

Fig. 1. [Exps. 1–3] Diagram of drug injections (A). Data from three experiments (Exps. 1–3) were pooled and analyzed together. Effects of progesterone (PROG; 10 mg/kg) and allopregnanolone (ALLO; 10 mg/kg) administration in postnatal day 7 (P7) rats. Representative photographs of rat brains at 7 days after hypoxia–ischemia (HI) (B). PROG and ALLO reduced the ipsilateral hemispheric volume (C). A lower dose of ALLO (1 mg/kg) did not reduce the hemispheric volume (D). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (vehicle $n = 42$; PROG $n = 22$; ALLO, 10 mg $n = 28$; ALLO, 3 mg $n = 10$; ALLO, 1 mg $n = 10$).

Results

PROG and ALLO exacerbate brain injury in P7 rats

First, the effect of PROG (10 mg/kg \times 3) and ALLO (10 mg/kg \times 3) administration on P7 rats with HI-induced brain injury was examined [Exp. 1]. With respect to hemispheric volumes, two-way ANOVA revealed a hemispheric difference and a treatment group difference. Ipsilateral hemispheric volume was significantly reduced in the PROG-treated group ($271 \pm 11 \text{ mm}^3$) and the ALLO-treated group ($293 \pm 15 \text{ mm}^3$) compared with the vehicle-treated group ($345 \pm 14 \text{ mm}^3$) (Fig. 1B). Second, the effect of the dose of ALLO administration on P7 rats with HI-induced brain injury was examined [Exp. 2]. Two-way ANOVA did not reveal a dose difference. Because the vehicle-control groups in three experiments with P7 rats [Exps. 1–3] did not differ from each other (two-way ANOVA) with respect to hemispheric volumes, these data were pooled together into a single control group. The exacerbating effects of PROG and ALLO were the same as the original analysis (Fig. 1C), and the effect of the dose of ALLO became significant. The administration of 10 mg/kg \times 3 ALLO or 3 mg/kg \times 3 ALLO, but not 1 mg/kg \times 3 ALLO, significantly reduced the ipsilateral hemispheric volume compared with that of the vehicle-treated group (Fig. 1D).

Based on the neuropathological scores, PROG (10 mg/kg \times 3) significantly exacerbated injury in all four regions examined, the cortex, striatum, hippocampus, and thalamus (Fig. 2A). Although ALLO (10 mg/kg \times 3) increased the injury scores, its effect was not statistically significant in any of the four regions. Given that the mortality rate was significantly higher in the ALLO-treated, but not the PROG-treated group, than in the vehicle group (Table 1), ALLO may be detrimental in HI-induced brain injury. The number of pups that died or were severely injured with a neuropathological score greater than 10 was significantly higher in both the PROG- and ALLO-treated groups compared with that in the vehicle-treated group ($P < 0.05$, Fisher's exact test with Bonferroni's correction) (Fig. 2B).

There were no sex differences in the effects of PROG or ALLO on either evaluation of brain damage, i.e., hemispheric volume (data not shown) or the neuropathological injury score (Fig. 2C).

GABA_A receptor antagonism abolishes the exacerbating effect

To better understand the mechanism behind the exacerbation caused by ALLO, bicuculline, a GABA_A receptor antagonist, was co-administered with ALLO to the rats [Exp. 3]. After pooling data from the three P7 experiments [Exps. 1–3], two-way ANOVA revealed a

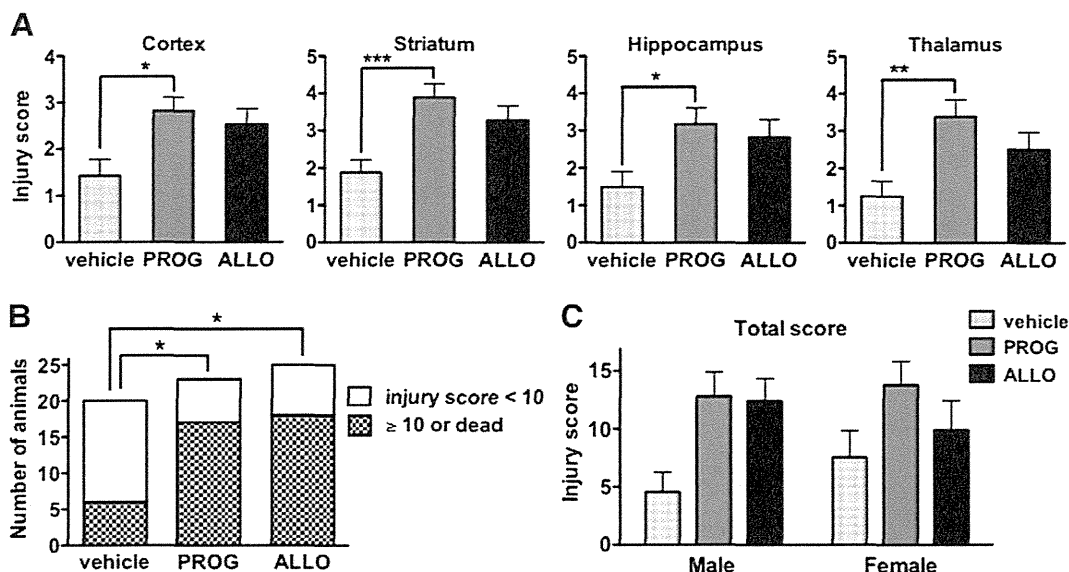


Fig. 2. [Exp. 1] Effects of PROG (10 mg/kg) and ALLO (10 mg/kg) administration in P7 rats. The neuropathological injury score 7 days after HI in each region (A). PROG administration exacerbated HI-induced brain injury in all four regions examined. The number of pups that died or were severely injured (i.e., an injury score greater than 10) was significantly higher in both the PROG and the ALLO groups when compared with the vehicle group (B). There was no sex difference in the effects of PROG or ALLO on total injury score (C). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (vehicle $n = 20$; PROG $n = 22$; ALLO $n = 18$).

treatment difference in hemispheric volumes. Post hoc tests showed statistical significance only for the comparison of ipsilateral hemispheric volumes between the vehicle- and the ALLO-treated groups and between the bicuculline- and the ALLO-treated groups (Fig. 3). Ipsilateral hemispheric volumes in the bicuculline + ALLO-treated group ($312 \pm 13 \text{ mm}^3$) were not significantly different from those of the vehicle-treated group. In other words, ALLO treatment exacerbated ipsilateral hemispheric volume loss from 16.3% in control to 26.6%, and bicuculline co-administration partially mitigated it to 18.6%. Ipsilateral hemispheric volume loss was calculated as follow: $(1 - (\text{ipsilateral volume} / \text{contralateral volume})) \times 100\%$. The lack of any statistically significant difference between the ALLO- and the bicuculline + ALLO-treated groups may result from the relatively higher mortality rate in the ALLO-treated group (11/42) compared with that in the bicuculline + ALLO-treated group (1/20) ($P = 0.08$). Detrimental effects of ALLO may be underestimated, as only the surviving

pups were analyzed. Likewise, the mitigating effects of bicuculline may be underestimated in comparison with ALLO. The number of pups that died or were severely injured, with a neuropathological score greater than 10, was significantly lower in the bicuculline + ALLO-treated groups (8/20) compared with that in the ALLO-treated group (27/39); because a few P7 pups were killed by their stressed dams, only the number of pups that died during the hypoxia and the 1 h recovery period was analyzed.

PROG and ALLO are less detrimental in P14 and P21 rats

The effects of PROG (10 mg/kg $\times 3$) and ALLO (10 mg/kg $\times 3$) on HI-induced brain injury in more mature rats, i.e., those at P14 [Exp. 4] and P21 [Exp. 5], were examined. In rats subjected to HI-induced injury at P14, ipsilateral hemispheric volume was significantly reduced in the PROG- ($346 \pm 8 \text{ mm}^3$) and ALLO-treated ($348 \pm 10 \text{ mm}^3$) groups

Table 1

Mortality rates and the numbers of rats analyzed. The number of rats that died/the number of rats subjected to hypoxia are indicated in the upper rows. The mortality rate differed significantly between the allopregnanolone (ALLO; 10 mg/kg)-treated group and other two groups in experiment 1 [Exp. 1] using postnatal day 7 (P7) rats. Two males and five females out of 28 pups died in ALLO-10 mg group in Exp.1. Because a few P7 pups were killed by their stressed dams, only the number of pups that died during the hypoxia and the 1 h recovery period was analyzed. The number of males:females analyzed are indicated in the lower rows.

Exp.	Exp.	Exp.	Exp.	Exp.				
1	2	3	4	5				
P7	P7	P7	P14	P21				
Vehicle	0/22	Vehicle	0/9	Vehicle +	1/15	Vehicle	1/14	0/12
	10:10		7:2	vehicle	7:6		6:7	6:6
PROG	1/25	ALLO	0/10	Bicuc +	0/19	PROG	1/12	3/14
10 mg	11:11	3 mg	5:5	vehicle	10:9	10 mg	6:5	5:6
ALLO	7/28*	ALLO	0/10	Vehicle +	4/14	ALLO	1/13	3/13
10 mg	9:9	1 mg	5:5	ALLO	5:5	10 mg	5:7	6:4
				Bicuc +	1/20			
				ALLO				
					10:9			

PROG: progesterone, Bicuc: bicuculline.
* $P < 0.05$.

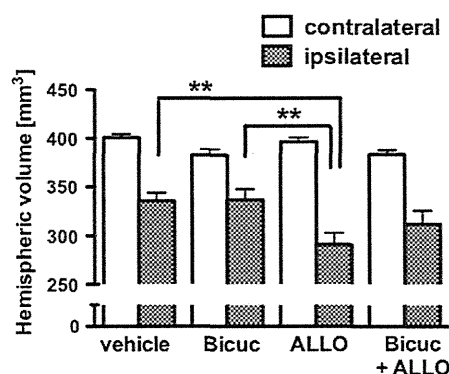


Fig. 3. [Exps. 1–3] Effects of the co-administration of a GABA_A receptor antagonist, bicuculline (Bicuc; 2 mg/kg), with ALLO in P7 rats. Data from three experiments (Exps. 1–3) were pooled and analyzed together. Co-administration of the GABA_A receptor antagonist partially mitigated the effect of ALLO. Two-way analysis of variance and post hoc tests showed statistical significance only for the comparison of ipsilateral hemispheric volumes between the vehicle- and the ALLO-treated groups and between the bicuculline- and the ALLO-treated groups. The ipsilateral hemispheric volumes in the bicuculline + ALLO-treated group were not significantly different from those of the vehicle-treated group. ** $P < 0.01$. (vehicle $n = 42$; Bicuc $n = 19$; ALLO $n = 28$; Bicuc + ALLO $n = 19$).

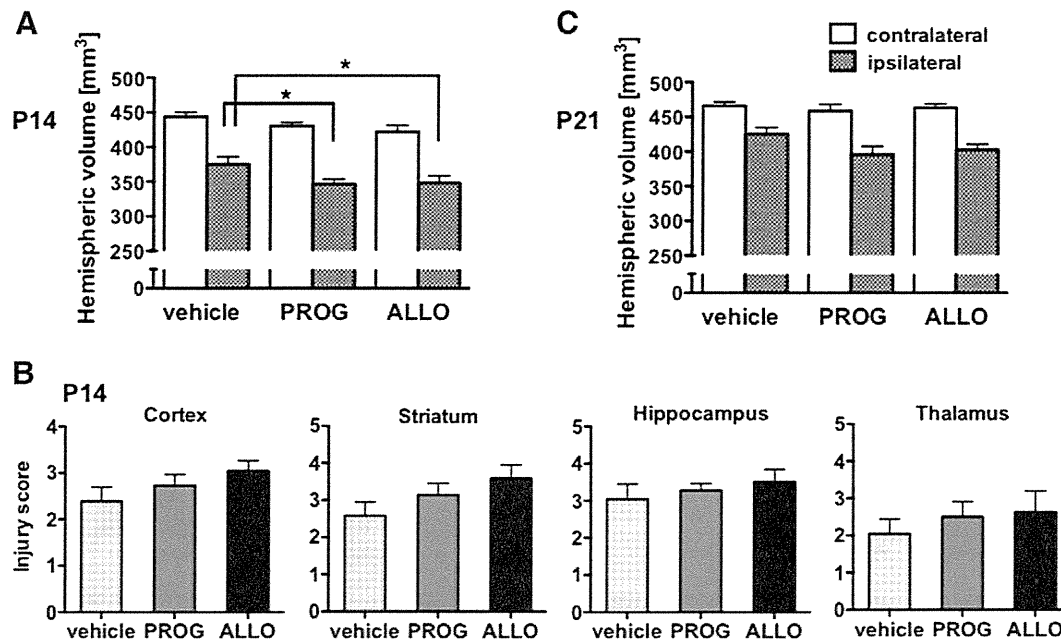


Fig. 4. [Exps. 4, 5] Effect of PROG (10 mg/kg) and ALLO (10 mg/kg) administration in more mature rats. PROG and ALLO reduced the ipsilateral hemispheric volume in P14 rats (A) but did not significantly alter the neuropathological injury score in any regions examined (B). * $P < 0.05$. (vehicle $n = 13$; PROG $n = 11$; ALLO $n = 12$). PROG and ALLO did not significantly alter the hemispheric volume in P21 rats (C). (vehicle $n = 12$; PROG $n = 11$; ALLO $n = 10$).

compared with that of the vehicle-treated group ($375 \pm 10 \text{ mm}^3$) (Fig. 4A). There was no difference in the neuropathological scores among the three groups in any of the four regions examined (Fig. 4B).

In rats subjected to HI-induced injury at P21, two-way ANOVA showed no difference in hemispheric volumes between treatment groups ($P = 0.109$) (Fig. 4C).

Body temperature and weight

Rectal temperatures did not differ between the groups at any time point before or up to 7 h after HI in any age group (data not shown).

Body weights on the day of HI did not differ significantly between the treatment groups for each age group. The weight gain until the day of perfusion (7 days after HI) was significantly smaller in the P7 PROG-treated group than in the other P7 groups (table 2). The weight gain did not differ among treatment groups in the P14 or P21 age groups.

Discussion

Contrary to our initial hypothesis, our results clearly showed that PROG and its metabolite, ALLO, can worsen HI-induced brain injury in immature rats. To our knowledge, no study in brain injury models has shown a consistent detrimental effect of either PROG or ALLO using either immature or mature animals, with the exception of one study using ovariectomized rats (Murphy et al., 2000). The

exacerbating effects in the present study were demonstrated by a reduction of hemispheric volume and determined using the neuropathological evaluation of four brain regions, i.e., the cortex, striatum, hippocampus, and thalamus, in P7 rats. We previously reported that ipsilateral hemispheric areas correspond well with the results of behavioral tests (Mishima et al., 2005). The effects of these neurosteroids were both dose- and age-dependent. In particular, PROG and ALLO were detrimental in P14 rats to a lesser degree than in P7 rats and were not detrimental in P21 rats. A GABA_A receptor antagonist, bicuculline, partially mitigated the effects of ALLO. PROG is also a sex steroid, and sex differences in neonatal HI-induced brain injury have recently been reported on the effects of the treatment (Tsuji et al., 2010), and of the brain injury itself (Hill et al., 2011). However, in the present study, we did not find any statistically significant differences according to gender.

Exacerbating mechanisms: progesterone

The effects of PROG and ALLO were quite similar in the present study. In particular, each neurosteroid demonstrated the same age-dependent exacerbating effects on HI-induced brain injury. Based on this similarity, we speculate that PROG accentuated neuronal injury mainly via the activity of its metabolite, ALLO. PROG exerts its action via both its classical receptor and the activity of its metabolite, ALLO, and it has multiple effects on neurons and the brain (Gibson et al., 2009). We cannot exclude other mechanisms of action that

Table 2

Body weights. The body weight gain (grams) over a 7-day period, from the day of hypoxia–ischemia (HI) to the day of perfusion, was significantly smaller in the PROG (10 mg/kg)-treated group than in the other four groups using postnatal day 7 (P7) rats. Data from three experiments [Exps. 1–3] were pooled and analyzed together. There were no other statistical differences in either the weight before HI or the weight gain until the day of perfusion among the treatment groups for each age group.

	P7 [Exps. 1–3]		P14 [Exp. 4]		P21 [Exp. 5]	
	Before HI	Gain	Before HI	Gain	Before HI	Gain
Vehicle	9.7 ± 0.1	7.7 ± 0.4	18.2 ± 0.4	8.5 ± 0.7	29.8 ± 0.7	25.1 ± 0.5
PROG 10 mg	9.4 ± 0.2	5.5 ± 0.4***	18.3 ± 0.4	7.0 ± 0.5	29.5 ± 0.7	20.9 ± 2.2
ALLO 10 mg	9.3 ± 0.2	6.4 ± 0.4	18.6 ± 0.4	5.7 ± 0.6	29.9 ± 0.9	22.9 ± 0.7
Bicuc	9.6 ± 0.2	6.7 ± 0.4				
Bicuc + ALLO	9.8 ± 0.1	5.9 ± 0.4				

*** $P < 0.001$.

may have contributed to the detrimental effects observed in the present experiments. A few studies, however, have reported that PROG has negative effects in injured nervous systems. These negative results are mostly minimal and are inconsistent with those from other studies. Only one previous report demonstrated a detrimental effect of PROG in an animal model of stroke: Murphy et al. (2000) demonstrated that the daily administration of PROG for a week before ischemia exacerbated brain injury in ovariectomized rats. The authors speculated that this detrimental effect was due to modulation of the GABA system by a sharp decline in PROG levels after the pre-stroke treatment (Murphy et al., 2000), and they later reported that PROG administration both before ischemia and during reperfusion decreased brain injury (Murphy et al., 2002). The treatment of ovariectomized rats with PROG exacerbated the cerebrovascular inflammatory response (inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2) to lipopolysaccharide (Sunday et al., 2006). PROG suppressed the proliferation of progenitor cells but enhanced the survival of new neurons in adult male rats with ischemia (Zhang et al., 2010). These actions of PROG are unlikely to be the main mechanism responsible for the detrimental effect of PROG in the present study. Studies have shown that PROG is beneficial for transient middle cerebral artery occlusion in adult male rats (Jiang et al., 1996), in spontaneously hypertensive adult male rats (Kumon et al., 2000), in reproductively senescent female rats (Alkayed et al., 2000), for permanent middle cerebral artery occlusion in adult male rats (Sayeed et al., 2007), for four vessel occlusion in adult male rats (Morali et al., 2005), and for traumatic brain injury in adult male rats (VanLandingham et al., 2008). Therefore, PROG may be detrimental only in immature subjects with HI, probably due to the effects of its metabolite, ALLO.

Exacerbating mechanisms: allopregnanolone

We suggest that the detrimental effect of ALLO was, at least in part, mediated via GABAergic neurotransmission because a GABA_A receptor antagonist, bicuculline, partially mitigated this effect. Another result supporting this idea is the age-dependent effect of ALLO, in which it became less detrimental with development. The effects of GABA_A receptor activation are also age-dependent. Neurons have a higher intracellular chloride concentration at an early stage, leading to an efflux of chloride and the excitatory actions of GABA in immature neurons. The progressive reduction of the intracellular Cl⁻ concentration during early development causes the developmental switch from the excitatory (depolarizing) to inhibitory (hyperpolarizing) action of GABA (Ben-Ari et al., 2007). The timing of this shift depends on the species, sex, brain structure, and neuronal type. It occurs at around P8–12 in the Wistar rat hippocampus (Ben-Ari et al., 2007). Although ALLO became less detrimental with age in the present study, it was not neuroprotective in P21 rats, by which age GABA action reportedly becomes inhibitory, i.e., neuroprotective against excitotoxicity. We speculate that HI-induced injury may alter and delay the developmental switch or that exacerbating mechanisms in addition to the GABA-mediated action may occur in immature animals.

Given that the reversal effect of bicuculline on the ALLO-induced brain injury was not complete, additional mechanisms may be in play to worsen ischemic brain injury in immature animals. ALLO has been understudied in ischemic brain injury, and to our knowledge, no *in vivo* study has shown or suggested that ALLO has negative effects other than those on GABA-mediated neurotransmission in nervous system disease models. There are only three studies examining the effects of the administration of ALLO in stroke, all of which demonstrated beneficial results (Sayeed et al., 2006, 2009; Ishrat et al., 2010). ALLO has been shown to be beneficial in other neurological disease models, such as traumatic brain injury (VanLandingham et al., 2008), Niemann–Pick type C disease (Griffin et al., 2004), and Alzheimer's disease (Wang et al., 2010).

Evidence from *in vitro* studies has suggested that a high concentration of ALLO may be harmful. High concentrations of ALLO (>100 μmol/L) significantly repressed proliferation of neural progenitor cells (Wang et al., 2005). In addition, relatively high concentrations of ALLO (1–3 μmol/L, approximately 320–960 μg/L) induced the regression of neurite outgrowth (Brinton, 1994) and caused the death of rat hippocampal neurons via a GABA_A receptor-dependent mechanism (Xu et al., 2000). Our protocol is not only based on protocols reported to be neuroprotective in adult rats (Sayeed et al., 2006), but was also chosen to reproduce the steroid levels found in the fetal brain in the brains of immature rats. Previous studies demonstrated that the administration of PROG and ALLO (8–10 mg/kg) at doses similar to those used in this study increases the plasma or cortical levels to the ranges observed in rodent fetuses (Jiang et al., 1996; Grobin et al., 2003). Cortical ALLO levels in a rat fetus at late gestation are almost 20 ng/g (Grobin et al., 2003), and a 10-mg/kg dose of ALLO results in a mean cortical level of 22 ng/g in mice (Wang et al., 2010). We do not consider the ALLO levels in our study to be as high as those shown to be harmful in the *in vitro* studies.

GABA is involved in the mechanism of thermoregulation in the preoptic area of the hypothalamus (Osaka, 2004). As neither ALLO nor PROG treatment altered the body temperature, we do not consider that GABA-mediated thermoregulation plays a role in the detrimental effects of these neurosteroids.

Translating the results into practice

PROG and ALLO are not always detrimental to immature animals and human neonates. A single injection of 25 mg/kg of ALLO at P7, P10, or P17 increased survival and delayed neurological impairments in a mouse model of Niemann–Pick type C disease (Griffin et al., 2004). Pilot studies on postnatal estradiol and PROG replacement for extremely preterm infants demonstrated no adverse effects on growth and psychomotor development (Trotter et al., 2001). Because HI increases excitability in neurons, PROG and ALLO may enhance HI-induced hyperexcitability and the associated excitotoxicity in immature brains. Caution should be exercised when interpreting our results and translating them into practice when dealing with neonates and infants. It was previously mentioned that in long-gestation species such as humans and sheep, as opposed to altricial species, such as rodents, GABAergic currents become inhibitory by the last third of gestation (Hirst et al., 2009). In contrast, other authors mentioned that Cl⁻ transport in the perinatal human cortex is as immature as that seen in the rat, suggesting GABA-mediated excitation (Dzhala et al., 2005).

The fact that the treatments turned out to be detrimental, contrary to our initial hypothesis and to data obtained in adult models, is meaningful. Thus, it is clear that speculations that a certain treatment could be beneficial to a similar but different group of subjects just because the treatment was beneficial to a group of tested subjects must be carefully reexamined. This is especially true when applying a treatment to neonates; at a stage when the brain is going through dramatic developmental changes. Considering the dramatic transitions of the central nervous system from the fetal to neonatal period, even a treatment proven to be neuroprotective in term neonates, such as hypothermia, may be of no benefit or could even be detrimental in preterm babies or infants beyond the neonatal period.

Conclusions

Our study shows that both PROG and its metabolite, ALLO, have adverse effects on hypoxic–ischemic brain injury in immature rats. The results presented herein represent a prime example of the dramatic difference between immature and mature brains. Studies are still required to clarify the uncertainties of the effects of PROG and ALLO in immature subjects. For the future development of

neuroprotectants in neonatal brain injury, the maturity, or immaturity, of the brain should be carefully and fully taken into consideration.

Disclosure/conflict of interest

None.

Sources of funding

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (JSPS KAKENHI 22890254) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

Acknowledgments

We thank Manami Sone for excellent technical assistance with histological preparations. We also thank Shinichi Sugiyono from Department of Oral Anatomy and Neurobiology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Japan, and Donald Stein from Department Emergency Medicine, Emory University, for technical advice to drug preparations.

References

- Alkayed, N.J., Murphy, S.J., Traystman, R.J., Hurn, P.D., 2000. Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. *Stroke* 31, 161–168.
- Belelli, D., Lambert, J.J., 2005. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA_A receptor. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 565–575.
- Ben-Ari, Y., Gaiarsa, J.L., Tyzio, R., Khazipov, R., 2007. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol. Rev.* 87, 1215–1284.
- Brinton, R.D., 1994. The neurosteroid 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one induces cytoarchitectural regression in cultured fetal hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 14, 2763–2774.
- Clancy, B., Finlay, B.L., Darlington, R.B., Anand, K.J., 2007. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* 28, 931–937.
- Dobbing, J., Sands, J., 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* 3, 79–83.
- du Plessis, A.J., 2009. Cerebral blood flow and metabolism in the developing fetus. *Clin. Perinatol.* 36, 531–548.
- Dzhala, V.I., Talos, D.M., Sdrulla, D.A., Brumback, A.C., Mathews, G.C., Benke, T.A., Delpire, E., Jensen, F.E., Staley, K.J., 2005. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat. Med.* 11, 1205–1213.
- Galanopoulou, A.S., 2008. Dissociated gender-specific effects of recurrent seizures on gaba signaling in ca1 pyramidal neurons: role of gaba(a) receptors. *J. Neurosci.* 28, 1557–1567.
- Gibson, C.L., Coomber, B., Rathbone, J., 2009. Is progesterone a candidate neuroprotective factor for treatment following ischemic stroke? *Neuroscientist* 15, 324–332.
- Griffin, L.D., Gong, W., Verot, L., Mellon, S.H., 2004. Niemann–Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat. Med.* 10, 704–711.
- Grobin, A.C., Heenan, E.J., Lieberman, J.A., Morrow, A.L., 2003. Perinatal neurosteroid levels influence gabaergic interneuron localization in adult rat prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 23, 1832–1839.
- Hill, C.A., Threlkeld, S.W., Fitch, R.H., 2011. Early testosterone modulated sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia in rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29, 381–388.
- Hill, M., Parizek, A., Bickova, M., Havlikova, H., Klak, J., Fait, T., Cibula, D., Hampl, R., Cegan, A., Sulcova, J., Starka, L., 2000. Neuroactive steroids, their precursors, and polar conjugates during parturition and postpartum in maternal and umbilical blood: 1. Identification and simultaneous determination of pregnanolone isomers. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 75, 237–244.
- Hirst, J.J., Walker, D.W., Yawno, T., Palliser, H.K., 2009. Stress in pregnancy: a role for neuroactive steroids in protecting the fetal and neonatal brain. *Dev. Neurosci.* 31, 363–377.
- Ishrat, T., Sayeed, I., Atif, F., Hua, F., Stein, D.G., 2010. Progesterone and allopregnanolone attenuate blood–brain barrier dysfunction following permanent focal ischemia by regulating the expression of matrix metalloproteinases. *Exp. Neurol.* 226, 183–190.
- Jiang, N., Chopp, M., Stein, D., Feit, H., 1996. Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res.* 735, 101–107.
- Johnston, M.V., Ferriero, D.M., Vannucci, S.J., Hagberg, H., 2005. Models of cerebral palsy: which ones are best? *J. Child Neurol.* 20, 984–987.
- Juul, S.E., 2000. Nonerythropoietic roles of erythropoietin in the fetus and neonate. *Clin. Perinatol.* 27, 527–541.
- Kumon, Y., Kim, S.C., Tompkins, P., Stevens, A., Sakaki, S., Loftus, C.M., 2000. Neuroprotective effect of postischemic administration of progesterone in spontaneously hypertensive rats with focal cerebral ischemia. *J. Neurosurg.* 92, 848–852.
- Lindstrom, K., Lagerroos, P., Gillberg, C., Fernell, E., 2006. Teenage outcome after being born at term with moderate neonatal encephalopathy. *Pediatr. Neurol.* 35, 268–274.
- Luisi, S., Petraglia, F., Benedetto, C., Nappi, R.E., Bernardi, F., Fadalti, M., Reis, F.M., Luisi, M., Genazzani, A.R., 2000. Serum allopregnanolone levels in pregnant women: changes during pregnancy, at delivery, and in hypertensive patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2429–2433.
- McPherson, R.J., Juul, S.E., 2010. Erythropoietin for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Curr. Opin. Pediatr.* 22, 139–145.
- Mishima, K., Ikeda, T., Aoo, N., Takai, N., Takahashi, S., Egashira, N., Ikenoue, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., 2005. Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neurosci. Lett.* 376, 194–199.
- Morali, G., Letechipia-Vallejo, G., Lopez-Loeza, E., Montes, P., Hernandez-Morales, L., Cervantes, M., 2005. Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus. *Neurosci. Lett.* 382, 286–290.
- Murphy, S.J., Traystman, R.J., Hurn, P.D., Duckles, S.P., 2000. Progesterone exacerbates striatal stroke injury in progesterone-deficient female animals. *Stroke* 31, 1173–1178.
- Murphy, S.J., Littleton-Kearney, M.T., Hurn, P.D., 2002. Progesterone administration during reperfusion, but not preischemia alone, reduces injury in ovariectomized rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 1181–1188.
- Nguyen, P.N., Billiards, S.S., Walker, D.W., Hirst, J.J., 2003. Changes in 5alpha-pregnane steroids and neurosteroidogenic enzyme expression in the perinatal sheep. *Pediatr. Res.* 53, 956–964.
- Osaka, T., 2004. Cold-induced thermogenesis mediated by gaba in the preoptic area of anesthetized rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R306–R313.
- Rice 3rd, J.E., Vannucci, R.C., Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 9, 131–141.
- Romijn, H.J., Hofman, M.A., Gramsbergen, A., 1991. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum. Dev.* 26, 61–67.
- Sayeed, I., Guo, Q., Hoffman, S.W., Stein, D.G., 2006. Allopregnanolone, a progesterone metabolite, is more effective than progesterone in reducing cortical infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion. *Ann. Emerg. Med.* 47, 381–389.
- Sayeed, I., Wali, B., Stein, D.G., 2007. Progesterone inhibits ischemic brain injury in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Restor. Neurol. Neurosci.* 25, 151–159.
- Sayeed, I., Parvez, S., Wali, B., Siemen, D., Stein, D.G., 2009. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism for better neuroprotective effects of allopregnanolone over progesterone. *Brain Res.* 1263, 165–173.
- Sunday, L., Tran, M.M., Krause, D.N., Duckles, S.P., 2006. Estrogen and progestagens differentially modulate vascular proinflammatory factors. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E261–E267.
- Trotter, A., Bokelmann, B., Sorgo, W., Bechinger-Kornhuber, D., Heinemann, H., Schmucker, G., Oesterle, M., Kohntop, B., Brisch, K.H., Pohlandt, F., 2001. Follow-up examination at the age of 15 months of extremely preterm infants after postnatal estradiol and progesterone replacement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 601–603.
- Tsuji, M., Wilson, M.A., Lange, M.S., Johnston, M.V., 2004. Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model. *Exp. Neurol.* 189, 58–65.
- Tsuji, M., Aoo, N., Harada, K., Sakamoto, Y., Akitake, Y., Irie, K., Mishima, K., Ikeda, T., Fujiwara, M., 2010. Sex differences in the benefits of rehabilitative training during adolescence following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Exp. Neurol.* 226, 285–292.
- VanLandingham, J.W., Cekic, M., Cutler, S.M., Hoffman, S.W., Washington, E.R., Johnson, S.J., Miller, D., Stein, D.G., 2008. Progesterone and its metabolite allopregnanolone differentially regulate hemostatic proteins after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 1786–1794.
- Wang, J.M., Johnston, P.B., Ball, B.G., Brinton, R.D., 2005. The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. *J. Neurosci.* 25, 4706–4718.
- Wang, J.M., Singh, C., Liu, L., Irwin, R.W., Chen, S., Chung, E.J., Thompson, R.F., Brinton, R.D., 2010. Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6498–6503.
- Xu, W., Cormier, R., Fu, T., Covey, D.F., Isenberg, K.E., Zorumski, C.F., Mennerick, S., 2000. Slow death of postnatal hippocampal neurons by GABA_A receptor overactivation. *J. Neurosci.* 20, 3147–3156.
- Zhang, Z., Yang, R., Cai, W., Bai, Y., Sokabe, M., Chen, L., 2010. Treatment with progesterone after focal cerebral ischemia suppresses proliferation of progenitor cells but enhances survival of newborn neurons in adult male mice. *Neuropharmacology* 58, 930–939.

細胞移植療法による神経機能回復

猪原匡史, 笠原由紀子, 田口明彦

IHARA Masafumi, KASAHARA Yukiko, TAGUCHI Akihiko
先端医療振興財団先端医療センター再生医療研究部

幹細胞は、連続的な自己再生能と適切な誘導下でさまざまな細胞種への分化能を示す。骨髄中の造血系幹細胞、間葉系幹細胞は、広範囲の細胞種に分化する能力をもっていることが判明している。これらの幹細胞を含む骨髄単核球による細胞治療は、げっ歯類や霊長類の脳血管障害モデルにおいて、血管再生・神経再生を誘導することが証明されており、脳卒中における臨床試験も開始された。脳卒中の再生治療が現実味を帯びつつある。

Key Words

脳梗塞, 細胞治療, 血管再生, 神経再生, 骨髄単核球

はじめに

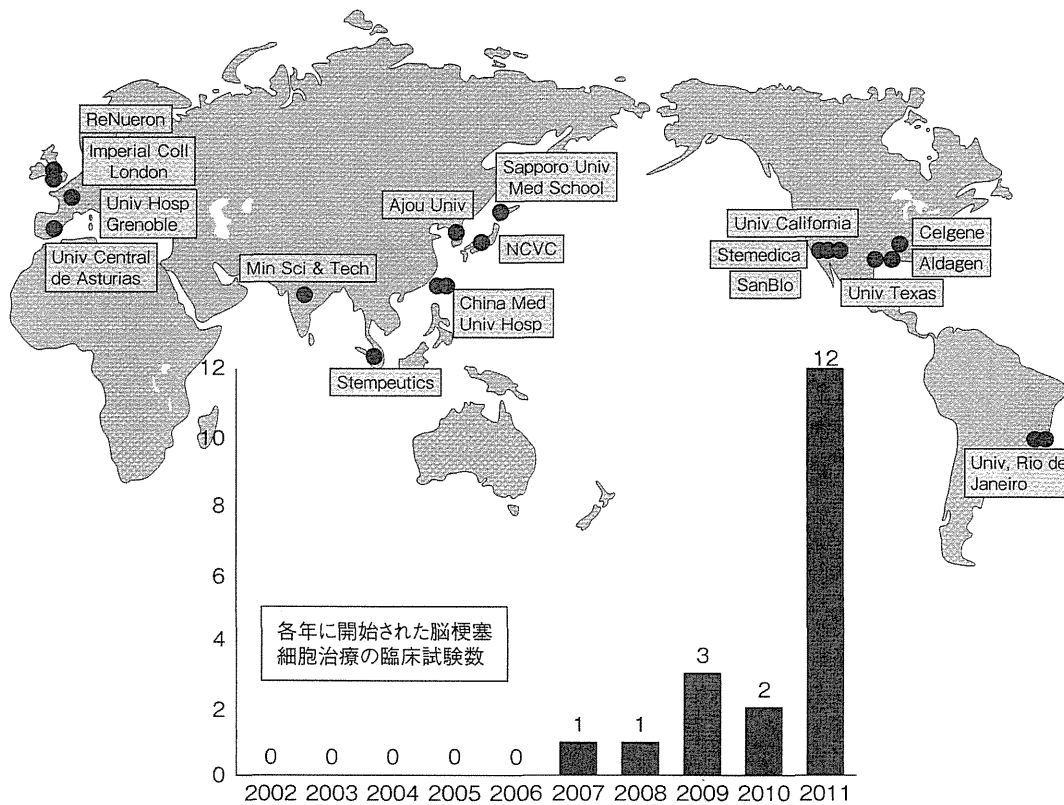
高齢者における寝たきりの3分の1以上が脳血管障害によるものであり、脳血管障害に対する新規治療法の開発は超高齢社会を迎えたわが国の存亡にかかわりかねないきわめて重大な課題である。その治療はt-PA時代を迎えて変貌を遂げているとはいえ、その恩恵を得るのは短いtime windowの問題からわずか3%の患者にとどまる。残念ながら多くの患者に後遺症が残り、いったん症状が平衡状態に達すれば発症前の機能を取り戻すことは甚だ困難であるといわざるを得ない。したがって、神経保護療法もいまだ実現していないこの閉塞状況を打破する手段として、脳卒中治療におけるパラダイムシフトが切望されている。さまざまなニューロリハに加えて「神経再生」治療が注目されており、本稿では脳卒中からの

回復を促進する細胞治療に焦点を当てて論じる。

1 細胞治療—概説

幹細胞研究は医学・医療を根底から覆すインパクトを与えつつけている。生物には生来の可塑性と柔軟性が備わっており、その貯蔵庫が幹細胞であることから、脳卒中の細胞治療における究極のゴールは、死滅したニューロンの置換や神経回路の修復 (cell/circuit replacement) であろう。しかし、当面の目標は、栄養因子の放出による内因性の神経再生機構の賦活化 (molecular repair) であるとも考えられており、細胞治療による血管新生がそこに果たす役割は大きい。

循環器疾患に対する自己骨髄幹細胞 (単核球細胞) を用いた細胞治療は、四肢虚血¹⁾および虚血性心疾患²⁾に対



図① 脳卒中中の細胞治療
 世界では、ここ 2、3 年で脳梗塞に対する細胞療法を用いた臨床試験が急増してきている。われわれの臨床試験を含め、現時点で少なくとも 19 件の臨床試験がおこなわれている。

してはほぼ有効性が確認されており、脳血管障害に対しても米国の研究グループがその有効性を発表³⁾しているとともに、われわれの研究グループも治療効果および安全性を明らかにしている。世界では、ここ 2、3 年で脳梗塞に対する細胞療法を用いた臨床試験が急増してきている。われわれの臨床試験を含め、現時点で少なくとも 19 件の臨床試験がおこなわれた事実がある (図①)。

したがって、骨髄単核球細胞を用いた細胞治療は、現状ではニューロリハ以外にはまったく治療法が存在しない脳血管障害患者に対する再生医療を、“より有効に”かつ“より安全で”かつ“より多くの患者群に”普及させる可能性を有している。

2 細胞治療による脳梗塞予防法の開発

脳血管など全身の血管網の恒常性維持には、末梢血中に存在する骨髄由来血管血球系幹細胞 (CD34 陽性細胞など) の関与が明らかにされている (図②)⁴⁾。われわれは、末梢血中血管血球系幹細胞の動態と、患者病態との

関連について共同研究を展開してきた⁵⁾。その結果、①脳梗塞急性期において全身的な組織修復反応として末梢血中へ骨髄由来血管血球系幹細胞の動員がおこなわれること⁶⁾、②慢性期における末梢血中血管血球系幹細胞が、脳循環代謝と関連していること⁶⁾、③血管血球系幹細胞の減少が、認知機能の異常と関連していること⁷⁾、④前向き検討においても、血管血球系幹細胞の減少が認知機能の経時的な低下と関連していること⁸⁾、⑤脳血管障害の関与が弱いアルツハイマー型認知症においては、末梢血中血管血球系幹細胞の減少はみられないこと⁹⁾、さらに、⑥脳血管再生が促進されている病態では、末梢血中血管血球系幹細胞の増加がみられること¹⁰⁾、また脳血管障害以外の病態においても、末梢血中血管血球系幹細胞の減少が、⑦糖尿病性心筋障害¹¹⁾、⑧糖尿病性腎症の経時的な悪化¹²⁾、さらに、⑨透析患者における死亡率の上昇や、循環器疾患の発症¹³⁾とも関連していること、また、⑩末梢血中血管血球系幹細胞の増加と高感度 C 反応蛋白 (C-reactive protein : CRP) の減少・アディポネクチンの増加が関連していること¹⁴⁾など、末梢血中血管血球系

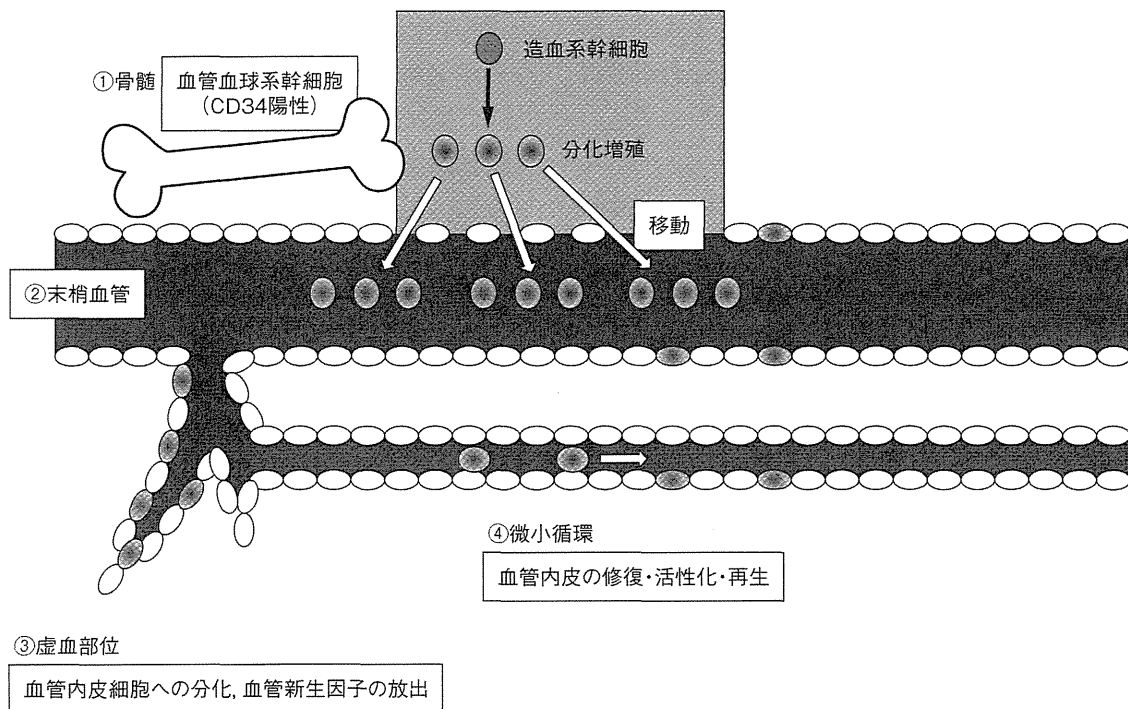


図2 骨髄由来血管血球系幹細胞と血管のメンテナンス

(田口明彦ほか, 2009⁴⁾より引用)

骨髄中に存在する造血・血管系幹細胞は末梢血中に動員され、虚血部位において、血管内皮細胞への分化や血管新生因子の放出だけでなく、既存の血管内皮細胞の修復にも関与していると考えられている。

幹細胞と微小循環障害・再生機転に関するさまざまな知見を報告している。

またわれわれは、バジャー病患者に対する自己骨髄単核球移植においては、慢性微小循環障害に対する血管血球系幹細胞を含む骨髄単核球の治療をおこない、その治療効果を明らかにするとともに¹⁵⁾、高齢慢性脳血管障害動物モデルにおいて、血管血球系幹細胞移植（造血系幹細胞の入れ替え）が脳血管内皮細胞機能を改善させることを明らかにしている¹⁶⁾。現在われわれは、これらの臨床的観察研究、介入試験、および基礎研究による知見をもとに、自己血管血球系幹細胞や iPS 細胞を用いた脳血管障害・血管性認知症の予防の開発に向けて精力的な研究をおこなっている。

3 細胞治療による脳梗塞治療法の開発

● 1. マウス脳梗塞モデルを用いた骨髄由来血管血球系細胞の投与効果

われわれが開発した再現性の高い動物モデルを用いて、脳梗塞 48 時間後のマウスに対し、骨髄由来血管血球系

幹細胞を尾静脈より単回投与し、血管再生の促進効果、内因性の神経再生促進効果、脳組織再生効果および神経機能再生効果に関して検討をおこなった。その結果、①脳梗塞後の血管血球系幹細胞投与は梗塞周囲における血管再生を促進し、血流の再建を誘導すること、②脳梗塞後の血管再生は内因性の神経再生を誘導するだけでなく、その生着に必須であること、③血管血球系幹細胞投与による脳梗塞後の血管再生は、脳神経組織の再生を誘導すること、④脳梗塞後の血管再生による脳組織再生は脳機能の再生をもたらすことを明らかにした¹⁷⁾。これらの知見は、骨髄単核球など血管血球系幹細胞の血管内移植による血管再生（あるいは微小循環保護）が、内因性の神経再生に必要な不可欠であることを示唆するとともに、脳梗塞亜急性期患者に対する新しい細胞治療の可能性を示すものであると考えている。さらに、骨髄単核球との比較検討のため、ほかの細胞群の治療効果における検討をおこなったが、骨髄由来間葉系幹細胞投与では一定の治療効果を認めるものの、血管血球系幹細胞を骨髄から動員する作用のある顆粒球コロニー刺激因子（granulocyte colony-stimulating factor : G-CSF）の投与においては、

逆に脳萎縮や神経機能が低下することを明らかにしており¹⁷⁾、顆粒球を中心とした炎症系の活性化は、神経機能回復過程に負の影響を与えることを示唆していると考えられている。

さらに治療時期に関する検討では、マウス骨髄単核球細胞を脳梗塞 1, 2, 4, 7, 10, 14 日および 21 日後に投与し、その効果を検討した。その結果、脳梗塞後 2, 4, 7, 10 日および 14 日後の投与において、脳梗塞巣の減少および行動の改善を認めたが、脳梗塞後 1 日および 21 日後においてはこれらの改善効果を認めなかった。これらの結果は、内因性の神経幹細胞の動員など組織修復機構が活性化されている時期においては細胞投与による効果が期待できるものの、脳梗塞発生直後や脳梗塞慢性期においては骨髄単核球細胞移植による効果が期待できないことを示している。

●2. マウス血管性認知症モデルを用いた骨髄単核球細胞の投与効果

われわれが開発した脳循環不全を再現するマウスモデル¹⁸⁾¹⁹⁾においても、骨髄単核球細胞の効果を検討した。

マウスの両側総頸動脈狭窄処置 (bilateral common carotid artery stenosis : BCAS) 後 24 時間の時点で、高感度緑色蛍光蛋白質で標識をおこなった脾臓由来の単核球細胞、骨髄単核球細胞 (5×10⁶ 細胞)、または陰性コントロールとして溶媒の経尾静脈投与をおこない、処置後 1, 30 日の時点で解析をおこなった²⁰⁾。蛍光実体顕微鏡による直視下の脳表血管の観察により、高感度緑色蛍光蛋白質陽性細胞が脳表血管内の循環血液中に観察され、一部の標識細胞は血管壁に接着し、また血管壁をローリングしていた。その結果、①骨髄単核球細胞投与 6 時間後の早期に脳血流の顕著な増加がみられ、脾臓由来の単核球細胞投与群や溶媒投与群では血流増加はみられないこと、②この現象は、FITC-デキストラン灌流解析法で血管新生が観察される時期に先行すること、③骨髄単核球細胞投与後 1 日経過すると、血管内皮増殖因子と Ser1177 リン酸化 eNOS の上昇が観察されること、④投与したドナー骨髄単核球細胞が内皮細胞やオリゴデンドロサイトに直接分化・生着はしないが、ごく一部は血管壁の周皮細胞に分化していたこと、⑤BCAS によって 30 日後に誘導される脳白質病変は骨髄単核球細胞投与によって有意に軽減すること、⑥NOS 阻害薬 L-NAME を

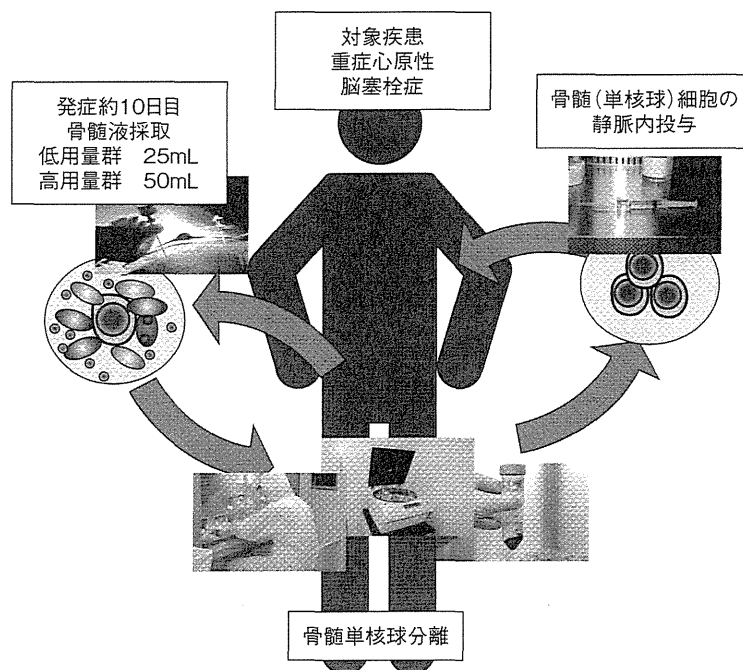
投与することにより、骨髄単核球細胞投与による早期の脳血流回復効果や後期の血管新生作用や白質保護効果はいずれも消失することがわかり、骨髄単核球細胞投与による脳血流改善作用や血管新生作用はいずれも eNOS、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) を一部介していることが示唆された。また、一部の細胞が周皮細胞へ分化・生着しており、血管新生との関連で注目される。

以上、灰白質と白質を病変の主座とする、二つの脳血管障害モデルマウスを用いて骨髄単核球細胞の有用性を示したことは、幹細胞治療を脳卒中に応用するための提言である Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS)²¹⁾が推奨するように、臨床応用への可能性を強く示唆するものである。

●3. 霊長類における脳梗塞後の自己骨髄単核球細胞投与

つぎにわれわれは、脳梗塞患者に対する自己骨髄単核球移植の臨床試験として、霊長類における脳梗塞後の骨髄採取、およびその静脈内投与に関する検討をおこなった。ヒトにおける臨床試験では、対象疾患を心原性脳塞栓症患者としているため、当動物実験モデルにおいてもヒト病態に近い自己血栓によるカニクイザル塞栓モデルを国立循環器病研究センター研究所放射線医学部とともに作製した。カニクイザルを用い、全身麻酔下に血管撮像装置を使用し、超選択的カテーテル法により自己血栓を中大脳動脈遠位部より投与し、PET による血流評価を併用して中大脳動脈領域の脳梗塞を作製した。脳梗塞の確認は MRI を用いておこない、脳梗塞後にはおもに左上肢を中心とした機能障害を確認した。脳梗塞作製後 7 日後に、腸骨骨髄より骨髄液 (10 mL) を採取し、臨床プロトコルに基づき Ficoll を使った単核球細胞の精製をおこない、静脈より自己骨髄由来単核球細胞の投与をおこなった。

投与骨髄単核球の体内分布の検討においては、骨髄単核球細胞の FDG ラベルをおこない、細胞投与 3 時間目における FDG 陽性細胞の分布を観察した。投与された細胞群は脾臓に多くの集積がみられるものの、肺にはほとんど集積がみられなかった。また一部は頭部における集積も観察された。さらに、骨髄単核球投与前後における末梢血中血管血球系幹細胞の定量的評価をおこなった



図③ 脳梗塞患者を対象とする自己骨髄細胞を用いた臨床試験
対象患者群を重症心原性脳塞栓症患者（NIHSS 10 点以上かつ入院時からの回復が 5 点以下）とし、脳梗塞発症 7～10 日後に局所麻酔下において自己骨髄細胞を採取し、骨髄単核球分画を精製後に静脈内への投与をおこなう。

ところ、細胞投与 1 時間後においても末梢血中 CD34 陽性細胞数の約 2.5 倍の増加が観察された。現在のところ、再現性の十分高い霊長類の心原性脳塞栓症モデルは存在せず、われわれのモデルにおいても個体間の神経機能および脳梗塞領域に関する変動性が統計解析を妨げるものの、脳梗塞後の経時的神経学的評価においては、細胞投与後に順調な機能回復が観察された。また、細胞投与に伴う神経症状の悪化や脳出血は認められなかった。

● 4. 脳梗塞患者における神経再生に関する病理的検討

脳損傷後において、マウスなどげっ歯類だけでなく、脳梗塞患者においても神経再生機構が活性化されることが報告されている。われわれは脳梗塞患者における神経再生に関する病理的検討をおこない、血管再生および神経再生のピークはそれぞれ脳梗塞数日後、および 2～3 週間後であり、マウスにおける脳梗塞後の再生過程と類似していることを明らかにしている。これらの所見は、ヒトにおいても、脳梗塞急性期～亜急性期に内因性神経幹細胞誘導が起こることを示しており、ヒトにおける血管再生療法の可能性を示す重要な所見であると考えている。

● 5. 心原性脳塞栓症患者に対する自己骨髄単核球移植

自己骨髄単核球を用いた血管再生、あるいは組織修復促進を目的とした治療法は、四肢虚血性疾患だけでなく、虚血性心疾患に対する数百症例規模の double blind placebo-controlled study においてその有効性が報告されている。

われわれがおこなう脳梗塞患者を対象とする自己骨髄細胞を用いた臨床試験では、対象患者群を重症心原性脳塞栓症患者 [NIH Stroke Scale (NIHSS) 10 点以上かつ入院時からの回復が 5 点以下] とし、脳梗塞発症 7～10 日後に局所麻酔下において自己骨髄細胞を採取し、骨髄単核球分画を精製後に静脈内への投与をおこなうものである (図③)。一次エンドポイントは、①投与 1 ヶ月後の NIHSS の改善度 (有効性)、②NIHSS 悪化症例の頻度 (安全性) であり、2007 年 10 月“厚生労働省ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針”による認可を経て、臨床試験を開始している。予定症例数は低用量群 (骨髄液採取 25 mL) 6 名と高用量群 (骨髄液採取 50 mL) 6 名であり、過去に国立循環器病研究センターに重度心原性脳塞栓症で入院した患者群をヒストリカルコントロール

として用いる。すでに10名の患者のエントリーを終えており、自己骨髄単核球移植治療を心原性脳塞栓症の新しい治療法として確立したいと考えている。

おわりに

脳梗塞においては、神経細胞だけでなく血液脳関門・血液脳脊髄液関門を形成する細胞群などが障害されるため、脳の組織修復および脳神経機能の改善にはこれらの支持細胞群を含む神経組織全体の再構築が望まれている。われわれは脳梗塞後の神経再生には血管の再生が必要不可欠であることを明らかにしてきたが、神経幹細胞の生着、成熟のための新生血管床の形成、その血管床への神経幹細胞移植、および薬剤などを用いた移植神経幹細胞の分化、成熟、機能の促進、さらにはこれらの再生機転に対する内因性阻害因子の抑制など、生理的なメカニズムに基づいた治療法の発展・開発を現在進めており、脳梗塞により誘導・動員される神経幹/前駆細胞の同定・分離²²⁾、またそれらの神経幹/前駆細胞の新生血管床への移植による機能回復・治療効果²³⁾など、血管新生を基盤としたより効果的、かつ安全な治療法開発に向けた研究を継続している。

また、脳血管障害・血管性認知症の予防に関しては、末梢血中のCD34陽性細胞などの血管血球系幹細胞の減少が脳梗塞の発症や神経組織の代謝や機能にまで影響を与え、高次神経機能の低下や認知症の発症とも関連していることをわれわれは示してきたが、血管血球系幹細胞を用いた治療法は急性期脳梗塞など急性虚血性疾患患者に対する有効な治療法となるだけでなく、血管性認知症や糖尿病性腎症における微小循環障害、糖尿病性心不全患者など、生活習慣病に伴う幅広い疾病群に対する根治的・普遍的な予防法として発展させることができるとわれわれは考えており、基礎・前臨床研究および臨床的疫学研究、病理解析、症例検討などの多方面からの研究を継続しながら、臨床試験をおこなっている。

●文 献●

- 1) Tateishi-Yuyama E *et al*: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* **360**: 427-435, 2002
- 2) Zhang C *et al*: Efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow-derived cell transplantation in patients with acute myocardial infarction: insights from randomized controlled trials with 12 or more months follow-up. *Clin Cardiol* **33**: 353-360, 2010
- 3) Savitz SI *et al*: Intravenous autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke. *Ann Neurol* **70**: 59-69, 2011
- 4) 田口明彦ほか: 脳血管障害に対する幹細胞治療法の開発. *Clinical Neuroscience* **27**: 112-113, 2009
- 5) Kikuchi-Taura A *et al*: A new protocol for quantifying CD34 (+) cells in peripheral blood of patients with cardiovascular disease. *Tex Heart Inst J* **33**: 427-429, 2006
- 6) Taguchi A *et al*: Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* **109**: 2972-2975, 2004
- 7) Taguchi A *et al*: Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**: 445-449, 2008
- 8) Taguchi A *et al*: Circulating CD34-positive cells have prognostic value for neurologic function in patients with past cerebral infarction. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**: 34-38, 2009
- 9) Taguchi A: Vascular factors in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **16**: 859-864, 2009
- 10) Yoshihara T *et al*: Increase in circulating CD34-positive cells in patients with angiographic evidence of moyamoya-like vessels. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**: 1086-1089, 2008
- 11) Okada S *et al*: Circulating CD34-positive cell number is associated with brain natriuretic peptide level in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **31**: 157-158, 2008
- 12) Makino H *et al*: Decreased circulating CD34+ cells are associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabet Med* **26**: 171-173, 2009
- 13) Maruyama S *et al*: Low circulating CD34+ cell count is associated with poor prognosis in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* **74**: 1603-1609, 2008
- 14) Makino H *et al*: Pioglitazone treatment stimulates circulating CD34-positive cells in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract* **81**: 327-330, 2008
- 15) Taguchi A *et al*: Therapeutic angiogenesis by autologous bone-marrow transplantation in a general hospital setting. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **25**: 276-278, 2003
- 16) Taguchi A *et al*: Reduced ischemic brain injury by partial rejuvenation of bone marrow cells in aged rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**: 855-867, 2011
- 17) Taguchi A *et al*: Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model. *Eur*

- J Neurosci* **26** : 126-133, 2007
- 18) Shibata M *et al* : White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35** : 2598-2603, 2004
- 19) Ihara M *et al* : Lessons from a mouse model characterizing features of vascular cognitive impairment with white matter changes. *J Aging Res* **2011** : 978761, 2011
- 20) Fujita Y *et al* : Early protective effect of bone marrow mononuclear cells against ischemic white matter damage through augmentation of cerebral blood flow. *Stroke* **41** : 2938-2943, 2010
- 21) Savitz SI *et al* : Stem Cell Therapy as an Emerging Paradigm for Stroke (STEPS) II. *Stroke* **42** : 825-829, 2011
- 22) Nakagomi T *et al* : Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice. *Eur J Neurosci* **29** : 1842-1852, 2009
- 23) Nakagomi N *et al* : Endothelial cells support survival, proliferation, and neuronal differentiation of transplanted adult ischemia-induced neural stem/progenitor cells after cerebral infarction. *Stem cells* **27** : 2185-2195, 2009

 いはら・まさふみ

猪原匡史 先端医療振興財団先端医療センター再生医療研究部
副部長

1970年、奈良県生まれ。
1995年、京都大学医学部卒業。2003年、京都大学大学院医学研究科にて医学博士を取得。2004年、日本学術振興会特別研究員。2006年、英国ニューカッスル大学に留学。2008年、京都大学神経内科助教を経て、2012年より現職。専門は脳卒中、臨床神経学。研究テーマは、脳血管障害の再生医療と神経変性疾患における虚血の役割について。

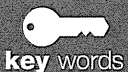
β -アミロイドの血管周囲リンパ排水路を介したクリアランス

Perivascular Lymphatic Drainage of β Amyloid from The Brain

猪原匡史, 田口明彦

Masafumi Ihara, Akihiko Taguchi

アルツハイマー病では不溶性 β -アミロイド(A β)の脳実質(老人斑)や血管壁への沈着(脳アミロイド血管症)が見られる。後者は、間質液の排泄ルートである毛細血管や動脈の基底膜、すなわち血管周囲リンパ排水路(ドレナージ)経路に、間質液に含まれるA β が沈着したものである。動脈拍動が本ドレナージの駆動力であると考えられており、加齢とともに動脈硬化が進み、駆動力が減少すると、不溶性A β としてこのドレナージ経路上に沈着し、最終的には可溶性A β のドレナージまでも妨げる。したがって、この血管周囲ドレナージ経路の通過性を高める治療的アプローチが、アルツハイマー病の認知機能低下を防ぐ一助となることが期待されている。



A β , アミロイド血管症, 血管周囲リンパ排水路

はじめに

脳はそのホメオスタシスを維持するために3つの関所を準備して神経機能に必須のイオンやアミノ酸濃度を厳密に管理している。①血液/間質液(細胞間隙液)間に存在する血液脳関門、②血液/脳室脳脊髄液間の血液髄液関門、そして、③血液/クモ膜下腔脳脊髄液間の血液髄液関門である¹⁾。血液脳関門がその関所の主体をなし、血液髄液関門の5,000倍もの面積を占めている²⁾。こうした関所の存在は、ニューロン内外のイオン勾配や神経伝達物質濃度をコントロールするために必須であることから、動物の進化の過程でも淘汰圧として働いたと考えられているが、同時に弊害も生む。このような厳重な関所が発達した結果、間質液は容易には血管内腔側に戻ることができなくなり、他の排水路を流れて処理される必要が生じた。脳以外の臓器ではリンパ管がその役割を担うところであるが、脳にはリンパ“管”が存在しない。しかも、脳では動脈と静脈が並走せず、その灌流システムは他の臓器にはない特殊性を持つ。リンパ管が存在しないのならば、神経細胞やグリア細胞から産生される老廃物を含む間質液はどのように処理されているのであろうか？

その答えは、脳内のリンパ系システムとも言える“血管周囲リンパ排水路(perivascular lymphatic drainage pathway)”の存在である³⁾。血管を単なる血液の通り道ではなく、内皮細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、軟髄膜細胞などから構成される1つの臓器として捉えるならば、その壁内に間質液の通り道が

準備されていたとしても不思議ではない。間質液に含まれる β -アミロイド(A β)は重合すれば血液脳関門を越えにくく、他の排泄経路が必要なことは容易に想像できる。本稿では、A β の排水路としての血管周囲リンパ排水路に着目する。本排水路に着目することで、アルツハイマー病に血管性要因がしばしばオーバーラップする理由や、脳アミロイド血管症の成因、アルツハイマー病で髄液中A β 42が低下する理由、さらにはワクチン療法の不成功の一因が明らかとなり、アルツハイマー病制圧へのヒントが得られるだろう。

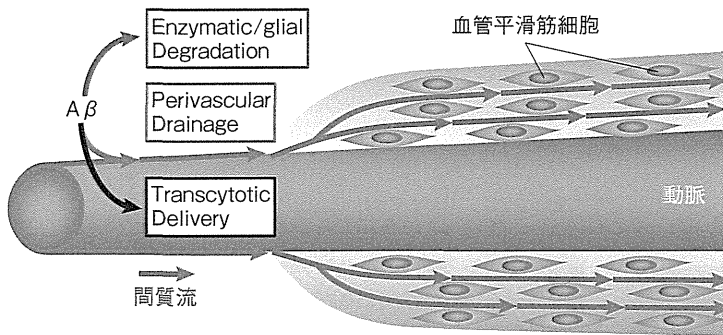
I A β の除去機構

若年性アルツハイマー病を除き、高齢者の孤発性アルツハイマー病の主要因は、加齢に伴うA β 除去能の低下である⁴⁾。

A β の除去機構には、以下の3つの代表的機構(3つのD)が知られている。つまりDelivery, Drainage, Degradationである(図1)。

① Transcytotic Delivery :

トランスサイトーシスによる血管内腔への排出 LRP-1 (lipoprotein receptor related protein-1)⁵⁾や cellular prion protein⁶⁾を介して、毛細血管の反内腔(脳実質)側から内腔側へA β がトランスサイトーシスにより排出輸送される経路。



■図1 Aβのクリアランス機構(3つのD)

Aβのクリアランス(除去)機構には、3つの代表的な機構が知られている。つまり、①Transcytotic Delivery: 毛細血管の内腔(脳実質)側から内腔側へのトランスサイトosisによる輸送、②Perivascular Drainage: 血管周囲リンパ排水路を流れる間質流(細胞間隙流)に乗った輸送、③Enzymatic/glia Degradation: Aβを分解する作用のある酵素あるいはグリア(アストロサイトやミクログリア)による分解である。この3つの除去機構は互いに相補的に働き、Aβの蓄積を防いでいるが、加齢や動脈硬化などにより、一度その均衡が破れると、Aβの脳内蓄積が始まると考えられる。各機構の寄与度については本文を参照されたい。

②Perivascular Drainage:

血管周囲リンパ排水路を介した排出

Aβを含む間質流が血管中膜基底膜層を流れて最終的に髄液や頸部リンパ節に輸送される経路⁷⁾。

③Enzymatic/glia Degradation

Aβ分解酵素やグリアによる分解

ネプリライシン、インスリン分解酵素、プラスミン、アンジオテンシン変換酵素などのプロテアーゼやグリア(アストロサイトやミクログリア)の働きによるAβ分解経路⁸⁾。

この3つの機構の比率に関して、¹²⁵I-Aβ40を用いたマウス脳(尾状核)への注入実験の結果が報告されている。注入後5時間までの観察では、血管内腔への排出が73.8%、血管周囲リンパ排水路を介したと考えられる髄液への移行が10.7%、脳内での残存が15.6%であった。動態解析によると、トランスサイトosisによる血管内腔への排出速度は、血管周囲リンパ排水路を介する排出速度よりも6倍程度速かったと報告されている。また、脳内に残存していたAβのうち10%弱(注入Aβ40全体の~1.5%)でのみ酵素による分解が起こっており、酵素分解によるAβ除去は相対的に遅い反応と考えられた。例えば、ネプリライシンが基質と結合するアフィニティーレンジはmMであるが、脳内Aβの濃度は過剰発現マウスでも数十nMであると考えられており⁹⁾、分解系の果たす役割は相対的に低いと思われる。したがって、トランスサイトosisによる血管内腔への排出と血管周囲リンパ排水路を介した排出がAβの主たる排出経路と考えられるが、後者への依存度が大きくなる機序として、

a. Aβ濃度の上昇¹⁰⁾

b. アミロイド前駆体(APP)遺伝子変異(Dutch/Iowa変異)¹¹⁾

c. Aβ42増加¹¹⁾

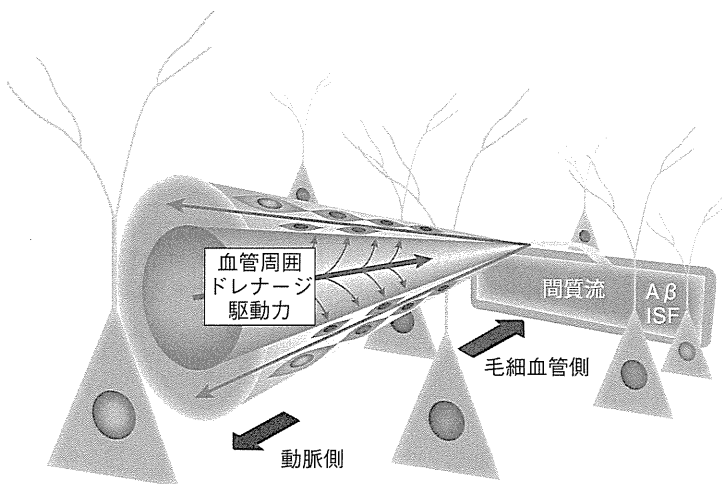
が知られており、血管周囲リンパ排水路を介したAβの排

泄機構が、加齢やアルツハイマー病との関連で重要であることは明らかである。

II 血管壁に沿うAβのドレナージ経路: 血管周囲リンパ排水路

血管周囲リンパ排水路の存在が示唆されたのは1860年台にSchwalbeが、大槽(小脳と延髄の間に存在するクモ膜下槽)に注入された墨汁が1分以内に頸部リンパ節に検出されたことに遡る¹²⁾。その後、BradburyやCserrらによって、①髄腔に注入されたトレーサーは篩板(前頭骨の篩骨切痕に入り込み、頭蓋底の一部となる不正四辺形の骨板。篩孔という多数の小孔が開いている)を介して頸部リンパ節に流れ込む、②尾状核に注入されたトレーサーは脳脊髄液とは無関係な経路で頸部リンパ節に流れ込む、③放射性同位体でラベルされたトレーサーを脳実質内に注入すると頭蓋内では動脈壁に沿って観察される、という事実が明らかにされ、その存在が目立つようになった^{12)~14)}。1990年台初頭にはWellerらが中心となり、①ラット線条体に注入された墨汁は拡張した血管周囲腔に近接して存在し、中大脳動脈枝からWillis動脈輪に沿い、続いて嗅動脈-篩骨動脈に沿って篩板に到達する、②さらに篩板を通り、鼻腔リンパ管から頸部リンパ節にまで至る、という報告がなされた¹⁵⁾。その後のKidaら¹⁶⁾やJohnstonら¹⁷⁾の報告も上記経路の存在を支持するものであった。

その後のCarareらによる詳細な観察の結果、脳内の毛細血管や動脈壁の基底膜が上述した血管周囲リンパ排水路を構成しており、この経路は間質液の高速排水システムであることが示された¹⁸⁾。このリンパ排水路は、分子が細胞外腔を拡散する速度よりもずっと早く、間質液は脳内や軟髄膜内の動脈壁に沿ってほぼ即座に排出される(図2)。可溶性のトレーサーを脳内に注入すると、10分以内に軟髄膜血管の基底膜へ到達する。なお、この排水路は動脈壁内に存在する経路であっ



■図2 血管周囲リンパ排水路の模式図

脳内の毛細血管や動脈壁の基底膜が上述した血管周囲リンパ排水路を構成しており、この経路はAβを含む間質液(interstitial fluid; ISF)の高速排水システムである。このリンパ排水路は、分子が細胞外腔を拡散する速度よりもずっと早い。動脈拍動がこの血管周囲リンパ排水路の駆動力になっており、本排水路は血流の方向と反対に流れる。脳内に注入された可溶性トレーサーは10分以内に軟髄膜血管の基底膜へ到達する。

て、Virchow-Robin腔(穿通動脈や髄質動静脈の周囲に認められる血管周囲腔)とは異なるものであることには注意を要する。

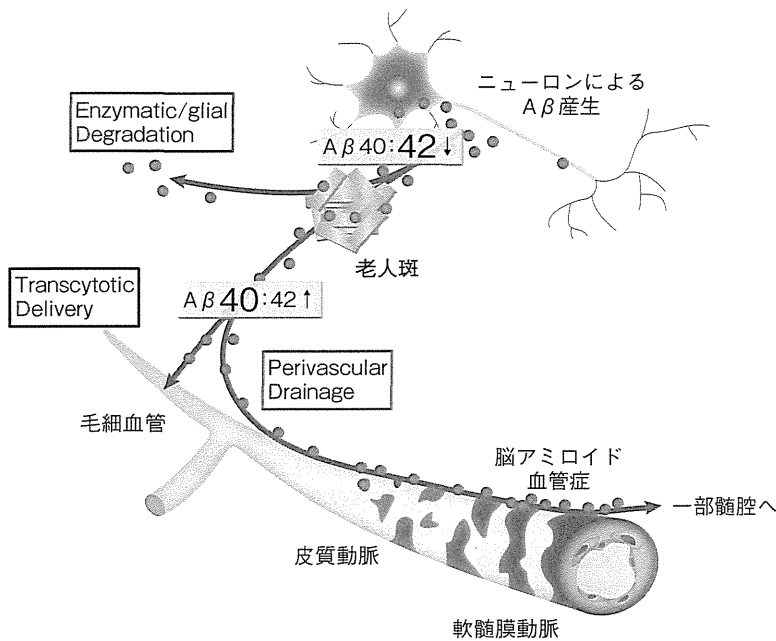
理論モデルでは、動脈拍動がこのリンパ排水路の駆動力になっており、その力は、心臓由来の脈波に続いて生じる反射波が生み出す遠心力によってもたらされることが証明されている¹⁹⁾。Aβは脳底部の中大脳動脈や脳底動脈の壁には検出されるが、頸部内頸動脈には検出されないことから²⁰⁾、血管周囲リンパ排水路を流れる溶質は、脳底部で血管壁を離れ、局所のリンパ節に流れ込むと考えられている⁷⁾。頸動脈鞘内には内頸動脈と隣接してリンパ節が平均12個存在しており、これらのリンパ節が溶質の回収装置として働いていると考えられる²¹⁾。下丘に注入されたCy5(蛍光色素)-Aβ40も30分以内には、尾状核や嗅球の血管壁のみならず、頸部リンパ節に検出されることも本経路を考えるうえで興味深い²²⁾。上述した¹²⁵I-Aβ40を用いた実験では、血中に検出された¹²⁵I-Aβ40をすべてトランスサイトシスによる血管内腔への排泄とカウントしているが¹¹⁾、血管周囲リンパ排水路を介して排泄されるAβも最終的には血中に回収される(髄液→血中あるいはリンパ節→血中)ことから、血管周囲リンパ排水路を過小評価していた可能性も否定できず、本経路がAβクリアランスに果たす役割は実際にはもっと大きいかもしれない。

Ⅲ 血管周囲リンパ排水路が破綻する病態

興味深いことに、このリンパ排水路は、初期の脳アミロイド血管症のAβ沈着部位に合致している⁷⁾。すなわち、リン

パ排水路の経路である中膜平滑筋基底膜からAβの蓄積が始まる。したがって、本経路のうっ滞が脳アミロイド血管症の病態と密接に関連しているのではないかと、という予想が容易に成り立つ。実際、高齢マウスや脳アミロイド血管症を呈したマウスでは間質流が障害されており²³⁾、さらに脳アミロイド血管症モデルマウスの両側総頸動脈を人工的に狭窄させると脳アミロイド血管症の病態が加速するなど²⁴⁾、加齢・動脈硬化やAβ沈着による血管拍動性の低下が脳アミロイド血管症の増悪因子として働く可能性が高い。ネプリライシンの濃度が低下したり²⁵⁾、LRP1の発現レベルが低下すると¹⁰⁾、Aβのクリアランスが障害され、脳アミロイド血管症を招くことも報告されており、3つのAβ除去機構は相補的に機能してAβの蓄積を防いでいるのであろう。

クリアランス機構が破綻して血管壁にタンパク質が蓄積するような病態がPEFA (protein-elimination failure arteriopathies)と総称されることがある(図3)。Aβ以外でも、ゲルソリン、シスタチンC、トランスチレチンは家族性脳アミロイド血管症を背景に、脳出血や認知症の原因になり、特に後二者は脳以外の臓器の血管にも蓄積する²⁶⁾。また、Notch3遺伝子変異によって起こる遺伝性の血管性認知症であるCADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy)では、血管平滑筋細胞より産生されるNotch3が血管壁に蓄積し、GOM (granular osmiophilic material)の形成に関与するが²⁷⁾、これもPEFAの一型であるとも考えられている。GOMは皮膚を含め、末梢血管でも観察されることから、このようなドレナージ経路の破綻は脳以外でも起こりうる現象であるとも言える。



■図3 PEFAの一型としての脳アミロイド血管症 クリアランス機構が破綻して血管壁にタンパク質が蓄積するような病態がPEFA (protein-elimination failure arteriopathies) と総称され、脳アミロイド血管症をも含む大きな疾患概念である。間質液中のAβが髄液へ移行するためには、血管周囲リンパ排水路を流れ、軟膜を透過する必要があり、血管周囲リンパ排水路の駆動力が低下する状況、すなわち、年齢、細動脈硬化、そして脳アミロイド血管症などの存在下ではAβの髄液移行が減少することになる。特に易凝集性のAβ42は老人斑や毛細血管壁での沈着が主となり、髄腔内まで到達しにくくなると考えられる。

IV アルツハイマー病における脳脊髄液 Aβ42低下機序

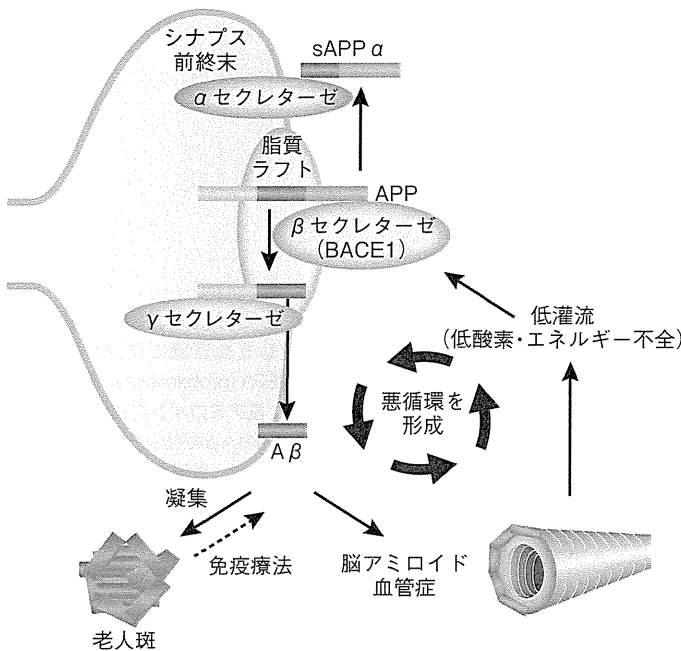
Aβを含む間質液は絶えず血管周囲リンパ排水路を介して排泄されている。脳の間質液は280mLであり、髄液の140mL (脳室内30mL, クモ膜下腔110mL) と比較して倍ほど多く²⁸⁾、ラットやウサギではその産生量は0.11~0.29 μL/min/g brainと見積もられており¹⁾、ヒトで同様の産生率と仮定すれば約200~500mL/日ほどの量に達する。間質液圧のほうが脳脊髄液圧よりも高いことが知られている¹⁹⁾。間質液と脳脊髄液の直接の往来は脳室周囲に限られており、しかもここでの間質流はごく限定されたものである。したがって、間質液中のAβが髄液へ移行するためには、血管周囲リンパ排水路を流れ、軟膜を透過する必要があり、血管周囲リンパ排水路の駆動力が低下する状況、すなわち年齢、細動脈硬化、そして脳アミロイド血管症など²³⁾の存在下ではAβの髄液移行が減少することになる。実際、脳アミロイド血管症の患者では、髄液中のAβ40とAβ42が共に高度に低下することが知られている²⁹⁾。アルツハイマー病患者でも、血管壁へのアミロイド沈着の程度は低い、必発であり、間質流速が低下するとAβの髄液中濃度が低下する。しかし、脳アミロイド血管症と比べて間質流速低下の程度が軽いために、より易凝集性のAβ42でのみ、その傾向が見られると考えられる³⁰⁾。

V 脳アミロイド血管症が引き金を引く悪循環

脳アミロイド血管症の存在は、重度になると脳の循環不全を招くため、低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor ; HIF)³¹⁾ やエネルギー不全³²⁾ を介してβセクレターゼ1 (BACE1) を誘導し、さらなるAβの産生増加を招くと考えられる (図4)。したがって脳アミロイド血管症がいったん完成してしまうと、上述したように血管周囲リンパ排水路の破綻によりAβを十分に排出できないにもかかわらず、その産生は亢進し、Aβ蓄積への悪循環を形成する。

VI アルツハイマー病の免疫療法との関連

欧米を中心に臨床試験が行われていたアルツハイマー病のAβワクチン療法において、老人斑が消失した部位で、かえって脳アミロイド血管症が悪化したという所見が報告された³³⁾。この現象は、すでにリンパ排水路がうっ滞していた患者で、老人斑から溶出したAβがさらに脳アミロイド血管症を悪化させたからとも解釈されている³⁴⁾ (図4)。また、Bapineuzumabによる受動免疫療法時にしばしば観察されたARIA (amyloid-related imaging abnormalities) の病態との関連では、可溶化したAβが血管周囲リンパ排水路に流れ込むも十分ドレナージされずに溢れて浮腫性変化が生じた



■図4 脳アミロイド血管症が招く悪循環の形成機序

重度の脳アミロイド血管症は脳の循環不全を招き、低酸素誘導因子やエネルギー不全を介してBACE1を誘導し、さらなるAβの産生増加を招くと考えられる。脳アミロイド血管症により、すでに血管周囲リンパ排液路が閉塞していても、この悪循環を断ち切ることははなはだ困難であり、免疫療法によって老人斑から可溶化したAβはかえって悪循環のサイクルを回転させ、病態を悪化させる可能性すらある。

ものがARIA-E (edema)であり、血管壁のAβが中途半端に引き抜かれたことにより血管壁が脆弱化し、出血性変化が生じたものがARIA-H (hemorrhage)であるとも考えられており、その程度は免疫療法前の脳アミロイド血管症の程度やAβクリアランス効率により規定されると考えられている³⁵⁾。したがって、アルツハイマー病の免疫療法が将来実現した暁には、その適応を考慮する際に、少なくとも高度の脳アミロイド血管症の患者は除外すべきと言えるだろう。さらに、ドレナージを改善させる薬剤の投与など、本ドレナージ経路の健全性を高める方策が免疫療法の成否の鍵を握るかもしれない。

管障害とアルツハイマー病を代表とする神経変性疾患は、高齢者で合併することこそあれ、互いに相容れない疾患概念とも考えられていた。しかし、血管拍動性を維持することが脳内リンパ系の通過性を高め、ひいてはAβの沈着をも防ぐ最良の方法となりうることから、生理的にも病理的にも重要なこの血管周囲リンパ排液路のさらなる解明が、アルツハイマー病を含む様々な疾患の病態解明に一筋の光明を与えるだろう。神経変性疾患としてのアルツハイマー病研究は目覚ましい進展を遂げてきた。そこに、血管病の視点からのアルツハイマー病研究が加わることで、アルツハイマー病の根本治療法の確立が早晩実現することを願ってやまない。

おわりに

以上、Aβの除去機構について概説し、その中で特に血管周囲リンパ排液路について詳述した。アルツハイマー病の免疫療法を確立するために、この古くて新しい経路の理解は避けて通れない。また、加齢や脳アミロイド血管症に伴い、血管拍動性が低下し、本ドレナージ経路が障害されAβの蓄積が加速することから、アルツハイマー病の治療に“血管拍動性をいかに維持するか？”言い換えれば、“いかに血管病を予防するか？”という視点が重要になってくる³⁶⁾。かつて脳血

PROFILE 猪原匡史

■ 先端医療振興財団 先端医療センター 再生医療研究部
■ E-mail : ihara@fbri.org

1995年京都大学医学部卒業。西神戸医療センターでの内科・神経内科研修後、京都大学大学院医学系研究科(脳統御医科学系)。大学院修了後、先端領域融合医学研究機構助手、日本学術振興会特別研究員、英国留学(ニューカッスル大学)、京都大学医学部神経内科助教を経て、現職。専門は脳卒中、神経内科学。

PROFILE 田口明彦

■ 先端医療振興財団 先端医療センター 再生医療研究部

文献

- 1) Abbott NJ: *Neurochem Int* (2004) 45: 545-552
- 2) Rapoport SI: *Blood-brain barrier in physiology and medicine* (Raven Press, New York), 1976
- 3) Ihara M, et al: *Clin Neurosci* (2012) 30: 1076
- 4) Weller RO, et al: *Brain Pathol* (2008) 18: 253-266
- 5) Davis J, et al: *J Biol Chem* (2004) 279: 20296-20306
- 6) Pflanzner T, et al: *J Cereb Blood Flow Metab* (2012) 32: 628-632
- 7) Weller RO, et al: *Acta Neuropathol* (2009) 117: 1-14
- 8) Vardy ER, et al: *Trends Mol Med* (2005) 11: 464-472
- 9) Hsiao K, et al: *Science* (1996) 274: 99-102
- 10) Shibata M, et al: *J Clin Invest* (2000) 106: 1489-1499
- 11) Deane R, et al: *Neuron* (2004) 43: 333-344
- 12) Schwalbe G: *Zentralb Med Wiss* (1869) 7: 465-467
- 13) Bradbury MW, et al: *Am J Physiol* (1981) 240: F329-336
- 14) Bradbury MW, et al: *J Physiol* (1983) 339: 519-534
- 15) Zhang ET, et al: *Acta Neuropathol* (1992) 83: 233-239
- 16) Kida S, et al: *Neuropathol Appl Neurobiol* (1993) 19: 480-488
- 17) Johnston M, et al: *Cerebrospinal Fluid Res* (2004) 1: 2
- 18) Carare RO, et al: *Neuropathol Appl Neurobiol* (2008) 34: 131-144
- 19) Schley D, et al: *J Theor Biol* (2006) 238: 962-974
- 20) Shinkai Y, et al: *Ann Neurol* (1995) 38: 421-428
- 21) Clapham R, et al: *Clin Anat* (2010) 23: 43-47
- 22) Ball KK, et al: *J Cereb Blood Flow Metab* (2010) 30: 162-176
- 23) Hawkes CA, et al: *Acta Neuropathol* (2011) 121: 431-443
- 24) Okamoto Y, et al: *Acta Neuropathol* (2012) 123: 381-394
- 25) Miners JS, et al: *J Neuropathol Exp Neurol* (2006) 65: 1012-1021
- 26) Revesz T, et al: *J Neuropathol Exp Neurol* (2003) 62: 885-898
- 27) Ishiko A, et al: *Acta Neuropathol* (2006) 112: 333-339
- 28) Bergsneider M: *Neurosurg Clin N Am* (2001) 12: 631-638, vii
- 29) Verbeek MM, et al: *Ann Neurol* (2009) 66: 245-249
- 30) Shaw LM, et al: *Acta Neuropathol* (2011) 121: 597-609
- 31) Sun X, et al: *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) 103: 18727-18732
- 32) Velliquette RA, et al: *J Neurosci* (2005) 25: 10874-10883
- 33) Patton RL, et al: *Am J Pathol* (2006) 169: 1048-1063
- 34) Nicoll JA, et al: *Neurobiol Aging* (2004) 25: 589-597
- 35) Sperling R, et al: *Lancet Neurol* (2012) 11: 241-249
- 36) Kalaria RN, et al: *J Neurosci Sci* (2012), in press

for beginners

- "Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease" Weller RO, et al: *Acta Neuropathol* (2009) 117: 1-14 (血管周囲リンパドレナージ経路に関する総説)

Quantitative Evaluation of Cerebral Blood Flow and Oxygen Metabolism in Normal Anesthetized Rats: ^{15}O -Labeled Gas Inhalation PET with MRI Fusion

Tadashi Watabe^{1,2}, Eku Shimosegawa¹, Hiroshi Watabe³, Yasukazu Kanai³, Kohei Hanaoka¹, Takashi Ueguchi⁴, Kayako Isohashi¹, Hiroki Kato¹, Mitsuaki Tatsumi⁴, and Jun Hatazawa^{1,2}

¹Department of Nuclear Medicine and Tracer Kinetics, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan;

²Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Suita, Osaka, Japan; ³Department of Molecular Imaging in Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan; and ⁴Department of Radiology, Osaka University Hospital, Suita, Osaka, Japan

PET with ^{15}O gas has been used for the quantitative measurement of cerebral blood flow (CBF), cerebral metabolic rate of oxygen (CMRO₂), oxygen extraction fraction (OEF), and cerebral blood volume (CBV) in humans. However, several technical difficulties limit its use in experiments on small animals. Herein, we describe the application of the ^{15}O gas steady-state inhalation method for normal anesthetized rats. **Methods:** Eight normal male Sprague–Dawley rats (mean body weight \pm SD, 268 \pm 14 g) under anesthesia were investigated by ^{15}O -labeled gas PET. After tracheotomy, an airway tube was placed in the trachea, and the animals were connected to a ventilator (tidal volume, 3 cm³; frequency, 60/min). The CBF and OEF were measured according to the original steady-state inhalation technique under artificial ventilation with ^{15}O -CO₂ and ^{15}O -O₂ gases delivered through the radioactive gas stabilizer. CBV was measured by ^{15}O -CO gas inhalation and corrected for the intravascular hemoglobin-bound ^{15}O -O₂. Arterial blood sampling was performed during each study to measure the radioactivity of the whole blood and plasma. MR image was performed with the same acrylic animal holder immediately after the PET. Regions of interest were placed on the whole brain of the PET images with reference to the semiautomatically coregistered PET/MR fused images. **Results:** The data acquisition time for the whole PET experiment in each rat was 73.3 \pm 5.8 (range, 68–85) min. In both the ^{15}O -CO₂ and the ^{15}O -O₂ studies, the radioactivity count of the brain reached a steady state by approximately 10 min after the start of continuous inhalation of the gas. The quantitative PET data of the whole brain were as follows: CBF, 32.3 \pm 4.5 mL/100 mL/min; CMRO₂, 3.23 \pm 0.42 mL/100 mL/min; OEF, 64.6% \pm 9.1%; and CBV, 5.05 \pm 0.45 mL/100 mL. **Conclusion:** Although further technical improvements may be needed, this study demonstrated the feasibility of quantitative PET measurement of CBF, OEF, and CMRO₂ using the original steady-state inhalation method of ^{15}O -CO₂ and ^{15}O -O₂ gases and measurement of CBV using the ^{15}O -CO gas inhalation method in the brain of normal anesthetized rats.

Key Words: ^{15}O -gas PET; CBF; OEF; CMRO₂

J Nucl Med 2013; 54:283–290

DOI: 10.2967/jnumed.112.109751

Cerebral blood flow (CBF) and metabolic rate of oxygen (CMRO₂) have been extensively studied in humans using PET with ^{15}O -labeled gases and H₂¹⁵O to elucidate the brain functions (1) and hemodynamic and metabolic compromise in stroke patients (2). However, several difficulties restrict the application of this method to experimental animals.

The major difficulty of ^{15}O gas PET in small animals is related to the delivery of ^{15}O gas to the brain. Inhaled radioactive gases exist in the nasal and oral cavities and the lung, which may disturb accurate measurement of the intracranial radioactivity because of increased random coincidence events and scattered photons. The second is the limited volume of blood that can be sampled from small animals to measure the arterial input function, which is essential for quantitative analysis. The third is the limited volume of the tracer solution that can be injected into small animals. To overcome these technical difficulties, some previous studies have applied ^{15}O gas inhalation through a tracheal tube (3), venous injection of ^{15}O -O₂ hemoglobin-containing red blood cells (4,5), ^{15}O -CO or O₂ hemoglobin-containing vesicles (6), or liposome-encapsulated hemoglobin (7). For quantitative measurements, the radioactivity of the cardiac chambers has been measured (3). A β -probe was developed to directly measure the arterial input function, without any need for blood sampling (8). Furthermore, programmed injection devices have been developed to achieve steady-state radioactivity of the brain (9). However, there have been no reports of quantitative measurement of CBF, cerebral blood volume (CBV), oxygen extraction fraction (OEF), and CMRO₂ in the rat brain by ^{15}O -gas inhalation PET. The purpose of this study was to establish a standard methodology to evaluate the cerebral circulation and oxygen metabolism in rats, to allow the evaluation

Received Jun. 16, 2012; revision accepted Aug. 23, 2012.

For correspondence or reprints contact: Jun Hatazawa, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871 Japan.

E-mail: hatazawa@tracer.med.osaka-u.ac.jp

Published online Jan. 3, 2013

COPYRIGHT © 2013 by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

of cerebral ischemia in a rat model. We developed a method to measure CBF, CBV, OEF, and CMRO₂ in anesthetized rats according to the original ¹⁵O gas steady-state inhalation method, which was used in clinical studies (10–12). We paid special attention to administration of the ¹⁵O gases through the trachea under a steady-state supply of ¹⁵O-CO₂ and ¹⁵O-O₂. We describe here the feasibility of the method and the quantitative measurement of CBF, CBV, OEF, and CMRO₂ in the brains of normal rats under anesthesia. We performed all studies using a clinical PET camera. The feasibility of the PET camera for small-animal imaging was evaluated by phantom experiments as well.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of ¹⁵O Gas

¹⁵O gas was produced by a ¹⁴N(d,n)¹⁵O nuclear reaction with 2.0% O₂ (for ¹⁵O-CO and ¹⁵O-O₂) or 2.0% CO₂ (for ¹⁵O-CO₂) added to an N₂ gas target at a 12-MeV-proton 20- μ A current accelerated by the CYPRIS HM 12S in-house cyclotron (Sumitomo Heavy Industry). The concentrations and flow rates of ¹⁵O-O₂, ¹⁵O-CO, and ¹⁵O-CO₂ were controlled by the CYPRIS gas stabilization module, G3-A (Sumitomo Heavy Industry). Flow volume from the gas stabilizer system was regulated by a mass flow controller to achieve a constant supply of radioactivity.

PET and MR Scanner

The PET study was performed with the Headtome-V PET scanner (Shimadzu Corp.). The performance of the scanner has been described previously (13). PET data were collected in 2-dimensional (2-D) mode (septa extended) and reconstructed by the 2-D filtered backprojection method with Butterworth filter (1-mm cutoff frequency). The spatial resolution was 4.0 mm in full width at half maximum (FWHM) in the transaxial direction and 4.5 mm in FWHM in the axial direction. The voxel size was 0.5 \times 0.5 \times 3.125 mm. The PET data were not corrected for attenuation or scatter.

The PET and MR studies were performed with an MR-compatible acrylic holder held at the same position in all the experiments. MR imaging was performed with the same holder immediately after the PET acquisition, using a permanent magnet MR imaging system of 0.3 T (Hitachi Metal; NEOMAX, Ltd.) (14). The MR imaging sequence was a fast low-angle shot (repetition time/echo time, 50/5 ms; 64 slices; field of view, 60 mm). Position shift between the PET and MR images was confirmed by a phantom experiment, and coregistration of the PET and MR images was automatically performed using in-house fusion software (gPET/MRI).

Estimation of Partial-Volume Effect

The body phantom of the National Electrical Manufacturers Association was used for the evaluation of the partial-volume effect. Five spheres of different sizes were placed inside the water (diameter, 10, 13, 17, 22, and 28 mm) and filled with ¹⁵O-H₂O of the same radioactivity concentration. The scanning time was 15 min, and the PET images were reconstructed using a 2-D filtered backprojection method with attenuation correction. Regions of interest (ROIs) were placed on each sphere, and the mean count ratios to the 28-mm-diameter sphere were plotted against the diameter.

Effect of Attenuation Correction

Transmission scanning with a ⁶⁸Ge–⁶⁸Ga rod source was performed in the brain of a sacrificed rat to prepare an accurate

attenuation map (scan duration, 167 min). The ¹⁵O-O₂ gas PET images were reconstructed both with and without attenuation correction. Profile curves of the brain count were compared between the images with and without attenuation correction.

Effect of Scatter Correction

The lung phantom (rubber balloon) was placed in the pleural cavity of a sacrificed rat after the lung was removed. PET was performed for 16 min under ¹⁵O-O₂ ventilation (100 MBq/min, 180 mL/min). Then, scatter radiation from the lung was evaluated.

Cross Calibration Factor

Because of the limited volume of the blood samples, we tested the linearity of the cross calibration factor against the volume of plasma measured by a well counter. The radioactivity concentrations of 0.01, 0.025, 0.05, 0.10, and 0.20 mL of H₂¹⁵O solution were measured by the well counter. The radioactivity concentrations were corrected for physical decay and weight and plotted against the weight.

Animal Preparation and PET Measurements

Normal male Sprague–Dawley rats from Japan SLC Inc. were used for this investigation. Eight rats (8 wk old; mean body weight \pm SD, 268 \pm 14 g) were anesthetized with 2% isoflurane plus 100% oxygen during the arterial cannulation, followed later by intramuscular injection of midazolam (1.2 mg/kg of body weight), xylazine (4.8 mg/kg of body weight), and butorphanol (1.6 mg/kg of body weight). Arterial cannulation was performed on the femoral artery using a 0.8-mm polythene tube (n = 6) or on the tail artery using a Terumo 24-gauge indwelling catheter (n = 2). Tracheotomy was performed, and a flexible tube (6-French, 5 cm; Hanako Medical Products) was placed into the trachea to serve as an airway for the administration of ¹⁵O-gas. The airway tube was connected to the ventilator (SN-480-7-10; Shinano Seisakusho), and artificial ventilation was performed with room air (tidal volume, 3 cm³; frequency, 60/min). The rats were placed supine on the bed, and the airway tube was flexed to the distal side to exclude it from the transaxial field of view of the brain.

¹⁵O-CO₂, ¹⁵O-O₂, and ¹⁵O-CO gas were administered, where the order of ¹⁵O-O₂ and ¹⁵O-CO₂ studies was randomized, with room air as the carrier (50, 100, and 100 MBq/min, respectively). The flow volume and radioactivity concentration were automatically maintained through the stabilization module, which was directly connected to the artificial ventilator. The PET measurements were started with the administration of each ¹⁵O-labeled gas. Inhalation of the ¹⁵O-CO₂ and ¹⁵O-O₂ gas was continued during the PET measurements for 16 min (60 s \times 16 frames). The inhalation time of the ¹⁵O-CO gas was 3 min, and the PET measurements were continued for a total of 12 min (60 s \times 12 frames). Arterial blood sampling (0.1 mL) was performed from the arterial cannula during the steady-state PET acquisition in the ¹⁵O-CO₂ and ¹⁵O-O₂ studies (13 and 16 min after the start of scanning, respectively) and 7 min after the start of the scanning in the ¹⁵O-CO study. The radioactivity and weight of the whole blood and plasma after centrifugation (3,000 round/min, 3 min) were measured with a well scintillation counter (BeWell; Molecular Imaging Labo), and the radioactivity concentration of each blood sample (cps [count per second]) was corrected for the decay from the sampling time.

Systemic blood pressure (BP) and heart rate (HR) were indirectly measured with a tail-cuff apparatus during the study (BP-98A-L; Softron). Arterial blood gas was analyzed using the blood samples collected during the ¹⁵O-CO₂ and ¹⁵O-O₂ PET acquisition