

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500453

研究課題名(和文) 運動療法の効果と神経栄養因子や神経伝達物質の変化に関する研究

研究課題名(英文) Effects of voluntary exercise on expression of neurotrophic factors and neurotransmitter levels in rat brain

研究代表者

大渡 昭彦 (OHWATASHI AKIHIKO)

鹿児島大学・医学部・助教

研究者番号：30295282

研究成果の概要(和文)：マイクロダイアリシスを使用して、運動によるモノアミンの変化を線条体と海馬で測定した。トレッドミル走行によるモノアミンの細胞外濃度変化は、セロトニンとノルエピネフリンは運動中に増加して運動後は元に戻るが、ドーパミンは運動中よりも運動後にピークがみられる傾向がみられた。トレッドミルのトレーニングを1週間行うことにより、線条体で大きな変化は認められなかったが、海馬ではトレーニング前よりもトレーニング後の方が走行中のセロトニン濃度が高くなる傾向がみられた。

研究成果の概要(英文)：Extracellular concentrations of monoamines were investigated in the striatum and hippocampus before, during, and after treadmill exercise using microdialysis technique. It was found that serotonin and norepinephrine levels were increased during treadmill running and then returned to baseline levels; however, dopamine levels peaked after treadmill exercise. Serotonin levels were increased in the hippocampus during treadmill running after 1 week of treadmill exercise.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | | | |
| 2007年度 | | | |
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2009年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 総計 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：マイクロダイアリシス、神経伝達物質、脳の可塑性、運動療法、機能回復

1. 研究開始当初の背景

マイクロダイアリシス法は、中枢神経での神経伝達物質の研究手法としては確立されたものであるが、運動刺激に伴う神経伝達物質の変動に関する検討は少ない。近年、脳梗塞後の運動刺激の影響という観点からの研

究もみられるが、まだこのような報告は非常に少ない。また、神経栄養因子と神経伝達物質の関係では、BDNFとセロトニンが脳の可塑性や機能の維持に協調的に機能していることが報告されている。しかし、本研究のように脳梗塞モデルを使用して、運動、神経栄養

因子、神経伝達物質の関係を連続的に検討する研究は他にはみられない。

2. 研究の目的

我々は臨床において、脳卒中患者に対する促通的運動訓練が麻痺の回復を促進することを報告してきた。しかし、ヒトにおいてその機能回復に関わる脳内物質の変化を検討することは困難である。そこで、本研究の目的は、脳梗塞モデルラットを用いて機能回復のプロセスに関わる脳内物質を明らかにし、その発現を効果的に促進する最適な運動刺激や薬物治療の開発を目指すものである。特に今回の研究では、神経伝達物質に関する検討を行う。

3. 研究の方法

今回の研究ではマイクロダイアリシス法を使用してモノアミン (NE:ノルエピネフリン、DA:ドーパミン、5-HT:セロトニン) の細胞外濃度変化を測定した。実験には9週令のWistar系ラットの雄を合計22匹使用した。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、2個のアンカービス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:+0.2mm、lateral:3.0mm、ventral:3.5 mm)、海馬は (anterior:-3.8mm、lateral:2.0mm、ventral:1.6 mm) とした。ガイド挿入後3日目以降に微量生体試料分析システム (HTEC-500、エイコム社製) を使用し、15分間隔で測定した。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。

(1) モノアミンがトレッドミル走行時にどのように変化するかを検討した。ラット用トレッドミルの設定は、勾配 0° で速さ 18m/min の30分間とした。

(2) 神経伝達物質がトレーニングの有無でどのように変化するかを検討した。最初にガイド挿入後3日目に、ラット用トレッドミルで走行中の濃度変化を測定した。走行は速さ 18m/min で30分間とした。その後7日間トレッドミルトレーニングを行い、その後同じ条件で走行中の濃度変化を測定した。トレーニングは 18m/min の速さで30分程度から開始し、徐々に負荷を大きくして最終的に 24m/min で60分程度可能になるように行った。

(3) 脳梗塞作成後にトレッドミル走行中の濃度変化を測定した。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 560nm の緑色光線を照射しながら尾静脈より光感受性色素ローズベンガルを 20mg/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、Bregma より右 6mm・後方 4mm を中心とした直径 10mm の範囲とし、照射時間は20分で行った。脳梗塞作成後、同側へガイドカニューレを挿入・固定し3日後、7日後、14日後にそれぞれ速さ 18m/min の30分間でトレッドミル走行中の濃度変化を測定した。

4. 研究成果

(1) マイクロダイアリシスのデータは、測定開始時が不安定になることから3時間以降のデータを採用した。トレッドミル走行時と前後60分間の線条体におけるDAの変化を図1、5-HTの変化を図2に示す。海馬におけるNEの変化を図3、DAの変化を図4、5-HTの変化を図5に示す。結果は全て横軸が時間で縦軸は細胞外濃度を示している。

図1 線条体でのDA濃度変化(n=14)

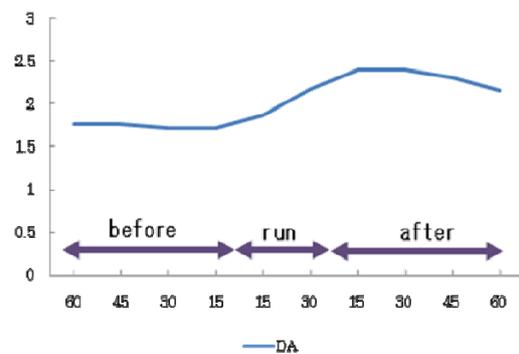
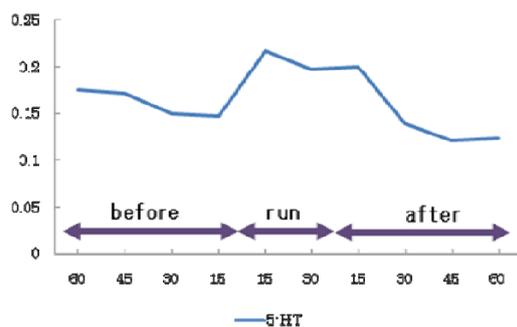


図2 線条体での5-HT濃度変化(n=14)



線条体ではNEの細胞外濃度が低く検出が困難であった。DAは走行により濃度が上昇し、走行後も高濃度が維持されていた。5-HTは走行中に濃度が上昇し、走行後は濃度が低下する傾向を示した。

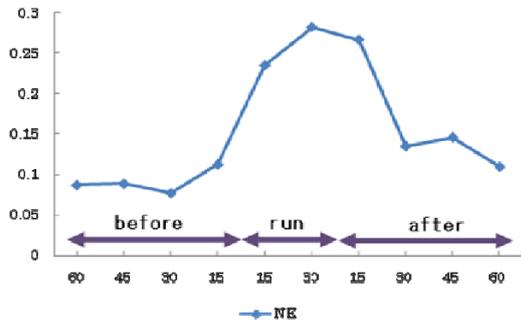


図3 海馬での NE 濃度変化 (n=12)

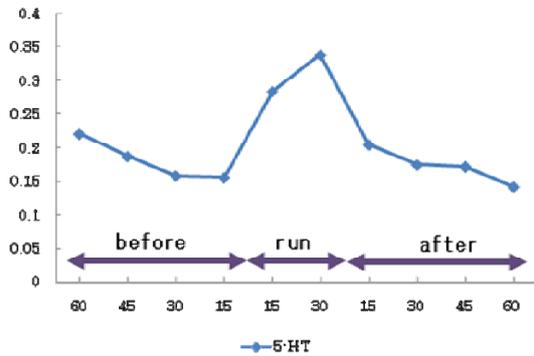


図4 海馬での 5-HT 濃度変化 (n=12)

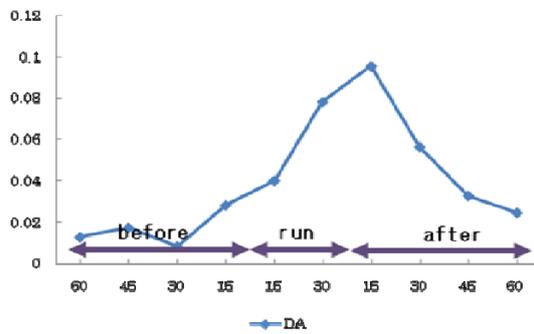


図5 海馬での DA 濃度変化 (n=12)

海馬では NE 濃度のピークは走行中にあり、走行後も走行前より比較的高い濃度を維持していた。5-HT は線条体と同様に、走行中に濃度が上昇し、走行後は前の濃度に戻る傾向を示した。DA は走行により濃度が上昇し、走行後にピークがきて徐々に濃度が低下する傾向を示した。

5-HT はリズム運動で上昇することが知られており、今回のトレッドミル運動でも予想通り濃度が上昇した。NE も同様に走行中に上昇していたが、DA は走行後に上昇する傾向がみられた。DA は報酬に関与しており、運動学習との関連で興味深く、今後更なる検討が必要と考えている。

(2) 7 日間のトレッドミルトレーニング前後で走行中の濃度を比較した。before は走行前 60 分間の平均濃度で、run は走行 30 分間の平均、after は走行後 60 分間の平均を示している。また、グラフの波線はトレーニング前、実線はトレーニング後を示している。線条体における DA の変化を図 6、5-HT の変化を図 7 に示す。海馬における NE の変化を図 8、DA の変化を図 9、5-HT の変化を図 10 に示す。

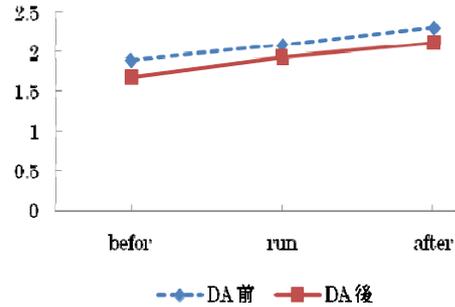


図6 線条体での DA 濃度変化 (n=4)

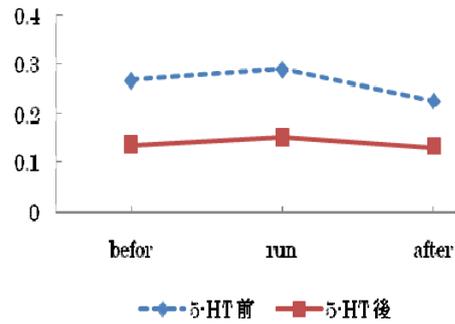


図7 線条体での 5-HT 濃度変化 (n=4)

線条体では、トレーニング前後で濃度変化のパターンに大きな変化がみられなかった。

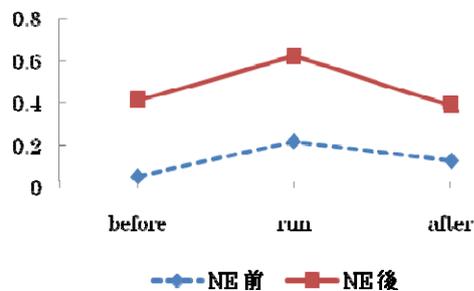


図8 海馬での NE 濃度変化 (n=4)

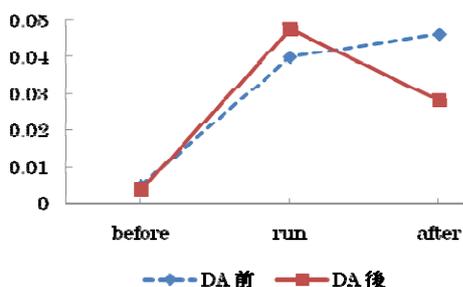


図9 海馬でのDA濃度変化(n=4)

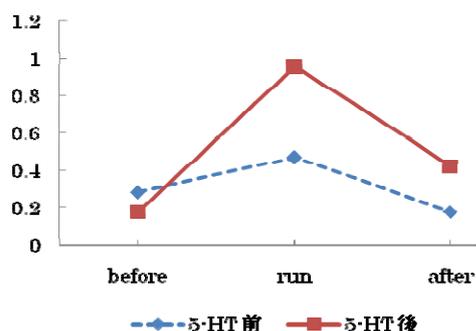


図10 海馬での5-HT濃度変化(n=4)

海馬ではDAでトレーニング後の方が走行後の濃度低下が大きくなる傾向がみられた。また5-HTはトレーニング後の方が走行中の濃度上昇が大きくなる傾向がみられた。5-HTに関していえば、トレーニングをすることによりリズム運動で濃度上昇が大きくなり、気分変化や鎮痛効果なども期待できる。今後、更なる検討を行いたい。

(3) 脳梗塞作成後にトレッドミル走行中の濃度変化を3日後、7日後、14日後にそれぞれ測定した。線条体ではDAと5-HT両方とも走行による濃度変化が小さくなる傾向がみられた。また、海馬ではNE、DA、5-HT、の全てで14日後が機能回復に伴い大きくなる傾向がみられたが、対象数が少なく今後更なる検討を重ねていきたい。

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10件)

① Kawahira K, Shimodozono M, Etoh S, Kamada K, Noma T, Tanaka N. Effects of intensive repetition of a new facilitation technique on motor functional recovery of the hemiplegic upper limb and hand. *Brain Inj.* 査読有, 24(10):1202-13, 2010

- ② Kawasaka T, Shimodozono M, Ogata A, Tanaka N, Kawahira K. Salivary secretion and occlusal force in patients with unilateral cerebral stroke. *Int J Neurosci.* 査読有, 120(5):355-60, 2010
- ③ Etoh S, Noma T, Matsumoto S, Kamishita T, Shimodozono M, Ogata A, Kawahira K. Stroke patient with mirror movement of the affected hand due to an ipsilateral motor pathway confirmed by transcranial magnetic stimulation: a case report. *Int J Neurosci.* 査読有, 120(3):231-5, 2010
- ④ Matsumoto S, Shimodozono M, Miyata R, Kawahira K. Effect of the angiotensin II type 1 receptor antagonist olmesartan on cerebral hemodynamics and rehabilitation outcomes in hypertensive post-stroke patients. *Brain Inj.* 査読有, 23(13-14):1065-72, 2009
- ⑤ Noma T, Matsumoto S, Etoh S, Shimodozono M, Kawahira K. Anti-spastic effects of the direct application of vibratory stimuli to the spastic muscles of hemiplegic limbs in post-stroke patients. *Brain Inj.* 査読有, 23(7):623-31, 2009
- ⑥ Matayoshi S, Shimodozono M, Hirata Y, Ueda T, Horio S, Kawahira K. Use of calcitonin to prevent complex regional pain syndrome type I in severe hemiplegic patients after stroke. *Disabil Rehabil.* 査読有, 31(21):1773-9, 2009
- ⑦ Kawahira K, Noma T, Iiyama J, Etoh S, Ogata A, Shimodozono M. Improvements in limb kinetic apraxia by repetition of a newly designed facilitation exercise in a patient with corticobasal degeneration. *Int J Rehabil Res.* 査読有, 32(2):178-83, 2009
- ⑧ Nomoto Y, Yoshida A, Ikeda S, Kamikawa Y, Harada K, Ohwatashi A, Kawahira K. Effect of menthol on detrusor smooth-muscle contraction and the micturition reflex in rats. *Urology.* 査読有, 72(3):701-5, 2008
- ⑨ Etoh S, Kawahira K, Ogata A, Shimodozono M, Tanaka N. Relationship between dysgeusia and dysesthesia in stroke patients. *Int J Neurosci.* 査読有, 118(1):137-47, 2008
- ⑩ Iiyama J, Matsushita K, Tanaka N, Kawahira K. Effects of single

low-temperature sauna bathing in patients with severe motor and intellectual disabilities. Int J Biometeorol. 査読有, 52(6);431-7, 2008

〔学会発表〕(計9件)

- ① 大渡昭彦, 池田 聡, 吉田輝, 原田雄大, 上川百合恵, 根路銘周子, 川平和美: 線条体, 海馬, 皮質におけるモノアミンの日内変動, 第45回日本理学療法学会大会, 岐阜, 2010.5.28
- ② Satoshi Ikeda, Hirofumi Sasaki, Ken-Ichi Matsushita, Katsuhiro Harada, Yurie Kamikawa, Akihiko Ohwatashi, Akira Yoshida, Shuko Nerome, Yurika Shimozono. Improvement of Brachial-Ankle Pulse Wave Velocity by Rehabilitative Exercise on Hemiplegic Stroke Patients. 17th European Congress European society of Physical and Rehabilitation Medicine, Venice Italy May 25, 2010
- ③ Satoshi Ikeda, Katsuhiro Harada, Yurie Kamikawa, Akihiko Oowatashi, Keisuke Horinouchi, Akira Yoshida, Yoshiko Nomoto, Kazumi Kawahira. Muscle related gene expression on passive repetitive stretching of skeletal muscle. 2009 annual meeting of The Association of Academic Physiatrists, Colorado Springs, CO Feb 26, 2009
- ④ 原田雄大, 池田聡, 大渡昭彦, 上川百合恵, 吉田輝, 根路銘周子, 下園由理香, 川平和美: 霊長類脳梗塞片麻痺モデルの作成と機能回復に関する研究, 第46回日本リハビリテーション医学会学術集会, 静岡, 2009.6.4.
- ⑤ 上川百合恵, 池田聡, 原田雄大, 大渡昭彦, 吉田輝, 野元佳子, 下園由理香, 川平和美: ラット腓腹筋持続伸張と反復伸張刺激による筋肥大効果の分子生物学的検討 定量 RT-PCR による効果判定, 第45回日本リハビリテーション医学会学術集会, 横浜, 2008.6.6.
- ⑥ 池田聡, 上川百合恵, 原田雄大, 大渡昭彦, 吉田輝, 下園由理香, 川平和美: 骨格筋に対する機械的ストレッチ刺激の効果 細胞骨格タンパク「デスミン」の発現, 第45回日本リハビリテーション医学会学術集会, 横浜, 2008.6.6.
- ⑦ 大渡昭彦, 池田 聡, 原田雄大, 上川百合恵, 吉田 輝, 堀ノ内啓介, 下園由理香, 野元佳子, 川平和美: Photochemical infarctionモデルラットにおける運動による機能回復とGDNFの発現について, 第43回日本理学療法学会大会, 福岡,

2008.5.15.

- ⑧ Satoshi Ikeda, Katsuhiro Harada, Yurie Kamikawa, Akihiko Ohwatashi, Keisuke Kamikawa, Akira Yoshida, Yoshiko Horinouchi, Kazumi Kawahira. Muscle related gene expression on passive repetitive stretching of skeletal muscle. Association of academic physiatrist annual meeting. Anaheim CA, Feb 22, 2008
- ⑨ Katsuhiro Harada, Satoshi Ikeda, Akihiko Ohwatashi, Yurie Kamikawa, Akira Yoshida, Kazumi Kawahira. Effects of edaravone: a free radical scavenger, on hemiplegic model of rat cerebral infarction. Association of academic physiatrist annual meeting. Anaheim CA, Feb 22, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大渡 昭彦 (OHWATASHI AKIHIKO)
鹿児島大学・医学部・助教
研究者番号: 30295282

(2) 研究分担者

池田 聡 (IKEDA SATOSHI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
講師
研究者番号: 00343369

吉田 輝 (YOSHIDA AKIRA)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 40347109

川平 和美 (KAWAHIRA KAZUMI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 20117493