

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670268

研究課題名(和文) 実験動物の顔表情・姿勢による悪心解析用システムの構築

研究課題名(英文) Development of detective methods of nausea in experimental animals using their facial expression and posture

研究代表者

山本 浩一 (YAMAMOTO, KOUICHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40362694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪心は「上腹部に感じる不快感」と定義されるため、人間が「気持ち悪い」「しんどい」と感じた場合に自身のレベルを記入する方法で判定する。しかし、この方法では個人の主観が入るため客観評価が難しい。また、言葉を発しない動物では判定が不可能である。しかし、ラットの顔をモニターしていると抗悪性腫瘍剤投与によりラットは活動期にもかかわらず閉眼するようになり、悪心・嘔吐の治療薬をあらかじめ投与しておくことで、この閉眼状態が抑制された。これらの結果はラットの「顔表情」を画像情報としてモニターし、特徴的な条件(今回の場合は閉眼状態)を抽出することで実験動物の悪心客観評価法を開発するための端緒を開く結果となった。

研究成果の概要(英文)：Quantifying of nausea in humans is generally used a 100-mm visual analogue scale (VAS), which is common in pain evaluation. However, since this method is based on subjective evaluation, it is impossible to recognize and evaluate whether animals feel nausea with this method. Alternatively, since we observed that rats made a grimace after administration of nauserant stimuli, we hypothesized that changes of facial expression are used as a method to detect nausea in rats. In the series of experiments, we observed that administration of nauserant stimuli induced a significant the decrease of the eye-opening index, i.e. closed their eyes, in rats. Furthermore, anti-emetic drugs significantly inhibited the decrease of the eye-opening index. Based on these results, it is possible that the changes of facial expression has the potential to be useful for detection of nausea in laboratory animals.

研究分野：薬理学

キーワード：悪心 表情 評価法 ラット マウス

1. 研究開始当初の背景

新規開発される制吐剤の承認に向けて非臨床安全性試験・臨床試験を実施する場合、対象となる実験動物や患者が惹起する悪心・嘔吐を客観化して重症度の定量評価を行い、既存の制吐薬と比較して有効性を確認することが重要となる。

嘔吐は消化管の内容物を強制的に吐出する反射と定義されるため (Gastroenterology 120: 263-286; 2001)、人間の他、嘔吐反射を有するフェレット、スンクスが観察時間内に胃内容物を何回口腔から吐出するかで判定するため、客観的把握することは容易である。一方、悪心は「上腹部に感じる不快感」と定義されるため、「気持ち悪い」「しんどい」と感じた場合に、自身の悪心レベルを記入してもらい visual analog scale (VAS) を用いて判定する (Cancer Nurs 34: E14-E24; 2011)。この方法は 100mm の水平な直線を用いて、自分の悪心レベルはどの程度の長さになるか自己申告する方法で評価する。言葉に不自由な患者にも用いることができ、世界各国で共通した尺度として用いられる。しかし、この方法では患者個人の主観が入るため客観評価が難しい。しかも、言葉を発しない動物では VAS を用いることができないため、悪心を客観的・他覚的判定するための基準がない。これまで報告者は内臓不快感を惹起する抗悪性腫瘍薬投与によってラットは異味症が生じ、土壌やカオリンなどの通常の餌としては考えられない非栄養物を摂取するパイカ行動が現れることに着目し、パイカ行動を指標とする悪心病態モデルを構築する研究を行ってきた (J Pharmacol Toxicol Methods 63: 30-34; 2011 など)。しかし、摂食行動と密接な関係があるパイカ行動はラットの活動期にのみ惹起されるため、非活動期や行動抑制が生じた際に悪心がどの程度なのか評価することは困難であった。また、パイカ行動を惹起しない程度の極めて弱い刺激の場合、行動抑制 (摂食抑制) が現れるだけであった。このことから、悪心・嘔吐の研究で著名な Andrews は悪心モデルとして使えるのは「I feel sick!」と話すオウムだと揶揄するほどであった (TiPS 9:334-341, 1988)。

ところで、「表情」とは、感情や情緒を外見に出し表す行為をさし、非言語によるコミュニケーションのひとつである。表情を作り出せるのは表情筋を発達させている霊長目に属するサルや人間に限るとされているが、イヌやネコなどの伴侶動物 (ペット) でも喜怒哀楽を示すと思われる仕草は見て取

れる。実際、放射線照射や抗悪性腫瘍薬投与など催吐刺激後のラットの様子を観察していると、刺激前の好奇心あふれる表情とは異なり、「目を細める」「ヒゲが垂れる」「耳介を垂らす」「大頬骨筋を痙攣させる」などつらそうな表情をしていた。また、このような表情をしている時には「ぐったり」したで表現できる独特の姿勢をしていた。いずれも報告者の主観によって確認したもののだが、これらは「眠さ」や「痛み」とは違って何かに耐えているようであった。ラットが発する情報としてはこれまで利用されず見過ごしてきたものであるが、報告者はパイカ行動の実験系に組み合わせてラットの顔表情や姿勢を情報として取得し、特徴的な条件を抽出すれば、より感度良く悪心を認識できるのではないかとひらめき、「顔表情」や「姿勢」を画像情報としてモニターし、特徴的な条件を抽出することでその情報から悪心を認識できると考え、実験動物の悪心を客観評価するための新規実験手技法の開発を挑戦しようと、本研究を企画した。

2. 研究の目的

主観が左右する悪心の判定において、行動薬理実験では捕らえることがなかったラットやマウスの「つらさ」「しんどさ」を表情や姿勢などから読み取り、どの程度「気持ち悪い」のかを客観評価・自動判定するシステム開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 顔表情による悪心評価法の確立

顔表情データ取得システムの構築

Wistar/ST 系雌性ラットをアクリル製ケージに収容し、ケージは 12 時間明期・12 時間暗期 (6 時点灯 - 18 時消灯) となる遮光性防音ボックス内に設置した。ケージ内には餌と水を置き、自由に摂取できる様にした。ラットがどの方向を向いても途切れることなく表情や姿勢データを取得することが必要であったため、ケージ下にディスプレイ用のターンテーブル (シグマプランニング製) を設置し、 $1^\circ/\text{sec}$ となるようにケージを回転させた。

ケージより 30cm 離れた場所に赤外線カメラ (プラネックス社製 CS-W70HD) を設置し、明期・暗期ともに連続して表情・姿勢が記録できるようにした (図 1)。この環境に約 1 週

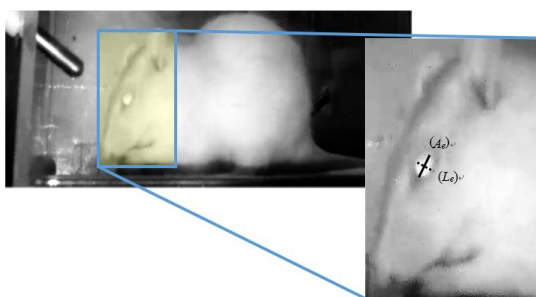
間馴化させたのち、ラットに抗悪性腫瘍薬のシスプラチン (3, 6 mg/kg) を腹腔内投与した。シスプラチン投与 48 時間まで同一環境にてラットの顔表情を記録した。



図 1: 実験図

悪心の評価

記録した顔表情画像から 10 分ごとに静止画にキャプチャした。画像解析ソフト ImageJ (Version 1.48) を用いて眼球長径 (L_e) に対する短径 (A_e) の割合 (eye-opening index) を求め (図 2) 3 時間ごとの eye-opening index の平均値を求めた。



$$\text{Eye-opening ratio} = \frac{\text{longitudinal length of rat's eye } (L_e)}{\text{axial length of rat's eye } (A_e)}$$

図 2: eye-opening ratio の計測法

制吐剤の効果

シスプラチン投与 30 分前、シスプラチン投与 24 時間後の 2 回ラットに制吐剤を投与し、eye-opening index に及ぼす影響を検討した。なお、制吐剤にはシスプラチンなど抗悪性腫瘍剤に伴う悪心・嘔吐の治療薬として保険適用を受けるセロトニン 5-HT₃ 受容体遮断薬のグラニセトロン (0.1 mg/kg) とタキキニン NK₁ 受容体遮断薬のホスアプレピタント (2 mg/kg) を選択した。

(2) 抗悪性腫瘍薬以外の催吐剤による実験外科手術後に患者が抱える問題に悪心・嘔吐 (術後悪心嘔吐: postoperative nausea and vomiting: PONV) がある。手術を受けた 3~4 人に 1 人の割合で発症するこの症状は周術期満足度の低下になりうる (Br J Anaesth. 69: 7 suppl1 24S-32S, 1992)。この領域の基礎実験ではイヌやフェレット、スunksの嘔吐反射を指標に用いるが、これら動物を用いても麻酔薬による嘔吐反射が再現できていない (Physiol Behav. 106: 562-568. 2012)。安全性試験で汎用されるラットは嘔吐をしないが、内臓不快感を惹起する刺激によってラットは異味症が生じ、カオリンなどの通常の餌としては考えられない非栄養物を継続的に摂取するパイカ行動を惹起する。報告者はパイカ行動を指標とすればラットにおいても抗悪性腫瘍薬や放射線による悪心・嘔吐を評価できることを報告してきた。そこで、この行動指標を用いて、PONV 動物モデルを作成した。Wistar/ST 系ラットを水、餌、カオリンが自由に摂取できるケージで飼育し、連日 24 時間のカオリン摂取量を測定した。馴化期間を経た後、静脈麻酔薬のプロポフォル (36-54 μg/kg/h) 吸入麻酔薬のセボフルラン (1.5%) を投与し、投与 24 時間後のカオリン摂取量を測定した。なお、麻酔時間は 0.5, 1, 3, 6 時間を設定した。また、PONV は若年女性に現れやすいとの報告から、使用するラットは成年 (6-8 週齢) 雄・雌、高齢 (20 週齢) 雌の 3 種類を使用した。

さらに、麻酔投与後に現れるパイカ行動に対して、ドーパミン D₂ 受容体遮断薬のプロクロルペラジン (1, 5 mg/kg) 5-HT₃ 受容体遮断薬のグラニセトロン (0.1, 0.5 mg/kg) NK₁ 受容体遮断薬のホスアプレピタント (1, 2 mg/kg) ヒスタミン H₁ 受容体遮断薬のジフェンヒドラミン (5, 10mg/kg) 副腎皮質ステロイド剤のデキサメタゾン (0.5, 1 mg/kg) がどのような影響を与えるか検討した。最後に、麻酔薬によって顔表情 (eye-opening ratio) がどのように変化するか確認した。

(3) マウスによる実験系の確認

実験に使用可能となるマウス系統の選別マウスにおいてもパイカ行動によって悪心嘔吐の評価ができることを報告しているが、摂取量が少なく、実験の全期間にわたり、カオリンペレットに興味を示し、実際に摂取しない場合でも噛み砕いた粉末状のカオリンペレットがケージ全体に飛び散りこれらの食べこぼし全てを回収することは極めて困

難であった。このため、消化管からは吸収されず糞便中に排出される赤色色素のカルミンをカオリンペレットに添加し、催吐刺激後に回収した糞便からカルミンを抽出し比色定量してカオリン摂取量を推定する方法を用いていた。一連の実験では ICR 系マウスを用いていたが、予備実験として、C57BL/6 系マウスを使用した際に全てのカオリンペレットをかみ砕くなどのような行動が見られなかったことから、これは使用していたマウス系統にはないかと考え、系統差を確認する実験を行うことにした。

マウス摂餌量自動測定装置 (FDM-300SW) を開発し、8 週齢の ICR, BALB/c, C57BL/6, DBA/2 系雄性・雌性マウスを収容し、餌・カオリン・水を自由に摂取できる様にした。摂餌量が安定したところで、シスプラチン (7.5, 15 mg/kg) を腹腔内投与し、その 24・48 時間後の摂餌量、カオリン摂取量の測定を試みた。また、5-HT₃ 受容体遮断薬のグラニセトロン (0.1 mg/kg) と NK₁ 受容体遮断薬のホスアプレピタント (2 mg/kg) の前投与でシスプラチン投与によるパイク行動がどのような変化を受けるか確認した。

抗悪性腫瘍誘発性悪心発症における脳内 PPT-A の役割

シスプラチン投与 8 ならびに 32 時間後にマウス延髄を摘出し、組織中に含まれる全 RNA を採取した。その後、サブスタンス P の前駆体であるプレプロタキキニン (PPT) -A をコードする mRNA 発現量を RT-PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 顔表情による悪心評価法の確立

生理食塩水投与による eye-opening ratio の変化を確認したところ、暗期に約 0.7、明期に約 0.3 の値となる概日リズムを示した。ラットは夜行性であるため、暗期に eye-opening ratio が高い値を取る、すなわち開眼していることは、理にかなった結果である。次に、シスプラチン投与後の eye-opening ratio を算出したところ、3, 6 mg/kg のいずれも暗期において生理食塩水投与群より低い値を示した。この低下は投与 1 日目だけでなく 2 日目にも続いた。また、低下の割合は 3 mg/kg 投与群よりも、6 mg/kg 投与群でより顕著であった。いずれの用量でも暗期での閉眼頻度が高くなるのはある種

の異常反応であるが、この結果だけでは何の原因であるか判定できない。そこで、シスプラチン 3 mg/kg 投与 30 分前と 24 時間後にグラニセトロンを投与したところ、シスプラチン投与 1 日目の eye-opening ratio の低下のみを抑制することができた。一方、ホスアプレピタントを投与すると、シスプラチン投与 1 日目と 2 日目のいずれの eye-opening ratio の低下を抑制することができた。グラニセトロンなどの 5-HT₃ 受容体遮断薬は抗悪性腫瘍薬投与から 24 時間以内に現れる急性悪心・嘔吐は効果的に抑制できるが、24 時間以降に現れる遅発性悪心・嘔吐に対し余り有効ではなく、NK₁ 受容体遮断薬は急性、遅発性悪心・嘔吐のいずれにも有効であるとの臨床報告を踏まえると、今回の eye-opening ratio の低下は抗悪性腫瘍薬による悪心・嘔吐に起因するものであると考えられる。

しかしながら、シスプラチン 6 mg/kg 投与群では制吐剤を投与しても eye-opening ratio の低下を完全に回復できなかった。つまり、制吐剤では改善できないほどの強い悪心や別の要因 (神経障害性疼痛など) で閉眼せざるを得ない状況であったかもしれない。

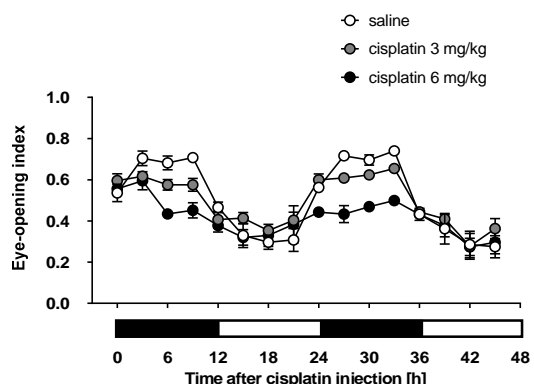


図 3: 実験結果

シスプラチン誘発 eye-opening ratio の変化

(2) 抗悪性腫瘍薬以外の催吐剤による実験
 成年雌性ラットに静脈麻酔薬のプロポフォル (36-54 μg/kg/h) を 3 時間、6 時間、吸入麻酔薬のセボフルラン (1.5%) を 6 時間それぞれ投与した場合にそれぞれカオリン摂取量の有意な増加が認められた。このカオリン摂取行動はグラニセトロン、プロクロラペラジン、ホスアプレピタント、デキサメタゾンといった現在臨床で PONV に対して有効とされる制吐剤の前投与によって有意に抑制することができた。また、この実験で得られた麻酔刺激を用いて eye-opening ratio によ

る悪心評価を行ったところ、(1)でのシスプラチンでの結果と同様に、麻酔薬によって eye-opening ratio の低下が認められた。

一方、成年雄・高齢雌ラットでは麻酔薬によってカオリン摂取行動は見られなかった。これはヒトの悪心発症と同様にラットのカオリン摂取行動にも性差・年齢差が関係することを示しているものと思われる。

(3)マウスによる実験系の確認

シスプラチンによって全ての系統・性別のマウスでパイカ行動が認められたが、雄性 DBA/2 マウスで特に顕著なカオリン摂取量の増加が認められた。このカオリン摂取行動はグラニセトロン、ホスアプレピタントのいずれでも抑制できた。また、シスプラチン投与8ならびに32時間後にDBA/2マウス延髄において、顕著なPPT-A mRNAの増加が認められ、シスプラチンによるカオリン摂取行動の原因として延髄でのサブスタンスPの分泌が関与していることが示唆された。

この実験結果を基に、マウスの eye-opening ratio によって悪心が評価できないか検討した。その結果、評価は可能であるとの方向性が得られたが、目が非常に小さかったため、使用している赤外線カメラでは解析が非常に困難であった。眼形状を以下に捉えるかについて今後の課題であることが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Yamamoto K., Tatsutani S., Ishida T. "Detection of nausea-like response in rats using the monitoring of facial expression" Front Pharmacol. 7. 534, 2017 査読有り

Yamamoto K., Yamamoto E., Sugimoto T., Sakagami T., Yamatodani A. Sevoflurane-Induced pica in female rats. J Pharmacol Sci, 131. 68-71, 2016 査読有り

Yamamoto K., Kato N, Isogai Y., Kuroda T., Ishida T., Yamatodani A. Induction and antagonism of pica induced by teriparatide in rats. Eur J Pharmacol 764: 457-462. 2015

査読有り

[学会発表](計8件)

Yamamoto K. Effect of anti-emetic drugs on chemotherapeutic agents-induced grimace expression in rats. MASCC/ISOO International Symposium on Supportive Care in Cancer. Washington D.C, USA, June 22-24, 2017

山本 浩一 シスプラチンが誘発するマウスパイカ行動における性差・系統差の影響 第90回日本薬理学会年会 長崎 2017年3月15日

Yamamoto K., Tatsutani S., Ishida T. Development of detection of nausea in rats using the monitoring of facial expression. Neuroscience 2016. San Diego, CA, USA. Nov.11-17, 2016

Yamamoto K., Ishida T. Strain differences in cisplatin-induced emesis in mice. MASCC/ISOO International Symposium on Supportive Care in Cancer. Adelaide, Australia, June 23-27, 2016

山本 浩一、磯谷 幸宏、石田 隆行、大和谷 厚 ラットの異食行動を利用したテリパラチド誘発悪心病態モデルの作成 第89回日本薬理学会年会 横浜 2016年3月8日

山本 浩一、磯谷 幸宏、石田 隆行 テリパラチド誘発悪心に対するドーパミン・ニューロキニン受容体遮断薬の効果 第17回日本骨粗鬆症学会 広島 2015年9月18日

山本 浩一、山本 笑梨 プロポフォール麻酔誘発悪心に対する治療薬の選択 第88回日本薬理学会年会 名古屋 2015年3月19日

山本 浩一、辰谷 聡一、石田 隆行 眼形状モニタリングによるラットの悪心判定法の開発 171回医用画像情報学会春季大会 東京 2015年2月7日

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 浩一 (YAMAMOTO KOUICHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 40362694