

運動が化学療法誘因性末梢神経障害モデルラットに及ぼす影響

上村 心・友田亮平

本研究では、中強度の有酸素運動が化学療法誘因性末梢神経障害の発生と進行に及ぼす影響について検討した。実験動物には7週齢の Sprague Dawley ラット 32 匹を用い、これらを1) 対照群 (n = 11 匹), 2) 非運動群 (n = 11 匹), 3) 運動群 (n = 10 匹) の 3 群に振り分けた。非運動群および運動群にはパクリタキセル 2.0mg/kg を隔日 4 回腹腔内投与し、化学療法誘因性末梢神経障害を惹起させた。そして、運動群にはパクリタキセル投与開始後から中強度の有酸素運動を 2 週間負荷した。実験期間中は機械的刺激に対する痛覚閾値、熱痛覚閾値、活動量、体重、摂食量、バランス能力の評価を実施し、実験終了後は足底皮膚、坐骨神経、ヒラメ筋を採取して組織学的解析を行った。結果、熱痛覚閾値のみ非運動群と運動群との間で有意差を認めしたが、その他の項目と組織学的所見に差は見られなかった。以上のことから、今回行ったような有酸素運動は化学療法誘因性末梢神経障害の発生と進行に対する効果は少ないと考えられた。

はじめに

現在の本邦において、死因の第 1 位とは悪性腫瘍いわゆるがんとなっており、多くの患者はがん治療を受けている。そのがん治療は外科治療、放射線療法、化学療法の 3 つに分けられ、加えて緩和療法やリハビリテーションが行われている。リハビリテーションに関しては運動機能の向上、身体症状の改善、生活の質 (Quality of Life; QOL) の向上に効果があるとのエビデンスがあり、がん診療ガイドラインでも推奨されている¹⁾。ただ、がん患者のリハビリテーションにおいては様々な治療の副作用により難渋することがある。中でも化学療法はしびれや疼痛、吐き気、バランス能力低下などを惹起する化学療法誘因性末梢神経障害 (Chemotherapy-induced Peripheral Neuropathy: 以下, CIPN) は患者のリハビリテーションを妨げるだけでなく、QOL の低下を引き起こし、大きな問題となっている²⁾。しかし、CIPN に対する治療法ならびに効果的なリハビリの介入方法は確立されていない。

CIPN が生じると軸索や髄鞘変性、末梢血流量の減少がみられ、これらによってしびれや痛覚過敏または脱失、バランス能力の低下が引き起こされるという報告があるが²⁾、詳しいメカニズム

は未だ明らかになっていない。一方、CIPN と類似した症状を呈する糖尿病性末梢神経障害においては、血流低下による軸索や髄鞘変性、神経再生障害が原因となっていることが明らかにされている³⁾。また、これらの症状は有酸素運動によって予防・治療することが可能であると報告されている⁴⁾。これらを参考にすると、CIPN に対しても有酸素運動は有効であり、症状を抑制することができるのではないかと仮設できる。そこで本研究では、CIPN モデルラットを作成し、有酸素運動による予防効果を検討した。

材料と方法

1. 実験動物

実験動物には7週齢の Sprague Dawley 系雄性ラット 32 匹を用い、これらを無作為に通常飼育する対照群 (n = 11)、末梢神経障害を惹起させた後、通常飼育する非運動群 (n = 11)、末梢神経障害を惹起させた後、中強度の有酸素運動を負荷する運動群 (n = 10) の 3 群に振りわけた。なお、今回の実験は長崎大学が定める動物実験指針に準じ (許可番号: 1809051477)、長崎大学先端生命科学支援センター動物実験施設で実施した。



図2 実験プロトコル

2. 化学療法誘因性末梢神経障害モデルラットの作成方法

非運動群と運動群には抗がん剤の一種であるパクリタキセル 2.0mg/kg を隔日で4回腹腔内投与し、CIPNを惹起させた^{5,6)}。また、条件として3群とも餌および水は自由摂取とした。

3. 実験プロトコル

実験プロトコルを図1に示す。実験期間は7週齢から9週齢の計2週間とした。実験開始から1, 3, 5, 7日目にパクリタキセルを2.0mg/kg ずつ投与し、また0, 2, 5, 8, 11, 14日目に摂食量と体重の測定、0, 7, 15日目にその他の評価を実施した。実験終了後に足底皮膚、坐骨神経、ヒラメ筋を摘出した。

4. 運動方法

運動群に対しては、小動物用トレッドミル(シナノ製作所製, Model-SN460)を用いた有酸素運動を実施した。運動強度は中強度とされる分速20mで⁷⁻⁹⁾、1回の運動時間は15分間とし、また運動期間は投与期間も含めて7週齢から9週齢の計2週間、運動頻度は週5回とした。

5. 評価方法

行動学的解析として、機械的刺激に対する痛覚閾値、熱痛覚閾値、活動量、ビーム歩行テスト、ラダー歩行テスト、握力の6種類を評価した。機械的刺激に対する痛覚閾値の評価は、von Frey filament キット(North Coast Medical 社製)を用いて行い、弱いフィラメント(1g)から強いフィラメント(60g)へ順番に足底中心部に7秒間、2回ずつ押しあて、2回連続で回避行動をとったフィラメント強度を痛覚閾値として記録した。評価は

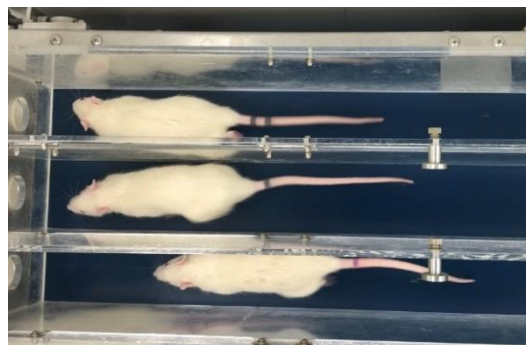


図1 トレッドミルでの運動の様子

左右ともに3回ずつ実施し、その平均値をデータとした。また、熱痛覚閾値の検査は、足底中心部にあてた小動物用熱刺激装置のプローブを42℃から徐々に温度を上昇させ、回避行動をとった時の温度を熱痛覚閾値として記録した。これも左右ともに3回ずつ実施した。活動量の評価は、自主的にラットが動いた回数をカウントする自発運動量測定装置(山下技研, HAMB2003)を用いて行い、記録時間は30分間とした。歩行バランスの評価を目的として実施したビーム歩行テストは、高さ50cm×距離2m×幅5cmの渡り橋をラットに歩行させ、後肢を踏み外した回数を記録した。前後肢の巧緻動作の評価を目的として実施したラダー歩行テストは、長さ120cmの滑りやすい梯子を歩行させ、前後肢を踏み外した回数を記録した。握力の検査は、重量ばかりに繋げた棒をラット両前肢で掴ませて引っ張り、ラットが棒を離れた時の力を握力として記録した。バランス、巧緻動作、握力の評価はすべて3回ずつ行い、その平均値をデータとした。その他の測定として体重および摂食量を3日間隔で測定した。

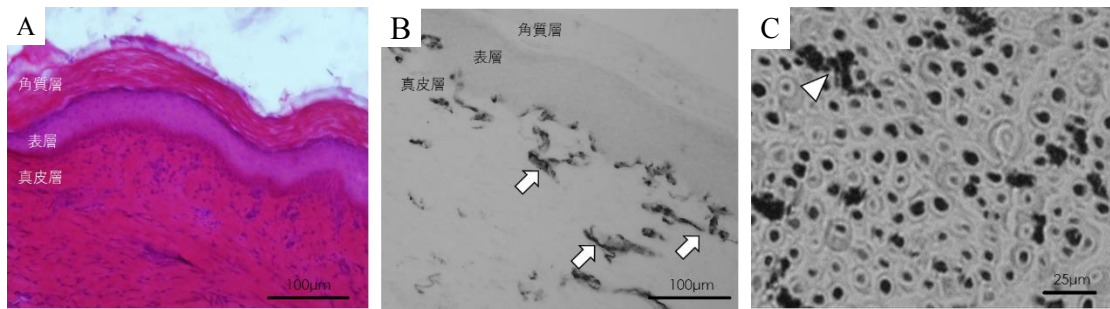


図3 染色像の例

A: 足底皮膚組織の HE 染色像. B: 皮膚組織の感覚神経線維(矢印)に対する免疫組織化学的染色像. C: 坐骨神経の感覚神経線維に対する免疫組織化学的染色像, 黒点に見えるのが有髄神経の軸索. 矢頭は無髄神経を示す.

6. 組織学的解析方法

実験終了後に足底皮膚, 坐骨神経, ヒラメ筋を採取し, 以下の解析を行った.

1) 皮膚組織

足底皮膚はトラガントガムに包埋した後, 液体窒素で冷却したイソペンタンの中で急速凍結した. 試料はクリオスタットを用いて 30 μ m 厚の凍結切片とし, その一部にはヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した. そして, 染色像を 100 倍率でコンピューターに取り込み, 画像解析ソフト Image J を用いて表皮厚を測定した. 測定は 1 画像あたり 7 カ所, 3 画像で行い, その平均値をデータとした.

また, 凍結切片の一部には末梢神経線維に対する免疫組織化学的染色を実施した. 一次抗体には感覚神経線維に対する抗 Peripherin 抗体 (Assay Biotechnology; Sunnyvale 社製; 1000 倍) を用い, 通法に従って行った. そして, 染色像を 100 倍率でコンピューターに取り込み, 表皮から深さ 100 μ m までの真皮に存在する陽性神経線

維をカウントし, それを測定面積で除して感覚神経密度を求めた. 測定は 3 画像で行い, その平均値をデータとした.

2) 坐骨神経

坐骨神経は 2.5% グルタルアルデヒドで固定した後, パラフィン包埋し, 厚さ 5 μ m のパラフィン切片とした. その後, 皮膚組織と同様の方法で感覚神経線維に対する免疫組織化学的染色を行い, 軸索を可視化した. そして, 染色像を 400 倍率でコンピューターに取り込み, 3 画像に含まれるすべての陽性軸索の直径と, その周囲の髄鞘厚を測定し, その平均値をデータとした.

3) ヒラメ筋

ヒラメ筋は筋湿重量を測定した後, 急速凍結して厚さ 10 μ m の凍結切片とし, HE 染色を行った. そして, 染色像を 100 倍率でコンピューターに取り込み, 筋線維 100 本の短径を測定し, その平均値をデータとした.

7. 統計解析

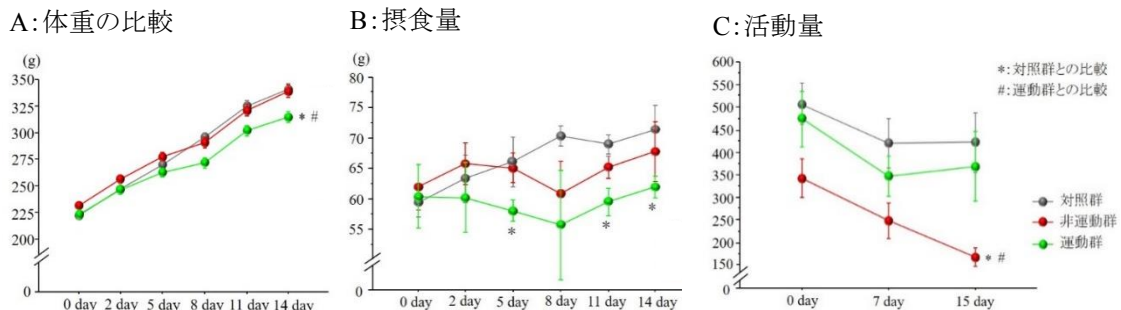
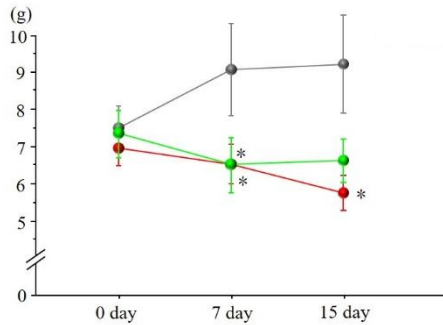


図4 体重, 活動量, 摂食量の比較

*: 対照群との比較 ($p < 0.05$), #: 非運動群との比較 ($p < 0.05$)

A: 機械的刺激に対する痛覚閾値



B: 熱痛覚閾値

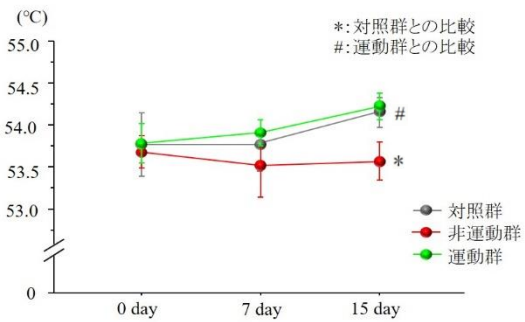


図5 痛覚閾値の比較

*: 対照群との比較 ($p < 0.05$), #: 非運動群との比較 ($p < 0.05$)

すべてのデータは平均±標準誤差で表した。統計学的解析には、全ての比較において一元配置分散分析(以下, ANOVA)を適応した。ANOVAにて有意差を認めた場合, 事後検定としてFisherのPLSD法を適用し, 各群間の比較を行った。なお, 有意水準は5%としました。

結果

1. 体重, 活動量, 摂食量の比較

対照群, 非運動群の2群に比べて運動群は体重の増加が緩やかであり, 実験開始から14日目時点で有意差が認められた(図5-A)。また, 実験群に摂食量においても対照群, 非運動群に比べ有意に少ない日が認められた(図5-B)。一方, 活動量は非運動群において対照群に比べて有意な低下が認められた。これに対して, 運動群は対照群と変わらなかった(図5-C)。

2. 痛覚閾値の比較

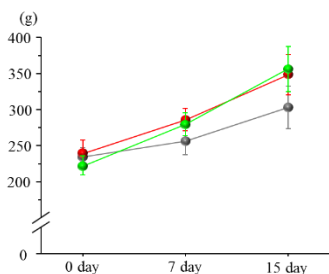
実験開始から7日および15日目において, 非運動群の機械的刺激に対する痛覚閾値は対照群に比べて有意に低値を示した。同様に, 運動群は対照群に比べて低値を示し, 7日目においては対照群との有意差も認められた(図5-A)。

一方, 熱痛覚閾値の推移を見ると, 非運動群は対照群より有意に低値を示したものの, 運動群は対照群と変わらなかった。また, 運動群と非運動群を比較する2群と有意差が認められた(図5-B)。

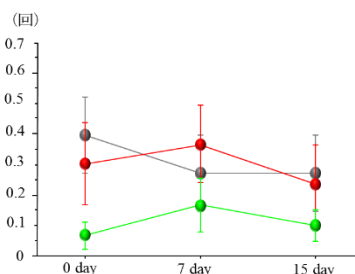
3. 握力, バランス, 巧緻動作テストの比較

握力は経過とともに3群とも上昇し, 3群間に差は認めなかった(図6-A)。ビーム歩行テストでは経過による変化および群間の有意差は認められず(図6-B), また, ラダー歩行においては若干の減少傾向は見られるものの3群とも同様な傾向を示し, 群間に有意差は認められなかった(図

A: 握力



B: ビーム歩行テスト



C: ラダー歩行

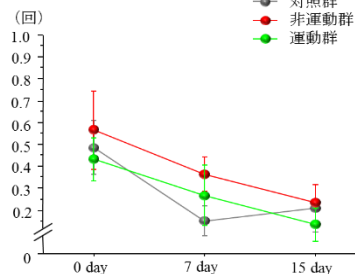


図6 握力, バランス能力, 巧緻動作能力の比較

ビーム歩行テスト(B)は後肢, ラダー歩行テスト(C)は前後肢を踏み外した回数を表す。

6-C).

4. 坐骨神経の比較

軸索の組織像を見ると、様々太さの有髄神経と無髄神経の軸索が可視化されており、また、有髄神経の髄鞘は無色であるものの明確に形態を観察することができた。ただ、無髄神経の軸索に関しては、複数の軸索が束になって存在していたため、1本の無髄神経の軸索を識別することは困難であった。そこで、陽性の有髄神経すなわち感覚神経線維の軸索のみの直径を測定したところ、対照群は $8.5 \pm 2.9 \mu\text{m}$ 、非運動群は $8.8 \pm 3.1 \mu\text{m}$ 、運動群は $8.2 \pm 2.8 \mu\text{m}$ であり、3群間に有意差は認められなかった。

一方、4. 感覚神経線維の髄鞘厚を測定して比較すると、対照群に比べて非運動群、運動群

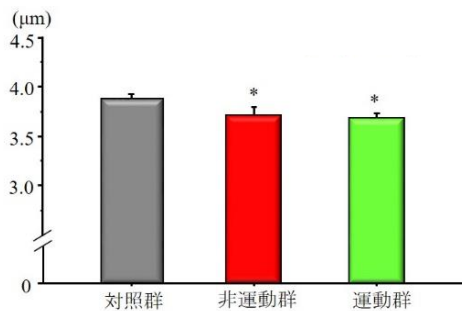
ムを作成したところ、2峰性分布といった異常な分布は認められなかったが非運動群、運動群のヒストグラムが全体的に左にずれており、この2群は対照群に比べて髄鞘が菲薄化していたことは明確であった(図7-B)。しかし、非運動群、運動群の間に有意差は認められなかった。

5. 足底皮膚

足底皮膚のHE染色像を検鏡したところ、非運動群、運動群において炎症といった病理像は認められなかった。次に、表皮厚を測定して比較したところ、対照群と比べて非運動群、運動群ともに有意に低値を示した。しかし、非運動群と運動群の間に有意差は認められなかった(図8-A)。

次に、免疫組織化学的染色にて皮膚組織に分布する感覚神経を可視化した染色像を見ると、

A: 髄鞘厚(平均値)



B: 髄鞘厚(ヒストグラム)

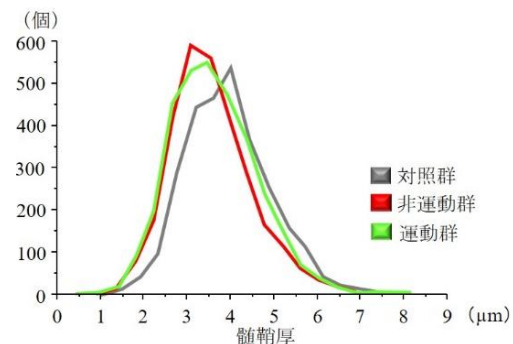
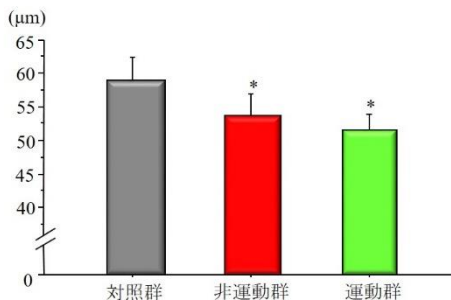


図7 髄鞘厚の比較

*: 対照群との比較 ($p < 0.05$)

A: 表皮厚



B: 皮膚神経密度

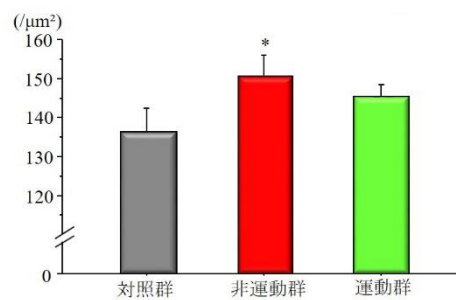


図8 表皮厚および皮膚神経密度の比較

*: 対照群との比較 ($p < 0.05$)

は有意に低値を示した(図7-A)。そこで、神経病理学的所見の有無を確認するためにヒストグラ

真皮において多くの陽性線維が認められたが、表皮内の陽性線維は極めて細く、明確に識別す

ることはできなかった。そこで、真皮における神経密度を測定したところ、対照群と比べて非運動群は有意に高値を示した。運動群の平均値は非運動群と対照群の中間に位置し、有意差はどちらの群とも認められなかった(図 8-B)。

5. ヒラメ筋

ヒラメ筋の相対筋重量比は対照群が 1.07 ± 0.26 、非運動群が 0.96 ± 0.19 、運動群が 0.92 ± 0.10 であり 3 群間に有意差は認められなかった。またヒラメ筋線維直径においても 3 群間に有意差は認められなかった。次に、ヒラメ筋の HE 染色像を鏡検したところ、特に壊死線維や再生線維の増加や、局所的な筋線維萎縮といった筋原性および神経原性の筋病理学的所見は認められなかった。また、筋線維直径を比較しても、3 群間に有意差は認められなかった(図 9)。

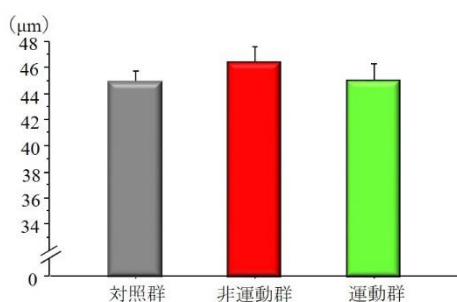


図 9 ヒラメ筋線維直径の比較

考察

本研究では CIPN モデルラットを用いて、有酸素運動が CIPN の症状を予防、進行抑制できるかを行動学的、組織学的解析にて検討した。今回は化学療法誘因性末梢神経障害の発生を抑制できるかを検証することを目的としたため、運動はパクリタキセル投与開始直後から開始し、実験期間は 2 週目と短期間に設定した。

今回使用したパクリタキセルはオキサリプラチンと並び、高確率で末梢神経障害を引き起こすとされている¹⁰⁾。パクリタキセルは投与量によって症状が異なり、熱痛覚閾値は少量投与で痛覚過敏、多量になると痛覚鈍麻を示すとされている²⁾。本研究ではラットに少量のパクリタキセルを投与

し、痛覚過敏モデルの作成を試みた。その結果、機械的刺激に対する痛覚閾値および熱痛覚閾値は、対照群に比べてパクリタキセルを投与した非運動群が有意に閾値の上昇を示していることから、痛覚過敏を示す CIPN モデルができていたと考えられる。また、非運動群においては表皮の菲薄化、皮膚末梢神経密度の増加、髄鞘の菲薄化がみられ、これらの変化は CIPN の発生に関与していると考えられる¹¹⁾。軸索や骨格筋に変化はみられなかった。パクリタキセルによる CIPN では軸索障害が発生するという先行研究が多いが²⁾、軸索障害はいわゆる伝導障害であり組織学的には検出が難しいかと思える。一方、臨床での CIPN 患者の症状では、痛み・しびれの他にバランス能力の低下が問題となっている¹²⁾。これを踏まえて、今回はバランス能力の評価としてビーム歩行テスト、巧緻動作能力の評価としてラダー歩行テストを行った。しかしながら、今回の非運動群では、ビーム歩行テストおよびラダー歩行テストのいずれにおいても変化は認められず、バランス、巧緻動作の低下を示さなかった。その原因としては、それぞれの歩行テストは中枢神経障害による運動麻痺モデルのバランス能力の評価法として開発されたテストであり^{13,14)}、本実験においては末梢神経障害には適さなかったことがあげられる。したがって、ビーム歩行テストおよびラダー歩行テストの結果は、CIPN に対する運動効果を検証するにあたっては参考にできないと考えられた。

次に、CIPN モデルにトレッドミル走行による中強度の有酸素運動を実施した運動群では、熱痛覚閾値のみ非運動群との間に有意な改善傾向を認めたが、機械的刺激に対する痛覚過敏において変化は認められなかった。また、皮膚および坐骨神経を組織学的に解析しても、非運動群、運動群との間には認められていない。つまり、パクリタキセルによって惹起される組織学的な変化を有酸素運動で防ぐことはできなかったといえる。運動群において熱痛覚閾値の低下が認められなかった事に関しては中枢神経系の作用があったのではないかと推測される。先行研究をみると、神経障害性疼痛モデルに対して運動負荷を行うと下行性疼痛抑制系が賦活され、熱痛覚閾値の低下が改善したとの報告がある¹⁵⁾。ただ、本研究

では中枢神経系の解析は行っていないため、推測の域を脱しない。また、中枢神経系の作用があったとすると、機械的刺激に対する痛覚閾値に改善が認められなかったことを説明できない。この点に関しては、しびれの発生といった他の要因が関わっている可能性も否定できないが、いずれにしても、CIPN の発生に対して有酸素運動は効果が少ないと思われる。したがって、CIPN の予防または進行抑制に対しては運動以外のアプローチを検討する必要があると思われた。運動以外のアプローチとして考えられものとしては、末梢組織や中枢神経系への作用が期待できる物理療法があげられる。実際に、近年の研究では、寒冷療法が CIPN の発生を抑制したとの報告もされている¹⁶⁾。また、運動と同様に下行性疼痛抑制系の賦活化が期待できる電気神経刺激療法も CIPN に対して適用できる可能性はある。

なお、本実験における研究目的からは外れるが、摂食量と体重の結果に興味深い点があった。具体的には有酸素運動を実施した運動群の摂食量と体重が他群に比べて有意に低値を示したことである。有酸素運動そのものの効果で体重が減少したことも考えられるが、摂食量も同時に減少しているため、今回行った中強度の有酸素運

動が化学療法の副作用である悪心、嘔吐、食欲減衰を助長し、体重減少につながった可能性もある。運動が化学療法の副作用を助長するという報告はみあたらないが、もし化学療法の副作用が運動によって助長されたとすると、患者には過負荷となってさらなる体重減少や筋萎縮を惹起する可能性がある。化学療法を行うがん患者に対するリハビリテーションにおいては、CIPN の有無とは関わりなく、運動機能の維持・改善を目的とした運動療法が行われているが、今回の結果を踏まえると、運動量や強度、時期には注意が必要であると考えられる。

以上のことから、本研究においては CIPN の発生に対する有酸素運動の効果は少ないという結論に至った。ただ、痛覚閾値の結果からわかるように、今回作成した CIPN モデルは痛覚過敏の症状が軽度であり、運動効果を適切に検証できていたかどうかには疑問は残る。また、今回は複数の運動条件を設定しておらず、運動強度、実施時間、実施時期の違いにより結果が異なってくる可能性もある。したがって、実験モデルを再検討し、運動条件を変更して再検討する余地はあり、今後の研究に期待したい。

参考文献

- 1) 日本癌治療学会 がん診療ガイドライン. <http://www.jsco-cpg.jp/> (2019年12月23日引用)
- 2) 荒川和彦, 鳥越一宏, 他: 抗がん剤による末梢神経障害の特徴とその作用機序, 日本緩和医療薬学雑誌, 2013; 4: 1-13.
- 3) 安田斎: 糖尿病性ニューロパチーの病態と治療, 臨床神経, 2009; 49: 149-157.
- 4) 大平雅美, 片田圭一, 他: 連載第 17 回 糖尿病 理学療法診療ガイドライン. 理学療法学. 2016; 43: 273-280.
- 5) Toma W, Kyte SL, et al.: Effects of paclitaxel on the development of neuropathy and affective behaviors in the mouse. *Neuropharmacology*. 2017; 117: 305-315.
- 6) Polomano RC, Mannes AJ, et al.: A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain*. 2001; 94: 293-304.
- 7) Ni GX, Liu SY, et al.: Intensity-dependent effect of treadmill running on knee articular cartilage in a rat model. *Biomed Res Int*. 2013; 172392. doi: 10.1155/2013/172392 [cited 2019 Dec 23].
- 8) Wisløff U, Helgerud J, et al.: Intensity-controlled treadmill running in rats: VO (2 max) and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 280: 1301-1310.
- 9) Malicka I, Siewierska K, et al.: Impact of Physical Training on Sex Hormones and Their Receptors During N-Methyl-N-nitrosourea-induced Carcinogenesis in Rats. *Wozniowski M. Anticancer Res*. 2017; 37: 3581-3589.

- 10) 勝山壮, 佐々木美織, 他.: がん化学療法に伴う末梢神経障害に関する実態調査, 日病薬誌. 2011; 47: 207-210.
- 11) Imai S, Koyanagi M, et al.: Taxanes and platinum derivatives impair Schwann cells via distinct mechanisms. *Sci Rep* 2017; 7: 5947.
- 12) Monfort SM, Pan X, et al: Gait, balance, and patient-reported outcomes during taxane-based chemotherapy in early-stage breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2017; 164: 69-77.
- 13) Adén U, Dahlberg V, et al.: MRI Evaluation and Functional Assessment of Brain Injury After Hypoxic Ischemia in Neonatal Mice. *Stroke.* 2002; 33: 1405-1410.
- 14) Metz GA, Whishaw IQ.: Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods.* 2002; 115: 169-179.
- 15) Shen J, Fox LE, et al.: Swim therapy reduces mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by chronic constriction nerve injury in rats. *Pain Med.* 2013; 14: 516-525.
- 16) Rosenbaek F, Holm HS, et al: Effect of cryotherapy on dose of adjuvant paclitaxel in early-stage breast cancer. *Support Care Cancer.* 2019 [Epub ahead of print].

(指導教員: 中野治郎)