

Enriched environment が海馬神経細胞死及び  
神経新生へ与える影響  
：ラット脳虚血モデルを用いた検討

Influence of stress on hippocampal neuronal cell death and  
neurogenesis in rat cerebral ischemia in enriched environment

日本大学大学院医学研究科  
外科系脳神経外科学専攻 博士課程

加藤 智一

修了年 2015 年

指導教員 吉野 篤緒

Enriched environment が海馬神経細胞死及び  
神経新生へ与える影響  
：ラット脳虚血モデルを用いた検討

Influence of stress on hippocampal neuronal cell death and  
neurogenesis in rat cerebral ischemia in enriched environment

日本大学大学院医学研究科  
外科系脳神経外科学専攻 博士課程

加藤 智一

修了年 2015 年

指導教員 吉野 篤緒

## 目次

1. 要旨
2. 略語集
3. 研究の背景
4. 材料
5. 動物の取り扱い及び実験における倫理的配慮
6. 方法
  - 6-1 ラットの各群モデル作成
  - 6-2 脳組織切片の作成
  - 6-3 行動解析による空間記憶の評価
    - 1) Y字迷路試験 (Y-maze test)
    - 2) 新奇物体認識試験 (novel object recognition test)
  - 6-4 FJB の免疫組織化学染色
  - 6-5 BrdU の投与及び免疫組織染色
  - 6-7 定量と解析
7. 結果
  - 7-1 Y字迷路試験 (Y-maze test)
  - 7-2 新奇物体認識試験 (novel object recognition test)
  - 7-3 海馬における遅発性神経細胞死
  - 7-4 海馬における神経新生
8. 考察

8-1 海馬における遅発性神経細胞死

8-2 海馬における神経新生

8-3 行動解析による空間記憶の評価

9. 結語

10. 謝辞

11. 図表

12. 引用文献

13. 研究業績

## 1. 要旨

【背景】脳血管障害は、我が国における死亡原因の第4位であり、介護保険法に基づく要介護者の原因疾患の第1位を占めている。そのため、本疾患の予防は、現代医療の大きな課題である。我々は過去に、予防医学の観点から環境要因が脳虚血に及ぼす影響を検討してきた。虚血前のストレス負荷が、ラット脳虚血モデルにおける海馬の遅発性神経細胞死を増悪させ、神経新生を抑制することを報告してきた。一方、ストレスとは対照的な環境である enriched environment (EE) が脳血管障害による神経細胞損傷に対してどのような影響を及ぼすかは未だ明らかにされていない。そこで、ラットの一過性前脳虚血モデルを用いて、虚血前の EE が脳虚血による神経損傷に及ぼす影響を与えるか検討した。

【材料と方法】月齢 6 ヶ月の雄 Sprague-Dawley (SD) ラット 32 匹を SE+Sham 群 (standard environment : SE)、SE+虚血群、EE+Sham 群及び EE+虚血群の 4 群 (各 8 匹) に分けた。SE 飼育群は 255×220×150 mm の飼育ゲージで 6 週間、各ゲージ 2 匹ずつ飼育した。一方、EE 飼育群は 800×400×610 mm の広いゲージで 6 週間飼育した。各ゲージに 4 匹ずつ飼育し、ゲージ内にはプラスチック製のトンネル、プラットフォーム、木製のブロック、ランニングホイールを設置し、1 週間に 2 回の配置換えを EE+Sham 群と EE+虚血群だけに行った。虚血を負荷する SE+虚血群と EE+虚血群の 2 群では、6 週間の飼育後に全身麻酔下で両側総頸動脈の 10 分間の遮断と低血圧を併用する Smith らのモデルに従ってラットの一過性前脳虚血を作成した。虚血を負荷しない SE+Sham 群と EE+Sham 群では、両側頸動脈を露出し虚血を負荷しない Sham 手

術を施行した。虚血負荷もしくは Sham 手術後より、bromodeoxyuridine (BrdU) を 7 日間連続して腹腔内投与した後に灌流固定を行い、脳冠状断切片を作成した (図 1)。

空間記憶の評価として Y 字迷路試験 (Y-maze test) と新奇物体認知試験 (novel object recognition test : ORT) の行動解析を飼育前、6 週間の飼育後 (虚血前) 及び灌流固定前 (虚血 1 週間後) の計 3 回施行した。各行動解析の結果は虚血前後でのスコア減少率 [(虚血前スコア - 虚血後スコア) / 虚血前スコア × 100] を算出して評価した。

Fluoro-Jade B (FJB) と BrdU による免疫組織学化学染色を行い、それぞれ海馬における神経細胞死と神経新生を検討した。FJB 染色では海馬 CA1 水平部の単位長 (1 mm) における陽性細胞数を計測し、BrdU 染色では海馬歯状回の subgranular zone (SGZ) の単位面積 (1 mm<sup>2</sup>) における陽性細胞数を計測した。各群における細胞数の差異は Mann-Whitney's U test を用いて検定した。

【結果】虚血処置で死亡した、もしくは灌流固定で固定不十分であった個体を除外し、最終的に各群 n=6 で実験結果の解析を行った。(1) 行動解析 : Y 字迷路試験と新奇物体認知試験ともに、EE+虚血群のスコア減少率は、SE+虚血群のそれと比較して有意に低値を示した (図 4C、図 5C)。特に ORT では、EE+虚血群において虚血前と虚血後のスコアに有意な差を認めなかった (p=0.257)。(2) 海馬の遅発性神経細胞死 : 虚血を負荷した 2 群 (SE+虚血群と EE+虚血群) では、非虚血群 (SE+Sham 群と EE+Sham 群) とそれぞれ比較し、FJB 陽性細胞数の有意な細胞数増加を認めた (p<0.05) (図 6B)。さらに、EE+虚血群では、SE+虚血群と比較して神経細胞死の有意な減少を認めた (p<0.05)。(3) 海馬の神経新生 : 虚血群は非虚血群と比較して BrdU 陽性

細胞数の有意な増加を認めた ( $p < 0.05$ ) (図 7B)。しかし、SE+虚血群と EE+虚血群との間には有意な差を認めなかった ( $p = 0.45$ )。

【考察】一過性前脳虚血後の EE はラットの記憶機能を改善させるものの、SGZ 領域の神経細胞死を悪化させるという報告がある。一方、中大脳動脈領域の局所脳虚血後の EE は側脳室下層 (subventricular zone : SVZ) の神経新生を増加させるとの報告がなされている。しかしながら、予防医学の観点から脳虚血負荷前の EE が神経細胞死や神経新生にどのように影響するかは十分な検討がなされていない。

本研究では、EE を虚血前の環境因子とし、虚血後の海馬神経細胞死及び神経新生にどのように影響するかを検討した。結果は、虚血前に EE で飼育したことにより、海馬 SGZ の神経細胞死が減少した。これは、前述のラットを虚血負荷後に EE 下で飼育することにより海馬の神経細胞死が増加するという過去の報告とは異なった反応であった。一方、神経新生については EE+虚血群と SE+虚血群の間で有意差を認めなかった。神経細胞死と同様に、本研究での虚血前 EE は、以前の報告における虚血後 EE と異なった結果が示された。

EE は脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF) を増加させることが知られている。BDNF は分泌性の生理活性タンパク質であり、ニューロンの生存や分化、シナプスの発達や可塑性などを制御し、記憶や学習、精神機能に関与すると言われている。増加した BDNF によって CREB (cyclic AMP response element binding protein) pathway が活性化される。CREB は細胞内シグナル伝達機構の一つである CREB pathway 内の転写因子であり、脳への侵襲に対して保護作用を示すことが知られている (図 8)。CREB pathway は EE だけでなく、虚血や外傷、精神障害、変性疾

患による中枢神経系への侵襲によっても活性化される。その結果、CREB pathway が賦活することにより、組織応答レベルでは Bcl-2 を介して抗アポトーシス効果を示し、症候レベルでは COX-2 を介して認知機能を改善させることが知られている。

推察だが、本研究結果は EE によって BDNF が増加し、CREB pathway が活性化したことにより、虚血前の空間記憶を向上させただけでなく、一過性の虚血負荷による遅発性神経細胞死の抑制を介して虚血後の空間記憶の低下をも軽減したものと考えられる。このメカニズムについては本研究では検証していないため、今後の課題と言える。

【まとめ】我々が渉猟した限りでは、虚血前の EE での飼育が虚血後の海馬における神経細胞死、神経新生にどのように影響を及ぼすかを検討した報告はない。本研究は、虚血前の EE 下での飼育が虚血による海馬の遅発性神経細胞死を抑制することを示した。さらに、虚血前の空間記憶を向上させ、虚血負荷による空間記憶の低下を軽減することが示された。本研究結果は、予防的に普段から社会活動・身体活動に富んだ環境で生活することによって、脳卒中による神経障害を軽減する事を示唆している。これは、脳虚血障害に与える環境因子の影響を示す有用な知見と思われる。

## 1. 略語集

ABC : avidin-biotinylated peroxidase complex

AMPA : DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate

BDNF : brain-derived neurotrophic factor

BrdU : bromodeoxyuridine

BBB : blood brain barrier

CREB : cyclic AMP response element binding protein

DAB : diaminobenzidine

DNA : deoxyribonucleic acid

EE : enriched environment

FGF : fibroblast growth factor

FJB : Fluoro-Jade B

HB-EGF : heparin-binding epidermal growth factor

HSP : heat-shock protein

IGF : insulin-like growth factors

LTP : long-term potentiation

NMDA : N-methyl-D-aspartate

ORT : novel object recognition test

PBS : phosphate buffer solution

SE : standard environment

SD : Sprague-Dawley

SGZ : subgranular zone

SVZ : subventricular zone

TBS : tris-buffered saline

TBS/TX : 1% TBS solution / triton X-100

VEGF : vascular endothelial growth factor

## 2. 研究の背景・緒言

我が国では、諸外国に比べて脳血管障害の発生率が高い。平成 23 年度の厚生労働省の「人口動態統計の概要」によれば、脳血管障害は死亡原因の第 4 位である<sup>3</sup>。また、死亡原因 3 位の肺炎の基礎疾患には脳血管障害が多く含まれていると言われている。さらに、脳血管障害は高齢者の要介護直接原因 1 位 (24.1 %) の疾患であり、年々膨れ上がる国民の経済的負担の主な原因といえる。今後、高齢化に伴い脳血管障害は増加していく事が予想され、本疾患の予防は我が国にとって大きな課題である。

近年、脳血管障害は心疾患と同様に「治療可能な緊急疾患」として、超急性期血栓溶解療法や血栓回収デバイスを用いた血管内治療などが発達してきている。しかし、医療技術が発達してきたとはいえ、時間制限のある急性期治療の恩恵に与る例は少ないのが現状である。従って、脳血管障害は発症を未然に防ぐ、もしくは発症しても症状を軽減させることが重要となってくる。

脳血管障害の主な原因である生活習慣病の予防・治療については、以前から積極的に研究が行われてきた。高血圧や脂質異常症、肥満だけでなくストレスが全身の動脈硬化を促進させ、脳血管障害や虚血性心疾患のリスクを高めることが知られている。ストレス社会と言われる現代において、環境要因と脳血管障害による神経細胞障害との関係を調べる事は重要と考えられる。

ラットを用いた過去の検討では、虚血前のストレス環境因子として **forced swimming** が虚血後の神経細胞死を悪化させ、神経新生を抑制することを報告してきた<sup>4</sup>。本研究では、ストレスに相反する環境因子として考えられる **enriched environment**

(EE) が脳虚血にどのように影響を及ぼすか、ラット一過性前脳虚血モデルを用いて検討した。以下に、これまでの報告を紹介し、その課題などについて述べる。

### 3-1 海馬

海馬は大腦側頭葉の内側部、側脳室下角底部に位置し、ギリシャ神話に登場する海神ポセイドン（ネプチューン）がまたがる海馬（4頭立ての馬車を引く架空の動物）の尾に形が似ていることから、解剖学者 Arantio により海馬（hippocampus）と名付けられた<sup>5</sup>。また海馬は雄羊の角に似ていることからアンモン角（Ammon's horn）とも呼ばれる。海馬は海馬体（hippocampal formation）とよばれる大腦辺縁系の一部で、海馬体は歯状回（dentate gyrus）、海馬、海馬支脚（subiculum）、前海馬支脚（presubiculum）、傍海馬支脚（parasubiculum）、嗅内皮質（entorhinal cortex）に分けられる。また、海馬は組織学的にも明確な構造をもっている。歯状回、海馬、海馬支脚は細胞層が単層であり、その上下を低細胞密度の層と無細胞層が挟む3層構造をとっている。これらの構造は神経解剖学や電気生理学の研究に適しており、さらには、海馬が記憶形成や学習などの興味深い機能を持つことから、今日まで多くの研究の対象となってきた。

1957年に Scoville と Milner がてんかんの治療目的に両側の海馬を切除したところ、術後に新しい情報を記憶することができなくなった症例を報告した<sup>6</sup>。それ以来、海馬は記憶、学習に関与していると認知されはじめ、神経解剖学、生理学、行動学など多くの分野で、記憶・学習の脳内メカニズムを明らかにしようと研究が盛んに行われている。特に哺乳類の記憶には海馬での短期及び長期のシナプスの可塑的変化が必要であることがわかっている。記憶に関する分子機構を解明することによって、認知機

能障害を改善する薬剤の開発が期待され、今でもなお、世界中で研究が行われている。

### 3-2 海馬における遅発性神経細胞死

1975年に伊藤らが、一過性脳虚血モデルで虚血直後ではなく遅発性に神経細胞死が生じることを報告した<sup>7</sup>。そして1982年に桐野らが、内頸動脈系と椎骨動脈系の交通を欠く砂ネズミの両側総頸動脈を5分間閉塞させた後、血流を再開させると海馬のCA1領域の神経細胞死が遅発性に起こることを報告し、遅発性神経細胞死 (delayed neuronal death) と名付けられた<sup>8</sup>。その後Petitoらが、Wistarラットの両側総頸動脈・椎骨動脈の4血管を遮断 (four-vessel occlusion model) した全脳虚血モデルにおいて海馬のCA1及びCA3において遅発性神経細胞死が生じることを報告した<sup>9</sup>。またSmithらが、両側総頸動脈閉塞に加えて、低血圧を併用する一過性前脳虚血モデル (two-vessel occlusion model) を提唱して以来、多くの研究者たちが海馬の遅発性神経細胞死を検討する際には、この方法を選択している<sup>10</sup>。

上述の海馬の遅発性神経細胞死には、以下の特徴がある。

- 1) ラットに一過性の虚血負荷を加えると、神経細胞の代謝活動や電氣的活動はほぼ完全に虚血前の状態へ復旧する。
- 2) 虚血24時間後までは神経細胞死の所見は認めないが、虚血3~4日後より形態的变化が明らかとなり、海馬CA1領域の錐体細胞において神経細胞死が極めて緩徐に進行する。

この遅発性神経細胞死のメカニズムとして、アポトーシスによる細胞死が考えられている。特に、アポトーシスの分子機構に関与する蛋白の脱リン酸化酵素である

calcineurin の働きが大きく関与すると報告されている<sup>11</sup>。calcineurin は海馬に多く存在することが知られており、この酵素の発現を高めることによって容易にアポトーシスが誘発される。一方、遅発性神経細胞死は主として海馬 CA1 領域に生じるが、これは海馬 CA1 領域に、虚血に対して脆弱な神経細胞が集中しているためと考えられる。この脆弱性の原因として、神経細胞膜上のグルタミン酸受容体が関与している説（グルタミン酸・カルシウム説）が指摘されているが、未だに正確な機序は明らかとなっていない。

この海馬における遅発性神経細胞死は、脳虚血だけでなく外傷による神経損傷、てんかん発作などによっても誘発される<sup>12</sup>。また、ストレスなどの環境要因によっても、遅発性神経細胞死を引き起こす事が知られている。1992年に Watanabe らは、ラットに拘束ストレスを繰り返し与えることによって、海馬歯状回 CA3 領域での神経細胞死が増加することを報告した<sup>13</sup>。ヒトにおいては1996年に Sheline らが、ストレス環境下やうつ病患者で海馬の容量が低下する事を報告している<sup>14</sup>。

以上のように、海馬における遅発性神経細胞死について分子機構や疾患との関連については多くの検討が行われているが、環境因子との関連を検討したものは非常に少ない。

### 3-3 海馬における神経新生

1928年に Romon らによって成体哺乳類の中枢神経は再生しないと結論付けられて以来、半世紀以上にわたって、中枢神経系の神経細胞は新生・増殖しないとされてきた。しかし、1983年に Goldman らによって、カナリアが季節性のさえずりを覚え

る際に中枢神経において神経細胞が新生することが確認された<sup>15</sup>。それ以後、哺乳類を対象とした神経新生の研究が活発に行われるようになり、ヒトの成熟脳においても生涯を通じて神経新生が生じている事が明らかとなった<sup>16</sup>。最近の研究では、成体哺乳類脳において、側脳室前角周囲の脳室下層（subventricular zone : SVZ）に存在する神経幹細胞が増殖し、嗅球に神経細胞を供給していることが示されている<sup>17,18</sup>。また、海馬歯状回の顆粒細胞下（subgranular zone : SGZ）にある神経幹細胞が顆粒細胞を産生していることが明らかとなっている<sup>19</sup>。

このように、成体哺乳類の神経新生は限られた領域でおこなわれているが、これらが持続的におこなわれるためには、二つの因子の関与が必要であることがわかっている。一つは、神経幹細胞自体の遺伝子発現プログラムによる内在的因子（intrinsic program）である。内在性因子として遺伝子や蛋白質が神経新生の調整に関与している事が報告されている。例えば、E2F 転写因子ファミリーや Rb といった遺伝子により構成される蛋白は神経前駆細胞の細胞周期を調節しており、E2F1 欠損により成熟脳における神経新生が減少することが報告されている<sup>20</sup>。もう一つの因子は、神経細胞を取り巻く微小環境によって誘起される外的因子（extrinsic program）である。外的因子として、神経伝達物質や BDNF（brain-derived neurotrophic factor）、HB-EGF（heparin-binding epidermal growth factor）、FGF2（fibroblast growth factor）、IGF-1（insulin-like growth factor-1）、VEGF（vascular endothelial growth factor）などの増殖因子、ホルモンが報告されている<sup>21</sup>。神経伝達物質の代表的なものとして、グルタミン酸の関与が知られている。グルタミン酸は AMPA（DL-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate）受容体を介して、分裂を促進させる。一方、NMDA

(N-methyl-D-aspartate) 受容体や metabotropic 受容体を介して<sup>22, 23</sup>、神経幹細胞や神経前駆細胞の分裂を抑制するなど、神経新生の調節に重要な役割を持っている<sup>24</sup>。セロトニン (5-HT) が海馬歯状回の受容体を介して神経前駆細胞の分裂を促進させる<sup>25</sup>。ドパミンは神経前駆細胞の分裂を抑制する事が知られており、パーキンソン病における神経新生を抑制するなど、神経伝達物質の神経新生への関与については多くの報告がなされている<sup>26</sup>。ホルモンも外的因子として神経新生に重要な役割を担っている。エストロゲンやプロゲステロンなど性ホルモンは海馬歯状回における神経新生を促進させるが、ストレスホルモンとして知られているグルココルチコイドは神経新生を抑制する<sup>27, 28</sup>。

海馬の神経幹細胞は、環境刺激の多い EE によって増加し、逆にストレス・加齢によって低下することが知られている<sup>15, 19, 29</sup>。その一方では、痙攣発作、外傷性脳損傷、虚血負荷によって一過性に増殖頻度が増加することが報告されている<sup>30, 31, 32</sup>。しかし、虚血負荷によって発生する神経前駆細胞は短命であり、成熟細胞まで発達しにくい。そこで神経細胞の分化・生存を促す様々な試みがなされた。神経栄養因子である EGF や FGF-2 の脳室投与によって、これらの未熟な神経細胞を機能的な成熟細胞へと分化・生存させることが可能であると報告されている<sup>33, 34</sup>。また、IGF-1 の末梢投与は、SVZ の神経前駆細胞に作用し、神経新生を増加させることができると報告されている<sup>35</sup>。

我々は、成熟げっ歯類の一過性脳虚血モデルを用いて、海馬における遅発性神経細胞死・神経新生の関連について様々な形で検討してきた。予防医学に重点をおく現

代医療において、虚血前の環境因子の影響を研究することは重要である。神経新生を増加させる環境因子として EE が知られているが、これを虚血前のプレコンディショニングとして遅発性神経細胞死や神経新生について検討した研究はない。そこで、虚血前 EE がその後の海馬における遅発性神経細胞死及び神経新生に影響するか否かを検証した。

### 3. 材料

Sprague-Dawley (SD) ラットは Charles River Laboratories (埼玉) より、normal horse serum、normal rabbit serum、normal goat serum および Vectastain ABC Elitekit は Vector laboratories (Burlingame, CA) より、monoclonal mouse anti-BrdU antibody (神経新生で取り込まれた BrdU を標識するための抗体) は Chemicon (Temecula, CA, USA)、FJB (Fluoro-jade B ; 細胞内の変性ミトコンドリアを標識する物質)、BrdU (bromodeoxyuridine ; 神経新生時に核内に取り込まれる物質) やその他試薬は、Sigma (St. Louis, MO, USA) より購入した。

#### 4. 動物の取り扱い及び実験における倫理的配慮

動物の取り扱いおよび実験は、Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research (National research Council, National Academy Press, Washington, DC, 2003) および「日本大学医学部動物実験指針」を遵守し、「日本大学医学部実験動物取扱要領」に準じて行った。また、事前に日本大学医学部動物実験委員会及び日本大学動物実験委員会に動物実験計画書を申請し、当実験の承認を得ている。実験動物は日本大学医学部総合医学研究所共同利用研究部門実験医学動物系にて、室温 22～23 °C、湿度 50～60 %に制御された実験動物飼育室で飼育した。飼育室の明暗設定は、午前 8 時～午後 8 時までを明期、午後 8 時～午前 8 時までを暗期とした。糞尿処理は、自動流水式飼育装置に 2 時間毎に清掃し、空調は高性能フィルター(HEPA フィルター)を通して給気されるオートフレッシュ方式を用いている。給餌は不断給餌とし、実験動物用固形飼料 MF (オリエンタル酵母工業株式会社)を自由摂取させている。給水は、25  $\mu\text{m}$  と 0.8  $\mu\text{m}$  のフィルターを通した水道水を自動給水装置で自由摂取させている。給水装置の配管内適正置換は 2 時間毎に行っている。実験動物施設の環境条件については「ガイドライン-実験動物施設の建築および設備」(実験動物施設基準研究会、1983 年)を遵守している。

## 6. 方法

### 6-1 ラットの各群モデル作成

本研究では成熟ラット、生後3ヶ月の雄SDラット（体重200～250g）を32匹準備した。32匹をそれぞれ8匹ずつ、A) SE+Sham群（Standard environment : SE）、B) SE+虚血群、C) EE+Sham群、D) EE+虚血群の4群に分類した（図1）。なお、各群は以下の通りである。

A) SE+Sham群：2匹ずつ、通常のゲージ（255×220×150mm）で6週間飼育し、その後、両側頸動脈を露出し、虚血負荷を行わないSham手術を施した（図2）。

B) EE+Sham群：4匹ずつ、通常よりも大きいゲージ（800×400×610mm）で6週間飼育した（図3）。また、Komitovaらの方法を参考にしゲージ内にはプラスチック製のトンネル、プラットホーム、木製のブロック、運動用の回転車輪を配置した<sup>1</sup>。ゲージ内のこれらの遊具は1週間に2回配置を換え、掃除を行った。6週間の飼育後に、A)と同様のSham手術を施した。

C) SE+虚血群：A)と同様の環境下で6週間飼育し、その後一過性前脳虚血の処置を施した。本研究では、1984年にSmithらなどにより広く用いられる10分間の両側総頸動脈遮断に低血圧を加える方法を選択した。麻酔はイソフルラン（0.5～1.5%）、笑気（0.5～1.5%）にて吸入麻酔を施行し、左大腿動脈よりカニューレーションを行い、血圧と心拍数、血中酸素濃度をモニタリングした。体温は37℃を維持するようにシートヒーターにて加温を行った。頸部に正中切開を行い、両側総頸動脈を露出し、temporary clipを用いて10分間遮断した。その間、血圧が

平常時の約 50~60 %になるように、大腿動脈より脱血を行った。10 分後に clip を除去して遮断を解除し、脱血した血液を大腿静脈から戻し、閉創した。

なお、予備実験として 5 分間から 60 分間までの一過性両側総頸動脈遮断を施行したモデルを作製した。致死率、遅発性神経細胞死発生の安定性を考慮し、Smith らと同様に 10 分間の遮断時間とした。また、虚血処置にて死亡してしまった個体については当実験から除外した。

D) EE+虚血群 : B) と同様の環境下で 6 週間飼育を行い、その後、C) と同様の一過性前脳虚血を負荷した。

## 6-2 脳組織切片の作成

各群 6 週間の飼育後に、7 日間 BrdU (50 mg/kg/日、Sigma) を腹腔内投与した。BrdU の 7 日間の投与終了後、ペントバルビタール (50 mg/kg、Somnopentyl、共立製薬) で腹腔内麻酔を行ない、手術台に固定した。開腹して速やかに経門脈的にヘパリン化を行なった後に、開胸・開心を行ない経心臓的に上行大動脈にカニューレーションを行った。乳酸リンゲル液による灌流を行い、十分に脱血し、引き続いて 4 % paraformaldehyde を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (phosphate buffer solution: PBS, pH 7.4) にて灌流固定を行った。灌流固定後に摘出した脳を 4 °C の 4 % paraformaldehyde で 24 時間固定を行った後、0.1 M PBS 内で保存した。そして、vibratome を用いて 50 µm 厚の脳冠状断切片を作成した。

### 6-3 行動解析による空間記憶の評価

空間記憶を評価するために、行動解析として Y 字迷路試験 (Y-maze test) と新奇物体認知試験 (novel object recognition test : ORT) を全個体に対して、飼育前、6 週間の飼育後 (虚血負荷前)、虚血 1 週間後の 3 回施行した (図 1)。それぞれの方法は以下に述べる。

#### 1) Y 字型迷路試験

Y 字型迷路試験は、ラットが分かれ道において進むルートを選択する際に、直前に選択したルートとは異なるルートを選ぶ性質を利用して空間記憶、短期記憶を評価する試験である<sup>36,37</sup>。

A・B・C の 3 本のアームを持つ Y 字型の迷路を用いて試験を行った (図 4A)。最初にラットを A のアームに入れ、8 分間の自発的な探索行動によるアームの選択を記録した。総進入回数を自発運動量の回数の指標とした。また、3 回連続して異なるアームに進入した回数を自発的交替行動数として、以下を用いて、自発的交替行動変化率 (%) を算出し、空間記憶の指標とした<sup>36,37</sup>。

$$\text{自発的交替行動変化率(\%)} = \frac{\text{自発的交替行動数}}{\text{総進入回数}} \times 100$$

#### 2) 新奇物体認知試験

当試験はラットの新奇性を好むという特性を利用した試験で、空間記憶、短期および長期記憶を評価する方法として用いられる<sup>38-40</sup>。

まず、ラットを灰色の亚克力製の実験装置 (縦 55×横 55×高さ 50 cm) に慣ら

すため、一匹ずつオブジェクトを設置しない状態で3日間（15分/日）装置内を探索させた（図5A）。4日目に訓練試行として装置内に二つの同じオブジェクト（物体Xと物体Y）を設置し、ラットが各オブジェクトに接触する時間を5分間記録し、ラットを静かに飼育ケージに戻し装置内をアルコールで消毒した。次に保持試行として1時間後に一方のオブジェクトを新奇オブジェクト（物体Z）と取り替え、再びラットを装置内に戻し、各オブジェクトに接触する時間を5分間記録した。訓練試行においては総探索時間内の物体Yへの探索時間の割合を算出し、保持試行においては総探索時間内の物体Zへの探索時間の割合を算出した<sup>38-40</sup>。本研究では、保持試行における探索時間のみを評価の対象とした。

$$\text{探索時間割合(保持試行)} = \frac{\text{物体 Z 探索時間}}{\text{総探索時間}} \times 100$$

群間での比較は、以下の式を用いて各試験におけるスコア減少率を算出し、評価した。

$$\text{スコア減少率} = \frac{(\text{虚血負荷前のスコア} - \text{虚血負荷後スコア})}{\text{虚血負荷前}} \times 100$$

#### 6-4 FJB の免疫組織化学染色

Fluoro-Jade B (FJB) は細胞内の変性ミトコンドリアを標識するため、一般的に神経細胞死に至る細胞を検出するために用いられている。まず、各脳切片をゼラチンコーティングスライド上にマウントし、0°Cにて60分乾燥させた。各スライドを1% NaOHを含む80% alcoholに5分間浸けた後、70% alcoholに2分間浸し、蒸留水に

て 2 分間洗浄した。次に 0.06 %  $\text{KMnO}_4$  内に 10 分間浸けた状態で震盪させ、蒸留水にて 2 分間洗浄した。FJB 乾燥粉末 10 mg を蒸留水 100 ml に溶解して、FJB 0.01 % stock solution を作製した。作製した stock solution に 0.1 % acetic acid を加え、staining solution を作成した。各スライドを staining solution に 20 分間浸け、蒸留水に 1 分間浸けた後、洗浄を 3 回繰り返した。水分を除去するため、0 °C にて 20 分間乾燥させ、xylene に 1 分間浸透させた後、DPX mounting medium にて封入した。

#### 6-5 BrdU の投与及び免疫組織化学染色

BrdU (bromodeoxyuridine) は thymidine analog であり、細胞周期の S 期 (DNA 合成期) に細胞内に取り込まれることが知られており、BrdU 投与後に新生した神経細胞の存在を調べるためのマーカーとして使用されている。作製した各群のラットに、BrdU (50 mg/kg/日、Sigma)、7 日間連日腹腔内投与を行った。

脳冠状断切片を 0.1 M PBS 内で浮遊切片とし、3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 分間) により内因性ペルオキシダーゼ除去を行った。Tris-buffered saline (TBS) にて洗浄 (15 分間) 後、1 % TBS solution / triton X-100 (TBS/TX) にて洗浄した (15 分間、2 回)。37 °C の 2N HCl (30 分間) に浸した後、再度同様に洗浄した。

BrdU に対する一次抗体として、monoclonal mouse anti-BrdU antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA) を使用し、TBS/TX で希釈した。一次抗体の感作は、切片を各々の一次抗体を含む希釈溶液中に 24 時間、4 °C の条件下で行なった。一次抗体の感作後に各切片を TBS/TX で 2 回、TBS で 1 回、各々 15 分間洗浄した。

二次抗体として、anti-mouse IgG antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA) を 1 % horse

serum と TBS/TX にて 400 倍に希釈して使用した。一次抗体感作後の切片を二次抗体の希釈溶液中に 1 時間（室温にて）浸透した。二次抗体の感作後に各切片を TBS/TX で 2 回、TBS で 1 回、各々 15 分間洗浄した。続いて、200 倍のアビチン・ビオチン複合体（ABC）を室温下で作成し、1 時間、室温の条件下で切片の ABC 反応を行なった。反応後、各切片を TBS/TX で 2 回、TBS で 1 回、各々 15 分間洗浄した。免疫標識された構造物は、増感剤として 0.4%  $\text{NiCl}_2$  付加を行った。続いて 0.005 % 3'3-diaminobenzidine（DAB）を用いて可視化した。発色後、TBS で 3 回 15 分間ずつ洗浄した。洗浄後、各切片をゼラチンコーティングスライド上にマウントし、一晚風乾した後、エタノール脱水、キシレン透徹を経てカバーガラスで封入した。

## 6-7 定量と解析

海馬歯状回を The rat brain（6<sup>th</sup> edition, George Paxinos）を参考に同定した。

FJB 染色のデータ処理では、Biozero（BZ-8000；KEYENCE）と解析ソフト BZ-Analyzer（KEYENCE）を用いた。左側の海馬 CA1 水平部分単位長さ（1 mm）におけるそれぞれの陽性細胞数を Domoráková の手法と同様に計測し<sup>41</sup>、各群間における陽性細胞数を比較した。

BrdU 免疫染色陽性細胞のデータ処理には、解析ソフト NEUROLUCIDA（Version 3; MicroBrightField, USA）を用いた。左側の海馬歯状回の SGZ の面積を測定し、その領域に存在する全ての細胞数を重複なくカウントした後、単位面積当たりの細胞数を算出し、各群間において陽性細胞数を比較した。

データ解析は、統計ソフト SPSS STATISTICS 21.0 を用いた。行動解析における

虚血前の群間比較は、Kruskal Wallis の検定を行い有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められれば、比較したい二群間で Mann-Whitney U test にて差異を評価した。虚血後の行動解析結果及び組織染色結果については、two-way ANOVA を行い有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められれば、比較したい二群間で Mann-Whitney U test にて差異を評価した。そして結果は、各群の平均値±標準誤差で示した。

## 7. 結果

各群 n=8 でモデルを作製したが、虚血処置で死亡したもしくは灌流固定で固定不良だった個体を除外し、最終的に各群 n=6 で実験結果の解析を行った。具体的には、SE+Sham 群：2 検体固定不良、EE+Sham 群：2 検体固定不良、SE+虚血群：2 匹死亡、EE+虚血群：1 匹死亡及び 1 検体固定不良である。

### 7-1 Y 字迷路試験

各群における飼育前、飼育後（虚血前）、虚血後の自発的交替行動変化率（%）は以下の通りである。

	SE+Sham 群	EE+Sham 群	SE+虚血群	EE+虚血群
飼育前	67.76±3.12	65.03±4.26	67.98±2.21	61.29±2.96
飼育後	63.16±1.33	79.17±2.56	61.54±1.69	78.45±0.74
虚血後	63.10±3.10	81.22±2.01	54.08±0.85	73.45±1.61

SE 環境下で飼育されたラットは 6 週間の飼育後、自発的交替行動変化率が減少するのに対して、EE 環境下で飼育されたラットは上昇した（図 4B）。しかし、SE+虚血群、EE+虚血群共に 6 週間の飼育後に虚血負荷を与えることによって、自発的交替行動変化率の減少を認めた（ $p < 0.05$ ）（図 4B）。虚血負荷を行った 2 群（SE+虚血群と EE+虚血群）における虚血負荷前後のスコア減少率（%）は SE+虚血群で 16.96±2.49 %（n=6）、EE+虚血群で 6.29±2.60 %（n=6）であった（図 4C）。SE+虚血群に対して、EE+虚血群で有意に低値であった（ $p < 0.05$ ）。

## 7-2 新奇物体認知試験

各群における飼育前、飼育後（虚血前）、虚血後の探索時間割合（%）は以下の通りである。

	SE+Sham 群	EE+Sham 群	SE+虚血群	EE+虚血群
飼育前	67.29±3.02	66.22±1.53	68.15±2.44	66.72±2.57
飼育後	61.66±2.75	71.19±2.67	61.82±2.06	72.93±2.00
虚血後	60.51±1.71	71.67±2.13	53.71±1.51	69.05±2.72

SE 環境下で飼育されたラットは 6 週間の飼育後、探索時間割合が減少したが、EE 環境下で飼育されたラットでは上昇した（図 5B）。SE+虚血群では、6 週間の飼育後に虚血負荷を与えることによって、探索時間割合は減少したが（ $p < 0.05$ ）、EE+虚血群では有意な減少は認めなかった（ $p = 0.257$ ）（図 5B）。虚血負荷を行った 2 群（SE+虚血群と EE+虚血群）における虚血負荷前後のスコア減少率（%）は SE+虚血群で  $12.82 \pm 2.79$  %（ $n = 6$ ）、EE+虚血群で  $5.06 \pm 5.54$  %（ $n = 6$ ）であった（図 5C）。虚血負荷による探索時間割合のスコア減少率で比較すると、EE+虚血群の減少率は SE+虚血群のそれと比較して有意に低値であった（ $p < 0.05$ ）。

## 7-3 海馬における遅発性神経細胞死

各群における海馬 CA1 での FJB 陽性細胞数（cell/mm）は、以下の通りであった（図 6A）。

	SE+Sham 群	EE+Sham 群	SE+虚血群	EE+虚血群
FJB 陽性細胞数	1.33±0.83	1.50±1.51	21.83±7.85	11.33±5.04

虚血群 (SE+虚血群と EE+虚血群) では、非虚血群 (SE+Sham 群と EE+Sham 群) と比較し、それぞれ FJB 陽性細胞数の有意の細胞数増加を認めた ( $p < 0.05$ )。さらに、EE+虚血群は SE+虚血群と比較し、FJB 陽性細胞数の有意な減少を認めた ( $p < 0.05$ ) (図 6B)。

#### 7-4 海馬における神経新生

各群における海馬歯状回での BrdU 陽性細胞 (cell/mm<sup>2</sup>) は、以下の通りである (図 7A)。

	SE+Sham 群	EE+Sham 群	SE+虚血群	EE+虚血群
BrdU 陽性細胞	31.07±5.70	34.00±2.86	45.93±5.83	48.60±6.82

虚血群は非虚血群と比較し、BrdU 陽性細胞数の有意な増加を認めた ( $p < 0.05$ )。しかし、SE+虚血群と EE+虚血群に有意差は認めなかった ( $p=0.45$ ) (図 7B)。

## 8. 考察

我々の教室では過去に、虚血前の環境因子としてストレス負荷が虚血後の遅発性神経細胞死を増悪させ、神経新生を抑制することを報告した<sup>4</sup>。また、ストレス環境は虚血侵襲の細胞障害を増強する事は多くの研究で示されてきている<sup>42-44</sup>。一方、虚血後の EE 飼育と海馬の遅発性神経細胞死・神経新生の関連に対しても報告がなされている。2005 年に Komitova らは、ラットの局所脳虚血モデルを用いて虚血後の EE によって SVZ における神経幹細胞及び前駆細胞の増殖が促進され、神経新生が増加する事を報告した<sup>45</sup>。また、虚血後の EE は運動機能、記憶・学習は改善させるものの神経細胞死は悪化させるといった報告もある<sup>46</sup>。しかし、虚血前の EE と虚血後の海馬に対する影響を調べた報告は渉猟する限りでは存在しない。そこで本研究は、ストレスと対照的な環境である EE が虚血前の環境因子として、虚血後の遅発性神経細胞死及び神経新生にどのように影響するかを検討した。そして、虚血前の環境因子としての EE は海馬において遅発性神経細胞死を抑制し (図 6)、神経新生に対しては影響しないという結果を得た (図 7)。本研究の結果をこれまでの海馬における遅発性神経細胞死及び神経新生に関しての報告を踏まえて考察する。

### 8-1 海馬における遅発性神経細胞死

虚血前のプレコンディショニングとしての運動負荷は、海馬の神経細胞死を抑制することが報告されている<sup>47</sup>。特に虚血前の運動負荷は虚血に対する耐性現象を引き起こすだけでなく、毛細血管の機能向上、虚血ストレスの一つであるグルタミン酸

の放出の抑制、血液脳関門の機能改善、HSP70 を介した抗アポトーシス効果をもたらすことが報告されている<sup>47,48</sup>。このように、虚血前の運動負荷は中枢神経系に保護的に作用する。EE はより多くの個体で飼育し、ゲージ内に遊具や自発運動を促すランニングホイールが設置される環境である。その効果は社会活動の向上や自発運動量の増加、学習・記憶能力の改善など様々なものが言われている<sup>49,50</sup>。特に中枢神経系に大きく寄与する要因は、複合的な環境である EE の中で、自発運動量の増加であると考えられる<sup>51</sup>。すなわち、EE によって自発運動量が増加することが、遅発性神経細胞死抑制に寄与するところが大いと考えられる。

一方、EE が中枢神経系へ与える効果の機序についても多くの研究がなされている。EE は神経回路網の形成や発達に重要な役割を担っている BDNF を増加させることが知られている<sup>52,53</sup>。この BDNF の増加により CREB pathway が活性化され、COX-2 を介して認知機能を改善させ、Bcl-2 の発現、カスパーゼ 3 の抑制を介して抗アポトーシス効果を示す (図 8)<sup>2,54,55</sup>。CREB pathway は EE だけでなく、虚血侵襲や外傷、精神障害、変性疾患などの中枢神経系への侵襲が加えられることによっても活性化する<sup>56,57</sup>。すなわち、EE+虚血群では EE による環境刺激に加えて虚血侵襲が合わさり、CREB pathway がより活性化することによって、Bcl-2 の発現やカスパーゼ 3 の抑制を介して抗アポトーシス効果、つまり遅発性神経細胞死が抑制されたものと考えられる<sup>2,58</sup>。本研究では、BDNF 及び CREB pathway、さらに Bcl-2、カスパーゼ 3 の関与については十分な検証を行っていないため、上記のメカニズムについては推察レベルである。今後、追加で研究を行い、これらのメカニズムを明らかにしていく必要がある。

## 8-2 海馬における神経新生

本研究では、一過性前脳虚血によって BrdU 陽性細胞の増加を認め、過去の研究報告と同様の結果が得られた<sup>32</sup>。しかし、SE+Sham 群と EE+Sham 群を比較した場合、BrdU 陽性細胞数に有意差は認めなかった。同様に、虚血を負荷した SE+虚血群と EE+虚血群でも BrdU 陽性細胞数に有意差を認めなかった。

EE 飼育によって神経新生を増加させるだけでなく、虚血後の EE 飼育によって、SE 飼育に比較して海馬 SGZ での神経新生が促進することが報告されている<sup>45, 29</sup>。しかし、本研究では虚血前の EE は虚血後の神経新生に影響を与えないという結果となった。また、EE 飼育中は神経新生が増加する事は過去の報告にあるが、本研究の結果では SE+Sham 群と EE+Sham 群で神経新生について有意差を認めなかった。この要因として、本研究では EE の飼育中に BrdU を投与していない点が挙げられる。虚血前の環境の違いが虚血後の神経細胞にどのように影響を及ぼすかを調査しているため、虚血後に同じ環境下で BrdU を投与している。この結果は EE 飼育後に通常飼育に移してしまうと神経新生が通常の状態に戻ってしまうことを示唆しているのかもしれない。一方、持続的に一日を通じて EE で飼育する場合よりも、一日の決まった時間に短時間の EE を暴露する方が空間記憶、学習能力が向上すると報告されている<sup>36</sup>。少ない時間でも継続して毎日 EE に暴露される方が、より神経新生が促進させる事を示唆する。

この研究には制約が数点存在する。まずは動物愛護の観点から組織学的、行動学的試験において統計学的に有意差を生じる最小の動物数を用いている。サンプル数を増やすことにより異なった結果が出る可能性がある。また、環境因子が神経新生細胞数に変化を与えなかった点については上述の通り、これまでの報告と異なる点もあり、

BrdU の投与方法の違いにより結果が変わった可能性がある。

### 8-3 行動解析による空間記憶の評価

本研究の行動解析の結果として、EE+虚血群では、SE+虚血群と比較して有意に空間記憶が良好であることが判明した。虚血後の EE は海馬の遅発性神経細胞死の抑制と共に行動評価で空間記憶、学習が向上することが報告されており、本研究結果と矛盾しない<sup>59-62</sup>。飼育環境の違いによって虚血後の空間記憶に差が認められた理由として二つ考えられる。まず一つは、EE+虚血群において神経細胞死が抑制されたことによって空間記憶に差が生じたという考えである。今日にまで、海馬の神経細胞死と記憶・学習障害の関連について多くの研究が行われてきている。1986年に Zola-Morgan らが心臓バイパス手術時に短時間の虚血状態となり、回復後に記憶障害を認めた患者を報告した<sup>63</sup>。この患者の剖検により両側の海馬 CA1 領域の神経細胞の脱落を認めたことから、虚血による海馬神経細胞死と記憶障害の関連がヒトで実証された。よって、海馬の遅発性神経細胞死が抑制されれば、空間記憶障害が軽度になることは考えやすい。

二つ目として、虚血前の空間記憶が向上していたことにより、虚血負荷による空間記憶障害が代償されたという考えである。実験結果では、EE 下の飼育により虚血前の空間記憶は向上し、その後の虚血負荷後においても、SE 飼育と比較して有意に空間記憶が良好だった。記憶が向上するメカニズムとして、海馬におけるシナプス間の情報伝達効率が向上することが知られている<sup>64</sup>。このシナプスの伝達効率が変化す

ることをシナプスの可塑性と呼ぶ。特に記憶が形成される際に、海馬錐体細胞におけるシナプス間の情報伝達が一過性に増強することが知られており、この現象は長期増強現象 (long-term potentiation : LTP) と呼ばれている。EE 下での飼育によって、海馬の錐体細胞における LTP が持続し、記憶が向上することが数多くの研究によって明らかになっている<sup>62,65</sup>。また、これらの現象が誘導されるためには蛋白合成及び遺伝子発現が必要であり、特に前述の CREB pathway の関与が指摘されている<sup>66</sup>。

以上記述してきたように、EE 下の飼育は数多くの遺伝子・蛋白質、神経伝達物質や増殖因子などの関与によって神経保護作用を示す。本研究により、虚血前の環境因子としての EE は虚血による神経細胞死を抑制し、さらに EE によって空間記憶が向上し、虚血後の空間記憶障害を軽減することが明らかになった。環境因子が中枢神経系に与える影響を調べた報告は数多くあるもののメカニズムを含め、依然として未知な部分が多い。しかし、ストレス社会である現代において、環境因子が中枢神経系に与える影響を明らかにしていくことは重要と言える。本研究結果は、普段から社会活動・身体活動に富んだ環境下で生活することによって、脳卒中による認知機能障害や寝たきりを軽減する事を示唆する。生活環境を整えることは、脳卒中が原因で要介護となるリスクを低下させることによって、高騰する国民の経済的負担を削減する上でも極めて重要である。本研究を足がかりとして、今後さらに、環境因子が中枢神経系に与える影響についてメカニズムを追求していくことが課題といえる。

## 9. 結語

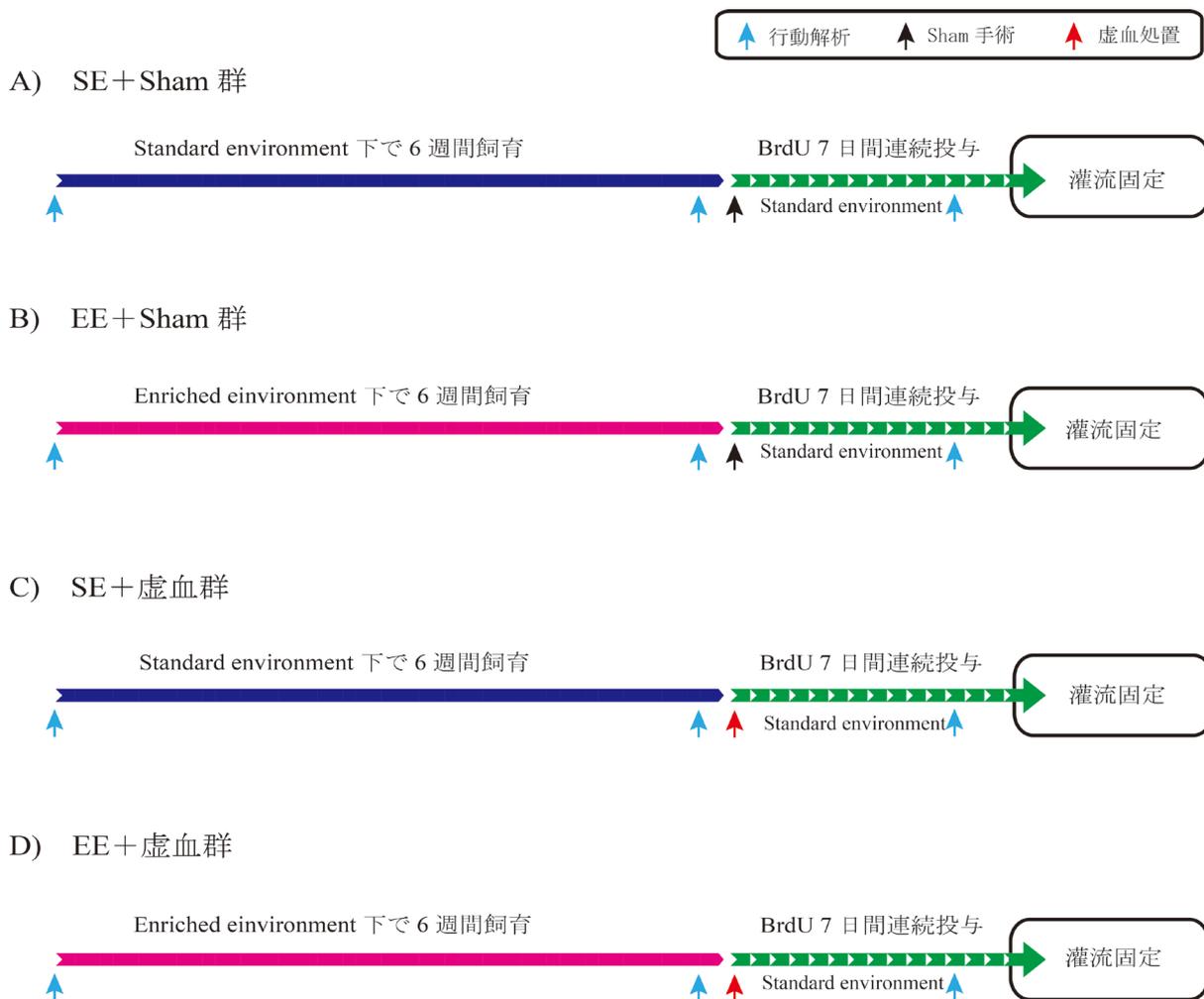
一過性前脳虚血負荷前の環境因子として EE が虚血後の海馬における遅発性神経細胞死及び神経新生にどのように影響するかを検証した。一過性前脳虚血前の EE 下の飼育は、虚血負荷後の海馬における遅発性神経細胞死を抑制した。神経新生は虚血負荷により明らかな上昇を認めたが、環境因子による変化は認めなかった。さらに、EE 下の飼育は虚血前の空間記憶を向上させ、虚血負荷による空間記憶の低下を軽減することがわかった。すなわち、脳虚血前の環境因子は虚血後の神経細胞障害に対して良好に作用し、特に EE は虚血による神経細胞障害に対して保護的に作用することが示唆された。環境因子による神経新生の変化が認められなかった点については今回の評価では不十分な点があり、今後の更なる検討が必要である。

## 10. 謝辞

本研究の遂行及び論文執筆におきまして、懇切な御指導を賜りました日本大学医学部脳神経外科学系 片山容一 教授と日本大学医学部脳神経外科学系神経外科学分野 吉野篤緒 教授に御指導いただきましたことを深く感謝いたします。

### 11. 図表

図 1. Time Table



上から、A) SE+Sham 群、B) EE+Sham 群、C) SE+虚血群、D) EE+虚血群の time table を示す。各群 6 週間の飼育後に 7 日間の BrdU 腹腔内投与を行い、断頭、灌流固定を施行した。BrdU 投与開始前に虚血処置、Sham 手術を施行した。また、行動解析は飼育前、飼育後、灌流固定前に評価した。

図 2. Standard environment



通常のゲージ (255×220×150 mm) で2匹ずつ飼育した。ゲージ内に遊具は設置していない。

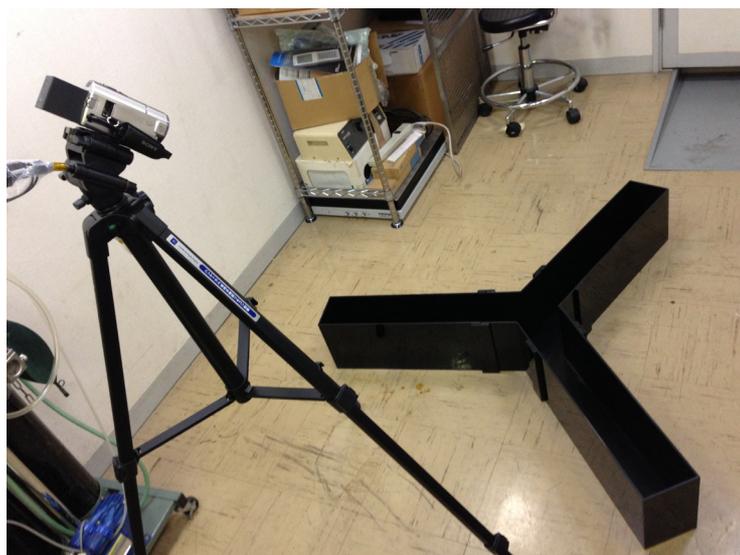
図 3. Enriched environment



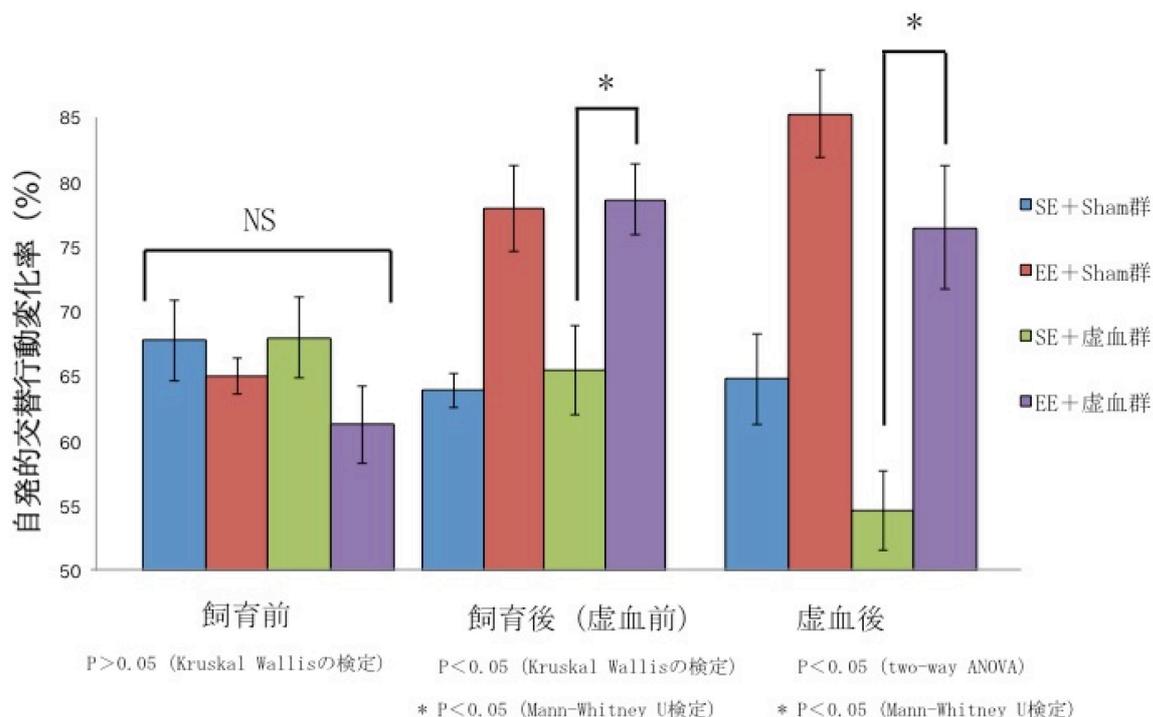
通常よりも大きいゲージ (800×400×610 mm) で4匹ずつ飼育した。ゲージ内にはプラスチック製のトンネル、プラットフォーム、木製のブロック、運動用の回転車輪を配置した。

## 図 4. Y 字迷路試験

### A. Y 字迷路

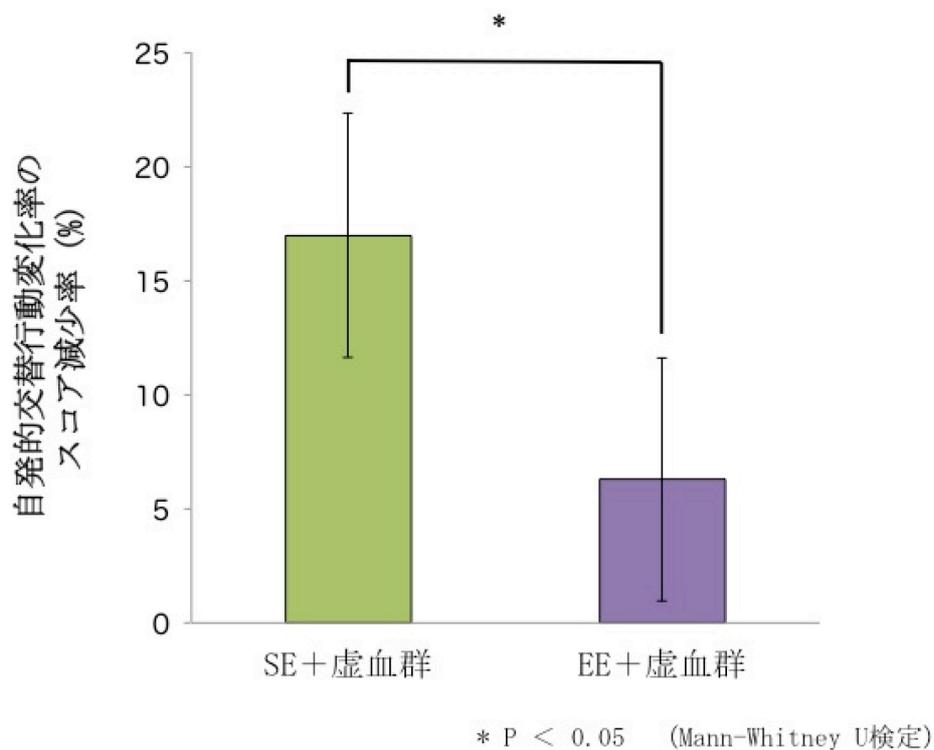


B. 自発的交替行動変化率



飼育前では、Kruskal Wallis の検定で有意差を認めなかった。飼育後（虚血前）では Kruskal Wallis の検定で有意差を認め（ $P < 0.05$ ）、さらに、SE+虚血群と EE+虚血群を Mann-Whitney U 検定で比較すると EE+虚血群で有意に自発的交替行動変化率の増加を認めた（ $P < 0.05$ ）。虚血後の結果についても虚血前（飼育後）と同様の結果が得られた。

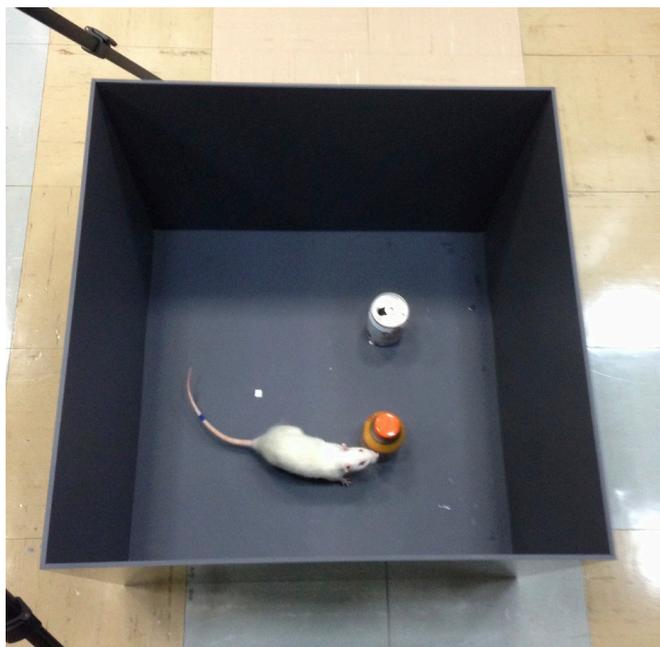
### C. 自発的交替行動変化率のスコア減少率



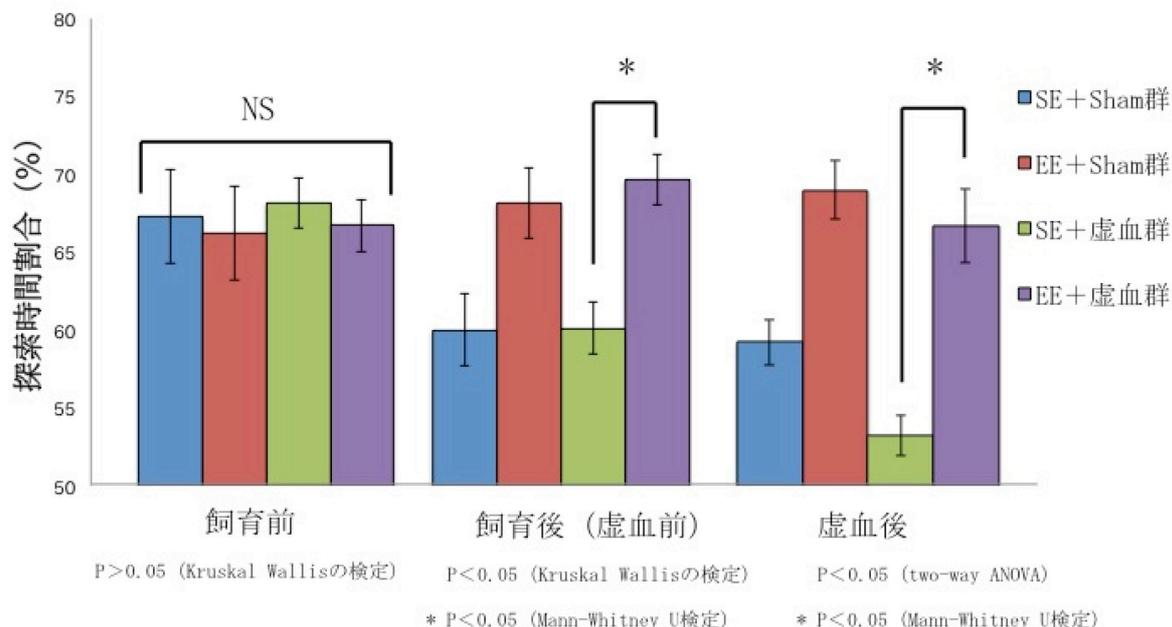
EE+虚血群は SE+虚血群に比較して、虚血後の自発的交替行動変化率のスコア減少率が有意に低値であった (P<0.05)。

## 図 5. 新奇物体認識試験

### A. 実験装置

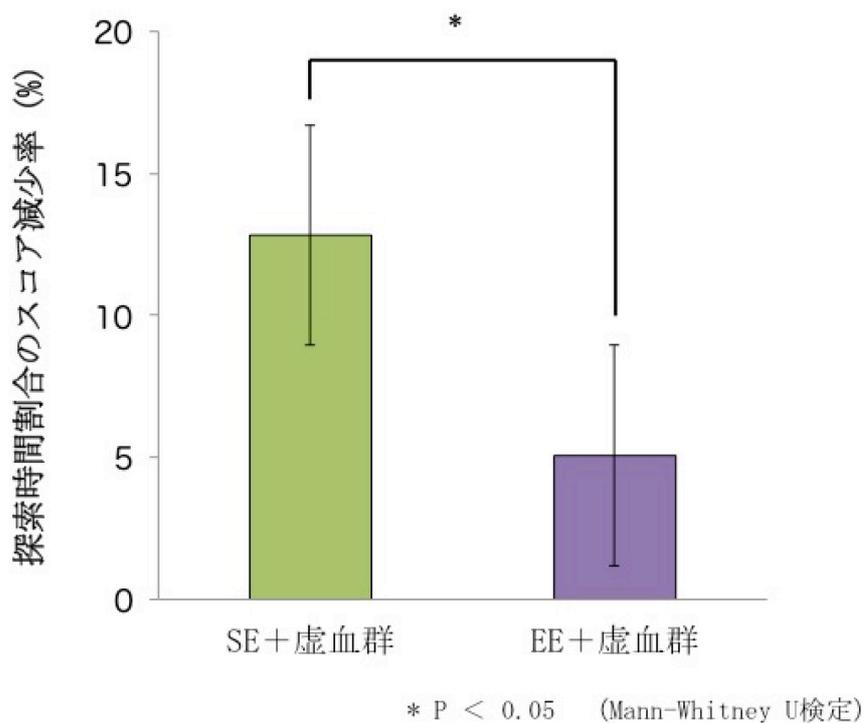


B. 探索時間割合



飼育前では、Kruskal Wallis の検定で有意差を認めなかった。飼育後（虚血前）では Kruskal Wallis の検定で有意差を認め（ $P < 0.05$ ）、さらに、SE+虚血群と EE+虚血群を Mann-Whitney U 検定で比較すると EE+虚血群で有意に探索時間割合の増加を認めた（ $P < 0.05$ ）。虚血後の結果についても虚血前（飼育後）と同様の結果が得られた。

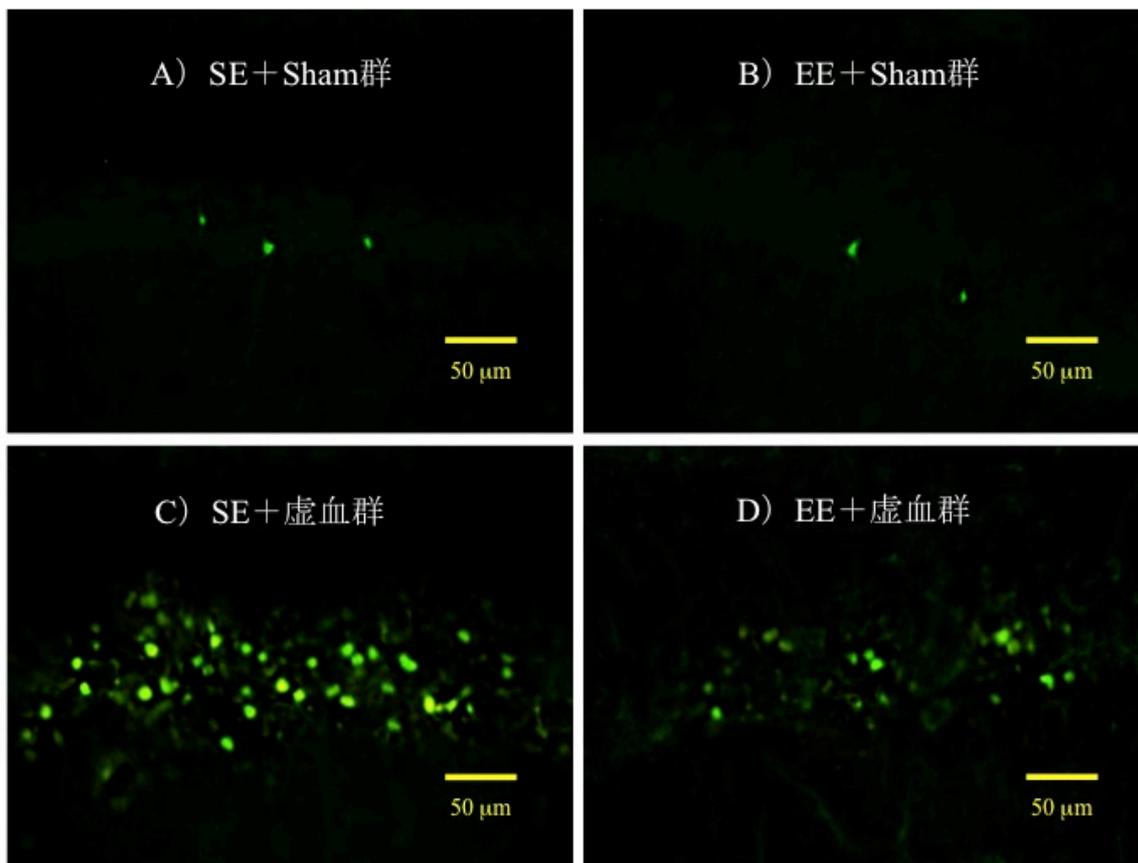
### C. 探索時間割合のスコア減少率



EE+虚血群は SE+虚血群に比較して、虚血負荷による探索時間割合の減少率が有意に低値であった。

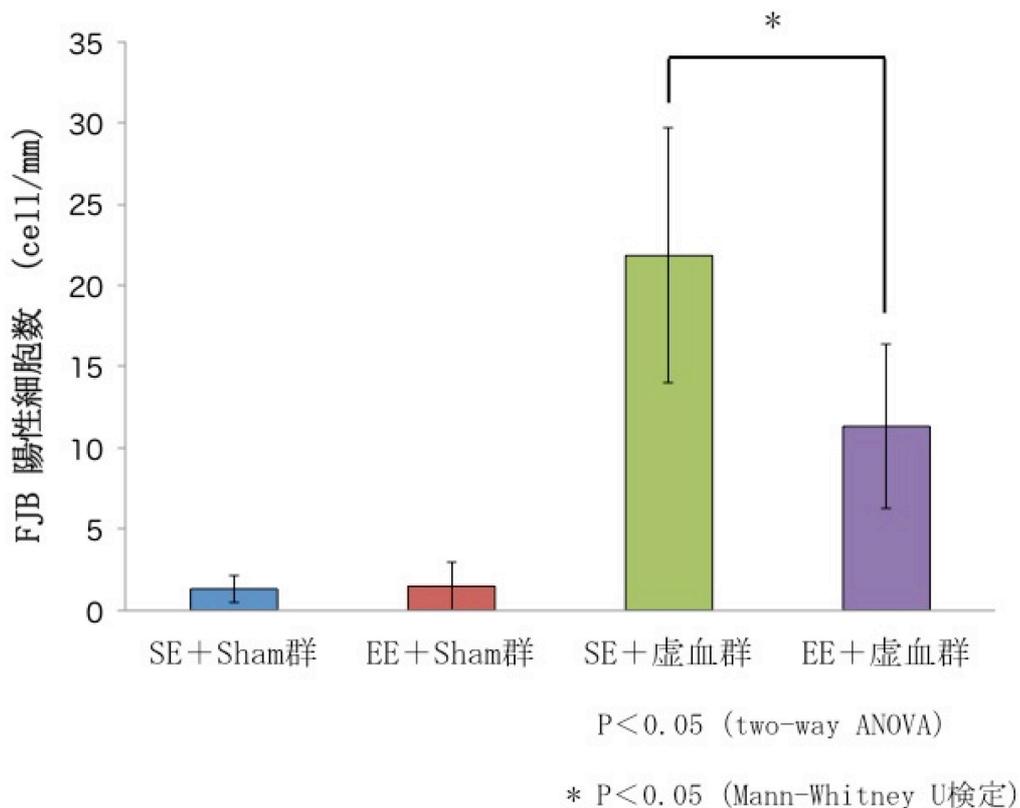
図 6. Fluoro jade B 免疫染色

A. 海馬 CA1 における FJB 陽性細胞



海馬 CA1 領域における Fluoro-Jade B (FJB) 染色

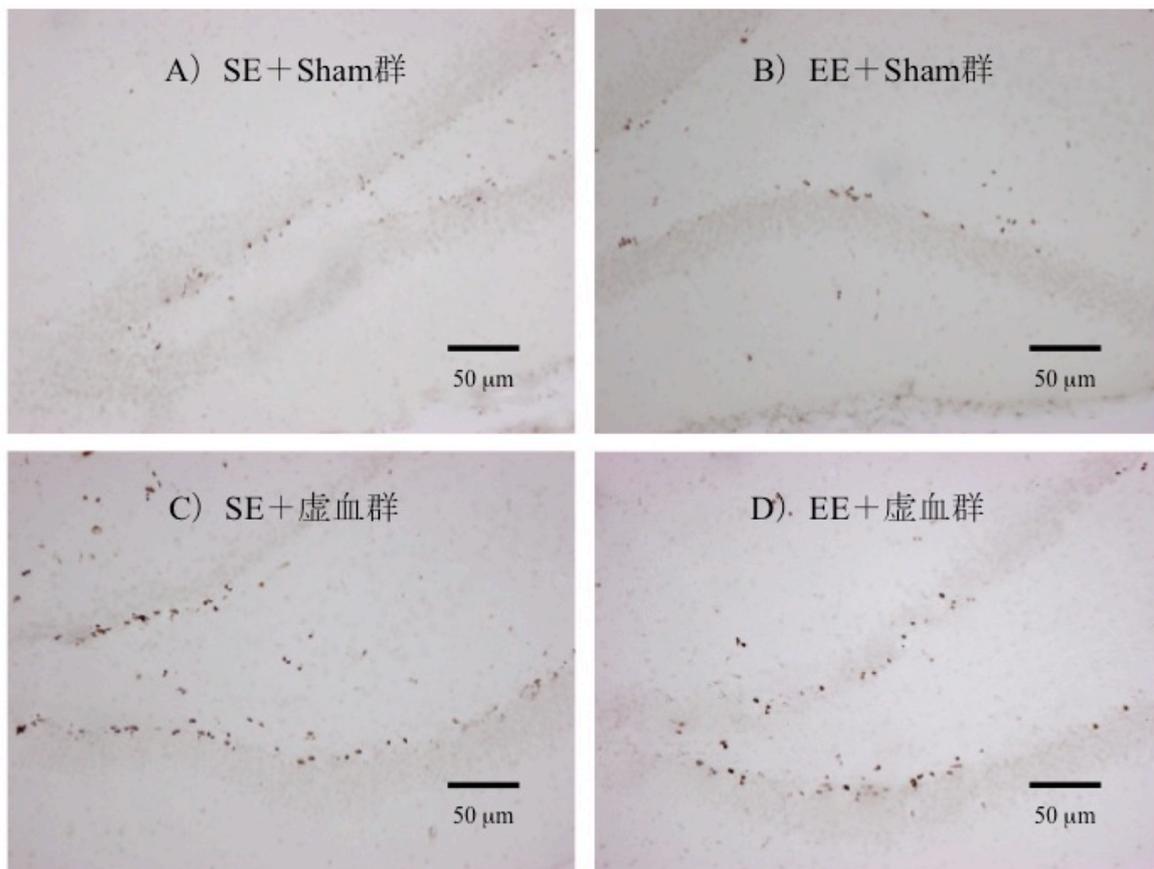
B. 海馬 CA1 における FJB 陽性細胞数の比較



非虚血群 (SE + Sham 群、EE + Sham 群) と比較し、虚血群 (SE+虚血群、EE+虚血群) で Fluoro-Jade B (FJB) 陽性細胞の有意な増加を認めた。さらに、EE+虚血群は SE+虚血群と比較し、FJB 陽性細胞数は有意に少なかった。

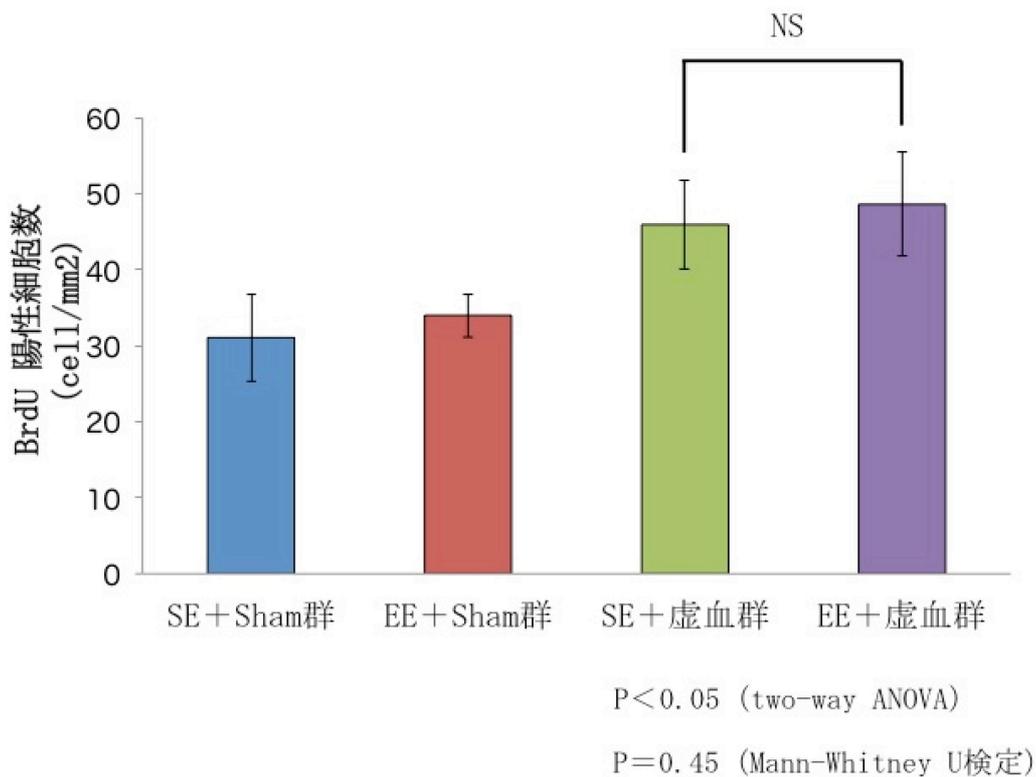
図 7. BrdU 免疫染色

A. 海馬 SGZ における BrdU 陽性細胞



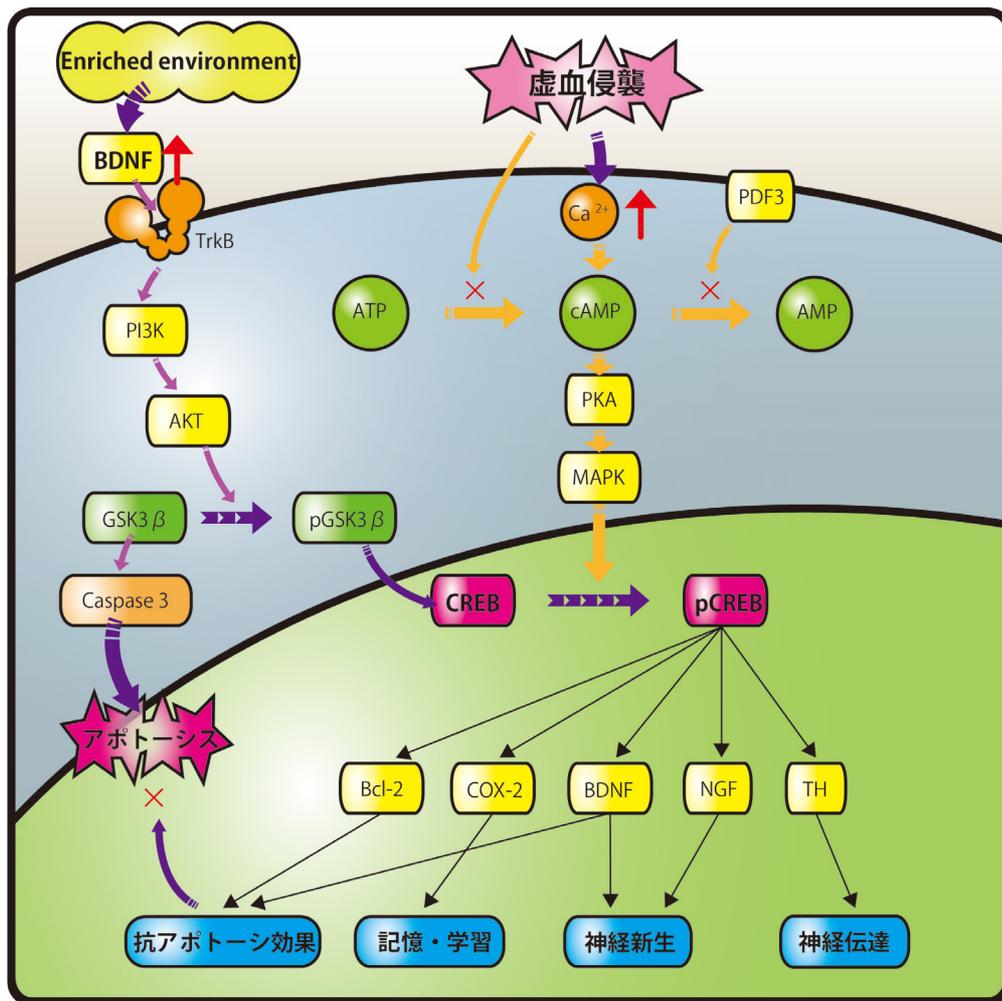
SGZ (subgranular zone) における BrdU 染色

## B. 海馬 SGZ における BrdU 陽性細胞の比較



非虚血群 (SE + Sham 群、EE + Sham 群) と比較して、虚血群 (SE + 虚血群、EE + 虚血群) では bromodeoxyuridine (BrdU) 陽性細胞の有意な増加を認めた。SE + 虚血群 と EE + 虚血群の間に有意な差は認めなかった。

図 8. CREB pathway



転写因子 CREB の脳虚血侵襲・EE による活性化とその後の各種蛋白質産生・脳保護作用 (文献 8、54 を改変)

## 12. 参考文献

1. Komitova M, Perfilieva E, Mattsson B, Eriksson PS, Johansson BB. Effects of cortical ischemia and postischemic environmental enrichment on hippocampal cell genesis and differentiation in the adult rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2002;22:852-860.
2. Kitagawa K. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain. *The FEBS journal* 2007;274:3210-3217.
3. 厚生労働省. 平成 23 年人口動態統計月報年計 (概数) の概況.  
〈<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai11/kekka03.html>〉 (2014/8/13 アクセス)
4. Eriguchi T, Kutsuna N, Kondo Y, et al. Influence of stress preconditioning on hippocampal neuronal cell death and neurogenesis in rat cerebral ischemia. *Advances in experimental medicine and biology* 2012;737:57-61.
5. 浅野孝雄. 脳虚血の病態学. 中外医学社 東京 2003.
6. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1957;20:11-21.
7. Ito U, Spatz M, Walker JT, Jr., Klatzo I. Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta neuropathologica* 1975;32:209-223.

8. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain research* 1982;239:57-69.
9. Petito CK, Pulsinelli WA. Delayed neuronal recovery and neuronal death in rat hippocampus following severe cerebral ischemia: possible relationship to abnormalities in neuronal processes. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1984;4:194-205.
10. Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjo BK. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta neurologica Scandinavica* 1984;69:385-401.
11. Yamasaki Y, Onodera H, Adachi K, Shozuhara H, Kogure K. Alteration in the immunoreactivity of the calcineurin subunits after ischemic hippocampal damage. *Neuroscience* 1992;49:545-556.
12. Tashlykov V, Katz Y, Gazit V, Zohar O, Schreiber S, Pick CG. Apoptotic changes in the cortex and hippocampus following minimal brain trauma in mice. *Brain research* 2007;1130:197-205.
13. Watanabe Y, Gould E, McEwen BS. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain research* 1992;588:341-345.
14. Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW.

- Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:3908-3913.
15. Goldman SA, Nottebohm F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983;80:2390-2394.
  16. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, NY)* 1992;255:1707-1710.
  17. Luskin MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 1993;11:173-189.
  18. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002;22:629-634.
  19. Cameron HA, McKay RD. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nature neuroscience* 1999;2:894-897.
  20. Cooper-Kuhn CM, Vroemen M, Brown J, et al. Impaired adult neurogenesis in mice lacking the transcription factor E2F1. *Molecular and cellular neurosciences* 2002;21:312-323.

21. Lee E, Son H. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB reports* 2009;42:239-244.
22. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1997;17:2492-2498.
23. Yoshimizu T, Chaki S. Increased cell proliferation in the adult mouse hippocampus following chronic administration of group II metabotropic glutamate receptor antagonist, MGS0039. *Biochemical and biophysical research communications* 2004;315:493-496.
24. Bai F, Bergeron M, Nelson DL. Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology* 2003;44:1013-1021.
25. Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2004;29:450-460.
26. Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature neuroscience* 2004;7:726-735.

27. Shingo T, Gregg C, Enwere E, et al. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science (New York, NY)* 2003;299:117-120.
28. Cameron HA, Gould E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 1994;61:203-209.
29. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997;386:493-495.
30. Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:10432-10437.
31. Dash PK, Mach SA, Moore AN. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. *Journal of neuroscience research* 2001;63:313-319.
32. Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1998;18:7768-7778.
33. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002;110:429-441.

34. Teramoto T, Qiu J, Plumier JC, Moskowitz MA. EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia. *The Journal of clinical investigation* 2003;111:1125-1132.
35. Aberg MA, Aberg ND, Palmer TD, et al. IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Molecular and cellular neurosciences* 2003;24:23-40.
36. Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S. Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined procedure of the Hebb-Williams maze task. *Journal of neuroscience research* 2002;70:340-346.
37. Kurinami H, Shimamura M, Ma T, et al. Prohibitin viral gene transfer protects hippocampal CA1 neurons from ischemia and ameliorates postischemic hippocampal dysfunction. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2014;45:1131-1138.
38. Biegon A, Fry PA, Paden CM, Alexandrovich A, Tsenter J, Shohami E. Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: Implications for treatment of neurological and cognitive deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:5117-5122.
39. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural brain research*

- 1988;31:47-59.
40. Han X, Tong J, Zhang J, et al. Imipramine treatment improves cognitive outcome associated with enhanced hippocampal neurogenesis after traumatic brain injury in mice. *Journal of neurotrauma* 2011;28:995-1007.
  41. Domorakova I, Mechirova E, Dankova M, Danielisova V, Burda J. Effect of antioxidant treatment in global ischemia and ischemic postconditioning in the rat hippocampus. *Cellular and molecular neurobiology* 2009;29:837-844.
  42. Lucassen PJ, Vollmann-Honsdorf GK, Gleisberg M, Czeh B, De Kloet ER, Fuchs E. Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. *The European journal of neuroscience* 2001;14:161-166.
  43. Liu Y, Ma S, Qu R. SCLM, total saponins extracted from Chaihu-jia-longgu-muli-tang, reduces chronic mild stress-induced apoptosis in the hippocampus in mice. *Pharmaceutical biology* 2010;48:840-848.
  44. Jayatissa MN, Bisgaard CF, West MJ, Wiborg O. The number of granule cells in rat hippocampus is reduced after chronic mild stress and re-established after chronic escitalopram treatment. *Neuropharmacology* 2008;54:530-541.
  45. Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS. Enriched

- environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2005;36:1278-1282.
46. Farrell R, Evans S, Corbett D. Environmental enrichment enhances recovery of function but exacerbates ischemic cell death. *Neuroscience* 2001;107:585-592.
47. Chaudhry K, Rogers R, Guo M, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) activation in exercise-reduced neuronal apoptosis after stroke. *Neurosci Lett* 2010;474:109-114.
48. Liebelt B, Papapetrou P, Ali A, et al. Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated-kinase 1/2. *Neuroscience* 2010;166:1091-1100.
49. Birch AM, McGarry NB, Kelly AM. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus* 2013;23:437-450.
50. Monteiro BM, Moreira FA, Massensini AR, Moraes MF, Pereira GS. Enriched environment increases neurogenesis and improves social memory persistence in socially isolated adult mice. *Hippocampus*

- 2014;24:239-248.
51. Gregoire CA, Bonenfant D, Le Nguyen A, Aumont A, Fernandes KJ. Untangling the influences of voluntary running, environmental complexity, social housing and stress on adult hippocampal neurogenesis. *PloS one* 2014;9:e86237.
  52. Falkenberg T, Mohammed AK, Henriksson B, Persson H, Winblad B, Lindefors N. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neuroscience Letters* 1992;138:153-156.
  53. Cao W, Duan J, Wang X, et al. Early enriched environment induces an increased conversion of proBDNF to BDNF in the adult rat's hippocampus. *Behavioural brain research* 2014;265:76-83.
  54. Garoflos E, Stamatakis A, Mantelas A, Philippidis H, Stylianopoulou F. Cellular mechanisms underlying an effect of "early handling" on pCREB and BDNF in the neonatal rat hippocampus. *Brain research* 2005;1052:187-195.
  55. Suzuki A, Fukushima H, Mukawa T, et al. Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2011;31:8786-8802.
  56. Tanaka Y, Tanaka R, Liu M, Hattori N, Urabe T. Cilostazol attenuates

- ischemic brain injury and enhances neurogenesis in the subventricular zone of adult mice after transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 2010;171:1367-1376.
57. Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 2002;35:605-623.
58. Jain V, Baitharu I, Prasad D, Ilavazhagan G. Enriched environment prevents hypobaric hypoxia induced memory impairment and neurodegeneration: role of BDNF/PI3K/GSK3beta pathway coupled with CREB activation. *PloS one* 2013;8:e62235.
59. Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature reviews Neuroscience* 2006;7:697-709.
60. Komleva Iu K, Salmina AB, Prokopenko SV, et al. [Changes in structural and functional plasticity of the brain induced by environmental enrichment]. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk / Rossiiskaia akademiia meditsinskikh nauk* 2013:39-48.
61. Gobbo OL, O'Mara SM. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. *Behavioural brain research* 2004;152:231-241.
62. Lima AP, Silva K, Padovan CM, Almeida SS, Fukuda MT. Memory, learning, and participation of the cholinergic system in young rats exposed

- to environmental enrichment. Behavioural brain research 2014;259:247-252.
63. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 1986;6:2950-2967.
64. Cooke SF, Bliss TV. Plasticity in the human central nervous system. Brain : a journal of neurology 2006;129:1659-1673.
65. Hosseiny S, Pietri M, Petit-Paitel A, et al. Differential neuronal plasticity in mouse hippocampus associated with various periods of enriched environment during postnatal development. Brain structure & function 2014.
66. Kovacs KA, Steullet P, Steinmann M, et al. TORC1 is a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector involved in hippocampal long-term synaptic plasticity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2007;104:4700-4705.

### 13. 研究業績

加藤 智一

#### I 発表

① 一般発表 2

② 特別発表 0

#### II 論文

① 原著論文 1 (単 1 / 共 0)

欧文 : 1

和文 : 0

② 症例報告 0 (単 0 / 共 0)

③ 総説 0 (単 0 / 共 0)

III 著書 0 (単 0 / 共 0)

## I 発表

### 一般発表

- ① Tomokazu Kato, Takashi Eriguchi, Norio Fujiwara, Yoshihiro Murata, Atsuo Yoshino, Kaoru Sakatani and Yoichi Katayama : Effects of enriched environment on hippocampal neuronal cell death and neurogenesis in rat global ischemia. 41st Annual ISOTT meeting & EPR 2013, Hanover, NH, USA, June 24-28, 2013.
  
- ② 加藤智一、大高稔晴、中村秀、江里口隆、星野達哉、藤原徳生、村田佳宏、古市眞、平山晃康、吉野篤緒、酒谷薫、片山容一：高齢発症の広範囲脳梗塞に対する外減圧術の治療成績：特に malignant middle cerebral artery infarction 症例についての検討、第 27 回日本神経救急学会学術集会、東京、2013 年 6 月

## II 論文

### 原著論文

Tomokazu Kato, Takashi Eriguchi, Norio Fujiwara, Yoshihiro Murata, Atsuo Yoshino, Kaoru Sakatani and Yoichi Katayama : Effects of enriched environment on hippocampal neuronal cell death and neurogenesis in rat global ischemia. *Advances in experimental medicine and biology* 2014;812:203-208.