



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1949号
学位記番号	第1379号
氏名	坪井 義晃
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	Habilitation Improves Mouse Gait Development Following Neonatal Brain Injury (ハビリテーションによって新生児脳傷害マウスの歩行は改善する)  Progress in Rehabilitation Medicine 2022; Vol. 7, 20220061:1-9.
論文審査担当者	主査： 植木 美乃 副査： 飛田 秀樹, 松川 則之

## 論文内容の要旨

目的: 歩行発達前の新生児の脳損傷は、神経回路を混乱させ、恒久的な歩行機能障害を引き起こす。既に獲得した機能が障害された際に再び機能獲得を目指す手法としてリハビリテーションがよく知られているが、今回対象としている新生児のように未だ獲得をしていない機能の開発を支援する手法を”ハビリテーション”と呼んでいる。障害のある歩行機能を改善するための介入としてのリハビリテーションは、成人の脳卒中および脊髄損傷の治療として使用されてきた。一方で新生児はより高い神経可塑性と再生能力を有しているが、新生児の脳損傷後の歩行機能に対するハビリテーションの影響はほとんど知られていない。脳損傷後の歩行機能解析は、代表的な実験動物であるマウスを用いて研究されることが多いが、マウス新生仔期の歩行発達についても分かっていない。本研究では、新生仔マウスを用いて、マウスの正常歩行発達過程について明らかにすると共に、新生仔脳傷害マウスに対してハビリテーションを導入することで脳傷害に伴う歩行機能障害におけるハビリテーションの効果を調査した。

方法: 本研究では、生後 2 日齢マウスに凍結脳傷害を与え、その後 4 週間、自律的な四肢の動きを促進するためのハビリテイティブトレーニングを実施した。ハビリテイティブトレーニングは、傷害翌日よりマウスをゴム性ベルトで宙づりにして、四肢の運動を制限することなく自動運動を促進することで実施した。はじめに、グリア細胞の免疫染色を実施し、脳傷害体積を算出した。次いで、foot fault test によって脳傷害およびハビリテーションによる影響を検討した。さらに、歩行解析装置である Catwalk XT システムを使用して、生後 2,3,4 週におけるマウス歩行獲得過程並びに脳傷害およびハビリテーション導入による歩行獲得過程の変化を定量的に分析した。

結果: 生後 30 日で脳傷害の体積を測定した結果、傷害単独およびハビリテーション導入による変化を認めなかった。また foot fault test では、傷害によって患側の機能が低下していることを確認し、ハビリテーションの導入によって傷害による機能低下が正常水準まで改善することが明らかになった。

定量的歩行解析装置 CatwalkXT を用いてマウスの正常歩行発達過程を調べるため、body speed、swing speed、max contact max intensity、max contact mean intensity という 4 種のパラメーターの変化を解析した。その結果、歩行周期における遊脚期のパラメーターである swing speed が生後 2 週から 3 週にかけて有意に上昇した。一方で、立脚期中の足底機能を反映する intensity (足底接地圧) は 2 週から 3 週に上昇したのち、3 週から 4 週では低下したことから、ヒトの足底機能の成熟過程でも観察される足底接地圧の低下がマウスでも観察されることが示唆された。以上の結果から、マウスの正常歩行発達過程において、遊脚期の機能が先行して成熟した後に、立脚期の機能が成熟することを示した。

脳傷害を受けた新生仔マウスに対するハビリテーションが歩行発達に与える影響を調べるため、CatwalkXT を用いて歩行パターンを解析した。その結果、歩行機能の獲得が障害されたマウスにおいて、床に接地せずにゴムバンドで吊るすことで能動的な四肢の動きが強化されるハビリテーションが、body speed、swing speed の改善に効果があることが分かった。一方で足底機能を反映するパラメーターでは改善を認めなかった。

考察: 今回の研究で、歩行機能の獲得過程は、ヒトでも見られるように、マウスにおいても近位より発達することが明らかになった。本研究で明らかになった、発達に伴う足底の接地圧の減少

は、ヒトで知られるロッカー機能と同様の機構がマウスでも存在することを示唆しており、足底機能の発達が近位筋よりも遅延して、出現することに合致する。また、傷害早期よりのハビリテーションの導入により、マウスにおいて歩行機能を含む運動学習を促進することも実証した。本研究では、ハビリテーションによって障害された足底機能を改善させることができなかったため、今後の課題として、荷重を含む足底刺激を促すハビリテーションを開発することやハビリテーションが脳障害に伴う運動機能障害の改善に寄与するメカニズムを神経細胞や脳の可塑性といった細胞、組織レベルで明らかにしていくことが挙げられる。

.....

結論 本研究結果は、マウスの歩行発達に関する研究の基盤を提供し、低酸素性虚血性脳症や脳室周囲白質軟化症などの周産期脳疾患によって引き起こされる歩行発達障害に対する新しいハビリテーション戦略を提唱している。

## 論文審査の結果の要旨

### 1. 審査論文の要旨

【はじめに】歩行発達中の新生児の脳損傷は、神経回路を混乱させ、恒久的な歩行機能障害を引き起こす。障害のある歩行機能を改善するための介入としてのリハビリテーションは、神経障害の治療としても成人に使用される。しかし、新生児は成人よりも優れた神経可塑性と再生能力を持っているが、正常な歩行発達と、新生児の脳損傷後の歩行機能に対するリハビリテーションの影響はほとんど知られていない。【方法】生後 2 日目にマウスに凍結脳損傷を作成し、その後 4 週間、自律的な四肢の動きを促進するためのリハビリテーションを実施した。歩行解析装置である Catwalk XT システムを使用して、body speed, swing speed 等を記録し、生後 2, 3, 4 週におけるマウス歩行獲得並びにリハビリテーション導入による歩行獲得過程の変化を定量的に解析した。【結果】定量的歩行分析を使用して、マウスの通常の歩行発達では、立脚期機能が遊脚期機能よりも遅く成熟することを示した。また、新生児の脳損傷により歩行機能の獲得が障害されたマウスにおいて、能動的な四肢の動きが強化されたリハビリテーションが、body speed, swing speed の改善に効果を認めた。【考察】本研究により、マウスの歩行発達にリハビリテーションが歩行機能を含む運動学習を促進することを実証した。周産期脳疾患によって引き起こされる歩行発達障害患者のための新しいリハビリテーション戦略の一助となる。

### 2. 審査内容の要旨

主査の植木教授より、傷害作製の技術的な正確性、脳性麻痺モデルマウスとしての妥当性、今後のリハビリテーションの方向性、脳可塑性の関与を解析する手法など 6 項目の質問があった。脳定位固定装置を利用して再現性良く脳傷害を作製していること、皮質の一部に限局した傷害である脳挫傷を選択し、限定的な範囲での運動機能障害を対象に検討をしたこと、今後の方向性としてハーネスのようなもので接地をとり入れたリハビリテーションを検討すること、免疫染色や蛍光タンパク質導入による神経回路の可視化が検討可能なこと等の回答があった。

続いて飛田教授より、central pattern generator (CPG) の関与や、Catwalk XT 使用の限界並びにその他の解析手法の可能性、今回の大学院生活で学んだことなど、9 項目の質問があった。また、傷害を考慮する上での TTC 染色の必要性や、実験デザインの不備に対して指摘があった。CPG の障害で起こりうる異常については、Catwalk 計測上のパラメーターに有意な変化が見られなかったこと、Catwalk で拾えない異常を検知するため側面よりの関節可動域の変化を計測する手法が考えられること、リサーチマインドに触れたこと等の回答があった。

最後に、松川教授よりマウスの神経発達過程から見た今回のモデルマウスの妥当性や、functional MRI の適応可能性、今回のリハビリテーション研究の継続性など 5 項目の質問に対して、今回のモデルは障害を単純化する目的で脳挫傷としていること、functional MRI はマウスモデルでの実施報告があること、リハビリテーションによる治療介入の可能性に興味があること等の回答があった。

申請者は審査員の質問に概ね良好な回答が得られ、本研究の背景、方法、結果を理解し、正しく解釈するとともに、臨床応用の可能性を考察できていると判断した。本研究は、新生児の脳損傷における早期リハビリテーションの有用性を提示し発展性を述べた重要な基礎研究である。したがって、申請者は学位（医学）を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 植木 美乃 副査 飛田 秀樹、松川 則之