

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300195
 研究課題名 (和文) リハ患者及び疾患モデル動物に行うリハ訓練の効果を生体成分から評価する解析法の確立
 研究課題名 (英文) The establishment of an analytical method to evaluate of the rehabilitation with biogenic specimens obtained from rehabilitation patient and disease model animal
 研究代表者 別府 英博 (別府 秀彦) BEPPU HIDEHIRO (BEPPU HIDEHIKO)
 藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・准教授
 研究者番号：30142582

研究成果の概要 (和文)：

リハビリ訓練患者の訓練の効果を、生体成分で評価するために、入院患者血清や、運動負荷動物の筋肉を用いて、タンパク質やアミノ酸の解析を生化学的手法で検討した。血清の2次元電気泳動法で入院退院時により変動する、タンパク・スポットの発現が見られた。また UPLC を用いた遊離アミノ酸の分析で増減が観察されたが、現在のところ、運動に関連づける特異成分の同定には至らなかった。一方 cytokines では HGF と FIM efficiency に相関が見られた。

研究成果の概要 (英文)：

Using the serum of the inpatient and the muscle of exercise-load animal, We examined analyses of protein and amino acid in the specimens with a biochemical technique to evaluate the effect of the rehabilitation training.

The magnified expression of a protein spot of the serum that fluctuated on and admission and discharge from hospital was observed by two-dimension electrophoresis.

In addition an increase and decrease in the analysis of free amino acid were observed using UPLC, although any specific component that linked with the rehabilitation exercise was not identified. On the one hand there was a correlation between HGF and FIM efficiencies in the determination of cytokines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	11,100,000	3,330,000	14,430,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：リハビリテーション科学・福祉工学・

キーワード：リハビリ訓練・脳卒中回復期リハ・生体成分・微量成分検索・サイトカイン・遊離アミノ酸・運動負荷・筋肉成分

1. 研究開始当初の背景

脳卒中リハビリ訓練患者の訓練の効果を、生体成分で評価する方法は、現在まで確立されていない。そこで、バイオマーカを検索するに当たり、患者から低侵襲的に検体を得ること。微量検体で、網羅的に物質の情報が得られること。これらの情報と日常活動動作（ADL）評価とが一致すること。以上の技術面と解析法の確立が、リハ訓練の効果を新しい手法で評価できるのではないかと考えに至り、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究は、脳卒中患者が回復期リハ病棟に入院した直後および退院直前に得られた健康管理のための残余血清を用いることを条件として、微量検体で網羅的に情報が得られるタンパク質や遊離アミノ酸などの遺伝子産物を定量することが、有用な解析法となりえるか、その分析法を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) リハ訓練患者から低侵襲的に得られた血清を微量（ $10\mu\sim 500\mu\text{L}$ 程度）用いて、①キャピラリー電気泳動によるタンパク分画の定量、HPLCによる3-メチルヒスチジンの測定 ②筋肉増強因子と思われるIGF, VEGF, HGFなどのELISA法による測定。③2次元電気泳動（2D-PAGE）による血清中タンパク成分の網羅的解析。④UPLCを用いた、低分子物質、遊離アミノ酸の定量。

(2) リハ訓練患者をモデルとした、動物実験 ①マウス、ラット後肢にキプスを装着あるいは後肢懸垂による筋萎縮モデルの血清および筋肉、②脳梗塞モデルラットの血清および筋肉、③遺伝的に行動異常があるマウスの血清および筋肉を用い、上記と同様の解析を行い、臨床との比較を行った。

(3) これらの結果は、共同研究者のリハ専門医が、訓練患者のADL評価を指標に、評価と相関する、バイオマーカを特定する。さらに、疾患と訓練の改善とを関連づける。

(4) 以上の一連の分析技術と解析法を確立させる。

4. 研究成果

(1) キャピラリー電気泳動（CE）による血清タンパク分画法は、微量検体量（ 10nL ）で、従来のセルロース・アセテート膜よりも多くの分画情報が得られた。入院時（ 20.3 ± 7.5 ）は退院時（ 14.9 ± 3.3 ）よりもタンパク分画数が有意（ $P, 0.05$ ）に多かった。

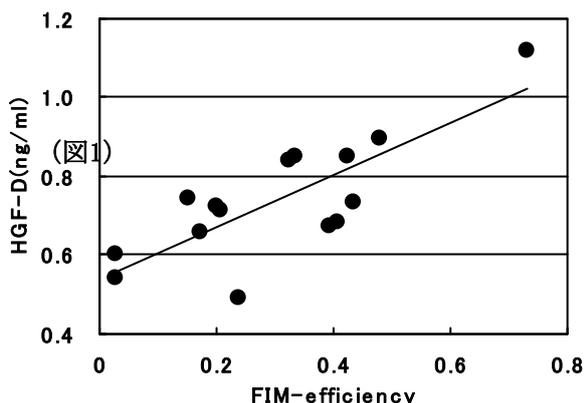
(2) 2D-PAGEにおいて、より多くの微量タンパクスポットを得るために、Albumin およびIgGを除去処理した血清試料を用いることが有用であった。SYPRO Ruby染色を行うことで、検出感度が増し、タンパクスポットの観察において汎用パソコンで画像を色調補正し重ねる簡易な方法を確立した。ゲルスポットから、Transthyretin complex with Milrinone, chain A-human, Ceruloplasmin, fragment

1-human, ApolipoproteinA-IV precursor human など、数十種のタンパクに差異が見られた。現在、運動に関連づける、特異的な成分は検索中である。

(3)脳卒中患者などにリハビリテーションを行う際、その効果を臨床における生化学的評価として得るため、筋肥大に関与するとされるサイトカインの血清中発現量を定量した。対象者は、回復期リハ病棟に入院する 15 名 (平均年齢 68.1±12.7 歳) とし、サイトカインのうち Hepatocyte growth factor (HGF)、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)、Insulin-like growth factor-I (IGF-I) の各濃度を、入退院時直前に早朝空腹時採血を行った血清を用い ELISA 法で測定した。

まず、ELISA 測定の信頼性を得るために、血清中 HGF の長期保存による回収率と、ウェスタンブロット法を用いた血清中 HGF の ELISA 抗体反応特異性を確認した。-20℃での 499 日間の保存前後の HGF 濃度は 0.71ng/ml と 0.66ng/ml であり、回収率は 94.0%であった。また、分子量約 60 k Da HGF 抗体への反応特異性が認められた。

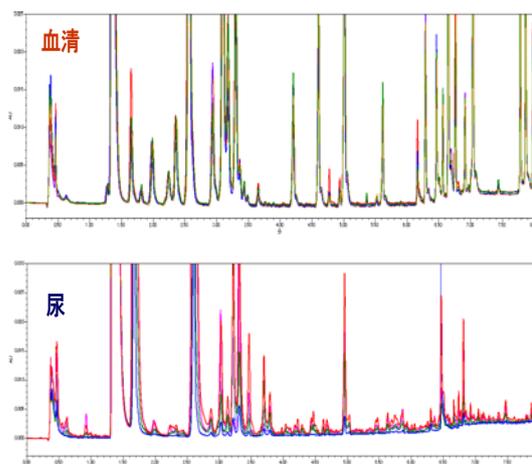
次に日常生活動作(ADL) 評価法として用いられる Functional Independence Measure (FIM™) と血清中サイトカイン量の関連を検討した。退院時 FIM 値から入院時 FIM 値を引いて在院日数で除す FIM 効率について検討したところ、FIM 効率は退院時 HGF 値と強い正の相関 ($p=0.0012$, $r=0.75$) が認められた。



一方、VEGF, IGF には相関性は認められなかった。以上のことより、血清中 HGF は FIM 増減の影響を反映することが示唆された (図 1)。

(4)リハ患者から連続的な数mL 以上の採血は不可能なので、低侵襲的な方法として、将来訓練後の部分尿および訓練により生じる汗を採取する。ついで数μLで分析が可能な、キャピラリー電気泳動および Ultra Fast Liquid Chromatography (UF 型 HPLC) を用い、身体組成成分や代謝成分由来の特異蛋白、ペプチド、アミノ酸、有機酸、低分子群、微量元素の分離・同定を行う計画を立てた。今回 UPLC を用いて、血清と尿の測定条件の確立を行った (図 2)。

●筋萎縮モデル実験マウスの血清・尿中遊離アミノ酸のUPLCによる分離

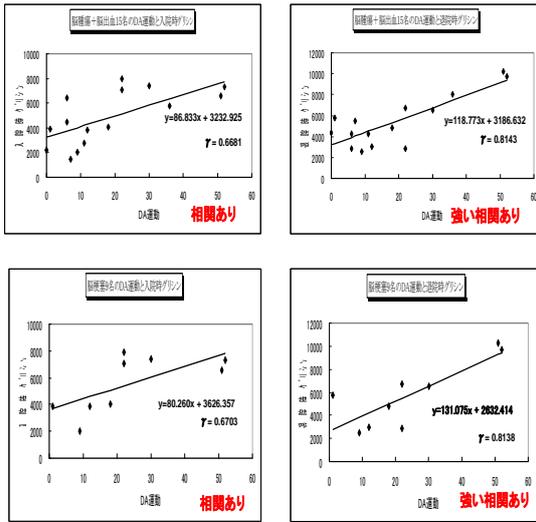


*雌ICRマウス14週齢 後肢ギプス固定法14日間装着後採血採尿

(図 2)

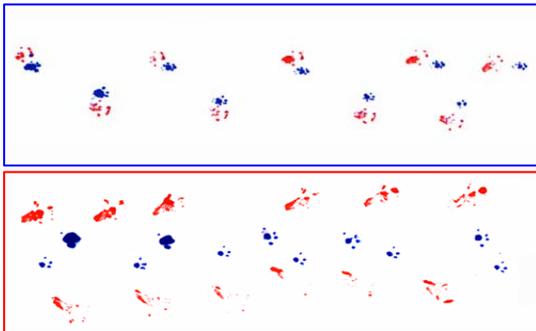
- ① 図 2 は、ヒト血清および尿中の遊離アミノ酸を、アミノ酸誘導化試薬と反応させ、UPLC で分離したクロマトグラムである。
- ② 血清中の遊離アミノ酸の測定を行い、アミノ酸標準物質と FIM 運動の量と相関のあるものについて検討した。その結果グリシンが脳梗塞 9 名に対し強い相関 ($\gamma=0.8138$) した。

DA運動量(退院入院時FIMの差)とグリシンとの相関



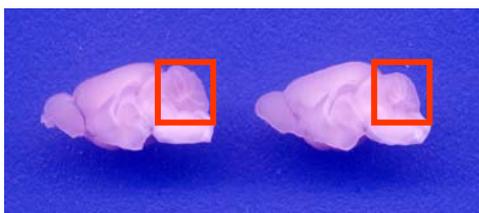
(図 3)

(5) 遺伝的に行動異常(運動失調)を示す B6-wob を育成する中で、四肢の筋運動と、中枢神経の異常の有無を観察した。さらにこのマウスがリハ関連の疾患モデルとして成り立つかを検証した。



(図 4)

上図(図 4)の上側は正常のマウスの足跡で、下側は、Wob の足跡である。あきらかに、歩行障害が見られた。また小脳を観察したところ wob マウスは明らかに小脳の萎縮が見られた。(図 5)



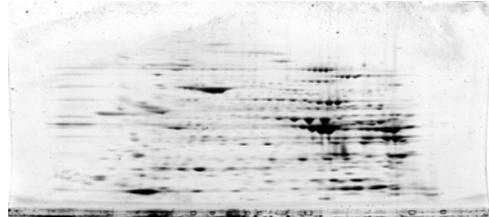
(図 5)

この小脳の 2D-PAGE で、カルビンディンのタンパクの減少が確認された。その考察としてプルキンエ細胞の欠落が推定された。



(図 6)

一方、wob マウスの筋肉の 2D-PAGE のスポットを図 7 に示した。その結果、対照の B-6 に対しアクチンの発現減少が確認された



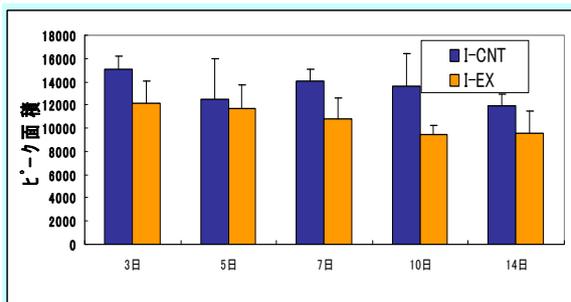
(図 7)

(6) 片麻痺を示す右中大静脈閉塞再灌流モデルラットを作製し、トレッドミルなどによるリハビリを行い、運動負荷増大に伴う筋増量を導き、筋細胞の肥大および増殖による変化をおこす筋細胞外シグナルの検索を行った。

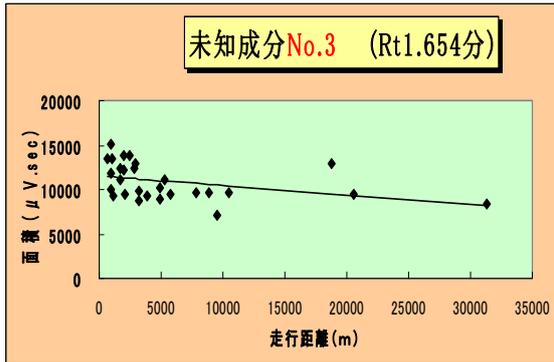
また、ギプス固定による筋廃用萎縮を作製し(図 8) 同様の試験を行った。



(図 8)



(図 9)



(図 10)

図 9 は、UPLC による遊離アミノ酸の解析において、脳梗塞ラットの発症後トレッドミル運動負荷を行い、その 3, 5, 7, 10, 14 日目に、血清中の遊離アミノ酸を測定した結果のひとつです。棒グラフは未知遊離アミノ酸が、経時的に、非運動群に対し 5 日目以外有意にし、運動により、減少する遊離アミノ酸で認められた。しかしこのアミノ酸は標準物質の 20 種のアミノ酸以外と思われ、未知成分 3 番と示した。この未知アミノ酸は、運動すると減少する成分であることが示唆された。

(7) 以上の結果から、

- ①リハ訓練患者の、生体成分情報を、通常の臨床検査値から、評価することは困難であることから、血清中のタンパクや遊離アミノ酸など遺伝子産物を、網羅的に検索することは、今後の研究の進め方として、意義があるかもしれない。その為に、微量の血清で、多量の情報を得る、プロテオーム解析や遊離アミノ酸を測定できる最新の技術（ただし汎用型）を駆逐する。
 - ②臨床にフィードバックさせるためには、疾患モデル動物での、再現も必要であり、今回筋萎縮、脳梗塞、運動失調モデル動物を用いて、整合性を図ることも重要である。
- 以上、当該研究結果を元に、次の試験研究の応用につなげたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Mizutani K, Sonoda S, Hayashi N, Takasaki A, Beppu H, Saitoh E, Shimpo K ; 2010 ; Analysis of Protein Expression Profile in the Cerebellum of Cerebral Infarction Rats After Treadmill Training. Am. J. Phys. Med. Rehabil., 8 (2), 107-114.

(査読有)

② 尾崎清香, 別府秀彦, 園田 茂, 岡崎英人, 水谷謙明, 井谷功典, 林 宣宏, 岡本さやか, 松井太衛 (2007). リハビリテーションを行う脳卒中患者のサイトカイン濃度と日常生活動作能力との関連. 臨床病理, 55(6), 522-527.

(査読有)

[学会発表] (計 13 件)

① 別府秀彦 ; リハビリテーション患者の運動療法評価に利用可能な血清・尿中成分検索条件の検討 (6) 回復期リハ訓練患者の UPLC-PDA を用いた血清遊離アミノ酸の測定 第 20 回生物試料分析科学会学術集会 (生物試料分析, Vol. 33 No. 1 p88) 2010; 3 月 13-14 日東京

② 別府秀彦 ; 運動障害モデルマウス B6-wob Takahashi の行動観察と病因解析 (2) 一下肢骨格筋と小脳の性状およびプロテオーム解析 ; 第 41 回藤田学園医学会 (藤田学園医学会誌, Vol. 33 Suppl. p9) 2009; 10 月 1-2 日豊明

③ 別府秀彦 ; リハ患者の運動療法評価に利用可能な血液・尿中成分検索条件の検討 (5) -

回復期リハ訓練患者の血中遊離アミノ酸の測定条件の検討. 第 64 回日本体力医学会、(体力科学 Vol.58 No.6 p970) 2009 ; 9 月 18-20 日新潟

④別府秀彦 ; 運動障害モデルマウスB6-wob Takahashiの行動観察と病因解析(1) 第 8 回 コ・メディカル形態機能学会 (形態・機能 Vol.8 No.1 p41) 2009;9 月 12 日京都

⑤別府秀彦 ; リハ患者の運動療法評価に利用可能な血清・尿中成分検索条件の検討 (3) 3-Methylhistidineの検討. 第 63 回日本体力医学会大会 (予稿集、p140) 2008;9 月 18-20 日別府

⑥別府秀彦 ; リハ運動効果を評価する生化学的マーカーの検索(4) : マウス骨格筋のプロテオミクス解析. コ・メディカル形態機能学会第 7 回学術集会(プログラム・抄録集、p29) 2008;9 月 13 日豊明

⑦ 別府秀彦 ; リハビリテーション患者の運動療法評価に利用可能な血清・尿中成分検索条件の検討 (2) 健常者の血中・尿中 3-Methylhistidineに影響を与える食事および運動負荷条件ならびに測定条件の検討. 第 18 回生物試料分析科学会学術集会(生物試料分析、Vol.31 No.1, p79) 2008;2 月 10-11 日大阪

[その他]

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

別府英博(別府秀彦) (BEPPU HIDEHIRO / BEPPU HIDEHIKO)

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・
准教授 : 研究者番号 : 30142582

(2) 研究分担者

近藤 晶子 (KONDOU AKIKO)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・
助教 : 研究者番号 : 90396838

林 宣宏 (HAYASHI NOBUHIRO)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・
准教授 (H19→H20年 : 研究分担者)
東京工業大学・生命理工学研究科・准教授
(H20→H21:連携研究者に変更)
研究者番号 : 80267955

(3) 連携研究者

園田 茂 (SONODA SHIGERU)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号 : 10197022

高橋 久英 (TAKAHASHI HISAHIDE)
藤田保健衛生大学・名誉教授
研究者番号 : 80084606

水谷 謙明 (MIZUTANI KENMEI)
藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・
助教 : 研究者番号 : 30351068

(4) 研究協力者

岡崎英人 (OKAZAKI HIDETO)
藤田保健衛生大学・医学部・
講師 : 研究者番号 : 30410707

山口久美子 (YAMAGUCHI KUMIKO)
藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・
技術員 : 研究者番号 : 50526308