

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500604

研究課題名(和文) 運動は歩行・姿勢制御とそれに関与する神経系の老化を抑制・改善できるのか？

研究課題名(英文) Can exercise maintain and/or improve age-related changes in function and morphology of nervous system responsible for postural and locomotor control?

研究代表者

武本 秀徳 (Takemoto, Hidenori)

県立広島大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：10453218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：運動開始時の年齢が老齢期の移動能力，そして筋と脊髄前角細胞の形態に与える影響をラットに自発走行を課すことで調べた。老齢期における走行距離は，中年齢からの走行運動では増加したが老齢期からのそれでは変化しなかった。また自発走行は最高走行速度は向上させたが，中年齢から開始した方が効果が大きかった。後肢筋の筋湿重量は加齢に伴い減少したが，自発走行は中年齢，高齢期いずれから開始してもこの低下を抑制した。加齢は腰髄前角細胞数を減少させたが，中年齢から自発走行はこの減少を防止した。以上より，運動介入は老齢期における筋の形態を維持改善するとともに，開始時期に依存して脊髄前角細胞の保護にも働くことが示された。

研究成果の概要(英文)：Whether age at onset of exercise affects locomotor ability and morphology of limb muscles and spinal motoneurons in aged rats was studied. Daily running distance in senescence increased when wheel running started in middle age but not in senescence. Although wheel running increased maximum running speed in all runners greater effect was found in rats that began running in middle age. Wet weight of hind limb muscles declined age-dependently in sedentary controls but running prevented or recovered the decline. Age-related loss of lumbar motoneurons existed in sedentary controls but was prevented in rats that began running in middle age. The results demonstrate that exercise intervention maintains and/or recovers muscle morphology in senescence, and helps to survive spinal motoneurons depending on age at onset of exercise.

研究分野：リハビリテーション科学・福祉工学

科研費の分科・細目：リハビリテーション医学

キーワード：抗老化 運動介入 移動能力 骨格筋 脊髄前角細胞

## 1. 研究開始当初の背景

移動能力を維持及び向上させることは健康的な高齢期を迎え過ごすために重要である。先行研究より、地域高齢者の移動能力に比例して転倒発生のリスクは減少することが示されている(鈴木ら, 1999)。また移動能力の低下は高血圧、心臓疾患、がんなどの発症率が高まり、生命予後は悪化すると報告されている(Paffenbarger ら, 1986)。また、移動能力が高いほど、行動範囲が拡大し社会参加の機会が増加するため、生活の質が上昇する(黒田 2005)。したがって、高齢期においていかにして移動能力を維持、及び向上させるかが課題となる。

ウォーキングは、直接的に移動能力を維持、向上させうる方法である。この方法は、等尺性運動より血圧や血糖の変動が緩やかで、基礎疾患の合併率が高い高齢者にとって比較的安全である。また、場所や道具の要求性が低く経済的に実行できるという利点を併せ持つ。

加齢に伴い筋系や神経系(重本ら, 2011; Ando, 2012)の可塑性は低下し、筋萎縮や運動ニューロンの減少が生じる(石原と勝田, 1987)ことが知られている。可塑性の低下を抑制するために早期からの運動が有利だと考えられる。しかし、我々が知る限り、運動開始の時期がその効果にどのような差をもたらすのかは検討されたことがない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、運動介入が開始された年齢が異なると、高齢期における移動能力、そして後肢筋と神経系の形態学的な特性に差が生まれるのか検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

8~9ヶ月齢のWistar系雄性ラットを購入し、以下の4つの群、12ヶ月齢まで運動介入を行わなかった群(12 mo SED,  $n = 8$ ),

24ヶ月齢まで運動介入を行わなかった群(24 mo SED,  $n = 8$ ), 22~24ヶ月齢まで回転かごによる自発走行を行わせた群(S-WR,  $n = 10$ ), 12~24ヶ月齢まで回転かごによる自発走行を行わせた群(L-WR,  $n = 11$ )とした。いずれの群も実験期間中、1日のカロリー摂取量を70kcalとしたが、飲水に制限は加えなかった。

### (2) 運動介入の方法

SおよびL-WRの各群のラットは、それぞれの介入期間において回転かごを設置した飼育ケージである回転ケージ(Mini Mitter Co., USA)で飼育し、24時間自発的に走ることを許した。

### (3) 移動能力の測定

SおよびL-WR群では介入期間中、30秒ごとの回転かごの回転数をコンピューターに記録した。12および24 mo SED群は実験期間最期の24時間回転ケージ内に置き、回転を記録した。その後この回転記録を用いてSおよびL-WR群は4週間ごとの走行距離と1日の走行距離、最高走行速度を算出した。12および24 mo SED群は1日の走行距離、最高走行速度を算出した。

### (4) 組織試料の採取

全てのラットは実験期間終了後、ペントバルビタールナトリウム(64.8mg/ml)を腹腔内投与し、麻酔下で失血させ屠殺した。その後、ヒラメ筋(soleus, SOL)、長趾伸筋(Extensor digitorum longus, EDL)および脊髄を摘出した。

### (5) 腰髄運動ニューロン数の計測

摘出後の脊髄を氷温の4%パラフォルムアルデヒド含リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に一晩浸漬した。浸漬固定後の脊髄は、氷傷を予防するため10%スクロース含PBS

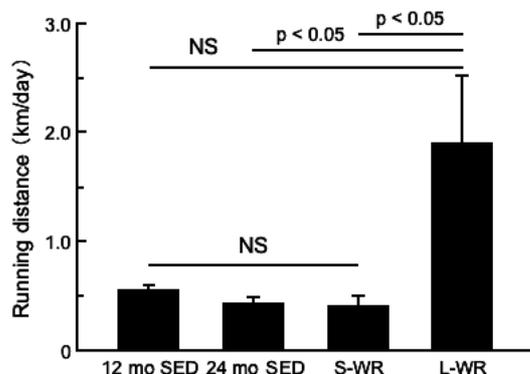


Fig.1 Running distance during the last 24 hours

(4-6 時間), 15%スクロース含 PBS (4-6 時間), 20%スクロース含 PBS (一晚) に順次に移した。この脊髄から, 第2 腰髄の髄節を切り出し, O.C.T.compound (Sakura Finetek Japan Co.Ltd., Japan) に包埋した後, -80 で凍結した。凍結後の腰髄から 10  $\mu$ m の横断切片を -20 のクリオスタット内で作成した。この切片の髄鞘及び神経細胞体をクリューバー・バレラ法にて可視化した。切片の灰白中で脊髄運動ニューロンが位置する領域のデジタル画像を 10 倍の対物レンズ, 光学顕微鏡 (ECLIPSE E600, Nikon Co., Japan), およびカメラ (DXM1200, Nikon Co.) にて撮影した。画像中のニューロンのうち, 第 1 層にあって 20  $\mu$ m 以上の直径を持つものを運動ニューロンと定義し, 盲検的に計測した。1 個体あたり 3 つの切片の左右の灰白質で撮影された 6 つの画像について計測を行った。各個体とも, 計測結果は合計後, 平均値を算出した。

#### (6) 単位体重あたり筋湿重量の算出

摘出された SOL, EDL の筋湿重量を計測し, その個体の体重で除すことで算出した。

#### (7) 統計学的分析

データは, すべて平均値  $\pm$  標準偏差で表した。各群間の比較には一元配置分散分析を行い, 危険率 5%未満をもって有意とした。多重比較では Turkey-Kramer を用いた。

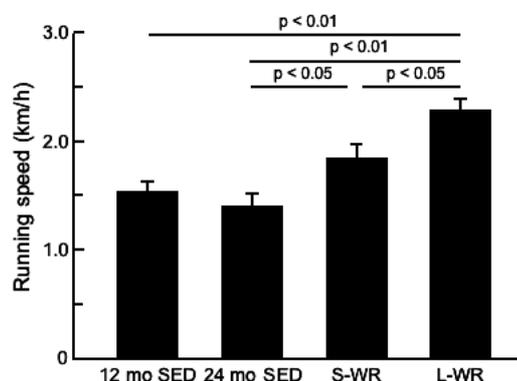


Fig.2 Maximum running speed during the last 24 hours

## 4. 研究成果

### (1) 走行距離 (Fig.1)

12 および 24 mo SED 群の間に差がみられず, 老化は走行距離を変化させていなかった ( $p > 0.05$ )。12 および 24 mo SED 群, および S-WR 群に差はみられず, 3 群間に差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。L-WR 群は, 12 mo SED 群と比べ有意差は得られなかったが, 他の 3 つの群と比べ約 4 倍の増加がみられた ( $p < 0.05$ )。

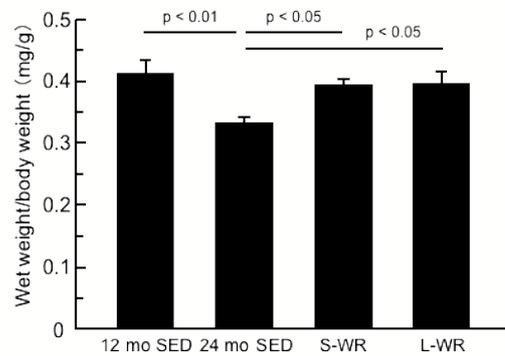
### (2) 最高走行速度 (Fig.2)

走行距離と同様に 12 および 24 mo SED 群の間に差がみられず, 老化により最高走行速度は変化していないことがわかった ( $p > 0.05$ )。24 mo SED 群と S-および L-WR 群の比較から, 自発走行により最高走行速度は増加していたことが示された。S-WR 群と比較すると L-WR 群で増加していたことから, より早期から長期的に行うことでより増加したことがわかった ( $p < 0.01$ )。

### (3) 筋湿重量 (Fig.3)

SOL および EDL ともに同じ変化を示した。両方の筋とも, 12 および 24 mo SED 群の間に減少がみられ, 老化により筋湿重量は減少していた。24 mo SED 群と比べ S-および L-WR 群で増加していたことから, 自発走行により筋湿重量の減少は抑制または改善されることがわかった。S-および L-WR 群の間に差はなかった ( $p > 0.05$ )。

## Soleus



## EDL

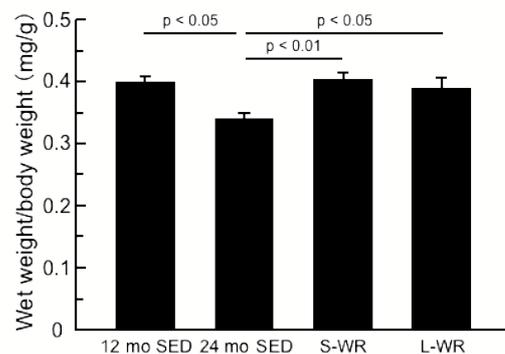


Fig.3 Ratio of wet weight of limb muscles to body weight

### (4) 腰髄運動ニューロン数 (Fig.4)

12 および 24 mo SED 群間で減少がみられたことから、老化により運動ニューロン数は減少したことがわかった ( $p < 0.05$ )。12 mo SED 群と比べ L-WR 群に差はみられなかった ( $p > 0.05$ )。24 mo SED 群と比べ L-WR 群でのみ差がみられた ( $p < 0.01$ )。以上のことから、長期的な自発走行により運動ニューロン数の減少を防止したことがわかった ( $p < 0.01$ )。

### (5) 考察

今回の結果から、より早期からの継続した自発走行が、最高走行速度をより増加させる、老化は筋湿重量を減少させるが、継続して行われた自発走行はこれを抑制または回復させる、試験管的に測定された筋収縮力は開始時期に関わらず自発走行では増加しない、老化は腰髄の運動ニュー

ロン数を減少させるが、早期からの継続した自発走行はこれを防止させる、以上のことがわかった。

### 1) 継続した自発走行の開始時期が移動能力に与える影響

これまでに運動介入が高齢者に対し身体機能、歩行能力を改善させうることを実証した研究はいくつか知られている (Kazumasaら, 2007; 糸谷ら, 圭介, 2012)。しかし、運動介入が老齢期に入る以前から継続された場合の身体機能の向上・維持効果について実証的に検討されたことはこれまでなかった。自発走行を介入方法とした今回の研究結果から、運動介入はより早期から継続された方が移動能力をより改善させることが、走行距離および最高走行速度を通して効果を判定することで明確に確認された。

自発走行が行われた量は、最高走行速度を高める上で重要な因子となる可能性がある。今回、より早期から自発運動が行われたラット (自発走行が行われたのは中齢期～老齢期まで) では、最高走行速度がより大きく向上したが、これとともに1日の走行距離も大きく向上していた。このラットの走行距離は、より遅い時期から自発走行が行われたラット (自発走行が行われたのは老齢期以降) の4倍に達した。この走行量の違いが、運動開始時期の違いに伴う最高走行速度の差をもたらしたのかもしれない。一方、より遅い時期から自発走行が行われたラットでは、同年齢の対象ラットと比べて走行量が増加していないにもかかわらず最高走行速度は対象ラットより向上していた。したがって、自発走行によって最高走行速度が向上する、走行量に応じて速度の向上程度が変わる、そして速度の向上が得られる走行距離は対象ラットが示すことができるものと同程度でもよいと要約するこ

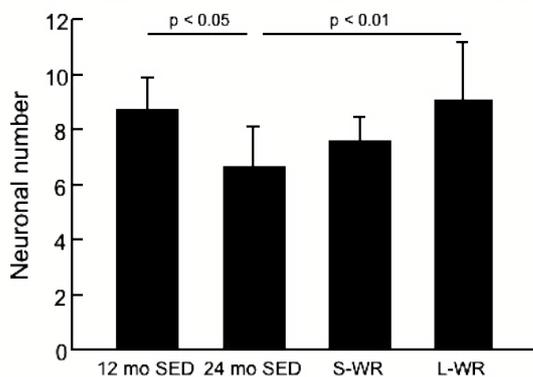
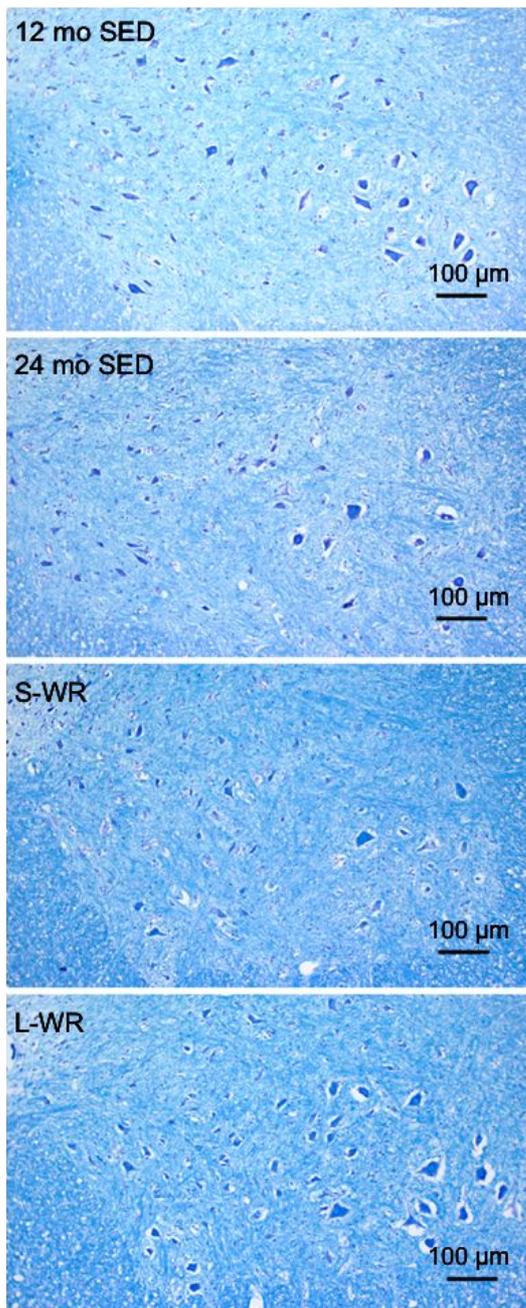


Fig.4 Number of lumbar motoneurons

とができる。高齢期では、身体的な予備能の低下や基礎疾患の存在のため、運動介入

の方法や量には、若年期より制限が必要だと考えられる。より早期から自発運動が行われたラットが示したような長大な走行距離は高齢期における運動介入としては適切とはいえない。移動能力を高める上で、無理なく効果を上げうる運動量について今後検討を進める必要がある。

## 2) 自発走行による筋の質量に対する影響

自発走行は、老化に伴って生じたヒラメ筋と長趾伸筋の湿重量低下を抑制し得た。これらの筋の湿重量は老齢期遺残から開始された介入と老齢期に入って開始された介入間で差はなかったことから、介入の開始時期が異なっても筋の加齢性変化の抑制効果は同等であるように見える。しかしこの見解は過大評価である可能性がある。なぜなら筋の湿重量は同等であっても、ラットが果たし得た最高走行速度はより早くから介入が行われた場合の方が高値を示したためである。この身体機能の差が筋の機能差に由来するのかについて、今後検証していく必要がある。

## 3) 早期からの自発走行による運動ニューロン数減少の防止効果

文献を検索し得た限りでは、これまでに老化に伴う脊髄運動ニューロンの減少を抑制したという報告は、Valdezら(2010)による研究ただ1つのみである。彼らは、4-24ヶ月齢のマウスの比較検討から、この月齢間で加齢に伴う脊髄運動ニューロンの減少が起きることを確認した。そしてこの期間で40%のカロリー制限を加えると、ニューロンの減少が抑制できることを腰髄前根の神経線維数の計測から見いだした。今回の研究によって、このニューロンの脱落を運動介入によっても得られることが初めて確認された。

今回の運動ニューロン数減少の防止には、

脳由来神経栄養因子（以下，BDNF）の増大が関連している可能性がある。BDNFは，神経系の細胞だけでなく筋によっても産生される液性因子で，神経栄養作用や抗酸化作用によって，ニューロンの栄養，生存や神経接続の維持，増大をもたらす（Gomez-Pinillaら，2001）。筋におけるBDNFの発現は，運動量に比例して増大することが知られている（VaynmanとGomez-Pinilla，2002）。より早期から自発運動が行われたラットでは，より大きな走行距離で自発運動が行われたことから，より大量のBDNFが腰髄の運動ニューロンに供給され，その生存を助けたと予想される。

腰髄運動ニューロン数の減少を防止し得たことは最高走行速度の維持・向上に有利に働いた可能性が高い。脊髄の運動ニューロンが減少すると，少数のニューロンで多数の筋線維を支配しなければならなくなる。また，神経支配されていない筋が増加する。そのため，運動をより協調的にしたり巧緻的にする上で不利であり，運動パフォーマンスを低下させる可能性がある。腰髄の運動ニューロンの減少を防止したことは，これらの悪影響を除くことを通して走行能力，特に最高走行速度の向上につながったと考えられる。

#### 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)

〔学会発表〕(計2件)

Takemoto H, Kanemura N, Saka Y, Oki S, Otsuka A, Deie M: Effects of treadmill exercise on the expression of BDNF and the improvement of serotonergic innervation in the lumbar cord of aged rats. The 42nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, New Orleans, 2012.10.16

Takemoto H, Kanemura N, Imagita H, Okada K, Yamakami T, Kawata S, Koichiro Fujimaki K, Matsumoto T, Murata K,

Kokubun T, Kataoka T, Deie M, Otsuka A, Oki S, Morinobu S: Age at onset of exercise affects locomotor ability and survival of lumbar motoneurons in aged rats. The 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, 2013.11.11

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等: 特になし

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

武本 秀徳 (TAKEMOTO, Hidenori)  
県立広島大学・保健福祉学部・助教  
研究者番号: 10453218

##### (2)研究分担者

金村 尚彦 (KANEMURA, Naohiko)  
埼玉県立大学・保健医療福祉学部・准教授  
研究者番号: 20379895

##### (3)連携研究者

藤巻 康一郎 (FUJIMAKI, Koichiro)  
県立広島大学・保健福祉学部・教授  
研究者番号: 50324570

森信 繁 (MORINOBU, Shigeru)  
高知大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 30191042

今北 英高 (IMAGITA, Hidetaka)  
畿央大学・健康科学部・教授  
研究者番号: 00412148

松本 知也 (MATSUMOTO, Tomoya)  
広島大学・医歯薬保健学研究科・特任助教  
研究者番号: 30552567