

博士論文

脳梗塞後の血管透過性亢進に伴う活性酸素産生
が神経変性およびその機能に及ぼす影響の検討

2021年3月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科
バイオサイエンス専攻
バイオ科学技術研究領域

俣野 泰毅

目次

略語一覧	4	ページ
序論	5	ページ
第1章. 「新規脳梗塞モデルとしての PIT-F モデルの確立」		
I. 緒言	7	ページ
II. 材料と方法	8	ページ
2-1. 動物実験		
2-2. 脳傷害モデル		
2-3. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 染色		
2-4. 灌流固定		
2-5. 凍結包埋・切片作成		
2-6. Hematoxylin-Eosin(HE)染色		
2-7. 傷害サイズ		
2-7-1. 脳表面の傷害面積の測定		
2-7-2. 傷害体積の測定		
2-8. 脳浮腫、実傷害および線条体傷害		
2-8-1. 脳浮腫体積の測定		
2-8-2. 実傷害体積の測定		
2-8-3. 線条体の傷害体積の測定		
2-9. 活性型ミクログリアと活性型アストロサイトの免疫染色		
2-10. 行動評価		
2-10-1. von Frey test		
2-10-2. Balance beam test		
2-10-3. Tail suspension test		
2-11. 統計解析		
III. 結果	14	ページ
3-1. 脳梗塞表面積および傷害体積の経時変化の比較検討		
3-2. 実傷害、脳浮腫および線条体傷害サイズの経時変化の比較検討		

3-3. 脳梗塞傷害周辺部でのミクログリアおよびアストロサイトの活性化	
3-4. 脳梗塞誘導後の 2 系統間での神経機能障害とその経時的な回復	
IV. 考察	17 ページ
V. 図	20 ページ

第 2 章. 「脳梗塞後の血管透過性亢進に伴う Fibrinogen の漏出に起因する活性酸素種の産生と活性酸素が神経変成および神経機能に及ぼす影響の検討」

I. 緒言	31 ページ
II. 材料と方法	32 ページ
2-1. 動物実験	
2-2. 脳梗塞モデル	
2-3. Edaravone および cyclic-RGD の投与	
2-4. ROS 産生と血管透過性亢進の測定	
2-5. 灌流固定・パラフィン包埋	
2-6. 神経細胞と Fbg との免疫染色	
2-7. 大脳実質への Human Fbg の投与	
2-8. 神経細胞樹状突起変成の評価	
2-9. Tail suspension test と傷害サイズ	
2-9-1. Tail suspension test	
2-9-2. 傷害サイズ測定	
2-10. 統計解析	
III. 結果	37 ページ
3-1. 脳梗塞モデルにおける血管透過性亢進および ROS 産生	
3-2. Fbg の漏出が神経細胞に及ぼす影響および ROS 産生への寄与の検討	
3-3. 脳実質における Human Fbg の注入による ROS 産生の検討	
3-4. 脳梗塞に伴う神経細胞樹状突起の変成の検討	
3-5. ROS 産生が運動機能に及ぼす影響の検討	
IV. 考察	40 ページ
4-1. 脳梗塞モデルにおける血管透過性亢進および ROS 産生	
4-2. 脳梗塞に伴う神経細胞樹状突起の変成	

4-3. ROS 産生が運動機能に及ぼす影響

4-4. まとめ

結語43 ページ

V. 図44 ページ

VI. 参考文献54 ページ

VII. 謝辞59 ページ

略語一覧

PIT: Photochemically-Induced Thrombosis
PIT-P: PIT-Parietal lobe
PIT-F: PIT-Frontal lobe
ROS: Reactive Oxygen Species (活性酸素種)
BBB: Blood-Brain Barrier (血液脳関門)
Fbg: Fibrinogen
TTC: 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride
HE: Hematoxylin-Eosin
GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein
MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1
CSPG: Chondroitin Sulfate Proteoglycan (コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)
I/R: Ischemia/Reperfusion (虚血/再灌流)
MCA: Middle Cerebral Artery (中大脳動脈)
MCA-O: MCA occlusion (中大脳動脈閉塞)
EDV: Edaravone
cRGD: cyclic-Arginin-Glycine-Aspartic Acid
DHE: Dihydroethidium
oxDHE: oxidized DHE
MAP2: Microtubule-Associated Protein 2
AIVIA: Artificial Intelligence Visualization Image Analysis

序論

脳卒中とは、脳の血管が詰まる「脳梗塞」と脳の血管が破れて出血する「脳出血・膜下出血」に分類される。脳卒中のうちの虚血性脳梗塞は、脳血管の閉塞に伴う酸素、栄養の欠乏による脳組織の虚血壊死と、それに付随する神経症状を呈する疾患であり、日本における死亡原因の第 3 位である。さらに脳卒中を発症した多くの人に後遺症が残るという問題がある。脳卒中による後遺症は、発症した脳の部位によって言語障害、手足の感覚運動障害、嚥下障害など様々である。

これまで虚血性脳梗塞では様々な動物モデルが確立され、脳梗塞の病態研究に用いられてきた^[1-3]。しかし、既存の脳梗塞モデルでは、マウスの系統、遺伝的背景の異なるトランスジェニックおよびノックアウト動物間において、誘導される脳梗塞の位置や大きさにばらつきがある^[4-8]。また、本研究室の先行研究から、光化学血栓法 (Photochemically-Induced Thrombosis (PIT) 法) によって大脳皮質の視覚野(頭頂葉: the parietal lobe)に虚血性脳梗塞を誘導した PIT-P モデルにおいて、脳梗塞初期の傷害のサイズがその後の修復過程に大きく影響することが明らかとなっている^[5]。したがって、これまでの傷害サイズにばらつきの大きい動物モデルでは、脳梗塞後の脳内における修復過程での組織学的な評価には適していない。さらに、このばらつきによって脳梗塞で傷害を受ける脳領域にもばらつきが生じるため、神経機能への障害の程度や傷害の回復プロセスに影響を与えたと考えられる。

これらの知見から、第 1 章では、脳傷害のサイズや誘導部位の再現性が高く、個体間、系統間での差が非常に小さい PIT モデルを用いて、大脳皮質前頭部(the frontal lobe)の運動野や感覚野に虚血性脳梗塞を誘導し、運動および感覚機能を評価できる新しい脳梗塞モデル(PIT-F)の確立と、遺伝的背景の異なる C57BL/6J マウスと BALB/c マウスにおける傷害の縮小、ミクログリア集積、アストロサイト活性化を含む傷害修復反応と、3 種の行動評価テスト(von Frey test^[9], balance beam test^[10], tail suspension test^[11])によって評価した神経機能障害の経時変化の比較の結果について報告する。

虚血性脳梗塞においては、脳虚血とそれに続く血液の再灌流により神経および血管内皮細胞が活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)を生産し、神経を傷害することで脳梗塞が増悪すると考えられてきた^[12]。ROS とは、生体防御や細胞増殖、細胞死の調節に関わる重要な因子であるが、過剰な ROS の産生は細胞の傷害、過度な細胞増殖、血液脳関門(Blood-Brain Barrier: BBB)の破綻^[13]を誘導し生体に悪影響を及ぼすとされている。BBB は、神経細胞を血液中の有害物質から守るバリアー機構であり、

脳血管内皮細胞間のタイトジャンクションに加えて、アストロサイトとペリサイトから成り立っている。一方、多発性硬化症とアルツハイマー病のマウスモデルにおいて、血管透過性の亢進に起因して血管外に漏出した Fibrinogen(Fbg)が、ミクログリアの細胞膜表面に発現する Fbg レセプターの活性化を介して ROS 産生を誘導し、神経軸索および樹状突起を傷害することが報告された^[8, 14]。この Fbg レセプターは $\alpha M \beta 2$ インテグリン(CD11b/CD18: Mac-1)と同一の分子であり、ビトロネクチンや Fbg などをリガンドとし、ミクログリア、マクロファージ、好中球、NK 細胞などに発現している。また、虚血性脳梗塞においても、傷害周辺部の BBB が破綻し血管透過性が亢進することが知られている^[13]。本研究室においても、PIT-P モデルにおいて、脳傷害周囲の血管透過性の亢進領域は脳梗塞誘導 2 時間後までに急激に拡大し、8 時間後まで拡大が継続するが、24 時間後には 8 時間後の血管透過性の亢進領域よりも縮小していることを大森らが報告している^[15]。

これらの知見から、虚血性脳梗塞誘導後の急性期(8 時間から 24 時間)において血管透過性の亢進を介した ROS の産生によって神経細胞の変成が誘導され、神経機能障害を引き起こす可能性が予想される。第 2 章では、この可能性を検討する目的で、虚血性脳梗塞を PIT-F モデルを用いて誘導し、急性期における血管透過性の亢進に伴う Fbg の漏出と ROS の産生の関連、及び ROS 産生が神経細胞樹状突起の変成と神経機能障害に及ぼす影響を評価した結果を報告する。

第1章

新規脳梗塞モデルとしての PIT-F モデルの確立

I. 緒言

虚血性脳梗塞の動物モデルは様々なものが確立されている^[1-3]が、個体間、C57BL/6J や BALB/c を含む様々な系統間^[4-6]、遺伝的背景の異なるトランスジェニックおよびノックアウト動物間では、誘導される脳梗塞のサイズや部位に比較的大きなばらつきがある^[7, 8]。本研究室では、光化学血栓法 (PIT: Photochemically-Induced Thrombosis) によって傷害サイズや誘導部位の再現性が高く、個体間、系統間での差が非常に小さい虚血性脳梗塞を大脳皮質の視覚野(頭頂葉: the parietal lobe)に誘導するモデル (PIT-P モデル) を確立し、脳梗塞誘導初期のサイズの違いが、その後の修復反応の強さに影響を与えること、すなわち、傷害が大きほど強い反応が得られることを示した^[5]。本知見から、傷害後の修復反応は脳傷害の大きさが同程度の動物間で比較する必要があることが明らかとなり、傷害のサイズや誘導部位のばらつきが比較的大きい既存の脳梗塞モデルは修復過程での研究には適さないことが示された。

一方、PIT-P モデルでは神経機能障害を伴わず、神経機能障害の回復の評価には用いることができない。そこで本研究では、PIT 法を用いて、大脳皮質前頭部(the frontal lobe)の運動野や感覚野に再現性のある傷害を誘導し、運動および感覚機能を評価できる新しい脳梗塞モデル(PIT-F)の確立を行った。さらに PIT-F モデルを用いて、脳梗塞誘導後の傷害修復反応と神経機能障害の変化を C57BL/6J マウスと BALB/c マウスの 2 系統間で比較した。傷害修復反応は傷害サイズ、浮腫、ミクログリアの集積、活性化アストロサイトにより形成されるグリア瘢痕を、組織学的手法を用いて検討した。このうち、活性型ミクログリアは傷害部位を貪食して除去し、虚血性脳梗塞の病態に関与している^[16]こと、活性化アストロサイトによって形成されるグリア瘢痕は、傷害組織からの有害因子から正常な脳組織を保護するための「壁」として機能している^[17]ことが知られている。さらに、神経機能障害を von Frey test^[9]、Balance beam test^[10]、Tail suspension test^[11]の 3 種類の行動評価テストを用いて 2 系統間で比較した。

II. 材料と方法

2-1. 動物実験

全ての動物実験は「長浜バイオ大学実験附属施設規定」および The ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) Guidelines (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>)に従って行った。実験には体重が 25-34 g、週齢が 12-16 週の C57BL/6JJcl および BALB/c (CLEA Japan, Tokyo, Japan)のオスを使用した。各実験に用いた動物の数は結果の図に記載した。

2-2. 脳傷害モデル

脳傷害は PIT 法を用いて誘導した。麻酔は 100%酸素下でイソフルランを用い、5%で導入し 2%で手術を行った。また手術中はマウスを 37°Cのヒートパッドの上で維持した。麻酔下でマウスを仰向けに寝かせ、頸部の皮膚を切開し、頸静脈からカテーテルを挿入した。次にマウスをうつ伏せにし、頭皮をメスで切開した。bregma から lambda へ 0 mm、正中線から左側へ 3 mm の大脳皮質運動野感覚野および統合野の一部を含む位置 (Fig. 1B) に直径 1 mm のプローブ (HAMAMATSU Photonics, Shizuoka, Japan) をセットして 540 nm の波長の緑色光を 27200 ルクスで 10 分間光照射した (Fig. 1A)。照射と同時に、20 mg/kg のローズベンガル (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) をカテーテルより注入した。ローズベンガルは光照射により励起され、血中の酸素より一重項酸素を生成する。この一重項酸素が血管内皮細胞を傷害することで血栓が誘導される (Fig. 1C)。照射終了後、カテーテルを抜き取り、切開した頭皮と頸部の皮膚を縫合し、麻酔から覚醒させた。

2-3. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 染色

本モデルによって誘導される虚血性傷害の領域は、2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC; Sigma Aldrich, USA) 染色によって評価した。C57BL/6J および BALB/c マウスに脳梗塞誘導後 1 日目で 200 mg/kg のセコバルビタールナトリウム溶液 (Nichi-Iko Pharmaceutical Company, Toyama, Japan) の腹腔内投与による深麻酔を誘導し、約 10 mL の生理食塩水を心臓から灌流した後、生理食塩水で希釈した 2% TTC 溶液を心臓から約 10 mL 灌流し、速やかに全脳を摘出した。脳梗塞が誘導された C57BL/6J (Fig. 2A) および BALB/c (Fig. 2B) マウスでの左脳側の大脳表面を 45° の角度から撮影した。その後、ブレインスライサー (BrainScience idea Corp., Osaka, Japan)

を用いて 1 mm 間隔で大脳の冠状断面を作成し^[8]、37°Cのインキュベーター内で 2% TTC 溶液で 15 分間反応させ、C57BL/6J(Fig. 2C)および BALB/c(Fig. 2D)マウスでの各冠状断面を撮影した(Fig. 2C, D)。

2-4. 灌流固定

脳梗塞誘導後 1、4、7、14、21 日でのマウスの体重を測定後、200 mg/kg のセコバルビタールナトリウム溶液を腹腔内投与し深麻酔を誘導した。麻酔後、約 10 mL の生理食塩水を心臓から灌流した後、約 10 mL の 4%パラホルムアルデヒド溶液(0.1M リン酸バッファー pH7.4)で灌流固定を行った。その後、全脳を取り出し、左脳側の脳表面を 45° の角度から撮影した後、4%パラホルムアルデヒド溶液で後固定を一晩行った。

2-5. 凍結包埋・切片作成

凍結ブロックの作成には、4%パラホルムアルデヒド溶液による後固定の後、20%スクロース溶液で一晩置換し、液体窒素を用いて O.C.T. compound(Sakura Finetec, Tokyo, Japan)に包埋し、-80°Cのフリーザーで一晩保存した。その後、クリオスタット(CM3050 S; LEICA, Germany)を用いて、傷害吻側(①)、傷害中央(②)、傷害尾側(③)の 3 点を 1 mm 間隔で厚さ 8 μ m の凍結切片を作成した。

2-6. Hematoxylin-Eosin(HE)染色

脳梗塞誘導後 1、4、7、14、21 日でのマウスの脳の凍結切片を Hematoxylin 溶液で 30 秒間染色した後、約 40-50°Cの流水で 15 分間色出しを行なった。その後、一部の切片は Eosin 溶液で 2 分間染色した後、95%エタノールで色出しを行なった。80%エタノール、95%エタノール、100%エタノールに 2 回、代替キシレンに 3 回をそれぞれ 2 分の透徹を行った後、PARA mountTM-N(FALMA, Tokyo, Japan)を用いて封入した。

2-7. 傷害サイズ

2-7-1. 脳表面の傷害面積の測定

脳梗塞誘導後 1、4、7、14、21 日での C57BL/6J および BALB/c マウスの灌流固定後の脳を方眼紙上にて撮影し、傷害領域を画像解析ソフト ImageJ(National Institutes of Health, USA)を用いて測定した(Fig. 3C)。方眼紙の 10 mm \times 5 mm の面積を基準として、以下の式で傷害面積を算出した。

$$\text{傷害面積(mm}^2\text{)} = \frac{\text{傷害領域のピクセル数}}{10 \text{ mm} \times 5 \text{ mm のピクセル数}} \times 50$$

2-7-2. 傷害体積の測定

脳梗塞誘導後 1、4、7、14、21 日での C57BL/6J および BALB/c マウスの Hematoxylin 染色後の各点(2-5 の①-③)の切片を方眼紙上にて撮影し、傷害領域のサイズを、画像解析ソフト ImageJ を用いて測定した(Fig. 3A)。方眼紙の 10 mm × 5 mm の面積を基準として、2-7-1 の式で各点の傷害面積を算出し、以下の式で傷害体積を算出した。

$$\text{傷害体積(mm}^3\text{)} = (\text{①} + \text{②} + \text{③})(\text{mm}^2) \times 1 \text{ (mm)}$$

さらに、脳表面の傷害面積と傷害体積の相関係数 (R^2) を MS Excel (Microsoft, Washington, USA) を用いて算出した。

2-8. 脳浮腫、実傷害および線条体傷害

2-8-1. 脳浮腫体積の測定

脳梗塞誘導後 1、4、7 日での C57BL/6J (Fig. 4A) および BALB/c (Fig. 4B) マウスの HE 染色後の各点(2-5 の①-③)の切片を方眼紙と共に撮影した。この切片を傷害部位(X)、傷害同側の正常部位(Y)、傷害対側(Z)の 3 領域に区分けし(Fig. 4C)、それぞれの領域の面積を 2-7-1 の式を用いて算出し、以下の式で脳浮腫体積を算出した^[18]。

$$\text{脳浮腫体積(mm}^3\text{)} = \{(X + Y) - Z\} (\text{mm}^2) \times 1 \text{ (mm)}$$

2-8-2. 実傷害体積の測定

脳梗塞誘導後 1、4、7 日での C57BL/6J および BALB/c マウスにおいて、各点(2-5 の①-③)の切片でそれぞれの領域の面積を 2-7-1 の式を用いて算出し、傷害対側(Z)と傷害同側の正常部位(Y)の差から実傷害領域を算出した(Fig. 4C)。

$$\text{実傷害体積(mm}^3\text{)} = (Z - Y (\text{mm}^2)) \times 1(\text{mm})]$$

2-8-3. 線条体の傷害体積の測定

脳梗塞誘導後 1、4、7 日での C57BL/6J および BALB/c マウスにおいて、各点(2-5 の①-③)の切片でそれぞれの線条体の傷害領域の面積を 2-7-1 の式を用いて算出し、以下の式で線条体の傷害体積を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{線条体の傷害体積(mm}^3\text{)} \\ & = (\text{線条体の傷害面積 (① + ② + ③)})(\text{mm}^2) \times 1 \text{ (mm)} \end{aligned}$$

2-9. 活性型ミクログリアと活性型アストロサイトの免疫染色

マウスの脳より凍結切片を作成し、活性型ミクログリアのマーカーである F4/80 と活性型アストロサイトのマーカーである GFAP (Glial fibrillary acidic protein)の局在を免疫組織化学法により評価した。

脳梗塞誘導後 7、14、21 日目の C57BL/6J および BALB/c マウスの凍結脳よりクリオスタット(CM3050 S; LEICA, Germany)を用いて 8 μm の凍結切片を作製した。その後、Methanol/H₂O₂ 処理によって内因性の Peroxidase を不活性化させ、免疫染色を行った。活性型ミクログリアは抗 F4/80 抗体(Abcam, Tokyo, Japan)を、活性型アストロサイトは抗 GFAP 抗体(Diagnostic Biosystems, USA)を一次抗体に用いた。その後、ペルオキシダーゼが結合した適切な二次抗体で処理し、ペルオキシダーゼ活性を蛍光色素標識チラミド(Cy3 または FITC; PerkinElmer, USA)で可視化した。対比染色として VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI(Vector Laboratories, USA)で核酸染色および封入を行った。その後、落射蛍光顕微鏡(BX53; OLYMPUS, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

その後、F4/80 は ImageJ で傷害周囲の陽性層の厚さを 3 か所測定し、その平均を陽性層の厚さとした。また GFAP は大脳皮質での陽性層を 3 か所測定し、その平均を陽性層の厚さとした。

2-10. 行動評価

PIT-F モデルで運動野、感覚野および線条体の一部に脳梗塞を誘導した C57BL/6J および BALB/c マウスで脳梗塞誘導前(Pre)と脳梗塞誘導後 1、2、5、7、14、21 日目における運動感覚機能を von Frey test^[9]、Balance beam test^[10]、Tail suspension test^[11]を用いて評価した。

2-10-1. von Frey test

脳梗塞を誘導したマウスを間隔 2.0 mm の格子の網(8 cm×8 cm)の上に乗せ、感覚刺激の強さの違うフィラメント(0.008, 0.02, 0.04 or 0.07 g/cm²)であみ越しに足の裏に刺激を与えた。細いフィラメントから開始し、反応がなければ徐々にフィラメント径を太くしていき、刺激に反応を示した閾値を測定値とした。

2-10-2. Balance beam test

脳梗塞を誘導したマウスを、幅 2.5 cm 横の長さ 30 cm の一本橋の端に乗せ反対側まで歩かせる。その歩行を 3 回行い、脳傷害の対側にあたる右側の前肢と後肢の踏み外し回数を各々測定した。なお、脳梗塞誘導後 1 日目のマウスは自発的な歩行を示さなかったため、評価を行わなかった。

2-10-3. Tail suspension test

マウスの尾を持ち、高さ 20 cm の位置で 1 分間ぶら下げ、傷害同側と対側に体を反らせた秒数および回数をそれぞれ測定し、傷害同側に反らした時間および回数の割合を計算した。時間および回数の割合はそれぞれ以下の式で算出した。

$$\text{傷害同側に反らした時間の割合(\%)} = \frac{\text{傷害同側に反った時間}}{(\text{傷害同側に反った時間}) + (\text{傷害対側に反った時間})} \times 100$$

$$\text{傷害同側に反らした回数の割合(\%)} = \frac{\text{傷害同側に反った回数}}{(\text{傷害同側に反った回数}) + (\text{傷害対側に反った回数})} \times 100$$

2-11. 統計解析

傷害の表面積、傷害体積、脳浮腫、実傷害および線条体の傷害については、C57BL/6J および BALB/c マウスの 2 系統の群内の差の検定は One-way ANOVA を用い、脳梗塞誘導後の各時間での群間の差は Student's T-test を用いた。

傷害体積と表面積の相関については、MS Excel を用いて一次相関関数と相関係数 (R²) 値を算出した。

免疫染色による F4/80 陽性の活性型ミクログリア層および活性型アストロサイト層の幅については、C57BL/6J および BALB/c マウスの 2 系統間の差について Student's T-test を用いた。

各行動評価についても、2 系統の群内の差は One-way ANOVA を用い、脳梗塞誘導後の各時間での群間の差は Student's t-test を用いた。

検定の結果、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

III. 結果

3-1. 脳梗塞表面積および傷害体積の経時変化の比較検討

PIT-F モデルでは、C57BL/6J マウス(Fig. 2A)、BALB/c マウス(Fig. 2B)において運動野の一部、感覚野、連合野を含む大脳皮質の前頭葉および線条体の一部に傷害が誘導された^[19]。また、C57BL/6J マウスと BALB/c マウスで傷害の大きさと分布を比較したところ、ほぼ同じ部位に傷害が誘導されていた(Fig. 2C, D)。

PIT-F モデルを用いて C57BL/6J と BALB/c マウスに脳梗塞を誘導し、傷害誘導後 1、4、7、14、21 日目において脳切片から算出した傷害体積(Fig. 3A)と脳表面の傷害面積(Fig. 3C)を比較検討した。その結果、誘導された脳梗塞の傷害体積および脳表面の傷害面積は脳梗塞誘導後 1 日目において C57BL/6J と BALB/c マウスの 2 系統間で同程度であった(Fig. 3B, D)。その後、両系統とも 21 日目まで経時的に傷害体積および面積が縮小していた(Fig. 3A-D)。一方で、傷害の縮小の程度は両系統で異なっており、BALB/c マウスでは、C57BL/6J マウスよりも 4、14、21 日目に傷害体積(Fig. 3A, B)および面積(Fig. 3C, D)が有意に小さかったが、7 日目においては両系統で傷害体積および面積に差は認められなかった(Fig. 3A-D)。また、両系統において傷害体積と脳表面の傷害面積の相関関係を評価すると、C57BL/6J マウス(Fig. 3E、 $R^2=0.916$)および BALB/c マウス(Fig. 3F、 $R^2=0.931$)のいずれにおいても高い相関性が認められた。

3-2. 実傷害、脳浮腫および線条体傷害サイズの経時変化の比較検討

PIT-F モデルを用いて C57BL/6J と BALB/c マウスに脳梗塞を誘導し、傷害誘導後 1、4、7 日目における脳梗塞の実傷害サイズ、脳浮腫および線条体の傷害サイズを脳切片の HE 染色の結果から評価・比較を行なった(Fig. 4A, B)。HE 染色後の脳切片において、傷害部位(X)、傷害同側の正常部位(Y)、傷害対側(Z)の 3 領域に区分し(Fig. 4C)、実傷害サイズを $Z-Y$ 、脳浮腫を $(X+Y)-Z$ から算出し、線条体の傷害サイズは X における線条体領域を測定した。

その結果、実傷害サイズは両系統とも脳梗塞誘導後 7 日目まで変化しなかった(Fig. 4D)。一方、脳梗塞誘導後 1 日目において傷害対側半球と比較すると傷害同側で顕著な浮腫が両系統で認められた(Fig. 4E)。この脳浮腫は脳梗塞誘導後 7 日目まで縮小し、7 日目ではほぼ消失した(Fig. 4E)。脳浮腫の縮小は、傷害誘導後 1 日目から 4 日目までは C57BL/6J マウスよりも BALB/c マウスの方が顕著であったのに対し、4 日目

から 7 日目までは同程度であった(Fig. 4E)。また、線条体では、脳梗塞誘導後 1 日目において両系統で同程度の傷害が誘導され、その後 7 日目まで傷害は縮小したが、系統間での傷害縮小の差は認められなかった(Fig. 4F)。

3-3. 脳梗塞傷害周辺部でのミクログリアおよびアストロサイトの活性化

次に、脳梗塞誘導後 7、14、21 日目の凍結切片において抗 F4/80 抗体による免疫染色法でミクログリアの集積を、また抗 GFAP 抗体による免疫染色法でアストロサイトの活性化を評価した。

抗 F4/80 抗体による活性型ミクログリアの免疫染色の結果から、両系統において脳梗塞誘導後 7 日目で、傷害周辺部で F4/80 陽性の活性型ミクログリアの集積が認められた(Fig. 5B)。この結果は先行研究の結果と一致する^[5]。また、傷害誘導後 7 日目において C57BL/6J マウスでは、BALB/c マウスと比較してミクログリア集積層の厚さが有意に薄かった(Fig. 5C)。一方で、傷害誘導後 14、21 日目においては、両系統で F4/80 陽性細胞が傷害内部に広く分布していたため、厚さの測定は行わなかった(Fig. 5B)。

また、抗 GFAP 抗体による活性型アストロサイトの免疫染色の結果から、両系統で脳梗塞誘導後 7 日目において、GFAP 陽性のアストロサイトが傷害周辺部でグリア瘢痕を形成しており(Fig. 6B)、この結果は先行研究の結果と一致する^[5]。また、白質部における GFAP 陽性反応は傷害誘導後 21 日目まで継続して顕著に認められた(Fig. 6B: 矢印)のに対して、大脳皮質での GFAP 陽性層は脳梗塞誘導後 7 日目において両系統で顕著に認められ、その後 21 日目までに経時的に減少した(Fig. 6B, C)。また、脳梗塞誘導後 7 日目における大脳皮質での GFAP 陽性のアストロサイト層の厚さは、C57BL/6J マウスが BALB/c マウスよりも厚くなる傾向 ($p=0.059$) が見られたが、14、21 日目では 2 系統間で同程度の厚さであった(Fig. 6C)。

3-4. 脳梗塞誘導後の 2 系統間での神経機能障害とその経時的な回復

C57BL/6J と BALB/c マウスにおける、脳梗塞誘導 1、2、5、7、14、21 日目での感覚・運動機能障害および時間経過に伴う神経機能障害の回復を、von Frey test^[9]、Balance beam test^[10]、Tail suspension test^[11]の 3 種類の行動評価テストを用いて評価した。

感覚機能を評価する von Frey test の結果から、両系統とも脳梗塞誘導前(Pre)と比較して、傷害対側の後肢で脳梗塞誘導後 5 日目まで有意な感覚閾値の上昇を認めた

が、7 日目には正常値まで回復した。この感覚閾値の上昇は、BALB/c マウスよりも C57BL/6J マウスで顕著に認められた (Fig. 7A)。一方で、傷害同側の後肢では脳梗塞誘導後 21 日目までで、両系統で Pre 値との差が認められなかった (データ未表示)。

傷害対側の前・後肢の運動機能と感覚機能を評価する Balance beam test の結果から、両系統とも Pre 値と比較して脳梗塞誘導後に対側前・後肢ともに踏み外し回数の増加が認められたが、21 日目までの時間経過に伴って踏み外し回数が減少した (Fig. 7B)。傷害誘導後 1 日目では、手術の影響に伴うマウスの自発運動量の低下が顕著に認められたため、Balance beam test を行わなかった。C57BL/6J マウスにおける踏み外し回数は Pre 値と比較して、前肢では傷害誘導後 2 日目と 5 日目、後肢では 2、7、14、21 日目に有意な増加を認めたのに対し、BALB/c マウスにおける踏み外し回数は Pre 値と比較して、前肢では傷害誘導後 7 日目、後肢では 2、5、7 日目にのみ有意な増加にとどまった (Fig. 7B)。

左右の体の運動機能のバランスを評価する Tail suspension test の結果から、両系統とも Pre 値と比較して、脳梗塞誘導後 1 日目において体を振った時間および頻度の傷害対側への有意な偏向が認められた (Fig. 7C)。この傷害対側への偏向は、C57BL/6J マウスでは傷害誘導後 21 日目まで継続して認められたが、BALB/c マウスでは 2 日目には傷害対側への偏向は消失した (Fig. 7C)。特に、脳梗塞誘導後 21 日目においては、BALB/c マウスに対して C57BL/6J マウスの傷害同側へ体を振った時間は有意に長かった (Fig. 7C)。

IV. 考察

脳梗塞後の神経機能障害と関連した多くの動物モデルが確立されているが、その多くは慢性期での脳梗塞病態に比較的大きなばらつきが認められる^[1-3]。本研究室の先行研究では、脳梗塞の初期傷害の大きさがその後の修復反応の誘導に影響を与えること^[5]を認めており、脳梗塞初期において変化の大きい脳梗塞モデルは傷害誘導後の病理学的な反応を研究するには適さないことを明らかにしている。一方、PIT-FモデルはPIT-Pモデルと同様に、個体や系統差によらず再現性の高い脳梗塞を誘導するうえ、神経機能障害を伴っていた。また、本モデルにおいて脳浮腫、ミクログリアの集積、アストロサイトの活性化などの脳梗塞後の病理学的な反応も他の脳梗塞モデルと同様に認められることを確認した。したがって、本モデルは、脳梗塞後の病理学的反応に加えて神経機能障害の回復との関係を研究するのに適していると考えられる。

本モデルにおいて脳梗塞誘導後 1、4、7、14、21 日目において脳切片から算出した傷害体積(Fig. 3A)と脳表面の傷害面積(Fig. 3C)の相関を比較した結果、C57BL/6JとBALB/c マウスの両系統において高い相関が認められた。したがって、PIT モデルでは脳表面の傷害面積から傷害の大きさを評価することが可能である。この高い相関は、PIT モデルでは脳梗塞が光化学反応によって光が到達した領域のみに誘導されていることに起因すると考えられる。

C57BL/6J と BALB/c マウスにおいて、脳梗塞誘導後の傷害サイズの経時的な縮小は、初期の傷害サイズが同程度であっても異なることが明らかになった(Fig. 3A-D)。この傷害の縮小の差は、今回が初めて明らかとなった系統間の差である。脳浮腫の縮小は脳梗塞誘導後 7 日目まで両系統で認められ、1 日目から 4 日目までは C57BL/6J マウスよりも BALB/c マウスの方が顕著であった(Fig. 4E)。このことから傷害の縮小の系統差のうち 7 日までの差は浮腫の減少の差に起因すると考えられる。C57BL/6J マウスでは BALB/c マウスよりも脳血流量が少ないことが報告されていることから^[20]、BALB/c マウスよりも C57BL/6J マウスの方が浮腫の縮小が遅いのは、血流による浮腫部位の細胞内液・細胞間液のクリアランスが C57BL/6J マウスで少ないことに起因する可能性が考えられる。

次に、傷害後の病理学的反応を評価する目的で、ミクログリアの集積とアストロサイトの活性化を脳梗塞誘導後 7、14、21 日目に評価した。抗 F4/80 抗体でミクログリアの集積を評価した結果、脳梗塞誘導後 7 日目での C57BL/6J マウスは BALB/c マウスに対して F4/80 陽性の活性化型ミクログリアからなる顆粒層が薄くなっていた(Fig. 5C)。

活性型ミクログリアによる傷害部位の貪食が虚血性脳梗塞の病態軽減に関与していることから^[16]、C57BL/6J マウスでは脳梗塞誘導後 7 日目以降、BALB/c マウスに対して傷害部位への活性型ミクログリアの集積が少ないことが傷害縮小の遅延の原因と考えられる。また、虚血性脳梗塞後のミクログリアの集積に寄与するメカニズムの1つとして、マクロファージの Chemoattractant protein-1 (MCP-1) による制御が報告されていること^[21]から、C57BL/6J マウスでは傷害後の MCP-1 の誘導が BALB/c マウスに比べて低い可能性が考えられる。

また、脳梗塞誘導後 7、14、21 日目の凍結切片において抗 GFAP 抗体でアストロサイトの活性化を免疫染色法で評価した(Fig. 6)結果、GFAP 陽性の活性化アストロサイトで構成されるグリア瘢痕層は、脳梗塞誘導後 7 日目には C57BL/6J マウスで BALB/c マウスよりも厚くなる傾向 (Fig. 6C: $p=0.059$) が認められた。このグリア瘢痕は、傷害組織からの有害因子から正常な脳組織を保護するための「壁」として機能している^[17]。また、アストロサイトの活性化には Transforming growth factor、Ciliary neurotrophic factor、Interleukin-6、Leukemia inhibitory factor、Oncostatin M などのシグナル伝達分子が寄与することが知られている^[22]。このことから、これらの分子種の誘導量の違いが系統間でのアストロサイトの活性化の違いにつながっている可能性が考えられる。

脳梗塞誘導後の神経機能障害のうち、感覚機能を von Frey test^[9]、運動機能を Balance beam test^[10]および Tail suspension test^[11]の 3 種類の行動評価テストを用いて評価した結果(Fig. 7)、傷害誘導後 1 日目で、これらの行動評価テストで評価できる運動・感覚機能の神経機能障害が両系統で認められ、本モデルが虚血性脳梗塞後の神経機能障害を評価するのに有用であることが明らかとなった。さらに、これの神経機能障害では傷害誘導 21 日目までに経時的な回復が認められた。神経機能障害の原因としては、神経細胞の機能低下に伴う障害と神経細胞の消失に伴う障害の 2 つが考えられる。前者は傷害された神経細胞の修復により回復すると予想される。また、傷害部位の浮腫は周囲の脳組織を圧迫し、神経細胞に障害を与えるため^[23]、脳浮腫の縮小により神経機能障害が回復する可能性が高い。本モデルにおいて、脳浮腫は脳梗塞誘導後 7 日目までにほぼ消失していたこと(Fig. 4E)から、7 日目までの神経機能障害の回復は脳浮腫の縮小と関連している可能性が考えられる。一方、後者は神経細胞再生または神経ネットワークの再構築によって回復すると予想される。神経細胞の再生は脳梗塞発症から 3 週間後に顕著になる^[24]ことから、本モデルでは神経ネットワーク再構築が主に神経機能障害の回復に起因していると考えられる。神経機能障害を回復する神経ネットワークの再構築は、脳梗塞部位の近傍だけではなく、脊髄を

含む傷害から離れた部位でも起こることが報告されている^[25]。しかし、脳の各部位で起こると予想される神経ネットワークの再構築のそれぞれが、神経機能障害の回復にどの程度寄与しているのかは明らかになっていない。この理由の1つは、既存の脳梗塞モデルでは比較的ばらつきが大きいため、虚血性脳梗塞後の病理学的反応のばらつきが大きく、これらの関与を解析することが困難なためである。誘導される脳梗塞のばらつきが小さい本モデルを用いて、傷害の修復や神経ネットワークの再生が神経機能障害の回復に関与する程度を評価することが可能であり、また、脳梗塞慢性期でのリハビリテーションの効果を評価することも可能であると考ええる。

傷害の修復反応同様、神経機能障害の回復には系統間で差があり、BALB/c マウスに比べて C57BL/6J マウスの方が神経機能障害が顕著であった。このことから、遺伝的背景の異なるトランスジェニックやノックアウトマウスで神経機能障害の回復を評価する際には、系統間に認められるような遺伝的背景の違いに起因する影響を考慮する必要があることが示唆される。この系統差の原因として、大脳皮質前頭葉内での運動野、感覚野の部位が系統間で異なり、同程度の傷害を誘導しても、傷害の誘導される脳領域が異なることで機能障害に差が生じる可能性が考えられる。運動野、感覚野の分布の比較は今後の課題である。もう1つの可能性としては、神経機能障害の回復反応の程度が系統間で異なることが考えられる。前述のとおり、脳浮腫の縮小は、脳梗塞誘導後1日目から4日目まではC57BL/6J マウスよりもBALB/c マウスで顕著であった (Fig. 4E)。脳浮腫による周囲の圧迫が神経機能障害を誘導する^[23]とを考えると、C57BL/6J での浮腫減少の遅延が7日までの神経機能回復の遅延に寄与する可能性が考えられる。また、F4/80 陽性の活性型ミクログリア集積は、7日目にはC57BL/6J マウスよりもBALB/c マウスの方が顕著であった (Fig. 5C)。ミクログリアが神経細胞の可塑性を加速させる^[26]ことを考えると、BALB/c マウスでのより顕著な活性型ミクログリアの集積が、神経機能障害の回復に促進している可能性が考えられる。また、傷害周辺部でのGFAP 陽性の活性化アストロサイトの層はC57BL/6J マウスに比べてBALB/c マウスで薄くなる傾向を示した。活性化アストロサイトは軸索伸長抑制因子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG) を分泌する^[27] ことから、C57BL/6J マウスはBALB/c マウスよりもアストロサイトの活性化に伴うCSPGの分泌が多く、神経機能障害を改善するための神経ネットワークの再構築を遅延する可能性が考えられる。これらの可能性の検討には、PIT-F モデルを用いたさらなる研究が必要である。

V. 図

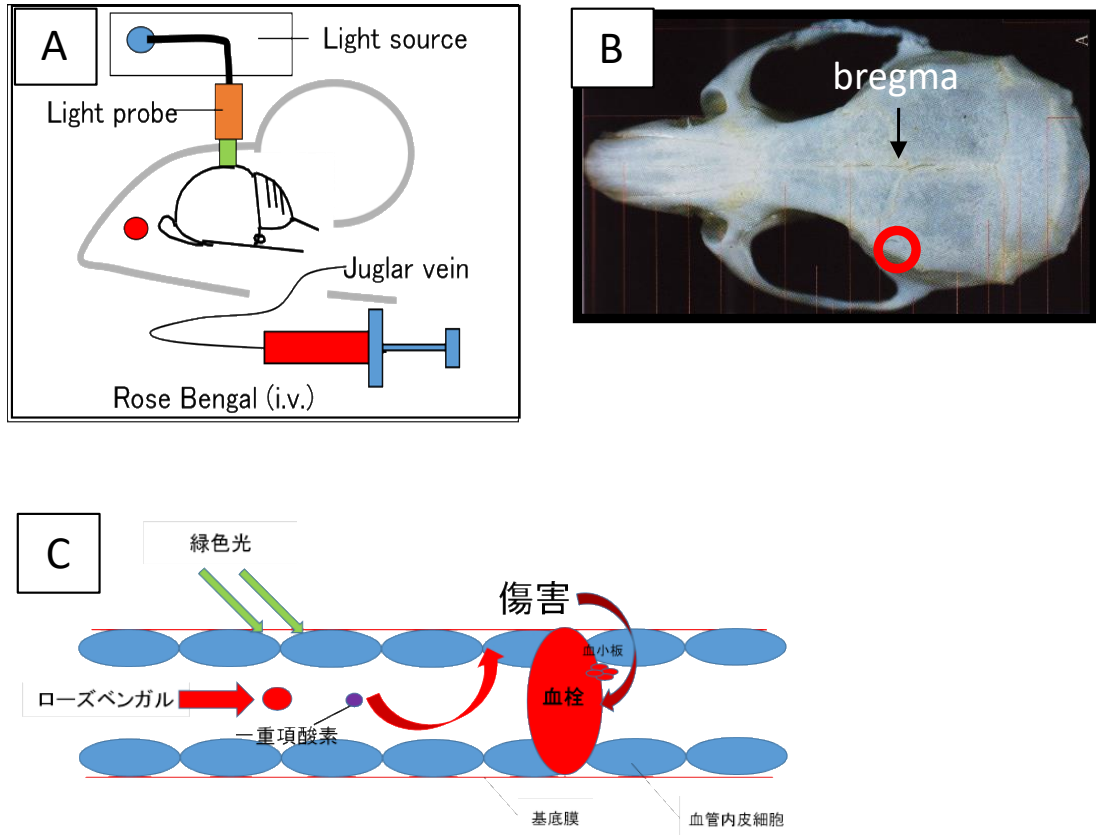


Fig. 1 Photochemically-induced thrombosis - Frontal lobe (PIT-F)モデル

A: PIT-F モデルの概要図。鎖骨下静脈に挿入したカテーテルよりローズベンガルを投与するとともに、脳局所に 1 mm の緑色光を照射する。

B: ○ はマウス頭蓋骨上での光照射部位を示す。頭蓋骨三点縫合の bregma から左脳側へ 3 mm の位置に光を照射した。

C: PIT 法による血管閉塞の誘導のメカニズム。ローズベンガルは緑色光照射により励起され、血中の酸素より一重項酸素を生成し、この一重項酸素が血管内皮細胞を傷害することで血栓が誘導され、血管が閉塞する。

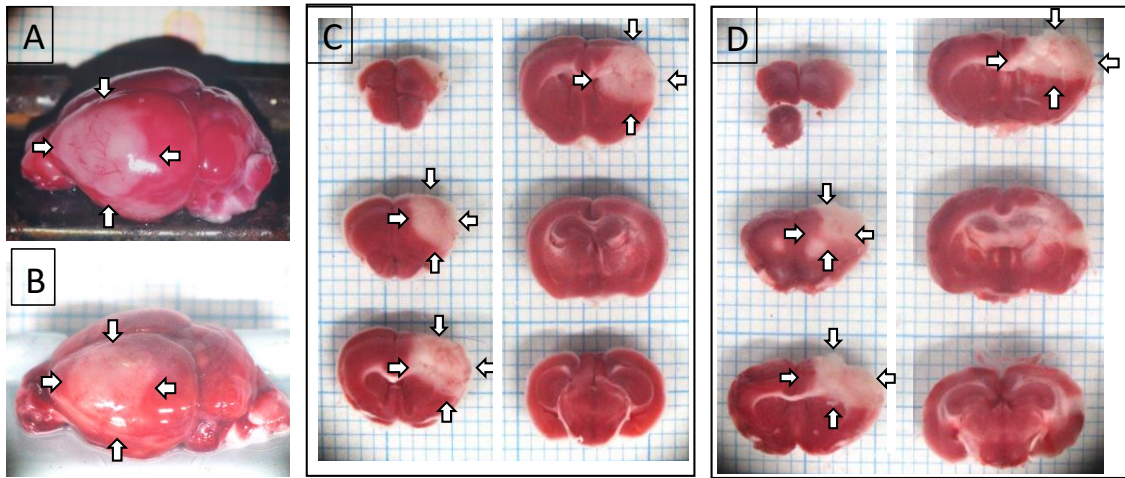


Fig. 2 PIT-F モデルにおける C57BL/6J と BALB/c マウスでの脳傷害領域

A: C57BL/6J マウスでの脳梗塞誘導後 1 日目における脳表面の TTC 染色像。B: BALB/c マウスでの脳梗塞誘導後 1 日目における脳表面の TTC 染色像。C: C57BL/6J マウスで厚さ 1 mm に作成した大脳冠状切片の TTC 染色像。D: BALB/c マウスで厚さ 1 mm に作成した大脳冠状切片の TTC 染色像。両系統において PIT-F モデルでは、大脳運動野、感覚野および統合野の一部を含む領域に同程度の脳梗塞が誘導された。

矢印で囲まれた白色の領域が傷害部位を、赤褐色の領域が正常部位を示す。

方眼紙の 1 マス: 1 mm × 1 mm。

使用したマウスの数、C57BL/6J: n=4 (脳表面: n=2, 脳冠状断面: n=2), BALB/c: n=4 (脳表面: n=2, 脳冠状断面: n=2)

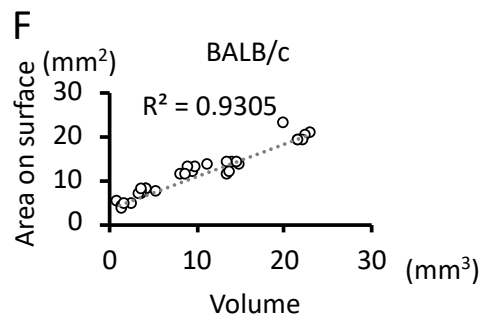
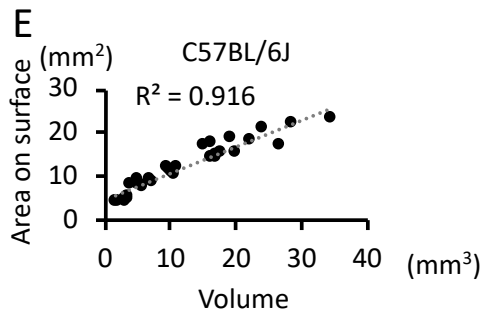
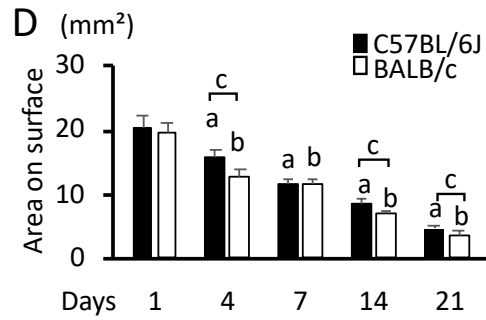
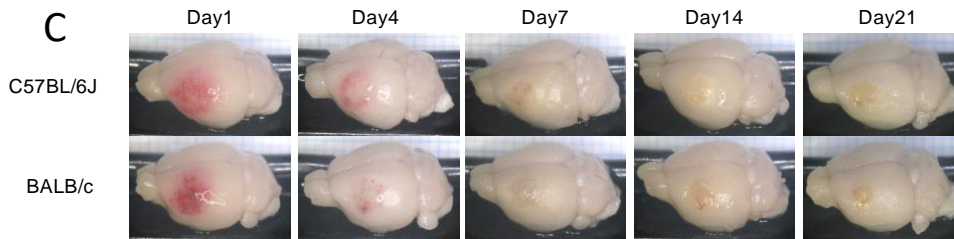
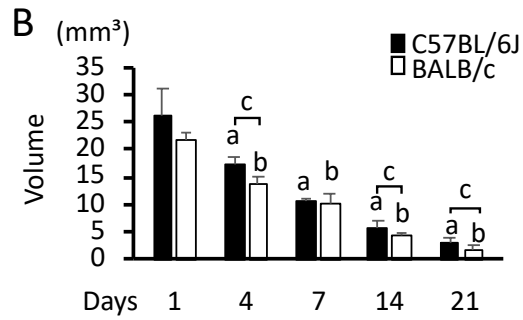
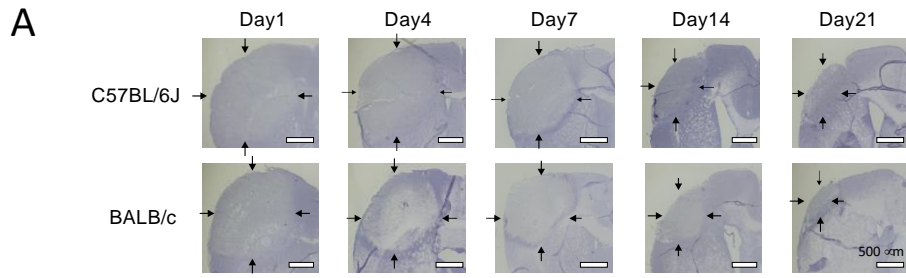


Fig. 3 C57BL/6JとBALB/c マウスの傷害サイズの経時変化

A: C57BL/6JとBALB/c マウスで脳梗塞誘導後 1、4、7、14、21 日目における傷害中央部の Hematoxylin 染色像。矢印で囲まれた領域が傷害部位。Scale Bar: 500 μ m。

B: C57BL/6J および BALB/c マウスにおける傷害誘導後 21 日目までの傷害体積の経時変化のグラフ。

C: C57BL/6JとBALB/c マウスで脳梗塞誘導後 1、4、7、14、21 日目における脳表面の写真。方眼紙の 1 マス: 1 mm \times 1 mm。

D: C57BL/6J および BALB/c マウスにおける傷害誘導後 21 日目までの脳表面の傷害面積の経時変化のグラフ。

B,D のグラフの値は平均 \pm 標準偏差を示す。

E, F: C57BL/6J (E) および BALB/c (F) マウスにおける脳梗塞誘導後 1、4、7、14、21 日での脳表面の傷害面積と傷害体積の相関関係のグラフ。相関係数を R^2 で示した。

グラフ内のシンボルは以下の通り、a: $p < 0.05$; C57BL/6J 系統での Day1 に対する群内比較, b: $p < 0.05$; BALB/c 系統での Day1 に対する群内比較, c: $p < 0.05$; C57BL/6J と BALB/c 系統の群間比較。

使用したマウスの数、C57BL/6J: n=6 (Day 1), n=7 (Day 4), n=5 (Day 7), n=7 (Day 14), n=6 (Day 21), BALB/c: n=6 (Day 1, 4, 7), n=7 (Day 14), n=5 (Day 21)

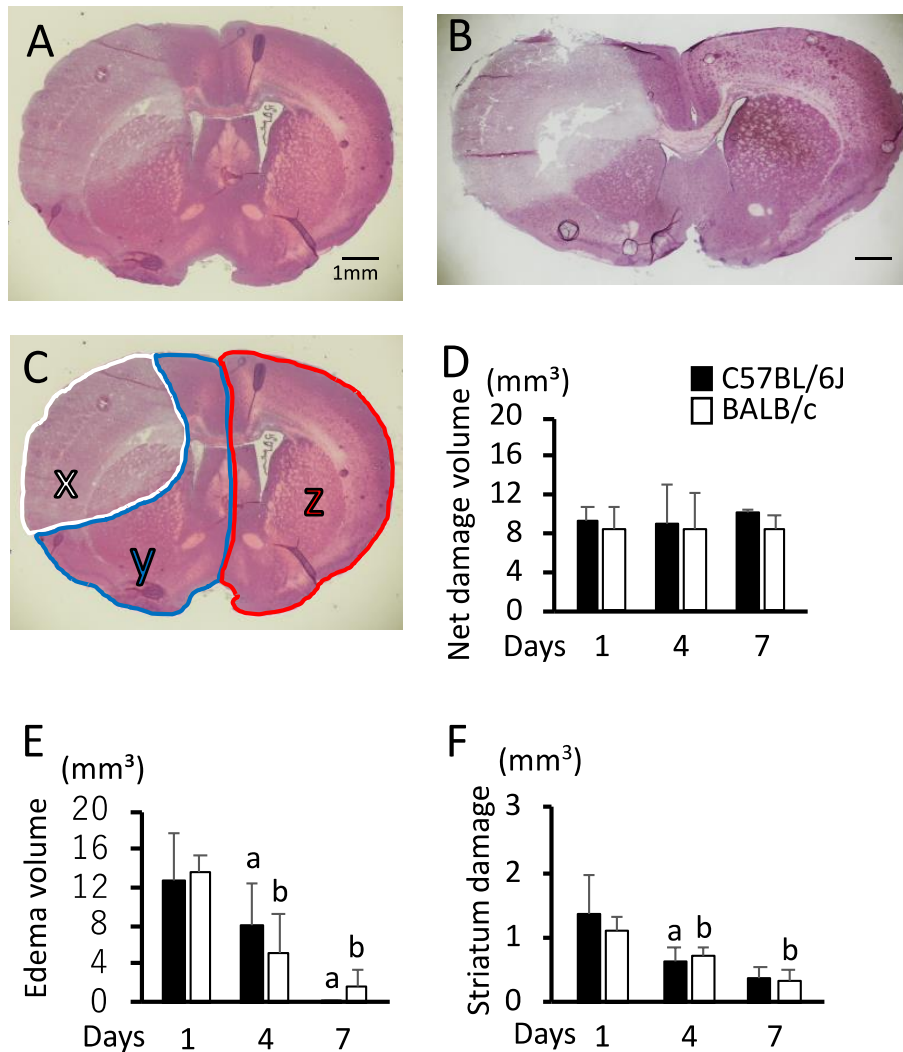


Fig. 4 脳梗塞誘導後 7 日目までの C57BL/6J および BALB/c マウスの脳浮腫、実傷害サイズおよび線条体の傷害サイズの経時変化

A, B: C57BL/6J および BALB/c マウスでの脳梗塞誘導後 1 日目における脳切片の HE 染色像。Scale Bar は 1 mm。C: A で示した脳切片を傷害部位(X)、傷害同側の正常部位(Y)、傷害対側(Z)の 3 領域に区分けし、それぞれの面積を測定した。傷害同側の面積を(X+Y) (mm²)、対側の面積を Z (mm²)とした。D: 脳梗塞誘導後 7 日目までの実傷害体積の経時変化。脳梗塞誘導後 1、4、7 日目の脳切片から傷害対側と傷害同側の正常部位の差(Z-Y)より実傷害面積を算出し、それらの面積の和に切片間の間隔 1 mm を掛けた値を実傷害体積とした。E: 脳梗塞誘導後 7 日目までの脳浮腫体積の経時変化。脳梗塞誘導後 1、4、7 日目の脳切片から、{(X+Y)-Z} (mm²)より脳浮腫面積

を算出し、それらの浮腫面積の和に、切片間の間隔 1 mm を掛けた値を脳浮腫体積とした。F: 脳梗塞誘導後 7 日目までの線条体の傷害体積の経時変化。脳梗塞誘導後 1、4、7 日目の脳切片から X の領域に含まれる線条体の面積を算出し、それらの面積の和に切片間の間隔 1 mm を掛けた値を線条体の傷害体積とした。グラフの値は平均 ± 標準偏差を示す。

グラフ内のシンボルは以下の通り、a: $p < 0.05$; C57BL/6J 系統での Day1 に対する群内比較, b: $p < 0.05$; BALB/c 系統での Day1 に対する群内比較。

使用したマウスの数、C57BL/6J: n=6 (Day 1), n=7 (Day 4), n=5 (Day 7), BALB/c: n=6 (Day 1, 4, 7)

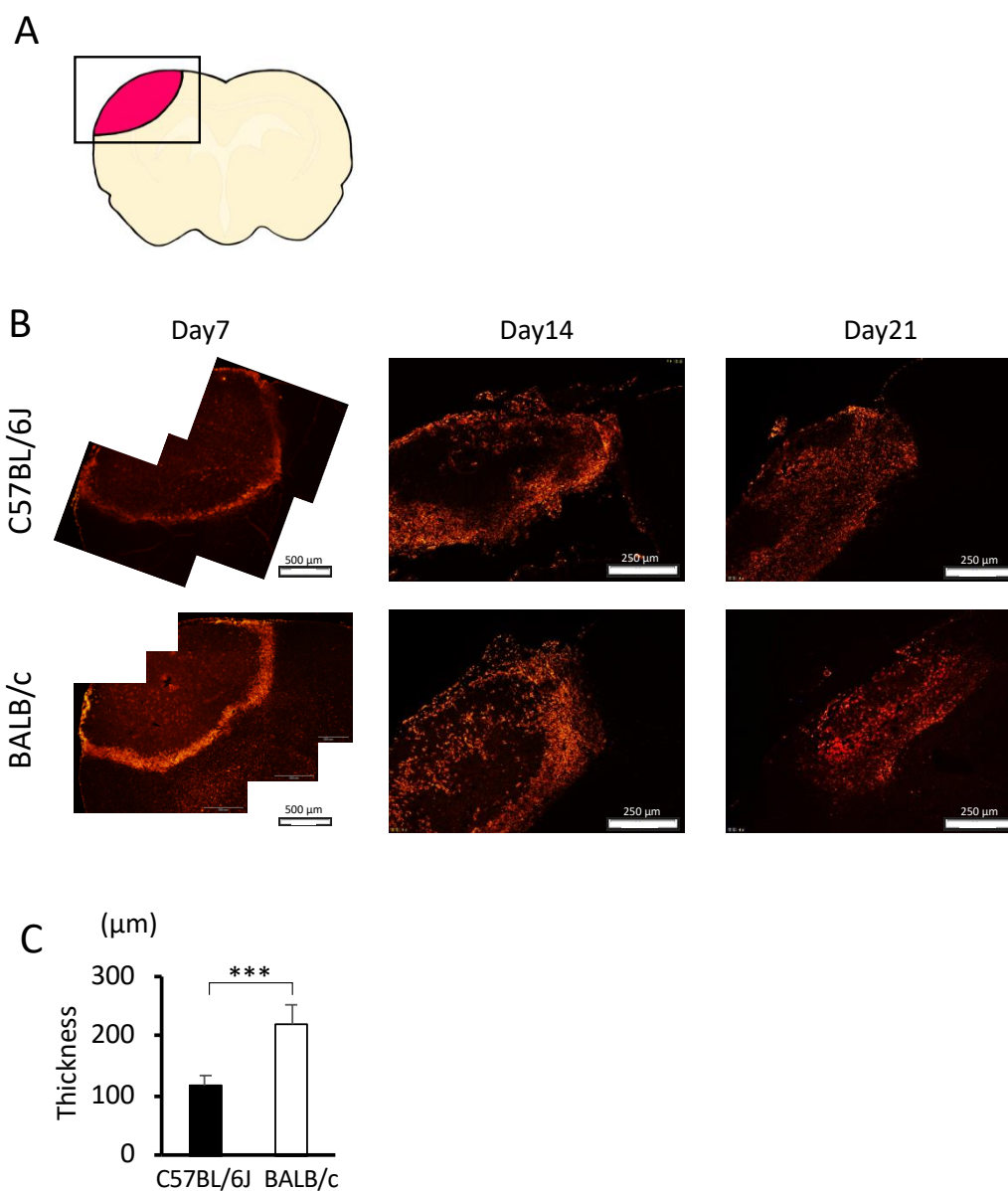


Fig. 5 脳梗塞誘導後 7、14、21 日目における抗 F4/80 抗体による免疫染色
 A: 脳切片での活性型ミクログリア層の観察領域。黒枠は観察した領域を示す。B:
 C57BL/6J および BALB/c マウスでの脳梗塞誘導後 7、14、21 日目における F4/80 陽
 性の活性型ミクログリア層の染色像。Scale Bar: 500 μ m (7 日目)、250 μ m (14、21 日
 目)。C: C57BL/6J および BALB/c マウスの脳梗塞誘導後 7 日目における活性型ミク
 ログリア層の厚さの比較。グラフの値は平均±標準偏差を示す。***: $p < 0.001$
 使用したマウスの数、C57BL/6J: $n = 5$, BALB/c: $n = 6$ (Day 7)

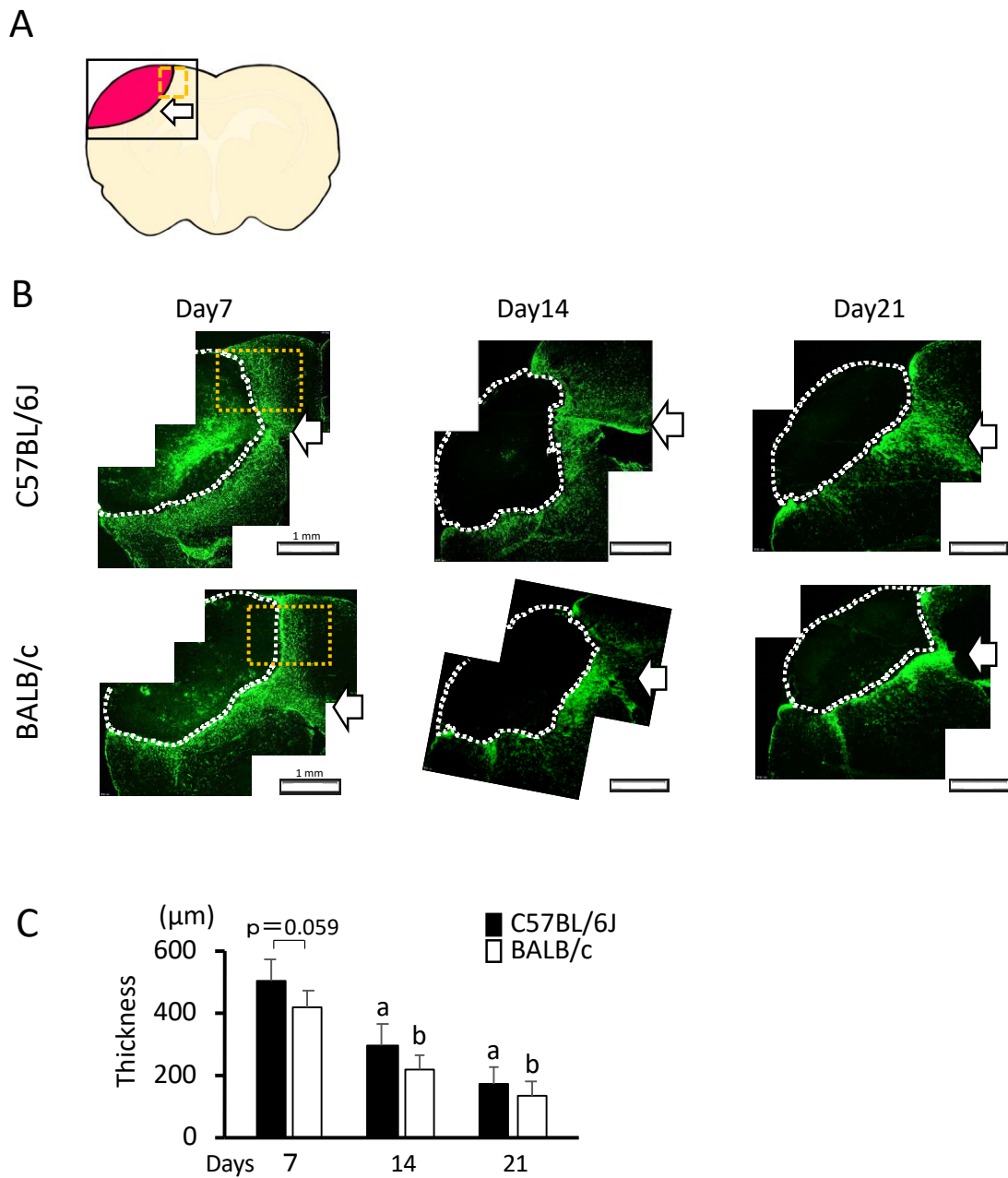


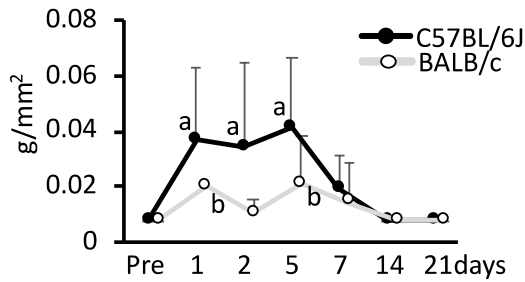
Fig. 6 脳梗塞誘導後 7、14、21 日目における抗 GFAP 抗体による免疫染色
A: 脳切片で大脳皮質の活性型アストロサイト層の観察領域(橙色の枠内)。矢印は白質部を示す。
B: C57BL/6J および BALB/c マウスでの脳梗塞誘導後 7、14、21 日目における GFAP 陽性の活性型アストロサイト層の染色像。大脳皮質の活性型アストロサイト層の観察領域(黄色の枠内)。矢印は白質部を示す。Scale Bar:は 1 mm。
C:

C57BL/6J および BALB/c マウスの脳梗塞誘導後 7、14、21 日目における活性型アストロサイト層の厚さの比較。値は平均±標準偏差を示す。

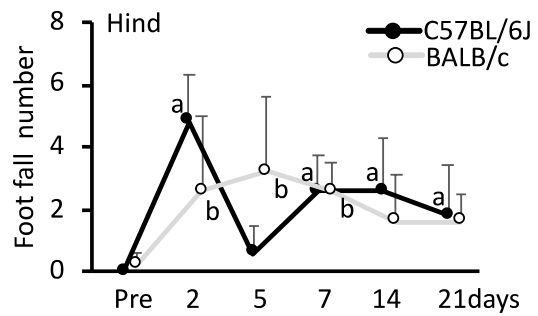
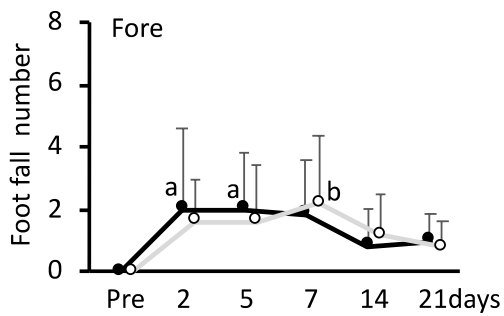
グラフ内のシンボルは以下の通り、a: $p < 0.05$; C57BL/6J 系統での Day7 に対する群内比較, b: $p < 0.05$; BALB/c 系統での Day7 に対する群内比較。

使用したマウスの数、C57BL/6J: n=5 (Day 7, 14), n=4 (Day 21), BALB/c: n=5 (Day 7, 14, 21)

A. The von Frey test



B. The balance beam test



C. The tail suspension test

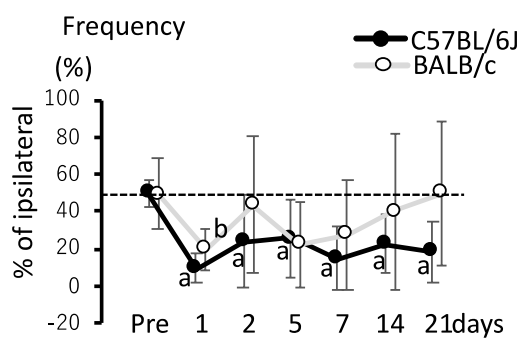
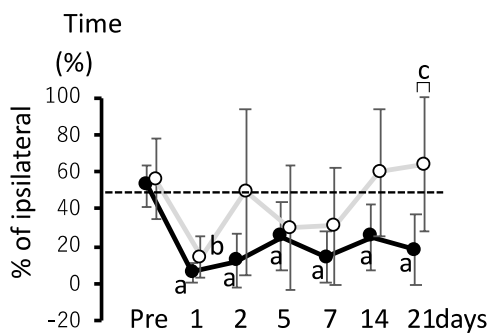


Fig. 7 PIT-F モデルでの C57BL/6J マウスおよび BALB/c 系統マウスにおける脳梗塞後の神経機能障害の経時変化

A: 脳梗塞誘導後 21 日目までの von Frey テストにおける両後肢の感覚閾値の経時変化。B: 脳梗塞誘導後 21 日目までの Balance beam テストにおける傷害対側の前後肢の踏み外し回数の経時変化。C: 脳梗塞誘導後 21 日目までの Tail suspension テストにおける傷害同側に反らした時間および回数の割合の経時変化。グラフの値は平均 ± 標準偏差を示す。

グラフ内のシンボルは以下の通り、a: $p < 0.05$; C57BL/6J 系統での Pre に対する群内比較, b: $p < 0.05$; BALB/c 系統での Pre に対する群内比較, c: $p < 0.05$; C57BL/6J と BALB/c 系統の群間比較。

使用したマウスの数、C57BL/6J: $n=6$, BALB/c: $n=5$ 。

第2章

脳梗塞後の血管透過性亢進に伴う Fibrinogen の漏出に起因する活性酸素種の産生と活性酸素が神経変成および神経機能に及ぼす影響の検討

I. 緒言

虚血性脳梗塞では、脳の血管が詰まることにより、脳組織への栄養および酸素の供給が途絶する虚血状態に陥ることによって、運動機能や感覚機能など様々な神経機能異常が起こる疾患である。また、血液の供給が途絶することによって血液脳関門 (Blood-Brain Barrier: BBB) が崩壊し、血管透過性が亢進することが報告されている^[13, 28, 29]。BBB は循環血液中の有害物質から神経細胞を保護する^[30]と考えられており、脳血管内皮細胞間のタイトジャンクションに加えてアストロサイトとペリサイトから構成され、その機能は神経細胞によって制御されている^[31, 32]。これまでに、脳虚血とそれに続く血液の再灌流 (Ischemia/Reperfusion: I/R) に起因して神経細胞や血管内皮細胞で産生された活性酸素種 (ROS) が神経細胞の傷害を誘導し、脳梗塞を増悪させること^[12, 33, 34]が報告されている。ROS は生体防御、細胞増殖、細胞死に重要な役割を果たすが、過剰な ROS 産生は細胞の傷害、過剰な細胞増殖などの悪影響を及ぼす。またアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経疾患や虚血性脳梗塞において ROS が BBB の崩壊を引き起こすことも報告されている^[35]。一方、多発性硬化症やアルツハイマー病において、血管透過性の亢進に伴って Fibrinogen (Fbg) が漏出し、Fbg 受容体である CD11b/CD18 インテグリン^[36]を介してミクログリアを活性化して ROS を産生し、この ROS によって神経軸索および樹状突起の傷害が誘導されること^[14, 37]が近年報告されている。Fbg は血液凝固反応の最終段階でトロンビンの作用によりフィブリンに変化し、血液凝固・止血・血栓形成だけでなく、創傷治癒、炎症、血管新生および細胞あるいはマトリックス間の相互作用などに関与する血漿タンパク質である。

脳梗塞後に脳梗塞周囲部で血管透過性が亢進することから、脳梗塞においても Fbg が漏出し ROS の産生と神経変成が誘導されている可能性が考えられる。そこで、本研究では、第1章で報告した PIT-F モデルを用いて、脳梗塞誘導後の急性期での血管透過性亢進、Fbg 漏出、ROS 産生、神経細胞の変成、神経機能障害に及ぼす影響を検討した。

II. 材料と方法

2-1. 動物実験

全ての動物実験は「長浜バイオ大学実験附属施設規定」および The ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) Guidelines (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>)に従って行った。実験には体重が25-34 g、週齢が12-16週のC57BL/6Jcl およびBALB/c (CLEA Japan, Tokyo, Japan)のオスを使用した。各実験に用いた動物の数は結果の図に記載した。

2-2. 脳梗塞モデル

脳梗塞は PIT-F モデル、PIT-P モデルおよび中大脳動脈閉塞 (Middle cerebral artery occlusion, MCA-O)モデルで誘導した^[8]。

PIT-F モデルでは、第1章 [2-2.]と同様の方法で脳梗塞を誘導した。PIT-P モデルでもPIT-Fモデルと同様の方法で脳梗塞を誘導した。但しプローブの設置位置と照射光強度はPIT-Fモデルと異なり、プローブは bregma と lambda の中間、正中線から左側へ 2.5 mm にセットし、4000 ルクスで 10 分間光を照射した。

MCA-O モデルでは、麻酔は通常酸素条件下でイソフルランを用い、5%で導入し2%で手術を行った。また手術中はマウスを 37°Cのヒートパッドの上で維持した。麻酔下でマウスを左半身が上を向くよう横向きに寝かせ、左耳と左目の間の皮膚を U 字に切開し、側頭筋を露出した。その後、側頭筋を剥離して頭蓋骨の側部を露出し、中大脳動脈(MCA)上にドリルを用いて直径約 1mm の小穴を頭蓋に作成した。その穴から中大脳動脈を 10-0 Nylon suture(ETHICON, USA)を用いて結紮し、脳梗塞を誘導した。

3モデルとも、処置終了後に切開した皮膚を縫合し、麻酔から覚醒させた。

2-3. Eदारavone および cyclic-RGD の投与

ラジカルスカベンジャーである Eदारavone (EDV; NIPRO, Osaka, Japan)を、脳梗塞誘導 8 時間で評価を行う場合は、傷害誘導後 0, 4 時間において各 3.0 mg/kg を、脳梗塞誘導 24 時間で評価を行う場合は、傷害誘導後 0, 4, 8, 16 時間に各 6.0 mg/kg を、2%イソフルラン麻酔下で陰茎静脈より投与した。

ミクログリアに発現する Fbg レセプターのアンタゴニストである cyclic-RGD (BACHEM, Switzerland)は、傷害誘導直前に 5.0 mg/kg を 2%イソフルラン麻酔下で鎖骨下静脈カテーテルから投与した。

2-4. ROS 産生と血管透過性亢進の測定

脳梗塞を誘導したマウスの安楽死 1 時間前に、Dihydroethidium (DHE; AAT Bioquest, USA) 1.0 g/kg を腹腔内に、Dextran-Cy5 (Invitrogen, USA) 2.0 mg/kg を 2%イソフルラン麻酔下で陰茎静脈から投与した。DHE は還元型エチジウムで、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)を比較的特異的に検出し、DHE と $O_2^{\cdot-}$ が反応し生成されるエチジウムカチオン (E^+)や 2-OH- E^+ が DNA と結合して青色蛍光(355/420 nm)を示す。さらに酸化されると oxidized DHE (oxDHE)に変化し、これが DNA と結合して赤色蛍光(518/605 nm)を発する。oxDHE の生成を ROS 産生の指標とした。Dextran-Cy5 は、膜非透過性の蛍光プローブであり、血液中に投与した後の血管外への漏出により血管透過性の亢進の指標とした。DHE および Dextran-Cy5 投与 1 時間後に体重を測定し、200 mg/kg のセコバルビタールナトリウム溶液の腹腔内投与による深麻酔下で約 10 mL の生理食塩水を心臓から灌流した後、脳を摘出した。その後、生体イメージング装置 Lumazone(Shoshin EM Corp., Aichi, Japan)により、脳組織の oxDHE および Dextran-Cy5 の分布を計測した。oxDHE は GFP ロングパスフィルター、Dextran-Cy5 は Cy5 フィルターを用いて、脳の背側方向からの写真および傷害部位から吻側に 1 mm の箇所と冠状断面を撮影した。

2-5. 灌流固定・パラフィン包埋

体重を測定後、200 mg/kg のセコバルビタールナトリウム溶液を腹腔内投与し深麻酔を誘導した。麻酔後、約 10 mL の生理食塩水を心臓から灌流した後、4%パラホルムアルデヒド溶液(0.1M リン酸バッファー pH7.4)で灌流固定を行った。その後、脳を取り出し 4%パラホルムアルデヒド溶液で後固定を一晩行った。その後、パラフィンブロックの作成には 70%エタノールで1日置換し、80%エタノール、95%エタノール、100%エタノールに 3 回、代替キシレン(Hemo-De; FALMA Corp., Tokyo, Japan)に 3 回、パラフィンに 3 回をそれぞれ 2 時間ずつの透徹を行った後、パラフィンブロックに包埋した。

2-6. 神経細胞と Fbg との免疫染色

脳梗塞誘導後 8 時間および 24 時間のマウスの脳よりパラフィン切片を作成し、生存している神経細胞のマーカーである MAP2 (Microtubule-associated protein 2)と血管外に漏出した Fbg の分布を免疫組織化学法により評価した。MAP2 は神経細胞樹状突起と細胞体に存在する微小管結合タンパク質であり、微小管の重合状態や構造の安定化に寄与している^[38, 39]。

マウスのパラフィンブロックに包埋した脳より、Microtome (RM 2155; LEICA, Germany)を用いて5 μm の切片を作製した。その後、脱パラフィン処理を行い、120°C、5分のクエン酸バッファー(ダコ・ジャパン, 東京)処理により抗原賦活化を行い、免疫二重染色に用いた。一次抗体は、神経細胞に対する抗MAP2抗体(Abcam, UK)および抗Fbg抗体(Abcam, UK)を使用した。その後、抗MAP2抗体は、Biotinが結合した適切な二次抗体で処理し、Streptavidinに蛍光色素が結合した標識体で可視化した。抗Fbg抗体は、ペルオキシダーゼが結合した適切な二次抗体で処理し、ペルオキシダーゼ活性を蛍光色素標識チラミド(Cy3)で可視化した。対比染色としてVECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, USA)により核酸を染色、および封入を行った。その後、落射型蛍光顕微鏡(BX53 OLYMPUS, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

2-7. 大脳実質へのHuman Fbgの投与

Fbgの脳内への漏出の直接的な影響を調べるために、Human Fbgを脳実質に注入した。2%イソフルラン麻酔下で大脳皮質上の頭蓋骨にドリルで直径1mmの穴を作り、29Gの針を1mmの深さまで挿入した。生理食塩水(Saline: 0.6 μl)、Human Fbg(60 ng/ μl : 大阪府)を生理食塩水に溶解したもの、またはHuman Fbgとcyclic-RGD(1.0 ng/ μl)を添加した食塩水を、29G針を用いてマウスに注入した。注射の1時間後にDHEを500 μl 腹腔内投与した。さらに1時間後に全脳を摘出し、LumazoneとImage Jを用いて、各注入部位のoxDHE蛍光輝度の相対値を未処理の対側領域の蛍光輝度を100%として算出し、ROS産生として定量した。

2-8. 神経細胞樹状突起変成の評価

神経細胞の変成を評価するために、Dil染色と抗Rat IgG抗体の免疫染色を行った。安楽死1時間前にRat IgG(Southern Biotech, USA) 2.0 mg/kgを2%イソフルラン麻酔下で陰茎静脈より投与後、脳梗塞誘導後8時間で200 mg/kgのセコバルビタールナトリウム溶液を腹腔内投与し深麻酔を誘導し、生理食塩水の灌流および、1.5%パラホルムアルデヒド溶液(0.1Mリン酸バッファーpH7.4)で固定を行い、脳を摘出した。その後、1.5%パラホルムアルデヒド溶液で後固定を2時間行い、Vibrating Microtome (Neo Linear Slicer AT; DOSAKA EM CO, Kyoto, Japan)を用いて100 μm の冠状切片を作成した。まず、浮遊切片法を用いてRat IgGの免疫染色を行った。Rat IgGは、Biotinが結合したビオチン化抗-Rat IgG抗体(Vector Laboratories, USA)で処理し、

Streptavidin に蛍光色素(FITC)が結合した標識体で可視化した。その後、脂溶性神経細胞蛍光標識トレーサーである DiI クリスタル(Biotium, USA)^[40, 41]を、脳梗塞周辺部の Rat IgG 陽性領域の下端に配置(Fig. 12A)し、4°C、湿潤条件下で 4 日間暗所静置した。その後、VECTASHIELD Antifade Mounting Medium (Vector Laboratories, USA)により封入を行い、共焦点レーザー走査型顕微鏡(FLUOVIEW FV1000, OLYMPUS, Tokyo, Japan)を用いて傷害周辺部の 2 つの領域を観察した。これらの領域のうち Area-1 は傷害に隣接する近位部、他方は Rat IgG 陰性領域に近接する遠位部である(Fig. 12A)。

各領域で得られた DiI 陽性の樹状突起を 2 種類の解析法を用いて形態学的に分析した。いずれの方法においても、樹状突起を分岐点から隣接する分岐点まで伸びる部位、あるいは分岐点から樹状突起末端まで伸びる部位に区分し、選択した。

1 つ目の解析法では、画像上の全ての樹状突起枝区分を選択し、樹状突起変成の程度を形状から、正常なスパインが形成されたもの(I)、スパインが部分的に消失したもの(II)、樹状突起が数珠上に変成した(III)ものの 3 グループに分類し、(I)、(II)の樹状突起を正常(Damage score: -)とし、(III)の樹状突起のみを損傷している(Damage score: +)とした(Fig. 12B)。次に、Area-1 および Area-2 における単一視野内の各カテゴリーの樹状突起枝をカウントし、視野内の全樹状突起枝(6-15 本)に対する(III)の樹状突起枝の割合をそれぞれ算出した(Fig. 12C, D)。

2 つ目の解析法では、樹状突起スパインの数を AIVIA (Artificial Intelligence Visualization Image Analysis; ORIENT SYSTEM, INC., Tokyo, Japan)を用いて分析した(Fig. 12E-H)。この解析では、画像内の全ての樹状突起枝(4-32 本)を、樹状突起の末端に分布する遠位の分枝(Fig. 12E, F: 白色に標識された樹状突起枝)と、近位に分布する分枝(Fig. 12E, F: 青色に標識された樹状突起枝)の 2 グループに自動的に分類し、解析では樹状突起末端の遠位のスパイン密度を測定した。また、近位部において樹状突起が密に走行している領域では、樹状突起枝を正確に識別することができなかつたため、スパイン密度の測定の対象としなかつた。

2-9. Tail suspension test と傷害サイズ

2-9-1. Tail suspension test

第 1 章 [2-10-3]と同様の方法および計算式を用いて、傷害同側に反らした時間および回数の割合を算出した。

2-9-2. 傷害サイズ測定

第1章 [2-7-1]と同様の方法および計算式を用いて、傷害面積を算出した。

2-10. 統計解析

傷害の大きさ、蛍光輝度、および神経機能障害の解析においては、One way ANOVA に続いて、フィッシャーの最小有意差(PLSD)検定を実施した。樹状突起変成の評価については、Mann-Whitney U 検定を用いて統計解析を行った。 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

III. 結果

3-1. 脳梗塞モデルにおける血管透過性亢進および ROS 産生

PIT-F、PIT-P、MCA-O モデルで脳梗塞を誘導し、安楽死 1 時間前に血管透過性のマーカーとして Dextran-Cy5 と、ROS のインジケータとして DHE を投与して、傷害誘導後 8 時間および 24 時間で脳を摘出し、生体イメージング装置を用いて血管透過性の亢進および ROS 産生の検討を行った。Dextran-Cy5 は、投与してから脳を摘出するまでの 1 時間における漏出を示している。3 種のモデル全てにおいて脳梗塞誘導後 8 時間で血管透過性マーカーである Dextran-Cy5 の漏出領域は、傷害内部と傷害周辺部の領域で増加した。また、脳表面と傷害中心部の冠状切片で血管透過性の亢進が認められた (Fig.8)。この結果はこれまでの報告と一致している^[15]。さらに、各モデルにおいて oxDHE 陽性領域が血管透過性亢進領域と一致して認められた (Fig. 8: 矢印)。同様の結果は傷害誘導後 24 時間でも認められた (データ未表示)。また、PIT-F モデルにおいて、ラジカルスカベンジャーである EDV の投与により、脳梗塞誘導後 8 時間で Control 群(-EDV)と比較して EDV 投与群(+EDV)で大脳皮質および冠状断面の傷害周辺部での oxDHE 陽性の蛍光輝度は抑制された (Fig. 9A, B)。同様の結果は傷害誘導後 24 時間でも認められた (データ未表示)。また、8 時間と 24 時間での EDV による蛍光輝度の抑制抑制は統計的に有意であった (Fig. 9D, F)。このことから、oxDHE 陽性は ROS 産生を示していることが確認された。一方で、脳梗塞誘導後 8 時間および 24 時間において大脳皮質または脳冠状断面に占める Dex-Cy5 陽性の血管透過性亢進領域の割合を Control 群と EDV 投与群で比較したところ、差は認められなかった (Fig. 9C, E)。

3-2. Fbg の漏出が神経細胞に及ぼす影響および ROS 産生への寄与の検討

脳梗塞誘導後 8 時間および 24 時間の傷害周辺部 (Fig. 10A) において、抗 MAP2 抗体および抗 Fbg 抗体を用いて、神経細胞および Fbg の漏出を免疫二重染色により評価した (Fig. 10B, C)。

その結果、傷害誘導後 8 時間 (Fig. 10B) および 24 時間 (Fig. 10C) の傷害周辺部において、抗 Fbg 抗体陽性領域が認められ、脳組織中に漏出した Fbg が観察された (Fig. 10B, C: 矢頭)。また、抗 MAP2 抗体陽性の生存している神経細胞が傷害境界部から正中側の正常部にかけて観察され、(Fig. 10B, C)。神経細胞が生存している傷害周囲領域での Fbg の漏出が認められた (Fig. 10B, C: 矢印)。

また、傷害誘導後 8 時間および 24 時間において、Fbg レセプター (CD11b/CD18) の

アンタゴニストである cyclic-RGD(cRGD)の投与が血管透過性亢進とそれに伴う ROS 産生におよぼす影響を検討した(Fig. 10D-I)。その結果、傷害誘導後 8 時間の傷害周辺部の大脳皮質と白質の一部において、血管透過性が亢進した領域で ROS の産生が認められた(Fig. 10D, E)。また、傷害誘導後 8 時間および 24 時間において、cRGD 投与群で血管透過性の亢進が起こったものの、それに伴う ROS 産生は Control 群に比べて低下していた(Fig. 10H, I)。同様の結果は傷害誘導後 24 時間でも認められた(データ未表示)。cRGD 投与群、Control 群の大脳皮質または脳冠状断面に占める血管透過性亢進領域および ROS 産生領域の割合を比較したところ、傷害誘導後 8 時間および 24 時間の大脳皮質および脳内部での血管透過性亢進領域は、cRGD 投与群と Control 群で差は認められなかった(Fig. 10F, G)。cRGD 投与群で Control 群に対して、oxDHE 陽性の ROS 産生領域の有意な抑制が認められた(Fig. 10H, I)。

3-3. 脳実質における Human Fbg の注入による ROS 産生の検討

大脳皮質に Fbg を投与し、急性期の ROS 産生が Fbg に起因することを検証した。正常脳の大脳皮質に生理食塩水(Saline: I)、Human Fbg(II)、Human Fbg に CD11b のアンタゴニストである cRGD を添加した溶液(III)をそれぞれ注入し(Fig. 11A, B: 矢印)、1 時間後に DHE を投与して、その後 1 時間に全脳を摘出し生体イメージング装置を用いて ROS 産生を評価した。

その結果、Human Fbg の注入部位(II)で生理食塩水の注入部位(I)と比較して、oxDHE 陽性の ROS 産生が増加し、Human Fbg に cRGD を添加した溶液の注入部位(III)では、Human Fbg の注入部位(II)と比較して oxDHE 陽性の ROS 産生が抑制されていた(Fig. 11A, B)。また、これら蛍光強度の差は統計的に有意であった(Fig. 11C)。

3-4. 脳梗塞に伴う神経細胞樹状突起の変成の検討

本検討では、PIT-F モデルで誘導した脳梗塞における血管透過性のマーカーの Rat IgG 陽性領域のうち脳梗塞部位に隣接した傷害近位部(Area-1)と Rat IgG 陰性領域に近接した傷害遠位部(Area-2)での、DiI 陽性の神経細胞の樹状突起を観察した(Fig. 12A)。

樹状突起変成の程度を形状から、正常なスパインが形成されたもの(I)、スパインが部分的に消失したもの(II)、樹状突起が数珠上に変成した(III)ものの 3 種類に分類し、(I)、(II)の樹状突起を正常(Damage score: -)、(III)の樹状突起を変成とした(Damage score: +) (Fig. 12B)。Area-1 および Area-2 における全樹状突起数に対する Damage

score +の変成した樹状突起の割合を測定した結果、Area-1 では EDV 投与群と Control 群(-EDV)間で差が認められなかった (Fig. 12C)。一方で、Area-2 では Control 群と比較して EDV 投与群で有意に減少した(Fig. 12D)。

また、画像解析ソフトである AIVIA を用いて Area-1 および Area-2 における樹状突起枝に対するスパインの数を解析した結果(Fig. 12E, F)、Area-1 では EDV 投与群と Control 群(-EDV)間で差が認められなかった (Fig. 12G)。一方で、Area-2 では Control 群と比較して EDV 投与群で有意に増加していた(Fig. 12H)。

3-5. ROS 産生が運動機能に及ぼす影響の検討

Control 群と EDV 投与群のマウスの傷害誘導前(Pre)および、傷害誘導後 8 時間または 24 時間に Tail suspension test を用いて運動機能の評価を (Fig. 13B, C, E, F)、および傷害の大きさを比較した(Fig. 13D, G)。

Tail suspension test の結果、傷害誘導前は体の振り上げは対側と同側にほぼ均等であったが、EDV 投与群および Control 群で傷害誘導後 8 時間および 24 時間において、傷害対側への振り上げ回数および時間の有意な偏向が認められた(Fig. 13B, C, E, F)。傷害誘導後 8 時間では、EDV の投与濃度依存的に対側への振り上げ回数および時間の偏りの減少に伴う正常状態への回帰が有意に認められた(Fig. 13B, C)。一方、傷害誘導後 8 時間における傷害サイズは、EDV 投与群および Control 群で差が認められなかった(Fig. 13D)。傷害誘導後 24 時間では、高濃度の EDV 投与により対側への振り上げ回数および時間の偏りの減少に伴う正常状態への回帰が認められた (Fig. 13E, F)。一方、傷害誘導後 24 時間における傷害サイズは、EDV 投与群および Control 群で差が認められなかった(Fig. 13G)。

IV. 考察

4-1. 脳梗塞モデルにおける血管透過性亢進および ROS 産生

PIT-F、PIT-P、MCA-O モデルの異なる脳梗塞モデルの傷害誘導後 8 時間および 24 時間で傷害周辺部において血管透過性亢進とそれに一致した oxDHE 陽性が認められた。この陽性反応は EDV の投与により減弱/消失し、ROS の産生を反映することが確認されたことから、脳梗塞後の血管透過性亢進に伴う ROS の産生はモデルの種類に因らず起こることであり、脳梗塞に伴い一般的に起こっている現象であることが示された。これまで、脳梗塞においては虚血/再灌流に伴う ROS 産生が報告されていたが他のメカニズムは知られていなかった。今回の知見は、慢性疾患である多発性硬化症やアルツハイマー病^[14, 37]の病態形成メカニズムと同様に、脳梗塞急性期においても血管透過性亢進に伴う ROS 産生の誘導が起きていることを明らかにした。

本研究では、脳梗塞後の血管透過性亢進に伴って傷害周辺部で血液中の Fbg が漏出すること(Fig. 10B, C)、Fbg レセプターの CD11b/CD18 インテグリンのアンタゴニストである cyclic-RGD の前処理により脳梗塞後の血管透過性亢進に伴う ROS 産生が抑制されること(Fig. 10D, E, H, I)、さらに、脳実質への Human Fbg の注入で ROS 産生が誘導されたが、Human Fbg と cyclic-RGD の共投与により ROS 産生が抑制されることを認めた(Fig. 11)。これらの知見はこれまでの報告と一致しており^[8, 37]、PIT-F、PIT-P、MCA-O モデルにおいて観察された ROS 産生も、脳実質へ漏出した Fbg が脳に常在するミクログリアに発現する CD11b/CD18 インテグリンの活性化を介して誘導する可能性が示唆される。また、大脳への Fbg の注入後 2 時間以内に ROS 産生が誘導されること(Fig. 11)、マウスの大脳皮質ではフィブリンが 15 分以内にミクログリアを活性化すること^[37]と合わせて考えると、血管透過性の亢進後すぐに ROS 産生が始まると予想される。ROS の産生は cyclic-RGD で前処理したマウスでは脳梗塞誘導後 8 時間でほぼ消失したのに対し、傷害誘導後 24 時間では有意に抑制されたものの産生が認められた(Fig. 10H, I)。これは、本検討では cyclic-RGD を手術前に単回投与し ROS 産生の評価を行なったため、傷害誘導後 24 時間では cyclic-RGD の半減期が約 12 時間であるため阻害効果が低下し、傷害誘導後 8 時間と比較して ROS 産生が増加したと考えられる。これらの結果は、脳梗塞誘導後 24 時間の ROS 産生は 8 時間よりも後に活性化したミクログリアに起因する可能性を示唆し、脳梗塞後の血管透過性が亢進し脳実質に Fbg が存在している間はミクログリアの活性化が持続している可能性が考えられる。一方で、ミクログリアに加えてマクロファージや好中球においても

CD11b/CD18 インテグリンが発現しており^[42, 43]、急性期の脳梗塞ではマクロファージや好中球の浸潤が誘導される^[42]ことから、ミクログリアでなくマクロファージあるいは好中球が脳梗塞後の血管透過性亢進に伴う ROS の産生に関与している可能性が依然残されている。ROS 産生細胞の同定は今後の課題である。

4-2. 脳梗塞に伴う神経細胞樹状突起の変成

我々は血管透過性亢進領域の遠位部 (Area-2) の神経細胞の樹状突起変成は EDV の投与により有意に抑制されること (Fig. 12) を認め、血管透過性の亢進に伴う ROS 産生が神経細胞の樹状突起の変成を誘導することを明らかにした。これまでに、虚血・再灌流 (I/R) 傷害では、ミトコンドリアからの ROS 産生を介して脳傷害を引き起こすことが知られている^[34, 44, 45]。I/R 傷害においては、ROS は主に神経細胞に内在するクエン酸回路のコハク酸の蓄積により産生され^[46]、神経細胞への傷害を引き起こす^[34, 47]。一方、本研究では、樹状突起変成は Fbg-CD11b/CD18 インテグリン経路を介して活性化されたミクログリア等の細胞によって産生される外因性の ROS に起因すると考えられる。さらに、EDV は脳梗塞の大きさに影響を及ぼさなかった (Fig. 13D, G) ため、血管透過性亢進に伴う ROS 産生は I/R 傷害と異なり、傷害誘導後 24 時間での神経細胞傷害を増加しないことが明らかとなった。また、虚血性脳梗塞では ROS が血管透過性亢進を促進すること^[35] が報告されているが、本研究では、EDV による ROS 産生の抑制は血管透過性へ影響を与えなかった。このことから、PIT-F モデルにおいては ROS による血管透過性への関与は少ないことが示唆された。

本研究において、脳梗塞周辺部血管透過性亢進領域のうち脳梗塞部位に隣接した傷害近位部 (Area-1) において、傷害遠位部 (Area-2) に比べて顕著な樹状突起変成を認めた (Fig. 12C, G)。PIT-P モデルでは、血管透過性亢進領域が時間経過と共に傷害遠位方向に拡大していくこと^[15] を考えると、この顕著な樹状突起変成は、漏出した Fbg によって産生された ROS に暴露した時間が、Area-1 ではより長かった結果であると考えられる。さらに、Area-1 において EDV の投与による樹状突起変成の抑制が認められないのは、ROS の産生が長時間持続したため、EDV による ROS の除去が不十分であった可能性が考えられる。また、EDV は脳梗塞誘導後 8 時間での樹状突起の変成を抑制するが、傷害誘導後 24 時間で脳梗塞の大きさは抑制されないこと (Fig. 13D, G) から、傷害周囲部の樹状突起の変成をきたした神経細胞は 24 時間後でも生存していると考えられる。PIT-F モデルでは傷害周囲部の樹状突起の変成が 24 時間後でも顕著に観察された。これに対して、傷害周辺部のスパインや樹状突起の変成は

脳梗塞誘導後 24 時間以内に回復すること^[48-51] が他のグループから報告されている。この違いは、用いたモデルの違いに起因する可能性が考えられ、PIT-F モデルでは他のモデルに比べて神経変成は比較的長く持続し、その後回復する可能性も残されている。この可能性の検討は今後の課題である。

4-3. ROS 産生が運動機能に及ぼす影響

PIT-F モデルを用いて、マウスに脳梗塞を誘導し、傷害誘導前(Pre)および、傷害誘導後 8 時間または 24 時間に各半身の運動機能のバランスを評価する Tail suspension test^[52, 53]を用いて運動機能の評価を行った(Fig. 13)。その結果、脳梗塞誘導後 8 時間および 24 時間の両方において、体の振り上げが傷害対側へ有意に偏向したことから、脳梗塞に伴う運動機能の障害が認められた(Fig. 13B, C, E, F)。EDV の投与が、脳梗塞のサイズを縮小しなかった(Fig. 13D, G)ものの、傷害周辺部での神経細胞樹状突起の変成を抑制したことから、EDV による運動機能の回復は傷害周辺部の樹状突起変成の抑制によるものであると考えられる。したがって、脳梗塞後の血管透過性の亢進による Fbg の漏出に伴う ROS 産生を抑制することは、虚血性脳梗塞による神経機能障害を抑制するための新たなターゲットとなる可能性がある。

4-4. まとめ

本研究の結果から、脳梗塞の急性期においては、傷害周辺部の血管透過性亢進に伴って Fbg が血管外に漏出し、この Fbg が Fbg レセプターである CD11b/CD18 インテグリン陽性細胞の活性化を介して ROS の産生が起こること、この ROS 産生により神経細胞の樹状突起の変成が誘導されること、その変成に伴い神経機能障害が増悪することが明らかとなった (Fig. 14)。

結語

本研究で確立した新規脳梗塞マウスモデルは、脳傷害の大きさおよび誘導位置の再現性が高く神経機能障害を伴っていた。また、本モデルを用いて C57BL/6J と BALB/c マウスにおいて同程度の脳梗塞誘導後の傷害修復と神経機能障害の経時的な修復に差があることを明らかにできた。これらの結果は、本モデルが、異なる遺伝的背景を持つマウスにおいても、傷害修復に加えて神経機能障害回復の評価が可能であることを示している。既存モデルでは、多くの遺伝子組換えマウスにおいて傷害サイズに差が認められることを考えると、これらの遺伝子組換えマウスにおける傷害修復および神経機能障害回復の評価に本モデルは有用であると考えられる。

さらに、本モデルを用いて、脳梗塞後の血管透過性亢進に伴って漏出した Fbg が Fbg レセプターである CD11b/CD18 インテグリンの活性化を介して ROS の産生を亢進する事、産生された ROS が神経変成および神経機能異常を誘導する新規のメカニズムを明らかにした。これらは、本モデルで誘導される傷害が高い再現性を有するため、得ることが出来た知見であると言える。

今回の研究から、脳梗塞増悪の新規のメカニズムが明らかとなった。しかし、産生した ROS が神経変成を誘導する分子メカニズムは明らかではない。また、レセプターの活性化は刺激に対する「能動的な」反応であり、本来は生理学的な有用性があると予想され、その過剰反応が脳梗塞における神経変成とそれに伴う神経機能異常を誘導すると考えられる。この生理機能は今後の検討課題である。本研究で確立した PIT-F モデルは、これらの課題の解明にも有用であると考えられる。

V. 図

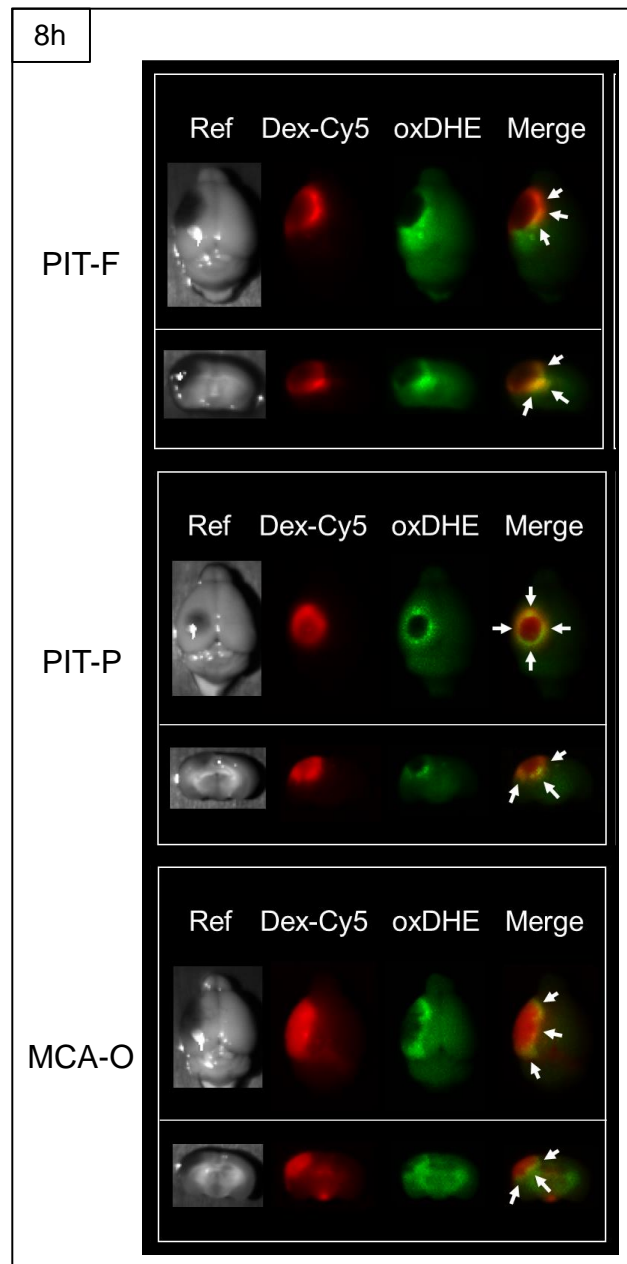


Fig. 8 異なる脳梗塞モデルにおける血管透過性亢進と ROS 産生
 PIT-F、PIT-P、MCA-O モデルにおける脳梗塞誘導後 8 時間での脳表面(上段)と傷害中心部における冠状断面(下段)の Ref、Dex-Cy5 陽性領域(赤色)、oxDHE 陽性領域(緑色)、Dex-Cy5 と oxDHE の重ね合わせ画像を示した。矢印は Dex-Cy5 と oxDHE の二重陽性領域を示す。Ref: 明視野、Dex-Cy5: 血管透過性、oxDHE: ROS 産生を示す。

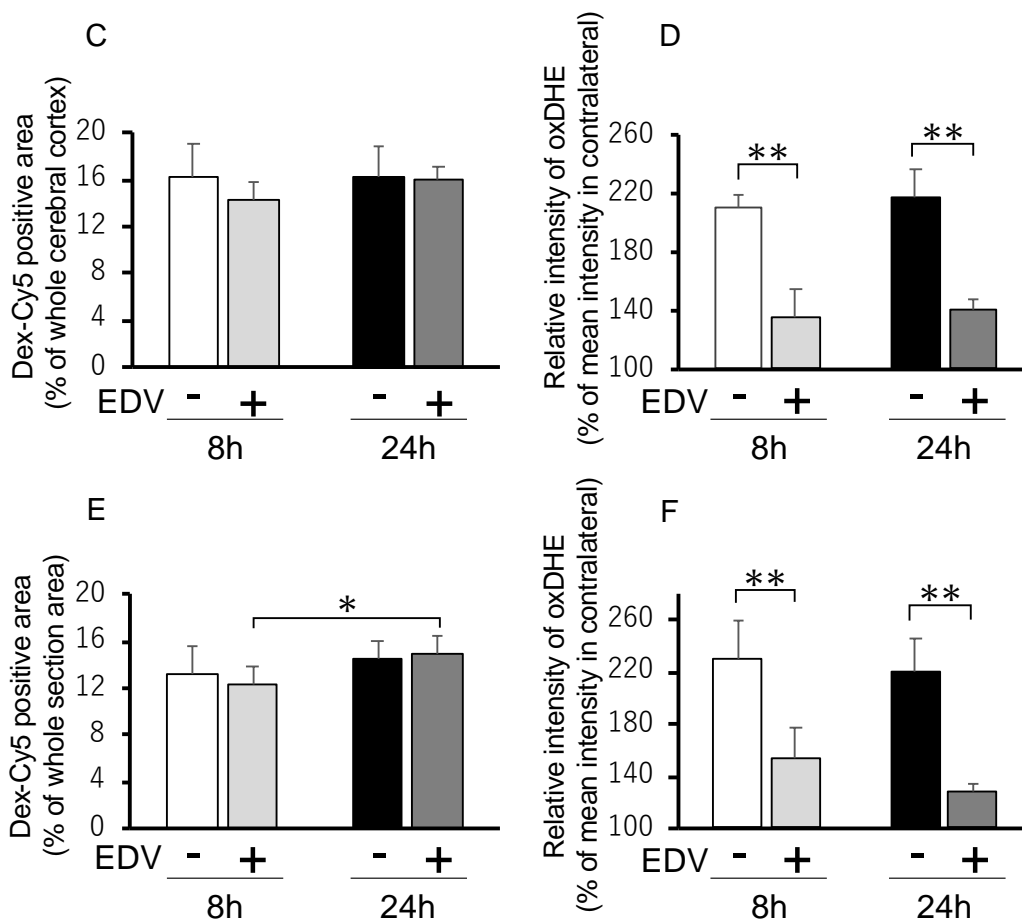
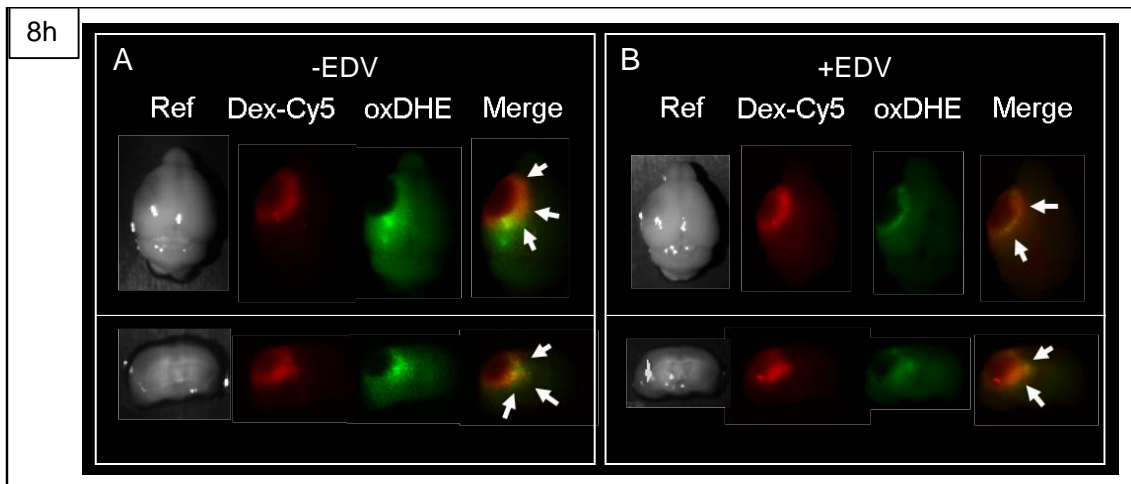


Fig. 9 EDVが血管透過性とROS産生に及ぼす影響

A, B: 脳梗塞誘導後8時間でのControl (A)およびEDV投与 (B)マウスの脳表面(上段)と傷害中心部における冠状断面(下段)の反射像(Ref)、Dex-Cy5 陽性領域(赤色)、

oxDHE 陽性領域(緑色)、Dex-Cy5 と oxDHE の重ね合わせ画像を示した。矢印は Dex-Cy5 と oxDHE の二重陽性領域を示す。

C-F: 脳梗塞誘導後 8 時間および 24 時間での大脳皮質と脳冠状断面に対する Dex-Cy5 陽性の血管透過性亢進領域(C, E)および、Dex-Cy5/oxDHE 二重陽性領域において傷害対側に対する oxDHE 陽性の ROS 産生領域の蛍光輝度(D, F)の割合をグラフに示す。

値は平均±標準偏差を示す。One-way ANOVA で統計検定を行なった。

使用したマウスの数、Control 群: n=4 (8h), n=4 (24h), EDV 投与群: n=4 (8h), n=4 (24h)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

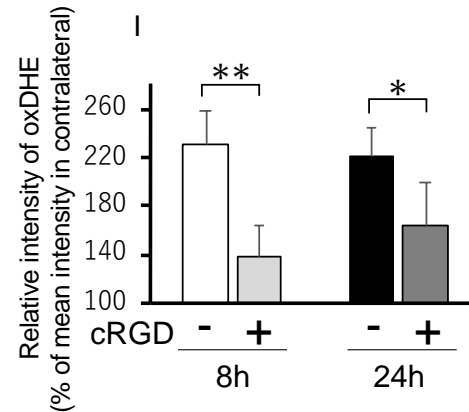
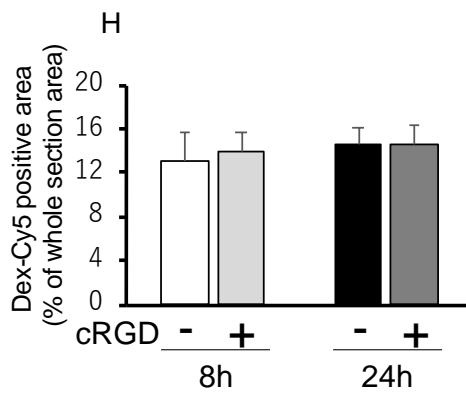
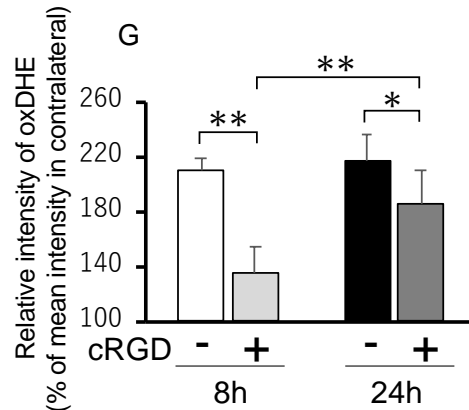
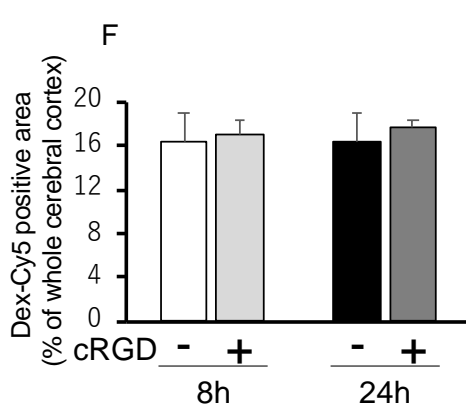
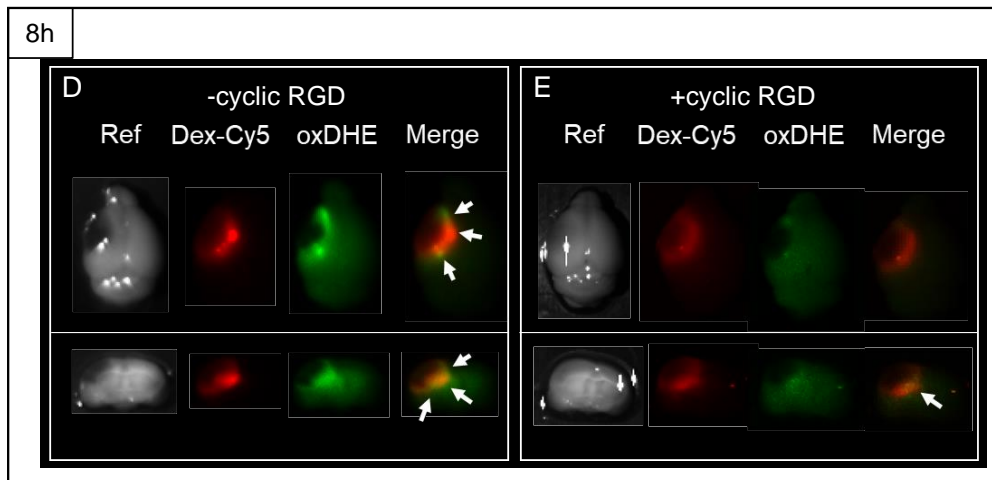
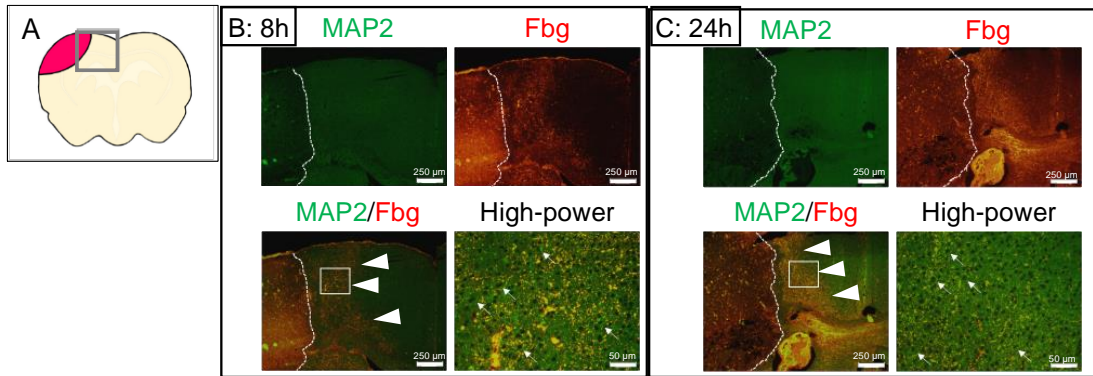


Fig. 10 Fbg の漏出と cyclic-RGD が血管透過性および ROS 産生に及ぼす影響

A: 脳梗塞傷害周辺領域。赤い部分が脳梗塞を示す。四角で囲われた部分は B と C の観察領域を示す。

B, C: 脳梗塞誘導後 8 時間および 24 時間における抗 MAP2 抗体陽性 (緑色)、抗 Fbg 抗体陽性 (赤色) の分布、MAP2 および Fbg の重ね合わせ画像および、MAP2/Fbg の重ね合わせ画像上の白枠で囲まれた領域の高倍率像(High-power)を示す。白い点線は、傷害領域と正常領域の境界を示す。矢印は MAP2 陽性の神経細胞を示し、矢頭は MAP2 陽性領域へ漏出した Fbg 陽性領域を示す。Scale Bar: 画像では $500 \mu\text{m}$ 、高倍率画像では $100 \mu\text{m}$ 。

D, E: 脳梗塞誘導後 8 時間での脳表面(上段)と傷害中心部における冠状断面(下段)の反射像(Ref)、Dex-Cy5 陽性領域(赤色)、oxDHE 陽性領域(緑色)、Dex-Cy5 と oxDHE の Merge 画像を示した。矢印は Dex-Cy5 と oxDHE の二重陽性領域を示す。

D: Control 群。E: cyclic-RGD 投与群。

F-I: 脳梗塞誘導後 8 時間および 24 時間での大脳皮質と脳冠状断面に対する Dex-Cy5 陽性の血管透過性亢進領域(F, H)および、Dex-Cy5/oxDHE 二重陽性領域において傷害対側に対する oxDHE 陽性の ROS 産生領域の蛍光輝度(G, I)の割合をグラフに示す。値は平均±標準偏差を示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

使用したマウスの数、Control 群: $n=8$ (8h), $n=5$ (24h), cyclic-RGD 投与群: $n=8$ (8h), $n=5$ (24h)

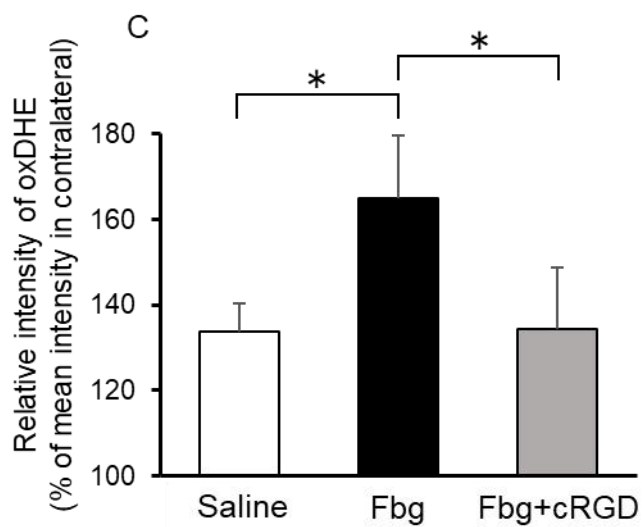
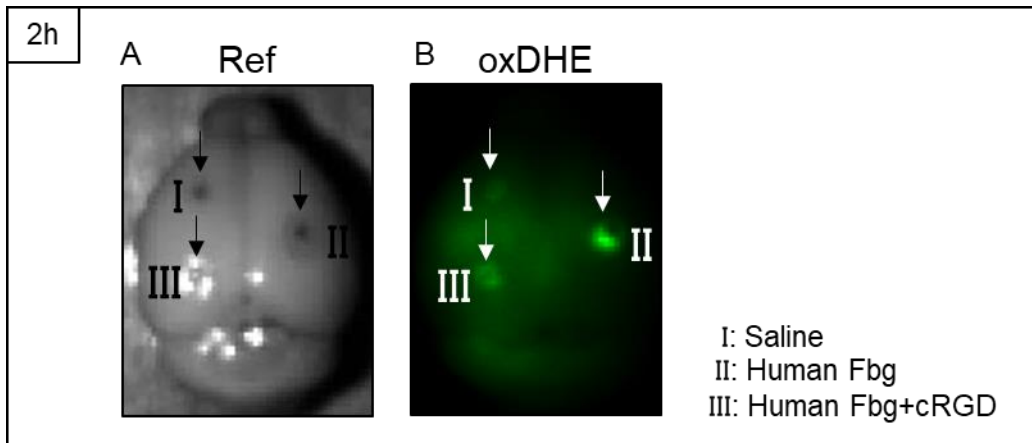


Fig. 11 大脳皮質への Human Fbg 投与後 2 時間における ROS 産生

A, B: 生理食塩水(Saline: I)、Human Fbg(II)および、Human Fbg に cRGD を添加した溶液(III)を大脳皮質表面の矢印の点に注入し、投与後 2 時間での脳表面の反射像(Ref: A)、oxDHE 陽性領域(緑色: B)の画像を示した。

C: 正常領域に対する各点での単位面積当たりの oxDHE 陽性の ROS 産生領域の蛍光輝度の割合をグラフに示した。

使用したマウスの数、n=6

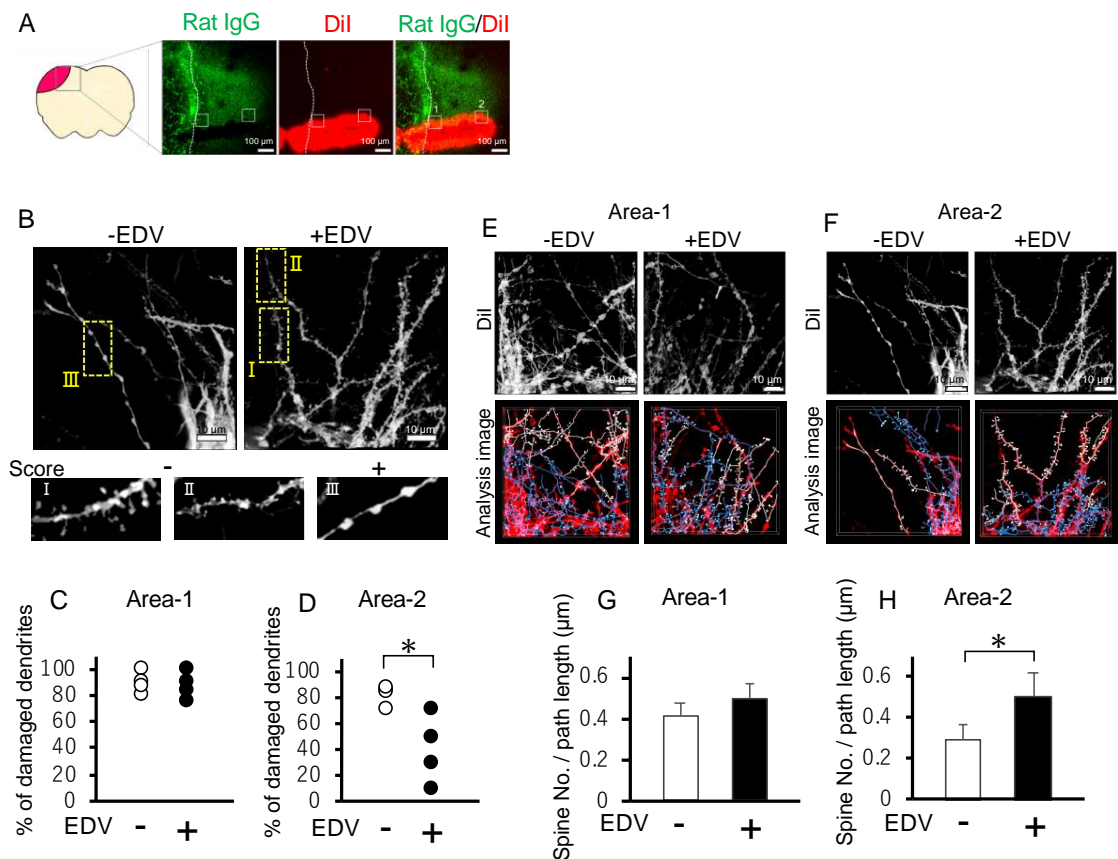


Fig. 12 脳梗塞誘導後8時間での血管透過性亢進領域における神経変成

A: 脳梗塞周辺部の枠内の領域を観察した。Rat IgG 陽性の血管透過性亢進領域(緑色)、Dil クリスタルの設置位置(赤色)、および Rat IgG/Dil の重ね合わせ画像を示す。Rat IgG 陽性の血管透過性亢進領域における Dil クリスタルの設置位置で、傷害に隣接する近位部(Area-1)、Rat IgG 陰性領域に近接する遠位部(Area-2)の樹状突起の形態を解析した。

B: 樹状突起変成の分類。上段は、Area-2 における Control 群(-EDV)または EDV 投与群(+EDV) マウスから得られた樹状突起の蛍光画像を示す。下段は、樹状突起変成の程度を形状から、正常なスパインが形成されたもの(I)、スパインが部分的に消失したもの(II)、樹状突起が数珠上に変成した(III)ものの3グループに分類し、(I)、(II)の樹状突起を正常(Damage score: -)とし、(III)のみを損傷した樹状突起(Damage score: +)とした。

C, D: Control 群および EDV 投与群における Area-1 と Area-2 での全樹状突起に対する損傷した樹状突起(III)の割合をグラフに示した。

E, F: Control 群および EDV 投与群における Area-1 および Area-2 で画像解析システム(AIVIA)を用いた樹状突起の解析。上段は Dil で染色された樹状突起の画像を、下段は AIVIA で解析された画像を示す。AIVIA では、単一の樹状突起を全て選択し、樹状突起の末端に分布する遠位の分枝(白色)と、近位に分布する分枝(青色)の 2 グループに分類した。

G, H: Control 群および EDV 投与群において Area-1(G)および Area-2(H)での樹状突起の末端に分布する遠位の分枝(白色)当たりのスパイン密度をそれぞれグラフで示した。Scale Bar: 100 μm (B)、10 μm (E), (F)。値は平均 \pm 標準偏差を示す。*: $p < 0.05$ 。使用したマウスの数、Control 群: $n=4$, EDV 投与群: $n=4$

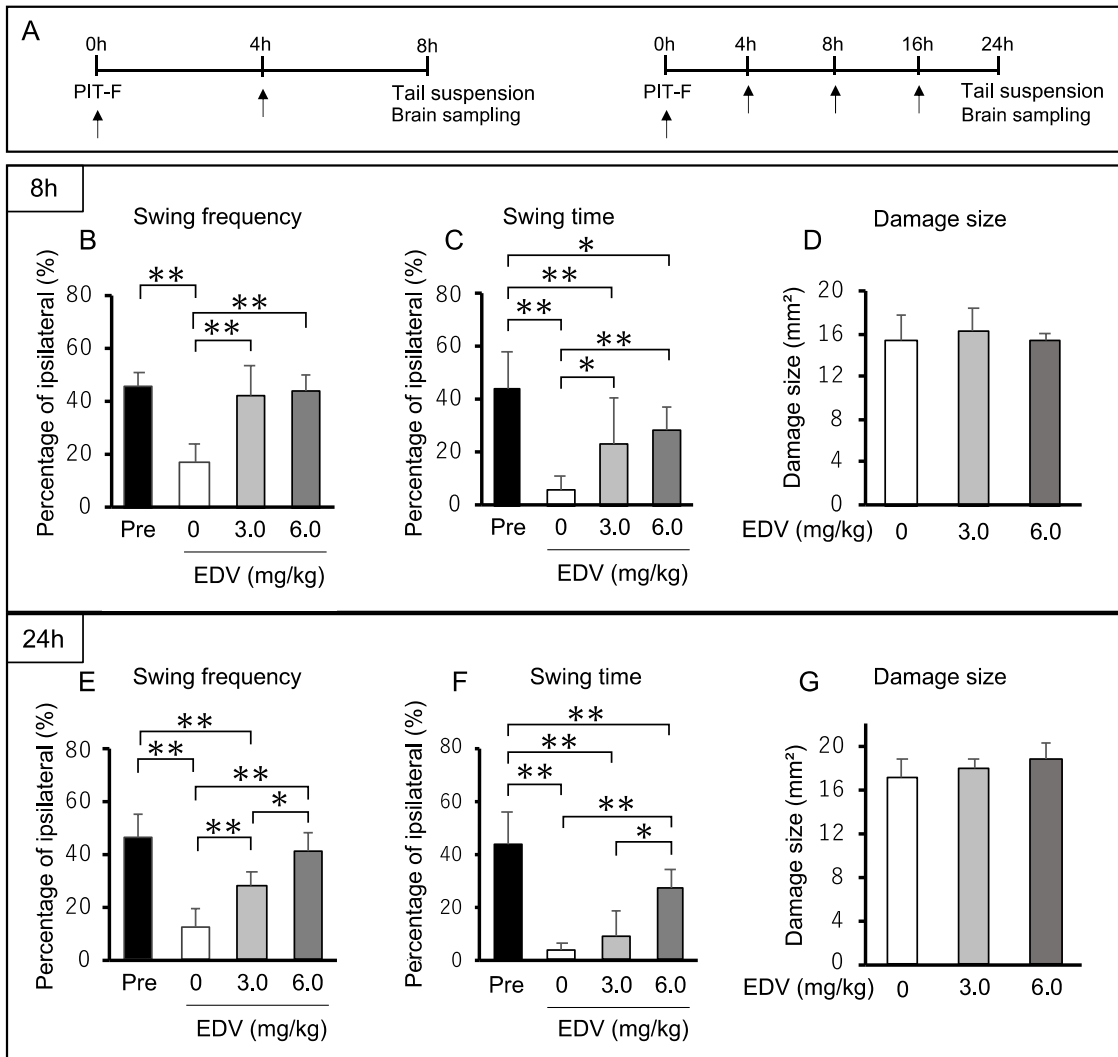


Fig.13 Tail suspension test と傷害サイズ

A: 実験の流れを模式図で示す。矢印は EDV の投与タイミングを示す。

B, C, E, F: 脳梗塞誘導後 8 時間(B, C)および 24 時間(E, F)での Control 群および EDV 投与群の Tail suspension test における傷害同側に体を振った回数(B, E)および時間(C, F)の割合を示した。

D, G: 脳梗塞誘導後 8 時間(D)および 24 時間(G)での Control 群および EDV 投与群の傷害サイズを示した。値は平均±標準偏差を示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

使用したマウスの数、脳梗塞誘導後 8 時間: $n=8$ (Control), $n=4$ (+EDV 3.0 mg/kg), $n=4$ (+EDV 6.0 mg/kg), 脳梗塞誘導後 24 時間: $n=8$ (Control), $n=4$ (+EDV 3.0 mg/kg), $n=4$ (+EDV 6.0 mg/kg)

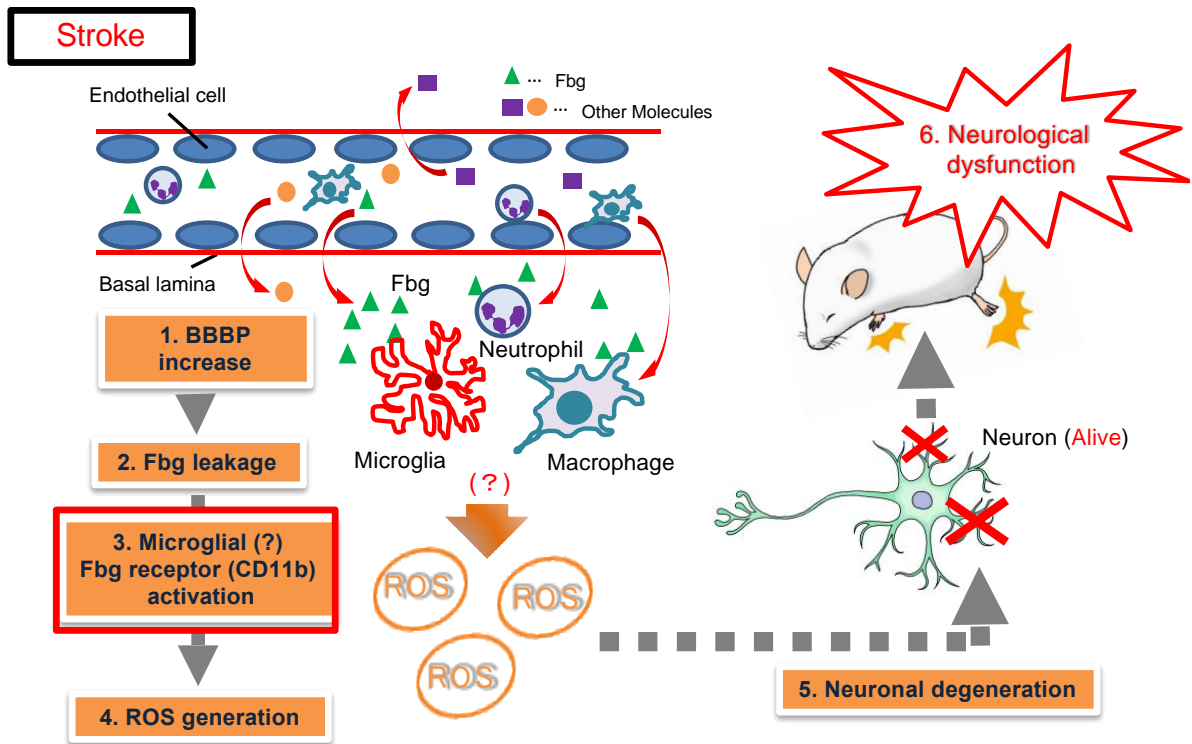


Fig.14 脳梗塞における血管透過性亢進に伴う ROS 産生および神経細胞変成
 本研究で明らかとなった、血管透過性亢進と神経細胞変成および神経機能異常のメカニズムをまとめた。脳梗塞誘導後 24 時間までの急性期においては、傷害周辺部の血管透過性の亢進に伴って Fbg が血管外に漏出し、この Fbg が CD11b/CD18 インテグリンを介してミクログリア、浸潤したマクロファージ、あるいは好中球を活性化することによって ROS が産生される。この ROS 産生に起因する神経細胞の変成によって、神経機能障害が増悪する。

VI. 参考文献

1. Fujie W, Kirino T, Tomukai N, et al. Progressive shrinkage of the thalamus following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1990; 21: 1485–1488.
2. Koizumi J, Nakazawa T and Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Japanese Journal of Stroke* 1986; 8: 1–8.
3. Umemura K, Wada K, Uematsu T, et al. Evaluation of the combination of a tissue-type plasminogen activator, SUN9216, and a thromboxane A2 receptor antagonist, vapiprost, in a rat middle cerebral artery thrombosis model. *Stroke* 1993; 24: 1077–1081; discussion 1081–1072.
4. Majid A, He YY, Gidday JM, et al. Differences in vulnerability to permanent focal cerebral ischemia among 3 common mouse strains. *Stroke* 2000; 31: 2707–2714.
5. Nagai N, Kawao N, Okada K, et al. Initial brain lesion size affects the extent of subsequent pathophysiological responses. *Brain Res* 2010; 1322: 109–117.
6. Zhang H, Prabhakar P, Sealock R, et al. Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major determinant of variation in severity of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30: 923–934.
7. Chan PH, Epstein CJ, Li Y, et al. Transgenic mice and knockout mutants in the study of oxidative stress in brain injury. *J Neurotrauma* 1995; 12: 815–824.
8. Nagai N, De Mol M, Lijnen HR, et al. Role of plasminogen system components in focal cerebral ischemic infarction: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation* 1999; 99: 2440–2444.
9. Wu J, Su G, Ma L, et al. Protein kinases mediate increment of the phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in spinal cord of rats following capsaicin injection. *Mol Pain* 2005; 1: 26.
10. Luong TN, Carlisle HJ, Southwell A, et al. Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *J Vis Exp* 2011
11. Ritzel RM, Patel AR, Spsychala M, et al. Multiparity improves outcomes after cerebral ischemia in female mice despite features of increased metabovascular risk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: E5673–E5682.
12. Parfenova H, Leffler CW, Basuroy S, et al. Antioxidant roles of heme oxygenase, carbon monoxide, and bilirubin in cerebral circulation during seizures. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 1024–1034.
13. Yano M, Kawao N, Tamura Y, et al. Spatiotemporal differences in vascular permeability after

ischaemic brain damage. *Neuroreport* 2011; 22: 424–427.

14. Merlini M, Rafalski VA, Rios Coronado PE, et al. Fibrinogen Induces Microglia-Mediated Spine Elimination and Cognitive Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *Neuron* 2019; 101: 1099–1108 e1096.
15. Ohmori C, Sakai Y, Matano Y, et al. Increase in blood-brain barrier permeability does not directly induce neuronal death but may accelerate ischemic neuronal damage. *Exp Anim* 2018; 67: 479–486.
16. Schroeter M, Jander S, Huitinga I, et al. Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. *Stroke* 1997; 28: 382–386.
17. Silver J and Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 146–156.
18. Yao X, Derugin N, Manley GT, et al. Reduced brain edema and infarct volume in aquaporin-4 deficient mice after transient focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2015; 584: 368–372.
19. Franklin B and Paxinos G. The mouse brain in the stereotaxic coordinate. *Third edition ed London: Elsevier* 2008
20. Kang HM, Sohn I, Kim S, et al. Optical measurement of mouse strain differences in cerebral blood flow using indocyanine green. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35: 912–916.
21. Hughes PM, Allegrini PR, Rudin M, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 308–317.
22. Pekny M, Wilhelmsson U, Tatlisumak T, et al. Astrocyte activation and reactive gliosis—A new target in stroke? *Neurosci Lett* 2019; 689: 45–55.
23. Kubis N. Non-Invasive Brain Stimulation to Enhance Post-Stroke Recovery. *Front Neural Circuits* 2016; 10: 56.
24. Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 2006; 26: 6627–6636.
25. Ueno M, Hayano Y, Nakagawa H, et al. Intraspinal rewiring of the corticospinal tract requires target-derived brain-derived neurotrophic factor and compensates lost function after brain injury. *Brain* 2012; 135: 1253–1267.
26. Lartey FM, Ahn GO, Ali R, et al. The relationship between serial [(18) F]PBR06 PET imaging of microglial activation and motor function following stroke in mice. *Mol Imaging Biol* 2014; 16: 821–829.
27. Smith GM and Strunz C. Growth factor and cytokine regulation of chondroitin sulfate

proteoglycans by astrocytes. *Glia* 2005; 52: 209–218.

28. Bektas H, Wu TC, Kasam M, et al. Increased blood–brain barrier permeability on perfusion CT might predict malignant middle cerebral artery infarction. *Stroke* 2010; 41: 2539–2544.

29. Nagai N, Suzuki Y, Van Hoef B, et al. Effects of plasminogen activator inhibitor–1 on ischemic brain injury in permanent and thrombotic middle cerebral artery occlusion models in mice. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1379–1384.

30. Rubin LL and Staddon JM. The cell biology of the blood–brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 1999; 22: 11–28.

31. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, et al. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis* 2010; 37: 13–25.

32. Keaney J and Campbell M. The dynamic blood–brain barrier. *FEBS J* 2015; 282: 4067–4079.

33. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 2–14.

34. Sun MS, Jin H, Sun X, et al. Free Radical Damage in Ischemia–Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 3804979.

35. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44–84.

36. Adams RA, Bauer J, Flick MJ, et al. The fibrin–derived gamma377–395 peptide inhibits microglia activation and suppresses relapsing paralysis in central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med* 2007; 204: 571–582.

37. Davalos D, Ryu JK, Merlini M, et al. Fibrinogen–induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nat Commun* 2012; 3: 1227.

38. Kharlamov A, LaVerde GC, Nemoto EM, et al. MAP2 immunostaining in thick sections for early ischemic stroke infarct volume in non–human primate brain. *J Neurosci Methods* 2009; 182: 205–210.

39. Soltani MH, Pichardo R, Song Z, et al. Microtubule–associated protein 2, a marker of neuronal differentiation, induces mitotic defects, inhibits growth of melanoma cells, and predicts metastatic potential of cutaneous melanoma. *Am J Pathol* 2005; 166: 1841–1850.

40. Kim BG, Dai HN, McAtee M, et al. Labeling of dendritic spines with the carbocyanine dye DiI for confocal microscopic imaging in lightly fixed cortical slices. *J Neurosci Methods* 2007; 162: 237–243.

41. Mufson EJ, Brady DR and Kordower JH. Tracing neuronal connections in postmortem human hippocampal complex with the carbocyanine dye DiI. *Neurobiol Aging* 1990; 11: 649–653.

42. Perez-de-Puig I, Miro-Mur F, Ferrer-Ferrer M, et al. Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. *Acta Neuropathol* 2015; 129: 239–257.
43. Pliyev BK, Antonova OA and Menshikov M. Participation of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in neutrophil transendothelial migration. *Mol Immunol* 2011; 48: 1168–1177.
44. Jeong EI, Chung HW, Lee WJ, et al. E2-25K SUMOylation inhibits proteasome for cell death during cerebral ischemia/reperfusion. *Cell Death Dis* 2016; 7: e2573.
45. Xu N, Meng H, Liu T, et al. TRPC1 Deficiency Exacerbates Cerebral Ischemia/Reperfusion-Induced Neurological Injury by Potentiating Nox4-Derived Reactive Oxygen Species Generation. *Cell Physiol Biochem* 2018; 51: 1723–1738.
46. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 2014; 515: 431–435.
47. Yan RY, Wang SJ, Yao GT, et al. The protective effect and its mechanism of 3-n-butylphthalide pretreatment on cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21: 5275–5282.
48. Brown CE, Wong C and Murphy TH. Rapid morphologic plasticity of peri-infarct dendritic spines after focal ischemic stroke. *Stroke* 2008; 39: 1286–1291.
49. Diaz A, Merino P, Manrique LG, et al. A Cross Talk between Neuronal Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Astrocytic uPA Receptor (uPAR) Promotes Astrocytic Activation and Synaptic Recovery in the Ischemic Brain. *J Neurosci* 2017; 37: 10310–10322.
50. Wu F, Catano M, Echeverry R, et al. Urokinase-type plasminogen activator promotes dendritic spine recovery and improves neurological outcome following ischemic stroke. *J Neurosci* 2014; 34: 14219–14232.
51. Zhang S, Boyd J, Delaney K, et al. Rapid reversible changes in dendritic spine structure in vivo gated by the degree of ischemia. *J Neurosci* 2005; 25: 5333–5338.
52. Borlongan CV and Sanberg PR. Elevated body swing test: a new behavioral parameter for rats with 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism. *J Neurosci* 1995; 15: 5372–5378.
53. Eckmann DM and Armstead SC. Surfactant reduction of cerebral infarct size and behavioral deficit in a rat model of cerebrovascular arterial gas embolism. *J Appl Physiol (1985)* 2013; 115: 868–876.

VII. 謝辞

今研究を行うにあたり、多大なるご指導・ご助言を頂きました長浜バイオ大学動物分子生物学研究室の齊藤修教授、ペプチド科学研究室の向井秀仁教授、エピジェネティック制御学研究室の中村肇伸教授、動物生理学研究室の永井信夫教授に厚く御礼申し上げます。

また実験の実施に協力して頂いた、動物生理学研究室の河津陸さん、野尻悠斗さん、野村美月さん、増田陽さん、森池優雅さんに深く感謝します。

最後に実験のために貴重な命を提供していただいた実験動物に深く感謝するとともに、追悼の意を表します。