

## 前脳基底部コリン作動性血管拡張神経系の神経保護作用

Neuroprotective effect of cholinergic vasodilative system originating in the basal forebrain.

鍵谷 方子

Fusako KAGITANI

(お茶の水女子大学大学院)

### 1. はじめに

高次脳機能に重要な役割をもつ大脳の神経細胞、中でも海馬 CA1 領域の神経細胞は、酸素不足に対し非常に脆弱で短時間の血流低下により死に至ることが報告されている<sup>5,10)</sup>。

私の所属する研究室では海馬へ投射する前脳基底部コリン作動性神経が、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を介して大脳血流を増加させる事実を、ラットを用いて証明してきた<sup>12,13)</sup>。

以上の事実から、海馬の血流が低下し神経細胞死が起こる際に、前脳基底部のコリン作動性血管拡張系を働かせると、海馬の血流低下が改善され血流低下による神経細胞死が防がれることが予想される。本研究では、その可能性について調べたので、以下にその内容を報告する。

### 2. 本研究の目的

本研究は、前脳基底部コリン作動性血管拡張系の神経保護作用について調べることを目的とした。

具体的にはラットを用い、脳に血流を供給する血管を短時間結紮することにより起こる海馬の血流低下と、それに伴う神経細胞死が、前脳基底部コリン作動性血管拡張系の賦活によって防がれるかどうかを調べた。測定部位としては、前脳基底部コリン作動性神経が投射している海馬のうち CA1 領域を選んだ。

### 3. 実験方法

実験には、Wistar 系雄ラット (3~9 カ月齢、体重 300~410 g) を用い、脳へ血流を供給する血管を短時間結紮した際の、海馬の血流反応と

神経細胞死を検討した。

実験動物の麻酔と生理的状态の維持：血流低下によって起こる神経細胞死は、血管結紮中の血中酸素濃度や体温に影響を受けることが知られている。そこでこれらを生理的範囲内に保って実験を行った。すなわち、ラットはハロセンで麻酔し、人工呼吸下で呼気中の酸素濃度を一定にし、ヒートパッドと赤外線ランプを用いて体温を一定の範囲内に保った。

脳へ血流を供給する血管の結紮：脳の血流は左右椎骨動脈および総頸動脈によって供給される。Pulsinelli & Brierley (1979)<sup>9)</sup>の方法に従い、左右椎骨動脈を永久結紮し、その上で左右総頸動脈を短時間一過性にクランプした。その際結紮方法を従来のもより一部改変した。すなわち、(1) 椎骨動脈の永久結紮を確実にを行うために、従来の第一頸椎内の椎骨動脈を電気凝固する方法から、第六頸椎内に入る直前で、顕微鏡下、直視下にて血管を糸で縛って結紮するよう改変した。(2) 連続的に結紮するよりも、短い断続的結紮を繰り返す方が血管拡張系の作用を見やすいと考え、2分ごとに、総頸動脈の結紮と解除を繰り返す、断続的結紮を行った。

海馬局所血流の測定：海馬の血流 (hippocampal blood flow: Hpc-BF) は、Cao et al. (1989)<sup>3)</sup>の方法にしたがい、秒単位で連続的に測定できるレーザードップラー血流計 (ALF 21D, Advance, Tokyo) を用いて測定した。血流値はレーザードップラー血流計から電圧の値 (mV) として出力され、これをポリグラフ (RM-6000, Nihon Kohden, Tokyo) に記録した。

前脳基底部コリン作動性血管拡張系の賦活：薬物で刺激する方法を用いた。前脳基底部コリン

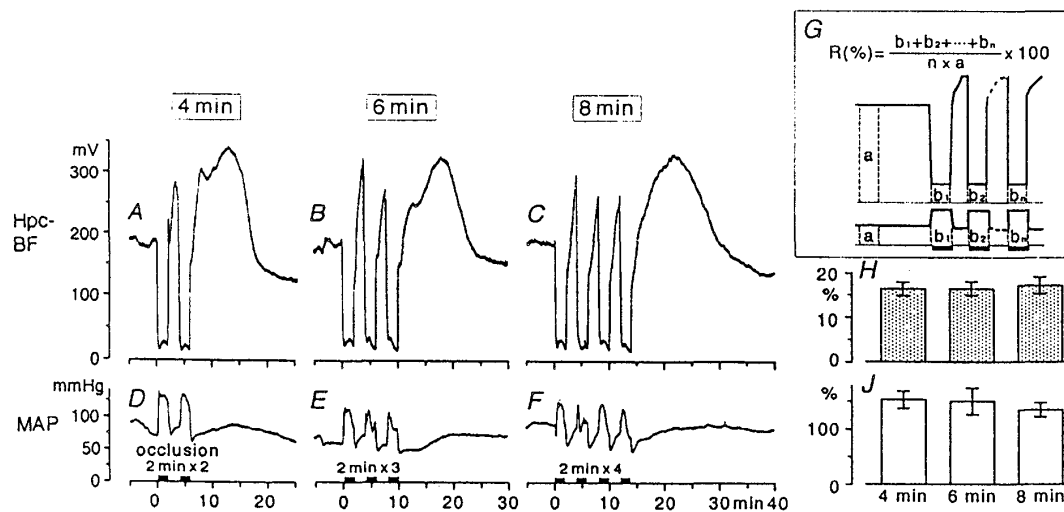


Fig. 1. Responses of hippocampal blood flow (Hpc-BF) and mean arterial pressure (MAP) to intermittent transient occlusion for a total of 4, 6, or 8 min.

A-F: Sample recordings of Hpc-BF (A-C) and MAP (D-F). The horizontal heavy bar on the bottom abscissa indicates the intermittent occlusion. G: Diagram showing how the decreases in Hpc-BF and increases in MAP during occlusion were calculated. H, J: Summaries of the Hpc-BF (H) and MAP (J) responses, calculated as shown in G. Each column and vertical bar represents a mean  $\pm$  S.D.

ン作動性血管拡張系が nAChR を介することから、nAChR 刺激薬であるニコチン (Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo) の静脈内投与を行った。ニコチンは生理食塩水で希釈し、10, 30, 100 及び 300  $\mu$ g/kg を投与した。

**組織学的検討:** 血管結紮終了後、ラットを覚醒させ、3~7日間飼育した後、ホルマリン溶液で灌流固定した。固定した脳組織をパラフィンで包埋し、脳を 6 $\mu$ m の厚さにスライスした後、ヘマトキシリンとエオジンで染色して標本作製した。標本はブレグマから尾側 3.3 mm (B-3.3 mm) の前頭面中の海馬 CA1 領域を代表部位として選び、400 倍の光学顕微鏡 (Olympus, AH-2, Tokyo) 下で観察した。標本中の海馬 CA1 領域の形態的に正常な神経細胞数を数えることにより、血管結紮による神経細胞死の程度を評価した。

**データ処理:** 全ての値は、平均値  $\pm$  S.D.として表した。統計には、Mann-Whitney U-test または Student's *t*-test, one-way factorial ANOVA と Dunnett's multiple comparison test を用いた。

## 4. 結果

### 4.1 断続的一過性結紮が海馬血流に及ぼす影響

両側椎骨動脈を予め永久結紮し、加えて両側

総頸動脈を 2 分毎に 2~4 回断続的に結紮し、それが Hpc-BF に及ぼす影響を調べた。予め行った椎骨動脈の結紮では Hpc-BF は変化しなかった。

Fig.1A-F に、2 分間の断続的結紮を 2 回 (A, D), 3 回 (B, E), 4 回 (C, F) 繰り返してトータル 4 分、6 分、8 分間結紮した時の Hpc-BF (A-C) と全身の平均血圧 (mean arterial pressure: MAP) (D-F) の典型的記録例を示す。断続的結紮中、Hpc-BF は著しく低下し、結紮解除まで低いレベルを維持した。断続的一過性結紮による Hpc-BF 低下反応は、結紮を繰り返す毎に同様に起こった。結紮を解除すると、Hpc-BF はすぐに結紮前のレベルに回復し、さらに上昇し約 20 分高い値を維持した。MAP は結紮中 30~50 mmHg 上昇し、結紮解除後、結紮前の値に戻った。この反応は、断続的結紮を繰り返す毎に見られた。

結紮前の値に対する結紮中の Hpc-BF および MAP の値を%で表し (計算方法を Fig.1G 上段に示した)、5~6 例についてまとめた結果を Fig 1 H, J に示した。トータル 4, 6, 8 分間の結紮中 Hpc-BF は、それぞれ結紮前の約 16%に低下した。結紮中の MAP はそれぞれ結紮前の約 140%に増加した。Hpc-BF, MAP とともに結紮時間の違いによる有意な差は認められなかった。

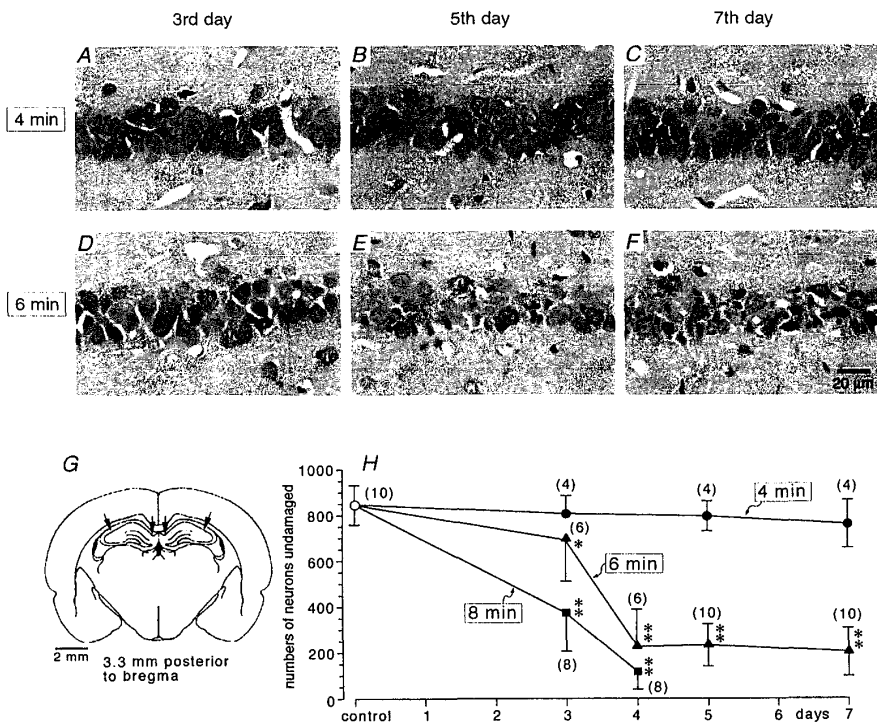


Fig. 2. The effect of intermittent transient occlusion on neurons in the CA1 region. A-F: Representative histological pictures of neurons in the hippocampal CA1 region by coronal section on the 3rd, 5th and 7th days after intermittent occlusion for a total of 4 or 6 min at a magnification of x400, stained with HE. G: A diagram showing the CA1 regions used for counting neurons. H: Summaries of the number of normal neurons in one coronal section of the bilateral hippocampal CA1 region in the control rats and in the rats tested 3-7 days after occlusion for 4-8 min. Each point and vertical bar represents a mean  $\pm$  S.D. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01; significantly different from control group using Student's  $t$ -test.

#### 4.2 断続的一過性結紮が海馬のニューロンに及ぼす影響

両側椎骨動脈を予め結紮し、加えて両側総頸動脈を断続的に繰り返し行い、それが海馬 CA1 領域 (Fig.2G) のニューロンに及ぼす影響を調べた。Fig.2A-F はトータル 4 分 (A-C)、6 分 (D-F) の断続的血管結紮終了後 3、5、7 日目の海馬 CA1 領域のニューロンの典型的な組織像を示している。4 分間の結紮では CA1 ニューロンにほとんど損傷が見られなかったが、6 分間の結紮では、CA1 ニューロンに損傷が見られた。損傷ニューロンは、Buchan A et al. (1991) <sup>2)</sup> が報告しているように、虚血性損傷、すなわち、エオジン好性の細胞質と暗く濃染した核をもち、萎縮した様子を示していた (Fig.2D-F)。

Fig.2G にニューロンを数えた CA1 領域を示した。Fig.2H にトータル 4、6、8 分間の断続的一過性結紮終了後 3、4、5、7 日目における海馬 CA1 領域の正常ニューロン数をまとめた。結紮をしていないコントロールラットにおける 1 枚の切片中 (厚さ 6  $\mu$ m) の左右 CA1 領域のニューロン数は、約 850 (n=8) だった (Fig.2H, 白丸)。

正常 CA1 ニューロン数は 2 回結紮を繰り返すトータル 4 分結紮では、ほとんど変化なく、1 回結紮の多い 6 分結紮では、4 日目には、コントロールの約 1/4 に減少し、さらに結紮回数を増やす

と、1/7 に減少した。

トータル 6 分の血管結紮で神経細胞数の時間経過を見てみると、3 日目、4 日目と神経細胞数の減少が進み、4 日目以降はそれ以上は減少しない時間経過を示した。

本研究の目的である、前脳基底部血管拡張系の神経保護作用を調べるためには、わずかな結紮時間の差で遅発性神経細胞死が起こらなくなるトータル 6 分結紮で効果を見やすいのではないかと考え、以降の実験ではトータル 6 分結紮を用いた。

#### 4.3 ニコチン投与が安静時の Hpc-BF へ及ぼす影響

Fig.3 は安静時においてニコチン 10, 30, 100, 300  $\mu$ g/kg を投与した時の、Hpc-BF 反応および MAP 反応について、典型例 (A-D) および 7 例でまとめた結果 (E-H) を示す。

10  $\mu$ g/kg のニコチンは HpcBF および MAP に効果がなかった (Fig.3A, E)。30  $\mu$ g/kg のニコチン投与により、Hpc-BF が増加し、コントロールの約 105% に達し、10 分以内に投与前のレベルに戻った。その際、MAP はほとんど変化しなかった (Fig.3B, F)。100  $\mu$ g/kg のニコチン投与により Hpc-BF は増加し、最大約 157% に達した。MAP はわずかに増加したが、すぐに元のレベルに戻

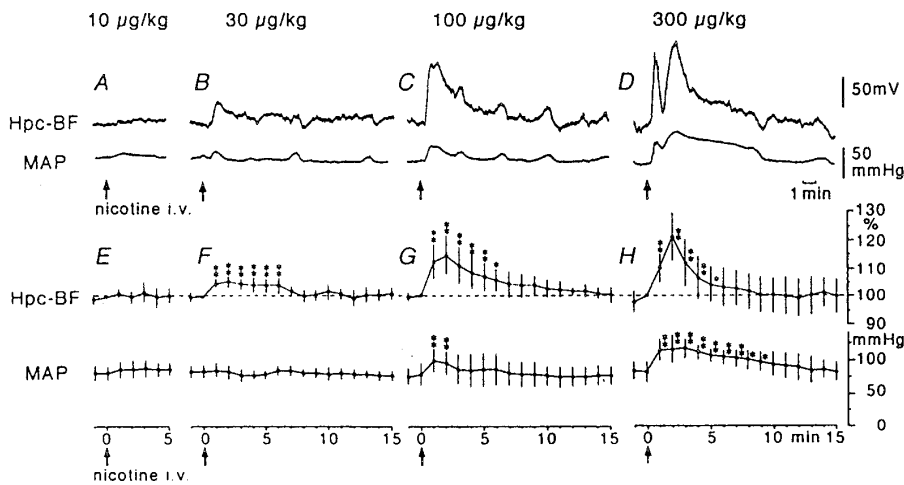


Fig. 3. Hpc-BF and MAP responses to i.v. injection of nicotine in the resting state. A-D: Sample recordings. E-H: Summary of the responses (n=7). Hpc-BF is expressed as a percentage of the pre-injection value, and MAP is expressed as an absolute value (mmHg). Each point and vertical bar represents a mean  $\pm$  S.D. \*p<0.05, \*\*p<0.01; significantly different from pre-injection values by repeated measures ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests.

った (Fig.3C,G), 300  $\mu$ g/kg のニコチンにより MAP が著しく増加し, それに伴って Hpc-BF が増加した (Fig.3D,H).

4.4 断続的一過性結紮中の Hpc-BF に及ぼすニコチン投与の効果

血圧を全くあるいはわずかしき変化させない用量の 10, 30, 100  $\mu$ g/kg のニコチンを用いて, ニコチン投与が, トータル 6 分間の断続的一過性結紮中の Hpc-BF 低下反応に及ぼす効果を調べた. Fig. 4 A-D は, 生理食塩水 (A,C) あるいはニコチン 30 $\mu$ g/kg (B,D) を結紮 5 分前に投与し血管結紮を行ったラットの Hpc-BF (A,B) と MAP (C,D) の典型的記録例を示す. ニコチン 30 $\mu$ g/kg は, MAP は変化させずに (Fig.4D) Hpc-BF の安静時レベルを増加させ, 結紮中の Hpc-BF 低下の程度を減弱させた (Fig.B,D). 血管結紮解除後の Hpc-BF 増加反応にはニコチン投与の効果は認められなかった.

Fig.4E, F は生理食塩水, ニコチン 10, 30, 100  $\mu$ g/kg 前投与群の断続的結紮中の Hpc-BF 低下と MAP 増加の程度を Fig.1G に示すように計算したまとめである.

生理食塩水及び, ニコチン 10, 30, 100  $\mu$ g/kg を投与したラットの結紮中の Hpc-BF はそれぞれ結紮前の約 16 (n=6), 16% (n=6), 21% (n=5), 25% (n=5) だった. 10  $\mu$ g/kg のニコチンは有意な効果を示さず, 30  $\mu$ g/kg と 100  $\mu$ g/kg のニコチンは, 結紮中の Hpc-BF 低下を有意に減弱した. 血管結

紮中の MAP には生理食塩水およびニコチン投与群間で有意な差はなかった.

4.5 断続的一過性結紮による CA1 ニューロン損傷に及ぼすニコチン投与の効果

Fig.5A-C は, 正常なラット (コントロール) (Fig.5A) と生理食塩水 (Fig.5B) あるいはニコチン (30  $\mu$ g/kg, Fig.5C) を血管結紮 5 分前に投

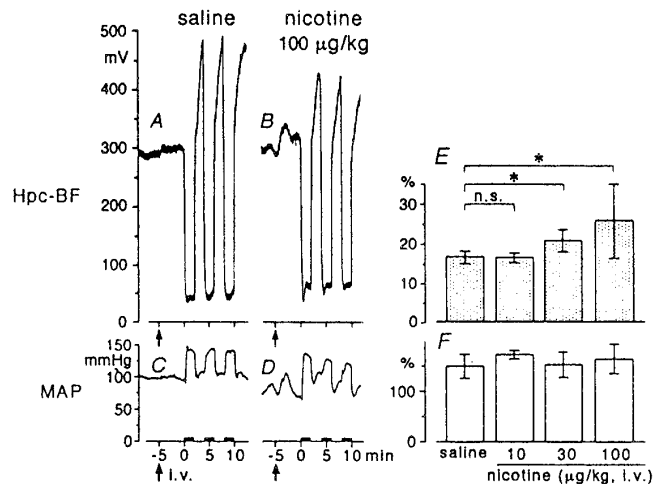


Fig. 4. The effect of nicotine on Hpc-BF and MAP during intermittent occlusion for a total of 6 min. A-D: Sample recordings of Hpc-BF (A,B) and MAP (C,D). The arrow on the bottom time scale indicates injection of saline (A,C) or nicotine (30  $\mu$ g/kg, B,D). E,F: Summarized data of the effects of pretreatment of nicotine (10-100  $\mu$ g/kg) on Hpc-BF (E) and MAP (F) during intermittent, calculated as shown in Fig. 1G. Each column and vertical bar represents a mean  $\pm$  S.D. \*p<0.05, \*\*p<0.01; significantly different from saline-pretreated group by Mann-Whitney U test. n.s. indicates no significant difference.

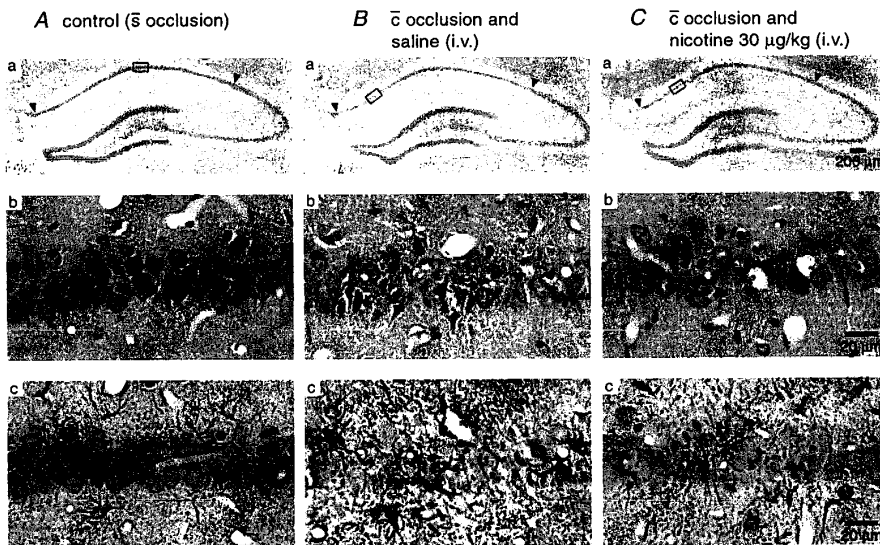


Fig. 5. The effect of nicotine on neuronal damage in the CA1 region following occlusion. Representative histological pictures by coronal section of the hippocampal CA1 region in a normal control rat (A) and in 2 other rats (B,C) prepared on the 5th day after intermittent transient occlusion for a total of 6 min, with pre-treatment of either saline (B) or nicotine (30 µg/kg, C) at magnifications of x40 (a) and x400 (b,c), stained with HE (a,b) and GFAP (c). Arrowheads in a show medial and lateral borders of the CA1 region.

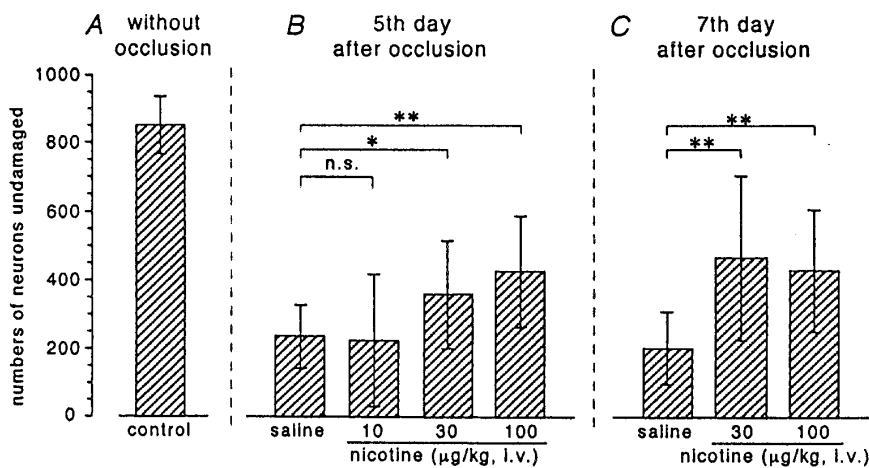


Fig. 6. The effect of nicotine on the number of normal CA1 neurons following occlusion. Summaries of the numbers of normal neurons in one coronal section of the bilateral CA1 region in the control rats (A) and in the rats on the 5th day (B) and 7th day (C) after intermittent transient occlusion for a total of 6 min with pre-injection of saline and nicotine (10-100 µg/kg). Each column and vertical bar represents a mean  $\pm$  S.D. (n=10). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01; significantly different from the saline-injected group by Student's  $t$ -test.

与し、トータル6分間の断続的一過性結紮を行ったラットの、結紮後5日目における海馬および海馬 CA1 領域の典型的写真である。ニコチン 30 µg/kg は血管結紮による海馬 CA1 ニューロン損傷を軽減した (Fig.5B と Fig.5C を比較)。

Fig 6 は (1) 結紮をしていないラット (コントロール) の CA1 ニューロン数と、(2) 生理食塩水 (Fig.6B,C), またはニコチン (10, 30, 100 µg/kg) (Fig.6B, C) を前投与したラットの断続的血管結紮後 5, 7 日目の残っている正常 CA1 ニューロン数をまとめたものである。Fig.6B に示すように、断続的一過性結紮後 5 日目の、生理食塩水およびニコチン 10, 30, 100 µg/kg を前投与したラットの正常ニューロン数は、それぞれ、233, 226,

357, 428 であった。ニコチン 30 および 100 µg/kg 前投与群では生理食塩水投与群に比べ正常な残っている CA1 ニューロン数が有意に増加した。

断続的一過性結紮後 7 日目においても 5 日目同様、生理食塩水群に比べニコチン 30, 100 µg/kg 前投与群で血管結紮によるニューロン死が防がれた。また、ニューロン数に対するニコチンの効果には 5 日目と 7 日目間に有意な差はなかった。

## 5. 考察

ニコチンを投与すると、全身血圧には依存せずに、特に大脳皮質などの脳局所血流が増加す

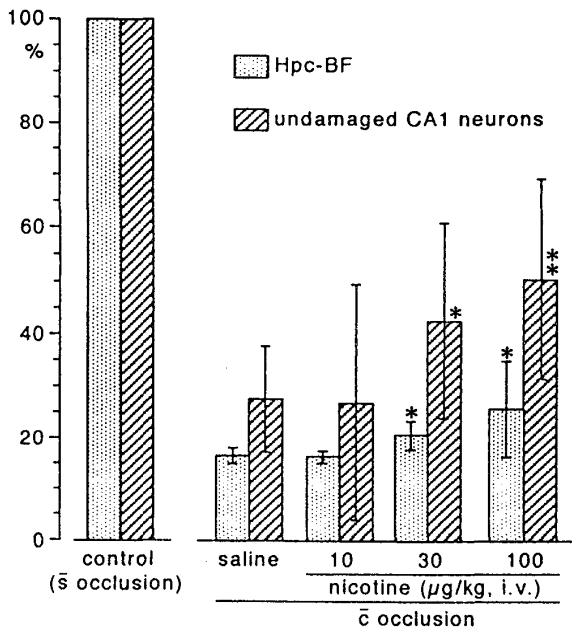


Fig. 7. Summary of the effects of nicotine on blood flow and delayed neuronal death following occlusion in rat hippocampus. Stippled column: Hpc-BF during occlusion. Hatched column: number of normal CA1 neurons on the 5th day after occlusion.

る事実が報告されている<sup>4,7,16</sup>。本研究では初めてニコチン少量投与 (30 μg/kg) により、海馬でも全身血圧に依存せずに局所血流が増加することを明らかにした。

前脳基底部に起始し、大脳皮質や海馬に広く投射する内因性コリン作動性神経は、大脳皮質や海馬の nAChR を介して血管を拡張する<sup>12,13</sup>。Uchida ら (1997)<sup>16</sup>は少量のニコチン (30 μg/kg) 投与による、大脳皮質の血管拡張は、前脳基底部と大脳皮質の nAChR の刺激によって起こることを示唆している。海馬においても、ニコチン投与による血管拡張はニコチンが前脳基底部や海馬にある nAChR を刺激して起こると考えられる。

Kirino (1982)<sup>5</sup>と Pulsinelli et al. (1982)<sup>10</sup>によって、一過性の脳虚血による海馬 CA1 ニューロンの遅発性神経細胞死が見いだされて以来、多くの研究が行われてきた。脳の一過性虚血は、ラットでは Pulsinelli & Brierley (1979)<sup>9</sup>の両側椎骨動脈の永久電気凝固に加え、両側総頸動脈を一過性に結紮する方法がよく用いられる。し

かし、この方法では第一頸椎内の椎骨動脈の結紮を確実にできないため、脳波などを測定して確実に結紮できたラットを選別する必要があった。本研究では、両側椎骨動脈を第六頸椎内に入る直前で、直視下で糸で縛って永久結紮して、確実に結紮する方法を開発した。また、従来は総頸動脈の結紮は連続的に短時間 (5~30 分間) 行うが、本研究では、両側総頸動脈を 2 分間の一過性結紮を断続的に繰り返した。本研究のように血管拡張物質投与による血流障害を改善する作用を調べるためには、本研究の断続的一過性結紮モデルは有利と考えられる。

Kirino (1982)<sup>5</sup>や Pulsinelli et al. (1982)<sup>10</sup>によって見出された遅発性神経細胞死が本研究の断続的一過性結紮でも認められた。今回の結紮では、海馬 CA1 ニューロンの遅発性神経細胞死は、結紮 3 日に起こりはじめ、結紮 5, 7 日目に最大に達することが確認された。結紮時間を変えることで細胞死の程度を変えることが可能だった。すなわち結紮回数を増やすと細胞死の程度が進んだ。

Pulsinelli & Brierley (1979)<sup>9</sup>の一過性血管結紮モデルにおいて、血管結紮時に海馬血流は結紮前の 3~18% に低下する、ことが既に報告されている<sup>6,11,15</sup>。本研究の断続的一過性結紮において、海馬血流は結紮前の約 16% に低下した。従って本研究のモデルでも Pulsinelli & Brierley (1979)<sup>9</sup>のモデルでの血流低下の範囲内であった。本研究では、安静時に Hpc-BF を増加させる用量 (30, 100 μg/kg) のニコチンを血管結紮 5 分前に前投与しておく、一過性結紮中の血流低下の度合いが減弱し、その 5~7 日目に見られる海馬の遅発性神経細胞死の程度が減少することを明らかにした。血管結紮中の Hpc-BF 低下と遅発性神経細胞死の程度を改善するのに効果のあるニコチンの用量が一致することから、ニコチンの投与により血管結紮中の Hpc-BF 低下が改善したために海馬 CA1 ニューロンの遅発性神経細胞死が防がれたと考えられる (Fig.7)。

ニコチンの全身投与が虚血性神経細胞死を防ぐ事実は、既に Nanri et al. (1998)<sup>8</sup>によって報

告されている。彼らは、砂ネズミを用いて、ニコチン 1.5 mg/kg を虚血 30 分前に腹腔内投与すると、海馬 CA1 ニューロンの虚血性神経細胞死を軽減することを示し、Akaike et al. (1994)<sup>1)</sup>らによって報告されているニコチンの海馬 CA1 ニューロンに対する直接的な保護作用であることを考察している。

Akaike et al. (1994)<sup>1)</sup>は培養大脳皮質ニューロンのグルタメート細胞毒性に対し、ニコチンが保護作用を持つ事実を見出した。さらに Semba et al. (1996)<sup>14)</sup>は培養海馬 CA1 ニューロンにおいても同様の効果を見出した。本研究においても、ニコチンの CA1 ニューロンに対する直接的な保護作用を否定できないが、生体内においては、血流改善効果の方が重要と考えられる。本研究では、ニコチンが虚血の程度を軽減したことによって、海馬 CA1 ニューロンの遅発性神経細胞死を間接的に保護したと考えられる。

本研究では nAChR 刺激薬を用いて nAChR を刺激したが、前脳基底部に起始し、海馬や大脳皮質に投射するコリン作動性神経血管拡張系を刺激した場合にも内因性の ACh 放出により nAChR が刺激され、本研究の結果と同様に虚血による神経細胞死を防ぐことが予想される。

## 6. おわりに

本研究により、ニコチン静脈内投与によって前脳基底部のコリン作動性血管拡張神経系を賦活すると、血管結紮による海馬の血流低下が改善され、海馬の神経細胞死が防がれることが初めて明らかとなった。

## 7. 参考文献

- 1) Akaike A, Tamura Y, Yokota T, Shimohama S, and Kimura J: Nicotine-induced protection of cultured cortical neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res* 644: 181-187, 1994
- 2) Buchan A, Li H and Pulsinelli WA: The N-methyl-d-aspartate antagonist, MK-801, fails to protect against neuronal damage caused by transient, severe forebrain ischemia in adult rats. *J Neurosci* 11: 1049-1056, 1991
- 3) Cao W-H, Inanami O, Sato A, and Sato Y: Stimulation of the septal complex increases local cerebral blood flow in the hippocampus in anesthetized rats. *Neurosci Lett* 107: 135-140, 1989
- 4) Crystal GJ, Downey HF, Adkins TP, and Bashour FA: Regional blood flow in canine brain during nicotine infusion: effect of autonomic blocking drugs. *Stroke* 14: 941-947, 1983
- 5) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239: 57-69, 1982
- 6) Kuroiwa T, Bonnekoh P, and Hossmann K-A: Laser Doppler flowmetry in CA1 sector of hippocampus and cortex after transient forebrain ischemia in gerbils. *Stroke* 23: 1349-1354, 1992
- 7) Linville DG, Williams S, Raszkievicz JL, and Arneric SP: Nicotinic agonists modulate basal forebrain control of cortical cerebral blood flow in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 440-448, 1993
- 8) Nanri M, Yamamoto J, Miyake H, and Watanabe H: Protective effect of GTS-21, a novel nicotinic receptor agonist, on delayed neuronal death induced by ischemia in gerbils. *Jpn J Pharmacol* 76: 23-29, 1998
- 9) Pulsinelli WA and Brierley JB: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10: 267-272, 1979
- 10) Pulsinelli WA, Brierley JB, and Plum F: Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11: 491-498, 1982
- 11) Pulsinelli WA, Levy DE, Duffy TE: Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11: 499-509, 1982
- 12) Sato A and Sato Y: Regulation of regional cerebral blood flow by cholinergic fibers originating in the basal forebrain. *Neurosci Res* 14: 242-274, 1992
- 13) Sato A and Sato Y: Cholinergic neural regulation of regional cerebral blood flow. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 9: 28-38, 1995

- 14) Semba J, Miyoshi R, and Kito S: Nicotine protects against the dexamethasone potentiation of kainic acid-induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 735: 335-338, 1996
- 15) Suzuki R, Yamaguchi T, Kirino T, Orzi F and Klatzo I: The effects of 5-min ischemia in Mongolian gerbils: I. Blood-brain barrier, cerebral blood flow, and local cerebral glucose utilization changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 60: 207-216, 1983
- 16) Uchida S, Kagitani F, Nakayama H, and Sato A: Effect of stimulation of nicotinic cholinergic receptors on cortical cerebral blood flow and changes in the effect during aging in anesthetized rats. *Neurosci Lett* 228: 203-206, 1997