

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K03390

研究課題名（和文）非侵襲的測定技術を用いた実験動物の情動テストバッテリーの開発

研究課題名（英文）Development of non-invasive measurements of emotion in laboratory animals.

研究代表者

菱村 豊（Hishimura, Yutaka）

広島国際大学・健康科学部・教授

研究者番号：90293191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウスの情動を非侵襲的に測定する新たなテストバッテリーを開発するために、社会的場面や嫌悪的場面に置かれたマウスの超音波発声、体表面温度、表情に関する時系列データを収集し、同時に測定した行動データを加えて、それらの時間的相関関係（反復測定相関とグレンジャー因果の検定）を検討した。その結果、各指標間に有意な相関関係が検出されたがその数が多すぎるため、情報を集約するためのより有効な時系列データに対する統計的方法論が必要だと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会的に大きな変化がみられる動物倫理の観点からすれば、実験動物にとってより負荷の少ない情動測定方法の開発は喫緊の課題だと考えられる。ペット等の小動物の情動測定については社会的なニーズが高まりつつあり、動物の情動測定技術の応用面を考える上でも、その非侵襲的な測定法は社会的に望まれる技術である。測定技術の進歩から膨大な時系列データを収集することは心理学でも可能となってきたが、そうしたデータの集約方法について検討を続けることは今後も必要であり汎用性の高い学術的価値がある。

研究成果の概要（英文）：To develop a new test battery for non-invasively measuring the emotions of mice, we collected time-series data on ultrasonic vocalizations, body temperature, and facial expressions in social and aversive situations. We also collected behavioral data concurrently and examined the time series analysis (using repeated measures correlation and Granger causality) among these measures. As a result, significant correlations were detected among various indices, but it was too complex to comprehend. Therefore, it is necessary to explore the statistical methodologies for aggregating the time-series data.

研究分野：実験心理学

キーワード：マウス 情動 超音波発声 体表面温度 表情

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物の情動を計測する従来の「行動テストバッテリー」という方法では、オープンフィールドなどの装置内で示す凍結反応や行動潜時等を動物の情動(恐怖や不安)反応として測定してきた。しかしこれは、情動の一次的反応を測定するものではなく、副次的/間接的に発生する行動変化の組み合わせから動物の情動状態を推測する測定法である。一方、動物の情動変化が直接的に反映される生理的反応を測定する技術も古くから利用されており、電極やプローブを体内に挿入したり、トランスミッターを腹腔内に埋め込むことにより、脳波や自律神経系の活動が測定されてきた。しかしこれらの生理的指標は、動物にとっては侵襲的な計測法である。近年社会的に大きな変化がみられる動物倫理の観点からすれば、実験動物にとってより負荷の少ない測定方法の開発は喫緊の課題だと考えられる。また、ペット等の小動物の情動測定については社会的なニーズが高まりつつあり、動物の情動測定技術の応用面を考える上でも、非侵襲的な測定は社会的に望まれる技術である。

2. 研究の目的

本研究では、実験動物(マウス)の情動変化を直接的に遅延なく反映する生体情報のうち、非侵襲的な測定が可能な超音波発声、体表面温度、表情を同時に測定する。これらの指標とマウスの置かれた文脈やその際の行動変化との対応関係を見ることで、動物の情動を測定する新たな指標を開発することが本研究の目的である。マウスの超音波発声は高周波専用マイクとスペクトラム分析によって可視化できる。体表面温度はサーモグラフィーを用いることで非接触的にその変化を連続的に測定することができる。表情についてもマウスの頭部部位の変化を画像解析によって数値化する試みが行われている。本研究は、これらのそれぞれ別個に研究が進められている3つの生体指標を組み合わせることで、マウスの情動状態をより直接的かつ連続的な変化量として測定する非侵襲的な情動テストバッテリーを開発することを目標とした。

3. 研究の方法

(1)2019年度：新たな測定機器を導入した上で予備実験を行い、機器の動作確認と実験パラメータの選択作業を行った。

(2)2020年度：前年度に選定したC57BL/6NとCD2F1系統のマウスを使い、社会的接触場面(同系統同性、同系統異性、異系統同性、異系統異性の4パターン)の実験を行った。

(3)2021年度：昨年度に引き続き、社会的接触場面での実験を行った。今年度より新たにアクリル製のコミュニケーションボックスを使用し、被験体が刺激個体とは直接接触できない条件で実験を行うことにした。

(4)2022年度(延長1年目)

被験体マウスの系統を近交系のC57BL/6Nに絞った上で、未知の他個体が提示される条件(同性提示条件と異性提示条件)、くすぐり刺激条件、嫌悪刺激である毒物投与(塩化リチウム溶液の腹腔内投与)による中毒条件、毒物投与の環境(文脈)への再提示をおこなう再提示条件の5条件で実験を行った(n=24)。被験体は休憩期間を置きながら5条件すべてを経験した。

各条件の測定時間は10分間で、実験は全て防音室内に設置したコミュニケーションボックス内で実施した。測定機器としては、超音波発声を録音する専用マイク、体表面温度を測定するサーモグラフィー、動物の移動を計測するためのwebカメラをコミュニケーションボックス上部に設置し、被験体の表情を録画するためのビデオカメラをコミュニケーションボックスの側面に設置した。

(5)2023年度(延長2年目)

昨年度測定した実験データを用いて解析作業を行った。行動(ANY-mazeを用いた動画解析)、頭部の表情(Moene & Larsson (2022)を参考にImageJを用いた画像解析)、超音波発声(MATLABとUSVSEGを用いた超音波発声数の自動計測)、体表面温度(赤外線サーモグラフィー付属ソフトによる計測)の4種類のデータを解析した。具体的な各測定指標は以下のとおりである：行動(移動距離、不動頻度、凍結反応頻度、刺激個体側壁への接近頻度)、表情(目の縦横比、耳の角度、顔の傾き)、超音波発声(ピーク周波数をもとに3分類(30-50, 50-100, 100-160 kHz)した発声の頻度)、体表面温度(最高温、眼球部温度、肩甲骨部温度、尻尾部温度)。

これらのデータは数値化のサンプリング頻度が違うため、全て1分毎のデータにまとめた上で、統計的分析を行うことにした。複数個体の複数指標に関する時系列データであることを考慮し、統計的分析として心理学の分野ではまだまだ一般的ではない反復測定相関(Bakdash &

Marusich, 2017)とグレンジャー因果性(次数1)の検定を行うことにした。

4. 研究成果

(1)2019 年度：予備実験と文献調査の結果を受けて、被験体に提示する刺激条件は同性他個体、異性他個体、くすぐり刺激(ラットでは快刺激になるとの報告がある)、嫌悪刺激(中毒症状)の4条件を選定した。また分析に必要な時間分解能を得るためにサーモグラフィーの機種(testo, 885)を選定した。さらに被験体マウスの系統選定作業を行い、学習能力や社会性、視覚の良さ、実験動物としての一般利用率などを考慮し、2つの系統(一般的に利用される機会が多く相対的に視覚も良いと考えられる非アルビノの系統 C57BL/6N と、雑種強勢による行動変化が期待されるハイブリッド系統 CD2F1)を選択した。

(2)2020 年度：コロナ感染症の影響から実験は十分にできなかった(各系統雌雄 n = 3)。そのため、解析も計画通りには進まなかった。ただし、雌同士の組み合わせで発声が多いことや、ハイブリッドの CD2F1 は近交系の C57BL/6N よりも発声が多いという観測結果は得られた。一方で、体温や表情については分析が困難で、実験装置のさらなる工夫が必要であった。今後の実験では、アクリルケースを用いた新たな実験装置(コミュニケーションボックス)を製作し使用することで指標の数値化が容易になるように工夫することとした。

(3)2021 年度：超音波発声に関しては、昨年度の観察結果とは異なり、CD2F1 よりも C57BL 系統の方が発声が多く、オスからメスへの発声も多かった。このことはコミュニケーションボックスという新たな装置導入の影響や個体差の影響の大きさが考えられた。体表面温度に関しては、同性であるオスが提示された場合の方がメスが提示された場合よりも一貫して温度上昇が見られ、よりストレス状態にあることが推察された。ただし今年度もコロナ禍の影響から各系統雌雄3匹ずつしか実験を実施できず、これらの結果は統計的検討をするまでに至らなかった。表情の分析については分析できる解像度のデータが得られなかった。研究期間の延長を行い、検討する系統も絞った上で研究を継続することにした。

(4)2022 年度(延長1年目)：他個体提示条件では、オスが同性を提示された場合に、20 kHz 以下の低めの超音波発声が他の場合よりも多く見られた。皮膚温はオスが異性を提示された場合にのみ体温の上昇が観察され、それ以外では結果がはっきりしなかった。毒物条件では、超音波発声は毒物投与時にはほとんど観測されず、環境の再提示時に 50 kHz 以下の発声が見られた。体温も毒物投与時には変化が見られなかったが、環境の再提示時に上昇した。くすぐり刺激条件では、雌雄ともに超音波発声が広い周波数帯域で観測され、ストレスを受けた時に見られる体温の低下が見られた。行動観察の結果からもマウスに対するくすぐり刺激はラットのような快刺激ではなく、回避すべき不快刺激として機能しているようであった。これらの結果はマウスの情動状態を反映していると考えられるが、当初考えていたような時間的対応関係に関する明確な結果を得ることができなかった。

(5)2023 年度(延長2年目)：多数の指標間に有意な相関と因果性が認められた。例えば、メス同士の場合は刺激個体への接近と超音波発声の頻度に正の相関がみられる(図1左)が、異性の場合には相関がみられないことや、体温変動が起きた後に行動の変化が起きる関係性(図1右)などが示唆された。ただし、時系列分析の結果が膨大であるため、情報集約のためのさらなる分析方法を模索中である。一方、表情についての測定方法は確立できたが、他の指標との明確な相関関係は得られておらず、実験条件や分析手法についてさらなる検討が必要である。本研究で使用した3つの指標はいずれもマウスの情動指標として有用だと考えられるが、情報を集約するためのより有効な統計的方法論が必要である。

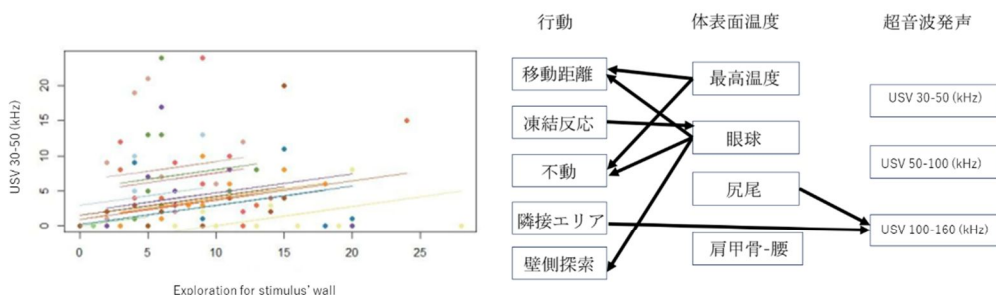


図1 左：メスマウスの同性提示条件での刺激個体寄りの壁側探索頻度と超音波(30-50 kHz)発声頻度との反復測定相関：散布図(同一個体は同色)と回帰直線、右：メスマウスの異性提示条件での行動・体表面温度・超音波発声の各指標間について次数1で実施したグレンジャー因果で有意性が見られた方向性(黒矢印)

<引用文献>

- Bakdash, J. Z. and Marusich, L. R. (2017) Repeated Measures Correlation. *Frontiers in Psychology*. 8:456. doi:10.3389/fpsyg.2017.00456
- Le Moëne O, Larsson M. A New Tool for Quantifying Mouse Facial Expressions. *eNeuro*. 2023 Feb 23;10(2):ENEURO.0349-22.2022. doi: 10.1523/ENEURO.0349-22.2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------