

博士論文

健常人およびパーキンソン病患者におけるL-DOPAの
運動野可塑性への影響：経頭蓋磁気刺激を用いた検討

田中 信行

健常人およびパーキンソン病患者における L-DOPA の運動
野可塑性への影響：経頭蓋磁気刺激を用いた検討

脳神経医学専攻神経内科学教室

指導教員：辻省次教授

田中 信行

目次

要旨	4
序文	5
方法	
実験1 健常人における検討	15
実験2 パーキンソン病患者における検討	16
結果	
実験1	27
実験2	40
考察	
実験1	46
実験2	61
結語	65
謝辞	66
参考文献	67

要旨

4 連発経頭蓋反復磁気刺激法(QPS)を用いて、L-DOPA がヒトの脳運動野の可塑性に与える影響を検討した。健常者では、L-DOPA により QPS による長期増強(LTP)様変化がより増大した。加齢により QPS の LTP 様変化は低下したものの、L-DOPA による増強効果には差が見られなかった。また、QPS では他の非侵襲的脳刺激法に比して L-DOPA 用量による可塑性変化に変動なく、これは QPS が D2 には効果が少ないためと考えられ、D1 関与の可塑性変化の検出には有用と考えられた。

早期のパーキンソン病患者での検討では、ドパミン OFF で QPS による LTP 様変化が低下ないし消失しており、L-DOPA 内服により回復した。L-DOPA 投与による運動野可塑性の改善と臨床症状の改善の間には相関がみられ、本刺激法は治療効果の予測や客観的な評価に役立つ可能性がある。

序文

環境に適応し学習・記憶していくためには、環境の変化に応じて中枢神経の神経細胞が興奮性を柔軟に変化することが必要である。この柔軟性の基盤となる生理機能として、外的な刺激の入力の変化に応じてシナプス効率を変化させる神経可塑性が知られている。神経可塑性は、実験動物の海馬歯状回のシナプスにおいてシナプス効率が長期的に変化することで発見された(Bliss 1973)。この海馬の研究によると、海馬の CA3 から CA1 に入力する Shaffer 側枝を刺激することによって得られる CA1 の錐体細胞の興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potential : EPSP) が、条件により両方向性に変化する事が示された。100Hz や Theta burst stimulation (TBS) の短い高頻度刺激を歯状回へ入力する貫通線維へ与えた後には、神経細胞の反応性が増大し同じ強度の Shaffer 側枝刺激に対する EPSP の立ち上がりの傾きが長時間にわたって大きくなるという長期増強 (long term potentiation: LTP) を生じ、逆に、Shaffer 側枝へ 1 Hz の低頻度刺激を加えると長期持続する EPSP の低下を起し、長期抑圧現象 (long term depression : LTD) と呼ばれる現象がみられる。このような刺激入力の状態に応じて神経細胞の興奮性の変化する仕組みが、学習や記憶、順応の神経基盤と考えられている。近年では、このような可塑性変化は海馬だけではなく、

大脳皮質でも生じることが知られるようになってきている(Tsumoto 1990)。

近年、ヒトの大脳皮質の可塑性変化を経頭蓋磁気刺激を用いて検査することができるという報告されている。経頭蓋磁気刺激とは、急激に変化するコイル内の電流により誘導磁場を生じさせ、その変動磁場により二次的に生じる渦電流により脳内を電氣的に刺激できる方法である(Barker 1985)。運動野に経頭蓋磁気刺激を与えると、大脳皮質内の介在ニューロンが刺激されシナプスを介して錐体細胞が興奮し、脊髄前角細胞を経て末梢の筋肉が収縮する。これを、表面筋電図で記録し運動誘発電位(motor evoked potential: MEP)を測定する。MEPの振幅は運動野の興奮性を反映するため、その増減が運動野の皮質興奮性の指標として広く使われている(Cooke and Bliss 2006)。反復経頭蓋磁気刺激後に、単発経頭蓋磁気刺激による運動誘発電位の反応の振幅が長期的に変化し、大脳皮質の興奮性が継続して変化する(Pascual-Leone 1994)。近年では、より効率よく長期効果を誘導するために種々の反復刺激法が開発されている。複数の磁気刺激装置を用いて3連発のバースト刺激を一定間隔の5Hzであたえる、単相性パルスを用いる4連発経頭蓋反復磁気刺激法(quadri-pulse stimulation: QPS)といった磁気刺激法が報告された。また、末梢の体性感覚刺激と組み合わせたpaired associative stimulation (PAS)なども開発された。それらの刺激後に誘導されるMEP変化はいくつかの特徴をもっている。その変化が

NMDA 依存性であること (Haung 2007, Stefan 2002)、入力特異性や共同性、適合性といったシナプス可塑性の特徴をもっていること (Hallett 2007)、また、海馬のスライスに対して高頻度の反復磁気刺激を与えることにより、微小興奮性シナプス後電流 (miniature excitatory postsynaptic current; mEPSC) の振幅および頻度の上昇がみられ LTP が誘導され、シナプスの大きさの増大が数時間にわたってみられるとされている (Vlachos 2012)。これらのことから、反復時刺激後の MEP 変化にはシナプス可塑性がその基盤に関与している可能性が考えられている。

その中でも我々の研究室で開発した QPS は単相性の 4 連発の磁気刺激を一組として 5 秒毎 30 分間にわたって刺激するもので、4 連発の刺激間隔により、QPS 後に 30 分から 60 分程度持続する運動誘発電位の振幅の増減が双方向性に誘導される。この誘発電位の振幅の変化は、動物実験での神経可塑性 (長期増強・抑圧) と同様の生理学的特性を有しており、ヒトにおいて非侵襲的に大脳神経可塑性を検討可能である (Hamada 2007)。4 連発磁気刺激パルスの刺激間隔と誘発電位の振幅の変化の関係は S 字状のカーブを描く。脳のシナプス可塑性は、シナプス前ニューロンの繰り返す発火によるシナプス後ニューロンの発火頻度が高いほどシナプス後膜の長期興奮増強効果を生じるとされる Hebb 則 (Hebb 1949) に従う。更に、Bienenstock-Cooper-Munro (BCM) 仮説ではシナプス前の発火と

シナプス後膜電位との関係は、シナプス前ニューロンの発火が少ない場合にはシナプス後電位は減弱するが、刺激頻度がある閾値をこえると増強に転じるという 2 相性のカーブを描き、その閾値は環境などに応じて変化する (Bienenstock 1982)。4 発の刺激間隔と QPS 後の効果の S 字状のグラフはこの BCM カーブと類似しており、刺激頻度が少ない場合には減弱効果を示し、刺激頻度が高くなると増強効果を示すという 2 相性の S 字状のカーブを呈する(図 1)。あくまで類似性を示しているに過ぎないものの、QPS の効果は、BCM 仮説で提唱されているシナプス可塑性の特性を有していることが示唆されている (Hamada 2008)。運動野の可塑性を検討する方法として適していると考えられ、今回は長期増強を誘導するために、4 発刺激の間隔が 5ms に設定した QPS5 を用いることとした。

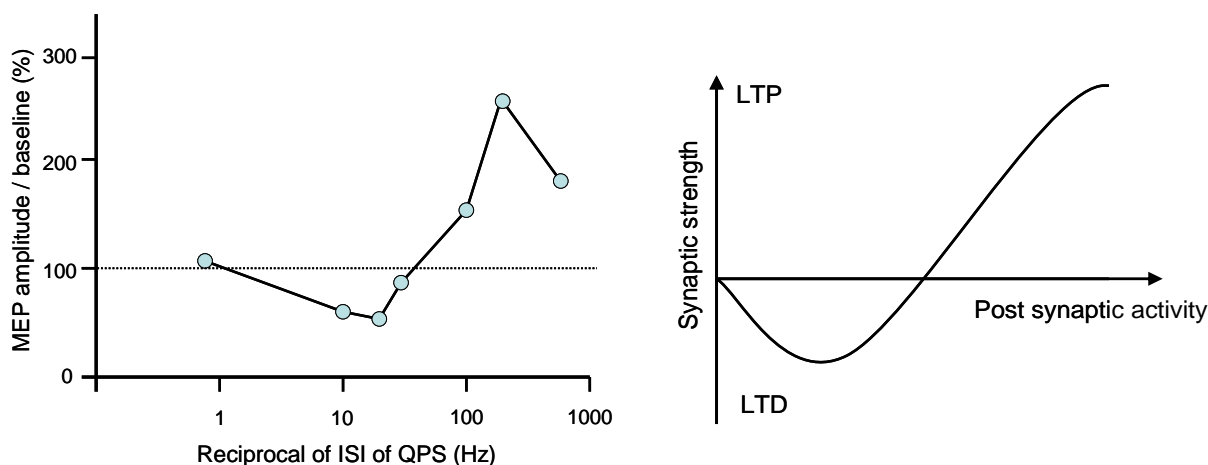


図 1 QPS の刺激頻度と誘導される効果との関連と BCM 理論。

右図は QPS での刺激頻度と誘導される MEP の変化率。X 軸には刺激頻度の対数、Y 軸には MEP の変化率をとっており、2 相性の S 状カーブがみられる。(Hamada 2008 より一部改変)

左図は BCM 理論でのモデル図。X 軸には後シナプスの発火頻度、Y 軸にはシナプス伝達の強度をとっている。(Bienenstock 1982 より一部改変)

両図には類似のカーブがみられている。

ドパミン機能の破綻により、様々な神経疾患や精神疾患が生じる。神経変性疾患のなかでも比較的頻度の高いパーキンソン病は、特にドパミンとの関わりが強い疾患であり、中脳黒質緻密部に存在するドパミン作動性神経細胞の変性が重要な病因であると考えられている。病態を説明するモデルのひとつとして

Alexander や DeLong らによって提唱された皮質-基底核ループモデルがある

(Alexander 1990, DeLong 1990)。線条体の D1 受容体から淡蒼球内節、視床を介して皮質を興奮させる直接路と線条体の D2 受容体から淡蒼球外節、視床下核、淡蒼球内節、視床を介して皮質を抑制する間接路があり、ドパミンが不足することにより直接路からの皮質の興奮性刺激の低下、間接路の抑制性刺激の抑制低下により皮質の興奮性低下がみられ、無動、筋強剛、振戦、姿勢反射障害などの運動症状が出現するとされている(図 2)。

このモデルはパーキンソン病の病態の一部を説明するものではあるが、研究がすすむにつれ、学習障害など十分に説明出来ないことも明らかになりつつある。すなわち、ドパミンの欠乏するパーキンソン病では運動学習の障害がみられ、ドパミンの投与に伴い回復がみられるという(Doyon 1997, Shin 2003)。例えば 6-OHDA の一次運動野の局所投与に伴う、運動野皮質のドパミン終末を破壊することにより学習障害が見られ、これは皮質の可塑性の異常によって学習された運動系列にも異常をきたすとされている(Molina-Luna 2009)。日々の運動自体は、

さまざまな運動系列の組み合わせであり、個々の運動自体を阻害する可能性がある (Hosp 2013)。さらに、系列記憶の行動への翻訳が障害されることにより運動障害が生じるのではないかとする仮説もある (Seidler 2007, Doyon 2008)。以上のようにパーキンソン病の病態に可塑性の異常が関与していることが強く示唆されている。

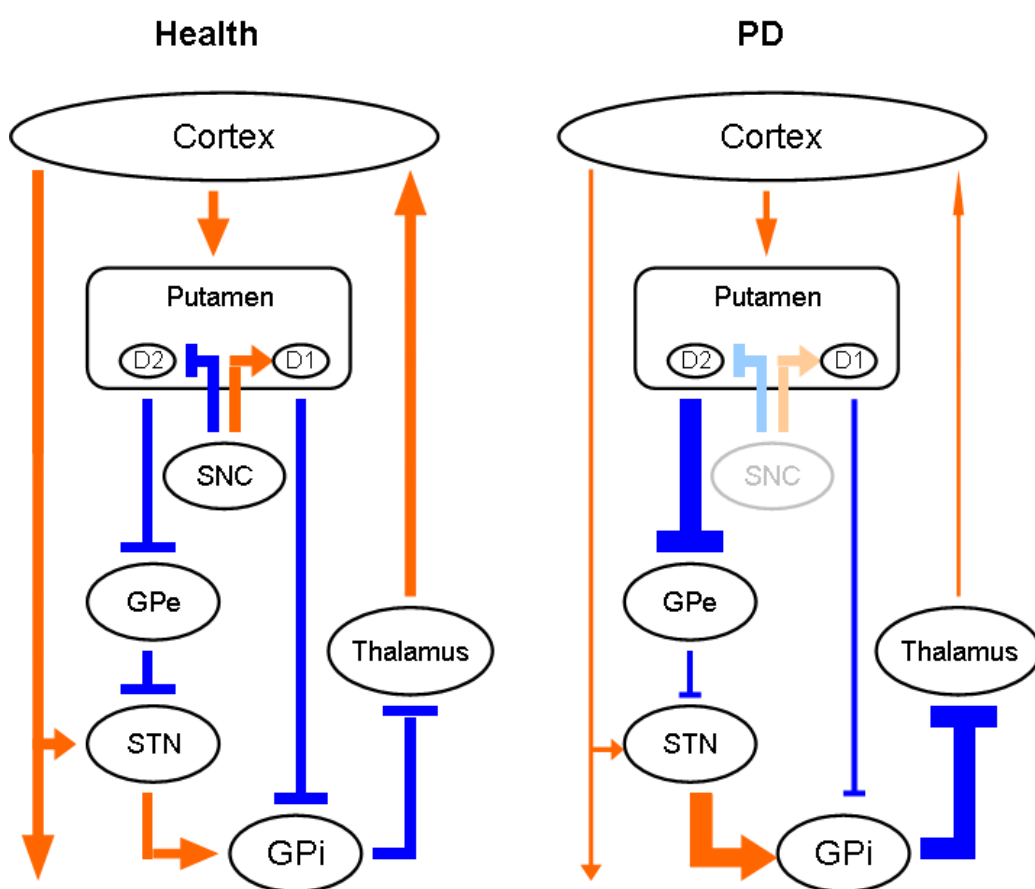


図 2 健常人およびパーキンソン病患者における皮質-基底核モデルの概略図。D1 受容体を介した直接路による皮質の興奮性刺激と D2 受容体を介した間接路による皮質抑制性刺激のバランスにより調整されている。パーキンソン病では SNC の変性に伴い、直接路の興奮低下、間接路の抑制の低下により皮質機能低下すると考えられた。(Alexander 1990 より一部改変)
 SNC: 黒質緻密部、STN: 視床下核、GPe: 淡蒼球外節、GPi: 淡蒼球内節、D1: D1 受容体、D2 : D2 受容体

実際に、パーキンソン病のモデル動物では、基底核および大脳皮質での可塑性の異常があり、その可塑性を変化させることで症状の改善が見られている。

パーキンソン病モデル動物における線条体のシナプス可塑性の異常については、ドパミン off 時に線条体ニューロンでは LTP が消失(可塑性の異常)し、L-DOPA 投与によりそれが正常に回復するという(Picconi 2003)。線条体だけではなく大脳皮質においても同様の可塑性の異常が示唆されている(Morgante 2006)。大脳皮質の高頻度電気刺激を行うことによりパーキンソン病モデル動物の運動症状の改善がみられる(Lefaucheur 2004)ことから、パーキンソン病の病態には大脳皮質の可塑性変化が関与していることが示唆される。加えて、遺伝子導入したモデル動物にて特定の神経細胞の選択的刺激が可能であるオプトジェネティクスという手技により(Zhang 2007)、パーキンソン病モデルラットの視床下核の高頻度刺激を行うと DBS と同等の治療効果がえられるが、一次運動野皮質の第 V 層の神経細胞を選択的に高頻度脱分極させることによっても同様の効果が得られることが示されており、パーキンソン病における基底核の機能異常は大脳皮質の興奮性異常を起こしており、その皮質の異常が症状にも関与していることが意味される(Gradinaru 2009)。

これらの動物における知見に合致し、先に述べた経頭蓋磁気刺激などの可塑性誘導プロトコールを利用したヒトのパーキンソン病患者においても可塑性異常

が示されている。まず DBS 電極を用いたヒトのパーキンソン病患者の可塑性検討では、基底核での LTP の低下がみられ、その振幅とパーキンソン病の運動症状のスコアリングである Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III (UPDRSIII) のスコアには相関がみられていた (Prescott 2009)。また、Ueki らによる PAS を用いた運動野皮質における LTP 様変化における検討においても振幅と UPDRSIII のスコアには相関を認めており、LTP 様変化の消失が抗パーキンソン病薬の投与に伴い回復している (Ueki 2006)。

これらの現状を踏まえ、パーキンソン病などの神経疾患における運動野皮質における可塑性の異常を検討し、ドパミンの可塑性への効果を解明することは、神経疾患の機序を解明するため、さらに動物実験にみられるように皮質を刺激することで治療にも結び付けることができる可能性があり、臨床的にも非常に重要であると考えた。

本研究の目的は、QPS により誘導される一次運動野での LTP 様変化を詳細に検討することである。さらに、この検討を L-DOPA をはじめとする薬物効果の評価にも応用することをもう一つの目的とした。パーキンソン病をはじめとした神経疾患の検討の前に、ヒトにおいては健常者での可塑性の状態の把握がまだ十分ではないため、まずは健常者において運動野の可塑性を評価し、治療薬による神

経可塑性の変化の詳細を明らかにすることとした。これまでのヒトにおける可塑性変化、およびドパミンの可塑性に対する影響の報告は、20代や30代の若年者を対象としていることが多く、神経疾患の患者が多い高齢者での検討は十分でない。高齢者では、LTP様変化が若年者と比較し低下するという報告(Fathi 2010, Freitas 2011)がある一方、MEPの振幅には変化がないが促通の出現に遅延がみられるとする報告(Fujiyama 2014)もみられ、結果が一定していない。そのため、健常高齢者における可塑性の検討が必要であると考えた。

本研究においてはまず、高齢者における可塑性を検討し、年齢により神経可塑性に違いがみられるかを検討した。また、パーキンソン病患者において、L-DOPAは用量依存性に症状を改善することから(Fahn 2004)から、L-DOPAの可塑性に対する効果も用量依存性である可能性が考えられる。健常人における用量依存性の変化にはこれまでいくつかの検討があるが(Monte-Silva 2010, Thirugnanasambandam 2011)、一定の結果が得られていない。既報告が一重盲検でしか行われていないこともあり、バイアスの混入も否定出来ない。そのため、本試験においてはL-DOPAの用量依存性に関して二重盲検にて検討を行う。

これにより可塑性の年齢による変化を把握するとともに、高齢で発症することが多い神経疾患での検査の時の基礎データとした。さらにパーキンソン病患者において同様な検討を行い、パーキンソン病における可塑性の変化とドパミンによ

る治療効果に関して解析した。

方法

実験 1 健常人における検討

倫理申請

本試験は東京大学医学部附属病院臨床試験審査委員会に申請を行い、了承を得ている(P2012004-11X)。全ての被験者に対して研究内容およびその意義について書面および口頭にて説明を行い、十分な理解の上で同意を取得した。

対象

人材派遣会社を通じて有償ボランティア、63-67歳の健常被験者 54 人、および 43-47歳の健常被験者 12 人を募集し検査を施行した。内服薬(レボドパ/カルビドパ水和物配合製剤: L-DOPA)の禁忌事項に触れるもの(添付文書参照)と一般的な反復磁気刺激検査除外基準(Wassermann 1996, Rossi 2009)に準じて以下の除外基準を設けた。

1. 口腔以外の頭部に金属が存在する
2. 心臓ペースメーカー・薬物治療ポンプ留置
3. 重篤な心臓病患者、肝疾患、腎疾患、肺疾患、腸閉塞
4. 気管支喘息
5. コントロール不良な糖尿病

6. 慢性開放隅角性緑内障
7. 大きな脳梗塞・頭部外傷後・脳腫瘍・てんかん患者、精神疾患、
向精神薬を内服中
8. 妊娠中または妊娠を計画する女性
9. その他、担当医師が参加には適切ではないと判断した場合

薬理学的介入

被験者は各試験日ごとにそれぞれのセッションに応じた用量の L-DOPA (100mg or 200mg) または乳糖 (placebo として) のいずれかを内服する。可塑性の誘導をはじめ 2 時間前に内服を行う。L-DOPA の最高血中濃度到達時間 (Tmax) は 1-2 時間とされ、髄液中の高値は 2-4 時間まで持続する。十分な血中濃度および髄腔内濃度を得られるよう試験の 2 時間前に内服とした。

それぞれの試験日の間隔は、薬剤と反復磁気刺激の効果の混入を防ぐため最低 1 週間以上とした。薬剤の投与順はランダムとし、薬剤については内容がわからないよう粉砕・カプセル化し、double blind の試験とした。

刺激および記録方法

被験者はリクライニングチェアに座り安静位を維持した。表面筋電図はディスプレイの表面電極にて、右第一背側骨間筋(FDI)から belly-tendon のモニターにて測定した。反応は Neuropack μ (日本光電 : MEB9103)にて x1000 に増幅し、100-3000Hz にてフィルター処理をした。サンプリングレート 10kHz にて転送し、オフラインの PC に保存した。

単発の単相性 TMS および QPS の刺激部位は左一次運動野で、FDI から得られる MEP が最大となる部位(hot spot)を刺激した。同部位を繰り返し刺激できるよう頭皮上に水性ペンにてマーキングを行った。刺激には外径 9cm の 8 の字型コイル(Magstim 社)を用い、コイルはハンドルが外後方 45° となるように保持した (図 3-A)。

安静時運動閾値(resting motor threshold: RMT)は、安静時に 10 回の刺激中に 5 回以上 50 μ V 以上の MEP が誘発される最小の刺激強度と定義し、刺激装置の最大出力に対する割合(100%)で示した。また、活動時運動閾値(active motor threshold : AMT)は弱収縮を一定に保持し、その間に 10 回中 5 回以上 200 μ V 以上の MEP が誘発される最小の刺激強度と定義し、刺激装置の最大出力(100%)に対する割合で示した。刺激強度は装置の最大出力の 1%刻みにて調整することができる。単発 TMS は Magstim 200(Magstim 社)によって行った。

QPS による神経可塑性の誘導

QPS は単相性の TMS を発生させる刺激装置(Magstim 200, Magstim 社)を 4 台用意し、特殊な連結装置(Magstim 社)にて連結させ、ひとつのコイルから 4 連発の磁気刺激が発生するようにした (図 3-B)。QPS のプロトコールとしては、TMS パルスの刺激間隔(inter-stimulus interval : ISI)を 5ms の 4 連発を 1 バーストとし、バーストの初発ごとの間隔は 5 秒 (0.2Hz)とした。これを 30 分間、1440 回(360 バースト)の刺激を行う。刺激強度は AMT の 90%に設定とした(図 3-C)。

単発 TMS による MEP の測定

TMS よって誘発される右 FDI での peak-to-peak での MEP 振幅を測定することによって運動野皮質の興奮性変化をみる。単発の経頭蓋磁気刺激は単発 TMS 記録は安静時で行い、QPS 前のコントロール測定時点で MEP の peak-to-peak 振幅が約 0.5mV になるように、刺激強度を調整し、ひとつのセッションの間はこの値に固定した。QPS 刺激後にも同じ刺激強度で MEP の測定を行った。

試験の概要

各試験は 2 重盲検クロスオーバー比較試験である。第 3 者によって薬剤は粉碎

し、同一のカプセルにいれられ、割り当てられることにより、検者および被験者はいずれの薬剤を内服したかがわからないよう盲検化した。薬剤および磁気刺激の影響の混入をふせぐため、いずれの試験においても同一被験者における各試験日は1週間以上の間隔をあけた。

各試験日ごとに1種類の内服薬を服用し、2時間ほど待ち時間を設ける。待ち時間後、RMT、AMT および単発 TMS にて MEP の振幅を約 0.5mV 導出する刺激強度の測定を行ったのちに QPS を施行した。

QPS 後に単発 TMS を行い、MEP の振幅の変化をみる。QPS 施行直後から施行後 30 分までは 5 分おきに、30 分後から 60 分後までは 10 分おきに MEP の測定を行う (T0、T5、T10…T30、T40、T50、T60)。それぞれの時間ごとに単発の TMS を 20 回行い、時間ごとに平均し解析を行った。(図 3-D)

・実験 1-1 65 歳群での L-DOPA200mg 内服の影響の検討

L-DOPA200mg と Placebo をとしての乳糖の内服薬 2 剤での差を検討する。34 人の正常被験者(平均 65.0±1.7 歳)に対して検査を施行した。各被験者には 2 日の試験日を設けた。第 1 試験日には、同意の取得および適格性の確認を行った。その後、ランダムに割り付けた 2 種のいずれかの薬剤を内服し、内服後 2 時間後に磁気刺激による検査を行った (単発での誘発筋電図測定後に、反復磁気刺激に

よる可塑性の誘導 (QPS)、その後の単発の誘発筋電図検査測定)。第 2 試験日は第 1 試験日から 1 週間以降のところに設定し、2 種のうちの残りの薬剤を内服し、同様の磁気刺激検査を行った。

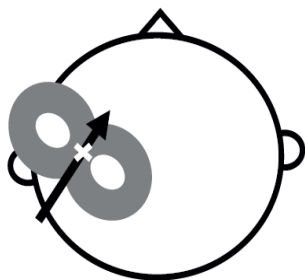
・実験 1-2 65 歳群での L-DOPA100mg 内服の影響の検討

20 人、平均 65.0 ± 1.3 歳の健常者に対して、L-DOPA100mg と Placebo の 2 群での検討を実験 1-1 と同様に行った。

・実験 1-3 45 歳群での L-DOPA200mg 内服の影響の検討

12 人、平均 44.8 ± 1.4 歳の健常被験者に対して、L-DOPA100mg と Placebo の 2 群での検討を実験 1-1 と同様に行った。

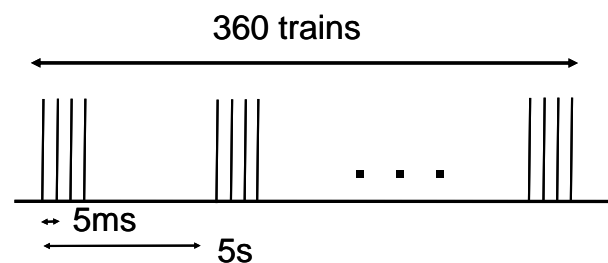
3-A



3-B



3-C



3-D

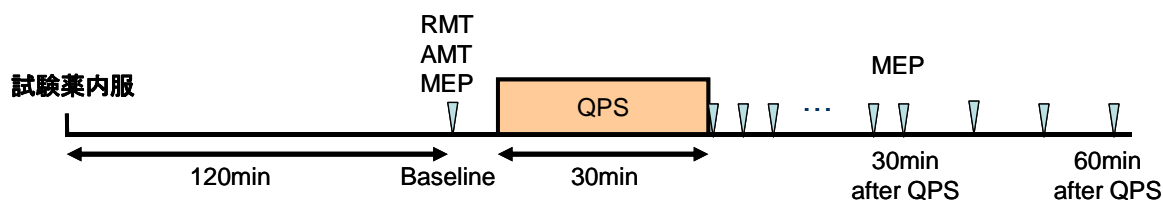


図 3-A 単発 TMS および QPS の刺激部位。左 M1 の中で FDI から得られる MEP が最大となる部位を刺激する。コイルはハンドルが外後方 45° となるように保持した。

図 3-B QPS の刺激発生装置。単発の TMS を発生させる Magstim200 4 台を特殊な連結装置を用いて連結させている。

図 3-C QPS の概要図。TMS 刺激パルスの間隔は 5ms に設定している。4 連発の刺激を 5 秒おきに 360 バースト、30 分間施行する。刺激強度は AMT の 90% を使用した。

図 3-D 試験の概要図。試験薬のいずれかの単回投与を行い、投与二時間後に RMT、AMT および刺激前の MEP 振幅およびその導出に必要な刺激強度を右第一背側骨間筋(FDI)から測定を行った。MEP 測定の刺激強度は振幅が約 0.5mV になるように設定した。MEP 振幅を刺激終了後から 30 分後までは 5 分おきに、30 分後から 60 分後までは 10 分おきに計 10 回測定を行った。

解析

実験 1-1

薬剤ごとに RMT、AMT、ベースラインの MEP とその導出に必要な刺激強度に差がないかを paired t 検定を用いて検討する。

QPS に伴う可塑性変化については、まずは被験者それぞれについて薬剤、時間の条件ごとに平均し、baseline の MEP からの比をとる。その後、薬剤(L-DOPA、Placebo)、時間(T0、T5、T10…T30、T40、T50、T60)を被験者内因子として 2-way repeated measures ANOVA にて解析を行う。ANOVA にて球面性の仮説が棄却された場合には Greenhouse-Geisser の ϵ 補正を行った。全ての解析において有意水準は 0.05 に設定している。解析ソフトには SPSS for windows ver16.0 を用いた。

実験 1-2

まずは、実験 1-1 と同様の検討を行う。2-way repeated measures ANOVA による薬剤、時間での検定を行う。

実験 1-1 との用量による差の検討においては、既報告(Thirugnanasambandam 2011, Monte-Silva 2010)と同様に実験 1-1 の被験者群、実験 1-2 の被験者群それぞれにおいて、薬剤ごとに、QPS 後 0 分から 30 分後までの MEP 比を平均化し

L-DOPA 内服の有無(L-DOPA, Placebo)を被験者内因子、L-DOPA の用量(100mg, 200mg)を被験者間因子とした 2-way repeated measures ANOVA を行い検討する。

実験 1-3

実験 1-1 と同様の検討を行う。2-way repeated measures ANOVA による薬剤、時間での検定を行う。

実験 1-1 との年齢による L-DOPA の反応性の差の検討においては実験 1-2 におけると同様の処理を行い、L-DOPA 内服の有無(L-DOPA, Placebo)を被験者内因子、年齢(45 歳平均、65 歳平均)を被験者間因子とした 2-way repeated measures ANOVA により検討する。

実験 2 パーキンソン病患者における検討

パーキンソン病患者 8 名(男性 6 人、女性 2 人、平均年齢 68.0 ± 3.9 歳)に対して施行した。パーキンソン病の診断は 1996 年の特定疾患神経変性疾患調査研究班：パーキンソン病診断基準に準じている。1. 進行性の経過であること、2. 自覚症状としてふるえ、または動作や歩行の緩慢があること、3. 神経所見として振戦、無動・寡動、固縮、姿勢反射障害・歩行障害の一つ以上がみられること、4. 抗パーキンソン病薬による治療にて自覚症状、神経所見に改善がみられること、5. 鑑別診断で血管性や薬剤性、他の変性疾患に伴うものを除外できること、のすべてを満たすものとしている。薬剤性を除外するため、向精神薬を内服している患者は除外している。パーキンソン病患者の中でも、本試験においてはジスキネジアのない L-DOPA のみで治療を行っている患者を対象とし、明らかな認知機能障害を伴っている患者や著明な振戦がみられる患者は除外した。また、実験 1 と同様に一般的な反復磁気刺激検査除外基準に準じた要件を満たすことを確認している。被験者はすべて右利きであった。

ON 時と OFF 時の 2 回を別な日に検査を行い、互いの試験間隔は 1 週間以上あけた。ON 時の検査には試験 2 時間以内の内服とし、off 時の検査には L-DOPA

の内服を前日の夜分を最終内服とし、最短でも前回の内服から 12 時間以上あいた状態で検査を行っている。それぞれの試験日には、試験前に運動機能の評価として Unified Parkinson's disease rating scale(UPDRS)Ⅲ.運動能力の部分(18.から 31.の 14 項目、104 点満点)を計測した。

それぞれの試験日には、実験 1 と同様に右第一背側骨間筋(FDI)から刺激前の motor evoked potential (MEP) 振幅、resting motor threshold (RMT)、active motor threshold (AMT) の測定を行った。MEP 測定の刺激強度は振幅が約 0.5mV になるように設定した。QPS のプロトコールとしては、QPS5 を用いた。QPS 施行後から施行後 30 分までは 5 分おきに、30 分後から 60 分後までは 10 分おきに MEP の測定を行う(T0、T5、T10…T30、T40、T50、T60)。それぞれの時間ごとに単発の TMS を 20 回行い、時間ごとに平均した。

解析のために QPS 誘導の可塑性については、まずは被験者それぞれについて ON-OFF および時間の条件ごとの MEP を baseline の MEP からの比をとり標準化する。その後、薬剤内服の有無(ON, OFF)、時間(T0、T5、T10…T30、T40、T50、T60)を被験者内因子として 2-way repeated measures ANOVA にて解析を行った。ANOVA にて球面性の仮説が棄却された場合には Greenhouse-Geisser の ϵ 補正を行った。全ての解析において有意水準は 0.05 に設定した。

また、健常者と PD 患者の比較を行うために、実験 1-1 の被験者との比較を行う。PD 患者の薬剤を内服していない条件と健常者における Placebo において、MEP の増減についての検討を行った。実験 1-2 および 1-3 と同様に 0-30 分までの MEP 変化率を平均化したものを用いて、L-DOPA 内服なしの状態と内服ありの状態の PD 患者と健常高齢者との間で比較をした。

PD 患者においては症状と可塑性変化の関連の検討も行った。ON の状態および OFF 状態それぞれにおいて、UPDRSⅢの点数と T0 から T60 までの MEP 比率の平均との相関について Pearson の相関係数を求めた。ON-OFF での症状の変化（UPDRSⅢの差）と MEP の変化率（ON 時の MEP 平均/OFF 時の MEP 平均）についても同様に検討を行った。解析ソフトには SPSS for windows ver16.0 を用いた。

結果

実験 1

実験 1-1 では、63-67 歳の健常高齢者 3610 人に対して募集を行い、99 人の応募があった。除外基準を再度確認し抵触した 5 人については除外した。94 名の中からランダムに選んだ 34 人(65.0±1.7 歳)を被験者とした。実験中、1 人に L-DOPA 200mg 内服後に頻回の嘔気、嘔吐がみられ、ドンペリドン 5mg 投与、試験継続困難中止となっており、また、1 人に第 1 試験日終了後に同意撤回の申し出があり、試験中止となっている。一過性の軽度の嘔気が L-DOPA 200mg にて 3 人、Placebo にて 2 人にみられたが、ドンペリドン内服なしで自然軽快し、試験は継続している。34 人の被験者のうち 32 人が実験を完遂している。

実験 1-2 では、63-67 歳の健常高齢者 2111 人に対して募集を行い、79 人の応募があった。除外基準を再度確認し抵触した 10 人については除外した。69 名の中からランダムに選んだ 20 人(65.0±1.3 歳)を被験者とした。実験 1-2 においては Placebo にて 1 人が一過性の嘔気認めたが、L-DOPA 100mg においては嘔気を認めた被験者はいなかった。中止なくすべての被験者において試験をおこなっており、20 人にて実験完遂している。

実験 1-3 では、43-47 歳の健常高齢者 7902 人に対して募集を行い、69 人の応募があった。除外基準を再度確認し抵触した 4 人については除外した。65 名の

中からランダムに選んだ 12 人(44.8±1.4 歳)を被験者とした。被験者の体動が多く、MEP の導出が困難となった 1 人については除外している。一過性の軽度の嘔気が L-DOPA 200mg にて 3 人、Placebo にて 1 人にみられたが、ドンペリドン内服なしで自然軽快し、試験は継続している。完遂した 11 人のデータについて解析をおこなっている。

実験 1-1 から 1-3 を通して磁気刺激に伴う副作用はいずれにも認めなかった(図 4)。

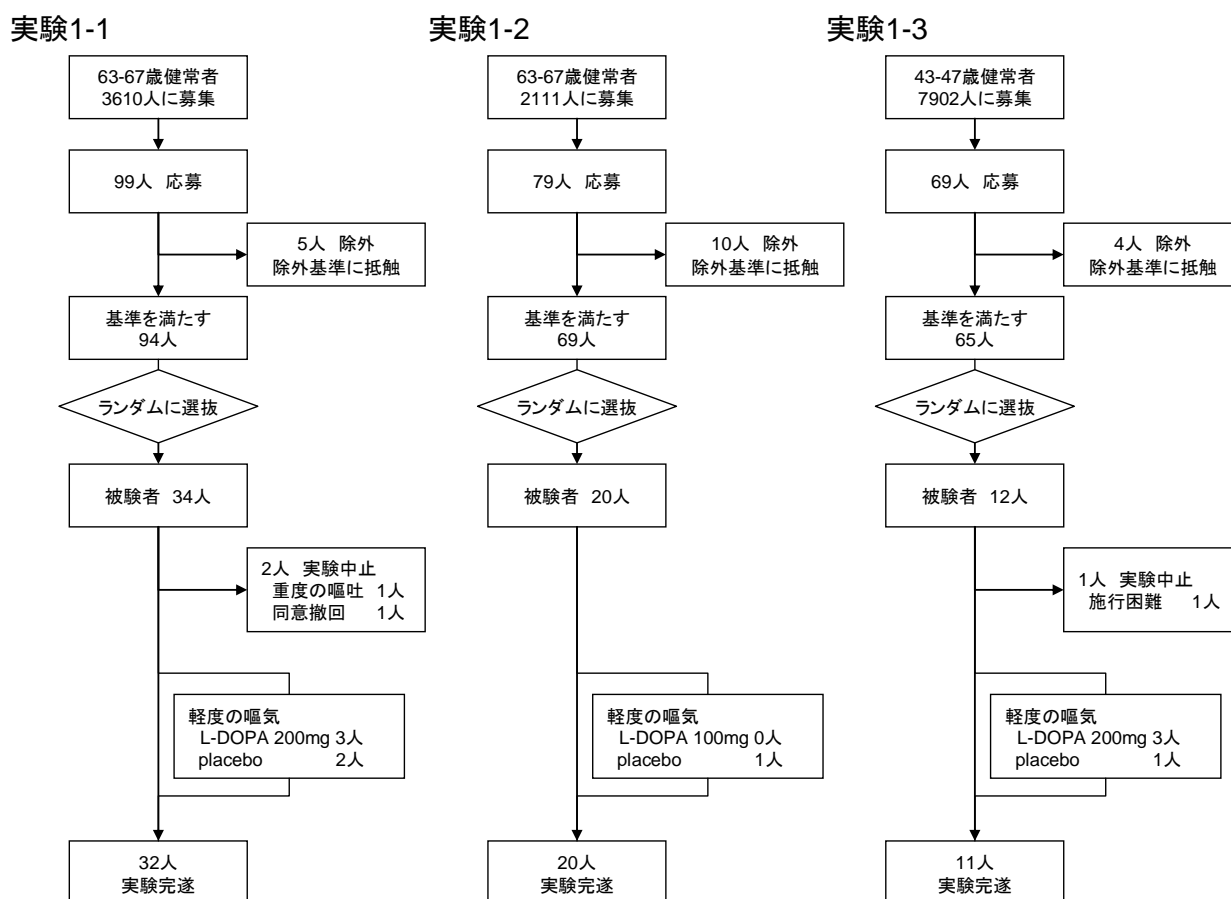


図 4 実験 1 における被験者の選抜基準と試験中止の理由

実験 1-1 65 歳平均での L-DOPA200mg 内服の影響

QPS 前のベースラインの条件としては RMT ($p=0.137$, いずれも paired t-test, two-tailed), AMT($p=0.934$), baseline MEP($p=0.612$), baseline MEP の導出に必要な刺激閾値($p=0.585$)と L-DOPA200mg, placebo 間に差は認めなかった(表 1)。

統計学的には、MEP の変化については 2-way repeated measures ANOVA においては L-DOPA 200mg と Placebo の 2 剤間での薬剤の主効果を認めたが($F(1.0, 31.0) = 9.71, p = 0.004$)、時間については主効果を認めなかった($F(5.3, 163.2) = 1.02, p = 0.408$)。薬剤と時間との間に交差作用は認めなかった($F(6.5, 201.5) = 0.732, p = 0.635$)(図 4)(表 2)。65 歳高齢者においても QPS における MEP の増高がみられ、L-DOPA 内服にて QPS 直後から少なくとも 60 分まで増強作用の持続がみられた。

表 1 実験 1-1 における内服薬ごと baseline の測定値

実験1-1	RMT (%)	AMT (%)	baseline MEP(mV) (intensity (%))
L-DOPA 200mg	49.8±10.4	31.0±5.1	0.48±0.12 (65.0±18.6)
Placebo	51.8±12.9	31.0±5.9	0.50±0.19 (62.9±19.8)

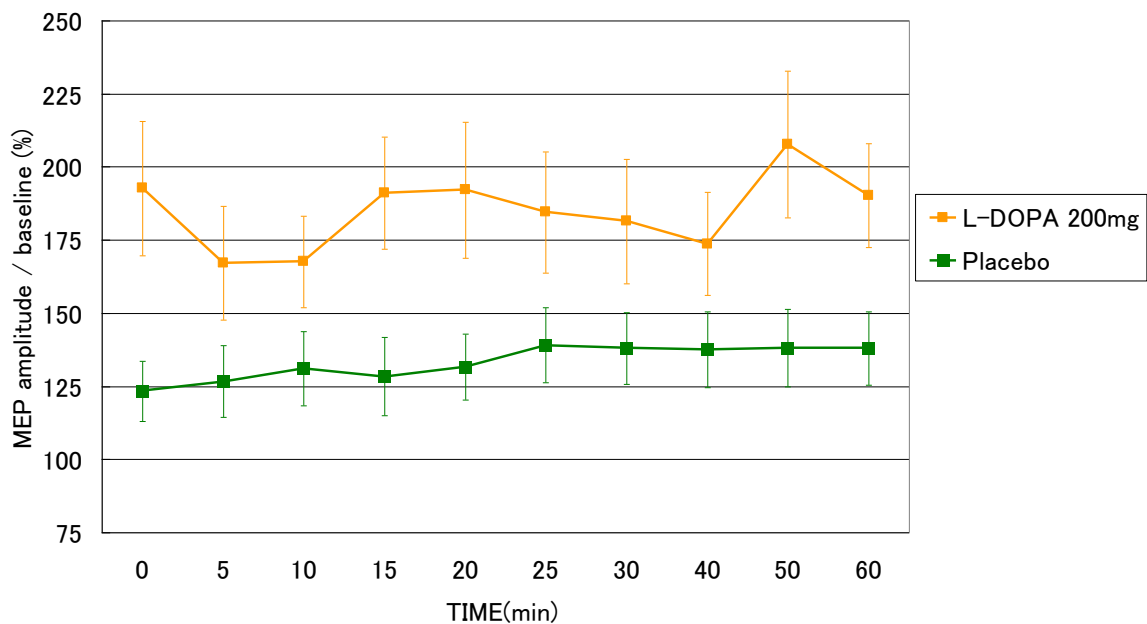


図 5 65 歳平均の健常高齢者における Placebo および L-DOPA 200mg 内服における QPS 後の MEP の経時変化。X 軸には QPS 後から経過時間(分)を示している。baseline の MEP を対する割合(%)を Y 軸にプロットしている(mean ±SE)。L-DOPA200mg の投与に伴い LTP 様変化の増強効果がみられている。

2-way repeated measures ANOVA			
	df	F value	p value
薬剤	1	9.71	0.004
時間	5.3	1.02	0.408
薬剤 x 時間	6.5	0.732	0.635

表 2 65 歳平均の健常高齢者における Placebo および L-DOPA 200mg 内服における QPS 後の MEP の経時変化の ANOVA による解析。

薬剤(L-DOPA200mg、Placebo)、時間(T0、T5、T10…T30、T40、T50、T60)を被験者内因子として 2-way repeated measured ANOVA を行っている。

実験 1-2 65 歳平均での L-DOPA100mg 内服の影響

QPS 前のベースラインの条件としては RMT ($p=0.764$, いずれも paired t-test, two-tail), AMT($p=0.560$), baseline MEP($p=0.842$), baseline MEP の導出に必要な刺激閾値($p=0.133$)と L-DOPA100mg、placebo 間に差は認めなかった(表 3)。

L-DOPA100mg 内服と Placebo 内服での 2-way repeated measures ANOVA においては MEP の変化について薬剤の主効果を認めたが($F(1.0, 19.0) = 8.145$, $p = 0.010$)、時間については主効果がなかった($F(4.1, 78.2) = 2.391$, $p = 0.056$)。薬剤と時間との間に交差作用は認めなかった($F(5.1, 97.4) = 0.492$, $p = 0.786$) (図 6)(表 4)。実験 1-2 において、実験 1-1 と同様に Placebo において促通効果がみられ、L-DOPA 100mg 内服にてさらに促通効果の増強がみられた。

L-DOPA の用量依存性については、0-30 分を平均化した値により L-DOPA 内服の有無 (L-DOPA、Placebo)を被験者内因子、L-DOPA の用量(100mg, 200mg)を被験者間因子とした 2-way repeated measures ANOVA では、L-DOPA 内服の有無での主効果は認めるが($F(1, 50) = 15.915, p < 0.001$)、L-DOPA 内服の有無と用量における交互効果は認めなかった($F(1, 50) = 0.055, p = 0.819$)。用量での被験者間効果は認めなかった($F(1, 50) = 0.567, p = 0.455$) (図 7)(表 5)。L-DOPA 100mg 内服と L-DOPA 200mg 内服での増強作用には差がみられなかった。

表 3 実験 1-2 における内服薬ごとの baseline の測定値

実験1-2	RMT (%)	AMT (%)	baseline MEP(mV) (intensity (%))
L-DOPA 100mg	53.2±12.0	33.1±5.9	0.51±0.07 (62.7±15.6)
Placebo	52.9±10.3	32.1±5.1	0.51±0.06 (65.6±17.9)

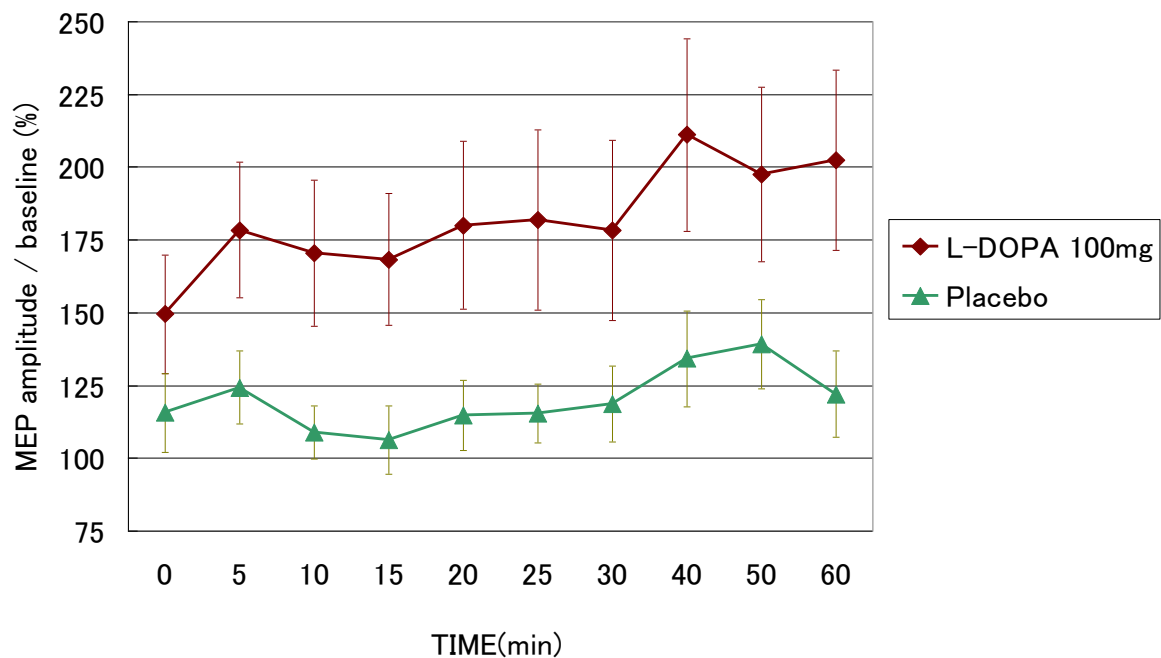


図 6 65 歳平均の健常者における Placebo および L-DOPA 100mg 内服における QPS 後の MEP の経時変化。X 軸には QPS 後から経過時間(分)を示している。baseline の MEP を対する割合(%)を Y 軸にプロットしている(mean ± SE)。L-DOPA 200mg と同様に 100mg においても LTP 様変化の増強効果がみられている。

	df	F value	p value
薬剤	1	8.145	0.010
時間	4.1	2.391	0.056
薬剤 x 時間	5.1	0.492	0.786

表 4 65 歳平均の健常高齢者における Placebo および L-DOPA 100mg 内服における QPS 後の MEP の経時変化の ANOVA による解析。

薬剤(L-DOPA100mg、Placebo)、時間(T0、T5、T10…T30、T40、T50、T60)を被験者内因子として 2-way repeated measured ANOVA を行っている。

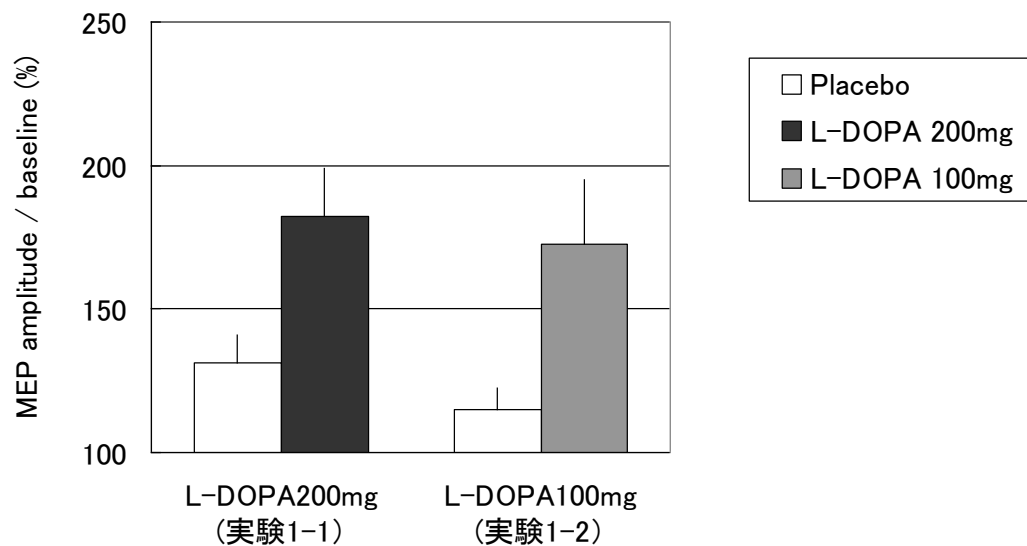


図 7 65 歳平均の健常者における L-DOPA 100mg および 200mg 内服による 30 分までの可塑性変化。0 分から 30 分までの MEP の変化率の平均値 (mean+SE)。

2-way repeated measures ANOVA			
	df	F value	p value
薬剤	1	15.915	< 0.001
薬剤 x 用量	1	0.055	0.819
用量	1	0.567	0.455

表 5 65 歳平均の健常者における L-DOPA 100mg および 200mg 内服による
による 30 分までの可塑性変化の ANOVA による解析。薬剤(L-DOPA、Placebo)
を被験者内因子、用量(100mg, 200mg)を被験者間因子として 2-way repeated
measured ANOVA を行っている。

実験 1-3 45 歳平均での L-DOPA200mg 内服の影響

QPS 前のベースラインの条件としては RMT ($p=0.764$, いずれも paired t-test,
two-tail), AMT($p=0.560$), baseline MEP($p=0.842$), baseline MEP の導出に必要
な刺激閾値($p=0.133$)と L-DOPA100mg、placebo 間に差は認めなかった(表 6)。

実験 1-3 における 2-way repeated measures ANOVA では薬剤の主効果は認め
ず($F(1.0, 11) = 1.552$, $p = 0.239$)、時間についても主効果を認めなかった($F(9, 99)$
 $= 1.535$, $p = 0.146$)。薬剤と時間との間に交差作用は認めなかった($F(9, 99) =$
 0.551 , $p = 0.834$)(図 8)(表 7)。

可塑性の年齢依存性と L-DOPA 効果の年齢依存性については、0-30 分を平均
化したものにて L-DOPA 内服の有無 (L-DOPA、Placebo)を被験者内因子、年齢
(45 歳平均, 65 歳平均)を被験者間因子とした 2-way repeated measures ANOVA

により解析した。L-DOPA 内服の有無での主効果は認めるが($F(1, 42) = 6.853, p = 0.012$)、L-DOPA 内服の有無と年齢での交互効果は認めなかった($F(1,42) = 0.340, p = 0.563$)。年齢の主効果も認めなかった($F(1, 42) = 0.390, p = 0.536$)。(図 9)(表 8)

表 6 実験 1-3 における内服薬ごとの baseline の測定値

実験1-3	RMT (%)	AMT (%)	baseline MEP(mV) (intensity (%))
L-DOPA 200mg	52.1 ± 10.5	30.8 ± 3.7	0.48 ± 0.12 (65.0 ± 18.6)
Placebo	51.6 ± 8.83	30.8 ± 3.3	0.50 ± 0.19 (62.5 ± 21.3)

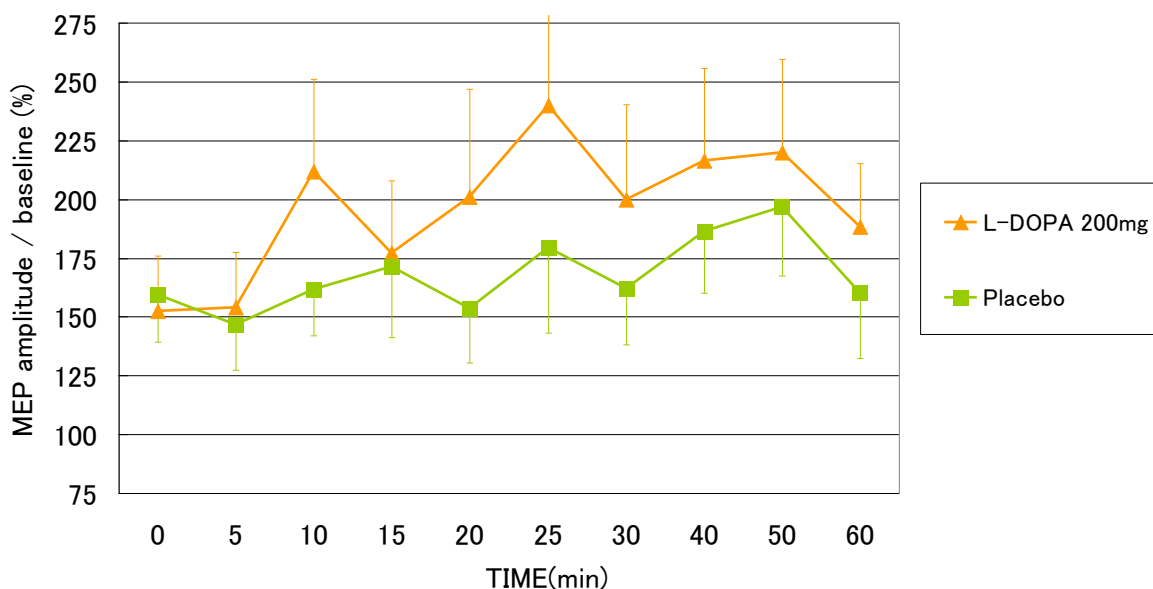


図 8 45 歳平均の健常者における Placebo および L-DOPA 200mg 内服における QPS 後の MEP の経時変化。X 軸には QPS 後から経過時間(分)を示している。baseline の MEP を対する割合(%)を Y 軸にプロットしている(mean ± SE)。

2-way repeated measures ANOVA

	df	F value	p value
薬剤	1	1.552	0.239
時間	9	1.535	0.146
薬剤 x 時間	9	0.551	0.834

表7 45歳平均の健常者における Placebo および L-DOPA 200mg 内服における QPS 後の MEP の経時変化の ANOVA による解析。薬剤(L-DOPA200mg、Placebo)、時間(T0、T5、T10…T30、T40、T50、T60)を被験者内因子として 2-way repeated measured ANOVA を行っている。

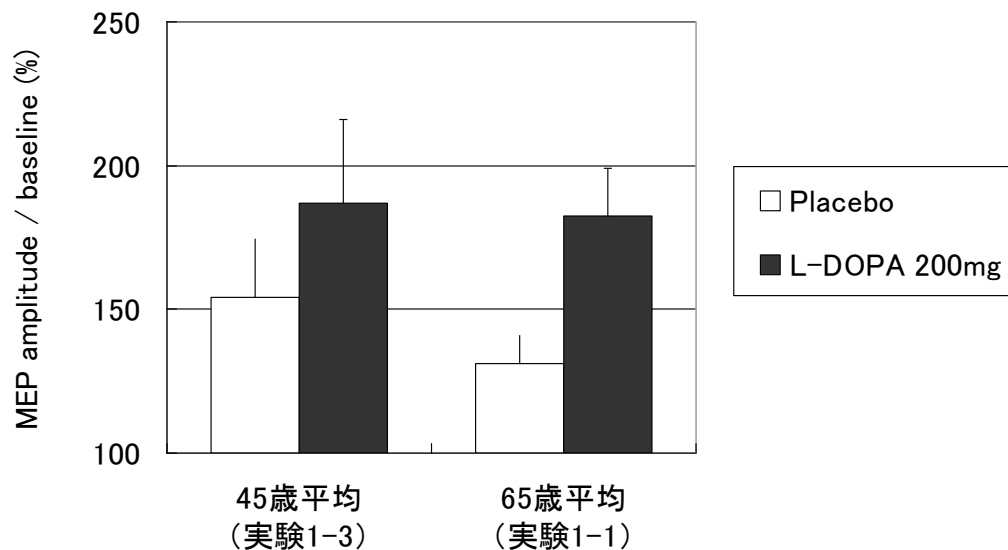


図9 45歳平均および65歳平均の健常者における Placebo および L-DOPA による 30分までの可塑性変化。0分から30分までの MEP の変化率の平均値 (mean+SE)。2-way repeated measures ANOVA にて年齢および内服薬の主効果を認めず、年齢と内服薬の交互作用についても認めなかった。

2-way repeated measures ANOVA

	df	F value	p value
薬剤	1	6.853	0.012
薬剤 x 年齢	1	0.34	0.563
年齢	1	0.39	0.536

表 8 45 歳平均および 65 歳平均の健常者における Placebo および L-DOPA による 30 分までの可塑性変化の ANOVA による解析。薬剤(L-DOPA、Placebo)を被験者内因子、年齢(45 歳平均, 65 歳平均)を被験者間因子として 2-way repeated measured ANOVA を行っている。

年齢による可塑性の変化の解析

Placebo 内服時の QPS による可塑性の年齢による差異を検討した。Placebo による 65 歳平均のデータは実験 1-1 および実験 1-2 にて有意差がないため、一群のデータと判断できるため実験 1-1 と実験 1-2 をあわせて 65 歳平均群は 52 人とし、45 歳平均は実験 1-3 の 11 人として、0-30 分を平均した値を比較した。45 歳平均と比較し 65 歳平均では QPS 後の促通効果は減弱がみられた($p = 0.030$, Student's t-test, two-tail)。 (図 10)

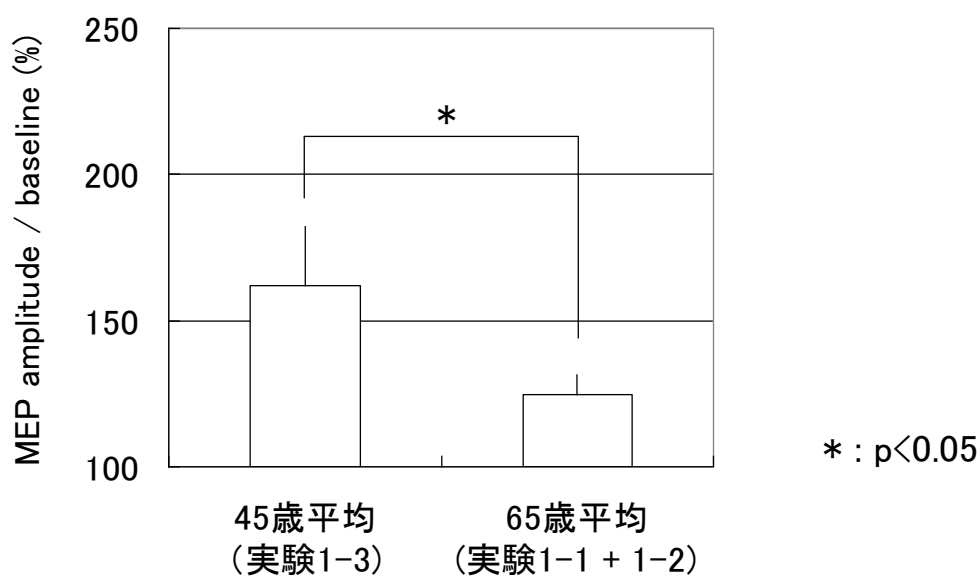


図 10 45 歳平均および 65 歳平均の健常者における Placebo での 30 分までの可塑性変化。65 歳平均には実験 1-1 と 1-2 の合計を使用。0 分から 30 分までの MEP の変化率の平均値 (mean+SE)。45 歳平均と 65 歳平均の 2 群の比較では有意差をもって 65 歳平均における効果が低かった($p=0.030$)。

実験 2

表 9 実験 2 における被験者の臨床情報

Patient No.	Age(yr)	Sex	Duration (yr)	Yahr	UPDRSⅢ		L-DOPA (mg/day)
					ON	OFF	
1	65	M	4	2	17	26	200
2	63	M	4	2	10	21	300
3	72	M	5	2	14	18	200
4	67	M	2	1	7	12	300
5	67	M	2	1	11	21	300
6	69	M	3	3	13	26	300
7	66	F	2	2	9	17	400
8	75	F	1	3	14	22	200

Yahr: Hoehn and Yahr stage

UPDRSⅢ: Unified Parkinsons Disease Rating Scale

表 10 実験 2 におけるドパミン ON および OFF での baseline の測定値

実験2	RMT (%)	AMT (%)	baseline MEP(mV) (intensity (%))
ON	50.0±9.0	31.8±7.0	0.50±0.07 (59.3±15.8)
OFF	48.3±8.2	30.8±6.3	0.53±0.06 (55.0±12.1)

被験患者における平均罹病期間は 2.8 ± 1.4 年、Hoehn and Yahr stage は平均 2.0 ± 0.7 であった。L-DOPA は平均 275.0 ± 71.0 mg 内服しておりドパミン OFF 時の UPDRSⅢの平均は 20.4 ± 4.7 点、ドパミン ON 時の平均は 11.9 ± 3.2 点で

あり、 8.5 ± 3.0 点の改善を認めた。(表 9)

QPS 施行前のベースラインの条件としては RMT ($p=0.141$, いずれも paired t-test, two-tailed), AMT($p=0.315$), baseline MEP($p=0.389$), baseline MEP の導出に必要な刺激閾値($p=0.121$)と ON と OFF の間に差は認めなかった。(表 10)

2-way repeated measures ANOVA においてはドパミン ON-OFF 間の主効果を認めた ($F(1, 7) = 38.05$, $p < 0.001$)。時間の効果は認めず($F(9, 63) = 1.78$, $p = 0.09$)。薬剤と時間との間に交差作用は認めなかった($F(9, 63) = 0.745$, $p = 0.68$)。

(図 11)(表 11)

健常高齢者と比較し、パーキンソン病患者においては QPS 後の LTP 様変化の有意な減弱を認めた($p=0.025$, t-test, two-tailed) (図 12)。L-DOPA 内服後の両群の比較においては有意差を認めなかった ($p=0.148$, t-test, two-tailed)。

臨床症状の UPDRSⅢのスコアと MEP 増加率の相関については、ON 時、OFF 時ともに相関を認めなかった(ON 時; $p=0.621$, OFF 時; $p=0.935$)(図 13-A, 13-B)。

OFF から ON での UPDRSⅢスコアの改善度と MEP 増加率の ON と OFF での改善度(ON 時の標準化 MEP 変化率－OFF 時の標準化 MEP 変化率)との間には有意な相関がみられた($p= 0.030$, Pearson 係数 0.76)(図 13-C)。

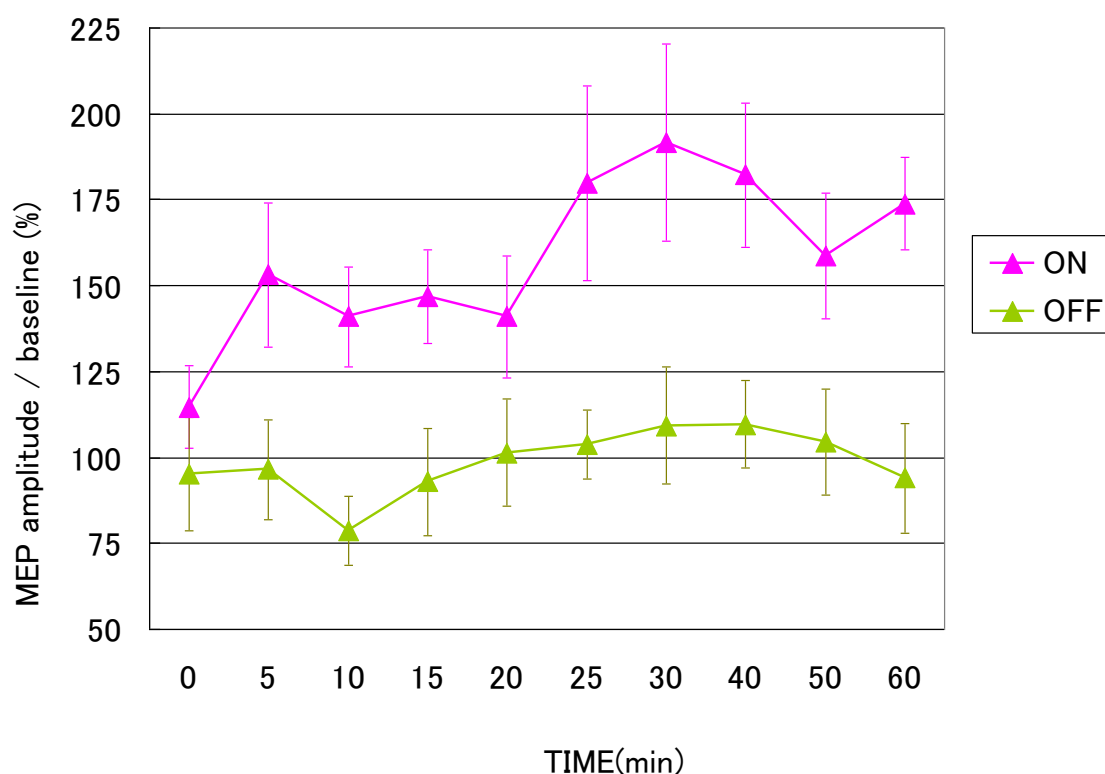


図 11 パーキンソン病患者におけるドパミン ON 状態および OFF 状態における QPS 後の MEP の経時変化。X 軸には QPS 後から経過時間(分)を示している。baseline の MEP を対する割合(%)を Y 軸にプロットしている (mean ±SE)。OFF 状態において LTP 様変化は消失しているが、ON 状態では LTP 様変化の回復がみられている。

2-way repeated measures ANOVA

	df	F value	p value
内服	1	38.05	< 0.001
時間	9	1.78	0.09
内服 x 時間	9	0.745	0.68

表 11 パーキンソン病患者におけるドパミン ON 状態および OFF 状態における QPS 後の MEP の経時変化の ANOVA による解析。内服(薬剤 ON、薬剤 OFF)、時間(T0、T5、T10…T30、T40、T50、T60)を被験者内因子として 2-way repeated measured ANOVA を行っている。

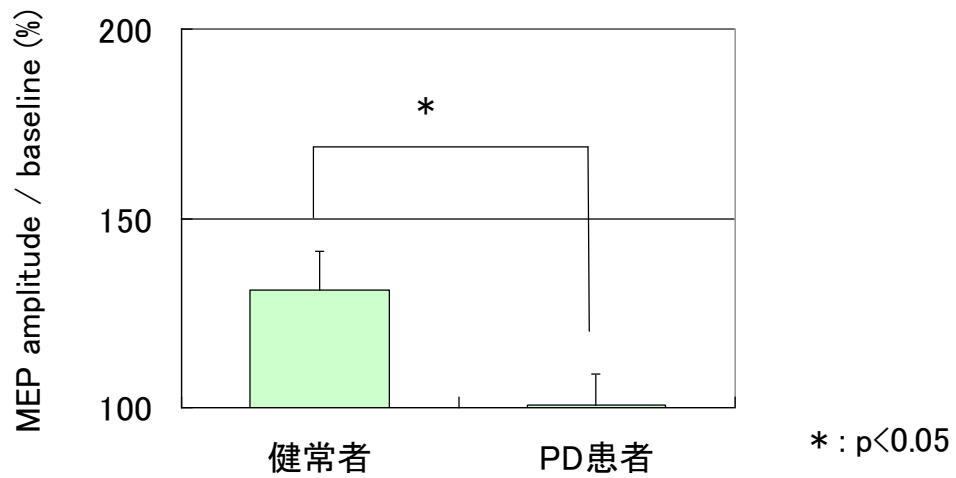
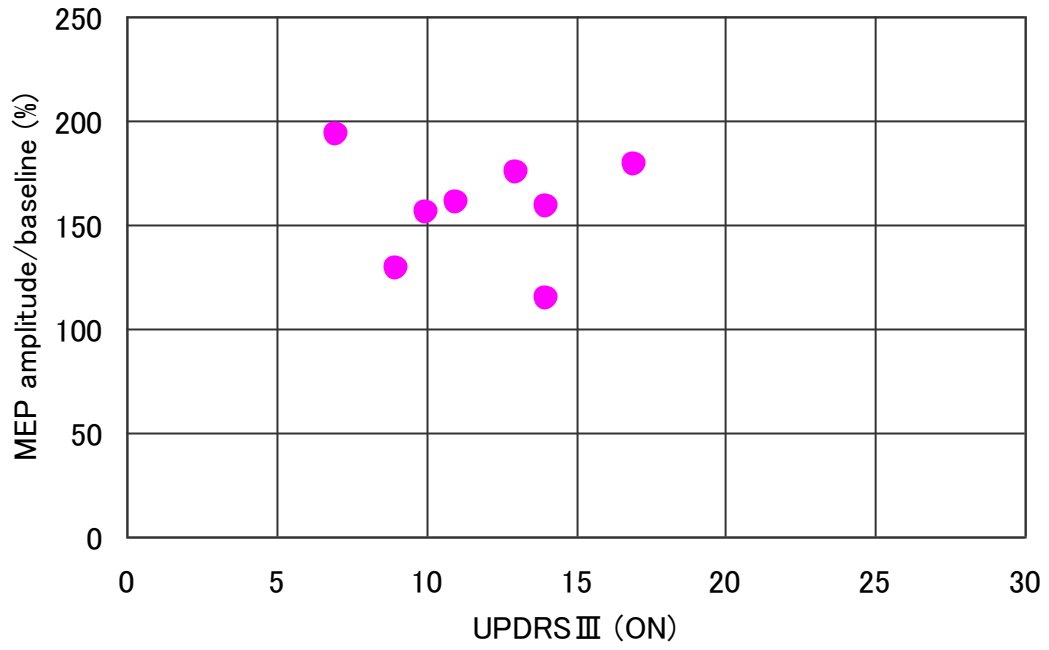
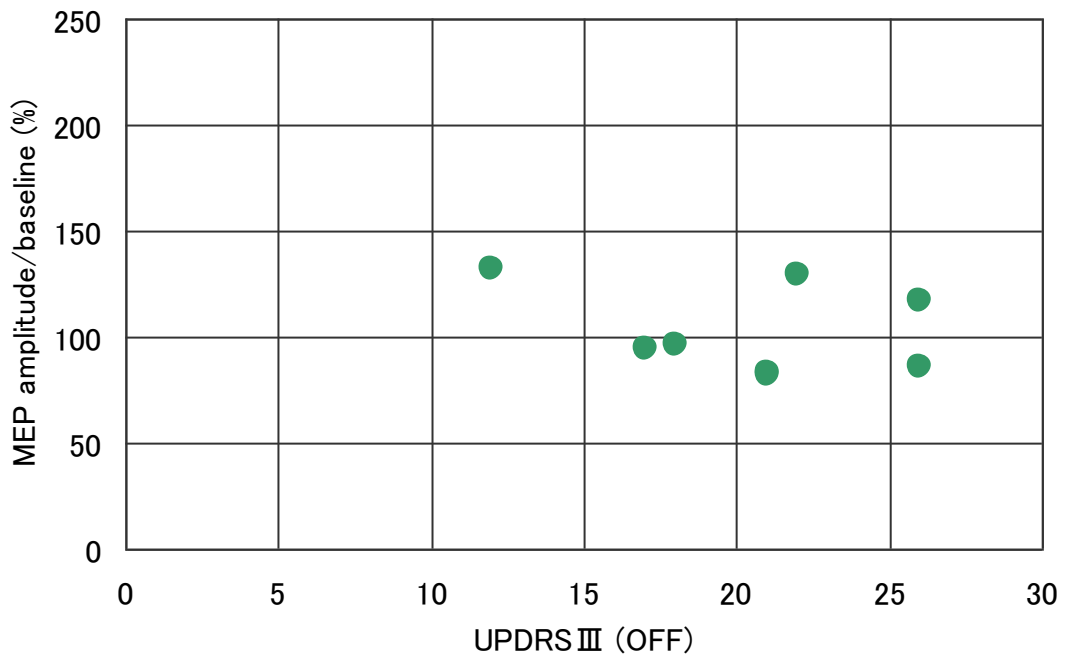


図 12 65 歳平均の健常者とパーキンソン病患者における内服なしでの MEP 変化の比較。0 分から 60 分までの MEP の変化率の平均 (mean+SE)。パーキンソン病患者において健常高齢者(実験 1-1 被験者)と比較し、PD 患者においては LTP 様変化の消失みられ、健常高齢者から有意な低下となっている(p=0.025)。

13-A



13-B



13-C

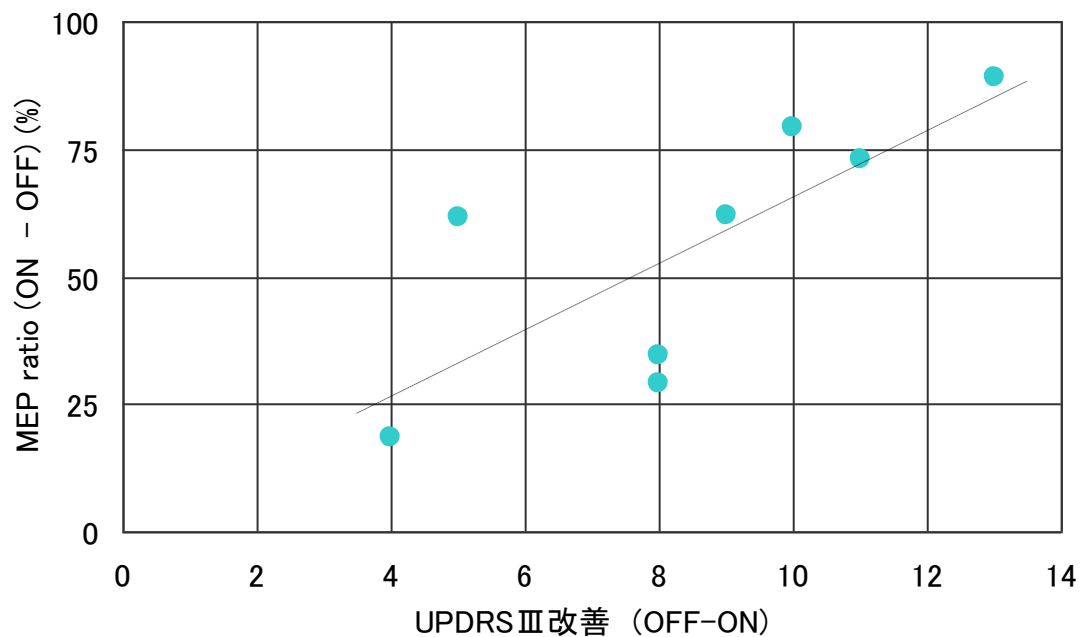


図 13 パーキンソン病患者における臨床症状と MEP 変化率の相関の検討。

図 13A ドパミン ON 状態での UPDRSIII のスコアにおける散布図。

図 13B ドパミン OFF 状態での UPDRSIII のスコアにおける散布図。

図 13A および 13B においては X 軸に UPDRSIII のスコア、Y 軸には 0-60 分の MEP 変化率の平均を用いている。ON 時、OFF 時ともに有意な相関はみられていない (ON 時; $p=0.621$, OFF 時; $P=0.935$)。

図 13C L-DOPA 内服による臨床症状の変化と可塑性の変化。

X 軸に UPDRSIII スコアの改善、Y 軸には 0-60 分の MEP 変化率の平均の ON 時と OFF 時の差をとっている。有意な相関がみられている ($p=0.030$, Pearson 係数 0.76)。

考察

実験 1

実験 1 では、QPS 誘導による一次運動野の LTP 様変化が L-DOPA により増強されることが示された。この増強効果について、L-DOPA の用量と被験者の年齢の要因による違いを検討した。L-DOPA 用量に関しては、100mg と 200mg では増強効果には差がなく、用量による差異はなかった。また、65 歳群と 45 歳群の比較では、placebo 時の QPS の効果は 65 歳群が 45 歳群と比較して有意に低かったが、L-DOPA 投与後の MEP の振幅は両群で同等であった。以下に、動物実験などのこれまでの報告で知られている知見をもとに、本研究での結果を、可塑性に対する影響の 3 点に注目して考察する。

可塑性へのドパミンの影響

ラット脳スライスの線条体ニューロンの可塑性誘導には、ドパミンの存在が必要であり、ドパミンの投与が LTP および LTD 双方向の効果を増強するとされている(Otani 2003)。線条体ニューロンで LTP 誘導は NMDA 型グルタミン酸受容体に依存する(Calabresi 1992)が、LTP 誘導を起こすテタヌス刺激に同期して、ドパミン受容体の D1 刺激が行われることが LTP 誘導には重要である。さらに、D1 受容体拮抗薬(raclopride)の投与にて LTP が著明に低下することが示されて

いる(Molina-Luna 2009)。LTP 誘導には D2 受容体刺激は必要ないとされている。

一方、線条体ニューロンでの LTD 誘発は、NMDA 型グルタミン酸受容体には非依存的であり、ドパミンの D1、D2 の両方の受容体刺激が必要である (Seamans 2004)。つまり、ドパミンと LTP/LTD 誘導の関係は、LTP には D1 刺激が必須で、LTD には D1, D2 両者が必要ということになる。ドパミンの投与のタイミングや用量などにより、D1 刺激と D2 刺激のどちらが有意になるかのバランスが変化して、LTP の誘導が主体になるか LTD が誘導されるかわかるのではないという仮説が立てられている (Seamans 2004)。スライスでの電気活動だけではなく、実際に動物においてドパミン拮抗薬の投与で学習も記憶も阻害されることが示されている (Hyman 2006)。ヒトにおいても、ドパミンの内服により、言語学習で正答率および速度の増強がみられたとの報告(Knetch 2004)やドパミン投与により記憶形成を加速するとの報告があり(Flöel 2005)、ドパミンは行動レベルでの可塑性の向上も起こすと考えられる。

ヒトの運動野の可塑性誘導においては電気刺激および磁気刺激を用いた種々の非侵襲的脳刺激法が報告されている。これまで報告されている非侵襲的脳刺激法の多くでは、LTP の機序は D1 受容体により調整された NMDA 受容体活性が関係していると推察されている (Stefan 2002, Huang 2007, Monte-Silva2010)。

そのひとつである Paired associative stimulation(PAS)は末梢神経の電気刺激に

よる M1 への求心性入力と M1 への TMS による入力をほぼ同時に運動野のニューロンに入力することで可塑性の誘導を引き起こす。この PAS の後に持続する MEP の増大が LTP 様の機序によるものと考えられているが、NMDA 受容体をブロックした条件下ではこの LTP 様変化が誘導されなくなることから、NMDA 受容体依存性に可塑性を誘導すると考えられている。さらに、L-DOPA の D1 受容体により調整されている NMDA 受容体の活性化作用がこの可塑性の機序だと考えられる (Stefan 2002)。本研究で用いた QPS は、4 発の刺激の頻度が高いほど LTP になり、刺激頻度が遅いと LTD になるという BCM 仮説に従った可塑性を誘導する。運動野皮質内の興奮性介在ニューロンと皮質脊髄路細胞のシナプスで起きる可塑性変化と考えられている。PAS とは機序の異なる可塑性を見ていると考えられ、NMDA 受容体との関係は不明である。次項で考察するように、今回ドパミン投与により L-DOPA の用量によらず常に可塑性の増強をみたことから D1 受容体により調整された NMDA 受容体の活性化を起こすことで LTP を増大する可能性が考えられた。

L-DOPA 用量による変化

本研究の結果では、65歳平均の健常者において L-DOPA の 100mg と 200mg では QPS によって誘導される LTP の増強作用には変化がなく、いずれも placebo に比較して有意な LTP 様変化の増強がみられた。これは、後述するように PAS や経頭蓋直流刺激(transcranial direct current stimulation: tDCS)による可塑性変化での結果とは異なるものであった。

動物実験では L-DOPA の効果は逆 U 字型の用量依存曲線を描くと考えられている(Seamans 2004, Williams 2006)。ラットの prefrontal cortex(PFC)のスライスの第 V 層の錐体細胞の可塑性に対するドパミンの用量差の影響についての検討では、背景のドパミン濃度が中用量の 5 μ M では 50Hz での高頻度刺激後の LTP の有意な増強と効果の延長を認めるが、低用量の 1 μ M、高用量の 10 μ M のドパミン濃度では LTP の増強はみられないことが示されている(Kolomiets 2009)。ヒトにおける L-DOPA の用量依存性についての既報告では、PAS による可塑性変化は、一重盲検クロスオーバー試験による検討が行われているが、12 人の健常若年者(29.7 \pm 8.0 歳)において、LTP 様変化を誘導する PAS25 において、低用量の L-DOPA 25mg と高用量の 200mg では LTD 様変化への反転を認め、L-DOPA 100mg では Placebo と同等の LTP 様変化を誘導されている(Thirugnanasambandam 2011)。別の PAS による LTP についての検討において

は、L-DOPA 100mg は Placebo に比べて LTP 様変化を増強するとの報告もある (Nitsche 2006)。

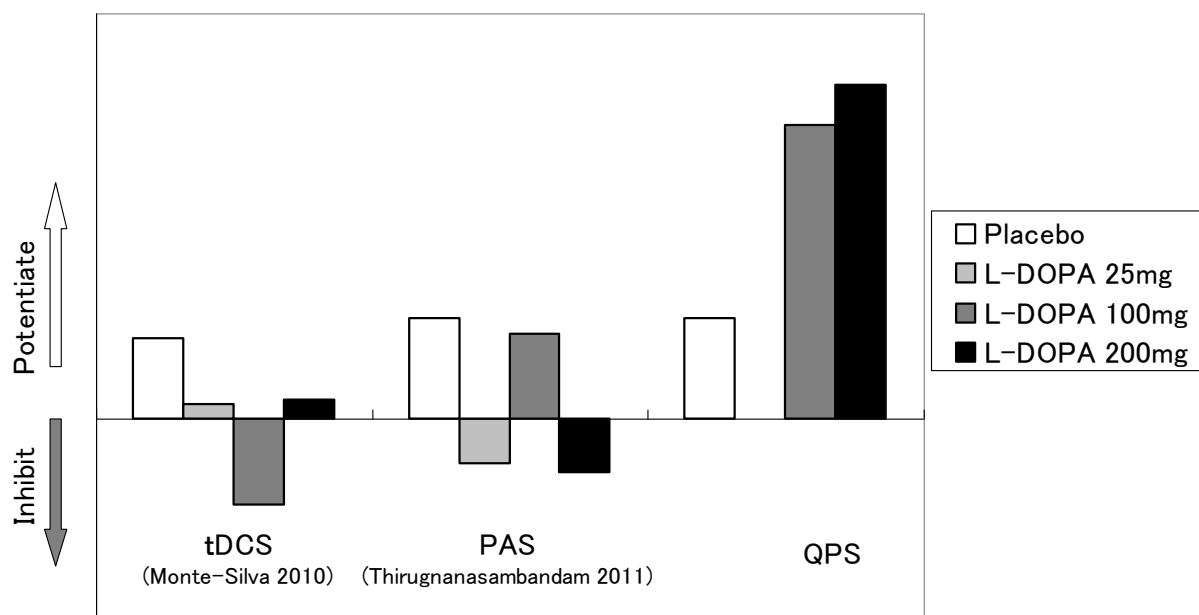


図 14 L-DOPA 用量差による可塑性変化の tDCS/PAS/QPS ごとの比較図。0分から30分までの標準化した MEP を平均したものを使用している。placebo、低用量としての 25mg(QPS での実施はなし)、中用量としての 100mg、高用量としての 200mg を示す(tDCS は Monte-Silva 2010、PAS は Thirugnanasambandam 2011 より引用し一部改変)。L-DOPA 内服なしでは同程度の LTP 様変化の誘導がみられるもの L-DOPA 内服後は tDCS では U 字型の用量変化、PAS においては逆 U 字型の用量変化がみられる。QPS においては中用量、高用量ともに LTP 様変化の増強がみられる。

一方、tDCS を用いた検討では、LTP 様変化を誘導する Anodal-tDCS において 25mg の低用量とでは 200mg の高用量では LTP 様変化の減弱がみられ、

100mg の中用量では LTP 様変化から LTD 様変化に反転しているというように、L-DOPA により LTP 様変化の減弱がみられている(Monte-Silva2010)。つまり、どちらの方法でも本研究と異なり、L-DOPA200mg では LTP 様変化の増強作用が得られず、むしろ LTD 様への反転がみられている。本研究と PAS や tDCS による可塑性変化の比較図を図 14 に示す。

経頭蓋反復磁気刺激および経頭蓋直流刺激の LTP 様変化は D1 受容体を介した NMDA 受容体により調整されていると考えられており (Stefan 2002, Huang 2007, Monte-Silva2010)、QPS も前述の考察から同様の機序が考えられた。動物における PFC での D1 受容体刺激薬 (SKP81297) を用いた D1 受容体刺激の用量依存性について作動記憶での検討では、低用量および高用量ではニューロンの発火頻度の軽度低下がみられ、空間作動記憶の低下がみられ、中用量においては空間作動記憶の改善がみられるとされている(Vijayraghan 2007)。ヒトにおいても L-DOPA と D2 受容体拮抗薬である sulpiride の併用により、D1 受容体刺激状態での用量依存の機序を PAS および tDCS を用いて検討した報告がある (Fresnoza 2014)。PAS においては L-DOPA と類似しており、低用量と高用量においては LTP 様変化には消失、中用量においては LTP 様変化の減弱がみられ、逆 U 字型の容量依存性がみられる。tDCS においては L-DOPA と異なり、低用量と高用量においては LTP 様変化には消失、中用量においては LTP 様変化の減

弱傾向がみられ、逆 U 字型の容量依存曲線を示すようになる。これらより、可塑性の逆 U 字型の容量依存曲線は D1 受容体によるところが大きいとされている。

D1 受容体を介した逆 U 字の用量依存性曲線を起こす機序としては、以下のようなことが考えられる。錐体細胞におけるドパミンの作用部位としてはグルタミン系の NMDA 受容体だけではなく、GABA 受容体も存在しており、グルタミン系と GABA 系には深い関連がある(Durstewitz 2009)。D1 および D2 受容体は NMDA 受容体だけではなく、GABA 受容体にも作用する。D1 受容体は NMDA 受容体および GABA 受容体とともに活性化し、D2 受容体は NMDA 受容体、GABA 受容体の活動を抑制する。さらに D1 受容体の活性化が十分ではないときには、NMDA 受容体より GABA 受容体を介した作用をもつ(Seamans 2004)。そのため、低用量においては、D1 受容体刺激が十分ではなく、LTP 様作用が減弱したものと考えられる。中用量では D1 が十分に刺激され、NMDA 受容体を介した促通作用もあわせて出現することにより、低容量でみられていた LTP の減弱がなくなる。高用量の D1 受容体の過剰刺激では、NMDA 受容体が阻害されるため、この阻害作用により NMDA 受容体の活動低下みられ、LTP の減弱がみられたと考えられている。NMDA 受容体は Ca 流入量を調整しており、細胞内 Ca 濃度が下がることにより、LTD が誘導され、濃度上昇により LTP が起こる (Lisman 2001)。NMDA 受容体の過剰な刺激は過分極性の Ca 受容体を活性化し、十分な

細胞内への Ca 流入に伴うものと考えられ (Misonou 2004)、それに伴い促進の可塑性が低下または抑圧性に反転すると考えられる。

それ以外にも錐体細胞と介在細胞のバランスでの調整も関連していると考えられている (Zahrt 1997, Goldman-Rakic 2000)。D1 受容体刺激は錐体細胞、介在ニューロン両方の興奮性の入力を増大させるが、その作用は錐体細胞でより効果がみられやすい (Mury 1998)。そのため、低容量においては錐体細胞および介在ニューロンはどちらにおいてもグルタミン性の興奮性入力を賦活しない。中用量においては錐体細胞におけるグルタミン性の興奮性入力を増大させ、LTP も増大する。高用量においては介在ニューロンへも効果がみられるようになり、錐体細胞は介在ニューロンからの抑制性の入力もうけるようになり LTP の増大は減弱する。

ヒトの運動野皮質における tDCS、PAS、QPS の L-DOPA 用量依存性はいずれもこれら動物実験の結果とは異なるものであった。そこで、それぞれの刺激法での作用機序の違いを考える。

直流電流を用いた tDCS は皮質に対し主に垂直に刺激電流を流すことにより持続的に刺激し続けることで作用する。比較的広い範囲をニューロンおよび軸索の膜の興奮性を非選択的に変化させているという機序が考えられており、その効果は特定の部位やシナプスを介した機序は提唱されていない (Nitche 2007,

Purpura and McMurtry 1965)。

PAS や QPS に用いられる経頭蓋磁気刺激での刺激機序は以下の様に考えられている。動物において直接運動野皮質を刺激した時には、多相性の下降波が記録される。最も早い波は D-wave と呼ばれ、その後の連なる波は I-wave で、順に I1、I2、I3 とよばれている (Patton and Amassian 1954)。またその起源としては D-wave は錐体細胞の軸索丘にあり、I1 については介在細胞によりシナプスを 1 つ介して、I2 はシナプスを 2 つ、I3 であればシナプスを 3 つ介して錐体細胞が刺激された結果と考えられている (Amassian and Deltis 1999)。経頭蓋磁気刺激は主として I-wave を誘発することが知られており、介在細胞を刺激することで生じていると考えられている (Di Lazzaro 1998)。QPS はその作用をシナプスひとつ介して錐体細胞を刺激している興奮性介在細胞を介したもの (I1) のものであると考えられており (Hamada 2008)、PAS は QPS とはことなり、皮質内の関与する介在ニューロンも錐体細胞までの潜時が長い、シナプスを 3 つ介して錐体細胞を刺激している介在ニューロンによるものとされ (I3) とされている (Di Lazzaro 2009) (図 15)。

以上のような、それぞれの刺激法での作用部位の違いが可塑性の変化にも影響を与えていると考えられる。

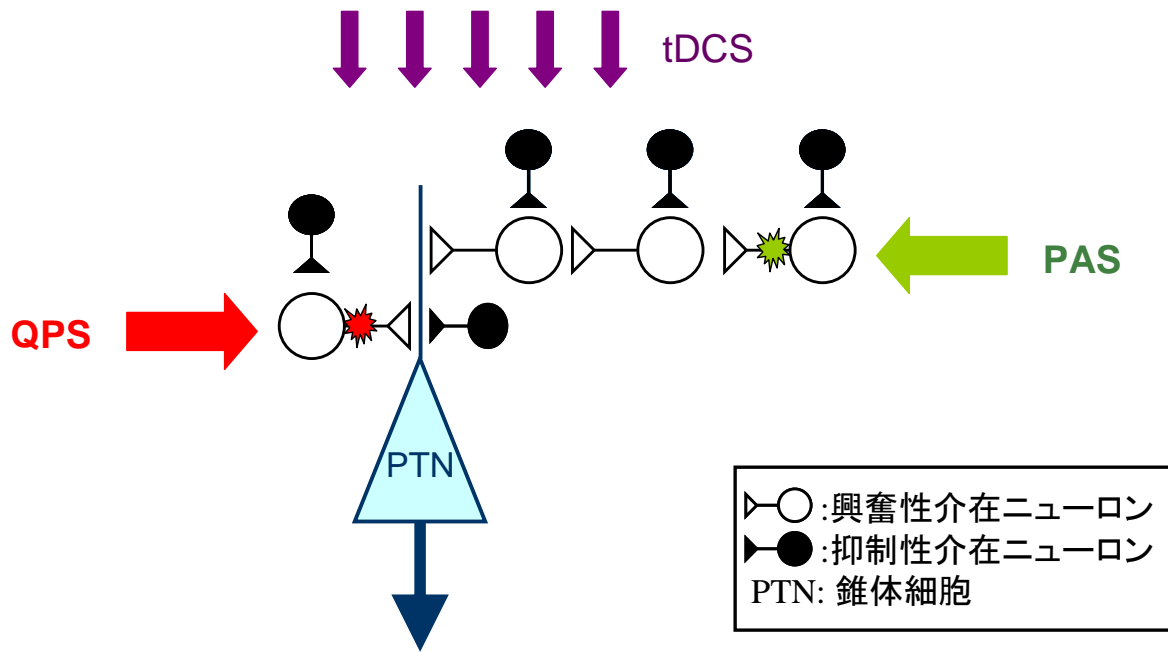


図 15 tDCS/PAS/QPS それぞれの作用部位の模式図。

tDCS は皮質に垂直に広範な範囲への非選択的刺激を行う。QPS は錐体細胞に直接シナプス結合している興奮性介在細胞を介したもの(I1)と考えられている。PAS はシナプスを3つ介した I3 からのものと考えられている。

QPS においては中用量および高用量においても、他の刺激法と異なり LTP 様変化の増強がみられていて、L-DOPA200mg と用量が抑圧性に反転するのに十分な刺激ではない可能性が示唆される。動物やヒトにおける髄液中のドーパミン濃度には同等とされ、報告により差が大きいものの 0.1-1.5 μ M 程度とされている (Hout 2012)。パーキンソン病患者ではあるが L-DOPA 250mg 投与にて髄液中最高濃度は 0.43 \pm 0.09 μ M の上昇にしか満たない。Otani ら(Otani 2003)や Kolomiets ら(Kolomiets 2009)による動物実験でみられた invert-U 型変化の凸

にあたる部分の濃度は $3\mu\text{M}$ や $5\mu\text{M}$ である。L-DOPA 200mg の投与によって $3\mu\text{M}$ 以上の濃度をとることは考えにくく、まだ興奮性が用量依存性に減少する段階には達していないと考えられる。つまり、QPS においても L-DOPA を 200mg よりも更に高用量とすれば、LTP 様変化が減弱する可能性があり、LDOPA 用量による invert-U 型変化が QPS で起こらないと断定はできない。しかし、これ以上の高用量は副作用の問題もあり検討を行えなかった。tDCS、PAS による LTP 様効果に比べて、LDOPA 用量による invert-U 型変化が出にくいということは言えると考えられる。

また、QPS は他の刺激法と比較し、GABA 受容体による抑圧性の作用をより受けにくい可能性が考えられる。作用部位からは、QPS の作用はシナプスひとつ介して錐体細胞を刺激している興奮性介在細胞を介したもの(I1)のものであるため(Hamada 2008)、その可塑性に影響を与える抑制性の介在細胞も少ない。そのため、PAS など他の刺激法に比して、GABA 受容体を有する抑制性の介在細胞からの影響を受けにくいため増強の程度が高いと考えられる。

PAS においては、シナプスを 3 つ介して錐体細胞を刺激している介在ニューロンによるもの(I3)とされ(Di Lazzaro 2009)、その誘導に際してそれらの興奮性介在ニューロンなどに結合している抑制性の GABA 系介在ニューロンからの影響を受ける可能性がある。それらにより逆 U 字の容量依存曲線をえがくと共に、

L-DOPA による LTP の増強効果がみられないと考えられる。tDCS は D1 受容体と L-DOPA での用量依存曲線が大きく異なることから、tDCS の選択性の低い持続的な刺激によって周囲から抑制性の刺激をうけるだけではなく、D2 受容体を介した LTD 様の変化の影響を強く受け、抑圧性に反転した U 字様の変化を示しているものと考えられる。

本研究や既報告からは L-DOPA の可塑性に対する影響は、その用量やサブ受容体の特異性、可塑性の種類により、違うと考えた。今回の QPS での結果は、100mg でも 200mg でも LTP の増強がおこり、動物でみられる D1 活性を介した LTP の増強に合致するものである。GABA 受容体を介した可塑性変化の影響を受けにくく、このため、既報告とは異なる結果となったと考える。つまり、QPS5 はドパミンの作用のなかでも D1 受容体の興奮性の作用、つまり NMDA 受容体を介した LTP への関与を純粹に調べるには良い方法ではないかと考えられた。

可塑性への年齢の影響

加齢による可塑性の変化は、加齢による学習能力の低下などに関連すると予想されるが詳細はわかっていない。健常高齢者において、低下した運動学習が tDCS にて改善がみられたとの報告 (Zimmerman 2010)からも、その関連は強いと考え

られている。

加齢に伴う LTP 変化については動物における検討がいくつかあり、神経の可塑性は老化とともに減衰するとされている(Burke 2006, Burke 2010, Lynch 2006)。ラットの海馬における実験では、部位によりその LTP 変化には差があるとされており、Shaffer 側枝を刺激することによって得られる CA1 の錐体細胞の興奮性シナプス後電位(SC-CA1)においては加齢に伴う可塑性の変化はほとんどみられないが、嗅内野からの貫通繊維と歯状回 (PP-DG)では LTP の低下がみられ、貫通繊維と CA3(PP-CA3)においてはより強い LTP の低下がみられる(Burke 2006)。

また、ヒトにおいては運動野における可塑性の年齢による変化について、TBS (Freitas 2011)、PAS (Fathi 2010)、tDCS (Galea 2009)それぞれを用いた報告があるが、いずれにおいても加齢に伴い低下傾向を示している。今回の試験においても既報告と同様に 45 歳平均に比して 65 歳平均にて低下がみられている。可塑性に関する神経系の年齢による変化としてはいくつかの報告がある。加齢によりシナプスの数の減少がみられるとの報告(Burke 2006)や、後シナプスの膜の分子構造に変化がおきるとの報告(Henly 2013)もある。酸化ストレスも加齢に伴う可塑性変化の原因のひとつと考えられる。加齢に伴い酸化ストレスの増大がみられる(Knight 1998)、過酸化水素の投与により用量依存性に LTP の低下がみられると

言う報告もある(Watoson 2002)。

今回の結果では、placebo 投与の LTP では、加齢に伴い可塑性の減少傾向がみられ統計的にも有意な差がみられた。従来と同様な傾向が示せたといえるであろう。

L-DOPA による影響の年齢変化に関しては、L-DOPA200mg への反応については、45 歳平均では placebo と比較し上昇傾向はみられたものの統計学的に有意差が見られなかったが、65 歳平均では placebo との比較にて有意な上昇がみられ、むしろ加齢に伴い強い反応がみられるようになっている。一つの説明としては、加齢による LTP の低下はドパミン不足によるもので、ドパミン受容体などの外からのドパミンへの反応性は衰えないため、今回の結果が得られたという事が考えられる。しかし、以下に述べるようにこの説明が正しいとは言えない。

実際、加齢によりドパミンは減少すると知られている。黒質および腹側被蓋におけるドパミン作動系ニューロンの減少し(Vaillancourt 2012, Gaspar 1991)、ドパミンの絶対量も減少している(Garnett 1983)。線条体および皮質におけるドパミン受容体も減少している(Inoue 2001)。中でも D1 および D2 受容体の減少がみられる (Wong 1997)。10 歳年を取るにつれて 6.6%の線条体ドパミン輸送体の機能低下(van Dyck 2002, 2008)がおき、小胞内のドパミン含有量が加齢により 48%減少、パーキンソン病患者においては 85%の低下あり(Kumakura 2005)、

ドパミンの合成の分布能も低下している。ヒトにおける PET を用いた検討において、加齢に応じてドパミン合成が低下することが示されている(Mobbs 2009)。加齢に伴い D1/D2 の割合が変化している可能性も考えられていて、抑圧傾向に働く D2 が促通傾向の D1 より低下傾向が強いため、D1 の作用が相対的に増強するとされる (Wong 1997)。このため、常時はドパミンの作用の低下により LTP が小さくとも、ドパミン投与されると D1 の強い作用により LTP が強く増強されると考えられる。今回の結果はこの仮説に合致する結果だった。

以上、実験 1 では、QPS による LTP に対する L-DOPA の効果は L-DOPA の用量、被患者の年齢では変化せず安定して得られることがわかった。パーキンソン病などの神経疾患における可塑性の異常の検出や、内服薬による可塑性機能の回復の評価などの解析において、他の刺激法より QPS 刺激が勝っていると考えられた。また、神経疾患患者が多い高齢群で健常ボランティアでも中年群と同様に LTP が誘導され、L-DOPA にて LTP が増強することが判明した点も、QPS5 を患者に使用して検査する時に良い条件となると判断した。

実験 2

パーキンソン病における考察

PD 患者では、QPS 後において MEP 振幅が増加せず、可塑性の異常が示された。既報告でも同様に PD では LTP が減少していることが知られている。

パーキンソン病のモデル動物では、線条体においてドパミン off 時の LTP の消失し、その変化が L-DOPA 投与にて回復する (Picconi 2003)。パーキンソン病における可塑性の異常は線条体のみでみられるものではなく、大脳皮質においてもその異常が指摘されている (Calabresi 2007, Gradinaru 2009)。PD モデル動物においては、ドパミンは直接的に線条体および prefrontal 皮質のグルタミン作動性ニューロンの LTP および LTD を誘導する (Centonze 2003, Otani 2003)。ヒトにおいてはいくつかの異なった報告がある。パーキンソン病患者における PAS では、モデル動物と同様に、off 時には運動野での LTP 様効果の消失がみられ、抗パーキンソン病薬による治療で LTP 効果が改善する (Morgante 2006, Ueki 2006)。TBS を用いた検討においては、off 時に LTP の消失がみられるものの、治療により on となっても、LTP の回復がみられないという報告もある (Suppa 2010)。

またパーキンソン病の可塑性の障害は病期によって変化していて、症状の変化と深くかかわっていると考えられている。L-DOPA を長期服用後の副作用としてジスキネジアを生じたラットでは、LTP の誘導後に低頻度刺激を行っても LTP

の消失がみられず(脱増強: depotentiation)、LTP の持続が報告されている (Picconi 2003)。ヒトにおいても、ジスキネジアを示すパーキンソン病患者の運動野において、脱増強がみられることが報告されている (Morgante 2006)。このようにパーキンソン病の症状や副作用に可塑性の変化が関わっているといういくつかの知見がある。

既報告と本試験との違いの一つは、今回は対象 PD 患者の罹患期間が短く、単剤投与であることがあげられる。Morgante(Morgante 2006)らの報告においては本試験より経過の長い PD 患者を対象としており、対象の PD 患者は平均罹病期間 8.9 年であり、Ueki(2006)らの検討においては on/off を検討した患者の平均罹病期間は 5.6 年であり、本試験においては経過 2.8 年であった。ただし、UPDRS III のスコアには本試験と既報告では有意差を認めなかった (ON 時スコア 9.9 $p=0.49$ 、OFF 時スコア 18.4 $p=0.49$)。治療としては単剤ではなく、L-DOPA 中心とした多剤で病状コントロールされている。本研究においては、L-DOPA 単剤で治療を行っている早期の PD 患者においても LTP の誘導が異常であったことから、PD における可塑性の異常は早期からみられると結論した。また、その可塑性が L-DOPA により改善することもわかった。

また、今回の LTP 効果と臨床症状との関連では、PD 患者において、L-DOPA

内服により臨床症状が改善するとともに、LTP 効果の改善も見られた。OFF 時、ON 時ともに UPDRSⅢのスコアと QPS 後の MEP の振幅の上昇率との間には相関は認められなかった。しかし、OFF 時と ON 時との UPDRSⅢのスコアの改善度と OFF 時と ON 時での可塑性の改善度合との間には有意な相関がみられた。従って、この検査法が患者ごとの治療効果予測には有用である可能性が考えられる。

既報告での可塑性と臨床症状との関連については、OFF 時での UPDRSⅢスコアと LTP 効果の度合いについてのみ相関がみられたとされている (Ueki 2006)。本試験とその報告の大きな差異は、対象患者と可塑性の誘導法にあると考える。さらに、本試験が L-DOPA 単剤での治療患者を対象としていたのに対し、Ueki らの報告では L-DOPA だけではなく、ドパミンアゴニストや抗コリン剤などの多剤が用いられている患者を対象としていた。ドパミンアゴニストや抗コリン剤などが可塑性にどのような影響を与えるのかの検討は十分になされておらず、皮質の可塑性を介さず症状を改善している可能もある。そのために、我々の研究は L-DOPA のみ使用している患者での上乘せ効果との関連を見たため、ドパミンの可塑性への効果に相関が見られたが、これまでの既報告では、多種の薬を服用した患者でのドパミンの上乗せ効果との相関をみたために治療効果と MEP 変化の間に相関が認められなかったのかもしれない。また、PAS によって誘導される可

塑性に対する L-DOPA の用量依存曲線が逆 U 字をえがくためにドパミンの可塑性との間に関連がみられなかった可能性も考えられる。

また、既報告で見られていた OFF 状態での運動症状と可塑性様変化の相関が本試験においてみられていない。PD 患者には症状の左右差がみられることがあるが、可塑性変化にも症状に応じて障害にも差があるとの報告もある (Kojovic 2012)。今回の被験者は早期の患者に対して利き手の右上肢側にて施行した。早期については症状の左右差の影響を強くうけてしまい、OFF の症状と可塑性様変化に相関がみられなかった可能性も考えられる。

パーキンソン病患者においては LTP 効果の低下がみられ、それが L-DOPA による治療にて改善がみられる。また QPS を用いることにより、L-DOPA の治療効果を客観的に評価できる可能性が考えられる。他の抗パーキンソン病薬の可塑性に与える効果は十分に検討されていない。それらの薬剤において可塑性への影響を調べることで、その機序を解明するのにも役に立つことが示唆された。

結語

本研究において、QPS 誘導による LTP 様効果に対する L-DOPA の増強効果は、L-DOPA の用量に影響を受けないことを示した。安定した効果であることから、L-DOPA による可塑性への影響を分析するには QPS は最適な方法であると考
えられた。パーキンソン病患者で誘導されなくなっている LTP 様効果が L-DOPA
により回復し、その改善の度合いと症状の改善度合いが相関しており、パーキン
ソン病の治療効果の客観的な判定にも有用な可能性が示唆された。今後は、他の
パーキンソン病治療薬における検討を加え、治療効果の判定や予測、病態不明
な症状との関係を明らかにしていくための基礎的知見を、本研究は提供できたと
考える。

謝辞

本研究の一部は大日本住友製薬株式会社の研究助成を受けて行われた。

本研究を遂行するに当たりご指導を賜りました、東京大学大学院医学系研究科
脳神経医学専攻神経内科学教室の辻省次教授、福島県立医科大学医科大学医学部
神経内科学講座の宇川義一教授に深謝いたします。

北里大学医学部神経内科学教室の花島律子先生 堤涼介先生、東京大学医学部
神経内科学教室生理グループの寺尾安生先生、濱田雅先生、寺田さとみ先生、清
水崇弘先生、徳重真一先生らにご協力、ご助言いただき、考察を深めることがで
きました。この場を借りて御礼申し上げます。

東京大学医学部付属病院薬剤部 柳原良次先生には本研究における薬剤の盲
験化にご協力を賜り深謝します。

参考文献

- Amassian, V.E. and Deletis, V. Relationship between animal and human corticospinal responses. in: W. Paulus, M. Hallett, P.M. Rossini, J.C. Rothwell (Eds.) Transcranial magnetic stimulation, 79–92(1999).
- Bailey, C. H., et al. Is Heterosynaptic modulation essential for stabilizing hebbian plasiticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 1, 11–20 (2000).
- Barker, A. T., Jalinous, R. & Freeston, I. L. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet* 1, 1106–1107 (1985).
- Bienenstock, E. L., et al. Theory for the development of neuron selectivity: orientation specificity and binocular interaction in visual cortex. *J. Neurosci.* 2, 32–48 (1982).
- Bliss, T. V. & Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol. (Lond.)* 232, 331–356 (1973).
- Burke, S. N. & Barnes, C. A. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 30–40 (2006).
- Calabresi, P., Maj, R., Pisani, A., Mercuri, N. B. & Bernardi, G. Long-term

- synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J. Neurosci.* 12, 4224–4233 (1992).
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A. & Di Filippo, M. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 30, 211–219 (2007).
- Centonze, D. et al. Receptor subtypes involved in the presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons. *J. Neurosci.* 23, 6245–6254 (2003).
- Chen, C.-H., Chien, S.-H. & Hwu, H.-G. Lack of association between TaqI A1 allele of dopamine D2 receptor gene and alcohol-use disorders in Atayal natives of Taiwan. *Am. J. Med. Genet.* 67, 488–490 (1996).
- Cooke, S. F. & Bliss, T. V. P. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 129, 1659–1673 (2006).
- Da Cunha, C., et al. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 227–237 (2002).
- Di Lazzaro, V. et al. Comparison of descending volleys evoked by transcranial magnetic and electric stimulation in conscious humans. *Electroencephalogr*

- Clin Neurophysiol 109, 397–401 (1998).
- Di Lazzaro, V. et al. Associative Motor Cortex Plasticity: Direct Evidence in Humans. *Cereb. Cortex* 19, 2326–2330 (2009).
- Doyon, J. et al. Role of the Striatum, Cerebellum, and Frontal Lobes in the Learning of a Visuomotor Sequence. *Brain and Cognition* 34, 218–245 (1997).
- Doyon, J. Motor sequence learning and movement disorders: Current Opinion in Neurology 24, 478–483 (2008).
- Fathi, D. et al. Effects of aging on the human motor cortical plasticity studied by paired associative stimulation. *Clinical Neurophysiology* 121, 90–93 (2010).
- Freitas, C. et al. Changes in Cortical Plasticity across the Lifespan. *Front Aging Neurosci* 3, (2011).
- Fresnoza, S., Paulus, W., Nitsche, M. A. & Kuo, M.-F. Nonlinear Dose-Dependent Impact of D1 Receptor Activation on Motor Cortex Plasticity in Humans. *J. Neurosci.* 34, 2744–2753 (2014).
- Frey, U., Hartmann, S. & Matthies, H. Domperidone, an inhibitor of the D2-receptor, blocks a late phase of an electrically induced long-term

- potentiation in the CA1-region in rats. *Biomed. Biochim. Acta* 48, 473–476 (1989).
- Flöel, A. et al. Dopaminergic influences on formation of a motor memory. *Ann Neurol.* 58, 121–130 (2005).
- Fujiyama, H. et al. Delayed plastic responses to anodal tDCS in older adults. *Front. Aging Neurosci.* 6, 115 (2014).
- Garnett, E. S., Firnau, G. & Nahmias, C. Dopamine visualized in the basal ganglia of living man. *Nature* 305, 137–138 (1983).
- Gaspar, P., Duyckaerts, C., Alvarez, C., Javoy-Agid, F. & Berger, B. Alterations of dopaminergic and noradrenergic innervations in motor cortex in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 30, 365–374 (1991).
- Gradinaru, V., Mogri, M., Thompson, K. R., Henderson, J. M. & Deisseroth, K. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science* 324, 354–359 (2009).
- Goldman-Rakic, P. S., Muly, E. C. & Williams, G. V. D (1) receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31, 295–301 (2000).
- Hallett, M. Transcranial Magnetic Stimulation: A Primer. *Neuron* 55, 187–199 (2007).

- Hamada, M. et al. Quadro-pulse stimulation is more effective than paired-pulse stimulation for plasticity induction of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol* 118, 2672–2682 (2007).
- Hamada, M. et al. Bidirectional long-term motor cortical plasticity and metaplasticity induced by quadripulse transcranial magnetic stimulation. *J Physiol* 586, 3927–3947 (2008).
- Huang, Y.-Z., Chen, R.-S., Rothwell, J. C. & Wen, H.-Y. The after-effect of human theta burst stimulation is NMDA receptor dependent. *Clinical Neurophysiology* 118, 1028–1032 (2007).
- Hebb, C. O. & Konzett, H. Difference between morphine and synthetic analgesics in their actions on ganglionic transmission. *Nature* 163, 720 (1949).
- Hoogendam, J. M., Ramakers, G. M. J. & Di Lazzaro, V. Physiology of repetitive transcranial magnetic stimulation of the human brain. *Brain Stimul* 3, 95–118 (2010).
- Hyman, S. E., Malenka, R. C. & Nestler, E. J. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 565–598 (2006).

Inoue, M. et al. Age-related reduction of extrastriatal dopamine D2 receptor measured by PET. *Life Sci.* 69, 1079–1084 (2001).

Iversen, S. D. & Iversen, L. L. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.* 30, 188–193 (2007).

Jenner, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 665–677 (2008).

Knecht, S. et al. Levodopa: faster and better word learning in normal humans. *Ann. Neurol.* 56, 20–26 (2004).

Knight, J. A. Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 28, 331–346 (1998).

Kojovic, M. et al. Functional reorganization of sensorimotor cortex in early Parkinson disease. *Neurology* 78, 1441–1448 (2012).

Kolomiets, B., Marzo, A., Caboche, J., Vanhoutte, P. & Otani, S. Background Dopamine Concentration Dependently Facilitates Long-term Potentiation in Rat Prefrontal Cortex through Postsynaptic Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinases. *Cereb. Cortex* 19, 2708–2718 (2009).

Kumakura, Y. et al. PET studies of net blood-brain clearance of FDOPA to human brain: age-dependent decline of [18F]fluorodopamine storage

- capacity. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 807–819 (2005).
- Kuo, M.-F., Paulus, W. & Nitsche, M. A. Boosting focally-induced brain plasticity by dopamine. *Cereb. Cortex* 18, 648–651 (2008).
- Lefaucheur, J.-P. et al. Improvement of motor performance and modulation of cortical excitability by repetitive transcranial magnetic stimulation of the motor cortex in Parkinson's disease. *Clinical Neurophysiology* 115, 2530–2541 (2004).
- Lisman, J. E. Three Ca²⁺ levels affect plasticity differently: the LTP zone, the LTD zone and no man's land. *J Physiol* 532, 285–285 (2001).
- Lynch, G., Rex, C. S. & Gall, C. M. Synaptic plasticity in early aging. *Ageing Research Reviews* 5, 255–280 (2006).
- Misonou, H. et al. Regulation of ion channel localization and phosphorylation by neuronal activity. *Nat. Neurosci.* 7, 711–718 (2004).
- Molina-Luna, K. et al. Dopamine in Motor Cortex Is Necessary for Skill Learning and Synaptic Plasticity. *PLoS ONE* 4, e7082 (2009).
- Molloy, S., et al. The role of levodopa in the management of dementia with Lewy bodies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 76, 1200–1203 (2005).
- Monte-Silva, K., Liebetanz, D., Grundey, J., Paulus, W. & Nitsche, M. A.

- Dosage-dependent non-linear effect of L-dopa on human motor cortex plasticity. *J. Physiol. (Lond.)* 588, 3415–3424 (2010).
- Morgante, F., Espay, A. J., Gunraj, C., Lang, A. E. & Chen, R. Motor cortex plasticity in Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesias. *Brain* 129, 1059–1069 (2006).
- Muly, E. C., Szigeti, K. & Goldman-Rakic, P. S. D1 Receptor in Interneurons of Macaque Prefrontal Cortex: Distribution and Subcellular Localization. *J. Neurosci.* 18, 10553–10565 (1998).
- Nitsche, M. A. & Paulus, W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J. Physiol. (Lond.)* 527 Pt 3, 633–639 (2000).
- Nitsche, M. A. & Paulus, W. Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology* 57, 1899–1901 (2001).
- Nitsche, M. A. et al. Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *J. Physiol. (Lond.)* 553, 293–301 (2003).
- Nitsche, M. A. et al. Dopaminergic modulation of long-lasting direct

- current-induced cortical excitability changes in the human motor cortex. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1651–1657 (2006).
- Nitsche, M. A. et al. Timing-dependent modulation of associative plasticity by general network excitability in the human motor cortex. *J. Neurosci.* 27, 3807–3812 (2007).
- Otani, S., et al. Dopamine facilitates long-term depression of glutamatergic transmission in rat prefrontal cortex. *Neuroscience* 85, 669–676 (1998).
- Otani, S., Daniel, H., Roisin, M.-P. & Crepel, F. Dopaminergic Modulation of Long-term Synaptic Plasticity in Rat Prefrontal Neurons. *Cereb. Cortex* 13, 1251–1256 (2003).
- Packard, M. G. & Knowlton, B. J. Learning and Memory Functions of the Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience* 25, 563–593 (2002).
- Pascual-Leone, A., Valls-Solé, J., Wassermann, E. M. & Hallett, M. Responses to rapid-rate transcranial magnetic stimulation of the human motor cortex. *Brain* 117, 847–858 (1994).
- Patton, H. D. & Amassian, V. E. Single and multiple-unit analysis of cortical stage of pyramidal tract activation. *J. Neurophysiol.* 17, 345–363 (1954).
- Picconi, B. et al. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in

- L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature Neuroscience* 6, 501–506 (2003).
- Poewe, W. Parkinson disease: treatment of the nonmotor symptoms of Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 6, 417–418 (2010).
- Rossi, S., Hallett, M., Rossini, P. M., Pascual-Leone, A. & Safety of TMS Consensus Group. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol* 120, 2008–2039 (2009).
- Seamans, J. K. & Yang, C. R. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog. Neurobiol.* 74, 1–58 (2004).
- Seidler, R. D., Tuite, P. & Ashe, J. Selective impairments in implicit learning in Parkinson's disease. *Brain Research* 1137, 104–110 (2007).
- Shin, J. C. & Ivry, R. B. Spatial and Temporal Sequence Learning in Patients with Parkinson's Disease or Cerebellar Lesions. *Journal of Cognitive Neuroscience* 15, 1232–1243 (2003).
- Stefan, K., Kunesch, E., Benecke, R., Cohen, L. G. & Classen, J. Mechanisms of enhancement of human motor cortex excitability induced by interventional paired associative stimulation. *J Physiol* 543, 699–708

(2002).

Suppa, A. et al. Lack of LTP-like plasticity in primary motor cortex in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 227, 296–301 (2011).

Thirugnanasambandam, N., Grundey, J., Paulus, W. & Nitsche, M. A. Dose-Dependent Nonlinear Effect of l-DOPA on Paired Associative Stimulation-Induced Neuroplasticity in Humans. *J. Neurosci.* 31, 5294–5299 (2011).

Tsumoto, T. Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex. *Progress in Neurobiology* 39, 209–228 (1992).

Ueki, Y. et al. Altered plasticity of the human motor cortex in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 59, 60–71 (2006).

Vaillancourt, D. E., Spraker, M. B., Prodoehl, J., Zhou, X. J. & Little, D. M. Effects of aging on the ventral and dorsal substantia nigra using diffusion tensor imaging. *Neurobiol. Aging* 33, 35–42 (2012).

Van Dyck, C. H. et al. Age-related decline in dopamine transporters: analysis of striatal subregions, nonlinear effects, and hemispheric asymmetries. *Am J Geriatr Psychiatry* 10, 36–43 (2002).

Van Dyck, C. H. et al. Striatal dopamine transporters correlate with simple

- reaction time in elderly subjects. *Neurobiol. Aging* 29, 1237–1246 (2008).
- Vlachos, A. et al. Repetitive Magnetic Stimulation Induces Functional and Structural Plasticity of Excitatory Postsynapses in Mouse Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *J. Neurosci.* 32, 17514–17523 (2012).
- Wassermann, E. M. et al. Use and safety of a new repetitive transcranial magnetic stimulator. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 101, 412–417 (1996).
- Watson, J. B. et al. Age-related deficits in long-term potentiation are insensitive to hydrogen peroxide: coincidence with enhanced autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurosci. Res.* 70, 298–308 (2002).
- Williams, G. V. & Castner, S. A. Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. *Neuroscience* 139, 263–276 (2006).
- Wong, D. F., et al. Quantification of Neuroreceptors in the Living Human Brain: III. D2-Like Dopamine Receptors: Theory, Validation, and Changes during Normal Aging. *J Cereb Blood Flow Metab* 17, 316–330 (1997).
- Zahrt, J., Taylor, J. R., Mathew, R. G. & Arnsten, A. F. Supranormal

stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex
impairs spatial working memory performance. *J. Neurosci.* 17, 8528–8535
(1997).

Zimmerman, M. & Hummel, F. C. Non-Invasive Brain Stimulation: Enhancing
Motor and Cognitive Functions in Healthy Old Subjects. *Front Aging
Neurosci* 2, (2010).