

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

—うつ動物の検出とうつ症状定量の試み—

A new behavioral test for screening of depressed laboratory animals and for quantification of depressive-like symptoms utilizing soft mechanical stimulation

鹿児島純心女子大学国際人間学部こども学科

鹿児島大学理学部生命化学科

鹿屋体育大学体育学部

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

口 岩 俊 子

口 岩 琢 哉

森 司 朗

口 岩 聡

要 約

マウスにプラスチック棒で軽く触れる刺激を与えると、動物が正常であれば刺激を無視することが多い。しかし、うつモデルマウスや触覚過敏症状があるマウスでは、棒を後肢で激しく払い除けたり（払い除け行動）、あるいは棒に激しく噛みつく（対物攻撃行動）など、過敏な応答行動を起こす。本研究では、この症状を定量的に測定する目的で、軽い機械的刺激に対する動物の応答行動を記録する機器を作製した。実験では、ダイオキシンを摂取させることにより作製したうつモデルマウスと、長期間隔離飼育することにより作製したうつモデルマウスを使用して刺激に対する応答量を計測し、正常な動物における計測値と比較した。作製した機器では、後肢レベルを刺激することにより払い除け行動を、顔面付近へ刺激棒を提示することにより対物攻撃行動を計測できる。この機器を用いた刺激実験では、両うつモデルマウスにおいて、著しく大きな払い除け行動と対物攻撃行動が計測された。侵害性のない軽い機械的刺激に対する過敏な応答行動はうつ症状の一部と考えられ、動物の辺縁系に起こる精神の苛立ちに関係して発現すると推察される。したがって、軽い機械刺激に対する応答行動を計測することによりうつ動物をスクリーニングすることができ、定量化によって動物のうつ症状の重症度を推察することができると考えられる。本機器を用いる方法は、これまでの研究方法と比較すると、極めて簡便かつ正確に、うつ様症状の有無およびうつ症状の強弱を推察することが可能である。しかも、本機器を用いた行動実験計測は、動物に強いストレスを与えることなく反復して行うことができるので、抗うつ薬の効果を時間経過を追って計測する場合などに極めて有用である。また、うつ動物に限らず、触覚に対する過敏症状を持つ動物を定量的に計測する研究にも有用である。

キーワード：触覚過敏，うつ症状定量的計測，接触刺激応答行動，ダイオキシンの，行動学的研究

緒言

皮膚感覚には、温痛覚、識別性触圧覚および粗大触圧覚（機械的接触に対する触覚）がある。これらの感覚は、皮膚においてそれぞれ異なる終末受容器によって受容され、異なる神経細胞により

中継され、そして異なる神経伝導路によって大脳皮質感覚野へ伝えられる。従って、これらの3つの触覚は異なる感覚として明確に区別されている。

現在、温痛覚に対する実験動物の応答を調べる計測機器は、すでに多くのものが市販されており、

それらを用いた計測手法が確立され、さまざまな研究が行われている。これに対して、粗大触圧覚に対する応答行動を対象にした行動学的研究はあまり行われていない。粗大触圧覚は、温痛覚や識別性触圧覚に比較して臨床的に軽視されることが背景にあると考えられ、そのため粗大触圧覚刺激（軽い接触刺激）に対する応答行動を定量的に測定する手法に関する報告がほとんどなく、またそれを定量的に測定する機器も開発される機会がなかったものと推察できる。

粗大触圧覚刺激は、放置していても傷害を受けることがない非侵害性の刺激であるので、この刺激に対する脊髄反射は存在しない。したがって、粗大触圧覚刺激に対する応答の有無は上位中枢、とりわけ辺縁系の活動、すなわち精神状態に強く影響を受けることが考えられる。人は、些細なストレス刺激に対し、心の落ち着きがあれば冷静に判断し対応するが、心の状態が不安定であるときに過剰な応答を起こすことがある。このことは動物でも同じであると考えられ、脳内環境が安定していない動物、すなわち、精神的に苛立ちのあるうつ動物では、些細な刺激に対して過敏な応答行動を起こすことが多いと考えられる。

実験動物に軽い接触刺激を与えると（たとえばプラスチック棒で軽く身体に触れると）、動物が正常であるならば、最初は刺激を無視することが多い。しかし、しつこく何度も刺激を与え続けると、動物は苛立ち始め、刺激から回避する行動（応答行動）を起こすようになる。刺激に対して応答行動を起こすか否かは、動物のそのときの気分にも強く影響される。大脳新皮質は、辺縁系の活動（精神状態または情動）に影響をうけて「応答行動を起こすか否か」を判断する。

辺縁系に病的症状を持つうつ動物では、軽い接触刺激に対してさらに低い閾値で過敏に応答行動を起こす。このような動物をプラスチック棒で軽く触れると、動物は、刺激を回避する行動にとどまらず、床敷（木くず）に潜って隠れたり、プラスチック棒を後肢で激しく払い除けたり、プラスチック棒に激しく噛みついたりする。我々は、こ

れらの行動に注目し、うつ動物をスクリーニングするために、またそのうつ症状の重症度を定量的に評価するために、軽い接触刺激を動物に与えてそれに対する動物の応答を記録し、分析した。応答行動の強度、潜時、継続時間などの計測値は、動物の精神的苛立ちの程度（うつ症状の重症度）を示す指標になると考えられる。

材料・方法・結果

1. 接触刺激応答計測装置（Limbic Response meter: LRM）

粗大触圧覚に対する応答を計測するためには、他の触覚刺激（識別性触圧覚と温痛覚）を排除し、それらの神経路を興奮させない触覚刺激を用いる必要がある。そして、刺激に対する動物の応答行動を効率よく感受するセンサーが必要である。しかも、センサーには、身繕いや体位変換などの動物の自発的行動を感受しない仕組みが必要である。そのような観点から後述の装置を作製した。装置の作製は、小原医科産業（東京）に依頼した。装置は、刺激装置、駆動装置コントローラー兼アナログ/デジタルコンバーター（A/D変換器）およびコンピュータから構成される（図1）。

1) 動物ケージ

動物ケージは動物を収容するためのチャンバーとチャンバーを刺激装置に固定するための天板から構成される。動物が常に装置の中央に位置するようにチャンバーは円筒形にした。チャンバーの床には、刺激棒を通過させるための2本の縦孔（幅5mm、長さ50mm）を開けた。また、シャッターを挿入する横孔を左右に各3孔開け、動物の大きさに合わせてチャンバーの広さを調節できるようにした（図2）。チャンバーは直径40mmのadult用と、直径30mmのyoung adult用の2サイズを用意した。チャンバーは、動物がチャンバー内でかろうじて向きを変えることができる広さのものを選択した。

2) 刺激棒駆動装置および刺激棒

刺激棒駆動装置は、装置の上部に取り付けた刺激棒を等速直線運動で動かす装置である。動物に接触する刺激棒は、チャンバーの長軸に対して垂直に2本、2つの縦孔を1本ずつ通過するように、上向きに15mm間隔で取り付けた。刺激棒には、直径3mm、長さ50mmの太い金属棒を使用し、動物に痛覚を与えることがないように先端を球状に削った。刺激棒の駆動速度は、40mm/s、55mm/s、70mm/s、85mm/s、100mm/s、115mm/sの6段階可変式とし、コンピュータで制御し、刺激棒を自動的にチャンバー底板の縦孔からチャンバー内に等速直線運動で上昇させるように設定した。刺激棒は、動物の腹側からゆっくりと上昇し、動物の腹側面（後肢、腹部、前肢、頸部、下顎のいずれか）に接触する。動物に過度の圧迫を与えないように、刺激棒は底板から10mmの位置で停止するように設定した。刺激棒の上昇時間、上昇（刺激）間隔、上昇回数はコンピュータソフトで自動制御した。刺激棒駆動装置はスライドレール上に載せ、手動で左右に自由に移動できる設計とした。これは、動物がチャンバー内で体位を変えるため、動物の位置に合わせて刺激棒を移動させる必要があるためである。なお、実験中の動物の排泄行動に対応し、駆動部の上方に汚物トレイを設置した。また動物の温冷覚を刺激しないように、実験室の室温を $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に維持した。刺激装置は実験開始の1時間以上前に室内に設置し、刺激棒の温度を管理した（口岩ら、2008：図1と2を参照）。

3) 加速度センサー

刺激棒を下からゆっくり上昇させてマウスの腹部または後肢に接触させることにより、動物はその刺激を嫌がって刺激棒を後ろ足で払いのけようとする行動（払い除け行動）を起こすことがある。また、顔の近くに刺激棒を上昇させると刺激棒に噛みつく行動（対物攻撃行動）を取ることがある。正常なマウスではこのような刺激に対してあまり顕著な応答を示さないことが多いが、うつモデル

マウスでは、激しく「払い除け行動」や「対物攻撃行動」を起こすことが多い（口岩ら、2006）。本装置では、動物が刺激棒を蹴ることにより生じる振動を計測するため、また噛みついた時の振動を記録するために刺激棒に加速度センサーを直接取り付けた。加速度センサーからの信号（加速度センサーに生じる誘導電流）を増幅したのちアナログ/デジタル変換ボードを経由してコンピュータに入力し、コンピュータソフトにより刺激棒に加えられた振動の大きさとその継続時間の積（電位差 \times 時間： $\text{volt} \cdot \text{ms}$ ）を求めた。信号は、縦軸に誘導電位差（V）、横軸に時間（ms）を取った波形に変換して画面表示し、刺激から応答までの時間（潜時）、応答時間、応答強度、払い除け行動または攻撃行動の回数の解析を行った（口岩ら、2008：図3と4を参照）。

刺激棒に取り付けた加速度センサーは、動物の「払い除け行動」や「対物攻撃行動」の強さを感知するのに優れる長所をもつが、駆動装置自体の振動を感知する欠点も持つ。従って、加速度センサーの効果的な設置場所を調べる目的で、天板にも加速度センサーを設置し、動物ケージ全体の振動量を計測する試みを行った。その結果、天板固定部に設置した加速度センサーは、駆動装置の振動は除外できたが、逆に身繕いや体位変換など動物の自発行動に伴うエネルギーも敏感に感知し、「払い除け行動」や「対物攻撃行動」を正確に抽出することはできないことが分かった。本実験では、両者を総合的に比較した結果、「払い除け行動」や「対物攻撃行動」の検出精度が高い刺激棒にセンサーを直接取り付ける方法をより適切なシステムとして選択した。以下は、刺激棒に加速度センサーを取り付けた装置による実験結果および実験の評価である。

2. 適切な刺激条件

1) 増幅率

加速度センサーからの出力の増幅率を大きくすれば、動物の応答だけではなく駆動装置などから発する振動も増幅される。そこで、増幅率を10段

階に切り替えて、刺激棒上昇の際に発生する振動（ノイズ）の大きさを計測し、実際に計測を行う際に用いる適切な増幅率（増幅感度）を決める試みを行った。刺激棒の上昇速度は、後述の実験データを参考にして、40mm/sと85mm/sの2段階で行った。計測は各感度ごとに10回行い、それぞれの平均値および標準偏差を算出した。

図3に、その結果を示す。横軸に10段階の増幅感度、縦軸にノイズ量の大きさを示した。両実験とも、ノイズの大きさは感度8まで緩やかに増加したが、感度9でややノイズは増加し、感度10では著しく増大した。以上から、増幅感度は感度7以下または感度8以下に設定されるのが適切であると評価された。

2) 刺激棒の上昇速度

刺激棒の上昇速度とノイズ量の関係を調べた。上で行った実験の結果を参考にして、加速度センサーは感度7に設定し計測した。刺激棒の駆動速度は、40mm/s、55mm/s、70mm/s、85mm/s、100mm/s、115mm/sの6段階、各速度ごとに50回刺激棒を駆動し、ノイズ量の平均値および標準偏差を求めた。

図4では、横軸に刺激棒の駆動速度、縦軸にノイズ量の大きさを示した。ノイズ量の大きさは、秒速85mmまではほぼ一定だったが、秒速100mmおよび秒速115mmでは、2倍以上に増大した。秒速100mm以上では、駆動装置の振動が刺激棒に共鳴し、ノイズ量が急激に増加したものと考えられた。この結果から、棒の上昇速度は、秒速85mm以下で計測することが適切であると評価された。

3. 実験動物

本研究では、2種類のうつモデルマウスを作製した。そして、これらのうつモデルマウスと正常マウスについて、試作した機械を用いて刺激と計測を行い、軽い接触刺激に対する応答行動の定量化の試みを行った。

1) ダイオキシンうつモデルマウスの作製

実験には九動(佐賀県鳥栖市)から購入したddY系マウスを使用した。雌雄各5匹の正常なマウスを標準的なプロピレン製ラット用ケージに入れ、自由環境で飼育した。マウスの飼育室は常に室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 10\%$ に維持し、午前7時から午後7時までの12時間照明を行った。餌と水は自由に摂取させた。動物実験は、鹿児島大学(鹿児島市)の動物実験倫理規定および日本国の法律を遵守して行った。

上の環境内で1ヶ月以上飼育した雌雄のマウスを交配し、妊娠・出産させて産仔を得た。出産後直ちに雄マウスを飼育ケージから分離し、母マウスと産仔だけをケージに残した。産後0日から4日の母マウス(n=5)に、局方オリーブオイルに溶解したダイオキシン(Accu Standard, Inc., D-404N, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: TCDD)を毎日、午前10時~12時の時間帯に1回、 $100 \mu\text{g/kg}$ (合計 $500 \mu\text{g/kg}$)を経口投与した。この母マウスに産仔を母乳飼育させ、母乳を介してダイオキシンを産仔に摂取させた。ダイオキシンの投与量は、投与前に母マウスのその日の体重を測定して決定した。産仔は、上述の標準飼育環境で飼育を継続し、出生日を生後0日として数えて生後28日目まで母動物と同じケージで飼育した。その後、雌雄を分離して4匹から7匹のグループ飼育を行った。

胎盤・母乳を介してダイオキシンを摂取したマウス産仔の多くに触覚過敏や攻撃性を主症状とする行動異常(うつ様症状)が出現することが分かっている(Kuchiiwa et al., 2002)。症状の発現は、生後2週から3週の頃で、一時期症状が軽減するマウスも存在したが、生後6週頃以後に症状が強まる個体が多かった。この過敏症状は少なくともしばらくの間(数週間から十数週間)継続した。うつ症状の大きさには個体差が認められたが、本研究では払い除け行動、攻撃行動、潜隠行動、回避行動が強く現れたマウスをうつモデルマウスとして認定し、実験に使用した。

2) 隔離飼育によるうつモデルマウスの作製

マウスを個室に1ヶ月以上の長期間隔離飼育したところ、ほとんどの動物(24例中22例:91.7%)に精神不安定な状態(うつ様症状)が現れた。その症状は、潜隠行動の頻度が低いことを除けば、ほぼダイオキシンを摂取したうつモデルマウスと同じである。すなわち、身体に触れる軽い接触刺激に対して後肢で激しい払い除け行動を起こすか、あるいは回避行動をとる。身動きができない狭い場所では、顔面付近に接近する物体に対し噛みつき行動(対物攻撃行動)を起こす。この隔離ストレスマウスは、脳内の神経伝達物質や血液の生化学的变化から、うつモデルマウスと考えられている(Yanai and Sze, 1983; Popova and Petkov, 1990; Crepsi et al., 1992; Jaffe et al., 1993, 1998; Rasmuson et al., 1998; Laaris et al., 1999; Miura et al., 2004)。

4. 動物の刺激位置と動物の応答

上述の実験で得られたデータを基礎に、実際にマウスをチャンバー内に入れ、刺激棒で刺激して以下の調査を行った。実験には、ダイオキシン投与により作製されたうつモデルマウス、隔離飼育により作製されたうつモデルマウス、および正常な対照群マウスを用いた。

動物を過剰に刺激しないように配慮しつつケージのチャンバー内に導き、ケージを刺激装置に装着した(図5)。上述の実験結果を参考にして、加速度センサーは増幅感度7に設定し、刺激棒の上昇速度は、40mm/s, 55mm/s, 70mm/s, 85mm/sの4段階で実験を行った。実験は、動物をチャンバー内に導入してから5分以上放置し、動物がチャンバー内で落ち着いた状態になるまで待つて開始した。そして、動物の後肢レベル、前肢レベル、頭部レベル(図6)に刺激棒を上昇させ、動物の刺激棒に対する応答の様子を観察し、応答量を計測した。すべての刺激に対する応答行動はビデオ録画し、後の行動解析時に使用した。

1) 後肢レベルの刺激と動物の応答

後肢レベル(図6の1で示す位置)の刺激では、上昇した刺激棒は、マウスの後肢または腹部に触れたのち、後肢または腹部を軽く押し上げて停止する。上昇から下降の合計時間は1秒間に設定した。正常対照群マウスでは、刺激棒の接触を無視することが多かったが、時に足を持ち上げ棒から離れる行動を取ることもあった。うつモデルマウスでは、ダイオキシン投与群および隔離飼育群の両群において、刺激棒の接触を極端に嫌がり、ほとんどの刺激に対して後肢で刺激棒を払い除けようとする動作を起こしたり、全身を振るわせる行動など何らかの応答行動を起こした。払い除け行動は、身体に接触する物体を連続して数回、後肢で激しく後方に蹴る動作である。払い除け行動を起こしたマウスは、多くの場合刺激棒を直接蹴ったが、刺激棒の後方で空振りする場合もあり、その場合は、計測値は低値を示した。そこで、後述する「刺激に対する慣れ」の問題も併せて検討した結果、本実験では、10秒間隔で連続12回、2分間の刺激による計測法を採用した。後肢レベルの払い除け行動は、正常マウスにはあまり見られない行動であるが、うつ動物ではほとんどすべてに見られる特徴的な行動である。したがって、後肢レベルの刺激は、うつ動物のスクリーニングおよびうつ症状の定量的測定に使用できる可能性が示唆された。

2) 前肢レベルの刺激と動物の応答

前肢レベル(図6の2で示す位置)の刺激では、刺激棒は前肢または胸部下方からネズミに触れ、前足または胸部を軽く押し上げて停止する。正常マウスは、このレベルの刺激に対して、強く応答することはほとんどなく、刺激棒に対してまったく無関心であるか、時に前足を刺激棒から離す行動が多く見られた。これに対してうつモデルマウスでは、刺激棒の接触を激しく嫌い、逃避しようとして全身で暴れたり、刺激棒を避けてチャンバー内で向きを変えたり、また刺激棒に噛みつくなど、多様な応答行動を示した。

動物の刺激に対する応答量は、行動の取り方により大きな差が認められた。計測された行動量は、正常動物に比較して、非常に大きな数値を示したので、前肢レベルの刺激は、動物のうつ症状をス



図1：接触刺激応答計測装置（LRM）の全体像。システムは、刺激装置本体（左端）、駆動装置コントローラー兼アナログ/デジタル（A/D）コンバーター（中央）およびコンピュータ（右）から構成される。

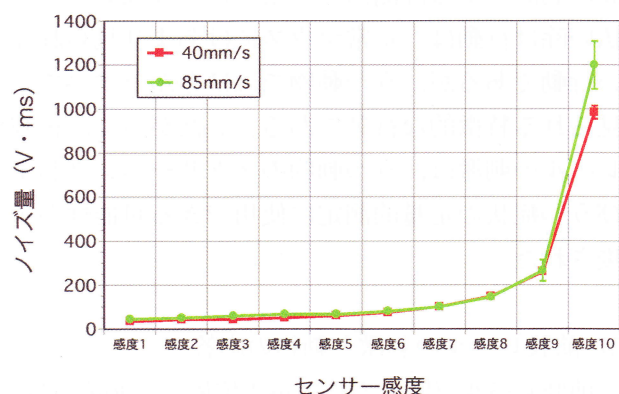


図3：刺激棒上昇速度40mm/sおよび85mm/sにおけるセンサー感度とノイズ量の関係を示す。横軸は10段階に均等に区分したセンサー感度、縦軸はノイズ量の10回試行の平均値±標準偏差値を示す。感度8までは緩やかな直線的増加を示したが、感度9と感度10では、ノイズ量が際だって増加した。

クリーニングするには優れていると考えられた。しかし、動物の応答様式により行動量にばらつきがあることから、定量化には向かない刺激であることが示唆された。

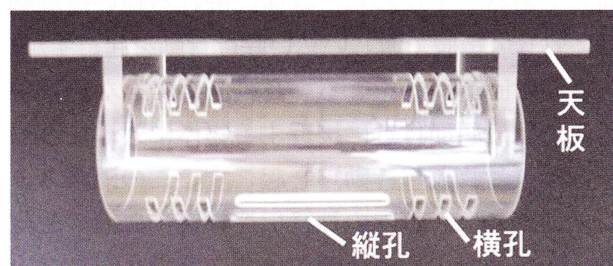


図2：動物用ケージを前面から見た写真。円筒形のチャンパーが天板に取り付けられ、天板で装置に固定される。チャンパー底には2本の縦孔と左右各3本のシャッター用横孔を設置した。

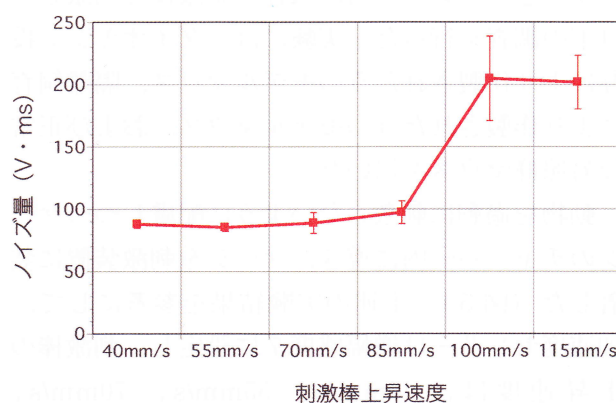


図4：刺激棒上昇速度と加速度センサーで計測されたノイズ量の大きさの関係を示す。刺激棒上昇速度85mm/s以下では、ノイズ量はほぼ一定の値を示した。100mm/s以上の上昇速度では、ノイズ量は2倍以上に増大した。

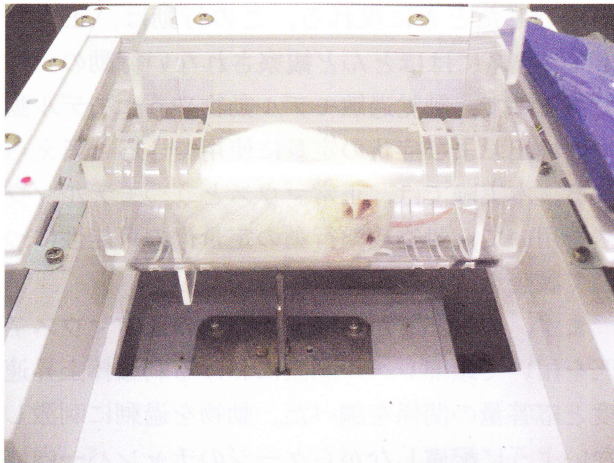


図5：マウスを動物ケージのチャンバーに入れ、ケージを刺激装置に装着した写真。画面中央やや下方に2本の刺激棒が下降した位置に見える。

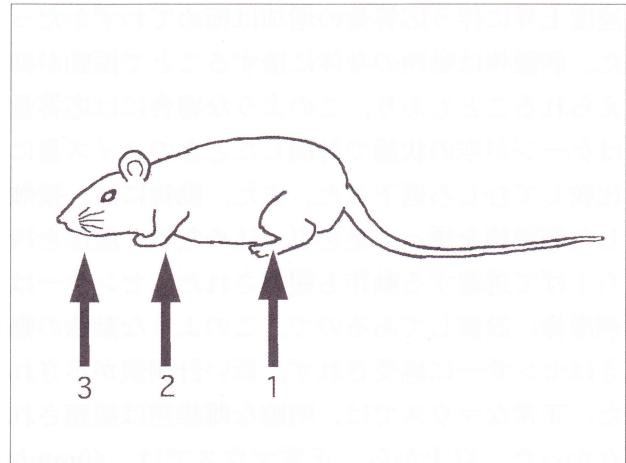


図6：マウスの刺激位置。マウスを試験的に3カ所のレベルで刺激した。1は後肢レベル、2は前肢レベル、3は頭部レベルを示す。

3) 頭部レベルの刺激と動物の応答

頭部レベル（図6の3で示す位置）の刺激は後肢レベルの刺激実験終了後直ちに開始した。このレベルの刺激では、上昇した刺激棒はマウスの下顎に触れ下から頭部を軽く押し上げるか、顔の横または前を上昇し、停止する。正常マウスでは、このように顔付近に刺激棒を上昇させた時、最初の数回は刺激棒に興味を示し軽く噛みついたり、臭いを嗅いだり、刺激棒を嫌って顔の位置を変えたり、身体の向きを変えたりするなどの行動をとることが多かった。しかし、まもなく刺激に興味を示さなくなり、刺激棒を無視することが多くなった。これに対しうつモデルマウスでは、実験の開始から実験終了まで終始上昇してくる刺激棒に対して噛みつく対物攻撃行動を取った。刺激棒に対する無関心は実験時間中（最長8分間48回）には観察されなかった。このような対物攻撃行動はうつモデルマウスに顕著に見られる行動であり、うつ動物のスクリーニングおよびうつ症状の定量化に有用な刺激である可能性が考えられた。

5. うつモデルマウスと正常マウスにおける後肢レベル接触刺激に対する応答行動の比較

刺激棒の上昇速度が極端に速いと、正常動物で

あっても、驚愕反応様の応答を起こさせる可能性がある。そこで、まず、正常動物で驚愕反応様応答を生じさせない刺激条件を調べるために、正常マウスを用いて、後肢レベル刺激における刺激棒上昇速度と応答量の関係を調査した。

体重25 g から50 g の雌雄正常マウス8匹を用いて以下の実験を行った。動物を過剰に刺激しないように配慮しながらケージのチャンバー内に動物を導き、刺激装置にケージを装着した。前述および後述の実験結果を参考に、アンプの増幅感度は7、刺激間隔は10秒、刺激棒上昇時間（各回の計測時間）は1秒間に設定した。1匹の動物につき、40mm/s、55mm/s、70mm/s、85mm/sの4段階のそれぞれで連続10回の刺激を行い、各速度ごとの刺激に対する応答量を調べた。動物の刺激に対する慣れを回避するため、実験は動物1匹につき1日に2回以内とし、各実験の間隔は3時間以上あけた。上述の実験で、100mm/sおよび115mm/sではノイズ量が大きくなることが明らかになっているので、これらの速度における実験は行わなかった（図4参照）。実験中は動物をビデオ録画し、後のデータ分析に使用した。

図7に、8匹の正常マウスの各速度ごとの応答量の平均値および標準誤差値を示した。8例とも

速度上昇に伴う応答量の増加は極めてわずかだった。刺激棒は動物の身体に接することで振動が抑えられることもあり、このような場合には応答量はケージが空の状態で計測したときのノイズ量に比較してむしろ低下した。また、動物には、接触した刺激棒を嫌って足を引っ込めたり、腹部を持ち上げて逃避する動作も観察された。センサーは刺激棒に設置してあるので、このような動物の動きはセンサーに感受されず、低い計測値が示された。正常なマウスでは、明瞭な雌雄差は観察されなかった。以上から、正常マウスでは、40mm/sから85mm/sの範囲の刺激棒速度では、驚愕応答は出現しないと結論できた。

同様の実験をうつモデルマウスでも行い、刺激棒速度と応答量の関係を調べ、正常動物と比較した。実験には、うつ症状が強い体重25 gから50 gの雌雄のマウス10匹を使用した。図7にうつモデルマウスにおける刺激棒速度と応答量の関係を示した。低速（40mm/sおよび55mm/s）の刺激でも、うつモデルマウスは正常マウスに比較して明らかに大きな応答を示したが、さらに高速の刺激（70mm/sと85mm/s）では、正常マウスの平均値の2倍から2.5倍の応答量が観察された。これは、うつモデルマウスが刺激棒に対して後肢で払い除け行動を起こしたことが数値化された結果である。以上のことから、うつモデルマウスは、正常マウスとは異なり、より高速の刺激に対し過敏に応答行動を起こすことが明らかとなった。うつモデルマウスは、刺激に対する個体差が大きいことも明らかとなった。以上から、後肢レベルの刺激による払い除け行動を計測することにより、うつ症状を持つ動物をスクリーニングしたり、そのうつ状態を定量することが可能であると考えられた。

6. うつモデルマウスと正常マウスにおける頭部レベルの刺激に対する応答行動（対物攻撃行動）の比較

対物攻撃行動は、顔面付近に近づいてきた物体に激しく噛みつく行動である。回避行動がとれない狭い空間に置かれた動物の顔面付近に刺激物体

が接近したときに現れる。この行動は、正常なddYマウスにはほとんど観察されない行動の一つであるので、触覚過敏モデル動物やうつモデル動物の検出および症状の定量に使用できると考えられる。本実験では、正常マウスとうつモデルマウスを用いて、対物攻撃行動の定量化の可能性について調査を行った。

まず、体重25 gから50 gの雌雄の正常マウス7匹を用いて頭部レベル刺激における刺激棒上昇速度と応答量の関係を調べた。動物を過剰に刺激しないように配慮しながらケージのチャンバー内に導き、刺激装置にケージを装着した。前述の実験結果を参考に、増幅感度は7、刺激間隔は10秒、刺激棒上昇時間は毎回1秒間に設定した。1匹の動物につき連続10回、顔付近に刺激棒の提示を行い、対物攻撃行動を記録した。刺激棒の上昇速度は、40mm/s、55mm/s、70mm/s、85mm/sの4段階で、各速度ごとの刺激に対する応答量を調べた。動物の刺激に対する慣れを回避するため、実験は一日に1回、1速度のみとした。すべての実験をビデオ録画し、後のデータ分析に使用した。上の実験で、100mm/sおよび115mm/sではノイズ量が大きくなることが明らかになっているので、これらの速度における実験は行わなかった（図4参照）。

前述した通り、正常マウスはほとんど対物攻撃行動を起こさないが、最初の数回の試行では、刺激棒に興味を示し、臭いを嗅いだり、軽く噛むなどの行動を示す例も見られた。そのため、刺激棒上昇に伴う振動量と比較してわずかに大きな応答量が記録されたが、その数値は小さかった。この場合の噛む行動は探索行動の一つと考えられ、攻撃的な噛みつき行動とは明らかに異なるものと考えられた。

次に、うつモデルマウスを使用し、同様の実験を行い、刺激棒上昇速度と応答量の関係を調べた。うつモデルマウスは、体重25 gから50 gの雌雄のマウス7匹を用いた。前述した通り、頭部レベル（顔面付近）に刺激棒を上昇させるとうつモデルマウスは激しく刺激棒に噛みつき対物攻撃行動を

取った。動物は刺激棒に噛みつき、時に激しく刺激棒を前後左右に揺さぶることもあった。図8に、刺激棒をマウスの頭部付近に接近させた際の、正常マウスとうつモデルマウスの対物攻撃行動の応答量の平均値と標準誤差値を示した。うつモデルマウスは、正常動物に比較し、攻撃行動の応答量が大きいことが明瞭である。したがって、顔面レベルの刺激による応答行動量を計測することにより、うつ動物のスクリーニングが可能であり、うつの症状を定量化することが可能であると考えられた。

図7

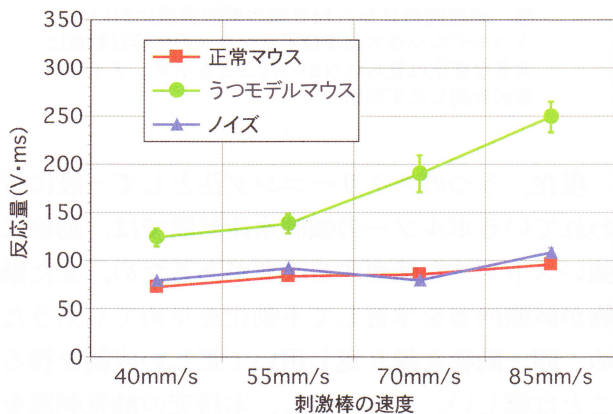


図7：正常マウスとうつモデルマウスにおける後肢レベル刺激時の刺激棒速度と応答量の関係を示す。正常マウス8例とうつモデルマウス10例の計測値の平均値±標準誤差を示した。正常マウスは、刺激棒の速度の如何に関わらず応答量は小さく、その平均は100V・msを超えない。また、うつモデルマウスでは、刺激棒の駆動速度が速くなると著しく応答量が増大したことを示す。どの速度でも、両者の応答量に有意差があるが、特に70mm/sおよび85mm/sでは大きな差が認められた。正常マウスの応答量はノイズ量とほとんど差が存在しない。

7. 刺激に対する慣れ

触覚刺激に対して過敏に反応する動物も、刺激が長時間に及んだ場合は、刺激に対して慣れが生じ、応答量が変化する可能性が考えられる。そこで、うつモデルマウスを用い、長時間刺激に対する応答量の変化を計測して動物の刺激に対する順応性を調べた。実験には体重25gから50gの雌雄のうつモデルマウス10匹を用い、後肢レベルの刺激を行い、払い除け行動に対する順応を調査した。

図8

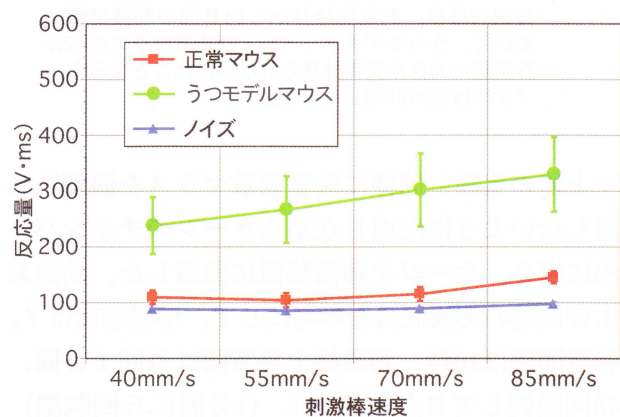


図8：正常マウスとうつモデルマウスにおける顔面付近への刺激棒提示時における刺激棒速度と対物攻撃行動応答量の関係。うつモデルマウスの応答行動量は、正常マウスに比較して著しく大きいことを示す。また、正常マウスの刺激では、動物がほとんど応答を示さないため、応答行動量が機械自体のノイズとほとんど差が現れなかったことを示す。

図9

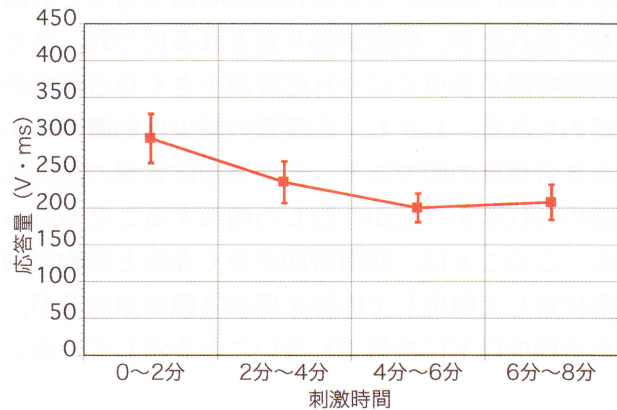


図9：うつモデルマウスの後肢レベル刺激時における刺激時間および刺激回数と払い除け行動の応答量の関係を示す。払い除け行動は、計測開始から2分以内、刺激回数12回以内の刺激においてもっとも強く、その後減少する傾向が見られたことを示す。

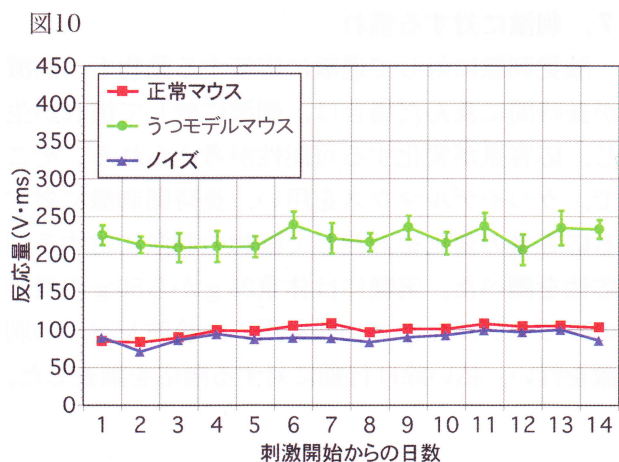


図10：うつモデルマウスと正常マウスにおける後肢レベル刺激時における応答行動（払い除け行動）量の長期的推移。刺激開始日から14日間の刺激実験において、うつモデルマウスおよび正常マウスの応答行動量に大きな変化は見られなかったことを示す。ノイズは数回計測した平均値。

上述の実験と同様に触覚過敏マウスを過剰に刺激しないように配慮しながらケージのチャンバー内に導き、ケージを刺激装置に装着した。前述および後述の実験成績を参考にして、増幅感度は7、刺激間隔は10秒、刺激棒上昇時間は毎回1秒間、48回連続して8分間刺激し（1分間に6回刺激）記録を行った。刺激棒の上昇速度は、前の実験結果に従い、85mm/sとした。すべての実験をビデオ録画し、後のデータ分析に使用した。

図9にうつモデルマウスにおける後肢レベル刺激時の刺激時間と応答量の関係を示した。動物の応答量は、最初の2分間12回の刺激でもっとも顕著に表れたが、刺激が繰り返されるにつれ、また刺激時間が長引くにつれ応答が小さくなる傾向が認められた。しかし、応答量の減少は刺激開始から5分程度の間であり、その後の応答量の減少は認められなかったか、むしろ増大することもあった。このことは、刺激時間が長くなると動物が刺激に対して順応して応答を弱める傾向があるが、ある程度以下には低下しないことを示している。

8. 計測時のストレスによる新たなうつ発症またはうつ重症化の有無および応答行動計測値の再現性

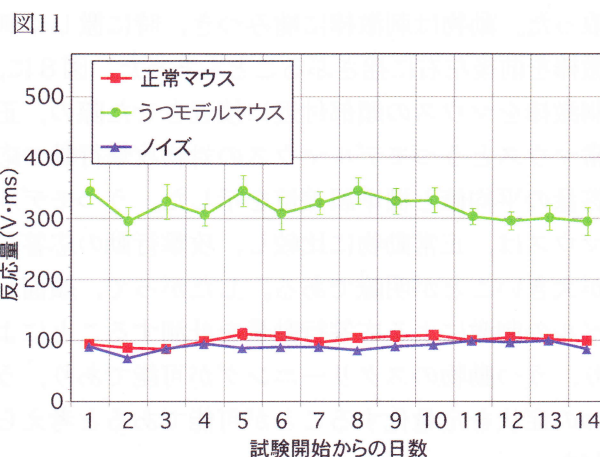


図11：うつモデルマウスと正常マウスにおける顔面部刺激時における応答行動（攻撃行動）量の長期的推移。刺激開始日から14日間の刺激実験において、うつモデルマウスおよび正常マウスの応答行動量に大きな変化は見られなかったことを示す。ノイズは数回計測した平均値。

現在、うつのスクリーニング法として一般に行われているポルソーの強制水泳試験では、動物に強いストレスを強要する必要があるため、また動物が試験内容を学習して不動化を早めてしまうため、同一動物を繰り返し用いて正しい成績を得ることは難しい。これに対し、本研究の触覚刺激を用いる試験は、ストレスが軽微であるので、同一動物を使用した反復試験が可能であると考えられる。本実験では、このことを証明するために、繰り返し行われる試験によって動物に新たなうつが発症したり、あるいは、すでに発症しているうつ症状が悪化することがないか、同一動物を用いた長期間の反復試験を行って検証した。

本実験には隔離飼育により作製したうつモデルマウス18匹と正常マウス9匹を使用し、後肢レベル刺激による払い除け行動量の大きさと、顔面レベル刺激による対物攻撃行動量の大きさの両方について計測を行った。ダイオキシシン投与によるうつモデルマウスは長期間の飼育期間中に症状が回復する可能性があるため、本実験には使用しなかった。本実験では、他の実験と同様に、増幅感度は7、刺激間隔は10秒、刺激棒上昇時間は毎回1秒間、刺激棒の上昇速度は85mm/s、刺激回数は12回、刺激時間は2分に設定した。計測は1日に1

回、原則として毎日、14日間連続して、ほぼ同一の時刻に計測を行った。14日を経過した後も、数日間隔で計測を実施し、延べ1ヶ月以上、計測値の推移を追跡した。すべての刺激実験をビデオ録画し、後のデータ解析に使用した。

うつモデルマウスおよび正常マウスの後肢レベル刺激による応答行動（払い除け行動）の平均値と標準誤差の14日間推移を図10に示した。うつモデルマウスおよび正常マウスのいずれにおいても、14日間の継続計測において、払い除け行動の応答量に顕著な一方向性の増減は認められなかった。14日以後1ヶ月以上に渡る断続的計測においても、両動物群の計測値に有意な変化が現れなかった（データは示していない）。このことは、本試験で用いた後肢レベルの刺激条件では、うつモデル動物のうつ症状を悪化させることはなく、また正常動物に新たなうつ症状を発症させることがないことを示唆している。

また、顔面レベルの刺激棒接近に対する対物攻撃行動を計測する試験においても、両動物群において実験開始から14日間、応答行動量の平均値は一方向性に顕著な増大も減少もせず、ほぼ一定の数値が継続した（図11）。後肢レベルの刺激実験と同様に、14日以後1ヶ月以上におよぶ断続的試験においても、計測値に有意な変化は認められなかった。このことから、本機器による顔面レベル刺激による長期間の計測では、動物に新たなうつが発症したり、すでに存在するうつ症状が悪化したりすることはないと考えられた。

以上のことは、同一動物のうつ症状を長期間に渡り追跡することに本法が適していることを示している。抗うつ薬の動物試験では、投薬後の動物のうつ症状の推移を同一動物で追跡することが望ましい。本機器を使用した方法は、この点で従来法とは比較にならないほど優れている。異なる動物で比較せざるを得なかったこれまでの方法に比較すると、本法による同一動物の反復試験では、格段に信憑性の高いデータを得ることができると考えられる。

また、行動が正しく定量されているかどうかは、

同一個体に与えた同一刺激に対し毎回ほぼ一定の応答量が得られるかどうか、すなわち同一条件で同一状態の動物を計測した場合に再現性の高い計測値が得られるかどうかを調査することにより判断できると考えられる。上の実験では、実験開始から2週間以上にわたる長期の連続計測において大きな変化が現れないことが示された。このことは、ほぼ正確に動物の応答量を検出していることを示唆している。実験データの再現性が高いことは、動物の応答行動量を定量する上で極めて重要なことであり、本機器を用いた本法による計測は、刺激に対する応答量を定量化するのに信頼があることを示している。

9. 接触刺激応答試験における雌雄差

雌マウスは性周期に応じて行動に変化が現れることがあるので、雌動物を行動学的研究に使用するには注意が必要であるが、本研究における雌雄比較では、応答行動量にはまったく差が見られなかった。また雌動物に周期的行動量変化が存在するかどうか分析を行ったが、その存在を示す明瞭なデータは得られなかった（データは示していない）。以上から、接触刺激に対する応答行動は、性差や性周期に影響を受けないと考えられた。

考察

本研究で使用したうつモデルマウスは、軽い接触刺激に対して過敏な応答行動を起こし、顔面付近に接近する物体に対し攻撃行動を起こす。前述したとおり、自由に動き回ることができる広いケージ内に入れたうつモデルマウスの脇腹をプラスチック棒で軽く接触しようとする、動物は刺激を嫌がって、その場から逃げるか（回避行動）、棒を後肢で連続して数回激しく蹴って取り払おうとする（払い除け行動）。さらにしつこく脇腹に触れようとする、ダイオキシンを摂取したうつモデル動物では、回避行動の後に床敷（木くず）の中に潜り身を隠す（潜隠行動）。回避行動がとれない狭い空間に動物を拘束し、顔面付近に刺激棒を接近させると、動物は刺激棒に対し噛みつき行動

(対物攻撃行動)を起こす。これらの行動は、正常なマウスにおける出現頻度は低いので、うつモデルマウスに特徴的な行動であると言える。本研究では、これらの行動に着目し、軽い接触刺激に対する動物の行動量を計測し、うつ動物のスクリーニング、およびうつ症状の定量化の方法を検討した。

本研究で作製した機器では、刺激棒基部に加速度センサーを取り付け、動物の応答行動量の計測を行った。本機では、加速度センサーを刺激棒に連動させたため、刺激棒の駆動振動をノイズとして検出することを免れ得ない。そこで、本研究では、ノイズ量を小さくする条件を探ることにし、そのための動作試験を行った。実験の結果、アンプの増幅感度は7、駆動速度は85mm/s以下で、ノイズ量を軽減できることが明らかとなった。動物をチャンバーに導入していない空の状態では、このノイズ量はすべての刺激においてほぼ一定であるので、刺激に対する応答量を動物間で比較する際には大きな障害にはならない。あらかじめノイズ量を計測し、動物刺激の実測値からノイズ量を差し引いて評価する方法も考えられるが、実際には、動物が刺激棒を押さえこむなどしてノイズを吸収することもあり、また刺激棒の停止前(ノイズ発生中)に棒を蹴ることも多いので単純に実測値からノイズを差し引くことはできないと考えられた。今後、動物の刺激に対する応答行動以外の動きを除外し得るフィルターを装備するなど、ノイズを完全に除去できる機器の開発が必要である。

本機器では、動物の温痛覚を刺激することがない。動物は強い温痛覚刺激を与えられると、逃避反射(屈曲反射)を起こし、刺激から逃れようとする。逃避反射は脊髄が関係する反射であるので、温痛覚を刺激してしまうと、脊髄に起始する反射的応答が現れる可能性が出る。これに対し軽い接触刺激は、大脳新皮質の意志に基づく判断に依存する行動である。軽い触覚刺激は、大脳に伝えられて分析され、刺激に対して何らかの行動を取るか否かが判断されるのであり、反射による行動と

は異なる。すなわち、触覚刺激に対する応答行動は、大脳皮質の精神活動を反映する行動である。

動物は、与えられた刺激を「嫌だ」と感じれば刺激から回避する行動(払い除け行動、対物攻撃行動、回避行動、潜隠行動など)を起こすし、「どうでもよい」と感じれば、特に行動を起こさずにじっとしている。本研究で用いた正常マウスのように精神的苛立ちを持たない動物は、軽い接触刺激に対しては無関心であることが多い。これに対し、うつモデルマウスのように情動中枢(辺縁系)に精神的不安定要素を持つ動物では、軽い接触刺激に対して過敏に応答行動を起こす。正常動物にとっては「無視できる程度の些細な刺激」であっても、うつモデルマウスには「我慢できない嫌な刺激」に感じられるのだろう。

「我慢できない」という衝動は、辺縁系が支配する精神活動である。触覚過敏モデル動物およびうつモデル動物では、軽い接触刺激または接近する物体に対して低い閾値で辺縁系が賦活されると考えられる。それが大脳新皮質に影響を与え、刺激から回避する行動を起こすか、または刺激に対して攻撃行動を起こすか、あるいは刺激を無視するか、それらの判断が下されるものと考えられる。すなわち、軽いこれらの機械的刺激を用いることにより、精神的苛立ちをもつ動物を検出することが可能である。

うつモデル動物の脳は、隔離ストレス動物(ラットまたはマウス)においてよく調べられており、以下のような報告がある。(1) 前頭前野、側坐核、海馬において、*in vitro*でセロトニンの自発放出が減少する(Jaffe et al., 1993)。(2) 前頭前野、側坐核、海馬において、*in vivo*で、塩化カリウム誘導性セロトニン(5-HT)放出が増加する(Crepsi et al., 1992; Jaff, 1998)。(3) 縫線核では、ストレスによって誘発される5-HT_{1A}受容体の活性が低下する(Laaris et al., 1999)。(4) 中脳ではトリプトファン水酸化酵素活性の低下が観察される(Yanai and Sze, 1983)。(5) 海馬と視床下部における5-HT₁受容体が減少する(Popova and Petkov, 1990)。(6) 海馬背側部

における5-TH_{1A} mRNAレベルが低下し、CA1における5-TH_{1A}受容体量が減少する (Rasmuson et al., 1998)。(8) 海馬, 前頭前野, 中脳では, セロトニン合成とドパミン合成の共通の補酵素であるテトラヒドロビオプテリン (BH₄) のレベルが上昇する (Miura et al., 2004)。これらの報告から, 隔離飼育により少なくとも脳内セロトニン系およびドパミン系に病変が現れることは明らかであり, これがうつの病理学的機序の一つであると考えられている。

ヒトでは, 自殺したうつ病患者において, 前頭前野腹外側部におけるセロトニンシステム異常 (Arango et al., 1995), 青斑核における α_2 受容体異常 (Ordway et al., 1994), 縫線核における5-TH_{1A}受容体異常 (Biver et al., 1997) が報告されている。また, うつ病患者では, 前頭眼窩野前部の皮質の厚さの減少, 細胞密度の低下, 細胞の小型化が観察されている (Rajkowska et al., 1999; Stockmeier et al., 2002)。したがって, ヒトでも同様の病理学的発症機序が存在するものと考えられる。

現在, 行動学的にうつ動物をスクリーニングする方法としては, 強制水泳などのストレス試験を行い, うつ症状をもつ動物を検出する方法が広く使われている (Porsolt et al., 1977)。この強制水泳試験では, 水を張ったシリンダー瓶 (標本瓶) 中で動物を強制的に泳がせ, 泳ぎを止めるまでの時間, 水泳休止 (不動) 時間, 水泳距離などを計測し, うつ動物に特徴的な無気力状態を検出する。この試験では, 強いストレスを実験動物に強要しなければならないので, 試験そのものによりうつ症状が悪化したり, 正常動物に新たにうつ症状を発症させる可能性がある。また, 動物の学習の問題も存在するので, この方法によって同一動物を何度も試験することは不可能である。

うつ動物の攻撃性を調査する方法としては, resident-intruder testが広く用いられている。ホームケージによそ者のネズミを入れた時にintruderに対して起こす攻撃行動の頻度と回数を計測する方法であり, 攻撃行動を評価するのに使

われている。この方法は, 「自分の住環境に入り込んだよそ者を排除するために攻撃を加えようとする精神的衝動」を調べる方法 (攻撃行動試験) である。これに対し, 我々が用いた方法は, 「顔面付近に接近する煩わしい物体に噛みついて撃退しようとする精神的衝動」, すなわち, 物体に対する攻撃行動を数値化しようとする方法である。両者は共に攻撃行動と表現されるが, 他の動物に対する攻撃と, 物体に対する攻撃は, 明確に区別されなければならない。すなわち, 両攻撃行動は, 同一の精神的機序で起こる行動ではない。したがって, このことを明確にするために, 将来的には同一うつ動物を用いて両方法を比較する必要がある。

自発行動や社会行動性を観察することによりうつ症状を探る行動学的手法も行われている。高架式十字迷路や明暗箱などを用いて不安行動の増加を検出したり, オープンフィールドにおける立ち上がり行動の回数と総移動距離の増加, および動物間相互の接触行動などを検出する方法である。しかし, 上述の不安行動はうつ以外の心的要因に影響を受ける行動であるので, これらの行動指標だけでうつ動物をスクリーニングすることはできない。隔離によるうつモデル動物に抗うつ薬を投与した実験では, 立ち上がり回数は減少するが, 総移動距離には変化がみられなかったと報告されている (Miura et al., 2004)。このことは, 少なくとも総移動距離は他の心的要因により修飾される行動であることを意味している。すなわち, 総移動距離は, うつ症状の指標として相応しいかどうかは疑問である。

本研究で用いたうつ動物の接触刺激に対する過敏な「払い除け行動」については, これまで報告がない。今回用いた隔離ストレスによるうつモデルマウスと薬物 (ダイオキシシン) によるうつモデルマウスの両者にまったく同じ行動が観察されたことから, 払い除け行動の増加は, うつ症状の一つであると推察することができる。

払い除け行動は後肢による非常に素早い運動であり, 肉眼的に刺激棒を蹴った回数を数えることは不可能である。しかし, 我々が今回用いた方法

では、加速度センサーが動物の払い除け行動をとらえ、コンピュータ解析され、グラフ化される。したがって、グラフの波形を読み取ることにより、蹴った回数をカウントすることも可能であり、蹴りの強さも同時に計測でき、うつ行動指標の一つとして実用化することができる。すなわち、本研究で作製した装置は、払い除け行動を正しく定量化できる可能性を示唆している。今後の機器の機能整備により、的確にうつ症状を定量できるものと考えられる。

まとめ

今回の研究は、軽い機械的刺激を動物に与えることによって動物の辺縁系を刺激し、それによって引き出される情動行動（応答行動量）を物理的に計測する試みである。他の方法に比較すると非常に簡便であり、かつ正確な方法である。刺激自体には全く侵害性はなく、何度でも同一動物を試験することが可能である点にこれまでの方法にない優位性がある。本研究では、うつモデルマウスの応答量と正常マウスの応答量の間に、明確な差を検出することができた。したがって、本機器は、うつモデルマウスのスクリーニング、およびうつ症状の定量に有効な研究機器であると結論することができる。さらに、同一動物を連続して14日間刺激を行った実験では、実験期間中に症状の悪化や新たなうつ発症の兆候は観察されず、毎日ほぼ一定の測定値が計測された。このことは、本実験で用いた刺激方法が動物のうつ症状に影響を与えないことを示しており、しかも、この機器を用いて得られた応答量の数値はかなり再現性が高いことを示している。このことは、抗うつ薬の動物実験などでは非常に重要な利点である。うつ症状を定量化することにより、うつ症状の改善状態を時間経過と共に示すことが可能となるからである。このようなデータを有効に得る研究方法および研究機器は現在のところ報告されていない。本研究法は、我々が提供する本機器が初めて可能にする研究手法である。

謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金（基盤研究（C）：研究課題番号15510062および16510040）を使用して行った。

引用文献

- Arango, V., Underwood, M. D., Gubbi, A. V. and Mann, J. J., 1995. Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Research*, 688: 121-133.
- Biver, F., Wikler, D., Lotstra, F., Damhaut, P., Goldman, S. and Mendlewicz, J., 1997. Serotonin 5-HT₂ receptor imaging in major depression: focal changes in orbito-insular cortex. *British Journal of Psychiatry*, 171: 444-448.
- Crepes, F., Wright, L.K. and Mobius, C., 1992. Isolation rearing of rats alters release of 5-hydroxytryptamine and dopamine in the frontal cortex: an in vivo electrochemical study. *Experimental Brain Research*, 88: 495-501.
- Jaffe, E.H., De Frias, V. and Ibara, C., 1993. Changes in basal and stimulated release of endogenous serotonin from different nuclei of rats subjected to two models of depression. *Neuroscience Letters*, 162: 157-160.
- Jaffe, E.H., 1998. Ca²⁺ dependency of serotonin and dopamine release from CNS slices of chronically isolated rats. *Psychopharmacology*, 139: 255-260.
- Kuchiwa, S., Cheng, S.-B., Nagatomo, I., Akasaki, Y., Uchida, M., Tominaga, M., Hashiguchi, W., Kuchiwa, T., 2002. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin decreases serotonin immunoreactive neurons in raphe nuclei of male mouse offspring. *Neuroscience Letters*, 317, 73-76.
- 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年, ダイオキシン胎盤・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― 鹿兒島純心女子大学人間科学研究科紀要, 3: 17-26.
- Laaris, N., Le Poul, E., Laporte, A.M., Hamon, M. and Lanfumey, L., 1999. Differential effects of stress on presynaptic and postsynaptic 5-hydroxytryptamine-1A receptors in the rat brain: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience*, 91: 947-958.
- Miura, H., Qiao, H., Kigagami, T., Ohta, T., 2004. Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, suppresses tetrahydrobiopterin in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology*, 46: 3400-348.
- Miura, H., Qiao, H., Kitagami, T., Ohta, T., Ozaki, N., 2005. Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, suppresses tetrahydrobiopterin levels and dopamine as well as serotonin turnover in the mesoprefrontal system of mice. *Psychopharmacology*, 177: 307-314.
- Ordway, G. A., Widdowson, P. S., Smith, K. S. and Halaris, A., 1994. Agonist binding to α_2 -adrenoceptors is elevated in the locus coeruleus from victims of suicide. *Journal of Neurochemistry*, 63: 617-624.
- Popova, J.S. and Petkov, V.V., 1990. Changes in 5-HT₁ receptors in different brain structures of rats with isolation syndrome. *General Pharmacology*, 21: 223-225.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M. and Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266: 730-732.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J. J., Wei, J., Dilley, G.,

- Pittman, S. D., Meltzer, H. Y., Overholser, J.C., Roth, B. L. and Stockmeier, C. A., 1999. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biological Psychiatry*, 45: 1085-1098.
- Rasmuson, S., Olsson, T., Henriksson, B.G., Kelly, P.A.T., Holmes, M.C., Seckl, J.R. and Mohammed, A.H., 1998. Environment enrichment selectively increases 5-HT_{1A} receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 53 : 285-290.
- Stockmeier, C. A., Shi, X., Konick, L., Overholser, J. C., Jurjus, G., Meltzer, H. Y., Friedman, L., Blier, P. and Rajkowska, G., 2002. Neurokinin-1 receptors are decreased in major depressive disorder. *Neuroreport*, 13: 1223-1227.
- Yanai, J. and Sze, P.Y., 1983. Isolation reduces midbrain tryptophan hydroxylase activity in mice. *Psychopharmacology*, 80 : 284-285.

Abstract

We observed that the depressed mice showed characteristic behaviors against mechanical soft stimuli. That is, when the depressed mice were touched on their abdomen or hind paws with a stick, they often kick them away with their hind paws. When they were touched on their jaw with a stick or when an object came close to their face they often bit them aggressively. In the present study we made a new research apparatus that could measure the response behaviors to these mechanical stimuli. This apparatus is able to estimate the degree of kicking away behavior and the aggressive biting behavior with an acceleration meter attached to the stimulation sticks. In the present study we tested two types of depressed model mice. One was made by perinatal exposures of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, and the other was made by a procedure of a long-term isolation housing. The measuring tests revealed that the response levels in both depressed model mice were much higher than those of the normal control mice in both stimulation procedures. The increased responses of the kicking away behavior and the aggressive biting behavior were thought to be kinds of the depressive symptoms. Therefore, it is considered that the depressed animals can be screened and the degree of the depressive-like symptoms can be estimated semi-quantitatively in this mechanical stimulating method. We certified that the method used in this study never gave hard stress to the mice and never facilitated the depressive symptoms, so we can measure the same mice repeatedly for a long term. These new behavioral methods are worth to test antidepressants in estimating their effects on laboratory animals.

KeyWords : depression, behavioral test, quantitative analysis, dioxin, responses to mechanical stimulation