

財団法人日中医学協会
2004年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

平成17年 3月 11日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

受給者氏名： 加藤 宏 司



所属機関名： 山形大学 医学部

所属部署： 神経機能統御学分野 職名： 教授
〒 990-9585

所在地： 山形市飯田西2丁目2番2号

電話： 23-628-5217 内線： 直通

1. 助成金額： 1,000,000 円

2. 研究テーマ

調査・共同研究助成

砂ネズミの海馬脳虚血モデルを用いた漢方薬の治療効果

3. 成果の概要 (100字程度)

砂ネズミの海馬虚血モデルを作成し、行動実験と海馬の組織および電気生理学実験を行った。その結果の報告にもとづき、李建民先生には博士(医学)号の授与が決定した。また、若手の付愛軍先生が来日し勉強した。一方、加藤宏司が中国に行き研究指導等を行った。これらにより、今後の共同研究の基礎を築くことができた。

4. 研究組織

日本側研究者氏名： 加藤 宏 司 職名： 教授

所属機関： 山形大学医学部 部署： 神経機能統御学分野

中国側研究者氏名： 李 建 民 職名： 教授

所属機関： 華北煤炭医学院 部署： 脳神経外科

砂ネズミの海馬脳虚血モデルを用いた漢方薬の治療効果

研究者氏名	加藤宏司, 李建民
日本研究機関	山形大学医学部 神経機能統御学分野
中国所属機関	華北煤炭医学院脳神経外科, 教授
指導責任者	教授 加藤宏司
共同研究者	藤井聡, 山崎良彦, 金子健也, 付愛軍

本報告書では、I) 砂ネズミの海馬虚血モデルを用いた学習行動と海馬CA1ニューロンの研究と題した結果と、II) 助成事業の援助を受けて達成された共同事業との二つに、内容を分けて報告する。I) は漢方薬の治療効果を検証するための基礎になる実験結果である。II) については概要を報告する。

I) 砂ネズミの海馬虚血モデルを用いた学習行動と海馬CA1ニューロンの研究

要旨

高齢化社会で最も問題になっている疾病の一つは、脳梗塞を代表とする脳の虚血性疾患である。これに対する予防と治療に関する漢方薬の有効性を検証するためには、適切な脳の虚血モデルを作成し、虚血によりニューロンの機能がどうなるか、また個体の行動がどうなるかをまず明らかにする必要がある。その上で漢方薬の投与の有無で効果を検証しなければならない。本研究は、両側頸動脈を一過性に閉塞した砂ネズミを用いて、海馬ニューロンの組織と電気生理学的な性質および学習行動とを調べた結果であり、砂ネズミの一過性虚血モデルが漢方薬の効果を検証するのに適したモデルであることを明らかにしたものである。

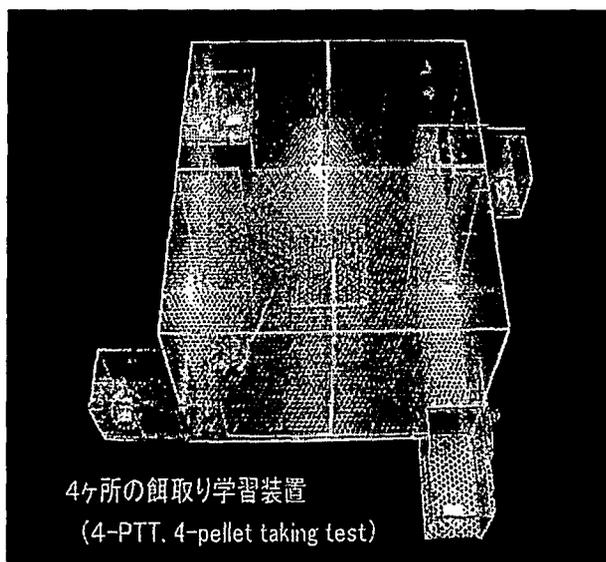
Key Words 砂ネズミ, 両側頸動脈閉塞, 海馬遅発性神経細胞死, 4ヶ所からの餌取り学習, 海馬薄切標本, 海馬CA1ニューロンのシナプスの可塑性 (長期増強と脱長期増強)

諸言

脳の神経細胞は血流障害に脆弱である。なかでも、陳述記憶や場所記憶に深く関係する海馬CA1領域の神経細胞は、一過性の虚血により特異な遅発性神経細胞死がおこることが知られている。砂ネズミはウィリス動脈輪で内頸動脈系と椎骨動脈系との間の連絡がないため、両側の総頸動脈を閉塞するだけで確実に前脳虚血をおこす

ことができる。一方、ラットは海馬ニューロンの性質や学習実験によく用いられているが、頸動脈閉塞による虚血前脳モデルを一定に作ることは難しい。椎骨・脳底動脈系がウィリス動脈輪に入り、単に両側頸動脈を閉塞しただけでは一定した前脳虚血を得るのが難しいからである。

本研究では実験動物として砂ネズミを採用することにした。両側の頸動脈の閉塞時間を加減することで、容易に一定レベルの前脳虚血モデルを作ることが出来るからである。しかし、砂ネズミの学習行動の観察には工夫が必要であった。ラットなどの学習実験として用いられている、周囲の視覚情報を手がかりとしたモリスの水迷路や八方迷路は、砂ネズミには適切でない。砂ネズミは泳ぎが得意でないからである。



4ヶ所の餌取り学習装置
(4-PTT, 4-pellet taking test)

図 1

そこで、本実験では砂ネズミの場所学習に適した学習装置、「4ヶ所からの餌取り学習装置 4-pellet taking test apparatus, (4-PTTA)」(図1)を作り学習行動を観察した。4-PTTAは透明なアクリ製の50 cm四方の中央の箱と、脇の4ヶ所に付けた餌場から出来ている。砂ネズミを床の中央の台に載せ実験を開始する。餌場には小さなペレットを置いて、これを取ることを学習する。毎日1回の試行を午後6時にスタートし、試行は20分間とした。摂食ドライブのために朝9時から飼育ケージの餌を取り外した。砂ネズミの学習中の行動はコンピュータに記録した。これらには、餌を取った場所と時間、毛づくろいや立ち上がり行動のタイミングなどであった。

本研究では虚血に対する漢方薬の効果を検討するための基礎実験であり：1) 海馬 CA1 の神経細胞死の程度と4-PTTA を用いた学習行動との関係、2) 術後の過剰運動と学習行動との関係、3) 学習障害の回復の有無の検討、4) 海馬 CA1 の残存神経細胞の電気生理学的な性質、について検討した。

対象と方法

実験には13-16週齢のオスの砂ネズミ (mongolian gerbil, 60-80 g) を用いた。動物舎から実験室に動物を移し、少なくとも5日間1匹ずつケージに入れて飼育し、まず一般的な行動を観察した。餌箱への接触、餌の摂取

量、体重の変化を自動的に観察出来る装置を作り、それらのデータをコンピュータに記録した(図2)。その後、ネブタール麻酔下で両側総頸動脈の閉塞手術を施した。動物を2群に分け、5分間 (five-min, F群) あるいは10分間 (ten-min, T群) 閉塞群とした。砂ネズミは術後の過剰運動が消失する10日目 (-10群) および20日目 (-20群) から学習実験をスタートした (F-20群は、F-10群とほぼ同じ結果であったため、今回は、F-10, T-10, および T-20の3群に分けて報告する)。それぞれの群について、

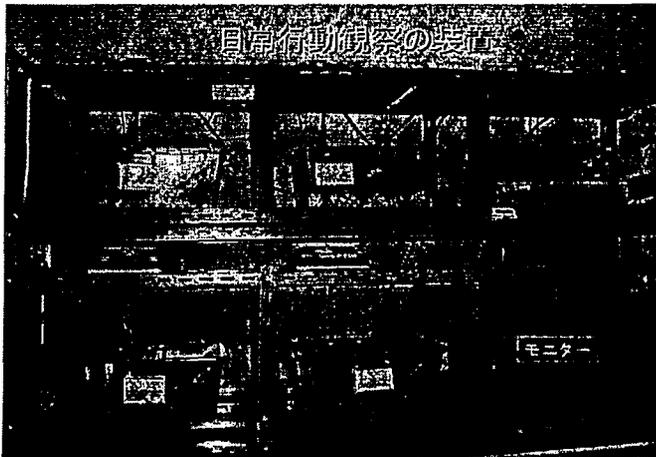
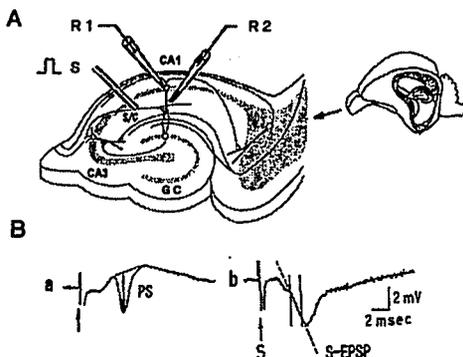


図 2 (上) 図 3 (下)

電気生理の実験: 刺激と記録



行動・感覚の観察装置

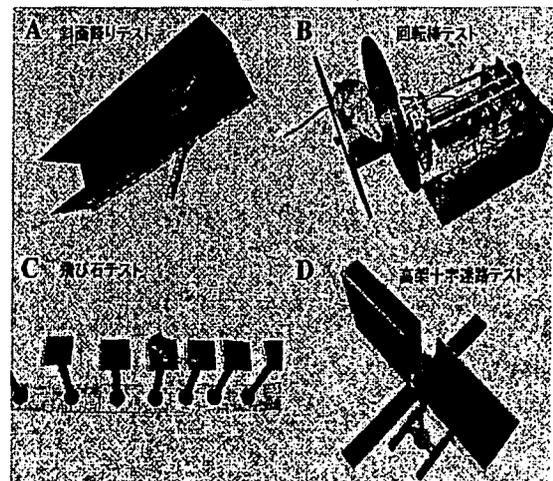


図 4 (下)

学習実験の他に、1)海馬 CA1 に残存するニューロンの数を染色して組織学的に数え、2)海馬薄切片を作り残存ニューロンの電気生理学的な性質を検討した (図3)。

学習実験の間およびその後、日常行動を続けて観察すると共に、砂ネズミに適当な装置（斜面降りテスト、回転棒テスト、飛び石テスト、高架十字迷路テスト）を作成して、感覚および運動機能をチェックした（図4）。

なお、本実験は山形大学医学部動物実験指及び動物愛護及び管理に関する指針に従って行った。

結果 結果をまとめると以下のようであった。

- 1) T群では術後剰な運動行動が見られたが、これは数日以内におさまった。ごく小数例であるが、左・右の海馬、あるいは背・腹側の海馬でCA1領域の残存神経細胞数に25%以上の差の見られる固体があった。これらの個体については今回の解析から除外した。
- 2) CA1領域の平均残存ニューロンは対照群（閉塞手術を施さない群）を100%とすると、F-10群では $69.1 \pm 3.0\%$ (n=6)、T-10およびT-20群ではそれぞれ、 12.4 ± 3.0 (n=6) および $10.9 \pm 2.9\%$ (n=6)であった（図5）。

海馬CA1領域の残存ニューロン

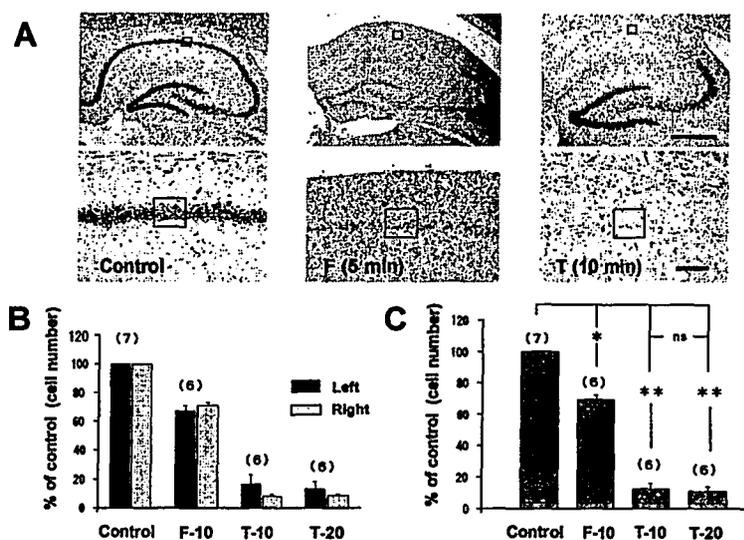


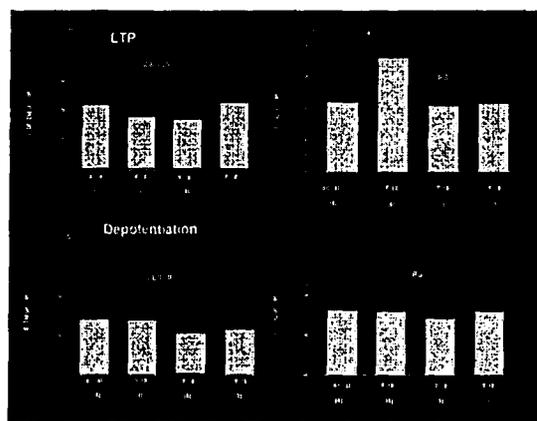
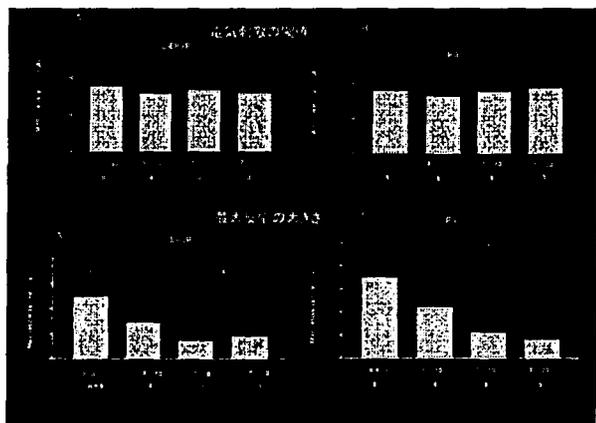
図 5

- 3) 4-PTTA を用いた学習行動では、T-10 群で、対照群 (n=7) と比較して有意の障害が見られ、さらにこの群は作業記憶が障害されていた。有意差は、①学習をスタートしてから4個の餌を取り終わるまでにかかった時間、②学習完成日（4ヶ所の餌を3分間以内に、続けて3日間取り終わる場合の第1日目）で見られ、作業記憶の障害は、③一度餌を取り終わった餌場に再度入る回数（エラー、作業記憶）で見られた。

- 4) T-20 群では、生存神経細胞数は T-10 群とほぼ同程度であるにもかかわらず、4-PTT 学習行動は対照群と有意差がなく、学習障害の回復が起っていた。
- 5) いずれの群も、海馬スライスの残存神経細胞の性質は対照群と有意差はなかった。つまり、①反応を起こす電気刺激の閾値（図6上段）、②シナプスの長期増強 LTP、および③脱長期増強 Depotentiation の程度（図7）

図 6

図 7



には対照群との差はなかった。しかし、③反応の振幅はT群では有意に減少していた(図6下段)。

6) 各種の運動と感覚のテストでは、F群、T群共に対照群と有意な差はなかった。

考察

砂ネズミの両側経動脈閉塞を10分間行くと、海馬CA1神経細胞の約90%が限局的に破壊された(遅発性神経細胞死)。それにもかかわらず、砂ネズミは4-PTTAによる場所学習が可能であった。海馬が場所学習に重要であることが知られていることから、もっと強く障害が起こるのではないかと予想していたが、意外な結果であった。これにはいくつかの可能性が考えられるが、最も可能性のあるのはこの学習を達成するのに脳のいくつかの複数の部位が関わっており、海馬はそのうちの一つで、これのみの破壊では学習にある程度の障害が見られるものの学習遂行は可能であるとする考え方である。そこで注目されるのは、この学習障害が約3週間で回復する点である。海馬の残存神経細胞の数は増えておらず、また神経細胞の性質も対照群と変化が見られないという今回の実験結果からすると、この学習に関わっている脳の他の部位、例えば嗅皮質 rhinal cortex や前頭葉による代償作用が起こっている可能性が高い。他の可能性としては、この学習遂行にはいくつかの手がかりを利用して、海馬の破壊で失われる手がかりをすばやく他の手がかりに変えて学習を可能にするということも考えられる。

学習実験を脳を破壊した動物で行う際には、運動や感覚そのものが障害されていないか細心の注意が必要である。今回の実験ではそれをチェックしたが、対照群とは有意な変化は見られなかった。また海馬破壊の術後に過剰運動が起こりこれが学習行動を障害する可能性が指摘されている。今回も過剰運動が見られたがこれは術後数日で止み、これが学習障害の主要な原因ではないと結論した。

以上のことから、砂ネズミを用いた前脳虚血モデルは、①組織学的な神経細胞の数、②電気生理学的な反応の大きさ、さらには③4-PTT装置を用いた学習障害の程度の3点から、今後各種の漢方薬の検証に使えるモデルであると結論した。

参考文献他

李建民先生は本実験の結果を英文の論文にして博士(医学)論文として提出し、審査を受けて合格した。現在雑誌に投稿する準備を進めている。

11) 助成事業の援助を受けて達成された共同事業

1. 李先生は3回来日し、追加実験、論文作成、および学位論文の発表を行った。その間、華北煤炭医学院の付愛軍先生(脳神経外科講師)が来日し、李先生からも指導を受け実験技術等を勉強して帰国した。
2. 李建民先生の滞在中の平成16年6月に蘭州医学院の景玉宏先生(解剖組織学)が国際協力銀行と中国西部六省との円借款協定の援助で来日した。教室で彼を受け入れたので、同時期に中国の別々の大学の先生が我々と実験する機会に恵まれた。そこで、煤炭医学院と蘭州医学院が、将来この様な方法で脳虚血に対する漢方薬の効果というテーマで共同実験に取り組むことになりその計画が中国で進んでいる。
3. 加藤は平成16年9月15日から1週間華北煤炭医学院を訪問した。そこで行われている砂ネズミの学習実験について脳神経外科の若手と4回にわたり討論をした。またその機会に、医学院の学生に“Functions of glial cells studied in CA1 area of the sliced hippocampus of rat”と題して講演し、さらに看護学科の学生に対して“日本語学習”と題して2回の講義を行った。
4. 訪中の際に、4-PTTAを中国で作製して実験することについて、および他の案件についての協議をし、華北省および華北煤炭医学院(袁聚祥院長)と協定を結んだ。

作成日：2005年3月13日