

①

## 主 論 文

マイネ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教室  
(主任：辻 省次教授)

姉崎 利治

### 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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>もあり、老人斑形成などともなう二次的なものか、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 injury<sup>3)</sup>やcold injury<sup>4)</sup>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<sup>5)</sup>、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<sup>6)</sup>。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、200gの雄Wistarラットを用いた。ハロセン麻酔下に、Paxinos & Watsonの図譜<sup>7)</sup>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<sup>8)</sup>に従い、bregmaより1.1mm後方、正中より2.4mm外側、頭蓋骨表面より7.6mmの深さに針を刺入し、microinjector pump(CMA100, Carnegie Medicine A/B)を用い、イボテン酸(5mg/ml)1 $\mu$ 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<sup>9)</sup>に基づき、bregmaより後方4.1mm、正中より0.5mm外側、8.7mmの深さに針を刺入し、6-hydroxydopamine(6-OHDA)(2 mg/ml)3 $\mu$ lを注入した破壊した。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、後半分のスライスを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、Kluver-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15000rpm, 20分間遠心、AChは0.2N過塩素酸にてホモジナイズ後10000rpm, 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 $\mu$ 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、250g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(7.5mg/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<sup>10)</sup>) 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  $102.3 \pm 23.2$  pmol/mg proteinと、コントロール ( $191.8 \pm 20.4$  pmol/mg protein) に対し有意の低下を認めた (Fig. 3a)。VTA破壊ラットでは、DA濃度  $1488.0 \pm 64.9$  ng/g proteinと、コントロール

( $2824.8 \pm 753.9$  ng/g protein) に比し有意の低下を認めた (Fig. 3b)。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VI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VI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. 4A, 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. 7a)。デンス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. 7b)。

### 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. 8A, 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. 9A, 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. 8C, D, 9C, 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 injury<sup>3)</sup>, cold injury<sup>4)</sup>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らにより、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<sup>11)</sup>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<sup>6)</sup>。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<sup>12)</sup>が、noradrenalin<sup>13)</sup>, serotonin<sup>14)</sup>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<sup>16)</sup>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<sup>19)</sup>や、stab injuryモデル<sup>20, 21)</sup>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らかとなった。

Takamiyaら<sup>15)</sup>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、<sup>3</sup>H-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<sup>3</sup>H-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up-

regulation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up-regulation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が起き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。

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 B-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  $\alpha$ -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 excitotoxicity 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 [<sup>14</sup>C] 2-Deoxyglucose investigation. *Brain Res.* 292:239-249, 1984.
- 14) Cudennec, A., Duverger, D., Nishikawa, T., McRae-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.: Immunohisto

chemical 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  $\beta$ -amyroid precursor protein immunoreactivity in

damaged axons and reactive glial cells in rat brain following needle stab injury. *Brain Research*, 568:335-338, 1991.

Figure legend

- 図 1 : マイネルト基底核破壊3日後のラット脳 (Kluver-Barrera 染色)  
矢印 ; イボテン酸注入部位  
(Bar=2.0mm)
- 図 2 : 腹側被蓋野(VTA)破壊3日後のラット脳 (Kluver-Barrera 染色)  
矢印 ; 6-hydroxydopamine注入部位  
(Bar=2.0mm)
- 図 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

- 図 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=0.1mm)  
A, B : マイネルト基底核破壊ラット  
A : 非破壊側  
B : 破壊側  
C, D : 腹側被蓋野破壊ラット  
C : 非破壊側  
D : 破壊側
- 図 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 $\mu$ m)
- 図 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 $\mu$ m)
- 図 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

図 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  $\mu$ 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

図 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  $\mu$ 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。

Remote astrocytic response of prefrontal cortex caused by the lesions in the nucleus basalis of Meynert

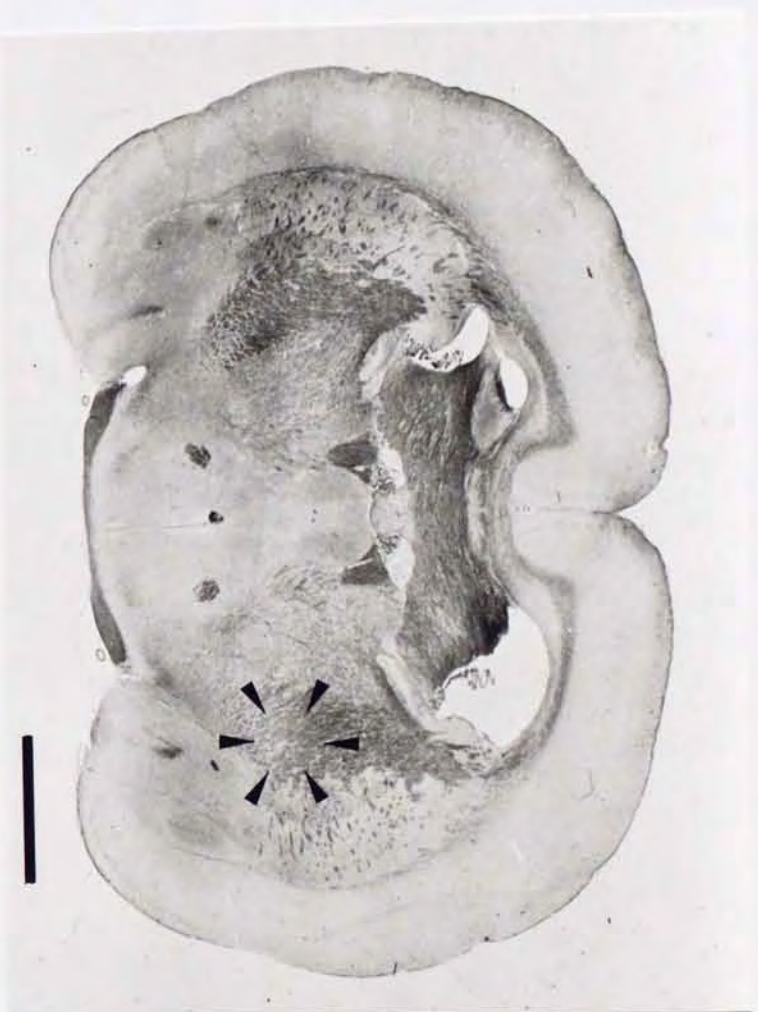
Toshiharu ANEZAKI

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



**Fig. 1**





Fig.2

a

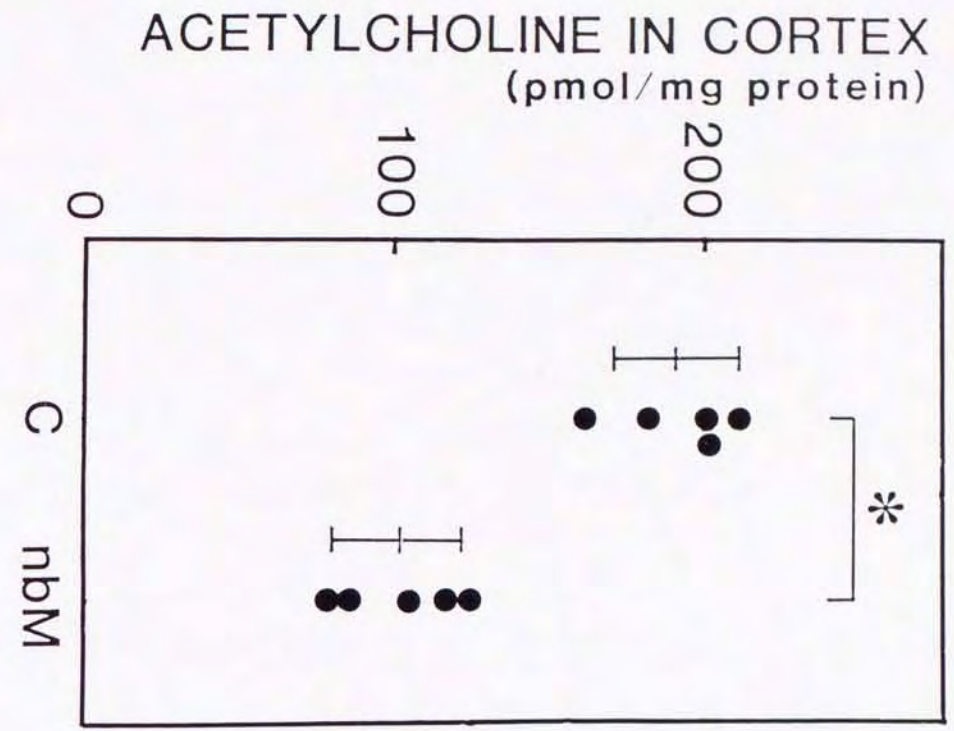


Fig.3

b

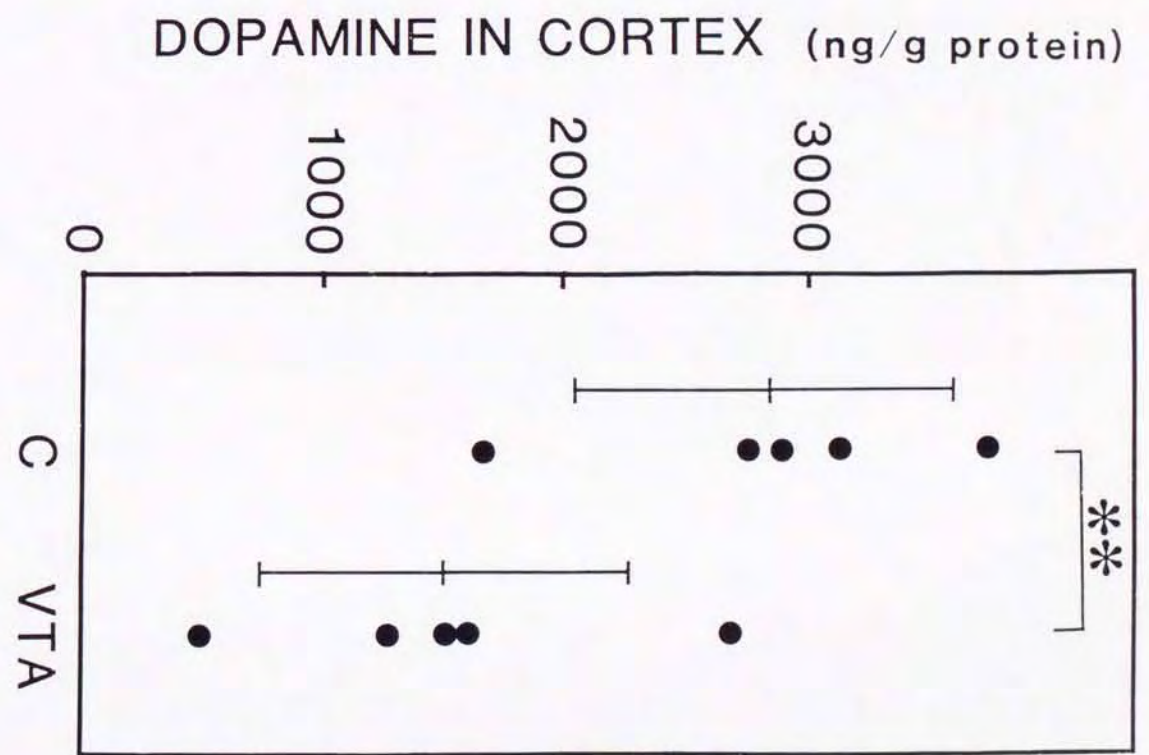


Fig.5

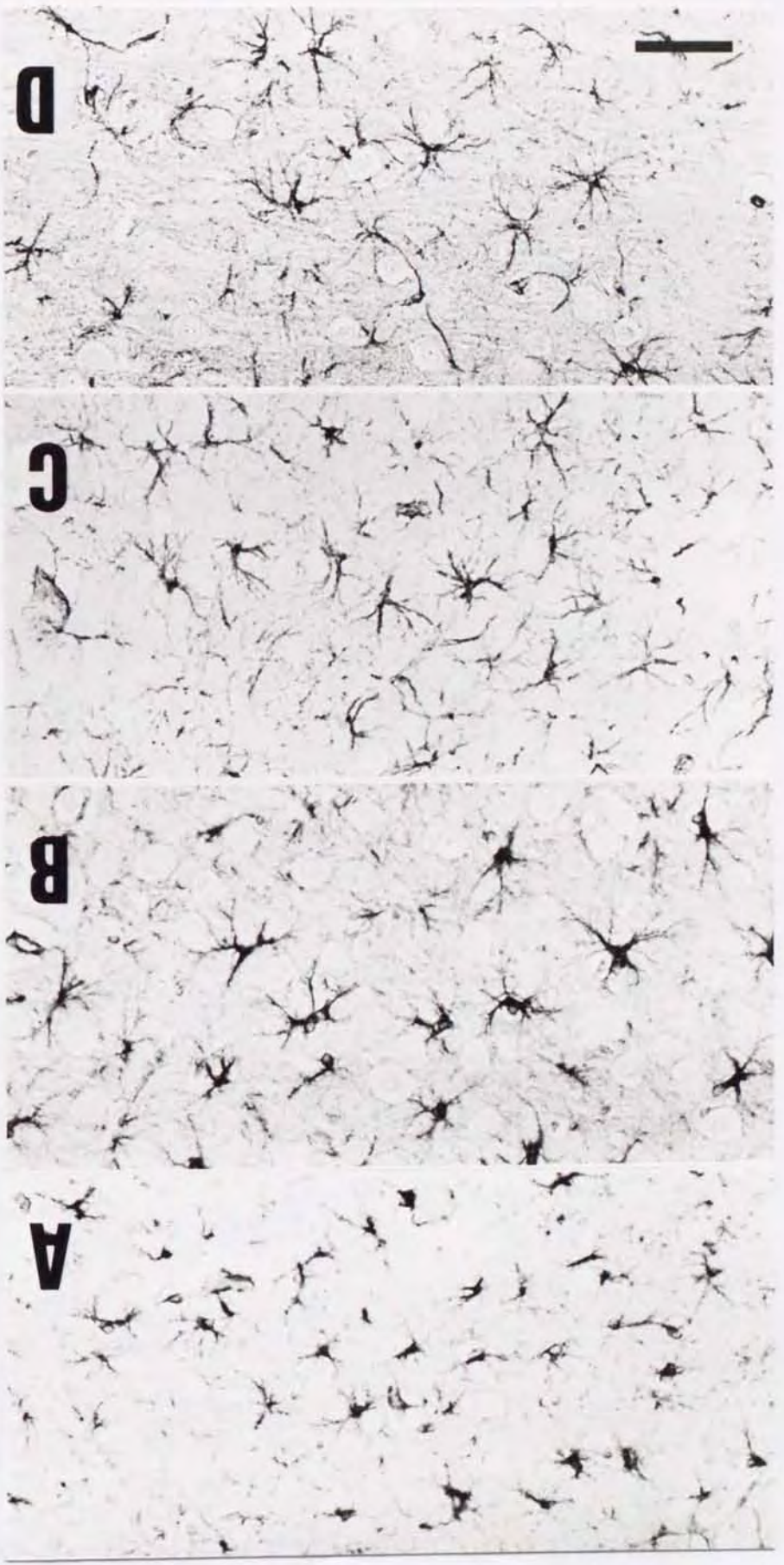
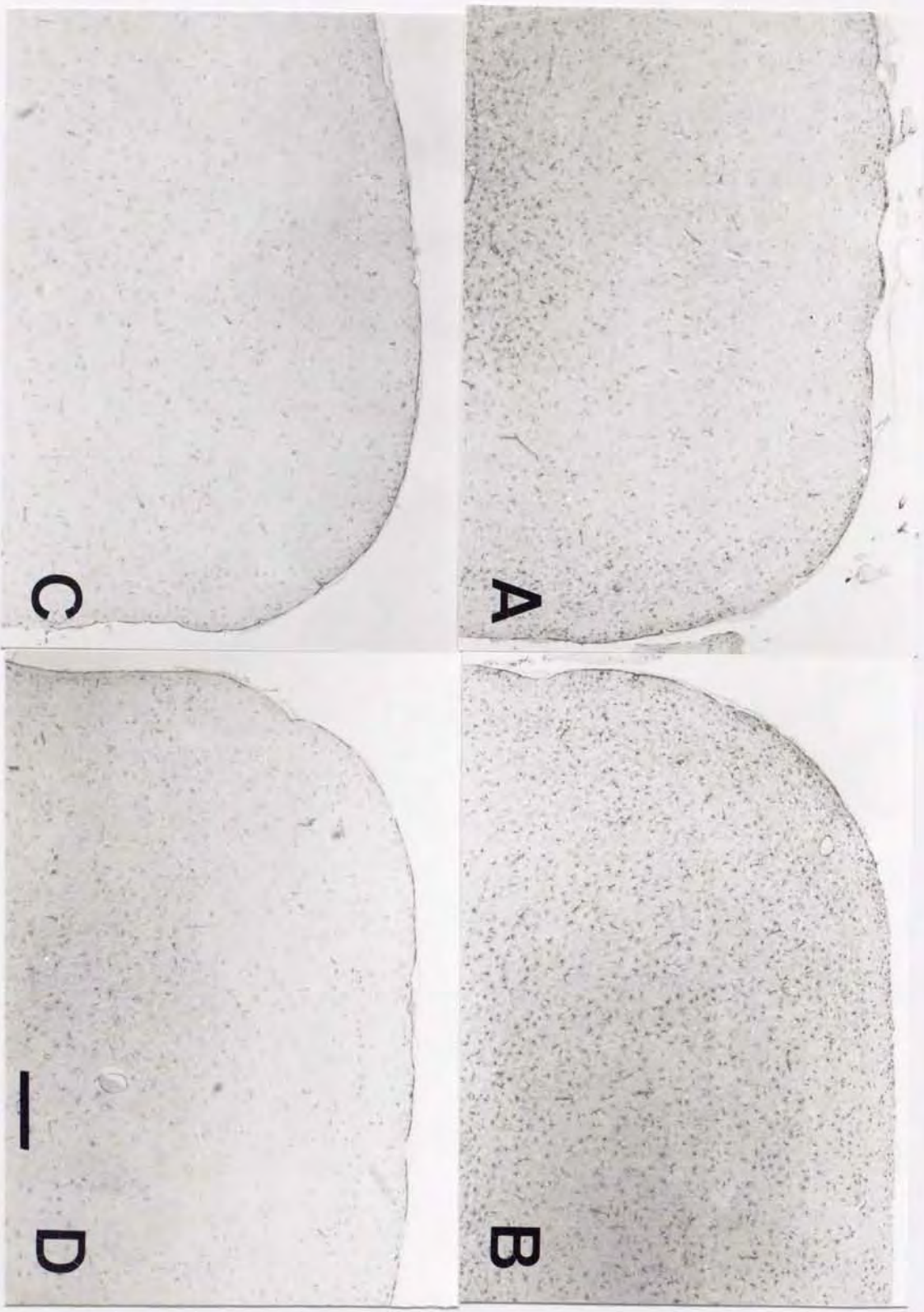
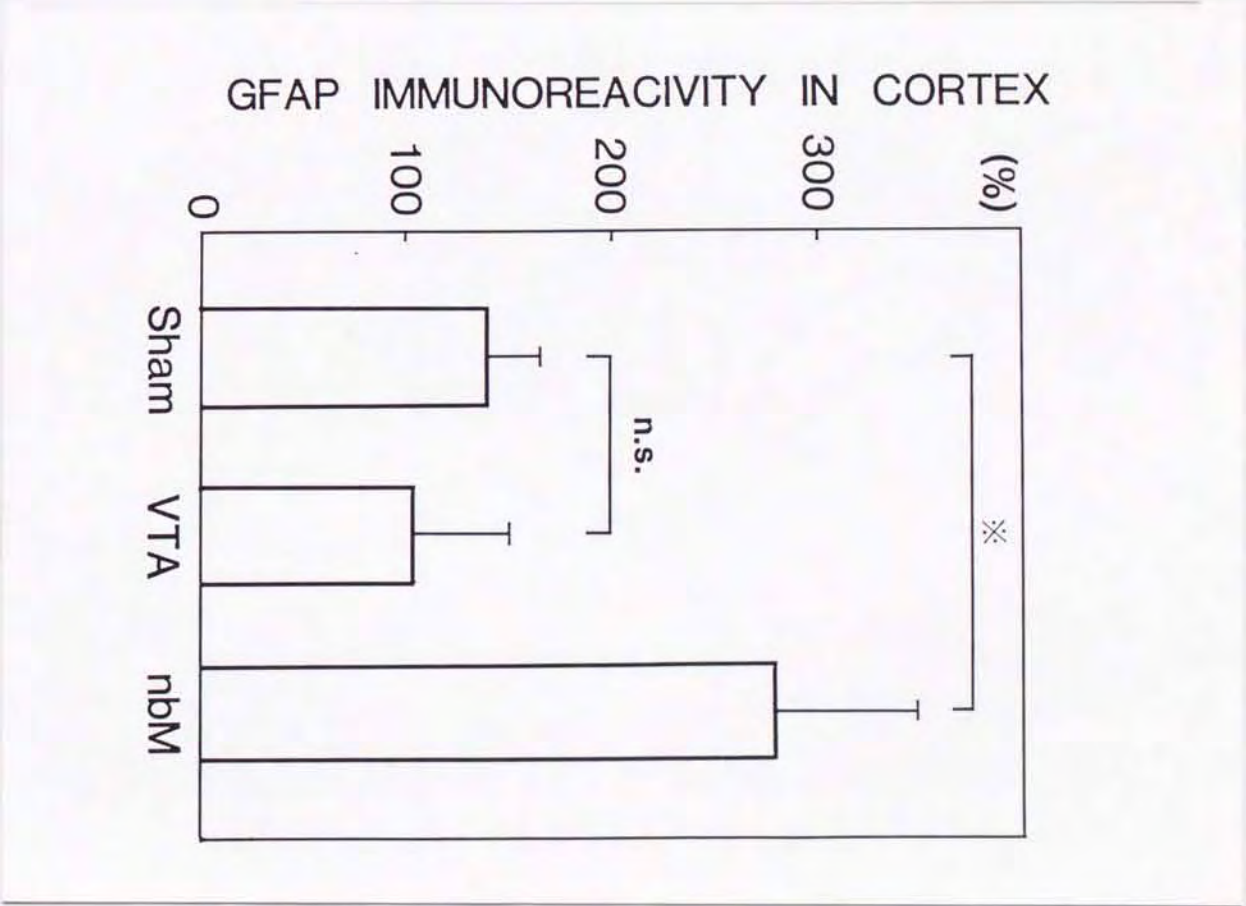
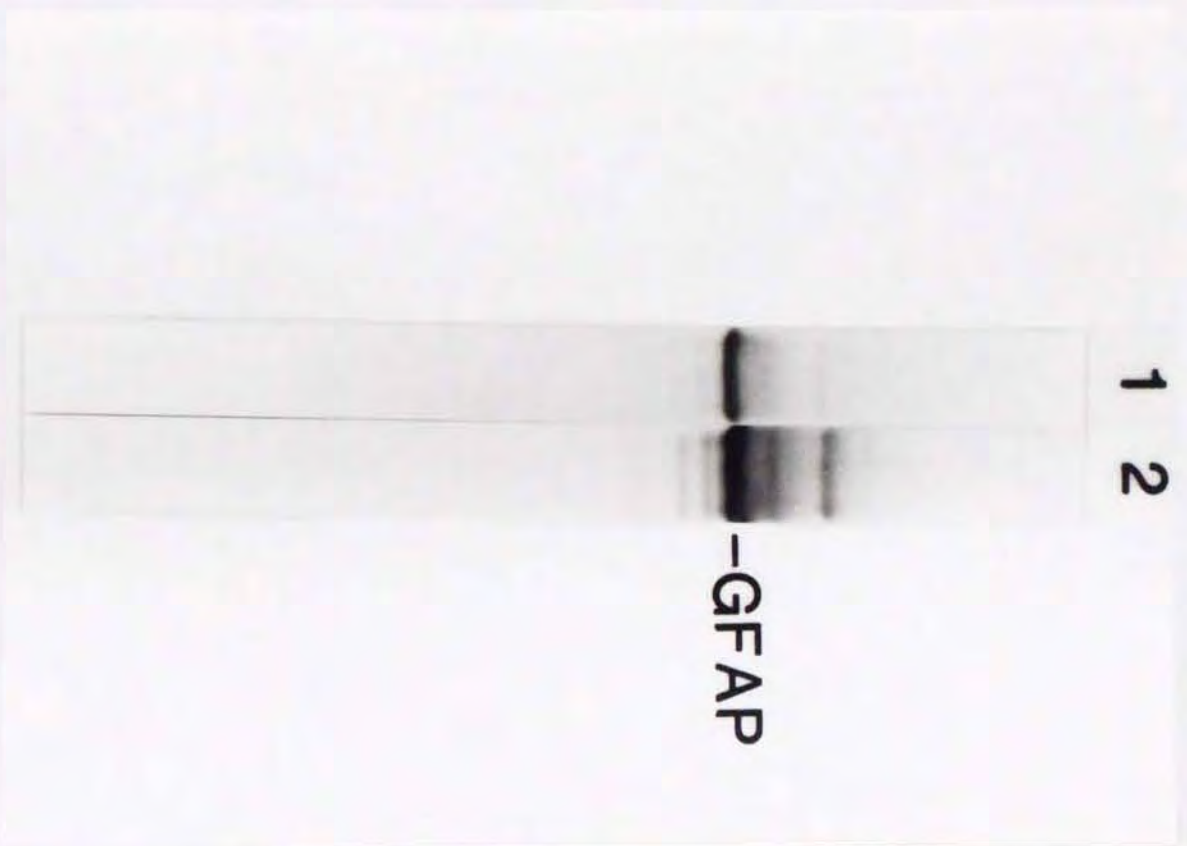


Fig.4



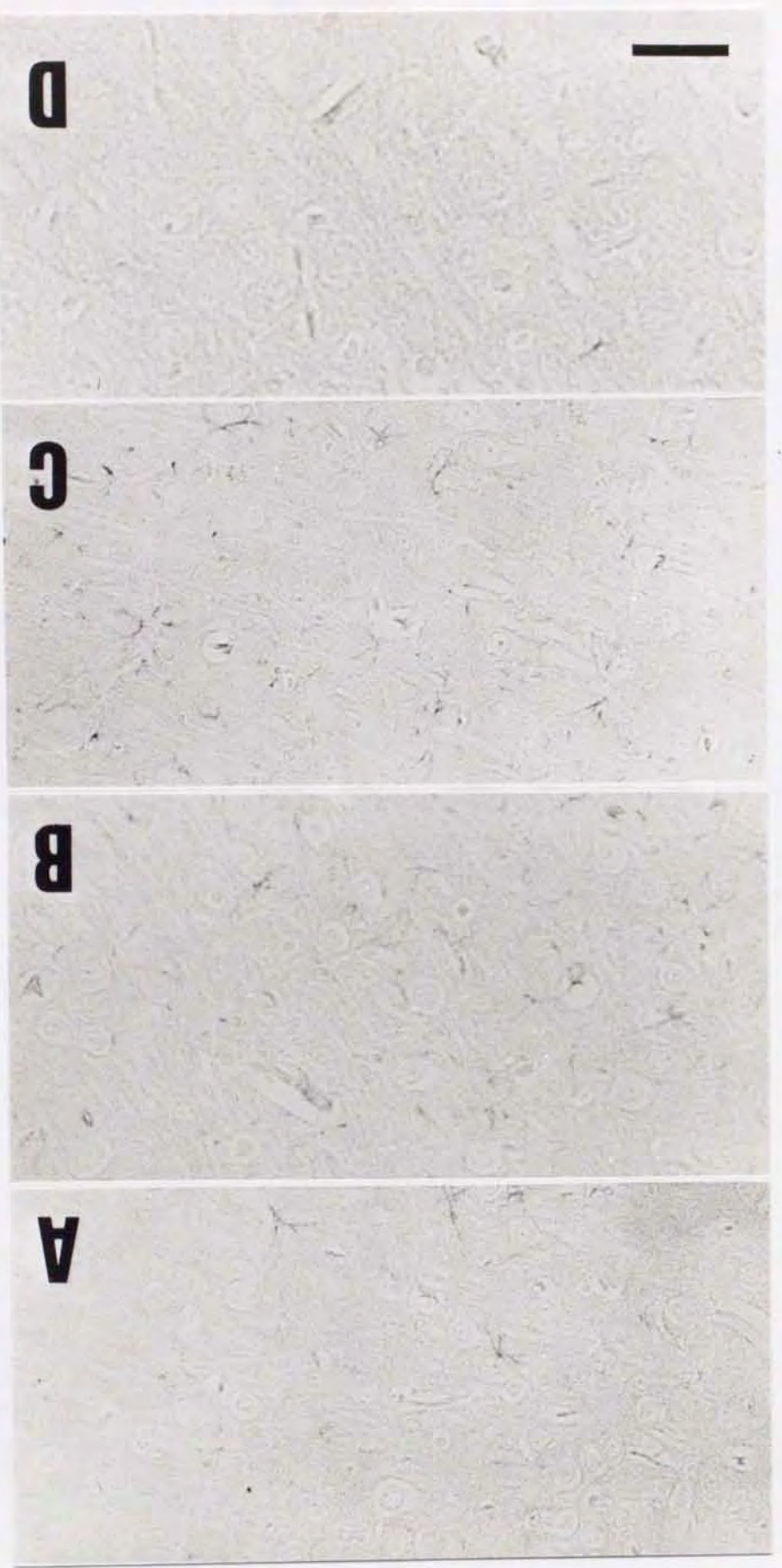


**a**

**b**

**Fig. 7**

**Fig. 6**



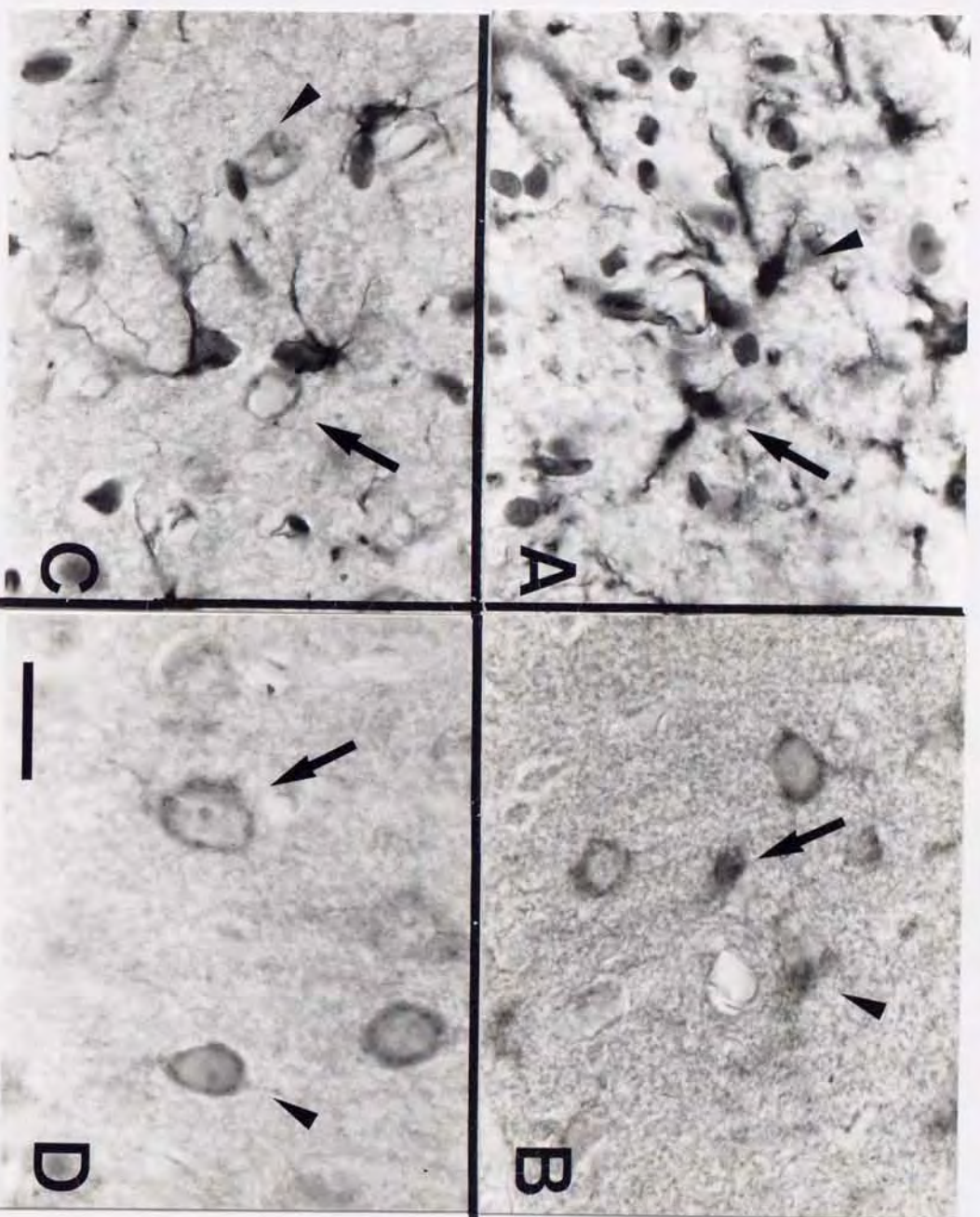


Fig. 9

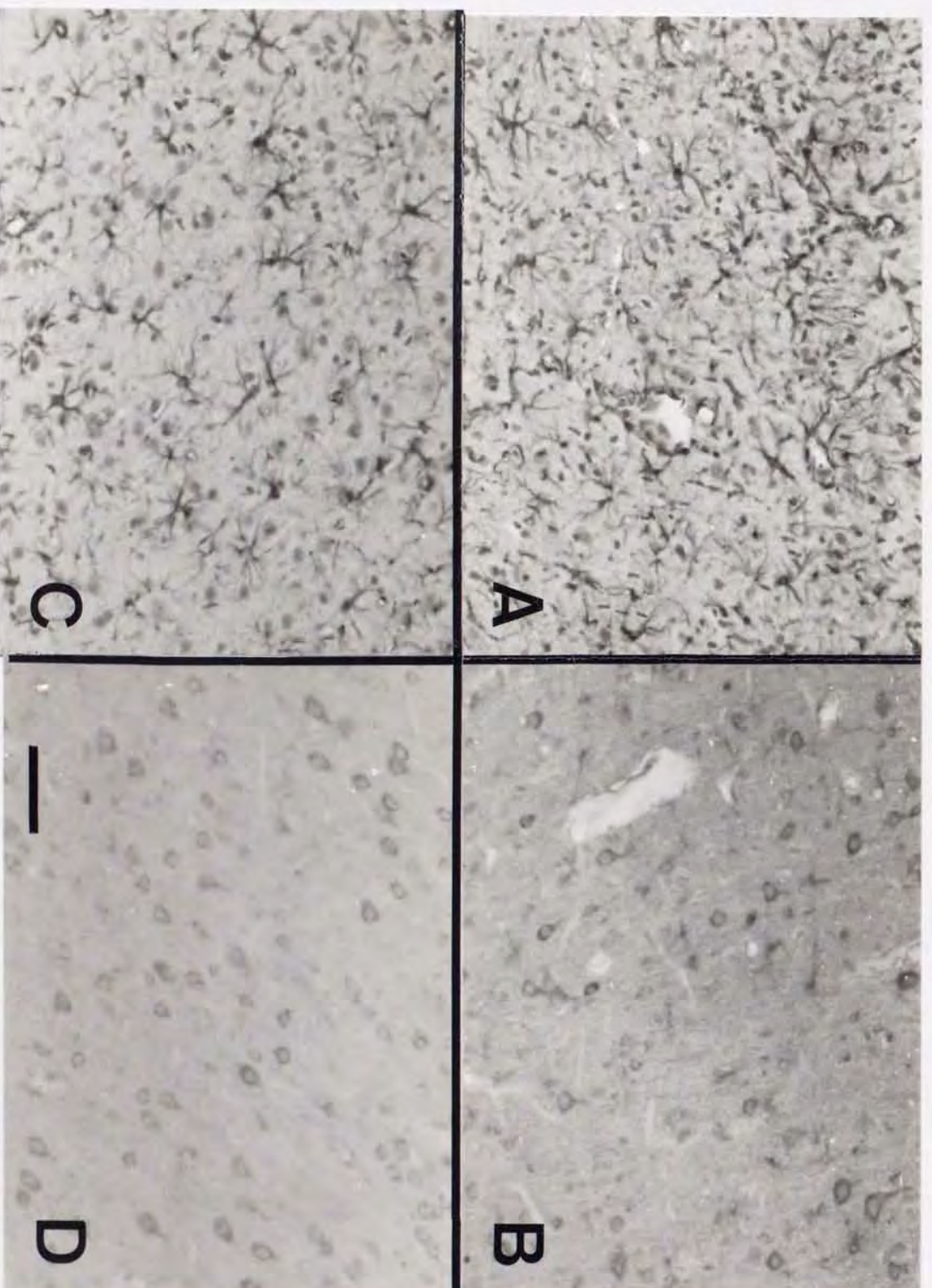


Fig. 8