

うとともに、実験後脳組織評価を行い、両解析法の差異なども合わせて検証する。

B. 研究方法

大脳新皮質微小脳梗塞モデル

このモデルにおいては、光照射により過酸化ラジカルである一重項酸素を発生する特殊な色素(ローズベンガル)を利用した。あらかじめ、実験動物にローズベンガルを注入し、脳血管内に浸潤するのを待って、実験動物の頭皮を切開し頭骸骨の上から一定量の光を照射した。高い再現性で一定の梗塞部位を作製するために、サルの大脳回(Cerebral gyrus)の部位から光照射を行った。この処置により、光照射部位において、微小な毛細血管内に過酸化ラジカルが発生し、数段階のカスケード反応を経てこの毛細血管が閉塞し、結果的にこの血管が栄養を供給していた脳組織に虚血性の障害が誘導される。

大脳新皮質性微小脳梗塞モデルでは、光照射により一定の病変を作成することができるため、梗塞コア・梗塞周囲層・障害性白質の3つの領域を厳密に再現させることが可能である。そこでこの点を活かし、MRI画像診断により、この3つの領域を特定する技術開発を進める。

多発性ラクナ梗塞モデル

このモデルにおいては、サルの大腿部を切開し、シース(スーパーシース#4Fメディキット)を大腿動脈に設置する。そして親カテーテルを大腿動脈から挿入し、頸動脈部位まで進める。内頸動脈への進入に際しては、親カテーテル内にマイクロカテーテル(ボストン・サイエンティフィック製

トラッカーエクセルインフュージョンカテーテル モデルSL-10 [カテーテル径 1.0 mm])を装着し、適宜造影剤を使いカテーテルの先端部位(内頸動脈と外頸動脈の分岐部など)をX線透視で確認しつつ、内頸動脈から眼動脈・前大脳動脈・中大脳動脈が分岐する手前までカテーテルを進める。霊長類の脳内においては、この部位で動脈が鋭角的に湾曲する特徴的な領域(サイフォン部)がある。ここを超えてカテーテルを進めるためには非常に熟練の技が必要である。本モデル作製においては、汎用性もかんがみ、サイフォン部の手前でカテーテルを留置する。

この部位でマイクロカテーテルからガイドワイヤーを抜き、マイクロビーズ注入用のシリンジを装着する。このシリンジには、1/2濃度の造影剤溶液中(0.5 ml)、約2000個のマイクロビーズが封入されており、パンプ操作によりビーズを経カテーテル的に注入する。

倫理面への配慮)

全ての動物試験は、所属施設の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

大脳新皮質微小脳梗塞モデル

本モデルにおいて、術後わずか3時間後にMRI観察(拡散画像)において明瞭な梗塞層を認めることができた。時間経過とともに皮質梗塞部位直下の白質部位に巨大なグリオーシスを伴う軸索損傷が形成されることが認められた。この組織変化が、脳梗塞後亜急性期における神経症状の悪化の一つの大きな原因になっていることが推定さ

れた。また、梗塞周囲層においては、ニューロン内で遺伝子修復（DNA 修復）が進んでいることが新たに認められた。脳梗塞後のニューロン細胞死を回避するために、DNA 修復機構を活用した新たな戦略が考えられ、このポイントも遺伝子治療のひとつのターゲットになることが示唆された。

多発性ラクナ梗塞モデル

このモデルにおいても、術後わずか3時間後に MRI 観察（拡散画像）において明瞭な梗塞層を認めることができた。そして、1日後には、線条体、大脳新皮質、ならびに関連する神経線維層（内包、帯状束、など）において、MRI 観察（T2 画像）により多数の梗塞層を認めた。多発性ラクナ梗塞（びまん性脳梗塞）患者では、ニューロン群や神経線維束のダメージにより、認知症が発症してしまうことが論じられている。

そこで、本モデルにおいても、遅延学習課題により脳高次機能の評価を行った。その結果、本モデルにおいても、ビーズ注入によってラクナ梗塞が誘導されると、記憶機能が障害されることが示された。

今後、今回開発した①大脳新皮質性微小脳梗塞モデル、②多発性ラクナ梗塞モデルを用いて、遺伝子導入実験を行い、脳梗塞に対する遺伝子治療プロトコルの開発を進める。

D. 考察

脳梗塞後の脳高次機能評価法の改良

脳梗塞による病的な脳組織の変化が、認知症の発症を誘発することが論じられている。脳血管性認知症の場合、大脳半球内の神経線維束部位などに小型の脳梗塞が散在

することが観察されている。脳梗塞後の脳高次機能の障害を評価するために、遅延学習課題に代表される複数の学習課題を術前、術後で実施し、多発性ラクナ梗塞による脳高次機能の障害について評価検討し、評価プロトコルを確立させる。

脳梗塞モデルを用いた遺伝子導入

多発性ラクナ脳梗塞に対しての遺伝子導入に際しては、障害部位が散在しているので、脳血管より血管カテーテルを用いてより広いエリアに遺伝子を導入する方法のほうがより適している。そこで、MRI によって病変部位を大まかに特定したのち、血管カテーテルにより GFP 発現センダイウイルスを導入し、遺伝子導入の程度を評価する。また、新たな遺伝子導入の方法として、遺伝子を導入した自家細胞の利用などもあわせて検討する。

高齢ザルを用いた脳梗塞モデル

一般に、加齢に伴い、学習・記憶に代表される脳の脳高次機能は低下することが知られている。多発性ラクナ梗塞は、高齢者において多く発症する疾病である。そのため、高齢の多発性ラクナ梗塞患者では、潜在的に低下した脳高次機能が、散在するラクナ梗塞によりさらに障害され、目に見える脳機能の低下（認知症）として現れてしまっている可能性が考えられている。実際、我々がすでに実施した、高齢ザルと若齢ザルを用いた比較学習評価試験の結果、サルにおいても加齢による脳高次機能の低下が認められている。そのため、高齢ザルを用いて多発性ラクナ梗塞モデルを作出し、術後の脳高次機能の評価することができれば、ヒ

トの疾病により近い、さらにより霊長類モデルになると考えられる。そこで、本研究では、20歳以上のカニクイザル（ヒトの年齢に換算すると60歳以上）を用いて研究を進める。

E. 結論

カニクイザルにおいて二つの小血管性脳梗塞モデルの確立に成功した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tozuka Y; Fukuda S; Namba T; Seki T; Hisatsune T “GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells” *Neuron*, 47, 803-815 (2005)
- (2) Imura T; Kanatani S; Fukuda S; Miyamoto Y; Hisatsune T “Layer-specific production of nitric oxide during cortical circuit formation in postnatal mouse brain” *Cerebral Cortex*, 15, 332-340 (2005)
- (3) Muramatsu D; Sato Y; Hishiyama S; Miyamoto Y; Hisatsune T “Transplantation of GABAergic neurons into adult mouse neocortex” *Exp Neurol*, 194, 1-11 (2005)

2. 学会発表

国際学会

1. T. Hisatsune. “Adult hippocampal progenitor receives GABAergic inputs” Cortical

Development Meeting, Santorini, Greece, May 12-15, (2005)

2. Y. Sato, N. Ageyama, H. Ito, K. Aizawa, Y. Tozuka, K. Terao, Y. Yoshikawa, T. Hisatsune. “Small ischemic injury gives massive damage to primate white matter accompanied by prolonged activation of astrocyte” 35th Annual Meeting of Society for Neuroecience, Washington, DC, USA, Nov. 12-16, (2005)
3. Y. Tanaka, N. Matsumura, D. Muramatsu, K. Nakashima, T. Hisatsune. “Nestin-positive progenitor cells in adult neocortex” 35th Annual Meeting of Society for Neuroecience, Washington, DC, USA, Nov. 12-16, (2005)
4. Y. Ide, S. Fukuda, D. Muramatsu, Y. Tozuka, N. Tamamaki, T. Hisatsune. “Functional maturation of new neurons derived from nestin-positive progenitors in adult dentate gyrus” 35th Annual Meeting of Society for Neuroecience, Washington, DC, USA, Nov. 12-16, (2005)
5. R. Nochi, H. Ito, S. Fukuda, Y. Tozuka, T. Hisatsune. “Characterization of dividing cell type after transient focal cerebral ischemia in adult dentate gyrus” 35th Annual Meeting of Society for Neuroecience, Washington, DC, USA, Nov. 12-16, (2005)
6. T. Hisatsune. “Theta oscillations activate adult hippocampal stem cells” Memory and Related Disorders Meeting, Madrid, Spain, December 12-14, (2005)

国内学会

1. 佐藤祐樹、揚山直英、伊東英恵、相澤憲、戸塚祐介、吉川泰弘、久恒辰博：微小脳梗塞により誘導される霊長類に特有な広

- 範囲白質障害に関する研究。第 28 回日本神経科学大会（横浜）、講演プログラム P2-252 (2005)
2. 相澤憲、揚山直英、横山ちひろ、寺尾恵治、久恒辰博：老齡ザルにおける視覚弁別学習能力の低下。第 28 回日本神経科学大会（横浜）、講演プログラム P3-246 (2005)
 3. 戸塚祐介、福田諭、石龍徳、難波隆志、久恒辰博：成体海馬におけるニューロン分化を促進する興奮性 GABA 入力の解析。第 28 回日本神経科学大会（横浜）、講演プログラム P1-174 (2005)
 4. 田中裕一、松村直人、太田綾、宮本有正、久恒辰博：成体マウス大脳新皮質に存在する Nestin 陽性細胞の解析。日本農芸化学会 2005 年度大会（札幌）、講演要旨集 p131 (2005)
 5. 伊東英恵、能智禄弥、宮本有正、久恒辰博：マウス脳虚血モデルに対する食品抗酸化物質の保護作用。日本農芸化学会 2005 年度大会（札幌）、講演要旨集 p269 (2005)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

①サル大脳皮質小梗塞モデル

虚血を誘導したい部位を露出させる。



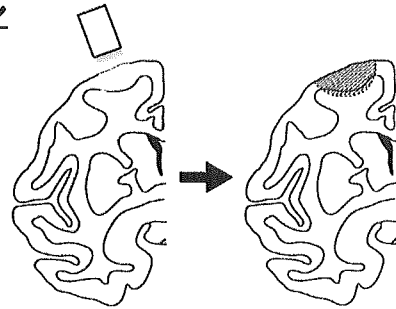
ローズベンガルを静脈から注入する。



露出させた部位に、コールドランプを照射する。

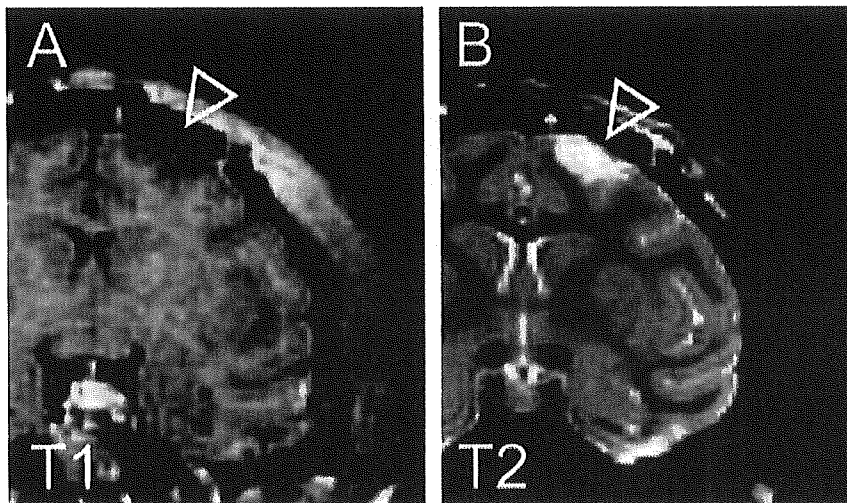


ランプ照射部位にのみ選択的に虚血を誘導できる。



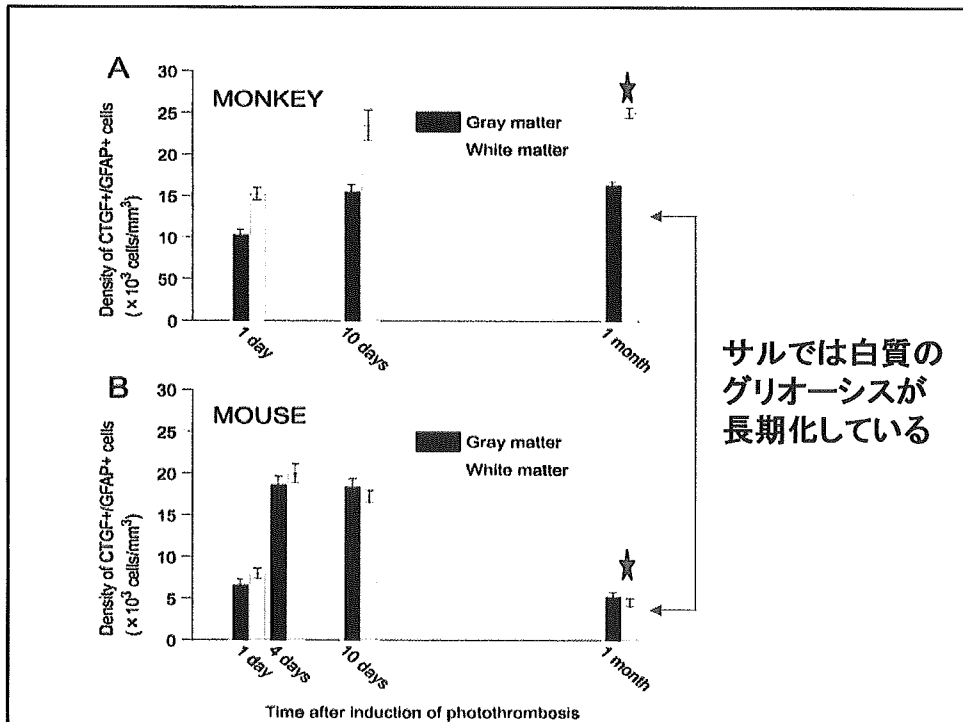
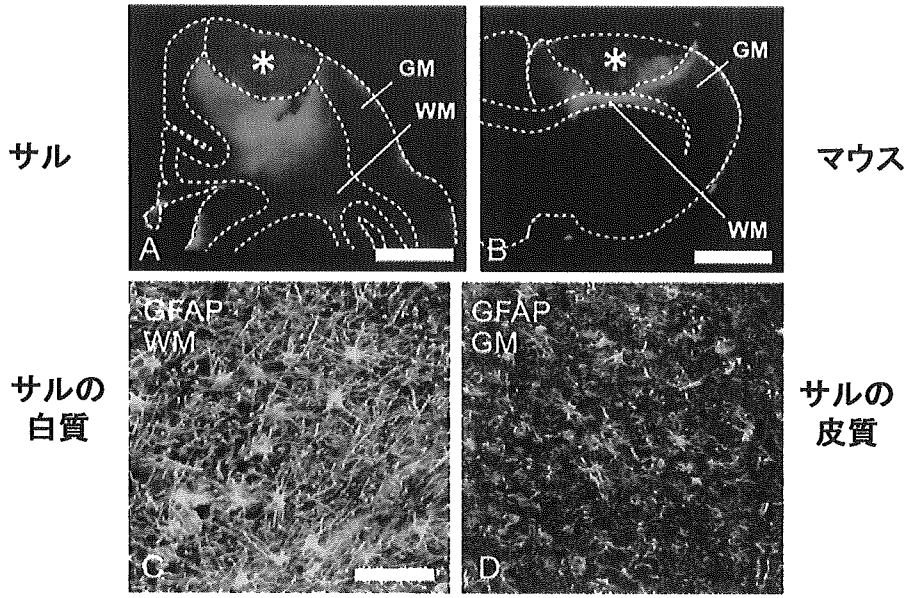
ローズベンガルが photoactivation を起こし、活性酸素を生じる。
⇒ ランプ照射部位の微細な血管に血栓ができる。

脳梗塞の様子 (MRI 観察)



術後10日目

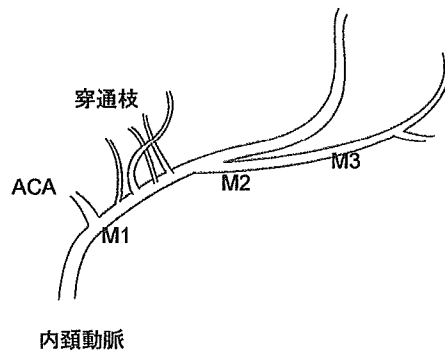
脳梗塞後のカニクイザルにおいては、特に白質の部位で reactive astrocyte (GFAP+) が誘導されている



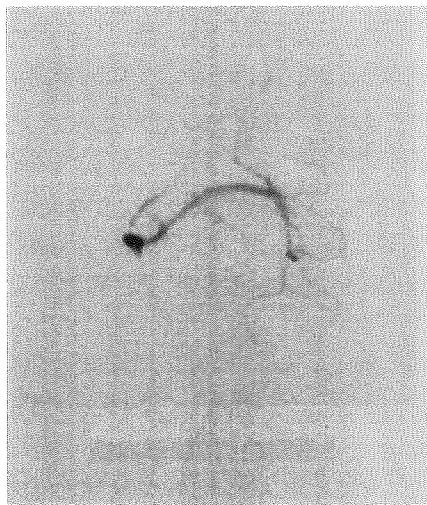
②サル多発性ラクナ梗塞モデル

Microsphere-Induced Stroke Model

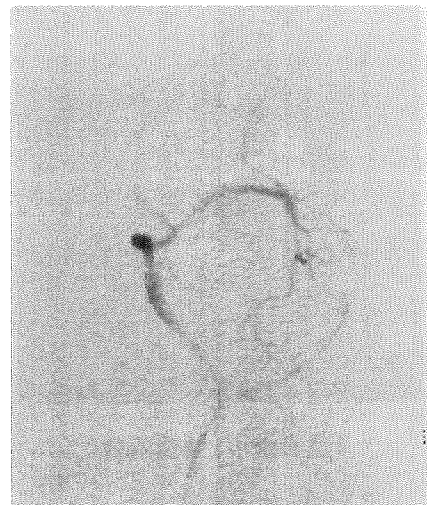
- モデル作製方法(前回まで)
 - 大腿動脈からマイクロカテーテルを挿入し、内頸動脈から中大脳動脈へアプローチ
 - 微小な粒子を注入し、中大脳動脈から分枝する穿通枝を閉塞
- 方法を変更
 - マイクロカテーテルの挿入は内頸動脈までとする
 - 粒子の数を少なくする(約1/3)



内頸動脈へのアプローチ

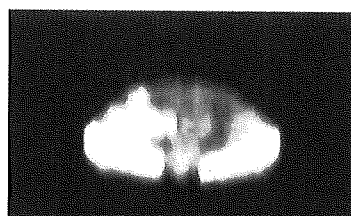
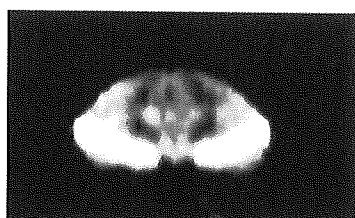


粒子注入前



注入後(バックフローが見られる)

MRI・超急性期～急性期

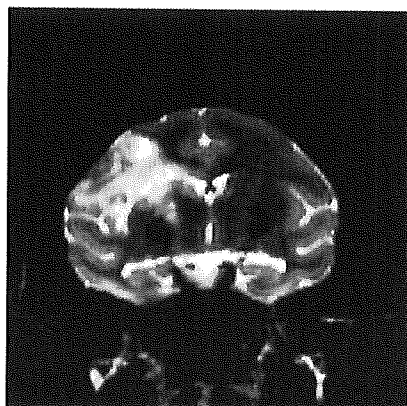


(上) 3時間後・拡散強調画像
(右上) 1日後・拡散強調画像
(右下) 1日後・T2強調画像

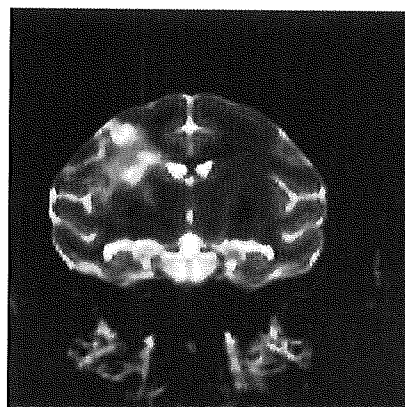


- 拡散強調画像により、3時間後から梗塞を検出可能。
- T2強調画像では1日後から描出された。

MRI・亜急性期



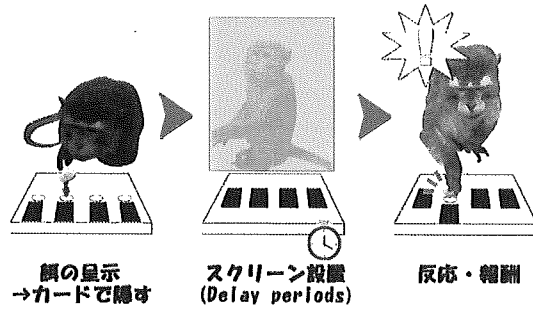
1週間後・T2強調画像



2週間後・T2強調画像

T2強調画像で、梗塞巣の周囲に高信号領域が観察された。
→ 高信号領域は徐々に減少。

4-wells Delayed Response Task

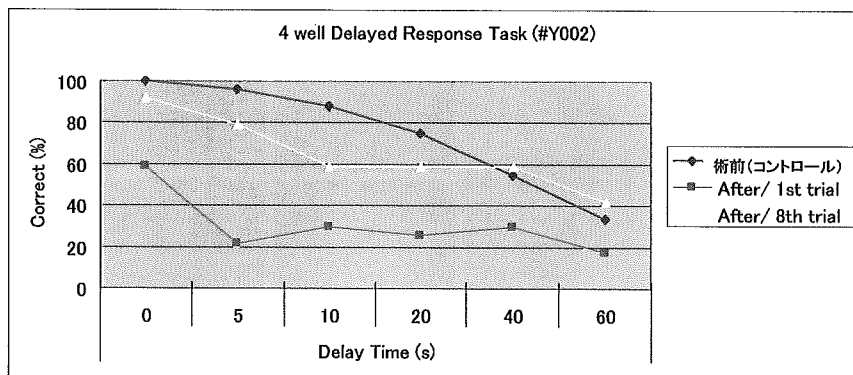


◆ 特徴・採用理由

- 4 well設置
片側無視でも
残り2穴でL/R判定.

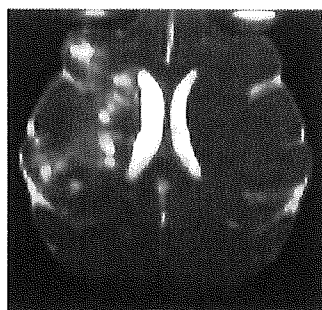
- random (%)が25%
梗塞後, 成績低下を
顕著に観察可.

脳梗塞後に記憶力が顕著に低下した

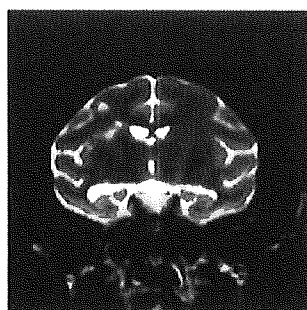


- 梗塞作成直後, 成績低下 (After / 1st trial) (術後1週間)
- 最終的に回復傾向あり (After / 8th trial) (術後2週間)

解剖直前のMRIと固定後の脳組織



術後1ヶ月
T2強調画像
(水平断面)

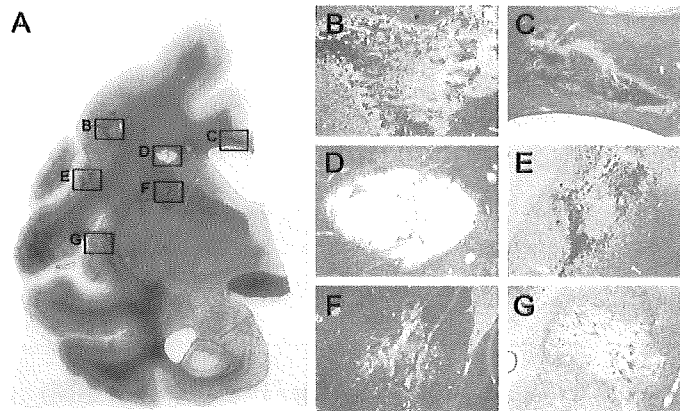


術後1ヶ月
T2強調画像
(横断面)



脳摘出後の
脳組織の様子

組織染色結果



クリューバー・パレラ染色(Luxol Fast Blueによるミエリン染色およびCresyl VioletによるNissl染色)を施した冠状切片のマクロ像。小梗塞が多数観察された。

大血管性脳梗塞モデルの作成と遺伝子治療の脳機能による評価

分担研究者 小野文子（社団法人 予防衛生協会）
協力研究者 間瀬光人（名古屋市立大学 脳神経外科）
土田順子（医薬基盤研 霊長類医学研究センター）
和田直巳（山口大学農学部 獣医生理学）
川原信隆（東京大学 脳神経外科）
飯島 明（東京大学 医学部附属病院）
大宅宗一（東京大学 大学院）
斉藤直之（社団法人 予防衛生協会）

研究要旨

血管性脳障害に対する治療法の開発は世界的な急務であり、ヒトへの応用を考えた場合、脳の構造と機能がヒトと類似した霊長類モデルは不可欠である。これまでに 7 例のカニクイザルにおいて、マイクロカテーテルを用いた中脳大動脈閉塞による局所梗塞モデル作成を試みた。梗塞術後明らかな臨床症状と MRI による梗塞像が確認された。最初の 5 例では広範な梗塞部位とともに重度の脳浮腫を伴い死亡した。障害の程度が著しかったことから、梗塞時間、全身ヘパリン化処置等の検討により続く 2 例において安定した中大脳動脈梗塞の作出が可能となり、治療研究の評価に適切なモデル系を確立できた。また、MRI による梗塞の評価、食物回収試験による記憶力評価、脳波トポグラフィマッピングによる脳機能評価系について検討を行い有効な評価系が確立した。今後、このモデルと評価系を用いて血管性脳障害の遺伝子治療評価を行う。

キーワード：カニクイザル、脳梗塞、MRI、脳波トポグラフィ、高次脳機能解析

カニクイザル 7 頭（3～22 歳、雌雄）を用いて脳梗塞モデルの作成を行った。

2. 局所脳梗塞モデル作成

イソフルレン全身麻酔下において、サルの大動脈よりレントゲン透視下でマイクロカテーテルをマイクロガイドワイヤーとともに脳内の右中大脳動脈に留置し一定時間虚血後カテーテルを抜去することにより、再灌流モデルの作成を行った。

3. MRI 撮像

MRI 撮像は 3T MRI 装置（MAGNETOM Allegra [Siemens 社]）を用い、術前、術中および術後定期的に行った。組織灌流画像（perfusion）撮像は、静脈ラインを確保し、造影剤（ガドジアミド水和物水溶液）を撮像中に投与した。動物は麻酔下で全身を保温しマグネットボア内に頭部を固定し撮像を行った。カニクイザルの脳撮像に際し、空間分解能・解像度を上げるために撮像視野を小さくし、高い S/N を持つ撮像条件を設定し、ヒト用ヘッドコイルの CP 型コイルを用いて T_1 , T_2 , プロトン強調画像、perfusion 及び diffusion 画像を撮像した。Perfusion 撮像データを用いて脳血流量及び

A. 研究目的

高齢化社会を迎え老人病、なかでも血管性痴呆症は患者数の多さ、高齢者の QOL の低下・孤立化をもたらすだけでなく、社会的な負担も著しく増大させる最も深刻な疾患である。

本研究はヒトへのトランスレーショナルリサーチとして、カニクイザルの大血管脳梗塞モデルを作成し、センダイウイルスベクターを用いた脳梗塞治療法等の開発研究において臨床応用可能なプロトコルを作成しようとするものである。

脳梗塞モデル作成はヒト脳梗塞に近いモデル系確立のために、脳内にマイクロカテーテルを留置し、再灌流を行う方法について検討した。

梗塞の評価には認知機能、MRI による画像診断、脳波解析等の指標を用いて評価系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. 動物

脳血流速度について解析を行った。

4. 行動解析

食物回収課題

高次脳機能評価の手法として、空間的記憶容量の評価系である食物回収課題を実施した。

1) 動物は、#G051 (1020407045、オス、4歳)、#G064 (1020502021、オス、2歳)を使用した。

2) 食物回収課題装置は、移動式架台・アクリル製パネル (28cm×28cm×2cm)・パネルを装置上方から撮影するカメラ・カメラで撮影された映像をモニタするビデオウォークマンで構成されている、この課題専用のものを用いた (Fig. 1)。パネルには縦3列、横3列の計9個の穴 (報酬穴; 直径2cm、深さ1cm、穴と穴との間隔は8cm) が開いていた。

また、実験前にサルホームケージの前扉を網格子から縦格子のものに取り替え、サルの手がケージ外に出るようにした。

3) 手術前の訓練手続き (規定の手続き)

食物回収課題は3課題 (予備訓練、コントロール課題、テスト課題) からなる。予備訓練ではフタなしのパネルを、コントロール課題では報酬穴をアクリル製の透明なフタで覆ったパネルを、テスト課題では報酬穴をアクリル製の不透明なフタで覆ったパネルを用いた (Fig. 2)。以下に詳細な手続きを示す。

実験者はパネルの穴すべてに報酬 (リンゴ片) を入れ、パネルをプラスチック板で覆った状態で装置を被験体のケージ前面に密着させた。ビデオの撮影を開始し、プラスチック板をパネルから取り去った (試行の開始)。実験者はできるだけ素早くかつ静かにケージから離れ、ビデオウォークマンで被験体の動作を観察した。被験体がすべての報酬を取り去ったら実験者はただちにプラスチック板でパネルを覆った (試行の終了)。その後、ビデオの撮影を終了し、装置をケージから離れた。各課題は1日1セッション (2試行) を行った。

被験体が試行開始後5分以上パネルに手を触れなかった際は、その日の実験を中止し、データは除外した。また翌日に矯正訓練を実施した。

4) 矯正訓練の手続き

矯正訓練の第1試行では、試行開始から30分間、装置をケージに密着させた状態で放置した。その間、実験者は退室した。第1試行ですべての報酬を回収していた場合は第2試行を通常の手続きで行った。もしも第1試行で報酬を取り残していた場合には、その日の実験を中

止し、給餌の際にはリンゴを与えなかった。

矯正訓練を中止した個体は、翌日も矯正訓練を実施した。ただし第1試行では、給餌の際に与えるリンゴ (100g) を1cm角程度に刻み、これを架台のパネル周辺に置いた。そのほかの手続きは通常 of 矯正訓練と同様であった。

矯正訓練を中止した日以外には給餌制限を行わなかった。また、リンゴの給餌量を制限した日は固形飼料を多めに与え、栄養状態の悪化がないように努めた。

サルの報酬穴とそれを覆うフタへの反応は、正ストロークと誤ストロークに分類された。正ストロークとは、報酬の入っている報酬穴あるいはその上のフタへ触れ、報酬を回収することである。誤ストロークとは、報酬の入っている穴に指を入れる、あるいはその上のフタを動かして報酬穴を露出させる行動である。

予備訓練は2セッション連続で、その日の2試行とも開始から遅滞なく装置にストロークを開始することを習得基準とした。この基準に達した個体は翌日よりコントロール課題に進んだ。

コントロール課題はまず5セッションを訓練した。5セッション目以降、その日の2試行とも誤ストロークが見られないことを習得基準とした。この基準に達した個体は翌日よりテスト課題に進んだ。

テスト課題は誤ストロークの有無にかかわらず、15セッション分のデータを得るまで継続した。

5. 皮質脳波トポグラフィ解析

#G064 (1020502021、オス、2歳) において、イソフルラン吸入麻酔下で Fig. 8 に示す24箇所手術用ステープラによる電極を配置し日本光電 EEG-1100 を用いて皮質脳波を測定した。

測定した脳波データは我々が日本光電、MTSの協力の下に作成した脳波解析ソフトを用いて2次処理を行った。Fig. 9 に二次処理した情報を示す。左から実際記録されている脳波、各チャンネルのパワースペクトラム、 δ 、 θ 、 α (低周波数帯)、 α (高周波数帯)、 β (低周波数帯)、 β (高周波数帯) のパワースペクトラムのヒストグラム、右には各周波数帯のパワースペクトラムによるマッピングを示している。このソフトの特徴はMemCac1の導入によりこの2次処理がほぼ脳波記録と同期して表示し、その結果が記憶メディアに蓄積できる点である。2次処理は ①各電極の周波数的変動: パワースペクトラムの時間的変動、②各

電極の振幅変動、③周波数的マッピング、④振幅マッピングを行った。

C. 研究結果

1. 脳梗塞モデル作成

脳梗塞の臨床に最も近いと考えられる中大脳動脈閉塞再灌流モデル作成を進めた経過を Table 1 に示す。昨年度報告した 3 頭に引き続き 4 頭において実験を行った。4 例目及び 5 例目では激しい脳浮腫を伴い手術翌日に死亡した。そこで 6 例目の #G051 において、それまでの 5 頭の実験経緯より 3 時間の閉塞が脳障害への負荷が大きすぎる可能性が考えられたため 2 時間の梗塞時間とした。梗塞は尾状核に観察されたが、MRI 像においてその他の部位に明らかな異常は観察されず、臨床症状も軽微であった。そのため 4 ヶ月後に再度反対側に梗塞を作成した。臨床症状は軽微であり、術後の経過も順調であった。梗塞作成手技において再検討を行い、梗塞中の全身へパリン化に違いがある可能性が考えられたため、へパリン投薬方法について検討をいった。7 例目では 6 例目以上、5 例目以下の梗塞作成を目標に梗塞 3 時間、へパリン化処置を初回 1 回のみとして作成した。術後左後肢にナックリングが認められた。翌日より左前後肢の麻痺が認められるとともに、左視界に対して反応性の低下が認められた。症状は徐々に改善されたが、術後 1 ヶ月目においても後肢の麻痺は継続して認められた。Fig. 10 に術後 5 週目に解剖した脳の肉眼所見を示す。右側被殻に明確な梗塞部が認められた。

2. MRI 所見

T₁, T₂, プロトン強調画像において血管閉塞後より梗塞部の所見が観察され、死亡した症例では広範な梗塞とともに、激しい脳浮腫が観察され、梗塞作成反対側を圧迫している所見が認められた。Fig. 6 に #G064 における梗塞 2 時間後の T₂ 強調画像をしめす。被殻を中心に広範な梗塞像が観察された。Fig. 7 に梗塞開始 2 時間後の Perfusion データを解析した Cerebral Blood Flow (CBF) を示す。左下の Perfusion 画像の中央部を Arterial Input Flow (AIF) として脳内血液流入最大流量部と設定し、脳実質各部位の相対的な造影剤の流量を示した。右側がわずかに低信号の傾向は観察されたが、あまり明確な所見は認められていない。同様の解析を #G051 で行ったところ、明らかに低下している部分は観察された。

3. 行動解析 食物回収課題

2 回 (右、左) の梗塞手術を行った #G051 では 1 回目の手術後、誤ストロークは減少傾向にあった。これは、練習の効果によるものと考えられる。しかし、2 回目の手術後のテストにおいて、一過性に誤ストローク数の劇的な増加が見られた。また、連続正ストローク数も、初回の手術後には成績の低下は見られず、むしろ成績は向上していたが、第 2 回目の手術直後のセッションの 2 試行ともが、連続して正しいストロークを遂行できなかった。ただし、その後のセッションにおいて成績は回復した。#G064 の誤ストローク数の変化は各セッションにおける誤ストローク数の平均を算出した (Fig. 3)。実験日ごとにばらつきはあるが、全般に訓練期間および術前と比較して、誤ストローク数の増加が見られた。また、障害は #G051 よりも長期にわたって観察された。正ストロークの連続数は、試行開始直後から最初の誤ストロークまでの間に、正ストロークが何回連続したかを Fig. 4 に示した。手術直後の 2 セッションにおいて、成績の低下が観察されたが、その後は回復した。誤ストロークの生じる位置とその数は、それぞれの正ストロークの間に、サルが何回誤ストロークを犯しているのかを Fig. 5 に示した。訓練時に比べ、術後はグラフの立ち上がりやや早く、また後半のエラー数の増加が著しかった。以上の結果より、脳梗塞後、空間記憶容量の低下が示唆された。

4. 皮質脳波トポグラフィ解析

#G064 において術前 11/18 及び術後 5 日目の 11/26 の皮質脳波についてマッピングを行い比較検討した。

Fig. 10 は G 6 4, 梗塞作成前 (11/18)、及び梗塞 5 日目 (11/26) δ 波および θ 波のマッピングを経時的に並べたものである。5 秒間ごとのマッピングで、約 2 分間のデータである。

術前の δ 波は経時的に δ 波の焦点、広がりさまざまに変化しており、類似したパターンが周期的に出現している (最上段左から 2 番目の広がり方が 2 分間でも何度か出現している)。イソフルレン吸入麻酔下での脳波測定であり、睡眠状態の脳波は圧倒的に δ 波である。しかし高周波数帯の θ 波の解析はきわめて重要だと思われる。出現率は低く、ブルーで示される 10 - 20% 以下の領域がほとんどである。しかし、広がり δ と同様に多様であるが周期性に同

様なパターンが観察された。

梗塞 5 日目の脳波には多くの脳波以外のノイズが時々混入していたため、その部分を除いてマッピングしたために、解析時間は 5 分と長くなった。各周波数帯 (δ 波、 θ 波) の広がりや左右対称性の違いが注目される。脳梗塞病変の作成により δ 、および θ の分布域の減少と左右の対称性の低下が明らかである。今回約 15 分間のデータを記録した。その全体の動画観察においても左右差が明瞭であった。

梗塞作成前後の発生頻度において、 δ の分布域は梗塞を作成した右に偏っており、 θ 波についても同様な傾向が明らかであった。

D. 考察

高齢化社会を迎え、血管性脳障害に対する治療法の開発は世界的な急務であり、治療薬の探索や、遺伝子治療・再生医療などの新医療技術開発へ向けた研究が進められている。ヒトへの応用を考えた場合、脳の構造と機能がヒトと類似した霊長類モデルは不可欠である。

遺伝子治療により脳梗塞治療を行うことを目的に中脳大動脈閉塞による局所梗塞モデルを作出しその評価系を確立について検討を行った。7 頭のカニクイザルを用いてマイクロカテーテルによる中大脳動脈再灌流モデル作出を行ったところ、最初の 5 例では梗塞部位が広範となり、脳浮腫を伴い障害の程度が著しかったことから、梗塞術実施中の全身へパリン化法について検討を行い、良好なモデルを確立することが可能となった。また、これまでは評価のために手術翌日の MRI 撮像を行っていたが、術後の侵襲により生体に最も負荷がかかっていると思われる 24 時間目の麻酔処置を行わないこととし長期生存可能なモデル確立がなされた。

2005 年 10 月より脳梗塞治療薬として有効な遺伝子組み換え組織型プラスミノゲン・アクチベータ (recombinant tissue-type plasminogen activator, rt-PA) が日本国内でも脳卒中治療薬として承認され、治療指針として発症 3 時間以内の虚血性脳血管障害に静注療法により転帰良好例が有意に増加すると報告されている。ベクター治療を行うタイミングについて梗塞 3 時間目の再灌流時の治療検討により臨床応用への有用性が考えられ、今後本モデルによるベクター治療の検討を進めていく。

MRI による梗塞の評価については脳損傷の

広がりを非侵襲的、経時的に描出でき、非常に有用な手段であり今回撮像を行った T1, T2 およびプロトン強調画像においても経時的な病態変化が観察された。梗塞の程度と予後の推測を梗塞作成時に正確に行うことにより、個体差を考慮しての評価系が確立できるものと考えられる。そのためには MRI の拡散強調画像 (diffusion weighted image; 組織内の水分子の拡散の早さと方向をパラメータとして画像化する方法) と造影剤を用いた組織灌流画像 (perfusion weighted image; 外因性物質の血管内の通過を測定し画像化する方法) を用いた解析は必須である。現在、perfusion weighted image のデータに基づき梗塞時の脳血流量の評価について検討を行っているが明確な所見を得ることはできなかった。Perfusion の時間分解能が、ヒトの場合は 1.5 秒に一回の測定としているところ、サル用に現在、やや短めに TR=1 秒で行っている。しかし、全血量がヒトの 1/10 であることを考えるとさらに短い解析時間に設定することにより適切な AIF を得ることができると考えられることから、今後撮像の条件について検討を進めていく。

サル 2 頭を用いて、食物回収課題の学習成績が手術前後で変化するかどうかを検討した。手術直後は (特に総誤ストローク数を指標とした際に) 2 頭とも、明確な成績の低下を示した。しかし、比較的短期間に成績は回復した。アップルテストによる運動機能の評価では異常が認められていないことから、時間経過とともに補償作用が働いたものと考えられる。実施手続きおよび評価については問題はいくつか残るものの、食物回収課題が脳梗塞ザルの認知能力評価法として有用である可能性は示唆された。食物回収課題は飼育ケージ内で実験が可能であり、装置も単純である。そのため、サルの馴化や訓練に要する期間は他の実験装置を使った実験と比較して、非常に短い。また、テスト課題については学習成績ではなく日数を終了の基準としているため、手術等のスケジュールを組みやすいという利点もある。今後、安定したスケジュールの中でできるだけ多くの個体に対し高頻度にテストを行っていくことで、より信頼性の高い結果を得られるようになることを期待している。

皮質脳波トポグラフィ解析により、睡眠脳波である低周波数帯のパワースペクトラムによるマッピングを作成することによって脳機能の異常の存在を示すことができる可能性を

示すことができた。現在の電極装着状況に応じてノイズ除去が十分でないことから、さらに安定した情報を得ることのできる多電極装置の開発を行っていく。また、今回用いた2次処理はパワースペクトラムによるマッピングであり、低周波数帯のみの解析である。他の振幅によるマッピング、また時間経過、さらには、高周波数帯成分の解析を行うこととする。

脳波は生体のあらゆる情報が投射し、その情報をもとに運動および精神活動の指令を決定するという統合制御を行う大脳皮質の活動を記録するものであり、さらにダイポールトレーシングなどの2次処理によってはその活動を発現させる脳深部の機能を評価することのできる方法である。とくに脳機能の時間分解能、そして電氣的活動の評価には最もすぐれた方法の1つである。非侵襲的機能評価法として、サル用のトポグラフィープログラムを用いることにより、大脳皮質の詳細な機能の異常部位、程度の評価を経時的に行うことが可能になると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

間瀬光人, 小野文子, 飯島 明, 川原信隆, 大宅宗一, 寺尾恵治, 吉川泰弘, 山田和雄: マイクロカテーテルを用いたMRI対応サル局所脳虚血再灌流モデルの開発. 第21回日本脳神経血管内治療学会総会, 平成17年11月10日(和歌山)

間瀬光人, 小野文子, 飯島 明, 川原信隆, 大宅宗一, 寺尾恵治, 吉川泰弘, 山田和雄: 新しい霊長類局所脳虚血再灌流モデルの開発. 第17回日本脳循環代謝学会総会, 平成17年11月25日(名古屋)

G. 知的所有権の出願・登録状況 なし

Fig 1. 食物回収装置課題

A. 正面(サルから見た図); B. 側面; C. パネル前面(不透明フタ付き); D. パネル後面; E. カメラ設置台(装置最上部)

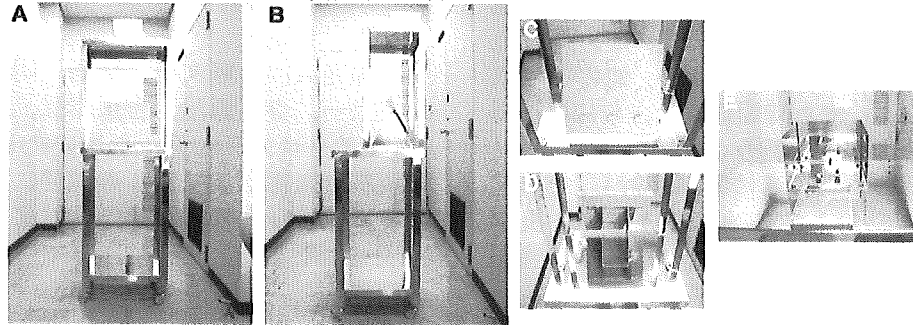


Fig. 2 実験手続きの概略

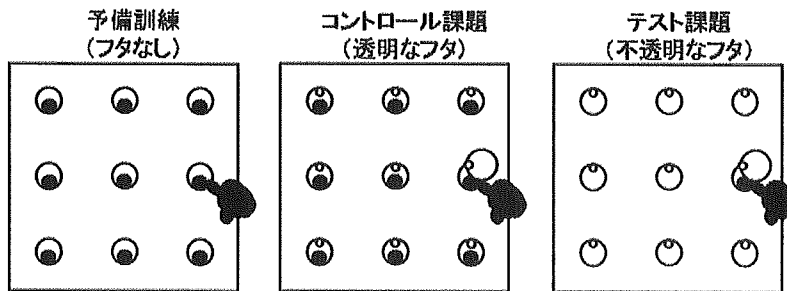


Fig. 3 #64 手術日と各セッションにおける平均誤ストローク数

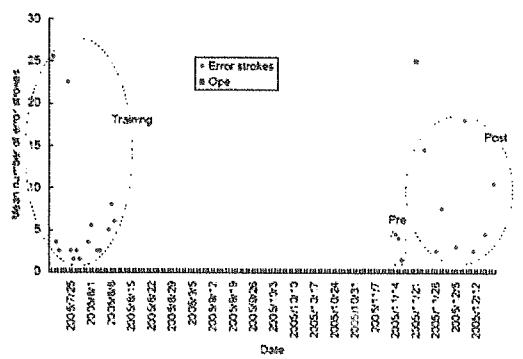


Fig. 4 #64 手術日と各セッションにおける平均連続正ストローク数

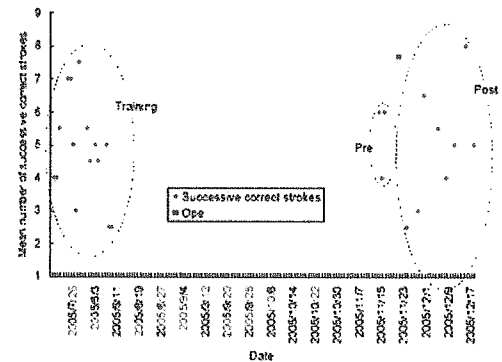


Fig. 5 # 64 誤ストロークの出現位置

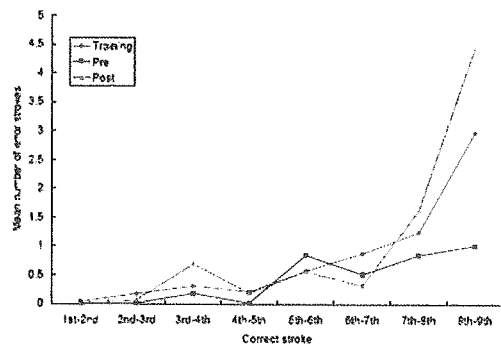


Fig.6 #64における梗塞2時間後のMRI T2強調画像

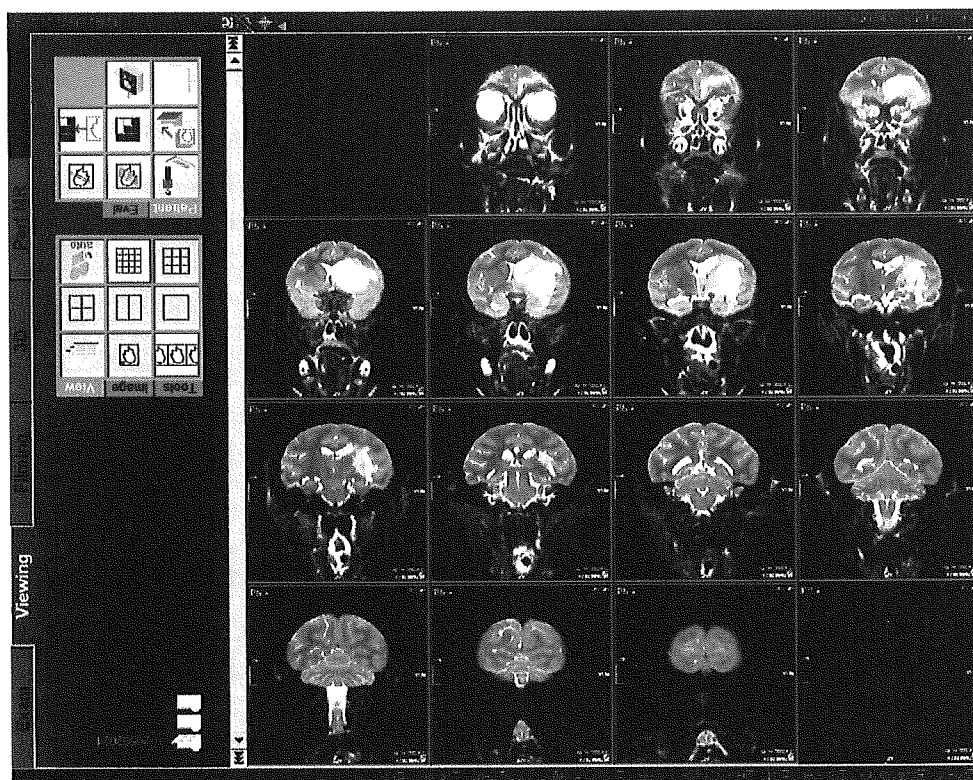


Fig.7 #64における梗塞2時間後のPerfusion 解析所見

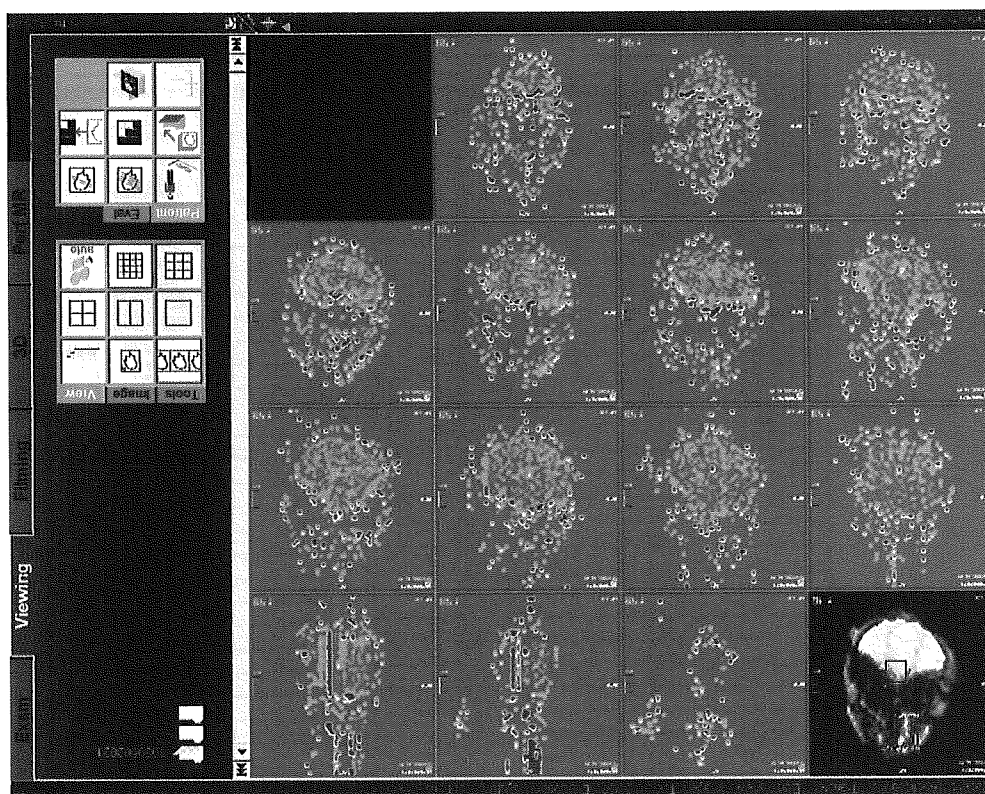


Fig. 8 カニクイザル脳波トポグラフィ測定ポイント

ソフトに表示されたマッピング

90度左回転

実際の電極配置と大脳皮質の関係

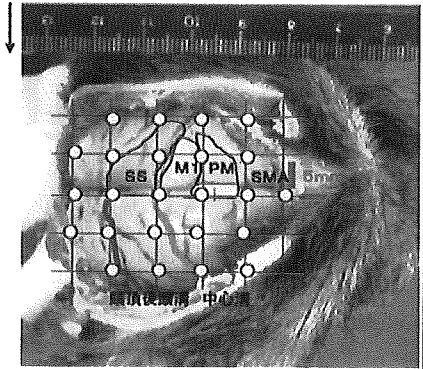


Fig. 9 脳波解析ソフト2次処理モニター画面

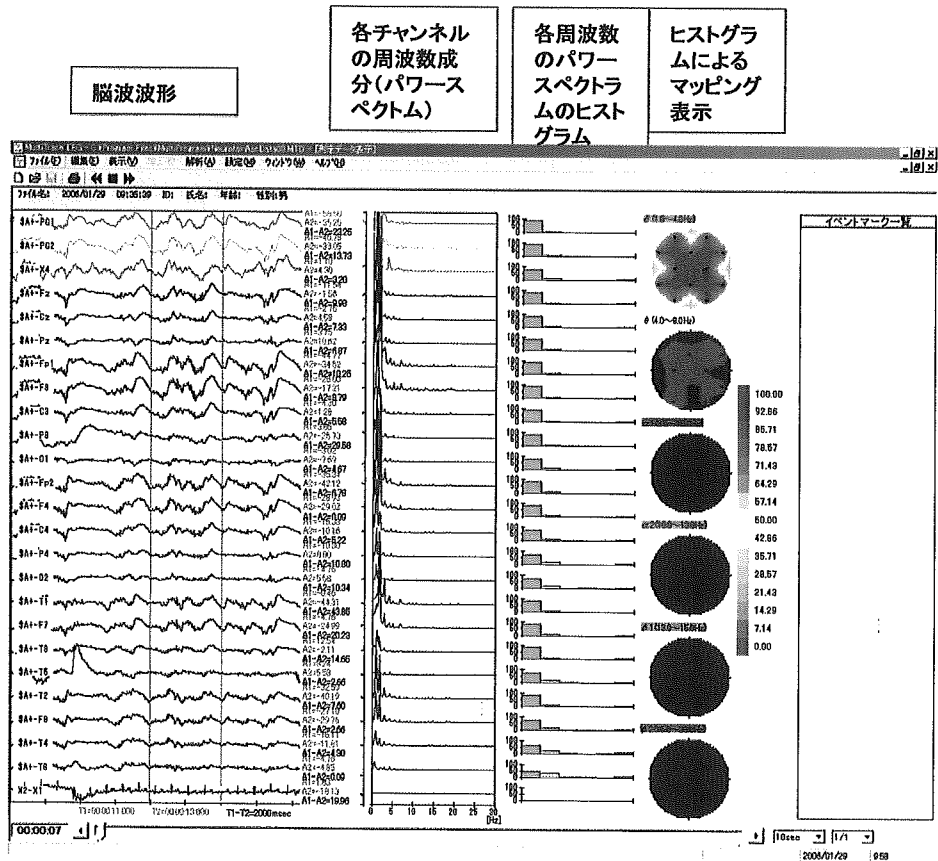
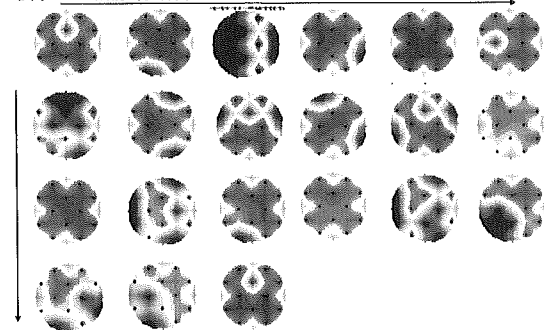


Fig.10 #G64における梗塞前及び梗塞後5日目の δ 波帯及び θ 波成分の分布密度

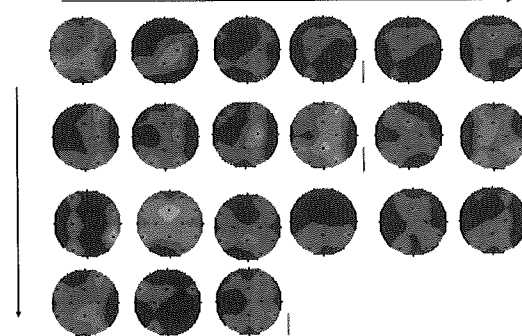
G64 11/18 (梗塞作成前) δ 波帯の分布密度

5秒間ごとの連続 約2分間のデータ



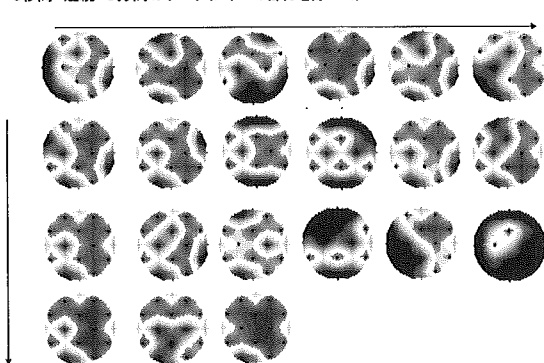
G64 11/18 (梗塞作成後) θ 波成分の分布密度

5秒間 連続 約2分間のデータ



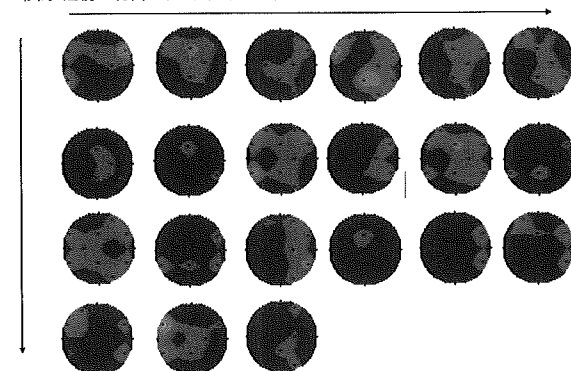
G64 11/26 (右側梗塞作成後) δ 波帯の分布密度

5秒間 連続 5分間のデータ(ノイズの部分を除いて)

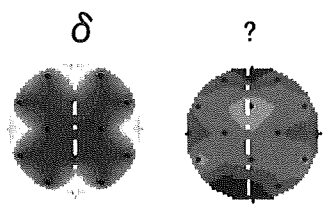


G64 11/26 (梗塞作成後) θ 波成分の分布密度

5秒間 連続 5分間のデータ(ノイズの部分を除いて)

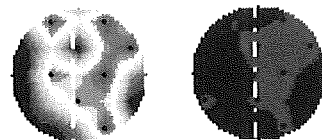


左



梗塞病変作成前

δ



梗塞病変作成後

右

G64 11/26 (梗塞病変作成後)

β 成分の出現

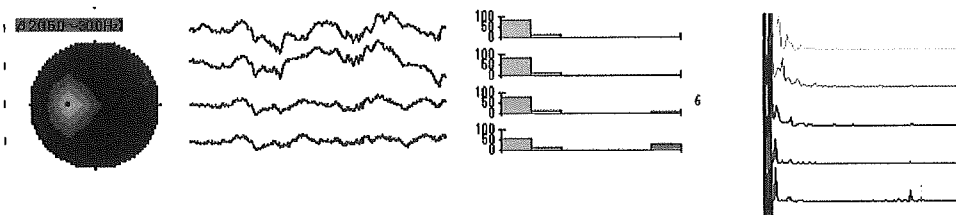


Fig.11 #G64における梗塞35日目の脳 肉眼所見

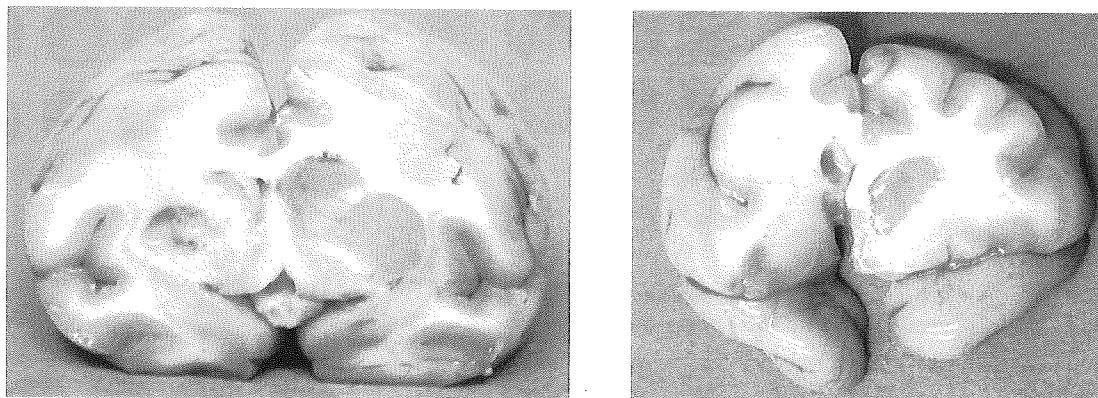


Table 1 MCA脳梗塞モデル作成の経緯

Animal No.	手術日	動物番号	年齢	性別	体重	死亡日	術式	マイクロカテ	親カテーテル	へバ化	麻酔時間	虚血時間	術後	予後	虚血中DWI
1	2004/6/14	YG001 1118211320	22	F	4.5	2004/6/15	マイクロカテーテルから液体塞栓物質(Eudragit)注入による永久閉塞モデル	MCAへは最大径0.021mmのカテ挿入可能	内頸動脈に挿入	+	10:00~22:00 不明 12h	開始時間不明 永久閉塞	覚醒。起立不能。	1日目のMRI撮影中除脈、死亡	x
2	2005/1/20	K001 1228401003	11	M	5.6	2005/1/20	腫脹式コイルによる梗塞。6時間後再灌流。	SL-10(金属ブレード入り)		-	9:30~21:15 12h	14:00~20:40 6h	覚醒。起立不能。右側麻痺	翌日死亡確認	x
3	2005/2/14	YG060 1319911100	5	F	3.08	2005/2/17	マイクロカテーテル留置による梗塞。3時間後再灌流	Renegade 18(先端マーカーあり)	内頸動脈に挿入	+	9:00~18:00 9h	11:30~14:50 3h20m	覚醒。起立不能	翌日左前、後肢麻痺座位。1日目のMRI撮影後横臥、3日目に死亡	x
4	2005/3/1	K002 1219212265	13	F	3.52	2005/3/2	マイクロカテーテルによる梗塞。3時間後再灌流	Renegade 18(先端マーカーなし)	総頸動脈に留置	+	9:25~16:15 7h	11:40~14:40 3h	覚醒。起立不能。左前後肢麻痺、後肢は伸展。右手、右足はケージの網をつかむ。	翌日座位。左側麻痺。舌弛緩。1日目のMRI撮影中に死亡	○
5	2005/4/19	K003 1228111238	14	M	4.97	2005/4/20	マイクロカテーテルによる梗塞。3時間後再灌流。血管結紮後の大脳動脈内出血。MRI撮影中に気づき圧迫。	Renegade 18(先端マーカーなし)	内頸動脈に結紮	-	10:30~17:15 7h	13:15~16:15 3h	術後覚醒は確認	手術翌日朝死亡を確認。腎臓皮質に梗状梗塞が散在。術中の血栓播種の可能性?	○
6R	2005/6/21	G051	4	M	3.52	05/11/11 安楽死	マイクロカテーテルによる梗塞。2時間後再灌流	Renegade 18(先端マーカーなし)	総頸動脈に留置	+	9:30~16:00 7h	10:15~12:15 2h	左手がやや多動	症状は軽微	○
6L	2005/10/4	1020407045					マイクロカテーテルによる梗塞。3時間後再灌流	Renegade 18(先端マーカーあり)	総頸動脈に留置	初回0.5ml、以後1時間毎に0.1ml静注	9:00~16:00 7h	12:00~15:00 3h	右手、右足多動	症状軽微	○
7	2005/11/21	G064 1020502021	3	M	2.85	05/12/26 安楽死	マイクロカテーテルによる梗塞。3時間後再灌流	Renegade 18(先端マーカーあり)	総頸動脈に留置	初回0.1m/kg静注のみ	12:00~17:00 7h	13:00~16:00 3h	覚醒。左上下肢麻痺、左視界反応性低下	左下肢不全麻痺	○