

## 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 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500358

研究課題名（和文） 曲がれない、止まらない - ゼブラフィッシュを利用した歩行障害の病態生理解明

研究課題名（英文） Freezing and festinating : zebrafish model shed light on pathophysiology of gait disturbances

研究代表者

齋藤 和也 (SAITOH KAZUYA)

熊本大学・教育学部・准教授

研究者番号：20301997

研究成果の概要（和文）：日常生活における歩行は、周囲の環境に応じて方向転換や歩行停止などに切り替えられる。本研究の目的はこの変換の神経機序を調べることによりパーキンソン氏病で観られる歩行障害の病態生理を解明することである。メダカ成魚において仮想遊泳中の脳活動を光計測することに成功した。また実験モデルとしてメダカ成魚の脳眼球脊髄摘出標本の作製も試みたが、網膜機能の低下などの課題が残った。

研究成果の概要（英文）：Locomotion in our daily life is transferred to steering, elimination of locomotion etc., depending on surroundings. Our aim is to elucidate pathophysiology of gait disturbances in Parkinson's disease by studying the neural mechanism of this conversion. Brain activities were successfully recorded from adult Medaka fish during fictive locomotion. We also tried to make an isolated brain-eye-spinal cord preparation using adult Medaka fish as an advanced experimental model. Decline in retinal function still remain to be solved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：姿勢・運動制御

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン氏病では多彩な歩行障害が現れる。歩行量の減少、歩幅の短縮、ゆっくりとした歩行、最初の歩が出せない（すくみ足）、一旦歩き始めると曲がれない、止まれ

ない（突進現象）などが代表的な症候である。これらの歩行障害が出現する機序として、大脳基底核出力核から中脳歩行誘発野（歩行の指令を出す）や脚橋被蓋核（筋緊張を制御す

る)への抑制性投射の病的増強が指摘されている。これは上記の歩行障害を部分的にはうまく説明し得ているが、なぜ自由に曲がれないのか?なぜうまく止まれないのか?(突進現象)といった疑問に対しては納得のゆく解答は得られない。

歩行障害の病態生理が不明なのは、結局のところ、歩行調節の神経基盤が十分理解されていないためである。一方で歩行の左右交代性リズムを産み出す機構についてはこれまでもよく調べられてきており、ロコモーションの神経機構には種をこえた類似性が見出されている。我々は遊泳中のヤツメウナギの運動学的解析において、遊泳開始・停止時には方向転換時と同様、あるいはそれ以上に強い体幹吻側部の湾曲を観察している。このことから脳幹・脊髄の運動ニューロンの活動性に適切な左右差を産み出すことが、ロコモーション(歩行・遊泳)の開始・停止や進行方向転換に共通して求められる要件ではないかと考えている。

われわれはヤツメウナギの脳脊髄摘出標本を用いた実験により、視蓋(上丘)局所の活性化によって脊髄運動ニューロンの活動性に左右差が産み出され、遊泳の開始・停止や遊泳中の方向転換が実現されているのではないかと考えた。これを基に、“パーキンソン病においては、上丘の活動性が基底核からの出力によって過度に抑え込まれることで、歩行の開始困難(すくみ足)や突進現象(方向転換困難、歩行停止困難)が出現する”という仮説を得た。

## 2. 研究の目的

ゼブラフィッシュを実験モデルとして大脳基底核-視蓋系の機能解明を目指した。この目的のためには、遊泳中のゼブラフィッシュの脳の神経活動を広範囲に同時記録する必

要がある。また課題はパーキンソン氏病の病態解明を念頭においているため、成魚による実験モデルの確立が必須である。本課題ではゼブラフィッシュ成魚の脳脊髄摘出標本を作製し、仮想遊泳中の脳活動を光信号として捉えることでこれらの条件をクリアする。また申請時当初の研究計画では脳を直接電気刺激することによって仮想遊泳のモジュレーション(停止、方向転換など)を誘発する計画であったが、より自然に近い状態で引き起こされた調節に係る神経機序の解明が望ましいと考えた。そこで脳脊髄摘出標本において眼球も温存し、様々な視覚刺激パターンを提示したときの脳活動記録を試みることにした。このような脳眼球脊髄摘出標本を成熟した動物において作製した例は少ない。しかし代表者はヤツメウナギ *Petromyzon marinus* のいわゆる young-adult (transformer) 動物においては同様の標本を作製し、少なくとも4-5時間程度はLEDのスポット光による視覚刺激に対する十分な応答が網膜脊髄路細胞から記録できることを経験している。

以上より本研究課題では、第一段階として緩い拘束下で泳ぐ adult のゼブラフィッシュにおいて、視覚刺激による遊泳調節のパターンを観察することを目的とした。第二段階では、非動化した adult ゼブラフィッシュの脳組織の視覚刺激への応答パターンを光計測により明らかにする。第三段階では adult ゼブラフィッシュによる脳眼球脊髄摘出標本の作製方法を確立する。そして最後に脳眼球脊髄摘出標本における仮想遊泳中の脳活動を光計測する。以上の4段階で研究を計画した。

## 3. 研究の方法

研究の目的に記載したように、当初本研究はゼブラフィッシュを主な実験動物として

計画された。しかしながら手術操作や脳機能イメージングのための染色を行っている間に、視蓋および前脳の反応性が著しく低下し、脳眼球脊髄摘出標本から満足のいく神経活動を記録することは難しかった。これは熱帯魚であるゼブラフィッシュ成魚では、神経組織の酸素需要が高く脆弱なためと考えられた。そこで年度途中から、ゼブラフィッシュよりも酸素需要が低いと考えられるメダカ *Oryzias latipes* を用いて同様の脳眼球脊髄摘出標本の作製に着手した。

また本研究は最終的にパーキンソン病や脳梗塞などの運動統合障害の病態解明への応用を念頭に置いている点から、adult の動物を実験対象とした。

以下に、メダカ成魚を用いた実験方法を記す。

(1) 視覚誘導性運動。無麻酔のメダカ成魚を下顎で固定し、胸鰭の尾側体幹部分は鉛板で緩やかに動きを制限する。これは、動物が暴れた際に下顎が割れて固定が外れるのを防ぐためのものであり、通常の遊泳行動では体幹は鉛板に強く当たることはない。実験水槽の下方に設置したコンピュータディスプレイにより正弦波状に明暗が変化する縞模様を縞と直行する向きに動く画像を提示する。この時の行動を観察・記録する。

(2) 視覚刺激に対する中脳視蓋の応答。無麻酔で d-tubocurarine 筋注によって非動化したメダカ成魚に対し、視覚刺激に対する中脳視蓋における神経活動を、膜電位感受性色素 RH1691 を用いた実時間光計測法によって記録した。

(3) 脳眼球脊髄摘出標本の作製。

(4) 脳眼球脊髄摘出標本において1) と同じ視覚刺激を与えた時の仮想眼球運動および仮想遊泳を外転（または動眼）神経および脊髄腹根から記録しながら同時に中枢神経系

の活動を膜電位感受性色素を用いた光イメージングで計測する。

#### 4. 研究成果

(1) 無麻酔のメダカ成魚における視覚誘導性運動

正弦波縞の進行方向を  $0^\circ$ （動物の尾側から吻側に向かう方向）、以下時計回りに  $90^\circ$ 、 $180^\circ$ 、 $270^\circ$  と変化させた時、それぞれ前進、右ターン、後退、左ターンと考えて矛盾しない体幹尾側および胸鰭の動きが観察された

（図 1）。また正弦波縞の進行方向が  $90^\circ$  いし  $270^\circ$  の時には、正弦波縞の進行を追う方向に両側眼球が conjugate な運動をするのが観察され、 $0^\circ$ 、 $180^\circ$  では特異的な眼球運動は認められなかった。これらの運動はこれまで主にゼブラフィッシュの稚魚で報告されてきた体幹運動 (optomotor response : OMR) および眼球運動 (optokinetic response : OKR) と同様の運動と考えられる。

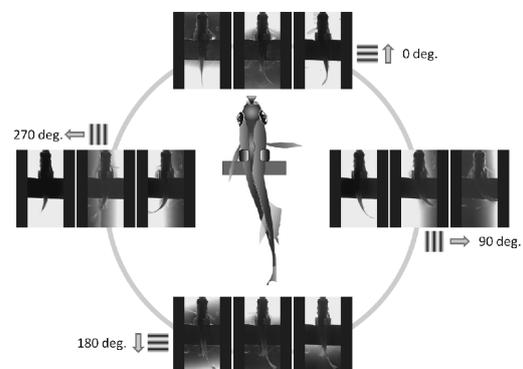
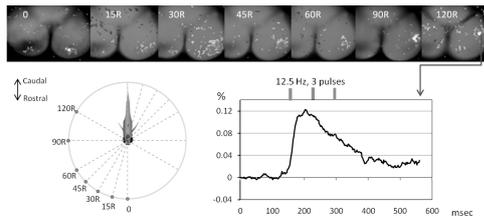


図 1 視覚誘導性運動 下顎を固定されたメダカ成魚の下方から正弦波状に明暗が変化するパターンを提示。正弦波縞の各方向 ( $0^\circ$ 、 $90^\circ$ 、 $180^\circ$ 、 $270^\circ$ ) に特異的に、optomotor response と optokinetic response の反応パターンが変化する。

(2) 無麻酔非動化したメダカ成魚における、視覚刺激に対する中脳視蓋の応答

① メダカの脳組織に対する膜電位感受性色素 RH1691 の有効性を確認するために、緑 LED によるスポット光を提示した時の視蓋

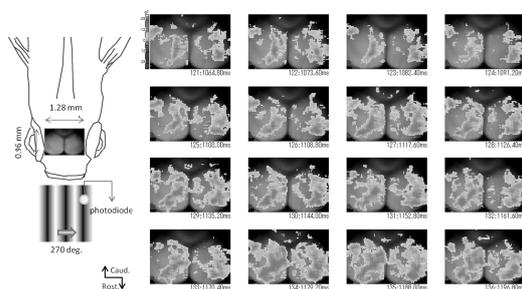
の応答をイメージングした (図 2)。LED の点灯する位置の変化に応じて視蓋の活動部位がレチノトピカルに移動するのが観察された。併せて、メダカ成魚の中脳神経細胞が膜電位感受性色素 RH1691 に感受性を有することも確認された。これまで RH1691 はげっ歯類を中心に使用されてきたが、今回の結果から小型魚類成魚の神経細胞にも有用で



あることが明らかになった。

**図 2 スポット光に対する視蓋の応答の 1 例** 非動化したメダカ成魚に対し、latitude  $0^\circ$  で水平に右方向  $0^\circ$ 、 $15^\circ$ 、 $30^\circ$ 、 $45^\circ$ 、 $60^\circ$ 、 $90^\circ$ 、 $120^\circ$  の各位置で緑 LED を 80 ミリ秒の時間間隔で 3 回点滅させたときの視蓋の応答を RH1691 を用いて光計測した。左視蓋において活性化された領域が吻内側から尾外側へ徐々に移動している。

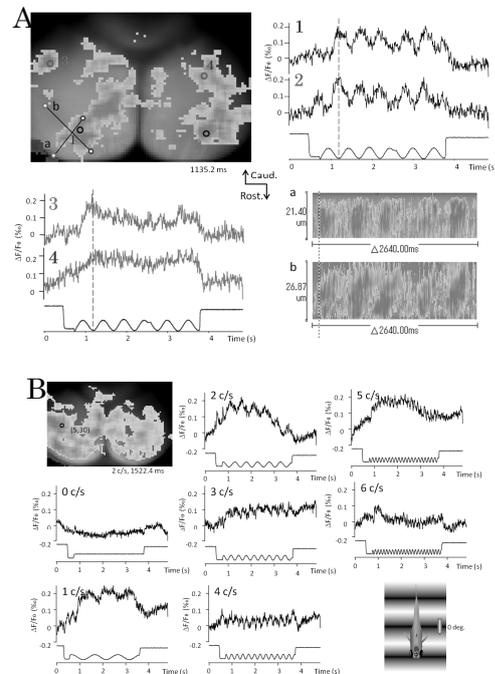
② ①と同じ標本で、(1)と同様に動物の下方から正弦波状に明暗が変化する正弦波縞が移動する刺激パターンを提示したときの中脳視蓋の応答を光計測した。図 3 に 1 例を示す。正弦波縞を  $270^\circ$  の方向に動かした時の両側のの中脳視蓋の光イメージングの時間的推移を示している。両側視蓋の吻側にやや優位な活動が認められる。



**図 3 正弦波縞を  $270^\circ$  の方向に移動させたときの視蓋応答の 1 例** メダカは非動化されている。各画像は 8.8 ミリ秒ごとにサンプリングされている。

同じ動物の左右視蓋の吻側と尾側で強い反応を示す各 1 ピクセルを選び、活動の時間経

過を図 4 に示した。吻側 (図 4A、1 および 2) では正弦波縞の時間周波数に一致した信号強度のオシレーションが観られた。一方、尾側 (図 4A、3 および 4) ではオシレーションは不明瞭であった。正弦波縞の時間周波数に同期した信号のオシレーションは約 5Hz まで



確認できた (図 4B)。

**図 4 正弦波縞の時間周波数に一致してオシレーションする中脳被蓋の光信号** A 正弦波縞を  $270^\circ$  の方向に移動させたときの視蓋応答の 1 例。B 正弦波縞の時間周波数を増加させたときの視蓋活動のオシレーションの変化。正弦波縞は  $0^\circ$  の方向に移動している。

また視蓋上で光信号がオシレーションする領域は帯状を呈し (図 4A-a)、その長軸とはほぼ直行する方向に繰り返し移動する (図 4A-b) 例が多く観られた。長軸の向きはコンピュータディスプレイ上の正弦波縞の向きに概ね一致し、正弦波縞が  $0^\circ$  または  $180^\circ$  の方向に移動する場合には、視蓋上の信号の帯も同じ方向に移動を繰化した。また正弦波縞が  $90^\circ$  または  $270^\circ$  の方向に移動する場合には、視蓋上の信号は、おのおの逆の方向に移動を繰り返した (図 5)。

③ メダカ成魚を用いた脳眼球脊髄摘出標本では、視蓋等への電気刺激により良好な神経応答を観察できた。その後も手術手技については改善を重ね、可能な限り短時間で侵襲の少ない方法を模索してきたが、最終的に①および②で述べた様な視覚刺激に対して、視

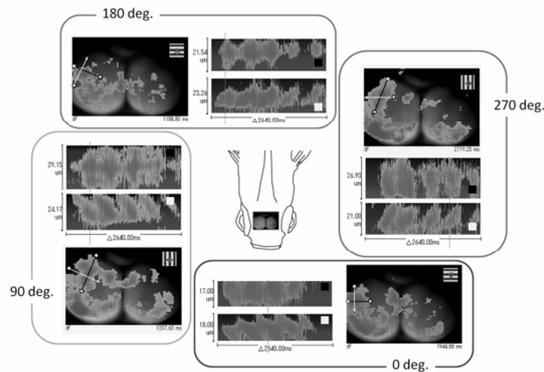


図5 正弦波縞の移動方向に依存して変化する中脳被蓋の光信号の時空間パターン。

蓋から十分な応答を得るまでには至らなかった。ある程度の反応が得られた標本においても、その後1時間程のうちに急激に光信号の振幅は小さくなった。この主な理由として血流途絶後の網膜の機能を維持することが困難であった可能性が考えられた。代表者はいわゆる young-adult のヤツメウナギ *Petromyzon marinus* の脳眼球脊髄標本において少なくとも4 - 5時間程度は、LEDのスポット光による視覚刺激に対する十分な応答が網膜脊髄路細胞から記録できることをかつて経験している。したがって本研究においても比較的若いメダカで同様の標本作製すればある程度の信号を得ることが可能であったかもしれない。しかし本来の研究目的から、成魚による実験が必須であると考えた結果、本研究期間中に脳眼球脊髄摘出標本による十分な成果をあげることはできなかった。

④ 眼球運動やロコモーションといった運動プログラムの制御機構を小型魚類の脳を利用して神経回路レベルで明らかにしてゆ

こうという試みは、ここ数年Engert, F.のグループなどを中心に精力的に行われてきている。しかし実験モデルとしてはこれまでのところ、larvaeを利用したものにはほぼ限られている。

また本研究のように複数の運動プログラムが協調的に実行される機序について明らかにしようとする試みはまだ少ないが、最近では Simmers, J.と Straka, H.のグループが共同で larval *Xenopus laevis* (2012) や juvenile toad *Xenopus laevis* (2013) で脳眼球脊髄標本作製し、電気生理学的方法でロコモーションと眼球運動の協調機構に関する研究を開始しており、この方向性は今後一層強まってくるものと考えられる。

こうした流れの中で、本研究は現在、adultの動物による実験モデル作製に拘ってきたが、前述の如く網膜の機能を維持するための方法を確立できず、当初の目的を十分に達成できず研究期間を終えることになった。しかしながら本研究で得られた多くの経験と教訓をもとに、研究期間終了後、改めて adultのヤツメウナギ *Lethenteron japonicum* を利用した脳眼球脊髄摘出標本の作製に着手し、現在、大動脈から氷冷した人工脳脊髄液を灌流することで神経活動の著しい向上が得られることを確認している。成熟動物での実験モデル確立に向けて今後も研究を続けていきたい。

#### 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2件)

- ① Sawatari, H., Tanaka, Y., Takemoto, M., Nishimura, M., Hasegawa, K., Saitoh, K., and Song, W-J. (2011), Identification and characterization of an insular auditory

field in mice. European Journal of Neuroscience 34, 1944-1952. 査読有

② Saitoh, K., Inagaki, S., Nishimura, M., Kawaguchi, H., Song, W. J. (2010).

Spontaneous activity resembling tone-evoked activity in the primary auditory cortex of guinea pigs. Neurosci. Res. 68, 107-113.

査読有

[学会発表] (計1件)

① Ocana, F.M., Saitoh, K., Rodriguez, F., Robertson, B. and Grillner, S., Is there a “motor pallium” in the lamprey? 8th World Congress of Neuroscience, International Brain Research Organization (IBRO), 2011.6.16, Florence-Italy

[図書] (計1件)

① Song, W.-J., Nishimura, M., Saitoh, K. (2012). Auditory cortex in guinea pigs: subfield organization and functional domains. In “A

② uditory Cortex: Anatomy, Functions and Disorders”, Chapter4, ed: Mounya Elhilali, Nova Science Publishers, Inc., 73-82.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 和也 (SAITOH KAZUYA)

熊本大学・教育学部・准教授

研究者番号: 20301997