

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500442
 研究課題名（和文） 脳卒中モデル動物による効果的なリハビリテーションの
 検討とその作用メカニズムの解析
 研究課題名（英文） Exploration of the effective rehabilitative therapy and its
 mechanisms after stroke in rats
 研究代表者
 石田 和人 (ISHIDA KAZUTO)
 名古屋大学・医学部（保健学科）・講師
 研究者番号：10303653

研究成果の概要：脳卒中後のリハビリテーションには科学的根拠に基づいた効果的な方法の開発が望まれる。本研究では、脳出血のモデル動物を作成し発症後早期からトレッドミル運動を行うと、運動機能の回復が促進され運動機能に関わる脳領域で神経細胞の樹状突起の枝が複雑化することを示した。また片側前肢の使用を制限し、反対側の麻痺した手を強制的に使用する治療法があり、この場合のストレス等による神経への障害性は一過性で少ないことを示した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2008年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| | | | |
| | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：脳出血モデル・運動機能・トレッドミル運動・運動強度・運動介入時期・リハビリテーション・dark neuron・運動療法

1. 研究開始当初の背景

脳虚血モデルラットを用いた研究で、運動により機能の回復が促進されることを報告した研究は少ない。更にほとんどは脳梗塞モデルを用いたものである。それに対し申請者らは脳出血モデル (Rosenberg et al, 1990) を用いた独自の研究を進めてきた。申請者らのデータでは、脳出血後4日～2週間まで毎日30分間のトレッドミル運動を行うと、脳出血1～4日後に、運動しないコントロール群に比べ有意な改善が認められ、運動機能の回復時期が早まることが分かった。さらに、運動期間を1週間延長しても機能の回復は同

程度であった。また、高速度で運動すると機能回復がより良好であること。などを報告した。

本研究では、この研究実績を更に発展させ、より効果的な運動負荷の条件を検討する。国内外の研究動向としては、脳梗塞モデルを用いて、梗塞後早期に運動を始めた方が機能の回復が良好であること (Yea-Ru Yang, 2003)、豊かな環境での飼育を併用して運動すると健常側大脳皮質の樹状突起拡大がみられること (Biernaskie J, 2001) などが報告されている。しかし、いずれの先行研究においても機能回復や (樹状突起の) 形態的変

化を示す現象論に終始しており、その作用機序に関してはほとんど調べられていない。

2. 研究の目的

(1) 線条体脳出血モデルラットを用いた運動療法効果の検討：特に運動負荷の強度、時期、種類（自発的な運動と強制的な運動）による効果の違いなどを調べ、最も効果のある条件を見出す。

(2) 運動療法による機能回復促進の作用に関する機序の解析：各種の運動の条件下で、大脳皮質に着目し、組織学的変化および神経栄養因子の発現について検討する。

3. 研究の方法

(1) 脳出血モデルに対するより効果的な運動療法の検討

コラゲナーゼ注入線条体脳出血モデルラットの作成：深麻酔下にてラットを脳定位固定装置に固定し、コラゲナーゼ(type IV)を左線条体の中央部に微量注入し、麻酔から覚醒した後、右片麻痺が生じることを確認する。

トレッドミルによる運動効果の検討：それぞれについて最大の効果が得られる条件を模索する。条件として運動の強度、運動の時期を考慮する。

前肢使用制限の影響に関する検討：脳出血モデルを用いた CI 療法 (constraint induced movement therapy) の作用機序を検討する前段階として、健全なラットの片側前肢を軽く固定し使用制限させる（反対側前肢の強制使用を促す）。その影響について運動機能の変化を調べる。

運動機能評価：効果判定は、Altumbabicらによる運動障害スコア(自発回転、前肢把握、棒上歩行、後肢引き込み反射4項目から点数化)および前肢運動機能(staircase test, ladder test, cylinder test)を実施する。

(2) 運動および片側前肢使用制限実施に対する脳の組織学的検討

脳出血モデル作成3日、1および2週間後、深麻酔下で還流固定後、脳を取り出し、H-E染色およびArgyrophil III染色(神経障害初期像とされるdark neuronの解析)に供し、組織損傷の範囲およびdark neuronの出現について解析する。また、上記で実施する運動効果との関連を検討する。

(3) 脳皮質運動野の可塑性に着目した運動効果の組織学的検討

脳皮質の厚さ測定：ラット脳の前額断面像(H-E染色)の大脳皮質に着目し、第一次運動感覚野(前肢支配領域および後肢支配領域)、運動前野・補足運動野領域での厚さを計測する。

脳皮質錐体細胞層に存在するニューロン

樹状突起の染色：効果が認められる条件下で運動を実施した後、深麻酔下で経時的に生理食塩水を還流して脱血し、Golgi-Cox染色(Biernaskie, 2001)により運動感覚領域の錐体細胞層に存在するニューロンの樹状突起を染色する。染色像から画像解析を行い、樹上突起の分枝数(arborization)および棘(spine)の数をカウントする。

(4) 前肢使用制限の影響に関する組織障害性、神経新生および神経栄養因子の発現に関する検討

片側の前肢使用制限は反対側の強制使用を促すので、脳機能改善効果を促進するものと想定されるが(CI療法)、使用制限自体による副作用の有無について検討するために以下の検討を行った。

脳の組織障害性(Argyrophil III染色)

神経新生(Brd U染色)

神経栄養因子の発現(real time RT-PCR法により、BDNF、GDNFおよびVEGFの各mRNA量を解析)

4. 研究成果

(1) トレッドミル運動による脳出血後の機能回復促進効果：線条体脳出血モデル作成4日後より2週間まで9 m/minの速度でトレッドミル運動を毎日30分間実施した結果、運動機能の回復が促進することが分かった。運動の有無で、線条体残存体積および大脳皮質の厚さに差は認めなかったが、非麻痺側の線条体残存部および大脳皮質補足運動野・前運動野で樹状突起の伸展が観察された。

(2) トレッドミル運動の時期および強度の違いによる効果の検討：上記の運動を7日後から同期間行う群と比較すると、4日後から実施した方が機能の回復が良好であり、発症後早期に開始するトレッドミル運動がより機能回復に効果的であることが示された。また、脳出血モデル作成4日後より開始し、7日後より13 m/minに速度アップさせる群と比較検討したところ、運動強度(速度)を増加した方がより良好な回復をもたらすことが分かった。以上より、線条体脳出血後、早期にある程度の強度でトレッドミル運動を実施することにより、大脳皮質での可塑性が高まり、運動機能の改善につながることを示された。

(3) 脳出血モデルラットの脳組織学的病態の解析：上述のモデル動物を作成し、脳出血直後から7日後まで、線条体および大脳皮質の残存面積および神経細胞障害の初期像であるといわれるdark neuron(Argyrophil III陽性ニューロン)の出現様式を観察した。その結果、線条体の残存面積は経時的に減少し、

dark neuronは3時間後、血腫周辺で検出されるも、1~3日後には、やや離れた部位でみられ、7日後には検出されなかった。以上よりdark neuronの出現は、脳出血による脳組織の傷害進展に関連しており、今後脳出血後のリハビリテーション効果を検証する上で注目すべきマーカーの一つであると考えられた。

(4) 一側前肢の使用制限が中枢神経組織および神経新生に及ぼす影響：脳卒中後の効果的なりハビリテーション戦略として知られている constraint-induced movement therapy (CI療法) を想定して、健常ラットの一側前肢の使用を持続的に制限した。1週間の使用制限の後、運動機能は変わらず、dark neuron (神経細胞障害初期像) が、両側の海馬 CA1/CA2 錐体細胞層に出現したが、細胞死 (TUNEL 染色陽性細胞) は確認されなかった。また、使用制限により海馬歯状回での神経新生が一過性に抑制された。以上よりCI療法に関する基礎研究を進める上での副作用を確認することができた。

本研究プロジェクトにより以上の成果が得られた。これらの研究結果は、脳卒中なりハビリテーションのエビデンスに直結する有用な基礎医学的データであり、今後更なる検討を加えることにより、近い将来、脳卒中後遺症(片麻痺)に悩む人々の福祉に役立つエビデンスの確立に貢献できるものと考えられる。

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 8件)

Torihashi S, Hattori T, Hasegawa H, Kurahashi M, Ogaeri T and Fujimoto T: The expression and crucial roles of BMP signaling in development of smooth muscle progenitor cells in mouse embryonic gut. *Differentiation* 77: 277-289, 2009. (査読有)

石田和人: 刺激入力の継続と脳機能再生に関する動物モデルによる研究. *理学療法の医学的基礎* 12(印刷中), 2009. (査読有)

鈴木麻友、水野陽太、蜷川菜々、八木保、鳥橋茂子: マウス ES 細胞を用いた骨格筋細胞の発生モデル. *理学療法の医学的基礎* 12(印刷中), 2009. (査読有)

Yates C, Charlesworth A, Reese N, Ishida K, Skinner RD and Garcia-Rill E: Modafinil

normalized hyperreflexia after spinal transection in adult rats. *Spinal Cord (Online)*: 1-5, 2008. (査読有)

Kurahashi M, Niwa Y, Cheng J, Ohsaki Y, Fujita A, Goto H, Fujimoto T and Torihashi S: PDGF signals play crucial roles in differentiation of longitudinal smooth muscle cells in mouse embryonic gut. *Neurogastroenterol Motil* 20: 521-531, 2008. (査読有)

石田和人: 理学療法への挑戦, そして広がる夢 神経系・基礎系. *理学療法福井* 12: 11-15, 2008. (査読無)

Sato K, Torihashi S, Hori M, Nasu T and Ozaki H: Phagocytotic Activation of Muscularis Resident Macro-phages Inhibits Smooth Muscle Contraction in Rat Ileum. *J Vet Med Sci* 69: 1053-1060, 2007. (査読有)

Torihashi S, Kuwahara M and Kurahashi M: In vitro developmental model of the gastrointestinal tract from mouse embryonic stem cells. *Nagoya Medical Journal* 69: 133-137, 2007. (査読有)

[学会発表](計 13件)

A. Ishida, et al: Effects of forced-disuse by constraint-induced movement therapy on the normal function: minor damages in the hippocampus with decreases of VEGF and GDNF. Society for Neuroscience 38rd annual meeting, 2008.11.18. Washington, DC.

M. K. Garrison, et al: Passive exercise alters stretch reflex properties in rats with spinal cord transaction. Society for Neuroscience 38rd annual meeting, 2008.11.18. Washington, DC.

S Urakawa, et al: Environmental enrichment enhances the neurogenesis following brain lesions in rats. 10th International Congress of the Asian Confederation for Physical Therapy (ACPT), 2008.8.31. Makuhari, Chiba.

石田章真, 他: ラットにおける前肢使用制限が運動機能および海馬の神経新生に及ぼす影響. 第55回中部生理学会, 2008.10.17. 長久手.

石田章真, 他: Restraint effect of

unilateral forelimb on histological changes and neurogenesis in central nervous system in rats. 第 31 回日本神経科学会, 2008.7.10. 東京.

石田和人: 刺激入力の継続と脳機能再生に関する動物モデルによる研究. 第 13 回理学療法の医学的基礎研究会学術集会, 2008.5.17. 福岡.

石田章真, 他: 一側前肢の使用制限が中枢神経組織および神経新生に及ぼす影響. 第 13 回理学療法の医学的基礎研究会学術集会, 2008.5.17. 福岡.

高松泰行, 他: 脳出血モデルにおける急性期の脳組織学的変化 ~ dark neuron に着目して ~. 第 13 回理学療法の医学的基礎研究会学術集会, 2008.5.17. 福岡.

渡邊裕介, 他: 脳出血モデルラットに対する早期トレッドミル運動の効果 運動時期による効果の違い . 第 43 回日本理学療法学術大会, 2008.5.16. 福岡.

石田和人, 他: 脊髄損傷モデルラットにおける自転車式他動運動の後肢過反射抑制効果. 第 43 回日本理学療法学術大会, 2008.5.15. 福岡.

Arfaj A. et al: Changes in the H-reflex after spinal cord injury: a longitudinal study in awake rats. Society for Neuroscience 37rd annual meeting, 2007.11.5. San Diego.

石田章真, 他: 脳出血モデルラットにおける CI 療法の効果に関する検討. 第 41 回日本理学療法学術大会, 2007.5.25. 新潟.

〔図書〕(計 3 件)

石田和人: 三輪書店、理学療法 MOOK 第 16 巻 脳科学と理学療法、2008 年、243 頁(41-49) .

天野修、千田隆夫、鳥橋茂子 (監訳): 丸善株式会社、人体解剖カラーリングブック、2008 年、219 頁 .

石田和人: 文光堂、障害別・ケースで学ぶ理学療法臨床思考 PBL で考え進める、2007 年、496 頁 (48-60) .

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/ishida/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石田 和人 (ISHIDA KAZUTO)
名古屋大学・医学部 (保健学科)・講師
研究者番号: 10303653

(2)研究分担者

鳥橋 茂子 (TORIHASHI SHIGEKO)
名古屋大学・医学部 (保健学科)・教授
研究者番号: 90112961

(4)研究協力者

石田 章真 (ISHIDA AKIMASA)
名古屋大学大学院・医学系研究科 (リハビリテーション療法学専攻)・大学院生

高松 泰行 (TAKAMATSU YASUYUKI)
名古屋大学大学院・医学系研究科 (リハビリテーション療法学専攻)・大学院生