

原

著

マインルト基底核破壊ラットにおける大脳皮質
アストロサイトの反応性に関する研究

新潟大学脳研究所神経内科学部門 (主任: 辻 省次教授)

姉崎 利治

Remote Astrocytic Response of Prefrontal Cortex Caused
by the Lesions in the Nucleus Basalis of Meynert

Toshiharu ANEZAKI

*Department of Neurology,
Brain Research Institute, Niigata University
(Director: Prof. Shoji TSUJI)*

The nucleus basalis of Meynert (nbM) was lesioned by injection of ibotenic acid and the prefrontal cortices were subjected to immunohistochemical and Western blot analysis for the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP). In some rats, vehicle was injected into the nbM and in others 6-hydroxydopamine (6-OHDA) was injected into the ventral tegmental area (VTA). Quantitative Western blot analysis revealed significantly greater immunoreactivity for GFAP in the prefrontal cortex of nbM-lesioned rats. Immunohistochemical examination revealed fibrous and hypertrophic GFAP-positive astrocytes even one day after surgery, and this reaction was stronger at three days after surgery. In contrast, GFAP-positive astrocytes were not observed in the brains of vehicle-injected or VTA-lesioned rats, even 21 days after surgery. The present results indicate that cortical astrocytes respond to cholinergic deafferentation. In addition, the expression of amyloid precursor protein (APP) in the reactive astrocytes were examined by immunohistochemical techniques with antibody against APP. The reaction of astrocytes was induced by the deposition of kainic acid (KA) on the dura or the infusion of ibotenic acid into the ipsilateral nbM. The expression of GFAP was observed in the cortical astrocytes induced by both treatment, but the expression of APP was observed only in the reactive astrocytes in the

Reprint requests to: Toshiharu ANEZAKI,
Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University,
Asahimachi-dori 1, Niigata City,
951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所神経内科 姉崎 利治

cortex injected with KA. This suggests that the reaction of astrocytes is heterogeneous dependent on the feature of the lesion.

Key words: reactive astrocyte, glial fibrillary acidic protein, β -amyloid precursor protein, nucleus basalis of Meynert, ventral tegmental area

反応性アストロサイト, グリア線維性酸性蛋白, アミロイド前駆体蛋白, マイネルト基底核, 腹側被蓋野

I. 緒 言

従来の神経生物学の概念からは、神経細胞が主体であり、周囲に存在するグリア細胞は単なる支持細胞として論じられることが多かった。しかし、近年の細胞生物学的研究の進歩により、グリア細胞がさまざまな神経栄養因子・サイトカインを分泌し、神経伝達物質の受容体を有していることが明らかとなり、神経細胞の生存・維持や機能にグリア細胞が重要な役割を果たしていると考えられるようになった。

さまざまな神経疾患において、病巣修復に対してアストロサイトの反応が観察されるが、アルツハイマー病においても、老人斑や神経原線維変化などとともに、GFAP陽性アストロサイトの出現をみることが知られている¹⁾。このアストロサイトの出現は、老人斑の程度とは必ずしも相関しないという報告²⁾もあり、老人斑形成などともなる二次的なものか、あるいはアストロサイト自体の一次的な反応かははっきりしない。アルツハイマー病の原因は不明であり、有効な治療法もないが、神経細胞の脱落の根本原因は解明されなくとも、神経細胞を支持するアストロサイトの機能を変えることを介して神経細胞死を防ぎ、治療への道を開くことができるのではないかと考え、アストロサイトの機能を解明するために、in vivo での新しい実験モデルを確立し検討を加えた。

アストロサイトを動かす in vivo での実験は stab injury³⁾ や cold injury⁴⁾ のように、主に、神経細胞に直接的な損傷をひきおこすモデルが多かったが、ラット脳外側膝状体破壊による視覚領 GFAP 陽性反応性アストロサイトの出現が報告され⁵⁾、直接的な病巣から離れた部位に観察される遠隔反応性アストロサイトの存在が明らかとなった。この遠隔反応性アストロサイトの出現機序や、さまざまな物質の発現については、十分に解明されておらず、直接的脳損傷に対して出現するアストロサイトと性質が異なるのではないかと考えた。そこで新たに、アルツハイマー病において高度に神経細胞が脱落するマイネルト基底核 (nbM) を破壊するモデルを作

成し、その被投射域である前頭葉皮質のアストロサイトの反応性を検討した。

また、老人斑の主な構成成分である β -蛋白の前駆体である amyloid precursor protein (APP) が、脳損傷周囲の反応性アストロサイトに出現することが報告されている⁶⁾。直接的な脳損傷に伴い出現するアストロサイトと遠隔反応性アストロサイトの反応メカニズムを比較するため、APP をマーカーとして免疫組織学的検討を加えた。

II. 実験方法

1. モデル動物の作成

実験には、200 g の雄 Wistar ラットを用いた。ハロセン麻酔下に、Paxinos and Watson の図譜⁷⁾に基づき、前頭葉皮質に acetylcholine (ACh) を投射するマイネルト基底核 (nbM) は Arendash, G.W. らの方法⁸⁾に従い、bregma より 1.1 mm 後方、正中より 2.4 mm 外側、頭蓋骨表面より 7.6 mm の深さに針を刺入し、microinjector pump (CMA100, Carnegie Medicine A/B) を用い、イボテン酸 (5 mg/ml) 1 μ l を 5 分間かけてゆっくり注入し破壊した。対照実験として前頭葉皮質に dopamine (DA) を投射する腹側被蓋野 (ventral tegmental area: VTA) を Herve, D. らの方法⁹⁾に基づき、bregma より後方 4.1 mm、正中より 0.5 mm 外側、8.7 mm の深さに針を刺入し、6-hydroxydopamine (6-OHDA) (2 mg/ml) 3 μ l を注入し破壊した。Sham 手術は、nbM 破壊と同様の手技で頭蓋骨に穴を開けるが針は刺入しないものとした。それぞれ、手術後 1, 3, 7, 21 日後に、エーテル麻酔下に速やかに断頭し、左右前頭葉皮質の一部を、Western blot analysis 用に -80 $^{\circ}$ C に保存し、後半分のスライスに 4% パラホルムアルデヒドにて浸潤固定後、パラフィン包埋し組織学的検討に用いた。

組織破壊の確認は、hematoxylin-eosin (H.E) 染色、Klüver-Barrera (KB) 染色にて行うとともに、nbM 破壊ラットは、choline acetyltransferase (ChAT)

(Boehringer Mannheim) 免疫染色を、VTA 破壊ラットは tyrosine hydroxylase (TH) (実験神経病理学教室 高橋助教授供与) 免疫染色を行うことにより免疫組織学的に ACh, DA 作動性ニューロンの破壊を確認した。

2. 前頭葉皮質 ACh, DA 濃度の測定

nbM および VTA の破壊を生化学的に確認するため、前頭葉皮質の ACh, DA 濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。nbM もしくは VTA 破壊3日後に、マイクロウェーブ (Toshida, microwave applicator) を照射 (5KW, 1.5 秒) にて屠殺し、前頭葉皮質を切り出した。DA は 0.1N 過塩素酸にてホモジナイズ後 15,000 rpm, 20分間遠心, ACh は 0.2N 過塩素酸にてホモジナイズ後 10,000 rpm, 20分間遠心し上清を得た。測定には電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー (BAS) を用い、DA 測定には Biophase ODS-VI column (BAS) を、ACh 測定用には Acetylcholine analysis column 51-5054 (BAS) を使用した。

3. 組織学的検討

nbM および VTA を破壊後、1, 3, 7, 21日の各群における前頭葉皮質のアストロサイトの反応性を、glial fibrillary acidic protein (GFAP) に対する免疫組織学的染色により検討した。GFAP 染色は、抗 GFAP ポリクローナル抗体 (Dakopatts) を用い、avidin-biotin peroxidase complex (Vector Lab.) と反応後、diaminobenzidine にて発色させた。

4. 前頭葉皮質 GFAP 蛋白量の定量

nbM および VTA 破壊3日目と Sham 手術ラットの、左側前頭葉皮質をホモジナイズし、15 μ g 蛋白量を 11% SDS/polyacrylamide gel にて電気泳動後、ニトロセルロース膜に電気泳動転写した。抗 GFAP 抗体 (Dakopatts) にて免疫染色後、avidin-biotin complex (Vector) と反応させ、4-chloronaphthol にて発色し、densitoscanner (CS910, Shimadzu) にて定量した。

5. 反応性アストロサイトにおける、Amyloid precursor protein (APP) の発現の検討

大脳皮質損傷に伴い、損傷部周辺に出現する反応性アストロサイトと、nbM 破壊に伴いその被投射域である前頭葉に出現する遠隔反応性アストロサイトを比較するため、APP を指標としてその免疫反応性を組織学的に検討した。

大脳皮質損傷モデルは、250 g の雄 Wistar ラットをハロセン麻酔下に、左前頭部頭蓋骨に硬膜、脳実質を傷つけないように直径 2mm の穴を開け、カイニン酸 (7.5

mg/ml) をしみこませたオキシセル綿を留置し作成した。nbM 破壊モデルは前述の方法で作成した。それぞれ組織破壊後 1, 3, 7, 21日後に、ピクリン酸—4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、20% ショ糖/PBS にて cryoprotection 後、急速凍結しクリオスタットにてミラー切片を作成した。それぞれを抗 GFAP 抗体 (Dakopatts), 抗 APP ポリクローナル抗体 (APP666-695: 東大脳研神経病理, 井原康夫教授供与¹⁰⁾) にて免疫染色を行った。

III. 結 果

1. nbM, VTA 破壊モデルの確立

nbM および VTA の破壊を、H.E 染色, K.B 染色にて確認した。nbM 破壊モデルでは、nbM に存在する大型のコリン作動性神経細胞が破壊され (Fig. 1), ChAT 免疫染色でも、ChAT 陽性細胞の減少を認めた。一方、VTA 破壊モデルでは、黒質の内側部にあたる VTA の神経細胞が破壊され (Fig. 2), TH 免疫染色でも TH 陽性神経細胞の減少を認めた。

さらに、nbM, VTA 破壊ラットの前頭葉皮質における、ACh, DA 濃度を HPLC を用いて測定した結果、nbM 破壊ラットでは ACh 濃度 102.3 ± 23.2 pmol/mg protein と、コントロール (191.8 ± 20.4 pmol/mg protein) に対し有意の低下を認めた (Fig. 3-a)。VTA 破壊ラットでは、DA 濃度 1488.0 ± 64.9 ng/g protein と、コントロール (2824.8 ± 753.9 ng/g protein) に比し有意の低下を認めた (Fig. 3-b)。このように組織学的、生化学的に破壊を確認したラットを用いて、前頭葉皮質のアストロサイトの反応性を GFAP をマーカーとして、免疫組織学的・免疫生化学的に検討した。

2. 前頭葉皮質における GFAP 免疫反応性

4% パラホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋切片においては、正常無処置ラットでは、大脳皮質第 I 層と白質のアストロサイトが抗 GFAP 抗体陽性となるが、Sham 手術ラットでは、第 II 層から第 VII 層のアストロサイトはごくわずかに染色されるのみであった。これに比し、nbM 破壊ラットでは、前頭葉皮質の第 I 層から第 VII 層にわたるまで広汎に GFAP 陽性の反応性アストロサイトの出現を認め、対側との間に明らかな差異を認めた (Fig. 4-A, B)。GFAP 免疫反応性は、nbM 破壊後 1 日目から出現し、3 日目に最大となり、突起を四方に伸ばし、胞体の肥大したアストロサイトが観察された。その後、7 日から 21 日と経過に伴い徐々に減少し、形態学的にもその胞体は縮小していった (Fig. 5)。一

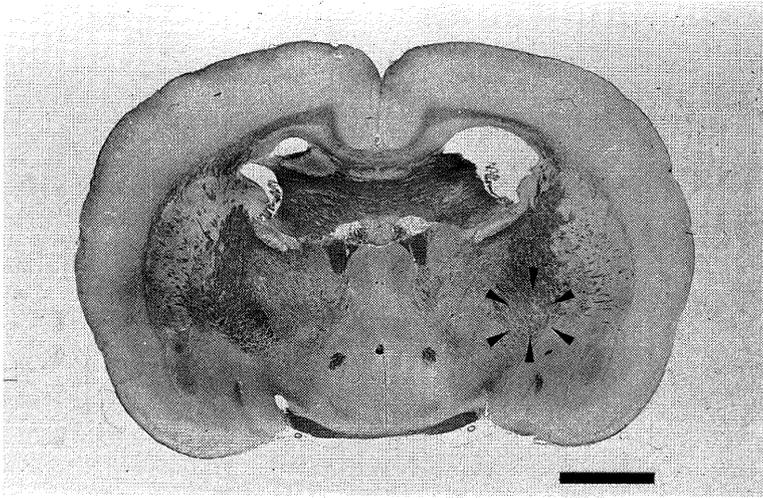


Fig 1 マイネルト基底核破壊3日後のラット脳 (Klüver-Barrera 染色)
矢印；イボテン酸注入部位 (Bar=2.0 mm)

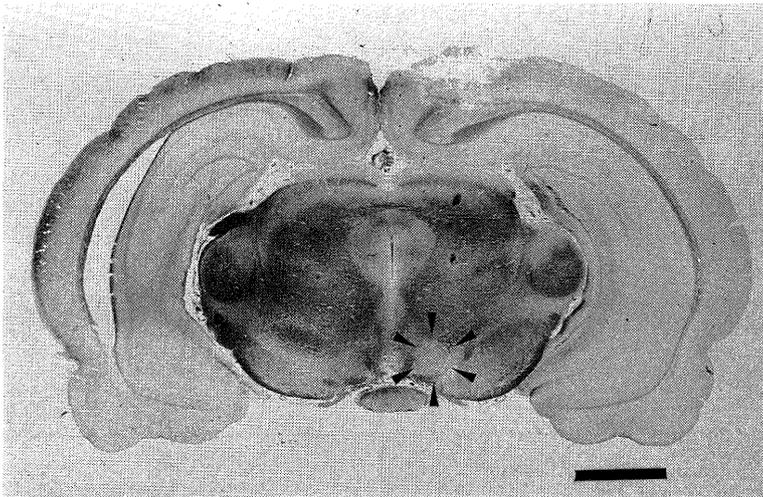


Fig 2 腹側被蓋野 (VTA) 破壊3日後のラット脳 (Klüver-Barrera 染色)
矢印；6-hydroxydopamine 注入部位 (Bar=2.0 mm)

方, VTA 破壊ラットでは, 対側との間にも明らかな差異は認められず (Fig. 4-C, D), 1~21日のいずれの経過中においても, GFAP 陽性の反応性アストロサイトの出現は認めなかった (Fig. 6). さらに GFAP 免疫反応性を定量的に評価するため, nbM, VTA 破壊3日目の前頭葉皮質ホモジネートを用い, Western blot

analysis を行った. その結果, 無処置ラットに比し, nbM 破壊ラットでは明らかに GFAP の増加を認めた (Fig. 7-a). デンシトメーターによる定量的解析の結果, nbM 破壊ラットでは sham 手術ラットに比し, GFAP の有意の上昇を認めたが, VTA 破壊ラットでは明らかな上昇を認めなかった (Fig. 7-b).

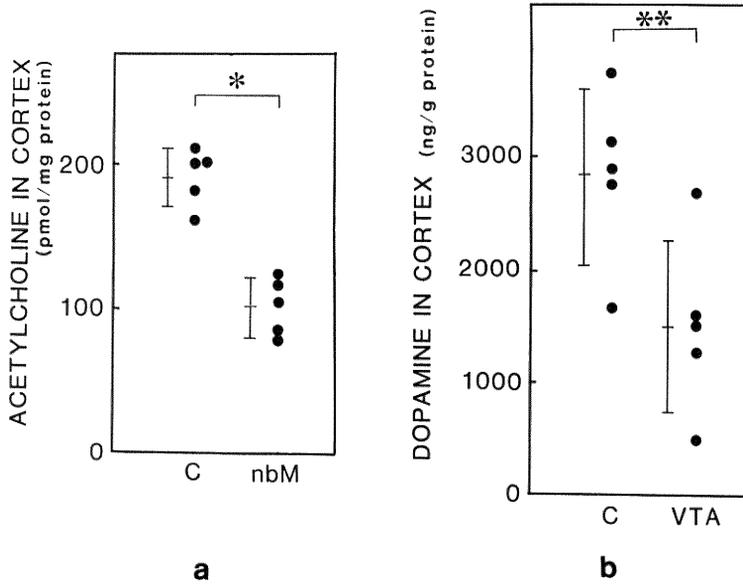


Fig 3 a : 前頭葉皮質ホモジネートの Acetylcholine 濃度
 C : control
 nbM : マイネルト基底核破壊ラット * p < 0.01
 b : 前頭葉皮質ホモジネートの Dopamine 濃度
 C : control
 VTA : 腹側被蓋野破壊ラット ** p < 0.05

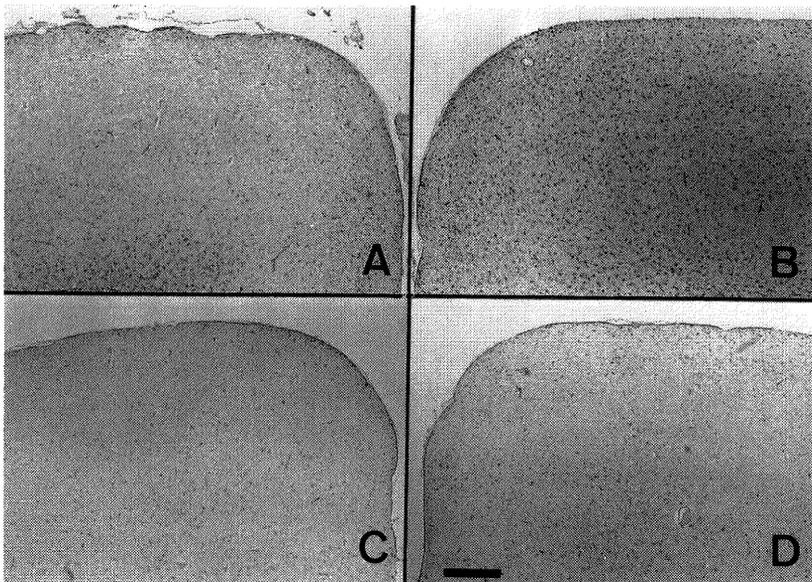


Fig 4 マイネルト基底核・腹側被蓋野破壊3日後の前頭葉皮質アストロサイト (GFAP 免疫染色) (Bar=0.1 mm)
 A, B : マイネルト基底核破壊ラット C, D : 腹側被蓋野破壊ラット
 A : 非破壊側 C : 非破壊側
 B : 破壊側 D : 破壊側

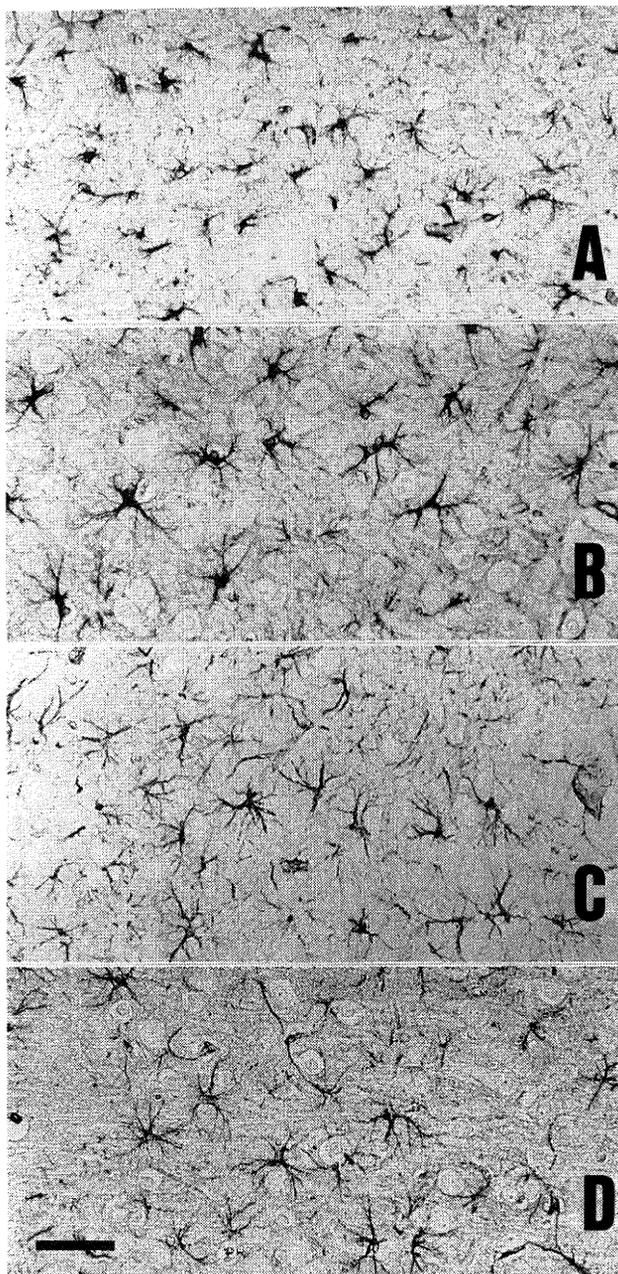


Fig 5 マイネルト基底核破壊ラットの前頭葉皮質
GFAP 免疫反応性の経時的変化
A, B, C, D: それぞれ破壊1, 3, 7,
21日後 (Bar=20 μ m)

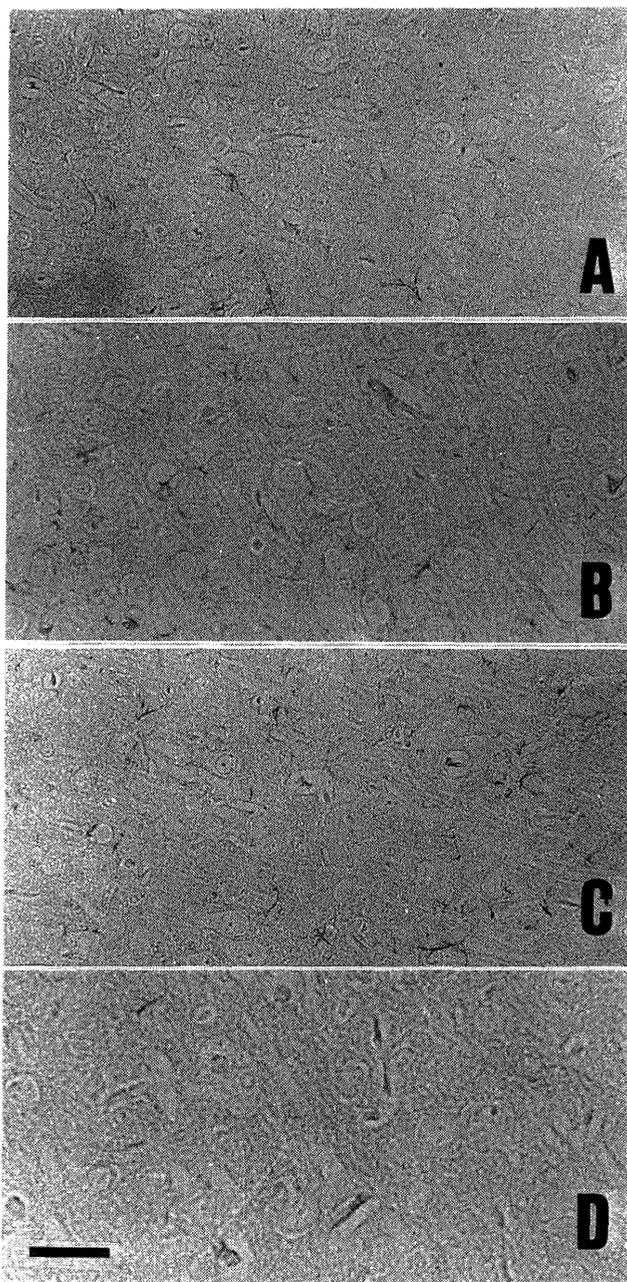


Fig 6 腹側被蓋野破壊ラットの前頭葉皮質の GFAP 免疫反応性の経時的変化
A, B, C, D: それぞれ破壊 1, 3, 7, 21日後 (Bar=20 μ m)

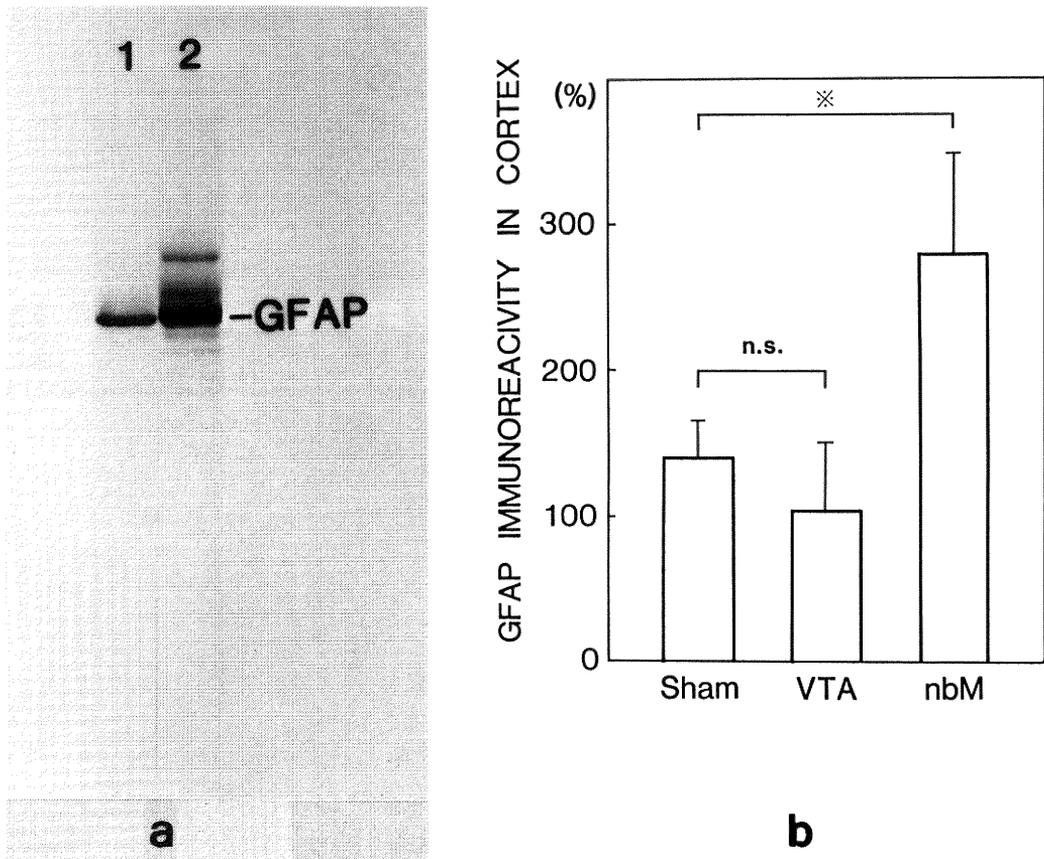


Fig 7 Westren blot analysis

a : ラット前頭葉皮質ホモジネートの Immunoblot (GFAP 免疫染色)
 Lane 1 : control
 Lane 2 : マイネルト基底核破壊ラット
 b : GFAP 免疫反応性定量
 Sham : sham 手術ラット
 VTA : 腹側被蓋野破壊ラット
 nbM : マイネルト基底核破壊ラット
 * p < 0.01

3. 脳損傷モデルと nbM 破壊モデルにおける反応性アストロサイトの APP 免疫反応性について

我々の作製した、カイニン酸を浸潤させた綿を硬膜上に置く直接的脳損傷のモデル動物は、needle injury のような広範な壊死を伴わず、大脳皮質第Ⅱ～Ⅲ層までの神経細胞を障害することを可能とした。この直接損傷モデルと nbM 破壊モデルを用いて、APP の発現を免疫組織学的に検討した。APP のC末 666-695 に対する抗体は、ピクリン酸-4%パラホルムアルデヒド固定・凍

結切片では、正常ラット脳の神経細胞の胞体を染色したが、アストロサイトについては、皮質第Ⅰ層のアストロサイトの一部を染色するのみであった。カイニン酸による脳損傷モデルでは、皮質第Ⅰ層と損傷部周囲に APP 陽性細胞の出現を認めた (Fig. 8-A, B) が、ミラー切片でこれらの細胞は GFAP 陽性の反応性アストロサイトであることが確認された (Fig. 9-A, B)。反応性アストロサイトにおける APP 免疫反応性は損傷後1日目から出現し、3日目に最も強く、以後漸減した。損傷部から離れた部位に出現する GFAP 陽性反応性アスト

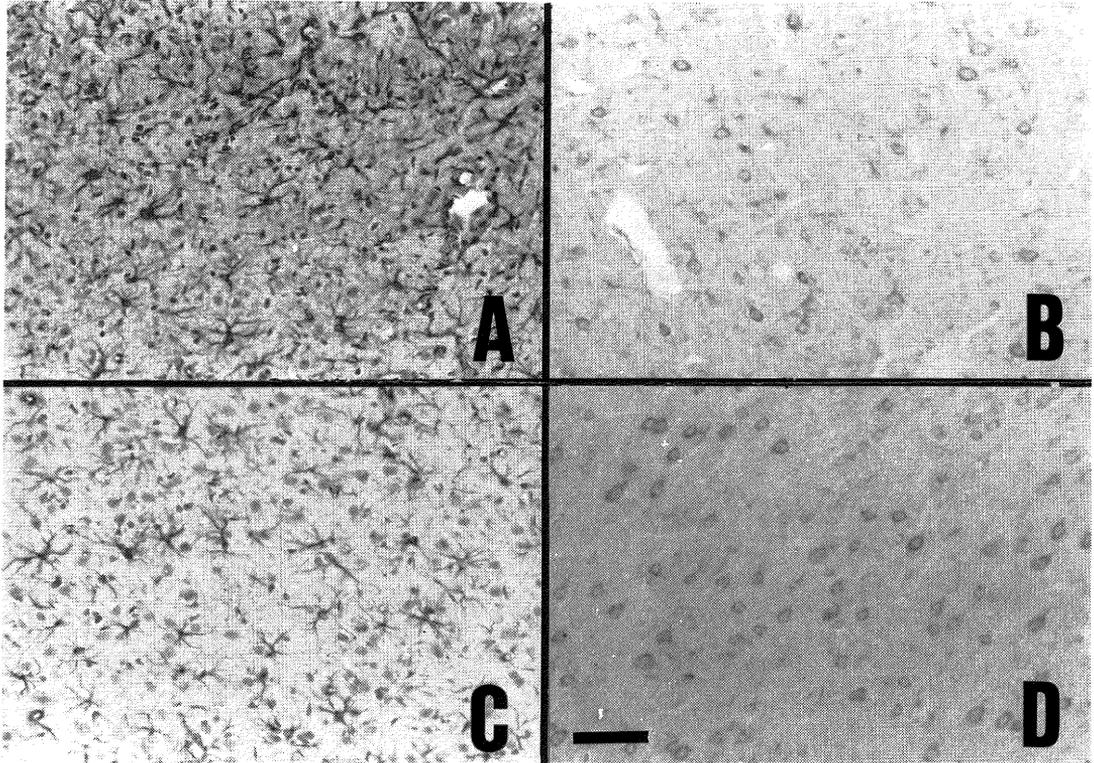


Fig 8 大脳皮質損傷モデルとマイネルト基底核破壊モデルでの APP, GFAP 免疫組織化学 (ミラー切片) (弱拡大) (Bar=30 μ m)

A, B: カイニン酸皮質損傷モデル

A: GFAP 免疫染色

B: APP 免疫染色

C, D: マイネルト基底核破壊モデル

C: GFAP 免疫染色

D: APP 免疫染色

ロサイトは APP 陰性であった。一方, nbM 破壊に伴い前頭葉皮質に出現する反応性アストログリアには, 1~21日後のいずれの経過においても APP 免疫反応性を認めなかった (Fig. 8-C, D, 9-C, D)。

IV. 考 察

アストロサイトの機能を研究する in vivo の実験系としては, stab injury³⁾, cold injury⁴⁾ などの直接的な脳損傷モデルが用いられることが多かったが, Isacson により, 線条体をイボテン酸にて破壊することによりその被投射域である淡蒼球・黒質・大脳皮質に GFAP 陽性反応性アストロサイトが出現することが発表¹¹⁾ されてから, 遠隔反応性アストロサイトが注目され, これを観察するいくつかのモデルが報告されている⁶⁾。我々が作製した, 前頭葉皮質に ACh を投射する nbM と, DA

を投射する VTA を破壊する新たな実験モデルでは, nbM 破壊モデルにおいてのみ前頭葉皮質に反応性アストロサイトの出現を見た。VTA 破壊では認められなかったことより, これらの反応は単なる anterograde degeneration によるものではなく, cholinergic deafferentation に特異的に生ずる反応である可能性が推察された。nbM, 青斑核, 縫線核を破壊し脳代謝を観察した研究では, nbM 破壊による ACh の低下により脳代謝が低下する¹²⁾ が, noradrenalin¹³⁾, serotonin¹⁴⁾ 作動性ニューロンの deafferentation では脳代謝の低下は認められないと報告されており, 大脳皮質においては, ACh が重要な働きをしているものと思われ, アストロサイトの反応も cholinergic deafferentation に伴い特異的に生じた反応である可能性が考えられた。

この遠隔反応性アストロサイトが, 周囲のいかなる刺

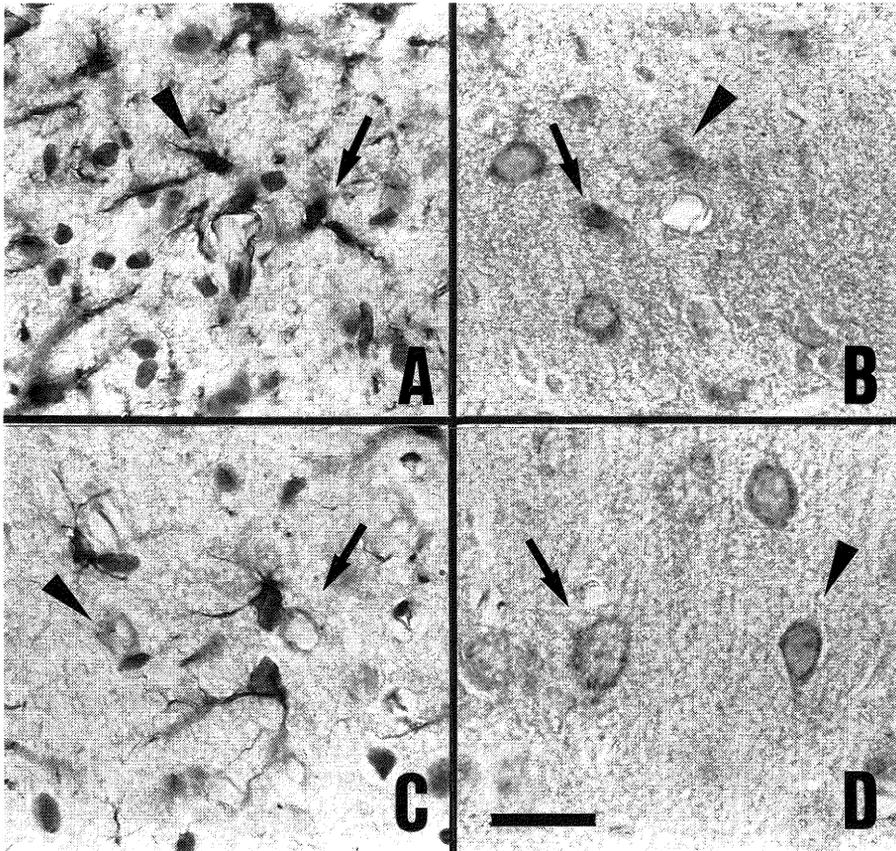


Fig 9 大脳皮質損傷モデルとマイネルト基底核破壊モデルでの APP, GFAP 免疫組織化学 (ミラー切片) (強拡大) (Bar=5 μ m)

A, B: カイニン酸皮質損傷モデル

A: GFAP 免疫染色

B: APP 免疫染色

矢印 (→・▲) は, それぞれ同じアストロサイトを示す.

C, D: マイネルト基底核破壊ラット

C: GFAP 免疫染色

D: APP 免疫染色

矢印 (→・▲) は, それぞれ同じ神経細胞を示す.

激に反応して, 反応性アストロサイトに変化するかは不明である. 光顕レベルでは, 前頭葉皮質の神経細胞に形態学的な変化は認められない. 電顕レベルでは, 神経細胞に形態学的変化はなく, シナプス小胞が増加しそれをアストロサイトの foot が取り囲む所見などが認められると報告¹⁶⁾されており, シナプスの変化に対しアストロサイトが反応している可能性が考えられる. いずれにせよ, nbM 破壊モデルでは, 神経細胞が生存し, 明らかな形態変化を呈さない環境の中で GFAP 陽性の反応

性アストロサイトが出現しており, 隣接する神経細胞が直接的に障害を受けている stab injury などの病変とは性格が異なるので, アストロサイトの機能を解明する新たなモデルとして有用と思われる.

stab injury などの直接的な脳損傷に伴い出現するアストロサイトと, nbM 破壊に伴い出現する遠隔反応性アストロサイトの発現機序を比較するため, APP 免疫反応性を免疫組織学的に検討した. APP の発現については, 側脳室にカイニン酸を注入するモデル⁶⁾や, stab

injury モデル²⁰⁾²¹⁾においてその病巣周囲の反応性アストロサイトに APP が発現することが確認されている。我々のカイニン酸による障害モデルにおいても、病巣周辺部と大脳皮質分子層 (I層) のアストロサイトに APP 免疫反応性を認めた。一方、nbM 破壊ラットでは、GFAP 陽性の遠隔反応性アストロサイトに APP 免疫反応性は認められず、APP 免疫反応性については異なった所見がみられた。しかし、直接的な脳損傷モデルでも、病巣からやや離れた部位に出現する GFAP 陽性アストロサイトは APP 陰性であり、必ずしも全ての反応性アストロサイトが APP を発現しているわけではなかった。以上のように、GFAP 免疫染色上は陽性で、いわゆる GFAP 陽性の反応性アストロサイトと呼ぶべきアストロサイトではあるが、APP 免疫反応性はそれぞれ異なっており、病巣の性格・程度によりその反応態度が異なることが明かとなった。

Takamiya ら¹⁵⁾は、stab injury に伴い出現する反応性アストロサイトを BrdU, vimentin 免疫染色, ³H-Thymidine の取り込み所見などからさらに細分類している。vimentin はグリア細胞の主要な細胞骨格蛋白であり、幼若期のアストロサイトに存在し成熟に伴い消失するが、脳損傷にともない一過性に皮質分子層と損傷周囲に出現する。BrdU 免疫染色や ³H-Thymidine 取り込み細胞の分布の検討から、分裂増殖するアストロサイトにのみ一過性に発現すると考えられている。一方、損傷部からやや離れた周辺部に出現するアストロサイトは浮腫に関連して出現すると考えられているが、これは vimentin 陰性であった。これらの結果から、GFAP 陽性の反応性アストロサイトのなかには、① 分裂増殖し、グリアフィラメントの豊富なアストロサイトになるものと、② 単にグリアフィラメント蛋白の合成が一過性に増加するアストロサイトが存在すると述べている。APP も脳損傷モデルの皮質分子層と損傷周囲の反応性アストロサイトにのみ発現しており、vimentin の分布と似ており、損傷に伴い一過性に分裂増殖したアストロサイトにのみ発現している可能性がある。一方、nbM 破壊による遠隔反応性アストロサイトでは、GFAP 蛋白合成は増加するものの、APP の upregulation はおこらないと考えられる。この反応性の違いは、刺激の強さによるものか、刺激の性格によるものかははっきりしないが、GFAP 免疫反応性には差がなく、GFAP の upregulation は同程度であると考えた。以上の結果より、病巣の違いによりアストロサイトでの APP 発現機序が異なることが明らかとなった。

アルツハイマー病における、GFAP 陽性アストロサイトの発現機序は不明であるが、老人斑の程度とは相関しないという報告もあり、二次的なものか、一時的な反応かははっきりしない。一方、アルツハイマー病では nbM のコリン作動性ニューロンの著明な脱落を認め、大脳皮質では cholinergic deafferentation が起こっていると考えられる。したがって nbM 破壊モデルはアルツハイマー病でのアストログリアの動態を調べる上で有効なモデルと考えられる。

謝 辞

稿を終えるに当たり、終始御指導いただき、御校閲を賜りました辻 省次教授に深謝致します。また直接御指導いただきました東京大学脳研究施設神経病理 柳澤勝彦先生、国立療養所西小千谷病院 石川 厚先生、国立循環器病センター神経内科 宮下光太郎先生、国立療養所犀潟病院神経内科 中島 孝先生、新潟大学脳研究所神経内科 犬塚 貴先生、保住 功先生、石黒英明先生、新潟大学脳研究所実験神経病理 高橋 均助教授、生田房弘教授に深謝致します。諸橋イネ子さん、平原美智子さん、阿部裕有子さんの御協力に感謝いたします。また研究の道を与えて下さいました元新潟大学脳研究所神経内科宮武 正教授に心から感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Delacourte, A.: General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. *Neurology*, **40**: 33~37, 1990.
- 2) Schechter, R., Yen, S.H.C. and Terry, R.D.: Fibrous astrocytes in senile demintia of Alzheimer type, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **40**: 95~101, 1981.
- 3) Mathewson, A.J. and Berry, M.: Observation on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rat *Brain Res.*, **327**: 61~69, 1985.
- 4) 若林考一, 生田房弘: アストロサイトの発生分化, 脳病巣修復と Nerve Growth Factor, *神経進歩*, **37**: 601~610, 1993.
- 5) Hajos, F., Kalman, M., Zilles, K., Schleicher, A. and Sotonyi, P.: Remote astrocytic response as demonstrated by glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry in the visual cortex of dorsal lateral geniculate nucleus lesioned rats.

- Glia, **3**: 301~310, 1990.
- 6) **Siman, R., Card, P., Nelson, R.B. and Davis, L.G.**: Expression of β -amyloid precursor protein in reactive astrocytes following neuronal damage, *Neuron*, **3**: 275~285, 1989.
 - 7) **Paxinos, G. and Watson, C.**: The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, New York, 1982.
 - 8) **Arendash, G.W., Millard, W.J., Dunn, A.J. and Meyer, E.M.**: Long-term neuropathological and neurochemical effects of nucleus basalis lesions in the rat, *Science*, **238**: 952~956, 1987.
 - 9) **Herve, D., Trovero, F., Blanc, G., Vezina, P., Glowinski, J. and Tassin, J.P.**: Involvement of dopamine neurons in the regulation of α -adrenergic receptor sensitivity in rat prefrontal cortex, *J. Neurochem.*, **54**: 1864~1869, 1990.
 - 10) **Takio, K., Hasegawa, M., Titani, K. and Ihara, Y.**: Identification of protein precursor in newborn rat brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**: 1296~1301, 1989.
 - 11) **Isacson, O., Fisher, W., Wictorin, K., Dawbarn, D. and Bjorklund, A.**: Astroglial response in the excitotoxically lesioned neostriatum and its projection areas in the rat. *Neuroscience*, **20**: 1043~1056, 1987.
 - 12) **Kiyosawa, M., Baron, J.-C., Hamel, E., Pappata, S., Duverger, D., Riche, D., Mazoyer, B., Naguet, R. and MacKenzie, E.T.**: Time course of effects of the nucleus basalis of Meynert on glucose utilization by the cerebral cortex. *Brain*, **112**: 435~455, 1989.
 - 13) **Savaki, H.E., Graham, D.I., Grome, J.J. and McCulloch, J.**: Functional consequences of unilateral lesion of locus coeruleus: a quantitative [14 C] 2-Deoxyglucose investigation. *Brain Res.*, **292**: 239~249, 1984.
 - 14) **Cudennec, A., Duverger, D., Nishikawa, T., McKrae-Degueurce, A., McKenzie, E.T. and Scatton, B.**: Influence of ascending serotonergic pathways on glucose use in the conscious rat brain. I. Effects of electrolytic or neurotoxic lesions of the dorsal and/or median raphe nucleus. *Brain Res.*, **444**: 214~226, 1988.
 - 15) **Takamiya, Y., Kohsaka, S., Toya, S., Otani, M. and Tsukada, Y.**: Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Developmental Brain Research*, **38**: 201~210, 1988.
 - 16) **Inoue, H.K., Nakamura, M., Mouton, P.R., and Olson, L.**: Transneuronal degeneration in a rat model of Alzheimer's disease: Ultrastructural comparison with aged rats. *J. Clin. Electron Microscopy*, **25**: 79~86, 1992.
 - 17) **Kawarabayashi, T., Shoji, M., Harigaya, Y., Yamaguchi, H. and Hirai, S.**: Expression of APP in the early stage of brain damage, *Brain Research*, **563**: 334~338, 1991.
 - 18) **Otsuka, N., Tomonaga, M. and Ikeda, K.**: Rapid appearance of β -amyloid precursor protein immunoreactivity in damaged axons and reactive glial cells in rat brain following needle stab injury, *Brain Research*, **568**: 335~338, 1991.

(平成6年2月14日受付)