

0124 パーキンソン病モデルラットの発症過程における神経機能変化の解析

98-140 沖津 有美

(指導教官：川井 恵一 教授)

要旨 神経変性疾患のひとつであるパーキンソン病の早期診断を目的として、その発症過程にみられる脳内ドーパミン神経路における変化を、パーキンソン病モデルラットを用いて、PET 製剤投与により解析し、画像化した。また、SPECT への応用として、 ^{125}I -AMT や ^{125}I -FTM などの SPECT 製剤の投与により解析した。

解析の結果、大脳皮質や小脳では、いずれにおいても顕著な変化はみられなかった。線条体において、D1 レセプターでは急性期に集積が低下し、発症期に増加した。D2 レセプターでは急性期から集積の増加がみられ、発症期にはさらに増加した。ドーパミン動態では急性期に集積が低下し、発症期に回復の傾向がみられた。アミノ酸膜輸送では発症期に集積が低下する傾向が認められた。ドーパ脱炭酸酵素活性では集積が低下するものが多かったがばらつきが大きく、傾向は両極端であった。

以上の結果より、PET 製剤のみならず SPECT 製剤においても、急性期より神経機能変化を捉え得たことから、これらを指標としたパーキンソン病の早期診断の可能性が示唆された。

I.はじめに

近年、様々な神経変性疾患と脳内代謝機能との関連が注目されており、それらを画像化し、定量的に解析できる放射性医薬品が開発されている。神経変性疾患のひとつであるパーキンソン病では、発症後に脳の黒質線条体におけるドーパミン含有量が顕著に減少するとの報告があり、黒質ドーパミン神経が何らかの原因で選択的に脱落することでその神経機能に変化がおこるとされている¹⁾。D1、D2 レセプター機能の評価にはそれぞれ ^{11}C -SCH23390、 ^{11}C -raclopride などのリガンド、ドーパミン動態の指標にはドーパミン前駆物質のドーパ誘導体である ^{18}F -FDOPA が用いられている²⁾。また、 ^{123}I -3-iodo- α -methyl-L-tyrosine (^{123}I -AMT) は、脳におけるアミノ酸膜輸送機能を選択的に測定し得ることが報告されている^{3, 4)}。さらに ^{123}I -3-iodo- α -difluoromethyltyrosine methyl ester (^{123}I -FTM) による脳内ドーパ脱炭酸酵素活性の画像診断の可能性が示唆されている⁵⁾。発症後の神経機能の変化は、数多く報告されている⁶⁾ が、急性期における変化についての報告は少ない。急性期の神経機能変化を捉えることができれば、パーキンソン病の早期診断が可能となる。

本研究では、パーキンソン病の早期診断を目的として、現在、神経機能の定量解析に用いられている PET 製剤による解析とともに、SPECT 製剤の臨床応用への初期検討を行った。

II.実験方法

1) PET 製剤を用いた検討

①PET 製剤の調整

常法に従い、 ^{11}C -SCH23390、 ^{11}C -raclopride、 ^{18}F -FDOPA を京都大学附属病院のサイクロトロン施設にて調製した。

②ラットの脳内分布実験

6-Hydroxydopamine (6-OHDA) により偏側性 (左側) にドーパミン神経を破壊した Wistar 系雄性ラットの、処置後 3~4 日 (急性期)・14 日目 (発症期) のものについて、ネンブタール麻酔処理後、尾静脈から ^{11}C -SCH23390 (3.5mCi/300 μl)、 ^{11}C -raclopride (2.0mCi/200 μl)、 ^{18}F -FDOPA (150 μCi /1ml) を投与した。一定時間後にヘパリン処理した注射器で心臓穿刺により採血した後、頸椎脱臼により屠殺し、左右の大脳皮質、線条体、小脳を摘出してそれぞれの重量を秤量した。放射能の測定にはオートウェルガンマカウンタ (パッカードインスツルメント 5003) を用いた。

③ラットの頭部断層撮影実験

6-OHDA により偏側性（左側）にドーパミン神経を破壊した処置後 3~4 日目の Wistar 系雄性ラットをネブタール麻酔後、背位に固定し、尾静脈から $^{11}\text{C-SCH23390}$ (5.5 mCi/600 μl)、 $^{11}\text{C-raclopride}$ (6.7mCi/700 μl) を投与した。動物用 PET カメラ（浜松ホトニクス SHR-7700）を用いて投与直後より頭部冠状断層データを 60 分間連続収集した。

2) SPECT 製剤を用いた検討

① $^{125}\text{I-AMT}$ の調製

$^{125}\text{I-NaI}$ は、Amersham 社より購入し、その他の試薬は、試薬特級品を用いた。 $^{125}\text{I-AMT}$ は、chloramine-T 法により作製した。AMT $1.0 \times 10^{-7}\text{mol}$ と無担体 $^{125}\text{I-NaI}$ (37MBq) を含む 100 μl の 0.4M リン酸緩衝液 (pH6.2) に、chloramine-T $1.0 \times 10^{-8}\text{mol}$ (Aldrich) を溶解した 0.05M リン酸緩衝液 (pH6.2) 25 μl を加えた。反応液を 15 分間放置し、当量の飽和ピロ亜硫酸ナトリウムで反応を止めた。精製は Sep Pak C₁₈ plus (Waters) にて行った。Sep Pak C₁₈ plus をエタノール 2ml に続きリン酸緩衝生理液 (PBS) 8ml でコンディショニングした後、反応液を通水した。次に担体の NaI 100 μg を含む PBS 1ml を通水し、さらに PBS 10ml で未吸着化合物を十分に洗浄した。20%エタノールと 50%エタノールを 4ml ずつ通水し、 $^{125}\text{I-L-AMT}$ を溶出した。標識率及び放射化学的純度は以下の条件のシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC, Merck; Art. 5554) を用いて検討した。

TLC 展開溶媒；

メタノール：酢酸 = 100 : 1 (Rf 値 $^{125}\text{I-AMT}$ = 0.45~0.50 ^{125}I = 0.75)

メタノール：10%酢酸アンモニウム = 10 : 1 (Rf 値 $^{125}\text{I-AMT}$ = 0.50~0.55 ^{125}I = 0.80)

② $^{125}\text{I-FTM}$ の調製

$^{125}\text{I-NaI}$ は、Amersham 社より購入し、その他の試薬は、試薬特級品を用い、chloramine-T 法により作製した。FTM $1.0 \times 10^{-8}\text{mol}$ と無担体 $^{125}\text{I-NaI}$ (22.2MBq) を含むエタノール 10 μl に、chloramine-T $1.0 \times 10^{-9}\text{mol}$ を溶解したエタノールを 10 μl 加えた。反応液を 15 分間放置し、当量の飽和ピロ亜硫酸ナトリウムで反応を止めた。精製には①と同様に Sep Pak C₁₈ plus を用いた。溶出は 50%エタノールと 80%エタノール各 4ml で行った。標識率及び放射化学的純度は以下の溶媒系による TLC により確認した。

TLC 展開溶媒；

酢酸エチル：ヘキサン = 1 : 1 (Rf 値 $^{125}\text{I-FTM}$ = 0.30~0.35 ^{125}I = 0.10)

クロロホルム：メタノール：酢酸 = 400 : 200 : 1 (Rf 値 $^{125}\text{I-FTM}$ = 0.75~0.80 ^{125}I = 0.60)

③ラットの脳内分布実験

6-OHDA により偏側性（左側）にドーパミン神経を破壊した Wistar 系雄性ラットの、処置後 3 日・14 日目のものについて、ネブタール麻酔処理後、尾静脈から $^{125}\text{I-AMT}$ (10 $\mu\text{Ci}/100\mu\text{l}$)、 $^{125}\text{I-FTM}$ (5 $\mu\text{Ci}/100\mu\text{l}$ ~10 $\mu\text{Ci}/200\mu\text{l}$) を投与した。一定時間後にヘパリン処理した注射器で心臓穿刺により採血した後、頸椎脱臼により屠殺し、左右の大脳皮質、線条体、小脳を摘出してそれぞれの重量を秤量した。放射能の測定にはオートウェルガンマカウンタ（アロカ ARC-1000M）を用いた。

III. 結果と考察

1) PET 製剤を用いた検討

①パーキンソン病モデルラットにおける脳内分布

Fig.1 には $^{11}\text{C-SCH23390}$ 、 $^{11}\text{C-raclopride}$ 、 $^{18}\text{F-FDOPA}$ の脳内各部位における、無処置側に対する処置側の集積比を示す。いずれの投与においても他部位に比べ、線条体における集積の変化は顕著であった。 $^{11}\text{C-SCH23390}$ の投与では、大脳皮質、小脳に顕著な変化はみられなかった。線条

体では急性期に低下し、発症期には逆に増加した。 ^{11}C -Raclopride の投与では、大脳皮質、小脳に変化はなかった。線条体では急性期から大きな増加がみられ、発症期にはさらに増加した。 ^{18}F -FDOPA の投与では、大脳皮質、小脳に多少の変化が認められた。線条体では急性期に低下し、発症期に回復する傾向がみられた。線条体における各機能変化をまとめると、急性期から発症期にかけて、D1 レセプターでは一旦低下して増加に転じた。D2 レセプターでは増加を続け、ドーパミン動態では低下した後回復の様子がうかがえた。D1 レセプター、D2 レセプター、ドーパミン動態それぞれの機能によって集積の変化の仕方は異なっていた。つまり、個々の神経機能の経時変化は一様ではなく、それぞれ特徴ある変化を示すことが判明した。この結果より、急性期から発症期にかけて脳内の神経機能に変化が起っており、上述の PET 製剤でその変化が検出し得る可能性が示された。

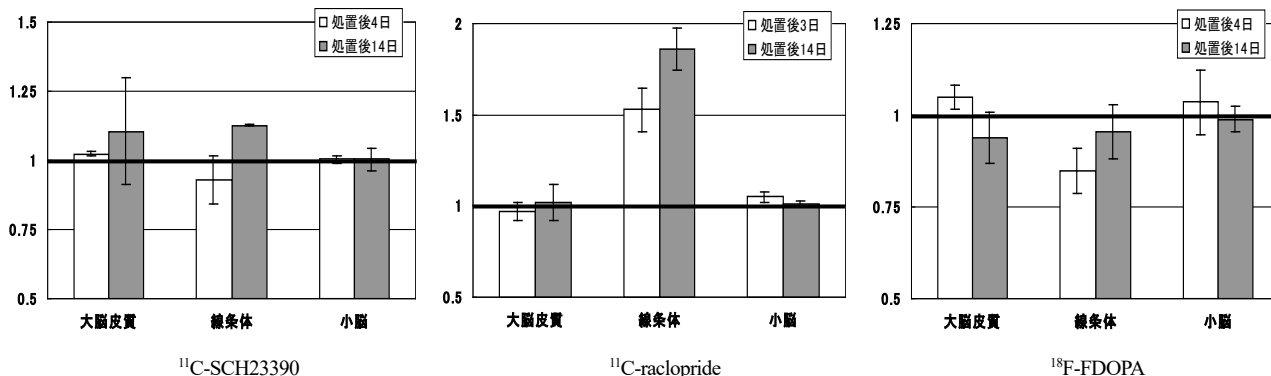


Fig.1 各組織における無処置側に対する処置側の集積比

②パーキンソン病モデルラットにおける頭部断層撮影

Fig.2 は ^{11}C -SCH23390、 ^{11}C -raclopride 投与後のラットの頭部冠状断層像である。ラットを背位に固定したことから、頭頂部が下になっている。 ^{11}C -SCH23390 の投与では、どちらのラットも左脳側、つまり処置側の線条体で集積が相対的に低下していた (A,B)。 ^{11}C -Raclopride の投与では、C はハーダー腺が重なっているため見にくい画像になっているが、線条体周辺に注目すると、どちらも処置側である左脳の線条体における集積が相対的に高くなっていた (C,D)。これは定量解析の結果と一致しており、機能変化を画像検出し得ることが確認できた。

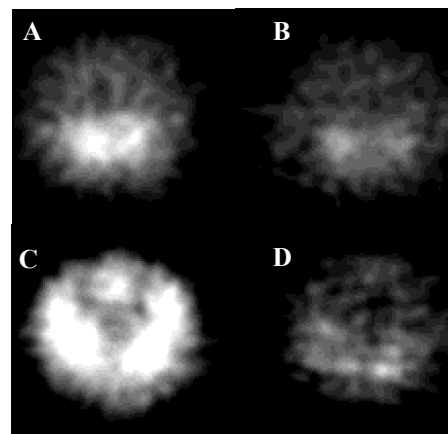


Fig.2 PET によるラットの頭部冠状断層像(n=2)

- A: ^{11}C -SCH23390 (投与後 50-60 分)
- B: ^{11}C -SCH23390 (投与後 50-60 分)
- C: ^{11}C -raclopride (投与後 30-60 分)
- D: ^{11}C -raclopride (投与後 30-40 分)

2) SPECT 製剤を用いた検討

① ^{125}I -AMT、 ^{125}I -FTM の調製

本研究において、 ^{125}I -AMT、 ^{125}I -FTM の精製は、Sep Pak C₁₈ plus カートリッジにより行った。この方法では、従来の HPLC 法に比べてより簡便で短時間の精製が可能である。標識率は ^{125}I -AMT、 ^{125}I -FTM とともに 71% の高い値が得られた。また、用いる溶出液について、エタノール濃度の条件設定の検討を行った結果、精製後、ともに十分に高い純度 (^{125}I -AMT : 96%、 ^{125}I -FTM : 98%) で得られた。このことから Sep Pak C₁₈ plus による精製法が有用であることが確認された。

②パーキンソン病モデルラットにおける脳内分布

Fig.3 は、 ^{125}I -AMT、 ^{125}I -FTM の各組織における、無処置側に対する処置側の集積比を示す。 ^{125}I -AMT では、大脳で増加する傾向がみられた。線条体では急性期に多少の増加がみられ、発症期に低下する傾向がみられた。 ^{125}I -FTM では、大脳、小脳で大きな変化はなかった。線条体で急性期から低下するものが多かったが、程度にばらつきが多く、発症期で傾向は両極端になった。ここではアミノ酸膜輸

送機構、ドーパ脱炭酸酵素活性に注目した。線条体における集積は、ばらつきが大きいものの変化が認められ、急性期から発症期にかけてこれらの機能に変化が起こっていることがうかがえた。この結果から、上述の SPECT 製剤による神経機能変化の検出が可能であることが示された。特に急性期における神経機能変化が観察されたことから、早期診断への応用に有望な結果が得られた。

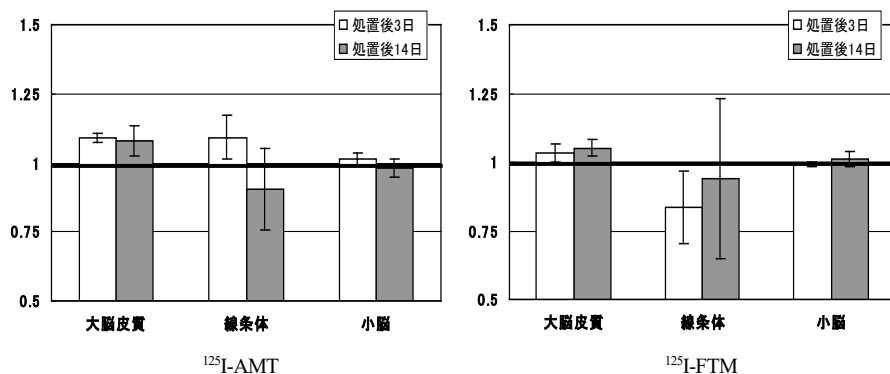


Fig.3 各組織における無処置側に対する処置側の集積比

IV. 結語

本研究により、すでに臨床使用されている PET 製剤による定量解析と画像化が可能であることが示された。特に処置後早期において神経機能変化を検出し得たことより、これらを指標としたパーキンソン病の早期診断の可能性が示唆された。また、今回用いた SPECT 製剤においても急性期より神経機能変化が認められた。このことから、これらの SPECT 製剤の臨床応用も期待される。

謝辞

本研究の実施にあたり、パーキンソン病モデルラットを供与していただいた宮崎医科大学石田助教授、PET 実験の機会をいただいた京都大学薬学研究科佐治教授、間賀田助教授 (現浜松医科大学教授)、PET 製剤を供給していただいた京都大学医学部向井先生、動物実験をお手伝いいただいた本学医学研究科絹谷先生に心から感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Ueda H, Inoue A, Nakata Y, Misu Y. Dopamine receptors and G-proteins in Parkinson's model rats. *Mol. Med.*, **32**: 188-196, 1995.
- 2) 井上 修, 小林 薫. PET による神経伝達・受容体機能の測定
「最新 SPECT/PET の臨床 脳機能の検査法」西村 恒彦 編集., メジカルビュー社. pp118-126, 1995.
- 3) Kawai K, Fujibayashi Y, Saji H, *et al.* A strategy for the study of cerebral amino acid transport using Iodine-123-labeled amino acid radiopharmaceutical ; 3-iodo- α -methyl-L-tyrosine. *J. Nucl. Med.*, **32**: 819-824, 1991.
- 4) Kawai K, Fujibayashi Y, Yonekura Y, *et al.* Canine SPECT studies for cerebral amino acid transport by means of ^{123}I -3-iodo- α -methyl-L-tyrosine and preliminary kinetic analysis. *Ann. Nucl. Med.*, **9**: 47-50, 1995.
- 5) Kawai K., Kodama H., Jinnouchi S., Nagamachi S., Kubodera A., Watanabe K.
3- ^{123}I Iodo- α -(difluoromethyl)tyrosine methyl ester, a new radiopharmaceutical for amino acid decarboxylase measurement. *Labelled Compd. Radiopharm.*, **40**: 701-703, 1997.
- 6) Reading P. J., Dunnett S.B. 6-Hydroxydopamine lesions of nigrostriatal neurons as an animal model of Parkinson's disease. In *Toxin-induced models of neurological disorders.*, Eds. Woodruff M. L., Nonneman A. J. Plenum Press. pp89-119, 1994.