

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700439

研究課題名（和文） 脳血管障害後の早期運動療法による神経栄養因子の発現と脳の可塑性に関する研究

研究課題名（英文） The effects of early exercise on brain plasticity and the expression of neurotrophic factor after focal cerebral infarction in rats.

研究代表者

松田 史代（MATSUDA FUMIYO）

鹿児島大学・医学部・助教

研究者番号：70437953

研究成果の概要：

本研究では、リハビリテーションの視点から、リハビリテーション介入が脳血管障害後の脳の可塑性を促せるのか、脳血管障害後の MK の機能および神経脱落に対する神経栄養因子 MK の働きについて検討するとともに、他の神経栄養因子との相互関係を検証し、神経栄養因子が神経細胞死や神経修復にどのように働いているのかを検討することを目的とする。経時的に脳梗塞モデルを作成し、術 1 日後よりトレッドミル運動介入を行い、トレッドミル介入群と非介入群における脳梗塞体積測定後、パラフィン切片作成し、HE 染色・免疫組織化学染色にて観察した。その結果、脳梗塞作製後、運動療法介入により 28 日後のみでトレッドミル介入群が非介入群よりも有意に脳梗塞体積が減少した。また、免疫組織化学染色結果より、家兎 MK 免疫組織化学染色にて、トレッドミル介入群が非介入群に比べて 3 日後で有意に発現面積が増加していた。MK は、神経再生・アポトーシスによる細胞死を防ぐ作用・血管新生作用などが提唱されており、それらの作用との関係を立証するために、抗 PECAM-1 抗体、抗 caspase-3 抗体の免疫染色を行った。また、他の神経栄養因子との関係を調べるために抗 NGF 染色を行った。NGF 発現量は、運動群の発現量が全体的に多く、4 週間後で有意に増加がみとめられた。PECAM-1 発現量は、1・2 週後で有意に運動群の発現量が多く、また、caspase-3 発現量は、2 週間後に運動群で有意に発現の減少がみられた。これらの結果より、脳梗塞発症後、早期より運動を開始することで神経成長因子や新生血管の発現量が促進され、神経脱落を抑制している可能性や、運動開始比較的早期の時期に新生血管が増し、その結果、神経成長因子などが梗塞巣周辺部へ供給され、その結果、神経細胞死を抑制していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	210,000	3,510,000

研究分野：リハビリテーション

科研費の分科・細目：人間医工学 リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：

実験的脳梗塞ラットモデル 早期運動療法 神経栄養因子 理学療法学 MidKine

1. 研究開始当初の背景

近年、脳血管障害発症後、早期リハビリテーションを行うことで廃用性症候群の予防や身体機能回復などの効果が期待でき、診療報酬についても発症早期に手厚い体制を整えている。臨床現場では発症直後よりリハビリテーションが行われるようになってきたが、発症直後よりリハビリテーションを施行することが本当に効果的であるのか、急性期の身体状態が落ち着かない時期にどの程度の負荷であれば増悪を引き起こさないのかといった基本的なところの検証がなされていない状態で臨床現場のセラピストたちはリハビリテーションを施行しているのが現状である。

リハビリテーションの必要性が重要視されているが、リハビリテーションの効果に関するエビデンスはあまりにも少ない。ヒトを対象とした脳血管障害後のリハビリテーション効果を検証する実験研究は、個体差や合併症の有無、発症部位、発症後経過期間などケーススタディが困難であるため、治療法・治療手技は従来臨床経験に基づいて行われてきた領域が多くみられ、一般的にエビデンスの面からは妥当性が十分とは言えない。また、動物を用いた実験的脳血管障害モデル作製も緻密な作業を強いられ、技術獲得が困難であることや成功率の低さなどを理由に敬遠する研究者が多いのも事実であり、リハビリテーションを絡めた動物実験的基礎的研

究は、リハビリテーション効果の科学的理論的根拠づけがあまりされておらず、全体的に不明な点が多く、また行う研究者も多くない。

これまで、脳血管障害後のリハビリテーション介入と運動機能や神経学的所見の回復を検討した報告(Ding Y ら, 2004)、リハビリテーション介入と脳梗塞体積を検討した報告(Yang YR ら, 2003)、リハビリテーション介入と神経栄養因子の発現を検討した報告(Ding Y ら, 2003 : Ang ET ら, 2003 : Kim MW ら, 2005)などリハビリテーション介入による一因子の効果・結果を検討した研究はあるが、リハビリテーション介入と神経栄養因子の発現・運動機能や神経学的所見の回復・脳梗塞体積など複数因子を絡めて検討した研究はない。

2. 研究の目的

本研究では、リハビリテーションの視点から、リハビリテーション介入が脳血管障害後の脳の可塑性を促せるのか、その時の神経栄養因子の働きについて、行動学的・免疫組織化学的に検討することである。また、脳血管障害後の MK の機能および神経脱落に対する神経栄養因子 MK の働きについて検討するとともに、他の神経栄養因子との相互関係を検証し、神経栄養因子が神経細胞死や神経修復にどのように働いているのか検討する。

3. 研究の方法

実験的脳梗塞を作製する場合、臨床病態に近く動物への負担が少ないことが最良である。Longaら(1989)の中大脳動脈閉塞・再開通モデルは、手術的侵襲が少なく、再現性がよく、臨床病態と同じ血流が再開通するモデルであることから、国内外で多くの研究者が実験的脳梗塞を作製する際に用いている方法である。この方法により、ラットの左中大脳動脈から左内頸動脈へ直径 0.2~0.3 mm長さ約 5mmの糸付き塞栓糸(全長 16mm)を挿入し、90 分間塞栓糸を留置し中大脳動脈領域を虚血状態にする。その後、塞栓糸を引き抜き再開通する。術中は低体温による脳保護作用の影響を避ける為、直腸温度を 37℃に保つように thermostat 付ブランケットを用いる。術後 1,3,5,7,14,28 日に脳を摘出して以下の項目を観察する。

- ① 経時的に摘出した脳を 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride(TTC)染色し、梗塞巣の確認を行う。一晚 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(pH7.4)で浸漬固定しデジタルカメラで撮影した脳の標本写真を scion image software を用いて脳梗塞巣体積を計測する。
- ② パラフィン包埋した脳切片を免疫組織化学染色により神経栄養因子の発現有無、発現部位や発現時期を観察し、それぞれの神経栄養因子の発現動態を検証する。
- ③ アポトーシスマーカーである caspase-3 との 2 重染色を行い、神経栄養因子が神経細胞死・神経保護にどのような作用をもたらしているか検証する。
- ④ 脳梗塞ラットの運動機能・神経学的所見も観察し、経時的回復を観察する。

脳梗塞ラットの運動機能・神経学的所見も観察し、経時的回復を観察する。

4. 研究成果

脳梗塞作製後、運動療法介入により 28 日後のみでトレッドミル介入群が非介入群よりも有意に脳梗塞体積が減少した。また、免疫組織化学染色結果より、家兎 MK 免疫組織化学染色にて、トレッドミル介入群が非介入群に比べて 3 日後で有意に発現面積が増加していた。MK は、神経再生・アポトーシスによる細胞死を防ぐ作用・血管新生作用などが提唱されており、それらの作用との関係を立証するために、抗 PECAM-1 抗体、抗 caspase-3 抗体の免疫染色を行った。また、他の神経栄養因子との関係を調べるために抗 NGF 染色を行った。NGF 発現量は、運動群の発現量が全体的に多く、4 週間後で有意に増加がみとめられた。PECAM-1 発現量は、1・2 週後で有意に運動群の発現量が多く、また、caspase-3 発現量は、2 週間後に運動群で有意に発現の減少がみられた。これらの結果より、脳梗塞発症後、早期より運動を開始することで神経成長因子や新生血管の発現量が促進され、神経脱落を抑制している可能性や、運動開始比較的早期の時期に新生血管が増し、その結果、神経成長因子などが梗塞巣周辺部へ供給され、その結果、神経細胞死を抑制していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Yoshida Y, Ikematsu S, Muramatsu H, Sakakima H, Mizuma N, Matsuda F, Sonoda K, Umehara F, Ohkubo R, Matsuura E, Goto M, Osame M, Muramatsu T. Expression of the heparin-binding growth factor midkine in the cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders. Internal Medicine 47: 83-89(2008). (査読有)

〔学会発表〕（計 4 件）

① **FUMIYO MATSUDA**, AI IRIE, HARUTOSHI SAKAKIMA, MASAKO IKUTOMO, YOSHIHIRO YOSHIDA The effects of treadmill training in different period groups following middle cerebral artery occlusion in rats. 第 10 回 Asian Confederation for Physical Therapy 2008. 8. 31（千葉県・幕張メッセ）

② **Fumiyo Matsuda**, Harutoshi Sakakima, Yoshihiro Yoshida. Treadmill exercise increase the expression of nerve growth factor after cerebral infarction in rats. 第 31 回日本神経科学学会 2008. 7. 10（東京都・東京国際フォーラム）

③ **Fumiyo Matsuda**, The Expression of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) After Acute Cerebral Infarction in Rats. 第 30 回日本神経科学学会 2007. 9. 12.（横浜市・パシフィコ横浜）

④ **Fumiyo Matsuda**, Yoshihiro Yoshida, Harutoshi Sakakima. EXERCISE IMPROVES THE NEUROLOGICAL DEFICIT AND INCREASES MIDKINE EXPRESSION IN THE SURROUNDING ZONE OF INFARCT IN RAT BRAIN. World Physical Therapy 2007 (WCPT) 2007. 6. 5.（カナダ・バンクーバーコンベンション・エクサビジョンセンター）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 史代 (MATSUDA FUMIYO)

鹿児島大学・医学部・助教

研究者番号：70437953

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者