

薬剤投与マウスの歩行メカニズムの解析

昌子浩登^{1,2}, 中富康仁³, 横山ちひろ⁴, 正木大貴³, 福居顕二³, 花井一光¹

1 京都府立医大・医・生命情報科学, 2 JST さきがけ, 3 京都府立医大・医・精神医学, 4 理研分子イメージング
2009 年 5 月 29 日提出

1 はじめに

動物行動のモデリングとその数理解析は、生態学的な視点 [1] のみならず、統計的な興味 [3] など多方面の学術的な興味から研究が進められている。私たちは、行動異常に関連する疾患や薬剤投与後の行動に対して、その様態や影響を分類する物理的行動指標の作成を目指して研究を進めている。昨今このような行動指標を用いた解析は必要性が増してきている。例えば、パーキンソン病における動物の行動解析 [4] では、分子動態の解析のみならず、その行動解析が必須である。にもかかわらず、行動解析の方法が十分に定まっていない現状である。

一般に、動物の歩行運動を見ると、その質的差を”なんとなく”感知することができる。例えば、多量のアルコールを摂取した人の歩行運動の様子を見ると、”なんとなく”この人は酔っているなど目星がつく。しかし、非科学的なこの”なんとなく”をどのように物理的に表しているのかは難問である。

本稿では、昨今社会問題にもなりつつある薬物の典型例であるコカイン (COC) について、その投与後の歩行運動の解析を行う。COC 嗜癖は、精神的な行動、脳損傷、過度の投与による死を引き起こし得る [5]。そればかりか、お金を生み出す不法薬物の取引など社会的問題をも引き起こしうる。そのため、COC 投与後の行動を判定する物理的指標の作成は重要である。

COC は投与すると興奮しきわめて活動的になり、絶え間なく歩き回る行動をとることが知られている [5]。これまで、COC のような不安度を誘発する薬剤の行動指標作成を行おうという試みがいくつか見られる [2, 7] が、未だ実用な物理的指標とはいいがたい現状にある。本稿では物理的指標を作成するため、COC 投与後の歩行運動の特徴調べる。近交系黒色マウスを用いて、COC 投与後のマウスの行動をデジタル画像解析し、運動量の変化、歩行軌跡の直線性、歩行イベントの頻度などの歩行運動特徴量をコンピュータ処理により解析する。そして、ランダムウォークとの対比し、考察を行う。

2 方法と解析

2.1 行動実験とその画像解析

近交系黒色マウス (C57BL/6), 7 から 8 週齢, 体重 20 から 23g (個体数 $N=20$) を使い、図 1(a) のような直径 60cm 円形フィールドにおいて歩行運動観察を行った。これまでの実験のプロトコル [2] に従って実験を行った。つまり、実験フィールドに慣れるフェーズとして、薬剤投与前にまず 90 分間初めて体験するフィールドを自由歩行させる。その後静かにフィールドからマウスを取り出し、薬剤 (COC 5, 10, 20mg/kg とコントロールとして同量の生理食塩水。各 5 匹ずつ) を腹腔内投与する。速やかにマウスをフィールドに戻す。そしてその後 90 分間歩行運動を観察するフェーズとして、図 1(a) のようにセットしたビデオカメラで歩行

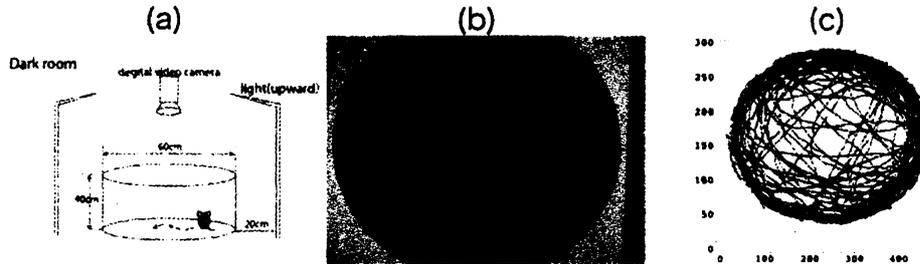


図 1: (a) 実験のセッティング。(b) ビデオ撮影像の一コマ。(c) 画像解析で得られたマウス歩行軌跡の例 (COC20mg/kg 投与後 10 分間の軌跡)。

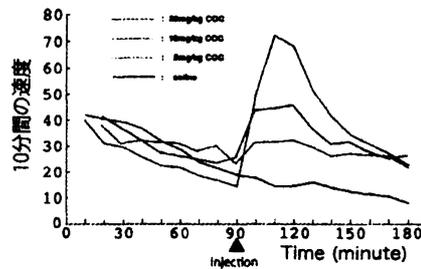


図 2: 各薬剤投与量に対する運動量の時間経過。

運動の様子を撮影する。撮り終わった映像を画像解析ソフトを用いて、マウスの重心の軌跡のデータを取得する。図 1(c) は、得られた 1/30 秒ごとのマウスの重心データを線で結んだ結果を示した例である。この重心データを用いて、次に示す各種のデータ解析を行う。

2.2 歩行特徴量の解析

2.2.1 (1) 運動量解析

得られた重心データから 10 分ごとの運動量を解析し、その時間変化を調べた。各薬剤投与量に対し 5 個体の平均をプロットした結果が図 2 である。

はじめのフェーズ (0 から 90 分の間) において、最初マウスは探索行動のため運動量が急激に増える。時間が経過し、フィールドに慣れてくると、運動量が減少してくる。そして、次のフェーズにおいて COC 投与すると運動量が 90 から 120 分について飛躍的に増加する。一方で、コントロール群では、運動量は変化しないことがわかる。以下、この運動量の急激な変化の見られる 90 から 120 分の 30 分間について運動の特徴的な量を調べていく。

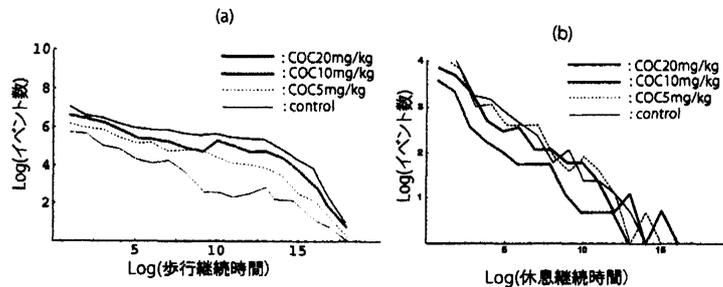


図 3: 歩行運動における (a)Log(歩行継続時間):横軸 -Log(その歩行イベント数): 縦軸プロットと (b)Log(休息継続時間):横軸 -Log(そのイベント数): 縦軸プロット。

2.2.2 歩行継続時間と休息継続時間の解析

マウスの歩行運動全体の構成要素を見てみると、マウスが動きだし、ある程度のスピードの動きになり、その後、動きを止める。そして歩行運動の休息に入る。そしてまた動き出すという一連の繰り返しから構成される。この動きだしから動きを止めるモーション 1 回の歩行継続時間 (図 3(a) 横軸)、もしくはその歩行間の休息継続時間 (図 3(b) 横軸) とそれらの度数 (図 3 それぞれの縦軸) の関係を両対数表示したのが図 3 である。図 3(a) を見ると、投与する COC 投与量が増えれば歩行継続時間が長い歩行が多くなっていくのがわかる。特に長い歩行継続時間 (図 3 (a) の横軸 15 以上) のデータを除くと、ベキ則が成りたつ。直線回帰し、その傾きを計測すると薬剤投与量によって歩行継続時間がより長く続くようになる。また、直線の傾き比較からランダムに歩行継続時間を選ぶという試行からも有意に異なることがわかる。一方で、図 3(b) を見ると、歩行間の休息継続時間とその度数の関係もベキ則になる。しかし、直線回帰したときの薬剤投与量による傾きの違いはみられなかった。

2.2.3 接触走性

図 1(c) の歩行軌跡を見ると軌跡の集中度合いから周辺部分により多くの時間動き回っていることが推察できる。図 4 は横軸に円形フィールドの半径に対する割合 (0 から 1) をとり、そして縦軸に滞在時間の割合をプロットしたものである。コントロールでも COC 投与個体でも周辺部分により長くいることがわかる。一般的に考えて、ヒトでも動物は何もない空間にぽつんと置かれると壁際に寄り添った行動する傾向がある。この傾向を接触走性 (Thigmotaxis) とよばれている [7]。図 4 のように、実験で用いたマウスでは、薬剤投与量を上げていくとより中心を行動するようになったことがわかる。

2.3 歩行軌跡のフラクタル次元の比較

ここでは、中心と周辺部分では歩行軌跡の直線性がどのように変わるかを調べるため、領域ごとの軌跡のフラクタル次元を調べてみる。フラクタル次元とは図形の複雑さを表す指標であり、実数値の次元で表現される。歩行軌跡の場合、フラクタル次元は 1 から 2 の間の実数値となる。ランダムウォークの軌跡のフラクタル次元は 2 となり、2 に近い程行ったり来たりする歩行軌跡となる。フラクタル次元を求めるため、次に

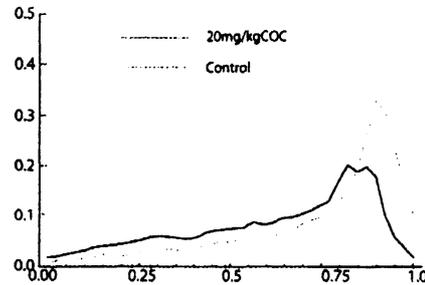


図 4: (円形実験フィールドの半径に対する割合) と (その滞在時間の割合)

記すボックスカウント法 [6] を用いた。

1. 円形フィールド内の歩行軌跡を一辺の長さが d の正方形で細分化する。
2. 軌跡が属する正方形の個数を求め $N(d)$ をカウントする。
3. 4 種類の d を用いて同様の作業を行う。
4. d と $N(d)$ に関する両対数グラフを作成し、回帰係数 $-a$ を求め、この値 a をボックスカウント法から求めた軌跡のフラクタル次元とする。

薬剤投与後 30 分間の歩行軌跡データを用いて、中心付近と周辺領域の軌跡データに分け、それぞれの歩行軌跡のフラクタル次元を解析した。各薬剤投与後 30 分の歩行軌跡データを 30 秒ごとのデータに分割し、その分割軌跡データ毎にフラクタル次元を計測する。そして得られたフラクタル次元の頻度分布を記したのが図 5 である。

中心域は周辺部分より直線的に歩き回り、周辺部分は探索のためうろうろと歩き回ることがみられる。が、ランダムウォークの軌跡のフラクタル次元である 2 と比べると非常に小さい。また、周辺域でも中心域でも、COC 投与量によりフラクタル次元が低くなり、より直線的に歩き回ることがわかる。

3 考察

本稿では、画像解析を用いてマウスの COC 投与後の行動変化を物理的に調べ、歩行運動の特徴的な量を解析した。特に、COC 投与の影響が顕著に見られる投与後 30 分の運動についてその特徴量を調べた。ランダムウォークやコントロールと比較して、薬剤投与により、運動量が増え、連続歩行時間が長くなる。そして、フラクタル次元の解析から歩行軌跡がより直線的になることがわかった。つまり、COC 投与により運動せずにはいられなくなる。が、歩行中は探索など行わず、一心不乱に、長い時間歩行行動を行ってしまう傾向があることが理解できる。

この薬剤投与マウスの歩行運動の様子を数理的に理解するために、ランダムウォークから次の 2 点の修正を加えた数理モデルを考えている。まず、接触走性 (Thigmotaxis) を考え、距離 r と方向 θ をいる場所依存で選択範囲が異なるよう設定する。そして、図 3 のようなベキ分布から歩行時間長さを選び、歩行モードのスタートやストップに関連する歩行スピードコントロールを導入した修正ランダムウォークを考えた。

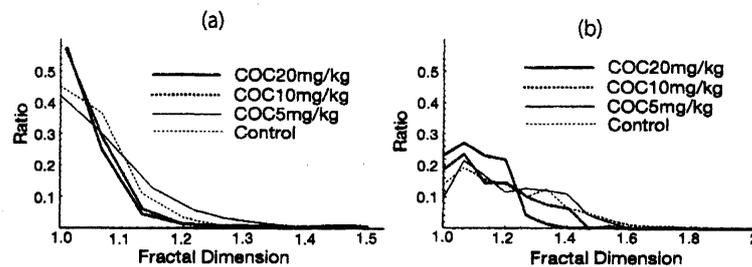


図 5: 歩行軌跡のフラクタル次元。(a) 中心部分の歩行軌跡。(b) 周辺部分の歩行軌跡

もちろん、この歩行軌跡に対して、本稿で調べた各種の運動特徴量を調べてみるとパラメータを調整すれば再現できる（特徴量にあわせてモデルを作成したので当然）。しかし、コンピュータ上の重心の動きをアニメーションで見ていると、どうも動物の動きらしくないように思える。また、ここまで紹介してきた運動特徴量のみならず、独自に解析してきた特徴量も含めていくつかの運動物理的ファクターを考察したランダムウォークを開発してきたが、未だに十分に動物の歩行たらしめる運動特徴量を導入できたという実感には至っていない。

一方、行動の物理的指標については、これまで接触走性が提案されてきた [7]。アルビノマウスを用いた実験から、COCのような恐怖感を煽る作動薬に対して接触走性がより高くなることが見られる。このことから、行動指標としてこの接触走性が有効であると提唱されてきた [7]。しかし、黒色マウス (C57BL/6) を用いた実験結果 [2] や本稿図 4 を見ると、文献 [7] でいわれている接触走性と正反対の (COC 投与量が増えると接触走性が下がる) 結果が得られる。この原因は、マウスの種による薬剤作動性が異なるためと考えられる。現在私たちは種に関わらず成り立つ物理的指標の提案を目指し、この稿で示した黒色マウス (C57BL/6) だけでなく、アルビノマウス (BALB/c) や灰色マウス (DBA/2) の行動観察とその解析を繰り返し行い、物理的指標の開発を行っている。

参考文献

- [1] 大久保 明, "生態学と拡散", 築地書館, (1975).
- [2] N. Kafkafi & G. Elmer, *Pharm. Bioch. Beh.*, **80**, p239-249, (2005).
- [3] A. M. Edwards *et al.*, *Nature*, **449**, p1044-1048, (2007).
- [4] R. Fuentes, *et al.*, *Science*, **323**, p1578-1582, (2009).
- [5] N. R. Carlson, *Physiology of Behavior*, Pearson International Edition, (2004).
- [6] 松下 貢, "フラクタルの物理 I", 裳華房, (2002).
- [7] P. Simon *et al.*, *Behav. Brain. Res.*, **61**, p59-64, (1994).