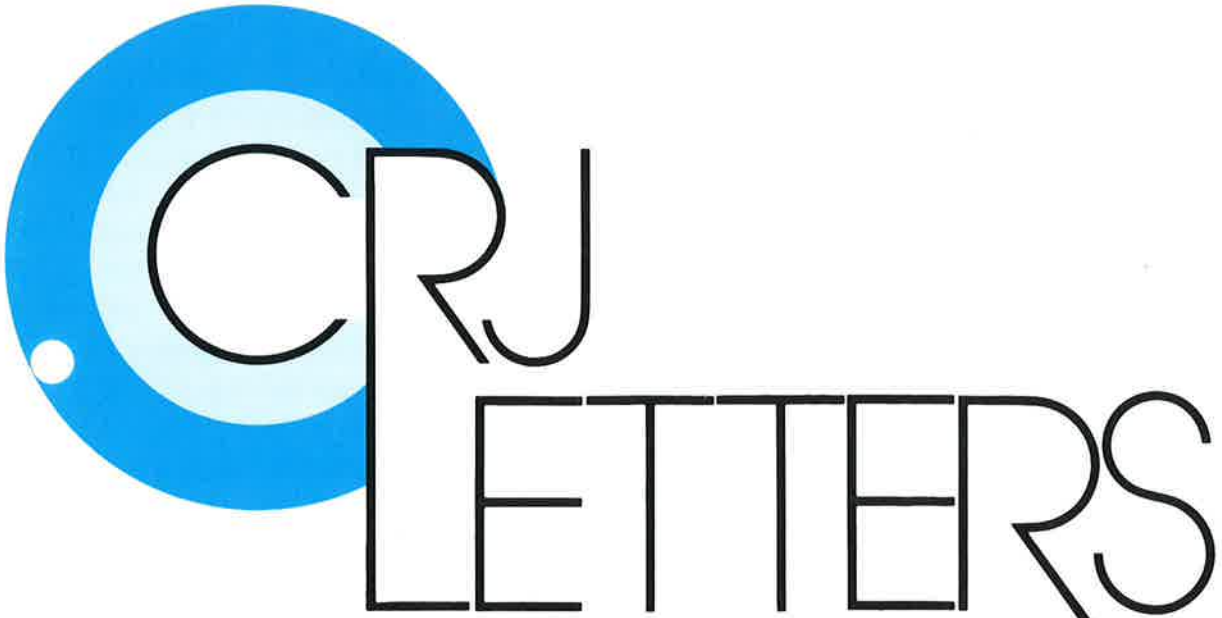


Vol.9 No.1

June 1996



CRJ LETTERS

—— 卷頭論文 ——

マウス両側総頸動脈閉塞による脳虚血発生頻度の系統差に関する検討

Charles River
Japan Inc.



FROM THE
HAND OF THE
VETERINARIAN
TO RESEARCH

マウス両側総頸動脈閉塞による脳虚血発生頻度の系統差に関する検討

大阪大学医学部第一内科 北川一夫

要旨

これまで虚血性脳障害の実験的検討にはラット、砂ネズミが主として用いられてきた。しかし近年の分子生物学的手法の進歩により遺伝子変異マウスの脳虚血病態解明への応用が行われつつある。マウスでの脳虚血作成は中大脳動脈の閉塞による局所脳虚血モデルが一般的である。本研究では手技的に容易な両側総頸動脈閉塞が脳虚血を作成するかどうかについて7系統（C57BL, ICR, BALB/C, C3H, CBA, DDY, DBA2）のマウスを用いて検討した。7系統の中ではC57BLが最も再現性良く脳虚血症状を示し、20分間の頸動脈閉塞後1週間後に海馬、線条体に虚血性神経細胞死を観察した。レーザードプラー法による脳血流測定でもC57BLは両側頸動脈閉塞による低下率が最も大きく、閉塞前の10%以下にまで低下した。脳底部のウイリス輪の観察ではC57BLでは頸動脈系と椎骨脳底動脈系の間細い吻合を認めるのみであったのに対し他の系統では半数以上の例に太い吻合を認めた。以上の結果からC57BLでは他の系統に比べ脳底部のウイリス輪の発達が不完全なため両側総頸動脈閉塞により重度の前脳虚血が作成され、線条体や海馬での神経細胞の選択的脆弱性の検討が可能であると考えられた。

はじめに

近年、各種の遺伝子欠損マウス（ノックアウトマウス）や遺伝子過剰発現マウスが作成され、各

種病態における遺伝子産物の特異的な関与が明らかにされつつある。脳虚血病態においても各遺伝子産物の関与が遺伝子変異マウスを用いることにより従来より明瞭な形で解析されつつあるように思われる（文献1,2）。遺伝子変異マウスを用いて脳虚血を作成するには主として中大脳動脈を閉塞する局所脳虚血モデルが用いられている。局所脳虚血モデルはヒトの脳梗塞に最も近い病態モデルであり、脳梗塞や虚血性脳浮腫の発生、進展等の検討に適している。一方、脳虚血病態でもう一つ注目されているのは、神経細胞がなぜ虚血侵襲に脆弱なのかという、神経細胞の選択的脆弱性の問題である（文献3,4）。ラットや砂ネズミでは前脳領域（大脳皮質、線条体、海馬、視床など）に重度の虚血を短期間負荷すると、血流再開ののち海馬、線条体といった虚血に脆弱な部分で神経細胞死が発生する。砂ネズミでは先天的にウイリス輪の発達が不完全で頸動脈系と椎骨脳底動脈系の吻合が不十分であるため両側の総頸動脈の閉塞のみで均一な前脳虚血の作成が可能である（文献5）。一方ラットではウイリス輪がよく発達しており頸動脈の閉塞だけでは大部分の動物で脳虚血を作成できない。そこで両側総頸動脈閉塞と全身的低血圧を組み合わせたモデル（文献6）、心停止モデル（文献7）や椎骨動脈を焼却したのち両側総頸動脈を閉塞するモデル（文献8）などが考案されている。遺伝子変異マウスを用いて選択的神経細胞死の検討を行うには一過性前脳虚血を作成する必要があるが、マウスが両側総頸動脈閉塞のみでどの程度脳虚血を発生するのか、ウイリス輪での頸動脈系と椎骨脳底動脈系の吻合の程度はどの程度なのかなど明らかになっていない。本稿では筆者らがマウスの代表的な7系統の両側総頸動脈閉塞による脳虚血発生頻度について、神経症状、組織学的所見、脳底部ウイリス輪の観察、脳血流測定の観点から行った検討について述べる。

筆者プロフィール

北川一夫

大阪大学医学部附属病院医員
（第一内科）

医学博士。1958年12月25日生。1983年大阪大学医学部卒業。第一内科学教室に入局、臨床研修を経て1986年より実験的脳虚血の研究に従事。1990年より1993年までアメリカ・コロロンビア大学、マウントサイナイ医科大学にてDavid R Colman博士のもとで分子生物学的手法を用いてミエリンの基礎研究に従事。1993年帰国後、第一内科学教室にて実験的脳虚血に関する研究を再開。趣味は旅行、スポーツ観戦。





1. マウス7系統の両側総頸動脈永久閉塞による神経症状の発生頻度及び24時間死亡率

代表的なマウス7系統としてC57BL, ICR, Balb/C, C3H, CBA, DBA2 (日本チャールスリパー)、DDY (SLC) を用いた。性別は雄性で8-16週齢のものを用いた。マウスの総頸動脈閉塞及びその後の神経症状の観察は砂ネズミの片側脳虚血モデルで行った方法(文献9)に準じて行った。マウスを軽エーテル麻酔下に仰臥位に固定し頸部皮膚を正中切開、両側総頸動脈を剝離後、二重結紮し室温下で2時間後まで神経症状の観察を行った。神経症状としては表1にのべる意識障

害(傾眠、体向反射消失)、回旋現象、頸部捻転、痙攣の4項目をとりあげた。各系統の神経症状の発現頻度を図1にまとめた。頸部捻転や痙攣といった重度の虚血症状がC57BLでは30分までに、ICRやBalb/Cでも120分までにほぼ全例で観察された。これら3系統は24時間後の死亡率もほぼ100%であった。一方、C3H, CBA, DDYでは2時間後までの重度虚血症状発現頻度及び24時間後の死亡率ともほぼ50%程度であった。DBA2は一部の例で回旋現象、意識障害を認めるものの頸部捻転、痙攣を示す動物は少なく24時間後の死亡率も低かった。

表1 マウス両側総頸動脈閉塞に際して観察される神経症状と神経スコアの評価法

神経症状	傾眠	体向反射消失	昏睡
意識障害			
傾眠	1	—	—
体向反射消失	—	2	—
昏睡	—	—	7
回旋現象	1	—	—
頸部捻転	2	2	—
痙攣	3	3	—
最大スコア	7	7	7

20分間の一過性頸動脈閉塞例では5分毎に20分まで計4回神経症状を評価した。

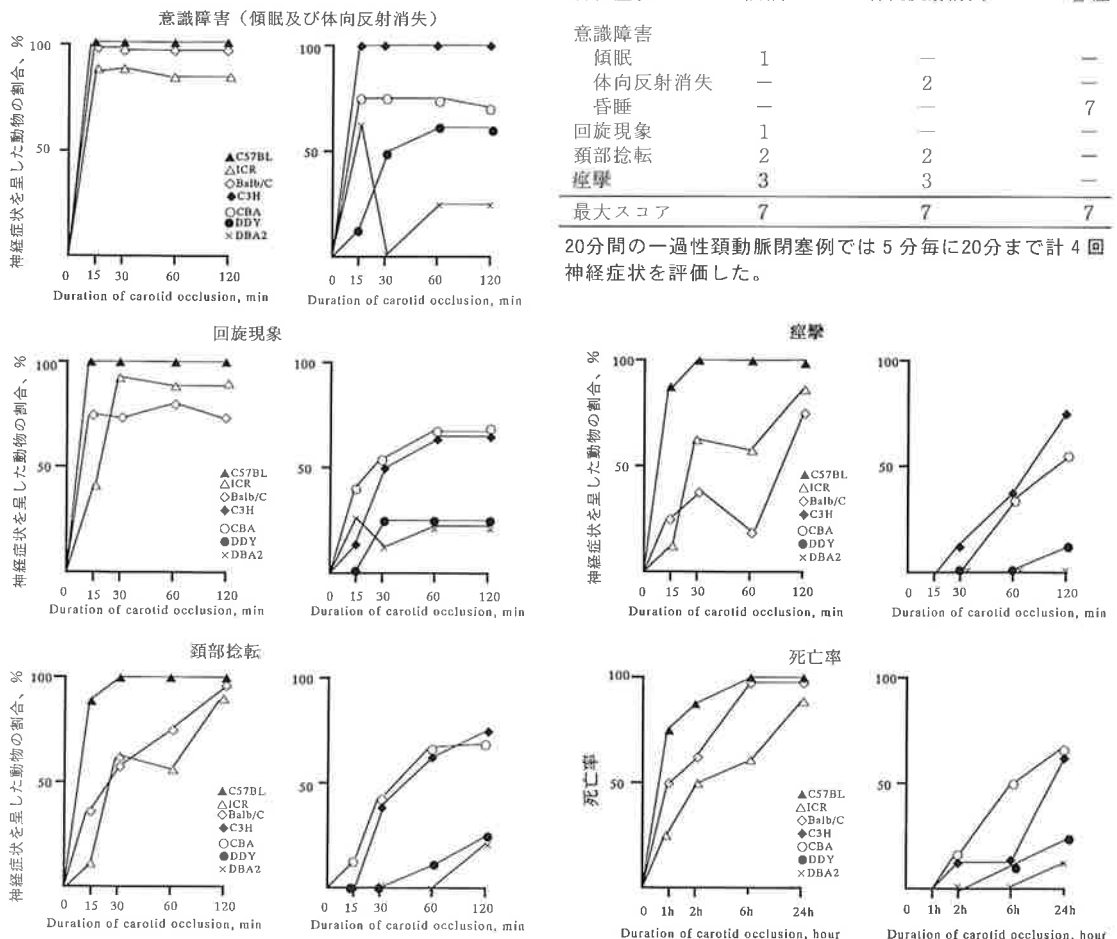


図1: マウス7系統の両側総頸動脈永久閉塞時の神経症状の発現頻度。

神経症状の評価は15分後から120分後まで、死亡率の評価は24時間後まで行った。頸部捻転、痙攣といった重度虚血症状はC57BL, ICR, Balb/Cで高率にみられとともに、これら3系統の動物は24時間以内にほぼ全例が死亡した。

2. マウス7系統の一時的両側総頸動脈閉塞（20分間）による虚血性神経細胞死の発生頻度—神経症状と組織学的病変の対応を含めて—

1.の検討からC57BL, ICR, Balb/Cでは両側総頸動脈閉塞により前脳虚血が発生していることが示唆されたため、虚血時間を短期間にしその後血流再開通し1週間後の組織学的病変を検討した。1.と同様にマウスを軽エーテル麻酔下に両側総頸動脈を剝離し体温及び側頭筋温を36—37度に保ったのちクリップにより閉塞した。クリップ後動物を内部温35度に保った保温チャンバーに置き、神経症状を観察した。神経症状は表1の項目について5分毎に評価し、7点満点でスコアをつけ20分

後まで計4回評価し、各5分毎のスコアを加算し累積神経スコアとした。20分間のクリップ後血流を再開通し、1時間後まで動物を保温チャンバーにおいたのち室温下にあるケージに戻した。1週間後に動物を断頭屠殺し、取り出した脳を固定後パラフィン包埋し、作成したパラフィン切片をHE染色、ニッスル染色、抗微小管結合タンパク質2 (MAP2) 抗体を用いた免疫組織化学染色に供した（文献10）。MAP2は神経細胞の樹状突起、細胞体に局在するタンパク質でその免疫組織化学染色は神経細胞障害の評価に有用である。20分間の頸動脈閉塞中の神経症状の発現は1.と同様にC57BLで最も一定してみられた（図2）。C57BLでは頸動脈閉塞後5分まで体向反射の消失がみられ、

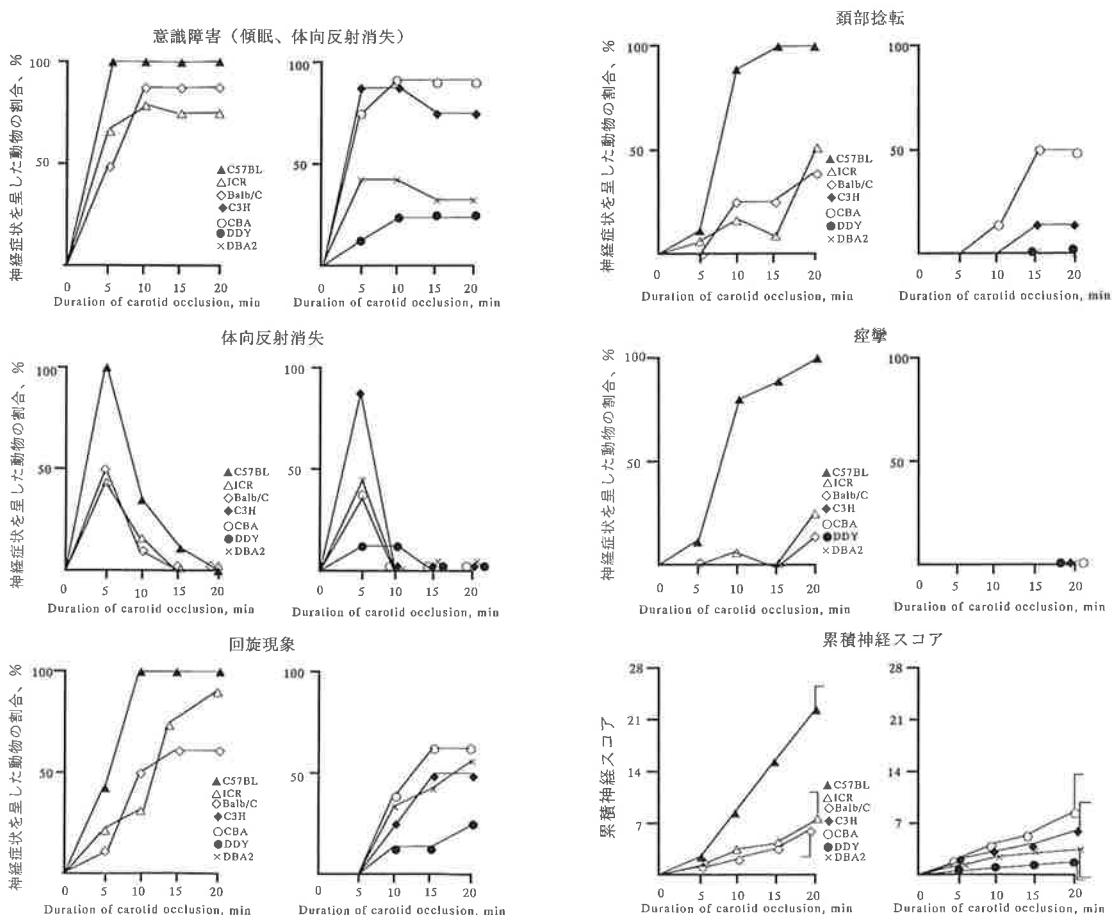


図2：マウス7系統を保温した状態で20分間の両側総頸動脈閉塞を行った際の神経症状の発現頻度、累積神経スコア。C57BLでは20分間の虚血中、頸部捻転、痙攣といった重度虚血症状が高率に観察された。

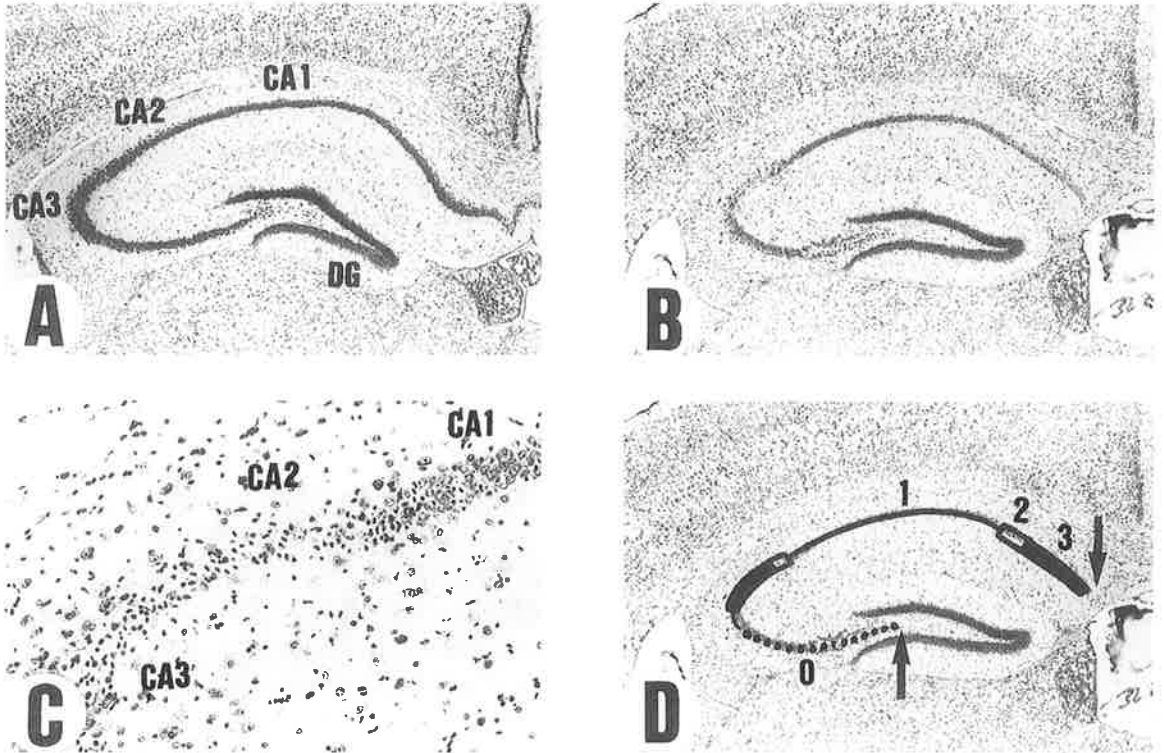


図3：マウス海馬での虚血性神経細胞死の評価

A：正常C57BLマウス（ニッスル染色）、CA1-CA3は海馬での各領域を、DGは歯状回を表す。B：20分間の両側頚動脈閉塞1週間後のC57BLマウス（ニッスル染色）。CA1内側部とCA2, CA3に細胞脱落を認める。

C：BのCA2, CA3領域の強拡大像。D：Bの切片での神経細胞死の評価法を示す。.....は細胞死を認めない重症度0、——は10%未満の細胞に障害を認める重症度1、□は10-50%の細胞に障害を認める重症度2、■は50%以上の細胞に障害を認める重症度3の領域を示す。矢印ではさまれたCA1からCA3の全長を1とし、<重症度X当該重症度を示す領域のCA1-CA3の全長に占める割合>を重症度1、2、3について求め加算し左右海馬での平均値を虚血性神経細胞死の程度として用いた。

5～10分の間にはほとんどの動物で回旋現象、頸部捻転が発現し、15-20分までの間に痙攣が観察された。なおクリップ閉塞中の死亡率はICRで8%、血流再開通から1週間後までの間の死亡率はC57BLで11%、ICRで33%であった。組織学的検索では虚血に脆弱とされる海馬と線条体に焦点をあてた。海馬ではニッスル染色でCA1領域からCA3領域までを観察し、各セグメントでの組織学的重症度を0：細胞死を認めない、1：10%未満の細胞死を認める、2：10-49%の細胞死を認める、3：50%以上の細胞死を認める、の3段階に分類し、<重症度X当該重症度の占める長さのCA1-CA3全体の長さに占める割合>を各重症度ごとに求め加算し、両側海馬での平均値を求めた（図3）。線条体では抗MAP2抗体を用いた免疫組織化学

染色像で線条体全体の面積のうちMAP2染色の脱落した領域の占める割合を%表示にして求めた（図4）。虚血性神経細胞死の発生頻度はC57BLの海馬、線条体では各々8例中6例と7例に認め、うち5例と6例は両側性であった。ICR、Balb/Cでも8例中6例に海馬及び線条体の神経細胞死がみられたがいずれも一側性であった。C3H, CBA, DDY, DBA2では8例中1-2例に細胞死を認めるのみであった。各系統の虚血20分間の神経スコアと海馬、線条体での虚血病変の重症度を図5に示す。以上の結果からC57BLが両側頚動脈閉塞により最も再現性良く神経症状が観察され、海馬、線条体での神経細胞死の発生頻度も他の系統に比べると一定していた。

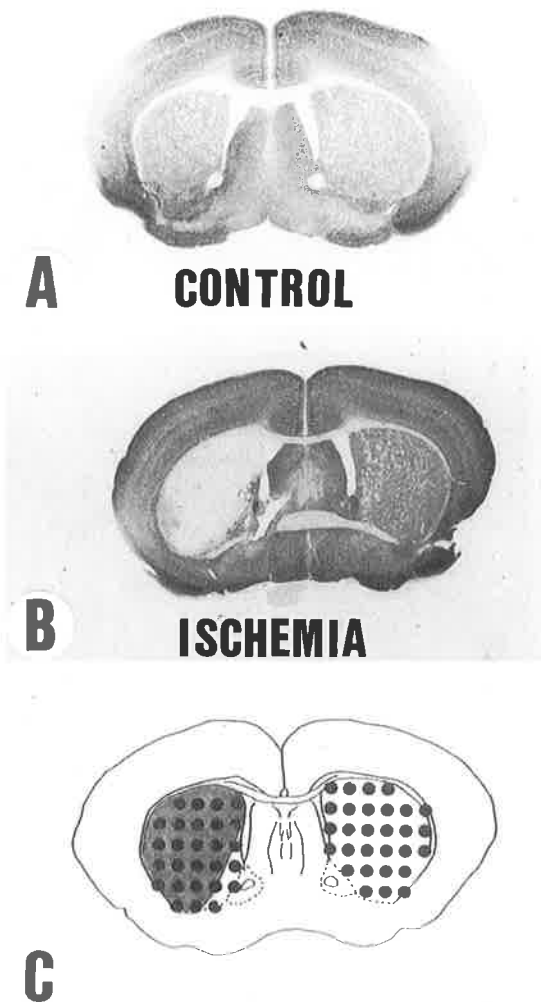


図4：マウス線条体での虚血病変の評価
 A：正常C57BLマウスの抗MAP2抗体を用いた免疫組織化学染色像
 B：20分間の両側総頸動脈閉塞1週間後のC57BLマウスの抗MAP2抗体を用いた免疫組織化学染色像。右線条体にMAP2免疫反応の脱落した虚血病変すなわち神経細胞死を示す領域が認められる。
 C：Bでの線条体の虚血病変の評価法。線条体全体 (::) の面積のうちMAP2免疫反応の脱落した領域 (:::) の占める割合を%表示で求めた。

3. マウス7系統の脳血管構築、両側総頸動脈閉塞による脳血流低下率

両側総頸動脈閉塞による脳虚血発生の有無は主としてウイリス輪での頸動脈系と椎骨脳底動脈系の吻合の程度に依存すると考えられる。そこでマウス7系統でケタミン麻酔下に両側総頸動脈を1分間クリップし閉塞前後の脳血流の変化を頭蓋骨表面においたレーザードプラー血流計にて計測した。その後、深ネブタール麻酔下に開胸し左心室から生理食塩水にて血液を洗い流したのち、ゼラチン加墨汁を注入し脳を取り出し脳底部の血管構築を観察した(文献9)。脳底部での頸動脈系と椎骨脳底動脈系の間の吻合の程度(図6)は以下のように評価した。後大脳動脈と小脳動脈の間に吻合を認めないものを0、吻合の太さが脳底動脈の系の太さに比べ1/3未満のものを1、1/3以上2/3未満のものを2、2/3以上のものを3とし、左右別に評価しその合計を0から6までの7段階に分類した。

両側頸動脈閉塞前後の脳血流低下率はC57BLで最も大きく平均で91%ついでICRの84%、Balb/Cの82%であった。C3H, CBA, DDY, DBA2では70-78%の低下率であった。脳底部の血管構築ではC57BLでは全例で左右のどちらかにのみ脳底動脈径の1/3未満の細い吻合を認めるのみであった。ICR, Balb/Cを含む他の7系統では個体間で吻合の程度にばらつきがみられた(図7)。

4. マウス両側総頸動脈閉塞モデルとラット、砂ネズミ前脳虚血モデルの比較

以上の結果から検討した7系統のマウスのうち、C57BLは両側頸動脈閉塞による神経症状、組織学的虚血病変、血流低下率の面から最も再現性良く前脳虚血を発生し、脳底部での頸動脈系と椎骨脳底動脈系との吻合の不全がその主因と考えられた。ICRやBalb/Cでは脳底部での吻合の程度にばらつきがみられるものの一定の頻度で虚血性神経細胞死が観察された。これら3系統及びこれら系統を遺伝的背景に持つ遺伝子変異マウスでは両側総頸動脈閉塞による選択的神経細胞死の実験系が可能であると考えられる。しかし今回のマウスを用いた検討でみられた神経細胞死の発生様式は、従来ラットや砂ネズミで一過性前脳虚血後にみら

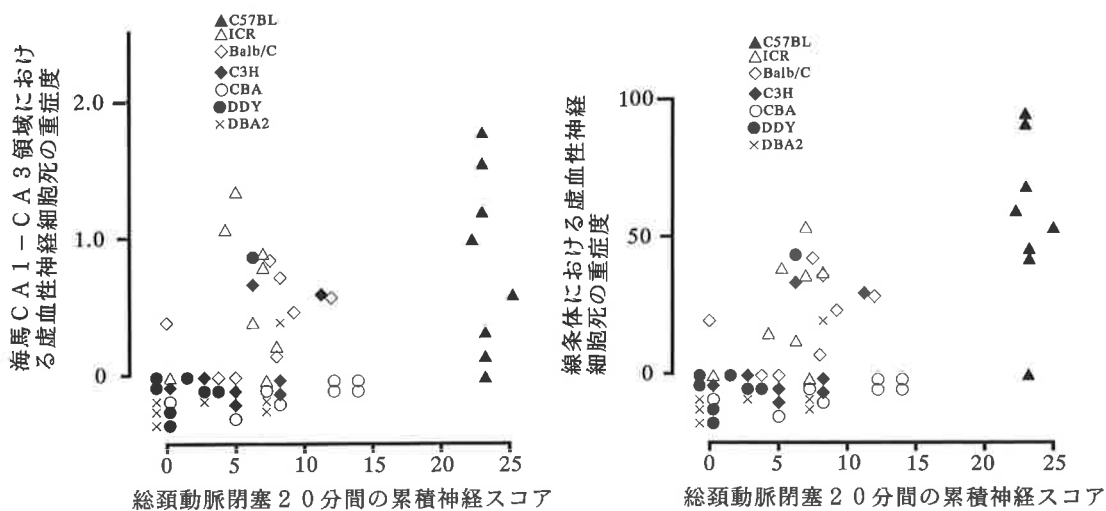


図5：マウス7系統での20分間の一過性総頸動脈閉塞時の累積神経スコアと1週間後の海馬(A)、線条体(B)での虚血性神経細胞死の重症度

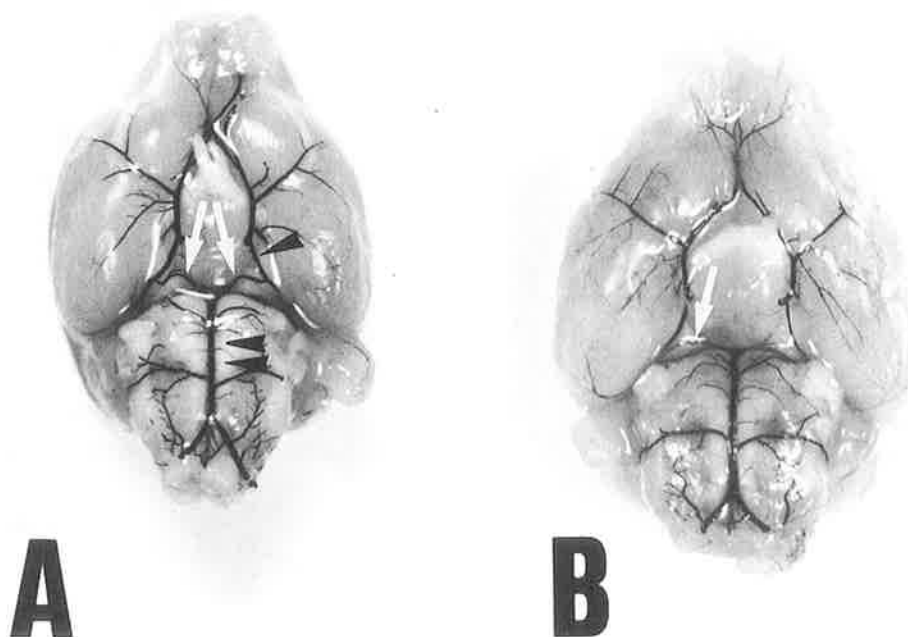


図6：マウス脳底部ウィリス輪での血管構築

A：ICR、B：C57BL。ICRでは後大脳動脈(▼)と脳底動脈(▼▼)の間に左右に脳底動脈径の1/2、2/3程度の径をもった太い吻合(⇩)を認める。Bに示すC57BLでは右の後大脳動脈と上小脳動脈の間に脳底動脈径の1/3未満の細い吻合を認め、左には吻合血管を全く認めない。

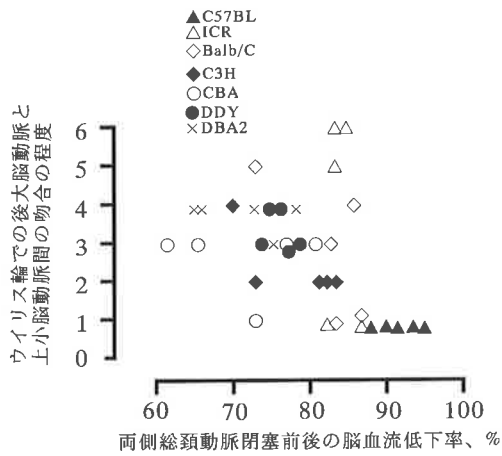


図7：総頸動脈閉塞前後の脳皮質血流低下率と脳底部血管構築の関連。

脳皮質血流は頭蓋骨表面よりレーザードプラー法により測定した。脳底部での血管構築の評価はゼラチン加墨汁を左心室より注入した脳標本(図6)を用いて以下に行った。後大脳動脈と脳底動脈または上小脳動脈との間の吻合血管の径が脳底動脈の2/3以上のものを3、1/3以上2/3未満のものを2、1/3未満であるが検出されるものを1、全く認めない場合を0とし、左右の合計値を吻合の程度として評価した。

れる神経細胞死の発生様式と少し異なる点に留意する必要がある(文献3,6,8)。ラット及び砂ネズミでは海馬CA1領域はCA3領域や線条体よりも虚血に脆弱とされている。しかしマウスではしばしばCA3領域に多数の神経細胞死を認め、線条体にも同様な虚血病変を認めるもののCA1外側部での神経細胞が保たれている例が観察された(図8)。この原因については明らかでない。また両側の頸動脈を閉塞しているにもかかわらず同一個体の左右の海馬、線条体で虚血病変の発現にばらつきがみられる例がラットや砂ネズミに比べ多くみられる(図8)。ほとんどのマウスで前大脳動脈間の吻合はみられるため虚血の程度や脳温が左右脳半球間で異なるとは考えにくく、クリップ解放後の血流再開時の微小循環の状態が左右脳半球で異なる可能性が考えられる。いずれにしてもマウス一過性両側総頸動脈閉塞により発生する神経細胞死がラットや砂ネズミの海馬CA1領域での遅発性神経細胞死と発生機序が同じものかどうかについて今後の検討を要すると思われる。

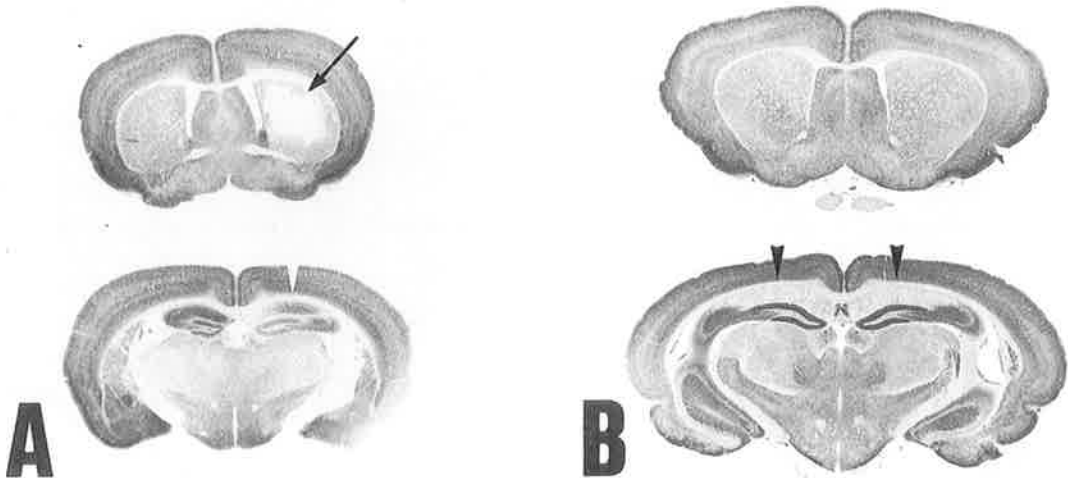


図8：一過性前脳虚血後にマウス(A)と砂ネズミ(B)で見られる選択的神経細胞死の比較

20分間の両側総頸動脈閉塞1週間後のC57BLマウス(A)、及び5分間の両側総頸動脈閉塞1週間後の砂ネズミ(B)の抗MAP2抗体を用いた免疫組織化学染色像。Bに示す砂ネズミでは海馬CA1、CA2領域に限局した免疫反応の脱落を認める。

一方C57BLでは左海馬CA1内側、CA2領域、線条体にMAP2免疫反応の脱落を認めるが、左海馬CA1外側では神経細胞は生存している。このようにマウスではラットや砂ネズミと異なり海馬CA1とくにその外側部は線条体や海馬CA3神経細胞よりも必ずしも虚血に脆弱とはいえない。



まとめ

マウスの両側総頸動脈閉塞モデルとしてはこれまでICR（文献11）、Balb/C（文献12）、C57BL（文献13,14）が評価され、再現性が良いと報告されてきた。本研究では実験動物として最も良く用いられるかあるいは遺伝子変異動物作成の遺伝的背景として良く用いられるマウス7系統を一同に集め両側総頸動脈閉塞による脳虚血発生の頻度を神経症状、組織学的所見、脳血流の面から検討した。マウス7系統の中ではC57BLが最も再現性良く虚血病変を発生し、ついでICR、Balb/Cの順に虚血性神経細胞死が高率に観察された。以上の結果からこれら3系統およびその遺伝的背景を持った遺伝子変異マウスでは両側総頸動脈閉塞による選択的神経細胞死の検討が可能と考えられた。

参考文献

1. Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Chan PH (1991) Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11158-11162
2. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA (1994) Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthetase. *Science* 265: 1883-1885.
3. Kirino T (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239: 57-69
4. Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F (1982) temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11: 491-498
5. Levine S, Sohn D (1969) cerebral ischemia in infant and adult gerbils. *Acta Pathol* 87: 315-317
6. Smith ML, Bendek G, dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjo BK (1984) Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* 69: 385-401.
7. Kawai K, Nitecka L, Ruetzler CA, Nagashima G, Joo F, Mies G, Nowak TSJr, Saito N, Lohr JM, Klatzo I (1992) Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 238-249.
8. Pulsinelli WA, Brierley JB (1979) A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10: 267-272
9. Kitagawa K, Matsumoto M, Handa N, Fukunaga R, Ueda H, Isaka Y, Kimura K, Kamada T (1989) Prediction of stroke-prone gerbils and their cerebral circulation. *Brain Res.* 479: 263-269.
10. Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M, Mikoshiba K, Hata R, Ueda H, handa N, Fukunaga R, Isaka Y, Kimura K, Kamada T (1989) Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage—immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience* 31: 401-411
11. Izumi N, Yasuda H (1983) A convenient cerebral ischemic model using mice. *J cereb Blood Flow Metab* 3: S391-S392
12. Barone FC, Knudsen DJ, Nelson AH, Feuerstein GZ, Willette RN (1993) Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy. *J cereb Blood Flow Metab* 13: 683-692
13. 寺島豊秋、上村喜彦、名村尚彦、菊池晴彦 (1995) C57BL/6マウスにおける一過性前脳虚血モデル。脳循環代謝 7: 157



日本チャールス・リバーからのお知らせ

技術センター業務のご案内

当センターでは定期検査をはじめとする当社の生産動物の品質管理業務を行っております。

定期検査では毎月1回各室各品種ごとに動物の解剖検査を行い、肉眼的に異常の有無を観察するほか、培養検査・血清検査によって微生物モニタリングを行っております。また毎月1回生産各室の落下菌・飲水検査を行い、飼育環境のチェックを合わせて行っております。

これらの自社内定期検査に加え、各生産エリアの動物と採取してある血清を当社の親会社である米国Charles River Laboratories社へ毎年4回送付し、微生物モニタリングを委託しております。米国でモニタリングを実施することにより①日本で入手しにくい抗原が入手できるため、日本で定常的に実施される種類よりもはるかに多くのウィルス検査が可能となっている②自社と異なる検査手法によって血清検査を行い、結果の再確認を行える③自社では設備・要員上実施が難しい検査が可能、といった利点が生れております。

なお、この米国Charles River Laboratories社の微生物モニタリングは、Charles Riverグループ外のお客様からの要請にも応じられる検査の受託業務体制を整えております。

今回の技術センターの移転後も当社の検査体制は従来通り自社と米国の併用となりますが、検査部門を飼育施設から分離したことを機会に社内検査体制を見直し、新たな検査手法の導入への取り組みを行ってゆきたいと考えております。また品質検査以外の業務につきましても、当社生産動物やその周辺に関わる問題点解決に対しても技術水準の向上を図るとともに、実験動物周辺の新事業への取り組みへも力を注いでゆきたいと考えております。

今後とも一層のご支援を賜りますようお願い申し上げます。

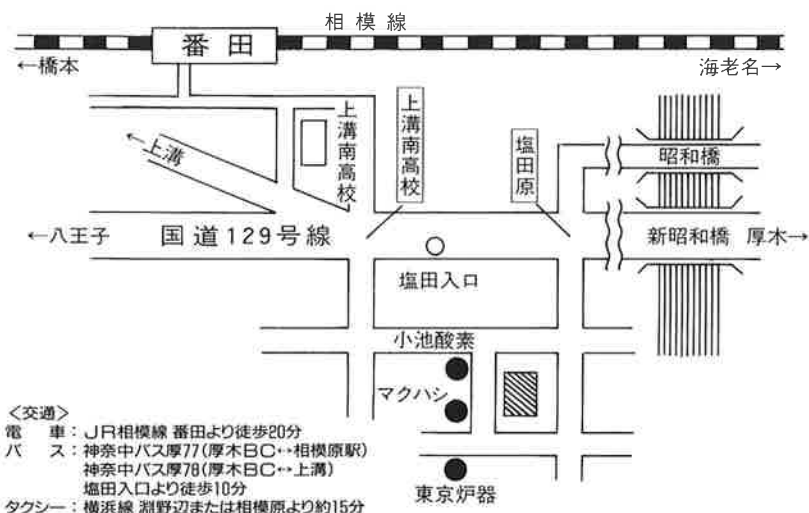
当社技術センターはこのたび従来の厚木飼育センターより
下記に移転いたしましたのでお知らせいたします。

*****技術センター*****

住所 〒229 相模原市田名10210-6

電話 0427-78-6271

FAX 0427-78-6330



<交通>

電 車：JR相模線 番田より徒歩20分
バ ス：神奈中バス厚77(厚木BC⇄相模原駅)
神奈中バス厚78(厚木BC⇄上溝)
塩田入口より徒歩10分
タクシー：横浜線 淵野辺または相模原より約15分

《非売品》

CRJ LETTERS Vol.9 No.1

この小冊子に関するご意見、ご要望を下記までお寄せください。

発行日：平成8年6月1日

発行所：日本チャールス・リバー株式会社

〒222 横浜市港北区新横浜 2-3-8

東伸24 新横浜ビルB-4階

電話 045 (474) 9340

企画・編集：日本チャールス・リバー株式会社

制作：(株)オービックO.A



●弊社の英文社名は **Charles River Japan, Inc.** です。

動物についてのお問合せ、ご注文先

国内飼育動物 ☎045(474)9350 ファックス045(474)9351
輸入動物 ☎045(474)9340 ファックス045(474)9341