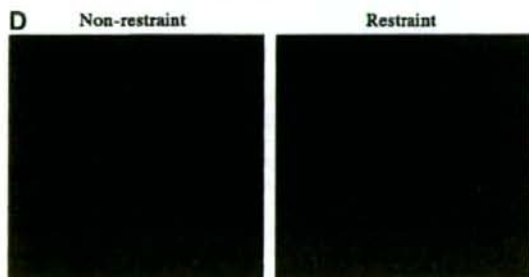
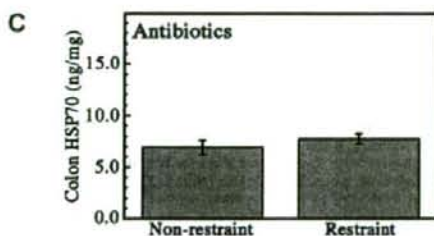
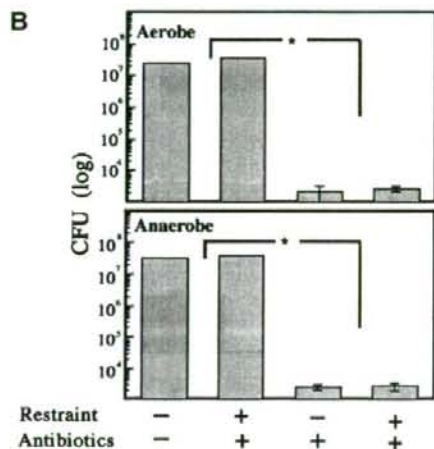
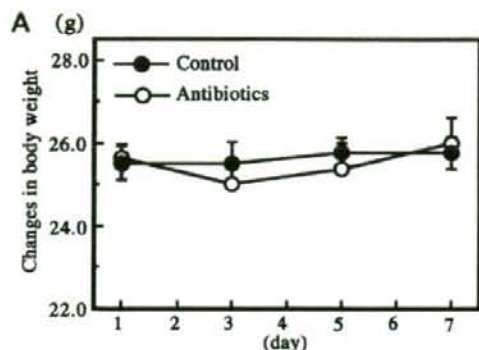


There were no differences between the changes in body weight of water- and antibiotic-treated mice (water vs. antibiotics NS) (Fig. 3A).



Both anaerobic and aerobic bacteria in the feces sufficiently dropped to less than 1/10,000 of the levels in untreated mice by antibiotic treatment ($n = 8$, $P < 0.001$, Fig. 3B). Restraint did not affect the number of colonies of either aerobic or anaerobic commensal bacteria.

Elimination of commensals abolished restraint-induced HSP70 augmentation (Fig. 3C, 3D). The level of colonic HSP70 of antibiotic-treated restrained mice was 7.75 ± 0.47 ng/ml ($n = 8$), while that in the non-restraint group was 6.93 ± 0.71 ng/ml ($n = 8$) (Fig. 3C). There was no significant difference in the level of HSP70 between the non-restrained and restrained mice. There were no apparent morphological changes, such as damage to the colonic epithelia after antibiotic treatment. Immunohistochemical analyses indicated no apparent enhancement of colonic HSP70 of restrained mice (Fig. 3D).

3.6. LPS administration partially restores restraint stress-induced colonic HSP70 augmentation of commensal bacteria-depleted mice

As it has been reported that TLR signaling is required for commensal bacteria-dependent HSP expression (Rakoff-Nahoum et al., 2004), LPS, the ligand for TLR4, was administered to antibiotic-treated mice.

LPS administration alone without restraint did not alter the level of HSP70 ($n = 8$), whereas LPS treatment significantly increased the level of colonic HSP70 in restrained mice ($n = 8$, Fig. 4).

Colonic HSP70 level of mice that received distilled water without LPS did not increase even after restraint stress. Immunohistochemical analyses revealed moderate enhancement of HSP70 in colonic epithelial cells, without apparent morphological changes.

3.7. TLR4 expression in the colonic tissue was unaffected by restraint stress

As TLR4 is known to be responsible for LPS-dependent expression of HSP70, the effect of restraint stress on the level of TLR4 expression was examined (Fig. 5).

Immunohistochemical analysis showed that the restraint session had no effect on the level or distribution of TLR4 (Fig. 5A). TLR4 was strongly positive in the muscularis externa as well as in the lamina propria. The level of TLR4 in the colonic tissue was not increased but was slightly down-regulated by restraint stress (Fig. 5B and C).

3.8. Passage of Alexa-LPS through the colon epithelia by restraint stress

Next, we examined whether LPS is translocated through the colonic epithelia into the lamina propria after restraint. Immediately after restraint, Alexa-LPS was injected into the looped colonic

Fig. 3. A cocktail of antibiotics was administered for 7 days to eliminate commensal bacteria. Up-regulation of colonic HSP70 expression by restraint was abrogated in antibiotic-treated mice. (A) Effects of antibiotic treatment on body weight changes in C57BL/6 mice. Antibiotic treatment did not affect body weight. The results are shown as means \pm SE of 8 mice. (B) Effects of antibiotic treatment on colonic bacterial number (top: aerobic; bottom: anaerobe). Both the colony forming unit (CFU) of anaerobic and aerobic bacteria in the feces dropped to less than 1/10,000 of those from mice without antibiotic treatment. Restraint did not affect the number of colonies of either aerobic or anaerobic commensal bacteria. The results are shown as means \pm SE of 8 mice ($P < 0.001$). (C) There was no significant difference in HSP70 level between non-restrained and restrained mice treated with antibiotics. The results are shown as means \pm SE of 8 mice. (D) Immunohistochemical analysis revealed no apparent morphological differences in the levels of colonic HSP70 between non-restrained and restrained mice treated with antibiotics. HSP70 augmentation after restraint was absent in antibiotic-treated mice. HSP70: red; Topro-3: blue (200 \times).

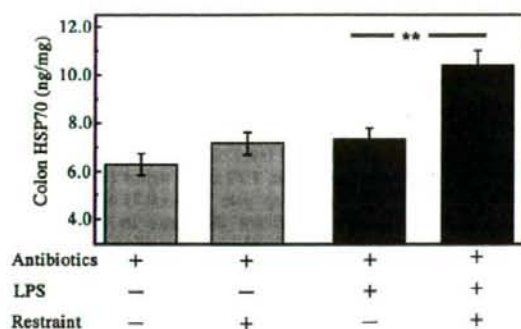


Fig. 4. LPS administration partially restores restraint-induced colonic HSP70 augmentation of commensal bacteria-depleted mice. LPS administration alone without restraint did not alter the level of HSP70, while LPS increased colonic HSP70 level of commensal-depleted restrained mice. Colonic HSP70 level of non-restrained mice, which received distilled water without LPS, did not change even after restraint stress. The results are shown as means \pm SE of 8 mice ($P < 0.01$). There was a significant group \times time interaction in repeated-measures ANOVA analysis ($p = 0.0404$, $F = 4.621$).

lumen. After 10 min of incubation, we examined the localization of Alexa-LPS (Fig. 6). Alexa-LPS staining was localized along the luminal surface on the apical membrane of epithelial cells in both control and restrained mice. Interestingly, however, Alexa-LPS staining was rarely detected in the lamina propria of non-restrained mice, but was detectable in the lamina propria of the restrained mice. This result clearly indicated that Alexa-LPS passed through the epithelial barrier of the colon and translocated into the lamina propria after restraint stress.

3.9. Tight junction component ZO-1 was down-regulated after restraint stress

As TLR4 was not expressed on the luminal surface of epithelial cells, we hypothesized that the integrity of tight junctions may be reduced under restraint for LPS or bacterial components to reach TLR4 in the lamina propria. As the level of ZO-1, a component of tight junctions, has been reported to correspond to permeability across a sheet of cultured epithelial cells (Boivin et al., 2007), we examined whether the level of colonic epithelium ZO-1 protein expression was affected by restraint stress (Fig. 7).

Immunohistochemical analysis indicated that ZO-1 staining was localized along the apical membrane of epithelial cells. Restraint resulted in a marked reduction of ZO-1 staining (Fig. 7A).

Western blotting analysis clearly demonstrated that ZO-1 protein level was down-regulated by restraint, in clear contrast to the up-regulation of HSP70 (Fig. 7B and C). The glucocorticoid receptor antagonist RU486 blocked restraint-induced down-regulation of ZO-1 as well as the augmentation of HSP70. ZO-1 level seemed to be enhanced under restraint when RU486 was administered.

4. Discussion

To understand how the colon tissue deals with physical stress, we investigated induction of HSP70 by physical stressors in colonic tissue *in vivo*. While baseline HSP70 expression in gut epithelial cells has been reported to be dependent on commensal bacteria (Arvans et al., 2005), we hypothesized that stress-inducible HSP70 expression was dependent on generalized stress reactions due to activation of the HPA axis and/or sympathetic activation.

Restraint-induced HSP70 augmentation was abrogated almost completely by prior administration of RU486, suggesting an

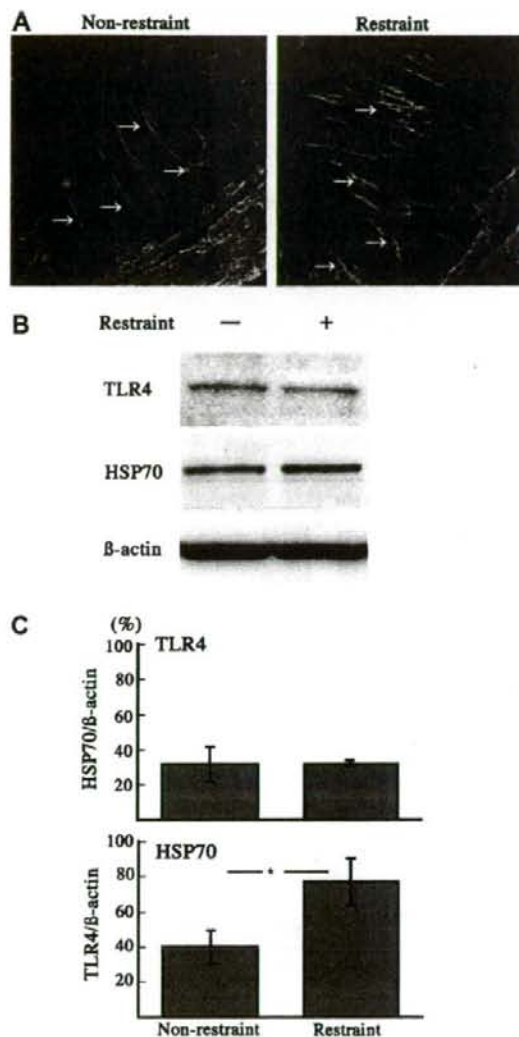


Fig. 5. Effects of 2-h restraint stress on TLR4 and HSP70 expression in colonic tissue (A, immunohistochemistry; B and C, Western blotting). (A) Immunohistochemical analysis showed that restraint stress did not affect the level or distribution of TLR4 (arrow). HSP70: red; TLR4: green; Topro-3: blue (400 \times). (B) The level of TLR4 in the colonic tissue was unaffected by restraint, while marked augmentation of HSP70 was observed after restraint ($n = 3$). (C) TLR4 expression of the colonic tissue was evaluated by Western blotting analysis in three separate experiments. Standard error of means (SE) is shown as bars.

essential role of the HPA axis in colonic HSP70 augmentation. Fukudo et al. (1997) reported that water-immersion induced HSP70 in the gut tissue as well as in the brain of rats. Similarly, Udelsman et al. (1994) showed increases in HSP70 in the aorta after restraint stress as well as after dexamethasone administration. They also showed that RU486 effectively reduced the induction of HSP70 in the aortic tissue (Udelsman et al., 1994). Therefore, the glucocorticoid dependence of HSP70 induction may be common in various tissues, including the colon.

Elimination of commensal bacteria by antibiotic treatment did not abrogate baseline HSP70 expression, but markedly abolished

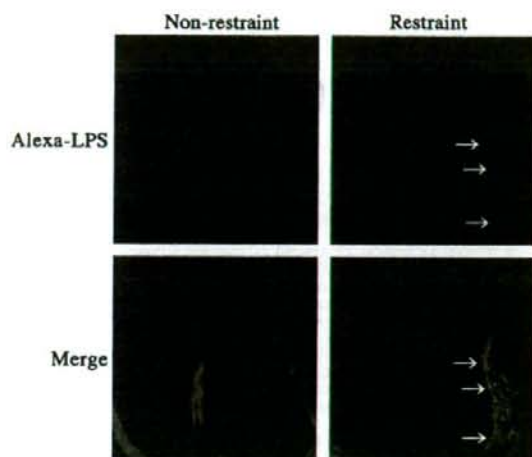


Fig. 6. LPS was translocated to the lamina propria after restraint stress. Immunohistochemical analysis showed that Alexa-LPS (arrow) passed through the mouse colon epithelium with restraint stress. GFP colon tissue: green; Alexa-LPS: red (200 \times).

stress-induced HSP70 augmentation. As antibiotic treatment alone did not affect the baseline level of corticosterone or the elevation after restraint, our results suggest that stress-induced augmentation of colonic HSP70 requires both glucocorticoid augmentation and colonic microflora.

The requirement for commensal bacteria in restraint stress-induced HSP70 augmentation may be partially replaced by administration of LPS in commensal-depleted mice. As TLR4 is a specific receptor for LPS (Akira and Takeda, 2004), and Rakoff-Nahoum et al. (2004) showed that TLR4 signaling is required for colonic HSP70, the induction of HSP70 by restraint stress observed in this study was likely to be mediated by TLR4.

Interestingly, immunohistochemical examination revealed prominent expression of TLR4 in the lamina propria but not on the epithelial surface. Furrie et al. (2005) reported that TLR4 was only detected in the crypt epithelial cells and was lost as the cells matured and moved toward the gut lumen. Rumio et al. (2006) reported that functional TLR4 is not expressed in the epithelial layer, but its expression is much stronger in the smooth muscle cells and myenteric plexus of human and mouse intestines. They suggested that the low or absent expression of TLR4 on enterocytes may explain the intestinal epithelium hyporesponsiveness to the abundance of LPS in the intestinal lumen.

Then, we examined how luminal bacterial LPS could reach TLR4 in the lamina propria or the muscularis externa. For bacterial LPS to activate TLR4 signaling required for HSP70 induction (Rakoff-Nahoum et al., 2004), LPS must reach the lamina propria or beyond. Although the present study provided no direct evidence that LPS binds to TLR4 at the lamina propria, restraint stress markedly facilitated translocation of LPS to the lamina propria.

Tight junctions at the zonula occludens between epithelial cells form a strong barrier to macromolecules, and the expression and the localization of the tight junction proteins occludin and ZO-1 are known to be directly associated with the membrane permeability of cultured intestinal cells (Dokladny et al., 2006). Down-regulation of ZO-1 protein in the colonic epithelium by restraint stress in this study was glucocorticoid-dependent, as RU486 treatment effectively reversed the down-regulation of colonic epithelial ZO-1 expression. Therefore, we suggest that stress-induced glucocorticoid elevation down-regulated tight junction integrity of the

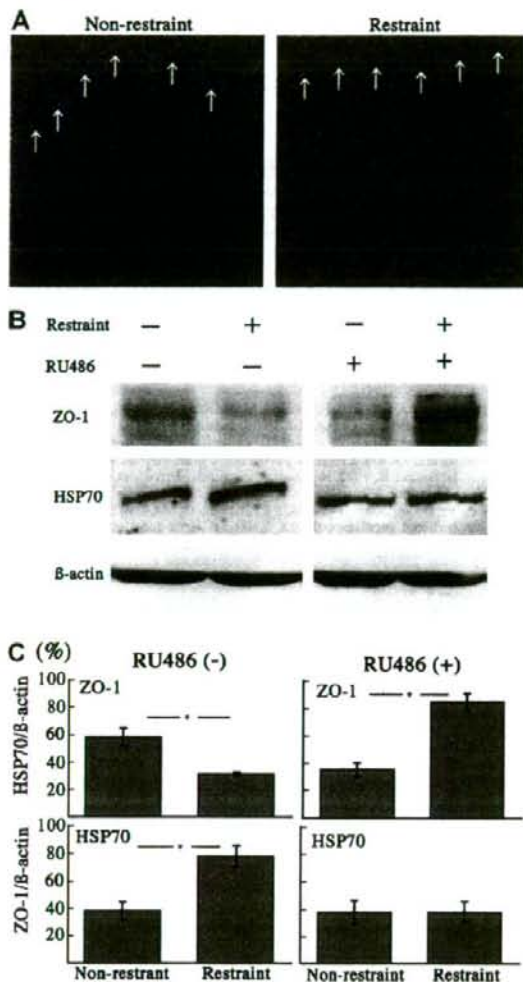


Fig. 7. Tight junction component ZO-1 was down-regulated after restraint. (A) Immunohistochemistry; B and C, Western blotting). (A) Immunohistochemical analysis demonstrated that ZO-1 staining (arrow) was localized along the apical portion of the epithelium. Restraint resulted in marked reduction of ZO-1 staining ($n = 3$). ZO-1: green; Topro-3: blue (400 \times). (B) Western blotting analysis clearly demonstrated that ZO-1 protein level was down-regulated by restraint in clear contrast with the up-regulation of HSP70. The glucocorticoid receptor antagonist RU486 blocked restraint-induced down-regulation of ZO-1. ZO-1 level was rather enhanced under restraint when RU486 was administered ($n = 3$). (C) ZO-1 expression of the colonic tissue was evaluated by Western blotting analysis in three separate experiments. Standard error of means (SE) is shown as bars.

colonic epithelium, resulting in increased translocation of LPS into the lamina propria. Although we lack direct evidence, LPS translocated into the lamina propria may interact with TLR4, resulting in HSP70 expression in the colonic epithelium.

In conclusion, we demonstrated that colonic HSP70 augmentation under physical stress is dependent on endogenous glucocorticoid elevation and luminal bacterial components. We demonstrated that endogenous glucocorticoid elevation reduced tight junction integrity in the colonic epithelium, which facilitated entry of luminal LPS into the lamina propria, where LPS could interact with TLR4 leading to epithelial HSP expression. Although

we still do not know the mechanism by which TLR4 activation in lamina propria led to epithelial HSP70 expression, the results of the present study demonstrated an elaborate and cooperative strategy of stress coping in the colon.

Acknowledgments

We thank Professor Hiroshi Nagura (Division of Athletics and Nutrition, Sendai College, Japan), Dr. Keiko Ishii (Department of Behavioral Neurology and Cognitive Neuroscience, Tohoku University Graduate School of Medicine) for their valuable advice regarding experimental techniques.

References

- Ader, R., Cohen, N., Grotz, L.J., 1979. Adrenal involvement in conditioned immunosuppression. *Int. J. Immunopharmacol.* 1, 141–145.
- Akira, S., Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.
- Arvans, D.L., Vavricka, S.R., Ren, H., Musch, M.W., Kang, L., Rocha, F.G., Lucioni, A., Turner, J.R., Alverdy, J., Chang, E.B., 2005. Luminal bacterial flora determines physiological expression of intestinal epithelial cytoprotective heat shock proteins 25 and 72. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G696–G704.
- Besedovsky, H., Sorokin, E., 1977. Network of immune–neuroendocrine interactions. *Clin. Exp. Immunol.* 27, 1–12.
- Boivin, M.A., Ye, D., Kennedy, J.C., Al-Sadi, R., Shewela, C., Ma, T.Y., 2007. Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G590–G598.
- Campisi, J., Leem, T.H., Flesher, M., 2003. Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell Stress Chaperones* 8, 272–286.
- Concordet, J.P., Ferry, A., 1993. Physiological programmed cell death in thymocytes is induced by physical stress (exercise). *Am. J. Physiol.* 265, C626–C629.
- Cvoro, A., Dundjerski, J., Trajkovic, D., Matic, G., 1998. Heat stress affects the glucocorticoid receptor interaction with heat shock protein Hsp70 in the rat liver. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46, 63–70.
- Danese, S., Sans, M., Fiocchi, C., 2004. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun. Rev.* 3, 394–400.
- Dokladny, K., Moseley, P.L., Ma, T.Y., 2006. Physiologically relevant increase in temperature causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290, G204–G212.
- Drummond, I.A., Steinhilber, R.A., 1987. The role of oxidative stress in the induction of *Drosophila* heat-shock proteins. *Exp. Cell Res.* 173, 439–449.
- Dutton, J., Hodgkinson, A.J., Hutchinson, G., Roberts, N.B., 1999. Evaluation of a new method for the analysis of free catecholamines in plasma using automated sample trace enrichment with dialysis and HPLC. *Clin. Chem.* 45, 394–399.
- Dwyer, B.E., Nishimura, R.N., Brown, I.R., 1989. Synthesis of the major inducible heat shock protein in rat hippocampus after neonatal hypoxia–ischemia. *Exp. Neurol.* 104, 28–31.
- Evdonin, A.L., Martynova, M.G., Bystrova, O.A., Guzhova, I.V., Margulis, B.A., Medvedeva, N.D., 2006. The release of Hsp70 from A431 carcinoma cells is mediated by secretory-like granules. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 443–455.
- Fehrenbach, E., Niess, A.M., Voelker, K., Northoff, H., Mooren, F.C., 2005. Exercise intensity and duration affect blood soluble HSP72. *Int. J. Sports Med.* 26, 552–557.
- Flesher, M., Campisi, J., Amiri, L., Diamond, D.M., 2004. Cat exposure induces both intra- and extracellular Hsp72: the role of adrenal hormones. *Psychoneuroendocrinology* 29, 1142–1152.
- Fukudo, S., Abe, K., Hongo, M., Utsumi, A., Itoyama, Y., 1997. Brain–gut induction of heat shock protein (HSP) 70 mRNA by psychophysiological stress in rats. *Brain Res.* 757, 146–148.
- Fukui, Y., Sudo, N., Yu, X.N., Nukina, H., Sogawa, H., Kubo, C., 1997. The restraint stress-induced reduction in lymphocyte cell number in lymphoid organs correlates with the suppression of *in vivo* antibody production. *J. Neuroimmunol.* 79, 211–217.
- Furnie, E., Macfarlane, S., Thomson, G., Macfarlane, G.T., 2005. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* 115, 565–574.
- Hotchkiss, R., Nunally, L., Lindquist, S., Taulien, J., Perdizet, G., Karl, L., 1993. Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin. *Am. J. Physiol.* 265, R1447–R1457.
- Kanemi, O., Zhang, X., Sakamoto, Y., Ebina, M., Nagatomi, R., 2005. Acute stress reduces intraparenchymal lung natural killer cells via beta-adrenergic stimulation. *Clin. Exp. Immunol.* 139, 25–34.
- Kugathasan, S.M., Sauberman, L., Smith, L., Kou, D., Itoh, J., Binion, D., Levine, A., Blumberg, R., Fiocchi, C.M., 2007. Mucosal T-cell immunoregulation varies in early and late Crohn's disease. *Gut* 56, 1696–1705.
- Kukreja, R.C., Kontos, M.C., Loesser, K.E., Batra, S.K., Qian, Y.Z., Gbur Jr., C.J., Naseem, S.A., Jesse, R.L., Hess, M.L., 1994. Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *Am. J. Physiol.* 267, H2213–H2219.
- Kwon, S.B., Young, C., Kim, D.S., Choi, H.O., Kim, K.H., Chung, J.H., Eun, H.C., Park, K.C., Oh, C.K., Seo, J.S., 2002. Impaired repair ability of hsp70.1 KO mouse after UVB irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 28, 144–151.
- Lee, W.C., Wen, H.C., Chang, C.P., Chen, M.Y., Lin, M.T., 2006. Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke. *J. Appl. Physiol.* 100, 2073–2082.
- Levenstein, S., Prantera, C., Varvo, V., Scribano, M.L., Andreoli, A., Luzi, C., Arca, M., Berto, E., Millite, G., Marcheggiano, A., 2000. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 1213–1220.
- Liu, T.S., Musch, M.W., Sugi, K., Walsh-Reitz, M.M., Ropeleski, M.J., Hendrickson, B.A., Pothoulakis, C., Lamont, J.T., Chang, E.B., 2003. Protective role of HSP72 against *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 284, C1073–C1082.
- Ludwig, D., Stahl, M., Ibrahim, E.T., Wenzel, B.E., Drabicki, D., Wecke, A., Fellermann, K., Stange, E.F., 1999. Enhanced intestinal expression of heat shock protein 70 in patients with inflammatory bowel diseases. *Dig. Dis. Sci.* 44, 1440–1447.
- Mandis, N.J., Cheung, M.C., Chintalacharuvu, K.R., Rey, J., Corthey, B., Neutra, M.R., 2002. Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J. Immunol.* 169, 1844–1851.
- Mawdsley, J.E., Rampton, D.S., 2005. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 54, 1481–1491.
- Nohta, H., Mitsui, A., Uemegae, Y., Ohkura, Y., 1987. Determination of free and total catecholamines in human urine by HPLC with fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* 2, 9–12.
- Oksala, N.K., Kaarimäntä, K., Tenhunen, J.J., Tiihonen, R., Heino, A., Sistonen, L., Paimela, H., Alhava, E., 2002. Reperfusion but not acute ischemia in pig small intestine induces transcriptionally mediated heat shock response *in situ*. *Eur. Surg. Res.* 34, 397–404.
- Qiu, B.S., Vallance, B.A., Blennerhassett, P.A., Collins, S.M., 1999. The role of CD4⁺ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat. Med.* 5, 1178–1182.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglini, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R., 2004. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–241.
- Ramaglia, V., Harapa, G.M., White, N., Buck, L.T., 2004. Bacterial infection and tissue-specific Hsp72, -73 and -90 expression in western painted turtles. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 138, 139–148.
- Riley, V., 1981. Psychoneuroendocrine influences on immunocompetence and neoplasia. *Science* 212, 1100–1109.
- Rumio, C., Besusso, D., Arnaboldi, P., Palazzo, M., Salleri, S., Gariboldi, S., Akira, S., Uematsu, S., Bignami, P., Ceriani, V., Menard, S., Balsari, A., 2006. Activation of smooth muscle and myenteric plexus cells of jejunum via Toll-like receptor 4. *J. Cell Physiol.* 208, 47–54.
- Stam, R., Akkermans, L.M., Wiegant, V.M., 1997. Trauma and the gut: interactions between stressful experience and intestinal function. *Gut* 40, 704–709.
- Sudo, N., Yu, X.N., Sogawa, H., Kubo, C., 1997. Restraint stress causes tissue-specific changes in the immune cell distribution. *Neuroimmunomodulation* 4, 113–119.
- Tanaka, K.I., Namba, T., Arai, Y., Fujimoto, M., Adachi, H., Sobue, G., Takeuchi, K., Nakai, A., Mizushima, T., 2007. Genetic evidence for a protective role for heat shock factor 1 and heat shock protein 70 against colitis. *J. Biol. Chem.* 282, 23240–23252.
- Tiaskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., Kozakova, H., Rossman, P., Bartova, J., Sokol, D., Funda, D.P., Borovska, D., Rehakova, Z., Sinkora, J., Hofman, J., Drastich, P., Kokesova, A., 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* 93, 97–108.
- Tobian, A.A., Canaday, D.H., Boom, W.H., Harding, C.V., 2004. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8⁺ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J. Immunol.* 172, 5277–5286.
- Tomasovic, S.P., Steck, P.A., Heitzman, D., 1983. Heat-stress proteins and thermal resistance in rat mammary tumor cells. *Radiat. Res.* 95, 399–413.
- Trautinger, F., Kindas-Mugge, I., Knobler, R.M., Honigsmann, H., 1996. Stress proteins in the cellular response to ultraviolet radiation. *J. Photochem. Photobiol. B* 35, 141–148.
- Udelman, R., Blake, M.J., Stagg, C.A., Holbrook, N.J., 1994. Endocrine control of stress-induced heat shock protein 70 expression *in vivo*. *Surgery* 115, 611–616.
- Yoneda, T., Benedetti, C., Urano, F., Clark, S.G., Harding, H.P., Ron, D., 2004. Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones. *J. Cell Sci.* 117, 4055–4066.
- Yun, J.K., McCormick, T.S., Villalona, C., Judware, R.R., Espinosa, M.B., Lapetina, E.G., 1997. Inflammatory mediators are perpetuated in macrophages resistant to apoptosis induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13903–13908.
- Zhang, X., Okutsu, M., Kanemi, O., Gametchu, B., Nagatomi, R., 2005a. Repeated stress suppresses interferon-gamma production by murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Tohoku J. Exp. Med.* 206, 203–212.
- Zhang, X., Okutsu, M., Kanemi, O., Nagatomi, R., 2005b. Effect of foot shock stress on the interferon-gamma production of murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Immunol. Lett.* 100, 170–176.
- Zimmerman, L.H., Levine, R.A., Farber, H.W., 1991. Hypoxia induces a specific set of stress proteins in cultured endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 87, 908–914.

◆ 特集 ◆

加齢ステージと運動

高齢者に対する運動介入の効果

永富 良一

高齢者の身体機能低下に伴う生活機能の低下や転倒のリスク軽減のために、体力低下がみられる高齢者に対して積極的な運動介入が全国的に実施されるようになってきた。契機となったのは、Fiataroneらが施設入所虚弱高齢者に対して10週間の高負荷レジスタンストレーニングの筋力、歩行速度や椅子からの立ち座りなどの身体機能および日常の身体活動量に対して改善効果がみられたことを報告したことであった¹⁾。その後も多数の報告があり、運動効果に関するエビデンスはわが国ではやや乏しいものの世界的にみればかなり集積されつつある。積極的な運動介入は基本的にはハイリスク者に対して行なわれるが、現在では予防的な立場から比較的风险の小さい人を対象にしたサービスの機会も増えてきている。しかし運動介入の効果を評価するのはそれほど簡単ではない。本稿ではハイリスク高齢者に対する運動介入サービスにおける介入効果の評価に関わる問題点をとりあげる。

1. 運動処方 の 個別性

介入を行なう場合、集団指導であってもできるだけ個別に負荷強度や量の調節を行なうことが重要である。測定の方法によっては必ずしも十分に個別化されない場合もある。われわれが以前に行なった平均年齢67歳の高齢者を対象にした無作

為対照試験(仙台シルバーセンター研究)では、1日2時間、週2日、6カ月間の自転車エルゴメータによる持久的運動、レジスタンストレーニング、バランストレーニングなどを実施した。このとき自転車エルゴメータによる負荷は心拍数で管理を行ない、心拍予備で55~60%の負荷を設定していた。介入前には推定最大酸素摂取量の測定を行なった。これは自転車エルゴメータにより3段階負荷を行なった時の酸素摂取量を測定し、最大心拍数を年齢による推定式で算出し、外挿して推定最大酸素摂取量を求めた²⁾。推定最大酸素摂取量は運動介入後、介入群において有意に改善がみられた。しかし推定最大酸素摂取量のゲインにはばらつきがあり、ベースラインにおいて最大酸素摂取量が低い者ほどゲインが大きく、ベースラインにおいて最高に近い値であった数名はほとんど改善がみられなかった(図1)²⁾。データは公表していないが、このとき行なったシャトルウォーキングテスト中の最大心拍数は毎分200近くに達しており、Tsujiら²⁾の年齢推定の最大心拍数は過小であることがわかった。エルゴメータによる運動負荷はこの推定値に基づいていたため、最大心拍数が高かった数名にとっては有効な負荷になっていなかったことが考えられた。

実際、運動プログラム中の心拍数の記録例であるが、本来ウォーミングアップフェーズとしてプログラムしたリズム体操がエルゴメータ負荷と同

等であることがわかる(図2)。さらにこちらもデータは公表していないが、日常生活の心拍数が介入プログラム中の心拍数を上回っているケースもあった。このケースは住まいが丘陵地にあり、介入プログラム中教室に通うため往路は下り、帰路はバス停から坂道を5分以上上っており、このときの心拍数は推定最大心拍数を上回っていた。当然運動プログラム中よりも心拍数は高かった。このケースの場合のトレーニング効果はプログラムそのものではなく、会場を往復することにより

得られたものであった可能性が高かった。結果には問題ないが、運動介入サービスを考えるときには日常生活を考慮する必要があることを示す経験であった。

2. 日常生活の影響

上述の例は介入プログラム会場への往復が負荷になっていた例であるが、日常生活での負荷も介入効果に少なからず影響を与える。図3は2つのタイプの有料老人ホーム入居者の体力を比較したものである。両タイプとも同じメニューの運動プログラムを1回約1時間、週2回実施しているが、タイプAは建築時期が新しくトイレはすべて自室にあるのに対してタイプBは建築時期が古くトイレが共用である。その結果、認知機能や抑鬱の程度にはまったく差がなかったのに対してTimed Up & Go Test (TUGT)の成績はタイプAがはるかに優れていることがわかる。これも前項で紹介した例と似ているが、プログラム外に負荷要素が、しかも日常的にあるケースである。図4は運動トレーニングのゲインとリスクを示す一般的な図に日常生活の範囲を加えたものである

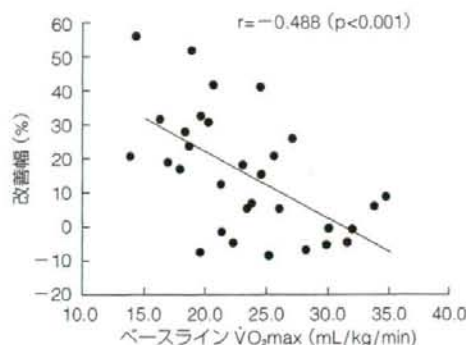


図1 介入前の最大酸素摂取量とトレーニングによる改善率の関係 (Tsuji, et al., 2000²⁾)

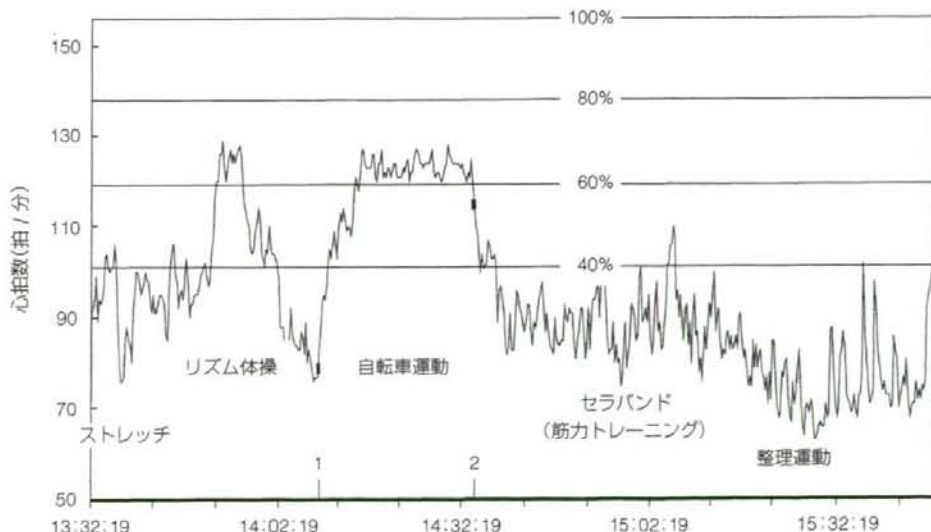


図2 運動介入プログラム実施中の心拍数推移の例 (67歳女性)

が、わざわざ積極的な介入を行なうハイリスクアプローチでは日常生活を越える範囲の負荷設定を行ないゲインを確実にすることが望ましい。デイサービスでのレクリエーショナルな活動にもトレーニング効果を付加するのであれば、個々の日常生活を考慮した負荷設定を行なうべきである。集団指導の中でも回数を個別化するなどの工夫ができるはずである。問題なのは日常生活における身体活動をどのように評価するかという点である。高齢者の場合、すり足歩行や歩行補助具を使用している場合、市販の加速度センサを利用した活動量計ではそもそも歩行として認識されない可能性がある。家族や本人からの聴取や住環境もおさえておく方が望ましい。また上述のトイレ環境の例からも容易に想像できるようにバリアフリー

住宅居住者は転倒経験は少なくなっている可能性があるものの身体機能レベルはかえって低い可能性がある。施設利用者の例であるが、自立歩行ができるにもかかわらず、時間的な制約や転倒の危険性を考慮して運動介入プログラムの実施会場へ車椅子で送迎する場合がある。たしかに移動時に転倒してしまっただけでは元も子もないが、自力移動をした方が効果的であることはいうまでもない。可能であれば転倒を予防する万全の対策をたてた上で自力移動してもらう方が望ましい。

日常の身体活動は疾患リスクとも大きく関連しており、単に介入プログラムで目標を達成するだけではなく、その後のメンテナンスが重要である。われわれは先に紹介した仙台シルバーセンター研究において、運動介入プログラムに参加することによって運動プログラム中の運動負荷を除いてもなお日常の身体活動量が増加することを明らかにしている³⁾。またその後実施した在宅高齢者を対象とした高齢者総合健診（仙台鶴ヶ谷研究）において高血圧者あるいは動脈硬化の代理指標である高CRP血症 (>1mg/dL) 者のオッズは質問紙で調査した身体活動レベル（量・強度）が高くなるほど小さくなっていることを明らかにしている（図5）⁹⁾。横断調査なので因果関係は明らかではないが、このことは介入プログラムの目標を単に代理指標の改善だけにおくのではなく、日常身

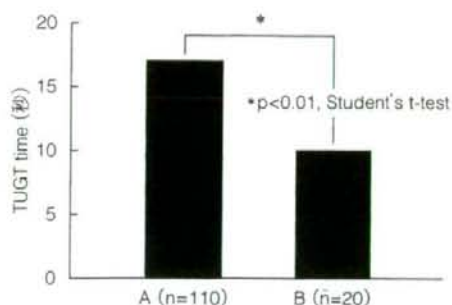


図3 タイプの異なる老人ホーム入所者のTUGTの平均値

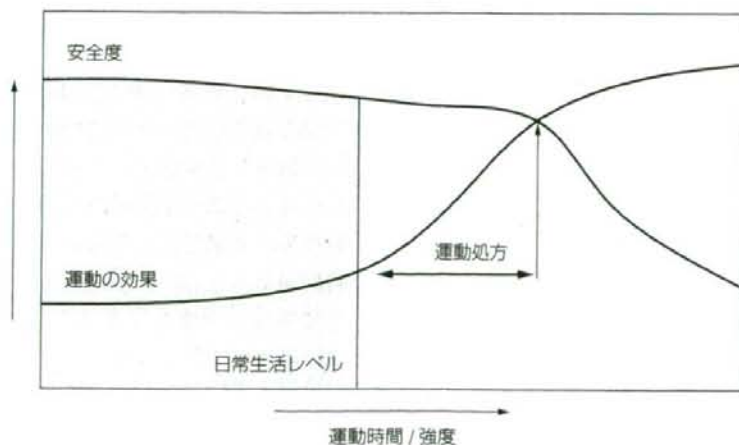


図4 運動の効果と安全度

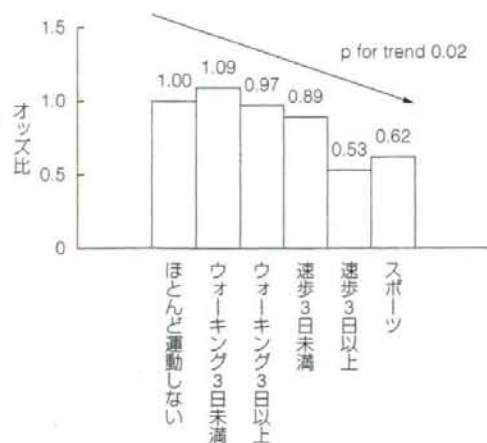


図5 身体活動レベルと高血圧有病率の関係 (70歳以上)
(Niu, et al., 2005⁴⁾ より引用改変)

n=643, 運動頻度は1回30分以上, 1週間当たり

身体活動レベルに対しても変容効果をもたせるようにすることが重要であることを示している。

3. 代理指標の問題点

ハイリスク者に対する運動介入の目的は、転倒予防、自立維持あるいは生活機能の維持・改善である。ただし生活機能や自立状態を評価することは容易ではない。施設入所者では実際の転倒事故の件数がどの程度変化したかを直接評価することが可能であるが、在宅高齢者対象の研究の場合は必ずしも容易ではない。したがって介入効果の評価は、たとえ介入効果の科学的根拠としてもっとも高いレベルに位置づけられているのは無作為割付対照試験であっても代理指標に頼る場合が多くなる。よく用いられる歩行速度、脚伸展力、最大酸素摂取量、握力などの体力指標はいずれも代理指標である。これらの代理指標は横断研究やコホート研究などでは生活機能とマッチするが、介入効果の指標として用いる場合、必ずしも生活機能に結びつくわけではない。

もちろん代理指標を用いる場合でも実際のリスクと関連がある指標を用いるが、個人レベルでみた場合、必ずしも実情にあわない場合もある。わ

れわれは2002年に仙台市鶴ヶ谷において70歳以上の住民の50%弱を対象とした高齢者総合健診「ねたきり予防健診」を実施した。このうち転倒リスクと関連があるとされる歩行速度、TUGT、Functional Reachなどの測定を行ない、総合的に体力レベルが下位1/3に当たる400名余りに、転倒予防教室への参加を呼びかけ、うち除外基準に該当しない87名を対象に5カ月間のストレングストレーニング、バランストレーニングなどを軸とした運動介入を実施した⁵⁾。2003年3月上旬の介入終了時点での体力評価は、いずれも改善がみられたが、2003年8月に追跡調査を行なった時点ではほとんど前年度の値に戻っていた。その後このうち74名の追跡調査を実施した。このグループは2005年秋にさらに当研究室主催の3カ月間の運動プログラムに参加した⁶⁾。またこの74名のうち半数以上は第一期の運動教室終了後、自主サークルを組織し、運動インストラクターに月1~2回の指導を受けている。図6はこのグループのTUGTの推移を示すものである。2002年秋から6カ月間の介入は高齢者専用のトレーニングマシンを用いた。一方、2005年の介入プログラムは自重負荷にゴムバンド(セラバンド)を用いただけのものであった。TUGTの改善(時間短縮)はマシントレーニングの方が大きい印象はあるが、自重負荷でも改善が得られていることがわかる。結局集中的な介入のたびに改善はするが、集中的介入が終了するとあっという間に前値に戻っていることがわかる。だからといって生活機能まで元に戻る(悪化)わけではない。これはTUGTは転倒リスクを評価する指標ではあっても、日常生活機能まで評価するものさしにはなっていない、あるいは日常生活ではTUGT動作を検査時ほど速やかに行なう機会がないという可能性がある。ただしいずれの場合においても、長期間にわたる推移をみると、単発的な集中介入(3カ月以上)であっても、年に1回程度機会があるだけでも長期の維持につながっていることがわかる。これはTUGTだけではなく、データは示さないが、Functional Reach testなど他のテスト

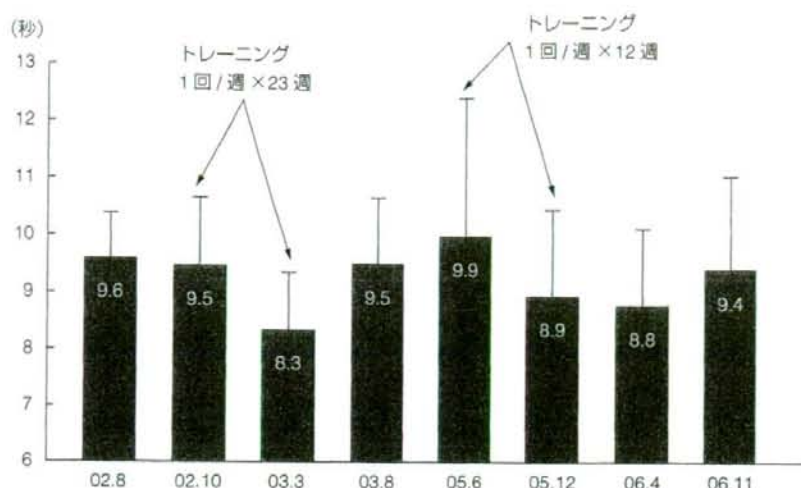


図6 在宅高齢者(70歳以上)のTUGT成績の推移とトレーニング教室参加の影響 (n=74, 平均±SD)

も同様の傾向である。

ちなみにベースライン測定時に同等の身体機能レベルにあっても教室に参加していない地域住民では、明らかに身体機能レベルの低下傾向がみられている。したがって仮に運動教室終了後数カ月たって身体機能レベルが教室前のレベルまで戻っていたとしても、運動介入による身体機能維持効果は十分にあると考えられる。教室終了後の身体機能レベルは、日常生活における身体活動レベルに依存するものと思われる。逆にいくら運動介入プログラムに参加して身体機能レベルがあがったとしても、抑うつなどで日常生活活動が低下していけば、すみやかに自立を保つことが困難なレベルにいたる可能性もある。

以上のように体力指標という代理指標の特徴を十分に理解してプログラムをデザイン・評価する必要がある。握力は簡便な検査で、大集団の検査には向いているが、下肢筋力との対応は必ずしもよくない。これもトレーニング理論における局所性を考えればむしろ当然のことである。足を使う人は手もよく使うだろうと考えられるから握力が筋力指標になりうるのであって、個別介入を行なうときには個人個人の身体利用状況を考慮して検査指標の解釈を行なうべきである。

4. 今後の問題点

すでに前項までに触れているが、運動介入がプログラム期間中に十分効果的であっても、それが日常生活に反映されなければならない。すでに医療機関における介入後の取り組みに対する評価も行なわれはじめて⁷⁾、介入を続けることも1つの選択肢ではあるが、サービス終了後に運動そのものが習慣化したり、日常生活の行動が変化していくことが重要である。いかにそのようなきっかけをつくっていくかが今後の課題である。特に高齢期にあっては認知機能の低下、また抑鬱傾向に陥る人も少なくない。高齢者の運動介入プログラムにあっては認知機能低下・抑鬱への対策を考慮する必要がある。

本稿では、筆者らの研究室のこれまでの経験の中から高齢者の運動介入について問題になる点と、今後解決すべき問題点を紹介した。今後の高齢者に対するサービスプログラムを考えるときの参考になれば幸いである。

[文 献]

- 1) Fiatarone MA, et al: Exercise training and nutri-

- tional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med*, 330: 1769—1775, 1994
- 2) Tsuji I, et al: Randomized controlled trial of exercise training for older people (Sendai Silver Center Trial; SSCT): study design and primary outcome. *J Epidemiol*, 10: 55—64, 2000
 - 3) Fujita K, et al: Effects of exercise training on physical activity in older people: a randomized controlled trial. *J Epidemiol*, 13: 120—126, 2003
 - 4) Niu K, et al: Influence of leisure-time physical activity on the relationship between C-reactive protein and hypertension in a community-based elderly population of Japan: the Tsurugaya project. *Hypertens Res*, 28: 747—754, 2005
 - 5) 藤田和樹ほか: 高齢者に対する運動トレーニングの効果. *臨床*, 104: 665—675, 2004
 - 6) 矢野秀典ほか: 地域虚弱高齢者に対する体力レベル別運動指導の効果. *日老医誌*, 43: 390—397, 2006
 - 7) Sze PC, et al: The efficacy of a multidisciplinary falls prevention clinic with an extended step-down community program. *Arch Phys Med Rehabil*, 89: 1329—1334, 2008

NAP新刊



SPTSシリーズ1
**ACL損傷予防
プログラムの
科学的基礎**

監修 福林 徹・蒲田 和芳
定価3,150円(税込)
B5判・160頁・図表164点
ISBN 978-4-931411-74-6



SPTSシリーズ2
**肩のリハビリ
テーションの
科学的基礎**

監修 福林 徹・蒲田 和芳
定価3,150円(税込)
B5判・208頁(予定)
ISBN 978-4-931411-79-1



**新スポーツ外傷・
障害とリハビリ
テーション**
イラストでわかる
リハビリテーション

著 魚住 廣信
定価2,100円(税込)
A5判・224頁
ISBN 978-4-931411-78-4

■カラーアトラス骨格系ランドマークの定義と触診法

監訳 渡邊 裕之・白井 正樹 B5判/192頁/オールカラー/定価5,250円(税込) ISBN978-4-931411-75-3

■ACSMメタボリック・カリキュレーション・ハンドブック運動時代謝の計算法

監訳 大野 秀樹・訳 長澤 純一 A5判/139頁/定価1,890円(税込) ISBN978-4-931411-73-9

■フラダンスによる健康運動教室楽しく継続できる効果的な運動プログラム

著 原 久美子 A5判/140頁/図表200点以上/定価1,890円(税込) ISBN978-4-931411-77-7

■テニスパフォーマンスのための実践トレーニングガイド

監訳 別府 諸兄 A5判/400頁/図表421点/定価3,780円(税込) ISBN978-4-931411-76-0



〒111-0056 東京都台東区小島1-7-13 NKビル
TEL 03-5820-7522/FAX 03-5820-7523
ホームページ <http://www.nap-ltd.co.jp>

有限会社 ナップ

お近くに書店のない場合やお急ぎの場合には、左記へ直接お申込みください。代金後払いでお送りさせていただきます。

特集

転倒の科学—高齢者の転倒を予防するには—

転倒予防プログラムにおける
脱落者の特性永富 良一¹⁾, 牛 凱軍²⁾, 小嶋 恭子³⁾

はじめに

高齢者の転倒はさまざまな要因で発生する。転倒骨折の予防あるいは重症度の軽減には、体力の維持と改善が重要であり^{1,2)}、筋力増強トレーニングやバランス訓練などの運動プログラムの有用性が示されている^{3,4)}。しかし、運動プログラムの効果については、プログラムそのものよりも運動プログラムへの参加や継続が問題視されている^{5,6)}。すなわち運動の利点がわかっても運動プログラムに参加しない、あるいは参加しても中途脱落する例が少なくない^{9,10)}。プログラムからの脱落の理由はさまざまであるが、共通の要因があれば対処できる可能性があることから、さまざまな分析が行なわれている。本稿では最新の情報を整理し、今後転倒予防の集団プログラムを実施する際に考慮すべき点について言及する。

1. 身体要因

転倒予防プログラムの対象者になるのは、体力レベルあるいは身体能力の低下がみられる高齢者である。慢性疾患の存在は体力レベルあるいは身体能力の低下に直結するので、疾患の増悪が起

ればプログラムからの脱落に結びつくのはむしろ当然である。Schmidtら¹⁰⁾は、虚弱高齢者に対する18カ月の運動プログラムにおいて、36%の脱落があったことを報告している。脱落の半数以上は最初の3カ月で起きており、3カ月以降の脱落者と比較して初期脱落者は有疾患者の割合が高く、歩行速度が遅く、6分間歩行距離が短かったこと、自覚的健康感が低かったことを報告している。関連する疾患は身体機能に関連する呼吸器系、循環器系、運動器系など、さまざまな疾患が多く、中途脱落を防ぐには現疾患の管理が重要なのはいうまでもない。プログラム参加時には顕在化していなかった症状が顕在化する。例えば、プログラム参加時には顕在化していなかった症状が顕在化するような悪性腫瘍も脱落に関与する疾患のひとつである。

自験例では、転倒予防のための太極拳を含んだ6カ月の運動介入プログラムにおいて、およそ1/4の脱落者があったが、脱落者はベースラインの6分間歩行、前方リーチテスト、Timed up & go testの成績が継続者に比して有意に低かった(小嶋未発表)。有疾患者の割合には差がなく、初期の体力レベルが低い人は脱落しやすいことがわかった。

筆者：1) ながとみ りょういち (東北大学大学院医工学研究科健康維持増進医工学研究分野教授)

2) きゅう がいぐん (東北大学大学院医工学研究科健康維持増進医工学研究分野准教授)

3) おがも きょうこ (東北大学大学院医学系研究科運動学分野大学院生)

このように体力レベルに幅がある参加者を対象にする集団運動指導プログラムでは、個別対応を行わない限り、体力レベルが高い人あるいは低い人いずれかにとってつまらない、あるいは難しいものになる可能性がある。そこで、われわれは以前に体力レベル別にグループ分けをした転倒予防プログラムの検証を行なったことがある⁹⁾。その結果、グループ分けをしなかった群との間に有意な体力改善効果の差はみられなかった。ただし、それぞれのグループのリーダーからは、体力別に分けたグループの方が安全に安心に指導ができたことを強調された。混在グループのリーダーの気苦労を考えると、指導者の自己効力感あるいはストレスレベルを評価することにより検証が可能になるかもしれない。今後の検証が必要である。

2. 精神心理的要因

身体機能に直接の関連がなくても、認知機能の低下が進行すれば集団プログラムへの参加が困難になるのは当然である。運動プログラム参加に際しては、認知機能についての配慮を行なうことは当然といえよう。

高齢者で増加しつつある抑うつ傾向は、高齢者の疾病の発生・進行、体力の低下や身体機能の低下などに強く関連している¹¹⁾。抑うつ傾向は、運動プログラムの継続を含むさまざまな介入的アプローチに対する障害要因となっている^{12,13)}。抑うつ傾向の場合、最初から運動プログラムに参加せず「閉じこもり」に至ることも少なくない。しかし、介護予防活動の強化策のひとつである地域支援事業で行なわれているように、基本健診時に行なう簡単なスクリーニングにより高齢者の身体機能強化プログラムへの参加を促すような場合には、初期に参加する機会を得られたとしても中途脱落する可能性が生じてくる。地域、施設を問わず転倒予防プログラムにおいて抑うつ、認知機能の低下に対する包括的な対策はますます重要になってくるはずである。

抑うつに対して、音楽療法に一定の効果がみら

れていることが知られている¹⁴⁾。そこで運動プログラムの実施とともに、音楽や園芸など感性にはたらきかける介入による抑うつ状態の改善により、運動プログラムへの参加率の向上、脱落率の改善が得られる可能性があると考えた。この仮説を検証するために、任意参加の運動プログラムおよびカラオケ（音楽）および園芸プログラムを開始した老人ホーム入居高齢者に対して、運動プログラムのみの参加者、運動プログラムとカラオケ・園芸両方の参加者を比較するケースコントロール研究を実施した¹⁵⁾。その結果、カラオケ・園芸・運動プログラム両方に参加した方が参加率が有意に高く、運動機能の改善もよかったことが明らかになった。このように単に運動介入を行なうだけではなく、全人的な役割の創出、感性へのはたらきかけ脱落を防ぐのに重要であったと考えられる。

3. 社会経済的要因

Janceyら¹⁶⁾は、オーストラリアの比較的的身体機能が保たれている248人の在宅高齢者に対して、ウォーキングと筋力トレーニングを含む多地域で実施した6カ月のグループ運動プログラムから脱落した35%の参加者の分析を行なった。その結果、脱落者は継続者に比べて低所得、肥満、不活動、ウォーキングに対する自己効力感が低い、そして孤独感が強い者の割合が高かったことを明らかにしている。わが国とは社会経済状況が異なるオーストラリアでの結果であり、虚弱高齢者に対する転倒予防プログラムではないが、ソーシャルサポートの欠如は、わが国における虚弱高齢者の転倒予防プログラムにおいてもマイナスにはたらく可能性が否めない。

4. 脱落者の特性をふまえた今後の転倒予防プログラムの方向性

われわれは仙台市の一部地域における運動介入のモデル事業に関与してきたが、現在いかに研究

者や行政機関ができるだけ関与しないように、地域の高齢者およびそれを支える地域住民が自律的に転倒予防を含めた高齢者の健康づくりに取り組めるように活動を支援している。体力低下高齢者（虚弱高齢者を含む）や有疾患者には運動に伴うリスクを考慮した適切な運動処方が必要であるが、移動能力に支障がない高齢者では個人の嗜好にもとづいてスポーツやレクリエーションなど、さまざまな選択ができる環境が望ましい。仙台で実施した研究機関主導の転倒ハイリスク者に対する運動教室終了後は、多くの選択肢の中から参加者あるいは簡単なノウハウを伝授した高齢者のリーダーの好みの種目やメニューを実施する自由度の高い運動を実施する自主運営運動サークルに移行している。自主運営サークルは高齢地域住民が複数の異なる形態で運動を継続し、いずれも非参加者における体力低下を軽減する効果が得られている。ソーシャルサポートといってもお仕着せのサポートではなく、住民が主体的に活動していくようなサポートがより望ましい形ではないかと考えている。

また、転倒予防には筋力強化要素、柔軟要素、バランス要素、持久的要素などが含まれるが、高齢者に、理屈抜きにプログラムを提供するだけではなく、どのような運動を行なうとどのような適応が起こるのかを理解してもらいながら運動を実施してもらうことが重要であると考えている。また、このとき誤った考え方をただしながら行なうことも重要である。疲れたら「寝る」ことも、寝過ぎるとせっかく運動によって獲得した骨格筋の適応を失うことになるであろうことを理解してもらうことが重要である。専門家が問われたときに適切な情報を提供する立場になることが望ましいと考えられる。

参加者の身体的要因、精神心理的要因、社会経済的要因および教育、それぞれが考慮されて初めて脱落者の少ない地域における健康づくりが実現する。そのためには運動プログラムの専門家、医師、精神保健の専門家、および高齢者を含む地域ネットワーク全体が、各要因を理解し、取り組む



図1 転倒予防プログラムからの脱落の要因

地域に応じた画一的ではない高齢者および地域住民の健康を守る仕組みが形になっていくことが、脱落者なく地域が健康になっていくために必要なことであると考えている（図1）。

貴重な情報を提供してくださった仙台市鶴ヶ谷地区の運動教室参加者、ベネッセスタイルケア社老人ホーム入居者およびスタッフの皆様へ深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Goodpaster BH et al: The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 61 (00): 1059-1064, 2006.
- 2) Runge M et al: Is muscle power output a key factor in the age-related decline in physical performance? A comparison of muscle cross section, chair-rising test and jumping power. *Clin Physiol Funct Imaging*, 24 (6): 335-340, 2004.
- 3) 矢野秀典ほか: 地域虚弱高齢者に対する体力レベル別運動指導の効果. *日本老年医学会雑誌*, 43 (3): 390-397, 2006.
- 4) 郭輝ほか: 太極拳及びカンフー体操を取り入れた転倒予防トレーニングの体力低下高齢者の体力に及ぼす効果の検証—従来型転倒予防トレーニングとの比較—. *体力科学*, 56 (2): 241-256, 2007.
- 5) Paffenbarger RS Jr et al: Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. *N Engl J Med*, 314 (00): 605-613, 1986.
- 6) Spirduso WW et al: Exercise dose-response effects on quality of life and independent living in older adults. *Med Sci Sports Exerc*, 33 (6 Sup-

- pl) : S598-608; discussion S609-510, 2001.
- 7) Boyle PA et al: Physical activity is associated with incident disability in community-based older persons. *J Am Geriatr Soc*, 55(2) : 195-201, 2007.
 - 8) Nelson ME et al: Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*, 116(9) : 1094-1105, 2007.
 - 9) Robison JI et al: Adherence to exercise programmes. Recommendations. *Sports Med*, 17(1) : 39-52, 1994.
 - 10) Schmidt JA et al: Attrition in an exercise intervention: a comparison of early and later dropouts. *J Am Geriatr Soc*, 48(8) : 952-960, 2000.
 - 11) Alexopoulos GS: Depression in the elderly. *Lancet*, 365 (9475) : 1961-1970, 2005.
 - 12) Rhodes RE et al: Factors associated with exercise adherence among older adults. An individual perspective. *Sports Med*, 28(6) : 397-411, 1999.
 - 13) Wing RR et al: The role of adherence in mediating the relationship between depression and health outcomes. *J Psychosom Res*, 53(4) : 877-881, 2002.
 - 14) Maratos AS et al: Music therapy for depression. *Cochrane Database Syst Rev*, 23(1) : CD004517, 2008.
 - 15) 牛 凱軍: 老人ホーム向けの転倒骨折予防運動プログラム開発の研究—1年間のコホート内のケースコントロール研究—. 明治安田厚生事業団第24回健康医科学研究助成論文集, 2009 (印刷中) .
 - 16) Jancey J et al: Reducing attrition in physical activity programs for older adults. *J Aging Phys Act*, 15(2) : 152-165, 2007.

片麻痺に対する非侵襲的脳刺激の有用性と限界

出江 紳一 近藤 健男

Therapeutic Effectiveness and Limitations of Noninvasive Brain Stimulation in Hemiplegic Patients

by

Shin-Ichi Izumi, M.D., Ph.D., and Takeo Kondo, M.D., Ph.D.

from

Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Tohoku University Graduate School of Medicine

Noninvasive brain stimulation techniques such as rTMS and transcranial direct current stimulation (tDCS) have emerged as a promising tool for enhancing recovery of hemiplegia following stroke. In patients with a unilateral supratentorial lesion, up-regulation of excitability of the affected hemisphere by high-frequency rTMS or anodal tDCS over the affected motor area, or down-regulation of the unaffected motor area by low frequency rTMS or cathodal tDCS, have been reported to improve motor function in a hemiplegic hand. In the literature concerning the effect of rTMS or tDCS on motor function of the affected hand in chronic hemiplegic patients, these interventions improved reaction time, movement speed, and manual performance rather than voluntary hand function evaluated with clinical scales. We presented the effectiveness of a unique method for treating hemiplegic hand in chronic stroke patients, i. e., TMS synchronized with maximal effort at a target hand movement (effort-associated TMS). Further studies such as large randomized controlled trials with more TMS sessions and longer follow-up periods would further clarify the effectiveness and limitations of effort-associated TMS.

(Received October 2, 2007; accepted October 16, 2007)

Key words: hemiplegia, stroke, homeostasis, transcranial magnetic stimulation, transcranial direct current stimulation

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 17: 519-526, 2008

片麻痺上肢に対する
リハビリテーションの変化

今世紀に入って主要なリハビリテーション関連誌を中心に片麻痺上肢機能評価尺度の論文が多数掲載されてきた (Table 1)。評価尺度自体は新しいものではなく、なぜ今更という印象を受けるかもしれない、これまでは回復が不良であることや日常生活動作 (ADL) が非麻痺側上肢を使って代償できることから、非実用レベルの麻痺側上肢の機能訓練は、不良肢位の予防や可動域の維持な

ど消極的な内容にとどまっていた。けれども constraint-induced movement therapy (CI療法: 非麻痺側上肢を拘束して麻痺手を強制的に使用させる訓練方法)³³⁾ (Table 2) が注目され、その有効性を検証する研究で用いられる評価尺度について、計量心理学的特性を保証するデータが呈示されてきたわけである。ヒトの中樞神経系における可塑性が、単なる概念ではなく、臨床神経生理学的に確定される現象として示され、それを背景としたリハビリテーション技術の開発、臨床研究が行われる時代が到来した。

東北大学大学院医学系研究科肢体不自由学分野 / 〒980-8575 仙台市青葉区星陵町 2-1 (連絡先: 出江紳一)
Address reprint requests to: Shin-Ichi Izumi, M.D., Ph.D., Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8575, Japan

Table 1 Studies on scales of functional evaluation for hemiplegic hand

Year	Authors	Contents
1992	Stern et al.	Stability of Jebsen Taylor Test across three test sessions
1998	Hsieh et al.	Reliability and validity of Action Research Arm Test (ARAT)
2001	van der Lee et al.	Responsiveness of ARAT is better than Fugl-Meyer Assessment (FMA)
2001	Morris et al.	Reliability of the Wolf Motof Function Test (WMFT)
2001	Whitall et al.	Reliability and validity of the modified WMFT
2001	van der Lee	Reliability of ARAT
2002	Hsueh et al.	ARAT can be done using ordinary tables
2002	van der Lee et al.	Dimensionality of ARAT
2005	Platz et al.	A multicenter study on reliability of ARAT, Box Block Test, and FMA
2005	Barreca et al.	Chedock Arm and Hand Activity Inventory (CAHAI) is more sensitive than ARAT
2005	Wolf et al.	WMFT is reliable and valid for patients with subacute (3-9 months postinsult) stroke
2006	Rabadi et al.	ARAT and FMA are equally responsive in acute stroke rehabilitation
2006	Barreca et al.	CAHAI is more sensitive than ARAT
2006	Koh et al.	ARAT is unidimensional, but cannot be transformed into interval Rasch scores
2006	Dramerick et al.	Relationship between WMFT and self-reported disability
2006	Wolf et al.	Pilot normative database for WMFT

Table 2 History of constraint-induced movement therapy

Year	Authors	Contents
1917	Odgen & Franz	Restricted use of the unaffected limb in primates
1981	Ostendorf & Wolf	A single case design
1989	Wolf et al.	Sling during wake for 2 weeks
1993	Taub et al.	Ability to extend 10 degrees at MP, 20 degrees at IP, and 20 degrees at the wrist as indication for CIMT
2000	Dromerick et al.	CIMT within 2 weeks after ischemic stroke
2003	Wittenberg et al.	PET activation decreased after CIMT
2004	Park et al.	Decrease in overall oxyHb with an increase in laterality index toward the affected hemisphere after CIMT
2007	Wolf et al.	Multicenter trial of CIMT 3-9 months after stroke

中枢神経系の可塑性

可塑性 (plasticity) とは、「外力を取り去っても歪みが残り変形する性質」を意味する。一方、医学用語としての可塑性は、「組織が損傷しても、その後に形態を修復あるいは機能を補償できる性質」である。また神経科学でいう可塑的变化とは、神経回路網やシナプスが、損傷に限らず介入などによっても機能や形態を変化させ、その損傷や介入の直接的な影響が終わった後まで、生じた変化が一定時間持続する現象を指す。機能の変化は細胞レベルで生じ、ある時点での活動電位や画像上の賦活領域として計測される興奮性の増大あるいは抑制、さらには時系列や脈絡も含めた神経信号処理の過程にまでみられ

る現象である。神経系の可塑性は記憶や学習、あるいは損傷後の機能回復の基盤であるだけでなく、病態形成にも重要な役割を果たす。

例えば脳卒中後の痙攣性麻痺は、皮質脊髄路損傷による単純な筋力低下ではなく、筋緊張異常や共同運動パターンなどを呈するが、痙攣の形成には脊髄の可塑的变化が必須である。また CI 療法における重要なコンセプトの一つである learned nonuse (学習された不使用) の状態も一種の可塑的变化であり、CI 療法の効果を説明する機序の一つに use-dependent plastic change がある。なお、後述するような大脳半球間の拮抗を考えると、麻痺側上肢の強制使用だけでなく、非麻痺側の上肢にも意味がある可能性があり、CI 療法の邦訳は「麻痺側上肢の強制使

用」よりも「非麻痺側上肢の拘束による運動の発現」のほうが機序の不確実性を忠実に表現している。

ところで神経系に可塑的变化をもたらす介入には、薬物、運動、電気刺激などがある。以下に成人を対象とした経頭蓋磁気刺激 (transcranial magnetic stimulation; TMS) あるいは経頭蓋直流電気刺激 (transcranial direct current stimulation; tDCS) で誘導される大脳皮質の可塑的变化について概説し、片麻痺に対する医学的リハビリテーションへの応用と限界を述べる。なお TMS の基本的な事項については、総説¹⁷⁾¹⁸⁾に記載されている。

脳の非侵襲的刺激法

① rTMS: 脳の興奮性を変化させる技術

規則正しく反復される TMS を反復 TMS (repetitive TMS; rTMS) といい、頻度が 1 Hz を超える場合に「高頻度」rTMS と呼ぶ。高頻度 rTMS は刺激された大脳皮質を「お話し中」状態にしてその皮質機能を刺激の間停止させる。この状態は virtual lesion (仮想病変) と呼ばれ、脳の機能局在や可塑的变化⁶⁾の研究に用いられているが、ここでは刺激後にまで持続する効果を健常者の rTMS について述べる。刺激の強度と頻度、他の感覚入力との併用の有無などにより、興奮・抑制というまったく逆の効果を生じること注目していただきたい。

1. 大脳皮質興奮性の増強

強い高頻度の刺激あるいは感覚入力の修飾により運動野の興奮性が増大することを示した研究を箇条書きにする。

(1) 運動野で閾値の 150% 強度、3 Hz、あるいはそれ以上の強度・頻度の rTMS を行うと、先行刺激がその次の刺激による反応を増大させた²⁶⁾。

(2) 短母指外転筋の最適刺激部位における rTMS (閾値上強度、0.05 Hz、90 発) と正中神経のパルス電気刺激 (感覚閾値の 300% 強度) の組み合わせ刺激 (ペア刺激) で、安静時の運動野刺激による運動誘発電位 (motor evoked potential; MEP) 振幅が増大したが、脳幹刺激による MEP 振幅や F 波の振幅には変化がなく、運動野の興奮性増大が示唆された²⁹⁾。

(3) 閾値の 105% 強度、0.1 Hz、30 分間の rTMS と、標的筋である第 1 背側骨間筋運動点の電気刺激 (幅 1 msec の矩形波、10 Hz、持続時間 500 msec、運動閾値よりも少し強い刺激) とのペア刺激で、MEP と皮質起源の体性感覚誘発電位、および長母指屈筋の長潜時伸張反射の振幅増大が 10 分間持続した³²⁾。

(4) 前腕で短時間止血して、手からの感覚入力を遮断

すると、上腕に対応する運動野の興奮性が増大するが、感覚遮断と同運動野への閾値上強度の rTMS を組み合わせると、さらにその興奮性が高まった³⁴⁾。

(5) 母指の運動訓練中に、母指の最適刺激部位で 0.1 Hz の rTMS を行うと、単発の TMS で誘発される運動の向きは、訓練された方向に向かう頻度が多くなり (「運動記憶」の増強)、その効果は運動訓練と rTMS を同期させた場合に、同期させない場合よりも著しかった⁴⁾。

2. 大脳皮質興奮性の抑制

健常者を対象として、手内筋の最適刺激部位における低頻度 rTMS による運動野の抑制が報告されている。Chen ら⁵⁾によれば閾値の 115% の強度、0.9 Hz、15 分間、810 発の刺激により MEP の振幅が減少し、その効果は 15 分間持続した。Muellbacher ら²⁴⁾は、短母指屈筋の最適刺激部位で、閾値の 115% 強度、1 Hz、15 分間、900 発の刺激を行い、短母指屈筋、第 1 背側骨間筋、小指外転筋の閾値が刺激直後に増大し、30 分後に刺激前のレベルに戻ったと報告した。上腕二頭筋の閾値、ピンチ力、手指の加速度には変化がみられなかった。Gerschlagler ら¹³⁾は、これらの運動野の低頻度 rTMS による抑制効果が、運動前野の弱い刺激による効果である可能性を指摘した。すなわち被検筋弱収縮時の閾値 (安静時閾値よりも低い) の 90% 強度、1 Hz、1500 発の刺激を左 1 次運動野の手の領域 (M1-hand)、左背外側運動前野、左背外側前頭前野、あるいは左頭頂葉に行った結果、左運動前野刺激のみが、右第 1 背側骨間筋の MEP 振幅を減少させ、その効果は刺激後 15 分間持続した。興味深いことに、抑制効果が最大となったのは、900 発目の直後であった。

これらの抑制には長期シナプス抑制様の機序が想定されているが、明らかではない。Fitzgerald ら⁹⁾は、閾値の 115% 強度、1 Hz、15 分間の rTMS で MEP の閾値が増大したが、2 連発刺激法で示される短潜時皮質内抑制、静止期のいずれにも変化がみられなかったと報告した。この短潜時皮質内抑制は、閾値上強度 TMS (試験刺激) に 1~6 msec 先行させて閾値下強度の TMS (条件刺激) を行うと、試験刺激による MEP の振幅が条件刺激のない場合よりも小さくなることで定量的に評価される。また静止期は、被検筋弱収縮中の閾値上強度 TMS により、MEP 出現後に観察される 100~200 msec 程度の電氣的静止期で、その持続時間によって抑制の程度が定量化される。短潜時皮質内抑制は GABA-A 受容体に関与し、静止期は GABA-B 受容体に関与すると考えられている。

M1 への rTMS は感覚野も抑制する。Enomoto ら⁸⁾は、短母指外転筋随意収縮中に計測された閾値の 110% 強

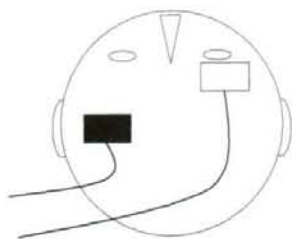


Fig. 1 Transcranial direct current stimulation (tDCS) of the left primary motor cortex (M1). Surface electrodes were placed over the M1 and the contralateral supraorbital area. Anodal stimulation indicates that the anode is placed over the M1, and cathodal stimulation denotes that the cathode is placed over the M1. Direct current with 1mA is delivered for about 10 minutes.

度、1 Hz、200 回の rTMS を、M1、運動前野、感覚野の 3 カ所に行い、体性感覚誘発電位 (somatosensory evoked potential; SEP) への影響を比較検討した。その結果、M1 刺激だけが、皮質起源の SEP 振幅を低下させ、その効果は刺激後約 100 分間持続した。

3. (プレ) コンディショニングと rTMS の効果

rTMS を行う前の脳刺激あるいは rTMS 中の運動条件が rTMS の効果に影響を及ぼす。Iyer ら²¹⁾は閾値下強度、6 Hz、5 または 10 秒間を 20 回繰り返す rTMS を直前に行うと、その後の rTMS (閾値の 115% 強度、1 Hz、10 分間) によって生じる MEP 抑制が増強することを示した。また Fujiwara ら¹²⁾は閾値強度、5 Hz、10 秒間の rTMS が、橈側手根屈筋と橈側手根伸筋を被検筋とした皮質内抑制に及ぼす効果を次のように報告した。すなわち、手関節屈曲 (掌屈) 時に rTMS を行うと屈筋の抑制が減少し、伸筋の抑制が増大した。逆に手関節伸展 (背屈) 時に刺激すると、屈筋の抑制が増大し、伸筋の抑制が減少した。

② tDCS: 微弱な直流電流が皮質の興奮性を変化させる

tDCS は、5 cm×7 cm の長方形電極を 2 個 (一方が陽極で他方が陰極) 頭皮上に置き、1mA の微弱な電流を数~10 分間通電する電気刺激である (Fig. 1)。例えば左運動野に干渉する場合には、電極の一方を左運動野に、他方を右眼窩上に置く。このとき運動野に陽極を置く刺激を陽極刺激、陰極を置く刺激を陰極刺激と呼ぶ。刺激方法自体は古くからあったが³⁾、運動野の興奮性を TMS で評価できるようになったことで、その効果が注目を集めている。

Nitsche & Paulus²⁵⁾は、ヒトにおける tDCS の効果を初めて明らかにした。すなわち 3 分間の tDCS を健常者の運動野に行い、運動野の興奮性が陽極刺激で増大し陰極刺激で減少すること、その効果の大きさが刺激の持続時間と強さに依存し、刺激終了後数分間持続することを報告した。

tDCS の効果の機序として、陽極刺激で神経細胞膜電位が脱分極、陰極刺激で過分極し、それぞれ発射頻度が増加あるいは減少することが動物実験で示されており、ヒトでも同様の機序が想定されている。fMRI で右手指運動による賦活領域が、左運動野の陰極刺激で減少し、その程度が M1-hand よりも補足運動野で著しいことから、皮質間結合を介した効果が主張されている²⁾。

脳 non 侵襲的 刺激による片麻痺の治療

病巣側運動野の高頻度 rTMS や tDCS 陽極刺激による損傷半球興奮性の up-regulation、あるいは非病巣側運動野の低頻度 rTMS や tDCS 陰極刺激による非損傷半球の down-regulation が片麻痺上肢の機能を改善させると報告されている¹⁰⁾¹¹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾²²⁾³¹⁾ (Fig. 2)。ただし慢性期脳卒中患者を対象としたこれらの報告での改善項目は、手指の運動回復段階尺度ではなく、反応時間、運動速度、上肢操作機能検査成績である。また効果の持続時間は、5 日間連続して低頻度 rTMS セッションを行い 2 週間後にも改善の持続を認めた報告²²⁾を除き、ほとんど直後効果のみにとどまっている。

脳刺激に末梢の電気刺激や運動を併用する方法も試みられている。鈴木ら³⁰⁾は、上述のペア刺激による促進を脳卒中患者で検討した。手指分離運動がある程度可能な脳卒中片麻痺患者を対象とし、短母指外転筋の最適刺激部位で、閾値の 95% 強度、0.1 Hz、30 分間の rTMS と、TMS の前 25 msec から短母指外転筋運動点における電気刺激 (幅 1 msec の矩形波、20 Hz、持続時間 500 msec、運動閾値より少し強い強度) とのペア刺激で、20 分間持続する第 1 背側骨間筋 MEP 振幅の増大を観察した。このとき小指外転筋の F 波振幅に変化はみられなかった。このようにペア刺激は健常者だけではなく脳卒中患者でも運動皮質の興奮性を増大させる。

標的筋の随意収縮中に刺激をすると、MEP の振幅が安静時よりも増大し、これを促進現象と呼ぶ。実際の筋収縮を伴わない運動企図だけでも、その運動の動筋から記録される MEP は増大し¹⁶⁾、この現象は片麻痺上肢においても観察されている¹⁾。運動企図による促進現象や rTMS による可塑的变化の誘導の知見から、脳卒中後の

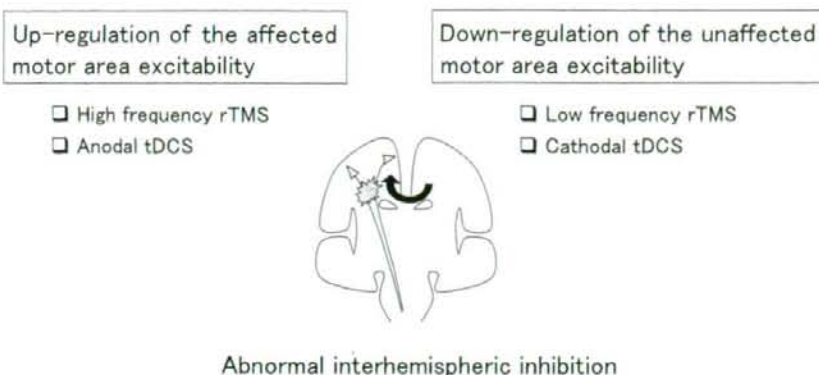


Fig. 2 Targets for intervention strategies in treating hemiplegia following a unilateral supratentorial lesion based on possible pathophysiological mechanisms (abnormal interhemispheric inhibition). (Hummel & Cohen: *Lancet Neurology* 2006)

Fig. 3 Methods of effort-associated TMS. At 3 to 4 sec after the instruction to do a target hand movement is given, TMS to the affected hand area is delivered, then the subject is instructed to relax. The interstimulus interval (ISI) is 10 sec.

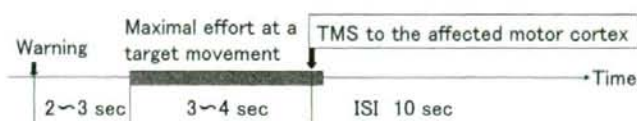
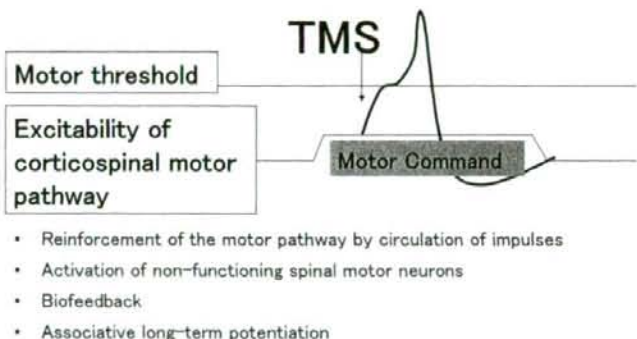


Fig. 4 Hypothetical mechanism for enhancement of motor function induced by TMS during effort at a target movement. Subthreshold activation of the motor pathway may influence the direction of the TMS-induced movements, which could reinforce the neural circuits by circulation of impulses including spinal motor neurons, and help the patient find out whether her/his motor commands are appropriate (biofeedback). Excitation of the sensory cortex may also play a part.



完全麻痺でも収縮努力をすれば、運動閾値に近づくような可塑性変化が生じ、rTMSがそれを増強することが、一つの仮説として考えられる。

われわれは機能的プラトーに達した片麻痺患者で、目標運動努力に同期させた TMS (0.1 Hz, 1セッションに 100 発, Fig. 3) により運動出力の再構築が生じたことを示唆する知見を得た¹⁹⁾。さらに慢性期脳卒中患者片麻痺で週 1 セッションで 4 セッション行うことにより上肢運動遂行機能あるいは痙縮が改善することを二重盲検化対照比較試験で示した²⁰⁾。この効果は介入終了 1 週間後も維持されていた。目標運動努力と TMS を同期させることは、誘発される運動がフィードバック効果を有する

こと、有効な動作の神経基盤をより選択的に賦活できることから合理的な方法と思われる (Fig. 4)。

可塑性、ホメオスタシス、リハビリテーション介入

中枢神経系の可塑的变化には 2 段階のプロセスが想定される²⁷⁾。第一段階は、外乱によって急速にかつ恒常的に生じる一過性の可塑的变化で、その都度あらかじめセットされた興奮性の水準に戻る力が働く。このような生体システムの出力を一定に保つ仕組みはホメオスタシスと呼ばれ、神経系においても細胞レベルから機能系全体

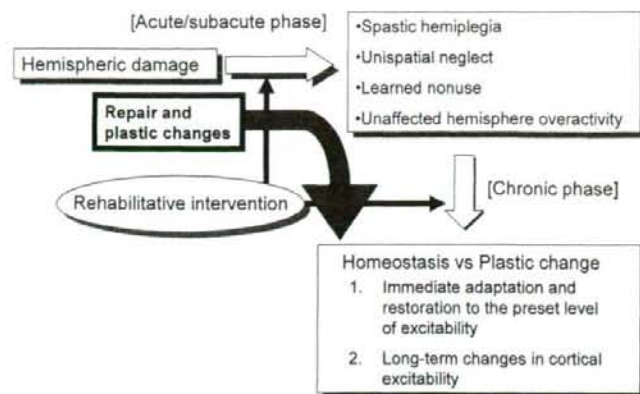


Fig. 5 Repair and plastic changes in the cerebral hemisphere following a unilateral supratentorial stroke. Plastic changes in the central nervous system result in functional recovery of hemiplegia as well as undesired sequelae such as spasticity and learned nonuse. Overactivity of the unaffected hemisphere may worsen hemiplegia or unilateral spatial neglect. Even in the chronic phase, intervention can transiently change the set-point of homeostasis in the nervous system. Consolidation of such changes is necessary for long-term recovery in hemiplegia.

にまで働く⁷⁾。Langら²³⁾は、高頻度 rTMS (被検筋随意収縮時の閾値強度, 5 Hz, 100 発) が、先行する tDCS (1mA, 10 分間) で生じた興奮性の変化を逆転させることを示した。また Siebnerら²⁸⁾は 1 Hz, 閾値強度の rTMS が、tDCS による効果を逆転させることを示した。すなわち陽極刺激後に rTMS を行うと MEP 振幅が低下し、陰極刺激後に rTMS を行うと MEP 振幅が増大した。このように rTMS の影響は、低頻度刺激でも高頻度刺激でも、刺激前の皮質興奮性変化を打ち消す方向に作用する (homeostatic plasticity)。

長期的に持続する機能的な変化を生じるには、介入によって生じた第一段階の変化を強化し、変化した興奮性の規準 (ホメオスタシスのセットポイント) を介入後も維持する必要がある。rTMS や tDCS の効果が興奮性規準の変化に繋がる方法 (刺激方法、発症からの時期、適応となる病態の選択) や機序についてさらなる検討が望まれる。

Fig. 5 に一側大脳半球損傷後の可塑的变化に関連する事項をまとめた。中枢神経系の可塑的变化は急性期から亜急性期にかけての回復と病態形成ならびに慢性期以降の機能的変化にかかわり、脳だけでなく脊髄においても生じる。慢性期においても外乱 (介入) によってホメオスタシスのセットポイントは一過性に変化する。望ましい変化を強化し持続させることができれば長期的な機能改善につながる。慢性期までの病態形成と機能回復、慢性期以降のホメオスタシスと機能改善との関係を整理し、rTMS や tDCS を含めたりハビリテーション介入の意義を考慮することが大切である。

脳の非侵襲的的刺激は可塑的变化を望ましい方向に誘導するための物理療法として日常診療に取り入れられていくと思われる。そのためには治療効果の検証、作用機序の解明と適応範囲の拡大、安全性の検討などが、刺激装

置の改良とともに進展することが大切である。刺激装置に求められるスペックとして、より深部の局所を定位して興奮させられること、複数の部位をコイルを動かすことなく刺激できること、刺激 1 発ごとの反応に応じて刺激強度を自動的に調節できることなどが挙げられる。一方で基礎的研究の進歩は目覚ましいが、冒頭で CI 療法について述べたように現時点での不確定性を正しく理解することの重要性を強調したい。

文 献

- 1) 有田元英: 脳卒中片麻痺の経頭蓋磁気刺激誘発電位に関する基礎的研究. リハ医学 38: 920-931, 2001.
- 2) Baudewig J, Nitsche MA, Paulus W, Frahm J: Regional modulation of BOLD MRI responses to human sensorimotor activation by transcranial direct current stimulation. *Magn Reson Med* 45: 196-201, 2001.
- 3) Bindman LJ, Lippold OC, Redfearn JW: The action of brief polarizing currents on the cerebral cortex of the rat (1) during current flow and (2) in the production of long-lasting after-effects. *J Physiol* 172: 369-382, 1964.
- 4) Bütetisch CM, Khurana V, Kopylev L, Cohen LG: Enhancing encoding of a motor memory in the primary motor cortex by cortical stimulation. *J Neurophysiol* 91: 2110-2116, 2004.
- 5) Chen R, Classen J, Gerloff C, Celnik P, Wassermann EM, Hallett M, Cohen LG: Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. *Neurology* 48: 1398-1403, 1997.
- 6) Cohen LG, Celnik P, Pascual-Leone A, Corwell B, Falz L, Dambrosia J, Honda M, Sadato N, Gerloff C, Catalá MD, Hallett M: Functional relevance of cross-modal plasticity in blind humans. *Nature* 389: 180-183, 1997.
- 7) Davis GW: Homeostatic control of neural activity: From phenomenology to molecular design. *Annu Rev Neurosci* 29: 307-323, 2006.
- 8) Enomoto H, Ugawa Y, Hanajima R, Yuasa K, Mochizuki H, Terao Y, Shio Y, Furubayashi T, Iwata NK, Kanazawa I: Decreased sensory cortical excitability after 1 Hz rTMS over the ipsilateral primary motor cortex. *Clin Neurophysiol* 112: 2154-2158, 2001.