

論 文 要 旨

Quantitative behavioral evaluation of a non-human primate stroke model using a new monitoring system

新しいモニタリングシステムを用いた
非ヒト霊長類脳梗塞モデルの定量的行動評価

廣畑 俊和

【序論及び目的】

脳卒中の病態解明や新しい治療法の開発には、動物実験が大きく貢献している。しかし、脳卒中治療法の開発を目的とした前臨床試験のほとんどは、げっ歯類モデルであり、脳の構造および脳損傷の程度の違いからヒトと脳卒中後の回復過程が大きく異なる。したがって、神経解剖学的構造がヒトと類似している非ヒト霊長類を疾患モデルとして使用することがより適切である。

近年、神経科学分野の研究で、小型の非ヒト霊長類であるコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) に大きな関心が集まっている。成体は全長 20~30cm、平均体重 350~400g に達し、実験室で利用しやすく、さらに、マーモセットの遺伝子技術が確立されたことによって、ヒト疾患動物モデルとしてのマーモセットの価値は高まっている。我々は先行研究でマーモセットを用いて光血栓法による非ヒト霊長類脳梗塞モデルの作製に成功し、その回復過程を長期観察した。一方で、マーモセット脳梗塞モデルには従来いくつかの行動テストが存在するものの、機能障害を定量的に評価することに限界と困難さが生じていた。第一に、マーモセットはストレスに非常に敏感であり、特定の行動テストの間、ストレスのない方法で取り扱う必要がある。第二に、評価者と動物の信頼関係を確立することが不可欠であり、事前に十分なトレーニングを行う必要がある。これら 2 つの要因は、霊長類の機能障害を評価する上で大きな障壁となっていた。したがって、脳卒中モデルにおける神経障害を評価するために、簡易的で客観的、かつ再現性の高い方法が必要と考えられる。

MarmoDetector はマーモセット専用の 3 次元動作解析ソフトであり、ストレスのない条件下でマーモセットの行動を記録することができる。我々は、このシステムを用いて、非ヒト霊長類脳梗塞モデルの行動変化を定量的に評価できると仮定した。本論文では、非ヒト霊長類脳梗塞モデルにおける MarmoDetector を用いた行動解析について、画像評価と観察行動評価とともに検討した。

【材料及び方法】

成熟した 3 匹の雌マーモセット (280-390 g、4-16 歳) を使用した。動物実験は、NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 8023, revised 1978) に従って実施し、すべての動物実験は大阪大学大学院医学系研究科の Institutional Animal Care and Use Committee (承認番号: 01-056-003) および鹿児島大学動物実験委員会 (承認番号: MD19099, MD20026. および MD20087) の承認を得ている。

全身麻酔を施して脳梗塞実験を行った。マーモセットに光感受性色素ローズベンガル(20 mg/kg)を静脈内投与し、緑色光(532 nm)を 20 分間光量 20 mW で大脳皮質運動野に照射することで、照射部位で血小板凝集が生じ、血栓性脳梗塞を発症させる。実験翌日に動物用 MRI で標的領域に脳梗塞ができていることを確認した。MarmoDetector は術前から記録し、脳梗塞実験後 2 日目から 28 日まで連日記録する。そして、記録解析をもとに、マーモセットが 1 日に移動した距離、移動速度、活動時間、飛ぶ回数を算出する。加えて、脳梗塞後のマーモセットがケージ内で示す行動の軌跡を解析した。

観察的行動評価は、Marshall(1996) の神経学的スコアを改良し、独自の神経学的スコアで測定する。脳梗塞作製後にマーモセットの行動を観察し、以下の 4 つの異常徴候があるかどうかを確認する。①手足がスノコから滑り落ちる、② 手が止まり木からぶら下がったままになる、③ 腕が屈曲肢位で異常な姿勢をする、④ 腕と手が連動しない振りをする。各徴候に 1 点ずつ加算、合計 4 点として、脳梗塞発症後 28 日間評価を行う。

MarmoDetector によるデータと従来の神経学的スコアとの相関は Spearman の相関分析で解析した。統計的有意性は $P < 0.05$ とした。すべての分析は GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego California USA) を用いて行った。

【結果】

全個体とも MRI 拡散強調画像および T2 強調画像で脳梗塞像を確認できた。MarmoDetector のデータでは、いずれの指標も脳梗塞発症直後から数週間かけて徐々に改善した。行動軌跡は術後 2 日目まで行動範囲が制限されていたが、術後 3 日目には拡大し始めた。神経学的スコアは脳梗塞発症直後が最も悪く、観察期間中 (28 日間) に発症前のレベルまで回復することはなかった。MarmoDetector のデータと従来の神経学的スコアとの間には有意な相関が認められた。

【結論及び考察】

光血栓法による脳梗塞実験は他の脳梗塞作製法と比べて侵襲性が低く、脳梗塞の再現性が高いことが特徴である。我々は以前、マーモセットを用いた光血栓法の脳梗塞モデルを報告していたが、本研究は先行研究の脳梗塞手術プロトコルを改良させて、さらに侵襲性の低減と再現性の向上を図ることができた。これにより、脳梗塞発症後、非常に早い段階から動物を観察することが可能となった。

MarmoDetector は日中の時間帯の活動を長期的に記録することが可能であり、日内・日間で大きく変動する動物の行動データのばらつきを抑えるために非常に有効な手段である。また、自動で 3 次元動作解析を行うため、人による測定バイアスを最小限に抑えることができる。

従来の行動テストは事前にマーモセットは入念な訓練が必要であるが、この評価システムはストレスフリーであり、簡易性に優れている。本研究結果では MarmoDetector の行動データと従来の神経学的スコアに強い相関が示されており、神経学的スコアの代替方法として使用できることが示された。

本研究で示した評価系は、梗塞部位が一様に安定した脳梗塞モデルにおいて、簡易的に再現性の高いデータを抽出することが可能である。この評価系に組織学的、電気生理学的評価を加えることで、脳梗塞の回復に寄与する神経機構や神経可塑性の解明、脳梗塞の新しい治療法の検証に役立つと思われる。