Preparation and assessment of animal model of Alzheimer's disease

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/3324

アルツハイマー病動物モデルの作製とその評価法

松田　博史　　絹谷　啓子　　辻　　志郎　　寺田　一志
柴　　和弘　　小島　一彦　　森　　厚文　　隅屋　　寿
久田　欣一

核医学第27巻第8号別刷
(1990年8月発行)

《ノート》

アルツハイマー病動物モデルの作製とその評価法

Preparation and Assessment of Animal Model of Alzheimer's Disease

松田 博史[*1] 絹谷 啓子[*1] 辻 志郎[*2] 寺田 一志[*3]
柴 和弘[*4] 小島 一彦[*5] 森 厚文[*4] 隅屋 寿[*1]
久田 欣一[*1]

Hiroshi MATSUDA[*1], Keiko KINUYA[*1], Shiro TSUJI[*2], Hitoshi TERADA[*3]
Kazuhiro SHIBA[*4], Kazuhiko KOJIMA[*5], Hirofumi MORI[*4]
Hisashi SUMIYA[*1] and Kinichi HISADA[*1]

[*1]*Department of Nuclear Medicine, Kanazawa University School of Medicine*
[*2]*Department of Radiology, Toyama Medical Pharmaceutical University*
[*3]*Department of Radiology, Ohashi Hospital, Toho University School of Medicine*
[*4]*Radioisotope Center, Kanazawa University*
[*5]*School of Allied Medical Professions, Kanazawa University*

I. はじめに

近年の中枢神経核医学領域の発展にはめざましいものがあり，シングルフォトンで標識された新しい放射性医薬品の開発と撮像機器である single photon emission computed tomography (SPECT) 装置の普及によって，一般病院においても容易に断層像による局所脳血流情報を得ることが可能となった．現在では脳における機能的情報を提供する手段として脳血管障害に加えて，てんかん，痴呆，躁うつ病，精神分裂病などの疾患で臨床的有用性[1~4]が認められており，形態学的情報を提供するX線CTやMRIとともに一般診療上必須の検査となってきた．

さらにSPECTによる中枢神経核医学領域では，局所脳血流以外の機能的情報をもたらすとされる神経受容体分布の画像化が欧米にて報告されはじめており[5~9]，わが国でも近い将来種々の神経受容体分布のSPECT像によって，精神・神経疾患の解明，診断，薬物治療の効果判定，および治療方針の選択が可能になるものと期待される．

一方，今後，いずれの神経受容体分布のSPECT像の臨床的有用性の評価に先だっても，より優れたSPECT用放射性リガンドの開発および正常動物または疾患モデルにおける基礎的研究が不可欠であると考えられる．

本研究においては，将来の神経受容体分布のSPECT像の標的疾患として高齢化社会の到来にともなって患者数の増加が予想されるアルツハイマー病を選択し，その疾患動物モデルの一つとして報告されている[10]一側性前脳基底部破壊によるコリン作動性神経支配除去手術ラットを作製し

[*1] 金沢大学医学部核医学科
[*2] 富山医科薬科大学医学部放射線科
[*3] 東邦大学医学部大橋病院放射線科
[*4] 金沢大学アイソトープ総合センター
[*5] 同 医療短期大学部
受付：2年3月13日
最終稿受付：2年6月8日
別刷請求先：金沢市宝町13-1 (〒920)
金沢大学医学部核医学科
松田博史

Key words: nuclear medicine imaging, cholinergic innervation, Alzheimer's disease, animal model.

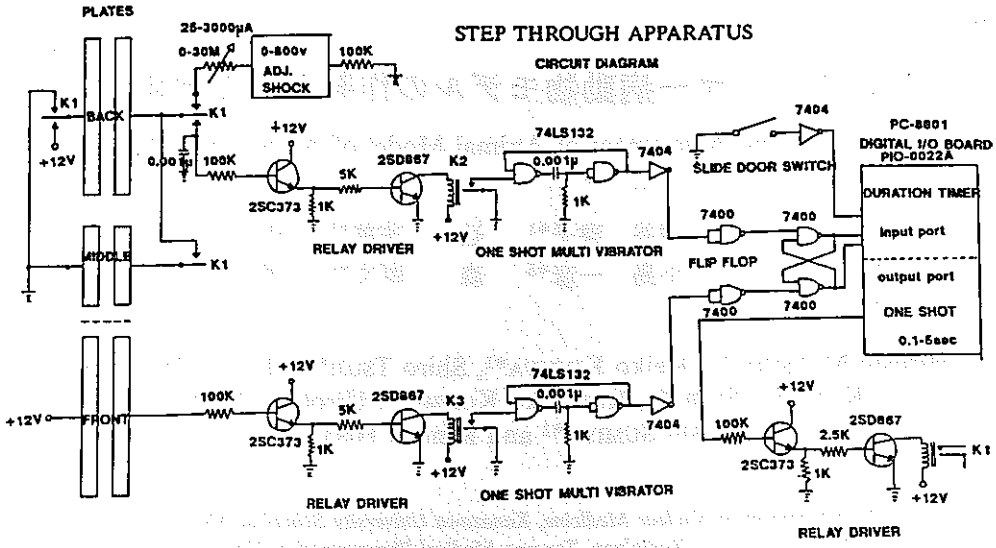


Fig. 1 Circuit diagram of a step-through apparatus for the evaluation of passive avoidance performance in the rat.

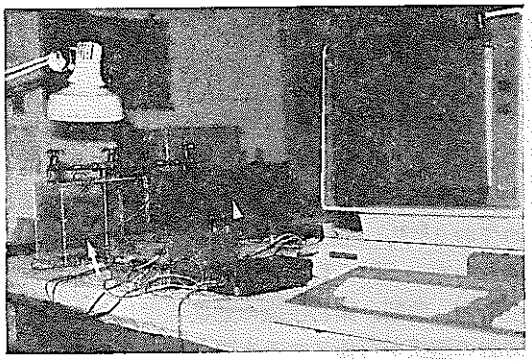


Fig. 2 Overview of the step-through apparatus. The experimental box consists of light (arrow) and dark (arrowhead) compartments.

た．モデルの作製法と疾患モデルとしての妥当性について報告する．

II. 材料と方法

ラット手術群の作製

前脳基底部破壊手術には体重 200 g の雄性ドンリュウ系ラット25匹を用い，ペントバルビタール (50 mg/kg, 腹腔内投与) 麻酔下，ラット頭部を脳定位固定装置 (Narishige SR-5) に固定し，Paxinos & Watson の図譜[11] にしたがって 29 ゲージステンレススチール注入針を bregma の後方 0.8 mm，正中より右側 2.6 mm，硬膜より腹側 7.3 mm の位置まで刺入した。細胞破壊にはリン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.4) に溶解したイボテン酸 (Sigma, 60 nmol/μl) を用い，5 μg 0.5 μl を微量注入装置 (サミットメディカル社製，B-3373C) にて 2 分間かけて緩徐に注入し，逆流防止のため 3 分間静置後に針を抜いた．対照として，針を刺入後 5 分間静置し何も注入しない偽手術群を 9 匹作製した．

行動薬理学的検索

Jarvik & Kopp の回路[12] を参考に step-through 型受動的回避実験装置を考案，製作した．回路図および装置の全景を Fig. 1 および Fig. 2 に示す．実験箱は明暗 2 室からなる．20 cm の高さから 100 W の白色電球で照明した明室 (幅 25 cm，高さ 20cm，長さ 25 cm，アクリル板 5 mm 厚) にラットをおくと，ラットの身体を介して床の銅板による前方電極板間 (間隙 3 mm) に微弱電流が生じる．この電流をトランジスタにより増幅し (リレードライバー)，電磁リレー (K3) を働かす．このリレーによる入力パルスは，74LS132 の 2 入力 NAND ゲートと C-R 微分回路を組み合わせた単

安定（ワンショット）マルチバイブレータにより，整形された負の出力パルスとなる．この負の出力パルスは 7404 の NOT 回路により正のパルスとされた後，7400 のリセット，セット (R-S) フリップフロップ回路の一端子にはいる．フリップフロップとは，出力が "1" および "0" の 2 値の安定状態を持ち，外部から与えられた入力条件によって，そのどちらかの安定状態になる回路をいう．そして次の入力条件が与えられるまで，その状態（セット状態）に維持する，1 ビットの記憶素子である．明室と暗室の間にはスライドするドアがあり，このドアを開けるとスイッチが ON になるように連動している．一方，デジタル I/0 ボード (NEC, PIO-8022A) を装着したマイクロコンピュータ (NEC, PC-8801) により，入力ポートにフリップフロップからの信号とドアスイッチからの信号の両方が入ると，コンピュータのタイマーが働き出す．ラットには，明室から比較的速やかに暗室に移動する習性がある．暗室（幅 25 cm，高さ 20 cm，長さ 50 cm，アクリル板に黒色スプレー塗料を塗布）の床には中間電極板と後方電極板があり，ラットが後方電極板に達すると明室におけると同様に微弱電流が生じる．先に述べたリレー (K2) ドライバーおよび単安定マルチバイブレータを介して信号がフリップフロップ回路の前回とは別端子にはいると，入力条件の違いによりセット状態になる．このフリップフロップの出力状態の変化が入力ポートからコンピュータに伝えられタイマーが停止する．それと同時に出力ポートより 5 ボルトの電圧が生じ，リレードライバーにより増幅されリレー (K1) を働かす．このリレーの作動時間は任意に設定可能であるが通常 5 秒とした．このリレー，K1 が働くと交流 800 ボルト，最高 3 mA が後方電極板および中間電極板に加わり，電撃ショックがラット両足間に与えられる．このショックによりラットは，慌てて明室側に戻ってくる．先ほど述べたタイマーは，両室間のドアを開けてから，ラットが後方電極板に到達するまでの時間となる．この時間を受動的回避反応における反応潜時（回避潜時）という．この実験装置により反応潜時を自動的にかつ正確に測定することが可能である．

受動的回避学習は反応の獲得と消去について検討した．モデル作製 6 日後の獲得試行では，ラットを明室に入れ 10 秒後にドアを開けた．ラットは暗室に移動し電撃ショックを受け，明室に戻ったところで取り出した．保持テストはその36時間後に行い，獲得試行時と同様にラットを明室におき，ラットが暗室へ移動するまでの潜時を最大 300 秒まで測定した．

組織化学的検索

受動的品避実験における保持テスト終了後，前脳基底部破壊モデルラット13匹においてペントバルビタール麻酔下，ラット左心室より 200 m*l* の 2% パラホルムアルデヒドおよび 2% グルタルアルデヒドにて頭部を灌流し，全脳摘出後，一昼夜 4% パラホルムアルデヒド中に固定した．ひき続き 20% 蔗糖リン酸緩衝液中 (0.1 M, pH 7.4) に 3 日間浸漬後，厚さ 20 μm の連続前額断面切片を作製し，一部はクレシルバイオレットによる Nissl 染色，一部は Karnovsky & Roots[13] および Tago ら[14] のアセチルコリンエステラーゼ染色を施行した．

コリンアセチル転移酵素 (CAT) およびアセチルコリンエステラーゼ (AchE) 活性の測定

受動的回避実験とは別に，前脳基底部破壊ラット12匹において，モデル作製 7 日後に破壊側と非破壊側から摘出した大脳頭頂葉皮質を，CAT 測定用の 7 匹では 1.5% w/v，AchE 測定用の 5 匹では 0.2% w/v の割合で氷冷 1 m*l* の EDTA 溶液 (10 mM, pH 7.4) 中にて Triton X-100 (0.5% v/v) とともにポッター型ホモジナイザーで破砕した．

CAT 測定は Fonnum の方法[14,16] によった．すなわち 100 μ*l* のミニチューブに上記のホモジネート 5 μ*l* と，NaCl (300 mM)，リン酸緩衝液 (50 mM, p H7.4)，塩化コリン (8 mM)，EDTA (20 mM, pH 7.4)，フィゾスチグミン (0.1 mM) を含む 15 μ*l* の溶液を入れた．その後，RI 標識

基質である [acetyl-1-^{14}C]-Acetyl Coenzyme A (New England Nuclear, NEC 313L, 2.01 GBq (54.32 mCi)/mmol) 20 μl (0.4 mM) を加え 37°C にて反応を開始した．反応開始15分後に塩酸ハイドロキシラミン (1 M, pH 6.5) 20 μl を加え，氷冷することにより反応を停止させた．この反応溶液に 0.5 ml のリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.4) を加え，20 ml 容量の液体シンチレーション用バイアルに移した．このバイアルに 10 mg の Kalibor を含む 2 ml のアセトニトリルを加え，さらに，10 ml の疎水性シンチレータ (New England Nuclear, Econofluor) を加え，静かに振盪した．生成された ^{14}C 標識アセチルコリンはシンチレータ相に溶解するが，RI 標識基質 Acetyl Coenzyme A は水相に留まり，液体シンチレーションカウンタでは計数されない．

AChE 測定も Fonnum の方法[17] によった．100 μl のミニチューブの上記のホモジネート 5 μl を入れ，これにリン酸緩衝液 (20 mM, pH 7.2) と牛血清アルブミン (0.8 mg/ml)，および RI 標識基質である [acetyl-1-^{14}C]-Acetylcholine (New England Nuclear, NEC-350-10, 2.07GBq (55.95 mCi)/mmol) を含む溶液を加えることにより 30°C にて反応を開始させた．反応開始15分後に塩酸ハイドロキシラミン (1 M, pH 6.5) 20 μl を加え，氷冷することにより反応を停止させた．この反応溶液に 0.5 ml のリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.4) を加え，1 ml 容量のミニチューブに移した．これに 15 mg の Kalibor を含む 0.5 ml のブチルエチルケトンを加えボルテックスミキサーにて攪拌し，さらに遠心後，上層のブチルエチルケトンを吸引し取り除いた．この過程により，未分解の RI 標識基質アセチルコリンが取り除かれる．これを，再度繰り返した後，下層のリン酸緩衝液を 20 ml 容量の液体シンチレーション用バイアルに移した．これに 10 ml の親水性シンチレータ (New England Nuclear, Aquasol II) を加え，液体シンチレータにて測定した．

なお，蛋白定量は Bradford の方法[18] によった．

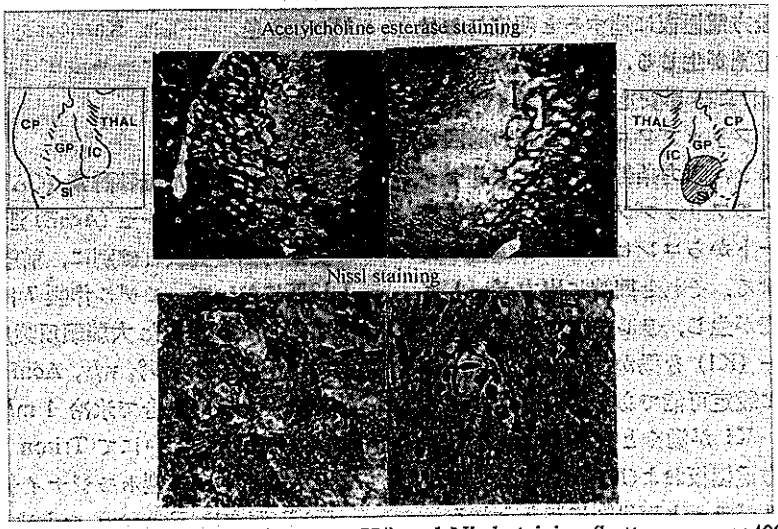


Fig. 3 Acetylcholine esterase (top row, X4) and Nissl staining (bottom row, ×400) at basal forebrain in the ipsilateral (right column) and contralateral (left column) side to the unilateral lesion. These staining methods reveal neuronal cell loss, gliosis, and diminished AchE staining in a ventral region of globus pallidus, substantia innominata, and internal capsule in the ipsilateral side. CP: caudate putamen, GP: globus pallidus, IC: internal capsule, THAL: thalamus, SI: substantia innominata.

III. 結　果

受動的回避反応

獲得施行時の反応潜時は，前脳基底部破壊手術群が8±12秒 (mean±SD)，偽手術群8±9秒と差異はなく，明室から暗室へとすみやかに移動した．36時間後の保持テストでは，前脳基底部破壊モデルにおいて13匹中5匹で著明な回避潜時の短縮がみられ (9, 15, 25, 39, 42秒)，他の8匹は300秒以上であった．一方，偽手術群9匹における保持テストでは，全例が300秒以上の回避潜時を示した．42秒以内の回避潜時を示した割合は，手術群において偽手術群よりも統計学上有意に大であった (Fischer の直接確率計算法．$p<0.05$)．

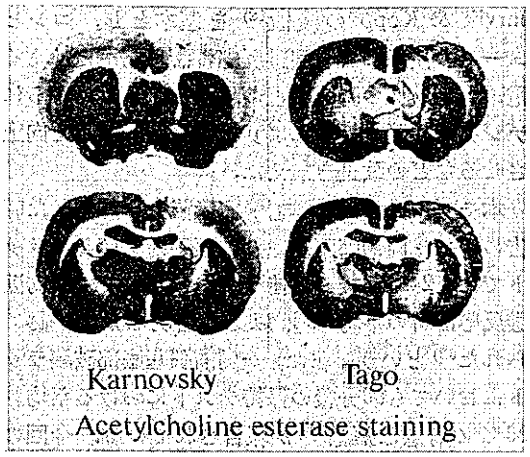


Fig. 4 Acetylcholine esterase staining by Karnovsky & Roots' and Tago's methods in coronal brain slices showing diminished staining in the extensive area of frontal, temporal, and parietal cortices in the ipsilateral side to the basal forebrain lesion. Top row: caudate putaminal level. Bottom row: thalamic level.

Table 1 Effects of ibotenic acid injection into unilateral basal forebrain on CAT and AchE in parietal cortex

Enzyme	No rats	Levels in parietal cortex		% change
		Ipsilateral	Contralateral	
Choline acetyltransferase (CAT) nmol/mg protein/hr	7	15.1±3.2*	27.8±2.8	−46%
Acetylcholine estrase (AchE) μmol/mg protein/hr	5	1.2±0.2*	2.0±0.2	−40%

*$p<0.001$, ipsilateral side v.s. contralateral side to basal forebrain lesion in operated rats (Student's t test).

組織化学的変化

前脳基底部破壊モデルラットにおける破壊部位では，淡蒼球腹側部，無名質，および内包において神経細胞の脱落およびグリオーシスが顕著であり，アセチルコリンエステラーゼ染色性の低下が認められた (Fig. 3)．また，投射部位である破壊側前頭葉から側頭葉・頭頂葉皮質において，アセチルコリンエステラーゼ染色性の低下が Karnovsky & Roots および Tago らのいずれの方法でもみられた (Fig. 4)．一方，帯状回皮質，後頭葉皮質，海馬，線条体の染色性には破壊側と非破壊側で差はみられなかった．

CAT および AchE 活性の変化

頭頂葉皮質において破壊側は非破壊側に比べ，CAT 活性が平均46%，AchE 活性が平均40%，統計学上有意に ($p<0.001$, Student's t-test) 低下していた (Table 1)．

IV. 考　察

アルツハイマー病は初老期 (40–60歳) に発症し，徐々に進行する高度な痴呆を主体とする大脳の代表的変性疾患[19]である．わが国のアルツハイマー病の有病率は欧米に比較して少ないものの，加齢にともない有病率が増加するため高齢化社会を将来迎えるわが国で患者実数の増加は必至[20]であり，積極的原因の究明と有効な治療法，早期発見方法の確立の必要性が叫ばれるている．

この疾患の死後脳においてはコリン作動性起始核とされる Meynert 核での細胞脱落と神経原線維変化が著しく[21,22]，大脳皮質の老人斑の出現と Meynert 核の細胞脱落量に相関があることが指摘

されている[23,24]．1974年にムスカリン受容体阻害作用を持つ中枢性抗コリン剤の健常者への投与によってアルツハイマー病類似の記憶・認知障害がおき，抗コリンエステラーゼ剤投与によって回復することがDrachmanとLeavitti[25]によって明らかにされて以来，コリン作動性神経の記憶・認知機能への関与が注目されてきた．これらの知見に基づいて，アルツハイマー病の動物モデルの確立とモデルによる薬物効果の評価を中心とする実験が行われてきた[10]．

現在用いられているモデル動物の作製の方法は大きく2つに分類され，基底核の物理的および化学的破壊を起こす方法[26~28]と，ムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬（アトロピン，スコポラミンなど）の投与[29~31]による方法があり，各々について組織学的，神経化学的解析と行動薬理的評価の両面から研究が進められている．今品の実験に使用したイボテン酸は，神経繊維を除いて細胞体と樹状突起を選択的に破壊する作用をもつ[32]とされており，カイニン酸と比較してより均一で特異的な作用を有している．

Smithはコリン作動性神経支配除去によるアルツハイマー病の動物モデルの報告の総括[10]において，同疾患患者と動物モデルの多項目の比較を行っている．前脳基底部破壊手術動物では，CAT，AchE，アセチルコリン，高親和性コリン取り込み等のコリン作動性ニューロンマーカーの低下，グルコース代謝のびまん性の低下，スコポラミン高感受性，学習・記憶の獲得・保持の低下，空間認識力の低下がみられ，アルツハイマー病患者における所見と一致する．一方，手術動物で認められる慢性期における学習能力の自然回復とAchE阻害剤による学習能力の改善が患者でみとめられない，同患者でみられる非コリン作動性ニューロンマーカーの多彩な変化と特徴的な分布を示すグルコース代謝の低下が手術動物ではみられないなどの相違があったという．

本研究ではこのようなアルツハイマー病患者と動物モデルの相違点に留意しながらコリン作動性神経の核医学的画像化のための基礎的検討としてイボテン酸による一側性前脳基底部破壊手術ラットを作製し，動物モデルの妥当性の評価と核医学的画像化のための基礎的研究を行った．

学習・記憶障害の評価法には受動的および能動的回避学習や空間迷路学習など種々のものがあるが，本研究では簡便・安価で比較的短時間で結果の得られる受動的回避学習による評価を選択し，その実験装置を考案，制作した．今回の装置はJarvik & Koppの装置[12]を基本とし，コンピュータの使用により回避反応の潜時測定と加える電撃ショックの時間調整の誤差を減らし，さらにデジタル回路の採用により精度，計算速度を向上させるなどの改良を加えた．

本モデルにおいて学習・記憶能力を評価した報告の中で，両側前脳基底部破壊手術を施したラットでは，24時間後の保持テストにおいて受動的回避反応潜時の平均65％以上の著明な短縮が認められた[33]という．また，一側前脳基底部破壊ラットにおいても30分後の保持テストにおける平均約20％の有意な短縮[34]が報告されている．今回の検討でも36時間後の保持テストにおいて偽手術群と比較して統計学上有意な反応潜時の短縮が手術群ラットで認められた．Fineら[35]はイボテン酸による一側性前脳基底部破壊ラットを作製し，受動的回避反応において記憶の獲得と保持に障害がみられたことを確認した．その後，コリン作動性神経の移植の学習能力改善への影響を調べ，記憶の獲得は移植後も改善しなかったが，記憶の保持は改善したとしている．これらのことから，主に記憶保持能力の低下が手術群ラットの受動的回避学習における反応潜時の短縮に関与したことが示唆される．

アセチルコリンは，はじめて証明された神経伝達物質であるがアセチルコリンの脳内分布そのものを可視化する適当な手段はいまだ開発されておらず，前脳基底部の破壊によるコリン作動性神経投射路を介した影響の解析のため今回はAchE染色を施行した．この染色では酵素組織化学法が最も頻繁に用いられ，その中でもKarnovsky & Rootsの方法[13]が良く知られている．しかし，

この方法はAchEの強い活性が神経軸索や終末部にみられるのに対し，神経細胞体の活性は低い，または強く密に染まった線維網に妨げられて細胞体の観察・同定が困難であるという欠点を有する．このため今回はTagoらの方法[14]によっても検討した．この方法では，コリン神経細胞体と神経線維の両方を良好なコントラストで認識しうるという長所を有する．この両法のAchE染色において，前脳基底部破壊同側，大脳前頭頭頂側頭葉皮質における広い範囲の染色能の明かな低下が認められた．horseradish peroxidase (HRP) などを大脳皮質の各領野へ限局性に注入し，標識された細胞を観察するという逆行性軸索輸送法を用いた報告[36~38]によれば，無名質を中心とする前脳基底部におけるコリン神経の起始細胞は，ほぼ皮質の投射領域に対応した一定の部位に特異的な配列を示すという．すなわち，より吻内側のブローカの対角帯核からは帯状回および後頭葉皮質へ，無名質からは前頭葉皮質へ，淡蒼球の腹側からは頭頂，側頭葉皮質へと主として投射する．今回イボテン酸を用いて破壊した部位は淡蒼球腹側部，無名質であり，この配列に合致したAchE染色能の低下が大脳皮質で認められた．

ラット脳内のコリン作動系は内在型神経細胞と投射系に分けられる．前者には線条体におけるコリン作動系神経細胞および大脳皮質に存性するコリン作動系神経細胞がある．後者には前述のごとくラット前脳において前脳基底部に神経細胞を有し大脳皮質へ投射する前脳基底部—皮質系と，中隔およびブローカの対角帯に神経細胞を有し海馬へ投射する中隔—海馬系[39]がある．大脳皮質におけるコリン作動系神経細胞はその30%が内在型，残りの70%が投射型である[40]とされている．今回の実験ではこのコリン系の起始部の一つである前脳基底部を破壊し，大脳頭頂葉皮質におけるCATおよびAchEの変化も定量した．非破壊側の頭頂葉皮質においてCATおよびAchE活性の値は従来の報告値[40,41]とほぼ一致した．また破壊側においては非破壊側に比べCAT活性が平均46%，AchE活性が平均40%低下しており同手術施行ラットにおける活性低下率の報告値[40,41]とほぼ同等であった．

本研究で用いた手術ラットは前述のごとく大脳皮質への投射核である前脳基底部を神経毒であるイボテン酸により化学的に破壊したものである．以上に述べたごとくこの破壊の効果を行動薬理学的，および組織学・神経化学的の両面から検索したところ，学習能力の劣化と前シナプス性のコリン作動性ニューロンマーカーの著明な低下が確認された．これらのことからこのコリン作動性神経支配除去モデルは人工的なアルツハイマー病の一モデルとして是認しうると考えられた．

V. 結　語

脳におけるコリン作動性神経支配の核医学的画像化のための基礎的研究として，イボテン酸を用いた一側前脳基底部破壊によるコリン作動性神経支配除去ラットを作成し，学習・記憶障害の評価，組織化学的検索，酵素化学的検索を行い，疾患モデルとしての妥当性を検討した．

1) より精度の高いstep-through型受動的回避実験装置を制作し，受動的回避学習における反応の獲得と消去について検討した．獲得施行時の反応潜時は，手術群と偽手術群で差異はなかったが，保持テストでは手術群は偽手術群よりも統計学上有意に短い回避潜時を示した．

2) ラット手術群の連続冠状断面切片を作製し，Nissl染色およびAchE染色を施行した．破壊側ではNissl染色において淡蒼球腹側部，無名質，および内包の神経細胞脱落とグリオーシスが顕著であり，AchE染色性の低下がみられた．投射部位の破壊側前頭葉から頭頂葉，側頭葉皮質においてもAchE染色性の低下がみられた．

3) Fonnumの方法によりCATおよびAchE活性の測定を行った．頭頂葉皮質において破壊側は非破壊側に比べCAT活性が平均46%，およびAchE活性が平均40%統計学上有意に低下していた．

以上，コリン作動性神経支配除去ラットは実験的アルツハイマー病の一動物モデルとして是認し

うると考えられた.

謝辞：本研究にあたり組織化学的検索に関しご指導いただいた金沢大学医学部第三解剖学教室，尾小山重雄先生に深く感謝致します.

文 献

1) Podreka I, Suess E, Goldenberg G, et al: Initial experience with technetium-99m HM-PAO brain SPECT. J Nucl Med **28**: 1657–1666, 1987
2) Hill TC, Magistretti PL, Holman BL, et al: Assessment of regional cerebral blood flow (rCBF) in stroke using SPECT and N-isopropyl-(I-123)-p-iodoamphetamine (IMP). Stroke **15**: 40–45, 1984
3) Fazekas F, Alavi A, Chawluk JB, et al: Comparison of CT, MR, and PET in Alzheimer's dementia and normal aging. J Nucl Med **30**: 1607–1615, 1989
4) Matsuda H, Gyobu T, Hisada K, et al: SPECT imaging of auditory hallucination using ^{123}I-IMP. Advances in Functional Neuroimaging **2** (4): 9–16, 1989
5) Kung HF, Pan S, Kung MP, et al: In vitro and in vivo evaluation of [^{123}I] IBZM: a potential CNS D-2 domapnine receptor imaging agent. J Nucl Med **30**: 88–92, 1989
6) Crawley JCW, Crow TJ, Johnstone EC: Uptake of ^{77}Br-spiperone in the striata of schizophrenic patients and controls. Nucl Med Commun **7**: 599–607, 1986
7) Holman BL, Gibson RE, Hill TC, et al: Muscarinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. JAMA **254**: 3063–3066, 1985
8) Holl K, Deisenhammer E, Dauth J, et al: Imaging benzodiazepine receptors in the human brain by single photon emission computed tomography (SPECT). Nucl Med Biol **16**: 759–763, 1989
9) Bartenstein P, Ludolph A, Schober O, et al: Comparison of blood flow and distribution of benzodiazepine receptors in focal epilepsy: preliminary results of a SPECT study. Nucl Med **28**: 181–186, 1989
10) Smith G: Animal models of Alzheimer's disease: experimental cholinergic denervation. Brain Res Rev **13**: 103–118, 1988
11) Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. 1st ed. Academic Press, Sydney, 1982
12) Jarvik ME, Kopp R: An improved one-trial, passive avoidance learning situation. Psychol Rev **21**: 221–224, 1967
13) Karnovsky MJ, Roots L: A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. J Histochem Cytochem **12**: 219–221, 1964
14) Tago H, Kimura H, Maeda T: Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and neuron staining in rat brain by a sensitive histochemical procedure. J Histochem Cytochem **4**: 1431–1438, 1986
15) Fonnum F: A radiochemical method for the estimation of choline acetyltransferase. Biochem J **100**: 479–484, 1966
16) Fonnum F: A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. J Neurochem **24**: 407–409, 1975
17) Fonnum F: Radiochemical microassays for the determination of choline acetyltransferase and acetylcholine esterase activities. Biochem J **115**: 465–472, 1969
18) Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248–254, 1976
19) 池田久男：Alzheimer 病，Alzheimer 型老年痴呆. Geriat Med **23**: 799–806, 1986
20) 笠原洋勇：日本における Alzheimer 病の疫学と今後の展望. 日本臨床 **46**: 10–17, 1988
21) Saper C, German D, White C: Neuronal pathology in the nucleus basalis and associated cell groups in senile dementia of Alzheimer type: possible role in cell loss. Neurology **35**: 1089–1095, 1985
22) Whitehouse P, Price D, Struble R, et al: Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. Science **215**: 1237–1239, 1983
23) 水谷智彦：アルツハイマー病の神経生化学. 総合臨床 **35**: 2891–2897, 1986
24) Arendt T, Bigl V, Tennstedt A, et al: Neuronal loss in different parts of the nucleus basalis is related to neuritic plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease. Neuroscience **20**: 1–14, 1985
25) Drachman DA, Leavitti J: Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? Arch Neurol **30**: 113–121, 1974
26) Flicker C, Dean R, Watkins S, et al: Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex. Pharmacol Biochem Behav **18**: 973–981, 1983
27) Helper D, Olton D, Wenk G, et al: Lesions in nucleus basalis and medial septal area of rats produce qualitatively similar memory impairments. J Neurosci **5**: 866–873, 1985
28) Lo Conte G, Bartolini L, Casamenti F, et al: Lesions of cholinergic forebrain nuclei: changes in avoidance behavior and scopolamine actions. Pharmacol Biochem Behav **17**: 933–937, 1982
29) Bartus R: Evidence for direct cholinergic involve-

ment in the scopolamine-induced amnesia in monkeys: effects of concurrent administration of physostigmine and methylphenidate with scopolamine. Pharmacol Biochem Behav **9**: 833–836, 1978
30) Buresova O, Bolthius J, Bures J: Differential effects of cholinergic blockade on performance of rats in the water tank navigation task and in a radial arm maze. Behav Neurosci **100**: 476–482, 1986
31) Wirsching B, Benninger R, Jhamandas K, et al: Differential effects of scopolamine on working and reference memory of rats in the radial maze. Pharmacol Biochem Behav **20**: 659–662, 1984
32) Schwarcz R, Hokfelt T, Fuxe K, et al: Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: a morphological and neurochemical study. Exp Brain Res **37**: 199–216, 1979
33) Lerer B, Nicholson V: A longitudinal examination of the behavioral and biochemical deficits produced by ibotenate lesions of the rat nucleus basalis magnocellularis. Soc Neurosci Abstr **16**: 553, 1986
34) Miyamoto M, Shintani M, Nagaoka A, et al: Lesioning of the rat basal forebrain leads memory impairments in passive and active avoidance tasks. Brain Res **328**: 97–104, 1985
35) Fine A, Dunnett SB, Bjorklund A, et al: Cholinergic ventral forebrain grafts into the neocortex improve passive avoidance memory in a rat model of Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA **82**: 5227–5230, 1985
36) Lamour Y, Dutar P, Jobert, A: Topographic organization of basal forebrain neurons projecting to the rat cerebral cortex. Neurosci Lett **34**: 117–122, 1982
37) Saper CB: Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Magnocellular basal nucleus. J Comp Neurol **222**: 313–342, 1984
38) Bigl V, Woolf NJ, Butcher LL: Cholinergic projections from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital, and cingulate cortices: a combined fluorescent tracer and acetylcholinesterase analysis. Brain Res Bull **8**: 727–749, 1982
39) Mcilwain H, Bachelard HS: Biochemistry and the central nervous system. 5th ed. Churchill Livingstone, New York, pp 413–440, 1985
40) Johnston MV, McKinney M, Coyle JT: Neocortical cholinergic innervation: a description of extrinsic and intrinsic components in the rat. Exp Brain Res **43**: 159–172, 1981
41) Johnston MV, McKinney M, Coyle JT: Evidence for a cholinergic projection to neocortex from neurons in basal forebrain. Proc Natl Acad Sci USA **76**: 5392–5396, 1979