

# MPTP投与パーキンソン病モデルマウスの線条体 における非ドーパミン神経の組織化学的变化

岡山大学医学部第一解剖学教室

芳 地 俊 和

(昭和61年 3月 7日受稿)

**key words** : MPTP, 線条体, 非ドーパミンニューロン,  
組織化学, マウス

## 緒 言

MPTP (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine) がパーキンソン病をおこすことは、1982年米国でメペリジン (人工ヘロイン) 合成の不純物 MPTP を混入する麻薬を使用した中毒患者にパーキンソン病が多発した事件から、全く偶然に発見された<sup>1)</sup>。MPTP は黒質線条体系ドーパミンニューロンを選択的に変性させ、臨床的見地からも自然発症パーキンソン病と区別し難いほど類似している<sup>2), 3), 4)</sup>。この毒物はヒト以外にもサルやマウスなど数種の動物においても、同様な黒質線条体系ドーパミンニューロンの変性をもたらした<sup>2), 3), 5)</sup>。MPTP による研究が、パーキンソン病発症の機構解明に役立つのではないかと期待されている。

周知のごとく、パーキンソン病をはじめとする錐体外路系疾患における機能的障害を惹起する主座は新線条体 (尾状核と被殻) にあるとされ、とくにこの領域における種々の神経化学的变化と機能的障害の種類や症状の発現との間に密接な関連があるのではないかと考えられている<sup>6), 7)</sup>。最近の組織化学技法、なかでも免疫組織化学法の発展により、新線条体は黒質緻密質のドーパミンニューロンから強力な入力線維を受けるほか、縫線核セロトニン神経<sup>8)</sup>、被蓋コレシストキニン含有神経<sup>9)</sup>、視床サブスタンス P 含有神経<sup>10)</sup>、大脳皮質グルタミン酸<sup>11)</sup>あるいはソ

マトスタチン含有神経<sup>12)</sup>から軸索投射を受け、これらの神経系によっても支配されていることが報告されている。さらに線条体内在性要素として介在性 GABA ニューロン<sup>13)</sup>のほかに大型コリンニューロン<sup>14)</sup>やソマトスタチン含有ニューロン<sup>15)</sup>の存在が明らかにされるとともに、淡蒼球へ投射する GABA 含有神経<sup>16)</sup>およびエンケファリン含有神経<sup>17), 18)</sup>、さらには黒質網様質へ投射するサブスタンス P<sup>19)</sup>、エンケファリン、ダイノルフィン<sup>20)</sup>あるいは GABA 含有神経<sup>21)</sup>などについての詳細な形態学的知見が集積されつつある。この他にもその投射様式の詳細はなお不明であるが、線条体に分布する神経細胞体のうちの一部がソマトスタチン<sup>22)</sup>およびニューロテンシン<sup>23)</sup>などのペプチドや NADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼ<sup>24)</sup>、アセチルコリンエステラーゼ<sup>25)</sup>などの酵素を含有することが知られている。

以上のような研究の成果とともに、例えばもう一つの代表的錐体外路系疾患であるハンチントン舞踏病において、その主病因とされるコリン神経の変性脱落現象のほかに、サブスタンス P<sup>26)</sup>や GABA 含有ニューロン<sup>27)</sup>の異常が見い出されるようになった。したがって、これら錐体外路系疾患の病理学的基礎は、決して少数の神経系の病態に基づくものではなく、各種の伝達物質含有神経が構築する回路網において、正常脳で成立している機能的平衡が多面的に崩壊

したためではないかと推察される。

本研究では、MPTP を投与したパーキンソン病モデルマウスの線条体において、非ドーパミン神経のうちとくにセロトニン、エンケファリン、GABA、NADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼ、アセチルコリン含有神経がどのような影響を受けるかを組織化学的に検索し、パーキンソン病発症機構説明の手がかりを得ることを目的とした。

### 材料および方法

#### 1) 実験動物

成熟雄性 ICR 系マウス (12~14 週齢, 体重 30~40g) 計 82 匹を用い, 対照群 15 匹, MPTP 投与群 7 匹, MPTP・HCl 投与群 60 匹に分けた。

#### 2) 薬物

MPTP および MPTP・HCl はそれぞれ Aldrich chemicals 社および Biochemical Research 社から購入した。

免疫組織化学に使用した一次抗体は、岡山大学解剖学教室で作成した抗エンケファリン抗体と滋賀医科大学解剖学教室の木村宏助教授から供与された抗セロトニン抗体および抗 GABA 抗体を使用した。抗ウサギ IgG およびペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ抗体 (PAP) 複合物は、医学生物学研究所社から、ビオチン化抗ウサギ IgG, アビジン DH およびビオチン化ペルオキシダーゼ H は、ベクター社から購入した。

#### 3) 薬物投与方法

MPTP および MPTP・HCl は蒸留水に溶解した後、1N-HCl で pH 6~7 に調整し、動物の腹腔内に MPTP または MPTP・HCl 20mg/kg (一匹当り約 0.25ml) を 1 日 1 回注射し、連続 3 日間繰り返した。対照群の動物には生理的食塩水 (一匹当り約 0.25ml) を同様な方法で投与した。これらの動物を最終注射後それぞれ 3, 7, 30, 60 日目以下の方法に従って実験に供した。

#### 4) 脳試料作製法

ペントバルビタール (50mg/kg, 腹腔内) 深麻酔下で動物を開胸し、左心室から Krebs-Ringer 液 (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 混合ガス飽和, pH7.4, 4℃) を灌流して脱血したのち、引き続き酵素組織化学あるいは免疫組織化学用の固定

液を灌流した。灌流固定した脳をクリオスタットで厚さ 20 μm の前額断の切片とし、各々の組織化学法に従い染色した。それぞれの酵素組織化学法および免疫組織化学法の詳細は以下のとおりである。

#### 5) 酵素組織化学

##### i) アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 酵素組織化学

灌流固定液は 2% パラホルムアルデヒド (FA), 2% グルタルアルデヒド (GA) を含む 0.1M 燐酸緩衝液 (PB; pH7.4, 4℃) を用い 50ml を 5 分間かけて灌流した。固定した脳を摘出し 15% ショ糖液 (0.1M PB, pH7.4, 4℃) に 3~4 時間浸漬後、クリオスタット切片を作製した。この切片を浮遊状態で田子ら<sup>28)</sup>の高感度 AChE 組織化学法により染色した。すなわち、切片を 0.1M マレイン酸緩衝液 (MB; pH6.0) で 15 分間洗浄し 50 μM クエン酸ナトリウム, 30 μM 硫酸銅, 5 μM フェリシアン化カリウムおよび 18 μM ヨウ化アセチルチオコリンを含む 0.1M MB 中で室温で 60 分間反応させた。反応終了後、50mM トリス-塩酸緩衝液 (Tris-HCl; pH7.6) で洗浄し、0.04% ジアミノベンチジン塩酸塩 (DAB) および 0.3% 硫酸ニッケルアンモニウム (NAS) を含む 50 μM Tris-HCl (pH7.6) 中で 5 分間反応を行なった。最後に過酸化水素 (0.006%) を加えることにより、反応産物 (青紫色) の可視化を行なった。

##### ii) NADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼ酵素組織化学

灌流固定、固定操作およびクリオスタットによる切方作成は AChE 酵素組織化学の場合と全く同一に行ない、やはり切方を浮遊状態で Scherer-Singler ら<sup>29)</sup>の方法に従って染色した。反応液の組成は、1.0mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドナトリウム, 0.2mM ニトロブルーテトラゾリウムおよび 1.0mM グルコース-6 リン酸を含む 50mM Tris-HCl (pH8.0) で、この液に切片を浸漬浮遊し 37℃ で 60 分間インキュベートした。

#### 6) 免疫組織化学

以下に述べる免疫組織化学法の基本的操作は木村ら<sup>30)</sup>の方法に従ったが、それぞれの目的物質に応じて若干の改変を施した。

## i) GABA の免疫組織化学

灌流固定液の組成は 4 % FA, 0.5 % GA を含む 0.1M PB (pH7.4, 4℃) であり、灌流固定脳を摘出し厚さ 5 ~ 6 mm の前額断に離断し、さらに 4 % FA を含む 0.1M PB 中で 2 日間後固定した。次いで、組織塊を 15 % しょ糖液に 2 日間浸漬した後、厚さ 20  $\mu$ m のクリオスタット切片を作製した。直ちにこれらの浮遊切片を 0.1 M 磷酸緩衝食塩水 (PBS; pH7.4) で洗浄したのち、抗 GABA 血清 (ウサギ, 10,000 倍希釈) と 4℃ で 3 日間、ビオチン化抗ウサギ IgG (400 倍希釈) と室温で 60 分間さらにアビジン-ビオチン複合体 (ABC 法<sup>31)</sup>; 800 倍希釈) と室温で 60 分間、それぞれ反応させた。上記各々の抗体との反応後は、切片を PBS で十分に洗浄した。最後に 0.02 % DAB, 0.3 % NAS, 0.005 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む 50mM Tris-HCl (pH7.6) と室温で 10 分間インキュベートし呈色反応を行なった。なお、抗体液の希釈は PBS により行なった。

## ii) セロトニン (5-HT) の免疫組織化学

灌流固定液の組成は 4 % FA, 0.5 % GA, 0.2 % ピクリン酸 (PA) を含む 0.1M PB (pH7.4, 4℃) であり、摘出脳を厚さ 5 ~ 6 mm の前額断組織片としさらに 4 % FA および 0.2 % PA を含む 0.1M PB (pH7.4) 中で 2 日間後固定した。次いで、組織塊を 15 % しょ糖液に 2 日間浸漬した後、クリオスタット切片を作製し、浮遊切片を 0.3 % トリトン X-100 を含む PBS (PBS-T) に最低 4 日間保存した。その後、抗 5-HT 血清 (ウサギ, 10,000 倍希釈) と 4℃ で 3 日間、抗ウサギ IgG (ヤギ, 5,000 倍希釈) と 4℃ で 4 ~ 10 時間さらにペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ抗体複合物 (PAP 法; 5,000 倍希釈) と室温で 2 時間、それぞれ反応させた。上記各々の抗体との反応後切片を PBS-T で十分に洗浄した。最後に、GABA の免疫組織化学と同一の DAB-NAS 混液で呈色反応を行なった。なお、抗体液の希釈は PBS-T により行なった。

## iii) エンケファリン (Enk) の免疫組織化学

5-HT の免疫組織化学と全く同一の方法で作製した PBS-T 中の浮遊切片を 0.2 % トリプシン, 0.5mM 塩化カルシウムを含む 0.1M PBS 中で 37℃ で 10 分間酵素処理を行なった。その後、抗

Enk 血清 (ウサギ) を用いて、5-HT の免疫組織化学と同一の手順で PAP 法により免疫染色を行なった。一次抗体は 400 倍希釈とし、4℃ で 7 日間反応を行なった。

それぞれの染色の終了した切片はゼラチン処理スライドガラスに貼付し、アルコール系列にて脱水、キシレンにて透徹およびエンタランにて封入した。完成した組織標本について、線条体における各種神経伝達関連物質の変化を吻側から尾側にかけて光学顕微鏡で観察を行なった。

## 結 果

## 1) AChE の組織化学

正常マウスの線条体では、AChE 陽性線維は主として灰白質に分布している。その線維は種々の大きさを示し、ほとんど常にバリコシティー (連珠状構造) を有している。これらの陽性線維は非常に密なネットワークを形成しているので個々の線維形態の観察が困難なこともしばしばである。また、その線維網に埋没するようにして直径約 15 ~ 20  $\mu$ m の大型で卵円形または紡錘形の陽性細胞が、線条体内にほぼ均一に散在するがその分布密度はそれ程高くない。一方、線条体内に認められる白質すなわち線維束には、ごく少数の AChE 陽性線維が混在するのが認められた。

次に MPTP 投与マウスについてみると、投与後の生存期間の相違にかかわらず、正常動物で認められた所見と異なる結果は認められなかった。例えば図 1A と図 1B を比較してみると、少なくとも AChE 陽性の神経線維や終末の分布密度あるいは AChE 陽性細胞の大きさ、形状、分布様式などに有意な差が認められないのがわかる。

2) NADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼの組織化学

正常マウスの線条体では、灰白質のすべての領域に染色強度は弱いもののかなり密な NADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼ陽性の神経終末が分布している。この陽性の線維網の間隙に陽性細胞およびその樹状突起や軸索などが散在性に分布していた。これらの陽性細胞は強いジアホラーゼ活性を示すため濃染され、分布密度は AChE 陽性細胞より高く、線条体の至る所に認められるも

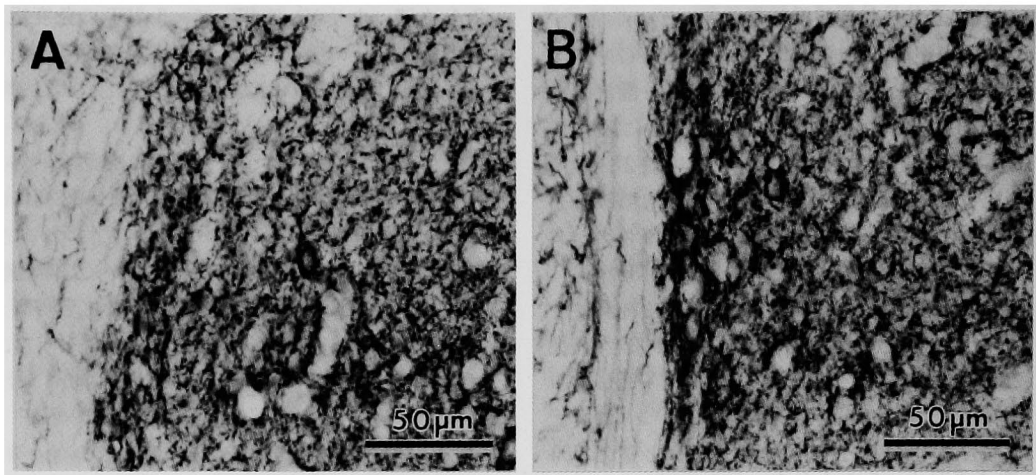


Fig. 1 AChE histochemistry in mouse striatum from control (A) and from 7 days after MPTP treatment (B). Positive nerve fibers with various sizes form a dense network. Large sized, oval cell bodies are seen. No effect of MPTP treatment is found in the staining result.

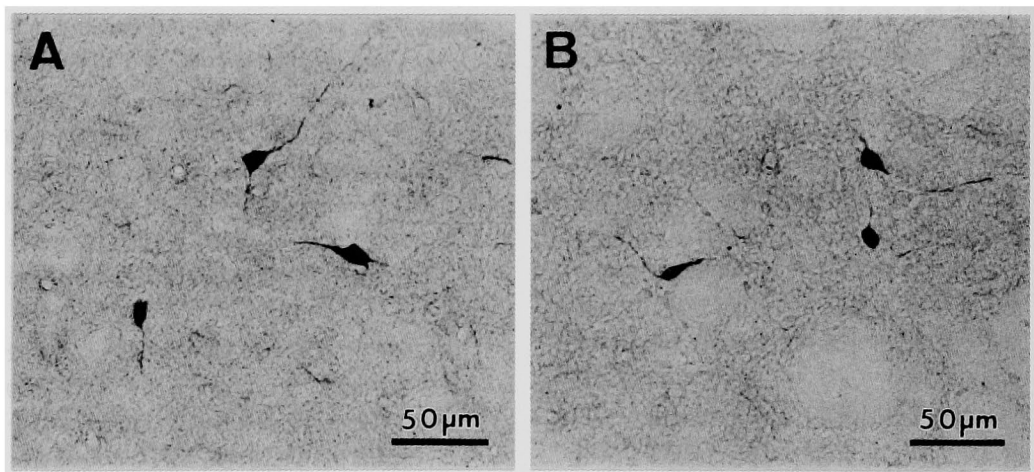


Fig. 2 NADPH<sub>2</sub>-diaphorase histochemistry in mouse striatum from control (A) and from 7 days after MPTP treatment (B). Medium sized positive cells extend a few thick and long dendrites. No noticeable change is seen in morphology nor in number of these positive cells.

のの不規則に存在していた。その細胞体は、三角形、紡錘形あるいは卵円形であり直径約10～15µmであった。これらの細胞体から比較的太くて長い数本の樹状突起が出ており分枝を出しているのもしばしば認められた。またパニコシティーを有する少数の樹状突起も認められたが樹状突起棘を持つものはなかった。一方、白質の線維束には陽性の構造物は認められなかった。

次にMPTP投与マウスについてみると、投

与後いずれの生存期間の例においても、正常動物で認められた所見と異なる結果は認められなかった。例えば図2Aと図2Bを比較してみると、少なくともNADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼ陽性の終末の分布密度あるいはNADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼ陽性細胞の染色強度、大きさ、形状、分布様式などに有意な差が認められないのがわかる。

### 3) GABAの免疫組織化学

正常マウスの線条体の灰白質は GABA様の

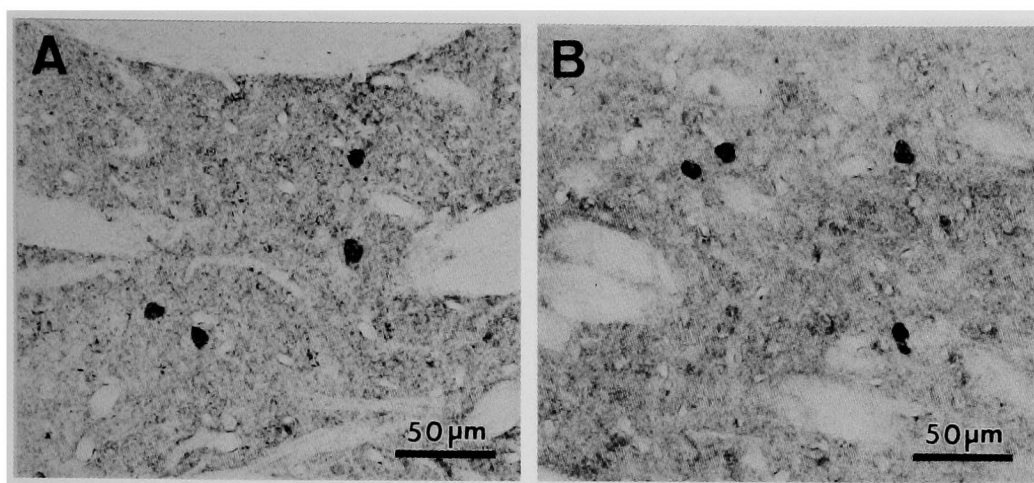


Fig. 3 GABA immunohistochemistry in mouse striatum from control (A) and from 7 days after MPTP treatment (B). Medium sized oval cells are scattered throughout the striatum. No effect of MPTP treatment is found in the staining result.

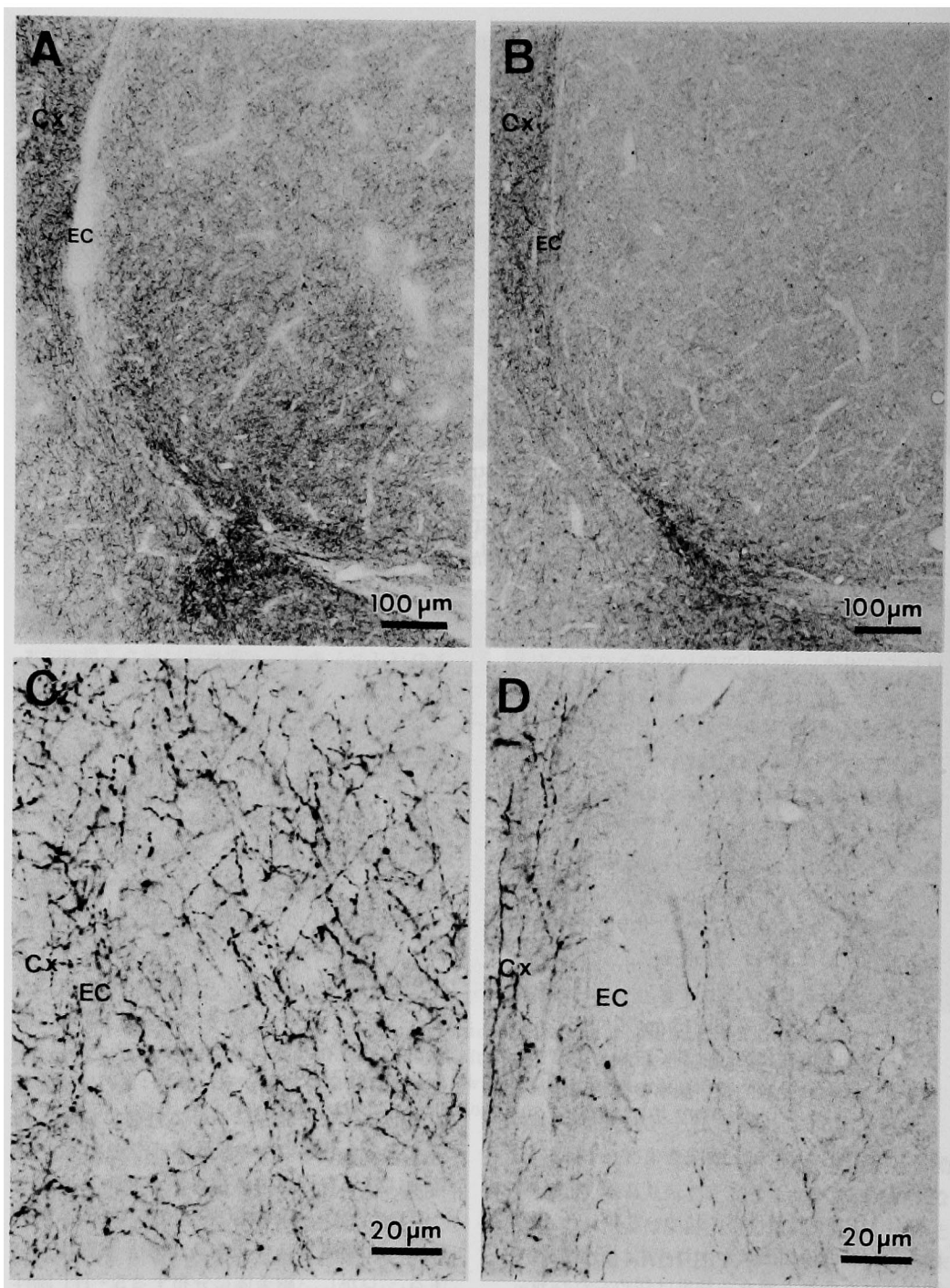
免疫活性を示す非常に微細な顆粒様構造が密に分布しているため、弱拡大では線条体全体が一見してびまん性にかつ中等度に染色されているように見えた。このような傾向は線条体の前額断面におけるいづれの部位でも、あるいは吻尾側の広がりにおいても同様に観察された。これらの顆粒様構造はGABA含有神経の突起とくに神経終末と思われた。このほか、灰白質には比較的濃染するGABA様免疫陽性の神経細胞体が見られ、均一に散在性に分布しているのが認められた。その分布密度はNADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼ陽性細胞の分布密度に比して若干低かった。GABA陽性細胞体はおおむね卵円形あるいは紡錘形で、そのほとんどは直径約10~15μmの中型であった。これらの細胞の樹状突起は多くの場合染色されないが、まれに比較的に長い数本の樹状突起が強く染色されることもあった。一方、白質の線維束にはGABA様免疫活性を有する構造は認められなかった。

次にMPTP投与マウスについてみると、投与後の生存期間の相違にかかわらず、正常動物で認められた所見と異なる結果は認められなかった。例えば図3Aと図3Bを比較してみると、灰白質の免疫活性あるいは陽性細胞の染色強度、大きさ、形状、分布様式などに有意な差が認められないのがわかる。

#### 4) 5-HTの免疫組織化学

正常マウスの線条体においては、種々の大きさのバリコシティーが珠数状に連なる微細な5-HT免疫反応陽性線維および終末が密なネットワークを形成しているのが観察された。

これらの陽性線維には、微小なバリコシティーを有する繊細な線維と比較的大きなバリコシティーを有する太い線維の2種が認められた。これらの陽性線維の分布密度は線条体内の領域によって差異が認められた。すなわち、線条体の吻側方ではその腹内側部で高く、さらに尾側方に行くに従い腹外側部で高く観察された。このような陽性線維の分布密度の高い部位では大きなバリコシティーを有する太い5-HT陽性線維が密に分布しているのが特徴的であった。最も5-HT陽性線維が密に分布するのは前交連の後部を含む前額断における外包に接する領域、すなわち線条体の腹外側部であった。ここでは外包を形成する線維束が非常に細くなっているため、線条体に分布する5-HT陽性線維と大脳皮質に分布するそれとが直接会合する。しかし、線条体に分布する5-HT陽性線維の分布密度が大脳皮質のそれよりもはるかに高いので、両者の境界は明瞭に見分けられた。一方、白質の線維束にはごく少数の5-HT陽性線維が混在していたがやはり、その多くは

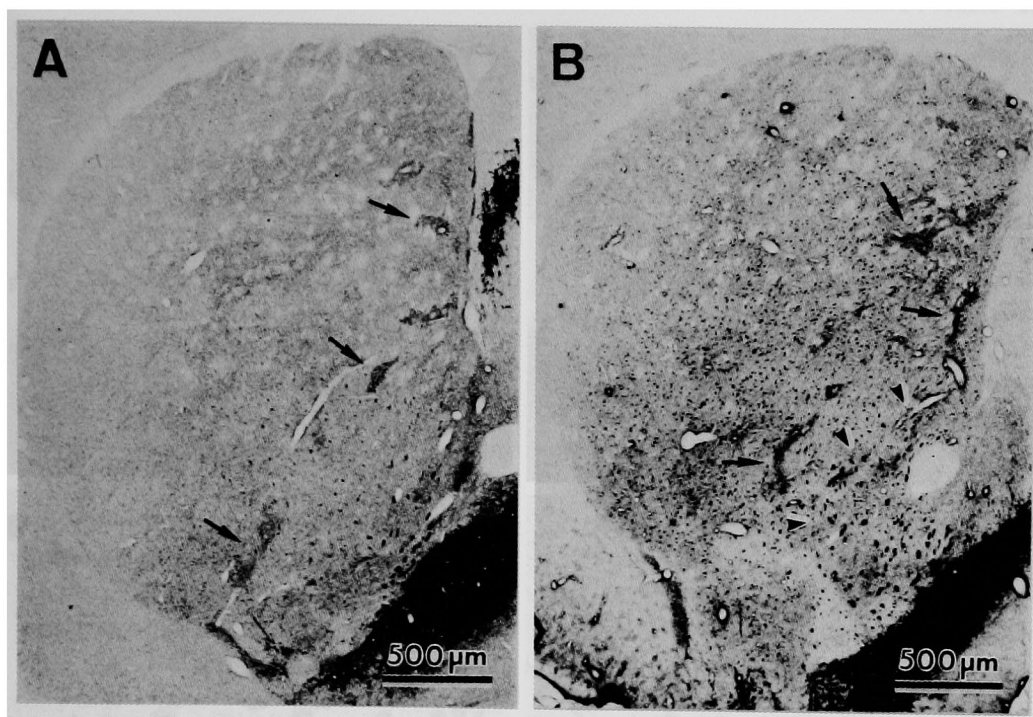


バリコシティーを有しているのが認められた。

次にMPTP投与マウスについてみると、投与後3日の生存例では、正常動物で認められた所見と異なる結果は観察されなかった。しかし

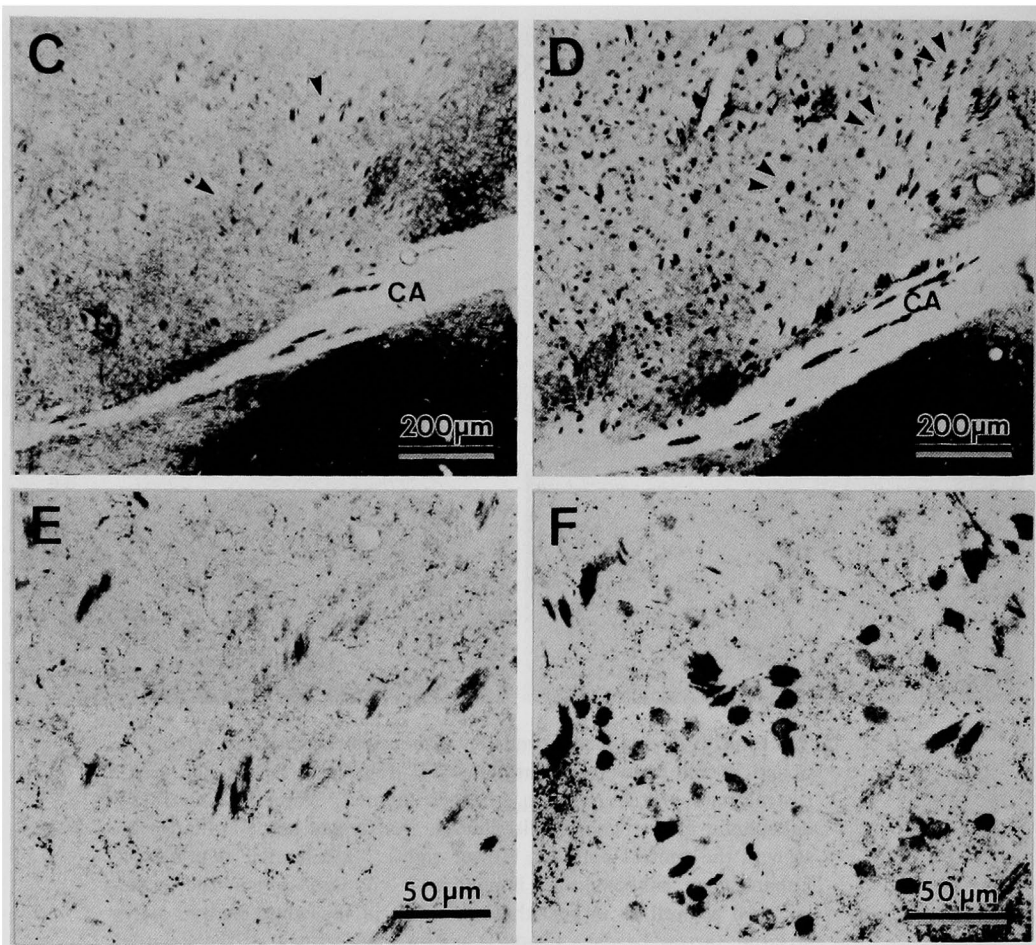
ながら、投与後7日の生存例では陽性線維の分布密度が減少している例が数多く(MPTP投与7例中3例, MPTP・HCl投与5例中2例)認められた。このような減少の傾向は、線条体





**Fig. 5** Enkephalin immunohistochemistry in mouse striatum from control (A, C and E) and from 3 days after MPTP treatment (B,D and F). A; a rostral part of the striatum. Islands (arrows) stained intensely for enkephalin are irregularly distributed. Extremely dense stainings are seen in the ventral pallidum (lower right). B; a similar region to A. Enhancement of enkephalin immunoreactivity is seen in the islands (arrows) as well as in pass-through fibers in the white matter of the striatum (arrow heads). C and D; a ventromedial part of the striatum, slightly caudal to A and dorsally to the commissura anterior (CA). Here the number of enkephalin positive pass-through fibers (arrow heads) are far greater in D than in C. E and F; A higher power magnification of the ventrolateral part of the striatum. Densities of positive terminals and varicose fibers are higher in F than in E. In addition, many cell bodies are stained intensely for enkephalin in F.

**Fig. 4** 5-HT immunohistochemistry in the striatum from control (A and C) and MPTP-treated (B and D) mice. A; distribution of 5HT nerve fibers in a lateral part of the striatum which is adjacent with the external capsule (EC). Further laterally (left) a part of the cerebral cortex (Cx) is seen. Note that the ventrolateral part of the striatum contains the highest density of 5HT fibers. C; a higher magnification of the ventrolateral striatum. B; on 7 days after MPTP treatment, very few fibers are observed in a similar region to A. D; on 30 days after MPTP treatment, a higher magnification of the ventrolateral striatum demonstrates that 5HT fibers are very few in the striatum (right) but are rich in the cortex (Cx).



の吻側から尾側に至るすべてのレベルで観察されたが、その減少の程度は個々の動物により異なり、かなり大きな個体差が認められた。例えば、減少の程度が比較的弱い動物の線条体では、陽性線維のネットワークが正常物のそれに比べて平均して若干疎になっているのみであり、特に分布密度の高い領域では差が不明瞭であった。これに対し、減少の程度の強い動物の線条体では、平均的な線維密度の低下が明瞭であるばかりでなく、正常動物で高い線維密度を示す腹外側部領域でも著明に分布密度が減少しているのが認められた。このような分布密度減少の原因は、主として小さなバリコシティーを有する繊細な線維が選択的に減少することによるものとみなすことができ、大きなバリコシティーを有する太い線維は比較的MPTP投与による影響

を受けずに、なお豊富に残存する傾向があった。図4Bと4Dは最も著しい減少を示した例で、その弱拡大所見（図4B）では、線条体にほとんど5-HT陽性線維を見出すことが出来ず、非常に少数の線維が大脳皮質との境界領域近くに分布するのみであった。その強拡大所見（図4D）では、これら少数の陽性線維が比較的大きなバリコシティーを持つことが判かる。このようなMPTP投与によって導かれる5-HT陽性線維の減少は、投与後30日あるいは60日目の長時日経過した動物でも認められた。

#### 5) Enkの免疫組織化学

正常マウスの線条体の灰白質には、かなり豊富かつ濃く染まるEnk免疫反応陽性の神経線維と終末および非常に淡く染まる細胞体が観察された。これらの陽性線維のほとんどは長さ数十



$\mu\text{m}$ 以下の短かい繊細な線維であるが、大別してバリコシティーの大きさから2種に区別でき、両者がほぼ同等の割合で混在していた。これに加え、豊富な顆粒状を示すEnk陽性構造も認められ、これらはおそらくEnk神経終末と思われた(図5E)。Enk陽性線維や終末の分布密度について、例えば前交連を含む前額断レベルでみると、最も高い部位は線条体の腹内側部である。ここでは大きな(約 $2.5\mu\text{m}$ )バリコシティーを有する太い線維が密集して存在し、時としてこれらの線維が分岐する像も観察された。これに対して、線条体の背外側部におけるEnk陽性線維および終末の分布密度は低く、線維も繊細なものが優勢で分岐像もめったに観察されない。このような分布密度の様式とは別に前交連よりも吻側レベルの線条体では、陽性線維や終末が特異な分布様式を示すことが認められた。すなわち、特に濃厚な密度をもつEnkに陽性構造が島状に分布し、いわゆるモザイク様分布を示した。この傾向は吻側の線条体頭においてより明瞭に認められた。一方、Enk陽性細胞は一般に淡く染色され、その数は多いと推定されるものの、豊富かつ濃染するEnk陽性線維に妨げられて観察が困難である。しかし、注意深くみるとこれらの陽性細胞は線条体内に均一に散在して分布し、モザイク様の分布はどのレベルにおいても観察されない。これらの陽性細胞は、卵円形あるいは紡錘形の直径約 $10\sim 15\mu\text{m}$ の中型細胞であり、樹状突起は染色されなかった。また、淡蒼球の腹側部の現われるレベルでは、線条体の腹内側部において、それらに投射しているものと思われる白質の線維束の中にEnk免疫反応陽性の産物が密に分布しているのが認められた(図5A)。しかしながら、背側部やその他のレベルの線維束には陽性構造は観察されなかった。

次にMPTP投与マウスについてみると、投与3日後の動物で明らかな変化が認められた。すなわち、線条体の最吻側部においてEnk陽性終末や線維の染色強度が明らかに増大し、この傾向はとくに島状により濃密に分布する部位において著明であり、このためモザイク様の分布が弱拡大写真でも容易に認めることができる(図

5B)。より尾側に至り、淡蒼球の腹側部が現われるレベルでは、線条体の腹内側部に分布するEnk陽性神経線維の染色性が非常に増強し、灰白質に分布する連珠状線維の分布密度が高くなってみえるばかりでなく、淡蒼球の外側および腹側に投射すると考えられる通過型のEnk陽性線維が線条体の白質すなわち線維束内に明瞭に観察された。このようなEnk免疫陽性反応の増強は、Enk含有細胞についても認められ、無処置の動物の場合に比してより鮮明な形態の観察が可能となった。しかし、これらの陽性細胞の染色強度の程度は一樣でなく、線条体内の部位に応じて差異があった。すなわち、線条体の背外側部では主として比較的染色強度の弱い細胞がかなりの密度をもって認められるのに対し、腹内側部では非常に濃染された細胞がより高い密度をもって分布していた。これらの濃染された細胞について詳細に観察すると、細胞体から数本の樹状突起が放射状に伸びはげしく分岐するのが認められた。これら非常に濃染するEnk陽性細胞の分布密度が最高となるのは淡蒼球主部が出現するレベルであって、これよりもさらに尾側に向かうにつれ、次第に染色強度の弱い細胞の占める割合が増えることが認められた。

以上のようなEnk免疫染色の増強所見は、投与後3日目のような動物において最も顕著で投与後の日数とともに回復の傾向が認められたが、30日目の動物においてもなお有意な変化が認められた。すなわち、投与後7日の生存例では、線条体吻側部のモザイク様分布の密なEnk陽性線維および終末は、MPTP投与後3日目の例に比べてやや染色強度が低下した。

淡蒼球腹側部の出現するレベルでは線条体の背側部におけるEnk陽性細胞の数が減少し、また線条体腹側部における濃染された細胞の占める割合も低くなった。これよりも尾側の線条体では、いずれのレベルにおいても線条体の白質すなわち線維束内に認められる通過型のEnk陽性投射神経の染色性がやはり低下した。

投与後30日目の動物においては、線条体吻側部のモザイク様分布の様式は正常例の場合とほとんど差がなくなった。より尾側の線条体においては、その背側部に認められるEnk陽性細胞

の数が増加するばかりでなく、線条体腹側部におけるEnk陽性細胞の分布密度も7日目の例に比べて低下した。またEnk陽性の投射線維の数も線条体のいずれの部位においてもさらに減少していた。

投与後60日目の動物においては、いずれのEnk陽性構造の分布様式においても、無処置動物におけるそれとほぼ同等の所見が認められた。

以上のようにMPTP処置マウスにおいては、Enk免疫染色の結果は一過性に増強しその後漸次減退していく傾向が認められた。しかし、このような経過は決してすべての動物において同様という訳ではなくかなりの個体差が認められた。

## 考 察

ドーパミンの神経毒MPTPの投与により、マウス線条体における5-HT含有神経およびEnk含有神経に著明な変化が生じることが、形態学的に立証された。しかし、同様に組織化学的技法を用いてAChE, NADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼあるいはGABA含有神経を検索したところ、少なくとも光学顕微鏡レベルでは有意な変化が認められなかった。この毒物により惹起される線条体の5-HT神経の形態学的変動の特徴は、その求心性神経線維および終末の染色性が著明に減弱するため、みかけ上の分布密度が減少することにある。これに対し、線条体のEnk含有神経は、その大部分が線条体に内在する細胞体およびそれらの神経突起や終末の染色性が、MPTP投与によって増強されるのが特徴である。

以上の結果から、パーキンソン病の動物モデルとされるMPTP投与マウスの線条体において、ドーパミン神経が退行性変化をうけるのみならず、5-HT含有神経が退行性の、そしてEnkに含有神経が代償反応性の変化を受けることが推察される。

本研究で立証されたMPTP投与による5-HT陽性線維の減少は、投与後少なくとも7日目から認められ、個体によっては30日あるいは60日目でも認められる持続的な変化である。これに対して、Pilebladら<sup>32)</sup>およびHallmanら<sup>33)</sup>はMPTP投与によってマウス線条体の5-HT含有

量は変化しないと報告している。しかし、PilebladらはMPTP(投与量; 50mg/kg, 1回)を皮下に注射し、しかも投与後120分という非常に短時間後の変化を調べたにすぎない。また、Hallmanらは一匹あたり総量20mg/kgを投与した動物について検索しており、本研究で用いた投与総量の1/3と少ため、5-HT含有量の変化を惹起するには不十分であったと思われる。

Scattonら<sup>34)</sup>はパーキンソン病患者脳を生化学的に調べ、線条体5-HT含有量が対照例に比し、有意に低下することを認めている。本研究結果と併せて判断すると、ヒトおよびマウスの両者において黒質線条体ドーパミン神経の変性と平行して5-HT神経も退行性変化を受けるものと推察される。この現象を説明する機構として、二通りの可能性が考えられる。その一つは、何らかの原因でまずドーパミン神経に変性が起り、それが原因となって二次的に5-HT神経に退行性変化が起こるとする考えである。他の一つは、現在なお未知であるパーキンソン病発症の素因あるいはMPTP投与による毒性原因物質とされる1-methyl-4-phenyl-pyridium(MPP<sup>+</sup>)が、ドーパミン神経のみならず5-HT神経に対しても同時進行的に毒性作用を及ぼすとする考えである。但し、後者の場合、毒性作用はドーパミン神経に対して非常に強く、5-HT神経に対しては弱いものと推定でき、従って神経変性の指標もドーパミン神経よりも5-HT神経の方が遅れて発現するものと思われる。マウスにMPTPを投与することにより惹起される線条体ドーパミン含有量の低下は、最終投与後3日目に最も顕著となるという(Heikkiläら<sup>35)</sup>)。ところが、本研究におけるMPTP投与後3日目の動物では線条体5-HT陽性線維には変化が認められず、投与後7日目以降の例でその分布密度の低下が認められた。この結果からだけでは、上述の2つの可能性を吟味することは出来ないが、少なくとも5-HT神経における変動は遅延性かつ遷延性のものであることが確められる。今後の課題は、このような5-HT神経の変化がドーパミン神経におけるそれと同様非可逆性であるか否かをより長期間の慢性実験をも含めて検討し、上述の機構のうちいずれが重要であるか決定す

ることにある。

本研究で用いた免疫組織化学法により、5-HT 陽性線維には微小なバリコシティーを有する繊細な線維と比較的大きなバリコシティーを有する太い線維の2種あることが確められた。このうち、繊細な線維の方がMPTP投与の影響をより強く受け著明に減少する傾向がある。これは、単に細い線維に含有される5-HT量が太いものより少ないため、検出限界以下に低下することによるのかも知れない。

しかし、形態学的に詳細に観察すると、太い5-HT線維は多く線条体の神経細胞体に密着し、おそらく軸索細胞体シナプスを形成するのに対し、細い線維はニューロピルに豊富に存在するという異なった形態学的特徴を示す。従って、5-HT神経のなかでもそれぞれの機能分担を反映して、MPTP投与に対し、異なる反応性を示したとも考えられる。

Hallman ら<sup>39)</sup> はマウス線条体のトリプトファン酸化酵素 (TH) を免疫組織化学的に観察し、TH 陽性神経終末の分布密度がMPTP投与により顕著に減少することを認めた。一方、Gupta ら<sup>36)</sup> は本研究で用いたと同様な5-HT免疫組織化学法を用いて、マウス縫線核を観察し、5-HT 陽性細胞数はMPTP投与によって影響を受けないと結論づけた。これらの報告と本研究の結果とは矛盾しないばかりでなく、MPTP投与による5-HT神経の退行性変化は線条体5-HT神経終末に主として起こり、特にそれら5-HT神経に存在するTHの含有量が低下することに基づくことを示している。この酵素蛋白THの量的変化とTH活性の強弱は必ずしも関連するものではないので、5-HT含有量の減少を直ちにTHの量的変化と結びつけることは出来ない。しかし、いずれにしてもTHの蛋白量および5-HT含有量が共に低下していることから、線条体5-HT神経が機能低下に陥っていることは想像に難くない。

パーキンソン病患者の線条体 Enk 含有量を測定した報告では、正常人のそれと比べて有意な変動がないことが知られている (Taquet ら<sup>37)</sup>, Llorens-cortes ら<sup>38)</sup>)。本研究でもMPTP投与60日目においては正常群の場合とほぼ同等

の結果が得られており、したがって線条体 Enk 神経における変動は、この疾患の早期に一過性に認められる現象とみなされる。このEnk神経に認められる変動のうち、神経終末におけるEnk陽性反応の増強は特に線条体吻側部に多数分布するより濃密なEnk終末からなる島状の領域において著明であった。最近この島状に分布する領域は、他の神経伝達関連物質や投射路の面から眺めても特異的な性格を持つことが示されている (Gerfen<sup>39)</sup>)。なかでも本研究と関連して興味をもたれるのは、この島状構築に一致してオピエート受容体が密に分布するという事実である (Pert ら<sup>40)</sup>, Herkenham ら<sup>41)</sup>)。線条体に分布しているオピエート受容体の一部はドーパミン神経終末の膜上に存在すること (Pollard ら<sup>42)</sup>, Pollard ら<sup>43)</sup>)、また Enk はドーパミン神経終末に作用してドーパミンの合成および放出を促進することが知られている (Urwyler ら<sup>44)</sup>)。従って、MPTP投与により線条体ドーパミン含有量が低下するのにに対しEnkが代償的に含有量を増加させて、ドーパミンの合成および放出に促進的に働くものと思われる。このようなEnk神経に認められる変動は、吻側の島状分布領域のみならずより尾側では線条体腹内側部の灰白質および線条体白質に混在する通過型の線維にも認められ、やはり Enk 免疫陽性反応が増強する。このような Enk 神経線維および終末における変動と符合して Enk 含有神経細胞も同様に免疫陽性反応が増強する。この Enk 陽性細胞体における変化は特に線条体腹内側部において著しく、そこでは濃染された細胞が密集して存在する。上記のような Enk 免疫反応が著しく増強した神経細胞体や軸索の分布からみて、線条体出力系のなかでも特に「線条体腹内側部—淡蒼球路」における Enk 神経がMPTP投与により増強するものと考えられる。事実、線条体 Enk 神経が淡蒼球に投射すること (Correa ら<sup>17)</sup>, Del Fiaccio ら<sup>18)</sup>)、線条体腹内側部から淡蒼球腹内側部に神経投射があること (Brann ら<sup>45)</sup>) はすでに報告がある。従って、この投射路における Enk 神経の変動は、前述の線条体吻側部におけるようなドーパミン終末に対する調節機能とは全く異なる機構による可能性

が大である。現在のところ、この後者の Enk 神経路における変動の意義を明らかにすることはできない。しかし、「線条体—淡蒼球路」が、いわゆる錐体外路系の運動機能を調節していることは周知の事実であり、この経路における Enk 神経の役割を緊急に解明することは重要な課題である。興味あることは、MPTP 投与により惹起される Enk 神経の変動は投与後3日目に最大となることであり、従ってこの機構解明のために格好の動物モデルが提供されたと云えよう。

線条体は脳内で最も AChE 活性の高い部位であり、この AChE 活性は主として線条体内に散在性に分布するコリン作動性神経の細胞体や樹状突起に局在するが (Woolf ら<sup>14)</sup>)、この他にも一部の AChE 活性は黒質線条体ドーパミン投射路の神経終末に含有されるという (Lehmann ら<sup>16)</sup>)。MPTP 投与よりマウス線条体ドーパミン神経が変性を受けることは既に報告があり、また今回の研究を含めた一連の実験でも同種のマウス線条体ドーパミン神経終末が MPTP 投与により変性を受けることは確かめられている (Itagaki ら<sup>17)</sup>)。従って、線条体の AChE 活性のうち黒質ドーパミン神経に由来するものは神経変性の結果減少するものと予想された。しかしながら今回の実験結果では、対照群と MPTP 投与群のマウス線条体において、AChE 含有神経の染色強度あるいは分布様式に差異を認めることが出来なかった。この事実から2つの可能性が考えられる。一つは、黒質ドーパミン神経に対する MPTP の毒性作用は神経伝達物質であるドーパミンの合成を特異的に障害するが、細胞脱落を伴うことなく AChE 活性などは正常に保たれている場合である。もう一つは、黒質線条体ドーパミン神経の変性は確かに MPTP 投与によって惹起され、この投射路に含有されていた AChE 活性も大幅に減少するが、線条体に内在するコリン作動性神経に含有される AChE 活性が代償的に増強したため、対照群とほぼ同等の AChE 活性が保持されている可能性である。本実験で用いられた AChE 酵素組織化学法は、最近開発された最も鋭敏な染色法であり、線条体の AChE 含有神経の微細な形態を把握することが出来る。しかし、なおこの方法をも

ってしても、線条体に分布する AChE 含有神経線維のうち、いずれが線条体に内在性かあるいは求心性であるかを鑑別することは極めて困難である。従って、上記の2つの可能性を追求するためには、黒質における AChE 染色を実施するなど、さらなる研究が必要と考えられる。

パーキンソン病患者の剖検脳についてそれら線条体における AChE 活性あるいはコリンアセチル基転移酵素 (CAT) 活性を生化学的に測定した報告が幾つかあるが、その成績は必ずしも一致したものではない。Lloyd ら<sup>48)</sup> および Reisine ら<sup>49)</sup> は CAT 活性が低下すると報告し、Rinne ら<sup>50)</sup> は AChE 活性が低下すると報告している。これに対して、McGeer ら<sup>6)</sup> は CAT 活性には異常が認められないと報告している。薬物を投与して作製したモデル動物における成績とヒトの剖検脳での成績を同次元で論ずることは出来ない。しかし、両者とも脳内に共通の病態機序が働いていると仮定した場合、黒質線条体ドーパミン神経路に含有される AChE 活性の動態について、パーキンソン病のヒト患者脳およびモデル動物の両面から、詳細に検討を加えることは有意義と考えられる。

線条体に分布する NADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼ含有神経に関しては、Vincent ら<sup>24)</sup> が、この神経細胞体にソマトスタチンおよび Avian Pancreatic Polypeptide が共存することを見い出している。このことから、NADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼは、線条体に分布するソマトスタチン含有神経を同定する一つの指標となっている。従って本研究結果から、マウス線条体のソマトスタチン含有神経もおそらく MPTP 投与により形態的に把握しうろような変化がないと推察される。この推察は Flint Beal ら<sup>15)</sup> の実験結果とも符号すると思われる。すなわち彼らは、6-ヒドロキシドーパミンを黒質内に注入することにより、ドーパミン神経を破壊した動物において、線条体ソマトスタチン含有量が変動しないことを示した。さらに、パーキンソン病患者脳においても、線条体ソマトスタチン含有量は正常ヒト脳のそれと比べほとんど変動しないことも知られている (Epelbaum ら<sup>51)</sup>)。上記の事実を総合すると線条体における NADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼお

よびソマトスタチン含有神経は、黒質線条体ドーパミン神経の変性によってほとんど影響を受けないものと考えられる。

MPTP 投与マウスの線条体 GABA 神経系に関して、最近 Wallace ら<sup>52)</sup>は生化学的に測定した GABA 含有量が、投与後 7 日目に一過性に有意な上昇 (7%) を示すと報告した。またラットを用い、6-ヒドロキシドーパミンを線条体に注入することにより、ドーパミン神経終末を変性させると線条体 GABA 含有量が増加 (33%) するという (Perry ら<sup>53)</sup>)。さらにパーキンソン病患者脳でも GABA 含有量が増加 (28%) していることが報告されている。しかしながら、本研究における GABA の免疫組織化学的検索では、上記の報告と合致する結果が得られなかった。この不一致の理由は現在明らかでないが、おそらくは検出方法の相違によるのかも知れない。一般に、免疫組織化学的検索では、その詳細な形態学的知見が容易に得られるものの、上記のような僅少の生化学的变化を検出することは困難な場合が多い。さらに GABA 免疫組織化学法の検出原理からみても、細胞内結合性の GABA を染色することはできても非結合あるいは遊離型の GABA は把握し難いことは容易に想像される。これらの理由にもかかわらず、本法はなおこの研究課題の追求にとって有用であると考えられる。何故なら、もし線条体におけるドーパミン神経終末の変性と GABA の変動が関連するならば、GABA 神経のより機能的な変動は伝達物質の作用する部位すなわちシナプスにおいても起っていると考えられるからである。今後、GABA 免疫組織化学法により GABA 神経終末およびそのシナプスを同定し、電顕レベルでドーパミンと GABA の相関を追求することが重要と考えられる。

本研究で検索した物質や酵素の他に、線条体にはさらに多くの神経伝達関連物質を含有する神経が存在し、それらが複雑な回路網を形成している。従ってパーキンソン病の病因解明には、これら各種の伝達物質含有神経について、より詳細な形態学的、神経化学的および神経生理学的知見を集積し多面的に検討を加えることが重要と考える。

## 結 論

MPTP 投与パーキンソン病モデルマウスの線条体における数種の非ドーパミン神経の変化を明らかにするため、組織化学的に検討し、次の結果を得た。

1) 5-HT 免疫染色の結果は正常動物の線条体ではバリコシティーを有する陽性線維が密なネットワークを形成するのに対し、MPTP 投与マウスでは少なくとも投与後 7 日目の例で陽性線維の減少が認められた。この減少は投与後 30 日あるいは 60 日目の例でも認められることから、5-HT 神経におけるこの変動は遅延性かつ遷延性のものと推察される。

2) Enk 免疫染色の結果は正常動物の線条体では陽性線維や終末がモザイク様に分布し、さらに通過型の線維束および非常に淡く染まる散在性の陽性細胞が認められた。一方、MPTP 投与マウスでは投与後 3 日目の例でそれら Enk 陽性構造の染色強度の増大が認められ、特に淡蒼球腹内側部が現われるレベルで顕著であった。この陽性反応の増強は一過性の現象であり、その後日時経過とともに減弱する傾向を示した。

3) AChE 染色の結果は正常動物および MPTP 投与マウスとも線条体には密な線維網および散在性の大型陽性細胞が認められ両者の間に有意な差は認められなかった。

4) NADPH<sub>2</sub>-ジアホラーゼ染色の結果は正常動物および MPTP 投与マウスとも線条体には密な神経終末、線維網および濃染する中型細胞が認められ両者の間に有意な差は認められなかった。

5) GABA 免疫染色の結果は正常動物および MPTP 投与マウスとも線条体には密に分布する非常に微細な陽性終末および散在性の中型細胞が認められ両者の間に有意な差は認められなかった。

## 謝 辞

本研究は滋賀医科大学解剖学講座において行なったもので、終始直接御指導と御校閲を賜った滋賀医科大学解剖学講座木村宏助教授に深甚の謝意を表します。さらに、懇篤なる御指導と御校閲の労をとられた越智淳三教授および恩師・大塚長康教授に対し、謹んで感謝の意を表します。

## 文 献

1. Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W. and Irwin, I. : Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, **219**, 979-980, 1983.
2. Burns, R. S., Chiueh, C. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Jacobowitz, D. M. and Kopin, I. J. : A primate model of parkinsonism : Selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 4546-4550, 1983.
3. Burns, R. S., Markey, S. P., Phillips, J. M. and Chiueh, C. C. : The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the monkey and man. *Can. J. Neurol. Sci.* **11**, 166-168, 1984.
4. Langston, J. W. and Ballard, P. : Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) : Implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* **11**, 160-165, 1984.
5. Heikkila, R. E., Hess, A. and Duvoisin, R. C. : Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* **224**, 1451-1453.
6. McGeer, P. L. and McGeer, E. G. : Enzymes associated with the metabolism of catecholamines, acetylcholine and GABA in human controls and patients with Parkinson's disease and Huntington's chorea. *J. Neurochem.* **26**, 65-76, 1976.
7. Spokes, E. G. S. : Neurochemical alterations in Huntington's chorea. A study of post-mortem brain tissue. *Brain*, **103**, 179-210, 1980.
8. Dray, A. : Serotonin in the basal ganglia : functions and interactions with other neuronal pathways. *J. Physiol. paris*. **77**, 393-403, 1981.
9. Fallon, J. H., Wang, C., Kim, Y., Canepa, N., Loughlin, S. and Seroogy, K. : Dopamine and cholecystokinin-containing neurons of the crossed mesostriatal projection. *Neurosci. Lett.* **40**, 233-238, 1983.
10. Sugimoto, T., Takada, M., Kaneko, T. and Mizuno, N. : Substance P-positive thalamocaudate neurons in the center median-parafascicular complex in the cat. *Brain Res.* **323**, 181-184, 1984.
11. McGeer, P. L., McGeer, E. G., Scherer, U. and Singh, K. : A glutamatergic corticostriatal path ? *Brain Res.* **128**, 369-373, 1977.
12. Nieuwenhuys, R. : *Chemoarchitecture of the Brain*. Springer-Verlag. Berlin, P. P. 77-82, 1985.
13. McGeer, P. L. and McGeer, E. G. : Evidence for glutamic acid decarboxylase-containing interneurons in the neostriatum. *Brain Res.* **91**, 331-335, 1975.
14. Woolf, N. J. and Butcher, L. L. : Cholinergic neurons in the caudateputamen complex proper are intrinsically organized : A combined Evans blue and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res. Bull.* **7**, 487-507, 1981.
15. Flint Beal, M. and Martin, J. B. : Effects of lesions on somatostatinlike immunoreactivity in the rat striatum. *Brain Res.* **266**, 67-73, 1983.
16. Fonnum, F., Gottesfeld, Z. and Grofova, I. : Distribution of glutamate decarboxylase, choline acetyltransferase and aromatic amino acid decarboxylase in the basal ganglia of normal and operated rats. Evidence for striatopallidal, striatoentopeduncular and striatonigral GABAergic fibers. *Brain Res.* **143**, 125-138, 1978.
17. Correa, F. M. A., Innis, R. B., Hester, L. D. and Snyder, S. H. : Diffuse enkephalin innervation from caudate to globus pallidus. *Neurosci. Lett.* **25**, 63-68, 1981.



18. Del Fiaccio, M., Paxinos, G. and Cudllo, A. C. : Neostriatal enkephalin immunoreactive neurones project to the globus pallidus. *Brain Res.* 231, 1-17, 1982.
19. Kanazawa, I., Emson, P. C. and Cuello, A. C. : Evidence for the existence of substance P-containing fibres in striato-nigral and pallido-nigral pathways in rat brain. *Brain Res.* 119, 447-453, 1977.
20. Vincent, S., Hokfelt, T., Christensson, I. and Terenius, L. : Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striato-nigral pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 85, 251-252, 1982.
21. Jessell, T. M., Emson, P. C., Paxinos, G. and Cuello, A. C. : Topographic projections of substance P and GABA pathways in the striato- and pallido-nigral system: A biochemical and immunohistochemical study. *Brain Res.* 152, 487-498, 1978.
22. Takagi, H., Somogyi, P., Somogyi, J. and Smith, A. D. : Fine structural studies on a type of somatostatin-immunoreactive neuron and its synaptic connections in the rat neostriatum : A correlated light and electron microscopic study, *J. Comp. Neurol.* 214, 1-16, 1983.
23. Junnes, L., Stumpf, W. E. and Kalivas, P. W. : Neurotensin : Topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* 210, 211-224, 1982.
24. Vincent, S. R., Johansson, O., Hokfelt, T., Skirboll, L., Elde, R. P., Terenius, L., Kimmel, J. and Goldstein, M. : NADPH-diaphorase : A selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP)-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 217, 252-263, 1983.
25. Parent, A., O'Reilly-Fromentin, J. and Boucher, R. : Acetylcholinesterase-containing neurons in rat neostriatum : A morphological and quantitative analysis. *Neurosci. Lett.* 20, 271-276, 1980.
26. Emson, P. C., Arregui, A., Clement-Jones, V., Sandberg, B. E. B. and Rossor, M. : Regional distribution of methionine-enkephalin and substance P-like immunoreactivity in normal human brain and in Huntington's disease. *Brain Res.* 199, 147-160, 1980.
27. Spokes, E. G. S., Garrett, N. J. and Iversen, L. L. : Differential effects of agonist status on measurements of GABA and glutamate decarboxylase in human post-mortem brain tissue from control and Huntington's chorea subjects. *J. Neurochem.* 33, 773-778, 1979.
28. Tago, H., Kimura, H. and Maeda, T. : Detailed acetylcholinesterase fiber and neuronal staining in rat brain by a new and highly sensitive histochemical procedure. *J. Histochem. Cytochem.*, (in press).
29. Scherer-Singler, U., Vincent, S. R., Kimura, H. and McGeer, E. G. : Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Methods.* 9, 229-234, 1983.
30. Kimura, H., McGeer, P. L., Peng, J. H. and McGeer, E. G. : The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J. Comp. Neurol.* 200, 151-201, 1981.
31. Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H. : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem.* 29, 577-580, 1981.
32. Pileblad, E., Nissbrandt, H. and Carlsson, A. : Biochemical and functional evidence for a marked dopamine releasing action of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (NMPTP) in mouse brain. *J. Neural. Trans.* 60, 199-203, 1984.
33. Hallman, H., Olson, L. and Jonsson, G. : Neurotoxicity of the meperidine analogue N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurone in the mouse. *Eur. J. Phar-*

- macol.* **97**, 133-136, 1984.
34. Scatton, B., Javoy-Agid, F., Rouquier, L., Dubois, B. and Agid, Y. : Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res.* **275**, 321-328, 1983.
  35. Hallman, H., Lange, J., Olson, L., Stromberg, I. and Jonsson, G. : Neurochemical and histochemical characterization of neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurones in the mouse. *J. Neurochem.* **44** 117-127, 1985.
  36. Gupta, M., Felten, D. L. and Gash, D. M. : MPTP alters central catecholamine neurons in addition to the nigrostriatal system. *Brain Res. Bull.* **13**, 737-742, 1984.
  37. Taquet, H., Javoy-Agid, F., Cesselin, F. and Agid, Y. : Methionine-enkephalin deficiency in brains of patients with Parkinson's disease. *Lancet* **1**, 1367-1368, 1981.
  38. Llorens-Cortes, C., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Taquet, H. and Schwartz, J. C. : Enkephalinergic markers in substantia nigra and caudate nucleus from Parkinsonian subjects. *J. Neurochem.* **43**, 874-877, 1984.
  39. Gerfen, C. R. : The neostriatal mosaic : Compartmentalization of corticostriatal input and striatonigral output systems. *Nature* **311**, 461-463, 1984.
  40. Pert, C. B., Kuhar, M. J. and Snyder, S. H. : Opiate receptor : Autoradiographic localization in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3729-3733, 1976.
  41. Herkenham, M. and Pert, C. B. : Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum. *Nature* **291**, 415-417, 1981.
  42. Pollard, H., Llorens-Cortes, C. and Schwartz, J. C. : Enkephalin receptors on dopaminergic neurones in rat striatum. *Nature* **268**, 745-747, 1977.
  43. Pollard, H., Llorens, C., Schwartz, J. C., Gros, C. and Dray, F. : Localization of opiate receptors and enkephalins in the rat striatum in relationship with the nigrostriatal dopaminergic system : Lesion studies. *Brain Res.* **151**, 392-398, 1978.
  44. Urwyler, S. and Tabakoff, B. : Stimulation of dopamine synthesis and release by morphine and D-Ala<sup>2</sup>-D-Leu<sup>5</sup>-enkephalin in the mouse striatum in vivo. *Life Sci.* **28**, 2277-2286, 1981.
  45. Brann, M. R. and Emson, P. C. : Microiontophoretic injection of fluorescent tracer combined with simultaneous immunofluorescent histochemistry for the demonstration of efferents from the caudate-putamen projecting to the globus pallidus. *Neurosci. Lett.* **16**, 61-65, 1980.
  46. Lehmann, J. and Fibiger, H. C. : Acetylcholinesterase in the substantia nigra and caudate-putamen of the rat : Properties and localization in dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* **30**, 615-624, 1978.
  47. Itagaki, S., Hochi, T., Uemura, S. and Kimura, H. : Discrete lesions of the nigrostriatal dopaminergic system induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the mouse brain. *Neurosci. Lett. Suppl.*, (in press) .
  48. Lloyd, K. G., Mohler, H., Heitz, Ph. and Bartholini, G. : Distribution of choline acetyltransferase and glutamate decarboxylase within the substantia nigra and in other brain regions from control and Parkinsonian patients. *J. Neurochem.* **25**, 789-795, 1975.
  49. Reisine, T. D., Fields, J. Z. and Yamamura, H. I. : Neurotransmitter receptor alterations in Parkinson's disease. *Life Sci.* **21**, 335-344, 1977.
  50. Rinne, U. K., Riekkinen, P., Sonninen, V. and Laaksonen, H. : Brain acetylcholinesterase in Parkinson's disease *Acta Neurol. Scand.* **49**, 215-226, 1973.
  51. Epelbaum, J., Ruberg, M., Moyse, E., Javoy-Agid, F., Dubois, B. and Agid, Y. : Somatostatin and

- dementia in Parkinson's disease. *Brain Res.* 278, 376-379, 1983.
52. Wallace, R. A., Boldry, R., Schmittgen, T., Miller, D. and Uretsky, N. : Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on monoamine neurotransmitters in mouse brain and heart. *Life Sci.* 35, 285-291, 1984.
53. Perry, T. L., Javoy-Agid, F., Agid, Y. and Fibiger, H. C. : Striatal GABAergic neuronal activity is not reduced in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 40, 1120-1123, 1983,

The histochemical changes of non-dopaminergic neurons of the mouse striatum induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), a nigrostriatal dopaminergic neurotoxin used for a model of Parkinson's disease.

by

Toshikazu Hochi

Department of Anatomy, Okayama University Medical School, Okayama

(Director : Professor N. Otuka)

The effects of MPTP on non-dopaminergic neurons were studied in the striatum of ICR mice, by means of enzyme histochemistry for neurons containing acetylcholinesterase (AChE) or NADPH<sub>2</sub>-diaphorase and of immunohistochemistry for neurons containing GABA, serotonin or enkephalin.

The most prominent changes were observed in immunohistochemical staining for enkephalin, 3 days after the treatment with MPTP. Enkephalinimmunoreactive nerve fibers and terminals were increased both in number and in intensity, particularly at enkephalin-rich islands seen in the rostral striatum. In addition, enkephalin-positivepass-through fibers and cell bodies were also increased throughout the striatum. The highest density of these cell bodies was found in the caudal striatum. These changes in enkephalin immunoreactivity became less evident day by day, and 60 days later the staining result appeared almost the same as that in control mice. In contrast, serotonin-immunoreactive nerve fibers became sparse, particularly in ventrolateral parts of the striatum, from 7 days after the treatment with MPTP. Such a change was observed for as long as 60 days, so that it was suggested that the MPTP treatment caused irreversible degenerative changes in serotonin nerve terminals of the striatum.

On the other hand, no significant change was recognized in other striatal neurons containing AChE, NADPH<sub>2</sub>-diaphorase or GABA.

The present study indicates that some non-dopaminergic neurons, either intrinsic or extrinsic to the striatum, are affected by the MPTP treatment and therefore an important to the understanding of the etiology of Parkinson's disease.