

飼育ケージを用いた暗期におけるラットの活動量解析法の開発

横井克彦^{1,2)†}, 許斐重紀³⁾, 北川茉友²⁾, 大木美和²⁾

(¹聖徳大学大学院 人間栄養学研究科*, ²聖徳大学 人間栄養学部 人間栄養学科,

³山梨学院大学 健康栄養学部 管理栄養学科)

(受付 2023年8月30日, 受理 2023年10月10日)

Development of video analysis for home cage activity of rats during dark period

Katsuhiko YOKOI^{1,2)†}, Aki KONOMI³⁾, Mayu KITAGAWA²⁾, Miwa OKI²⁾

¹Department of Human Nutrition, Seitoku University Graduate School

²Faculty of Human Nutrition, Seitoku University

³Faculty of Health and Nutrition, Yamanashi Gakuin University

Summary

The analyzing procedure for home cage activity of rats under dark cycle was developed. Forty-eight 4-week-old female Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups according to a 2x2 factorial design. The first factor was dietary nickel level (no supplemental or 1 mg/kg diet). The second factor was surplus sodium chloride in diets (no additional or 4%(w/w)). Two rats were kept in a transparent acrylic cage for 10 weeks. At Day 67 or Day 68 rats were video recorded under dim red LED light (0.5-1.0 lux on the floor). Flickering and image noises were removed from the recorded videos. The 2-hour video records from 2 hours after the start of dark cycle was analyzed with both ANY-maze software and the visual observation. The freezing scores obtained with ANY-maze each second during bilateral fighting and unilateral attack visually observed were significantly higher than that during other behaviors. The freezing score indicators were positively and significantly correlated with both total fighting duration and total fighting bouts, enabling analysis of activities of two rats in a home cage under dark cycle.

近年、動物の行動解析による脳機能の分析が進んでいる。今まで、行動解析によってニッケル欠乏ラットに、視覚、嗅覚、味覚の異常があることを明らかにしてきた¹⁾。これらの行動解析には、実験動物にとって普段飼育されているケージ（飼育ケージと以後記載）とは異なる特殊な装置を用いる。活動量（activity）の解析においても、飼育ケージとは異なる装置を用いるのが一般的である²⁾。最近、動物の横方向から明期に飼育ケージ内の行動を記録する方法³⁾が報告されている。暗期の活動量については、赤外線ビームの遮断をもって活動ありとする方法が従来から使われてきたが^{2,4)}、赤外線ビームと検出部の配置によるケージ形状の制限と費用の問題があり、飼育ケージへの適用は実用的ではない。そのほか、検出される動きは限定されるが、回し車でのランニング（wheel running）による回し車の回転数と回転速度を活動量の指標に用いる方法がある⁵⁾。

そこで、飼育ケージを用いて動物の上方にカメラを設置し、暗所でも撮影が可能な市販の車載 CCD カメラに動画編集ソフトと汎用的な行動解析ソフトを組み合わせ、暗

期の活動量を解析する方法を考案した。本報では、技術的な側面について報告し、栄養状態に伴う暗期の行動変化については、別途報告する予定である。

方 法

飼育：日本 SLC の Sprague-Dawley 系 4 週齢雌ラット 48 匹を 2x2 の 2 要因デザインに割り付け、10 週間飼育した。実験要因は、飼料中ニッケル（1 mg/kg と無添加）並びに塩化ナトリウム（過剰添加分なしと過剰添加分 4% (w/w)）とした。基本飼料の組成は、AIN-93G 処方を基とし、たんぱく源としてシグマ社製ビタミンフリーカゼインの分量を 15% (w/w) にし、コーンスターチを 5% (w/w) 増やし、ミネラルについては酸化亜鉛を亜鉛源としてアメリカ合衆国 National Research Council の必要量 12 mg/kg を補い、他のミネラル成分は前報¹⁾の処方に従った。なお、分量の細部はコーンスターチ量で調整した。飲み水として、硬質ガラスを用いた飲用器でミリ Q 水を

*所在地：千葉県松戸市岩瀬550（〒271-8555）

与えた。飼育室は、HEPA フィルターを通した空気を供給し、温度は22度から24度、湿度は45%から55%に保った。飼育には、HEPA フィルターを通した超微量元素飼育用特注装置内に設置した特注の無色透明アクリル製3連ケージを用いた。したがって、飼育ケージ内に供給されている空気は、HEPA フィルターを二重に通っている。1室の内寸は、幅216 mm、奥行き340 mm、高さ186 mmである。床には、スチレン製グリッドを用いている。体重が見合ったラット2匹をアクリル製ケージの1室で飼育し、真ん中の上方設置カメラで飼育67日目ないし68日目の暗期にビデオ録画した。なお、グリッド床面からレンズ前面までの高さは、265 mmに設定した。

今回は暗期開始後2から4時間のビデオを観察して、双方向のファイティングと片方のみのアタック（強制的グルーミングを含む）を秒単位で記録した。なお、片方のみのアタックは、2匹のうちの1匹が優位性（dominance）を持っている可能性を示すため、双方向のファイティングと区別して記録した。双方向のファイティング（bilateral fighting）については、以下のように定義した。一方のラットから物理的な前肢または後肢を用いた打撃があり、他方が同じように打撃で返した場合、1回の双方向のファイティングとした。続けて元のラットが打撃で返した場合は、さらに1回の双方向のファイティングとしてカウントした。また、打撃と打撃の間を双方向のファイティングが継続した時間とした。

片方のみのアタック（unilateral attack including forced grooming; 強制的グルーミングを含む）については、以下のように定義した。一方のラットが他方のラットを追いかけて打撃をしたか、強制的なグルーミングをし、それが終了しても他方のラットが打撃で返さず、双方の動きが止まった場合を1回の片方のみのアタックとした。追いかけ始めた時から打撃または強制的グルーミング後に、双方の動きが止まった時までを、片方のみのアタックが継続した時間とした。

結果的に、双方向のファイティングまたは片方のみのアタックがなかった時間は、ファイティング・アタック以外の行動（other behaviors）の時間となる。典型的なファイティング・アタック以外の行動には、静止、摂餌、飲水、移動、グルーミングが含まれる。なお、本研究は、聖徳大学動物実験委員会の承認（No. 209）を得て実施した。

照明：午後8時から午前8時を暗期、午前8時から午後8時までを明期とした。明期には、室内天井設置の蛍光灯（昼光色）でケージ床面を50～80 luxとなるように照明した。暗期には蛍光灯は消し、赤色LEDでケージ床面が0.5～1.0 luxとなるように照明した。

撮影：市販アナログ車載CCDカメラ（Car Rover, Guangzhou Startway Autopart Co Ltd, Guangzhou, China; 写角170°, 最小照度0.6 lux）を飼育ケージ底面に対して上方から垂直下方向に観察するように設置した。アナログ車載CCDカメラは、ビデオ取り込み用アナログ/

デジタルコンバーターGV-USB2（アイ・オー・データ機器、金沢市）を介してパソコンに接続した。動画は、wmvファイル形式で記録した。

動画のノイズ除去・画質改善：暗所で撮影した動画であるので、そのまま行動解析ソフトで解析することは出来なかった。そこで、動画編集ソフトVideoPad13（NCH Software, Greenwood Village, CO, USA）でMSU Deflicker ver.1.3プラグインを用いてフリッカーおよびノイズを軽減した。得られたmp4動画は、さらに画質改善ソフトvReveal 3（MotionDSP Inc, Burlingame, CA, USA）を用いて画質を調整した。また、動画には、主に電源アダプターの青色LED由来のノイズが含まれていたため、動画編集ソフトVSDC Video Editor ver. 8.1（Flash-Integro LLC, ADP-RB Ltd, Sofia, Bulgaria）を用いてBlue成分を除去したものを行動解析に用いた。

行動解析：ラットの動画は、行動解析ソフトANY-maze（Stoelting Co, Wood Dale, IL, USA）で解析し、1秒ごとのフリージングスコア（freezing score）を得た。なお、ANY-mazeのフリージングスコアは、ピクセルあたりの光強度の時間変化をスコア化したものであり、この値を1秒ごとにその間の平均値をデジタル記録したものである。また、画面全体の光強度の変化の影響を除去する設定とした。動画にノイズがない状況でフリージングスコアは動きの指標となり、動きが全くないときに0で、概ね300以下の数値となる。ノイズがある動画では、動きに由来するスコアにノイズの分が上乘せされる。残存するノイズの影響を除くため、各組における2時間における1秒当たりのフリージングスコアの最小値を差し引いた値を解析の対象とした。また、急激な動きのピークは、フリージングスコアが100より大きく、かつ、過去10秒間の平均値+2標準偏差値を上回った場合、ピークとして検出するように、Microsoft Excelのワークシートを設定した。

統計解析：行動の種別間のフリージングスコアは、Schefféの多重比較検定で比較した。また、各種指標間のPearson積率相関係数を求めた。データ解析には、統計解析ソフトSYSTAT13（Systat Software Inc, Inpixon, Palo Alto, CA, USA）を使用し、危険率5%未満を有意とした。

結 果

本研究は、暗期のケージ内の活動量のデジタル測定法を開発することが目的であり、全群のデータをまとめて解析し、群間比較はおこなっていない。

本研究では、2匹をケージの1室で飼育し、1組としている。動画が記録できたラットの組数は24組中22組であった。2時間の記録における1秒ごとのフリージングスコアの最小値の22組中分布を調べた結果、その最小値は0、中央値は1.8、最大値は22.3、平均値3.8、標準偏差5.3であった。なお、フリージングスコアの最小値が22.3を示した動画を肉眼的に観察した際、ラット自体に動きはな

く、画面上に肉眼的にノイズが残っていた。また、照明の照度が0.5 luxであり、メーカーの保証最小照度(0.6 lux)を僅かではあるが下回っており、ノイズを生じたものである。それ以上のノイズ除去は困難であったので、2時間における各組のフリージングスコアの最小値を各1秒のフリージングスコアから差し引いた値を、その後の解析対象とした。なお、1秒ごとのフリージングスコアの最大値の22組における最大値は、297.3であった。本研究では、大きな活動量を問題としており、ノイズによるスコアが動きに伴うスコアに上乘せされ、見かけ上大きな活動量が記録されるほうが問題である。もちろん、一般的なフリージングスコアの使用目的であるフリーズの検出では、ある低い値未満のスコアであった時間がフリーズとして記録される。この場合には、最小値の減算は不適切である。

Fig. 1に、フリージングスコアの時間経過ならびにピーク検出の例を示す。Pと示したものが、検出されたピークである。急に激しい動きに転じ、それが直ちに落ち着いた場合にピークとして検出されることを示している。

Fig. 2に、双方向のファイティング、片方のみのアタック、ファイティング・アタック以外の行動におけるフリージングスコアを比較した結果を示す。この比較の際、ラットの組や群の構成については考慮せず、すべての組における1秒ごとの各行動のフリージングスコアをまとめて比較した。延べ秒数は、双方向のファイティングが1,297秒、片方のみのアタックが149秒、ファイティング・アタック

以外の行動が156,976秒であった。Schefféの多重比較検定では、ファイティング・アタック以外の行動は、双方向のファイティングおよび片方のみのアタックに比べてフリージングスコアが有意に低く、双方向のファイティングおよび片方のみのアタックの30%程度に低下していた。また、双方向のファイティングと片方のみのアタックのフリージングスコアには差がなかった。ファイティング・アタック以外の行動には、フリージングスコアがほぼ0付近まで下がる静止ないし睡眠の時間が含まれている一方、双方向のファイティングと片方のみのアタックではほぼ活動しか含まないので、当然得られるべき結果が観察できたことを示している。

フリージングスコアでは、双方向のファイティングと片方のみのアタックに差がなかったため、両者を合わせた総ファイティング回数(total fighting bouts)および総ファイティング時間(total fighting duration)と平均フリージングスコア(average freezing score)、フリージングスコアが100より高かったピークの数(フリージングスコア・ピーク数, peaks with freezing score greater than 100)、フリージングスコアが100より高かった時間(高フリージングスコア時間, duration with freezing score greater than 100)の相関を調べた。

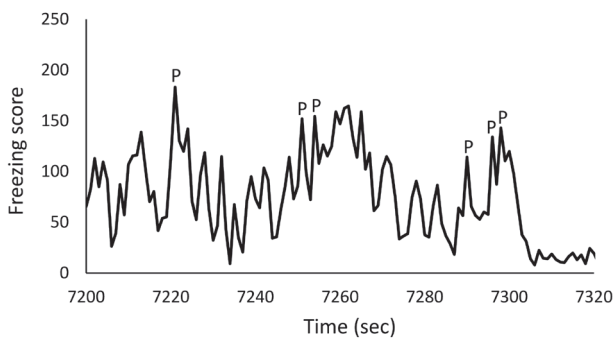


Fig. 1. Illustration of the freezing score along time. Peaks are detected when the score is greater than both 100 and the mean+2 σ in the previous 10 seconds. P in the graph shows the detected peak.

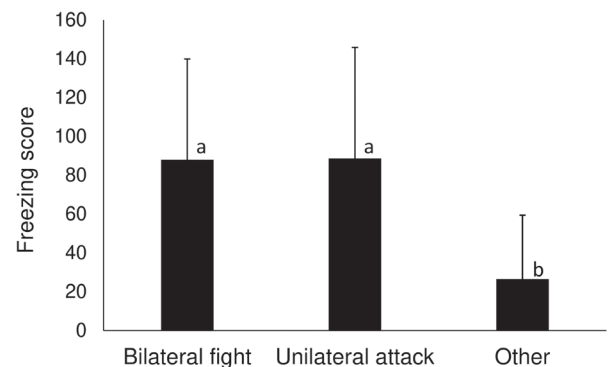


Fig. 2. Comparison of the freezing scores for various behaviors. Bilateral fight shows bilateral fighting. Other shows other behaviors. The column shows the average value, and the above short bar shows the standard deviation. The data were compared with Scheffé's multiple comparison. The columns with different letters indicate the significant difference between them ($P < 0.05$).

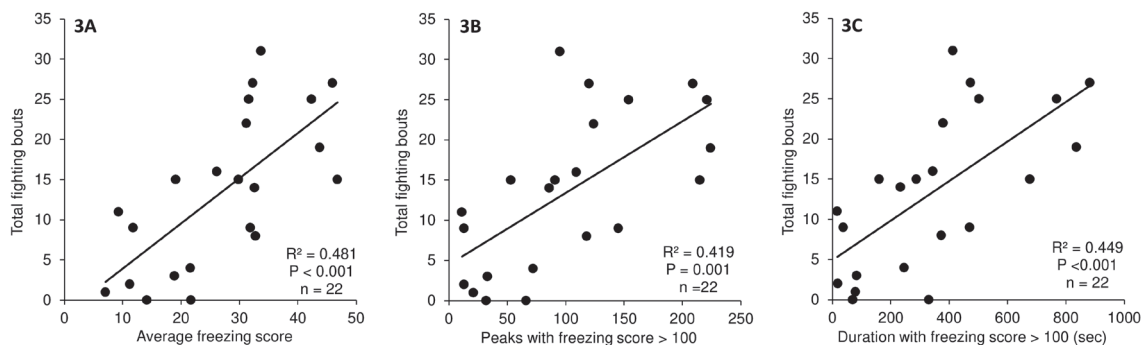


Fig. 3. Correlation of the total fighting bouts with the average freezing score (3 A), the peaks with the freezing score greater than 100 (3B), and the duration (sec) with the freezing score greater than 100 (3 C). Pearson correlation coefficients, P value, and sample size (n) were shown in each graph.

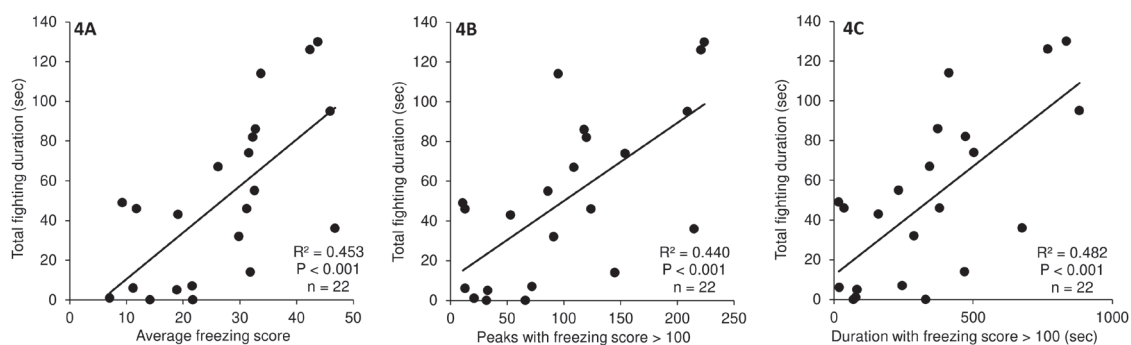


Fig. 4. Correlation of the total fighting duration (sec) with the average freezing score (4A), the peaks with the freezing score greater than 100 (4B), and the duration (sec) with the freezing score greater than 100 (4C). Pearson correlation coefficients, P value, and sample size (n) were shown in each graph.

Fig. 3 に示すように、平均フリージングスコア、フリージングスコア・ピーク数、高フリージングスコア時間のいずれもが、総ファイティング回数と有意に相関した。また、Fig. 4 に示すように、平均フリージングスコア、フリージングスコア・ピーク数、高フリージングスコア時間のいずれもが、総ファイティング時間と有意に相関した。

考 察

ラットの飼育ケージにおける暗期の行動を日用品レベルの機材を組み合わせることで記録し、行動解析ソフトで分析できる状況に持ち込めた。ラットは夜行性であり、明所を忌避するが、三枝らによれば、明期に暗順応させたラットで明所忌避がみられるのは、15 lux 以上とされる⁶⁾。著者らが、ニッケルを充足させたSD系雄ラットを暗期に調べた結果では、2.5 lux および 5 lux で明所忌避はみられなかったが、10 lux で明所忌避が見られた¹⁾。ラットにとって全く見えないことを保証するには、赤外線照明-赤外線カメラのシステムを用いる必要があるが、今回用いた照度は飼育ケージ床面で0.5-1.0 lux と明所忌避閾値未満であり、ラットの行動に目立った影響は及ぼさないと考えられる。

栄養学でもラットのファイティングに関する研究は、通常、2匹のラットをチェンバーに入れ、床面のステンレス製グリッドに通電し、電気ショックを与えて aggressive attacks (攻撃的な攻撃) を観察したものが多い^{7,8)}。aggressive attacks は、臀部への噛みつき (biting) を含む激しい攻撃である^{9,10)}。また、普段同室では暮らしていない、全く見知らぬ動物 (侵入者) をケージに入れて、その動物 (侵入者) への防御のための攻撃を観察する resident-intruder test も行われている^{11,12)}。今回の研究で観察したファイティングは、4週令から同室に住ませた inmate 同士の play fighting であり¹⁰⁾、aggressive attacks で見られる臀部への噛みつき (biting) は観察されなかった。

本研究で play fighting を対象としたのは、それ以外の行動との間に明確な肉眼的な活動量の差が存在するからで

ある。それ以外の行動には静止や睡眠が含まれ、その際には呼吸筋の収縮、心拍動、消化管の蠕動運動等の体内での動き以外に、大きな外的な活動がない。あるデジタル指標を用いて play fighting とそれ以外の行動の間に、明らかな差が見出せれば、その指標は活動量の指標として有効である。

フリージングスコアを用いてデジタルに記録した平均フリージングスコア、フリージングスコア・ピーク数、高フリージングスコア時間のいずれの指標も、用手法で記録した総ファイティング回数および総ファイティング時間と有意に正の相関を示した。 R^2 値すなわち決定係数は、0.419 から 0.482 であり、フリージングスコアを用いた活動量の指標で説明できる play fighting の回数や時間は、40% 台に過ぎない。フリージングスコアは客観的に記録する点では優れているが、行動の種類判別まではできない。また、総ファイティング時間は、高フリージングスコア時間の10%以下であり、これらの二つの指標で見ていた現象が完全に同じわけではない。しかしながら、用手法でファイティングを記録した際、身体的なアタックの前からラットの動きが激しくなっていることが観察され、フリージングスコアにはこれらの動きが反映していたものと思われる。ファイティング中ならびにファイティング前後の動きを客観的に解析するためには、2匹の動物を追跡し位置を定位して、動物間の距離を測定する必要がある。今回使用した ANY-maze ソフトウェアでは2匹の追跡はできないので、別途方法を検討中である。

結 語

今回研究した方法で、暗期において用手法のファイティングに相関する客観的なデジタル指標が得られたので、今後、栄養素の欠乏が動物の暗期の行動に及ぼす影響の評価に活用していきたい。

謝 辞

本研究は、科学研究費基盤研究 C (22K02141) の援助

を受けた。

文 献

- 1) Yokoi K, Uthus EO, Penland JG, Nielsen FH (2014) Effect of dietary nickel deprivation on vision, olfaction, and taste in rats. *J Trace Elem Med Biol*. Vol 28, pp 436-440.
- 2) Hunt JR, Zito CA, Erjavec J, Johnson LK (1994) Severe or marginal iron deficiency affects spontaneous physical activity in rats. *Am J Clin Nutr* 59: 413-418.
- 3) Rojas-Carvajal M, Quesada-Yamasaki D, Brenes JC (2021) The cage test as an easy way to screen and evaluate spontaneous activity in preclinical neuroscience studies. *Methods X* 8:101271.
- 4) Furukawa M, Izumo N, Manabe T, Kurono H, Hayamizu K, Nakano M, Watanabe Y (2021) Therapeutic effects of sertraline on improvement of ovariectomy-induced decreased spontaneous activity in mice. *Drug Discov Therap* 15: 28-34.
- 5) Peng Z, Ziros PG, Martini T, Liao X-H, Stoop R, Refetoff S, Albrecht U, Sykiotis GP, Kellenberger S (2023) ASIC1a affects hypothalamic signaling and regulates the daily rhythm of body temperature in mice. *Commun Biol* 6:857.
- 6) 三枝 雅, 金子 洋二, 奈良間 功 (1984) 生殖試験におけるラットを用いた視覚異常の簡易検出法: 臨界照度および暗順応効果. *実験動物* 33: 181-185.
- 7) Halas ES, Reynolds GM, Sandstead HH (1977) Intra-uterine nutrition and its effects on aggression. *Physiol Behav* 19: 653-661.
- 8) Fadda F (2000) Tryptophan-free diets: A physiological tool to study brain serotonin function. *Physiol* 15: 260-264.
- 9) Eichelman B, Dejong W, Williams RB (1973) Aggressive behavior in hypertensive and normotensive rat strains. *Physiol Behav* 10:301-304.
- 10) Pellis SM, Pellis VC (2007) Rough-and-tumble play and the development of the social brain. *Curr Dir Psychol Sci* 16: 95-98.
- 11) Kantak KM (1988) Magnesium deficiency alters aggressive behavior and catecholamine function. *Behav Neurosci* 102: 304-311.
- 12) Uchida S, Kitamoto A, Umeeda H, Nakagawa N, Masushige S, Kida S (2005) Chronic reduction in dietary tryptophan leads to changes in the emotional response to stress in mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 51: 175-181.