

# パーキンソンモデルラットの作出と その評価について



日本エスエルシー株式会社



<http://www.jslc.co.jp>



## ■はじめに

パーキンソン病は1817年ジェームズ・パーキンソンによって報告されたことに由来する。その症状は、振戦(手足にふるえ)筋固縮、動作緩慢、姿勢反射障害などがあげられる。人間では50歳代以降での発病が多く、我が国の患者数は、約千人に一人の割合である。

病理学的には、中脳にある黒質神経細胞の変性が認められる。黒質神経細胞は、脳の基底核にある線条体にドーパミンを送り円滑な随意運動を行う役割を担っている。線条体の中ではアセチルコリンが神経細胞に刺激を送り、やはり正常な随意運動に大切な役割を果たしている。

通常ドーパミンとアセチルコリンは、釣り合いがとれているが、パーキンソン病ではアセチルコリンを使う神経細胞の役割が強くなりすぎている。黒質神経細胞はメラニン色素を含み黒く見える。しかしパーキンソン病になると、黒質の色が薄くなり、ドーパミンが減少する。

治療法としては、薬物療法(ドーパミン補充療法、アセチルコリン受容体の遮断)、手術療法、リハビリテーション等があり、中でも薬物療法が一般的であるが、病気の進行をくい止める程度で、根本的な治療法が無いのが現状である。

## ■目的

パーキンソンモデルを作出し、パーキンソン病状の発症をするか、評価を試みた。

## ■材料および方法

使用動物:Slc:SDラット、8週齢、雄、36匹、飼育環境:照明(7~19時)、飼料(自由摂取)、手術後は個別ケージで飼育した。使用試薬:6-OHDA(シグマ)、アスコルビン酸(和光純薬)、アポモルフィン(和光純薬)を使用した。6-OHDAは、3.5mg/mlで0.02%アスコルビン酸添加生理食塩液に溶かした。アポモルフィンは1mg/mlで添加生理食塩液に溶かして使用した。

使用器具機材は、脳定位保定装置、電気バリカン、電気ドリル、刃は0.8、1.0、1.2mm、外科用メス、小直バサミ、無効ピンセット、開創器、持針器、マイクロシリンジ(10,50 $\mu$ l)エイコム社製ステレオガイド、マイクロインジェクションカニューレ、を使用した。パーキンソンモデルラットの手術方法は、6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)を脳の線条体へ投与することによりドーパミン神経の細胞死を誘発し、ドーパミンを減少させて、パーキンソン病の症状を誘発させた。

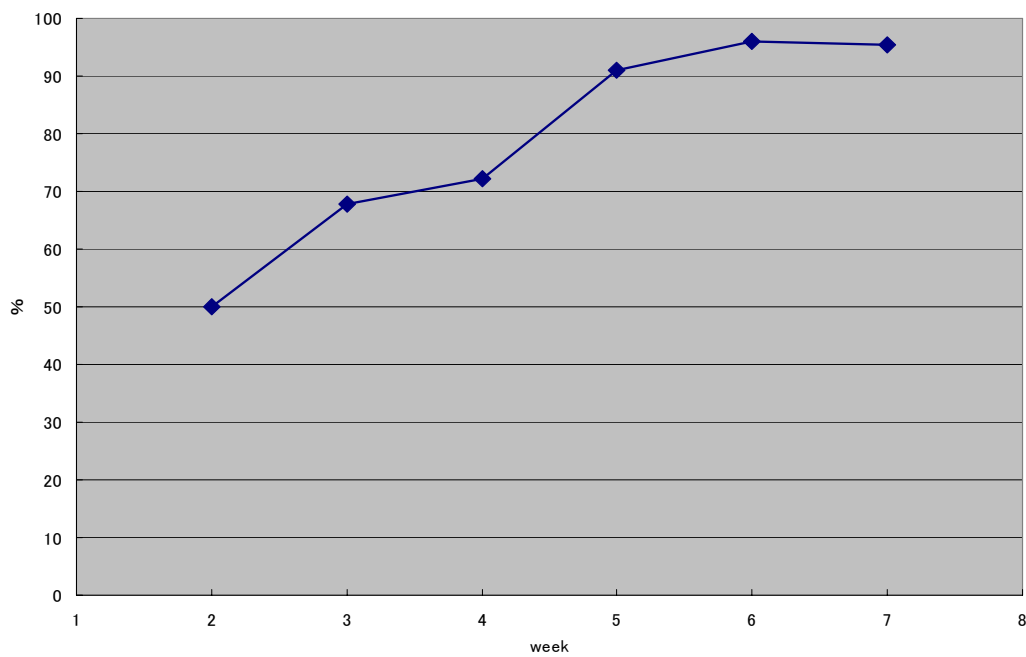
動物は、ペントバルビタール(50mg/kg)で麻酔し、後頭部から頸背部を広く除毛し、イヤーパーを取り付け、脳定位保定装置に保定した。頭部の皮膚を3~4cmメスで切開し、開創器をかけ、結合組織を切除し、丁寧に骨膜をはがし頭骨を露出し縫合線を確認し、プレグマとラムダの座標を測定した。投与座標は、AP(+1.3,+0.4,-0.4,-1.3mm)ML(-2.6,-3.0,-4.2,-4.5mm)DV(-5.0mm)の4ポイントで、座標測定後頭骨に電気ドリルで穴を開け、マイクロインジェクションカニューレを脳表面より5.0mm侵入させて、6-OHDAを2 $\mu$ l/2minで投与した。投与後1分間はそのまま放置し、4ポイントについて同様の操作を行った。投与終了後、抗生物質を塗布し、切開部を縫合した。

評価は、行動学的変化と組織学的変化について実施した。行動学的変化は、手術後の自発回転運動、尾刺激回転運動の観察、ならびに、手術後2~3週以降に、ドーパミン受容体作用薬であるアポモルフィン(1mg/kg)を腹腔内投与し、投与後約30分間動物の回転運動を観察した。パーキンソン病の状態であればアポモルフィン投与後に、動物は左回転することから、回転を始めてから1分間に7回以上左回転した個体をパーキンソン病状の発症とした。組織学的変化の評価として脳の凍結切片を作成した後、ドーパミン産生ニューロンの抗体染色を行った。

## ■結果

6-OHDAの脳内投与手術は36匹行った。2匹が手術後死亡し、4匹がアポモルフィン投与において全く回転しなかったため30匹を成功とした。手術後、動物は破壊した右脳側に湾曲した姿勢をとり、尾を刺激すると右側に回転(半回転程度)した。アポモルフィン投与後、数分で動物は手術側と反対方向(左回転)へ回転した。1分間に15回以上激しく回るもの、7回程度のもの、回転方向に横臥状態なもの、全く回転しないもの等の症状がみられた。投与後約20分は激しく回るが次第に回転は治まった。

アポモルフィン投与による回転運動の発現



左回転の発現は、手術後2週目で50.0%、3週目で67.9%、4週目で72.2%、5週目以降では90%以上の個体でみられ増加を示した。

## 脳の凍結切片における抗体染色の結果



6-OHDAを投与していない左脳側(正常側)は染色されたが、投与した右脳側では染色されなかった。

正常な場合、大脳の凍結切片を作製すると、ドーパミン産生ニューロンが染色される。写真の様に、6-OHDAを投与していない左脳側ではドーパミン産生ニューロンが染色されるが、右脳側では染色されなかった。この結果、6-OHDAの投与により線条体が破壊されたと確認された。

### ■考察

パーキンソンモデルの手術(6-OHDA投与)の成功率は83.3%であった。しかし、アポモルフィン投与によって手術の成功を判定する場合は、手術後4週での回転運動の発現が72.2%であるので、手術後5週目以降に行うと良いと考えられる。

### ■まとめ

我々の作製したパーキンソンモデルラットは、アポモルフィン投与により手術後5週で90%以上が1分間に7回以上の左回転運動を示した。また、抗体染色により、線条体が破壊されていることも確認できた。

このモデルは、パーキンソン病の研究に寄与できると考えられる。

### ■参考

1) Aleksandra Madenovic, Milka Perovic, Nevena Raicevic, Selma Kanazir, Ljubisav Rakic, Sabera Ruzdijic Brain Research 996(2004)237-245

2) Haiei Xu, Xiaotang Fan, XuanWu, Jun Tang, Hui Yang

Biochemical and biophysical Research Communication 326(2005)115-122

## 脳室内投与(icv)、脳室内投与用ガイド装着モデル

脳室は、脳のほぼ中央にあり、脳脊髄液を産生しています。脳脊髄液は、脊髄や脳を取り囲んでいる空間を循環する透明な体液であり、脳や脊髄を外傷や身体的衝撃から保護し、神経分泌物(神経組織から放出される化学物質)、栄養素、細胞内の化学物質、細胞内で化学物質が変化したものなどを輸送する役割をもっています。

血液脳関門を通過しない物質を脳室内に投与する実験はよく行われています。研究者が脳室内投与を簡便行えるように、脳室内にガイドカニューレを装着致します。

装着場所は脳冠状縫合と矢状縫合の交叉する点(Bregma)を基点0点(0,0,0)とし、ユーザーの希望にお答えします。

ガイドは、基本的にはエイコム(株)社製を用いますが、その限りではありません。

Paxinos G, Watson Cのラット脳地図を参考に行います。

### 手術方法(簡単な手術方法です。)

ペントバルビタールで動物に麻酔をかけます。

動物を脳定位保定装置へ正しく保定します。

頭皮をメスで切開し、頭骨を露出させ縫合線を露出させます。

bregmaを基点0点とし投与する座標を測定します。

頭骨上の目的の座標へ歯科用ドリルを用いて慎重に穴を開けます。

### 1) 投与を行う場合

インジェクションカニューレ(エイコム)を脳室内へ進入させ投与を行います。

### 2) 投与用ガイドを装着する場合

基本的にはエイコム社製ガイドカニューレを装着します。

頭骨上へ目的の座標以外にアンカービス用の穴を歯科用ドリルであけ、アンカービスを取り付けます。

ガイドカニューレを目的の位置へ挿入させ、歯科用セメントで頭骨上へ固定します。この時アンカービスを絡めてセメントで固定します。

日本SLCの外科的病態モデル動物のお問い合わせ

053-486-3155(関東地区)

053-486-3157(関西地区)

担当 須部

<http://www.jslc.co.jp/>