

C. 研究結果

サル扁桃体から総数710個のニューロン活動を記録し、そのうち379個は各課題遂行時のいずれかの時期に応答した。これら379個の応答ニューロンのうち79個は視覚刺激に応答し、刺激が報酬性であれ、嫌悪性であれ、新奇性も含めて視覚刺激に生物学的な価値があれば応答した(価値評価ニューロン)。これら価値評価ニューロンでは、とくに好きな食物ほど強く応答し、報酬性物体への視覚応答はその報酬価の度合と正の相関を示した。

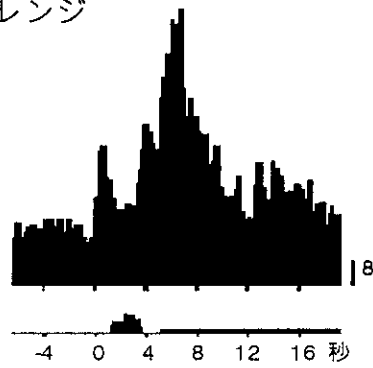
図2Aは、代表的な価値評価ニューロンの例である。このニューロンは、報酬価の高い報酬性物体であるオレンジの視覚認知および摂取期に強く応答したが(Aa)、報酬価の低い報酬性物体であるレーズンにはあまり応答せず(Ad)、無意味な物体であるテープには応答しなかった(Ae)。また、嫌悪性物体であるクモのモデル(Ab)や電気ショックを意味する茶色円柱(Ac)にも応答した。すなわち、このニューロンは、1)生物学的に意味のある物体(報酬性および嫌悪性物体)に応答するが、無意味物体には応答しない、2)報酬価の高い報酬性物体(オレンジ)に強く応答するが、報酬価の低い報酬性物体(レーズン)にはあまり応答しないことから、価値評価ニューロンであると考えられる。この対象物の生物学的な価値は、対象物と自己との関係に基づいて評価される。図2Bには、対象物は変化しないが、自己の状態が変化したために対象物の生物学的価値が低下したときの扁桃体ニューロンの応答を示してある(図2Aと同一ニューロン)。このニューロンは、水を十分に飲む前はそれぞれ水およびジュースを意味する赤色および白色円柱の視覚認知期、ならびに水およびジュースの摂取期に応答した(Ba)。しかし、サルに80mlの水を飲ませて

サルが水に対してほぼ満腹状態になった後にもう一度同様の試行を行うと、ジュースを意味する白色円柱の視覚認知期およびジュースの摂取期に対する応答は変化しなかったが、水を意味する赤色円柱の視覚認知期および水の摂取期に対する応答が減弱した(Bb)。このように扁桃体ニューロンの応答は、対象物と自己との関係に基づいて柔軟に変化するのが特徴である。

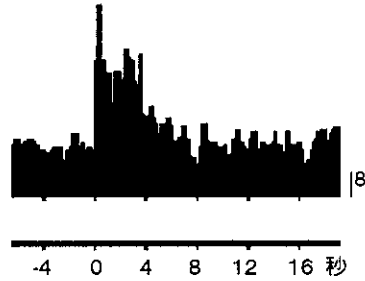
図3Aには、対象物自体を変化させることにより対象物と自己との関係を変化させて解析した扁桃体ニューロンの応答例が示されている。このニューロンは、報酬性物体であるクッキー(Aa)やレーズンの視覚認知期に応答した。ついで、外見が変化しないように後面に塩を添付したレーズンを用いて視覚認知課題をテストした。その結果、サルは最初は塩の添付が分からないのでレバー押しを行って塩付きレーズンを摂取し、そのときニューロン応答は、レーズンの視覚認知期だけでなくその摂取期にも認められた(Ab)。しかし、さらに試行を続けて行くとサルはレバー押しをしなくなり、ニューロン応答も減弱した(Ac)。これらのことから、サルの嫌いな塩をレーズンに添付することによりレーズンは一時的に嫌悪性物体として価値評価されたが、その後、サルがレバー押しを中止してレーズンが塩付きレーズンであることを学習するにつれて、レーズンの生物学的な価値が低下したと考えられる。図3Bには、この扁桃体ニューロンに対して、さらに実験者を含めて対象物の呈示場所を変化させてニューロンの応答性を解析した結果が示されている。その結果、実験者がサルに顔を向けて前進すると活動が上昇し、後退すると減少した。また、このニューロンの活動は、実験者がサルに対して背中を向け

A FR10 N: 5

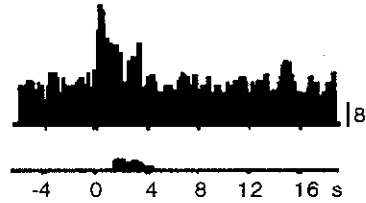
a. オレンジ



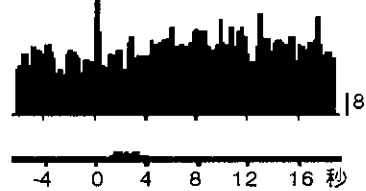
b. クモのモデル



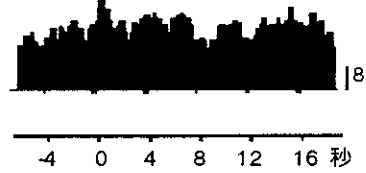
c. 茶色円柱 (電気ショック)



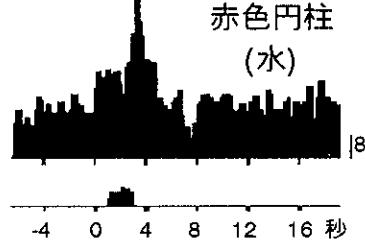
d. レーズン



e. テープ

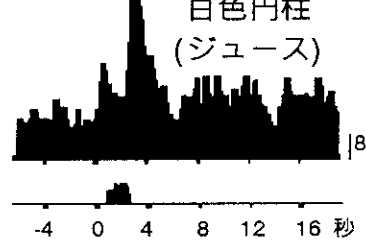


B a 満腹前



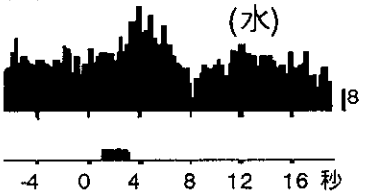
赤色円柱
(水)

白色円柱
(ジュース)



↓ 飲水

b. 満腹後



(水)

(ジュース)

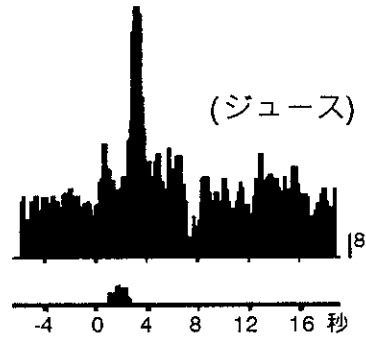


図2 サル扁桃体価値評価ニューロンの応答性。

A: 各種物体に対するニューロンの応答性。報酬価の高いオレンジ(a), 嫌悪性のクモのモデル(b)ならびに電気ショックを意味する茶色円柱(c)に促進応答(インパルス放電数の増加)を示しているが, 報酬価の低いレーズン(d)や無意味な黄色円柱(d)には応答がない。B: 満腹による応答性の変化。満腹前には水と連合した赤色円柱およびジュースを意味する白色円柱にしているが(a), 80mlの飲水後は選択的に赤色円柱に対する応答性が減弱している(b)。A, Bのヒストグラム上: ニューロンの応答の4回加算。縦軸, インパルス放電数/ビン。ビン幅: 200msec。ヒストグラム下: レバー押し信号の4回加算。縦軸, レバー押し信号数/ビン。横軸, 時間(秒); 0, 刺激呈示時点; -, 刺激呈示前; +, 刺激呈示後。

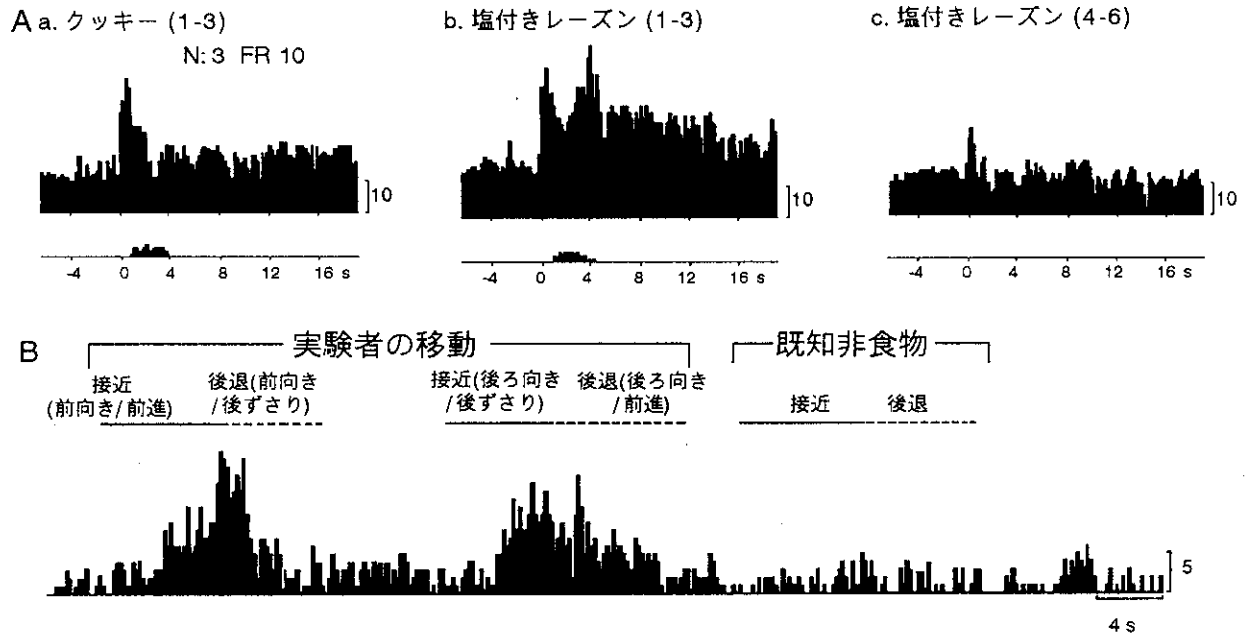


図3 サル扁桃体ニューロンの応答性。

A: 報酬物体応答ニューロン。報酬性物体(クッキー)の視覚識別期に応答するが(a), 報酬性物体(レーズン)に嫌悪性の塩を添付すると, 摂取期にも促進応答(インパルス放電数の増加)を示すようになる(b)。その後, サルがレバー押しをしなくなると応答が減弱する(c)。B: 実験者および無意味物体の移動に対する応答性。実験者がサルに近づくとニューロン活動が上昇するが, 無意味なテープの移動には応答しない。他の図の説明は図2を参照。

て後ろ向きで後ずさりしながら接近した場合にも同様に活動が上昇した。しかし, 無意味物体であるテープをサルに接近させてもニューロン活動は変化しなかった。これらのことから, このニューロンは, 単にヒトの顔などに応答しているのではなく, 生物学的に意味のある対象物(ヒト)が接近あるいは後退することによる対象物の価値評価の変化に基づいて活動が変化したと考えられる。

一方, 47個のニューロンはいくつかの特定物体に選択的に応答した(意味認知ニューロン)。これら選択応答ニューロン中には, 顔の表情の変化や報酬を期待できる状況などに応答するニューロンが存在することが確認された。

D. 考察

扁桃体における価値評価ニューロンの存在は, 扁桃体が, 実際の感覚刺激の生物学的価値評価と意味認知に重要な役割を果たしていることを強く示唆する。また, これら扁桃体ニューロンはヒトの接近や後退, あるいは報酬を期待できる状況に応じて活動が変化したことから, 扁桃体は海馬体や前頭葉などとの相互連絡により空間情報や文脈に関する情報を受けて総合的に感覚刺激の生物学的価値評価や意味認知を行っていると考えられる。一方, これまでの解剖学的研究により, 扁桃体は直接, あるいはマイネルト基底核や視床背内側核を介して広範な皮質領域に線維投射していることが明らかにされている。これら遠心性投射は, 計算論的研究によると, 学習過程における大脳皮質ニューロンの受容野の可塑的変化や刺激応答性の先鋭化に重要な役割を果

たしていることが示唆されている。これらのことから、扁桃体は、単純な感覚刺激だけでなく文脈や空間情報を含むすべての情報の最終的な価値評価や意味認知に関与し、これらトップダウン情報により脳の情報処理システムを制御していることが示唆される

E 結論

扁桃体における価値評価ニューロンならびに意味認知ニューロンの存在は、扁桃体が、感覚刺激の生物学的な価値評価や意味認知に重要な役割を果たしていることを強く示唆する。また、これらのニューロンはヒトの接近や後退、あるいは報酬を期待できる状況に応じて活動が変化したことから、扁桃体は海馬体や前頭葉などから空間情報や文脈に関する情報を受けて総合的に感覚刺激の価値評価や意味認知を行っていると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nishijo, H., Uwano, T., Tamura, R. and Ono, T. Gustatory and multimodal neuronal responses in the amygdala during licking and discrimination of sensory stimuli in awake rats. *J. Neurophysiol.*, 79: 21-36, 1998.
- Ikeda, H., Nishijo, H., Miyamoto, K., Tamura, R., Endo, S. and Ono, T. Generators of visual evoked potentials investigated by dipole tracing in the human occipital cortex. *Neuroscience*, 84: 723-739, 1998.
- Hagino, H., Tabuchi, E., Kurachi, M., Saitoh, O., Sun, Y., Kondoh, T., Ono, T. and Torii, K. Effects of D2 dopamine receptor agonist and antagonist on brain activity in the rat assessed by functional magnetic resonance

imaging. *Brain Res.*, 813: 367-373, 1998.

- Nishijo, H., Ono, T., Uwano, T., Kondoh, T., and Torii, K. Hypothalamic and amygdalar neuronal responses to various sapid solutions during ingestive behavior in rats. *J. Nutrition*, 1999, in press.
- Kondoh, T., Mori, M., Ono, T., and Torii, K. Mechanisms of umami taste preference and aversion in rats. *J. Nutrition*, 1999, in press.
- Matsumura, N., Nishijo, H., Tamura, R., Eifuku, S., Endo, S., and Ono, T. Spatial and task-dependent neuronal responses during real and virtual translocation in the monkey hippocampal formation. *J. Neurosci.*, 1999, in press.
- Ono, T. and Nishijo, H. Neurophysiological basis of emotion in primates: neuronal responses in the monkey amygdala and anterior cingulate cortex. In: *The Cognitive Neurosciences*, 2nd ed., by M.S. Gazzaniga (Ed.), MIT Press, 1999, in press.
- Ono, T. and Nishijo, H. Active spatial information processing in the septo-hippocampal system. *Hippocampus*, 1999, in press.
- ### 2. 学会発表
- Ono T.: Neurophysiological basis of emotion in primates : neuronal responses in the monkey amygdala and anterior cingulate cortex. Summer Inst. in Cognitive Neuroscience, 1998, 7, Reno.
- Nishijo H., Ono T., Uwano T., Kondoh T., and Torii K.: Hypothalamic and amygdalar neuronal responses to various sapid solutions during ingestive behavior in rats. *Int. Symp. on Glutamate*, 1998, 10, Milano.
- Tanebe K., Nishijo H., Muraguchi A., Saito S.,

and Ono T.: Characteristic changes of endogenous IL-1beta and IL-2 during chronic stress in different hypothalamic areas; Possible roles in regulation of GnRH gene expression. 4th Int. Cong. of Neuroendocrinol., 1998, 10, Kokura.

Uwano T., Nishijo H., Tanebe K., Zhong Y.M., Eifuku S., and Ono T.: Prenatal stress affects anatomical development, motor development, and spatial learning in rats. 28th Ann. Meet. Neurosci., 1998, 11, Los Angeles.

Nishijo, H., Tanebe, K., Muraguchi, A. and Ono, T. : Negative correlation between hypothalamic cytokines and LHRH gene expression in ovariectomized rats during stress. 28th Ann. Meet. Neurosci., 1998, 11, Los Angeles.

Matsumura N., Nishijo H., Tamura R., Eifuku S., and Ono T.: Monkey hippocampal neuronal responses to space during real and virtual navigation. 28th Ann. Meet. Neurosci., 1998, 11, Los Angeles.

Fukuhara K., Konishi J., Nishijo H., Tamura R., and Ono T.: Neurotrophin attenuates hypoxia-induced depolarization in rat hippocampal CA1 neurons. 28th Ann. Meet. Neurosci., 1998, 11, Los Angeles.

Hori E., Nishijo H., Tamura R., Uwano T., and Ono T.: Effects of NC-1900 (a novel arginine-vasopressin derivative) on spatial memory impairment of rats with transient forebrain ischemia. 28th Ann. Meet. Neurosci., 1998, 11, Los Angeles.

PETによる脳の老化度指標の開発

分担研究者 千田 道雄 東京都老人総合研究所ポジトロン医学研究室長

研究要旨 健常若年者および高齢者を対象に、FDG-PETを用いて、安静時と歩行時の脳糖代謝を測定した。歩行時には小脳虫部の糖代謝が増加した。高齢者は若年者に比べて、糖代謝の増加の程度が小さかったが、若年者同様虫部の賦活が見られ、機能と形態の関係は保たれていた。

A. 研究目的

ポジトロンCT (PET) を用いると、ヒトの局所脳血流や糖代謝などの機能を測定して断層画像に描出できるので、加齢による脳機能の変化を測定し老化度を評価することができると期待されている。ところが、健常人の若年者から高齢者までを対象に安静時の脳血流や代謝を測定した報告によれば、結果はきわめてばらついており、加齢とともに脳血流や代謝が低下するかどうかは、必ずしも明らかでない。その原因としては、安静時脳血流自体が動脈血炭酸ガス分圧などいろいろな要因で変動しうることや、PETで計測される局所脳血流や糖代謝値は脳組織の萎縮の影響を受けることが考えられる。しかし、より本質的には、老化は個人差がきわめて大きい現象であることが背景にある。

そこでわれわれは、本研究事業において、同一被検者に対して安静時と刺激時または課題施行時に繰り返し測定を行い、刺激や課題施行による局所脳機能の変化を検討してきた。この手

法はPET脳賦活検査法といい、その刺激や課題に關与する脳の部位を描出し、脳の機能解剖を研究するのに用いられる方法である。われわれはこれを老化の研究に応用し、脳の機能局在や賦活の大きさが加齢とともにどのように変わるかを検討している。このアプローチにより、個人差がある程度取り除かれてばらつきが減少し、また、安静時のデータでは現れない加齢の効果がわかると期待される。

本年度の研究では、歩行刺激による局所脳代謝の変化を検討した。歩行は体幹・下肢の単純な運動ではなく、その制御には平衡覚やさらに高次の機能が働いていると言われるので、老化度の評価に活用できる可能性がある。歩行中はもちろんPET撮影ができないが、F-18 標識フロロデオキシグルコース (FDG) を用いれば、歩行中の局所脳糖代謝を歩行後に測定することができる。FDGは局所糖代謝速度に応じて脳に取り込まれて蓄積するので、FDGを静脈注射すると約40-45分間後には放射能分布が局所糖代謝

を反映するようになり、その時点以後は放射能分布はほとんど変わらない。そこで、FDG投与直後より被検者に歩行をさせ、40分後からPETカメラの寝台に寝かせて撮影することによって、歩行中の脳糖代謝を測定した。

B. 研究方法

対象は精神神経学的に異常のない22歳から88歳の健常人14名（男8、女6）で、被検者には本研究倫理委員会の承認に基づいて研究と計測内容の説明を行い承諾を得た。

被検者は、1週間の間隔をあけて、安静時および歩行時の2つの条件でPET計測を行った。まず、吸収補正のために、Ge-68/Ga-68外部線源を用いて8分間のトランスミッションスキャンを行った。次に、歩行時スキャンの場合には、150MBqのFDGを静脈投与し、直後より30分間トレッドミル上で歩行させた。トレッドミルの両側は、視覚刺激を避けるためにカーテンで覆い、被検者は前方の壁を見ながら歩行した。歩行速度は1.5km/hr、勾配は10%にセットした。歩行の前後で血糖を測定し、大きな変化がないことを確認した。歩行終了後、PETカメラの寝台にトランスミッションスキャンと同じ位置で頭部を固定した。FDG静注40分後より12分間のエミッションスキャンを行い、小脳から帯状回上縁付近のレベルにかけて6.5mm間隔14スライスの放射能分布を撮影した。一部の被検者では、さらに12分かけて頭頂部の放射能分布を撮影した。安静時スキャンの場合は、トランスミッションスキャンの後、仰臥位にて150MBqのFDGを静脈投与したのち、撮影まで開眼仰臥位安静を保った。

PETカメラは島津製 HEADTOME-IV を用

いた。PET画像はトランスミッションデータで吸収補正して再構成し、6.5mm間隔14スライスの放射能画像を作成した。空間分解能は7.5mm、軸方向分解能は10mmである。

一部の被検者では、別に形態情報を得るため、GE製Signa (1.5T) を用いてT1強調MRIを撮影した。

得られたPET画像は、画像処理ワークステーションIndy上で、画像処理ソフトウェアDrViewを用いて以下の解析を行った。まず、2回のPET画像を、われわれ自身が開発したregistration法を用いて三次元的に回転平行移動させて位置あわせをした。次に、FDG-PET画像の全脳平均値を5にノーマライズした後、歩行時画像から安静時画像を引き算し、スムージングをかけた。歩行によって糖代謝が亢進した小脳虫部に関心領域(ROI)をとってFDGの集積を測定し、糖代謝の変化を安静時に対する割合、すなわち、(歩行時-安静時)÷安静時で表した。MRIを撮影した例では、PET画像をさらにMRIにregistrationして重ね合わせ、賦活部位の解剖学的構造を確認した。

C. 研究結果

歩行により、すべての被検者で小脳虫部が賦活された。これは、(歩行時-安静時)のサブトラクション画像をMRIに重ね合わせることで確認された(図1)。テント上では、中心溝最上部の体幹下肢の一次運動感覚野が賦活された。一部の例では後頭葉の視覚野も賦活された。

小脳虫部の歩行による賦活の大きさを安静時に対する割合で表すと、若年者では約40%の賦活が見られたが、高齢者では約20%と低く、加齢による賦活の低下が見られた(図2)。しか

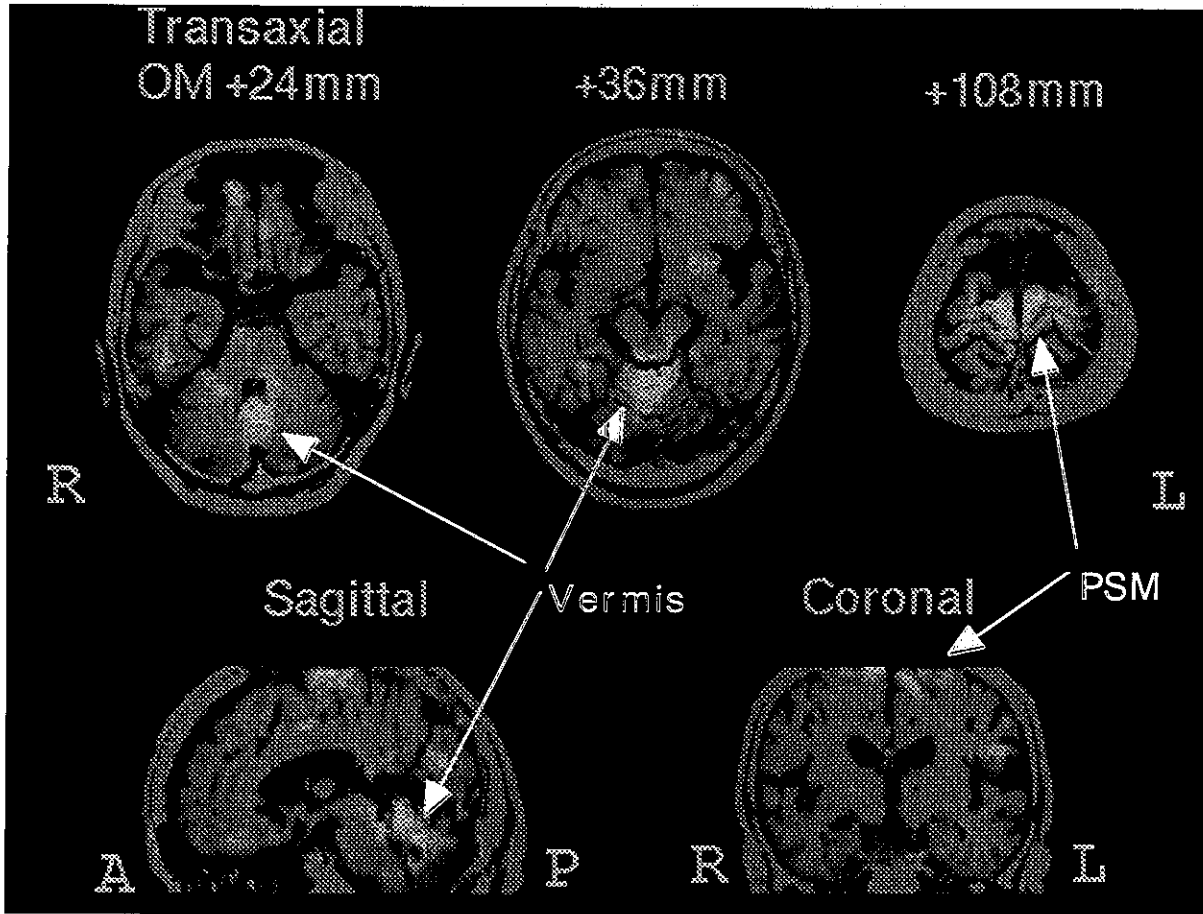


図1 : 73歳の健常人女性にて、歩行による脳糖代謝の増加（白く光っている部位）をMRIに重ねて表示した。小脳虫部（Vermis）および一次運動感覚野上部（PSM）が賦活されている。

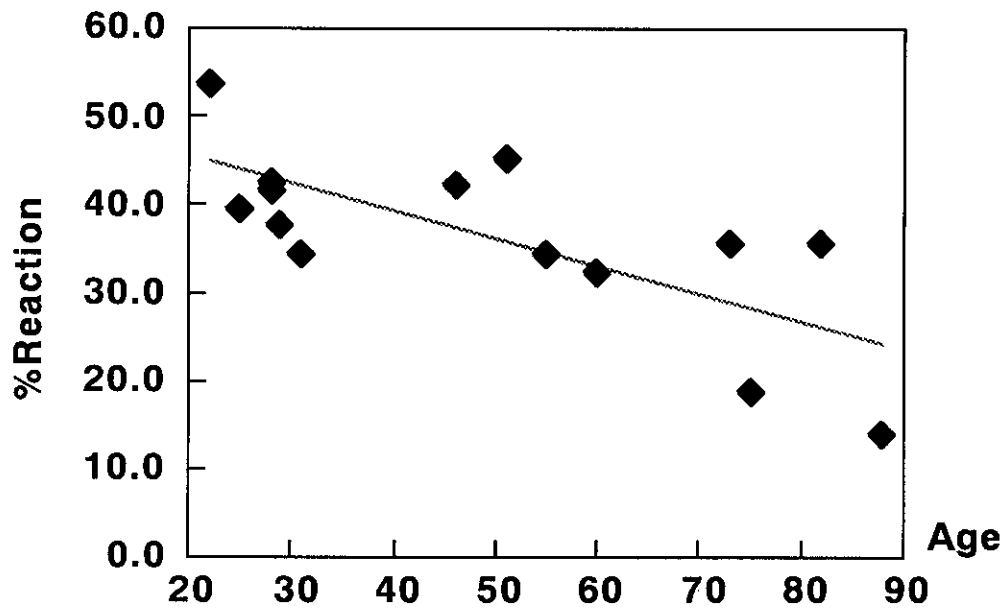


図2 : 健常人における小脳虫部の歩行による賦活率の加齢変化。タテ軸は賦活率で、全脳平均値でノーマライズ後の（歩行時－安静時）÷安静時×100%。

し、賦活部位は、高齢者でも若年者と同様小脳虫部に限局しており、機能と形態の関係は加齢によって変わらなかった。

D. 考察

昨年度までの本研究事業で、われわれは、同一被検者に対して安静時と刺激時とに酸素-15標識の水によるPETで繰り返し脳血流の測定を行い、刺激や課題施行による脳血流の変化を検討してきた。まず、安静時と手指振動刺激時の脳血流を比較し、MRIと重ね合わせた結果、高齢者でも若年者でも手指振動刺激によって中心溝の一次運動感覚野が賦活された。賦活の大きさは、70歳台までは若年者と変わらなかったが、80歳を越える極端な高齢者では低下する傾向があった。次に、安静時とガム咀嚼時とを比較した結果、年齢にかかわらず中心溝下部の一次運動感覚野の顔面口腔の部位とその内側の弁蓋部・島部にかけての広い領域が賦活され、その大きさは加齢に伴って低下した。加齢の影響そのものを画像にマッピングするために、われわれの開発した方法を用いてピクセル毎に汎用線型モデルを用いて検討すると、一次運動感覚野よりもむしろ弁蓋部・島部において、加齢の影響が強く見られた。このように、PET脳賦活検査法は、安静時の計測ではわからない脳の刺激反応性を見ることができ、老化度の評価に有効であることが示唆された。

本年度の研究では、歩行刺激による局所脳糖代謝の変化と加齢による影響を検討した結果、年齢にかかわらず歩行によって小脳の正中部(虫部)が賦活された。小脳虫部(vermis)は平衡覚との結びつきが強く、躯幹のバランスに関与していると言われるので、歩行により賦活

されたことは矛盾しない。また、加齢に伴って小脳虫部の賦活の大きさが低下したことは、老化に伴う脳の反応性の低下を示唆しており、昨年度までの結果とも合う所見である。

賦活の大きさを評価するには、刺激時と安静時の差を測定をするのが普通であるが、「差」は萎縮の影響を受け、萎縮がある場合には部分容積効果によって低く評価される。そこで、本年度の研究では、安静時に対する「割合」で賦活の大きさを表し、部分容積効果の影響を少なくした。

E. 結論

歩行時には小脳虫部の糖代謝が増加した。高齢者は若年者に比べて、糖代謝の増加の程度が小さかったが、若年者同様小脳虫部の賦活が見られ、機能と形態の関係は保たれていた。

一般に運動機能やその制御に関して、刺激による賦活部位の賦活の大きさは、刺激の種類によって時期や程度の違いはあるが、加齢とともに低下することが示唆される。また、賦活部位の解剖学的位置は不変で、形態と機能の関係は加齢によって変わらないことが示唆される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Sugiura, M., Kawashima, R., Sadato, N., Senda, M., Kanno, I., Oda, K., Sato, K., Yonekura, Y. and Fukuda, H. : Anatomic validation of spatial normalization methods for PET. J Nucl Med, 40(2), 317-322, 1999
- ② 壬田道雄：脳PET画像の解剖学的標準化. Med. Imag. Tech., 16(3), 190-195, 1998

③ Senda, M., Ishii, K., Oda, K., Sadato, N., Kawashima, R., Sugiura, M., Kanno, I. Ardekani, B., Minoshima, S. and Tatsumi, I. : Influence of ANOVA design and anatomical standardization on the statistical mapping for PET activation. NeuroImage, 8(3), 283-301, 1998

2. 学会発表

- ① Kimura, Y., Toyama, H., Senda, M. and Alpert N. : New clustering method of noise suppression and fast computation for parametric images. Neuroreceptor Mapping 98, Michigan, 98.6.12-.6.14
- ② Narial, T., Senda, M., Kanouchi, T., Yokota, T., Ishii, K., Ohta, Y. and Hirakawa, K. : Abnormal PET motor activation pattern in the territory of occluded major cerebral artery. - Discrepancy between PET motor mapping and TMS study-. 4th International Conference on Functional Mapping of Human Brain, Montreal, 98.7.7-.7.12
- ③ 栗原淳圭、外山比南子、上村幸司、海老原一司、木村裕一、千田道雄、内山明彦：脳賦活検査における賦活部位間の相関図作成法に関する研究．第38回日本核医学会総会，高松，98.10.14-10.16
- ④ 千田道雄：PETによる脳機能マッピング．日本画像医学会，東京，99.2.11-.2.13

G. 知的所有権の取得状況

なし

脳血流の神経性調節の老化度評価

堀田晴美（東京都老人総合研究所・主任研究員）

本研究は、中隔から海馬に投射するコリン作動性神経による海馬の血流調節とその加齢変化およびニューロン保護作用を明らかにする目的で、ニコチン性アセチルコリン受容体刺激が海馬血流と虚血による海馬遅発性ニューロン死に及ぼす効果を調べた。ラットを麻酔し、海馬局所血流をレーザードップラー血流計で連続測定した。椎骨動脈を結紮し、総頸動脈を2分間ずつ断続的にクランプして虚血を行い、虚血3-7日後に遅発性神経細胞死を観察した。虚血直前にニコチンを静脈内投与し、海馬血流および遅発性神経細胞死への効果を検討した。

(1) 3-10ヶ月齢成熟ラットではニコチン 30-100 μ g/kg 静脈内投与により血圧に依存せずに海馬局所血流が投与前の120-140%に増加した。23-26ヶ月齢老齢群では成熟群と同程度の反応が観察されたが、32-42ヶ月齢老齢群では反応が減弱した。(2) 虚血により海馬局所血流は虚血前の5-15%まで低下した。虚血5分前のニコチン投与により、虚血による海馬局所血流の低下反応が減弱した。(3) 6分虚血により海馬CA1正常ニューロン数はコントロールラットの1/2となったが、虚血前にニコチンを投与したラットではコントロールの2/3と有意に多かった。以上の結果より、ニコチン性アセチルコリン受容体の刺激は海馬血流を増加させ、虚血中の虚血の程度を軽くし、海馬ニューロンを虚血性損傷から保護することが明らかとなり、このニコチン性アセチルコリン受容体を介する海馬血流調節機能は加齢により低下することがわかった。

キーワード：海馬局所血流、中隔、ニコチン性アセチルコリン受容体、遅発性ニューロン死、加齢、ラット

A. 研究目的

脳の機能を維持するには、酸素やエネルギーを運ぶ血流が正常に保たれることが大切であり、脳血流調節の老化度を評価することは、脳機能の生理的老化を捉えるために重要な要素である。脳の血流調節は、古くから代謝性調節が重要とされてきたが、近年、脳血管にアセチルコリン(ACh)、ノルアドレナリンや種々の神経ペプチドを含む神経が分布することが明らかになるにつれて、神経性調節の可能性が信じられるようになった。我々の研究室ではこれまでに、前脳基底部のマイネルト核から大脳皮質に、中隔から海馬に投射するコリン作動性神経を刺激すると

大脳皮質や海馬にアセチルコリンが放出され、ニコチン性アセチルコリン受容体を介して大脳皮質や海馬の局所血流が増加する事実を示し、このコリン作動性神経系が大脳皮質や海馬の血管拡張系として作動することを証明してきた。

次に、このコリン作動性神経系の加齢変化と役割を明らかにすることが重要である。昨年度までに我々の研究室では、マイネルト核から大脳皮質へ投射するコリン作動性神経による大脳皮質血流調節機能が、ニコチン性アセチルコリン受容体の機能低下により、加齢により低下することを報告してきたが、海馬の血流調節についてはまだ明らかにしていない。また、海馬CA1

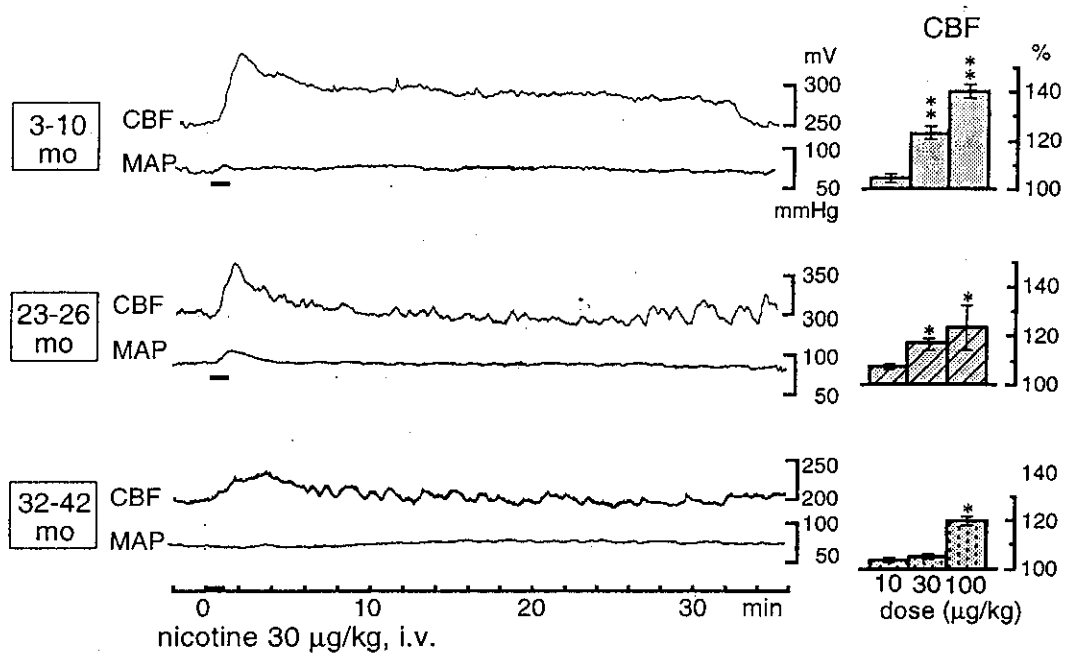


図1 ニコチン性アセチルコリン受容体刺激による海馬局所血流の反応

3-10ヶ月齢（成熟）、23-26ヶ月齢、32-42ヶ月齢（老齢）ラットにおけるニコチン30 µg/kg投与による海馬局所血流と血圧の反応の典型例とニコチン10-100 µg/kg投与による海馬局所血流の反応の平均値とS.E.M.を投与前を100%として示す。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 、投与直前の値に対し有意差があることを示した(統計にはone-way ANOVA+ Fisher's testを用いた)。

ニューロンは虚血により傷害されやすく、遅発性ニューロン死と呼ばれる現象を起こすことが良く知られており、虚血の際にニコチン性アセチルコリン受容体が刺激されると、海馬の血流が増加し、海馬ニューロンが虚血性損傷から保護されることが予想される。そこで、本研究では、1) ニコチンの静脈内投与によりニコチン性アセチルコリン受容体を刺激した際の海馬血流の反応とその加齢変化、2) ニコチン性アセチルコリン受容体刺激が虚血の際の局所血流の反応に及ぼす効果、3) ニコチン性アセチルコリン受容体刺激が虚血による海馬遅発性ニューロン死に及ぼす効果を調べた。

B. 研究方法

実験動物：3-10ヶ月齢（成熟）、23-26ヶ月齢、32-42ヶ月齢（老齢）のWistar系ラットを用いた。ウレタン或いはハロセン麻酔下で実験を行った。

海馬局所血流の測定：レーザードップラー血流計を用いて測定した。人工呼吸下で、脳血流測定部位の頭蓋骨を部分開頭し、海馬背側部 (Bregma -4.3mm, Lateral 1.4mm, Ventral 3.0mm) にレーザードップラー血流計のプロープ（直径 0.8 mm）を挿入し、プロープの直下約 1mm³の領域の海馬局所血流量を連続的に測定した。呼気ガス中の炭酸ガス濃度が約 4%になるよう呼吸量を調節した。血圧、心拍数、体温を常時モニターし生理的状态に維持した。

脳虚血の方法：鎖骨の近傍で左右椎骨動脈を結紮し、鉗子で総頸動脈を一過性に閉じて脳虚血を行った。虚血の際の血流変化を観察するために、総頸動脈のクランプは2分ごとに断続的に行った。

遅発性ニューロン死の観察：虚血後3-7日後にラットをネンブタールで麻酔し、10%ホルマリン溶液で灌流固定し、脳の6µmのパラフィン切

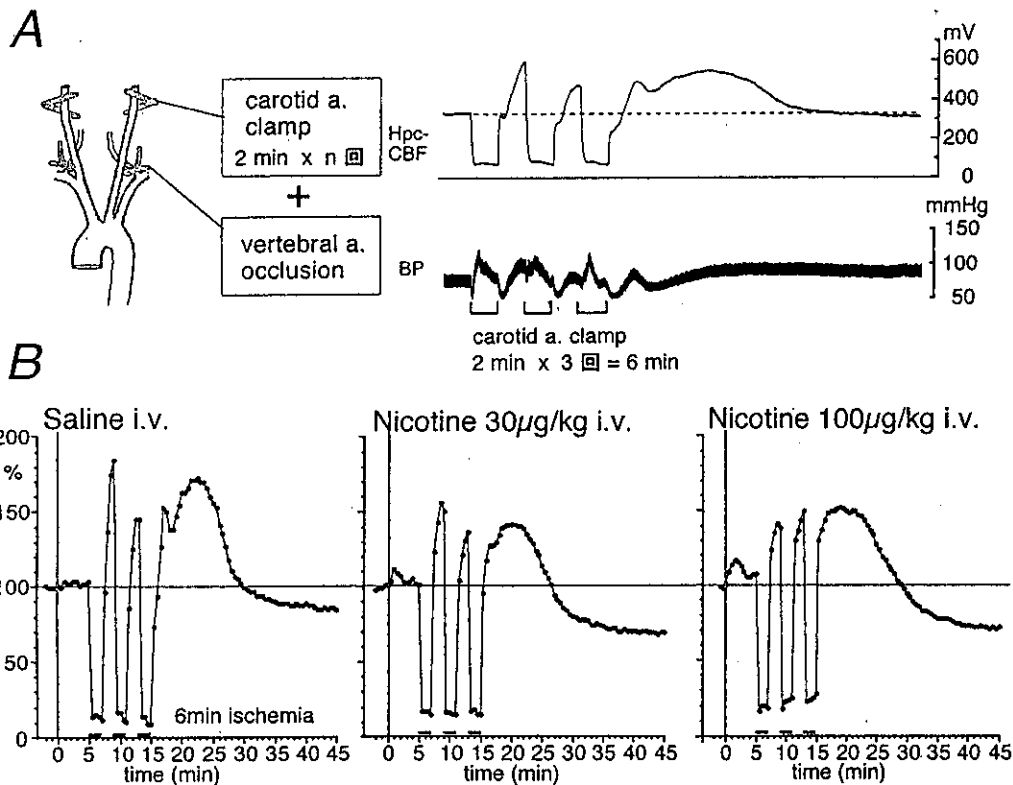


図2 ニコチン性アセチルコリン受容体刺激が、虚血による海馬局所血流の反応に及ぼす効果

A: 断続的虚血方法と6分断続虚血による海馬局所血流と血圧の反応の典型例。 B: saline, nicotine 30, 100 µg/kg が、虚血による海馬局所血流の低下反応に及ぼす効果。投与前の血流を100%として示した。

片を作成した。グリアと判別してニューロンを観察するためにヘマトキシリン・エオジン染色(HE)とグリア線維性酸性プロテイン(GFAP)の免疫染色を行い、Bregma-3.3mmにおける核小体のある海馬CA1ニューロンを正常ニューロンとして数えた。

ニコチン性アセチルコリン受容体刺激: ニコチン(10-300µg/kg)を静脈内投与した。

C. 研究結果

1. ニコチン性アセチルコリン受容体刺激による海馬局所血流の反応とその加齢変化

3-10ヶ月齢、23-26ヶ月齢、32-42ヶ月齢のラットにおいて、ニコチンの静脈内投与により脳内ニコチン性アセチルコリン受容体を刺激した際の海馬局所血流の反応を図1に示す。3-10ヶ月齢の

成熟群では、10 µg/kgのニコチン投与により海馬局所血流、血圧ともに変化はなかった。30 µg/kg投与により海馬局所血流は、血圧に依存せずに刺激前の約120%に増加し、100 µg/kg投与では刺激前の約140%にまで増加した。この海馬血流増加反応は30分程度持続した。ニコチン300µg/kg投与では、血圧、海馬局所血流共に著しく上昇したが、5-15分程度で元のレベルに戻った。以上の結果より、ニコチン性アセチルコリン受容体刺激により海馬血流が増加すること、この効果はニコチン30µg/kgおよび100µg/kgがとくに有効であることが明らかになった。

23-26ヶ月齢の老齢ラットでは、ニコチン30 µg/kg投与により3-10ヶ月齢の成熟ラットと同程度の反応がみられ、100 µg/kgでは成熟ラットよりも反応が小さい傾向がみられた。

32-42 ケ月齢の老齢ラットでは、ニコチン 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では有意な反応がみられず、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与による反応は、3-10 ケ月齢ラットでの反応と比べて有意に小さかった。

以上の結果より、ニコチン性アセチルコリン受容体刺激による海馬血流増加反応が加齢により減弱することが明らかになった。

2. ニコチン性アセチルコリン受容体刺激が虚血による海馬局所血流の反応に及ぼす効果

椎骨動脈をあらかじめ結紮し、総頸動脈を 2 分間ごとに鉗子で閉じたり開いたりをして 3 回繰り返して断続的虚血を行った (図 2A)。海馬局所血流は、総頸動脈をクランプすると閉じる前の 5-15% に著しく低下し、鉗子クランプ解除により 150-200% に上昇した。

ニコチン 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ あるいは 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与し、その 5 分後から総頸動脈のクランプを行うと、クランプ中の海馬局所血流の低下反応はクランプ前の 15-30% 程度に留まった (図 2B)。この事実より、ニコチン投与により海馬局所血管があらかじめ拡張していたために、虚血中の血流量が多かったと考えられる。

3. ニコチン性アセチルコリン受容体刺激が虚血による海馬遅発性ニューロン死に及ぼす効果

(1) 虚血の強度および経過日数と海馬虚血性ニューロン死

椎骨動脈をあらかじめ結紮し、総頸動脈を 2 分間ごとに鉗子で閉じたり開いたりをして 24 回繰り返して 4-8 分間の断続的虚血を行い、3 日、4 日、5 日、7 日後にラットを灌流固定して、Bregma-3.3mm の位置での海馬 CA1 ニューロンの遅発性ニューロン死を観察した。虚血をしないコントロールラット群では Bregma-3.3mm の位置での海馬 CA1 正常ニューロン数は約 150 個/mm で、密に規則正しく配列しており、グリア細胞

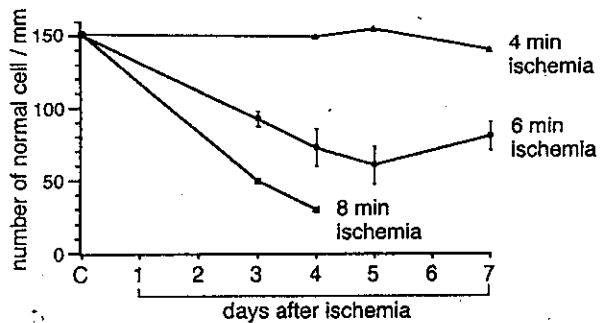


図3 虚血からの経過日数と海馬遅発性ニューロン死
虚血による海馬 CA1 正常ニューロン数の変化
縦軸: B-3.3 における海馬 CA1 正常ニューロン数/mm
横軸: 虚血からの経過日数

胞が少かった。4 分虚血をしたラットでは 3-7 日のいずれでも海馬 CA1 正常ニューロン数はコントロールラットとほとんど変わらなかった。6 分虚血したラットでは、3 日後には海馬 CA1 正常ニューロン数はコントロールラットの 2/3 程度になり、4 日-7 日後にはコントロールラットの約 1/2 程度になり、グリア細胞が増殖していた。8 分虚血したラットでは、海馬 CA1 正常ニューロン数は 3 日後でコントロールラットの 1/3 程度、4 日後には約 1/5 に減少した (図 3)。以上の結果より、虚血の程度に依存して海馬 CA1 ニューロン死が起こり、ほぼ 4 日でプラトーに達することがわかった。

(2) 虚血による海馬遅発性ニューロン死に対するニコチンの効果

椎骨動脈をあらかじめ結紮し、総頸動脈を 2 分間ごとに鉗子で閉じたり開いたりをして 3 回繰り返して 6 分間の断続的虚血を行い、4 日あるいは 5 日後の Bregma-3.3mm の位置での海馬 CA1 ニューロンの遅発性ニューロン死を観察し、ニコチンの効果を調べた。虚血開始の 5 分前に生理食塩水を投与したラットでは、Bregma-3.3mm の位置での海馬 CA1 正常ニューロン数は約 70 個/mm

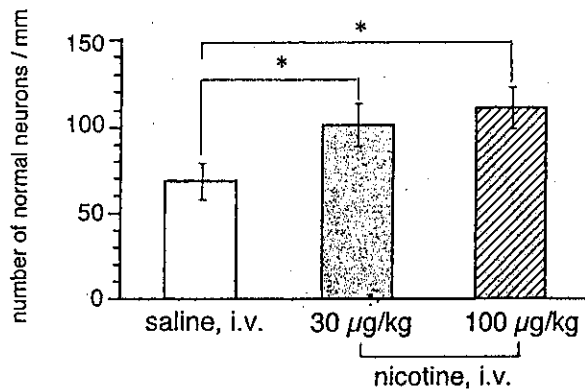


図4 ニコチン性アセチルコリン受容体刺激が虚血による海馬遅発性ニューロン死に及ぼす効果
saline, nicotine 30, 100 µg/kg を投与したラットのB-3.3における海馬CA1正常ニューロン数/1mm(虚血から4-5日後)。* $p < 0.05$ 、saline投与群の値に対して有意差があることを示した(統計にはMann-Whitney testを用いた)。

で、虚血をしないラットの約半分であった。虚血開始の5分前にニコチン30あるいは100 µg/kg投与したラットでは、海馬CA1正常ニューロン数はそれぞれ約100個/mm、115個/mmで、生理食塩水を投与したラットと比べて有意に多かった(図4)。以上の結果より、ニコチン性アセチルコリン受容体刺激は、海馬局所血流を増加させるとともに、虚血による海馬CA1遅発性ニューロン死を抑制し、ニューロンを保護する作用があると考えられる。

D. 考察

本研究により、ニコチン静脈内投与によるニコチン性アセチルコリン受容体刺激により、海馬局所血流が増加すること、このニコチン性アセチルコリン受容体を介する海馬血流調節機能は加齢により低下することが明らかになった。昨年度までに我々の研究室では、脳内コリン作動性神経による大脳皮質血流調節機能が、ニコチン性アセチルコリン受容体の機能低下により加齢に伴って減弱することを明らかにしてきた。海馬においても大脳皮質とほぼ同じ経過で脳内コリン作動性

神経による血流調節機能が低下してくることがわかった。

さらに本研究により、脳内コリン作動性神経が海馬のニューロンを保護する働きを持つことが明らかになった。虚血の直前にニコチン性アセチルコリン受容体刺激を刺激すると、虚血の際の血流低下が軽減され、虚血による海馬の遅発性ニューロン死が軽減された。ニコチン性アセチルコリン受容体刺激による血流増加反応とニューロン細胞死の効果が同じ量のニコチン投与で観察されることから、海馬血流改善によって遅発性ニューロン死の軽減が起こったと考えられるが、ニコチンがニューロンに直接効果を及ぼした可能性も考えられる。本研究ではニコチン投与によるニコチン性アセチルコリン受容体刺激を用いて海馬ニューロンに対する保護作用を調べたが、次にはマイネルト核および中隔刺激により大脳皮質や海馬において血流改善とともにニューロン保護の作用が起こるかどうか調べるのが重要である。

E. 結論

ニコチン性アセチルコリン受容体の刺激は海馬血流を増加させ、虚血中の虚血の程度を軽くし、海馬ニューロンを虚血性損傷から保護すること、このニコチン性アセチルコリン受容体を介する海馬血流調節機能は加齢により低下することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakayama H, Noda K, Hotta H, Obsawa H, Hosoya Y. Effects of aging on numbers, sizes and conduction velocities of myelinated and unmyelinated fibers of the pelvic nerve in rats. *Journal of the Autonomic Nervous System* 1998; 69: 148-155.

2. Hotta H, Ito H, Kagitani F, Sato A. Cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor, dilates retinal arterioles and increases retinal and choroidal blood flow in rats. *European Journal of Pharmacology* 1998; 344: 49-52.
3. Budgell BS, Hotta H, Sato A. Reflex responses of bladder motility after stimulation of interspinous tissues in the anesthetized rat. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics* 1998; 21: 1-7.
4. Hotta H, Uchida S, Shimura M, Suzuki H. Uterine contractility and blood flow are reflexively regulated by cutaneous afferent stimulation in anesthetized rats. *Journal of the Autonomic Nervous System* 1999; 75: 23-31.

2. 学会発表

1. 内田さえ、堀田晴美、木村敦子. マイネルト核コリン作動性神経による大脳皮質血管

拡張機能の加齢変化. 第 21 回日本神経科学・第 41 回日本神経化学合同大会 1998; 9.21-23. 東京.

2. Uchida S, Hotta H, Kimura A. Nicotinic and muscarinic cholinergic vasodilatation of cortical blood flow in adult and aged rats. The Fourth Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies, The Second Congress of the Federation of Asian-Oceanian Neuroscience Societies, 1998; 9.27-10.1. Brisbane, Australia.
3. 内田さえ、堀田晴美、木村敦子. 前脳基底部マイネルト核コリン作動性神経による大脳皮質血管拡張機能の加齢変化とその機序. 第 51 回日本自律神経学会 1998; 11.5-6. 東京.
4. 鍵谷方子、木村敦子、堀田晴美. ニコチン性アセチルコリン受容体刺激は海馬血流を増加させる. 第 51 回日本自律神経学会 1998; 11.5-6. 東京.