

機関番号：35303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500474

研究課題名 (和文) 脳梗塞後の急性期リハビリテーションが脳の血管新生および酸化ストレスに与える影響

研究課題名 (英文) The effects of exercise on angiogenesis and oxidative stress in the brain after cerebral infarction

研究代表者

氷見 直之 (HIMI NAUYUKI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：70412161

研究成果の概要 (和文)：軽度な脳梗塞モデル動物を用い、梗塞発症後に適度な運動負荷を与えたことによる脳への効果を調べた。血管新生や酸化ストレスを示すタンパク質の発現は健常な動物と比較して差が見られなかったが、空間記憶機能が改善されていた。この要因として梗塞部位でのニューロン数増加が考えられたが、新生ニューロンの密度は梗塞群と健常群に差は見られなかった。

研究成果の概要 (英文)： We tried to make diffuse small size infarction in the rat brain by microsphere injection and investigated early-stage effects of exercise in the present study.

After the injection of Microsphere, mild exercise (Excercise Group) for 7days or no exercise (No exercise Group) was loaded to the rats. There was no difference between groups on the expression of related proteins to angiogenesis and oxidative stress. However, cognitive function of exercise group was significantly recovered compared with no exercise group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経科学 生理学

科研費の分科・細目：人間医工学 リハビリテーション

キーワード：脳梗塞 リハビリテーション 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

脳虚血により脳組織に壊死が生じる脳梗塞は、その後血流が回復した後も場合によっては全身的に重大な機能の損傷が残る。これを防ぐため、脳梗塞患者の回復には、筋や神経系の萎縮を阻止するため可能な限り早期のリハビリテーション開始が望ましい。

脳梗塞後の急性期リハビリテーションは、機能回復に対し有効性が高いことは周知の事実である。ただしこれは豊富な経験論に基づいて行われていて信頼性は高いものの、生理学・分子生物学的な裏付けについてはまだ乏しいところである。さらに急性期にリハビリテーションを行うことで二次的な障害が生じる例もあり、脳梗塞後の急性期にリハビ

リテーションを行うことの是非はまだ議論中の問題でもある。急性期に行うリハビリテーションが、その強度によっては脳の虚血管所に大量の血流を分配する結果となり、いわゆる「虚血-再灌流」時に生じる酸化ストレスに晒されるという2次的な危険を誘発しうる。しかしこの脳虚血後の再灌流時に伴う危険性については充分議論、研究されていない。

## 2. 研究の目的

脳梗塞後の急性期に行うリハビリテーションの意義や効果を明確にするために、脳梗塞の動物モデルを用い、急性期に与える軽い運動負荷と、脳内の生理学・分子生物学的変化を関連づけた研究を計画した。例えば酸化ストレスや血管新生に関する各分子の発現や活性といった生理学的変化を総合的に調べ、それを基に脳梗塞後の急性期リハビリテーションのあり方を議論していく。また急性期のリハビリテーションとして過度の運動負荷を与えると、確かに身体的な機能の回復は期待されるが、脳では血管新生が不十分なため過度の酸素要求が生じ、結果、障害部位の周辺血管より過剰の酸素が供給され、周辺組織に無視できない酸化ストレスが生じると考えられる。このような結果が得られた場合、急性期リハビリテーションの運動強度やその開始時期によっては危険性が高いことが示唆されるので、現在のできるだけ早期に、というあり方に警鐘を鳴らすことになる。一方、酸化ストレスがほとんど生じないという結果となった場合においては、急性期リハビリテーションの危険性が低いことが示唆されるので、機能回復を進めるために急性期リハビリテーションの更なる推進を提唱できる。

## 3. 研究の方法

当研究は、実験動物としてラットを用いるため、日本生理学会の動物実験の指針に従い、さらに川崎学園内の実験動物委員会の承認を得て行った。

具体的な手法として、Sprague Dawley 系ラットをペントバルビタール麻酔後、頸部を切開し、右総頸動脈より 45 $\mu$ m のマイクロスフェア懸濁液を注入し脳血管を閉塞させた。脳梗塞による四肢麻痺の評価は Furlow および McGraw らが提唱した行動観察により数値化した。脳梗塞症状確認後、リハビリテーションとしてトレッドミルにて強制運動を負荷した運動群と、強制運動を負荷しない非運動群に分け、梗塞後 48 時間後より 7 日間運動を負荷した。運動は 15m/min の速度で毎日 30min とした。

脳の認知機能回復に及ぼすリハビリテ

ーションの効果も検証した。方法として、7 日間の運動後モリス水迷路試験を 4 日間行った。4 日目に逃避台を外し、水迷路を 4 分画に分け逃避台のあった分画に滞在した時間の割合で短期記憶能を評価した。

梗塞脳の組織学的確認は、4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定した大脳半球を摘出しマイクロスライサーにて厚さ 20 $\mu$ m の切片を作成し、ヘマトキシリン-エオシン (HE) にて染色を行い顕微鏡にて観察した。

また運動負荷後の脳を灌流固定せずに摘出してジチオスレイトール (DTT) やドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を加えたバッファー下で粉碎し、タンパク質抽出液を得た。この抽出液をポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) にて分画し、ウェスタンブロットにてタンパクの発現を半定量的に調べた。脳血管新生の指標となるタンパク質である vascular endothelial growth factor (VEGF)、酸化ストレス消去能の指標となるスーパーオキシド除去酵素 (SOD) および脳由来神経栄養因子 (BDNF) について運動群と非運動群の発現量の比較を行った。

新生ニューロンの同定のため、梗塞後 5 日間腹腔内にプロモデオキシウリジン (BrdU) を投与し (50mg/kg/day)、運動群および非運動群それぞれの脳において抗 BrdU 抗体にて BrdU 陽性ニューロンを染色しカウントした。

リハビリテーションとして与える運動負荷の身体的強度およびストレスを定量化するため、トレッドミル運動の乳酸閾値 (LT) を測定した。LT とは、トレッドミル速度の増加に伴い血中乳酸濃度が増加する過程で示す屈曲点に相当する運動強度であり、LT に相当する運動強度を境に、それ以下なら適度な運動強度、それ以上だと過度な運動強度と考えられる指標である。ラットをトレッドミル上で 5m/min から 35m/min まで 5m/min 刻みに運動強度を上げていき、それぞれの強度の運動を 2 分間実施後すぐに採決し、乳酸値を測定し、トレッドミル速度と血中乳酸濃度の関係をグラフにし、その屈曲点より LT を求めた。

## 4. 研究成果

まずはマイクロスフェア法の確立を目標に、マイクロスフェアを注入したラット群 (梗塞群) と、マイクロスフェアを含まない生理食塩水のみを注入を行った sham (コントロール群) の梗塞状態を比較した。TTC 染色を行った結果、梗塞群では梗塞部位特有のニューロン欠損やグリア集積が線条体、皮質および海馬にスポット的に確認され、多発性脳梗塞に近い症状が作成できていることが確認された。一方コントロール群ではこうした部位は見られなかった (図 1)。

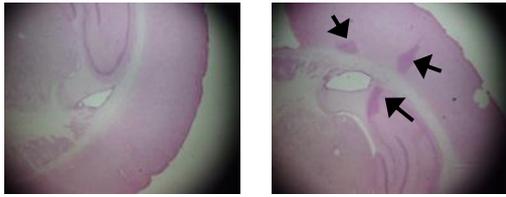


図1 梗塞部位の HE 染色像一例 左：非梗塞側 右：梗塞側（マイクロスフェア注入側）矢印は梗塞巣を示す

また梗塞24時間後の症状スコアは梗塞群が有意に高かった（図2）。しかしながら図1に示したようにラクナ梗塞のように小さい梗塞が島状に発生していた。このような病態であるため梗塞巣の大きさや場所により症状がバラつくことを危惧し、マイクロスフェアの注入量を変えて注入後24時間経過時点で行動観察により四肢の麻痺状態をスコア化した。ほぼ注入個数に依存した重症度を示した。注入個数を厳密に制御すれば全身症状は均一化できるものとした。

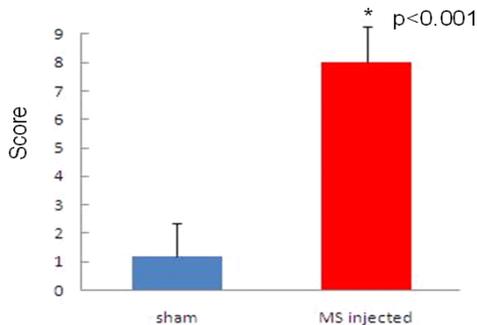


図2 コントロール群（青）と梗塞群（赤）の症状スコア（9点満点。9重篤⇔0軽度）

梗塞発症2日後より運動負荷を7日間与えた運動群と運動負荷を与えていない非運動群について、モリス水迷路にて認知機能の変化を比較した。水迷路試験3日目までは両群とも逃避台到達時間は短縮していったが、4日目に逃避台を外したプローブテストを行い逃避台のあった分面に滞在した時間の割合を比較した結果、運動群が非運動群に比べて有意に高かった。短期記憶能力は運動負荷により改善されることが示唆された（図3、4）。

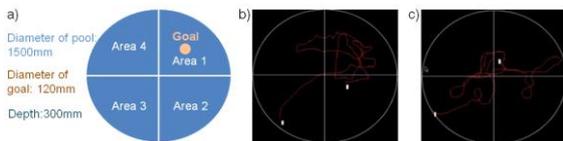


図3 モリス水迷路プローブテスト一例 a)水迷路分面 b)運動群の一例 c)非運動群の一例

梗塞後2日後から7日間運動および非運動を課した各群（運動群、非運動群）それぞれより大脳半球を摘出し、タンパク質抽出を行い

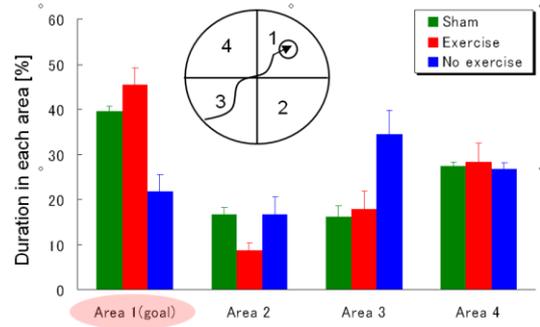


図4 モリス水迷路プローブテスト各分面滞在時間の割合。分面1が逃避台のあった分面 緑：コントロール群 赤：運動群 青：非運動群

SDS-PAGE電気泳動により分画しウエスタンブロット法により半定量を試みた。運動群と非運動群の間には、VEGF、BDNFおよびSOD産生量ともに有意な差は見られなかった（図5）。

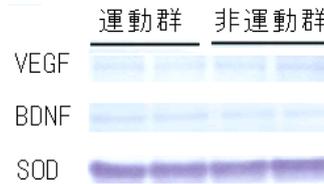


図5 VEGF、BDNFおよびSODのウエスタンブロット検出バンド

運動負荷により認知機能が回復した機序を考察すべく、BrdU投与により新生ニューロンの染色を行った。運動群と非運動群の脳切片についてBrdU陽性細胞をカウントした結果、個数に有意差は見られなかった。

さらに、リハビリテーションの運動強度に着目しさらに検討を続けた。運動負荷の強弱の境界点として、乳酸閾値(LT)が一つの指標になると考え、梗塞後の運動負荷が適度か過度かを考察した。マイクロスフェア注入前のラットではLTはトレッドミル速度25.4m/minにあったが、マイクロスフェア注入2日後ではLTは20.9m/minに低下し、7日後にはLTは25.2m/minに回復していた。健常時には適度な強度であった運動が脳梗塞後急性期には過負荷となる可能性が示唆された。

## 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）

Takahashi Hisashi, Himi Naoyuki, Katsushi Kuniyasu, Koga Tomoshige, Changes in the Lactate Threshold During Treadmill Exercise After Microsphere-Induced Infarction in Rats, Journal of Stroke &

Cerebrovascular Diseases, 査読あり, 2011  
in press

[学会発表] (計 2 件)

① Himi Naoyuki, Takahashi Hisashi, Nakamura Emi, Kuniyasu Katsushi, Narita Kazuhiko, Koga Tomoshige and Miyamoto Osamu, Early stage effects of exercise on cognitive dysfunction in cerebral infarction model rats by microsphere injection, 第 87 回日本生理学会大会, 2010.5.19、盛岡

② 氷見直之 高橋尚 古我知成 丸山恵美 国安勝司 宮本修、脳梗塞後の短期間運動が認知機能の回復に及ぼす効果、第 65 回日本体力医学会、2010.9.17、千葉

[その他]

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/info.php?id=209>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

氷見 直之 (HIMI NAOYUKI)  
川崎医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70412161

### (2) 研究分担者

橋本 謙 (HASHIMOTO KEN)  
川崎医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80341080  
(H21→22：連携研究者)  
遠藤 恒介 (ENDO KOUSUKE)  
川崎医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00350463  
(H21：連携研究者)

### (3) 連携研究者

古我 知成 (KOGA TOMOSHIGE)  
川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授  
研究者番号：50186649  
国安 勝司 (KUNIYASU KATSUSHI)  
川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授  
研究者番号：10299258