

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11213

研究課題名（和文）両手間転移からニューロリハビリテーションへの新たなアプローチ

研究課題名（英文）New approach for neurorehabilitation with the intermanual transfer

研究代表者

深堀 良二（Ryoji, Fukabori）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：40457784

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：手の動作に関する学習は利き手依存であり、それらの動作学習は対応する大脳皮質運動野に記憶されると考えられている。これらの記憶は非利き手にも影響を与えることが示唆されている。本研究ではラットに片方の前肢でレバー押し動作を学習（原学習）させ、反対側の前肢のレバー押し動作の学習（再学習）を評価した。その結果、原学習の期間が短い場合、反対側の前肢を用いたレバー押し運動の再学習は多くの試行を要したが、原学習の期間が長いと反対側の前肢の再学習は非常に短かった。これらのことから長い訓練期間によって形成された動作記憶が反対側の動作に影響を与えていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は頭部拘束型オペラント実験装置を用いて、ラットの一方の前肢の動作学習が反対側の前肢の動作学習に影響を与えることを示し、げっ歯類を用いて両手間転移が起こることを明らかにした。人を被験者とした研究で示されていた動作の反応スピードや正確さに関する結果と同様に、ラットの行動でも反応時間や正確さについて評価できた。人における研究では非侵襲的な手法しか用いることができなかったが、ラットにおける侵襲的な研究を推し進めることによってより詳細な神経回路基盤を解明することができる。本研究を進展させ、脳機能障害モデル動物の研究を進め、神経科学的な知見に基づいたリハビリテーションの発展に寄与する。

研究成果の概要（英文）：Memory of movement learning with a hand or a foot are stored in the corresponding cortical motor cortex. It has been suggested that these memories also affect the other hand or foot. In the present study, to evaluate the interference of movement learning between hands, rats learned a lever-pressing action in one forelimb (original learning) and then learned same action in the opposite forelimb (transfer learning). Rats were assigned to two groups. Rats in the long training group had 400 trials in the original learning period, whereas rats in the short training group had 40 trials in the original learning period. In the long training group, the response time from the onset of trial start tone to the end of lever-pressing was shorter than in the short training group. The number of immature responses of lever-pressing action was less in the long training group. These results indicate that the movement memory formed by the long training period influenced the contralateral movement.

研究分野：Neuroscience, Behavioral Science

キーワード：intermanual transfer

## 1. 研究開始当初の背景

脳卒中は脳血管が詰まったり、破れて出血したりすることで脳が損傷を受け、言語障害、手足の麻痺、感覚障害などの症状を呈する疾患である。平成 28 年度の国民生活基礎調査では、脳血管疾患は介護が必要になった原因の第 2 位であった。このことから脳卒中の予防方法、機能障害の客観的な理解、機能回復訓練の発展は国民の共通の利益である。近年の神経科学の発展に伴い、脳卒中後の動作能力の低下（能力障害）や脳組織の損傷（機能障害）の詳細が調べられるようになり、リハビリテーションは新たな局面を迎えた。科学的な方法で脳機能障害の回復を促進させようとする試みをニューロリハビリテーションと呼び、その基礎となる神経回路基盤の解明は非常に重要である。

学習・記憶された動作は、身体の左右別に記憶されている。そのため右手で取得した動作の記憶は、同様の滑らかさで、左手で再現することはできない。しかし、訓練をすることにより、学習した手（学習手）の動作記憶（本研究において学習された動作の記憶を動作記憶と表記する）は、学習していなかった手（非学習手）に影響を与え、短期間で動作を習得できる。この現象は両手間転移（intermanual transfer）と呼び、鏡映描写テストやリーチングの課題を用いて昔から様々な研究がおこなわれてきた（Cook, 1933; Imamizu, 1995）。両手間転移を用いた脳卒中患者のリハビリテーションの研究では、麻痺してしまった手（麻痺手）の動作を非麻痺手でいった動作訓練によって、ある程度回復できることが報告された（Ausenda, 2011）。

大脳皮質運動野や線条体は身体動作の学習・記憶に関与している。申請者は遺伝子改変動物を用いて線条体に関する研究を行ってきた。線条体から脚内核・黒質網様部への経路（線条体黒質路）が学習された行動の反応速度に関与していることを明らかにした（Fukabori, 2012）。また、淡蒼球に投射する経路（線条体淡蒼球路）は学習された行動の正確さに重要であることを示した（Nishizawa, 2012）。さらに、線条体内のコリン作動性介在神経細胞は学習された行動の柔軟性に関与していることも明らかにした（Okada, 2014）。このコリン作動性介在神経細胞は視床からの投射を受けており、視床束傍核からの投射は行動の反応の速度、正確性に関与し（Kato, 2011）、視床外側中心核からの投射は柔軟性に関与していることが分かった（Kato, 2018）。

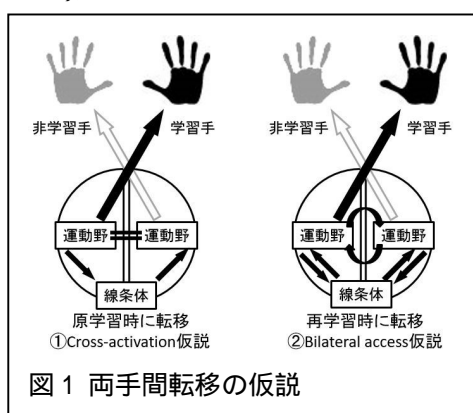


図 1 両手間転移の仮説

動作記憶の両手間転移は、学習手の学習（原学習）時に両側の運動野・線条体に同時に形成される仮説と、非学習手の学習（再学習）時に学習手の運動野・線条体に形成された動作の記憶が参照されるという仮説の二つが考えられている（図 1）。

経頭蓋磁気刺激で人の運動野を刺激し、両手間転移の促進・抑制を示した研究から、運動野は両手間転移に中心的な役割を果たしていることが分かっている（Stöckel T, 2016）。両側の大脳皮質運動野を連絡している投射神経細胞は皮質第 5 層に存在し、投射先によって二つに分けられている。同側の皮質下領域や脊髄の下位運動ニューロンに投射を行う神経細胞は PT（pyramidal tract）型もしくは ET（extratelencephalic）型と呼ばれ、反対側の運動野、

両側の線条体に投射する細胞は IT（intratelencephalic）型と呼ばれている（Saiki, 2018）。両側線条体からの情報は脳基底核回路を経て大脳皮質に再度伝達される。

## 2. 研究の目的

今まで脳卒中後の脳機能障害による能力低下と機能回復の研究は主に人を対象として進められてきた。本研究では侵襲的な操作を加えて両手間転移の神経回路基盤の解明を目指すためにげっ歯類を用いて、両手間転移が生じる行動実験を検討した。また、行動実験で得られた様々なデータに関して、詳細な解析を行い、両手間転移が生じるパラメータを検討した。また、経路特異的に破壊を行うために皮質線条体間の経路の特定、破壊を試みた。

## 3. 研究の方法

### 【実験動物】

ロングエバンスラットで、8 週齢以降の雄を用いて実験を行った。飼育室の電灯は午前 7 時に点灯し、午後 7 時に消灯した。ラットは購入後、飼育室に一週間馴化させた。両手間転移の実験は明期に行った。実験時以外は餌と水は自由に摂取させた。本研究は福島県立医科大学動物実験

委員会に承認された動物実験計画書に従って行われた。

### 【手術】

遺伝子導入ベクターを注入するための手術、頭部拘束型オペラント実験装置に固定するための固定具を装着する手術を行った。1.5~3%イソフルランを吸入させ麻酔した。脳定位固定装置に固定した後、剃毛・ヨーチンによる消毒を行い、切開部位の皮下に1%キシロカインを注入し、局所麻酔を施した。

切開し、頭蓋骨を露出させたあと、頭蓋にアンカーピスを8~12か所打ち込んだ。その後、歯科用のデンタルセメントを用いて固定具と頭蓋を固めた。

頭部皮膚の縫合後に抗生物質のペニシリンを2000ユニット(皮下)全身性鎮痛薬メロキシカムを1 mg/kg(皮下)投与した。固定具を付けたラットは1週間の回復期間後に、実験を開始した。

### 【実験装置】

固定具を付けたラットをタスクフォーサー(頭部拘束型オペラント実験装置、小原医科産業)に固定して実験を行った(図1)。タスクフォーサーの制御はMatlabで作成した実験プログラムを用いた。水平方向の角運動を検出できるレバーをラットの頭部側面に配置した。レバーはエンコーダーに固定され、可動域はエンコーダーの中立位置から-11.5度~+11.5度であった。レバーが中立位置より前方に5.5度以上動いた場合、レバーを押したと判定した。レバーは中空になっており、先端から液体を出ることができる。レバー先端はラットの舌が届く位置になっており、ラットは液体を報酬として獲得できた。レバーの位置とは反対の前肢でレバーを操作させないために、反対側前肢の位置にカバーを付けた。



図1 両手間転移の実験例(右側面にレバーがある場合) 頭部を固定されたラットは側面にあるレバーを前に押し出すことによって報酬を得ることができる。レバーの反対側の前肢は赤色のプラスチック製のカバーによりレバーまで届かない。

### 【行動実験手順】

48時間の絶水を行った後に反応形成を120試行を行った。使用する前肢は左右をランダムで割り当てた。動物は試行中にレバーを中立位置(0度)から5.5度以上前に押し出すと10 microLの報酬が与えられた。最初、中立位置を0.2秒間維持すれば試行が開始されたが、維持する時間は訓練の進行に沿って延長され、最後の20試行では中立位置を1秒間維持しなければ試行は始まらないようにした。報酬を得るためにはレバーを5.5度以上に押し出し状態を0~1秒間維持することを要求された。維持する時間は訓練の進行に沿って長くした。

反応形成後に原学習・再学習を行った。タスク開始時に6 kHzの矩形波による音刺激を聞かせた。この音刺激は15秒間提示され、この間にラットが前に押し出したレバーの位置を維持できれば報酬が与えられた。ラットがレバー押しをしなかった場合、または位置を維持できなかった場合、報酬は与えられなかった。レバーが中立位置で1秒間維持されれば次の試行が開始された。前試行終了から1.5秒を経過してから次の試行の中立位置の検出を行った。40試行を1セッションとし、統制群では原学習を10セッション、実験群では1セッションを行った。その後、再学習では原学習とは反対の前肢を用いて実験を行い、両群ともに20セッションを行った。1日400試行か、実験時間が3時間を超えた場合、その日の実験は終了させた。原学習と再学習は同日には実施しなかった。

### 【解析】

再学習において両手間転移を評価するために、試行開始から押し出し動作を完了するまでの時間、レバー押し失敗数、試行間隔、試行間のレバー押し数を用いた。これらの指標は試行を

制御するプログラムより出力されたレバー位置のアナログデータと、イベントのタイムスタンプをもとに計算され、40 試行 1 セッションの平均として集計された。統計には 10 セッションを 1 ブロックとして平均を算出した値を用いて繰り返しのある分散分析を行った。

#### 4. 研究成果

前肢の動作記憶が反対側前肢に与える影響を検討するために、ラットの一方の前肢でレバー押し運動を学習させた(原学習)。その後、反対側前肢で同様の学習実験(再学習)を行った。試行開始音からレバーを押すまでの時間を反応時間として測定し、動作の習熟度の指標とした。また、1 秒未満のレバー押し回数についても測定を行い、正確さの指標とした。また本学習課題に対する動機付けを試行間隔によって評価した。十分に摂水したラットでは試行を開始しないため試行間隔が長くなり、絶水したラットでは試行間隔が短くなるため、動機付けの一つの指標として用いた。また、比率累進試験などの課題と同様に、レバー押し行動の回数も動機付けの指標として算出した。

原学習で 10 セッション行った長期訓練群では、再学習時の反応時間は 2 セッション目で原学習時の反応時間とほぼ同じとなった(図 2 上)。一方で、原学習で 1 セッションしか行わない短期訓練群では、再学習時の反応時間が原学習と同じになるのは 10 セッション以降であった。10 セッションを 1 ブロックとして集計した結果、再学習時の最初の 10 セッションで両群の間で差が認められた(図 2 下、 $F(1, 8)=12.472$ ,  $p=0.008$ , Bonferroni post-hoc test,  $p=0.02$ )。この結果から、ラットでも動作課題の長期訓練によって反対側前肢の反応時間の短縮が認められ、学習内容の転移が生じたと考えられる。また再学習時の最初のセッションでは反応時間の短縮が起きてないことから、反対側前肢に対応する神経回路基盤は原学習時ではなく再学習時に形成されることが考えられる。

試行開始から報酬を獲得するまでの間、ラットが押すレバーの回数をカウントした。このレバー押し数はラットがレバーを押したが、1 秒間位置を維持できなかった回数で、動作の失敗数を示している(図 3)。再学習時、反応時間と同様に短期訓練群では失敗数が多く、学習の進行と

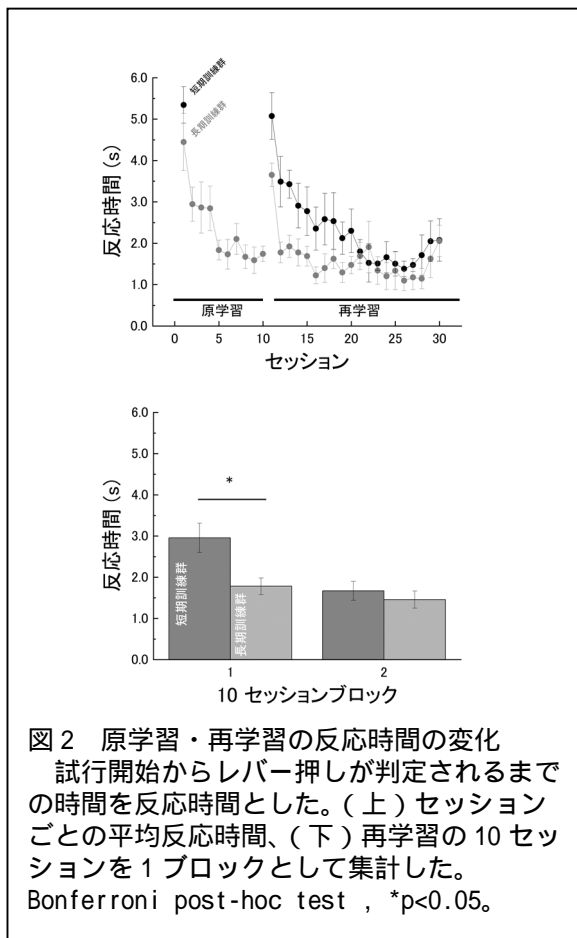


図 2 原学習・再学習の反応時間の変化  
試行開始からレバー押しが判定されるまでの時間を反応時間とした。(上)セッションごとの平均反応時間、(下)再学習の 10 セッションを 1 ブロックとして集計した。Bonferroni post-hoc test , \* $p<0.05$ 。

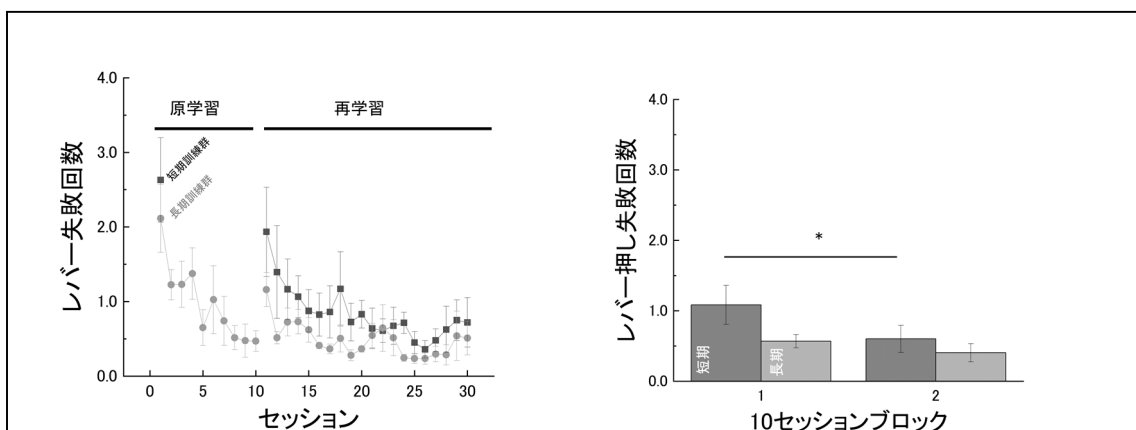


図 3 試行中のレバー押し回数  
試行開始からレバー押しが判定されるまでのレバー押し失敗回数。(左)セッションごとの平均レバー失敗回数。(右)再学習の 10 セッションを 1 ブロックとして集計したレバー押し失敗回数。Bonferroni post-hoc test , \* $p<0.001$ 。

もに失敗数は減少した ( $F(1,8)=5.650$ ,  $p=0.045$ , Bonferroni post-hoc test,  $*p<0.001$ )。一方で長期訓練群では失敗の回数は再学習初期から低く、動作学習の転移が示唆された。再学習初期において、短期訓練群の失敗数が長期訓練群に比べて多い傾向にあった (Bonferroni post-hoc test,  $p=0.114$ )。人における先行研究から、両手間転移は反応時間を指標にした場合に観察されることが多く、失敗数など精緻さの指標では差が分かりづらいことが知られている。特に動作の習熟度は運動の加速度の変化から観察できると考えられていることから、動作の反応時間が両手間転移の指標として適しているものと考えられる。

試行間隔、その間のレバー押し回数についても検討した。試行間隔は再学習時の初期では長かったが、学習の進行とともに低下した。試行間のレバー押し回数も同様の傾向を示した。訓練の長さに関わらず、群間において差は認められなかった (図4)。

本研究ではラットを用いて原学習時の前肢の動作記憶が再学習時の反対側の前肢に与える影響を検討した。短期訓練群では再学習時に動作がスムーズに実行されるまで長い訓練期間が必要であった。長期訓練群では再学習時の反応時間は顕著に短くなり、原学習時に使用した前肢の動作記憶の影響が示唆された。

レバー押しの失敗回数についても同様に検討を行った。再学習時、レバー押しの失敗回数は短期訓練群ではより多くなる傾向があり、長期訓練群では失敗回数は少ない傾向があった。再学習の後半にはどちらの群も同様の値となることから、再学習時の訓練の効果は認められた。

試行間隔、試行間隔中のレバー押し回数を検討した結果、両群ともに差はみられなかった。このことから訓練の長さによって、試行や報酬への動機付けに変化はなかったと考えられる。

ラットによるレバー押し動作の学習において、動作の長期訓練は訓練をした前肢だけではなく、反対側の前肢の動作にも影響を与えることが示された。特に原学習の訓練が長ければ、再学習時の反応時間は顕著に減少した。一方で、レバー押し動作の正確さに関しては、原学習の訓練期間はそれほど重要ではないが、ある程度の影響を及ぼしていると考えられる。動作記憶の両手間転移は反応時間などの運動のスムーズさで判断することができ、正確さなどもある程度の指標となることが分かった。今後、本研究の手法を用いてさらに研究を進め、障害側及び健側での動作記憶の効率的な再生とその神経回路基盤を明らかにしていく。

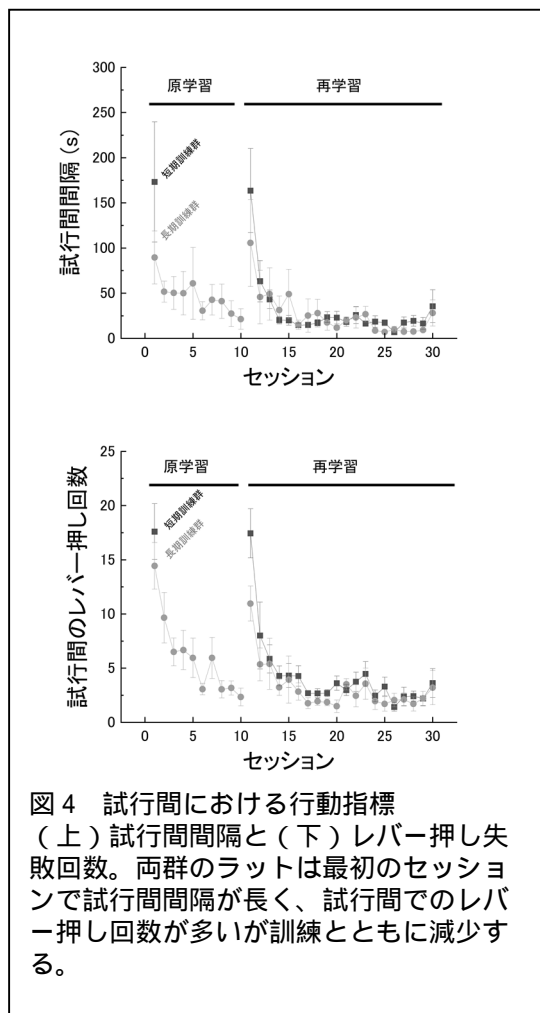


図4 試行間における行動指標  
(上) 試行間隔と(下)レバー押し失敗回数。両群のラットは最初のセッションで試行間隔が長く、試行間でのレバー押し回数が多いが訓練とともに減少する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Fukabori Ryoji, Iguchi Yoshio, Kato Shigeki, Takahashi Kazumi, Eifuku Satoshi, et al.	4. 巻 40
2. 論文標題 Enhanced Retrieval of Taste Associative Memory by Chemogenetic Activation of Locus Coeruleus Norepinephrine Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8367 ~ 8385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1720-20.2020	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 -

1. 著者名 Iguchi Yoshio, Fukabori Ryoji, Kato Shigeki, Takahashi Kazumi, Eifuku Satoshi, Maejima Yuko, Shimomura Kenju, Mizuma Hiroshi, Mawatari Aya, Doi Hisashi, Cui Yilong, Onoe Hirofumi, Hikishima Keigo, Osanai Makoto, Nishijo Takuma, Momiyama Toshihiko, Benton Richard, Kobayashi Kazuto	4. 巻 7
2. 論文標題 Chemogenetic activation of mammalian brain neurons expressing insect Ionotropic Receptors by systemic ligand precursor administration	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-024-06223-4	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryoji Fukabori, Kazuto Kobayashi
2. 発表標題 Intermanual transfer between both forelimbs of lever-push motion procedural memory in rodents
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 深堀 良二, 小林 和人
2. 発表標題 ラットの両手間転移学習モデルにおける原学習と再学習の運動パフォーマンス
3. 学会等名 日本ニューロリハビリテーション学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryoji Fukabori, Yoshio Iguchi, Shigeki Kato, Kazumi Takahashi, Satoshi Eifuku, et al.
2. 発表標題 lonotropic receptor-mediated chemogenetic activation of LC neurons enhances conditioned memory retrieval through adrenergic receptor subtypes in the basolateral amygdala
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

1) 【論文の解説】昆虫のにおい受容体を用いたほ乳類脳神経細胞の新たな活動操作技術の開発と... <a href="https://www.fmu.ac.jp/home/molgenet/news-1086">https://www.fmu.ac.jp/home/molgenet/news-1086</a>
2) 深堀良二, 小林和人, 2023, 疾患モデル動物における脳機能・身体機能の評価, メディカルクリエーションふくしま2023(福島県郡山市), 2023年11月1日~2日

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

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
---------	---------