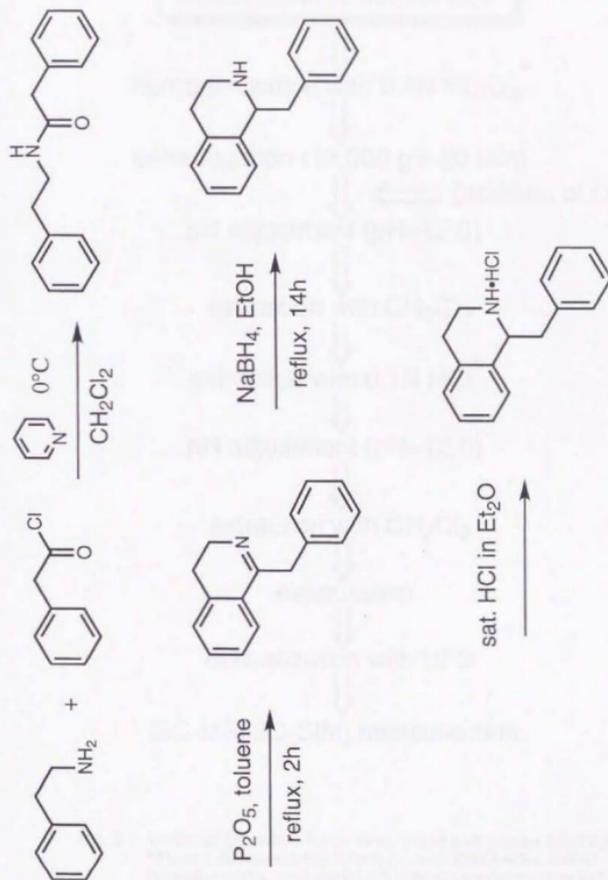


Fig. 2-2 Organic synthesis of 1BnTIQ

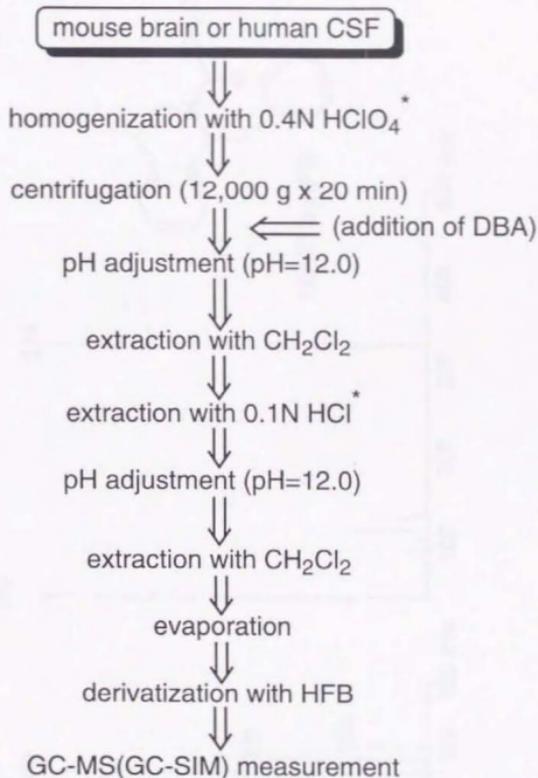


Fig. 2-3 Analytical procedure for the detection of endogenous IBnTIQ.

*These solutions contain 0.05% (wt/vol) EDTA•4Na, 0.05% (wt/vol) ascorbic acid and 0.02% (wt/vol) semicarbazide•HCl.

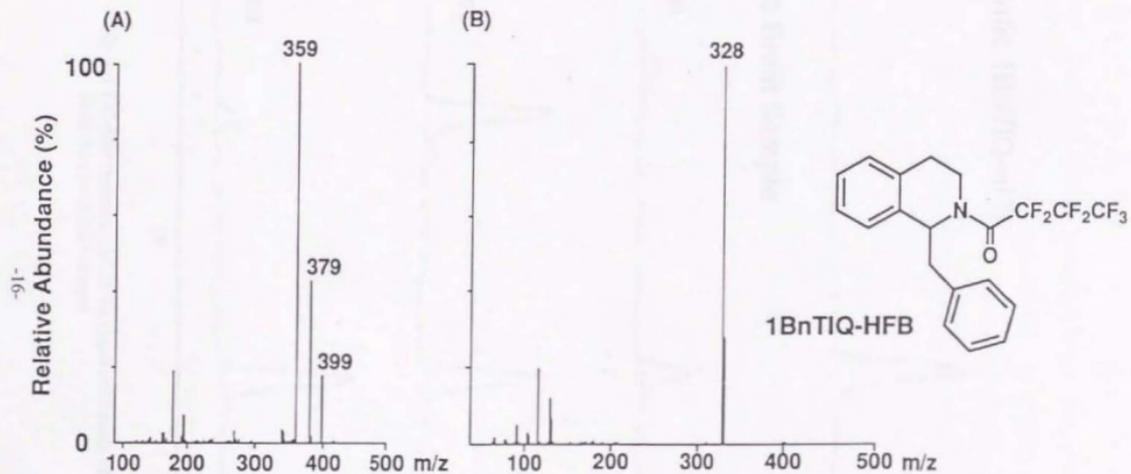
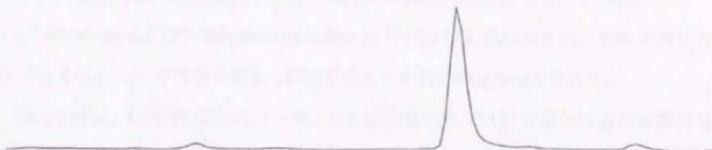


Fig. 2-4 Mass spectra of the authentic HFB-derivatized 1BnTIQ. (A) negative CI mode. (B) positive EI mode.

Authentic 1BnTIQ-HFB



Mouse Brain Sample

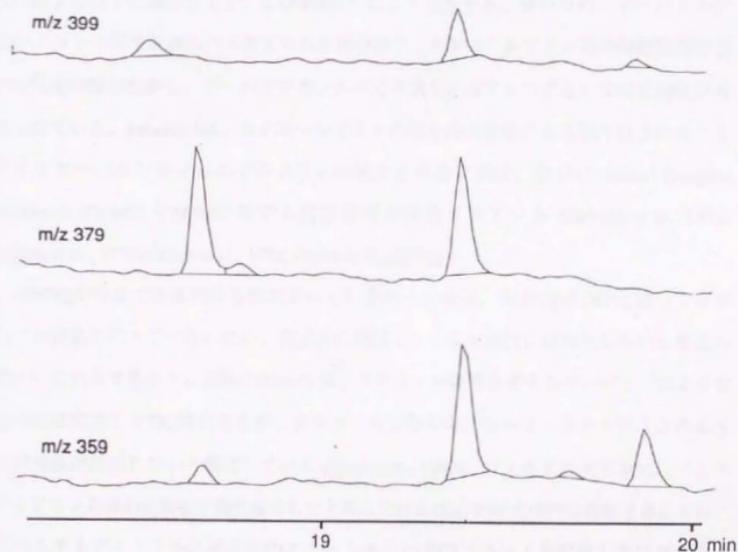


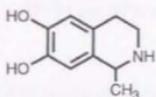
Fig. 2-5 GC-SIM chromatogram in the negative CI mode of 1BnTIQ from the mouse brain sample.

THP 以外の内在性 TIQ 類としては、TIQ、1MeTIQ、Salsolinol、7-hydroxy-TIQ-3-carboxylic acid (HTIC)、6-hydroxy-7-methoxy-TIQ-3-carboxylic acid (HMTIC)、6-methoxy-7-hydroxy-TIQ-3-carboxylic acid (MHTIC) (Nakagawa et al., 1997)、1-(3',4'-dihydroxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (3',4'DHBnTIQ)、1-benzyl-

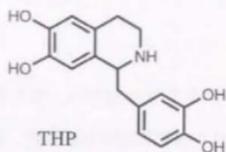
6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (6,7DHBnTIQ) (Kawai et al., 1998) が挙げられる (Fig. 2-6)。この中で最も詳しく研究されているのは Salsolinol であろう。

Salsolinol は、L-DOPA 投与のパーキンソン病患者尿中に THP と同時に存在が報告されたアルカロイドで (Sandler et al., 1973)、アルコール中毒者で増加していることからアルコール毒性の原因である可能性が示唆されていることもあって興味を持たれ、研究されてきた。Salsolinol は L-DOPA 治療を受けていないパーキンソン病患者の尿中では、健常人の約 5 分の 1 に減少するが、L-DOPA 投与により上昇する。そのため、ドーパミンが C2 ユニットの得て閉環したと考えられる化合物で、カテコールアミン系の神経伝達物質との構造の類似性から、ドーパミンやノルエピネフリンのアナログとしての可能性が考えられている。Salsolinol は、カテコールアミンの取り込み機構により取り込まれることによるドーパミンやノルエピネフリンの取り込み阻害活性、並びに catechol O-methyl transferase (COMT) や MAO に対する阻害活性が報告されている (Heikkila et al., 1971; Collins et al., 1973; Cohen et al., 1974; Alpers et al., 1975)。

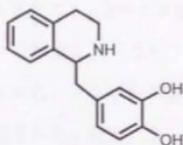
1BnTIQ が今まで生体内から検出されていなかったのは、1BnTIQ が THP と違ってカテコール骨格を持っていないため、化学的に環化しにくく生体内には存在しないと考えられていたからであろう。実際に Davis らは、カテコール骨格を有するドーパミンのような化合物は閉環して TIQ 類になるが、カテコール骨格を持たないフェネチルアミンのような化合物は閉環しないと報告している (Davis et al., 1982)。フェネチルアミンと、フェネチルアミン自身の代謝物が環化縮合したと考えられる 1BnTIQ が生体内に存在することは、フェネチルアミン以外に新たに C1 ユニットのあるいは C2 ユニットの想定しなければならぬ TIQ や 1MeTIQ と比較しても、より合理的であるといえる。



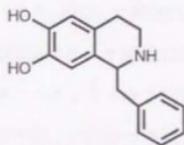
Salsolinol



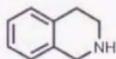
THP



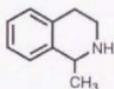
3',4'DHBnTIQ



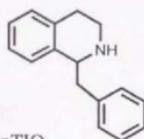
6,7DHBnTIQ



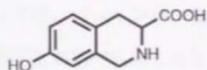
TIQ



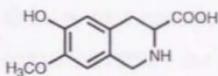
1MeTIQ



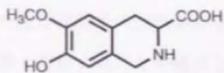
1BnTIQ



HTIC



HMTIC



MHTIC

Fig. 2-6 Endogenous TIQ derivatives

2 マウス脳内1BnTIQの定量

次に、マウス脳内の1BnTIQ量を明らかにするため、C57BLマウスを用いて1BnTIQ量をGC-SIM法を用いて測定した。サンプルの調製、測定条件は前節で述べた通りである。

その結果、C57BLマウス脳内の1BnTIQ量は、 7.67 ± 1.60 ng/g wet brain (mean \pm SEM, n=5)であった。フェネチルアミンをマウス全脳のサンプルに添加して同様の抽出操作を行い、アーティファクトを検討したところ、1BnTIQ-HFB体のピーク面積はほとんど増加しなかった。このことから、サンプルの調製の段階でアーティファクトはほとんど生成していないことが確認された。以前に我々のグループでは、C57BLマウスのTIQ量、1MeTIQ量が既に測定されており、それぞれ 1.1 ± 0.8 ng/g wet brain、 9.8 ± 0.7 ng/g wet brain (mean \pm SEM)であることが知られている (Tasaki et al., 1991)。同じTIQ骨格を持ち、構造的に非常に良く似たTIQ、1MeTIQ、1BnTIQの3者が同程度の量存在するという事は、これらが生合成過程において密接に絡んでいる可能性を示唆する。

3 マウス脳内1BnTIQの光学異性体存在比の検討

1BnTIQは1位に不斉炭素を持ち、R体とS体の両方が存在する。以前に我々のグループでは、パーキンソン病防御物質候補である1MeTIQの生体内及び食品中の光学異性体存在比が調べられており、1MeTIQは生体内ではS体の方が多く存在することが確認されている (Makino et al., 1990a)。1BnTIQは、生体内ではR体とS体のどちらが多く存在しているのだろうか。これを調べるために、キラルな誘導化剤を用いて、マウス脳内1BnTIQの光学異性体存在比をGC-SIM法により測定した。

まず、合成した1BnTIQをダイセル化学工業の光学分割カラムCHIRALCEL OJを使って、HPLCで光学分割したところ、2本の完全分離可能なピークが得られたので、それぞれ

の旋光度を測定し、文献値と比較して、R体、S体を同定した。これらを標品として、標品とC57BLマウス全脳を6匹分合わせたサンプルに(-)-perfluoro-2-propoxypropionyl (PPP) chlorideを添加して誘導化した後、GC-SIM法により、光学異性体存在比を調べた。

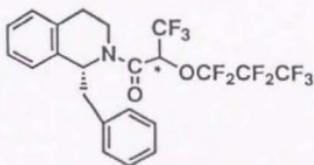
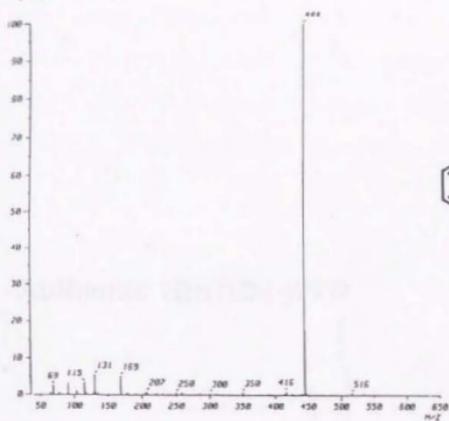
はじめに、GC-MSによりマススペクトルを測定した (Fig. 2-7)。この測定条件では、保持時間の早いピークがR体、遅いピークがS体であった。1BnTIQ-PPP体はR体、S体ともにm/z 444にbase peakを持つことが明らかとなり、このm/z 444をモニターしてGC-SIMを行った (Fig. 2-8)。その結果、標品では保持時間の早いピークの面積 / 保持時間の遅いピークの面積、つまりR/S=0.560であり、マウス脳のサンプルではR/S=0.578であった。マウス脳の結果を標品の結果で補正すると、マウス脳内の1BnTIQはR/S=1.03とラセミないしはラセミに近い形で存在していることが明らかとなった。このことは1BnTIQ生成過程の最終段階が非酵素関与であることを示唆している。

ここで他のTIQの光学異性体存在比について述べたい。カテコール骨格を有するSalsolinolは、健康人の尿中においてR体が多く存在する。一方食品中ではポートワインでS体が多く、Salsolinolを豊富に含む乾燥したバナナにはR/S=1の割合で存在する。L-DOPA治療が施されているパーキンソン病患者、及びL-DOPAを投与された健康人の尿中ではR/S=1であることから、生体内で合成されるSalsolinolはR体であることが示唆される (Benedetti et al., 1989a; Dostert et al., 1989; Benedetti et al., 1989b)。

1MeTIQはマウス脳においてR/S=0.60の割合でS体が多いものの、R体も存在することが知られている (Makino et al., 1990a)。このことは1MeTIQの生合成過程の少なくとも一部が酵素関与である可能性を示唆しており、実際にC57BLマウス全脳のマイクロソーム+サイトゾール分画で1MeTIQが酵素関与で生成することをin vitroの実験において明らかにしている (Tasaki et al., 1993)。また食品中の1MeTIQも、例えばココア、ワインではR/S=0.55, 0.24とS体がR体に比べて豊富である。

今回の実験から、1BnTIQ生合成過程の最終段階が酵素非関与であることが示唆された。この点において、1MeTIQとは異なるスキームで1BnTIQが生成することが予想され、1BnTIQと1MeTIQの生成に、共通の酵素等の調節機構が存在するか否かにも興味を持た

(A)



(B)

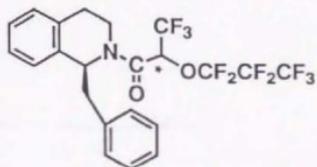
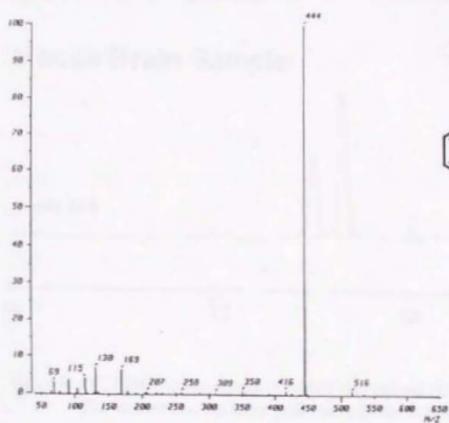
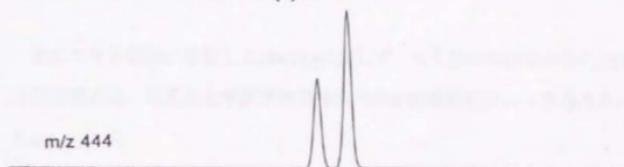


Fig. 2-7 Mass spectra of (-)-PPP-derivatized 1BnTIQ in the positive EI mode.
(A) R diastereomer, (B) S diastereomer.

Authentic 1BnTIQ-(-)PPP



Mouse Brain Sample

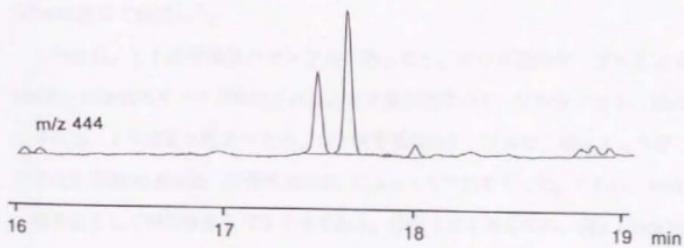


Fig. 2-8 GC-SIM chromatogram of (-)PPP-derivatized 1BnTIQ from the mouse brain. The former and the latter peaks were R and S diastereomer, respectively.

れる。1MeTIQ合成酵素について、現在我々のグループで精力的に研究が行われており、精製途中であるが(Yamakawa et al., 1997)、1BnTIQはこの酵素による1MeTIQの生成を阻害することが示唆されている。加えて、食品中の1BnTIQの光学異性体存在比を検討することも、脳内1BnTIQが食品由来である可能性を考える上で重要であると思われる。

4 ヒト脳脊髄液中からの1BnTIQの検出

次にマウス脳内に存在した1BnTIQに関して、ヒト脳脊髄液中からの検出を試みた。ヒト脳脊髄液は、順天堂大学医学部脳神経内科水野美邦教授から恵与されたものを使用した。

ヒト脳脊髄液のサンプルに関しても、1に述べたマウス脳からの検出と同様に、同じ0.4 M過塩素酸を加えて除タンパクした後、塩基性画分を抽出、HFBで誘導化を行い、GC-SIM法にて検出した。

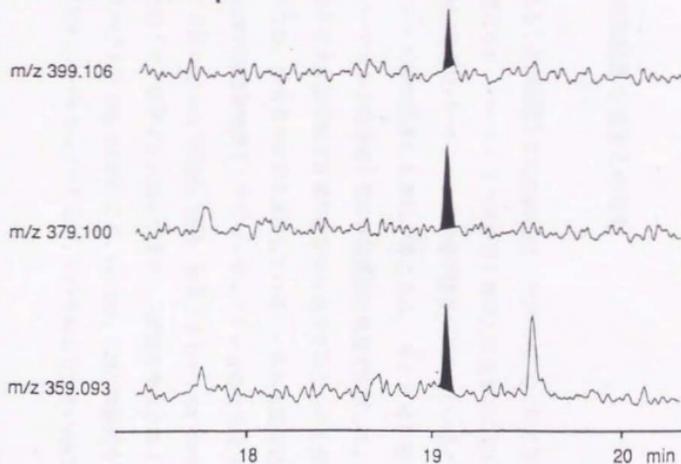
その結果、ヒト脳脊髄液のサンプルに関しても、マウス脳のサンプルと全く同様に1BnTIQ-HFB体のピークが検出された。ヒト脳脊髄液のサンプル全てから、1BnTIQは検出された。より確実な同定のため、ヒト脳脊髄液のサンプルは、陰イオン化学イオン化法で高分解能GC-SIM法(分解能10,000)によっても検出を行った。これは、MSのスリット幅を狭くして選択性を上げる方法である。感度は落ちるものの、例えば m/z 359.093と359.094の区別ができるようになり、これにより分子式が決定できるため、定性分析の有用な手段となりうる。

ヒト脳脊髄液のサンプルを、陰イオン化学イオン化法の高分解能GC-SIM法(分解能10,000)で測定した結果をFig. 2-9に示す。1BnTIQ-HFB体の m/z 359.093、379.100、399.106の3本のピークが、標品とヒト脳脊髄液のサンプルの両方にみられ、ヒト脳脊髄液のサンプルの3本のピーク比並びに保持時間は、標品のそれと一致した。以上より、

Authentic 1BnTIQ-HFB



Human CSF Sample



-25-

Fig. 2-9 High resolution GC-SIM chromatogram in the negative CI mode of 1BnTIQ from human CSF sample.

内在性脳内アミンとして1BnTIQが、マウス脳と同様に、ヒト脳脊髄液中に存在することが示された。

5 パーキンソン病患者の脳脊髄液中1BnTIQの定量

(1) 他の神経疾患の患者との比較

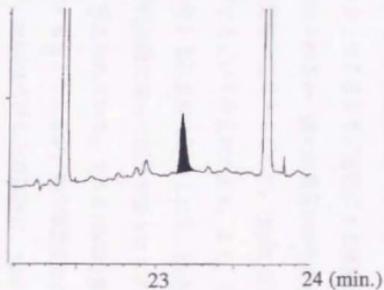
内在性脳内アミンであることが確認された1BnTIQは、TIQや1MeTIQと同じフェネチルアミンから生成すると考えられ、パーキンソン病患者と健常人の死後脳において、TIQ量に有意差はないが、1MeTIQ量はパーキンソン病患者で顕著に減少していることから、脳内1BnTIQ量とパーキンソン病の関連にも興味を持たれる。そこでヒト脳脊髄液中1BnTIQの定量を行い、パーキンソン病患者と他の神経疾患の患者で比較した。ヒト脳脊髄液は前節と同様に、順天堂大学医学部水野美邦教授から恵与されたものを使用した。ヒト脳は入手困難であるため、脳自身の変化を反映しているといわれる脳脊髄液を用いた。ヒト脳脊髄液3~10 mlを内部標準物質としてジベンジルアミン (DBA) を添加した後、定性分析のときと同様の方法 (Fig. 2-2) で抽出、濃縮、誘導化を行い、GC-SIM法で定量した。定性分析で用いた陰イオン化学イオン化法ではなく、測定の簡便な陽イオン電子衝撃法を用いた。マススペクトル (Fig. 2-3 (B)) より、 m/z 328、329に特徴的なピークが観察され、この2つのマスナンバーをモニターしたが、このうちより大きい m/z 328のピークを使って定量した。

Fig. 2-10は陽イオン電子衝撃法で測定したヒト脳脊髄液のGC-SIMチャートである。左が1BnTIQ-HFB体の m/z 328、右が内部標準物質であるDBA-HFB体の m/z 302のクロマトグラムで、標品と保持時間が一致することにより、これらをそれぞれのピークと同定した。

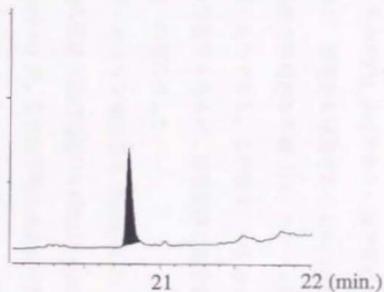
パーキンソン病患者と他の神経疾患の患者の、脳脊髄液中1BnTIQ量と年齢の相関を表

M. B.
(PD, 55, male)

HFB-derivatized 1BnTIQ (m/z 328)



HFB-derivatized dibenzylamine (m/z 302)



M. K.
(PD, 65, male)

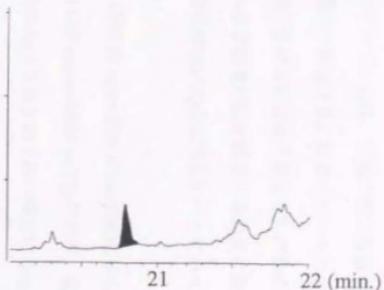
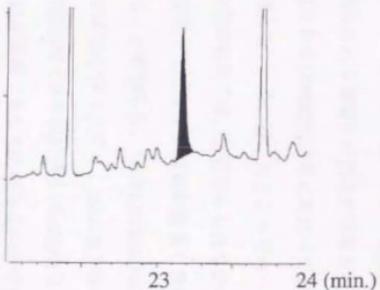


Fig. 2-10 GC-SIM chromatogram in the positive EI mode of human CSF samples. The mass numbers used for quantitative analysis were m/z 328 (HFB-derivatized 1BnTIQ), 302 (HFB-derivatized dibenzylamine as an internal standard). The retention time of human CSF samples agreed with that of the authentic sample.

したものがFig. 2-11である。脳脊髄液のサンプルには、手術の際に脳室から採取されたものと、腰部から採取されたものの2種類が存在する。前者はパーキンソン病を含む神経疾患の外科的な手術（パーキンソン病における定位脳手術など）の際に検査用に採取されたものである。この両者、いわゆる脳室髄液と脳脊髄液には溶質の濃度勾配が存在する可能性もあるが、脳室髄液と脳脊髄液の1BnTIQ量は同じレベルにあったので、結果を同一の図に示した。

パーキンソン病患者の1BnTIQ量は 1.17 ± 0.35 ng/ml CSF (mean \pm SEM, n=18)、他の神経疾患の患者の1BnTIQ量は 0.40 ± 0.10 ng/ml CSF (mean \pm SEM, n=11)であり、有意差はなかった(p=0.10)が、前者の平均は後者の平均に比べて約3倍と高い傾向にあった。約60歳以上の数人のパーキンソン病患者の1BnTIQ量が非常に高く、その他のパーキンソン病患者では、他の神経疾患の患者と同じレベルであった。若い世代に1BnTIQ量の高い人は存在しなかったことより、老化による長期間にわたる蓄積との関係が示唆される。つまり、生合成されるか、或いは食品中から摂取された1BnTIQが長年にわたって蓄積し、個人的な感受性の差はあるものの、1BnTIQ量があるレベルに達したところでパーキンソン病を発症するという考え方である。また、今回の実験では、性差はみられなかった。

老化と共に量的に減少したり、活性が低下したりする酵素が数多く存在する中で、MAOは加齢に従って活性が徐々に上がることが知られ、1BnTIQはMAO-B関与で生成すると考えられている。すると1BnTIQ量の年齢に伴う上昇は、MAO-B活性の上昇によるものとも考えられるが、他の神経疾患の患者群では年齢に伴う1BnTIQ量は認められないので、MAO-B活性の上昇以外に、1BnTIQが蓄積するための何らかの分子機構が働いていると思われる。

自然発症のパーキンソン病は複数の因子により発症する疾患である可能性が考えられ、そのうちのひとつの要因が1BnTIQであるかもしれない。他の神経疾患の患者(neurological control)群には様々な神経疾患が含まれるので、脳脊髄液中1BnTIQ量が多いという傾向はパーキンソン病患者に特有のものである。パーキンソン病は代表的な神経難病のひとつに数えられ、その原因は全く解明されていない。生化学試験や画像診断を

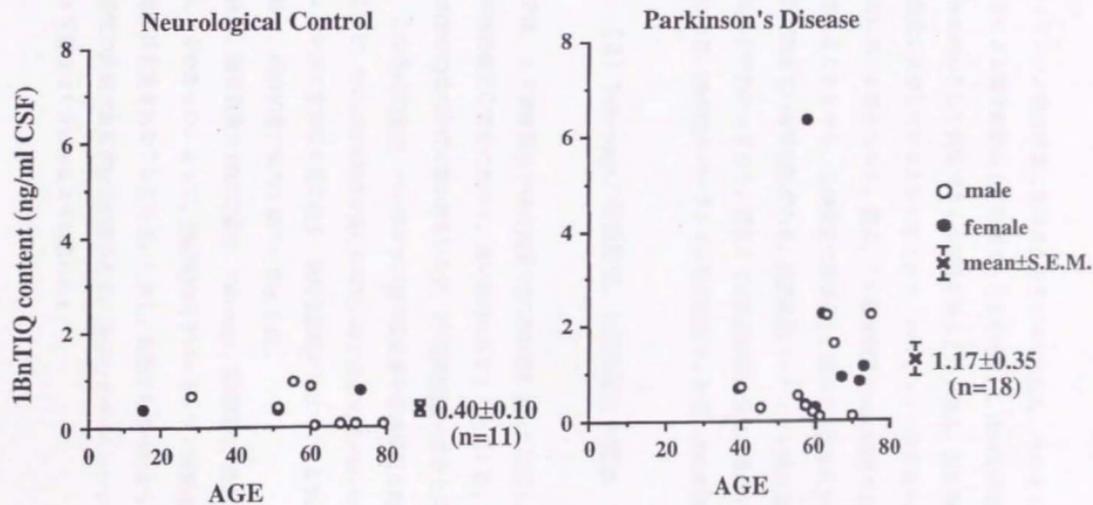


Fig. 2-11 1BnTIQ content in parkinsonian CSF

含むパーキンソン病の検出に使用されるあらゆる方法も、今のところ迅速性と特異性の点で医者による臨床診断以上に信頼できるものはない。1BnTIQが自然発症パーキンソン病のearly markerとして使用できる可能性があると思われる。脳脊髄液中濃度の変化は脳自体の変化を反映しているといわれており、パーキンソン病患者の脳自体の1BnTIQ量も多い傾向にあると考えられる。更に、この脳脊髄液中1BnTIQ量の変動は二次的なものであると考えることもでき、この仮定に基づくと、脳内では直接的かつより大きな1BnTIQ量の変化が起きている可能性がある。自然発症パーキンソン病は遺伝的素因の少ない疾患であることがわかっており、現在までに臨床診断に役立つ遺伝子等のearly markerが存在しないので、1BnTIQとパーキンソン病の関係のより深い追究が望まれる。

(2) Yahr stage、罹病期間、発症年齢との関係

前節では、ヒト脳脊髄液中1BnTIQ量をGC-SIM法によって測定し、パーキンソン病患者が他の神経疾患の患者に比べて、高い傾向にあることを示した。パーキンソン病患者の中には1BnTIQ量の非常に高い者もいたが、他の神経疾患の患者と同レベルの者もいた。そこで、この1BnTIQ量は、パーキンソン病の重症度や罹病期間と関係があり、重症であればあるほど、或いは罹病期間が長ければ長いほど1BnTIQ量が高いのではないかと考え、パーキンソン病の重症度を表す最も一般的な指標のひとつであるYahr stage、罹病期間、発症年齢と、1BnTIQ量との関係を調べた (Fig. 2-12)。

この結果、脳脊髄液中1BnTIQ量は、Yahr stage、罹病期間、発症年齢のどれとも相関がないことがわかった。よって、1BnTIQのみがパーキンソン病発症の原因物質であるという可能性は否定されたことになる。しかし、前節でも述べたように、パーキンソン病は多因子性の疾患である可能性が高いので、1BnTIQがパーキンソン病の原因物質のひとつである可能性は十分にあるように思われる。

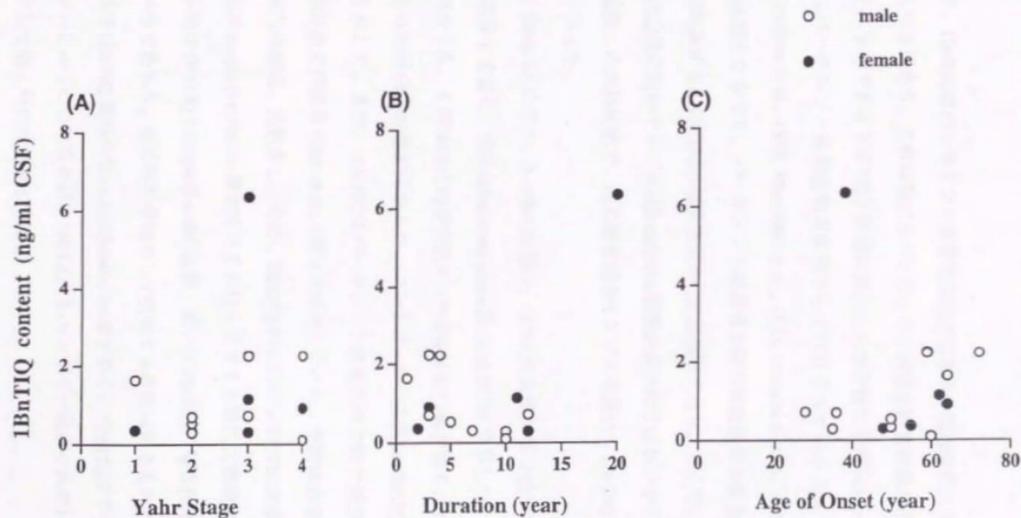
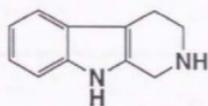


Fig. 2-12 Relationship IBnTIQ content and (A) Yahr stage, (B) duration, (C) age of onset.

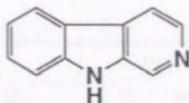
6 ヒト脳脊髄液中1BnTIQ、1MeTIQと β -carbolineの同時定量

前節で、1BnTIQはパーキンソン病患者の脳脊髄液中で増加傾向にあることが示されたが、ばらつきがあり、これは他にもパーキンソン病発症物質候補が存在することを示唆している。トリプタミンがTIQと同様に環化した化合物として β -carboline類があり、TIQと同様にパーキンソン病発症物質候補として注目されている (Fig. 2-13; Drucker et al., 1990; Matsubara et al., 1993; Matsubara et al., 1995; Matsubara et al., 1996)。Fig. 2-14は、 β -carboline類のなかでも、パーキンソン病患者と他の神経疾患の患者で顕著な差がみられる2,9-Me₂NH⁺と、1BnTIQの脳脊髄液中の定量結果である。そこで、パーキンソン病患者で1BnTIQ量の低いサンプルは β -carboline類量が高いのではないかと考え、旭川医大松原和夫先生との共同研究で、同じ脳脊髄液サンプルを用いて1BnTIQと β -carboline類の同時定量を行った。

結果をTable 2-1に示す。 β -carboline類は、HPLC蛍光検出器で検出可能な β -carbolinium cationの総量を定量し、全 β -carbolinium cation量 (total BC's) で示した。パーキンソン病患者の2例のうち、1例は1BnTIQ量が低かったがtotal BC's量が高く、もう1例はtotal BC's量が低かったが1BnTIQ量が高かった。コントロールの2例は1BnTIQもtotal BC'sも中程度の値を示した。また、1MeTIQはパーキンソン病患者の2例で減少しており、これは以前の脳自身での結果 (Ohta et al., 1987) を支持している。今回は測定の都合上、1BnTIQとtotal BC'sの測定、比較をしたため、1BnTIQがtotal BC'sの約100倍多い結果となった。total BC'sはsimple β -carboline類がN-メチル化してできる毒性代謝物であると考えられており、本来は1BnTIQとsimple β -carboline類、或いは1BnTIQの毒性代謝物とtotal BC'sを比較するべきであろう。更に例数を増やして検討する必要はあるものの、パーキンソン病患者の中で1BnTIQ量の少ない人は β -carboline量が多く、1BnTIQ量の多い人は β -carboline量が少ないということになれば、1BnTIQと β -カルボリン類がそれぞれパーキンソン病発症物質として働く可能性が考えられる。

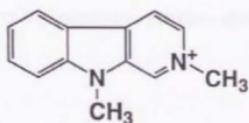


tetrahydro- β -carboline (THBC)

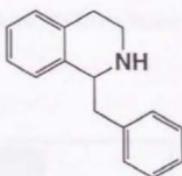


β -carboline (BC)

Fig. 2-13 Structures of endogenous β -carbolines



2,9-Me₂NH⁺



1BnTIQ

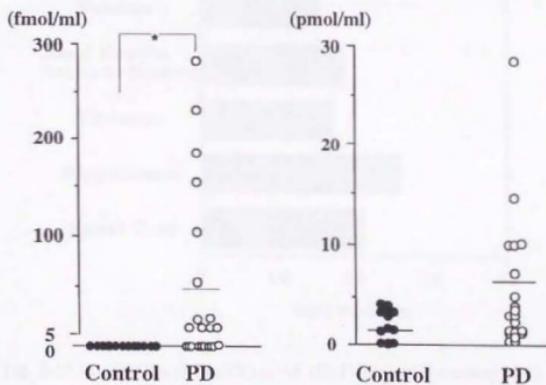


Fig. 2-14 2,9-Me₂NH⁺ and 1BnTIQ contents in parkinsonian CSF

	Control		PD	
	Y. T.	R. H.	F. N.	M. M.
total BC ⁺ s (fmol/ml)	39	31	53	14
1BnTIQ (pmol/ml)	4.30	3.45	1.57	14.57
1MeTIQ (pmol/ml)	13.54	5.51	3.88	1.84

Table 2-1 Simultaneous detection of total BC⁺s and 1BnTIQ in human CSF

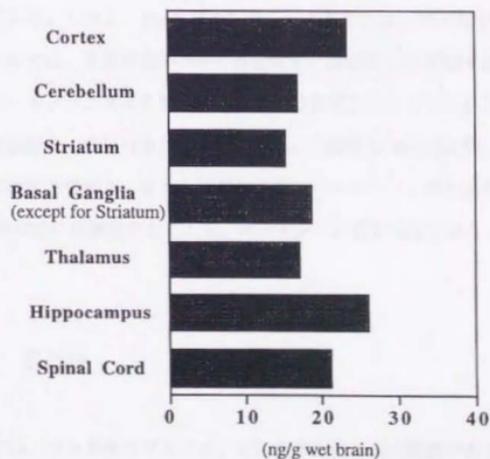


Fig. 2-15 Distribution of 1BnTIQ in the 1BnTIQ-injected monkey brain

7 1BnTIQ連投サルの脳部位別1BnTIQの定量

以前に我々のグループでは、自治医科大学吉田充男名誉教授らとの共同研究により、カンクイサルに1BnTIQ・HCl 22mg/kgを66日間皮下注射したときの行動変化について、9つの項目別にスコアをつけ、その結果、カンクイサルには急性毒性と慢性毒性が観察され、1BnTIQの連投によりパーキンソニズムが認められている (Kotake et al., 1996)。このサルの右脳の部位別1BnTIQ量をGC-SIM法により定量した。サンプルの抽出、誘導化、測定は、第5節で述べた方法に従った。

結果はFig. 2-15に示す通りで、1BnTIQ連投サルの脳の1BnTIQ量に部位間に差は認められず、黒質線条体のみを集積性はみられなかった。サルは非常に貴重な実験動物であり、コントロールのサル脳の入手が不可能であったため、コントロールとの比較ができないのが残念である。しかし、Fig.2-15のみからいえることは、1BnTIQは、皮下注射により連投したサルでは、黒質線条体のみを集積せず、1BnTIQが黒質線条体のみを集積することによりパーキンソニズムを発症する可能性は否定されたことになる。ただし、違う投与方法、実験動物、或いは生体内で合成される内因性の1BnTIQに関してはこの限りではなく、更に検討を要する。また、黒質線条体にパーキンソン病を発症させる分子機構があれば、1BnTIQに集積性がなくとも、パーキンソン病を発症させることは可能である。

8 まとめ

この章では、フェネチルアミンと、それ自身のMAO-B代謝物であるフェニルアセトアルデヒドが環化縮合してできると考えられる1BnTIQを、マウス脳内、及びヒト脳脊髄液中から検出した。また、ヒト脳脊髄液中1BnTIQを定量してパーキンソン病患者と他の神経疾患の患者と比較し、パーキンソン病患者の1BnTIQ量で増加傾向にあることを示した。

マウス脳内で1BnTIQの光学異性体存在比を検討したところ、R/S≒1で存在することがわかり、このことは1BnTIQの生合成過程や、1MeTIQ生合成過程との関連を考える上で、重要な手がかりになると思われる。

パーキンソン病患者の脳脊髄液中に量的に高い傾向のあった1BnTIQには、生体内で何らかの神経毒性を有している可能性が考えられる。これについては次章以降で検討する。

第3章 パーキンソン病治療薬デプレニルの効果

1 1BnTIQ *in vitro* 生合成における阻害

MAO-B阻害剤であるL-デプレニル (Fig. 3-1) は、日本では認可されていないものの、欧米ではパーキンソン病治療薬として広く臨床応用されている (Parkinson Study Group, 1989a; Parkinson Study Group, 1989b)。その作用機序はドーパミンの代謝を阻害するためや、MPTP構造類似神経毒の代謝を抑制し、作用を発現させないようにするためではないかといわれているが、抗酸化作用によるという説、神経栄養因子の量を増加させることによるという説も唱えられている。また、近年パーキンソン病に対する効果のみならず、記憶の増強といった他の脳部位で効いているという報告もあり、混沌としている (Gerlach et al., 1992; Wu et al., 1994)。ここではまず、フェネチルアミンを基質としたときの1BnTIQ生合成、並びにそれに及ぼすデプレニルの効果について検討を行った。

C57BLマウス全脳の核分画を除いたホモジネートを調製し、酵素源とした。デプレニルはモノアミン酸化酵素を十分に阻害する10 μ Mの濃度を用いた。反応は1 mMフェネチルアミンを酵素源とともに60分間インキュベートし、2M NaOHで反応を停止した後、塩基性画分を抽出、HFBで誘導化してGC-SIM法にて検出を行った。

結果をFig. 3-2に示す。Complete系では1BnTIQが約100 pmol生成したが、熱処理した酵素源を用いたときは、Complete系と比較して僅かしか1BnTIQが生成していなかった。これは1BnTIQが酵素関与で生成していることを示唆している。デプレニルはフェネチルアミンを基質とした*in vitro*の1BnTIQ生合成も阻害することが明らかとなった。この結果から、1BnTIQはMAO関与で生成することが示唆され、*in vivo*でも*in vitro*と同様に、1BnTIQがデプレニルにより減少する化合物である可能性が考えられた。

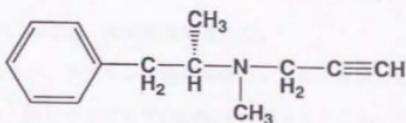


Fig. 3-1 Chemical structure of L-deprenyl

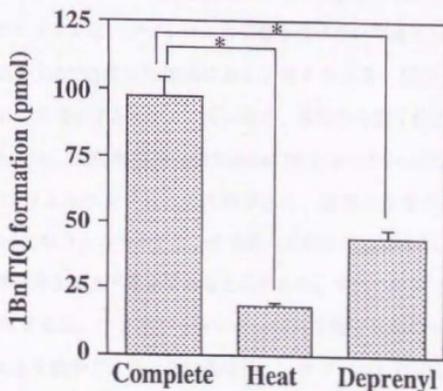


Fig. 3-2 Effect of deprenyl on *in vitro* biosynthesis of IBnTIQ. Columns and bars show mean+SEM values. Heat-denatured protein was used as a negative control. * $p < 0.001$ vs. complete.

2 デプレニル連投マウスの脳内1BnTIQ、1MeTIQ量の変動

そこで、デプレニル連投による1BnTIQの量的変動について調べた。C57BLマウスにデプレニル5 mg/kgを1日2回計4日間連投し、最終投与2時間後の全脳を取り出し、第2章の方法に従って1BnTIQ、1MeTIQを定量した。

その結果 (Fig. 3-3)、デプレニル連投群はコントロール群と比較して1BnTIQ量が有意に減少していた。同じサンプルで1MeTIQも定量したところ、デプレニル投与群で有意差はなかったものの1BnTIQとは反対に増加傾向にあった。また、1BnTIQの1MeTIQに対する量比を調べたところ、顕著な減少がみられた。この結果は以下のように考えられる。

デプレニルはFig. 3-4のように、MAO-Bを阻害することによりフェネチルアミンからフェニルアセトアルデヒドへの代謝を抑制し、これによって1BnTIQが減少すると考えられる。フェネチルアミンは代謝が抑制されることにより増加することが予想されるので、フェネチルアミンと、デプレニルの影響を受けないであろうC2ユニットから生成すると考えられる1MeTIQは増加傾向にあると考えられる。脳内フェネチルアミン量はMAO阻害剤により増加するといわれているが、数倍から数十倍と報告はまちまちである (Philips and Boulton, 1979; Riederer and Youdim, 1986; Youdim and Riederer, 1993; Scarr et al., 1994)。これはフェネチルアミンの代謝が速く、正確な定量が難しいためであろう。1BnTIQと1MeTIQはフェネチルアミンを共通の前駆体として持ち、両者のバランスはパーキンソン病態を考える上で重要であると思われる。今回の結果で、デプレニルが1BnTIQの1MeTIQに対する比、つまりパーキンソン病発症物質候補のパーキンソン病防御物質候補に対する比を減少させたことは興味深く、デプレニルによるパーキンソン病治療効果に、脳内の1BnTIQ/1MeTIQの減少が関与する可能性が示唆された。

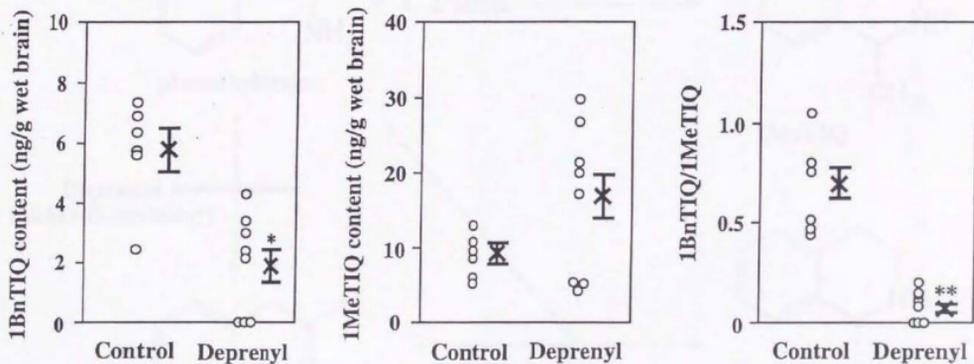


Fig. 3-3 1BnTIQ and 1MeTIQ content in the brain of deprenyl-treated mice. Mean \pm SEM values are also indicated in the figure. 1BnTIQ content and the ratio of 1BnTIQ to 1MeTIQ of deprenyl-treated mice were significantly reduced compared with those of nontreated mice. * p <0.005 vs. control, ** p <0.001 vs. control.

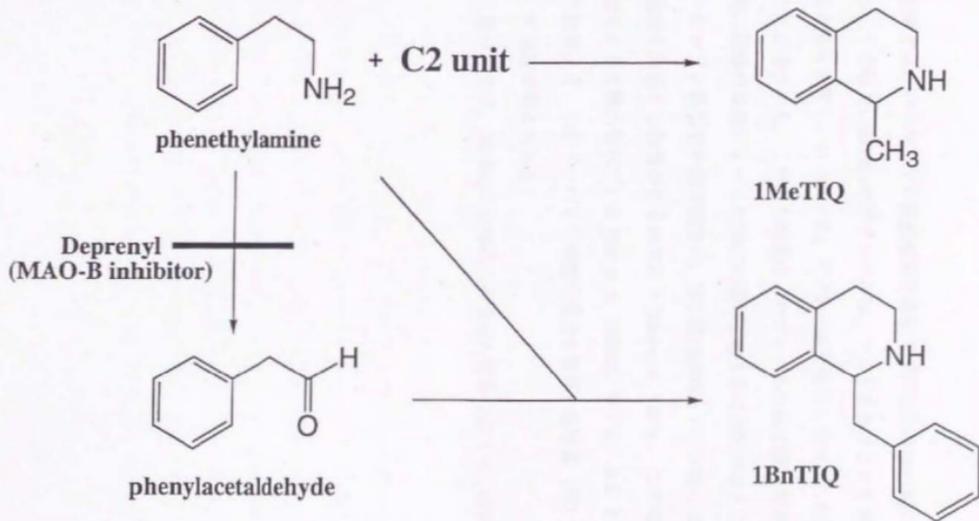


Fig. 3-4 Effect of deprenyl on biosynthesis of TIQ derivatives.

3 まとめ

この章では、パーキンソン病治療薬であるデプレニルの1BnTIQに対する効果について調べた。その結果、*in vitro*でデプレニルは、フェネチルアミンを基質にした1BnTIQの*in vitro*生合成を阻害し、*in vivo*では、デプレニルを投与したマウスの脳内1BnTIQ量が減少することが示された。これらの結果は、デプレニルのMAO阻害作用によると考えられるが、他の種類の薬物によっても1BnTIQ量が変動する可能性が考えられる。

パーキンソン病患者の脳脊髄液の、分子量10,000以下の分画には、中脳ドーパミン神経の機能を阻害する物質が含まれており (Hao et al., 1995a)、この毒性はデプレニルにより抑制されると報告されている (Hao et al., 1995b)。デプレニルにより1BnTIQが減少するという結果より、中脳ドーパミン神経の機能を阻害する物質 (群) が1BnTIQである (を含む) 可能性が考えられる。

第4章以降では、1BnTIQの生体内での役割の解明に迫るべく検討を加える。

第4章 1BnTIQのパーキンソン病関連in vitro生理活性の検討

1 1BnTIQのドーパミン取り込み阻害活性

第1章でも少し触れたが、MPTPによるパーキンソンズム発症作用は、MPTPが血液脳関門を通過して脳内に入り、MPP⁺に変換されてドーパミントランスポーター (DAT)、ミトコンドリア膜の順に取り込まれて、呼吸鎖のComplex Iを阻害してATP産生能を低下させるためであるといわれている (Fig. 4-1; Fig. 4-2; Chiba et al., 1984a; idem, 1984b; Ramsay et al., 1984)。これによりMPTPはドーパミン神経を死に至らしめる。パーキンソン病患者の脳脊髄液中で増加傾向にあり、アプレニルにより減少する1BnTIQは、化学構造的にもMPTPと関係が深い化合物であると考えられるので、1BnTIQがMPTPと同じ作用機構により、神経毒性を発現する可能性が大いに考えられる。

そこでまず、1BnTIQがドーパミンの取り込みを抑制するか否かを検討するため、名古屋市立大学医学部島田昌一教授らとの共同研究により、COS細胞にDATを強制発現させ、³H]ドーパミンの取り込みに対する1BnTIQの効果を調べた。

その結果、1BnTIQはMPP⁺と同程度のドーパミン取り込み阻害活性を有していることが明らかとなった (Fig. 4-3)。DATがある化合物をドーパミン神経細胞内に取り込むためには、第1段階としてDATが化合物を認識し、第2段階として実際に取り込むという2段階の過程を経る。コカインは非常に高いドーパミン取り込み阻害活性を持つが、細胞内に取り込まれることはない。これは第1段階はクリアできても、第2段階をクリアできないことによる。今回の結果より、1BnTIQは第1段階をクリアできることが明らかになった。現在、実際に細胞内に取り込まれるか否かを検討中である。

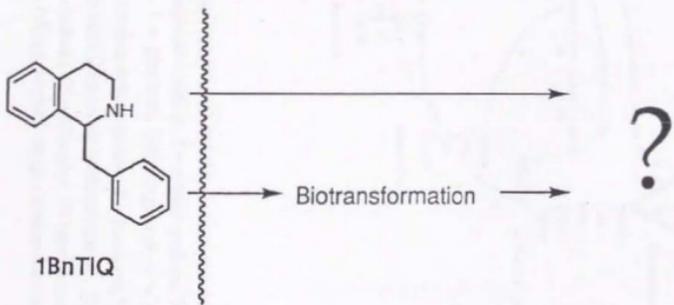
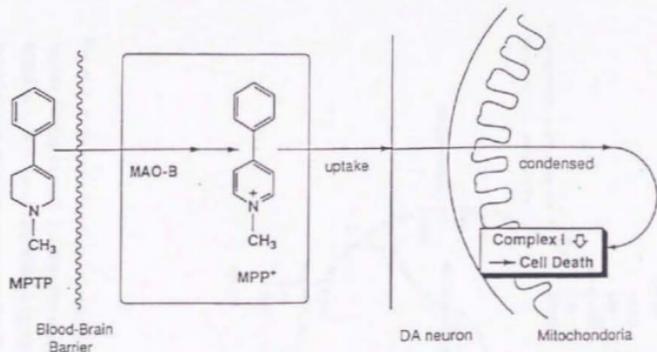


Fig. 4-1 Proposed mechanism of the neurotoxicity of 1BnTIQ, compared with MPTP.

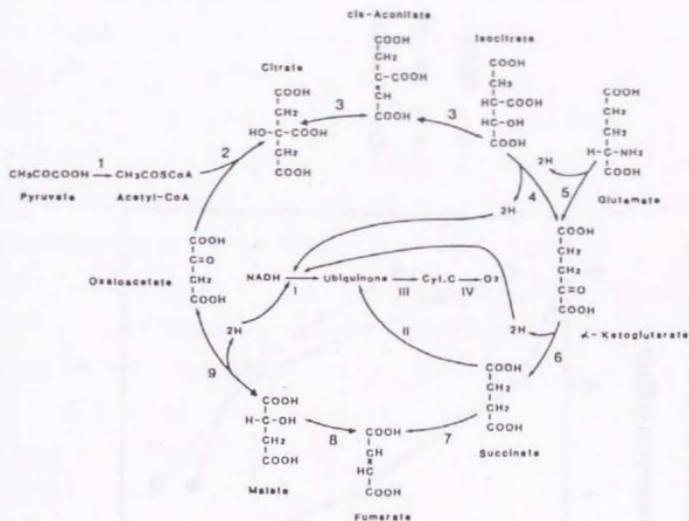


Fig. 4-2 Schematic representation of the tricarboxylic acid and the electron transport system (in the center). 1 = pyruvate dehydrogenase complex, 2 = citrate synthase, 3 = aconitase, 4 = isocitrate dehydrogenase, 5 = glutamate dehydrogenase, 6 = α -ketoglutarate dehydrogenase complex, 7 = succinate dehydrogenase, 8 = fumarase, 9 = malate dehydrogenase, I = Complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase), II = Complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase), III = Complex III (ubiquinone-cytochrome c oxidoreductase), IV = Complex IV (cytochrome c-oxygen oxidoreductase).

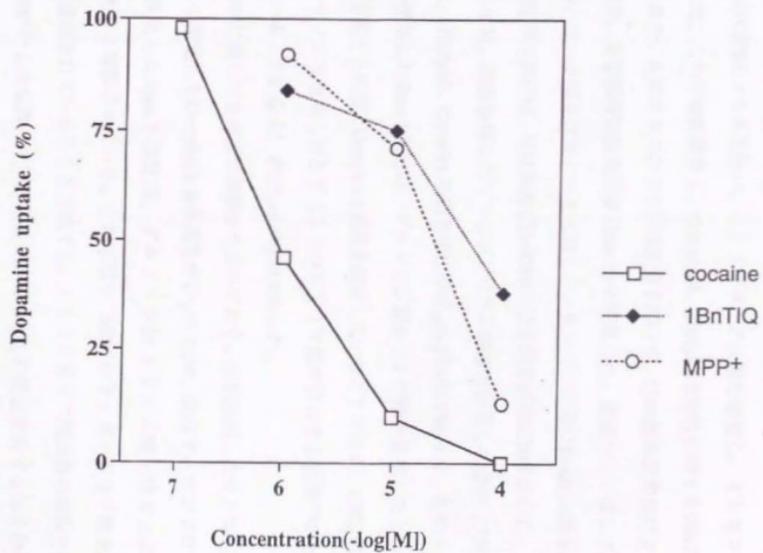


Fig. 4-3 Inhibitory effect of 1BnTIQ on dopamine uptake.

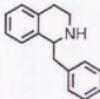
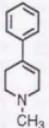
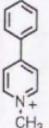
2 1BnTIQのミトコンドリア呼吸鎖阻害活性

次に、順天堂大学医学部水野美邦教授らとの共同研究により、1BnTIQのミトコンドリア呼吸鎖阻害能について検討を加えた。

2～3週齢のC57BLマウスを用い、ミトコンドリア分画を調整し、ミトコンドリア浮遊液を作成した。これを凍結融解し、Complex I、Complex II活性に対する1BnTIQの影響を検討した。また、生のミトコンドリア浮遊液を用いて、Clark型酸素電極によりミトコンドリアのADP、基質依存性酸素消費 (State 3) を測定した。基質としては、グルタミン酸+リンゴ酸、コハク酸+ロテノンを使用した。タンパク定量はBradford法を用いて測定し、酵素活性の計算には、NADH及びNADPHの分子吸光係数6270を用いた。

結果 (Fig. 4-4) は、凍結融解したミトコンドリア浮遊液を使用して測定したComplex I 阻害活性が $IC_{50}=52.6\mu\text{M}$ 、Complex II 阻害活性が $IC_{50}=7.38\text{mM}$ であった。生のミトコンドリア浮遊液を使用したState 3 阻害は、グルタミン酸+リンゴ酸を使用したとき (ミトコンドリア膜が存在する状態でComplex I 活性を測定していることになる) の $IC_{50}=1.66\text{mM}$ 、コハク酸+ロテノンを使用したとき (ミトコンドリア膜が存在する状態でComplex II 活性を測定していることになる) の $IC_{50}=4.48\text{mM}$ であった。

以前に、MPP⁺に関しても同様の実験がなされており、凍結融解したミトコンドリア浮遊液を使用して測定したComplex I 阻害活性が $IC_{50}=3.2\text{mM}$ 、生のミトコンドリア浮遊液を使用して測定したState 3 阻害は、グルタミン酸+リンゴ酸を使用したときに $IC_{50}=50\mu\text{M}$ であると報告されている。これは即ち、MPP⁺がミトコンドリア膜を通過する際に約60倍に濃縮されていることを意味する。ミトコンドリア膜は負の電荷を持つことが知られ、MPP⁺のような陽イオンで電荷が非局在化した構造を有する化合物は、膜を通過し易いため、濃縮され易いと考えられる。今回の結果から考察すると、1BnTIQはState 3 阻害活性は強くないが、MPP⁺と比較して極めて低濃度でComplex I を阻害するので、ミトコンドリアの膜透過性が上昇したりすることによって1BnTIQがミトコンドリア

	IC ₅₀			
	Glutamate + Malate respiration (State 3)	Complex I	Succinate + Rotenone respiration (State 3)	Complex II
 1BnTIQ	1.66 mM	52.6 μM	4.48 mM	7.38 mM
 MPTP	0.76 mM	—	—	—
 MPP ⁺	50 μM	3.2 mM	—	—

(Mizuno Y. et al., *J. Neurochem.* **48**, 1787-1793)

Fig. 4-4 Inhibitory effects of 1BnTIQ on the mitochondrial respiratory chain. Glutamate + Malate and Succinate + Rotenone respiration were measured using nonfrozen mitochondria, and Complex I and II activities were measured using freeze-thawed mitochondria.

膜を通過し易い状況になれば、Complex Iを阻害し、細胞に傷害を与える可能性は高いであろう。

1BnTIQがミトコンドリア呼吸鎖のComplex Iを阻害することにより、ドーパミン神経を死滅させるとすると、次の3つの可能性が考えられる。

1、ドーパミン神経に取り込まれる段階で濃縮がおきている可能性

MPP⁺はミトコンドリアの取り込みだけでなく、ドーパミントランスポーターを介してドーパミン神経に取り込まれる際にも濃縮されることがわかっている。1BnTIQがドーパミントランスポーターの基質となり、ドーパミン神経内で濃縮されていれば、ミトコンドリア膜を傷害する可能性もあり、Complex Iを阻害しうる。

2、1BnTIQが脳内で、より活性の強い化合物に化学変換される可能性

MPTPは前述のように、血液脳関門を通過した後MAO-BでMPP⁺に代謝されてはじめて毒性を発現し、MPTP自身の活性によりパーキンソン症を誘発しているのではない。1BnTIQも脳内で化学変換されて活性の強い物質になり、神経毒性を発現する可能性がある。具体的には、1BnTIQが代謝されてN-Me体、更にN-Me isoquinolinium ionに変換されていることが考えられる。特にN-Me isoquinolinium ionは正の電荷を持ち、MPP⁺と構造が類似しており、ミトコンドリアを通る際に濃縮される可能性が高い。

3、1BnTIQがミトコンドリア内で生合成されている可能性

1BnTIQ生合成の基質であると考えられるフェネチルアミン、酵素であると考えられるMAO-Bは、共にミトコンドリア内に存在しているため、1BnTIQがミトコンドリア内で生合成される可能性があり、生成していると今回の実験結果から、低濃度でComplex Iを阻害し、細胞死を誘発しうるであろう。

MPP⁺によるATP産生の低下はComplex Iの阻害だけでは不完全で、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体の阻害も関与しているとの報告もあるので、1BnTIQが α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体を初めとするTCAサイクル中の酵素や、Complex III、Complex IVを阻害することにより、ATP産生能を低下させることも考えられ、これらを検討することも興味深いと思われる。

3 1BnTIQのMK-801結合部位に対する親和性の測定

以前に1BnTIQは、phencyclidine (PCP)受容体に $IC_{50} = 1 \mu\text{M}$ という中程度の親和性を有していることが報告されている (Gray et al., 1989)。一方、興奮性アミノ酸受容体のサブタイプのひとつであるNMDAレセプターの非競合阻害薬にMK-801があり、NMDA受容体のMK-801結合部位は、PCP受容体とほとんど同じ位置にあることが知られているので、1BnTIQがMK-801結合部位に親和性がある可能性は高いと思われる。そこで、1BnTIQのパーキンソニズム発症作用が、MK-801結合部位を介してNMDA受容体によってグルタミン酸神経の活動に影響を与えるためではないかと考え、1BnTIQのMK-801結合部位に対する親和性を調べた。

シナプトゾームの調整並びにbinding assayの際の実験条件は、常法 (Yoneda and Ogita, 1989) をC57BLマウス用に改良した方法 (Tasaki, 1994) に従った。C57BLマウス全脳を摘出し、予めニトロセルロース膜のフィルターを通しておいた50mMトリス酢酸緩衝液 (pH 7.4) でホモジナイズした。そのホモジネートを、50,000 gで20分遠心し、上清を捨ててペレットをトリス酢酸緩衝液に懸濁させた。この遠心して懸濁させる操作を更に3回繰り返して、最後の遠心の際のペレットを、予めニトロセルロース膜のフィルターを通しておいた0.32Mショ糖溶液に懸濁させ、Bradford法にてタンパク定量した後、 -80°C で保存された。実験当日に、懸濁液は凍結融解し、0.04% Triton X-100を加えて攪拌した後、50,000gで20分遠心を2回行い、ペレットをトリス酢酸緩衝液に懸濁させて、これをシナプトゾームとして用いた。

シナプトゾーム、種々の濃度の薬物 (1BnTIQ、あるいは非標識MK-801)、L-グルタミン酸、トリス酢酸緩衝液の入った試験管を5分間ブレインキュベートした後、 $[^3\text{H}]$ MK-801を添加して30分間インキュベーションを行った。非特異的結合を減らすため、予め0.5%ポリエチレンイミン処理したメンブレンフィルターに、米国Brandel社製の自動Bound/Free分離装置セルハーベスターを使用して反応液を流し、緩衝液で洗い、フイ

ルターを乾かし、最後に液体シンチレーションカウンターで測定して放射活性を調べた。

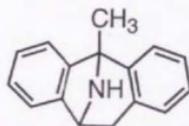
この結果、1BnTIQはMK-801結合部位に対して、 $IC_{50}=14.6\mu M$ という弱い親和性を有することが明らかとなった (Fig. 4-5)。最近、興奮性アミノ酸受容体のアンタゴニストがパーキンソニズム防御作用を持つという報告がなされており、以前に我々のグループで、1MeTIQがMK-801結合部位に親和性を持つか否かを調べたところ、1MeTIQは全く親和性を持たないことがわかった。よって、1MeTIQが興奮性アミノ酸レセプターのアンタゴニストとして働くために、パーキンソニズム防御作用を発現するという可能性は否定されている。今回、1BnTIQがMK-801結合部位に対して弱いながらも親和性を有していることがわかり、内在性物質がMK-801結合部位に結合することにより興奮性アミノ酸神経を制御しているのであれば、その制御を解放することによって興奮性アミノ酸神経を亢進させ、神経毒性を発現させていると考えることもできる。しかし、 IC_{50} 値が $14.6\mu M$ という弱い親和性では、この機構のみで1BnTIQが神経毒性を発現させているとは考えにくく、他にも作用機序が存在するものと考えるのが妥当であろう。

4 まとめ

前章までに、新規内在性脳内アミンである1BnTIQが、パーキンソン病患者の脳脊髄液中で増加傾向にあり、デプレニルにより減少することが明らかとなった。この作用機構が如何なるものかを調べるため、本章ではMPTP類似作用機構を中心に、様々な角度から検討を加えた。凍結融解したミトコンドリア膜を使用して、1BnTIQのミトコンドリア呼吸鎖阻害活性を測定したところ、 IC_{50} 値が $52.6\mu M$ と、MPP⁺と比較して非常に低濃度でComplex Iを阻害した。また1BnTIQは、ドーパミン取り込みを阻害し、MK-801結合部位に弱い親和性を持つことが明らかとなった。今後更に多方面から1BnTIQのパーキンソニズム発症機序を検討することにより、パーキンソン病発症物質としての可能性を探る

$IC_{50} = 14.6 \mu M$

$pHi = 0.93$



MK-801

ligand; [3H]MK-801 final 5 nM

tissue; 50,000 \times g pellet of C57BL
mouse whole brain 300 μ g pt.

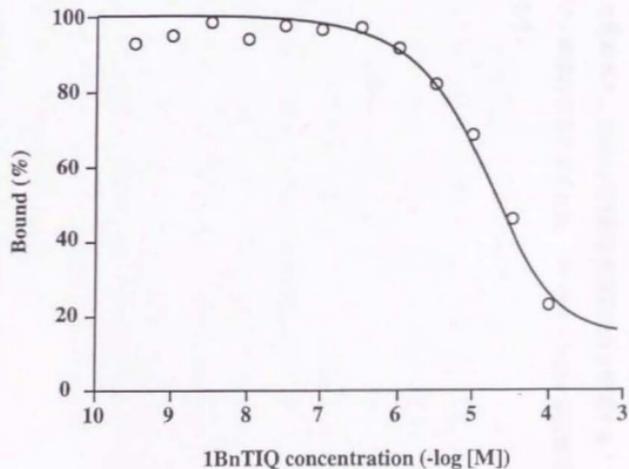


Fig. 4-5 Effect of 1BnTIQ on MK-801 binding site. The reaction mixture was incubated at 0 °C for 30 min in pH 7.4 50 mM Tris acetate buffer containing 2 μ M L-glutamic acid. Non specific binding was defined as that in the presence of 100 μ M unlabelled MK-801.

必要があると思われる。1BnTIQの神経毒性発現機構を解明することは、たとえ1BnTIQがパーキンソン病発症物質でなくとも、パーキンソン病の原因解明に重要な示唆を与えることになろう。

第5章 中脳線条体切片共培養系を用いた1BnTIQの毒性検討

前章までに、1BnTIQ量とパーキンソン病態に関連があり、*in vitro*で様々なパーキンソン病関連生理活性を示すことを明らかにしてきた。TIQ、Salsolinol等の内在性脳内アミンについて、培養細胞を用いるとmMオーダーの高濃度で細胞死を引き起こすが、実際に動物に投与しても細胞死は起こさないことが知られている。そこで、東京大学医学部桜井正樹講師らとの共同研究により、現存する培養系で*in vivo*に最も近いと思われる中脳線条体切片共培養系を用いて1BnTIQの神経毒性の解析を行った。切片共培養系は脳部位の基本構造を保持しており、高次の神経ネットワークを*in vitro*で再構築できるという特色を持つ (Gähwiler, 1988; Østergaard et al., 1990; Yamamoto et al., 1992; Steensen et al., 1995)。

具体的には、Wistar系ラット妊娠16日目から胎児を摘出し、中脳腹側部を切除した。また、Wistar系ラット生後1日齢から線条体切片を400 μm の厚さにマイクロトームにて切り出し、中脳と線条体の切片を約500 μm 離して、コラーゲンでコーティングされた多孔質膜上に培養した (Fig. 5-1)。培養液は5%FBS含有DMEM/F-12培地を用い、3日後に無血清培地に交換し、以後週2回培養液を交換した。培養を始めて1~2日で中脳のドーパミン神経が線条体に向かって突起を伸ばし始め、約1週間で線条体の隅々にまで突起が行き渡ることが、免疫組織化学的検討によって明らかにされている。このように免疫組織化学による検討は詳細に行われているが、生化学的検討は殆ど行われていない。

1 培養液中LDH活性測定による条件検討

そこでまずはじめに実験の基礎となる生化学的データを得るため、細胞死の指標となる培養液中に漏出した乳酸脱水素酵素 (Lactate Dehydrogenase, LDH) の活性を測定した。

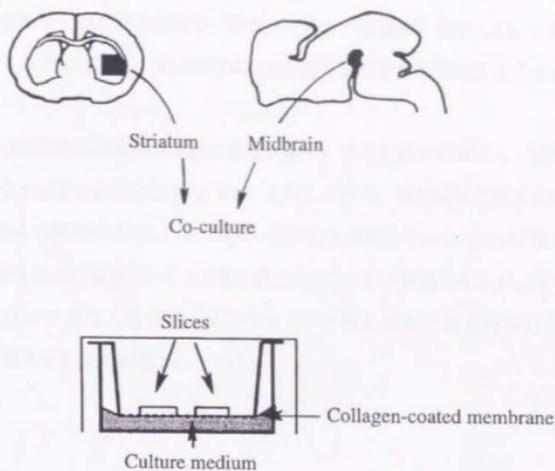


Fig. 5-1 Method of organotypic slice culture of midbrain and striatum.

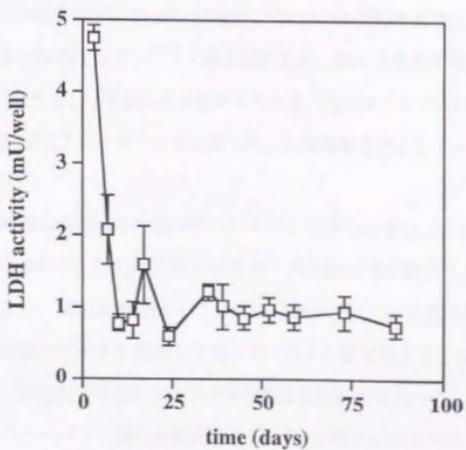


Fig. 5-2 Time course of LDH activity in the medium of organotypic slice culture of midbrain and striatum.

培養液交換に合わせて週2回の割合で、培養84日目まで経時的に測定した。LDH活性はビルビン酸ナトリウム存在下、NADHの340 nmの吸光度の減少を測定することにより求めた。

その結果、LDH活性は培養開始直後に非常に高く、その後徐々に減少し、ほぼ一定の値に収束することが明らかとなり (Fig. 5-2)、このことから、他の細胞培養系と同様に培養開始直後に多くの細胞が死滅し、その後は一定の割合で死んでいくことが示唆された。この培養系は半年以上の長期にわたり培養可能な点がひとつの特色であるが、徐々に弱っていくため、グリア細胞の増殖が一定になるという報告のある培養約10日目から、1BnTIQを培養液中加入して実験することにした。

2 1BnTIQによる中脳、線条体ドーパミン量の変動

培養開始10日目の培養液中に10 μ M、30 μ M、100 μ M 1BnTIQを添加し、一定時間経過後に中脳、線条体それぞれのドーパミン量を測定した。膜ごと切片を切り出し、過塩素酸を加えてホモジナイズし、遠心による除タンパク後、濾過フィルターにて限外濾過し、HPLC電気化学検出器にてドーパミンを定量した。内部標準物質としてイソプロテレンールを用いた。

まず、1BnTIQ添加24時間後の中脳のドーパミンを定量した (Fig. 5-3 (a))。ドーパミン量は濃度依存的に減少し、100 μ Mではコントロールの約10%に減少していた。1BnTIQの添加期間を長くし、1BnTIQを加えて7日後の中脳のドーパミン量を測定したところ (Fig. 5-3 (b))、24時間のデータと比較して更にドーパミン量は減少し、10 μ Mでもコントロールの約20%、100 μ Mでは全てのサンプルで検出限界以下であった。

1BnTIQ添加後のドーパミン量の時間変化をFig. 5-4に示す。コントロールでは、時間経過によるドーパミン量の減少は僅かにしかみられなかったが、1BnTIQの濃度が上がる

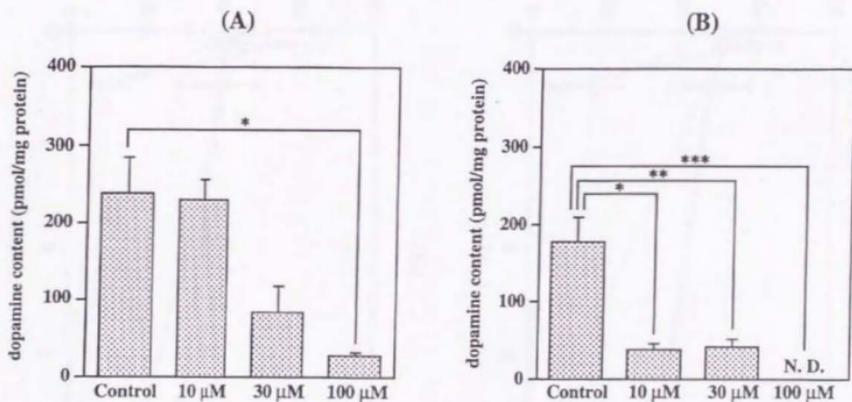


Fig. 5-3 Effect of 1BnTIQ on mesencephalic dopamine content in organotypic slice culture. (A) 24 hr exposure, (B) 7 days exposure. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ (by Scheffe's F test).

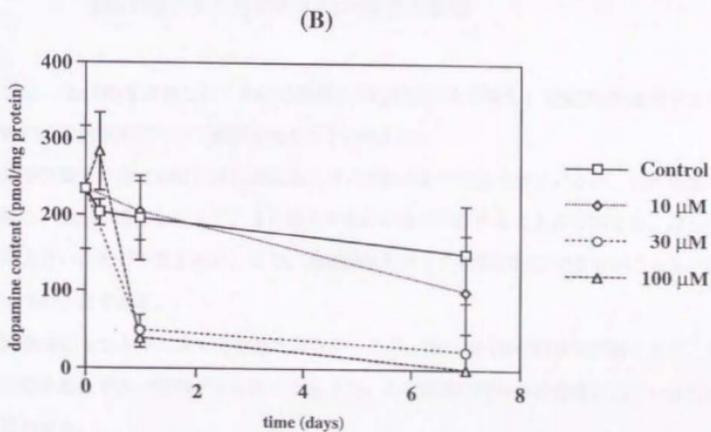
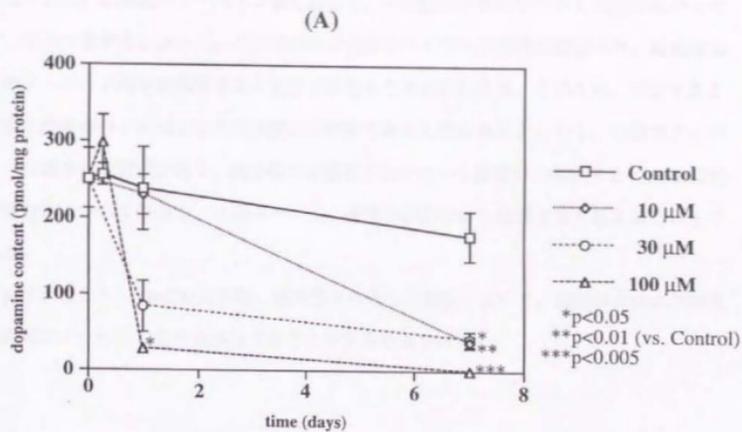


Fig. 5-4 Time course of dopamine reduction in organotypic slice culture by 1BnTIQ.
 (A) Midbrain. (B) Striatum.

につれてドーパミンの減少が急になり、100 μ Mでは時間と共に顕著なドーパミンの減少がみられた。線条体のドーパミン量に関して、平均値は中脳のデータと大差はなかったが、ばらつきが大きかった。これは切片ごとのネットワーク形成に差があり、線条体切片のドーパミン神経の投射される程度が異なるためと思われる。そのため、平均すると中脳と線条体のドーパミンの減少度は同程度であると思われる。しかし、中脳でドーパミンの減少に有意差があり、線条体で有意差がないという結果から考察すると、1BnTIQが神経終末からではなく、中脳ドーパミン神経の細胞体から傷害すると考えることもできる。

いずれにしろ、1BnTIQは中脳、線条体それぞれの部位において、濃度依存的かつ時間依存的にドーパミン量を減少させることが明らかとなった。

3 1BnTIQによる培養液中LDH活性の変動

次に、1BnTIQを添加したときの培養液中のLDH活性を測定し、1BnTIQが誘発する可能性のある細胞死について検討を加えようと考えた。

分散培養系ではLDH活性は死細胞数と良い相関があり汎用されているが、切片培養系の場合、LDHが漏出しにくく、また漏出するのに時間がかかることが予想され、ばらつきが大きいことが予想される。また、神経細胞とグリア細胞が区別できないことも、ばらつきの一因である。

結果はばらつきが大きく有意差は出なかったが、100 μ M 1BnTIQ添加開始4日目、7日目の培養液で高い傾向がみられた (Fig. 5-5)。この時期に何らかの毒性が出ているためと思われる。

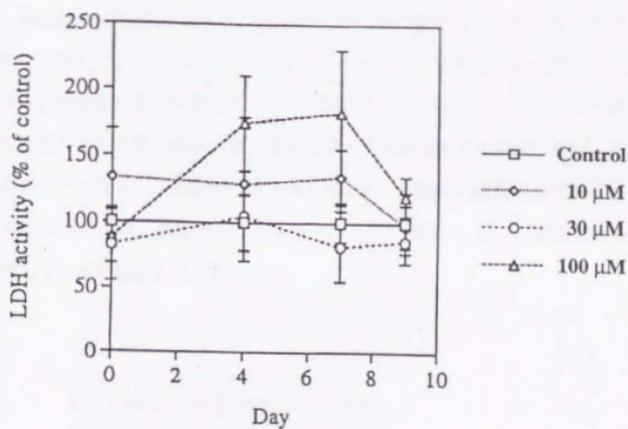


Fig. 5-5 Effect of 1BnTIQ on LDH activity in the medium of organotypic slice culture.

4 免疫組織化学的検討

次に、1BnTIQによりドーパミン神経の細胞死が起きているか否かを調べるため、抗チロシン水酸化酵素 (TH) 抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った。切片を4%パラホルムアルデヒドで固定後、sucroseで脱水、20 μm の凍結切片を作製した。1次抗体に家兎抗TH抗体、2次抗体に山羊抗IgG抗体を用い、ジアミノベンチジンで発色の後、光学顕微鏡にて観察した。

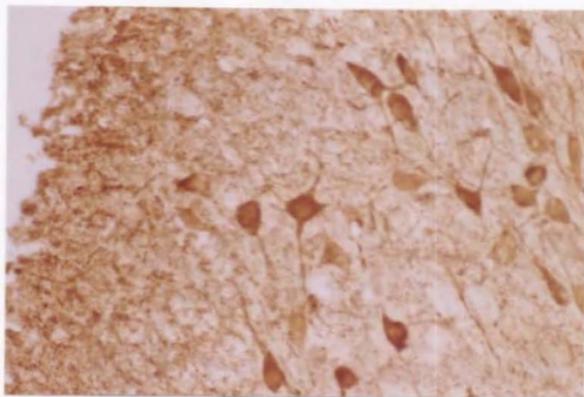
100 μM 1BnTIQ添加10日後の切片でも線条体に変化はみられなかったが、中脳で染色性が不均一で、TH陽性細胞、つまりドーパミン神経の細胞体の萎縮、突起の退縮がみられ、細胞体に異常が起きているのが観察された (Fig. 5-6)。これは細胞死に繋がる重要な知見であると思われる。更に長い期間や更に高濃度でも検討したが、切片が剥離してボロボロになり、染色が不可能であったため、細胞死の観察には至らなかった。このことから1BnTIQは、神経細胞のみならず、グリア細胞や、或いは細胞接着因子に影響を及ぼしている可能性も考えられる。

5 1BnTIQ神経毒性の不可逆性

第2節で明らかになった1BnTIQによるドーパミン減少の可逆性を検討するため、100 μM 1BnTIQ添加24時間後に1BnTIQ無添加培地に交換し、3日後にドーパミンを定量した。ドーパミン減少が可逆的であれば、1BnTIQがチロシン水酸化酵素を阻害するためにドーパミンを減少させている可能性が考えられる。

その結果、1BnTIQ無添加培地に交換しても、ドーパミンの減少は回復しておらず、100 μM 1BnTIQ添加24時間後のドーパミンの減少は不可逆的であることがわかった (Fig. 5-7)。このことから、1BnTIQによるドーパミン量の減少は、化合物自身の有するチロシ

(A)



(B)

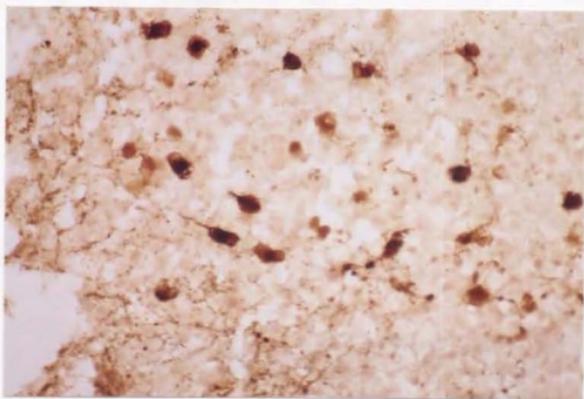


Fig. 5-6 Immunohistochemical study of tyrosine hydroxylase on 1BnTIQ-induced meencephalic slice. (A) Control, (B) 10 days exposure of 100 μ M 1BnTIQ.

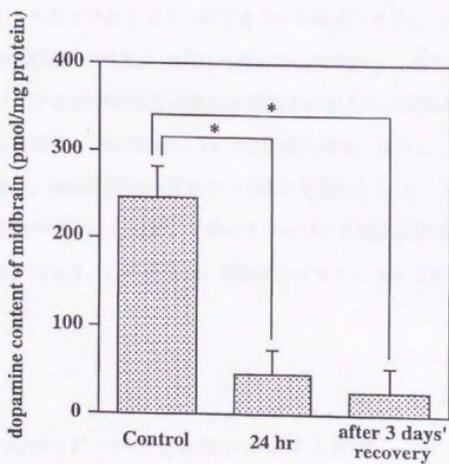


Fig. 5-7 Irreversible neurotoxicity of 1BnTIQ in organotypic slice culture.
* $p < 0.05$ (by Scheffe's F test)

ン水酸化酵素の阻害能等によるものではなく、ドーパミン神経の機能低下を反映したものであると考えられる。これ以降、ドーパミンの減少を指標に、1BnTIQ神経毒性の作用機序を種々の薬物（リセプターのアンタゴニスト等）を用いて評価することが可能である。また、4の結果より100 μ M 1BnTIQを長期間添加し続けるとドーパミン神経の細胞死を引き起こすことが示唆されているので、ドーパミンの減少が不可逆的であるという事は、100 μ M 1BnTIQ添加24時間後には細胞死シグナルのスイッチがオンになっていること、そのスイッチをオフにすることはできないと考えられる。このことから考えると、100 μ M 1BnTIQ添加24時間後に1BnTIQ無添加培地に交換し、長時間の後に4でみられたようなドーパミン神経の細胞体の萎縮が観察されることが期待される。また、100 μ M 1BnTIQ添加6時間後、12時間後に、1BnTIQ無添加培地に交換し、同様の実験を行うと、ある時間を境に、1BnTIQ添加時間がその時間より短いとドーパミン減少は可逆的であるが、1BnTIQ添加時間がその時間より長いとドーパミン減少は不可逆的であるという結果が予想される。つまり、この時間が、細胞死シグナルのスイッチがオンになる時間である。

6 AP5のドーパミン量減少に対する影響

中脳は発生初期からNMDAリセプターを発現しており、グルタミン酸神経の投射を受けることが知られている。中枢神経系で興奮性アミノ酸神経が亢進するために発現する毒性は、現在までに数多く報告されている。

そこで、1BnTIQの神経毒性が、NMDAリセプターを介したものであるか否かを調べるため、NMDA競合阻害剤であるAP-5 (Fig. 5-8)を用いて、ドーパミンの減少を指標に実験を行った。100 μ M AP-5（活性体であるAP-5(-)として50 μ M）と、30 μ M、100 μ M 1BnTIQを同時添加し、24時間後にドーパミン量を測定した。

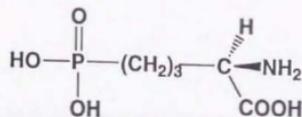


Fig. 5-8 Chemical structure of D (-)-AP5.

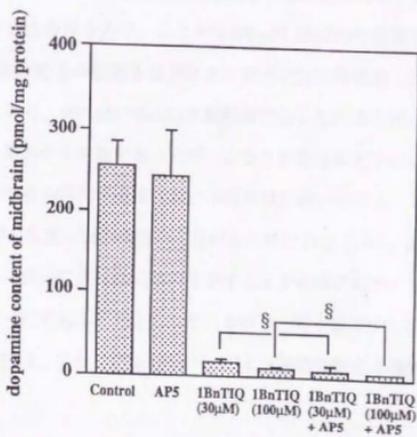


Fig. 5-9 Effect of NMDA antagonist on 1BnTIQ toxicity.
 § Not significantly different.

その結果、AP-5は1BnTIQによるドーパミンの減少を抑制しなかった (Fig. 5-9)。実験結果からは、1BnTIQの神経毒性は中脳のNMDAリセプターを介さない可能性が示唆されたが、今回の結果のみで結論づけることはできず、更に詳細な検討を行う必要があると思われる。

7 1BnTIQ神経毒性の脳部位選択性

次に、1BnTIQ神経毒性の脳部位選択性を調べるため、中脳線条体共培養系、及び中脳単独、線条体単独、大脳新皮質単独、海馬単独、小脳単独をそれぞれ同様に多孔質膜上にて培養し、300 μ M 1BnTIQ添加24時間後に培養液中のLDH活性を調べた。100 μ M 1BnTIQ添加したときのLDH活性は、第3節でみられたように、添加数日後に僅かな上昇傾向が観察されるのみなので、ここでは300 μ M 1BnTIQを培養液中に添加することにした。300 μ M 1BnTIQを中脳線条体切片共培養系に24時間添加した後、免疫組織化学的検討を行ったところ、100 μ M 1BnTIQを長期間添加したときと同様に切片が剥離してポロポロになり、染色が不可能であったが、かなりの毒性が出ていると思われる。

結果は、中脳線条体共培養系、及び中脳単独においてのみ、コントロールと比較して1BnTIQ添加群の有意なLDH活性の上昇がみられた (Fig. 5-10)。このことから、1BnTIQは中脳ドーパミン神経に選択的に毒性を示すことが示唆された。グリア細胞は、脳部位によらず性質は一定であると考えられているので、第4節で少し述べた1BnTIQのグリア細胞に対する毒性は、少なくとも中脳ドーパミン神経に対する毒性よりは小さいと思われる。

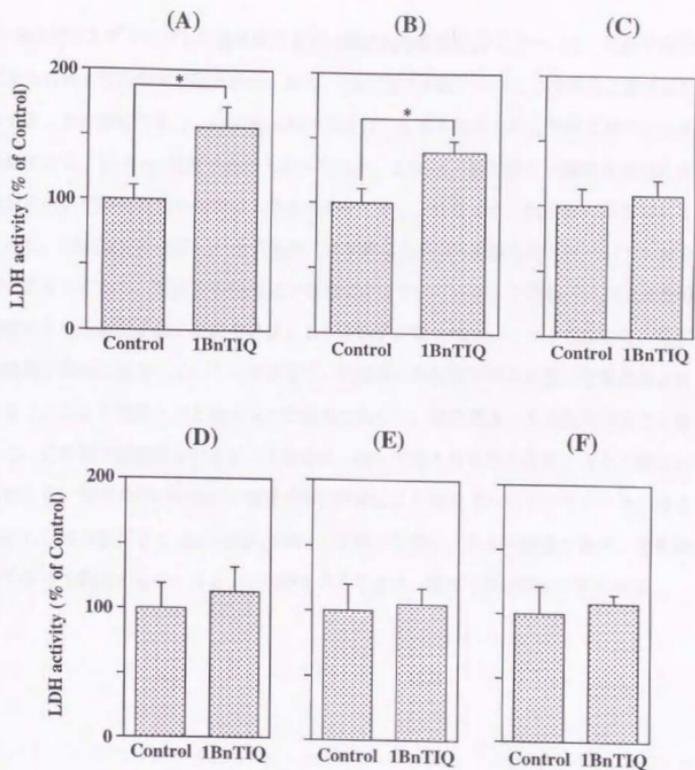


Fig. 5-10 Selective neurotoxicity of 1BnTIQ in organotypic slice culture.
 (A) Co-culture of midbrain and striatum, (B) Midbrain, (C) Striatum,
 (D) Neocortex, (E) Hippocampus, (F) cerebellum.
 * $p < 0.05$ (by Student's t test)

8 まとめ

1BnTIQはまずドーパミン量を低下させ、細胞体の萎縮を経てドーパミン神経を細胞死に至らしめる可能性が示唆された。また、1BnTIQは中脳ドーパミン神経系に選択毒性を有することが示唆された。1BnTIQの脳内濃度は、種差を無視した上で第2章の結果から推測すると、数十 nM程度であると考えられる。これは、第5章の中脳線条体切片共培養系において神経毒性を発現する濃度と比較すると、数百倍から数千倍の開きがある。しかし、脳内濃度と比較して1BnTIQが、濃度依存のかつ時間依存的にドーパミン量を減少させることから、低濃度の1BnTIQが長時間かけて、ドーパミン量低下、細胞体萎縮、細胞死という過程を経て毒性を発現する可能性が示唆される。このような場合、発症原因物質が脳内に蓄積していくのではなく、低濃度の発症原因物質に数十年間暴露されていることにより発症すると考えるのが妥当であろう。脳内濃度と毒性発現濃度に大差がなく、短期間で細胞死を引き起こす物質は、決して老人性疾患の原因とはなり得ないと思われる。神経毒性の発現が、濃度の時間積分により規定されるというデータ、考え方を示した例は数少なく (Bella et al., 1996)、今回の結果は、老人性疾患であり、老年期になり初めて発症するパーキンソン病態を考える上で、極めて興味深いと思われる。

第6章 1BnTIQのパーキンソニズム発症作用

1 マウスを用いた行動薬理試験による検討

パーキンソン病患者の脳脊髄液で増加傾向にあり、中脳ドーパミン神経系に選択毒性を有する1BnTIQのin vivoにおける生理活性を調べるため、C57BLマウスを用いてパーキンソン病の症状に特徴的な運動緩徐の指標となるボールテストを行った。ボールテスト (Fig. 6-1) は岡山大学の小川らにより開発された行動薬理試験 (Ogawa et al., 1985) で、マウスを棒の最上部に上向きに捕まらせ、マウスが動き始めてから回転して下に向くまでの時間をT_{turn}、下に降りるまでの時間をT_{LA}とし、時間が多くかかるほど運動緩徐が強くなっていくものである。マウス等のパーキンソン病モデル動物において行動薬理的評価は難しく、適切な行動薬理試験の出現が望まれていた。その点このボールテストは簡便であり、MPTPによるパーキンソン病モデルマウスによりその有用性が既に示されている (Ogawa et al., 1985)。我々のグループでも以前にマウスによるボールテストを用いた毒性試験でMPTP、TIQがパーキンソニズムを誘発し、1MeTIQを前投与した群では、両化合物の毒性が抑えられることを示している (Tasaki et al., 1991)。Table 6-1のようにA群 (n=4) を無処置のコントロール、B群 (n=4) を1BnTIQ 80mg/kgを1日2回、5日間連投、C群 (n=4) を1MeTIQ 80mg/kgを1日2回、5日間連投の後、B群と同様に1BnTIQ連投、D群 (n=5) をB群と同様に1BnTIQ連投の後、測定当日に末梢性L-芳香族アミノ酸脱炭酸酵素阻害薬であるカルビドバ10 mg/kg投与、その1時間後にL-DOPA 100 mg/kgを投与したものとし、全て腹腔内投与で行った。連投後、2日間休業してテストを行い、実際の測定では1回訓練した後の5回の結果が用いられた。

TIQだけでなく、1,3-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1,3DiMeTIQ) や3-methyl-6,7-methylenedioxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (3Me6,7MDTIQ) のような他のTIQ誘導体も様々な神経毒性を持つことが知られている。例えば、1,3DiMeTIQを投与したマ

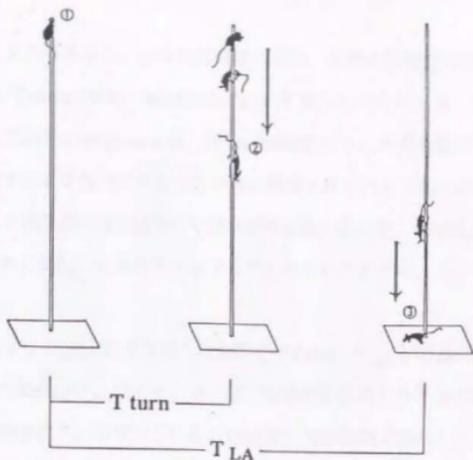


Fig. 6-1 Pole test

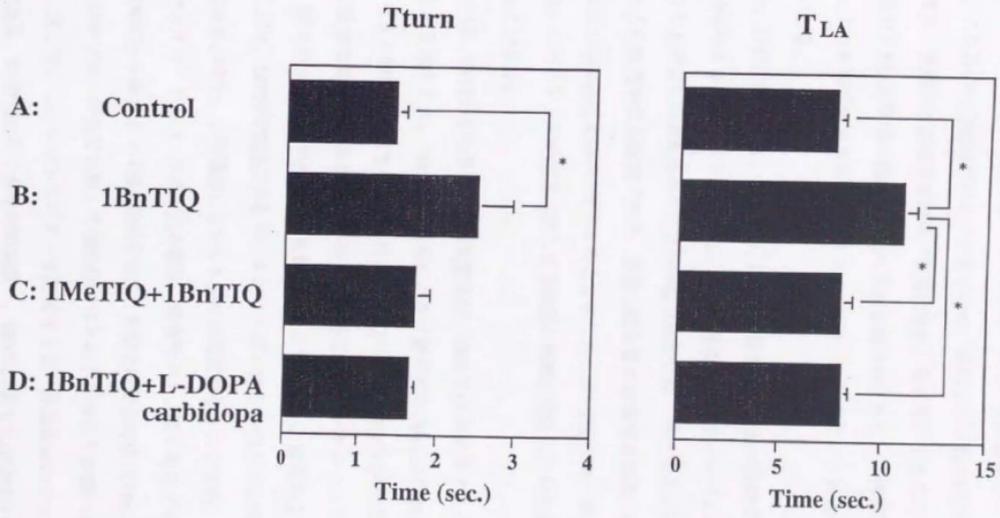
Group	First treatment	Second treatment
A (n=4)	None	None
B (n=4)	Saline 2inj./day, 5days	1BnTIQ 80mg/kg/inj. 2inj./day, 5days
C (n=4)	1MeTIQ 80mg/kg/inj. 2inj./day, 5days	1BnTIQ 80mg/kg/inj. 2inj./day, 5days
D (n=5)	Saline 2inj./day, 5days	1BnTIQ 80mg/kg/inj. 2inj./day, 5days treatment with carbidopa 10mg/kg L-DOPA 100mg/kg

Table 6-1 Injection schedule for the pole test. Mice were intraperitoneally injected. There was a day interval between the first and the second treatments. The pole test was carried out in a dimmed room 2 days after the last injection.

ウスでは、よるめき歩行、自発的運動量の増加、運動の協調性の低下がみられ (Makino et al., 1990b; Tamiya, 1994)、3Me6,7MDTIQを投与したマウスでは、自発的運動量の減少が観察されている (Nakagawa et al., 1993)。1BnTIQにも、常同行動や運動失調といった行動異常を引き起こす作用があることが既に報告されている (Gray et al., 1989)。1BnTIQがパーキンソン病患者の脳脊髄液中で増加傾向にあったので、1BnTIQがパーキンソニズムないしはそれに類似の薬理作用を有するのではないかと考え、ポールテストを用いて研究を行った。

Fig. 6-2のように1BnTIQを連投したB群ではT_{tum}、T_{LA}が有意に延長され、MPTPやTIQと同様に1BnTIQが、パーキンソン病に特徴的な症状のひとつである運動緩徐を誘発することが示された。現在のところ、1BnTIQを実験動物に投与して、黒質あるいは中脳の神経細胞死は観察されていないが、カンクイサルに1BnTIQ 22 mg/kg/dayを66日間皮下注射し、5日間休業した後の病理変化を観察したところ、TH陽性細胞に細胞体の萎縮、突起の退縮といった第5章4節でみられたものと同様の所見が得られている (Yoshida, personal communication)。これは、第5章の切片培養系で用いられた1BnTIQの濃度とin vivoで動物に投与した1BnTIQの濃度には、大きな隔たりがないことを示唆している。またこれらの所見は、1BnTIQを更に長期間投与し続けると神経細胞死を引き起こす可能性を示唆していると考えられる。1BnTIQの長期間連投により細胞死が観察されたならば、1BnTIQはパーキンソン病に関連した神経細胞死を誘発する化合物としてははじめての内生性物質であり、1BnTIQの連投により待望のパーキンソン病モデル動物が作成できることになる。

パーキンソン病モデル動物を作成できる薬物としては、黒質線条体のドーパミン神経に選択的に毒性を示すMPTPの他に、ドーパミンの誘導体で、カテコールアミン神経終末において活性酸素種を生成し、神経終末を破壊する6-hydroxyl-dopamineがある。しかし残念ながらどちらも外因性物質であるため、パーキンソン病の原因であることは決してあり得ない。TIQ類では、Salsolinolや、Salsolinolが生体内で変換されて生成すると考えられるN-methyl-R-salsolinolを、ラットに投与し、行動観察すると、寡動 (動作が緩慢



* $p < 0.01$ by Tukey's test

Fig. 6-2 Effect of 1BnTIQ on parkinsonism (bradykinesia).

になること)ラットが作成でき、パーキンソン病モデル動物になりうるという報告があるが、これらの化合物は脳移行性が悪いため、末梢からであれば大量に投与せねばならず、また、実際に行動薬理試験等で数値化され、有用性が示されているわけではない。その点で、TIQ及び1BnTIQは、脳内に存在が確かめられている内因性物質で、ホールテストにより有用性が示され、パーキンソン病モデル作成という大きな目標に1歩近づいたといえる。

また、D群の結果より、1BnTIQによる行動異常は、測定の前直前にL-DOPA及びカルビドパの投与することによって回復し、この作用は、中枢性ドーパミン系の賦活化によると考えられた。L-DOPAとカルビドパの組み合わせは、パーキンソン病の対症療法として最もよく処方される薬物であり、事前に投与量の最適化を試み、L-DOPA 100mg/kg、カルビドパ 10mg/kgをD群に投与することにした。高、L-DOPA:カルビドパ=10:1の割合は、パーキンソン病患者に対して臨床医が頻繁に使うことから、この割合は妥当であるといえる。

C群では、1BnTIQが引き起こす運動緩徐が、1MeTIQを前投与することにより抑制されるか否かを検討した。1BnTIQの連投による行動異常が1MeTIQの前投与によりMPTPやTIQのときと同様に抑制されたことは、1BnTIQの毒性や1MeTIQの防御メカニズムを考える上で重要な知見であると思われる。1MeTIQによるパーキンソニズム防御活性に関しては、我々のグループで既に様々な研究がなされている。前述のように、1MeTIQは前投与により、MPTPやTIQによるパーキンソニズム発症を阻止する内在性化合物であり(Tasaki et al., 1991)、この機構についても種々の検討がなされてきた。ドーパミンのD1、D2レセプター、ドーパミン取り込み部位、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸のサブタイプのNMDAレセプター(競合的結合部位、非競合的結合部位(MK-801結合部位))、AMPAレセプターの全てに対して親和性がほとんどないことが調べられている(Tasaki, 1994)。従って、これらのレセプターを直接介さない神経調節因子として働いている可能性がある。いずれにしても今回の実験で、TIQに加えて1BnTIQがパーキンソニズム発症作用を、1MeTIQがパーキンソニズム防御作用を有していることが明らかとなり、TIQ

骨格の1位の置換基の僅かな構造の違いで、正反対の作用を示すことがわかった。TIQ、1MeTIQ、1BnTIQの量的関係がパーキンソン病発症と関係がある可能性があり、また1MeTIQは、既存の機構とは異なる新しい機構で自然発症パーキンソン病を阻止する有用な治療薬となりうる。

2 まとめ

パーキンソン病患者の脳脊髄液中で増加傾向にあり、中脳ドーパミン系に選択毒性を有する1BnTIQの、*in vivo*における生理活性を行動薬理試験を用いて調べたところ、1BnTIQの連投は、パーキンソニズム発症物質として既に認められているMPTPやTIQと同様な神経毒性を有することがわかった。その神経毒性は1MeTIQの前投与によって抑制され、また連投後のL-DOPA投与によって回復することがわかった。これらの結果から、1BnTIQによるパーキンソン病モデル動物作成が期待される。

第7章 まとめ

前章までに、1BnTIQの生体内からの検出、定量と、パーキンソン病関連の神経毒性について述べてきた。著者が明らかにした主要な結果をまとめると以下のようになる。

- 1、GC-SIM法により、マウス脳内、及びヒト脳脊髄液中に1BnTIQが存在することを明らかにした。また1BnTIQの存在は、高分解能GC-SIM法によっても確認された。
- 2、ヒト脳脊髄液中の1BnTIQ量をGC-SIM法により定量し、パーキンソン病患者と他の神経疾患の患者で比較したところ、パーキンソン病患者に約3倍高い傾向がみられた。
- 3、フェネチルアミンを基質にした1BnTIQのin vitro生合成に対して、パーキンソン病治療薬アプレニルの効果を調べたところ、アプレニルは1BnTIQの生成を阻害した。
- 4、アプレニルを連投したマウスの脳内1BnTIQ量は減少していた。また、パーキンソン病防御物質候補と考えられる1MeTIQに対する1BnTIQの比は、更に顕著に減少していた。
- 5、MPTP毒性の責任部位であると考えられているミトコンドリア呼吸鎖に対し、1BnTIQを用いて阻害活性を測定したところ、凍結融解したミトコンドリア膜を使用したComplex I 阻害活性の IC_{50} 値が52.6 μ Mと、MPTPの脳内代謝物であり、毒性本体であるMPP⁺と比較して、強い阻害活性を示した。
- 6、中脳線条体切片共培養系を用いて1BnTIQの神経毒性を調べたところ、1BnTIQは濃度依存的かつ時間依存的にドーパミン量を減少させ、細胞体の萎縮を引き起こした。
- 7、様々な脳部位の切片培養系を用いて、培養液中のLDH活性を指標に1BnTIQ神経毒性の部位選択性を調べたところ、中脳ドーパミン神経選択的に毒性を有していた。
- 8、1BnTIQのin vivoにおける生理活性を調べるため、1BnTIQを連投したマウスを用いてポールテストを行ったところ、1BnTIQの連投が運動緩徐を引き起こし、この

行動異常は1MeTIQ前投与により抑制され、またL-DOPA投与により回復した。

Fig. 7-1は、加齢並びにパーキンソン病における黒質ドーパミン神経細胞脱落の模式図である。黒質のドーパミン神経細胞は正常の加齢でも減少する。ヒトがもし120歳まで生きれば、その数は出生時の20%以下になり、全てのヒトがパーキンソン病を発症するともいわれている。新規内在性脳内アミンであることが示された1BnTIQは、パーキンソン病患者の脳脊髄液中で他の神経疾患の患者と比較して増加傾向にあった。両者の差は大きくはないが、低濃度の1BnTIQが数十年間暴露されていることによりドーパミン量を低下させ、細胞体の萎縮を経てドーパミン神経を長時間かけて細胞死に至らしめる可能性、つまり、Fig. 7-1において1BnTIQは、AやBのような直線の傾きをCのように急にする要因となる可能性が考えられる。

以上より私は、1BnTIQがパーキンソン病と深い関連があり、パーキンソン病発症物質群のひとつである可能性を示した。

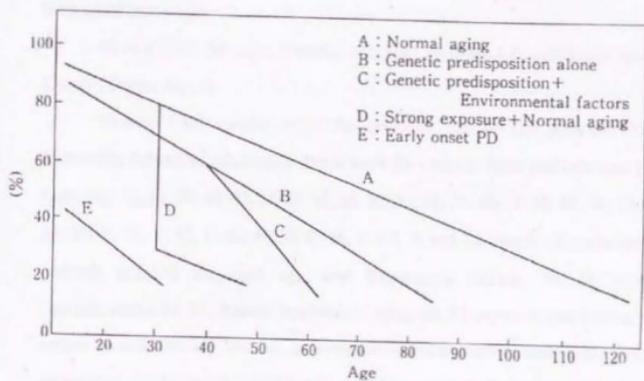


Fig. 7-1 Proposed scheme of nigrostriatal dopaminergic cell death

MATERIALS AND METHODS

CHAPTER 2

Chemicals

EDTA·4Na·4H₂O was purchased from Dojin (Kumamoto, Japan). Dibenzylamine (DBA), heptafluorobutyric (HFB) anhydride, and other chemicals were purchased from Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan).

Biological materials

Male C57BL/6J mice, 7 weeks old, were purchased from Nippon Biosupply Center (Tokyo, Japan).

Human CSF samples were the generous gift of Dr. Mizuno (Juntendo University School of Medicine). There were 18 samples from parkinsonian patients (age, sex; 75, M; 70, M; 65, M; 63, M; 61, M; 59, M; 57, M; 55, M; 45, M; 40, M; 39, M; 73, F; 72, F; 67, F; 62, F; 60, F; 58, F; 57, F) and 11 samples from neurological controls (clinical diagnosis, age, sex; Binswanger disease, 79, M; meningitis carcinomatosa, 72, M; diabetic oculomotor palsy, 68, M; cervical spondylosis, 61, M; motor neuron disease, 60, M; post-cerebrovascular disease abnormal involuntary movement, 55, M; cervical disk hernia, 51, M; postencephalitic monoathetosis, 28, M; pituitary tumor, cerebrovascular parkinsonism, 73, F; olivo-ponto-cerebellar atrophy, 51, F; cerebral palsy, 15, F).

Organic synthesis

Authentic 1BnTIQ was synthesized by modifying the method of Gray et al. (1989) as follows. Phenylacetyl chloride was added dropwise to PEA in dichloromethane and pyridine at 0°C. The solution was stirred for half an hour, and usual work-up afforded N-phenylacetyl-PEA, which was recrystallized from ethyl

acetate. An anhydrous toluene solution of the amide with diphosphorus pentaoxide was refluxed for 2 h. Cold water with crushed ice was poured into the resulting solution and the aqueous layer was separated after mixing. The aqueous layer was extracted with diethylether three times and the whole ether solution was evaporated after the usual work-up to obtain 1-benzyl-3,4-dihydroisoquinoline. 1BnTIQ was obtained by refluxing 1-benzyl-3,4-dihydroisoquinoline in ethanol with sodium borohydride for 14 h. 1BnTIQ hydrochloride was obtained from a mixture of the free amine and ether saturated with hydrogen chloride, and was recrystallized from dichloromethane and acetone (m.p. 165.0–166.5°C). Its structure was confirmed by ¹H NMR. 1McTIQ was synthesized by means of a modified Bischler-Napieralski cyclization (Kessar et al., 1971; Tasaki et al., 1991). 1McTIQ hydrochloride and DBA hydrochloride were obtained and recrystallized by the same methods as 1BnTIQ hydrochloride. Each salt was converted back to the free base when necessary. A solution of each compound for injection was prepared by dissolving the hydrochloride in water.

Sample preparation from the mouse brain

Samples were prepared according to the method of Kohno et al. (1986). The mice were killed by decapitation and their brains were quickly removed. Each brain was weighed, placed in an ice-cooled Potter-Elvehjem type homogenizer, and homogenized in 0.4 M perchloric acid containing 0.05% (wt/vol) EDTA•4Na, 0.05% (wt/vol) ascorbic acid and 0.02% (wt/vol) semicarbazide hydrochloride. The homogenate was centrifuged (12,000 × g for 20 min at 4°C) and the supernatant was separated. A constant volume of DBA was added to the supernatant as an internal standard for quantitative analysis. Every supernatant solution was adjusted to pH 12.0 and extracted with dichloromethane. The organic layer was extracted with 0.1 M hydrochloride containing 0.05% (wt/vol) EDTA•4Na, 0.05% (wt/vol) ascorbic acid

and 0.02% (wt/vol) semicarbazide hydrochloride. The aqueous layer was re-adjusted to pH 12.0 and re-extracted with dichloromethane. The organic layer was dried with anhydrous potassium carbonate and the filtrate was evaporated down to 200 μ l.

Sample preparation from human CSF

Human CSF (3-10 ml) was added to 0.4 M perchloric acid containing 0.05% (wt/vol) EDTA \cdot 4Na, 0.05% (wt/vol) ascorbic acid and 0.02% (wt/vol) semicarbazide hydrochloride. The mixture was centrifuged (12,000 \times g for 20 min at 4°C) and the pellet was discarded. A constant volume of DBA was added to the supernatant as an internal standard for quantitative analysis. After that, the procedure was the same as for the mouse brain.

Derivatization with heptafluorobutyric anhydride

The solution after extraction and concentration was placed in a 1 ml glass ampoule. The HFB derivative was prepared by the addition of 10 μ l anhydrous HFB to the ampoule, which was sealed and left in a water bath for 30 min at 70°C. Ethyl acetate (5 μ l) was added dropwise to form homogeneous solution. This solution (1 μ l) was injected into a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) for analysis.

GC-MS conditions for HFB-derivatized IBnTIQ

For GC-MS, we employed a gas chromatograph (Hewlett Packard 5890 Series II), double-focusing mass spectrometer (JMS SX102A) and mass data system (Complement Data System). GC analysis was carried out on a J&W 30 m \times 0.25 mm (i.d.) bonded-phase DB-5 fused-silica capillary column operated in the splitless mode with helium as a carrier gas. Initially the oven temperature was programmed from 60°C (1 min) to 150°C (10 min) at 20°C/min, and then from 150°C to 250°C (10 min) at 30°C/min (method A). In later experiments we used improved conditions: the oven

temperature was programmed from 60°C (1 min) to 150°C (7 min) at 15°C/min, and then from 150°C to 250°C (5 min) at 30°C/min (method B). Injection temperature, electron energy and ionizing current were 220°C, 70 eV and 300 μ A, respectively. 1BnTIQ was detected by the GC-selected ion monitoring (SIM) method. The mass numbers used for characterization were m/z 359, 379, 399 (HFB-derivatized 1BnTIQ, resolution=1,000) and m/z 359.093, 379.100, 399.106 (HFB-derivatized 1BnTIQ, resolution=10,000) in the negative ion chemical ionization (negative CI) mode using methane. 1BnTIQ content was also determined by GC-SIM. The mass numbers used for quantitative analysis were m/z 328 (HFB-derivatized 1BnTIQ), 302 (HFB-derivatized DBA) in the positive ion electron impact (positive EI) mode.

Derivatization with (-) perfluoro-2-propoxypropionyl chloride

Six C57BL mouse brains were gathered and the sample was prepared according to the same method as the sample preparation for HFB-derivatizing. In order to the proportion of R and S enantiomers of 1BnTIQ, 100 μ l of a chiral derivatizing reagent, (-) perfluoro-2-propoxypropionyl chloride (PPP-Cl) was added to the sample. The mixture was heated at 80°C for 30 min to be derivatized.

GC-MS conditions for (-) PPP-derivatized 1BnTIQ

The GC program was carried out from 60°C (1 min) to 170°C (3 min) at 20°C/min, and then from 150°C to 250°C (2 min) at 5°C/min. The mass number used for detection was m/z 444 (PPP-derivatized 1BnTIQ). The other conditions were the same as the HFB-derivatized sample.

Sample preparation from the 1BnTIQ-injected monkey brain

The monkey brain sample was the generous gift of Dr. Yoshida (Jichi Medical School). 1BnTIQ \cdot HCl (22mg/kg) was injected to a monkey for 66 days to observe the

acute, and the chronic effect including parkinsonism. After 5 days passed, the monkey was killed and decapitated. The brain was quickly removed and was separated into each section, which was cortex, cerebellum, striatum, basal ganglia (except for striatum), thalamus, hippocampus and spinal cord. These sections were weighed and the samples were prepared and analyzed with GC-MS according to the same method for the mouse brain.

CHAPTER 3

Effect of deprenyl on *in vitro* biosynthesis of IBnTIQ

Nontreated C57BL/6j mouse (7 week old, male) was killed by decapitation and the brain was quickly removed and homogenized in 5 ml of 0.32 M sucrose in a Polytron. The homogenate was centrifuged at 900 g for 10 min at 4 °C, and its supernatant was used as the enzyme source in the experiment. Deprenyl (10 µM) was employed as a MAO inhibitor. Two ml of the assay sample contained 1 mM phenethylamine (PEA) as a substrate and 5 mg protein in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). After preincubation for 5 min, the assay was initiated by the addition of phenethylamine and the mixture was incubated for 60 min. The reaction was terminated by adding NaOH. The homogenate was centrifuged (12,000 g for 20 min at 4 °C) to precipitate protein, and dibenzylamine was added to the supernatant as an internal measurement standard. The basic fraction was extracted and derivatized with heptafluorobutyric anhydride, and the contents of IBnTIQ and 1MeTIQ were determined by the gas chromatography-selected ion monitoring method.

Quantitative detection of IBnTIQ in deprenyl-treated mouse

Deprenyl 5 mg/kg in saline was intraperitoneally injected into C57BL/6j mice (7 week old, male) twice daily for two days. The animal was handled in accordance with Guide for Animal Experimentation, Faculty of Medicine, University of Tokyo.

The brain was quickly removed 2 h after the last injection, and homogenized with 0.4 M perchloric acid in a Polytron. The subsequent procedures were the same as in the *in vitro* study.

CHAPTER 4

Effect of 1BnTIQ on activities of enzyme complexes in the electron transport system

The following method was a modification of the method described previously (Mizuno et al., 1987a; Mizuno et al., 1987b; Mizuno et al., 1988). C57BL mice, 6-8 weeks old, were killed and brains were immediately removed. Three brains were used on each experiment. The mitochondrial fraction was prepared according to Ozawa et al., (1966). Brains were homogenized in 20 ml of 0.3 M mannitol adjusted to pH 7.4 with KOH using 30ml ice-cooled Potter-Elvehjem type homogenizer, and then they were homogenized with 10 ml of 0.3 M mannitol for wash. The homogenate was centrifuged (600 g for 8 min), and its supernatant was centrifuged (10,000g for 10 min). A fluff layer was removed and was washed 5 times. The pellet was suspended in 1.0 ml Chance, of which 20 μ l was used for total protein assay according to Bradford (1966). A part of the suspension was freeze-d, and was thawed when necessary. On the experiments, nonfrozen and freeze-thawed mitochondria were used.

Oxygen consumption was measured polarographically using a Clark-type oxygen electrode in the same medium used to suspend mitochondria. Glutamate + malate, and succinate (with rotenone) served as substrates. ADP was added, 4-5 min after the addition of substrates. Oxygen consumption in state 3 (ADP and substrate-dependent) respiration was calculated from the recording made shortly after the addition of ADP. At the end of polarography, an aliquot of the suspension was transferred to a 1 ml cuvette, and activities of Complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase) and Complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) were assayed

according to the method of Hatefi (1978). All the assays were performed at 37°C. Molar extinction coefficients for NADH of 6,270 at 340 nm was used for calculation of the enzyme activities.

Binding assay for [³H] MK-801 binding site in the mouse brain

The following method was according to the method described previously (Yoneda and Ogita, 1989; Tasaki 1994).

Materials

(+)-[3-³H]-MK-801 (24.0 Ci/mmol) were purchased from Daiichi Pure Chemicals Co. Ltd. (Tokyo, Japan). The other unlabelled compounds were purchased from Research Biochemicals Inc. (Natick, USA) and other inorganic salts were from Wako Pure Chemical Industries Co. Ltd. (Osaka, Japan).

Tissue preparation

The male C57BL/6J mice were decapitated and the brains were quickly removed into the ice-cooled homogenizer and homogenized in 10 volume of ice cooled 50mM Tris•acetate buffer (pH 7.4). The buffer was always prepared freshly by diluting 500mM Tris•acetate buffer (pH 7.4), and were filtered through a nitrocellulose membrane filter with a pore size of 0.45µm. The homogenate was subsequently centrifuged four times (50,000 g for 20 min at 2°C) by repeating the resuspension of the resultant pellet in 50mM Tris•acetate buffer. The final pellet was suspended in 0.32M sucrose, filtered through the membrane similarly, and the proteins were determined by the method of Bradford (1976). The suspension was stored at -80°C. On the day of the binding assay, frozen suspension (8mg protein) was thawed and treated with 0.04% Triton X-100 in a total volume of 0.25ml of Tris•acetate buffer at 2°C for 10 min with a gentle stirring. This treatment was terminated by the centrifugation at 50,000 g for 20

min and the resultant pellet was washed by the 50mM Tris•acetate buffer and centrifuged again. The final pellet was resuspended in the Tris•acetate buffer, and the protein of the suspension was determined again by the method of Bradford (1966).

Binding conditions for [³H]MK-801 binding site

The assay sample contained 300mg protein of the tissue preparation and various concentrations of each compounds in 50mM Tris•acetate buffer (pH 7.4). The concentrations of protein in this assay was determined by the same incubation with several concentration of protein as described below. The binding reaction was initiated by addition of the final 5nM [³H]MK-801 and the total volume of each sample was 0.5ml after the preincubation for 2 min. Incubation was for 30 min at 30°C, and terminated by rapid vacuum filtration, used by Brandel harvester, over Whatman GF/B filters prewetted with 0.5% polyethyleneimine. The filters were four times with 3ml of ice-cooled Tris•acetate buffer which was the same in incubation and their residual radioactivity, after dissolved inethanol, was measured by conventional sintillation counting. Nonspecific binding, defined as that present after addition of 100μM unlabelled (+)MK-801, was subtracted from total binding to yeild specific binding.

CHAPTER 5

Chemicals

NADH, sodium pyruvate, perchloric acid, ascorbic acid, semicarbazide hydrochloride and isoproterenol hydrochloride was purchased from Wako Pure Chemical Industry Ltd. (Tokyo, Japan). Dopamine hydrochloride was purchased from Tokyo Kasei (Tokyo, Japan). EDTA•4Na was purchased from Dojin (Kumamoto, Japan).

Organotypic Slice Co-culture

Ventral mesencephalic slices were prepared from E16 Wistar rats. Forebrain of newborn rats was cut into 400- μm -thick slices with a Microslicer, and the striatum was separated. Mesencephalic and striatal slices were put on a dish consisting of collagen coated membrane at a separation of 500 μm . DMEM/F-12 was employed as the culture medium.

Measurement of LDH Activity in the Medium

The activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the medium was measured at intervals as an index of cell death, to determine the time course of cell death in this organotypic culture system. The medium was added in the presence of NADH and sodium pyruvate, and the decrease of absorbance at 340 nm was measured. After exposure of the slices to 1BnTIQ, LDH activity in the media was determined on day 0, day 4, day 7 and day 9.

Measurement of Dopamine Content in Mesencephalic and Striatal Slices

The slices were cultured for about 10 days, then 1BnTIQ was supplemented in the medium for 24 h or 7 days. Mesencephalic and striatal slices were separated, and each mesencephalic slice was homogenized by the use of a sonifier with 0.4 M perchloric acid containing 0.05% (wt/vol) EDTA·4Na, 0.05% (wt/vol) ascorbic acid, and 0.02% (wt/vol) semicarbazide hydrochloride. The homogenate was centrifuged (20,000 g for 15 min at 4 °C). Isoproterenol was added to the supernatant as an internal standard, and the solution was filtered through a 0.45 μm pore disposable filter (Millipore, Tokyo, Japan). Dopamine content was assayed by high-performance liquid chromatography with an electrochemical detector (HPLC-ECD). The detection voltage of ECD was +700 mV.

CHAPTER 6

Measurement of bradykinesia induced by 1BnTIQ in mice

To measure the degree of bradykinesia, a typical symptom of parkinsonism, the pole test was employed (Ogawa et al., 1985; Tasaki et al., 1991). The dosage schedule for mice is shown in Table 1. Mice for this test were classified to 4 groups: (A) non-treated control (n=4), (B) saline treatment 2 injections/day \times 5 days before 1BnTIQ treatment 80 mg/kg/injection, 2 injections/day \times 5 days (n=4), (C) 1MeTIQ treatment 80 mg/kg/injection, 2 injections/day \times 5 days before 1BnTIQ treatment 80 mg/kg/injection, 2 injections/day \times 5 days (n=4), (D) saline treatment 2 injections/day \times 5 days before 1BnTIQ treatment 80 mg/kg/injection, 2 injections/day \times 5 days, and carbidopa, peripheral L-aromatic amino acid decarboxylase inhibitor 10 mg/kg and L-DOPA 100 mg/kg treatment 1 h before the pole test (n=5).

The interval between the first and the second treatments was one day. The pole test was carried out in a dimmed room 2 days after the last treatment. The mouse was placed grasping a rough-surfaced pole (diameter 8 mm, height 55 cm), and Tturn was defined as the interval from the time at which the mouse released either forefoot from the pole to turn downward until it turned completely downward. TLA was defined as the interval from the beginning of measurement of Tturn until all four feet of the mouse reached the floor. This test was carried out five times successively for each mouse, after one successful practice test.

REFERENCES

- Alpers H. S. *et al.* (1975) *Biochem. Pharmacol.* **24**, 1391-1396.
- Ayala A. *et al.* (1994) *Brain Res.* **638**, 334-336.
- Bella V. L. *et al.* (1996) *Neuroscience* **70**, 1039-1052.
- Benedetti M. S. *et al.* (1989a) *J. Neural. Transm.* **77**, 47-53.
- Benedetti M. S. *et al.* (1989b) *J. Neural. Transm. [Gen. Sec.]* **78**, 43-51.
- Carlsson A. *et al.* (1958) *Science* **127**, 471.
- Chiba K. *et al.* (1984a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **120**, 574-578.
- idem (1984b) *ibid.* **128**, 1229-1232.
- Cohen G. *et al.* (1974) *Eur. J. Pharmacol.* **29**, 292-297.
- Collins A. C. *et al.* (1973) *Biochem. Pharmacol.* **22**, 2337-2348.
- Davis V. E. *et al.* (1982) *Beta-Carbolines and Tetrahydroisoquinolines*, pp. 99-111. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Dostert P. *et al.* (1989) *J. Neural. Transm. [P-D Sect.]* **1**, 269-278.
- Drucker G. *et al.* (1990) *Brain Res.* **509**, 125-133.
- Gähwiler B. H. (1988) *Trends Neurosci.* **11**, 484-489.
- Gerlach M. *et al.* (1992) *Eur. J. Pharmacol.* **226**, 97-108.
- Gray N. M. *et al.* (1989) *J. Med. Chem.* **32**, 1242-1248.
- Hao R. *et al.* (1995a) *Neurology* **45**, 138-142.
- Hao R. *et al.* (1995b) *Neurosci. Lett.* **200**, 77-80.
- Heikkila R. *et al.* (1971) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **179**, 250-258.
- Inwang E. E. *et al.* (1973) *J. Neurochem.* **20**, 1469-1473.
- Kawa H. *et al.* (1982) *J. Fluor. Chem.* **20**, 475-485.
- Kawai H. *et al.* (1998) *J. Neurochem.* **70**, in press.

- Kessar S. V. *et al.* (1971) *J. Chem. Soc. (C)*, 266-269.
- Kikuchi K. *et al.* (1991) *Drug Metab. Dispos.* **19**, 257-262.
- Kohn M. *et al.* (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **140**, 448-454.
- Koike K. *et al.* (1989) *Gen. Pharmacol.* **20**, 259-260.
- Langston J. W. *et al.* (1983) *Science* **219**, 979-980.
- Lewy (1913) *Handbuch der Neurologie*, herausgegeben von Lewandowsky. 3ter Band, Spezielle Pathologie II, 920.
- Makino Y. *et al.* (1988) *Life Sci.* **43**, 373-378.
- Makino Y. *et al.* (1990a) *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **19**, 415-419.
- Makino Y. *et al.* (1990b) *J. Neurochem.* **55**, 963-969.
- Matsubara K. *et al.* (1993) *Brain Res.* **610**, 90-96.
- Matsubara K. *et al.* (1995) *Neurology* **45**, 2240-2245.
- Matsubara K. *et al.* (1996) *Eur. J. Pharmacol.* **315**, 145-151.
- Mizuno Y. *et al.* (1987a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **143**, 294-299.
- Mizuno Y. *et al.* (1987b) *J. Neurochem.* **48**, 1787-1793.
- Mizuno Y. *et al.* (1988) *J. Neurol. Sci.* **86**, 97-110.
- Myers R. D. (1978) *Alcoholism: Clin. Exp. Res.* **2**, 145-154.
- Myers R. D. and Melchior C. L. (1977) *Pharmac. Biochem. Behav.* **7**, 381-392.
- Nagatsu T. and Hirata Y. (1987) *Eur. Neurol.* **26**, Suppl. 1, 11-15.
- Nagatsu T. and Yoshida M. (1988) *Neurosci. Lett.* **87**, 178-182.
- Nakagawa H. *et al.* (1993) *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 579-582.
- Nakagawa H. *et al.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Niwa T. *et al.* (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 1084-1089.
- Ogawa N. *et al.* (1985) *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **50**, 435-441.
- Ohta S. *et al.* (1987) *Biomed. Res.* **8**, 453-456.
- Ohta S. *et al.* (1990) *Life Sci.* **46**, 599-605.

- Østergaard K. *et al.* (1990) *Exp. Brain Res.* **82**, 547-565.
- Parkinson J. (1817) "An essay on the shaking palsy" Sherwood, Neely and Jones, London.
- Parkinson Study Group (1989a) *N. Engl. J. Med.* **321**, 1364-1371.
- Parkinson Study Group (1989b) *Arch. Neurol.* **46**, 1052-1060.
- Philips S. R. and Boulton A. A. (1979) *J. Neurochem.* **33**, 159-167.
- Ramsay R. R. *et al.* (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 1284-1289.
- Riederer P. and Youdim M.B.H. (1986) *J. Neurochem.* **46**, 1359-1365.
- Sandler M. *et al.* (1973) *Nature* **241**, 439-443.
- Scarr E. *et al.* (1994) *Neurochem. Res.* **19**, 153-159.
- Steensen B. H. *et al.* (1995) *Exp. Brain Res.* **106**, 205-214.
- Suzuki K. *et al.* (1988) *Neurosci. Lett.* **86**, 105-108.
- Suzuki K. *et al.* (1990) *Neurochem. Res.* **15**, 705-710.
- Tamiya K. (1994) Master's thesis.
- Tasaki Y. *et al.* (1991) *J. Neurochem.* **57**, 1940-1943.
- Tasaki Y. (1994) Doctor's thesis.
- Wu R. M. *et al.* (1994) *Ann. New York Acad. Sci.* **738**, 214-221.
- Yamakawa T. *et al.* (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 676-681.
- Yamamoto N *et al.* (1992) *Neuron* **9**, 217-228.
- Yoneda Y. and Ogita K. (1989) *Brain Res.* **499**, 305-314.
- Yoshida M. *et al.* (1990) *Neurosci. Lett.* **119**, 109-113.
- Youdim M. B. H. and Riederer P. (1993) *Mov. Disord.* **8**, Suppl. 1, S8-S13.

謝 辞

本研究は、東京大学大学院薬学系研究科分子薬学専攻薬品代謝化学教室 長野哲雄教授の元で行われたものであり、同教授に感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、直接親身になって御指導下さり、数々の御助言を頂きました広島大学医学部総合薬学科社会薬学教室 太田 茂教授に心から感謝致します。

本研究を始めるにあたり、テーマを与えて下さり、御指導下さいました東京大学名誉教授 廣部雅昭先生に心より感謝致します。

本研究に御協力頂きました厚生省関東甲信越地区麻薬取締官事務所 牧野由紀子博士、順天堂大学医学部 水野美邦教授、旭川医科大学 松原和夫教授、自治医科大学名誉教授 吉田充男先生、名古屋市立大学医学部 鳥田昌一教授、東京大学大学院医学系研究科 桜井正樹講師、吉田由美子さん、金澤一郎教授に感謝致します。

本研究を進めるにあたり、多くの御助言、御討論をして頂きました東京大学薬学部薬品代謝化学教室、東京大学医学部神経内科、広島大学医学部総合薬学科社会薬学教室の皆様へ感謝致します。

最後に、長い大学院での研究生生活を支えてくれた両親に感謝します。

論文目録

1. 題目 「パーキンソン病関連新規内在性脳内アミン1BnTIQに関する神経化学的研究」

2. 印刷公表の方法及び時期

(1) Kotake Y., Tasaki Y., Makino Y., Ohta S. and Hirobe M.

1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline as a parkinsonism-inducing agent: a novel endogenous amine in mouse brain and parkinsonian CSF. *J. Neurochem.* **65**, 2633-2638 (1995).

(2) Kotake Y., Yoshida M., Ogawa M., Tasaki Y., Hirobe M. and Ohta S.

Chronic administration of 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous amine in the brain, induces parkinsonism in a primate. *Neurosci. Lett.* **217**, 69-71 (1996).

(3) Kotake Y., Tasaki Y., Hirobe M. and Ohta S.

Deprenyl decreases an endogenous parkinsonism-inducing compound, 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in mice: *in vivo* and *in vitro* studies. *Brain Res.* (1998) in press.

3. 参考論文 (含紀要)

(1) Okada T., Sato K., Shimada S., Kotake Y., Kawai H., Ohta S., Tohyama M. and Nishimura T.

Tetrahydropapaveroline and its derivatives inhibit dopamine uptake through dopamine transporter expressed in HEK293 cells. *Brain Res.* (1998) in press.

(2) Tasaki Y., Kotake Y., Makino Y., Ohta S. and Hirobe M.

A novel endogenous amine, 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (1BnTIQ) in parkinsonian CSF, and its toxicological effect. *Advances in Behavioral Biology Vol. 44 Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Recent Developments* (Edited by Hanin I., Yoshida M. and Fisher A.) pp599-604 (1995) Plenum Press, New York.

(3) Kotake Y., Sakurai M., Kanazawa I. and Ohta S.

Toxicity of 1BnTIQ, endogenous amine in the brain, in mesencephalic slice culture. *Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases* (Edited by Fisher A., Yoshida M. and Hanin I.) (1998) Plenum Press, New York, in press.

4. 学会発表

- (1) 古武弥一郎、田崎嘉一、牧野由紀子、廣部雅昭、太田茂
パーキンソン病態における新規内在性アミン1BnTIQ量変動とその神経毒性
日本薬学会 第114年会 東京 1994年3月
- (2) 古武弥一郎、田崎嘉一、牧野由紀子、廣部雅昭、太田茂
内因性神経毒1BnTIQの作用機序の検討とパーキンソン病態における量的変動
日本薬学会 第115年会 仙台 1995年3月
- (3) Kotake Y., Tasaki Y., Makino Y., Ohta S. and Hirobe M.
A novel endogenous amine, 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in the mouse brain and parkinsonian CSF: relation to Parkinson's disease.
15th meeting of the International Society for Neurochemistry, Kyoto, Japan, July 2-7, 1995.
- (4) 古武弥一郎、廣部雅昭、太田茂
パーキンソン病治療薬Deprenylによる内在性脳内アミンTIQ類の量的変動
日本薬学会 第116年会 金沢 1996年3月
- (5) 古武弥一郎、河合洋、太田茂、桜井正樹、金澤一郎
中脳切片培養系を用いた内在性脳内アミン1BnTIQの毒性検討
日本薬学会 第117年会 東京 1997年3月
- (6) Kotake Y., Sakurai M., Kanazawa I. and Ohta S.
Toxicity of 1BnTIQ, endogenous amine in the brain, in mesencephalic slice culture.
Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Fourth International Conference, Eilat, Israel,
May 18-23, 1997.
- (7) 古武弥一郎、桜井正樹、金澤一郎、太田茂
脳切片培養系を用いたパーキンソン病関連内在性脳内アミン1BnTIQ神経毒性の不可逆性
とドーパミン神経選択性
日本薬学会 第118年会 京都 1998年3月

