

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 5 月 24 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22650132

研究課題名（和文）脊髄小脳変性疾患患者のリハビリ訓練の効果を小脳失調モデルマウスで評価する
技術の確立

研究課題名（英文）Development of a Method to Evaluate the Effects of Rehabilitation on Patients with Spinocerebellar Degeneration Using a Mouse Model of Cerebellar Ataxia

研究代表者

別府 英博（別府秀彦）(BEPPU HIDEHIRO (BEPPU HIDEHIKO))

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・准教授

研究者番号：30142582

研究成果の概要（和文）：

本研究モデルマウスは、小脳プルキンエ細胞の変性による運動失調を呈するヒトの小脳失調性疾患（SCD）モデルの有用な動物と考えられる。SCD 患者の運動機能改善の効果を高める有効なリハビリ訓練法は確立されておらず、現在、脊髄小脳系以外の機能を保つことが優先される。そこで当該マウスに模擬リハビリ訓練として行い、ロータロッドにおける平行感覚と協調運動を観察し、非運動群と比較した。その結果、運動負荷は、当該マウスの協調運動の改善をみた。この結果は SCD 患者にできる限り連続した歩行訓練を行うことによりふらつき歩行を軽減させる可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：

The mouse model developed in this study may be applicable to patients with spinocerebellar degeneration (SCD) involving motor ataxia due to cerebellar Purkinje cell degeneration.

Appropriate methods of rehabilitation for SCD patients to improve their motor functions have not yet been established, and, therefore, priority is given to the maintenance of functions other than the spinocerebellar system at present. Considering such a situation, in the study, the mouse was treated with simulation rehabilitation training, and a rotarod test was subsequently performed to evaluate its balance ability and coordinated movements in comparison with those without training. As a result, training with exercise improved the mouse's coordinated movements, suggesting that continuous gait training may reduce SCD patients' staggering gait.

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	0	1,200,000
2011 年度	800,000	0	800,000
2012 年度	800,000	0	800,000
— 年度			
— 年度			
総計	2,800,000	0	2,800,000

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：(1) 脊髄小脳変性疾患 (2) 疾患モデルマウス (3) 小脳失調 (4) 運動失調 (5) リハ訓練 (6) 運動負荷 (7) B6-wob/t マウス (8) 生体成分分析

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳失調症 (SCD) は臨床的には、運動失調を呈し、小脳そのもの、小脳とつながる経路に変性性病変をもつ神経変性疾患である。本研究モデルマウスは、共同研究者の高橋が、C57BL/6J cpk の系統維持中、酪酐様歩行を示すマウスを発見し B6-wob/t として育種しているものである。生後4週齢目からの特徴は、A)行動解析検査から①酪酐様歩行②間歇歩行③筋力低下④筋協調運動低下⑤平行感覚低下を示し、B)解剖学的所見から①小脳萎縮②小脳プルキンエ細胞の変性・脱落、C)プロテオーム解析から①筋アクチン・タンパクの減少②小脳内カルビンディンの減少などである。このように B6-wob/t は小脳プルキンエ細胞の変性による運動失調を呈する SCD 疾患モデルの有用な動物と考えられる。

2. 研究の目的

SCD 患者の運動機能改善の効果を高める有効なリハ訓練法は確立されておらず、現在、脊髄小脳系以外の機能を保つことが優先される。その理由として、SCD は変性疾患であるために、損なわれていく運動機能を回復させるリハ訓練方法がないと考えられる。当該マウスを用い日常的に SCD 患者に行っている歩行訓練、下肢重錘負荷、膝装具、バンテージ処方などのリハを、マウスの体躯に合わせた模擬リハ訓練として行うことを考えた。すなわち訓練中の行動や運動後の改善を観察し、SCD 患者に対するリハ訓練が有効であるかどうかを動物実験で評価することにある。その結果から、SCD 患者に対し、より効果的な訓練あるいは不必要な訓練を解析し、SCD 患者の運動機能障害を遅らせるプログラムの構築を目指し、QOL 向上を図ることを目的としている。

3. 研究の方法

1) 24 時間行動監視装置による観察

回転ゲージとオープンフィールドを組み合わせた飼育養箱に赤外線監視装置でマウスの行動を 24 時間監視した。

2) 強制歩行運動および歩行解析

回転ホイール (かご) による強制運動負荷 (2m/分 x 50 分 x 3 回 x 6 日 x 4 ヶ月) 運動前後の運動能力評価 (Rotarod のよる協調運動の改善、病理解剖組織学的解析など) を行い、Rotarod のよる協調運動を評価した。

行動監視装置による、当該マウスと健常対照マウス (B6) の運動量の測定および行動解析法による協調運動機能、平衡運動機能、歩行異常の解析 ③回転ホイール (かご) による強制運動負荷 (2m/分 x 50 分 x 3 回 x 6 日 x 4 ヶ月) 運動前後の運動能力評価 (Rotarod、歩行異常解析、病理解剖組織学的解析など) を行い、評価した。

3) 体軸を決めた歩角の解析

当該マウスは、後肢を広げて歩行することで、酪酐歩行による転倒を回避していることから、体軸よりも下肢を広げている。よって病態の強さと下肢の広がりや足首の角度を測定する装置を考案した。

4) 振戦の測定

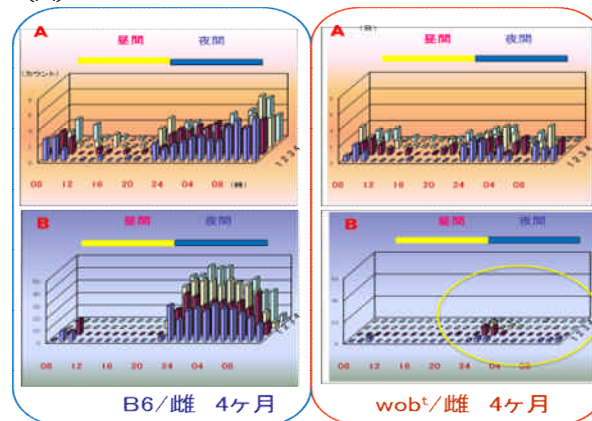
当該マウスは、体幹が左右に揺れながら歩行する特徴があるので、振戦を測定することにより、小脳失調の程度を評価した。

4. 研究成果

1) 当該マウスの 24 時間行動を監視モニター付ランニングホイールで測定し、野生型と比較した。

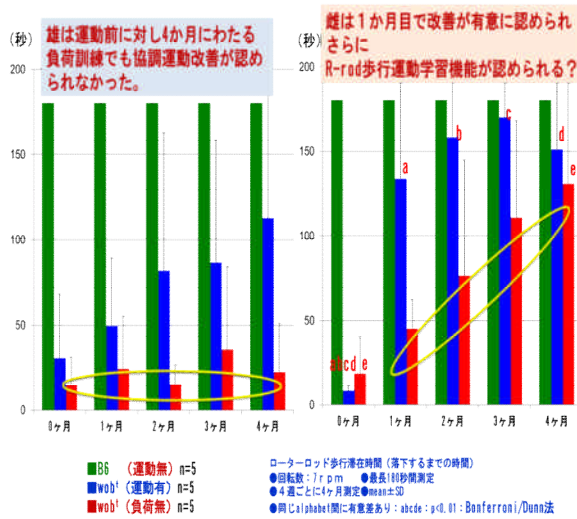
下図 (A) は、当該マウスの昼夜の運動量であるが B6 に対し 50 分の 1 程度であるが、当該マウスに回転ホイール強制歩行訓練を生後 20 週から 4 か月間施行した。その間 1 か月ごとに Rotarod 試験を行い筋協調運動・平衡運動能力を評価した (図 B)。その結果リハ訓練群は開始前に対し 1 か月目から有意に能力の向上が見られた。したがって強制歩行訓練は、当該マウスの歩行失調を改善させる有用性が示された。

(A)



(B)

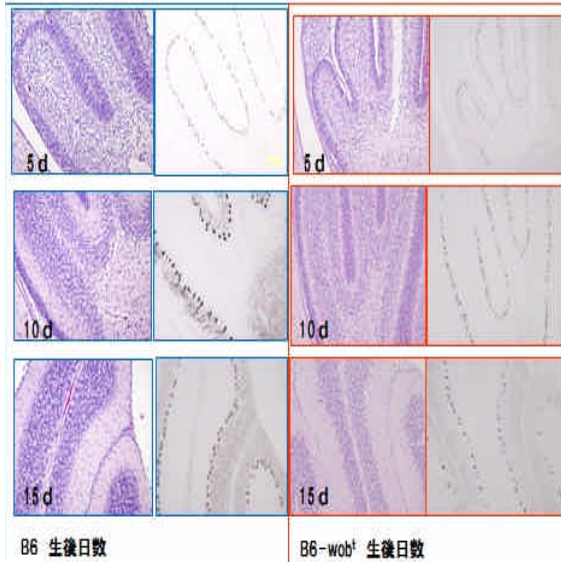
結果1: B6とwob^t 20週齢群運動有無におけるR-rod試験*の経時的変化



以上の知見は、当該マウスの協調運動失調は、歩行訓練などの運動負荷が必要と考えられる。

2) 生後5日~20日齢の小脳をHE染色で確認したところ、10日齢で、プルキンエ細胞の変性と一部脱落が観察された。

小脳のH&EおよびCalbindin抗体染色による経時的変化

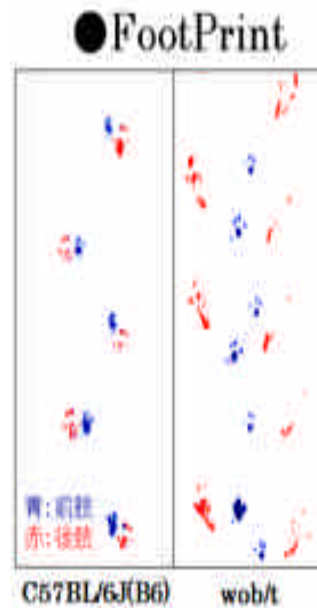


3) 体軸を決めた歩角の解析

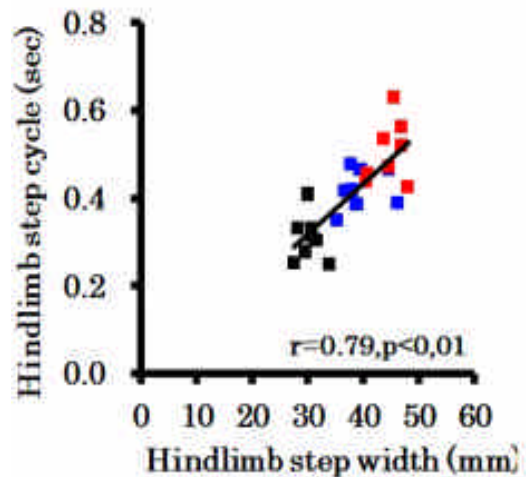
当該マウスは、後肢を広げて歩行することで、酩酊歩行(下図A)による転倒を回避している。すなわち表現型の強いほど、後肢角度は体軸より広がっているのが特徴である。よってその体軸を正しい既定することが大切である。そこで骨盤軸を設け、wob^tのように側屈を示す歩行

する場合は、鼻-尾軸よりも正確に歩隔や足角度を測定することができた。

(A)



下図Bは、我々が開発した骨盤体軸基準法(詳細省略)で測定した当該マウスの結果を示す。黒■は野生型の歩隔と歩行周期の相関を見たものである。青■は歩行強制運動を行った当該マウスで赤■は非運動の当該マウスである。明らかに、歩行失調のマウスに強制歩行運動の介入を行うことにより歩行が上達している。



相関分析: ピアソン $r=0.79, p<0.01$

3) 体軸を決めた歩角の解析

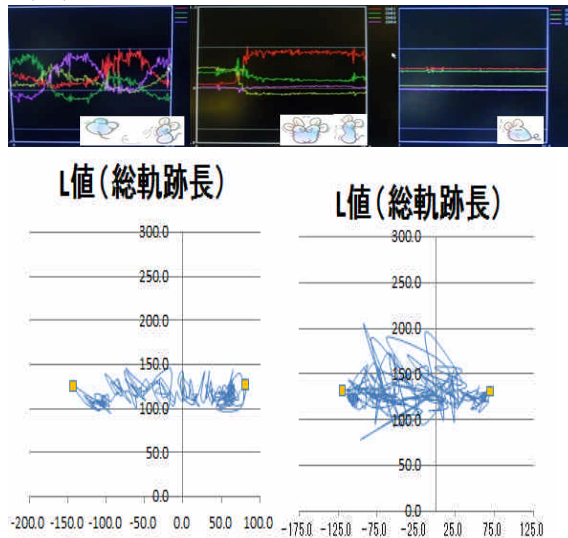
当該マウスは、後肢を広げて歩行することで、酩酊歩行による転倒を回避していることから、正しい歩角を求めた。

5) 振戦の測定

振戦を計測するために、臨床の重心動揺計の原理を応用した。

マウスの体重が計測できる4つのモジュールをオープンフィールドの4隅に下に置き、その中に当該マウスを入れて歩行中、休息中の振れ幅を100Hzの信号でとらえた。

(A)



図Aの上左の波形は、マウスが歩いているところ、中は立ち止まり停止中、右は静止し、寝ている状況に近いときの体躯の揺れを示している。下の折れ線グラフはその信号をXY座標で揺れ幅を示したものである。左は野生型マウス、右は当該マウスである。明らかに体躯の揺れが大きい。

本研究はこの波形の違いを運動負荷有無で比較した。

その結果、強制歩行運動を行った群は有意に体躯の揺れが少なくなった。

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6件)

1. Hidehiko Beppu, Kenmei Mizutani, Naoki Takayanagi, Masanori Shinzato, Shigeru Sonoda, Hisahide Takahashi. (2013). Characterization of ataxia shown by an abnormal behavior mouse derived from the C57BL/6-cpk mouse with infantile cystic kidney disease. Structure

and Function (Structure and

Function) ;11(2):92-101 Kenmei

Mizutani, Sigeru Sonoda, Keiki Yamada,

Hidehiko Beppu, Kan Shimpo (2011).

Alteration of protein expression profile

following voluntary exercise in the

perilesional cortex of rats with focal

cerebral infarction. BRAIN RESEARCH,

1416, 61-68.

(主要なもの以外4報)

[国内学会・会議・]

(計39件)

1. 別府秀彦、水谷謙明、玉井育子、山口久美子、高柳尚貴、園田 茂 (2013). UPLC-SQDを用いた小脳変性マウス大脳、小脳、橋・延髄内遊離アミノ酸量の検討. 第23回生物試料分析化学学会年次学術集会、大阪梅田、2月10-11日.
2. 別府秀彦、富田 豊、園田 茂、高柳尚貴、水谷謙明、Abbas Orand、山口久美子、新里昌功 (2013). 小動物用重心動揺計の開発および運動失調マウスの振戦の測定. 第4回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、岡山、2月17日 高柳尚貴、園田 茂、別府秀彦、水谷謙明、山口久美子、富田 豊、Abbas Orand (2013). 運動失調マウスB6-wob/tの歩行解析(3): 運動負荷が失調歩行に及ぼす影響. 第4回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、岡山、2月17日
3. 水谷 謙明、園田 茂、別府 秀彦、岡崎 英人、高柳 尚貴 (2012). 脳梗塞ラットへの訓練効果および可塑性関連物質の脳内局在解析. 第3回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、横浜市、2月25日
4. 高柳 尚貴、園田 茂、別府 秀彦、水谷 謙

- 明、鈴木 昇一、長尾 枝澄香、山口 久美子、岡崎 英人、富田 豊、高橋 久英 (2012). 小脳変性症モデル動物マウスの歩行分析 ー 体軸足跡法の開発. 第 3 回 日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、横浜市、2月25日
5. 別府 秀彦、水谷 謙明、高柳 尚貴、園田 茂、岡崎 英人、新里 昌功、山口久美子、富田 豊、近藤和泉、高橋久英(2012). 運動失調マウス B6-wob/t の行動解析(7)強制歩行運動が運動協調性に与える影響. 第 3 回 日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、横浜市、2月25日
 6. 新里昌功、別府秀彦、水谷謙明、山口久美子、中村政志、高柳尚貴、園田 茂、高崎昭彦、高橋久英(2012). 運動失調マウス B6-wob/t の幼若期の組織細胞学・免疫組織化学染色の観察および LMD による小脳タンパク成分の同定. 第 7 回日本臨床検査学教育学会、名古屋市、8月22-24日.
 7. 別府 秀彦、水谷 謙明、園田 茂、高柳 尚貴、山口 久美子、高橋 久英(2012). 運動失調マウス B6-wob/ t の行動解析(8)強制歩行運動が運動協調性に与える影響、第 67 回日本体力医学会大、岐阜、9月14-16日
 8. 別府 秀彦、富田 豊、園田 茂、高柳 尚貴、水谷 謙明、山口 久美子、Abbas Orand、新里 昌功、高橋 久英(2012). 小動物用重心動揺計の開発および運動失調マウス B6-wob/t の振戦の測定、第 11 回形態・機能学会学術集会、東京、9月22日
 9. 高柳 尚貴、園田 茂、別府 秀彦、水谷 謙明、山口 久美子、富田 豊、AbbasOrand、新里 昌功、高橋 久英(2012). 運動失調マウス B6-wob/t の歩行解析:運動負荷が失調歩行に及ぼす影響、第 11 回形態・機能学会学術集会、東京、9月14日
 10. 山口久美子、別府秀彦、富田 豊、園田 茂、高柳尚貴、水谷謙明、Abbas Orand、新里昌功、高橋久英(2012). 運動失調マウス B6-wob/t における小動物用重心動揺による測定条件の検討. 第 44 回藤田医学会、豊明市、10月4-5日
 11. Ken Hirosaki、Hidehiko Beppu、Lumi Negishi、Paxton Thanai、Takayuki Yonezawa、Shigeru Sonoda、Ung-il Chung、Nobuhiro Hayashi (2012). Development of human serum proteomics. The 85th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. December 14 - 16, Fukuoka, Japan.
 12. 水谷謙明、園田 茂、別府秀彦、岡崎英人、山口久美子、高柳尚貴(2011). 脳梗塞モデルラットの運動機能回復に関わる脳内機能的生理活性物質の解析. 第 2 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、名古屋市、2月12日(プログラム・抄録集、p53)
 14. 岡崎英人、別府秀彦、水谷謙明、山口久美子、近藤和泉、才藤栄一、園田 茂(2011). ラットにおける肝細胞増殖因子と筋委縮. 第 2 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、名古屋市、2月12日(プログラム・抄録集、p54)
 15. 別府秀彦、水谷謙明、新里昌功、近藤和泉、岡崎英人、山口久美子、園田 茂、高柳尚貴、高橋久英(2011). 運動失調モデルマウス B6-wob/t の行動観察と病因分析(4)小脳変性症のモデル動物として有用か? 第 2 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、名古屋市、2月12日(プログラム・抄録集、p63)
 16. 高柳 尚貴、別府 秀彦、園田 茂、水谷 謙明、新里 昌功、山口 久美子、富田 豊、近藤 和泉、中村 政志、高橋 久英 (2011). 運動失調マウス B6-wob/t の行動解析(6)日常運動量と歩行訓練の協調運動への影響. コ・メディカル形態機能学会 第 10 回学術集会・総会、春日井市、9月17-18日

17. 別府 秀彦、水谷 謙明、新里 昌功、園田 茂、富田 豊、岡崎 英人、山口 久美子、高柳 尚貴、高橋 久英 (2011). 運動失調マウスの行動観察と病因解析 (5) 強制歩行訓練による運動失調の改善の検討. 第 66 回 日本体力医学会大会、下関市、9 月 16-18 日
18. 山口 久美子、別府 秀彦、水谷 謙明、新里 昌功、中村 政志、原 和宏、園田 茂、高柳 尚貴、富田 豊、高橋 久英 (2011). 運動失調マウス B6-wobt の行動解析と病因解析 (7) 生後 5 日齢後の脳重量の変化と病理組織・免疫組織化学染色および LMD を用いた小脳タンパク成分の同定. 第 43 回藤田学園医学会、豊明市、10 月 6-7 日
19. 廣崎 賢、別府 秀彦、遠藤 毅、根岸 留美、Thanai Paxton、米澤 貴之、園田 茂、林 宣宏 (2011). ヒト血清プロテオミクス解析法の開発. 第 34 回 日本分子生物学会年会、横浜市、12 月 13-16 日
20. 岡崎英人、別府秀彦、水谷謙明、山口久美子、近藤和泉、才藤栄一、園田 茂 筋萎縮ラットにおける肝細胞増殖因子の運動による変化(2010). 第 47 回日本リハビリテーション医学会学術集会、鹿児島市、5 月 20-22 日(プログラム・抄録集、p S157)
21. 別府秀彦、水谷謙明、新里昌功、山口久美子、近藤晶子、林 宣宏、近藤和泉、高橋久英 (2010). 運動障害モデルマウス B6-wob t の行動観察と病因解析 (3) 協調運動と小脳組織の経時的観察. コ・メディカル形態機能学会第 9 回学術集会、新潟市、9 月 11 日 (形態・機能、Vol. 9No. 1p27)
22. 別府秀彦、水谷謙明、岡崎英人、山口久美子、園田 茂 (2010). リハ患者の運動療法評価に利用可能な血液・尿中成分検索条件の検討 (7) 回復期リハ訓練患者と脳梗塞ラットの運動負荷後の血中遊離アミノ酸の測定. 第 65 回日本体力医学会大会、市川市、9 月 16-18 日 (予稿集、p255)
23. 山口久美子、別府秀彦、水谷謙明、岡崎英人、園田 茂 (2010). リハ患者の運動療法評価に利用可能な血清・尿中成分検索条件の検討 (8) UPLC を用いた脳梗塞ラットへの運動負荷後の遊離アミノ酸の測定. 第 42 回藤田学園医学会、豊明市、10 月 7-8 日 (藤田学園医学会誌、Vol. 34 Suppl., p43)
24. 岡崎英人、別府秀彦、水谷謙明、山口久美子、近藤和泉、才藤栄一、園田 茂 (2010). ラットにおける筋萎縮と運動による肝細胞増殖因子の変化. 第 42 回藤田学園医学会、豊明市、10 月 7-8 日 (藤田学園医学会誌、Vol. 34 Suppl., p16)
- (主要なもの以外 15 件)
- [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
<http://www.fujita-hu.ac.jp/FMIP/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
別府 英博(別府 秀彦) (BEPPU HIDEHIRO (BEPPU HIDEHIKO))
藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・准教授
研究者番号：30142582
- (2) 研究分担者
新里 昌功 (SINZATO MASANORI)
藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授
研究者番号：80148288
- (3) 連携研究者
水谷 謙明 (MIZUTANI KENMEI)
藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・助教
研究者番号：30351068
山口 久美子 (YAMAGUCHI KUMIKO)
藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・技術員
研究者番号：50526308

高橋 久英 (TAKAHASHI HISAHIDE)

藤田保健衛生大学・名誉教授

研究者番号：80084606

園田 茂 (SONODA SIGERU)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：10197022