



Title	ラットおよびマウス脳ムスカリン性受容体応答機能と加齢に関する薬理学的研究
Author(s)	大貫, 敏男
Citation	北海道大学. 博士(薬学) 乙第4945号
Issue Date	1996-03-25
DOI	10.11501/3112134
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/51341
Type	theses (doctoral)
File Information	000000297326.pdf



[Instructions for use](#)

①

学位論文

ラットおよびマウス脳ムスカリン性受容体応答機能と
加齢に関する薬理学的研究

1996年

大貫敏男

学位論文

1.1 実験材料および実験方法 11

1.1.1 実験動物 11

1.1.2 大脳皮質切片凍結における *carbachol* 刺激による
[³H]-acetylcholine 蓄積の測定 11

1.1.3 ラットおよびマウス脳ムスカリン性受容体応答機能と
加齢に関する薬理学的研究 12

1.1.4 大脳皮質ムスカリン受容体の分布 12

1.1.5 大脳皮質ムスカリン受容体に対する [³H]pirenzepate 結合の *carbachol* による
調節作用に関する *guanine* 5'-[γ-³²P]ATPase の測定 12

1.1.6 大脳皮質ムスカリン受容体 12

1.1.7 大脳皮質ムスカリン受容体 12

1.1.8 大脳皮質ムスカリン受容体 12

1.2 実験結果 12

1.2.1 大脳皮質ムスカリン受容体に対する [³H]pirenzepate 結合の
調節作用に関する *carbachol* の影響 12

1.2.2 *carbachol* 刺激による [³H]acetylcholine 蓄積の調節作用
に関する *guanine* 5'-[γ-³²P]ATPase の測定 12

1.2.3 *carbachol* 刺激による [³H]acetylcholine 蓄積の調節作用
に関する *guanine* 5'-[γ-³²P]ATPase の測定 12

1.2.4 ラット大脳皮質ムスカリン受容体に対する [³H]pirenzepate
結合の調節作用に関する *carbachol* の影響 12

1.2.5 ラット大脳皮質ムスカリン受容体に対する [³H]pirenzepate
結合の調節作用に関する *carbachol* の影響 12

1.3 考察 12

1996年

大貫敏男

目次

略号表	4
序章	6
第1章 ラット脳内ムスカリン性受容体介在性細胞内情報伝達機構	9
I-1 実験材料および実験方法	11
I-1-1 実験動物	11
I-1-2 大脳皮質切片標本における carbachol 刺激による $[^3\text{H}]$ inositol 1-phosphate 蓄積の測定	11
I-1-3 大脳皮質切片標本における adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate 蓄積の測定	12
I-1-4 大脳皮質シナプス粗膜画分の調製	12
I-1-5 大脳皮質粗膜画分における $[^3\text{H}]$ pirenzepine 結合の carbachol による 結合阻害に対する guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) の影響	12
I-1-6 蛋白質量の測定	13
I-1-7 統計処理方法	13
I-1-8 使用薬物	13
I-2 実験結果	13
I-2-1 大脳皮質切片標本における $[^3\text{H}]$ inositol 1-phosphate 蓄積に 対する高濃度 KCl の影響	13
I-2-2 carbachol 刺激による $[^3\text{H}]$ inositol 1-phosphate 蓄積活性の上昇に 対する pirenzepine および 11-[[2-[(diethylamino)methyl]-1-piperidinyl] acetyl]-5,11-dihydro-6H-pyrido [2,3-b][1,4]benzodiazepine-6-one の作用	14
I-2-3 guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) 存在下および非存在下における ラット大脳皮質粗膜画分における pirenzepine 結合に対する carbachol の影響	17
I-2-4 ラット大脳皮質切片標本における carbachol による adenosine 3',5'-cyclic monophosphate および $[^3\text{H}]$ inositol 1-phosphate 蓄積に対する pertussis toxin の影響	17
I-3 考察	19

第 II 章	マウスを用いたムスカリン性受容体応答の学習／記憶への 関与に関する行動薬理学的研究	22
II-1	実験材料および実験方法	23
II-1-1	実験動物	23
II-1-2	実験装置	23
	A) step-through 型受動的回避反応実験	23
	B) 八方向放射状迷路実験	23
II-1-3	実験原理	25
	A) 受動的回避反応実験	25
	B) 八方向放射状迷路実験	26
II-1-4	実験方法	26
	A) 受動的回避反応実験	26
	B) 八方向放射状迷路実験	28
II-1-5	統計処理	28
II-1-6	使用薬物	28
II-2	実験結果	29
II-2-1	受動的回避反応実験における電気刺激の感受性に対する ムスカリン性アンタゴニストの影響	29
II-2-2	ムスカリン性アンタゴニストの獲得試行における 初期潜時に対する薬物投与の影響	29
II-2-3	ムスカリン性アンタゴニストの獲得試行前投与の作用	30
II-2-4	獲得試行直後投与したムスカリン性アンタゴニストの 再生試行における影響	33
II-2-5	ムスカリン性アンタゴニストの再生試行前投与の影響	33
II-2-6	dantrolene の獲得試行前投与の影響	34
II-2-7	八方向放射状迷路実験における dantrolene の作用	36
II-3	考察	37
第 III 章	老齢ラットおよび老化促進モデルマウスの脳における acetylcholine 神経系の加齢変化	42
III-1	実験方法	44
III-1-1	実験動物	44

III-1-2	老化促進モデルマウスの老化度の判定方法	44
III-1-3	ラット大脳皮質および海馬粗膜画分における [³ H]pirenzepine あるいは [³ H]inositol 1,4,5,-trisphosphate 結合活性の測定	44
III-1-4	ラット脳切片標本における [³ H]inositol 取り込み活性の測定	44
III-1-5	ラットおよび老化促進モデルマウス脳切片標本における [³ H]inositol 1-phosphate 蓄積活性の測定	45
III-1-6	蛋白質量の測定	45
III-1-7	統計処理	45
III-1-8	使用薬物	45
III-2	実験結果	45
III-2-1	当研究室老化促進モデルマウスの老化度スコアの加齢変化	45
III-2-2	老齢ラット大脳皮質および海馬粗膜画分における [³ H]pirenzepine 結合活性	45
III-2-3	ラット脳切片標本における [³ H]inositol 取り込み活性の加齢変化	46
III-2-4	ラットおよび老化促進モデルマウス脳切片標本における carbachol 刺激による [³ H]inositol 1-phosphate 蓄積活性の加齢変化	47
III-2-5	ラット各脳部位粗膜画分における [³ H]inositol 1,4,5,-trisphosphate 結合活性の加齢変化	49
III-3	考察	51
第 IV 章	総括	55
	謝辞	57
	参考文献	58

略号表

AF-DX 116: 11-[[2-[(diethylamino)methyl]-1-piperidinyl]acetyl]-5, 11-dihydro-6*H*-pyrido
[2,3-*b*][1,4]benzodiazepine-6-one

ACh: acetylcholine

ACh-R: acetylcholine receptor

Bmax : 最大結合活性

BSA: bovine serum albumin

[Ca²⁺]_i: 細胞内 Ca²⁺ 濃度

CaMKII: calcium-calmodulin kinase II

cAMP: adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate

CCh: carbachol

4-DAMP: 4-diphenylacetoxy-*N*-methylpiperidine methobromide

DMSO: dimethyl sulfoxide

GTP: guanosine 5'-triphosphate

GTPγS: guanosine 5'-*O*-(3-thiotriphosphate)

G 蛋白質 : GTP 結合蛋白質の総称

H-7: 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine

IC₅₀ 値 : 50% 抑制濃度

i.c.v.: intracerebroventricular administration

IP: inositol 1-phosphate

IP₃: inositol 1, 4, 5-trisphosphate

Kd 値 : 解離定数

mACh-R: muscarinic acetylcholine receptor

PDBu: phorbol 12, 13-dibutyrate

PI: phosphatidylinositol

PK 11195: 1-(2-chlorophenyl)-*N*-methyl-*N*-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide

PKC: protein kinase C

PLC: phospholipase C

PTX: pertussis toxin

QNB: quinuclidinyl benzilate

RO 20-1724: 4-[(3-butoxy-4-methoxyphenyl)methyl]-2-imidazolidinone

SAM: senescence-accelerated mouse

Tris: Tris (hydroxymethyl) aminomethane

W-7: N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide

序章

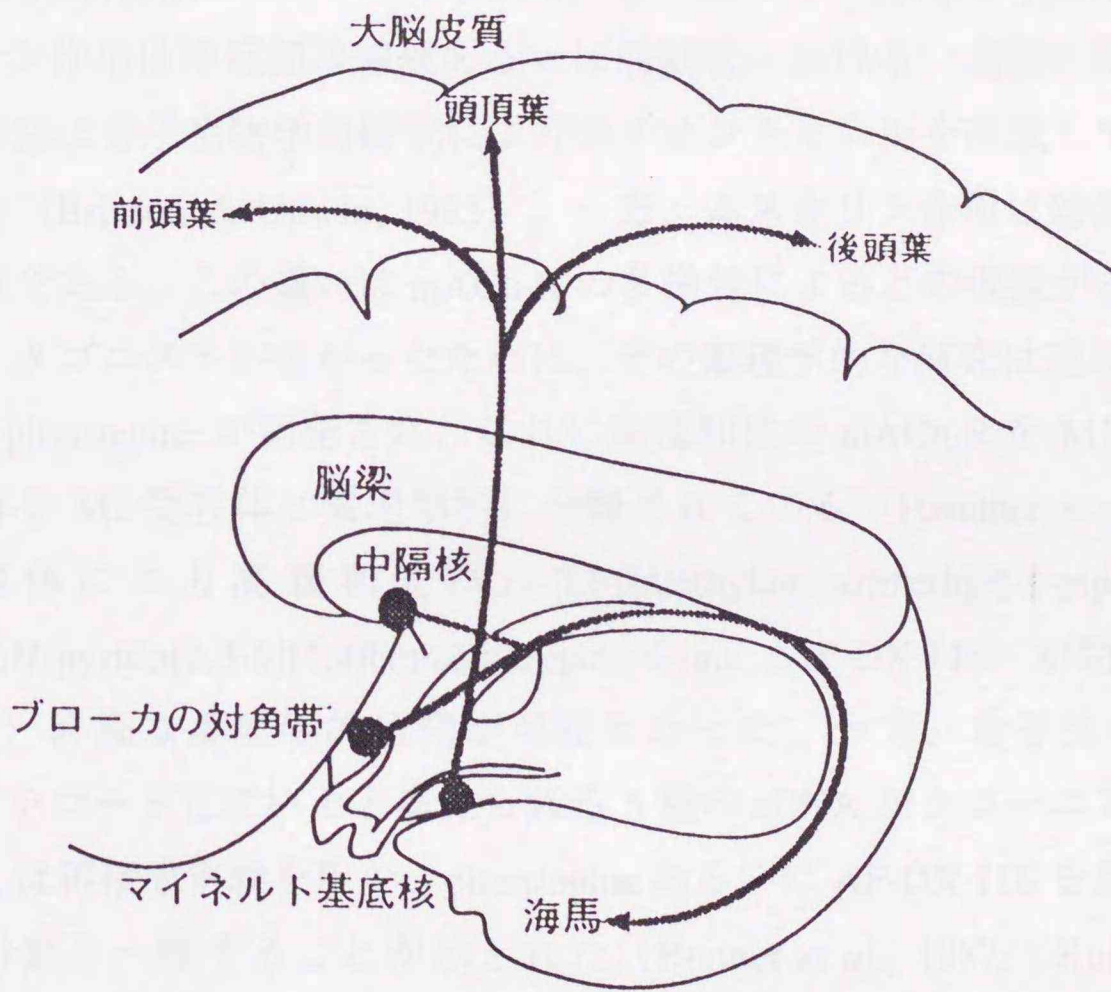
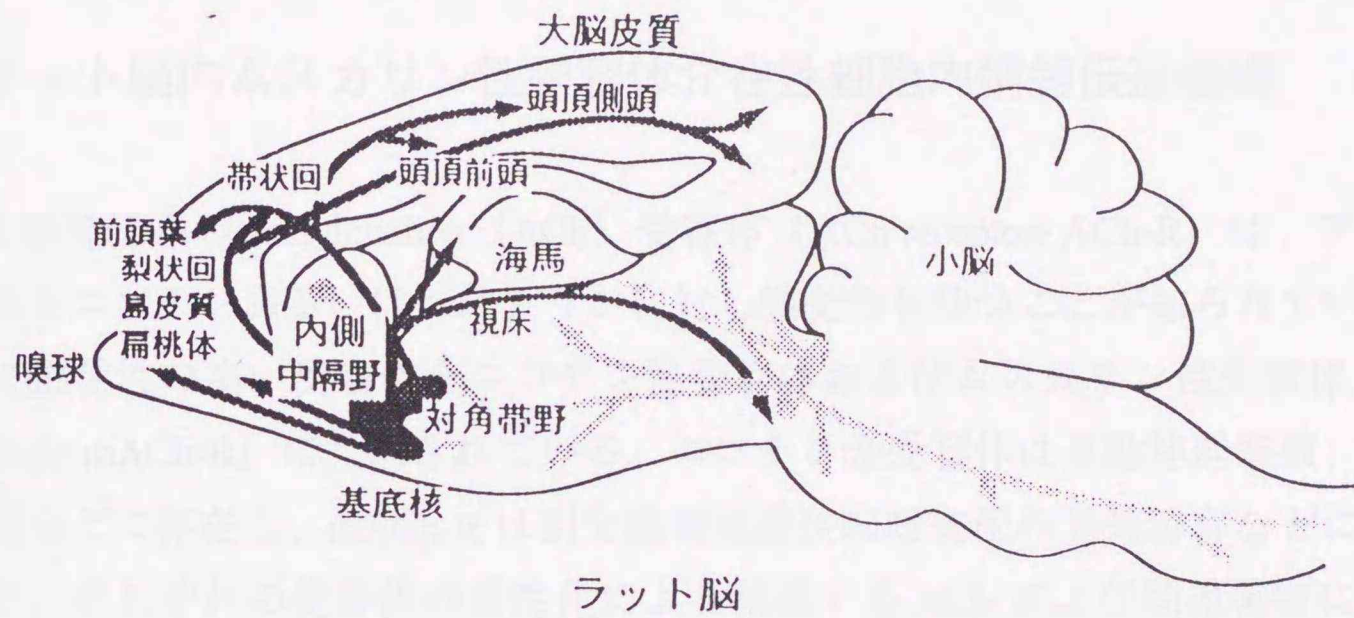
acetylcholine (ACh) は最も早く神経伝達物質として同定された物質の一つである。その受容体は、運動神経終板、自律神経節後膜、副交感神経支配の効果器あるいは中枢神経系に広範に存在する。ACh 受容体 (ACh receptor: ACh-R) はニコチン性受容体およびムスカリン性受容体 (muscarinic ACh-R: mACh-R) に大別されている。mACh-R は自律神経支配の効果器あるいは脳内 ACh 神経系に存在することが知られている。脳内 ACh 神経系は図 1 に示すように学習あるいは記憶に重要である海馬および大脳皮質に高密度に投射している (Gage *et al.*, 1983; Saper, 1984; Sofroniew *et al.*, 1982)。治療薬物の副作用 (Gruber *et al.*, 1967; Sitaram *et al.*, 1978) あるいは外科的手術の後遺症などから (Milner *et al.*, 1968) 脳内 ACh 神経系の学習/記憶に対する関与が推測され、実験的にも多くの証明がなされてきた (Drachman, 1977; Flicker *et al.*, 1983; Kitajima *et al.*, 1992; Mouton *et al.*, 1988; Walsh *et al.*, 1985; Whishaw *et al.*, 1985)。アルツハイマー病患者脳において大脳皮質あるいは海馬における ACh 神経系の機能低下 (Davis & Maloney, 1977; Rossor *et al.*, 1982) あるいは神経細胞の脱落などが報告され (Coyle *et al.*, 1983; Whitehouse *et al.*, 1982)、臨床的にも脚光を浴びることとなった。mACh-R を介する生理作用は多様であるため、受容体の多様性が指摘されてきたが、薬理的な特異的プローブがなかったため研究は進展しなかった。近年、mACh-R のサブタイプの存在を証明する選択的アンタゴニストとしてpirenzepine (M1 受容体選択的アンタゴニスト (Hammer *et al.*, 1980)) あるいは 11-[[2-[(diethylamino)methyl]-1-piperidinyl]acetyl]-5,11-dihydro-6H-pyrido[2,3-b][1,4] benzodiazepine-6-one (AF-DX 116: M2 受容体選択的アンタゴニスト (Giachetti *et al.*, 1986)) が開発された。これにより、mACh-R の分類がなされ、詳細な研究が可能となった。

近年、急激に高齢化社会が進行し、老人性疾患が社会的問題となっている。老人性疾患の中でも老人性痴呆症の患者数が急激に増加するとの予測に対し、医療面での根本的な解決策は見つかっていない。老人性痴呆症にはアルツハイマー病や脳血管性痴呆症があるが、特にアルツハイマー病の発症機構についてはほとんど解明されていない。脳高次機能の解明は、アルツハイマー病、パーキンソン病などの精神神経疾患の病態解明、治療、予防の面からも大きな期待が寄せられている。脳の研究分野においても、分子生物学はめざましい発展を遂げている。脳高次機能に関連する分子の同定や、特定の遺伝子の個体レベルでの機能解明が可能になってきている (Bourtchuladze *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1992)。また、陽電子放射断層法や核磁気共鳴画像などの計測

技術の向上により生体における様々な脳活動状況の把握が可能となってきた。ようやく、分子レベルの研究と生体レベルの研究が融合し始めたところである。これまでに、薬理学的研究はこの両研究レベルに多くの指針を与えてきた。今後はさらに、この両者の先導役としてあるいは橋渡し役として重要な役目を担うであろう。

ヒト病態を直接研究材料とすることは困難であることが多い。この場合、病態モデル動物を使う方法がある。モデル動物を用いることにより、その病態に関する情報のみならず、生体機能に関する基礎的知見を得ることができる。また、生体機能に関する基礎研究は疾患の根本的な病態解明などにとって必須である。

今回、著者は正常マウスを用いることにより学習／記憶に関与する mACh-R のサブタイプを、また、そのサブタイプに関連する細胞内情報伝達系を薬理学的研究法により同定した。さらに、老齢ラットあるいは老化モデルマウスを用いることにより、老化に伴う脳内 ACh 神経系における神経化学的变化を検討した。老齢動物として長期飼育したラットを、また、老化モデル動物として老化促進モデルマウス (senescence-accelerated mouse: SAM) を使用した。SAM は通常の実験動物より早期に各種の老化兆候を発現するマウスで (Miyamoto *et al.*, 1986; Takeda *et al.*, 1981)、老化の基本的機構の解明のための動物モデルとして注目されている。今回得た結果は脳高次機能の解明および老人性痴呆症などの病態解明にとって重要な薬理学的知見と考えられる。



ヒト前脳基底核からの投射

図1 ラットおよびヒト脳内 ACh 神経系の投射

ラット脳においてもヒト脳においても海馬あるいは大脳皮質など学習／記憶に重要であると考えられている部位に mACh-R 受容体が存在する (Gage *et al.*, 1983; Saper, 1984; Sofroniew *et al.*, 1982)。アルツハイマー病患者脳においてマイネルトの基底核の神経細胞の脱落などが報告されている (Coyle *et al.*, 1983; Davis & Maloney, 1977; Rossor *et al.*, 1982; Whitehouse *et al.*, 1982)。

第1章

ラット脳内ムスカリン性受容体介在性細胞内情報伝達機構

末梢神経系の acetylcholine (ACh) 受容体 (ACh receptor: ACh-R) は、アルカロイドであるニコチンあるいはムスカリンに対し感受性を持つことが知られている。それぞれに感受性の高い受容体をニコチン性受容体およびムスカリン性受容体 (muscarinic ACh-R: mACh-R) に大別されている。ニコチン性受容体は運動神経終板、自律神経節後膜などに存在し、mACh-R は副交感神経節後線維支配の効果器官などに存在する。また、それぞれの受容体の活性化により発現する ACh および関連薬物による生理学的/薬理学的作用はニコチン作用あるいはムスカリン作用と呼ばれている。

ニコチン作用は神経節後線維あるいは筋細胞における一過性の興奮である。ニコチン性受容体は分子生物学的研究によりカチオンチャネルを形成していることが明らかとなった (Brisson & Unwin, 1985)。一方、ムスカリン作用は効果器官などの違いにより多様である。この違いは mACh-R の多様性によるとの仮説があったものの、選択的なアンタゴニストがなかったために、その薬理学的な研究は遅れていた。

近年、pirenzepine が開発され、これに高親和性の mACh-R を M1 受容体、低親和性の受容体を M2 受容体と薬理学的に分類されている (Hammer *et al.*, 1980)。後に、M2 受容体により高親和性の 11-[[2-[(diethylamino)methyl]-1-piperidinyl]acetyl]-5,11-dihydro-6H-pyrido[2,3-b][1,4]benzodiazepine-6-one (AF-DX 116) が開発され (Giachetti *et al.*, 1986) 詳細な薬理学的研究が可能となった。一方、分子生物学的研究により mACh-R をコードしていると考えられる 5 種の cDNA がクローニングされた。これらの cDNA は再構成実験を用い、pirenzepine あるいは AF-DX 116 を用いることにより薬理学的分類と一致することが示された (Bonner *et al.*, 1987; Kubo *et al.*, 1986-a, b; Peralta *et al.*, 1988)。しかし、中枢神経系における *in vivo* の mACh-R の薬理学的研究はその重要性に比較し遅れていた。

神経細胞において、Ca²⁺ は 2 次メッセンジャーとして重要な役割を果たしていると考えられている。神経細胞には他の組織細胞に比べリン脂質含有量が多いことが知られている。Ca²⁺ の細胞内動員にリン脂質代謝が関与している可能性が指摘されており (Berridge *et al.*, 1982, 1983; Jacobson *et al.*, 1985)、神経細胞における各種受容体の活性化とリン脂質代謝の連関が注目されている。

そこで、本章では pirenzepine および AF-DX 116 を用い、特に、リン脂質代謝を中心

I-1 実験材料および実験方法

I-1-1 実験動物

Wistar 系雄性ラットを使用した。4 - 6 週齢のラット（日本ラット）を購入した後、当研究室動物飼育室にて飼育した。7:30 - 19:30 を明時とし、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度約 50% に保った conventional 環境において飼育した。固形飼料（CE-2（日本クレア））と水道水を自由摂取させた。1 週間以上飼育することにより環境に馴化させ、実験に使用した。

I-1-2 大脳皮質切片標本における carbachol 刺激による [^3H]inositol 1-phosphate 蓄積の測定

雄性ラットを断頭致死後、直ちに頭蓋骨を割り、全脳を摘出した。氷温下にて大脳皮質を分離し、かみそり刃にて細分した。ナイロンメッシュ（メッシュサイズ：0.3 mm）に通し大きさをそろえ、これを切片標本とした。切片標本を Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液（123 mM NaCl, 26 mM NaHCO_3 , 5 mM KCl, 1.4 mM KH_2PO_4 , 0.8 mM CaCl_2 , 1.3 mM MgSO_4 , 10 mM glucose (pH 7.4)）中で O_2/CO_2 (95/5, v/v) の混合ガスを通気しながら 37°C で 30 - 45 分間プレインキュベートした。10 mM LiCl（同濃度の NaCl と置換）, 2 μCi [^3H]inositol を含む Krebs-Ringer 緩衝液 250 μl にプレインキュベートした切片標本を 30 μl 加え、試験管に混合ガスを充満し密栓をし 37°C 、60 分間インキュベートした。LiCl は IP の加水分解を抑制する（Berridge *et al.*, 1983; Jacobson *et al.*, 1985）。この後、carbachol（CCh：サブタイプ非選択的ムスカリン性アゴニスト）溶液 10 μl を加えさらに 37°C 、60 分間インキュベートした。切片標本を氷冷 Krebs-Ringer 緩衝液で 3 回洗浄して反応停止とした。室温にて、0.94 ml のクロロホルム/メタノール（1/2, v/v）混液を加え、10 分間、リン脂質を抽出した。0.31 ml のクロロホルムと同容量の蒸留水を加え、水層と有機層を分離した。水層を 0.6 ml のイオン交換カラム AG 1-X8（100 - 200 メッシュ、ギ酸型）を用い各画分に分離した。分離には以下の順で各溶出液 3 ml で 2 回ずつ溶出した。1) 5 mM inositol：遊離 inositol 画分、2) 5 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 60 mM HCOONa ：glycerophosphoinositol 画分、3) 0.1 M HCOOH , 0.2 M HCOONH_4 ：inositol 1-phosphate (IP) 画分。IP 画分にシンチレーションカクテル（Beckmann Ready Gel）を加え放射活性を測定した。また、抽出後の水層の一部にシンチレーションカクテルを加え放射活性を測定し、水層の総量に換算し [^3H]inositol の総取り込み量とした。百日咳毒素（pertussis toxin: PTX）の処置はプレ

インキュベーションの際に2時間行った。膜リン脂質代謝の結果産生されてくると考えられる inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)、inositol 1,4-bisphosphate (IP_2) は順次加水分解され IP となる。組織における [3H]inositol の取り込み活性は低いため [3H]inositol 由来の放射性 IP_3 、 IP_2 および IP の産生量は低い。また、各イノシトールポリリン酸の生物学的半減期は短い。したがって、刺激時間を長くし、LiCl により加水分解を阻害され蓄積した IP の放射活性を PI 代謝活性の指標とした。

I-1-3 大脳皮質切片標本における adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate 蓄積の測定

上記大脳皮質切片標本 50 μ l を 0.5 mM 4-[(3-butoxy-4-methoxyphenyl)methyl]-2-imidazolidinone (RO 20-1724: adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cAMP) の分解酵素であるホスホジエステラーゼの阻害薬)、1 μ M pirenzepine を含む Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液 (pH 7.4、組成は I-1-2 に同じ) 150 μ l に加え、37°C にて15分間インキュベートした。このインキュベーションの際、1 μ M forskolin で刺激した反応を対照とし、1 mM CCh 共存下の反応と比較した。反応系に 0.2 N HCl を 0.2 ml 加え、3分間煮沸した。15,000 g で遠心分離した後、上清 100 μ l をヤマサ cAMP 測定キットを用いたラジオイムノアッセイ法により cAMP 量を測定した。

I-1-4 大脳皮質シナプス粗膜画分の調製

雄性ラットを断頭致死後、直ちに頭蓋骨を割り、全脳を摘出した。氷温下にて大脳皮質を分離し、かみそり刃で細分した。大脳皮質の約10倍量の 0.32 M ショ糖を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中、ポッター式ガラス/テフロンホモジナイザーを用いホモジナイズした。1,000 g にて10分間遠心分離し、上清をさらに 50,000 g にて10分間遠心分離し沈渣を得た。この沈渣をシナプス粗膜画分とし、100 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) にて懸濁し、液体窒素にて凍結し実験に使用するまで -80°C で保存した。

I-1-5 大脳皮質粗膜画分における [3H]pirenzepine 結合の carbachol による結合阻害に対する guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) の影響

粗膜画分 0.1 mg における 10 nM [3H]pirenzepine の結合活性に対する 0 - 10 mM CCh による結合阻害活性を 50 μ M guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTP γ S) 存在下、非存在下において検討した。5 mM MgCl₂、100 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 200 μ l 中で 25°C、1.5 時間反応を行った。非特異的結合活性は 1 μ M

atropine 存在下における結合活性とした。反応系に氷冷 Tris-HCl 緩衝液 1.0 ml を加え反応を停止し、Whatman GF/B ガラスフィルターにて素早く吸引濾過した。さらに、フィルターを 1.5 ml Tris-HCl 緩衝液で 3 回洗浄した。フィルターをバイアルに入れ、シンチレーションカクテルを加え、フィルターに残存した放射活性を測定した。得た測定値は非線形最小二乗法によりコンピュータ解析を行った (Kitamura, & Nomura, 1986)。

I-1-6 蛋白質量の測定

Lowry らの方法 (Lowry *et al.*, 1951) に準じて行った。標準検量線にはウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) を用いた。粗膜画分量は全てこの方法による蛋白質量を示す。

I-1-7 統計処理方法

実験結果は平均値または (平均値) ± (標準誤差) で表した。Student's *t*-test を用い、対照群との有意差を検定した。

I-1-8 使用薬物

AF-DX 116 : Dr.Thomae GmbH より恵与された。

その他は、下記より購入した。

Myo-[2-³H]inositol、[N-methyl-³H]pirenzepine : Du Pont/NEN Research Products

PTX : 科研製薬株式会社

RO 20-1724 : 日本ロッシュ株式会社

cAMP 測定キット : ヤマサ醤油株式会社

Tris (Trizma base)、pirenzepine、CCh : Sigma Chemical Co.

GTPγS : Boehringer Ingelheim

その他の試薬 (特級) : 和光純薬工業株式会社

1-2 実験結果

1-2-1 大脳皮質切片標本における [³H]inositol 1-phosphate 蓄積に対する高濃度 KCl の影響

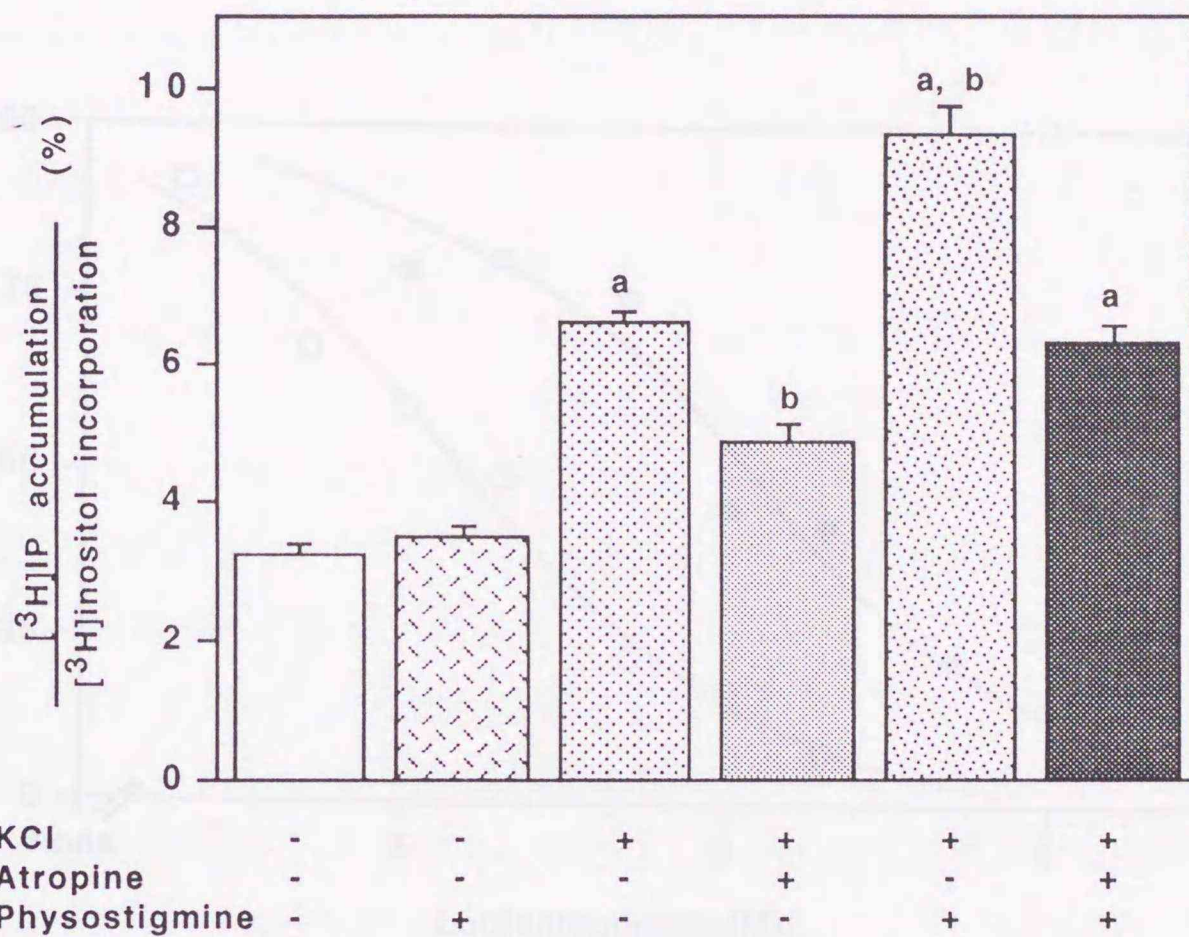
[³H]inositol を取り込ませた大脳皮質切片標本に対し、10 mM LiCl 存在下、50 mM

KCl (Krebs-Ringer 緩衝液の同濃度 NaCl と置換) 刺激をした。高濃度 KCl は基礎活性に比し、有意に [3 H]IP 蓄積を増加した。この高濃度 KCl の作用はムスカリン性アンタゴニストである 10 μ M atropine により有意に抑制された。また、ACh 分解酵素の阻害薬である 10 μ M physostigmine 単独存在下では、基礎活性に比し有意な差は認められなかった。高濃度 KCl との共存下で physostigmine は高濃度 KCl の作用をさらに上昇させた (図 I-1)。したがって、本切片標本における高濃度 KCl 刺激による [3 H]IP 蓄積の上昇には内因性 ACh が関与すると推定された。すなわち、高濃度 KCl 刺激により 1) シナプス前部が脱分極し、2) 内因性 ACh が遊離され、3) 遊離された ACh がシナプス後部膜上の mACh-R を活性化し、4) その結果、ホスホリパーゼ C (phospholipase C: PLC) が活性化し、phosphatidylinositol (PI) 代謝活性が上昇したと推定された。したがって、本切片標本を用いた実験系は ACh の PI 代謝活性への影響を検討する目的に適切な系であることが示された。

また、高濃度 KCl 刺激による PI 代謝活性の上昇は atropine により完全に抑制されなかったことから、大脳皮質切片標本においては他の神経伝達物質も関与しているか、あるいは、シナプス後膜が直接脱分極され、 Ca^{2+} 流入により Ca^{2+} 依存性 PLC (Honma *et al.*, 1988; Katan & Parker, 1987; Ryu *et al.*, 1986, 1987) が活性化される可能性が推測される。

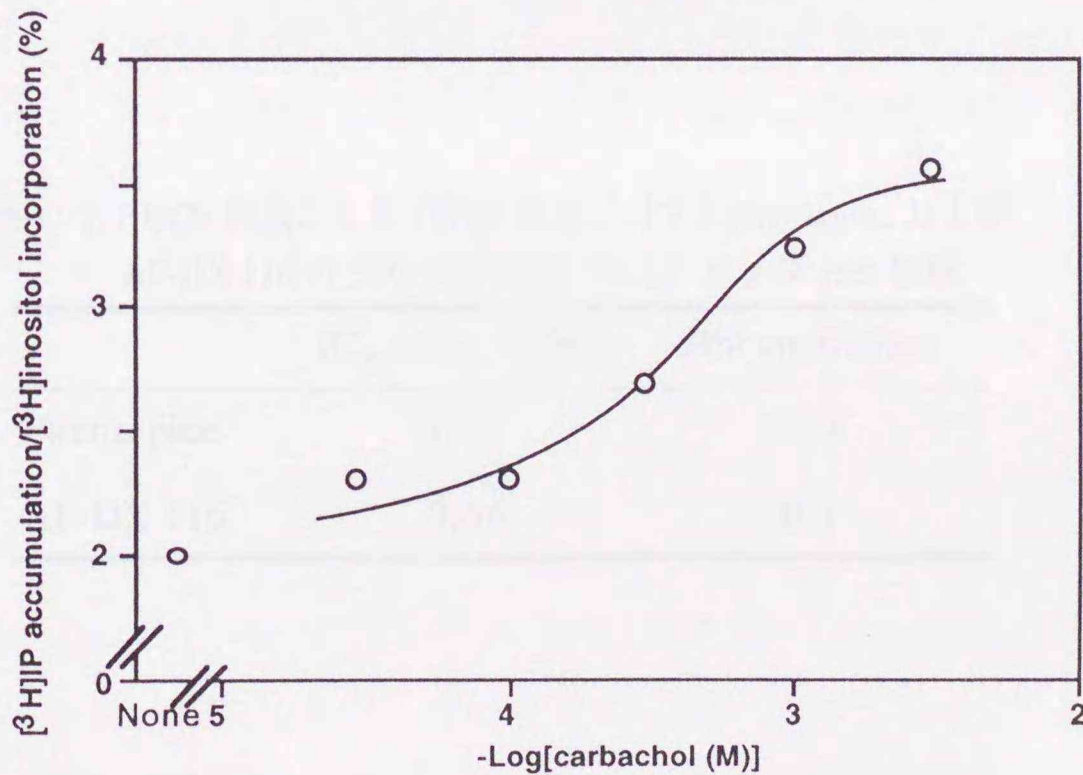
I-2-2 carbachol 刺激による [3 H]inositol 1-phosphate 蓄積活性の上昇に対する pirenzepine および 11-[[2-[(diethylamino)methyl]-1-piperidinyl]acetyl]-5,11-dihydro-6H-pyrido [2,3-b][1,4]benzodiazepine-6-one の作用

大脳皮質切片標本において、CCh は濃度依存的に [3 H]IP 蓄積活性を上昇した (図 I-2)。pirenzepine および AF-DX 116 は 1 mM CCh による [3 H]IP 蓄積効果を濃度依存的に抑制した (図 I-3)。各々の 50% 阻害濃度 (IC_{50} 値) および Hill 係数を示す (表 I-1)。 [3 H]IP 蓄積活性は AF-DX 116 に比較し、pirenzepine により低濃度で阻害されたことから、CCh 刺激による PI 代謝は主に M1 受容体を介する反応であることが示唆された。Hill 係数が 1 ではない場合、アロステリック効果などにより活性阻害作用に正の協調性 (Hill 係数 >1)、あるいは負の協調性 (Hill 係数 <1) が現れていると考えられる。AF-DX 116 による阻害効果に関し、Hill 係数が 0.7 であったことから M2 受容体を介する反応が PLC に対して影響している可能性がある。



図I-1 ラット大脳皮質切片標本における [³H]IP 蓄積活性に対する KCl、physostigmine、atropine の作用

[³H]イノシトール取り込み後、50 mM KCl、10 μM physostigmine、10 μM atropine を加え1時間インキュベートした。データは [³H]inositol の総取り込み量の放射活性に対する [³H]IP 画分の放射活性の比の平均値および標準誤差を示す (n = 5)。a: p<0.001 基礎活性に対し、b: p<0.01 50 mM KCl による活性に対しての有意差を示す。



図I-2 ラット大脳皮質切片標本におけるCCh刺激の [³H]IP 蓄積活性

[³H]inositol 取り込み後、各濃度の CCh により1時間刺激した。データは [³H]inositol の総取り込み量の放射活性に対する [³H]IP 画分の放射活性の比の平均値を示す。

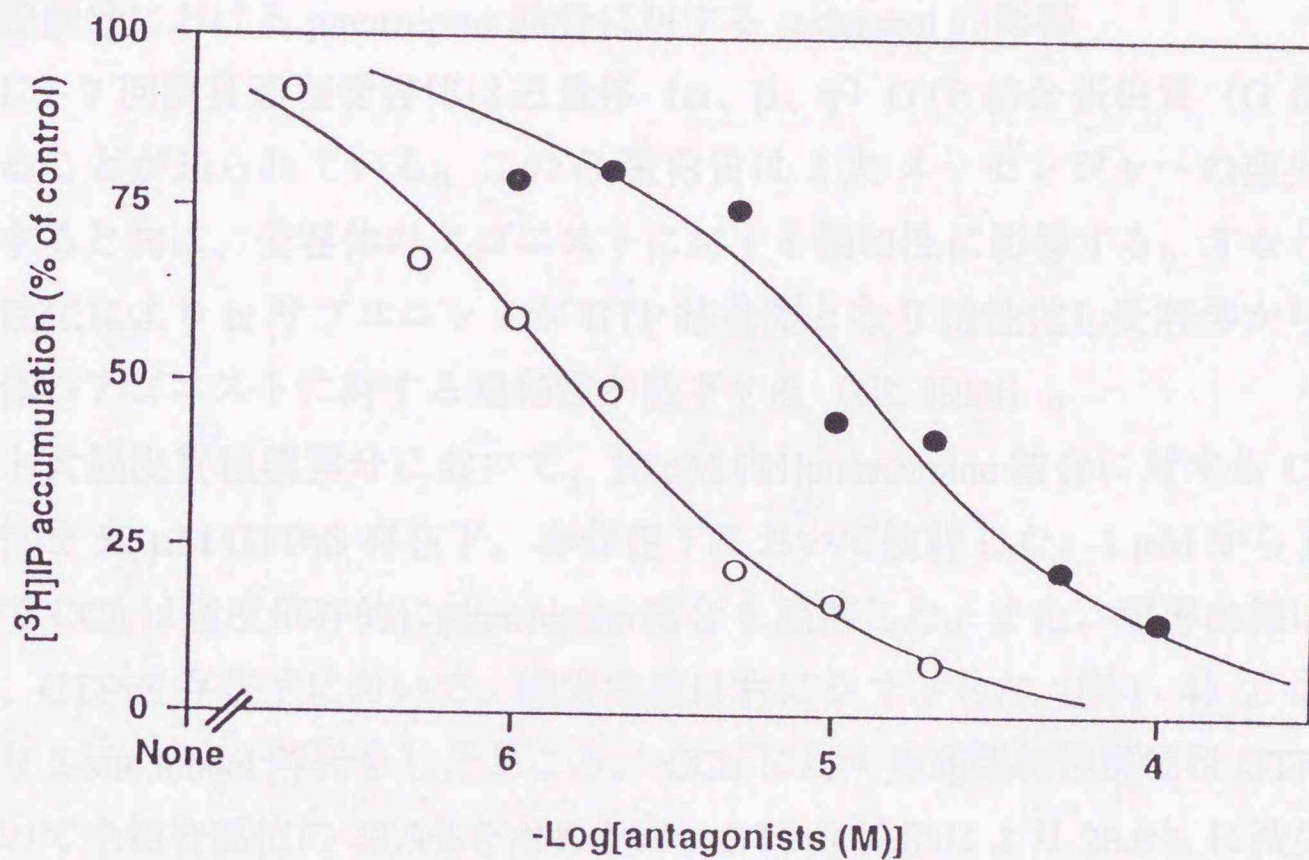


図1-3 ラット大脳皮質切片標本における CCh 刺激による $[^3\text{H}]\text{IP}$ 蓄積活性に対するムスカリン性アンタゴニストの作用

1 mM CCh 刺激による $[^3\text{H}]\text{IP}$ 蓄積活性に対する ○ : pirenzepine、● : AF-DX 116 存在下の活性の比を平均値で示す。

表1-1 CCh 刺激による $[^3\text{H}]\text{IP}$ 蓄積に対するpirenzepine および AF-DX 116 の 50% 阻害濃度 (IC_{50}) および Hill 係数

	IC_{50} value (μM)	Hill coefficient
Pirenzepine	1.15	1.0
AF-DX 116	9.66	0.7

I-2-3 guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) 存在下および非存在下におけるラット大脳皮質粗膜画分における pirenzepine 結合に対する carbachol の影響

一般に、7 回膜貫通型受容体は三量体 (α 、 β 、 γ) GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質) と共役することが知られている。この G 蛋白質は 2 次メッセンジャーの産生触媒部位を調節すると共に、受容体のアゴニストに対する親和性に影響する。すなわち、受容体の活性化により α サブユニットが GTP 結合型となり活性化し受容体から解離すると受容体のアゴニストに対する親和性が低下する (Ui, 1984)。

ラット大脳皮質粗膜画分において、10 nM [3 H]pirenzepine 結合に対する CCh の結合阻害活性を 50 μ M GTP γ S 存在下、非存在下において検討した。1 μ M から 1 mM の濃度範囲で CCh は濃度依存的に pirenzepine 結合を阻害した。また、阻害曲線は二相性を示した。GTP γ S 存在下において、阻害曲線は右にシフトした (図 I-4)。コンピュータにより 2-site model 解析をしたところ、CCh に対する高親和性部位は GTP γ S 非存在下において全結合部位の 43.3% を占めたが、GTP γ S 添加により 26.8% に減少した (表 I-2)。したがって、M1 受容体は G 蛋白質と共役する可能性が示唆された。

I-2-4 ラット大脳皮質切片標本における carbachol による adenosine 3',5'-cyclic monophosphate および [3 H]inositol 1-phosphate 蓄積に対する pertussis toxin の影響

PTX は抑制性 G 蛋白質 (Gi/Go) の α サブユニットを ADP リボシル化することにより受容体との連関を阻害することが知られている (Ui, 1984)。ラット大脳皮質切片標本における CCh による cAMP 蓄積活性および [3 H]IP 蓄積活性に対する作用への PTX の影響を検討した。1 mM CCh 単独刺激は cAMP 蓄積活性を若干上昇した。

(データ未提示)。一方、1 μ M forskolin による cAMP 蓄積上昇を 1 mM CCh は 37% 阻害した。この作用は、PTX により濃度依存的に抑制され、1 μ g/ml の処置ではほぼ完全に抑制された (図 I-5-A)。この反応系には、1 μ M pirenzepine を添加しているため、この CCh の作用は M2 受容体を介する反応であると考えられる。したがって、M2 受容体は抑制性 G 蛋白質 (Gi/Go) を介しアデニール酸シクラーゼ活性を抑制することが示唆された。

一方、CCh 刺激による [3 H]IP 蓄積活性は 10 および 100 ng/ml PTX 処置により上昇傾向を示したが、有意な差ではなかった (図 I-5-B)。したがって、M1 受容体は PTX 非感受性 G 蛋白質と連関し、PLC を活性化することが示唆された。

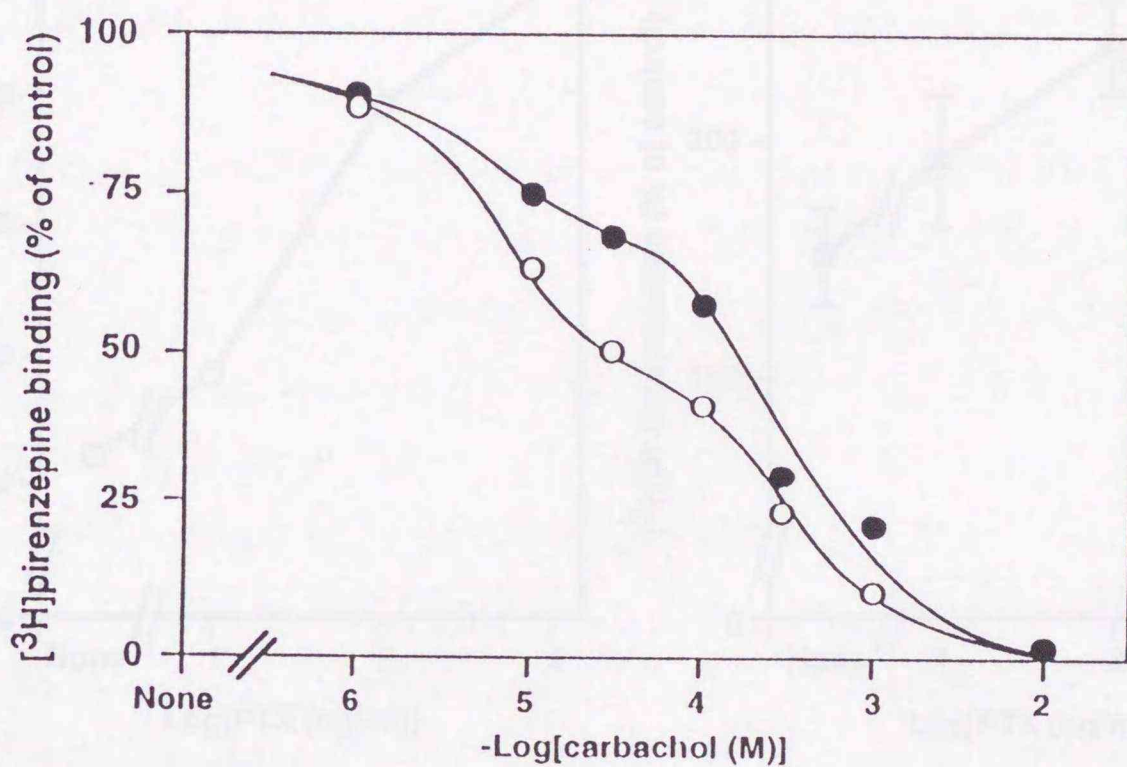


図1-4 GTP γ S 存在下および非存在下におけるラット大脳皮質粗膜画分における ^3H pirenzepine 結合に対する CCh の阻害作用

5 mM MgCl_2 存在下、CCh および GTP γ S 非存在下における 10 nM ^3H pirenzepine 結合活性を対照とし、各濃度の CCh 存在下における結合活性の比の平均値を示す。○：GTP γ S 非存在下、●：50 μM GTP γ S 存在下における結合活性を示す。

表1-2 ラット大脳皮質粗膜画分における ^3H pirenzepine 結合に対する CCh の阻害作用に対する GTP γ S の効果

	High affinity site		Low affinity site	
	- GTP γ S	+ GTP γ S	- GTP γ S	+ GTP γ S
IC ₅₀ value (M)	2.3×10^{-6}	1.2×10^{-6}	2.7×10^{-4}	3.4×10^{-4}
Receptor ratio (%)	43.4	26.8	56.6	73.2

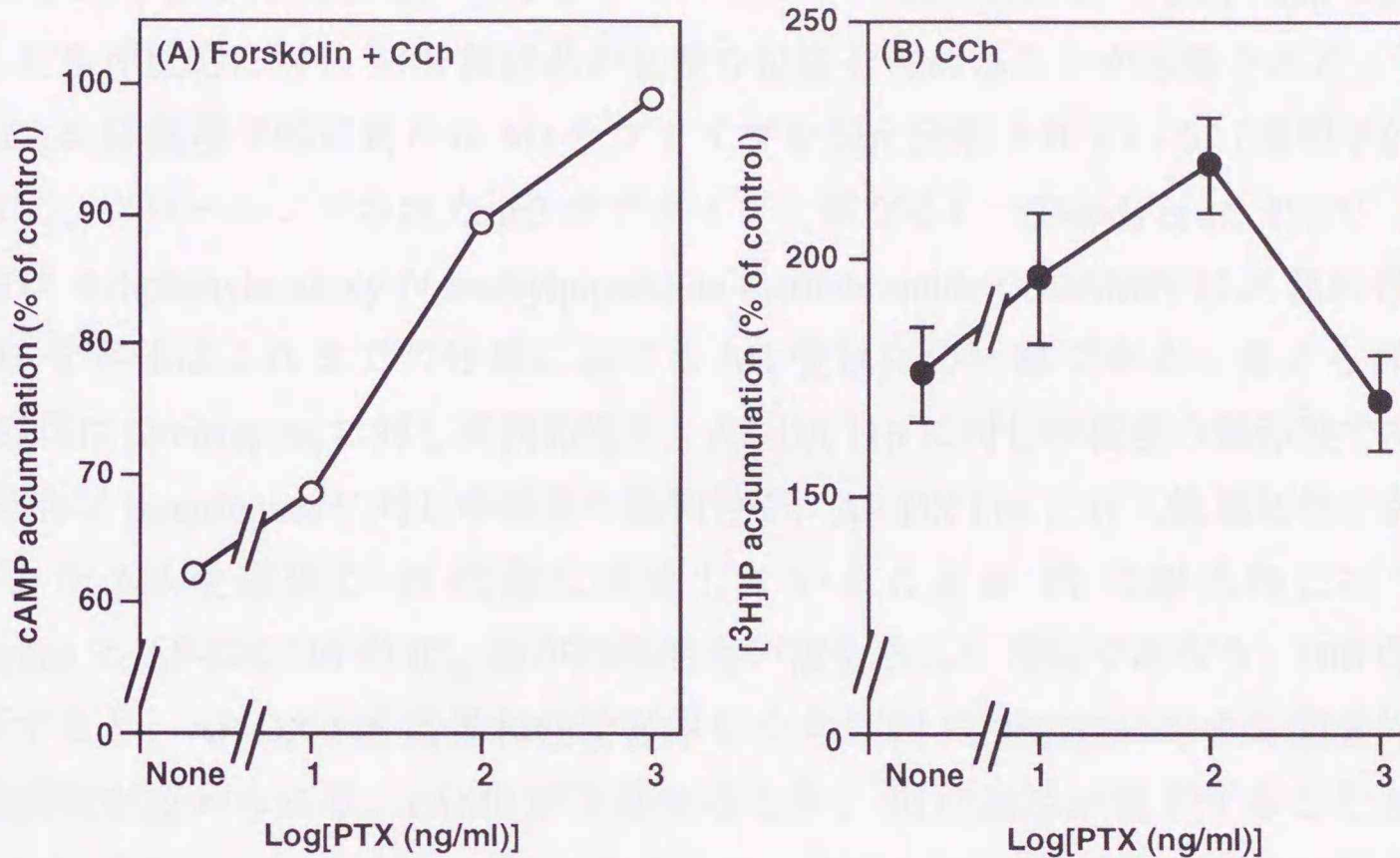


図 I-5 ラット大脳皮質における forskolin による cAMP 蓄積活性、あるいは CCh による $[^3\text{H}]\text{IP}$ 蓄積活性に対する PTX の作用

プレインキュベーションの際に各濃度の PTX を 2 時間処置した。

(A) ラット大脳皮質切片標本における $1\ \mu\text{M}$ forskolin 刺激による cAMP 蓄積活性に対する $1\ \text{mM}$ CCh の阻害作用に対する PTX の影響

PTX 未処置脳皮質切片標本における CCh 非存在下の $1\ \mu\text{M}$ forskolin による cAMP 蓄積活性を 100% とし、 $1\ \text{mM}$ CCh および各濃度の PTX 存在下の活性の比の平均値を示した。forskolin および CCh 刺激は 15 分間行った。

(B) ラット大脳皮質切片標本における $3\ \text{mM}$ CCh による $[^3\text{H}]\text{IP}$ 蓄積活性に対する PTX の影響

PTX 未処置脳切片標本における $3\ \text{mM}$ CCh 刺激による $[^3\text{H}]\text{IP}$ 蓄積活性を 100% とし、各濃度の PTX 存在下の活性の比の平均値と標準誤差を示した。CCh 刺激は 1 時間行った。

I-3 考察

ラット大脳皮質において、*in vivo* において ACh は PI 代謝を活性化することが示された。高濃度 KCl 刺激による PI 代謝活性の上昇はシナプス前部の脱分極による各種神経伝達物質の遊離による受容体活性化を介するものと、 Ca^{2+} 依存性 PLC (Honma *et al.*, 1988; Katan & Parker, 1987; Ryu *et al.*, 1986, 1987) の Ca^{2+} による直接的な活性化によるものと推定される。atropine による活性阻害は高濃度 KCl 単独刺激による活性

化を50%近くまで抑制した。したがって、ラット大脳皮質におけるPI代謝の活性化を介した生理反応に対しACh神経系が重要な位置を占めることが示唆された。

mACh-Rは薬理的に新たにM3サブタイプを加え分類されている(薬理学的分類であって、クローニングされたm3サブタイプと異なる)(Doods *et al.*, 1987)。M3受容体は4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methobromide (4-DAMP)に高親和性である。M3受容体はこれまでの分類におけるM1受容体の一部であると考えられる。M1受容体はpirenzepineに対し高親和性で、AF-DX 116に対し中程度の親和性である。M3受容体はpirenzepineに対し中程度の親和性で、AF-DX 116に対し低親和性である。M1およびM3受容体がPI代謝に関連していることがPI代謝活性に対するpirenzepineとAF-DX 116の IC_{50} 値が比較的近い値を示した理由であろう。Hill係数から判断すると、AF-DX 116高親和性受容体を介するPI代謝活性に対する阻害作用に負の協調性が認められる。cAMPが上昇するとき、PLC活性が低下することが報告されている(Kennedy *et al.*, 1995)。おそらく、AF-DX 116高親和性受容体を介する反応がPLC活性の上昇に対し協調的に作用し、その結果、PLC活性に対する阻害作用は負の協調性として現れると推定される。

精製されたmACh-R、あるいはcDNAより推定されるアミノ酸配列より、mACh-Rは7回細胞膜を貫通していると推定されている(Bonner *et al.*, 1987; Kubo *et al.*, 1986-a, b; Peralta *et al.*, 1988)。このタイプの受容体は三量体型G蛋白質と関連し、cAMPあるいは IP_3 などの2次メッセンジャーの生成を調節していると推定されている(Ui, 1984)。本章において、M1およびM2受容体はG蛋白質と関連することを示した。M1受容体の活性化はPI代謝の活性化に、M2受容体の活性化はアデニル酸シクラーゼの抑制に関連する。M1受容体はPTX非感受性G蛋白質と、また、M2受容体はPTX感受性G蛋白質と共役することでこれらの反応を制御していることが示された(Ohnuki & Nomura, 1991)。分子生物学的研究法により、多くのG蛋白質がクローニングされてきている。G蛋白質 α サブユニットの G_q/G_{11} (Lee *et al.*, 1992)および G_{14} (Nakamura *et al.*, 1995)がPI代謝を触媒する酵素であるPLC- β と関連する可能性が報告されている。この α サブユニットはPTXによりADPリボシル化される可能性のあるシステイン残基を持たない。これに対し、HL-60細胞においてPTX感受性のPLCの活性化が報告されている(Oinuma *et al.*, 1987)。この活性化に関与するG蛋白質は脳内にも存在するとの報告がある(Katada *et al.*, 1987)。また、 $\beta\gamma$ サブユニットがPLC- β_2 を活性化する可能性が報告されている(Camps *et al.*, 1992)。さらに、この $\beta\gamma$ サブユニットは G_{12} のサブユニットであることが報告され

た (Iiri *et al.*, 1992, 1995)。しかし、 $\beta\gamma$ サブユニットのみで PLC- β_2 の活性化が可能であるかについては結論がでていない。本章において、PTX は 100 ng/ml まで濃度依存的に [3 H]IP 蓄積活性を上昇した。M1 受容体は本来、PTX 非感受性 G 蛋白質と関連し PLC を活性化するが、一部は PTX 感受性 G 蛋白質 Gi/Go と共役できる状態にあるのかも知れない。この G 蛋白質が PTX 処置により共役できなくなり、その分 PTX 非感受性で PLC を活性化できる G 蛋白質がより共役しやすくなり、その結果、 [3 H]IP 蓄積活性が上昇するのではないだろうか。さらに高濃度の PTX 処置は一部の PTX 低感受性であり PLC を活性化できる G 蛋白質を ADP リボシル化し、 [3 H]IP 蓄積活性が減弱するのではないだろうか。

クローニングされた M3 (m3) 受容体あるいは M4 (m4) 受容体に対する選択的アンタゴニストが、近年、開発されてきている (M3 受容体に対して hexahydrosiladifenidol および p-fluorohexahydrosiladifenidol、M4 受容体に対して tropicamide (Caulfield, 1993))。cDNA 発現系を用いた再構成系の実験においては M3 受容体は M1 受容体に類似しており主に PI 代謝に関連し、M4 受容体は M2 受容体に類似し、主に cAMP 生成の抑制系に関連する。しかし、現在開発されているサブタイプ選択的ムスカリン性アンタゴニストは再構成系による受容体結合実験において、各サブタイプに対して 10 倍以上の親和性の差を示さない。本章に示した CCh 刺激による PI 代謝活性に対する pirenzepine と AF-DX 116 の差も同様である。したがって、生体由来の組織あるいは細胞を用いた実験系において、現在クローニングされている 5 種の mACh-R (m1 - m5) を薬理学的手法により区別することは困難であると思われる。薬理学的分類にしたがうと、m1、m3 および m5 は M1 受容体、m2 および m4 は M2 受容体に分類される。m1、m3 および m5 にはホスホリパーゼ A₂ C および D、およびある種のチロシンキナーゼの活性化に、また、m2 および m4 にはアデニル酸シクラーゼの抑制あるいは K⁺ チャネルの調節に関連すると報告がある (Felder, 1995; Kurachi *et al.*, 1986; Pfaffinger *et al.*, 1985)。mACh-R を介した生理反応の多様性は受容体の多様性のみならず、各々に関連する細胞内情報伝達系が多様であることに起因することが示されつつある。しかし、これらの内、詳細が明らかとなりつつあるのは機構は PLC の活性化、アデニル酸シクラーゼの抑制および K⁺ チャネルの調節である。さらに、これらの報告のほとんどが再構成系を用いている。今後、再構成系を用いた分子生物学的手法とともに、より生理的条件を反映した研究法による検討が必要となろう。

第II章

マウスを用いたムスカリン性受容体応答の学習／記憶への関与に関する行動薬理学的研究

ACh 神経系が学習／記憶に関与することは、これまで薬物治療の副作用あるいは外科的治療の結果から推定されてきた (Gruber *et al.*, 1967; Milner *et al.*, 1968; Sitaram *et al.*, 1978)。実験的には、非特異的ムスカリン性アンタゴニストである scopolamine や、ACh 作動性神経系に対する神経毒であるコリンマスタードなどを動物に投与し得られた結果から示されてきた (Drachman, 1977; Flicker *et al.*, 1983; Kitajima *et al.*, 1992; Mouton *et al.*, 1988; Walsh *et al.*, 1985; Whishaw *et al.*, 1985)。ここ数年、学習／記憶に関与する神経伝達物質として特にグルタミン酸 (Ishikawa *et al.*, 1977; Jaffe & Blanco, 1994; Murtha & Pappas, 1994; Tonkiss & Rawlins, 1991) など他の神経伝達物質も注目されているが、近年、社会的に問題となりつつあるアルツハイマー病患者脳において ACh 神経系の機能低下 (Davis & Maloney, 1977; Rossor *et al.*, 1982) あるいは神経細胞の脱落 (Coyle *et al.*, 1983; Whitehouse *et al.*, 1982) などが報告され、臨床的視点からも学習／記憶の ACh 仮説およびその加齢変化が脚光を浴びることとなった。

しかし、これまでの研究成果において、ACh 神経系が学習／記憶に対して何らかの重要な役割を果たしている可能性を示したに過ぎず、学習／記憶の過程において、どの段階で関与するのか、さらに mACh-R のどのサブタイプが関与するのかなどについての検討はなされていなかった。第I章に述べたように、pirenzepine (Hammer *et al.*, 1980) あるいは AF-DX 116 の開発 (Giachetti *et al.*, 1986) により mACh-R に関するより詳細な薬理的／神経化学的研究が可能となった。本章では、これらの薬物を使用し、また、学習／記憶機能を解析する行動薬理学的方法を用い、薬物投与時期などに工夫を加えることにより学習／記憶への ACh 神経系の関与の機構を解明しようと考え、検討を行った。

II-1 実験材料および実験方法

II-1-1 実験動物

ddY 系雄性マウスを使用した。3 - 4 週齢のマウス (Charls River) を購入後、当研究室動物飼育室にて飼育した。7:30 - 19:30 を明時とし、 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度約 50% に保った conventional 環境において飼育した。固形飼料 (CE-2 (日本クレア)) と水道水を自由摂取させた。1 週間以上飼育し実験に使用した。

II-1-2 実験装置

A) step-through 型受動的回避反応実験

小原医科産業株式会社製マウス step-through 型実験箱 (Model No. PA-M、図 II-1) および 実験箱に流す電流の制御および時間計測を行う 5 連式受動的回避反応実験装置 (Model No. PA-M5) を用いた。実験箱は横断面が台形 (上底 10、下底 4、高さ 9 cm) で奥行き 13 cm の明箱と、それに連結された奥行き 16 cm の暗箱とから成る。明箱と暗箱は直径 3 cm の穴の開いた壁で仕切られている。この穴はスライド式のドアにより開閉される。両箱の床はステンレス製の棒のグリッドになっており、暗箱の床グリッドには実験装置から通電できるようになっている。

B) 八方向放射状迷路実験

当研究室において設計および制作した。一辺 8 cm の正八角形のプラットホームを中心に、そこから放射状に長さ 40 cm の八本のアーム (選択肢) が延びている (図 II-2)。アームを囲む透明なアクリル板製の壁によりマウスは実験装置の外へ逃げることはできない。実験装置は、実験期間中、常に同じ位置に設置されており、また、実験者を含むすべての周囲の事物の位置は一定に保たれている。

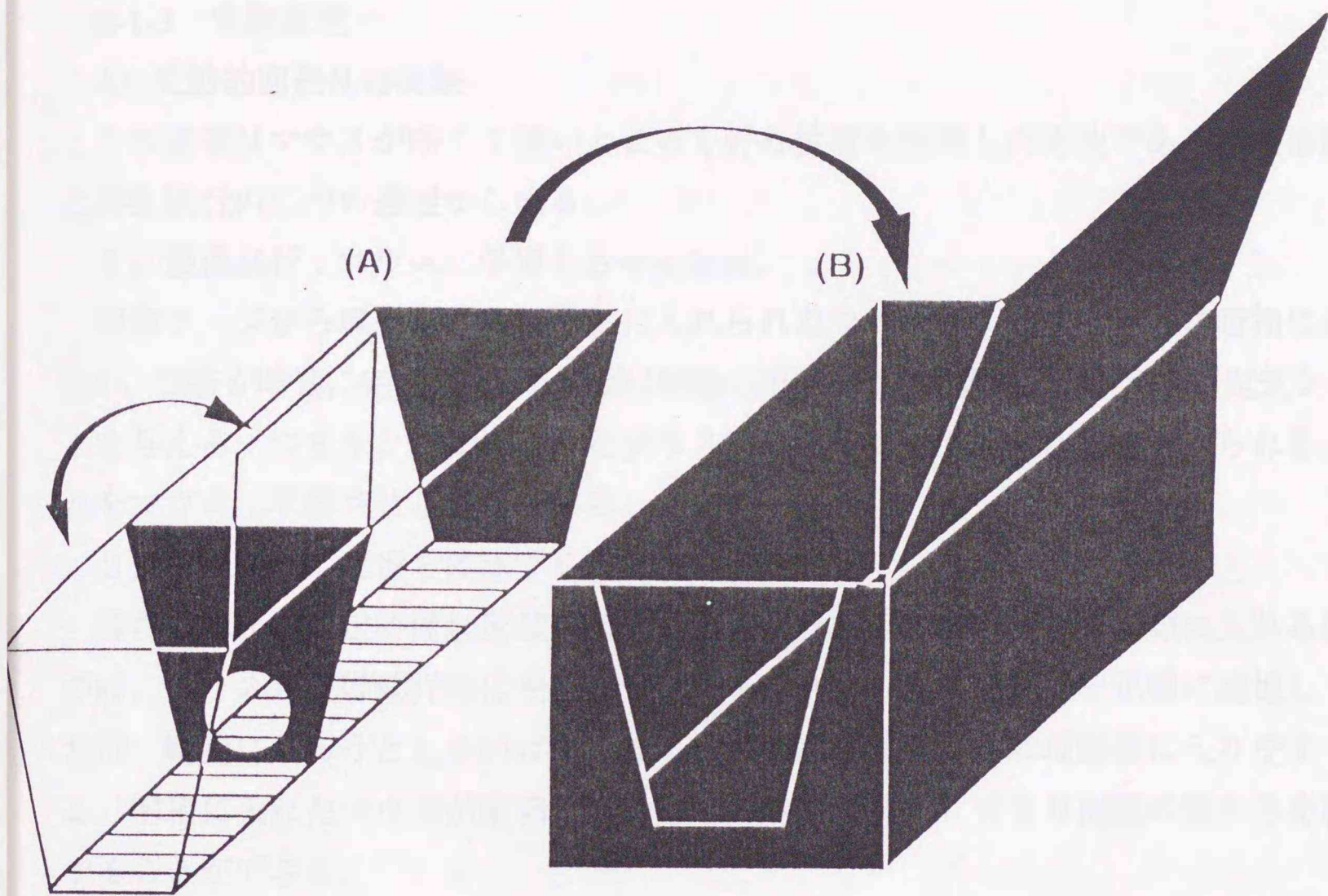


図 II - 1 Step-through 型受動的回避反応実験箱

- (A) : 内箱。外壁は透明なアクリル板で作られている。手前が明箱となる。間に黒いアクリル板で作られた仕切壁がある。仕切壁の穴はスライドドアにより開閉される。
- (B) : 外箱。内箱をセットすることにより、内箱の仕切壁より奥が暗箱となる。

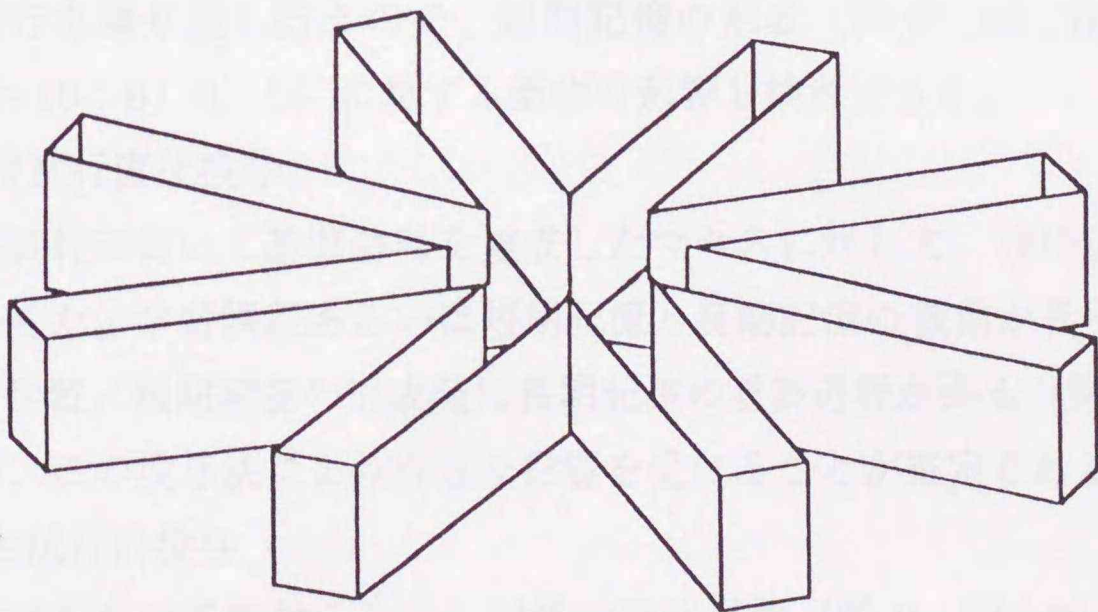


図 II - 2 八方向放射状迷路装置

各選択肢は透明なアクリル板で囲まれている。迷路は実験期間中、同一位置に設置される。また、周囲の事物の位置も一定に保たれる。

II-1-3 実験原理

A) 受動的回避反応実験

この実験はマウスが暗くて狭いところを好む性質を利用した方法である。獲得試行と再生試行の二つの過程から成る。

1) 獲得試行：マウスに学習をさせる過程。

飼育ケージから取り出され、明箱に入れられたマウスは、通常、直ちに暗箱に逃げ込む。四肢が暗箱に完全にいった瞬間に暗箱の床グリッドに通電し、マウスに電気ショックを与える。つまり、暗箱に入ったマウスは電気ショックという罰を与えられる。これをマウスに学習させる過程である。

2) 再生試行：記憶を確認する過程。

獲得試行から一定時間経過後に行う。獲得試行と同様にマウスを明箱に入れる。この時、マウスが獲得試行時に受けた電気ショックという不快経験を正確に記憶していれば、暗箱に入ろうとしないはずである。逆に記憶障害があれば暗箱に入りやすくなる。明箱に入れたマウスが暗箱に入るまでの時間（潜時）により記憶の確かさを検討することができる。

3) 薬物投与時期

薬物投与は以下の3通りの時点に行った。

a) 獲得試行前投与

獲得試行開始前に薬物投与した。これは学習課程における薬物の影響を検討するための投与方法である。また、今回は基準潜時（II-1-4, d に記述）に達するまで獲得試行を繰り返し行うので、短期記憶の形成（図 II - 10 : B) ①-a) / 想起（図 II - 10 : B) ①-b)）に対する薬物の影響も検討できる。

b) 獲得試行直後投与

獲得試行において基準潜時を達成したマウスに対して、獲得試行終了直後に薬物投与した。学習課程あるいは短期記憶と長期記憶の機構が異なるとすると、または、学習 / 短期記憶の形成後に長期記憶の重要過程がある（図 II - 10 : B) ②）ならば、この投与方法により有意な影響を受けることが推定される。

c) 再生試行前投与

再生試行前に薬物投与した。記憶の想起過程（図 II - 10 : B) ③）における薬物の影響を検討するための投与方法である。

B) 八方向放射状迷路実験

実験に使用されるマウスは1週間前より食餌制限がなされる。迷路のアームの先端には一粒の小さな餌が置いてある。プラットホームに放たれたマウスは迷路中を探索し、やがて餌を見つけ食べる。すべての餌をとり終えるまで迷路内に放置しておく。この訓練を1日1回行う。訓練を繰り返すごとに、マウスは徐々に効率良く餌を見つけるようになる。つまり、一度餌をとったアームに入らずに餌の残っているアームを次々に選択するようになる。ほとんどのマウスはあたかもランダムに選択するようになる。マウス間に共通の選択順序は認められないし、同一のマウスについても各訓練ごとの選択順序は異なる。選択していないアームに入り餌をとることを正選択、一度選択したアームに再び入ることを誤選択とする。はじめの8選択のうち7選択以上が正選択である試行が連続5試行出現することを習得基準とした。この習得基準を満たしたマウスを薬物作用の検討に使用した。

この実験における記憶は、作業記憶および参照記憶の二つで構成されていると考えられている (Honig, 1978)。参照記憶は各試行間で共通して有効な情報の記憶であり、この迷路実験においては周囲の事物の配置などであり、認知地図とも呼ばれている。作業記憶はある試行内においてのみ有効な情報の記憶であり、この迷路実験においては、すでに選択したアームの記憶である。

II-1-4 実験方法

A) 受動的回避反応実験

a) 被験動物

実験開始1-2時間前に実験環境下に1匹ずつ小ケージ(ホームケージ)に隔離し環境に馴化した。

b) 薬物投与方法

薬物はすべて脳室内へ投与した (intracerebroventricular administration: i.c.v.)。HaleyとMcCormickの方法 (Haley & McCormick, 1957) に準じて行った (図II-1)。冠状縫合上で、矢上縫合から1-1.5 mmの位置に深さ3-3.5 mmにトップ社製の二段針を用いて投与した。薬液を5秒間かけて注入し、その後、10秒間針を挿入したままにしておく。ムスカリン性アンタゴニストは0.2 Mリン酸緩衝液に溶解し、pH7に調整した。投与量は各濃度の薬物1 μ lとした。dantroleneは最終濃度3 mM/20% DMSOに調製し、2あるいは3.3 μ l投与した。

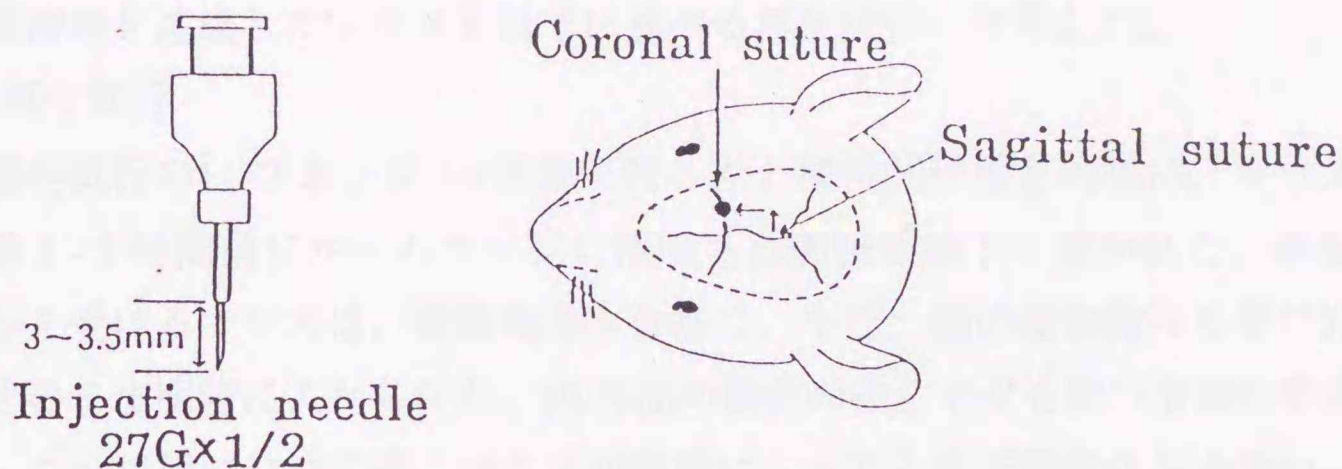


図 II - 1 脳室内薬物投与方法 (intracerebroventricular administration: i.c.v.)

c) 電気刺激強度の決定

獲得試行における、電気刺激の強度を検討した。薬物投与5分後に、マウスを実験箱の暗箱に入れ1分間隔で段階的に0.05 - 1.0 mAの電気刺激を加えた。薬物は用いた薬物の最高濃度(40 nmol)を投与した。刺激強度の指標として以下の3種の行動を観察した。① flinch: 「うずくまり」や「驚き」などの行動で弱い刺激に対する反応、② jump: 同時に2本以上の足を床からはなす行動で、強い刺激に対する反応、③ vocalization: 何らかの声を発する行動で、強い嫌悪感の表現であると解釈されている。これらの行動を最初に現した強度の電気刺激をそれぞれの行動に関する閾値とした。マウスが罰として電気刺激を認知する必要があるのでjumpを起こす強度が適当であろうと考えた。

d) 獲得試行

実験環境下に馴化した後、獲得試行前投与の場合は投与5分後に、その他の投与方法の場合は処置なしのまま実験箱の明箱に入れた。この時、明箱と暗箱を仕切るスライドドアは閉じておいた。10秒間の馴化の後、ドアを開け、マウスが暗箱に入ることを許可した。この時からマウスが暗箱に完全に入るまでの潜時を計測した。マウスの四肢が暗箱に入った瞬間に床グリッドに通電した。直ちにマウスを暗箱から取りだし、ホームケージに戻した。マウスを1分後、再び明箱に入れ、初回と同様に、10秒の馴化の後にドアを開け潜時を測定した。潜時は300秒を上限(基準潜時)とし、300秒間明箱に留まったマウスは学習を完了したとみなした。300秒の潜時を達成するまで、マウスは同様に繰り返し訓練を受けた。また、

獲得試行後投与を受けるマウスは基準潜時を達成直後に投与を受けた。

基準潜時を達成したマウスを以下に述べる再生試行に使用した。

e) 再生試行

獲得試行の1、7および14日後に行った。獲得試行前と同様に、マウスは試行開始1-2時間前にホームケージに隔離され実験環境下に置かれた。再生試行前投与を受けるマウスは、薬物投与5分後に、また、他の薬物投与を受けたマウスはそのまま明箱に入れられた。10秒間の馴化の後、ドアを開け潜時の計測を行った。この試行においては、マウスが暗箱に入っても電気刺激は与えない。マウスが暗箱に入るかあるいは300秒間明箱に留まった場合、直ちに試行を終えた。

B) 八方向放射状迷路実験

a) 実験動物

訓練開始1週間前より食餌制限によりマウスの体重を食餌制限開始時の7-8割程度に維持した。

b) 習得過程

訓練開始1時間前から、ホームケージにマウスを隔離し実験環境下においた。1日1回の訓練を毎日同時刻に行った。10分を上限とし、マウスがすべての餌を取るまで迷路内に放置した。この時のマウスのアームの選択順および時間を記録した。10分以内にすべての餌を取らなかった場合は、10分経過した時点で訓練を終了した。

c) 薬物作用の検討

最初の8選択のうち7選択以上が正選択である試行を5回連続で達成したマウスを実験に使用した。試行5分前に薬物を投与した。

d) 薬物投与

20 mM dantrolene/DMSOを1 μ l投与 (i.c.v.) した。

II-1-5 統計処理

平均値を示したデータでは Student's *t*-test を、中央値と4分位数で示したデータでは Mann-Whitney *U*-test を適用した。

II-1-6 使用薬物

各薬物は下記より購入した。

dantrolene : Sigma Chemical Co.

その他の試薬（特級）：和光純薬工業株式会社

II-2 実験結果

II-2-1 受動的回避反応実験における電気刺激の感受性に対するムスカリン性アンタゴニストの影響

flinch に関して、どの薬物投与群も有意差は認められなかった。Jump および vocalization に関して、atropine 投与群では感受性の有意な低下が認められたがその影響は微小であった（表 II-1）。この実験における刺激強度は Jump を誘導する強度以上があれば充分である。感受性低下の認められた atropine 投与群も jump を示す強度（（II-1-4、c）に記述）として 0.5 mA を刺激強度とした。

表 II-1 電気刺激の感受性に対するムスカリン性アンタゴニストの影響

	Flinch	Jump	Vocalization
None	0.105 ± 0.033	0.265 ± 0.052	0.450 ± 0.067
Vehicle	0.096 ± 0.017	0.213 ± 0.021	0.456 ± 0.112
Atropine	0.140 ± 0.023	0.345 ± 0.034**	0.725 ± 0.095**
Pirenzepine	0.135 ± 0.023	0.275 ± 0.059	0.425 ± 0.025
AF-DX 116	0.100 ± 0.008	0.245 ± 0.039	0.492 ± 0.058

平均値と標準誤差（mA）を示す（n = 5 - 8）。**：p < 0.01 溶媒投与群に対する有意差を示す。

II-2-2 ムスカリン性アンタゴニストの獲得試行における初期潜時に対する薬物投与の影響

受動的回避反応実験はマウスの暗所および狭所を好む性質に依存した実験系である。ベンゾジアゼピン系薬物の投与すると、抗不安作用により明箱に留まったままのマウスが現れることがある。このような影響を持つ薬物はこの実験に不適當である。また、運動機能に強く影響する薬物もこの実験系には使えない。そこで、獲得試行前に投与した薬物がマウスの習性、あるいは運動機能に対する影響について検討した。これら

の薬物は運動機能および運動量に強い影響を示さなかった。また、第一回目の獲得試行における潜時（初期潜時）に対して、各薬物投与群において一定の用量依存性は認められず、各薬物投与群間で有意差は認められなかった（表 II-2）。したがって、今回用いた薬物はこの用量の範囲において運動機能およびマウスの習性に影響しないことから、受動的回避反応実験に用いることが可能であると判断した。

表 II-2 ムスカリン性アンタゴニスト投与の獲得試行初期潜時に対する影響

Antagonists (nmol)	None	Vehicle	Atropine	Pirenzepine	AF-DX 116
0	21.6 ± 6.9	20.0 ± 7.5			
1			25.2 ± 3.2	38.4 ± 26.2	27.2 ± 13.2
10			36.6 ± 18.7	25.0 ± 8.9	16.0 ± 4.6
40			22.4 ± 4.5	34.6 ± 16.2	33.8 ± 10.2

平均値と標準誤差 (sec) を示す (n = 5 - 8)。

II-2-3 ムスカリン性アンタゴニストの獲得試行前投与の作用

A) 獲得試行における影響

薬物投与後の獲得試行において、基準潜時を達成するために必要な訓練回数を検討した（図 II-4）。atropine 投与群は用量依存的に必要な訓練回数が増加した。溶媒投与群に対し、10 nmol および 40 nmol 投与群は有意な訓練回数の増加を示した。pirenzepine 投与群および AF-DX 116 投与群には有意な変化は認められなかった。40 nmol pirenzepine 投与群は増加傾向を示した。なお、この実験に使用されたマウスはすべて基準潜時を達成した。学習過程あるいは短期記憶形成／想起過程において、一部 mACh-R 応答機能が関与している可能性が示唆された。

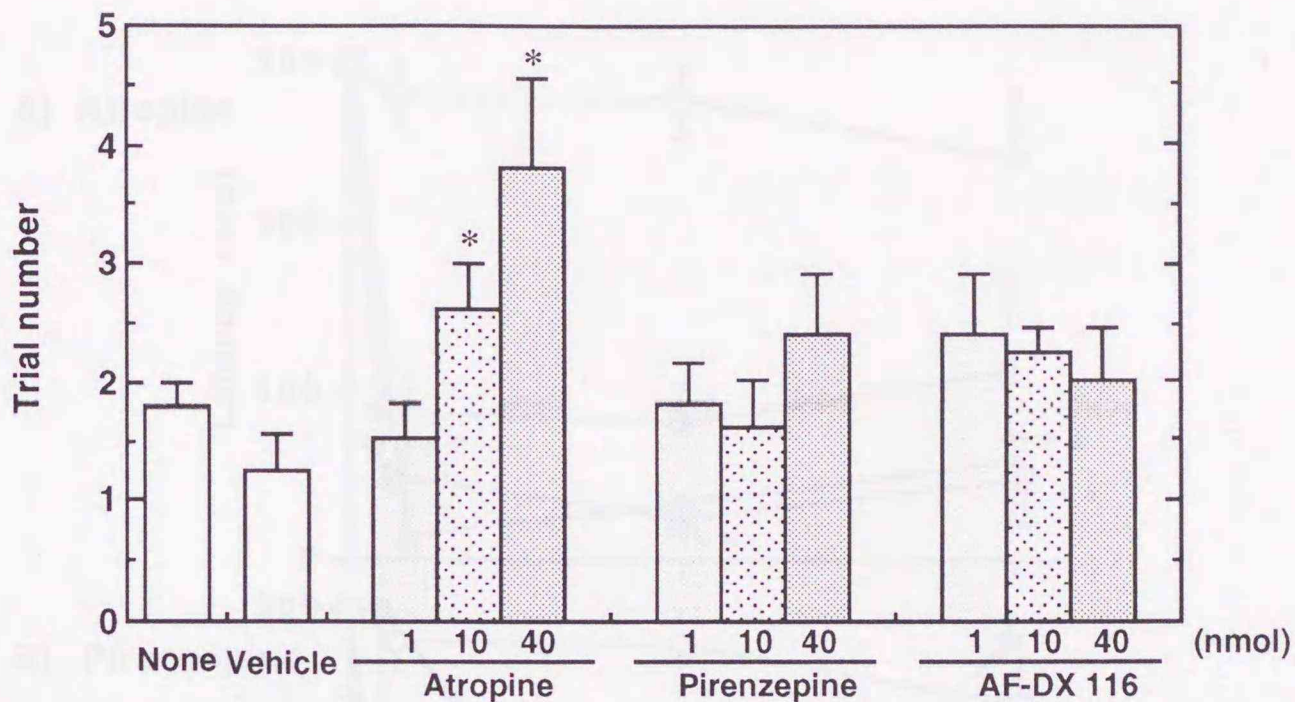


図 II-4 獲得試行における基準潜時達成に要する訓練回数に対するムスカリン性アンタゴニストの獲得試行前投与の影響

獲得試行 5 分前に薬物投与 (i.c.v.) を行った。獲得試行訓練は基準潜時を達成するまで 1 分おきに繰り返した。データは平均値と標準誤差を示す (n = 5 - 7)。* : p < 0.05 溶媒投与群に対する有意差を示す。

B) 再生試行における影響

薬物投与後、獲得試行において基準潜時を達成したマウスについて、1 日後、1 週間後、2 週間後に再生試行を行った。再生試行においては、たとえマウスが基準潜時以内に暗箱に入っても電気刺激は与えず、直ちに暗箱からマウスを取り出し試行を終えた。atropine 投与群は獲得試行において顕著な差の認められた用量に比べ、より低用量から有意な差が認められた (図 II-5)。1 nmol 投与群から溶媒投与群に対して有意に潜時の短縮が認められた。pirenzepine 投与群は同範囲の用量で獲得試行において有意な差が認められなかったが、10 nmol 投与群より有意な潜時短縮が認められた。一方、AF-DX 116 投与群は 40 nmol 投与群も有意な短縮は認められなかった。むしろ、溶媒投与群よりも若干良い成績を示す傾向にあった。

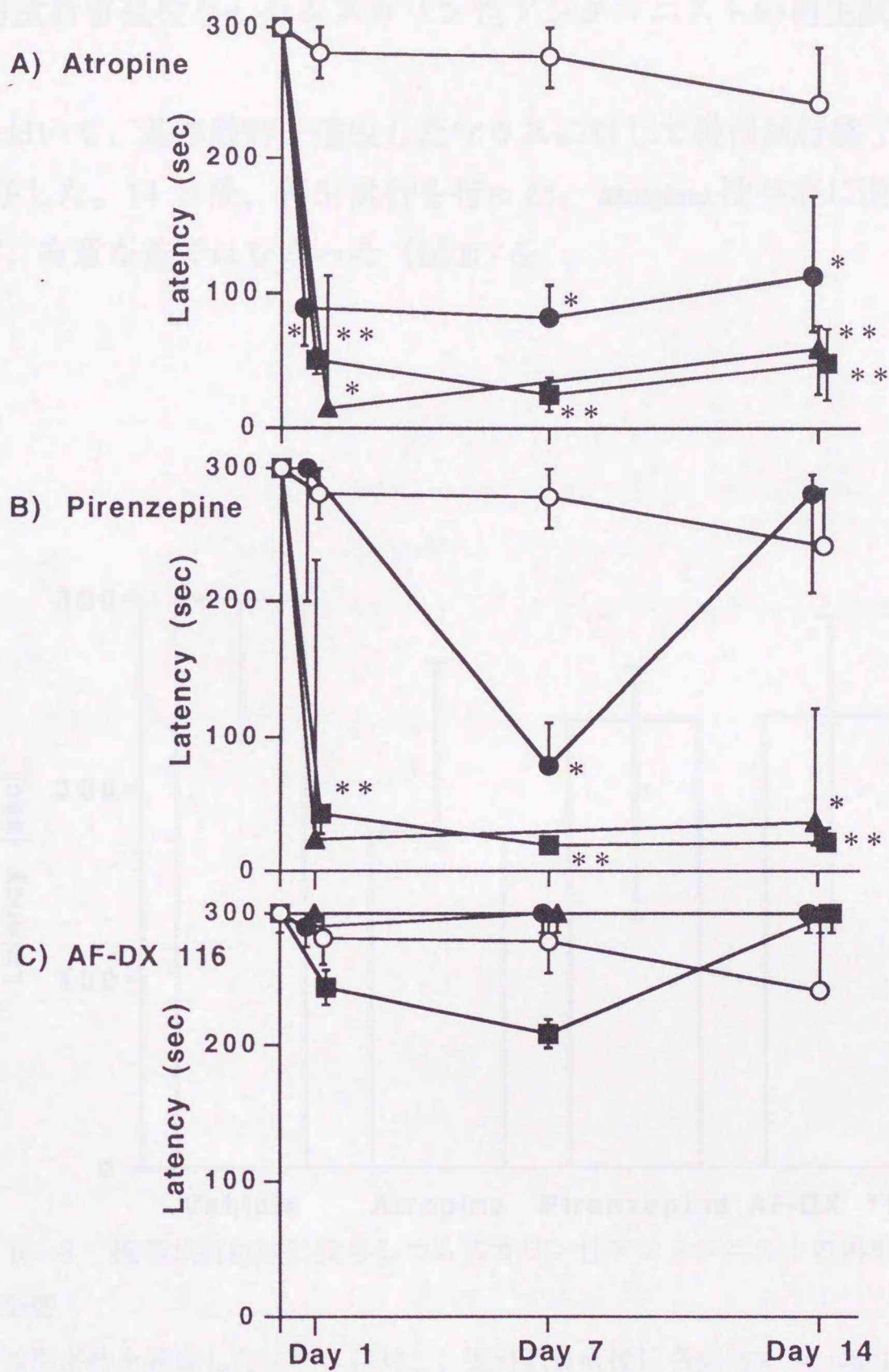


図 II - 5 ムスカリン性アンタゴニストの獲得試行前投与を受けたマウスの各日の再生試行における成績

獲得試行前投与後、獲得試行において基準潜時を達成したマウスを用いた。各日における再生試行の成績を示す。A) atropine、B) pirenzepine、および C) AF-DX 116、を ● : 1 nmol、▲ : 10 nmol、■ : 40 nmol 投与した。各グラフ中に ○ : 溶媒投与群データを示す。データは中央値と 4 分位数で示す (n=5-7)。Mann-Whitney *U*-test を用いた、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 溶媒投与群に対する有意差を示す。

II-2-4 獲得試行直後投与したムスカリン性アンタゴニストの再生試行における影響

獲得試行において、基準潜時を達成したマウスに対して獲得試行終了直後に各薬物を40 nmol 投与した。14 日後、再生試行を行った。atropine 投与群に潜時短縮傾向が認められたが、有意な差ではなかった (図 II - 6)。

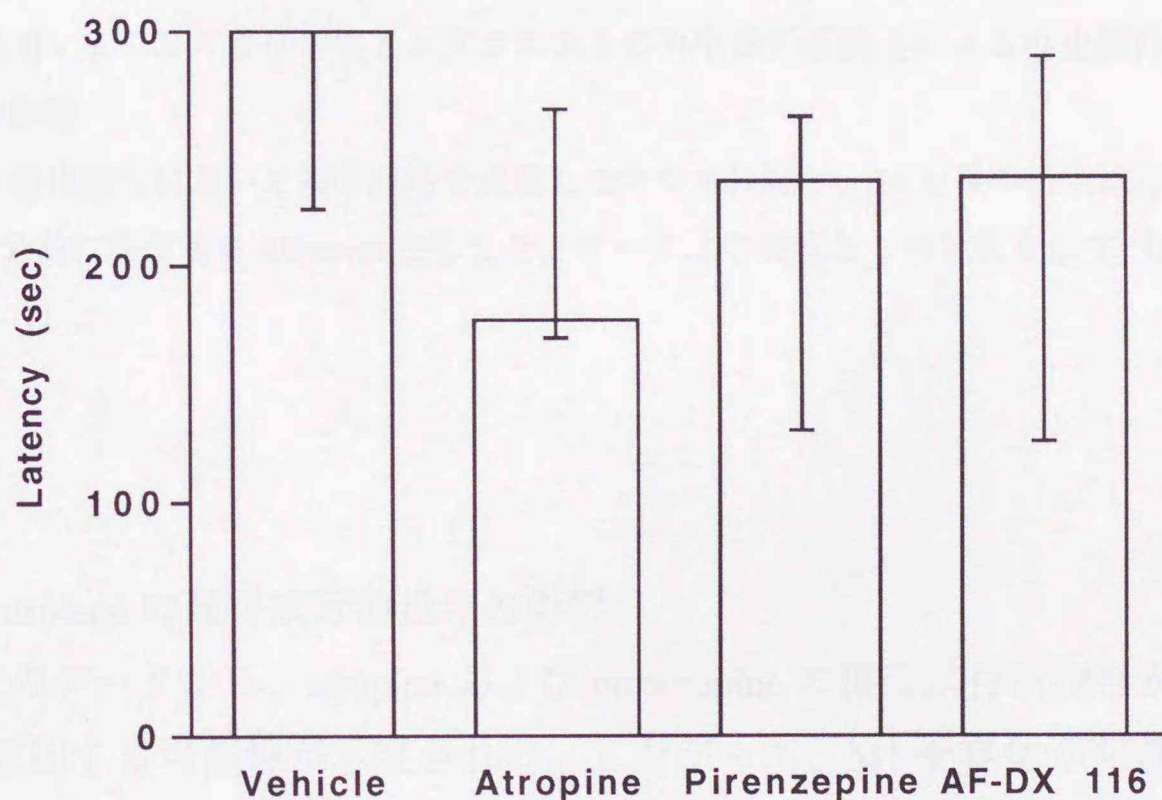


図 II - 6 獲得試行直後に投与したムスカリン性アンタゴニストの再生試行への影響

基準潜時を達成したマウスに対し、獲得試行直後に各薬物を 40 nmol 投与した。14 日後、再生試行を行った。データは中央値と 4 分位数を示す (n=5 - 7)。

II-2-5 ムスカリン性アンタゴニストの再生試行前投与の影響

獲得試行において基準潜時を達成したマウスに対し、14 日後の再生試行の 5 分前に各薬物を投与した。atropine 投与群に若干の潜時短縮傾向が認められたが、有意な差ではなかった (図 II - 7)。

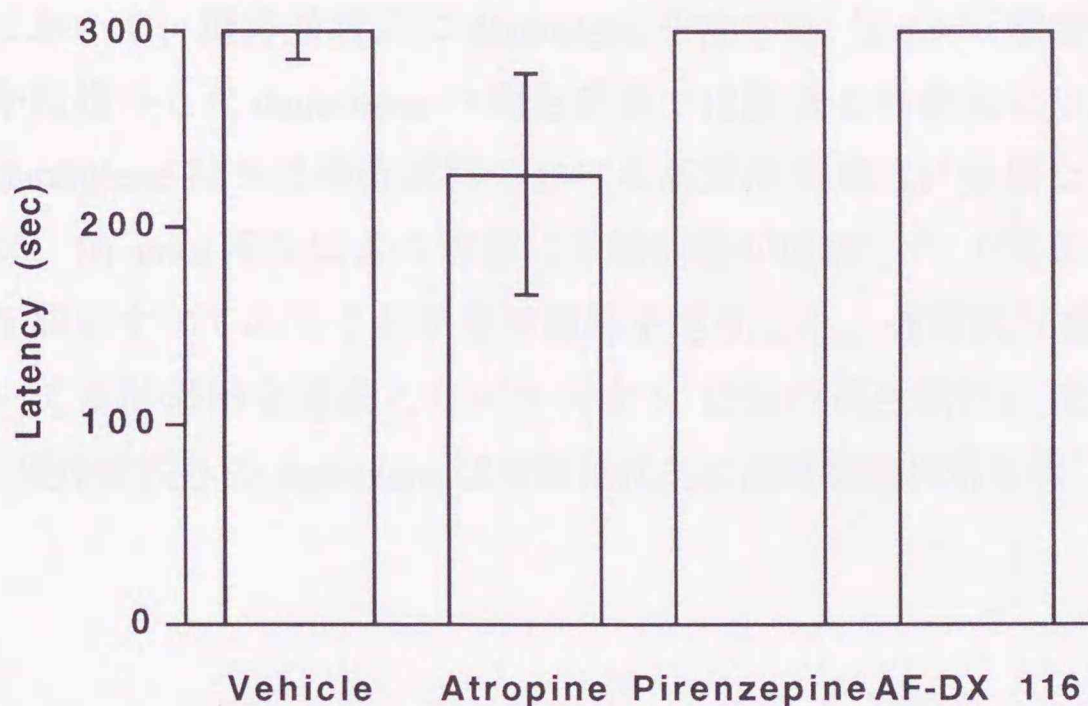


図 II-7 ムスカリン性アンタゴニストの再生試行前投与による再生試行への影響

獲得試行において基準潜時を達成したマウスに対し、14日後の再生試行の5分前に各薬物を40 nmol投与した。データは中央値と4分位数を示す (n = 5-7)。

II-2-6 dantrolene の獲得試行前投与の影響

II-2-5 までのデータから、atropine および pirenzepine の獲得試行前投与が長期記憶の形成を強く抑制する可能性が示唆された。したがって、M1 受容体が記憶形成の初期過程において重要である可能性が示唆された。第 I 章で述べたように M1 受容体機構は PI 代謝を促進し (Fukuda *et al.*, 1987; Ohnuki & Nomura, 1991)、PI から diacylglycerol および IP₃ を産生すると考えられる (Berridge *et al.*, 1984; Brown *et al.*, 1984; Macphee *et al.*, 1984; Murayama & Ui, 1985)。これらは 2 次メッセンジャーとして、IP₃ は細胞内 Ca²⁺ プール、おそらく小胞体に局在する受容体/Ca²⁺ チャネルを活性化し、細胞内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) を上昇させる (Berridge & Irvine, 1984; Furuichi *et al.*, 1989)。また、diacylglycerol はプロテインキナーゼ C (protein kinase C: PKC) を活性化する (Berridge *et al.*, 1984)。

dantrolene は筋弛緩作用薬で、その作用機序は筋細胞の Ca²⁺ プールからの Ca²⁺ 遊離を抑制することであると報告されている (Ohta *et al.*, 1990)。また、神経細胞においてグルタミン酸受容体を介した [Ca²⁺]_i 上昇を抑制する (Lei *et al.*, 1992) ことや虚血性脳神経細胞死を抑制する (Zhang *et al.*, 1993) などの報告がある。そこで、受動的回

避反応実験において、獲得試行前に dantrolene を投与し (i.c.v.) 学習機能への影響を検討した。今回投与した dantrolene の用量範囲では顕著な行動変化は認められなかった。6 nmol dantrolene 投与は獲得試行における基準潜時達成に必要な訓練回数に影響しなかったが、10 nmol 投与により有意に訓練回数が増加した (図 II-8)。なお、どの用量の投与群もすべてのマウスが基準潜時を達成した。獲得試行前投与を受け、獲得試行において基準潜時を達成したマウスを 1 日後の再生試行に使用した。再生試行において、獲得前投与の dantrolene は用量依存的に潜時短縮作用を示した (図 II-9)。

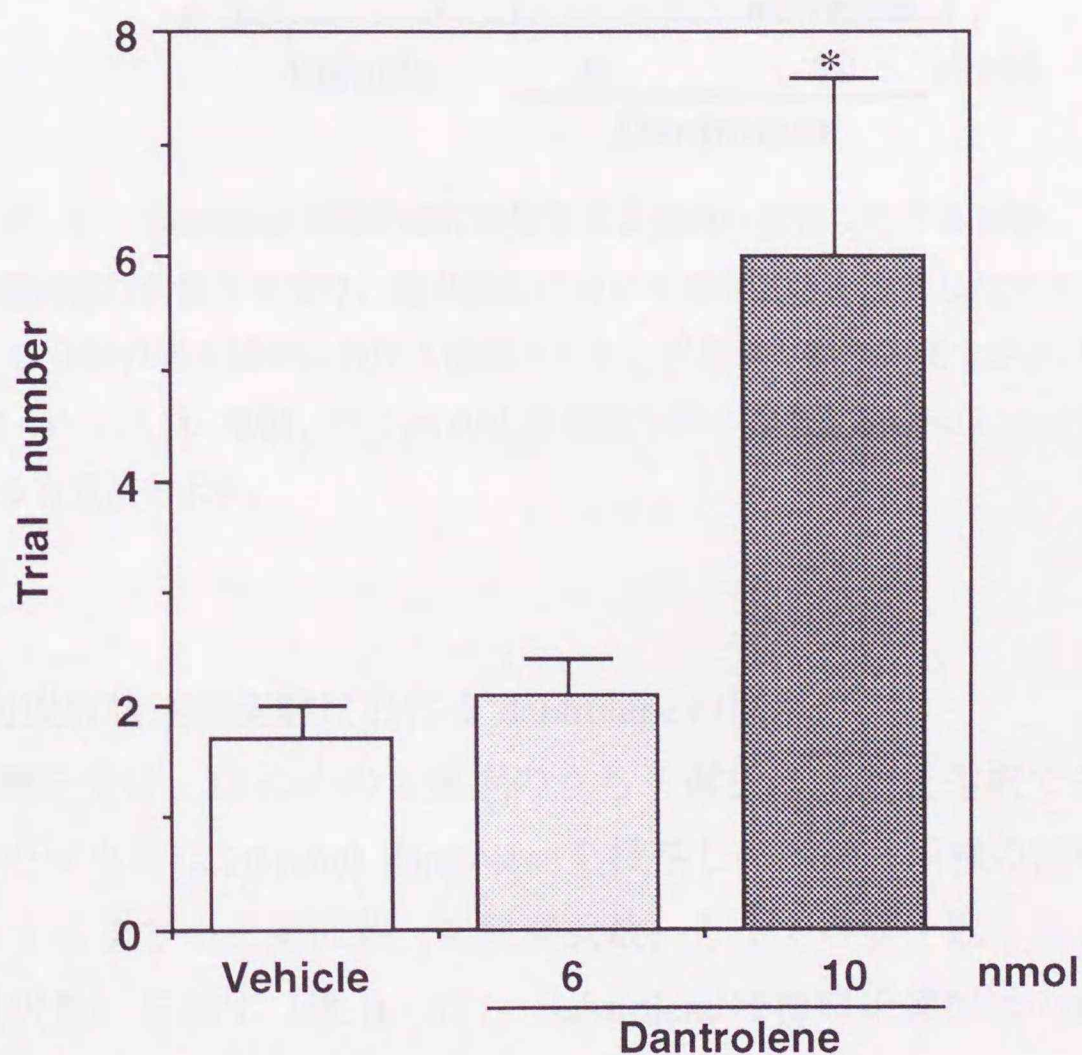


図 II - 8 基準潜時達成に必要な訓練回数に対する獲得試行前投与の dantrolene の影響

dantrolene は獲得試行 5 分前に投与 (i.c.v.) した。対照群は同容量の溶媒 (20% DMSO) 投与群とした。平均値と標準誤差を示す (n = 5-8)。

* : $p < 0.05$ 溶媒投与群に対する Student's *t*-test による有意差を示す。

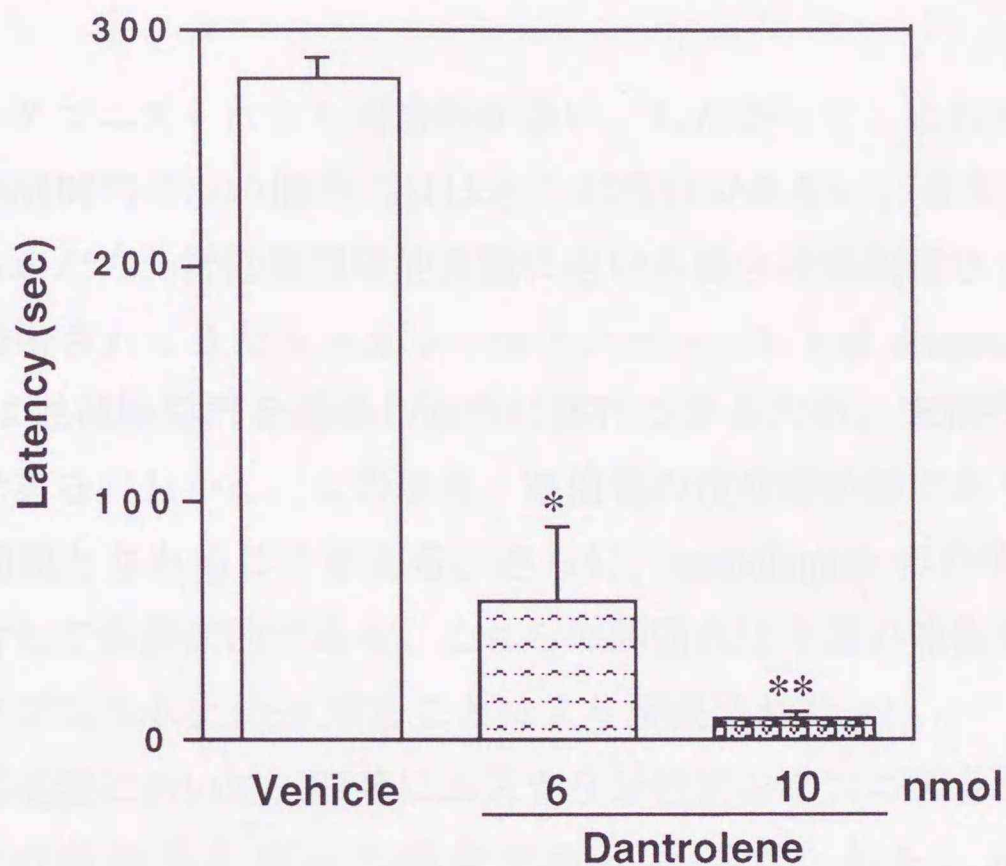


図 II - 9 dantroleneの獲得試行前投与による再生試行に対する影響

獲得試行前投与を受け、獲得試行において基準潜時を達成したマウスの1日後の再生試行における成績を示す。平均値と標準誤差を示す (n = 5 - 8)。* : p < 0.05、** : p < 0.01 溶媒投与群に対する Student's t-test による有意差を示す。

II-2-7 八方向放射状迷路実験における dantrolene の作用

1日1回の訓練を受け、はじめの8選択のうち7選択以上が正選択である試行が連続5試行つづいたマウスに20 nmol dantroleneを投与し、訓練と同様の試行を行った。最初の誤選択をするまでの正選択数（初期選択数）と全ての餌を取り終えるまでの誤選択数（総誤選択数）を示す（表 II - 3）。dantroleneは初期正選択数の減少と、総誤選択数の増加をもたらした。

表 II - 3 八方向放射状迷路において課題習得後の dantrolene投与の影響

Dantrolene (nmol)	Correct	Error
Vehicle	7.7 ± 0.21	0.3 ± 0.21
20	4.0 ± 0.72*	7.7 ± 1.74**

平均値と標準誤差（回数）を示す (n = 6 - 8)。* : p < 0.05、** : p < 0.01 溶媒投与群に対する有意差を示す。

II-3 考察

今回用いたアンタゴニストは全て水溶性が高い。したがって、これらの薬物は末梢投与されても血液脳関門のため脳内にはほとんど移行できない。また dantrolene は強力な筋弛緩薬であるため、行動薬理学的実験に用いる場合は末梢投与することができない。これまで繁用されてきたムスカリン性アンタゴニストは scopolamine などである。scopolamine は血液脳関門を通過し脳内に移行できるため、末梢投与が可能であり、操作が簡便である。しかし、この場合、高用量の投与が必要であり、末梢組織における副作用が問題とされることがある。さらに、scopolamine の作用は mACh-R の各サブタイプに対して非選択的である。これらの問題点は今回の報告の通り選択的ムスカリン性アンタゴニストを i.c.v. することにより解決された。

受動的回避反応実験において、顕著にムスカリン性アンタゴニストの影響が認められたのは獲得試行前投与を行った場合であった。すなわち、atropine および pirenzepine 投与群の 1 日後以降の再生試行の成績が有意に低下した。したがって、M1 受容体応答機能は長期記憶形成時 (図 II - 10 : B) ①-c、C) あるいは記憶の保持過程に重要であることが示唆された。また、獲得試行前投与において、atropine は用量依存的に基準潜時達成に必要な訓練回数を増加したことより、短期記憶の形成 / 想起 (図 II - 10 : B) ①-a, b、C) においても一部何らかの役割を担っているものと推定される。興味ある点は、獲得試行において顕著な影響が認められないにもかかわらず、再生試行における成績低下が強く現れた点である。この傾向は、dantrolene の作用についても同様であった。獲得試行に有意な差を与えない低用量の dantrolene 投与が再生試行の有意な成績低下をもたらした。これは、学習 / 短期記憶の形成、あるいはその想起過程と、長期記憶の形成過程の機構が異なる可能性を示している。短期記憶の形成あるいは想起においては、ACh も一部関与するが、むしろ他の神経伝達物質が重要な役割を担っているのであろう (図 II - 10、C))。一方、長期記憶の形成過程においては ACh が重要な役割を担っており、特に M1 受容体を介した細胞内機構が重要であることが示唆された。獲得試行終了直後にムスカリン性アンタゴニストを投与しても再生試行において顕著な成績低下を誘導しなかった (図 II - 10 B) ②))。獲得試行前投与の結果と比較すると、短期記憶形成後に mACh-R 応答機能を介し長期記憶が形成されるのではなく、おそらく、短期記憶形成過程と平行して長期記憶が形成されてゆくのであろう (図 II - 10 : A) における MTM、B) ① - c、②))。神経伝達物質はこの形成過程に対する引き金的役割を果たし、記憶形成過程が進行した後は細胞外刺激より細胞内機構が重要となることが推定される。再生試行前投与の薬物投与が

有意な作用を示さなかったことより、記憶の想起には ACh 神経系の関与は弱いことが示唆された (図 II - 10 B) ③)。実験動物において、前脳基底核を損傷すると、大脳皮質の ACh 神経系の活性低下が誘発される (Johnston *et al.*, 1979)。この動物は受動的回避反応において、短期記憶に若干の障害を起し、長期記憶に大きな障害を起すことが報告されている (Helper *et al.*, 1985; Miyamoto *et al.*, 1985; Wenk *et al.*, 1980)。本章の結果をあわせ考慮すると、受動的回避反応において、長期記憶は M1 受容体応答機能を介し大脳皮質において保持されることが推測される。

細胞内 Ca^{2+} 動員が長期記憶の形成に重要であることが今回の dantrolene の作用に関する実験結果より示唆された (図 II - 10 : B) ④、C)。また、高用量の dantrolene 投与の結果より、短期記憶の形成/想起においても細胞内 Ca^{2+} 動員が一部役割を担っている可能性が示唆された。神経細胞における dantrolene の作用機序の詳細は不明であるが、これまでの報告 (Lei *et al.*, 1992; Ohta *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1993) から推察すると、 IP_3 による細胞内 Ca^{2+} 動員を抑制するか、あるいは筋細胞における作用機序と同様にリアノジン感受性の細胞内 Ca^{2+} 動員 (Ouyang *et al.*, 1993) を抑制すると考えられる。八方向放射状迷路課題習得に必要な記憶と受動的回避反応課題習得に必要な記憶とは異なることが報告されている (Betty & Shavalia, 1980)。作業記憶は短期記憶と類似しているが、数時間保持される点で異なる。また、実験動物において、前脳基底核の損傷は長期記憶に影響し (Miyamoto *et al.*, 1985)、内側中隔核の損傷は空間記憶、特に短期の作業記憶に対し影響する (O'Keefe & Dostrovsky, 1971; O'Keefe *et al.*, 1975)。内側中隔核の損傷は中隔 - 海馬系の ACh 神経系の活性低下を誘導する (Divac, 1975; Johnston *et al.*, 1979, 1981)。記憶の種類により、重要な脳部位が異なるが、今回示した実験法においていずれも $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が重要であることが dantrolene の作用により明らかとなった。

海馬においてシナプス前線維に高頻度の電気刺激を与えるとシナプス後部の活動電位の振幅が数時間以上増大する現象が観察される。この現象は長期増強 (long-term potentiation: LTP (Blis & Lømo, 1973; Yamamoto, 1972)) と呼ばれ、神経系の可塑性を示す現象として注目され、学習/記憶の基礎機構であると考えられている。細胞内 Ca^{2+} 動員により Ca^{2+} とカルモジュリンが結合し、活性化したカルモジュリンがカルモジュリンキナーゼ II (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: CaMK II) を活性化する (Yamauchi & Fujisawa, 1989)。LTP に CaMK II が関与するとの報告がある (Chapman *et al.*, 1995; Fukunaga *et al.*, 1995; Pettit *et al.*, 1995)。さらに、CaMK II のノックアウトマウスが学習/記憶に障害を持ち、海馬の LTP 発現能力が低下することが

報告されている (Silva *et al.*, 1992-a, b)。また、マウスに対する活性型 CaMK II の遺伝子移入は海馬における LTP 発現に変化を及ぼすことが報告されている (Bach *et al.*, 1995; Mayford *et al.*, 1995)。学習/記憶に細胞内 Ca^{2+} 動員が重要であるという今回の結果と一致する。また、LTP に対する PKC の関与も報告されている (Pasinelli *et al.*, 1995)。PKC のノックアウトマウスも学習/記憶に障害を持ち、LTP の発現が減弱することが報告されている (Abeliovich *et al.*, 1993-a, b)。しかし、著者は、本章で述べた実験系によりプロテインキナーゼの阻害薬である 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) あるいはカルモジュリンの阻害薬である N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7) などの作用を検討したが、顕著な作用は認められなかった。薬物の用量が不適切であったか、あるいは組織における薬物の細胞内透過性などが問題であったのか不明である。また、海馬スライス標本 CA1 領域における LTP に対する ACh 神経系の関与について検討したが、少なくとも、この領域においてスライス標本を用いた実験系では ACh 神経系の関与は認められなかった。ACh は単独では LTP 発現に関与しないのかも知れない (Bear & Singer, 1986)。探索行動中の実験動物の海馬において 4-12 Hz 程度の脳波 (θ 波) が観察されることから (Bland, 1986)、学習に θ 波の発現が必要であると推測されている。この脳波の発現に ACh 神経系の関与が示唆されている (Winson, 1978)。この周波数に近い電氣的刺激により海馬スライス標本において LTP が発現するが、この LTP はグルタミン酸依存性である (Arai & Lynch, 1992)。ACh は単独で LTP を発現するのではなく、他の神経伝達物質と協調し合い LTP を発現する可能性が考えられる。また、著者は山形大学医学部第二生理学教室加藤教授らとの共同研究により、海馬スライス標本 CA1 領域において、アラキドン酸あるいはその代謝物が LTP 発現に関与することを見いだした (Saito *et al.*, 1992)。アラキドン酸は逆行性伝達物質の候補として注目されている。この知見は CaMK II あるいは PKC を介する系以外の重要な系が存在する可能性を示唆する。今後、M1 受容体活性化以降の機構、たとえば上記キナーゼの基質の同定、アラキドン酸代謝物の同定およびその作用機序、などに関する神経化学的な研究成果と行動薬理学的研究レベルの融合が期待される。

受動的回避反応実験結果全般において、atropine に比較し pirenzepine あるいは AF-DX 116 による影響が小さい。atropine は M1、M2 いずれの受容体サブタイプに対しても非常に高親和性であり、それぞれの受容体サブタイプに対し pirenzepine、AF-DX 116 に比べ 100-1000 倍高い親和性を有する。選択的アンタゴニストの作用の弱さはこの親和性の差により説明されよう。また、AF-DX 116 はいずれの実験系にお

いても顕著な作用を示さなかった。シナプスに放出された ACh がシナプス前部に局在する M2 受容体に結合し、ACh 放出を抑制する（負のフィードバック機構）との報告がある（Billird *et al.*, 1995）。第 I 章に示したように、M2 受容体は cAMP の生成を抑制する。ACh の放出抑制はこの機構を介したものと推測される（図 II - 10 : C）。AF-DX 116 はこの ACh 放出抑制を阻害すると考えられるので、学習 / 記憶過程に対し、むしろ協調的に作用することが期待される。若干の成績低下作用が認められたのは CCh による PI 代謝に対する AF-DX 116 の IC_{50} 値が比較的 pirenzepine に近いことが原因であろう。ACh 神経系に障害を誘導するなどの適当な病態動物を用いた実験系により証明できる可能性がある。

本章で用いた pirenzepine および AF-DX 116 に加え、サブタイプ選択的アンタゴニストが開発されてきている。クローニングされている M3 (m3) 受容体に対して hexahydrosiladifenidol および p-fluorohexahydrosiladifenidol、M4 (m4) 受容体に対して tropicamide などがある（Caulfield, 1993）。cDNA 発現系を用いた再構成系の実験においては M3 受容体は M1 受容体に類似しており主に PI 代謝に関連し、M4 受容体は M2 受容体に類似し、主に cAMP 生成の抑制系に関連する。関連する細胞内情報伝達系が同じことからこれら新規選択的アンタゴニストも行動薬理的に pirenzepine あるいは AF-DX 116 と類似の作用を示すと推定される。しかし、行動薬理学的実験において、動物に習得させる課題により重要な脳部位が異なることがある。課題の違いによる各アンタゴニストの作用と mACh-R サブタイプの脳内の局在との関連を検討することは有意義であろう。ただし、現在開発されているサブタイプ選択的ムスカリン性アンタゴニストは受容体結合実験において、各サブタイプに対して 10 倍以上の親和性の差を示さない（第 I 章に示した CCh 刺激による PI 代謝活性に対する pirenzepine と AF-DX 116 の差も同様である。）。この事実は生理学的レベルのより詳細な研究の障壁である。より選択性の高い薬物の開発が待たれる。

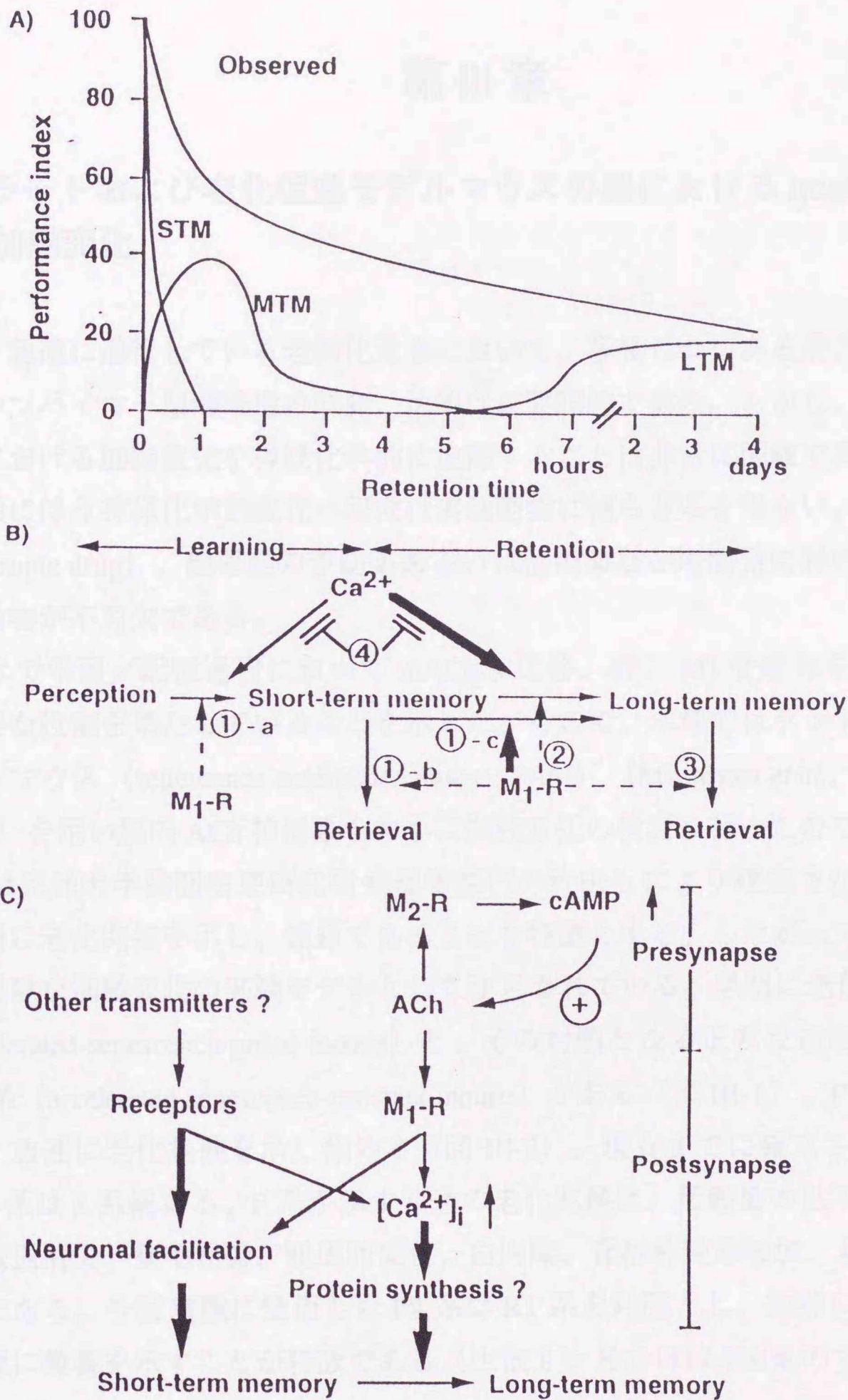


図 II - 10 ACh 受容体応答の学習/記憶の各過程に対する関与

- A) 記憶の経時変化。STM：短期記憶、MTM：中期記憶（個体にとって必要な情報か否かを選別する段階で、本文中では長期記憶の初期段階として記述している）、LTM：長期記憶
- B) M₁ 受容体応答および dantrolene の学習/記憶過程における関与。pirenzepine の ①：獲得試行前投与、②：獲得試行後投与、③：再生試行前投与による結果から推定された。④：dantrolene 投与の結果から推定された。
- C) 記憶の形成過程に関与する ACh および他の神経伝達物質による細胞内応答

第 III 章

老齡ラットおよび老化促進モデルマウスの脳における acetylcholine 神経系の加齢変化

現在、急速に進行している老齡化社会において、多発しつつある老人性痴呆症あるいはアルツハイマー型痴呆症の研究、治療は重要課題である。しかし、現時点で、ヒト脳における加齢変化を神経化学的に追跡することは非常に困難である。したがって、加齢に伴う神経化学的变化の研究は実験動物に頼らざるを得ない。また、向知性薬 (nootropic drug)、痴呆症の予防薬あるいは治療薬などの開発において適当な病態モデル動物が不可欠である。

第 II 章で学習／記憶過程において mACh-R 応答、特に M1 受容体を介した細胞応答が重要な役割を果たしていることを示した。そこで、本章ではラットおよび老化促進モデルマウス (senescence-accelerated mouse: SAM) (Miyamoto *et al.*, 1986; Takeda *et al.*, 1981) を用い脳内 ACh 神経系を中心に加齢変化の検討を行ったので記述する。

SAM は京都大学胸部疾患研究所病理学部門の竹田らにより確立された。自然発症的に早期に老化兆候を示し、短命であることを特徴とする。したがって、実験動物の確保が困難な加齢変化の実験モデルとして注目されている。早期に老化兆候を現す P 系 (accelerated senescence-prone mouse) と、その対照となる正常な速度で老化が進行する R 系 (accelerated senescence-resistant mouse) がある (図 III-1)。P 系は正常な発育の後、急速に老化兆候を示し始める (図 III-2)。現在までに確立された R 系は 3 系統、P 系は 8 系統ある。P 系が示す共通の老化兆候は、活動量の低下、脱毛、被毛光沢の減退消失、被毛粗雑、眼周囲変化、白内障、脊椎前後弯増加、および寿命の短縮などである。今回実験に使用した P8 系は R1 系を対照とし、加齢に伴い早期に学習と記憶に障害を示すことが特徴である (生後 8 ヶ月ではほぼ 100% のマウスに障害が認められる) (Yagi *et al.*, 1988)。

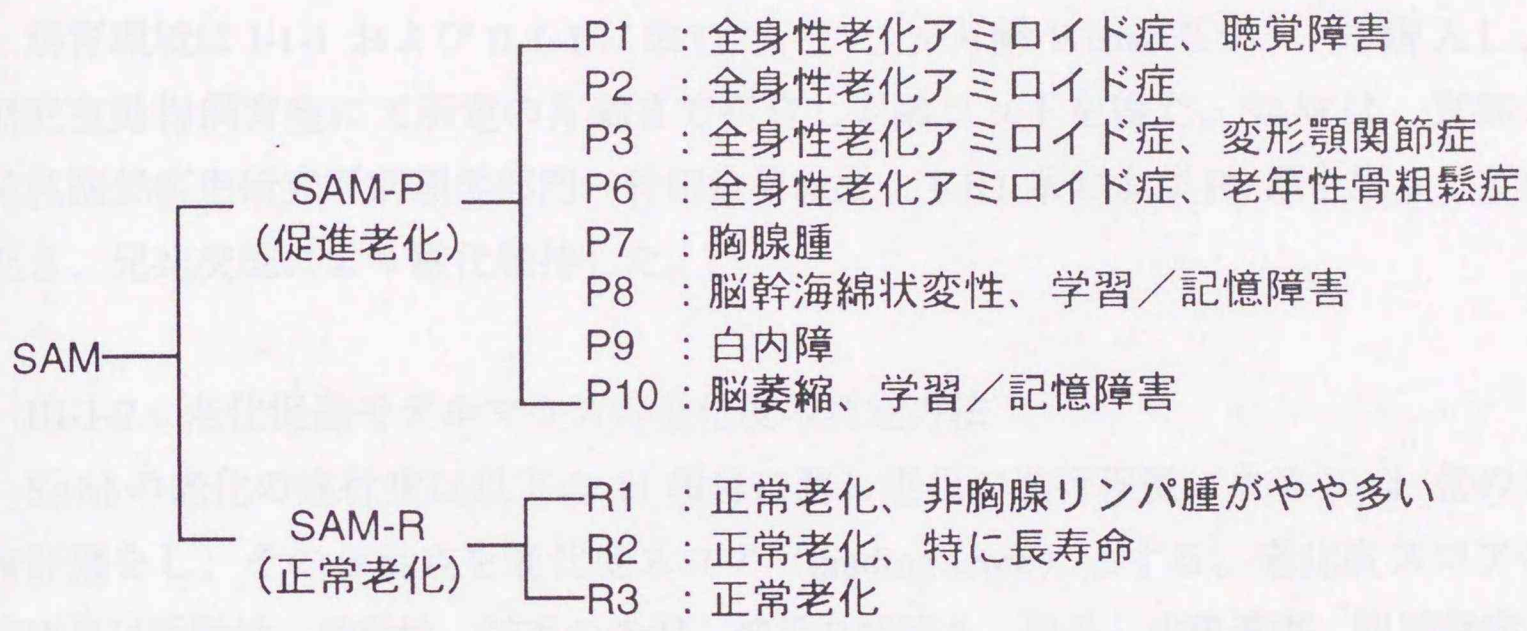


図 III-1 SAM の系統と生物学的特徴

III-1 実験方法

III-1-1 実験動物

飼育環境は I-1-1 および II-1-1 に準じた。2 - 3 ヶ月齢 Wistar 系ラットを購入し、当研究室動物飼育室にて所定の月齢まで飼育し老齢ラットを得た。SAM は、京都大学結核胸部疾患研究所病理学部門・竹田俊男教授より R1 系および P8 系を恵与していただき、兄妹交配により継代維持した。

III-1-2 老化促進モデルマウスの老化度の判定方法

SAM の老化の進行度は以下の 11 項目に関し老化の進行程度により 0 - 4 点の 5 段階評価をし、その合計点を老化度スコア (grading score) とする。老化度スコアの判定項目は活動性、受動性、被毛の光沢、被毛の粗雑さ、脱毛、皮膚潰瘍、眼周囲病変、白内障、角膜潰瘍、角膜混濁、および脊椎湾曲である。

III-1-3 ラット大脳皮質および海馬粗膜画分における [³H]pirenzepine あるいは [³H]inositol 1,4,5,-trisphosphate 結合活性の測定

ラット脳粗膜画分の調製は I-1-4 に準じた。

a) ラット大脳皮質および海馬粗膜画分における [³H]pirenzepine 結合活性の測定

10 nM [³H]pirenzepine、5 - 500 nM 非放射性 pirenzepine、粗膜画分 0.1 mg、100 mM NaCl を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中で 25°C、1.5 時間反応を行った。1 μM atropine 存在下における結合活性を非特異的結合活性とした。非放射性 pirenzepine の結合阻害活性から Scatchard 解析を行った。

b) ラット大脳皮質および海馬粗膜画分における [³H]IP₃ 結合活性の測定

3 nM [³H]IP₃、1 nM - 1 μM 非放射性 IP₃、粗膜画分 0.2 mg および 1 mM EDTA を含む 25 mM Tris-HCl 緩衝液 (各 pH に調製) 200 μl 中で 25°C、1 時間反応を行った。1 μM 非放射性 IP₃ 存在下の結合活性を非特異的結合活性とした。非放射性 IP₃ の結合阻害活性から Scatchard 解析を行った。

III-1-4 ラット脳切片標本における [³H]inositol 取り込み活性の測定

I-1-2 に準じて行った。

III-1-5 ラットおよび老化促進モデルマウス脳切片標本における $[^3\text{H}]$ inositol 1-phosphate 蓄積活性の測定

I-1-2 に準じて行った。

III-1-6 蛋白質量の測定

I-1-6 に準じて行った。粗膜画分量は全てこの方法による蛋白質量を示す。

III-1-7 統計処理

実験結果は平均値または（平均値） \pm （標準誤差）で表した。Student's *t*-test を用い、成熟動物に対する老齢動物の、または、SAMR1 系に対する SAMP8 系の比較を行った。

III-1-8 使用薬物

各薬物は下記より購入した。

$[^3\text{H}]$ IP₃ : Du Pont/NEN Research Products

その他の試薬（特級） : 和光純薬工業株式会社

III-2 実験結果

III-2-1 当研究室老化促進モデルマウスの老化度スコアの加齢変化

当研究室動物飼育室において兄妹交配により飼育してきた SAM の老化度スコアを評定した。P8 系は3ヶ月程度まで R1 系と同様の加齢変化を示したが、その後、R1 系に比較し急速に老化度スコアが増加した（図III-2）。

III-2-2 老齢ラット大脳皮質および海馬粗膜画分における $[^3\text{H}]$ pirenzepine 結合活性

28 - 30 ヶ月齢ラット大脳皮質および海馬粗膜画分における $[^3\text{H}]$ pirenzepine 結合活性は1 - 2 ヶ月齢ラットの活性に比較し解離定数（Kd 値）の変化を伴わず、最大結合活性（Bmax）が有意に低かった（表 III -1）。

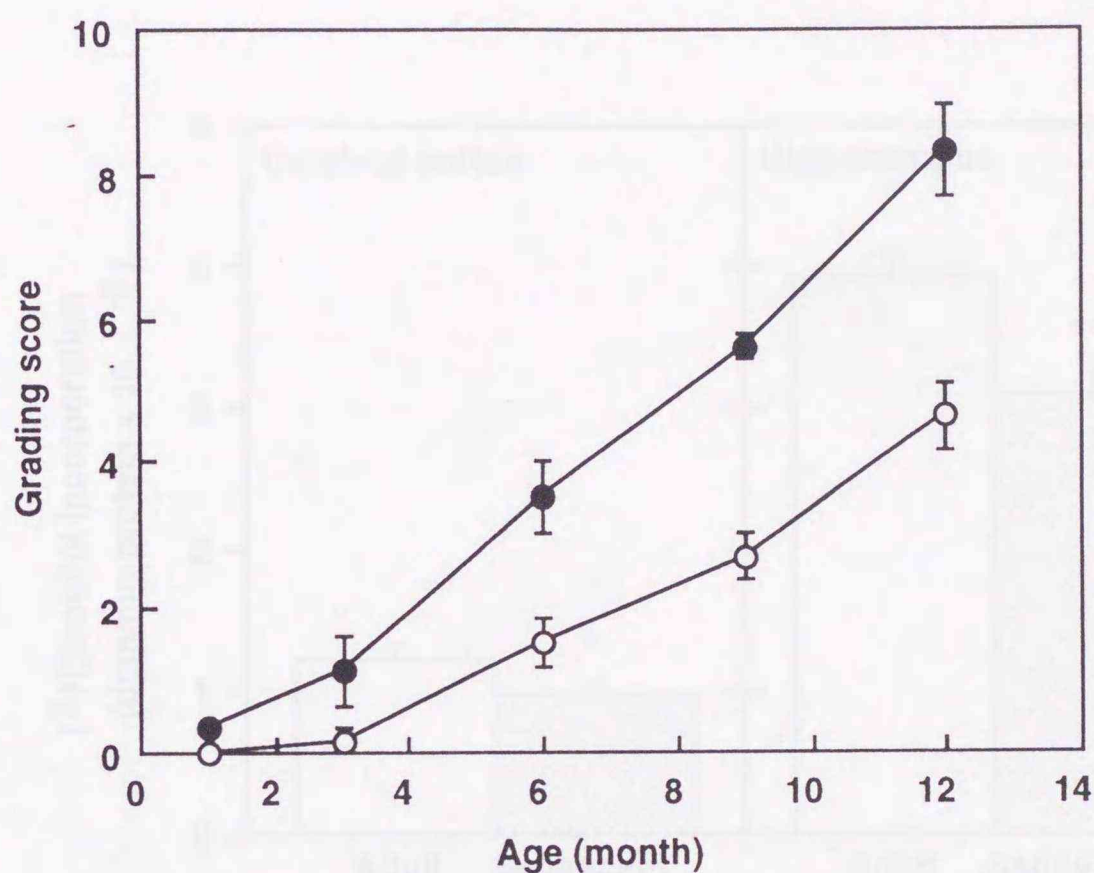


図 III-2 当研究室において兄妹交配し継代している SAM の老化度スコア
○：R1 系 および ●：P8 系の老化度スコアを示す。スコアの低いほど老
化兆候が現れている。

表 III - 1 老齢および成熟ラット脳各部位粗膜画分における³H]pirenzepine 結合活性

Age (month)	1 - 2		28 - 30	
	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg protein)	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg protein)
Cerebral cortex	26.0 ± 2.0	1.55 ± 0.11	21.1 ± 1.7	1.00 ± 0.04*
Hippocampus	38.3 ± 3.4	2.42 ± 0.18	30.3 ± 2.9	1.32 ± 0.06*

平均値と標準誤差を示す (n = 3 - 5)。* : p < 0.05 各脳部位における 1 - 2 ヶ月齢成熟動物に対する 28 - 30 ヶ月齢老齢動物の有意差を示す。

III-2-3 ラット脳切片標本における³H]inositol 取り込み活性の加齢変化

28 - 30 ヶ月齢ラット大脳皮質および海馬切片標本における³H]inositol 取り込み活性は 1 - 2 ヶ月齢ラット脳の活性に比較し有意に低かった (図 III - 3)。大脳皮質においては 36% の、海馬においては 46% の低下であった。

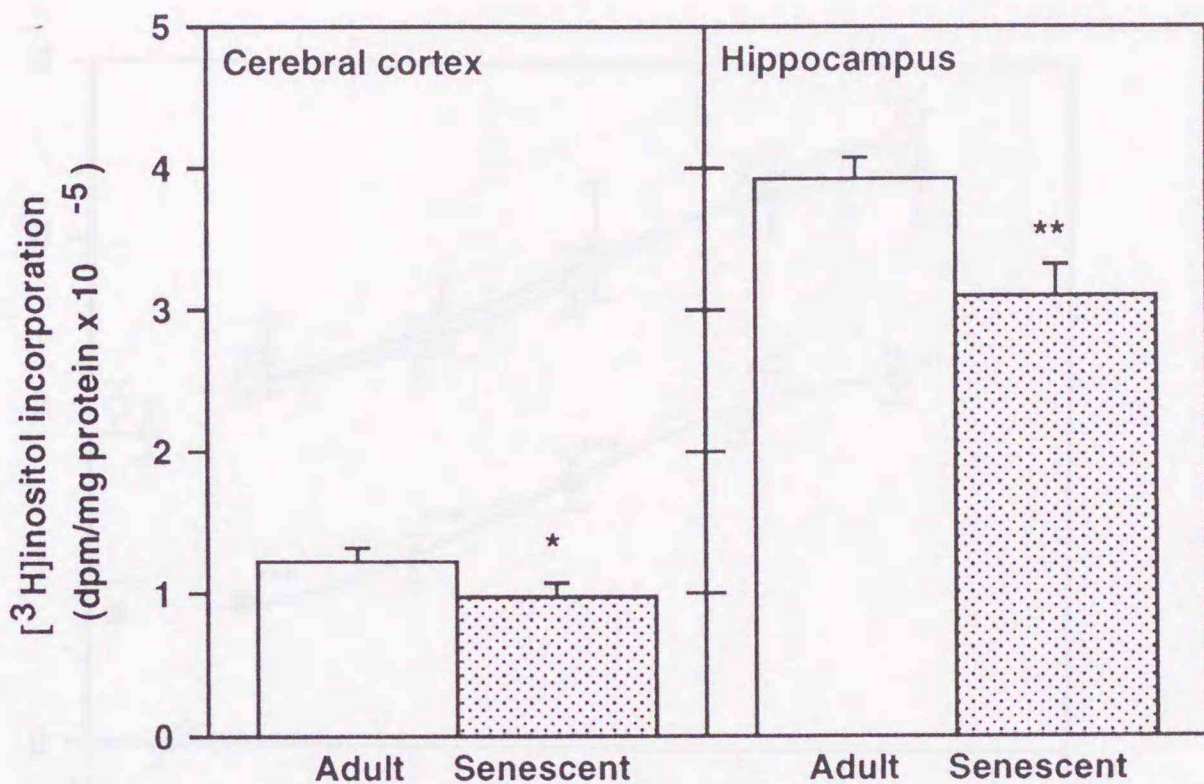


図 III-3 ラット脳各部位切片標本における [³H]inositol 取り込み活性の加齢変化
 Adult: 1-2 ヶ月齢、Senescent: 28-30 ヶ月齢ラット各脳部位切片標本における [³H]inositol 取り込み活性の平均値および標準誤差を示す (n = 3-5)。*: p < 0.05、 **: p < 0.01 各脳部位の成熟動物に対する老齢動物の有意差を示す。

III-2-4 ラットおよび老化促進モデルマウス脳切片標本における carbachol 刺激による [³H]inositol 1-phosphate 蓄積活性の加齢変化

ラット大脳皮質切片標本における CCh 刺激による [³H]IP 蓄積活性は 1-2 ヶ月齢ラットと 22 ヶ月齢ラットでは顕著な差は認められなかった。しかし、28-30 ヶ月齢ラットでは 1-2 ヶ月齢ラットに比較し、基礎活性および CCh に対する反応性に顕著な活性低下が認められた (図 III-4-(A))。一方、ラット海馬切片標本においては、28-30 ヶ月齢において、1-2 ヶ月齢に比較し、基礎活性の有意な変化を伴わず CCh に対する反応性が有意に低下した。(図 III-4-(B))。SAM 大脳皮質切片標本では、9 ヶ月齢において P8 系の基礎活性および CCh に対する反応性が R1 系に対し有意に高かった。13 ヶ月齢 P8 系において、CCh に対する反応性に高い傾向が認められた (図 III-5)。

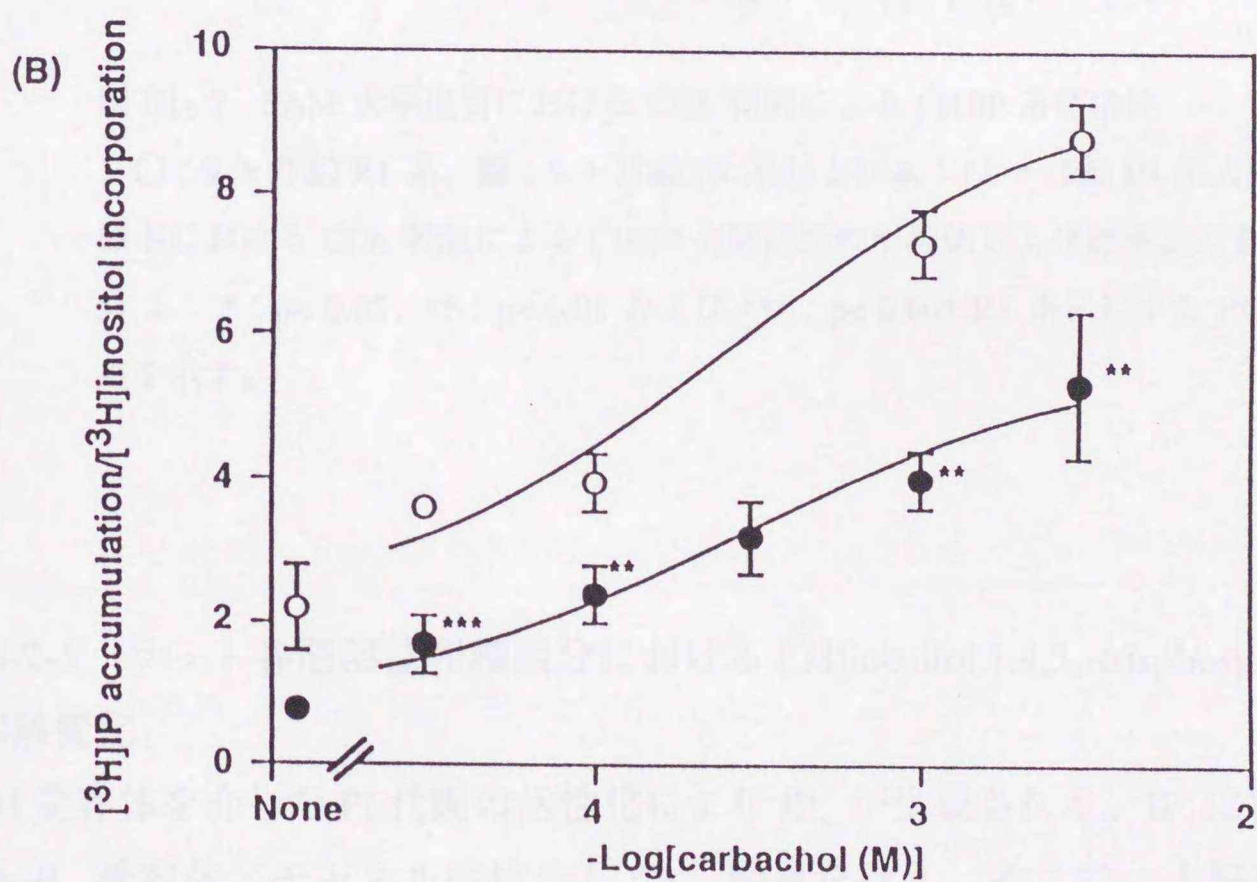
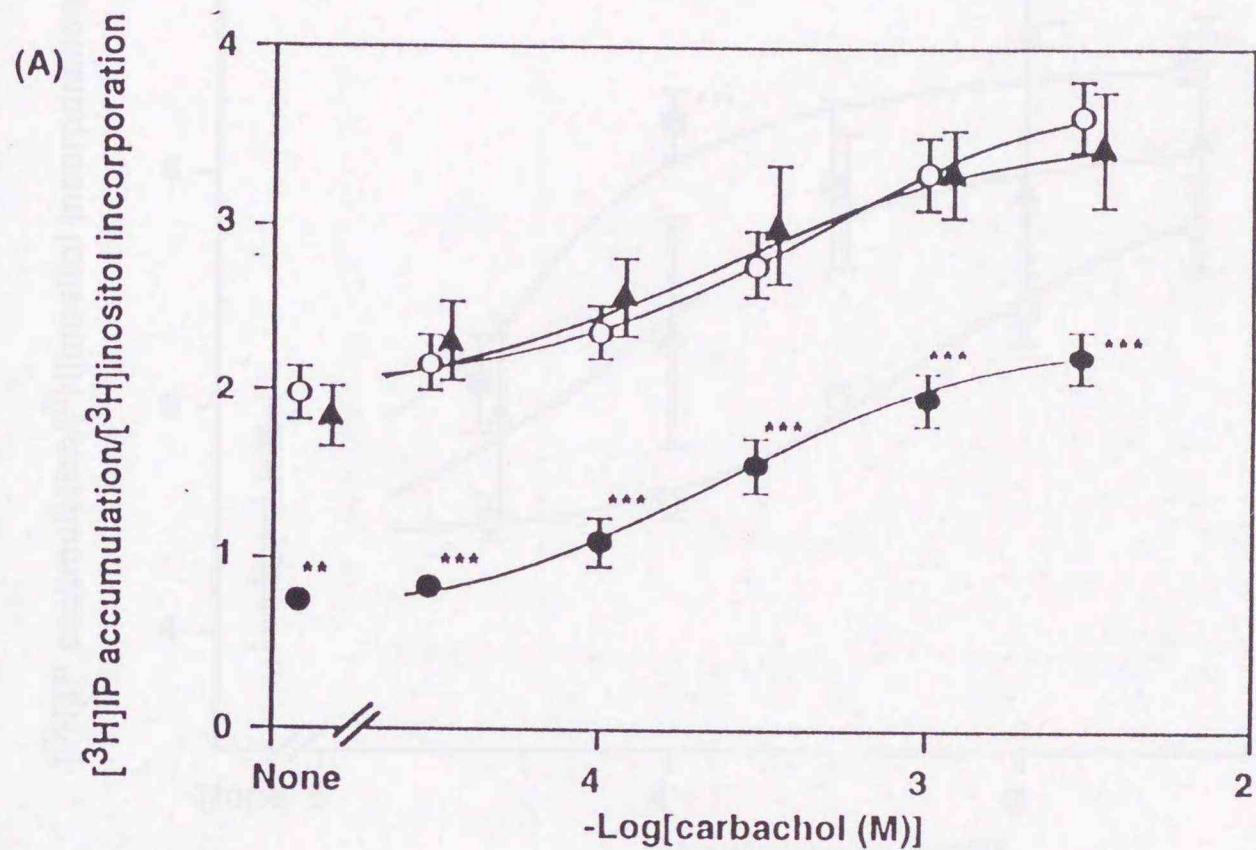


図 III-4 ラット大脳皮質および海馬切片標本における CCh 刺激による $[^3\text{H}]\text{IP}$ 蓄積活性の加齢変化

○：1-2ヶ月齢、▲：22ヶ月齢、●：28-30ヶ月齢ラット大脳皮質 (A) および海馬 (B) における CCh 刺激による $[^3\text{H}]\text{IP}$ 蓄積活性を示す。平均値および標準偏差を示す (n=3-5)。**：p<0.01、***：p<0.001 成熟動物に対する老齢動物の有意差を示す。

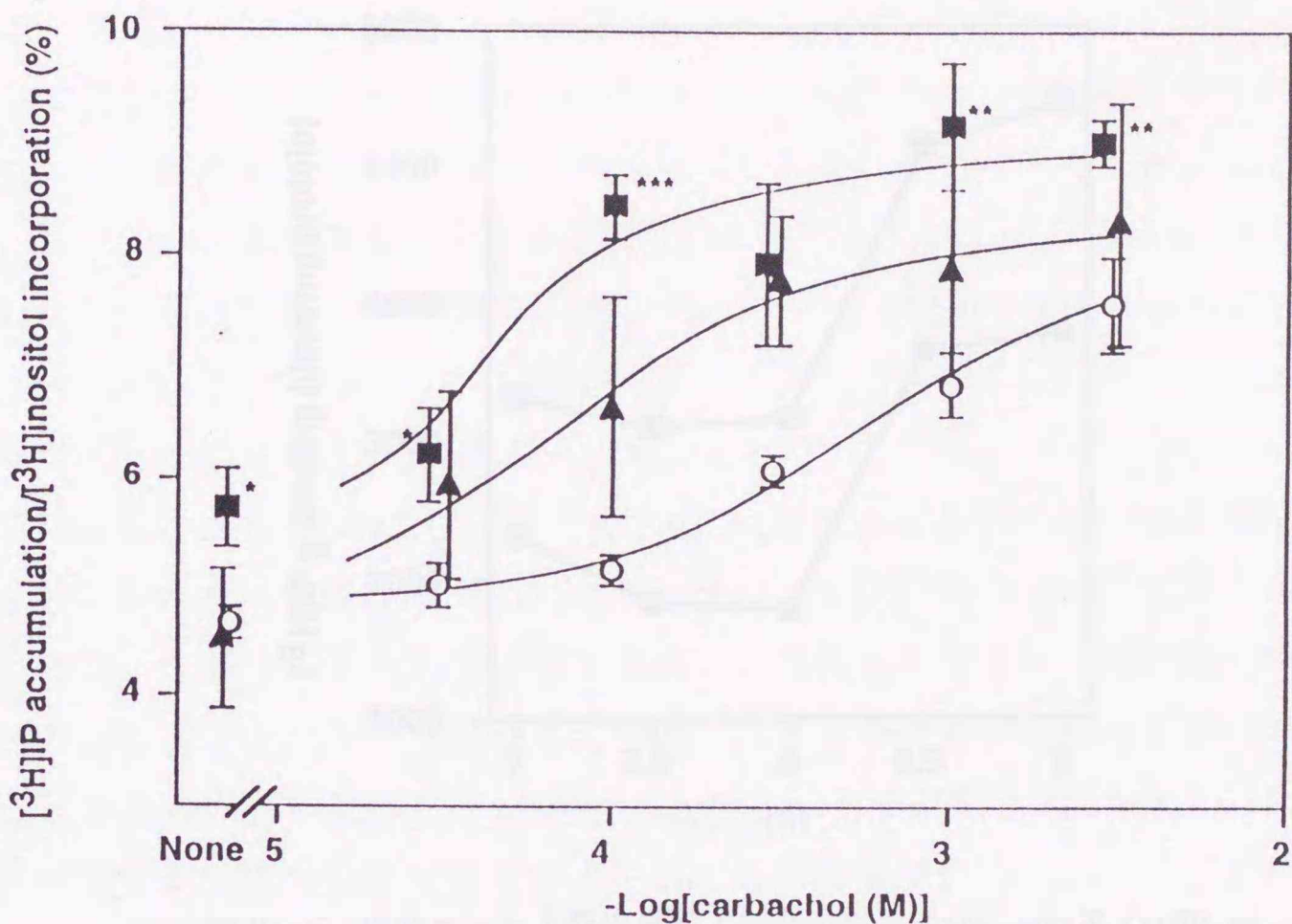


図 III-5 SAM 大脳皮質における CCh 刺激による $[^3\text{H}]\text{IP}_3$ 蓄積活性

○：9ヶ月齢 R1 系、■：9ヶ月齢 P8 系および▲：13ヶ月齢 P8 系大脳皮質切片標本における CCh 刺激による $[^3\text{H}]\text{IP}_3$ 蓄積活性の平均値および標準誤差を示す (n = 5)。*：p < 0.05、**：p < 0.01 および ****：p < 0.001 R1 系に対する P8 系の有意差を示す。

III-2-5 ラット各脳部位粗膜画分における $[^3\text{H}]\text{inositol}$ 1,4,5,-trisphosphate 結合活性の加齢変化

M1 受容体を介した PI 代謝の活性化により IP_3 が生成される。 IP_3 は細胞内 Ca^{2+} プールの IP_3 受容体/チャンネルに結合し Ca^{2+} 動員を行う。そこで、大脳皮質および海馬粗膜画分における IP_3 結合活性の加齢変化について検討した。小脳膜標本において pH の上昇に伴い IP_3 の結合活性が上昇することが報告されてる (Worley *et al.*, 1987)。

成熟ラット大脳皮質および海馬粗膜画分において、小脳膜標本と同様に $[^3\text{H}]\text{IP}_3$ 結合活性は pH に依存して上昇した (図 III-6)。27-28ヶ月齢ラット大脳皮質粗膜画分において、最大結合活性の上昇および pH 8.5 における K_d 値の上昇が認められた (表 III-2)。海馬粗膜画分において、最大結合活性に変化は認められず、pH 8.5 における K_d 値に上昇傾向が認められた。

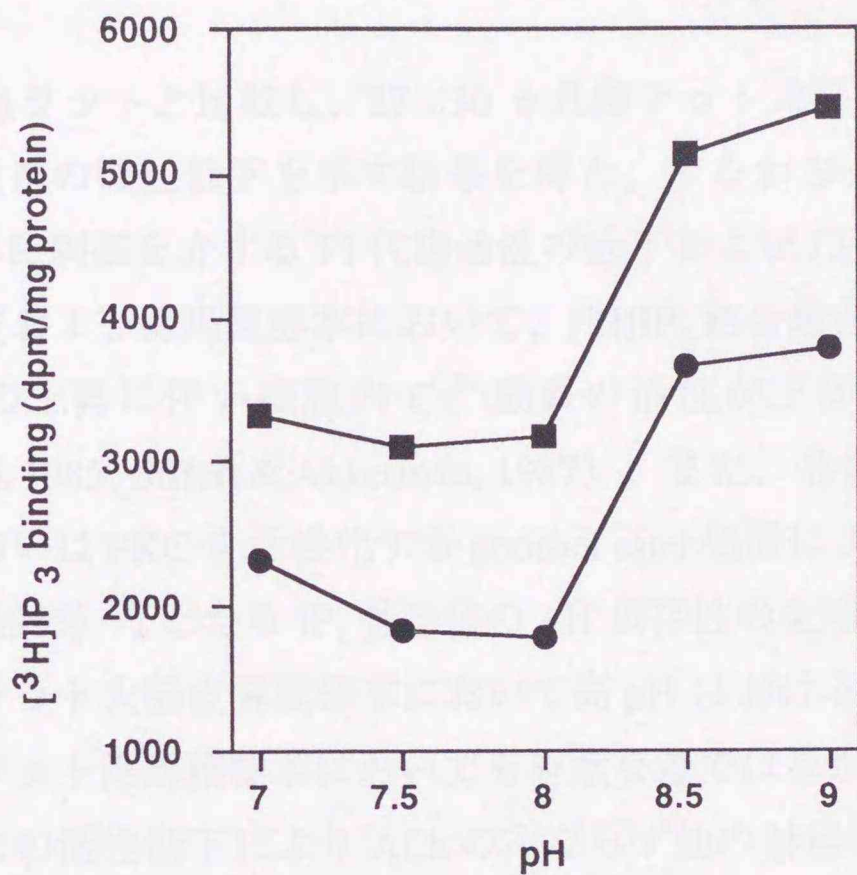


図 III-6 成熟ラット大脳皮質および海馬粗膜画分における [³H]IP₃ 結合活性の pH 依存性

■：海馬粗膜画分、●：大脳皮質粗膜画分における [³H]IP₃ 結合活性の平均値を示す。

表 III-2 ラット脳各部位粗膜画分における [³H]IP₃ 結合活性の加齢変化

	pH	7.5		8.5		
		Age (month)	1 - 2	27 - 28	1 - 2	27 - 28
Cerebral cortex						
Kd (nM)		1 - 2	24.3 ± 5.9	22.8 ± 1.3	1 - 2	6.8 ± 0.43
Bmax (pmol/mg protein)		27 - 28	0.38 ± 0.05	0.57 ± 0.03	27 - 28	0.68 ± 0.04**
Hippocampus						
Kd (nM)		1 - 2	28.7 ± 1.1	28.9 ± 1.3	1 - 2	7.1 ± 0.9
Bmax (pmol/mg protein)		27 - 28	0.70 ± 0.05	0.69 ± 0.13	27 - 28	0.65 ± 0.07

平均値と標準誤差を示す (n = 5 - 6)。**：p < 0.01 各部位間の比較による 1-2 カ月齢成熟動物に対する 27-28 カ月齢老齢動物の有意差を示す。

III-3 考察

2-3 ヲ月齡の成熟ラットと比較し、27-30 ヲ月齡ラット大脳皮質あるいは海馬において、mACh 神経系の機能低下を示す結果を得た。すなわち、 $[^3\text{H}]$ pirenzepine 結合活性の低下、mACh-R 刺激を介する PI 代謝活性の低下および $[^3\text{H}]$ IP₃ 結合親和性の低下である。大脳皮質および海馬膜標本において、 $[^3\text{H}]$ IP₃ 結合活性は pH 依存的に上昇した。細胞内 pH の上昇に伴い細胞内 Ca²⁺ 動員の活性が上昇すること (Brass & Joseph, 1985; Macara, 1985; Siffert & Akkerman, 1987)、また、各種ホルモンによる PI 代謝の活性化、あるいは PKC を活性化する phorbol ester 処置により細胞内 pH が上昇すること (Macara, 1985) などから IP₃ 受容体の pH 依存性の生理的意義が示唆されている。今回、老齡ラット大脳皮質膜標本において高 pH における親和性の有意な低下が示された。老齡ラット海馬膜標本においても有意な差ではなかったものの同様の傾向が認められた。この活性低下により ACh のみならず他の神経伝達物質による PI 代謝を介する生理機能の発現も低下していることが推定される。2-3 ヲ月齡の成熟ラットと比較し、27-30 ヲ月齡ラット大脳皮質および海馬において共通の神経化学的な変化が認められた。1) 粗膜画分における $[^3\text{H}]$ pirenzepine の最大結合活性の低下、2) 切片標本における $[^3\text{H}]$ inositol 取り込み活性の低下、3) 切片標本における CCh 刺激による $[^3\text{H}]$ IP 蓄積活性の低下である。CCh 刺激による $[^3\text{H}]$ IP 蓄積活性の低下は、 $[^3\text{H}]$ pirenzepine 結合部位の減少に一部起因すると考えられる。しかし、 $[^3\text{H}]$ pirenzepine 結合部位の減少だけでは CCh 刺激による $[^3\text{H}]$ IP 蓄積活性の濃度反応曲線は右方シフトとして観察されるはずである。大脳皮質および海馬切片標本における $[^3\text{H}]$ IP 蓄積活性の濃度反応曲線は下方へもシフトしている。また、 $[^3\text{H}]$ inositol 取り込み活性も低下している。これらを考慮すると、 $[^3\text{H}]$ pirenzepine 最大結合活性の低下、 $[^3\text{H}]$ inositol 取り込み活性の低下および $[^3\text{H}]$ IP 蓄積活性の低下は神経細胞の減少が一部関与していると推測される。本章で示した $[^3\text{H}]$ IP 蓄積活性は $[^3\text{H}]$ inositol 取り込み活性との比で表している。したがって、inositol の取り込み活性が低下していることを考慮すると、実際の脳内における PI 代謝活性はここに示した変化以上に低下していると推測できる。また、大脳皮質と海馬における加齡変化で異なる点は、1) 大脳皮質切片標本における $[^3\text{H}]$ IP 蓄積は基礎活性および CCh に対する反応性が低下したが、海馬切片標本において $[^3\text{H}]$ IP 蓄積の基礎活性は成熟ラットと大きな差がなかったにもかかわらず、CCh 刺激に対する反応性が著しく低下したこと、2) 大脳皮質および海馬粗膜画分における $[^3\text{H}]$ IP₃ 最大結合活性は上昇傾向があったが、大脳皮質粗膜画分における pH 8.5 における $[^3\text{H}]$ IP₃ 結合の親和性が低下したことである。これらの変化は単に

受容体数あるいは神経細胞数など量的変化のみならず、質的变化をも伴っていることを示唆している。老齢ラット脳 (Sawaki *et al.*, 1995) およびアルツハイマー病患者脳 (Jope *et al.*, 1994) 膜標本において mACh-R 受容体を介した PI 代謝活性が低下しているとの報告がある。これらの報告では、PLC 含量および G 蛋白質を直接活性化した場合の PLC の活性上昇は対照標本と比較し変化がないことから、mACh-R を介した G 蛋白質の活性化の低下が原因であるとしている。これらの報告は、本章に示した老齢ラット海馬における PI 代謝活性の低下様式を支持している。また、大脳皮質粗膜画分における pH 8.5 で [³H]IP₃ の親和性の低下は IP₃ 受容体に何らかの変化が起きていることを示す。これらの変化の原因として、関連分子自身の構造的変化、化学的修飾による変化あるいは微小環境の変化などが考えられる。加齢に伴う膜リン脂質の過酸化および膜流動性の低下 (Nagy *et al.*, 1983) あるいは蛋白質のジスルフィド結合 (-S-S-) の修飾 (Thakur, 1983) などの報告がある。これらが今回得た加齢による質的变化の原因の一部であるかも知れない。今後これらの原因究明が期待される。

実験に使用したラットの月齢を考慮すると、今回示したラットにおける神経化学的变化は加齢に伴う最終的な変化を観察していると考えられる。本来であれば、これらの変化に至る過程をも検討する必要がある。実験動物の確保の困難さなど制約があり必ずしも十分な結果を得ることはできなかった。しかし、第 II 章で述べた学習/記憶過程における mACh-R 応答機能の重要性を考慮すると、老齢期における学習/記憶能力の低下の一部の原因が神経化学的に解明された。

著者は当研究室において、北村、趙、山中らとともに SAM 脳における加齢変化について神経化学的に検討を行ってきた (図 III-7)。そこで、次に今回の結果とあわせ SAM 脳における mACh 系、PKC およびグリオーシスに関する老化に伴う変化について考察したい。

SAM 脳における加齢に伴う ACh 神経系の活性変化について、海馬においては大脳皮質に比較し機能低下が早期に発現することを示唆する結果を得た。すなわち、9 ヶ月齢の [³H]quinuclidinylbenzilate (QNB: サブタイプ非選択的アンタゴニスト) 結合活性は、大脳皮質において R1 系と P8 系で差が認められなかったが、海馬において R1 系との比較で P8 系に有意な活性低下が認められた。また、2-12 ヶ月齢における [³H]pirenzepine 結合活性は、大脳皮質において、むしろ加齢に伴い R1 系に比較し P8 系で活性上昇が認められた。しかし、海馬においては、R1 系も P8 系も加齢に伴い活性低下し、さらに、R1 系との比較において P8 系は有意な活性低下を示した。SAM 大脳皮質において、 [³H]pirenzepine 結合活性が加齢に伴い上昇しているにもかかわらず

ず [^3H]QNB 結合活性に変化が認められないことから加齢に伴う M2 受容体の減少が推察される。M2 受容体の減少は M2 受容体の局在するシナプス前部の減少を示唆する。これに対し、シナプス後部では代償的に M1 受容体が増加し、シナプス後部の感受性を上げているのではないだろうか。実際に、9 ヶ月齢 P8 系大脳皮質切片標本における CCh 刺激による [^3H]IP 蓄積活性は有意に上昇していた。さらに、加齢が進み、13 ヶ月齢では、シナプス後部における代償機能も弱くなっていく。また、老齢 22 ヶ月齢ラット大脳皮質においても、成熟ラットに比較しほとんど活性の変化が認められなかった。これらは、大脳皮質における ACh 神経系の加齢による活性低下とそれに対する代償的变化を示していると推定される。この代償的機能の発現も、脳の可塑性の一つといえるのではないだろうか。この代償的機能の発現メカニズム、たとえば M1 受容体など情報伝達機構関連分子の発現制御あるいは化学修飾などの解明は脳可塑性の解明においても病態解明においても重要な知見を与えてくれるのではないだろうか。

Parameter	Experiment	Age (month)				
		1	3	6	9	12
Total mACh-R	QNB binding				R = P R > P	
M1 mACh-R	Pirenzepine binding	R = P R > P		(R: -, P: ↑) (R, P: ↓)		R < P R > P
PKC	PDBu binding				Cytosol: R = P, Membrane: R > P Cytosol: R > P, Membrane: R > P	
Glycolysis	PK 11195 binding	R < P		(R, P: ↑)		(R: -, P: ↑)
		R < P		(R: -, P: ↑)		R < P

図 III-7 SAM 大脳皮質および海馬における mACh 神経系、PKC およびグリコーシスの加齢変化
各因子について R1 系と P8 系の各脳部位粗膜画分および細胞質画分を用いたリガンド結合実験によって検討した。各パラメータの上段は大脳皮質の、下段は海馬の変化を示す。= : 活性が等しいことを、<、> : 活性の高低を示す。() 内の ↑、↓ : 活性上昇あるいは低下の大きな変化、↑ : 活性上昇の小さな変化、および - : 変化がほとんどなかったことを示す。QNB: quinuclidinyl benzilate、PDBu: phorbol 12, 13-dibutyrate、PK 11195: 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide。(Kitamura *et al.*, 1989; Nomura *et al.*, in press; Nomura *et al.*, in press より)

1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide (PK 11195) は ω_3 ベンゾジアゼピン受容体に対するアンタゴニストである (Benavides *et al.*, 1984)。

ω_3 ベンゾジアゼピン受容体は末梢性のベンゾジアゼピン受容体として知られていたが、損傷を受けた脳 (Benavides *et al.*, 1987) あるいはアルツハイマー病患者の脳 (Diorio *et al.*, 1991) における PK 11195 結合活性の上昇が報告され、さらに、PK 11195 結合部位はグリア細胞に局在している (McCarthy & Harden, 1981) ことから PK 11195 結合活性の上昇は神経膠症 (グリオーシス) の良い指標となることが示唆されている。グリオーシスは障害を受けた細胞の除去など、損傷に対する修復機構であると考えられている。 $[^3\text{H}]$ PK 11195 結合活性の変化は、海馬において、すでに2ヶ月齢で P8 系は R1 系に比較し有意に活性が高く、加齢に伴い顕著に活性上昇した。大脳皮質において、P8 系はいずれの月齢においても R1 系に比較し結合活性が高かった。さらに、R1 系においては6ヶ月齢以降結合活性は一定であったが、P8 系においては加齢に伴い結合活性が上昇し続けた。しかし、海馬と比較すると活性は低く、また、活性上昇は緩慢な変化であった。したがって、海馬では大脳皮質に比較して早期に、また、重度のグリオーシスが起きている可能性がある。phorbol 12, 13-dibutyrate (PDBu) は発癌プロモータで PKC の脂質結合部位に特異的に結合する。したがって、PDBu の結合活性は PKC 含量の指標となる。PKC は細胞質画分および細胞膜画分の両方に存在するが、その活性化には細胞膜近傍への移行が必要であると考えられている (Akers *et al.*, 1986; Kraft & Anderson, 1983)。 $[^3\text{H}]$ PDBu 結合活性は大脳皮質において細胞質画分の、海馬において膜画分および細胞質画分の PKC の減少が示唆された。以上の結果からも、海馬は大脳皮質に比べより加齢変化による障害を受けやすい可能性が推定される。老人性痴呆症の特徴の一つに、古い記憶は保持されているにもかかわらず、新規の記憶を保持できないことがあげられる。新規記憶の情報処理を行う座は海馬であり、大脳皮質は記憶保持の座と考えられている。このことから、老人性痴呆症において、加齢に伴い海馬において著しい機能低下が起きていること、また、大脳皮質は比較的機能を保っていることが推測される。今回の実験結果より、海馬 ACh 神経系において、1) 加齢の影響を受けやすく早期に機能低下を示すこと、2) 加齢による機能低下に対して代償的機能が働かないこと、一方、大脳皮質 ACh 神経系において、1) 大脳皮質は比較的加齢の影響を受けにくいこと、2) 加齢による機能低下に対して代償機能が働くこと、など老人性痴呆症の特徴を神経化学的な視点より支持する知見を得ることができた。

第IV章

総括

【1】 mACh-R サブタイプ選択的アンタゴニストを用いた薬理的／神経化学的検討により以下の知見を得た。

(1) M1 受容体刺激は PI 代謝活性を上昇した。

この活性調節には PTX 非感受性 G 蛋白質が関与する。

(2) M2 受容体は forskolin による cAMP 蓄積上昇を阻害した。

この阻害活性は PTX 感受性だったことより、Gi/Go を介していることが示された。

【2】 mACh-R サブタイプ選択的アンタゴニストおよび細胞内 Ca^{2+} 動員阻害薬である dantrolene を用いた行動薬理的検討により以下の知見を得た。

(1) mACh-R 応答機能は学習／短期記憶において一部役割を担っている。

(2) 短期記憶から長期記憶への移行期、あるいは長期記憶形成のごく初期段階において、M1 受容体応答機能が関与する。

(3) 記憶想起過程において、mACh-R 応答機能は関与しない。

(4) 学習／短期記憶形成過程において、細胞内 Ca^{2+} 動員が一部役割を担っている。

(5) 長期記憶形成過程において細胞内 Ca^{2+} 動員が関与する。

(6) 作業記憶／参照記憶において細胞内 Ca^{2+} 動員が関与する。

【3】 老齢ラットを用いた神経化学的検討より以下の知見を得た。

(1) 大脳皮質および海馬において、M1 受容体数が減少した。

(2) 大脳皮質および海馬において、M1 受容体を介した PI 代謝活性は老齢期に低下した。老齢期における学習／記憶障害の原因である可能性が示唆された。

(3) 大脳皮質において、 IP_3 結合部位が増加し、高 pH における IP_3 結合の親和性が低下した。

【4】 SAM 大脳皮質切片標本において、9ヶ月齢 P8 系の CCh 刺激による PI 代謝活性は同月齢の R1 系に比較し有意に高かった。この活性亢進は 13ヶ月齢において

低下した。SAM 大脳皮質において、ACh 神経系は機能低下に対して代償的機能が作用することを示唆していると推定される。

以上より、学習／記憶に mACh-R のサブタイプの脳内 M1 受容体応答機能あるいは細胞内 Ca^{2+} 動員が重要であることを個体レベルにおいて示すことができた。また、老人性痴呆症あるいはアルツハイマー型痴呆症における病理学的所見と類似する幾つかの知見を得ることができた。つまり、1) 脳内 ACh 神経系が加齢に伴い機能低下すること、2) 大脳皮質 ACh 神経系は老齢期でも比較的機能を維持できているが、海馬 ACh 神経系はより早期に機能低下する可能性があることである。この代償的機能発現の機構の解明は、痴呆症の薬物治療の検討、および脳高次機能の解明につながる可能性を秘めている点で重要な知見であると思われる。

また、中枢神経系の老化に関する実験モデル動物としての SAMP8 系の有用性を示すことができた。

分子生物学の発展を始め脳神経機能に関する研究基盤が整いつつある現在、より多角的な個体レベルでの機能解明の進展が期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻いただいた北海道大学薬学部薬効学講座教授 野村靖幸博士に謹んで感謝の意を表します。また、ご助言、御激励くださいました徳光幸子助教授はじめ諸職員のみなさまに深く感謝いたします。また、本論文を審査してくださいました北海道大学薬学部薬剤学講座教授 栗原堅三博士、同講座助教授 三宅教尚博士に心から感謝いたします。

老化促進モデルマウス SAM を御提供くださった京都大学胸部疾患研究所病理学部門教授 竹田俊男博士に深く感謝いたします。

1996 厳冬

大貫敏男

参考文献

- Abeliovich, A., Paylor, R., Chen, C., Kim, J.J., Wehner, J.M. & Tonegawa, S. (1993-a)
Cell **75**, 1263-1271
- Abeliovich, A., Chen, C., Goda, Y., Silva, A.J., Stevens, C.F. & Tonegawa, S. (1993-b)
Cell **75**, 1253-1262
- Akers, R.F., Loviger, D.M., Colley, P.A., Linden, K.J. & Routenberg, A. (1986) *Science*
231, 587-589
- Arai, A. & Lynch, G. (1992) *Brain Res.* **598**, 173-184
- Bach, M.E., Hawkins, R.D., Osman, M., Kandel, E.R. & Nayford, M. (1995) *Cell* **81**,
905-915
- Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B. & Lippa, A.S. (1982) *Science* **217**, 408-417
- Bear, M.F. & Singer, W. (1986) *Nature* **320**, 172-176
- Benavides, J., Fage, D., Carter, C. & Scatton, B. (1984) *Brain Res.* **421**, 167-172
- Benavides, J., Guilloux, F., Rufat, P., Uzan, A., Renault, C., Dubroeuq, M.C.,
Gueremy, C. & Le-Fur, G. (1984) *Eur. J. Pharmacol.* **99**, 1-7
- Berridge, M.J., Dawson, R.M.C., Downes, C.P., Heslop, J.P. & Irvine, R.F. (1983)
Biochem. J. **212**, 473-482
- Berridge, M.J., Downes, C.P. & Hanley, M.R. (1982) *Biochem. J.* **206**, 587-595
- Berridge, M.J., Heslop, J.P., Irvine, R.F. & Brown, K.D. (1984) *Biochem. J.* **222**,
195-201
- Berridge, M.J. & Irvine, R.F. (1984) *Nature* **312**, 315-321
- Betty, W.W. & Shavalia, D.A. (1980) *Behav. Neural. Biol.* **28**, 454-462
- Bland, B.H. (1986) *Prog. Neurobiol.* **26**, 1-54
- Billird, W., Binch, H.-III, Crosby, G. & McQuade, R.D. (1995) *J. Pharmacol. Exp. Thera.*
273, 273-279
- Bliss, T.V.P. & Lømo, T. (1973) *J. Physiol.* **232**, 331-356
- Bonner, T.I., Buckley, N.J., Young, A.C. & Brann, M.R. (1987) *Science* **237**, 527-532
- Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schultz, G. & Silva, A.J.
(1994) *Cell* **79**, 59-68
- Brass, L.F. & Joseph, S.K. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 15172-15179
- Brisson, A. & Unwin, P.N. (1985) *Nature* **315**, 474-477

- Brown, K.D., Blay, J., Irvine, R.F., Heslop, J.P. & Berridge, M.J. (1984) *Biopys. Biochem. Res. Commun.* **123**, 377-384
- Camps, M., Carozzi, A., Schnabel, P., Scheer, A., Parker, P.J. & Giaersshik, P. (1992) *Nature* **360**, 684-686
- Caulfield, M.P. (1993) *Pharmacol. Ther.* **58**, 319-379
- Chapman, P.F., Frenguelli, B.G., Smith, A., Chen C.M. & Silva, A.J. (1995) *Neurone* **14**, 593-597
- Davis, P. & Maloney, A.J.F. (1977) *Lancet* **2**, 1403
- Diorio, D., Welner, S.A., Butterworth, R.F., Meaney, M.J. & Suranyi-Cadotte, B.E. (1991) *Neurobiol. Aging* **12**, 255-258
- Divac, I. (1975) *Brain Res.* **93**, 385-398
- Doods, H.N., Mathy M.J., Davidesko, D., van Charldorp, K.J., de Jonge, A. & van Zwieten P.A. (1987) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **242**, 257-262
- Drachman, D.A. (1977) *Neurology* **27**, 783-790
- Felder, C.C. (1995) *FASEB J.* **9**, 619-625
- Flicker, C., Dean, R.L., Warkins, D.L., Fisher, S.K. & Bartus, R.T. (1983) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **18**, 973-981
- Fruichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N. & Mikoshiba, K. (1989) *Nature* **342**, 32-38
- Fukuda, K., Kubo, T., Akiba, I., Maeda, A., Mishina, M. & Numa, S. (1987) *Nature* **327**, 623-625
- Fukunaga, K., Muller, D. & Miyamoto, E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 6119-6124
- Gage, F.H., Björklund, A., Stenevi, U. & Dunnet, S.B. (1983) *Brain Res.* **268**, 39-47
- Giachetti, A., Micheletti, R. & Montagna, E. (1986) *Life Sci.* **38**, 1663-1672
- Grant, S.G.N., O'Dell, T.J., Karl, K.A., Stein, P.L., Soriano, P. & Kandel, E.R. (1992) *Science* **258**, 1903-1910
- Gruber, R.P., Stone, G.C. & Reed, D.K. (1967) *Neuropharmacology* **6**, 266-271
- Haley, T.J. & McComick, W.G. (1957) *Br. J. Pharmacol.* **12**, 12
- Hammer, R., Berrie, C.P., Birdsall, N.J.M., Burgen, A.S.V. & Hulme, E.C. (1980) *Nature* **283**, 90-92
- Helper, F.J., Olton, D.S., Wenk, G.L. & Coyle, J.T. (1985) *J. Neurosci.* **5**, 866-873
- Homma, Y., Imaki, J., Nakanishi, O. & Takenawa, T. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**,

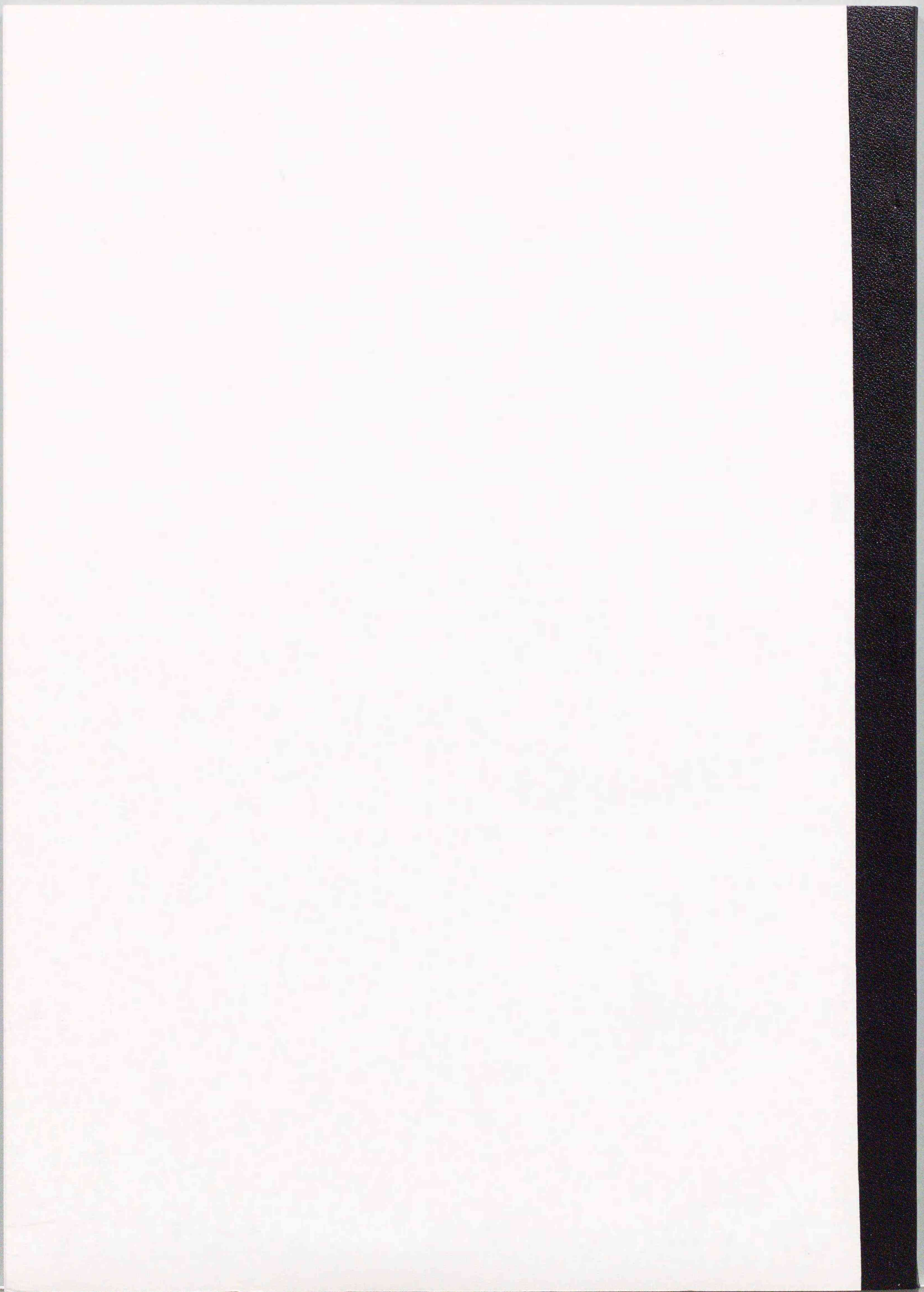
6592-6598

- Honig, W.K. (1978) Studies of working memory in the pigeon. *in* Cognitive aspects of animal behavior, Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, N.J.
- Iiri, T., Honma, Y., Ohoka, Y., Robishaw, J.D., Katada, T. & Bourne, H.R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 5901-5908
- Iiri, T., Ohoka, Y., Ui, M. & Katada, T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 1020-1026
- Ishikawa, K., Kunimatsu, H. & Saito, S. (1977) *Proc. west. Pharmacol. Soc.* **20**, 185-190
- Jacobson, M.D., Wusteman, M. & Downes, C.P. (1985) *J. Neurochem.* **44**, 465-472
- Jaffe, K. & Blanco, M.E. (1994) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **47**, 493-496
- Johnston, M. V., McKinney, M. & Coyle, J.T. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 5392-5396
- Johnston, M. V., McKinney, M. & Coyle, J.T. (1981) *Exp. Brain Res.* **43**, 159-172
- Jope, R.S., Song, L., Li, X. & Powers, R. (1994) *Neurobiol. Aging* **15**, 221-226
- Katada, T., Oinuma, M. & Ui, M. (1987) *FEBS Lett.* **213**, 353-358
- Katan, M. & Parker, P.J. (1987) *Eur. J. Biochem.* **168**, 413-418
- Kennedy, C.R., Proulx, P.R. & Hebert R.L. (1995) *Biochem. Biophys. Acta* **1258**, 206-214
- Kitajima, I., Yamamoto, T., Ohno, M. & Ueki, S. (1992) *Japan. J. Pharmacol.* **58**, 175-183
- Kitamura, Y. & Nomura, Y. (1986) *Japan. J. Pharmacol.* **42**, 321-324
- Kitamura, Y., Zhao, A.-H., Ohnuki, T. & Nomura, Y. (1989) *Neurosci. Lett.* **106**, 334-338
- Kraft, A.S. & Anderson, W.B. (1983) *Nature* **301**, 621-623
- Kubo, T., Fukuda, K., Mikami, A., Maeda, A., Takahashi, H., Mishina, M., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Kangawa, K., Kojima, M., Matuo, H., Hirose, T. & Numa, S. (1986-a) *Nature* **323**, 411-416
- Kubo, T., Maeda, A., Sugimoto, K., Akiba, I., Mikami, A., Takahashi, H., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Kangawa, K., Matuo, H., Hirose, T. & Numa, S. (1986-b) *FEBS Lett.* **209**, 367-372
- Kurachi, Y., Nakajima, T. & Sugimoto, T. (1986) *Am. J. Physiol.* **251**, H681-H684
- Lee, C.H., Park, D., Wu, D., Rhee, S.G. & Simon M.I. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16044-16047
- Lei, S.Z., Zhang, D., Abele, A.E. & Lipton, S.A. (1992) *Brain Res.* **598**, 196-202

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Macara, I.G. (1985) *Am. J. Physiol.* **248**, C3-C11
- Macphee, C.H., Drummond, A.H., Otto, A.M. & Jimenez de Asua, L. (1984) *J. Cell. Physiol.* **119**, 35-40
- Mayford, M., Wang, J., Kandel, E.R. & O'Dell, T.J. (1995) *Cell* **81**, 891-904
- McCarthy, K.D. & Harden, T.K. (1981) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **216**, 183-191
- Milner, B., Corkin, R. & Teuber, H.L. (1968) *Neuropsychologica* **6**, 215-234
- Miyamoto, M., Kiyota, Y., Yamazaki, N., Nagaoka, A., Matuo, T., nagawa, Y. & Takeda, T. (1986) *Physiol. Behav.* **38**, 399-406
- Miyamoto, M., Shintani, M., Nagaoka, A. & Nagawa, Y. (1985) *Brain Res.* **328**, 97-104
- Nomura, Y., Yamanaka, Y., Kitamura, Y., Arima, T., Ohnuki, T., Oomura, Y., Sasaki, K., Nagashima, K. & Ihara, Y. (in press) *Annal. New York Acad. Sci.*
- Nomura, Y., Kitamura, Y., Ohnuki, T., Arima, T., Yamanaka, Y., Sasaki, K. Oomura, Y. (in press) *Behav. Brain Res.*
- Mouton, P.R., Meyer, E.M., Dunn, A.J., Millard, W. & Arendash, G.W. (1988) *Brain Res.* **444**, 104-118
- Murayama, T. & Ui, M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 7226-7233
- Murtha, S.J. & Pappas, B.A. (1994) *Brain Res.* **651**, 16-26
- Nagy, K., Simon, P. & Zs.-Nagy, I. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 688-694
- Nakamura, F., Kato, M., Kameyama, K., Nukada, T., Haga, T., Kato, H., Takenawa, T. & Kikkawa, T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 6246-6253
- Ohnuki, T. & Nomura, Y. (1991) *Japan. J. Pharmacol.* **57**, 483-493
- Ohta, T., Ito, S. & Ohga, A. (1990) *Eur. J. Pharmacol.* **13**, 11-19
- Oinuma, M., Katada, T. & Ui, M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 8347-8353
- O'Keefe, J. & Dostrovsky, J. (1971) *Brain Res.* **34**, 171-175
- O'Keefe, J., Nadel, L., Keightley, S. & Kill, D. (1975) *Exp. Neurol.* **48**, 152-166
- Olton, D.S., Walker, J.A. & Gadge, F.H. (1978) *Brain Res.* **139**, 295-
- Ouyang, Y., Deerinck, T.J., Walton, P.D., Airey, J.A., Sutko, J.A. & Ellisman, M.H. (1993) *Brain Res.* **620**, 269-280
- Pasinelli, P., Ramakers, G.M., Urban, I.J., Hens, J.J., Oestreicher, A.B., de Graan, P.M.

- & Gispen, W.H. (1995) *Behav. Brain Res.* **66**, 53-59
- Peralta, E.G., Winslow, J.W., Ashkenazi, A. Smith, D.H., Ramachandran, J. & Capon, D.J. (1988) *Trends Pharm. Sci. Supp.* 6-11
- Pettit, D.L., Perlman, S. & Malinow, R. (1995) *Science* **266**, 1881-1885
- Pfaffinger, P.J., Martin, J.M., Hunter, D.D., Nathanson, N.M. & Hille, B. (1985) *Nature* **317**, 536-538
- Rossor, M.N., Svendsen, C., Hunt, S.P., Mountjoy, C.Q., Roth, M. & Iversen, L.L. (1982) *Neurosci. Lett.* **28**, 217-222
- Ryu, S.H., Cho, K.S., Lee, K.Y., Suh, P.G. & Rhee, S.G. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 137-144
- Ryu, S.H., Cho, K.S., Lee, K.Y., Suh, P.G. & Rhee, S.G. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12511-12518
- Saito, K., Ohnuki, T., Nomura, Y., Kato, K., Uruno, K., Fujii, S., Kato, H. & Totuka, S. (1992) *Yamagata Med. J.* **10**, 117-131
- Saper, C.B. (1984) *J. Comp. Neurol.* **222**, 313-342.
- Sawaki, K., Baum, B.J., Roth, G.S. & Ambudkar, I.S. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **322**, 319-326
- Seiden, L.S. & Dykstra, L.A. (1977) *Psychopharmacology in A Biochemical and Behavioral Approach.* Van Nortrand Rheinhold Co., New York
- Siffert, W & Akkerman, J.W. (1987) *Nature* **325**, 456-458
- Silva, A.J., Paylor, R., Wehner, J.M. & Tonegawa, S. (1992-a) *Science* **257**, 206-211
- Silvia, A.J., Stevens, C.F., Tonegawa, D. & Wang, Y. (1992-b) *Science* **257**, 201-206
- Sitaram, N., Weingartner, H. & Gillin, J.C. (1978) *Science* **201**, 274-276
- Sofroniew, M.V., Eckenstein, F., Thoenen, H. & Cuello, A.C. (1982) *Neurosci. Lett.* **33**, 7-12
- Takai, Y., Kikkawa, U., Kaibuchi, K. & Nishizuka, Y. (1984) *Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **18**, 119-158
- Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M. & Yamamoto, T. (1981) *Mech. Aging. Dev.* **17**, 183-194
- Thakur, M.K. (1983) *Archiv. Gerontol. Geriat.* **2**, 1-10
- Tonkiss, J. & Rawlins, J.N. (1991) *Exp. Brain Res.* **85**, 349-358

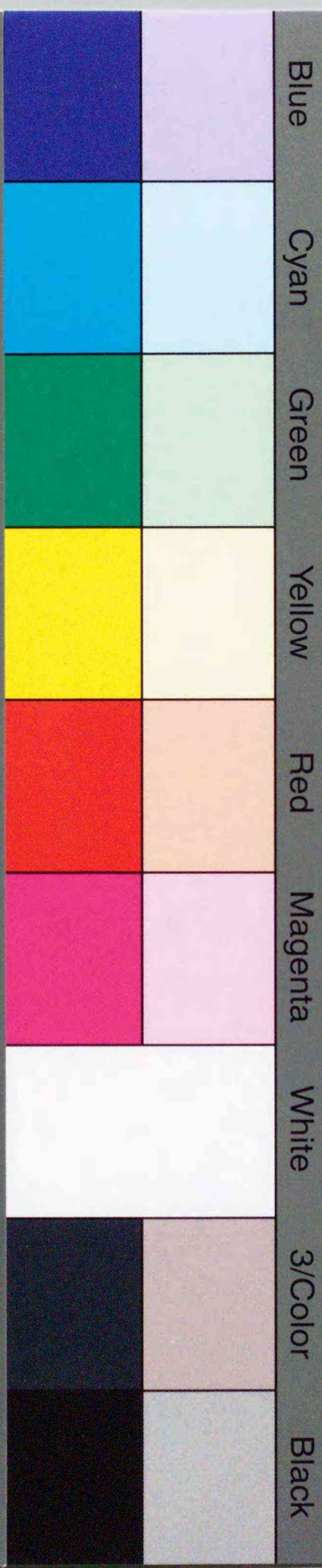
- Tsuda, Y., Kaibuchi, K., Kawahara, Y., Fukuda, H. & Takai, Y. (1985) *FEBS Lett.* **191**, 205-210
- Ui, M. (1984) *Trends Pharmacol. Sci.* **5**, 277-279
- Walsh, T.J., Chrobak, J.J., Tilson, H.A., Dehaven, D.L. & Hanin, I. (1985) *Annal. New York Acad. Sci.* **444**, 538-540
- Wenk, H., Bigl, V. & Meyer, U. (1980) *Brain Res. Rev.* **2**, 295-316
- Whishaw, I.Q., O'Connor, W.T. & Dunnet, S.B. (1985) *Behav. Brain Res.* **17**, 103-115
- Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T. & Delon M.R. (1982) *Science* **215**, 1237-1239
- Winson, J. (1978) *Science* **201**, 160-162
- Worley, P.F., Baraban, J.M., Supattapone, S., Wilson, V.S. & Snyder, S.H. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12132-12136
- Yagi, H., Katoh, S., Akiguchi, I. & Takeda, T. (1988) *Brain Res.* **471**, 86-93
- Yamamoto, C. (1972) *Exp. Brain Res.* **14**, 423-435
- Yamauchi, T. & Fujisawa, H. (1989) *FEBS Lett.* **116**, 141-144
- Zhang, L., Andou, Y., Masuda, S., Mitani, A. & Kataoka, K. (1993) *Neurosci. Lett.* **158**, 105-108



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

