Possibility of Detecting Visual Functional Disturbance in Rats by the Open-field Test

Iwami KIYOSAWA, Makoto AOKI, Takahiro IMAMURA, Jun NAITO,
Toru R. SAITO*, and Kazuaki W. TAKAHASHI*

*Kissei Pharmaceutical Co., Ltd., 2, 320-1 Maki, Hotaka, Minamiazumi, Nagano 399-83
and *Department of Laboratory Animal Science, Nippon Veterinary and Animal
Science University, 1-7-1 Kyonan-cho, Musashino-shi, Tokyo 180, Japan*

(Received 28 August 1992/Accepted 20 January 1993)

In order to determine whether visual disturbance in small rodents is detectable by means of the open-field test, the ambulation scores of enucleated and intact rats in an open-field were measured. In a 30-min test of Slc:Wistar/ST rats, there were significant differences in ambulation scores between enucleated and intact rats in the first 10-min. In addition, the effects of observation times (09:00-11:00, 13:00-15:00 and 17:00-19:00 hr) and strains on the open-field test were studied using a 10-min test. Regardless of observation times, ambulation scores of enucleated rats of the Slc:Wistar/ST and F344/N Slc strains were significantly elevated as compared with those of intact rats from both strains. When tested during the 13:00-15:00 hr period, there were significant differences in the Slc:SD rats. These findings indicate that the changes in ambulation are due to visual disturbance. However, significant ambulatory changes in F344/N Slc rats were documented at the three different observation times. Based on these results, Slc:Wistar/ST rats appear to be suitable for detecting visual disturbance by the open-field test. —KEY WORDS: ambulation scores, open-field test, rat, time point, visual function

オープンフィールド試験による視覚障害ラット 検出の可能性

清澤 岩水・青木 誠・今村 卓広・内藤 惇
斎藤 徹*・高橋 和明*

キッセイ薬品工業株式会社

*日本獣医畜産大学実験動物学教室

近年、薬物の開発に際し、薬物の副作用としての視覚機能障害に関する検討が必要となっている。視覚器はその構造、機能の特異性から薬物の副作用を受けやすく、その副作用も不可逆的で重篤な障害であることが知られている。そのため、薬物の安全性試験の中で視覚機能検査はその重要度を増し、各種実験用動物の視覚機能検査法が検討され、視覚誘発電位および網膜電図の測定等が行われている [7]。しかし、これらの検査は手技が複雑で高価な測定機器を使用するゆ

えに安全性試験において必ずしもルーチンに実施されることは容易ではない。大沼ら [4] はオープンフィールド試験 [2] において眼球摘出マウス、視覚障害マウスが正常マウスより高い歩行移動量を示すことを報告している。著者らはオープンフィールド試験にて、Wistar 系、SD 系および F344 系ラットの歩行移動量を検討し、視覚機能検査に使用できる可能性を認めたので報告する。

材料および方法

供試動物および飼育環境：供試動物として日本エスエルシー株式会社より入手した Slc:Wistar/ST 系（以後 Wistar/ST 系と略す）、Slc:SD 系（以後 SD 系）および F344/N Slc 系（以後 Fischer 系）の雄ラット各44匹を8週齢にて入手した。各系統ラットとも10週齢時に無処置群（対照群）と眼球摘出処置群（摘出群）の2群に分け、摘出群の動物はペントバルビタールソーダ（ネンブタール：大日本製薬）深麻酔下にて眼球を摘出し、眼窩に抗生物質を塗布し、2週間飼育した後実験に供した。実験開始時の体重は Wistar/ST 系344.7～387.9 g, SD 系385.3～422.6 g, Fischer 系252.9～289.1 g であった。動物は室温22.5～23.7℃, 湿度45.0～52.9%, 換気回数16.7回/時間（オールフレッシュエアー方式）、白色蛍光灯による人工照明12時間（午前8時点灯、午後8時消灯）の飼育室のクリーンラック内にて、洗浄滅菌済ステンレス製群飼育ケージ（260W×380D×180Hmm：夏目製作所）に5～6匹ずつ飼育した。飼料として、放射線滅菌固型飼料（CE-2：日本クレア、10KGy）を、飲料水としてフィルター濾過ならびに紫外線照射処理した水道水を自動給水器（TV-15：システムエンジニアリング）にてそれぞれ自由摂取させた。

オープンフィールド試験による歩行移動量の測定：使用したオープンフィールドを Fig. 1 に示した。フィールドは幅2mmの黒線で20×20cmの6区画に分割した40×60cmの灰色のステンレス製トレイを使用し、四方を高さ40cm、厚さ4mmの白色アクリル板で囲った。装置はフィールドが蛍光灯の直下で天井より180cm、床より70cmになるように飼育室の一定位置に設置された。測定時の照度はフィールド中央部で480Lux、コーナーで310～450Lux であった。背景音レベルは57.5dB（クリーンラックより発する単一音）であり、飼育室内の臭気（アンモニア濃度）は1ppm 未満であった。ラットの腹部を手で抱えてケージより取り出し、Fig.1のA区画でラットの頭部をbコーナーに向けて置き、測定を開始した。矢印方向より装置から30cm離れた斜め上方より観察を実施した。ラットが区画線を横断する時、区画線の交点を越える時、区画線上を移動する時に体長部（鼻端部から尾根部まで）が通過すれば歩行移動量を「1」とした。測定の終了したラットはすみやかにケージに戻

Fig.1. Schematic representation of open-field apparatus

し、1個体の測定が終了するごとに囲いの内面を酒精綿で清拭し、フィールドは洗浄滅菌済のものと交換した。

実験Ⅰ．観察時間帯における歩行移動量の検討：Wistar/ST 系を用いて、9～11時、13～15時および17～19時の各2時間の時間帯内の30分間において、10分単位の歩行移動量を測定した。なお、観察時間帯は飼育管理、各種検査の作業時間を考慮して設定した。

実験Ⅱ．観察時間帯における歩行移動量の系統差の検討：実験Ⅰの結果、10分間の観察にて歩行移動量の差を検討できる事が明らかとなったので、Wistar/ST 系、SD 系および Fischer 系を用いて、実験Ⅰと同時間帯で歩行移動量を10分間ずつ測定した。なお、Wistar/ST 系の1回目の成績は実験Ⅰの成績を使用した。測定に供する個体の順番および観察時間帯はランダムに分散させた。

統計処理：各群の平均値および標準誤差を算出し、各群間の平均値の差がF検定により等分散ならば Student-t 検定を、不等分散ならば Mann-Whitney U 検定を用いて解析した。

成 績

1. 観察時間帯における Wistar/ST 系ラットの歩行移動量（実験Ⅰ）

10分間単位の歩行移動量の変化を Fig.2に示した。

9～11時に観察された30分間の平均歩行移動量（±標準誤差）は摘出群74.2±4.3、対照群49.7±4.8であり、摘出群が有意に高い値を示した（ $P<0.01$ ）。観察開始から10分間では摘出群40.9±2.3、対照群31.2±2.7で、30分間全体に対し摘出群は55.1%、対照群は62.7%を占めていた。10～20分間での歩行移動量は摘出群19.2±1.6、対照群12.4±1.5であり、20～30分

Fig. 2. Time-related changes in ambulation during 30-min examination period in Wistar/ST rats ● Enucleated rats (n=21) ○ Intact rats (n=21) Mean $\pm$ S.E.

* : Significant difference from intact rats : $P < 0.05$

** : Significant difference from intact rats : $P < 0.01$

Fig. 3. Ambulation scores during 10-min examination period in three different strains of rats ■ Enucleated rats (n=21) □ Intact rats (n=21) Mean $\pm$ S.E.

* : Significant difference from intact rats : $P < 0.05$

** : Significant difference from intact rats : $P < 0.01$

: $P < 0.01$

間での歩行移動量は摘出群 14.1 ± 1.5 , 対照群 6.1 ± 1.4 であった。10分毎の両群の歩行移動量を比較すると、いずれの10分間でも摘出群が対照群より有意に高かった ($P < 0.01$)。

13～15時に観察された30分間の歩行移動量は摘出群 67.4 ± 3.9 , 対照群 48.8 ± 3.1 であり、摘出群が有意に高い値を示した ($P < 0.01$)。観察開始から10分間では摘出群 41.4 ± 1.7 , 対照群 30.3 ± 1.7 で、30分間全体に対して摘出群61.4%, 対照群62.0%を占めていた。10～20分間での歩行移動量は摘出群 17.2 ± 2.0 , 対照群 11.4 ± 1.5 であり、20～30分間での歩行移動量は摘出群 8.8 ± 1.5 , 対照群 7.1 ± 1.2 であった。10分毎の両

群の歩行移動量を比較すると、観察開始から10分間および10～20分間において摘出群が対照群より有意に高く ($P < 0.05$, 0.01)、20～30分間では有意差はみられなかった。

17～19時に観察された30分間の歩行移動量は摘出群 57.2 ± 4.1 , 対照群 44.5 ± 3.2 で有意差が認められた ($P < 0.01$)。観察開始から10分間では摘出群 37.0 ± 2.9 , 対照群 28.1 ± 2.2 で、30分間全体に対し摘出群64.8%, 対照群63.0%を占めていた。10～20分間での歩行移動量は摘出群 13.0 ± 1.3 , 対照群 11.2 ± 1.7 であり、20～30分間での歩行移動量は摘出群 7.2 ± 1.1 , 対照群 5.2 ± 1.1 であった。10分毎の両群の歩行移動量を

比較すると、観察開始から10分間のみ摘出群が対照群より有意に高く ($P<0.05$)、10~20、20~30分間では有意差は見られなかった。

2. 観察時間帯における歩行移動量の系統差 (実験II)

実験Iの結果より、10分間の観察により歩行運動量の差を検討できることが明らかとなったので、Wistar/ST系、SD系およびFischer系各ラットの各観察時間帯での観察開始から10分間の歩行移動量をFig.3に示した。なお、Wistar/ST系については、実験Iの成績を使用した。

前述したごとくWistar/ST系ラットでは測定開始から10分間に、いずれの時間帯でも摘出群は対照群より有意に高い歩行移動量を示した ($P<0.05$, 0.01)。摘出群、対照群での各時間帯間の歩行移動量を比較した結果、いずれも有意差は認められなかった。

SD系ラットでは9~11時の観察は摘出群 44.6 ± 6.5 、対照群 30.5 ± 5.2 、13~15時の観察では摘出群 42.0 ± 5.4 、対照群 24.7 ± 4.6 、17~19時の観察では摘出群 28.3 ± 5.6 、対照群 16.9 ± 3.0 であった。13~15時では摘出群は対照群より有意に高い歩行移動量を示した ($P<0.05$)。9~11時、17~19時では、摘出群が対照群より高い歩行移動量を示す傾向が観察されたが、有意差は認められなかった。摘出群、対照群内で歩行移動量を比較した結果、両群とも17~19時に減少傾向が認められたのみで有意差は見出せなかった。

Fischer系ラットでは9~11時の観察は摘出群 48.3 ± 2.7 、対照群 39.1 ± 1.9 、13~15時の観察では摘出群 64.5 ± 2.9 、対照群 44.8 ± 2.6 、17~19時の観察では摘出群 38.7 ± 4.2 、対照群 22.1 ± 2.5 であり、すべての時間帯で摘出群は対照群より有意に高い歩行移動量を示した ($P<0.01$)。各時間帯間の比較では摘出群で、13~15時が9~11、17~19時より有意に高い歩行移動量を示し ($P<0.01$)、対照群では9~11時、13~15時が17~19時より有意に高い歩行移動量を示した ($P<0.01$)。

考 察

歩行移動、たちあがり等の自発運動はラットの生得的行動として代表的なものであり、観察が容易であることから、行動観察の対象とされている。また、薬物の効果や副作用をラット、マウス等の自発運動を指標として検討する際、一般的にオープンフィールド試験

による行動観察が行われている。著者らは薬物の副作用として視覚障害が発生した際のラットの行動の特性を検討するため、眼球摘出ラットと無処置ラットのオープンフィールドでの歩行移動量を検討した。

歩行移動をオープンフィールドでの新奇環境への適応のための探索行動 [1] として捕らえてみると、ラットの歩行移動量は摘出群、対照群ともに観察開始から10分間に集中し、その後は急激に減少した。このことから、観察を10分間に設定すれば対照群との歩行移動量の差も大きく、立ち上がり等の歩行移動以外の自発運動も少なく、視覚障害を検出し得ると思われた。

しかし、このラットの歩行移動量を詳細に調べると、系統差が認められた。Wistar/ST系ラットではいずれの時間帯でも摘出群は対照群より高い歩行移動量を示し、両群内で各時間帯の絶対値を比較してもほぼ一定で、時間帯に関係なく視覚障害検出が可能と思われた。SD系ラットは摘出群、対照群ともに個体間のばらつきが大きい13~15時の観察のみ視覚障害が検出可能であった。Fischer系ラットはいずれの時間帯でも摘出群は対照群より有意に高い歩行移動量を示し、視覚障害の検出が可能であったが、時間帯によって歩行移動量が異なることを考慮しておく必要性が示唆された。

今回のオープンフィールド試験の結果、10分間にわたる1回の歩行移動量の測定で有意な差が確認できたが、オープンフィールド試験の信頼性を検討する方法として同一個体を反復して同一試験に用いて検査の安定性をあらわす再テスト法 [6] も検討されている。さらに、オープンフィールド試験は実験条件の設定も信頼性の大きな要因となる [8, 9] と言われている。今回、反復試験により信頼性の検討は実施しなかったが、十分な有意差が確認でき、実験条件の設定も充分であったと思われる。

恒明あるいは恒暗条件下では、動物の行動活性リズムはフリーランし、ついには固有の周期をとる [5] といわれる。また、Gobら [3] は、生後7日目にて眼球摘出したラットを術後10日から30日目までオープンフィールド試験を実施し、すべての試験日で眼球摘出ラットに有意な増加を認めた ($P<0.01$) と報告している。これらの報告より、眼球摘出によりラットの行動活性リズムはフリーランするが、眼球摘出後2週間程の今回のような時期に実施されるオープンフィールド試験には影響しないものと考えられた。以上より、10分間の1回施行によるオープンフィールド試験

により視覚機能障害の検出が可能であり、今回検討した3系統ではWistar/ST系ラットを使用することが最適であると結論された。

要 約

オープンフィールド試験で眼球摘出ラットおよび無処置ラットの歩行移動量を比較し、同試験による視覚機能障害検出の可能性を検討した。Slc:Wistar/ST系ラットを用いて30分間測定した結果、10分間の観察で無処置群との間に有意差が認められた。次に、観察に適した系統と時間帯を検討するために、Slc:Wistar/ST系、Slc:SD系およびF344/N Slc系ラットを用いて9～11時、13～15時および17～19時の時間帯に10分間の測定を実施した。その結果、Slc:Wistar/ST系およびF344/N Slc系ラットではすべての時間帯に、Slc:SD系ラットでは13～15時に無処置群との間に有意差が認められ、視覚障害による歩行移動量の変化が確認された。しかし、F344/N Slc系ラットでは時間帯により歩行移動量に有意な差があることが確認された。以上より、オープンフィールド試験にて視覚

機能を検討する場合、3系統の中ではSlc:Wistar/ST系ラットを用いることが最適であると考えられた。

文 献

- [1] 藤田 統 (1967). 生体が受容する刺激の意味について (その1). 東京教育大学教育学部紀要, **13**, 85-97.
- [2] 福原武彦・小野 宏 [編集] (1990). 毒性試験講座7. 機能毒性学. pp.22-23, 地人書館, 東京.
- [3] Gob, R., Kollner, U., Kollner, O., and Klingberg, F. (1987). The post natal development of open field behaviour of the visually deprived rat. *Biomed. Biochim. Acta.*, **4**, 215-223.
- [4] 大沼富雄・赤堀 修・斉藤 徹・高橋和明 (1980). 簡易な自発運動量5分間測定法による視覚障害マウス検出の可能性について. 実験動物技術, **2**, 101-104.
- [5] 篠田元扶・田所作太郎 (1989). サーカディアンリズムー昼と夜の違いー. 臨床麻酔, **10**, 1381-1387.
- [6] 橘 敏明 (1983). Open-field test の妥当性と信頼性. 先天異常, **23**, 131-135.
- [7] 高橋和明・天尾弘実・鈴木勝士・今道友則 (1982). 各種実験用動物の視・聴覚器検査法. 昭和57年度科学研究費補助金 (一般研究B) 研究成果報告書, 8-88.
- [8] Tanaka, K. (1983). Determining of operating condition for the open field test under nonclinical fertility study. *Cong. Anom.* **23**, 145-155.
- [9] 吉田順一・小佐妻恒夫 (1983). オープンフィールド試験における実験条件の検討. 先天異常, **23**, 157-164.