

# Fundamental Study on Assessment of Neurotransplantation Using Nuclear Medicine Imaging : The Effect of Vagal Autotransplantation in Rats with an Unilateral Lesion of Nucleus Basalis Magnocellularis

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9290">http://hdl.handle.net/2297/9290</a>

## 前脳基底核破壊モデルラットにおける迷走神経下神経節移植の核医学的検討

金沢大学医学部医学科核医学講座 (主任: 利波紀久教授)

市川 聡 裕

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) を代表とする痴呆性疾患は医学領域のみならず、緊急の対応を迫られる社会的問題ともなっている。AD に関しては現在のところ有効な治療法はなく、複数の遺伝子が関与する症候群として捉えられつつあるものの、その病態についても不明な点が多い。コリン作動性神経は学習、記憶といった脳の高次機能に関与していると言われており、AD 患者においてコリン作動性神経が減少することが知られている。また、脳機能の改善として脳神経移植による脳神経系の再構築の試みがモデル動物において盛んに試みられている。パーキンソン病モデル動物および臨床例においては機能の改善が多数報告されており、今後さまざまな神経変性疾患において有効な治療法の1つとなる可能性がある。本研究では、学習障害モデルの1つとされる一側前脳基底核 (nucleus basalis magnocellularis, NBM) 破壊モデルラットに対する迷走神経節の自家移植を行い、種々のオートラジオグラフィ法を用いてアセチルコリン (acetylcholine, ACh) 系の機能回復について評価するとともに、神経移植の核医学的評価の可能性について検討した。一側 NBM 破壊群、移植群、偽手術群の3群において1週間、2週間、4週間後の経時的に連続切片を作製し、イメージングプレートを用いたオートラジオグラフィによる評価を行った。 $^{99m}\text{Tc}$ -ヘキサメチル-プロピレンアミノキシム ( $^{99m}\text{Tc}$ -hexamethyl-propyleneamine oxime) による生体内脳血流分布画像化を一部の群について行い、 $^3\text{H}$ -キノクリジニルベンジレート ( $^3\text{H}$ quinuclidinyl benzilate) によるムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (muscarinic acetylcholine receptor, mAChR) 分布画像化、そのサブタイプ遺伝子として知られる m1, m2 の mRNA について特異的な  $^{35}\text{S}$  標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた組織内ハイブリダイゼーション法により m1, m2mAChR-mRNA 分布画像を作製した。ACh トランスポーター分布としてシナプス小胞トランスポーターのリガンドである  $^3\text{H}$ -ベサミコール ( $^3\text{H}$ vesamicol) および膜トランスポーターのリガンドである  $^3\text{H}$ -ヘミコリニウム-3 ( $^3\text{H}$ hemicholinium-3,  $^3\text{H}$ -HC-3) を用いて画像化を行った。これらの画像について関心領域における平均黒化度を算出し、患側/健側比による半定量的評価を行った。脳血流、mAChR, m1 および m2mAChR-mRNA については有意な変化を認めなかった。ACh トランスポーターのうちベサミコールにおいて一側 NBM 破壊群では皮質における患側/健側比で、1週間  $0.82 \pm 0.14$  ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )、2週間  $0.80 \pm 0.17$ 、4週間  $0.82 \pm 0.13$  と患側において有意に健側に比しての低下を認めた ( $p < 0.01$ )。移植群では、1週間  $0.87 \pm 0.15$ 、2週間  $0.87 \pm 0.16$ 、4週間  $0.90 \pm 0.12$  と経時的に患側/健側比の増加が認められ4週間において有意に破壊群と比しての改善を認めた ( $p < 0.05$ )。HC-3 においては有意な変化を認めなかった。

以上よりベサミコールを  $^{125}\text{I}$  などの放射性薬剤で標識しエミッションコンピュータ断層撮影法 (emission computed tomography) を用いることにより AD における神経移植あるいは薬物治療の評価への応用が期待される。

**Key words** vesamicol, Alzheimer's disease, vagal autotransplantation, cholinergic neuron, autoradiography

近年、わが国は急速な人口の高齢化をきたしているが、それに伴って、老年期痴呆、とくにアルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) が医学領域のみでなく、重大な社会的問題ともなっている。

AD の病理学的所見の中心は大脳皮質や皮質下に認められる老人斑や神経原線維変化といった異常蓄積構造物と、選択的な神経細胞の脱落である<sup>1,2)</sup>。老人斑は神経原線維変化に先行して出現し、神経化学的にはアミロイド  $\beta$  蛋白 (amyloid  $\beta$  protein, A $\beta$ ) の細胞外における異常蓄積であり<sup>3)</sup>、神経原線維変化は過

剰にリン酸化された、タウ蛋白が主成分<sup>4)</sup>といわれている。また、最近では、病因遺伝子探索の研究が精力的に進められており、AD は複数の遺伝子が関与する症候群として捉えられつつある<sup>5-12)</sup>。

一方、治療に関してはコリンエステラーゼ阻害薬、コリンやレシチンの脳室内持続投与などの薬物療法があるが<sup>13)</sup>、感情や行動面の周辺症状は治療できても知的機能障害を改善させる薬剤は現在のところ存在しない。もう1つの治療法として神経系移植による脳神経系の再構築があるが、その効果については不

平成8年11月28日受付、平成9年2月3日受理

Abbreviations: A $\beta$ , amyloid  $\beta$  protein; ACh, acetylcholine; AChE, acetylcholinesterase; AD, Alzheimer's disease; BBB, blood brain barrier; ChAT, choline acetyltransferase; ECT, emission computed tomography; HC-3, hemicholinium-3; HMPAO, hexamethyl-propyleneamine oxime; IP, imaging plate; mAChR, muscarinic acetylcholine

明な点が多く、治療の客観的評価法についても確立されていない。この神経移植の臨床応用に際し、その治療効果の客観的評価のために脳機能の生化学的マーカー、すなわち神経伝達物質・受容体などの変化を非侵襲的に評価できることが望まれる。特に AD 剖検例において著明な変化があると報告されているアセチルコリン (acetylcholine, ACh) 系<sup>10)</sup>の機能評価が重要と考えられる。その方法としては、エミッションコンピュータ断層撮影法 (emission computed tomography, ECT) が最も適していると考えられる。そこで本研究では、日本でも近年患者数が増加し社会問題となっている AD における神経移植の核医学的評価に関する基礎的研究を行った。

本研究では、AD モデルの1つとされる前脳基底核 (nucleus basalis magnocellularis, NBM) 破壊による学習障害モデルラットに対する迷走神経節の自家移植を行い、種々のオートラジオグラフィ法を用いて ACh 系の機能回復について評価するとともに、神経移植の核医学的評価の可能性について検討した。

### 対象および方法

#### I. モデル作成

対象は、雄性ドンリウラット、8-12週齢、250~350 g、計75匹 (三共ラボサービス、東京) を用いた。

##### 1. NBM 破壊群

エーテル麻酔後、5%抱水クロラル (1.5ml/200g 体重) を腹腔内に注射し、脳定位固定装置 Type SR-6 (成茂、東京) に固定した。キシロカインによる局部麻酔後、頭皮を切開し頭蓋骨を露出、歯科技工用ドリル (浦和工業、東京) にてプレグマ (前頂) 正中より Paxinos & Watson の図譜<sup>11)</sup>に従って右側 2.6mm、後方 0.8mm の部位に開窓した。開窓部より29ゲージカテラン針を深さ 7.3mm の位置に刺入し、微量注入装置 B-3373C (サミットメディカル、東京) を用いてマイクロリッターシリンジ 701-RN (ハミルトン、Reno, USA) よりイボテン酸 8 $\mu$ g/0.8 $\mu$ l を2分間かけて注入し、その後5分間静置してから針を抜去した。開窓部をボーンワックス (東京エムアイ商会、東京) にてふさいだ後、頭皮を縫合した。

##### 2. 移植群

神経移植は Ikeda らの方法<sup>12)</sup>に準じた。イボテン酸による破壊1週間後、抱水クロラルによる麻酔を行い板の上に背臥位に固定し前頸部に縦切開を行った。左総頸動脈を露出し背側の迷走神経を中枢側にたどって、内頸・外頸動脈分岐部より内頸動脈背側上方のレベルにある迷走神経下神経節を摘出しリン酸緩衝生理食塩液 (日水、東京) に保存した。頸部の術部を縫合してすぐさま脳定位固定装置に固定し頭蓋骨を露出、イボテン酸刺入部より約45度外側後方 3mm の部位にドリルで開窓し、極細ピンセットにて神経節を 5mm の深さに挿入した。開窓部をボーンワックスによりふさいだ後、頭皮を縫合した。

##### 3. 偽手術群

イボテン酸注入部と同様に、プレグマ正中より右側 2.6mm、後方 0.8mm の部位に開窓した。開窓部より29ゲージカテラン針を深さ 7.3mm の位置に針のみ刺入し、その後5分間静置し、偽手術群とした。

#### II. 切片作成

それぞれの群のラットに対して術後1, 2, 4週後にエーテル麻酔後断頭し、脳を摘出した。NBM 破壊群、移植群では10匹、偽手術群では5匹をそれぞれの時期に断頭した。脳を摘出後速やかにティッシュテック (Miles, Elkhart, USA) にて包埋しヘキサンドライアイスにて急速凍結し、クリオスタット HM505E (カールツァイス、東京) により 20 $\mu$ m の切片を作製した。プレグマより約 0.8mm 後方のイボテン酸注入部周辺、約 3mm 後方の移植部周辺の2部位にて連続切片を作製した。切片はゼラチン溶液 (40~45 $^{\circ}$ Cの水 10ml にゼラチン50mg、クロムミョーバン 5mg を混合) を塗布したスライドガラスに貼付し、脳血流分布用の切片を除き、オートラジオグラフィを施行するまでディープフリーザーにて凍結 (-80 $^{\circ}$ C) 保存した。

#### III. オートラジオグラフィ

##### 1. 脳血流分布

それぞれの群において2匹づつ断頭5分前に尾静脈より<sup>99m</sup>Tc-ヘキサメチルプロピレンアミンオキシム (<sup>99m</sup>Tc-hexamethyl-propyleneamine oxime, <sup>99m</sup>Tc-HMPAO) を185MBq 静注し、厚さ 20 $\mu$ m の切片を作製した。風乾した後、汎用イメージングプレート (imaging plate, IP) BAS-IP SR 2025 (富士写真フィルム、東京) に1時間露光した。

##### 2. ムスカリン作動性アセチルコリン受容体分布

ムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (muscarinic acetylcholine receptor, mAChR) 用リガンドの<sup>3</sup>H-キノクリジニルベンジレート (<sup>3</sup>H]quinuclidinyl benzilate, <sup>3</sup>H-QNB) を用いて受容体オートラジオグラフィを施行した<sup>17)</sup>。切片を 10mM EDTA を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中に室温にて30分間ブレインキュベーションを行い、1nM <sup>3</sup>H-QNB (1.61TBq/mmol, DuPont, Boston, USA), 1mM EDTA, 1mM N-エチルマレイמיד (N-ethylmaleimide) を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 中で室温3時間のインキュベーションを行い、4 $^{\circ}$ C 50mM リン酸緩衝液にて1分間洗浄を2回行った。乾燥後<sup>3</sup>H 専用IP BAS-TR 2025 (富士写真フィルム) に4日間露光した。

##### 3. mAChR-mRNA 分布

オリゴヌクレオチドプローブを用い、3'-オリゴヌクレオチドエンドラベリングシステムにより<sup>35</sup>S-dATP (51.1TBq/mmol, DuPont) にて3'末端を<sup>35</sup>S 標識し精製したのにより組織内ハイブリダイゼーションを行った<sup>18)</sup>。オリゴヌクレオチドプローブとしてラット mAChR プローブ NEN-545 (DuPont), ラット mAChRm2 プローブ NEN-546 (DuPont) を使用した。切片を4%ホルマリン 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4), 4 $^{\circ}$ Cで30分間固定し、4 $^{\circ}$ C, 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) で5分間洗浄した。これを200ml 中、塩化ナトリウム 1.8g, トリエタノールアミン 3ml, 無水酢酸 0.5ml を混合した溶液にて室温10分間のブレインキュベーションを行い、脱水、脱脂して乾燥させた。ハイブリダイゼーションバッファ (ダイアトロン、東京) 250 $\mu$ l, ジチオスレイトール (ダイアトロン) 5 $\mu$ l, <sup>35</sup>S 標識オリゴヌクレオチドプローブ 2 $\mu$ l, 約 100kBq を混合しハイブリダイゼーション液を調整した。スライドガラス上の1切片あたりハイブリダ

receptor; MP4A, 4-piperidyl acetate; NBM, nucleus basalis magnocellularis; NGF, nerve growth factor; PSL, photo-stimulated luminescence; PET, positron emission computed tomography; QNB, quinuclidinyl benzilate; SPECT, single photon emission computed tomography

イゼーション液を 250  $\mu$ l 滴下し切片全体に広がるようにパラフィルムをかぶせ、42°Cの湿箱中にて24時間インキュベーションを行った。SSC (pH 7.4) 中でパラフィルムをはがし、SSC に10分間置いた後、55°C、15分間の洗浄を4回行い、室温に10分間置いて脱水乾燥した。その後汎用 IP に2週間露光した。

4. ACh トランスポータ分布

2種類のリガンドを用いて ACh トランスポータ分布画像を作製した。ACh 再取り込み阻害薬でありシナプス小胞に特異的に結合する  $^3\text{H}$ -ベサミコール ( $^3\text{H}$ ]vesamicol) およびシナプス前膜のコリン再取り込み部位に特異的に結合する  $^3\text{H}$ -ヘミコリンニウム-3 ( $^3\text{H}$ ]hemicholinium-3,  $^3\text{H}$ -HC-3) を用いてオートラジオグラフィを行った。

1) ベサミコール

Alter らの方法<sup>19)</sup>に準じて、オートラジオグラフィを行った。120mM 塩化ナトリウム、5mM 塩化カリウム、1mM 硫酸マグネシウム、2mM 塩化カルシウムを含む 50mM トリス緩衝液 (pH7.6) に 1nM  $^3\text{H}$ -ベサミコール (1.11TBq/mmol, DuPont) を混入、1時間のインキュベーションを行った。その後同トリス緩衝液にて1分間の洗浄を3回行い、乾燥後  $^3\text{H}$  専用 IP に2週間露光した。

2) HC-3

Vickroy らの方法<sup>20)</sup>に準じて、オートラジオグラフィを施行した。120mM 塩化ナトリウム、4.8mM 塩化カリウム、1.2mM 硫酸マグネシウム、1.3mM 塩化カルシウム、10mM D-グルコースを含む 20.3mM リン酸緩衝液 (pH 7.14) 中にて25°Cで20分プレインキュベーションを行い、2.47nM  $^3\text{H}$ -HC-3 (4.50TBq/mmol) を含む上記リン酸緩衝液にて25°C、30分間のインキュベーションを行った。その後4°C同リン酸緩衝液で1分間を2回、蒸留水にて1回の洗浄を行った。乾燥後  $^3\text{H}$  専用 IP に2週間露光した。

IV. イメージ処理

それぞれ露光した IP をバイオイメージアナライザー BAS-5000 (富士写真フィルム) にて読み取った。解像度 25  $\mu\text{m}$   $\times$  25  $\mu\text{m}$ , 65536階調の高解像度のモードを使用し、読み取り後のデータはパワーマッキントシュ8500/120 (アップルコンピュータジャパン, 東京) に転送され、その後専用ソフト Image Reader Ver. 1.0 (富士写真フィルム) にてハードディスクに保存した。

V. 画像解析

それぞれのオートラジオグラフィ画像について専用解析ソフト MacBAS Ver.2.3 (富士写真フィルム) にて頭頂葉から側頭葉に相当する両側皮質に対して関心領域を設定し、1ピクセルあたりの平均黒化度を保存されたデータより算出し、患側/健側比を求めた。なお、イメージングアナライザーでは放射エネルギーに比例して蛍光 (photo-stimulated luminescence, PSL) を生成し、黒化度、すなわち蛍光強度は PSL 値 (PSL/mm<sup>2</sup>) として表示される。脳血流、 $^3\text{H}$ -ベサミコールについては局所ごとの平均黒化度も算出した。それぞれのモデル動物群に対してこれらの値について比較を行った (図1)。

VI. 統計処理

各群の患側/健側比についてそれぞれの時期ごとに平均および標準偏差を算出した。同時期の偽手術群と NBM 破壊群、NBM 破壊群と移植群間に対して Mann-Whitney の U 検定を用いて、危険率 5% 未満をもって有意とした。ベサミコールの局所についても Mann-Whitney の U 検定にて同様の評価を行った。

成 績

I. 脳血流分布

大脳皮質ではほぼ一様な分布を示し、大脳白質では皮質よりも低い黒化度であった。脈絡叢では皮質よりも高い黒化度を示

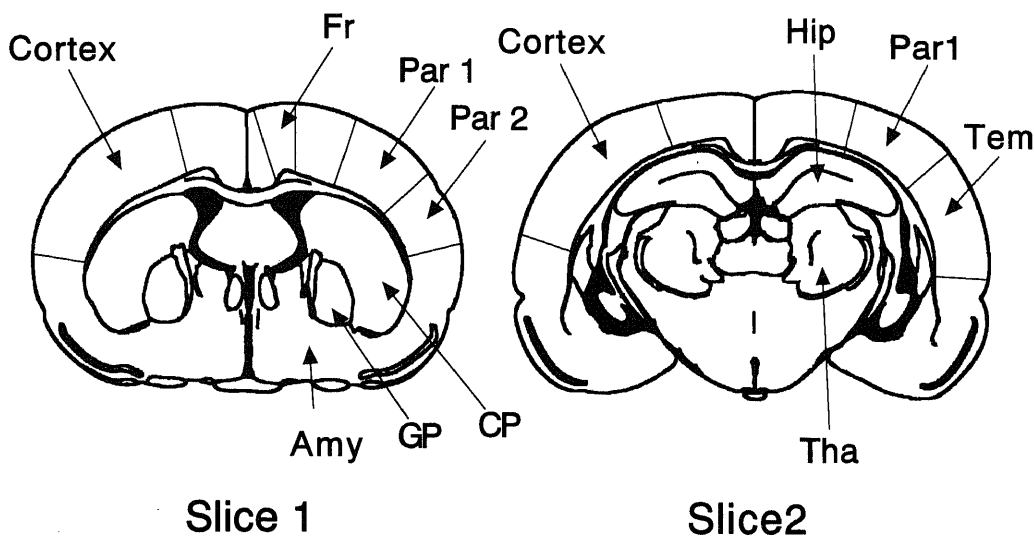


Fig. 1. The schema of two sections of coronal brain slices. The left side of figure is affected-side. Slice 1 is at the level of injection site of ibotenic acid. Slice 2 is at the level of the autotransplantation. The regions of interest (ROIs) were set in cortex of the affected side and unaffected side symmetrically and the affected-side/unaffected-side ratios were calculated from these mean photo-stimulated luminescence (PSL) rates. In the autoradiogram of  $^3\text{H}$ ] vesamicol, more ten segmental ROIs were set in the cortex of the affected side and unaffected side symmetrically. Fr, frontal lobe; Par, parietal lobe; Tem, temporal lobe; CP, caudate putamen; GP, globus pallidus; Amy, amygdaloid; Hip, hippocampus; Tha, thalamus.

し、深部構造についても著明な局所的な黒化度の分布差は尾状核線条体でわずかに高めなものほぼ皮質と同様な一様な分布を示した(図2).

対象数が少ないものの皮質については偽手術群, NBM 破壊群では患側/健側比に変化を認めなかった(図3). 移植群の1

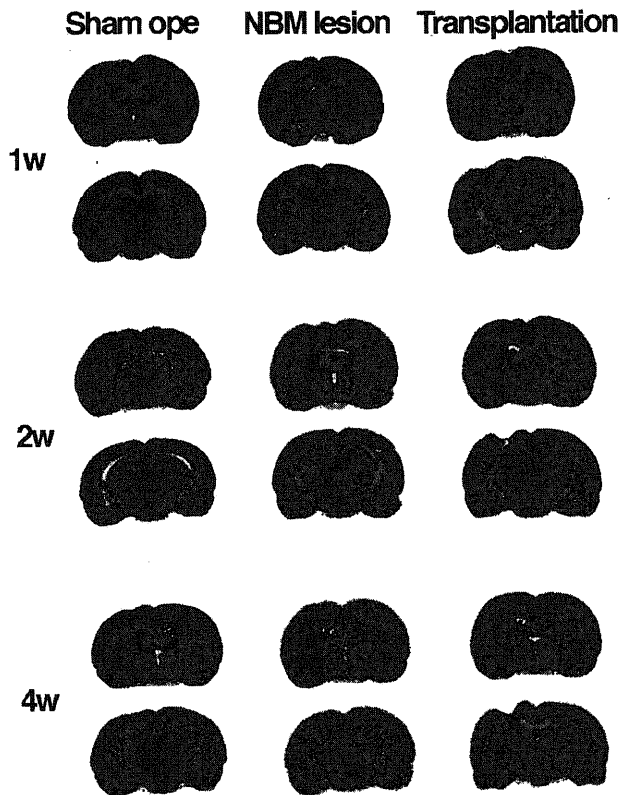


Fig. 2. Autoradiograms of the perfusion images using <sup>99m</sup>Tc-hexamethyl-propyleneamine oxime (<sup>99m</sup>Tc-HMPAO) in the coronal sections in duration of 1, 2 and 4 weeks (1w, 2w, 4w) after surgery. The upper slice of each duration is at the level of injection site of ibotenic acid. The lower slice is at the level of the autotransplantation. Sham ope, sham operation.

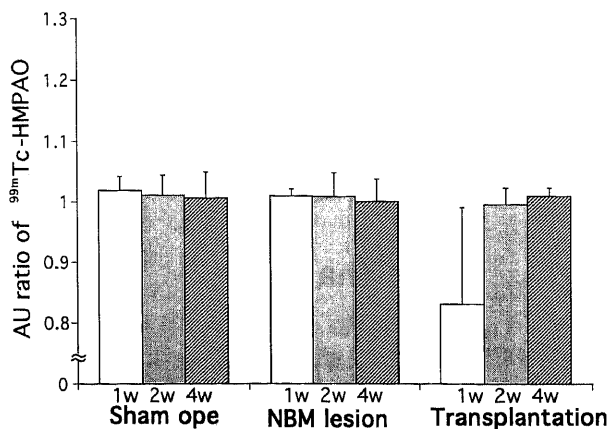


Fig. 3. Changes in the affected-side/unaffected-side ratio (AU ratio) of the photo-stimulated luminescence in the cortex on the autoradiogram of the perfusion images using <sup>99m</sup>Tc-HMPAO.

週間では低下傾向を示したが、1例で侵襲によると思われる急性の変化が生じておりこれによる低下が考えられた.

II. mAChR 分布

皮質の患側/健側比において偽手術群, NBM 破壊群, 移植群共に変化については画像上視覚的に有意差を認めなかった(図4). 数値上も有意な変化は認められなかった(図5). しかし偽手術群にては急性期の増加およびその後の低下傾向が認められた. NBM 破壊群, 移植群では急性期での低下傾向およびその後の増加傾向が認められたが1週間後の低下は移植群にて

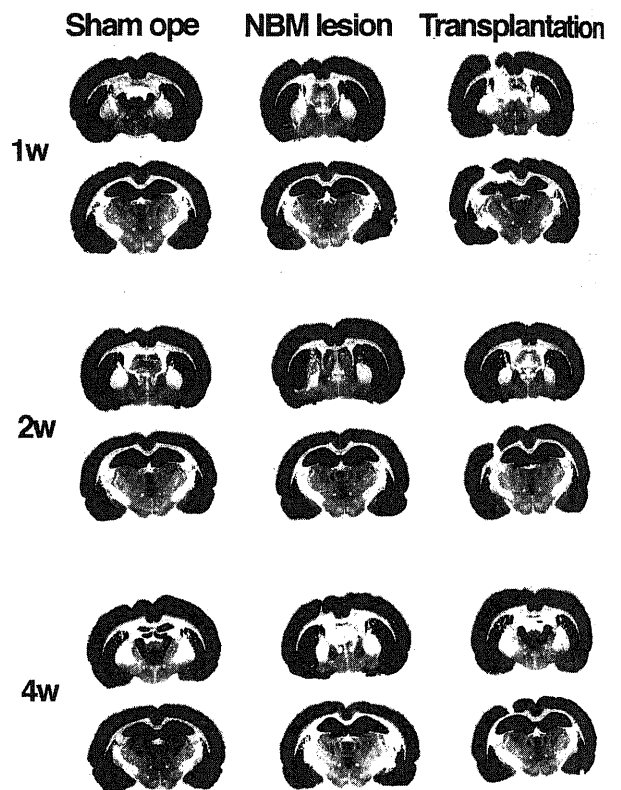


Fig. 4. Autoradiograms of [<sup>3</sup>H] quinuclidinyl benzilate (<sup>3</sup>H-QNB) binding sites in the coronal sections.

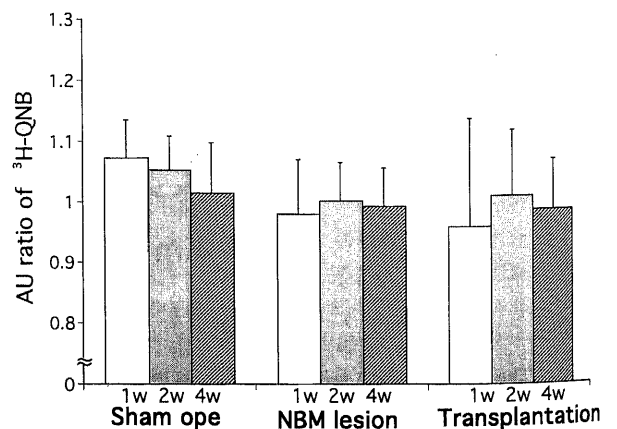


Fig. 5. Changes in the affected-side/unaffected-side ratio (AU ratio) of the photo-stimulated luminescence in the cortex on the autoradiogram of <sup>3</sup>H-QNB binding sites.

わずかに大きかった。

Ⅲ. mAChR-mRNA 分布

1. m1mAChR-mRNA 分布

皮質の患側/健側比において偽手術群, NBM 破壊群, 移植群共に変化については画像上明らかな変化は認められず (図 6), 数値上も有意差を認めなかった (図 7). 傾向としてはいずれの群においても増加傾向を示した. 移植群では 1 週間で増加傾向, その後は漸減傾向がみられた.

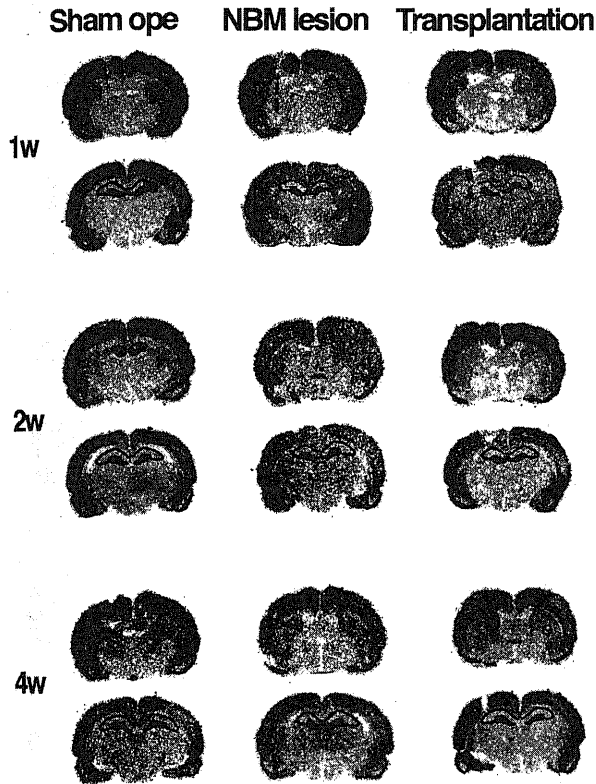


Fig. 6. Autoradiograms of m1-muscarinic acetylcholine receptor-mRNA (m1mAChR-mRNA) *in situ* hybridization in the coronal sections.

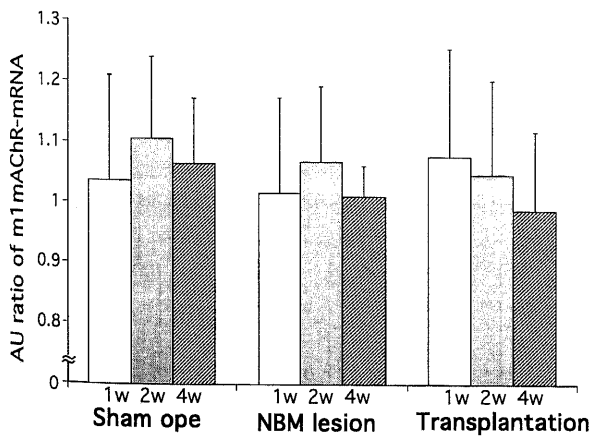


Fig. 7. Changes in the affected-side/unaffected-side ratio (AU ratio) of the photo-stimulated luminescence in the cortex on the autoradiogram of m1mAChR-mRNA *in situ* hybridization.

2. m2mAChR-mRNA 分布

皮質の患側/健側比においていずれの群についても画像上明らかな変化は認められず (図 8), 数値上も有意差を認めなかったが全体的には早期で低下傾向を示した. 移植群にては低下傾向が 4 週間後まで持続していた (図 9).

Ⅳ. ACh トランスポータ分布

1. ベサミコール

偽手術群において皮質における患側/健側比では 1 週間

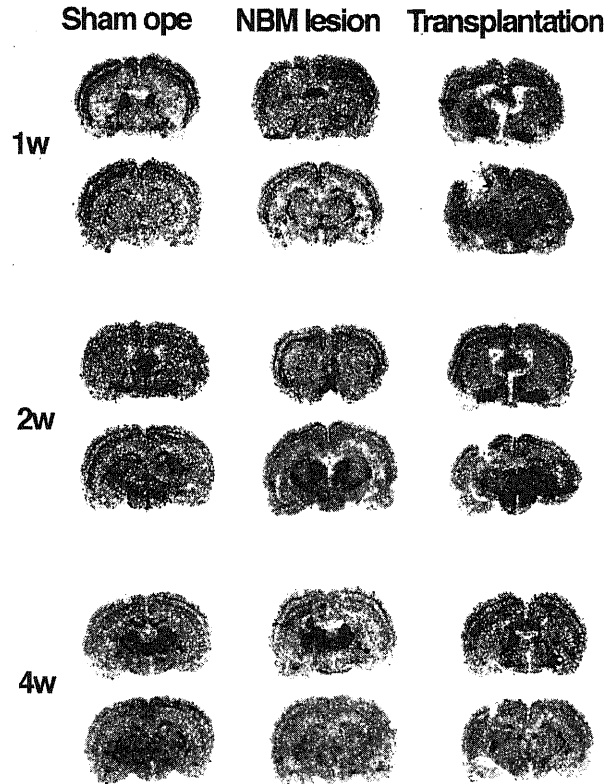


Fig. 8. Autoradiograms of m2mAChR-mRNA *in situ* hybridization in the coronal sections.

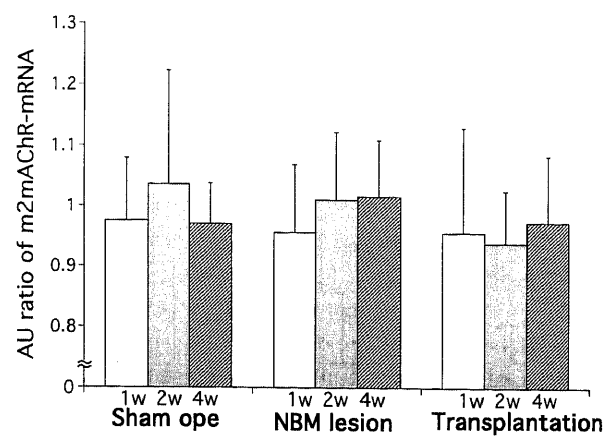


Fig. 9. Changes in the affected-side/unaffected-side ratio (AU ratio) of the photo-stimulated luminescence in the cortex on the autoradiogram of m2mAChR-mRNA *in situ* hybridization.

0.99±0.06 (̄±SD), 2週間0.99±0.05, 4週間0.98±0.07であった。NBM破壊群では1~4週間まで偽手術群と比して有意な患側/健側比の減少を認めた (p<0.01)。患側/健側比では1週間0.82±0.14, 2週間0.80±0.17, 4週間0.82±0.13であり1~4週間まで患側で約20%の低下を認めた。移植群では患側/健側比は, 1週間0.87±0.15, 2週間0.87±0.16, 4週間0.90±0.12となり1週間での低下は破壊群に比して少なく, また経時

的に患側/健側比の増加が認められた。4週間においては有意に破壊群と比しての改善を認めた (p<0.05) (図10, 11)。

ベサミコールに関しては局所にも関心領域を設定し検討を行った (表1)。偽手術群では全般的に線条体にて増加傾向を示したが他の部位では著明な変化は認められなかった。NBM破壊群では皮質については頭頂葉での低下が強く側頭葉ではほとんど低下は認められなかった。早期に淡蒼球, 扁桃体において低

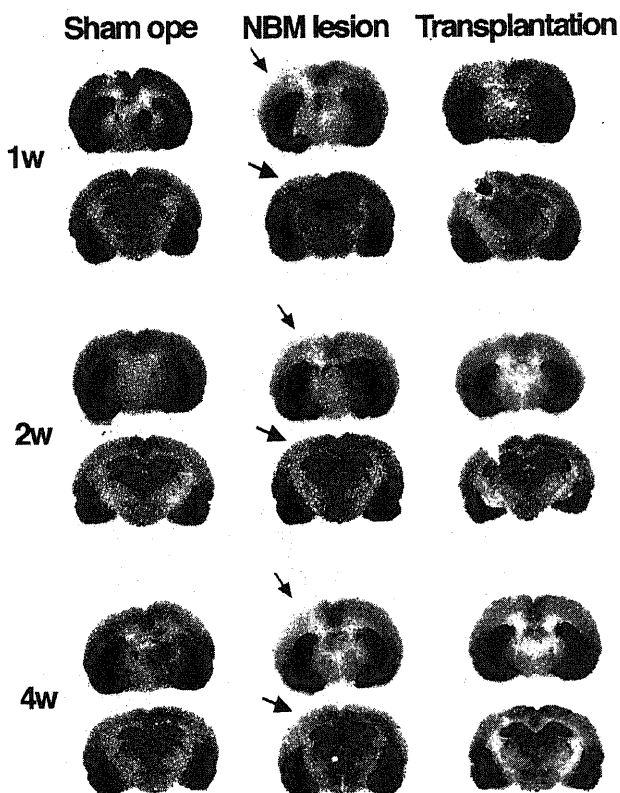


Fig.10. Autoradiograms of <sup>3</sup>H vesamicol binding sites in the coronal sections. Decrease of <sup>3</sup>H vesamicol binding in the affected cortex of rats of NBM lesion is pointed out by arrows.

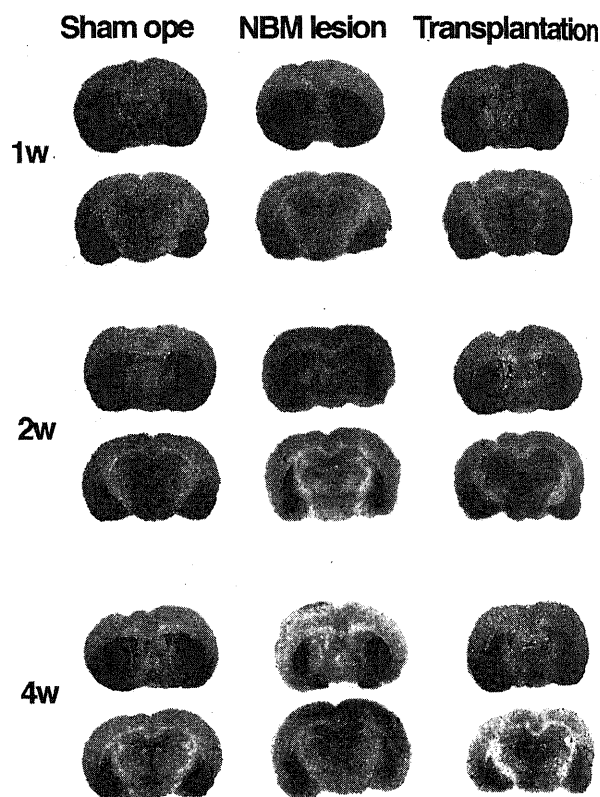


Fig.12. Autoradiograms of <sup>3</sup>H hemicholinium-3 (<sup>3</sup>H-HE-3) binding sites in the coronal sections.

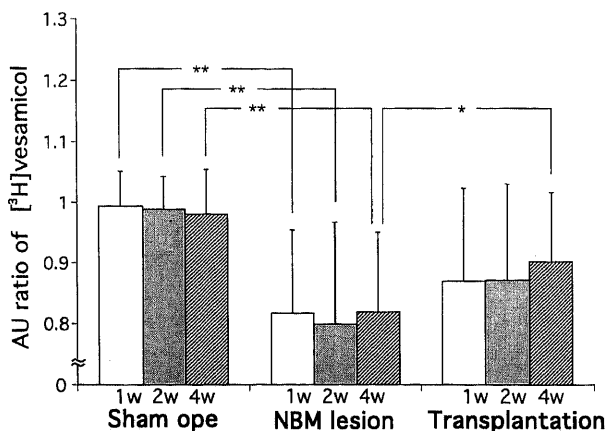


Fig.11. Changes in the affected-side/unaffected-side ratio (AU ratio) of the photo-stimulated luminescence in the cortex on the autoradiogram of <sup>3</sup>H vesamicol binding sites. \*P<0.05, \*\*P<0.01 by Mann-Whitney U-test.

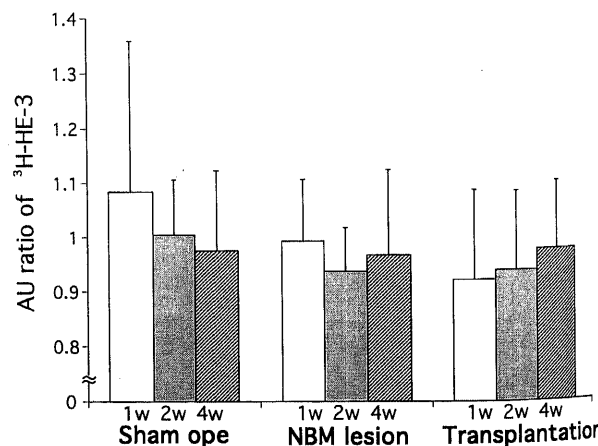


Fig.13. Changes in the affected-side/unaffected-side ratio (AU ratio) of the photo-stimulated luminescence in the cortex on the autoradiogram of <sup>3</sup>H-HE-3 binding sites.

Table 1. The affected-side/ unaffected-side ratio of [<sup>3</sup>H] vesamicol binding

Location	Duration (week)	AU ratio (x±SD) of [ <sup>3</sup> H] vesamicol binding of group		
		Sham ope (n=5)	NBM lesion (n=10)	Transplantation (n=10)
Frontal	1	0.98±0.05	0.86±0.13*	0.79±0.13
	2	0.93±0.06	0.90±0.14	0.90±0.11
	4	0.99±0.07	0.94±0.16	0.93±0.12
Parietal 1	1	0.98±0.08	0.80±0.15*	0.82±0.13
	2	0.99±0.08	0.77±0.18*	0.82±0.16
	4	1.00±0.10	0.76±0.14*	0.86±0.14 <sup>#</sup>
Parietal 2	1	1.06±0.06	0.86±0.14*	0.95±0.14
	2	0.99±0.08	0.82±0.20*	0.89±0.18
	4	1.02±0.08	0.84±0.15*	0.95±0.12 <sup>#</sup>
Temporal	1	0.96±0.03	0.98±0.10	1.10±0.19
	2	1.03±0.08	0.98±0.27	1.02±0.22
	4	1.08±0.07	0.92±0.10	1.02±0.09 <sup>#</sup>
Caudate putamen	1	1.21±0.41	1.05±0.22	0.75±0.18 <sup>#</sup>
	2	1.12±0.16	0.86±0.14*	1.09±0.30
	4	1.24±0.17	1.10±0.39	0.98±0.25
Globus pallidus	1	1.02±0.13	0.84±0.11*	0.75±0.06
	2	1.05±0.05	0.88±0.20	0.95±0.17
	4	1.00±0.16	0.94±0.26	0.93±0.17
Amygdaloid	1	0.93±0.13	0.85±0.12	0.87±0.18
	2	1.01±0.12	0.85±0.09*	0.96±0.15
	4	1.04±0.06	0.95±0.22	0.94±0.08
Thalamus	1	1.04±0.06	1.00±0.05	0.91±0.12
	2	1.03±0.06	1.09±0.14	1.03±0.09
	4	1.08±0.10	1.04±0.13	1.01±0.08
Hippocampus	1	1.01±0.03	1.02±0.08	0.89±0.09 <sup>#</sup>
	2	0.98±0.08	1.02±0.06	1.01±0.14
	4	1.01±0.07	1.02±0.05	0.97±0.11

AU ratio, affected-side/ unaffected-side ratio ; Sham ope, sham operation.

\* p<0.05, sham ope versus NBM lesion ; <sup>#</sup> p<0.05, NBM lesion versus transplantation by Mann-Whitney U test.

下を認めたが同部では4週間後で改善傾向を認めた。頭頂葉の低下は4週間後にも持続していた。海馬、視床では著明な変化を認めなかった。移植群では皮質の低下は経時的に全般的に改善していたが NBM 破壊群の低下部位の辺縁においての改善が強かった。また1週間後において NBM 破壊群に比して被殻、海馬での有意な低下が認められた。

2. HC-3

皮質の患側/健側比において偽手術群, NBM 破壊群, 移植群共に変化については画像上明らかな変化は認められなかった(図12)。数値上は移植群ではベサミコールと同様の傾向を示したものの、いずれの群でも有意差は示されなかった(図13)。

考 察

神経細胞は分化した細胞であり、分裂・増殖ができない。特に、中枢神経系である脳神経細胞は再生能力が弱いため、ひとたび障害されると変性・死滅し、その結果機能の脱落がおこり、各種神経伝達物質の減少・欠損が生じる。パーキンソン病では中脳黒質のドーパミン細胞<sup>29)</sup>、AD では前脳基底部マイネルト

核の ACh 細胞<sup>29)</sup>、ハンチントン舞踏病では線条体γ-アミノ酪酸細胞<sup>29)</sup>などが主病変と考えられ、これらの疾患では、失われた神経伝達物質を体外から補充する薬物療法が試みられている<sup>30)</sup>。しかし、生体内での神経伝達物質とは異なり、過剰放出やそれに伴う受容体の減少などが生じ、長期薬物療法に疑問が投げかけられている。このような補充療法に替わって、失われた神経細胞を脳内に移植して、より生理的な状態で神経伝達物質を放出させ、失われた神経回路網を修復させる試みが世界中で精力的に行われており、21世紀における神経変性疾患などに対する有力な治療法の一つとして期待されている<sup>16)24) 30)</sup>。今回の実験においては AD モデルに対して移植を試みたが、これまでに AD モデル動物として、1) イボテン酸やカイニン酸で霊長類のマイネルト核に相当する NBM を破壊したラット<sup>31)32)</sup>、2) Aβ を脳室に連続投与したラット<sup>33)</sup>、3) クエン酸アルミニウムの慢性経口投与<sup>34)</sup>、4) 3-プロモピルベート (3-bromopyruvate) を脳室に投与したラット<sup>35)</sup>、5) 神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) レセプタのモノクローナル抗体である 192-サボリンを脳室に投与したラット<sup>36)</sup>、6) ヒトのアセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase, AChE) を発現



するトランスジェニックマウス<sup>37)</sup>, 7) ヒトのアミロイド前駆体蛋白質 (amyloid precursor protein) を過剰に発現するトランスジェニックマウス<sup>38)</sup>などが報告されている。しかしながら真のADモデルはまだ開発されていないといってもよい。そこで、痴呆の症状の一つである学習障害のモデルとして手技の確立されている、イボテン酸によるNBMを破壊したラットを用いて実験を行った。このNBM破壊ラットは、神経心理学的には自発活動量の著明な増加、受動回避反応における記憶保持障害および迷路テストの学習能力低下が報告されており<sup>19)</sup>, ADの病態の一部を反映していると考えられる。

ADモデル動物における神経移植法として、1) 胎仔前脳基底核<sup>26)</sup>, 2) 迷走神経下神経節<sup>19)</sup>, 3) NGFなどの神経栄養因子, コリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase, ChAT)などを過剰分泌する細胞株あるいは遺伝子導入細胞を移植する方法<sup>29-30)</sup>がある。Itakuraら<sup>27)</sup>は、臨床応用を重んじる観点から、胎仔脳の使用を避け、NBM破壊ラットを用いて、自家副交感神経節である迷走神経節の脳内移植を行い、移植片中にACh含有細胞が多数生着しており、自発活動量は減少し、記憶保持障害・学習能力障害も減少したと報告している。また、Ikedaら<sup>19)</sup>は、迷走神経節の移植により脳内のChATおよびAChEレベルの改善ならびに事象関連電位 (event-related potential) の改善を報告した。そこで、今回は拒否反応がなく、生着性が比較的高い迷走神経下神経節の自家移植を行った。

ADにおいては種々の神経の脱落が認められるが、高次神経系に関与すると考えられているACh系を今回対象とした。オートラジオグラフィを行うにあたって、ACh, ChATおよびAChEの画像化については安定性の問題により困難でありmAChRおよびAChトランスポータについて評価を行った。

近年、分子生物学の進歩により、mAChRに対するcDNAのクローニングがなされ、その一次構造および分子多様性が明らかにされ、mAChRは5つのサブタイプ、すなわちm1~m5に分類されている<sup>39-41)</sup>。サブタイプm1については皮質では主に後シナプスにあり神経伝達そのものに関与しており、またm2については皮質では前シナプスに存在し自己調節に関与しているといわれているが<sup>41)</sup>、これらの働きには依然として不明な点が多い。Mashら<sup>42)</sup>は、ADモデルの一つとされるNBM破壊モデルおよびAD患者の脳皮質においてm1レセプタは変化しないがm2レセプタの数が減少すると報告している。一方、Wangら<sup>43)</sup>はAD患者においてm2, m3およびm4のAChR-mRNAの変化は認められないが、側頭葉および後頭葉でm1AChR-mRNAが減少すると報告している。このようにNBM破壊モデルなどにおけるmAChRおよびそのmRNAの変化に関する報告は多いが<sup>42-46)</sup>、必ずしも結果は一致しない。このような不一致は測定方法、病期などの相違が関与していると考えられる。今回の実験では、いずれの群においてもmAChRおよびそのmRNAのサブタイプm1, m2に関しては有意な変化を認めなかったが、傾向としてはm1では全般的に増加傾向があり、神経除去に伴うAChの欠乏に対する神経除去性過敏 (denervation hypersensitivity) の状態を反映し、移植群での継続的な低下傾向はAChレベルの改善を反映している可能性がある。m2では早期にて全般的に低下傾向を示し、前シナプスの障害を反映している可能性が考えられた。<sup>3</sup>H-QNBについては、m1mAChRとm2mAChRの両方に結合するリガンドであ

り両者の変化を反映していると考えられるが、その発現の時期、蛋白合成率など多数の要因が関与するため今後の検討が必要と考えられる。

一方、ベサミコールにおいては、NBM破壊モデルにおいて破壊側にて著明な黒化度の低下を認めた。ベサミコールは小胞に存在するAChトランスポータに特異的に結合するリガンドであるが、この著明な減少の原因としては、起始核の障害による脳皮質のAChトランスポータの減少が考えられる。このことはNBMよりの投射領域である頭頂葉にて低下が著明であったことから説明される。移植に際しては経時的にNBM破壊群に比して有意に増加し、これまでのChATおよびAChEレベルの改善の報告とあわせて移植による効果を反映しているものと考えられる。移植による増加の原因としてはシナプス数自体の増加およびACh再取り込みの増加の2つの要因が考えられるが、その詳細については再考が必要である。なお、NBM破壊群において頭頂葉皮質での低下が主であり他の部位では基本的には目立った低下は認められなかったが、早期にて淡着球、扁桃体においての低下が認められた。その後改善傾向を示しておりこれに関しては何らかの一過性の反応性変化の可能性が。移植群においては早期に被殻、海馬での減少が認められたが経時的に改善しており、同部については移植部位に近いこともあり侵襲による変化が考えられる。

HC-3はシナプス前膜のトランスポータのリガンドであるが、今回の実験では有意な変化を認めなかった。この原因としては非特異的な結合が同薬剤においては高く、また薬剤としての安定性の問題、<sup>3</sup>H標識のため比放射能が少ないことも関係していると考えられる。個々のイメージに関しては同一個体についてベサミコールと基本的には大きな解離はなかったがイメージに関してはベサミコールと比して劣っておりそれ以上の情報は得られなかった。

神経移植による機能回復のメカニズムに関しては、パーキンソン病モデル動物を用いた研究では、以下のように考えられている<sup>47-49)</sup>。すなわち、経時的に1) 移植細胞の生着、2) 神経伝達物質の増量、3) 前シナプスへの再取り込み、4) レセプタ活性の正常化、5) 神経回路の再建、6) 神経栄養因子の産生・放出による宿主ニューロンの生存・再生 (移植組織が活性物質を放出し宿主ニューロンの生存・再生・発芽を高める)、7) 軸索伸展の橋渡しが生じる。ただし、移植細胞の軸索はせいぜい1~2mmぐらしか伸びず、脳内で数mm以上はなれた部位まで軸索を投射させようとするときは、細胞表面に突起伸展の足がかりとなるような基質分子を発現する細胞を移植し、軸索伸展の足がかりを与える必要がある<sup>50)</sup>。1) から3) は神経伝達機構の前シナプス終末の要因、4) と5) はシナプス後膜の要因であり、神経移植により両機構が修復されると考えられている。NBMモデルにおける迷走神経下神経節移植でも同じようなメカニズムが働いて神経組織の再構築がなされているかどうかは、今後の検討が必要がある。

今回の実験においては、イメージアナライザーによるオートラジオグラフィによる評価を行った。この方法の利点としてこれまでのX線フィルムによるオートラジオグラフィと比して感度の高さと計数率との直線性による定量性の良さがあげられる。また脳局所ごとの解析が可能であり、もともとデジタルデータであるため数値化して扱えるのも利点といえる。また将来的に臨床でのECTを用いた画像化を考えた場合、方法的に

共通点も多く、この指標となると考えられる。しかし今回捉えることはできなかったが QNB, m1mAChR-mRNA, m2mAChR-mRNA に関しても微量な変化は生じている可能性は十分考えられるが、この点については今回の測定系をもってしても測定できなかった。微量な変化の解析については使用する放射性核種の比放射能、薬剤の結合の特異性について再考する必要がある。また方法の煩雑さ、黒化度のばらつき、測定精度の問題により、今回は患側/健側比による相対的評価となったが絶対値の算出法の確立が望ましいと考えられる。

現在、中枢神経系の画像診断としては形態的評価および局所脳血流の評価が主体であり、神経移植に関する単光子エミッションコンピュータ断層撮像法 (single photon emission computed tomography, SPECT) およびポジトロンエミッション断層撮像法 (positron emission computed tomography, PET) に関する報告は国内外ともに少なく、パーキンソン病およびハンチントン舞踏病における PET による臨床的評価がいくつか認められるのみで<sup>51)-56)</sup>、AD に関する臨床的評価並びにその基礎的研究はみあたらない。しかし臨床において痴呆、変性疾患などをふまえて高次脳機能の評価の必要性が今後重要となると考えられる。今回対象数は少ないものの脳血流においてはそれぞれの群において有意な変化を認めなかった。現在、臨床における脳血流 SPECT では、ある程度進行した AD において頭頂側頭葉の血流低下が知られている。しかし今回の結果よりは初期の AD の診断については脳血流のみの評価では不十分と考えられる。AD において血流の低下は神経細胞の脱落のち、血液需要の低下に伴い生じると考えられるが、あくまで種々の神経伝達物質代謝の変化に伴う二次的な変化を見ているに過ぎない。今回の実験においては 4 週間後までと比較的早期での評価であり、NBM 破壊後長期的には変化が生じる可能性はあるが、少なくとも移植の効果判定には不十分であった。

シナプスの情報伝達は、前シナプスにおける神経伝達物質の合成、分解、貯蔵、放出、再取り込み、後シナプスにおけるレセプターへの結合などの過程により巧みに制御され、これによって高次機能を初めとする脳の諸機能が発現される。脳機能診断としては、神経伝達物質代謝、酵素活性、トランスポーター、レセプター、セカンドメッセンジャーのイメージングだけでなく、核医学的方法による定量的診断すなわち種々の解析モデルに基づく動態解析の可能性も考えられる。錐体外路性疾患 (パーキンソン病、ハンチントン舞踏病など)、精神疾患 (精神分裂病、躁うつ病) におけるドーパミン系に関する研究は多いが<sup>57)-62)</sup>、AD に関する報告は少ない。コリンと AD との関連性は、Pope ら<sup>63)</sup>による死後脳の生化学的分析の報告がはじめてなされ、特に大脳皮質、海馬での ChAT, AChE の著明な減少が示されている。したがって、ChAT あるいは AChE の画像化が可能になれば最も優れた診断法となる。一般的に酵素活性を核医学的手法により画像化するためには酵素と反応する基質を放射性核種で高率に標識合成でき、かつ自由に脳血液関門 (blood brain barrier, BBB) を通過し反応後の生成物が脳内に留まる性質を有しなければならない。しかし、ChAT に関しては、自由に BBB を通過するような基質がないため、標識合成は困難と考えられる。AChE に関しては、Irie ら<sup>64)</sup>は ACh の人工類似体である 4-ピペリジルアセテート (4-piperidyl acetate, MP4A) の N-メチルの炭素を <sup>14</sup>C で標識した <sup>14</sup>C-MP4A を合成し、ポジトロン核種である <sup>11</sup>C で標識すれば PET に応用できると報告しているが、

血中で非常に不安定であり定量的評価に関しては検討すべき点がいくつか残されている。神経伝達物質代謝用薬剤は L-ドーパのように BBB を通過する前駆物質がないため合成が困難であり、核医学的な ACh 代謝に関する報告はみあたらない。また、mAChR 用薬剤としていくつか開発されているが、NBM 破壊モデルラットでは mAChR, m1mAChR-mRNA および m2mAChR-mRNA で有意な変化を認めず、AD の診断には有効とは考えられない。シナプス前膜に存在する ACh トランスポーターの画像化は、HC-3 は水溶性であるため BBB を通過できないだけでなく、放射性標識 HC-3 は比較的不安定であり短期間で分解しやすい性質を有する。一方、シナプス小胞の ACh トランスポーターに特異的に結合するベサミコールは NBM 破壊モデルラットで減少し、迷走神経節移植により回復し、かつ BBB を自由に通過できる。また <sup>125</sup>I で標識したベサミコールが開発され<sup>65)</sup>、経静脈投与にても同様の分布を示すことが報告されている。これらよりベサミコールはヒトにおける AD の病態解明、進行度の評価において有用であると考えられる。また近い将来治療法が確立された場合、ベサミコールは AD の神経移植あるいは薬物治療の評価に最も有力なリガンドと考えられるため、<sup>125</sup>I 標識化により SPECT への応用が期待される。

## 結 論

AD モデルの一つとされる一側 NBM 破壊モデルラットにおいて迷走神経下神経節の移植を行い、脳血流および ACh 系に関してオートラジオグラフィによる評価を行った。<sup>99m</sup>Tc-HMPAO による脳血流、<sup>3</sup>H-QNB による mAChR 分布、<sup>35</sup>S 標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた m1 および m2mAChR-mRNA 分布、<sup>3</sup>H-ベサミコールおよび <sup>3</sup>H-HC-3 によるトランスポーター分布を 1, 2, 4 週間にわたって経時的に比較検討し以下の知見を得た。

1. 生体内脳血流分布では NBM 破壊モデル、移植モデルともに有意な変化は認められず、ACh 系の画像診断に脳血流はほとんど影響しないことがわかった。

2. QNB, m1 および m2mAChR-mRNA による AChR 関連の分布は、NBM 破壊群の患側皮質において m1mAChR-mRNA の増加傾向、m2mAChR-mRNA の減少傾向を示し、それぞれ神経除去性過敏および低下を反映し、また移植により改善傾向を示したことから移植による ACh レベルの改善が示唆されたが、患側/健側比はいずれも有意差を認めず、画像診断への応用は困難と考えられた。

3. シナプス小胞 ACh トランスポーターのリガンドである <sup>3</sup>H-ベサミコールにおいて NBM 破壊群で患側側の皮質において有意な低下を認め ( $p < 0.01$ )、起始核の障害による皮質の ACh トランスポーターの減少が考えられ、NBM よりの投射領域である頭頂葉において低下が著明であった。また移植群では NBM 破壊群に比して経時的に増加し、4 週間後において有意な改善を認め ( $p < 0.05$ )、移植による効果を反映していることが示された。

4. 膜 ACh トランスポーターのリガンドである <sup>3</sup>H-HC-3 による分布は、<sup>3</sup>H-ベサミコールと類似の傾向を示したが、非特異的結合が高く良好な画像を得られないため、患側/健側比で有意差は認められなかった。またそのままでは BBB を通過できないため、画像診断のための放射性薬剤の合成には特別な工夫

が必要と考えられた。

以上の治験より、ADにおける神経移植の核医学的評価法としては、ベサミコールによるシナプス小胞 ACh トランスポーター・イメージングが最も適しており、<sup>125</sup>I で標識することにより SPECT イメージングが期待される。

#### 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利波紀久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 厚文教授、柴 和弘助手、金沢大学核医学講座隅屋 寿助手、絹谷啓子先生、久慈一英助手並びに教室員各位、金沢大学医学部保健学科辻 志郎助教授に深く感謝致します。

また本研究にあたり脳神経移植、脳機能解剖に関し御指導、御協力頂いた金沢大学脳神経外科池田清延講師に深く感謝致します。

なお本論文の一部は、第35回日本核医学会総会(1995年横浜)、第36回日本核医学会総会(1996年京都)にて発表を行った。

#### 文 献

- 1) 平野朝雄. 神経病理を学ぶ人のために, 第3版, 370-373頁, 医学書院, 東京, 1992
- 2) Terry RD, Peck A, DeTeresa R, Schechter R, Horoupian DS. Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. *Ann Neurol* 10: 184-192, 1981
- 3) Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature* 324: 733-736, 1987
- 4) Kondo J, Honda T, Mori H, Hamada Y, Miura R, Ogawara M, Ihara Y. The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1: 827-834, 1988
- 5) George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinski RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D, Growdon J, Bruni A, Foncin JE, Salmon D, Frommelt P, Amaducci L, Sorbi S, Placentini S, Stewart GD, Hobbs WJ, Conneally PM, Gusella JF. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235: 885-890, 1987
- 6) Goate AM, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704-706, 1991
- 7) Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, Potter H, Heston LL, Mortin GM. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258: 668-671, 1992
- 8) Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923, 1993
- 9) Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance MA, Englund J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: High-avidity binding to  $\beta$ -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1977-1981, 1993
- 10) Levy-Lahad E, Wasco W, Pookaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC, Fu YH, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269: 973-977, 1995
- 11) Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, Mar L, Sorbi S, Nacmias B, Placentini S, Amaducci L, Chumakov I, Cohen D, Lannfelt L, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376: 775-778, 1995
- 12) Sherrington R, Rogaeva EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-760, 1995
- 13) 植木昭紀. 痴呆の動物モデル. 痴呆の生物学(日本生物学的精神医学会編), 第1版, 163-181頁, 学会出版センター, 東京, 1994
- 14) Pope A, Hess HH, Lewin E. Microchemical pathology of the cerebral cortex in presenile dementias. *Trans Am Neurol Assoc* 89: 15-16, 1964
- 15) Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed, Academic Press Inc, San Diego, 1986
- 16) Ikeda K, Egashira T, Yamashita J, Okoyama S. Effect of vagal autotransplantation and bifemoral hydrochloride on cholinergic markers and event-related potentials in rats with lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Brain Res* 688: 171-183, 1995
- 17) Mash DC, Potter LT. Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. *Neuroscience* 19: 551-564, 1986
- 18) 久慈一英. 局所脳虚血に対するムスカリン作動性アセチルコリン受容体および mRNA の経時的変化についての核医学的研究. 十全医会誌 103: 252-264, 1994
- 19) Alter CA, Marien MR. [<sup>3</sup>H] Vesamicol binding in brain: autoradiographic distribution, pharmacology, and effects of cholinergic lesions. *Synapse* 2: 486-493, 1988
- 20) Vickroy TW, Roeske W, Gehlert DR, Wamsley JK, Yamamura H. Quantitative light microscopic autoradiography of [<sup>3</sup>H] hemicholinium-3 binding sites in the rat central nervous system: a novel biochemical marker for mapping the distribution of cholinergic nerve terminals. *Brain Res* 329: 368-373, 1985
- 21) Kopin IJ. Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. *In* BW Agranoff, RW Alers, PB Molinoff (eds), *Basic Neurochemistry*, 5th ed, p899-918, Raven Press, New York, 1993

- 22) Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215: 1237-1239, 1982
- 23) Crossman AR, Mitchell IJ, Sambrook MA. Chorea and nucleons in the monkey induced by gamma-aminobutyric acid antagonism in the lentiform complex. *Brain* 111: 1211-1233, 1988
- 24) Brundin P, Lindvall O. Transplantation in Parkinson's disease. In O Lindvall (ed), *Restoration of Brain Function by Tissue Transplantation*, 1st ed, p5-17, Springer-Verlag, Berlin, Heidenberg, 1993
- 25) Bjorklund A, Wictorin K. Transplantation in Huntington's disease: Experimentation basis and clinical perspectives. In O Lindvall(ed), *Restoration of Brain Function by Tissue Transplantation*, 1st ed, p19-26, Springer-Verlag, Verlin, Heidenberg, 1993
- 26) Dunnet SB, Tonolio G, Fine A, Ryan CN, Bjorklund A, Iversen SD. Transplantation of embryonic ventral forebrain neurons to the neocortex of rats with lesions of nucleus basalis magnocellularis. II. sensorimotor and learning impairments. *Neuroscience* 16: 787-797, 1985
- 27) Itakura T, Umemoto M, Kamei I, Imai H, Yokote H, Yukawa S, Komai N. Autotransplantation of peripheral cholinergic neurons into the brains of Alzheimer model rats. *Acta Neurochir* 115: 127-132, 1992
- 28) Fisher LJ, Raymon HK, Gage FH. Cells engineered to produce acetylcholine: therapeutic potential for Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 695: 278-284, 1993
- 29) Ebendal T, Lonnerberg P, Pei G, Kylberg A, Kullander K, Persson H, Olson L. Engineering cells to secrete growth factors. *J Neurol* 242: 5-7, 1994
- 30) Hammang JP, Emerich DF, Winn SR, Lee A, Lindner MD, Gentile FT, Doherty EJ, Kordower JH, Baetge EE. Delivery of neurotrophic factors to the CNS using encapsulated cells: developing treatments for neurodegenerative diseases. *Cell Transplant* 4: 27-28, 1995
- 31) Unger JW, Schmidt Y. Galanin-immunoreactivity in the nucleus basalis of Meynert in the rat: age-related changes and differential response to lesion-induced cholinergic cell loss. *Neurosci Lett* 153: 140-143, 1993
- 32) Wallace W, Brane D, Hsu N, Khowong N, Merrill CR, Haroutunian V. Characterization of gene expression in the cerebral cortices of rat brains containing subcortical lesions. *Appl Theor Electrophor* 4: 33-38, 1994
- 33) Nabeshima T, Nitta A. Memory impairment and neuronal dysfunction induced by beta-amyloid protein in rats. *Tohoku J Exp Med* 174: 241-249, 1994
- 34) Florence AL, Gauthier A, Ponsar C, Aguilar P, Crichton RR. An experimental animal model of aluminium overload. *Neurodegeneration* 3: 315-323, 1994
- 35) Froelich L, Ding A, Hoyer S. Holeboard maze-learning deficits and brain monoaminergic neurotransmitter concentrations in rats after intracerebroventricular injection of 3-bromopyruvate. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 917-922, 1995
- 36) Wiley RG, Berbos TG, Deckwerth TL, Johnson EM, Lappi DA. Destruction of the cholinergic basal forebrain using immunotoxin to rat NGF receptor: modeling the cholinergic degeneration of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 128: 157-166, 1995
- 37) Beerl R, Andres C, Lev-Lehman E, Timberg R, Huberman T, Shani M, Soreq H. Transgenic expression of human acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. *Curr Biol* 5: 1063-1071, 1995
- 38) Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523-527, 1995
- 39) Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 323: 411-416, 1986
- 40) Paralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J, Capon DJ. Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J* 6: 3923-3929, 1987
- 41) Levy AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR. Identification of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 11: 3218-3226, 1991
- 42) Mash DC, Flynn DD, Potter LT. Loss of M2 muscarinic receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science* 228: 1115-1117, 1985
- 43) Wang SZ, Zhu SZ, Mash DC, Fakahany EE. Comparison of the concentration of messenger RNA encoding four muscarinic receptor in control and Alzheimer brains. *Brain Res Mol Brain Res* 16: 64-70, 1992
- 44) Mandel RJ, Vhen AD, Connor DJ, Thal LJ. Continuous physostigmine infusion in rats with excitotoxic lesions of nucleus basalis magnocellularis: effects on performance in the water maze task and cortical cholinergic markers. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 612-619, 1989
- 45) Miyai I, Ueno S, Yorifuji S, Fujimura H, Tarui S. Alterations in neocortical expression of nicotinic acetylcholine receptor mRNA following unilateral lesions of the rat nucleus basalis magnocellularis. *J Neural Transmi Gen Sect* 82: 79-91, 1990
- 46) Ueki A, Miyoshi K. Changes in cholinergic markers following kainic acid lesion of the ventral globus pallidus in rat. *Jpn J Psychiatry Neurol* 41: 87-96, 1987
- 47) Bohn MC, Cupit LC, Marciano F, Gash DM. Adrenal medulla grafts enhance recovery of striatal dopaminergic fibers. *Science* 237: 913-916, 1987
- 48) Hansen JT, Fiandaca MS, Kordower JH, Natter MFD, Gash

- DM. Striatal adrenal medulla/sural nerve cogafts in hemiparkinsonian monkeys. *Prog Brain Res* 82: 573-580, 1990
- 49) Nishio H. Intracerebral grafting of catecholamine producing cells and reconstruction of disturbed brain function. *Neurosci Res* 16: 157-172, 1993
- 50) Vidal-Sanz M, Bray GM, Villegas-Perez MP, Thanos S, Aguayo AJ. Axonal regeneration and synapse formation in the superior colliculus by retinal ganglion cells in the adult rat. *J Neurosci* 7: 2894-2909, 1987
- 51) Hammang JP, Emerich DF, Winn SR, Lee A, Lindner MD, Gentile FT, Doherty EJ, Kordower JH, Baetge EE. PET studies of parkinsonian patients treated with autologous adrenal implants. *Can J Neurol Sci* 16: 305-309, 1989
- 52) Schumacher JM, Hantraye P, Brownell AL, Riche D, Madras BK, Davenport PD, Maziere M, Elmaleh DR, Brownell GL, Isacson O. A primate model of Huntington's disease: functional neural transplantation and CT-guided stereotactic procedures. *Cell Transplant* 1: 313-322, 1992
- 53) Widner H. Immature neural tissue grafts in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 146: 43-45, 1993
- 54) Peschanski M, Defer G, N'Guyen JP, Ricolfi F, Monfort JC, Remy P, Geny C, Samson Y, Hantraye P, Jeny R, Gaston A, Keravel Y, Degos JD, Cesaro P. Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain* 117: 487-499, 1994
- 55) Remy P, Samson Y, Hantraye P, Fontaine A, Defer G, Mangin JF, Fenelon G, Geny C, Ricolfi F, Frouin V, N'Guyen JP, Jeny R, Degos JD, Peschanski M, Cesaro P. Clinical correlates of [18F]fluorodopa uptake in five grafted parkinsonian patients. *Ann Neurol* 38: 580-588, 1995
- 56) Defer GL, Geny C, Ricolfi F, Fenelon G, Monfort JC, Remy P, Villafane G, Jeny R, Samson Y, Keravel Y, Gaston A, Degos JD, Peschanski M, Cesaro P, N'Guyen JP. Long-term outcome of unilaterally transplanted parkinsonian patients. *Brain* 119: 41-50, 1996
- 57) Wong DF, Wagner NH, Tune LE, Dannals RF, Pearlson GD, Links JN, Tamminga CA, Broussoll EP, Ravert HT, Wilson AA, Toung JKT, Malat J, Williams JA, O'Tuama LA, Snyder SH, Kuhar MJ, Gjedde A. Positron emission tomography reveals elevated D<sub>2</sub> dopamine receptors in drug-naive schizophrenics. *Science* 234: 1558-1563, 1986
- 58) Antonini A, Vontobel P, Psylla M, Gunther I, Maguire PR, Missimer J, Leenders KL. Complementary positron emission tomographic studies of the striatal dopaminergic system in Parkinson's disease. *Arch Neurol* 52: 1, 1995
- 59) Dolan RJ, Fletcher P, Frith CD, Friston KJ, Frackowiak RS, Grasby PM. Dopaminergic modulation of impaired cognitive activation in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Nature* 378: 180-182, 1995
- 60) Lundkvist C, Halldin C, Swahn CG, Hall H, Karlsson P, Nakashima Y, Wang S, Milius RA, Neumeyer JL, Farde L. [O-methyl-11C]beta-CIT-FP, a potential radioligand for quantitation of the dopamine transporter: preparation, autoradiography, metabolite studies, and positron emission tomography examinations. *Nucl Med Biol* 22: 905-913, 1995
- 61) Seibyl JP, Zea-Ponce Y, Brenner L, Baldwin RM, Krystal JH, Offord SJ, Mochowiak S, Charney DS, Hoffer PB, Innis RB. Continuous intravenous infusion of iodine-123-IBZM for SPECT determination of human brain dopamine receptor occupancy by antipsychotic agent RWJ-37796. *J Nucl Med* 37: 11-15, 1996
- 62) Tedroff J, Pedersen M, Aquilonius SM, Hartvig P, Jacobsson G, Langstorm B. Levodopa-induced changes in synaptic dopamine in patients with Parkinson's disease as measured by [11C]raclopride displacement and PET. *Neurology* 46: 1430-1436, 1996
- 63) Irie T, Fukushi K, Namba H, Iyo M, Tamagami H, Nagatsuka S, Ikota N. Brain acetylcholinesterase activity: validation of a PET tracer in a rat model of Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 37: 649-55, 1996
- 64) Efang SM, Khare AB, Langason RB. Comparative tissue distribution of conformationally restricted radioiodinated vesamicol receptor ligands. *Nucl Med Biol* 22: 437-444, 1995
- 65) Shiba K, Mori H, Matsuda H, Tsuji S, Tonami N, Hisada K. In vivo characterization of radioiodinated 2-(4-phenylpiperidino)cyclohexanol (vesamicol) analogs: potential radioligand for mapping presynaptic cholinergic neurons. *Nucl Med Biol* 22: 823-828, 1995

**Fundamental Study on Assessment of Neurotransplantation Using Nuclear Medicine Imaging: The Effect of Vagal Autotransplantation in Rats with an Unilateral Lesion of Nucleus Basalis Magnocellularis** Akihiro Ichikawa, Department of nuclear medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **106**, 155—167 (1997)

**Key words** vesamicol, Alzheimer's disease, vagal autotransplantation, cholinergic neuron, autoradiography

#### Abstract

Alzheimer's disease is one of most troublesome problems encountered in the elderly population. One proposed hypothesis is that a deficit in cholinergic neurotransmission in Alzheimer's disease underlies this serious symptom of the disease. The Cholinergic denervation rat model by producing an unilateral lesion of nucleus basalis magnocellularis (NBM) is reported to a model of cognitive deficits, audis one of instructive models of Alzheimer's disease (AD). Neurotransplantation is now promising to be an effective strategy for functional repair in a variety of neural systems in disorders such as Parkinson's disease. In this study autotransplantation of vagal ganglion was performed to NBM lesioned rats. The effects of cholinergic grafts on cholinergic systems were evaluated by autoradiographic images at intesuals of 1, 2 and 4 weeks after surgery. Cerebral blood flow (CBF), muscarinic acetylcholine receptor (mAChR), m1 and m2 subtype of AChR-mRNA images were obtained using  $^{99m}\text{Tc}$ -hexamethyl-propyleneamine oxime ( $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO), [ $^3\text{H}$ ]quinuculidinal benzilate,  $^{35}\text{S}$ -labeled oligonucleotide probes by *in situ* hybridization respectively. Also acetylcholine transporter images were obtained using [ $^3\text{H}$ ]vesamicol and [ $^3\text{H}$ ]hemicholinium-3 ( $^3\text{H}$ -HC-3). The autoradiograms were quantified by bio-imaging analyzer using an imaging plate; the regions of interest (ROIs) were set in the cortex of the affected side and unaffected side symmetrically, and the affected-side/ unaffected-side ratios (AU ratio) were calculated from these mean photo-stimulated luminescence (PSL) rates. In both NBM lesioned and autotransplanted rats, there were no remarkable changes of the AU ratio at CBF, mAChR, m1mAChR-mRNA and m2mAChR-mRNA images. On the other hand, the [ $^3\text{H}$ ]vesamicol images of the NBM lesioned rats showed significant reduction of the mean AU ratio at 1, 2 and 4 weeks after lesioning ( $p < 0.01$ ). Furthermore, the mean AU ratio in autotransplanted rats gradually increased and significantly improved 4 weeks after transplantation ( $p < 0.05$ ). There were no remarkable changes of the AU ratio at  $^3\text{H}$ -HC-3. Clinically emission computed tomography (ECT) with radiolabeled vesamicol may be a potential procedure for the assessment of neurotransplantation therapy for patients with AD.