

脳出血モデルラットにおける超急性期理学療法の効果に関する基礎医学的検証

玉越敬悟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，超急性期理学療法，炎症促進因子

はじめに

近年、大規模な臨床研究で、発症後 24 時間以内の超急性期介入は通常介入よりも機能予後が悪いことが報告された¹⁾。脳梗塞モデルラットを用いた基礎研究においても、超急性期介入が機能予後を悪化させることが報告されている。それらの報告では、脳梗塞後 24 時間以内の運動介入は、炎症促進因子やアポトーシス促進因子の発現を増加促進し、神経細胞死を促進することが示されている²⁻⁴⁾。これらの報告を踏まえ、近年、脳卒中後の超急性期リハビリテーションの是非が国際的に議論されている。

我々は、これまでの研究で、コラゲナーゼ注入法による線条体出血モデルラットを用いて、脳出血発症後 24 時間以内の運動介入が運動機能障害に与える影響について検証した。ラットに梯子の上を渡らせて梯子の掴み方から運動機能を評価する Horizontal ladder test を用いて、発症後 24 時間以内にトレッドミル走行をさせた超急性期介入群と非介入群を比較検証した。その結果、超急性期介入群は非介入群と比較して梯子を正確に掴むことができなくなり、さらに、前肢が梯子から落下する割合が多くなった。これらの結果から、脳出血後 24 時間以内の運動介入は、脳内に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、本研究では、脳出血発症後 24 時間以内の運動介入が、血腫および脳浮腫に与える影響について検証した。また、感覚運動野における炎症促進因子（インターロイキン- 1β ：以下、IL- 1β ）の mRNA 発現量を検証した。

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=40) 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 + 超早期介入群 (ICH+VET；n=13) の 3 群を設けた。

2. 脳出血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醉下にて、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. 運動介入条件

運動介入にはトレッドミル走行を用いて、発症 6 時間後と 24 時間後に実施した。走行速度は、発症 6 時間後は 9 m/分、24 時間後は 11 m/分とし、走行時間は 60 分とした。

4. 血腫・脳浮腫の解析

介入終了 3 時間後に組織採取を行った。血腫体積は、500 μ m 厚の凍結切片を作製し、imageJ を用いて解析した。解析結果は、反対側半球に対する割合で示した。脳浮腫の評価は脳内水分含有量で評価した。脳水分含有量は、脳摘出直後の脳重量 (wet weight) および 100°C で 24 時間乾燥させた後の脳重量 (dry weight) を用いて、Wet-dry 法により算出した。

5. mRNA 発現量解析

実験終了 3 時間後に傷害側感覚運動野を採取し、リアルタイム PCR 法を用いて、IL- 1β の mRNA 発現量を $\Delta\Delta$ Ct 法にて定量化した。

結 果

血腫体積は全群間に有意差はなかった (ICH 群：16.5 \pm 1.64%，ICH+VET 群：14.3 \pm 1.24%)。脳浮腫は、SHAM 群と比較して、ICH 群と ICH+VET 群は有意に高値を示したが、ICH 群と ICH+VET 群の間には有意差はなかった (SHAM 群：78.5 \pm 0.14 %，ICH 群：79.5 \pm 0.24 %，ICH+VET 群：79.3 \pm 0.26%)。IL- 1β の mRNA 発現量において、ICH+VET 群は SHAM 群より有意に高値を示した (SHAM 群：1.02 \pm 0.21，ICH 群：1.67 \pm 0.53，ICH+VET 群：2.06 \pm 0.92)。

考 察

本研究は、脳出血モデルラットを用いて、脳出血 24 時間以内の運動介入が、血腫、脳浮腫、炎症促進因子に及ぼす影響について検証した。本検証から脳出血 24 時間以内の運動介入は、血腫および脳浮腫を増悪させないが、感覚運動野における炎症促進因子の増加を促進させることが明らかとなった。脳卒中発症後早期の段階で

は、傷害部位においてM1ミクログリアが活性化し、炎症促進因子を発現する⁵⁾。脳出血発症後のM1ミクログリア活性化は血腫周辺だけでなく、感覚運動野においても起こることが確認されている⁶⁾⁷⁾。大脳皮質損傷モデルラットを用いた検証において、早期介入は後期介入と比較してM1ミクログリアを活性化させることが示されている⁸⁾。M1ミクログリアの活動期における運動介入は、M1ミクログリアの活性化促進につながる可能性が考えられる。そのため、脳出血発症24時間以内の運動介入は、M1ミクログリアの活性化を促進させた可能性が考えられる。脳卒中発症後の炎症促進因子の増加は、神経細胞死の誘導や神経増殖の阻害に関与するため、運動機能回復の障壁となる⁵⁾⁹⁾。今後、脳出血発症24時間以内の運動介入は、炎症促進因子の発現を考慮した介入開始時期や至適条件を検証する必要があるといえる。

文 献

- 1) group AVERT Trial Collaboration: Efficacy and safety of very early mobilisation within 24 h of stroke onset (AVERT): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2015; 386: 46-55.
- 2) Li F, Pendy JT, *et al.*: Exercise rehabilitation immediately following ischemic stroke exacerbates inflammatory injury. *Neurol Res*. 2017; 39: 530-537.
- 3) Li F, Shi W, *et al.*: Enhanced apoptosis from early physical exercise rehabilitation following ischemic stroke. *J Neurosci Res*. 2017; 95: 1017-1024.
- 4) Li F, Geng X, *et al.*: Exacerbation of brain injury by post-stroke exercise is contingent upon exercise initiation timing. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2017; 11: 311.
- 5) Xiong XY, Liu L, *et al.*: Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog Neurobiol*. 2016; 142: 23-44.
- 6) Zhao X, Sun G, *et al.*: Hematoma resolution as a target for intracerebral hemorrhage treatment: role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in microglia/macrophages. *Ann Neurol*. 2007; 61: 352-362.
- 7) Neves JD, Aristimunha D, *et al.*: Glial-associated changes in the cerebral cortex after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in the rat striatum. *Brain Res Bull*. 2017; 134: 55-62.
- 8) Piao CS, Stoica BA, *et al.*: Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*. 2013; 54: 252-263.
- 9) Wu MD, Montgomery SL, *et al.*: Sustained IL-1 β expression impairs adult hippocampal neurogenesis independent of IL-1 signaling in nestin+ neural precursor cells. *Brain Behav Immun*. 2013; 32: 9-18.

発表実績

- 1) Tamakoshi K, Ishida K, Hayao H, Takahashi H, Tamaki H: Early rehabilitation inhibits inflammation and aids motor function recovery after intracerebral hemorrhage in rats. The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society(Kobe), 2018.7.26 ~ 7.29.
- 2) 玉越敬悟, 石田和人, 高橋英明, 早尾啓志, 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障害および大脳皮質感覚運動野に及ぼす影響. 第25回脳機能とリハビリテーション研究会学術集会(千葉), 2018.8.19
- 3) 玉越敬悟, 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中枢神経系に及ぼす影響. 第26回日本運動生理学会(大阪), 2018.7.28 ~ 29
- 4) 玉越敬悟, 石田和人, 高橋英明, 早尾啓志, 田巻弘之: 脳梗塞後および脳出血後の運動介入が運動機能改善および組織傷害に与える効果の比較検証. 第23回日本基礎理学療法学会学術大会(京都), 2018.12.15 ~ 16
- 5) 玉越敬悟, 石田和人, 高橋英明, 早尾啓志, 田巻弘之: 脳出血後の早期運動介入は感覚運動野における樹状突起の退縮と神経細胞死を抑制する. 第61回脳循環代謝学会(岩手), 2018.10.19 ~ 20
- 6) Tamakoshi K, Hayao K, Takahashi H, Tamaki H: Early exercise inhibits inflammation and promotes neuroprotection in intracerebral hemorrhage rats. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (Kobe), 2019.3.28 ~ 31
- 7) 河本絵美, 玉越敬悟, 羅成圭, 増田紘之, 川中健太郎: 不活動はラット骨格筋のTXNIP遺伝子発現とインスリン抵抗性を誘導する. 第73回日本体力医学会(福井), 2018.9.7 ~ 9
- 8) 赤塚菜穂, 玉越敬悟, 高橋英明, 早尾啓志, 田巻弘之: 脳梗塞後および脳出血後の運動介入が運動機能障害および組織傷害・シナプス関連タンパクに与える効果の比較検証—モデル動物を用いた検証—. 第18回新潟医療福祉学会学術集会(新潟), 2018.10.27