

平成 2 6 年 6 月 1 3 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500594

研究課題名（和文）脳損傷後の学習能力や運動機能改善と神経栄養因子や神経伝達物質の変化に関する研究

研究課題名（英文）A study of the functional recovery on the motor learning and activity, and changes e
xpression of neurotrophic factors and neurotransmitter levels after brain injury

研究代表者

大渡 昭彦（AKIHIKO, OHWATASHI）

鹿児島大学・医学部・助教

研究者番号：30295282

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円、（間接経費） 1,080,000 円

研究成果の概要（和文）：マイクロダイアリシスを使用して、モノアミンの変化を線条体、海馬、皮質、皮質後肢領域、腹側被蓋野で測定した。それぞれの部位におけるモノアミンの細胞外濃度の違いを確認した。また、これまでの研究で強制的に運動させることで、モノアミンの細胞外濃度が高くなることを確認している。しかし、強制的に運動させることは神経活動が活発になっても、機能回復にとって効率的とは考えにくい。そこで今後、我々は報酬物質としてのドーパミンの変化に着目して、効率的に機能を回復させる方法を検討する。

研究成果の概要（英文）：Extracellular concentrations of monoamines were investigated in the striatum, hippocampus, primary cortex, hindlimb region and ventral tegmental area using microdialysis technique. We confirmed that monoamine levels were increased during treadmill running. Nerve activity becomes active by compulsorily exercise, but is not efficient for the functional recovery. We pay our attention to change of dopamine levels as the reward material and examine a method to restore motor function effectively.

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：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

1. 研究開始当初の背景

我々は臨床において、脳卒中患者に対する促通的運動訓練が麻痺の回復を促進することを報告してきた。しかし、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。他者の基礎実験でも脳梗塞の改善には運動が有効であるとする報告は多くみられ、神経栄養因子の発現と麻痺の回復や梗塞巣の減少を関連づけた研究、特に脳由来神経栄養因子 (BDNF) に注目したものが多くみられる。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えない。

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

本研究の目的は、脳梗塞モデルラットを用いて脳損傷後の学習能力や運動機能回復のプロセスに関わる脳内物質を明らかにし、その変化を効果的に促進する最適な運動刺激や薬物治療の開発を目指すものである。特に今回の研究では、自由行動下での神経伝達物質の変化を観察し、日内変動等の基礎的なデータを収集した。

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 週齢の Wistar 系ラットの雄を使用した。イソフル

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。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)、腹側被蓋野は (anterior: +1.6mm、lateral: 1.4mm、ventral: 5.8 mm) とした。ガイド挿入後 3 日目に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。

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 1 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。

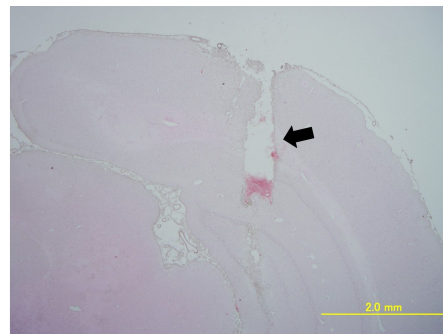


図 1 プローブの挿入位置
黒の矢印の位置がプローブ挿入部

典型的なマイクロダイアリシスの測定結果として、標準液の結果を図 2 に示す。マイクロダイアリシスのデータは、測定開始時が不安定になることから、全てにおいて 3 時間以降のデータを採用した。

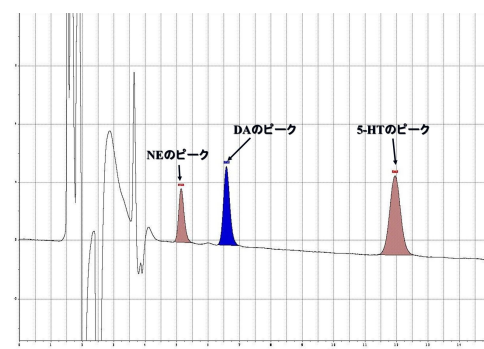


図 2 標準液の測定結果
左から NE、DA、5-HT のピークが確認できる

線条体での測定結果を図3に示す。DAの値が大きく、5-HTも確認できるがNEの変化は比較的小さい。

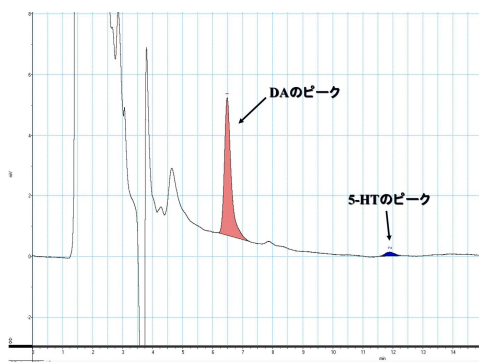


図3 線条体での測定結果

海馬での測定結果を図4に示す。NE、DA、5-HTの全てにおいて変化が確認できるが、DAは比較的变化が小さい。

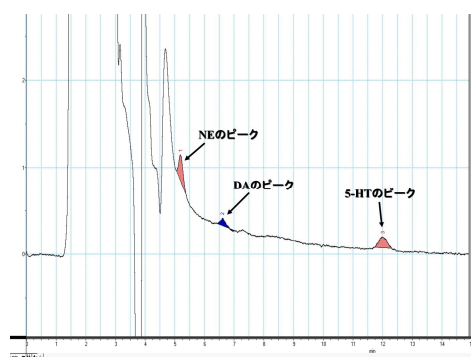


図4 海馬での測定結果

皮質(Primary cortex)での測定結果を図5に示す。NE、DA、5-HTの全てにおいて変化が確認できるが、全体的に変化が少なく不明なピークが入りやすい傾向が見られた。垂直方向の深さが0.5mmで、表層に近いことも影響しているかもしれない。

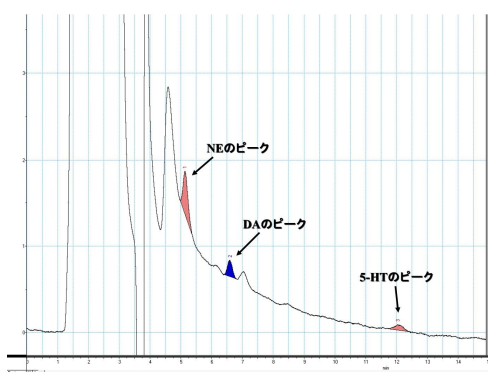


図5 皮質での測定結果

皮質後肢領域(Hindlimb region)での測定結果を図6に示す。基本的には皮質と同じでNE、DA、5-HTの全てにおいて変化が確認できるが、全体的に変化が少なく不明なピークが入りやすい傾向が見られた。

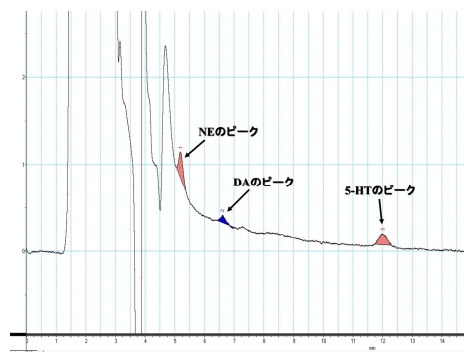


図6 皮質後肢領域での測定結果

腹側被蓋野での測定結果を図7に示す。腹側被蓋野は中脳の一領域であり、DA作動性ニューロンが多く存在し、報酬予測に関わっており、様々な情動にも関わっていると考えられている。

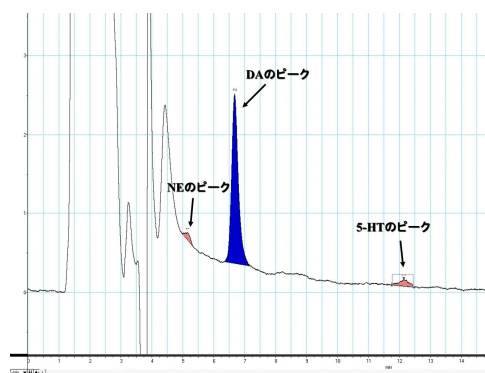


図7 腹側被蓋野での測定結果

このように様々な部位におけるモノアミン細胞外濃度を観察したところ、それぞれに違いを確認することができた。また、これまでの研究で日内変動を観察したところ、全体的に夜間の値が高くなる傾向を示した。これはラットが夜行性であり、夜間の活動が多くなることと関係していると考えられる。また、トレッドミルで走行させると、それぞれの値が高くなる傾向があり、運動することで神経活動が活発になると考えられる。

しかし、強制的に運動させることは神経活動が活発になっても、機能回復にとって効果的とは考えにくい。そこで、今後は側坐核と腹側被蓋野の経路を利用して報酬物質としてのドーパミンを指標に検討していきたい。

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11件)

Satoshi Ikeda, Akihiko Ohwatashi, Katsuhiko Harada, Yurie Kamikawa and Akira Yoshida. Expected for acquisition movement exercise is more effective for functional recovery

than simple exercise in a rat model of hemiplegia. SpringerPlus 査読有, doi:10.1186/2193-1801-2-517, 2013

Akihiko Ohwatashi, Satoshi Ikeda, Katsuhiro Harada, Yurie Kamikawa, Akira Yoshida. Exercise enhanced functional recovery and expression of GDNF after photochemically induced cerebral infarction in the rat. EXCLI journal. 査読有, Vol.12;693-700, <http://www.excli.de/volume12.php>, 2013

Satoshi Ikeda, Yurie Kamikawa, Akihiko Ohwatashi, Katsuhiro Harada, Akira Yoshida. The effect of anabolic steroid administration on passive stretching-induced expression of mechano-growth factor in skeletal muscle. The Scientific World Journal. 査読有, doi: 10.1155/2013/313605. 2013

Satoshi Ikeda, Katsuhiro Harada, Akihiko Ohwatashi, Yurie Kamikawa, Akira Yoshida. Contralateral cortical role on functional recovery in a Rat Model of Photochemically induced cerebral infarction. EXCLI journal. 査読有, Vol.12;641-646, <http://www.excli.de/volume12.php>, 2013

Satoshi Ikeda, Katsuhiro Harada, Akihiko Ohwatashi, Yurie Kamikawa. Effects of edaravone, a free radical scavenger, on photochemically induced cerebral infarction in a rat hemiplegic model. The Scientific World Journal. 査読有, doi: 10.1155/2013/175280. 2013

Yurie Kamikawa, Satoshi Ikeda, Katsuhiro Harada, Akihiko Ohwatashi, Akira Yoshida. Passive Repetitive stretching short duration within a week increases myogenic regulatory factors and myosin heavy chain mRNA in rat skeletal muscles. The Scientific World Journal. 査読有, doi: 10.1155/2013/493656. 2013

Satoshi Ikeda, Katsuhiro Harada, Akihiko Ohwatashi, Yurie Kamikawa, Akira Yoshida, Kazumi Kawahira. A New Non-Human Primate Model of Photochemically Induced Cerebral Infarction. PLoS ONE, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0060037. 2013

Yoshiharu Nagai, Tetsuo Maeda, Ryoji Kiyama, Akihiko Ohwatashi, Hideo Kaneko, Kensuke Matsuda, Masami Nakahara, Hiroyuki Tahara, Kazunori Yone, Akio Inoue. Relationship between Physical Activity Level and Hip Joint

Pain in Adult Women with Chiari Pelvic Osteotomy. Journal of the physical Therapy Science. 査読有, Vol.24;561-565, 2012

Noma T, Matsumoto S, Shimodozono M, Etoh S, Kawahira K. Anti-spastic effects of the direct application of vibratory stimuli to the spastic muscles of hemiplegic limbs in post-stroke patients: a proof-of-principle study. J Rehabil Med. 査読有, 44(4):325-30. doi: 10.2340/16501977-0946. 2012

Shimodozono M, Noma T, Nomoto Y, Hisamatsu N, Kamada K, Miyata R, Matsumoto S, Ogata A, Etoh S, Basford JR, Kawahira K. Benefits of a repetitive facilitative exercise program for the upper paretic extremity after subacute stroke: a randomized controlled trial. Neurorehabil Neural Repair. 査読有, 27(4):296-305. doi: 10.1177/1545968312465896. 2012

Matsumoto S, Shimodozono M, Miyata R, Kawahira K. Effect of cilostazol administration on cerebral hemodynamics and rehabilitation outcomes in poststroke patients. Int J Neurosci. 査読有, 121(5):271-8. doi: 10.3109/00207454.2010.551431. 2011

〔学会発表〕(計6件)

吉田輝, 大渡昭彦, 池田聡, ラット排尿反射に対する温熱の影響, 第20回日本排尿機能学会, 2013.9.19, 静岡

Satoshi Ikeda, Katsuhiro Harada, Akihiko Ohwatashi. Functional recovery on Marmoset model of photochemically induced cerebral infarction. 2nd Japan-Korea NeuroRehabilitation Conference. February 16, 2013. Okayama

大渡昭彦, 池田聡, 吉田輝, 原田雄大, 上川百合恵, 根路銘周子, 川平和美: トレッドミル運動が線条体と海馬のモノアミン細胞外濃度に与える影響, 第47回日本理学療法学会, 2012.5.26, 神戸

Satoshi Ikeda, Kayo Nakamura, Katsuhiro Harada, Akihiko Ohwatashi, Yurie Kamikawa, Akira Yoshida, Kazumi Kawahira. Exercise accelerates the functional recovery and induces neurotrophic factor NGF on the rat cerebral infarction model. The 11th Congress of European Forum for research in Rehabilitation, May 27, 2012, Riva del Garda, Italy

原田雄大, 池田聡, 大渡昭彦, 上川百合恵, 吉田輝, 根路銘周子, 山下真紀, 川

平和美：霊長類を用いた脳梗塞片麻痺長期生存モデルの作成と機能回復に関する研究，第 48 回日本リハビリテーション医学会学術集会，2011.11.2，千葉
永井良治，前田哲男，金子秀雄，吉住浩平，中原雅美，松田憲亮，木山良二，太渡昭彦，米和徳，井上明生：変形性股関節症術後患者の身体活動量に関する研究
股関節に過負荷になる身体活動量について，第 46 回日本理学療法学術大会，2011.5.28，宮崎

6．研究組織

(1)研究代表者

大渡 昭彦 (OHWATASHI AKIHIKO)
鹿児島大学・医学部・助教
研究者番号：30295282

(2)研究分担者

池田 聡 (IKEDA SATOSHI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号：00343369

吉田 輝 (YOSHIDA AKIRA)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：40347109

川平 和美 (KAWAHIRA KAZUMI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員
研究者番号：20117493