

βアミロイドタンパク脳室内持続注入ラットにおける空間迷路課題とコリン作動性神経系の変化に対する核医学的基礎研究

金沢大学医学部医学科核医学講座 (主任: 利波紀久教授)

池 田 英 二

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) は進行性の痴呆を来し、医学的のみならず、緊急の対応を迫られる社会的問題ともなっている。ADの病理学的特徴は大脳皮質や皮質下に認められる老人斑や神経原線維変化といった異常蓄積構造物と、広範な神経細胞の脱落である。老人斑は神経原線維変化に先行して出現し、神経化学的にはアミロイドβ蛋白 (β-amyloid protein, Aβ) の細胞外における異常蓄積である。また、コリン作動性神経は学習、記憶といった脳の高次機能に関与していると言われていたが、AD患者においてコリン作動性神経が減少することが知られている。本研究では、学習障害モデルの1つとされるAβ脳室内持続注入ラットに対して空間学習記憶能力の評価を8方向放射状迷路を用いて行い、同時に、アセチルコリン (acetylcholine, ACh) 系の機能変化についてイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィによる評価を行った。Aβ脳室内持続注入ラットは、ラット側脳室内に14日間Aβを持続的に注入することにより作製した。³H-キヌクリジニルベンジレート (³H]quinuclidinyl benzilate) によるムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (muscarinic acetylcholine receptor, mAChR) 分布と、³H-ベサミコール (³H]vesamicol) によるシナプス小胞アセチルコリントランスポータの画像化を行い、これらの画像から前頭葉皮質、頭頂葉皮質、側頭葉皮質および海馬における平均結合量を算出した。Aβ脳室内持続注入ラットは、迷路課題での正選択数減少を示した。mAChRについては有意な変化を認めなかったが、シナプス小胞アセチルコリントランスポータは頭頂葉皮質において有意に低下した。

以上よりAβにより惹起される記憶障害とシナプス小胞アセチルコリントランスポータの減少には関連があり、さらに、ベサミコールあるいはその類似体を¹²⁵Iなどの放射性同位体で標識し、エミッションコンピュータ断層撮影法 (emission computed tomography) を用いることにより、ADの評価が可能であることが示された。

Key words β-amyloid protein, Alzheimer's disease, spatial memory, vesamicol, autoradiography

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

ADの病理学的所見の中心は大脳皮質や皮質下に認められる老人斑や神経原線維変化といった異常蓄積構造物と、広範な神経細胞の脱落である¹⁾²⁾。老人斑は神経原線維変化に先行して出現し³⁾、神経化学的にはアミロイドβ蛋白 (β-amyloid protein, Aβ) の細胞外における異常蓄積であり⁴⁾、神経原線維変化は過剰にリン酸化されたタウ蛋白が主成分⁵⁾といわれている。また、最近では病因遺伝子探索の研究が精力的に進められており、ADは複数の遺伝子が関与する症候群として捉えられつつある^{6)~13)}。

また、ADの早期発見のために脳機能の生化学的マーカー、すなわち神経伝達物質・受容体などの変化を非侵襲的に評価できることが望まれる。特にAD剖検例において著明な変化があると報告されているアセチルコリン (acetylcholine, ACh) 系¹⁴⁾

の機能評価が重要と考えられる。

ACh再取り込み阻害薬であり小胞アセチルコリントランスポーター (vesicular ACh transporter, VACHT) に特異的に結合する³H-ベサミコール (³H]vesamicol) は、ADモデルの1つとされる前脳基底核 (nucleus basalis magnocellularis, NBM) 破壊による学習障害モデルラットにおいて減少すると報告されている¹⁵⁾が、増加するという報告もあり¹⁶⁾、一定した見解は得られていない。しかし、このモデルは先に述べたような病理学的特徴がなく、また、同一個体での記憶についての検討がほとんどされていない。しかし、ベサミコールの類似体であるイオドベンゾベサミコール (iodobenzovesamicol, IBVM) を¹²⁵I標識した¹²⁵I-IBVMを用いてAD患者を評価したところ結合が減少したという報告もある¹⁷⁾。

本研究では、ADの早期発見における核医学的評価の可能性について基礎的検討を加えるため、Aβ脳室内持続投与ラットにおいて空間記憶の変化とオートラジオグラフィ法を用いてのACh系の機能変化を同一個体で評価することを目的とした。

平成11年11月26日受付, 平成12年1月18日受理

Abbreviations: Aβ, β-amyloid protein; ACh, acetylcholine; AChE, acetylcholinesterase; AD, Alzheimer's disease; BBB, blood brain barrier; ChAT, choline acetyltransferase; IBVM, iodobenzovesamicol; IP, imaging plate; mAChR,

対象および方法

I. 空間記憶課題

8方向放射状迷路(図1)を用い、従来からの報告¹⁸⁾¹⁹⁾に基づき課題を施行した。ラットを食餌制限下におき、自由飲食時の85~75%の体重に維持した。8本の腕の先端部に餌をおき、迷路中央からスタートしたラットが8本全ての腕の先端部に到達するか、試行開始から10分経過した時点で終了とした。試行は1日につき1回とした。最初の8回の選択の内、少なくとも7個の餌をとるのを5日連続で達成した段階で課題を習得したものとした。課題習得後、モデル作成のための手術を行った。術後14日間は回復期として課題を行わず、15日後から14日間にわたって課題を行った。最初の8回選択の内、餌を取った回数を正選択数とした。また、ラットの行動はCCDカメラと行動記録装置(MAZER MZ-30, MAZER SYSTEM SOFT, 東洋産業, 富山)(図2)によって記録した。

II. モデル作成

対象は、雄性ドンリュウラット、8-12週齢、250~350g、各群8匹ずつ、計16匹(三共ラボサービス、東京)を用いた。

1. A β 脳室内持続注入群(A β 群)

従来からの報告²⁰⁾に準じて小型浸透圧ポンプAlzet 2002(Alza, Palo Alto, USA)を用いて脳室内に持続投与した。合成ヒトA β (1-42)(Research Biochemicals International, Natick, USA)を35%アセトニトリル/0.1%トリフルオロ酢酸(trifluoroacetic acid, TFT)に一日あたり300pmolの投与量となるように溶解した。ラットをエーテル麻酔後、5%抱水クロラル(1.5ml/200g体重)を腹腔内に注射し、脳定位固定装置Type SR-6(成茂, 東京)に固定した。キシロカインによる局部麻酔後、頭皮を切開し頭蓋骨を露出、歯科技工用ドリル(浦和工業, 東京)にてプレグマよりPaxinos & Watsonの図譜²¹⁾に従って右側1.5mm、後方0.8mmの部位に開窓した。開窓部よりBrain infusion kit(Alza, Palo Alto, USA)を側脳室内に挿入し、ポンプ

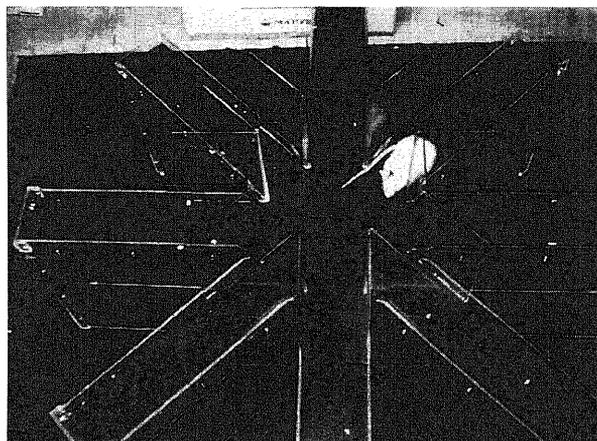


Fig. 1 The eight-arm radial maze.

本体を皮下トンネルを介して肩甲骨付近に埋め込み、頭皮を縫合した。

2. 対照群

合成ヒトA β (1-42)(Research Biochemicals International, Natick, USA)を含まない35%アセトニトリル/0.1%TFTを用いた以外は全てモデル群と同様にした。

III. 切片作成

各群のラットに対して術後4週後にエーテル麻酔後断頭し、脳を摘出した。脳を摘出後速やかにTissue Tek O.C.T. Compound(Miles, Elkhart, USA)にて包埋しヘキサソードライアイスにて急速凍結し、クリオスタットHM505E(カールツァイス, 東京)により20 μ mの切片を作製した。プレグマより約1.7mm前方(前頭葉)、約0.8mm後方(頭頂葉)、約3.8mm後方(側頭葉、海馬)の三部位にて連続切片を作製した²¹⁾。切片はゼラチン溶液(40~45 $^{\circ}$ Cの水10mlにゼラチン0.5g, クロムミョウバン5mgを混合)を塗布したスライドガラスに貼付し、オートラジオグラフィを施行するまでディープフリーザーにて凍結(-80 $^{\circ}$ C)保存した。

IV. A β 免疫染色

A β 群の切片に対してA β の沈着を確認するため、抗ヒト β アミロイドタンパクモノクローナル抗体(Sigma-Aldrich Japan, 東京)とVectastain Elite ABC Kit(Vector Laboratories, Burlingame, USA)を用いて免疫染色を行った。

V. オートラジオグラフィ

1. ムスカリン作動性アセチルコリン受容体分布

ムスカリン作動性アセチルコリン受容体(muscarinic ACh receptor, mAChR)用リガンドの³H-キヌクリジニルベンジレート([³H]quinuclidinyl benzilate, ³H-QNB)を用いて受容体オートラジオグラフィを施行した²²⁾。切片を10mM EDTAを含む50mMリン酸緩衝液(pH 7.4)中に室温にて30分間予備反応を行い、1nM ³H-QNB(1.55TBq/mmol)(NEM Life Science Products, Inc., Boston, USA), 1mM EDTA, 1mM N-エチルmaleイミド(N-ethylmaleimide)を含む50mMリン酸緩衝液(pH 7.4)中で室温3時間の結合反応を行い、4 $^{\circ}$ C 50mMリン酸緩衝液に

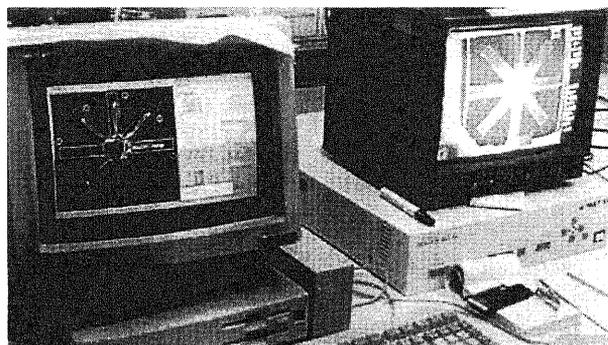


Fig. 2 The recording system for the eight-arm radial maze task.

muscarinic acetylcholine receptor; MP4A, 4-piperidyl acetate; NBM, nucleus basalis magnocellularis; PSL, photo-stimulated luminescence; PET, positron emission computed tomography; ³H-QNB, [³H]quinuclidinyl benzilate; SPECT, single photon emission computed tomography; TFT, trifluoroacetic acid; VAcHT, vesicular acetylcholine transporter

て1分間洗浄を2回行った。乾燥後 ^3H 専用イメージングプレート (imaging plate, IP) BAS-TR 2025 (富士写真フィルム, 東京) に3日間露光した。

2. VACHT分布

Altarらの方法¹⁵⁾に準じて、オートラジオグラフィを行った。120mM塩化ナトリウム, 5mM塩化カリウム, 1mM硫酸マグネシウム, 2mM塩化カルシウムを含む50mMトリス緩衝液 (pH7.6) に1 nM ^3H -ベサミコール (1.30TBq/mmol) (NEM Life Science Products, Inc., Boston, USA) を混入, 1時間の結合反応を行った。その後、同トリス緩衝液にて1分間の洗浄を3回行い, 乾燥後 ^3H 専用IPに2週間露光した。

VI. イメージ処理

それぞれ露光したIPをバイオイメージアナライザーBAS-5000 (富士写真フィルム, 東京) にて読み取った。解像度 $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$, 65536階調の高解像度のモードを使用し, 読み取り後のデータはパワーマッキントシュ8500/120 (アップルコン

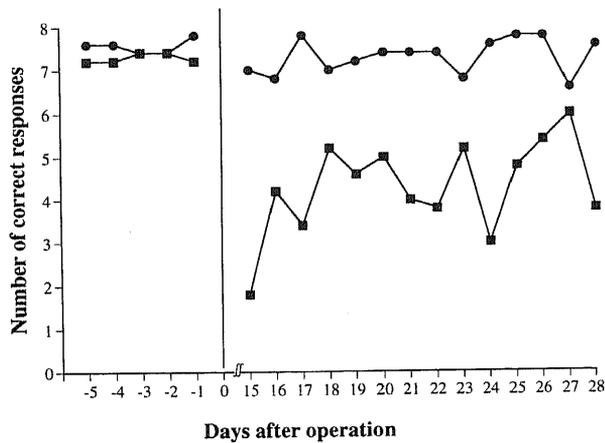


Fig. 3. Effects of β -amyloid protein on the eight-arm radial maze task. Each value represents the mean correct responses of initial eight responses. The operation day is defined as day 0. Minus day represent preoperative period. Beta-amyloid protein-infused group (■) demonstrated significantly fewer correct response than the vehicle-treated group (●) in the postoperative state ($p < 0.01$).

ピュータジャパン, 東京) に転送され, その後専用ソフト Image Reader Ver. 1.0 (富士写真フィルム, 東京) にてハードディスクに保存した。

VI. 画像解析

それぞれのオートラジオグラフィ画像について専用解析ソフト MacBAS Ver.2.3 (富士写真フィルム, 東京) にて前頭葉, 頭頂葉, 側頭葉および海馬に相当する領域に対して関心領域を設定し, 平均黒化度を保存されたデータより算出した。なお, イ

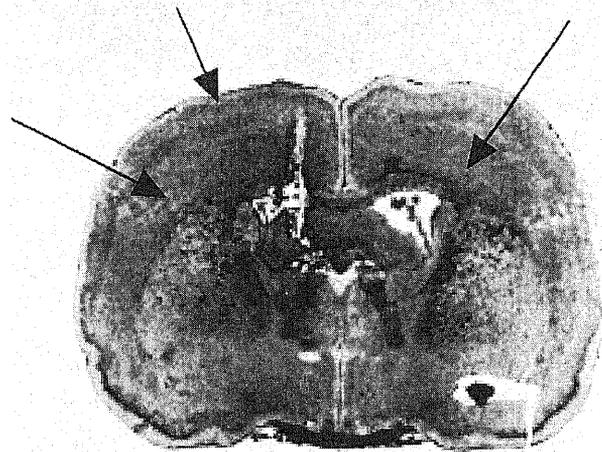


Fig. 4. The deposition of β -amyloid protein is pointed by arrows.

Table 1. Reduction of [^3H] QNB binding in neocortex and hippocampus following A β infusion

Location	[^3H] QNB binding (fmol/mg wet tissue)		
	Vehicle	β -Amyloid	% Change
Frontal cortex	401 \pm 37	373 \pm 44	-7.0
Parietal cortex	388 \pm 28	364 \pm 26	-6.2
Temporal cortex	449 \pm 42	420 \pm 39	-6.5
Hippocampus	557 \pm 67	543 \pm 41	-2.5

Values shown are $\bar{X} \pm \text{SD}$.

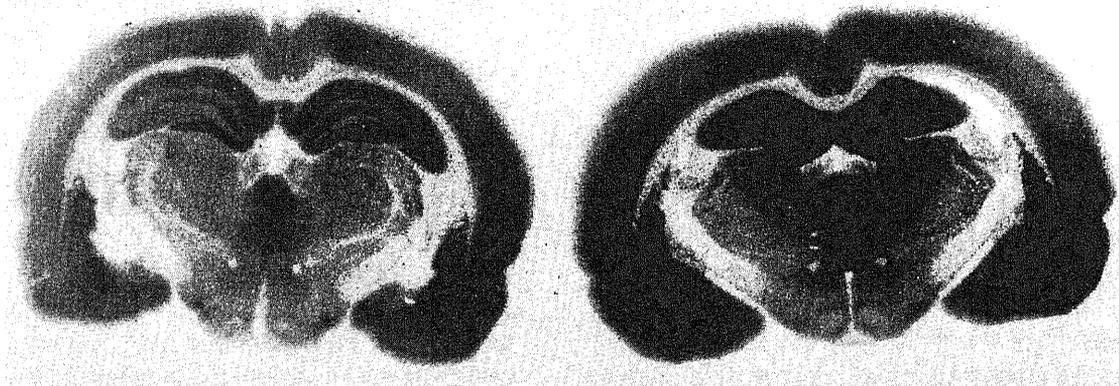


Fig. 5. Representative autoradiograms of ^3H -QNB. A β -infused rat is demonstrated in the left and the vehicle-treated rat is in the right. ^3H -QNB binding density of A β -infused rat do not differ from that of the vehicle-treated rat.

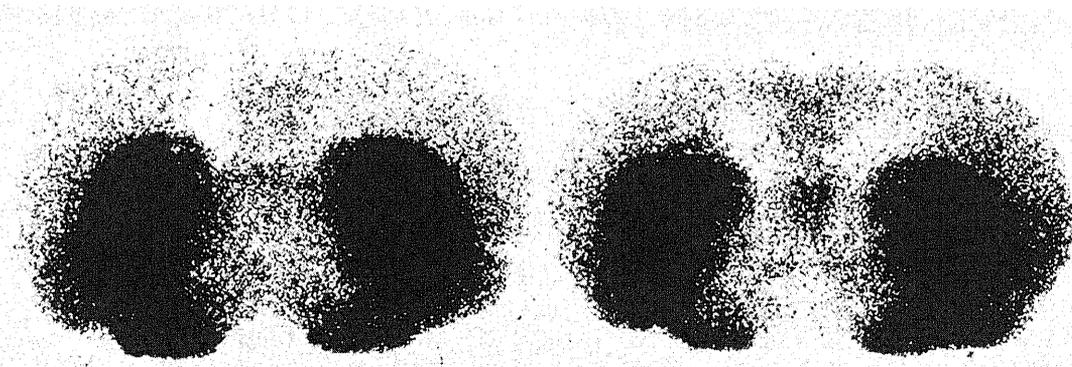


Fig. 6. Representative autoradiograms of ^3H -vesamicol. $\text{A}\beta$ -infused rat is demonstrated in the left and the vehicle-treated rat is in the right. ^3H -vesamicol binding density of $\text{A}\beta$ -infused rat's neocortex is lower than that of the vehicle-treated rat.

Table 2. Reduction of [^3H] vesamicol binding in neocortex and hippocampus following $\text{A}\beta$ infusion

Location	[^3H] vesamicol binding (fmol/mg wet tissue)		% Change
	Vehicle	β -Amyloid	
Frontal cortex	19.1 \pm 1.6	15.2 \pm 1.4	-20
Parietal cortex	18.8 \pm 2.4	12.8 \pm 3.1*	-32
Temporal cortex	15.9 \pm 2.9	12.6 \pm 3.3	-21
Hippocampus	19.6 \pm 3.0	17.0 \pm 4.6	-13

* $p < 0.01$ vs. vehicle. Values shown are $\bar{X} \pm \text{SD}$.

イメージアナライザーでは放射能に比例して蛍光 (photo-stimulated luminescence, PSL) を生成し、黒化度、すなわち蛍光強度は PSL 値 (PSL/mm²) として表示される。また各 IP には標準線源 (Amersham Co., Buckinghamshire, UK) も同時に露光させておき、IP 毎に PSL 放射能の標準曲線を作成して各関心領域の平均放射能に変換した。こうして求めた放射能と放射性リガンドの比放射能からリガンドの結合量を算出した。

VII. 統計処理

迷路課題の正選択数の比較には反復測定分散分析を用い、結合量の平均値の差の比較には対応のない Student の t 検定を用いた。有意水準は 1% とした。

成 績

I. 空間記憶課題

術後、 $\text{A}\beta$ 群において正選択数が有意に減少した (図 3)。術後、14 日間の正選択数の平均は、対照群で 7.3、 $\text{A}\beta$ 群で 4.3 であった。

II. アミロイド免疫染色

脳室周囲から皮質にかけて、従来からの報告²⁰と同様、 $\text{A}\beta$ の沈着を認めた (図 4)。

III. mAChR 分布

画像上視覚的に有意差を認めなかった。数値上も $\text{A}\beta$ 群は対照群に比べて総じて軽度の低下を示したものの、有意な変化は認められなかった (表 1)。代表的な画像を図 5 に示した。

IV. VACHT 分布

$\text{A}\beta$ 群の皮質では対照群に比べて全体に低下傾向を示し、特に、頭頂葉では有意に減少した。海馬の低下は皮質よりも軽度であった (表 2)。代表的な画像を図 6 に示した。

考 察

現在、真の AD モデルはまだ開発されていないといってもよい。しかし、記憶学習障害を示し、AD の病態の一部を反映しているモデル動物として、イボテン酸やカイニン酸で霊長類のマイネルト核に相当する NBM を破壊したラット²³⁾²⁴⁾、クエン酸アルミニウムの慢性経口投与²⁵⁾、3-ブロモピルベート (3-bromopyruvate) を脳室に投与したラット²⁶⁾、神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) レセプタのモノクローナル抗体である 192-サボリンを脳室に投与したラット²⁷⁾、ヒトのアセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase, AChE) を発現するトランスジェニックマウス²⁸⁾、ヒトのアミロイド前駆体蛋白質 (amyloid precursor protein) を過剰に発現するトランスジェニックマウス²⁹⁾ などが報告されている。今回の実験においては AD モデルの 1 つとされている $\text{A}\beta$ 脳室内持続注入ラットを用いたが、このモデルは細胞外に $\text{A}\beta$ 蓄積が見られ、記憶障害を示し、かつ、神経生化学的にもコリンアセチルトランスフェラーゼ (choline acetyltransferase, ChAT) 活性低下を示す²⁰⁾。また、ニコチン刺激による ACh 放出が減少している³⁰⁾。

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

NBM 破壊ラットにおいてベサミコールの皮質への結合が減少すると報告されているが、異論もあり、定見は未だ得られていない¹⁵⁾¹⁶⁾。また、同一個体に対して記憶学習能力を評価したものはほとんど見られない。さらに、NBM 破壊ラットは AD の大きな神経病理組織学的特徴である細胞外の $\text{A}\beta$ 集積を反映していない。今回の実験では $\text{A}\beta$ によって記憶能力と mAChR、VACHT がどのように変化するかを、8 方向放射状迷路、QNB、ベサミコールおよびオートラジオグラフィ法を用いて同一個体で直接的に評価した。

今回の結果では、空間迷路課題では、術後、 $\text{A}\beta$ 群において、

正選択数が有意に減少しており、A β は記憶能力を障害する事が示された。また、QNBの結合はアミロイド群は対照群に比べ有意な変化は認められず、A β によってmAChRは障害されないが、ベサミコールはA β 群頭頂葉で有意な結合の減少がみられ、A β によってVACHTは障害されることが示唆された。

空間記憶には海馬が特に作業記憶に関して重要な働きを担っている³⁰⁾。しかし、その詳細については未だに議論されている。また、頭頂葉は記憶の貯蔵、利用に関係しているとの報告³²⁾があり、どちらかという参照記憶に影響すると思われる。今回の空間迷路課題では作業記憶と参照記憶を明確に区別しておらず、結果からどちらが障害されたかを言うのは困難である。しかし、海馬における結合はQNB、ベサミコールともに低下が見られなかったが、頭頂葉でベサミコールの結合が減少していたことと、先の報告を併せて考えると、参照記憶がより強く障害され、その結果正選択数が減少したと思われる。

また、ベサミコールの結合の減少はQNBに比べ、あらゆる部位で大きかったが、これはmAChRの方がVACHTよりも代償作用が強い、あるいは、シナプス前ニューロンの方がシナプス後ニューロンよりもA β によって障害され易いことによると考えられる。

今回の実験においては、イメージアナライザーとイメージングプレートを用いたオートラジオグラフィによる評価を行った。この方法は、これまでのX線フィルムによる方法と比べて感度が高い³³⁾。また、放射濃度とPSLとの直線性に優れている³⁴⁾ため定量性が良い。さらに、脳局所ごとの解析が可能であり、元々デジタルデータであるため数値化して扱える。この点で臨床で用いられている単光子エミッションコンピュータ断層撮像法 (single photon emission computed tomography, SPECT) およびポジトロンエミッション断層撮像法 (positron emission computed tomography, PET) との類似性がある。

現在、中枢神経系の画像診断としては形態的評価および局所脳血流の評価が主体であるが、今後、痴呆、変性疾患などをふまえた高次脳機能の評価の必要性が重要となると考えられる。現在、臨床における脳血流SPECTでは、ある程度進行したADにおいて頭頂側頭葉の血流低下が知られている³⁵⁾。しかし、ADにおける血流の低下は神経細胞脱落による血液需要の低下に伴い生じる二次的な変化を見ているに過ぎない。

シナプスの情報伝達は、前シナプスにおける神経伝達物質の合成、分解、貯蔵、放出、再取り込み、後シナプスにおけるレセプタへの結合などの過程により巧みに制御され、これによって高次機能をはじめとする脳の諸機能が発現される。脳機能診断としては、神経伝達物質代謝、酵素活性、トランスポータ、レセプタ、セカンドメッセンジャーのイメージングだけでなく、核医学的方法による定量的診断すなわち種々の解析モデルに基づく動態解析の可能性も考えられる。コリンとADとの関連性は、Popeら¹⁴⁾による死後脳の生化学的分析の報告ではじめてなされ、特に大脳皮質、海馬でのChAT、AChEの著明な減少が示されている。したがって、ChATあるいはAChEの画像化が可能になれば最も優れた診断法となる。一般的に酵素活性を核医学的手法により画像化するためには酵素と反応する基質を放射性核種で高率に標識合成でき、かつ自由に脳血液関門 (blood brain barrier, BBB) を通過し反応後の生成物が脳内に留まる性質を有しなければならない。しかし、ChATに関しては自由にBBBを通過するような基質がないため、標識合成は困

難と考えられる。AChEに関しては、Irieら³⁶⁾はAChの人工類似体である4ピペリジルアセテート (4-piperidyl acetate, MP4A) のN-メチルの炭素を¹⁴Cで標識した¹⁴C-MP4Aを合成し、ポジトロン核種である¹¹Cで標識すればPETに応用できると報告しているが、血中で非常に不安定であり定量的評価に関しては問題がある。神経伝達物質代謝用薬剤はLドーパのようにBBBを通過する前駆物質がないため合成が困難であり、核医学的なACh代謝に関する報告はみあたらない。一方、シナプス小胞のAChトランスポータに特異的に結合するベサミコールはA β 持続注入モデルラットで減少し、かつBBBを自由に通過できる。また¹²⁵Iで標識したIBVMはラット経静脈投与にても同様の分布を示すことが報告されている³⁷⁾³⁸⁾。今回の実験結果と¹²⁵I-IBVMの分布の報告は、¹²³I-IBVM SPECTによる痴呆患者の評価において、痴呆の重症度と皮質の¹²³I-IBVMの結合に負の相関が見られたという報告¹⁷⁾を支持するものである。これらより、ベサミコールおよびその類似体はヒトにおけるADの病態解明、進行度の評価においても有用であると考えられる。また近い将来治療法が確立された場合、ベサミコールおよびその類似体はADの治療効果の評価にも有力なりガンドと考えられる。

結 論

ADモデルの一つとされる β アミロイドタンパク脳室内持続注入ラットにおいて、八方向放射状迷路課題を用いた空間記憶能力を評価し、加えて³H-QNBによるmAChR分布、³H-ベサミコールによるVACHT分布も評価し以下の知見を得た。

1. A β をラット脳室内に持続注入することによって空間記憶の保持能力は低下した。
2. QNBによるAChRの分布は、A β 群と、対照群の間に有意差を認めなかった。
3. VACHTのリガンドである³H-ベサミコールの結合はA β 群で頭頂葉皮質において有意に低下した ($p < 0.01$)。

以上の知見より、記憶能力の低下は頭頂葉のベサミコール結合低下と関連していると考えられ、ベサミコールはADの診断、病勢評価に対して有力なりガンドといえる。よって、臨床応用を考えると、ベサミコールの類似体である¹²³I-IBVMを用いたSPECTはADの診断、評価に期待できる方法である。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました利波紀久教授に謹んで謝意を表します。また、本研究の遂行に多大な御協力を賜りました金沢大学核医学講座および金沢大学アイソトープ総合センターの皆様へ深謝いたします。

なお、本論文の一部は第38回日本核医学会総会 (1998年高松)、第39回日本核医学会総会 (1999年秋田) にて発表を行った。

文 献

- 1) Dayan AD. Quantitative histological studies on the aged human brain. II. Senile plaques and neurofibrillary tangles in senile dementia (with an appendix on their occurrence in cases of carcinoma). *Acta Neuropath (Berl)* 16: 95-102, 1970
- 2) Davies CA, Mann DMA, Sumpter PQ, Yates PO. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78: 151-164, 1987

- 3) Wisniewski KE, Wisniewski HM, Wen GY. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol* 17: 278-282, 1985
- 4) Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell surface receptor. *Nature* 324: 733-736, 1987
- 5) Kondo J, Honda T, Mori H, Hamada Y, Miura R, Ogawara M, Ihara Y. The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1: 827-834, 1988
- 6) George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinski RJ, Haines JL, Nee L, Watkins PC, Myers RH, Feldman RG, Pollen D, Drachman D, Growdon J, Bruni A, Foncin JE, Salmon D, Frommelt P, Amaducci L, Sorbi S, Placentini S, Stewart GD, Hobbs WJ, Conneally PM, Gusella JF. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science* 235: 885-890, 1987
- 7) Goate AM, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704-706, 1991
- 8) Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, Potter H, Heston LL, Mortin GM. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science* 258: 668-671, 1992
- 9) Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261: 921-923, 1993
- 10) Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance MA, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein E: High-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1977-1981, 1993
- 11) Levy-Lahad E, Wasco W, Pookaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, Crowley AC, Fu YH, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269: 973-977, 1995
- 12) Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, Mar L, Sorbi S, Nacmias B, Placentini S, Amaducci L, Chumakov I, Cohen D, Lannfelt L, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376: 775-778, 1995
- 13) Sherrington R, Rogaeva EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-760, 1995
- 14) Pope A, Hess HH, Lewin E. Microchemical pathology of the cerebral cortex in presenile dementias. *Trans Am Neurol Assoc* 89: 15-16, 1964
- 15) Altar CA, Marien MR. [3 H] Vesamicol binding in brain: autoradiographic distribution, pharmacology, and effects of cholinergic lesions. *Synapse* 2: 486-493, 1988
- 16) Wenk GL, Mobley SL. Choline acetyltransferase activity and vesamicol binding in Rett syndrome and in rats with nucleus basalis lesions. *Neuroscience* 73: 79-84, 1996
- 17) Kuhl DE, Minoshima S, Fessler JA, Frey KA, Foster NL, Ficaro EP, Wieland DM, Koeppe RA. In vivo mapping of cholinergic terminals in normal aging, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 40: 399-410, 1996
- 18) Olton DS, Samuelson RJ. Remembrance of places passed: Spatial Memory in Rats. *J exp Psychol: Anim Behav Proc* 2: 97-116, 1976
- 19) Masuda Y, Iwasaki T. Effects of caudate lesions on radial arm maze behavior in rats. *Jpn Psychol Res* 26: 42-49, 1984
- 20) Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, Nabeshima T. β -Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett* 170: 63-66, 1994
- 21) Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed, Academic Press Inc, San Diego, 1986
- 22) Mash DC, Potter LT. Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. *Neuroscience* 19: 551-564, 1986
- 23) Unger JW, Schmidt Y. Galanin-immunoreactivity in the nucleus basalis of Meynert in the rat: age-related changes and differential response to lesion-induced cholinergic cell loss. *Neurosci Lett* 153: 140-143, 1993
- 24) Wallace W, Brane D, Hsu N, Khowong N, Merrill CR, Haroutunian V. Characterization of gene expression in the cerebral cortices of rat brains containing subcortical lesions. *Appl Theor Electrophor* 4: 33-38, 1994
- 25) Florence AL, Gauthier A, Ponsar C, Aguilar P, Crichton RR. An experimental animal model of aluminium overload. *Neurodegeneration* 3: 315-323, 1994
- 26) Froelich L, Ding A, Hoyer S. Holeboard maze-learning deficits and brain monoaminergic neurotransmitter concentrations in rats after intracerebroventricular injection of 3-bromopyruvate. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 917-922, 1995
- 27) Wiley RG, Berbos TG, Deckwerth TL, Johnson EM, Lappi DA. Destruction of the cholinergic basal forebrain using immunotoxin to rat NGF receptor: modeling the cholinergic degeneration of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 128: 157-166, 1995
- 28) Beerli R, Andres C, Lev-Lehman E, Timberg R, Huberman T, Shani M, Soreq H. Transgenic expression of human

- acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. *Curr Biol* 5: 1063-1071, 1995
- 29) Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373: 523-527, 1995
- 30) Itoh A, Nitta A, Nadai M, Nishimura K, Hirose M, Hasegawa T, Nabeshima T. Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in β -amyloid protein-infused rats. *J Neurochem* 66: 1113-1117, 1996
- 31) Jarrard LE. On the role of the hippocampus in learning and memory in rat. *Behav Neural Biol* 60: 9-26, 1993
- 32) Cho YH, Kesner RP. Involvement of entorhinal cortex or parietal cortex in long-term spatial discrimination memory in rats: Retrograde amnesia. *Behav Neurosci* 110: 436-442, 1996
- 33) Yanai K, Ryu JH, Watanabe T, Iwata R, Ido T. Receptor autoradiography with ^{14}C and [^3H]-labelled ligands visualized by imaging plates. *Neuroreport* 3: 961-964, 1992
- 34) Yamane Y, Ishide N, Kagawa Y, Takeyama D, Shiba N, Chida M, Sekiguchi Y, Nozaki T, Ido T, Shirato K. Quantitative double-tracer autoradiography with tritium and carbon-14 using imaging plates: Application to myocardial metabolic studies in rats. *J Nucl Med* 36: 518-524, 1995
- 35) 森脇 博. 脳血流の臨床応用: 最新 脳SPECT/PETの臨床 脳機能の検査法 (西村恒彦編), 初版, 74-79頁, メジカルビュー社, 東京, 1995
- 36) Irie T, Fukushi K, Namba H, Iyo M, Tamagami H, Nagatsuka S, Ikota N. Brain acetylcholinesterase activity: validation of a PET tracer in a rat model of Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 37: 649-55 1996
- 37) Efan SM, Khare AB, Langason RB. Comparative tissue distribution of conformationally restricted radioiodinated vesamicol receptor ligands. *Nucl Med Biol* 22: 437-444, 1995
- 38) Shiba K, Mori H, Matsuda H, Tsuji S, Tonami N, Hisada K. In vivo characterization of radioiodinated 2-(4-phenylpiperidino) cyclohexanol (vesamicol) analogs: potential radioligand for mapping presynaptic cholinergic neurons. *Nucl Med Biol* 22: 823-828, 1995

Fundamental Study of Cholinergic Neural Function Using Nuclear Medicine Imaging and Spatial Memory Impairment in β -Amyloid Protein Infused Rats Eiji Ikeda, Department of Nuclear Medicine, Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa 920-8640 — *J. Jusen Med Soc.*, **109**, 71 — 77 (2000)

Key words vesamicol, Alzheimer's disease, β -amyloid protein, memory, autoradiography

Abstract

Alzheimer's disease is one of the most troublesome problems encountered in elderly populations. The pathological features of Alzheimer's disease are extracellular senile plaques, intracellular neurofibrillary tangles and widespread neuronal degeneration. Among them, senile plaques are the earliest neuropathological marker of Alzheimer's disease. Senile plaques are the cerebral deposition of amyloid, an insoluble substance composed mainly of β -amyloid protein. One proposed hypothesis is that a defect in cholinergic neurotransmission in Alzheimer's disease underlies this serious symptom of the disease. The aim of this study was to investigate the correlation between cholinergic presynaptic functions and memorial ability in rats treated with β -amyloid protein, a model of Alzheimer's disease. In this study, β -amyloid protein was infused into the cerebral ventricle of rats for 14 days; with an eight-arm radial maze being used to evaluate spatial memorial ability. In the same time, vesicular acetylcholine transporter and muscarinic acetylcholine receptor density in the frontal cortex, parietal cortex, temporal cortex and hippocampus were measured using high sensitive autoradiography. The performance of the eight-arm radial maze task was found to be impaired in β -amyloid protein treated rats. In the parietal cortex, vesicular acetylcholine transporter density was lower in β -amyloid protein treated rats than in vehicle-treated rats; there was no difference in muscarinic acetylcholine receptor density between the two groups. These results suggest that the reduction in vesicular acetylcholine transporter density is related to the memory impairment induced by β -amyloid protein. Our results also suggest that it may be possible that the condition of Alzheimer's disease can be evaluated by a suitably labeled vesamicol analogue for single photon emission tomography or positron emission tomography.