

脳梗塞後と脳出血後における理学療法効果の比較検証による脳卒中病型別理学療法法の開発

玉越敬悟 (PT)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

キーワード：脳出血，脳梗塞，運動介入

はじめに

脳卒中は、我が国における死亡の原因として悪性新生物、心疾患、肺炎に次いで第4位である。また、要介護状態に至る原因としては認知症に次いで多い。脳卒中は、脳出血および脳梗塞に大きく分類される。脳梗塞では、脳血管の閉塞により脳血流量が低下し、虚血状態が持続することによって脳損傷を引き起こす。一方、脳出血は、脳血管の破裂によって脳内の血腫が脳損傷の要因となる。このように脳梗塞と脳出血では病態の発症機序が異なるため、機能予後も異なる。脳卒中モデルラットを用いた基礎研究では、損傷部位を大脳皮質と線条体に局限し、同程度の大きさの脳損傷を呈した脳出血ラットと脳梗塞ラットの自然回復における運動機能回復を比較検証した研究があり、その研究では脳出血の方が脳梗塞より機能回復が早いことが示されている¹⁾。線条体に局限した同程度の大きさの脳傷害をもつ脳出血モデルラットと脳梗塞モデルラットを比較検証した報告においても、脳出血は脳梗塞と比較して機能回復が早く、脳萎縮の進行が遅いことが示されている²⁾。また、同程度の脳傷害を負った脳梗塞と脳出血の患者にリハビリテーションを行い、機能回復の程度を比較した臨床研究では、脳梗塞患者の機能回復は脳出血患者と比較して遅いことが示されている³⁻⁵⁾。このことから、脳出血と脳梗塞では脳内改善機序が異なり、リハビリテーションによる効果も異なる可能性があると考えられる。しかし、脳卒中ガイドラインでは、病型別リハビリテーションは推奨グレードが低く、病型別に治療方針を記載していないため、病型別リハビリテーションの治療方針を策定する必要があると考えられる。

我々はこれまでの研究で、脳傷害の部位や大きさを統一させた脳梗塞と脳出血のモデル動物を開発した。そして、両者の運動機能障害を比較検証したところ、脳梗塞と脳出血は自然回復過程が異なることを明らかにした²⁾。しかし、病型別理学療法法の開発には至っていないため、本研究では傷害の部位と大きさを同程度にした脳梗塞と脳出血のモデル動物を用いて、同運動療法の効果と比較検証することを目的とした。

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=15) 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 (承認番号：26021) を得て行った。実験群には偽手術群 (n=14)、脳出血群 (n=14)、脳梗塞群 (n=14)、脳出血+運動群 (n=14)、脳梗塞+運動群 (n=14) を設けた。

2. 脳卒中モデルラットの作製

ベントバルビタールナトリウム腹腔内投与麻酔下にて、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、ドリルでブ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。脳出血モデルラットの作製には血管壁を脆弱化させるコラゲナーゼ (TypeIV, 200 U, 2.0 ul, Sigma 社)、脳梗塞モデルラットの作製には血管を攣縮させるエンドセリン-1 (400 pmol, 2.0 ul, Calbiochem 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 10 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. 運動機能評価

運動機能評価には Rota-rod test を使用した。5 分間で 40 rpm まで加速回転する円柱の上にラットを乗せ、円柱から落下するまでの時間を計測した。個体あたり 5 回実施し、平均値を算出した。

4. 組織学的評価

術後 29 日目に深麻酔下にて 0.9% 生理食塩水で経心的に脱血を行った後、4% パラフォルムアルデヒドで灌流固定を行った。脳組織を採取し、同溶液で後固定を行った。ブレグマを起点に前方 +1.4 mm から 500 μ m ごとに 6 枚の凍結切片を作製し、クレシルバイオレット溶液を用いて染色を行った。画像解析ソフト ImageJ を用いて傷害体積およびペナンプラ体積を解析した。また、蛍光免疫組織化学染色法を用いて GFAP (glial fibrillary acidic protein) 陽性細胞を標識した。解析範囲は、ペナンプラ領域の平均範囲とした。GFAP 陽性細胞数のカウントは ImageJ を用いた。

5. タンパク発現量解析

ラットを深麻酔下におき、生理食塩水を用いて灌流脱血を行った後、脳を採取し、on ice にて線条体をトリミングした。採取した組織は急速凍結後に -80°C の超低温冷凍庫で保存した。タンパク発現量解析にはウェスタンブロットティング法を用いた。はじめに、Protein inhibitor を含んだ RIPA buffer 内で組織のホモジナイズを行い液

状化した。その後、Biospec-nano (SHIMADZU) で総タンパク質濃度を測定した。全サンプル 10 ng 量のタンパクを電気泳動装置で分離した後、PVDF (poly vinylidene di-fluoride) 膜にブロッティングした。抗 PSD95 抗体を用いて標識し、化学発光により発現量解析を行った。発現量解析には画像解析ソフト imageJ を用いて行った。

6. 統計学的手法

Rota-rod の結果は、二元配置分散分析および Turkey 法にて統計処理を行った。組織損傷体積、GFAP 陽性細胞数、PSD95 (postsynaptic density protein 95) タンパク発現量の結果は、一元配置分散分析および Turkey 法にて統計処理を行った。

結 果

発症 28 日目において、脳出血群および脳出血 + 運動群の運動機能障害は脳梗塞群と比較して有意な改善を認めた。脳出血 + 運動群および脳梗塞 + 運動群は、それぞれの対照群と比較して運動機能障害の有意な改善は見られなかった。組織損傷体積は全群間に有意差はなかった。しかし、脳梗塞 + 運動群のペナンプラ体積は脳梗塞群と比較して有意に低値を示した。脳梗塞 + 運動群の GFAP 陽性細胞数は脳梗塞群と比較して増加傾向にあった。PSD95 タンパク発現量は全群間に有意差はなかった。

考 察

本研究は、脳損傷を同部位、同程度の大きさにした脳梗塞モデルラットと脳出血モデルラットを用いて同運動条件の介入効果を検証した。脳梗塞および脳出血ともに運動介入による運動機能改善効果は認められなかったが、脳梗塞ではペナンプラの縮小と GFAP 陽性細胞数の増加が認められた。ペナンプラ領域は、血流量が低下しているが神経細胞死を免れている細胞もあり、運動によって改善を期待できる領域である。先行研究では、ペナンプラ領域周辺の回復は脳梗塞の機能回復に寄与しているといわれており、特に、GFAP 発現量の増加が機能回復に関与していることが報告されている⁶⁾。また、梗塞巣周囲のアストロサイトが血管のリモデリングを促進させ、脳卒中後の機能回復促進に関与している可能性が示唆されている⁷⁾。そのため、運動介入によって増加した

GFAP 発現量がペナンプラ領域の縮小に関与している可能性が高い。一方、脳出血後にトレッドミル運動介入を実施した群では、運動機能の改善および GFAP 陽性細胞数に変化は見られなかった。Caliaperumal らは、出血発症 7 日後から 2 週間のリーチトレーニングは血腫周囲の GFAP 陽性細胞数を変化させないことを報告している⁸⁾。そのため、本研究の結果と類似しているといえる。しかし、本研究では、脳出血、脳梗塞ともに運動介入によって PSD95 発現量の変化が見られなかったため、シナプスへの影響はなかった可能性がある。アストロサイトによる脳内改善機序への関与についてさらなる検証が必要であるが、本研究から脳出血と脳梗塞では、運動介入による脳内改善機序が異なることが示唆された。

文 献

- 1) Mestriner RG, Miguel PM, *et al.*: Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats. *Behav Brain Res.* 2013; 244: 82-89.
- 2) Tamakoshi K, Kondo H, *et al.*: A Comparison of Motor Functional Recovery and Brain Damage between Striatal Lesions Induced by Ischemia and Hemorrhage in Rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2020; 29: 104668.
- 3) Paolucci S, Antonucci G, *et al.*: Functional outcome of ischemic and hemorrhagic stroke patients after inpatient rehabilitation: a matched comparison. *Stroke.* 2003; 34: 2861-2865.
- 4) Katrak PH, Black D, *et al.*: Do stroke patients with intracerebral hemorrhage have a better functional outcome than patients with cerebral infarction? *PM R.* 2009; 1: 427-433.
- 5) Kelly PJ, Furie KL, *et al.*: Functional recovery following rehabilitation after hemorrhagic and ischemic stroke. *Arch Phys Med Rehabil.* 2003; 84: 968-972.
- 6) Choudhury GR, Ding S: Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. *Neurobiol Dis.* 2016; 85: 234-244.
- 7) Hayakawa K, Nakano T, *et al.*: Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010; 30: 871-882.
- 8) Caliaperumal J, Colbourne F: Rehabilitation improves behavioral recovery and lessens cell death without affecting iron, ferritin, transferrin, or inflammation after intracerebral hemorrhage in rats. *Neurorehabil Neural Repair.* 2014; 28: 395-404.