

実験的虚血脳における muscarinic cholinergic receptor および choline acetyltransferase の変化

高知医科大学脳神経外科学教室 (指導: 森 惟明教授)

溝 洵 光

〔原稿受付: 昭和63年10月26日〕

The Change of Muscarinic Cholinergic Receptor and Choline Acetyltransferase in the Experimental Ischemic Brain

HIKARU MIZOBUCHI

Department of Neurosurgery, Kochi Medical School
(Director: Prof. Dr. KOREAKI MORI)

Abstract

Acetylcholine (ACh) is the neurotransmitter related to learning and memory. The activity of its metabolic enzyme choline acetyltransferase (CAT) is found to be remarkably decreased at autopsy. We consider that there is some relationship between ACh and cerebrovascular dementia such as dementia in ischemia and forgetfulness after ischemia. So we studied the relationship between ischemia and cholinergic neuron. We examined changes of muscarinic cholinergic receptor (m-ChR) in experimental ischemia by binding assay and autoradiography, and performed immunohistochemical study of CAT that is, acetylcholine synthetase, by PAP method. We also studied delayed neuronal death from the aspect of cholinergic system because the hippocampus receives ACh pathway arising from the basal nucleus. Materials used include: Pulsinelli's 4 vessel occluded rats, Tamura's MCA occluded rats and forebrain ischemia mongolian gerbils.

In ischemia, the number of m-ChR decreased and binding affinity of m-ChR increased, and recirculation caused increased the number of m-ChR. While m-ChR changed immediately after ischemia, it was not until the fourth day that CAT positive cells decreased in hippocampus. In other words, at first m-ChR in postsynaptic membrane changed in ischemia, and with the progress of neuronal damage, CAT also changed. After m-ChR decreased in the thalamus, stria terminalis and Meynert nucleus 1 day following ischemia, it decreased in hippocampus

Key words: Muscarinic cholinergic receptor, Choline acetyltransferase, Experimental ischemia, Hippocampus, Delayed neuronal death.

索引語: ムスカリン受容体, コリンアセチルトランスフェラーゼ, 実験脳虚血, 海馬, 遅発性神経細胞死.

Present address: Department of Neurosurgery, Kochi Medical School, Nankoku City, Kochi Pref. Japan.

after 7 days. We can consider receptor changed corresponding to the pathway of cholinergic neuron. Our study suggested that the receptor change in cholinergic system plays some role in the delayed neuronal death in the hippocampus.

結 言

中枢神経系における acetylcholine (ACh) の存在は、1933年に Chang と Gaddum によって報告された。その後、ACh が脳内の伝達物質であることが明らかにされ、さらに receptor の研究が進み、ACh receptor にはムスカリン性レセプター (m-ChR) とニコチン性レセプター (n-ChR) の2種があり、それぞれ異なった特性を持つことが明らかにされた。中枢神経系では m-ChR が多く、n-ChR の約10倍量存在している。

アゴニストによって m-ChR が刺激されると、中枢神経系では neuron の興奮が引き起こされる。細胞レベルの反応は、m-ChR の刺激により細胞外より細胞内への Ca^{+} イオンの流入が起こり、続いて phospholipase A₂ の活性化、膜結合性 guanylate cyclase の活性が順次起き、細胞内の cyclic GMP の上昇が認められる⁹⁾。

虚血脳における neurotransmitter metabolites の研究は従来から数多くなされている。これまでの neurotransmitter に関する研究は、presynaptic level で行われてきたが、neurotransmitter の生物学的反応は receptor との結合により惹起されるものであり、最近、receptor の同定が可能になったことから、neurotransmitter に関し receptor 側からのアプローチができるようになってきた。

neurotransmitter の receptor に関する研究は、その receptor に対し高い特異性と親和性をもった RI 標識物質の開発に伴い、盛んに行われるようになってきている。muscarinic receptor に関しては、1974年 Yamamura ら⁴⁰⁾ によって初めて muscarinic receptor に高い特異性と親和性をもつ物質である quinuclidinyl benzilate (QNB) を tritium (³H) でラベルした RI 標識物質を用いての脳内 muscarinic receptor の測定の結果がなされて以来、数多くの研究が行われるようになった。中枢神経系のことにはラットの脳内 muscarinic receptor の分布に関しては、Rotter ら³⁴⁾ により、すでに詳細な分布図が作成されている。また、各種病態におけるその変化についての報告も散見される。

虚血ラットを用いた実験では、CAT および AChE はともに低下する^{21,22,36)}。また、脳血管障害による痴呆では海馬において CAT 活性は低下する²⁷⁾。大きな梗塞のある例では AChE の髄液内活性の有意の低下が認められている²⁰⁾。また、m-ChR は血管性痴呆では有意な低下が認められている²³⁾。

しかし、脳虚血急性期より、慢性期に至る時間経過で、血管性痴呆とも関連して ACh 系および receptor はどのように変化するかについてはこれまで報告がない。そこで著者は、実験脳虚血において、³H]QNB を用いた binding assay および autoradiography により muscarinic cholinergic receptor (m-ChR) の変化を検討するとともに、acetylcholine (ACh) 合成酵素である choline acetyltransferase (CAT) を酵素抗体法による免疫組織学的検討を行い、receptor の変化と比較検討した。また、砂ネズミの海馬に発生する delayed neuronal death に関しても、ACh は海馬と特に関係が深いことから、cholinergic system の面からこの現象について検討した。

方 法

1. 全脳虚血モデル

1) 実験全脳虚血の作成

体重 200~300 g の成熟雄 Wister 系ラット (日本チャールス・リバー(株)より購入) 10匹を用い、pentobarbital sodium (Nembutal®) 40 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下で、Pulsinelli²⁹⁾ の方法に従い、両側椎骨動脈を電気焼灼切断した。翌日、無麻酔下でラットを仰臥位に固定し、頸部正中で皮膚を切開し、両側総頸動脈を露出し、30分間閉塞した。また正常ラット 5匹を対照群とした。

2) muscarinic cholinergic receptor (m-ChR) の binding assay^{1,2,24)}

虚血後、無麻酔下で断頭し、速やかに脳を取り出し、小脳、脳幹を除いて大脳を 0.32M sucrose 中で、テフロンホモジェナイザーを用いて 5分間ホモジェナイズし、1,000×g で10分間遠沈した。その supernatant を 10,000×g で20分間遠沈し、その pellet を 0.01M

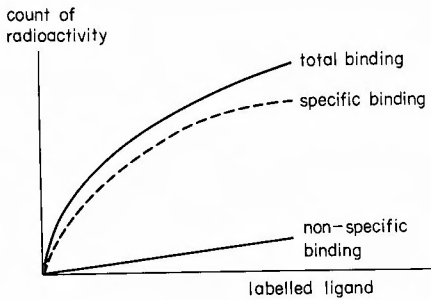


Fig. 1 Specific binding of a ligand to its receptor.

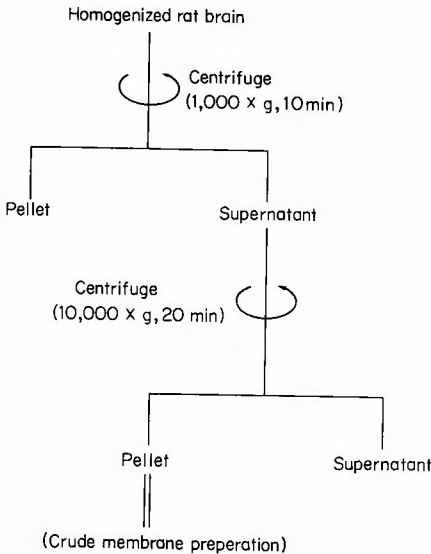


Fig. 2 Crude membrane preparation of rat brain.

phosphate buffer(pH 7.2) でホモジェナイズし, crude membrane preparation として $[^3\text{H}]$ QNB binding assay に用いた (Fig. 2).

receptor preparation と $[^3\text{H}]$ QNB (phenyl-4- ^3H , specific activity 38 Ci/mmol, ethanol solution) を 25°C で60分間 incubate した. この際, 非特異的結合をみるために実験系に atropine sulfate (和光純薬工業株 019-04851) 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ を加えた assay も行った. incubation ののち内容を glass fiber filter (Whatman GF-B) を通して吸引濾過した. filter を赤外線ランプで乾燥ののち, シンチレーターを 10 ml 加えて48時間以上暗室中に置き, ケミルミネッセンスを抑えた後, liquid scintillation spectrometry (Tracor Analytic MARK III) で radioactivity を測定した (Fig. 3). なお, receptor preparation の蛋白質量は bovine serum albu-

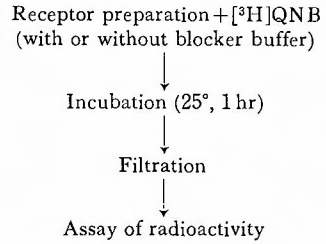


Fig. 3 Method of assay for muscarinic cholinergic binding in rat brain.

min を standard として, Lowry 法¹³⁾ で測定した.

neurotransmitter receptor assay の原理は receptor に対する RI 標識物質と非標識物質の競合的結合を利用するものである. receptor と標識物質を反応させると, receptor 結合標識物質ができるが, 非標識物質を大量添加すれば理論的にはすべての receptor は非標識物質で占拠されるので, 結合型として測定される放射エネルギーはほとんど0となるはずである. しかし, 実際にはかなりの結合型放射能が検出される. これは標識物質が receptor 以外の細胞成分に非特異的に吸着する nonspecific binding である. したがって, すべての放射エネルギーから非特異的結合放射エネルギーを差引いたものが真の receptor に結合した量となる (Fig. 1).

2. 局所脳虚血のモデル

1) 実験局所脳虚血の作成

体重 100~200 g の成熟雄 Wistar 系ラット20匹を用い, pentobarbital sodium (Nembutal[®]) 40 mg/kg 腹腔内投与による麻酔下で, 田村の方法^{37,38)} に従い, 左中大脳動脈を電気凝固後切断した.

2) carbon perfusion による梗塞巣の確認

虚血ラットを浅エーテル麻酔下に左頸動脈および左頸静脈を露出した. 23G カテーテルを左総頸動脈に挿入し, perfusion を開始し, 左頸静脈を切断した. perfusion は, 70 cm の高さから行い, まず carbon suspension (懸濁液) 単独, 次に carbon suspension と10%ホルマリンの混合液 (200 ml) で灌流した. 直ちに脳を取り出し, 10%ホルマリンで一晩固定後, 前額断面の標本を作成し, carbon defect 部位の検索を行った.

3) muscarinic cholinergic receptor (m-ChR) の autoradiography (Fig. 4)

手術の翌日, 無麻酔でラットを断頭し, 速やかに脳を取り出し, ドライアイスアセトン中で -60°C ~ -70°C で凍結させた. 次に, -20°C に保ったクライ

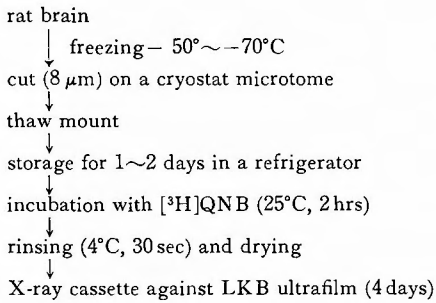


Fig. 4 Procedure for autoradiography of muscarinic cholinergic receptor.

オスタットの内で、8 μm 厚の組織切片を作成した。次に、thaw mount 法により、あらかじめゼラチンコートをしたスライド上にのせ、冷風で30分間乾燥させ冷凍庫内 (-20°C) で2日間保存した。その後、50 mM の phosphate buffer に 10 μCi の [³H]QNB を加え、25°C で2時間反応させた。反応後 4°C に冷却した同一緩衝液で30秒間洗浄し、ついで冷風で乾燥させた。乾燥させたスライドは暗室でX線撮影用のカセット (Fuji EC cassette) に並べ、LKB ultrafilm に密着させ、4日間曝露させた。現像はコードールXにより 20°C で5分とし、定着はコニフィクスにて10分とした。

4) 組織学的検索

連続切片を用い、HE 染色、luxol fast blue (LFB) 染色を加え標本を作成した。

3. 前脳虚血モデル

1) 実験前脳虚血の作成

1. Fixation by perfusion of paraformaldehyde (PFA)		
2. PFA fixation	4°C	overnight
3. 10% sucrose, 0.01 M PBS	4°C	4 hr
4. 15% sucrose, 0.01 M PBS	4°C	4 hr
5. 20% sucrose, 0.01 M PBS	4°C	overnight
6. making of frozen section		
7. Washing with 0.01 M PBS	4°C	5 min × 3
8. Removal of endogenous peroxidase	room temperature	30 min
9. Washing with 0.01 M PBS	4°C	5 min × 3
10. Blocking solution (normal rabbit serum)	room temperature	10 min
11. First antibody (anti CAT)	4°C	48 hr
12. Washing with 0.01 M PBS	4°C	5 min × 3
13. Second antibody (rabbit anti mouse IgG, A, M)	room temperature	60 min
14. Washing with 0.01 M PBS	4°C	5 min × 3
15. PAP solution	room temperature	60 min
16. Washing with 0.01 M PBS	4°C	5 min × 3
17. DAB stain	room temperature	30 min

Fig. 5 Procedure for PAP method.

体重 60~80 g の8週令の砂ネズミ (成和実験動物研究所より購入) 42匹を用い、浅エーテル麻酔下に頸部の正中切開により左右の総頸動脈を露出し、覚醒を待ったあと、動脈瘤クリップ (杉田式テンポラリクリップ) を用いて左右の総頸動脈を5分間閉塞した。

2) m-ChR の binding assay

虚血直後および血流再開後10分, 60分, 1日, 2日, 4日, 7日後に無麻酔下で断頭した。以下は前述の通り binding assay を行った。

3) m-ChR の autoradiography

同様の時間経過で無麻酔下で断頭した。以下は前述の通り autoradiography を行った。画像解析処理には、Nikon Luzex 2D 全自動画像解析システムを用いた。

4) Choline acetyltransferase (CAT) に対する酵素抗体法^{10,11,26,39)} (Fig. 5)

同様の時間経過でエーテル麻酔後、左心室から生理食塩水、次いで 0.1% paraformaldehyde (PFA) 液 (約 200 ml) にて約10分間、120~140 cm H₂O の圧で灌流固定した。その後大脳を摘出し、さらに4% PFA 液に一晩浸漬した。固定液の洗浄は、10% sucrose 加 PBS で4時間、15% sucrose 加 PBS で4時間、20% sucrose 加 PBS で一晩行った。-15°C でクライオスタットを用い、8 μm の凍結切片を作成した。酵素抗体法は peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法にて行った。操作手順は、1) 内因性 peroxidase 除去 (H₂O₂) 室温30分、2) 正常ウサギ血清 (blocking solution) 室温10分、3) 1次抗体 (抗 CAT) 4°C 2日、4) 2次

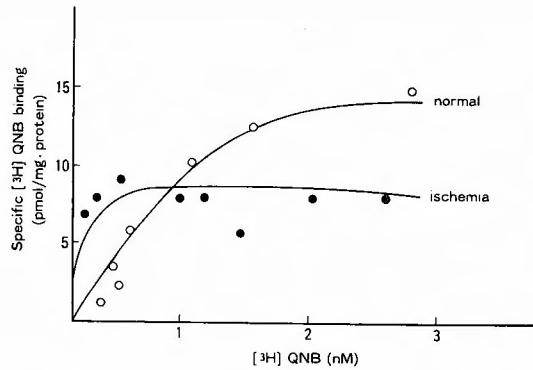


Fig. 6 Specific [³H] QNB binding to crude membrane prepared from rat brain.

抗体 (ウサギ抗マウス IgG,A,M,) 室温60分, 5) PAP solution 室温60分, 6) DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride) で発色, 室温15分, 7) メチルグリーン染色室温30分, 8) アルコールで脱水後, グリセリン PBS で封入した。

各操作後は 0.01 M phosphate buffer solution で十分洗浄した。また, 連続切片を用い, HE 染色をほどこした標本もあわせて作成した。

結 果

1. 全脳虚血モデル

1) 一般症状

右総頸動脈閉塞直後, ラットは不規則な呼吸を示したが, 30~60秒後には回復した。次いで, 左総頸動脈を閉塞すると, ラットは無呼吸となり, 10~20秒間軀幹をねじらせ, その後自発呼吸が出現し, 1~2分後にはほぼ正常呼吸となった。無呼吸のまま死亡する例もあった (手術例の30%) が検討から除外した。

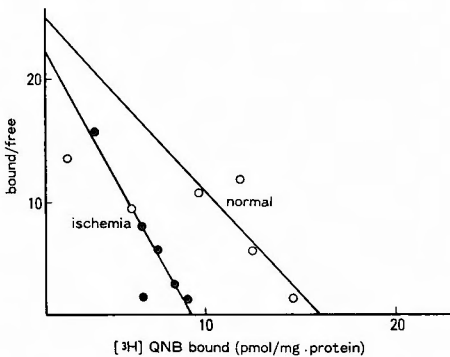


Fig. 7 Scatchard plot of [³H] QNB binding to crude membrane prepared from rat brain.

Table 1. Dissociation constant (Kd) and maximal binding (B max) in normal and ischemic rat brains.

	Kd ($\times 10^{-12}$ M)	B max (p mol/mg · protein)
Normal	0.64 ± 0.10	15.8 ± 4.0
Ischemia	0.41 ± 0.08*	9.0 ± 2.2*

* p < 0.01

2) binding assay

specific [³H]QNB binding は, Fig.6 のごとく, ligand の量の増加に伴って飽和された。虚血脳では ligand の量が少なきときには, binding の affinity が増加するという結果が得られた。本実験における Scatchard plot は Fig.7 のごとくである。すなわち, 正常に比べ, 虚血脳では receptor に対する specific [³H]QNB binding が減少している。

maximal binding (B max) は, 正常脳では 15.8 ± 4.0 (p mole/mg · protein), 虚血脳では 9.0 ± 2.2 (p mole/mg · protein) であり, 虚血脳で有意に減少していた。また, 解離定数 (Kd) は正常脳で 0.64 ± 0.10 × 10⁻¹² M, 虚血脳で 0.41 ± 0.08 × 10⁻¹² M と, 虚血脳において Kd が有意に減少していた (Table. 1)。

2. ラット中大脳動脈閉塞モデル

1) 一般症状

平均手術時間は, 28.4分であった。

硬膜内操作により脳出血をきたし, 死亡した例があった (手術例の15%)。

神経症状としては, 麻酔覚醒後に軽度の右片麻痺が認められた例があった。

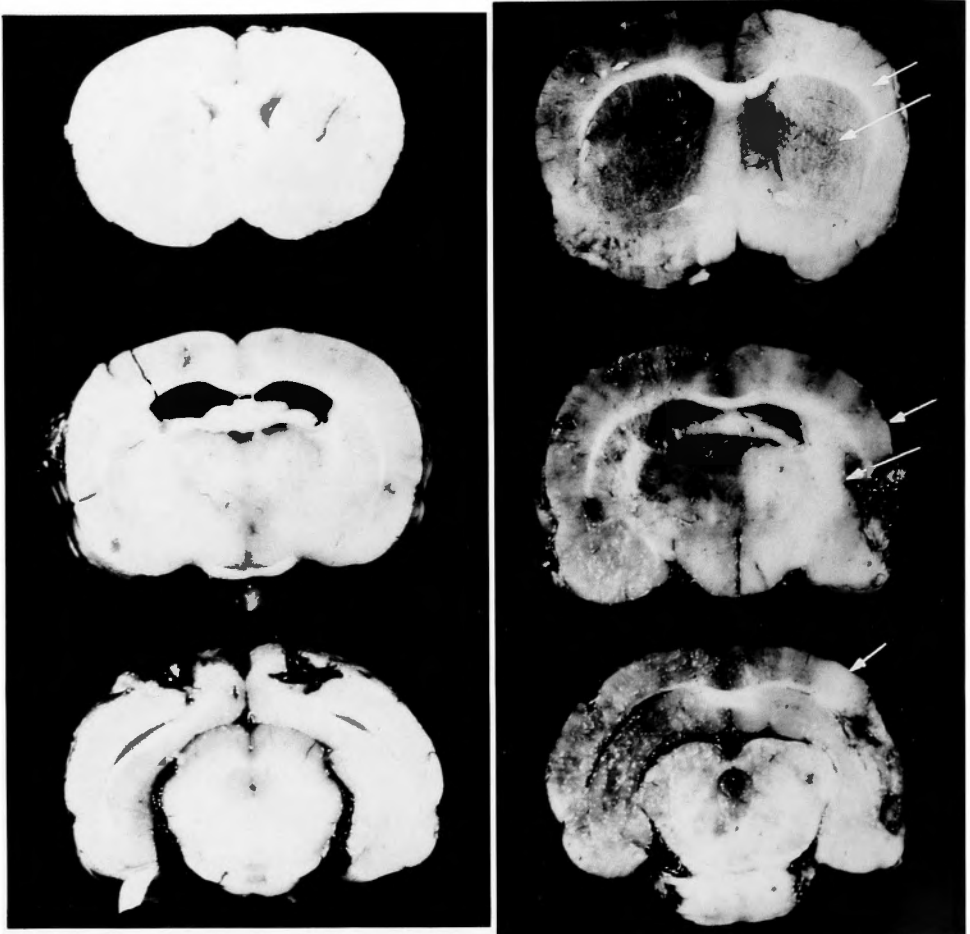


Fig. 8 Coronal sections of normal rat brain (left) and left MCA occluded rat brain with carbon perfusion (right). Carbon defect was recognized in the cortex of left MCA region and striatum (arrows).

2) carbon perfusion

左中大脳動脈灌流領域の大脳皮質および線条体に carbon defect が認められた (Fig. 8).

3) HE 染色・LFB 染色

左中大脳動脈灌流領域の大脳皮質および線条体に梗塞(壊死)がみられ、一部に脱髄がみられた (Fig. 9).

4) autoradiography

正常ラットでは $[^3\text{H}]\text{QNB}$ は、線条体、大脳皮質、海馬に強く集積がみられた。中大脳動脈閉塞ラットでは、Fig. 10 のごとく中大脳動脈領域の大脳皮質および線条体に著明な $[^3\text{H}]\text{QNB}$ の減少が認められた。

また、同側海馬、視床、尾状核頭部外側においても

$[^3\text{H}]\text{QNB}$ の減少が認められた。

3. 前脳虚血モデル(砂ネズミ)

1) 一般症状

両側総頸動脈をクリップすると、呼吸数、心拍数の増加がみられたが、神経症状はみられなかった。クリップをはずし、血流を再開させると、呼吸、心拍とも元の状態に復した。

砂ネズミは四肢を動かさず、約30分の間、寡動を示した(痛み刺激には四肢を動かし反応した)。

2) 組織学的変化

虚血負荷後の4日目より、大部分の CA1 錐体細胞は崩壊し、細胞数の減少が認められた。海馬以外には

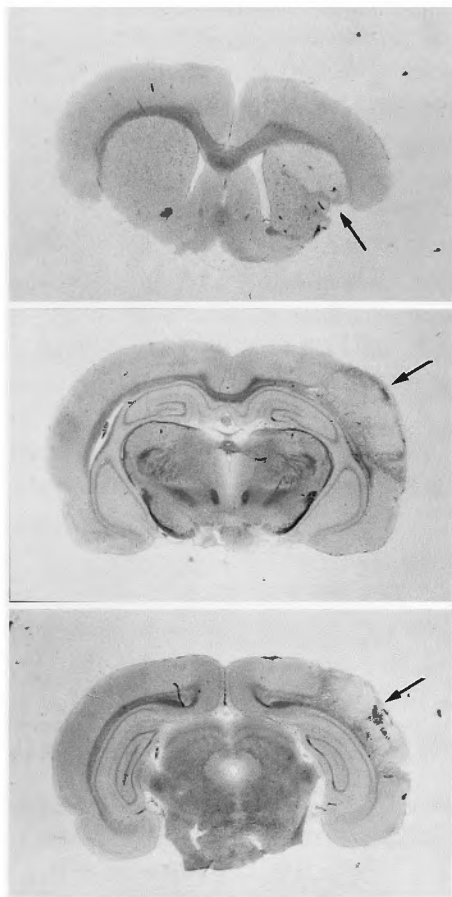


Fig. 9 Coronal sections of rat brain with occlusion of the left MCA.

Luxol fast blue stain. Infarction was recognized in the cortex of left MCA region and striatum with demyelination (arrow).

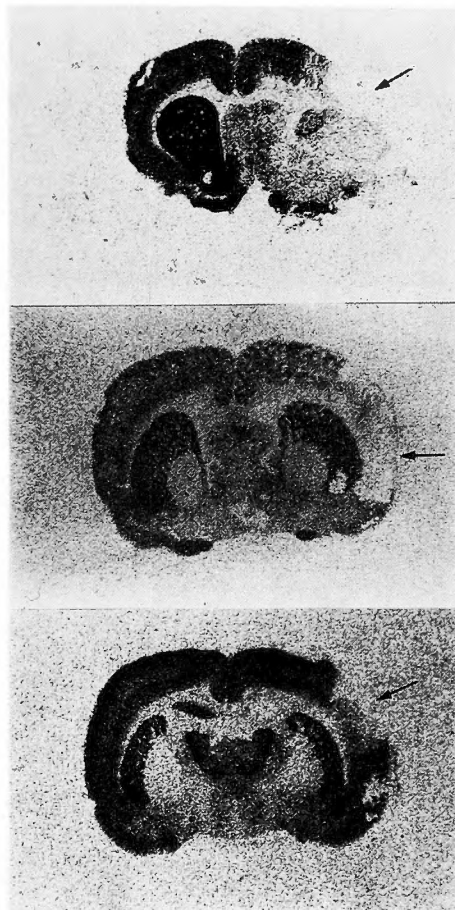


Fig. 10 $^3\text{H-QNB}$ autoradiograms in rat brain with occlusion of the middle cerebral artery. Note reduction of radioactivity in the cortex of middle cerebral artery region, striatum, hippocampus, thalamus and lateral caudate nucleus head (arrow).

Table 2. Dissociation constant (Kd) and maximal binding (B max) in normal and ischemic gerbil brains.

	Kd ($\times 10^{-12}$ M)	B max (p mol/mg \cdot protein)
Normal	1.53 ± 0.38	13.3 ± 1.5
Ischemia no recir.	$0.59 \pm 0.13^{**}$	$10.2 \pm 1.0^*$
Ischemia 10' recir.	0.96 ± 0.22	16.1 ± 2.3
Ischemia 60' recir.	$0.71 \pm 0.18^{**}$	$9.8 \pm 1.6^{**}$
Ischemia 1 ^d recir.	$0.69 \pm 0.16^{**}$	10.5 ± 2.1

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

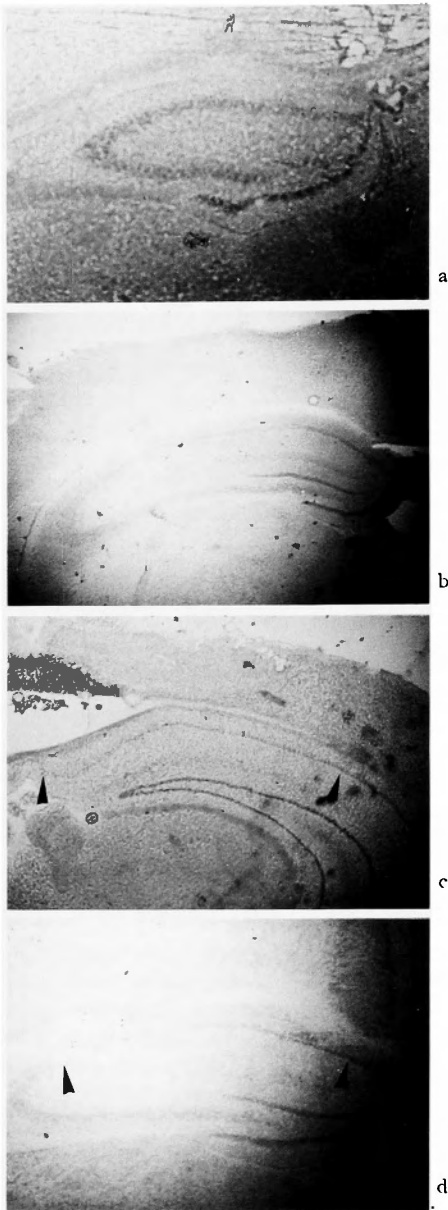


Fig. 11 Gerbil hippocampus. Normal (a), 2 days (b), 4 days (c) and 7 days (d) following 5 minutes ischemia. On and after 4 days following ischemia, neurons in the CA1 subfield have been destroyed (between arrow heads). Other areas remain intact morphologically. H.E. Stain.

変化を認めなかった (Fig. 11).

3) binding assay

虚血直後 (非再開通例) では, binding は減少した。ところが, 虚血後10分間の再開通例では, B_{max} は増加した。再開通後, 60分後には, 再び B_{max} は減少した。また, 虚血例では全例正常に比べ affinity が増加していた (Fig. 12)。Scatchard plot は Fig. 13 のごとくである。 B_{max} は, 正常に比し虚血直後 (再開通なし) から有意に減少し, 再開通10分後では有意に増加した。再開通60分以後は再び減少した。 K_d は, 虚血直後 (再開通なし) では正常に比し有意に減少し, 再開通後10分では有意に増加するものの, 60分後には減少し, 時間経過とともに減少した (Table. 2)。

4) autoradiography

虚血1日目より視床外側核, 視床腹側核, 分界条, Meynert 核において m-ChR の減少が認められた。虚血7日目では海馬において m-ChR の減少がみられた。経過中, 線条体, 大脳皮質には変化を認めなかった (Fig. 14)。

5) CAT 陽性細胞の変化

虚血4日目より海馬 CA1 neuron の減少とともに CAT 陽性細胞も減少した。他の部位, 特に Meynert 核, 内側中隔野では, 特に変化がなかった (Fig. 15)。

考 察

従来, 脳の生化学的研究は主に transmitter の量の増減を測定し, その結果から脳のすべての現象を説明しようとしてきた。しかし, transmitter の量は, 合成・貯蔵・放出の総和を示しているにすぎず, 実際に放出されて機能した transmitter だけを分離して測定することは難しい。その点, receptor の大部分はシナプス後膜に限局するので, シナプス部での機能を敏感に反映しうる。

記憶・学習に最も重要な役割を果たしている神経伝達物質は ACh 系であると現在考えられている。その背景は, scopolamine を正常人に注射すると痴呆症状と同様の記憶障害を生じ⁶⁾, さらにそれは physostigmine の投与により改善されることにある⁷⁾。加えて, Alzheimer 病の大脳皮質の CAT 活性は著しく低下しており⁸⁾, 老齡ラットや正常老人でも CAT 活性は低下している。

脳血管性痴呆や虚血後の健忘が知られているように虚血による痴呆症状の発現にも ACh 系は関与していることが考えられる。

中枢神経の大部分の ChR は m-ChR であり, 線条体, 海馬, 大脳皮質に密度が高く, 小脳では密度が低

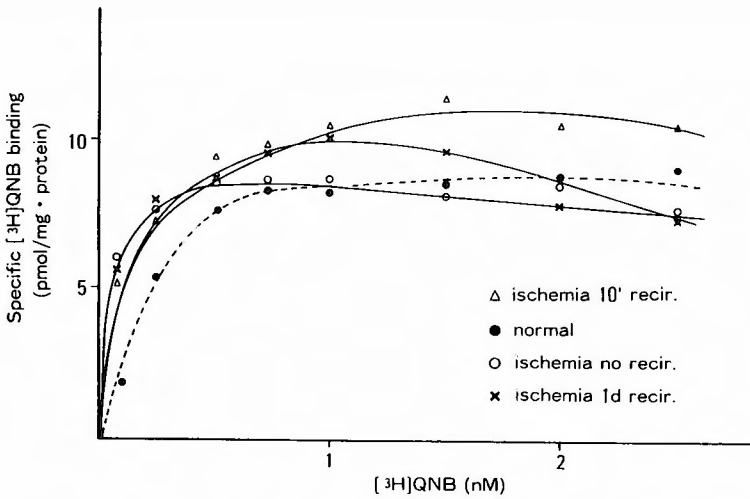


Fig. 12 Specific $[^3\text{H}]$ QNB binding to crude membrane prepared from gerbil brain.

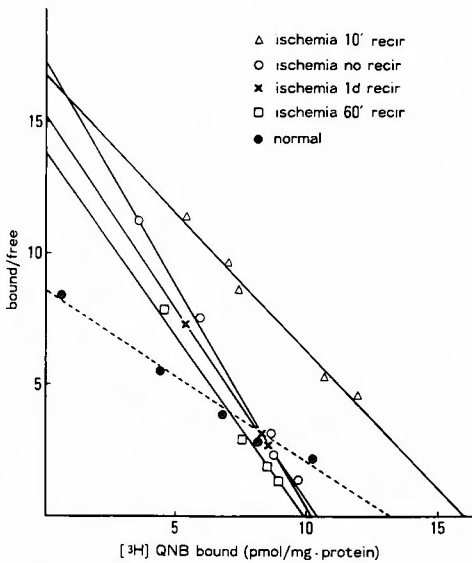


Fig. 13 Scatchard plot of $[^3\text{H}]$ QNB binding to crude membrane prepared from gerbil brain.

い⁴¹⁾.

Yamamura ら⁴⁰⁾ によるラット脳⁴⁰⁾の $[^3\text{H}]$ QNB で調べた m-ChR 量, CAT, acetylcholine esterase(AChE) の data では, ACh が最も多く分布している部位である線条体には receptor 量が多く, 酵素活性も高い。しかし, 2 番目に m-ChR が多い大脳皮質では CAT が少なく, AChE 活性も非常に低く, 両者の分布は平行

しない。m-ChR が最も少ないのは小脳皮質で, この部位の CAT, AChE 活性も脳内で最も少ない。以上のように, m-ChR と ACh の合成や代謝に関係した酵素は必ずしも平行して分布していない。

最近の neurotransmitter や receptor の研究によれば^{4,25,33)}, Alzheimer 病では, 大脳皮質, 海馬, 線条体における CAT 活性の低下が知られているが^{25,26)}, さらに海馬においてのみ m-ChR の減少が指摘され³²⁾, 病因として脳内コリン系の異常, 特にムスカリン性の皮質—海馬経路の変性が注目されている。

脳虚血に関連して, 血管性痴呆があるか, この病態および発症のメカニズムに関しては海馬の病変が注目されているが, 実際に脳虚血における m-ChR および CAT が時間経過でどう変化するかについては, これまで報告がない。そこで, 著者はこれらを明らかにすることにより, 虚血および血管性痴呆の病態の解明をはかった。

m-ChR については, 本教室ですでに実験的水頭症における変化を検討している¹⁹⁾ が, 虚血により m-ChR がどのように変化するかを調べた。Pulsinelli の方法による全脳虚血ラットでは, 結合量は減少し, affinity は増加した。これは, 虚血による receptor の減少を affinity の増加で代償するものと考えられる。

では, 虚血のどの部位で receptor の変化がみられるのかを, 局所脳虚血でみてみると, 田村の方法による中大脳動脈閉塞では組織学的に梗塞巣が境界明瞭に認められた。梗塞巣では neuron の壊死により receptor

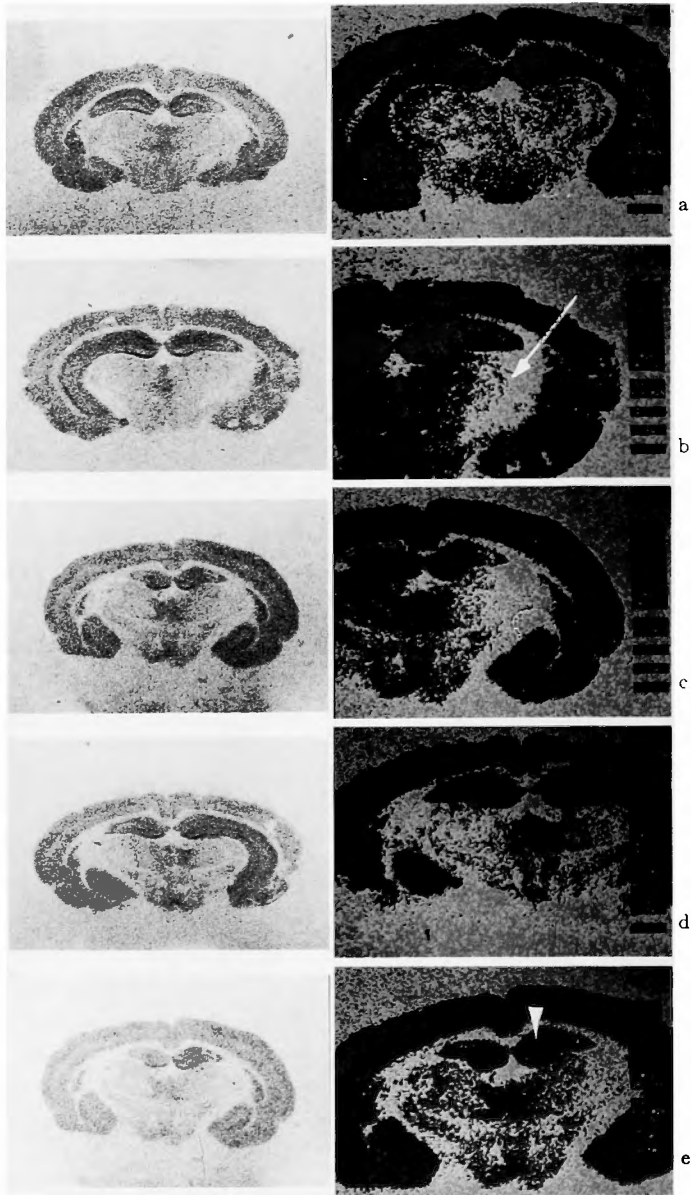


Fig. 14 ^3H -QNB autoradiograms in normal and ischemic gerbil brain. On the right side, a computerized image analyzer was used. Normal (a), 1 day (b), 2 days (c), 4 days (d) and 7 days (e) following 5 min ischemia. On and after 1 day (b) following ischemia, m-ChR in the lateral thalamic nucleus and ventral thalamic nucleus decreased (arrow). 7 days (e) following ischemia, m-ChR in the hippocampus decreased (arrow head).

は消失するが、梗塞周囲に binding の変化を認めなかった。

梗塞にいたらない虚血脳では receptor は時間の経

過とともにどのように変化するか、また、再開通は receptor にどのような影響を与えるかが問題になる。そこで、砂ネズミを用い、5分間の短時間の虚血を施し、

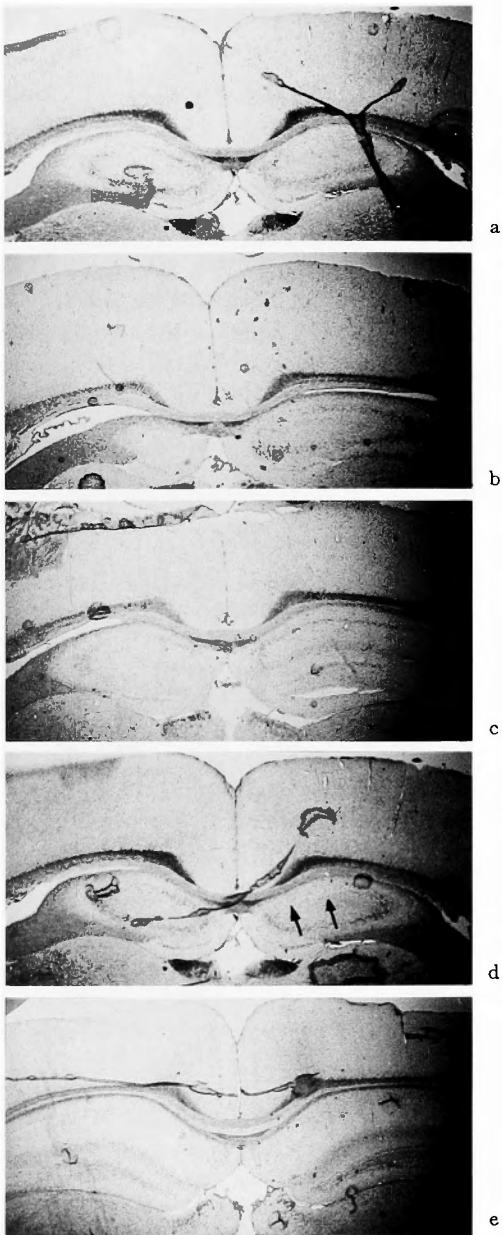


Fig. 15 Immunohistochemical study of normal and ischemic gerbil hippocampi with anti-CAT. Normal (a), 1 day (b), 2 days (c), 4 days (d) and 7 days (e) following ischemia. On and after 4 days (d) following ischemia, CAT positive cells decreased (arrows).

mild ischemia を作成したところ, delayed neuronal death として知られている海馬 CA1 錐体細胞の崩壊

と, 細胞数の減少が認められたが, 他の部位には組織学的変化をきたさなかった. 虚血直後 (再開通なし) では receptor の結合量は減少し, 再開通10分後には増加し, 60分後には再び減少を示した. また, 虚血により affinity は時間経過に関係なく増加していた. このように mild な虚血では, receptor が敏感に反応していることがわかった.

receptor の変化は, 虚血によるシナプス後膜の障害の結果起こったものか, あるいは障害の原因となるものか, あるいは障害を代償するものであるのか, 今回の実験成績からはそのいずれであるかは明らかではないが, 虚血早期より変化していることから, receptor の変化は, 虚血による細胞障害に早期より関係があることが示唆された.

次に, どの部位で, binding の変化がみられたかを autoradiography により検索してみると, 虚血1日目では, 視床, 分界条, Meynert 核で減少がみられた. 海馬は7日以降になってはじめて減少する. これは, 海馬へ投射するコリン作動性ニューロンの起始核は前脳基底部大細胞群の内側中隔野, 対角帯野であると考えられており³¹⁾, この部の receptor binding の減少に引き続いて海馬の binding の減少 (receptor の減少) が惹起されたと考えることができる.

次に, transmitter の変化をみるため, 酵素抗体法による CAT の局在を調べた. コリン作動性神経系の指標として ACh 自身の濃度や分解酵素である AChE 活性などを使用しない理由は, 前者は死後変化が著しく, 後者は ACh neuron にのみ特有なものではないことによる. CAT 陽性細胞は Meynert 核, 対角帯核, 内側中隔野, 海馬, 大脳皮質 II-IV 層の非錐体細胞の一部, 線条体に存在することが示されている. 虚血負荷では海馬以外に CAT 陽性細胞の変化を認めなかった. 海馬は, 虚血4日目より neuron の減少とともに CAT 陽性細胞も減少した. つまり, m-ChR は虚血直後より変化するが, CAT は cholinergic neuron の変性, 死滅まで変化しない. これは, シナプス後膜の m-ChR が虚血により最初に反応変化し, やがて neuron 全体が虚血障害をきたして初めて CAT が変化したととらえることができる.

delayed neuronal death については, これまで数多くの研究がなされている. 虚血時間が短くて, 代謝障害の程度が軽ければ, 脳細胞は血流の再開に伴って次第にホメオスタシスを回復して生き残って行く. しかし, 1982年になって桐野ら¹²⁾, Pulsinelli ら^{30,31)} は相

次いで、これら生き残った細胞群の中のいくつかの細胞(群)が、2日目以降に次々と死んで行く現象を発見した。これを彼らは delayed neuronal death と呼んだ。その後の研究から¹³⁻¹⁶⁾、このような delayed neuronal death の現象は海馬 CA1 領域の細胞のみならず、脳のほとんど全域においてみられることがわかった。しかも、今まで知られていた虚血性の細胞死と異なり、これらの細胞は、血流が正常、エネルギー代謝状況 (energy state) も正常、そしてホメオスタシスもまた正常なのに、虚血侵襲2日目以降、突如として死に始めるという奇妙な経過をたどることが知られるようになった。小暮らの仮説¹⁷⁾では、虚血により神経終末から非特異的でも非生理的に大量の神経伝達物質 (glutamate) であるという説が有力である) が放出され、これに反応して、シナプス後細胞膜に、非生理的に大きなまたは多数のイオン透過性の穴ができる。この後膜の穿孔を通して、イオンの流入が起こり、その修復のための能動輸送のため合成から ATP を取り上げてしまう形となり、代謝障害をきたすとしている。

著者は実験結果により以下のように仮説を立てた。すなわち、虚血によりまずシナプスが障害され、シナプス後膜の receptor が変化するとともに affinity が増加する。この receptor の変化の役割は不明であるが、このようなコリン作動性 neuron の障害により、やがては CAT の減少とともに neuron の死をきたすと考えられる。

CA1 neuron の減少をきたすのは、虚血に対する vulnerability が大きいことによるが、これはコリン作動性 neuron と関係が深いことから、障害されやすい性質をもっているのかも知れない。

Echkelman ら⁸⁾ は, muscarinic acetylcholine の antagonist である QNB に ¹²⁵I を標識し, SPECT (single photon emission computed tomography) でヒトの m-ChR イメージングを試みている。今後、このような臨床応用により、痴呆の鑑別診断や病態の解明が期待される。

今後、脳虚血のみならずいろんな病態における acetylcholine receptor の変化を検討することは、SPECT による臨床応用の貴重な基礎データとなるであろう。

結 語

1. ラットおよび砂ネズミにおいて実験的脳虚血を作成して、m-ChR の binding assay, autoradiography として PAP 法による CAT の変化を調べることによ

り、コリン作動性神経系の変化について検討した。

2. 虚血により、m-ChR は減少し、binding affinity は増加した。再開通は一時的に m-ChR を増加させた。m-ChR は虚血直後より変化したが、CAT は虚血4日目まで初めて海馬において減少した。つまり、シナプス後膜の m-ChR は虚血により最初に反応変化した、やがて neuron 全体の虚血障害が進むにつれ、CAT が変化すると考えられた。

3. m-ChR は虚血1日目での視床、分界条、Meynert 核で減少した後、虚血7日目には海馬で減少がみられたことは、コリン作動性ニューロンの投射路に一致して receptor の減少が惹起されたと考えることができる。

4. 海馬における delayed neuronal death として知られる神経細胞障害には、コリン系はレセプターの変化が何らかの役割を演じていることが示唆された。

5. 各種病態における m-ChR の変化は、今後の SPECT による臨床応用の貴重な基礎データとなるものと思われる。

本論文の要旨は、第1回 Brain Hypoxia 研究会 (1986年9月、東京)、International Symposium on Surgery for Cerebral Stroke (1987年5月、仙台)、第46回日本脳神経外科学会総会 (1987年10月、東京)、Microsurgery for Cerebral Ischemia 9th International Symposium (1988年7月、Detroit)、第47回日本脳神経外科学会総会 (1988年10月、神戸) において発表した。

稿を終えるに臨み、ご指導、ご校閲を賜った高知医科大学脳神経外科教授森惟明先生、並びに助教栗坂昌宏先生に深甚の謝意を表するとともに、終始、ご指導ご協力を賜った高知医科大学第1病理学教室教授原弘先生、同助手十河正典先生 (現広島大学医学部第3内科) に深く感謝いたします。また、本研究に際しご助力をいただいた本教室藤戸健司技官、広井千里技官、実験実習機器センター矢生健一技官、RI 研究センター氏原隆子技官に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Anderson WJ: Neuroreceptor autoradiography. *Monogr Neurol Sci* 10: 120-139, 1984.
- 2) Bennett P Jr: Methods in binding studies. In: Yamamura HI, et al (eds), *Neurotransmitter Receptor Binding*, Raven Press, New York, 1978, pp. 57-90.
- 3) Bowen DM, Smith CB, White P, et al: Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain* 99: 459-496, 1976.
- 4) David P, Verth AH: Regional distribution of muscarinic acetylcholine receptor in normal and Alzheimer-type dementia brain. *Brain Res* 138: 385-392, 1978.

- 5) Davis P, Maloney AJF: Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* II 1403, 1976.
- 6) Drachman DA, Leavitt J: Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol* 30: 113-121, 1974.
- 7) Drachman DA: Memory and cognitive function in man: Does the cholinergic system have a specific role? *Neurology* 27: 783-790, 1977.
- 8) Eckelman WC, Reba RC, Rzeszotarski J, et al: External imaging of cerebral muscarinic acetylcholine receptors, *Science* 223: 291-293, 1984.
- 9) Goldberg ND, Haddox MK: Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. *Ann Rev Biochem* 46: 823-896, 1977.
- 10) Kimura H, McGeer PL, Peng F, et al: Choline acetyltransferase-containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science* 208: 1057-1059, 1980.
- 11) Kimura H, McGeer PL, Peng JH, et al: The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J. Comp Neurol* 200: 151-201, 1981.
- 12) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239: 57-69, 1982.
- 13) Kirino T, Sano K: Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 62: 201-208, 1984.
- 14) Kirino T, Sano K: Fine structural nature of delayed neuronal death following ischemia in the gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol(Berl)* 62: 209-218, 1984.
- 15) Kirino T, Tamura A, Sano K: Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 64: 139-147, 1984.
- 16) Kirino T, Tamura A, Sano K: A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus. *Stroke* 17: 455-459, 1986.
- 17) 小暮久也, 飛田宗重, 泉山公明: 虚血脳ではどんな変化が起こっているか. 代謝異常とその対策. *Medical Practice* 3: 1718-1722, 1986.
- 18) Lowry OH, Rosebrough NJ, et al: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- 19) Mori K, Fugito K, Kamimura Y: Binding assay for muscarinic cholinergic receptors in Kaolin induced hydrocephalus. *Arch Jpn Chir* 53: 695-701, 1984.
- 20) Nakano S, Kato T, Nakamura S, et al: Acetylcholinesterase activity in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and senile dementia. *J Neurol Sci*, in press.
- 21) 中村重信: 神経伝達物質. *脳神経* 37: 410-411, 1985.
- 22) 中村重信: 虚血脳ではどんな変化が起こっているか. 神経伝達物質の変化とその対策. *Medical Practice* 3: 1728-1731, 1986.
- 23) Norberg A, et al: Cholinergic receptors in the hippocampus in normal aging and dementia of Alzheimer type. Giacobini E, et al (eds): In the aging brain: Cellular and molecular mechanisms of aging in the nervous system. Raven Press, New York, 1982, pp.231-245.
- 24) 小川和朗, 中根一穂, 他(編): 組織細胞化学の技術. ホルモンと神経伝達物質. 朝倉書店, 東京, 1986, pp.199-234.
- 25) 小川紀雄(編): 脳のレセプター. 世界保健通信社, 大阪, 1986, pp.167-183.
- 26) Peng HJ, Kimura H, McGeer PL, et al: Anti-choline acetyltransferase fragments antigen binding (Fab) for immunohistochemistry. *Neurosci Letters* 21: 281-285, 1981.
- 27) Perry EK, Gibson PH, Blessed G, et al: Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. *J Neurol Sci* 34: 247-265, 1977.
- 28) Perry EK, Perry RH, Blessed G, et al: Neuropsych evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* I 189, 1977.
- 29) Pulsinelli, WA: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10: 267-272, 1979.
- 30) Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11: 491-498, 1982.
- 31) Pulsinelli WA: Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. In: *Progress in Brain Research* 63: 29-37, Elsevier, New York, 1985.
- 32) Reisine TD, Yamamura HI, Bird ED, et al: Pre-and postsynaptic neurochemical alternations in Alzheimer's disease. *Brain Res* 159: 477-481, 1978.
- 33) Rossor MN, Svendsen C, Hunt SP, et al: The substantia innominata in Alzheimer's disease: An histochemical and biochemical study of cholinergic marker enzymes. *Neurosci Letters* 28: 217-222, 1982.
- 34) Rotter A, Birdsall NJM, Burgen ASV, et al: Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. 1. Technique for autoradiographic localization of the binding of [³H]-propylbenzylcholine mustard and its distribution in the forebrain. *Brain Res Rev* 1: 141-165, 1979.

- 35) 塩谷弥兵衛(編)：目で見る脳の構造と活性物質。厚生社，大阪，1985，pp.223-225.
- 36) 武 陽明，成実重彦，永井康雄，他：椎骨および総頸動脈閉塞による脳虚血モデルラットの神経化学的検討。日薬理誌 84: 485-498, 1984.
- 37) Tamura A: Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences follow middle cerebral occlusion. J Cereb Blood Flow Metabol 1: 53-60, 1981.
- 38) Tamura A: Focal cerebral ischemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C] iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. J Cereb Blood Flow Metabol 1: 61-69, 1981.
- 39) 渡辺慶一，中根一穂(編)：酵素抗体法。学際企画，東京，1985，pp.37-71.
- 40) Yamamura HI, Snyder SH: Muscarinic cholinergic binding in rat brain. Proc Natl Acad Sci USA 71: 1725-1729, 1974.
- 41) 吉田 博，村井裕夫(編)：レセプター基礎と臨床。中外医学社，東京，1983，pp.14-29.