

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01458

研究課題名(和文) 神経活動変化を基盤としたリハビリテーションアプローチの効果機序に関する研究

研究課題名(英文) Study on the mechanism of effect of rehabilitation approach based on changes in neural activity

研究代表者

大渡 昭彦 (OHWATASHI, AKIHIKO)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：30295282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中後の機能回復には、運動や脳神経伝達物質が関与していることが知られているが、その影響をリアルタイムに検討した報告はみられない。今回、主要な神経伝達物質であるドーパミンとセロトニンに着目し、運動や脳梗塞発症による線条体と海馬における細胞外濃度の変化を調査した。脳梗塞の影響として線条体では、同側でDAが有意に高くなり反対側では殆ど変化はみられず、対側で5-HTが有意に高くなった。海馬では対側海馬で運動前にどちらも高くなっていた。これは、同側海馬が損傷されている影響による代償機能として働いた可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、運動学習や機能向上を効果的に促進する、最適な運動刺激や物理的な刺激を、主に脳内物質(神経伝達物質や神経栄養因子、それらのレセプターなど)を指標として明らかにすることを目的としている。このことにより、リハビリテーションによる機能変化のプロセスを脳内物質の変化から明らかにでき、より効果的な運動療法や物理療法、またはリハビリテーションと併用した薬物療法の研究基盤が確立できる。また、脳梗塞モデルラットを用いることで、脳損傷後の機能回復にも応用でき、根拠に基づいた臨床の実践に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Although there are many reports that exercise is effective for functional recovery after stroke, there are no reports that examine in detail how neurotransmitters affect the recovery process. In this study, the effects of cerebral infarction and exercise were investigated in the striatum and hippocampus for changes in extracellular concentrations of the major neurotransmitters dopamine and serotonin.

As an effect of cerebral infarction, in the striatum, dopamine was significantly higher on the ipsilateral side, almost no change was observed on the opposite side. In the hippocampus, both were higher in the opposite hippocampus before the exercise. These results may have compensated for function due to damage to the hippocampus.

研究分野：総合領域

キーワード：マイクロダイアリス法 ドーパミン セロトニン 脳梗塞 運動 脳の可塑性 機能回復

1. 研究開始当初の背景

本研究では、運動学習や機能向上を効果的に促進する、最適な運動刺激や物理的な刺激を、主に脳内物質(神経伝達物質や神経栄養因子、それらのレセプターなど)を指標として明らかにすることを目的としている。このことにより、リハビリテーションによる機能変化のプロセスを脳内物質の変化から明らかにでき、より効果的な運動療法や物理療法、またはリハビリテーションと併用した薬物療法の研究基盤が確立できる。また、脳梗塞モデルラットを用いることで、脳損傷後の機能回復にも応用でき、根拠に基づいた臨床の実践に貢献できると考えている。

2. 研究の目的

脳神経伝達物質であるモノアミンの主要なものにはセロトニン(5-HT)、カテコールアミンであるドーパミン(DA)とノルエピネフリン(NE)がある。これまでの研究から 5-HT は、シナプス可塑性、神経新生およびニューロンの生存を調節することや¹⁾、運動回復を誘発する脳の可塑性に関連していることが示唆されている²⁾。また、DA 作動性ニューロンは随意運動や認知、報酬行動や動機付けなどに関与していることや³⁾、DA 受容体は海馬で重要な神経調節の役割を果たし、シナプス可塑性の発現に影響を及ぼすと考えられている⁴⁾。また、線条体を含む大脳基底核は大脳皮質と強く関連しており、姿勢と運動の制御や手続き学習、認知、運動、感情の機能などさまざまな機能に関連していると考えられていて、機能回復にも重要な役割を果たす可能性がある⁵⁾⁶⁾。海馬には最も可塑性の高い細胞の一つである顆粒細胞を含み、脳卒中または局所損傷後の回復に寄与する適応プロセスが発生する⁷⁾⁸⁾。歯状回も存在していて、中枢神経系の損傷からの回復の基礎となることが示唆されている⁹⁾。これらのことから、今回の研究では海馬と線条体における、特に 5-HT と DA の変化に焦点を当てた。

これまで脳損傷が各部位のモノアミン細胞外濃度に与える影響や、脳損傷後における運動の影響が報告されているが、*in vivo* でリアルタイムな変化を検討した報告はみられない。マイクロダイアリシス法は、自由行動下の動物の行動観察と同時に組織の生体内物質の変動を経時的かつ連続的に研究手法として確立されたものであり、様々な部位の測定ができる点も強みである。本研究ではこのマイクロダイアリシス法を使用して、主要な神経伝達物質である DA と 5-HT に着目し、運動や脳梗塞発症による線条体と海馬における細胞外濃度の変化を調査した。

3. 研究の方法

9 週令の Wister 系ラットの雄を合計 30 匹(体重 263.35 ± 11.60 g)を使用した。細胞外濃度の測定部位ごとに以下のように分類した。同側線条体の脳梗塞無し群(線条体-CNT: $n = 6$)、同側線条体の脳梗塞群($n = 6$)、対側線条体の脳梗塞群($n = 6$)、対側海馬の脳梗塞無し群(海馬-CNT: $n = 6$)、対側海馬の脳梗塞群($n = 6$)の 5 つに分類した。全てのラットは 12 時間周期の明暗サイクルで環境制御された部屋のプラスチックケージで飼育された。なお、今回の実験は鹿児島大学動物実験指針に従い、鹿児島大学動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号: 第 M19003 号)。

イソフルランの吸入麻酔下でラットを脳定位固定装置(SR-8N Narishige)で固定し、ガイドカニューレを挿入後 2 個のアンカーピストと歯科用セメントで固定した。ガイドカニューレの挿入位置は、ブレグマを基準に線条体は(anterior: +0.2 mm、lateral: 3.0 mm、ventral: 3.5 mm)、海馬は(anterior: -3.8 mm、lateral: 2 mm、ventral: 1.6 mm)とした。

脳梗塞モデルは、イソフルランの吸入麻酔下でラットを脳定位固定装置で固定し、頭皮を剥離した状態で光源装置(MHF-G150LR Moritex)より誘導された波長 560 nm の緑色光線を照射しながら尾静脈より光感受性色素のローズベンガルを 20 mg/kg 静注して作成した。照射部位は下肢の運動野に照射されるようブレグマより右 6 mm、後方 4 mm を中心とした直径 10 mm の範囲とし、照射時間は 20 分で行った。

術後 3 日目に、イソフルランの吸入麻酔下で測定用プローブに変更し測定を開始した。微量生体試料分析システム(HETC-500、エイコム社製)を使用し 5 分間隔で測定した。細胞外濃度の数値が安定するまで時間がかかるため、運動前の安静として 3 時間設けたがデータとしては運動前 1 時間の数値を使用した。その後ラット用トレッドミルで走行中の濃度変化を 30 分間測定した。走行は速さ 10 m/min で勾配 0°で行った。その後運動前と同様の状態で 1 時間測定した(図 1)。プローブ挿入位置の確認は、以下のように免疫染色で行った。深部麻酔を行い生理食塩水で脱血灌流後、脳を摘出した。摘出した脳を 10%ホルマリンで一晩以上浸漬固定した脳をブレグマ 3 mm 後方から 2 mm 間隔の横断面で切りパラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。統計処理は各群の運動中とその前後の値はフリードマン検定を行い、海馬と線条体の各群の比較は Kruskal-Wallis 検定を行い、有意差があったものに対して Steel-Dwass 検定による多重比較を行った。統計解析は R ver.2.8.1 を使用した。



A. 運動前のケージ内で安静している様子

B. 運動中にトレッドミル走行している様子

図 1: 実際の測定中の様子

4. 研究成果

各群の運動による影響は、線条体-CNTの5-HTでのみ運動中が運動前後と比較して有意に高かった($p < 0.01$) (図2)。脳梗塞の直接的な影響を示す運動前を比較すると、5-HTは対照群と比較して脳梗塞群の対側線条体($p < 0.05$)と対側海馬($p < 0.01$)で有意に高かった(図3)。DAは対照群と比較して脳梗塞群の同側線条体($p < 0.01$)と対側海馬($p < 0.05$)で有意に高く、脳梗塞群の対側線条体よりも同側線条体が有意に高かった($p < 0.01$) (図4)。対照群や測定部位との比較は、運動中と運動後における線条体のDAだけが運動前と同様の違いを示したが、その他はランダムに変化していた。

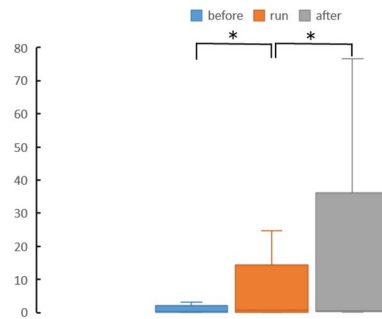


図2: 線条体-CNTの運動前後、運動中の5-HTの比較 *は $p < 0.01$

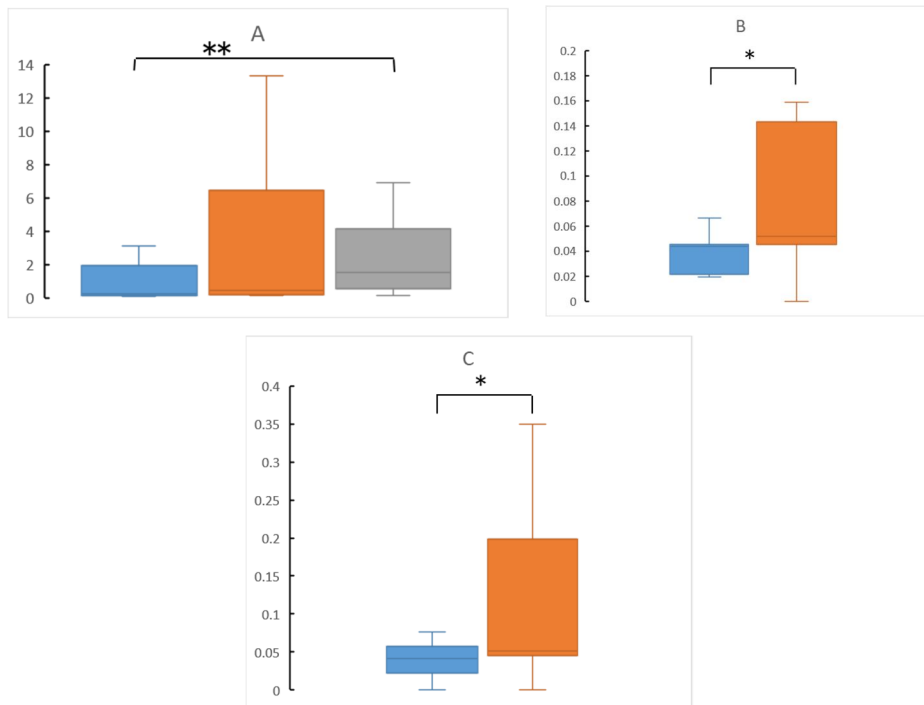
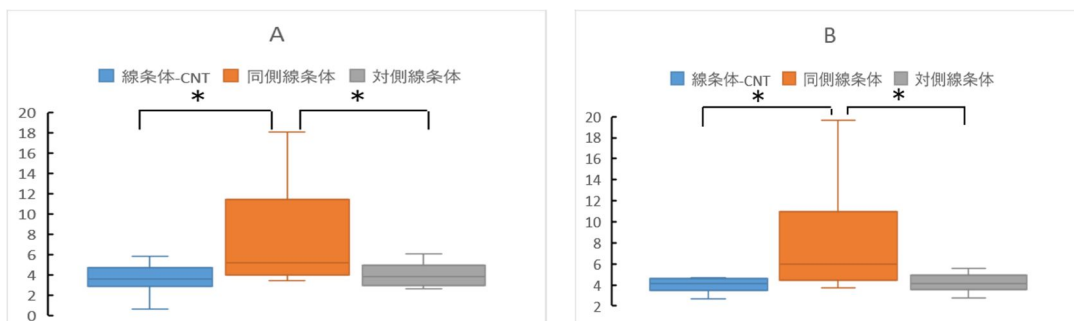


図3: 運動前と運動後、運動中でのそれぞれの部位の5-HT濃度の比較

A: 線条体の運動前を比較したもの、B: 海馬の運動前を比較したもの、C: 海馬の運動中を比較したもの。*は $p < 0.01$ 、**は $p < 0.05$



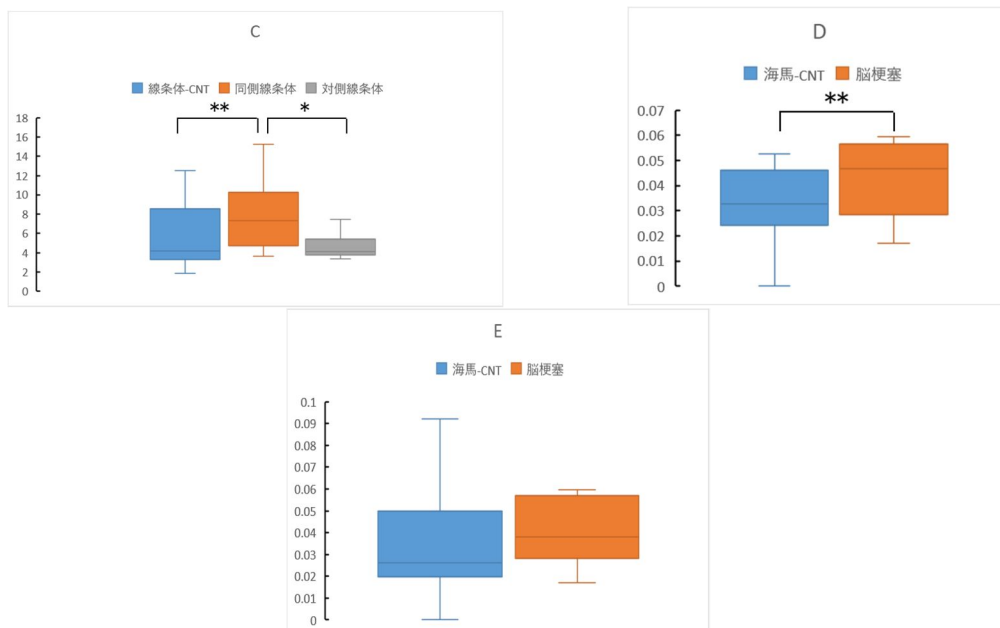


図 4：運動前と運動後、運動中でのそれぞれの部位の DA 濃度の比較

A：線条体の運動前を比較したもの、B：線条体の運動中を比較したもの、C：線条体の運動後を比較したもの、D：海馬の運動前を比較したもの、E：海馬の運動後を比較したもの。* は $p < 0.01$ 、** は $p < 0.05$

HE 染色で形態学的に確認すると、プローブの挿入状況に問題は無く、周囲への影響も見られなかった(図 5.A)。今回作成した脳梗塞モデルの梗塞部位は海馬まで達していることが確認できた。(図 5.B)

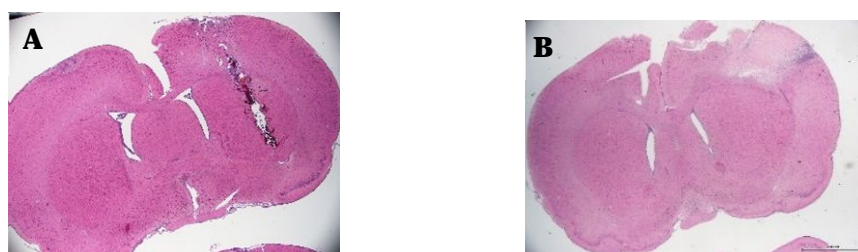


図 5：HE 染色後の前額面断面図

スケールバーは 2 mm

- A 同側線条体のプローブが挿入されている前額面(倍率： $\times 1.25$)
- B 脳梗塞作製部位の前額面(倍率： $\times 1.25$)

今回変化を確認する部位のひとつとして脳梗塞の対側を設定した。池田らの研究¹⁰⁾から、両側に脳梗塞を作成した場合、麻痺が重症化し対側が機能回復に重要な役割を担っていると報告されている。また、経頭蓋磁気刺激を臨床応用して対側を刺激する治療も存在している¹¹⁾。以上のことから非損傷側が機能変化に関与していると考えられる。また、今回の脳梗塞モデルはペナンプラ領域が少ないため、アポトーシスの抑制変化というよりも代償機能による影響が強いことが予想される。

これらの事を受けて、今回の実験結果を確認してみる。今回の実験では、運動前、運動中、運動後のデータがあり、運動前のデータは純粋に脳梗塞による影響を示している。先行研究では光感受性脳梗塞は作成後 3 日目に脳内の GDNF 細胞が有意に増加し可塑性の変化が最大になっていたと報告されている¹²⁾。今回の計測も術後 3 日目に計測していることから、回復過程が顕著な時期と考えられる。

まずは、運動前のデータを比較検討してみる。5-HT は対照群と比較して運動前に脳梗塞群の対側線条体と対側海馬で有意に高かった。また、海馬では運動前に DA と 5-HT のどちらも梗塞群で有意に高くなっていた。これは、前述の仮説を支持しており、損傷部位の代償機能として反対側の機能が活性化していると考えられる。形態学的に確認しても、今回のモデルでは海馬が直接的な損傷を受けていることが確認できる。しかしながら、DA は運動前に線条体で脳梗塞の対側ではなく同側で有意に高い値を示した。この結果は、DA は黒質線条体経路に病変がないとき脳梗塞によって同側は増加するとした先行研究¹³⁾を支持している。この時に対側の線条体では、殆ど変化がみられない今回の結果は新しい発見であり大変興味深い。このことは、代償作用という考え方からすると、形態学的に確認して殆ど損傷されていない線条体が、より直接的なストレスを受ける同側で活性化していると考えられるが、この傾向は DA のみにみられ、5-HT の動向が

逆になっている理由は不明である。

次に運動による影響を考えてみる。運動前、運動中、運動後を触接比較してみると対照群の同側線条体 5-HT でのみ運動中の値が有意に高くなっていた。その他では運動による直接的な比較に違いは認められなかったが、運動中と運動後の脳梗塞対側線条体・同側線条体、対照群の対側線条体、運動中と運動後の脳梗塞対側海馬、対照群の同側海馬、を比較すると優位差がみられるものと、そうではないものがあった。その中でも、運動前後と運動中を比較して全てにおいて脳梗塞同側線条体は有意に高値を示していたが、その他の比較では変化の傾向を確認できなかった。

今回の研究では、トレッドミル運動がストレスにならないよう速度 10 m/min で 30 分間と設定しており、運動負荷量が不足していたために変化が少なく、違いを明確にできなかった可能性が考えられる。今後、方法や条件の見直しを行い、神経栄養因子などの動向も合わせて検討することで研究を発展させていきたい。

【引用文献】

- 1) Mattson MP, Maudsley S, Martin. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 27 :589–594 ,2004
- 2) Chollet F, Tardy J, Albucher JF, et al. Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 10 :123–130, 2011
- 3) Lin T-W, Kuo Y-M. Exercise benefits brain function: the monoamineconnection. *Brain Sci.* 3(1):39–53, 2013
- 4) Goekint M, Bos I, Heyman E, et al. Acute running stimulates hippocampal dopaminergic neurotransmission in rats, but has no influence on brain-derived neurotrophic factor. *J Appl Physiol*(1985). 112(4):535-41, 2012
- 5) Takakusaki K, Habaguchi T, Ohtinata-Sugimoto J, et al. Basal ganglia efferents to the brainstem centers controlling postural muscle tone and locomotion: a new concept for understanding motor disorders in basal ganglia dysfunction. *Neuroscience* 119:293–308, 2003
- 6) Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266–271, 1990
- 7) K. Jin, M. Minami, J.Q. Lan, X.O. Mao, S. Bateur, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 98:4710–4715, 2001
- 8) Ogita K, Nishiyama N, Sugiyama C, et al. Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as amodel. *J. Neurosci. Res.* 82: 609–621, 2005
- 9) Laura E R, Gabriela G D, Angélica G M, et al. Sensorimotor Intervention Recovers Noradrenaline Content in the Dentate Gyrus of Cortical Injured Rats. *Neurochem Res.* 41, 2016: 3261-3271
- 1 0) Ikeda S, Harada K, Ohwatashi A, et al. Contralateral cortical role on functional recovery in a rat model of hemiplegia. *EXCLI J.*12: 641-646, 2013
- 1 1) Kang N, Summers JJ, Cauraugh JH. Transcranial direct current stimulation facilitates motor learning post-stroke: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry.* 87(4):345–355, 2016
- 1 2) Ohwatashi A, Ikeda S, Harada K, et al. Exercise enhanced functional recovery and expression of GDNF after photochemically induced cerebral infarction in the rat. *EXCI J.* 12:693-700, 2013
- 1 3) Mizutani K, Sonoda S, Karasawa N, et al. Effects of exercise after focal cerebral cortex infarction on basal ganglion. *Neurol Sci.* 34(6):861-867, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyara K, Kawamura K, Matsumoto S, Ohwatashi A, Itashiki Y, Uema T, Noma T, Ikeda K, Shimodozono. M	4. 巻 27(1)
2. 論文標題 Acute changes in cortical activation during active ankle movement after whole-body vibration for spasticity in hemiplegic legs of stroke patients: a functional near-infrared spectroscopy study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Top Stroke Rehabil	6. 最初と最後の頁 67-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10749357.2019.1659639.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 山田誠, 石原田秀一, 大渡昭彦	4. 巻 90
2. 論文標題 介護予防の総合事業にみる行動選択と代替プログラムの設計：飯島コンセプト、「ナッジ」の行動経済学と「気晴らし」の遊びを手がかりにして	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 鹿児島大学法文学部紀要「経済学論集」	6. 最初と最後の頁 45-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kodai Miyara, Shuji Matumoto, Tomohiro Uema, Keiko Ikeda, Akihiko Ohwatashi, Ryoji Kiyama, Megumi Shimodozono	4. 巻 25(2)
2. 論文標題 Effect of whole body vibration on spasticity in hemiplegic legs of patients with stroke.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Topics in Stroke Rehabilitation	6. 最初と最後の頁 90-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10749357	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川口 貴史, 川原 弓佳, 矢野 望夢, 宮良 広大, 大渡 昭彦
2. 発表標題 体操とゲームのサービス特性の違いと有効な介護予防事業について
3. 学会等名 九州理学療法士学会大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上濱 裕樹, 大渡 昭彦
2. 発表標題 介護予防事業を継続的に展開するための有効なプログラムの検討
3. 学会等名 九州理学療法士学会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木草太, 下村郷, 縄瀬浩太, 宝満厚太, 東條竜二, 松澤雄太, 大渡昭彦, 木山良二, 中村俊博
2. 発表標題 脳卒中片麻痺者に対し短下肢装具と機能的電気刺激を併用した歩行練習の即時効果:パイロットスタディ
3. 学会等名 第17回日本神経理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Araki S, Shimomura G, Nawase K, Homan K, Tojo R, Nakamura T, Matsuzawa Y, Ohwatashi A, Kiyama R
2. 発表標題 Immediate effect of gait training with functional electrical stimulation on the gait of stroke patients with an ankle foot orthosis: A pilot study.
3. 学会等名 13th International Society of Physical and Rehabilitation Medicine World Congress 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田雄大, 大渡昭彦, 上川百合恵, 吉田輝, 下堂蘭恵
2. 発表標題 壺長類脳梗塞モデルによる長期観察および慢性期リハビリテーション医療の研究
3. 学会等名 第55回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮良広大, 河村健太郎, 松元秀次, 大渡昭彦, 板敷裕喜, 上間智博, 池田恵子, 下堂蘭恵
2. 発表標題 脳卒中片麻痺下肢痙縮への全身振動刺激 (Whole Body Vibration) 直後における足背屈自動運動時の皮質活性化の変化: 近赤外分光法を用いた検討
3. 学会等名 第16回日本神経理学療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川田将之, 木山良二, 大渡昭彦, 前田哲男
2. 発表標題 筋骨格モデルシミュレーションによる歩行中の股関節安定化機構に寄与する筋の検討
3. 学会等名 第52回日本理学療法学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大山あゆみ, 大渡昭彦, 石原田秀一, 山田誠, 西聡子, 川畑了大, 吉村理恵子, 徳留修身
2. 発表標題 地域で介護予防を展開するための連携推進事業に関する報告 (第1報) - 介護予防事業を継続的に展開するために必要な要因について -
3. 学会等名 第59回鹿児島県公衆衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西聡子, 大渡昭彦, 石原田秀一, 山田誠, 大山あゆみ, 川畑了大, 吉村理恵子, 徳留修身
2. 発表標題 地域で介護予防を展開するための連携推進事業に関する報告 (第2報) - 新しい低負荷体操とゲームの要素を取り入れた運動の有効性について -
3. 学会等名 第59回鹿児島県公衆衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川畑了大, 大渡昭彦, 石原田秀一, 山田誠, 大山あゆみ, 西聡子, 吉村理恵子, 徳留修身
2. 発表標題 地域で介護予防を展開するための連携推進事業に関する報告(第3報) - 体操とゲームのサービス特性の違いと有効な介護予防事業について -
3. 学会等名 第59回鹿児島県公衆衛生学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	下堂 蘭 恵 (SHIMODOZONO MEGUMI) (30325782)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	川田 将之 (KAWADA MASAYUKI) (30783477)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	
研究分担者	吉田 輝 (YOSHIDA AKIRA) (40347109)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	木山 良二 (KIYAMA RYOJI) (60315413)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------