

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350599

研究課題名(和文) 内包梗塞モデル動物の作成および梗塞後のリハビリテーションに関する基礎検討

研究課題名(英文) The effects of exercise therapy on the recovery of memory function in internal capsule stroke model rats

研究代表者

氷見 直之 (HIMI, Naoyuki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70412161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：内包に梗塞が生じた場合のリスクや治療の基礎検討に適した内包梗塞モデルの確立を目指し、光感受性色素と光ファイバーを用いた本研究に着手したが、H27年にKimらにより同手法が発表され(JCBFM, 2014)本法の新規性が無くなった。そこでマイクロスフェア(MS)注入により内包梗塞に似た症状を誘発させ、梗塞前の運動習慣の有無を想定した運動群と非運動群を比較した。結果として、MSが運動麻痺を生じない個数(3,000個以下)であれば梗塞前の運動は認知機能を回復させた。一方、3,500個以上のMSを注入した場合、梗塞前の運動による認知機能の回復効果は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：The new internal capsule (IC) stroke model using the optic fiber has been reported by other group in 2014. Therefore we have switched from optic fiber method to microsphere (MS) injection model showing memory dysfunction and IC stroke model-like motor dysfunction. Rats were forced to run on a treadmill with mild strength for 7 days as the exercise (Ex group). At the 8th day after beginning the exercise, MS were injected. Non-exercise group (NE group) and sham operated groups were also examined as control groups. The Morris water maze test were performed at 8 days after onset stroke. The memory functions in the Ex group was significantly improved compared with the NE group. However, in the severer MS model (increased number of particles), exercise showed no significant motor functional recovery.

研究分野：神経科学

キーワード：脳梗塞 リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

脳卒中の患者数は日本で年間100万人を超え、さらに増加傾向にある。中でも脳梗塞は、閉塞された脳血管の下流領域の脳組織が虚血により重篤な障害を受けるため数時間以内に血栓溶解剤の投与が必要、など緊急性が高い。特に、内包は塞栓を生じる好発部位であるにもかかわらず血管系が小さく、カテーテル治療などが困難である。さらに、内包の脳梗塞により大脳皮質の広範囲に小さい梗塞が散発し、重篤な麻痺を生じる可能性も高い。しかしながら、内包の脳梗塞に関する動物モデルおよび検討例は、一過性の血管収縮物質である endothelin-1 を内包に投与し、細胞死と感覚性機能障害を確認した1例のみであった (Frost SB et al. Behav Brain Res 2006)。一方、内包出血に関しては、出血による組織障害、治療から回復に至るまで多岐に渡って報告されている。しかし、内包出血の病巣は、出血箇所周辺が主であり、内包の脳梗塞のように血管の下流領域に至る広い範囲が障害を受けることは少ない。そのため、内包出血に関する知見はそのまま内包の脳梗塞には適用できないと考えられ、適切な内包の脳梗塞モデルが望まれていた。

一方、脳梗塞により認知機能や運動機能に障害を受けるが、四肢または全身の軽い運動を持続的に行うことにより機能回復が生じる。この機能回復のメカニズムや、運動強度および運動の時期の影響を検討した研究例は多いが、内包の脳梗塞およびその後のリハビリテーションに着目した例はほとんどなく、内包の脳梗塞のような梗塞巣が小さい割に重篤な麻痺が生じる場合のリハビリテーションは、その強度、時期を慎重に選択する必要があった。

2. 研究の目的

我々は内包の脳梗塞の適切な動物モデルの作成方法を探索してきた過程で、光感受性色素と光ファイバーを用いて限局した範囲の血管のみに塞栓を生じさせる技術の着想に至った。光感受性色素を用いた塞栓形成法は、大脳皮質表面ではよく用いられているが、脳の深部にこれを適用した例はなく、内包以外に小脳や脳幹など、梗塞発症部位を限定したより詳細な梗塞モデルに適用できる技術として期待した。

そして完成した内包の脳梗塞モデルを用いてリハビリテーションの効果を検討する。内包出血では内包梗塞に比べて比較的症状が軽いため、積極的な運動やリハビリテーションが効果的とされているが (Ishida A et al. Behav Brain Res 2011)、内包の梗塞後のリハビリテーションの検討は本研究が初となる。内包出血の場合と異なり、梗塞発症後の急性期には低強度の運動を行うことが神経保護や機能回復に有効であることが予想される。内包の血管障害として、出血と梗塞ではリハビリテーションの処方に違いがある

ことを示す基礎研究になると期待する。

3. 研究の方法

9週齢の Sprague-Dawley ラットを3%-セボフルラン蒸気麻酔下にて定位脳固定装置に固定し、頭部の皮膚を切開後 Bregma から A-1.9、L7.0 の位置の右頭蓋骨を穿孔し、25° の角度で径 50 μm の石英製の光ファイバーを右半球にのみ刺入しておく。光感受性色素である Rosebengal 2% 溶液を尾静脈から 1ml/kg 投与し、直後より光ファイバーに波長 532nm の光を2分間照射する。これにより光ファイバー先端部 (内包に到達) にのみ光化学反応による血栓が生成され梗塞が生じる。梗塞作成から 24 時間後に体幹の屈曲、回旋動作、寡動の3項目について目視にて各 0~3 点の数値で評価し (0:無症状、1:軽微、2:中程度、3:顕著) て症状スコアとした。

後に光ファイバー法からマイクロスフェア (MS) 塞栓法にモデルを切り替えてリハビリテーションの検討を行った。MS 塞栓法とは、ラットを麻酔後、頸部を切開して外頸動脈および翼口蓋動脈を一時閉止した状態で総頸動脈からポリスルフォン製 MS (Polyscience 製、径 45 μm) 3,500 個を懸濁させた生理食塩水 0.1ml を注入する方法である。MS が脳内のどこに行くか制御できない欠点はあるものの、注入回数および速度を固定することで分散や症状は安定したものとなる。3,500 個の注入により内包付近における MS 塞栓の生成が高確率で生じることが予備実験で確認できている。MS 注入 2 日後に梗塞のダメージを受けた部位の特定のため、ヘマトキシリン・エオシンにて組織染色を行った。麻酔下で心臓より 4%パラホルムアルデヒド溶液を灌流し脳組織を固定後摘出し、30%スクロース溶液に沈降するまで脱水処理後包埋凍結してクリオスタットにて -20 °C で厚さ 18 μm の冠状切片を作成し、乾燥後染色を行った。また、同様に作成した標本について免疫染色にて (TUNEL 染色または抗活性化 caspase3 抗体) 細胞死の検出を試みた。

リハビリテーションとしてラットに有酸素全身運動を行わせた。MS 注入 1 日後よりトレッドミルにて 15m/min、30min/day の条件で7日間運動を負荷した。また、運動による予防効果を確認する群については、MS 注入 8 日前より同条件で運動を負荷した。

脳梗塞発症による誘発される運動障害をロータロッド、認知機能 (空間記憶能) 障害をモリス水迷路によりそれぞれ測定した。

4. 研究成果

(1): 光ファイバーを用いた内包梗塞作成

100 μm 径のファイバーでは刺入経路からの出血が顕著であったため 50 μm 径のファイバーで検討したが、出血量は減少したものの、内包に局所的に梗塞を作製するには到らなかった。この出血の問題を回避するため、あらかじめ中空のカテーテル (径 200、肉厚 40

μm)を刺入し血液を内腔より吸引除去しながら先端を内包に到達させ、止血を確認後100μmの光ファイバーをカテーテル内腔より挿入し先端より光照射を行う方法の検討に移行したが刺入経路に相当する部位の組織損傷が激しく断念した。さらに手法を検討中に光ファイバーおよび光感受性色素を用いた内包の梗塞作製法が他グループより報告され(Kim HS et al. JCBFM 2014)この方法に新規性が無くなったため、手法の検討は中断した。

(2) : リハビリテーションの効果について

内包梗塞の作成法を光ファイバー法ではなくMS注入法に切り替えて検討を続行したが、MSの注入個数を3,000個とすると内包周辺部に梗塞巣が観察されなかったが空間記憶能の低下が見られ、またトレッドミル運動により空間記憶能は改善した。一方MSの注入個数を3,500個とすると線条体、視床および皮質に梗塞巣が確認されるようになり(図1)内包に梗塞が生じていることが示唆された。MS3,500個注入群では全身運動による空間記憶能の回復が見られなかった。運動機能については、3,000個注入で起こるロータロッド走行時間の低下は非運動群においても4日ほどで回復し、運動群と回復曲線に有意な差は見られなかった。一方3,500個注入群では顕著な運動機能低下が生じ、全身運動の有無は回復に影響しなかった。

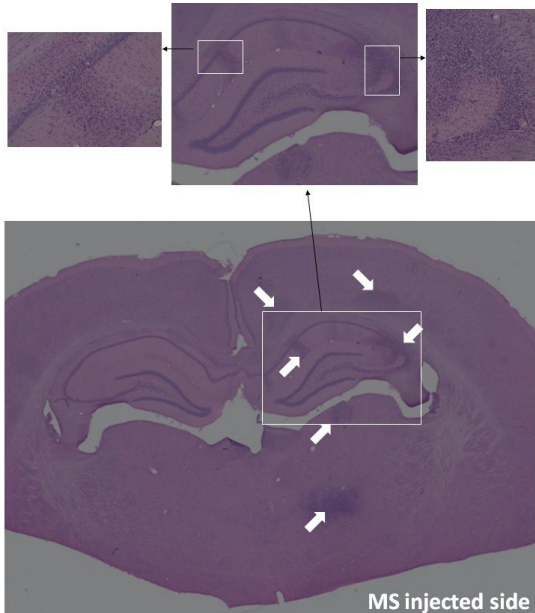
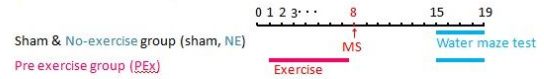


図1 : MS注入による内包梗塞組織染色像

次に運動の予防効果について検討を行った。MS3,000個注入群では、MS注入前の7日間のトレッドミル運動によりMS注入による空間記憶能の低下が抑えられた(図2)。一方でMS3,500個注入群では、注入前の運動による空間記憶能および運動機能の回復効果は見られなかった。これらの結果から、梗塞前の運動習慣の効果について、MSが運動麻痺を

生じない個数(3,000個以下)であれば認知機能が有意に回復することが示された。一方、3,500個を超える数のMSを注入すると24時間後の運動麻痺もより重篤となり、MS注入前の運動負荷による認知機能の回復効果は見られなかった。つまり内包梗塞が軽度であれば運動による認知機能の回復効果が期待できることが示唆された。

The protocol of the experiments



The results of watermaze test

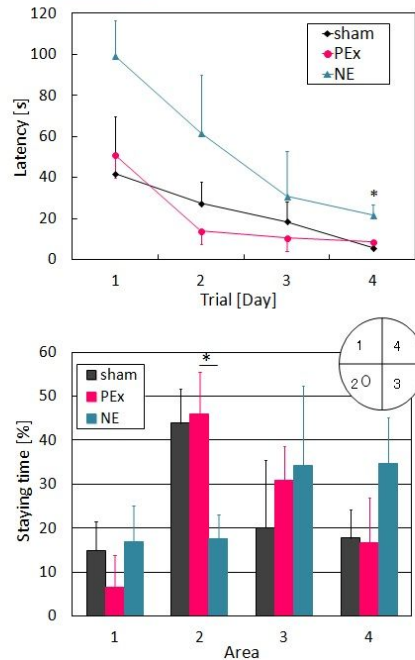


図2 : 運動による梗塞後に生じる記憶能低下の抑制効果

(3) : 内包梗塞の組織学的検出

一方、内包梗塞により変性したニューロンの検出を行うため、海馬梗塞モデルにてニューロンの免疫染色(TUNEL法、抗caspase3抗体)を行った。梗塞発生2日後のラットの脳をパラホルムアルデヒドの灌流により固定した後、厚さ18μmの凍結切片標本作製し、免疫染色を行った。海馬梗塞モデルは梗塞範囲が微小であるため、TUNEL法では変性ニューロンを有効に検出できず、結果として活性化カスパーゼ-3の免疫染色による検出が最も有効であった。

<引用文献>

Kim HS, Kim D, Kim RG, Kim JM, Chung E, Neto PR, Lee MC, Kim HI., A rat model of photothrombotic capsular infarct with a marked motor deficit: a behavioral, histologic, and microPET study. *J Cereb Blood Flow Metab.* 34(4), 2014, 683-9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Himi N, Takahashi H, Okabe N, Nakamura E, Shiromoto T, Narita K, Koga T, Miyamoto O. Exercise in the Early Stage after Stroke Enhances Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression and Memory Function Recovery. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 査読あり 25(12), 2016, 2987-2994. DOI:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.08.017

〔学会発表〕(計1件)

Himi N, Okabe N, Nakamura E, Shiromoto T, Takahashi H, Narita K, Koga T, Miyamoto O. Customary exercise prevents the poststroke memory dysfunction by constitutive elevation of hippocampal BDNF, Society for Neuroscience, SanDiego, CA, USA 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/physiology>

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・講師

研究者番号： 7 0 4 1 2 1 6 1

(2)研究分担者

宮本 修 (MIYAMOTO Osamu)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号： 0 0 2 5 3 2 8 7

岡部 直彦 (OKABE Naohiko)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号： 3 0 6 1 4 2 7 6

(3)連携研究者

高橋 尚 (TAKAHASHI Hisashi)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・講師

研究者番号： 3 0 6 1 2 9 8 1

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： 5 0 1 8 6 6 4 9

(4)研究協力者

城本 高志 (SHIROMOTO Takashi)

陸 豊 (LU Feng)

丸山-中村-恵美 (MARUYAMA-NAKAMURA-Emi)