

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19530670

研究課題名（和文）

マウスの防衛的覆い隠し行動をモデルとした抗鬱薬・抗不安薬の効率的評価系の開発

研究課題名（英文）

Analysis of properties of the marble burying behavior in mice: development of a rapid screening system for psychoactive drugs

研究代表者

山田 一之 (Yamada Kazuyuki)

独立行政法人理化学研究所・動物実験支援ユニット・専門職研究員

研究者番号：50212288

研究成果の概要（和文）：マウスのガラスビーズ覆い隠し行動(MB)をモデルとして、抗鬱薬や抗不安薬の評価に適した実験システムの構築を試みた。まず、実験に用いる床材の種類と MB の関係を検討し、床材の物理的特徴と相関して MB が変化する可能性を見だし(2007 年度)、これを系統的に明らかにし、国際誌に発表した(2008-9 年度)。そして、MB による各種薬剤の評価には適した床材があることを示した(2008 年度)。さらに、MB の系統差について検討し、評価する薬剤の特性によって、薬効評価に適した系統がある可能性を示した(2009 年度)。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop a rapid screening system for psychoactive drugs such as anxiolytics and/or antidepressants using the marble burying behavior (MB) in mice. First, the significant correlation was showed between physical properties of bedding materials and MB (FY 2007), and detailed replications were done and reported the results in an international journal (FY 2008-9). Then, it was shown that there were suitable bedding materials in the evaluation of some psychoactive drugs by MB (FY 2008). Furthermore, some results suggested that using an appropriate mouse strain should be more effective to evaluate certain drugs (FY 2009).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：社会科学

科研費の分科・細目：心理学・実験心理学

キーワード：防衛的覆い隠し行動、ガラスビーズ覆い隠し行動、床材、情動、抗鬱薬、抗不安薬、マウス

1. 研究開始当初の背景

これまで、ラットやマウス等の小動物を用いた不安や抑鬱のモデル実験系として多様な方法が考案されてきた（例えば **Crawley & Goodwin, 1980**）。しかし、これらの方法については膨大なデータが提出されているにもかかわらず、未だ動物の不安のいかなる側面について評価しているのか議論の一致を見ていない。明暗往来試験 (**Crawley & Goodwin, 1980**)や高架式十字迷路テスト (**Rodgers & Johnson, 1995**)は特殊な実験装置が必要であるとともに、実験装置の形状や特性、あるいは装置の置かれた環境要因によって結果が大きく異なることが知られている。これに対して、防御的覆い隠し行動、特にガラスビーズ覆い隠し行動(以下 **MB** と略す)は、実験実施について特別な装置を必要とせず、床敷を厚めに敷いた飼育ケージにガラスビーズを配置し、所定の時間内に床敷で覆い隠したガラスビーズの個数を測定するという、極めて簡便な試験である。しかし、実験の簡便性にもかかわらず、結果の再現性は比較的安定しているといわれている (**Broekkanp et al, 1986**)。近年ではその利便性から、抗不安薬の薬効評価や強迫性障害のモデル実験系としても盛んに利用されるようになってきた。しかしその反面、実験の利便性・簡易性故に、**MB** そのものの特性に関する基礎的な研究はほとんど行われておらず、動物の **MB** を規定する要因については未だに不明な点が多い。応募者はこれまで **MB** について遺伝子改変マウスにおける変異 (**Yamada et al., 2002**)や発達の側面等から検討を加えてきた。これらの研究成果は、実験に用いるマウスの系統と床材が、**MB** の重要な規定因であることを強く示唆している。し

たがって、ガラスビーズ覆い隠し行動をモデルとした効率的な薬物評価系の構築には、利用するマウスの系統と床材の相互作用およびそれらの適合性について十分な検討が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は3年間で目的を達成するように計画された。まず初年度である平成 19 年度には、近年遺伝子改変動物の遺伝的背景系統として実験に多用されている **C57BL/6J** 系統について、通常の飼育に利用している床材を用いて、ケージの大きさや実験室の照度などの物理的要因の影響について詳細な分析を行い、**MB** に及ぼす物理的要因を明らかにする。またこれらの予備実験において明らかにされた **MB** に最適な物理的条件下において、多様な床材を用いて本行動における床材の効果について詳細な分析を行う。また、実験の進行状況によっては、マウス系統と床材の交互作用についても検討を行い、マウス系統と床材の関係について体系的なデータを収集する。

中間年度である平成 20 年度においては、すでに薬効の知られている各種抗鬱薬(**SSRI** を含む)や抗不安薬(**BZP** など)を用いて、より測定感度の高いマウス系統と床材の組み合わせについて検討を行う予定である。これらの諸研究によって、**MB** を用いた高感度の薬物評価系の構築を目指す。

さらに、最終年度である平成 21 年度には、**C57BL/6J** マウスに加えて、近交系マウスとして多用される **DBA/2J** 系統および各種薬剤試験に用いられてきたクローズドコロニーの **ICR** 系統のマウスを加えて、マウス系統間における **MB** の比較、およびマウス系統と利用する床材の交互作用について検討を加える。

3. 研究の方法

1)平成 19 年度は年度半ばからの研究開始となっ

たので、予備実験として、照明条件・実験ケージの大きさなどの外的・物理的要因が MB に及ぼす影響について C57BL/6J 系統のマウスで検討した。また、数種の床材を用いて、床材と MB の関係について予備実験を行った。

具体的な方法は、Yamada ら (2002) に準じた。すなわち、5cm 程度の厚みに床材を入れた飼育ケージにマウスを 1 匹ずつ入れ、30 分間の馴致期間をおいて一旦マウスをホームケージに戻し、その間にガラスビーズを床材上に等間隔に配置し、再びマウスを導入した。30 分間放置した後、マウスをホームケージに戻し、床材に 2/3 以上覆い隠されたガラスビーズの数を測定した。測定時は 2 名の判定員によってそれぞれ計測し、計測数が一致しない場合には再度計測した。また、計測においては実験後の画像を保存し、NIH Image による画像処理を用いて客観的にガラスビーズの覆い隠された割合を算出した。

実験条件としては、実験ケージの種類 2 種類 (ラット用集団ケージ: 259mm x 476mm x 209mm; マウス用ケージ: 189mm x 297mm x 128mm) のおよび、照明条件 3 種類 (高: 150lux; 中: 70lux; 低: 10lux) を用いた。また、床材としては実験動物関連業者およびペットショップで入手可能なものを用いた (TEK-Fresh (通常飼育で利用している床材)、Alpha-dri、GreenTru、Paper Clean、Soft Chip、Cellu-dri、Envelo-dri、他)。

2) 平成 20 年度は、床材の MB に及ぼす影響について、多様な床材を用いて集中的に検討した。また、提示するガラスビーズの数と MB の関係についても合わせて検討した。

実験方法は平成 19 年度と同様の方法を用いた。マウスは C57BL/6J マウスを用い、平成 19 年度に行った実験において MB の外的・物理的環境として最適な条件において (マウスケージを利用、低照明条件)、各種

床材 (TEK-Fresh (Harlan, IN, USA; 通常利用している床材)、Alpha-dri、Cellu-dri (Shepherd Specialty papers, TN, USA)、GreenTru (GREENPRODUCTS, IA, USA)、Soft Chip、Paper Clean (SLC, Shizuoka, Japan)) について、MB に及ぼす影響について検討した。

また、提示したガラスビーズの数は少 (10 個)、中 (20 個) および多 (40 個) の 3 条件であった。

3) 平成 21 年度は、まず MB の系統差について、平成 20 年度の諸実験によって得られた結果から、ガラスビーズ覆い隠し行動に適した床材 (TEK-Fresh) を用いて比較した。更に、ポジティブコントロールとして抗不安薬であるベンゾジアゼピン類のクロルジアゼポキシドを用いて、各種薬剤 (結果参照) の MB に対する効果について比較検討した。

マウス系統としては、近交系の C57BL/6J、C3H/HeJ、BALB/c および DBA/2J 系統と、クローズドコロニーの ICR 系統を用いた。使用した床材は本研究において MB に最適であった TEK-Fresh と最も不適であった GreenTru を用いた。また、実験方法は平成 19 年度および平成 20 年度と同様であった。使用した薬物は次節の表 1 にまとめた。

なお、本研究における全ての動物実験は、理化学研究所動物実験委員会によって承認され、その倫理規定に遵守して行われた。

4. 研究成果

1) 平成 19 年度は研究実施期間が半期のみであったため、学会発表あるいは論文発表等に至るまとまった成果を上げるには至らなかった。しかし、極めて限られた時間ではあったが、マウスの防衛的覆い隠し行動の特性を解明するための各種予備的実験を実施することができた。

具体的には、実験に使用するケージ大きさや照明条件に関する諸実験から、マウスにおいては比較的小さなケージ (マウス用ケージ) で、低い照明条件 (本研究では <10lux) の場合に、盛んな

MB を行うことが示された。また、多様な床材を用いて行った、床材の MB に対する効果に関する予備実験からは、試した床材の中から TEK-Fresh、Alpha-dri、GreenTru、Paper Clean、Soft Chip、Cellu-dri の 6 種類の床材が MB にそれぞれ異なった影響を及ぼす可能性を見いだした。

2) 平成 20 年度は近交系マウス (C57BL/6J 系統)を用いて、MB について、床敷の物理的特性 (密度、テクスチャー等) の影響および、これらの物理的特性と提示したガラスビーズの数との相互作用について詳細な検討を行った。用いた床材は平成 19 年度に予備実験で用いた床材の中から MB に利用可能と判断された、TEK-Fresh、ALPHA-dri、GreenTru、Sawn wood (soft chip)、Paper-Clean および Cellu-dri の 6 種類の市販品を用いた。また、共同研究として各種精神疾患関連遺伝子改変マウスの行動表現型解析において MB の変化について検討した。

床敷の密度とテクスチャーの効果については、床敷の密度およびテクスチャーと覆い隠されたガラスビーズの数に有意な負の相関が認められた。また、床敷の種類によってマウスが示す自発活動に質的な違いが認められた。これらの結果は、MB が床材の密度およびテクスチャーによって大きな影響を受けることを示している。また、同時に、これら床材の特徴を利用することによって、これまで MB に反応性の良くなかった薬剤について、MB が適用できる可能性を示唆している。

次に、床敷の物理的特性とガラスビーズの数との関係については、床材の密度が低いし中程度の場合にのみ、用いたガラスビーズの数と覆い隠したガラス

ビーズの数に正の相関が認められた。これらの結果は、密度の高い床材を用いた MB 実験では、提示するガラスビーズの数が結果に反映されないことを示している。従って、密度の高い床材は特殊な場合 (活動性の非常に高いマウス等における MB) のみに適用するのが妥当だと考えられる。これらの結果は、国際誌に発表した ([雑誌論文] の項参照)。

さらに、各種精神疾患関連遺伝子改変マウスの行動表現型解析においては、数系統の遺伝子改変マウスにおいて MB の変化が認められた (業績の項参照)。このことから、MB は遺伝子改変マウスの行動評価にも適した課題であることが確認された。

3) 平成 21 年度は、まず MB の系統差について検討した。平成 19・20 年度に用いた近交系マウス (C57BL/6J 系統)に加えて、DBA/2J、C3H、および BALB/c 系統およびクローズドコロニーの ICR 系統を用いて比較した (JCL, Tokyo, Japan)。その結果、通常の飼育で用いている床材 (TEK-Fresh) を使った実験においては、C57BL/6J と ICR 系統のマウスが DBA/2J、BALB/c および C3H 系統のマウスよりも多くのガラスビーズを覆い隠した。この結果は、MB に系統差があることを示している。MB を評価系とした抗不安薬・抗鬱薬などのスクリーニングでは、MB の発現しやすい C57BL/6J・ICR 系統のマウスを利用することでスクリーニングをより効率的なものに出来ると期待される。

次に、MB における、マウス系統と用いる床材の相互作用について検討した。用いた床材は平成 20 年度に用いた床材と同じ種類を用いた。全ての床材において、C57BL/6J 系統と ICR 系統のマウスの MB が他の系統のマウスの行動よりも高い傾向が見られた。特に密度の高い床材 (GreenTru や ALPHA-dri) を用いた実験では、ICR のガラスビーズ覆い隠し数が顕著であった。これは、ICR 系統が他のマウス系統よりも体格で勝ること、およ

び自発活動性が高い傾向にあることも関与していると考えられる。このように、本年度の研究から、MB を用いた抗不安薬・抗鬱薬評価系としては、床材として密度の中等度である TEK-Fresh を用い、マウスは C57BL/6J 系統あるいは ICR 系統を用いると効率的であることが示された。また、一部の薬物については、密度の高い GreenTru を用いて ICR 系統で実験することで、評価効率をあげることが期待される。

MB に対する薬物の効果に関する実験結果を表 1 に示す。先行研究と同様に、TEK-Fresh を床材として用いた場合に抗不安薬であるクロロジアゼポキシドで MB が減少すること、およびパラクロロフェニルアラニンで部分的にはあるが MB が増加することを追試し、その後各種薬物について検討した。MB についてはベンゾジアゼピン系薬物やセロトニン系薬物、抗精神病薬などが多数調べられているので、本研究では比較的調べられていないノルアドレナリン系薬物（ノルエピネフリン、ヨヒンビン、レゼルピン、チアネプチン）について検討した。その結果、ノルアドレナリン受容体作動薬であるノルエピネフリンと拮抗薬であるヨヒンビンがともに MB を減少させた。一方、選択的セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬であるチアネプチンでは MB が部分的に増加傾向を示した。更に、小胞体モノアミントランスポータ阻害薬であるレゼルピンは MB を減少させる傾向を示したが、その効果は不明瞭であった。これらの結果は、MB がノルアドレナリン系神経活動と関連していることを示しているが、セロトニンやガンマアミノ酪酸 (GABA) 系神経活動同様、ノルアドレナリン系神経活動が MB に果たしている

役割については、今のところ不明である。

表 1

薬物	用量 (mg/kg)	効果
クロロジアゼポキシド	5, 10, 30	↓
ヨヒンビン	0.3, 1, 3	↓
ノルエピネフリン	1, 2.5, 5	↓
パラクロロフェニルアラニン	300	↑ (?)
レゼルピン	0.5, 1, 2	↓ (?)
チアネプチン	1	↑ (?)

3) 床敷の物理的特性と薬物の関係については、チアネプチン投与が床敷の密度が低いし中程度の場合に覆い隠したガラスビーズの数を増加させた。しかし、レゼルピンおよびパラクロロフェニルアラニンでは一貫した結果が得られなかった。

4) 総括

本研究では、マウスをモデル動物とした MB を用いた、向精神薬等の効率的な評価系の構築を目指した。その結果、これまで明らかにされなかった、各種実験環境や床材の物理的特性、被験マウスの系統などが MB に及ぼす影響の詳細を明らかにした。これらの研究から、MB による標準的な薬効評価系を提言するとともに、薬物に応じた床材とマウスの組み合わせについても事例を提示することができた。今後、薬物に選択的なモデルを確立するとともに、これらの研究結果が実際の薬物スクリーニングの現場で活用されることを望んでいる。

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：査読有] (計 1 件)

C. Homma, K. Yamada*: 2009 Physical properties of

bedding materials determine the marble burying behavior of mice (C57BL/6J). TOBSJ, 3, 34-39. (*:Corresponding author)

[学会発表] (計 12 件)

1. K. Katayama, K. Yamada, et al.: 2007 Analysis of Slitrk1- and Slitrk2-deficient mice. 第 30 回日本神経科学学会 (9 月 10 日-12 日 横浜)
2. K. Katayama, K. Yamada, et al.: 2007 Touretts' syndrome-associated gene, *Slitrk-1* deficient mice exhibited elevated anxiety-like behavior. 第 30 回日本分子生物学会年会 (12 月 11 日-15 日 横浜)
3. A. Shimohata, K. Yamada, et al.: 2008 Behavioral phenotyping of the Ts1Cje, a model for Down syndrome. 第 31 回日本神経科学学会 (7 月 9 日-11 日 東京)
4. 下畑充志、山田一之、他: 2007 ダウン症モデルマウス(Ts1Cje)に見られた活動更新と行動抑制障害 日本人類遺伝学会第 52 回大会 (9 月 19 日-22 日 川崎医療福祉大学)
5. 山田一之、本間千尋: 2008 Arc 欠損マウスの行動解析 (2) 第 68 回日本動物心理学会大会 (9 月 13 日-15 日 常磐大学)
6. 守村直子、山田一之、他: 2008 シナプス接着分子Lrfrn2/SALM1 ノックアウトマウスにみられた統合失調症様行動異常 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (12 月 9 日-12 日 神戸)
7. 佐野良威、山田一之、他: 2008 アダプタータンパク質X11-like/Mint2 欠損マウスの葛藤に対する消極的行動適応
8. 佐野良威、山田一之、他: 2009 X11L protein deficiency is associated with the selective impairment of motivational approach behavior and the withdrawn response to social conflict. 第 32 回日本神経科学学会 (9 月 16-18 日 名古屋国際会議場)

9. 守村直子、山田一之、他: 2009 Lrfrn2/SALM1 a synaptic leucin-rich repeat transmembrane molecule is required for proper synapse maturation and brain function. 第 32 回日本神経科学学会 (9 月 16-18 日 名古屋国際会議場)
10. 松本圭史、山田一之、他: 2009 Slitrk5-deficient mice display elevated anxiety-like behavior and serotonergic abnormalities. 第 32 回日本神経科学学会 (9 月 16-18 日 名古屋国際会議場)
11. 小川実幸、山田一之、他: 2009 膜結合型ユビキチン Rines ノックアウトマウスの行動解析および神経化学的解析 第 32 回日本分子生物学会年会 (12 月 9-12 日 パシフィコ横浜)
12. 前川利男、山田一之、他: ATF-7 依存的なヒストン H3 メチル化を介したストレスによる転写制御 第 32 回日本神経科学学会 (9 月 16-18 日 名古屋国際会議場)

(注: 学会発表は研究代表者が MB を担当したものを含む)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 一之 (Yamada Kazuyuki)

独立行政法人理化学研究所・動物実験支援ユニット・専門職研究員

研究者番号: 50212288

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

本間 千尋 (Homma Chihiro)

独立行政法人理化学研究所・動物実験支援ユニット・テクニカルスタッフ