

## 蹴り払い応答と噛みつき応答を指標とする易刺激性の行動学的評価

—慢性緩和ストレスマウスを用いた行動学的・行動薬理学的研究—

Behavioral assessments of kicking and biting responses for evaluation of irritability  
in chronic stressed mice

鹿児島純心女子大学 国際人間学部 こども学科

口 岩 俊 子

鹿児島純心女子大学 国際人間学部 こども学科

若 本 純 子

室町機械株式会社 開発部

村 上 理

鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 神経病学講座 神経解剖学分野

口 岩 聡

### 和文要旨

Irritability（易刺激性または易怒性）は、些細な事に対して衝動的に不機嫌な感情または怒りを発現する症状であり、精神疾患患者においてきわめてその有症率が高い。精神疾患モデル動物にもirritabilityに起因する行動異常が存在するが、その行動学的評価法は確立していない。実験動物においてirritabilityの行動学的評価法が確立されれば、向精神薬の新しい評価基準としてその有用性は極めて高い。

irritabilityを持つ動物には、接触刺激に対する過敏な応答反応があり、後肢または下腹部への接触刺激に対して蹴り払い応答が発現し、頭部への刺激では噛みつき応答が発現する。本研究では、これらの応答行動を力学的に計測する研究機器（TRM）を作製し、蹴り払い応答と噛みつき応答を計測した。そしてこれらの応答行動を指標として、irritabilityを定量的に評価する試みを行った。

雌雄の健康なマウスを交配し産仔を得た。3週齢においてTRMを用いてすべての雄産仔の蹴り払い応答と噛みつき応答の強度および発現頻度を計測した。計測後に隔離飼育群と集団飼育群（対照群）に分け、生後9週齢において再度両応答反応の強度および発現頻度を計測した。隔離飼育群の蹴り払い応答および噛みつき応答の強度および発現頻度は、隔離前に比較し有意に増強および増加した。

他の健康な雄産仔を離乳後6週間隔離飼育したのち、蹴り払い応答および噛みつき応答を計測した。計測後、動物を2群に分け、連続して4週間、イミプラミンまたは生理食塩水を腹腔内に投与した。4週後のTRMによる計測において、イミプラミン投与群の噛みつき応答は有意に減弱したが、蹴り払い応答に大きな変化は認められなかった。対照群の両応答にも有意な変化は現れなかった。

隔離飼育による慢性ストレスを負荷された動物は、ストレス障害/鬱病モデルと考えられている。本実験の結果から、TRMを用いて蹴り払い応答および噛みつき応答を定量的に計測することにより、ストレス障害/鬱病モデル動物に発現するirritabilityを定量的に評価しうることが示された。

キーワード：蹴り払い応答/噛みつき応答、うつ病/ストレス障害、向精神薬評価、イミプラミン、行動学的非臨床的研究、接触刺激応答計測装置

## 緒言

易怒性または易刺激性 (irritability) は、些細なことに強く反応し、穏やかな心的状態から一転して爆発的に不快感情または怒りを亢進させる精神症状である。Irritabilityには、家族や介護者など周囲の人々に対する暴力行動が伴うこともある。Irritabilityは、1985年に *Index Medicus* に “irritable Mood” として始めて登録され、現在では精神医学用語として一般化している。Irritabilityは、古い論文では “Sudden bursts of anger” と表記され(Snaith and Taylor, 1985)、より近年では、“panic attacks without anxiety or fear generally associated” と表現されている(Fava and Rosenbaum, 1998, 1999)。

Irritabilityは、ストレス障害、鬱病、双極性障害、薬物誘発性気分障害、統合失調症、パーソナリティ障害、認知症、広汎性発達障害、注意欠陥・多動性障害、破壊的行動障害など、多くの精神疾患患者や発達障害者に日常的に現れ(Andre et al., 2010; Chadman, 2011; Uchida et al., 2009; Walker et al., 2011)、また向精神薬や麻薬の副作用として現れることもあり、さらにはこれらの薬物を中断もしくは減量した時の離脱症状として現れることもある(Suzuki et al., 1992; Wise et al., 2011)。

精神疾患患者と同様に、精神疾患モデルマウスまたはラットにもirritabilityに起因する行動異常が存在する。そのため、精神疾患モデル動物は、正常動物に比較すると、一般に扱いにくい性質を有している。例えば、精神疾患モデル動物を手で掴もうとすると、動物はホームケージ内を激しく逃げ回り、時には実験者の手指に噛みつくこともある。このような症状がある動物の体幹を棒で軽く突くと、動物は棒を後肢で蹴り払い(蹴り払い応答)、また頭部を執拗に触ると棒に噛みつきこれを排除しようとする(噛みつき応答)。これらの精神疾患モデル動物の行動は正常な実験動物には観察されないため、これらは脳疾患または脳障害に伴う症状の一部であると考えられる。蹴り

払い応答および噛みつき応答は、irritabilityを有する動物に特徴的に発現する異常行動であるといえる。

精神疾患モデル動物は、向精神薬の開発における非臨床的研究において不可欠である。非臨床的研究では、薬理学的研究、生化学的研究、生理学的研究に加え、行動学的研究が重要である。行動学的試験では、ポルソルト強制水泳試験(Cryan et al., 2005; Porsolt et al., 1977a; Porsolt et al., 1977b; Sanchez and Meier, 1997)、尾懸垂試験(Steru et al., 1985; van der Heyden et al., 1987)、レジデント-イントルーダー試験(Hatch et al., 1965; Valzelli, 1969, 1973; Yen et al., 1959)、高架式十字迷路試験(Montgomery, 1955)、明暗選択試験(Imaizumi et al., 1994)、オープンフィールド試験(安松, 1995)、プレパルス抑制試験(Powell et al., 2003)、潜在抑制試験(Shao et al., 2009)などが行われている。これらの行動試験では、動物の不安、鬱様症状、攻撃性、新奇探索傾向、統合失調症様症状などが評価されるが、irritabilityを適切に評価することはできない。さまざまな精神疾患や脳障害にirritabilityが伴うことを考えると、動物のirritabilityを定量的に評価する技術を確立させる必要があることは論を待たない。

精神疾患モデル動物の一部は、慢性的なストレスを負荷することにより作製される(Willner, 1997)。長期隔離飼育モデルはその代表的な例であり、向精神薬の評価試験などに広く用いられている(Aloe et al., 1990; Cai et al., 1993; Hatch et al., 1963; Hatch et al., 1965; Jones et al., 1992; Krsiak, 1975; Leng et al., 2004; Liang et al., 2003; Malkesman et al., 2006; Matsumoto et al., 2005; Matsumoto et al., 2007; Miura et al., 2004; Miura et al., 2005a, b; Miura et al., 2002a, b; Muchimapura et al., 2002; Muchimapura et al., 2003; Ojima et al., 1995; Pinna et al., 2006; Porsolt et al., 1978a; Porsolt et al., 1978b; Powell et al.,

2003; Zhang et al., 2006; Ziskind, 1958)。本研究では、マウスを長期間隔離飼育してストレス障害を発症させ、蹴り払い応答および噛みつき応答をパラメータとするirritabilityの評価を行った。さらに向精神薬投与後の反応の変化について調査を行い、irritabilityの定量的評価にこれらの応答反応をパラメータとして使用することの妥当性について検証を行った。なお、本研究では、蹴り払い応答および噛みつき応答の強度および発現頻度を計測するための研究装置（接触刺激応答計測システム Touch Response Meter: TRM）を作製し、蹴り払い応答および噛みつき応答の計測を行った。

## 材料と方法

### 1) 実験動物

本研究では、九動株式会社（熊本）から購入したddY系マウスを交配し、その雄産仔23匹を使用した。出生日に産仔を間引き、全体数を8匹とし、十分な母乳を与えて飼育した。生後3週目に産仔を離乳し、雄産仔を隔離飼育群と集団飼育群に分けた。隔離飼育を行ったマウスは17匹で、1ケージに1匹を収容した。集団飼育では1ケージに6匹を飼育した。隔離飼育用には幅14cm×奥行21cm×高さ12cmの小型ケージを、集団飼育用には幅25cm×奥行30cm×高さ17cmの大型ケージを使用した。両ケージは透明な合成樹脂製で、床敷には鮑屑を使用した。ホームケージ内には後述のTRMで使用する動物用チャンバーを常時設置した。動物にチャンバーを遊具として使用させることにより、チャンバーに動物を順応させた。ケージの清掃と床替えは、週に1回行った。両飼育群は同室内で飼育し、温度、湿度、音、照明、臭気、換気等、あらゆる環境が同一となるように配慮した。飼育室の室温は $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度は $55 \pm 10\%$ に調節し、照明は12時間サイクル（7:00点灯, 19:00消灯）とした。水と餌は自由に摂取させた。動物の取り扱いについては鹿児島純心女子大学動物実験指針および鹿児島大学動物実験指針に従った。

### 2) Irritabilityの計測理論

上述のように、irritabilityが増強したマウスの後肢または腹部を棒などで軽く突くと蹴り払い応答を起し、顔面付近に刺激棒を接近させると噛みつき応答を発現する。そこで、刺激棒に荷重センサをとりつけて動物を突けば、刺激棒に対する蹴り払い応答および噛みつき応答を力学的に検出することができる。刺激棒の上昇速度をコンピュータ制御することにより画一的な刺激を行うことができ、一定刺激量に対する応答行動量を計測できる。さらに刺激に対する応答頻度を記録することにより応答発現頻度の計測が可能である。これによりirritabilityが増強したマウスをスクリーニングすることができ、動物のirritabilityを評価することが可能である。

### 3) 計測装置

我々は、今回の研究において、室町機械株式会社と共同で、上述の理論に基づいた接触刺激応答計測システム（Touch Response Meter: TRM）を作製した（脚注1）。TRMは動物に一定条件で機械的刺激を与え、その刺激に対する動物の蹴り払い応答と噛みつき応答の強度を力学的に検出し、また応答行動の発現頻度を記録するシステムである。

TRMは、刺激/計測装置、刺激装置制御/荷重変換装置および解析指令装置から構成される（図1）。TRMの主要部である刺激/計測装置には、動物を収容するチャンバー、動物を機械的に刺激する金属製刺激棒、刺激棒に取り付けた荷重センサ、刺激棒の駆動装置、駆動装置を左右に移動するため

脚注1：我々が前論文（口岩ら，2008a）で試作した計測装置における予備実験および解析記録をもとに本研究のTRMを作製した。前試作機では、動物が刺激棒に与える力による加速度を検出したために動物の応答反応量を正しく計測することができなかった。また、刺激棒駆動時の振動がノイズとして検出され、正確な応答反応の検出ができなかった。本研究のTRMでは、動物が刺激棒に加えた力を検出する仕組みに変更し、さらに刺激棒駆動時の振動ノイズを除去した。本研究の動物の応答反応計測理論は前試作機と同一であるが、応答反応検出原理が異なっているために計測値の単位が異なる。またTRMでは新たな電算システムを導入したことから、より正確な応答反応の検出が可能となった（特許第4858996）。

の金属レール、移動装置、汚物トレイを装備した(図1A)。刺激装置制御/荷重変換装置には、刺激/計測装置を制御するための基板と、計測された荷重を増幅しデジタル変換する装置を搭載した。解析指令装置には刺激/計測装置と刺激装置制御/荷重変換装置を制御するプログラムおよび入力された計測データを電算処理するプログラムを搭載した。解析指令装置にはデータを表示するディスプレイとデータを入力するキーボードを接続した。

刺激/計測装置の上部には、脱着可能な透明アクリル製動物チャンバーを設置した(図1B1\*)。チャンバーの底面には幅4mm、長さ90mmのスリットを2本作製し、下方から直径3mmの2本の金属製刺激棒を上昇させ、このスリットを通過させるように設定した。刺激棒は、動物の下肢または下半身に接触して停止するか、または頭部に接近または接触して停止するように制御した。刺激棒の先端は円形ドーム状に成形し、動物に対して痛み刺激を与えないようにした。チャンバーの広さは高さ×幅×長さ=35mm×35mm×95mm; 40mm×40mm×95mm; 45mm×45mm×95mmの3種類を作製し、動物の大きさに合わせて適切なものを使用できるようにした。刺激棒の上昇距離は10mmに設定した。

刺激に対し応答反応を発現した動物が刺激棒に加えた力は、刺激棒の基部に設置した荷重センサによって検出され、検出された信号は荷重変換装置を介してコンピュータに入力される設定とした。反応の大きさは、荷重センサに加えられた力(ミリニュートン:mN)×時間(秒:s)で表示した(脚注2)。刺激棒の駆動速度、上昇時間、刺激回数、刺激間隔などの刺激条件は、解析指令装置に入力することにより実験者自身で設定することができる仕組みにした。チャンバー内の動物の位置と姿勢を実験者が目視で確認し、適切な刺激位置を得ることができるように、手動で駆動装置を左

右に動かすことができる装置を設置した。無効な刺激または計測がなされた場合には、実験者がディスプレイ上の「無効ボタン」を押し、無効刺激として記録から除外することが可能なプログラムとした。このほか「反応記録ボタン」を設置し、実験者が目視下に動物の応答を観察し、応答反応の回数を記録できるようにした。実験データはエクセルファイルに自動入力されるように設定した。

#### 4) 蹴り払い応答と噛みつき応答の計測

チャンバーは、動物がチャンバー内で向きを変えることができる程度の大きさのものを選択した。実験に先立ち、動物をチャンバー内に誘導し、数分間放置してチャンバー内の環境に慣れさせ、自発行動が収まるのを待った。動物の自発行動が停止したところでチャンバーを刺激/計測装置に装着し、実験を開始した。本研究で使用した刺激条件は、我々の以前の予備的研究の結果に基づき、刺激棒の上昇速度=100mm/秒、刺激回数=30回、刺激棒の上昇時間=1秒、刺激間隔=10秒とした(口岩他, 2008a)。最初に蹴り払い応答の強度と発現頻度を計測し、その数分後に噛みつき応答の強度と発現頻度を計測した。計測条件を一定にするために、すべての試験をこの順序で行った。

蹴り払い応答の計測では、刺激棒を後肢のレベル(図2のAレベル)で上昇させた。この実験では、刺激棒は動物の足底に接触して上昇するか、または腹部に接触して停止した。刺激棒上昇時に動物が刺激とは関係のない動作をしていた場合、例えば、方向転換、毛繕い、探索行動、チャンバー外への糞出し行動などを行っていた場合には、ディスプレイ上の「無効ボタン」を押し、そのトライアルをデータから除外した。マウスが後肢を高く維持したために動物に接触刺激を与えられなかった場合にも無効刺激として処理した。刺激時に動物が刺激に反応して明らかに蹴り払い応答を起こしたことが確認されたときは、実験者はディスプレイ上の「反応記録ボタン」を押し、応答回数を記録した。

脚注2: 蹴り払い応答および噛みつき応答によって刺激棒に加えられた力は刺激装置基部の荷重センサーで検出されるが、荷重センサーが検出する荷重は棒の基部に加わる外力であり、マウスが棒に力を加える先端部と同一ではない。刺激棒には「てこ」の原理が働くと考えられ、マウスの力以上の数値が荷重センサーによって検出される可能性が推察される。



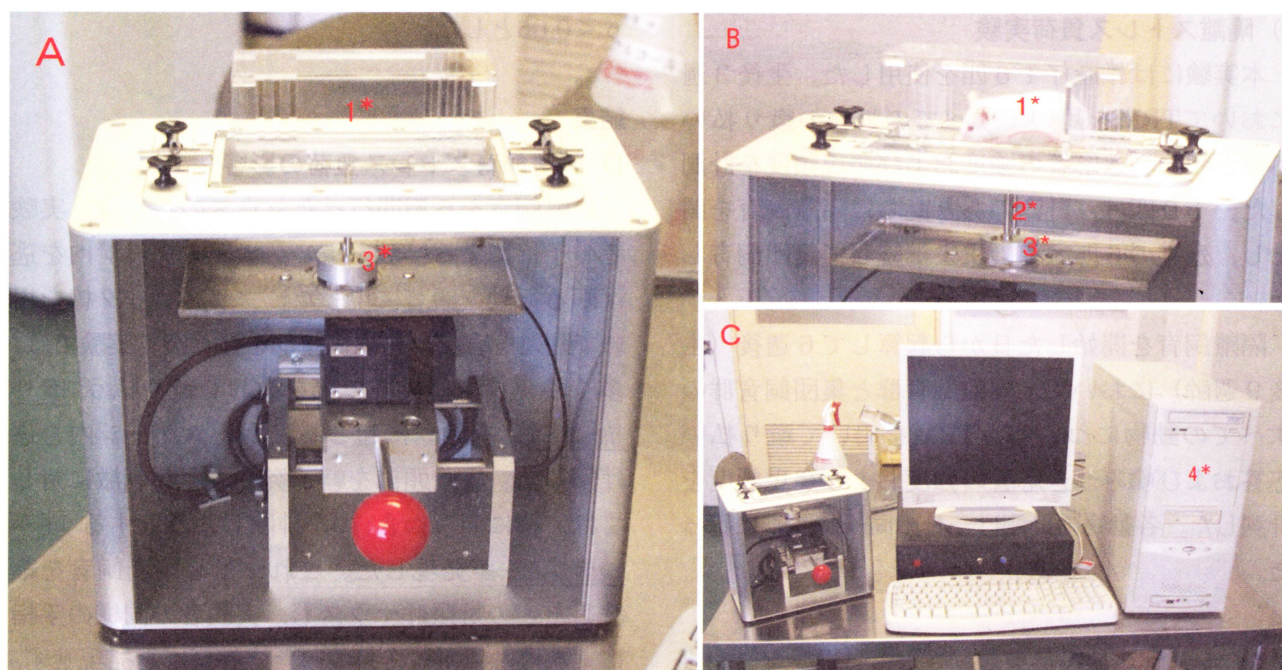


図1. A : 接触刺激応答計測システム (Touch Response Meter: TRM) の主要部である刺激/計測装置。刺激棒駆動装置 (中央の黒箱) を2本の金属製レール上に設置し、手動で左右に移動することが可能な設計にした。実験者は赤い取手を持ち、動物の動きに合わせて駆動装置を左右に移動させ、適切な位置で2本の金属製刺激棒 (B : 2\*) を上昇させる。装置の上には動物を収容する脱着可能な動物用チャンバー (1\*) を設置した。B : 刺激/計測装置上に設置した動物チャンバーに収容したマウス。チャンバーは透明アクリル製で、底部に2本のスリットを設けた。このスリットを通して下方から刺激棒 (2\*) が上昇し、動物に機械的刺激を与える。刺激棒の下部に荷重センサ (3\*) を取り付け、動物の応答反応を力学的に検出できる構造にした。C : TRMの全体写真。写真左が刺激/記録装置、中央のディスプレイ下の黒色の装置は刺激装置制御/荷重変換装置。4\*は解析指令装置 (コンピュータ)。

噛みつき応答の計測では、刺激棒を目のレベル (図2のBレベル) で上昇させた。マウスが頭を下げているときには刺激棒は動物の下顎を軽く持ち上げて停止した。マウスが顔を上げていたときには下顎の下または顔の付近で刺激棒は停止した。刺激棒上昇時に動物が刺激に対して注意を向けていない状態、たとえば方向転換、毛繕い、探索行動、糞出し行動などを行っているときなどに刺激棒が上昇した場合には、無効刺激として処理した。

計測は、飼育室に頻繁に出入りし、日常の動物の世話をを行っている研究者が担当した。実験者は、日常以外の臭気に注意を払った。特に、当日ラットの飼育室に立ち入った研究者の入室は禁忌とした。消毒薬は日常使用するもの以外は使用を禁止した。チャンバーは、マウスを交換するたびごと

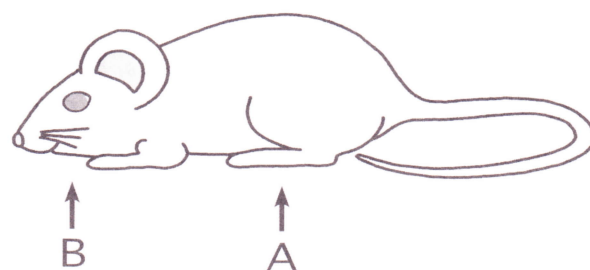


図2. 蹴り払い応答および噛みつき応答試験の刺激位置を示す。A, 蹴り払い応答計測時の刺激位置 : B, 噛みつき応答計測時の刺激位置。

に中性洗剤で洗浄された清潔なものを使用したが、同一ケージで集団飼育中のマウスを連続して計測する場合には、糞尿でチャンバーが汚れた場合を除き、交換を行わなかった。

## 5) 隔離ストレス負荷実験

本実験には雄産仔16匹を使用した。生後3週においてTRMを用いてすべての動物の蹴り払い応答と噛みつき応答の強度および発現頻度を計測した。10匹は、計測のあと直ちに隔離飼育を開始し、残りの6匹はそのまま継続して集団飼育した。

隔離飼育を開始した日から起算して6週後（生後9週齢）において、隔離飼育群と集団飼育群のすべての動物について、TRMを用いて蹴り払い応答および噛みつき応答の強度および発現頻度を計測した。各動物の計測は一日の同一時間帯に行った。

## 6) イミプラミン投与実験

本実験には生後3週に離乳したのち6週間の隔離飼育を行った7匹の雄マウスを使用した。イミプラミンまたはヴィークル（生理食塩水）の投与開始に先立ち、生後9週において、すべての動物の蹴り払い応答と噛みつき応答の強度および発現頻度を計測した。計測後、イミプラミン投与群（ $n=3$ ）と対照群（ $n=4$ ）に分け、第一回目のイミプラミン生理食塩水溶液（30mg/kg）または同量のヴィークルの腹腔内投与を行った。その後毎日連続して4週間、ほぼ同一時刻にイミプラミン溶液またはヴィークルを投与した。腹腔内注射は、注射時の痛覚を抑制する目的で29Gインシュリン用マイJECTAシリンジ（テルモ株式会社、東京）を用いた。投与開始後4週において、TRMを用いて蹴り払い応答および噛みつき応答の強度と発現頻度を再計測した。投与期間中、すべてのマウスは通常通りの隔離飼育を継続した。

## 7) 統計処理

隔離飼育群と対照群（集団飼育群）の間の蹴り払い応答および噛みつき応答の平均強度および発現頻度の有意差検定、およびイミプラミン溶液投与群と対照群の応答強度および発現頻度の有意差検定には、対応のあるt検定を行った。有意水準は

$p < 0.05$ とした。

## 結果

### 1) 隔離飼育ストレス負荷の影響

隔離飼育を6週間行ったマウスの多くは、実験者の手指による接触を嫌い、ホームケージ内を逃げ回る行動を顕著に現した。プラスチック棒を用いて隔離飼育マウスの側腹部を軽く突く実験では、多くのマウスは後肢で棒を激しく蹴り払い蹴り払い応答を頻繁に起こし、ホームケージ内を逃げ回った。また頭部を軽く突くような刺激に対しては、棒に噛みつき棒を排除しようとする噛みつき応答が発現した。これに対し集団飼育を継続したどの対照群マウスも、実験者の同様の手指による接触に対して目立った応答反応を発現せず、また刺激棒による突き刺激に対する応答反応も発現しなかった。

6週間の隔離飼育を行ったマウスの多くでは、TRMを用いた蹴り払い応答および噛みつき応答の計測において、両応答反応の強度および発現頻度が、隔離飼育前に比較し、有意に増強または増加した。表1に個々の隔離飼育マウスの3週齢および9週齢における蹴り払い応答と噛みつき応答の1セッション当たりの平均強度と応答回数、および隔離飼育群全体の各計測値の平均を示した。表1は、6週間の隔離飼育によって、多くの動物に顕著な蹴り払い応答および噛みつき応答の増強が起こったことを示している。その一方で、一部の動物には大きな変化が起こらなかったことも示している。すなわち、個々の動物の応答反応発症の有無を示している。図3は全隔離飼育マウスの蹴り払い応答および噛みつき応答の平均強度と発現頻度を対照群集団飼育マウスのそれらと対比したものである。グラフは隔離後に両応答反応の平均強度および発現頻度が有意に増強および増加したことを示している。それに対し、対照群の集団飼育マウスでは、飼育期間中に両応答反応はほとんど変化を示さなかったことを示している。

Table 1  
Intensities of kicking and biting responses in each isolation-reared mouse

animal ID	0w (p.n. 3w)		6w (p.n. 9w)	
	kicking	biting	kicking	biting
101	3.31	0.23	10.35	3.27
102	3.69	0.22	23.97	14.93
103	3.12	1.88	15.13	1.98
104	3.86	0.44	4.70	2.43
105	1.06	0.09	29.05	8.10
106	0.83	0.00	2.90	0.47
107	0.03	0.01	8.22	8.16
108	0.21	0.85	31.36	30.58
109	0.34	0.10	5.40	1.42
110	0.07	0.09	14.51	0.32
mean±S.E.M	1.65±0.52	0.39±0.18	14.56±3.26	7.17±2.98

(mNs)

## 2) イミプラミン投与の影響

長期隔離飼育ストレスを負荷したマウスでは、イミプラミン投与前またはヴィークル投与前において、顕著な蹴り払い応答および噛みつき応答がTRMを用いた計測により認められた。これらの動物に対する4週間のイミプラミン投与のあとの再計測では、噛みつき応答の強度および発現頻度が有意に減弱または減少した。これに対し蹴り払い応答の強度および発現頻度は、有意な変化を認めなかった（図4）。ヴィークルを投与した対照群は、投与期間中に蹴り払い応答の強度と発現頻度はやや減弱および減少を示したが、投与前のそれに比較して統計学的有意差は認められなかった。

## 考察

本研究で用いた長期間の隔離飼育を行ったストレス障害モデル動物は、鬱病モデルとしても認識されている(Cai et al., 1993; Einon and Morgan, 1977; Frances and Lienard, 1989; Gentsch et al., 1988; Hatch et al., 1963; Hatch et al., 1965; Krsiak, 1975; Lapiz et al., 2001; Leng et al., 2004; Liang et al., 2003;

Matsuda et al., 2001; Matsumoto et al., 2005; Miura et al., 2004; Miura et al., 2005a; Miura et al., 2002b; Muchimapura et al., 2002; Muchimapura et al., 2003; Ojima et al., 1995; Pinna et al., 2006; Valzelli, 1973; Yanai and Sze, 1983; Yen et al., 1959)。本研究では、6週間の隔離ストレスを正常マウスに負荷することにより、蹴り払い応答および噛みつき応答が有意に増強することを示した。長期の隔離飼育により動物はストレス障害または/および鬱様症状を発症し、それに伴いirritabilityが増強したものと考えられる。

蹴り払い応答試験と噛みつき応答試験は、些細な刺激に対し過敏に反応する動物の応答反応に着目した行動評価法である。蹴り払い応答試験は動物の粗大触圧覚刺激(soft touch)に対する応答、すなわち触られることをうるさいと感じる情動を検出する試験である。刺激棒による刺激は痛みを伴わないので、逃避反射が蹴り払い応答に加わる可能性はない。一方、噛みつき応答は刺激棒が顔に接近することによって発現する。このとき、刺激棒の頭部への接触は行動発現の必要条件とはな

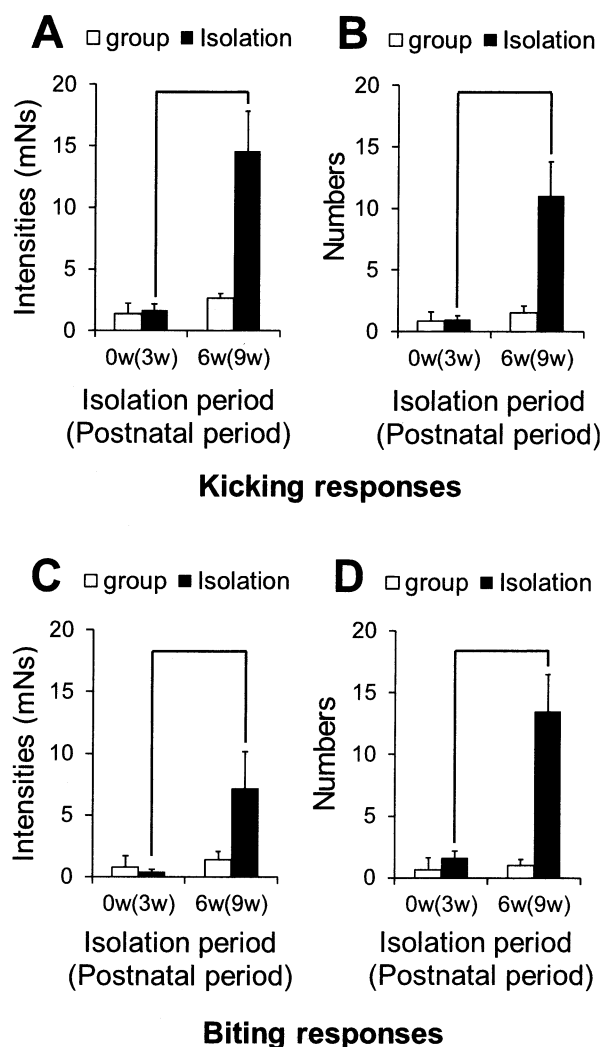


図3. 3週齢および9週齢における蹴り払い応答と噛みつき応答の強度および発現頻度。6週間の隔離飼育後において、隔離飼育前に比較して、蹴り払い応答および噛みつき応答が有意に増強および増加したことを示す。対照群には変化がなかったことを示す。\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

らない。このことは、噛みつき応答試験は顔に近づくうるさい刺激に対する動物の怒りを検出する試験であることを示している。正常な動物ではこのような非侵襲性の刺激を無視することが多いが、irritabilityを有する動物ではそのような些細な刺激に過敏に反応し、衝動的な不機嫌または怒りを発現する。本研究において検出した蹴り払い応答と噛みつき応答は、動物のirritabilityに伴って発現する応答反応である。

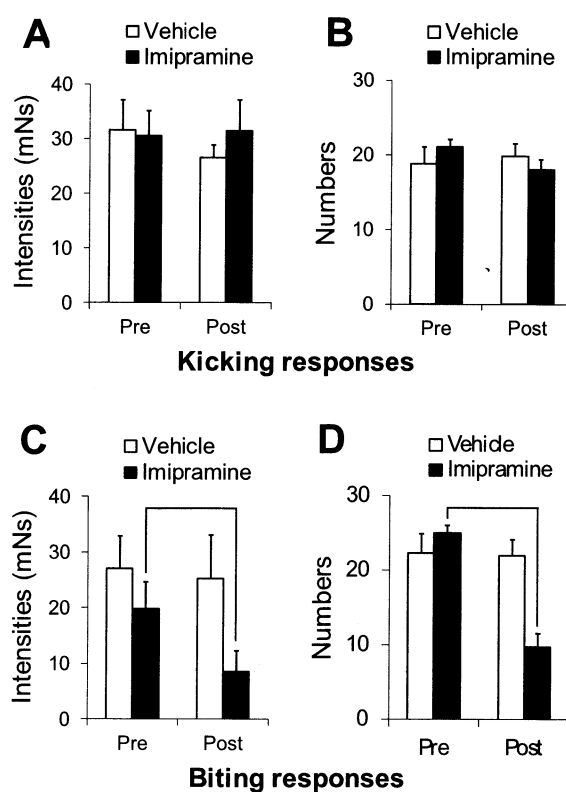


図4. イミプラミン投与群およびヴィークル投与群における蹴り払い応答および噛みつき応答の変化。イミプラミンの投与後の噛みつき応答は、投与前に比較して有意に減弱および減数したことを示す。イミプラミン投与群の蹴り払い応答には変化がみられず、また対照群にも変化が現れなかったことを示す。  
\*\*  $p < 0.01$

現在、鬱モデル動物の評価には、強制水泳における不動時間を評価する強制水泳試験と(Cryan et al., 2005; Porsolt et al., 1977a; Porsolt et al., 1977b; Sanchez and Meier, 1997), 尾を挟んでつり下げたときの動物の無動時間を計測する尾懸垂試験が広く用いられている(Steru et al., 1985; van der Heyden et al., 1987)。またホームケージに侵入した雄動物(イントルーダー)に対する攻撃行動を鬱様症状の一つとして評価す



るレジデント-イントルーダー試験も行われている(Blanchard and Blanchard, 1977; Krsiak, 1975; Malkesman et al., 2006; Mucignat-Caretta et al., 2004; Olivier, 1981; Veenema et al., 2007; Yen et al., 1959)。これらのうち強制水泳試験は最も頻繁に用いられる鬱症状の行動評価法である。水中での動物の不動は鬱モデル動物の絶望的情動を反映するものと考えられ(Porsolt et al., 1977a; Porsolt et al., 1977b), 鬱症状の評価に高い信頼を得ている。強制水泳試験は30年以上前から用いられている優れた行動評価技術であるが, この評価法には回避しがたい欠点が存在する。すなわち, 試験自体が動物に強いストレスを強いること, また同一個体を用いた複数回の試験では学習効果の影響を除外できないことである。これらのことから同一個体を対象にして何度も繰り返し試験を実施することは難しい。尾懸垂試験も, 強制水泳試験と同様に, 動物の絶望的情動に依存する無動時間を計測するものであるが, この手法も動物に与えるストレスが大きく, 同一動物を用いた再試験ではその影響を除外することはできない。したがってこれらの方法では鬱症状の発症または治癒の過程を同一個体において長期間にわたって追跡することは困難である。これに対し, 我々が今回用いた蹴り払い応答および噛みつき応答から鬱症状またはirritabilityを評価する方法は, 動物に与える負荷が極めて小さく, 学習効果も存在しない。したがって同一個体において経時的に長期に渡って何回でも試験をすることが可能である。我々は, 同一個体における1ヶ月間の連続計測試験において両応答反応に有意な変化が検出されなかったことを示し, 同一個体を用いた長期間の試験に本研究の行動指標が有効であることを報告した(口岩他, 2008a)。同一個体のストレス性障害をこれほど長期に渡って行動学的に追跡した研究は他には存在しない。

行動学試験は, 原則として画一的な条件設定下で主観を排除して行われることが必要である。とくに動物の情動変化を定量的に評価する試験では,

これらは最も厳しく管理されるべき必要条件である。しかし, 現実には各研究室が同一条件で行動学試験を行うことは難しく, また観察に熟練を要する試験では主観の排除が困難なことも多い。事実, レジデント-イントルーダー試験では実験環境などの条件設定が実験結果に影響を与えることがあることが指摘されており(Veenema et al., 2007), また強制水泳試験では, シリンダー瓶の形状, 水深, 水温などが成績に影響を与えることがあるとされている(山本と采, 2002; 辻他, 2007)。これに対し蹴り払い応答と噛みつき応答を指標とする行動試験は, 実験条件の設定が容易であり, ばらつきが少ない計測結果を得ることができる。TRMは, 同一刺激に対する動物の反応を同一の検出条件で機械的に数値化するシステムであるので, 初学者でも画一的な条件設定のもとに主観を排除した再現性の高い計測値を得ることができる。行動学の定量的評価は, 同一条件設定のもとで行われ, 同一の基準で測定されて初めて信頼性の高い所見となる。本研究で用いた手法は同一個体のirritabilityの変化を客観的に経時的に定量化できる唯一の行動評価技術である。

本研究では, ストレス障害および/または鬱様症状を発症したマウスに抗鬱薬であるイミプラミンを継続的に投与し, 向精神薬のirritabilityに対する影響をTRMによって検出することが可能であるか否か試験を行った。その結果, イミプラミン投与群における蹴り払い応答試験では明瞭な変化を検出できなかったが, 噛みつき応答試験では顕著な減弱を検出することができた。このことは, 向精神薬のirritabilityへの影響をTRMによって検出し得たことを示している。イミプラミンはセロトニントランスポーターとノルアドレナリントランスポーターを阻害する三環系抗うつ薬である。長期の隔離ストレス負荷では脳内セロトニンシステムに異常が発生することが知られているので(Miura et al., 2002a; Muchimapura et al., 2002; Muchimapura et al., 2003; Yanai and Sze, 1983; Zhang et al., 2006), 噛みつき応答

はセロトニンが関与する応答反応である可能性がある。生理食塩水を投与した対照群では若干の蹴り払い応答反応および噛みつき応答反応の減弱を認めたが、この現象は毎日のハンドリングの効果であることが推察される。このことは、隔離飼育により鬱様症状が発現した動物に毎日短時間のスキニップを行うと鬱様症状が緩和されることを報告した研究に一致する(Gentsch et al., 1988; Hatch et al., 1963)。生食注入時のハンドリングが動物のirritabilityを緩和させたことが推察される。

## 謝辞

本研究の一部は科学研究費補助金（基盤研究(C)：課題番号21591487）を使用して行った。

## 文献

- 口岩俊子, 口岩琢哉, 森 司朗, 口岩 聡, 2008 a, 実験動物における機械的接触刺激に対する応答行動の定量的計測—鬱動物の検出と鬱症状定量の試み—, 鹿児島純心女子大学大学院人間科学研究科紀要, 第3号, 3-17頁。
- 口岩俊子, アブドアイニ・アブドラヒマン, 口岩琢哉, 森 司朗, 口岩 聡, 2008 b, ダイオキシシン胎盤・母乳暴露により若年期に発症する接触刺激に対する過敏な応答行動—若年期うつ発症の可能性について—, 鹿児島純心女子大学大学院人間科学研究科紀要, 第3号, 19-28頁。
- 辻稔, 宮川和也, 竹内智子, 武田弘志, 2007, 一般行動および抑うつ様行動の評価法, 日本薬理学雑誌, 第139巻, 97-104頁。
- 安松浩, 1995, 抗不安薬のスクリーニング法(4) Social interaction法, 日本神経精神薬理学雑誌, 第15巻, 295-304頁。
- 山本政之, 采輝明, 2002, 行動薬理学的側面から見た精神疾患モデルとその妥当性, 日本薬理学会雑誌, 第120巻, 173-180頁。
- Aloe, L., Alleva, E., De Simone, R., 1990. Changes of NGF level in mouse hypothalamus following intermale aggressive behaviour: biological and immunohistochemical evidence. *Behav Brain Res* 39, 53-61.
- Andre, V.M., Cepeda, C., Levine, M.S., 2010. Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act. *CNS Neurosci Ther* 16, 163-178.
- Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., 1977. Aggressive behavior in the rat. *Behav Biol* 21, 197-224.
- Cai, B., Matsumoto, K., Ohta, H., Watanabe, H., 1993. Biphasic effects of typical antidepressants and mianserin, an atypical antidepressant, on aggressive behavior in socially isolated mice. *Pharmacol Biochem Behav* 44, 519-525.
- Chadman, K.K., 2011. Fluoxetine but not risperidone increases sociability in the BTBR mouse model of autism. *Pharmacol Biochem Behav* 97, 586-594.
- Cryan, J.F., Valentino, R.J., Lucki, I., 2005. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 547-569.
- Einon, D.F., Morgan, M.J., 1977. A critical period for social isolation in the rat. *Dev Psychobiol* 10, 123-132.
- Fava, M., Rosenbaum, J.F., 1998. Anger attacks in depression. *Depress Anxiety* 8 Suppl 1, 59-63.
- Fava, M., Rosenbaum, J.F., 1999. Anger attacks in patients with depression. *J Clin Psychiatry* 60 Suppl 15, 21-24.
- Frances, H., Lienard, C., 1989. Isolation-induced social behavioral deficit test: effect of tranquilizing drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 34, 293-296.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Frischknecht, H.R., Feer, H., Siegfried, B., 1988. Isolation-induced locomotor hyperactivity and hypoalgesia in rats are prevented by handling and reversed by resocialization. *Physiol Behav* 43, 13-16.
- Hatch, A., Wiberg, G.S., Balazs, T., Grice, H.C., 1963. Long-term isolation stress in rats. *Science* 142, 507-508.
- Hatch, A.M., Wiberg, G.S., Zawidzka, Z., Cann, M., Airth, J.M., Grice, H.C., 1965. Isolation syndrome in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 7, 737-745.
- Imaizumi, M., Suzuki, T., Machida, H., Onodera, K., 1994. A fully automated apparatus for a light/dark test measuring anxiolytic or anxiogenic effects of drugs in mice. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 14, 83-91.
- Jones, G.H., Hernandez, T.D., Kendall, D.A., Marsden, C.A., Robbins, T.W., 1992. Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacol Biochem Behav* 43, 17-35.
- Krsiak, M., 1975. Timid singly-housed mice: their value in prediction of psychotropic activity of drugs. *Br J Pharmacol* 55, 141-150.
- Lapiz, M.D., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T., Marsden, C.A., 2001. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behaviour and neurotransmission. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 87, 730-751.
- Leng, A., Feldon, J., Ferger, B., 2004. Long-term social isolation and medial prefrontal cortex: dopaminergic and cholinergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav* 77, 371-379.
- Liang, J., Wang, X., Lu, Y., Liu, R., Zhang, Q., Sun, H., Li,

- L., 2003. Effects of antidepressants on the exploration, spontaneous motor activity and isolation-induced aggressiveness in mice. *Beijing Da Xue Xue Bao* 35, 54-60.
- Malkesman, O., Maayan, R., Weizman, A., Weller, A., 2006. Aggressive behavior and HPA axis hormones after social isolation in adult rats of two different genetic animal models for depression. *Behav Brain Res* 175, 408-414.
- Matsuda, T., Sakaue, M., Ago, Y., Sakamoto, Y., Koyama, Y., Baba, A., 2001. Functional alteration of brain dopaminergic system in isolated aggressive mice. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 21, 71-76.
- Matsumoto, K., Pinna, G., Puia, G., Guidotti, A., Costa, E., 2005. Social isolation stress-induced aggression in mice: a model to study the pharmacology of neurosteroidogenesis. *Stress* 8, 85-93.
- Matsumoto, K., Puia, G., Dong, E., Pinna, G., 2007. GABA(A) receptor neurotransmission dysfunction in a mouse model of social isolation-induced stress: possible insights into a non-serotonergic mechanism of action of SSRIs in mood and anxiety disorders. *Stress* 10, 3-12.
- Miura, H., Qiao, H., Kitagami, T., Ohta, T., 2004. Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, suppresses tetrahydrobiopterin in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology* 46, 340-348.
- Miura, H., Qiao, H., Kitagami, T., Ohta, T., Ozaki, N., 2005a. Effects of fluvoxamine on levels of dopamine, serotonin, and their metabolites in the hippocampus elicited by isolation housing and novelty stress in adult rats. *Int J Neurosci* 115, 367-378.
- Miura, H., Qiao, H., Kitagami, T., Ohta, T., Ozaki, N., 2005b. Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, suppresses tetrahydrobiopterin levels and dopamine as well as serotonin turnover in the mesoprefrontal system of mice. *Psychopharmacology (Berl)* 177, 307-314.
- Miura, H., Qiao, H., Ohta, T., 2002a. Attenuating effects of the isolated rearing condition on increased brain serotonin and dopamine turnover elicited by novelty stress. *Brain Res* 926, 10-17.
- Miura, H., Qiao, H., Ohta, T., 2002b. Influence of aging and social isolation on changes in brain monoamine turnover and biosynthesis of rats elicited by novelty stress. *Synapse* 46, 116-124.
- Montgomery, K.C., 1955. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol* 48, 254-260.
- Muchimapura, S., Fulford, A.J., Mason, R., Marsden, C.A., 2002. Isolation rearing in the rat disrupts the hippocampal response to stress. *Neuroscience* 112, 697-705.
- Muchimapura, S., Mason, R., Marsden, C.A., 2003. Effect of isolation rearing on pre- and post-synaptic serotonergic function in the rat dorsal hippocampus. *Synapse* 47, 209-217.
- Mucignat-Caretta, C., Bondi, M., Caretta, A., 2004. Animal models of depression: olfactory lesions affect amygdala, subventricular zone, and aggression. *Neurobiol Dis* 16, 386-395.
- Ojima, K., Matsumoto, K., Tohda, M., Watanabe, H., 1995. Hyperactivity of central noradrenergic and CRF systems is involved in social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep. *Brain Res* 684, 87-94.
- Olivier, B., 1981. Selective anti-aggressive properties of DU 27725: ethological analyses of intermale and territorial aggression in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav* 14 Suppl 1, 61-77.
- Pinna, G., Agis-Balboa, R.C., Zhubi, A., Matsumoto, K., Grayson, D.R., Costa, E., Guidotti, A., 2006. Imidazenil and diazepam increase locomotor activity in mice exposed to protracted social isolation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4275-4280.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978a. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47, 379-391.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977a. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229, 327-336.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1978b. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* 51, 291-294.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977b. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.
- Powell, S.B., Geyer, M.A., Preece, M.A., Pitcher, L.K., Reynolds, G.P., Swerdlow, N.R., 2003. Dopamine depletion of the nucleus accumbens reverses isolation-induced deficits in prepulse inhibition in rats. *Neuroscience* 119, 233-240.
- Sanchez, C., Meier, E., 1997. Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike? *Psychopharmacology (Berl)* 129, 197-205.
- Shao, F., Jin, J., Meng, Q., Liu, M., Xie, X., Lin, W., Wang, W., 2009. Pubertal isolation alters latent inhibition and DA in nucleus accumbens of adult rats. *Physiol Behav* 98, 251-257.
- Snaith, R.P., Taylor, C.M., 1985. Irritability: definition, assessment and associated factors. *Br J Psychiatry* 147,

- 127-136.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85, 367-370.
- Suzuki, T., Lu, M.S., Motegi, H., Yoshii, T., Misawa, M., 1992. Genetic differences in the development of physical dependence upon diazepam in Lewis and Fischer 344 inbred rat strains. *Pharmacol Biochem Behav* 43, 387-393.
- Uchida, N., Egashira, N., Iwasaki, K., Ishibashi, A., Tashiro, R., Nogami, A., Manome, N., Abe, M., Takasaki, K., Mishima, K., Takata, J., Oishi, R., Nishimura, R., Fujiwara, M., 2009. Yokukansan inhibits social isolation-induced aggression and methamphetamine-induced hyperlocomotion in rodents. *Biol Pharm Bull* 32, 372-375.
- Valzelli, L., 1969. The exploratory behaviour in normal and aggressive mice. *Psychopharmacologia* 15, 232-235.
- Valzelli, L., 1973. The "isolation syndrome" in mice. *Psychopharmacologia* 31, 305-320.
- van der Heyden, J.A., Molewijk, E., Olivier, B., 1987. Strain differences in response to drugs in the tail suspension test for antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* 92, 127-130.
- Veenema, A.H., Bredewold, R., Neumann, I.D., 2007. Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology* 32, 437-450.
- Walker, J.M., Fowler, S.W., Miller, D.K., Sun, A.Y., Weisman, G.A., Wood, W.G., Sun, G.Y., Simonyi, A., Schachtman, T.R., 2011. Spatial learning and memory impairment and increased locomotion in a transgenic amyloid precursor protein mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 222, 169-175.
- Willner, P., 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 134, 319-329.
- Wise, L.E., Varvel, S.A., Selley, D.E., Wiebelhaus, J.M., Long, K.A., Middleton, L.S., Sim-Selley, L.J., Lichtman, A.H., 2011.  $\Delta$ -tetrahydrocannabinol-dependent mice undergoing withdrawal display impaired spatial memory. *Psychopharmacology (Berl)* 217, 485-494.
- Yanai, J., Sze, P.Y., 1983. Isolation reduces midbrain tryptophan hydroxylase activity in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 80, 284-285.
- Yen, C.Y., Stanger, R.L., Millman, N., 1959. Ataractic suppression of isolation-induced aggressive behavior. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 123, 179-185.
- Zhang, X.Y., Kehoe, P., Kosten, T.A., 2006. Neonatal isolation alters estrous cycle effects on ventral striatal extracellular monoamine levels. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30, 504-511.
- Ziskind, E., 1958. Isolation stress in medical and mental illness. *J Am Med Assoc* 168, 1427-1431.

---

**Abstract**

**Behavioral assessments of kicking and biting responses for evaluation of irritability in chronically stressed mice**

Toshiko Kuchiiwa, Junko Wakamoto, Osamu Murakami, Satoshi Kuchiiwa

Irritability is a widely occurring DSM-IV symptom in patients with psychiatric disorders and/or developmental disorders. Behavioral symptoms of irritability also occur in laboratory psychiatric model animals such as stress and/or depression disorders. However, behavioral parameters for estimation of irritability have not been reported in preclinical studies using laboratory animals. Establishment of protocols for estimation of behavioral symptoms of irritability in psychiatric animal models is needed to study psychotropic drug evaluations.

It is known that in psychiatric animal models with irritability, the animals respond excessively to soft touch stimuli. For example, they express 'kicking responses' toward mechanical touch stimuli to their leg or lower abdominal skin, and they exhibit 'biting responses' toward inanimate objects approaching their face. We developed a new research apparatus, Touch Response Meter (TRM), that can stimulate animals mechanically with moving sticks regulated with a computer program, and can detect and record intensities and incidence rates of kicking and biting responses toward the stimuli. In the present study, we attempted to estimate irritability in chronically stressed mice using the kicking and biting responses as behavioral parameters.

Normal ddY mice were mated and their offspring were weaned at postnatal week 3, and then all male offspring were studied for intensity and incidence rates of kicking and biting response using the TRM. Just after the measurements, the offspring were divided into 2 groups, isolation- and group-housing groups. At postnatal week 9, both responses were re-measured. All behavioral responses in the isolation-reared mice significantly increased in comparison to group-housed mice.

In other mice isolated for 6 weeks, kicking and biting responses were measured, and then the mice were divided into 2 groups. The first group received daily intraperitoneal injection of 30 mg/kg imipramine for 4 weeks, and the second group was administered the same volume of vehicle (saline). Intensities and incidence rates of biting responses were significantly decreased in the imipramine group, but rates of kicking response were not significantly changed. Neither response was significantly altered in the control group.

It is considered that prolonged isolation of mice created not only a stress model but also a depression model. The results of the present study suggest that irritability with stressed and/or depressed mice can be evaluated quantitatively by using the kicking and biting responses as behavioral parameters.

**KeyWords :** irritability and anger, kicking and biting responses, depression and stress disorder, nonclinical behavioral study