

G-001

くも膜下出血モデル動物に関する行動評価指標の検討 Selection of behavioral score for subarachnoid hemorrhage mouse in animal video monitor system

中村 和浩^{†*} 武藤 達士^{†*} 佐々木 一益[‡] 瀧 靖之[‡] 石川 達哉[†]

Kazuhiro Nakamura Tatsushi Mutoh Kazumasu Sasaki Yasuyuki Taki Tatsuya Ishikawa

1. はじめに

くも膜下出血(Subarachnoid Hemorrhage; SAH)は、破裂動脈瘤からの出血を主因とする病態であり、その致死率は非常に高い。この病態を解明するため、いくつかのSAHモデル動物の作製方法が知られている。自家血を脳室内に投与するモデル(自家血SAHモデル)^{1,2)}では実際の臨床病態との乖離がある。そのため、致死率は高いものの内頸動脈から挿入したナイロン糸により、前大脳動脈を穿刺し脳底全体に出血させる動物モデル(穿刺SAHモデル)がより臨床病態に近いと考えられている^{2,3)}。穿刺SAHモデルにおいては出血量に基づく、くも膜下出血の重症度(SAH Grade)を評価することが重要であるが、外見からは出血量が判断できない。そのため、実験終了後、動物をと殺し脳底部の出血状況を確認することで、SAH Gradeを決定することが一般的である³⁾。Egashiraらにより、MRIにより脳内血腫の量を観察し、SAH Gradeを評価する手法が報告されているが³⁾、高価なMRI装置が必要であり、簡便な手法ではない。そこで、我々はビデオカメラ撮影による行動評価からSAH Gradeを判別できるのではないかと考えた。実験動物の行動評価として知られているOpen Field Testでは、ある一定の領域を自由に行動する様子を上部に設置したカメラから撮影し、得られたビデオ画像に基づき、移動速度や領域間の移動頻度、旋回運動の頻度などいくつかの指標を計算する^{1,4)}。自家血SAHモデルラットを用いたOpen Field Testでは、脳室内に投与した血液量の増加に伴い、総移動量や領域中心部での滞在時間が低下することが報告されている¹⁾。穿刺SAHモデルにおいても、SAH Gradeに対応して指標が変化することが予想されるが、どういった指標がSAH Gradeと対応しているかは明らかにされていない。そこで、Open Field Testで解析される複数の行動評価指標のうち、穿刺SAHモデル動物の重症度を評価するために有効な指標を検討した。

2. 方法

13匹の雄性mouse(C57BL/6, 9週齢)を用い、5-0ナイロン糸を内頸動脈から挿入し、前大脳動脈先端部を穿刺するEndovascular perforation法により穿刺SAHモデル動物を作成した^{2,3)}。SAHモデル作成前および、SAHモデル作成3日後の時点で10分間のOpen Field Testをおこない、そのビデオ画像を評価した。Open Field Testは西村らにより開発されたビデオトラッキングシステム⁵⁾を利用した。実験動物は縦横それぞれ70cmのフィールドにおかれ、フィー

ルドは暗幕で覆われた暗所とした。ビデオトラッキングシステムは38万画素の赤外線CCDカメラ(OS-C103, 日本防犯システム社)からのNTSC信号をビデオコンバータ(ADVCMINI; Grass Valley社)によりパソコン(Macbook; Apple社)にMOV形式で取り込んだ。この動画像について、西村らが開発した統合処理環境「Calender Memo」の拡張機能として用意された「Motion Analyzer」により解析を行った。「Motion Analyzer」では輝度閾値とクラスターサイズ閾値を設定することで、実験動物の位置に相当するクラスターが抽出され、クラスターの重心座標として実験動物の位置が決定される。動物の位置座標は30fpsの画像から0.2秒ごとに計算した。

検討した行動評価指標は移動速度平均値、位置遷移回数および左回転比の3つの指標である。移動速度平均値(Mean Velocity)は抽出した位置座標から1秒ごとに移動速度を算出し10分間の平均値を評価した。位置遷移回数(Position Translate Ratio)は、ケージの中心部の縦横30cmの領域を中心部、その外側を周辺部とした時、中心部から周辺部、周辺部から中心部に遷移した回数を合計して評価した。左回転比(Left Rotation Ratio)は3フレームの位置座標の遷移において1フレーム目から2フレーム目の位置を直線で結んだ時3フレーム目の位置が直線の左側にある時を左回転、右側にあるときを右回転とし、左回転回数の右回転回数に対する比として計算した。

SAH GradeはSAHモデル作成7日後に、実験動物をと殺し脳を取り出し、脳底の出血状態に基づき4段階で判定した。脳底全体に広く出血している状態をGrade 4とし、ほとんど出血が認められない状態をGrade 1とした。各状態の代表的な脳底写真を図1に示す。

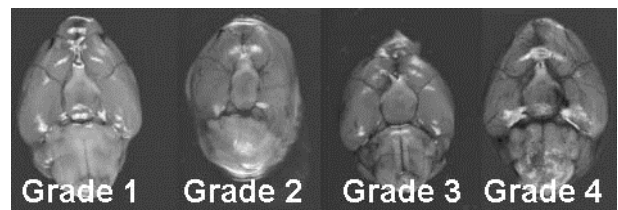


図1 脳底画像に基づくSAH重症度分類の典型例について示した。Grade 4においては脳底全体に広く出血が認められ、Grade 1では出血がほとんど認められない。

SAH作成後の神経学的な評価として、粘着テープ除去テスト(Adhesion Removal Test)をおこなった。縦横4mmに切断したサージカルテープ(21N ニチバン社)を実験動物の左もしくは右の前脚に張り付け、テープを剥がすまでの時間を評価し、左右それぞれの時間の平均値を粘着テープ除去時間(Adhesion Removal time)として評価した。180秒を超えても除去できなかった場合、180秒として評価した。

[†] 秋田県立脳血管研究センター Research Institute for Brain and Blood Vessels-Akita

[‡] 東北大学加齢医学研究所 Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

3. 結果

脳底の出血量から鑑別した、SAH重症度は Grade 1, 2, 3, 4 がそれぞれ、3, 2, 7, 1 例であった。それぞれの SAH 重症度に応じた典型的な運動軌跡について図 2 に示した。出血量の多い重症例において動きが少なく、軽症例では活発な動きが認められた。

SAH モデル作成前の Open Field Test において粘着テープ除去時間は 29.1 ± 8.5 sec、平均移動速度は 115.8 ± 25.0 mm/sec、位置遷移回数は 60 ± 18 回、左回転比は 0.96 ± 0.066 であった。SAH モデル作成 3 日後の、粘着テープ除去時間、平均移動速度、位置遷移回数、左回転比はそれぞれ、 68.0 ± 63.1 秒、 44.6 ± 26.3 mm/sec、 30 ± 24 回、 1.12 ± 0.4 であり、粘着テープ除去時間、平均移動速度、位置遷移回数は SAH 作成前後で比較すると有意に変化した。SAH 重症度、粘着テープ除去時間と Open Field Test から得られた平均移動速度、位置遷移回数、左回転比の関係を図 3 に示した。左回転比に関しては、SAH 重症度、粘着テープ除去時間との相関係数がそれぞれ、 $-0.524(P=0.066)$ 、 $0.559(P=0.047)$ であり、弱い相関が認められたが、平均移動速度、位置遷移回数については相関があるとはいえない結果であった。

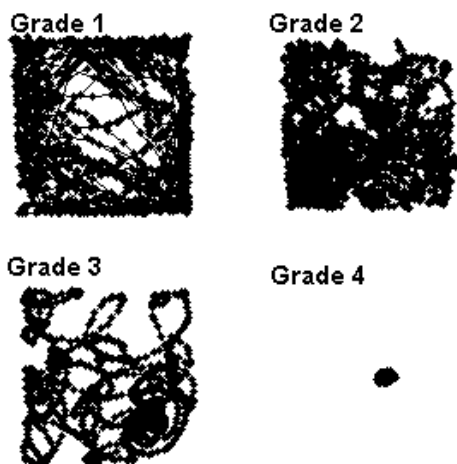


図 2 典型例について 10 分間の運動軌跡を示した。Grade 4 においてはほとんど動きが認められず、Grade 1 では SAH 作成前よりは活動量が低下しているものの、10 分間持続した運動が観察された。

4. 考察

SAH モデル作成 3 日後の粘着テープ除去時間は有意に延長し、位置遷移回数と、平均移動速度は有意に低下していた。このことは、手術手技が安定しており、出血量に違いはあるものの、作成した実験動物が SAH の臨床症状を良く再現していることを示している。また SAH モデル作成前の Open Field Test において計算された平均移動速度は Aragao らの報告⁴⁾とほぼ一致しており、西村らが開発したビデオトラッキングシステム⁵⁾の解析値が信用できる値であることを示している。

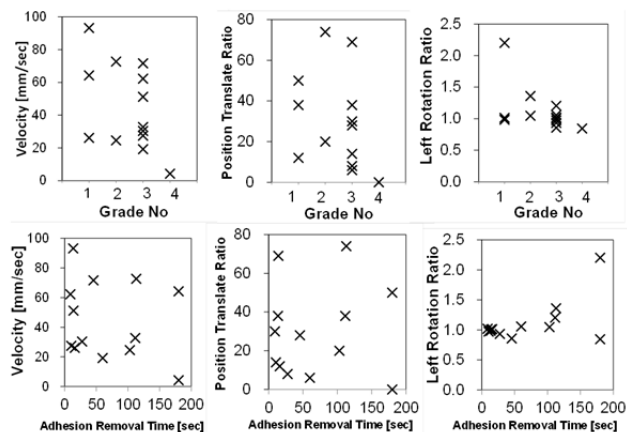


図 3 SAH 重症度および、神経学的評価指標と Open Field Test において得られた 3 つの指標について相関関係を示した。

今回の実験結果では、平均移動速度および、位置遷移回数において、SAH モデルの重症度や神経学的評価手法である粘着テープ除去時間と相関が認められなかった。今回、脳底出血の評価は SAH 作成 7 日後におこなっており、重症出血例において時間経過と共に血腫が吸収され、見かけ上出血量が少なく見積もられた可能性がある。Egashira らが報告している MRI を用いる方法³⁾であれば、出血量をより正確にとらえられると共に、出血量の時間経過を MRI により観察することにより、血腫が吸収される様子も観察できる可能性がある。今後の研究課題としたい。

左回転比については、SAH モデルの重症度や粘着テープ除去時間と弱い相関関係が認められた。今回の解析例では完全に動かなくなった重症例は 1 例だけであったが、動きの無い症例では、見かけ上回転は観察されないため、重症例が増えた場合は相関関係が認められなくなるという問題もある。同じ場所にとどまっている時間も解析し、回転比と組み合わせることで、より適切な指標となる可能性がある。今後実験例を重ねてより詳細な検討をおこなってきたい。

参考文献

- [1] M Byko, AN Azab, R Kuts et al., "The neuro-behavioral profile in rats after subarachnoid hemorrhage", Brain Res, Vol. 1491, pp. 109-116, 2013
- [2] I Gules, M Satoh, BR Clowe et al., "Comparison of three rat models of cerebral vasospasm", Am J Physiol Heart Circ Physiol, Vol. 283, pp. H2551-H2559, 2002
- [3] Y Egashira, H Shishido, Y Hua et al., "New grading system based on magnetic resonance imaging in a mouse model of subarachnoid hemorrhage", Stroke, Vol. 46, pp. 582 - 584, 2015
- [4] RS Aragao, M Aurelio, B Rodrigues et al., "Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents - a reproducibility study", J Neurosci Methods, Vol. 195, pp. 216 - 221, 2011
- [5] 西村 弘美, "プログラミング言語を有するビデオ・トラッキング・システム～ラットの行動解析システムへの応用実施可能性調査～", 平成 22 年度秋田県産学連携推進事業医工連携フィージビリティスタディ委託事業研究成果報告会資料, 2011