

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K03383

研究課題名(和文) 精神疾患モデル動物の症状緩和に関する生理心理学的研究

研究課題名(英文) Physiological psychology studies on relief of symptoms in model animals for psychiatric disorders

研究代表者

岡田 隆 (Okada, Takashi)

上智大学・総合人間科学部・教授

研究者番号：00242082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：(1)心的外傷後ストレス障害様症状をラットに惹起するための、拘束・強制水泳・麻酔を連続して与える手続きにおいて、3種混合麻酔にはエーテルの代替としての効果は見られなかった。(2)ラットの鬱様行動に対するニコチンの慢性経口自由摂取は、学習性無力感の側面には影響しなかったが、アンヘドニアを減少させる効果があった。(3)オペラント行動を用いたラットの偽薬効果検出について探索的に検討し、鎮痛剤トラマドールを用いての偽薬効果は検出されなかった。(4)慢性予期不能弱ストレス手続き後のラットの鬱様行動に及ぼす環境の影響を検討したところ、若齢期のエンリッチメント環境飼育がレジリエンス個体出現率を増加させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題においては心的外傷後ストレス障害および鬱に着目し、複数の観点から動物実験を行った結果、鬱におけるアンヘドニア(快感消失の状態)の側面にニコチンによる治療効果が示唆されること、エンリッチメント環境における生育がストレス刺激へのレジリエンスを高める可能性があることなどを明らかにした。精神疾患モデル動物の症状緩和につながる手法を探索することは、ヒトにおける新たな治療法の発見への手がかりとなり得る点で意義がある。

研究成果の概要(英文)：(1) The usage of a mixture of three agents as anesthesia in a single prolonged stress procedure (sequential exposure to restraint, forced swimming, and agents inducing anesthesia) for a rat post-traumatic stress disorder (PTSD) model was insufficient for PTSD induction compared with the usage of ether. (2) Chronic voluntary oral ingestion of nicotine in rats reduced depression-like anhedonic behaviors, but it did not affect depression-like learned helplessness behaviors. (3) The placebo effect was not detected with the pain agent tramadol using rat operant behaviors. (4) The exposure to a postnatal enrich environment prior to chronic mild stress procedures increased the expression of resilience to depression-like behaviors in rats.

研究分野：生理心理学

キーワード：ラット 鬱 ニコチン 心的外傷後ストレス障害 スクロース 3種混合麻酔 ストレス 偽薬効果

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 心的外傷後ストレス障害 (PTSD) 症状を緩和するための方法を解明するためには、PTSD の動物モデルを確立することが重要である。ラットを「拘束」「強制水泳」「麻酔」というストレス刺激に連続して曝露することによって PTSD 動物モデルを作製する SPS (single prolonged stress) 手続きにおいては麻酔剤としてエーテルが一般に用いられるが、エーテル使用には安全性の問題があるため、SPS 手続きにおける麻酔法の有効な代替が求められていた。

(2) ニコチン摂取と鬱の関係性を明らかにするための動物モデル実験において、ニコチン投与が鬱様行動に及ぼす影響についてこれまでの知見が一致していなかった。先行研究の問題点として、ニコチン摂取終了から鬱様行動の試験までの期間が研究間でばらつきがみられること、ニコチンの急性投与がヒトの喫煙モデルとしての妥当性を欠いていることが挙げられ、それらの点を改善した実験が必要とされていた。

(3) 精神疾患に対する薬物の効果を正しく評価しようとする際、偽薬効果の有無およびその機序に関する知見が必要となる。これまでの動物実験においては疼痛モデルのラットを用いて足引っ込み反応などの反射的行動を痛みの指標として使うことが多かったが、人間における偽薬効果を模すためには情動的側面を含んだ行動を指標とすることが望ましいため、オペラント行動を指標とした偽薬効果検出のための実験系開発が必要とされていた。

(4) 鬱様症状を示すモデル動物を作製する方法として、予測不能で比較的弱いストレス刺激に長期曝露するという慢性予期不能弱ストレス手続き(Chronic Unpredictable Mild Stress, CMS)がある。先行研究において、CMS を経験しても約 4 割のラットは鬱様行動を呈さないというレジリエンスの現象が報告されており、このレジリエンス個体の出現率を高める要因を同定することが精神疾患モデル動物の症状緩和の有力な方法となり得るとして期待されていた。

### 2. 研究の目的

(1) 従来の SPS 手続きのうちの「麻酔」部分について、エーテルよりも安全性が高いと考えられる 3 種混合麻酔 (塩酸メドミジン・ミダゾラム・酒石酸ブトルファノール) で置換した場合にも、SPS の 1 週間後に実施する不安行動試験において PTSD 様症状が出現するか、またその出現に週齢差はあるのかについて検討することを目的とした。

(2) ラットに対して慢性的にニコチンを自由選択的に経口摂取させ、その後に測定される鬱様行動への影響、およびニコチン離脱の鬱様行動への影響の有無について調べることを目的とした。

(3) ホットプレート (48 ) の上をラットが通って甘味水 (スクロース水) を得るオペラント行動において、鎮痛剤トラマドールによるオペラント行動回復効果の程度と、その後の生理食塩水投与による影響を調べることにより、偽薬 (プラシーボ) 効果のモデルとしての利用可能性を探索することを目的とした。

(4) CMS に先立つエンリッチメント環境が鬱様行動におけるレジリエンス個体出現率に及ぼす影響について調べること、強制水泳試験・T 字迷路課題成績への環境エンリッチメントの影響を調べること、抗鬱剤の一種であるアゴメラチンにレジリエンス増強効果があるかどうかを検討することを目的とした。CMS が鬱様行動に及ぼす影響の性差についても検討することとした。

### 3. 研究の方法

(1) 被験体として Sprague-Dawley ラット (オス) 3 週齢 (n=30) および 6 週齢 (n=30) (週齢は搬入時) を用い、1 週間の馴致期間ののち SPS 手続き群に対して、円筒型拘束器による拘束 (2 時間) 強制水泳 (20 分間) 休息 (15 分間) 三種混合麻酔投与 (腹腔内投与) の一連の操作を行った。三種混合麻酔は、塩酸メドミジン (ドミツール) 0.375 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、酒石酸ブトルファノール (ベトルファール) 2.5 mg/kg となるように投与した。7 日間の不操作期間のあと、下記の行動試験を実施して PTSD 様症状の発現を比較した。オープンフィールド試験: 底面 (90 × 90 cm) を白マーカーにより 36 個の正方形に区切り、中央の 16 個の部分 (60 × 60 cm) をセンターゾーンと定義した。10 分間におけるセンターゾーン滞在時間割合、およびセンターゾーン移動距離割合を指標とした。明暗探索課題: 明室と暗室 (各 33 ×

25×30 cm) からなり、開口部(8×8 cm)によって室間移動可であった。被験体を明室に入れた後、暗室に入るまでの潜時と、10 分間における明室滞在時間を指標とした。高架式十字迷路試験：2本のオープンアーム(10×50 cm)と2本のクローズドアーム(10×50×40 cm)、センターエリア(10×10 cm)からなる装置であり、被験体の5分間の行動を記録した。両アームの総滞在時間に対するオープンアーム滞在時間の割合、両アームの総侵入回数に対するオープンアーム侵入回数の割合を指標とした。

本研究は、上智大学動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号 2018-015)。

(2) 被験体として Sprague-Dawley ラット(オス)4週齢(n=54)(週齢は搬入時)を用いた。ニコチン摂取群については、給水瓶に入れたニコチン水溶液(10 mg/L)と水道水を同時提示し、被験体の自由選択摂取とした(統制群は2本の給水瓶とも水道水を含む)。ニコチン水溶液提示開始14日後に行動試験を開始した。強制水泳試験：15分間の強制水泳を経験させた24時間後に5分間のテスト試行を行い、無動時間の長さとして潜時を鬱様行動の指標とした。自発運動活性試験：オープンフィールドにおける5分間の総水平移動量および休息時間を測定し、被験体の運動活性の指標とした。スクロース嗜好性試験：スクロース水溶液(1%)入りの給水瓶と水道水入りの給水瓶を同時提示して各飲水量を測定した。総飲水量に対するスクロース水溶液飲水量の割合をスクロース嗜好度と定義した。

本研究は、上智大学動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号 2018-016)。

(3) 被験体として Sprague-Dawley ラット(オス)7週齢(n=24)を用いた(週齢は実験開始時)。課題箱は、出発箱・通路・報酬箱の3部分からなり、通路部分には表面温度が可変のホットプレート(日伸理化 NHP-45N)を用いた。Day 1・3・5・7・9・11 が訓練試行、Day 13 がベースライン試行、Day 15 が再訓練試行、Day 17・19 が薬物投与試行、Day 21 がテスト試行であった。訓練試行：スクロース水溶液入りの給水瓶を配した報酬箱への移動を学習させた。ホットプレートの温度は37℃とし、被験体を出発箱に入れ15分間自由探索させた。ベースライン試行：ホットプレートの温度を48℃とし、鎮痛剤なしの状態での行動を測定した(15分間)。再訓練試行：訓練試行と同様の条件(ホットプレート温度37℃)にて実施した。薬物投与試行：トラマドール群(n=8)、偽薬群(n=8)、統制群(n=8)に分け、ホットプレート温度48℃の状態での自由探索させる試行開始40分前に薬物(トラマドール群と偽薬群には19.5 mg/kg トラマドール、統制群には生理食塩水)を腹腔内投与した。テスト試行：偽薬鎮痛効果の発現を検討するため、トラマドール群にはトラマドールを、偽薬群と統制群には生理食塩水を腹腔内投与した。投与の40分後、ホットプレート温度48℃の条件で課題を実施した。

本研究は、上智大学動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号 2020-006)。

(4) 被験体として Wistar ラット(オス)3週齢(n=102)(週齢は搬入時)を用い、飼育室馴致・ハンドリング(7日間)、飼育環境フェーズ(エンリッチメントまたは標準)(14日間)、慢性予期不能弱ストレス操作(CMS有りまたは無し)(19日間)、行動試験2回(各2日間)のスケジュールで順次実施した。飼育環境フェーズ：エンリッチメント群として、エンリッチメント用品が投入された飼育ケージで3匹ずつ2週間飼育した。スタンダード群はエンリッチメント用品を含まない個別ケージで飼育した。CMS：次のいずれかを、19日間、日ごとに種類を変えて課した。断水(6時間)、断食(15時間)、ケージ傾斜(4時間)、床敷濡れ(6時間)、匂い(4時間)、暗期照明(12時間)、拘束(1時間)、尻尾つまみ(1分間)。行動試験：スクロース嗜好試験を、飼育環境フェーズの Day 7・11・14 と、CMS フェーズの Day 7・14・19 に実施した。1% スクロース溶液瓶と水道水瓶を1時間提示し、合計摂取量に対するスクロース溶液摂取量の割合を算出した。T字迷路課題は、獲得試行(左右いずれかのアームの入口が遮断された状態で5分間探索)、試行間間隔(5分間)、テスト試行(両アームに行ける状態で5分間探索)から成り、新奇アームへの侵入回数および滞在時間を新奇率とした。強制水泳試験は、プレテスト(15分間)と翌日の本テスト(5分間)の強制水泳からなり、本テストにおける無動時間を指標とした。アゴメラチン(40 mg/kg、2 mL/kg)または生理食塩水を、行動試験開始30分前に腹腔内投与した。なお、CMS 手続き後の不安行動発現の性差に関するパイロット実験については、被験体として Wistar ラット(オス n=6、メス n=6)3週齢(ハンドリング開始時)を用いた。

本研究は、上智大学動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号 2019-002, 2021-002)。

#### 4. 研究成果

(1) SPS 曝露の有無および SPS 曝露時の週齢が不安様行動に及ぼす影響について、分散分析により検討した。

オープンフィールド試験：センターゾーン滞在時間割合および移動距離割合について、SPS 曝露の主効果、週齢の主効果、交互作用いずれも有意ではなかった。総移動距離については、週齢の主効果が有意であったが SPS 曝露の主効果は有意でなく、交互作用も有意ではなかった。

明暗探索試験：暗室侵入の潜時について、SPS 曝露および週齢の主効果は有意でなく、交互作用も有意ではなかった。明室の滞在時間については、週齢の主効果が有意であったが、SPS 曝露

の主効果、交互作用は有意ではなかった。

高架式十字迷路試験：オープンアーム滞在時間割合について、SPS 曝露の主効果、週齢の主効果、交互作用いずれも有意ではなかった。オープンアーム侵入回数については、週齢の主効果が有意であったが、SPS 曝露の主効果は有意ではなく、交互作用も有意ではなかった。

以上のことから、PTSD 様症状を惹起させるための SPS における意識喪失手続きに 3 種混合麻酔薬を用いることは適切ではなく、従来の SPS 手続きにおいて用いられたエーテルのもつ麻酔効果以外の作用が PTSD モデル動物作製に重要であったことが示唆された。

本研究を実施するにあたり、大竹亮椰氏（上智大学大学院総合人間科学研究科心理学専攻）の多大なる協力を得たことを深謝する。

(2) ニコチンの慢性的摂取および離脱が鬱様行動に及ぼす影響について、分散分析により検討した。

強制水泳試験：被験体の無動時間、および無動状態が現れるまでの潜時について、慢性群、停止群、統制群間で比較した。独立変数を処置（各群） 従属変数を無動時間とした場合も、独立変数を処置（各群） 従属変数を無動潜時とした場合も、いずれも有意ではなかった。従って、ニコチンの慢性摂取および離脱は、強制水泳試験における無動時間および潜時には影響を与えなかったと考えられる。

スクロース嗜好性試験：ストレス後の各群におけるスクロース嗜好度を比較したところ分散分析の結果は有意であった。多重比較の結果、慢性群のほうが停止群よりもスクロース嗜好度が有意に高かった。

以上のことから、ニコチンの経口による慢性的な自由選択摂取が鬱様行動に及ぼす影響について、強制水泳試験で示される学習性無力感のモデル行動にはニコチン摂取の影響は無いが、スクロース嗜好性試験で示されるアンヘドニアのモデル行動はニコチンの摂取により減少させることが示された。

本研究を実施するにあたり、高木聡氏（上智大学大学院総合人間科学研究科心理学専攻）の多大なる協力を得たことを深謝する。

(3) ホットプレート上を横切って報酬箱に到達する行動において、鎮痛剤の効果の経験後に生理食塩水投与試行で偽薬効果が検出できるか検討した。

訓練試行最終日（Day 11）の行動を初日（Day 1）と比較すると、通路に出るまでの潜時の短縮と通路通過回数増加がいずれも有意に見られたため、訓練試行における学習は成立したと考えられた。また、ベースライン試行（Day 13）においては潜時・通過回数とも 3 群間で差がなかったことが確認された。

薬物投与試行 1 日目（Day 17）において、統制群に通過回数増加が有意にみられ、またトラマドール群の潜時が統制群よりも有意に長かった。薬物投与試行 2 日目（Day 19）においても同様の結果、すなわち統制群に通過回数増加が有意にみられ、またトラマドール群の潜時が統制群よりも有意に長かった。テスト試行（Day 21）において、トラマドール群の通過回数が他の 2 群に比べて有意に減少し、潜時も有意に長くなった。

以上のことから、鎮痛剤としてトラマドールを用いる今回の手続きによって偽薬効果は検出されず、トラマドールがオペラント行動自体に何らかの影響を及ぼした可能性が示唆された。

本研究を実施するにあたり、浜野汐織氏（上智大学総合人間科学部心理学科）の多大なる協力を得たことを深謝する。

(4) CMS 手続きに先立つエンリッチメント環境飼育が、CMS 後の鬱様行動に及ぼす影響、およびアゴメラチンによる効果の有無について検討した。

スクロース嗜好指標に基づき、レジリエンス個体とヴァルネラビリティ個体の数を比較したところ、エンリッチメント経験後に CMS を経験した群でレジリエンス個体が 28、ヴァルネラビリティ個体が 12 であったのに対し、通常の飼育環境後に CMS を経験した群でのレジリエンス個体は 16、ヴァルネラビリティ個体は 23 であったことから、若齢期にエンリッチメント環境飼育を経験した場合にレジリエンス個体出現率が高くなるといえる。

CMS 期間後の行動試験のうち T 字迷路課題成績（新奇アーム探索率）に群間差は無く、また強制水泳試験（無動時間）においても環境エンリッチメントの影響は見られなかった。アゴメラチン投与による効果は見いだされなかった。

また、CMS 手続きが不安行動に及ぼす影響に関する性差は見いだされなかったが、強制水泳試験における無動時間はメスの方が長い傾向があった。

以上のことから、CMS 手続きに先立つエンリッチメント環境飼育はストレス後のレジリエンス個体出現率を高めることが示されたが、強制水泳試験等で測られる鬱様行動については若齢期のエンリッチメント環境飼育の効果は見いだされなかった。

本研究を実施するにあたり、レジリエンス個体出現率にかかる一連の実験は Shuyue Mao 氏（上智大学大学院総合人間科学研究科心理学専攻）の、性差にかかる実験は丹羽優希氏（上智大学総合人間科学部心理学科）の、それぞれ多大なる協力を得た。深謝する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田 隆・Shuyue Mao
2. 発表標題 Effects of environmental enrichment prior to chronic mild stress on the expression of resilience to depression in rats.
3. 学会等名 日本動物心理学会第81回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大竹 亮椰・岡田 隆
2. 発表標題 Anxiety-like behaviors in preadolescent- and adolescent rats exposed to a single prolonged stress paradigm including administration of a mixture of three anesthetic agents.
3. 学会等名 日本動物心理学会第80回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高木 聡・岡田 隆
2. 発表標題 Different effects of chronic nicotine ingestion and its withdrawal on two distinct depressive-like behaviors measured by the forced swim test and sucrose preference test.
3. 学会等名 日本動物心理学会第80回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大竹亮椰、岡田隆
2. 発表標題 Relationship between the duration of the anesthetic-induced unconsciousness state and subsequent anxiety-like behaviors in rats exposed to a single prolonged stress paradigm.
3. 学会等名 日本動物心理学会第79回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤麻莉、岡田隆
2. 発表標題 Helping behaviors mediated by glucocorticoid activity in rats raised in an isolated environment.
3. 学会等名 日本動物心理学会第79回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関