

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：アルツハイマー病動物モデルにおける神経伝達物質および受容体の変化

著者	Matsuda Hiroshi, Kinuya Keiko, Tsuji Shiro, Terada Hitoshi, Shiba Kazuhiro, Mori Hirofumi, Sumiya Hisashi, Hisada Kinichi
雑誌名	核医学
巻	27
号	10
ページ	1099-1107
発行年	1990-10-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/3323

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：
アルツハイマー病動物モデルにおける
神経伝達物質および受容体の変化

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

核医学第27巻第10号別刷
(1990年10月発行)

《原 著》

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： アルツハイマー病動物モデルにおける 神経伝達物質および受容体の変化

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

要旨 脳におけるコリン作動性神経支配の核医学的画像化の基礎的研究として、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において、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%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をインビトロ受容体オートラジオグラフィにより定量した。総受容体数、M₁受容体数、M₂受容体数のいずれも破壊側、非破壊側間で有意な差は認められなかった。さらに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ところ、AH5183の結合は破壊側前頭・頭頂・側頭葉皮質において、非破壊側よりも平均14%有意に低下していた。AH5183は脳におけるコリン作動性神経支配画像化のための有力なリガンドと考えられ、核医学画像への応用が期待される。

I. はじめに

核医学的手法によるコリン作動性中枢神経支配の画像化に関する基礎的研究として、ラットにおいて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によりアルツハイマー病動物モデルを作製し、その行動薬理的、組織化学的、ならびに酵素化学的評価を行った¹⁾。本論文ではこのモデルにおいて、大脳皮質における神経伝達物質および受容体の変化を定量的にとらえることにより、コリン作動性中枢神経支配除去の核医学的マッピングの可能性について検討したので報告する。

II. 材料と方法

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^{2,3)}によるアセチルコリンの定量を行った。手術施行1週間後に、マイクロウェーブ(新日本無線, NJE2603型)を照射した後、断頭し、破壊側と非破壊側の大脳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ナイザで破碎した。蛋白定量に用いるサンプル40 μ lを分注後遠心(1,000g, 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(TPB)を10mg/mlの割合で溶解したイソアミルアルコール(IsoA)60 μ lを加え十分に振盪した後遠心した(1,000g, 5分間)。アルコール層から得られた40 μ lを0.4N塩

* 金沢大学医学部核医学科

** 富山医科薬科大学医学部放射線科

*** 東邦大学医学部大橋病院放射線科

**** 金沢大学アイソトープ総合センター

受付: 2年3月13日

最終稿受付: 2年6月8日

別刷請求先: 石川県金沢市宝町13-1 (☎920)

金沢大学医学部核医学科

松田 博史

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 (1,000 g, 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 (1,000 g, 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。

0.5 N リン酸緩衝液 (pH 8.0), 0.2 M 塩化マグネシウム, 1 mM アデノシン三リン酸 (ATP, pH 7.0), コリンキナーゼ (CK: choline phosphotransferase, Sigma) を含む反応液 10 μ l を乾燥した試料に加え, 38°C 15 分間のインキュベーションを行った。

さらに 0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0), 1 mM ATP, CK, アセチルコリンエステラーゼ (AchE, Sigma), Adenosine 5'-[γ - 32 P] triphosphate (Amersham, 168~110 TBq/mmol) を含む反応液 10 μ l を追加し, 38°C 15 分間のインキュベーションを行った。氷冷後 0.3 M 酢酸バリウム 30 μ l を加え, 遠心 (1,000 g, 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, 0.05 N 水酸化ナトリウム 0.5 ml を用いて計 4 回溶出を行い, (32 P) 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 5 N 蟻酸・2 M 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。

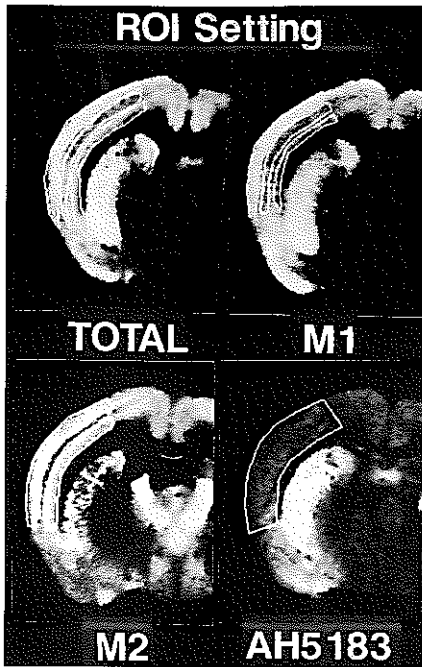
スタンダードは 100 mM 塩化アセチルコリン溶液 5 μ l に蟻酸アセトン混合液を加えたものに試料と同様の操作を加えて作成し内部標準とした。

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⁴⁾ で測定し, タンパク質 100 mg 当りのアセチルコリン量を算出した。

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 6 匹において受容体オートラジオグラフィを手術 1 週後に施行し, 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

らクリクリオスタット (三共 Tissue Tec 4551) 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⁵⁾ の A9820-A4620 の範囲) を作製し, ゼラチンを塗布したスライドガラスにのせた。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目的で, これらの脳切片を 10 mM の ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む 50 mM 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 [3 H]-quinuclidinyl benzilate (QNB) 1 nM (NEN, NET-656, 1.69 GBq/mmol) を, 1 mM の N-ethylmaleimide (NEM) と 1 mM の EDTA を含む 50 mM 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 1 nM 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 1×10^{-4} M 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 3×10^{-6} M 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⁶⁾ 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 95% 阻害され, また QNB と pirenzepine の組合せでは M₂ 受容体の 60% が描出されるのに対し M₁ 受容体は 90% 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 μ 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⁷⁾ した 8 種類の濃度のゼラチン標準線源とともに, 3 H 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すでに報告⁷⁾した Video Digitizer System を用いてフィルム濃度をデジタル化し、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-SYSTEM⁸⁾ を使用した。

◀ Fig. 1 Methods of setting regions of interest (ROI) over digitized autoradiograms of coronal brain slices. ROIs were drawn over outer, middle, and inner cortical layers for muscarinic acetylcholine receptors. 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.

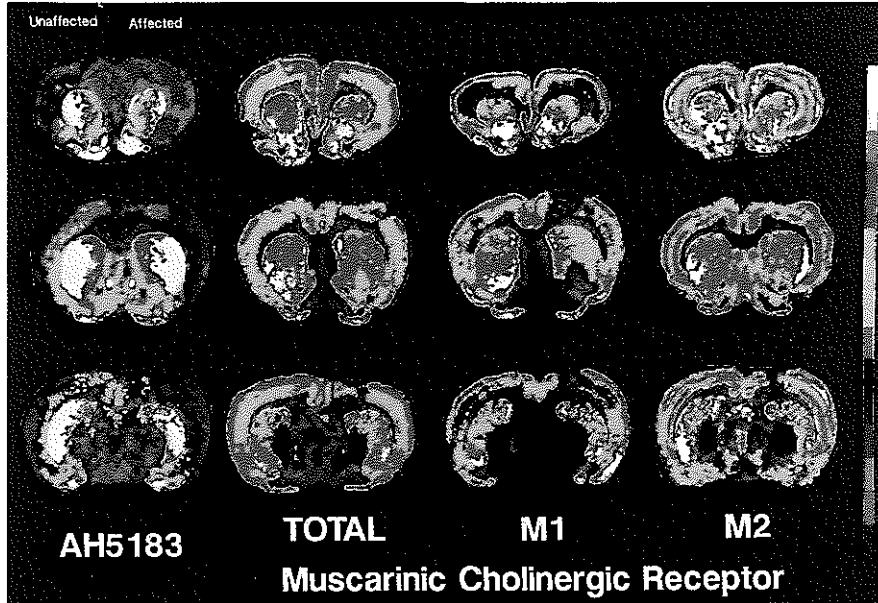


Fig. 2 Representative autoradiograms of total, M₁, and M₂ muscarinic cholinergic receptor and AH5183 binding in the rat brain with unilateral cholinergic denervation showing the decreased AH5183 binding in the cortex of the ipsilateral side to basal forebrain lesion despite of no significant alteration of muscarinic cholinergic receptor.

Table 1 Acetylcholine levels in parietal cortex

Model (N=7)		% change
Ipsilateral	Contralateral	
**8.6±1.0	12.5±1.5	-31%

(means±SEM, nmol/100 mg protein)

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

2-(4-phenylpiperidino) cyclohexanol (AH5183) 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、120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂を含むトリス緩衝液(50 mM, pH 7.6)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 GBq/mmol) 30 nM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 μM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か月露光した。得られたオートラジオグラムを前述のごとくデジタル化し、大脳皮質における放射能濃度をAH5183の結合濃度(pmol/g)に換算した。非放射性AH5183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。

III. 結 果

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) nmol/100 mg proteinであり、非破壊側のそれは12.5±1.5 nmol/100 mg proteinに比べ平均31%統計学上有意に(p<0.01,

Student's t-test) (Table 1) 低下していた。

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, Fig. 1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Table 2-5に示す。また, 各受容体の代表的なオートラジオグラムをFig. 2に示す。手術群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, M₁, M₂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's t-test, p<0.001)低下し, また偽手術群, 手術群同側脳皮質に比べても12%有意に(Student's t-test, 0.01<p<0.02)低下していた(Table 5)。

IV. 考 察

すでに報告した¹⁾イボテン酸投与による一側性前脳基底部破壊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McCamanらにより開発された同位元素を利用した酸素定量法^{2,3)}を採用した。本法は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測定を行い定量する方法である。アセ

Table 2 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

(mean±SEM, pmol/g tissue)

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

Table 3 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 4 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

(mean±SEM, pmol/g tissue)

Table 5 AH5183 binding in fronto-temporo-parietal cortex

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

(mean±SEM, pmol/g tissue)

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

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

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⁹⁾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⁹⁾があるため、単位蛋白量当りのアセチルコリン量を算出した。

今回測定した7匹のモデルラットの脳頭頂葉皮質のアセチルコリン量は、破壊側、非破壊側でそれぞれ8.6±1.0 (mean±SEM), 12.5±1.5 nmol/100 mg 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^{10,11)}はカイニン酸を用いて同様にラットの一側淡蒼球後腹側部の破壊モデルを作製して行った研究で破壊側大脳前頭-頭頂葉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している。今回の結果はJohnstonらのそれに比べると低下率がやや小さいが、同じモデルにおいて測

定したアセチルコリントランスフェラーゼ (CAT) およびアセチルコリンエステラーゼの破壊側皮質における低下率¹⁾(それぞれ -46% および -40%) も Johnston らの報告値¹⁰⁾(それぞれ -53% および -62%) に比べてやや小さい。この原因としては用いたラットの種差、細胞破壊に使用した神経毒の違いなどが考えられる。

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モデル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、pirenzepin 高親和性のは M₁、低親和性のは M₂ と名付けられた¹²⁾。

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¹³⁻¹⁶⁾されている。M₁ および M₂ 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 M₂ 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¹³⁾。M₁ 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、M₂ 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 M₂ 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¹³⁾。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¹⁴⁾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、アルツハイマー病脳におい

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 結合部位に変化がなかったという報告¹⁷⁾、急性期に M₂ 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 M₁ 受容体の増加がみられたという報告¹⁸⁾、M₁・M₂ 受容体の低下があったとする報告¹⁹⁾、総受容体・M₁・M₂ 受容体いずれにおいて変化がなかったとする報告²⁰⁾等があり、いま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、M₁・M₂、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²¹⁾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。今回の実験は手術施行1週後に受容体測定を行ったが、今後さらに急性期およびより慢性期での検討も必要と思われる。

さらにコリン作動性中枢神経支配除去によって生じたモデル動物の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同モデル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 AH5183²²⁾ 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^{23,24)}、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²⁵⁾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²⁶⁾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²⁴⁾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²⁴⁾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構は 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²⁴⁾ 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である 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^{27,28)} もみられる。さらに Marien ら²⁴⁾ 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モデル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ドと考えられた。

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、いまだ疾患の本態に迫っていない感をまぬがれない。

インビトロオートラジオグラフィにおいて患側頭頂葉皮質におけるコリン作動性神経の変化を鋭敏に捉えた AH5183 は、臨床においても脳における同神経支配の画像化のための有望なリガンドと考えられる。インビボへの応用には、血液脳関門の通過性や生体内での代謝などいくつかの検討余地があるが、ポジトロンやシングルフォトン核種を用いた標識化による核医学画像への応用が期待される。

V. 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ラットコリン作動性神経支配除去モデルを用いて、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) 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と比べ平均 31% 統計学上有意に低下していた。

2) ムスカリン性アセチルコリン受容体をインビトロ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、pirenzepin 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および非破壊側において有意な変化は認められなかった。

3) ³H 標識 AH5183 を用いて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初めて確認された。また、偽手術群ラット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。

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到有

意な変化は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 AH 5183 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リガンドと考えられ、核医学画像への応用が期待される。

謝辞：アセチルコリン定量に関しご指導賜りました金沢大学医学部第二生化学教室、細野隆次講師、池田泰子先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) 松田博史, 絹谷啓子, 辻 志郎, 他: アルツハイマー病動物モデルの作製とその評価法. 核医学 27: 883-891, 1190
- 2) Goldberg AM, McCaman RE: The determination of picomole amounts of acetylcholine in mammalian brain. *J Neurochem* 20: 1-8, 1973
- 3) McCaman RE, Weinreich D, Borys H: Endogenous levels of acetylcholine and choline in individual neurons of *Aplysia*. *J Neurochem* 21: 473-476, 1973
- 4) 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
- 5) Konig JFR, Kippel RA: The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. 1st ed, Robert E, Krieger Publishing, New York, 1967
- 6) Mash DC, Potter LT: Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarinic receptors in the rat brain. *Neuroscience*, 19: 551-564, 1986
- 7) 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——. 金沢大学十全医学会雑誌 97: 376-399, 1988
- 8) 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
- 9) 栗山欣弥, 大熊誠太郎: 神経伝達物質, 第1版, 中外医学社, 東京, pp 37-38, 1986
- 10) Johnston MV, McKinney M, Coyle JT: Neocortical cholinergic innervation: a description of extrinsic and intrinsic components in the rat. *Exp Brain Res* 43: 159-172, 1981
- 11) Johnston MV, McKinney M, Coyle JT: Evidence for a cholinergic projection to neocortex from neurons in basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5392-5396, 1979
- 12) Hammer R, Giachetti A: Muscarinic receptor subtypes: M₁ and M₂ biochemical and functional characterization. *Life Sci* 31: 2991-2998, 1982
- 13) Araujo DM, Lapchak PA, Robitaille Y, et al: Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 50: 1914-1923, 1988
- 14) 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
- 15) Shimohama S, Taniguchi T, Fujiwara M, et al: Changes in nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in Alzheimer-type dementia. *J Neurochem* 46: 288-293, 1986
- 16) Rinne JO, Laakso K, Lonnberg P, et al: Brain muscarinic receptors in senile dementia. *Brain Res* 336: 19-25, 1985
- 17) Bartus RT, Flicker C, Dean RT, et al: Selective memory loss following nucleus basalis lesions: long time behavioral recovery despite persistent cholinergic deficiencies. *Pharmacol Biochem Behav* 23: 125-135, 1985
- 18) McKinney M, Coyle J: Regulation of neocortical muscarinic receptors: effects of drug treatments and lesions. *J Neurosci* 2: 97-105, 1982
- 19) DeBelleruche J, Gardiner I, Hamilton M, et al: Analysis of muscarinic receptor concentration and subtypes following lesions of the rat substantia innominata. *Brain Res* 340: 201-209, 1985
- 20) Wenk G, Englisch K: [^3H]Ketanserin (serotonin type 2) binding increases in rat cortex following basal forebrain lesion with ibotenic acid. *J Neurochem* 47: 845-850, 1986
- 21) 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
- 22) Brittain RT, Levy GP, Tyers MB: The neuromuscular blocking action of 2-(4-phenylpiperidino)cyclohexanol (AH5183). *Eur J Pharmacol* 8: 93-99, 1969
- 23) Marshall IG, Parsons SM: The vesicular acetylcholine transport system. *TINS* 10: 174-177, 1987
- 24) Marian MR, Parsons SM, Altar CA: 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
- 25) Whitton PS, Marshall IG, Parsons SM: Reduction of quantal size by vesamicol (AH5183), an inhibitor of vesicular acetylcholine storage. Brain Res 385: 189-192, 1986
- 26) Edwards C, Dolezal V, Tucek S, et al: Is an acetylcholine transport system responsible for non-quantal release of acetylcholine at the rodent myoneural junction? Proc Natl Acad Sci USA 82: 3514-3518, 1985
- 27) Hoover DB, Muth EA, Jacobowitz DM: A mapping of the distribution of acetylcholine, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. Brain Res 153: 295-306, 1978
- 28) Satoh K, Armstrong DM, Fibiger HC: 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

Summary

Fundamental Study on Nuclear Medicine Imaging of Cholinergic Innervation in the Brain: Changes of Neurotransmitter and Receptor in Animal Model of Alzheimer's Disease

Hiroshi MATSUDA*, Keiko KINUYA*, Shiro TSUJI**, Hitoshi TERADA***, Kazuhiro SHIBA****, Hirofumi MORI****, Hisashi SUMIYA* and Kinichi HISADA*

*Department of Nuclear Medicine, Kanazawa University School of Medicine

**Department of Radiology, Toyama Medical Pharmaceutical University

***Department of Radiology, Ohashi Hospital, Toho University School of Medicine

****Radioisotope Center, Kanazawa University

A fundamental study was performed on the nuclear medicine imaging of cholinergic innervation in the brain. In a cholinergic denervation model prepared by producing an unilateral basal forebrain lesion in the rat, which is reported to be one of animal models of Alzheimer's disease, quantitative determination of acetylcholine in parietal cortices revealed statistically significant 31% decrease on an average in the ipsilateral side relative to the contralateral side to the lesion. In vitro receptor autoradiography showed no significant differences in total, M₁, and M₂ muscarinic acetylcholine receptors between the ipsilat-

eral and contralateral cortices to the lesion. Simultaneous mapping of presynaptic cholinergic innervation using ³H-2-(4-phenylpiperidino) cyclohexanol (AH5183) demonstrated significant 14% decrease of AH5183 binding on an average in the ipsilateral relative to the contralateral fronto-parieto-temporal cortices to the lesion. These results suggest that AH5183 is a promising ligand for mapping cholinergic innervation in nuclear medicine imaging.

Key words: cholinergic innervation, muscarinic acetylcholine receptor, acetylcholine, autoradiography, AH5183.