

平成 30 年度博士論文

パーキンソン病モデルラットの運動要素に対する
継続的な有酸素運動介入効果の検証

-運動要素の測定方法確立から臨床応用まで-

前橋工科大学大学大学院 環境・生命工学専攻

学籍番号：1556501

氏名：大野洋一

概要

パーキンソン病 (Parkinson's Disease, PD) は厚生労働省により難病に指定されており、60 歳代より急激に増加することから、社会的な高齢化に伴い PD 患者は今後も増加していくことが予想されている。

PD の病態は、中脳黒質部における神経細胞の変性によるドーパミンの合成の問題が原因とされ、神経伝達物質であるドーパミンが欠乏状態となり、様々な運動障害や非運動症状が出現する進行性の疾患である。

PD に対する主要な治療方法として、薬物療法、外科的治療方法、リハビリテーションが用いられている。しかし、現在のところ薬物療法や外科的治療方法を用いて最適な医学的マネジメントを行なっても症状の進行を抑えることはできない。また、リハビリテーションも前述した 2 つの治療方法に加えて行うことで、進行に伴う活動性低下により生じた廃用症候群など 2 次的な機能障害に対する効果は期待できるが、やはり PD の進行を抑えることはできない。

近年、PD 患者に対する有酸素運動の効果として、ドーパミン作動性ニューロンの可塑性を中心に報告が行われはじめている。一方、基礎研究となるカテコールアミン選択的神経毒 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) を用いて作成された片側 PD モデル動物の報告では、運動による脳由来神経栄養因子 (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) の増加に起因したドーパミン作動性ニューロンの可塑性の報告がすでに多く行われている。これら PD に関する病態や治療の詳細を第 1 章で述べる。

これまで、PD モデル動物を用いた研究での運動介入による効果判定は、チロシンヒドロキシラーゼ (Tyrosine Hydroxylase, TH) 免疫染色 (TH 染色) によるドーパミン作動性ニューロンの同定など組織化学的な方法が用いられてきた。また、行動実験としては目標到達課題 (Reaching Task, RT) の成功率やドーパミン受容体アゴニストであるアポモルフィンを用いたアポモルフィン誘発回転検査による回転数の測定が用いられており、定量化はされているが運動要素の解析は十分に検討されてこなかった。このことは PD モデル動物を使用した基礎研究の結果を PD 患者の臨床像に直接結びつけることが難しい現状を示している。この詳細を第 2 章で述べる。

我々はこれまでにラットにおける RT 遂行中の前肢運動をハイスピードカメラ

で撮影し画像解析を行うことで、前肢運動の定量的評価法を確立してきた。本研究では PD モデルラットに対する運動特性および運動効果の検証方法として、片側線条体に 6-OHDA を注入し片側 PD モデルラットを作成した。また、画像解析による定量的評価法に加え、組織化学的な検証方法として TH 染色を用いた。この詳細を第 3 章で述べる。

本研究では PD モデルラットの運動特性を調査するために、6-OHDA 注入前後の RT に対して画像解析を用いた前肢と姿勢状態の詳細な分析を実施した。

その結果、PD モデルラットの運動特性として、注入後、前肢の回旋運動は回外方向へ変移し、姿勢状態は RT を行う前肢側へ傾斜することが確認され、PD モデルラットに運動調整の障害や姿勢反射障害が生じることが本研究により世界で初めて証明された。そして、RT の画像解析は PD モデルラットの運動要素の特性を十分に捉えられることも証明された。この詳細を第 4 章で述べる。

PD モデルラットの運動特性が確認できたことから、次の段階として PD モデルラットを運動群とコントロール群に設定し、運動介入による効果の検証を行った。運動内容としてはモーターにより速度調整のできるホイール型運動装置内において、週に 5 回、30 分間の有酸素運動を 6-OHDA 注入後 7 日目より 4 週間継続して行わせた。

その結果、コントロール群では PD モデルラットの特性として認められた前肢の回旋運動と姿勢状態の異常が継続したのに対し、運動群では注入前の状態へ近づくように改善した。

この結果の要因として、本研究で使用した 6-OHDA の薬剤効果が約 30 日間軽度に継続することから、コントロール群では PD 症状が進行した結果と考えられる。一方、運動群では運動介入により、例えば脳細胞保護に作用する物質等が増加した結果、6-OHDA による PD 症状の進行が妨げられた可能性や障害されたドーパミン作動性ニューロンの回復が考えられた。この詳細を第 5 章で述べる。

この結果を参照して本研究では PD 患者に対しても 4 週間の有酸素運動介入を行った。そして、PD モデルラットの特性と比較するために、第 1 指と第 2 指にマーカーを貼付した状態での指タップテストの様子をハイスピードカメラで撮影して画像解析を用いて分析した。また、歩行機能、PD 症状、筋力に対する介入効果の検証も行った。

その結果、指タップテストにおいて総軌跡長が有意に増加することが明らか

となった。また、歩行機能、PD 症状の改善を認めた。この結果は PD モデルラットと同様に、運動による介入が機能改善効果をもたらした可能性が考えられた。加え、指タップテストでは総軌跡長が有意に増加したことから、開閉という交代運動の変換機能改善を捉えることができた。この詳細を第 6 章で述べる。

本研究で得られた PD モデルラットにおける回旋運動と PD 患者におけるタップテストは両方ともに運動変換機能を調査したものである。このことから、本研究による RT の画像解析は、PD モデルラットにおける運動特性を詳細に捉え、その結果は PD 患者にも反映できる可能性を示すことができた。この詳細を第 7 章で述べる。

本研究では、PD モデルラットの運動要素に対する継続的な有酸素運動の効果を検証するため、RT の画像解析を用いた検査方法を実施し、運動特性として運動調整の障害と姿勢反射障害を捉えることができた。そして、運動介入が運動機能を改善させることを証明した。また、PD モデルラットにおける結果を参照し、PD 患者に対しても有酸素運動による介入を行い、指タップテストの結果から PD モデルラットと PD 患者の症状の共通性を確認した。これは基礎研究である PD モデルラットの結果を PD 患者の検討に応用できる可能性を示唆している。

今後の展望として、PD モデルラットと PD 患者の病状の進行には大きな違いがある。そのため、有酸素運動による機能回復の機序の違いが懸念させることから、病状の進行が患者に近いモデルラットの作成が必要と考えられた。また、患者の多くは高齢者である。そのため、一般的に推奨されている運動負荷量では過負荷となり運動を継続できない患者も認められ、運動負荷量の変化が効果に与える影響の検証が求められた。この詳細を第 8 章で述べる。

本論文の構成を以下に示す。

第1章
緒論



第2章
関連研究



第3章
パーキンソン病モデルラットを
用いた研究方法



第4章
パーキンソン病モデルラットの運動特性



第5章
パーキンソン病モデルラットに対する
有酸素運動の効果に関する研究



第6章
パーキンソン病患者に対する
有酸素運動の効果に関する研究

第7章
パーキンソン病モデル動物と
パーキンソン病患者における結果の関係性



第8章
まとめ
今後の展望

目次

第1章 諸論.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 パーキンソン病の症状と脳内神経回路の関係.....	3
1.3 パーキンソン病に対する治療方法.....	4
1.3.1 薬物療法.....	4
1.3.2 外科的治療方法.....	4
1.3.3 リハビリテーション.....	5
1.3.4 有酸素運動.....	6
1.4 本研究の目的.....	7
1.5 本文の構成.....	7
第2章 関連研究.....	9
2.1 パーキンソン病モデル動物の作成方法.....	9
2.1.1 遺伝子組み換えによる方法.....	9
2.1.2 薬理学的方法.....	9
2.2 パーキンソン病モデルラットにおける運動介入効果の報告.....	10
2.3 パーキンソン病モデルラットに対する運動機能評価.....	12
2.3.1 目標到達課題.....	12
2.3.2 アポモルフィン誘発回転検査.....	14
2.4 パーキンソン患者に対する運動効果の研究.....	14
2.5 まとめ.....	15
2.6 問題提起.....	15
第3章 パーキンソン病モデルラット用いた研究方法.....	17
3.1 使用動物.....	17

3.2	パーキンソン病モデル作成方法.....	17
3.2.1	作成手順.....	17
3.2.2	作成時期.....	18
3.3	目標到達課題の測定方法.....	18
3.3.1	装置.....	19
3.3.2	撮影方法.....	19
3.3.3	運動画像解析用ペインティング.....	20
3.4	運動画像解析プログラム.....	20
3.5	正面視点からの運動画像解析.....	25
3.5.1	前肢運動.....	25
3.5.2	姿勢状態.....	25
3.6	床面視点からの運動画像解析.....	25
3.7	運動画像解析項目.....	26
3.8	動作学習方法.....	27
3.9	訓練期間.....	29
3.10	灌流固定による脳摘出.....	29
3.11	Tyrosine Hydroxylase 免疫染色.....	29
3.12	まとめ.....	32
第4章	パーキンソン病モデルラットの運動特性.....	33
4.1	目的.....	33
4.2	実験手順.....	33
4.3	6-OHDA 注入前後における運動要素の解析.....	33
4.4	目標到達課題に対する 6-OHDA の影響.....	34
4.4.1	成功率.....	34
4.4.2	最大距離.....	34

4.4.3	回旋運動 最大角度・最小角度・運動範囲	34
4.4.4	頭部傾斜角度	35
4.4.5	ペレットと各指との直線距離	35
4.4.6	まとめ	36
4.5	考察	37
第5章	パーキンソン病モデル動物に対する有酸素運動の効果に関する研究	41
5.1	目的	41
5.2	実験手順	41
5.3	運動方法	41
5.4	ホイール型運動装置の概要	42
5.5	アポモルフィン誘発回転検査	42
5.6	有酸素運動効果の解析	43
5.6.1	運動群, コントロール群の RT 各検査項目における測定時期および運動介入による変化の比較	43
5.6.2	成功率に影響を与える目標到達課題の測定項目の調査	43
5.6.3	運動群, コントロール群のアポモルフィン誘発回転検査の比較	43
5.7	目標到達課題に対する運動介入の効果	44
5.7.1	成功率	44
5.7.2	最大距離	44
5.7.3	回旋運動 最大角度・最小角度・運動範囲	45
5.7.4	頭部傾斜角度	45
5.7.5	ペレットと各指との直線距離	46
5.7.6	成功率に影響を与える目標到達課題の測定項目の相関関係	48
5.7.7	アポモルフィン誘発回転検査	48
5.7.8	まとめ	49

5.8 考察	49
第6章 パーキンソン病患者に対する有酸素運動の効果に関する研究	53
6.1 目的	53
6.2 対象としたパーキンソン病患者	53
6.3 倫理的配慮	54
6.4 運動方法	54
6.5 測定項目	55
6.5.1 歩行能力	55
6.5.2 下肢筋力	55
6.5.3 パーキンソン病の1次障害に対する評価	55
6.6 有酸素運動効果の解析	59
6.7 有酸素運動による効果	60
6.7.1 歩行能力	60
6.7.2 下肢筋力	60
6.7.3 パーキンソン病の1次障害に対する評価	61
6.7.4 まとめ	62
6.8 考察	62
第7章 パーキンソン病モデル動物とパーキンソン病患者における結果の関係性	64
7.1 動物モデルと患者の比較	64
7.1.1 類似点	64
7.1.2 相違点	64
7.1.3 有用性	65
7.1.4 限界	65
7.2 モデル動物間の比較	66
7.2.1 障害作成部位による比較	66

7.2.2 注入部位の検討	67
7.2.3 使用薬剤の検討	67
7.2.4 モデル動物の検討	68
7.3 まとめ	68
第8章 まとめ, 今後の展望	69
謝辞	71
参考文献	72
研究業績	79
図表	81

第 1 章 諸論

1.1 研究背景

日本におけるパーキンソン病 (Parkinson's Disease, PD) の有病率は 10 万人に約 150 人といわれ、アルツハイマー病に次いで 2 番目に発生頻度の高い変性難病である [1]. また、現在、330 疾病が指定されている厚生労働省の難病医療助成制度の対象疾患の中では、潰瘍性大腸炎について特定疾患医療受給者証所有者数が約 13 万人を超えて 2 位を占める疾患である [2] (図 1). そして、60 歳代より急激に増加することから、社会的な高齢化に伴い PD 患者は今後も増加していくことが予想されている [3]. この増加傾向は日本のみでなく世界的にも同様であり、特に人口数の多い中国では、試算から 2030 年には 2005 年次の約 2.5 倍にあたる約 500 万人に患者数が増加するといった報告もある [4].

PD は孤発性と家族性と言われる約 10%弱の遺伝性に分類される.

遺伝性 PD は若年性 PD 患者に多く、その原因として今までに 6 つの遺伝子 (α -synuclein, parkin, PINK1, DL-1, ATP13A2, LRRK2) が同定されている [5]. これらの原因遺伝子に対する機能や発症原因の解明も進んでおり、遺伝性 PD のみでなく孤発性 PD に対する原因解明にも寄与することが予想されている.

PD の多くを占める孤発性 PD の原因は現時点では不明であるが、遺伝的な要因や農村における有病率が高いことから殺虫剤や除草剤などとの接触時間による環境因子の関与が報告されている [5]. つまり、様々な環境因子に加え、1 つ 1 つは影響力の弱い遺伝子によって、その総和がある閾値を超えたときに発症する多因子疾患であると考えられている [6].

PD 症状の原因は中脳黒質部における神経細胞の変性によるドーパミン合成の問題とされ、これにより PD では神経伝達物質であるドーパミン欠乏状態が生じて、様々な運動障害及び非運動症状が出現する (表 1). また、近年ではレビー小体の病理学的進展も原因因子として検討されている [7]. レビー小体とは α -synuclein を主な構成成分とするグリア神経細胞内の封入体であり、古くから PD の特徴的な所見として病理診断の際にも重要視されてきた. α

-synuclein の異常蓄積は神経細胞死あるいは細胞毒性を引き起こす可能性が指摘されている。また、神経連絡のある部位に伝播することも報告されている [8]。

PD 症状の進行は緩徐であるため、近年では適切な薬物治療による長期間の症状コントロールが可能となり、生命予後も健常者の寿命と大差はなくなった。しかし、PD を根治する方法は未だ存在せず、経過期間の長期化に伴う症状の進行が患者の生活の質 (Quality of Life, QOL) の低下や日常生活動作 (Activities of Daily Living, ADL) の低下を招く要因となっている [9-10]。さらに PD 治療にもっとも有効とされる L-3,4-ジヒドロキシ・フェニルアラニン (L-3,4-dihydroxyphenylalanine, L-ドーパ) を使用した長期薬物療法では、2 年以上投与すると約 20% の患者に不随意運動が誘発されることが報告されている [11]。また、L-ドーパの長期使用に伴って、その効果は減弱してしまい、結果として薬物効果持続時間が短縮し、L-ドーパの投与時間に連動して症状の変動が生じてしまう。これらの副作用症状が PD 症状の進行に加わることで、患者の QOL や ADL はより低下していく。そして、患者に関わる家族介護者は中等度の介護負担感や先の見えない介護に対する持続的ストレスを抱え [12]、うつ症状を有するものも多いことが報告されている [13]。

PD の臨床症状は無動、固縮、振戦、姿勢反射障害を 4 大症状とし、これらを運動症状と呼んでいる (表 2)。PD は片側の手や足の震え (振戦) を初発症状として認めることが多く、一側の手や足に出現した振戦が同側の手 (足) にも認められるようになり、さらに進行すると対側の上下肢にも現れてくる進行性の疾患である。PD の進行状況の判別には 5 段階で判定する Hoehn & Yahr 分類 (H&Y) が多く用いられている。そして、運動症状を評価基準とし、中間となる III 度では姿勢反射障害の有無を判断基準としている (表 3)。これら運動症状は患者の様々な ADL を直接的に障害していることが確認されている [11] (表 4)。特に歩行障害は患者にとって重大な問題であり、移動や外出といった項目で介助を有していることもわかっている [14]。

PD における歩行障害の特徴としては「すくみ」、「小刻み」、「すり足」といったものが出現し、歩行中の腕振りも減少する。そして、他の症状と同様に左右差が目立つことも特徴である [15]。また、PD は転倒頻度の高い疾患とされ、一般高齢者の年間転倒発生率が約 20% なのに対し [16]、PD 患者は約 70% と高い割合を示し [17]、外傷発生率も一般高齢者の 2.2 倍に及ぶとさ

れている [18]. PD 患者のように運動機能に障害を有するものが転倒等により骨折などの外傷を合併すると、一般高齢者に比べ回復が遅延し、ADL の再獲得も難しい状態となる。

近年、PD の非運動症状も注目を集めている。非運動症状には精神行動学的症状、睡眠障害、自律神経障害、その他にも嗅覚障害や味覚障害など様々な症状が報告されている [19]. そして、何らかの症状が 90% の患者に認められ、4 から 5 種類と多くの非運動症状を有する患者も 23.2% に及ぶことが報告されている [20].

このように多種多様な非運動症状出現の原因は解明されていないが、嗅覚、自律神経障害等が運動症状よりも先行して出現することや、病変が中脳黒質部にとどまらず、さらに上行してマイネルト基底核、扁桃核、大脳皮質と進むことからレビー小体を要因とする考えが報告されている [7]. また、PD におけるドーパミン欠乏の影響は運動症状のみでなく、うつ症状との関連も報告されている [21].

1.2 パーキンソン病の症状と脳内神経回路の関係

PD 症状の原因となるドーパミンの減少は、脳内の黒質から線条体に投射する大脳基底核において運動制御に重要な影響を与える。動物が運動を開始する際、まず、大脳と脳幹の活動を抑制することで運動開始に不必要な運動を抑制し、運動開始の準備を整える。次に大脳皮質と脳幹の活動を促進（脱抑制）させ、目的とする運動の発現を行う。そして最後に再び大脳皮質と脳幹を抑制することで遂行した運動を終わらせ、次の運動に備える働きをしている [22]. この仕組みにより、大脳皮質による不要なプログラムは抑制され、必要なプログラムが正確なタイミングで遂行されている [23] (図 2) .

PD ではドーパミンの減少により、大脳基底核における活動が定常的に亢進する。そのため、大脳皮質と脳幹に対する抑制も定常的に亢進し、その結果として脱抑制が働いても大脳皮質や脳幹は十分に活動することができなくなる [22] (図 3) .

大脳基底核における運動制御には、他に運動プログラムの生成がある。大脳基底核は大脳皮質運動野と「運動ループ」を、前頭前野とは「認知ループ」を構成している。これらのループにより、状況に即した運動のプログラムが生

成される [22] (図 4) . 前頭前野から運動前野の病変では, 駅の改札口や障害物の手前で足が出なくなる「すくみ」が出現することが報告されている [24]. そして, これらの障害により PD 患者では随意運動の速度低下や運動量の減少が誘発される [22].

1.3 パーキンソン病に対する治療方法

PD には薬物療法, 外科的治療方法, リハビリテーションが主要な治療として用いられている.

1.3.1 薬物療法

薬物療法は PD 治療における第 1 選択肢であり, 脳内で減少したドーパミンに変わり, ドーパミンを補う L-ド-とドーパミン受容体に作用するドーパミンアゴニストに大きく分けられる. 効果としては L-ド-パがドーパミンアゴニストよりも優れているが, L-ド-パでは長期使用により薬効が変動するウェアリングオフ現象やオンオフ現象, また不随意運動を発現させるジスキネイジア等の合併症が出現する (表 5) . そのため, 現在の治療の多くは L-ド-パとドーパミンアゴニストの併用が主流となっている. しかし, これらの治療も運動症状の出現を遅延させることが目的であり, 薬物療法の有無に関わらずドーパミン細胞は減少していく. そのため, PD 初期には効果的である薬物療法も PD の進行に伴う L-ド-パ取り込み能やドーパミン保持能の低下により効果は徐々に減衰していく.

1.3.2 外科的治療方法

外科的治療方法は, 薬物療法だけでは運動症状のコントロールが困難になった患者を対象として実施される. その効果としては術後 5 年目においても運動機能改善効果や投薬量の軽減効果の持続が認められている [25].

主要な外科的治療方法としては脳深部刺激療法 (Deep Brain Stimulation, DBS : 図 5-A) が行われている. これは脳内に電極を埋め込

むことで、運動調整に関する領域に持続的な電気刺激を与え障害させている神経回路の働きを調整し、症状の改善を図る治療法である。また、胃瘻を作成し、そこから抗 PD 薬を持続的に投与することで、血中 L-ドーパ濃度を一定にして症状の変動を抑える外科的治療方法も行われている [26] (図 5-B)。しかし、外科的治療方法においても効果は薬物療法と同様であり、PD 症状の進行に伴い減衰していく。

神経細胞移植による方法も 1990 年代より行われ、自己の交感神経を用いた自己移植、胎児腹側中脳（黒質）を用いた同種異系間移植、ブタ胎仔腹側中脳を用いた異種間移植が行われてきた。これらの方法も PD 症状の改善効果を認め、特に同種異系間移植が最も効果があると考えられている [27]。しかし、胎児細胞を使用することに対する倫理的な問題や取得方法の問題から標準的な治療として普及するには至っていない。そこで、胚性肝細胞 (Embry Stem cells, ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem cells, iPS 細胞) を用いた治療が期待されている。現在、動物モデルを用いた研究では良好な結果が認められており、今後は患者に対する臨床試験も検討されているが細胞誘導にかかる費用や時間といった課題が残っている。また、移植細胞とホスト神経細胞が必要十分な神経回路を形成するには薬物、リハビリテーションが三位一体となって作用することが重要とされている [28]。

1.3.3 リハビリテーション

現在のところ薬物療法や外科的治療方法を用いて最適な医学的マネジメントを行なっても症状の進行を抑えることはできないとされている。PD に対する第 3 の治療となるリハビリテーションは、前述した 2 つの治療方法に加えて行うことで、症状のさらなる改善が期待できる。また、患者本人が参加できる治療方法であり、患者やその家族の関心も高い [29]。しかし、リハビリテーションに関しても PD の進行を抑えることはできず、PD による直接的な症状 (1 次機能障害) を改善するリハビリテーションはないとされている [30]。だが、進行に伴う活動性低下により生じた廃用症候群など 2 次機能障害に対する有用性は多く報告されている [30-34]。

具体的なリハビリテーション効果としては、身体機能、健康関連 QOL、筋力、バランス、歩行速度の改善に有効であり、PD 治療ガイドライン 2011 内でも高い推奨レベルを得ている。また、PD 特有のリハビリテーションである外部刺激の利用や音楽療法も推奨されている。

外部刺激や音楽療法には、音刺激を聞きそのリズムに合わせて歩行練習を行う方法 [35]や歩行を行わずに音刺激を聴く方法 [36]、また、視覚的な刺激として床に線を引く方法 [37]などが報告されている。そして、これらは実際の臨床場面や ADL 場面でも使用されている。

外部刺激や音楽療法の効果機序として、動作の発現には生体内で動作を開始させる内発性随意運動と外部の刺激をきっかけとして動作を開始させる外発性随意運動がある。内発性随意運動の伝達経路は大脳辺縁系—大脳基底核—補足運動野—1 次運動野からなり、PD 患者ではドーパミンの不足による大脳基底核の障害によりこの経路が破綻する。その結果、PD 患者は自発的な動作の発現が困難となる。これに対して、外発性随意運動は大脳基底核を通らずに感覚情報—小脳—運動前野—1 次運動野を経由して運動を発現させる。そのため、PD 患者においても自発的な動作の発現が可能となる [38]。我々もこの外的刺激に関する調査を行い、振動刺激による歩行への効果や音楽の聞き流しによる活動量や精神機能への改善効果を認めている [39-40]。

1.3.4 有酸素運動

PD に対する有酸素運動効果として Schenkman ら [32]は有酸素運動群、一般的な運動群、コントロール群に分けた介入研究を行い、歩行やバランスなどの運動機能で有酸素運動群、一般的な運動群がコントロール群よりも有意に改善し、特に有酸素運動群に限っては酸素消費効率も有意に改善したことを報告している。しかし、この報告の中では 1 次機能障害に対する有用性は認められていなかった。

一方、これまでに PD モデル動物を用いてトレッドミルを利用した運動負荷実験が多く行われ [41-44]、脳由来神経栄養因子 (Brain-Derived Neurotrophic Factor : BDNF) を中心にドーパミン作動性ニューロンの可塑性に対する運動の有用性、すなわち 1 次機能障害

に対する運動効果が報告されている。近年になり、PD 患者に対する有酸素運動の効果として、陽電子断層撮影を用いた研究から、ドーパミンの伝達に関連する神経の可塑性を促進する可能性が示唆された [45]。この報告はこれまでの 2 次機能障害の治療を主としたリハビリテーションにとって、PD に対する介入効果の新たな可能性を示唆するものである。

1.4 本研究の目的

PD により障害されるドーパミン作動性ニューロンの影響を受ける大脳基底核は運動調整の中枢である。そのため、患者に対する有酸素運動効果の検討を進める上では、モデル動物を用いた基礎研究においても運動調整に関する詳細な測定が必要となる。これまで PD モデル動物を用いた先行研究 [41-44] では、運動機能評価として、目標到達課題 (Reaching Task, RT) の観察、アポモルフィン誘発回転検査などが主に用いられてきた。しかし、これらの方法は運動機能の障害や回復の程度を定量的に測定できる評価ではなく、半定量的もしくは主観的な解釈を含むものであった。また、多くの報告が四肢の運動に注目しており、姿勢反射障害により影響を受ける頭頸部や体幹の変化の検討も十分に行われていない。

我々はこれまでに脳卒中モデルラットに対して RT の様子をハイスピードカメラで撮影し、前肢運動の定量的評価を確立している [46]。本研究の目的は、この画像解析法を用いて PD モデル動物の運動や姿勢保持を定量的に評価することである。また、モデル動物と患者に対するリハビリテーションとして有酸素運動を行い、それが PD の 1 次機能障害に与える効果を研究することである。

1.5 本文の構成

第 1 章では緒論として PD の概要から本研究を想起するまでの過程と目的を述べた。第 2 章では関連研究として、PD モデル動物および PD 患者に対する研究の詳細を提示し、問題を提起する。第 3 章では実験方法として PD モデル動物の作成方法、運動機能の測定方法、解析方法を説明する。第 4 章で

は PD モデル動物の運動特性について述べる。第 5 章では PD モデル動物に対する有酸素運動の効果を述べる。第 6 章では PD 患者に対する有酸素運動効果を述べる。第 7 章では PD モデル動物と PD 患者に対する有酸素運動効果の結果から、基礎研究と臨床研究との関係性を議論し、第 8 章ではまとめを行い、今後の展望について述べる。

第2章 関連研究

2.1 パーキンソン病モデル動物の作成方法

PD モデル動物の作成方法には遺伝子組み換えによる方法と薬理学的方法がある。

2.1.1 遺伝子組み換えによる方法

(1) トランスジェニック

α -synuclein のトランスジェニックがある。 α -synuclein は第1章で説明した PD の原因因子として考えられているレビ-小体の主成分である [47]。

(2) ノックアウト

PARK7 のノックアウトが作成方法として使用されている。 PARK7 は脳を含め哺乳類の組織に広く存在するタンパクである。 特にニューロンとグリアで抗酸化機能を有するストレス応答性の多機能タンパク質であると考えられ、酸化ストレス分子の検出とそれに対する保護作用を担っている可能性が指摘されている。 この PARK7 ノックアウトマウスでは黒質のドーパミン作動性ニューロンが存在しているものの、運動低下症など同ニューロンの障害による症状が認められる [48]。

2.1.2 薬理学的方法

薬剤投与による方法としてはカテコールアミン選択的神経毒 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA) モデル, 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine, MPTP) モデル, リポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPW) モデルがある。

(1) 6-OHDA

酵素を利用してエネルギーを得る生物の体内では、常に活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) が生産されている。ROS はその高い反応性からタンパク質、脂質、DNA などの機能分子を修飾することで、細胞機能の障害を引き起こす。細胞は ROS に対する防御機能を備えているが、細胞の内外で過剰に産生される ROS を十分に処理できないときに酸化ストレスによる神経細胞の障害が生じる [49]。6-OHDA はこの ROS を産生しドーパミン作動性ニューロンおよびノルアドレナリン作動性ニューロンを選択的に変性除去する神経毒であり、多くの PD モデル動物の作成に用いられている。

(2) MPTP

MPTP は脳内のアストロサイトに取り込まれ、モノアミン酸化酵素 MAO-B により酸化されて MPP⁺となる。MPP⁺はドーパミントランスポーターを介してドーパミン作動性ニューロンに取り込まれ、ミトコンドリアによる ATP 合成を阻害することによって神経細胞死を引き起こし PD 症状を発現させる [50]。

(3) LPS

LPS はグラム陰性菌の細胞壁構成成分であり、ミクログリアの活性化を介して選択的にドーパミン作動性ニューロンを障害することで PD 症状を発現させる [51]。

2.2 パーキンソン病モデルラットにおける運動介入効果の報告

PD モデルラットに対する運動介入効果としては、運動の有無のみでなく運動時期 (6-OHDA 注入前後など) の検討も行われている。また、その効果判定にはチロシンヒドロキシラーゼ (Tyrosine Hydroxylase, TH) 免疫染色 (TH 染色) やウェスタンブロットティング法を用いた組織化学的な方法や RT およびアポモルフィン誘発回転検査による行動検査が主に用いられている。

以下に関連研究を紹介する。

Toun ら [41]はラットを非運動+擬似手術群, 非運動+手術群, 運動+擬似手術群, 運動+手術群の4群に分け, 8週間のトレッドミルによる運動(頻度: 3-4/w, 時間: 50分, 速度: 13-14 m/min)を行わせた後に片側線条体へ6-OHDAを注入しPDモデルとした. そして, PDモデル作成7日後にアポモルフィン誘発回転検査を行い, その後, 摘出した線条体にウェスタンブロッティング法を用いてドーパミン作動性ニューロン数とBDNFの調査を行った. また, 2-チオバルビツール酸反応性物質を指標として酸化ストレスの調査も行なっている. 結果として, 6-OHDAを注入された群では, 運動群が非運動群と比較し有意にドーパミン作動性ニューロン数, BDNFが多いことを認めている. また, 酸化ストレスにおいても運動群と非運動群を比較すると運動群のストレスが有意に少ない結果を示した. このことから, 6-OHDA注入前の運動には脳神経保護に対する有用性があることを報告している.

Choe ら [42]は6-OHDA注入による片側PDモデルラット作成後に, 非運動群と運動群に分け16日間のトレッドミルによる運動(頻度: 毎日2回, 時間: 30分, 速度: 10 m/min)を行わせた. そして, 黒質に対するTH染色と線条体に対するウェスタンブロッティング法によりドーパミン作動性ニューロン数の調査を行った. また, 同時にヒラメ筋の重量と筋線維タイプの調査も行なっている. 結果として運動群では非運動群に対して, ドーパミン作動性ニューロン数が黒質, 線条体ともに有意に増加し, ヒラメ筋の重量および, タイプI, タイプII両方の筋線維の回復も認めた. そして, この結果から運動は神経保護作用を有することを報告している.

Yoon ら [43]は6-OHDA注入による片側PDモデルラット作成後に, Toun ら [41]と同様に非運動+擬似手術群, 非運動+手術群, 運動+擬似手術群, 運動+手術群の4群に分け, 14日間のトレッドミルによる運動(頻度: 毎日1回, 時間: 30分, 速度: 最初の5分は2.0 m/min, 残り25分は3.0 m/min)を行い, その後, アポモルフィン誘発回転検査と黒質と線条体に対してTH染色を行った. そして, 黒質および線条体において健常側脳と損傷側脳のドーパミン作動性ニューロン数の比率を求めて比較した. その結果, 6-OHDAが注入された群では運動群が非運動群に比べて, 黒質, 線条体ともにドーパミン作動性ニューロンの比率が高い結果を示した. このことから6-OHDA注入後の運動の脳神経保護に対する有効性を示している.

Real ら [44]は神経保護, 回復に関与するBDNFの影響を調査するため,

6-OHDA 注入による片側 PD モデルラットを非運動+擬似手術群, 非運動+手術群, 手術前後運動群+手術群, 手術後運動群の 4 群に分け, さらに, すべての群に BDNF 受容体阻害剤である K252a を投与して BDNF 遮断処理を行なった 4 群を作成し, 計 8 群の PD モデルラットを設定した. そして, トレッドミルによる運動を手術前後ともに 4 週間 (頻度: 3/w, 時間: 40 分, 速度 10 m/min) 行わせ, アポモルフィン誘発回転検査, ウェスタンブロッティング法により黒質緻密部と線条体の BDNF およびドーパミン作動性ニューロン数を β -actin を分母とした比率にて比較した. また, 黒質緻密部と線条体のドーパミン作動性ニューロンにおいては, TH 染色により健常側脳の細胞数を分母として比率を比較した. その結果, BDNF は黒質緻密部で運動群が非運動群と比較し有意に高い結果を示したが, K252a の有無による変化は認めなかった. 線条体においては運動の有無, K252a 投与の有無ともに有意な変化は認めなかった. ドーパミン作動性ニューロンにおいては K252a の投与の有無に関わらず, 運動群が非運動群と比較し有意に高い結果を示した. また, K252a の有無による比較では, 黒質緻密部, 線条体ともに運動群において K252a 投与群が非投与群に比べ低い結果となった. このことから BDNF は運動により特に黒質緻密部で発現量が増加し, また, BDNF の存在が神経保護作用を促進していることを示唆した.

2.3 パーキンソン病モデルラットに対する運動機能評価

2.3.1 目標到達課題 (Reaching Task) (図 6)

RT はラットの前肢運動機能を評価する運動課題として有効な方法とされている. この課題はボックスに設けたスリットを通して片側前肢を伸ばし, ペレットを取らせるものである. この課題は熟練した目標到達運動 (Skilled Reaching) とも呼ばれ, 指, 手, 手首, 肘, 肩の運動を複雑に組み合わせて行わなければペレットを正しく握り, 口へ運ぶことができないため, 始めからできる課題ではなく, ラットに対して練習を必要とする課題となっている. そのため, 人間の成熟した動作に類似しているとされ, 脳損傷や脳卒中, PD など神経変性疾患に対する障害評価として推奨されている [52].

先行研究により，ラットにおける RT は床から前肢が離れペレットをつかみ，口へ放出するまでに次の 10 項目の運動要素によって構成される事が分かっている [53].

- (1) 指の正中線上への移動 (Digits to midline) : 図 7- (1)
RT を行う前肢が床から離れ，指先が体の正中線上に移動する.
- (2) 指の半固定状態 (Digits semiflexed) : 図 7- (2)
前肢が上がるにつれて，指を固定しながら前肢が回外運動し，手首も部分的に固定する.
- (3) 肘の正中線上への移動 (Elbow to midline) : 図 7- (3)
指先を体の正中線上に維持しながら，肘を正中線方向へ内転する.
- (4) 手の進行運動 (Advance) : 図 7- (4)
前肢が標的となるペレットに向けてスリットを通り，まっすぐに進行する.
- (5) 指の伸展運動 (Digits extend) : 図 7- (5)
手の進行運動の間に，指先がペレットを指すように伸展をはじめ徐々に全指が広がり始める.
- (6) 回内運動 (Pronation) : 図 7- (6)
ペレットの上に手が到達すると，手は回内運動し，第 5 指から第 2 指まで順番に柵に接触し，ペレットに接触する.
- (7) 把握運動 (Grasp) : 図 8- (7)
ペレットの上で指が曲げられペレットを握る．そして，ペレットを持ち上げるために，前肢がわずかに進行する.
- (8) 回外運動 1 (Supination1) : 図 8- (8)
手をボックス内に引き戻しながら，スリットを通るまでに手が約

90 ° となるように回外運動を行う。

(9) 回外運動 2 (Supination2) : 図 8- (9)

手がスリットを通り口まで移動すると、ペレットを口に入れるためにさらに約 45 ° 回外運動する。

(10) 放出運動 (Release) : 図 8- (10)

口と手が接触し、手がペレットを放出するために開かれる。

2.3.2 アポモルフィン誘発回転検査

片側のドーパミン作動性ニューロンが障害された PD モデル動物では、ドーパミン受容体が補償的に増加し、ドーパミン感受性が亢進した状態となる。この状態に対してドーパミン受容体アゴニストである薬剤（アポモルフィン）を注入すると損傷側では受容体結合が高く、結果として脳損傷側と反対側方向（脳健常側）への継続した回転運動が生じる。この現象を利用し、一定時間内の回転数を測定することでドーパミン作動性ニューロンの残存状況の把握に用いることができる。ドーパミン作動性ニューロンの残存が多ければ、ドーパミン受容体の補償的な増加が抑制され、本検査における回転数は減少する [54]。

2.4 パーキンソン患者に対する運動効果の研究

Schenkman ら [32]は軽症の PD に対して無作為比較試験によりトレッドミルや自転車エルゴメーターを用いた有酸素運動群、セラピストによる管理下の関節可動域練習やバランス練習などを用いた運動群、自宅での自主練習による関節可動域練習やバランス練習などを用いたコントロール群に分けた介入研究を 16 ヶ月間行い、4 ヶ月、10 ヶ月、16 ヶ月で効果を比較した。その結果、運動群では 4 ヶ月の時点でコントロール群に比べ有意な運動機能の改善を認めている。また、4 ヶ月と 16 ヶ月の時点で ADL の有意な改善も認めている。有酸素運動群においては全ての時期においてコントロール群と比較し酸素消費量の改善を認めている。

Fisher ら [45]はPD患者のドーパミン作動性ニューロンに対する有酸素運動効果をPETイメージングにより検討している。対象は軽症PD患者4名を無作為に8週間のドレッドミルによる有酸素運動を実施した有酸素運動群と運動をしなかったコントロール群に分け両群を比較した。その結果、運動群ではドーパミン受容体の1つであるD2受容体の増加と姿勢制御の改善を報告し、軽症PD患者に対する有酸素運動効果の有用性を報告している。

Comella ら [33]は中等度のPD患者に対してクロスオーバー試験により関節可動域練習、持久力練習、バランス練習、歩行練習等を4週間行った時と行わなかった時を比較し、有意にADLや運動機能の改善を認めたことを報告している。また、運動介入終了後6ヶ月間に定期的な運動を行わないと身体機能は元の状態に戻ったことも報告している。

Yang ら [55]は日常における身体運動量（家庭内活動、仕事、余暇等）とドーパミン作動性ニューロンの保護効果との関連性を調査するためにPD発症リスクに関して約4万人に及ぶ大規模調査によるCox比例ハザードモデルを用いた研究を実施している。その結果、平均12.6年間の調査期間中に約300人のPD発症を認め、中等度の身体活動がPD発症のリスクを低下させることを報告している。

2.5 まとめ

本章ではPDモデル動物の作成方法から、モデルラットを使用した運動効果の報告、そして、その運動要素に対する評価方法を紹介した。また、PD患者に対するリハビリテーション効果を紹介した。

以上よりモデルラットにおいては運動がドーパミン作動性ニューロンに対する保護作用を示すことが多くの報告で証明され、患者に対してもその可能性が調査され始めていることがわかる。

2.6 問題提起

PDモデル動物に対する運動が神経機能に与える有用性に関して多くの報告がある一方、神経保護作用は認められるがそれが実際の運動要素にどのように反映しているかを運動機能面から詳細に評価した報告はない。

現在までに用いられている PD モデルラットに対する主要な運動機能評価は運動機能の回復の程度を動作時間や課題の成功率で定量化する方法である。そのため、運動要素を詳細に測定できる評価法はなく、主観的もしくは半定量的な解釈を含むものであった。

画像を用いた機能評価として Miklyaeva ら [56]は PD モデルラットにおける姿勢変化を撮影したビデオカメラ画像から解析している。しかし、その方法も主観的な観察を主体としており、得られた結果の数値化には至っておらず定量化された客観的な検査内容とは言い難い。

このように現在用いられている主要な PD モデル動物に対する評価方法では PD による運動調整の障害から生じる運動要素への影響を詳細に捉えることはできない。それは PD モデル動物による研究結果を PD 患者の運動機能に反映することの限界を意味している

これまで PD 患者の運動効果に関する研究報告は、2 次機能障害に対するものが主体であった。しかし、PD 患者におけるドーパミン作動性ニューロンの可塑性に注目した報告も増え始めている。このような現状の中で PD モデル動物の詳細な運動要素を測定することは、基礎研究による結果を患者の検討に反映させることに繋がり、運動効果の検証をより行いやすくと考えられる。

そこで本研究では、PD モデルラットに対する RT の画像解析による定量的評価を実施し、運動要素の調査を行った。第 3 章では、PD モデルラットの作成方法と研究に用いた評価方法の詳細を述べる。

第3章 パーキンソン病モデルラット用いた研究方法

3.1 使用動物

本研究では PD の発症が高齢者に多いことを考慮し、20 週齢以上の成熟した Long-Evans ラットを用いた。

RT では動物の空腹状態が課題の運動要素に大きな影響を与える。そのため、研究期間中の体重は RT 練習開始時の 90-95% の状態を保つようにしながら摂食制限を行った。水は自由に給水できるようにした。

3.2 パーキンソン病モデル作成方法

第2章で紹介したように PD モデルラットの作成には様々な方法が存在している。本研究では先行研究での使用が多い点と作成方法が確立していることを考慮し、6-OHDA を片側線条体へ注入する方法を採用した。

3.2.1 作成手順

作成手順としてまずラットをケタミン (1.0 $\mu\text{l/g}$) /ドミトール (0.5 $\mu\text{l/g}$) /アトロピン (0.1 $\mu\text{l/g}$) を生理食塩水にて希釈し、腹腔内投与によって麻酔導入し、手術中はガス麻酔器 (アコマ気化器 I 型 MkII, アコマ医科工業株式会社) を使用してイソフルランと酸素と笑気の混合麻酔で適切な麻酔深度を維持した。酸素と笑気は 1:1 の割合で 0.5 L/min の量と設定した。麻酔導入後、ラットの頭部を剃毛し、定位固定装置に固定した。定位固定装置に固定されている間、ラットの心電図、体温、呼吸数をモニターした。心電図はラットの右手と左手の皮膚に接触させた電極とアース電極によって計測され、心拍数の計測と心電波形をモニターした (多用途プリアンプ装置 RMP-6004 & ブラウン管モニター VC-640G, NIHON KOHDEN CORPORATION)。また体温が計測されると同時にヒートパッド (Animal Blanket Controller ATB-1100, NIHON KOHDEN CORPORATION) によって手術中の体温低下を防いだ。呼吸数は目視によって1分間の胸郭の動きから計測した。ラットの頭皮切開部と定位固定によって圧迫される部

位には局所麻酔薬（キシロカイン®）を注射した。頭皮切開後は頭蓋表面の結合組織を除去し、頭蓋骨を露出させた。頭蓋骨に注入部の確保のためを頭蓋骨冠矢状縫合の交差点（ブレグマ）を基点にして頭側に0.7 mm, 正中線から外側へ 2.6 mm の部位に固定装置用ドリル（SD-101, NARISHIGE）を使用して穴を開け脳表を露出した。露出した脳の領域に対して腹側方向に深さ 4.5 mm の場所へ 33-gauge Hamilton syringe を用いて 6-OHDA の注入を行なった。6-OHDA は 0.4%アスコルビン酸を含む生理食塩水にて希釈し、7.0 µg/µl の濃度とし 1 分間に 1.0 µl の速度で 3 分間かけ計 3.0 µl（計 21 µg）を注入した。また、注入後 5 分間は注入した状態を保持し溶液を拡散させた。

注入後、頭蓋の開窓部を歯科用セメントで閉じ、頭皮は縫合により閉創した。手術終了後にドミトールの拮抗薬であるアンチセダンと抗生物質（ピクシリン）を皮下注射した。

ラットには術後 3 日間、抗生物質を投与し、個別にケージ内で飼育した。また頭皮創の抜糸まで毎日傷口の消毒を行った。

3.2.2 作成時期

PD モデルラットの作成は 5 日間の RT 成功率の平均が 70%以上になってから行った。

3.3 目標到達課題の測定方法

第 2 章では PD モデルラットに対する測定方法に関して問題提起を行った。この問題を解決すべく本研究では間中勇輝らが平成 26 年度に修士論文で報告した RT の画像解析を実験方法として採用した [46]。間中勇輝らは RT を画像解析することにより脳卒中モデルラットの前肢運動の詳細な分析を可能としたことを報告している。RT は齧歯類とヒト、それ以外の霊長類で詳細に比較され、類似しているということが明らかになっている [57]。このことから齧歯類の RT で起こる機能的損失と改善の性質を理解することはヒトでの疾患による上肢障害とその運動の性質を理解することにつながると考えられている。以下に RT 測定の方法を説明する。

3.3.1 装置

RT の測定には専用の到達運動ボックスを使用した (図 9・10・11) . このボックスは厚さ 5 mm のアクリル板を用いて作製されている. ボックスの寸法は長さ 45 cm, 幅 25 cm, 高さ 30 cm となっており, 前壁の中央には, 床から 3 cm のところから幅 1 cm, 高さ 15 cm のスリットが設けられている. そして, 前壁の床から 3 cm の高さのところ厚さ 2 mm のアクリル板を用いて, 長さ 4 cm, 幅 25 cm の棚を取り付け, その棚にはスリットから 1.5 cm のところにペレットを置くための直径 3 mm, 深さ 1.5 mm の穴が設けられている.

本研究ではラットが課題を行っている様子を床下からの視点で撮影するため, 到達運動ボックスを置く台が使用されている (図 12・13) . この台は厚さ 3 mm の塩化ビニル板を用いて作製された. 台の寸法は外径の長さ 52 cm, 幅 32 cm, 高さ 43.5 cm となっており, ガラス板を置けるように台の上面は内径の長さ 46 cm, 幅 28 cm の吹抜けとなっている. ガラス板は厚さ 5 mm のものを用いて, 寸法は長さ 50 cm, 幅 29.5 cm とした. また台の中にはカメラを置けるようにスペースが設けられている.

課題は画像処理を用いて解析されるため, 動画撮影時には不要な物が映らないように, ボックスの上の部分と後ろの部分に白い布を背景として置いて撮影した.

3.3.2 撮影方法

動画撮影は運動画像解析を行うためにボックスの正面からの視点と床面からの視点からの 2 方向から行った. 正面からの視点の撮影は CASIO デジタルカメラ EX-ZR400 を使用し, 床面からの視点の撮影は CASIO デジタルカメラ EX-ZR1600 を使用した. 動画の撮影はハイスピード動画機能, 画面サイズ 512×384 pixels で行い, 両方のデジタルカメラの ISO 感度は 3200, マニュアルフォーカスに設定した. カメラの位置として正面からの視点は RT の際にラットの全身が映り (ペレットを置く棚から約 7 cm 離れた距離), かつ, 画面中央に前壁のスリットの中心がくるようにカメラのレンズの中心を棚の高さに一致させ, 縦構図で三脚に固定した. 床面から

の視点は RT の際にペレットに対して伸展した全ての指が映り（ガラス板の床から約 8 cm 離れた距離）、かつ、画面中央が前壁のスリットの間となるようにカメラのレンズの中心と前壁の位置を一致させ、自由雲台 (SBH-100, SLIK) を装着したゴリラポッド (JOBY SLR-ZOOM, ケンコー トキナー) でカメラを固定した (図 14) .

2 方向からの動画撮影を行う際、2 つの動画の同期を計るために点灯周期が 1 秒の LED 点滅回路を使用し、ラットの運動撮影時に同時に撮影した (図 15) .

3.3.3 運動画像解析用ペインティング (図 16)

画像処理時にラットの指を抽出しやすくするために指に色を塗った。色を塗る際、ラットにイソフルランと酸素と笑気の混合麻酔 (麻酔装置, MODEL EM-2, アコマ医科工業株式会社) を導入した。酸素と笑気は 1:1 の割合で 1.0 L/min の量と設定した。麻酔導入時のイソフルランは 4.0% と設定し、その後、麻酔は 1.0-2.0% のイソフルランによって維持した。画像処理によって手の開き具合を簡潔に測定するため、色を塗る対象はラットの優位な前肢の第 2 指と第 5 指とした。本研究では色を塗る際、第 2 指には実験動物用マーカー (FG2200B 細シリーズ, 室町機械株式会社)、第 5 指には黄色のカーマニキュア (カニバルイエロー, Y53 H-10, 武蔵ホルト株式会社) を塗った。色を塗った直後から 3 分間ドライヤーを使用し、塗料を乾燥させた。麻酔による影響を避けるために、麻酔から覚めて 1 時間以上経過した後に、測定用動画を撮影した。

3.4 運動画像解析プログラム

動作画像処理には間中勇輝らが報告し [46], それをもとに堀越顕法らが改変し修士論文内で報告したプログラム [58] を使用した。解析プログラムの詳細を以下に示す。

画像処理プログラムは C 言語で作成されたプログラムをもとにプログラム言語 Python2.7 を用いて、Eclipse4.4 上で RT 解析プログラムが導入されている。また、画像解析のために画像処理ライブラリである Open CV を導入し、

バージョンは 3.0 を用いた。Open CV とは、Intel 社によって開発され、難解なソースプログラムを記述する手間を省き、プログラムの読みやすさ、再利用性を向上させるために代表的な画像処理をライブラリ化したものである [59]。

撮影された動画は 1 セッション RT20 試行で 1 ファイルになるように撮影されている。また、プログラム上で動画を読み込む際に動画の形式は AVI 形式でなければならないが、カメラによって撮影された動画の形式は MOV 形式である。そのため、正面視点の動画、床面視点の動画両方に関して、1 セッションのファイルを 1 試行ずつに切り分け、動画の形式を Open CV で認識できる AVI 形式に動画ライブラリである ffmpeg を用いてコマンドライン上で変更を行った。このときデータ速度は 94285kbps (bit per second) に統一した。

解析を始める前には正面視点の動画と床面視点の動画の同期を計った。2 つの動画の同期を完璧に計るために同期は目視によって行った。まず 2 つの動画を別々に 1 フレームずつ再生し、各視点で LED が点滅した瞬間まで再生する。そして両方の動画で LED が点滅した瞬間まで再生した後、両方の動画を同時に再生することで同期を計った。また、背景のノイズの削減と解析速度向上のために正面・底面画像それぞれにマウス入力による関心領域 (Region of Interest ; ROI) を作成し、ROI の範囲内のみを解析するようにした。解析を開始するタイミングは前壁に設置されたスリットを前肢の一部が通過した瞬間からとした。解析を終了するタイミングとして、RT が成功している場合はペレットを把握した前肢がスリットを通過し終えた瞬間とした。失敗の場合はペレットを弾くなどペレットの把握失敗が確定された瞬間とした。

2 本の指先間の距離と指先を結んだ直線と水平線の成す角度の解析プログラム (正面視点の解析) はコマンド画面から解析対象となる動画ファイルを入力した。この際、動画の名前を「reachingfrontA-B」, 「reachingbottomA-B」とし、A (セッション番号) , B (試行番号) の部分に数字を入力することで正面視点、床面視点の動画の該当する試行を一度に読み込めるように設定されている。なお、使用する前肢が左右で異なることによって起こる指先の誤認識といった解析上の問題を防ぐために、解析前に解析対象となる前肢が左右のどちらかを選択するようにプログラムは作成されている。

正面の視点から撮影された動画に関しては第2指と第5指に塗られた色に対して色相抽出法を用いることで解析が行われた。抽出方法は、Open CVの中に含まれる関数を使用されている。まず、入力された動画のフレーム画像に対して、画像の色空間を変更する関数を適用した。この関数は表色系を変更する関数となっており、RGB (Red, Green, Blue) 表色系、HSV (Hue, Saturation, Value) 表色系、グレースケールなどを相互に変換することができる関数である。この関数を使用し、RGB 表色系を HSV 表色系に変換することにより、RGB 表色系では見ることができない色の種類、色の鮮やかさ、色の明るさを数値で表現することが可能となる。表色系を変換した後に、フレーム画像の1画素ごとのH, S, Vの値を取得し、あらかじめ設定した青色のH, S, Vの値の最低値と最高値の範囲で取得したH, S, Vの値がすべて当てはまる場合はその画素を unsigned char 型のグレースケールにおける白とし取得した。また、それぞれの値がその範囲に当てはまらない場合は黒として2値化画像を出力した。

黄色または青色で塗られた指に関しても、同様に黄色または青色のH, S, V値を設定し、2値化画像を出力した。

指の領域を抽出した後にノイズ除去が実施された。ノイズ除去にはクロージング (Closing) 処理が行われた。クロージングとは対象となる画像に膨張を行った後に膨張と同じ回数だけ収縮を行う処理のことである。膨張と収縮とは画像中の領域をある画素数分だけ大きくする、または小さくする処理である。クロージングを行うことにより、抽出された指の領域中の小斑点状ノイズや抽出しきれず、部分的に抜けてしまった指の領域を補完することが可能となっている。クロージングは2値化画像の状態によって、膨張と収縮の回数が変わるため、回数の調節が必要である。

指の領域を抽出し、クロージング処理を行った後、ラベリング (Labeling) 処理が行われた。ラベリング処理とは、隣接する同じ値をもつ画素に同じラベル番号を付ける処理であり、主に2値化画像に対する処理として用いられる。このラベリング処理を行うことにより、画素単位の処理ではなく領域単位の処理が可能となり、重心や面積などの領域ごとの特徴を得ることも可能となった。クロージング処理を行った後の画像でも比較的大きなノイズが残ることがあり、残ってしまったノイズを除去するために、ラベリング処理によって不必要な領域が除去された。今回のプログラムは色を塗った指が最大領

域になると仮定し、ラベリング処理のラベル番号を面積の大きい順にソートし、最大領域を示すラベル番号 1 の領域を指の領域とし、ラベル番号 2 以降の領域はノイズとして除去された。これまで述べてきた処理を行うことで青色が塗られた指の領域と黄色が塗られた指の領域のみを 2 値化画像として出力することが可能となっている。

抽出された 2 本の指の領域から指先を求めるために、楕円フィッティングが適用された。まず 2 本の指を抽出した 2 値化画像から 2 つの領域の輪郭がそれぞれ検出された。輪郭を検出する際は Open CV 内の関数である「Find Contours 関数」が使用され、輪郭検出設定は「CHAIN_APPROX_NONE」、 「RETR_EXTERNAL」とした。前者は輪郭点同士のつながり方を表しており、「CHAIN_APPROX_NONE」は検出した輪郭のすべての点を出力する設定である。後者は輪郭の構造を表しており、「RETR_EXTERNAL」は外側に存在する輪郭のみを出力し、内側に存在する輪郭は出力しない設定である。輪郭を抽出した後、最小二乗推定によって輪郭を最小で囲むことができる四角形を推定し、四角形の中心座標、幅、長さ、と水平軸との角度が計算された。そして、四角形で囲むことが可能な楕円の大きさを推定し、画像中に描画された。推定された楕円を基に楕円の長軸と短軸を求め、長軸を指の長さ、短軸を指の太さと仮定し、ラットの優位な前肢が右手の場合、画像上で右側にある長軸の点を指先の点とし、左手の場合は左側にある長軸の点を指先の点とした (図 17)。

次に、決定された 2 点の指先から距離の計算が行われた。距離の計算方法は 2 点の x 座標、y 座標を使用し、2 点の x 座標、y 座標それぞれの絶対値の差を計算し、三平方の定理から距離が求められた。しかし、この計算によって出力された数値は画素数であり、画像上の距離となってしまうため、画素数で表された数値を実際の長さに変換する必要がある。変換方法はラットが RT を行う前に、到達運動ボックスの前壁部分に定規を置き、RT の時と同じ撮影方法で動画を撮影し、1 cm の画素数を数えることによって行った。画素数の測定回数は最低 30 回とし、平均値を求め、画素数を実際の長さに変換した (図 18-A)。

角度の計算は 2 点の指先からなる直線と x 平面との間の角度を求めた。角度はベクトルの内積と外積を求め、逆正接であるアークタンジェントを用いて角度に変換された。また、角度の単位はラジアンであるため、単位は度に変

換された。計測された距離と角度の時系列データは連続する 3 点で平均され、移動平均によって平滑化された。

床面の画像からラットの優位な前肢がペレットに触れる瞬間の第 1 指から第 5 指の指先位置とペレットの中心位置の相対距離を計測する解析（床面視点の解析）を行う際、手の領域抽出には正面画像と同様に、マウス入力により与えられた ROI の範囲内において色相抽出法を用いて 2 値化画像を取得した。手の領域抽出後、クロージング処理によりノイズ削減と欠損領域の補間を行い、続いてラベリング処理により抽出した領域のラベル画像を取得し、最大の面積を示すラベル領域を手の領域とし、それ以外を除去した。前述した方法で求められた手の領域の輪郭を Open CV の「Find Contours 関数」を用いて検出した。この時、輪郭検出の設定は正面視点画像解析と同様に「CHAIN_APPROX_NONE」、「RETR_EXTERNAL」とした。輪郭の検出後、指先点の候補を抽出するために凸包を求め、候補点を間引くために隣接する凸包点の距離が一定以上の凸包点が抽出された。この際、間引くための距離の閾値は経験的に定められた。

ラットはペレットを把握するために、優位な前肢の指先を広げてペレットに触れる。そのため、第 3 指と第 4 指はそのほかの指に比べ、床面視点動画の画面上において y 座標の値が小さく画面上側に存在する。これにより、間引いた凸包点からもっとも y 座標の値が小さい点と 2 番目に小さい点を検出し、優位な前肢が右側肢である場合はもっとも y 座標が小さい 2 点において画面右側の点を第 3 指とし、優位な前肢が左前肢の場合はもっとも y 座標の値が小さい 2 点において画面左側の点を第 3 指とした。第 3 指と第 4 指を求めた後、優位な前肢が右前肢の場合、残っている候補点の中から第 3 指よりも右側かつもっとも第 3 指に近い点を第 2 指とし、第 4 指よりも左側かつもっとも第 4 指に近い点を第 5 指とした。また、第 1 指は第 2 指から第 5 指の指先点を抽出後に残った候補点の中から、もっとも第 2 指に近い点とした。

ペレットの領域の抽出においても HSV 表色系を使用した色相抽出により行われた。領域の抽出後、クロージング処理、ラベリング処理を実施した後、ラベル領域の面積が最大の領域以外の除去が行われた。その後、輪郭の検出は正面画像解析と同様に「CHAIN_APPROX_NONE」、「RETR_EXTERNAL」に設定し、「Find Contours 関数」によって輪郭検出を行い、ペレットの領域の楕円フィッティングを行い、楕円の中心座標をペレットの中心とした。

検出された 5 点の指先座標とペレットの中心座標から相対距離を計算するためにペレットの中心座標を原点として 5 点の指先座標が再計算された。この計算の単位はピクセルであるため、正面視点の解析時と同様に柵の位置に定規を置いた状態で動画を撮影し、長さの単位変換を行った (図 18-B)。

3.5 正面視点からの運動画像解析

3.5.1 前肢運動

動作確認の例として指の伸展運動中の画像を図 19-A に示す。入力された画像は、プログラムにより自動的に青色と黄色についての色相抽出が行われ、ラベリング処理を施した (図 19-B)。次に抽出された領域に対して楕円フィッティングを行い、楕円を赤色で表示し、指の領域を推定した (図 19-C)。また、このときに推定された楕円から長軸と短軸を求め、長軸を緑色、短軸を水色で表示した。そして右手の場合は長軸の左側にある点を指先として認識し、第 2 指と第 5 指の指先の点を赤色で表示し、2 点を結んだ直線、すなわち距離 (緑色の直線) と水平線 (水色の直線) との角度の計測した (図 20)。

3.5.2 姿勢状態

姿勢状態の評価には RT における手掌部がペレットに接触した瞬間の頭部の最大傾斜角度を姿勢変化の指標とした。測定方法として、佐々木ら [60] は正面画像から両眼球を結ぶ線を設定し頭部の傾きと定義している。本研究では詳細に計測するため測定点をさらに限定し涙嚢切痕を結んだ線と水平線が成す角度を頭部傾斜角度として算出した (図 21)。

3.6 床面視点からの運動画像解析

ラットの手がペレットに触れた瞬間の画像 (図 22-A) を入力画像とした。2 値化画像からノイズ除去を行い、ラベリング処理によって最も大きい領域を手の領域として検出した (図 22-B)。この手の領域に対して輪郭を赤線で描

画し、輪郭上を一周するまで一定の間隔で点が打たれた (図 22-C) . この輪郭を一周する点のうち、始めに打たれた点を青色で表示し、そこから時計周りに緑色で点を打った. そして連続する 3 点で構成される角度の計測が行われ指先が検出された. ペレットの位置は色相抽出によって検出された後に楕円フィッティングされ、楕円の中心をペレットの中心として検出された (図 22-D) . 最後に、検出された 5 点の指先 (赤色) とペレットの中心位置 (緑色) が画像上に表示されていることが確認された (図 22-E) . そして、ペレットの中心位置と各指の相対距離が計測された.

3.7 運動画像解析項目

運動画像解析は RT を実行しているラットの正面および床面からの視点で撮影した動画とし、RT の成功、失敗を問わずに 20 施行全てを解析対象とした. ペレットを弾くなどして RT が失敗となった場合、その後の前肢をボックス内に戻すまでの動作は測定できない. そのため、本研究における解析範囲は各試行でラットの前肢の一部がボックスの前壁のスリットより出た時点からペレットに接触するまでとした.

解析項目は Whishaw ら [53]により定められた RT における 10 項目の動作を参考に、正面からの視点の動画からは第 2 指と第 5 指の指先間の距離とこの 2 本の指先点を結んだ直線と水平線が成す角度を計測した. また、両涙切痕を結んだ線と水平線より頭部傾斜角度を計測した.

床面からの視点の動画からは第 1 指から第 5 指の指先位置とペレットの中心位置の相対距離を計測した.

以下に解析項目の詳細を示す.

(1) 成功率

成功率は運動画像撮影において実施された 20 施行の RT より求めた. 成功の基準は前肢が前壁のスリットを通過しペレットを把持して、再びスリットを通過し口まで運べたものとした.

(2) 最大距離 (図 23-A)

第 2 指と第 5 指の指先間距離における最大値を最大距離とした.

(3) 最大角度 (図 23-B)

前肢の回旋運動における最大回外角度を最大角度とした。角度の算出方法は第 2 指と第 5 指の先点を結んだ直線と水平線が成す角度とした。

(4) 最小角度 (図 23-B)

前肢の回旋運動における最小回外角度を最小角度とした。角度の算出方法は最大角度と同様に第 2 指と第 5 指の先点を結んだ直線と水平線が成す角度とした。

(5) 運動範囲 (図 23-B)

測定対象域における前肢の回旋運動範囲を運動範囲とした。角度の算出方法は最大角度より最小角度を減じることにより求めた。

(6) 頭部傾斜角度 (図 23-C)

姿勢状態の評価として RT 実施時の前肢がペレットに触れた瞬間の頭部の傾斜角度を姿勢変化の値とした。測定方法として RT 動作時の正面画像より両涙嚢切痕を結んだ線と水平線の角度から算出した。

(7) ペレットからの直線距離 (図 24)

床面視点の解析から前肢がペレットに触れた瞬間におけるペレットと各指の相対距離の結果を基に、ペレットの中心位置から各指先位置までの直線距離を算出した。距離の算出には三平方の定理を使用した。

3.8 動作学習方法

ラットに対して RT を習得させるために、学習を 5 段階 (Stage1-5) に分けて訓練を行った [66]。Stage3 までは 1 日 20 分と訓練時間を設定し、RT 専用のペレットの量は制限せずに与えた。Stage4 以降は RT のテストを行うために 1 日に 20 施行と制限を設けた。

以下に 5 段階の訓練の詳細を示す。

(1) Stage1 ボックスへの順応とペレットへの慣れ

ラットをボックスの中に入れて、柵の上にペレットを置いた。ペレットの位置はラットの舌が届く範囲とした。ボックスとペレットに慣れたところで、ラットの舌が届かない範囲にまでペレットを移動し、舌で届かないことを認識させ、手でペレットを回収させるようにした。このステージの達成に 1-3 日の訓練を必要とした。

(2) Stage2 優位な前肢の決定

スリットと餌を置く 2 つの穴の中間位置にペレットを置いた。そして、このペレットが左右どちらの前肢を使用して回収されるか観察した。これを数回行った後、両方の穴にペレットを置き、どちらのペレットを回収するか観察し、この時に使用した前肢を優位な前肢と決定した。その後は決定された優位な前肢でペレットを回収させるように、決められた穴の方にペレットを置いて到達運動を上達させた。このステージの達成に 3-4 日の訓練を必要とした。

(3) Stage3 到達運動の全工程の学習

到達運動の上達に合わせ、しばらくペレットを置かず、ラットに探索行動を行わせた。そして、この探索行動の最中にボックスの後壁に移動した際にペレットを置くようにした。ペレットの回収 - 食べる - 探索行動 - 後壁へ移動 - ペレットを置く - 前壁へ戻る - ペレットの回収、この一連の動作ができるようになるまで訓練を続けた。このステージの達成に約 3-4 日間の訓練を必要とした。

(4) Stage4 到達運動以外の行動の除去

Stage3 の状態では、ボックスの前後を移動することでペレットがあると認識しているため、ペレットがなくても到達運動を行うことがある。ラットが後壁へ移動して前壁へ戻ってきたときに、ペレットの有無を判断させるためににおいを嗅いで認識させるようにした。前後壁の往復運動の際に毎回ペレットを置くのではなく、ランダムにペレットを置く試行と置かない試行を繰り返した。このステージの達成に約 2 日間の訓練を必要とした。

(5) RT 学習の完了

RT の 20 試行を 10 分以内に行える状態に到達した時点で訓練は終了とした。このステージの達成に約 2 日間の訓練を必要とした。

3.9 訓練期間

学習終了後より RT の成功率が 70%を超えるまで訓練を継続した。この訓練は 1 セッションを 20 試行として、1 日に 1 セッションを 10 分以内と定め実施した。訓練中は成功率の確認と同時に 20 試行に要する時間の測定も行った。

3.10 灌流固定による脳摘出

PD モデルラットの検証期間終了後、ラットを灌流固定し、抜脳した。まずラットにペントバルビタールナトリウム塩溶液(ソムノペンチル[®], 50 mg/kg, i.p) を投与した。痛覚反射消失後、ラットの四肢をコルク板に固定し開胸した。下行大動脈を遮断し、右心房を切開し、放血を確認後、左心室内より生理食塩液を注入し脱血した。生理食塩液注入後、4.0%パラホルムアルデヒド/0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH7.4) を同様にして左心室から注入し、組織を固定した。その後抜脳し、パラホルムアルデヒドで一晩後固定した。その後、組織の凍結保護を目的として、固定液を 30%シュクロース液に浸漬した。

3.11 Tyrosine Hydroxylase 免疫染色

本研究では灌流固定した脳に対して TH 染色を行ない、6-OHDA による線条体の損傷を確認した (図 25)。

TH はカテコールアミン代謝の第一段階を触媒する酵素であり、ドーパミン作動性ニューロンやノルアドレナリン作動性ニューロンで発現している。そのためドーパミン作動性ニューロンの検出には TH の発現を検出することにより同定が可能である。この TH 染色には間接法を用いた。間接法とは抗原に特

異的に結合する抗体（一次抗体）を結合させ、さらに一次抗体に特異的に結合する抗体（二次抗体）を結合させることにより、抗原の信号を増幅させて可視化する方法である。抗原抗体反応は酵素と基質を用いた ABC（Avidin Biotinylated enzyme Complex）を用いた。抗原の可視化には DAB（Diaminobenzidine）を用いたベンチジン呈色反応を使用した。

以下に浮遊法における TH 染色の手順を示す。

- (1) 内因性ペルオキシターゼを不活性化させるために、過酸化水素を用いた。抗体の組織切片への浸透率を高めるために界面活性剤を用いて切片を処理した。10 mM の PBS (Phosphate Buffered Saline) に 0.3% の Triton X-100 と 0.1% の過酸化水素が含まれる溶液を用いて室温で 20 分間処理した。
- (2) 10 mM の PBS を用いて 5 分間の洗浄を 3 回行なった。
- (3) 一次抗体の標的抗原以外への非特異的結合を防ぐために 0.3% の Triton X-100, 2.5% のウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin, BSA), 2% の正常血清, 10% のブロッキング剤を含む 10 mM の PBS を用いて、切片を一晩 4°C で処理した。2.5% の BSA 溶液には 2.5 g の BSA と 3.0% のアジ化ナトリウムを含む 10 mM の PBS を用いた。
- (4) TH に特異的に結合するマウスのモノクロナール抗体 (Tyrosine Hydroxylase Antibody, IMMUNOSTAR) を 1 万倍に希釈した溶液に 4°C で 24-48 時間反応させた。
- (5) 10 mM の PBS を用いて 7 分間の洗浄を 3 回行なった。
- (6) BSA 溶液を用いて 20 分間の洗浄を行った。
- (7) 一次抗体を検出するために、ビオチンで標識した抗ウサギ免疫グロブリン (Immunoglobulin G, IgG) 二次抗体と 10 mM の PBS が

1 : 250 となるように調整した溶液を用いて室温で 30 分間処理した。

- (8) 10 mM の PBS を用いて 7 分間の洗浄を 3 回行った。
- (9) 二次抗体のシグナルを更に増加させるために HRP (Horseradish Peroxidase, 西洋ワサビペルオキシターゼ) が結合した ABC (Vectastain Elite ABC Kit, Vector) と 10 mM PBS が 1 : 500 となるように調整した溶液を用いて室温で 45 分間処理した。
- (10) 10 mM の PBS を用いて 15 分間の洗浄を 2 回行った。
- (11) 0.05 M の Tris-HCl を用いて 15 分間の洗浄を行った。
- (12) DAB 反応による発色を増強させるために、0.01% の DAB, 0.5% 硫酸ニッケルアンモニア, 0.34% のイミダゾールを含む 0.05 M の Tris-HCl 溶液を用いて、DAB 反応前処理を室温で 10 分間行なった。
- (13) 発色を行うために、(12) 溶液に 0.01% の過酸化水素水を含む 0.05 M の Tris-HCl 溶液を用いて 5 分間処理した。
- (14) 0.05 M の Tris-HCl を用いて 15 分間の洗浄を行った。
- (15) 10 mM の PBS を用いて 15 分間の洗浄を 2 回行った。
- (16) PBS 溶液中でスライドガラスに切片を伸展, 乾燥させた。
- (17) 組織切片への透徹を行うために、スライドガラスを有機溶媒 (リモネン液®, ヘモデ) に 20 分間浸漬した。

- (18) 水溶性封入液（マウントクイック）を用いて封入し，自然乾燥させた．

3.12 まとめ

本章では PD モデルラットの作成方法から本研究で用いる評価方法の説明を行った．特に PD モデルラットの RT における前肢運動と姿勢保持の様子を画像解析により定量的に評価し，その運動特性を報告したものはこれまでになく，本研究が初めての試みとなる．次の第 4 章では 6-OHDA 注入前後における運動要素をこの画像解析を用いて比較することで PD モデルラットの運動特性について報告する．

第4章 パーキンソン病モデルラットの運動特性

4.1 目的

第1, 2章で説明したように, PDモデルラットのRTにおける前肢運動の運動要素を詳細に評価した報告はない. 運動要素の変化を調査しPDモデルラットの運動特性を把握することは, 第5章におけるPDモデルラットに対する有酸素運動による効果を判定する際の観察すべき部分を明確にする意味でも大変重要となる. また, PDモデルラットの運動特性とPD患者の運動特性を比べることにより第7章におけるヒトへの汎用性を検討する上でも必要な情報と考えられる.

本章では第3章にて説明したRTに対する画像解析を用いた検査がPDモデルラットに対しても有用な評価となり得るか, 6-OHDA注入前後のRTを比較することで検証した. また, そこからPDモデルラットの運動特性の調査を行った.

4.2 実験手順

実験には成熟した20週齢以上のLong-Evansラット19匹(雄:14匹, 雌:5匹)を用いた. 実験手順を図26に示す. 第3章にて示したようにRTの成功率が70%を超えるまで訓練を行い, 70%を超えたのちに注入前画像検査(PRE)を行った. その後, 6-OHDAを注入しPDモデルラットを作成した. 6-OHDA注入後は6日間の回復期間を設けて作成後7日目(POST1)の測定を行った.

4.3 6-OHDA注入前後における運動要素の解析

分析にはIBM® SPSS Statistics Ver.17.0を用いて統計学的有意水準の危険率は5%とした.

解析方法として各検査項目におけるPREとPOST1のデータを比較し検討

した。統計学的検定法として正規性を示した場合は対応のある t 検定を用いた。正規性を示さない場合は Wilcoxon 検定を用いた。

4.4 目標到達課題に対する 6-OHDA の影響

4.4.1 成功率 (図 27)

PRE と比較し POST1 にて有意な低下を認めた。このことから 6-OHDA の注入が RT の運動要素に影響を与えることがわかった (PRE : $69.2 \pm 3.5\%$ POST1 : $40.5 \pm 4.6\%$ 。統計的検定法 : 対応のある t 検定)。

4.4.2 最大距離

第 2 指と第 5 指の開閉距離において、PRE と比較し POST1 にて軽度の減少傾向を認めたが有意な差を認めなかった。このことから 6-OHDA が指の開閉運動に与える効果は少ないと考えられた (PRE : 18.8 ± 0.5 mm POST1 : 18.1 ± 0.7 mm。統計的検定法 : 対応のある t 検定 $p=0.29$)。

4.4.3 回旋運動 最大角度・最小角度・運動範囲 (図 28)

第 2 指と第 5 指を結んだ直線と水平線からなる回旋運動角度において、最大回外角度を示す最大角度では、PRE と比較し POST1 にて有意な増加を認めた (PRE : $58.1 \pm 2.7^\circ$ POST1 : $64.3 \pm 2.6^\circ$ 。統計的検定法 : 対応のある t 検定)。

最小回外角度を示す最小角度では PRE と比較し POST1 にて有意な増加を認めた (PRE : $13.2 \pm 1.8^\circ$ POST1 : $19.1 \pm 2.7^\circ$ 。統計的検定法 : 対応のある t 検定)。

最大角度から最小角度を減じた回旋運動の運動範囲では有意な差は認めなかった (PRE : $45.1 \pm 2.3^\circ$ POST1 : $45.1 \pm 2.8^\circ$ 。統計的検定法 : 対

応のある t 検定 $p=0.99$) .

これらの結果から、回旋運動は最大角度、最小角度ともに約 6° 増加し、一方で運動範囲は変化を認めていない。このことから、6-OHDA の効果として、前肢運動の回旋角度が全体的に鉛直方向に偏移していることが考えられた。

4.4.4 頭部傾斜角度 (図 29)

手がペレットに触れた瞬間の両涙嚢切痕を結んだ線と水平線からなる頭部傾斜角度は、PRE と比較し POST1 において有意に増加し、RT を行う優位な前肢側へ傾斜していた。このことから、6-OHDA の効果として姿勢保持に対する影響が認められた (PRE : $20.2 \pm 1.2^\circ$ POST1 : $24.6 \pm 1.6^\circ$. 統計的検定法 : 対応のある t 検定) .

4.4.5 ペレットと各指との直線距離 (図 30)

(1) 第 1 指

PRE と比較し POST1 にてペレットとの距離が有意に増加した (PRE : 9.1 ± 0.3 mm POST1 : 10.1 ± 0.3 mm. 統計的検定法 : 対応のある t 検定) .

(2) 第 2 指

PRE と比較し POST1 にてペレットとの距離は減少したが有意な差は認めなかった (PRE : 9.1 ± 0.5 mm POST1 : 8.3 ± 0.5 mm. 統計的検定法 : 対応のある t 検定 $p=0.18$) .

(3) 第3指

PRE と比較し POST1 にてペレットとの距離が有意に減少した (PRE : 8.7 ± 0.4 mm POST1 : 7.2 ± 0.4 mm. 統計的検定法 : 対応のある t 検定).

(4) 第4指

PRE と比較し POST1 にてペレットとの距離が有意に減少した (PRE : 7.1 ± 0.4 mm POST1 : 5.4 ± 0.6 mm. 統計的検定法 : Wilcoxon 検定).

(5) 第5指

PRE と比較し POST1 において有意な差は認めなかった (PRE : 6.6 ± 0.6 mm POST1 : 6.7 ± 0.7 mm. 統計的検定法 : 対応のある t 検定 $p=0.82$).

(6) まとめ

ペレットと各指との直線距離の結果として第1指では POST1 にて有意にペレットより離れ, 第3・4指では有意に近づく結果となった.

4.4.6 まとめ

RT を用いて 6-OHDA 注入による PD モデルラット作成前後の運動要素を測定した. その結果, 成功率は POST1 にて有意に低下した. 正面画像の解析からは, 回旋運動で最大角度・最小角度ともに POST1 で有意に増加する結果を得た. 頭部傾斜角度は POST1 で優位な前肢側に有意に傾斜角度が増加することが示された.

床面画像の解析からは, ペレットと各指における相対距離において第1指では有意に POST1 にてペレットとの距離が離れ, 第3指, 第4指においては有意に POST1 において近づく結果となった.

PRE と POST1 における特徴的な画像を示す (図 31・32) .

4.5 考察

大脳黒質，線条体を含む大脳基底核は主に運動の調整や運動の起始，また姿勢調整に関わる部分である．この大脳基底核機能がドーパミン作動性ニューロンの障害により破綻する疾患が PD である．

RT の実行にはまず前壁に設けられたスリットに対して前肢を適切な角度に回外運動させ壁面に触れず通過させる必要がある．そして，スリットを通過した後は柵に設けられた穴に設置されたペレットを把握するために前肢を回外した状態から反運動となる回内運動をさせる必要が生じる．本研究における最大角度増加の要因として，通常はスリットを通過しペレットを把持するために必要となる最低限の範囲での回旋運動を行えば良い．しかし，一般に PD による症状ではこのような運動の変換動作や調整に障害が生じている．そのため，PD モデルラットにおいても目的行動を遂行するには不足した状態での運動が行われている可能性が考えられた．しかし，運動範囲では PRE と POST1 で変化を認めておらず，前肢運動調整の問題のみの要因で解釈するのは難しい．

頭部傾斜角度を用いた姿勢状態の測定結果においては POST1 で優位な前肢側へ有意に傾斜角度が増加する結果を認めた．一般に PD による症状では姿勢反射障害を主としたバランス障害を認める．この要因として大脳基底核は大脳皮質と脳幹への投射系を介して前皮質脊髓路の活動を修飾することにより体幹や四肢の近位筋を調整して，適切な姿勢反射の出現を促している [22]．そのため，PD 患者においては症状の進行に左右差を生じることから，筋の固縮を強く認める側に傾斜する斜め徴候 (Pisa 症候群: 図 33) [61] を認める事がある．

佐々木らは角度調整が行える傾斜台を用いて傾斜時のラットの頭部・体幹・四肢の動きをデジタルカメラで測定し，その特徴と姿勢調整の関係を報告している [60]．それによると正常のラットでは，傾斜実験において頭部と体幹には独立した姿勢調節システムがあり，傾斜角度が増加しても頭部は水

平位に保持されるとしている。これに対して、本研究における結果では、有意に頭部の角度が変化し、体幹部も連動して傾斜していることが確認できた。このことから姿勢反射障害により頭部と体幹の姿勢制御の問題が生じていると考えられた。

本研究では前肢回旋における最小角度でも有意な角度の増加を示しており、最大角度とほぼ同じ角度だけ回外方向へ変移している。このことを考慮すると回旋角度の最大角度の増加は姿勢調整の障害により相対的に現れた結果である可能性も考えられる。

一方、通常は体幹が傾斜した場合、姿勢反射とともに体幹の傾斜に合わせて四肢が調整され目的行動を遂行することができる。しかし、本研究における POST1 の結果は、前述したように体幹の傾斜に連動し頭部と前肢も運動角度の変化を生じている。このことから前肢の最大角度増加の要因として、PD 症状により生じた姿勢反射障害と運動調整障害によるものが考えられた。

Miklyaeva ら [56]は RT 時の側方面像からペレットを把握し前肢をスリットから抜くまでの前肢運動の変化を測定し、6-OHDA 注入後 60 日後においても RT における前肢の挙上角度が低下することを報告している。これは障害が局所ではなく全身で生じていることを示しており、本研究の結果も体幹・四肢全体で生じた問題として捉えることができる。

これまで RT を用いた PD モデルラットに対する研究は前肢機能を中心に行われてきたが [56][62]、姿勢反射に関する検討は十分に行われていない。本研究の結果は PD モデルラットの運動評価を行う際には姿勢反射に対する検討の必要性を提唱するとともに、PD 患者においても認められる姿勢反射障害による斜め徴候を捉える事ができたものと考えられた。

本研究の結果として底面より測定した各指の指尖とペレットの直線距離において第 1 指は POST1 でペレットから有意に離れ、第 3 指、第 4 指で有意に近くなる結果となった。

ペレットと接触する瞬間の画像として PRE (図 31) ではペレットに対して各手指が平行に位置した状態で接触している。一方、POST1 (図 32) ではペ

レットとの接触時には手指部が回外し、指全体がペレットに対して外側に変移していることが確認できた。この要因として PD による運動調整障害による前肢の回外方向への変移に加え、姿勢の変化も伴い手指部分はさらに回外方向へ変移したことが考えられた。そして、結果としてペレットに対し、第 3 指、第 4 指がペレット直上を通過するのに必要な高度を保つことはができず、他の指よりも先行してペレットに接触してしまった。すなわち、第 3 指、第 4 指とペレットの相対距離は有意に近づき、最も遠位にある第 1 指は有意に離れる結果になったと考えられた。

RT における各手指の機能要素として、ラットの第 5 指は手の位置を安定させる働きを担っており [63]、第 1 指はペレットの把握に機能的な意味はないとされている [64]。すなわち第 2 指、第 3 指、第 4 指がペレットを握るために重要な役割を担っている。そのため、本研究においてペレットと第 3 指、第 4 指の距離に変移が生じたことが成功率の低下に直接的に影響を与えていることが考えられた。

以上より 6-OHDA の注入により作成した片側 PD モデルラットの運動要素の特徴は、手指の開閉運動よりも回旋運動における運動調整での障害を認めることが示された。また、姿勢においても RT を行う優位な前肢側へ傾斜を増す結果となり、姿勢反射障害が認められた。そして、回旋運動に対する運動調整の障害と姿勢反射障害により、ペレットを把握する際の手の角度に回外方向への変移が引き起こされた。そして、結果として、第 3・4 指の指尖とペレットの相対位置が接近し過ぎることでペレットに指尖が衝突し RT 成功率の低下を招いていることが考えられた。このことは RT を用いて PD ラットの運動要素を検討する際には、前肢運動のみでなく、全身の運動変化を総合的に検討する必要性を示している。

本研究は世界で初めて PD モデルラットにおける PD 症状を動態解析した報告である。本研究の結果は PD モデルラットの特性を明確にできたのみでなく、PD モデルラットの運動症状を緩和する手法の効果を検証する際に観察すべき運動要素も明確にした。

PD 患者では歩行時の衝突回避のための方向転換や着座のための椅子など目標物の前, 食事においては食べようとした食品に箸を進める際に「すくみ」といった意思とは関係なく目的運動の初動までに時間を要する障害が認められる。本研究の結果からはこの「すくみ」を定量的に捉えることができなかった。しかし, 測定中には前壁のスリットに対して前肢を伸ばすまでに時間を要する個体を認めており「すくみ」様の現象は確認できた。

この第4章では6-OHDA注入による片側PDモデルラットにおけるRT遂行時の前肢と姿勢状態の運動特性を捉え, 第5章で述べる有酸素運動効果の検証すべき運動要素を明確にした。これにより本研究は有酸素運動の有用性の検証に移行した。

第 5 章 パーキンソン病モデル動物に対する有酸素運動の 効果に関する研究

5.1 目的

第 4 章で PD モデルラットの評価として画像解析を用いた RT の有用性が示され、また、結果からは前肢の回旋運動における運動調整と姿勢反射の問題が確認できた。本章では第 4 章で明確になった PD モデルラットの運動特性における変化を中心に有酸素運動がもたらす効果を報告する。

5.2 実験手順

検討には 20 週齢以上の成熟した Long-Evans ラット 19 匹（雄：14 匹，雌：5 匹）を用いた。19 匹のラットのうち 10 匹（雄：9 匹，雌：1 匹）を運動群，9 匹（雄：5 匹，雌：4 匹）をコントロール群とした。なお，先行研究において RT 実行時のラットの四肢運動と成功率には性差がないことが示されている [65-66]。

実験手順を図 34 に示す。PRE および POST1 の測定は第 4 章にて示した実験手順と同様に RT の成功率が 70%を超えた時点で運動前の測定 (PRE) を行い，6-OHDA 注入後から 6 日間の回復期を設けて 7 日目の測定 (POST1) を行った。その後，両群共に 1 セッション 20 施行の RT を実施した。運動群に対しては RT に加えてホイール型運動装置での有酸素運動を実施した。21 日目 (POST2) と 35 日目 (POST3) に運動効果の判定として RT の評価を行った。

5.3 運動方法

第 2 章で提示したように運動負荷は，先行研究 [41-44]により様々な設定で行われている (表 6)。本研究ではこれらを参考に，ホイール型運動装置内での運動を 1 日 30 分間，1 週間に 5 回とし，運動負荷は 10 m/min とし実施した (先行研究の中間程度)。中間程度にした理由として，ストレスは神経

新生に対して強い抑制をもたらすことが報告されており、ラットにおいては拘束によるストレスも同様の結果が示されている [67]。そのため、本研究では可能な限りストレスを避けるためにこのような設定とした。

5.4 ホイール型運動装置の概要

自作したホイール型運動装置を図 35 に示す。ホイール型運動装置は厚さ 5 mm の透明アクリル性円柱（直径 50 cm, 幅 15 cm）で片面に対してアクリル円盤が設置されている。そしてアクリル円盤側の中心部がモーター装置に固定され、0-35 cm/s の任意の速度に調整することができる。動物はこの中に置かれ、4 足での歩行運動を継続的に行わせた。

運動中はアクリル円盤の反対側より逃走しない様にアクリル円盤と同型の蓋を作成し設置した（図 36）。

運動中に排泄物が運動装置内に排出された場合は運動時間の測定を止め、適宜清掃し歩行への影響を排除した。

ホイール型運動装置での運動方法の学習として、運動導入から約 2-3 回は餌を使用し、運動方向を誘導することで安定したホイール内での歩行を獲得させた。

5.5 アポモルフィン誘発回転検査

第 2 章で述べたように PD モデルラットではアポモルヒネ塩酸塩水和物（アポカイン®）の注入により、損傷側で増加したドーパミン受容体が反応し、結果として損傷側と反対側方向（脳健常側）への継続した回転運動が生じる。一方、ドーパミン作動性ニューロンの残存が多ければ、ドーパミン受容体の補償的な増加が抑制され、本検査における回転数は減少する。この現象を利用し、一定時間内の回転数を測定することでドーパミン作動性ニューロンの残存状況の把握に用いることができる。本研究においてはアポカイン®を生理食塩水にて希釈し、1.0 mg/ml 濃度とし 1.0 mg/kg を腹腔投与した。

アポモルフィン誘発回転検査の時期として、先行研究 [68] より、注入から 5 週目以降の検査が推奨されていることを参考に、術後 36-37 日目に検査を

実施した。本研究では Tuon ら [41]と同様に直径 28 cm の円柱型の容器内にて 30 分間のアポモルフィン誘発回転検査を実施した (図 37)。解析項目としては 30 分間の脳健常側への総回転数 (脳健常側回転数), 5 分毎の脳健常側への回転数の最大値 (最大回転数), および, 30 分間の両方向への回転数の和に対する脳健常側への回転比 (回転比) を求めた。

5.6 有酸素運動効果の解析

分析には IBM® SPSS Statistics Ver.17.0 を用いて統計学的有意水準の危険率は 5%とした。

5.6.1 運動群, コントロール群の RT 各検査項目における測定時期および運動介入による変化の比較

運動群, コントロール群の各検査項目における POST1, POST2, POST3 の結果から PRE との変化量を求めた。そして, それらを対応のない 2 元配置分散分析を用いて測定時期と運動介入の有無による変化を比較した。有意差を認めた場合の事後解析には Bonferroni 法を用いた。

5.6.2 成功率に影響を与える目標到達課題の測定項目の調査

5.6.1 と同様に POST1, POST2, POST3 の各測定結果における変化量を算出し, その後すべてを合わせ, 成功率に影響を与える RT の測定項目の調査を Spearman の順位相関係数を用いて実施した。

5.6.3 運動群, コントロール群のアポモルフィン誘発回転検査の比較

運動群, コントロール群におけるアポモルフィン誘発回転検査の脳健常側回転数, 最大回転数, 回転比の比較として, 正規性および等分散性を示

した場合は Student's t 検定を用いた。正規性を示し、等分散性を示さない場合 Weich's 検定を用いた。正規性を示さない場合は Mann-Whitney's U 検定を用いた。

5.7 目標到達課題に対する運動介入の効果

5.7.1 成功率 (図 38)

成功率では 2 元配置分散分析の結果、交互作用を認めた。運動群では POST2 の時点で RT 成功率がコントロール群に比べ大幅に改善し、POST3 においても改善傾向が継続していることがわかる (運動群 POST1: $-29.5 \pm 3.2\%$, POST2: $-13.5 \pm 4.0\%$, POST3: $-3.0 \pm 4.2\%$)。一方、コントロール群では、POST2 にて RT 成功率はさらに低下を示すが、POST3 では軽度の改善を示している (コントロール群 POST1: $-27.7 \pm 7.4\%$ POST2: $-40.0 \pm 6.8\%$ POST3: $-31.1 \pm 8.5\%$)。

以上より、運動の効果として早期より成功率を経時的に改善させることが示された。また、運動を行わない場合、成功率は悪化した後、一定期間経過後には改善する傾向が示された。

5.7.2 最大距離

最大距離では、測定時期、運動介入の有無による比較に有意な差は認めなかった (運動群 POST1: -1.3 ± 0.7 mm, POST2: -0.01 ± 1.1 mm, POST3: 0.6 ± 0.9 mm, コントロール群 POST1: 0.2 ± 0.9 mm, POST2: -0.4 ± 1.3 mm, POST3: -0.09 ± 0.7 mm. 統計的検定法: 2 元配置分散分析 測定時期 $p=0.29$, 運動介入の有無 $p=0.90$)。

両群ともに経時的な改善傾向を示したが、測定時期や運動効果による有意な変化は認められなかった。

5.7.3 回旋運動 最大角度・最小角度・運動範囲

最大角度では，測定時期，運動介入の有無による比較に有意な差は認めなかった（運動群 POST1： $4.9 \pm 1.8^\circ$ ，POST2： $1.7 \pm 2.3^\circ$ ，POST3： $4.0 \pm 2.8^\circ$ ，コントロール群 POST1： $9.4 \pm 4.1^\circ$ ，POST2： $8.9 \pm 2.9^\circ$ ，POST3： $7.4 \pm 2.4^\circ$ ．統計的検定法：2元配置分散分析 測定時期 $p=0.68$ ，運動介入の有無 $p=0.51$ ）．

最小角度では，測定時期，運動介入の有無による比較に有意な差は認めなかった（運動群 POST1： $7.8 \pm 1.8^\circ$ ，POST2： $2.0 \pm 2.4^\circ$ ，POST3： $4.2 \pm 2.4^\circ$ ，コントロール群 POST1： $5.0 \pm 3.0^\circ$ ，POST2： $8.6 \pm 3.0^\circ$ ，POST3： $10.2 \pm 3.2^\circ$ ．統計的検定法：2元配置分散分析 測定時期 $p=0.75$ ，運動介入の有無 $p=0.32$ ）．

運動範囲では，測定時期，運動介入の有無による比較に有意な差は認めなかった（運動群 POST1： $-3.3 \pm 2.9^\circ$ ，POST2： $-0.6 \pm 2.9^\circ$ ，POST3： $-0.4 \pm 4.1^\circ$ ，コントロール群 POST1： $4.5 \pm 2.8^\circ$ ，POST2： $0.3 \pm 2.3^\circ$ ，POST3： $-2.7 \pm 2.9^\circ$ ．統計的検定法：2元配置分散分析 測定時期 $p=0.67$ ，運動介入の有無 $p=0.51$ ）．

これらの結果から，両群ともに経時的な変化は示さず，また，運動介入の差も示さなかった．しかし，運動群ではすべての評価項目の結果において，6-OHDA 注入前の値に近づいていた．一方，コントロール群では，最小角度が経時的に増加し，運動範囲は減少する傾向を示した．

5.7.4 頭部傾斜角度 (図 39)

頭部傾斜角度の測定時期では，2元配置分散分析の結果，測定時期において POST1 と POST3, POST2 と POST3 の間で有意に POST3 で優位な前肢側への傾斜角度の低下を認めた（運動群 POST1： $-6.1 \pm 1.1^\circ$ ，POST2： $-2.4 \pm 1.1^\circ$ ，POST3： $-1.0 \pm 0.5^\circ$ ，コントロール群 POST1： $5.7 \pm 1.5^\circ$ ，POST2： $5.5 \pm 0.6^\circ$ ，POST3： $2.2 \pm 1.0^\circ$ ．統計的検定法：

Bonferroni 法) . 運動介入の有無では有意な差は認めなかった (統計的検定法 : 2 元配置分散分析. $p=0.17$).

以上より, 両群ともに経時的に改善することが示されたが, 運動群が POST1 と POST2 の比較で大きく改善を示すのに対し, コントロール群では POST2 と POST3 の比較で大きな改善を示した. このことから, 両群の改善時期には差があることが示された.

5.7.5 ペレットと各指との直線距離

(1) 第 1 指

第 1 指では, 測定時期, 運動介入の有無による比較に有意な差は認めなかった (運動群 POST1 : 1.0 ± 0.5 mm, POST2 : 1.0 ± 0.3 mm, POST3 : 0.4 ± 0.3 mm, コントロール群 POST1 : 0.9 ± 0.3 mm, POST2 : 1.5 ± 0.6 mm, POST3 : 0.2 ± 0.7 mm. 統計的検定法 : 2 元配置分散分析 測定時期 $p=0.06$, 運動介入の有無 $p=0.89$) .

(2) 第 2 指

第 2 指では, 測定時期, 運動介入の有無による比較に有意な差は認めなかった (運動群 POST1 : -0.7 ± 0.6 mm, POST2 : 0.1 ± 0.7 mm, POST3 : 1.0 ± 0.5 mm, コントロール群 POST1 : -0.7 ± 0.9 mm, POST2 : 0.3 ± 1.0 mm, POST3 : -0.2 ± 0.3 mm. 統計的検定法 : 2 元配置分散分析 測定時期 $p=0.14$, 運動介入の有無 $p=0.60$) .

(3) 第 3 指

第 3 指では, 測定時期, 運動介入の有無による比較に有意な差は認めなかった (運動群 POST1 : -1.6 ± 0.5 mm, POST2 : -0.1 ± 0.8 mm, POST3 : 1.1 ± 0.6 mm, コントロール群 POST1 : -1.3 ± 0.6 mm, POST2 : -1.5 ± 1.5 mm, POST3 : -1.5 ± 0.9 mm. 統計的検定法 : 2

元配置分散分析 測定時期 $p=0.09$, 運動介入の有無 $p=0.22$).

(4) 第4指 (図 40)

第4指では2元配置分散分析の結果, 交互作用を認めた. 運動群ではPOST1においてはコントロール群よりもPREよりペレットへ近づいている結果を示したが, POST2では同程度となり, POST3では, PRE程度まで改善を認めた (POST1: -2.5 ± 0.5 mm, POST2: -0.9 ± 0.8 mm, POST3: 1.1 ± 0.6 mm). コントロール群ではPOST1, POST2, POST3と徐々にペレットへ近づく傾向を示した (POST1: -0.8 ± 0.6 mm POST2: $-1.3 \pm 0.6\%$ POST3: $-1.7 \pm 1.0\%$).

(5) 第5指

第5指では, 測定時期, 運動介入の有無による比較に有意な差は認めなかった (運動群 POST1: -0.3 ± 0.6 mm, POST2: -0.4 ± 0.7 mm, POST3: -0.8 ± 0.6 mm, コントロール群 POST1: 0.6 ± 1.1 mm, POST2: -0.1 ± 0.8 mm, POST3: -1.5 ± 0.7 mm. 統計的検定法: 2元配置分散分析 測定時期 $p=0.84$, 運動介入の有無 $p=0.60$)

(6) まとめ

以上より, 運動群ではRTでペレットを把握するのに重要と考えられる第2, 3, 4指とペレットとの距離が経時的に延長する傾向が示された. 一方, コントロール群においては第1指以外の指は, 6-OHDA注入前に比べると測定期間を通じてペレットとの距離が近づく傾向を示した.

5.7.6 成功率に影響を与える目標到達課題の測定項目の相関関係 (表 7)

成功率に対する RT の各測定項目の相関関係として、回旋運動の最大角度、最小角度、頭部傾斜角度において有意な負の相関を認めた (回旋角度 最大値 $\rho = -0.42$, 最小値 $\rho = -0.26$, 頭部傾斜角度 $\rho = -0.26$) .

このことより、回旋運動の範囲が鉛直方向へ変移することが成功率低下の要因であると考えられた。また、同時に頭部傾斜角度も RT を行う優位な前肢側へ傾斜が増すことで成功率が低下しており、前肢のみでなく、全身的な傾斜が成功率に関係する可能性が示唆された。

5.7.7 アポモルフィン誘発回転検査

(1) 脳健常側回転数 (図 41-A)

コントロール群と比較し運動群において有意に回転数が少なかった (運動群 : 16.8 ± 2.3 回 コントロール群 : 105.1 ± 30.7 回. 統計的検定法 : Mann-Whitney's U 検定) .

(2) 最大回転数 (図 41-B)

コントロール群と比較し運動群において有意に回転数が少なかった (運動群 : 7.7 ± 2.7 回 コントロール群 : 26.8 ± 7.4 回. 統計的検定法 : Student's t 検定) .

(3) 回転比 (図 41-C)

コントロール群と比較し運動群において有意に脳健常側への回転比が少なかった (運動群 : $39.6 \pm 12.2\%$ コントロール群 : $81.6 \pm 7.5\%$. 統計的検定法 : Mann-Whitney's U 検定) .

(4) まとめ

以上より、運動群では長期的な回転状況だけでなく、短期的に調査した回転頻度も減少していた。また、回転比においても左右差が少ないことから、薬剤に対する反応性が低いことが示された。

5.7.8 まとめ

6-OHDA 注入後の経時的な変化と運動介入による効果を比較した結果、経時的な変化として、運動群では POST2 で RT 成功率の改善を認めた。また、運動要素においても頭部傾斜角度の改善が POST2 より認められており、6-OHDA 注入からの機能改善が早期より引き起こされることが示された。

一方、コントロール群においては成功率、頭部傾斜角度の改善が POST3 で確認されており、運動群に比べると改善時期の遅延が示された。

RT の成功率に関連する評価項目の調査では回旋運動における最大角度、最小角度、頭部傾斜角度においていずれも負の相関を示した。このことより頭部（体幹）や前肢における傾斜の変化が成功率に関連することが示された。

アポモルフィン誘発回転検査の結果からは運動群の薬剤に対する反応性の低下が示された。

5.8 考察

PD モデルラットに対する有酸素運動効果は、第 2 章で示したように多くの報告で脳神経機能に対する有用性が認められているが[41-44]、運動要素に関する報告はこれまでになく、本研究により世界で初めてその効果が示された。しかし、一方で Maldonado ら[69]は、脳卒中ラットモデルを作成し、RT の成功率と動物に実施させる運動の種類による機能回復の違いを検討してい

る。その報告では、運動として RT のみを行かせた群と RT とランニングホイールによる運動の両方を行かせた群での成功率の回復は有意な差がないとした。そして、RT のような技術を要する運動とホイールを使用する持続的な運動では別の効果を認め、持続的な運動では直接的に運動技術への改善効果は認めないという見解を示している。

PD と脳卒中の病態における大きな違いとして、PD では運動に直接関与している運動野の障害は認めない。そのため、錐体路の障害による運動麻痺は発生しない。一方、脳卒中では運動野の損傷を生じているため運動麻痺が認められ、運動介入による神経の回復過程においても、損傷部以外の残存している神経細胞間の連絡強化による改善過程が認められる。

PD においてはドーパミン作動性ニューロンの障害によりドーパミンの産生機能が失われる。そして、結果的に運動野にて構成された運動命令に対して修飾的に働くことができなくなり、運動の調整機能に障害が生じることで様々な運動障害を発症させている。そのため、運動介入による効果としても、脳卒中後のような神経細胞間の連絡強化による神経機能回復に比べより選択的であり、ドーパミンの産生の回復のみが求められる。このような違いが両疾患の間には存在しており、PD に対する運動効果としては単純に脳卒中モデルと比較できないこと、ドーパミン作動性ニューロンの回復に関する有用性が多く報告されていることを加味すると、本研究における有酸素運動が運動要素に対して改善効果を示したことは十分に考えられる。

6-OHDA の薬剤効果として Jeon ら [70]は、6-OHDA 注入後 12 時間後の検証で黒質線条体における大量の神経細胞死を確認し、その変性は 31 日間低レベルで持続したことを報告している。

本研究の結果より、成功率の変化として運動群では POST2 から POST3 まで継続的な改善を認めた。一方、コントロール群における成功率は POST3 で軽度の改善を示したが運動群と比較する成功率は低く、回復の時期の遅延も認められた。第 4 章の考察でも述べたが、成功率には運動の変換機能（前肢の回旋運動）と姿勢調整機能（頭部傾斜角度）が協調的に関連していると考

えられる。すなわち、ペレットの把持直前におけるペレットと手掌面の相対的位置関係が重要であり、回旋運動の最小角度が増加すると第3・4指とペレットとの距離が近づき接触することで把握運動を阻害し成功率低下を招いていると考えられる。成功率に関連する RT の測定項目を特定するために実施した相関関係の統計的検討からも、回旋運動の最大角度、最小角度、および頭部傾斜角度に有意な相関関係を認め、この考えを支持する結果が得られた。

本研究の結果からは頭部傾斜角度においては POST3 では両群で有意な改善を認め、特に運動群ではコントロール群に比べ早期からの改善傾向を示している。また、回旋運動の最小角度も有意な変化は認めていないものの、運動群ではコントロール群に比べ POST2, POST3 とともに PRE に近づき回復傾向を示している。そして、第4指の結果においても運動群ではコントロール群に比べ POST2, POST3 と PRE に近づく傾向を示している。これらの変化がペレットと手掌面の相対的位置関係を改善した結果として、成功率の改善に繋がったと考えられた。

RT の成功率や運動要素の改善をもたらした要因として、本研究では測定のタイミングを 6-OHDA 注入前 (PRE) , 注入後 7 日目 (POST1) , 21 日目 (POST2) , 35 日目 (POST3) と設定している。6-OHDA の薬剤効果が約 30 日間継続することを考慮すると、ドーパミン作動性ニューロンの継続的な減少による PD 症状の増悪もこれに関連することが考えられる。そして、運動要素もそれを反映するように経時的な低下が生じ、結果としても 30 日前後 (POST3) まで増悪が継続したと考えられる。それを裏付けるようにコントロール群においては成功率、頭部傾斜角度ともに運動群に比べ回復時期の遅延を認めた。

一方、運動群の成功率の結果では早期より改善を示した。この要因として、コントロール群が 6-OHDA の継続的な薬剤効果によりドーパミン細胞の減少が進行したのに対し、運動群では先行研究と同様に運動介入による効果として、神経保護に作用する BDNF が放出され、PD 症状の進行を予防できたためと考えられる。これはアポモルフィン誘発回転検査においても、運動群ではコ

ントロール群に比べ脳健常側への回転数が少ない結果を示しており、ドーパミン作動性ニューロンの残存が多いことを示す結果が得られている。

以上より本研究における有酸素運動効果として、これまでに報告されている BDNF を中心とした神経保護作用により 6-OHDA 注入後 7 日目からの運動が BDNF の発現を促進させ、6-OHDA による継続的なドーパミン作動性ニューロンの変性を抑制し、ドーパミンの産生を維持したことが考えられた。また、Nakai ら[71]は、6-OHDA を 1 週間連続投与した猫の視覚野におけるカテコルアミン受容体の変化を調査した。その結果、注入から 24 週間後には 6-OHDA により破壊された受容体が正常と同程度に改善したことを報告している。ドーパミンもカテコルアミンに属していることから、カテコルアミン受容体において可塑性を認めていることは、ドーパミン作動性ニューロンでも同様に再生が促され、改善に関与したことも想像される。

本章の結果より運動は神経細胞の保護に作用することが認められた。また、このことは進行性の疾患である PD の症状に対して、運動を行うことにより症状の進行を抑制または改善できる可能性を示した。そして、これまでの報告では十分に検討されていなかった運動要素の改善に関する結果を初めて明らかにできたことは、今後の PD に対する研究の方向性を決める重要な情報となりえたと考えている。

本章の課題として、PD 症状の改善には進行の抑制、ドーパミン産生能や受容体数の増加など様々な影響が考えられる。したがって、運動がいかにして細胞分子機構により BDNF を増加させ、増加した BDNF がどのようにドーパミンの伝達に関連する機能を保護、再生するかを詳細に調査することが必要と考えられた。

第 6 章では基礎研究と臨床研究の関連性を検討するために、第 5 章で確認された PD モデルラットにおける有酸素運動効果を参照し PD 患者に対する有酸素運動効果を検証した

第 6 章 パーキンソン病患者に対する有酸素運動の効果に関する研究

6.1 目的

第 4 章における RT の画像解析から、PD モデルラットの特長として回旋運動を中心とした運動調整の障害と姿勢反射障害が生じることが本研究より示された。また、第 5 章の結果からは有酸素運動により有意に RT における成功率が改善する結果が示され、その要因として 6-OHDA によるドーパミン作動性ニューロンの変性に対する抑制効果の可能性が示唆された。これは PD 症状に対する運動の有用性を示し、多くの先行研究 [41-44] を支持する結果となった。そして、本研究はさらに PD 症状を反映した運動要素を特定したことで、これまでにない PD モデルラットの運動特性の変化を含めた結果を示すことができた。本章ではこれまでに得られた結果を参照し、PD 患者に対する有酸素運動効果を検証した。特に PD モデルラットにおける特性と比較するため、PD 患者の測定に関しても指タップテストによる手指運動を画像解析できる機器を導入し運動効果を検証した。

6.2 対象としたパーキンソン病患者

対象は全国パーキンソン病友の会（群馬県支部、埼玉県支部、栃木県支部）に所属し、歩行が自立した状態で在宅にて生活をしている PD 患者 45 名とした。そして、以下の除外基準を設けた結果、本研究では 25 名（年齢：71.3±0.8 歳、性別 男性：7 名、女性：18 名、H&Y：2.8±0.1）を解析対象とした。対象者の詳細は表 8 に示す。

本研究における対象者の特徴は、女性が多く、症状が軽症から中等度であることが挙げられる。

除外基準と除外人数を以下に示す.

- (1) 介入前後に実施した 2 回の測定において介入後の測定に参加できなかったもの : 8 名
- (2) 運動実施日数 (20 分未満は対象外) が期間中の 1/2 未満であったもの : 5 名
- (3) 4 日以上連続したリハビリテーションの中断があったもの : 1 名
- (4) 運動に支障を与える疼痛等を有するもの : 1 名
- (5) 介入期間中に PD に対する内服内容に変更があったもの : 1 名
- (6) 測定不備等により測定データの一部に欠如を認めたもの : 4 名

6.3 倫理的配慮

研究の実施にあたり研究者が研究対象者に対して、研究内容を書面および口頭にて説明し研究参加の承諾を得た。また、本研究は対象者の主治医の了承を得て実施した。本研究は高崎健康福祉大学倫理審査委員会の承認を得て実施した (承認番号 : No.2717)。

6.4 運動方法

運動方法として市販のペダル運動機器 (図 42) による 4 週間 1 日 20 分の有酸素運動を自主運動にて在宅で実施した。床面の形状により運動機器が運動中に不安定とならないよう運動中は滑り止めマットを機器下部に敷いた。

運動は PD に対する内服薬が効いている状態 (ON の状態) での実施を依頼した。運動強度は糖尿病ガイドラインによる有酸素運動の推奨強度である中等度とし、年齢より運動中の目標脈拍数を算出した (計算式 : $138 - \text{年齢}/2$) [72]。そして、運動中はサチュレーションモニターにより脈拍数を確認し、で

きる限り目標とする脈拍数を維持するように依頼した。

運動介入中は運動状況に関して、運動実施の有無、運動時間、運動中の体調、その他（体調の変化など）の情報の記録を毎日依頼した。運動状況の詳細を表 8 に示す。

6.5 測定項目

本研究では介入前後で計 2 回の PD における 1 次機能障害と運動機能に対する評価を実施した。なお、内服時間による薬効の影響が生じないように 2 回の測定時間は統一して実施した。

6.5.1 歩行能力

10 m の歩行路の中間に 480 cm のシート式歩行分析装置システム（ウォーク way MW-1000 アニマ株式会社：図 43）を用いて、歩行速度（cm/sec）、ケイデンス（step/min）、ストライド（cm）を測定した。検討には 2 回の平均値を用いた。歩行速度は快適歩行とした。

6.5.2 下肢筋力

下肢の筋力として Hand-Held Dynamometer (HHD)（ μ Tas F-1 アニマ株式会社：図 44）を用いて大腿四頭筋筋力を測定した。測定は左右で 2 回ずつ行い、検討には左右の 2 回ずつの合計（計 4 回分）の平均値を用いた。

6.5.3 パーキンソン病の 1 次障害に対する評価

(1) パーキンソン病総合評価

Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part3 (UPDRS3) を用いた。UPDRS は世界中の研究者や医師に広く利用されている PD の総合評価尺度である。4 分野（精神機能・行動、日常生活、運動能力、治療の合併症）に分けられており、全体で 42 の項目を 0（正常）-4（重度）の 5 段階に分けて総合得点で評価し得点が高いほど重症となる。

本研究では4分野のうちの運動能力分野となる Part3 (18項目) の評価 (得点範囲 : 0-72) を用いた。以下に 18 項目の詳細を記載する。

① 言語

患者が自由に話す言葉を聞き、声量や抑揚、明確さから評価する。0は「言語障害なし」、4は「ほとんどの言語が理解困難、あるいは判然としない」となる。

② 顔の表情

安静時と会話時を含めて 10 秒間の観察から、まばたきの頻度、仮面用顔貌または表情の乏しさなどを評価する。0は「正常な表情」、4は「仮面用顔貌があり、口を動かしていないとき、口はほとんどの時間閉じていない」となる。

③ 固縮

リラックスした状態で、四肢、頸部の主な関節をゆっくりと他動的に動かして受ける抵抗から評価を行う。0は「なし」、4は「誘発法を用いずに固縮を検出できる。評価者が関節可動域全域を動かすことができない」となる。

④ 指タッピング

第1指と第2指をできるだけすばやく、大きく 10 回タップする。0は「異常なし」、4は「運動の遂行が、動作の遅さ、中断、振幅の減衰などのため、不可能あるいは非常に難しい」となる。

⑤ 手の運動

手を握った状態から素早く開く動作をできるだけ速く 10 回行う。評価基準は④指タッピングと同様。

⑥ 手の回内と回外運動

手掌を下に向け、それから上、下と交互にできるだけ速く 10 回行う。評価基準は④指タッピングと同様。

- ⑦ つま先のタッピング
踵を床につけて、つま先でできるだけ大きく、速くタッピングを行う。評価基準は④指タッピングと同様。
- ⑧ 下肢の敏捷性
椅子に座り踵を床に着けて、できるだけ高く、速く 10 回足を上げる。評価基準は④指タッピングと同様。
- ⑨ 椅子からの立ち上がり
椅子に座った状態から腕を胸の前で組み立ち上がる。0 は「問題なし。躊躇なくすぐに立ちあがれる」、4 は「介助がなければ立ち上がることができない」となる。
- ⑩ 歩行
10 m 歩き、方向転換をして評価者のところまで戻るまでの様子を観察する。0 は「問題なし」、4 は「全く歩けない。あるいは人の介助があれば歩ける」となる。
- ⑪ 歩行のすくみ
歩行開始時のすくみや「つかかかる」様な動きの有無を観察して評価する。0 は「すくみ足なし」、4 は「まっすぐ歩いているあいだに何回もすくむ」となる。
- ⑫ 姿勢の安定性
開眼し起立した患者を急速に、力強く肩を後方へ引いた際に生じる反応を観察する。0 は「問題なし。1, 2 歩で姿勢を戻せる」、4 は「非常に不安定で、自然あるいは肩を軽く引いただけでバランスを崩す」となる。
- ⑬ 姿勢
椅子から立ち上がったあとの立位、歩行中、姿勢反射検査の時の姿勢を観察する。0 は「問題なし」、4 は「重度の姿勢異常を伴っ

た前屈，側弯，一側への傾き」となる。

⑭ 運動の全般的な自発性（身体の動作緩慢）

全ての動作に対する遅さやためらい，乏しさを評価する。0は「問題なし」，4は「重度の全般的な遅さや自発的な運動の乏しさ」となる。

⑮ 手の姿勢時振戦

患者は上肢を身体の前に伸ばした状態を10秒間保持し，姿勢を保つと再出現する静止時振戦を含むすべての振戦を振幅の大きさを評価する。0は「振戦なし」，4は「振戦があり，振幅は10cm以上」となる。

⑯ 手の運動時振戦

鼻指試験（患者は第2指を伸ばし，自分の鼻と評価者の指を交互に触る）を用いて運動時の振戦を振幅の大きさを評価する。評価基準は⑮手の姿勢時振戦と同様。

⑰ 静止時振戦の振幅

10秒間の安静座位をとり，その際に観察された四肢と唇もしくは下顎の最大振幅を評価する。0は「振戦なし」，4は「最大振幅>10cm」となる。

⑱ 静止時振戦の持続性

測定中に観察された振戦の持続状況をまとめて評価する。0は「振戦なし」，4は「静止時振戦は全診療時間の75%を超えてみられる」となる。

(2) 指タップテスト（図45・46）

運動症状の評価として指タップテストを用いた。指タップテストはUPDSR3内にも用いられているPD症状を測定する方法の1つである。本来は第1指と第2指の10回のタップから開閉運動の回数や振幅の様

子を目視にて測定する。しかし、本研究では我々が開発した画像解析による指の開閉速度や運動の軌跡を定量的に測定できる機械（竹井機器工業株式会社）を用いた。

画像解析の方法を以下に示す。

- ① 被験者はマーカー付きの手袋を着用し専用の台に手を載せる。
- ② 手袋に向け赤外線を照射し専用のハイスピードカメラで画像を撮影する。動作指示は UPDRS3 と同様に「できるだけ速く大きく動かす」ように依頼した。
- ③ 専用ソフトを用いて解析を行った。
解析項目を以下に示す。解析は運動開始から 5 回分の指タップを対象とした。
 - 1) 左右の第 1 指と第 2 指の総軌跡長の平均（以下、総軌跡長）
 - 2) 左右の第 1 指と第 2 指の最大開き距離の平均（以下、最大距離）
 - 3) 左右の第 1 指と第 2 指における運動速度の平均（以下、運動速度）

6.6 有酸素運動効果の解析

分析には IBM® SPSS Statistics Ver.17.0 を用いて統計学的有意水準の危険率は 5%とした。

解析方法として各検査項目における有酸素運動による介入前と介入後のデータを比較し検討した。統計学的検定法として正規性を示した場合は対応のある t 検定を用いた。正規性を示さない場合は Wilcoxon 検定を用いた。

6.7 有酸素運動による効果

6.7.1 歩行能力

(1) 歩行速度 (図 47)

介入前と比較し介入後において有意な増加を認めた (介入前 : 85.8 ± 6.0 cm/sec 介入後 : 90.6 ± 5.6 cm/sec. 統計的検定法 : 対応のある t 検定) .

(2) ケイデンス

介入前と比較し介入後において増加傾向を示したが有意な差は認めなかった (介入前 : 112.0 ± 2.8 step/min 介入後 : 115.1 ± 2.0 step/min. 統計的検定法 : Wilcoxon 検定 $p=0.42$) .

(3) ストライド

介入前と比較し介入後において増加傾向を示したが有意な差は認めなかった (介入前 : 90.3 ± 5.5 cm 介入後 : 93.0 ± 5.4 cm. 統計的検定法 : 対応のある t 検定 $p=0.21$) .

(4) まとめ

歩行能力においては速度のみ有意な増加を認めたが、ケイデンス、ストライドにおいても介入後は増加を示している。このことから、本研究における有酸素運動が歩行能力の向上に効果的であることが考えられた。

6.7.2 下肢筋力

介入前と比較し介入後において増加傾向を示したが有意な差は認めなかった (介入前 : 129.6 ± 7.8 N 介入後 : 132.1 ± 7.3 N. 統計的検定法 : 対応のある t 検定 $p=0.61$) . このことより、本研究における有酸素運動は筋力の最大値の向上には効果的でないことが考えられた。

6.7.3 パーキンソン病の1次障害に対する評価

(1) UPDRS3 (図 48)

介入前と比較し介入後において有意な改善を認めた (介入前 : 11.4 ± 1.5 介入後 : 7.9 ± 1.7 . 統計的検定法 : Wilcoxon 検定) . このことから, 本研究における有酸素運動が PD 症状に効果的であることが考えられた.

(2) 指タップテスト

1) 総軌跡長 (図 49)

介入前と比較し介入後において有意な増加を認めた (介入前 : 533.4 ± 34.2 mm 介入後 604.1 ± 26.7 mm. 統計的検定法 : 対応のある t 検定) .

2) 最大距離

介入前と比較し介入後において増加傾向を示したが有意な差は認めなかった (介入前 : 115.2 ± 5.6 mm 介入後 : 119.8 ± 4.2 mm. 統計的検定法 : 対応のある t 検定 $p=0.33$)

3) 運動速度

介入前と比較し介入後において増加傾向を示したが有意な差は認めなかった (介入前 : 175.2 ± 14.6 mm/sec 介入後 : 182.8 ± 11.8 mm/sec. 統計的検定法 : Wilcoxon 検定 $p=0.47$) .

4) まとめ

指タップテストにおいては総軌跡長のみ有意な増加を認めたが, 最大距離, 運動速度においても介入後は増加を示している. このことから, 本研究における有酸素運動が PD 症状に効果的であることが考えられた.

6.7.4 まとめ

有酸素運動による効果を介入前後で比較した結果、歩行能力、PD の 1 次機能障害に対する評価において有意な増加を認めた。一方、下肢筋力では有意な増加を認めていないことから、本研究における有酸素運動の効果は、PD の 1 次機能障害および、その影響を受ける動作（歩行）の改善に有効であることが考えられた。

6.8 考察

本研究は PD 患者における 1 次機能障害と運動機能に対する有酸素運動の有用性を検討した。これまで PD に対するリハビリテーションは対象者の病状の進行状況に合わせバランス練習や筋力強化練習、歩行練習などを中心に 2 次機能障害の改善を目的として行われてきた [34]。しかし、本研究における PD モデルラットの結果も含め、近年になり PD モデル動物を用いた運動効果に対する多くの研究が行われ、線条体における酸化ストレスの軽減 [41]、神経可塑性に関係する細胞外シグナル調節キナーゼ (Extracellular Signal-regulated Kinase ; ERK) の増加 [42]、BDNF の増加 [44]等によるドーパミン作動性ニューロンの修復・保護が報告されている。また、PD 患者に対する有酸素運動の効果として、PET を用いてドーパミン D2 受容体結合能を検査し、運動群では D2 受容体の結合能が上昇したことも報告されている [45]。これらは PD 患者に対する有酸素運動が 1 次機能障害を改善する可能性を示唆するものである。

本研究の結果からは歩行速度の改善、UPDRS3 の改善、指タップにおける総軌跡長の増加を認めた。注目すべき点として、ペダル運動は主に下肢の筋群を使用した運動であり、下肢筋力の増加による運動要素の向上が考えられるが、実際に得られたデータでは下肢筋力に有意な変化を認めていない。一方、運動による介入をしていない手指における指タップテストで総軌跡長の有意な増加を認めた。この結果は UPDRS3 の改善と合わせ、本研究の有酸素運動による介入が先行研究と同様に PD の 1 次機能障害に対して有効な効果を与えたことを示している。

これまで PD の 1 次機能障害に対する有酸素運動効果の有用性に関する報

告の多くは PET 等の大掛かりな機器を使用した検査や医療機関内で専門スタッフの管理のもとに行われたものが主体であり、専門の施設にて研究および有酸素運動を行う必要性があった。PD 患者における特定疾患医療費助成制度は、主に重症 PD 患者を対象としており、軽症例では医療機関でのリハビリテーションを受けにくい現状がある。

一方、本研究では自宅で患者主体の運動により機能改善を認めており、有酸素運動としても市販のペダル運動器を用いているので、在宅で生活している PD 患者に導入しやすい方法となっている。加えて、PD は転倒率が大変高い疾患である。本研究では座位で行うことができるペダル運動なので安全であり、専門スタッフによるリスク管理が行えない状況においても、転倒リスクを極力予防できる。その点からも在宅で生活している PD 患者や入院中の自主練習として導入しやすい汎用性も高い運動方法と考えられる。

以上のことから本研究の結果は、PD 患者に対する有酸素運動効果の証明に加え、PD 患者に対する有酸素運動方法を検討する上で貴重な情報となると考えている。

今後の課題として、有酸素運動の効果機序を明確にするために、血中 BDNF の測定を含めたドーパミン系の機能再生に関わる機能分子に対する検査方法の検討が必要と考えられる。

第 6 章では PD 患者に対して有酸素運動による介入を行い、PD における 1 次機能障害に対する有用性を示すことができた。また、指タップテストを画像解析することで、モデルラットの研究で得られた運動特性との比較を可能とした。第 7 章ではモデルラットと患者との比較を中心に検討する。

第7章 パーキンソン病モデル動物とパーキンソン病患者における結果の関係性

本研究では画像解析を用いて 6-OHDA 片側線条体注入モデルラットと患者における前肢機能の障害を明らかにすることができた。これまで、モデルラットと患者における機能障害の関連性を運動要素の面から報告した研究は国内外ともに本報が初めてである。

本章では6-OHDA片側線条体注入モデルラットと患者のPD症状を比較したことで判明した類似点、相違点、有用性、限界を検討する。また、他のモデル動物と本研究で用いたラットを比較し、患者と比較するうえで実験動物としてラットの妥当性も検討する。

7.1 動物モデルと患者の比較

7.1.1 類似点

モデルラットと患者では画像解析に用いた動作内容は異なるが、両課題とも運動要素として運動変換に対する調整能力を評価したものである。そして、両群でPD症状である運動調整の障害を確認できた。

モデルラットでは前肢の回内運動角度がRTの成功率と相関していた。また、有酸素運動を行わせることでRTの成功率は回復しており、患者においても有酸素運動を行うことで指タップテストの成績が改善した。このことから、モデルラットによる結果をヒトの障害に反映できる可能性を示すことができた。

7.1.2 相違点

本研究で用いた「RT」と「指タップテスト」では運動様式と難易度が異なる。運動様式の違いとして、RTはペレットを把握するまでに回内・回外運動の変換や手指の開閉運動を一度だけ行う。これに対して指タッ

プテストは同じ変換動作を繰り返し行うものである。PD の症状である無動は動作の繰り返しにより誘発するため、指タップテストでは発現しやすい。一方、RT では運動変換が少ないため無動は発現されにくい。そのため、指タップテストでは無動の影響が加わった結果を評価している可能性が考えられる。

難易度の違いとして、RT では前肢をスリットに通す、目標物（ペレット）を把握するといった回内・回外の変換に加えて複雑な運動調整を要する。一方、指タップテストに求められる運動調整は指の開閉運動の変換を円滑に行わせることのみである。一般に患者ではワーキングメモリの障害により、二重課題など複数の動作を同時に遂行する能力が障害される。そのため、RT ではワーキングメモリ障害の影響が加わった結果である可能性が考えられる。

以上より、モデルラットと患者から得られた結果の相違点として、モデルラットではワーキングメモリ障害、患者では無動といった異なったPD 症状がそれぞれ結果に影響した可能性が考えられる。

7.1.3 有用性

6-OHDA 片側線条体注入モデルラットの RT に画像解析を用いることで、一部の PD 症状を捉えることが可能となった。そして、患者との比較も可能であることが証明され、今後は新規的で効率的な治療方法の検討も可能となった。

相違点にあげた PD 症状の違いにおいて、RT の遂行中にはすくみ症状や姿勢反射障害も測定できている。今後は新しい課題を適用することで、より多くの PD 症状を患者とラットで比較できる可能性がある。また、患者に対してもモデルラットとの比較を考慮し、ラットと同様の環境設定で RT を測定するなど、モデルラットの行動実験に近い測定方法を考案することで、より精度の高い比較をすることが可能である。

7.1.4 限界

PD 患者は表情の変化や小声、小字といったコミュニケーションに要する

能力においても障害が生じ、QOL の低下を招く要因となっている。一方、ラットは表情に乏しく、また鳴くことも少ない。このことから PD 症状により障害されるヒト特有のコミュニケーション能力や精神機能、高次脳機能による問題ではラットを用いた検討には限界がある。

回復過程の比較においても、ラットは一定の範囲内で行動し、決められた運動のみを実行する。また、回復に対する欲求も認めない。一方、患者では生活スタイルにより日常の運動量は異なり、また回復に対する欲求によりモチベーションも様々に変化する。ドーパミンは目標行動の実行を促進する物質であり、モチベーションに重要な関わりを持つ [73]。これら日常の運動量や回復の欲求が患者の回復には複雑に関係しており、モデルラットと同様の測定環境や運動量を設定しても影響を排除することはできない。

モデルラットと患者の症状の進行速度には相違があり、経時的な変化を対応させることは不可能である。一般に患者では数年から十数年をかけて緩徐に症状が進行していく。これに対して、6-OHDA を使用したモデルラットは短時間で急激に症状が発現し、約 30 日程度で停止する。第 6 章で報告した患者に対する有酸素運動の介入期間は 4 週間である。そのため、この期間中に症状が急激に増悪することは考えにくい。したがって、病状の進行の経時的な相違から、同一の回復メカニズムが適用できるかどうか更なる検討が必要である。

7.2 モデル動物間の比較

7.2.1 障害作成部位による比較

これまで PD モデル動物における RT の検証には、本研究で用いた RT を行う優位な前肢と反対側の線条体に 6-OHDA を注入したモデルラット (Contra Model : CM) の他、RT を行う優位な前肢と同側の線条体へ 6-OHDA を注入したモデル (Ipsi Model : IM) が作成させている。

CM と IM の比較として、成功率はコントロール群と CM, IM を比較すると、CM, IM とともに有意に低下するが、IM よりも CM で低下が顕著である [56]。また、第 2 章で紹介した RT における 10 項目において、IM は

コントロール群と比較するとペレットを把握後の回外運動 2 と放出運動のみ障害を認める [74]. そして全 10 項目で CM, IM, コントロール群を比較した場合, CM とコントロール群の間のみ有意な差を認める [56].

本研究では前肢がペレットに接触した瞬間までを解析対象としている. そのため CM を用いた研究計画は妥当であったと考えられる.

7.2.2 注入部位の検討

6-OHDA による薬理的なモデル動物の作成方法には, 注入する場所の違いにより本研究で採用した線条体破壊と内側前脳束 (Medial Forebrain Bundle :MFB) 破壊の 2 種類がある. その特徴として, 両方とも線条体に対するドーパミン作動性ニューロンのシナプス前ドーパミントランスポーターとシナプス後 D2 受容体数の変異が認められる. 違いとしては, その後の経過 (作成 4 週間後) において線条体破壊モデルでは D2 受容体の減少が継続するが, MFB 破壊モデルでは D2 受容体数が増加を示す [75]. そして, さらに長期的な経過 (作成 6 ヶ月後) では, 線条体破壊モデルの D2 受容体数は 4 週間後とほぼ変わらないのに対して, MFB では健常側よりも受容体数が高い状態ではあるが 4 週間後に比べ低下する [76].

本研究ではモデルラット作成後より運動要素の変化を 5 週間調査している. そのため, 作成後より D2 受容体の変化が少ない線条体破壊モデルを用いた研究計画は妥当であったと考えられる.

7.2.3 使用薬剤の検討

薬理的な PD モデル動物の作成方法の多くは 6-OHDA と MPTP が用いられている. MPTP は動物種差により神経毒の発現性が異なり, サルにおいては極めて高い薬剤感受性を認める. また, マウスにおいても系統差はあるものの中程度から高い薬剤感受性を認める. 一方, ラットは MPTP に対して極めて強い抵抗性を有するため, 投与後に急性の運動障害は認めるが, 持続的な運動障害は観察できない [77].

本研究ではラットを使用しているため 6-OHDA の使用は妥当であったと考えられる.

7.2.4 モデル動物の検討

RT はマウス、ラットなどの齧歯類やアカゲザルなど霊長類に対して行われる行動実験である。マウスやラットは多産であり飼育しやすく、神経学的にもヒトの神経系に近い [78]。しかし、齧歯類では大脳基底核の機能にヒトと異なる点があり、PD でみられる無動や固縮などの運動症状が現れにくい [79]。一方、霊長類ではヒトの神経症状に類似した PD 症状を観察することができる [78]が、繁殖や飼育が難しく性成熟までに時間を要する。

本研究では画像解析を用いたことで PD による運動症状を捉えることに成功している。このことから、運動調整や姿勢反射など一部の PD 症状を検討する場合には、ラットで十分に検証できる可能性を示すことができたものと考えている。

7.3 まとめ

パーキンソン病モデル動物とパーキンソン病患者における結果の関係性を検討するうえで、本研究により 6-OHDA 片側線条体注入モデルラットと患者における類似点、相違点、有用性、限界を明確にすることができた。また、実験動物として、一部の PD 症状においては霊長類の代用としてラットを用いることの有用性を示すことができた。

第 8 章 まとめ, 今後の展望

本研究では, PD モデルラットの運動要素に対する継続的な有酸素運動介入効果を検証するため, 6-OHDA 注入による片側 PD モデルラットを作成し, RT の画像解析を用いた前肢機能と姿勢保持の評価を実施した. その結果, モデルラットの運動特性として運動変換の障害と姿勢反射障害を捉えることができた.

RT による画像解析方法により, モデルラットの運動特性を研究することに成功したことから, モデルラットに対する有酸素運動効果の検討を運動群とコントロール群を設けて実施した. その結果, 運動群ではコントロール群に比べ, 有意な運動特性の改善を認めることができた.

さらに, その結果から臨床応用として, 在宅で生活している PD 患者に対しても有酸素運動による介入を行なった. その結果, 患者においても PD 症状の改善を認めることができた.

特にモデルラットにおける RT と患者における指タップテストは運動変換を評価する課題である点で共通している. この両検査において改善傾向を認めたことは, モデルラットと患者の症状の共通性を確認できたものと考えられる. 以上のことは本研究が基礎研究と臨床研究を関連づける重要なものであることを示している.

今後の展望として, 第 7 章で述べたように測定中に主観的には認めているが, 今回用いた測定項目では定量化できなかった PD 症状に対して, 新たな測定課題を検討することで, さらに多くの PD 症状をモデルラットと患者で比較することが可能になると考えている. また, 本研究のモデルラットの作製方法は, 6-OHDA を 1 回で注入している. そのため, PD 症状が急激に進行し, 約 30 日後には進行が停止する. 一方, 患者の症状は数年から十数年をかけて緩徐に症状が進行していく. そのため, 病状の経時的な変化に相違が生じており, 有酸素運動による機能回復の機序の違いが懸念される. この問題を解決するために浸透圧ポンプ等を使用し, 6-OHDA の継続的な微量連続注入を行うなど, より患者の症状に近いモデルラットの作製の必要性が挙げられた. さらに本研究では患者に対して, 多くの研究で使用されている運動負荷量を参考にした有酸素運動を実施した. PD は

高齢発症であるため、患者の多くは高齢者である。現在、有酸素運動として推奨されている運動負荷量は「ややきつい」程度の運動を 30 分間以上継続する必要がある。高齢者では健常者であっても「ややきつい」程度の運動を 30 分間行うことは難しい。したがって、モデルラットを用いて運動負荷と回復程度の変化の関係を明らかにすることで、より患者が取り入れやすい運動方法のプログラムが提案できるものと考えられた。患者に対する評価方法において、本研究では画像解析を用いることで動作の定量化を図ることに成功している。現在、患者に用いられている UPDRS など主要な評価は主観的なものが多い。画像解析技術を応用することは、これまで主観的であった患者に対する評価の妥当性の改善に寄与できると考えられる。今後、本研究で得られた画像解析による情報や技術を臨床評価に応用することも考えていきたい。

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々にご協力をいただきました。特に指導教員今村一之教授、研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。また、一般社団法人 全国パーキンソン病友の会 群馬県支部、埼玉県支部、栃木県支部の会員の皆様に関しましても研究に快く参加していただき厚く御礼申し上げます。

本研究は平成 27 年度、独立行政法人日本学術振興会科学研究費「萌芽的研究」の支援を受けて実施されました。

参考文献

- [1] 水野美邦, 近藤智善: よくわかるパーキンソン病のすべて. 第2版, p3, 永井書店, 大阪, 2011.
- [2] 難病情報センター-HP <http://www.nanbyou.or.jp/entry/5460> (2017年8月8日)
- [3] 葛原茂樹: パーキンソン病治療の現状と展望. 臨床神経, 48: 835-843, 2008.
- [4] Dorsey ER, Conatantinescu R et al: Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. Neurology 30: 384-386, 2007.
- [5] 前掲: よくわかるパーキンソン病のすべて. p379-380.
- [6] 戸田達史: パーキンソン病の原因遺伝子. 日本臨牀 75(1): 21-27, 2017.
- [7] Braak H, Del Tredici K, et al: Staging of Brain Pathology related to sporadic Parkinson's disease. Neurobiol Aging 24: 197-211, 2003.
- [8] 亀谷富由樹, 長谷川成人: アミロイド関連構造物の脳内伝播. 医学のあゆみ 258(6): 719-723, 2016.
- [9] 日本神経学会: パーキンソン病治療ガイドライン 2011. (パーキンソン病治療ガイドライン作成委員会編). 第1版, p63-65, 医学書院, 東京 (2011).
- [10] 中江秀幸, 對馬 均: パーキンソン病患者の on-off 現象が活動状況に与える影響. 東北理学療法学 21: 1-6, 2009.
- [11] 前掲: よくわかるパーキンソン病のすべて. p264-266.
- [12] 柴 善崇, 荻野 裕: 在宅パーキンソン病患者の家族介護者の介護負担感. 難病と在宅ケア 15(3): 43-45, 2009.
- [13] Meara J, Mitchelmore E, et al: Use of the GDS-15 geriatric depression scale as a screening instrument for depressive symptomatology in patients with Parkinson's disease and their carers in the community. Age Ageing 28(1): 35-38, 1999.
- [14] 大野洋一: 在宅パーキンソン病患者における症状の日内変動が ADL 介助状況に与える影響について. 臨床理学療法研究 32: 7-11, 2015

- [15] 赫 寛雄, 相澤仁志, 他 : パーキンソニズムの歩行障害の鑑別. MB Med Reha 196 : 20-24, 2016.
- [16] 鈴木隆雄, 杉浦美穂, 他 : 地域高齢者の転倒発生に関連する身体的要因の分析的研究-5年間の追跡研究から-, 日老医誌 36-7 : 472-478, 1990.
- [17] Wood BH, Bilclough JA, et al : Incidence and prediction of falls in Parkinson's disease—a prospective multidisciplinary study, J Neurol Neurosurg Psychiatry 72 (6) : 721-25, 2002.
- [18] Melton LJ, Leibson CL, et al : Fracture risk after the diagnosis of Parkinson's disease: Influence of concomitant dementia, Movement Disorder 21-9 : 1361-1367, 2006.
- [19] 小畔美弥子, 立花久大, 他 : パーキンソン病のADLとQOL. Prog. Med, 28 : 103-107, 2008.
- [20] Shulman LM, Taback RL, et al: Comorbidity of the nonmotor symptoms of Parkinson's disease. Mov Disord 16 : 507-510, 2001.
- [21] 前掲 : よくわかるパーキンソン病のすべて. p152-156.
- [22] 高草木 薫 : 大脳基底核による運動の制御. 臨床神経 49 : 325-334, 2009.
- [23] Nambu A: A new dynamic model of the cortico-basal ganglia loop. Prog Brain Res 143: 461-466, 2004.
- [24] 望月仁志, 宇川義一: 神経学における歩行 Review. Brain Medical 19: 317-322, 2007.
- [25] 小池亮子: パーキンソン病の外科的治療. 難病と在宅ケア 22 (10) : 52-55, 2017.
- [26] 佐賀 健 : 第 5 回 抗パーキンソン病剤 デュオド-パ (R) レボド-パ・カルビド-パ水和物. クリニックマガジン 44 (2) : 26-27, 2017.
- [27] 垣下浩二, 新谷亜紀, 他 : パーキンソン病における神経細胞移植. Congnition and Dementia 6 (1) : 38-44, 2007.
- [28] 高橋 淳: Parkinson 病に対する細胞移植治療. 神経治療 34 (3) : 146-150, 2017.
- [29] 前掲 : パーキンソン病治療ガイドライン 2011. 139-142.

- [30] Horstink M, Tolosa E, et al: European Federation of Neurological Societies; Movement Disorder Society-European Section. Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Movement Disorder Society-European Section. Part I : early (uncomplicated) Parkinson's disease. Eur J Neurol. 13 (11) : 1170-1185, 2006.
- [31] Goodwin VA, Richards SH, et al : The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. Mov Disord 23 (5) : 631-640, 2008.
- [32] Schenkman M, Hall DA et al: Exercise for people in early- or mid-stage Parkinson disease: a 16-month randomized controlled trial. Phys Ther 92 (11) : 1395-1410, 2012.
- [33] Comella CL, Stebbins GT, et al: Physical therapy and Parkinson's disease ; A controlled clinical trial. Neurol 44 : 376-378, 1994.
- [34] 阿部 勉 : パーキンソン病に対する運動療法の実際. 理学療法 30 (2) : 146-153, 2013.
- [35] 三原 盤, 藤本幹雄, 他 : パーキンソン病患者の歩行障害に対する音楽療法の効果 (第 1 報) -リズム・メロディの即時的効果, 三次元動作解析装置による検討-, 日本音楽療法学会誌 5 (1) : 58-64, 2005.
- [36] 林 明人 : Parkinson 病における音楽療法, 神経治療 24 (6) : 703-710, 2007.
- [37] 千田圭二: パーキンソン病患者の転倒対策, 難病と在宅ケア 17 (7) : 45-48, 2011.
- [38] 松尾喜美 編, パーキンソン病に対する標準的理学療法介入, 第 2 版, p120-132, 文光堂, 2014.
- [39] 大野洋一, 木暮香奈 : 在宅パーキンソン病患者の歩行に対する振動刺激を用いた外的刺激の有用性の検討. 日本福祉工学雑誌 19 (2) : 20-15, 2017.

- [40] 大野洋一：在宅パーキンソン病患者に対する聞き流しによる受動的音楽聴音効果の検討. 日本在宅ケア学科誌 21 (1) : 61-66, 2017.
- [41] Toun T, Valvassori SS, et al : Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in the an animal model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 227 : 305-312, 2012.
- [42] Choe MA, Koo BS, et al : Effect of treadmill exercise on the recovery of dopaminergic neuron loss and muscle atrophy in the 6-OHDA lesioned Parkinson's disease rat model. *Korean J Pharmacol* 16 : 305-312, 2012.
- [43] Yoon MY, Shin MS, et al : Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rat. *Neuroscience Letters* 423 : 12-17, 2007.
- [44] Real CC, Ferreira AFB, et al : BDNF receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 237 : 118-129, 2013.
- [45] Fisher BE, Li Q, Nacca A, et al ; Treadmill exercise elevates striatal dopamine D2 receptor binding potential in patients with early Parkinson's disease. *NeuroReport* 24 (10) : 509-14, 2013.
- [46] 間中勇輝：運動野損傷による前肢片側麻痺ラットにおける運動機能回復. 平成 26 年度前橋工科大学大学院修士論文.
- [47] Iwai, A., Properties of NACP/alpha-synuclein and its role in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1502; 95-109, 2000.
- [48] Goldberg MS, Pisani A, et al : Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron* 45 : 489-496 , 2005.
- [49] 原 宏和：酸化ストレスに対して神経細胞保護作用を有する化合物の作用機序の解明. *YAKUGAKU ZASSHI* 127 (8) : 1199-1200, 2007.
- [50] 望月秀樹, 早川英規, 他：パーキンソン病の動物モデル. *CJR LETTERS* 17 (1) : 1-8, 2008.
- [51] Herrera AJ, Castano A, et al : The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol Dis* 7 (4) : 429-47, 2000.

- [52] Klein A, Dunnett SB: Analysis of skilled forelimb movement in rats : the single pellet reaching test and staircase test. *Curr Protoc Neurosci*, 2012.
- [53] Whishaw IQ, Kolb B: The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests. Oxford University Press ; 162-170 , 2005.
- [54] Jackson EA, Neumeier JL, et al: Behavioral activity of some novel aporphines in rats with 6-hydroxydopamine lesions of caudate or nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 87 (1) : 15-23 , 1983.
- [55] Yang F, Lagerros YT, et al: Physical activity and risk of Parkinson's disease in the Swedish National March Cohort. *Brain* 138 : 269-275, 2015.
- [56] Miklyeva EI, Castaneda E: Skilled Reaching Deficits in Unilateral Dopamine-depleted Rat: Impairments in Movement and Posture and Compensatory Adjustments. *The Journal of Neuroscience* 14:7148-7158, 1994.
- [57] Sacrey LS, Alavardashvili M , et al: Similar hand shaping in reaching-for-food (skilled reaching) in rats and humans provides evidence of homology in release, collection, and manipulation movements. *Behavioral Brain Research* 204 : 153-161, 2009.
- [58] 堀越颯法: 片側パーキンソン病モデルラットにおける前肢運動機能の定量解析. 平成 27 年度前橋工科大学卒業論文.
- [59] 奈良先端科学技術大学院大学 OpenCV プログラミングブック制作チーム: OpenCV プログラミングブック第 2 版. 毎日コミュニケーションズ, 2007
- [60] 佐々木 健史, 長峯 隆, 他: 傾斜外乱時におけるラット動的姿勢調整の特徴. *理学療法科学* 30 (31) : 21-27, 2015.
- [61] 久野貞子: 姿勢異常・すくみ足・転倒とその対策. *難病と在宅ケア* 20 (5) : 29-32, 2014.
- [62] Vergara-Aragon P, Gonzalez CL, et al: A novel skilled-reaching impairment in paw supination on the "good" side of the hemi-Parkinson rat improved with rehabilitation. *J Neurosci* 23 (2) : 579-586, 2003.
- [63] Alavardashvili M, Whishaw IQ: Motor cortex stroke impairs individual digit movement in skilled reaching by the rat. *European Journal of Neuroscience* 28 : 311-322, 2008.

- [64] Azim E, Jiang J, Alstermark B, et al: Skilled reaching relies on a V2a propriospinal internal copy circuit. *Nature* 508 : 357-363, 2014.
- [65] Whishaw IQ: Loss of the innate cortical engram for action patterns used in skilled reaching and the development of behavioral compensation following motor cortex lesions in the rat. *Neuropharmacology* 39: 788-805, 2000.
- [66] Field EF, Whishaw IQ : Sexually dimorphic postural adjustments are used in a skilled reaching task in the rat. *Behavioral Brain Research* 163 : 237-245 , 2005.
- [67] 神庭重信 : ストレスから神経疾患に迫る : 海馬神経新生と精神機能. *日薬理誌* 128 : 3-7, 2006.
- [68] パーキンソン病モデルラットの作出とその評価について. 日本 SLC (株) URL: jslc.co.jp/inform/parkinson.pdf (平成 29 年 9 月 30 日) .
- [69] Maldonado MA, Allred RP, Feltauser EL, Jones TA : Motor skill training, but not voluntary exercise, improves skilled reaching after unilateral ischemic lesions of the sensorimotor cortex in rats. *Neurorehabil Neural Repair* 22 (3) : 250-261, 2007.
- [70] Jeon BS, Jackson-Lewis V, et al: 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* 4 (2) : 131-137, 1995.
- [71] Nakai K, Jonsson G, Kasamatsu T : Norepinephrinergic reinnervation of cat occipital cortex following localized lesions with 6-hydroxydopamine. *Neuroscience Research* 4 : 433-453, 1987.
- [72] 日本糖尿病学会 : 糖尿病診療ガイドライン (日本糖尿病学会編) . 第 1 版, P67-81, 南江堂, 東京, 2016.
- [73] 西 昭徳: ドーパミンシグナルの増幅と制御. *久留米医学会雑誌* 70:165-169, 2007.
- [74] Aragon PV, Gonzalez CLR, Whishaw IQ : A Novel Skilled-Reaching Impairment in Paw Supination on the “Good” Side of the Hemi-Parkinson Rat Improved with Rehabilitation. *The Journal of Neuroscience* 23:579-586, 2003.
- [75] Sun W, Sugiyama K, Fang X, Yamaguchi H, Akamine S : Different striatal D₂-like receptor function in an early stage after unilateral striatal lesion

- and medial forebrain bundle lesion in rats. *Brain Research*, Volume 1317: 227-35, 2010.
- [76] Sun W, Sugiyama K, Asakawa T, Yamaguchi H, Akamine S, Ouchi Y, Magata Y, Namba H : Dynamic changes of striatal dopamine D2 receptor binding at later stages after unilateral lesions of the medial forebrain bundle in Parkinsonian rat models. *Neurosci Lett* 496 (3): 157-62, 2011.
- [77] 吉原新一, 太田 茂 : パーキンソニズム発症物質 (MPTP) をめぐって. *The Journal of Toxicological Sciences* 24 (3) : 101-108, 1999.
- [78] 上村紀仁 : パーキンソン病のモデル動物. *Phama Medical* 33 (7): 25-29, 2015.
- [79] 佐藤栄人, 望月秀樹, 高橋良助, 永井義隆, 松井秀彰 : パーキンソン病のモデル動物－最近の話題 [座談会]. *Frontiers in Parkinson Disease* 9 (1) : 5-13, 2016.

研究業績

学術論文

1. 大野洋一, 神戸晃男, 神野亜紀子, 影近謙治: 病棟リハビリテーション開始後患者群における在院日数短縮の要因分析. 臨床理学療法研究, 30:21-23, 2013.
2. 柳田眞有, 大野洋一, 山上徹也: 高齢者の介護予防に有用な簡易姿勢評価法の検討. 北関東医学 65 (2) : 141-147, 2015
3. 大野洋一: 在宅パーキンソン病患者における症状の日内変動が ADL 介助状況に与える影響について. 臨床理学療法研究, 32 : 7-11, 2015
4. 大野洋一: パーキンソン病患者における日常生活動作の工夫. 月刊 難病と在宅ケア 22(2):45-49, 2016.
5. 大野洋一: 在宅パーキンソン病患者に対する聞き流しによる受動的音楽聴音効果の検討. 日本在宅ケア学会誌 21 (1) : 61-66, 2017.
6. 大野洋一, 木暮香奈: 在宅パーキンソン病患者の歩行に対する振動刺激を用いた外的刺激の有用性の検討. 日本福祉工学雑誌 19 (2) : 10-15, 2017.
7. Yoichi Ohno : Home-based aerobic exercise ameliorates symptoms in patients with parkinson's disease. Int J Phy 5 (1) : 1-6, 2018.
8. Youki Manaka, Yoichi Ohno, Akinori Horikoshi, Kazuyuki Imamura: A New Evaluation Method for Reaching Task of Rats. I: Effects of Motor Cortical Lesion. J. Neurosci. and NeuroEngineering.
9. Yoichi Ohno, Akinori Horikoshi, Kazuyuki Imamura: A New Evaluation Method for Reaching Task of Rats. II: Effects of intrastriatal 6-OHDA injection. J. Neurosci. and NeuroEngineering.

学会発表（査読付き）

1. 大野洋一：在宅パーキンソン病患者に対する症状の日内変動に着目した転倒に関するアンケート調査の報告. 第 50 回日本理学療法学会大会（東京, 2015. 6）.
2. 大野洋一：在宅パーキンソン病患者における症状の日内変動と非運動症状の関係について第 20 回日本在宅ケア学会（東京, 2015. 7）.
3. 大野洋一, 堀越顕法, 今村一之：パーキンソン病モデルラットにおける前肢運動機能の定量的解析の試み. 第 8 回神経機能回復セミナー（秋田, 2015. 9）.
4. 大野洋一, 堀越顕法, 今村一之：Study of forpaw function and posture using the Reaching Task of Parkinson's disease model rats. 第 93 回日本生理学会（北海道, 2016. 3）.
5. 大野洋一, 堀越顕法, 今村一之：パーキンソン病モデルラットにおける前肢機能および姿勢特性の検討. 第 53 回日本リハビリテーション医学会学会（京都, 2016. 6）.
6. 大野洋一, 木暮香奈：在宅パーキンソン病患者に対する体性感覚キュー激の有用性の検討ー歩行および日常生活に与える影響について - 第 22 回日本在宅ケア学会（東京, 2016. 7）.
7. 大野洋一, 堀越顕法, 吉田遼大, 今村一之：パーキンソン病モデルラットに対する運動が機能回復に与える効果について. 第 9 回神経機能回復セミナー（秋田, 2016.10）.
8. 大野洋一, 堀越顕法, 今村一之：パーキンソン病モデルラットにおける前肢機能および姿勢変化に対する画像解析を用いた定量的測定の試み 日本福祉工学会 第 20 回学術講演会（群馬, 2016. 11）.
9. 大野洋一:在宅パーキンソン病患者に対するペダル運動を用いた自主運動効果の検討. 第 54 回日本リハビリテーション医学会学会（岡山, 2017.6）.
10. Yoichi Ohno, Akinori Horikosi, Kazuyuki Imamura : Effect of an Aerobic Exercise on the Recovery of Forelimb Function in 6-OHDA rat-model of Parkinson's Disease. World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders（Vietnam, 2017, 11）.

図表

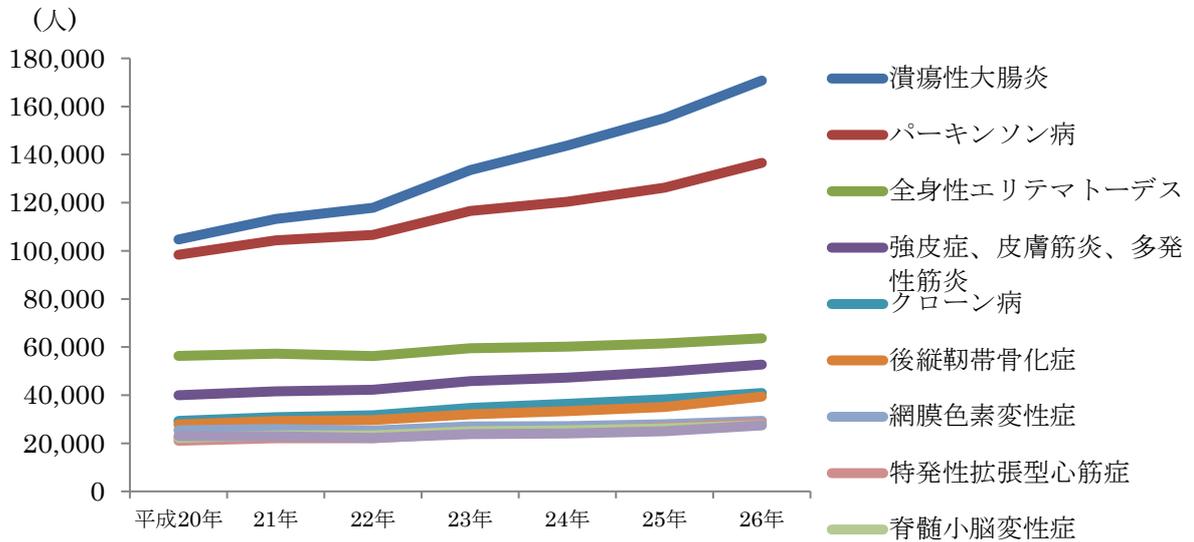


図1 特定疾患医療受給者証所持者数の推移

厚生労働省により公表されている特定疾患医療受給者証の所持者を示したグラフである。パーキンソン病（赤色）は潰瘍性大腸炎に続き2番目に多い疾患であり、年々増加傾向を示している。

{難病情報センター-HP <http://www.nanbyou.or.jp/entry/5460> (2017年8月8日)を参考に作成}

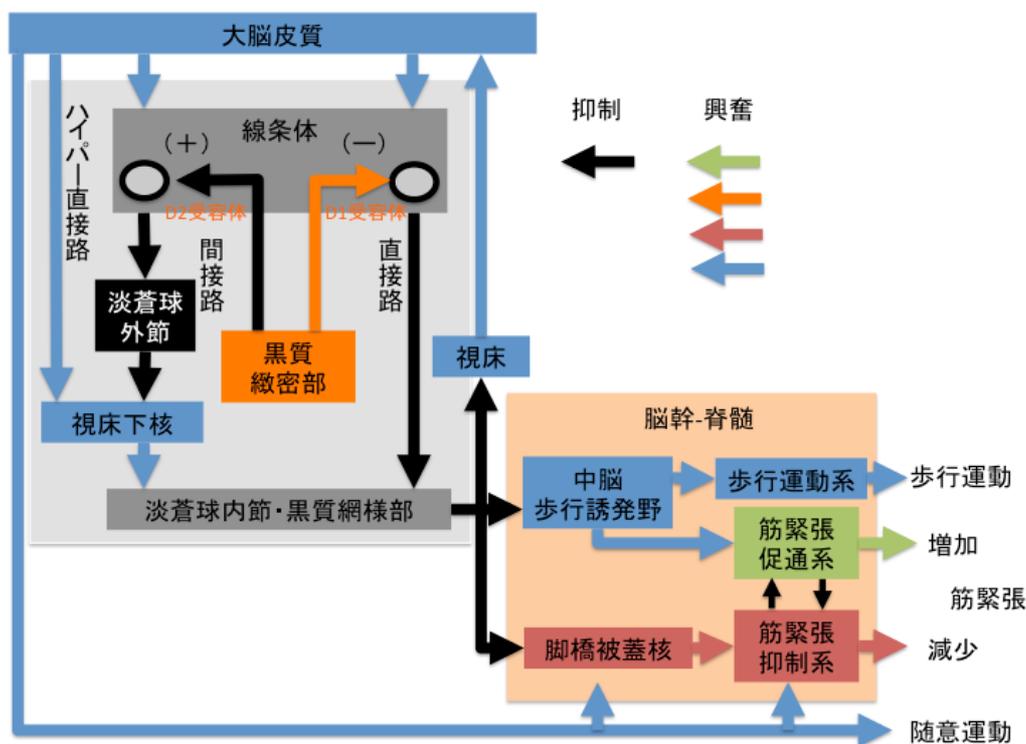


図2 大脳基底核内の神経回路と脳幹-脊髄神経機構の模式図

動物が運動を開始する際の大脳皮質、大脳基底核、脳幹の関係性を示した図である。黒い矢印は抑制を示し、その他の色の矢印は興奮を示している。また、線条体内の (+) は抑制を亢進、(-) は抑制を抑制する経路を示している。まず、大脳皮質よりハイパー直接路を介した刺激が大脳と脳幹の活動を抑制することで運動開始に不必要な運動を抑制し、運動開始の準備を整える。次に直接路を介した刺激が大脳皮質と脳幹の活動を促進(脱抑制)させ、目的とする運動の発現を行う。そして最後に間接路を介した刺激により再び大脳皮質と脳幹を抑制することで遂行した運動を終わらせ、次の運動に備える働きをしている。この仕組みにより、大脳皮質による不要なプログラムは抑制され、必要なプログラムが正確なタイミングで遂行されている。黒質部のドーパミン細胞は線条体に投射し、直接路と間接路の活動を修飾する。ドーパミンの減少は直接路を抑制し、間接路を亢進させるので、基底核の出力が増加する。

(高草木 薫：大脳基底核による運動の制御。臨床神経 49：325-334，2009 を参考に作成)

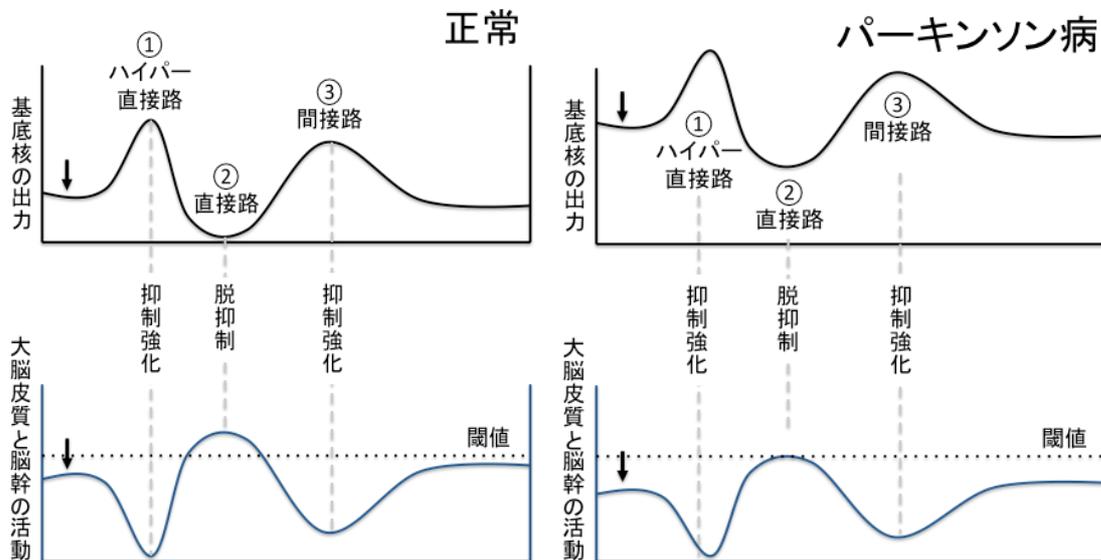


図3 基底核からの出力（上）と大脳皮質・脳幹の活動（下）の対応および正常とパーキンソン病との比較

- ①ハイパー直接路の活動による基底核から標的システムへの抑制強化
- ②直接路の活動による脱抑制
- ③間接路の活動と標的システムへの抑制

左図：正常 右図：パーキンソン病

左図のように正常では運動の開始に伴い①により大脳と脳幹の活動が抑制されることで不必要な運動を抑制し、運動開始の準備を整える。そして、②により刺激が閾値を超えることで目的とする運動の発現を行い、③により遂行した運動を終わらせ次の運動に備える。しかし、右図のようにパーキンソン病ではドーパミン作動性ニューロンの欠乏により基底核からの抑制出力は増加する（上）。その結果、大脳皮質と脳幹の活動が閾値を超えることができず活動は抑制される。

（高草木 薫：大脳基底核による運動の制御. 臨床神経 49：325-334, 2009 を参考に作成）

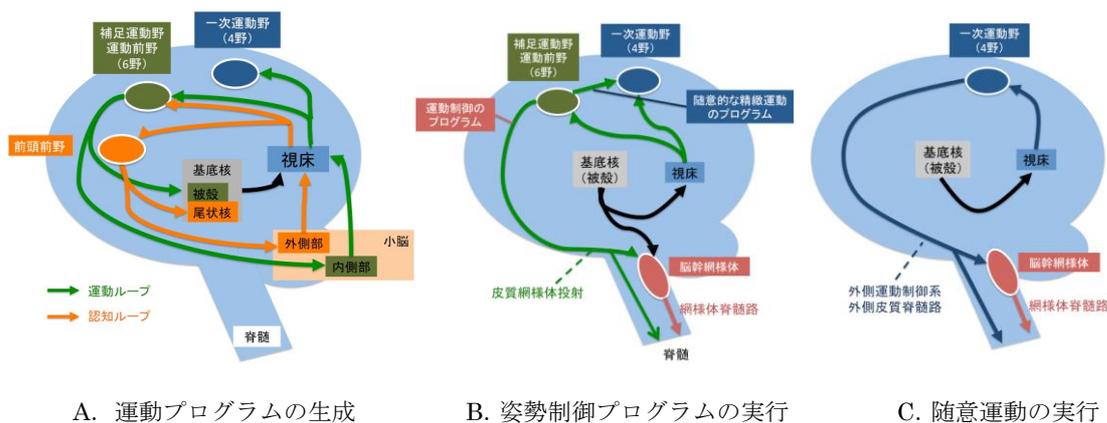


図 4 基底核における 3 種類の随意運動に対する制御機構

大脳基底核による随意運動制御機構に関する 3 つの過程を以下に示す。

A. 運動プログラムの生成

緑色で示した大脳皮質運動関連領域と基底核（被殻）・小脳内側部とを結ぶ“運動ループ”と、オレンジで示した前頭前野と基底核（尾状核）・小脳外側部とを結ぶ“認知ループ”との働きにより、“姿勢と精緻運動に関する”運動のプログラムが生成される。

B. 姿勢制御プログラムの実行

黒色で示した基底核からの大脳皮質と脳幹への脱抑制により、皮質網様体投射と網様体脊髓路系が駆動されて、精緻運動に先行する姿勢制御が可能になる。

C. 随意運動の実行

黒色で示した視床への脱抑制により一次運動野に対する抑制が解除されることによって運動指令が脊髄へと伝達され、精緻運動が実行される。

以上の A→B→C が動作の想起から発現までの流れとなる。パーキンソン病では大脳基底核からの抑制性出力が増加する結果、大脳皮質の活動を低下させ、前頭前野における「意志発動」、6野における「運動プログラム生成」、4野における「随意運動の指令」が低下する。これにより、随意運動の速度低下や運動量の減少が誘発される。加えて、脳幹部の活動も低下するため、筋緊張の異常や姿勢制御の異常が生じる。

(高草木 薫：大脳基底核による運動の制御. 臨床神経 49：325-334, 2009 を参考に作成)

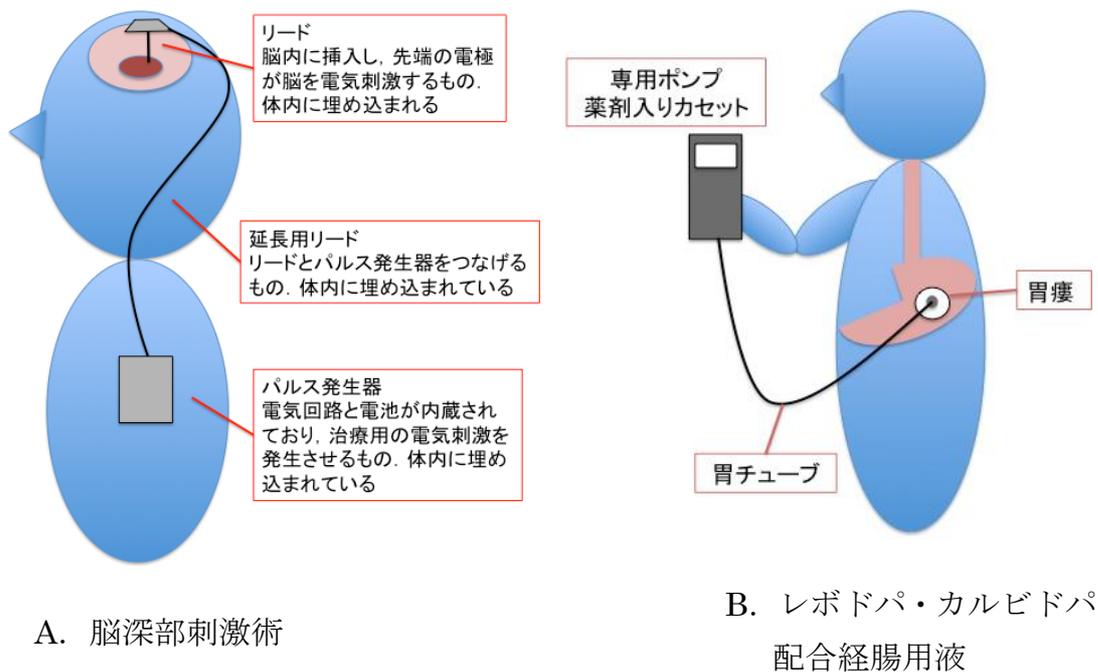


図5 パーキンソン病に対する外科的治療方法

A. 脳深部刺激術 (deep brain stimulation: DBS)

DBSとは脳の深部にある大脳基底核の一部である視床下核や淡蒼球内節、あるいは視床といった部位に埋め込み式の刺激電極を留置し、前胸部皮下に埋め込まれた電池内臓型の電流発生装置から電極先端にパルス電流を流して淡蒼球や視床下核を電気で刺激する治療である。

{和歌山県立医科大学 脳神経外科 HP URL:

<https://www.wakayama-med.ac.jp/med/neurosurgery/content/traid/parkinson.php> (平成29年10月8日)を参考に作成}

B. レボドパ・カルビドパ配合経腸用液 (LCIG; デュオドパ®)

内視鏡を使用して胃ろうを造設し、薬が吸収される空腸までチューブを挿入する。そのチューブに体外式のポンプをつなぎ、レボドパ・カルビドパ製剤を持続的に投与する治療法である。

{順天堂大学医学部附属浦安病院 HP URL:

<http://www.hosp-urayasu.juntendo.ac.jp/medicalcare/neurology/20170127.html> (平成29年10月8日)を参考に作成}

両手術ともベストオン(現状でもっとも良い運動機能状態)までの回復は見込めるが、障害の進行を抑制することはできず、徐々に機能低下を示していく。



図 6 目標到達課題

目標到達課題とは前肢をボックスの前壁に設けたスリットを通して伸ばし，前方の棚に設置された穴に入っているペレットを取らせる課題である．ボックス及びスリットのサイズとの対比として図では1円玉（直径2mm）を置いた．



(1) 指の正中線上への移動



(2) 指の半固定状態



(4) 手の進行運動

(3) 肘の正中線上への移動



(5) 指の伸展運動



(6) 回内運動

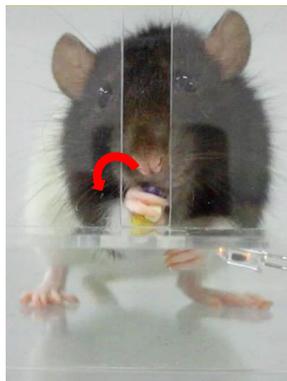
図7 目標到達課題の過程 1

前肢をボックス内に入れ、ペレットに接触するまでの過程を以下に示す。

- (1) 前肢が床から離し、指先を体の正中線上に移動する。
- (2) 前肢が上げるにつれて、指・手首を固定し、前肢が回外運動を行う。
- (3) 指先を体の正中線上に維持しながら、肘を正中線方向へ内転する。
- (4) 前肢が標的となるペレットに向けスリットを通り、進行する。
- (5) 手の進行運動の間に手が徐々に広がる。
- (6) ペレットの上に手が到達すると、手は回内運動し、第5指から第2指の順番に柵に接触し、ペレットに接触する。



(7) 指の伸展運動



(8) 回外運動 1



(9) 回外運動 2



(10) 放出運動

図 8 目標到達課題の過程 2

ペレットを把握し、前肢をボックス内に戻すまでの過程を以下に示す。

- (7) ペレットの上で指が曲げられペレットを握る。そして、ペレットを持ち上げるために、前肢がわずかに進行する。
- (8) 手をボックス内に引き戻しながら、スリットを通るまでに手が約 90° となるように回外運動を行う。
- (9) 手がスリットを通り口まで移動すると、ペレットを口の中に入れるために手はさらに約 45° 回外運動する。
- (10) 口と手が接触し、手がペレットを放出するために開かれる。

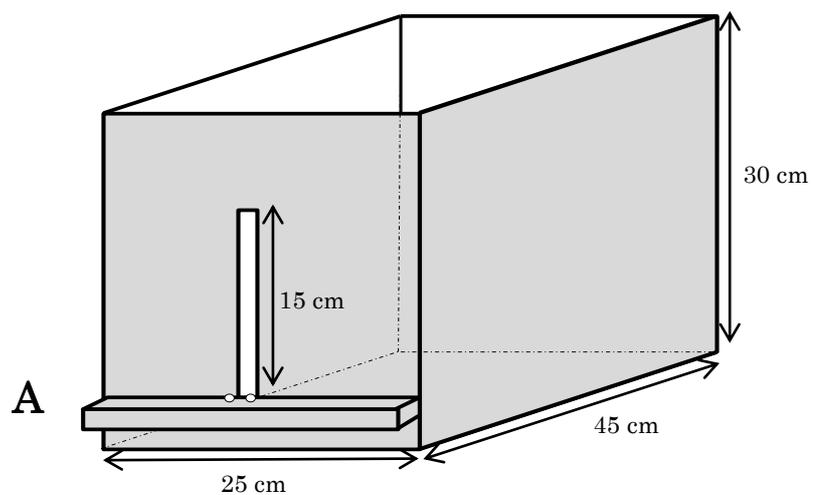


図9 ボックスの模式図 (A)

ボックスの模式図と寸法を示した。ボックスの外観である。前壁にはスリットと棚が取り付けられ、棚の穴に置かれた餌を取るためにラットが細いスリットから手を伸ばす仕組みになっている。

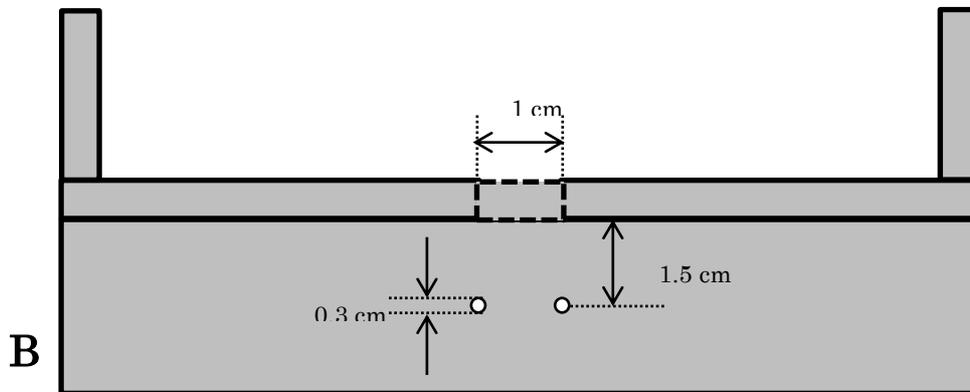


図 10 ボックスの模式図 (B)

ボックスの模式図と寸法を示した。柵を上から見た図である。前壁に幅 1 cm のスリットが空けられ, 直径 0.3 cm の 2 つの穴がスリットの幅と並ぶように設け, この穴に餌を置く。

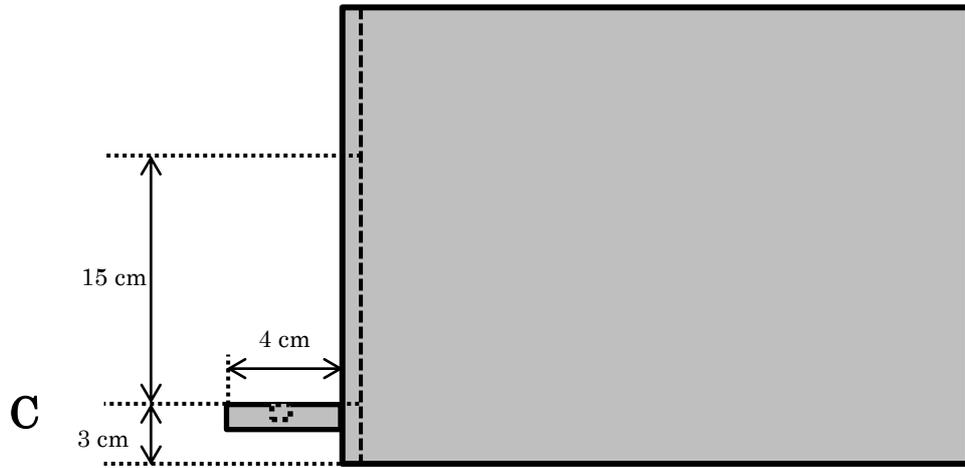


図 11 ボックスの模式図 (C)

ボックスの模式図と寸法を示した。ボックスの側面の図である。棚は床上 3 cm で取り付けられ、そこから高さ 15 cm のスリットが空けられている。

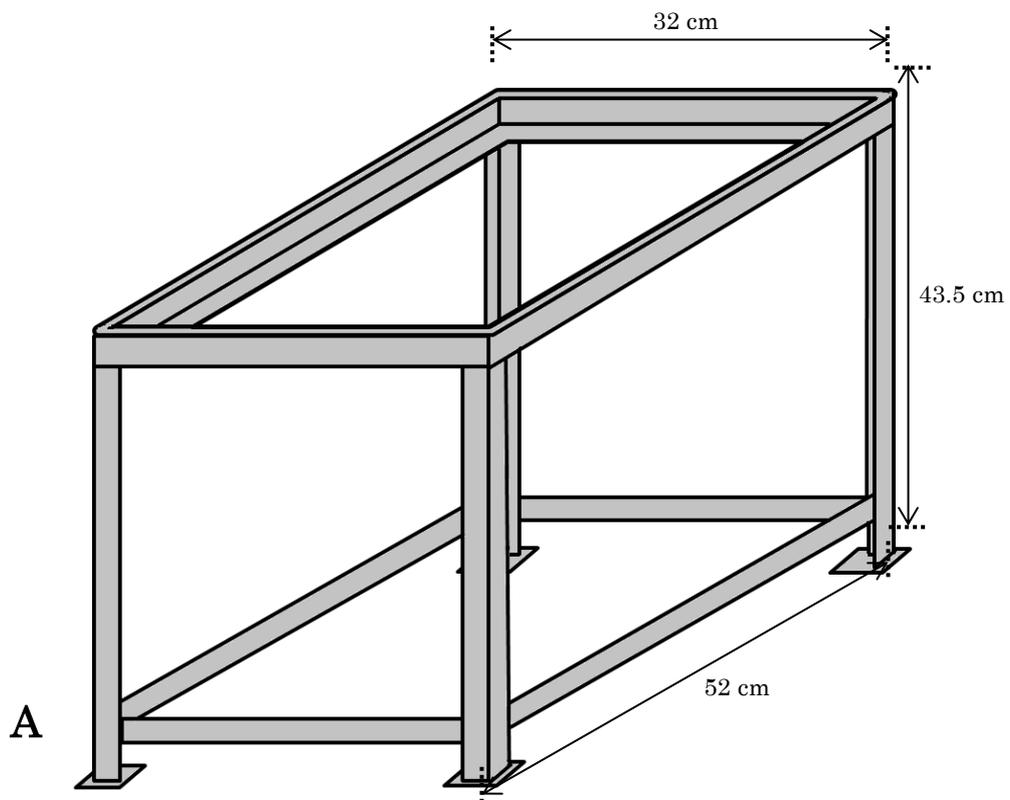


図 12 台の模式図 (A)

ボックスを置く台の模式図と寸法を示した。台の外観を示している。台の中にはカメラを置くスペースが空けられている。

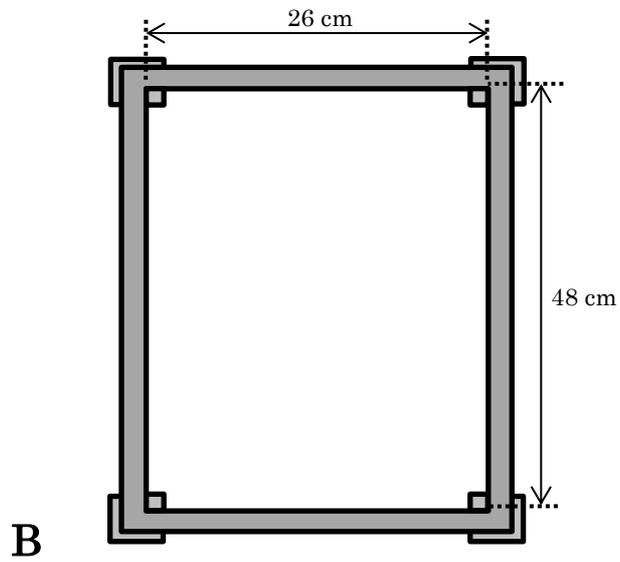


図 13 台の模式図 2 (B)

ボックスを置く台の模式図と寸法を示した。台を上から見た図である。外径と内径の差は上下左右 3 cm ずつになっており、ここにガラス板を置いた。

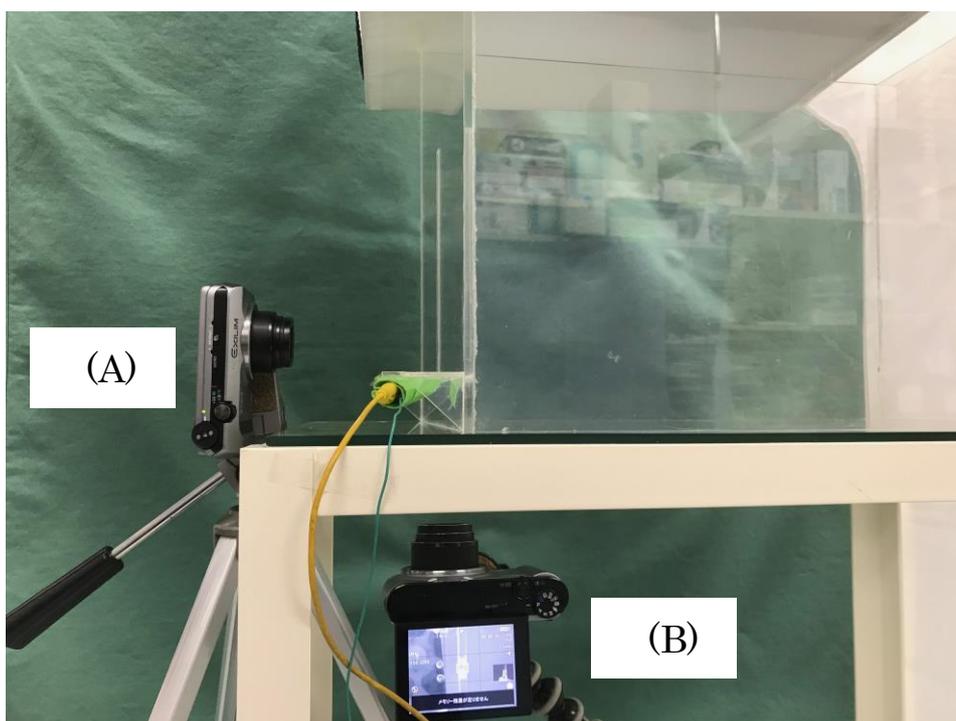


図 14 撮影時の設定

ボックスとカメラの位置関係を側面から見た図である。

(A) 正面から撮影するカメラである。カメラはレンズの高さと棚の高さが同じ高さになるように固定した。

(B) 床面から撮影するカメラである。カメラのレンズ位置とボックス前壁位置が同一の位置になるように固定した。

動画撮影時には不要な物が映らないように、ボックスの上の部分と後ろの部分に白い布を背景として置いて撮影した。

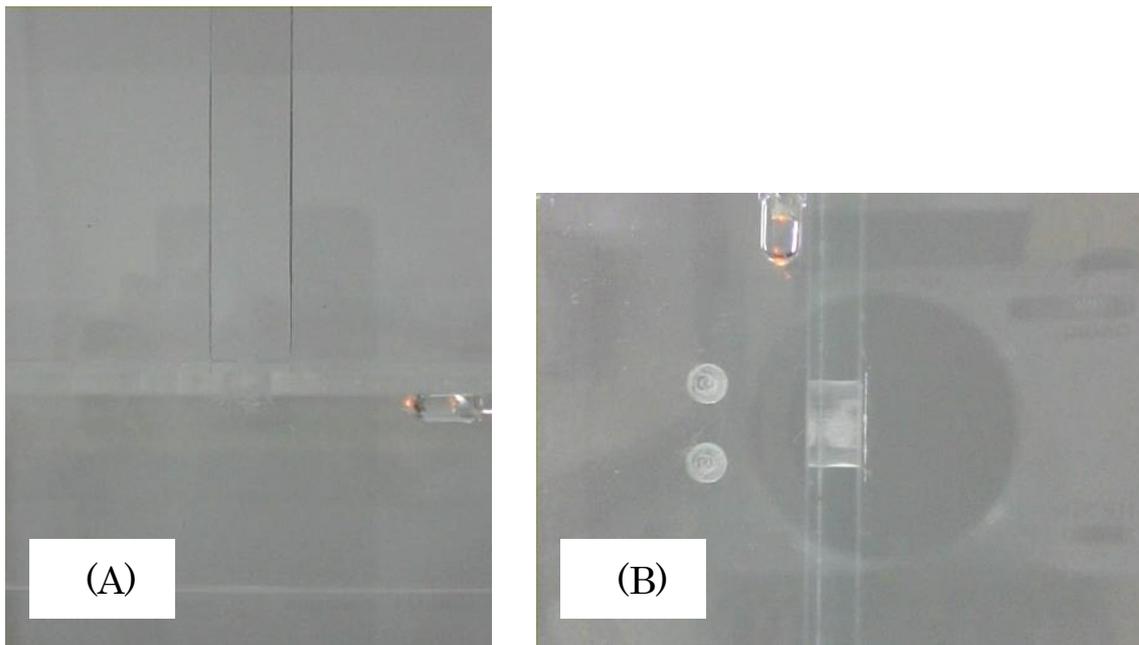


図 15 LED を用いた正面カメラと床面カメラの同期

2 台のカメラを固定した際のカメラ画像（背景画像）を示した。

(A) 正面からの視点で見たカメラの画像である。右端に LED を映している。

(B) 床面からの視点で見たカメラの画像である。画像上部に LED を映している。

両画像に映し込んだ LED の点灯もしくは消灯のタイミングを合わせることで, A, B の画像の同期を図った。

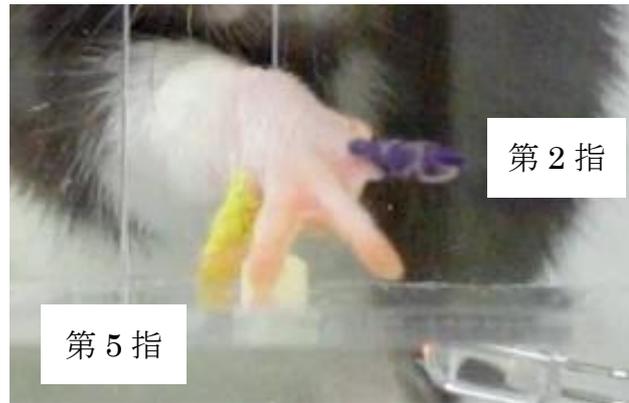


図 16 運動画像解析用ペインティング

ラットの到達運動を解析するための手法として画像処理を用いており，処理時にラットの指を抽出しやすくするために指に色を塗った．色を塗る対象はラットの優位な前肢の第2指と第5指とし，第2指は青色，第5指は黄色とした．

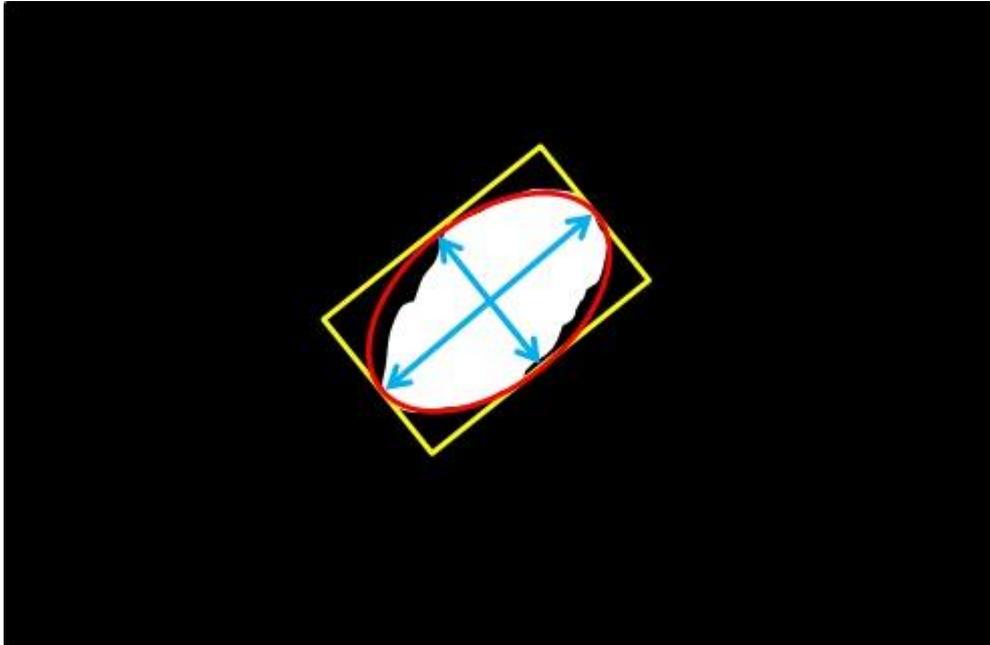


図 17 楕円フィッティングの様式図

楕円フィッティングを行う過程を示した様式図である。白で示された抽出領域に対して領域を囲む黄色の四角形を描画した。この作業には OPEN CV 内の関数である「Find Contours 関数」と「CHAIN_APPROX_NONE」を使用した。そして、そこから四角形に内接する赤の楕円を求めてフィッティングした。この楕円をもとに楕円の長軸と短軸を求め指先位置（指先点）を推定した。

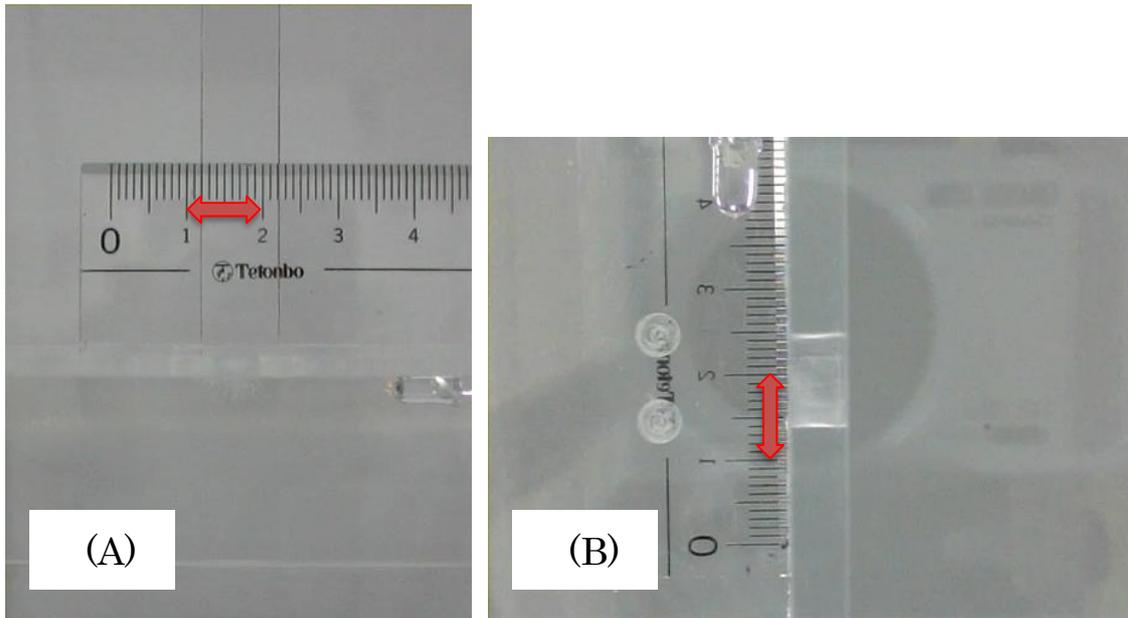
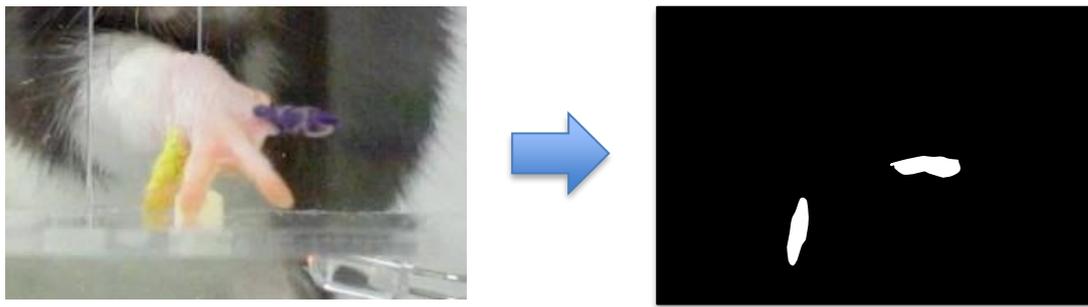


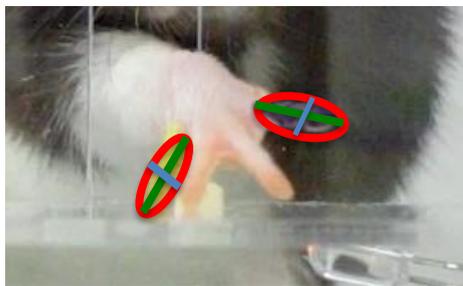
図 18 長さの校正に用いた正面画像 (A) と床面画像 (B)

長さの単位をピクセルからメートルに変換する際に使用する校正画像を示した。
1 cm 間 (赤色の矢印) のピクセル数を測定することによって長さの変換を行った。



(A) 画像の入

(B) 色相抽出



(C) 楕円フィットフィッティング

図 19 正面画像の処理の過程

(A) 画像の入力

記録された画像をプログラムに入力する．示した画像は指の伸展運動の 1 フレームである．

(B) 色相抽出

入力された画像より色相抽出によって青色と黄色の領域を検出する．示した画像は指の伸展運動の青色と黄色の領域を抽出した画像である．

(C) 楕円フィッティング

色相抽出によって検出された青色と黄色の領域それぞれに楕円フィッティングが行われる．赤色で描かれた円がフィッティングされた楕円である．緑色の直線は長軸を示し、水色の直線は短軸を示している．示した画像は指の伸展運動の楕円フィッティング画像である．

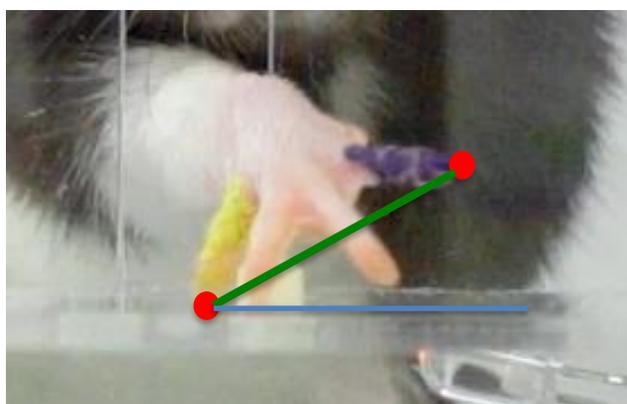


図 20 指先検出画像

楕円フィッティングより得られた長軸から指先点を検出し、距離と角度を計測した画像である。画像は右手のため、長軸を構成する 2 点のうち右側にあるものを指先点としている。赤色の 2 点は指先点を示し、緑色の直線は距離を示し、緑色の直線と水色の水平線との間の角度を計測している。示した画像は指の伸展運動時の計測結果の画像である。



図 21 姿勢状態の検出画像

画像より目視にて両涙嚢切痕を確認した．赤色の 2 点は両涙嚢切痕を示し，それを結んだ線と水色の水平線が成す角度を頭部傾斜角度として算出した．示した画像は手がペレットに触れた瞬間の画像である．

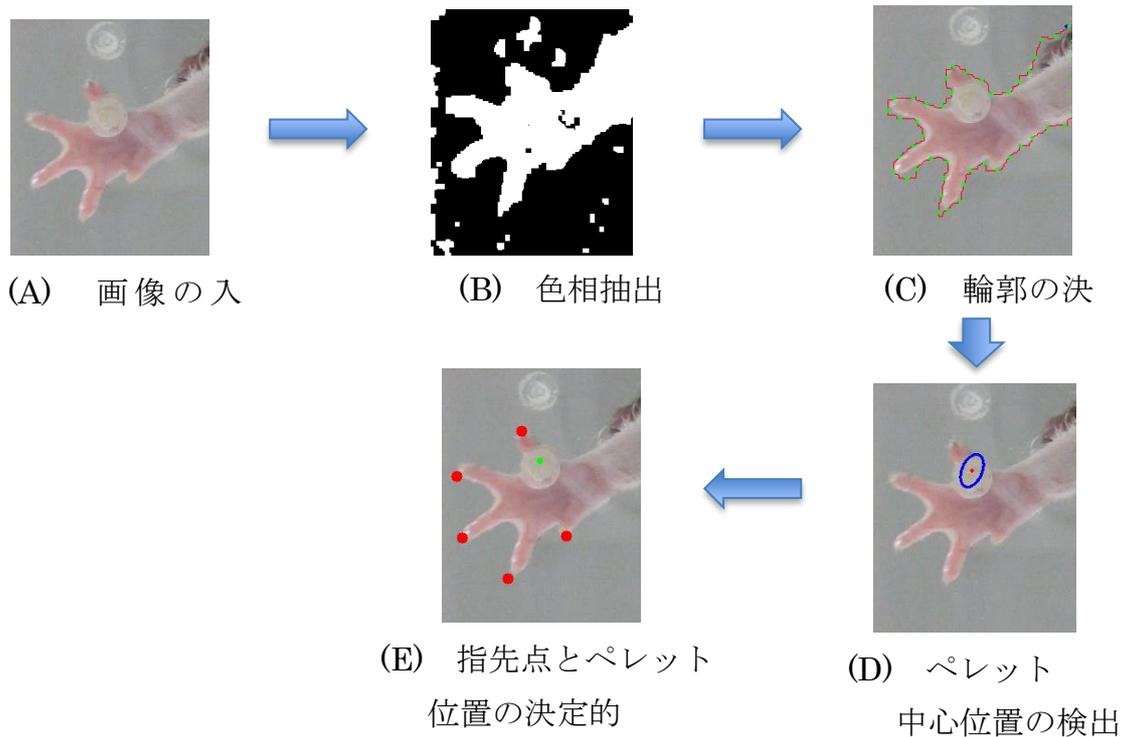


図 22 床面画像の処理の過程

(A) 画像の入力

画像を入力する。示した画像は左手がペレットに触れた瞬間である。

(B) 色相抽出

色相抽出法により 2 値化した画像である。最大面積を示すラベル領域を手の領域とした。

(C) 輪郭の決定

ノイズ除去、ラベリング処理が行われ、抽出された手の領域に対して輪郭を一周するまで時計回りに点（緑色）が一定の間隔で打たれ輪郭（赤色）が定められた。

(D) ペレット中心位置の検出

色相抽出と楕円フィッティングによってペレットの中心位置が検出された画像である。楕円は青色で描かれ、中心点は赤色の点で示した。

(E) 指先点とペレット位置の決定

(C) と (D) より各指の指先点（赤色）とペレットの中心位置（緑色）が定められた。



(A) 最大距離



(B) 回旋運動
最大角度
最小角度
運動範囲



(C) 頭部傾斜角度

図 23 正面画像における評価項目

正面画像からは以下の 3 項目に対する評価を行った。

(A) 最大距離

第 2 指 (赤い点) と第 5 指 (赤い点) の指先間の距離 (緑色の線) における最大値を用いた。

(B) 回旋運動の最大角度・最小角度・運動範囲

ペレットに前肢が触れるまでの第 2 指 (赤い点) と第 5 指 (赤い点) の指先点を結んだ直線 (緑色) と水平線 (水色) が成す角度 (赤い範囲) から最大回外角度 (最大角度) と最小回外角度 (最小角度) を求めた。

運動範囲は最大角度から最小角度を減じた値とした。

(C) 頭部傾斜角度

左右の涙嚢切痕 (赤い点) を結んだ直線 (緑色) と水平線 (水色) が成す角度 (赤い範囲) を求めた。測定は前肢がペレットに接触した瞬間とした。

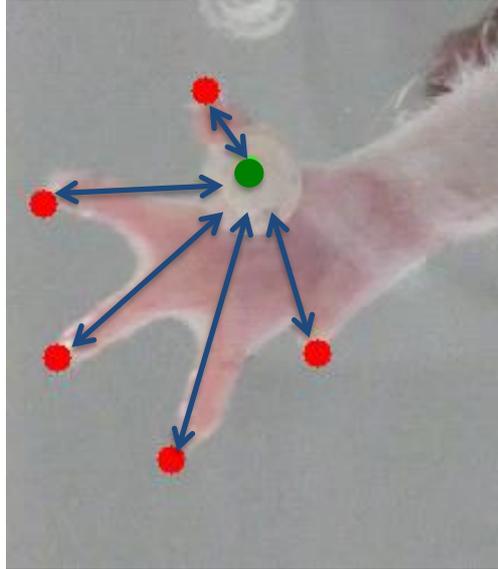


図 24 各指におけるペレット中心からの直線距離

各指におけるペレット中心からの直線距離として、床面視点の解析から得られた相対距離の結果を基に三平方の定理を使用して各指先位置までの直線距離を算出した。測定は前肢がペレットに接触した瞬間とした。

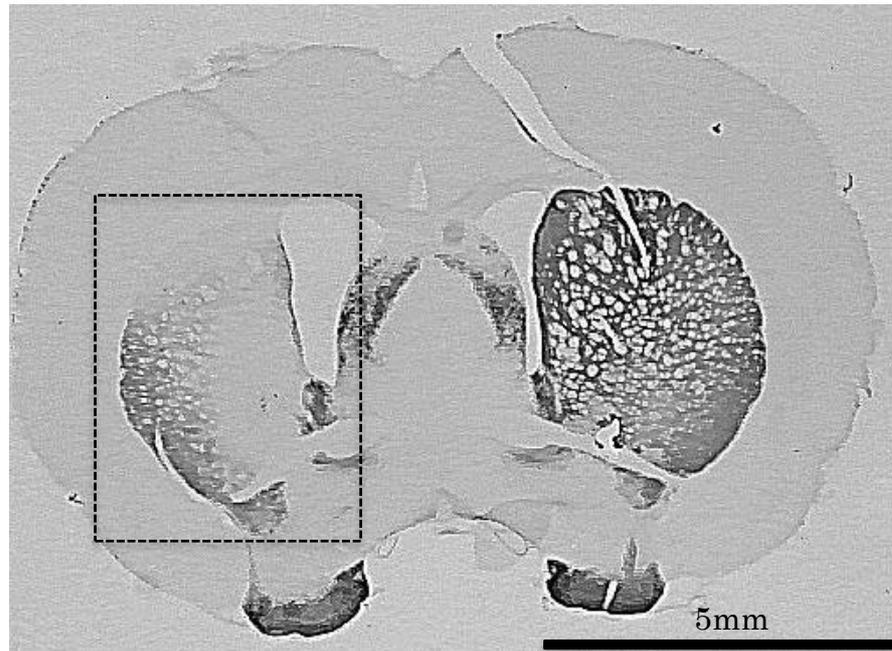


図 25 Tyrosine Hydroxylase (TH) 免疫染色

TH 染色された脳切片の代表例を示した. 本研究では灌流固定した脳に対して TH 免疫染色を行ない, 6-OHDA による線条体の損傷を確認した (損傷部を点線にて囲い表示). 損傷側の線条体では TH 陽性細胞 (濃く染色されている個所) が著しく減少していることが分かる.

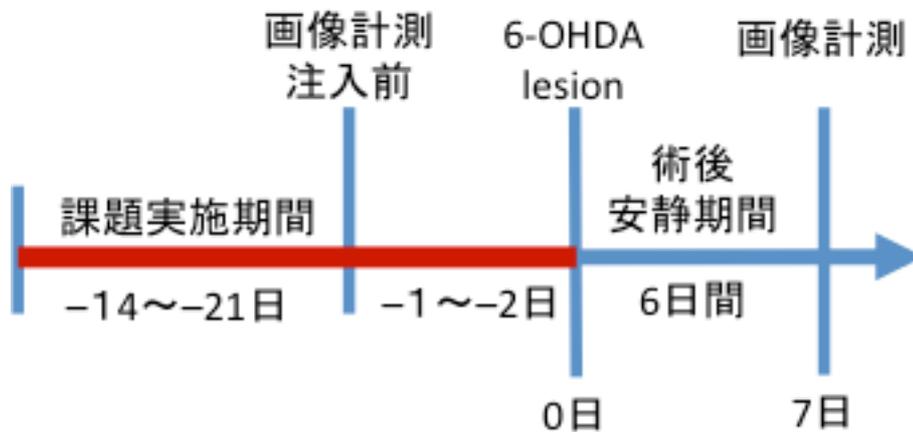


図 26 パーキンソン病モデルラットの運動特性の検証における実験手順

実験手順として、まず、課題学習のために 14 日から 21 日の課題実施期間（赤）を設けた。そして、課題成功率が 70% を超えた後に 6-OHDA 注入前の画像計測を実施した。6-OHDA 注入後は 6 日間の術後後安静期間を設け、術後 7 日目に注入後の画像計測を実施した。

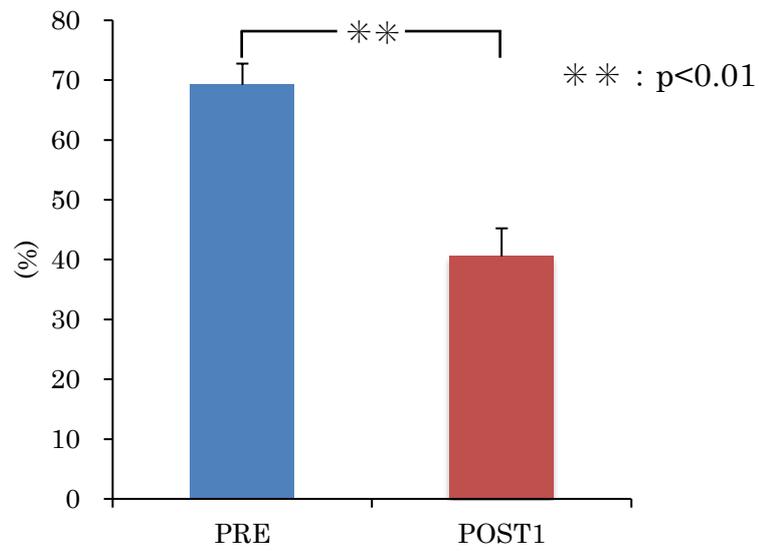


図 27 成功率の比較

縦軸は 20 施行の RT における成功率を示している。

PRE (青色) と比較し POST1 (赤色) では有意な成功率の低下を認めた (PRE : 69.2 ± 3.5% POST1 : 40.5 ± 4.6%) .

N=19, Mean±SEM.

* : p<0.05

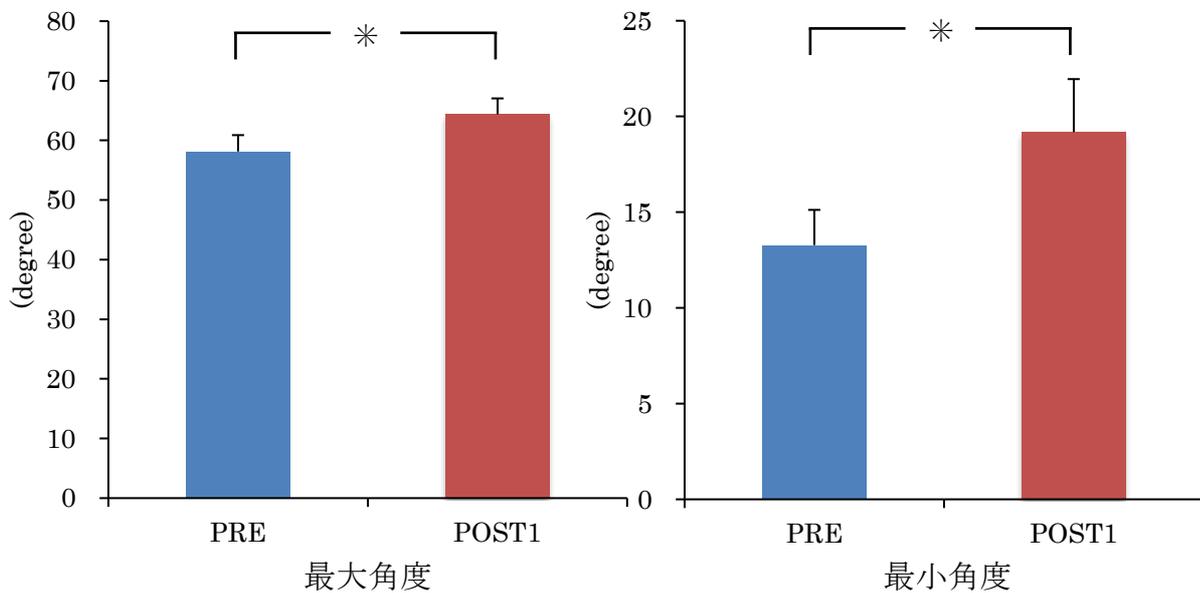


図 28 最大角度の比較

縦軸は第2指と第5指の先端を結んだ直線と水平線が成した前肢の回外角度を示している。最大角度、最小角度ともに有意な増加を示し、運動範囲が鉛直方向へ変位している。

(A) 最大角度

PRE (青色) と比較し POST1 (赤色) では有意な最大角度の増加を認めた (PRE : $58.1 \pm 2.7^\circ$ POST1 : $64.3 \pm 2.6^\circ$) .

(B) 最小角度

PRE (青色) と比較し POST1 (赤色) では有意な最小角度の増加を認めた (PRE : $13.2 \pm 1.8^\circ$ POST1 : $19.1 \pm 2.7^\circ$) .

N=19, Mean±SEM.

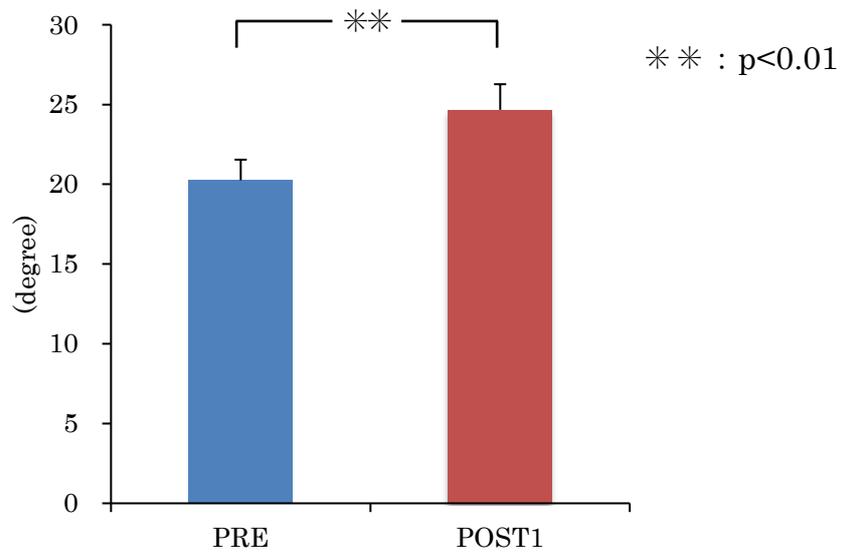


図 29 頭部傾斜角度の比較

縦軸は前肢がペレットに触れた瞬間の両涙嚢切痕を結んだ線と水平線が成した角度を示している。

PRE (青色) と比較し POST1 (赤色) では有意に RT を行う優位な前肢側への傾斜頭部が増加した (PRE : $20.2 \pm 1.2^\circ$ POST1 : $24.6 \pm 1.6^\circ$) .

N=19, Mean \pm SEM.

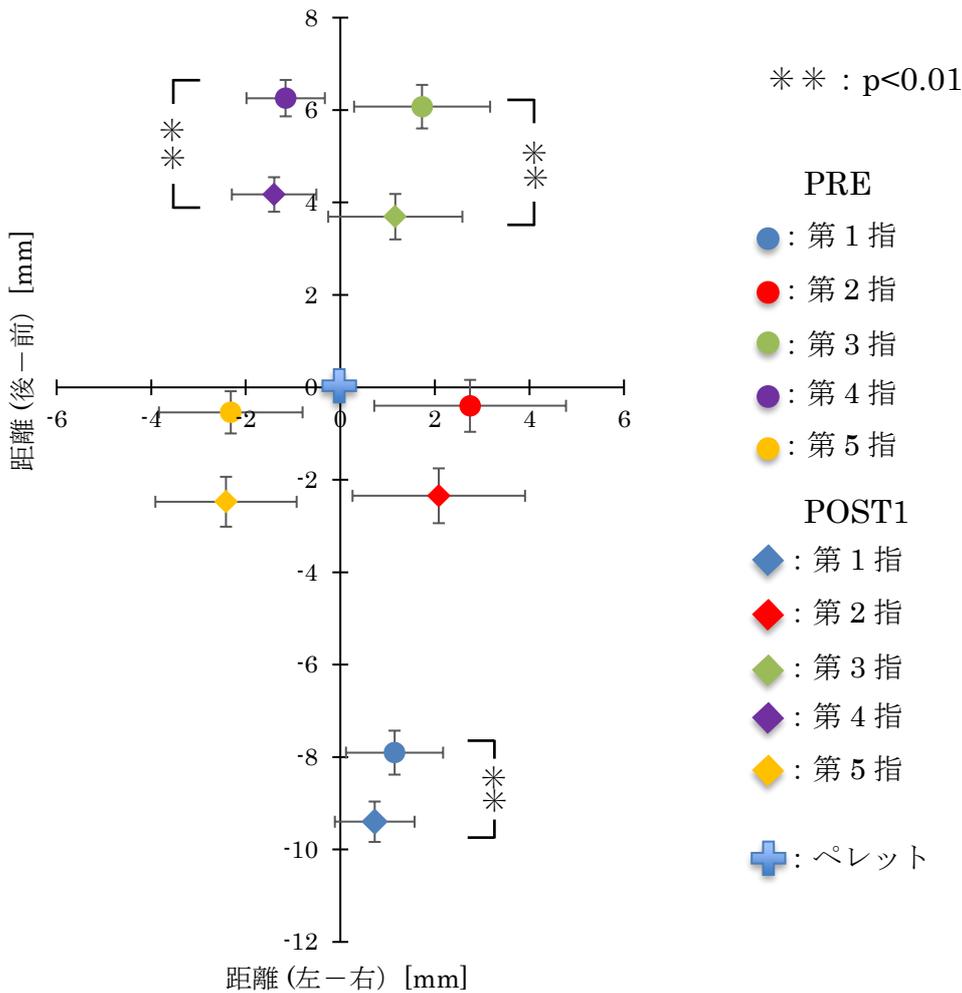


図 30 各指とペレットとの直線距離の比較

縦軸はペレットに対する相対的な前後を示し，横軸はペレットに対する相対的な左右を示している．統計的検定による有意水準は各指とペレットとの直線距離に対する結果を示している．距離の算出にはペレット中心位置を原点として三平方の定理を使用した．

第1指において PRE と比較し有意に POST1 にてペレットとの距離が増加し，第3指，第4指においては PRE と比較し POST1 にて有意に減少した（第1指 PRE : 9.1 ± 0.3 mm POST1 : 10.1 ± 0.3 mm, 第3指 PRE : 8.7 ± 0.4 mm POST1 : 7.2 ± 0.4 mm, 第4指 PRE : 7.1 ± 0.4 mm POST1 : 5.4 ± 0.6 mm $p < 0.01$) . N=19, Mean±SEM.

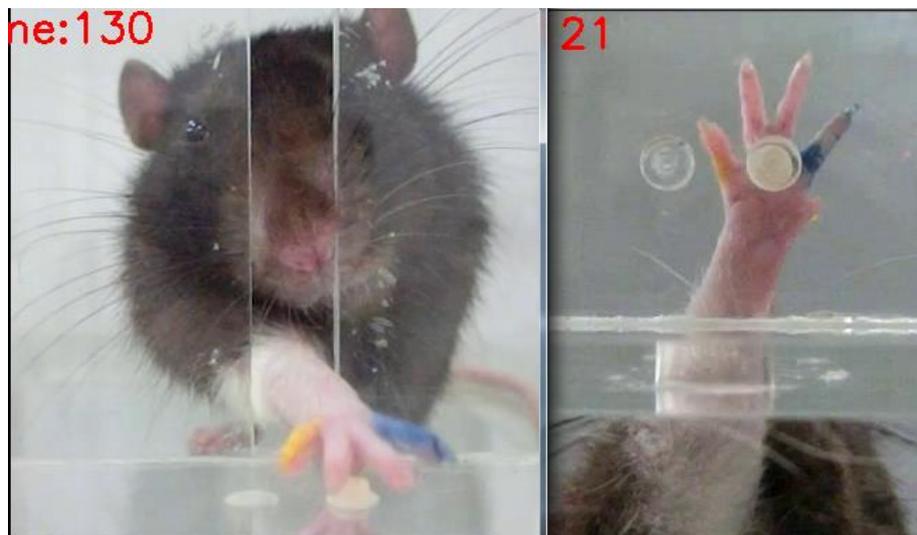


図 31 PRE における代表的な RT 画像

PRE においてペレットに前肢が触れた瞬間の画像を示した。

左図の正面画像からは頭部傾斜角度は水平線に近く，姿勢が安定している様子がわかる。また，右図の床面画像からは，手掌の中央部でペレットに触れていることがわかる。



図 32 POST1 における代表的な RT 画像

POST1 に置いてペレットに前肢が触れた瞬間の画像を示した。

左図の正面画像からは，頭部傾斜角度が PRE に比べ RT を行う優位な前肢側へ増していることがわかる。また，第 4 指の高度が低いペレットと接触している。そのため，右図の床面画像からは，手掌の中央部がペレットの直上に移動する前に 4 指が接触してしまっていることがわかる。



図 33 PD 患者における斜め徴候 (Pisa 症候群)

PD 患者においては症状の進行に左右差が生じることから、症状が強く筋の固縮を強く認める側に傾斜する斜め徴候 (Pisa 症候群) を認める事がある。

(久野貞子：姿勢異常・すくみ足・転倒とその対策．難病と在宅ケア 20 (5) : 29-32, 2014 より引用)

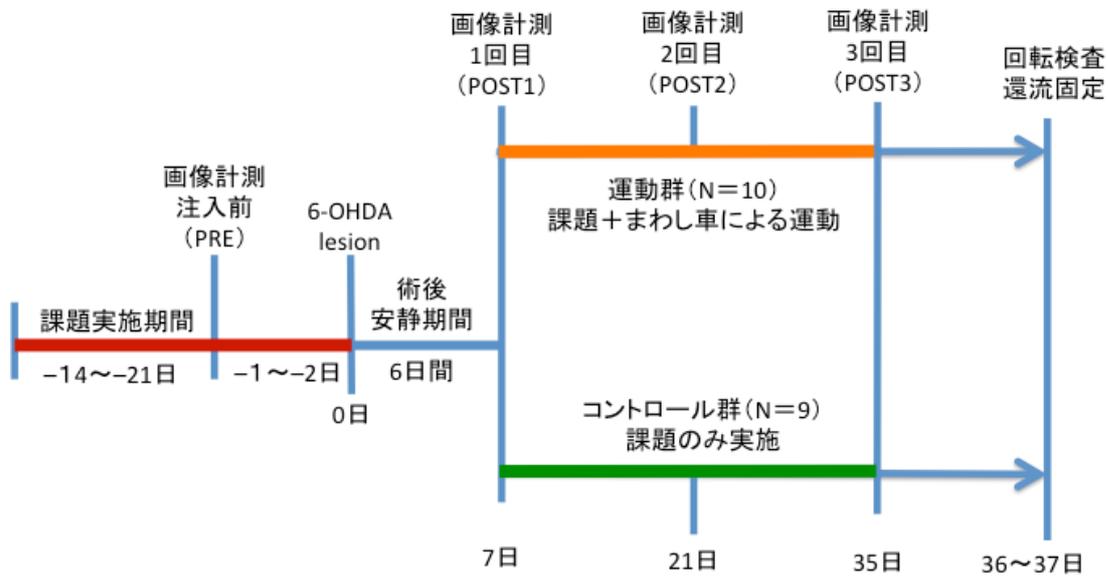
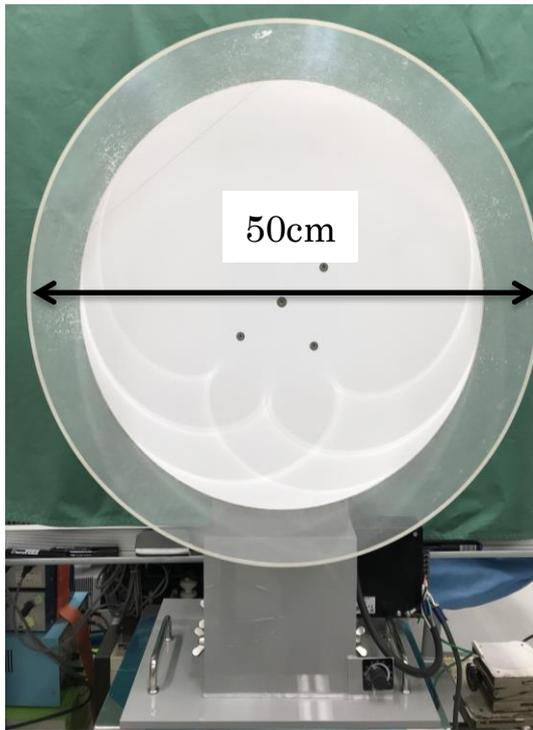
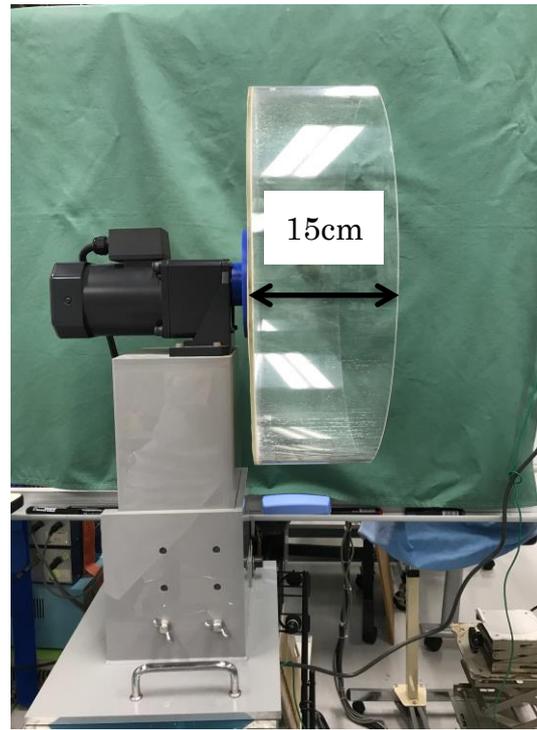


図 34 パーキンソン病モデルラットに対する運動介入効果の検証における実験手順

課題学習のために 14 日から 21 日の課題実施期間 (赤) を設け、課題成功率が 70%を超えた後に 6-OHDA 注入前の画像計測 (PRE) を実施した。課題は 6-OHDA 注入前日まで実施した。6-OHDA 注入後は 6 日間の術後安静期間を設け術後 7 日目に注入後の画像計測 (POST1) を実施した。その後、運動群とコントロール群に分け運動群に対しては課題とまわし車による運動を実施した。コントロール群は課題のみ実施した。両群共に 21 日目 (POST2) , 35 日目 (POST3) に画像計測を行い、36-37 日目にアポモルフィン誘発回転検査および還流固定を実施した。



(A) 正面図



(B) 側面図

図 35 ホイール型運動装置の概要

ホイール型運動装置は厚さ 5 mm の透明アクリル性円柱（直径 50 cm，幅 15 cm）で片面に対してアクリル円盤が設置されている。そして，アクリル円盤側の中心部がモーター装置に固定させ，0-35 cm/sec の任意の速度に調整することができる。

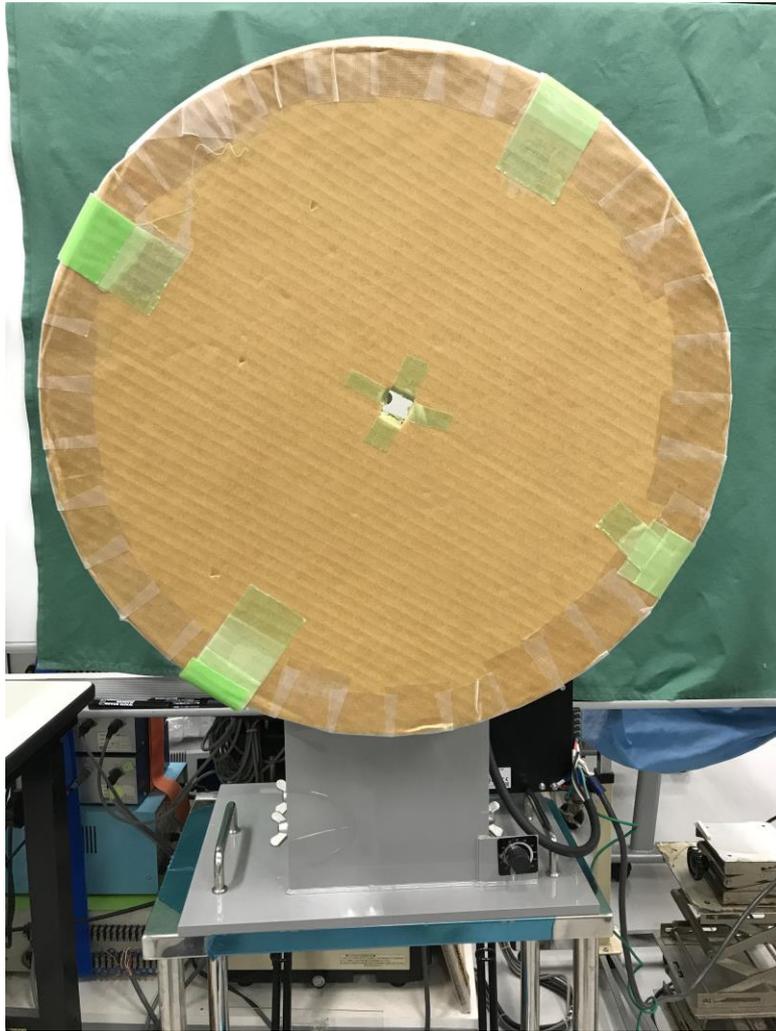


図 36 ホイール型運動装置による運動介入

運動群に対する運動介入は1日30分間を1週間に5回とし、運動負荷は10 m/minとして実施した。ホイール型運動装置での運動を学習させるために、運動導入から2, 3回程度は餌を使用し、運動方向を誘導することで安定したホイール内での歩行を獲得させた。

運動中はアクリル円盤の反対側よりラットが逃走しない様に、アクリル円盤と同型の蓋をダンボールにて作成し設置した。

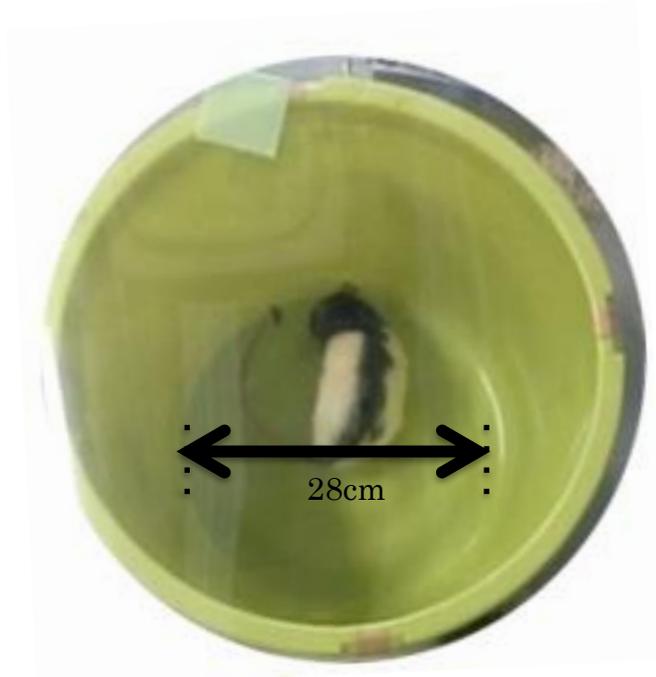


図 37 アポモルフィン誘発回転検査

PD モデルラットでは損傷側のドーパミン受容体の結合が高まっていることから、アポモルフィンの注入により脳損傷側と反対側方向（脳健常側）への継続した回転運動が生じる。この現象を利用し、一定時間内の回転数を測定することでドーパミン作動性ニューロンの残存状況の把握に用いられる。

本研究では Tuon ら [41] と同様に底面の直径が 28 cm のプラスチック製の容器を使用して検査を実施した。

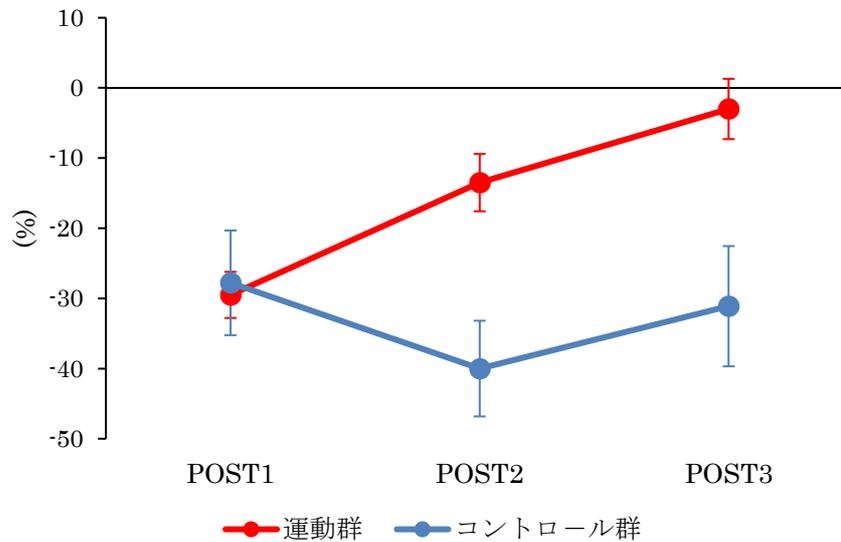


図 38 成功率

縦軸は各測定時期における 20 回の RT の成功率の結果から、PRE における同結果を減じた値を示している。

成功率では 2 元配置分散分析の結果、交互作用を認めた。運動群では POST2 の時点で RT 成功率がコントロール群に比べ大幅に改善し、POST3 においても改善傾向が継続していることがわかる（運動群 POST1：-29.5±3.2%，POST2：-13.5±4.0%，POST3：-3.0±4.2%）。一方、コントロール群では、POST2 にて RT 成功率はさらに低下を示すが、POST3 では軽度の改善を示している（コントロール群 POST1：-27.7±7.4% POST2：-40.0±6.8% POST3：-31.1±8.5%）。以上より、運動の効果として早期より成功率を経時的に改善させることが示された。また、運動を行わない場合、成功率は悪化した後、一定期間経過後には改善する傾向が示された。

運動群：N=10，コントロール群：N=9，Mean±SEM.

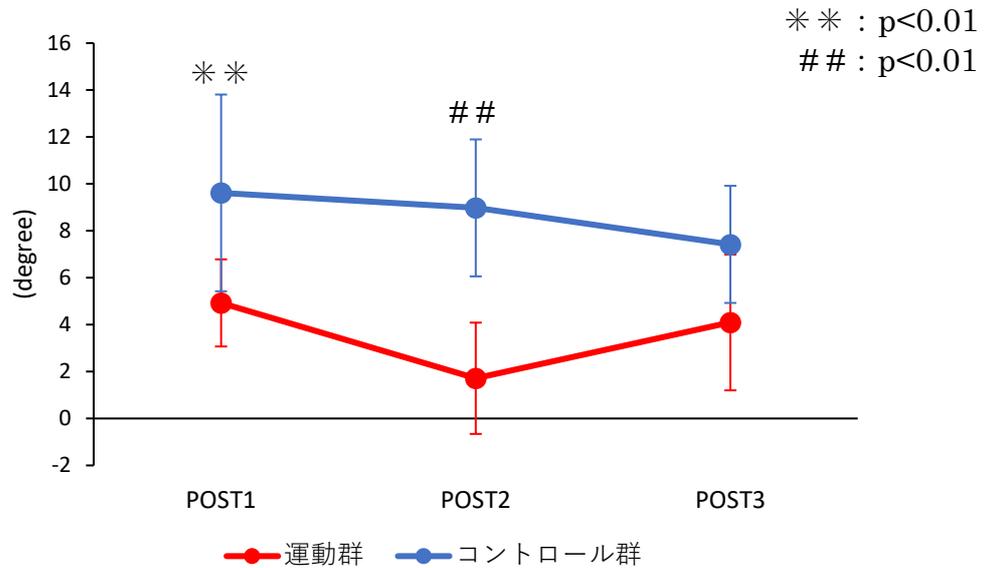


図 39 頭部傾斜角度

縦軸は各測定時期における頭部傾斜角度の結果から、PREにおける同結果を減じた値を示している。

頭部傾斜角度の測定時期では、2元配置分散分析の結果、測定時期においてPOST1とPOST3、POST2とPOST3の間で有意にPOST3は優位な前肢側への傾斜角度の低下を認めた（運動群 POST1: $-6.1 \pm 1.1^\circ$, POST2: $-2.4 \pm 1.1^\circ$, POST3: $-1.0 \pm 0.5^\circ$, コントロール群 POST1: $5.7 \pm 1.5^\circ$, POST2: $5.5 \pm 0.6^\circ$, POST3: $2.2 \pm 1.0^\circ$. 統計的検定法: Bonferroni法). 運動介入の有無では有意な差は認めなかった（統計的検定法: 2元配置分散分析. $p=0.17$).

以上より、両群ともに経時的に改善することが示されたが、運動群がPOST1とPOST2の比較で大きく改善を示すのに対し、コントロール群ではPOST2とPOST3の比較で大きな改善を示した。このことから、両群の改善時期には差があることが示された。

運動群: N=10, コントロール群: N=9, Mean±SEM.

** : POST1 vs POST3 ## : POST1 vs POST3

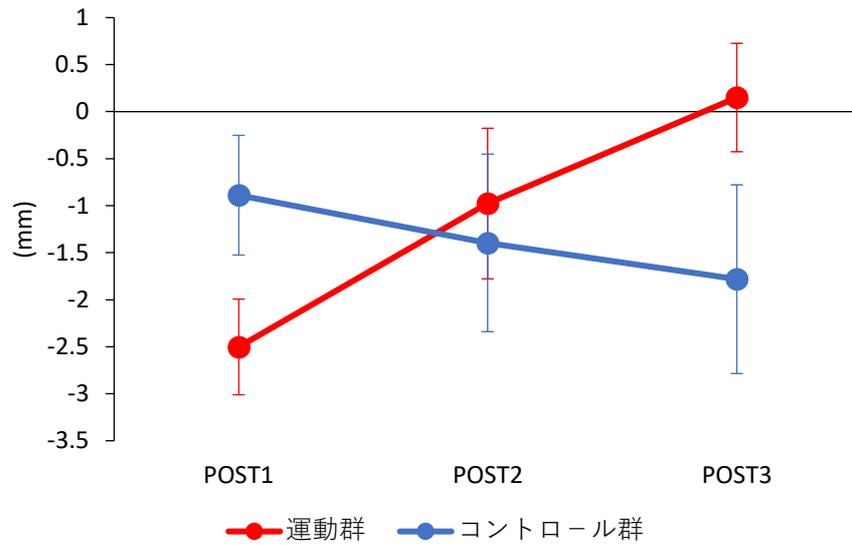


図 40 第 4 指とペレットとの直線距離

縦軸は各測定時期における第 4 指の結果から、PRE における同結果を減じた値を示している。

第 4 指では 2 元配置分散分析の結果、交互作用を認めた。運動群では POST1 においてはコントロール群よりも PRE よりペレットへ近づいている結果を示したが、POST2 では同程度となり、POST3 では、PRE 程度まで改善を認めた (POST1 : -2.5 ± 0.5 mm, POST2 : -0.9 ± 0.8 mm, POST3 : 1.1 ± 0.6 mm) 。 コントロール群では POST1, POST2, POST3 と徐々にペレットへ近づく傾向を示した (POST1 : -0.8 ± 0.6 mm POST2 : -1.3 ± 0.6 mm POST3 : -1.7 ± 1.0 mm) 。

運動群 : N=10, コントロール群 : N=9, Mean±SEM.

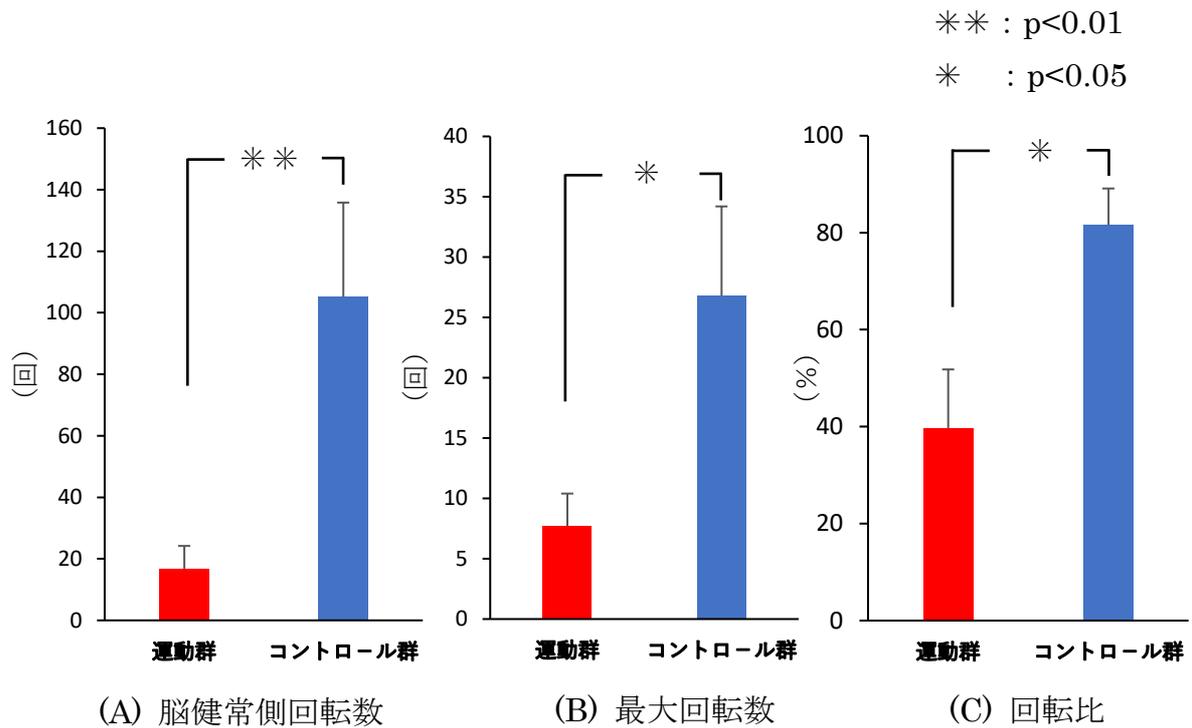


図 41 アポモルフィン誘発回転検査

(A) 脳健常側回転数

縦軸は 30 分間の脳健常側への総回転数（脳健常側回転数）を示している。

運動群はコントロール群と比較して有意に脳健常側への回転数が少なかった（運動群：16.8±2.3 回 コントロール群：105.1±30.7 回）。

(C) 最大回転数

縦軸は 30 分の測定時間を 5 分毎に分けた際の脳健常側への最大回転数（最大回転数）を示している。運動群はコントロール群と比較して有意に回転数が少なかった（運動群：7.7±2.7 回 コントロール群：26.8±7.4 回）。

(B) 回転比

縦軸は 30 分間の脳損傷側と脳健常側への総回転数に対する脳健常側への回転比を示している。運動群はコントロール群と比較して有意に脳健常側への回転比が少なかった（運動群：39.6±12.2% コントロール群：81.6±7.5%）。

運動群：N=10，コントロール群：N=9，Mean±SEM.



図 42 ペダル運動機器

ペダル運動の様子を示した。ペダル運動器は市販されている物を使用した。運動内容は1日20分の有酸素運動を自宅にて座位で実施した。運動負荷はサチュレーションモニターを使用し、脈拍をもとに自己管理とした。

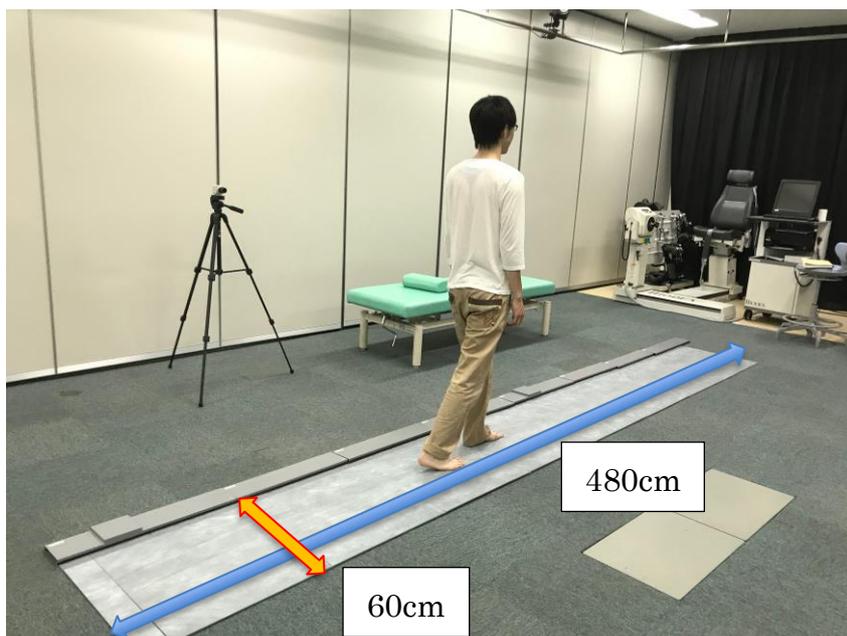


図 43 シート式歩行解析システムによる歩行測定

10m の歩行路の中間に 480×60 cm のシート式歩行分析装置システム（ウォーク way MW-1000 アニマ株式会社）を用いて歩行（歩行速度、ケイデンス、ストライド）を測定した。



図 44 Hand-held dynamometer による筋力測定

下肢の筋力として hand-held dynamometer (HHD) (μ Tas F-1 アニマ株式会社) を用いて大腿四頭筋筋力を測定した。測定時は代償を防ぐために上肢は胸の前で組み、体幹は伸展しないように対象者に指示をした。



図 45 指タップテスト機器

本研究では指タップテストの測定に我々が開発した画像解析による指の開閉速度や運動の軌跡を定量的に測定できる機械（竹井機器工業株式会社）を用いた。被験者は母指先端と示指先端にマーカーを着けた黒い手袋を装着し、指タップを解析カメラにて記録し解析した。

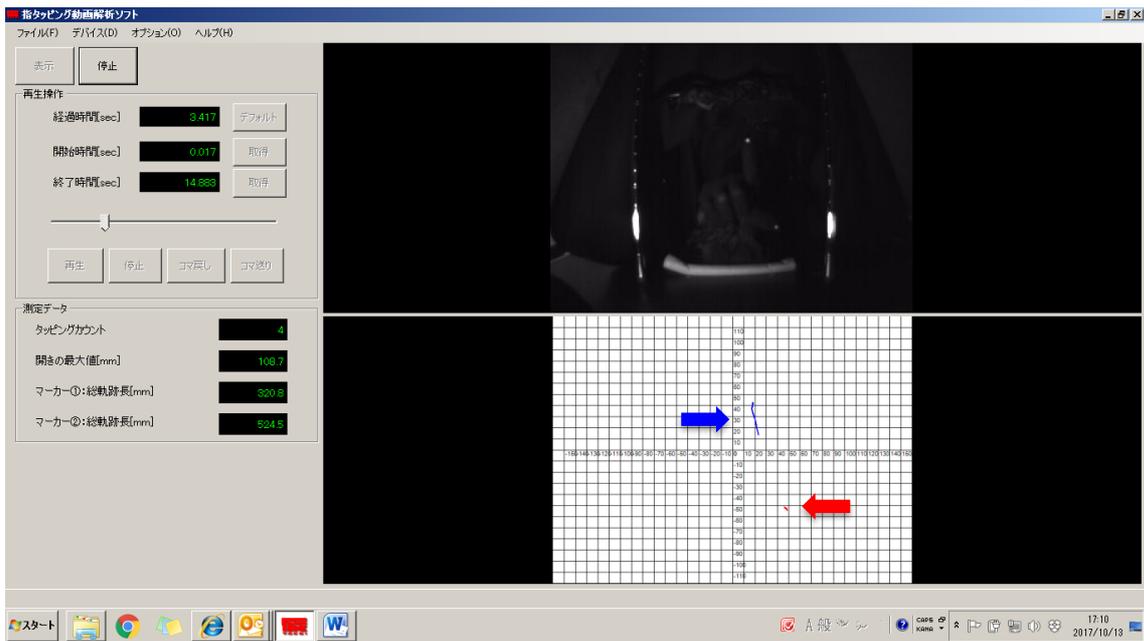


図 46 指タップテスト機器 解析画面

指タップテスト機器にて取得した画像を専用ソフトにて解析した。画面下半分の赤い矢印で示した軌跡が第 1 指の動きを表し、青い矢印で示した軌跡が第 2 指の動きを表している。

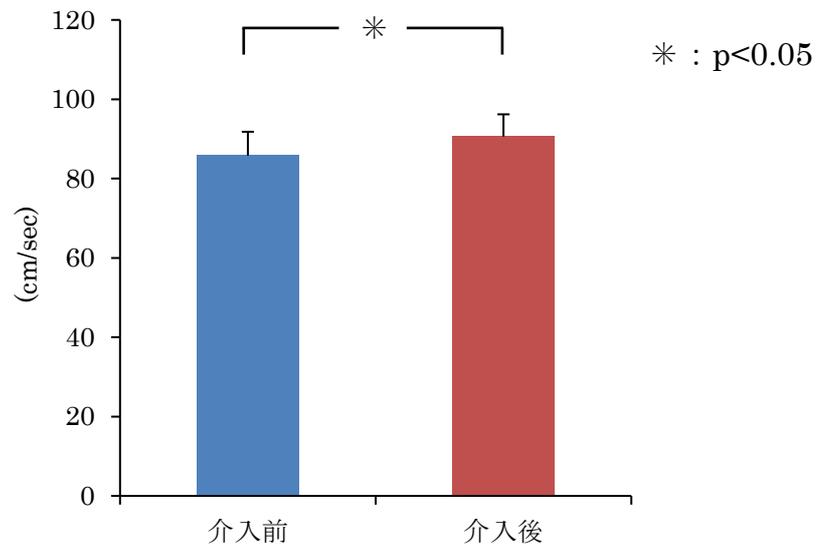


図 47 歩行速度

縦軸は歩行速度を示している。介入前と比較し介入後において有意な増加を認めた (介入前 : $85.8 \pm 6.0 \text{ cm/sec}$ 介入後 : $90.6 \pm 5.6 \text{ cm/sec}$) 。
N=25, Mean \pm SEM.

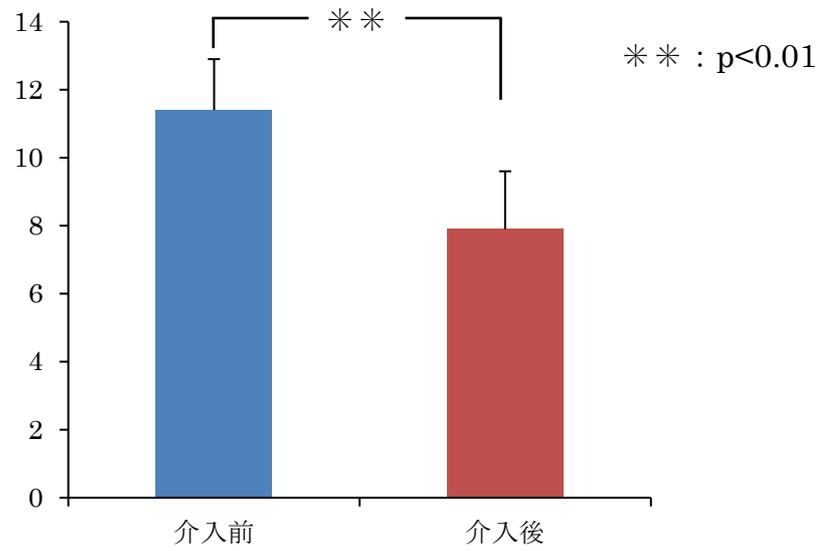


図 48 UPDRS3

縦軸は UPDRS3 の総得点を示している。総得点は高値を示すほど重症であり、介入前と比較し介入後において有意な改善を認めた（介入前：11.4±1.5 介入後：7.9±1.7）。

N=25, Mean±SEM.

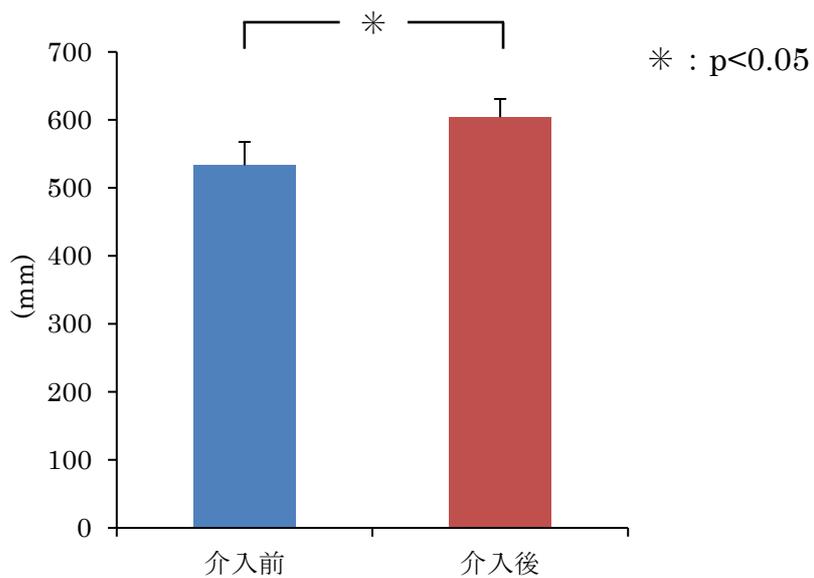


図 49 総軌跡長

縦軸は総軌跡長（第 1 指と第 2 指の総軌跡長の平均）を示している。介入前と比較し介入後において有意な増加を認めた（介入前：533.4±34.2mm 介入後 604.1±26.7mm）。

N=25, Mean±SEM.

表1 パーキンソン病の経過中に認められる諸症状

1.	運動症状	
	三大症状	振戦, 固縮, 無動
	四大症状	上記三症状+姿勢反射障害
	歩行障害	小刻み歩行, すくみ足
	(運動合併症: 症状の日内変動とジスキネイジア) *1	
2.	非運動症状	
	嗅覚障害	
	睡眠障害, 覚醒障害	
	認知機能障害	
	(精神症状) *2	
	気分障害: うつ状態	
	ドーパミン調整異常症候群: 衝動抑制障害, 反復常同行動	
	自律神経症状: (起立性低血圧), 排尿障害, 性機能障害	
	消化管運動障害, 発汗障害	
3.	その他	
	(悪性症候群) *3	
	疲労	

*1L-ドーパ長期服用により, *2PD 自体あるいは抗 PD 薬の影響により, *3抗 PD 薬の急激な変更か他の要因が加わり, 各々生じる可能性がある.

(水野美邦, 近藤智善: よくわかるパーキンソン病のすべて. 第 2 版, p7, 永井書店, 大阪 2011 を参考に作成)

表 2 パーキンソン病 4 大症候

	症状
振戦	振戦とは震えのことであり，初発症状の頻度として最も高い．筋肉が収縮していない安静時の目立つ「安静時」振戦が特徴で，毎秒 4-6 回 (4-6Hz) の規則的なものである．
固縮	PD による錐体外路の症状では屈筋，伸筋ともに筋ト-ヌス (筋の緊張状態) の亢進 (硬さ) を認め固縮と呼ばれる．この筋肉に感じる抵抗感には持続的に一様に
無動	PD 患者は運動麻痺がないにもかかわらず，自発的な動作が少なくなり，緩慢となり，やがて欠如する．この動作の減少を寡動症，動作の緩慢を動作緩慢，欠如を無動症と呼ぶ．
姿勢反射障害	PD 患者の立位姿勢は上半身を前屈し，上肢は軽く肘関節を屈曲させ前方に垂らし，膝も軽く曲げた前屈前傾姿勢となる．患者に安静立位の姿勢をとらせ後方に軽く引くと体勢を立て直せずに小走りに足を送ったり，倒れてしまう．この現象を後方突進現象と呼び，出現すると Hoehn&Yahr の重症度分類 III 度となる．

(水野美邦，近藤智善：よくわかるパーキンソン病のすべて．第 2 版，p3-6，永井書店，大阪 2011 を参考に作成)

表 3 Hoehn & Yahr の重症度分類

Hoehn & Yahr 分類	症状
Stage I	症状は一側性で機能障害はないか，あっても軽度
Stage II	両側性の障害はあるが，姿勢反射障害は認めない
Stage III	立ち直り反射に障害がみられ，活動は制限されるが，自力での生活が可能
Stage IV	重篤な機能障害を有し，自力のみの生活は困難となるが，支えられずに歩くことはどうにか可能
Stage V	立つことは不可能となり，介護なしにはベッド，車いすの生活を余儀無くされる

(水野美邦，近藤智善：よくわかるパーキンソン病のすべて．第 2 版，p18，永井書店，大阪，2011 を参考に作成)

表 4 パーキンソン病患者の ADL 症状

H&Y	n	歩行 (名)		立ち上がり (名)		寝返り (名)		食事 (名)		大便 (名)		小便 (名)	
		ON 時	OFF 時	ON 時	OFF 時	ON 時	OFF 時	ON 時	OFF 時	ON 時	OFF 時	ON 時	OFF 時
全体	71	14	26	19	31	5	16	4	16	8	13	5	13
I	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	5	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
III	23	1	7	5	7	2	4	1	3	0	1	0	1
IV	26	10	16	11	19	2	10	2	10	5	9	2	9
V	4	2	2	1	3	1	1	1	2	2	2	2	2

H&Y	入浴 (名)		更衣 (名)		洗面 (名)		外出 (名)		その他 (名)	
	ON 時	OFF 時	ON 時	OFF 時						
全体	16	28	20	35	3	11	22	33	1	4
I	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
II	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0
III	2	6	8	11	0	1	6	11	1	1
IV	10	17	9	18	1	8	13	18	0	3
V	3	3	2	3	1	2	1	2	0	0

H&Y: Hoehn・Yahr の重症度ステージ分類 ADL: Activities of daily living

ON 時: ON-period OFF 時: OFF-period N=71

表 5 L-ドーパとドーパミンアゴニストとの比較

	L-ドーパ	ドーパミンアゴニスト
運動症状の改善効果	優れている	L-ドーパに比べてやや劣る
認知機能障害や精神障害がない場合の安全性	同等かやや優れている	L-ドーパに比べて同等かやや劣る
高齢者, 認知機能障害のある場合の安全性	優れている	L-ドーパに比べてやや劣る
将来の運動合併症のリスク	長期治療した場合, 運動症状の日内変動やジスキネイジアを生じるリスクが相対的に高い	将来, 運動合併症を生じるリスクが相対的に低い

(水野美邦, 近藤智善: よくわかるパーキンソン病のすべて. 第2版, p66, 永井書店, 大阪, 2011. 一部改変)

表 6 先行研究における運動時間

	期間 (day)	頻度 (/w)	時間 (min)	速度 (m/min)
Toun et al [41]	56	3-4	50	13-14
Choe et al [42]	16	7 (2/day)	30	10
Yoon et al [43]	14	7	30	5 min : 2 25 min : 3
Real et al [44]	16	3	40	10

[41] Toun T, Valvassori SS, et al : Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in the an animal model of Parkinson' s disease. *Neuroscience* 227 : 305-312, 2012.

[42] Choe MA, Koo BS, et al : Effect of treadmill exercise on the recovery of dopaminergic neuron loss and muscle atrophy in the 6-OHDA lesioned Parkinson' s disease rat model. *Korean J Pharmacol* 16 : 305-312, 2012.

[43] Yoon MY, Shin MS, et al : Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson' s rat. *Neuroscience Letters* 423 : 12-17, 2007.

[44] Real CC, Ferreira AFB, at al : BDNF receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of Parkinson' s disease. *Neuroscience* 237 : 118-129, 2013.

表 7 成功率と各 RT 評価項目の相関関係 (N = 57)

相関係数 P-value	最大距離	回旋運動		運動範囲	頭部傾斜角度
		最大角度	最小角度		
成功率	-0.15	-0.42	-0.26	-0.11	-0.26
	0.20	0.00	0.04	0.40	0.40
最大距離		-0.22	-0.83	0.18	0.15
		0.09	0.00	0.16	0.24
最大角度			0.45	0.48	0.23
			0.00	0.00	0.08
最小角度				0.56	0.28
				0.00	0.03
運動範囲					-0.06
					0.65
頭部傾斜角度					

成功率に対する RT の各測定項目の相関関係として、回旋運動の最大角度、最小角度、頭部傾斜角度において有意な負の相関を認めた (回旋角度 最大値 $\rho = -0.42$ $p < 0.01$, 最小値 $\rho = -0.26$ $p < 0.05$, 頭部傾斜角度 $\rho = -0.26$ $p < 0.05$) . このことより、回旋運動の範囲が鉛直方向へ変移することが成功率低下の要因であると考えられた。また、同時に頭部傾斜角度も RT を行う優位な前肢側へ傾斜が増すことで成功率が低下しており、前肢のみでなく、全身的な傾斜が成功率に関係する可能性が示唆された。

表 8 対象者基本情報

年齢 (歳)	71.3±0.8
性別 (名)	男性 : 7 女性 : 18
運動回数 (回)	21.0±0.6
運動休止期間 (日)	1.8±0.1
罹患歴 (年)	9.0±0.9
H&Y (名)	2.8±0.1 (I : 3 II : 4 III : 18)

H&Y : Hoehn & Yahr の重症度分類

N=25, Mean±SEM.