

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

日本発の新しい抗パーキンソン作用薬
ゾニサミドの臨床研究班

平成15-17年度 総合研究報告書

主任研究者 村田 美穂
国立精神・神経センター武蔵病院神経内科

平成18(2006)年 3月

目 次

I.	主任総括研究報告		
	日本発の新しい抗パーキンソン作用薬ゾニサミドの臨床研究		
	国立精神・神経センター武蔵病院神経内科	村田 美穂	1
II.	分担研究報告		
	日本発の新しい抗パーキンソン作用薬ゾニサミドの臨床研究		
	国立精神・神経センター武蔵病院神経内科	村田 美穂	7
	ゾニサミドの L-DOPA およびドパミン誘発キノン体毒性に対する保護効果に関する検討		
	岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学		
		浅沼 幹人	12
	Zonisamide (ZNS)の臨床効果の検討		
	—パーキンソン病のドパミン作動性治療抵抗性振戦、本能的振戦、すくみ足—		
	和歌山県立医科大学神経内科	近藤 智善	21
	パーキンソン病の遺伝子多型と発症リスクおよびゾニサミドの薬剤効果の研究		
	大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学	戸田 達史	22
	日本発の新しい抗パーキンソン作用薬ゾニサミドの臨床研究		
	—パーキンソン病モデルサルによる検討—		
	自然科学研究機構生理学研究所	南部 篤	24
	日本発の新しい抗パーキンソン病作用薬ゾニサミドの臨床研究に関する研究		
	愛媛大学医学部臨床薬理学講座	野元 正弘	27
	ゾニサミドの臨床効果について		
	国立相模原病院神経内科	長谷川 一子	33
	Zonisamide のもつ神経保護作用についての基礎的研究		
	順天堂大学医学部脳神経内科	服部 信孝	34
III.	開催会議		37
IV.	班構成員名簿		45
V.	研究成果の発刊に関する一覧		49

I 総括報告書

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
研究年度終了総括報告書

日本発の新しい抗パーキンソン作用薬ゾニサミドの臨床研究

主任研究者 村田 美穂 国立精神・神経センター武蔵病院・第2病棟部長

研究要旨：主任研究者が抗パーキンソン作用を発見したゾニサミド(ZNS)は現在使用できる薬剤ではコントロール困難なパーキンソン病進行期症例に対し著明な臨床効果を示すこと、およびその効果が1年以上にわたり持続することを明らかにした。また、投与6ヶ月以降も経過とともに改善する傾向を認め、臨床的な神経保護作用を示唆する所見と考えられた。作用機序については、培養細胞、モデル動物などを用いた生理学的及び生化学的検討から、主たる作用点は被殻で、THmRNA発現増加を伴うドパミン合成亢進作用とドパミンに基質特異性の高い中等度のMAO阻害作用であること、ZNSはL-dopaの効果を増幅、延長するように作用するが、単独でもパーキンソンモデルにおける異常な淡蒼球の神経活動を正常化させるように作用することを明らかにした。また臨床的にL-dopa抵抗性の振戦やくみ足にZNSが効果を示すことを明らかにしたが、この作用機序として、ZNSの淡蒼球神経活動正常化作用が考えられた。さらにZNSの効果が最も出現しやすい症例群を明らかにするために、年齢、罹患期間、経過、併用薬物等臨床的な素因について層別解析を行った結果、特徴的な臨床像はなく、むしろ遺伝素因により決定している可能性が高いと結論した。一方、ドパミン及びMPP+による細胞毒性に対し著明な神経保護作用を示し、このときリン酸化PTEN蛋白質量の増加を伴うことを明らかにした。Parkin遺伝子産物の解析からドパミンキノンが細胞死の実行分子であることを明らかにし、さらにZNSがin vivo, in vitroで小胞外細胞質内の過剰ドパミン、L-dopaをすみやかにメラニンに変換することで、強力なキノン体消去作用を示すことを明らかにした。これらの結果はZNSが進行期症例での効果を示すのみならず、これまでL-dopa, ドパミンによる神経毒性の可能性を恐れてパーキンソン病初期にL-dopaを使用することがためらわれていたことに対し、ZNSを初期から併用することで、安全に必要な量のL-dopaを使用できる可能性を示唆している。さらに、神経保護作用を期待してとくに振戦主体の初期例などにZNS単独での投与の可能性を示唆するものである。

分担研究者

近藤智善 和歌山県立医大・教授
野元正弘 愛媛大学医学部・教授
南部 篤 生理学研究所・教授
浅沼幹人 岡山大学大学院・助教授
服部信孝 順天堂大学医学部・助教授
戸田達史 大阪大学大学院・教授
長谷川一子 国立相模原病院・医長

服薬に伴い症状が大きく変動するwearing-off現象の出現が最大の問題となっている。wearing-off現象を改善するために開発された多くの薬剤をもってしても効果は不十分で、しかもこれらの薬剤は高価であるために、患者の負担も大きくまた医療財政をも逼迫させている。包括医療の導入によりこれらの薬剤がますます使いにくくなることも想定され、厚生労働行政において今後一層大きな問題になると考えられ

A. 研究目的

パーキンソン病(PD)長期治療においてはレボドパの効果持続時間が短縮し、

る。また、PDは疾患単位として独立しているものの、経過や中核となる症状、薬物への反応性などから、いくつかの病型が存在すると考えられているが、薬剤の使い分けはいまだ混乱している。従って現在のPD治療においては1) wearing-off現象のコントロール、2) 経済的かつ最高の効果を得られる薬物の組み合わせの選択の2点が最も重要な問題であり、これらを解明することはPD患者のQOL上も医療財政上も強く求められている。

主任研究者らが2001年に抗PD作用を発見したゾニサミド(ZNS)は我が国で開発された抗てんかん薬で、すでに10年以上使用され、安全性も確立しており、比較的少数であるが二重盲検でもPD症状全般特にwearing-off現象に著明な効果を認めた。ZNS投与により寝たきりであった患者が歩行可能になるという著効を呈することも希ではなく、これほど効果がありかつ安全で安価な薬剤を適正に使用することは患者のQOLにも医療財政にも極めて大きく寄与すると考える。

そこで本研究では、ZNSの抗PD効果とその作用機序を明らかにして、新規抗PD薬の開発につなげるために1) 臨床的にZNSの抗パーキンソン作用の確認と、著明な効果を得られる症例の特徴的臨床像の抽出などにより、パーキンソン病のオーダーメイド医療の確立につなげる。2) 培養細胞系及びモデル動物を用いたZNSの作用発現機序の解明、3) 神経保護作用の程度、作用機序の解明、4) PD類縁疾患での効果の評価を目的に

研究を行った。

B. 研究方法・研究結果・考察

1) ZNSの臨床効果

a) 抗PD作用(村田、長谷川)

主任研究者らの小規模の臨床研究の結果を受け、患者の強い希望によりすでに多くの神経内科専門医が現在可能な治療でコントロール不十分な進行期PD患者を対象にZNSを使用していたことから、アンケートによる実態調査を行った。その結果、著効例16%を含む60%以上で、効果を認め、副作用としては眠気、ふらつき程度であった。その後主任研究者が医学専門家として、製造元会社が行った、大規模二重盲検試験でも25-50 mg/dという少量(抗てんかん薬としての常用量は300-600mg/d)で、安全にかつ明らかなパーキンソン症状の改善とwearing-off現象の改善を示すことを確認し、現在、抗PD作用薬としての使用申請中である。

b) 長期効果(村田)

3-5年抗PD薬としてのZNS投与を受けた患者について、UPDRS IIIの長期効果を評価した。その結果、8/12例で投与直後よりはやや悪化しているものの、3年以上、投与前よりも改善した状態を維持でき、長期的な効果を確認できた。製造元会社における1年間の長期投与試験においても、平均罹患期間約9年の進行期症例で投与4週後までに約60%がなんらかの改善を示し、投与16週までに著明に改善しているが、その後も1年までより改善する傾向にあった。PDは進行性の疾患であることもあり、従来抗PD薬の治療においては6ヶ月以降悪化するのが通常で

あるが、ZNSではやや改善する傾向があり、本研究班の成果からも進行期において3年以上投与前よりも改善を持続できるという点は、少なくとも長期的に効果があるということと、さらにあとにのべる神経保護作用を期待させる結果を得たといえる。

c) オーダーメイド医療に向けて (村田、長谷川、戸田)

ZNSは目を疑うほどの著効例がある一方で、少数ながら、効果が明らかでない患者も存在する。より適正でかつ効率のよい治療のために、ZNSの著効例に特徴的な臨床像を得るために大規模二重盲検試験の結果を詳細に層別解析にて検討した。その結果、罹患期間、性、年齢、併用薬剤等による差異は認められなかったことから、特徴的な臨床像はなく、むしろ遺伝素因により決定している可能性が高いと結論した。

戸田は多数の候補遺伝子 SNP による関連解析をより経済的かつ時間を節約して進めるために、pooled DNA 法による、高速タイピングの系を確立し、PD 疾患感受性遺伝子の検索を進め、その一つとして、 α -synuclein を同定した。ZNS の効果の違いは、ある 1 個の遺伝子 SNP により決定されるというよりは、このような疾患感受性遺伝子のいくつかの組み合わせにより決まる可能性が高く、この研究を進めている。現在、ZNS 投与患者の協力を得て、DNA 収集を進めており、今後効果の程度と効果に関係すると考えられる遺伝子多型とのタイピングをすすめる予定である。

2) ZNS の作用機序

a) 生化学的検討 (村田、野元)

村田は正常ラット、培養細胞への ZNS 投与実験から、ZNS はドパミン生成の律速酵素である tyrosine hydroxylase (TH) mRNA を介したドパミン合成亢進作用を持つことを示した。また、ZNS の monoamine oxydase (MAO)B 阻害活性は肝マイクロゾームでは $IC_{50}:670\mu M$ 、脳線条体膜分画では $27\mu M$ で、通常の投与量 ($50mg/d$)での脳内の濃度は $20\mu M$ 前後と推定されることから、末梢では MAOB 阻害作用は認めないが、中枢では中程度の阻害作用は出現し、抗 PD 効果の一部として作用する可能性があることを発見した。さらに PD モデルマーマーモセットにおいて、L-dopa による運動改善効果を ZNS が増強することを確認し、マイクロダイアリシス法にて、作用機序を検討した。その結果 ZNS 投与により、L-dopa 投与後の線条体 ECF のドパミン濃度が増加し、一方で、DOPAC, HVA は減少した。MAOB 量がサル約半分のラットでも同様の結果を得ており、代謝産物の変化からも、MAOB 阻害作用とは異なるドパミン代謝抑制作用 and/or ドパミン取り込み阻害作用を ZNS がもつことを示した。

b) 生理学的検討 (南部)

サルの PD モデルを用いて大脳基底核の単一ニューロン活動と臨床症状を調べた。ZNS はサルにおいても明らかな抗 PD 作用を示した。重症例においては L-dopa 併用により、L-dopa による症状改善時間を明らかに延長させ、皮質刺激による淡蒼球内節ニューロン反応パターンの正常化時間を延長させた。ZNS 単

独投与でも反応パターンが正常化する傾向にあった。

PD モデルサルの淡蒼球内節ニューロンでは正常ではほとんど認めないバースト発射や発振活動を認めるが、ZNS は単独投与でこのような神経活動を正常化する傾向にあった。淡蒼球内節ニューロンのバースト発射や発振活動が振戦の原因であることがこれまでに強く示唆されており、本研究にて近藤が臨床的に示した、L-dopa 抵抗性の振戦、すくみ足などへの ZNS の効果の作用機序を示している可能性がある。

さらに ZNS の局所投与実験では黒質では変化はなく、被殻への投与において、全身投与と同様な効果を得られたことから、主な作用点は被殻と考えられた。

c) 臨床的側面からの検討(村田、近藤)

以上より、現時点までに ZNS は被殻を作用点として、ドパミン合成亢進作用、中等度の MAOB 阻害作用、さらに MAOB 阻害とは異なる機序によるドパミン代謝抑制作用 and/or ドパミン取り込み阻害作用をもつことを明らかにした。

大規模二重盲検の層別解析において、より強力な MAOB 阻害剤である selegiline の併用の有無にかかわらず同程度の効果を得たことは、臨床的にも ZNS の抗 PD 作用の主体が MAOB 阻害作用ではないことを示している。

また、近藤は ZNS の振戦に対する効果に注目し、以下に述べるように本態性振戦における効果も確認している。この結果は ZNS の抗振戦作用がドパミン系のような疾患特異的な特定の神経系に対する作用というよりは振戦の発生や伝

達にかかわる系への作用である可能性を示唆している。

3) ZNS の神経保護作用についての検討(浅沼、服部)

浅沼はまず、ZNS が脳内グルタチオン増加作用と *in vitro* でドパミン自動酸化系でのキノン体の速やかな除去作用をもつことを示した。ついで、6OHDA による PD モデルラットに L-dopa を投与すると障害側線条体でのみキノプロテインが増加するが、ZNS の同時投与によりほぼ完全に抑制され、キノン体を中心とした細胞質過剰ドパミンによる神経毒性に対して ZNS が保護効果を有することを明らかにした。さらに ZNS 前投与により 6OHDA による黒質ドパミン神経細胞の減少が阻止されることを明らかにした。他系統への検討もふまえ、ZNS は、キノン体消去系因子への作用は乏しく、小胞外細胞質内の過剰ドパミン・L-dopa の安定なメラニンへの強力な変換作用、グルタチオン代謝抑制作用が ZNS の L-dopa 誘発キノン体毒性に対する保護・抑制効果の主体であることを明らかにした。これらは PD 治療において、大きな問題点であるドパミン毒性に対し、ZNS が保護効果を有することを示している。L-dopa が有効であるにもかかわらず、むしろ効果が低くかつ高価なドパミンアゴニストが推奨されていた根拠の最大の点はこの障害黒質ドパミン系に対するドパミン毒性の問題であったが、ZNS がこれに対し保護効果をもつことは比較的初期から ZNS と併用することで、安心して L-dopa を使えることを示唆しており、極

めて重要な発見といえる。

服部は常染色体性劣勢遺伝性若年性パーキンソンニズム (Park 2) の原因遺伝子である parkin の機能解析からドパミンキノン体が神経細胞死の実行分子であることを見出した。細胞レベルで ZNS の神経保護作用を評価したところ、SH-SY5Y 細胞の生存に対し ZNS 1-100 μ M で保護的に作用した。

さらに、レチノイン酸で分化させた SH-SY5Y 細胞を用い、5 μ M dopamine 及び 50 μ M MPP+による細胞毒性に対し、500 μ M ZNS が有意な保護効果を示すことを明らかにした。さらにこのとき、細胞生存制御に重要な PTEN の活性型であるリン酸化 PTEN の蛋白量増加を伴うことを明らかにした。

以上より ZNS は臨床治療濃度で PD の神経細胞死に強く関与していると考えられている酸化ストレスによる細胞毒性に対して保護作用を示し、さらに現在の PD 治療によりもたらせられる可能性の高い細胞内過剰ドパミンの毒性に対しても保護効果を持つことを見出した。

4) ZNS のパーキンソン病関連病態に対する効果 (近藤、長谷川)

ZNS は PD のすべての症状に効果を認めるが、とくに他の抗 PD 薬ではやや効果が落ちるとされている振戦に対しての効果が高いことが本研究の中から明らかになってきた。これに基づき、PD の治療抵抗性の振戦及び、本態性振戦について、クロスオーバー試験法にて検討した。いずれの病態でもすでに効果が確

立した薬剤 (trihexyphenidyl, arotinol) と同等の効果をえられた。これらは抗コリン剤と・阻害薬であり、副作用などから臨床上使いにくい場面が多いことから、ZNS がこれらにかわって使用できることは極めて有用といえる。

また、少数例ではあるが、restless leg syndrome、パーキンソン病関連疾患である進行性核上性麻痺 (PSP) のすくみ足への効果を見出した。今後より多数の例で有効性を確認する必要がある。

(倫理面への配慮)

1) 研究対象者に対する人権擁護の問題、インフォームドコンセントなどについては十分配慮し、臨床研究、ヒトゲノム・遺伝子解析研究のそれぞれの倫理指針に基づき、各研究施設の倫理委員会の承認のもとに行った。

2) 動物実験においては動物愛護に十分配慮し、各研究施設の動物実験の指針に沿って行った。

C. 結論

ZNS の臨床効果、作用機序、神経保護作用、パーキンソン病以外の病態への応用、オーダーメイド医療確立に向けたタイピングなど ZNS の適正な使用のために多角的な研究を展開した。臨床効果は大規模二重盲検試験により確認され、また、少数例の 3-5 年の長期投与でも、製造元による 1 年間の長期投与試験でも明らかな効果が持続し、しかも 1 年後までは投与直後より改善する傾向にあることが確認できた。作用機序は被殻を作用点として、ドパミン産生亢進、中等度の MAOB

て、ドパミン産生亢進、中等度の MAOB 阻害作用とともにドパミン再取り込み阻害作用 and/or MAOB 阻害以外の代謝抑制作用の存在も示唆された。

また、神経保護作用については、ZNS が神経細胞死の実行分子であるドパミンキノン体除去作用、脳内グルタチオン増加作用をもち、細胞質過剰ドパミンによる神経毒性に対し保護効果をもつことを示した。さらに実際に治療量で培養細胞のドパミン毒性、MPP+毒性に対し、細胞保護作用を示すことを明らかにした。

今後、オーダーメイド医療、新規薬剤の開発を視野に、作用機序、神経保護作用についての検討、さらに他の病態への ZNS の効果の確認を進めたい。

D. 研究発表

1) 国内

口頭発表	234 件
原著論文による発表	12 件
それ以外の発表（レビュー等）	104 件

1. 主な論文発表

別紙記載

2. 主な学会発表

別紙記載

E. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1) 特許取得

特になし

2) 実用新案登録

特になし

3) その他

特になし

Ⅱ 分 担 報 告 書

日本発の新しい抗パーキンソン作用薬ゾニサミドの臨床研究

主任研究者 村田 美穂 国立精神・神経センター武蔵病院・第2病棟部長

研究要旨：主任研究者が抗パーキンソン作用を発見したゾニサミド(ZNS)は現在使用できる薬剤ではコントロール困難なパーキンソン病進行期症例に対し著明な臨床効果を示すこと、およびその効果が1年以上にわたり持続することを明らかにした。また、6ヶ月以降も経過とともに改善する傾向を認め、臨床的な神経保護作用を示唆する所見と考えられた。作用機序については、ラット、培養細胞を用いた生化学的検討から、チロシン水酸化酵素(TH)蛋白量増加に先行するmRNA発現増加を伴うドパミン合成亢進作用とドパミンに基質特異性の高い中等度のMAO阻害作用であることを明らかにした。さらにZNSの効果が最も出現しやすい症例群を明らかにするために、年齢、罹患期間、経過、併用薬物等臨床的な素因について層別解析を行い、特徴的な臨床像はなく、むしろ遺伝素因により決定している可能性が高いと結論した。

A. 研究目的

パーキンソン病(PD)長期治療においてはレボドパの効果持続時間が短縮し、服薬に伴い症状が大きく変動する

wearing-off現象の出現が最大の問題となっている。wearing-off現象を改善するために開発された多くの薬剤をもってしても効果は不十分で、しかもこれらの薬剤は高価であるために、患者の負担も大きくまた医療財政をも逼迫させている。包括医療の導入によりこれらの薬剤がますます使いにくくなることも想定され、厚生労働行政において今後一層大きな問題になると考えられる。また、PDは疾患単位として独立しているものの、経過や中核となる症状、薬物への反応性などから、いくつかの病型が存在すると考えられているが、薬剤の使い分けはいまだ混乱している。従って現在のPD治療においては1) wearing-off現象のコントロール、2) 経済的かつ最高の効果を得られる薬物

の組み合わせの選択の2点が最も重要な問題であり、これらを解明することはPD患者のQOL上も医療財政上も強く求められている。

主任研究者らが2001年に抗PD作用を発見したゾニサミド(ZNS)は我が国で開発された抗てんかん薬で、すでに10年以上使用され、安全性も確立しており、比較的少数であるが二重盲検でもPD症状全般特にwearing-off現象に著明な効果を認めた。ZNS投与により寝たきりであった患者が歩行可能になるという著効を呈することも希ではなく、これほど効果がありかつ安全で安価な薬剤を適正に使用することは患者のQOLにも医療財政にも極めて大きく寄与すると考える。

本研究申請時にはまだ医師主導の治験の概念も十分成立しておらず、抗てんかん薬としての開発元の会社での治験が進められるかどうか不明な状況であった。このような状況下で、主任研究

者が行った少数例の検討により、ZNSの抗PD作用の手ごたえと作用機序の新規性が期待されたことから、本研究では、ZNSの抗PD効果を適正に評価し、今後の新規薬剤の開発につなげるために、1) 臨床的にZNSの抗パーキンソン作用の確認と、著明な効果を得られる症例の特徴的臨床像の抽出などにより、パーキンソン病のオーダーメイド医療の確立につなげる。2) 培養細胞系及びモデル動物を用いたZNSの作用発現機序の解明、3) 神経保護作用の程度、作用機序の解明、4) PD類縁疾患での効果の評価を目的に研究を行った。主任研究者は全体の総括とともに主に1)と2)についての研究を担当した。

B. 研究方法・研究結果・考察

1) ZNSの臨床効果

a) 抗PD作用

主任研究者らの小規模の臨床研究の結果を受け、患者の強い希望によりすでに多くの神経内科専門医が現在可能な治療でコントロール不十分な進行期PD患者を対象にZNSを使用していたことから、アンケートによる実態調査を行った。その結果、著効例16%を含む60%以上で、効果を認め、副作用としては眠気、ふらつき程度であった。その後主任研究者が医学専門家として、製造元会社が行った、大規模二重盲検試験でも25-50 mg/dという少量(抗てんかん薬としての常用量は300-600mg/d)で、安全にかつ明らかなパーキンソン症状の改善とwearing-off現象の改善を示すことを確認し、現在、抗PD作用薬としての使用申請中である。

b) 長期効果

3-5年抗PD薬としてのZNS投与を受けた患者について、UPDRS IIIの長期効果を評価した。その結果、8/12例で投与直後よりはやや悪化しているものの、3年以上、投与前よりも改善した状態を維持でき、長期的な効果を確認できた。製造元会社における1年間の長期投与試験においても、投与4週後までに約60%がなんらかの改善を示し、投与16週までに著明に改善しているが、その後も1年までより改善する傾向にあった。PDは進行性の疾患であり、従来の抗PD薬の治療においては6ヶ月以降悪化するのが通常であるが、ZNSではやや改善する傾向があり、本研究班の基礎研究の成果からも進行期において3年以上投与前よりも改善を持続できるという点は、少なくとも長期的に効果があるということと、さらにあとののべる神経保護作用を期待させる結果を得たといえる。

c) オーダーメイド医療に向けて

ZNSは目を疑うほどの著効例がある一方で、少数ながら、効果が明らかでない患者も存在する。より適正でかつ効率のよい治療のために、ZNSの著効例に特徴的な臨床像を得るために大規模二重盲検試験の結果を詳細に層別解析にて検討した。その結果、罹患期間、性、年齢、併用薬剤等による差異は認められなかったことから、特徴的な臨床像はなく、むしろ遺伝素因により決定している可能性が高いと結論した。

ZNSの効果の違いは、ある1個の遺伝子SNPにより決定されるというよりは、疾患感受性遺伝子のいくつかの組み合わせ

わせにより決まる可能性が高く、この研究を進めている。現在、ZNS 投与患者の協力を得て、DNA 収集が 100 例となっており、今後も収集を進め、効果の程度と効果に関係すると考えられる遺伝子多型とのタイピングをすすめる予定である。

2) ZNS の作用機序

a) 生化学的検討

正常ラット、培養細胞への ZNS 投与実験から、ZNS はドパミン生成の律速酵素である tyrosine hydroxylase (TH) mRNA を介したドパミン合成亢進作用を持つことを示した。また、ZNS の monoamine oxidase (MAO)B 阻害活性は肝マイクロゾームでは IC₅₀:670μM, 脳線条体膜分画では 27μM で、通常の投与量(50mg/d)での脳内の濃度は 20μM前後と推定されることから、末梢では MAOB 阻害作用は認めないが、中枢では中程度の阻害作用は出現し、抗 PD 効果の一部として作用する可能性があることを発見した。

(倫理面への配慮)

研究対象者に対する人権擁護の問題、インフォームドコンセントなどについては十分配慮し、臨床研究、ヒトゲノム・遺伝子解析研究のそれぞれの倫理指針に基づき、所属施設の倫理委員会の承認のもとに行った。

2) 動物実験においては動物愛護に十分配慮し、所属施設の動物実験の指針に沿って行った。

E. 結論

ZNS の臨床効果は大規模二重盲検試験

により確認され、また、少数例の 3-5 年の長期投与でも、製造元による 1 年間の長期投与試験でも明らかな効果が持続し、しかも 1 年後までは投与直後よりさらに改善する傾向にあることが確認できた。作用機序は、ドパミン産生亢進、中等度の MAOB 阻害作用が主体であることを明らかにした。

今後、オーダーメイド医療、新規薬剤の開発を視野に、作用機序、神経保護作用についての検討、さらに他の病態への ZNS の効果の確認を進めたい。

F. 健康管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 主な論文発表

1. Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. Multiple candidate gene analysis identifies {alpha}-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. Hum Mol Genet 2006; 15:1151-1158
2. Wang YL, Lui W, Wada E, Murata M, Wada K, Kanazawa I. Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. Neurosci Res 2005; 53: 241-249
3. Maraganore DM, Lesnick TG, ... Murata M, (UCHL1 Global Genetics Consortium): UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. Ann Neurol

- 2004; 55(4):512-521
4. Murata M.: Novel therapeutic effects of the anti-convulsant, Zonisamide, on Parkinson's disease. *Current Pharmaceutical Design* 2004; 10:687 - 693.
 5. Toda T, Momose Y, Murata M, Tamiya G, Yamamoto M, Hattori N, Inoko H: Toward identification of susceptibility genes for sporadic Parkinson's disease. *J Neurol* 2003; 250(Suppl3):40-43.
 6. 村田美穂. :パーキンソン病の診断基準・病型分類・重症度 内科疾患の診断基準・病型分類・重症度. *内科* 2005 ; 95(6) : 1531-1536.
 7. 村田美穂. :今日のパーキンソン病の診療—パーキンソン病治療のポイント パーキンソン病治療ガイドラインと tailor made 治療. *Modern Physician* 2005 ; 25(8) : 941-944.
 8. 村田美穂. :抗てんかん薬 zonisamide の抗パーキンソン作用. *内科* 2004 ; 93 : 713-716.
 9. 村田美穂, 長谷川一子, 沖山亮一, 望月秀樹. :抗てんかん薬 zonisamide の抗パーキンソン作用 パーキンソン病治療—今後の展開. *内科* 2004 ; 93 : 731-743.
 10. 村田美穂. :パーキンソン病治療薬の特徴と適応—テーラーメイド治療の進め方—. *Medical Practice* 2004 ; 21 : 1137-1143.
 11. 村田美穂. :Wearing-off 現象の薬物治療. *日本臨床* 2004 ; 62 : 1716 -1719.
2. 主な学会発表
1. Murata M. Zonisamide improves motor function in Parkinsonian patients: A nation-wide, double-blind, placebo-controlled trial. 16th International Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders Berlin (Germany) 2005, June.
 2. Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I. : Randomized, double-blind study of zonisamide with placebo in advanced Parkinson's disease. 8th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (Rome) 2004, June.
 3. Toda T, Satake W, Mizuta I, Yamamoto M, Hattori N, Murata M : Genome-wide microsatellite association studies for sporadic Parkinson's disease by using the pooled DNA method. 8th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (Rome) 2004, June.
 4. Murata M, Horiuchi E, Tsuji S, Kanazawa I. : Long-term clinical effects of zonisamide ; A new drug for Parkinson's disease. 6th International Conference AD/PD 2003 (Seville) 2003, May.
 5. Horiuchi E, Takahashi Y, Kanazawa I, Murata M. : The action mechanism of Zonisamide ; A new drug for Parkinson's disease. 6th International Conference AD/PD 2003 (Seville) 2003, May.
 6. Murata M, Horiuchi E, Tsuji S, Kanazawa I. : Zonisamide- A new drug for Parkinson's disease Long-term clinical effects. 55th Annual Meeting, American Academy of Neurology (Honolulu) 2003. March.
 7. Murata M, Horiuchi E, Takahashi Y, Kanazawa I. : Zonisamide increase dopamine synthesis by inducing TH mRNA. 7th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (Miami) 2003, November.

8. 佐竹 渉, 廣田勇二, 百瀬義雄, 水田依久子, 田宮 元, 猪子序英俊, 佐古田三郎, 山本光利, 服部信孝, 村田美穂, 戸田達史. : マイクロサテライト多型による孤発性パーキンソン病のゲノムワイド関連解析 第46回日本神経学会総会・鹿児島 2005年5月
9. 村田美穂, 長谷川一子, 野元正弘, 服部信孝. : 抗パーキンソン作用薬としての zonisamide の使用実態調査. 第45回日本神経学会総会・高輪 2004年5月
10. 佐竹 渉, 鹿田勇士, 百瀬義雄, 水田依久子, 田宮元, 猪子英俊, 佐古田三郎, 山本光利, 服部信孝, 村田美穂, 戸田達史. : マイクロサテライト多型による孤発性パーキンソン病のゲノムワイド関連解析. 第45回日本神経学会総会・高輪 2004年5月
11. 水田依久子, 百瀬義雄, 佐竹 渉, 鹿田勇士, 山本光利, 服部信孝, 村田美穂, 戸田達史. : 多数の候補遺伝子 SNP タイピングによる孤発性パーキンソン病の関連解析. 第45回日本神経学会総会・高輪 2004年5月
12. 村田美穂, 堀内恵美子, 辻省次, 金澤一郎. : Zonisamide のパーキンソン病に対する長期効果. 第44回日本神経学会総会・横浜 2003年5月
13. 堀内恵美子, 村田美穂, 高橋祐二, 辻省次, 金澤一郎. : Zonisamide の抗パーキンソン作用の発現機序 (3). 第44回日本神経学会総会・横浜 2003年5月

G. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 特許取得
特になし
- 2) 実用新案登録
特になし
- 3) その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

ゾニサミドの L-DOPA およびドパミン誘発キノン体毒性に対する
保護効果に関する検討

分担研究者： 浅沼 幹人

岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学 助教授

研究協力者：宮崎育子，小川紀雄

岡山大学大学院医歯学総合研究科脳神経制御学講座神経情報学

研究要旨

L-DOPA およびドパミンは細胞質のシナプス小胞外で過剰となった場合、自動酸化によりキノン体を生成し機能蛋白とシステイニル化合物を形成して、あるいはクロム体からラジカル体を生成して、細胞障害性に働く。本研究では、細胞質過剰ドパミンによるキノン体生成を介した神経障害機構に対するゾニサミドの効果について、*in vitro* のドパミン、L-DOPA 自動酸化系、ドパミン含有神経細胞およびパーキンソン病モデルマウスを用いて総合的に検討した。とくに、ゾニサミドの脳内グルタチオンへの作用ならびにパーキンソン病モデルに L-DOPA を投与した際に惹起されるキノン体毒性に対する保護効果とそのメカニズムについて、キノン蛋白結合体（キノプロテイン）、キノン消去系諸因子ならびにグルタチオン関連酵素を指標として検討した。ゾニサミド連日投与は大脳基底核のグルタチオン量を増加させること、さらにゾニサミド (Na 塩, 原末) は *in vitro* のドパミン、L-DOPA 自動酸化系においてキノン体を安定なメラニンに変換する作用を有することを見いだした。また、パーキンソン病モデルに L-DOPA を投与した際に惹起されるキノン体生成の増加に対して、ゾニサミド同時投与が強力な抑制効果を有することを見いだした。また、培養ドパミン系細胞において L-DOPA 生成を高めドパミンの小胞内への取り込みを阻害し、小胞外細胞質内のフリーのドパミンを増加させておくと、ゾニサミド同時添加によりキノン生成は有意に抑制された。これらの結果から、小胞外細胞質の過剰ドパミン、L-DOPA によるキノン体生成および神経毒性に対してゾニサミドが保護・抑制効果を発揮することを明らかにできた。さらに、その保護効果の発現メカニズムについては、その脳内グルタチオン増加作用やキノン体消去系因子への賦活作用に基づく可能性は低く、むしろ小胞外細胞質内の過剰ドパミン、L-DOPA に対する安定なメラニンへの変換能が関与していると考えられた。また、ゾニサミドの脳内グルタチオン増加作用は、グルタチオンの代謝抑制作用に基づく可能性が示唆された。今後、ゾニサミドとドパミンとの相互作用、グルタチオン関連酵素やキノン消去系酵素活性自体への作用について検討し、L-DOPA 誘発キノン体毒性に対する保護・抑制効果ならびに脳内グルタチオン増加作用のメカニズムを解明したい。これにより、ゾニサミドの効果発現の条件、相互作用因子、補助因子などを明らかにできる。

A. 研究目的

L-DOPA およびドパミンは細胞質のシナプス小胞外で過剰となった場合、自動酸化によりキノン体を生成し機能蛋白とシステイン化合物を形成して、あるいはクロム体からラジカル体を生成して、細胞障害性に働く。このような L-DOPA およびドパミンの神経毒性は、グルタチオンなどのキノン消去系諸因子により抑制されることを分担研究者らは既に報告した。そこで本研究では、細胞質過剰ドパミンによるキノン体生成を介した神経障害機構に対するゾニサミドの効果について、*in vitro* のドパミン、L-DOPA 自動酸化系、ドパミン含有神経細胞およびパーキンソン病モデルマウスを用いて総合的に検討した。とくに、ゾニサミドの脳内グルタチオンへの作用ならびにパーキンソン病モデルに L-DOPA を投与した際に惹起されるキノン体毒性に対する保護効果とそのメカニズムについて、キノン蛋白結合体(キノプロテイン)、キノン消去系諸因子ならびにグルタチオン関連酵素を指標として検討した。

B. 研究方法

in vitro のドパミン、L-DOPA 自動酸化系へのゾニサミドの効果

ドパミン、L-DOPA (1 mM) にゾニサミド Na 塩(1-8 mM: pH 10.8) を *in vitro* で加え(反応系 pH 8)、経時的に電子スピン共鳴法(ESR)によりセミキノン、キノン体およびメラニンの生成を観察した。また、反応液中のドパミン、DOPAC、HVA 濃度を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した。さらに、ドパミン、L-DOPA (1 mM) にゾニサミド原末(最終濃度 200 μ M) を *in vitro* で加え(反応系 pH 7)、経時的にドパミン・DOPA クロム生成量を吸光度(A475)測定により定量した。

ゾニサミド連日投与の脳内グルタチオンへの作用

ICR マウス(雄性 7 週齢)にゾニサミド Na (10, 30, 50 mg/kg, *i. p.*) の 14 日間連日投与を行い、脳内線条体および中脳上腹部のグルタチオン量を常法に従って測定した。

パーキンソン病モデルでの L-DOPA 誘発キノン体毒性に対するゾニサミド連日投与の保

護効果およびキノン体消去系諸因子への作用

片側線条体に 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を注入し作製した片側パーキンソン病モデル ICR マウスを用いて、アポモルフィン誘発回旋運動を確認の後、L-DOPA/carbidopa (50/5 mg/kg, *i. p.*) およびゾニサミド Na (30 mg/kg, *i. p.*) を 7 日間連日投与し、投与終了 1 日後に線条体組織をとりだし、線条体のキノプロテイン量を NBT-glycinate 法(Paz, 1991)で測定した。また、線条体のグルタチオン量も測定した。ドパミンキノンを還元・消去する NADPH:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)、その発現をプロモートする転写因子 Nrf2、グルタチオン合成酵素 glutamate cysteine ligase (GCL= γ -glutamylcysteine synthetase) およびグルタチオン抱合酵素 glutamyl-S-transferase (GST) の蛋白・mRNA の変化を Western blot 法、RT-PCR 法で解析した。

ドパミン含有神経細胞でのキノン体生成へのゾニサミドの作用

マウス由来ドパミン含有細胞 CATH. a 細胞 (1.0×10^5 cells/cm²) を用いて、継代 24 時間後に、ゾニサミド原末(最終濃度 1-100 μ M) を添加し、1, 5 日間培養し、キノプロテイン量を測定し、ドパミン・DOPA クロムを 1% Triton X-100 による抽出液の吸光度(A475)測定により、ドパミン、DOPAC、HVA 濃度を HPLC で、GCL 蛋白の変化を Western blot 法でそれぞれ測定した。また、ゾニサミド原末添加(最終濃度 1-100 μ M, 1, 5 日間)によるキノプロテイン量の変化に対するグルタチオン合成酵素 GCL 阻害薬 BSO (5, 10 μ M) の同時添加の効果についても検討した。さらに、チロシン水酸化酵素(TH) による L-DOPA 生成を高める tetrahydrobiopterin (BH4: 100 μ M) と小胞モノアミントランスポーター(VMAT2) 阻害薬 ケタンセリン (10 μ M) のゾニサミドとの同時添加のキノプロテイン量に対する効果についても検討した。

パーキンソン病モデルへのゾニサミド前投与のドパミン神経保護効果

ICR マウス(雄性 7 週齢)にゾニサミド Na (30 mg/kg, *i. p.*) の 14 日間前投与を行い、

片側線条体に 6-OHDA を注入し、片側パーキンソン病モデルを作製した。経時的にアポモルフィン (0.5 mg/kg, s. c.) 誘発回旋運動を評価し、6-OHDA 注入 40 日後に、4% paraformaldehyde で灌流固定し、凍結脳切片を作製した。黒質あるいは線条体を含む脳切片を用いて、TH の免疫染色を行った。また、線条体および中脳上腹部のグルタチオン量も測定した。

C. 研究結果

in vitro のドパミン、L-DOPA 自動酸化系へのゾニサミドの効果

ゾニサミド Na 塩添加数分後よりドパミン、L-DOPA からの用量依存性のメラニンへの変換が ESR で検出され始め、60 分後までに安定なメラニンへと変換された。これらのメラニンへの変換能は、ゾニサミド非添加対照群 (反応系 pH 8) での自動酸化による変換に比べ極めて急速であり、過剰 DA による神経毒性に対して保護効果を有するチロシナーゼでの変換と同様であった。また、HPLC により DOPAC, HVA, 3MT は検出されなかった。ゾニサミド原末の水溶液 (~1.75 mM: pH 7.4) では、ESR の検出限界のために、このようなメラニンへの変換能は認められなかったが、ドパミン、L-DOPA (1 mM) にゾニサミド原末 (200 μM) を加えると、30 分後~3 時間後にゾニサミド非添加群に比してドパミン・DOPA クロム生成量の有意な増加が認められた。

ゾニサミド連日投与の脳内グルタチオンへの作用

ゾニサミド (10, 30, 50 mg/kg, i. p.) の正常マウスへの 14 日間投与により線条体および中脳上腹部のグルタチオンは用量依存性に増加した。

パーキンソン病モデルでの L-DOPA 誘発キノン体毒性に対するゾニサミド連日投与の保護効果およびキノン体消去系諸因子への作用

パーキンソンモデルマウスへの L-DOPA 7 日間連日投与 (50 mg/kg, i. p.) により非障害側線条体ではキノプロテイン量は不変であったが、障害側線条体ではキノプロテインが有意に著明に増加していた。この L-DOPA 連日投与によるキノプロテイン増加はゾニサミドの同時投与 (30 mg/kg, i. p.) によりほぼ

完全に抑制された。

しかし、線条体のグルタチオンはゾニサミドにより影響されなかった。また、グルタチオン関連酵素やキノン還元酵素などのキノン消去系諸因子の変化についても検討した。グルタチオン合成酵素 GCL の catalytic subunit の mRNA の線条体での発現はゾニサミド投与により変化は認められなかった。障害側線条体で L-DOPA 連日投与により増加していた NQO1 の発現増加は、ゾニサミド同時投与でむしろ抑制された。また、NQO1 発現をプロモートする転写因子 Nrf2 の mRNA の線条体での発現は、ゾニサミド投与により不変であった。興味深いことに、GST 蛋白発現は L-DOPA とゾニサミドの連日投与群の障害側線条体において著明に低下していた。

ドパミン含有神経細胞でのキノン体生成へのゾニサミドの作用

ドパミン含有細胞 CATH. a 細胞にゾニサミドを持続添加したところ、1 日目にドパミン、DOPAC 濃度の増加傾向が認められたが、HVA およびドパミン代謝回転は不変であった。また、ドパミンの増加に一致してキノプロテイン量の有意な増加が認められた。さらにゾニサミド持続添加 5 日目では、逆にゾニサミド濃度依存的な細胞内ドパミンの有意な減少が認められ、DOPAC, HVA は不変であった。この時、ドパミンの減少に一致してキノプロテイン量の有意な減少が認められ、ドパミン・DOPA クロムは増加していた。ゾニサミド持続添加 (6 時間, 1 日間, 5 日間) により GCL 蛋白発現は不変であった。ゾニサミド原末添加による 1, 5 日目におけるキノプロテイン量の変化に対して、グルタチオン合成酵素 GCL 阻害薬 BSO 同時添加は全く影響しなかった。

BH4 (100 μM) とケタンセリン (10 μM) のゾニサミドとの同時添加を行うと、ゾニサミド濃度依存的にキノプロテイン量の減少が認められた。

パーキンソン病モデルへのゾニサミド前投与のドパミン神経保護効果

ゾニサミド前投与は、アポモルフィン誘発回旋運動に対して阻止効果はなく、大脳基底核のグルタチオンも障害・非障害側ともに不変であった。パーキンソンモデルマウス障害側黒質における TH 陽性ドパミン神

経細胞の減少に対しては、有意ではないもののゾニサミド前投与は阻止傾向を示した。

D. 考察

ゾニサミド連日投与は大脳基底核のグルタチオン量を増加させること、さらにゾニサミド (Na 塩, 原末) は *in vitro* のドパミン, L-DOPA 自動酸化系においてキノン体を安定なメラニンに変換する作用を有することを見いだした。

パーキンソン病モデルへの L-DOPA 連日投与により障害側線条体においてのみキノプロテインの増加が見られたが、これは神経終末が脱落している病態では L-DOPA を連日投与すると自動酸化によりキノン体, キノプロテイン生成に働く小胞外細胞質内のフリーのドパミンが増加することよると考えられる。このようなパーキンソン病モデルへの L-DOPA 連日投与による線条体でのキノプロテインの増加に代表される小胞外細胞質の過剰ドパミン, L-DOPA によるキノン体神経毒性は, ゾニサミドの同時投与によりほぼ完全に抑制された。また、培養ドパミン神経細胞においても、BH4 とケタンセリン添加により小胞外細胞質内のフリーのドパミンを増加させドパミンキノン体生成を高めた状態においては、ゾニサミド添加がキノン体を減少させることを見出した。これらの結果より、ゾニサミドが小胞外細胞質の過剰ドパミン, L-DOPA によるキノン体生成および神経毒性に対して保護・抑制効果を発揮することを明らかにできた。

この L-DOPA 誘発キノン体毒性に対するゾニサミドの保護・抑制効果のメカニズムについては、本研究で明らかになったように、①ゾニサミドのドパミン, L-DOPA に対する安定なメラニンへの変換能, ②ゾニサミドの著明な大脳基底核グルタチオン増加作用のいずれかあるいは両者に基づくか、あるいは③ゾニサミドがキノン還元酵素 NQO1 あるいはその発現をプロモートする転写因子 Nrf2 などのキノン体消去系諸因子への賦活作用を有する可能性もあると考えられた。

そこで、キノン還元酵素 NQO1 などのキノン消去系諸因子の変化についても検討したところ、パーキンソン病モデルへの L-DOPA 連日投与により増加する NQO1 の発現量は、

ゾニサミド同時投与により亢進されることなくむしろ完全に抑制された。これは L-DOPA 投与で増加したキノン体を消去すべく代償性に増加した NQO1 の発現が、ゾニサミド投与によりキノン体毒性が抑制あるいは消去されたことでみられなくなったことを示していると考えられる。また、Nrf2 の発現量もゾニサミド投与により影響されなかった。これらの結果からは、ゾニサミドがキノン体消去系因子への賦活作用を有する可能性は低いと考えられる。今後、NQO1 活性自体への影響について検討する必要がある。

また、ゾニサミドの大脳基底核グルタチオン増加作用のメカニズムについて検討した。グルタチオン合成酵素 GCL の mRNA のパーキンソン病モデル線条体での発現は、ゾニサミド投与により影響されず、ドパミン含有細胞 CATH. a へのゾニサミド添加によっても GCL 蛋白発現は不変であった。しかし、グルタチオンを蛋白に抱合させる GST の蛋白発現は、パーキンソン病モデルへの L-DOPA とゾニサミドの連日投与群の障害側線条体において著明に低下していたことから、ゾニサミド連日投与による大脳基底核のグルタチオン増加は、グルタチオンの代謝抑制作用に基づく可能性が示唆された。今後、グルタチオンを分解する γ

-glutamyltranspeptidase や GST (グルタチオン抱合酵素) の酵素活性へのゾニサミドの作用について、パーキンソン病モデル・培養ドパミン系細胞を用いて検討する必要がある。さらに、グルタチオン合成酵素 GCL 阻害薬 BSO 同時添加によっても、ゾニサミド原末添加による 1, 5 日目におけるキノプロテイン量の増加・減少は全く影響されなかったことから、ゾニサミドの L-DOPA 誘発キノン体毒性に対する保護・抑制効果はその脳内グルタチオン増加作用に基づくものではないと考えられる。

培養ドパミン系細胞へのゾニサミドの 5 日間持続添加によっても、パーキンソン病モデルでの結果と同様に、ゾニサミドの濃度依存的な DOPAC, HVA の増加を伴わない細胞内ドパミンの有意な減少とそれに並行したキノプロテイン量の減少、ドパミン・DOPA クロムの増加が認められた。これは、ゾニサミドによるドパミンのメラニンへの変換

を示唆しているのかもしれない。さらに、培養ドパミン系細胞において、BH4 とケタンセリンにより L-DOPA 生成を高めドパミンの小胞内への取り込みを阻害し、小胞外細胞質内のフリーのドパミンを増加させておくと、ゾニサミド同時添加によりキノン生成は有意に抑制された。これはパーキンソン病モデルでの L-DOPA 誘発キノン体毒性に対するゾニサミドの抑制効果に合致する。また、ゾニサミド Na 塩だけでなくゾニサミド原末もドパミン、L-DOPA のドパミン・DOPA クロムへの変換を増強させた。これらの結果から、L-DOPA 誘発キノン体毒性に対するゾニサミドの保護・抑制効果には、小胞外細胞質内の過剰ドパミン、L-DOPA に対する安定なメラニンへの変換能が関与している可能性が示唆された。RI・蛍光標識ドパミンとゾニサミドとの相互作用について解析することで、作用様式が解明できると考えられる。

また、培養ドパミン系細胞へのゾニサミドの短期間添加（1 日間；SH-SY5Y 細胞での TH 発現増加の際の添加時間）により TH の活性化亢進を示唆する一次的なドパミン、DOPAC 濃度の増加傾向がみられたこと、マウスへのゾニサミド前投与により 6-OHDA によるドパミン神経脱落に対し保護効果を有する傾向がみられたことは、ゾニサミドが TH への活性化作用を有することとも合致する。しかし、効果が一次的であり、保護効果発現に変動が見られることから、その評価と解釈にはさらに詳細な検討を要する。

いずれにしても、パーキンソン病モデルへの L-DOPA 連日投与あるいは培養ドパミン神経細胞への BH4 とケタンセリン添加に代表される小胞外細胞質の過剰ドパミン、L-DOPA によるキノン体生成および神経毒性を抑制・阻止し、さらに抗酸化にはたらくグルタチオン量を増加させるというゾニサミドの薬理作用は、パーキンソン病患者への L-DOPA の長期投与により生じる問題症状にゾニサミドが有効であるという臨床結果を裏付ける基礎データといえる。

今後、ドパミンとゾニサミドとの相互作用についてのさらなる解析を行い、 γ -glutamyltranspeptidase, GST, GCL などのグルタチオン関連酵素や NQO1 の酵素活性自体へのゾニサミドの作用について、パーキン

ソン病モデル・培養ドパミン系細胞を用いて検討し、ゾニサミドの L-DOPA 誘発キノン体毒性に対する保護・抑制効果ならびに脳内グルタチオン増加作用のメカニズムを解明する必要がある。これにより、ゾニサミドの効果発現の条件、相互作用因子、補助因子などを明らかにできると考えられる。

E. 結論

パーキンソン病モデルに L-DOPA を投与した際に小胞外細胞質の過剰ドパミン、L-DOPA により惹起されるキノン体毒性に対して、ゾニサミドの同時投与が強力な保護・抑制効果を有すること、脳内グルタチオン増加作用有することを明らかにできた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Haque, M.E., Asanuma, M., Higashi, Y., Miyazaki, I., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Apoptosis-inducing neurotoxicity of dopamine and its metabolites via reactive quinone generation in neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1619: 39-52, 2003.
2. Haque, M.E., Asanuma, M., Higashi, Y., Miyazaki, I., Tanaka, K. and Ogawa, N.: Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase protects neuroblastoma cells against dopamine cytotoxicity accompanied by increase in their glutathione level. *Neurosci. Res.*, 47: 31-37, 2003.
3. Asanuma, M., Tsuji, T., Miyazaki, I., Miyoshi, K. and Ogawa, N.: Methamphetamine-induced neurotoxicity in mouse brain is attenuated by ketoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Neurosci. Lett.*, 352: 13-16, 2003.
4. Kakishita, M., Nakamura, K., Asanuma, M., Morita, H., Saito, H., Kusano, K., Nakamura, Y., Emori, T., Matsubara, H., Sugaya, T., Ogawa, N. and Ohe, T.: Direct evidence for increased hydroxyl radicals in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through angiotensin II type 1a receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 42 (suppl. 1): S67-70, 2003.
5. Asanuma, M., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Dopamine- or L-DOPA-induced