<原 著>

Lisuride hydrogen maleate 投与による老齡ラット脳ムスカリン性 アセチルコリンレセプターの改善

— 一定量のレセプター・オートラジオグラフィー法による検討 —

高山 晴彦 浅沼 幹人 水川 公直 平田 洋
佐藤 博彦 太田 善介 小川 紀雄

<要 約> 若齡ラット (Fischer 系, 3 カ月齡) と老齡ラット (Fischer 系, 24 カ月齡) を用いて, ムスカリン性アセチルコリンレセプター (mACh-R) の加齡による変化とそれらに対する Lisuride hydrogen maleate (以下 lisuride) の慢性投与の効果をレセプター・オートラジオグラフィー法と画像解析装置による定量法を組合わせて検討した。

老齡ラットでは若齡ラットに比べ mACh-R は前頭葉, 線条体, 側坐核と扁桃核で著しく減少していた。老齡ラット群に lisuride の慢性投与 (0.05mg/kg/日, 14日間) を施行したところ, 上記脳部位および頭頂葉で加齡に伴う mACh-R 結合の減少がほぼ若齡ラットのレベルまで有意に増加した。このような加齡に伴い減少した mACh-R 結合の lisuride の慢性投与による増加は, lisuride の治療効果発現の基本をなしているものと推定される。

Key words : ムスカリン性アセチルコリンレセプター, オートラジオグラフィー, 老化, Lisuride hydrogen maleate

結 言

高齢化社会を迎えて加齡に伴う各種高次脳機能の低下や老年期痴呆が社会問題となり, その治療薬の開発が盛んである。近年, 脳血管障害後遺症の治療のためには優れた薬剤が次々と開発されるようになり, それらのうちのいくつかには老年期の痴呆患者に対する治療薬としての応用も試みられている。

一般に痴呆の中核症状である知的機能の低下にはアセチルコリン (ACh) 系神経機構の機能低下がその主役であるとされている。ことに, Alzheimer 型痴呆 (以下 ATD と略す) の患者脳の脳大皮質においては ACh 合成酵素の著しい低下が見られることから ACh 自体も減少していると考えられている¹⁾²⁾。しかし, ACh を補充する治療の試みはごく最近の少数例の成功の報告³⁾まではいずれも失敗していた。これは, たとえ減少

している神経伝達物質を補充しても, レセプター側の機能が正常でないために, 治療効果が現われないことが考えられる。したがって, レセプターに直接作用するか,あるいは, レセプターの機能あるいは数を増加させる薬剤が, 治療効果を上げる可能性がある⁴⁾。

Lisuride hydrogen maleate (以下 lisuride) は麦角アルカロイド誘導体で, わが国では脳血管障害後遺症患者における意欲低下・情緒障害の治療に用いられている⁵⁾。一方, ヨーロッパにおいては高用量の lisuride がパーキンソン病の治療薬として使用されている⁶⁾。動物実験においては, 多種類の神経伝達機構に作用すると報告されているが, 最近我々は, ACh 系神経機構に対しても強い作用力を有していることを見いだした⁷⁾。

そこで今回我々は ACh 系神経機構のうちシナプス後膜上のレセプターに対する作用を知る目的で, 老齡ラット脳におけるムスカリン性 ACh レセプターの減少に及ぼす lisuride 慢性投与の効果をレセプター・オートラジオグラフィー法を用いて定量的に検討した。

H. Takayama, H. Hirata, H. Sato, Z. Ota : 岡山大学医学部第三内科学教室

K. Mizukawa : 岡山大学医学部解剖学教室

M. Asanuma, N. Ogawa : 岡山大学医学部脳代謝研究施設

受付日 : 1991. 4. 22, 採用日 : 1991. 7. 17

方 法

24カ月齢 Fischer 344雄ラットに lisuride (Eunal[®], 日本シェーリング) 0.05mg/kg を連日14日間腹腔内投与し、最終注射の24時間後に断頭屠殺した。3カ月齢ラットと対照群の24カ月齢ラットに対しては、同量の溶媒(生理食塩水)を同じ期間腹腔内投与した。レセプター・オートラジオグラフィーの方法は既に報告した方法⁸⁾⁹⁾によったが、その概略は以下の通りである。断頭屠殺したラットの脳をすみやかに取り出し凍結後、12 μ m の厚さの前額断凍結切片を作成しゲラチンコートしたスライドガラス上に載せた。このスライドガラスを50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) で2~4分間 preincubate した後、同じ Tris 緩衝液に1nM になるように希釈した [³H] quinuclidinyl benzilate ([³H] QNB) 液の中で20℃で2時間 incubate し、切片上の mACh-R に [³H] QNB を結合させた。このように処理したスライドガラスをよく洗浄したのち乾燥させ可視化のためにマクロオートラジオグラフィー法を施行した。すなわち、切片上に [³H] 感受性フィルム(ハイパーフィルム; Amersham 社)をかぶせて密着させ、Amersham 社のマイクロスケール (RPA. 523) と共にレントゲンカセットに入れ、しっかりと密着させた状態で4℃で暗室内に入れて2週間露出をさせた。2週間後、フィルムを型のごとく現像定着し、得られたオートラジオグラムを画像解析装置 (RAS-1000, Amersham 社) によってカラー表示化すると共に optical density を定量化した。

なお、3カ月齢、対照群の24カ月齢、lisuride 処置群の24カ月齢ラット脳は凍結切片を作製した後は、同一の bath の中で [³H] QNB を結合させ、同一の一枚のフィルムに感光させた後現像した。このようにすべての操作過程を同一にすることで3者の比較を行いやすいように工夫した。

成 績

図1は検討したラット脳の線条体と海馬を含む前額断面の模式図を、図2は線条体、図3は海馬を含む前額断面のオートラジオグラムを画像解析装置で疑似カラー化した結果である。図2、3から明らかのように mACh-R は若齢(3カ月齢)ラットでは、線条体に最も高濃度に存在し、さらに海馬や大脳皮質にも高濃度に存在することがわかる。しかし、老齡(24カ月齢)ラットでは線条体、側坐核と大脳皮質の深層において

図1 ラット脳の前額断面の模式図。(上段:線条体を含む断面;下段:海馬を含む断面) Cg:帯状回, Fr:前頭葉, Par:頭頂葉, Pir:梨状回, Tem:側頭葉, Str:線条体, Acc:側坐核, CA1:海馬CA1領域, CA3:海馬CA3領域, DG:海馬歯状回, Amy:扁桃核, Th:視床

mACh-R は減少していた。(図2B, 図3B)。さらに老齡ラットに lisuride を2週間注射したものは、減少していた mACh-R 結合が回復している傾向がみられた。この回復は線条体、側坐核と大脳皮質の頭頂葉に顕著であった(図2C, 図3C)。

これら加齢による [³H] QNB 結合の変化と lisuride 注射による増加度を客観的に検討するために、得られたオートラジオグラムから画像解析装置によって optical density を算出した(図4)。このグラフに示すように、前頭葉および頭頂葉皮質(特に深層)、線条体、側坐核と扁桃核において、lisuride 処置により有意に mACh-R 結合が回復していた。しかし、その他の脳部位(大脳皮質側頭葉、帯状回、梨状回、海馬、視床)

図2 疑似カラー表示化した mACH-R のオートラジオグラム (線条体を含む断面)。A: 若壮年, B: 老齢 (対照群), C: 老齢 (lisuride 注射群)

図3 疑似カラー表示化した mACH-R のオートラジオグラム (海馬を含む断面)。A: 若壮年, B: 老齢 (対照群), C: 老齢 (lisuride 注射群)

においては lisuride 投与による mACH-R の有意な回復はみられなかった。

考 察

ACh 神経伝達機構が記憶・学習能力の発揮のために重要な役割を果たしていることは、古くから動物実験で明らかにされている^{10)~12)}。さらに ATD 患者脳で ACh 系神経機構の著しい障害のあることが判明したことから¹¹⁾、記憶能力が維持されるためには ACh 系神経機構が正常に作動していることが必須であると考えられている。はじめに述べたように著者らは神経伝達物質機構の変化を解析するに当たってそのレセプターの変化を検討することが重要であると考え、本研究では mACH-R の加齢による変化と、それに対する lisuride 投与の効果を検討した。

老齢ラット脳においては、 $[^3\text{H}]$ QNB 結合で調べた

mACH-R が若齢ラットに比較して減少しており、ことにレセプターが多く存在する線条体、側坐核、大脳皮質での減少がみられ既報¹³⁾と一致するが、海馬では著変なかった(図2, 3)。この差異は現時点では明らかではないが、老齢ラットの大脳皮質での mACH-R の減少も程度が軽かったことより、生育環境の違いのためか、今回使用した老齢ラットの老化の程度が全体的にみると軽かったためかも知れない。老齢ラットに lisuride を連日投与した場合には加齢に伴って減少していた mACH-R 結合は回復し、画像解析装置による定量的測定によって、客観的にこのことが裏付けられた(図4)。老齢ラットへの lisuride 投与は前頭葉および頭頂葉皮質(特に深層)、線条体、側坐核と扁桃核における mACH-R 結合能の低下を回復させた。海馬に対する lisuride の作用はみられていないが、神経伝達物質レセプターに対するこの種の薬剤は正常状態では作用

図4 画像解析装置によって得られた脳各部位別各群のオートラジオグラムの optical densities, 値は mean $\pm$ SEM (n = 4), +p < 0.05, ++p < 0.01: 老齡ラット群 (対照) と若壯年ラット群との比較 (one-way ANOVA); *p < 0.05, **p < 0.01: lisuride 注射老齡ラット群と老齡ラット群 (対照) との比較 (one-way ANOVA).

せず, 減少している場合に, 増加作用を示すものであり¹³⁾, 今後検討を重ねていく必要があるものと思われる。

前頭葉は本来創造性に関係があり, 自分で計画を立て意欲を持って事柄を押し進めるということに重要な働きをしていると考えられ, 一方, 線条体および側坐核は脳基底核に属し, 運動機能に重要な働きをしている。また, 扁桃核は脳辺縁系に属し, 情動行動と密接な関係にある。ところで, 臨床的には現在わが国で市販されている lisuride 錠は, 脳血管障害に伴う意欲低下・情緒障害に健康保険適応となっているが, 著者らは脳血管障害に伴うパーキンソニズムにも効果を発揮していると考えている¹⁴⁾。Lisuride は麦角アルカロイド剤であり, 多種類の神経伝達機構に作用を有すると報告されている。その主なものはノルアドレナリン神経機構¹⁵⁾¹⁶⁾, ドパミン神経機構¹⁵⁾¹⁷⁾, セロトニン神

経機構¹⁵⁾¹⁸⁾¹⁹⁾などである。さらに最近, 著者らは lisuride に脳虚血に伴う ACh の減少を強力に予防する効果のあることを報告した⁷⁾。パーキンソニズムは, 基底核領域の多発性脳梗塞で出現するが, 線条体における ACh ニューロンは内因性 ACh ニューロンであり, 黒質一線条体系ドパミンニューロンにより抑制的に制御されている²⁰⁾。Lisuride はドパミンレセプターに対するアゴニストであり, 線条体の内因性 ACh ニューロンは lisuride 投与により抑制され, ACh の放出が減少し, ACh 含量は見かけ上増加する。これに対応して mACh-R は up-regulate され [³H] QNB 結合は増加し, 本実験結果と一致する。つまり, 線条体に対しては lisuride の作用はドパミン系の作用が有意であり, ACh 系は二次的なものである。

以上のことより, 今回の実験成績は lisuride が高齡個体における意欲の低下や運動機能の低下, および情緒障害に対して効果のあることを裏付けている。

文 献

- 1) Davies P, Maloney AJF: Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* ii: 1403-1404, 1976.
- 2) Perry EK, Perry RH, Blessed G, Tomlinson BE: Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet* i: 189, 1977.
- 3) Summers WK, Majovski LV, Marsh GM, Tachiki K, Kling A: Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type. *N Engl J Med* 315: 1241-1245, 1986.
- 4) 小川紀雄: 知的機能とニューロトランスミッター. *Clin Neurosci* 5: 534-539, 1987.
- 5) 大友英一, 沓沢尚之, 後藤文男, 田崎義昭, 伊藤栄一, 阿部 裕, 尾前照雄, 藤島正敏, 小川暢也, 長谷川和夫: 脳血管障害に対する SH-1072 (lisuride hydrogen maleate: Eunal) の有用性—ifenprodil tartrate を対照薬とした多施設二重盲検法による検討—. *医学のあゆみ* 139: 927-957, 1986.
- 6) McDonald RJ, Horowski R: Lisuride in treatment of parkinsonism. *Eur Neurol* 22: 240-255, 1983.
- 7) Ogawa N, Haba K, Yoshikawa H, Kawata M, Sato H: Effects of lisuride hydrogen maleate on ischemia-induced depletion of brain acetylcholine levels in gerbils. *Clin Therapeutics* 11:

- 241—246, 1989.
- 8) 水川公直 : レセプターの形態学的研究法. 新・脳のレセプター, 小川紀雄 編著. 世界保健通信社, 大阪, 1989, p51—81.
 - 9) Ogawa N, Mizukawa K, Hirose Y, Kajita S, Ohara S, Watanabe Y : MPTP-induced parkinsonian model in mice : Biochemistry, pharmacology and behavior. *Eur Neurol* 26(Suppl 1) : 16—23, 1987.
 - 10) Deutch JA, Hamburg MD, Dahl H : Anticholinesterase-induced amnesia and its temporal aspects. *Science* 151 : 221—223, 1966.
 - 11) Deutch JA, Lutzky H : Memory enhancement by anticholinesterase as a function of initial learning. *Nature* 213 : 742, 1967.
 - 12) Squire LR : Physostigmine : Effects on retention at different times after brief training. *Psychonomic Sci* 19 : 49—50, 1970.
 - 13) 小川紀雄, 水川公直, 小野 剛, 吉川 寛 : Bifemelane Hydrochloride による老齢ラット脳内ムスカリン性アセチルコリン受容体結合能の改善. *Geriatr Med* 26 : 1915—1920, 1988.
 - 14) 小川紀雄, 佐藤博彦, 小倉俊郎, 太田善介, 山本光利 : パーキンソンニズムに対する Lisuride の治療効果. *Geriatr Med* 27 : 1043—1049, 1989.
 - 15) Martin GE, Williams M, Pettibone DJ, Zrada MM, Lotti VJ, Taylor DA, Jones JH : Selectivity of (+)-4-Propyl-9-Hydroxynaphthoxazine [(+)-PHNO] for dopamine receptors in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 233 : 395—401, 1985.
 - 16) Kehr W : Effect of lisuride and other ergot derivatives on monoaminergic mechanisms in rat brain. *Eur J Pharmacol* 41 : 261—273, 1977.
 - 17) 原 公生, 生駒幸弘, 押野 臨 : 麦角アルカロイド誘導体, Lisuride の中枢ドーパミン作動作用—行動薬理学的研究—. *日薬理誌* 80 : 1—13, 1982.
 - 18) Rosenfeld MR, Makman MH : The interaction of lisuride, an ergot derivative, with serotonergic and dopaminergic receptors in rabbit brain. *J Pharmacol Exp Ther* 216 : 526—531, 1981.
 - 19) 原 公生, 生駒幸弘, 富士枝繁, 山野勝子, 押野臨 : 麦角アルカロイド誘導体, Lisuride の中枢作用—体温調節機能への影響—. *薬理と治療* 10 : 3037—3049, 1982.
 - 20) De La Mora MT, Fuxe K : Brain GABA, dopamine and acetylcholine interactions. 1. Studies with oxotremorine. *Brain Res* 135 : 107—122, 1977.

Abstract

Chronic Administration of Lisuride Hydrogen Maleate Increases Muscarinic Acetylcholine Receptor Binding in Aged Rat Brain

Haruhiko Takayama, Masato Asanuma*, Kiminao Mizukawa**, Hiroshi Hirata, Hirohiko Sato, Zensuke Ota and Norio Ogawa*

Changes in the distribution and densities of muscarinic acetylcholine receptors (mACh-R) in young adult and aged rat brain, and the effects of chronic administration of lisuride hydrogen maleate (lisuride) on these changes were studied by in vitro quantitative autoradiography of [³H] quinuclidinyl benzilate binding. mACh-R was relatively higher in the striatum, hip-

pocampus and cerebral cortex in the young adult rats. In contrast, mACh-R binding was markedly reduced in the striatum, accumbens nucleus, amygdaloid nucleus and frontal cerebral cortex of aged rats compared to young adult rats. However, chronic administration of lisuride significantly increased mACh-R binding in the parietal cerebral cortex as well as in the above-mentioned regions in aged rats. This lisuride-induced increase in mACh-R of aged rat brain is considered to have important implications concerning the mechanism of therapeutic efficacy of lisuride.

key words: *muscarinic acetylcholine receptor, autoradiography, aging, lisuride hydrogen maleate*
(*Jpn J Geriatr* 29: 24—28, 1992)

Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

* Institute for Neurobiology, Okayama University Medical School

** Department of Anatomy, Okayama University Medical School