

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560257

研究課題名(和文)脳血管障害後の残存ニューロンに発現する可塑的变化の解析

研究課題名(英文)Effect of rehabilitative training on post-infarct cortical plasticity in rats

研究代表者

三谷 章(MITANI, Akira)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50200043

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)：リハビリテーションによってもたらされる脳血管性障害後の脳可塑的变化の機構を明らかにするために、ラット一側運動野への脳梗塞作製によって反対側上肢に運動麻痺を生じさせた後、麻痺上肢を使ったリーチ動作訓練を行った。その結果、巧緻性の高いリーチ動作を再獲得できた訓練群の梗塞反対側運動野では、脳内微小電気刺激によって麻痺肢の運動が誘発され、麻痺肢リーチ動作時のマルチユニット活動が増加することが観察された。これらの結果は、リハビリテーション訓練を行うことによって、本来その上肢の運動を司っていなかった梗塞反対側の運動野が代償的に機能するようになることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Functional changes induced in the rat contralesional motor cortex following training of affected forelimb were investigated using intracortical microstimulation and multi-unit recording. Rats had completed the reaching training and were divided into three groups: training, non-training and sham. The training and non-training groups were subjected to photothrombosis on the unilateral motor cortex to affect trained forelimb, and the training group was forced to use their affected hand by reaching. In the training group, the reaching success score was significantly higher than that in the non-training group, substantial enlargements of ipsilateral affected hand representation were induced in the contralesional motor cortex, and the firing rate of the contralesional motor cortex significantly increased during reaching movement. These results suggest that neuronal reorganization in the contralesional motor cortex is accelerated by training of the affected hand.

研究分野：リハビリテーション神経科学

キーワード：リハビリテーション 可塑性 脳梗塞 機能回復 脳内微小電気刺激 マルチユニット

### 1. 研究開始当初の背景

脳卒中などの脳血管障害によって中枢ニューロンが死に陥って脱落すると、そのニューロンが担当する機能が障害され、片麻痺などのさまざまな後遺症が発生する。リハビリテーションでは、残存するニューロンやそのネットワークに新たな機能を獲得させることによって、障害された機能の代償を行い、患者の日常生活活動を復元させようとする。この療法の拠り所となる科学的根拠はニューロンの可塑性である。ニューロンは高い可塑性を示す細胞であり、ニューロン死が発生すると残存するニューロンが神経軸索の伸長やシナプスの新規連絡などの可塑的变化を起こし、新たな神経ネットワークを形成すると考えられている。しかしながら、どのようにして新たな神経ネットワークが形成されるかという可塑的变化の仕組みについては依然未明のままである。

動物モデルの実験系では、脳梗塞発生後の梗塞巣周辺脳領域に残存するニューロンに可塑的变化が生じることが報告されている。一方、リハビリテーション訓練はこの可塑的变化に対して合目的に作用して、機能回復を促進すると考えられている。しかしながら、リハビリテーション訓練の寄与については十分に実証されていない。研究代表者は最近、リハビリテーション訓練中の動物の神経活動をモニターできるテレメーター装置を開発した。この装置を用いればリハビリテーション訓練によって生じる可塑的变化をニューロン活動に基づいて解析することができると考えられる。

### 2. 研究の目的

一側大脳皮質運動野梗塞後に、その反対側大脳皮質運動野に生じる可塑的变化に対して、リハビリテーション訓練がどのように作用するかを明らかにする。具体的には、ラットにおいて一側大脳皮質運動野の脳梗塞作製後発生した上肢運動麻痺に対してリハビリテーション訓練がどのように作用するかを行動学的に明らかにし、その上肢運動機能の回復を示したラットの梗塞反対側大脳皮質運動野の可塑的变化について解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) リーチング前訓練

リーチング動作は、片側上肢を前方の台上に置かれた餌へ伸長し、餌を把持した後、口元まで運ぶ一連の運動とした。リーチング動作学習には正面に長方形の隙間 (10×1.5cm) があるアクリルケース (20×20×30cm) と木製の給餌台 (5×5×3.5cm) を使用した。また、正面の壁はスライド式に可動できるようにした。餌は直径約 3mm のラット用錠剤ペレット (45mg, Bioserv 社) を用いた。上肢の運動機能の評価するために、リーチング動作学習開始 2 週間後に、各個体にリーチング動作を 50 試行させ、餌を把握し口元まで運ん

だ回数を成功率 (成功率 = 成功回数 / 50 回) で表した。この成功率が 90% を超えた個体はリーチング動作を習得したものとみなした。その後、訓練群、非訓練群、Sham 群の 3 群 (各群 n=12) に無作為に群分けした。

#### (2) 光照射脳塞栓法

訓練群と非訓練群のラットにおいてリーチング学習肢と反対側の大脳皮質運動野に光照射脳塞栓法を用いて脳梗塞を作製した。ラットを混合ガス麻酔後、Rose Bengal (1%) を静脈注入した (0.133ml/100g)。注入後、頭部固定装置に固定し、頭蓋骨を露出させ、リーチング学習肢と反対側の運動野に緑光を照射し、活性酸素発生による血管内皮細胞損傷、血小板凝集、塞栓形成を生じさせた。

#### (3) リハビリテーション訓練

訓練群では梗塞作製 24 時間後より麻痺肢のリーチング動作訓練を開始した。訓練として毎日 15 分間または 100 回リーチング動作を行わせた。訓練時にはアクリルケースの正面の隙間を麻痺側の側壁に移動させ、麻痺上肢のみを集中的に訓練した。訓練は 6 週間続け、麻痺上肢の運動機能回復の評価として、3 日、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間後にリーチング成功率を各群において評価した。

#### (4) 皮質内微小電気刺激

梗塞反対側大脳皮質運動野の可塑的变化を解析するために、梗塞 6 週間後に、梗塞反対側運動野に皮質内微小電気刺激を行った。訓練群、非訓練群、Sham 群のラット (各群 n=6) を 7% クロラルールの腹腔注射により麻酔し、梗塞反対側の頭部開頭後 (Bregma より後方 2mm, 前方 6.5mm, 外側 0~5mm の範囲)、髄膜を切除し、脳表を露出させた。刺激電極として金属微小電極を使用し、電気刺激を行った。刺激は 333Hz, 200μsec で 30msec 間通電し、出力提示強度は 0μA-70μA とした。各個体において麻痺上肢の運動を誘発する領域を特定した後、出現率を算出し (出現率 = 同側麻痺上肢運動出現箇所数 / 総刺激箇所数)、各群で比較した。

#### (5) マルチユニット記録

梗塞反対側大脳皮質運動野の可塑的变化について解析するために、梗塞 6 週間後に、梗塞反対側運動野においてマルチユニット記録 (各群 n=6) を行った。混合ガス麻酔下のラットの頭部を、頭部固定装置に固定し、麻痺上肢側の運動野 (Bregma より前方 2.0mm, 外側 2.5mm, 深さ 1.45mm) にマルチユニット記録電極を挿入した。記録電極はウレタンコーティングステンレス製ワイヤー (直径 50μm) を 2 本束ねたものを用いた。リファレンス用ステンレス螺子電極を頭蓋の鼻腔部分に設置し、無線送信機固定用台座とともにデンタルセメントにて固定した。

1 週間の回復期間後にラット頭部の送信機固定用台座に無線送信機を装着した後、ラットをアクリルケースに入れ、リーチング動作を 10 分間行わせ、リーチング動作を動画撮影とともにニューロン活動を記録した。記録したマルチユニット活動は、2 段式 FM 変調した後、無線で送信した。受信機において復調を行い、帯域 500~3000 Hz のフィルター処理を行い、データ収録システム PowerLab 4/25 (ADInstruments, オーストラリア) を用いてアナログデジタル変換を行い、PC にデータを収録した。

解析用ソフト LabChart 7 Pro (ADInstruments) を用いてオフライン処理を行った。リーチング時、すなわちラットの接地している麻痺上肢が離地した瞬間より麻痺手指で餌を把握する瞬間までのマルチユニット活動(信号/ノイズ比:2倍以上)を解析した。各個体においてリーチング動作時に記録されたマルチユニット数を安静時平均マルチユニット数(1.0)に対する比率に換算した。安静時マルチユニット活動は四肢体幹の運動が停止している期間のニューロン活動とした。

#### (6)組織学的剖検

記録電極挿入部位の同定は、麻酔下で記録電極に 1.2 $\mu$ A で 60 秒間、通電した。3%ホルムアルデヒドで灌流固定後、脳を 30%のショ糖液に浸した。凍結脳切片を作製し、プロシアンブルー反応を行った。反応後、ニューラルレッドを用いて対比染色を行い、光学顕微鏡にて電極挿入脳領域を確認した。

梗塞巣容積の計測には、40 $\mu$ m の脳切片を作製し、200 $\mu$ m ごとに梗塞面積を測定した。梗塞巣容積の評価には Image J ver. 1.46 (NIH) を用いた。

#### (7)統計処理

統計処理には SPSS statistics ver. 22 を使用した。リーチング成功率では処置条件 3 群と時間 5 段階を要因とし、反復測定二元配置分散分析(two-way repeated measures ANOVA)を行い、さらに Post hoc test として Bonferroni's test を用いた。皮質内微小電気刺激における総刺激箇所、同側麻痺上肢の運動出現率、マルチユニット活動における発火率の群間比較では一元配置分散分析(one-way ANOVA)を行い、Post hoc test では Tukey HSD's test を用いた。各群におけるリーチング動作時発火率と安静時発火率間の比較には対応のある t 検定を用い、梗塞巣容積については訓練群と非訓練群間で対応のない t 検定を行った。全ての統計処理において、有意水準は 5%未満とした。

### 4. 研究成果

#### (1)行動実験(リーチング動作)

全個体ともリーチング動作を習得し、90%以上の成功率を示した。

梗塞直後、訓練群や非訓練群ではリーチング成功率が大幅に低下し、その後時間経過とともに回復を示した(図 1)。訓練群と非訓練群のラットにおいて観察されたリーチング動作には質的な差があった。非訓練群では、梗塞後も前方の隙間より麻痺肢を伸長することは可能であったが、上肢を正確に餌の位置に運ぶことや餌を把握することが困難であった。訓練群では6週間後の成功率が68.2%となった。非訓練群では44.7%であった。反復測定二元配置分散分析の結果、訓練条件( $F(2,34) = 101.87, p < 0.001$ )と時間( $F(7,238) = 113.67, p < 0.001$ )のそれぞれに有意な主効果が見られた。また、訓練条件と時間の間に交互作用( $F(14, 238) = 31.54, p < 0.001$ )が見られた。訓練群では梗塞 2 週以後より非訓練群と比較して成功率が有意に高くなった(Bonferroni's test:  $p < 0.001$ )。

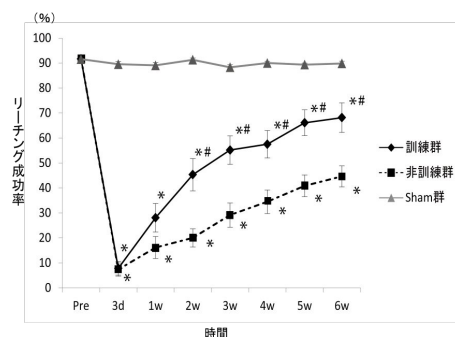


図 1 梗塞後のリーチング動作の成功率の変化

リーチング成功率(縦軸)は 50 試行中の成功回数で算出し、その評価は梗塞前、梗塞後 3 日、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間後にそれぞれ行った(横軸)。各値は平均値 $\pm$ 標準誤差を示している。\*は Sham 群と比較して、#は非訓練群と比較してそれぞれ有意差があったことを示す(Bonferroni's test,  $p < 0.001$ )。

以上の結果から、麻痺肢にリーチング動作を行わせる訓練は、その麻痺肢の運動機能の回復を促進することが明らかとなった。さらに、訓練群と非訓練群の間でリーチング動作の質的な差が観察されたことから、特に巧緻性の高い運動の回復のためにはリハビリテーション訓練が重要であるということが示唆された。

#### (2)皮質内微小電気刺激

梗塞反対側運動野に皮質内微小電気刺激を行い、同側である麻痺上肢の運動を誘発する領域を観察した。その結果、運動出現率は訓練群( $n=6$ )では  $18.4 \pm 1.9\%$ 、非訓練群( $n=6$ )では  $9.5 \pm 2.3\%$ 、Sham 群( $n=6$ )では  $1.5 \pm 0.9\%$ であった(図 2)。一元配置分散分析の結果、有意な差が見られた( $F(2,15) = 17.92, p < 0.001$ )。Tukey HSD's test において、訓練群と Sham 群( $p < 0.001$ )、訓練群と非訓練群( $p < 0.05$ )、非訓練群と Sham 群( $p < 0.05$ )の間に有意な差が認められ、訓練群では他群と比較して有意に高い出現率が観察された。

非訓練群でも Sham 群と比較して有意に高い出現率が観察された。

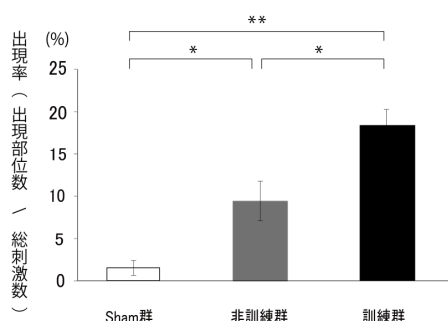


図2 梗塞反対側運動野電気刺激による同側麻痺上肢の運動出現率

縦軸は出現率。\*は有意差  $p < 0.05$ , \*\*は有意差  $p < 0.001$  を示す (Tukey HSD 's test)。値は平均値  $\pm$  標準誤差。

以上の結果より, Sham 群で同側上肢の運動発現率が僅か 1.5% だったことから, 通常のラットでは, 一侧の大脳皮質運動野は反対側の上肢を支配しており, 同側の上肢の運動にはほとんど関わっていないと考えられる。ところが, その一侧の大脳皮質運動野に梗塞が発生すると, たとえ訓練をしなくても, 反対側の運動野に可塑的な変化が生じ, 反対側運動野の微小電気刺激によって麻痺肢が動くようになった。しかも, 訓練を行った場合には, 同側上肢の運動は有意により多くの領域の電気刺激で誘発されるようになった。このことから脳梗塞後の反対側大脳皮質運動野において運動野から同側の上肢への新たな神経回路が形成されることが示唆された。特に, この可塑的变化はリハビリテーション訓練を行うことによって顕著になると考えられる。

### (3) マルチユニット活動

マルチユニット活動記録及び組織学的剖検の結果, 梗塞反対側運動野において各群 6 頭ずつから信号/ノイズ比 2.0 倍以上の振幅を示すマルチユニット活動が記録された。記録できた 18 例においてリーチング動作時と安静時のマルチユニット活動を解析した。

各群の安静時発火率は, 訓練群で  $4.46 \pm 0.58\text{Hz}$ , 非訓練群で  $3.54 \pm 0.47\text{Hz}$ , Sham 群で  $5.03 \pm 0.73\text{Hz}$  であり, 群間において有意な差は見られなかった (one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 3.68$ ,  $p = 0.301$ )。記録されたリーチング動作時のマルチユニット活動は訓練群では安静時と比較して有意に増加した ( $p < 0.01$ , paired t-test)。一方, Sham 群や非訓練群では発火率はむしろ減少する傾向が観察されたが, 統計学的には有意な差はなかった (Sham 群:  $p = 0.361$ , 非訓練群:  $p = 0.051$ )。リーチング運動時の発火率を安静時の発火率に対して表した発火の比率は, 訓練群で  $1.35 \pm 0.10$ , 非訓練群で  $0.93 \pm 0.05$ , Sham 群で  $0.78 \pm 0.07$  であった (図 3)。訓練群では, 非訓練群 ( $p < 0.01$ ) と Sham 群 ( $p$

$< 0.001$ ) と比較して, 梗塞反対側運動野のリーチング動作時のマルチユニット発火率が有意に増加した (one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 13.269$ ,  $p < 0.001$ ; Tukey HSD 's test)。

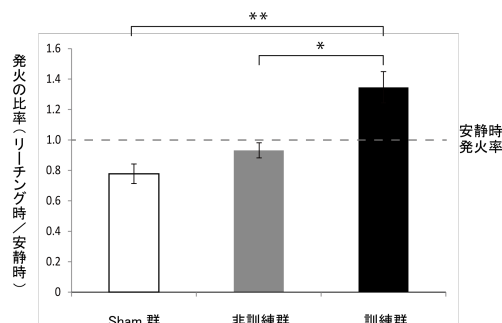


図3 リーチング動作時の発火の比率

リーチング動作時に記録された発火率を安静時の発火率に対して示した (縦軸)。破線は安静時発火率を示す。\*は有意差  $p < 0.01$ , \*\*は有意差  $p < 0.001$  を示す (Tukey HSD 's test)。

以上の結果から, 脳梗塞後に訓練を行うことによって, 梗塞反対側の大脳皮質運動野ニューロンは, その同側上肢のリーチング動作時に, その発火率を増加させることが明らかとなった。

### (4) まとめ

本研究の皮質内微小電気刺激実験結果より, 脳梗塞後に梗塞反対側大脳皮質運動野において, 訓練を行わなくても (非訓練群でも) 大脳皮質運動野と同側の上肢を連絡する新たな神経経路の形成が示唆された。しかし, マルチユニット活動記録実験結果より, 訓練を行わない (非訓練群の) 場合には, この梗塞反対側大脳皮質運動野ニューロンが実際のリーチング運動時に活動を高めることは観察されなかった。これは, 本来, 脳のもつ可塑性が発揮されたことによって新たな線維連絡が形成されたが, それは必ずしも合目的に働くものではないことを示唆している。一方, 行動実験, 皮質内微小電気刺激実験およびマルチユニット活動記録実験の全てにおいて, リハビリテーション訓練を行うことによって梗塞反対側大脳皮質運動野ニューロンは, 梗塞によって死滅してしまったニューロンの機能を合目的に代償することが示唆された。このことは, 脳血管性脳機能障害発生後のリハビリテーションの重要性を示唆するとともに, 梗塞反対側皮質が機能回復の担当領域になる可能性を示唆している。

### < 引用文献 >

Frost SB, et al.: Reorganization of remote cortical regions after ischemic brain injury: a potential substrate for stroke recovery. J Neurophysiol, 89: 3205-3214, 2003.

Dancause N, et al.: Extensive cortical

rewiring after brain injury. J Neurosci, 25: 10167-10179, 2005.

Nudo RJ, et al.: Reorganization of movement representations in primary motor cortex following focal ischemic infarcts in adult squirrel monkeys. J Neurophysiol, 75: 2144-2149, 1996.

Nudo RJ, et al.: Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. Science, 272: 1791-1794, 1996.

Ramanathan D, et al.: A form of motor cortical plasticity that correlates with recovery of function after brain injury. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 11370-11375, 2006.

## 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 4 件)

Momma, S., Goto, M., Shimizu, T., Mikami, T. and Mitani, A. Contribution of the contralesional sensorimotor cortex to the motor recovery in the rat brain after focal ischemia. 44<sup>th</sup> Society for Neuroscience Annual Meeting, 2014 年 11 月 19 日, ワシントン DC (米国).

後藤 萌, 門馬更無, 三谷 章, ラット脳梗塞反対側感覚運動野ニューロンの形態学的可塑性. 第 13 回コ・メディカル形態機能学会学術集会, 2014 年 9 月 20 日, 北九州国際会議場(福岡県, 北九州市).

門馬更無, 後藤 萌, 清水朋子, 三上 隆, 三谷 章, Functional reorganization for movement of affected hand was induced in the contralesional hemisphere of the rat brain following focal ischemia. 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 13 日, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市).

門馬更無, 周藤真実, 清水朋子, 三谷 章, ラット脳梗塞後の麻痺肢運動機能回復における反対側運動野の機能. 第 13 回コ・メディカル形態機能学会学術集会, 2013 年 9 月 14 日, 広島国際大学(広島県, 呉市).

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human\\_health/ot0101/](http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human_health/ot0101/)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 章 (MITANI, Akira)

京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 50200043