

A Fundamental Study on Nuclear Medicine Imaging of Cholinergic Innervation in the Brain

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 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/2297/8186

コリン作動性中枢神経支配の核医学的画像化の基礎的研究

金沢大学医学部核医学講座 (主任: 久田欣一教授)

絹 谷 啓 子

(平成2年2月7日受付)

脳におけるコリン作動性神経支配の核医学的画像化を目的とした基礎的研究として、アルツハイマー病の疾患動物モデルのひとつとされている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製した。同手術群における学習・記憶障害の評価のために、従来の装置よりも精度が高い踏み入れ型受動的回避実験装置を考案、製作して、受動的回避学習における反応の獲得と保持について検討した。手術施行6日後の獲得試行の反応潜時は、前脳基底部破壊手術群と偽手術群に差異がなかったが、36時間後の保持テストでは、手術群13匹中5匹に統計学上有意な回避潜時の短縮がみられた。受動的回避実験終了後の組織化学的検討では、手術群破壊側で淡蒼球腹側部、無名質、および内包の神経細胞脱落とグリオシスが顕著であり、同部位でのアセチルコリンエステラーゼ (acetylcholine esterase, AchE) 染色性の低下がみられた。さらに投射部位である破壊側前頭、頭頂、側頭葉皮質において AchE 染色性の低下がみられた。手術施行一週間後に両側大脳頭頂葉皮質におけるコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase, CAT) および AchE 活性の測定を行った。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%と統計学上有意に低下していた。以上より、このコリン作動性神経支配除去手術群は実験的なアルツハイマー病の一モデルとして是認し得ると考えられた。さらに手術群の両側大脳頭頂葉皮質におけるアセチルコリンの定量を行った。破壊側は非破壊側に比べ、平均31%統計学上有意に低下していた。また大脳皮質におけるムスカリン性アセチルコリン受容体数を生体外受容体オートラジオグラフィにより評価した。総受容体数、M₁受容体数、M₂受容体数のいずれも破壊側、非破壊側間で統計学上有意な差は認められなかった。さらに手術群の連続脳冠状断切片に ³H 標識 2-(4-phenylpiperidino) cyclohexanol (AH5183) を用いて、シナプス前コリン作動性神経支配の描出を試みた。AH5183 の結合が手術群の破壊側前頭・頭頂・側頭葉皮質において、非破壊側よりも平均14%統計学上有意に低下していることが本実験において初めて確認された。偽手術群における結合との比較においても有意に低下していた。AH5183 は、シナプス前ニューロンにおけるアセチルコリン量の変化を鋭敏に反映すると考えられた。³H 標識 AH5183 を用いて得られたオートラジオグラムに核医学画像処理システムを用いて、冠状断像から横断像を得る三次元的な核医学画像再構成を試みた。この再構成により結合濃度の変化部位をよりの確に把握することができた。AH5183 は脳におけるコリン作動性神経の画像化のための有力なりガンドと考えられ、¹²⁵I や ^{99m}Tc 標識化により単光子放出コンピュータ断層撮影 (single photon emission computed tomography, SPECT) への応用が期待される。

Key words cholinergic innervation, muscarinic acetylcholine receptor, AH5183, autoradiography, QNB

Abbreviations : AchE, acetylcholine esterase ; AH5183, 2-(4-phenylpiperidino) cyclohexanol ; CAT, choline acetyltransferase ; CT, computed tomography ; DPPN, (2 α , 3 β , 4A β , 8A α)-decahydro-3-(4-phenyl-1-piperidinyl)-2-naphthalenol ; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid ; HRP, horseradish peroxidase ; IsoA, 3-methylbutyl

近年の中核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単光子放出コンピュータ断層撮影 (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が認められており、形態学的情報を提供する X 線コンピュータ断層撮影 (X-ray Computed tomography, CT) や核磁気共鳴撮影 (Magnetic resonance imaging, 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 による中核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⁹⁻⁷⁾されはじめており、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・神経疾患の病態の解明、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ひとつとして報告されている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た。このラット手術群においてコリン作動性中枢神経支配の核医学的画像化に関する基礎的研究を行ったのでここに報告する。

対象および方法

I. ラット手術群の作製

前脳基底部破壊手術には体重 200g の雄性ドリュウ系ラット38匹を用い、ペントバルビタール (50mg/kg, i. p.) 麻酔下、ラット頭部を脳定位固定装置 SR-5 (成茂, 東京) に固定し、Paxinos & Watson の図譜⁹⁾に従って29ゲージステンレススチール注入針を前頂の

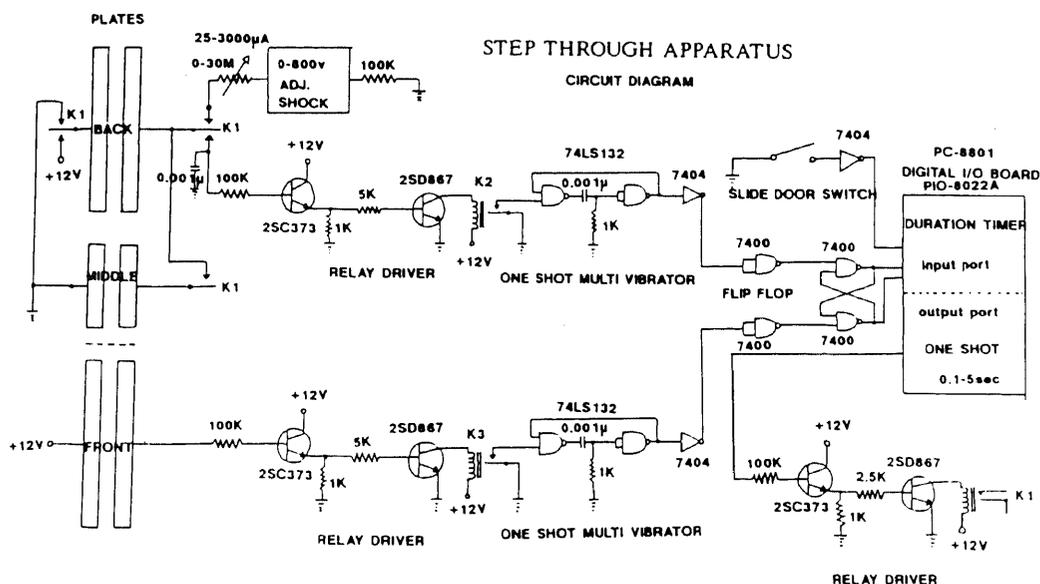


Fig.1. Circuit diagram of a step-through apparatus for the evaluation of a passive avoidance performance in the rat.

alcohol; ATP, adenosine triphosphoric acid; MRI, magnetic resonance imaging; NEM, N-ethylmaleimide; QNB, quinuclidinyl benzilate; RI, radio isotope; SPECT, single photon emission computed tomography; TPB, sodium tetraphenylborate

後方 0.8mm, 正中より右側 2.6mm, 硬膜より腹側 7.3mm の位置まで刺入した。細胞破壊にはリン酸緩衝液 (0.1M, pH 7.4) に溶解したイボテン酸 (Sigma セントリス, 米国) を用い, $5 \mu\text{g}$ $0.5 \mu\text{l}$ を微量注入装置 B-3373C (サミットメディカル社, 東京) 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 15 匹作製した。

II. 行動薬理的検索

Jarvik & Kopp の回路⁹を参考に踏み入れ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図 1 および図 2 に示す。実験箱は明暗 2 室からなる。20cm の高さから 100W の白色電球で照明した明室 (幅 25cm, 高さ 20cm, 長さ 25cm, アクリル板 5mm 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板間 (間隙 3mm) 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。そしてつぎの入力条件が与えられるまで, その状態 (セット状態) を維持する, 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, このドアを明けるとスイッチがオンになるように

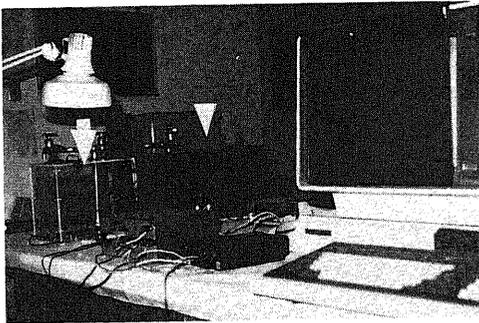


Fig. 2. Overview of the step-through apparatus. The experimental box consists of light (arrow) and dark (arrow head) compartments.

運動している。一方, デジタル I/O ボード PIO-802-2A (NEC, 東京) を装着したマイクロコンピュータ PC-8801 (NEC, 東京) 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, 明室から比較的速度やかに暗室に移動する習性がある。暗室 (幅 25cm, 高さ 20cm, 長さ 50cm, アクリル板に黒色スプレー塗料を塗布) の床には中間板と後方板があり, ラットが後方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は別端子にはいると, 入力条件の違いによりリセット状態となる。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 3mA が後方板および中間板に加わり, 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。

III. 組織化学的検索

受動的回避実験における保持テスト終了後, 前脳基底部破壊ラット 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 200ml 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 & Roots¹⁰ および Tago ら¹¹ のアセチルコリンエステラーゼ染色を施行した。

IV. コリンアセチル転移酵素 (choline acetyltransferase, CAT) およびアセチルコリンエステラーゼ (acetylcholine esterase, 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、モデル作製一週間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1mlの ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液 (10mM, 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碎した。

CAT 測定は Fonnum の方法¹²⁾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 (300mM), リン酸緩衝液 (50mM, pH 7.4), 塩化コリン (8mM), EDTA (20mM, pH 7.4), フィソスチグミン (0.1mM) を含む15 μ lの溶液を入れた。その後、放射性同位元素 (radioisotope, RI) 標識基質である [acetyl-¹⁴C] -Acetyl Coenzyme A (New England Nuclear, ボストン, 米国, NEC 313L, 2.01GBq/mmol) 20 μ l (0.4mM) を加え37°Cにて反応を開始した。反応開始15分後に塩酸ヒドロキシラミン (1M, pH 6.5) 20 μ l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0.5mlのリン酸緩衝液 (10mM, pH 7.4) を加え、20ml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10mgのKalibarを含む2mlのアセトニトリルを加え、さらに、10ml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¹⁴C 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¹⁰⁾によった。100 μ lのミニチューブに上記のホモジネート5 μ lを入れ、これにリン酸緩衝液 (20mM, pH 7.2) と牛血清アルブミン (0.8mg/ml), および RI 標識基質である [acetyl-¹⁴C] -Acetylcholine Iodide (New England Nuclear, NEC-350-10, 2.07GBq/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分後に塩酸ヒドロキシラミン (1M, pH 6.5) 20 μ l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0.5mlのリン酸緩衝液 (10mM, pH 7.4) を加え、1ml容量のミニチューブに移した。これに15mgのKalibarを含む0.5ml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20ml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10mlの親水性シンチレータにて測定した。

なお、蛋白定量は Bradford の方法¹⁰⁾によった。

V. アセチルコリンの測定

前脳基底部破壊ラット7匹において、McCaman らの方法¹⁰⁾によるアセチルコリンの定量を行った。手術施行後1週間後に、マイクロウェーブ NJ2603 型 (新日本無線, 東京) を照射した後断頭し、破壊側と非破壊側の頭頂葉皮質を採取した。それぞれ約7倍量の1N 蟻酸・アセトン溶液 (15:85, v/v) を加え3分間ポッター型ホモジナイザーで破碎した。蛋白定量に用いるサンプル40 μ lを分注後遠心 (1000g/10分間) して上清100 μ lをミニチューブに移し、窒素ガスにて乾燥させた。0.1N 塩酸100 μ lを加えた後10, 20, 30 μ lを3本のチューブに移した。サンプルと同量の50mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を加え、さらにテトラフェニルほう酸ナトリウム (sodium tetraphenylborate, TPB) を10mg/mlの割合で溶解したイソアミルアルコール (3-methylbutyl alcohol, IsoA) 60 μ lを加え十分に振盪した後遠心した (1000g, 5分間)。アルコール層から得られた40 μ lを0.4N 塩酸40 μ lが入ったミニチューブに移し十分に振盪した。遠心 (1000g, 2分間) 後上清 (TPB) を取り除いて IsoA 40 μ lを加え攪拌した。遠心 (1000g, 2分間) 後 IsoA 層を除去し、塩酸層から25 μ lをミニチューブにとり乾燥させた。

0.5M リン酸緩衝液 (pH 8.0), 0.2M 塩化マグネシウム, 1mM アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphoric acid, ATP, pH 7.0), コリンキナーゼ (ATP: choline phosphotransferase Sigma) を含む反応液10 μ lを乾燥した試料に加え、38°C15分間のインキュベーションを行った。

さらに、0.5M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0), 1mM ATP, CK, アセチルコリンエステラーゼ (Sigma), Adenosine 5'-[γ -³²P] triphosphate (Amersham, 英国 168~110TBq/mmol) を含む反応液10 μ lを追加し、38°C15分間のインキュベーションを行った。氷冷後0.3M 酢酸バリウム30 μ lを加え、遠心 (1000g 1分間) して上清30 μ lをマイクロカラム (Bio-Rad AG1X8 resin 200-400 mesh formate form) に加え、0.05N 水酸化ナトリウム0.5mlを用いて計4回溶出を行い、[³²P] ホスホリルコリンの放射

能を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

マイクロカラムは、レジンを4倍量の5N 蟻酸・2M 蟻酸アンモニウムで吸引濾過し、蒸留水でpH 5.0になるまで洗った後使用した。

スタンダードは100mM 塩化アセチルコリン溶液5 μ lに蟻酸アセトン混合液を加えたものに試料と同様の操作を加えて作成し内部標準とした。

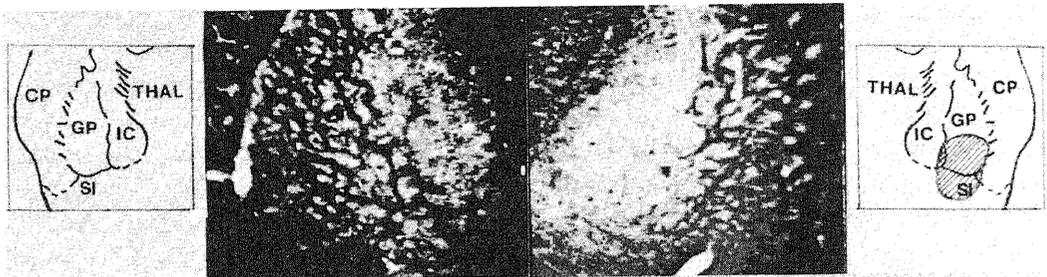
並行して脳組織ホモジネートに含まれるタンパク質をBradfordの方法で測定し、タンパク質100mg当たりのアセチルコリン量を算出した。

VI. ムスカリン様アセチルコリン受容体の測定

一側前脳基底部破壊ラット6匹と偽手術群ラット6匹において受容体オートラジオグラフィを施行し、脳におけるムスカリン様アセチルコリン受容体の測定を行った。手術施行1週間後に断頭し、脳を摘出した後、ドライアイス、ヘキサン(-60°C~-70°C)にて凍結した。この凍結脳からクリオスタット Tec 4551 (三共 Tissue, 東京)を用いて20 μ mの線状体を含む凍結切片(Konig and KlippelのアトラスのA9820-A4620の範囲)を作製し、ゼラチンを塗布したスライ

ドグラスにのせた。内在性のムスカリン様アセチルコリンを除去し、さらにプロテアーゼを不活性化するための、これらの脳切片を10mMのEDTAを含む50mMリン酸緩衝液(pH 7.4)で室温にて30分間プレインキュベーションした。この後、これらの脳切片とムスカリン様アセチルコリンの拮抗薬である[³H]-quinuclidinyl benzilate (QNB) 1nM (NEN, NET-656, 1.69GBq/mmol)を、1mMのN-ethylmaleimide (NEM)と1mMのEDTAを含む50mMリン酸緩衝液中で室温にて1時間インキュベーションした。NEMとEDTAは作動薬に対する受容体の低親和性状態を安定化させる目的で加えた。QNBはムスカリン様アセチルコリン受容体のサブタイプに対しては非選択的であるが、このQNB 1nMのインキュベーション溶液に、サブタイプM₂の作動薬であるcarbamoylcholine (carbachol)を1 \times 10⁻⁶Mの濃度で加えることによりサブタイプM₁の描出を、またM₁の拮抗薬であるpirenzepineを3 \times 10⁻⁶Mの濃度で加えることによりM₂の描出を試みた。Mashらの報告¹⁹⁾では、これらの濃度においてQNBとcarbacholの組合せではM₁受容体の80%が描出されるのに対しM₂受容体は

Acetylcholine Esterase Staining



Nissl Staining

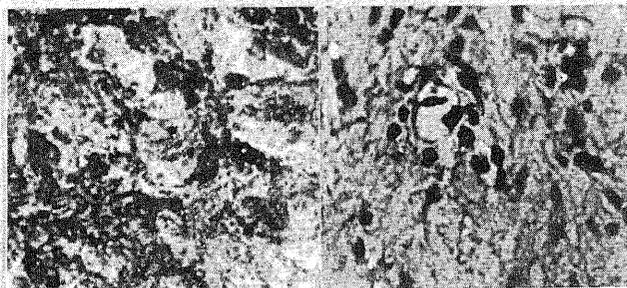


Fig. 3. Acetylcholine esterase (top row, $\times 4$) and Nissl staining (bottom row, $\times 400$) at basal forebrain in the ipsilateral (right column) and contralateral (left column) hemispheres. These staining methods reveal neuronal cell loss, gliosis, and diminished AchE staining in a ventral region of globus pallidus, substantia innominata, and internal capsule in the ipsilateral site. CP, caudate putamen; GP, globus pallidus; IC, internal capsule; THAL, thalamus; SI, substantia innominata.

95%阻害され、また QNB と pirenzepine の組合せでは M_2 受容体の60%阻害されるという。また QNB の非特異的結合の評価には、インキュベーション溶液に $10\mu\text{M}$ のアトロピンを加えた。1時間インキュベーション後、前述の氷冷リン酸緩衝液にて10分間、2回洗浄した。冷風にて乾燥後、以前報告²⁰⁾した8種類の濃度のゼラチン標準線源とともに、 ^3H 専用の Hyperfilm (Amersham) に密着させ、QNB 単独の場合10日間、QNB と carbachol の組合せの場合20日間、QNB と pirenzepine の組合せの場合30日間露光した後、現像しオートラジオグラムを作製した。得られたオートラジオグラムは辻が報告²⁰⁾したビデオディジタルライザーシステムを用いてフィルム濃度をディジタル化し、標準線源から得られた標準曲線を用いて、大脳皮質における放射能濃度を QNB の結合濃度 (pmol/g) に換算した。アトロピンの存在下と非存在下の濃度差から特異的結合濃度を算出した。画像処理には飯田らの PC-システム²¹⁾を使用した。

VII. 2-(4-phenylpiperidino) cyclohexanol (AH51-83) 結合部位の測定

ムスカリン様アセチルコリン受容体の測定を行った手術群と同一のラット6匹と偽手術群ラット6匹の隣接脳切片において、シナプス小胞におけるアセチルコリン貯蔵の強力な阻害剤である AH5183 結合部位の測定をオートラジオグラフィにより行った。脳切片を、 120mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂を含むトリス緩衝液 (50mM , pH7.6) で室温にて10分間プレインキュベーションした。その後、 ^3H 標識 AH5183 (NEN, NET-964, $2.11\text{GBq}/\text{mmol}$) 30nM を含む前述のトリス緩衝液中で室温にて1時間インキュベートした。非特異的結合の評価には非放射性 AH5183 $10\mu\text{M}$ をインキュベーション溶液に加えた。インキュベーション後、氷冷緩衝液にて30秒間、2回洗浄し、最後に2秒間氷冷蒸留水にて洗浄した。冷風にて乾燥後、ゼラチン標準線源とともに、 ^3H 専用の Hyperfilm (Amersham) に密着させ、1ヶ月露光した。得られたオートラジオグラムを前述のごとくディジタル化し、大脳皮質における放射能濃度を AH5183 結合濃度 (pmol/g) に換算した。非放射性 AH5183 の存在下の濃度差から特異的結合濃度を算出

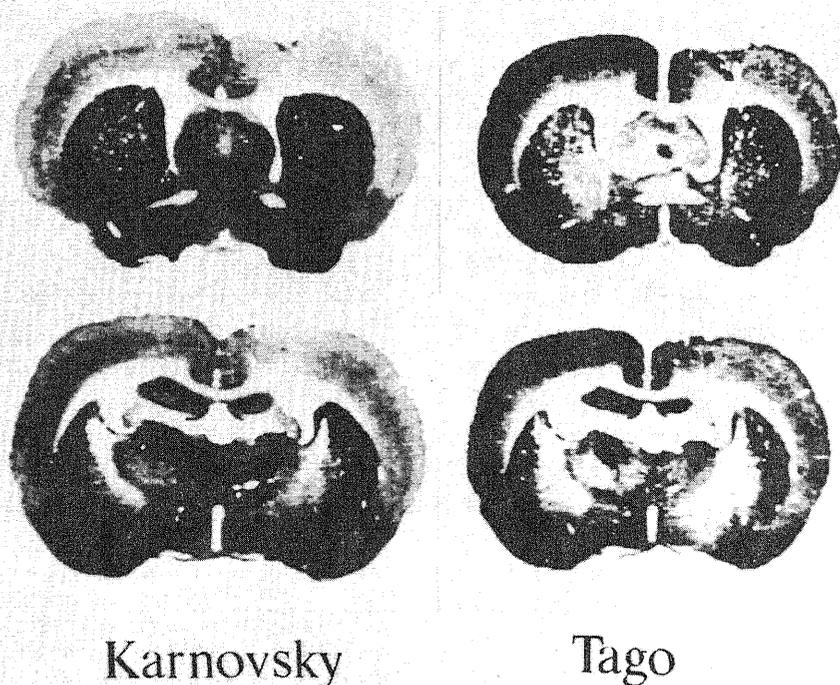


Fig. 4. Acetylcholine esterase staining by Karnovsky & Roots' (left column) and Tago's (right column) methods in coronal brain slices showing diminished staining in the extensive area of frontal, temporal, parietal cortices in the ipsilateral site. Caudate putamen is seen in slices in top row, thalamus in the bottom.

した。

また連続した脳8切片を同様にデジタル化し、256×256マトリックスサイズの各画像データを飯田らのプログラム²⁰⁾を用いてフロッピーデスクを介して、核医学画像処理装置 GMS55U (東芝、東京) に取り込み、128×128マトリックスサイズデータに圧縮後、再構成アルゴリズムを用いて冠状断像から横断像を作成し、AH5183 の脳内分布の三次元的評価を試みた。

成 績

I. 受動的回避反応

獲得試行時の反応潜時は、前脳基底部破壊手術群が 8 ± 12 秒 (mean±SD)、偽手術群が 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、手術群において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、手術群において正常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, $p < 0.05$)。

II. 組織化学的变化

前脳基底部破壊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、コリンエステラーゼ染色性の低下が認められた (図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、AChE 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 (図4)。一方、帯状回皮質、後頭葉皮質、海馬、線条体の染色性には差はみられなかった。

III. 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%と、統計学上有意に ($p < 0.001$, Student の t 検定) 低下していた。(表1)

IV. アセチルコリン

頭頂葉皮質において破壊側のアセチルコリン量は 8.6 ± 1.0 (mean±SEM) であり、非破壊側の 12.5 ± 1.5 nmol/100mg protein に比べ平均31%統計学上有意に ($p < 0.01$, Student の t 検定) (表2) 低下していた。

Table 1. Effects of unilateral ibotenic acid injection into magnocellular basal nucleus 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	$15.1 \pm 3.2^*$	27.8 ± 2.8	-46%
Acetylcholine esterase (AChE) μ mol/mg protein/hr	5	$1.2 \pm 0.2^*$	2.0 ± 0.2	-40%

* $p < 0.001$, ipsilateral site V.S. contralateral site in operated rats (Student's t test).

Table 2. Acetylcholine levels in parietal cortex

Model (N=7)		
Ipsilateral	Contralateral	% change
** 8.7 ± 1.0	12.5 ± 1.5	-31%

(means ± SEM, nmol/100mg protein)

** $p < 0.01$, ipsilateral site v.s. contralateral site to basal forebrain lesion in operated rats (Model) (Student's t test).

V. ムスカリン性アセチルコリン受容体, AH5183 結合部位

デジタル化されたオートラジオグラムの前頭葉から頭頂葉, 側頭葉の大脳皮質において, 図5のごとく関心領域を破壊側, 非破壊側ともに設定した. 大脳皮質の関心領域をムスカリン様アセチルコリン受容体については外層, 中間層, 内層の3層に分けて, AH5183 結合部位に関しては皮質全体に, 一側について6切片において設定した. 結合濃度はこの6切片における濃度の平均とした. 結果を表3-5に示す. また, 各受容体の代表的なオートラジオグラムを図6に示す. モデルラット脳においてムスカリン様アセチルコリン受容体の総結合濃度, M_1 , M_2 のサブタイプの結合濃度のいずれも破壊側と非破壊側皮質において差はみられなかった. また, 偽手術群ラット脳においても左右差はみられず, 手術群ラット脳とも差は認められ

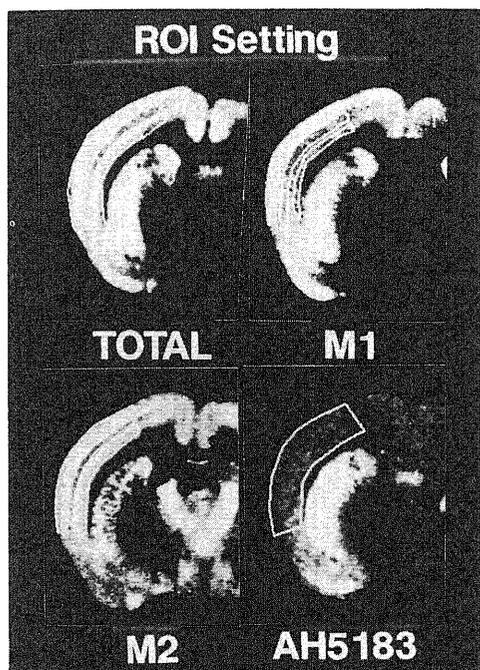


Fig. 5. Methods of setting regions of interest (ROI) over digitized autoradiograms of coronal brain slices at contralateral site. ROIs were drawn over outer, middle, and inner cortical layers for muscarinic acetylcholine receptor, while they were set on the whole cortical layers for AH5183 binding. Total, total muscarinic cholinergic receptor; M1, muscarinic M1 receptor; M2, muscarinic M2 receptor; AH5183, 2-(4-phenylpiperidino) cyclohexanol.

なかった. 一方, AH5183 結合部位濃度は, 手術群ラット脳において破壊側皮質は非破壊側に比べて14%有意に (Student の t 検定, $p < 0.001$) 低下し, また偽手術群同側脳皮質に比べても14%有意に (Student の t 検定, $0.01 < p < 0.02$) 低下していた. (表6)

手術群における AH5183 の脳内分布の冠状断像より作製した横断再構成像, および一部位でのプロフィール曲線を図7に示す. プロフィール曲線上にて矢印で示すごとく大脳皮質で破壊側の AH5183 の結合濃度は非破壊側に比べ明らかに低下していた.

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²⁹⁾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²⁹⁾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ている.

この疾患の死後脳においてコリン作動性基始核とされる Meynert 核での細胞脱落と神経原線維変化が著しく, ²⁴⁾²⁵⁾ 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²⁶⁾²⁷⁾. 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²⁸⁾ ことが Drachman と Leavitti 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.

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. 今回の実験に使用したイボテン酸は, 神経繊維を除去して細胞体と樹状突起を選択的に破壊する作用をもつ²⁹⁾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³⁰⁾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

Table 3. Muscarine M₁ receptor in fronto-temporo-parietal cortex

	Model (N=6)		Sham (N=6)	
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
Outer layer	133±4	130±4	139±3	136±2
Middle layer	99±2	98±3	102±3	101±2
Inner layer	100±3	100±2	103±3	104±2

(means ± SEM, pmol/g tissue)

Model, operated rats; Sham, sham-control rats;

Table 4. Muscarine M₂ receptor in fronto-temporo-parietal cortex

	Model (N=6)		Sham (N=6)	
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
Outer layer	83±2	80±1	83±3	80±1
Middle layer	76±2	73±1	72±3	73±2
Inner layer	78±2	79±1	77±3	78±1

(means ± SEM, pmol/g tissue)

Table 5. Total muscarinic receptor in fronto-temporo-parietal cortex

	Model (N=6)		Sham (N=6)	
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
Outer layer	251±6	243±6	260±5	252±4
Middle layer	212±3	204±3	217±5	212±3
Inner layer	219±4	212±3	221±6	220±3

(means ± SEM, pmol/g tissue)

Table 6. AH5183 binding in fronto-temporal parietal cortex

	Model (N=6)		Sham (N=6)	
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
*,#	347±10	403±14	395±16	408±16

(means ± SEM, pmol/g tissue).

* p<0.001 Ipsilateral site v.s. Contralateral site in operated rats(Model).

0.01(p<0.02 Ipsilateral site in Model v.s. Ipsilateral site in Sham-control rats(Sham).

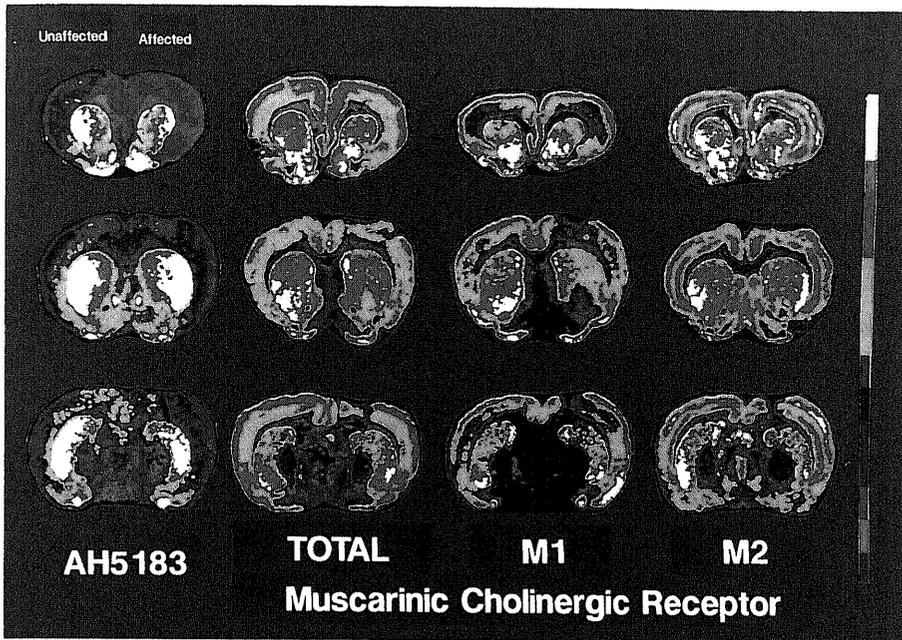


Fig. 6. Representative autoradiograms of total, M_1 , and M_2 muscarinic cholinergic receptor and AH5183 binding in the rat brain with unilateral cholinergic denervation showing the decreased AH5183 binding in the cortex of the ipsilateral site despite of no significant alteration of muscarinic cholinergic receptor.

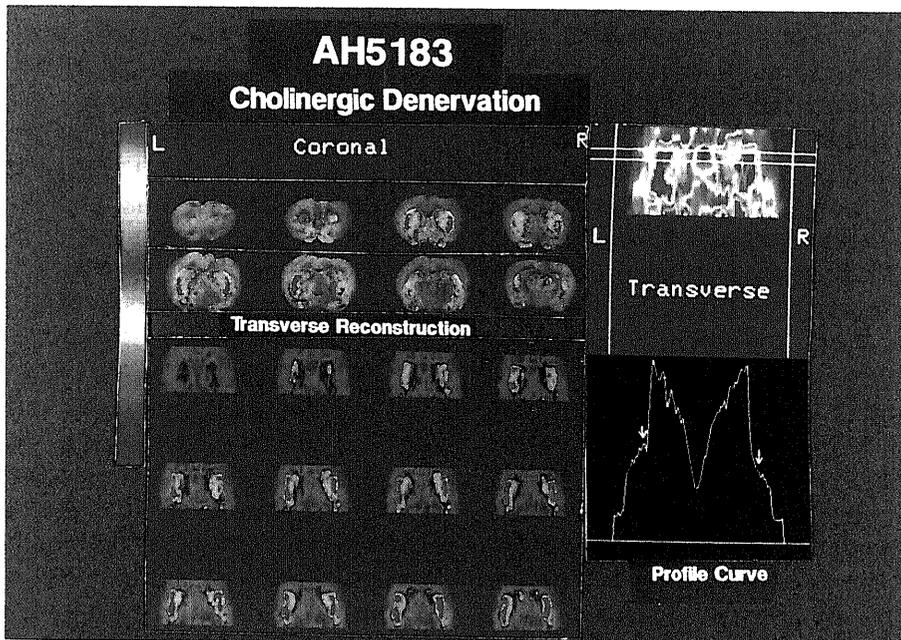


Fig. 7. Reconstruction of transverse AH5183 autoradiograms from consecutive coronal autoradiograms using a computer algorithm. Arrows on a profile curve set on the transverse autoradiogram indicate decreased AH5183 binding in the ipsilateral site relative to the contralateral site.

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、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動物モデル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ラットを作製し、動物モデルとしての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、製作した。今回の装置は Jarvik & Kopp の装置⁹⁾を基本とし、コンピューター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て、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。両側前脳基底部破壊手術を施したラットにおける報告では、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³¹⁾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³²⁾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³³⁾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りに用いられ、中でも Karnovsky & Roots の方法¹⁰⁾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¹¹⁾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す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、大脳前頭頂側頭葉皮質における広い範囲の染色性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域へ限局性に注入し、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³⁴⁾⁻³⁶⁾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 染色性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在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一皮質系と、中隔およびブローカ対角帯に神経細胞を有し海馬へ投射する中隔-海馬系³⁷⁾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70%が投射型である³⁸⁾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³⁸⁾³⁹⁾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従来の報告値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ラットは人工的なアルツハイマー病の一モデルとして是認しようと考えられた。

さらにこのラットにおいてアセチルコリン量を定量した。アセチルコリン定量には、大別して化学的方法と生物学的方法の2つの方法があり、本研究では McCamann らにより開発された同位元素を利用した酵素定量法⁴⁰⁾⁷⁾を採用した。³²P-ATP、および CK, AchE を用いて、コリンを CK によって非放射性ホスホリルコリンに変換したのちに、アセチルコリンを AchE によって分解し生じたコリンを放射性ホスホリルコリンに変換して、陰イオン交換樹脂を用いて基質から分離して放射能活性測定を行い定量する方法で、アセチルコリンとコリンが測定可能であり、感度・再現性に優れ特殊な装置を必要としないという特徴を有している。

動物の脳組織では死後急激な物質代謝の変化が生じるとされており、アセチルコリンも死後脳で著しい減少をきたす⁴⁰⁾とされている。そのため組織固定法として今回断頭前にマイクロウェーブ照射を施行した。この操作により生じる熱発生により組織内水分量の減少が起こり組織重量を不均一に減少させる可能性⁴⁰⁾があるため、単位蛋白量当りでアセチルコリン量を算出した。

今回測定した7匹のラット手術群の大脳皮質頭頂葉のアセチルコリン量は、破壊側、非破壊側でそれぞれ 8.7 ± 1.0 (mean \pm SEM), 12.5 ± 1.5 nmol/100mg protein であり、破壊側は非破壊側と比較して平均31%低下していた。

Johnston らはカイニン酸による一側淡蒼球腹側部破壊ラットを作成して行った研究において破壊側大脳皮質のアセチルコリンが非破壊側と比較して45%低下していたと報告³⁸⁾³⁹⁾している。

一般にシナプス前部は多数のシナプス小胞とミトコンドリアを含有し、軸索輸送により伝達物質合成酵素の供給を受け、伝達物質を生成・貯蔵し、刺激に対応して伝達物質を放出するという一連の機能を有している。今回のコリン作動性神経支配除去ラットの破壊側大脳皮質において認められたアセチルコリン量の低下に関しては、起始核である前脳基底部の細胞体の破壊が生じるため、同部位で合成され軸索輸送によって神経終末部に送られる CAT の量が減少したことが大

きく寄与していると考えられる。

アセチルコリンに対する受容体としてはニコチン作動性、ムスカリン作動性の2種が存在する。後者のうち、pirenzepine 高親和性のものは M_1 、低親和性のものは M_2 と名付けられた⁴¹⁾。

ヒトアルツハイマー病脳においては主に大脳皮質、海馬領域におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の有意な変化が報告^{42)~46)}されている。 M_1 および M_2 サブタイプの結合について平衡時解離定数(Kd)に関しては各領域で有意差はみられないが大脳皮質、海馬で M_2 結合部位における最大結合濃度(Bmax)の有意な減少がみられるとされている。 M_1 結合部位が主に皮質、海馬内のコリン作動性神経の後シナプス部位にあるのに対し、 M_2 結合部位は基底核由来のコリン作動性神経の神経終末に存在しており M_2 受容体数の減少は基底核由来コリン作動性神経の脱落に起因するものと考えられる⁴²⁾。一方、³H-QNB による他の実験結果では海馬での Kd, Bmax の有意な低下と Meynert 核での Bmax の低下が報告⁴⁴⁾されており、アルツハイマー病の病態、進行度、用いる放射性リガンドの相違によって異なった結果が生じている可能性があり、ヒトアルツハイマー脳においては明確な結論がまだ出されていない。

一方、モデル動物による研究においても、QNB 結合位に変化がなかったという報告⁴⁶⁾、急性期に M_2 受容体の低下、慢性期に総受容体結合部位には変化がなく M_1 受容体の増加がみられたという報告⁴⁷⁾、 $M_1 \cdot M_2$ 受容体の低下があったとする報告⁴⁸⁾、総受容体・ $M_1 \cdot M_2$ 受容体いずれにおいても変化がなかったとする報告⁴⁹⁾等があり、未だ一定した見解が得られていない。本研究における評価では、 $M_1 \cdot M_2$ 、総受容体結合濃度のすべてにおいて破壊側と非破壊側に有意な差がみられなかった。受容体の評価を行う時期の相違によって受容体の回復状態が異なったり、神経毒の相違、基底核破壊程度の相違⁵⁰⁾によってこれらの異なった結果が生じたものと考えられる。

さらにコリン作動性中枢神経支配除去によって生じた病態の画像化の試みとして、アセチルコリンのシナプス小胞への取り込みを阻害する作用をもつとされる AH5183 の脳における結合濃度をラット手術群の脳連続前額断面切片にて評価し、コリン作動性シナプス前神経の画像化について検討した。

1960年代 Allen & Hanbury 社において筋麻痺を起こす鎮痛剤のひとつとして発見された AH5183⁵¹⁾は、その後 Parson らによって、アセチルコリンのシナプス小胞への貯蔵を選択的、非競合的に阻害し⁵²⁾⁵³⁾、新し

く合成されたシナプス小胞内のアセチルコリン量を減少させることによって微小終板電位を減少させる⁵⁴⁾ことが確認された。また神経終末からのアセチルコリンの受動的漏出を阻害する作用も tubocurarine を用いた実験⁵⁵⁾で明らかにされており、アセチルコリン放出後のシナプス小胞のシナプス前部膜への融合状態においてこの作用を発現すると考えられている。

ラット脳切片を用いた結合阻害実験⁵⁵⁾では、結合を阻害するのは AH5183 とその類似体である (2 α , 3 β , 4A β , 8A α)-decahydro-3-(4-phenyl-1-piperidinyl)-2-naphthalenol (DPPN) のみであり、アセチルコリン、コリン、アトロピン、エゼリン、hemicholinium-3, hexamethonium, 構造類似化合物では阻害されなかったという。この結果より AH5183 はラット脳に強固な構造特異的結合部位をもつ⁵⁵⁾と考えられている。

アセチルコリンのシナプス小胞への取り込み機序は ATPase 依存性・Na 非依存性であり、ATPase とアセチルコリン輸送系によって構成されている。AH5183 は両者の活性部分とは異なる部位に結合して作用を発揮すると考えられているが正確な結合部位はまだ解明されていない。

Marien ら⁵⁵⁾はラット脳切片を用いた定量的オートラジオグラフィによって³H 標識 AH5183 結合部位の分布を検討した。その特徴的な分布は、高親和性コリン取り込み阻害剤の³H 標識 hemicholinium-3 の結合や CAT の免疫組織化学的染色法における分布と非常によく一致していたとしている。また、ラット脳の 14-18 部位において³H 標識 AH5183 結合部位の数と、CAT, AchE 活性、アセチルコリン量が非常に良好な相関を示したという報告⁵⁶⁾⁵⁷⁾もみられる。さらに Marien らはラット脳の海馬采の一側性切断 7 日後において、非投射部位である患側頭頂葉皮質における³H 標識 AH5183 結合濃度の不変と、投射部位である患側海馬の AH5183 結合濃度の低下並びに CAT 活性の低下⁵⁸⁾を確認している。今回の実験でも投射部位である破壊側頭頂葉皮質において AH5183 結合濃度の有意な低下が一側性前脳基底部破壊ラットにおいてはじめて確認された。このことにより、AH5183 はコリン作動性シナプス前神経支配の描出を目的としたオートラジオグラフィにおいてきわめて有力なリガントと考えられた。さらに、得られたオートラジオグラムを飯田らの画像処理システム²⁹⁾を介して核医学データ処理装置に導入し、冠状断像から横断像を得る三次元的画像再構成を試みた。この画像再構成は核医学臨床検査では既によく行なわれているが、動物実験で得ら

れたオートラジオグラムに初めて応用したところ、AH5183 結合濃度の局所の変化をよりの確に把握することができた。

将来、高齢化社会の到来によって痴呆は医学的のみならず大きな社会問題となることが予測される。アルツハイマー病に対しては有力な早期発見の手がかりとなる検査法が確立されておらず、臨床において施行されている核医学検査も SPECT による局所的脳血流の評価が中心であり、同疾患病態によって生じた最終的な血流情報を得ているだけであり、未だ疾患の本態に迫っていないといった感をまぬがれない。

オートラジオグラフィにおいてムスカリン性アセチルコリン受容体よりもより鋭敏に破壊側頭頂葉皮質におけるコリン作動性神経の変化を捉えた AH5183 は、臨床においても脳におけるコリン作動性神経の画像化のための有望なリガントと考えられ、¹²⁵I や ^{99m}Tc による標識化により SPECT 臨床への応用が期待される。

結 論

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。このラット手術群を用いて神経伝達物質の定量、受容体変化の検討、神経伝達物質貯蔵阻害剤による検討を行い、以下の結果を得た。

1. より精度の高い踏み入れ型受動的回避実験装置を考案、製作し、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。獲得試行時の反応潜時は、手術群と偽手術群に差異はなかったが、保持テストでは手術群は正常群よりも統計学上有意に短い回避潜時を示した。

2. ラット手術群の脳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 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。破壊側前頭葉から頭頂葉、側頭葉においても 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。

4. McCamann らの方法により Ach の定量を行った。頭頂葉皮質において破壊側は非破壊側に比べ平均

31%統計学上有意に低下していた。

5. ムスカリン性アセチルコリン受容体を生体外受容体オートラジオグラフィにより評価した。³H 標識 QNB を用いて carbamoylcholine 存在下に M₁ サブタイプを, pirenzepine 存在下に M₂ サブタイプをラット脳切片結合アッセイにより大脳皮質で定量した。ムスカリン性アセチルコリン総受容体数, M₁, M₂ サブタイプ受容体数ともに破壊側において有意な変化は認められなかった。

6. ラット手術群に AH5183 を用いて脳連続冠状断面切片にてシナプス前コリン作動性ニューロンの描出を試みた。AH5183 の結合濃度は, 破壊側前頭頂葉皮質において非破壊側よりも平均14%統計学上有意に低下していることが同手術群において初めて確認された。また, 偽手術群皮質における結合濃度と比較しても有意に低下していた。

7. ³H 標識 AH5183 により得られたオートラジオグラムに核医学画像処理システムを用いて, 冠状断面から横断面を得る三次元的な核医学的画像の再構成を試みた。再構成により結合の変化した部位をよりの確に把握することができた。

以上, コリン作動性中枢神経支配除去ラットにおいて, ムスカリン性アセチルコリン受容体に有意な変化が認められなかったが, ³H 標識 AH5183 を用いたオートラジオグラフィにおいて破壊側の統計学上有意な結合濃度の低下が認められた。AH5183 はアセチルコリンのシナプス小胞への取り込みを非競合的に強く阻害するため, シナプス前ニューロンにおけるアセチルコリン量の変化を鋭敏に反映すると考えられた。したがって AH5183 は, 脳におけるコリン作動性神経支配の画像化のための将来有望なりガンドと考えられ, SPECT による臨床検査への応用が期待される。

謝 辞

稿を終るに臨み, 終始御指導, 御校閲を賜りました恩師久田 欣一教授に謹んで謝意を表します。また, 貴重な御指導, 御協力を賜りました金沢大学アイソトープ総合センター 森 厚文助教授, 柴 和弘先生, 金沢大学医療短期大学部小島 一彦教授, 金沢大学医学部核医学講座松田 博史先生, 辻 志郎先生, 東邦大学医学部附属大橋病院放射線科寺田一志先生並びに教室員各位に深く感謝致します。

また本研究にあたり組織化学的検索に関し御指導いただいた金沢大学医学部第3解剖教室, 尾小山 重雄先生, 並びにアセチルコリン定量に関し御指導賜りました金沢大学医学部第2生化学教室, 細野 隆次講師, 池田 泰子先生に深く感謝致します。

本論文の一部は, 第29回核医学総会 (於大津, 1989) にて発表した。本研究の一部は, 平成元年度文部省化学研究費一般

研究 (A) (課題番号63440044), 奨励研究 (A) (課題番号01770774) に依ったことを付記する。

文 献

- 1) Podreka, I., Suess, E., Goldenberg, G., Steiner, M., Brucke, T., Muller, Ch., Lang, W., Neirinckx, R. D. & Deecke, L.: Initial experience with technetium-99m HM-PAO brain SPECT. *J. Nucl. Med.*, 28, 1657-1666 (1987).
- 2) Hill, T. C., Magistretti, P. L., Holman, B. L., Lee, R. G. L., O'leary, D. H., Uren, R. F., Royal, H. D., Mayman, C. I., Kolodny, G. M. & Clouse, M. E.: 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., Alave, A., Chawluk, J. B., Zimmerman, R. A., Hackney, D., Bilaniuk, L., Rosen, M., Alvas, W. M., Hurtig, H. I., Jamieson, D. G., Kushner, M. J. & Reivich, M.: Comparison of CT, MR, and PET in Alzheimer's dementia and normal aging. *J. Nucl. Med.*, 30, 1607-1605 (1989).
- 4) Matsuda, H., Gyoubu, T., Hisada, K. & Ii, M.: SPECT imaging of auditory hallucination using ¹²³I-IMP. *Advances in Functional Neuroimaging*, 2, 9-16 (1989).
- 5) Kung, H. F., Pan, S., Kung, M. P., Billings, J., Kasliwal, R., Reilly & Alavi, A.: In vitro and in vivo evaluation of [¹²³I] IBZM: a potential CNS D-2 dopamine receptor imaging agent. *J. Nucl. Med.*, 30, 88-92 (1989).
- 6) Crawley, J. C. W., Crow, T. J. & Johnstone, E. C.: Uptake of ⁷⁷Br-spiperone in the striata of schizophrenic patients and controls. *Nucl. Med. Commun.*, 7, 599-607 (1986).
- 7) Gibson, R. E., Schneidau, A., Cohen, V. I., Sood, V., Ruch, J., Melograna, J., Eckelman, W. C. & Reba, R. C.: In vitro and in vivo characteristics of [iodine-125] 3-(R)-quinuclidinyl (S)-4-iodobenzilate. *J. Nucl. Med.*, 30, 1079-1087 (1989).
- 8) Paxinos, G. & Watson, C.: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 1st ed. Academic Press, Sydney, 1982.
- 9) Jarvik, M. E. & Kopp, R.: An improved one-trial, Passive avoidance learning situation.

Psychol. Rep., 21, 221-224 (1967).

10) **Karnovsky, M. J. & Roots, L.:** A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.*, 12, 219-221 (1964).

11) **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).

12) **Fonnum, F.:** A radiochemical method for the estimation of choline acetyltransferase. *Biochem. J.*, 100, 479-484 (1966).

13) **Fonnum, F.:** A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.*, 24, 407-409 (1975).

14) **Fonnum, F.:** Radiochemical microassays for the determination of choline acetyltransferase and acetylcholine esterase activities. *Biochem. J.*, 115, 465-472 (1969).

15) **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).

16) **Goldberg, A. M. & McCaman, R. E.:** The determination of picomole amounts of acetylcholine in mammalian brain. *J. Neurochem.*, 20, 1-8 (1973).

17) **McCaman, R. E., Weinreich, D. & Borys, H.:** Endogenous levels of acetylcholine and choline in individual neurons of *Aplysia*. *J. Neurochem.*, 21, 473-476 (1973).

18) **Konig, J. F. R. & Kippel, R. A.:** The Rat Brain. A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem. 1st ed. Robert E. Krieger Publishing Co. INC., New York, 1967.

19) **Mash, D. C. & Potter, L. T.:** Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarinic receptors in the rat brain. *Neuroscience*, 19, 551-564 (1986).

20) 辻 志郎: 神経核医学画像診断法による受容体マッピングに関する基礎的研究—ラット脳における受容体オートラジオグラフィの定量化. 十全医会誌, 97, 376-399 (1988).

21) 飯田泰治, 松平正道, 山田正人, 河村昌明: パーソナルコンピュータを用いた核医学 CRT 診断システムの開発と画像互換. 核医学, 24, 1491-1497 (1987).

22) 池田久男: Alzheimer 病, Alzheimer 型老年痴呆. *Geriat. Med.*, 23, 799-806 (1986).

23) 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).

24) **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).

25) **Whitehouse, P., Price, D., Struble, R., Clark, A., Coyle, J. & DeLong, M.:** Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215, 1237-1239 (1983).

26) 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).

27) **Arendt, T., Bigl, V., Tennstedt, A. & Arendt, A.:** Neuronal loss in different parts of the nucleus basalis is related to neuritic plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 1-14 (1985).

28) **Drachman, D. A. & Leavitt, J.:** Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch. Neurol.*, 30, 113-121 (1974).

29) **Schwarcz, R., Hokfelt, T., Fuxe, K., Jonsson, G., Goldstein, M. & Terenius, L.:** Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: a morphological and neurochemical study. *Exp. Brain Res.*, 37, 199-216 (1979).

30) **Smith, G.:** Animal models of Alzheimer's disease: experimental cholinergic denervation. *Brain Res.*, 13, 103-118 (1988).

31) **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).

32) **Miyamoto, M., Shintani, M., Nagaoka, A. & Nagawa, Y.:** Lesioning of the rat basal forebrain leads to memory impairments in passive and active avoidance tasks. *Brain Res.*, 328, 97-104 (1985).

33) **Fine, A., Dunnett, S. B., Bjorklund, A. & Iversen, S. D.:** 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).
- 34) **Lamour, Y., Dutar, P. & Jobert, A.:** Topographic organization of basal forebrain neurons projecting to the rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.*, **34**, 117-122 (1982).
- 35) **Saper, C. B.:** Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Magnocellular basal nucleus. *J. Comp. Neurol.*, **222**, 313-342 (1984).
- 36) **Bigl, V., Woolf, N. J. & Butcher, L. L.:** 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).
- 37) **McIlwain, H. & Bachelard, H. S.:** *Biochemistry and the Central Nervous System*, 5th ed, 413-440, Churchill Livingstone, New York, 1985.
- 38) **Johnston, M. V., McKinney, M. & Coyle, J. T.:** Neocortical cholinergic innervation: a description of extrinsic and intrinsic components in the rat. *Exp. Brain Res.*, **43**, 159-172 (1981).
- 39) **Johnston, M. V., McKinney, M. & Coyle, J. T.:** Evidence for a cholinergic projection to neocortex from neurons in basal forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5392-5396 (1979).
- 40) 栗山欣弥, 大熊誠太郎: 神経伝達物質, 第1版, 37-38頁, 中外医学社, 東京, 1986.
- 41) **Hammer, R. & Giachetti, A.:** Muscarinic receptor subtypes: M1 and M2 biochemical and functional characterization. *Life Sci.*, **31**, 2991-2998 (1982).
- 42) **Araujo, D. M., Lapchak, P. A. & Quirion, R.:** Characterization of N- [³H] methylcarbamylcholine binding site and effect of N-methylcarbamylcholine on acetylcholine release in rat brain. *J. Neurochem.*, **51**, 292-299 (1988).
- 43) **Nordberg, A. & Winblad, B.:** Reduced number of [³H] nicotine and [³H] acetylcholine binding site in the frontal cortex of Alzheimer brains. *Neurosci. Lett.*, **72**, 115-120 (1986).
- 44) **Shimohama, S., Taniguchi, T., Fujiyama, M. & Kameyama, M.:** Changes in nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in Alzheimer-type dementia. *J. Neurochem.*, **46**, 288-293 (1986).
- 45) **Rinne, J. O., Laakso, K., Lonnberg, P. & Molsa, P.:** Brain muscarinic receptors in senile dementia. *Brain Res.*, **336**, 19-25 (1985).
- 46) **Bartus, R. T., Flicker, C., Dean, R. T., Pontecorvo, M., Figueiredo, J. C. & Fisher, S. K.:** Selective memory loss following nucleus basalis lesions: long time behavioral recovery despite persistent cholinergic deficiencies. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **23**, 125-135 (1985).
- 47) **McKinney, M. & Coyle, J.:** Regulation of neocortical muscarinic receptors: effects of drug treatments and lesions. *J. Neurosci.*, **2**, 97-105 (1982).
- 48) **DeBelleruche, J., Gardiner, I., Hamilton, M. & Birdsall, N.:** Analysis of muscarinic receptor concentration and subtypes following lesions of the rat substantia innominata. *Brain Res.*, **340**, 201-209 (1985).
- 49) **Wenk, G. & Engisch, K.:** [³H] Ketanserin (serotonin type 2) binding increases in rat cortex following basal forebrain lesion with ibotenic acid. *J. Neurochem.*, **47**, 845-850 (1986).
- 50) **Wenk, G., Cribbs, B. & McCall, L.:** Nucleus basalis magnocellularis: optimal coordinates for selective reduction of choline acetyltransferase in frontal neocortex by ibotenic acid injection. *Exp. Brain Res.*, **56**, 335-340 (1984).
- 51) **Brittain, R. T., Levy, G. P. & Tyers, M. B.:** The neuromuscular blocking action of 2-(4-phenylpiperidino) cyclohexanol (AH5183). *Eur. J. Pharmacol.*, **8**, 93-99 (1969).
- 52) **Marshall, I. G. & Parsons, S. M.:** The vesicular acetylcholine transport system. *Trends Neurosci.*, **10**, 174-177 (1987).
- 53) **Marien, M. R., Parsons, S. M. & Altar, C. A.:** Quantitative autoradiography of brain binding sites for the vesicular acetylcholine transport blocker 2-(4-phenylpiperidino) cyclohexanol (AH5183). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 876-880 (1987).
- 54) **Whitton, P. S., Marshall, I. G. & Parsons, S. M.:** Reduction of quantal size by vesamicol (AH5183), an inhibitor of vesicular acetylcholine storage. *Brain Res.*, **385**, 189-192 (1986).
- 55) **Edwards, C., Dolezal, V., Tucek, S., Zemkova, H. & Vyskocil, F.:** Is an acetylcholine transport system responsible for nonquantal

release of acetylcholine at the rodent myoneural junction? Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 3514-3518 (1985).

56) Hoover, D. B., Muth, E. A. & Jacobowitz, D. M.: A mapping of the distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. Brain Res.,

153, 295-306 (1978).

57) Satoh, K., Armstrong, D. M. & Fibiger, H. C.: A comparison of the distribution of central cholinergic neurons as demonstrated by acetylcholinesterase pharmacohistochemistry and choline acetyltransferase immunohistochemistry. Brain Res. Bull., 11, 693-720 (1983).

A Fundamental Study on Nuclear Medicine Imaging of Cholinergic Innervation in the Brain Keiko Kinuya, Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99,342—359 (1990)

Key words cholinergic innervation, muscarinic acetylcholine receptor, AH5183, autoradiography, QNB

Abstract

A fundamental study was performed on the nuclear medicine imaging of cholinergic innervation in the brain. A cholinergic denervation model was experimentally prepared by producing an ibotenic acid lesion in the unilateral basal forebrain, which is reported to be one of the animal models of Alzheimer's disease. To assess the passive avoidance performance in terms of acquisition of new responses and long term retention, a step-through apparatus with high precision was newly developed. At 6 days postsurgery acquisition latencies showed no significant differences between the models and sham-controls. However, the models revealed statistically significant shorter retention latencies than the sham-controls at 36 hours after the acquisition trial. Histochemical investigation in the animals which underwent the passive avoidance performance, revealed neuronal cell loss, gliosis, and diminished AchE staining in a ventral region of globus pallidus, substantia innominata, and internal capsule in the affected site. Furthermore, decreased AchE staining was observed in the frontal, parietal, and temporal projection cortices ipsilateral to the basal forebrain lesion in the models. Quantitative determination of choline acetyltransferase (CAT) and AchE in the parietal cortices showed a statistically significant 46% and 40% decrease on an average, in the ipsilateral site, compared to the contralateral site. These results suggest that this animal model is approved as an appropriate experimental model of Alzheimer's disease. Further quantitative determination of acetylcholine in the parietal cortices revealed a statistically significant 31% decrease on an average, in the ipsilateral site, relative to the contralateral site. Finally, in -vitro receptor autoradiography was performed to look for a promising ligand for mapping cholinergic innervation in the brain. No significant differences were observed in total, M₁, and M₂ muscarinic acetylcholine receptors in the cortices between the ipsilateral and contralateral sites in both the models and sham-controls. Simultaneously mapping of presynaptic cholinergic innervation was carried out using ³H-2-(4-phenylpiperidino) cyclohexanol (AH5183). The present study may be the first report of the demonstration of the statistically significant 14% decrease of AH5183 binding on an average, in the cortices of the ipsilateral site, relative to the contralateral site in models or relative to the cortices

in sham-controls. These results may imply that AH5183 is a sensitive presynaptic marker of acetylcholine levels. Reconstructed transverse autoradiograms of AH5183 from consecutive coronal autoradiograms, using a three dimensional reconstruction algorithm in a nuclear medicine technique, were convenient for delineating altered regions with decreased AH5183 binding. In conclusion, AH5183 binding showed a significant decrease in the projection cortices ipsilateral to the basal forebrain lesion, in spite of no significant alteration of muscarinic acetylcholine receptors in a unilateral cholinergic denervation model, which is regarded as an experimental model of Alzheimer's disease. The ^{125}I or $^{99\text{m}}\text{Tc}$ labeled AH5183 may become a promising ligand for mapping cholinergic innervation in the human brain in single photon emission computed tomography.