



東洋大学

新技術説明会  
New Technology Presentation Meetings!

# 実験小動物の微弱な震え 検出システム

東洋大学 理工学部 生体医工学科  
助教 吉田 崇将

2019年9月12日 (木)  
@JST東京本部別館ホール

- 1 振戦とは
- 2 本態性振戦の実験モデル
- 3 ネットリンG2遺伝子ノックアウトマウス
- 4 振戦検出器と検出アルゴリズム
- 5 実験結果
- 6 応用・発展

# 振戦とは

What is tremor?

---

## 振戦 Tremor

- “振戦とは筋肉の収縮，弛緩が繰り返された場合に起こる不随意のリズミカル運動” ([Wikipediaより](#))
- ストレス，不安，疲労，アルコールの離脱症状，甲状腺機能亢進症，カフェインや刺激薬の摂取などで出る場合がある。
- 運動制御にかかわる脳部位や神経回路の障害によって生じる。

## 振戦の種類

- 安静時もしくは活動時か、何か意図的な動きをした後に生じる。

- ➔ 安静時振戦 (resting tremor) → パーキンソン病の症状

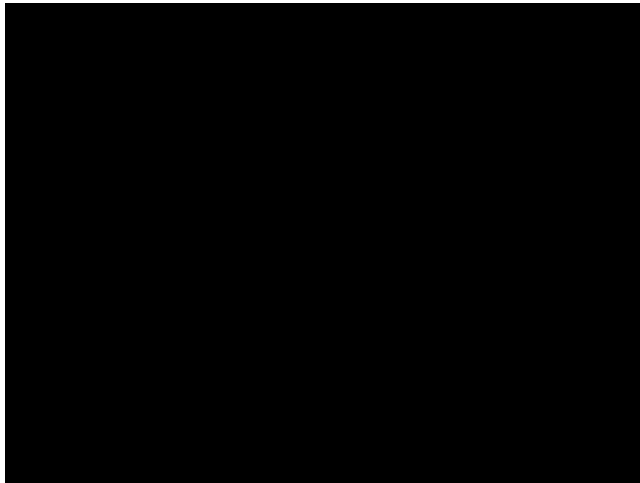
- ➔ 行動時振戦 (action tremor)

- ➔ 企図振戦 (intention tremor) → 小脳回路由来？

- ➔ 本態性振戦 (essential tremor: 原因がよくわからない)

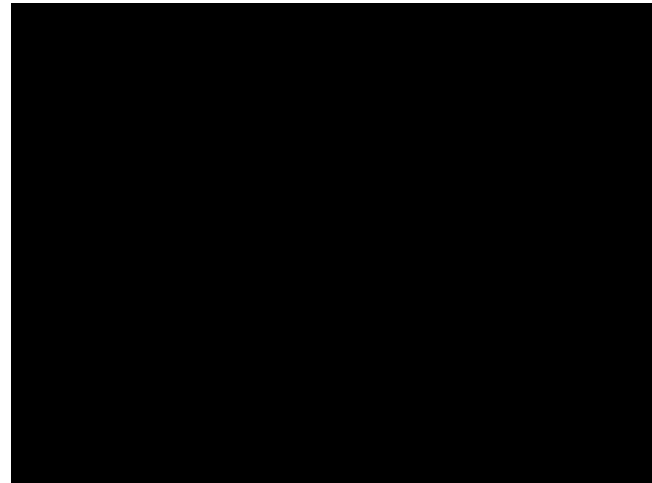
## 振戦の症例

### 安静時振戦



Unilateral resting tremor that decreases with action

### 企図振戦



Intention tremor

(YouTubeより)

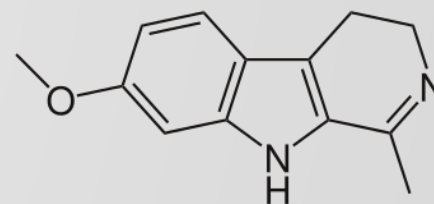
# 本態性振戦の実験モデル

Experimental model of essential tremor

---

## マウスやラットに対するハルマリンの全身投与モデル

- ハルマリン: トリプタミン系アルカロイド



モノアミン酸化酵素阻害作用があり脳内ではドーパミンやアドレナリン, セロトニンなどの分解を阻害する.

- マウスやラットに投与すると急性的に激しい振戦を誘起する. 小脳神経回路に異常や変性を来す. 本態性振戦のモデルとして用いられる. ([Handforth, 2012](#))



## マウスやラットに対するハルマリンの全身投与モデル

- ハルマリン投与モデル動物に対して、ヒトの治療薬として一部の振戦に効果があるといわれている $\beta$ ブロッカー(交感神経アドレナリン $\beta$ 受容体遮断薬)を投与すると、振戦が抑えられる。(Hedera et al., 2013; Handforth, 2012; Iwata et al., 1998; Paterson et al., 2009)
- つまり、モデル動物とヒトの患者間で共通性がある。

## 問題点

- 安静時にも比較的大きな振戦が生じる。  
つまり、企図振戦(行動時振戦)のモデルとは言えない。
- 全ての振戦に $\beta$ ブロッカーが効果があるわけではない。  
小脳回路由来の振戦の多くは効果のある治療薬がない。  
(NIH/NINDS web)

新規の振戦モデル動物が求められている。

# ネトリンG2遺伝子KOマウス

Netrin-G2 global knock-out transgenic mouse

---

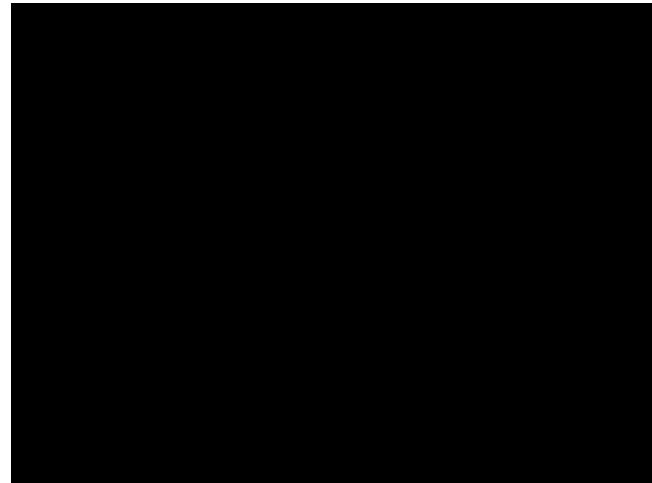
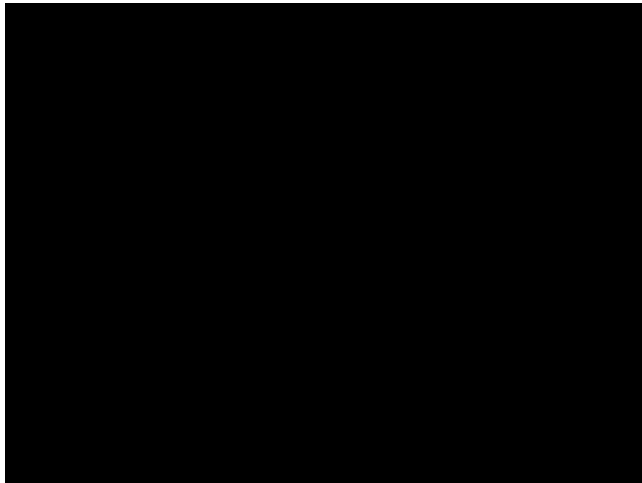
ネトリンG2-KOマウスは活動時に微弱な振戦を呈するが静止時には生じない。



エキスパートが観察すると識別できる程度

本態性振戦(企図振戦)の遺伝学的モデルになるか？

どちらがKOマウスでしょう？



## ネトリンG2 Netrin-G2

- ネトリンG2は細胞接着分子の一種で脊椎動物の脳に局在。
- アミノ酸配列とタンパク質の構造が似ているネトリンG1と脳内における分布がきれいに棲み分けされている(相補的に分布).  
(Nakashiba et al., 2002; Nishimura-Akiyoshi et al., 2007)
- 様々な脳機能を担う神経回路の形成に関与していると考えられているが、未だ謎が多い。

ネトリンG2-KOマウスは確かに震えているが、  
その振戦をシステムティックに定量化したい！



微弱な振戦を検出できる装置がない

微弱な振戦を検出・定量するシステムを開発した。

# 振戦検出器と検出アルゴリズム

Tremor detector and detection algorithm

---



## Harmaline-induced tremor

Strain	Detector	Peak frequency	Freely-moving	Reference
Rat (Sprague-Dawley)	<b>intramuscular EMG</b> in the neck, <b>accelerometer</b> (SPA-I, Grass Instruments) attached to a rat jacket	8–12 Hz	△	Sinton et al. (1989) Pflü gers Archiv 414, 31–36.
Mouse (B6)	<b>intramuscular EMG</b> in the hindlimb, <b>accelerometer</b> attached underneath suspended platform	11–14 Hz	△	Milner et al. (1995) J Neurophysiol 73, 2568–2577.
Mouse (B6)	original force-plate actometer, load cell ( <b>strain gauge</b> ) a.k.a. <u>Force Plate Actimeter (BASi)</u>	11–16 Hz	○	Fowler et al. (2001) J Neurosci Methods 107, 107–124.
Rat (Sprague-Dawley)	<u>Force Plate Actimeter (BASi)</u> , <b>strain gauge</b>	9–11 Hz	○	Wang & Fowler (2001) Psychopharmacol 158, 273–280.
Rat (Wistar)	<b>Force isometric transducers</b> of piezoelectric type (model KBI-2064, Projects Unlimited)	10 Hz	○	da Fonseca et al., (2002) J Pharmacol Toxicol Methods 46, 137–143.
Mouse (ICR) Rat (Sprague-Dawley)	<u>Convulsion/Tremor Meter: Convuls-1 (Columbus Instruments)</u> , <b>strain gauge</b>	Rat: 8–12 Hz Mouse: 10–16Hz	○	Martin et al. (2005) Mov Disord 20, 298–305.
Mouse (Tg, B6)	<u>AMTI Biomechanics Force Platform</u> , <b>Hall effect sensor</b> (AMTI)	12 Hz	○	Hutchinson et al. (2007) Neurosci 148, 825–832.
Mouse (ICR)	<u>Tremor Monitor (San Diego Instruments)</u> , <b>piezoelectric disk</b>	12–20 Hz	×	Paterson et al. (2009) Eur J Pharmacol 616, 73–80.
Mouse (B6)	suspended aluminium chamber, DC or ICP <b>accelerometer</b> (Piezotronics)	12–15 H	○	Park et al. (2010) PNAS 107, 10731–10736.

既存の研究ではそのほとんどがオリジナルの  
振戦検出システムを使っている。

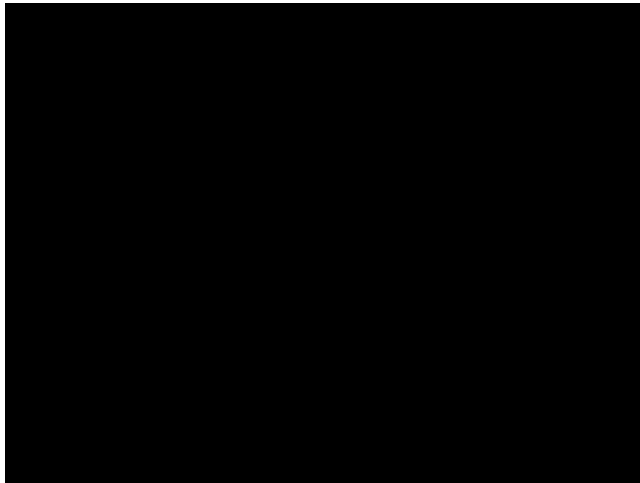


振戦検出のスタンダードはない

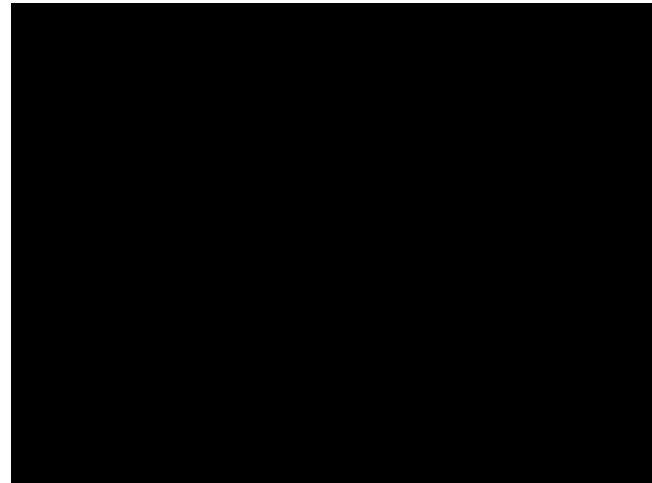
商品化されて販売している(していた)ものもいくつか  
あるが、いずれもハルマリン誘発振戦を想定しており、  
微弱振戦が測定できる保証はない。

## ハルマリン誘発振戦

野生型マウス



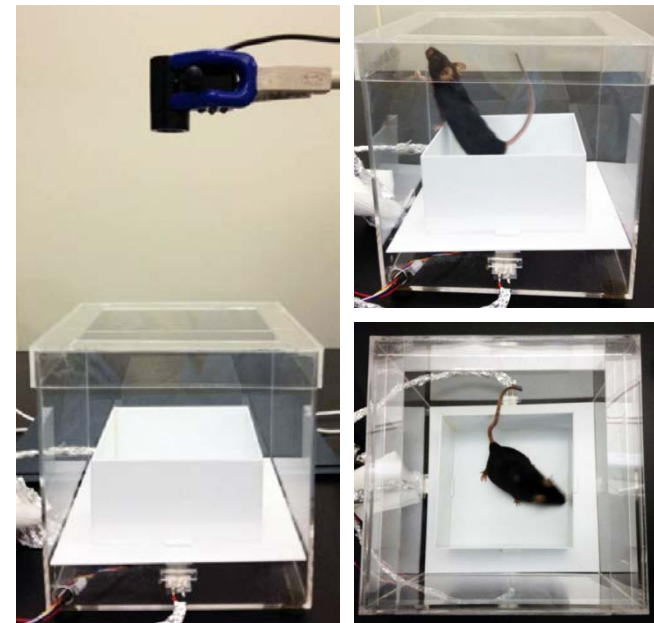
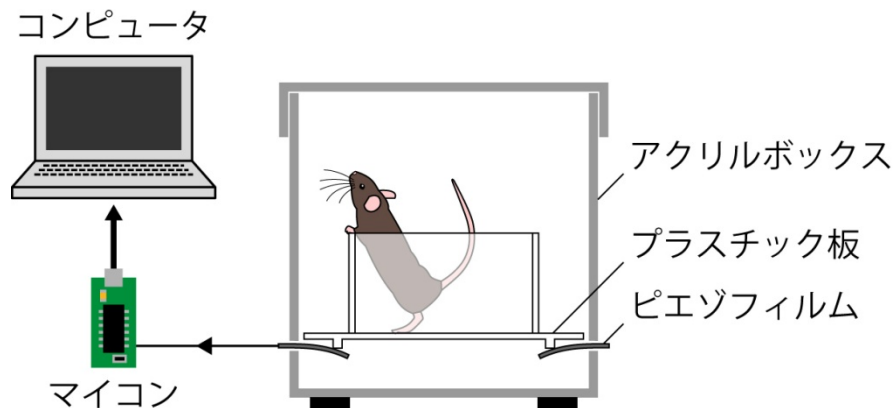
ネトリンG2-KOマウス



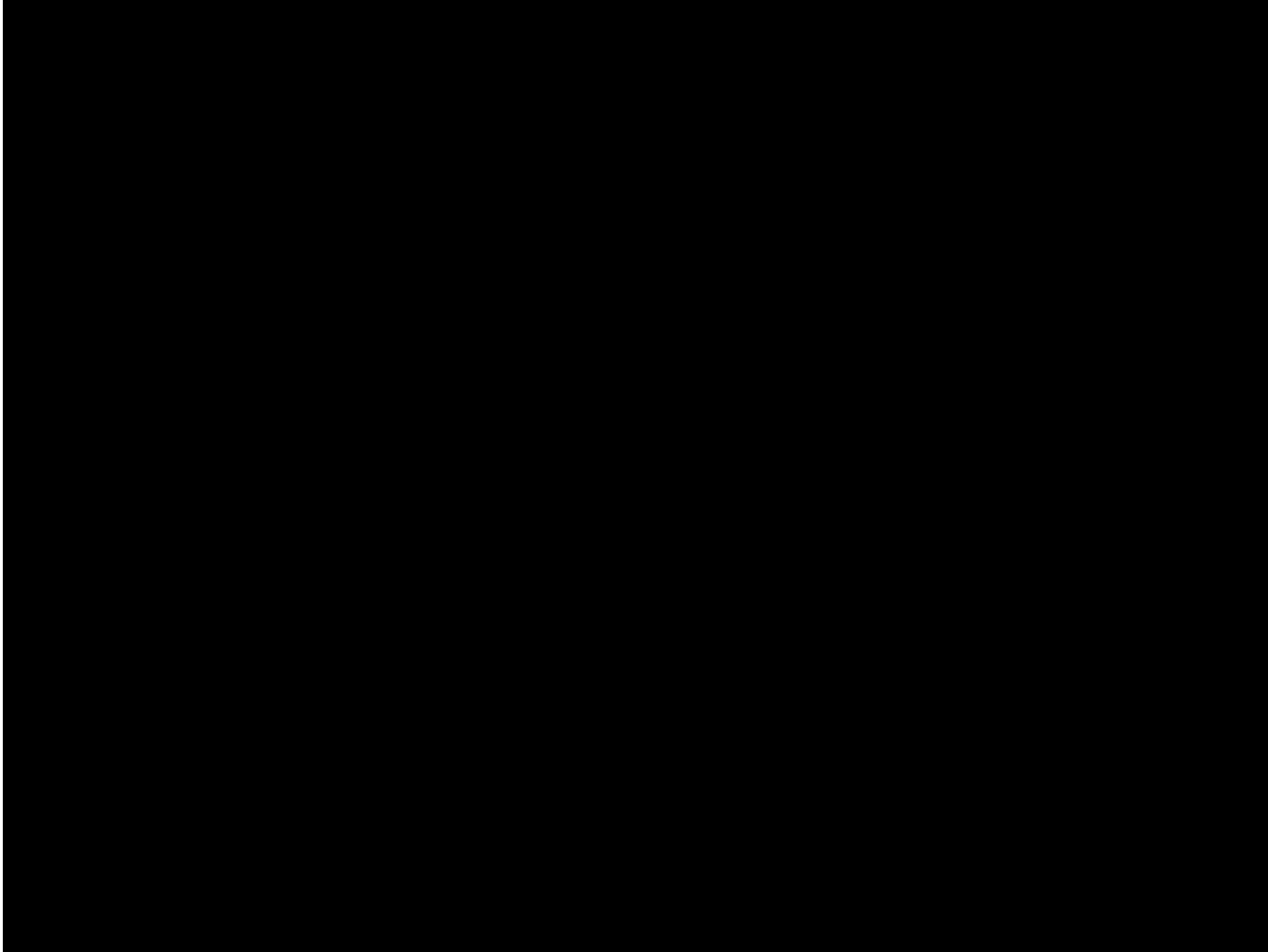
## 振戦検出器

微弱な振戦を検出・定量するための装置を開発した。

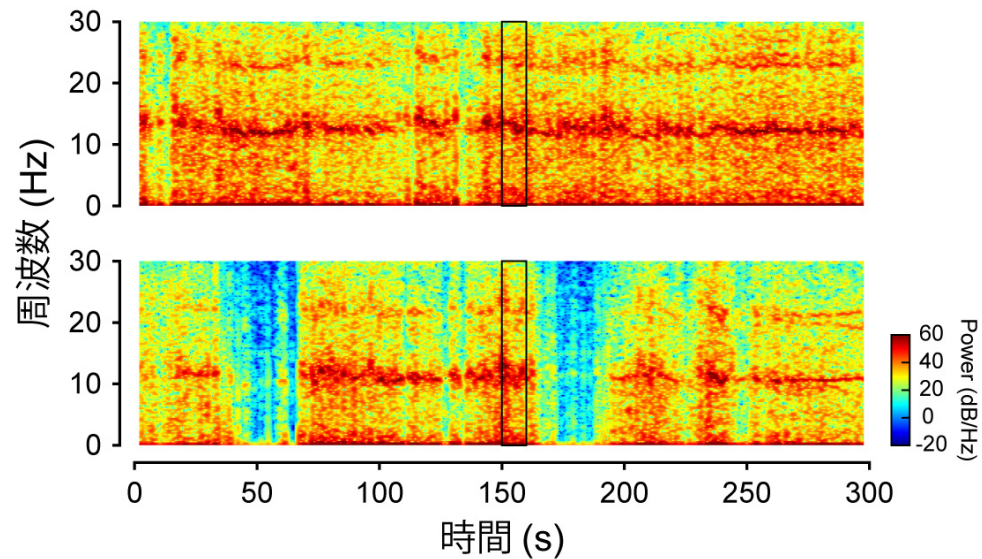
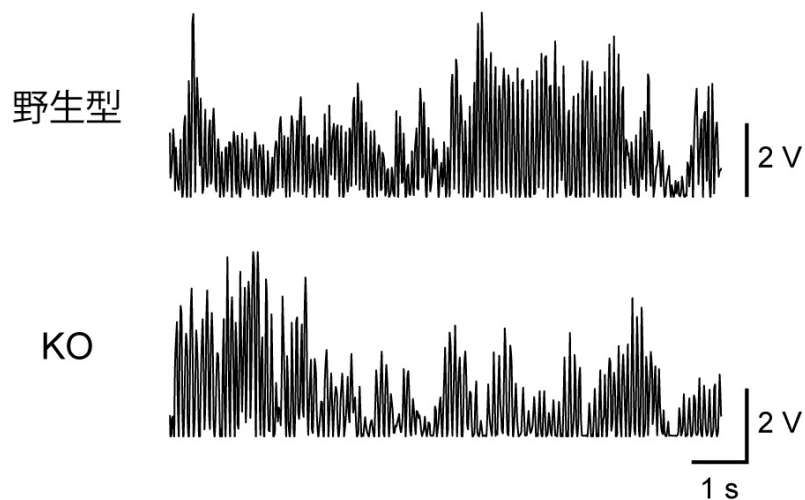
(特願2015-096458号. 2015-05-11.)



## 振戦測定の様子



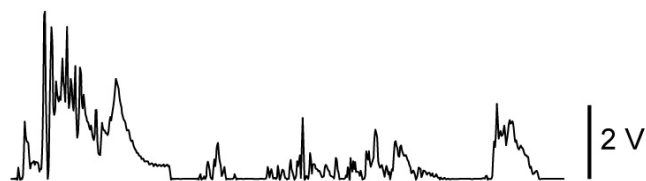
## ハルマリン投与条件



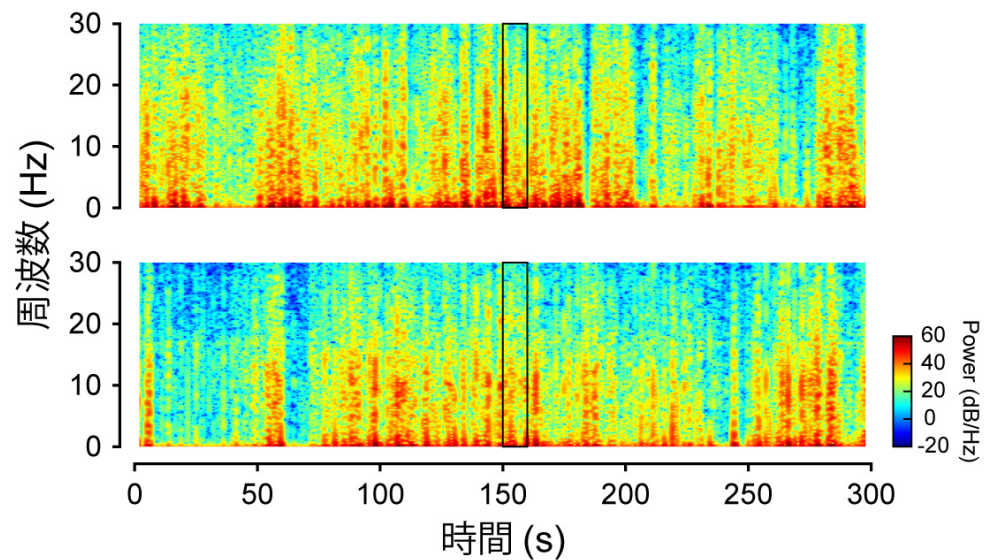
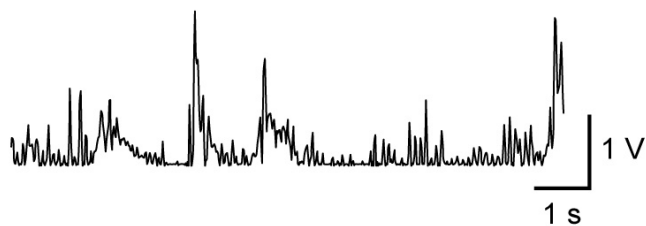
(Ajima & Yoshida et al., Unpublished)

トリートメントなし

野生型

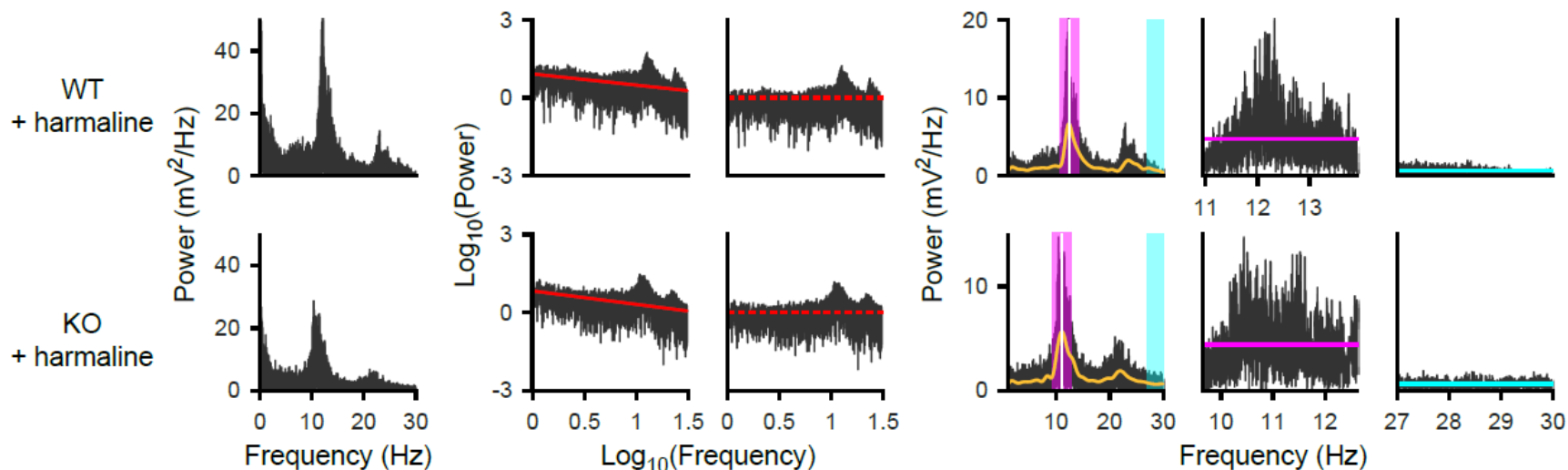


KO



(Ajima & Yoshida et al., Unpublished)

## 振戦検出アルゴリズム



高速フーリエ変換

常用対数変換

線形回帰

線形成分除去

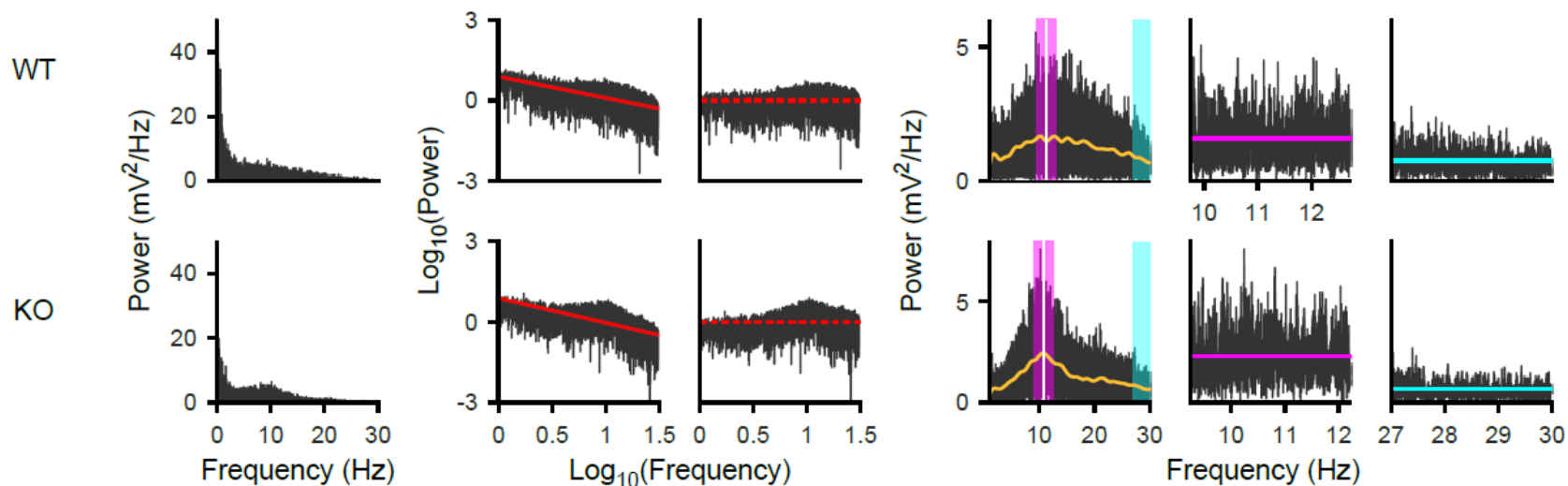
指数変換

ピーク周波数検出

振戦指標算出



## 振戦検出アルゴリズム



高速フーリエ変換

常用対数変換

線形回帰

線形成分除去

指数変換

ピーク周波数検出

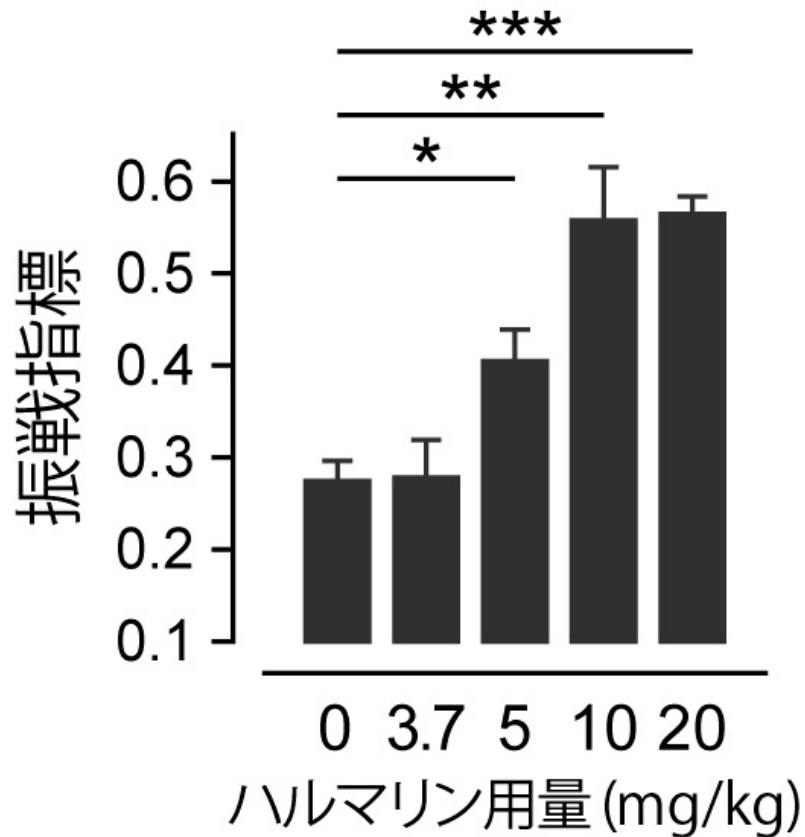
振戦指標算出

# 実験結果

Experimental results

---

どれくらい微弱な振戦が測れるか？



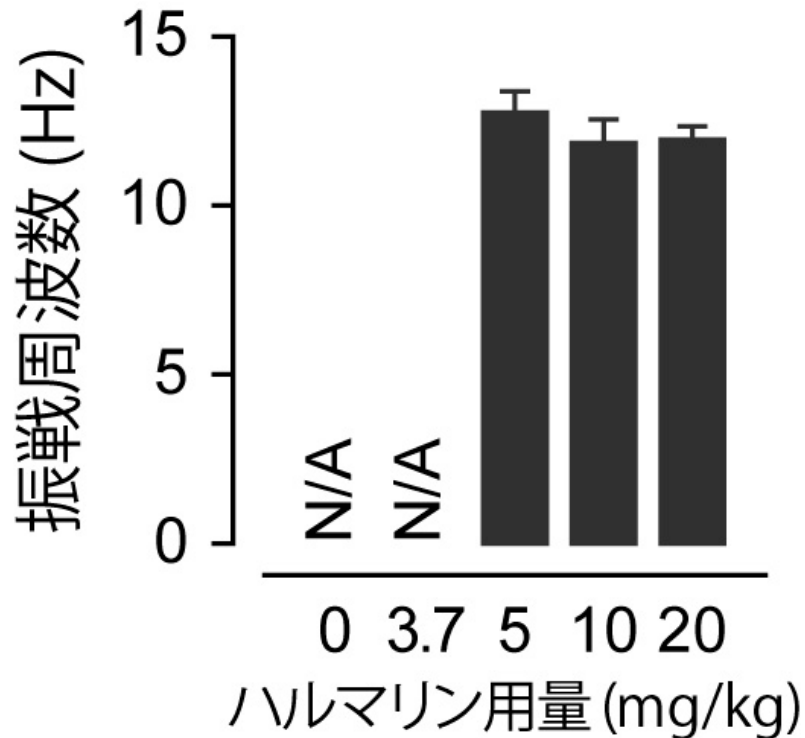
ハルマリンの用量を通常より段階的に減らして検証した。



5 mg/kgまで減らしても振戦を検出できた。

(Ajima & Yoshida et al., Unpublished)

## 振戦の質は変化したか？



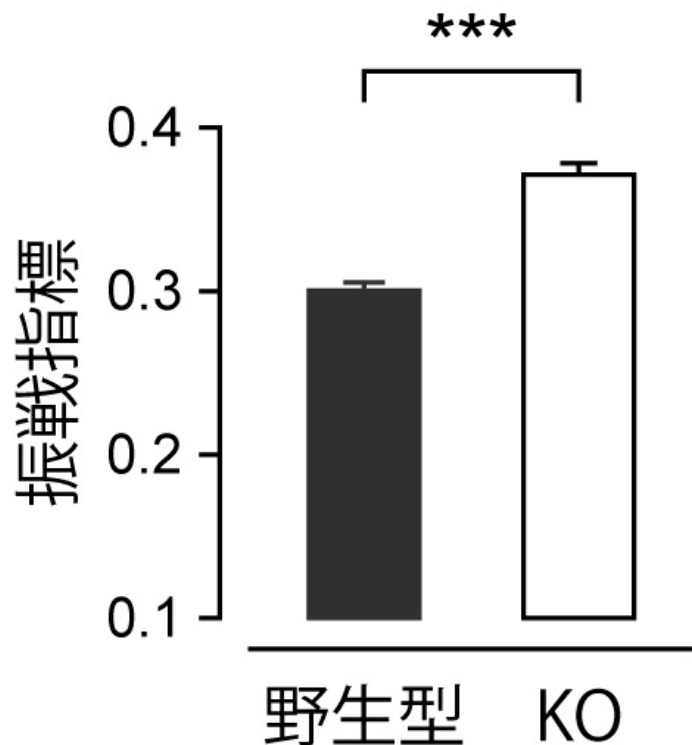
振戦指標が変化しても振戦周波数は変化しなかった。



振戦を生み出すメカニズムが変化していない。

(Ajima & Yoshida et al., Unpublished)

## KOマウスの微弱な振戦が測れるか？



野生型に比べてKOの方が振戦指標は有意に大きかった。



KOマウスのもつ微弱な振戦を検出できた。

(Ajima & Yoshida et al., Unpublished)

## 振戦検出システムの開発で達成したこと

- 1 新しい小動物用の振戦検出システムを開発した.
- 2 今まで検出できなかった微弱な振戦を精度よく安定的に検出できた.
- 3 振戦の量(振戦指標)と質(周波数)を自動的に定量できた.

# 応用・発展

Application and perspective

---

## 本振戦検出システムの利点

- 目視で識別できないような微弱な振戦は今まで見逃されていた可能性があるが、本システムではそれを検出できる。
- 振戦モデル(特に本態性振戦モデル)は確立されていないので、ネトリンG2-KOマウスの候補としての可能性には価値がある。
- 計測の手法も装置もシンプルなので、安価に作れて安定して測定でき、大規模化(多チャンネル化)も容易である。



## 本振戦検出システムの応用と発展

- 従来のマウスやラットの行動学的テストバッテリーに加えて、網羅的に振戦の有無や程度を測定する項目をプロトコルに追加する。
- 自由行動下における驚愕反応の検出に用いる。従来法ではマウスやラットの体を筒の中で拘束する必要があった。
- 遺伝子改変や投薬の影響による振戦の発生を検出する。 新薬の開発段階でマウスやラットを用いた薬物試験に用いる。
- マウスやラットにストレス負荷を与えた際のストレス性振戦の定量評価に用いる。

# 本技術に関する知的財産権

---

- 発明の名称 : 行動解析方法
- 登録番号 : 6495731
- 出願人 : 理化学研究所
- 発明者 : 吉田 崇将

# お問い合わせ先

---

東洋大学

研究推進部 産官学連携推進課

TEL : 03-3945-7564

E-mail : [ml-chizai@toyo.jp](mailto:ml-chizai@toyo.jp)