

## 領域選択的脳虚血誘導法を用いたカニクイザルにおける高次脳機能障害モデルの開発

分担研究者 吉川泰弘（東京大学大学院・農学生命科学研究科） 教授

協力研究者 久恒辰博、佐藤裕樹（東京大学大学院・新領域創成科学研究科）

研究要旨：本研究は、脳の任意の領域に虚血による障害を引き起こすことが可能な技術を用い、カニクイザルにおける脳の高次機能の解析を行うことを目的としている。非ヒト霊長類を用いた局所脳虚血モデルは、これまでいくつかの手法が開発されてきたが、それらはどれも中大脳動脈の閉塞によるものであり、梗塞が生じる領域や梗塞の程度を人為的に制御することは困難であった。一方、マウスやラット等のげっ歯類においては、脳内の微細な血管を閉塞することにより、安定した虚血を比較的自由に作製できる方法が確立されている。これは、血流内に光感受性色素（ローズベンガル）を注入し、梗塞を作製したい領域に光照射を施すものであり、これにより血管内皮の機能異常が起こり、血管内に血栓が生じることを利用している。我々は、この手法をカニクイザルに応用し、霊長類の大脳新皮質の任意の領域に虚血を作製する方法を開発した。これは、脳梗塞の治療法や予防法の確立へ向けた基盤技術となるのみならず、小動物では不可能な脳の高次機能に関する研究を推進する方法として非常に有用なものである。そこで、我々はこの脳虚血モデルによって生じる梗塞巣の病態を組織学的に調査するとともに、遅延反応課題によって高次脳機能障害の程度を評価する実験系を確立した。このような一連のモデル系は、脳血管性痴呆の病態を模倣できる可能性が高い。カニクイザルを用いた脳血管性痴呆のモデルは世界的に見ても前例はなく、今後の研究開発の布石となることが十分に期待できる。

### A. 研究目的

本研究の目的は、カニクイザルの大脳新皮質において任意の領域に虚血を作製する技術を開発し、その病態を組織学的に解析すること、およびこの技術を脳の高次機能研究へと応用することである。これらの目的を達成するため、光感受性色素であるローズベンガルを用いた手法を採用した。この方法は、すでにげっ歯類における研究報告があり、以下のような利点を有する。

- 1) 任意の部位に虚血を引き起こすことができる。
- 2) 実験条件を変えることで、虚血の強度を容易

に調整できる。

3) 手術の際に、複雑な手技（transorbital approach 等）を必要としない。

4) 非常に安定した梗塞巣を作製することができる。

今年度は、この手法によって実際にカニクイザルの大脳新皮質に虚血を引き起こし、Nissl 染色やTUNEL 染色、その他の免疫組織化学染色によって、梗塞巣とその周辺領域における組織学的変化を網羅的に解析することを目的とした。さらに、この技術を用いた脳の高次機能解析を目指し、前頭葉に虚血を作製した場合に生じることが予

想される機能障害を検出するため、遅延反応課題を用いた評価系の確立を試みた。

## B. 材料と方法

### 1) カニクイザルを用いた領域選択的脳虚血モデルの作製:

6歳の雄カニクイザル1頭(体重4.5 kg)を用いた。全身麻酔下で頭部の皮膚を切開し、頭蓋骨にドリルで直径約1 cmの穴をあけ、静脈からローズベンガル(20 mg/kg bw)を注入した。その後、光ファイバーを用いて硬膜越しに20分間光を照射した。光照射後は、取り出した頭蓋骨を元に戻し、周囲にゼラチンスポンジを詰めて皮膚を縫合した。術後2日間は、抗生物質の投与を行った。この開頭手術による虚血作製は、日程を2回に分け、大脳新皮質の計4か所(左半球および右半球の前頭葉、運動野にそれぞれ1か所ずつ)に施された。1回目の手術から10日後、2回目の手術から1日後にあたる時点で過剰量のバルビツール系麻酔薬の注射により、個体の安楽殺を行った。このとき、生理食塩水および4%パラフォルムアルデヒドによって上半身を灌流固定し、脳を採取した。また、虚血作製から安楽殺までの間、分裂細胞の動態を調べるためにBrdUの腹腔内投与(100 mg/kg bw)を計5回行った。

### 2) 虚血作製後の脳の組織学的解析:

採取した脳は、厚さ5 mmのブロックに分割し、凍結した。その後、クリオスタットを用いて厚さ50 μmの切片を作製し、スライドグラス上に貼り付けた。この凍結切片に対し、cresyl violetを用いたNissl染色、アポトーシス検出のためのTUNEL染色、およびNeuN(ニューロンマーカー)、Iba-1(ミクログリアマーカー)に対する免疫抗体染色を行った。

### 3) 遅延反応課題による高次脳機能障害の評価系の確立:

光照射による脳虚血作成後、脳傷害が行動学的に与える影響を判定するために、遅延反応課題

(delay task)を行った。ケージ内のカニクイザル(3歳、雄)に報酬として食餌を呈示し、これをケージ両端に設置したスチール箱の一方に入れ、スクリーンを下ろし、サルに対して反応不応期を設けた。10、20、40、60秒の遅延時間をランダムに選択、その遅延時間経過後にスクリーンを上げ、サルに対して一方の箱を選択させることを許した。報酬である食餌側を選択した場合、これを正当反応とし、そのまま食餌を与える。一方、からの箱を選択した場合は誤反応として処理し、サルに報酬は与えなかった。以上の試行を繰り返し、遅延反応における正当反応率を得て、その成績を脳虚血前後の高次機能の判定評価に用いた。

## C. 結果及びD. 考察

図1および図2Aに示すように、ローズベンガル投与後の光照射部位にははっきりとした梗塞巣が生じていた。梗塞巣の中心部(図2D)にはNissl染色によって確認されるニューロンはまったく存在していない。また、梗塞巣の周辺部(図1C)においても、健常部位(図2B)に比べて明らかに細胞数が減少している。さらに、この部分には、細胞死の途上にあるのではないかと考えられる形態を示すニューロンも観察された(図2C、矢頭)。

さらに、梗塞巣の中心部においては、アポトーシスを起こしている細胞が多数確認された(図3A-C)。これらの多くはTUNEL陽性であり(図3)、DAPIによる核染色でも凝集した核を数多く検出された(図3B)。梗塞巣の周辺部においても、中心部と比べて数は少ないものの、アポトーシスが起きていることが示された(図3D-F)。

また、脳の障害に対する応答の一つとして、ミクログリアが活性化することが知られている。今回作製した脳虚血モデルにおいても、虚血作製後1日目から梗塞巣周辺部位において活性型ミクログリアが現れはじめた。このような活性型ミク

グリアが現れはじめた。このような活性型ミクログリアは、虚血作製後 10 日目においては非常に多数観察され、その中には BrdU 陽性のもも見られた (図 4)。このことから、梗塞巣周辺部位に見られる活性型ミクログリアが、既存の静止型ミクログリアの単なる活性化だけではなく、分裂・増殖の産物である場合も少なくないことを示している。通常、ミクログリアは脳内の免疫細胞として機能している。しかし、ミクログリアが分泌するサイトカインやタンパク質分解酵素、活性酸素類は、正常なニューロンを死に至らしめる場合もある。これは、痴呆症患者の脳におけるニューロン脱落の一因であるとも考えられており、今回作製した梗塞が脳血管性痴呆の良いモデルとなっている可能性を示唆している。

脳虚血前後の高次脳機能の評価をするために行った遅延反応課題の様子を模式的に表したものが、図 5 である。虚血前の実験結果を図 6 に記した。遅延時間が長くなるほど、正常反応の率が低下する。このことは本遅延課題に関するカニクイザルの作業記憶に容量限界が存在することを意味している。この成績が、主溝上部選択的な脳虚血障害後には、低下すると考えられる。

#### E. 結論

カニクイザルに光感受性色素 (ローズベンガル) を静脈内注射し、光ファイバーで光照射することにより、大脳新皮質の任意の部位に梗塞巣を作成する技術を確立した。梗塞巣中心部にはニューロンは存在せず、TUNEL 陽性のアポトーシスを生じている細胞が多数検出された。アポトーシスを起こしている細胞は梗塞巣周辺部にも存在した。また、脳障害の生体応答の一つであるミクログリアの活性化も顕著で、特に BrdU 陽性の活性型ミクログリアの出現が特徴的であった。本法は任意の領域に虚血を作成する技術として、脳血管性痴呆モデルの作成に有用である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

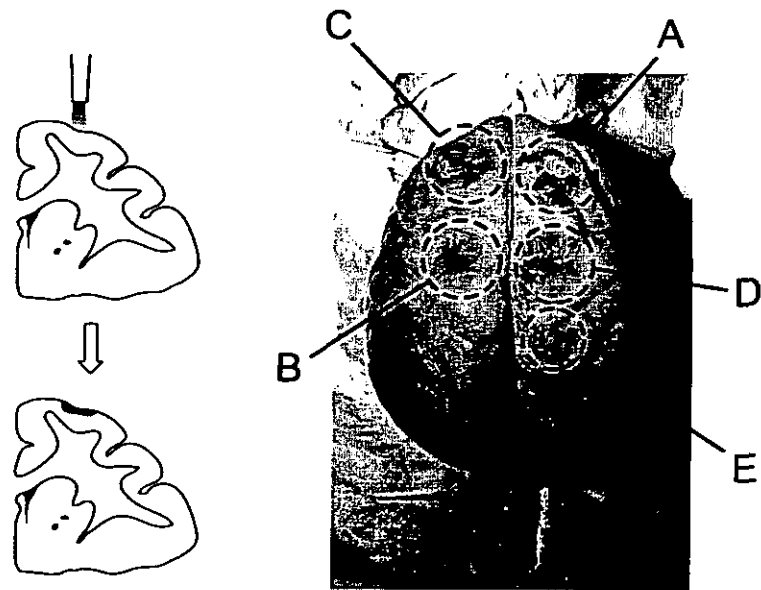


図1: 領域選択的脳虚血の作製法と虚血後の脳の外観

A, C, 前頭葉の梗塞巣。B, D, 運動野の梗塞巣。E, ローズベンガル投与前に光照射を行った対照領域。

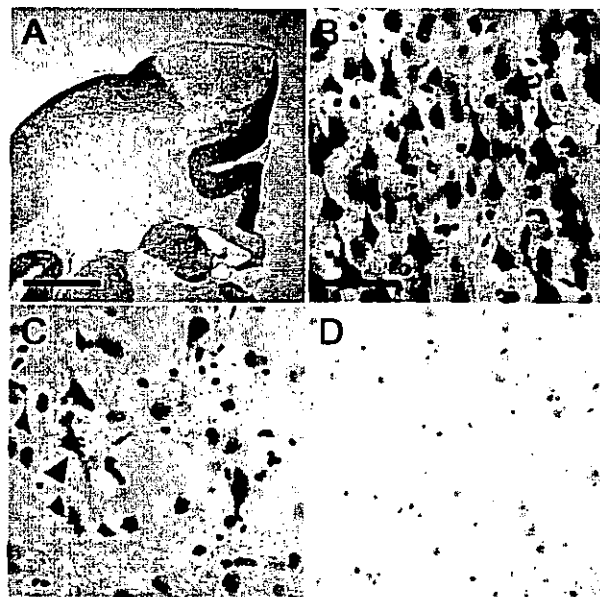


図2: 光照射部位に生じた梗塞巣 (Nissl 染色)

A, 梗塞巣の全体図。B, 正常部位の拡大図。C, 梗塞巣周辺の拡大図。D, 梗塞巣中心部の拡大図。Scale bar in A = 5 mm, in B = 50  $\mu$ m。

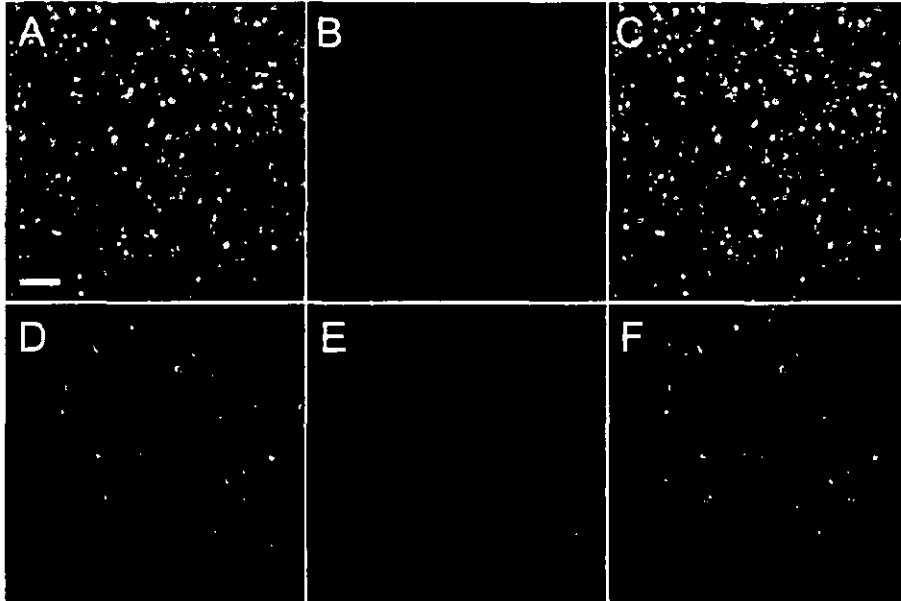


図3：梗塞巣におけるアポトーシスの検出 (TUNEL 染色)

A, 梗塞巣中心部の TUNEL 染色。B, 梗塞巣中心部の核染色 (DAPI)。C, A および B の重ね合わせ。Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ 。D, 梗塞巣周辺部の TUNEL 染色。E, 梗塞巣周辺部の核染色 (DAPI)。F, D および E の重ね合わせ。

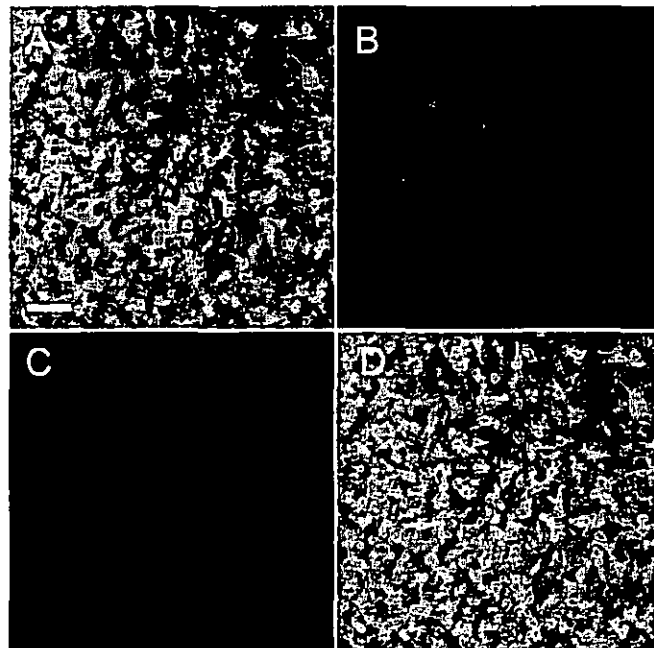


図4：虚血 10 日後における Iba-1 陽性ミクログリアの増殖

A, Iba-1 による免疫抗体染色。B, BrdU による免疫抗体染色。C, 核染色 (DAPI)。D, A-C の重ね合わせ。Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ 。

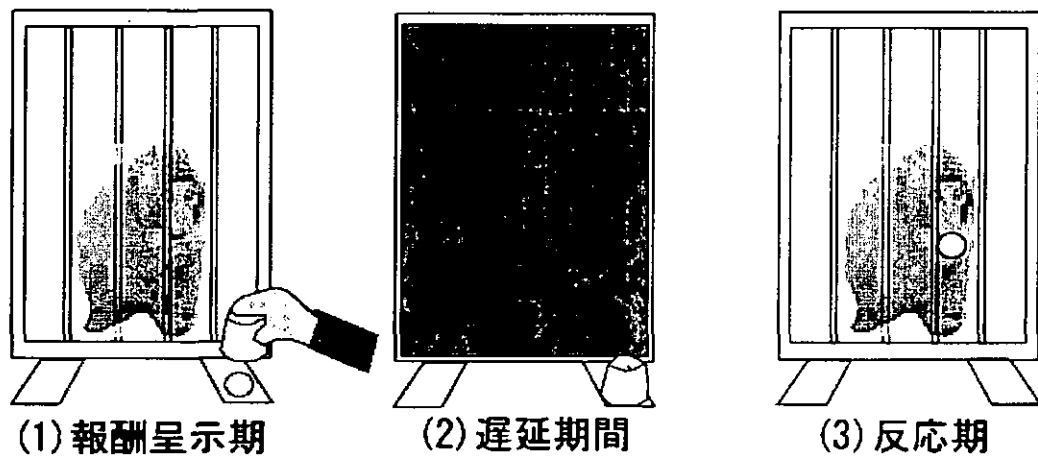


図5：遅延反応課題の概要

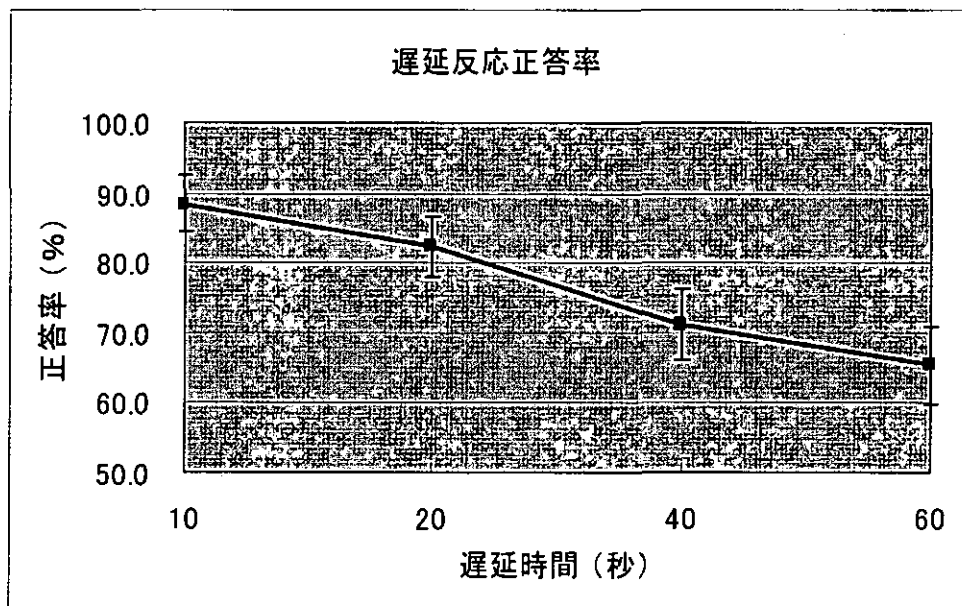


図6：カニクイザル遅延反応課題の成績

### Ⅲ．研究成果の刊行物に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
Fulka Jr., J., Miyashita, N., Nagai, T. and Ogura, A.	Do cloned mammals skip a reprogramming step?	Nat Biotechnol.	22	25-26	2004
Inoue, K., Ogonuki, N., Mochida, K., Yamamoto, Y., Takano, K., Kohda, T., Ishino, F. and Ogura, A.	Effects of Donor Cell Type and Genotype on the Efficiency of Mouse Somatic Cell Cloning	Biol Reprod.	69	1394-1400	2003
Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S. and Shinohara, T.	Long-Term Proliferation in Culture and Germline Transmission of Mouse Male Germline Stem Cells.	Biol Reprod.	69	612-616.	2003
Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Toyokuni, K., Kogishi, T., Honjo, T. and Shinohara, T.	Allogeneic offspring produced by male germ line stem cell transplantation into infertile mouse testis.	Biol Reprod.	68	167-173.	2003
Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue K., Ogura, A., Toyokuni, S. and Shinohara, T.	Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved mal germline stem cells.	Hum Reprod.	18	2660-2667.	2003
Miki, H., Lee, J., Inoue, K., Ogonuki, N., Noguchi, Y., Mochida, K., Kohda, T., Nagashima, H., Ishino, F. and Ogura, A.	Microinsemination with first- wave round spermatids from immature male mice.	J Reprod Dev.	50	131-137.	2004



Ogonuki, N., Mochida, K., Inoue, K., Matsuda, J., Yamamoto, Y., Takano, K. and Ogura, A.	Fertilization of Oocytes and Birth of Normal Pups Following intracytoplasmic Injection with Spermatids in <i>Mastomys (Praomys coucha)</i> .	Biol Reprod.	68	1821-1827.	2003
Ogonuki, N., Tsuchiya, H., Hirose, Y., Okada, H., Ogura, A. and Sankai, T.	Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey ( <i>Macaca fascicularis</i> ).	Hum Reprod.	18	1273-1280.	2003
Ogura, A., Ogonuki, N., Inoue, K. and Mochida, K.	New microinsemination techniques for laboratory animals.	Theriogenology	59	87-94.	2003
Okada, H., Hirose, Y., Ito, M. and Sankai, T.	Aspiration method to collect epithelial cells from mouse, rat, and monkey oviducts.	Comp. Top.Lab. Anim. Sci.	42	46-51	2003
Tsuchida, J., Kawasaki, K., Sankai, T., Kubo, N., Terao, K., Koyama, T., Makino, J. and Yoshikawa, Y.	Newtype of puzzle-task finger maze learning in <i>Macaca fascicularis</i> .	Int. J. Primatol.	24	261-270	2003
Fujita M, Yoshida A, Sakurai A, Tatsuki J, Ueno F, Akari H, Adachi A	Susceptibility of HVS-immortalized lymphocytic HSC-F cells to various strains and mutants of HIV/SIV.	International Journal of Molecular Medicine	11	641-644	2003

20030376

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。