

20000 926 ~ 0936

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

# 目 次

## 課題番号

11011	脳梗塞動物モデルの開発と創薬研究への応用	柳本 広二	……	1
11037	免疫・脳神経系のゲノム恒常性維持に係る遺伝子発現制御機構の解明	葛西 正孝	……	7
11106	ヒト組織構築モデル動物の作製と応用に関する研究	藤本純一郎	……	12
11168	疾患モデルラットの調査とラットゲノムの基盤研究によるヒト疾患遺伝子の総合的探索研究	芹川 忠夫	……	19
11178	神経・筋疾患モデル動物の病態解析及び開発のための基礎研究	菊池 建機	……	25
11217	長寿命新規蛍光標識剤の開発および応用	嶋 秀明	……	30
12004	薬物及び生体分子の高感度高性能分析・解析技術の開発に関する研究	今井 一洋	……	38
12129	ゲノム情報に基づく骨疾患治療医薬品の開発に関する研究	瀬原 淳子	……	45
12259	白血球機能の新しい制御手法の開発に関する研究	鈴木 和博	……	50
12263	チャネルの開口を視る技術の開発研究	川西 徹	……	56
12271	正常ヒト上皮組織に由来する初代培養細胞の増殖制御機構の解析とその研究資源化に関する研究	林 真	……	66

## 脳梗塞動物モデルの開発と創薬研究への応用

所属 国立循環器病センター研究所病因部  
研究者 柳本 広二

### 分担研究者

金子 次男、新津 陽一 三共株式会社 第三生物研究所  
永田 泉、国立循環器病センター脳血管外科

### 要旨

再灌流を伴わない虚血性脳卒中を模する新たな永久局所脳虚血モデルを開発した。このモデルでは、再現性に優れた皮質性脳梗塞を生じさせることが可能であり、また虚血負荷後、長期にわたり生存可能なため、解剖学的脳障害のみならず、客観的な虚血性神経機能障害の長期予後判定が可能である。すなわち、このモデルを用いることで、臨床開発途上の新たな脳保護薬剤の脳梗塞巣進展抑制に関する基礎的最終評価ならびに脳機能保護に対する的確な評価を行うことが可能である。この新たな皮質性脳梗塞モデルを用いて低体温の脳保護効果を検討したところ、長期に用いた低体温が永続する脳保護効果を永久局所脳虚血に対しても有することが明らかとなった。

### 1. 研究目的

脳梗塞に対する新たな治療法を開発するにあたり、ラットを用いた脳梗塞モデルが頻用されている。自然発生高血圧モデルを用いた場合は、単一血管の閉塞により、安定した脳梗塞巣を造り出すことが可能であるが、高血圧という病態が併存しているため、脳保護の厳密な評価が困難である。これに対し、正常血圧ラットでは、単血管の部分閉塞手技では、均一な皮質性脳梗塞を造り出すことが困難である。従来より報告されている実験的永久局所脳梗塞モデルの中では、両側頸動脈および一側中大脳動脈の3血管を同時に閉塞する技術を用いたモデルが最も再現性のよい皮質性脳梗塞を生み出すことが知られている。本研究では、正常血圧ラットを用いて、長期生存可能な新たな永久局所皮質性脳梗塞モデルの開発を目指した。また、すでに作成したラット脳神経脱落機能評価のためのスコアリングシステムを用いて、脳機能障害の経過を追跡し、低体温の有する脳保護効果を機能の面からも観察した。さらに永久的脳血管閉塞後の局所脳血流の変化を明らかとするため、新たな永久局所脳虚血モデルにおける局所脳血流の急性期における変化を常温群および低体温群において比較した。

### 2. 研究方法

まず、従来報告されている永久局所脳虚血負荷モデルとして、正常血圧ラット (male Sprague-Dawley rat) に3血管閉塞を施す手技を用いた。すなわち、両側の総頸動脈を結紮閉塞し、開頭術後に左中大脳動脈を嗅神経束横断後の部位にて凝固閉塞した。モデルの脳保護効果判定への有用性を見るためには、摂氏3

0度の中等度低体温を用いた。低体温は、虚血負荷直後より、導入し、2時間麻酔下に維持を行い、その後は低温室に置くことで体温の上昇を抑制した。常温下での脳虚血負荷も同じく2時間の麻酔を行い、術後は常温室に置いた。24時間後あるいは48時間後に脳を取り出し、TTC染色にて脳梗塞巣を描出し、脳切片上の脳梗塞面積を測定し、脳梗塞体積を算出した。

長期に生存可能な永久局所脳虚血モデルを作成するために両側頸動脈、内頸動脈、外頸動脈、左中大脳動脈のうち、様々な組み合わせによる脳虚血負荷を試みた。脳梗塞の判定は、虚血負荷1日後に脳を取り出し、上記の方法に準じて行った。様々な組み合わせの中より、安定した脳梗塞巣を示し、尚かつ長期生存可能な方法を用いて以下の実験を行った。モデルの脳保護効果判定への有用性を見るため、摂氏33度の軽度低体温を用いた。低体温は、虚血負荷直後より、導入し、2時間麻酔下に維持を行い、その後は低温室に48時間置くことで体温の上昇を抑制した。常温下での脳虚血負荷対照群も同じく2時間の麻酔を行い、術後は常温室に置いた。虚血後の局所脳血流の変化を観察するために虚血中心部および虚血辺縁部にてレーザー脳血流計による局所脳血流の計測を虚血開始後より6時間行った。脳梗塞巣の判定は、虚血負荷2日後あるいは21日後に行った。さらに、脳機能評価のためすでに開発した脳脱落機能評価系を用いて、2日後、1、2、3週間後にスコアリングを行った。

### 3. 研究成果

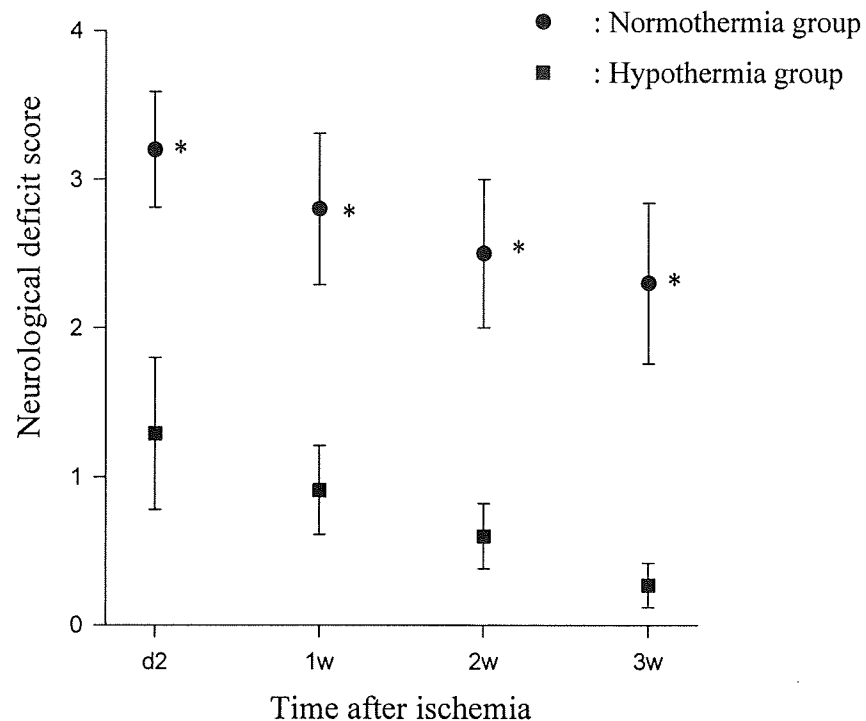
従来の3血管閉塞手技を用いた永久脳虚血モデルに中等度低体温を負荷した結果、24時間後の脳梗塞巣体積判定（各群 n=7）では、常温群が  $306 \pm 26 \text{ mm}^3$  であるのに対し、低体温群では、 $136 \pm 26 \text{ mm}^3$  と有意に縮小していた（mean, SEM）。また、脳浮腫比が常温群で  $11 \pm 1\%$  に対し、低体温群では、 $6 \pm 1\%$  であり、有意に軽度であった。48時間後の脳梗塞体積判定（各群 n=10）では、常温群が  $368 \pm 59 \text{ mm}^3$  であるのに対し、低体温群では、 $136 \pm 26 \text{ mm}^3$  と有意に縮小していた。また、脳浮腫比が常温群で  $10 \pm 1\%$  に対し、低体温群では、 $5 \pm 2\%$  であり、有意に軽度であった。ただし、これらの群では、48時間後の致死率が50%を超えることが明らかとなった。

新たな永久局所脳虚血の検討では、2血管閉塞手技では、脳梗塞が生じない個体があり、3血管以上の閉塞手技が必要であることが明らかとなった。多血管閉塞手技の検討の結果、右の内頸動脈、左の内頸動脈、左の外頸動脈、及び左の中大脳動脈の永久閉塞により、安定した脳梗塞が生じ、尚かつ、長期生存が可能であった。このモデルを用いて、軽度低体温負荷をおこない、脳保護効果の検討に対するモデルの有用性を検討した。新たな4血管閉塞手技を用いた永久脳虚血モデルに軽度低体温を負荷した結果、48時間後の脳梗塞巣体積判定（各群 n=6）では、常温群が  $139 \pm 21 \text{ mm}^3$  であるのに対し、低体温群では、 $77 \pm 20 \text{ mm}^3$  と有意に縮小していた（mean, SEM）。また、脳浮腫比が24時間後、常温群で  $10 \pm 1\%$  に対し、低体温群では、 $5 \pm 2\%$  であり、有意に軽度であった。3週間後の脳梗塞（欠落部位）体積判定（各群 n=6）では、常温群が  $211 \pm 19 \text{ mm}^3$  であるのに対し、低体温群では、 $88 \pm 15 \text{ mm}^3$  と有意に縮小していた。また、このモデルでは、虚血負荷による3週間以内の死亡は観察されな

った。

新たな永久局所脳虚血モデルに対し、虚血負荷後、常温群および低体温群で脳脱落機能の評価を行った結果を Figure 1 に示す。それぞれの群では虚血負荷により神経機能の脱落が生じたが、常温群に比し、軽度低体温負荷では、各測定時間において有意に軽度であった。

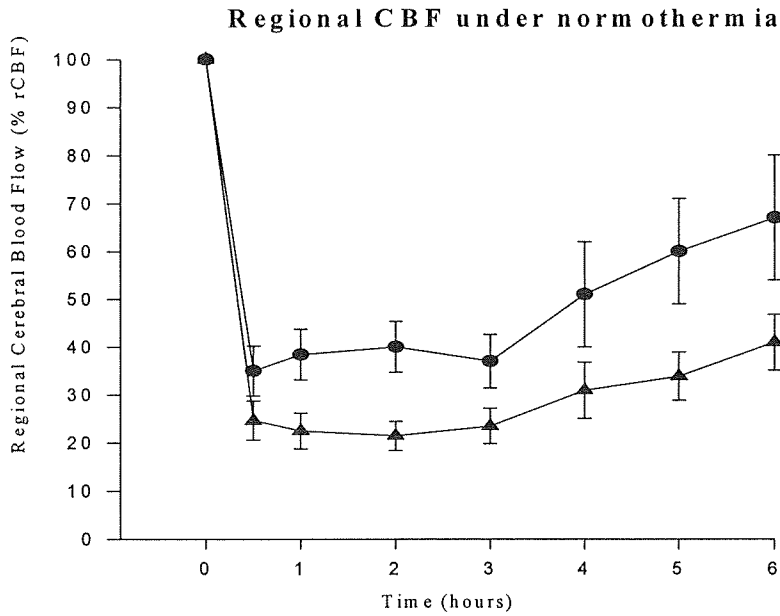
Figure 1



Time course of neurological deficit scores following permanent focal ischemia in the territory of the left middle cerebral arterial in the normothermia and hypothermia groups, assessed 2 days, and 1, 2, 3 weeks after ischemia. There were significant differences between the groups at each time point (Stroke 32: 232-239, 2001).

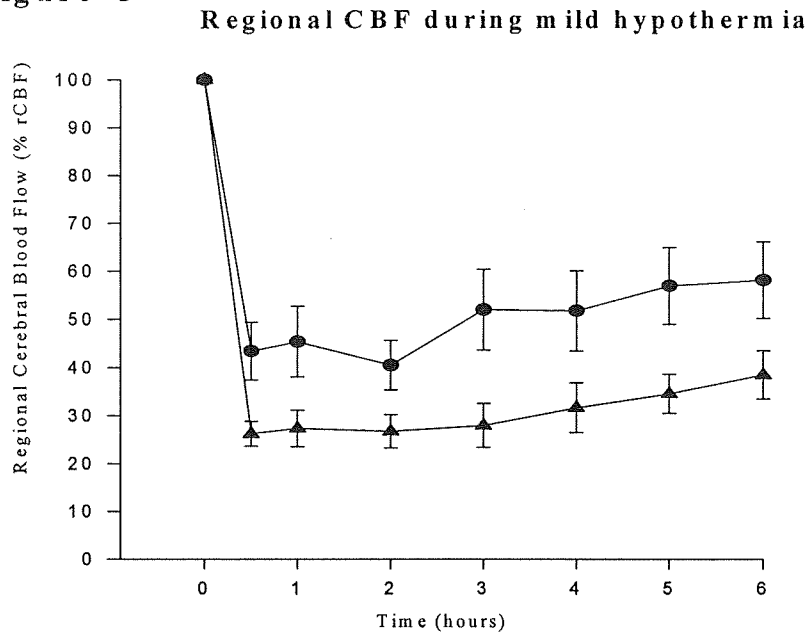
局所脳血流測定の結果、新たな永久局所脳虚血モデルの虚血中心部では、虚血前値（100%）のおよそ20%に低下した。しかしながら、虚血負荷3時間後より、虚血状態は徐々に緩和し、虚血負荷4時間後には、前値の50%まで回復することが明らかとなった。また、軽度低体温下での脳血流は、常温下に比して、虚血状態の緩和がより、緩やか（遅い）傾向を示した（Figure 2, 3）。

**Figure 2**



The regional cerebral blood flow (rCBF) values for the ischemic core and penumbra region after the induction of permanent focal ischemia under normothermic condition. Regional CBF increased 3 h after the induction of ischemia (Stroke 32: 232-239, 2001).

**Figure 3**



The regional cerebral blood flow (rCBF) values for the ischemic core and penumbra region after the induction of permanent focal ischemia under hypothermic condition (Stroke 32: 232-239, 2001).

#### 4. 考察

虚血性脳卒中の中では、再灌流の達せられない永久型の脳血管閉塞が最も多い病態であり、局所的に強度の脳虚血負荷が加わると考えられている。新たな脳保護薬を開発するにあたり強度の虚血負荷を模した動物モデルが欠かせない。しかしながら、従来より存在するラット3血管閉塞モデルでは、二日後の致死率が50%を超えることが明らかとなり、長期予後を判定することが困難であった。今回、我々の開発した新たな4血管閉塞手技を用いた永久局所脳虚血モデルでは、ばらつきの少ない安定した脳梗塞巣を造り出すことが可能であり、また、長期に生存することが明らかとなった。現在までに報告されている低体温の有する脳保護効果をこの新たな脳虚血モデルを用いて検討した結果、軽度の低体温は、永久血管閉塞に基づく局所脳虚血に対しても永続する脳保護効果を有することが初めて明らかとなった。このモデルでは、軽度低体温の有する抗脳浮腫効果も明らかとなった。さらにこのモデルの解析の結果、血管閉塞導入後より、脳梗塞体積が徐々に増大した。すなわち、従来より、虚血性脳梗塞は、血管閉塞による発症後速やかに病巣が確定し、6時間でほぼ完成すると考えられてきたが、脳梗塞体積は発症後2日間を経過しても尚、病巣の拡大(127±21 mm<sup>3</sup>から211±19 mm<sup>3</sup>へ)が存在し得ることが示された。超急性期の脳血流の改善にも拘わらず、病巣の体積が増大する原因としては、血管内血栓の増大進展、脳浮腫の進展による血管閉塞あるいは虚血領域の拡大、脳壊死組織からの放出物質による周囲組織への影響あるいはそれに基づく炎症反応等が可能性として考えられるが、現時点で、その主たる原因は明らかでない。しかしながら、この遅発性脳梗塞病巣の遅発性拡大がヒト病態でも生じるのであれば、それらの(重症)脳虚血治療における治療(脳梗塞巣進展の抑制)可能な時間帯は、発症後6時間を超えて存在する可能性がある。

#### 5. 結論

新たな永久局所脳虚血モデルを開発した。本モデルでは、安定した虚血性局所脳傷害を生じさせることが可能であり、長期予後の判定も可能である。さらに脳梗塞による脳の解剖学的な傷害のみならず、機能的な傷害をも追跡評価することを可能とする脳機能障害スコアリングシステムとの併用により、今後様々な新薬開発のための脳保護効果判定に有用であると考えられる。

#### 6. 研究発表

- 1) Yanamoto H, I Nagata, Y Niitsu, Z Zhang, J-H Xue, N Sakai, H Kikuchi  
Prolonged mild hypothermia therapy protects the brain against permanent focal ischemia, *Stroke*, 32, 232-239, 2001
- 2) Yanamoto H, I Mizuta, I Nagata, Z Zhang, J.-H Xue, H Kikuchi: Enhanced BDNF-like immunoreactivity in neuronal nuclei in the brain of infarct tolerance. *Soc. Neurosci.* 26, 12.5, 2000
- 3) Yanamoto H, Mizuta I, Nagata I, Xue J-H, Zhang Z, Kikuchi H: Infarct tolerance accompanied enhanced BDNF-like immunoreactivity in neuronal nuclei. *Brian Res*, 877, 331-334, 2000
- 4) Yanamoto H, Nagata I, Sakata M, Z Zhang, Tohnai N, Sakai H, Kikuchi H: Infarct tolerance induced by intra-cerebral infusion of recombinant brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res.* 24, 859, 240-248, 2000.



- 5) Yanamoto H, Nagata I, Tohnai N, Zhang Z, Kikuchi H: Prolonged hypothermia therapy suppress the extension of cerebral infarction following permanent focal ischemia. *J Neurosurg.*, 92, 219, 2000
- 6) Yanamoto H, Nagata I, Nakahara I, Inoue A, Tohnai N, Kikuchi H: Prolonged moderate hypothermia suppresses the extension of cerebral infarction for 48 hours following severe permanent focal ischemia. *Soc. Neurosci.* 25, 235.6, 1999
- 7) Yanamoto H, Nagata I, Mizuta I, Nishizaki J, Nakahara, Inoue A, Kikuchi H: Expression of glial fibrillary acidic protein, heat shock protein and neurotrophic factor during the infarct tolerance. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1999, 19, S1, S658
- 8) Yanamoto H, Nagata I, Nakahara I, Tohnai N, Z Zhang, Tohnai N, Kikuchi H: Combination of intraischemic and postischemic hypothermia provides potent and persistent neuroprotection against temporary focal ischemia in rats. *Stroke* 30:2720-2726, 1999.
- 9) Yanamoto H, Nagata I, Nishizaki J, Mizuta I, Nakahara I, Inoue A, Kikuchi H: A new model of temporary focal ischemia using a three-vessel occlusion technique in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1999, 19, S1, S603
- 10) Yanamoto H, Hashimoto N, Nagata I, Kikuchi H: Infarct tolerance against temporary focal ischemia following spreading depression. *Brain Res.* 784: 239-249, 1998.
- 11) Sakata M, Yanamoto H, Hashimoto N, Iihara K, Tsukahara T, Taniguchi T, Kikuchi H: Induction of infarct tolerance by platelet-derived growth factor against reversible focal ischemia. *Brain Res.* 474: 250-255, 1998.
- 12) Yanamoto H, Nagata I, Higashi T, Mizuta I, Nishizaki J, Kikuchi H. Combination of intra- and postischemic hypothermia exerts profound neuroprotection against temporary focal ischemia in rats. *Soc. Neurosci.* 24, 852.19, 1998
- 13) Yanamoto H, Nagata I, Nakahara I, Inoue A, Tohnai N, Kikuchi H: Prolonged moderate hypothermia suppresses the extension of cerebral infarction for 48 hours following severe permanent focal ischemia. *Soc. Neurosci.* 25, 235.6, 1998
- 14) Yanamoto H, Nagata I, Hashimoto N, Kikuchi H: Three-vessel occlusion using a micro-clip for the proximal left middle cerebral artery produces a reliable neocortical infarct in rats. *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, 3, 209-220, 1998.

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社

