

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 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500456

研究課題名（和文）

脳出血後の効果的なリハビリテーション療法の開発ならびに脳機能改善機序の解明

研究課題名（英文）

Useful rehabilitative methods in stroke rats and the mechanisms of functional recovery.

研究代表者

石田 和人（ISHIDA KAZUTO）

名古屋大学・医学系研究科（保健）・講師

研究者番号：10303653

研究成果の概要（和文）：脳卒中による機能障害を軽減するために、より有効なリハビリテーションの方法論を開発することが望まれる。我々は脳出血のモデル動物を作成し、運動方法の違い（トレッドミル運動、アクロバット運動、麻痺肢の強制使用）によるそれぞれの効果を示し、神経可塑性が関与することを示した。また脳梗塞のモデル動物を用いて、運動が脳梗塞を予防する効果を示し、また運動により機能回復のみならず、記憶機能も改善することを証明した。

研究成果の概要（英文）：It is very important to develop the methodology of physical therapy for stroke patients. We examined the effects of some kinds of exercise, as treadmill exercise, acrobatic motor skill training, and forced limb use. Each rehabilitative method was effective to enhance the functional recovery by the brain plastic changes. On the other hands, we showed the effects to prevent from brain infarction and to improve memory function by treadmill exercise in rat model of infarction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：リハビリテーション・脳卒中・運動療法・ラット

1. 研究開始当初の背景

医学の進歩に伴い、脳卒中の生命予後は比較的良くなった。しかし、その後遺症として重篤な機能障害をもたらすため、日常生活が極めて困難な状況となり、患者様の QOL は著しく低下することについては依然として大きな問題である。これに対する根本的な方策として、我々はリハビリテーション（運動療法）の新しい方法論確立を目指したいと考えている。

現在、脳卒中モデル動物を用いたリハビリ効果に関する研究は散見されるものの、その

ほとんどが脳梗塞を対象としており、我々が研究対象としている脳出血モデルでの研究報告は少ない。また、運動機能面の改善効果が示されても、その作用機序を示す研究報告は未だわずかである。これに対し我々は、片側の線条体に脳出血を引き起こし、その後 4 日～2 週間まで毎日 30 分間のトレッドミル運動 (9 m/sec) を行うと、運動しないコントロール群に比べ有意な改善を示し、運動機能の回復が早まることを示した（平成 15 年度～平成 16 年度科学研究費補助金による研究成果）。また、この機能改善効果が生じる際

の非出血側でみられる樹状突起の分枝拡大に着目した。その結果、脳出血後のトレッドミル運動により非出血側の線条体で、樹状突起が伸び、分枝が増えることがわかった（平成19年度～平成20年度科学研究費補助金による研究成果）。

このような運動による樹状突起の拡大は、大脳皮質や海馬などでも生ずることが推測され、機能改善効果に寄与しているものと考えられる。そのベースには、シナプスの可塑性に関する遺伝子群やタンパクの発現、また血管新生や神経栄養因子およびその受容体の発現などが関与しているものと考えられ、これらの因子の解析を進めることにより、運動効果の作用メカニズムを解明することができると思われる。

また、運動刺激の種類についても、単純運動であるトレッドミル運動に限らず、近年、臨床的にも注目されている **Constraint induced movement therapy; CIMT**（非麻痺側上肢の使用を制限して、麻痺肢の強制的かつ集中的な使用を誘発する運動療法（**Taub, 2002**）や **Motor skills training**（複雑なアクロバットの運動課題を行わせ、運動学習機能を賦活する、（**Kleim JA, 1996**）を脳出血モデルラットに適応することにより、より効果的なりハビリテーション介入手段を見出すことができ、その際においても樹状突起の解析ならびにシナプス形成や神経栄養因子等の解析を加えることで、作用メカニズムの解明が可能と考えられる。

2. 研究の目的

脳卒中モデル動物に対する最適な運動療法の条件を追求することを本プロジェクトの最終目的とする。本研究では、線条体および内包出血モデルラットを用いて、トレッドミル運動、アクロバット運動、麻痺肢の強制使用（**forced limb use: FLU**）という3種類の運動介入法を実施し、機能回復過程を検討するとともに、脳（線条体、大脳皮質、海馬）における、シナプス可塑性関連遺伝子群およびタンパクの発現などを解析し、運動による機能改善効果の作用機序を解明する。また、本研究では、脳梗塞モデルを用いた検討も行う。

3. 研究の方法

(1)線条体出血後のトレッドミル運動による機能改善効果に着目し、樹状突起ならびにシナプス関連タンパクの解析を行う。また、同モデルを用いて、アクロバット運動の実施方法を確立し、機能回復効果および作用機序について検討するとともに、トレッドミル運動による効果と比較検討する。

(2)内包出血モデルに **FLU** を施し、機能回復効果について調べ、また、実施のタイミング

による違いについて検討する。

(3)脳梗塞モデルを用いてモデル作成前の運動による脳梗塞軽減効果およびその際の酸化ストレスについて調べる。また、同モデルを用いて、記憶機能に着目し、トレッドミル運動による改善効果について調べる。

4. 研究成果

脳卒中モデル動物のより詳細な機能改善効果を評価する手段として、各種の運動および認知機能の評価法が実施できる体制を確立した。

(1)線条体出血モデルに対し、術後4-14日後にトレッドミル運動（9 m/min, 30分間）を行うことにより、運動機能の回復が促進され、非出血側の線条体で、樹状突起の拡大がおこることを示した。また、線条体出血モデル動物が実施可能なアクロバット運動のコースを作成・確立し、出血4日後から本運動法を実施することにより、脳出血後の運動機能障害の回復を早める効果をもたらすこと示し、脳出血による脳組織の損傷体積（線条体）および大脳皮質の厚さ（委縮の指標）には差異を認めないものの、免疫組織化学染色による解析から、大脳皮質運動野において、神経活動マーカーである Δ FosB タンパクの発現が高まり、**synaptophysin**（シナプス前マーカー）および **PSD-95**（シナプス後マーカー）の発現も増加を認めた。以上より、同運動刺激はシナプスの可塑性を高める効果を促すとともに運動機能の回復促進効果をもたらすものと考察した。

(2)脳卒中モデルに対する麻痺肢の強制使用（**forced limb use: FLU**）の効果を検討する前段階として、正常ラットの片側前肢を1週間強制使用させる（軽いギプス固定により反対側前肢の運動を抑える）ことによる弊害について調べ、大きな副作用は認めないものの、海馬で **dark neuron**（神経細胞障害初期像）の出現、神経栄養因子遺伝子（**VEGF** および **GDNF** の **mRNA**）の発現減少、および神経新生の抑制（**BrdU** 陽性細胞数の減少）が認められることを示した（論文業績4）。また、**FLU** を内包出血モデルに適応し、モデル作成後早期（術後翌日）から1週間実施すると、全身的に捉えた運動麻痺の回復や脳出血による脳組織損傷体積には変化を認めなかったが、ランダムに配置した梯子上の移動能力（**ladder test**）や前肢をペレットにリーチして把握し食べる動作機能（**single pellet reaching test**）のような比較的巧緻的な動作能力の改善が認められることを立証した（論文業績3）。

以上の研究成果から、脳出血モデルラットに対する運動療法の効果を検証する上で、ト

レッドミル運動に加え、アクロバット運動および麻痺肢の強制使用 (FLU) が有効であることが示され、その際、神経の可塑的变化が生じていることを確認した。このことは脳出血後のリハビリテーションの有用性を科学的に解明する上で重要な過程であると考えられる。

(3)また、脳卒中モデル動物に対するトレッドミル運動の効果を示す所見として、脳梗塞モデルラットを対象に、モデル作成3週間前から毎日、トレッドミル運動を実施すると、梗塞による組織障害を軽減する効果を示し、この際、脳内の酸化ストレス (4-HNE, 8OHdG の発現) を抑制することを示した (論文業績 1)。また、同モデル動物の記憶機能が障害されることを示し、トレッドミル運動により改善を示すこと、特にその効果は、低速度による条件の方が効果的であることを示した (論文業績 2)。

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 4 件)

- 1) M. Hamakawa, A. Ishida, K. Tamakoshi, H. Shimada, H. Nakashima, T. Noguchi, S. Toyokuni, K. Ishida: Repeated short-term daily exercise ameliorates oxidative cerebral damage and the resultant motor dysfunction after transient ischemia in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 52: (in press), 2013. (査読あり)
- 2) H. Shimada, M. Hamakawa, A. Ishida, K. Tamakoshi, H. Nakashima, K. Ishida: Low-speed treadmill running exercise improves memory function after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Behavioural Brain Research* 243: 21-27, 2013. (査読あり)
- 3) A. Ishida, K. Tamakoshi, M. Hamakawa, H. Nakashima, H. Shimada, T. Masuda, H. Hida, K. Ishida: Early onset of forced impaired forelimb use causes recovery of forelimb skilled motor function but no effect on gross sensory-motor function after capsular hemorrhage in rats. *Behavioural Brain Research* 225 : 126-134, 2011. (査読あり)
- 4) A. Ishida, Y. Ueda, K. Ishida, S. Misumi, T. Masuda, M. Fujita, H. Hida: Minor neuronal damage and

recovered cellular proliferation in the hippocampus after continuous unilateral forelimb restraint in normalrats. *J Neurosc Res* 89: 457-465, 2011. (査読あり)

[学会発表] (計 41 件)

- 1) K. Tamakoshi, A. Ishida, T. Noguchi, T. Toda, K. Ishida: Motor skills training improved motor function and enhanced synaptic plasticity in the sensorimotor and striatum following intracerebral hemorrhage in rats, 第 90 回日本生理学会大会, 2013. 3. 27-29, 東京.
- 2) K. Tamakoshi, K. Ishida: Effects of motor skills training on motor functions and neural plasticity following intra-cerebral hemorrhage in rats. 2012 Nagoya-Yonsei University Research Exchange Meeting on Health Sciences, 2012. 11. 23, Nagoya.
- 3) T. Toda, K. Ishida, S. Lee: Interaction between down-regulation of KCC2 expression in plasma membranes of spinal motoneuron and spasticity after stroke in mice. 2012 Nagoya-Yonsei University Research Exchange Meeting on Health Sciences, 2012. 11. 23, Nagoya.
- 4) K. Ishida, H. Shimada, A. Ishida, T. Noguchi, H. Nakashima, K. Tamakoshi, M. Hamakawa: Low intensity treadmill exercise improves memory dysfunction after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Neuroscience* 2012, 2012. 10. 15., New Orleans.
- 5) K. Tamakoshi, T. Noguchi, A. Ishida, H. Nakashima, H. Shimada, S. Lee, K. Ishida: Motor skill training promote motor functional recovery and neural activity and plasticity following intra-striatal hemorrhage in rats. *Neuroscience* 2012, 2012. 10. 15., New Orleans.
- 6) A. Ishida, S. Misumi, T. Masuda, K. Tamakoshi, K. Ishida, H. Hida: Induction of NMDA receptor expression in the sensorimotor cortex by intensive use of impaired upper limb relates to functional recovery after capsular hemorrhage in rats. *Neuroscience* 2012, 2012. 10. 15., New Orleans.
- 7) T. Toda, K. Ishida, S. Lee: Interaction

- between downregulation of KCC2 expressions in plasma membranes of spinal motoneuron and spasticity after cortical injury in mice - a novel spasticity model -. 第35回日本神経科学大会, 2012. 9. 18, 名古屋.
- 8) A. Ishida, T. Masuda, Y. Misumi, K. Tamakoshi, K. Ishida: Effect of early-forced impaired forelimb use after internal capsule hemorrhage is mediated by changes of NMDA receptors. 第35回日本神経科学大会, 2012. 9. 18, 名古屋.
 - 9) K. Tamakoshi, A. Ishida, T. Noguchi, H. Shimada, K. Ishida: Motor skill training promote motor functional recovery and synaptic plasticity following intra-striatal hemorrhage in rats. 第35回日本神経科学大会, 2012. 9. 18, 名古屋.
 - 10) 嶋田悠, 石田章真, 玉越敬悟, 中島宏樹, 野口泰司, 石田和人: 脳梗塞モデルラットの記憶障害に対するトレッドミル運動の影響 - 負荷速度の違いによる検討 -. 第47回日本理学療法学会大会, 2012. 5. 25-27., 神戸.
 - 11) 中島宏樹, 石田章真, 玉越敬悟, 嶋田悠, 石田和人: 慢性ストレス環境でのトレッドミル運動が抑うつ発症とその関連脳領域に及ぼす影響. 第47回日本理学療法学会大会, 2012. 5. 25-27., 神戸.
 - 12) 石田章真, 玉越敬悟, 中島宏樹, 嶋田悠, 飛田秀樹, 石田和人: 麻痺肢強制使用が感覚運動野におけるグルタミン酸受容体発現に及ぼす影響および運動機能回復との関連性の検討. 第47回日本理学療法学会大会, 2012. 5. 25-27., 神戸.
 - 13) 玉越敬悟, 石田章真, 中島宏樹, 嶋田悠, 石田和人: 脳出血モデルラットに運動スキル訓練が与える影響の行動学的解析および中枢神経系の生化学的解析. 第47回日本理学療法学会大会, 2012. 5. 25-27., 神戸.
 - 14) A. Ishida, K. Tamakoshi, T. Masuda, H. Hida, K. Ishida: Effect of forced impaired forelimb use on glutamate receptor expression in the sensorimotor cortex and functional recovery after capsular hemorrhage in rats. 第89回日本生理学会大会, 2012. 3. 29-31, 松本.
 - 15) A. Ishida, K. Tamakoshi, T. Adachi, H. Nakashima, H. Shimada, T. Masuda, H. Hida, K. Ishida: The effects of acute and delayed onset of forced impaired forelimb use on plastic changes and functional recovery in rats with internal capsule hemorrhage. Neuroscience 2011, 2011. 11. 12-16, Washington, DC.
 - 16) A. Ishida, K. Ishida: Acute but not delayed onset of forepaw use promotes plasticity and functional recovery in rats after capsular hemorrhage. Nagoya-Yonsei University Research Exchange Meeting in Health Sciences & Nursing, 2011. 11. 4., Wonju, Republic of Korea.
 - 17) 玉越敬悟, 石田章真, 中島宏樹, 嶋田悠, 石田和人: 脳出血後の運動スキル訓練が運動機能および神経細胞に与える影響. コ・メディカル形態機能学会第10回学術集会, 2011. 9. 17-18, 春日井.
 - 18) A. Ishida, T. Adachi, K. Tamakoshi, H. Nakashima, H. Shimada, T. Masuda, H. Hida, K. Ishida: Differential effects of early and late forced-use of impaired forelimb on functional recovery and expressions of growth-related factors after internal capsule hemorrhage in rats. 第34回日本神経科学会, 2011. 9. 14-17, 横浜.
 - 19) H. Shimada, M. Hamakawa, H. Nakashima, A. Ishida, K. Tamakoshi, K. Ishida: Treadmill Exercise Improves Memory Function After Cerebral Infarction In Rats. 6th International Congress of World Congress for Physical Therapy, 2011. 6., Amsterdam.
 - 20) 玉越敬悟, 石田章真, 濱川みちる, 嶋田悠, 中島宏樹, 石田和人: 線条体出血ラットにおける運動スキル訓練が運動機能回復と神経可塑性関連タンパクに与える影響. 第46回日本理学療法学会大会, 2011. 5. 27-29, 宮崎.
 - 21) 石田章真, 足立拓史, 石川順平, 玉越敬悟, 濱川みちる, 中島宏樹, 嶋田悠, 飛田秀樹, 石田和人: 内包出血後の麻痺肢強制使用は傷害側感覚運動野の可塑的变化を惹起する. 第46回日本理学療法学会大会, 2011. 5. 27-29, 宮崎.
 - 22) 濱川みちる, 嶋田悠, 中島宏樹, 石田章真, 玉越敬悟, 豊國伸哉, 石田和人: 脳梗塞発症前の運動の効果及び酸化ストレスに着目した作用機序の検討. 第46回日本理学療法学会大会, 2011. 5. 27-29, 宮崎.
 - 23) 嶋田悠, 濱川みちる, 中島宏樹, 石田章真, 玉越敬悟, 石田和人: 脳梗塞後ラットの記憶障害に対するトレッドミル運動の効果. 第46回日本理学療法学会大会, 2011. 5. 27-29, 宮崎.
 - 24) 中島宏樹, 石田章真, 玉越敬悟, 濱川み

- ちる, 嶋田悠, 石田和人: 慢性拘束ストレス負荷が行動, 運動機能, 組織に及ぼす影響. 第 46 回日本理学療法学会大会, 2011. 5. 27-29, 宮崎.
- 25) 石田章真, 足立拓史, 石川順平, 玉越敬悟, 濱川みちる, 嶋田悠, 中島宏樹, 飛田秀樹, 石田和人: 内包出血モデルラットに対する CI therapy の実施時期による効果の違い. 第 1 回日本基礎理学療法学会学術集会. 2011. 5. 26, 宮崎.
- 26) 濱川みちる, 石田章真, 玉越敬悟, 嶋田悠, 中島宏樹, 豊國伸哉, 石田和人: 脳梗塞発症前の運動による脳梗塞障害軽減効果及び作用機序の検討 一酸化ストレスに着目して一. 第 1 回日本基礎理学療法学会学術集会. 2011. 5. 26, 宮崎.
- 27) K. Tamakoshi, A. Ishida, M. Hamakawa, H. Nakashima, H. Shimada, K. Ishida: Effects of motor skills training on motor function and synaptic plasticity associated protein after intracerebral hemorrhage in rats. 第 88 回日本生理学会大会, 2011. 3. 28-30, 横浜.
- 28) A. Ishida, M. Hamakawa, K. Tamakoshi, T. Masuda, H. Hida, K. Ishida: Enhanced recovery of the skilled forepaw function in small hemorrhage model rats by forced-dominant use of the impaired limb. Neuroscience 40th annual meeting (Neuroscience 2010), 2010. 11. 13-17, San Diego.
- 29) 濱川みちる, 石田章真, 玉越敬悟, 嶋田悠, 中島宏樹, 豊國伸哉, 石田和人: 脳梗塞モデルラット作成前の運動の効果および作用機序の検討 ~抗酸化作用に着目して~. 第 26 回東海北陸理学療法士学会, 2010. 11. 6, 福井.
- 30) 玉越敬悟, 石田章真, 濱川みちる, 嶋田悠, 中島宏樹, 石田和人: 線条体出血ラットにおける運動スキル訓練が運動機能回復と大脳皮質の Δ fosB 陽性細胞の発現に与える影響. 第 26 回東海北陸理学療法士学会, 2010. 11. 6, 福井.
- 31) K. Tamakoshi, A. Ishida, Y. Takamatsu, M. Hamakawa, H. Shimada, H. Nakashima, K. Ishida: Motor skills training speed up the recovery of motor function following intracerebral hemorrhage in rats. 第 33 回日本神経科学会, 2010. 9. 2-4, 神戸.
- 32) A. Ishida, Y. Takamatsu, M. Hamakawa, K. Tamakoshi, H. Hida, K. Ishida: Forced-use of impaired forelimb increases expression of neurotrophic factors in rats motor cortex and induces recovery of skilled reaching and stepping following internal capsule hemorrhage. 第 33 回日本神経科学会, 2010. 9. 2-4, 神戸.
- 33) 玉越敬悟, 石田章真, 高松泰行, 濱川みちる, 嶋田悠, 中島宏樹, 平井梨奈, 石田和人: 線条体出血モデルラットにおける複雑運動が運動機能回復に与える影響. 第 45 回日本理学療法学会大会, 2010. 5, 岐阜.
- 34) 高松泰行, 石田章真, 濱川みちる, 玉越敬悟, 鄭且均, 石田和人: 線条体出血モデルラットに対するトレッドミル走による運動機能回復促進効果と大脳皮質の可塑的变化. 第 45 回日本理学療法学会大会, 2010. 5, 岐阜.
- 35) 石田章真, 飛田秀樹, 高松泰行, 濱川みちる, 玉越敬悟, 石田和人: 内包出血モデルラットにおける麻痺側前肢の強制使用が機能回復に及ぼす影響は運動タスクごとに異なる. 第 45 回日本理学療法学会大会, 2010. 5, 岐阜.
- 36) 濱川みちる, 中島宏樹, 石田章真, 高松泰行, 玉越敬悟, 嶋田悠, 平井利奈, 石田和人: 脳梗塞モデルラットに対する急性期経皮的電気刺激療法の効果検討. 第 45 回日本理学療法学会大会, 2010. 5, 岐阜.
- 37) 嶋田悠, 濱川みちる, 中島宏樹, 石田章真, 高松泰行, 玉越敬悟, 石田和人: 脳梗塞モデルラットの自然回復経過における記憶機能の変化. 第 45 回日本理学療法学会大会, 2010. 5, 岐阜.
- 38) 平井利奈, 石田章真, 高松泰行, 玉越敬悟, 石田和人: 線条体出血後のストレス負荷による影響の行動学的および組織学的検討. 第 15 回理学療法の医学的基礎研究会, 2010. 5. 名古屋.
- 39) 嶋田悠, 濱川みちる, 中島宏樹, 石田章真, 石田和人: 脳梗塞モデルラットの記憶機能は低下する. 第 15 回理学療法の医学的基礎研究会, 2010. 5. 名古屋.
- 40) 玉越敬悟, 石田章真, 高松泰行, 濱川みちる, 嶋田悠, 中島宏樹, 平井梨奈, 石田和人: 線条体出血モデルラットにおける運動スキル訓練が運動機能回復及び脳組織に及ぼす影響. 第 15 回理学療法の医学的基礎研究会, 2010. 5., 名古屋.
- 41) 石田章真, 高松泰行, 濱川みちる, 玉越敬悟, 飛田秀樹, 石田和人: 内包出血後早期における麻痺側前肢強制使用が運動機能回復および成長関連因子発現に及ぼす影響. 第 17 回脳機能とリハビリテーション研究会学術集会, 2010. 4., 東京.

〔図書〕（計 1 件）

1) 石田和人: 標準理学療法学・神経理学療法学 (第 2 章. 脳卒中の発症および回復メカニズム), 医学書院, pp 19-29, 2013.

〔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

<http://plaza.umin.ac.jp/ishida/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田和人 (ISHIDA KAZUTO)
名古屋大学・医学系研究科（保健）・講師
研究者番号：10303653

(2)研究分担者

鳥橋茂子 (TORIHASHI SHIGEKO)
名古屋大学・医学系研究科（保健）・教授
研究者番号：90112961

(3)連携研究者

鄭 且均 (JUNG CHA-GYUN)
名古屋市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00464579