

論文の内容の要旨

論文題目

Role of lateral cerebellum in obstacle avoidance during locomotion in the rat.

(ラットの歩行中の障害物回避動作における小脳外側部の役割)

青木 祥

背景・目的

小脳は、歩行や姿勢、目標到達運動といった様々な運動の制御において重要な役割を果たしている。小脳皮質は、解剖学的に最も内側に位置する虫部、それに隣接する中間部、最も外側に位置する外側部の三つの領域に分けることができ、その中で外側部は大脳皮質と密接な入出力関係を有し、目標到達運動などの視覚誘導型の運動制御に関わると考えられている。

歩行中、前方に認知された障害物を回避（跨ぎ越し）することは、歩行を安定かつ持続して遂行するために重要な動作であるが、この動作を適切に遂行するためには通常の歩行制御に加えて、障害物に関する視覚情報を基にして肢の軌道を適応的に制御する必要があると考えられる。これまで障害物回避動作に関わる脳領域として、一次運動野（M1）や後頭頂連合野（Posterior parietal cortex: PPC）等の大脳皮質の領域が主に調べられてきた。それらの領域に加えて、M1やPPCと入出力関係を有している小脳外側部の関与が示唆されている。外側部は橋核を介してPPCなどの大脳皮質の領域から投射を受け、小脳核の一部である歯状核および視床を経由してM1に連絡することが、神経解剖学的に認められており、この大脳-小脳ループが歩行中の障害物回避動作などの視覚誘導型の歩行動作に関与すると推測されている。しかしながら、現在までに歩行中の障害物回避動作において、大脳-小脳ループを構成する小脳外側部の役割について検討した研究は存在しない。そこで本研究では、小脳外側部の破壊が障害物回避動作に及ぼす影響を観察することにより、同動作における小脳外側部の役割を明らかにすることを目的とした。

研究①：障害物回避動作における前肢の動作および筋活動の解析

方法

実験動物として Wistar rat (雄性, 270~320 g, n = 10) を用いた。平面歩行および歩行中の障害物回避動作(障害物の高さは 2, 3, 4cm とした)の様子を高速度ビデオカメラ(200Hz; HAS-220, DITECT) を用いて記録した。前肢の肩関節、手関節、つま先にマーカーを貼付した。肘関節位置は、同部位周辺の皮膚の動きが大きく、正確な関節位置の測定が難しいため、三角測量法を用いて推定される関節位置を求めた。動作解析は動作解析ソフトウェア(Dipp-motion Pro 2D, Ditect)を用いて行った。平面歩行の解析項目として、前肢のつま先の高さ、肘関節角度変位を解析した。障害物回避動作では、障害物を跨ぎ越す際の前後肢のつま先の軌道を解析し、関節角度変位も平面歩行と同様に解析した。また、肘関節の動きに関与する上腕二頭筋及び三頭筋から埋め込み電極を用いて筋電図の記録を行った。障害物を跨ぎ越す際に、つま先が障害物の真上を通過する時点を基準に、筋活動の開始・終止を求めた。

結果

Leading forelimb (障害物を先に越える肢) および Trailing forelimb (障害物を後に越える肢) において、障害物の高さに応じてつま先が高く上がることがわかった。また、Leading forelimb は Trailing forelimb に比べて、障害物を跨ぎ越す際のつま先と障害物との距離 (Safety margin) が有意に小さくなること、Peak toe position (障害物を跨ぎ越す際のつま先の軌道において、つま先の最大拳上が観察される位置) が障害物の直上付近に集まることがわかり、Leading forelimb のつま先軌道はより精確に制御されている可能性が示された。さらに、Leading forelimb として障害物を跨ぎ越す際に、肘関節が屈曲から伸展に切り替わる時点および肘関節屈曲主働筋である上腕二頭筋の活動終止は、つま先が障害物の直上を通過する時間に合わせて観察されたことから、肘関節伸展および上腕二頭筋の活動終止が Leading forelimb の精確なつま先軌道の生成に寄与することが示唆された。

まとめ

Trailing forelimb に比べて、Leading forelimb のつま先の軌道は精確に制御され、これに肘関節伸展および上腕二頭筋の活動終止が寄与することが示唆された。

研究②：小脳外側部の片側破壊が障害物回避動作に及ぼす影響

方法

Wistar rat (雄性, 270~320 g, n = 10) を用いた。平面歩行および障害物回避動作の撮影・解析方法は研究①に準じて行った。これらに加えて、後肢の動作解析も行った。破壊に対して同側肢・対側肢の前肢・後肢、全ての肢を解析の対象とした。小脳外側部の片側破壊は脳定位固定装置下において吸引除去により行った。行動実験終了後、還流固定を施した

後に Nissl 対比染色を用いて破壊による損傷部位の同定を行った。

結果

組織学的に小脳外側部の破壊部位を調べた結果、主に第 5 葉から第 6 葉の Crus I までの領域の欠損が確認された。平面歩行において、前後肢ともに破壊による歩行動作への影響はみられなかった。障害物回避動作において、破壊による後肢への影響は観察されなかった。それに対して、破壊側前肢が **Leading forelimb** として用いられた場合特異的に、つま先の軌道が障害物の真上をオーバーシュートする症状が観察された。破壊前において、**Leading forelimb** の **Peak toe position** は障害物の真上に精確に合わせられるが、破壊後、破壊側前肢が **Leading forelimb** として使われた際の **Peak toe position** は水平および鉛直方向にずれることが示された。破壊前の **Leading forelimb** において、肘関節が屈曲から伸展へ変位するタイミングは障害物の真上をつま先が通過する時間とほぼ一致するのに対して、破壊後につま先が障害物の真上をオーバーシュートする軌道を呈する際には、肘関節の伸展に移行するタイミングが遅延することが分かった。さらに、これらの結果に付随するように、肘関節屈曲主働筋である上腕二頭筋の活動終止および肘関節伸展主働筋である上腕三頭筋の活動開始のタイミングが破壊前に比べて有意に遅れることも示された。

まとめ

小脳外側部は平面歩行には関与せず、障害物回避動作において、精確さを有する **Leading forelimb** のつま先の軌道制御およびそれに伴う適切な筋活動のタイミングの調節に関与することが示唆された。

研究③：解剖学的に同定された小脳中間部の不活化が平面歩行に及ぼす影響 方法

Wistar rat (雄性, 280~320 g, n = 23) を用いた。撮影および解析方法は研究②に準ずるが、平面歩行時の同側肢のみを対象とした。小脳外側部に隣接する中間部を微量 (320 nl ~ 360 nl) のムシモル (GABA 受容体作動薬) 注入により不活化した上で平面歩行動作の観察・解析を行った。対照として同一個体に生理食塩水を注入する群を用意した。注入部位は、それぞれ前後肢の体部位局在を有する小脳皮質前葉の第 4-5 葉中間部 (n = 9)、後葉の第 7-8 葉中間部 (n = 9) とした。別の 5 匹に関しては陽性対照群として、体部位局在を示さない Crus II にムシモルを注入した。ムシモル注入の際には、コレラ毒 b サブユニット (CTb) を混合して注入した。CTb の免疫染色法を用いて、ムシモルの注入部位が小脳中間部に限定されているかどうかについて神経解剖学的に解析した。

結果

免疫組織化学的にムシモルの注入が中間部に限定されていることを確認した。前葉の中

間部を不活化した群、後葉の中間部を不活化した群のどちらにおいても、生理食塩水を注入されたそれぞれの対照群に比べて、平面歩行中の前肢・後肢の関節が過屈曲し、つま先の最大拳上高は有意に高くなった。これらの影響は後葉の中間部に比べて、前葉の中間部を不活化した際に強く現れた。陽性対照群である小脳皮質の CrusII を不活化した場合には影響は観察されなかった。

まとめ

小脳外側部に隣接する中間部を不活化した場合、平面歩行中に過度なつま先の拳上、関節の過屈曲を呈することが示された。

研究④：大脳皮質運動・体性感覚関連領域に対する小脳皮質からの投射形式 方法

Wistar rat (雄性, 200~280 g, n = 14) を用いた。ニューロンおよびシナプスを逆行性に通過する経シナプストレーサーである狂犬病ウイルスを大脳皮質の以下に示す領域に注入し、適切な生存期間を設けたのちに還流固定を行った。その後、小脳皮質において狂犬病ウイルスに感染したニューロンを標識することにより、小脳からの大脳皮質運動・体性感覚関連領域に対する投射形式を解析した。注入の際は CTb を混合して注入し、注入部位の解剖学的同定を行った。注入部位は、M1 後肢領域、M1 前肢領域、一次体性感覚野 (S1) 後肢領域、S1 前肢領域、二次運動野 (M2) とした。

結果

CTb の免疫染色法により、上述した注入部位に対して適切にトレーサーが注入されていたことを確認した。M1 および S1 の後肢領域にトレーサー注入した場合には、小脳皮質の虫部・中間部の多くのニューロンが標識され、外側部のニューロンはほとんど標識されなかった。一方で、M1・S1 の前肢領域ならびに M2 にトレーサーを注入した場合には中間部と外側部のニューロンが標識され、虫部において標識されたニューロンは少なかった。

まとめ

小脳虫部は大脳皮質運動・体性感覚関連領域において後肢に係する領域に投射を有し、中間部は運動・体性感覚関連領域のすべてに連絡をもつことが示唆された。外側部は前肢に関わる領域および M2 に選択的に投射することが示された。

研究の総括

研究①・②の結果から、小脳外側部は障害物回避動作において、精確なつま先軌道を有する Leading forelimb として同側前肢が用いられる場合に、つま先の軌道の制御およびそれに関連する筋活動のタイミング制御に関わる可能性が示唆された。研究③により、隣接

する中間部が不活化された場合では平面歩行に影響が観察され、研究②の外側部の破壊実験では平面歩行に影響を及ぼさなかったことから、研究②で行った破壊実験は小脳外側部を適切かつ局所的に損傷できていたことを示す強い証拠が得られた。さらに、前肢特異的に小脳外側部破壊の影響が観察されたという知見に対して、小脳外側部は大脳皮質運動・体性感覚関連領野の前肢領域に選択的な神経線維連絡を有することがわかり（研究④）、研究②の結果を支持する神経回路の存在が示された。

結論

小脳外側部は障害物を跨ぎ越す際の、**Leading forelimb** における精確なつま先の軌道の生成およびそれに伴う筋活動のタイミング制御に関わることが結論された。