

中枢における **Cholecystokinin** に及ぼす
Dopamine の影響に関する研究

1995年

木村康浩

中枢における **Cholecystinin** に及ぼす
Dopamine の影響に関する研究

目次

緒言	1
第1章 Cholecystinin (CCK) 定量法の検討およびCCK8様免疫 活性(CCK8LI)のラット脳組織内分布	
第1節 序論	5
第2節 結果	5
第3節 考察	8
第4節 小括	9
第2章 6-hydroxydopamine(6-OHDA)脳室内投与後のラット脳内 CCK8LIの経日変化	
第1節 序論	11
第2節 結果	12
第3節 考察	16
第4節 小括	18
第3章 正常および6-OHDA処置ラットにおける脳内CCK8LIに及ぼす L-DOPAの影響	
第1節 序論	19
第2節 結果	21
第3節 考察	25
第4節 小括	28

第4章 6-OHDA 処置後のラット脳膜標品に対する [¹²⁵I]CCK8の特異的
結合量の変化

第1節 序論	29
第2節 結果	30
第3節 考察	37
第4節 小括	40
総括	41
結語	44
実験の部	45
引用文献	53
謝辞	62
本論文に関する報文	63

本論文においては以下の略号を使用した。

CCK : cholecystokinin

CCK8 : cholecystokinin octapeptide sulfated

DA : dopamine

CCK8LI : CCK8-like immunoreactivity

RIA : radioimmunoassay

6-OHDA : 6-hydroxydopamine

L-DOPA : L-3,4-dihydroxyphenylalanine

[¹²⁵I] CCK8 : [¹²⁵I] CCK8 sulfated labelled with Bolton Hunter reagent

AADC : aromatic L-amino acid decarboxylase

gastrin/CCK 様物質が存在していることが確認され、特に前頭皮質に高濃度に含まれていることが報告された(7,8,9)。更に、Dockray らはこの脳内に認められる gastrin/CCK 様物質の 90 % 以上が CCK8 であることを明らかにした(10)。

1980年、Hökfelt らは中脳辺縁系 (腹側被蓋野-側坐核、嗅結節系) dopamine (DA) ニューロン内に CCK8 が存在することを証明した(11)。一方で、縫線核における serotonin と substance P のような古典的神経伝達物質とペプチドの共存(12)、あるいは弓状核における adrenocorticotrophic hormone と melanocyte stimulating hormone のような複数のペプチドの共存など(13)、同一ニューロン内における異なった神経伝達物質の組み合わせが相次いで発見され、いわゆる one neuron - one transmitter の概念は当てはまらなくなった。以上の知見はニューロン間の情報伝達では、複数の伝達物質が状況に応じて精密な制御作用を司っているということを示唆するものである。

CCK8は脳内においては大脳皮質に最も多く存在し、次いで線条体、辺縁系などに多く存在している。一方、視床、視床下部では低濃度であり、小脳、橋、また延髄においては殆ど検出されない(5, 14, 15)。CCK 受容体は上述の CCK8 の分布と殆ど平行に分布していることが確認されている(16)。従って、CCK8 はそれが高濃度に存在し、かつ受容体の存在が認められる部位において、神経伝達物質あるいは修飾物質として機能している可能性が非常に高いと考えられる。神経伝達物質として有すべき条件には、1) 神経細胞内、特に終末部に存在すること、2) 神経刺激により終末部より遊離すること、3) 後膜に受容体が存在し、そこに作用して何らかの生理作用を示すこと、4) 特定の神経系において生合成され、また不活化機構が存在することなどが挙げられる。CCKに関しては、中枢神経組織内に不均一に存在し、神経終末部に最も高濃度に見いだされ、外液 Ca^{2+} 依存性に K^+ 刺激により放出される(17)。また、prepro-CCK から酵素的切断により、中枢内ではCCK8 が合成され、その分解酵素も見いだされている(18)。更に CCK 受容体については末梢性の CCK-A、中枢性の CCK-B 受容体の 2 つの subtype が存在するといわれている(19)。従ってこれらの知見から CCK8 は有力な神経伝達物質候補の一つであると考えられる。

CCK8の中樞作用には、鎮痛・鎮静効果(20)、体温降下(21)、節食抑制(22,23)および高血糖誘発(24)などが報告されているが、CCK8を末梢投与した場合と直接脳室内に投与した場合とでは結果の異なるものもあり、その生理作用についてはまだ十分に解明されているとは言い難い。

CCK8とDAの共存が証明されて以来(11)、この両者の相互関係について数多くの研究がなされている。CCK8とDAとの関係を検討する際には、得られた変化がCCK/DA共存ニューロンが存在している部位におけるものなのか、それ以外の部位での作用であるのかを識別する必要があると考えられるが、この点について十分に考慮して実験している例は少ない。また、Freyは向精神病薬であるhaloperidol, chlorpromazineを投与した後のラット脳各部位のCCK8-like immunoreactivity (CCK8LI)の組織濃度の上昇を報告したが(25)、その変化を否定する結果も提出された(26)。更に、ラット単離脳切片を用いた灌流系におけるCCK8の放出実験では、D-2受容体が主にCCK8の放出を司っているという見解が主流である。しかし、その作用はD-2受容体刺激によりCCK8放出が亢進する(27, 28)、あるいは低下する(29)という報告が提出されており、一定の見解が得られておらず、またD-1受容体の関与も考えられている(30)。このように、CCKとDAの間には密接な関係が示唆されるものの、今なおその本態については不明な点が数多く残されているのが現状である。

DA欠乏を主な症因とするパーキンソン病(31)、DA伝達の異常亢進が原因と考えられている分裂病(32)などDA系に異常を来す疾患患者の死後脳を用いた検討によると、部位によってはCCK8LI組織濃度が大きく変化しており、このことからDAニューロンの機能後退、あるいは亢進によりCCK系にも異常を来すものと考えられる。従って、これらの疾患の症因により、また治療の際投与されるDA系に作用する薬物によってもCCK系に何らかの影響を及ぼすことは十分考えられ、これら二つの内因性物質の相互関係を解明することは極めて重要である。

本研究においては中枢におけるCCK8とDAとの相互関係を明らかにする目的で、CCK系に及ぼすDA系の影響を検討した。つまり、CCK神経系の部位によ

る形態学的差異を十分考慮した上で、DAニューロンを選択的に破壊する6-hydroxydopamine (6-OHDA) をラット脳室内に投与しその後の CCK8LI 組織濃度をradioimmunoassay (RIA) により測定した。また、DA の前駆体であるL-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) を正常、あるいは 6-OHDA 処置ラットに投与することによる外因性 DA のCCK8LI 組織濃度に及ぼす影響から、6-OHDA 投与後の CCK8LI 組織濃度が変化する機構を検討した。更に、CCK8 受容体の変動を [¹²⁵I] CCK8 の脳膜標品に対する結合量の変化を指標にして検討した。

第1章 Cholecystikin(CCK)定量法の検討およびCCK8様免疫活性(CCK8LI)のラット脳組織内分布

第1節 序論

CCKは、中枢神経系においてはそのおよそ90%がチロシン残基が硫酸エステル化された octapeptide として存在している(10)。本章では CCK octapeptide sulfated (以下、CCK8)のN末端を認識する抗CCK抗体(OAL 656)を用いたRIA系を確立するとともにCCK8様免疫活性(CCK8-like immunoreactivity; CCK8LI)の脳組織内分布および存在様式を検討することを目的とした。

第2節 結果

2-1) CCK8 RIA系による定量法の検討

本RIA系の標準曲線をFig. 2に示した。この標準曲線は、logit-logスケールにおいて320 pg/tubeまで良好な直線性を示し、最小検出限界は1.25 pg/tubeであった。

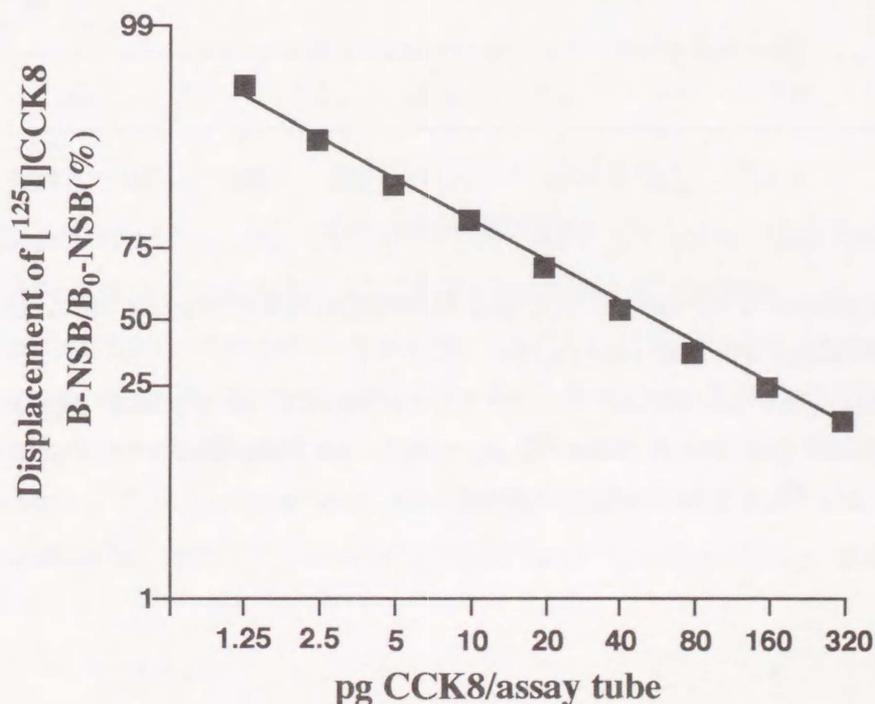


Fig. 2. Standard Curve of CCK8 Radioimmunoassay on Logit-Log Scale

2-2) 組織抽出物中のCCK8LIの希釈曲線

前頭皮質、線条体、および海馬からの抽出物のCCK8LIの希釈曲線を Fig. 3 に示した。いずれの希釈曲線も標準曲線に平行であり、合成 CCK8 と免疫化学的に差異がないことを確認した。

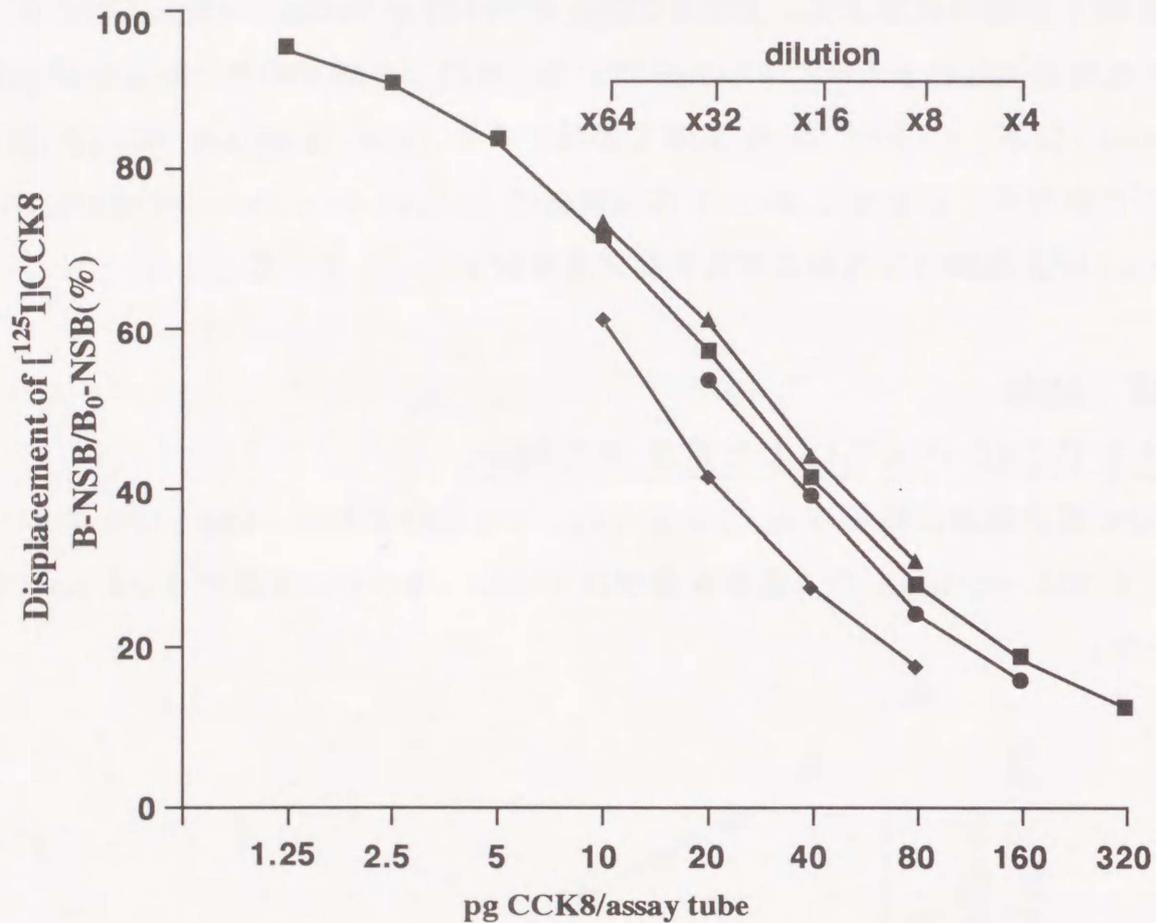


Fig. 3. Standard Curve of CCK8 Radioimmunoassay and Dose response Curves of Rat Brain Extracts

The amount (%) of tracer bound to antiserum is plotted against the various amounts of CCK8 per assay tube. ■, synthetic CCK8; ●, frontal cortex extract; ▲, striatum extract; ◆, hippocampus extract.

2-3) gel chromatography による CCK8LI の同定

本 RIA で検出される免疫活性を同定するため、前頭皮質からの抽出物について Sephadex G-50 superfine column chromatography により分析した。Fig. 4 に示したように合成 CCK8 の溶出位置にのみシングルピークが得られ、本 RIA で検出される免疫活性は CCK8 が主成分であることが判明した。

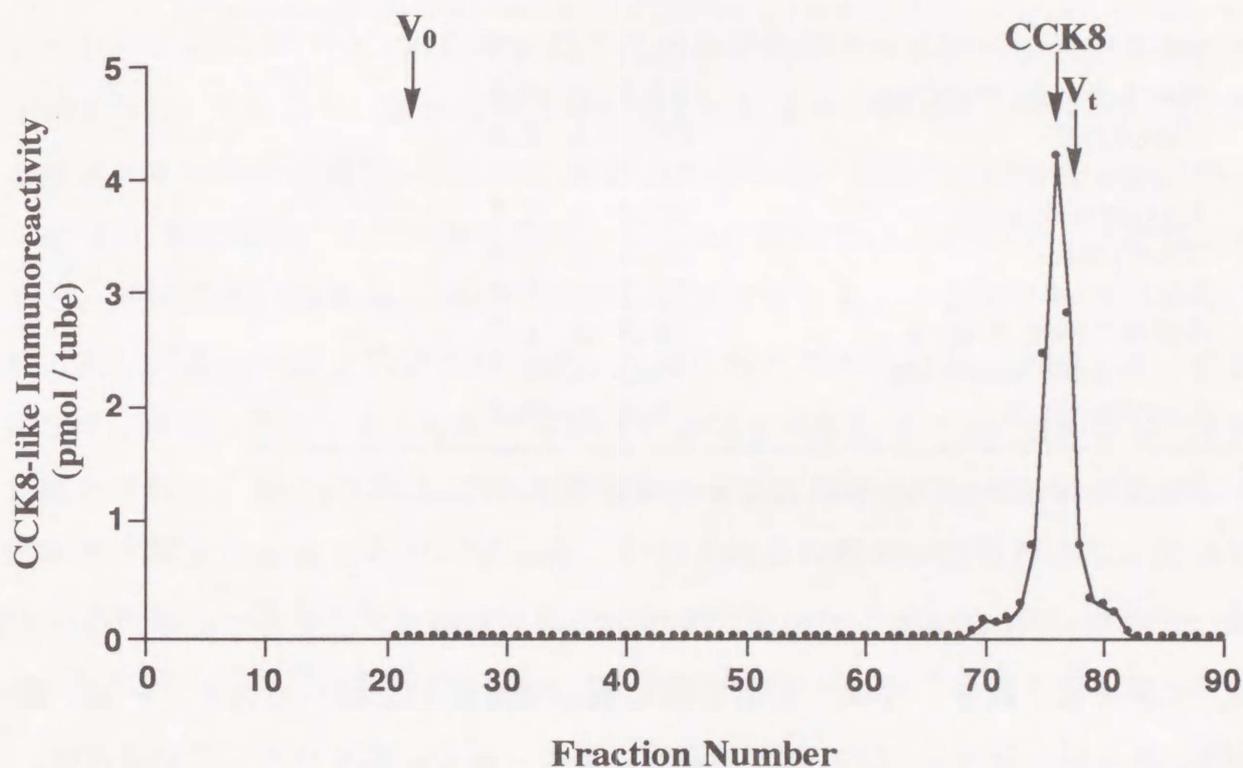


Fig. 4. Identification of CCK8LI in Rat Frontal Cortex Extract by Separation on a Sephadex G-50 Superfine Column

Gel chromatography was performed on 1 x 75 cm Sephadex superfine column at room temperature in 0.02 M veronal buffer (pH 8.4) containing 0.1% bovine serum albumin. Elution was made at 4 ml/h and 15 min fractions were collected for radioimmunoassay. The column was previously calibrated with blue dextran 2000 and NaI to establish the void (V_0) and total volume (V_t), respectively, and with synthetic CCK8.

2-4) CCK8LIの脳組織内分布

本 RIA 系により測定したラット脳各部位における CCK8LI の分布を Table I に示した。

Table I. Distribution of CCK8-like Immunoreactivity in Normal Rat Brain

Region	CCK8-like Immunoreactivity (ng CCK8/g wet weight)
Frontal Cortex	110.4 ± 3.7
Nucleus Accumbens	101.9 ± 3.5
Striatum	80.7 ± 2.0
Hippocampus	46.1 ± 3.1
Hypothalamus	33.4 ± 2.7
Thalamus	26.8 ± 2.0
Midbrain	19.9 ± 1.9
Substantia Nigra	16.5 ± 1.7
Pons and Medulla	5.3 ± 0.4
Cerebellum	0.4 ± 0.2

Each value represents the mean ± S.E.M. of 5-6 rats.

CCK8LIは、前頭皮質、線条体、側坐核に特に高濃度に分布しており、ついで海馬、視床下部、視床、中脳、黒質の順に高い免疫活性が認められた。一方、橋一延髄、および小脳では CCK8LI は非常に低く、脳内に広く分布している反面、部位間による濃度差が顕著であることが判明した。抽出過程における CCK8LI の回収率は $98.3 \pm 3.7\%$ ($N = 9$) であり、良好な回収率を示した。尚、本研究で得られた結果はこの回収率による補正は行なわなかった。

第3節 考察

本研究において使用した抗血清は CCK8 の N 末端を認識する特異性の高いものであり、特に C 末端の 4 個のアミノ酸残基が同一である gastrin とはまったく交差反応を示さないと報告されている (33)。一方、CCK33, CCK39 とは 100% の交差反応を示すとされているが、組織抽出物中の免疫活性希釈曲線と標準曲線と

の間に良好な平行性が認められたことから本 RIA 系で検出された免疫活性は標準抗原と同等な免疫化学的性質を有するものであることが示された。また gel filtration chromatogram により組織抽出物中の免疫活性のほとんどが CCK8 由来のものであることが示された。

一般にペプチドホルモンの組織抽出には 0.1 N AcOH あるいは 0.1 N HCl などの酸性溶媒が用いられることが多いが、CCK8 の抽出には中性溶液を用いることが重要である (34,35)。このアッセイ系においては N 末端を認識する抗血清を用いており、特にチロシン残基の硫酸エステルが免疫活性発現に必須であるとされている (33)。すなわち、酸性溶媒を用いることにより、硫酸エステルが容易に加水分解される可能性が高く、故に中性溶媒による抽出が必要であると考えられる。

本 RIA 系により、ラット脳各部位からの抽出物について CCK8LI を測定したところ、前頭皮質、線条体、側坐核に特に高濃度に分布しており、ついで海馬、視床、視床下部、中脳、黒質の順に高い免疫活性が認められた。一方、橋-延髄、小脳では非常に低く、特に小脳と高濃度の部位との間には 200 倍以上もの濃度差が認められた。このように CCK8LI は脳内に広く分布している一方で部位による濃度差が顕著であることが判明した。これらの分布傾向は既報の結果を支持するものであるが、濃度そのものには大きな差が認められた (5,14,15)。これは、使用した抗血清の交差反応性の差、あるいは抽出法の相違によるものと考えられる。

第4節 小括

本章においては N 末端を特異的に認識する抗血清を用いた RIA による CCK8 の定量法について検討した。組織抽出物の希釈曲線が標準曲線と良好な平行性を示したことから、この RIA 系で検出される免疫活性は合成 CCK8 と免疫化学的に等しいものであることが判明した。また、その免疫活性のほぼ 100 % は CCK8 由来のものであることが gel filtration chromatogram より示された。

更に、ラット脳各組織の CCK8LI 濃度を調べた結果、CCK 神経終末が存在している前頭皮質、線条体、側坐核において高濃度の CCK8LI が検出され、海馬、視床下部、視床などでは比較的低濃度であった。一方、小脳、橋-延髄では殆ど

CCK8LI は検出されず、CCK8 は脳内に広く分布している反面、部位間における濃度差が非常に顕著であることが判明した。

第2章 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 脳室内投与後の ラット脳内CCK8LIの経日変化

第1節 序論

CCK8 と DA との相互関係を調べる目的で本章では 6-OHDA をラット側脳室内に投与し、その後の脳組織内 CCK8LI 濃度を経日的に測定した。6-OHDA は非可逆的に DA ニューロンの変性破壊をもたらし、脳内 DA を激減させる神経毒である (36, 37)。6-OHDA の神経毒性発現機序を Fig. 5 に示した。6-OHDA を側脳室内投与すると、能動的に DA ニューロンに取り込まれる。6-OHDA は DA に比べ酸化還元電位が低いために容易に電子を放出する。その電子が分子状酸素を還元することで活性酸素種が生じ、細胞膜の脂質の過酸化反応を引き起こすことにより神経毒性が発現するとされている。

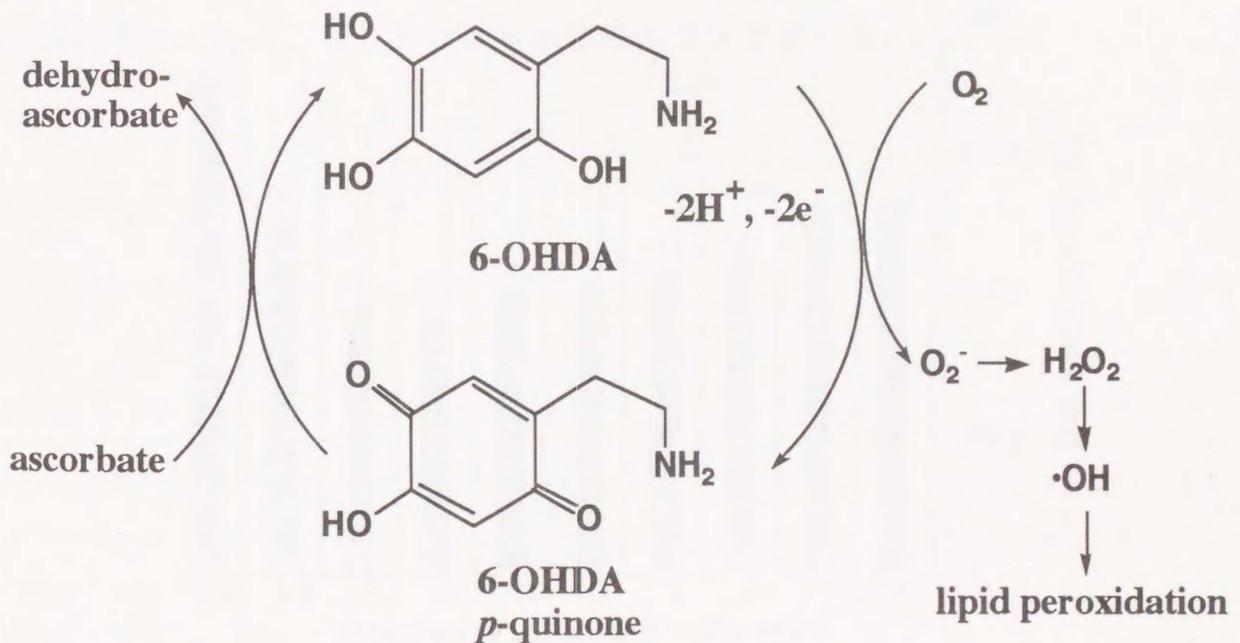


Fig. 5. Reaction Scheme for the Autooxidation of 6-OHDA with Formation of 6-OHDA *p*-Quinone, H₂O₂, Superoxide, and Hydroxy Radical

ただし、6-OHDA 単独処置では noradrenaline (NA) ニューロンも変性を受けるため、DA ニューロンに対する選択性および神経毒性増強を目的として、それぞれ NA の再取込み阻害剤である desmethylimipramine、およびモノアミン酸化酵素阻害剤である pargyline による前処置を施した (38)。

第2節 結果

2-1) 6-OHDA 処置後のラット体重の経日変化

6-OHDA、あるいは vehicle を投与したラットの経日的体重変化を Fig. 6 に示した。対照群の体重は正常ラットとほぼ同様に実験期間を通じて増加した。しかし、6-OHDA で処置したラットでは処置後 7 日目まで対照群に比べ顕著な体重減少が認められた。また、二元配置分散分析の結果、実験期間を通じての両群間の体重差は有意なものであった [$F(1,9)=53.10, p<0.001$]。その後、6-OHDA 処置群の体重は増加し、14 日目では処置前の体重に復し、28 日目には対照群との間に差は認められなくなった。

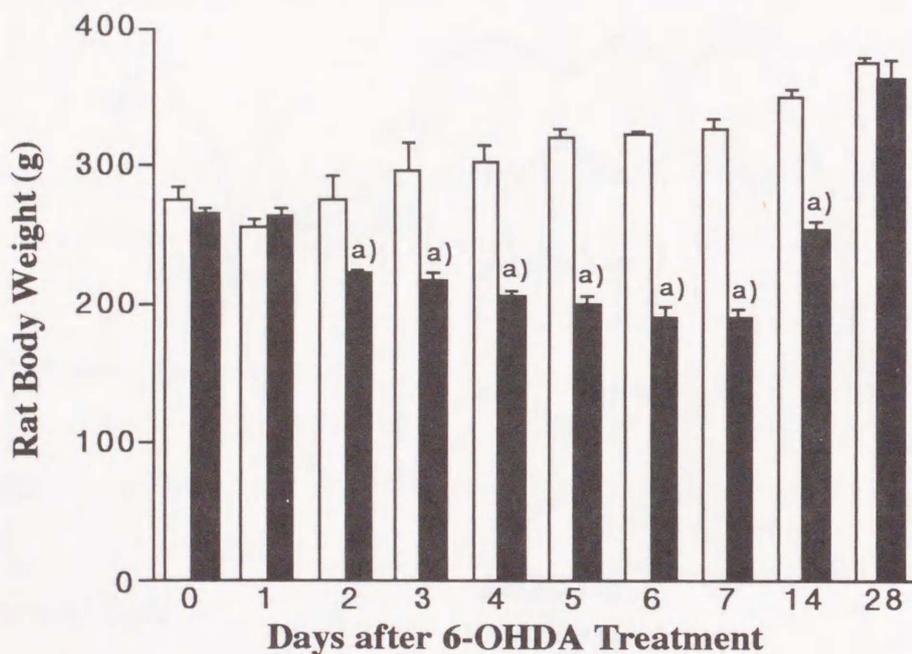


Fig. 6. Effects of 6-OHDA Treatment on Rat Body Weight

Rat body weights were measured at 10:00 a.m. Each bar shows the mean \pm S.E.M. of 6 rats. a) $p<0.01$, significantly different compared with saline treated group (Student's t -test). ■, 6-OHDA treated; □, saline treated.

2-2) 6-OHDA処置後の脳内CCK8LI組織濃度の経日変化

6-OHDA あるいは vehicle により処置したラットの脳各部位における CCK8LI 組織濃度の経日的変化を Fig. 7 (A) - (E) に示した。対照群の脳各部位における CCK8LI濃度には実験期間を通じて有意な変化は観察されなかった。また対照群と未処置ラットとの間には各部位の濃度に差は認められなかった。6-OHDA 処置後 1 日目に前頭皮質、線条体、海馬、側坐核、および黒質の CCK8LI 濃度は対照群に比較してそれぞれ 144%、159%、176%、143%、および192%に上昇した。しかし、これらの変化は一過性のものであり、側坐核では処置後 3 日目に、前頭皮質、線条体、および黒質では 7 日目に対照群のレベル以下に低下しその後28 日目まで回復は認められなかった。処置後 28 日目の CCK8LI 濃度は前頭皮質、線条体、側坐核、および黒質において対照群のそれぞれ 54%、82%、66%、42%であった。一方、海馬では CCK8LI 濃度の一過性の上昇は認められたものの 6-OHDA処置後3日目には処置前の濃度に復し、その後の変化は観察されなかった。また、検討したその他の部位(視床下部、視床、中脳)では CCK8LI 濃度変化は同様な傾向を示したが、その変化は有意なものではなかった。

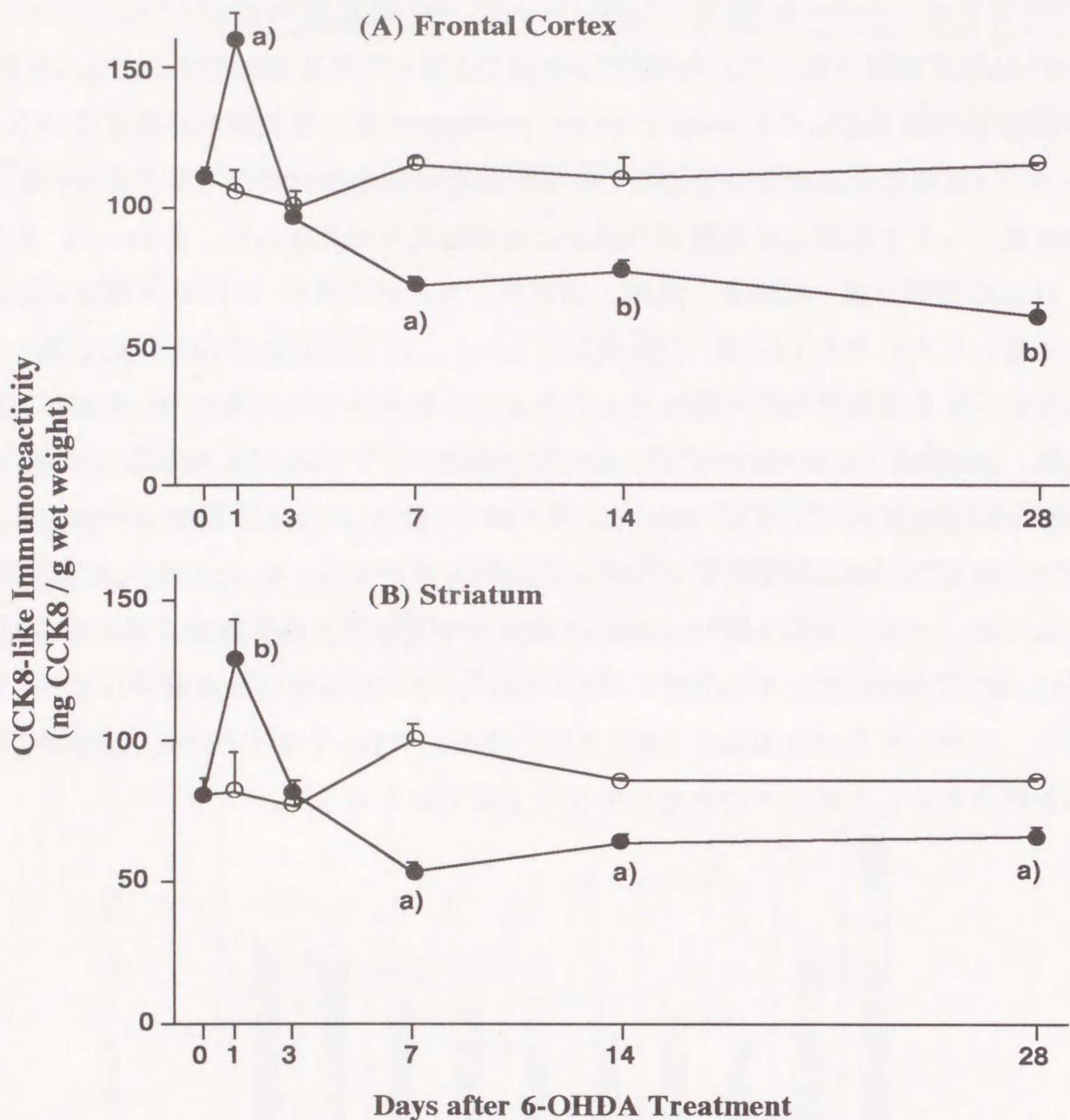


Fig. 7. Levels of CCK8LI in the Frontal Cortex (A), Striatum (B), Hippocampus (C), Nucleus Accumbens (D), and Substantia Nigra (E) at Various Intervals Following 6-OHDA Treatment

CCK8LI was measured on days 1, 3, 7, 14, and 28 after 6-OHDA treatment, and was expressed in ng/g wet weight. ●, 6-OHDA treated; ○, saline treated. Each point shows the mean \pm S.E.M. of 6 rats. a) $p < 0.01$ and b) $p < 0.05$, significantly different compared with saline treated group (Student's *t*-test).

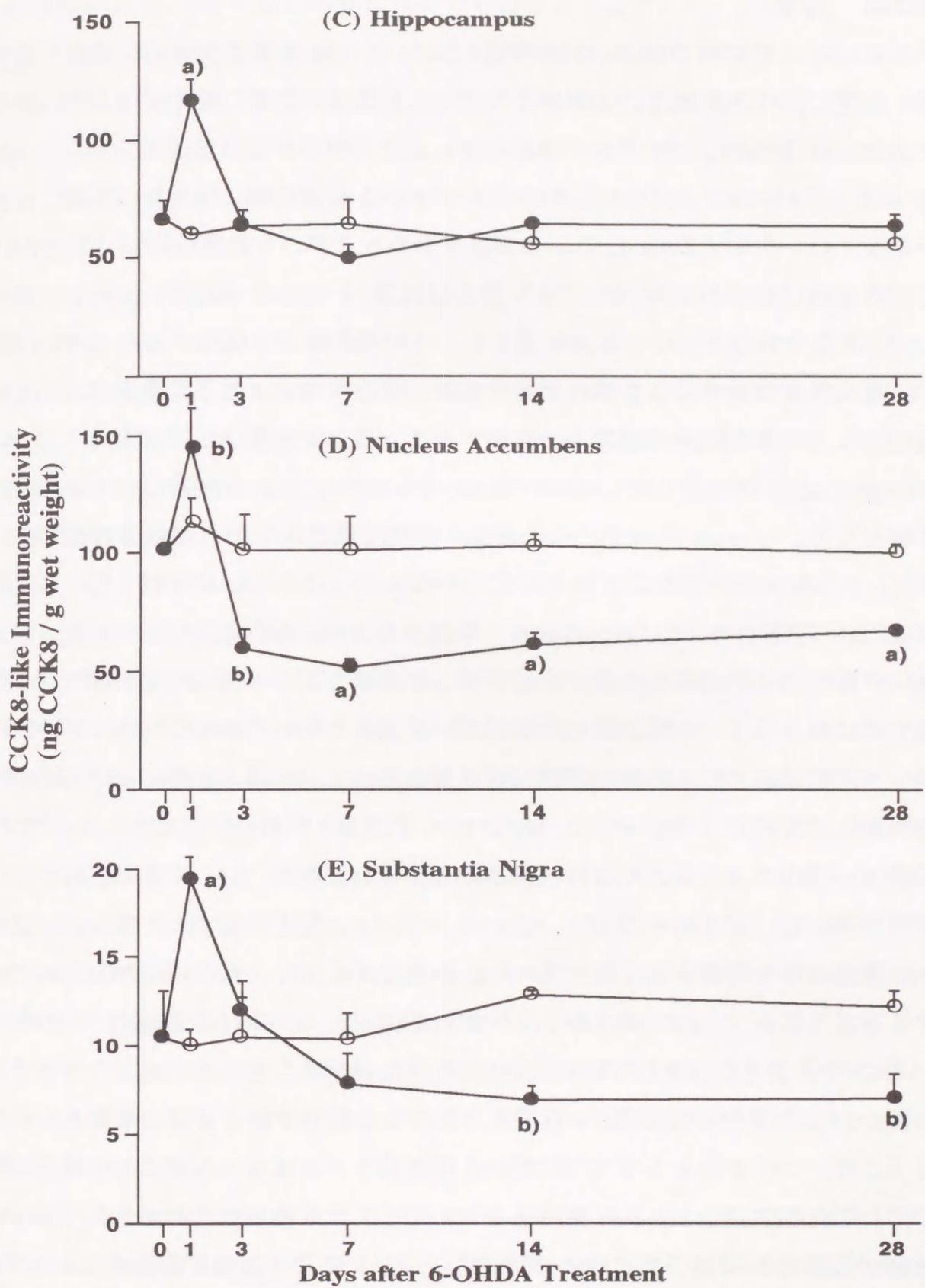


Fig. 7. continued

第3節 考察

本章においては 6-OHDA の脳室内投与という DA 神経細胞を非可逆的に変性させる処置により脳内各部位における CCK8LI 濃度は顕著に変化すること、またその変化には部位間における差が認められることを明らかにした。CCK ニューロンと DA ニューロンとが密接に相互分布している前頭皮質、線条体、黒質、また同一ニューロン内に CCK8 と DA の共存が認められている側坐核において CCK8LI 濃度の変化は著しかった。CCK8LI 濃度は処置 1 日目で一過性に上昇し、3 ないし 7 日目で対照群以下の濃度に低下し、その後の回復は観察されなかった。こういった大きな変化を示した部位は免疫組織化学的手法により示された 6-OHDA 処置により DA 神経細胞が脱落した部位とよく一致した (11)。

Zigmond らはラット脳室内への 6-OHDA 投与による DA 系に対する経時的な影響として、compensatory response (代償的反応) という現象を報告している (39)。これは 6-OHDA により DA ニューロンの 80-90 % が変性を受けることによる DA 受容体の up-regulation、一過性の DA 生合成、放出の亢進、および DA の再取込みの減少を意味する。しかしながら、この一過性の生合成、放出の亢進などは処置後 24 時間で最大となり、2-3 日後でそれぞれ非可逆的に対照群以下のレベルに到達し、その後の回復は認められていない (39)。本章において得られた結果をこの観点から考察すると、6-OHDA 処置後 1 日目に認められた CCK8LI 濃度の一過性の上昇は、やはり一過性に上昇した細胞外 DA により放出が抑制されたために生じたものと考えた。次いで、CCK8LI 濃度が低下した理由は、細胞外 DA 濃度はその後減少したため CCK8 の放出が亢進し、結果的に神経終末に存在する遊離可能な CCK8 が枯渇したためと考察した。6-OHDA 処置後 7 日目までの CCK8LI 濃度の変化は CCK8 の放出の変化を反映したのと考えられるが、その後 CCK8LI 濃度は処置後 28 日目まで低下した状態が続き変化は認められなかった。この一つの理由として CCK8 の生合成低下が挙げられるが、この因子の関与に関しては不明である。DA を枯渇させることにより線条体切片からの CCK8 の放出が亢進する (40)、また DA 受容体 agonist により放出が抑制される (29) といった実験結果から、処置後 7 日目までの CCK8LI 濃度の変化は、細胞外 DA 濃

度に依存した CCK8 の放出の変化によるものであると考えた。

6-OHDA により処置した後の CCK8LI 濃度変化について検討したいくつかの報告があるが、それらによれば処置後 2 日目で CCK8LI 濃度は上昇する (41)、あるいは 30 日目で低下する (42) とされており見解の一致を見ていない。しかし、本研究において示された経日的な CCK8LI 濃度の変化により上述の結果は支持されるものと考えられる。

側坐核では、処置後 1 日から 3 日目の間の変化が前頭皮質や線条体のそれに比べ顕著であった。6-OHDA 処置により、DA 単独ニューロンのみならず CCK8 および DA が共存するニューロンも同様に変性破壊されることが示されている(11)。側坐核では細胞外 DA 濃度の低下による CCK8 の放出の増加に加えて、変性を受けた CCK/DA 共存ニューロンからの CCK8 の損失が考えられ、従ってこの部位では顕著な CCK8LI 濃度の低下が認められたものと考えた。

海馬では、処置後一過性の上昇が認められたものの、他の部位とは異なり正常レベルに復し、その後の有意な変化は観察されなかった。CCK8LI 濃度が一過性に上昇した理由については不明であるが、海馬と CCK8LI 濃度が顕著に変化した部位との間には CCK 系における大きな神経形態的差異が認められている。DA の神経系には黒質一線条体系(A9)、中脳辺縁系 (腹側被蓋野一側坐核、嗅結節系、A10) が挙げられるが、CCK 神経系はこれらの DA 系と密接に分布しており、特に後者の系においては CCK8 は DA と共存している。一方、海馬ではこのような神経系は認められず、いわゆる local circuit neuron と呼ばれる局在化した神経細胞群の存在が認められている (43, 44)。これらの神経形態の差が海馬での CCK8LI 濃度の変化が他の部位と異なる理由の一つであると考えられる。

パーキンソン病死後脳における CCK8LI 濃度が検討されており、黒質において CCK8LI 濃度の顕著な低下が報告されている (31)。脳内 DA の著減はパーキンソン病のひとつの症因と考えられているが、本研究における 6-OHDA 処置によっても黒質での CCK8LI 濃度の非可逆的低下は観察されている。DA 欠乏による CCK8LI 濃度の低下はパーキンソン病における一つの二次的な変化と考えられ、この観点から 6-OHDA 処置したラットはこの疾病の有用な動物モデルとなりうる可

能性が示唆された。

CCKの生理作用の一つに摂食抑制作用のあることが示されている。CCK analogue 投与によりラットの摂食が抑制されること (22)、またヒツジ脳室内にCCK 抗血清を注入することで摂食量が 200 % 増加すること (23) が報告されている。CCK8の摂食中枢に対する作用は直接、あるいは間接的なものなのかは不明であるが、これらの報告は CCK8 という内因性の物質が摂食行動というものに大きく関わっていることを示唆するものである。本章における 6-OHDA 処置後 7 日目まで観察された顕著な体重減少はCCK8の放出亢進による摂食抑制が原因と考えられ、その後遊離可能な CCK8 が枯渇したと思われる 7 日目以降では摂食抑制が解除され、体重の回復が認められたものと考えた。

第4節 小括

CCK と DA との相互関係について興味を持たれ研究が行われてきたのはこの両者が共存する神経細胞が発見されたからである。この他にも同一ニューロン内に神経伝達物質と考えられる物質が共存する例が見出されており、たとえばネコ顎下腺における vasoactive intestinal polypeptide と acetylcholine との共存 (45)、またラット脊髄における substance P と serotonin との共存 (46) が報告されている。こういった例は今後数多く発見されるものと考えられるが、その共存の機能的意義を解明することは神経系での原因、機序の判明していない現象を理解する上で重要なものであると考えられる。本章においては、6-OHDA 処置により脳内各部位の CCK8LI 濃度が大きく変化することが判明し、その変化は細胞外 DA 濃度に依存した放出の変化を反映したものであることが示唆された。更に、部位間において CCK8LI 濃度の変化様式が異なり、これは CCK ニューロンの部位間における神経形態の差異に起因する可能性が示された。

第3章 正常および6-OHDA処置ラットにおける脳内 CCK8LIに及ぼす L-DOPA の影響

第1節 序論

第2章において、6-OHDAの脳室内投与によりラット脳内CCK8LI濃度が大きく変動することについて論述し、その変化はCCK8の神経末端からの放出の変化によるものと考察した。本章では、DAの前駆体であるL-DOPAを正常、あるいは6-OHDA処置したラットに腹腔内投与し、その後のCCK8LIの変動からCCK8の放出状態およびDAとの相互関係を明らかにすることを目的とした。すなわち、第2章における6-OHDA処置後のCCK8LI濃度変化から放出亢進状態にあると考えられる処置後3日目、および放出亢進はすでに停止し遊離可能なCCK8が枯渇した状態にあると考えられる処置後7日目のラットにL-DOPAを負荷し、その後のCCK8LI濃度を測定した。

L-DOPAはパーキンソン病におけるDA補充療法に広く用いられている薬物である。DA自身は血液-脳関門を通過することができないため、L-DOPAとして投与される。投与後、脳内に移行し、Fig. 8に示したようにDAニューロンに取り

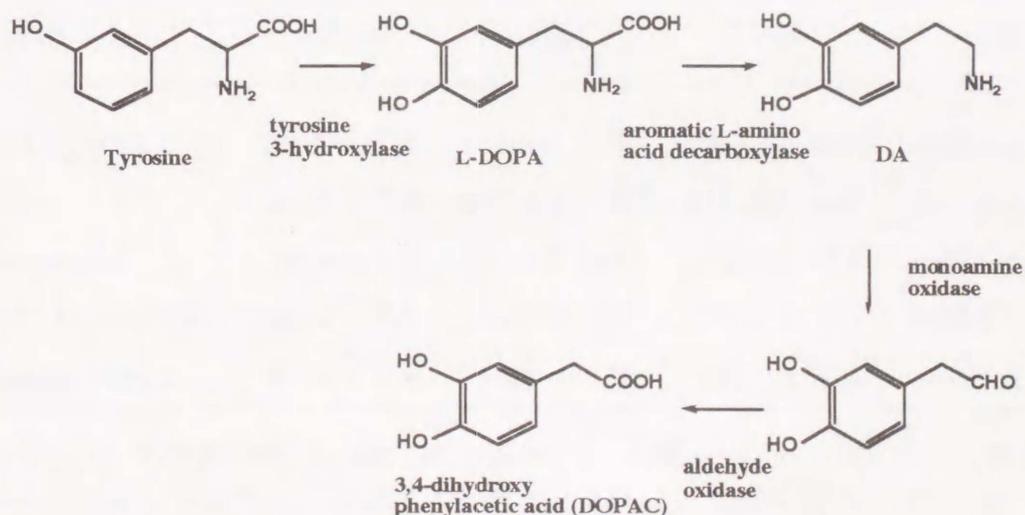


Fig. 8. Biosynthesis and Metabolism of Dopamine

込まれた後に aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) により、DA に変換され薬効を示すとされている(47)。L-DOPA のDA系に及ぼす影響としては、線条体における用量依存的な細胞外DA濃度の上昇(48,49)、また線条体のDAニューロンからのDA放出亢進(50)が報告されている。つまりL-DOPAはDAに変換されることによってDAの受容体に対するavailabilityを増大させると考えられる。また、AADCはDA神経細胞外にも全体量のおよそ20%の存在が認められているためにDA神経細胞の大部分が変性脱落した状態にあったとしても、L-DOPAはDA神経細胞外AADCによりDAに変換され得る(51,52)。

更に、近年になってL-DOPA自身が脳内において機能しているという報告もあり(53, 54)、このことについて調べる目的でD-2受容体に選択的な拮抗薬であるL-sulpirideをL-DOPAに併用した場合のCCK8LI濃度の変動も併わせて検討した。

第2節 結果

2-1) 正常ラットにおけるCCK8LIに及ぼすL-DOPAの影響

正常ラットに L-DOPA (100, 200, 300 mg/kg) を投与し、2 時間後の CCK8LI 組織濃度を測定した。その結果を Table II に示した。L-DOPA の CCK8LI 組織濃度に及ぼす影響を一元配置分散分析により検討した結果、前頭皮質 [$F(2,15) = 14.149, p < 0.01$]、線条体 [$F(2,15) = 31.168, p < 0.01$]、黒質 [$F(2,15) = 6.029, p < 0.05$]、側坐核 [$F(2,15) = 49.198, p < 0.01$] となり、用量依存的な CCK8LI 組織濃度の上昇が認められた。一方、海馬においては有意な変化は認められなかった [$F(2,15) = 0.546, N.S.$]。この L-DOPA 投与による CCK8LI 濃度の上昇は側坐核において最も顕著であり、300 mg/kg 投与群では対照群の約 2 倍にまで上昇した。

Table II. Effects of L-DOPA on CCK8-like Immunoreactivity in Normal Rat Brain

Region	CCK8-like Immunoreactivity (ng CCK8/g wet weight)			
	Dose of L-DOPA (mg/kg)			
	saline	100	200	300
Frontal Cortex	98.4 ± 7.2	102.4 ± 7.5	125.2 ± 2.1 ^{a)}	142.6 ± 5.5 ^{b)}
Striatum	89.4 ± 7.8	107.6 ± 8.0 ^{a)}	113.2 ± 3.5 ^{a)}	138.4 ± 4.1 ^{b)}
Hippocampus	58.4 ± 6.6	76.4 ± 5.9	75.3 ± 4.4	79.6 ± 6.7
Nucleus Accumbens	100.2 ± 5.1	151.2 ± 4.2 ^{b)}	176.1 ± 8.9 ^{b)}	193.4 ± 8.7 ^{b)}
Substantia Nigra	10.5 ± 1.7	10.9 ± 1.8	13.9 ± 1.0 ^{a)}	17.9 ± 1.5 ^{b)}

Each value represents the mean ± S.E.M. of 6 rats 2 hours after intraperitoneal administration of saline or L-DOPA. a) $p < 0.01$, b) $p < 0.001$ significantly different from saline administered group.

これらの結果から L-DOPA の CCK8LI に対する薬理的効果を得るためには、L-DOPA の投与は200 mg/kgで充分であると判断し、以下の実験にはこの投与量を使用した。

次に、D-2受容体 antagonist である L-sulpiride (100 mg/kg)を L-DOPA (200 mg/kg) と同時投与した場合の CCK8LI の変動を検討した (Table III)。その結果、線条体、側坐核、および黒質において L-DOPA と L-sulpiride との同時投与群では L-DOPA 単独投与により得られた CCK8LI 濃度の上昇が有意に阻害されることが認められた。また、そのレベルは生理食塩液投与群のそれと有意な差は観察されなかった。一方、前頭皮質においては同時投与による有意な変化は認められなかった。

Table III. Effects of Combined Treatment of L-DOPA and L-sulpiride on CCK8-like Immunoreactivity in Normal Rat Brain

Region	CCK8-like Immunoreactivity (ng CCK8/g wet weight)	
	L-DOPA	L-DOPA+L-sulpiride
Frontal Cortex	125.2 ± 2.1	121.1 ± 3.0
Striatum	113.2 ± 3.5	86.5 ± 8.7 ^{a)}
Hippocampus	75.3 ± 4.4	74.0 ± 3.1
Nucleus Accumbens	176.1 ± 8.9	102.6 ± 3.6 ^{b)}
Substantia Nigra	13.9 ± 1.0	10.3 ± 0.9 ^{a)}

Each value represents the mean ± S.E.M. of 6 rats 2 h after intraperitoneal administration of L-DOPA (200 mg/kg) alone and the combination of L-DOPA (200 mg/kg) and L-sulpiride(100 mg/kg). a) $p < 0.05$, b) $p < 0.001$ significantly different from L-DOPA single administration group.

2-2) 6-OHDA処置ラットにおけるCCK8LIに及ぼすL-DOPAの影響

6-OHDA処置後、3 および 7 日目のラットに L-DOPA (200 mg/kg) あるいは対照として生理食塩液を腹腔内投与し、2時間後のCCK8LI濃度を測定した (Fig.9)。

対照群では投与 2 時間後の CCK8LI 濃度は第 2 章で述べたそれぞれの時点における CCK8LI 濃度とよく一致した。6-OHDA処置後 3 日目のラットに L-DOPA (200 mg/kg) を投与した結果、CCK8LI 濃度は前頭皮質、線条体、側坐核、および黒質においてそれぞれ対照群の 161 %、145 %、169 %、155 % に上昇した。一方、6-OHDA 処置後 7 日目のラットに L-DOPA (200 mg/kg) を投与した場合、検討したいずれの部位においても CCK8LI 濃度の上昇は観察されなかった。海馬においては、6-OHDA 処置後 3 および 7 日目いずれの場合にも対照群に比べて L-DOPA 投与による CCK8LI 濃度の有意な変化は認められなかった。

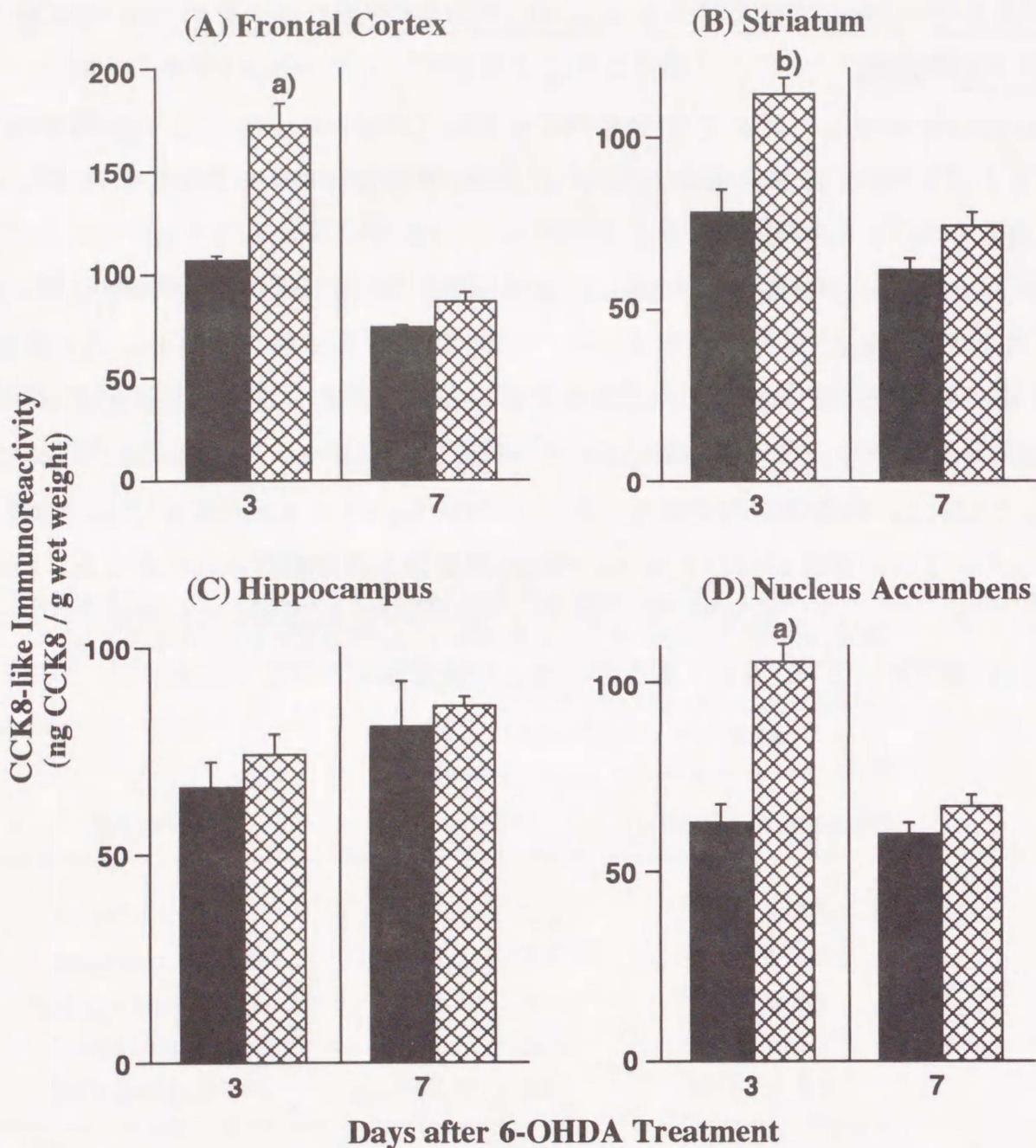


Fig. 9. Effect of L-DOPA on CCK8LI Levels in the Frontal Cortex (A), Striatum (B), Hippocampus (C), Nucleus Accumbens (D), and Substantia Nigra (E) of the Rat Brain on the 3rd Day and 7th Day after 6-OHDA Treatment

The regional CCK8LI level 2 hours after the intraperitoneal administration of L-DOPA or saline was determined by radioimmunoassay and expressed in ng/g wet weight. ■, saline ; ▨, L-DOPA. Each bar shows the mean \pm S.E.M. of 6 rats. a) $p < 0.001$, b) $p < 0.01$, c) $p < 0.05$, significantly different compared with saline treated group (Student's *t*-test).

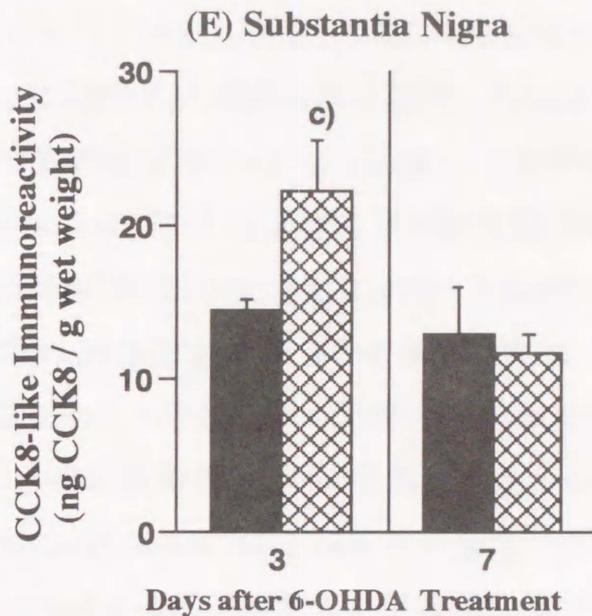


Fig. 9. continued

第3節 考察

本章においては CCK8 と DA との相互関係を調べる目的で、正常ラットに L-DOPA を単独あるいは L-DOPA と L-sulpiride を同時投与した後の、また 6-OHDA 処置後 3 および 7 日目のラットに L-DOPA を投与し、その後の CCK8LI 濃度の変化を検討した。

まず、正常ラットでは、L-DOPA 投与により、DA と CCK ニューロンとが密接に分布している前頭皮質、線条体、および黒質で、また同一ニューロン内における DA と CCK8 との共存が認められている側坐核で用量依存的な CCK8LI 濃度の上昇が観察された。前頭皮質を除く各部位における CCK8LI 濃度の上昇は D-2 受容体 antagonist である L-sulpiride の同時併用により顕著に抑制された。前頭皮質で変化が認められなかった理由は不明であるが、線条体、側坐核および黒質における CCK8LI の濃度変化から L-DOPA は脳内に移行後、AADC により DA に変換された後に D-2 受容体を介して CCK8 の放出を抑制し、CCK8LI 濃度の上昇を来したものと考えられる。近年、中枢において L-DOPA 自身が神経伝達物質として機能しているという可能性が示唆されているが (53,54)、本章における結

果から CCK8LI の濃度上昇という現象に L-DOPA 自身が神経伝達物質として関わっている可能性は否定された。

L-DOPA の投与量に依存して線条体の細胞外 DA 濃度は上昇すると報告されていることから(49)、正常ラットにおける L-DOPA 投与後の用量依存的な CCK8LI 組織濃度の上昇は細胞外 DA 濃度に依存したものであることが示唆された。従って、外因性 DA による CCK8LI 濃度の上昇は D-2 受容体刺激を介した CCK8 の放出抑制の結果を反映したものであることが考えられる。この D-2 受容体がかかっていると考えられる CCK8 の放出変化についていくつかの報告が提出されている(28, 29, 30, 31)。Hutchison らは、ラット線条体切片を用いた灌流系において、脱分極剤である veratrine により亢進した CCK8 の放出は D-2 受容体 agonist である amphetamine により抑制されること、また amphetamine により抑制された CCK8 の放出は sulpiride により解除されることを報告している(29)。これらの報告から本章における結果は D-2 受容体刺激を介して CCK8 の放出が抑制され、また D-2 受容体を競合的に遮断することで CCK8 の放出抑制は解除されるということで説明できる。従って、L-DOPA は脳内に移行後 AADC により DA に変換され、その後 D-2 受容体刺激を介した CCK8 の放出抑制が生じ、CCK8LI 濃度変化に反映されたものと考えられる。

次に 6-OHDA により処置したラットに L-DOPA を負荷した場合についてであるが、序論において述べたように 6-OHDA による DA ニューロンの非可逆的変性を受けたとしても DA 神経系以外にも存在する AADC により L-DOPA は DA に変換され得ることが確認されている(51,52)。従って、6-OHDA 処置ラットに L-DOPA を投与することにより得られた CCK8LI 濃度の変化は正常ラットと同様に L-DOPA が脳内に移行した後 AADC により DA に変換され、D-2 受容体に作用することによるものと考えられる。

第2章において 6-OHDA 処置後 3 日目のラットでは CCK8LI 濃度の変化から CCK8 は DA 枯渇による放出亢進状態にあると考えた。本章ではこのラットに L-DOPA (200 mg/kg) を投与したところ、CCK8LI 濃度は前頭皮質、線条体、側坐核、および黒質において、対照群のそれぞれ 161 %、145 %、169 %、155 % に

上昇することが認められた。一方、6-OHDA 処置後 7 日目のラットでは CCK8LI 濃度は最低値に達しており、遊離可能な神経終末内 CCK8 はすでに枯渇した状態にあると考察した。このラットに同量の L-DOPA を投与したところ、CCK8LI 濃度の対照群に対する変化は殆ど認められなかった。CCK8 の放出が亢進状態にあると考えられる 6-OHDA 処置後 3 日のラットでは細胞外 DA 濃度は低下しているものの、この時点における CCK8LI 濃度は神経終末内 CCK8 は充分残存していることを示しているものと考えられる。従って L-DOPA の投与により細胞外 DA 濃度が上昇し CCK8 の放出を抑制したために CCK8LI 濃度が増加したものと考えた。また、処置後 7 日目以降の CCK8LI 濃度変化から 7 日目では CCK8 の放出亢進の結果、遊離可能な CCK8 は枯渇していることが示唆された。従って、L-DOPA 投与により CCK8LI 濃度に影響を及ぼし得る細胞外 DA 濃度が得られたにも関わらず、CCK8LI 組織濃度の変化は認められなかったと考えた。

Sierralta らは、6-OHDA 処置後 6 日目のラット線条体切片を用いた灌流系において、高 K⁺ 灌流液を適用した場合、対照群に比べ CCK8 の放出が顕著に低下することを報告している (55)。この報告によれば、6-OHDA 処置により DA が枯渇したために CCK8 の放出が低下した、逆に言えば DA には CCK8 の放出を亢進させる作用のある可能性を示唆しているが、本章で得られた結果から推測される CCK8 と DA の相互関係とこの報告におけるそれとはまったく相反するものである。しかしながら、6-OHDA 処置により CCK8LI 濃度は非可逆的に低下した、つまり DA 低下に伴う CCK8 の放出亢進の結果、遊離可能な CCK8 は神経終末において枯渇した状態にあり、CCK8 の放出の変化はもはや認められなくなっているということから上述の結果は説明できるものと考えられる。

海馬における L-DOPA 投与による CCK8LI 濃度の変化は正常ラット、6-OHDA 処置ラット両者において認められなかった。この理由については不明であるが、大きく変化した部位と海馬との間には CCK ニューロンの神経形態の大きな差が存在することが示されている。つまり、第 2 章にも述べたように、L-DOPA 投与により CCK8LI 濃度が大きく変化した前頭皮質、線条体、黒質では DA ニューロンと CCK ニューロンとが密接に相互分布している部位であり、また側坐核では DA と

CCK8とが同一ニューロン内に共存する部位であるが、海馬においてはそのような神経系は存在しておらず、CCKニューロンはいわゆる local circuit neuron として存在しているといわれている (43,44)。従って、このような神経形態の部位間による差が L-DOPA 投与後の CCK8LI 濃度変化の差に反映されたものと考えられる。

第4節 小括

本章においては、L-DOPA 投与により正常ラットの脳内 CCK8LI 濃度は前頭皮質、線条体、側坐核および黒質において用量依存的に上昇することが判明した。更に、L-DOPA に D-2 受容体 antagonist である L-sulpiride を併用すると CCK8LI 濃度の上昇は阻害されることから、L-DOPA は脳内に移行後 DA に変換された後に D-2 受容体刺激を介して CCK8LI 濃度の上昇をもたらすことが示唆された。

また、CCK8 の放出が亢進状態にあると考えられる 6-OHDA 処置後 3 日目のラットに L-DOPA を負荷すると、CCK8LI 濃度の上昇が認められ、一方、神経終末内の遊離可能な CCK8 は枯渇していると考えられる処置後 7 日目のラットに L-DOPA を負荷した結果、CCK8LI 濃度の変化は観察されなかった。このことから、6-OHDA 処置による CCK8LI 濃度の変化は CCK8 の放出の変化によるものであることが示唆された。

第4章 6-OHDA処置後のラット脳膜標品に対する [¹²⁵I]CCK8の特異的結合量の変化

第1節 序論

第2章、および第3章においてCCKとDAとの相互関係を解明するための検討を行い、細胞外DAはD-2受容体刺激を介してCCK8の放出を抑制することを示唆する結果を得た。本章においては、6-OHDA処置後のCCK8の放出状態を知る目的で同様に処置したラット脳膜標品に対する[¹²⁵I]CCK8の特異的結合量の変化を検討した。

CCK8の脳膜標品に対する結合特性(16, 56, 57)やラット脳内におけるCCK受容体の分布(58, 59)に関しては数多く報告されている。また、dopaminergic drug投与によりCCK8の結合量は大きく変化することも報告されている(60)が、6-OHDAによりDAニューロンを変性させた後の膜標品に対するCCK8結合の経日的変化についてはほとんど検討されていない。しかしながら、このことはCCK8の放出状態を知る上で必要不可欠な検討項目であると考えられる。

第2節 結果

2-1) 正常ラット前頭皮質膜標品に対する $[^{125}\text{I}]\text{CCK8}$ の結合における基礎検討

まず、前頭皮質膜標品における $[^{125}\text{I}]\text{CCK8}$ の結合量に及ぼす膜蛋白量の影響を検討した (Fig. 10)。その結果、全結合量、非特異的結合量共に蛋白量が 2 mg/assay tube までの範囲では良好な直線関係が得られたが、それ以上の蛋白量では $[^{125}\text{I}]\text{CCK8}$ 結合量は低下する傾向が認められた。

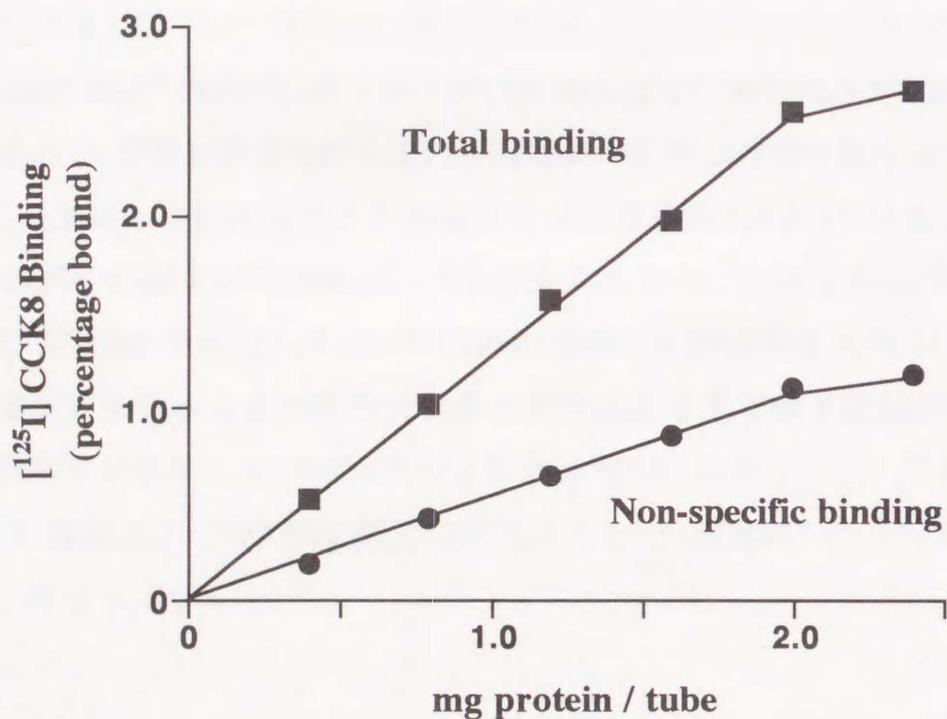


Fig. 10. Effect of Membrane Protein Concentration on $[^{125}\text{I}]\text{CCK8}$ Binding to the Normal Rat Cortical Membranes

Increasing amounts of membrane protein (0.4 - 2.4 mg/assay tube) were incubated with radioligand in the absence (total binding, ■) and presence (non specific binding, ●) of $1\ \mu\text{M}$ CCK8 at 25°C for 60 min. Data are expressed as percentage radioligand bound. Each point is the mean of triplicate determinations in two separate experiments.

次に 25 °C における $[^{125}\text{I}]$ CCK8 の前頭皮質膜標品に対する結合量の時間的推移を検討した (Fig. 11)。全結合量および非特異的結合量は時間と共に増加し、60 分で最大値を示し、120 分まで変化は認められなかった。一方、4 °C での検討では両結合量の増加は観察されなかった。また 37 °C では 25 °C における結合量に比して低値を示した。これらの検討結果より、以下の結合実験においては蛋白量は 2 mg/assay tube 以下、またインキュベーション時間および温度はそれぞれ、60 分、25 °C で行った。

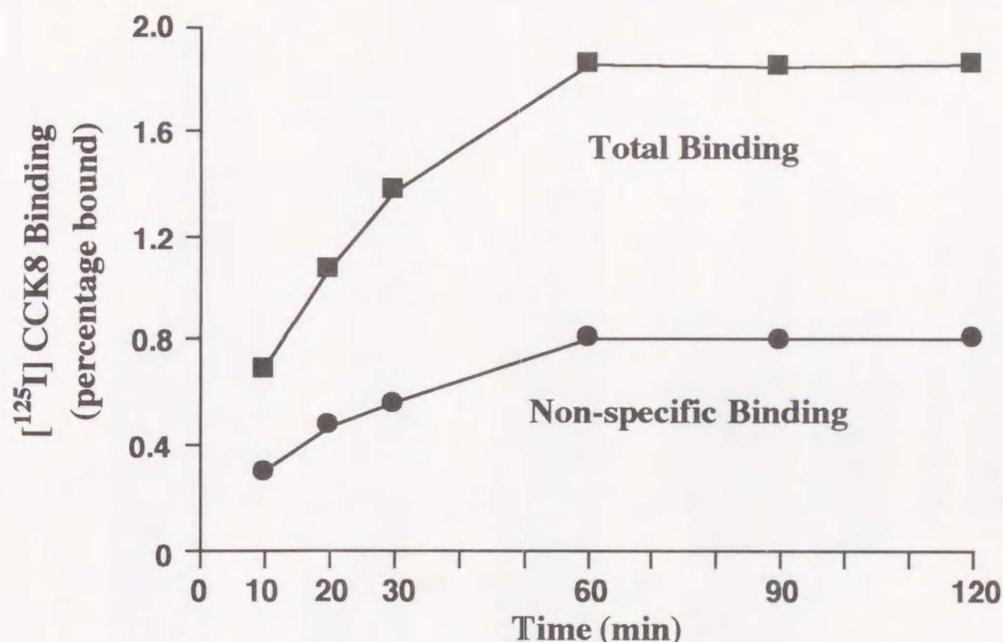


Fig. 11. Time Course Profile of $[^{125}\text{I}]$ CCK8 Binding to the Normal Rat Cortical Membranes

A membrane preparation of the rat frontal cortex was incubated with radioligand in the absence (total binding, ■) and presence (non specific binding, ●) of 1 μM CCK8 at 25 °C. Data are expressed as percentage radioligand bound. At indicated times, the incubation medium was treated as described in the text. Each point shows the mean of triplicate determinations in two separate experiments.

2-2) 正常ラット脳各部位の膜標品に対する [¹²⁵I] CCK8 の結合量

正常ラットにおける前頭皮質、線条体、海馬および側坐核の膜標品に対する [¹²⁵I] CCK8 の全結合量、特異的結合量、および非特異的結合量を Fig. 12 に示した。単位蛋白量当りの非特異的結合量はいずれの部位においてもほぼ類似の値を示した。前頭皮質、線条体、および側坐核における特異的結合量の全結合量に対する割合はそれぞれ 69、65、および 65 % であった。一方、海馬における割合は 24 % であった。

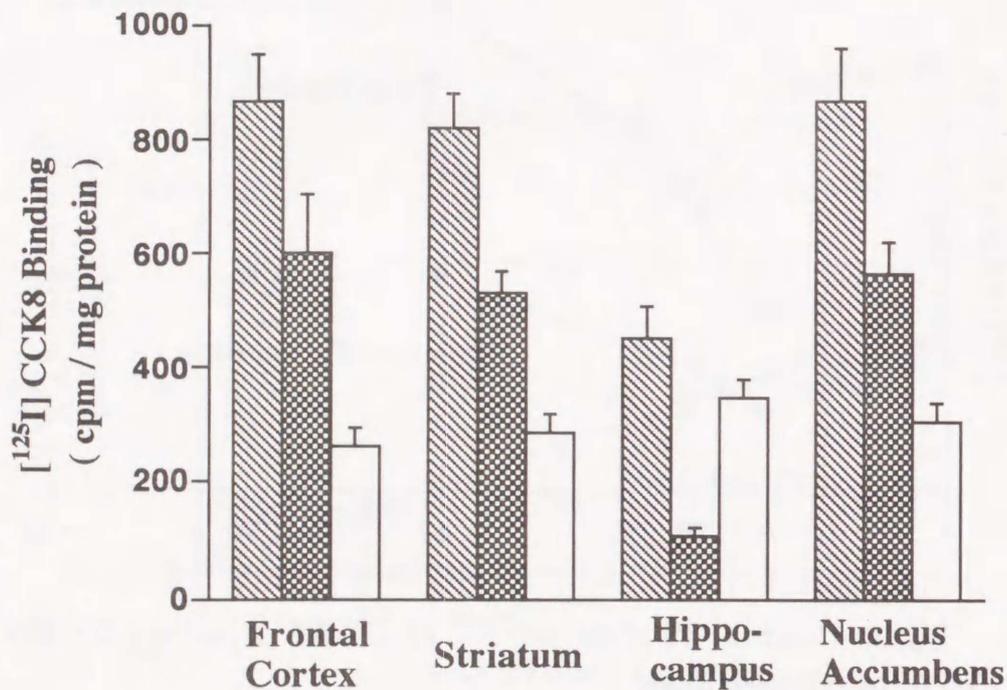


Fig. 12. Total, Specific, and Non Specific Binding [¹²⁵I] CCK8 to the Regional Brain Membrane Preparations of the Normal Rat

Data are expressed as bound counts of radioligand per mg membrane protein and each bar shows the mean \pm S.E.M. of 6 rats. , total binding; , specific binding; , non specific binding.

2-3) 6-OHDA 処置後の前頭皮質膜標品に対する
 $[^{125}\text{I}]\text{CCK8}$ の結合量の経日変化

6-OHDA 投与後の前頭皮質膜標品に対する $[^{125}\text{I}]\text{CCK8}$ 結合量の経日変化を Fig. 13 に示した。全結合量は大きく変化したのに対し、非特異的結合量の変化は実験期間を通じて認められなかった。従って、全結合量の変化は特異的結合量の変化を反映したものであることが示唆された。

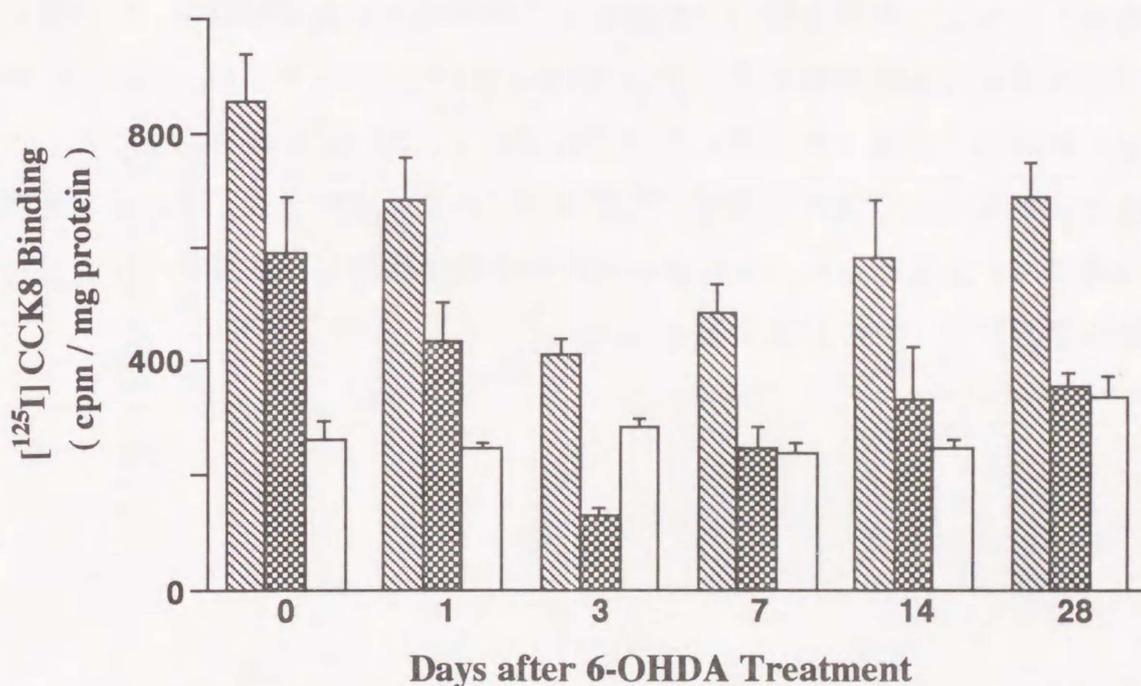


Fig. 13. Effects of 6-OHDA Intracerebroventricular Administration on Total, Specific, and Non Specific Binding $[^{125}\text{I}]\text{CCK8}$ to the Rat Frontal Cortex Membrane Preparation at Various Intervals Following 6-OHDA Treatment

Rats were decapitated at several intervals after 6-OHDA treatment and binding assay was carried out as described in the text. Data are expressed as bound counts of radioligand per mg membrane protein and each bar shows the mean \pm S.E.M. of 6 rats. , total binding; , specific binding; , non specific binding.

2-4) 6-OHDA 処置後の脳各部位における [¹²⁵I]CCK8 の特異的結合量の経日変化

Fig. 14 に前頭皮質、線条体、海馬、および側坐核における 6-OHDA 処置後の [¹²⁵I] CCK8 特異的結合量の変化を示した。生理食塩液処置群における脳各部位の [¹²⁵I] CCK8 特異的結合量には実験期間を通じて有意な変化は認められなかった。

6-OHDA 処置群では前頭皮質、線条体、および側坐核において特異的結合量の顕著な経日変化が認められたが、海馬においては実験期間を通じて有意な変化は観察されなかった。前頭皮質および線条体の特異的結合量は処置後 3 日目に最低値を示し生理食塩液処置群のそれぞれ 21%、39% に低下した。その後、特異的結合量は漸増し、処置 28 日後にそれぞれ 60%、65% にまで回復した。一方、側坐核では特異的結合量の最低値は処置後 7 日目に観察され、その値は生理食塩液投与群の 47% であった。その後特異的結合量は回復し、処置後 28 日目には生理食塩液処置群の 70% にまで増加した。

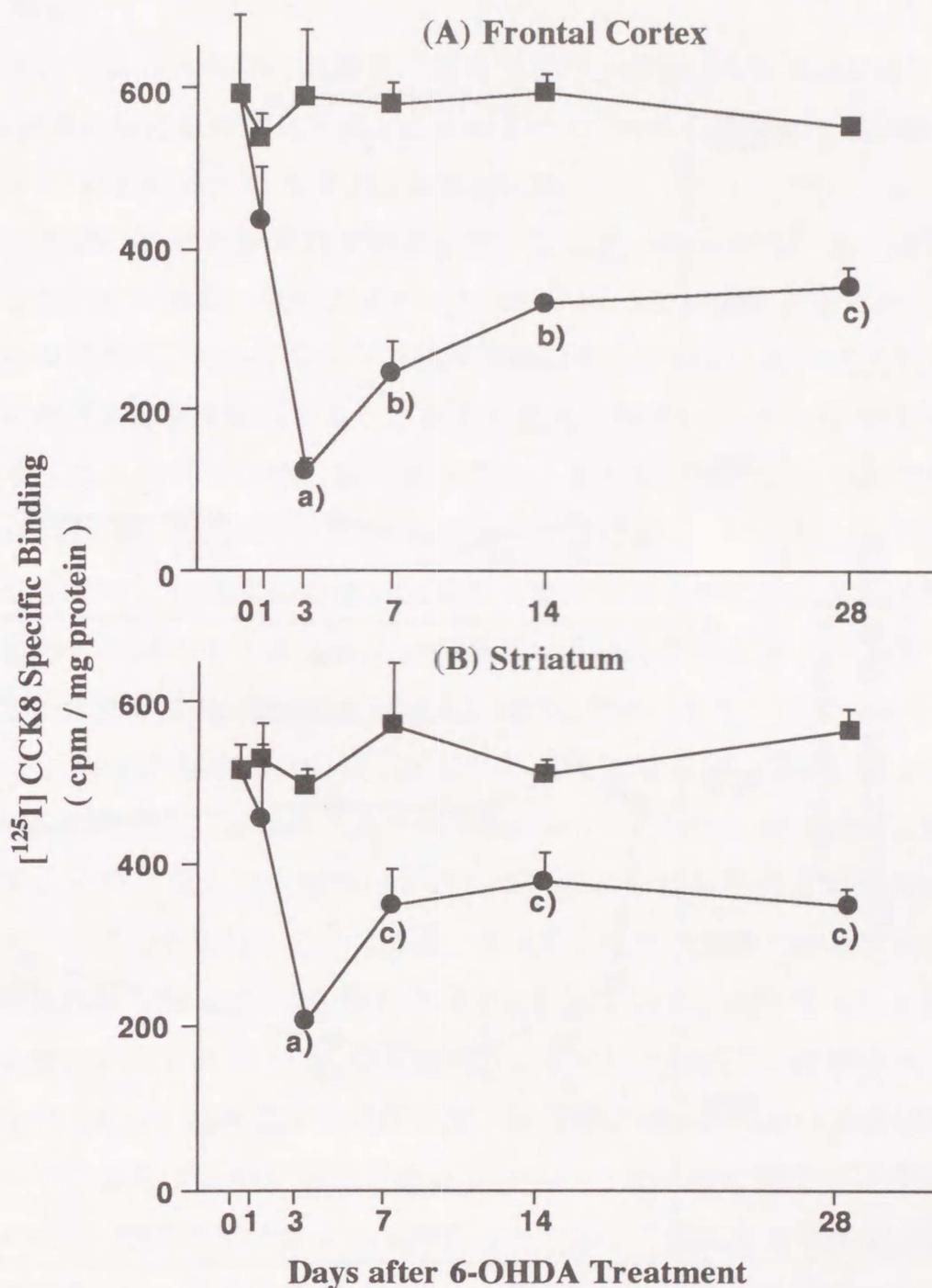


Fig. 14. Changes in Specific Binding of [¹²⁵I] CCK8 Binding to the Regional Brain Membranes from Frontal Cortex (A), Striatum (B), Hippocampus (C), and Nucleus Accumbens (D) at Various Intervals Following 6-OHDA Treatment

Data are expressed as bound counts of radioligand per mg protein and each point shows the mean \pm S.E.M. of 6 rats. ■, saline treated; ●, 6-OHDA treated. a) $p < 0.001$, b) $p < 0.01$, c) $p < 0.05$ significantly different compared with saline treated group at each interval (Student's *t*-test).

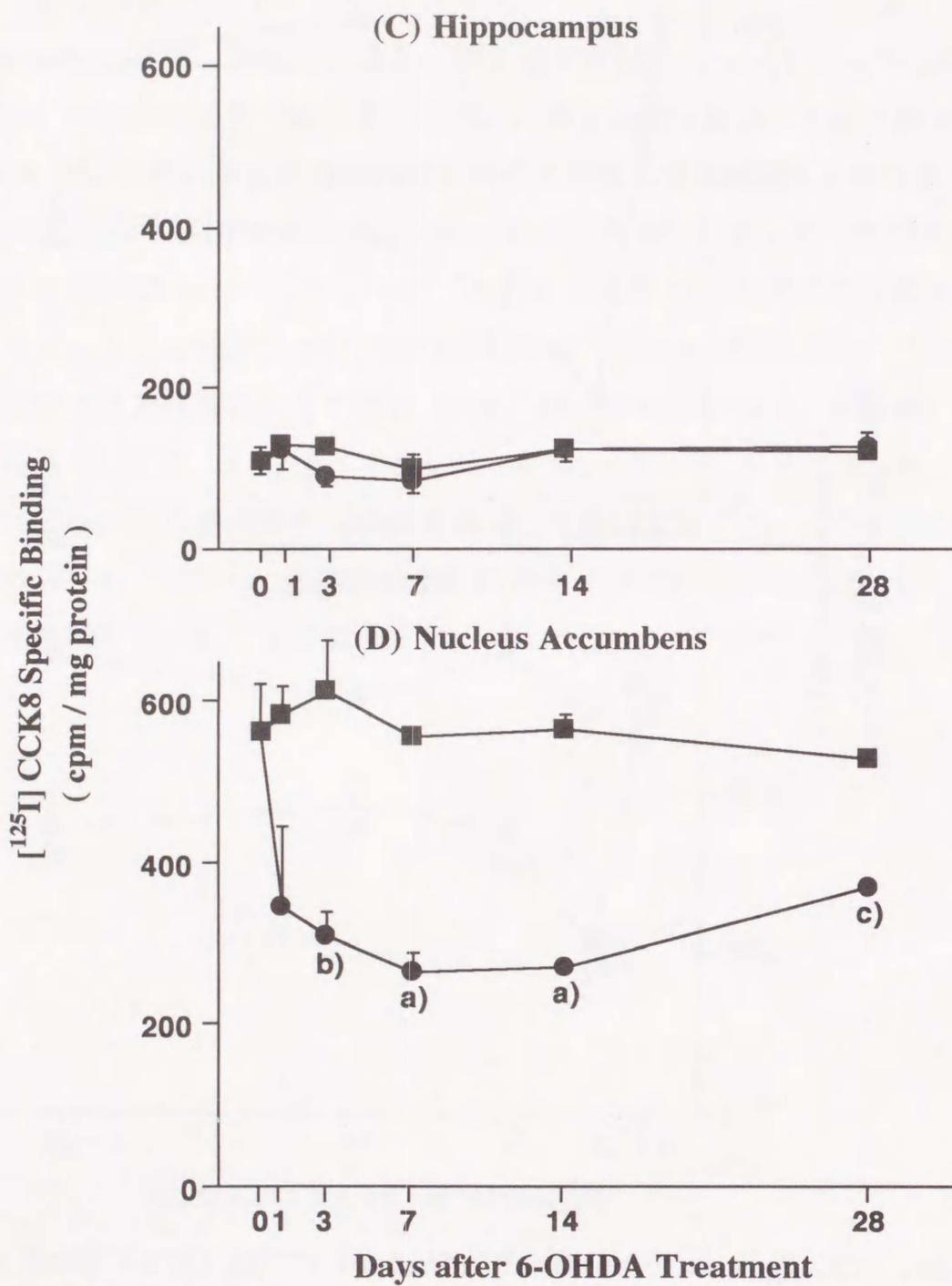


Fig. 14. continued

第3節 考察

本章においては 6-OHDA 処置後の脳各部位から調整した膜標品に対する [¹²⁵I] CCK8 の特異的結合量の変化と第2章における CCK8LI 濃度変化を比較検討することにより CCK8 の放出の状態を知ることが試みた。

まず結合実験における基礎的検討として、蛋白量、反応時間、および温度の影響を検討した。その結果、蛋白量は 2 mg / assay tube 以下、反応時間は 60 分、および温度は 25 °C という条件下で結合実験は可能であることが示された。従って、本章における結合実験条件は、これまで報告されている CCK8 と受容体の結合の際認められる温度依存性、蛋白量依存性、また飽和性といった条件を満たすものである (16, 56, 57)。

正常ラットでは、特異的結合量に部位間の差が認められたが、非特異的結合量には部位間の差は認められなかった。特異的結合量は前頭皮質、線条体、および側坐核で全結合量のそれぞれ 69%、65%、65% であったのに対し、海馬では 24% であった。Saito らは CCK ニューロンと DA ニューロンとの密接な相互分布が認められる前頭皮質、線条体および側坐核において CCK8 受容体が比較的豊富に存在しているのに対して、海馬のようにそのような神経形態を持たない部位では比較的乏しいことを報告している (58)。従って、本章において認められた各部位における特異的結合量は CCK8 受容体量を反映しているものと考えられる。

第2、3章において 6-OHDA 側脳室投与、および L-DOPA 腹腔投与といった処置により CCK8LI 組織濃度は前頭皮質、線条体、側坐核において顕著に変化したのに対して、海馬では殆ど変化は認められなかった。既に第2、3章で述べたように CCK8LI 組織濃度変化には CCK ニューロンの部位による神経形態の差異 (43, 44) に基づいた反応性の違いが大きく関与しているものと考察した。本章において 6-OHDA 処置による全結合量の変化は、非特異的結合量に変化しなかったことより特異的結合量の変化に基づいたものであることが示唆された。この特異的結合量の変化は前頭皮質、線条体、側坐核で顕著であったのに対し、海馬での特異的結合量は低値である上に殆ど変化しなかった。これらの結果から、[¹²⁵I] CCK8 特異的結合量の分布、および変化には CCK8LI 組織濃度に加えて部位によ

る神経形態の差に基づくことが示唆された。

Fukamauchi らは D-2 受容体 agonist および antagonist 投与後のラット前頭皮質膜標品に対する CCK8 の結合量の変化を報告している (60)。各薬物とも急性実験において結合量の変化は認められないものの、慢性実験では両者ともに結合量が増加することを報告している。これは、agonist では CCK8 の放出抑制により、また antagonist では放出亢進の結果生じる CCK8 の枯渇により受容体量が増加し、更に、Scatchard 解析の結果、 K_D 値は一定で B_{MAX} 値が変化することから、これらの結合量の増加は CCK8 受容体の up-regulation によるものであると結論付けている。この報告に代表されるように dopamine 系の薬物投与により CCK8 の binding capacity のみが増加することはこの他にも報告されており (61,62)、従って本章における [^{125}I] CCK8 の特異的結合量の変化も同様に binding capacity の変化に起因したものであることが考えられる。

CCK 受容体には末梢性の CCK-A、および中枢性の CCK-B 受容体が存在することが確認されている (19)。それぞれの生理機能に関しては不明な点が多いが、中枢には CCK-B type が広く分布している反面、CCK-A type の存在も示唆されている。しかしながら、CCK-A type はその量も僅かであり、存在部位も限られていることから、中枢において検出され得る結合部位は CCK-B type の受容体であると考えられている (63)。従って、本章における特異的結合量の変化も CCK-B 受容体に対する binding capacity の変化を反映したものであると考えられる。

次に、第 2 章で述べた 6-OHDA 処置後の CCK8LI 組織濃度変化と、本章で得られた特異的結合量の変化とを比較してみると、前頭皮質、線条体で組織濃度が減少過程にある 6-OHDA 処置後 1-3 日目では特異的結合量は減少し、また組織濃度が対照群以下に減少し、その後の変化は認められない 7 日目以降では特異的結合量の増加が認められた。すなわち、特異的結合量の減少は放出の亢進、また増加は放出の抑制に起因したものであることが示唆された。これらのことから 6-OHDA 処置による CCK8LI 組織濃度の変化は CCK8 放出の変化を反映したものであると考えられる。また、海馬では第 2 章における 6-OHDA 処置、および第 3 章における L-DOPA 投与により CCK8LI 組織濃度には大きな変化は観察されな

かったが、本章でも特異的結合量の変化は認められなかった。これは、既に述べたように部位による神経形態の差が大きく関わっていることによるものと思われる。

一方、側坐核における特異的結合量の経日変化は前頭皮質、線条体で観察されたものとは大きく異なることが観察された。特異的結合量は CCK8 の放出の亢進に伴い減少し、遊離可能な CCK8 が枯渇すると特異的結合量は増加するといった類似の傾向が認められた。しかしながら、側坐核における結合量の減少は、前頭皮質および線条体に比べ速やかであった。また、結合量の増加は前頭皮質および線条体では 6-OHDA 処置後 3 日目以降に認められたのに対して、側坐核では 7 日目以降に観察され、その程度も非常に小さいものであった。神経形態学的に示唆される側坐核と他の部位との間に見られる差というものに、側坐核では CCK/DA 共存ニューロンが存在することがまず挙げられる。この共存ニューロンは DA 単独ニューロンと同様、6-OHDA によって変性破壊されることが確かめられている (11)。従って、この部位で観察された特異的結合量の変化は CCK8 の放出変化に伴った結合量の変化に加え、6-OHDA 処置により pre-synaptic binding site が破壊されたため、結合量の減少は非常に速やかであり、かつその回復は遅延したものであることが示唆された。

第 2 章で 6-OHDA 処置 1 日後、CCK8LI 組織濃度は一過性に上昇することを述べたが、本章でその一過性の上昇を反映した特異的結合量の変化は観察されなかった。また、6-OHDA 処置 28 日後の特異的結合量は、前頭皮質、線条体で対照群のそれぞれ 65 %、60 % に過ぎなかった。従って、特異的結合量の減少は比較的速やかに生じる反面、増加には時間を要すること、すなわち down-regulation に比べ、up-regulation という現象が発現するには長時間を要するということが示唆された。

第4節 小括

本章では 6-OHDA 処置後のラット脳膜標品に対する [125 I] CCK8 特異的結合量の変化から 6-OHDA 処置により CCK8LI 組織濃度が変化する機構を調べることを目的とした。

結合実験の基礎的検討により [125 I] CCK8 の結合は、特異的結合、非特異的結合ともに温度、および蛋白量に依存的であり、また 25 °C において 60 分で定常状態に達することが判明した。この基礎的検討で定めた条件で 6-OHDA 処置後の脳各部位から調製した膜標品に対する特異的結合量の変化を検討した。

6-OHDA 処置後、DA 神経系を非可逆的に変性させることにより脳内各部位の CCK8LI 組織濃度のみならず [125 I] CCK8 特異的結合量にも影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち 6-OHDA 処置後の CCK8LI 組織濃度の変化は CCK8 の放出の変化を反映したものであることが示唆された。また特異的結合量の部位間による time-course profile の差は CCK 神経系の形態的差異を反映するものであると考えられる。

総 括

CCKは中枢において最も大量に存在する神経ペプチドの一つであり、その生理作用について種々の研究がなされているが、その詳細については明らかにされていない。そういった中で、CCK8 と DA とが共存するニューロンの存在が明らかにされ、以後 CCK8 と DA との相互関係について数多くの研究がなされてきている。しかしながら、その詳細については不明な点が多く残されている。そこで本研究においては複数の実験的アプローチによりその関係を明らかにすることを目的とした。

6-OHDA 脳室内投与により CCK8LI 組織濃度は CCK ニューロンと DA ニューロンとが密接に分布している、あるいは CCK/DA 共存ニューロンが存在している部位において顕著な変化が認められた。6-OHDA 処置後の DA 系には一過性の代償的反応、またそれに続く非可逆的な神経細胞の変性破壊が認められている。このことから CCK8LI の濃度変化は細胞外 DA 濃度に依存した放出の変化を反映したものであると考察した。つまり、CCK8 の放出が細胞外 DA 濃度の上昇により抑制されると CCK8LI 濃度は上昇し、逆に DA 濃度が低下すれば CCK8 の放出は亢進し組織濃度は低下すると考察した。

次に DA の前駆体である L-DOPA を投与した後の CCK8LI 濃度変化について検討した。L-DOPA 投与後 CCK8LI 濃度は海馬を除く各部位において用量依存的な上昇を示した。このことは上述の細胞外 DA 濃度に依存して CCK8 の放出が変化するという考えを支持するものである。更に、L-DOPA に D-2 受容体 antagonist である L-sulpiride を併用することにより、L-DOPA による CCK8LI 濃度の上昇が阻害されたことから、CCK8LI 濃度の変化は L-DOPA 自身によるものではなく L-DOPA が脳内に移行した後 DA に変換され、D-2 受容体刺激を介したものであることが示唆された。

6-OHDA 処置後 3 日目および 7 日目のラットに L-DOPA を負荷した後の

CCK8LI 濃度の変化を検討した。第2章における経日的変化から、前者は CCK8 は放出が亢進した状態、後者は遊離可能な CCK8 は枯渇した状態にあると考えられる。前者では顕著な CCK8LI 濃度の上昇が観察されたが、後者ではほとんど変化が認められず、このことから6-OHDA 処置後の CCK8LI 濃度変化は放出の変化を反映したものであることが示唆された。

次に、6-OHDA 処置後の脳膜標品を使用して $[^{125}\text{I}]$ CCK8 の結合実験を行った。CCK8 の放出が亢進していると考えられる段階では $[^{125}\text{I}]$ CCK8 特異的結合量は減少し、遊離可能な CCK8 が枯渇していると考えられる段階においては逆に増加した。この特異的結合量の変化は中枢に多く存在する CCK 受容体の subtype である CCK-B 受容体の capacity の変化を反映したものであると考察した。つまり、CCK8 の放出が亢進すると down-regulation により結合量は減少し、CCK8 が枯渇すると up-regulation により結合量は回復することが示唆された。

これまで述べてきた現象は CCK ニューロンと DA ニューロンとの密接な分布が認められる部位におけるものであるが、CCK/DA 共存ニューロンが存在する側坐核では若干の差が観察された。6-OHDA により変性を受ける神経系は DA 単独ニューロンだけではなく CCK/DA 共存ニューロンも同様に変性を受けることが示されている。従って、6-OHDA 処置により CCK8LI 濃度の低下する度合いも大きく、また $[^{125}\text{I}]$ CCK8 結合量の回復も他の部位に比べ緩徐であった。また、全ての実験を通じて海馬では CCK8LI 濃度、および結合量に有意な変化は認められなかった。この理由については明らかにしていないが、海馬に存在する CCK ニューロンは local circuit neuron、すなわち局在した神経系であるとされており、この形態的差異により反応性に差が出たものと考えられる。

以上、複数の実験的アプローチから CCK8 系に及ぼす DA の影響について論じてきたが、DA 系を修飾することによる CCK8 系の変化から CCK8 の放出は細胞外 DA 濃度に依存したものであることが示唆された。

この一方で CCK8 を投与した後の DA 系の変化に関する報告がなされている。ラット脳切片を用いた灌流実験により、CCK8 は DA の放出を抑制することが示

されている (64, 65)。これら、および本研究における実験結果から CCK8 と DA という内因性の物質の関係は同一ニューロンに共存する物質同志の関係を論ずる際に提唱されてきた、互いに相手の放出を制御し合うという、いわゆるcross-regulative relationship という関係にあるものと思われる(66)。

結 語

本研究では、CCK8 に及ぼす DA の影響について検討した。これまで論じてきたように、DA は CCK8 の放出を抑制するという機構により、中枢に最も大量に存在する神経ペプチドであり、生理的に重要な役割を担っていると考えられる CCK8 の作用を制御していると考えられる。DA 系の変化が CCK8 に大きな影響をもたらすことが明らかとなったが、その影響が中枢における CCK8 の生理機能にどのような変化を引き起こすのかという点についても不明であり、解明されなくてはならない問題である。近年、CCK8 の analogue である caerulein に抗分裂病薬としての有用性が見いだされ臨床応用されつつある。これは caerulein の DA 伝達抑制によるものであると考えられている。このことから CCK8 は高次神経機能に大きく関わったものであることが強く示唆され、CCK8 の中枢機能を明らかにすることは非常に重要である。

同一ニューロン内における異なった神経伝達物質は今後新たに発見される可能性があり、それにより原因や機序の不明であった現象の解明の糸口となり得るとも考えられる。また、中枢に作用する薬物はある神経系にのみ特異的に作用して薬理効果を発揮するのではなく、その神経系に介在している系にも影響を及ぼす可能性は非常に高いといえる。従って、CCK8 と DA との関係を一つの代表的な例として認識し、その他の内因性活性物質同志の関係、および中枢作用性薬物の target となる神経系以外の系への影響を一つ一つ解明していくことが、薬物治療における予期せざる副作用の防止、またより高度な薬物治療に大きく貢献するものと考えられる。

第1章の実験

1) 試薬

RIA には抗 CCK 抗体として OAL 656 (大塚アッセイ研究所、徳島) を、標識抗原として [¹²⁵I] CCK8 labelled with Bolton Hunter reagent (Amersham International、London、England) を、標準抗原として合成 CCK8 (ペプチド研究所、大阪) を使用した。また、B/F分離には山羊抗家兎 γ -globulin、正常家兎血清 (第一ラジオアイソトープ研究所、東京) を使用した。その他の試薬はすべて試薬特級を用いた。Gel chromatography には、Shephadex G-50 superfine および blue dextran 2000 (Pharmacia、Uppsala、Sweden) を用いた。

2) RIAによるCCK8 定量法の検討

OAL 656 は最終希釈倍率 35000 倍で使用した。標準希釈溶液として、0.2 % gelatin, 0.14 M NaCl, 0.025 M EDTA, 0.02 % NaN₃ を含む 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4) を用いた。本 RIA 系の操作手順を Fig. 15 に示した。

Antiserum : OAL656 (final dilution 1:35000)

Tracer : [¹²⁵I] CCK8

Standard Antigen : CCK8

Procedure

1st incubation (48 hr, 4°C)



2nd incubation (3 hr, 4°C)



centrifugation for B/F separation (3000 rpm, 30 min, 4°C)



counting precipitate radioactivity

Fig. 15 Procedure for CCK8 Radioimmunoassay

RIA の操作は以下の如く行った。ガラス製試験管に標準希釈溶液 (0.4 ml), 標準希釈溶液で検量線の各濃度に希釈した標準抗原溶液 (0.1 ml) あるいは未知検体溶液 (0.1 ml), 希釈抗血清 (0.2 ml) および希釈標識抗原 (0.1 ml, 約 5000 cpm) を順次添加し、十分に混和させた後、4 °C にて 48 時間インキュベーションを行った。抗体結合型抗原と遊離抗原の分離 (B/F 分離) は、polyethyleneglycol-第二抗体法にて行った。上記反応液に第二抗体として山羊抗家兔 γ -globulin 血清 1 バイアルを標準希釈溶液 (10 ml) に溶解したもの (0.1 ml)、また carrier protein として正常家兔血清 1 バイアルを標準希釈溶液 (10 ml) に溶解したもの (0.1 ml)、および沈殿促進剤として、0.01M phosphate buffered saline に溶解した 5 % polyethyleneglycol 6000 (0.5 ml) を添加、混和し、4 °C にて 3 時間インキュベーションを行った。その後、遠心分離 (4 °C, 3000 rpm, 30 min) して、上清を吸引除去して得られた沈渣の放射能をウエル型オートガンマカウンター (アロカ、ARC-600) で測定し、結合型放射能 (B) とした。また、同様に標準希釈溶液 (0.5 ml), 希釈抗血清溶液 (0.2 ml), および希釈標識抗原 (0.1 ml) を反応させて得た放射能を最大結合活性 (B_0) とした。更に、標準希釈溶液 (0.6 ml), 希釈標識抗原 (0.1 ml) を反応させて得た放射能を非特異的結合活性 (NSB) として、それぞれの標準抗原量における $(B-NSB) / (B_0-NSB)$ (%) を算出した。それを logit-log スケール上において直線回帰することにより標準曲線を作成し、未知検体の免疫活性濃度を求めた。

3) 組織からのCCK8抽出法

RIA 用検体のための組織は、Wistar 系雄性ラット (260-280 g) を断頭後、速やかに全脳を摘出し、氷上にて Glowinski-Iversen の方法 (67) に従い、以下の部位に分割することにより得た。すなわち、前頭皮質、線条体、海馬、側坐核、黒質、視床、視床下部、中脳、橋-延髄、および小脳の 10 部位である。組織重量の 10 倍量の氷冷蒸留水を加え、Polytron (KINEMATICA, GmbH) にてホモジナイズ後、沸騰水浴中で 10 分間煮沸した後、速やかに冷却し、遠心分離 (4 °C, 3000 rpm, 30 min) し、上清を分離した。沈渣に同量の氷冷蒸留水を加え、十分

攪拌した後、同様に遠心分離して得た上清を先の上清に加え、凍結乾燥し、検体とした。

4) Gel chromatographyによるCCK8の同定

3) にて調製した、前頭皮質抽出物に 2 ml の氷冷蒸留水を加え、4 °C にて 2 時間放置した後、遠心分離 (4 °C, 3000 rpm, 30min) し、上清 1 ml を Sephadex G-50 superfine column chromatography (1 x 75 cm) に付した。溶出液は、0.1 % bovine serum albumin を含む 0.02 M veronal buffer (pH 8.4) とし、各画分 1 ml として分取し、凍結乾燥して検体とした。

なお、あらかじめ、blue dextran 2000 と NaI により、それぞれこのカラムにおける void volume (V_0), total volume (V_t) を、また合成CCK8の溶出位置を決定した。

5) CCK8LIの測定

組織抽出および gel chromatography により得られた検体は、標準希釈液 1 ml にて溶解、4 °C にて 2 時間放置した後、遠心分離 (4 °C, 3000 rpm, 30min) により不溶物を除去した。こうして得られた上清の希釈系列を作成し、先述のCCK8 RIA 系 により測定した。

第 2 章の実験

1) 試薬

6-OHDA hydrobromide(6-OHDA)(Aldrich, Milwaukee, U.S.A.), pargyline hydrochloride(Sigma, St.Louis, U.S.A.), desmethylinipramine(Ciba-Geigy, Tokyo, Japan) を用いた。その他の試薬は全て試薬特級を用いた。

また、本章における RIA に用いた試薬はすべて第 1 章の実験と同一のものを用いた。

2) ラット脳室内投与

実験には Wistar 系雄性ラット (260-280 g) を用い、飼育は12 時間の明暗スケジュールで、また恒温 (24 °C) 条件下で行い、飼料および水は自由に摂取させた。6-OHDA 投与 1 時間前に pargyline (50 mg/kg) および desmethylimipramine (25 mg/kg) を腹腔投与した。次いで、pentobarbital sodium (15 mg/kg) 腹腔投与による麻酔下で脳定位固定装置 (SR-5, Narishige, Tokyo, Japan) にラットを固定し、Paxinos and Watson の脳地図に従い (68)、P 0.8 mm, L 1.5 mm, V 3.6 mm の位置にマイクロシリンジを挿入した。抗酸化剤として 0.1% ascorbic acid を含有する生理食塩液 10 μ l に遊離塩基として 250 μ g の 6-OHDA を溶解し 5 分間で注入した。対照には 0.1% ascorbic acid を含有する生理食塩液を注入した。注入後、10 分後にマイクロシリンジを取り除き、デンタルセメントで注入口をふさぎ、外科用接着剤で外皮と頭蓋とを接着した。6-OHDAあるいはその vehicle を投与した後 1、3、7、14、および 28 日後に断頭した。断頭はすべて午前 10:00 - 11:00 に行った。ラットの体重は午前 10:00 に測定した。

断頭後、全脳を速やかに摘出し、第 1 章に示した手順で脳分割、抽出、および凍結乾燥を行い、RIA に供した。

なお、RIA による定量は第 1 章の実験に示した方法と同様の方法にて行った。

3) 統計解析

ラット体重の経日変化は二元配置分散分析により解析した。6-OHDA 投与群と vehicle 投与群との間の体重、および CCK8LI 濃度の有意差検定は Student's *t*-test を用い、危険率 5 % 未満で有意差があるものとした。

第3章の実験

1) 試薬

L-DOPA (Wako Pure Chem., Osaka, Japan) および L-sulpiride (Sigma Chemical Co., St.Louis, U.S.A.) を用いた。また、RIA およびラット側脳室内投与に必要な試薬はそれぞれ第1章、第2章の実験と同じものを用いた。

2) 脳組織抽出、RIAおよび6-OHDAラット側脳室内投与

全て第1章、および第2章の実験に示した方法に準じて行った。

3) L-DOPA、L-sulpiride の腹腔内投与

正常ラットには L-DOPA (100、200、300 mg/kg)、また L-DOPA (200 mg/kg) と L-sulpiride (100 mg/kg) を同時に、あるいは生理食塩液を腹腔内投与した。6-OHDA 処置ラットには L-DOPA (200 mg/kg) あるいは生理食塩液を腹腔内に投与し、いずれのラットも投与2時間後に断頭し、第1章の実験に示した方法に準じて処理し、RIA に供した。

4) 統計解析

正常ラットにおける L-DOPA の CCK8LI 濃度に対する用量依存性は一元配置分散分析で解析した。正常ラットでの L-DOPA に対する L-sulpiride の影響、および6-OHDA 処置ラットでの L-DOPA の影響における有意差検定は全て Student's *t*-test により行い、危険率5%未満で有意差があるものとした。

第4章の実験

1) 試薬

Bacitracin、bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)を使用した。ラット脳室内投与に必要な6-OHDA、desmethyloxyimipramine および pargyline は第2章の実験に記載したものと同一のものを用いた。また合成 CCK8、 $[^{125}\text{I}]$ CCK8 labelled with Bolton Hunter reagent は第1-3章の実験におけるRIAと同一のものを使用した。

2) ラット側脳室投与

6-OHDA、および生理食塩液の側脳室投与は第2章の実験に記載した方法に準じて行った。

3) ラット脳膜標品調製

生理食塩液、あるいは6-OHDA処置したラットを処置後1、3、7、14、および28日に断頭した。なお、断頭は全て午前10:00-11:00に行った。全脳を摘出し、氷上にてGlowinski and Iversen (67)の方法に従い、前頭皮質、線条体、海馬、および側坐核に分割した。次いで、Fig. 16に示すようにTakedaらの方法(63)に従い、膜標品を調製した。組織を40倍量の5 mM MgCl_2 を含有する氷冷50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)中でホモジネートし、48000 x g、30 min、4 °Cで遠心分離した。沈渣を同容量の同じ氷冷bufferに懸濁させ、同じ条件で遠心分離を行った。この操作を二度繰り返した後、最終的に得られた沈渣を膜標品とし、結合実験に使用した。

4) [¹²⁵I] CCK8 結合実験

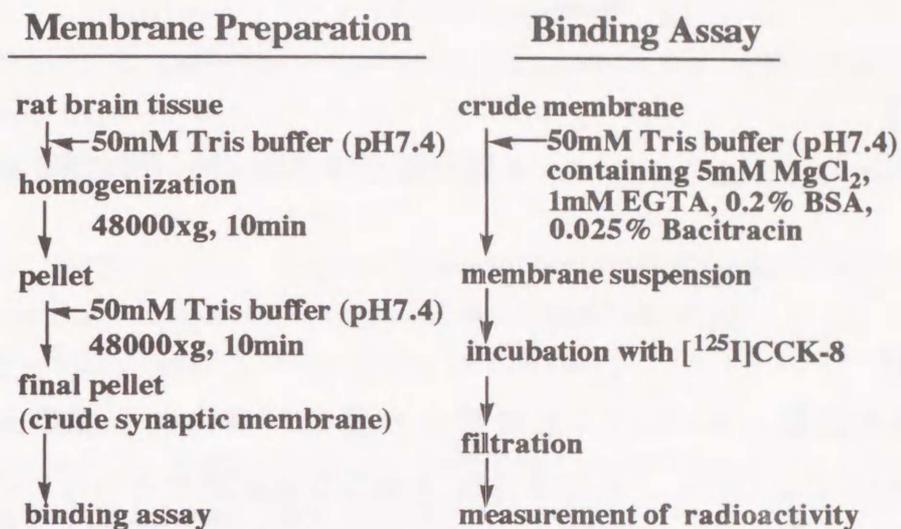


Fig. 16. Procedure for Membrane Preparation and Binding Assay

Fig. 16 に示したように [¹²⁵I] CCK8 結合実験は Takeda らの方法 (63) に若干の変更点を加え行った。まず、ラット脳各部位より得られた膜標品を 80 倍量の氷冷 assay buffer [5mM MgCl₂、1 mM ethylene glycol bis (β-aminoethyl ether) N,N'-tetraacetic acid (EGTA), 0.025 % bacitracin, 0.2 % bovine serum albumin を含有する 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)] に懸濁させた。 [¹²⁵I] CCK8 の膜標品に対する全結合量の測定には、25 μl assay buffer、25 μl [¹²⁵I] CCK8 in assay buffer (50000 cpm/assay tube)、および 450 μl の膜標品懸濁液の混液を用いた。また非特異的結合量の測定には上記の全結合量の場合における 25 μl assay bufferの代わりに 1 μM CCK8 in assay buffer を加えた混液を用いた。両混液共に恒温槽 (4、25、37 °C) で一定時間インキュベーションを行い、5 mM MgCl₂、0.2 % bovine serum albumin を含有する、氷冷 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 2 ml を加え、この反応液を Whatman glass filter (GF/F) で減圧ろ過することにより反応を停止させた。その後、同じ buffer 3 ml でフィルターを3度洗浄した。フィルター上の放射能はウエル型オートガンマカウンター(Aloka, ARC-600) により測定した。特異的結合量は全結合量から非特異的結合量を差し引くことにより求めた。また、膜標品懸濁液を含まない [¹²⁵I] CCK8

のみを含有した場合の放射能を blank とし、全結合量および非特異的結合量はこの blank radioactivity により補正した。

5) 蛋白定量

蛋白量は bovine serum albumin を標準品とし、Lowry らの方法 (69) に従い測定した。

6) 統計解析

生理食塩液処置群と6-OHDA処置群との間の特異的結合量の差の検定は Student's t-test により行い、危険率 5 % 未満で有意差があるものとした。

引用文献

- 1) A.C. Ivy, E. Oldberg: A hormone mechanism for gallbradder contraction and evacuation.
Am.J.Physiol., 86, 599-613 (1928).
- 2) A.A. Harper, H.S. Raper: Pancreozymin, a stimulant of the secretion of pancreatic enzymes in extracts of the small intestine.
J.Physiol.(London), 102, 115-125 (1943).
- 3) E. Jorpes, V. Mutt: Cholecystokinin and pancreozymin one single hormone?
Acta Physiol.Scand., 66, 196-202 (1966).
- 4) V. Mutt, E. Jorpes: Structure of porcine cholecystokinin pancreozymin cleavage with thrombin and with trypsin.
Eur.J.Biochem., 6, 156-162 (1968).
- 5) L.I. Larsson, J.F. Rehfeld: Localization and molecular heterogenesity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system.
Brain Res., 165, 201-218 (1979).
- 6) J.F. Rehfeld: Immunochemical studies on Cholecystokinin.
J.Biol.Chem., 253, 4022-4030 (1978).
- 7) J.J. Vanderhaeghen, J.C. Signeau, W. Gepts: New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies.
Nature (London), 257, 604-605 (1975).
- 8) G.J. Dockray, R.A. Gregory, J.B. Hutchison, J.I. Harris, M.J. Runswick: Isolation, structure, and biological activity of two cholecystokinin octapeptide from sheep brain.
Nature (London), 274, 711-713 (1978).
- 9) J.E. Muller, E. Straus, R.S. Yalow: Cholecystokinin and its COOH-terminal

octapeptide in the pig brain.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 74, 3035-3037 (1977).

- 10) G.J. Dockray: Immunohistochemical evidence of cholecystokinin like peptides in brain.
Nature (London), 264, 568-570 (1976).
- 11) T. Hökfelt, J.F. Rehfeld, L. Skirboll, B. Ivemark, M. Goldstein, K. Markey: Evidence for coexistence of dopamine and CCK in meso-limbic neurones.
Nature (London), 285, 476-478 (1980).
- 12) T.Hökfelt, O.Johansson, A.Ljungdahl, L.M. Lundberg, M. Schultzberg: Peptidergic neurones.
Nature (London), 284, 515-521 (1980).
- 13) R.L. Eskay, P. Giraud, C. Oliver, M.J. Brawnstein: Distribution of α -melanocyte stimulating hormone in the rat brain: Evidence that α -MSH containing cells in the arcuate region send projections to extrahypothalamic areas.
Brain Res., 178, 55-67 (1979).
- 14) M.C. Beinfeld, D.K. Meyer, R.L. Eskay, R.T.Jensen, M.J. Brownstein: The distribution of cholecystokinin immunoreactivity in the central nervous system of the rat as determined by radioimmunoassay.
Brain Res., 212, 51-57 (1981).
- 15) P.D. Marley, J.F. Rehfeld, P.C. Emson: Distribution and chromatographic characterization of gastrin and cholecystokinin in the rat central nervous system.
J.Neurochem., 42, 1523-1535 (1984).
- 16) A. Saito, I.D. Goldfine, J.A. Williams: Characterization of receptors for cholecystokinin and related peptides in mice cerebral cortex.
J.Neurochem., 37, 483-490 (1981).
- 17) P.C. Emson, C.M. Lee, J.F. Rehfeld: Cholecystokinin octapeptide. Vasicular

localization calcium dependent release from rat brain in vitro.

Life Sci., 26, 2157-2163 (1980).

- 18) S.W. Ryder, E. Straus, R.S. Yalow: Further characterization of brain cholecystokinin converting enzymes.
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 77, 3669-3671 (1980).
- 19) T.H. Moran, P.H. Robinson, M.S. Goldrich, P.R. McHugh: Two brain cholecystokinin receptors. Implications for behavioral actions.
Brain Res., 362, 175-179 (1986).
- 20) I. Jurna, G. Zetler: Antinociceptive effect of centrally administered caerulein and cholecystokinin octapeptide (CCK-8).
Eur.J.Pharmacol. 73, 323-331 (1981).
- 21) J.E. Morley, J.E. Levine, A.S. and S. Lindblad: Intracerebroventricular cholecystokinin octapeptide produces hypothermia in rats.
Eur.J.Pharmacol., 74, 249-251 (1981).
- 22) K.E. Asin, P.A. Gore Jr., L. Bednarz, M. Holladay, A.M. Nadzan: Effects of selective CCK receptor agonists on food intake after central or peripheral administration in rats.
Brain Res., 571, 169-174 (1992).
- 23) M.A. Della-Fera, C.A. Baile, B.S. Schneider, J.A. Grinker: Cholecystokinin antibody injected in cerebral ventricles stimulates feeding in sheep.
Science, 212, 687-689 (1981).
- 24) J.E. Marley, A.S. Levine: Intraventricular cholecystokinin octapeptide produces hyperglycemia in rats.
Life Sci., 28, 2187-2190 (1980).
- 25) P. Frey: Cholecystokinin octapeptide levels in rat brain are changed after subchronic neuroleptic treatment.
Eur.J.Pharmacol., 95, 87-92 (1982).

- 26) K. Gysling, M.C. Beinfeld: Failure of chronic haloperidol treatment to alter levels of cholecystinin in the rat brain striatum and olfactory tubercle nucleus accumbens area.
Neuropeptides, 4, 421-423 (1984).
- 27) U. Conzelmann, A. Holland, D.K. Meyer: Effects of selective dopamine D₂-receptor agonists on the release of cholecystinin-like immunoreactivity from rat striatum.
Eur.J.Pharmacol., 101, 119-125 (1984).
- 28) D.K. Meyer, J. Krauss: Dopamine modulates cholecystinin release in neostriatum.
Nature (London), 301, 338-340 (1983).
- 29) J.B. Hutchinson, J. Strupish, S.R. Nahorski: Release of endogeneous dopamine and cholecystinin from rat striatal slices. Effects of amphetamine and dopamine antagonists.
Brain Res., 370, 310-314 (1986).
- 30) D.K. Meyer, A. Holland, U. Conzelmann: Dopamine D₁-receptor stimulation reduces neostriatal cholecystinin release.
Eur.J.Pharmacol., 104, 387-388 (1984).
- 31) J.M. Studler, F. Javoy-Agid, F. Cesselin, J.C. Legrand, Y. Agid: CCK-8 immunoreactivity distribution in human brain : Selective decrease in the substantia nigra from parkinsonian patients.
Brain Res., 243, 176-179 (1982).
- 32) 渋谷 治男、深間内 文彦、高橋 良：精神分裂病死後脳、前頭前野、側頭脳、辺縁系のコレシストキニン免疫活性。
神経化学、23, 409-411 (1984).
- 33) E. Hashimura, F. Shimizu, T. Nishio, K. Imagawa, K. Tateishi, T. Hamaoka: Production of rabbit antibody specific for amino-terminal residues of

cholecystokinin octapeptide (CCK-8) by selective suppression of cross reactive antibody response.

J.Immunol.Methods, 55, 375-387 (1982).

- 34) P.D. Marley, J.F. Rehfeld: Extraction techniques for gastrin and cholecystokinins in the rat central nervous system.

J.Neurochem., 42, 1515-1522 (1984).

- 35) G.J. Dockray: Cholecystokinins in rat cerebral cortex. Identification, purification and characterization by immunochemical methods.

Brain Res., 188, 155-165 (1980).

- 36) G. Jonsson: Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology.

Ann.Rev.Neurosci., 3, 169-187 (1980).

- 37) N.J. Uretsky, L.L. Iversen: Effects of 6-hydroxydopamine on catecholamine containing neurones in the rat brain.

J.Neurochem., 17, 269-278 (1970).

- 38) G.R. Breeze, T.D. Traylor: Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine.

Br.J.Pharmacol., 42, 88-99 (1971).

- 39) M.J. Zigmond, T.W. Berger, A.A. Grace, E.M. Stricker: Compensatory responses to nigrostriatal bundle injury: Studies with 6-hydroxydopamine in an animal model of Parkinsonism.

Mol.Chem.Neuropathol., 10, 185-200 (1989).

- 40) S.P. Butcher, A. Varro, J.S. Kelly, G.J. Dockray: In vivo studies on the enhancement of cholecystokinin release in the rat striatum by dopamine depletion.

Brain Res., 505, 119-122 (1989).

- 41) P.D. Marley, P.C. Emson, J.F. Rehfeld: Effect of 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle on the distribution of cholecystokinin in rat forebrain.

Brain Res., 252, 382-385 (1982).

- 42) J. Luthman, E. Brodin, E. Sundstorm, B. Wiehager: Studies on brain monoamine and neuropeptide systems after neonatal intracerebroventricular 6-hydroxydopamine treatment.
Int.Devl.Neurosci., 8, 549-560 (1990).
- 43) J.H. Fallon, K.B. Seroogy: The distribution and some connections of cholecystokinin neurons in the rat brain.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 448, 121-132 (1985).
- 44) D.K. Meyer, Z. Protopapas: Studies on cholecystokinin-containing neuronal pathways in rat cerebral cortex and striatum.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 448, 133-143 (1985).
- 45) J.M. Lundberg, A. Anggard, J. Fahrenkrug, T. Hökfelt, V. Mutt: Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands. Functional significance of coexistence transmitters for vasodilation and secretion.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 77, 1651-1655 (1980).
- 46) R. Mitchell, S. Fleetwood-Walker: Substance P, but not TRH, modulates the 5-HT autoreceptor in ventral lumbar spinal cord.
Eur.J.Pharmacol., 76, 119-120 (1981).
- 47) P. Langelier, A.G. Roberge, R. Boucher, L.J. Poirier: Effects of chronically administered L-DOPA in normal and lesioned cats.
J.Pharmacol.Exp.Ther., 187, 15-26 (1973).
- 48) K.G. Lloyd, L. Davidson, O. Hornykiewicz: The neurochemistry of Parkinson's disease. Effect of L-DOPA therapy.
J.Pharmacol.Exp.Ther., 195, 453-464 (1975).
- 49) E.D. Abercrombie, A.E. Bonatz, M.J. Zigmond: Effects of L-DOPA on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine treated rats.

Brain Res., 525, 36-44 (1990).

- 50) G.L. Snyder, M.J. Zigmond: The effects of L-DOPA on in vitro dopamine release from striatum.
Brain Res., 508, 181-187 (1990).
- 51) R.C. Duvoison, C. Mytilineou: Where is L-DOPA decarboxylated in the striatum after 6-hydroxydopamine nigrotomy?
Brain Res., 152, 369-373 (1978).
- 52) F. Hefti, E. Melamed, R.J. Wurtman: The site of dopamine formation in rat striatum after L-DOPA administration.
J.Pharmacol.Exp.Ther., 217, 189-197 (1981).
- 53) Y. Goshima, T. Kubo, Y. Misu: Transmitter-like release of endogenous 3,4-dihydroxyphenylalanine from rat striatal slices.
J.Neurochem., 50, 1725-1730 (1988).
- 54) S. Nakashima, Y. Goshima, J.L. Yue, Y. Misu: Transmitter-like basal and K⁺-evoked release of 3,4-dihydroxyphenylalanine from the striatum in conscious rats studied by microdialysis.
J. Neurochem., 58, 270-275 (1992).
- 55) J. Sierralta, K. Gysling: Effect of dopamine depletion upon K⁺-evoked release of CCK from superfused striatal slices.
Neurosci.Letters, 112, 313-317 (1990).
- 56) A. Praissman, P.A. Martinez, C.F. Saladino, J.M. Berkowitz, A.W. Steggle, J.A. Finkelstein: Characterization of cholecystokinin binding sites in rat cerebral cortex using a ¹²⁵I-CCK-8 probe resistant to degradation.
J.Neurochem., 40, 1406-1413 (1983).
- 57) C.W. Lin, T. Miller: Characterization of cholecystokinin receptor sites in Guinea-pig cortical membranes using [¹²⁵I] Bolton Hunter-cholecystokinin octapeptide.

J.Pharmacol.Exp.Ther., 232, 775-780 (1985).

- 58) A. Saito, H. Sankaran, I.D. Goldfine, J.A. Williams: Cholecystokinin receptors in the brain : Characterization and distribution.
Science, 208, 1155-1156 (1980).
- 59) R. Sekiguchi, T. Moroji: A comparative study on characterization and distribution of cholecystokinin binding sites among the rat, mouse and Guinea pig brain.
Brain Res., 399, 271-281 (1986).
- 60) F. Fukamauchi, T. Yoshikawa, S. Kaneno, H. Shibuya, R. Takahashi: The chronic administration of dopamine antagonists and methamphetamine changed the [³H]-cholecystokinin-8 binding sites in the rat frontal cortex.
Neuropeptides, 10, 221-225 (1987).
- 61) J. Harro, S.S. Jossan, L. Orelund: Changes in cholecystokinin receptor binding in rat brain after selective damage of locus coeruleus projections by DSP-4 treatment.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 346, 425-431 (1992).
- 62) T. Yazu, T. Kimura, T. Sumii, H. Nawata: Alteration of cholecystokinin receptor binding after caerulein-induced pancreatitis in rats.
Digestion, 50, 142-148 (1991).
- 63) Y. Takeda, M. Hoshino, N. Yanaihara, C. Yanaihara, J. Isobe, N. Sugiura, K. Kashimoto, Y. Takano, H. Kamiya: Comparison of CCK-8 receptors in the pancreas and brain of rats using CCK-8 analogues.
Jpn.J.Pharmacol., 49, 471-481 (1989).
- 64) R.F. Lane, C.D. Blaha, A.G. Phillips: In vivo electrochemical analysis of cholecystokinin-induced inhibition of dopamine release in the nucleus accumbens.
Brain Res., 397, 200-204 (1986).

- 65) M.M. Voigt, R.Y. Wang: In vivo release of dopamine in the nucleus accumbens of the rat : modulation by cholecystokinin.
Brain Res., 296, 189-193 (1984).
- 66) T.Bartfai: Presynaptic aspects of the coexistence of classical neurotransmitters and peptides.
Trends in Pharmacol.Sci., 6, 331-334 (1985).
- 67) J. Glowinski, L.L. Iversen: Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. The distribution of [³H]dopamine and [³H]dopa in various regions of the brain.
J.Neurochem., 13, 655-669 (1966).
- 68) G. Paxinos, C. Watson: "The rat brain in stereotaxic co-ordinates" 2nd ed., Academic Press, New York (1986).
- 69) O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr, R.J.Randell: Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.Biochem., 193, 265-275 (1951).

謝 辞

終わりに臨み、本研究を行う機会を与えていただき、また終始御指導、御鞭撻を賜りました、広島大学医学部附属病院薬剤部教授・福地 坦先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり有益な御助言を賜りました、広島大学医学部附属病院薬剤部助教授・木平健治先生、ならびに広島大学医学部附属病院薬剤部・北浦照明博士、三宅勝志博士に深謝致します。

ペプチドの組織抽出、ラジオイムノアッセイに関する指導を賜りました、静岡県立大学薬学部教授・矢内原昇先生、同講師・井口和明先生に深謝致します。

本論文の作製に際し有益な御助言を賜りました、広島大学医学部総合薬学科教授・辰巳 淳先生、同助教授・西尾廣昭先生に深謝致します。

1995年3月 木村 康浩

本論文に関する内容は以下の雑誌に公表した。

第1、2章に関する報文

- 1) Y. Kimura, K. Miyake, T. Kitaura, K. Kihira, H. Fukuchi :
Changes of cholecystinin octapeptide tissue levels in rat brain
following dopamine neuron lesions induced by 6-hydroxydopamine.
Biol.Pharm.Bull., 17, 1210 - 1214 (1994)

第3章に関する報文

- 2) Y. Kimura, K. Kihira, K. Miyake, T. Kitaura, H. Fukuchi :
Effects of L-DOPA on cholecystinin octapeptide tissue levels in
normal and 6-hydroxydopamine treated rat brain.
Biol.Pharm.Bull., 18, 13 - 17 (1995)

第4章に関する報文

- 3) Y. Kimura, K. Kihira, K. Miyake, T. Kitaura, H. Fukuchi :
Regional characteristics of [¹²⁵I] cholecystinin octapeptide specific
binding to rat brain membranes following 6-hydroxydopamine
treatment.
Biol.Pharm.Bull., (1995) in press