

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300199

研究課題名（和文） 片麻痺リハビリテーションの最適化と連合野一辺縁系高次脳機能ネットワークの解明

研究課題名（英文） Experimental rehabilitation on rodents hemiplegia

研究代表者

糸井 康宏（KUMEI YASUHIRO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：30161714

研究成果の概要（和文）：

減負荷条件で動物を対象とした高速 X 線撮影に初めて成功し、ラット/マウスの減負荷時の姿勢制御を骨格内臓の運動と同期して解析した。また痛み、侵害受容ニューロンと片麻痺リハビリテーションと高次脳機能との関連性について客観的な評価を行った。さらに、荷重負荷中でのマイクロダイアリシスという高度な技術の開発にも成功し、ストレス中枢における神経伝達物質の回収と当該部位でのニューロン活動記録を同時に行う技術を達成した。これら本研究の成果は、片麻痺の病態進行を神経生化学および神経電気生理学の両視点からニューロンの分子レベルで同時に解析し、困難といわれている片麻痺リハビリテーションへの応用にとって有用な情報となる。

研究成果の概要（英文）：

We studied on various experimental rehabilitation using rodent hemiplegia models. X-ray analysis provides more significant detailed information about moving/behavior and its regulation on the joint-skeletal system of animals. Pain sensation makes a good indicator that reflects the recovery process of hemiplegia so as to prospect a reliable rehabilitation model. We succeeded for the first time in dual measurement of electrophysiological and neurochemical activities of the CNS that controls behavior/moving of rodents. These brain areas respond positively and negatively to mechanical loading and unloading. An appropriate mechanical loading enhances efficiency of synaptic transmission in hippocampus and amygdala that reflects stimulated function of learning/memory and emotional response. These molecular-based approaches would contribute to new rehabilitation for hemiplegia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	6,600,000	1,980,000	8,580,000

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：片麻痺、リハビリテーション、ニューロン活動、行動、高次脳機能

## 1. 研究開始当初の背景

片麻痺は、高齢者に多発する脳血管障害だけでなく、脳腫瘍や外傷などで若年者にも発症する、中枢系損傷による一側性の上下肢の運動麻痺である。実際には、運動障害や聴覚・視覚障害の他に、認知、学習・記憶、情動などの高次脳機能に関わる様々な障害を併発する。片麻痺リハビリテーションでは、感覚麻痺、運動障害、高次脳機能障害が最も重要な項目となる。片麻痺症状を正確に把握するためには、感覚と運動機能のみならず、前頭連合野の統合機能の解析を含めた包括的な診断が必要である。哺乳類では失われた中枢神経は再生されないが、軸索の再生、シナプス連絡の再開、残存する神経細胞による代償的な神経回路の再構築などが進行し、機能は次第に回復する。したがって片麻痺の病態に適合した合理的なリハビリテーションを施せば、予後の大幅な改善が期待される。そのためには片麻痺病態について、様々な障害のマクロ観察のみならず、それを構成するミクロ動態、特にニューロン活動のような細胞や分子レベルでのアプローチが要求される。

片麻痺リハビリテーションにとって体性感覚と侵害受容性応答は極めて重要な要素であるにもかかわらず、十分な検討は行われていない。侵害受容性応答としての痛みは、動物が危険を回避し、身体を保護するための普遍的な警告信号であり、片麻痺評価においても最も重要な生体反応のひとつである。痛みは、片麻痺の急性期と慢性期で、また患側肢と健側肢で異なり、さらに病態時にはアロディニアや交感神経依存性疼痛、記憶による幻肢痛も発生する。これらの痛みは、自律神経機能、内分泌機能、高次脳機能などによって可塑的な変調を受ける。したがって痛みは、片麻痺病態の全体像を反映する重要な指標となる。

## 2. 研究の目的

片麻痺ラットの急性期、慢性期において、感覚、運動機能、高次脳機能（学習・記憶、情動など）を評価する。痛み、感覚麻痺、運動障害、高次脳機能障害などの片麻痺予後について、辺縁系やその他該当する脳内特定部位のニューロン活動などの細胞・分子レベルでの関連性を明らかにする。

個体行動とニューロン活動の両レベルで片麻痺予後を追跡評価し、片麻痺の病態に即したリハビリテーションの最適化を図る。

## 3. 研究の方法

ラット運動野片側をカイニン酸注入によって破壊し、片麻痺モデルを作製する。片麻痺の急性期と慢性期において、1) 痛み閾値、2) 自由行動と運動障害、3) 高次脳機能：作業記憶、4) 神経活動：電気生理学的—神経生化学的多元解析5) 片麻痺予後：運動と感覚と高次脳機能との関連性、を調べる。

## 4. 研究成果

### 1) 痛み閾値

重量負荷2倍(2G)の条件設定で、Von Frey 針テストによる痛み閾値の測定を行った結果、正常ラット(片麻痺なし)では、痛み閾値が正常負荷(1G)時に比較して、約2倍に上昇し、明らかな痛覚低下の現象が約2時間継続し、その後元の値に戻るという現象が観察された。しかし、片麻痺発症後では、正常負荷(1G)時においても、すでに痛み閾値は、片麻痺発症以前の1.5倍に上昇しており、その状態から重量負荷を2倍(2G)に変えても、痛み閾値の有意な上昇は認められなかった。また、この重量負荷を2倍に変化させる直前に、ラットにナロキソン(内因性オピオイド拮抗薬)を投与しておくこと、痛覚は正常値に戻った。以上の所見は、片麻痺や重量負荷2倍の条件に対しては、全身性のストレス応答が惹起され、いわゆるストレス鎮痛が起きたことを示す。さらに宇宙航空研究開発機構 JAXA による協力を得て、0.3G以下の低重力環境でのラット Von Frey 針テストによる痛み閾値の測定実験を行った結果、正常ラットでは、0.2G以下の低重力環境では、痛み閾値が有意に上昇した。言い換えると、80%以上の減負荷条件では増負荷時と同様に負荷(重力)変化がストレス応答反応を誘導し、その結果ストレス鎮痛が惹起されたことを意味する。ところが片麻痺ラットでは、片麻痺自体がストレス誘発要因となり、痛み閾値が上昇し、痛覚が低下する。そしてその状態で負荷を増加させることは片麻痺による力学的負担を増大させることになり、

ストレスはさらに増大し、痛覚は低下したままである。他方、片麻痺ラットを80%以下の緩慢な減負荷環境(0.3Gや0.5Gなど)に置くと、減負荷によるストレスが誘導されない範囲で、片麻痺による力学的負担が軽減されるので、結果的に片麻痺によるストレスは軽減され、痛覚は元の正常値に戻ると考えられる。

痛みには、感覚的側面を制御する外側系(腹側基底核群など)と、情動的側面を支配する内側系(視床の髄板内核群など)があり、腹側基底核群では、他の感覚系と同様に、視床において末梢からの情報が収束され、大脳皮質の体性感覚野に中継される。他方、髄板内核群は大脳辺縁系とも入出力の線維連絡があり、痛みの情動面に参与している。そひて外側系および内側系ともに侵害受容ニューロンが多く存在し、侵害受容に参与する。したがって片麻痺の症状進行過程での痛みのモニタリングは、効果的なりハビリテーションを進める上で重要な指標となる。

## 2) 自由行動解析

近年コンピューターの発達とともに画像診断の進歩には著しいものがある。X線、血管造影、CT、MRI、RI診断、超音波診断などに加えて、蛍光によるバイオイメージングなど枚挙にいとまがない。最近ではCTやMRIもさらに進化を続けており、それに関わる領域も学際的になっている。ほとんどすべての画像がデジタル化され、またポジトロンCTやMRIのように機能・代謝と形態が融合したものまで出現し、生命現象をことごとく画像として表現できる時代が到来した。臨床では、様々な障害や機能の回復を訴える患者が増加している。これらの診断には、機能障害を正確に把握するため精度の高い計測システムが必要である。また治療結果の評価や予後の推測にも精度の高い計測システムが必要とされる。これまで動物モデルでの行動解析は、国内外を問わず、動物行動をビデオ録画し、録画上で四肢あるいは頭部背部の代表的なポイント3点を結び、その3点間のベクトルの動きを画像解析するものが主体であった。しかし、この方法では、片麻痺の微妙な動きを捉えるだけの十分な時感度が得られず、結果的に片麻痺の正確な評価ができないこ

とがわかった。片麻痺の機能障害を神経生理学的に理解する上では、神経活動や運動出力などを正確に記録する方法の選択が重要となる。例えば、自由行動のX線撮像による解析では、関節の動きや骨格の相互に動きが詳細に明瞭に提示されるので、片麻痺運動の正確な解析と評価が得られる。



図1 【X線撮影による行動解析】

3) 作業記憶：ワーキングメモリ(遅延応による行動課題)は、8本のアームからなる八方向放射状迷路試験によって評価した。同試験では、8本の各迷路の先に餌が置かれ、ラットはそれらを食べる事ができるように設定した。ただし、同一のアームに2回以上入っても餌はすでにないので、動物が効率よく餌を獲得するためには、以前の試行で自分が訪れたアームを記憶しておく必要がある。動物は訓練試行で得た情報を遅延時間の間保持し、その記憶をもとに保持試行で効率よく報酬を獲得できる条件を与えられた。訓練試行は、8本のアーム全てに餌を置き、毎回ランダムにすべてのアームのギロチンドアを閉め、ラットがすべてのアームに進入してすべての餌を食べるまでの時間と、餌を探索する行動の変化を10分間観察した。その結果、正常ラット(片麻痺発症以前)では、8本アーム全ての食餌摂取完了時間が、平均2.4±0.8分間(6匹)であったのに対して、片麻痺発症後では、急性期には平均7.3±2.9分間と時間が大幅に延長され、慢性期においても、平均6.1±2.5分間というように、訓練と慣れによる効果は見られなかった。

## 4) 神経活動

マイクロカニューレにタングステン電極を

接合したハイブリッド型の多機能プローブを開発し、片麻痺ラットの脳内特定部位に同プローブを挿入した状態で、ニューロン活動について電気生理学的および神経生化学的に解析する。



図2 【荷重負荷と行動/神経活動記録】

① 神経伝達物質の放出：

予め麻酔下でガイドカニューレ/タングステン電極複合体をセロトニン中枢である背側縫線核内に留置した (Ohgami et al., Brain Res. 1366:38-43, 2010)。この慢性ラットを荷重負荷装置上に固定した飼育ケージ内で、ガイドカニューレに透析プローブ（膜長 2mm）を挿入し、リンゲル液を 2  $\mu$  l/min の流速でシリンジポンプにより 3 時間灌流し、不純物を除去して、準備完了とした。サンプル回収はフラクションコレクターを用いて、荷重負荷前、負荷中、負荷終了までの全行程で一切ラットに触れることなく自動的に行われ、ラット縫線核で放出された神経伝達物質を回収した。透析液は冷凍状態で保存した後、解凍し、高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出器 (HPLC-ECD) による分析を行った。分析にかかるサンプル量は、各サンプルから 20  $\mu$  l とした。分析カラムにはドーパミン (DA)、セロトニン (5HT) の高速分析用カラムを用いた。移動相の流速は 500  $\mu$  l/min で、カラム温度は 25 $^{\circ}$ C とした。ECD では Ag/AgCl の参照電極に対して炭素電極を +400mV で保持した。ECD より得られたデータは、データ解析ソフト PowerChrom (eDAQ) を用いて解析した。マイクロダイアリス法を用いて、2 G 負荷中のラット背側縫線核のドーパミンとセロトニンを測定することに初めて成功した。セロトニンが異常高値に出ている症例が 2

例あるが、これが測定部位での出血の有無に影響されているかどうかの確認が必要である。今回の実験で荷重負荷中に異常高値や測定不能の状態になったケースがあり、統計解析の精度を減少させた。これは、荷重負荷に伴う、不規則かつ不安定なノイズや振動などにより、ダイアリスフローの不安定化を引き起こし、測定系の異常として発現した可能性もある。セロトニンやドーパミンは環境変化やストレス応答において異なる動態を示すことが明らかになっており、異なる重力環境におけるモノアミン系の動態を解明することは意義深い。

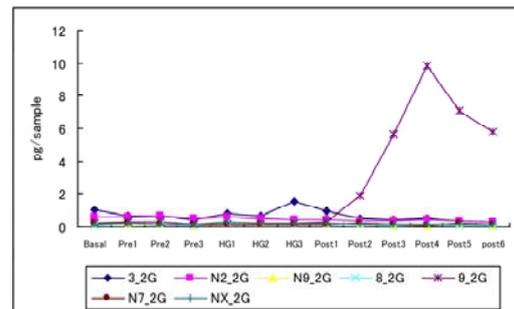


図3 【荷重負荷後のセロトニン放出応答】

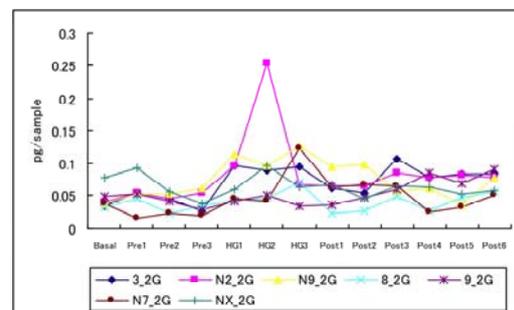


図4 【荷重負荷中のドーパミン放出応答】

② 運動とストレス中枢のニューロン活動  
タングステン双電極を付随させたガイドカニューレをラット視床下部に留置し、慢性自発放電活動を覚醒自由行動ラットからテレメトリで記録した。生シグナルはオフラインで Spike-Sorting Technology (Spike2 software, CED, Cambridge, UK) によってデジタルフィルターを通して分離した single unit の特徴的な template (周期約 4m 秒、振幅約 60  $\mu$  V) を示している。最上段 A は Z 軸方向の重力値を示し、中段 B は分離した single unit の 1 秒間あたりの放電頻度 (Hz)

を表す。上の図5では、5/6 減負荷（低重力 0.15G）中、顕著に視床下部スパイク活動が上昇していることがわかる。

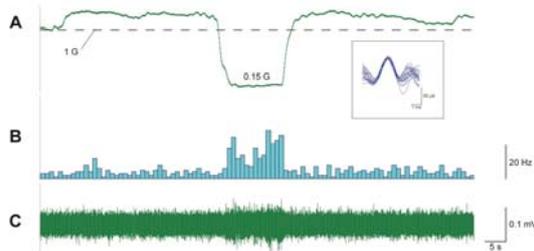


図5【減負荷時の神経活動（視床下部）】

### ③ 高次脳機能中枢のシナプス可塑性

ラットを過重(2G) 10 分間負荷の前後で海馬および扁桃体におけるシナプス伝達効率を調べた。その結果、海馬および扁桃体いずれも、負荷後にはシナプス伝達効率が150%に上昇することがわかった。

#### 【考察】

脳卒中などで半身不随（片麻痺）になると、破壊された神経細胞は再生しないため、治療効果も十分に望めず、回復しないと考えられていた。そのような片麻痺患者のリハビリテーションは、通常、麻痺のない健常側の上下肢を鍛えて、全体として困難ない日常生活を目標としてきた。ところが最近、損傷を免れた他の部位による代償機能がわかってきた。この神経系の可塑性を活用した、分子レベルでの新しいリハビリテーションが醸成される基礎とする新たな展開が今後の課題である。

#### 【まとめ】

- 1) 減負荷条件で動物を対象とした高速 X 線撮影に初めて成功し、ラット/マウスの減負荷時の姿勢制御を骨格内臓の運動と同期して解析した。
- 2) 痛み、侵害受容ニューロンと片麻痺リハビリテーションと高次脳機能との関連性について客観的な評価を行った。
- 3) ラットを用いて、荷重負荷中でのマイクロダイアリスという高度な技術の開発にも成功し、ストレス中枢における神経伝達物質の回収と当該部位でのニューロン活動記録を同時に行う技術を達成した。

4) 片麻痺の病態進行を神経生化学および神経電気生理学の両視点から、ニューロン活動の分子レベルでの新しいリハビリテーション指針を提供した。

#### 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 0 件）  
投稿準備中

〔学会発表〕（計 2 件）

① T. Ishida, J.L. Zeredo, T. Yabushita, S. Seki, Y. Fusejima, G. Fukushima, K. Toda, Y. Kumei: Nociceptive behaviors in rats at low gravity conditions. Congress Pain 2009.9.10 (Lisbon).

② Y. Kumei, J.L. Zeredo, T. Yabushita, T. Ishida, S. Seki, T. Ikeda, K. Toda, M. Matsuura, Y. Nomura, K. Iwasaki, F. Kawano, Y. Ohira, M. Okuno, D. Kageyama, and M. Yamashita: Japanese Research Group for Animal and Human Physiology in Lunar and Martian Gravity. 25<sup>th</sup> annual meeting, ASGSB, 2009.11.7 (Raleigh).

③ Y. Kumei, K. Hasegawa, J.L. Zeredo, K. Narikiyo, K.A. Inoue, Y. Watanabe, Y. Maezawa, N. Ishioka, M. Yamashita, and S. Aou: Rodents Response to Lunar and Martian Gravity: Posture, Behavior, and Neuronal Activity in Partial Gravity. 27<sup>th</sup> annual meeting, ASGSB, 2011.11.3 (San Jose).

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

糸井康宏 (YASUHIRO KUMEI)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研  
究科・講師  
研究者番号：30161714

### (2) 研究分担者

小島久幸 (HISAYUKI OJIMA)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研  
究科・講師  
研究者番号：00104539

石田宝義 (TAKAYOSHI ISHIDA)  
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・  
医員／研究者番号：90549966

### (3) 連携研究者

ゼレド・ジョージ (JORGE LL ZEREDO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研  
究科・非常勤講師  
研究者番号：10363459

井上カタジナアンナ (KA INOUE)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研  
究科・助教  
研究者番号：90302877

粟生修司 (SHUJI AOU)  
九州工業大学・大学院生命体工学研究科  
教授  
研究者番号：40150908

長谷川克也 (KATSUYA HASEGAWA)  
宇宙航空研究開発機構・宇宙科学研究所  
開発員  
研究者番号：30425780