

脳卒中後早期理学療法のエビデンス構築 に向けた基礎的検証 —モデル動物を用いた検証—

玉越敬悟 (PT)¹⁾, 石田和人 (PT)²⁾³⁾, 高橋英明 (PT)¹⁾,
早尾啓志 (PT)¹⁾, 田巻弘之¹⁾

- 1) 新潟医療福祉大学リハビリテーション学部理学療法学科
- 2) 豊橋創造大学保健医療学部理学療法学科
- 3) 名古屋大学大学院医学系研究科

キーワード：脳出血，早期運動介入，樹状突起

はじめに

発症後早期からのリハビリテーションは機能改善を促進させることが多くの臨床研究で確かめられており、脳卒中ガイドライン 2015 においても強く推奨されている。動物実験による基礎研究においても、早期リハビリテーションの有効性が示されている¹⁻³⁾が、その一方で、早期リハビリテーションが脳傷害を増悪させることも報告されている⁴⁾⁵⁾。これらの報告のもと、基礎研究分野では、脳卒中早期リハビリテーションの効果は脳傷害の起因、重症度、部位で異なり、それぞれの病態に適切な介入時期があることが近年の国際的な見解となっている。しかし、現在の早期リハビリテーションは、その介入効果が科学的に十分検証されていないまま提供されており、対象者によっては不適切な介入が行われているおそれがある。そのため、早期リハビリテーションの有効性を科学的に実証する基礎研究は、重点的かつ早急に取り組むべきリハビリテーション分野の最重要課題であるといえ、新しい脳卒中早期リハビリテーション方針の策定にもつながる。これまでの研究で、コラゲナーゼ注入法で作製した線条体出血モデルラットを用いて、運動療法の実施時期の違いが運動機能障害に与える影響について検証した。トレッドミル走行を使用し、発症後 2 日目から介入した群（早期介入）と発症後 8 日目から介入した群（後期介入）の運動機能を経時的に評価して比較検証を行った。その結果、早期介入の方が後期介入より運動機能の改善効果が高いことが分かった。大脳皮質の厚さを解析したところ、早期介入は後期介入と比較して、皮質の萎縮抑制効果が高く、さらに、皮質を層別に解析したところ、運動出力に関わる細胞がある第 V 層の萎縮を抑制していた。これらの結果から、脳出血後の早期介入は、大脳皮質の萎縮を抑制することで運動機能回復を促進させることが分かった。皮質の萎縮は、神経細胞数の減少や樹状突起・シナプスの退縮によって引き起こされる。脳出血後の運動療法は、神経細胞数の減少抑制、すなわちアポトーシス細胞死の抑制効果があり、さらに、樹状突起の退縮抑制効果があることが報告されて

いる。そこで、本研究では、神経細胞の減少と樹状突起の退縮が早期介入によって抑制されているか後期介入および非介入と比較検証する。

対象と方法

1. 実験動物と実験群

本研究には、Wistar 系雄性ラット (n=52) を用いた。全ラットは 12 時間の明暗サイクルの下、餌と水を自由摂取できる標準ケージで飼育した。すべての処置は新潟医療福祉大学動物実験委員会の承認を得て行った。実験群には偽手術 + 非介入群 (SHAM 群; n=14)、脳出血 + 非介入群 (ICH 群; n=13)、脳出血 + 早期介入群 (ICH+ET; n=13)、脳出血 + 後期介入群 (ICH+LT; n=12) の 4 群を設けた。

2. 脳卒中モデルラットの作製

ペントバルビタールナトリウム腹腔内投与麻酔下に、ラットを脳定位固定器に固定した。頭部の皮膚を切開して頭蓋骨を露出させた後、ドリルでプレグマ縫合から左外側 3.6 mm の位置に小穴を開けた。ステンレス製カニューレを頭蓋骨表面から深度 6.0 mm まで挿入した。血管壁を脆弱化させるコラゲナーゼ (TypeIV, 200 U/min, 1.6 μ l, Sigma 社) を、マイクロシリンジポンプ (Eicom 社) を用いて 0.2 μ l/min の流速で 8 分間注入した。注入終了後、切開した頭部の皮膚を縫合し、切開部を消毒した。

3. 運動条件

運動介入にはトレッドミル走行を使用した。走行速度は、介入初日は 9 m/分、その後は 11 m/分とし、走行時間は 60 分とした。走行期間は、ICH+ET 群は術後 2 日目から 8 日間まで、ICH+LT 群は術後 9 日目から 15 日目までとした。

4. 運動機能評価

運動機能評価には Forelimb Placing test を用いた。本評価ではラットの髭をテーブル端に付けたときの前肢の運動応答から運動麻痺の程度を評価できる。本評価を 10 回試行し、前肢の運動応答回数を測定した。評価日は、術後 1 日目、8 日目、15 日目とした。

5. 神経細胞数の解析

術後 16 日目に、全ラット (SHAM 群; n=6, ICH 群; n=5, ICH+ET 群; n=7, ICH+LT 群; n=7) を生理食塩水で灌流脱血し、その後、4% パラフォルムアルデヒドで灌流固定した。脳を採取し、同溶液で後固定した。40 μ m 厚の凍結切片を作製し、ニッスル染色を施した。両側の大脳皮質第 V 層を光学顕微鏡で観察し、神経細胞数をカウントした。

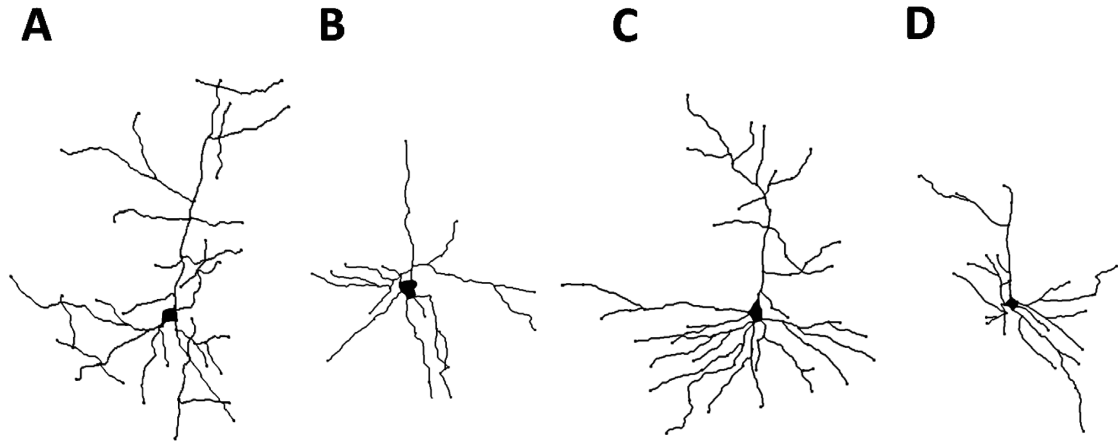


図 1 樹状突起のトレーシング画像

樹状突起のトレーシングを行った後、細胞体を中心に同心円を描き、交差点数を解析した。図は各群の代表的な樹状突起のトレーシング画像である (A: SHAM 群, B: ICH 群, C: ICH+ET 群, D: ICH+LT 群)。脳出血発症によって樹状突起の退縮を認めた。早期介入によって樹状突起の退縮が抑制されたが、後期介入では抑制されなかった。

6. 樹状突起の解析

術後 16 日目に、全ラット (SHAM 群; n=8, ICH 群; n=8, ICH+ET 群; n=6, ICH+LT 群; n=5) を生理食塩水で灌流脱血し、脳を採取した。200 μm 厚の脳切片を作製し、FD Rapid GolgiStain Kit を用いて樹状突起を染色した。光学顕微鏡で傷害側感覚運動野第 V 層における神経細胞の樹状突起を観察した。ImageJ を用いて樹状突起を半自動的にトレーシングし、細胞体を中心に 5 μm 間隔に描いた同心円と樹状突起の交差点を測定した。

7. 統計学的手法

Forelimb placing test, 神経細胞数, 樹状突起と同心円の全交差点数の群間比較には一元配置分散分析を行い、その後、Turkey-Kramer 法を用いて多重比較検定を行った。なお、有意水準は 5% とした

結 果

1. Forelimb placing test

ICH+ET 群は、ICH 群および ICH+LT 群と比較して術後 8 日目と 15 日目に有意に高値を示した (術後 8 日目: ICH 群; 1.375 ± 0.595 回, ICH+ET 群; 4.167 ± 2.927 回, ICH+LT 群; 1.574 ± 1.272 回, 術後 15 日目: ICH 群; 1.125 ± 0.398 回, ICH+ET 群; 8.0 ± 1.125 回, ICH+LT 群; 1.714 ± 0.4 回)。

2. 神経細胞数

傷害側において ICH 群および ICH+LT 群は SHAM 群より有意に低値を示した。また ICH+ET 群は ICH 群および ICH + LT 群より有意に高値を示した (SHAM 群; 53.4 ± 2.1 個/ mm^2 , ICH 群; 44.7 ± 2.2 個/ mm^2 , ICH+ET 群; 54.4 ± 1.03 個/ mm^2 , ICH+LT 群; 42.3

± 1.2 個/ mm^2)。非傷害側では全群間に有意差は認めなかった (SHAM 群; 51.5 ± 1.3 個/ mm^2 , ICH 群; 54.1 ± 2.8 個/ mm^2 , ICH+ET 群; 52.9 ± 2.0 個/ mm^2 , ICH+LT 群; 47.0 ± 1.8 個/ mm^2)。

3. 同心円と樹状突起の全交差点数

ICH 群および ICH+LT 群は SHAM 群より有意に低値を示した。また ICH+ET 群は ICH 群および ICH + LT 群より有意に高値を示した (SHAM 群; 365.7 ± 16.3 カ所, ICH 群; 271.8 ± 13.5 カ所, ICH+ET 群; 413.5 ± 44.2 カ所, ICH+LT 群; 264.5 ± 17.5 カ所)。

考 察

本研究から、脳出血後の早期介入による運動機能の改善は、大脳皮質感覚運動野第 V 層の神経細胞減少抑制および樹状突起の退縮抑制が関与している可能性が示唆された。脳出血モデルラットを用いた先行研究で、血腫による直接の影響を受けない二次的な変性として大脳皮質感覚運動野が萎縮することが示されている。これは大脳皮質感覚運動野における神経細胞の樹状突起の退縮⁶⁾ やアストロサイトの密度や突起数の減少⁷⁾ が関与している可能性が高い。また、本研究の結果から、大脳皮質感覚運動野第 V 層における神経細胞数の減少も関与していることが分かった。先行研究では、脳出血後の感覚運動野における樹状突起やアストロサイトの二次的な変性が運動介入によって抑制できることが示されている⁶⁾⁷⁾。本研究の結果から、運動介入による二次的な変性の抑制効果は、早期からの介入の方が後期からの介入より高いことが分かった。脳卒中発症後早期は、神経成長因子が多く発現し、その後は NOGO などの成長抑制因子が次第に増加する。そのため、発症早期はリハビリテーション介入で機能改善を促進させるための重要な時

期とされている⁸⁾。神経成長因子は、神経の可塑的变化や神経細胞死の抑制に関与しているため、早期介入によって感覚運動野の樹状突起の退縮抑制や神経細胞の減少抑制が引き起こされたと考えられる。今後、神経成長因子や細胞死抑制因子の発現状態について検証する必要がある。

文 献

- 1) Yang YR, Wang RY, *et al.*: Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 2003; 339: 91-94.
- 2) Zhang P, Yu H, *et al.*: Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model. *J Neuroeng Rehabil.* 2013; 10: 43.
- 3) Lee HH, Shin MS, *et al.*: Early treadmill exercise decreases intrastriatal hemorrhage-induced neuronal cell death and increases cell proliferation in the dentate gyrus of streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *J Diabetes Complications.* 2005; 19: 339-346.
- 4) Risedal A, Zeng J, *et al.*: Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; 19: 997-1003.
- 5) Piao CS, Stoica BA, *et al.*: Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury. *Neurobiol Dis.* 2013; 54: 252-263.
- 6) Takamatsu Y, Tamakoshi K, *et al.*: Running exercise enhances motor functional recovery with inhibition of dendritic regression in the motor cortex after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Behav Brain Res.* 2016; 300: 56-64.
- 7) Mestriner RG, Pagnussat AS, *et al.*: Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Exp Neurol.* 2011; 227: 53-61.
- 8) Murphy TH, Corbett D: Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10: 861-872.

発表実績

- 1) 玉越敬悟, 石田和人, 高松泰行, 中川弘毅, 早尾啓志, 田巻弘之. 脳出血モデルラットにおけるトレッドミル走行の実施時期の違いが運動機能回復および組織傷害に与える影響. 第 52 回日本理学療法学会 (千葉), 2017.5
- 2) Tamakoshi K, Ishida K, Hayao K, Takahashi H, Tamaki H. Early treadmill exercises inhibit cortical thickness atrophy following intracerebral hemorrhage in rats. The 40st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society(Kobe), Jul. 2017.
- 3) Tamakoshi K, Ishida K, Hayao K, Takahashi H, Tamaki H. Effect of early and late treadmill training on motor functional recovery and the cerebral cortex after hemorrhage in rats. Society for Neuroscience 2017(USA), Nov. 2017.
- 4) 玉越敬悟, 石田和人, 早尾啓志, 高橋英明, 田巻弘之. 脳出血モデルラットにおける早期トレッドミル走行は大脳皮質の萎縮を抑制し機能改善を促進する. 第 24 回脳機能とリハビリテーション研究会学術集会 (千葉), 2017.4
- 5) 玉越敬悟, 石田和人, 早尾啓志, 高橋英明, 田巻弘之. 脳出血後の運動機能障害は脳梗塞と比較して自然回復が早い. 第 24 回脳機能とリハビリテーション研究会学術集会 (千葉), 2017.4
- 6) 玉越敬悟, 石田和人, 早尾啓志, 高橋英明, 田巻弘之. 脳出血後の早期リハビリテーションが運動機能回復および組織傷害に及ぼす影響. 第 25 回日本運動生理学会 (横浜), 2017.7
- 7) 玉越敬悟, 石田和人, 早尾啓志, 高橋英明, 田巻弘之. 脳卒中リハビリテーションの開始時期の違いが運動機能回復および組織傷害に及ぼす影響. 第 16 回コメディカル形態機能学会 (名古屋), 2017.9
- 8) 玉越敬悟, 石田和人, 早尾啓志, 高橋英明, 田巻弘之. 脳出血モデルラットにおける超早期リハビリテーションが運動機能回復および大脳皮質感覚運動野に及ぼす影響. STROKE2018 (福岡), 2018.3
- 9) Tamakoshi K, Ishida K, Hayao K, Takahashi H, Tamaki H. Effect of very early exercise on motor functional recovery and brain damage after hemorrhage in rats. The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Kagawa), Mar. 2018.