

ラット脳虚血モデルにおける海馬神経細胞障害
に対する silymarin の改善効果(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系脳神経外科学専攻

平山 貢基

修了年 2015 年

指導教員 片山 容一

目次

1. 緒言	1
2. 方法	2
2.1. ラット	2
2.2. 飼育状況	2
2.3. 投与スケジュール	3
2.4. 手術法	4
2.5. 灌流固定法	4
2.6. 染色法	6
2.6.1. Fluoro Jade B(FJB) 染色 (細胞死の標識)	6
2.6.2. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色 (アポトーシスの標識)	7
2.6.3. Bromodeoxyuridine (BrdU) 染色 (細胞新生の標識)	8
2.7. 顕微鏡による観察	9
2.8. 細胞数の計数方法	9
2.9. 統計処理	9
3. 結果	10
4.1. FJB 染色	10
4.2. TUNEL 染色	10
4.3. BrdU 染色	10
4. 考察	11

5. 結語	12
6. 図表	13
7. 引用文献	19

1. 緒言

脳梗塞は、全世界での死亡者数が約 620 万人、心筋梗塞に次いで第 2 位 (WHO The 10 leading causes of death in the world 2012 : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>) であり、同時に運動障害や失語、認知症などの後遺症は日常生活においてその後の患者の QOL を著しく低下させる要因の一つである。特に、認知症は日本全国で 462 万人いるとされ、そのうち脳梗塞などが原因とされる血管性認知症は、約 90 万人とされている (朝田 2013)。虚血による脳への血流の低下が記憶障害に関連すること (Alexander 1997) や虚血によって生じる認知障害が特に海馬の CA1 領域の遅発性神経細胞障害に密接に関連しているという報告があること (Block 1998) から、血管性認知症の治療・予防には、海馬における CA1 領域の遅発性神経細胞死への対処が必要不可欠であると考えられる。

そこで私は、肝保護剤としてヨーロッパで長年にわたり利用されており、Milk thistle (和名: オオアザミ、学名: *Silybum marianum*) の種子から抽出された物質である silymarin (図 1) が近年、抗酸化作用や抗炎症作用などの脳保護作用がある可能性について報告されていることに注目し (Raza 2011)、一過性前脳虚血によるラット海馬の遅発性神経細胞死モデルを用いて、ラットの海馬の遅発性神経細胞死に

対する silymarin の影響を組織学的に調べた。

2. 方法

2.1. ラット

オリエンタル酵母工業から提供され、年齢は生後 8 週前後、体重は 250-300 g、性別はオスの Sprague-Dawley (SD) ラットを使用した。SD ラットの使用理由は、虚血に対する脆弱性が本実験に適しているためである。各群の振り分けは、ラットを虚血手術のみで silymarin を投与しない群 (非投与群)、虚血手術後から 1 週間 silymarin (200 mg/kg) を投与した群 (投与群) とした。また、各群は 6 匹ずつ振り分け、かつ群間に週齢および体重の差が生じないようにした。

2.2. 飼育状況

温度は 22 度、湿度は 55 % に設定し、照明は朝 8 時から夜 8 時は照明オンとし、夜 8 時から翌朝 8 時は照明オフとした。ケージは日本クレアのクリーン 200TPX で、各寸法は、幅 (上方) 263 mm、幅 (下方) 220 mm、深さ (上方) 420 mm、深さ (下方) 378 mm、高さ 199 mm である。飼料はオリエンタル酵母工業の MF を用いた。各ケージに 3 匹入れ、食事給水制限は設けなかった。なお、日本大学医学部実験動物

委員会によって、本実験の方法は審査され、認可されている。(動物実験計画書承認
番号 AP12M023-2)

2.3. 投与スケジュール

本研究における虚血慢性期は、虚血早期にも起こりえるグルタミン酸・カルシウム説やアポトーシスによる細胞死の影響を除外するため、虚血 7 日目と設定した。

投与群に用いた silymarin は、LKT Laboratories (LKT Laboratories, St.Paul, MN, USA) の製剤を使用した。生理食塩水に silymarin を混入して懸濁液とした後、シリンジに結合したゾンデを用いて一日にラット体重 100 g あたり silymarin 20 mg を経口投与した(図 2)。同様に非投与群には、シリンジに結合したゾンデを用いて一日にラット体重 100 g あたり生理食塩水 0.7 ml を経口投与した。投与スケジュールは、以下のように行った。投与群では、虚血手術 7 日前から虚血手術当日の 12 時間前まで生理食塩水の投与を行うとともに、虚血手術の 12 時間後から 7 日間 silymarin の投与を行った。非投与群では、虚血手術 7 日前から虚血手術当日の 12 時間前まで生理食塩水の投与を行うとともに、虚血手術の 12 時間後から 7 日間生理食塩水の投与を行った。また、BrdU (Bromodeoxyuridine) 5,000 mg を 200 ml

の蒸留水で懸濁し、シリンジを用いてラット体重 100 g あたり BrdU 13.4 mg を腹腔内投与した。投与期間はいずれの群においても、手術の 12 時間後から 7 日間投与を行った。

2.4. 手術法

虚血手術は、ペントバルビタール 20-40 mg/kg を腹腔内投与し、外部刺激に無反応となったことを確認した後に、四肢を固定して仰臥位とした。4-5 %のイソフルランで吸入麻酔の導入を行い、1-2 %のイソフルランで深麻酔の状態を維持した。皮膚への侵害(痛覚)刺激に対して反応がないことを確認した。頸部を 70 %アルコールで消毒し、頭部正中に約 2 cm の横切開を行い、両側総頸動脈を露出した。両側総頸動脈に対しクリップを用いて血流の遮断を行い(図 3)、20 分後にクリップを除去して再灌流させた。その後、閉創し、70 %アルコールで創部を消毒し終了した。また、sham 手術は虚血手術と同様に両側総頸動脈を露出した後に、両側総頸動脈に血管クリップをかけずに閉創した。術後はケージに戻し、ラットが麻酔から覚醒するまで観察を行った。ケージは温度 22 度で管理し、食事給水制限は設けなかった。

2.5. 灌流固定法

灌流固定は、各群において虚血手術および sham 手術施行した 1 週間後に行った。まず、ペントバルビタール 20-40 mg/kg を腹腔内投与してラットが非動化し、侵害(痛覚)刺激に対して反応がないことを確認した後に腹部を正中切開した。横隔膜まで達したところで、横隔膜下面に沿って左右に切開を行った。肝臓を露出し、門脈穿刺でヘパリン 1,000 単位を投与した後、横隔膜および胸壁側面を切開し心臓を露出させた。左心室に切開を加え、生理食塩水および固定液(4 %パラフォルムアルデヒドを含む pH7.4 の 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) 溶液)に結合したチューブの先端を大動脈弓まで挿入し、ブルドック鉗子でチューブ挿入部分を挟み、固定した。最初に、生理食塩水を約 400 ml 注入し、血液を洗い流した。生理食塩水による灌流時間は、肝臓および眼球の血色素が無くなり、白色になるまでを目安とした。固定液を約 200 ml 灌流し、固定の目安はラットの四肢・体幹が硬直するまでとした。灌流固定の後、脳を摘出した。

摘出した脳の後固定は、初めに 10 %ショ糖加 4 %パラフォルムアルデヒド PBS 溶液に浸けて行った。脳組織が溶液内に沈下したことをもって、溶液が組織に完全浸透した目安とした。次に、20 %ショ糖加 PBS 溶液を浸透させ、脳が溶液内に沈下したことをもって、溶液が組織に完全浸透した目安とした。さらに、30 %ショ糖加 PBS 溶液を用いて同様に処理を行い、氷結を防止した。スライデ

リングマイクロトームを用いて凍結切片を作成した。各切片の厚さは神経細胞の全体像が観察できるように 40 μm とした。作成した切片の半数はスライドガラスに貼り付け、40 度のスライドウォーマーで加温乾燥させた後に -20 度の冷凍庫内に保存した。また残りの半数の 40 μm 凍結切片は free-floating とし染色用に用いるために、0.01 % アジ化ナトリウム加えた 0.1 M PBS 溶液に入れ、4 度の冷蔵庫内で保存した。

2.6. 染色法

2.6.1. Fluoro Jade B (FJB) 染色 (細胞死の標識)

FJB 染色は神経細胞死の確認のために施行した。スライドガラスにはりつけた切片を 1 % 水酸化ナトリウム 20 ml と 100 % アルコール 80 ml の混合液に 5 分間つけた。次に 2 分間の水洗いを行い、FJB 溶液 (AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, USA) 4 ml と 0.1 % 酢酸 96 ml の混合液に 20 分間浸透して反応させた後、蒸留水で 1 分間の洗浄を 3 回行った。最後に、40 度のスライドウォーマーで乾燥させた後に、キシレンによる透徹を経て封入剤で封入し、カバーガラスをかけた。

2.6.2. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色 (アポトーシスの標識)

TUNEL 染色はアポトーシスの確認のために施行し、TACS® 2 TdT-Blue Label In situ Apoptosis Detection Kits (TREVIGEN, Gaithersburg, MD, USA)を用いて行った。スライドガラスにはりつけた切片を 5 分間 PBS につけた。各切片に 50 μ l の Cytonin を乗せ、カバーガラスを乗せて反応させた。切片を 2 分間で 2 回水洗いし、過酸化水素 5 ml とメタノール 45ml の混合液である Quinching solution に 5 分間つけた。切片を PBS に 1 分間つけ、TdT labeling buffer に 5 分間浸透し、各切片を 50 μ l の Labeling reaction mix (TdT dNTP Mix 10 μ l、TdT Enzyme stock 10 μ l、50 倍マンガン 10 μ l、TdT labeling buffer 500 μ l の混合液) で覆い 60 分間 37 度に加温処理を加えた。切片を取り出し TdT stop buffer に 5 分間つけた後、PBS で 5 分/回で 2 回洗浄し、各切片を 50 μ l の Strep-HRP solution (blue streptavidin diluent 500 μ l と strep-HRP 10 μ l の混合液) でカバーし 10 分間 37 度の加温処理を加えた。PBS で 2 分/回で 2 回洗浄した後に各切片を 50 μ l の blue label solution でカバーし 2-7 分間静置した後、蒸留水で 5 分/回で 2 回洗浄した。最後に、40 度のスライドウォーマーで乾燥させた後に、アルコール脱水およびキシレンによる透徹を行い、グリセリンで封入した。

2.6.3. Bromodeoxyuridine (BrdU) 染色 (神経新生の標識)

BrdU 染色は神経再生の確認のために施行した。内在性のペルオキシダーゼ活性を除くために、組織切片を 0.3 % 過酸化水素水とメタノールの混合液に 30 分間つけた。PBS で 10 分、3 回洗浄し、PBS と 10% cold water fish gelatin (Sigma-Aldrich、St. Louis, MO, USA) 25 ml と 1 % normal horse serum 50 μ l の混合液を作成し前処理を行った。抗 BrdU マウスモノクローナル抗体 (Merck Millipore、Billerica、MA, USA) 120 μ l と 10 % fish gelatin 24 ml を混合した約 10 % の抗 BrdU マウスモノクローナル抗体の溶液を作製し各切片を 4 度で 7 日間反応させた。各切片を PBS で 10 分 3 回洗浄した。各切片を VECTASTAIN ABC elite Kit の 2 次抗体 (Vector labs、Burlingame、CA、USA) と常温で 90 分間反応させる。各切片を PBS で 10 分、2 回洗浄し、さらに 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) で 10 分 2 回洗浄した。ABC solution に 30-90 分つけ、Tris-HCl 緩衝液で 10 分 3 回洗浄した。1 % ジアミノベンチジン (DAB) を溶かした Tris-HCl 緩衝液に各切片を 4 度で 60 分間浸透させた後、0.3 % 過酸化水素水 20 μ l を加えた 1 % DAB、Tris-HCl 緩衝液で各切片を 4 度で約 10 分間反応させ、発色させた。各切片を PBS で 1 分間 3 回洗浄し、各切片をスライドガラスに貼り付け、40 度のスライドウォーマーで乾燥させた後に、

アルコールで脱水し、キシレンによる透徹を行い、永久保存用標本封入剤で封入し、カバーガラスをかけた。

2.7. 顕微鏡による観察

TUNEL 染色および BrdU 染色の標本は明視野で、FJB 染色の標本は蛍光法で観察した。顕微鏡は Nikon E800M を用いた。FJB 染色は FITC 用フィルター (EX 465-495、DM 505、BA 515-555) を用いて観察した。

2.8. 細胞数の計数方法

各染色において海馬の CA1 錐体細胞に沿って細胞死および神経新生を生じている細胞を計数した。FJB 染色は細胞核を含み、細胞体及び樹状突起の確認できるものを陽性細胞として計数した。TUNEL 染色は灰色に染まった円形の細胞を陽性細胞として計数した。BrdU 染色は血管内皮および血管外皮以外の茶色に染まった細胞核を含む細胞を陽性細胞として計数した。

2.9. 統計処理

統計処理には Statcel3 を用いた(柳井 2011)。TUNEL 染色では、観察された細

胞数が各観察切片において少数であり、非正規分布のため、有意差検定にはマンホイットニーU検定を用いた。FJB染色とBrdU染色では、正規性の検定で正規分布であることを確認したことに引き続き、F検定を行い等分散か否かを調べた。等分散の場合は有意差検定としてスチューデント t 検定を用い、不等分散の場合はウェルチ検定を用いた。

3. 結果

3.1. FJB 染色

神経細胞死を示す Fluoro jade B (FJB) 染色において、非投与群に比べ投与群では FJB 陽性細胞が少なかった (図 4)。

3.2. TUNEL 染色

アポトーシスを示す細胞を染色する TUNEL 染色において、非投与群で少数の TUNEL 陽性細胞を認めたが、投与群において、ほとんど TUNEL 陽性細胞を認めなかった (図 5)。

3.3. BrdU 染色

新生細胞を示す BrdU 染色によると、非投与群に比べ投与群では BrdU 陽性細胞が少なかった (図 6)。

4. 考察

本研究において、神経細胞死を示す FJB 染色において、非投与群に比べ投与群では FJB 陽性細胞が少なかったことから、silymarin が虚血 7 日目でのラットの海馬における遅発性神経細胞死に対し抑制効果を有すると考えられた。また、アポトーシスを示す細胞を染色する TUNEL 染色において、非投与群、投与群のいずれにおいても TUNEL 陽性細胞をほとんど認めなかった。これまでに遅発性神経細胞死において虚血 4 日目の細胞死がアポトーシスによる細胞死である可能性が高いと Nitatori ら (Nitatori 1995) が報告していることを考えると、虚血 7 日目でのラットの海馬における遅発性神経細胞死の発生機序としては、アポトーシス以外の細胞死が関与している可能性がある。また、4 日目で生じている可能性の高い TUNEL 陽性細胞がほとんど認められなかった理由は、アポトーシスが細胞死後にマクロファージなどにより速やかに除去されたため、虚血 7 日目にはアポトーシスによる細胞死が観察できなかったと考えられる。

また、BrdU 染色では特に術前からの投与は海馬における神経新生を抑制する

と考えられたが、虚血 7 日目においては遅発性神経細胞死にほとんど影響は及ぼさないと考えられた。

5. 結語

本研究では、ラットの海馬の一過性虚血による遅発性神経細胞死に対する **silymarin** の影響を組織学的な研究アプローチにより明らかとした。**Silymarin** が脳梗塞の慢性期における遅発性神経細胞死に関連して生じる血管性認知症などの後遺症に対して有効である可能性が示唆された。

6. 図表



図 1. Silymarin

Silymarin は、Milk thistle (和名 : オオアザミ、学名 : *Silybum marianum*) の種子から抽出される物質であり、茶色の粉末である。今回は、LKT Laboratories (LKT Laboratories、St.Paul、MN、USA) の製剤を用いた。

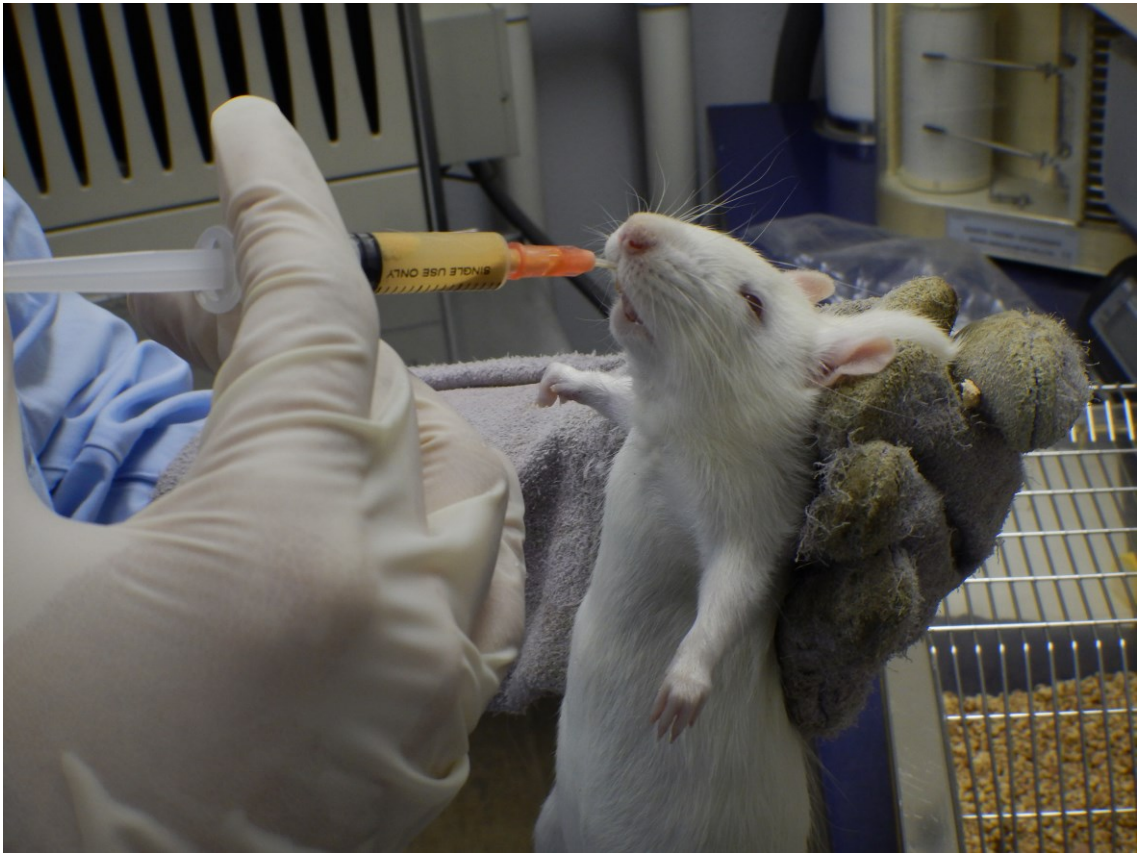


図 2. Silymarin の投与方法

上図のようにラットの頸部背側の皮膚を持ち、ラットを十分に慣らした後にゾンデを接続したシリンジを用いてラットに経口で silymarin を投与した。

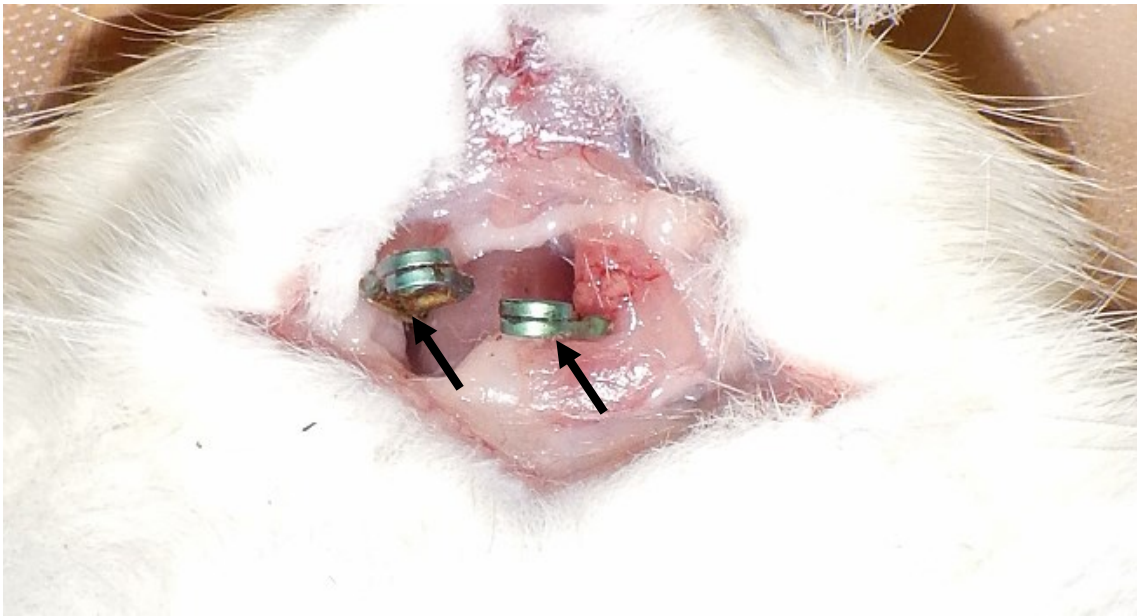


図 3. 虚血手術

頸部をアルコールで消毒し、頭部正中に約 2 cm の横切開を行い、両側総頸動脈を露出し、両側総頸動脈に対してクリップ(矢印)を用いて 20 分間の血流遮断を行った。

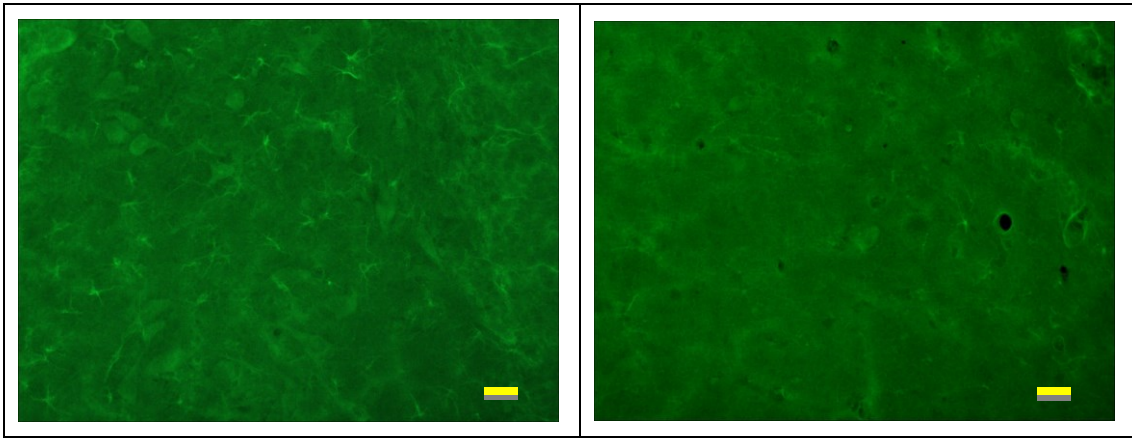


図 4. FJB 染色

左は非投与群、右は投与群である。FJB 染色では細胞体および樹状突起を有する細胞を陽性細胞とした。神経細胞死を示す Fluoro jade B (FJB) 染色において、非投与群に比べ投与群では FJB 陽性細胞が少なかった。右下の黄色のバーは 50 μm を示す。

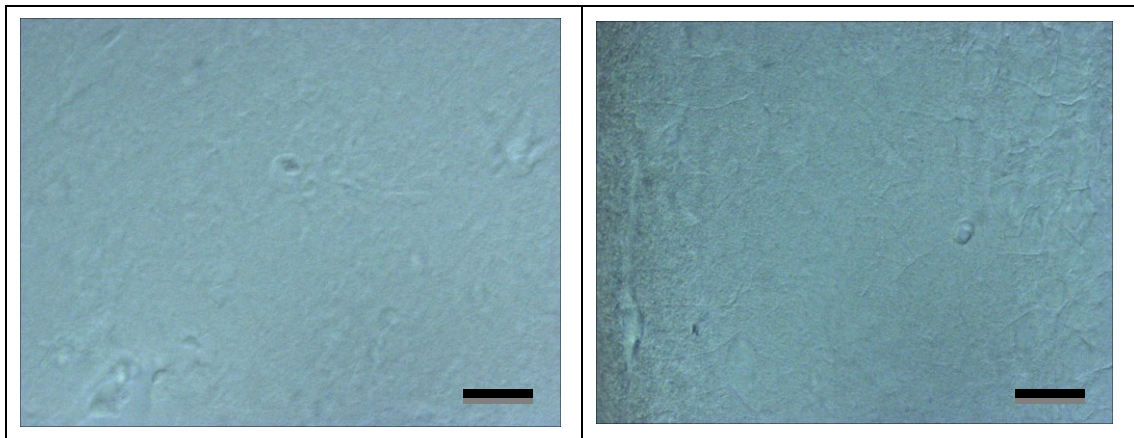


図 5. TUNEL 染色

左は非投与群、右は投与群である。TUNEL 染色は灰色に染まった円形の細胞を陽性細胞とした。アポトーシスを示す細胞を染色する TUNEL 染色において、非投与群でごく少数の TUNEL 陽性細胞を認めたが、投与群において、TUNEL 陽性細胞を認めなかった。右下の黒いバーは 250 μm を示す。

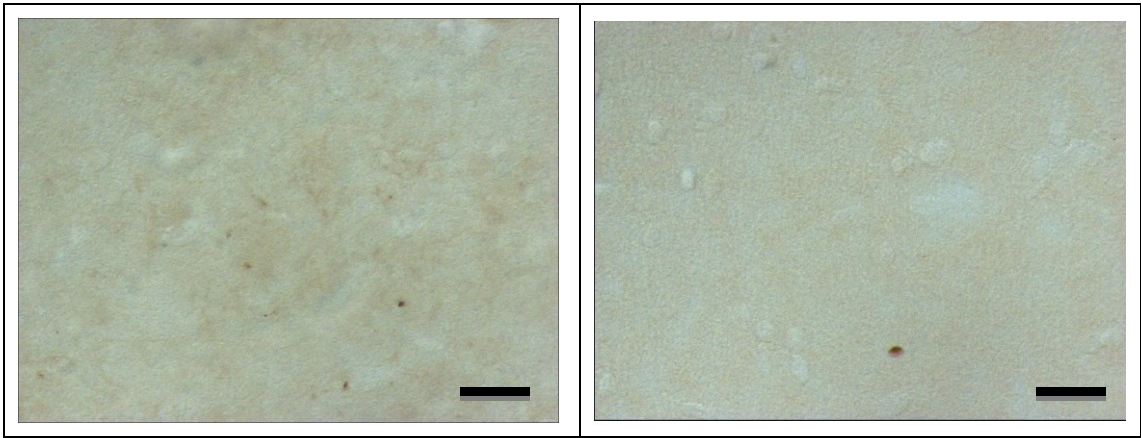


図 6. BrdU 染色

左は非投与群、右は投与群である。BrdU 染色は血管内皮および血管外皮以外の茶色に染まった細胞核を含む細胞を陽性細胞とした。新生細胞を示す BrdU 染色によると、非投与群に比べ投与群では BrdU 陽性細胞が少なかった。右下の黒いバーは 250 μm を示す。

7. 引用文献

- Alexander, M. P. (1997) . "Specific semantic memory loss after hypoxic-ischemic injury." Neurology **48** (1) : 165-173.
- Block, F. (1999) . "Global ischemia and behavioural deficits." Prog Neurobiol **58** (3) : 279-295.
- Nitatori, T., N. Sato, S. Waguri, Y. Karasawa, H. Araki, K. Shibana, E. Kominami, Y. Uchiyama (1995) . "Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis." J Neurosci **15** (2) : 1001-1011.
- Raza, S. S., M. M. Khan, M. Ashafaq, A. Ahmad, G. Khuwaja, A. Khan, M. S. Siddiqui, M. M. Safhi, F. Islam (2011) . "Silymarin protects neurons from oxidative stress associated damages in focal cerebral ischemia: a behavioral, biochemical and immunohistological study in Wistar rats." J Neurol Sci **309** (1-2) : 45-54.
- WHO. (2014) . "The 10 leading causes of death in the world 2012." from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>.
- 朝田隆 (2013) . "都市部における認知症有病率と認知症の生活機能障害への対

応." 厚生労働科学研究費補助金 認知症対策総合研究事業 平成23年度
～平成24年度 総合研究報告書

柳井久江 (2011) . 4steps エクセル統計 第三版, オーエムエス出版.