



Title	ラットを用いた顔面神経麻痺モデルにおける新たな評価法の確立に向けた研究- BASS : The Black light Assisted Scoring System - [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	三浦, 隆洋
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14983号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/85861">http://hdl.handle.net/2115/85861</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2718
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	MIURA_Takahiro_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 三浦 隆洋

### 学位論文題名

ラットを用いた顔面神経麻痺モデルにおける新たな評価法の確立に向けた研究

～BASS: The Black light Assisted Scoring System～

(Studies on a novel method for the assessment of facial palsy in a rat model: the black light-assisted scoring system)

【背景と目的】これまでのラットを用いた顔面神経麻痺の評価法は、ビデオ撮影を行い、研究者がその動きを評価し、ラットのヒゲの動きや鼻の位置などを2～3段階で健側と比較するといった方法が用いられてきた。しかしこれらの方法は、定量化することができず、評価者の主観性が強いものだった。さらには通常のビデオ撮影は1秒に30フレーム撮影を行う30 frame per second (fps)が用いられるが、ラットのヒゲの動きが非常に速いため、通常のフレーム撮影ではフレーム間の動きが速さに対応できず、ブレのある映像となってしまう正確な評価は不可能であった。また生理学の分野で、ヒゲの機能に着目した研究の中でハイフレーム撮影と赤外線カメラでヒゲの動きを評価する方法が複数報告されている。しかし、これらの方法は、顔面神経麻痺のために考案されていないため、顔面神経麻痺研究では特定の位置のヒゲの動きを毎週経時的に評価する必要があるが、そのような評価は不可能であった。さらには、装置が煩雑かつ高価であるという問題もあった。評価法がグローバルスタンダードとして普及するためには、再現性・客観性・簡便さ・低コストなどの条件を満たすことが求められる。つまり、顔面神経麻痺研究におけるラットのヒゲの動きの評価に対しては、毎回同じヒゲの動きを選択的にかつ繰り返し評価・定量化できること、選択したヒゲをカメラが識別するためのコントラストを付加できること、そして速い動きに対応するためハイフレーム撮影を行うことが重要であると考えた。これらの条件をクリアするために、紫外線ライトであるブラックライト、そしてハイフレーム撮影を行うためのツールとして広く普及している iPhone、そしてビデオ分析のためのオープンソフトウェアである Kinovea、これらの3つのツールを用いることでスタンダードとなる評価法の確立が可能と考えた。この方法を Black light-assisted scoring system (BASS) と名付け、この BASS 法の確立と妥当性について検討を行った。

【材料と方法】10週齢雄の Wister ラットを用いて、BASS 法確立に向けた評価する基準点並びに評価の指標における検討を行った。具体的には、どのヒゲの動きを評価し、どこを計測する基準とするのか、どのような計測を行うのかについて多角的に検討を行った。イソフルランを用いた浅麻酔下に、複数種類のヒゲおよび顔面における基準点をマーキングし、計測する基準点に関する評価検討を行った。マーキングはブラックライトに蛍光を示す専用塗料を用いた。ブラックライトをラットの前方から照射し、ラットの頭上 30cm から撮影した。撮影は3分以上行った。撮影モードは 240 fps とした。1 秒間 240 fps で撮影した動画を 8 秒間 30 fps にコンバートし、Kinovea を用いた動画解析を行った。BASS スコアは、健側に対する患側の割合として算出した。この研究では顔面神経麻痺モデルとして顔面神経を1箇所切離し再縫合する Cut & Suture モデルを使用した。またラットの制御困難な体動の影響をより小さくするため、角度の変化ではなく、時間で微分する角速度の変化の方が望ましい可能性がある。そのため、この2つ指標についても検討した。上記の検討によりより望ましいと考えら得た計測法や基準点の決定に基づいて、同じく10週齢雄の Wister ラット6匹を用いて、正常ラットおよび顔面神経麻痺ラットにおける BASS スコアの評価を行った。正常ラットは、左右差が存在せず、BASS スコアは100%に近似した結果に

ならなくてはならない。この点についての評価検討を行った。また、顔面神経麻痺モデルのラットでも同様に BASS 法による評価を行った。顔面神経麻痺は、顔面神経に Crush Injury を加えた不全麻痺モデルを使用した。顔面神経麻痺の程度に差が少ない受傷後早期に BASS 法による評価を行い、結果にばらつきが出ないかについて検討した。

【結果】BASS 法確立にあたり、正中を規定する基準点としての両側内眼角の midpoint、そして評価点としての 2 段目 4 列目の毛根およびそのヒゲとし、その 3 点からなる角度の変化を計測することが望ましいと考えられた。また計測内容については、最初の段階では角度の変化による評価を検討していたが、角度の変化ではラットの首の動きを完全に制御することは難しいため、首の動きによる計測値、特に基線の変化への影響が大きかった。このため、時間を微分することでその時点での角度の変化率、つまり角速度を評価することでより正確かつ簡便な評価につながると考えられたため、角速度を選択することとした。角速度については、ヒゲを前に動かす Protraction の動きと後ろへ動かす Retraction の動きに分けてそれぞれの最大角速度を  $V_{pro} \cdot V_{re}$ 、 $V_{pro}$  と  $V_{re}$  の大きい方を  $V_{max}$ 、 $V_{pro}$  と  $V_{re}$  の合計を  $V_{total}$  として 4 つの指標による評価を行った。BASS スコアは正常ラットの平均 ( $\pm$ 標準誤差) は、 $V_{max} = 115.0 \pm 6.0\%$ 、 $V_{pro} = 97.2 \pm 9.5\%$ 、 $V_{re} = 106.1 \pm 10.4\%$ 、and  $V_{total} = 101.6 \pm 6.6\%$  だった。顔面神経麻痺モデルでは、 $V_{max} = 65.5 \pm 4.2\%$ 、 $V_{pro} = 72.5 \pm 5.3\%$ 、 $V_{re} = 65.5 \pm 4.2\%$ 、and  $V_{total} = 68.0 \pm 3.6\%$  だった。100% が予想された正常モデルでは  $V_{total}$  が最も 100% に近かった。また  $V_{pro}$ 、 $V_{re}$  は誤差が大きく、これは顔面神経麻痺モデルでも同様の傾向だった。また  $V_{total}$  は神経麻痺モデルでは誤差が最も小さかった。

【考察】BASS 法では、3 つのツールが重要である。顔面神経麻痺研究では、経時的な回復の程度の評価が重要となる。したがって、常に同じポイントでの計測を毎週行える必要がある。これまで、特定のヒゲや毛根を選択して評価できた方法は存在しない。我々はブラックライトと蛍光塗料を用いることで、選択的に特定の毛根とそのヒゲを染色し、コントラストを高めることに成功した。動画撮影においては、通常の 30fps (1 秒に 30 コマ) ではラットのヒゲの動きは速いため不十分である。したがってハイフレーム撮影が望まれる。民生用カメラや iPhone 以外のスマートフォンでは、ハイフレーム撮影に対応はしているものの数秒程度の撮影に限定されてしまう。数秒ではラットの動きを完全に制御することは不可能であり、必要なタイミングで撮影を行うのは困難である。一方、業務用の専用カメラは、よりハイフレームかつ長時間の記録が可能だが、非常に高価である。本研究では、近年技術進歩のめざましいスマートフォンの中でも iPhone を使用した。iPhone では、240fps の動画を 10 分以上連続で撮影することが可能である。

Kinovea はフリーソフトウェアでありながら、動画の様々な動きや角度をトラッキングし経時的に計測可能な多機能性を持つ。しかし、ラットのヒゲは白く、背景や周囲とのコントラストがないため映像内で判別がつかず、そのままの状態では評価不能である。そこで、上記に示したブラックライトと蛍光塗料により映像内の特定の毛根とヒゲのコントラストを高めることで、トラッキングを可能にした。

【結論】我々はブラックライト、iPhone、Kinovea を用いた新たな評価法 (Black light-assisted scoring system: BASS) を開発した。BASS 法は、表情の変化による毛根の動きまでも反映可能だった。これは、表情の動きをより正確に反映し、更に選択したヒゲの動きの定量化と同部位の回復評価にも成功した初の方法である。BASS 法は、正確かつ客観性・再現性があり、低コストで導入可能な方法であるため、これからの顔面神経研究の評価法の一つとしてグローバルスタンダードとなりうると考えている。