

A Fundamental Study on Brain Receptor Mapping by Neuronuclear Medicine Imaging : Quantitation of Receptor Autoradiography in the Rat 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/2297/8028

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—

金沢大学医学部核医学講座 (主任: 久田欣一教授)

辻 志 郎

(昭和63年2月24日受付)

神経精神疾患の診断, 治療指針などに有用と期待されているエミッション CT (emission computerized tomography, ECT)・レセプターマッピングの基礎的資料を得ることを目的として, オートラジオグラフィ法を用いて脳内レセプターの定量化を研究した. ラット脳を用いて, 6種の³H-リガンドについて, インキュベーション時間, 洗浄時間, 結合曲線などを検討したところ, 全てのリガンドにおいて良好なオートラジオグラムが得られた. またオートラジオグラムの定量機器について, 1) ミクロフォトメータ, 2) ドラムスキャンデンシトメータ, 3) パーソナルコンピュータを利用した安価なビデオディジタイザシステムとを定量性と操作性の面で比較検討したところ, 定量性の面では上記三者間で測定値の相関は高く, 操作性の面ではビデオディジタイザシステムが格段に優れていたため, 以下ではこれを用いて定量化を行った. その結果, ムスカリン性アセチルコリンレセプターの拮抗剤である ³H-quinuclidinyl benzilate (³H-QNB)では, オートラジオグラフィ法と結合アッセイ法で Scatchard 解析から算定した最大結合量および解離定数の値が異なるとされていたが, 反応条件を適切にすることにより両法において極めて近似した値を得た. またオートラジオグラフィ法では空間分解能が優れているので, 結合アッセイ法は不可能と考えられる詳細な脳内の部位間の比較が可能であった. 従来の解析法である Scatchard 解析は, 反応系が平衡に達していない状態では, かなりの誤差を生じ, 解離定数についても解離速度定数と結合速度定数の比としてしか算出されないため, 結合曲線および解離曲線からパラメータを直接求める方法を検討した. これによれば, 計算は複雑であるが, 必ずしも系が平衡に達していなくても結合および解離速度定数を別々に算出可能であった. また, ³H-QNB に関して, そのリガンド-レセプター複合体は単一のものではなく, 低親和性状態から高親和性状態に移行する異性化という現象が従来から言われている. これについて, モデル式に忠実に数学的解析法を開発し, 結合曲線および解離曲線から得られたデータを用いて各速度定数を算出したところ, みかけの解離定数 ($K_{d,app}$) が異性化を考慮しない場合に極めて近似し, このモデルの妥当性が示された. 以上よりオートラジオグラフィ法では, 脳内レセプターの定量化に関し, 従来のレセプターアッセイ法に比べ, より詳細な解析が可能である. さらに今後, 種々の神経精神疾患モデル動物を用いて実験を行うことにより, 本法はそれらの疾患の病態解明に寄与するのみならず, 神経精神疾患の診断, 治療指針の決定などに有用と期待されている ECT によるレセプターマッピング解析のための基礎的情報を提供する有力な方法であると考えられた.

Key words receptor, autoradiography, emission computerized tomography, receptor binding assay, brain

Abbreviations: ECT, emission computerized tomography; ³H-DHA, ³H-Dihydroalprenolol hydrochloride; ³H-QNB, ³H-quinuclidinyl benzylate; PET, positron emission tomography; ROI, region of interest; SPECT, single photon emission computerized tomography; VDS, video digitizer system.

レセプターという概念は、古くは薬剤が作用するとき最初に結合する物質として Langley¹⁾により想定されたものであったが、後にホルモン、神経伝達物質など多様な物質を受容し、その情報を細胞内に伝えたりする機構にまで広がっていった²⁾。最近、インビトロ結合アッセイ法の開発、レセプターを介しての細胞内伝達機序に関する研究および分子生物学的手法によるレセプターのアミノ酸配列から三次構造までの解析法の発展などによりレセプターに関する研究は飛躍的に発展し³⁾、レセプター学といえる一分野を形成している。

精神神経疾患、例えばパーキンソン病、ハンチントン舞踏病、精神分裂病、アルツハイマー病などにおいて、レセプター異常が報告され、これらの諸疾患の原因追求、病態の解明が試みられている^{4)~6)}。しかしこれらの報告は、死後脳あるいは疾患モデル動物を用いたインビトロ結合アッセイの測定結果に基づいているため、前者は死後の自己融解、蛋白分解酵素、生前に投与された向精神薬、死亡前の低酸素状態などの影響⁷⁾を受け、後者は対象が人間の疾患と同等であるという確たる証拠に欠けるという問題点を有している。したがって、これらの問題点を解決するためには、生体を直接測定し、時々刻々に変化する生命現象を体外測定により直接捉える必要がある。この目的で、ポジトロン断層装置 (positron emission tomography, PET) およびポジトロン核種標識リガンドを用いたレセプターマッピングすなわち人体のレセプターを体外測定で描画することが可能となってきている⁸⁾。しかし生体内ではレセプターと放射性リガンドの反応以外に種々の複雑な因子が関与するため⁹⁾、レセプターマッピングによるレセプターの定量化は複雑となるのみならず、現在の PET の解像力は脳の解剖学的詳細部を

評価するには不十分である。したがって、レセプターマッピングの臨床的評価の前に基礎的検討を十分行う必要があると考えられる。インビトロの受容体オートラジオグラフィはインビトロ結合アッセイとインビトロのレセプターマッピングの両方の特徴を有し、両法の間中に位置している。そこで今回受容体オートラジオグラフィに関し、反応条件検討、定量化の方法、インビトロ結合アッセイとの比較、シミュレーション実験などに関し、基礎的検討を行った。

材料および方法

I. オートラジオグラム作製の条件検討

1. 放射性化合物および薬剤

放射性化合物として、ドーパミン 2 (D2) レセプター拮抗剤である ³H-spiperone (比放射能 23.4 Ci/mmol)、ムスカリン性アセチルコリンレセプター拮抗剤である ³H-quinuclidinyl benzylate (QNB) (同 59 Ci/mmol)、GABA レセプター作動薬である ³H-muscimol (同 7.9 Ci/mmol)、オピオイドレセプター拮抗剤である ³H-diprenorphine (同 10.5 Ci/mmol)、セロトニンレセプター拮抗剤である ³H-ketanserin (同 61 Ci/mmol)、 β レセプター拮抗剤である ³H-dihydroalprenolol hydrochloride (DHA) (同 95 Ci/mmol) の 6 種を使用した (前四者はアマシャムジャパン、東京、後二者は NEN Research Products, USA)。また、プレインキュベーション、インキュベーション、洗浄のための緩衝液として、³H-spiperone には pH 7.7 の 50 mM トリス緩衝液 (0.1% アスコルビン酸、120 mM NaCl、5 mM KCl、2 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂ を含む)、³H-QNB には pH 7.4 の 50 mM トリス緩衝液、³H-muscimol には pH 7.05 の 50 mM トリスクエン酸緩衝液、³H-diprenorphine には pH 7.05

Rat brain was frozen with compound at -60 to -70°C .

Tissue sections were prepared.

Cut ($20\ \mu\text{m}$) by a cryostat microtome.

Thaw-mounted onto slide glass.

Stored for 1 to 2 days in a refrigerator.

Preincubation.

Tissue sections were rinsed in 50mM phosphate buffer.

Incubation.

Tissue sections were incubated with radioactive ligands.

Washout.

Tissue sections were rinsed in the same buffer.

Dry.

Generation of autoradiogram.

Exposed to LKB Ultrafilm.

Fig. 1. Basic procedure of receptor autoradiography.

の 50 mM クエン酸緩衝液, ^3H -ketanserin には pH 7.4 の 50 mM トリス緩衝液, ^3H -DHA には pH 7.7 の 0.17 M トリス緩衝液 (10 mM MgCl_2 を含む) を使用した。さらに阻害剤として, ^3H -spiperone には $1\ \mu\text{M}$ の (+)butaclamol (フナコシ, 東京), ^3H -QNB には $10\ \mu\text{M}$ のアトロピン (田辺製薬, 大阪), ^3H -muscimol には $100\ \mu\text{M}$ の GABA (SIGMA, USA), ^3H -diprenorphine には $1\ \mu\text{M}$ の naloxane (SIGMA, USA), ^3H -ketanserin には $1\ \mu\text{M}$ の spiperone (エーザイ, 東京), ^3H -DHA には $10\ \mu\text{M}$ の dl-プロプラノロール (住友製薬, 大阪) を用いた。

2. 受容体オートラジオグラフィの基本的な手技

オートラジオグラム作製の基本的な手技を図 1 に示す。体重 150~200 g の雄性ドンリュウラットを断頭し、可及的すみやかに脳を摘出し、ドライアイスで冷却したヘキサン (約 -70°C) にて凍結した後、クリオスタット (三共 TISSUE TEC 4551, 東京) を用いて厚さ $20\ \mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、thaw-mount 法によりゼラチン塗末スライドガラス上に載せ¹⁰⁾、1~2 日間冷蔵庫 (4°C) に保存した。内在性のリガンドを除くため、切片を上記緩衝液にて 20 分間ブレインキュベート (muscimol では 4°C , それ以外では $23\sim 25^\circ\text{C}$) した後、同緩衝液にそれぞれの放射性リガンドを混合した溶液で同じ温度でインキュベートした。水冷の同緩衝液にて洗浄後乾燥し、ゼラチン標準線源と共に ^3H 専用ウルトロフィルム (LKB No. 2208-190, スウェーデン) に密着させ、2 週間から 3 カ月露光した後現像しオートラジオグラムを作製した。

3. 条件検討

条件検討として、インキュベーション時間および洗浄時間の影響を調べ、さらに飽和実験を行った。König and Klippel のアトラス¹¹⁾ の A9410-A6060 μm の範囲の線条体を含む連続切片を用いた切片をかき取ってその放射能を液体シンチレーションカウンタ (アロカ LSC1000, 東京) にて測定した。なお、各実験毎に 3 匹の平均値を求めた。

1) インキュベーション時間の影響

インキュベーション時間の影響をみるため、 ^3H -spiperone では $0.5\ \text{nM}$ の濃度で 15, 45, 60, 90, 120, 180 分, ^3H -QNB では $0.4\ \text{nM}$ の濃度で 15, 30 分, 1, 2, 3, 4 時間, ^3H -muscimol では $5\ \text{nM}$ の濃度で 1, 5, 10, 20, 30, 45, 60 分, ^3H -diprenorphine では $0.5\ \text{nM}$ の濃度で 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 分, ^3H -ketanserin では $0.4\ \text{nM}$ の濃度で 15, 30, 45, 60, 90, 120 分, ^3H -DHA では $0.5\ \text{nM}$ の濃度で 5, 10, 15, 20, 30 分と時間を変えてインキュベートした。なお洗浄時間は, ^3H -muscimol の 30 秒 2 回を除いて

すべて 10 分間 2 回である。

2) 洗浄時間の影響

洗浄時間の影響を検討した。 ^3H -spiperone では $0.5\ \text{nM}$ の濃度で 3 時間インキュベートし、30 秒, 1, 5, 10, 20, 30 分洗浄してその影響を調べた。 ^3H -QNB では $0.4\ \text{nM}$ で 4 時間インキュベートし同様に洗浄した。 ^3H -muscimol では $5\ \text{nM}$ で 30 分インキュベートし、1, 15 秒, 1, 3, 5, 10, 20 分洗浄した。 ^3H -diprenorphine では $0.5\ \text{nM}$ で 2 時間インキュベートし、1, 3, 5, 10, 20, 30 分洗浄した。 ^3H -ketanserin では $0.4\ \text{nM}$ で 120 分インキュベートし、1, 3, 5, 10, 20, 30 分洗浄した。 ^3H -DHA では $0.4\ \text{nM}$ で 30 分インキュベートし、2.5, 5, 10, 20, 30 分洗浄した。

3) 飽和実験

組織切片における各種放射性リガンドとレセプターの結合が飽和性を有するかどうか確認するため、 ^3H -spiperone では $0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0\ \text{nM}$ と濃度を変えて 3 時間インキュベートし、10 分間 2 回洗浄してその飽和曲線を作製した。同様に、 ^3H -QNB では $0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6\ \text{nM}$ で 4 時間インキュベートし、10 分間 2 回洗浄, ^3H -muscimol では $5, 10, 20, 30, 40, 50, 60\ \text{nM}$ で 30 分インキュベートし、30 秒 2 回洗浄, ^3H -diprenorphine では $0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.6\ \text{nM}$ で 2 時間インキュベートし、10 分間 2 回洗浄, ^3H -ketanserin では $0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6\ \text{nM}$ で 120 分インキュベートし、10 分間 2 回洗浄, ^3H -DHA では $0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0\ \text{nM}$ で 30 分インキュベートし、10 分間 2 回洗浄して飽和曲線を作成した。

II. オートラジオグラムの定量化

1. 定量化の方法

1) ミクロフォトメータ, ドラムスキャンデンストメータ, ビデオディジタイザシステムの比較

定量化装置の性能をみるため、ミクロフォトメータ (小西六 PDS15, 東京), ドラムスキャンデンストメータ (阿部設計, Model 2605, 東京) およびマイクロコンピュータと CCD カメラを使用したビデオディジタイザシステムの 3 者について比較検討した。

ミクロフォトメータは、スキャン方式の濃度計であり、一度のスキャンではオートラジオグラムの 1 ラインのみ測定可能で、データはアナログである。

ドラムスキャンデンストメータのブロック図を図 2 に示す。本装置はドラム回転型画像読み取り装置で、二次元的測定が可能で、 $512 \times 512 \times 8$ ビット (256 階調) のデジタルデータが得られる。データは、専用磁気テープを介して金沢大学情報処理センターの大型コンピュータ (富士通 FACOM 2605 型, 東京) に転

送り処理を行った¹²⁾。

ビデオディジタイザースステムのブロック図を図3に示す。マイクロコンピュータ PC-9801 (NEC, 東京) にイメージメモリボード EIP 98 (ADS, 奈良) を装着し, CCD カメラ (NEC T1-22A, 東京) にて取り込んだ画像をデジタル化した。EIP98 は 6 ビットのアナログデジタル変換器と 128k バイトのメモリをボード上に持ち, 一画面 256×240×6 ビット (64 階調) のデータを A, B, 二画面持つことができる。画像処理プログラムには DIAL10 (ADS, 奈良) および飯田らの PC-SYSTEM¹³⁾, 画像のカラー表示には PC-SYSTEM を使用した。なお, 3 方式とも測定アパチャーは 50×50 μm に設定した。

三者の比較として, 後述のゼラチンで作製した標準線源をそれぞれで測定し, 累積放射能とフィルム黒化度の測定値の相関を比較し, さらに三者の測定値の相関を調べた。

2) ビデオディジタイザースステムの基礎的検討

ビデオディジタイザースステムの基礎的検討として, バックグラウンドの測定を 20 回行い, デジタル値の分布, 標準偏差, 平均値, およびモード (最高ピクセル数を示したデジタル値) の変度を測定した。また均一性として, 画面を 16 分割しそれぞれを比較し

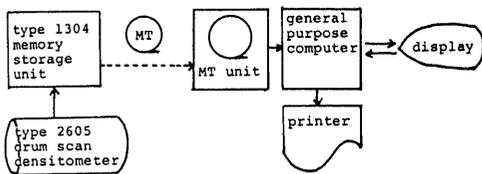


Fig. 2. Block diagram of drum scan densitometer and general purpose computer. Autoradiograms are digitized by drum scan densitometer. The data are transported to general purpose computer via magnetic tape (MT). Data analysis is performed by the computer.

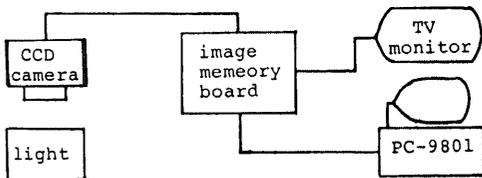


Fig. 3. Block diagram of video digitizer system. Image memory board has 128Kbyte RAM and analog-digital converter. It is inserted to PC-9801 and connected to CCD camera and monitor. Digital data of 256×240×6 bits are obtained in 1/60 sec, and displayed as 16 color scale.

た。なお, 以下のオートラジオグラムの定量化にはすべてビデオディジタイザースステムを使用した。

3) 標準曲線

標準曲線の作成には, 既知放射能濃度の標準線源が必要となる。そこでゼラチン法, 脳ペースト法¹⁴⁾, 市販標準線源法の三者にて比較検討した。ゼラチン法では, 水 10 ml (40~45°C) にゼラチン 2 g の割合で混合し, 種々の濃度の ³H-チミジン (アマシャムジャパン, 東京) を加えてガラス棒にて十分混和し, 冷蔵庫 (4°C) にて固まらせた後, -60~-70°C で凍結し, 厚さ 20 μm の切片を作製した。脳ペースト法では, 摘出ラット脳をガラス棒にてペースト状にし, その中に種々の濃度の ³H-チミジンを加え混合した後, ゼラチン法と同様に切片を作製した。なお, 標準線源の単位重量当りの放射能 (μCi/g) は, 切片を 20~30 枚集めて天秤 (島津 NL-200P, 京都) にて秤量した後, ゼラチンの場合には切片をそのままバイアル瓶にいれ, 脳のペーストの場合は組織燃焼装置 (アロカ ASC-1113, 東京) にて燃焼した後に, それぞれ液体シンチレーションカウンター (アロカ LSC-1000, 東京) にて放射能を測定することにより算定した。市販の標準線源として, ³H-マイクロスケール (アマシャムジャパン, 東京) を使用した。これら 3 種について, 同一試料をウルトロフィルム 2 枚に密着させ, それぞれ 13 日間, 26 日間露光した後現像し, 累積放射能とフィルム黒化度 (デジタル値) の相関を調べた。

2. データ処理

1) レセプター動態の定量化

³H-muscimol のオートラジオグラムにおいて, 小脳皮質を顆粒層とその他の層の二層に分けてそれぞれを別々に濃度を測定し, Scatchard 解析¹⁵⁾によりレセプター動態の定量化すなわち最大結合量 (B_{max}) および解離定数 (K_d) を求めた。

2) 抗鬱剤による変化

抗鬱剤であるクロミプラミン 10 mg/kg を, 体重 140~170 g の雄性ドンリュウラット 5 匹に 1 日 2 回の割で, 8 日間皮下注射にて投与し, 最終投与後 6 時間で断頭し, 前頭葉を含む切片 (König and Klippel のアトラス¹¹⁾の A11050-A10300 μm の範囲) および 1.5 nM の濃度の ³H-ketanserin を用いたオートラジオグラムを作製して, 正常ラット 6 匹と比較した。

3) 画像処理

³H-spiperone の全結合イメージと阻害剤を加えて得た非特異的イメージをビデオディジタイザースステムにてデジタル化し, 画像処理プログラムによってサブトラクションし, 特異的結合イメージを作製した。

III. インビトロ結合アッセイ法との比較

^3H -QNB を用いて、受容体オートラジオグラフィとインビトロ結合アッセイとの比較を試みた。

1. インキュベーション時間による飽和曲線の影響
- 1) オートラジオグラフィ

体重 150~200 g の雄性ドンリュウラット 3 匹を用いて、線条体部の凍結切片を作製し、前述の方法で ^3H -QNB 溶液でインキュベートした。インキュベーション時間を 2, 3, 4, 6, 8 時間と変えて、それぞれ

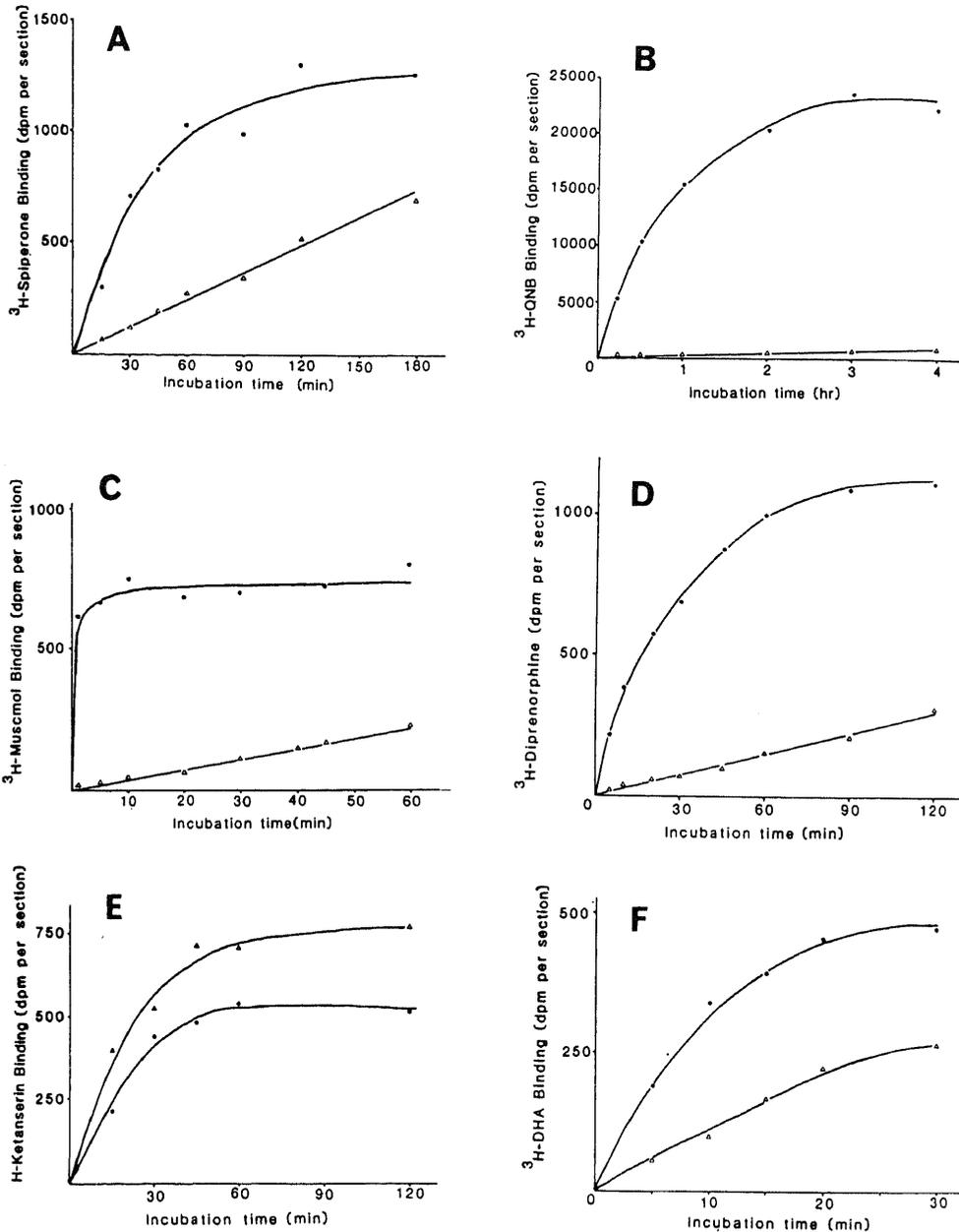


Fig. 4. Time course of association of ^3H -ligands to the sections at the level of striatum of rat brain. ●—●, specific binding; △—△, non-specific binding. Each plot shows mean value of three measurements. (A) ^3H -spiperone, (B) ^3H -QNB, (C) ^3H -muscimol, (D) ^3H -diprenorphine, (E) ^3H -ketanserin, (F) ^3H -DHA.

に ^3H -QNB の濃度を 20, 40, 55, 75, 120, 150 pM と変化させ、各時間における飽和曲線を作成した。

2) インビトロ結合アッセイ

体重 160~210 g の雄性ドブリウラット 5 匹を断頭後、線条体部を摘出し、天秤 (島津 NL-200P, 京都) にて秤量後、氷冷した 60 倍量の 0.32 M ショ糖溶液にいれ、ポッター型ホモジナイザーでホモジネートを作

製した。ホモジネート 30 μl に ^3H -QNB 溶液 3 ml をいれインキュベートした後、グラスファイバーフィルター (Whatman GF/B, USA) で吸引濾過し、4 ml の緩衝液にて 3 回洗浄した。洗浄後のフィルターの放射能を液体シンチレーションカウンタ (アロカ LSC-1000, 東京) にて測定した。飽和実験では、 ^3H -QNB 濃度を 25, 50, 100, 150, 200, 300 pM と変え、室温で

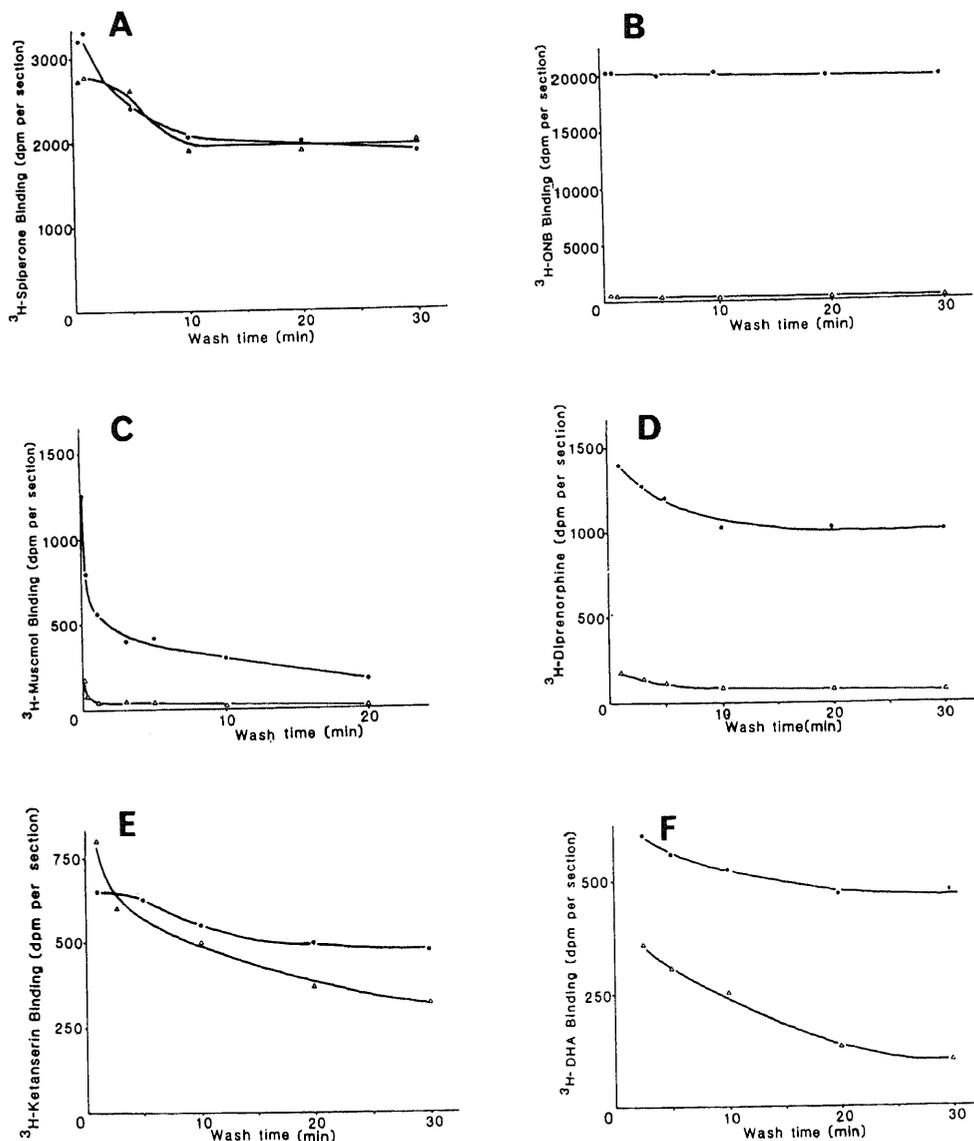


Fig. 5. Time course of dissociation of ^3H -ligands from the sections at the level of striatum of rat brain. ●—●, specific binding; △—△, non-specific binding. Each plot shows mean value of three measurements.

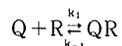
(A) ^3H -spiperone, (B) ^3H -QNB, (C) ^3H -muscimol, (D) ^3H -diprenorphine, (E) ^3H -ketanserin, (F) ^3H -DHA.

6時間および37°Cで45分でインキュベートした。

2. 結合, 解離曲線

^3H -QNBとレセプターとの反応を単純な2分子反応として以下のようなモデルを仮定した。

(モデル1),



なお, Qは遊離のリカンド濃度, Rは遊離のレセプ

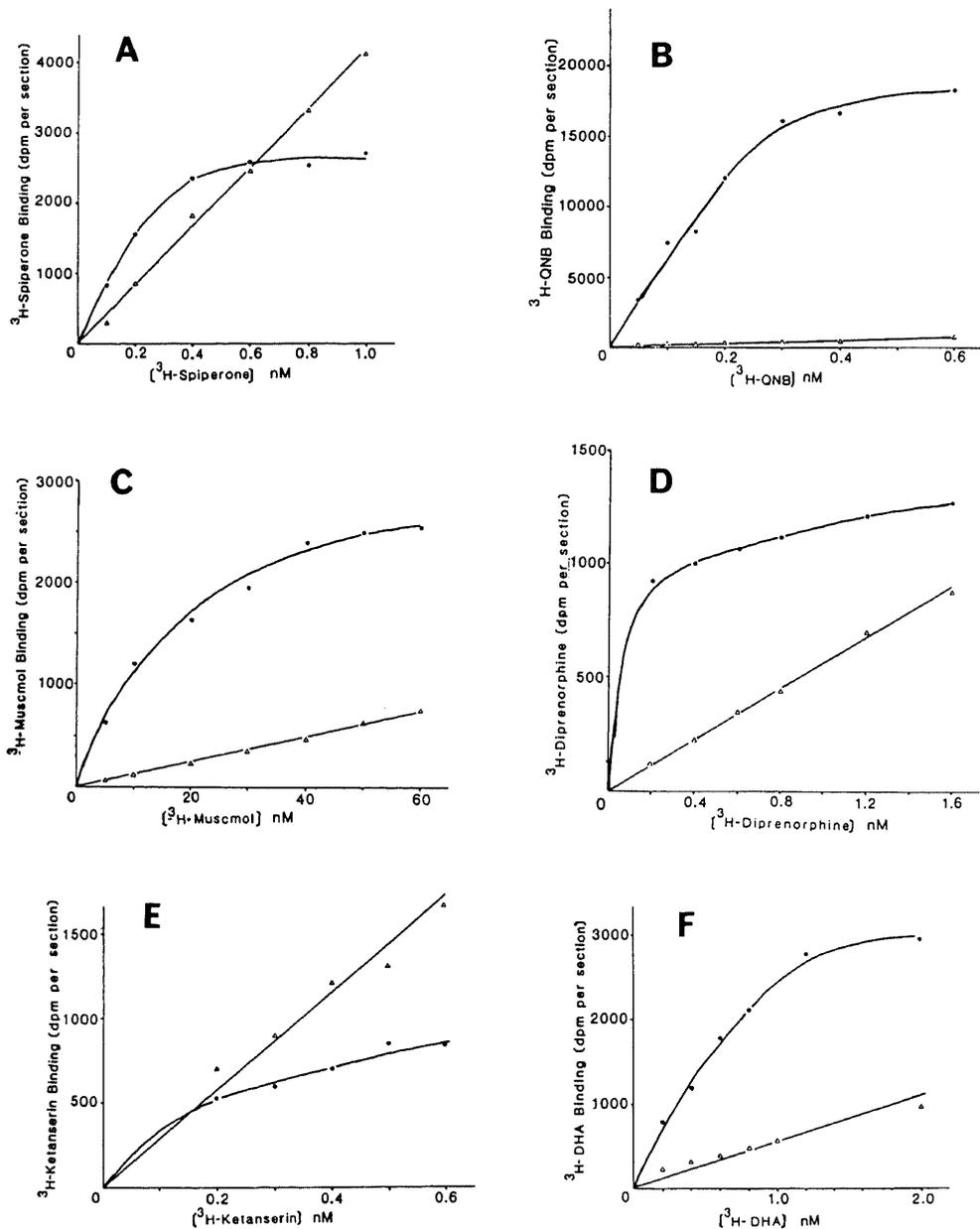


Fig. 6. Saturation kinetics of ^3H -ligands in the sections at the level of striatum of rat brain. ●—●, specific binding; △—△, non-specific binding. Each plot shows mean value of three measurements. (A) ^3H -spiperone, (B) ^3H -QNB, (C) ^3H -muscimol, (D) ^3H -diprenorphine, (E) ^3H -ketanserin, (F) ^3H -DHA.

ター濃度, QR はリガンド-レセプター複合体濃度, k_1 は Q+R から QR への二次結合速度定数, k_{-1} は QR から Q+R への一次解離速度定数を意味する。このモデルにおいて, 以下の実験を行いそのデータをもとに B_{max} , Kd および各速度定数を算出した。(補遺 1.1) 参照)。計算プログラムには非線形最小自乗法¹⁰⁾を用いた。

1) オートラジオグラフィ

40 pM, 220 pM の二種の濃度の ³H-QNB を用いて, インキュベーション時間を 15, 30, 45 分, 1, 2, 3, 4, 6 時間と変えて, 結合曲線を作成した。

2) インビトロ結合アッセイ

350 pM の ³H-QNB 溶液を用いて, 37°C で結合曲線は 2.5, 5, 10, 15, 20, 45, 60 分, 解離曲線は 1 時間インキュベートした後アトロピン 10 μM を加え, さらに 10, 30, 50, 70, 140, 180 分インキュベートして求めた。なお特異的結合は, アトロピン 10 μM 存在下と非存在下の差として求めた。

3. シミュレーション実験

結合解離実験のデータをもとに, シミュレーションを行った。

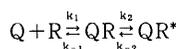
1) インキュベーション時間, 組織-リガンド液量比の Scatchard 解析におよぼす影響

インキュベーション時間, 組織-リガンド液量比が飽和曲線におよぼす影響を調べるため, 受容体オートラジオグラフィの結合曲線から算定した k_1 , k_{-1} および B_{max} のデータをもとに, インキュベーション時間を 2 時間および 10 時間, 組織-リガンド液量比を 2 mg/100 ml, 2 mg/4 ml とした場合のモデル 1 における飽和曲線をシミュレートした。(補遺 2.参照)。

2) 異性化を考慮した場合のシミュレーション

³H-QNB において, そのリガンド-レセプター複合体は単一のものではなく, 低親和性状態から高親和性状態に移行することが解離実験の結果から従来より言われており, これは異性化 (isomerization) と呼ばれている¹⁷⁻¹⁹⁾。これについて, 以下に示すモデル式を仮定し, これに忠実な数学的解析法を考案した (補遺 1.2) 参照)。

(モデル 2)



なお, Q は遊離のリガンド濃度, R は遊離のレセプター濃度, QR は異性化していないリガンド-レセプター複合体濃度, QR* は異性化したリガンド-レセプター複合体濃度, k_1 は Q+R から QR への二次結合速度定数, k_2 は QR から QR* への一次結合速度定数, k_{-1} は QR から Q+R への一次解離速度定数, k_{-2} は

QR* から QR への一次解離速度定数を意味する。このモデル 2 の式と結合アッセイ法の結合解離曲線の実験データをもとに, それぞれの複合体の濃度の時間変化をシミュレートした。計算プログラムには非線形最小自乗法を用いた。

IV. 統計処理

統計学的処理は, 等分散の検定には F-test, 平均値の差の検定には Student t-test を使用し, それぞれ危険率 5% 以下を有意とした。

成 績

I. オートラジオグラム作製の条件検討

1. インキュベーション時間の影響

6 種のリガンドの結合曲線を図 4 に示す。³H-spiperone では曲線は緩やかに上昇し, 2 時間で最高値に達した。³H-QNB ではやや遅く 3 時間で最高値になったが, ³H-muscimol では 10 分以降にはほとんど変化がみられなかった。³H-diprenorphine では 90 分にてほぼプラトーに達し, ³H-ketanserin では 60 分にて最高値に達した。³H-DHA では 30 分にてほぼプラトーに達した。

2. 洗浄時間の影響

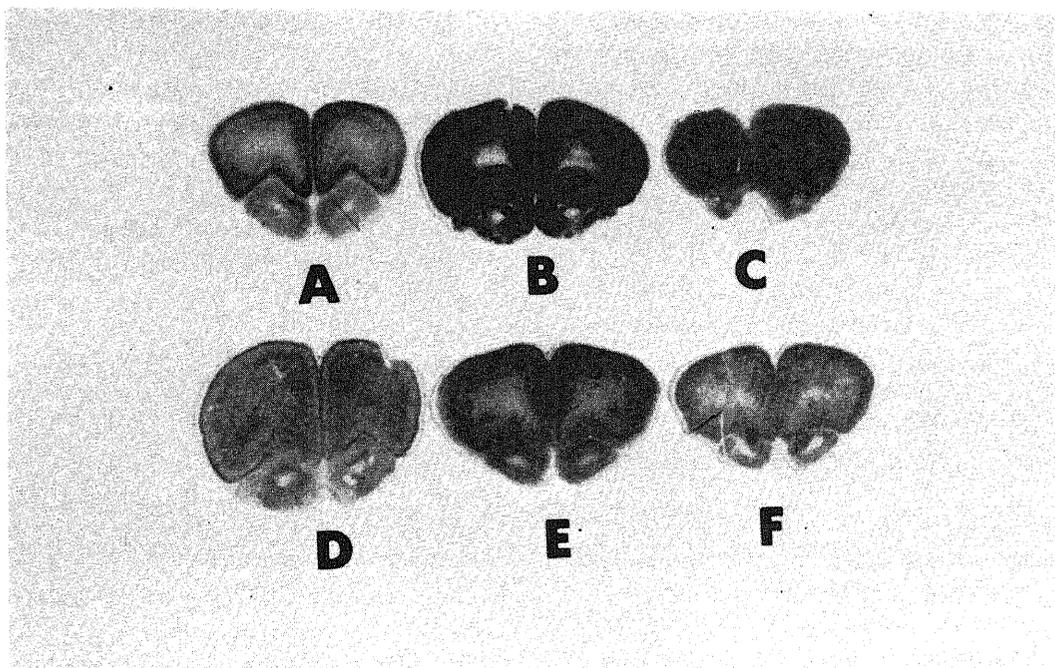
洗浄時間と放射能の関係を図 5 に示す。³H-spiperone では, 特異的結合, 非特異的結合とも 10 分まで急速に減少し, その後はほとんど変化しなかった。³H-QNB では変化はみられなかった。³H-muscimol では特異的結合は持続的に減少を示したのに対し, 非特異的結合は 1 分以降ほとんど変化しなかった。³H-diprenorphine では特異的結合, 非特異的結合とも 10 分まで減少し, その後はプラトーを示した。³H-ketanserin では特異的結合, 非特異的結合とも 30 分でほぼプラトーに達した。³H-DHA では特異的結合は 20 分でプラトーに達したが, 非特異的結合は 30 分まで減少を示した。

3. 飽和実験

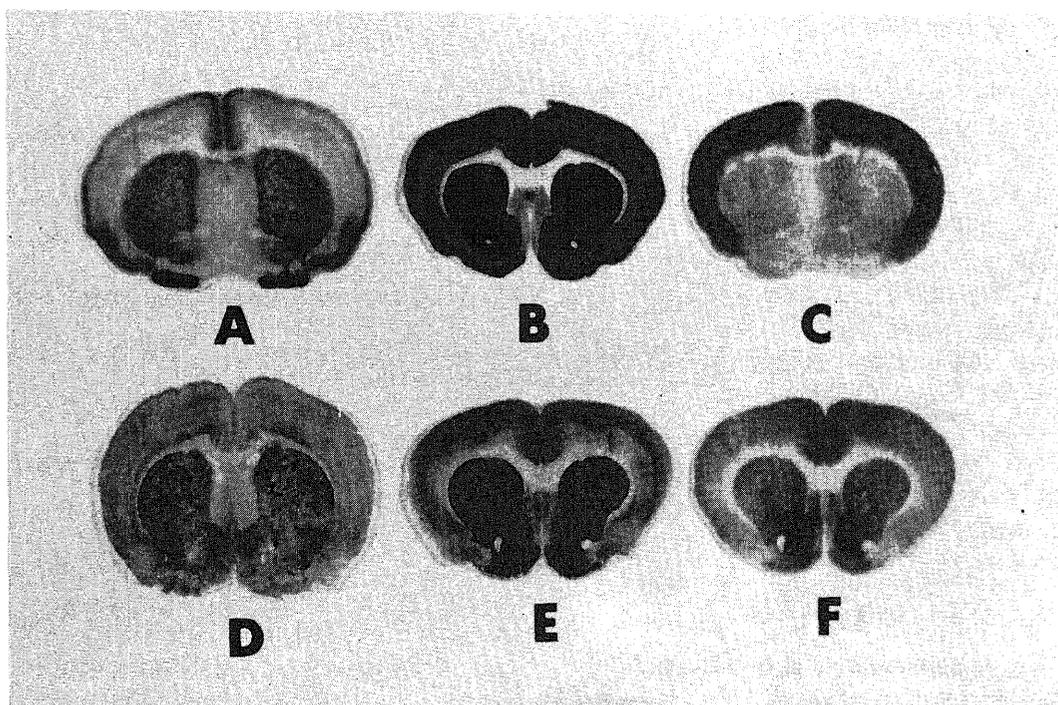
リガンド濃度と放射能の関係を図 6 に示す。特異的結合の場合, ³H-spiperone では 0.6 nM, ³H-QNB では 0.6 nM, ³H-muscimol では 50 nM でほぼプラトーに達した。³H-diprenorphine では 0.2 nM ですでに高値に達し, その後緩やかに増加した。³H-ketanserin では 0.5 nM で, ³H-DHA では 2.0 nM でプラトーに達した。非特異的結合では, いずれも直線的に増加した。

なお, 6 種の放射性リガンドで得られた前頭葉, 線条体, 視床, 小脳のレベルのオートラジオグラムを図 7 に示す。また, 線条体レベルでの全結合イメージと非特異的イメージを図 8 に示す。

II. オートラジオグラムの定量化

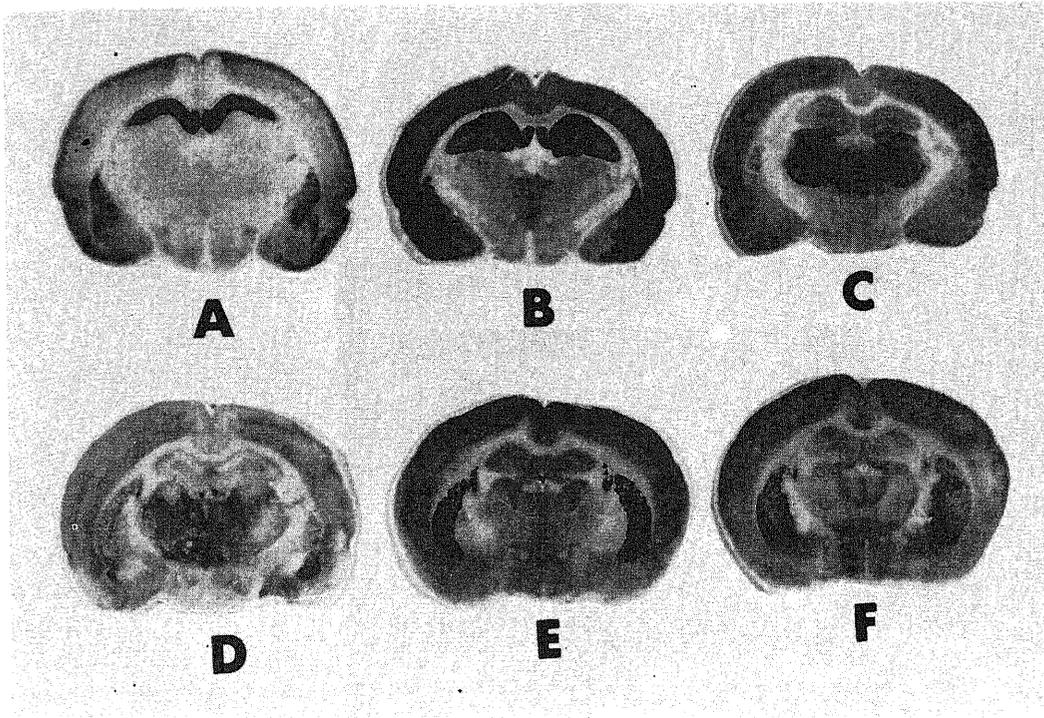


a. At the level of frontal lobe.

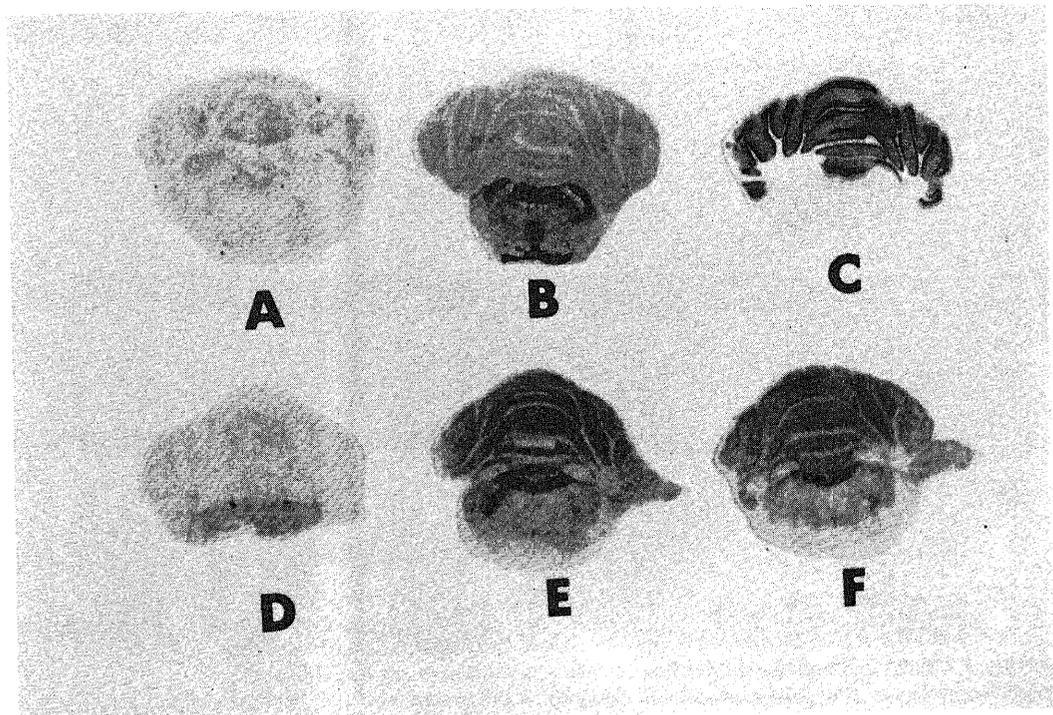


b. At the level of striatum.

Fig. 7. Autoradiograms of coronal sections of rat brain. (A) ^3H -spiperone, (B) ^3H -QNB, (C) ^3H -muscimol, (D) ^3H -diprenorphine, (E) ^3H -ketanserin, (F) ^3H -DHA.



c. At the level of thalamus.



d. At the level of cerebellum.

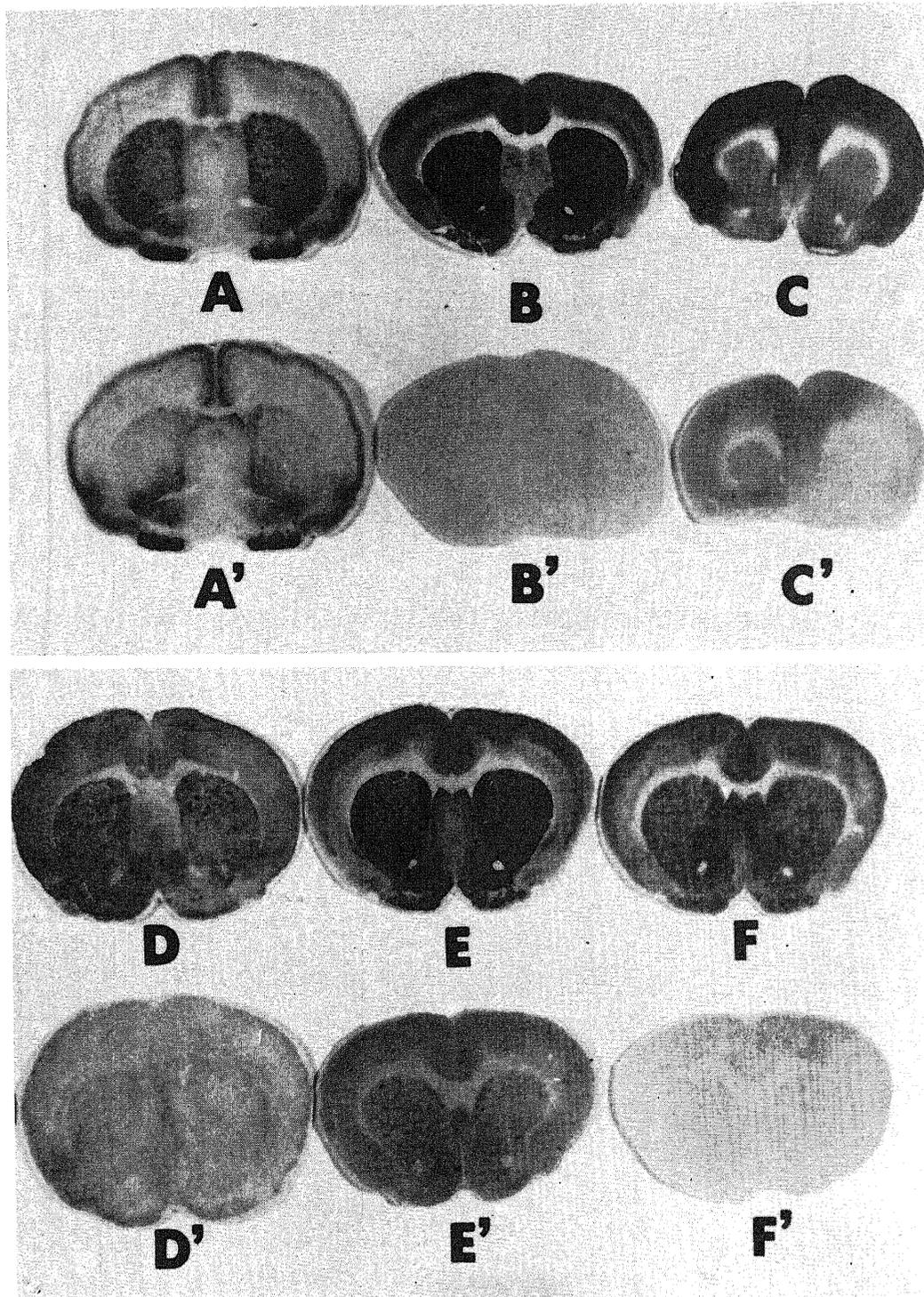


Fig. 8. Total and non-specific binding images of autoradiograms by ^3H -ligands. Total image: (A) ^3H -spiperone, (B) ^3H -QNB, (C) ^3H -muscimol, (D) ^3H -diprenorphine, (E) ^3H -ketanserin, (F) ^3H -DHA. Non-specific image: (A') ^3H -spiperone, (B') ^3H -QNB, (C') ^3H -muscimol, (D') ^3H -diprenorphine, (E') ^3H -ketanserin, (F') ^3H -DHA.

1. 定量化の方法

1) ミクロフォトメータ, ドラムスキャンデンシトメータ, ビデオディジタイザシステムの比較

³H-チミジンをゼラチンに混和して作製した標準線源を上記三種の機器で測定し, 累積放射能と測定値との関係を図9に示す. 通常のオートラジオグラムの累積放射能の範囲 (0~100 $\mu\text{Ci}\times\text{days/g}$) ではいずれも比較的良好な直線関係が得られた. ドラムスキャンデンシトメータとミクロフォトメータの間の相関係数 (r) は 0.9994, ドラムスキャンデンシトメータとビデオディジタイザシステムの間の r は 0.9982, ミクロフォトメータとビデオディジタイザシステムの間の r は 0.9983 で, 三者間で高い相関を示した.

2) ビデオディジタイザシステムの基礎的検討

ビデオディジタイザシステムの基礎的検討を行った. 1回のバックグラウンドの測定においてデジタル値の分布はモードを中心にして $\pm 1\sim 2$ 階調に集中し, 標準偏差も 0.4 以内であった. バックグラウンドを 20回測定したところ, デジタル値の平均値の変動の幅は 0.4 以内, モードには変化認めなかった. さらに画面の均一性を調べたところ, 16画面の平均値の分布の幅は 0.35, 標準偏差はやはり 0.4 以内, モードには変化を認めなかった.

3) 標準曲線

ゼラチン法, 脳ペースト法および市販標準線源法の三者で得た標準線源のオートラジオグラムと, それをビデオディジタイザシステムにて定量化して得た標準曲線を図10に示す. 関心領域 (region of interest, ROI) の大きさは 32×32 で, デジタル値は平均値で表した. ゼラチン法と脳ペースト法では, 極めて近似した値が得られた. これはモードをとった場合でも同様であった. しかし, 市販標準線源法では, ゼラチン法より約 40%低い値になった. また, ROIの大きさを 128×128 と大きくとったところ, 脳ペースト法はゼラチン法より約 7%低い値を示した.

2. データ処理

1) レセプター動態の定量化

³H-muscimol のオートラジオグラムにおいて小脳皮質を顆粒層とその他の層の二層に分けて行った Scatchard 解析を図11に示す. 顆粒層では $B_{\text{max}} 240 \text{ pmol/g}$, $K_d 3.0 \text{ nM}$, その他の層では $B_{\text{max}} 116 \text{ pmol/g}$, $K_d 5.8 \text{ nM}$ という値が得られ, インビトロ結合アッセイ法では不可能な細かい解剖学的部位別の定量化が可能であった (図11).

2) 抗鬱剤による変化

クロミプラミン投与ラットにおける ³H-ketanserin のオートラジオグラムで, 大脳皮質前頭葉の 5-HT2

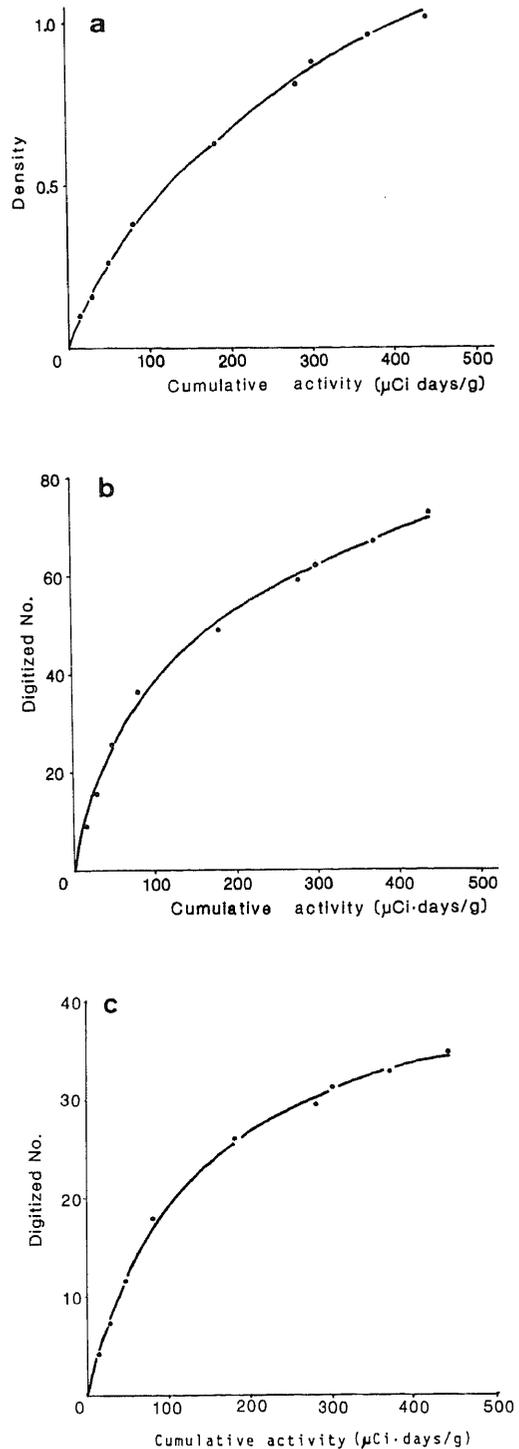


Fig.9. Correlation between cumulative activity and optical density or digitized number. Measuring instrument: a) microphotometer, b) drum scanner, c) videodigitizer system.

レセプターの変化の有無を調べた結果を表1に示す。Frontal 1, 2, 3 および Cg³²⁰, さらに前三者を2~3層に分けて正常ラットと比較した。各々の部位にて8%から31%減少したが, Frontal 1において正常群と有意な差(19~31%)の減少が認められた。

3) 画像処理

³H-spiroperone の全結合イメージと阻害剤を加えて得た非特異的イメージをビデオディジタイザーシステムにてデジタル化し, 画像処理プログラムによってサブトラクションし, 特異的結合イメージを得た。これらのデータは16階調のカラー表示が可能であり, これを図12に示す。

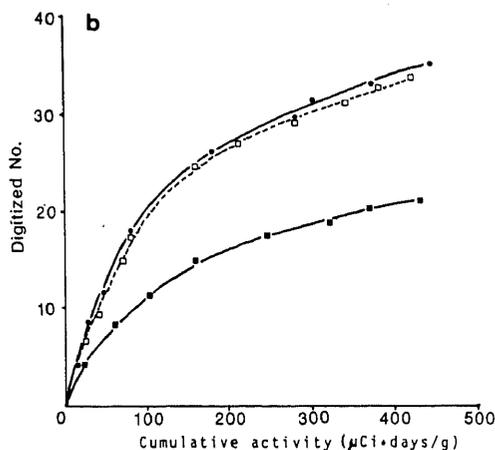
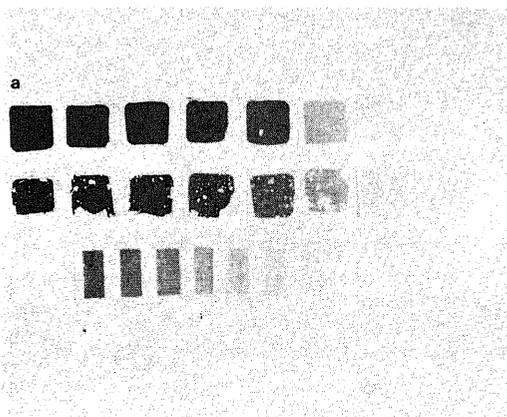


Fig. 10. a. Autoradiograms of standards. upper, gelatin; middle, brain paste; lower, commercially available standard scale. b. Correlation between cumulative activities and digitized numbers. Materials of standard: □ □, brain paste; ●——●, gelatin; ■——■, commercially available standard scale (tissue equivalents).

III. インビトロ結合アッセイ法との比較

³H-QNBを用いて, 受容体オートラジオグラフィ法とインビトロ結合アッセイ法とを比較し, 以下の結果を得た。

1. インキュベーション時間による飽和曲線の影響 1) オートラジオグラフィ法

インキュベーション時間毎の飽和曲線(全結合量)を図13aに示す。各々を比較すると, 時間が長くなるにつれて結合量が増加した。このデータをもとに行ったScatchard解析を図13bに, またこれから得た B_{max} と K_d の値を表2に示す。 B_{max} , K_d 共に, インキュベーション時間が長くなるにつれて値が小さくなる傾向を示した。 B_{max} では, 3時間で456 pmol/g, 8

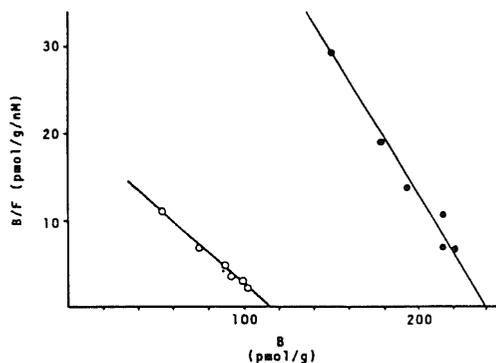


Fig. 11. Scatchard analysis of cerebellum by ³H-muscimol. ●——●, granular layer, B_{max} =240 pmol/g, K_d =3.0 nM; ○——○, other structure of cerebellar cortex, B_{max} =116 pmol/g, K_d =5.8 nM.

Table 1. Comparison of binding of ³H-Ketanserin to frontal lobe of the brain of normal and Clomipramine administered rat.

	Binding (pmol/g)	
	Normal	Clomipramine
Frontal 1. A.	17.0±1.7	13.8±2.4*
	26.3±3.1	18.6±3.0*
	19.3±3.8	13.4±2.4*
Frontal 2. A.	19.3±3.4	17.8±2.8
	33.6±5.2	30.0±2.8
	23.8±4.3	17.8±3.6
Frontal 3. A.	19.3±3.6	16.0±3.0
	32.8±4.6	27.6±4.0
Cg 3	32.0±4.7	28.5±3.6

Cg, cingulate gyrus

Values are mean±S.D.(N=6 for normal, N=5 for Clomipramine-model).

* $p < 0.05$, vs. normal value by Student t-test.

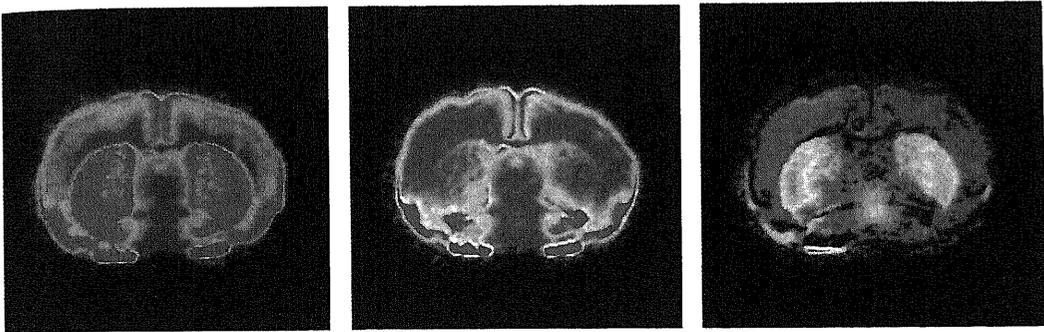


Fig. 12. Digitized color image by ^3H -spiperone at the level of striatum. total image (left), non-specific image (middle), specific image (right). Specific image is obtained by subtraction procedure.

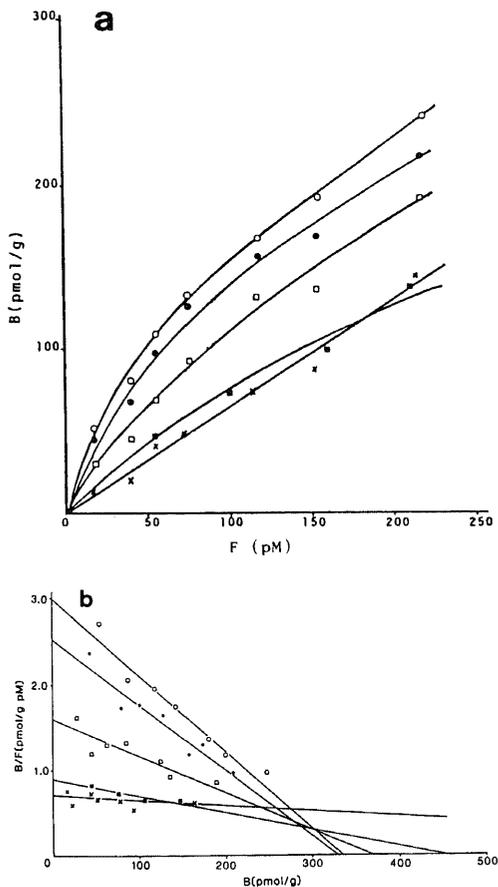


Fig. 13. a. Saturation kinetics at the various incubation time in ^3H -QNB. b. Scatchard analysis of saturation kinetics at the various incubation time. \times — \times , 2 hr; \blacksquare — \blacksquare , 3 hr; \square — \square , 4 hr; \bullet — \bullet , 6 hr; \circ — \circ , 8 hr; B, bound; F, concentration of free ligand.

時間で 341 pmol/g と変化の幅は小さいが, Kd は, 3 時間で 524 pM, 8 時間で 113 pM と大きく変化した。

2) インビトロ結合アッセイ法

室温, インキュベーション時間 6 時間で得られた飽和曲線をもとに Scatchard 解析すると, B_{\max} は 262 pmol/g, Kd は 100 pM という値が得られた。これらの値は, 同一条件のオートラジオグラフィ法による値 (B_{\max} 332 pmol/g, Kd 130 pM) およびインビトロ結合アッセイ法において 37°C, インキュベーション時間 45 分で得られた値 (B_{\max} 289 pmol/g, Kd 87 pM) と極めて近似した値を示した。

2. 結合解離曲線

1) オートラジオグラフィ法

2 種の濃度の結合曲線のデータを異性を考慮しないモデル 1 に当てはめ各パラメータを算出する²¹⁾と, k_1 0.0313 $\text{nM}^{-1}\text{min}^{-1}$, k_{-1} 0.00042 min^{-1} , Kd 13.5 pM, B_{\max} 250 pmol/g という値が得られた。

2) インビトロ結合アッセイ法

結合解離曲線を図 14a に示す。これから得られたモデル 1 の場合の各パラメータの値は, k_1 0.516 $\text{nM}^{-1}\text{min}^{-1}$, k_{-1} 0.0060 min^{-1} , Kd 11.7 pM, B_{\max} 211 pmol/g であり, オートラジオグラフィと比較すると両者間で温度差があるため k_1 , k_{-1} の値は異なるが, Kd, B_{\max} は極めて近似した値を示した。

3. シミュレーション

1) インキュベーション時間, 組織量ーリガンド量比による Scatchard 解析への影響

オートラジオグラムの 2 種の濃度の結合曲線から算出した k_1 , k_{-1} , Kd および B_{\max} の値を用いて組織の量とリガンドの量の比が異なる場合の結合曲線をシミュレーションした (図 15)。インキュベーション時間が長い場合, 結合量が大きく, 実測値の傾向と一致した。また, 組織量ーリガンド量比が高くなると, 結合量は

低値を示した。すなわち $^3\text{H-QNB}$ のインキュベーションに際しては、組織の重量に対して、リガンドの液量を十分多くする必要がある。

2) 異性化を考慮した場合のシミュレーション

異性化を考慮したモデル2の場合の結合曲線のシミュレーションを図16に示す。異性化していない成分は、約10分でピークに達し、その後徐々に減少した。異性化した成分は、時間と共に増加する傾向を示した。

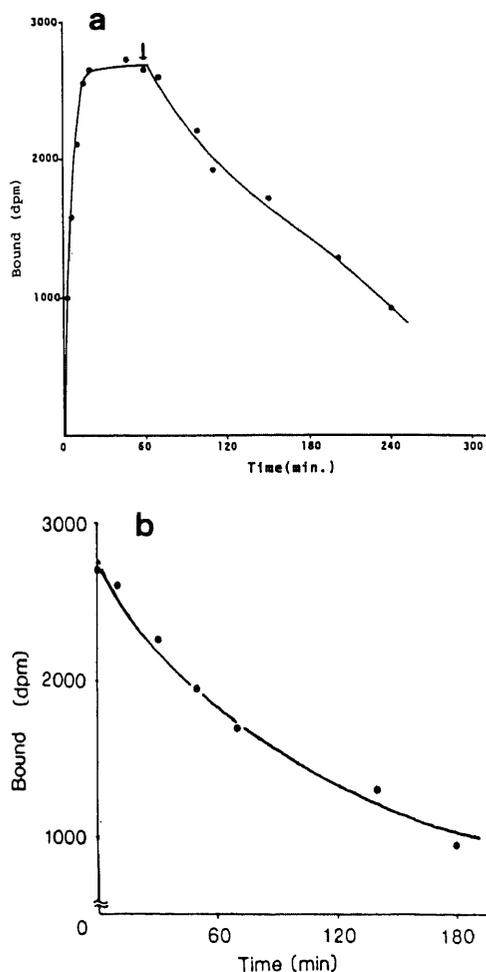


Fig. 14. a. Time course of association and dissociation curve of $^3\text{H-QNB}$. Association of brain homogenate with $^3\text{H-QNB}$ was performed up to 60 min, thereafter $10\ \mu\text{M}$ of atropine was added. An arrow stands for administration of atropine. Solid line shows a hand writing curve. b. Time course of dissociation and its fitting curve to the following equation in the isomerization model. $\text{Bound} = A \cdot e^{-Xt} + B \cdot e^{-Yt}$, $X = 0.00468$, $Y = 0.120$. ●, observed value.

Table 2. B_{max} and K_d value at variable incubation time of $^3\text{H-QNB}$ binding to striatum of rat brain.

	B_{max} (pmol/g)	K_d (nM)
2 hr	—	—
3 hr	456	524
4 hr	370	237
6 hr	332	130
8 hr	341	113

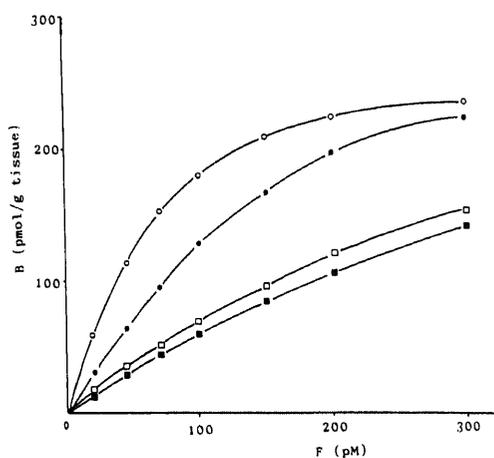


Fig. 15. Simulation of saturation curve when incubation time or volume of free ligand is changed. ○—○, 10 hr, 100 ml; ●—●, 10 hr, 4 ml; □—□, 2 hr, 100 ml; ■—■, 2 hr, 4 ml; B, bound; F, concentration of free ligand.

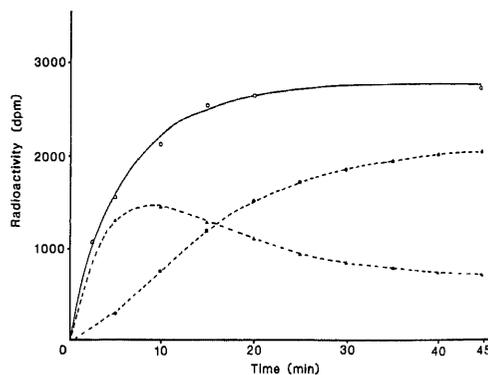


Fig. 16. Time course of association curve in the isomerization model. ○—○, total ligand-receptor complex; ●·····●, isomerized ligand-receptor complex; △·····△, non-isomerized ligand-receptor complex.

図 14b は解離曲線をシミュレートしたものであり、早い成分と遅い成分に分けることができる。結合解離曲線の実験データとモデル式から得られた解をもとにパラメータを算出すると、 k_1 0.514 nM⁻¹min⁻¹, k_{-1} 0.024 min⁻¹, k_{-2} 0.077 min⁻¹, k_2 0.024 min⁻¹となる。これよりみかけの Kd ($Kd_{app} = [k_1/k_{-1} (1 + k_2/k_{-2})]^{-1}$) を算出したところ、10.8 pM という値が得られ、異性化を考慮しないモデル 1 の結合アッセイ法の 11.7 pM, オートラジオグラフィ法の 13.5 pM と極めて近似した値を示した。

考 察

PET によるレセプターマッピング法は、生化学的根拠に基づく種々の精神神経疾患の病態解明、診断、治療および予防面において有用であると期待されている²²⁾。近年、人体のレセプターの画像化が¹¹C, ¹⁸F などのポジトロン核種で標識した放射性リガンドを用いて行われており^{23)~25)}、またレセプターの定量解析の試み²⁶⁾²⁷⁾、並びに臨床レベルの研究²⁸⁾²⁹⁾が次第に増えてきているが、PET 測定のためにはサイクロトロンを設置が必要であり、限られた施設でしか実施できない。一般臨床のためには、シングルフォトン断層装置 (single photon emission computerized tomography, SPECT) の方が望ましく、最近 SPECT 用として ¹²⁵I 標識リガンドの開発が盛んになりつつあり、その将来への期待は大きい³⁰⁾ (PET と SPECT を総称して ECT (emission computerized tomography) という)。しかしこのような in vivo による測定の場合、1) 脳血流および脳血液容積の影響、2) 特異的結合と非特異的結合の区別、3) 神経伝達物質のような脳内に存在する種々の内因子の影響、4) 投与された向精神薬の影響、5) 用いたリガンドの代謝などと関与し、定量化は必ずしも容易でない。一方 in vitro の測定は、1) 一定の条件下で結合反応を調べることができ、イオンその他の化学的影響を個々に見ることができる、2) 血液脳関門を通過しないリガンドも用いることができるという利点を有する。in vitro の測定としては、従来より結合アッセイ法が用いられてきている。この結合アッセイ法は、簡便で優れた方法であるが、目的とする部位をかき取ってくる方式であるため、小さな解剖学的部位の評価は不可能である。これに対し、受容体オートラジオグラフィ法では、解離力が優れているため解剖学的詳細部の変化を捉えることができ、また連続切片を使用すると異なった種類の放射性リガンドや異なった条件でほとんど同一部位を観察できる。さらに結合アッセイ法ではホモジナイズおよび遠心分離により正常構造が破壊されるのに対し、受容体オー

トラジオグラフィでは構造が保たれており、より in vivo に近いと考えられている³¹⁾。したがって ECT によるレセプターマッピングの臨床的評価の前に受容体オートラジオグラフィについて基礎的検討、ならびに疾患モデル動物を用いた病態解明および向精神薬の作用機序などの研究に利用し、その成果をレセプターマッピングに反映させることは意義のあることと考えられる。

本研究では、まず最初に ³H-spiperone, ³H-QNB, ³H-muscimol, ³H-diprenorphine, ³H-ketanserin, ³H-DHA の 6 種の放射性リガンドについてオートラジオグラム作製時の条件検討、すなわちインキュベーション時間、洗浄時間の検討および飽和実験を試みた。その結果、それぞれのリガンドによりインキュベーション時間および洗浄時間が異なるが、適切な条件下で図 7 に示すように鮮明なオートラジオグラムを作製することが可能であった。

オートラジオグラムのフィルム濃度測定法には、濃度計、ドラムスキャンデシトメータ、ビデオディジタイザーシステムなどがある。マイクロフォトメータはスキャン方式の濃度計で、得られるデータはアナログであり濃度分解能に優れるが、一ラインずつの測定で二次元的な評価は困難であり時間も長くなる。これに対し、ドラムスキャンデシトメータとビデオディジタイザーシステムでは、一回の測定で二次元のデジタルデータ (それぞれ 512×512×8 ビット, 256×240×6 ビット) が得られ、画像の視覚評価が可能で、数値処理も容易となる。濃度分解能に関しては、ドラムスキャンデシトメータでは 256 階調に分解可能であるが、実際に測定すると最高値と最低値の差は 90 階調 (すなわち、約 1.1% の濃度変化を捉え得る) であった。これはビデオディジタイザーシステムと同様に測定した 43 階調 (同じく約 2.3%) の約二倍にしか過ぎなかった。またドラムスキャンデシトメータでは大型コンピュータと磁気テープを介してデータを交換するので一面のデータが得られるまでに時間がかかり、さらに専用施設の機器のため常時使えないなど操作性に難点がある。これに対しビデオディジタイザーシステムでは、やや濃度分解能に劣るものの、標準線源の測定では他二者と良好な相関が得られ、定量性に関しては使用に耐え得ることが本研究において判明した。またビデオディジタイザーシステムでは 1 画面の取り込み時間は 60 分の 1 秒で、即座に ROI を設定しプリンタに打ち出し可能であり、操作性では格段に優れており、大量のデータを扱ううえで非常に有用と考えられた。画像のデジタル化にコンピュータを使ったシステムがいくつか報告されている。ミニコンピュー

タによるものが主流である^{32)~37)}が、マイクロコンピュータを使ったものもある^{38)~41)}。しかし、8ビットのマイクロコンピュータではハードウェアにかなり負担となる。最近では16ビットのマイクロコンピュータが普及し、メモリ空間の増大や演算速度の向上で使用に耐え得るものとなっている。また今回は6ビットの分解能を有するアナログデジタル変換モードを使用した。8ビットの分解能を有するものも高価であるが販売されており、濃度分解能の向上も望める。

CCDカメラ (charge coupled device camera) は、1) 空間分解能が高く画像の再構成が正確である、2) ダイナミックレンジが広い、3) 濃度直線性に優れるなどビジコンカメラに比較して、種々の利点を有する³⁷⁾⁴¹⁾⁴²⁾。筆者はCCDカメラの使用前にビジコンカメラを使用して見たが、CCDカメラに比較すると画像が不鮮明であり、バックグラウンドも均一でなく円周状のアーティファクトが入るため、定量化やイメージの作製時にはバックグラウンドサブトラクションを施行したものの、ノイズが大きいはいった。CCDカメラでは、バックグラウンドの測定において、画面は均一で部位による差はみられず、デジタル値もほとんどmode±1階調に集中していたため、ノイズは非常に小さく測定値の信頼性は高いものと思われる。

標準線源において、ゼラチンに加える水の量は、水分含量が脳組織と等しい80%になることを目安とした。脳ペースト法では、脳のペーストにアイソトープを混ぜるとき注意深くしても気泡が入りやすいが、ROIをとるとき、小さなROIで大きな気泡の部が入らないようにすることでゼラチン法と値がよく一致した。一方、市販標準線源とはかなり値が異なったが、これを用いた吸収率の補正計数が小さかったためと考えられる。これを補正したとしても、アイソトープ濃度が濃すぎるため、適正濃度が得にくいことが欠点としてあげられる。ゼラチン法は、均一で安定した標準曲線が得られ、濃度調整も自由にでき、また安価であるため最も優れていると考えられた。

オートラジオグラフィは、結合アッセイ法と比較して種々のデータ解析が可能である点でも優れている。³H-QNBのように非特異的結合の割合が少ない場合はサブトラクションイメージ作製の必要性は少ないのに対し、³H-spiperoneのように非特異的結合の割合が高く、しかもその割合が部位毎に異なる場合はサブトラクションイメージは有用である。連続切片を用いれば平行移動および単純な回転により総結合イメージと非特異的イメージが重なるはずであるが、実際にはスライドガラスに切片を乗せるときに伸縮、捻れなどが生じるため、完全に一致するとは限らず、何らかの画

像処理による補正が必要である。今回は、平行移動と回転のみで重ね合わせを行ったが、組織の捻れに対しては折れ曲がり部分の中心軸の両側で別々に一致させるなどの方法⁴³⁾があり、今後さらに検討を重ねる必要がある。その他のデータ処理としては、カラーイメージ化、平滑化、Sobel, Laplacianなどのフィルタが利用可能で、さらに定数、画面間の加減乗除が行えるので、代謝血流比などの除算イメージも作製できる。

レセプター動態、すなわち最大結合量 (B_{max}) および解離定数 (K_d) は、連続切片を用いてそれぞれ異なった濃度で反応させてオートラジオグラムを作製し、ビデオディジタイザシステムを用いて定量化を行って飽和曲線を作成しそれを基にScatchard解析することにより算定できる。しかも同一解剖学的部位、例えば皮質を何層かに分けて個々の値を得ることができる。本稿では、³H-muscimolを用いて小脳皮質を顆粒層とその他の層の二層に分けて解析したが、 B_{max} だけでなく K_d も異なることがわかった。したがって本法を用いて種々の疾患モデル動物あるいは向精神薬投与動物を用いて解剖学的詳細部の変化を評価できると考えられる。今回の抗鬱剤の一つであるクロミプラミンを投与したラットを用いて³H-ketanserinのオートラジオグラムを作製し、大脳皮質前頭葉の5-HT₂レセプターの変化の有無を調べた。前頭葉をFrontal 1, 2, 3およびCg3、さらに前三者を2~3層に分けて正常ラットと比較した。一つの濃度のみの比較であるが、Frontal 1において正常群と有意な差が認められた(約20~30%の減少)。これは抗鬱剤のアミン再取り込み阻害によってシナプス間隙のアミン量が増加し、その結果、二次的に5-HT₂レセプターが減少する(down regulation)というPeroutkaら⁴⁴⁾の推論に一致する。しかしFrontal 1以外の部位で本当に変化がないかどうかは、さらに例数を増やして検討する必要がある。

ホモジネートと切片の間における³H-QNB結合の挙動の差異については、Gilbertら³¹⁾が報告している。同様の現象はオピオイドレセプターでも報告されている¹⁰⁾⁴⁵⁾。このように、オートラジオグラフィ法と結合アッセイ法で B_{max} , K_d の値の解離が問題となっている³H-QNBについて、両法で条件検討を詳しく行ったところ、オートラジオグラムでの低濃度領域において、平衡状態に達するまでの時間が明らかに延長した。またシミュレーションでは組織重量に比してリガンド量が少ない場合に同様の現象がみられた。このため、Scatchard解析では、反応が平衡に達していることが必要であるのに、2時間から3時間の反応時間³¹⁾⁴⁶⁾では、低濃度において反応が平衡に達せず、結合量が少

なくなるためグラフで直線の勾配が小さくなり、その結果 K_d 値が大きき算出される。今回、低濃度の時の反応時間を長くすることによって Scatchard 解析で結合アッセイ法に近い K_d 値を得ることができた。したがって反応条件を適切にすることにより両法の値は等しくなり、両法における $^3\text{H-QNB}$ 結合の挙動の差はないと考えられる。

なお、Scatchard 解析から得られた K_d と、結合曲線、解離曲線から得られた K_d とはかなりの解離を示したが、これを 8 時間のインキュベーションでも $^3\text{H-QNB}$ の場合、低濃度においては未だ平衡に達していないため、Scatchard 解析では K_d を過大評価しており、結合解離曲線から得られた値がより真の値に近いものと思われる。

また Scatchard 解析では反応速度定数を個別に求めることは不可能であるが、結合曲線、解離曲線のデータを、モデル式から導かれるリガンド-レセプター複合体の時間濃度曲線に当てはめて最小自乗法を用いて計算すると B_{\max} 、 K_d のみならず各反応速度定数が算出可能である。 $^3\text{H-QNB}$ の場合、モデル 1 を用いてオートラジオグラフィ法と結合アッセイ法を比較すると反応温度の違いのため速度定数の値は異なるが、 B_{\max} (それぞれ、250 pmol/g, 211 pmol/g)、 K_d (それぞれ 13.5 nM, 11.7 nM) とともに極めて近似した値が得られた。

さらに、 $^3\text{H-QNB}$ では、解離実験における反応曲線が二相性になることから、そのレセプター-リガンド複合体は単一のものではなく、低親和性状態から高親和性状態に移行することが従来から言われており、異性化 (isomerization) と呼ばれている。これについて Galper ら¹⁹⁾は、筆者と同様のモデル式 (モデル 2) を仮定し、解離曲線の早い相、遅い相をそれぞれ k_{-1} 、 k_{-2} に当てて見かけの K_d ($K_{dapp} = [k_1/k_{-1}(1+k_2/k_{-2})]^{-1}$) を算出し、異性化を考慮しないモデル (モデル 1) で得られた K_d 値と大きく異なるとしている。今回の結合解離実験のデータをこの方法でモデル 2 に当てはめると K_{dapp} は 3.5 pM と算出され、これはモデル 1 に当てはめた場合の値 11.7 pM と大きく異なる。これは、厳密には各相とも k_{-1} 、 k_2 、 k_{-2} の影響を受けるためと思われる。そこでモデル式に忠実な数学的解析法を考案し、リガンド-レセプター複合体全体、異性化しないもの、異性化したものそれぞれについて時間濃度関数を算出し、これに結合解離実験のデータを当てはめ各パラメータ (k_1 、 k_2 、 k_{-1} 、 k_{-2} 、 K_{dapp} 、 B_{\max}) を算出した。その結果、 K_{dapp} として、モデル 1 より算出した結合アッセイ法の 11.7 pM やオートラジオグラフィ法の 13.5 pM と極めて近似する 10.8 pM という

値を得、モデル式と新しく考案した解析法の妥当性が示された。各反応速度定数を別々に算出することの意義として、 K_d に変化がみられた場合、結合と解離のどちらがおもに変化したかが解析でき、病態解明に有用であるということがあげられる。今回はオートラジオグラムでは反応に非常に時間がかかるため解離実験はデータが得られていないが、反応温度などを検討することによって同様の解析が可能であると考えられた。

以上より受容体オートラジオグラフィ法は、従来の結合アッセイ法と比較して、脳のレセプターの解剖学的詳細部の変化を捉えることが可能であり、種々の精神疾患モデル動物や向精神薬投与動物を用いることにより結合アッセイでわからなかった情報を得ることができるかと推測される。本法は動物を用いた基礎研究に役立つのみならず、ECT によるレセプターマッピングの臨床的評価の基礎的情報を提供する有力な方法であると考えられる。

結 論

受容体オートラジオグラフィ法を用いた脳内レセプターの定量化について、ラットを用いて基礎的検討を行い、以下の結果を得た。

1. $^3\text{H-spiperone}$ 、 $^3\text{H-QNB}$ 、 $^3\text{H-muscimol}$ 、 $^3\text{H-diprenorphine}$ 、 $^3\text{H-ketanserin}$ および $^3\text{H-DHA}$ についてインキュベーション時間、洗浄時間の検討および飽和実験の検討を行い、全てのリガンドにおいて良好なオートラジオグラムが得られた。
2. 1) ミクロフォトメータ、2) ドラムスキャンデンストメータ、3) ビデオディジタイザーシステムの 3 種のオートラジオグラムの定量機器について、定量性と操作性の面で比較検討したところ、定量性の面では上記 3 機種間で測定値の相関は高く、操作性の面でビデオディジタイザーシステムが格段に優れていた。
3. ビデオディジタイザーシステムを用いて、定量化の基礎的検討を行ったところ、標準線源としてはゼラチン法が最も優れていた。また画像処理プログラムを用いてサブトラクションイメージ、カラーイメージなどを作製し、二次元的視覚評価が可能であった。
4. 抗鬱剤のクロミプラミン 10 mg/kg を 1 日 2 回、1 週間皮下注射後断頭し、 $^3\text{H-ketanserin}$ を用いたオートラジオグラムを作製し、正常ラットと比較したところ、前頭部の結合量が 20~30% 減少していた。さらにオートラジオグラフィ法では、空間分解能が優れているため、結合アッセイ法では不可能と考えられる詳細な部位間の比較が可能であった。
5. ムスアカリン性アセチルコリンレセプターの拮

抗剤である³H-QNBでは、オートラジオグラフィ法と結合アッセイでScatchard解析から算定した最大結合量および解離定数の値が異なるとされていたが、反応条件を適切にすることによって、両法において極めて近似した値が得られた。

6. 従来の解析法であるScatchard plotは、反応系が平衡に達していないとかなりの誤差を生じ、解離定数に関しても解離速度定数と結合速度定数の比としてしか算出されないため、結合曲線および解離曲線から直接パラメータを求める方法を検討した。これによれば、計算は複雑であるが、結合および解離速度定数を別々に算出可能であった。また、³H-QNBの異性化モデルについて、モデル式に忠実な数学的解析法を開発し、上記方法にて各速度定数を算出したところみかけの解離定数(K_{d,app})が異性化を考慮しない場合の値と極めて近似し、このモデルの妥当性が示された。

以上より受容体オートラジオグラフィ法では、脳内レセプターの定量化に関し、従来のインビトロ結合アッセイ法に比べ、より詳細な解析が可能である。さらに今後、種々の神経精神疾患モデル動物を用いて実験を行うことにより、本法はそれらの疾患の病態解明に寄与するのみならず、神経精神疾患の診断、治療指針などに有用と期待されているECTによるレセプターマッピング解析のための基礎的情報を提供する有力な方法であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、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、御助言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、金沢大学医療技術短期大学部小島一彦教授、金沢大学医学部付属病院放射線部飯田泰治技官、金沢大学医学部核医学講座松田博史先生、並びに教職員各位に深く感謝致します。

本論文の一部は、第13回国際脳循環代謝シンポジウム(於モントリオール, 1987)で発表した。

この研究の一部は文部省科学研究費A, 課題番号6144045によった。

補 遺

1. ³H-QNBにおける反応モデル

1) モデル1 (異性化を考慮しない場合)

$$Q + R \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} QR \dots\dots\dots(1)$$

ここで、Qは遊離のリガンド濃度、Rは遊離のレセプター濃度、QRはリガンド-レセプター複合体濃度、k₁はQ+RからQRへの二次結合速度定数、k₋₁はQRからQ+Rへの一次解離速度定数を意味する。結合実験の場合(1)から次の微分方程式を得る。

$$\frac{dQR}{dt} = k_1 Q (B_{max} - QR) - k_{-1} QR \dots\dots\dots(2)$$

なお、B_{max}は最大結合量である。(2)にラプラス変換⁴⁷⁾を施すと

$$sQR(s) = \frac{k_1 Q B_{max}}{s} - (k_1 Q + k_{-1}) QR(s)$$

$$QR(s) = \frac{k_1 Q B_{max}}{s(s + k_1 Q + k_{-1})} \dots\dots\dots(3)$$

(3)に逆ラプラス変換を施して以下の解を得る。

$$QR(t) = \frac{k_1 Q B_{max}}{k_1 Q + k_{-1}} (1 - e^{-(k_1 Q + k_{-1})t})$$

解離実験の場合、k₁=0となるので(1)から次の微分方程式を得る。

$$\frac{dQR}{dt} = -k_{-1} QR \dots\dots\dots(4)$$

(4)から以下の解を得る。

$$QR(t) = QR_0 e^{-k_{-1}t}$$

ただし、QR₀はアトロピンをいれる直前の複合体の濃度である。

2) モデル2 (異性化を考慮した場合)

$$Q + R \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} QR \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} QR^* \dots\dots\dots(1)$$

なお、Qは遊離のリガンド濃度、Rは遊離のレセプター濃度、QRは異性化していないリガンド-レセプター複合体濃度、QR*は異性化したリガンド-レセプター複合体濃度、k₁はQ+RからQRへの二次結合速度定数、k₂はQRからQR*への一次結合速度定数、k₋₁はQRからQ+Rへの一次解離速度定数、k₋₂はQR*からQRへの一次解離速度定数を意味する。結合実験の場合(1)式から以下の微分方程式(2), (3), (4)が成立する。

$$\frac{dQB}{dt} = k_1 Q (B_{max} - QB) - k_{-1} QR \dots\dots\dots(2)$$

$$\frac{dQR}{dt} = k_1 Q (B_{max} - QB) - (k_{-1} + k_2) QR + k_{-2} QR^* \dots\dots\dots(3)$$

$$\frac{dQR^*}{dt} = k_2 QR - k_{-2} QR^* \dots\dots\dots(4)$$

なお、QB=QR+QR*, B_{max}は最大結合量である。

(2), (3), (4)にラプラス変換を施すと、

$$sQB(s) = \frac{k_1 Q B_{max}}{s} - k_1 Q QB(s) - k_{-1} QR(s) \dots\dots(5)$$

$$sQR(s) = \frac{k_1 Q B_{max}}{s} - k_1 Q QB(s) - (k_{-1} + k_2) QR(s) + k_{-2} QR^*(s) \dots\dots\dots(6)$$

$$sQR^*(s) = k_2 QR(s) - k_{-2} QR^*(s) \dots\dots\dots(7)$$

(5), (6), (7)をQB(s)について解くと、

$$QB(s) = \frac{k_1 Q B_{max} (s + k_2 + k_{-2})}{s((s + k_2 + k_{-2})(s + k_1 Q + k_{-1}) - k_{-1} k_{-2})}$$

ここで、 $\alpha = k_1 Q + k_{-1}$, $\beta = k_2 + k_{-2}$, $\gamma = k_{-1} k_2$ とおき、
さらに

$$X = \frac{(\alpha + \beta) - \sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)}}{2}$$

$$Y = \frac{(\alpha + \beta) + \sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)}}{2}$$

とおくと、

$$QB(s) = \frac{k_1 QB_{max}(s + k_2 + k_{-2})}{s\sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)}} \left(\frac{1}{s + X} - \frac{1}{s + Y} \right)$$

なる形に変換できる。さらに、

$$A = \frac{k_1 QB_{max}}{\sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)}}$$

とおくと、

$$QB(s) = A \left\{ \frac{(k_2 + k_{-2} - X)}{s(s + X)} - \frac{(k_2 + k_{-2} - Y)}{s(s + Y)} \right\}$$

これに逆ラプラス変換を施すと、

$$QB(t) = A \left\{ \frac{k_2 + k_{-2} - X}{X} (1 - e^{-Xt}) - \frac{k_2 + k_{-2} - Y}{Y} (1 - e^{-Yt}) \right\} \dots \dots \dots (8)$$

が得られる。同様に、(5),(6),(7)より

$$QR^*(s) = \frac{k_2}{s + k_2 + k_{-2}} QB(s)$$

$$= \frac{k_1 k_2 Q B_{max}}{s\{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)\}}$$

$$= k_2 A \left\{ \frac{1}{s(s + X)} - \frac{1}{s(s + Y)} \right\}$$

これに逆ラプラス変換を施すと、

$$QR^*(t) = k_2 A \left\{ \frac{1}{X} (1 - e^{-Xt}) - \frac{1}{Y} (1 - e^{-Yt}) \right\} \dots \dots (9)$$

さらに、

$$QR(t) = QB(t) - QR^*(t) \dots \dots \dots (10)$$

を得る。(8)(9)(10)が求める時間濃度関数である。解離実験における、微分方程式は、(1)式において $k_1 = 0$ となるので

$$\frac{dQB}{dt} = -k_{-1} QR \dots \dots \dots (11)$$

$$\frac{dQR}{dt} = k_1 Q (B_{max} - QB) - (k_{-1} + k_2) QR + k_{-2} QR^* \dots \dots \dots (12)$$

$$\frac{dQR^*}{dt} = k_2 QR - k_{-2} QR^* \dots \dots \dots (13)$$

(11),(12),(13)にラプラス変換を施すと

$$sQB(s) - QB_0 = -k_{-1} QR(s) \dots \dots \dots (14)$$

$$sQR(s) - QR_0 = -(k_{-1} + k_2) QR(s) + k_{-2} QR^*(s) \dots \dots \dots (15)$$

$$sQR^*(s) - QR^*_0 = k_2 QR(s) - k_{-2} QR^*(s) \dots \dots (16)$$

ただし、 QB_0, QR_0, QR^*_0 は、アトロピンを添加する直前の各複合体の濃度である。

(14),(15),(16)を $QB(s)$ について解くと、

$$QB(s) = \frac{k_{-1} QR^*_0 - QB_0(s + k_2 + k_{-2})}{s + k_{-1}(s + k_2 + k_{-2}) - k_{-1} k_2}$$

ここで、 $\alpha = k_{-1}$, $\beta = k_2 + k_{-2}$, $\gamma = k_{-1} k_2$ とおき、さらに

$$X = \frac{(\alpha + \beta) - \sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)}}{2}$$

$$Y = \frac{(\alpha + \beta) + \sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)}}{2}$$

とおくと、

$$QB(s) = \frac{k_{-1} QR^*_0}{\sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)}} \left(\frac{1}{s + X} - \frac{1}{s + Y} \right) + \frac{QB_0}{\sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)}} \left(\frac{\beta - X}{s + X} - \frac{\beta - Y}{s + Y} \right)$$

さらに、

$$A = \frac{k_{-1} QR^*_0}{\sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)}}, B = \frac{QB_0}{\sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)}}$$

とおき、逆ラプラス変換を施すと、

$$QB(t) = A(e^{-Xt} - e^{-Yt}) + B\{(\beta - Y)e^{-Xt} - (\beta - X)e^{-Yt}\}$$

$$\therefore QB(t) = \{A + B(\beta - X)\} e^{-Xt} - \{A + B(\beta - Y)\} e^{-Yt} \dots \dots \dots (17)$$

また、(14),(15),(16)を $QR^*(s)$ について解くと

$$QR^*(s) = \frac{k_2}{s + k_2 + k_{-2}} \left\{ \frac{k_{-1} QR^*_0 + QB_0(s + k_2 + k_{-2})}{(s + k_{-1})(s + k_2 + k_{-2}) - k_{-1} k_2} \right\}$$

$$= \frac{k_2 A}{s + \beta} \left(\frac{1}{s + X} - \frac{1}{s + Y} \right) - k_2 B \left(\frac{1}{s + X} - \frac{1}{s + Y} \right) + \frac{QR^*_0}{s + \beta}$$

これから、

$$QR^*(t) = k_2 A \left(\frac{e^{-Xt} - e^{-Yt}}{X - \beta} - \frac{e^{-Xt} - e^{-Yt}}{Y - \beta} \right) + k_2 B (e^{-Xt} - e^{-Yt}) + QR^*_0 e^{-\beta t}$$

$$\therefore QR^*(t) = \left(-\frac{k_2 A}{X - \beta} + k_2 B \right) e^{-Xt} + \left(\frac{k_2 A}{Y - \beta} - k_2 B \right) e^{-Yt} + \left(\frac{k_2 A}{X - \beta} - \frac{k_2 A}{Y - \beta} + QR^*_0 \right) e^{-\beta t} \dots \dots \dots (18)$$

$$QR(t) = QB(t) - QR^*(t) \dots \dots \dots (19)$$

(17),(18),(19)が求める時間濃度関数である。

見かけの解離定数 (Apparent K_d (K_{dapp})) は次のようになる。

$$\frac{dQB}{dt} = k_1 Q (B_{max} - QB) - k_{-1} QR \dots \dots \dots (20)$$

$$\frac{dQR}{dt} = k_1 Q (B_{max} - QB) - (k_{-1} + k_2) QR + k_{-2} QR^* \dots \dots \dots (21)$$

$$\frac{dQR^*}{dt} = k_2 QR - k_{-2} QR^* \dots \dots \dots (22)$$

平衡状態では、(20) = (21) = (22) = 0

(22) = 0より

$$QR = \frac{k_{-2}}{k_{-2}} QR^* \dots\dots\dots (23)$$

(20) = 0より

$$\frac{QR}{Q(B_{max} - QB)} = \frac{k_1}{k_{-1}} \dots\dots\dots (24)$$

(23)を(24)に代入

$$\frac{QR^*}{Q(B_{max} - QB)} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} \dots\dots\dots (25)$$

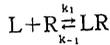
(24) + (25)より

$$\frac{QB}{Q(B_{max} - QB)} = \frac{k_1}{k_{-1}} + \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = \frac{k_1}{k_{-1}} \left(1 + \frac{k_2}{k_{-2}}\right)$$

$$Kd_{app} = \left\{ \frac{k_1}{k_{-1}} \left(1 + \frac{k_2}{k_{-2}}\right) \right\}^{-1}$$

2. インキュベーション時間, 組織量-リガンド量比による Scatchard 解析への影響

以下のモデル式が成立すると仮定する.



ここでは, L は遊離のリガンド濃度 (nmol/l), R は遊離のレセプター濃度 (nmol/l), LR はリガンド-レセプター複合体濃度 (pmol/g), k_1 は L+R から LR への二次結合速度定数, k_{-1} は LR から L+R への一次解離速度定数を意味する.

ここで, A ml のフリーリガンド溶液中に B mg の組織をいれて, 結合アッセイを行うとする. 1 l 中の全リガンド量を L_T とおくと,

$$\begin{aligned} \frac{dLR}{dt} &= k_1(L_T - LR) \frac{B}{A} \times 10^{-3} - (B_{max} - LR) - k_{-1} LR \\ &= k_1 \left\{ (LR)^2 \frac{B}{A} \times 10^{-3} - LR \left(\frac{B}{A} \times 10^{-3} B_{max} \right. \right. \\ &\quad \left. \left. + L_T \right) + B_{max} L_T \right\} - k_{-1} LR \\ &= (LR)^2 \frac{B}{A} \times 10^{-3} k_1 - LR \left(\frac{B}{A} \times 10^{-3} B_{max} k_1 \right. \\ &\quad \left. + k_1 L_T + k_{-1} \right) + B_{max} k_1 L_T \end{aligned}$$

ここで,

$$a = \frac{B}{A} \times 10^{-3} k_1, \quad b = \left(\frac{B}{A} \times 10^{-3} B_{max} k_1 + k_1 L_T + k_{-1} \right),$$

$$c = B_{max} \times k_1 L_T$$

とおくと,

$$\frac{dLR}{a(LR)^2 + bLR + c} = dt$$

さらに $D = \sqrt{b^2 - 4ac}$ とおき, 両辺を積分すると,

$$\frac{1}{D} \log \frac{2aLR + b - D}{2aLR + b + D} = t + \theta$$

$$\log \frac{2aLR + b - D}{2aLR + b + D} = Dt + \theta' (\theta, \theta' \text{ は積分定数})$$

$t=0$ のとき, $LR=0$ より

$$\theta' = \log \frac{b-D}{b+D}$$

$$\frac{b-D}{b+D} e^{Dt} = \frac{2aLR + b - D}{2aLR + b + D}$$

$$\therefore LR = \frac{1}{2a} \left(\frac{2D}{1 - \frac{b-D}{b+D} e^{Dt}} - b - D \right)$$

文 献

- 1) Langrey, J. N.: On the physiology of the salivary secretion. Part II. On the mutual antagonism of atropin and pilocarpin, having especial reference to their relations in the sub-maxillary gland of the cat. *J. Physiol.*, **1**, 339-369 (1878).
- 2) 吉田 博: レセプター基礎と臨床 (吉田・井村編), 改訂版, 1-12 頁, 中外医学社, 東京, 1983.
- 3) Numa, S., Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y. & Kikuyotani, S.: Molecular structure of the nicotinic acetylcholine receptor. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **48**, 57-69 (1983).
- 4) Reisine, T. D., Fields, J. Z. & Yamamura, H. I.: Neurotransmitter receptor alterations in Parkinson's disease. *Life Sci.*, **21**, 335-344 (1977).
- 5) Snyder, S. H.: Dopamine receptors, neuroleptics, and schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, **138**, 460-464 (1981).
- 6) Shimohama, S., Taniguchi, T., Fujiwara, M. & Kameyama, M.: Changes in nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in Alzheimer-type dementia. *J. Neurochem.*, **46**, 288-293 (1986).
- 7) 中村重信: 中枢神経の受容体. *Annual rev. 神経*, 11-27 (1987).
- 8) Wagner, H. N. Jr., Burns, H. D., Dannals, R. F., Wong, D. F., Langstrom, B. L., Duelfer, T., Frost, J. J., Ravert, H. T., Links, J. M., Rosenbloom, S. B., Lukas, S. E., Kramer, A. V. & Kuhar, M. J.: Imaging dopamine receptors in the human brain by positron tomography. *Science*, **221**, 1264-1266 (1983).
- 9) Perlmutter, J. S., Larson, K. B., Raichle, M. E., Markham, J., Mintun, M. A., Kilbourn, M. R. & Welch, M. J.: Strategies for in vivo measurements of receptor binding using positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, **6**, 154-169 (1986).
- 10) Young, W. S. & Kuhar, M. J.: A new method for receptor autoradiography: [³H] Opioid receptors in rat brain. *Brain Res.*, **179**, 255-270

(1979).

- 11) **König, J. F. R. & Klippel, R. A.** : The rat brain-A stereotaxic atlas, Robert E Krieger, New York, 1963.
- 12) 小島一彦: ドラムスキャナーとスパイダー (SPIDER) を利用した画像処理. 金沢大学計算機センター広報, **9**, 7-18 (1985).
- 13) 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).
- 14) **Unnerstall, J. R., Niehoff, D. L., Kuhar, M. J. & Palacios, J. M.** : Quantitative receptor autoradiography using [³H] Ultrofilm: Application to multiple benzodiazepine receptors. J. Neurosci. Meth., **6**, 59-73 (1982).
- 15) **Scatchard, D.** : The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci., **51**, 660-672 (1949).
- 16) **Bevington, P. R.** : Least squares fit to an arbitrary function. Data reduction and error analysis for the physical sciences, 1st ed., p204-246, McGraw-Hill Book Company, New York, 1969.
- 17) **Hartzell, H. C.** : Distribution of muscarinic acetylcholine receptors and presynaptic nerve terminals in amphibian heart. J. Cell Biol., **86**, 6-20 (1980).
- 18) **Kloog, Y., Egozi, Y. & Sokolovsky, M.** : Characterization of muscarinic acetylcholine receptors from mouse brain: Evidence for regional heterogeneity and isomerization. Mol. Pharmacol., **15**, 545-558 (1979).
- 19) **Galper, J. B., Dziekan, L. C., O'Hara, D. S. & Smith, T. W.** : The biphasic response of muscarinic cholinergic receptors in cultured heart cells to agonists. J. Biol. Chem., **257**, 10344-10356 (1982).
- 20) **Zilles K.** : The cortex of the rat-A stereotaxic atlas. Springer-Verlag, Berlin, Heiderberg, New York, Tokyo (1985).
- 21) **Weiland, G. A. & Molinoff, P. B.** : Quantitative analysis of drug-receptor interactions: 1. Determination of kinetics and equilibrium properties. Life Sci., **29**, 313-330 (1981).
- 22) **Wagner H. N. Jr.** : Images of the brain: Past as prologue. J. Nucl. Med., **27**, 1929-1937 (1986).
- 23) **Frost, J. J., Wagner, H. N. Jr., Dannals, R. F., Ravert, H. T., Links, J. M., Wilson, A. A., Burms, H. D., Wong, D. F., McPherson, R. W., Rosenbaum, A. E., Kuhar, M. J. & Snyder, S. H.** : Image in opiate receptors in the human brain by positron tomography. J. Comput. Assist. Tomogr., **9**, 231-236 (1985).
- 24) **Somson, Y., Hantraye, P., Baron, J. C., Soussaline, F., Comar, D. & Maziere, M.** : Kinetics and displacement of [¹⁴C] Ro15-1788, a benzodiazepine antagonist, studied in human brain in vivo by positron tomography. Eur. J. Pharmacol., **110**, 247-251 (1985).
- 25) **Arnett, C. D., Shiue, C. Y., Wolf, A. P., Flower, J. S., Logan, J. & Watanabe, M.** : Comparison of three ¹⁸F-labeled butyrophenone neuroleptic drugs in the baboon using positron emission tomography. J. Neurochem, **44**, 835-844 (1985).
- 26) **Wong, D. F., Gjedde, A. & Wagner, H. N. Jr.** : Quantification of neuroreceptors in the living human brain. I. Irreversible binding of ligands. J. Cereb. Blood Flow Metab., **6**, 137-146 (1986).
- 27) **Wong, D. F., Gjedde, A. & Wagner, H. N. Jr., Dannals, R. F., Douglass, K. H., Links, J. M. & Kuhar, M. J.** : Quantification of neuroreceptors in the living human brain. II. Inhibition studies of receptor density and affinity. J. Cereb. Blood Flow Metab., **6**, 147-153 (1986).
- 28) **Farde, L., Hall, H., Ehrin, E. & Sedvall, G.** : Quantitative analysis of D2 dopamine receptor binding in the living human brain by PET. Science, **231**, 258-261 (1986).
- 29) **Wong, D. F., Wagner, H. N. Jr., Tune, L. E., Dannals, R. F., Pearlson, G. D., Links, J. M., Tamminga, C. A., Broussolle, E. P., Ravert, H. T., Wilson, A. A., Toung, T., Malat, J., Williams, J. A., O'Tuama, L. A., Snyder, S. H., Kuhar, M. J. & Gjedde, A.** : Positron emission tomography reveals elevated D2 dopamine receptors in drug-native schizophrenics. Science, **234**, 1558-1563 (1986).
- 30) 久田欣一: 脳の核医学: PET から SPECT への転換の可能性. 1. イントロダクション. 核医学, **24**, 1061-1067 (1987).
- 31) **Gilbert, R. F. T., Hanley, M. R., & Iversen, L. L.** : [³H] -Quinuclidinyl benzilate binding to muscarinic receptors in rat brain: Comparison of results from intact brain slices and homogenates. Br. J. Pharmacol., **65**, 451-456 (1978).
- 32) **Gallistel, C., Piner, C., Allen, T., Adler, N.,**

- Yadin, E. & Negin, M. : Computer assisted analysis of 2-DG autoradiographs. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **6**, 409-420 (1982).
- 33) Waag, R., Schenk, E., Nisson, J. & Richeson, T. : Topographic display and quantitative analysis of blood flow marker distribution in normal and infarcted hearts. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **29**, 694-700 (1982).
- 34) Yonekura, Y., Brill, A. B., Som, P., Benett, G. W. & Fand, I. : Quantitative autoradiography with radiopharmaceuticals, Part 1: Digital film-analysis system by videodensitometry: Concise communication. *J. Nucl. Med.*, **24**, 231-237 (1983).
- 35) Som, P., Yonekura, Y., Oster, Z., Meyer, M., Pelletteri, M., Fowler, J., MacGreggor, R., Russell, J., Wolf, A., Fand, I., McNally, W. & Brill, A. : Quantitative autoradiography with radiopharmaceuticals, Part 2: Applications in radiopharmaceutical research: Concise communication. *J. Nucl. Med.*, **24**, 238-244 (1983).
- 36) Altar, C., Walter, R., Neve, K. & Marshall, J. : Computer-assisted video analysis of [3H] spiroperidol binding autoradiographs. *J. Neurosci. Methods*, **10**, 173-188 (1984).
- 37) Lear, J. L., Mido, K., Plotnick, J. & Muth, R. : High-performance digital image analyzer for quantitative autoradiography. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, **6**, 625-629 (1986).
- 38) Berck, D. J. & Rainbow, T. C. : Micro-computer-assisted densitometer for quantitative receptor autoradiography. *J. Neurosci. Meth.*, **13**, 171-181 (1985).
- 39) Lewellen, T. K., Graham, M. M. & Spence, A. M. : Quantitative autoradiography using a personal computer. *J. Nucl. Med.*, **27**, 549-554 (1986).
- 40) Ramm, P., Kulick, J. H., Stricker, M. P. & Frost, B. J. : Video and scanning microdensitometer-based imaging systems in autoradiographic densitometry. *J. Neurosci. Meth.*, **11**, 89-100 (1984).
- 41) Richards, H. K., Lovick, A. H. J. & Pickard, J. D. : Low-cost microcomputerbased densitometer. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, **5**, 481-482 (1985).
- 42) Alexander, G. M. & Schwartzman, R. J. : Quantitative computer analysis of autoradiographs utilizing a charge-coupled device solid-state camera. *J. Neurosci. Meth.*, **12**, 29-36 (1984).
- 43) 山下 明, 渡辺 恭良, 早石 修 : Differential image autoradiography による受容体の分布の解析法. *神経化学*, **22**, 150-152 (1983).
- 44) Peroutka, S. J. & Snyder, S. H. : Long term antidepressant treatment decreases spiroperidol-labeled serotonin receptor binding. *Science*, **210**, 88-90 (1980).
- 45) Simantov, R., Childers, S. R. & Snyder, S. H. : The opiate receptor binding interactions of ³H-methionine enkephalin, an opioid peptide. *Eur. J. Pharmacol.*, **47**, 319-331 (1978).
- 46) Rainbow, T. C., Bleisch, W. V., Biegon, A. & McEwen, B. S. : Quantitative densitometry of neurotransmitter receptors. *J. Neurosci. Meth.*, **5**, 127-138 (1982).
- 47) Wagner, J. G. : Use of Laplace transforms for linear models. *Fundamentals of clinical pharmacokinetics*. 1st ed., p231-246, Drug Intelligence Publications INC., Hamilton, 1975.

A Fundamental Study on Brain Receptor Mapping by Neuronuclear Medicine Imaging: Quantitation of Receptor Autoradiography in the Rat Brain Shiro Tsuji, Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. *Juzen Med. Soc.*, **97**, 376-399 (1988)

Key words: receptor, autoradiography, emission computerized tomography, receptor binding assay, brain

Abstract

The present study describes a quantitative measurement of brain receptor with an autoradiographic technique in rats to establish brain receptor mapping by emission computerized tomography, which is expected to be useful for diagnosis and therapeutic evaluation of neuropsychic diseases. Highly qualified autoradiograms were obtained using six different ligands labeled with ^3H after the investigation of appropriate incubation time and washing time, and of presence or absence of saturation. In a comparative study on quantitation and manipulation among the following three analyzing systems for autoradiograms: 1) scanning densitometer 2) drum scanner 3) video digitizer system (VDS), the VDS showed by far the most convenient manipulation along with a good correlation with the other two in quantitation. Therefore, autoradiograms were analyzed by the VDS thereafter. Appropriate setting of conditions in the ligand-receptor interaction revealed the similarity of the hitherto discordant values for the number of maximum binding sites (B_{max}) of the muscarinic acetylcholine receptor and equilibrium dissociation constant (K_d) of its antagonist, ^3H -quinuclidinyl benzylate, between in vitro receptor assay and receptor autoradiography in the conventional Scatchard analysis. The excellent spatial resolution of the receptor autoradiography, unlike the in vivo receptor assay, made it possible to compare the values for B_{max} and K_d among the fine structures in the brain. Although Scatchard analysis has been used for estimating the values for B_{max} and K_d , this method has the following limitations: 1) an equilibrium state should be attained in any concentration of free ligand, as otherwise appreciable errors would arise in the obtained values; 2) the dissociation rate constant (k_{-1}) and the association rate constant (k_1) cannot be obtained individually. To overcome these drawbacks of Scatchard analysis, a mathematical analysis was used for estimating individual rate constants and B_{max} on the basis of time courses of association and dissociation. It is said that the ligand-muscarinic receptor complex shows a conformational change from low to high affinity form, which is called isomerization. Four rate constants (k_1 , k_{-1} , k_2 and k_{-2}) were estimated in an isomerization model of muscarinic receptor by the use of a newly developed mathematical equation. The validity of this new analysis was confirmed by the observation that the apparent equilibrium dissociation rate constant ($K_{d_{\text{app}}}$) calculated from these four rate constants was in good agreement with that from a non-isomerization model.