

Original Article

小脳性運動失調 B6-wob/t マウスへの強制歩行訓練による歩行・協調運動能力の改善

別府秀彦,¹ 高柳尚貴,² 富田 豊,¹ 水谷謙明,¹
Orand Abbas,¹ 玉井育子,¹ 高橋久英,³ 園田 茂^{1,4}

¹ 藤田保健衛生大学藤田記念七栗研究所

² 東海学園大学健康栄養学部管理栄養学科

³ 藤田保健衛生大学前疾患モデル教育研究センター

⁴ 藤田保健衛生大学医学部リハビリテーション医学Ⅱ講座

要旨

Beppu H, Takayanagi N, Tomita Y, Mizutani K, Orand A, Tamai I, Takahashi H, Sonoda S. Improvement of gait and coordinated movement by forced gait training in cerebellar ataxic B6-wob/t mice. *Jpn J Compr Rehabil Sci* 2015; 6: 64-70.

【目的】小脳性運動失調マウス (B6-wob/t) に対する強制歩行訓練の効果歩行解析と Rota-rod 試験で検証した。

【方法】B6 マウスおよび B6-wob/t を非訓練群 (NEx) と訓練群 (Ex) に分けた。Ex 群は、強制歩行訓練回転かごを用いて分速 2 m で 50 分間の歩行訓練を 1 日 3 回、週 6 日の頻度で 12 週間行った。その間 4 週毎に Rota-rod 試験を行い、NEx 群と Ex 群に有意差が認められた時点で、われわれが開発した骨盤軸基準歩行解析 (骨盤軸法) を行い、多重比較検定で評価した。

【結果】歩行訓練 12 週目において Rota-rod 試験では落下までの時間が NEx 群 90 秒に対し Ex 群で 115 秒と有意に長くなり、骨盤軸法では NEx 群よりも Ex 群の後肢歩隔が有意に狭くなった。

【考察】B6-wob/t の失調症状に対し、強制歩行訓練は有効と考えられた。また失調改善の評価手段として、骨盤軸基準歩行解析法と Rota-rod 試験の併用が有用であった。

キーワード：小脳性運動失調, B6-wob/t マウス, 強制歩行訓練回転かご, 骨盤軸基準歩行解析法, Rota-rod 試験

著者連絡先：別府秀彦
藤田保健衛生大学藤田記念七栗研究所生化学研究部門
〒514-1296 三重県津市大鳥町 423 番地
E-mail: hbeppu@fujita-hu.ac.jp
2015 年 3 月 16 日受理

利益相反：本研究は営利企業・団体から財政的支援は受けていない。
この研究は、文部科学省の科学研究費補助金挑戦的萌芽研究 [KAKENHI2011-12] (No. 22650132) により実施された。

はじめに

われわれは、失調歩行や体幹失調を示す新奇の C57BL/6J(B6)-wob/t マウス (B6-wob/t) を維持している [1]。このマウスの病態の原因は、小脳プルキンエ細胞の変性と消失で、生後 20 日目頃から発症する [2]。歩行は、歩幅が短く、体幹の動揺に対し歩隔を広く後肢を toe-out している [3]。これは人の小脳性運動失調患者の wide base の歩行と類似しており [4-6]、B6-wob/t を用いて失調に対する治療研究を進展させられる可能性がある。

失調に対するリハビリテーションの一つとして動作反復が用いられる [7-9]。われわれは B6-wob/t に強制歩行訓練回転かごを行って強制歩行訓練を行い、歩行解析 [3] や Rota-rod 試験 [1, 10, 11] による協調運動計測を行うことでその効果を検証しようと考えた。

失調患者研究では、骨盤や背骨などの中心にマーカーやセンサーを貼着させ解析を行っている [12-14]。一方、四足歩行の B6-wob/t は、進行方向に対し体幹を左右に回旋と側屈をさせながら前進する [3] ため、客観的な評価のための独自の解析システム・歩行パラメータが必要である。そのためわれわれは骨盤軸を基準にした骨盤軸基準歩行解析法を開発しており [3]、今回もこの解析法を利用した。

動物と方法

1. 実験動物

妊娠中の C57 BL/6J Jms Slc (B6) (日本エスエルシー(株)：Hamamatsu, Japan) と B6-wob/t (九動(株)；Tosu, Japan) を購入し、Mouse Igloo (巣箱；直径 10 cm：Animec；Tokyo) と木質チップ製床敷を入れたプラスチック製ケージに移し、藤田記念七栗研究所疾患モデル動物室 (室温 24±2℃, 湿度 60±5%, 照明時間 7 時～19 時) で飼養した。

すべてのマウスは、オリエンタル MF 固形飼料 (オリエンタル酵母工業(株), Tokyo, Japan) と水道水を自由に与えた。飼養環境と動物の取扱いは『藤田保健衛生大学 藤田記念七栗研究所動物実験規程』に従つ

た。動物実験計画は藤田保健衛生大学実験動物委員会承認（承認番号 N-01-11）を得た。なお、本実験は Scientists Center for Animal Welfare (SCAW) カテゴリー D に属し、マウスに軽度の苦痛を与えるものではない。B6-wob/t マウスは自然発生的な疾患モデル動物であるので、低体重や不活発なマウスは実験前に除外された。

2. 実験群のマウスの性別構成

B6-wob/t の離乳後、生後 4 週目直前に異常歩行の表現型の確認 [1] と、性別、体重を確認した。選別された雌雄匹数に不足があり、前報 [3] と同じく雌雄混在で行った。実験群は、運動群 (Ex 群) 8 匹 (雌 4 匹, 雄 4 匹) と非運動群 (Non-Ex: NEx 群) 8 匹 (雌 6 匹, 雄 2 匹) に分けた。一方、B6 は 8 匹 (雌 3 匹, 雄 5 匹) とし非運動群の対照とした。さらに、試験開始後、4 週目ごとに、全匹の体重を測定した。

3. 強制歩行訓練回転かご

B6-wob/t の Ex 群は、強制歩行訓練回転かご (図 1a; 円周 50 cm; 回転距離分速 2 m) を用いて 50 分間強制歩行訓練をさせ、10 分間休憩後さらに 2 回繰り返した。なお、訓練は毎日 15 時から 18 時の間に、週 6 日繰り返す。Rota-rod 試験で Ex 群と NEx 群に有意差が得られるまで継続した。

4. Rota-rod 試験

強制歩行運動開始前日に Rota-rod (KN-75, NATUME Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用い、マウスを 7 rpm で回転する棒 (直径: 90 mm) の上に乗せ (図 1c)、落下するまでの時間を測定した。テストは 3 回行い、測定時間は最大 180 秒とし、平均を測定値とした [10, 15]。さらに 4 週ごとに Rota-rod 試験を行い、B6 群と NEx 群、Ex 群それぞれの差を検討した。

5. 歩行解析

Rota-rod 試験を行い、NEx 群と Ex 群に有意差が出た訓練 12 週目 (生後 16 週目) の時点で、骨盤軸基準歩行解析法 [3] による歩行解析を行った。歩行パラメータである、後肢歩幅は、左右後肢中足骨頭第 3 肢付根から骨盤軸と直角をなす垂線の和で評価した。後肢角度は後肢中足骨頭第 3 肢付根および踵を結ぶ骨

盤軸とのなす角で評価した。後肢歩幅は、左右後肢の接地から接地までの長さで評価した。後肢歩行周期は、左右後肢の接地から接地までの時間で評価した。さらに四つの歩行パラメータは計測値から平均値を引いて標準偏差で除す正規化を行い、正規化後の変数を用いて二つの全組み合わせで B6 群と NEx 群、Ex 群それぞれの散布図を作成した。

6. 統計処理

歩行パラメータの検定は、B6 と NEx 群、Ex 群の 3 群間で One-way ANOVA を用いた。その後、Bonferroni/Dunn を用いて post-hoc 多重比較検定を行った。データは平均±標準偏差で示し、すべて $p < 0.05$ を有意とした。

結果

実験群に用いた生後 4 週目の B6-wob/t マウスはすべての個体に、B6-wob/t 固有の運動失調歩行が観察された。Ex 群に選別された 8 匹は 12 週間の運動負荷で死亡や衰弱する個体は見られなかった。この歩行訓練かごは、網の目の回転かごなので (図 1b)、四肢を踏み外すことなく、歩行失調のある B6-wob/t マウスでも、回転スピードに合わせて前進することは可能で、連続した歩行訓練ができていた。また、生後 4 週目直前 (試験前 Pre)、訓練開始 4 週目 (生後 8 週齢)、8 週目 (12 週齢)、12 週目 (16 週齢) までの、雌雄混合、雌雄別々の体重推移を表 1 に示した。なお、本研究は、Rota-rod 試験、歩行解析試験の結果を、NEx 群と Ex 群の雌雄混合で評価しているため、表 1 には、全試験期間中の両群同士の検定結果を示した。その結果、NEx 群と Ex 群の雌雄混合群間同士の体重に有意な差はなかった。さらに、各試験期間中の全群雌雄同士にも有意な差は認められなかった。

1. Rota-rod 試験

図 2 に B6 および B6-wob/t (NEx, Ex) 群の Rota-rod 試験の結果を示す。棒グラフは強制回転かご歩行訓練開始前を Pre とし、訓練後 4 週ごと 12 週目までの回転棒での滞在時間を示した。B6 は、各週で 180 秒を達成し、NEx と Ex 群に対し有意に長時間滞在した ($p < 0.01$)。一方、12 週目において NEx 群 (90 ± 24.5 秒) よりも、Ex 群 (115 ± 16.1 秒) の滞在時間が有意に長くなった ($p < 0.05$)。また図 3 に、歩行訓練 12 週目における、全実験群マウスの体重と、Rota-rod の回転棒上の滞在時間の関係を散布図で示した。その結果、体重と Rota-rod 試験の滞在時間に相関は認められず、NEx 群と Ex 群における雌雄構成の匹数と体重に影響を与えないことが示された。

2. 歩行解析

骨盤軸基準歩行解析法による四つの歩行パラメータの 3 群の比較を図 4 に示す。後肢歩幅は B6 (30.3 ± 1.6 mm) に比べて NEx 群 (43.1 ± 2.3 mm) および Ex 群 (39.0 ± 2.6 mm) は共に有意に広がっていた ($p < 0.01$)。また、NEx 群と Ex 群間においても有意差が認められ、Ex 群に有意な後肢歩幅の短縮が認められた (図 4a)。後肢角度は B6 群 (21.9 ± 3.7 degree) に

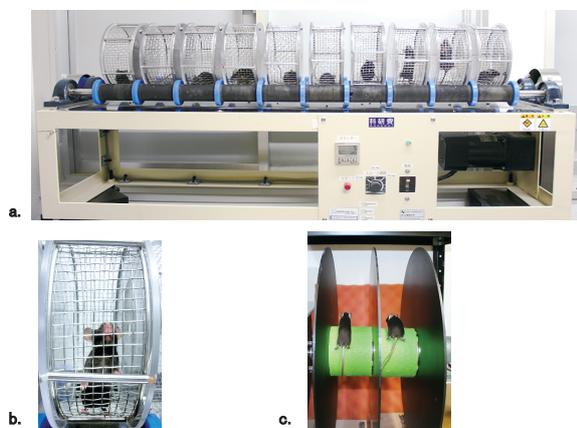


図 1. 強制歩行訓練回転かご装置全景 (a)、歩行訓練中の B6-wob/t (b)、Rota-rod 試験の様子 (c)。

表 1. 試験期間中の体重の推移

Group	Male or female	N	Pre (4w ³)	4W ¹ (8W ³)	8W (12W ³)	12w ² (16W ³)
B6	male and female	8	15.0 ± 1.72	20.50 ± 1.82	22.6 ± 2.26	25.9 ± 4.02
	female	3	13.7 ± 1.23	18.31 ± 0.71	20.5 ± 1.27	22.4 ± 0.90
	male	5	15.7 ± 1.57	21.04 ± 1.43	23.9 ± 2.83	28.1 ± 3.53
B6-wob/t NEx	male and female	8	12.9 ± 1.77	18.14 ± 1.79	20.1 ± 2.24	22.9 ± 1.36
	female	6	12.4 ± 1.69	17.47 ± 1.44	19.1 ± 1.69	22.3 ± 0.92
	male	2	14.3 ± 1.41	20.14 ± 1.25	22.7 ± 1.08	24.6 ± 0.45
			ns	ns	ns	ns
B6-wob/t Ex	male and female	8	12.8 ± 1.78	17.93 ± 1.03	19.9 ± 1.41	22.8 ± 1.83
	female	4	11.6 ± 1.20	17.38 ± 1.05	19.1 ± 1.30	21.3 ± 1.25
	male	4	14.1 ± 1.00	19.31 ± 1.42	20.8 ± 1.03	24.2 ± 0.85

Forced running wheel exercise experiment¹⁾ start²⁾ end stage. (Age³⁾.

Mean ± Standard deviation;

ns, not significant in Bonferroni/Dunn multiple comparison test.

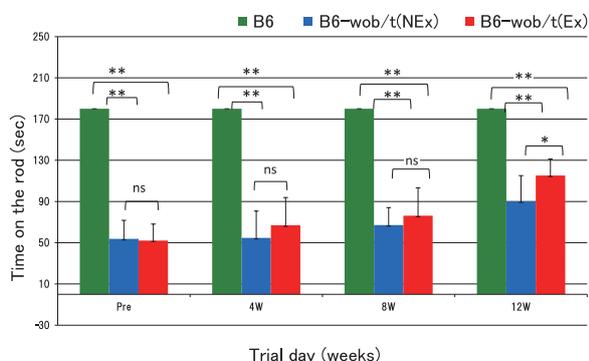


図 2. 16 週齢 B6, B6-wob/t(NEx), B6-wob/t(Ex) の Rota-rod 試験 mean±SD. Bonferroni/Dunn * : p < 0.05 ; ** : p < 0.01; ns : not significant.

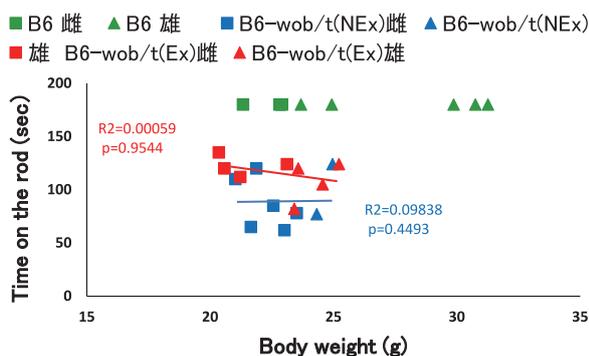


図 3. 体重と Rota-rod 試験の滞在時間の散布図と相関係数

比べて NEx 群 (40.1 ± 3.8 degree) および Ex 群 (32.3 ± 1.9 degree) は共に有意に広角になっていた (p < 0.01). また, NEx 群と Ex 群間においても有意差が認められ, Ex 群に有意な後肢角度の短縮が認められた (図 4 b). 後肢歩幅は B6 (55.9 ± 4.2 mm) に比べて NEx 群 (44.1 ± 4.6 mm) および Ex 群 (45.2 ± 3.6 mm) は共に有意に短縮していた (p < 0.01). しかし, NEx 群と Ex 群間において有意差は認められなかった (図 4 c). 後肢歩行周期は B6 (0.31 ± 0.05 sec) に比べて NEx 群 (0.50 ±

0.07 sec) および Ex 群 (0.42 ± 0.05 sec) は共に有意に延長していた (p < 0.01). また, NEx 群と Ex 群間においても有意差が認められ (p < 0.05), Ex 群に有意な後肢歩行周期の短縮が認められた (図 4 d).

正規化した後肢歩幅と正規化した後肢角度の散布図を図 5 a に示す. 3 群のデータが混在しないように傾きがマイナス 1 である分離線を引くことが可能であった. 正規化した後肢歩幅と正規化した後肢歩幅の散布図を図 5 b に, 正規化した後肢歩幅と正規化した後肢歩行周期の散布図を図 5 c に, 正規化した後肢角度と正規化した後肢歩幅の散布図を図 5 d に, 正規化した後肢角度と正規化した後肢歩行周期の散布図を図 5 e に, 正規化した後肢歩幅と正規化した後肢歩行周期の散布図を図 5 f に示す. 図 5 b から 5 f までいずれにおいても, B6 と B6-wob/t は分離できたが Ex 群と NEx 群はデータが重なり合う部分があり分離できなかった.

考察

小脳失調症患者における繰り返しの歩行訓練は失調歩行や歩行速度への効果が示唆されている [16]. 本研究では小脳性運動失調マウスに強制歩行訓練をさせ失調歩行や協調運動能力の改善が 12 週で得られた.

マウスの運動機能の評価には Rota-rod 試験や歩行パラメータ解析が広く用いられる [10, 11]. Rota-rod 試験は, 一定の速度で回転する回転棒にマウスを乗せ, 落下するまでの時間を比較する試験で, 運動機能の協調性と平衡感覚などを検討するテストである [17]. Cendelin J らは, Lurcher mutant mice of olivocerebellar degeneration model の Rota-rod 試験結果が wild type に比べ大幅に悪いものの, 歩行パラメータと Rota-rod 試験結果の間には相関関係は認められなかったとしている [18].

われわれの今回の Rota-rod 試験は, NEx と Ex 群の雌雄構成で体重差が起こりうる可能性が考えられた. 体重差は, Rota-rod 試験にも影響するかもしれない. 表 1 では, 試験期間中の体重推移を示した. その結果, NEx と Ex 群間に差は認められなかった. また図 3 に示した, 回転棒上の滞在時間と体重にも関係は見られ

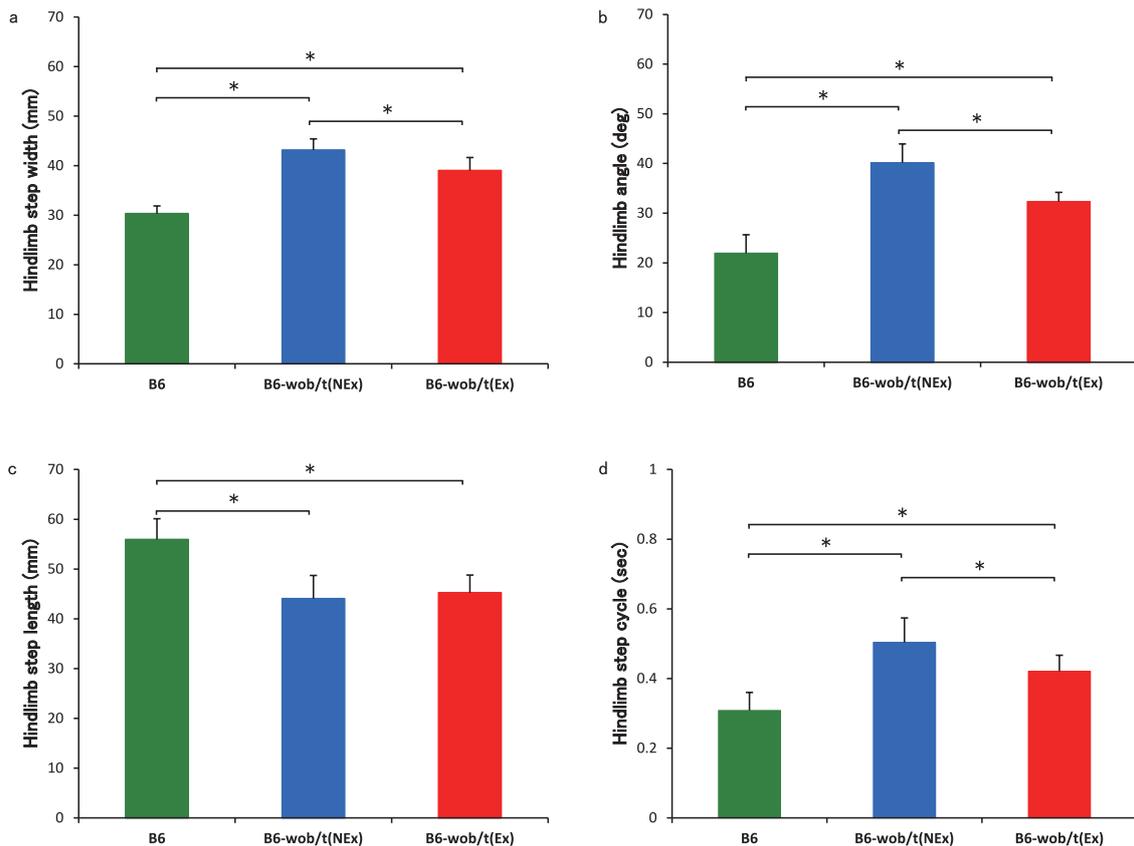


図4. 歩行パラメータの3群比較

a: Hind limb step width (後肢歩隔). b: Hind limb angle (後肢角度). c: Hind limb step length (後肢歩幅). d: Hind limb step cycle (後肢歩行周期). mean ± SD Bonferroni/Dunn *: $p < 0.01$.

なかった。

定量的な歩行分析は、神経学的な歩行障害の特徴を明らかにするために使用される [19]。われわれの報告した骨盤軸基準歩行解析法は、従来の解析法では困難であった体幹を側屈して歩行する運動失調マウスの後肢角度の定量も可能である [3]。骨盤軸基準歩行解析法を用いた歩行解析の結果、B6 に比べ NEx 群で後肢歩隔および後肢角度が有意に広がっていたことや後肢歩幅が有意に短縮していたこと、後肢歩行周期が有意に延長していたことから、重心の動揺に対し、後肢を拡げて支持基底面を大きくすることで代償するのが B6-wob/t の失調性の障害パターンと考えられた。また、Ex 群が、NEx 群と B6 との中間の歩行パラメータを有することから、強制歩行訓練は失調そのものの改善を促し、結果的に代償動作が減ったと推察される。この改善程度は、正規化した後肢角度と正規化した後肢歩隔の散布図上での $y=x$ 方向の距離により、定量化できる可能性もあり [3]、今後の検討が待たれる。

一方、われわれの今回の動物実験は B6 群と B6-wob/t の NEx 群、Ex 群は、雌雄混在で構成数も異なっている。これは群間で体重差が起りうる可能性が考えられ、Rota-rod 試験や歩行解析試験にも影響することも考えられる。われわれは前報 [3] と同じく、試験開始前に、体重と表現型 [1] の選択をおこなった。その結果、試験期間中の NEx と Ex 群間に差は認められなかった (表 1)。また、回転棒上の滞在時間と体重にも関係は見られなかった (図 3)。さらに B6-

wob/tNEx 群の歩隔値と歩角度値を見ると、体重の重い B6 よりも、有意に大きい値となっている (図 4)。これは前報 [3] と同じ結果である。一方 Ex 群は歩行訓練を行うことで、歩隔値と歩角度値は NEx よりも有意に小さくなり、B6 に近づいた値になったが、それでも B6 より有意に大きい値である。したがって、歩隔値と歩角度値の歩行パラメータは体重に関係しないことが示唆された。今後 B6-wob/t の繁殖技術を高め、雌雄別々での検証を行いたい。

本研究における、B6-wob/tEx 群の歩行訓練量は 12 週間で 21.6 km であり、歩数換算で 51.8 万歩 (1 歩 41.7 ± 4.7 mm; 図 4 および [3]) である。通常の飼育ゲージ内の歩数総数は約 11 万歩 (自発運動量測定システム ACTIMO-100N (Shifactory Co.Ltd; Fukuoka; Japan) を用いた 1 日 1327 歩から換算) の約 4.7 倍の歩数となった。これだけの量の差が無いと NEx 群と Ex 群との間に差が認められなかったことは、脳内のエンGRAM 形成には非常に多数回の反復が必要であるという Kottke らの主張 [20] を裏付けるものであろう。Larsen らは、水平式トレッドミル強制走行運動を、健常ラットを用いて、分速 20 m, 20 分間, 1 日 2 回, 週 5 日, 5 か月齢から 23 か月齢まで行い、小脳プルキンエ細胞体容積の解析を行っている [21]。その結果、対照の非運動老獣ラットのプルキンエ細胞は退行性による数が減少しているが、運動群は成獣ラットと変わらないほど有意に残存していると報告している。Larsen らとわれわれの運動訓練条件において、

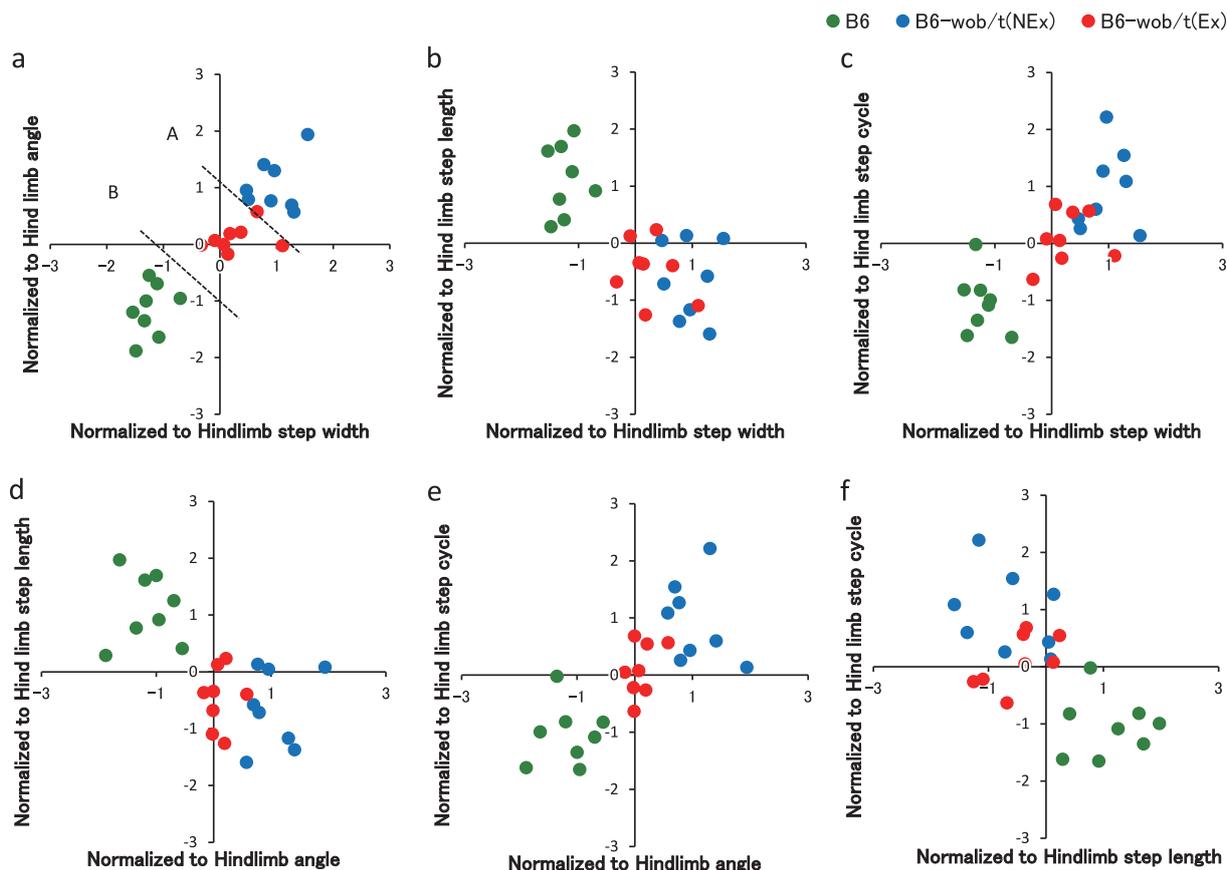


図5. 3群の正規化 (Normalized) された歩行パラメータ変数の散布図.

- a: 正規化した後肢歩幅と後肢角度の散布図
- b: 正規化した後肢歩幅と後肢歩幅の散布図
- c: 正規化した後肢歩幅と後肢歩行周期の散布図
- d: 正規化した後肢角度と後肢歩幅の散布図
- e: 正規化した後肢角度と後肢歩行周期の散布図
- f: 正規化した後肢歩幅と後肢歩行周期の散布図

a には 3 群のデータが混在しない傾きが -1 である分離線が可能となった。

動物種が異なり、運動総量の違いもあるものの、B6-wob/t は生後 20 日齢ごろから、プルキンエ細胞の変性と消失 [2] の自然発症型であることが大きな違いである。今回の生後 4 週目から早期の歩行訓練を兼ねた運動負荷は、プルキンエ線維の変性改善に関与している可能性が考えられる。この点に関しては、今後、小脳病理組織を加えて検討を実施したいと考えている。

以上より、本研究では小脳性運動失調マウスである B6-wob/t に回転かごによる強制歩行訓練を行い、骨盤軸基準歩行解析法や Rota-rod 試験を併用することで、失調に対する訓練効果をマウスにて示すことができた。今後、この系を失調症状に対する歩行訓練や薬物、リハビリテーションの効果判定に活用していきたい。

文献

1. Beppu H, Mizutani K, Takayanagi N, Shinzato M, Sonoda S, Takahashi H. Characterization of ataxia shown by an abnormal behavior mouse derived from the C57BL/6-cpk mouse with infantile cystic kidney disease. *Struct Funct* 2013; 11: 92–101.
2. Shinzato M, Beppu H, Mizutani K, Sonoda S, Takayanagi

- N, Takahashi H, et al. New breed of mouse with cerebellar degeneration: Analysis of changes in motor ataxia and cerebellum tissue of the B6-wob/t mouse. *Struct Funct* 2013; 12: 10–8.
3. Takayanagi N, Beppu H, Mizutani K, Tomita Y, Takahashi H, Sonoda S, et al. Pelvic axis-based gait analysis for ataxic mice. *J Neurosci Methods* 2013; 219: 162–8.
4. Palliyath S, Hallett M, Thomas SL, Lebedowska MK. Gait in patients with cerebellar ataxia. *Mov Disord* 1998;13: 958–64
5. Morton SM, Bastian AJ. Cerebellar control of balance and locomotion. *Neuroscientist* 2004; 10: 247–59.
6. Ilg W, Golla H, Thier P, Giese MA. Specific influences of cerebellar dysfunctions on gait. *Brain* 2007; 130: 786–98.
7. Miyai I, Ito M, Hattori N, Mihara M, Hatakenaka M, Yagura H, et al. Cerebellar ataxia rehabilitation trial in degenerative cerebellar diseases. *Neurorehabil Neural Repair* 2012; 26: 515–22.
8. Miyai I. Challenge of neurorehabilitation for cerebellar degenerative diseases. *Cerebellum* 2012; 11: 436–7.

9. Cernak K, Stevens V, Price R, Shumway-Cook A. Locomotor training using body-weight support on a treadmill in conjunction with ongoing physical therapy in a child with severe cerebellar ataxia. *Phys Ther* 2008; 88: 88–97.
10. Khan Z, Carey J, Park H.J, Lehar M, Lasker D, Jinnah A. Abnormal motor behavior and vestibular dysfunction in the stargazer mouse mutant. *Neuroscience* 2004; 127: 785–96.
11. Stroobants S, Gantois I, Pooters T, D’Hooge R. Increased gait variability in mice with small cerebellar cortex lesions and normal rotarod performance. *Behav Brain Res* 2013; 241: 32–7.
12. Ilg W, Synofzik M, Brötz D, Burkard S, Giese MA, Schöls L. Intensive coordinative training improves motor performance in degenerative cerebellar disease. *Neurology* 2009; 73: 1823–30.
13. Yavuzer G, Oken O, Elhan A, Stam HJ. Repeatability of lower limb three-dimensional kinematics in patients with stroke. *Gait Posture* 2007; 27: 31–5.
14. Fazio P, Granieri G, Casetta I, Cesnik E, Mazzacane S, Caliandro P, et al. Gait measures with a triaxial accelerometer among patients with neurological impairment. *Neurol Sci* 2013; 34: 435–40.
15. Saeed DM. Cerebellar CB₁ receptor mediation of Δ^9 -THC-induced motor incoordination and its potentiation by ethanol and modulation by the cerebellar adenosinergic A₁ receptor in the mouse. *Brain Res*. 2000; 864: 186–94.
16. Vaz DV, Schettino Rde C, Rolla de Castro TR, Teixeira VR, Cavalcanti Furtado SR, de Mello Figueiredo E. Treadmill training for ataxic patients: a single-subject experimental design. *Clin Rehabil* 2008; 22: 234–41.
17. Rozas G, Lopez-Martin E, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. The overall rod performance test in the MPTP-treated- mouse model of Parkinsonism. *J Neurosci Methods* 1998; 83: 165–75.
18. Cendelin J, Voller J, Vozech F. Ataxic gait analysis in a mouse model of the olivocerebellar degeneration. *Behav Brain Res* 2010; 210: 8–15.
19. Ebersbach G, Sojer M, Valldeoriola F, Wissel J, Müller J, Tolosa E, et al. Comparative analysis of gait in Parkinson’s disease, cerebellar ataxia and subcortical arteriosclerotic encephalopathy. *Brain* 1999; 122: 1349–55.
20. Kottke FJ. From reflex to skill: the training of coordination. *Arch Phys Med Rehabil* 1980; 61: 551–61.
21. Larsen JO, Skalicky M, Viidik A. Does long-term physical exercise counteract age-related Purkinje cell loss? A stereological study of rat cerebellum. *J Comp Neurol* 2000; 428: 213–22.