

総 説

脳蘇生研究の進歩

Recent progress in research on brain resuscitation based on  
experimental models in brain ischemia

—— 脳虚血実験モデルを中心として ——

室 園 美智博 松 本 晶 平 一 色 淳

Michihiro MUROZONO, Shohei MATSUMOTO, Atsushi ISSHIKI

東京医科大学麻酔科学講座  
Department of Anesthesiology, Tokyo Medical University

はじめに

心停止、低灌流、脳血管障害により、脳は他臓器と比べ容易に障害される。その特殊性から、脳虚血、脳蘇生は一大研究分野となり、生理学、生化学、薬理学といった基礎系教室をはじめ、脳神経外科・内科、麻酔科、救命救急といった臨床系教室まで、脳虚血、蘇生をテーマに世界中で、研究が行われている。その研究手法の中心となるのは、様々な動物実験モデルであり、脳虚血の病態生理及び治療法の発見のために、実験的脳虚血モデルによる基礎研究が現在進められている。特に分子生物学的アプローチや薬剤効果の評価などにおいて、動物実験は必要不可欠なデータをもたらす。

脳虚血モデルとして対象となる動物は、1980年代まではイヌ、ネコ、ラット、スナネズミ、霊長類など、それぞれの使用割合がほぼ同程度に平均化されていたり。しかし動物愛護、倫理的問題等が影響して、イヌやネコなどの大型動物の使用が困難になり、逆に経済的利点、脳血管や遺伝子の構造がヒトに類似しているということで、齧歯類の使用頻度が増加してきた。更

にトランスジェニックマウスの作成が普及し、並行して齧歯類を対象とした局所脳虚血モデルが様々な方法により開発されてきたため、現在では脳虚血モデルとして対象となる動物の90%以上が齧歯類となった。

当教室でも、開設以来、脳蘇生の研究を継続してきた。古くは雑種成犬の心停止による脳虚血モデルを使用し、多くの研究成果を残した。しかし、前述した背景により、最近ではラット・マウスを中心とした齧歯類モデルへと研究対象が変化している。測定するパラメーターは、古くは組織酸素分圧、脳灌流圧や脳血流量などの基本的なデータが中心であったが、脳虚血仮説の進歩に伴い、ミトコンドリア呼吸商や、細胞外グルタメート、モノアミン、アミノ酸等へ変遷し、近年では情報伝達関連タンパクなど分子生物学的なパラメーターが中心である。

本稿では、齧歯類を中心とした局所脳虚血モデルの現状と問題点を、当教室での実験結果を含めて解説する。

2004年11月12日受付、2005年1月4日受理

キーワード：脳虚血、実験モデル、齧歯類

(別冊請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1 東京医科大学麻酔科学講座 室園美智博)

### 齧歯類による脳虚血モデル (Rodent model)

理想的な脳虚血動物モデルとしての条件は

1. 臨床的病態がヒトに近いこと
2. 再現性があること
3. 安価で、簡単に数多く作成できること
4. 麻酔、手術などによる脳虚血以外の二次的な影響を受けないこと
5. 体温、血糖、血圧などの生理学的パラメーターがコントロールされていること
6. 倫理的に容認されうること

などが挙げられる<sup>2,3)</sup>。しかし現実にはこの条件を全て満足するモデルは存在しない。したがって各脳虚血モデルでの特徴や背景を十分理解した上で、得られたデータに対する解釈をするべきである。このような過程を経ることで、より精度の高いかつ詳細な情報が獲得され、確実な臨床への応用に結びつくのである。近年、脳虚血時の神経細胞障害に対する興奮性アミノ酸<sup>4)</sup>やフリーラジカル<sup>5)</sup>そしてアポトーシスの関連性<sup>6)</sup>、また神経保護としての抗炎症性サイトカイン<sup>7)</sup>や虚血耐性にける heat shock protein<sup>8)</sup>の働きなどが解明されてきている。さらに脳虚血に伴う遺伝子プロファイリングが行われ、神経細胞死の鍵となる遺伝子も特定されつつある<sup>9)</sup>。以上のような研究成果を獲得するために、多くの齧歯類による脳虚血モデル実験が利用されている。その背景として、ラットやマウスによる脳虚血モデルの開発が活発に行われ、より信頼性の高い実験モデルが確立してきたことが大きく貢献している。

脳虚血モデルには大きく分けて全 (前) 脳虚血モデルと局所脳虚血モデルがある。原則的には前者は心停止やショックの病態を想定しており、後者はヒト脳梗塞の病態に類似したモデルである。齧歯類モデルとしてはスナネズミ、ラット、マウスの3種類が代表的なモデル動物である。

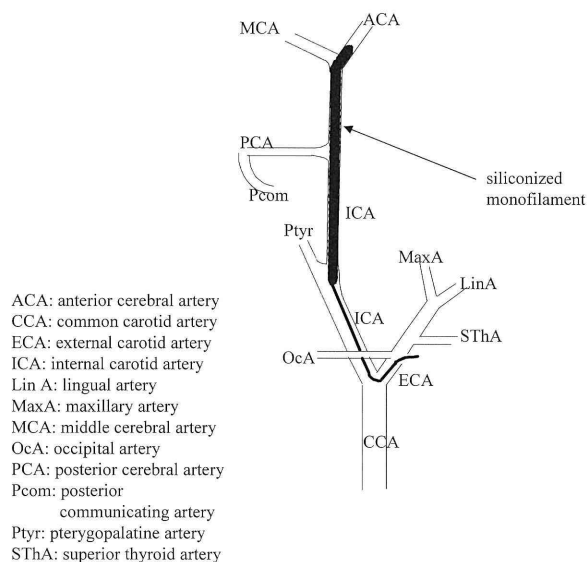
前脳虚血モデルでは、一定時間の虚血を受けた後、数日して海馬 CA1 領域に神経細胞死が起こる、いわゆる遅発性神経細胞死が知られており、前脳虚血モデルはそのメカニズムや治療を研究するために使われているといっても過言ではないだろう。ラットのモデルは、特に 1970 年後半から開発が進み、まず Pulsinelli らが 4 血管閉塞 (four vessel occlusion) モデルを開発し、各脳領域の選択的脆弱性を見出すことに非常に役立った<sup>10)</sup>。1980 年に入ってから、両側総頸動脈のクリップによる結紮と中心静脈からの脱血により脳虚

血を起こす Smith model が開発され、現在でも世界で広く使われている<sup>11)</sup>。比較的容易に作成でき、いったんモデル作成に習熟すれば、CA1 のダメージの再現性が高い。このモデルによって、前脳虚血の研究は大きく進歩したのである。スナネズミにおいても前脳虚血モデルは容易に作成できる。スナネズミは解剖学的に脳底動脈輪の後交通動脈を欠くため、両側総頸動脈の結紮により容易に前脳虚血が得られる。遅発性神経細胞死を世界で初めて報告した桐野らも、スナネズミを使用している<sup>12)</sup>。マウスの前脳虚血モデルは現在開発途上の段階で、未だに確立されたものは少ない。マウスは系統によって、ウィリス輪を中心とした脳血管構築上の相違が認められ、脳虚血に対する反応も系統ごとの特徴が存在する。しかしながら上記のような条件を踏まえて、最近ではマウスの前脳虚血モデルによる報告も確実に増えてきている<sup>13)</sup>。

局所脳虚血モデルは先にも述べたように脳梗塞を想定しており、スナネズミ、ラット、マウスにてそれぞれモデルが開発されている。スナネズミにおける局所脳虚血モデルは 1960 年代に Levine らが一側総頸動脈閉塞によるモデルを発表し<sup>14)</sup>、一時期は普及していたが、血管構造に個体差が著しいなどの欠点があり、現在はラットやマウスに比べて報告は少ない。それと対照的にラットは、局所脳虚血モデルの中で現在最も繁用されている動物モデルと言える。その局所脳虚血の作成にはいくつかの方法が現在までに報告され、それぞれの方法が実際に多くの研究者によって採用され優れた報告がなされている。マウスに関しては、体重・致命率・系統による差異などラットとは違った条件を考慮しなければならない。しかしラットでの作成方法に準じてマウスの場合も局所脳虚血モデルを作成していることが多い。ここではラットとマウスにおける局所脳虚血モデルの主な作成方法について、それぞれの方式の具体的アプローチ方法や長所・短所を中心として解説する。

### Intraluminal Filament Occlusion of Middle Cerebral Artery (MCA) (血管内モノフィラメントモデル)

このモデルは小泉らによって最初に報告されたもので、一過性局所脳虚血モデルとしてもっとも広く普及している<sup>15)</sup>。この方法は頸部正中を切開し、総頸動脈・外頸動脈・内頸動脈を剝離する。外頸動脈遠位部に切開を加えてそこから先端を溶かして丸く整えた



**Fig. 1** The schema of the vasculature with occlusion by a siliconized monofilament.

(ナイロン)モノフィラメント(ラットならば4-0、マウスならば5-0~8-0)を挿入し、内頸動脈を経て中大脳動脈近位部まで進め、中大脳動脈の血流を閉塞する(Fig. 1)。この方法で皮質及び皮質下に広く梗塞を生じる(半球体積の35-40%)。またモノフィラメントのサイズを調整することでマウスにも利用している。さらにモノフィラメントを抜去することで虚血時間を調節し、再灌流を行える。従って永久虚血でも一過性虚血及び再灌流でも対応可能である。開頭することなく血管閉塞をおこなえるので、比較的侵襲の少ないモデルといえよう。この方法の欠点としては、頭蓋内の中大脳動脈周辺を直接観察できないため、モノフィラメントの先端が十分に中大脳動脈起始部に留置できていないことや、進入しすぎて前大脳動脈を穿破してしまうことがある。またこの方式は中大脳動脈の他に、後交通動脈や視床下部への穿通枝なども閉塞するため、梗塞の範囲が非常に大きくなりやすい。これらの欠点が原因で再現性が若干低い結果となっているため、いくつかの改善点を加えた変法がさらに開発された。モノフィラメントをsilicon<sup>16)</sup>やpoly-L-lysine<sup>17)</sup>などでコーティングする方法もそのひとつで、これにより血管内への進入を滑らかにして、血管壁への損傷を減らす。しかも血管閉塞による血流低下に安定したものが望める。レーザー・ドップラーによる局所脳血流測定を利用して、モノフィラメントを留置する位置の判断をする方式も、フィラメントによる血管の破綻を防いで再現性を高める<sup>18)</sup>。またさらにこの虚血モデル

では、特にラットにおいて虚血後に生じる視床下部の傷害が原因で、高体温をきたすことがある<sup>19)</sup>。そのため術後に冷却ボックスにて一定時間管理するといった方法をとっている報告もある<sup>20)</sup>。

### Permanent Middle Cerebral Occlusion (PMCAO) by Craniotomy and Electrocoagulation (開頭中大脳動脈閉塞モデル)

本モデルは1981年Tamuraらにより発表されて以来、中大脳動脈閉塞モデルの主流のひとつとなっている<sup>21)</sup>。術式は、側頭筋を圧排し、卵円孔と眼窩裂の中間にて小孔をあけ、硬膜を切開する。中大脳動脈を確認したら、中大脳動脈の分枝である外側レンズ核線条体動脈より遠位側(場合によっては近位側)にて中大脳動脈を電気焼灼する。このモデルでは基本的には皮質のみの梗塞を生じる。また再現性を高めるために、総頸動脈にも閉塞を加えたり<sup>22)</sup>、高血圧自然発症ラットを利用している<sup>23)</sup>。欠点としては、直接脳表に接触するので、なるべく手術操作による脳損傷を与えないようにある程度高い熟練度が要求される。

### Clot Embolism with Autologous Blood Clot (塞栓子モデル)

本モデルでは自家血clotを内頸動脈または中大脳動脈に向かって注入し、塞栓を形成する<sup>24)</sup>。この方式では、血栓溶解により再灌流を生じるよう計画したものや<sup>25)</sup>、microsphere<sup>26)</sup>・air bubble<sup>27)</sup>による多発性塞栓など、いくつもの変法が存在する。他のモデルと比べて塞栓によるモデルの優れている点は、内因性凝血塊を使用しているため、より生理的な病態が生じていることである。欠点としては、微小栓子の量や塞栓の部位によって梗塞のサイズは変わるので、再現性はあまり高くない。また塞栓が形成されて虚血がいつの時点で生じているかがあいまいとなっている。これらの点を考慮して、モデル作成中にレーザー・ドップラーにより局所脳血流を測定する、または先の血管内モノフィラメント法と同様にカテーテルを挿入し、中大脳動脈起始部まで進めてから塞栓子を注入といった改良型が、最近報告されている<sup>28)</sup>。

### Photothrombotic Occlusion of the MCA (光線虚血モデル)

このモデルは、Rose Bengalを全身投与してから特定の波長をもった光線を露出した中大脳動脈領域皮

質に照射、その局所の微小血管にて内皮細胞にダメージが生じ血栓を形成、虚血を成立させる<sup>29)</sup>。脳表面を露出するが、脳実質に直接操作を加えないので低侵襲である。しかも照射部分のみ虚血となるので、再現性も比較的高い。しかしこのモデルにおいても上記の血栓モデルと同様に虚血開始時間や再灌流開始時間を確認するのは困難である。

### Vasospastic Occlusion with Endothelins (エンドセリン閉塞モデル)

エンドセリンは、強力な血管収縮作用をもっており、これを脳表面に投与することで脳梗塞を作成するのが、このモデルである<sup>30)</sup>。基本的に血管外からの投与にて成立するモデルなので、脳表面の皮質部分に投与する限りは侵襲が少ないが、脳実質内投与となると侵襲性が高まる。また再開通の時期や梗塞領域の大きさの不明瞭さが問題点である。

以上、ラットにおける局所脳虚血の主なモデルである。

マウスでは現在主に血管内モノフィラメント閉塞モデルまたは開頭中大脳動脈閉塞モデルが利用されている。

#### 当教室における齧歯類での局所脳虚血モデル実験

現在、当教室においては血管内モノフィラメント法を採用しており、ラット・マウスにおける局所脳虚血モデルでの実験成果を報告している。

当教室でのラットによる局所脳虚血モデルは、熱により先端部分を溶かしながら角をとり、さらに近位部をシリコンでコーティングした4-0ナイロンモノフィラメントを使用。ラットを(ハロタンによる)全身麻酔下にて、気管内挿管を施行し人工呼吸管理しながら、尾動・静脈にカテーテル挿入(動脈圧及び動脈血ガス測定、また静脈は輸液に使用)。内頸動脈よりモノフィラメントを挿入し、内頸動脈近位端からモノフィラメント19mmの長さを進める。この状態にてモノフィラメントを2時間留置してから抜去(再灌流)する。再灌流後体温上昇を考慮して冷却ボックスにて保存、2時間経過時に神経学的所見を評価し、虚血によるダメージの有無を確認する。

松本らは、サイクロスポリンA(CsA)を中心とする薬物の抗虚血作用に観点を置いて、脳虚血後のMitochondrial Permeability Transitionの変化と抗虚血作用の関連性を報告した<sup>20)</sup>。その研究では、上記の

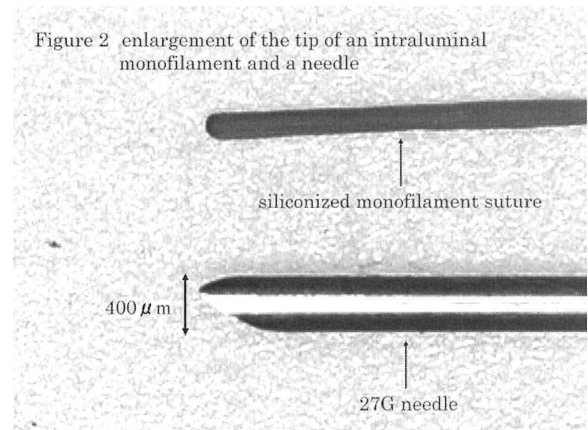
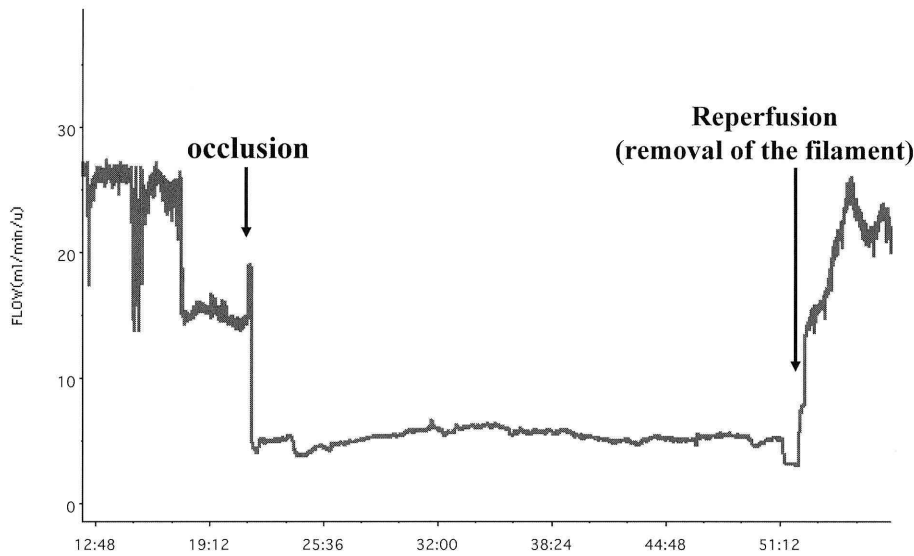


Fig. 2 The monofilament is covered with silicon and is 150-200  $\mu\text{m}$  in diameter.

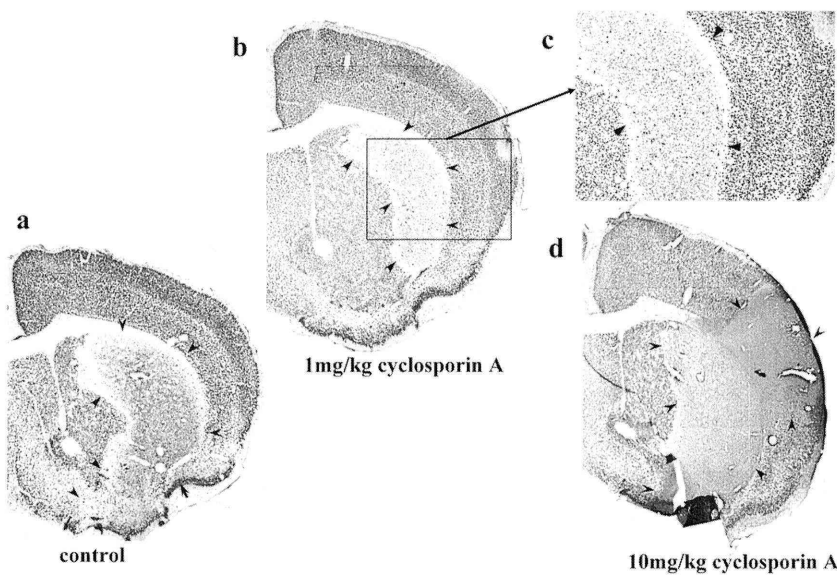
ラット局所脳虚血モデルを使用した。また同モデルを使った実験で、calcium/calmodulin-dependent kinase IIやprotein kinase C-[gamma]など細胞内シグナル伝達関連物質の脳虚血時や再灌流時の変化を観測し、脳保護への手がかりを検討している<sup>31)</sup>。

当教室でのマウスの局所脳虚血モデルも、血管内モノフィラメント法を採用している。使用するモノフィラメントは6-0のサイズのもので、長さ約12mmに調節し、先端から約5mmの長さをシリコンコーティングする。シリコンコーティングにより、モノフィラメントの直径を約150~200 $\mu\text{m}$ に調整する(Fig. 2)。吸入麻酔薬(イソフルランやハロタン)・笑気による麻酔下(マスクによる自発呼吸状態)にて、皮膚を剥離した頭蓋骨表面にレーザー・ドップラー・フローメトリーのプローブを装着、局所脳血流を測定開始(局所脳虚血モデル作成中継続してモニタリング)。続いて頸部に切開を加えてから総頸動脈・内頸動脈・外頸動脈を剥離展開した後、外頸動脈よりモノフィラメントを挿入。内頸動脈を経て中大脳動脈起始部までモノフィラメントを進める。モノフィラメントにより中大脳動脈が閉塞状態になると、局所脳血流測定にて急激な血流低下を示す(Fig. 3)。その時点でモノフィラメントを留置する。30分留置後モノフィラメントを抜去する(再灌流開始)。再灌流後麻酔を中止してから体温低下を防ぐために、約35 $^{\circ}\text{C}$ に維持したボックスにて保存、2時間経過時に神経学的所見を評価する。再灌流後48時間経過時に脳組織を染色(Fig. 4)、ダメージを評価する。

当教室では、上記のマウス局所脳虚血モデルをノックアウトマウスにて作成し、生体内における内因性物



**Fig. 3** Local cerebral blood flow by the laser doppler probe during middle cerebral artery occlusion in mice.



**Fig. 4** NeuN stained coronal sections at 48 h after 30 min middle cerebral artery occlusion. Arrowheads indicate the border between the damaged area and the non-damaged area. a: control (Non-treatment with Cyclosporin A), b, c: 1 mg/kg Cs A treatment group, d: 10 mg/kg Cs A treatment group.

質の虚血に対する影響を検索している。血漿フィブロネクチン・ノックアウトマウスに局所脳虚血実験を施行、血漿フィブロネクチンがアポトーシス関連の物質に影響することで、抗虚血作用に関与していることを報告した<sup>32)</sup>。一方、Cs A 等抗虚血作用を有する薬剤が、血液脳関門により脳実質への浸透が困難であることが言われている。そこで我々は血液脳関門の働きを有する物質が欠如したマウス (multi drug resistance 1a ノックアウトマウス) を使い、局所脳虚血時の Cs A の投与における影響を観察、結果、Cs A は濃度依存

性に抗虚血作用また毒性を発揮することが証明された (Fig. 4)。従って Cs A による投与方法や投与量を確立するのに、therapeutic window の検討が十分に必要であることが示唆された<sup>33)</sup>。更に現在我々は、血液脳関門としての働きを有する *mdr1a* gene 由来 p-glycoprotein の脳虚血に対する影響を、*mdr1a* ノックアウトマウスでの脳虚血実験にて継続して追究している。

### ノックアウトマウスを使った脳虚血実験

マウス胚性幹 (ES) 細胞を用いたノックアウトマウスの報告がされて以来、現在までに世界中で数多くのノックアウトマウスが作成され、膨大な数の生体内物質の存在・働きが報告されてきた。近年、脳虚血に関する研究においてもノックアウトマウスを対象とした実験報告が急増している。マウスの遺伝子はヒト遺伝子と相同性が高く<sup>34)</sup>、それ故にノックアウトマウスを利用した脳虚血研究ではヒトの細胞分子レベルの病態解析に非常に有用である。ここでノックアウトマウスの作成方法を簡単に説明する。

- 1) 欠失させたいマウスのゲノム標的遺伝子を単離して構造を決定する。
- 2) 標的遺伝子配列の一部を遺伝マーカーに置換した変異遺伝子配列を、ターゲティングベクターに挿入する。
- 3) ES細胞にターゲティングベクターを導入し、遺伝子マーカーを指標にして、相同組み換えを起こしたES細胞を選択する。
- 4) 妊娠雌マウスから取り出した胚盤胞に選択したES細胞を、マイクロインジェクションする(キメラ胚)。
- 5) キメラ胚を仮親の子宮へ移植し、キメラマウス(生殖細胞にES細胞由来遺伝子を取り込んだマウス)を取得する。
- 6) 選択したキメラマウスと野生型マウスを交配し、ヘテロ変異マウス (+/-) を取得する。
- 7) ヘテロ変異マウス同士の兄妹交配により、ホモ変異マウス (-/-) を取得する。

基本的な作製方法は上記のごとくである。

実際に多くの種類のノックアウトマウスが脳虚血実験に用いられているが、いくつかの問題点がある。

脳虚血領域で対象となるノックアウトマウスは系統として C57BL/6 や 129/Sv のマウスが多い<sup>35)</sup>。しかも ES 細胞は 129/Sv 由来で、キメラと掛け合わせる系統が C57BL/6 ということが多く、その場合ノックアウトマウスは 2 系統の遺伝的バックグラウンドを有していることになる。一方、マウスでは系統によって、脳血管構築や興奮性アミノ酸による神経毒性に差があると報告されている<sup>36,37)</sup>。従ってコントロールとしてのマウスの系統によって、ノックアウトマウスとの比較検討に慎重を要する。コントロールとして littermates を用いる方法もあるが<sup>38)</sup>、連鎖不均衡という現

象が影響して他の虚血感受性に関わる遺伝子が標的遺伝子とともに並行して遺伝する頻度に、ノックアウトか littermates のどちらかに偏る状況が危惧される。また、時としてノックアウトマウスがコントロールと比較して解剖学的表現型に有意な差を認めることもある。例えばコントロールマウスと比較して体重や骨格に差を認めたり<sup>39)</sup>、血管径や血管走行に違いを認めることがあり<sup>40,41)</sup>、その場合、それだけで脳虚血モデルを作製する際にダメージの大きさや局在性に違いが生じる可能性がある。ノックアウトマウスでは特定の遺伝子の欠損により一部の物質や機能が消失しているのだが、その働きが重要な機能に関わる物質や機能を司る遺伝子であるほど、マウスは致命的な結果を被ることになる。つまり欠失する遺伝子によっては胎児期に死亡してしまうようなことが生じる。実際そういった遺伝子は多く、その場合脳虚血におけるその遺伝子やそれに特定される物質の作用をノックアウトマウスでは検索できない。そこで特定の組織や時期に遺伝子の発現を抑制する方法が開発された。いわゆるコンディショナル・ターゲティングと言われるもので、そのひとつが Cre/loxP システムを使ったものである<sup>32)</sup>。これにより発生学上重要な遺伝子も、成長後一時的に機能を抑制させて、脳虚血実験に利用することが可能となった。また実験結果の評価に関して更に注意すべきこともある。ノックアウトマウスはある特定遺伝子の働きを抑制しているが、他の遺伝子はその代償的な作用を発揮することがあり、標的遺伝子の働きを純粋に評価できないこともある。また最終目標は脳梗塞の治療法の開発だが、ノックアウトマウスの実験では、特定遺伝子が複数経路を経て組織内の多方面に影響を与える場合もある。従ってその特定遺伝子のどの働きが抗脳虚血作用に繋がる機構であるかを詳細かつ十分に検討しなければ、臨床への応用の実現は困難である。

先に述べたように、理想的脳虚血モデルを作成するうえでの条件があるが、それをクリアするには現在のところいくつか問題がある。特にマウスではラットと比較してスタンダードな方法が確立してないように思われ、なかでも血糖・体温・血圧に関する調節や神経学的評価スケールに関しては、まだ十分に検討すべきだと考える。一方では、ノックアウトマウスによる研究成果には大きな期待が寄せられているのも事実である。従ってマウスの脳虚血モデルは今後も進歩を続けるだろう。また最近遺伝子操作したラットの開発

が進んでいるが、広く使用するにはまだ期間を要する。従ってラットを使った脳虚血は、薬剤や様々な外因性の影響を課した実験に頻繁に利用されていくことも、今後しばらくは変わらないだろう。

### ま と め

動物による脳虚血実験は、多くの研究者により様々な手法で行われ、多くの情報が得られている。その最終目的は、ヒトへの臨床応用に結びつけることであるが、解決すべき問題点が現在も残っている。例えば、齧歯類での虚血実験は発症後2,3日の評価が多く、長くて2週間くらいである。しかし臨床試験では発症1~3ヶ月後の評価が多い。また脳の構造と機能の關係に、ヒトと齧歯類では違いがある可能性もある。従って、齧歯類を含めた動物実験による結果を臨床へ応用するには、その道のりを埋めるためのさらなる努力が必要とされる。

### 文 献

- 1) 田中耕太郎: 脳虚血モデルの変遷と問題点。分子脳血管病 **1**: 97-103, 2002
- 2) Hossmann KA: Experimental models for the investigation of brain ischemia. *Cardiovasc Res* **39**: 106-120, 1998
- 3) 野川 茂: 脳虚血研究のための動物モデル (ノックアウト動物を含めて)。Annual review 神経 2000, 中外医学社、東京 128-156, 1997
- 4) Hossmann KA: Glutamate-mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain Pathol* **4**: 23-36, 1994
- 5) Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL: Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* **28**: 1283-1288, 1997
- 6) Chopp M, Li Y: Apoptosis in focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir (Wien) (Suppl)* **66**: 21-26, 1996
- 7) Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC: IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett* **251**: 189-189, 1998
- 8) Nowak TS Jr, Jacewicz M: The heat shock/stress response in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol* **4**: 67-76, 1994
- 9) Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S, Warden CH, Castilho RF, Melcher T, Gonzalez-Zulueta M, Nikolich K, Wieloch T: Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* **9**: 1062-1068, 2003
- 10) Pusinelli WA, Brierley JB: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* **10**: 267-272, 1979
- 11) 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 Neurol Scand* **69**: 385-401, 1984
- 12) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* **239**: 57-69, 1982
- 13) Olsson T, Wieloch T, Smith ML: Brain damage in a mouse model of global cerebral ischemia. Effect of NMDA receptor blockade. *Brain Res* **982**: 260-269, 2003
- 14) Levine S, Payan H: Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Exp Neurol* **16**: 255-262, 1966
- 15) Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G: Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemia area. *Jpn J stroke* **8**: 1-8, 1986
- 16) Takano K, Tatlisumak T, Bergmann AG, Gibson DG 3rd, Fisher M: Reproducibility and reliability of middle cerebral artery occlusion using a silicone-coated suture (Koizumi) in rats. *J Neurol Sci* **153**: 8-11, 1997
- 17) Belayev L, Busto R, Zhao W, Fernandez G, Ginsberg MD: Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res* **833**: 181-190, 1999
- 18) Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ: A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-doppler flowmetry. *Stroke* **29**: 2162-2170, 1998
- 19) Zhao Q, Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK: Hyperthermia complicates middle cerebral artery occlusion induced by an intraluminal filament. *Brain Res* **649**: 253-259, 1994
- 20) Matsumoto S, Friberg H, Ferrand-Drake M, Wieloch T: Blockade of the mitochondrial permeability transition pore diminishes infarct size in the rat after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**: 736-41, 1999
- 21) Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM: Focal cerebral ischaemia in the rat: I. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **1**: 53-60, 1981
- 22) Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD: A model of focal ischemic stroke in the rat:

- reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* **17**: 738-43, 1986
- 23) Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W: Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* **8**: 474-85, 1988
- 24) Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N: An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* **13**: 505-508, 1982
- 25) Papadopoulos SM, Chandler WF, Salamat MS, Topol EJ, Sackellares JC: Recombinant human tissue-type plasminogen activator therapy in acute thromboembolic stroke. *J Neurosurg* **67**: 394-398, 1987
- 26) Zivin JA, DeGirolami U, Kochhar A, Lyden PD, Mazarella V, Hemenway CC, Henry ME: A model for quantitative evaluation of embolic stroke therapy. *Brain Res* **435**: 305-309, 1987
- 27) Fritz H, Hossmann KA: Arterial air embolism in the cat brain. *Stroke* **10**: 581-589, 1979
- 28) Zhang Z, Zhang RL, Jiang Q, Raman SB, Cantwell L, Chopp M: A new rat model of thrombotic focal cerebral ischemia *J Cereb Blood Flow Metab* **17**: 123-135, 1997
- 29) Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD: Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* **17**: 497-504, 1985
- 30) Robinson MJ, Macrae IM, Todd M, Reid JL, McCulloch J: Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the rat. *Neurosci Lett* **118**: 269-272, 1990
- 31) Matsumoto S, Shamloo M, Isshiki A, Wieloch T: Persistent phosphorylation of synaptic proteins following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**: 1107-13, 2002
- 32) Sakai T, Johnson KJ, Murozono M, Sakai K, Magnuson MA, Wieloch T, Cronberg T, Isshiki A, Erickson HP, Fassler R.: Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med* **7**: 324-330, 2001
- 33) Murozono M, Matsumoto S, Matsumoto E, Isshiki A, Watanabe Y.: Neuroprotective and neurotoxic effects of cyclosporine A on transient focal ischemia in *mdrl1a* knockout mice. *Eur J Pharmacol* **498**: 115-118, 2004
- 34) Rabin M, Ferguson-Smith A, Hart CP, Ruddle FH: Cognate homeo-box loci mapped on homologous human and mouse chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 9104-9108, 1986
- 35) Gerlai R: Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci* **19**: 177-181, 1996
- 36) Fujii M, Hara H, Meng W, Vonsattel JP, Huang Z, Moskowitz MA.: Strain-related differences in susceptibility to transient forebrain ischemia in SV-129 and C57black/6 mice. *Stroke* **28**: 1805-1810, 1997
- 37) Schauwecker PE, Steward O: Genetic determinants of susceptibility to excitotoxic cell death: implications for gene targeting approaches. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4103-4108, 1997
- 38) Hata R, Gillardon F, Michaelidis TM, Hossmann KA: Targeted disruption of the *bcl-2* gene in mice exacerbates focal ischemic brain injury. *Metab Brain Dis* **14**: 117-124, 1999
- 39) Hefler LA, Reyes CA, O'Brien WE, Gregg AR: Perinatal development of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Biol Reprod* **64**: 666-673, 2001
- 40) Nakajima M, Yuasa S, Ueno M, Takakura N, Koseki H, Shirasawa T.: Abnormal blood vessel development in mice lacking presenilin-1. *Mech Dev* **120**: 657-667, 2003
- 41) Rehm HL, Zhang DS, Brown MC, Burgess B, Halpin C, Berger W, Morton CC, Corey DP, Chen ZY: Vascular defects and sensorineural deafness in a mouse model of Norrie disease. *J Neurosci* **22**: 4286-4292, 2002