

# 乳幼児の脳発達障害の病態を解明するための 新規動物モデル開発

平成 29 年 4 月 19 日受付

齋藤敏之\*

## 要旨

本研究では、生後発達が不良な子ブタを新たに乳幼児の脳疾患を念頭にいた脳研究に活用することを旨とし、ヒト乳幼児の脳疾患の病態を解明するための新規モデル動物を開発することを目的としている。

あらかじめ、麻酔下でホルマリン血管灌流を行った離乳前のオス子ブタ（ランドレース系、15 週齢）の頭部を磁気共鳴画像装置（Magnetic Resonance Imaging ; MRI, 3 テスラ）にて撮像し、T1 強調画像などに加え、拡張テンソル解析による脳内神経軸索の可視化を試みた。T1 シーケンスでは分解能、信号対雑音比とも良好な画像が得られたが、拡散テンソルシーケンスによる解析では脳の神経軸索を鮮明に可視化できなかった。一方、クリューパー・パレラ染色を用いた脳切片の染色を検証し、ルクソールファストブルーの定着を改善するための検証を終え、神経軸索の染色が技術的に可能となった。

本研究で、幼若子ブタの脳から MRI により鮮明な T1 強調画像などを得るための基本条件を確認できたが、拡散テンソルシーケンスを用いた神経軸索の可視化については、麻酔下でさらに検証する必要がある。今後、MRI を用いた脳の画像解析法と脳切片染色による手法を併用して、幼若子ブタの正常な脳発達とその障害を解析する上で必要な形態学的な基盤データを整備していきたい。

キーワード：脳発達障害、非侵襲的画像解析、形態学的解析、ストレス、子ブタ

## 1. はじめに

生まれた時のヒトの乳幼児の脳のサイズは成人の約 25% であるが、その後、急速に発達し、2 歳になる頃には成人の約 85% のサイズになると報告されている [3]。この脳が急速に発達する時期はシナプス新生、グリア新生、髄鞘形成など、その後の脳の機能的な発達を左右する時期である [9]。乳幼児におけるいろいろなストレスは成長後の神経心理的な異常を引き起こす可能性が示唆されている [2]。しかし、乳幼児の脳を対象とする神経生物学的研究はその性質上、実施が困難である。乳幼児の脳機能発達障害の病態を明らかにできるような動物モデルがあると、治療法や予防法を開発する

---

\* 京都産業大学総合生命科学部

道が拓けると考えるが、現状ではサルを用いた報告例があるものの [14, 16]、広く利用可能な有用な動物モデルは提示されていない。そこで、最近生命科学の分野で実験動物として活用されているブタに着目した [3, 4, 7, 11-14]。

新生子ブタは分娩後間もない時期から離乳までの4週間の間に急速に発達し、体重は10倍程度、大きくなる。脳もそれに伴って急激に大きくなる。ただ、生時体重が小さい子ブタや鉄欠乏性貧血からの回復が不良なブタがあり、それらの生後発達はよくない。このような子ブタの脳を科学的に解析することにより、ヒトの乳幼児の脳発達の研究に大きく貢献できる [5, 6, 8, 10, 15]。

低体重で生まれた新生子ブタや鉄欠乏性貧血で生後発達が不良な子ブタと正常に分娩・発育した子ブタを比較して、発育不良のブタにおける脳の構造変化や血管障害の有無などを解析していく上で必要な形態学的な基盤データを得るために、本研究を行った。

## 2. 材料および方法

### 2.1 脳血管灌流

生後15日齢のLWD子豚2頭(体重4.2 kg, 4.4 kg)に鎮静薬(塩酸メドミジン+ミダゾラム)を筋注後、イソフルランの吸入により全身麻酔を施した。麻酔下で、両側の内頸動脈と外頸静脈に薬液灌流用のカニューレを挿入・固定した。これらのカニューレはあらかじめ、ヘパリン加生理食塩水を満たしておいた。ローラーポンプ(Model 7554-80, MaterFlex)を用いて、ヘパリン加生理食塩水を灌流し、終了直前に、過剰量のペントバルビタール(60 mg/kg以上;ソムノペンチル, 共立製薬)を耳静脈から投与して、心停止を確認した。その後、10%中性緩衝ホルマリン液(pH 7.4)を両側内頸動脈より頭部に向けて灌流し、両側外頸静脈より排出した。一連の灌流が終了した後、MRI撮影時までホルマリン灌流固定した頭部を4℃に保管した。

本実験は、京都産業大学動物実験委員会の承認を得て行った。

### 2.2 頭部のMRI撮影

3T-MRI (Signa HDxt, GE Healthcare)を用いて、10%中性緩衝ホルマリン液で灌流固定したブタの頭部をT1強調、拡散テンソルシーケンスなどにより撮像した。

### 2.3 脳切片の作成および染色

MRI撮影後、脳を摘出し、4℃にてパラホルムアルデヒドにて後固定した。これらの脳を30%ショ糖水溶液に2~3日間静置した。その後、凍結切片(50 μm)を作成し、あらかじめゼラチンコートしたスライドガラスに貼り付けて乾燥させた後、染色を行うまで4℃にて保管した。常法を改良し、クリューバー・バレラ染色を行った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 頭部のMRI撮影 (T1強調画像)

MRIのT1強調によって得られた画像を図1に示した。脳の冠状断面画像を取得するにあたり、撮像断面を正確に設定するため、最初に高画質な矢状断面像を撮像して、その画像上で前交連と後交連を結ぶ基準線 (AC-PC line) を確認した。また、今回のMRI撮影ではスライスとスライスの上にギャップをなくしたギャップレス条件で撮像するとともに、T1強調画像のコントラスト向上のためにTR (繰り返し時間) を450msに変更した。その結果、図1に示したように、T1強調シーケンス撮像では、分解能、信号対雑音比とも良好な冠状断面画像が得られた。図には示していないが、T2強調シーケンス撮像においても鮮明な冠状断面画像を得ることができた。

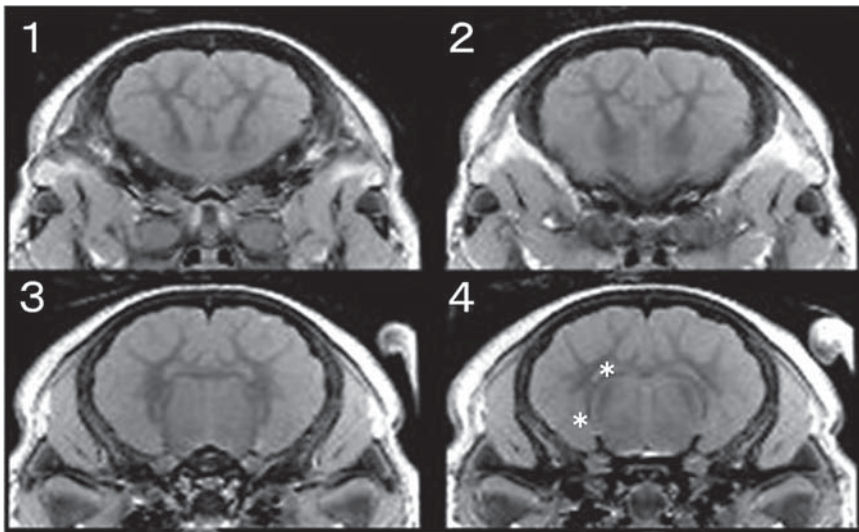


図1. T1強調によって得られた脳の冠状断面画像 (一部)。1から4は、吻側から尾側に向けて撮影した画像の一部を順に示す。画像4では海馬 (\*) の断面を見ることができる。

一方、拡散テンソルシーケンスにより得られた画像をもとに、MRI装置の解析ソフトウェアで算出したfractional anisotropy (FA) mapでは白質内に高値は確認できるが連続性はなく、神経線維の走行は明瞭に描出されていなかった (図2)。

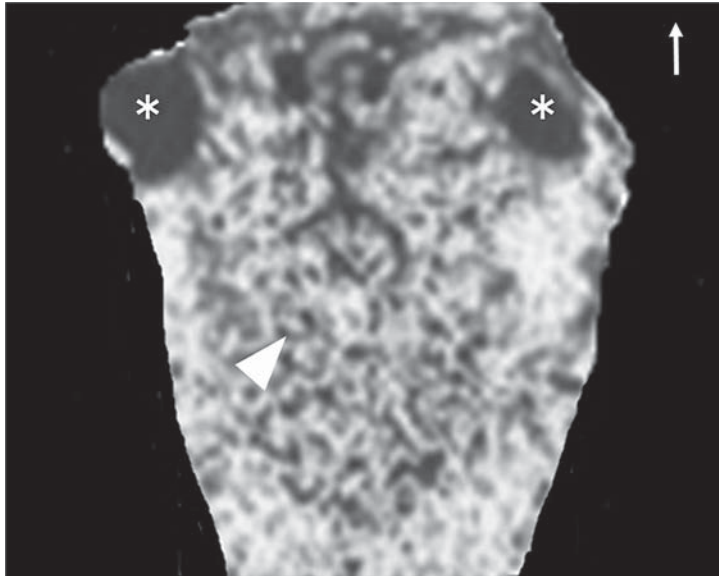


図2. 脳を撮像して得られた拡散テンソル画像例（水平断面）。断片化された神経軸索様構造（白矢印頭）が認められた。上矢印は吻側，\*は眼球をそれぞれ示す。

今回のMRI計測で神経走行が明瞭に描出できなかった主な要因として、子ブタの脳組織がホルマリンで長期に固定・保管されていたために、神経軸索内部や周囲における水の移動が大幅に減少した、あるいは消失したことが考えられる。今後、麻酔下で子ブタの脳のMRI画像を取得し、拡散テンソルシーケンスによる解析を行う必要がある。

### 3.2 クリューパー・バレラ染色

図3にクリューパー・バレラ染色を用いた二重染色例を示した。この染色切片像では、正中付近にクリューパー・バレラ染色に陽性を示した繊維の束（軸索；\*）が認められた。また、正中付近から左右にやや細い繊維の束（軸索）が伸びている像も視認できた。ニッスル染色陽性細胞は瀰漫性に散在していた（白矢印頭）。

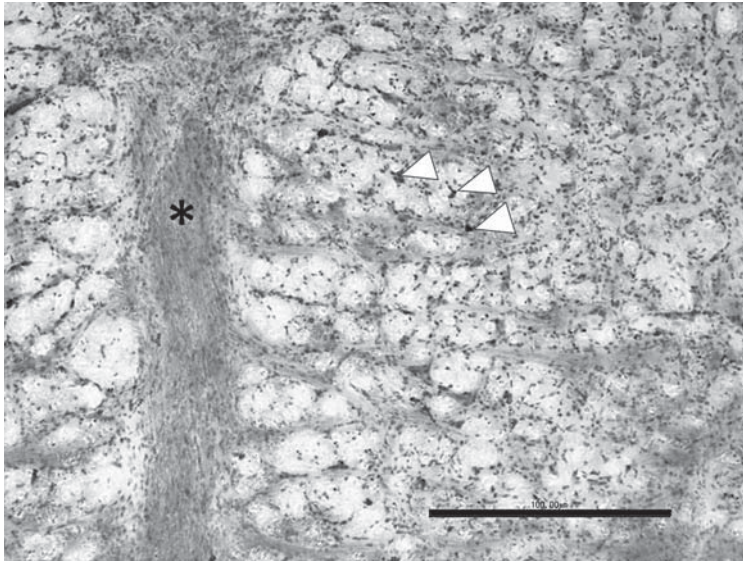


図3. ニッスル染色およびクリューバー・バレラ染色による二重染色例。小脳の腹側にある脳幹部分の凍結切片を染色した。ニッスル染色陽性細胞(白矢印頭)と軸索(クリューバー・バレラ染色陽性；\*)を明瞭に観察できる。スケールバー：100  $\mu\text{m}$ 。

離乳前の子ブタの脳から作成した切片を用いてクリューバー・バレラ染色の染色過程を検討する中で、ルクソールファストブルーの定着が安定しないことがしばしば見受けられた。この所見は、神経軸索が十分に発達していないことと関連性があると考えられる。幼若な子ブタの脳におけるクリューバー・バレラ染色について、一部、手順や技術的な改良を加え、安定しなかったルクソールファストブルーの定着の向上を図った。

#### 4. 今後の展開

ブタの脳はラットよりヒトとの共通性が多いと考えられている動物であり、脳研究においてもトランスレーショナル研究の視点から、さらに活用されるべき貴重な実験動物である。ヒトの乳幼児を念頭においた脳のトランスレーショナル研究は、近年、海外を中心に勢力的に展開されているが、その土台となる形態学的、機能的な知見が極めて不足している。その基盤を整備するための研究はこれまで未解決な乳幼児の脳発達障害の病態を解明し、治療法を開発していくために重要であると考えられる。今後、MRIを用いた脳の画像解析法と脳切片染色による手法を併用して、幼若子ブタの正常な脳発達とその障害を解析する上で必要な形態学的なデータを整備し、乳幼児の脳発達障害の病態を解明するための新規動物モデル開発につなげていきたい。

## 5. 謝辞

本研究の実施にあたり、技術的なご協力・ご支援をいただいた株式会社ケー・イー・シー バイオサイエンス部、株式会社浜松ファーマリサーチならびに本学大学院生命科学研究科・井森貴世さんに深く感謝いたします。

## 6. 参考文献

1. Bjarkam CR, Glud AN, Orlowski D, Sørensen JC, Palomero-Gallagher N. (2016) The telencephalon of the Göttingen minipig, cytoarchitecture and cortical surface anatomy. *Brain Struct Funct* 2016 Oct 24. [Epub ahead of print]
2. Hackman DA, Farah MJ, Meaney MJ. (2010) Socioeconomic status and the brain: mechanistic insights from human and animal research. *Nat Rev Neurosci* 11 (9):651-659.
3. Knickmeyer RC, Gouttard S, Kang C, Evans D, Wilber K, Smith JK, Hamer RM, Lin W, Gerig G, Gilmore JH. (2008) A structural MRI study of human brain development from birth to 2 years. *J Neurosci* 28 (47):12176-12182. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3479-08.2008.
4. Lind MN, Moustgaard A, Jelsing J, Vajta G, Cumming P, Hansen AK. (2007) The use of pigs in neuroscience: modeling brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 31:728-751.
5. Mallard C, Vexler ZS. (2015) Modeling ischemia in the immature brain: how translational are animal models? *Stroke* 46 (10):3006-3011.
6. Mudd AT, Dilger RN. (2017) Early-life nutrition and neurodevelopment: use of the piglet as a translational model. *Adv Nutr* 8 (1):92-104.
7. Nielsen MS, Glud AN, Møller A, Mogensen P, Bender D, Sørensen JC, Doudet D, Bjarkam CR. (2016) Continuous MPTP intoxication in the Göttingen minipig results in chronic parkinsonian deficits. *Acta Neurobiol Exp* 76:198-210.
8. Radlowski EC, Conrad MS, Lezmi S, Dilger RN, Sutton B, Larsen R, Johnson RW. (2014) A neonatal piglet model for investigating brain and cognitive development in small for gestational age human infants. *PLOS* Published: March 17, 2014, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091951>.
9. Rice D, Barone S. Jr. (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108 (Suppl. 3): 511-533.
10. Rutherford KM, Piastowska-Ciesielska A, Donald RD, Robson SK, Ison SH, Jarvis S, Brunton PJ, Russell JA, Lawrence AB. (2014) Prenatal stress produces anxiety prone female offspring and impaired maternal behaviour in the domestic pig. *Physiol Behav* 129:255-264.
11. Saito T, Uga M, Tsuzuki D, Yokota H, Oguro K, Yamamoto T, Dan I, Watanabe E. (2013) Evoked potential mapping of the rostral region by frameless navigation system in Mexican hairless pig. *J Neurosci Methods* 212:100-105.
12. Sauleau P, Lapouble E, Val-Laillet D, Malbert CH. (2009) The pig model in brain imaging and neurosurgery. *Animal* 3 (8):1138-1151.
13. Uga M, Saito T, Sano T, Yokota H, Oguro K, Rizki EE, Mizutani T, Katura T, Dan I, Watanabe E. (2014) Direct cortical hemodynamics mapping of somatotopy of pig nostril sensation by functional Near-infrared Cortical Imaging (fNCI). *Neuroimage* 91: 138-145.
14. Uno H, Tarara R, Else JG, Suleman MA, Sapolsky, RM. (1989) Hippocampal damage associated with

- prolonged and fatal stress in primates. *J Neurosci* 9(5): 1705-1711.
15. Winter JD, Dorner S, Lukovic J, Fisher JA, St Lawrence KS, Kassner A. (2011) Noninvasive MRI measures of microstructural and cerebrovascular changes during normal swine brain development. *Pediatr Res* 69(5 Pt 1):418-424.
  16. Young JT, Shi Y, Niethammer M, Grauer M, Coe CL, Lubach GR, Davis B, Budin F, Knickmeyer RC, Alexander AL, Styner MA. (2017) The UNC-Wisconsin rhesus macaque neurodevelopment database: A structural MRI and DTI database of early postnatal development. *Front Neurosci* 2017 Feb 2;11:29. doi: 10.3389/fnins.2017.00029. eCollection 2017.

# An approach for establishment of new animal model using preweaning piglets to reveal pathogenesis of developmental disorders in the brain of human infants

Toshiyuki SAITO

## Abstract

In the past decade, the use of pigs in neuroscientific study has increased, in which the piglet has been utilized to investigate as a potential model for studying brain and cognitive deficits, for example, associated with being born small for gestational age.

In this study, we had an approach to obtain fundamental morphological data of the brain using preweaning piglets by use of magnetic resonance imaging (MRI) as well as histochemical techniques, for revealing mechanisms of the developmental brain disorders in human infants. Prior to MRI measurement, the brain of the preweaning LWD piglets (age of 15 days) were perfused with saline solution containing heparin and then with 10% formaldehyde neutral buffer solution under general anesthesia with isoflurane inhalation. MRI image acquisition was performed on a 3-Tesla scanner including axial, coronal, and sagittal ones. T1- and T2-weighted gradient-echo images could be obtained. The diffusion tensor imaging (DTI) was, next, collected with magnetic resonance microscopy, however, the image contained only fragmented axial fibers. Following MRI acquisition, the sections were histologically processed using Klüver-Barrera staining (myelin staining) and imaged using light microscopy techniques. The axial fibers were good stained in the frozen brain section by use of this histochemical technique.

The experiment from now on needs to obtain the DTI image in the brain of anesthetized piglets. Three-dimensional reconstruction is also required from the DTI images and from the brain sections which are stained histochemically to experimentally analyze the developmental brain disorders using the piglets from the view of the comparative patho-physiology.

**Keywords :** non-invasive image analysis, morphological analysis, developmental brain disorders, stress, piglets