

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19500366  
 研究課題名（和文） 実験用ミニブタを用いた脳梗塞モデルの開発ならびに再生医療研究への応用  
 研究課題名（英文） Development and its applications of cerebral ischemia model using experimental miniature pigs  
 研究代表者  
 今野兼次郎（KONNO KENJIRO）  
 自治医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：30323348

研究成果の概要：

本研究では、1年目にラクナ梗塞モデルを完成させ、2年目にそのモデルを再生医療への応用を検討する事を目標とした。ミニブタラクナ梗塞の作製に成功し、その応用への前段階として GFP 遺伝子導入ブタの脳内における GFP 発現を確認した。また、脳細胞の増殖部位確認も個体レベルで確認し、再生医療への応用に大きく踏み出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：病態モデル、脳梗塞、再生医療、ミニブタ、GFP 遺伝子導入ブタ

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究開始以前から遺伝子改変動物を用いた研究が盛んに行われ、それは脳研究においても同様である。ただし、脳研究で用いられている実験動物はマウスやラットなどの齧歯類であり、ヒトとは基本的な解剖から異なる（図1）。従って、齧歯類を用いた研究結果の臨床応用において、基本的な解剖が異なる、言い換えると、種の壁を越えられない事に起因すると考えられる問題が、これまで見過ごされていた。

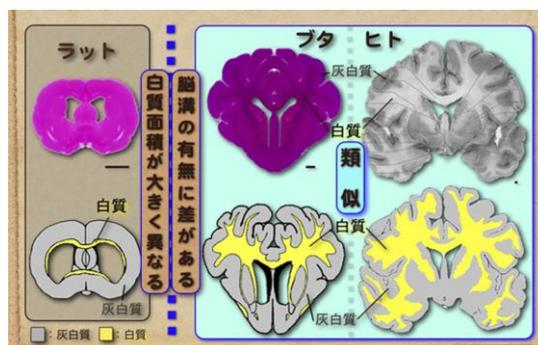


図1 脳解剖の種差

(2) 上述の通り、脳の血管障害に関する研究においては、種の壁による問題は大きく、実験動物の選択が重要となる。そこで、ミニブタに注目し、群馬大学の齊藤延人教授や今井英明助手らと共に、これまでミニブタを用いた脳梗塞モデルの開発を行ってきた。疾患モデルとしての有用性を報告すると共に (Imai *et al.*, 2006), 学会賞 (日本実験動物医学会第1回前島賞) も受賞するなど、少しずつではあるが認知されつつあった。この疾患モデルは、中大脳動脈 (MCA) をバイポーラにて焼灼して作製するが、齧歯類の脳梗塞モデルと比較し、ヒトの脳梗塞に非常に類似していた。しかしながら、梗塞部位が大き過ぎたため、再生医療への応用は困難であった。そこで、新たなミニブタモデルの作製に迫られていた。

(3) 静岡県畜産技術研究所の河原崎達雄博士らが家畜豚に GFP 遺伝子導入したブタの作製に成功し、それを我々の研究に使用する機会を得ていた。

## 2. 研究の目的

脳梗塞は日本における三大死因の1つである。死亡を免れたとしても後遺症が残る場合があり、患者本人だけでなく、患者を支援する周囲の人々にも大きな負担となり、高齢化社会と共に社会問題化している (図2)。

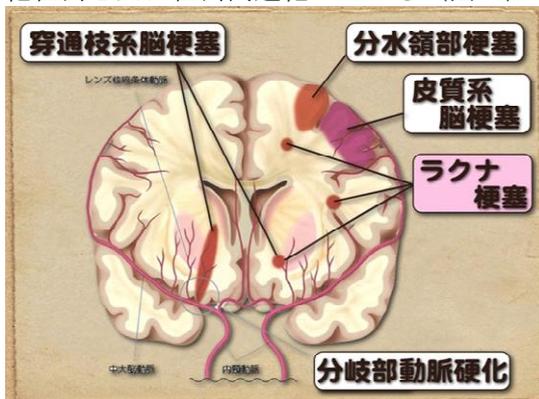


図2 ヒトの脳梗塞

しかしながら、有効な治療法の開発が遅れているのが現状であり、依然として疾患である。以上の状況を鑑み、脳血管障害に対する有効な治療法の開発のためには、良質な疾患モデルの開発が必須であるとの認識から、ミニブタを用いた脳梗塞モデルの開発を行ってきたが、本研究では更なる疾患モデルの開発と再生医療への応用を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) ミニブタに前処置として、塩酸ケタミン 60mg/kg とキシラジン 2.0mg/kg を筋肉注射して鎮静させた後、気管チューブを挿入し、イ

ソフルラン 1.2-1.9%にて吸入麻酔を術中維持した。

麻酔後、ブタの右前頭側頭骨を開頭し、硬膜を切開した後、顕微鏡下で前脈絡叢動脈を確認し、バイポーラにて電気焼灼する事により血流を遮断した。遮断が完全である事を確認するために、焼灼後は血管を切断した。その後、閉頭した。脳梗塞の判定は、①MRI ②脳組織の一般染色および免疫染色 ③脳組織の電子顕微鏡レベルでの観察 ④疾患モデルブタの臨床症状の解析、にて行った。

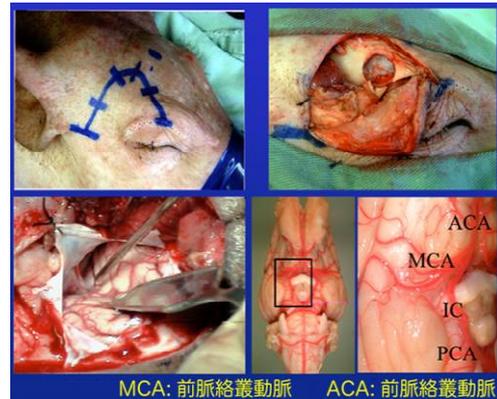


図3 ブタ脳梗塞モデルの作製方法

(2) 静岡県畜産技術研究所の河原崎達雄博士らが作製した GFP 遺伝子導入ブタを御提供頂いたが、本学解剖学講座の平尾温雄助教と共に、神経組織における GFP 発現を確認すべく、塩酸ケタミン 60mg/kg とキシラジン 2.0mg/kg を筋肉注射して鎮静させた後、4%の深麻酔下で麻酔を維持した。その麻酔下で左右総頸動脈を露出させ、両動脈から 1%ヘパリン加生理食塩水 1500mL にて血液を洗い出し、その後、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定した。脳摘出後、GFP 抗体を用いて脳での GFP 発現を免疫染色にて確認した。

(3) 共同研究者の齋藤らは、脳細胞が分裂能を残していると思われる生後 2 週齢のブタにブロモデオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与し、ブタの脳における細胞分裂が活発な領域を確認した。

## 4. 研究成果

(1) 様々な脳血管に注目し、新たな脳梗塞モデルの作製を試行錯誤したが、我々は前脈絡叢動脈に注目した。この血管は脳白質の中でも多数の軸索が通過する内包に血液を供給しており、この血管を閉塞させる事により、ラクナ梗塞を作製する事に成功した (図4)。

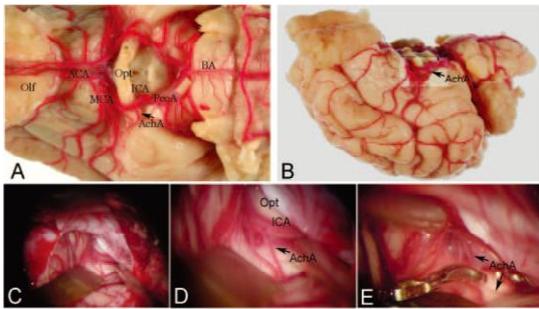


図4 ミニブタの前脈絡叢動脈

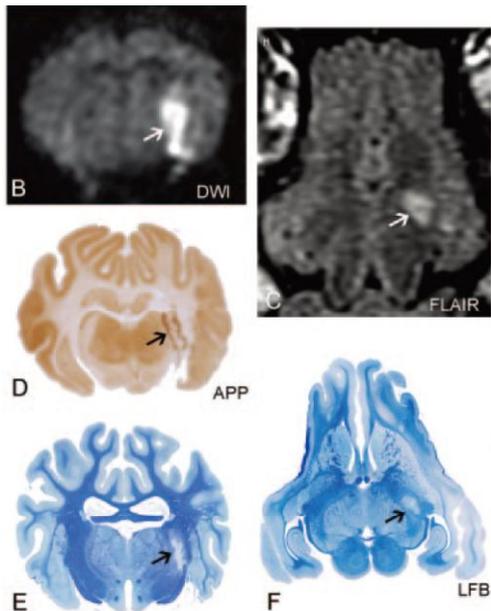


図5 ラクナ梗塞モデルの組織像

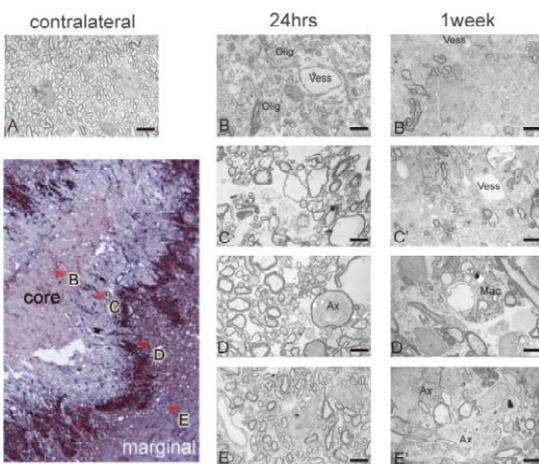


図6 ラクナ梗塞モデルの電子顕微鏡像

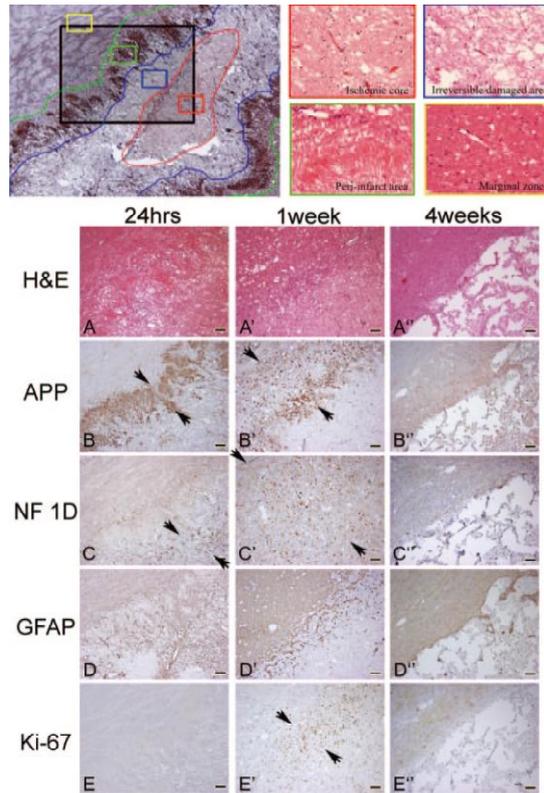


図7 脳梗塞病理の概念図



図8 ラクナ梗塞モデルの術後観察

この疾患モデルは、約9%に血管の解剖的の差異に起因すると思われる疾患モデル作製が不可能であったが、それ以外は非常に安定した病理像や臨床症状を呈した。

(2) 神経組織における GFP 発現に関して調べた結果、嗅上皮においては嗅細胞や支持細胞、ボーマン腺ならびに嗅神経に発現が認められると共に、BrdU や各種抗体を用いて免疫染色を行った結果、未分化な前駆細胞から成熟した嗅細胞において GFP を発現しているのが確認出来た。

(3) 生後2週齢のブタに BrdU を腹腔内投与した結果、脳室周囲 (SVZ, Subventricular Zone) ならびに海馬の歯状回神経細胞層より更に内側にある小型の細胞において BrdU が確認さ

れた事から、これらの細胞が再生治療のために有用である事が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Tanaka, Y., Imai, H., Konno, K., Miyagishima, T., Kubota, C., Puentes, S., Aoki, T., Hata, H., Takata, K., Yoshimoto, Y., Saito, N. Experimental model of lacunar infarction in the gyrencephalic brain of the miniature pig: neurological assessment and histological, immunohistochemical, and physiological evaluation of dynamic corticospinal tract deformation. Stroke 査読:あり 39(1) :205-212, 2008.
- ② 齋藤敏之. ブタのしぐさと賢さの神経機構に迫る—ブタの脳科学—. ビオフィリア 査読:なし 第4巻:50-54, 2008.

[学会発表] (計4件)

- ① 今野兼次郎 医学領域におけるブタ、特にミニブタの利用. 札幌実験動物セミナー 2008.12.6. 北海道伊達市
- ② 平尾温司, 河原崎達雄, 今野兼次郎, 竹内公一, 大竹正剛, 大河原重雄, 小林英司 CMV-IE GFP トランスジェニックブタの嗅上皮について. 日本味と匂学会 2008.9.17 富山県富山市
- ③ 平尾温司, 河原崎達雄, 今野兼次郎, 大竹正剛, 大河原重雄, 小林英司, 竹内公一 CMV-IE GFP トランスジェニックブタの嗅上皮における GFP 発現様式について. 自治医科大学シンポジウム 2008.8.30 栃木県小山市
- ④ 齋藤敏之, 藤原清悦, 今野兼次郎, 小林英司, 明間立雄, 笹森壮一郎, 山口峻司 無線を用いたブタの神経活動記録—有線との比較. Telemetry system for recording of pig neuronal activities comparison with the cable system. 第31回日本神経科学大会 2008.7.9. 東京都千代田区

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

今野兼次郎 (KONNO KENJIRO)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 30323348

### (2) 研究分担者

齋藤敏之 (SAITO TOSHIYUKI)  
(独) 農業生物資源研究所  
・動物科学研究 領域・主任研究員  
研究者番号: 10162215