

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350575

研究課題名(和文) 神経伝達物質や神経栄養因子を指標としたリハビリテーションアプローチの基礎的研究

研究課題名(英文) Effects of rehabilitative approaches on changes neurotransmitter levels and neurotrophic factor expression after brain injury in rats

研究代表者

大渡 昭彦 (OHWATASHI, AKIHIKO)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：30295282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロダイアリシス法を使用して、モノアミン細胞外濃度変化を線条体、海馬、皮質、後肢領域で測定した。それぞれの部位における、モノアミン細胞外濃度変化の推移を、日常の行動下で確認した。脳梗塞モデルを作成し、トレッドミル運動がモノアミン細胞外濃度変化に与える影響の変化を、脳梗塞作成後3日、7日、14日で比較検討した。セロトニンとノルエピネフリンの運動による変化が14日で著明に増加していた。今後は機能回復と関連する他の部位の変化も検討し、例数を増やしながら更なる検討を行いたい。

研究成果の概要(英文)：Extracellular concentrations of monoamines were investigated in the striatum, hippocampus, primary cortex and hindlimb region using microdialysis technique. We confirmed serotonin, norepinephrine and dopamine levels on those region of rat brain in daily living. Rats underwent photochemical infarction, and monoamine levels were investigated in the hippocampus during treadmill running on 3 days, 1 week and 2 weeks after infarction. Serotonin and norepinephrine levels increased remarkably during treadmill running on 2 weeks after infarction. Future study has to determine another region concerning functional recovery, and investigate repeatedly.

研究分野：総合領域

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 神経栄養因子

### 1. 研究開始当初の背景

我々は機能回復のプロセスに関わる脳内物質を明らかにし、その発現と運動刺激の関連を調べることで、運動療法の効果を明らかにすることを目指して研究を行っている。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り、基礎実験として動物実験も行っている。我々は特にグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) に着目し、GDNF が梗塞周囲に機能回復と平行して発現することを免疫組織学的に明らかにした。このような実験結果から機能回復には運動が有効であり、神経栄養因子が回復を促すということは理解できるが、どのような運動がより効果があるのか、またその回復過程全体も明確にはされていない。

そこで、我々は自由行動下の動物の行動観察と同時に組織の生体内物質の変動を経時的かつ連続的に検討できる唯一の方法である、マイクロダイアリシス法を使用して研究を行うこととした。この方法は、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、特に NE、5-HT、DA 等のカテコラミンの変動に関する検討は少ない。運動とカテコラミンに関する報告は温熱下での疲労に着目した研究があり、脳卒中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、後者の研究は神経伝達物質の指標としてカテコラミンに着目していない。このように、脳損傷後の回復と運動刺激や神経伝達物質の研究は十分とは言い難い。

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が、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

今回の研究の目的は、まず基礎データとして、日中の自由行動下におけるモノアミンの濃度変化を観察する。次に脳梗塞モデルラットで運動がモノアミン濃度変化に与える影響を検討する目的で、トレッドミル運動中と前後の変化を検討した。

### 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 (図1)。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:-5.8mm、lateral:5.0mm、ventral:3.5 mm)、皮質 (Primary cortex) は (anterior:+3.3mm、lateral:2.8mm、ventral:0.5 mm)、後肢領域 (Hindlimb region) は (anterior:-1.5mm、lateral:2.8mm、ventral:0.5 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。

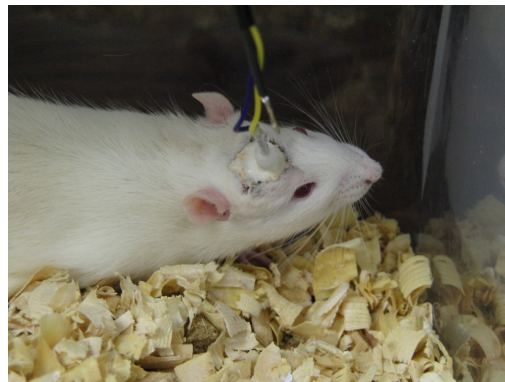


図1 プローブの挿入位置

### 4. 研究成果

まずプローブの挿入位置を確認するため、測定後に麻酔下で環流固定して脳を摘出してクライオスタットで凍結切片を作成し、ヘマトキシレン・エオジン染色を行った。

図2より、海馬領域にプローブが挿入されていることが確認できる。

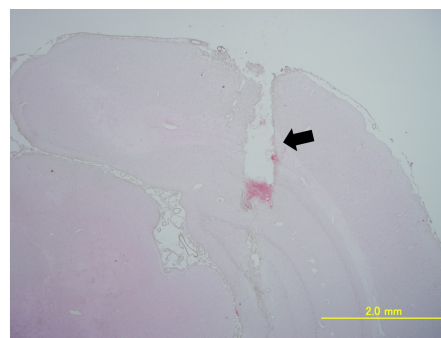


図2 プローブの挿入位置  
黒の矢印の位置がプローブ挿入部

次に自由行動下での NE、DA、5-HT 濃度変化を図3, 4, 5に示す。

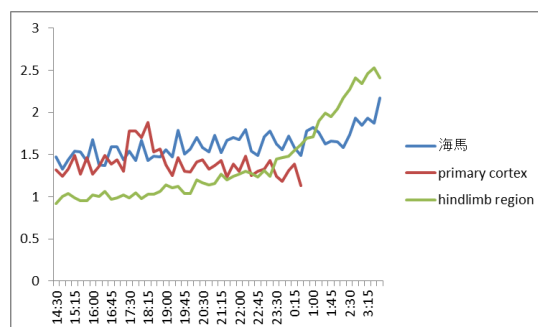


図3 NE濃度の日内変動

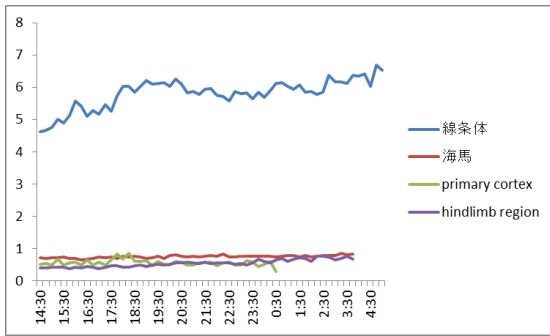


図4 DA濃度の日内変動

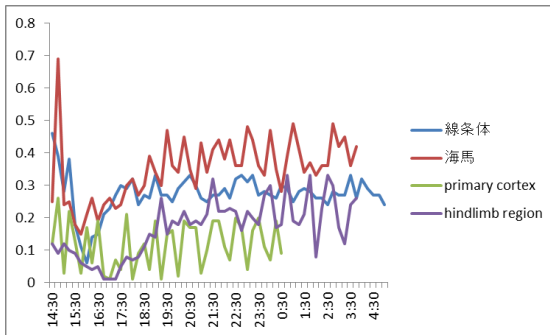


図5 5-HT濃度の日内変動

線条体における DA 濃度が、他と比較すると非常に大きくなっている。しかし、その他は 0.1~0.2mV 程度の変動はあるものの、比較的安定している印象を受ける。NE 濃度で hindlimb region だけ後半に上昇しているが、これは固定の不安定性や出血など、他の要因による影響が考えられる。

次に脳梗塞モデルラットにおいて運動がモノアミン濃度変化に与える影響を検討する目的で、トレッドミル運動中と前後の変化を検討した。脳梗塞作成 3 日後、7 日後、14 日後の海馬における比較を図 6, 7, 8 に示す。

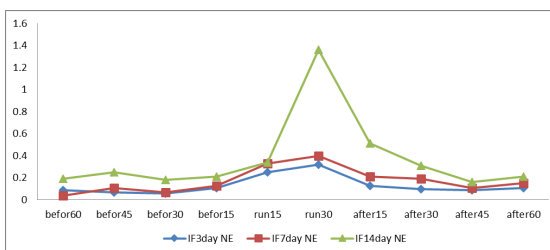


図6 海馬における NE 濃度変化

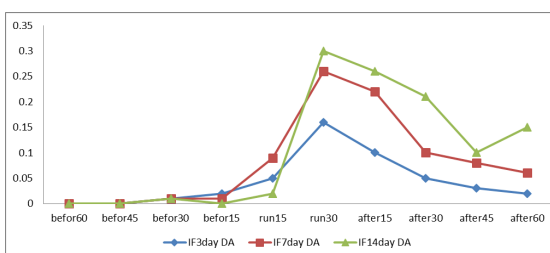


図7 海馬における DA 濃度変化

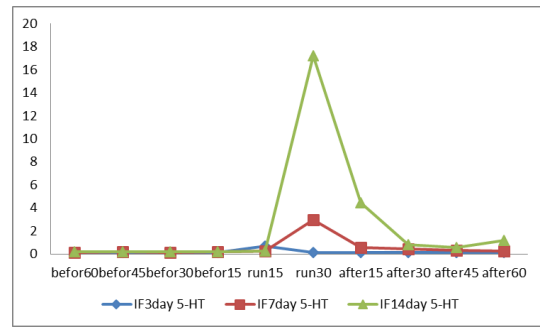


図8 海馬における 5-HT 濃度変化

DA は脳梗塞作成後の日数による変化は少ないが、NE と 5-HT は脳梗塞作成後 14 日目の運動による変化が最も大きくなっている。これらの結果から、脳梗塞回復に伴ってモノアミンの運動に対する感受性も改善することが考えられた。

今後は機能回復と関連する他の部位の変化も検討し、例数も増やしながら更なる検討を行いたい。

#### 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 8 件)

- ① Tokunaga K, Nakai Y, Matsumoto R, Kiyama R, Kawada M, Ohwatashi A, Fukudome K, Fukuda H, Kijima Y, Ohshige T, Maeda T, Effect of foot progression angle and lateral wedge insole on a reduction in knee adduction moment. Journal of Applied Biomechanics, 査読有, doi: 10.1123/jab.2015-0163, 32(5):454-61, 2016
- ② 山田誠, 石原田秀一, 大渡昭彦, 二次予防事業の不参加者特性と介護予防マシンの開発コンセプト—身体機能の向上と参加意欲を両立させるマシンの開発要件—, 鹿児島大学法文学部紀要「経済学論集」, 査読なし, 86; 39-63, 2016
- ③ 和田隆, 小野恵, 外西正博, 有川順子, 新保直規, 木山良二, 大渡昭彦, 大重匡, 吉元洋一, 虚弱高齢者において生活空間と身体機能が転倒リスクに与える影響, 理学療法科学, 査読有, 31(1): 81-85, 2016
- ④ Ohshige T, Ohwatashi A, Kiyama R, Nishi H, Takamori A, Hyperthermic effects of hand bathing: benefits of incorporating finger flexion-extension exercise. J Phys Ther Sci. 査読有, doi: 10.1589/jpts.27.3779, 32(5):454-61, 2015
- ⑤ Ohshige T, Ohwatashi A, Kiyama R, The varying effects of warm-water bathing therapies: partial bathing decreases

exercise tolerance to levels similar to full-body bathing. J Phys Ther Sci, 査読有, doi: 10.1589/jpts.27.3373. 27(11):3373-5, 2015

- ⑥ Uto Y, Maeda T, Kiyama R, Kawada M, Tokunaga K, Ohwatashi A, Fukudome K, Ohshige T, Yoshimoto Y, Yone K, The Effects of lateral wedge insole on knee and ankle joint during slope walking. J Appl Biomech. 査読有, doi: 10.1123/jab.2014-0247, 31(6):476-83, 2015
- ⑦ Ohwatashi A, Ikeda S, Harada K, Kamikawa Y, Yoshida A, Inoue K, Yanagida N, Fukudome K, Kiyama R, Ohshige T, Maeda T, Temperature changes caused by the difference in the distance between the ultrasound transducer and bone during 1 MHz and 3 MHz continuous ultrasound - a phantom study -. J Phys Ther Sci. 査読有, doi: 10.1589/jpts.27.205, 27(1):205-8, 2015
- ⑧ Kiyama R, Kawada M, Tokunaga K, Ohwatashi A, Fukudome K, Yone K, Yoshimoto Y, Ohshige T, Maeda T, The effect of force sensation on the ability to control muscle force during fatigue condition. Isokinetics and Exercise Science, 査読有, 22(4):287-293, 2014

[学会発表] (計9件)

- ① 才田剛志, 木山良二, 大渡昭彦, 貴島芳文, 前田哲男: 体幹の加速度・角速度を指標とした人工膝関節全置換術による歩容変化の分析, 第51回日本理学療法学会大会, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市), 2016. 5. 28
- ② 大重匡, 渋谷翔大, 宮崎 宣丞, 野田 詩織, 大渡昭彦, 木山良二: 温浴 (全身浴・前腕浴・下腿浴) の重心動揺効果とウォーミングアップ効果について, 第50回日本理学療法学会大会, 東京国際フォーラム (東京都千代田区), 2015. 6. 7.
- ③ 川田将之, 木山良二, 大渡昭彦, 大重匡, 前田哲男: 斜面歩行における関節負荷の検討, 第50回日本理学療法学会大会, 東京国際フォーラム (東京都千代田区), 2015. 6. 5.
- ④ Kiyama R, Kakoi H, Nojima T, Kisanuki I, Yamano T, Ohwatashi A, Maeda T, Effect of rotator cuff tears on joint reaction force and muscle force: musculoskeletal model simulation. World Confederation for Physical Therapy Congress, Singapore, May 2, 2015
- ⑤ 原田雄大, 池田聡, 大渡昭彦, 上川百合恵, 根路銘周子, 山下真紀, 吉田輝, 白

橋いずみ: 光感受性色素を用いた霊長類脳梗塞片麻痺モデルの作成とその行動観察研究, 第51回日本リハビリテーション医学会学術集会, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), 2014. 6. 6.

- ⑥ 池田聡, 上川百合恵, 原田雄大, 吉田輝, 大渡昭彦: 筋力増強の分子生物学的検討と脳梗塞モデルを用いた機能回復の検討 (シンポジウム), 第51回日本リハビリテーション医学会学術集会, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), 2014. 6. 5.
- ⑦ 大渡昭彦, 吉田輝, 池田聡, 原田雄大, 大重匡, 木山良二, 前田哲男: トレーニングの有無がトレッドミル運動による線条体と海馬のモノアミン細胞外濃度変化に与える影響, 第49回日本理学療法学会大会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2014. 5. 9
- ⑧ 徳永健, 木山良二, 大渡昭彦, 前田哲男: 歩行時の足角の変化が外側ウェッジの効果に及ぼす影響, 第49回日本理学療法学会大会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2014. 5. 9.
- ⑨ 上野友愛, 木山良二, 大渡昭彦, 前田哲男: 方向転換時の足部の運動学的分析と性差による影響, 第49回日本理学療法学会大会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2014. 5. 9.

[図書] (計1件)

- ① 前田哲男, 木山良二, 大渡昭彦, 医学書院, 解いてなっとく 使えるバイオメカニクス, 2015, 200

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大渡 昭彦 (OHWATASHI AKIHIKO)  
鹿児島大学・歯学域医学系・准教授  
研究者番号: 30295282

(2) 研究分担者

吉田 輝 (YOSHIDA AKIRA)  
鹿児島大学・歯学域附属病院・講師  
研究者番号: 40347109

池田 聡 (IKEDA SATOSHI)  
北海道大学・大学病院・准教授  
研究者番号: 00343369

(削除: 平成27年7月28日)