

令和元年6月17日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K12611

研究課題名(和文)半側空間無視モデルの作製とリハビリテーション効果の検証

研究課題名(英文)Development of a rat model of unilateral spatial neglect

研究代表者

武田 湖太郎 (Takeda, Kotaro)

藤田医科大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：50618733

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：半側空間無視(USN)は脳卒中後にみられる高次脳機能障害のひとつで、主に右半球の脳血管障害後に左側を無視する症状として現れる。投薬治療をはじめとしたより基盤的な研究のためには条件の統一された動物モデルが必要である。しかしげっ歯類を対象としたモデル動物においてUSNの程度を評価する方法がない。そこで本研究はモデルラットの行動からUSNの程度を評価するシステムを提案する。一方、投薬治療において頻繁に用いられる有機溶媒であるDMSOは、その細胞毒性によりラットの行動が影響を受けることが想定される。そこで本研究では、DMSOの適用範囲の同定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

半側空間無視(USN)は患者の日常生活活動を未自立レベルに留め在宅復帰を困難にさせる要因のひとつである。しかしヒトでは損傷部位がさまざまであり、症状も運動機能障害など多岐にわたる。そこで損傷部位を統一したモデル動物による検討が必要となるが、USNをはじめとした高次脳機能障害を評価できるシステムは殆ど報告されていない。そこで本研究では、モデル動物においてUSNを評価するシステムを提案する。

研究成果の概要(英文)：Unilateral Spatial Neglect (USN) is one of the cognitive dysfunctions after stroke and appears mainly as a symptom that neglects the left side after cerebrovascular disease in the right hemisphere. For a more consistent basic study of medications to treat the USN, animal models are still necessary. However, there is little way to assess the USN in rodent models. This study, therefore, we propose a system to evaluate the degree of USN from the behavior of the model rats. On the other hand, dimethyl sulfoxide (DMSO), which is an organic solvent frequently used in medication, may have toxicity to inhibit the rat behavior. Then, we also identified the safe dose range of DMSO.

研究分野：リハビリテーション工学

キーワード：半側空間無視 DMSO 細胞毒性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳卒中後などに生じる高次脳機能障害のひとつである半側空間無視 (Unilateral Spatial Neglect: USN) は、患者の日常生活動作を未自立レベルに留め在宅復帰を困難にさせている (Gillen et al., 2005). ヒトでは脳卒中による損傷部位が様々であり、運動麻痺をはじめとした他の症状も一定でないことからリハビリテーションの訓練効果を評価するのが難しく、USN に対するエビデンスレベルの高い訓練法は少ない。また、日常生活動作の獲得を優先することが多く積極的な治療を行うことは少ない状況にある。特定の脳部位を損傷させ、高次脳機能障害を呈するラットモデルを作製することができれば、ヒトを対象とした研究デザインでは難しいリハビリテーション訓練・薬剤投与をはじめとした治療の効果などを明らかにすることが可能となる。

また近年、脳梗塞後に活動が異常に亢進するグリア細胞の一種であるアストロサイトを抑制することで、脳梗塞後の細胞死が減弱することが報告され (Beppu et al., 2014), 脳卒中リハビリテーションにおいてアストロサイトを抑制する投薬治療が期待されている。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的を半側空間無視のラットモデルを作製することとし、その行動の観察および記録から、半側空間無視の状態を評価するシステムの開発を進めた。

第二の目的としてアストロサイトの抑制を挙げた。本研究では、アストロサイトが分泌する S100 β タンパク質を抑制する Arundic Acid (Pettigrew et al., 2006) を用いてアストロサイトの活性を抑制する想定であった。一方、この Arundic Acid を投与するためには有機溶媒が必要となるが、溶媒として広く用いられている dimethyl sulfoxide (DMSO) はそれ単体は無視できない毒性があり、予備実験において、必要な投与レベルにおいてもラットの不活性がみられた。そこでまず、DMSO の毒性が顕在化する量について明らかにすることを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 局所性脳梗塞モデルラットの作製と半側空間無視の評価システム

Watson ら (1985) の報告に準じ、後頭頂葉を中心とした局所性脳梗塞を作製した。ラット (Sprague-Dawley, 10-13 週齢) を用い、イソフルラン吸入麻酔下にて Rose Bengal の尾静脈投与 (30 mg/kg) を行い、後頭頂葉の領域に直径 3 mm の光ファイバーを用いて 30 分の間、光を照射 (wavelength: 540 nm) して右大脳に梗塞を作製した (図 1)。

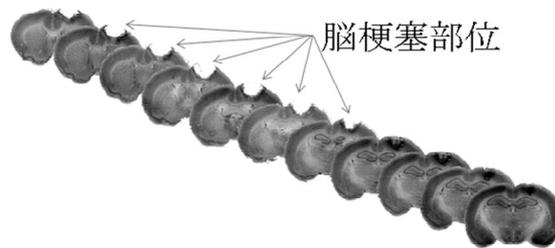


図 1: Nissl 染色による脳スライスの染色像

半側空間無視を評価する方法とし

て、2 つの部屋をラットが自由に行き来し、部屋間の通路に配置された障害物 (円柱) への程度接触したかを記録するシステムの開発を行った。接触センサとして、静電容量式のフィルムセンサを用い、接触により LED が点灯するよう設計した。記録はカメラにて行い、ラットの動作および LED の点灯を録画するシステムとした。

(2) Dimethyl sulfoxide (DMSO) の毒性評価

DMSO の影響に関して、マウス (7.1 \pm 1.8 週齢) を用いて呼吸と体性感覚への影響を調査した。呼吸の調査では、チャンバー内外の圧力差を差圧トランスデューサにより測定することにより (whole body plethysmography), フリームービング下での酸素濃度への呼吸応答を評価した (図 2a)。体性感覚の調査では、55 度に熱したホットプレートにおいて耐えられる時間を測定することで温度感受性を評価した (図 2b)。なお、本研究では DMSO の濃度依存性を評価するため、下記のような条件にて DMSO の濃度を徐々に増加させ、生理食塩水の条件と比較した。

1. Saline 1.82 mL/kg
2. DMSO 0.46 mL/kg + Saline 1.36 mL/kg (DMSO dose: 0.5 g/kg)
3. DMSO 0.91 mL/kg + Saline 0.91 mL/kg (DMSO cumulative dose: 1.5 g/kg)
4. DMSO 1.82 mL/kg (cumulative dose: 3.5 g/kg)
5. DMSO 3.64 mL/kg (cumulative dose: 7.5 g/kg)
6. DMSO 7.28 mL/kg (cumulative dose: 15.5 g/kg)

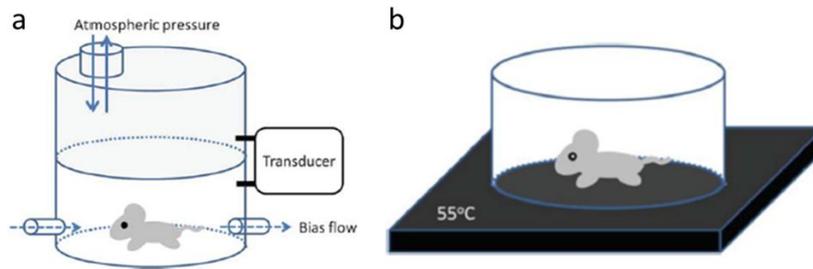


図 2: Whole body plethysmography (a) と Hotplate experiment (b)

4. 研究成果

(1) 半側空間無視の評価システム

図 3 に開発した実験システムの見取り図と実際の測定時の写真を示す．ラットは通路 (passageway) で繋がった 2 つの部屋を自由に行き来することができた．通路には半円柱の障害物 (柱, 直径 20 mm) により一部狭まっている部分があり, その先端 (図中太矢印) には静電容量式のフィルムセンサが配置され, 接触した側に応じて点灯した LED が装置上部に設置されたカメラにて記録された．この通路の長さは, 部屋から障害物までがラットの体長程度の距離を保てるよう, 片側 180 mm, 全長 360 mm に設計された．通路の幅はラットの体格に応じて可変になるよう設計された (図 3a X mm)．

半側空間無視の多くは右大脳半球損傷により左側を無視してしまい, 歩行時や車いす駆動時に左側を壁や物にぶつかってしまったり, ぶつかっても強引に進もうとしたりする, といった症状がみられる．本装置はそのような特性をラットにおいて評価するものであり部屋間を移動する際にどちらの障害物 (柱) へより多く接触するか, という回数から症状の重さを評価できるものになり得る．

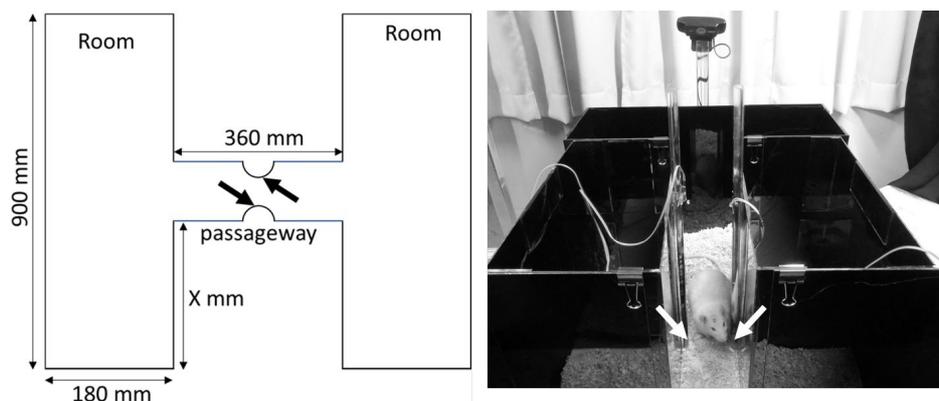


図 3: 実験システムの見取り図 (左) と測定時の写真 (右)

(2) Dimethyl sulfoxide (DMSO) の毒性評価

DMSO は, 生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水に溶解しない, 水溶性でない薬剤を溶かす溶媒として広く用いられている．他にエタノールなどが用いられることもあるが, 特に動物の行動を評価する場合にエタノールは不適切となるため, DMSO が用いられる頻度が高い．一方, 特に培養実験等の領域では DMSO の細胞毒性がよく知られており, その濃度には注意が必要であるとされる．本研究において, アストロサイトの S100 β タンパク質を抑制する Arundic Acid を必要量用いる際, 比較的大容量の DMSO が必要になり得たため, その細胞毒性が行動にどのような影響を与えるのかをまず調査した．

図 4a に酸素濃度および DMSO 濃度がマウスの単位体重あたりの分時換気量 (V_E mL/g/min) に与える影響を示す．DMSO が単位体重当たり 3.5 g/kg を超えると, 通常呼吸の量, 低酸素への応答, 低酸素後のいずれもが減少することが明らかとなった (発表論文 1)．一方, 温度感受性に関しては単位体重当たり 7.5 g/kg までは有意な減少はみられず (図 4b), 15.5 g/kg を超えると全く応答がみられなくなった (発表論文 2)．これらの結果は, 今後の動物行動実験における重要な知見となり得る．

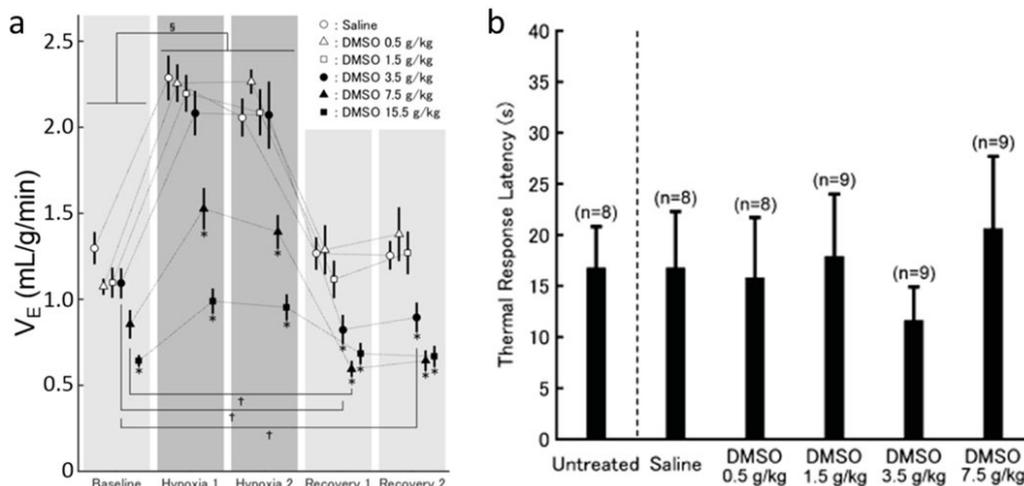


図 4: DMSO の分時換気量 (a) と温度感受性 (b) への影響

< 引用文献 >

- 1) Gillen R, Tennen H, McKee T. Unilateral spatial neglect: relation to rehabilitation outcomes in patients with right hemisphere stroke. Arch Phys Med Rehabil 86(4): 763-7, 2005.
- 2) Beppu K, Sasaki T, Tanaka KF, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K. Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. Neuron 81(2): 314-20, 2014.
- 3) Pettigrew LC, Kasner SE, Albers GW, Gorman M, Grotta JC, Sherman DG, Funakoshi Y, Ishibashi H. Safety and tolerability of arundic acid in acute ischemic stroke. J Neurol Sci 251(1-2): 50-6, 2006.
- 4) Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. Ann Neurol 17(5): 497-504, 1985.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Takeda K, Pokorski M, Sato Y, Oyamada Y, Okada Y. Respiratory toxicity of dimethyl sulfoxide. Adv Exp Med Biol 885: 89-96, 2016.
2. Takeda K, Pokorski M, Okada Y. Thermal sensitivity and dimethyl sulfoxide (DMSO). Adv Exp Med Biol 921: 45-50, 2016.

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岡田 泰昌

ローマ字氏名：OKADA, Yasumasa

所属研究機関名：国立病院機構 村山医療センター

部局名：臨床研究部 電気生理学研究室

職名：室長

研究者番号(8桁)：80160688

研究分担者氏名：水谷 謙明

ローマ字氏名：MIZUTANI, Kenmei

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：共同利用研究設備サポートセンター

職名：講師

研究者番号（8桁）：30351068

研究分担者氏名：宮坂 裕之

ローマ字氏名：MIYASAKA, Hiroyuki

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：保健衛生学部

職名：研究員

研究者番号（8桁）：00440686

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。