

ラット脳における ^3H -スピロペリドールによる 受容体マクロオートラジオグラフィ

森 厚文, 柴 和弘, 辻 志郎*, 松田博史*, 久田欣一*, 小島一彦**

金沢大学アイソトープ総合センター, *同大学医学部核医学科,

**同大学医療技術短期大学部

920 金沢市宝町 13-1

1985年3月28日 受理

ラット脳の ^3H -スピロペリドールによる受容体マクロオートラジオグラフィに関して、基礎的検討、すなわちインキュベーション時間、洗浄時間、飽和実験、拮抗薬による抑制効果について検討するとともに、ビデオカメラとコンピュータを組合せた Video Digitizer System を用いてサブトラックションイメージを作成した。その結果、本法はドーパミン等の受容体の形態学的分布ならびに動態の解析が可能であり、神経精神疾患の病態解明ならびに陽電子、あるいは単光子横断層イメージの解釈に有用と期待された。

Key Words: receptor macroautoradiography, tritium-spiroperidol, brain, dopamine receptor, neuro-psychiatric diseases

1. 諸 言

ある種の神経精神疾患では、神経伝達物質のシナプス伝達の生化学的レベルにおける障害が関与していると考えられている。たとえば、ドーパミン受容体の異常はパーキンソン病¹⁾、ハンチンソン舞蹈病²⁾、精神分裂病³⁾、晩発性ジスキネシア⁴⁾で報告されている。したがって、受容体異常を体外計測で評価できることが望まれ、最近、 ^{14}C -標識リガンドと陽電子横断層装置 (PET) を用いて人体の受容体を描画 (受容体マッピング) することが可能となってきた⁵⁾。しかし、受容体マッピングの意義づけのためには、臨床研究だけでなく、動物実験における基礎的検討が必要と思われる。

受容体オートラジオグラフィは種々の利点を有し、神経精神疾患の病態解明ならびに PET および単光子横断層装置 (SPECT) の基礎的研究に有用と期待される。そこで今回、ドーパミン拮抗剤である ^3H -スピロペリドールに関する定量的オートラジオグラフィの基礎的検討を加えたので報告する。

2. 方 法

Sprague-Dawley ラット (雄 200-250 g) を 0-4°C のリン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.1% ホルマリン含有) 約 150cm³ で灌流した後断頭した。ただちに全脳を摘出、ドライアイス、ヘキサン (-60-70°C) で凍結した後、クリオスタット内で 20 μm の線状体を含む切片

(König and Klippel のアトラス⁶⁾ の A9410-A6060 μm の範囲) を作成し、thaw-mount 法によりゼラチン塗末スライドガラスに載せた⁷⁾ (実験を行うまで -20°C で保存)。まず内在性のドーパミンを除去するため、室温で 50mM トリス緩衝液 (pH 7.7, 0.1% アスコルビン酸, 120mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ を含む) で 30 分間ブレインキュベーションした。つぎに ^3H -スピロペリドール (865.8 GBq/mmol (23.4 Ci/mmol)) を含む 50mM トリス緩衝液にてインキュベーション (40回/1分間で振とう) し、洗浄、乾燥後、反応条件等の基礎的実験のため切片をかきとり、その放射能を液体シンチレーションカウンタ (アロカ製 LSC-703) にて測定した。同時に連続切片を用いて (+)ブタクラモール 1 μM を加えて同様に反応させて非特異的結合量を調べた。基礎的実験としてインキュベーション時間、洗浄時間、飽和実験、各作動薬、拮抗薬による抑制効果について検討を行った。用いた ^3H -スピロペリドールの濃度は、飽和実験以外はすべて 0.5nM、反応温度はインキュベーション時間 (4, 25, 37°C で検討) を除いて 25°C で反応させた。インキュベーション時間は、15, 45, 60, 90, 120, 180分、洗浄時間は 30 秒, 1, 5, 10, 20, 30分と変えて至適条件を検討した。飽和実験は、 ^3H -スピロペリドールの濃度を 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0nM と変えて反応させて飽和の有無を確認した。拮抗剤としてスピロペリドール, (+)ブタクラモール, スルピリ

ド, KJK-945(一般名 ketanserin tartrate), 作動薬としてドーパミン, セロトニンを用いて, その濃度を 10^{-10} から 10^{-3} まで変化させて, 各薬剤の抑制効果を検討した。以上の実験は2-4回(1回の実験で, 同一条件の切片を2枚ずつ液体シンチレーションカウンタで測定)を行い, その平均値を求めた。一方, オートラジオグラム作成のため, ^3H 専用のultrofilmに標準線源とともに密着させ, 1,2か月露出後現像して得られたオートラジオグラムをVideo Digitizer System (Fig. 1)を用いて定量的オートラジオグラムを作成した。ゼラチン溶液(水 10cm^3 に対しゼラチン 2g の割合)に ^3H -スピロペリドールを混ぜ, 脳切片と同様の方法で $20\mu\text{m}$ の切片を作成したものを標準線源として用いた。Fig. 1にVideo Digitizer Systemのブロックダイアグラムを示す。シャーカステンの上に被写体フィルムを置き, その透過光をテレビカメラ(浜松ホトニクス社製C-1000)で撮像し, 制御装置, アナログデジタル変換器を介してデジタル化する。そのデジタル化されたイメージデータはこれらに接続されているミニコンピュータ(YHP-2100)の磁気ディスクおよび磁気テープに順次収集, 記憶する。大容量のイメージデータ(1フレームは 512×512 , 濃度レベルは8ビット)間の演算および配列換え等はミニコンピュータ内で処理し, 画像表示および画像変換には画像に対する直接指令を多くもち, 操作の簡便なマイクロコンピュータ(NEC PC-8801+RAM増設)を使用した。特異的結合イメージを得るため, (+)ブタクラモールを加えない総結合イメージから(+ブタクラモールを加えた非特異的イメージを引き算してサブトラクションイメージを作成した。位置合せ(方眼スケール上に両画像を一致させ重ね合わせる方法を用いた)をした両画像をそれぞれデジタル化し引き算処理して, 画像表示を行った。画像表示はカラーおよびモノクロの両方が可能であるが, オリジナルイメージとの比較を容易に

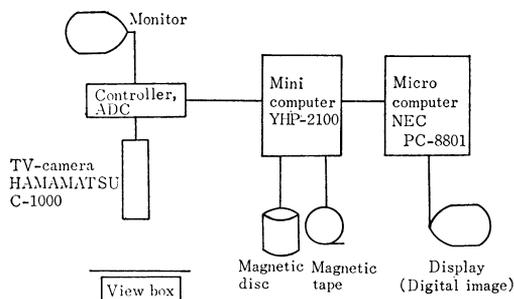


Fig. 1 Blockdiagram of Video Digitizer System.

するため, 本稿ではモノクロイメージ(オリジナルと同様に黒化度の順にグレイスケール7段階)で表示した。

3. 結果

インキュベーション時間による特異的結合の変化をFig. 2に示す。温度が 37°C と高い場合は30-60分でプラトーに達し, その後は速やかに減少した。 25°C では徐々に特異的結合量が増加し, 2時間でプラトーに達したが, 4°C では3時間までプラトーに達しなかった。 37°C で行う方が短時間ですむが, 切片がスライドガラスからはがれることがあり, また, 4°C ではプラトーに達するのに長時間を要するため, インキュベーション時間を 25°C , 2時間で行うことにした。洗浄時間による影響をFig. 3に示す。総結合量, 特異的および非特異的結合量ともに10分まで減少しつつあったが, その後は30分まで変化しなかった。洗浄時間が短い方が特異的結合量が高く, 洗浄30秒と10-30分後の差は何らかの特異的結合を意味する可能性を有するが, 洗浄時間が短いと再現性がやや乏しいので, 今回は洗浄時間を20分とした。飽和実験の結果をFig. 4に示すが, 特

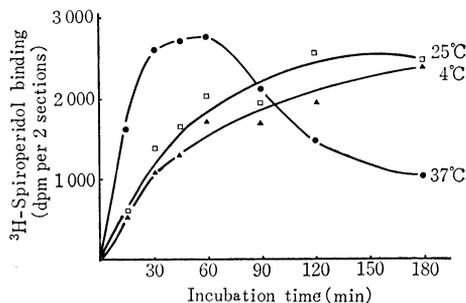


Fig. 2 Time course of ^3H -spiroperidol association.

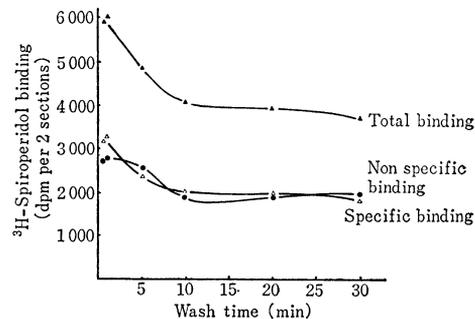


Fig. 3 Time course of ^3H -spiroperidol dissociation.

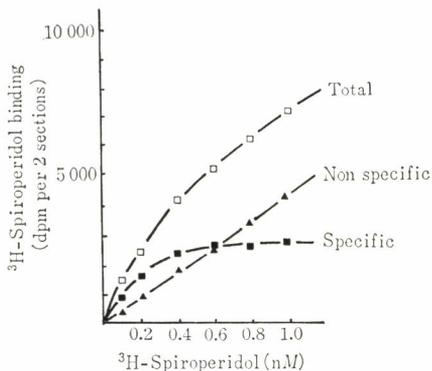
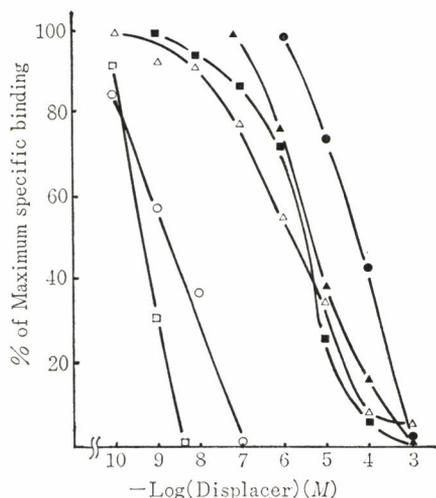


Fig. 4 Saturation kinetics of ^3H -spiroperidol.



□: Spiroperidol, ○: (+)-Butaclamol,
 △: Surpiride, ▲: KJK-945
 ■: Dopamine, ●: Serotonine

Fig. 5 Pharmacological specificity of [^3H]-spiroperidol specific binding to tissue sections.

異的結合は0.4nMで飽和に達した。作動薬,拮抗剤による抑制効果をFig. 5に示す。抑制効果,すなわち力価は高い順にスピロペリドール, (+)ブタクラモール, スルピリド, ドーパミン, KJK-945, セロトニンであり, それぞれの IC_{50} は, 0.4, 1.6, 1400, 3200, 5000, 63000 nMであった。Fig. 6はゼラチン溶液で作成した標準線源とVideo Digitizer Systemによるフィルム黒化度のデジタル値との相関を示す。横軸に($\mu\text{Ci day/g}$), 縦軸にデジタル値(バックグラウンドを差し引いた値)をとると, デジタル値が20以上ではほぼ直線関係が得られた。Fig. 7に定量的オートラジオグラム(^3H -スピロペリドールの濃度は1nM)を示す。線状体部(被殻)は総結合イメージで濃く, 非特異的結合

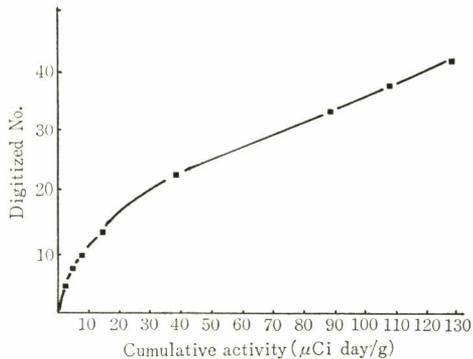
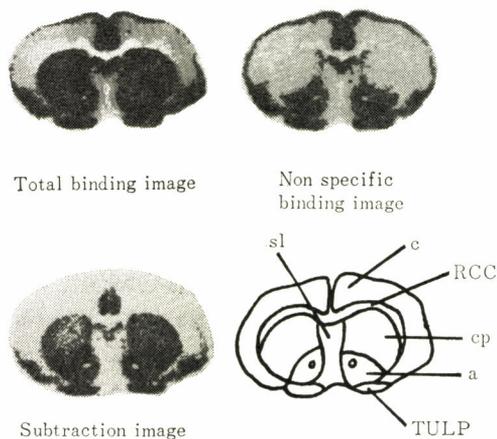


Fig. 6 Correlation between cumulative activity and digitized number.



Abbreviations: c, cortex; RCC, radiatum corpus callosi; cp, striatum (nucleus caudatus putamen); sl, n. septi lateralis; a, nucleus accumbens; TULP, tuberculum olfactorium, pars corticalis, lamina plexiformis.

Fig. 7 Quantitative digital autoradiograms.

イメージで淡く描画されており, 特異的結合が高く, しかも不均一分布を呈しているのが分かる。線状体以外にも, 脳皮質, 中隔外側核, 側坐核, 嗅結節部が総結合イメージで濃いが, 非特異的結合イメージでも濃く描画されており, その量は総結合および非特異的イメージのみでは不詳である。一方, サブトラクションイメージでは, 特異的結合の分布を視覚的によく観察できる。

4. 考 察

受容体の形態学的分布ならびに動態を評価する方法としてin vitroのレセプターアッセイ法, in vivoオートラジオグラフィ法の他に受容体オートラジオグラフィ

法がある。受容体オートラジオグラフィ法は、Youngら⁸⁾によって開発された方法であるが、他の2法より以下の点で優れている。すなわち、①標識リガンドを動物に投与する *in vivo* オートラジオグラフィ法は、すべての代謝課程が表現されることになり所見を誤って解釈しかねないのに対し、受容体オートラジオグラフィ法は薬理的な受容体の特異性に基づいて観察できる。②同一動物の連続切片を用いて、異なった種類の受容体の評価が可能である。③ *in vivo* オートラジオグラフィ法では不可能な血液脳関門を通過しないリガンドを用いることができる。④ *in vivo* オートラジオグラフィ法に比較して少量の放射性標識化合物で実験できるため安価である。⑤レセプタアッセイ法に比較して受容体の形態学的分布が詳細に分かる。すなわち、同一解剖学的部位における不均一分布も表示可能であり、また、レセプタアッセイ法では評価できない部位（正確に摘出することが困難）の評価も可能である。⑥人体でも剖検材料を用いれば受容体分布が高解像力で観察できる。なお、受容体オートラジオグラフィには、ミクロとマクロオートラジオグラフィがあるが、ミクロオートラジオグラフィはその定量性や汎用性に問題がある。そこで今回われわれは、ドーパミン拮抗剤である ³H-スピロペリドールによる受容体マクロオートラジオグラフィの基礎的検討を加えた。

反応温度は37°Cで行った方がインキュベーション時間が短くてすむが、37°Cで反応させると、①温度が低いときより切片がスライドガラスから少しはがれやすい、②反応（結合および解離あるいは不活性化）が速く進むため正確なインキュベーション時間に神経質になる必要がある、③37°Cで反応させた方がより生理的だという指摘は、本法は必ずしも生理的条件と同じでないのであまり重要な意味はないという理由でインキュベーションを25°C、2時間で行うことにした。洗浄時間が短い方が特異的結合の解離が少なくてすむが、やや変動があり、また非特異的結合の割合が高いので、今回は洗浄時間を比較的長く20分とした。緩衝液のpHは脳のpHが7.0-7.05、血液が7.4であるのでpHを7.05、あるいは7.4の方がよいという考え方もある^{7),9)}が、インキュベーション時間の検討をpH 7.05と7.7で行ってみたが、両者にはほとんど差は認められなかった。したがって、レセプタアッセイ法と同じくpH 7.7の緩衝液を用いた。飽和実験では非特異的結合は直線的に増加したのに対し、特異的結合は0.4nMでプラトーに達し飽和効果が認められた。拮抗剤としてスピロペリドールはドーパミン(D₂)以外にセロトニ

ン、スピロデカノン成分をブロックするのに対し、(+)ブタクラモールはドーパミン(D₂)とセロトニン成分、スルピリドはドーパミン(D₂)成分、KJK-945はセロトニン(S₂)成分をブロックする^{7),9)}。線状体部における拮抗薬の抑制効果の強さはスピロペリドール、(+)ブタクラモール、スルピリド、KJK-945の順であった。一方、作動薬であるドーパミンの方がセロトニン拮抗薬であるKJK-945より抑制効果が強かったが、ドーパミンよりドーパミン拮抗薬、セロトニンよりセロトニン拮抗薬の方が抑制効果が強かった。

オートラジオグラムの定量化を行う場合、標準線源が必要であり、その方法として、①ラット脳をペースト状にしたものを用いる方法⁹⁾、②ゼラチン溶液法、③市販の³H標準線源、の3つがある。現在のところ、市販の標準線源はその信頼性にやや問題がある。ゼラチン溶液法は、³Hのエネルギーが低く組織とゼラチン溶液との吸収の差について考慮する必要があるが、ラット脳を用いる方法より安価で簡便かつ一定範囲内で累積放射能とデジタル値に直線関係が得られたので、今回はゼラチン法を用いた。スピロペリドールの場合、非特異的結合の割合が高く、しかも部位ごとに異なるため、サブトラクションイメージは有用と考えられる。原則的には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は重なるはずであるため、今回は単に透明な方眼スケールを用いて位置合せをした。しかし、実際には切片をスライドガラスにのせるとき、ねじれ、伸縮等が生じるため連続切片でも完全に大きさが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。山下ら¹⁰⁾は伸縮に対してはアフィン交換による補正、組織の折れ曲りによるねじれに対しては折れ曲り部分の中心軸の両側に別々に一致させる方法を行っている。位置合せならびにねじれ、伸展等の補正に対する画像処理の最適方法について、今後検討する必要がある。今回は特異的結合の分布を単に視覚的にみるためサブトラクションイメージのみを示したが、関心領域のデジタル値ならびに標準線源で換算した特異的結合量を表示することが可能である。また連続切片を用いて種々の濃度の³H-スピロペリドールで反応させることにより、受容体の動態、すなわち最大結合量(B_{max})、および解離定数(K_d)が算出可能であり、今後は種々のモデル動物で本法を応用することにより、その病態解明ならびにPET、あるいはSPECTイメージの解釈に寄与することが期待される。

KJK-945 (ketanserin tartrate) をご提供下さいました協和醸酵工業(株), ヤンセン協和(株)に感謝します。

文 献

- 1) Reisine, T.D., Fields, J.Z., Stern, L.Z., et al.: *Life Sci.*, **21**, 335 - 344 (1977)
- 2) Snyder, S.H.: *Am. J. Psychiatry*, **138**, 460 - 464 (1981)
- 3) Goetz, C.G., Weiner, W.J., Nausieda, P.A., et al.: *Clin. Neuropharmacol.*, **5**, 3 - 22 (1982)
- 4) Wagner, H.N. Jr., Burns, H.D., Dannals, R.F., et al.: *Science*, **221**, 1264 - 1266 (1983)
- 5) König, J.F.R. and Klippel, R.A.: "The Rat Brain-A Stereotaxic Atlas", Robert F. Krieger, New York (1963)
- 6) Young, W.S. and Kuhar, M.J.: *Brain Res.*, **179**, 255 - 270 (1979)
- 7) Palacios, J.M., Niehoff, D.L. and Kuhar, M.J.: *ibid.*, **213**, 277 - 289 (1981)
- 8) Neve, K.A., Altar, C.A., Wong, C.A. and Marshall, J.F.: *ibid.*, **302**, 9 - 18 (1984)
- 9) Unnerstall, J.R., Niehoff, D.L., Kuhar, M.J. and Palacios, J.M.: *J. Neurosci. Meth.*, **6**, 59 - 73 (1982)
- 10) 山下 明, 渡辺恭良, 早石 修: 神経化学, **22**, 150 - 152 (1983)

Abstract

Receptor Macroautoradiography of ^3H -Spiroperidol Binding in Rat Brain

Hirofumi MORI, Kazuhiro SHIBA, Shiro TSUJI*,
Hiroshi MATSUDA*, Kinichi HISADA* and Kazuhiko KOJIMA**
Radioisotope Center, *Department of Nuclear Medicine, School of Medicine,
**School of Paramedicine, Kanazawa University
13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi 920, Japan

The kinetic and pharmacological characteristics of ^3H -spiroperidol binding sites were studied in slide mounted sections of rat forebrain, and optical binding conditions were defined. Using the receptor macroautoradiographic techniques with tritium-sensitive LKB sheet film, the distribution of dopamine (D_2) receptor was determined in slices including striatum of rat brain. The autoradiograms were analyzed using Video Digitizer System combined with video camera and minicomputer, and the subtraction images were obtained.

These studies suggest that this quantitative receptor macroautoradiography might be useful in the explanation of etiology in the field of neuro-psychiatric diseases and the fundamental studies of positron emission computed tomography, since this method has several advantages over in vivo autoradiography and in vitro receptor assay.

(Received March 28, 1985)