

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01457

研究課題名(和文) 霊長類脳梗塞モデルによる慢性期リハビリテーション及び薬物効果の研究

研究課題名(英文) Long-term behavioral observation of a nonhuman primate hemiplegic stroke model&amp;#8212;chronic rehabilitation and brain MRI

研究代表者

原田 雄大 (HARADA, KATSUHIRO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：30755228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒトに近いモデルとして霊長類の一種であるコモン・マーモセットを用い、脳血栓モデルを作成、その回復過程を観察した。光感受性色素を用いて脳梗塞を作成し、約5年間飼育したマーモセット脳梗塞モデルと、比較対象として同期間長期飼育を行った非介入の健常マーモセットを用意し、運動機能のスコア評価及び動作解析を行った。スコア評価では脳梗塞後5年経過しても麻痺側上肢の機能低下が持続していることが確認された。強制使用実験では、健常マーモセットにおいては非麻痺側の強制使用、使用動作の習熟が認められた。MRI撮像では運動野に梗塞領域が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞に関する治療介入研究は、未だ解明の余地が大きい。特に年々患者数が増加している慢性期脳梗塞患者においては、リハビリテーションが主な治療法であるが、その効果について客観的指標がまだまだ乏しいのが現状である。霊長類の中でもコモンマーモセットは飼育しやすく、繁殖が可能であり実験動物として適している。体重は400g程度であり、寿命は10～15年程度であり霊長類としては短命なため、加齢モデルとしても使用可能である。また、近年では、MRI画像を用いた組織、神経線維連絡を含む、マーモセット標準脳画像アトラスが提供されるようになってきている。マーモセット脳梗塞モデルの確立は今後の脳梗塞研究に有用と思われる。

研究成果の概要(英文)：A right hemiplegic model was established by irradiating green light on the sensorimotor areas and injected rose bengal. We evaluated motor function score and performed motion analysis in two marmosets: a marmoset reared for approximately 5 years after stroke used as the chronic stroke model and a normal marmoset with no intervention reared for the same period as the control. The infarct area was noninvasively confirmed using magnetic resonance imaging. Scoring evaluations revealed that decreased function of the paralyzed upper limb persisted even 5 years after stroke. In the forced use experiment, the normal marmoset mastered the use of the nondominant upper limb and made successful movements. Magnetic resonance imaging revealed infarct regions in the motor area. In the present study, we found that the paralyzed upper limb remained unrestored in the stroke marmoset and obtained magnetic resonance imaging images of the intracranial infarction in the marmoset in its living environment.

研究分野：リハビリテーション 神経科学

キーワード：脳梗塞 慢性期 リハビリテーション コモンマーモセット

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞治療は、急性期の臨床治療において、遺伝子組み換え組織型プラスミノゲン・アクティベータ (recombinant tissue-type plasminogen activator: 以下 rt-PA) の開始や直接経口抗凝固薬 (direct oral anticoagulants: 以下 DOAC) による再発予防等により大きく発展した。一方で、慢性期脳梗塞については、リハビリテーションの効果を認める報告もあるが、まだ未解明な部分も多く、研究が必要な領域である。

ラットにおいて脳梗塞モデルを作成する方法はいくつかあるが、その中でも光感受性色素を用いた方法は比較的死亡率が低く、安定して一定の大きさの脳梗塞を局所に作成可能である。一方でラットでの回復過程の観察において、一般的な評価方法では約 2 週間程度で障害は回復してしまう。

さらに、マーモセットでは梗塞による障害が 40 日程度は持続したとの報告があるが、年単位で長期に観察した報告はまだない。また、光感受性色素を用いた脳梗塞モデルについてはまだ報告がすくない。我々は前回の研究において光感受性色素を用いたコモンマーモセットの脳梗塞モデルを作成し 28 日間の回復過程を観察した。今回はさらに 5 年間の回復過程を観察した。ヒトの臨床研究においては発症後一年以上経過した、慢性期脳梗塞に対するリハビリテーション等の効果の報告はある。一方で、慢性期脳梗塞に対する基礎研究は少ない。

霊長類の中で、コモンマーモセットは飼育しやすく、繁殖が可能であり、実験動物として適している。体重は 400g 程度であり、脳サイズはラットのおよそ 4 倍程度である。寿命は 10~15 年程度であり、霊長類としては短命なため、加齢モデルとしても使用可能である。声によるコミュニケーションを行い、社会性を持ち、利き手が固定されている。このような特徴から、行動学的な研究もおこなわれている。マカクザルから発見されたミラーニューロンについても、今後の研究にはマーモセットのような繁殖させやすく、ヒトと神経組織、社会性において類似性を示す動物の使用が適しているのではないかと述べられている。

また、近年では、magnetic resonance imaging (以下 MRI) 画像を用いた組織、神経線維連絡を含む、マーモセットの脳画像アトラスが提供されるようになってきている。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳梗塞片麻痺モデルを霊長類で安定的に作成し、その回復過程を 5 年という長期に観察することによって、これまで基礎的研究が困難であった慢性期の脳梗塞に対するリハビリテーションの効果を検証した。また、マーモセットの慢性期脳梗塞について、非侵襲的評価を行うため、MRI 撮像を行った。

### 3. 研究の方法

コモンマーモセットに対してイソフルレン吸入麻酔下に頭皮を剥離する。そして、光感受性色素であるローズベンガル (20mg/kg) を静注後、5 分間、緑色光線を経頭蓋的に左大脳半球感覚運動野直上に照射することで血小板凝集を誘起し、脳血栓右片麻痺モデルを作成した。前回の実験にて詳細を述べている。

行動スコア評価 (Behavioural Assessment score): 上肢機能、下肢機能、食事動作、およびその合計スコアを評価した。(表 1) これは、Marshall や f r e r e t らの実験で使用されているものを、ビデオ観察で使えるように変更して作成したものであり、我々は前回の実験で使用した。

1. 前肢機能 (fore limb score): 金網の縦の棒をつかむ動作。0) つかめない。1) 掴めるがすべる。2) 滑らないでつかめる。
2. 後肢機能 (hind limb score): えさ箱の前の木の棒を横に渡る動作。滑るかどうかわ含む。0) 木の棒に載れない。1) 木の棒に乗るが片足を落とす。2) 足を落とさずわたる。
3. 食事動作 (feeding score): 0) 食べない。1) ミルクのみ飲む。2) ペレットを直接口で取る。3) 左手 (非麻痺側) を使用してペレットを取る。4) 右手 (麻痺側) を使用してペレットを取る。(健常マーモセットにおいても利き手は右手)。
4. 合計スコア (total behavior score): 上記の 1, 2, 3 の合計で 0 から 8 点で評価した。

動作解析: 我々はこの評価方法を前回の研究でも使用した。

慢性期脳梗塞モデルと健常マーモセットの、介入、観察の開始時、および 5 年経過後について、それぞれ一分間の最大移動速度と移動距離の運動量比較を行った。with analysis software (DIPP-MOTION-PRO; Ditect Co., Tokyo)

飼育ケージの正面から、PC 用カメラにて撮像を行い、240X150 ドット、秒間 30 フレームで 24 時間撮像を行った。撮影された動画のうち、一分間の移動距離について、及び、一分間中の最大運動速度について、健常マーモセットについては開始時、5 年後について 5 回計測し、脳梗塞マーモセットについては、手術前、術後一週間目、術後 4 週間目、5 年後についてその平均値、標準誤差を算出した。また、健常マーモセットについては T 検定にて有意差の検定を行った。脳梗塞マーモセットについては一元配置分散分析を行った。

強制使用:

餌の置き方を変えることで、脳梗塞後 5 年経過したマーモセットに対し、麻痺側の強制使用の小規模介入実験を行った。対象とした健常マーモセットについては、利き手ではない方の上肢の強制使用実験を行った。

脳梗塞右片麻痺のマーモセットの飼育ケージ外にある餌箱をマーモセットからみて右端に設置し、さらに右端隅に隙間を開けてそこから餌を取れるように配置した。右上肢での餌の摂取は容易だが、左上肢での摂取は困難な配置となった。(fig1a)

また、右利きの健常マーモセットに対しては、餌箱を左端に設置し、さらに左隅にスリットを開けてそこから餌を取れるように配置した。左上肢では餌がとりやすいが、右上肢では餌は取りにくい配置となった。(fig1c)

それぞれ 20 回のエサを取る動作を観察し、成功、失敗、使用上肢等を比較した。

MRI 撮像

鹿児島大学獣医学部付属動物病院において、日立メディコ社製 3T MRI (TRILLIUM OVAL) を使用した。小動物麻酔用の箱型麻酔容器を使用しイソフルレン 1% ~ 2% 吸入で導入し、シリコン製のマスクをテープで頭部に固定し 0.5% ~ 1% の濃度で維持麻酔を行った。T2 強調像を準備も含めて 20 分程度で撮像し、撮像を終了した。

### 4. 研究成果

### 行動スコア評価：

上肢機能は脳梗塞マーモセットで術前の平均は2であった。脳梗塞後一週間目の平均は0.8。4週間目の平均は1。5年後の平均は1であった。(fig2) 健常マーモセットでは開始時から2で5年後まで変化しなかった。下肢機能は術前の平均値は1であった。脳梗塞後一週間目は1。4週間目は2。5年後は2であった。(fig3) 健常マーモセットでは開始時から2で変化しなかった。食事動作スコアは術前の平均値は4であった。脳梗塞後一週間目の平均値は1.6であった。4週間目の平均値は3に改善した。5年後も3であった。(fig4) 健常マーモセットは観察開始時4で、5年後も変化はなかった。合計スコアは脳梗塞マーモセットでは術前8であった。脳梗塞一週間目の平均値は1で、4週間目には6に改善していた。5年後も6のままであった。(fig5) 一元配置分散分析において、 $F=21.6$ であり、 $P<0.0001$ であった。Wilcoxon検定において、術前と一週間後から5年後まで有意差があり、一週間後から4週間後、5年後まで有意差を認めた。健常マーモセットでは開始時8点で5年後まで変化しなかった。

### 動作解析：

脳梗塞モデルについて、術前の移動距離は平均1590mmであり、脳梗塞手術後一週目の平均は、744mm、術後4週目の平均は2427mm、5年後は3009mmであった。分散分析では $F=5.68$ であり、 $P$ 値は0.007であった。Dunn検定にて術後一週目と4週目、5年後の間に $P<0.05$ で有意差を認めた。(fig6) 最大運動速度の5回計測の平均は術前で606mm/sであり、術後一週目は441mm/sであった。4週間目は734mm/sであり、5年後は571mm/sであった。分散分析では $F$ 値は2.95であり、 $P$ 値は0.06であった。Tukey-KramerのHSD検定では一週間目と4週間目の間に $P=0.04$ で有意差を認めた。(fig7) コントロールとした健常マーモセットにおいて、観察開始時の平均移動距離は7566mmであり、5年後の移動距離は2300mmであった。 $(P=0.006)$ (fig8) 観察開始時の最大移動速度は1074mm/sであり5年後の最大移動速度は439mm/sであった。 $(P=0.12)$ (fig9)

### 相関：

動作解析結果とスコア評価の結果を散布図を使用し相関を検討した。一分間の移動距離とスコアの散布図において、順位相関係数0.39、 $P=0.03$ であり、スコア6から8で2000から4000に集中していた。(fig10) 最大速度とスコアの散布図において、順位相関係数0.32、 $P=0.07$  スコア6から8で600近辺に集中していた。(fig11)

### 麻痺側前肢の強制使用：

非脳梗塞マーモセットにおいては、非利き手強制使用開始後の左上肢使用率50%。餌をとる動作の成功率は35%であった。開始2か月後は左上肢使用率100% 餌をとる動作成功率45%となった。(fig1b)(fig12) 一方、脳梗塞マーモセットにおいては、介入開始時は右上肢使用率5% 餌を取る動作成功率は20%であった。開始2か月後では右上肢使用率は0% 餌を取る動作成功率90%であった。(fig1d)(fig13)

### 頭部MRI撮影：

長径6.0mm 短径2.6mm 深さ2.1mm程度のT2高信号領域が皮質に確認された。これはMINDSのマーモセット脳画像アトラスによると4野(一次運動野)に相当する領域を含むものと思われた。(fig14) 図の上段が本研究のMRI画像で、下段が脳画像アトラスからの引用である。4野(運動野)を黄色く塗る改変を行っている。左から、冠状断、水平断、矢状断である。

Fig 1.



Fig 2.

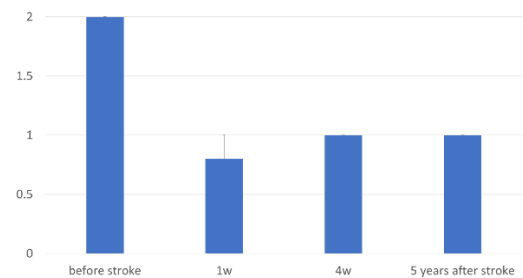


Fig 3.

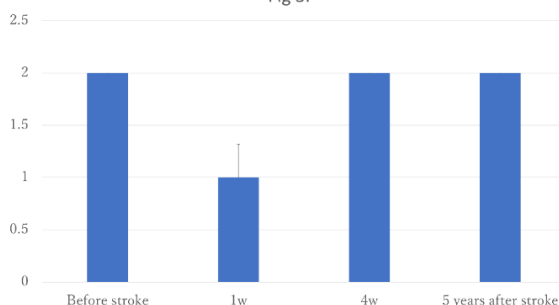


Fig 4.

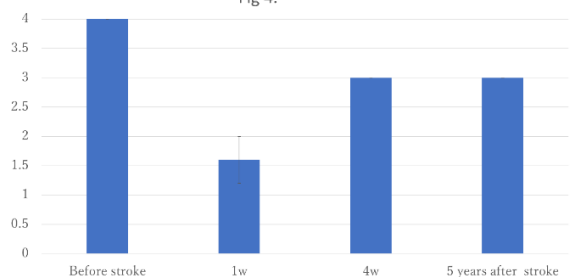


Fig 5.

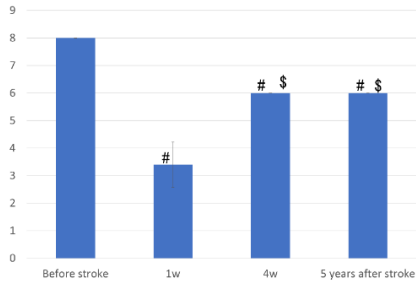


Fig 6.

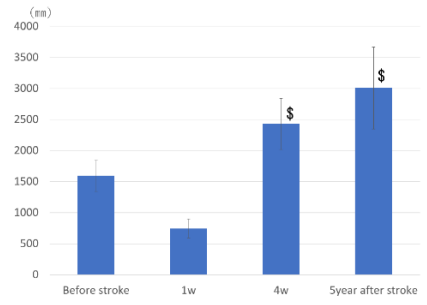


Fig 7.

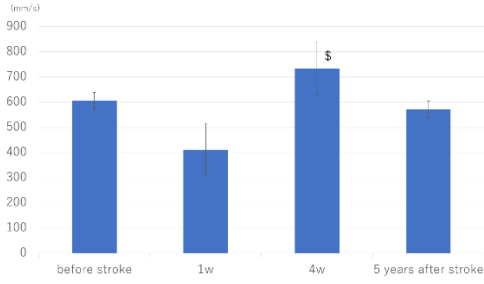


Fig 8.

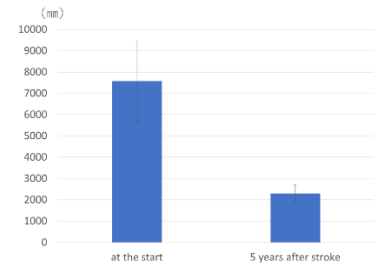


Fig 9.

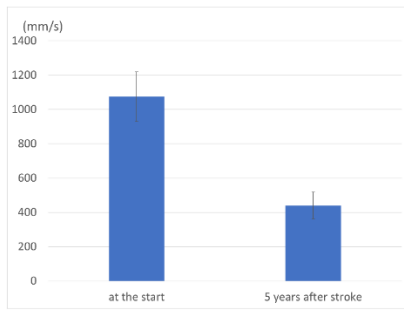


Fig 10.

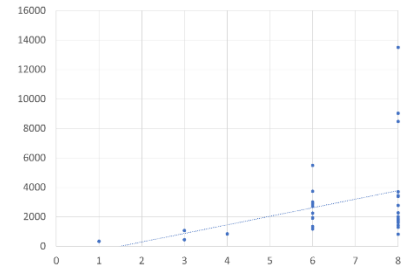


Fig 11.

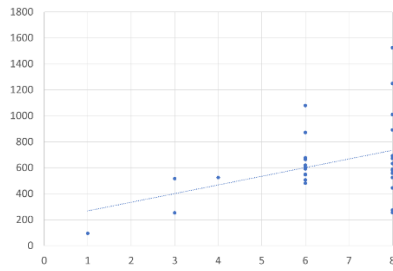


Fig 12.

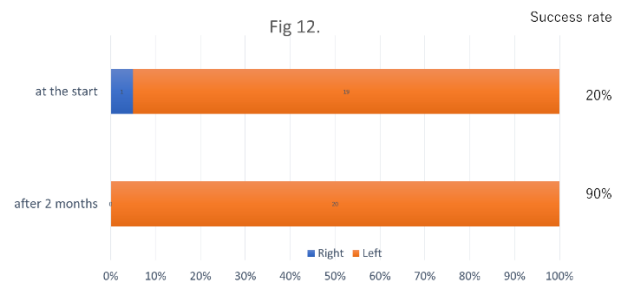


Fig 13.

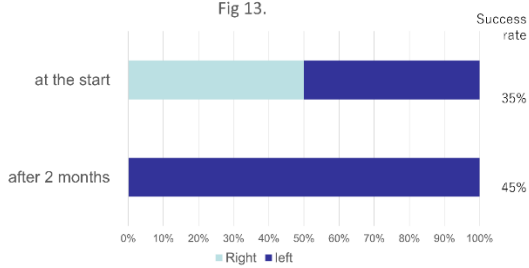
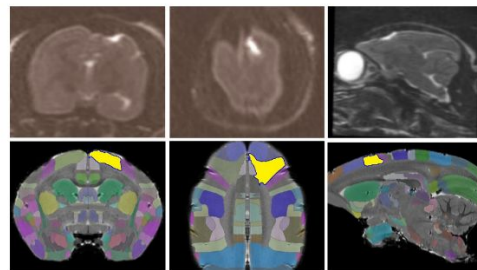


Fig 14.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田雄大
2. 発表標題 霊長類脳梗塞モデルによる長期観察および慢性期リハビリテーションの研究
3. 学会等名 第55回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大渡 昭彦 (Ohwatashi Akihiko) (30295282)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授  (17701)	
研究分担者	下堂 園 恵 (Shimodozono Megumi) (30325782)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  (17701)	
研究分担者	吉田 輝 (Yoshida Akira) (40347109)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師  (17701)	
研究分担者	上川 百合恵 (Kamikawa Yurie) (70418854)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員  (17701)	