

実験水頭症ラット脳における muscarinic cholinergic receptor および cholinergic neuron の変化

高知医科大学脳神経外科学教室（指導：森 惟明教授）

坂 本 貴 志

〔原稿受付：昭和63年10月28日〕

Changes of Muscarinic Cholinergic Receptors and Cholinergic Neurons in Experimental Hydrocephalic Rat Brain

TAKASHI SAKAMOTO

Department of Neurosurgery, Kochi Medical School, Nankoku City, Japan
(Director: Professor Dr. KOREAKI MORI)

Recently, the relationship between neurological disorders and neurotransmitters has received much attention. Many studies have been reported about the changes of neurotransmitters and their metabolites in cerebrospinal fluid (CSF) in hydrocephalus, and it is presumed that neurotransmitters may play a role in the regulation of CSF dynamics.

We injected kaolin suspension into the cisterna magna of rats and created experimental hydrocephalus. Here we define the acute hydrocephalic stage to be the seventh day after injection and the chronic to be the twenty-first day after injection. We made studies about the changes of muscarinic cholinergic receptors in experimental hydrocephalic rat brains using binding assay, macroautoradiography, and microautoradiography with ^3H -quinuclidinyl benzilate (QNB), which has a high and specific affinity for muscarinic receptors. We also studied the changes of cholinergic neurons in experimental hydrocephalic rat brains by immunohistochemical methods with anti-choline acetyltransferase (CAT), the antibody for the synthetic enzyme of acetylcholine which is thought to exist only in cholinergic neurons.

Muscarinic cholinergic receptors were increased in acute hydrocephalus, and tended to normalize in chronic hydrocephalus but no change was observed in its distribution. There seemed to be no difference in the number of CAT positive cells between normal and hydrocephalic rat brains, but in hydrocephalic rat brain, CAT positive cells were compressed by the dilated ventricles, and they might have fallen into hypofunction.

Key words: Hydrocephalus, Neurotransmitter, Acetylcholine, Cholinergic neuron, Muscarinic receptor.

索引用語：水頭症，神経伝達物質，アセチルコリン，コリン神経，ムスカリン受容体。

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

It is thought that muscarinic receptors were increased by some mechanism like denervation hypersensitivity because of the reduction of ACh production or release. Recent advancement of PET or SPECT has made it possible to investigate the changes of neurotransmitter receptors in human brain. Such biochemical examination may offer some information to assess the functional state of hydrocephalus and to find a new approach to its treatment.

はじめに

脳脊髄液の産生・吸収の機序，およびその調節機構に関しては未だ定説はなく，水頭症の病態生理についても不明な点が多い。しかしながら，水頭症において，脳脊髄液中の神経伝達物質の代謝産物の変化に関する研究が従来から数多くなされてお^{1-11, 17-19, 21, 26, 31, 34, 41, 42)}，水頭症の病態発現，あるいは脳脊髄液の産生・吸収の調節機構に神経伝達物質の関与が示唆されている^{20, 35, 39, 43)}。そこで，われわれは水頭症における神経伝達物質の変化に注目し，哺乳動物の中枢神経系における主要な神経伝達物質の一つであり，最近，痴呆との関係で注目されている acetylcholine (ACh) をまず取り上げ，実験水頭症ラット脳における muscarinic cholinergic receptor の変化を binding assay および autoradiography により検討し，さらに，cholinergic neuron の変化を免疫組織化学的に検討したので報告する。

対象および方法

1 水頭症の作成

体重 200 g 程度の成熟雄 Wistar 系ラット 55 匹を使用し，水頭症作成群 (35 匹) と対照群 (20 匹) に分けた。pentobarbital sodium (50 mg/kg) 腹腔内投与による全身麻酔下に，山木らの方法に従い⁶⁹⁾，後頭蓋窩正中切開を行い，手術用顕微鏡下に Kaolin 溶液 (100 mg/ml) を 0.1 ml 大槽内に注入し，水頭症を作成した。対照群には同様の手技により，0.1 ml の生理食塩水を大槽内に注入した。Kaolin 溶液注入後 7 日を急性期，21 日を慢性期とし，それぞれの病期に，以下の実験を行った。

2 ³H-QNB (quinuclidinyl benzilate) による muscarinic receptor の binding assay

(1) 大脳細胞膜成分の抽出

水頭症急性期，慢性期，対照群ラットのそれぞれを断頭し，すみやかに脳を摘出した後，小脳，および脳幹を除いた大脳部分を 0.32M sucrose 中で homoge-

nize し，1000×g で10分間遠沈した。その上澄液をさらに 10000×g で20分間高速遠沈し，得られた pellet を 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で homogenize し，これを大脳の細胞膜成分として binding assay に使用した (Fig. 1)。

(2) ³H-QNB binding assay^{9, 44, 46)}

大脳細胞膜成分に，種々の濃度 (0.5~8.0 mM) の ³H-QNB (1-Quinuclidinyl [phenyl-4-³H] benzilate, ethanol solution, specific activity 30-60 Ci/mmol コード番号 TRK604, アマージョムジャパン) を加え，25°C で60分間 incubate した。この際，³H-QNB が muscarinic receptor 以外の receptor と結合した non-specific binding の量を調べるため，100 μm atropine sulfate を加えた系も同時に測定した。incubation の後，内容を glass fiber filter (GF-B) を通して吸引濾過し，filter の radioactivity を liquid scintillation spectrometry (Tracor Analytic MARK III) で測定した。細胞膜成分の蛋白量を bovine serum albumin を標準として，Lowry 法³²⁾ で定量し，細胞膜成分単位

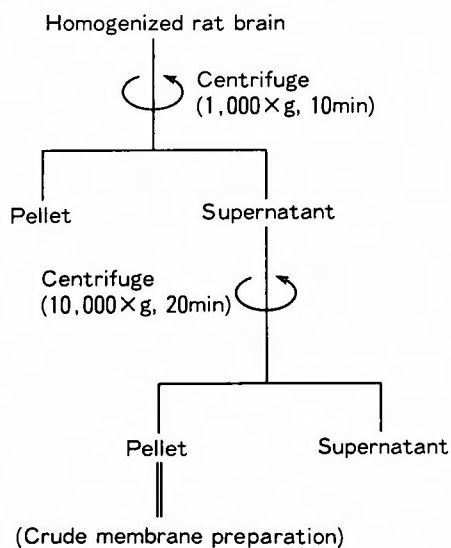


Fig. 1 Crude membrane preparation from rat brain.

蛋白量当たりの radioactivity を算出した. atropine を加えた系の値を引いた値を ^3H -QNB が特異的に muscarinic receptor に結合した量, すなわち specific binding の量とした.

3. ^3H -QNB による macroautoradiography^{16, 60, 62)}

水頭症急性期, 慢性期, 対照群ラットのそれぞれを断頭し, すみやかに脳を摘出し, ただちに液体窒素—アセトン法(−60〜−70°C)で凍結させた. 次に −20°C に保った cryostat 内で 8 μm 厚の凍結組織切片を作成した. thowmount 法により, あらかじめ gelatin coat を施したスライド上にのせ, 冷風で30分間乾燥させた. 次に 50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.4) に binding assay で求めた至適濃度の ^3H -QNB を加え, この中に組織切片をのせたスライドを入れ, 25°C で2時間 incubate した. incubate した後, 4°C に冷却した同一緩衝液で30秒間洗浄し, 冷風で乾燥させた. 乾燥させたスライドは暗室にてX線撮影用の cassette 内に並べ, その上に ^3H -sensitive film (サクラ autoradiofilm ^3H) を密着させて置き, 4°C で5日間曝露させた. film の現像は 20°C で5分とし, 定着は10分とした. non-specific binding を調べるために, 200 μM の atropine sulfate を incubation 用のリン酸緩衝液の中に加えた系でも同様の操作を行った.

4. ^3H -QNB による microautoradiography^{37, 50, 62, 65)}

macroautoradiography と同様の手技で凍結切片を作成し, ^3H -QNB と incubate した. 暗室にて dipping 法によりスライド表面を均一に乳剤 (サクラ NR-M) で覆い, 4°C で3週間曝露させた. 現像は 20°C で5分とし, 定着は10分とした. なお, この実験は水頭症急性期と対照ラットのみで行った.

5. 抗 choline acetyltransferase (CAT) 抗体を用いた PAP 法による cholinergic neuron の観察^{28-30, 51, 67)}

ラットを ether 麻酔下を開胸し, 左心室よりまず 4°C の生理食塩水 100 ml を灌流した. 次に4% paraformaldehyde 300 ml にて灌流固定を行った後, 脳を摘出し, 4°C の同一固定液で24時間の追加固定を行った. 次に 4°C で 10%, 15%, 20% sucrose 加, 0.01M リン酸緩衝液に順次浸して脱水処理をした後, 凍結切片を作成した. hydrogen peroxidase にて内因性 peroxidase を除去した後, background stain を減少させるために blocking solution (normal serum) を加えて incubate し, さらに一次抗体 (anti-CAT antibody, Boehringer Mannheim GmbH), 二次抗体, PAP を順次作用させて, 最後に DAB により発色させた (Table 1).

Table 1. PAP procedure.

1.perfusion fixation with 4% paraformaldehyde (PFA)	
2.fixation in 4% PFA	
3.dehydration in 10% sucrose added 0.01M PBS	4°C 4hr
4.dehydration in 15% sucrose added 0.01M PBS	4°C 4hr
5.dehydration in 20% sucrose added 0.01M PBS	4°C overnight
6.frozen section	
7.rinsed in 0.01M PBS	4°C 5min×3
8.removal of intrinsic peroxidase	room temp. 30min
9.rinsed in 0.01M PBS	4°C 5min×3
10.blocking solution	room temp. 10min
11.first antibody (anti-CAT)	4°C 48hr
12.rinsed in 0.01M PBS	4°C 5min×3
13.second antibody	room temp. 60min
14.rinsed in 0.01M PBS	4°C 5min×3
15.PAP solution	room temp. 60min
16.rinsed in 0.01M PBS	4°C 5min×3
17.diaminobenzidine (DAB) stain	room temp. 30min

結 果

1. 実験的水頭症ラット

水頭症作成時、水頭症群 5 匹、対照群 4 匹が大槽穿刺にて Kaolin 溶液、あるいは生理食塩水注入時に呼吸停止をきたして死亡した。対照群では処置後、一時的に体重減少を認めたが、次第に食欲、運動量ともに回復し、体重も 1 週間後には非処置群とほぼ同等にまで回復した。一方、水頭症群では対照群に比し、体重減少の程度が大きく、食餌摂取量は減少したままであり、動作が鈍く、ataxic な歩行をするようになり、脱毛傾向が認められた (Fig. 2)。断頭し、摘出した脳を乳頭体のレベルで前額断面に割を入れ、脳室を観察すると、生理食塩水注入群で脳室拡大が認められなかったのに対し、Kaolin 溶液注入群では程度の差はあるが、全例に脳室の拡大を認めた。急性期においては、拡大した脳室の周囲は浮腫状を呈したが、慢性期になると、浮腫は消失した (Fig. 3)。

2. binding assay

^3H -QNB の結合量を、大脳の細胞膜成分の単位蛋白当たりの量として求めてみると、水頭症急性期、慢性期、対照群ともに ^3H -QNB の量が増えるにしたがってその結合量が増加し、いずれもほぼ同じ QNB の量で飽和するが、その結合量は水頭症急性期において高値を示し、慢性期には正常値に近づくという傾向を示した (Fig. 4)。これに Scatchard 解析を行うと、直線の勾配によって示される解離定数 (Kd) には著明な変化を認めなかったが、maximal binding (B max) は急性期において増加し、慢性期には正常に近づく傾向

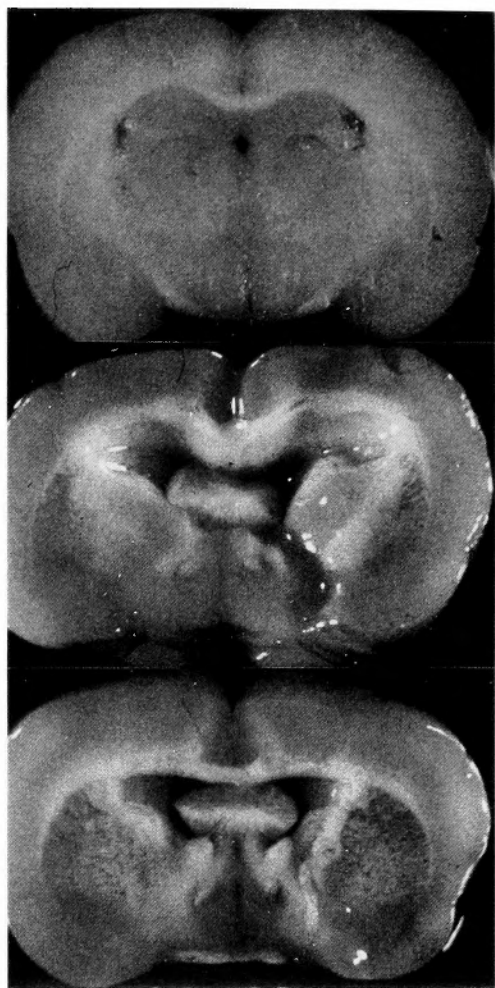


Fig. 3 Coronal section of rat brain. Control(above), acute hydrocephalus(middle), and chronic hydrocephalus(below).

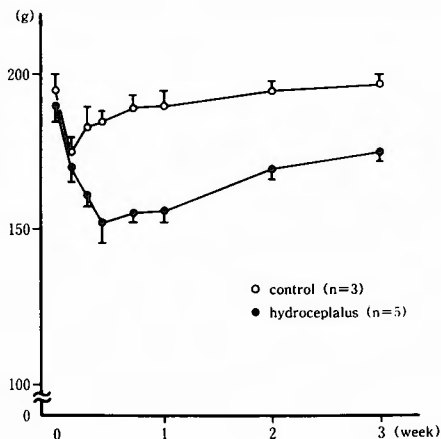


Fig. 2 Changes of body weight of rats.

を示した (Fig. 5, Table 2)。

3. macroautoradiography

macroautoradiography により muscarinic receptor の局在を調べたところ、対照群ラットでは cerebral cortex 外側部、hippocampus の CA₁ から CA₃ portion の外側部、dentate gyrus, thalamus, neostriatum, olfactory tubercle に集積が認められた (Fig. 6)。Fig. 6 下段は 200 μM の atropine sulfate を加えて、 ^3H -QNB の non-specific binding、つまり muscarinic receptor 以外への結合をみたもので、これにより ^3H -QNB が高い特異性をもって muscarinic receptor と

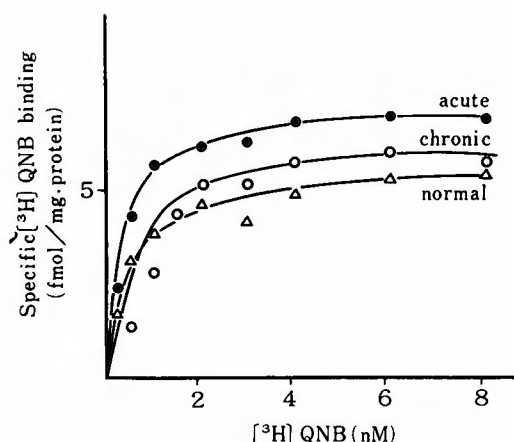


Fig. 4 Specific ^3H -QNB binding to crude membrane preparation from rat brain.

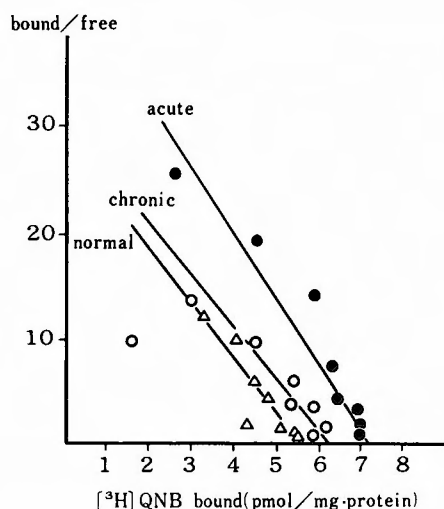


Fig. 5 Scatchard plot of ^3H -QNB binding to crude membrane preparation from rat brain.

Table 2. Dissociation constant (K_d) and maximal binding (B_{max}) in rat brain.

	K_d ($\pm 2SD$)	B_{max} ($\pm 2SD$)
Normal	0.200 (± 0.012)	5.610 (± 0.011)
Acute	0.172 (± 0.015)	7.240 (± 0.034)*
Chronic	0.208 (± 0.012)	6.249 (± 0.083)*

$n=5$ * $P < 0.001$

結合していることが示される。

水頭症急性期、慢性期を対照群と比較すると、receptor の分布上、新たに強い集積を示す部分はなく、水頭症、特に急性期においては、対照群で集積がみられた部分に、より強く集積する傾向が認められた (Fig. 7)。

4. microautoradiography

microautoradiography により muscarinic receptor の局在、および量的変化を光学顕微鏡レベルで検討したところ、水頭症急性期においては、一様にその density が高くなっており、水頭症急性期においては muscarinic receptor が増加していることが観察された (Fig. 8, 9)。局在の変化は macroautoradiography 同様、認められなかった。

5. cholinergic neuron の変化

CAT 陽性細胞は、正常では内側中隔野, neostriatum, globus pallidum, habenular nucleus, internal capsule, fornix などに認められた。水頭症、とくに慢性期においては、CAT 陽性細胞は拡大した脳室に圧排されていたが、細胞数には明らかな変化は認められなかった (Fig. 10)。

考 察

水頭症の病態生理は未だ完全には解明されておらず、脳脊髄液の産生・吸収の調節機構に関しても不明な点が多い。水頭症の病態への神経伝達物質の関与についてはまだ定説はないが、中枢神経系疾患のうち、Parkinson 病⁵⁸⁾、Huntington 舞蹈病^{10,36,52)}、脊髄小脳変性症^{53,63)}、Alzheimer 病^{11-13,34,42,43)} などでは、その病態の発現に、神経伝達物質の変化が重要な役割を果たしていることは広く知られており、また、脳脊髄液の主要な産生部位である脳室内脈絡叢に、モノアミン系やコリン系の神経終末が分布していることや、水頭症においては、脳脊髄液中の神経伝達物質の代謝産物の濃度に変化がある^{2-5,7,31-34,42,43)} という報告もあり、水頭症の原因あるいはその病態発現に、神経伝達物質が関与している可能性が考えられる。

中枢神経系における神経伝達物質およびその候補物質は数多く存在するが、われわれは次の理由から、まず ACh に注目した。すなわち、近年、各種神経疾患と神経伝達物質との関係が注目されてきているが^{10,36)}、最近、痴呆を呈する代表的疾患である Alzheimer 病において、記憶や情動に深く関与していると考えられている大脳基底核の cholinergic neuron が減少してお



Fig. 6 Macroautoradiography of normal rat brain without atropine(above) and with 200 μ M atropine(below).

り^{12,68)}, 大脳皮質において ACh 合成酵素である CAT や、分解酵素である cholinesterase (ChE) の活性が低下しているとの報告がなされ、また、Alzheimer 病に対して、muscarinic receptor の agonist である bethanecholchloride を髄液腔に持続的に注入する cholinergic therapy の試みも報告されており²²⁾, 痴呆と cholinergic neuron との関係がとくに注目されてき

ているが^{11,27,4,54,55,59,61)}, このことは今まで定説のなかった正常圧水頭症における痴呆の発現にも cholinergic neuron が関与している可能性を示唆するものと考えられるからである。

神経伝達物質、あるいはその作動神経系の変化を検討する方法としては、神経伝達物質そのものの測定、その前駆物質、あるいは代謝産物の測定、合成酵素、

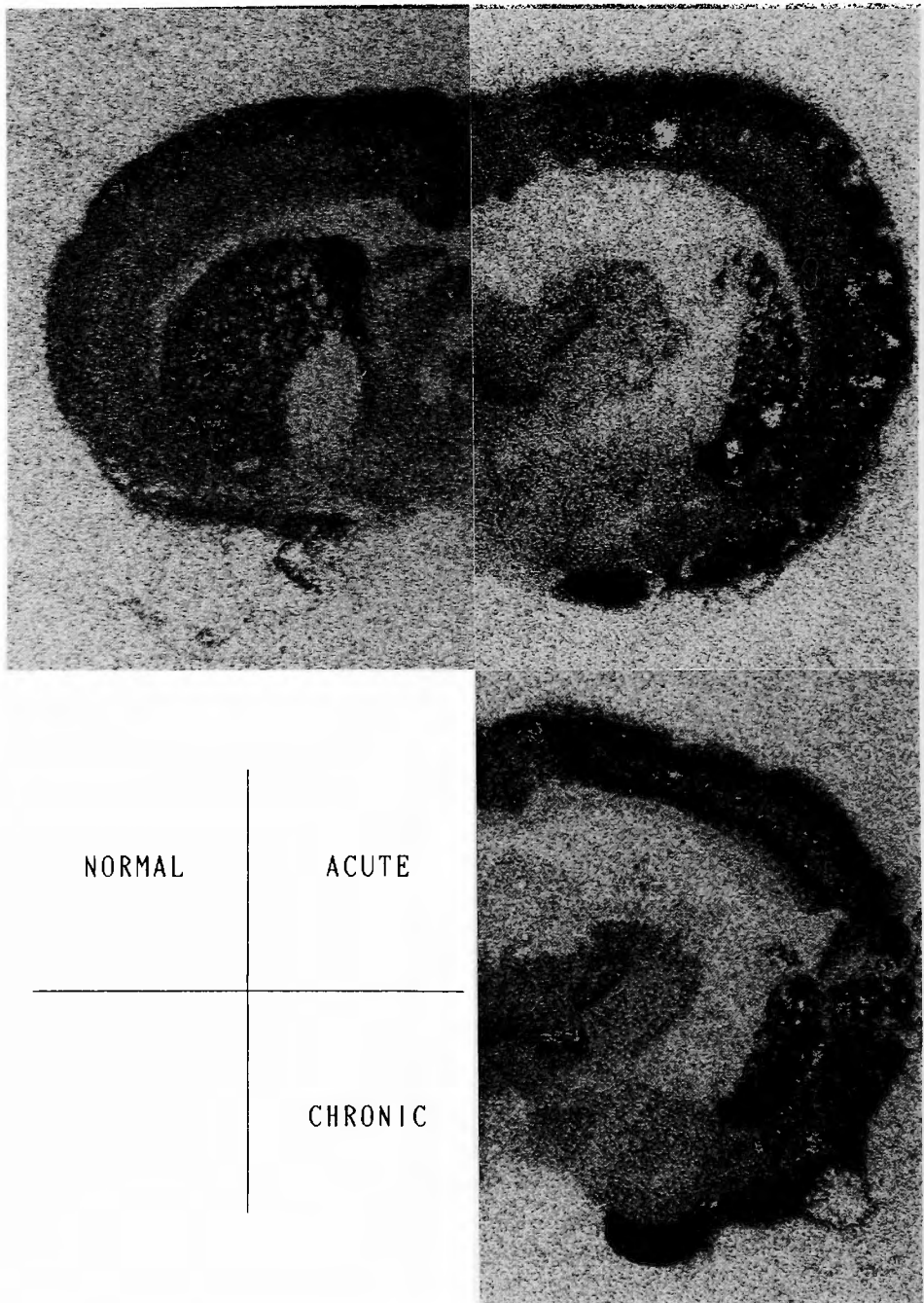


Fig.7 Macroautoradiography of normal and hydrocephalic rat brains.

あるいは分解酵素の活性の測定などがある。ACh は choline と acetyl-CoA から CAT により合成され、シナプス間隙に放出された ACh は ChE により、す

みやかに choline と酢酸に分解される。choline は再び神経終末に取り込まれ、ACh 合成に再利用される^{23,66)}。したがって、cholinergic neuron を検討する方

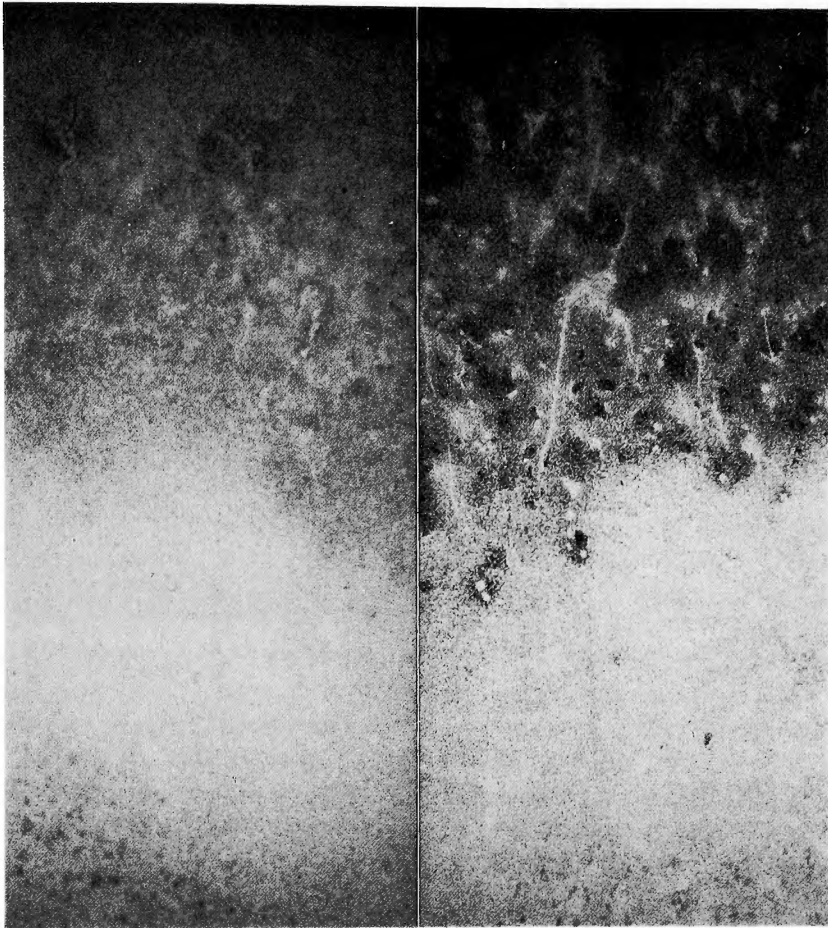


Fig. 8 Microautoradiography of normal(left) and hydrocephalic rat cortex(right) (X200).

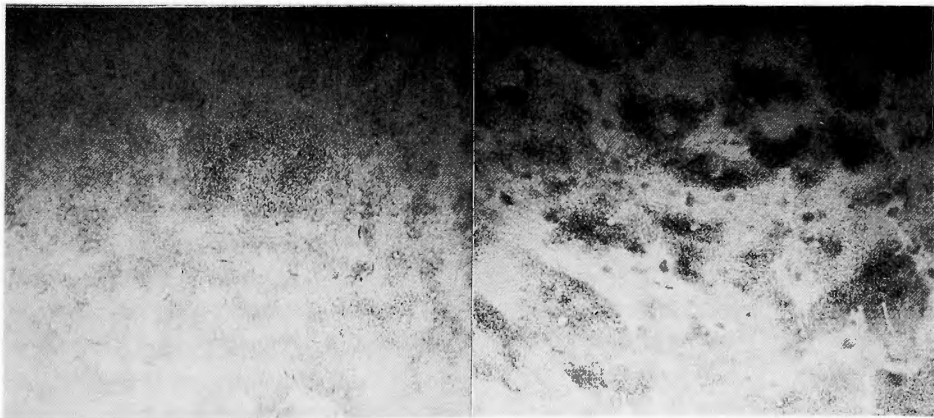


Fig. 9 Microautoradiography of normal(left) and hydrocephalic rat hippocampi(right) (X200).

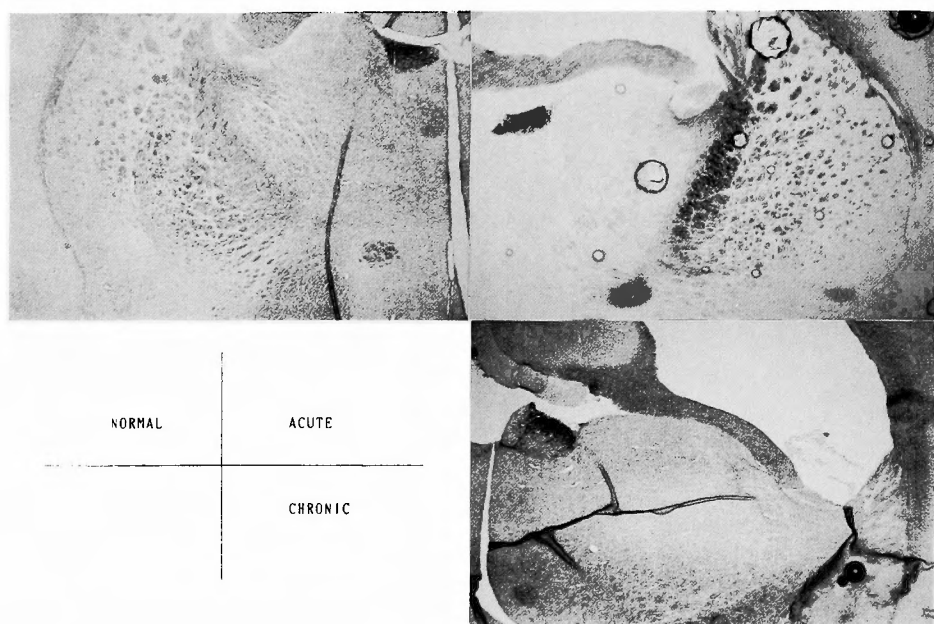


Fig. 10 Immunohistochemical study of normal and hydrocephalic rat brains with anti-CAT (X100).

法としては、ACh そのものの測定、choline の up-take の測定、CAT, ChE 活性の測定などがある。これまでの脳の生化学的研究は、主として神経伝達物質の測定によりなされることが多かったが、神経機能は、神経伝達物質がシナプス後膜の receptor と結合して初めて惹起されるものであり、したがって、神経伝達物質の測定だけでなく、その receptor の変化を併せて捉えられることが、神経機能の変化をより正確に反映するものと考えられる。

神経伝達物質の 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 radioactive ligands の開発にともない、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 らによって初めて、muscarinic receptor に高い特異性と親和性をもった物質である quinuclidinyl benzilate (QNB) が報告されて以来⁷⁰⁾、数多くの研究が行われるようになってきており^{13,24)}、中枢神経系、ことにラットにおける脳内 muscarinic receptor の分布に関してはすでに詳細な分布図が作成されている^{56,57)}。しかしながら、各種病態におけるその変化についての報告は少なく、水頭症に関する報告はない。そこでわれわれは QNB を ³H でラベルした radioactive ligand を用いて、水頭症における muscarinic

receptor の変化、すなわち、postsynaptic レベルでの変化をまず検討した。

binding assay, macroautoradiography, microautoradiography の結果、水頭症急性期においては、muscarinic receptor は、その生理的存在部位において一様に増加しており、慢性期になると徐々に正常に近づいていく傾向を示した。この原因として考えられるのは、水頭症においては何らかの原因により神経終末における ACh の放出が減少し、その結果、denervation hypersensitivity と同様の機序により、急性期においては一時的に muscarinic receptor が増加するが、ACh 放出低下の状態が長期間持続することにより、receptor の変化は次第に元に戻り始めるという機序が推定される。水頭症ラットは処置後3週間をすぎると死亡するものが多く、その後の receptor の変動は観察できなかったが、死亡前には receptor の量は正常よりも減少している可能性も考えられた。

receptor のこのような変化を惹起したと考えられる ACh 放出の低下の原因として、ACh 合成の低下、あるいは神経終末や神経細胞そのものの減少が考えられる。そこで、次に cholinergic neuron の変化を免疫組織化学的に検討した。cholinergic neuron の指標としては、ACh 合成酵素である CAT や、分解酵素であ

る ChE があるが、ChE は cholinergic neuron 以外にも存在するのに対し、CAT は cholinergic neuron にのみ特異的に存在するとされていることから^{6,23,66)}、抗 CAT 抗体を用いて検討を行った。

中枢神経系における cholinergic neuron の分布に関してはまだ不明な点も多いが、ヒトにおいては、神経細胞が Mynert nucleus にあるものが cerebral cortex に軸索をのぼし、septal nucleus にあるものが hippocampus に軸索をのぼすとされており、neostriatum にあるものはその中で完結されていて、cerebral cortex や hippocampus への projection はないと考えられている⁷¹⁾。このような cholinergic neuron の分布はラットにおいてもほぼ同様であることが知られている³⁸⁾。水頭症ラットにおいて、ヒトの Mynert nucleus に相当すると考えられる基底核付近は、拡大した脳室に強く圧迫されているが、CAT 陽性細胞の有意な減少は認められなかった。したがって、シナプス後膜における muscarinic receptor の増加は、拡大した脳室に強く圧迫された神経細胞が機能低下に陥り、ACh の合成もしくは放出の低下を反映しているものと考えられる。水頭症がさらに慢性化し、頭蓋内圧亢進の状態がさらに長期間続いた場合には、機能低下に陥った神経細胞が不可逆的な変化を呈し、変性・脱落する可能性も否定できないが、仮にそのような変化がおけるとすれば、比較的長期間続いていた正常圧水頭症にみられる痴呆が、シャント手術により改善されることがあるのは、正常圧水頭症では機能低下に陥った神経細胞に不可逆的な変化を生じるほどの圧亢進をきたさないからであり、これに対し、先天性水頭症、あるいは小児水頭症で、脳圧亢進状態が長期間存在したと考えられる例では、機能低下に陥った神経細胞に、さらに長期間、脳圧亢進が加わり続けることで、不可逆的な変化が生じるために、シャント手術を行っても知能の改善が期待しにくいのではないかと考えられる。

われわれは先天性水頭症において、脳室内髄液中の神経伝達物質の代謝産物の濃度、およびシャント術前後の変化を観察し、先天性水頭症の予後の予測を行う試みを検討している⁴⁸⁾。最近、positron emission computed tomography (PET) や、single photon emission computed tomography (SPECT) が普及してきたことにより、脳内の種々の神経伝達物質の receptor の観察が、in vivo で可能となっており、muscarinic receptor に関しても ¹¹C-QNB を用いての PET や、¹²⁵I-QNB を用いての SPECT により観察が可能とな

っている^{14,24)}。したがって、髄液中の神経伝達物質の代謝産物の測定に加え、このような神経伝達物質の receptor を中心とした生化学的な変化を捉えらることにより、たとえば先天性水頭症において、脳圧亢進の期間がどの程度であったか、それに伴う神経細胞の変性・脱落の有無などを推定することにより、予後の予測が可能となる事も考えられる。また、すでに荒廃に陥った脳に対する cell implantation や薬物療法など、新しい治療法の開発の可能性も考えられる。今後さらに髄液中の神経伝達物質の代謝産物の測定と併せ、脳内の生化学的な変化を実験動物および臨床で検討し、水頭症の新しい診断・治療法と予後測定の可能性を検討していきたい。

結 語

1. 実験水頭症における muscarinic receptor の変化を ³H-QNB による binding assay, macro-, micro-autoradiography により検討し、cholinergic neuron の変化を抗 CAT 抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。

2. 水頭症急性期においては、muscarinic receptor はその生理的存在部位において一様に増加していたが、慢性期には減少傾向を示した。大脳基底核の cholinergic neuron は拡大した脳室に圧排されていたが、明らかな細胞数の減少は認められなかった。したがって、このような muscarinic receptor の変化は、拡大した脳室に圧迫された神経細胞が機能低下に陥り、ACh の合成ないしは放出が低下したためと考えられる。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜った脳神経外科 森 惟明教授、栗坂昌宏助教授、また論文のご校閲を賜った本学第一病理学教室、原 弘教授、autoradiography の指導をしていただきました同、十河正典助手（現、広島大学第三内科）、RI 研究センター、氏原隆子技官、実験動物の管理にご尽力頂きました、本教室、広井千里技官に謝意を表します。

この論文の趣旨は第 46 回日本脳神経外科学会総会（東京 1986）、および第 16 回 annual scientific meeting of international society for pediatric neurosurgery（ローマ 1988）で発表した。なお、本研究の一部は昭和 59 年～昭和 61 年度の厚生省「難治性水頭症」研究班の研究費により行われた。

文 献

- 1) Anderson WJ: Neuroreceptor autoradiography. Monogr neural Sci 10: 120-139, 1984.
- 2) Andersson H, Roos BE: 5-hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid of hydrocephalic children. Acta Paediatr Scand 58: 601-608, 1969.
- 3) Andersson H, Roos BE: Acidic monoamine

- metabolites in cerebrospinal fluid of children with hydrocephalus. *Acta Neurol Scand* 13: 149-151, 1965.
- 4) Andersson H, Roos BE: Increased level of 5-hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid from infantile hydrocephalus. *Experientia* 22: 539, 1966.
 - 5) Andersson H: Acid monoamine metabolites in experimental hydrocephalus. *Develop Med Child Neurol* 15: 58-61, 1968.
 - 6) Ansell GB, Spanner S: Sources of choline for acetylcholine synthesis in the brain. In Barbeau A, Growdon JH, Wurtman RJ (eds): *Nutrition and the Brain*. vol. 5, Raven Press, New York, 1979, pp. 35-46.
 - 7) Aschcroft GW, Sharman DF: 5-hydroxyindoles in human cerebrospinal fluids. *Nature* 186: 1050-1051, 1960.
 - 8) 熱海佐保子: アセチルコリンセプターの細胞内合成と分化. *神経進歩* 26: 1025-1032, 1982.
 - 9) Bennett JP Jr: Methods in binding studies. In: Yamamura HI, Enna SJ, Kuhar MJ (eds), *Neurotransmitter receptor binding*, Raven Press, New York, 1978, pp. 57-90.
 - 10) Bird ED, Iversen LL: Huntington's chorea. Postmortem measurement of glutamic acid and choline acetyltransferase and dopamine in basal ganglia. *Brain* 97: 457-472, 1974.
 - 11) Brinkman SD, Gershon S: Measurement of cholinergic drug effects on memory in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 4: 139-145, 1983.
 - 12) Coyle JT, Price DL, DeLong MR: Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219: 1184-1190, 1983.
 - 13) David P, Verth AH: Regional distribution of muscarinic acetylcholine receptor in normal and Alzheimer-type dementia brain. *Brain Res* 138: 385-392, 1978.
 - 14) Eckelman WC: External imaging of cerebral muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 232: 291-292, 1984.
 - 15) Egozi Y, Kloog Y, et al: Studies of postnatal changes of muscarinic receptors in mouse brain. In: Littauer UZ, Dudai Y, Silman I, et al(eds), *Neurotransmitters and Their Receptors*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, 1980, pp. 201-215.
 - 16) Frey KA, Ehrenkauf RLE, Agranoff BW: Quantitative in vivo receptor binding II. Autoradiographic imaging of muscarinic cholinergic receptors. *J. Neuroscience* 5: 2407-2414, 1985.
 - 17) Gordon E, Perlow M, Oliver J, et al: Origins catecholamine metabolites in monkey cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 25: 347-349, 1975.
 - 18) Guldberg HC, Aschcroft GW, Grawford TBB: Concentrations of 5-hydroxyindole acetic acid and homovanillic acid in cerebrospinal fluid of the dog before and during treatment with probenecid. *Life Sci* 5: 1571-1575, 1976.
 - 19) 半田 肇, 石川正恒, 金 秀浩, 他: カオリン水頭症における中枢モノアミンの増加とその頭蓋内圧に及ぼす影響. 松本 悟 (編), *小児水頭症の病態および治療*. にゅーろん社, 1984, pp. 3-7.
 - 20) 半田 肇, 三輪聡一: 実験水頭症における中枢性ノルアドレナリンおよびドーパミン神経系の機能変化について. 松本 悟 (編), *小児水頭症の病態および治療*, にゅーろん社, 1983, pp. 33-39.
 - 21) Hansson O: Hydrocephalus and 5-hydroxyindoleacetic acid in the CSF. *Develop Med Child Neurol* 12: 103-104, 1970.
 - 22) Harbaugh RE, Robert DW, Coombs DW, et al: Preliminary report: Intracranial cholinergic drug infusion in patient with Alzheimer's disease. *Neurosurgery* 15: 514-518, 1984.
 - 23) Haubrich DR, Chippendale TJ: Regulation of acetylcholine synthesis in nervous tissue. *Life Sci* 20: 1465-1478, 1977.
 - 24) Holman BL: Muscarinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *JAMA* 254: 3063-3066, 1985.
 - 25) 市川友行, 平田幸男: アセチルコリン. *生体の科学* 37: 180-183, 1983.
 - 26) Inagawa T, Ishikawa S, Uozumi T: Homovanillic acid and 5-hydroxy indoleacetic acid in the ventricular CSF of comatose patients with obstructive hydrocephalus. *J Neurosurg* 52: 635-641, 1980.
 - 27) 飯塚礼二: Alzheimer 病と神経伝達物質. *神経進歩* 30: 697-710, 1986.
 - 28) Kimura H, McGeer PL, Peng F, et al: Choline acetyltransferase containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science* 208: 1057-1059, 1980.
 - 29) Kimura H, McGeer PL, Peng JH, et al: The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J. Comparative Neurology* 200: 151-201, 1981.
 - 30) 木村 宏: 中枢神経系におけるペプチドとコリン系の免疫組織化学. *神経進歩* 26: 1051-1060, 1982.
 - 31) 河野輝昭, 辻村雅樹, 森 和夫, 他: 水頭症における髄液 dopamine (DA) および homovanillic acid (HVA) の変動と probenecid 負荷. *Neurol Med Chir* 20: 373-378, 1980.
 - 32) Lowry OH, Rosebrough NJ: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*

- 193: 265-275, 1951.
- 33) Liles WC, Nathanson NM: Regulation of neuronal muscarinic acetylcholine receptor number by protein glycosylation. *J. Neurochemistry* 46: 89-95, 1986.
- 34) Masarotti M, Miglivre A, Roccella R, et al: 5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA) levels in the cerebrospinal fluid of hydrocephalic children before and after ventricular shunting procedure. *Child's Brain* 4: 195-204, 1978.
- 35) 松本 悟, 江原一雅: 水頭症における中枢カテコラミンニューロンの変化. 松本 悟 (編), 小児水頭症の病態および治療法, にゅーろん社, 1982, pp. 29-35.
- 36) McGeer PL, McGeer EG, Fibiger HC: Choline acetylase and glutamic acid decarboxylase in Huntington's chorea. *Neurology (Minneapolis)* 23: 912-917, 1973.
- 37) McIlwain H, Bachelard HS: *Biochemistry and the Central Nervous System*. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York, 1985, pp. 413-440.
- 38) Mesulam MM, van Housen GW: Acetylcholine-esterase-rich projections from the basal forebrain of the rhesus monkey to neocortex. *Brain Research* 109: 152-157, 1976.
- 39) Miwa S, Inagawa C, Fujiwara M, et al: The activities of noradrenergic and dopaminergic neuron system in experimental hydrocephalus. *J Neurosurg* 57: 67-73, 1982.
- 40) 宮田雄平: 終板外アセチルコリン感受性の分布に対する神経の影響. *神経進歩* 26: 1033-1039, 1982.
- 41) Moir ATB, Aschcroft GW, Crawford TBB, et al: Cerebral metabolites in cerebrospinal fluid as a biochemical approach to the brain. *Brain* 93: 357-368, 1970.
- 42) 森 和夫, 藤田雄三, 和賀志郎, 他: 水頭症における髄液 amine metabolites の変動. *脳神経* 25: 1005-1010, 1973.
- 43) 森 和夫, 河野輝昭, 栗原正紀: 脳内 aminergic neuron の機能と水頭症. 松本 悟 (編), 小児水頭症の病態および治療, にゅーろん社, 1984, pp. 9-12.
- 44) Mori K, Fujito K, Kamimura Y: Binding assay for muscarinic cholinergic receptors in kaolin induced hydrocephalus. *Arch Jpn Chir* 53: 695-701, 1984.
- 45) 森 惟明, 坂本貴志, 栗坂昌宏: 水頭症における髄液中 Neurotransmitter Metabolites の測定. シェント前後の比較. 難治性水頭症調査研究班昭和62年度研究報告書 1988, pp. 43-45.
- 46) Murray TF, Mpitsos GJ, Siebenaller JF, et al: Stereoselective 1-[³H] quinuclidinyl benzilate-binding sites in nervous tissue of *Aplysia californica*: evidence for muscarinic receptors. *J. Neuroscience* 5: 3184-3188, 1985.
- 47) 中村重信: 神経伝達物質および修飾物質の臨床. *日本臨床* 44: 92-97, 1986.
- 48) 西村 健, 山下 正, 多田國利, 他: 老年期痴呆の生化学的研究. *脳神経* 39: 9-16, 1987.
- 49) 野中良一, 諸治隆嗣: ムスカリン性アセチルコリンレセプター. *神経精神薬理* 5: 873-885, 1983.
- 50) 小川和朗, 中根一穂編: 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.
- 51) Peng JH, Kimura H, McGeer PL, et al: Anti-choline acetyltransferase fragment antigen binding (Fab) for immunohistochemistry. *Neuroscience Letters* 21: 281-285, 1981.
- 52) Perry TL, Hansen S, Kloster M: Huntington's chorea. Deficiency of γ -aminobutyric acid in brain. *N Engl J Med* 288: 337-342, 1973.
- 53) Perry TL, Kish SJ, Hansen S, et al: Neurotransmitter amino acids in dominantly-inherited cerebellar disorders. *Neurology* 31: 237-242, 1981.
- 54) Rossor MN, Svendsen C, Hunt SP, ET AL: The substantia innominata in Alzheimer's disease: An histochemical and biochemical study of cholinergic marker enzymes. *Neuroscience Letters* 28: 217-222, 1982.
- 55) Rossor MN: Dementia. *Lancet* 27: 1200-1204, 1982.
- 56) Rotter A, Birdsall NJM, Burgen ASV, et al: Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. I. Technique for autoradiographic localization of the binding of ³H-propylbenzylcholine mustard and its distribution in the forebrain. *Brain Res Rev* 1: 141-165, 1979.
- 57) Rotter A, Birdsall NJM, Field PM, et al: Muscarinic receptor in the central nervous system of rat. II: Distribution of binding ³H-propylbenzylcholine mustard in the midbrain and hindbrain. *Brain Res Rev* 1: 167-183, 1979.
- 58) Sano I: Biochemistry in the extrapyramidal system. *Adv Neurol Sci* 5: 42-48, 1960.
- 59) 佐々木秀直, 新井平伊: アルツハイマー型老年痴呆の神経伝達, 物質について. *臨床神経* 26: 1290-1293, 1986.
- 60) Schwarrz RD: Autoradiographic distribution of high affinity muscarinic and nicotinic cholinergic receptors labeled with [³H] acetylcholine in rat brain. *Life Sciences* 38: 2111-2119, 1986.
- 61) 下浜 俊, 亀山正邦: 老年痴呆と Receptors. *臨床神経* 26: 1294-1297, 1986.

- 62) 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.190-191.
- 63) Spokes EGS, Bannister R, Oppenheimer DR: Multiple system atrophy with autonomic failure. Clinical, histological and neuropathological observation on four cases. *J Neurol Sci* 43: 59-82, 1979.
- 64) 杉山博之：アセチルコリン受容体の構造と反応機序。神経進歩 30: 584-589, 1986.
- 65) 高垣玄吉郎：神経生化学Ⅰ。共立出版，東京，1981，pp.128-165.
- 66) Tucek S: Acetylcholine Synthesis in Neurons. Chapman and Hall, London, 1978.
- 67) 渡辺慶一，中根一穂 編：酵素抗体法。学際企画，東京，1985，pp.37-71.
- 68) Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, et al: Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215: 1237-1239, 1982.
- 69) 山木垂水，小竹源也，成瀬昭二，他：ラット実験的脳水腫。脳神経外科 5: 537-540, 1977.
- 70) Yamamura HI, Snyder SH: Muscarinic cholinergic binding in rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 71: 1725-1729, 1974.
- 71) 吉田充男：大脳基底核系と神経伝達物質。神経進歩 30: 643-655, 1986.