

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500790

研究課題名(和文) ラット脳出血モデルにおける運動プレコンディショニングの効果とその解析に関する研究

研究課題名(英文) Effects of physical exercise preconditioning on cerebrovascular damage in rat hippocampus.

研究代表者

住谷 和則 (sumitani, kazunori)

香川大学・医学部・その他

研究者番号：40294772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳出血のリスクファクターである高血圧症の予防・治療における運動プレコンディショニングの概念のもと運動療法がよく行われている。それに基づき脳内出血前の運動(プレコンディショニング)は、脳血管障害を軽減させるかをラットを用いて検証した。青年期及び老齢期のラットにおいても脳神経細胞の損傷は軽減された。しかしながらその仕組みや詳細は明らかにならなかった。

研究成果の概要(英文)：Physical exercise preconditioning is becoming generalized in patients with hypertension to reduce a risk factor of cerebrovascular diseases. Based on such therapeutic framework, we examined whether physical exercise preconditioning prior to the intracranial-hemorrhage can attenuate the cerebrovascular damage in rat hippocampus or not. Present study revealed that physical exercise preconditioning prior to intracranial hemorrhage can attenuate neuronal damages in both young and aged animals. However, precise etiological mechanisms involved in the preconditioning effects on the brain is unknown at present. Further studies are needed to clarify this phenomenon.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：軽運動 プレコンディショニング 脳神経細胞 樹状突起 脳出血 高血圧予防

### 1. 研究開始当初の背景

脳内出血の発症は、高血圧治療の普及により減少傾向であるが、以前欧米と比較すると高い割合で起こっている。脳内出血は、虚血性の脳卒中と異なり、血腫が病態に関与することが確認され、血腫自体が二次的損傷を引き起こし、神経脱落症状を悪化させ予後不良となることも報告されている (N Engl J Med 334:1450,2001)。先行研究において出血後は血腫形成の凝固作用と同時に血球成分の溶解もはじまり、その過程でも二次的損傷への関与を示し、蛋白レベルにおいても酸化的障害マーカーである DNP (dinitrophenyl) の有意な発現を認め (J Neurosurg 100:672,2004)。この研究をもとに「酸化的障害を抑制させるためには、抗酸化作用を上げることが重要で、その具体的な方法とその有用性」を探索することが必要であるという結論に至った。

そこで、本研究では、従来の医療現場で用いられる運動療法に着目し、特に最近注目されている運動プレコンディショニングという概念のもと、脳出血発症後ではなく発症前に運動プレコンディショニングとして軽運動を行い、その際に脳神経細胞に与える影響について組織学的・生理学的・行動学的に検討し、脳出血への耐性を明らかにし、臨床現場における疾病予防として活用できないかと考えている。

### 2. 研究の目的

運動療法は、血清脂質や血圧が改善して脳血管障害を予防するだけでなく、直接的な神経細胞保護による疾病予防効果も最近報告されている (Neurol Res 26:404,2004)。その一方で、申請者らは長期間の激しい運動が正常マウスの脳の海馬神経細胞を障害し、その機序の一つとして運動中に大量に発生する脳内活性酸素を指摘した (日本生理学会誌 64:152,2002)。また、運動の種類に関する申請者らの以前の研究では、自由運動は強制運動時に見られたような海馬神経細胞の障害は見られなかった (第 58 回日本体力医学会、2003)。これらのことから、運動の脳に与える影響を考える場合、脳神経細胞に悪影響を及ぼさない軽運動が運動プレコンディショニングとして適当であると考え、脳出血モデルラットを作成し以下のような解析を行い、運動プレコンディショニングの有用性を解明する目的である。

(1) 脳出血発症後の半身麻痺を評価する神経行動学検査により非運動群 (対照群) と運動群の麻痺の程度を比較検討し、軽減の有無を確認する。(2) 脳出血発症前後の日常の行動量測定を行い、麻痺の軽減が予想される運動群の行動量に変化を解析する。(3) 脳神経細胞での酸化的 DNA 障害や蛋白レベルにおける酸化的障害マーカーの発現を解析し、其の機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脳出血モデル動物の作成

先行研究により確立されている自家血注入型脳出血モデル作製法を用いた。運動後に抱水クロール全身麻酔下で、大腿動脈にカテーテルを挿入し、自家動脈血を採取し、右側の脳基底核部に注入して、自家血注入後より血腫形成を作成した。

#### (2) 運動プレコンディショニングの状態の検討及び運動後の脳神経細胞への影響の解析

8 週齢の SD ラットを運動群 (トレッドミル運動) 非運動群の 2 群に分ける。運動群はさらに激運動群 (35m/min) と軽度運動群 (15 m/min) に分け、30min/日の運動を 3 週間継続する。所定の運動期間終了後、灌流固定して脳を取り出し、凍結切片を作成する。ヘマトキシリン染色 (HE 染色) 微小管関連タンパクや血管内皮細胞特異抗原に対する抗体などによる免疫染色を行い、神経細胞や脳血管の障害について検討する (Exp Neurol 138:214, 1996; Acta Medica Okayama 59:135, 2005)。

#### (3) 脳出血後の神経行動学検査による半身麻痺評価

脳出血は臨床的に出血に伴う脳浮腫および片麻痺が問題になる。先行研究により (Stroke 33:2478,2002) 浮腫が数日後ピークになり、徐々に軽減していくことが確認されていることから、急性期 (1~7 日) では、出血に伴う浮腫を乾燥重量法で脳を測定し、浮腫の軽減の有無を確認する。軽減されているのならば、半身麻痺程度も軽減されると予想し、Corner Turn Test, Forelimb Placing Test を用いて半身麻痺を評価する。

#### (4) 脳出血発症前後の日常の行動量測定

運動プレコンディショニング状態及びモデル動物作成後の日常行動量をケージ設置型活動量測定装置 (LOCOMO LS-8MV システム) を用いて、24 時間測定する。非運動群の行動量を比較し、各群とも運動前・運動中・運動後も比較検討する。また、自発行動量と空間作業記憶について評価するために Y-迷路試験も行う。

#### (5) 脳神経細胞での酸化的 DNA 障害や蛋白レベルにおける酸化的障害マーカーの発現解析

モデル作成 24 時間、3 日、7 日、14 日、28 日後と経時的に検討する。脳スライスを作製し、コンピューターを用いて画像処理後、病巣の定量化を行い、運動による脳虚血保護効果を確認する。保護効果の機序の検討のために、8-OHdG などの酸化系の指標、脳由来神経栄養因子 (BDNF) や塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) などの栄養因子も解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 運動プレコンディショニングの検討及び運動後の脳神経細胞への影響

運動群においては激運動群の多数のラットが3週間継続する事が出来ない状態であった。そのため条件を再検討し、運動速度を若干低く設定(25m/min)し3週間継続できる速度で運動を行った。そのため激運動群、軽運動群、非運動群の3群ともにHE染色において脳神経細胞への大きな変化は見られなかった。微小管関連タンパクや血管内皮細胞特異抗原に対する抗体などによる免疫染色においても同様であった。

本研究では、高血圧等の要因により脳内出血の発症を起こしやすい高齢者の予防における運動プレコンディショニングの有効性を目的とするため、老齢ラットにおける指標が必要となる。そのため、脳神経細胞への悪影響が少なく、継続可能な軽運動群の条件を用いる事とした。そこで老齢ラット(48週齢)に同条件での軽運動を行わせ、その影響を確認した。結果は同様であり脳神経細胞の変化は見られなかった。この結果から、軽運動による運動プレコンディショニングは脳神経細胞に悪影響は及ぼさない事が示唆された。よって今後の運動プレコンディショニングの設定における指標となりうると考えられる。

##### (2) 脳出血後の神経行動学検査による半身麻痺評価

脳浮腫では、患部である血腫周囲の右側大脳皮質(RCX)及び右側大脳基底核部(RBG)において、運動群が非運動群より浮腫が小さかった。運動群では有意な差( $p < 0.05$ )が見られた。左側大脳皮質(LCX)及び左側大脳基底核部(LBG)、小脳(CE)においては、運動群と非運動群でその差は認められなかった。また半身麻痺評価テストのForelimb Placing Testでは、非運動群に比べ、運動群で疾患と反対側(左側)の半身麻痺が、軽減されていた。運動群では有意な差( $p < 0.05$ )が見られた。もう一つの半身麻痺評価テストのCorner Turn Testでも、非運動群に比べ、運動群が軽減されており、同様の結果であった。これは先行研究で報告されているものと同様であり、それを証明するものである。

また老齢ラットにおいて、脳浮腫では、同様に運動群が非運動群より小さかったが、有意な差は認められなかった。2つの半身麻痺評価テストも同様であったが、やはり有意な差は認められなかった。よって脳内出血前の運動(プレコンディショニング)は、脳血管障害を軽減させ、半身麻痺も軽減させることが示唆されたが、その効果は弱く、その要因を今後明らかにするための詳細な解析が必要である。

##### (3) 脳出血発症前後の日常の行動量測定の

#### 解析

脳出血発症前の記憶・行動量解析は今後の実験の最も重要な核となるので、今回はまずそこに焦点を絞りその際の脳神経細胞の組織的解析とともに検討した。行動量は各群に大きな変化は見られなかった。運動群のみ運動中減少傾向であったが、有意な差は見られず予想とは違った結果となった。Y-迷路試験による自発行動量と空間作業記憶については、運動前後で各群を比較した。自発行動量、空間作業記憶とも運動群が非運動群より良い傾向を示した。特に空間作業記憶では有意な差( $p < 0.05$ )が認められた。

空間作業記憶は脳神経細胞における海馬領域の活性化により向上する事がよく知られているため、運動プレコンディショニングにより海馬領域における脳神経細胞の活性化が予想される。その詳細な解析及び確認のために、神経細胞の樹状突起の活性化を明確にする目的で予定ではなかった組織学的検討(Golgi's染色)を追加実験した。

##### (4) 脳神経細胞の組織学的検討(Golgi's染色)

酸化的DNA障害や蛋白レベルにおける酸化的障害マーカーの発現解析を行う予定であったが、脳内出血前の運動プレコンディショニングの脳神経細胞(特に海馬領域)での神経細胞の樹状突起の活性化を確認する事が重要であると判断し、今回はまずGolgi's染色を行った。しかしながら、形態的变化は見られず、海馬領域における樹状突起の明確な活性化は確認されなかった。しかしながら、先行研究で適度な運動により、海馬領域において脳由来神経栄養因子(BDNF)の活性化が報告され、BDNFには神経保護作用も報告されており、今後はその解析を必要性とする事を示すものとなった。

#### [総括]

脳内出血前の軽運動(運動プレコンディショニング)は、発症後の麻痺の軽減や空間作業記憶の向上など脳神経細胞への関与は示唆されたが、組織学的検討ではその変化は確認されなかった。しかしその効果は現象として確認されただけであり、必ずしも効果的とは言えない結果となり、その機序解明には至らなかった。今後は運動プレコンディショニングの方法の再検討や、保護効果の機序の検討のために、8-OHdGなどの酸化系の指標、脳由来神経栄養因子(BDNF)や塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)などの栄養因子など詳細な検討が必要である。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

住谷和則、三木崇範、宮本賢作、山神眞一、  
中川真衣、西屋克己、岡田宏基 脳出血モデル  
での運動プレコンディショニングの検討  
第70回日本体力医学会大会 2015.9.18-20  
和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の  
国(和歌山市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

住谷 和則 (SUMITANI Kazunori)  
香川大学・医学部・教務職員  
研究者番号：40294772

### (2) 研究分担者

中村 丈洋 (NAKAMURA Takehiro)  
香川大学・医学部・准教授  
研究者番号：80419506

### (3) 研究分担者

三木 崇範 (MIKI Takanori)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号：30274294

### (4) 研究分担者

岡田 宏基 (OKADA Hiroki)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号：00243775