

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16374

研究課題名(和文) 運動皮質梗塞モデルによる運動負荷で産生する乳酸が皮質脊髄路網の再編成に与える影響

研究課題名(英文) The role of the exercise related lactate on the corticospinal reorganization in the focal stroke rat.

研究代表者

吉川 輝 (YOSHIKAWA, Akira)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：90737355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、脳梗塞後の運動負荷が神経の再構築に及ぼす影響を研究している。皮質の損傷領域と運動機能障害の関係性を明らかにするため、我々は運動皮質に限局的な脳梗塞モデルを齧歯類で作成した。モデル動物に対し運動負荷量を客観的に示すため、トレッドミル走行中の血中乳酸値、酸素消費量、呼吸数を測定した。その結果、無酸素性代謝閾値や乳酸代謝閾値となる運動負荷量を明らかにした。さらに運動機能の障害と回復を歩行動作で評価した。評価は運動学的な解析手法を用いることで回復のパラメーターを見出すことができた。これらの結果は、運動負荷によって産生される乳酸が運動機能の回復に関与する可能性をひろげることができた。

研究成果の概要(英文)：We have studied the role of physical rehabilitation on neuronal reconstruction after cerebral infarction. To elucidate the relationship between motor dysfunction and deficits in local region of cerebral cortex, we established the focal stroke mouse and rat model, which only have small size of infarction in distinct cortical area such as motor cortex. To determine the conditions of physical rehabilitation using treadmill, we measured blood lactic acid levels, oxygen consumption and respiratory rate during exercises. As a result, increasing the intensity of treadmill exercise revealed the anaerobic and lactate threshold similar to human. Moreover, evaluation of the motor function during gait using kinesiological analysis enabled us to detect the subtle impairment of the limb's function. These results can open the possibility to access the relationship between the exercise related lactate and functional recovery.

研究分野：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：脳梗塞 運動負荷 乳酸 皮質脊髄路

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳梗塞後のリハビリテーション(運動負荷)により運動機能の回復が認められ、この回復過程には神経系の再構築が関わることが示唆されている。研究代表者はこれまで、脳損傷からの回復能力が高いと考えられている新生児期の脳損傷モデルを用いて、損傷後の神経系の再構築について特に皮質脊髄路に着目して研究を行ってきた。その結果、非傷害皮質脊髄軸索からの側枝発芽、正常発達では不必要とされている神経細胞が淘汰されず残存し、新たなシナプス形成の可能性を見出した(Yoshikawa et al., 2012, Dev Neurosci.)。これらの結果から、成人期脳損傷後のリハビリテーションが発達期脳損傷後の神経系の再構築に見られる可塑的变化を惹起するかと着想し、本研究課題を立案した。

(2) 本研究課題を遂行する上で研究代表者は脳の機能局在に着目した。脳は運動野、感覚野など司る機能と領域が分かれている。さらに運動野においても手を司る領域、足を司る領域と機能局在が細分化されている。そのため、運動野においても脳梗塞による虚血部位により、その出現する障害の程度やリハビリテーション予後が異なることを研究代表者は臨床的に経験している。そこで研究代表者は、限局的な脳梗塞モデル動物を作出し用いることで領域特異的な運動機能の障害像などを捉え、脳虚血領域の差異が運動機能障害およびリハビリテーションによる運動機能の回復効果に与える影響を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、運動皮質において限局した実験的脳梗塞モデル動物を作出し、脳梗塞後の運動療法の神経学的作用機序について調べることが目的とした。具体的には、以下の4項目について取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 運動皮質に限局的な脳梗塞の作出
モデル作出にはSD系雄ラット(生後8週)を用いた。限局的脳梗塞の作出は、浜松医科大学薬理学講座で確立した光増感反応を利用したPIT法を変法し、限局的脳梗塞モデル作製に取り組んだ。梗塞巣の評価はTTC染色を梗塞後24時間で行い梗塞巣の解剖学的同定をした。

(2) 脳梗塞作出後の運動機能の変化に対する客観的な運動学的な評価方法の確立
行動評価として、広く用いられているローターロットテスト、ビームウォーキングテストに加え、運動学的な評価方法としてトレッドミル上の歩行を録画することによる歩行分析を行った。

(3) 運動負荷量の客観的評価を血中乳酸値に着目しての確立

密閉型トレッドミルチャンバーに対象動物を入れ、トレッドミル走行課題を行った。走行中の生体反応の評価として酸素摂取量などの代謝指標、一回換気量などの呼吸指標および血中乳酸値の測定を行った。これらの生体反応指標と運動負荷量(走行スピード)の関係を調べた。

(4) 脳梗塞後における神経系の再構築に関する組織学的評価
非傷害部位からの皮質脊髄路の新たな軸索伸長に関して

運動負荷後、逆行性トレーサー物質を麻痺側の頸髄に注入した。注入後、2週間の期間を経て灌流固定し、大脳皮質に集積している細胞を観察した。一方、別の個体は非梗塞巣の大脳皮質運動領域に順行性トレーサーを注入し、麻痺側頸髄を中心に軸索の投射様式を観察した。観察に際して、標識された神経の大脳皮質内の分布を3次元的に捉えるため、脳の組織を透明化して観察を行った。

神経新生に関して

脳梗塞作出後、翌日から1週間腹腔内にBrdUを投与した。投与後、一定期間を経て麻痺側頸髄に逆行性トレーサーを注入した。それによって新生細胞であるBrdU陽性細胞の一部が皮質脊髄ニューロンへ分化したのか調べた。

4. 研究成果

(1) 運動皮質に限局的な脳梗塞の作出

これまで、緑色光照射で用いていたファイバー径を小径にさせ、かつ小径の頭蓋骨の骨孔を作成することにより、より限局的に光照射ができるようになった。一定時間の照射後、24時間後にTTC染色にて虚血巣を確認した結果、吻側前肢運動領域を含む十字縫合から外側2mmかつ吻側2mm、尾側前肢運動領域を含む十字縫合から外側2mm、後肢運動領域を含む十字縫合から外側2mmかつ尾側2mmの3つの領域での照射による脳梗塞モデル動物の作出に成功した。これにより、領域特異的な現象を評価することができるようになった。

(2) 脳梗塞作出後の運動機能の変化に対する客観的な運動学的な評価方法の確立

これまで齧歯類を対象とした先行研究は、運動障害の検出に尻尾を持ち上げることにより、麻痺側四肢が内転を示すtail test、両肢の協調動作を評価するローターロットテスト、ハシゴ上や平行棒上を歩行させ、滑り落ちる状況の評価するビームウォーキングテストやはしご歩行テストが多く用いられている。そこで本研究もローターロットテストとビームウォーキングテストを実施した。その結果、ローターロットテストでは運動障害および機能回復の有意差は認められな

ったが、ビームウォーキングテストでは運動負荷群で、有意な運動機能の回復が認められた。さらに本研究では、モデル動物の歩行を運動学的なパラメーターで検証した。トレッドミル上を走行している動物を矢状面から撮影し、各関節に着目して歩行解析を行った。その結果、一歩行周期における各関節の障害が運動学的なパラメーターによって明らかになった。これをもとに脳梗塞後の運動負荷による運動機能の回復のポイントを捉えることができるようになった。

(3) 運動負荷量の客観的評価を血中乳酸値に着目しての確立

本研究課題の乳酸は、運動負荷量の違いによって関与が異なると考えている。そこで、運動負荷量を客観的に評価する手法の確立を目指した。対象動物に対し様々な運動負荷を課すことにより酸素摂取量、二酸化炭素排出量、呼吸換気比、そして血中乳酸値をもとに無酸素性代謝閾値、乳酸代謝閾値となる負荷量が明らかになった。この結果、運動負荷中の呼吸代謝をモニタリングすることで、当該の運動負荷がモデル動物において何パーセントの運動負荷量に相当するか推察することができるようになった。それにより運動負荷量の違いによる乳酸の関与と運動機能回復の関係性を見出すことができるようになった。

(4) 脳梗塞後における神経系の再構築に関する組織学的評価

麻痺側前肢に投射している皮質脊髄ニューロンを同定するために逆行性トレーサーを用いた。トレーサー標識細胞を観察する際、脳組織を透明化することにより、これまでより3次元的に捉えることに取り組んだ。その結果、脳梗塞周囲に逆行性トレーサー色素を含む陽性細胞が多く集積していることが明らかになった。また、透明化した脳に対して薄切片を作成し BrdU 陽性細胞と逆行性トレーサー物質の脳内分布の様子を確認した。その結果、BrdU 陽性細胞が脳梗塞巣の周囲および同側の側脳室周辺で多く集積していることが明らかになった。逆行性トレーサー陽性細胞と BrdU 陽性細胞の二重染色像は観察できなかった。順行性トレーサーを用いた検証では、新たな軸索側枝を捉えることができなかった。

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)

熊田竜郎, 吉川輝. 神経発生学的な視点から再生医療のリハビリテーションについて考える: 神経の電気的な活動を模倣するニューロリハへの可能性. 常葉大学保健医療学部紀要 査読有, 7:

(2016) 17-27.

[学会発表](計 4 件)

森下紗帆, 外村和也, 懸信秀, 吉川輝, 梅村和夫, 筒井祥博, 熊田竜郎. 運動皮質梗塞ラットの運動機能回復と神経新生を促がす運動負荷法の検討. 第 135 回日本薬理学会関東部会. 2016/10/8 アクトシティ浜松. (静岡・浜松)
Akira Yoshikawa, Tomoya Nakamachi, Hirokazu Ohtaki, Masahiko Izumizaki. Behavioral, Neuroanatomical, and DNA microarray Study after Neonatal and Adult Unilateral Brain Hemisuction Mice. The 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (SFN2016) 2016/11/12-16 San Diego Convention Center (San Diego, CA, U.S.A.)
Hirokazu Ohtaki, Saki Taniguchi, Yuki Tanaka, Jun Watanabe, Kazuyuki Miyamoto, Akira Yoshikawa, Kenji Dohi, Kazuho Honda. Responses of human mesenchymal stem/stromal cells in brain ischemia. The 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (SFN2016) 2016/11/12-16 San Diego Convention Center (San Diego, CA, U.S.A.)
Saho Morishita, Kazuya Hokamura, Akira Yoshikawa, Nobuhide Agata, Kazuho Umamura, Yoshihiro Tsutsui, Tatsuro Kumada. Effect of different exercises on neurogenesis and motor recovery in rats with motor cortex infarction. 第 94 回日本生理学会大会. 2017/03/28-30 アクトシティ浜松. (静岡・浜松)

[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:
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

吉川 輝 (YOSHIKAWA Akira)
昭和大学・医学部 助教
研究者番号：90737355

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

熊田 竜郎 (KUMADA Tatsuro)
常葉大学・保健医療学部・教授
研究者番号：00402339

筒井 祥博 (TSUTSUI Yoshihiro)
常葉大学・保健医療学部・教授
研究者番号：50073135

縣 信秀 (AGATA Nobuhide)
常葉大学・保健医療学部・講師
研究者番号：00549313

梅村 和夫 (MEMURA Kazuo)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：40232912

外村 和也 (HOKAMURA Kazuya)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：90436965

(4)研究協力者

森下 紗帆 (MORISHITA Saho)
常葉大学・健康プロデュース学部・助手