

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300190

研究課題名(和文) 高速X線4Dイメージングによるパーキンソン病リハビリテーションの次世代モデル開発

研究課題名(英文) X-ray movie system for analysis of Parkinson disease and rehabilitation

研究代表者

糸井 康宏 (Kumei, Yasuhiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：30161714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：2方向からX線を照射して撮影し、その画像を高速カメラで連続撮影して、3D動画として記録するシステムを製作した。同システムを用いて、パーキンソン病の4大症候(歩行・運動障害、鼻動、筋固縮、安静時振戦)の他に、呼吸など自律神経機能、咀嚼/嚥下/発声などの様子を、X線ムービーとして記録し、解析した。従来は、遅れて発症するといわれていた呼吸運動の変調・障害が、パーキンソン病の4大症候とほぼ同時期の早い段階で発現することが、この3DX線動画システムによって初めて明らかになった。これらのパーキンソン病症状の早期発見により、早期のリハビリ開始が可能となり、症状進行の予防に役立つことが示された。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease is a progressive degenerative CNS disorder to cause a typical motor symptoms. Respiratory alterations have been supposed to follow postural changes and osteoarticular degeneration, leading to an alteration in the spinal axis that in turn could affect breathing mechanics. We examined respiratory movements by using cineradiography on a model of mild hemi-Parkinson disease by an injection of 6-OHDA solution to the right striatum of mice (C57BL/6J), and were compared to control mice that were injected with saline solution. Two weeks after surgery, respiratory movements were recorded by video X-ray without restraint. Behavioral tests confirmed mild motor impairments in Parkinson mice. Parameters of respiratory function showed mild alterations in the Parkinson mice, suggestive of a restrictive-type respiratory disorder. Data suggest that respiratory alterations in Parkinson disease may emerge simultaneously to motor symptoms, and not as a consequence of the latter.

研究分野：硬組織病態生化学

キーワード：X線 パーキンソン病 リハビリテーション 運動障害 呼吸機能 横隔膜

1. 研究開始当初の背景

(1) パーキンソン病とリハビリテーション：パーキンソン病の治療は、運動機能や歩行能力の評価に用いられる“Yahl の尺度”を基にした薬物療法が中心であり、一般的には重症あるいは高齢患者にはドーパミン補充のL-DOPA が有効である。しかし長期間投与による症状の日内変動 (wearing-off 現象) や不随意運動 (ジスキネジア) などの副作用が懸念される軽症あるいは若年患者に対しては薬物療法ではなく、代わりに理学療法や作業療法が合併症防止や機能維持に役立つ (Tefertiller et al., J. Rehabil. Res. Dev. 2011)、高い罹患率の同疾患の病態進行と変動の大きい症状を正確に反映させたりハビリのプログラムは確立されていない。

(2) パーキンソン病モデル：我々は平成 21 年度および 22 年度採択の科研費補助金により、神経変性疾患リハビリテーションの生理学的研究を開始し、さらに平成 23 年度採択研究では生化学的アプローチも加えた。ドーパミン作動性ニューロンの特異的神経毒 MPTP のラット線条体被殻への注入によるパーキンソン病モデル実験を行った結果、基底核ループを構成する黒質、線条体、淡蒼球でのドーパミン作動性ニューロンの活動抑制と作業記憶の低下、口腔機能 (咀嚼、嚥下) 低下を発見した。また視床下部にマイクロカニューレを留置したラットに運動療法シミュレーションを行った実験で、減負荷時にセロトニン、増負荷時にドーパミンが脳内で放出され、高次脳機能変化の誘導性を明らかにした (井上ら、日本神経学会, 横浜, 2011)。

(3) X 線ムービー：JAXA の協力を得て行ったマウス減負荷実験では、マウス姿勢維持のための四肢の関節可動域が、1/6 減負荷を閾値として、鋭角から鈍角に大きく変わることを X 線ムービーによる簡単な実験で初めて明らかにした (Kumei et al., 米国重力生理学学会, San Jose, 2011)。

2. 研究の目的

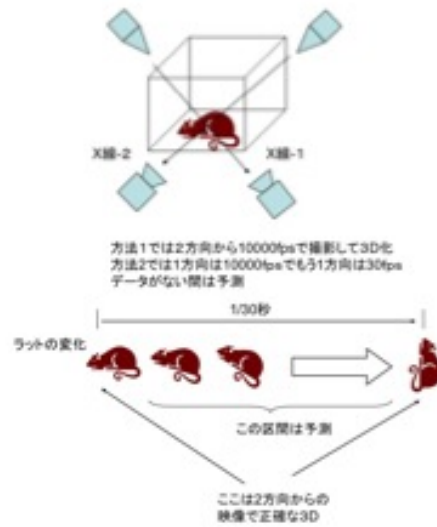
高精細 X 線 3D イメージングシステムを開発する。パーキンソン病マウスの実験モデルを使って、当該システムを用いて、パーキンソン病の 4 大症候 (歩行・運動障害、寡動、筋固縮、安静時振戦) の他に、呼吸など自律神経機能、咀嚼/嚥下/発声などの様子を、詳細に X 線ムービーとして記録し、解析する。それら呼吸運動の微細な変調が、パーキンソン病の 4 大症候に先行して早い段階で発現することを X 線動画として記録することができれば、それを応用して、パーキンソン病の早期発見と早期リハビリ開始によって、症状進行を防ぐための予防法開発のための基礎的研究を行なう。

3. 研究の方法

(1) X 線 3D 動画撮影システムの開発

【図 1 要素技術の開発】

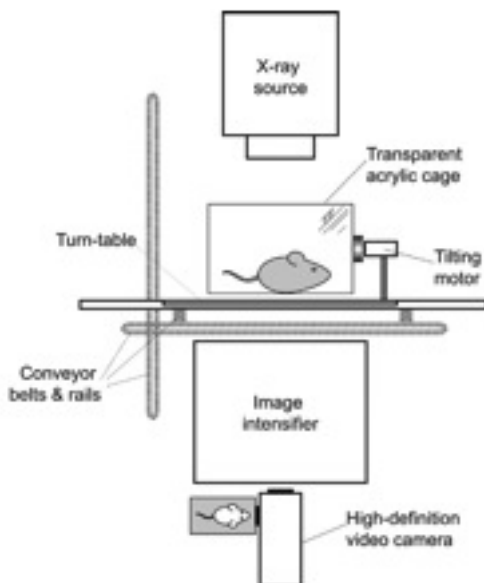
X 線デュアルビームと 3 次元イメージング



【図 2 X 線 3D 動画撮影システム製作】



【図 3 X 線動画撮影システム概念図】



(2) パーキンソン病マウス作製
 C57BL/6J マウス (23-25g 体重、日本クレア) を購入後 1 週間飼育し、脳内手術を施す。麻酔下 (ketamine 90-120mg/kg - xylazine 10mg/kg) で、マウスを脳定位固定装置にて、マニピュレータとマイクロインジェクションにより Bregma (頭蓋骨で冠状縫合と矢状縫合の結合点) より前方 0.5mm、右側 2.0mm、深さ 3.0mm (Paxinos and Franklin, 2008) の位置の右側線条体域に 32G 針ハミルトン製シリンジで 6-OHDA 塩酸 (Sigma-Aldrich) 3 μ g 生理的食塩水/2 μ l/4min で投与した (n=14)。偽手術対照群には、Ascorbic acid-生理食塩水のみを投与した (n=8)。

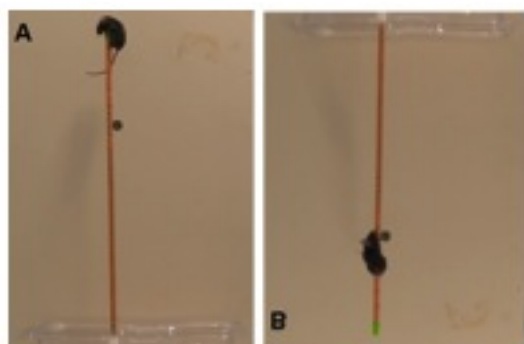
(3) 行動試験

上記脳内 6-OHDA 注入手術後、2 週間経過後に運動機能について、以下の 3 種の試験を行い、試験内容を告知していない、独立性を有する第三者による客観的評価を行った。

【Pole テスト】

Bradykinesia と Motor coordination については、床面に垂直に立てた木製円柱棒 (直径 1cm、高さ 50cm) の頂上に上向きに置いたマウスが、下向きに方向転換 (turn) するのに要する時間と円柱棒を下る (descent) のに要する時間とをそれぞれ計測した。

【図 4 Pole テスト】



【Cylinder テスト】



【図 5 Cylinder テスト】

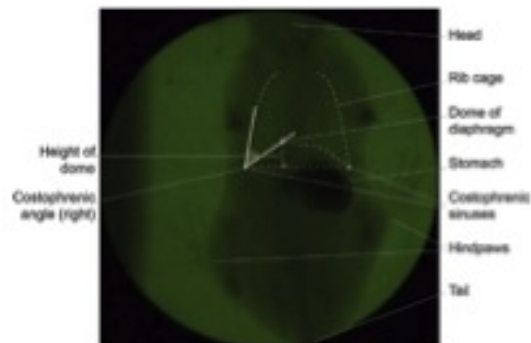
Cylinder テストは、マウスの活動が 1 日のうちで最大となる消灯直前に実施した。正常なマウスは、新しい環境 (シリンダーピーカー) の中に入れられると、探索行動 (ピーカー内面を立ち上がり、両前肢でピーカー内側のガラス面を触ったりする) の頻度を計測した。

*Pole テストと Cylinder テストの図は以下の論文から引用した: Campos, PS (2014). Evaluation of the diaphragmatic excursion in an experimental model of Parkinson's disease. Master Degree Dissertation (Advisor: Prof. JL Zeredo), University of Brasilia, Brazil.

(4) X 線ムービー撮像

本研究で開発された X 線ムービー装置を用いて、パーキンソン病マウスの呼吸機能 (横隔膜の運動距離、肋骨横隔膜角 CPA (costophrenic angle) (図 6 で 2 つの直線で作られた角度) の大きさ、呼吸頻度を測定した。呼吸頻度は、最大吸気と続く最大呼気との間のフレーム数で計測した。横隔膜ドームの高さは、左右の CPA を結ぶ直線に垂直に計測してドーム高さが最長となる点を選んだ。最大呼気と最大吸気時の横隔膜ドームの高さの差をもって横隔膜の運動距離とした。ムービー分割フレームについて、各フレーム間の測定は、Kinovea ソフトウェアを用いた。

【図 6 パーキンソン病マウスの横隔膜運動計測】



(5) 統計解析

6-OHDA 投与 (パーキンソン病マウス) 群と生理食塩水投与 (対照マウス) 群との間の計測値の有意性は、Mann-Whitney U 検定で行い、 $p < 0.05$ を以て有意な差とした。

4. 研究成果

(1) Pole テスト

6-OHDA 投与群 (パーキンソン病マウス) では、円柱頂上に置いた時、下降を開始するまでの方向転換 Turn に要する時間が、対照群 (正常マウス) の 2 倍を必要とし、典型的なパーキンソン症状を示した。他方、いったん下降を開始した後、床面に到達するまでの時間 Descent は、両群の間で有意差はなかった。

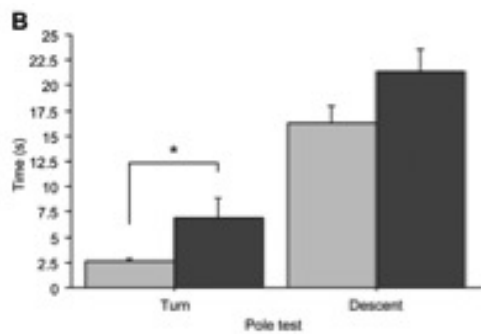


図7 パーキンソン病マウスの Pole テスト

P.S.de Campos, K. Hasegawa, Y. Kumei, J.L. Zeredo: Cineradiographic analysis of respiratory movements in a mouse model for early Parkinson's disease. *Respirat. Physiol. Neurobiol.* 218, 40-45, 2015.

(2) Cylinder テスト

正常対照群では、右側前肢の使用頻度が左側より数%多かったが、6-OHDA 投与群（パーキンソン病マウス）では、6-OHDA 投与側と同側性の前肢使用頻度が上昇し、6-OHDA 投与による片側麻痺の影響が認められた。

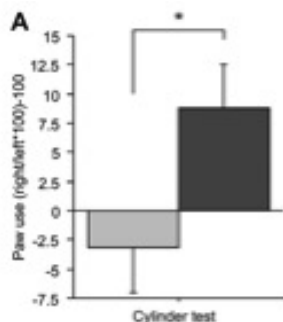


図8 パーキンソン病マウスの Cylinder テスト

P.S.de Campos, K. Hasegawa, Y. Kumei, J.L. Zeredo: Cineradiographic analysis of respiratory movements in a mouse model for early Parkinson's disease. *Respirat. Physiol. Neurobiol.* 218, 40-45, 2015.

(3) X 線ムービー撮像

X 線ムービーで呼吸運動を記録し、最大呼気（図9）と最大吸気の際のCPAを計測した。

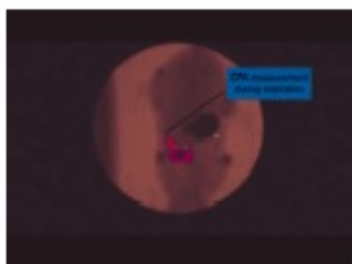


図9 パーキンソン病マウスの呼吸運動 X 線動画

Campos, PS (2014). Evaluation of the diaphragmatic excursion in an experimental model of Parkinson's disease. Master Degree Dissertation (Advisor: Prof. JL Zeredo), University of Brasilia, Brazil.

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 3 件）

P.S.de Campos, K. Hasegawa, Y. Kumei, J.L. Zeredo: Cineradiographic analysis of respiratory movements in a mouse model for early Parkinson's disease. *Respirat. Physiol. Neurobiol.* 218, 40-45, 2015.

Thesis of Campos, PS (2014). Evaluation of the diaphragmatic excursion in an experimental model of Parkinson's disease. Master Degree Dissertation (Advisor: Prof. JL Zeredo), University of Brasilia, Brazil.

K.Hasegawa, P.S.de Campos, J.L.Zeredo, Y. Kumei: Cineradiographic analysis of mouse postural response to alteration of gravity and jerk (gravity deceleration rate): *Life* 4, 174-188, 2014.

〔学会発表〕（計 4 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑井康宏 (東京医科歯科大学)

研究者番号 : 30161714

(2) 研究分担者

長谷川克也 (宇宙航空研究開発機構)

研究者番号 : 8264599924

粟生修司 (九州工業大学)

研究者番号 : 1710489220

KA 井上 (東京医科歯科大学)

研究者番号 : 1260296125

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :