

局所脳虚血後の脳内レセプター、局所脳血流、
グルコース代謝と学習能力の経時的变化

(課題番号 63570669)

昭和63年、平成1年、2年度科学研究費補助金

〔一般研究(C)〕研究成果報告書

平成3年3月

研究代表者 佐 古 和 廣
(旭川医科大学医学部脳神経外科)

<はしがき>

近年高齢化社会を迎え老人性痴呆が問題となってきた。本邦においては老人性痴呆の発生に脳血管障害が重要な役割を果していることが指摘されているが、その詳細は不明である。老人性痴呆にアセチルコリン系が関与しているという報告は1970年代よりみられ、その後多種の神経伝達物質がその原因として報告されているが未だ一定の見解はない。

従来より当施設において脳虚血モデルとして用いている中大脳動脈閉塞ラットにおいても慢性期に学習能力が落ちることが報告されている。そこで本研究では局所脳虚血の学習能力に及ぼす影響をオートラジオグラフィ法によるレセプターの分析の面より検討することを目的とした。

<研究組織>

研究代表者	佐古和廣	(旭川医科大学 医学部 脳神経外科・助手)
研究分担者	米増祐吉	(旭川医科大学 医学部 脳神経外科・教授)
	西原 功	(旭川医科大学 医学部 脳神経外科・助手)

研究経費	昭和63年度	1,000千円
	平成元年度	500千円
	平成 2年度	500千円
	計	2,000千円

＜研究発表＞

1. 学会誌等

- 1) Yura S, Sako K, Tsuchiya M, Yonemasu Y, Imahori Y: Topographical changes of local cerebral blood flow and second messenger systems in the ischemic brain. J Cereb Blood Flow Metab 11(Suppl 2):S90, 1991
- 2) Sako K, Yonemasu Y, Yura S: Autoradiographic measurement of muscarinic acetylcholine receptor in the MCA occluded rats. Brain Res (Submitted)
- 3) 佐古和廣、米増祐吉：ラット中大脳動脈閉塞後のムスカリン性アセチルコリンレセプター（M1, M2）の経時的変化 脳と神経（投稿中）

2. 口頭発表

- 1) 佐古和廣、米増祐吉：中大脳動脈閉塞ラットにおけるムスカリン性アセチルコリンレセプターの分布 第48回日本脳神経外科学会総会、盛岡、1989年9月
- 2) 佐古和廣、由良茂貴、土屋昌彦、苔米地正之、米増祐吉：虚血脳における線条体と大脳皮質のmuscarinic acetylcholine receptor binding activityの違い 第15回日本脳卒中学会総会、盛岡、1990年4月
- 3) 由良茂貴、佐古和廣、米増祐吉：中大脳動脈永久閉塞ラットにおける局所脳血流、second messengersystemの変化 第15回日本脳卒中学会総会、盛岡、1990年4月
- 4) 佐古和廣、由良茂貴、土屋昌彦、米増祐吉：ラット中大脳動脈閉塞後のムスカリン性アセチルコリンレセプター（M1, M2）の経時的変化 第2回日本脳循環代謝学会、東京、1990年11月
- 5) 佐古和廣、由良茂貴、土屋昌彦、米増祐吉：虚血脳における局所脳血流、細胞内情報伝達系の経時的変化 第2回日本脳循環代謝学会、東京、1990年11月

＜研究成果＞

研究目的

本邦においては老人性痴呆に脳血管障害が重要な役割を果していることが指摘されているがその詳細は不明である。本研究においては局所脳虚血モデルを作成し、脳の重要な神経伝達物質の一つであるアセチルコリンのレセプターおよびセカンドメッセンジャー系の局所的变化をオートラジオグラフィー法にて解明することを目的とした。今回の研究ではムスカリン性アセチルコリンレセプター (mAChR) の虚血に対する脆弱性と、虚血慢性期の遠隔部位におけるmAChRの変化を測定し学習能力と比較検討した。

方法

1. ラット中大脳動脈閉塞モデルの作成

雄Wistarラット (体重250~320g) を1.5%ハロセン麻酔下にTamuraら¹¹の方法に準じ左側頭下に骨窓を開け、手術顕微鏡下に左中大脳動脈を露出した。左中大脳動脈をolfactory tractより近位部にてbipolar coagulationにて約1mmの電気凝固、切離 (MCAO) を行ない、創を閉鎖した。

2. 局所脳血流測定

MCAO 3時間、6時間、24時間、48時間後に¹⁴C-iodoantipyrine (IAP) を用いた定量的オートラジオグラフィー法¹⁰にて局所脳血流 (local cerebral blood flow; LCBF) を測定した。MCAO 3、6時間後のLCBF測定ラットにおいてはMCAOに引続き、¹⁴C-IAP注入と動脈血採血のために右大腿動静脈にポリエチレンチューブ (クレイ・アダムス社、PE-50) をカニューレレーション後、下半身をギプス固定し、麻酔より覚醒させた。MCAO 24、48時間後に測定する場合はいったんケージに戻し、再度1.5%ハロセン麻酔下で、少なくとも測定2時間前にはカニューレレーションを終了した。¹⁴C-IAPオートラジオグラフィーは以前報告したように¹⁴C-IAPを約30秒間で注入後断頭し、脳を液体フレオンで凍結固定した。凍結固定した脳をクライオスタットで20 μ mの連続切片を作成し、既知の濃度の¹⁴Cスタンダードと共に片面乳剤X線フィルムに曝射した。トレーサー投与中約3秒間隔で採取した動脈血は20 μ lずつ液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。1週後にX線フィルムを現像し、画像解析装置にてSakuradaらの式よりLCBFを求めた。

3. アセチルコリンレセプター分布の測定

LCBF測定に用いた切片に隣接する4枚の切片をゼラチンコーティングスライドグラスに取り冷却空気で乾燥固定後、10mMのethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む50mMのリン酸緩衝液に30分間preincubationを行なった。このpreincubationの間に切片中に存在する¹⁴C-IAPは完全に除去されることは既に報告した通りである¹³。次に50mMのリン酸緩衝液に1mMのEDTA、1mMのN-ethylmaleimide (NEM) と

- 1) 1nMの³H-quinoclidinyl benzilate (QNB)
- 2) 1nM ³H-QNBと3mMのpirenzepine
- 3) 1nM ³H-QNBと0.1mM carbachol
- 4) 1nM ³H-QNBと1 μ M atropineをそれぞれ加えた4種類の液にpreincubationを行なった切片を60分間室温でincubationし、それぞれmuscarinic acetylcholine receptor (mAChR) の

total binding、M2 receptor、M1 receptor、non-specific bindingを測定した。pirezepineは ^3H -QNBのM1 receptorへの結合を、carbacholは ^3H -QNBのM2 receptorへの結合をそれぞれ阻害するため、得られた像はそれぞれM2、M1 receptorの分布を示す。non-specific bindingは ^3H -QNBの 10^3 倍の濃度のatropineを加えることにより得た。incubation後 4°C の3つの異なったリン酸緩衝液でそれぞれ10分間ずつ洗浄後乾燥させLKB-Ultrofilmに ^3H スタンダードと共に3週間密着させオートラジオグラフィーを作成した。

出来上がったオートラジオグラフィーを画像解析装置を用い、 ^3H スタンダードより得られたスタンダードカーブを基に脳組織単位重量当りの放射能に変換し、レセプター濃度を求めた。学習能力とmAChRの結合能を比較した実験においてはMCAO 1週、1か月後に学習能力を測定後ラットを屠殺し、その後脳を素速く取りだし、凍結切片を作成し同様に 1nM の ^3H -QNBにincubationを行なった。しかしこの実験ではより特異的mAChRのリガンドであると言われている ^3H -N-methyl-QNB²を用いた。

4. セカンドメッセンジャー系の脳内分布の測定

LCBF測定に用いた切片に隣接する2枚の切片をゼラチンコーティングスライドグラスに取り冷却空気で乾燥固定後、 10mM EDTAを含む 50mM のリン酸緩衝液に30分間preincubationを行なった。このpreincubationの間に切片中に存在する ^{14}C -IAPは完全に除去されることは先に述べた通りである。次に 50mM のリン酸緩衝液に 1mM のNEM、EDTAと

1) 1nM の ^3H -forskolin,

2) 1nM の ^3H -phorbtor-dibutylate (PDBu) をそれぞれ加えた2種類の液にpreincubationを行なった切片を60分間室温でincubationし、それぞれadenylate cyclase、protein kinase C activityの分布を測定した。incubation後 4°C の2つの異なったリン酸緩衝液でそれぞれ2分間ずつ洗浄後乾燥させLKB-Ultrofilmに ^3H スタンダードと共に3週間密着させオートラジオグラフィーを作成した。出来上がったオートラジオグラフィーを画像解析装置により ^3H スタンダードより得られたスタンダードカーブより脳組織単位重量あたりの放射能に変換し、レセプター濃度を求めた。

5. 学習能力の評価法

学習能力はMCAO後4日および1か月よりshuttle boxによる条件回避試験により行なった。shuttle boxは相等しい2室からなり、ラットが自由に移動できるように両室の中央に通路が設けられている。条件づけは刺激条件としては 2.8KHz 、 80dB の純音を5秒与え、この間にラットが他方の室に移動しなければ、床のグリッドに無条件刺激として 3mA の電気ショックを与えるというものである。1日40試行を3日間連続して行ない、ラットが条件刺激提示中に隣室へ移動した割合を示す回避率で評価した。

結果

1. 中大脳動脈閉塞後の脳血流とmAChRの関係

MCAO後の経時的LCBFとmAChRの関係はFig 1、2に示した。MCAO 3時間後にはLCBFはfrontal cortex、caudate-putamenでそれぞれ 11 ± 9 、 $9 \pm 9 \text{ ml}/100\text{g}/\text{min}$ ($3 \sim 48 \text{ ml}/100\text{g}/\text{min}$ の範囲)と低下しているにもかかわらずmAChRは対側に比較して有意の変化を示さなかった。MCAO 24時間後には虚血側では対側に比較してfrontal cortexで15%、caudate-putamenで34%の低下を示し、MCAO 48時間後にはfrontal cortexで29%、caudate-putamenで58%の低

下を示した。LCBFとmAChRの関係を見るとMCAO後3時間では血流に関係なくmAChRは保たれ、MCAO後24時間ではLCBFが20ml/min/100g以下で明らかな低下を示した。

2. 中大脳動脈閉塞後のmAChRのtotal binding、M1、M2 receptorの経時的変化

MCAO後のmAChRのtotal binding、M1、M2 receptorの経時的変化はTable 1に示した。測定部位をFigure 3に示した3箇所、すなわちA:cortexのmoderate ischemic area、B:cortexのsevere ischemic area、C:caudate-putamenのischemic areaと分け測定した。total bindingはMCAO 6時間後にはじめてcortexのsevere ischemic areaで低下を示し、24時間後にはA、B、Cすべての部位で有意の低下を示した。M1 receptorはMCAO 6時間後にcaudate-putamenでMCAO 24時間後でregion B、Cで低下を認めた。M2 receptorはMCAO 6時間後よりregion B、Cで、MCAO 24時間後にはregion A、B、Cで有意の低下が認められた。

Table 1

Total binding, carbachol inhibited binding(M1), and pirenzepine inhibited binding(M2) of [^3H]QNB at 3h, 6h, and 24h after left MCA occlusion in the rats.

	Total binding		M1		M2	
	Rt.	Lt.	Rt.	Lt.	Rt.	Lt.
3h						
A	701±34	683±29	421±23	413±26	229±25	198±20
B	725±42	692±26	432±20	401±22	237±15	202±18
C	731±39	711±27	459±48	409±35	300±45	256±23
6h						
A	636±35	612±46	382±46	385±32	209±20	201±15
B	703±47	644±25*	440±53	396±29	228±20	177±20**
C	771±38	746±27	467±31	416±24*	272±27	239±11*
24h						
A	671±46	559±50*	413±22	388±20	219±20	153±17*
B	680±36	441±40**	403±26	213±23**	193±21	134±23*
C	726±29	432±45**	431±48	256±48*	236±21	152±34*

pmol/g tissue

Significant difference from the contralateral. * p<0.05, ** p<0.01

Table 2

Local cerebral blood flow and specific binding of 3H-forskolin and ³H-pholbol-12,13-dibutyrate(PDBu) in the left MCA occluded rats.

		LCBF	Forskolin	PDBu
MCAO 3h				
Frontal cortex	R	168±18	165± 33	1492±112
	L	28±12**	178± 36	1408±235
Sensorimotor cortex	R	190±36	197± 36	1487± 66
	L	25±13**	162± 38	1412± 62
Caudate-putamen	R	135±42	637± 40	1408± 90
	L	9± 8**	403±124*	1265± 56*
Parietal cortex	R	207±40	194± 41	1422±132
	L	26±15**	164± 42	1440±170
Thalamus dorsal	R	183±46	120± 61	1217±201
	L	112±39*	117± 55	1175±219
medial	R	160±41	127± 70	1258±229
	L	114±37	116± 50	1263±244
ventral	R	147±43	78± 32	1197±232
	L	81±25*	58± 38	943±242
Auditory cortex	R	215±38	208± 49	1413±173
	L	32±22**	171± 54	1468± 67
Occipital cortex	R	176±53	199± 52	1490± 68
	L	59±24**	177± 48	1315±253
MCAO 24h				
Frontal cortex	R	221±10	239± 30	1309±106
	L	44±10**	155± 80	1526± 80*
Sensorimotor cortex	R	220±20	246± 24	1333±117
	L	38±14**	83± 42**	1676±306*
Caudate-putamen	R	189±12	674± 24	1301±199
	L	16±15**	94± 67**	1445±306
Parietal cortex	R	214±35	220± 29	1623±179
	L	41± 9**	83± 48**	1830±555
Thalamus dorsal	R	163±19	148± 25	1214±182
	L	114±31*	150± 15	1274±194
medial	R	166±17	173± 51	1546±366
	L	103±15**	161± 52	1421±323
ventral	R	171±37	122± 10	1193±270
	L	91± 9**	83± 13**	1154±487
Auditory cortex	R	229± 9	250± 20	1328±169
	L	48±11**	116± 66	1365±294
Occipital cortex	R	174±38	257± 39	1409±111
	L	85±30**	189± 23**	1418±155
		(ml/100g/min)	(fmol/mg)	(fmol/mg)

Values are the means±SD.

Significantly different from non-ischemic(R) side at *:p<0.05, and

**:p<0.01.

3. 中大脳動脈閉塞後のsecond messenger系の変化

MCAO後のLCBFとForskolin binding、PDBu bindingの関係はTable 2に示した。MCAO 3時間後ではcaudate-putamenにおいてのみforskolin bindingの低下、PDBu bindingの亢進を認めた。MCAO 24時間後にはforskolin bindingは新たにsensorimotor cortex、parietal cortex、thalamusの一部で低下を示し、PDBu bindingはfrontal cortex、parietal cortexで上昇を認めるのみであった。

4. 中大脳動脈閉塞後のmAChRと学習能力の関係

MCAO後4日目より条件回避学習試験を開始したラットでは回避率はsham手術群で86.1%、MCAO群で83.3%で、MCAO 1か月後に開始したラットではsham群86.7%、MCAO群73.2%であった。条件回避学習試験に使用したラットの³H-N-methyl QNBのbinding activityを測定した結果がTable 3である。その結果虚血により脳梗塞に陥った部分を除いた部位ではMCAO 1週間後ではparietal cortex、thalamusのventrolateral nucleusで低下を認めたが、1か月後ではさらにfrontal cortex、caudate-putamen、thalamusのmediodorsal nucleus、hippocampusのCA-1、dentate gyrusでその低下を認めた。

Table 3
Distribution of [³H]-N-methyl-QNB binding sites in brain

Structure	Control (n=5)	1 week after MCAO		1 month after MCAO	
		Rt.	Lt. (n=3)	Rt.	Lt. (n=3)
Sensorimotor cortex	396± 5	389±19	349±29	384± 3	337±16 ^{b, c}
Cingulate cortex	364± 7	369±23	350±13	363±20	357±26
Parietal cortex	404± 7	381± 5	353± 8 ^{b, c}	373± 6 ^a	353±15 ^a
Occipital cortex	394±11	364±37	368±18	360±10	359± 6
Caudate-putamen	398± 8	381±16	339±39	372±30	344±12 ^b
Thalamus:MD N.	287±10	287±25	245±36	253± 9	196±29 ^a
VL N.	234±10	234±23	158±11 ^{b, c}	179±20 ^a	73±21 ^{b, c}
Hippocampus:CA-1	421± 9	422± 6	414±11	401± 6	380±10 ^a
CA-3	386± 6	354±20	349±25	379±13	357±12
Dentate gyrus	402± 9	391± 9	379±16	381±14	354± 9 ^a
Inferior colliculus	336± 7	318±20	294±15 ^a	326±15	321±14

Values are mean±SEM in pmol/g tissue.
a:Significantrly different from control, p<0.05.
b:Significantrly different from control, p<0.01.
c:Significantrly different from contralateral, p<0.05.

考察

ラットMCAOモデルはすでに確立された局所脳虚血モデルであり広く用いられている。しかし中大脳動脈の閉塞部位により血流低下の程度及び範囲に差異の出現することが報告されている¹。今回我々が用いたLCBFとmAChRの結合能を同一個体で測定する方法は個体間で見られる血流低下のばらつきを考慮する必要がなく、優れてた方法である。方法でも述べたように30分のpreincubationで脳切片中の¹⁴C-IAPは完全に除去される¹³。以前我々が報告した¹⁴Cと¹⁸Fを用いた二重標識オートラジオグラフィー⁹も比較的簡単で誤差の少ない方法であるが、¹⁸Fが入手困難であることと、¹⁸Fの半減期が110分と短時間であることより実験時間および切片の処理に時間制約があるなどの問題があった。しかし今回の方法はそういった問題もなく、また切片を-80℃のdeep freezerに保存することでレセプターの結合能は1年間保たれることより、使いやすい方法と考える。

mAChR (M1, M2) のオートラジオグラフィーはMash and Potter⁷の方法によった。4℃のリン酸緩衝液中で10分間ずつ3回の洗浄でnon-specific bindingは完全に除去されるのに対し、specific bindingがほとんど変化を受けないことはすでにMash and Potter⁷により報告されている。今回10 μ Mのatropineをincubation液に加えることによりnon-specific bindingを同時測定したが、その結果正常および虚血巣ともにnon-specific bindingの影響がないことが証明された。

MCAO後のmAChRの結合能は、MCAO 3、6時間後には虚血中心部のcortex及びcaudate nucleusにおいては³H-QNBの結合能は低下していたが、その低下率は10%前後で比較的良好に保たれていた。虚血巣以外の部位は当然ながらその結合能の低下は認められなかった。cholinergic neuronはcortexではsmall fusiforme neuronで、interneuronとして全層に分布しており、caudate nucleusでは大型のneuronであるとされている⁴。一方そのレセプターの方はcaudate nucleusのsmall、medium sized neuronに存在しており、こちらの方は虚血に対しては脆弱であると言われている⁴。

Onoderaら⁸はジャービルの一過性前脳虚血後、神経細胞の脱落に先立ってQNBの結合能が低下することを報告している。しかし我々の結果ではMCAO 6時間では⁴⁵Caオートラジオグラフィーで見るとすでに⁴⁵Caの取り込みがみられ、neuronのischemic changeがおこっていることが明らかであるにもかかわらずQNBの結合能は比較的保たれているという結果であった。この結果はOnoderaらの結果とは異なっており、永久虚血モデルにおいては、一過性虚血と異なり、mAChRの低下はneuronの障害に先立っては認められず、逆にレセプター側は虚血後も比較的よく保たれていること示し、虚血後の神経細胞の障害の機序の違いによる可能性が示唆された。

MCAO後24時間では³H-QNBはcortexでは35%、caudate nucleusでは40%の低下を認めた。Hurskaら⁵はカイニン酸で線条体を破壊したところ³H-QNBのbinding activityが40%に低下したことを報告し、mAChRの60%はneuronに存在すること、またこの40%の低下は親和性の低下ではなく、結合部位の低下であることを示した。今回の我々の結果ではその低下は40%であったが、カイニン酸による破壊とは異なり、虚血による神経細胞の脱落は完全でないためその低下率が低いものと推測された。一方cortexにおいてはJohnstonら⁶によりcortexに直接カイニン酸を注入したところcholine acetyltransferase activityが29%低下し、basal

nucleusを破壊したところ、70%低下を認めたことが報告された。すなわちcortexのcholinergic neuronの70%はbasal nucleusの投射で、30%はinternueronであることを示した。

今回の我々の結果で見ると、MCAO24時間後にはM1、M2のタイプ別見るとM1のほうが低下率が著明であった。caudate nucleusにおいては、M1つまりpost synaptic sideはmedium、small sized neuronに存在し、虚血により脆弱であることより今回の結果は容易に理解出来る。cortexにおいてはM2レセプターの70%はbasal nucleusの投射繊維であり、basal nucleus自体は虚血より免れているため、そのterminalはより保たれていることが推測された。一方postsynaptic sideであるM1レセプターは虚血部に存在するためその障害がより強く出るものと考えられた。

セカンドメッセンジャー系では虚血部では ^3H -forskolinは結合能の低下を示し、 ^3H -PDBuは増加を示した。これはMCAO後虚血部では ^3H -forskolin bindingによって示されるadenylate cyclase活性の減少、すなわちc-AMP系の障害と、これとreciprocalな ^3H -PDBu binding siteの増加つまりPKC活性増加が認められたことを意味する。PKC活性の亢進の機序として虚血により細胞内Caイオンの増加の結果、phospholipase Cが活性化され、phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) が分解され、セカンドメッセンジャーであるdiacylglycerolの産生が促され、PKCの活性が増加したと考えられる。しかしこれらの現象は虚血急性期の細胞障害に関連した事象であり、mAChRの結合能の低下との関連は今後検討する予定であるが今回はその説明は課題として残った。

次にMCAO後のmAChRと学習能力の測定結果を見ると、MCAO 1週後では虚血巣以外では梗塞を免れたparietal cortexとthalamusのVL核でQNBの結合能の低下を認め、1か月後にはさらにsensorimotor cortex、caudate nucleus、thalamusのMD核、Hippocampus CA-1、dentate gyrusにまでその低下は拡大を認めた。ラットMCAO後逆行性の神経繊維の変化により視床に萎縮が起こることはすでに報告されているが³、この様にアセチルコリンレセプターもその結合能が低下することが示された。また従来の組織学的検討では指摘されなかった虚血周辺のsensorimotor、parietal cortex、caudate nucleusにその低下が認められ、虚血とは離れたhippocampus、dentate gyrusにも低下を認めたことは局所脳虚血のremote effectにレセプターが関与していることを示唆する所見である。

MCAO 1週と1か月後のラットの学習能力の比較では、1か月の方が学習能力が低いという傾向しか得られなかった。この原因としては、測定したラットの数が少ない、条件設定の問題、測定方法等、今後検討せねばならない幾つかの問題点を含んでいると思われる。今回は虚血後の学習能力の獲得で検討したが、虚血前に条件回避を獲得させ、その後虚血を誘発して再度回避率を測定する方がより臨床に即した方法と反省している。

以上のように学習能力の評価には多少の問題点は含んであるが、本研究より虚血急性期にはmAChRは比較的よく保たれていること、慢性期には梗塞巣周辺のみではなく、遠隔部位においてもmAChRの結合能の低下が認められた点は興味ある所見と考えた。

文献

- 1) Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis R, Bartkowski H: Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17:742-476, 1986
- 2) Brown JH, Goldstein D: Analysis of cardiac muscarinic receptors recognized selectively by nonquaternary but not by quaternary ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 238:580-586, 1986
- 3) Fujie W, Kirino T, Tomukai N, Iwasawa T, Tamura A: Progressive shrinkage of the thalamus following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 21:1485-1488, 1988
- 4) Francis A, Pulsinelli W: The response of GABAergic and cholinergic neurons to transient cerebral ischemia. *Brain Res* 243:271-278, 1982
- 5) Hruska RE, Schwarcz R, Coyle JT, Yamamura HI: Alterations of muscarinic cholinergic receptors in the rat striatum after kainic acid injection. *Brain Res* 152:620-625, 1978
- 6) Johnston MV, McKinney M, Coyle JT: Neocortical cholinergic innervation: A description of extrinsic and intrinsic components in the rat. *Exp Brain Res* 43:159-172, 1981
- 7) Mash DC, Potter LT: Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. *Neuroscience* 19:551-564, 1986
- 8) Onodera H, Sato G, Kogure K: Quantitative autoradiographic analysis of muscarinic cholinergic and adenosine A1 binding sites after transient forebrain ischemia in the gerbil. *Brain Res* 415:309-322, 1987
- 9) Sako K, Kato A, Diksic M, Yamamoto YL: Use of short-lived ^{18}F and long-lived ^{14}C in double tracer autoradiography for simultaneous measurement of LCBF and LCGU. *Stroke* 15:896-900, 1984
- 10) Sakurada O, Kennedy C, Jehle J, Brown LD, Carbin GL, Sokoloff L: Measurement of local cerebral blood flow with iodo[^{14}C]antipyrine. *Am J Physiol* 234:H59-H66, 1978
- 11) Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM: Focal cerebral ischemia in the rat. 1: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:53-60, 1981
- 12) Worley PF, Baraban JM, Souza EB, Snyder SH: Mapping second messenger systems in the brain: differential localization of adenylate cyclase and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4053-4057, 1986
- 13) Yura S, Sako K, Tsuchiya M, Yonemasu Y, Imahori Y: Topographical changes of local cerebral blood flow and second messenger systems in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 11(Suppl 2):S90, 1991

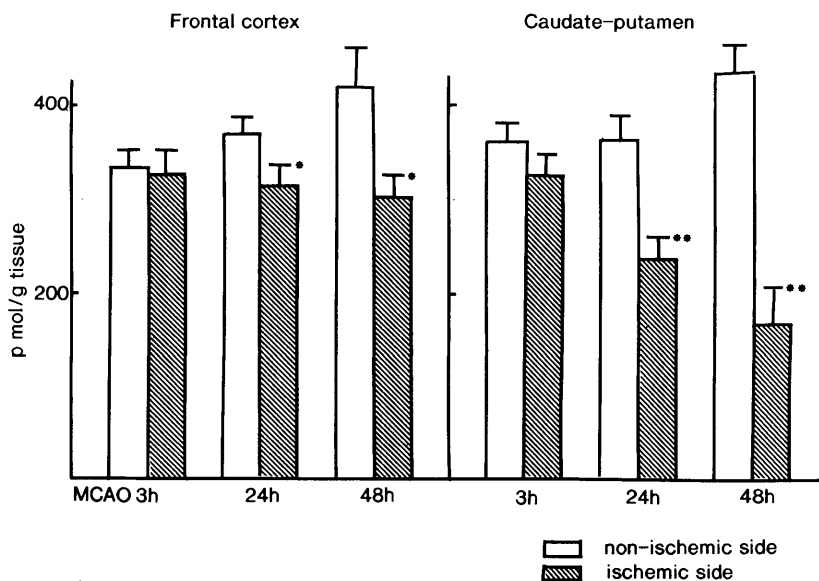


Figure 1

Bar graph of [^3H]QNB binding activity in the frontal cortex and caudate-putamen at 3h, 24h, and 48h after ischemia.

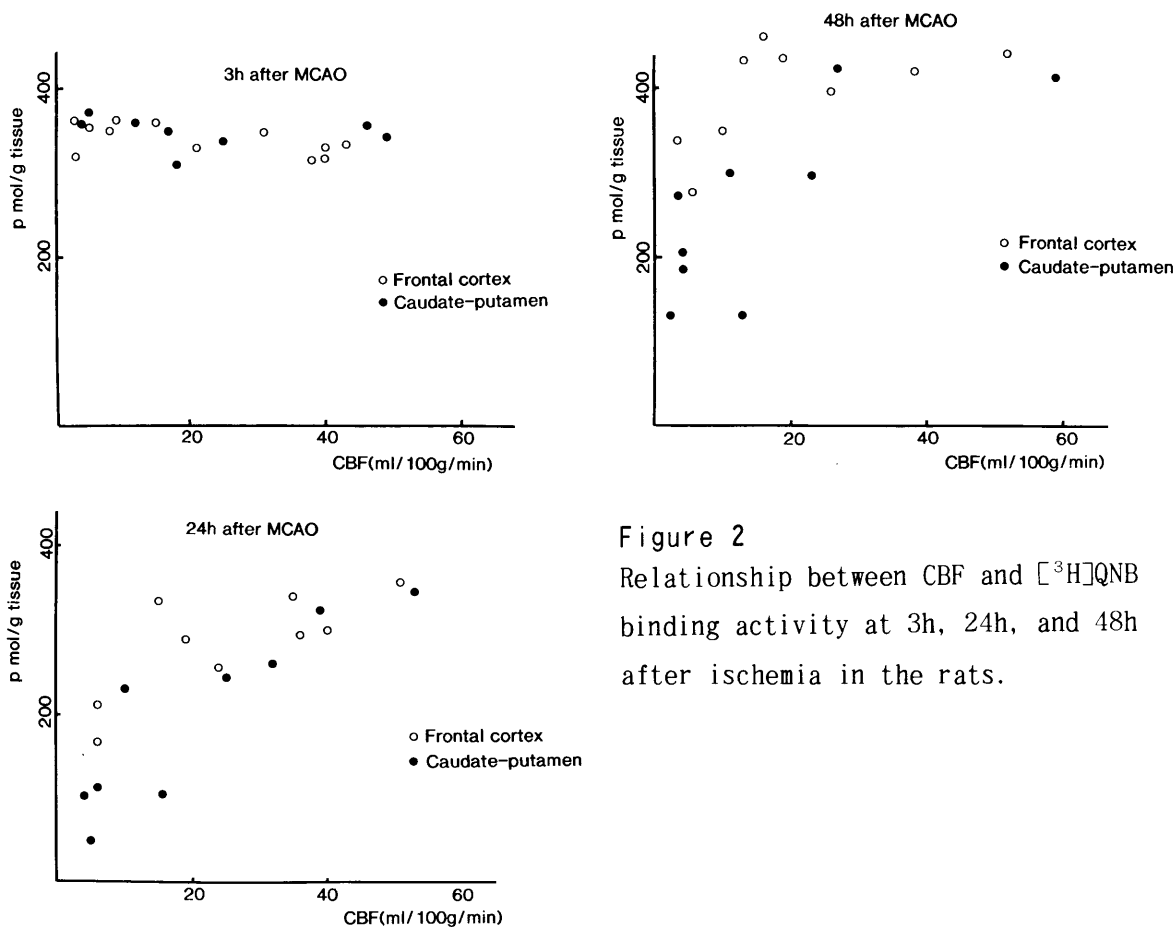


Figure 2

Relationship between CBF and [^3H]QNB binding activity at 3h, 24h, and 48h after ischemia in the rats.

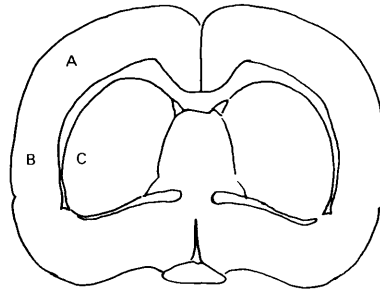


Figure 3

Schematic drawing of coronal section of the rat brain at the level of caudate nucleus. A, moderate ischemic area in the cortex; B, severe ischemic area in the cortex; C, Severe ischemic area in the caudate-putamen.

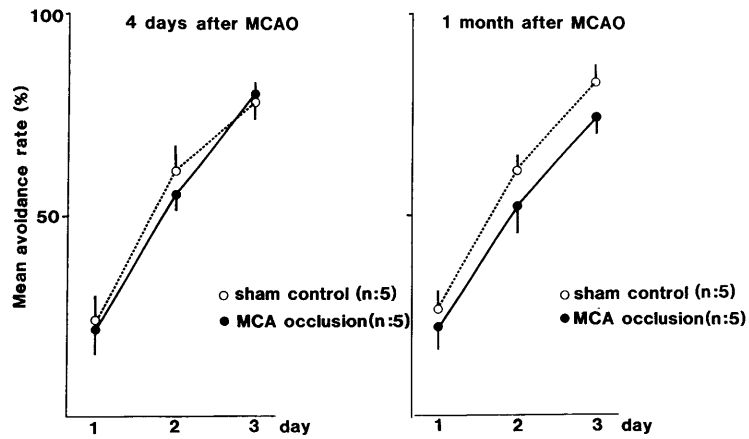


Figure 4

Active avoidance response in the left MCA occluded or sham operated rats.