

## 論文要旨

鹿児島大学

### The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats

実験的脳梗塞ラットにおける早期運動介入が脳損傷と回復に与える影響について

氏名 松田 史代

本研究では、リハビリテーションの視点から、運動療法介入が脳血管障害後の脳の可塑性を促進することができるのか、運動により、神経栄養因子の発現が促進され、梗塞巣修復にどのように関係しているのかを検討した。また、脳血管障害後の神経栄養因子 Midkine の機能および神経脱落に対する Midkine の働きについて検討するとともに、神経成長因子 (NGF) との相互関係を検証し、神経栄養因子が神経細胞死や神経修復にどのように働いているのか検討した。

実験動物は、Wistar 系雄性ラット 77 匹を使用した。脳梗塞作成後 1 日よりトレッドミル運動を最大 28 日間行う ischemia-exercise (IE 群) (n = 36)、脳梗塞作成後運動を行わない ischemia-control (IC 群) (n = 36)、ShamOpe 後 28 日間トレッドミル運動を行う sham-exercise (SE 群) (n = 5) の 3 群に無作為にわけた。

実験的脳梗塞作成方法は、ラットの左中大脳動脈から左内頸動脈へ直径 0.2~0.3 mm 長さ約 5 mm の糸付き塞栓糸(全長 16 mm)を挿入し、90 分間塞栓糸を留置し中大脳動脈領域を虚血状態にした。その後、塞栓糸を引き抜き再開通した。術中は低体温による脳保護作用の影響を避ける為、直腸温度を 37℃ に保つように thermostat 付ブランケットを用いた。SE 群は、塞栓糸を挿入する前段階まで同様の方法で行った。術後 1 日より、脳梗塞作成群は無作為に IE 群と IC 群に分け、IE 群および SE 群では 1 日 20 分最大 13m/分の運動を最大連続 28 日間行った。IE 群と IC 群は、術後 1,3,5,7,14,28 日 (それぞれ各 6 匹ずつ) に運動機能評価および神経学的評価、体重測定、脳を摘出し 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride(TTC)染色し脳梗塞体積率(脳全体に占める脳梗塞巣の割合)を計測した。一晚 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(pH7.4)で浸漬固定し、パラフィン包埋した。その後、脳切片を作成し免疫組織学染色および二重蛍光染色を行った。免疫組織学染色では、抗 Midkine 染色、抗 NGF 染色、新生血管マーカーとして抗 PECAM-1 染色、アポトーシスの指標として抗 Caspase-3 染色を行った。二重蛍光染色では、抗 NGF 染色で染色された細胞を同定するために、神経細胞のマーカーとして抗 MAP-2 抗体、反応性アストロサイトのマーカーとして抗 GFAP 抗体を用いた。

統計処理は、運動機能評価および神経学的評価は、四方位数 (quartile) で算出した。その他の評価項目は、平均と標準偏差を算出した。全項目、2 次元配置分散分析を行った。統計学有意は、 $p < 0.05$  とした。

結果として、経時的体重計測では IE 群・IC 群の有意な差はみられず、今回の運動強度はラットに対してストレスとなるような負荷ではなかった。また、術後すぐに IE 群・IC 群ともに運動機能評価および神経学的評価で低下を認めたが、IE 群では術後 7 日より回復がみられ、28 日後で

は IC 群に比べて IE 群が有意に運動機能評価および神経学的評価で回復を認めた。脳梗塞巣体積率では、術後 28 日で IE 群( $12.4 \pm 0.8\%$ )が IC 群( $19.8 \pm 4.2\%$ )に比べて有意に脳梗塞巣体積の縮小がみられた。Midkine の発現は、両群ともに術後 1 日より発現し術後 3 日でピークになり、術後 7 日ではほとんど発現はみられなくなった。術後 3 日で IE 群が IC 群に比べて有意に発現が増していた。また、NGF は、術後早期から 28 日後まで発現がみられた。術後 28 日で IE 群が IC 群に比べて有意に発現が増していた。また、28 日後の NGF が発現している細胞は、神経細胞 (MAP-2 陽性細胞) が IE 群で  $70 \pm 3.2\%$ 、IC 群で  $65 \pm 0.7\%$  で、アストロサイト (GFAP 陽性細胞) は、IE 群で  $30 \pm 3.2\%$ 、IC 群で  $35 \pm 0.7\%$  であった。PECAM-1 は、全期間で IE 群が IC 群に比べて発現が多く、特に術後 3、7、14 日で IE 群が IC 群に比べて有意に発現が増していた。Caspase-3 の発現は、全期間で IE 群が IC 群に比べて発現が少なく、特に術後 5、14 日で IE 群が IC 群に比べて有意に発現が減少していた。

今回の研究より、脳梗塞後、早期より軽度の運動療法を介入することで、神経成長因子や新生血管の発現量が促進され、神経脱落を抑制している可能性や、運動開始比較的早期の時期に新生血管が増し、その結果、神経成長因子などが梗塞巣周辺部へ供給され、その結果、神経細胞死を抑制していることが考えられた。

## 論文審査の要旨

|   |          |       |    |       |
|---|----------|-------|----|-------|
| 報告番号  | 保研 第 2 号 |       | 氏名 | 松田 史代 |
| 審査委員  | 主査       | 米 和徳  |    |       |
|   | 副査       | 吉田 愛知 | 副査 | 木佐貫 彰 |
|   | 副査       | 吉元 洋一 | 副査 | 築瀬 誠  |
| <p><b>The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats</b><br/> (実験的脳梗塞ラットにおける早期運動介入が脳損傷と回復に与える影響について)</p> <p>主査及び副査の5名は、平成22年9月24日16時から17時15分にかけて、学位請求者 松田史代 に論文発表を行わせ、論文審査を実施した。その発表要旨と審査結果は以下のとおりであった。</p> <p>【はじめに】<br/> 運動により、脳血管障害後の神経栄養因子Midkineと神経成長因子 (NGF) が、神経細胞死や神経修復にどのように働いているのか検討した。</p> <p>【方法】<br/> Wistar 系雄性ラット 77 匹を使用し、脳梗塞作成後 1 日よりトレッドミル運動を最大 28 日間行う ischemia-exercise (IE) 群 (n = 36)、脳梗塞作成後運動を行わない ischemia-control (IC) 群 (n = 36)、Sham 術後 28 日間トレッドミル運動を行う sham-exercise (SE) 群 (n = 5) の 3 群に無作為にわけた。90 分間塞栓糸を留置し中大脳動脈領域を虚血状態にし脳梗塞を作成した。術後 1 日より、IE 群および SE 群では 1 日 20 分最大 13m/分の運動を最大連続 28 日間行った。IE 群と IC 群は、術後 1,3,5,7,14,28 日 (それぞれ各 6 匹ずつ) に運動機能評価および神経学的評価、体重測定、脳を摘出し TTC 染色し脳梗塞体積率を計測した。脳切片を作成し免疫組織学染色 (抗 Midkine 染色、抗 NGF 染色、抗 PECAM-1 染色、抗 Caspase-3 染色) および二重蛍光染色 (抗 MAP-2 抗体、抗 GFAP 抗体) を行った。統計処理は、運動機能評価および神経学的評価は、四方位数 (quartile) で、その他の評価項目は、平均と標準偏差で表示した。全項目、2 次元配置分散分析を行った。統計学有意は、<math>p &lt; 0.05</math> とした。</p> <p>【結果】<br/> 術後 IE 群・IC 群ともに運動機能評価・神経学的評価で低下を認めたが、28 日後では IC 群に比べて IE 群が有意に運動機能評価および神経学的評価で回復を認めた。脳梗塞巣体積率では、術後 28 日で IE 群 (<math>12.4 \pm 0.8\%</math>) が IC 群 (<math>19.8 \pm 4.2\%</math>) に比べて有意に脳梗塞巣体積の縮小がみられた。Midkine の発現は、術後 3 日で IE 群が IC 群に比べて有意に発現が増していた。また、NGF は、術後 28 日で IE 群が IC 群に比べて有意に発現が増していた。PECAM-1 は、術後 3、7、14 日で IE 群が IC 群に比べて有意に発現が増していた。Caspase-3 の発現は、術後 5、14 日で IE 群が IC 群に比べて有意に発現が減少していた。</p> <p>【考察】<br/> 今回の研究より、脳梗塞後、早期より軽度の運動療法を介入することで、神経成長因子や新生血管の発現量が促進され、神経脱落を抑制している可能性や、運動開始比較的早期の時期に新生血管が増し、神経成長因子などが梗塞巣周辺部へ供給され、その結果、神経細胞死を抑制していることが考えられた。</p> <p>本研究によって得られた結果は、脳梗塞後の理学療法の発展に寄与するものであり、したがって、5 名の審査委員は本論文が博士 (保健学) の学位論文として十分な価値を有するものであると判定した。</p> |          |       |    |       |

## 最終試験の結果の要旨

|  |          |       |    |       |
|--|----------|-------|----|-------|
| 報告番号   | 保研 第 2 号 |       | 氏名 | 松田 史代 |
| 審査委員   | 主査       | 米 和徳  |    |       |
|  | 副査       | 吉田 愛知 | 副査 | 木佐貫 彰 |
|  | 副査       | 吉元 洋一 | 副査 | 築瀬 誠  |
| <p><b>The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats</b><br/> (実験的脳梗塞ラットにおける早期運動介入が脳損傷と回復に与える影響について)</p> <p>主査及び副査の5名は、平成22年9月24日16時から17時15分にかけて、学位請求者 松田史代 に対し、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>【質問】運動介入の方法は、トレッドミル運動以外にもあるのか。また、個体による運動差はあったのか。</p> <p>【回答】トレッドミル運動以外にも、ローターロッドや豊かな環境で飼育する方法で検討している論文はあるが、トレッドミル運動が最も単純な運動であり、バランスなどの他の因子を考えなく行え、かつ費用の面でも実行しやすかったために、今回はトレッドミル運動を行った。脳梗塞作成後、運動障害が出現するが、個体差による影響は、多くのラットが運動機能評価でスコア0~1、神経学評価でスコア2~3とバラツキが少なく同程度の麻痺レベルを作成できたことと、最初の運動開始強度が非常にゆっくりとしたものであり、個体差による影響はみられなかった。</p> <p>【質問】閉塞時間を90分とした理由は何か。</p> <p>【回答】60分や120分の閉塞時間も先行研究で行って検討したが、60分では麻痺が軽度であり、120分では梗塞が大きくなり、90分の閉塞時間が今回の実験には一番適した時間であったため行った。</p> <p>【質問】今回のトレッドミル運動の強度は、人間ではどの程度の強度となるのか。</p> <p>【回答】今回は毎分3mから運動を開始し、最終的には毎分13mの運動強度とした。他の正常ラットの研究で、毎分16-20mでVo<sub>2max</sub>55%との報告があり、比較するととても軽度な運動強度であると考えられる。</p> <p>【質問】脳梗塞の作成は技術的に難しいのか。</p> <p>【回答】一定レベルの麻痺を同じように作成できるように3カ月近く練習し、同等レベルの麻痺・梗塞を作成できるのを確認してから、本研究を行った。</p> <p>【質問】NGFはどの細胞が産出しているのか。</p> <p>【回答】先行研究で、アストロサイトで産生されることがわかっている。</p> <p>【質問】NGFは増殖に関与しているのか。</p> <p>【回答】NGFの働きとしては、神経細胞の分化・成熟および維持に働いている。</p> <p>【質問】脳梗塞作成で中大脳動脈分岐部に入った確認は行っているのか。</p> <p>【回答】可視化ではわからないが、塞栓系を入れたわずかな感覚と、塞栓系挿入前後で、側頭部より脳血流量を計測し、挿入後に挿入前の20%以下に脳血流量が低下していることを確認している。</p> |          |       |    |       |

【質問】 本文21頁の3行目の「Fig.4」の表記は「Fig.5」ではないのか。

【回答】 Fig.5の間違いである。

【質問】 MKの発現ピークは3日後で、麻痺の回復は28日後のタイム差は何か。

【回答】 栄養因子が発現したからすぐ機能的回復が起こるとは考えにくく、血管新生やアポトーシスなどの複合的な因子の結果、機能回復が起こるので、タイムラグがあることは考えられる。

【質問】 統計で四方位数と標準偏差の違いはなにか。

【回答】 運動機能・神経学的評価は、順位尺度であり平均では表記できないため、今回、四方位数を使用した。

【質問】 統計で2元配置分散分析をした後に、follow up ANOVAをするのは何故か。

【回答】 二元配置分散分析の結果、交互作用 (interaction) があることが重要で、今回はほとんどの検討項目で交互作用がみられ、交互作用がある場合は、一元配置分散分析を行うとの手順がある。

【質問】 運動によりペナンプラ領域の神経が、死んでいて回復したのか、もしくは生きて仮死状態から回復したのか。

【回答】 ペナンプラ領域の神経細胞は、虚血状態に陥り死んでしまった細胞と仮死 (休眠) 状態の神経細胞が入れ混じっており、今回の研究では、運動により仮死 (休眠) 状態の神経細胞が遅発性細胞死を起こさずに救えたことが考えられる。

【質問】 ペナンプラ領域を高圧酸素療法や低酸素療法でも救えるのか。

【回答】 検討したことはないのですが、断言はできないが、脳梗塞後の治療ターゲットは、ペナンプラ領域の遅発性細胞死抑制である。

【質問】 遅発性細胞死は、アポトーシスによる細胞死か。

【回答】 アポトーシスによる細胞死だと考える。

【質問】 壊死した (梗塞) 部分の計測方法はどのようにしているのか。

【回答】 脳梗塞体積測定で世界的に使用されている計算式があり、その式を用いて算出している。

【質問】 統計で順位尺度に2元配置分散分析を行っているが、ノンパラメトリックではないのか。

【回答】 順位尺度は確かにノンパラメトリックだが、2元配置分散分析にノンパラメトリックはなく、2元配置分散分析が唯一行える。

以上の結果から、5名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と識見を十分に具備しているものと判断し、博士 (保健学) の学位を与えるに足る資格をもつものと認めた。