

## 《原 著》

ラット脳における [ $^3\text{H}$ ]-QNB の定量的受容体  
オートラジオグラフィ

——ラジオ・レセプター・アッセイとの比較——

森 厚文\* 柴 和弘\* 松田 博史\*\* 辻 志郎\*\*  
久田 欣一\*\*

**要旨** 受容体オートラジオグラフィとラジオ・レセプター・アッセイ (RRA) より算出した定量値に相違があるといわれている [ $^3\text{H}$ ]-quinuclidinyl benzilate (QNB) を用いて、両法の比較を中心に基礎的検討を試みた。受容体オートラジオグラフィを文献と同一条件 (室温, インキュベーション時間 2 時間) で行うと, Scatchard 解析は困難であったが, インキュベーション時間を長くすると結合量が増加し解析が可能となった。インキュベーション時間を 6~8 時間にして Scatchard 解析すると, RRA と近似の定量値 (最大結合量およびみかけの解離定数値) が得られ, 速度論モデルを用いて算出した解離定数値も, RRA とほぼ同じ値が得られた。

[ $^3\text{H}$ ]-QNB は異性化 (isomerization) することが知られているが, モデル式に忠実な解析法を考案し, 従来より報告されている解析法と比較した。その結果われわれの解析法の方が実験データとよく一致した値を得ることができ, その妥当性が示唆された。

## I. はじめに

Emission Computed Tomography (ECT) によるレセプターマッピング (in vivo ラジオアッセイ) は, 化学的根拠に基づく精神・神経疾患の病態解明, 診断, 薬物治療の効果判定および治療指針に役立つことが期待されている<sup>1)</sup>。受容体の単なる画像化の段階<sup>2)</sup> はすでに終了し, 定量解析法の開発<sup>3~5)</sup> ならびに臨床レベルの研究が増加しつつある<sup>6,7)</sup>。しかし生体内では種々の因子が関与し<sup>8,9)</sup>、また ECT の解像力が脳の解剖学的詳細部の解析には不十分である現時点では, レセプターマッピングの臨床的評価に先立ち, 基礎的検討が必要と考え

られる。その基礎的検討の方法として, 正常動物あるいは疾患モデル動物を用いたラジオ・レセプター・アッセイ (RRA), 受容体オートラジオグラフィ (in vitro オートラジオグラフィ), in vivo オートラジオグラフィ (放射性リガンド投与動物の組織切片より作成) および体外測定 of ECT 検査などがある。

そこで今回われわれはムスカリン様アセチルコリンの拮抗剤である [ $^3\text{H}$ ]-quinuclidinyl benzilate (QNB) を用いた受容体オートラジオグラフィについて RRA との比較を中心に若干の基礎的検討を試みたので報告する。

## II. 材料および方法

## 1. 受容体オートラジオグラフィ

## 1) 方 法

ドンリュウラット (雄, 体重 150~200 g) 3 匹を断頭し, 脳を摘出した後, ドライアイス, ヘキサン ( $-60 \sim -70^\circ\text{C}$ ) にて凍結した。この凍結脳か

\* 金沢大学アイソトープ総合センター

\*\* 同 医学部核医学教室

受付: 62 年 12 月 14 日

最終稿受付: 63 年 3 月 24 日

別刷請求先: 金沢市宝町 13-1 (☎ 920)

金沢大学アイソトープ総合センター

森 厚 文

らクリオスタット (三共 TISSUE TEC 4551) を用いて  $20\ \mu\text{m}$  の線状体を含む凍結切片 (König and Klippel のアトラス<sup>10)</sup> の A9410-A6060  $\mu\text{m}$  の範囲) を作成した。内在性のムスカリン様アセチルコリンを除去するため  $50\ \text{mM}$  リン酸緩衝液 (pH 7.4) で室温にて 20 分間プレインキュベーションした後,  $[\text{H}^3]\text{-QNB}$  溶液 (pH 7.4 の  $50\ \text{mM}$  リン酸緩衝液に  $[\text{H}^3]\text{-QNB}$  を混合した溶液) で室温にてインキュベーションした。  $[\text{H}^3]\text{-QNB}$  濃度を 20, 40, 55, 75, 120, 150 および  $210\ \text{pM}$  と変えて飽和実験を行ったが, インキュベーション時間の影響を知るため, インキュベーション時間を 2, 3, 4, 6 および 8 時間と変えて各時間における飽和曲線を作成し, Scatchard 解析<sup>11)</sup>にて最大結合量 ( $B_{\text{max}}$ ) およびみかけの解離定数 ( $K_d(\text{app})$ ) を算出した。解離定数 ( $K_d$ ) は Scatchard 解析以外に 2 種以上の濃度のリガンドを用いた結合曲線より算出する方法<sup>12)</sup>がある。そこで  $40\ \text{pM}$ ,  $220\ \text{pM}$  の 2 種の濃度の  $[\text{H}^3]\text{-QNB}$  を用いて, インキュベーション時間を 15, 30, 45 分, 1, 2, 3, 4 および 6 時間と変えて結合曲線を作成した。インキュベーション後, 氷冷の  $50\ \text{mM}$  リン酸緩衝液にて 10 分間, 2 回洗浄した。冷風にて乾燥後, 8 種類の濃度のゼラチン標準線源 (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12.5,  $15\ \mu\text{Ci/g}$  になるようにゼラチン溶液と  $[\text{H}^3]\text{-QNB}$  溶液を混合し, 凍結後に  $20\ \mu\text{m}$  の切片を作成)<sup>13)</sup> とともに  $^3\text{H}$  専用の Ultrofilm (LKB 2208-190) に密着させ, 約 4 週間露光した後, 現像しオートラジオグラムを作成した。

## 2) 定量化

オートラジオグラムの定量化は Video Digitizer System (NEC 製 TI22A—CCD カメラ, A・D 変換ボードおよび PC-9801 VM 21 を組み合わせたシステム)にてフィルム濃度をデジタル化し, 標準線源から得られた標準曲線を用いて  $\text{pmol/g}$  に換算した<sup>13)</sup>。なお特異的結合はアトロピン  $10\ \mu\text{M}$  の存在下と非存在下の差として求めたが, 非特異的結合の割合は  $200\ \text{pM}$  で 2% と非常に小さかった。

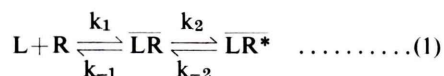
## 2. RRA

ドンリュウラット (雄, 体重  $160\sim 210\ \text{g}$ ) を断

頭後, 線状体部を摘出し天秤 (島津 NL-200p) にて秤量した後, 3~4 匹分を氷冷 60 倍量の  $0.32\ \text{M}$  ショ糖溶液に入れ, ポッター型ホモジナイザーで破碎しホモジネートを作成した。ホモジネート  $30\ \mu\text{l}$  に  $[\text{H}^3]\text{-QNB}$  溶液  $3\ \text{ml}$  を加えインキュベーション後, グラスファイバーフィルター (Whatman GF/B) で吸引濾過し,  $4\ \text{ml}$  の緩衝液にて 3 回洗浄した。洗浄後のフィルターの放射能を液体シンチレーションカウンタ (アロカ LSC-1000) にて測定した。飽和実験は  $[\text{H}^3]\text{-QNB}$  濃度を 25, 50, 100, 150, 200 および  $300\ \text{pM}$  と変え, 室温, インキュベーション時間 6 時間ならびに  $37^\circ\text{C}$ , インキュベーション時間 45 分で行った。結合実験および解離実験は  $37^\circ\text{C}$  で  $[\text{H}^3]\text{-QNB}$  濃度  $0.34\ \text{nM}$  で行い, 結合曲線はインキュベーション開始後 2.5, 5, 10, 15, 20, 45 および 60 分, 解離曲線は平衡に達してからアトロピン  $10\ \mu\text{M}$  添加後 10, 30, 50, 90, 140 および 180 分間インキュベーションすることにより作成した。なお特異的結合は, アトロピン  $10\ \mu\text{M}$  存在下と非存在下の差として求め, 実験ごとに 3 回の平均値を算出した。

## 3. 異性化モデルのシミュレーション実験

QNB は最も単純な 2 分子反応で複合体が形成されるのではなく, 低親和性結合からさらに高親和性結合に異性化 (isomerization モデル) されることが知られている<sup>14)</sup>。そこで異性化モデルに従い, RRA ( $37^\circ\text{C}$ , インキュベーション時間 45 分) の結合曲線および, 解離曲線を基に NEC-N-5200 を用いて, シミュレーションにて種々のパラメータ値を求めた。すなわち異性化モデルは以下の (1) 式に従う。



なお  $\text{L}$  = 未反応のリガンド濃度 ( $\text{pM}$ )

$\text{R}$  = 未反応の受容体濃度 ( $\text{pmol/g}$ )

$\text{LR}$  = リガンド - 受容体・複合体濃度 ( $\text{pmol/g}$ )

$\text{LR}^*$  = 異性化したリガンド - 受容体・複合体濃度 ( $\text{pmol/g}$ )

$k_1 = \text{L} + \text{R}$  から  $\text{LR}$  への二次結合速度定数  
( $\text{pM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )

$k_2 = \overline{\text{LR}}$  から  $\overline{\text{LR}}^*$  への一次結合速度定数  
( $\text{min}^{-1}$ )

$k_{-1} = \overline{\text{LR}}$  から  $\text{L} + \text{R}$  への一次解離速度定数  
( $\text{min}^{-1}$ )

$k_{-2} = \overline{\text{LR}}^*$  から  $\overline{\text{LR}}$  への一次解離速度定数  
( $\text{min}^{-1}$ )

結合に関し (1) 式より以下の (2), (3), (4) 式が導かれる。

$$\frac{d\overline{\text{LB}}}{dt} = k_1 \cdot \text{L} \cdot (\text{B}_{\text{max}} - \overline{\text{LB}}) - k_{-1} \cdot \overline{\text{LR}} \dots (2)$$

$$\frac{d\overline{\text{LR}}}{dt} = k_1 \cdot \text{L} \cdot (\text{B}_{\text{max}} - \overline{\text{LB}}) - (k_{-1} + k_2) \overline{\text{LR}} + k_{-2} \overline{\text{LR}}^* \dots (3)$$

$$\frac{d\overline{\text{LR}}^*}{dt} = k_2 \overline{\text{LR}} - k_{-2} \overline{\text{LR}}^* \dots (4)$$

なお  $\overline{\text{LB}} = \overline{\text{LR}} + \overline{\text{LR}}^*$

(2), (3), (4) 式を解くと、リガンド・受容体・複合体濃度の時間関数 ( $\overline{\text{LB}}(t)$ ) は以下のごとくなる。

$$\overline{\text{LB}}(t) = \frac{k_1 \cdot \text{L} \cdot \text{B}_{\text{max}} (k_2 + k_{-2} - p) \cdot (1 - e^{-pt})}{p \sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(2\beta - \gamma)}} - \frac{k_1 \cdot \text{L} \cdot \text{B}_{\text{max}} (k_2 + k_{-2} - q) \cdot (1 - e^{-qt})}{q \sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(2\beta - \gamma)}} \dots (5)$$

なお  $\alpha = k_1 \cdot \text{L} + k_{-1}$

$\beta = k_2 + k_{-2}$

$\gamma = k_{-1} \cdot k_2$

$p = [(\alpha + \beta) - \sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)}]/2$

$q = [(\alpha + \beta) + \sqrt{(\alpha + \beta)^2 - 4(\alpha\beta - \gamma)}]/2$

一方解離に関し (1) 式より以下の (6), (7), (8) 式が導かれる。

$$\frac{d\overline{\text{LB}}}{dt} = -k_{-1} \overline{\text{LR}} \dots (6)$$

$$\frac{d\overline{\text{LR}}}{dt} = -(k_{-1} + k_2) \overline{\text{LR}} + k_{-2} \overline{\text{LR}}^* \dots (7)$$

$$\frac{d\overline{\text{LR}}^*}{dt} = k_2 \overline{\text{LR}} - k_{-2} \overline{\text{LR}}^* \dots (8)$$

(6), (7), (8) 式を解くと、 $\overline{\text{LB}}(t)$  は以下のごとくになる。

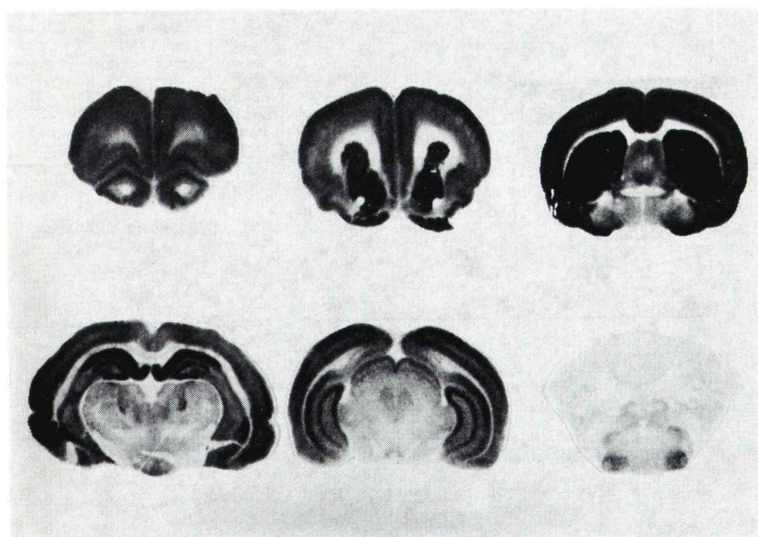


Fig. 1 Autoradiograms of  $[^3\text{H}]$ -QNB binding to muscarinic receptors in coronal rat brain sections.



$$LB(t) = \frac{(k_{-1}LR_0^* + LB_0(k_2 + k_{-2} - X)e^{-Xt})}{\sqrt{(\alpha' + \beta')^2 - 4(\alpha'\beta' - \gamma')}} + \frac{(LB_0 \cdot (Y - k_2 - k_{-2}) - k_{-1}LR_0^*)e^{-Yt}}{\sqrt{(\alpha' + \beta')^2 - 4(\alpha'\beta' - \gamma')}} \dots\dots\dots(9)$$

なお  $\alpha' = k_2 + k_{-2}$

$\beta' = k_{-1}$

$\gamma' = k_{-1} \cdot k_2$

$LR_0^*$  = 阻害剤投与直前の異性化したりガン  
ド・受容体・複合体濃度 (pmol/g)

$LB_0$  = 阻害剤投与直前の全リガンド・受容  
体・複合体濃度 (pmol/g)

$$X = [(\alpha' + \beta') - \sqrt{(\alpha' + \beta')^2 - 4(\alpha'\beta' - \gamma')}] / 2$$

$$Y = [(\alpha' + \beta') + \sqrt{(\alpha' + \beta')^2 - 4(\alpha'\beta' - \gamma')}] / 2$$

上記の (5), (9) 式を用いて,  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  および  $k_{-2}$  値をシミュレーションにて求めた. なお計算には Bevington の最小自乗法<sup>15)</sup>を用いた.

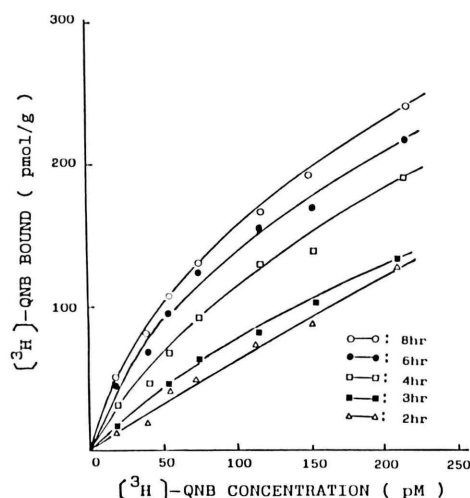


Fig. 2 Saturation curves obtained by quantitative receptor autoradiographic analysis of [<sup>3</sup>H]-QNB binding to rat striatum sections. The contiguous slices were incubated for 2, 3, 4, 6 and 8 hours at room temperature.

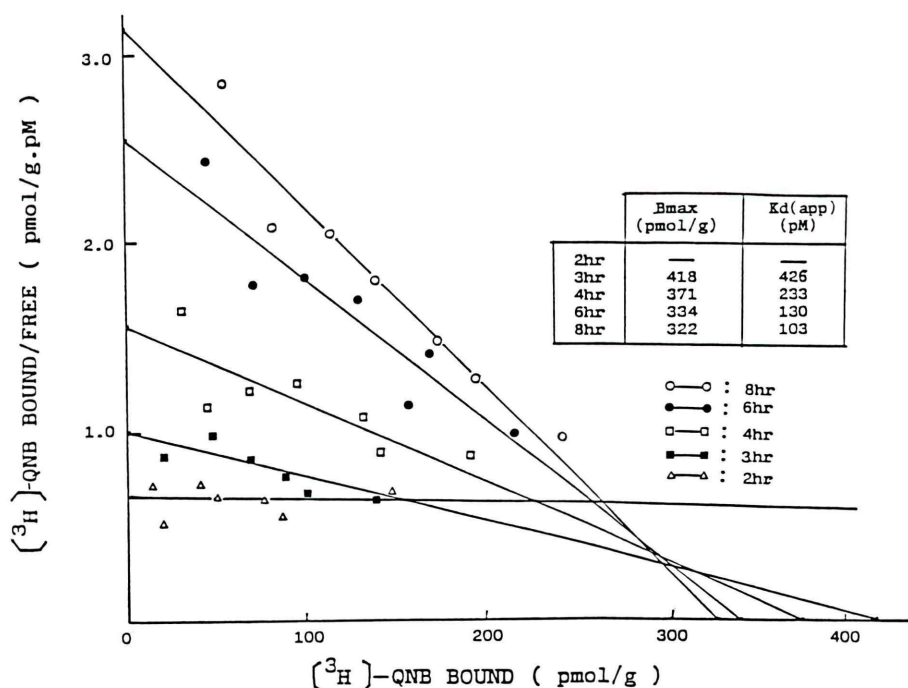


Fig. 3 Scatchard plots obtained by quantitative receptor autoradiographic analysis of [<sup>3</sup>H]-QNB binding to rat striatum sections. The contiguous slices were incubated for 2, 3, 4, 6 and 8 hours at room temperature.

### III. 結 果

#### 1. 受容体オートラジオグラフィ

Figure 1 に各部位のオートラジオグラム (全結合量イメージ) を示す. オートラジオグラムを

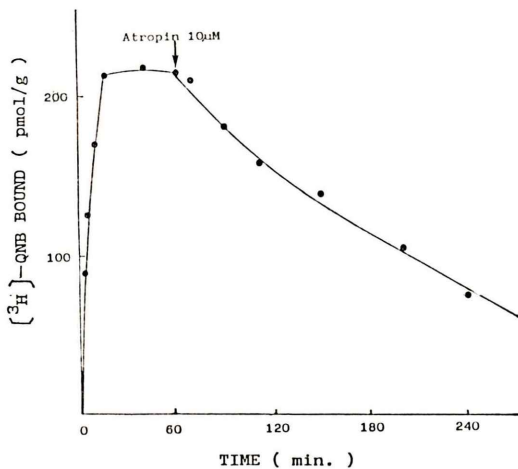


Fig. 4 Association and dissociation curves of  $[^3\text{H}]\text{-QNB}$  binding to homogenates of rat striatum. The tissue homogenates were incubated with  $0.34 \text{ nM } [^3\text{H}]\text{-QNB}$  for 45 minutes at  $37^\circ\text{C}$ .

Video Digitizer System を用いて定量化することにより各インキュベーション時間ごとの飽和曲線を作成した (Fig. 2). インキュベーション時間が長くなるに従い, 結合量が増加する傾向を示した. 次にこの飽和曲線を基に Scatchard 解析を行うと (Fig. 3),  $B_{\text{max}}$  は 3 時間で  $418 \text{ pmol/g}$ , 8 時間で  $322 \text{ pmol/g}$  とインキュベーション時間が長くなるにしたがい小さくなるがその程度は小さいのに対し,  $K_d(\text{app})$  は 3 時間で  $426 \text{ pM}$ , 8 時間で  $103 \text{ pM}$  と著明に小さくなる傾向を示した. 一方 2 種の濃度の結合曲線から算出<sup>12)</sup>した  $k_1$ ,  $k_{-1}$  および  $K_d$  値はそれぞれ  $0.0313 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ,  $0.00042 \text{ min}^{-1}$  および  $13.5 \text{ pM}$  であった.

#### 2. RRA

室温, インキュベーション時間 6 時間で行った RRA を Scatchard 解析すると,  $B_{\text{max}}$  は  $272 \text{ pmol/g}$ ,  $K_d(\text{app})$  は  $107 \text{ pM}$  と, 同一条件の受容体オートラジオグラフィ ( $B_{\text{max}} = 334 \text{ pmol/g}$ ,  $K_d(\text{app}) = 130 \text{ pM}$ ) および  $37^\circ\text{C}$ , インキュベーション時間 45 分で行った RRA ( $B_{\text{max}} = 267 \text{ pmol/g}$ ,  $K_d(\text{app}) = 85 \text{ pM}$ ) と近似した値を示した. 次に結合曲線および解離曲線 (Fig. 4) を用いて異性化を考慮し

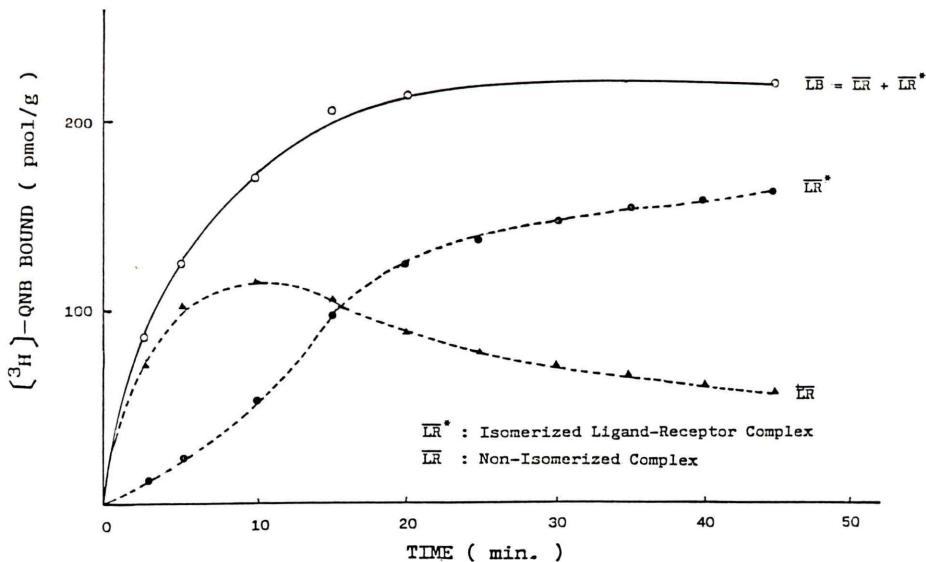


Fig. 5 A simulated association curve based on isomerization model. Total complex (○) is decomposed into rapidly reversible non-isomerized complex (▲) and irreversible isomerized complex (●).

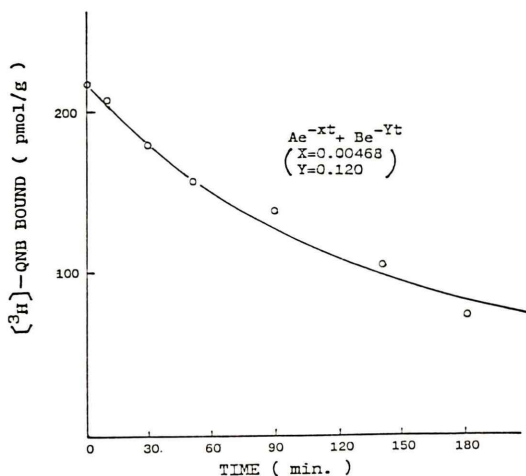


Fig. 6 A simulated dissociation curve based on isomerization model. The curve is expressed as sum of two exponentials.

ない最も単純なモデルで計算<sup>16)</sup>すると、 $k_1=0.516 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 、 $k_{-1}=0.0060 \text{ min}^{-1}$  および  $K_d=11.7 \text{ pM}$  という値が得られた。

### 3. 異性化モデルのシミュレーション実験

異性化を考慮してシミュレーションした結合曲線を Fig. 5 に示す。異性化していない成分と異性化した成分に分けると、前者は約10分でピークに達しその後は減少するのに対し、後者は時間とともに増加する傾向を示した。Fig. 6 はシミュレーションした解離曲線であるが、早い成分と遅い成分の2つに分けることができる。これらのデータを基に (5), (9) 式より算出すると、 $k_1=0.514 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 、 $k_{-1}=0.024 \text{ min}^{-1}$ 、 $k_2=0.077 \text{ min}^{-1}$ 、 $k_{-2}=0.024 \text{ min}^{-1}$ 、 $k_{-1}/k_1=0.46 \text{ nM}$ 、 $k_{-2}/k_2=0.31$  という値が得られた。みかけの  $K_d$  を  $(k_1/k_{-1}(1+k_2/k_{-2}))^{-1}$  より算出<sup>17)</sup> すると  $10.8 \text{ pM}$  という値が得られ、異性化のないモデルの  $K_d$  と比較すると、RRA の  $11.7 \text{ pM}$ 、オートラジオグラフィの  $13.5 \text{ pM}$  とよく一致した値が得られた。

## IV. 考 察

ECT によるレセプターマッピングの基礎研究としては究極的には大型動物を対象とした ECT 検査あるいは小動物を用いた in vivo オートラジオ

オグラフィが最も適している。しかし前者はサイクロトロンが設置された限られた施設でしか実施できず、また後者で経時の変化を調べる場合、同一動物では不可能であり多くの匹数の平均値で評価するためバラツキが大きくなる。さらに両者ともに 1) 脳血流および脳血液容積による影響、2) 非特異的結合量算出の精度、3) 内因子(内在性神経伝達物質、神経修飾物質など)による影響、4) 平衡状態からのずれ、5) 他の受容体との相互作用、6) 代謝、7) リガンド-受容体・複合体の小胞化(リセプトゾーム)による細胞内取り込み<sup>8,9)</sup> などが関与する。これらをすべて考慮した数学モデルが必要となるが、まだ確立された定量解析法はない。そこで現時点ではこれらの in vivo 実験の前段階として in vitro 実験が重要と考えられる。

受容体を定量する方法として RRA が広く用いられているが、組織をかきとってくる方式のため、形態学的に詳細な部位の受容体の評価は困難である。一方オートラジオグラフィは、解像力に優れており形態学的分布の詳細が解析でき、同一解剖学的部位の不均一分布も評価可能である。GABA<sup>18)</sup> やニューロテンシン<sup>19)</sup> の受容体の場合、オートラジオグラフィと RRA より算出した  $B_{\text{max}}$  および  $K_d(\text{app})$  値は、一致するといわれている。しかしムスカリン様アセチルコリン<sup>20)</sup> やオピオイド<sup>21)</sup> の受容体の場合は、異なった結果を示し、両法の特異的挙動の違いは、受容体の調整の違いによる結合特性を反映しているといわれている<sup>22)</sup>。特にムスカリン様アセチルコリンの拮抗剤である  $[^3\text{H}]\text{-QNB}$  を用いた場合、オートラジオグラフィでは飽和曲線において低濃度で歪みを生じ Scatchard 解析より得られる値は信頼できないといわれている<sup>23)</sup>。

そこでわれわれは、 $[^3\text{H}]\text{-QNB}$  を用いてオートラジオグラフィと RRA の比較を試みた。RRA は通常は粗シナプトゾーム分画 ( $P_2$  分画) が用いられているが、オートラジオグラフィより得られる値はすべての分画の平均値、すなわち遠心分離前のホモジネートより得られる値に匹敵すると考えられる。そこで RRA の試料として遠心分離前



のホモジネートを使用した。インキュベーション温度は、RRA の場合通常 37°C で行うが、オートラジオグラフィの場合、37°C で行うとゼラチン塗抹スライドガラスに載せた切片がはがれやすくなるため室温で行われている。インキュベーション時間は文献的に RRA は 45 分、オートラジオグラフィは 2 時間で行われている<sup>20)</sup>。そこでオートラジオグラフィを文献<sup>20)</sup>と同じ条件、すなわち室温、インキュベーション時間 2 時間で行うと鮮明なオートラジオグラムを得ることができるが、文献<sup>23)</sup>と同様に Scatchard 解析は困難であり定量値を得ることはできなかった。しかしインキュベーション時間を長くするにしたがい結合量が増加し、Scatchard 解析が可能となり、時間とともに  $B_{max}$  および  $K_d(app)$ 、特に後者が著明に小さくなる傾向を示した。また両法を同一条件(室温、インキュベーション時間 6 時間)で行うとよく一致した値が得られるとともに、RRA を通常の条件(37°C、インキュベーション時間 45 分)で行った結果に近似した値が得られた。したがってオートラジオグラフィの条件を適切(容器内の組織切片の総量すなわち受容体の総量に対し [<sup>3</sup>H]-QNB 溶液の容量を十分多くし<sup>22)</sup>、かつインキュベーション時間を十分長くする)にすることにより、両法はほぼ同じ値を示し、受容体の調整の違いによる結合特性の違いはないと考えられる。

解離定数は Scatchard 解析以外に速度論モデルすなわち、1) 2 種以上の濃度を用いた結合曲線<sup>12)</sup>、2) 結合曲線および解離曲線<sup>16)</sup> から算出する方法がある。Scatchard 解析は反応系が平衡に到達しないと適応できないのに対し、上記の結合曲線、解離曲線を用いた方法では系が必ずしも平衡に達しなくても、速度定数および  $K_d$  が測定できる利点を有する。オートラジオグラフィで結合曲線と解離曲線の両方から算出する場合には、室温で行うと時間がかかる。そこで今回はオートラジオグラフィは 2 種の濃度の結合曲線、RRA はより一般的な方法である結合曲線および解離曲線より算出した。オートラジオグラフィより算出した  $K_d$  は 13.5 pM、RRA は 11.7 pM と両者はよく一致

した。なお上記の方法は、最も単純な 2 分子反応と仮定した場合であり、QNB は厳密には異性化がおこり、(1) 式にしたがうことが知られている<sup>14)</sup>。しかし従来の方法<sup>17)</sup>は解離曲線を早い成分と遅い成分に分け、 $k_{-1}$  は早い成分、 $k_{-2}$  は遅い成分のみから算出しているが、早い成分、遅い成分おのおのは、 $k_{-1}$ 、 $k_2$ 、 $k_{-2}$  の相互作用で決まるはずであり数学的に誤っている。そこで正しい数学的解析より (5)、(9) 式を導き、RRA のデータに基づき  $k_1$ 、 $k_{-1}$ 、 $k_2$  および  $k_{-2}$  値を算出した。その結果従来の計算法<sup>17)</sup>では  $k_1$ 、 $k_{-1}$ 、 $k_2$  および  $k_{-2}$  値はそれぞれ  $0.614 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 、 $0.12 \text{ min}^{-1}$ 、 $0.26 \text{ min}^{-1}$  および  $0.005 \text{ min}^{-1}$ 、われわれの計算法ではそれぞれ  $0.514 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 、 $0.024 \text{ min}^{-1}$ 、 $0.077 \text{ min}^{-1}$  および  $0.024 \text{ min}^{-1}$  と両者の間に相違が認められた。みかけの  $K_d$  は  $(k_1/k_{-1}(1+k_2/k_{-2}))^{-1}$  より算出でき、異性化を考慮しないモデルより算出される  $K_d$  と同じ値を示すと考えられるが、従来の計算法では 3.5 pM、われわれの計算法では 10.8 pM であった。異性化を考慮しないモデルで算出した値の 11.7 pM と比較すると、われわれの計算法の方がより近似した値を示し、より正しい計算法と考えられる。このように異性化モデルに基づく種々のパラメータ値を算出することにより、種々の疾患モデルにおける変化をとらえることができれば、病態解明に新しい情報を提供できる可能性が秘められている。オートラジオグラフィは室温で結合実験と解離実験を連続して行うと時間がかかるため、異性化モデルに基づくパラメータ値の算出を今回は行わなかった。しかし切片がスライドガラスからはがれない温度までできるだけ上昇させることによりインキュベーション時間を大幅に減少でき、オートラジオグラフィでも RRA と同様に異性化モデルに基づく各パラメータ値を算出できると推測される。

以上のように受容体オートラジオグラフィは従来の RRA とほぼ同じ定量値を得ることができ、しかも解剖学的詳細部の解析が可能であるため、種々の疾患モデル動物を用いた病態解明および向精神薬の作用機序の解明に偉力を発揮すると考え

られる。さらにその成果が ECT によるレセプターマッピングの評価に反映でき、ひいては種々の精神・神経疾患の診断、治療指針および治療効果の判定などに役立つことが期待される。

本論文の要旨は第 26 回日本核医学会総会 (昭和 61 年 11 月, 千葉) において発表した。

## 文 献

- 1) Wagner HN Jr: Images of the brain: Past as prologue. *J Nucl Med* **27**: 1929-1937, 1986
- 2) Wagner HN Jr, Burns HD, Dannals RF, et al: Imaging dopamine receptors in the human brain by positron tomography. *Science* **221**: 1264-1266, 1983
- 3) Wong DF, Gjedde A, Wagner HN Jr: Quantification of neuroreceptors in the living human brain · I. Irreversible binding of ligands. *J Cereb Blood Flow Metab* **6**: 137-146, 1986
- 4) Wong DF, Gjedde A, Wagner HN Jr, et al: Quantification of neuroreceptors in the living human brain · II. Inhibition studies of receptor density and affinity. *J Cereb Blood Flow Metab* **6**: 147-153, 1986
- 5) Farde L, Hall H, Ehrin E, et al: Quantitative analysis of D<sub>2</sub> dopamine receptor binding in the living human brain by PET. *Science* **231**: 258-261, 1986
- 6) Wong DF, Wagner HN Jr, Tune LE, et al: Positron emission tomography reveals elevated D<sub>2</sub> dopamine receptors in drug-naïve schizophrenics. *Science* **234**: 1558-1563, 1986
- 7) Sedvall G, Farde L, Wiesel FA: Quantitative determination of D<sub>2</sub> dopamine receptors characteristics in healthy human subjects and psychiatric patients. *Life Sci* **41**: 813-816, 1987
- 8) Perlmutter JS, Larson KB, Raichle ME, et al: Strategies for in vivo measurements of receptor binding using positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* **6**: 154-169, 1986
- 9) Chugani DC, Ackerman RF, Phelps ME: <sup>3</sup>H-Spiperone is trapped in vivo via receptor-mediated endocytosis. *J Nucl Med* **28**: 612, 1987
- 10) König JFR, Klippel RA: "The rat brain—A stereotaxic atlas", Robert F Krieger, New York, 1963
- 11) Scatchard D: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* **51**: 660-672, 1949
- 12) Sibley DR, Lean AP, Creese I: Anterior pituitary dopamine receptors. *J Biol Chem* **257**: 6351-6361, 1982
- 13) 森 厚文, 柴 和弘, 辻 志郎, 他: ラット脳における <sup>3</sup>H-スピロペリドールによる受容体マクロオートラジオグラフィ. *Radioisotopes* **34**: 359-363, 1985
- 14) Hartzell HC: Distribution of muscarinic acetylcholine receptors and presynaptic nerve terminals in amphibian heart. *J Cell Biol* **86**: 6-20, 1980
- 15) Bevington PR: Data production and error analysis for the physical sciences, Bevington PR, ed, McGraw-Hill, New York, 1969, pp. 204-246
- 16) Weiland GA, Molinoff PB: Quantitative analysis of drug-receptor interactions: 1. Determination of kinetics and equilibrium properties. *Life Sci* **29**: 313-330, 1981
- 17) Galper JB, Dziekan LC, O'Hara DS, et al: The biphasic response of muscarinic cholinergic receptors in cultured heart cells to agonists. *J Biol Chem* **257**: 10344-10356, 1982
- 18) Penney JB, Pan HS, Young AB, et al: Quantitative autoradiography of [<sup>3</sup>H]muscimol binding in rat brain. *Science* **214**: 1036-1038, 1981
- 19) Young WS III, Kuhar MJ: Neurotensin receptor localization by light microscopic autoradiography in rat brain. *Brain Research* **206**: 273-285, 1981
- 20) Rainbow TC, Bleish WV, Biegon A, et al: Quantitative densitometry of neurotransmitter receptors. *J Neurosci Methods* **5**: 127-138, 1982
- 21) Young WS III, Kuhar MJ: A new method for receptor autoradiography: [<sup>3</sup>H]Opioid receptors in rat brain. *Brain Research* **179**: 255-270, 1979
- 22) Nonaka R, Moroji T: Quantitative autoradiography of muscarinic cholinergic receptors in the rat brain. *Brain Research* **296**: 295-303, 1984
- 23) Churchill L, Pazdernik TL, Samson F, et al: Topographical distribution of down-regulated muscarinic receptors in rat brains after repeated exposure to disopropyl phosphorofluoridate. *Neurosci* **11**: 463-472, 1984



## Summary

### Quantitative Receptor Autoradiography Using [<sup>3</sup>H]-Quinuclidinyl Benzilate Binding in the Rat Brain —A Comparison with Radio-receptor Assay—

Hirofumi MORI\*, Kazuhiro SHIBA\*, Hiroshi MATSUDA\*\*,  
Shiro TSUJI\*\* and Kinichi HISADA\*\*

*\*Radioisotope Center, \*\*Department of Nuclear Medicine, Kanazawa University*

Receptor autoradiography has several important advantages over radio-receptor assay (RRA) which is still widely utilized. However, it has been said that there are significant differences in the binding characteristics of muscarinic receptors observed in tissue slices versus homogenates. We compared receptor autoradiography with RRA, in terms of the binding kinetics for [<sup>3</sup>H]-quinuclidinyl benzilate (QNB) in the rat striatum. Receptor autoradiography according to experimental condition published in literature showed a distortion of the saturation curve at low concentration of [<sup>3</sup>H]-QNB and Scatchard analysis was difficult. However, the binding kinetics obtained with tissue slices depended on the incubation time and gradually approached the values with tissue homogenates closer with the incubation time. On the optimal condition, the results by both methods agreed well.

It is well known that the association kinetics of the binding of [<sup>3</sup>H]-QNB follows the two-step isomerization process. Therefore, our new mathematical analysis of two-step isomerization model was compared with the previously reported analysis. The values for dissociation constant ( $K_d$ ) from non-isomerization model, apparent  $K_d$  from our new analysis, and apparent  $K_d$  from the previously reported analysis were 11.7 pM, 10.8 pM, and 3.5 pM, respectively. Accordingly, the trustworthiness of our analysis was clearly demonstrated. This new correct kinetic analysis of two step isomerization model is expected to elucidate the complicated ligand-receptor interaction in various animal models.

**Key words:** Receptor autoradiography, Radio-receptor assay, [<sup>3</sup>H]-quinuclidinyl benzilate, Muscarinic acetylcholine, Brain.