

## サルの L-Dopa-induced dyskinesia に対する Ceruletide の長期効果

岡山大学医学部脳神経外科学教室 (指導: 大本堯史教授)

溝 瀧 雅 之

(平成 4 年 9 月 30 日受稿)

**Key words :** Ceruletide, L-Dopa-induced dyskinesia, Cholecystokinin  
Peptide regulation

### 緒 言

Cholecystokinin (CCK) は脳に存在する腸管ペプチドのひとつであり、当初はその末梢ホルモン作用で知られていたものである。最初に十二指腸粘膜から分離された CCK の基本構造は、C 末端がアミド化された 33 個のアミノ酸残基よりなり、C 末端から数えて 7 番目のタイロシンに SO<sub>3</sub>H 基を持っているポリペプチドであった。その後、哺乳動物の中枢神経系、特に大脳皮質や基底核、辺縁系などに高濃度に分布しており<sup>1)</sup>、その受容体も広く分布していることが発見された<sup>2-4)</sup>。中枢神経系での CCK の存在型は、C 末端から数えて 8 個のアミノ酸からなる CCK-8 が大部分である<sup>5)</sup>。さらに、中脳内側被蓋野や黒質内側部のドーパミン (DA) 含有細胞内に CCK-8 が共存していることが免疫組織学的に示されて以来<sup>6)</sup>、従来のニューロトランスミッターとして知られる DA とペプチドである CCK の相互作用が注目されている。マウスやラットを用いた動物の行動実験では、CCK は DA による機能亢進を抑制するという報告が多い<sup>7-10)</sup>。

一方、パーキンソン病患者の黒質における CCK-8 の著明な減少<sup>11)</sup>や、ハンチントン舞踏病患者の基底核および大脳皮質における CCK-8<sup>12)</sup>およびそのレセプターの減少<sup>13)</sup>、さらに分裂病患者の脳脊髄液中の CCK の減少等の報告<sup>14)</sup>から、これらの DA 系の変性や機能異常が主要な病態であるとされる疾患群について、CCK がその病態生理に深くかかわっていることが示唆されて

いる。以上のような背景から CCK-8 や、そのアナログであり中枢神経系において CCK-8 と同様の、或いはより強力な効果の認められる ceruletide (CLT) が種々の疾患に対して臨床応用が試みられつつある。初期の臨床応用として、CLT が分裂病患者に見られた遅発性ジスキネジアに有効であった例<sup>15,16)</sup>や、さらに老人性舞踏病、口舌ジスキネジア、本態性振戦等に有効であった例<sup>17,18)</sup>が報告されている。また、それらの有効例では 1 回の筋注で十分な臨床効果が長期間持続することが明らかにされた。

しかしながら、これらの不随意運動に対しての臨床報告に見られるような CLT の長期効果についての基礎的研究はなく、その薬理作用も不明である。さらに末梢投与された CLT の中枢神経系での作用部位や機序もいまだ不明のままである。その理由として、ヒトの種々の不随意運動類似の症状を示す動物モデルの作製が困難であることと、長期評価およびその再現性が困難であること等が考えられる。

一方、サルの一側中脳腹内側被蓋野 (ventromedial tegmentum-以下 VMT と略す) に小破壊巣を作成すると対応側肢に無動症や静止時振戦が誘発され、L-Dopa あるいは DA 投与によってそのパーキンソン病症状は軽快するが、それらの大量投与によってパーキンソン病患者のそれに類似した不随意運動が誘発され、このモデルを用いて種々の実験的検討が行われている<sup>19-24)</sup>。このサルのモデルの場合、健常側を対照として比較できる点、また MPTP-treated

### Symptoms of Unilateral VMT (Ventral-medial Tegmentum) Lesioned Monkey

1. Ipsilateral Mydriasis
2. Hypokinesia of Contralateral Upper and/or Lower Extremities
3. Tremor of Contralateral Upper and/or Lower Extremities (3 weeks after operation)
4. Others ; Torticollis, Ataxia etc

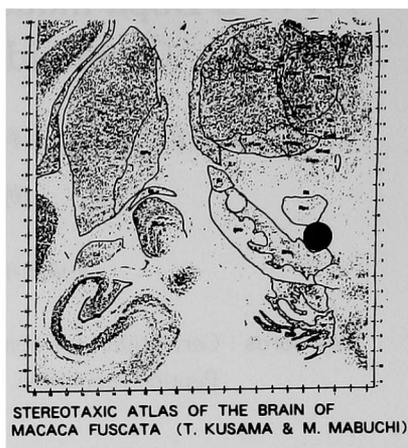


図1 VMT Lesion と観察される症状

monkey モデルのように症状が自然寛解しにくい点等で長期評価の実験モデルとして有用と思われる。

そこで本研究では、不随意運動に対する CLT の効果、その持続時間、作用部位および中枢機序を明らかにする目的で、一側 VMT 破壊後に対応側上下肢に無動症を呈し、L-Dopa によって対応側上下肢および口舌部にジスキネジアが誘発されるサルを用いて、実験的検討を行った。

#### 材 料 と 方 法

体重3.9~5.1kgの中国赤毛ザル (*Macaca mulatta*) 3頭、体重5.8~8.2kgのニホンザル (*Macaca fuscata*) 6頭を用いた。そのうちニホンザル3頭は手術をせず正常群として実験に用いた。

#### 1. サルにおける L-Dopa and DA-induced dyskinesia モデルの作成

##### 1) 一側 VMT 破壊巣の作成

塩酸ケタミン (10mg/kg) 筋注による麻酔で自発呼吸下にて実験を行った。成茂式定位頭蓋固定器に頭蓋を固定後、drill にて前頭骨傍正中で上矢状静脈洞外側縁が露われる様に小孔を開け、これより目標点にむけて刺激針を刺入した。目標点は Kusama の図譜<sup>25)</sup>により大本ら<sup>24)</sup>の方法に従い行った。即ち両外耳孔中点より10mm背側を基準点とし、赤毛ザルでは F : 6.5~7.0, L : 1.0~1.5, H : 0~-2.0mm, ニホンザルでは F :

12.0~14.0, L : 1.5~2.0, H : 0~-2.0mmをそれぞれ目標点とした。破壊巣作成部位はすべて右側とした。目標部付近の高頻度刺激は (日本光電製 Electronic Stimulator SEN-3201) 3~5V, 1 msec, 50Hz の矩形波を用い、ステンレス製同心円電極 (外径0.5mm, 電極間距離1mm) にて行った。動眼神経線維の刺激による縮腫を目安として、刺激側の縮腫および眼球の内転の最も著明な部位を目標点として RADIONICS 社製の lesion generator (Model RFG-3B) を用い、凝固針 (外径1.5mm, 電極露出部分3mm) にて65°C, 1分間の高周波凝固を行った。麻酔覚醒後は破壊側 (右) の瞳孔散大、眼瞼下垂、顎を破壊側に向ける斜頸、対側左上肢を肘関節で軽度屈折し手指を伸展した姿勢をとった。翌日からは対応側肢 (左上下肢) の無動症状が認められ、これが持続した (図1)。

##### 2) L-Dopa 経口投与によるジスキネジアの誘発

中国赤毛ザル3頭、ニホンザル3頭、合計6頭に一側 VMT 破壊巣作成手術1か月後より L-Dopa と末梢性脱炭酸酵素阻害剤の合剤 (L-Dopa/benserazide hydrochloride = 4/1) (以下 L-Dopa と省略) を、鼻腔より挿入した胃管を用いて投与した。投与は、一日一回とした。連日投与を行うと、最初の2日間はサルは著明な興奮状態となり、通常3、4日後より、顔面、口、舌、対側上下肢のジスキネジアが誘発された。これらのジスキネジアは、パーキンソン病



れた物質で10個のアミノ酸からなる分子量1352のCCK-8のアナログであり、胆道、膵臓診断薬としてすでに使用されている物質である。アミノ酸配列は一部がCCK-8とは異なっている(図3)。CLTは生理食塩水に溶解し以下の実験すべてに用いた。CLTの全身投与の量としては、ラットやサルへの行動実験の投与量<sup>26,27)</sup>を参考に、30, 50 $\mu$ g/kg筋肉内投与した。次いで少量の末梢投与として50ng/kgを筋肉内投与した。

また、CLTの中枢直接投与量に関してもラットにおける中枢直接注入による回転実験や報酬行動実験での投与量<sup>28)</sup>および血液脳関門の薬物通過の比率を考慮して20ng/kg, 10pg/kgの量を投与した

### 3. 行動の評価

L-DopaとDAの投与前後の行動はビデオに記録し、主に対側肢の無動症の変化、対側上下肢と口舌の不随意運動の程度、持続時間等について観察した。L-Dopaの経口投与の実験においては、前面に透明なアクリルボードを装着したケージを用いて前面より記録した。DAとCLTの直接中枢投与の実験においては、サ

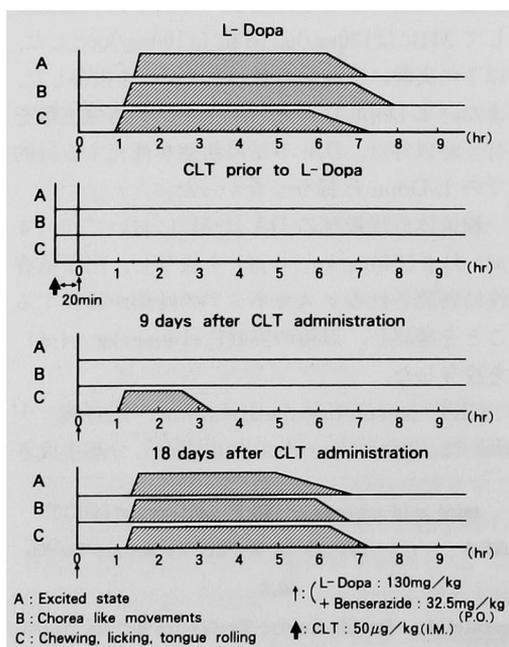


図4 M1 monkeyにおけるCLT筋注のL-Dopa誘発ジスキネジアに対する効果

ルをモンキーチェアに固定した状態で行った。

### 4. 組織学的検索

慢性実験終了後に、塩酸ケタミンの麻酔下に、左心室から大動脈まで挿入したカテーテルを介して、10%ホルマリン溶液にて脳を灌流固定後に摘出した。さらに、取り出した脳を10%ホルマリン溶液中で3週間固定した後、ヒブラトームで細切した連続切片を作成し、H-E染色によりVMT破壊巣の位置を確認した。

## 結 果

### 1. 末梢投与のCLTの効果

#### 1) M1 monkey study

##### (1) L-Dopa-induced dyskinesia

このサルにL-dopa 130mg/kgを経口投与すると、無動を呈していた左上下肢を約40分後より良く動かすようになりほぼ正常となった。そしてL-Dopa投与1時間後より左上下肢および口舌に6時間から7時間ほど続くジスキネジアが誘発された。この後、一見正常に見える四肢の運動状態を経て、少しずつ左上下肢の無動症が出現した。このジスキネジアは同量のL-Dopaで毎回再現され、6-7時間持続した(図4, 最上段)。

##### (2) 50 $\mu$ g/kgのCLTの長期効果

50 $\mu$ g/kgのCLTをM1に筋注するとやや鎮静状態となった。左上下肢のhypokinesiaは改善が認められなかった。また嘔吐、下痢等の他覚的な消化器症状は認められなかった。CLTだけではhypokinesiaが改善しないことを確認した後、CLT投与20分後にL-Dopa 130mg/kgを経口投与した。L-Dopa投与30ないし40分後に徐々に左上下肢のhypokinesiaは消失し、一見正常に見える運動改善が認められた。この対側肢の運動改善は正常側よりはわずかに劣るものの、持続的に認められた。またその期間、ジスキネジアは口舌、四肢ともに全く誘発されなかった(図4, 2段目)。L-Dopa投与後12時間で徐々に左上下肢のhypokinesiaが再び出現した。CLTはL-Dopaで誘発されるジスキネジアを完全に抑制し、またその間の対側肢のhypokinesiaは改善していた。

さらにその CLT の効果の持続を確認するため、最初の CLT の投与後9日目に同量の L-Dopa を再投与した。それぞれの実験の間は、L-Dopa は投与しなかった。その間に対応側肢の hypokinesia は持続的に観察された。L-Dopa 投与40分後に徐々に左上下肢の hypokinesia が改善し、その運動改善は投与後12時間程持続した。その間、左上下肢のジスキネジアは全く誘発されなかった。また、L-Dopa 投与1時間後より短時間の口舌部のジスキネジアが認められたが、その後は全く認められなかった。L-Dopa 投与12時間後ぐらいから徐々に、hypokinesia は再出現した(図4, 3段目)。

この効果の持続の有無の確認のために、さらに最初の CLT 投与18日後に同量の L-Dopa を再投与した。この期間には L-Dopa は投与せず対応側肢の hypokinesia も持続していた。今回は、L-Dopa 単独投与の時と全く同様の症状が観察された。即ち L-Dopa 投与40分後からの運動改善と、それに続く四肢および口舌部のジスキネジアの誘発と、次に正常に近い対応側肢の運動状態の後 hypokinesia が出現するという状態が観察された(図4, 最下段)。また興奮状態の程度も同様であった。さらに CLT の投与20日後、即ちこの L-Dopa 投与の2日後に L-Dopa を再投与したところ、全く同様の反応が得られた。これによって、再び L-Dopa によってジスキネジアが誘発された時は、それ以降 CLT を与えない限り同様のジスキネジアが誘発されることが確認できた。

この一連の検討により50 $\mu$ g/kgの CLT 一回単独筋注は、その直後から少なくとも9日間は L-Dopa によるジスキネジアの誘発を抑制し、さらに L-Dopa 投与後約12時間は hypokinesia は改善していることが明らかになった。また、その作用は18日目には完全に消失していることが判明した。

### (3) 50ng/kgの CLT の効果

次に最初に投与した量の1/1000に相当する50ng/kgの CLT にて、末梢投与の効果について検討した。CLT を筋注したところ、やや鎮

静状態となった。hypokinesia は改善しなかった。CLT 投与20分後に130mg/kgの L-Dopa を経口投与した。投与40分後頃より hypokinesia は徐々に改善したが、その一見正常状態の後に左上下肢、口舌ともにジスキネジアが6時間ほど誘発された。再び小時間の正常に見える状態の後に hypokinesia となった。この反応は L-Dopa 単独投与の時と全く同じであった。さらに長期効果の有無の確認のために4日後に再び同量の L-Dopa を投与した。L-Dopa 再投与にて、L-Dopa 単独の時と全く同様の反応が得られた。以上の結果より50ng/kgの CLT 筋肉内投与では、大量の L-Dopa 投与により誘発されるジスキネジアを抑制する効果は、投与後もまた長期的にも認められないことが確認された。

## 2) M2 monkey study

### (1) L-Dopa-induced dyskinesia

このサルに L-Dopa 100mg/kgを経口投与すると、無動を呈していた左上下肢を約1時間後より良く動かす様になりほぼ正常運動となった。間もなく左上下肢に10時間程度続く、

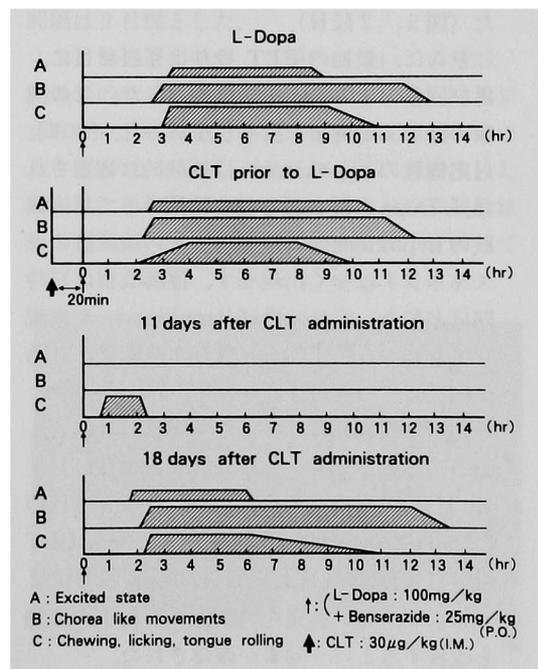


図5 M2 monkey における CLT 筋注の L-Dopa 誘発ジスキネジアに対する効果

また口舌には8時間ほど続くジスキネジアが誘発された、この後一見正常に見える運動状態を経て、少しずつ左上下肢の hypokinesia が再出現した。このジスキネジアは同量の L-Dopa で毎回再現されることを確認した。興奮状態は、それほど著明には認められなかった。(図5, 最上段)。

#### (2) 30 $\mu$ g/kgの CLT の長期効果

この L-Dopa に良く反応する M2に30 $\mu$ g/kg の CLT を筋注すると、M1同様やや鎮静状態となった。対応側肢の hypokinesia は改善が認められなかった。また、嘔吐、下痢等の他覚的な消化器症状は認められなかった。CLT だけでは対応側肢の hypokinesia が改善しないことを確認した後、CLT 投与20分後に L-Dopa を経口投与した。投与1時間後ぐらいから hypokinesia は軽減し、運動は正常化してきた。その少し後に、四肢、口舌ともにジスキネジアが出現し CLT を投与しない時と全く同様のジスキネジアが10時間ほど観察された。この結果より、投与直後の CLT はこのサルにおいては大量の L-Dopa により誘発されるジスキネジアは抑制しないことが判明した(図5, 2段目)。

さらに、最初の CLT 投与より11日目に、再び同量の L-Dopa を経口投与した。この実験の間は L-Dopa を投与しなかった。その間、対応側肢の hypokinesia は持続的に観察された。L-Dopa の経口投与後1時間ほどで対応側肢の hypokinesia は改善し、その後四肢のジスキネジアは全く出現せず、運動改善は15時間ほど続き、徐々に再び hypokinesia が出現してきた。また L-Dopa 投与1時間後から約1時間ほど口舌のジスキネジアが出現したが、その後は観察されなかった(図5, 3段目)。CLT 投与11日目の L-Dopa 単独投与に対する M2の反応は、M1の CLT 投与9日目の L-Dopa 投与の反応に酷似していた。即ち、CLT 投与11日目には、CLT は L-Dopa 投与によるジスキネジア誘発を抑制し、なおかつ運動を改善するという効果が確認された。

この長期効果の確認のため、CLT 投与18日目に再び同量の L-Dopa を投与した。この際

の L-Dopa 投与においては、CLT を投与する前の L-Dopa 単独投与の時とほぼ同じジスキネジアが誘発され、CLT 投与18日目には L-Dopa 投与によるジスキネジア抑制の効果は消失していることが確認された(図5, 最下段)。さらに CLT 投与22日後にも L-Dopa 単独投与で同様のジスキネジアが誘発された。

このサルでは、L-Dopa により誘発されるジスキネジアに対する CLT の抑制効果の発現は遅発性であり、またその効果は11日以上持続し、18日目にはその効果は消失していた。

## 2. 中枢投与の CLT の効果

### 1) DA-induced dyskinesia

中枢での CLT の作用をみる目的で、まず M2 monkey の VMT 破壊側の尾状核背内側部に DA を微量注入し誘発されるジスキネジアの程度および時間を観察した。10 $\mu$ g/kg, 40 $\mu$ g/kg の DA を直接投与した。40 $\mu$ g/kg (4 $\mu$ l) の場合、2ないし3分後から対応側肢の運動改善が認められたが、約5分後には対応側肢および口舌のジスキネジアが誘発された。口舌ジスキネジア

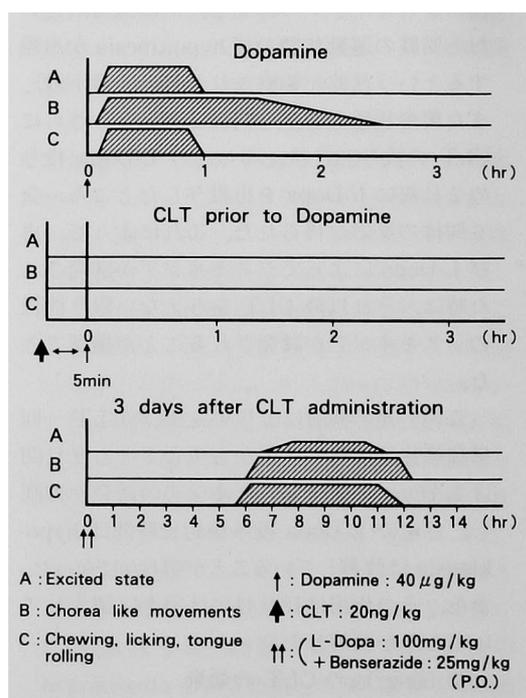


図6 M2 monkey における尾状核頭部背内側部に直接注入した CLT の DA および L-Dopa 誘発ジスキネジアに対する効果

は、約1時間後には消失したが、対応側肢のジスキネジアは1時間30分ほど激しく続いた後、徐々に消失し2時間30分後には消失した(図6, 最上段)。このジスキネジアは L-Dopa を経口投与した時と同じ部位に出現し、同程度のものであったが、持続は約2時間であった。また、10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の DA 投与の場合、同様のジスキネジアが誘発されたが持続時間は対応側肢において約1時間であった。DA の用量に依存してジスキネジアの持続時間が延長することも確認された。

## 2) CLT の中枢投与の効果

### (1) 20ng/kg の CLT の効果

DA 投与と同じ方法にて20ng/kg (2  $\mu\text{l}$ ) の CLT を同部に直接注入した。その直後より鎮静状態となり、対応側肢は hypokinesia のままであった。

その5分後に40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の DA を注入した。左上下肢の無動状態はその後約2時間つき、約3時間後から対応側肢を良く動かさし運動に左右差もなくなり、その状態が3時間程続いた。即ち、DA 投与後にジスキネジアは全く誘発されず、3時間後から約3時間にわたる運動状態の改善が確認された。その後、徐々に対応側肢の hypokinesia が出現した(図6, 中段)。

この尾状核内に直接投与した CLT の長期効果の有無を検討するため、3日後に L-Dopa 100mg/kg を経口投与した。投与1時間後より hypokinesia は改善した。投与6時間後ぐらまでは、運動状態の改善が認められていたのみであったが、投与6時間後ぐらから約6時間ほど四肢、口舌部ともジスキネジアが誘発された(図6, 下段)。その後、一見正常に見える状態の後、再び hypokinesia が認められた。これはこのサルに L-Dopa だけを投与した時と比べ、ジスキネジアは約半分の持続時間しかなく、またジスキネジアが誘発されるまでは対応側肢の運動が改善していたことから、20ng/kg の中枢直接投与した CLT の効果がまだ残存していたと考えられる結果であった。

### (2) 10pg/kg の CLT の効果

さらにごく微量の CLT の中枢直接投与に

ついて検討した。最初の投与量の1/2000の量に相当する10pg/kg (2  $\mu\text{l}$ ) の CLT を直接投与したところ、直後よりやや鎮静状態となり対応側肢の hypokinesia は同様であった。その5分後に DA を前回と同様40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与した。対応側肢の運動改善は認められたが、ジスキネジアは全く誘発されなかった。また、口舌ジスキネジアも誘発されなかった。

この微量の CLT の長期効果の有無の確認のため、その3日後に L-Dopa 100mg/kg を経口投与した。投与2時間後より、約10時間続くジスキネジアが口舌、四肢ともに誘発され、L-Dopa 単独の時と同様の反応が得られた。この結果より、このような微量では、L-Dopa 大量投与により誘発されるジスキネジアに対しては、直後は抑制効果を持つものの、3日後には効果が持続していないことが証明された。

3. CLT 単独投与のサルに及ぼす影響  
さらに CLT 単独のサルに及ぼす効果についても検討した。3頭の無処置のサルと、M1, M2を除き、VMT 破壊を持つ4頭のサルについて検討した。CLT の末梢投与量は、すべて50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  とした。1回目の投与と2回目の投与の間隔は2日間とした。

1) 無処置のサル(3頭)についての検討  
無処置のサルは大量の L-Dopa を投与してもジスキネジアは誘発されず、わずかに興奮したにとどまった。これらのサルに CLT を筋注したところ、その後15分から30分ほどやや鎮静状態となった。しかしすべてのサルは、すわって



図7 M2 monkey における中脳前額断の Hematoxylin-Eosin 染色

眼は開けており、30分後には両手で餌を取ることができた。実験中を通じ hypokinesia やカタレプシー等は観察されなかった。また、嘔吐や下痢等のはっきりした腹部消化器症状は認められなかった。その3日目に同量の CLT を再投与しても同様の反応であった。顔面紅潮が CLT 投与後30分で、2頭にそのつど認められたが、行動面では全く変化を認めなかった。

#### 2) VMT lesioned monkey についての検討

L-Dopa によって口舌のジスキネジアが誘発される2頭のサルにおいて、CLT を投与しても口舌ジスキネジアは誘発されなかった。また対応側肢の hypokinesia は変化が認められなかった。3日目に CLT を再投与しても、同様の反応であった。

また、L-Dopa により口舌にも四肢にもジスキネジアが誘発されなかった2頭においては、CLT による反応はみられず、そのうち1頭は CLT 投与の度に30分後に嘔吐した。それらの検討結果により、CLT 単独では DA 欠乏状態に認められる hypokinesia やカタレプシー等は生じさせないことが判明した。またジスキネジアも CLT 単独では誘発されないことも確認された。さらに他覚的に分かる嘔吐、下痢等の明らかな腹部消化器症状は、この1頭だけに繰り返し認められた嘔吐のみで、実験に用いた9頭中8頭には何らの症状も認められなかった。

#### 4. 組織学的検索

実験終了後、M1およびM2のサルについて、形態的な検討を行った。VMT 破壊巣の大きさは、中脳前額断で2mm × 3mmで黒質背内側部から、一部赤核にかかり、黒質よりその遠心性線維が収束していると思われる部位にあった(図7)。また、尾状核頭部に埋め込んだカニューレの先端は、目標とする位置にあった。

### 考 察

本研究において一側の VMT を破壊したサルパーキンソン病モデルを用いた一連の検討で、CLT は末梢投与でも中枢直接投与でも L-Dopa および DA 投与により誘発されるジスキネジアに対して長期的に抑制することが確認された。また L-Dopa および DA による対応側肢の無動

症の改善は、CLT のジスキネジア抑制期間中においても認められた。尾状核背内側部への直接注入による CLT が、経口 L-Dopa によるジスキネジアを抑制したことは、CLT の作用の場がこの部位に存在することを示しており、同部がジスキネジア発現に重要な役割を果たしていることの確認となったばかりでなく、CLT の主な脳内作用部位も初めて明らかになったものと思われる。

ところで CCK-8 のアナログである CLT の中枢神経系における作用は、CCK レセプターを介して働くものと考えられている。この CCK のレセプターは末梢型 (A 型) と中枢型 (B 型) の2種のサブタイプに分類されている。中枢神経系においては、A 型レセプターは最後野孤束核、脚間核等のごく限られた部位に存在するのみで、そのほとんどが B 型であり、これは小脳、線条体、側頭葉に多く存在している<sup>4,29)</sup>。線条体における CLT の B 型レセプターを介する作用は DA の放出抑制であり<sup>30)</sup>、また B 型レセプター拮抗薬を用いたサルのジスキネジアに対する検討<sup>31)</sup>などから、CLT の効果も B 型レセプターを介したものではないかと思われる。この CCK レセプターは線条体においては、そのほとんどは介在ニューロンにあることが示されている<sup>2)</sup>。また黒質への 6-OHDA の注入では、黒質と線条体で CCK レセプターの量的変化がなく<sup>32)</sup>、さらに線条体での CCK の mRNA の量も変化しない<sup>33)</sup>。さらに、パーキンソン病患者において黒質の CCK は著明に低下しているものの尾状核、被殻、淡蒼球では低下しておらず<sup>11)</sup>、MPTP 投与の動物モデルにおいても線条体での CCK の低下は認められていない<sup>34)</sup>。以上のことから線条体での CCK 系は、中脳 DA 系からのコントロールは受けていないことが示唆されている。今後、どのような調節により CCK と DA 系の相互作用が発揮されるかさらに検討が必要と思われる。

サルの VMT に破壊巣を作成すると、この部を通過する動眼神経根線維の他、黒質一線条体 DA 線維、dorsal raphe からのセロトニン線維、赤核からの遠心線維および結合腕線維の一部が破壊されるが、この部位の破壊による CCK 含

有細胞の障害の有無についての検討が必要であろう。またジスキネジアに対し CLT が尾状核背内側部において効果を発揮した結果からも、今後さらに、尾状核、被殻、淡蒼球内でのより詳細な部位局在的な CCK のレセプターの量の変化や感受性亢進の解明が必要と思われる。

一方、パーキンソン病の病態や不随意運動に深く関係している DA レセプターの一つである  $D_2$  受容体は、サブスタンス P, GABA, アセチルコリン, エンケファリン含有ニューロンに存在していることが明らかになっている。従って黒質線条体ニューロンはこれらのニューロンを介して種々の機能を発揮しているものと想定される。本実験では、L-Dopa 経口投与でも尾状核背内側部に DA を注入した場合でも、同様のジスキネジアが誘発された。これは、L-Dopa 負荷による DA の主な作用部位が、尾状核背内側部に存在していることを示している。この尾状核背内側部への種々の伝達物質の注入や受容体の検討から、この部位の  $D_2$  受容体の感受性亢進がジスキネジア発現の基盤になっている事が明らかになっている<sup>23,24)</sup>。即ち、パーキンソン病モデルにおける無動症は DA 系の機能低下によるものであり、L-Dopa によるジスキネジアは、尾状核  $D_2$  受容体の感受性亢進に基づく DA 系の機能亢進によるものと考えられる。今回の実験でも、尾状核背内側部への DA 投与によって無動症が改善し、かわってジスキネジアが出現した。しかし CLT の局所投与は DA による無動症の改善効果にほとんど影響を与えることなく、ジスキネジアの発現を抑制した。この結果は、無動症とジスキネジアの発現が同一細胞系における機能の低下と亢進という機序だけでは説明できない。

サルにジスキネジアが出現するのは、L-Dopa を数日間以上にわたって連続投与した後である。また、いったんジスキネジアが完成すると、その後は一定期間経過した後でも、投与量が一定である限り同じ運動を再現させることが可能である。これは denervated receptor の存在する線条体において、ジスキネジアの発現に一定の神経回路の完成が必要なることを示唆している。本実験からも、尾状核背内側部がジスキネジア

の発現のインパルスの起点と思われる。また、それからの重要な投射部位は、破壊により四肢のジスキネジアが出現しなくなる視床の腹外側 (VL) 核と考えられている<sup>23)</sup>。

最近、MPTP によるサルパーキンソン病モデルにおいて、視床下核の破壊後に無動症が改善したとの報告がある<sup>35)</sup>。視床下核は淡蒼球外節部から抑制的インパルスを受け、淡蒼球内節部にインパルスを送りだしている。最終的な視床 VL 核への投射部位である淡蒼球内節部へは、線条体からの直接入力と淡蒼球外節、視床下核を通じた間接的入力の両方が入って来ている。一方、本研究の実験的ジスキネジアと症候学的に極めて類似しているハンチントン病患者において、CCK は尾状核、被殻では減少していないが淡蒼球では正常と比べ半減していると報告されている<sup>12)</sup>。

本実験で、正常のサルに CLT を単独投与しても DA 拮抗剤を投与した時のような無動状態にはならなかったことから、CLT の効果は直接的に DA の放出を抑制したり、DA の効果を後シナプス性に遮断してしまうような単純なものではないことが推察される。

以上のことより、CLT と L-Dopa 併用において、無動症の改善とジスキネジアの抑制という両方の効果が認められたことは、尾状核からの淡蒼球内節内への直接および淡蒼球外節部一視床下核を経由した間接的な情報の調節異常の結果生じたジスキネジア神経回路網に、両物質が複合的に作用した可能性が考えられる。すなわち、L-Dopa 投与による効果は線条体  $D_2$  受容体を介して発揮されるが、無動症の改善とジスキネジア発現の神経回路は異なったものと考えられ、CLT は後者の回路網を選択的に抑制した結果ではないかと推察される。

種々の不随意運動を示す臨床例の報告においては、0.8mg/kg の筋注によって多くの例では、一週間以上の効果が認められている<sup>15-18)</sup>。臨床治験例では、筋肉内投与後15分から30分後に血中濃度は最高に達し、一時間後には血中から消失してしまうことが分かっており<sup>36)</sup>、さらに詳しいラジオイムノアッセイでも、6時間後には完全に血中からは消失してしまうことが動物実験

でも明らかになっている<sup>37)</sup>。血中からの消失速度は、本研究の CLT 末梢投与実験で得られた何日間にもわたって効果が持続していることとは関連していない。この長期効果の詳しい機序は、現在まで動物モデルがなかったことなどから、はっきりと証明する研究はなされていない。例えば、ラットにおいてはアンフェタミンによる機能亢進に対する CLT の長期抑制実験の結果も、同じ投与方法にも関わらず全く正反対の結果が報告されている<sup>26,38)</sup>。これはラットにおいては、サルやヒトのように DA 系の機能亢進を示すジスキネジアなどが誘発されず、長期効果を見るための評価の指標やモデル作製に問題があるためと思われる。

本実験で M1 と M2 のサルでは、CLT の末梢投与 9 日目あるいは 11 日目のジスキネジアに対する効果は類似していたものの、CLT 投与 20 分後に投与した L-Dopa に対する反応は全く異なった結果であった。これは L-Dopa に対する個々の反応の違いがあるように、CLT の効果にもそれぞれが発揮されるまでの時間に個体差があるものと考えられる。臨床報告でも、CLT の筋注後その翌日から効果が認められる例が多く、投与直後は却って症状は増悪し、その後改善する症例等もあり、その改善の時期には個人差があるとされている。この遅発性の効果発現はその効果の機序も含めて今後さらに検討が必要であろう。

ところで、この CLT の長期効果の説明として中枢神経系における代謝時間の長さが考えられている。内因性のペプチドである CCK は、その代謝時間は従来から認められているアミン類のニューロトランスミッターや、ペプチドではあるが半減期が数分であるエンケファリン<sup>39)</sup>などと異り、その代謝時間は極めて長く、その半減期は 16 時間とされている<sup>40)</sup>。さらに CCK-8 のアナログとして開発された CLT は中枢神経系内で最初に分解される部位の構造が異なることなどから、CCK-8 より分解を受けにくいことが示唆されている<sup>41,42)</sup>。また、動物実験において、CLT の投与による髄液中のエンドルフィンの持続的な増加が認められており<sup>43)</sup>、これらの二次的に産生される物質が関与して総合的な結果とし

て非常に長期にわたる効果が発揮される可能性も考えられている。

CCK や CLT をはじめ一般にペプチドは血液脳関門を通過しにくいといわれており<sup>44)</sup>、それらを末梢投与した際の作用点が中枢神経系内にあるかどうか疑問視されている。CLT は迷走神経を介して効果が発揮されるとの報告も多い<sup>45,46)</sup>。しかし迷走神経切断によっても、その中枢効果が完全に消失しないという報告が、黒質線条体の機能を示標とした生理学的実験においても<sup>47)</sup>、ラットを用いた動物実験においても認められており<sup>48)</sup>、末梢投与した CCK や CLT の効果は、すべてが迷走神経を介したものではないと考えられている。

今回の実験において、L-Dopa 経口投与および DA の尾状核内直接注入によって誘発されるジスキネジアが、CLT の末梢投与あるいは尾状核内の局所投与によって抑制された。また、DA の過剰状態として出現するジスキネジアを抑制し、また同時に無動症の改善という DA の効果に対しては影響を与えなかった。さらに尾状核内の CLT 微量注入でも長期間の抑制効果が認められたこと等、末梢投与の CLT と中枢投与の CLT は同じ薬理作用を発揮したと考えられる。また今回投与した 10 pg/kg の局所投与量は、現在の血液から脳内に物質が移行する有無を調べる最も精密なラジオイムノアッセイの最小測定可能量よりもさらに少量に当たる量である。即ち末梢投与された CLT が脳内に移行したかどうか判定出来ないほどの微量でも尾状核内では効果を発揮しうるものと思われる。以上のことから、末梢投与された CLT はごく少量であるが、効果を発揮するに十分な量が脳に移行し、中枢内で長期的な効果を発揮するものと考えられる。

また本実験結果から、CLT の効果持続は用量依存性に延長することを示唆しているものの、単純に量に正比例するというものではないので、より詳細に検討する必要があると思われる。また、臨床例においては、CLT の副作用である腹痛、下痢などのため 1 回の投与量は 0.8 μg/kg と実験に用いた量より少ない量しか与えることができない<sup>17,18)</sup>。また、このような少量 (平均 0.9 μg/kg) の CLT では、L-Dopa 治療中のパーキ

ンソン病患者に対して投与後60分間の短時間観察では、無動症、ジスキネジアに対してははっきりした効果を認めないと報告されている<sup>36)</sup>。今回の実験で CLT を大量投与した場合でも、投与後60分まではなんらの効果も認められなかった。効果発現の遅延もペプチドの特徴かもしれない。

今後臨床応用のためには投与方法の改良なども考慮されねばならないであろう。1回の投与で長期間にわたって運動症状の改善とジスキネジアの抑制という効果が期待出来る点は臨床例に応用するに当たって極めて有用であり、今後さらに DA との相互作用、その長期効果の詳細な機序、血液脳関門の通過性等の解明が望まれる。

## 結 論

一側中脳腹内側被蓋野に小破壊巣を作成し、対応側肢に無動症が生じ、L-Dopa 経口投与および DA の尾状核内投与で口舌および対応側肢にジスキネジアが誘発されるサルの不随意運動モデルを用いて、CCK-8のアナログとして開発された CLT と DA との相互作用を、これらの無動症とジスキネジアを指標にして検討した。

1. 末梢投与した CLT は DA 欠乏状態である hypokinesia は改善させなかったが、L-Dopa で誘発されるジスキネジアを抑制し、その間 L-Dopa による無動症の改善には影響を与えなかった。CLT 1回投与後のジスキネジア抑制および無動症改善の効果は、少なくとも9ないし11日間持続した。

2. 尾状核頭部背内側部に直接投与した CLT は、DA および L-Dopa で誘発されるジスキネジアを抑制した。CLT の効果の持続は、用量依存性であった。

3. 末梢投与した CLT と尾状核頭部背内側部に直接投与した CLT の効果は以下の点で、極めて類似していた。すなわち、CLT 単独では hypokinesia は改善せず、L-Dopa および DA で誘発されるジスキネジアを抑制し、その間の無動症は改善した。以上のことから、末梢投与した CLT も直接中枢に到達して効果を發揮している可能性が示唆された。

4. 以上より、CLT はパーキンソン病モデルにおいて、DA による hypokinesia の改善には影響を与えずジスキネジアのみを抑制するという特徴が認められたが、これは、DA 放出の抑制、D<sub>2</sub>レセプターの supersensitivity の抑制とは異なる部位で、作用を發揮するものと考えられた。また末梢投与の CLT は極めて微量が脳内に移行し、その作用部位は尾状核背内側部を中心とした領域であると考えられた。長期効果の機序については、脳内での代謝時間の長さや二次的産物の関与が考えられるが、今後の検討が必要と思われる。

稿を終えるに臨み、終始御懇切なる御指導、御校閲を賜った岡山大脳神経外科大本堯史教授ならびに直接御指導、御助言を頂きました香川医科大学生理学畠瀬 修教授、板野俊文博士に深く感謝の意を捧げます。

## 文 献

- 1) Beinfeld MC, Meyer DK, Eskay RL, Jensen RT and Brownstein MJ: The distribution of cholecystokinin immunoreactivity in the central nervous system of the rat as determined by radioimmunoassay. *Brain Res* (1981) **212**, 51-57.
- 2) Hays SE, Meyer DK and Paul SM: Localization of cholecystokinin receptors on neuronal elements in rat caudate nucleus. *Brain Res* (1981) **219**, 208-213.
- 3) Gaudreau P, Quirion R, St-Pierre S, Chiueh CC and Pert A: Localization of cholecystokinin receptors in relation to the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Neuropeptides* (1987) **9**, 283-293.
- 4) Moran TH, Robinson PH, Goldrich MS, and Mchugh PR: Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions. *Brain Res* (1986) **362**, 175-179.

- 5) Larsson L-I and Rehfeld JF : Localization and molecular heterogeneity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system. *Neurosci Lett* (1979) **6**, 127—135.
- 6) Hökfelt T, Rehfeld JF, Skirboll L, Ivemark B, Goldstein M and Markey K : Evidence for coexistence of dopamine and CCK in meso-limbic neurones. *Nature* (1980) **285**, 476—478.
- 7) Crawley JN, Hays SE, Paul SM and Goodwin FK : Cholecystokinin reduces exploratory behavior in mice. *Physiol Behav* (1981) **27**, 407—411.
- 8) Kovács GL, Szabó G, Penke B, Telegdy G : Effects of cholecystokinin octapeptide on striatal dopamine metabolism and on apomorphine-induced stereotyped cage-climbing in mice. *Eur J Pharmacol* (1981) **69**, 313—319.
- 9) Morency MA, Ross GM, Hesketh D and Mishra RK : Effects of unilateral intracerebroventricular microinjections of cholecystokinin (CCK) on circling behavior of rats. *Peptides* (1987) **8**, 989—995.
- 10) Itoh S and Katsuura G : Suppressive action of cholecystokinin octapeptide on the behavioral effects of L-Dopa in the rat. *Eur J Pharmacol* (1981) **75**, 313—316.
- 11) Studler JM, Javoy-agid F, Cesselin F, Legrand JC and Agid Y : CCK-8-immunoreactivity distribution in human brain : selective decrease in the substantia nigra from parkinsonian patients. *Brain Res* (1982) **243**, 176—179.
- 12) Emson PC, Rehfeld JF, Langevin H and Rossor M : Reduction in cholecystokinin-like immunoreactivity in the basal ganglia in Huntington's disease. *Brain Res* (1980) **198**, 497—500.
- 13) Hays SE, Goodwin FK and Paul SM : Cholecystokinin receptors are decreased in basal ganglia and cerebral cortex of Huntington's disease. *Brain Res* (1981) **225**, 452—456.
- 14) Verbanck PMP, Lotstra F, Gilles C, Linkowski P, Mendlewicz J and Vanderhaeghen JJ : Reduced cholecystokinin immunoreactivity in the cerebrospinal fluid of patients with psychiatric disorders. *Life Sci* (1984) **34**, 67—72.
- 15) Nishikawa T, Tanaka M, Koga I and Uchida Y : Biphasic and long-lasting effect of ceruletide on tardive dyskinesia. *Psychopharmacology* (1985) **86**, 43—44.
- 16) Nishikawa T, Tanaka M, Tsuda A, Kuwahara H, Koga I and Uchida Y : Effect of ceruletide on tardive dyskinesia : a pilot study of quantitative computer analyses on electromyogram and microvibration. *Psychopharmacology* (1986) **90**, 5—8.
- 17) 大本堯史, 三野章典 : 諸種不随意運動に対する ceruletide の長期臨床効果 ; 神経ペプチドの基礎と臨床, 厚生省新薬開発研究, 神経ペプチドによる精神神経障害治療薬の開発研究班, 昭和62年度研究成果報告書, 祖父江逸郎編, 中京出版, 名古屋 (1988) pp 386—392.
- 18) 大本堯史, 三野章典 : 不随意運動症特に振戦に対する ceruletide の臨床効果 ; 神経ペプチドの基礎と臨床, 厚生省新薬開発研究, 神経ペプチドによる精神神経障害治療薬の開発研究班, 昭和63年度研究成果報告書, 祖父江逸郎編, 中京出版, 名古屋 (1989) pp 339—343.
- 19) Poirier LJ : Experimental and histological study of midbrain dyskinesias. *J Neurophysiol* (1960) **23**, 534—551.
- 20) Poirier LJ, Péchadre JC, Larochelle L, Dankova J and Boucher R : Stereotaxic lesions and movement disorders in monkeys ; in *Advances in Neurology*, vol 10, Meldrum BS and Marsden CD eds, Raven Press, New York (1975) pp 5—22.
- 21) 大本堯史 : サルにおける実験的振戦と舞蹈病様不随意運動. *神経進歩* (1975) **19**, 592—603.
- 22) 大本堯史, 松本祐蔵, 中村成夫 : L-Dopa induced dyskinesia *神経進歩* (1981) **25**, 23—37.
- 23) 大本堯史, 桜井 勝 : パーキンソンニズムにおけるジスキネジア — その基礎と臨床 —. *神経薬理* (1985) **7**, 795—807.

- 24) Ohmoto T : Experimental study on resting tremor and L-dopa-induced dyskinesia. *Eur Neurol* (1987) **26** (suppl. 1), 47—55.
- 25) Kusama T and Mabuchi M : Stereotaxic atlas of the brain of *Macaca fuscata*. University of Tokyo Press, Tokyo (1970).
- 26) Matsubara K and Matsushita A : Long-lasting reduction of amphetamine-induced hyperactivity in rats after combined administration of caerulein with haloperidol. *Eur J Pharmacol* (1984) **101**, 157—158.
- 27) Boyce S, Rupniak NMJ, Steventon M and Iversen SD : CCK-8S inhibits L-dopa-induced dyskinesias in parkinsonian squirrel monkeys. *Neurology* (1990) **40**, 717—718.
- 28) Vaccarino FJ and Koob GF : Microinjections of nanogram amounts of sulfated cholecystokinin octapeptide into the rat nucleus accumbens attenuates brain stimulation reward. *Neurosci Lett* (1984) **52**, 61—66.
- 29) Hill DR, Shaw TM, Dourish CT and Woodruff GN : CCK-A receptors in the rat interpeduncular nucleus : evidence for a presynaptic location. *Brain Res* (1988) **454**, 101—105.
- 30) Altar CA and Boyar WC : Brain CCK-8 receptors mediate the suppression of dopamine release by cholecystokinin. *Brain Res* (1989) **483**, 321—326.
- 31) Boyce S, Rupniak NMJ, Tye S, Steventon MJ and Iversen SD : Modulatory role for CCK-8 antagonists in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* (1990) **13**, 339—347.
- 32) Beresford IJM, Davenport AP, Sirinathsinghji DJS, Hall MD, Hill RG and Hughes J : Experimental hemiparkinsonism in the rat following chronic unilateral infusion of MPP<sup>+</sup> into the nigrostriatal dopamine pathway -II. Differential localization of dopamine and cholecystokinin receptors. *Neuroscience* (1988) **27**, 129—143.
- 33) Savasta M, Ruberte E, Palacios JM and Mengod G : The colocalization of cholecystokinin and tyrosine hydroxylase mRNAs in mesencephalic dopaminergic neurons in the rat brain examined by in situ hybridization. *Neuroscience* (1989) **29**, 363—369.
- 34) Jenner P, Taquet H, Mauborgne A, Benoliel JT, Cesselin F, Rose S, Javoy-Agid F, Agid Y and Marsden CD : Lack of change in basal ganglia neuropeptide content following subacute 1-Methyl-4-Phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine treatment of the common marmoset. *J Neurochem* (1986) **47**, 1548—1551.
- 35) Bergman H, Wichmann T and DeLong MR : Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* (1990) **249**, 1436—1438.
- 36) Bruno G, Ruggieri S, Chase TN, Bakker K and Tamminga CA : Caerulein treatment of Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* (1985) **8**, 266—270.
- 37) Kominami G, Mori S, Sagawa K, Igano K, Inoue K and Kono M : A highly specific and sensitive radioimmunoassay of caerulein, an analogue of cholecystokinin-8. *J Immunoassay* (1988) **9**, 229—243.
- 38) Mueller K, Peel JL and Rewey KL : Effects of caerulein+haloperidol on amphetamine-induced locomotor stereotypy in rats. *Life Sci* (1989) **44**, 717—724.
- 39) 塩見浩人, 高木博司 : オピオイド・ペプチド—研究の進歩と将来. *神経進歩* (1983) **27**, 479—487.
- 40) Meek JL, Iadarola MJ and Giorgi O : Cholecystokinin turnover in brain. *Brain Res* (1983) **276**, 375—378.
- 41) Steardo L, Knight M, Tamminga CA, Barone P, Kask AM and Chase TN : CCK<sub>26-33</sub> degrading activity in brain and nonneural tissue : a metalloendopeptidase. *J Neurochem* (1985) **45**, 784—790.

- 42) Deschodt-Lankman M, Bui ND, Noyer M and Christophe J : Degradation of cholecystokinin-like peptides by a crude rat brain synaptosomal fraction : a study by high pressure liquid chromatography. *Regul Pept* (1981) **2**, 15—30.
- 43) Matsubara K : Further evidence for  $\beta$ -endorphin involvement in the long-lasting antagonistic effect of caerulein on amphetamine hyperactivity in rats. *Eur J Pharmacol* (1986) **121**, 297—301.
- 44) Passaro E Jr, Debas H, Oldendorf W and Yamada T : Rapid appearance of intraventricularly administered neuropeptides in the peripheral circulation. *Brain Res* (1982) **241**, 335—340.
- 45) Hamamura T, Kazahaya Y and Otsuki S : Ceruletide suppresses endogenous dopamine release via vagal afferent system, studied by in vivo intracerebral dialysis. *Brain Res* (1989) **483**, 78—83.
- 46) Crawley JN, Hays SE and Paul SM : Vagotomy abolishes the inhibitory effects of cholecystokinin on rat exploratory behaviors. *Eur J Pharmacol* (1981) **73**, 379—380.
- 47) Hommer DM, Palkovits M, Crawley JN, Paul SM and Skirboll LR : Cholecystokinin-induced excitation in the substantia nigra : evidence for peripheral and central components. *J Neurosci* (1985) **5**, 1387—1392.
- 48) Moroji T and Hagino Y : Bilateral subdiaphragmatic vagotomy does not prevent the behavioral effects of systematically administered ceruletide in mice. *Neuropeptides* (1987) **9**, 217—224.

**Long-lasting effects of ceruletide on L-Dopa-induced  
dyskinesias in monkey**

**Masayuki MIZOBUCHI**

**Department of Neurological Surgery,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. T. Ohmoto)**

The long-lasting effects of ceruletide (CLT), a cholecystokinin-8 (CCK-8) analogue, on involuntary movements were investigated. Nine monkeys were used. One group (6 monkeys) received unilateral lesions to the ventromedial tegmentum (VMT) of the midbrain. The second group (3 monkeys) served as controls.

Hypokinesia was produced after lesioning of the VMT. Administration of a large amount of L-Dopa or direct intracaudate injection of dopamine (DA) relieved the symptoms initially but then induced dyskinesias later. Two monkeys with reproducible dyskinesias were chosen for further study.

Systemically administered CLT combined with L-Dopa improved the hypokinesia without inducing dyskinesia. These effects of a single dose of 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  CLT continued up to 9 days. Direct combined administration of CLT and DA into the dorsomedial part of the head of the caudate nucleus ipsilateral to the VMT lesion improved the hypokinesia without inducing dyskinesia. The effects of a single direct injection of 20  $\text{ng}/\text{kg}$  CLT persisted for 3 days.

The long-lasting effects of systemically and directly administered CLT were confirmed. These findings suggest that CLT modulates the DA system indirectly through the central CCK system, especially in the dorsomedial part of the head of the caudate nucleus.