

多種行動テスト法を用いたマウス個体差の評価法の構築

甲斐 裕基

現代社会はストレス社会と呼ばれており、ストレス負荷に由来するさまざまな問題を抱える人が多いが、全ての人に問題が生じるわけではない。ストレス刺激への反応には、Lazarus and Folkman (1984)の心理的ストレスモデルにおいても考えられているように個人差がある。強いストレス刺激を受けても、それを克服するためにさまざまな行動を行う人もいれば、何もできなくなり無気力になる人もいる。ストレス反応における個人差の生物基盤にはまだまだ不明な点が多い。一方で、多種の行動テストを組み合わせたテストバッテリーによって、マウスの異なる系統間や遺伝子改変動物の行動特性の相違が研究されてきた。つまり、行動への遺伝的寄与が明らかとなりつつある。先行研究では、血縁係数がほぼ 100%であり遺伝的にほぼ等しいと考えられている同一の近交系系統(以後、単一系統と呼ぶ。)のマウス個体群では個体差が生じないか、もしくは、ほぼ無視できると考えられてきた。また、そのような個体差があっても何らかのスクリーニングで排除したり、サンプル数を増やしたりすることで統計的検出力を上げる方法が用いられてきた。しかしながら、同一の遺伝的背景を持っているマウスにおいても養育行動を受けた程度の違いが成長後のストレス応答に違いをもたらすことが示唆されている。つまり、遺伝的な相違だけでは個体差の生物基盤を説明できない。また、近年では、そのような単一系統マウスの個体間であっても学習行動には個体差があることが示唆された(Igata et al., 2016; 加田, 2016)。それゆえに、単一系統マウスの個体間でのストレス応答の相違を評価することが必要であると考えられる。そこで、本研究では、さまざまなストレス負荷を伴う複数の行動試験を代表的な近交系である C57BL/6J 系統マウスの個体群(n = 25)に呈示し、それぞれの行動試験で計測した指標の間での相関性を吟味した。その解析によって、単一系統マウス個体群においてどのような個体差があるのか、どのような行動指標に着目すれば単一系統マウス個体群におけるストレス応答特性を分別できるのかを調べた。本研究では、以下の 7 種類の行動試験を行った。

第 2 章では、明暗箱試験を調べた。夜行性であるマウスを初めて明箱に置くと、その明るい場所から回避する動機づけと、新奇環境(明箱)への探索動機づけが拮抗しつつ生じると考えられている。これは接近-回避コンフリクト(Aupperle et al., 2015)の一つである。明箱滞在時間、暗箱滞在時間、明暗境界滞在時間、明暗箱間移動回数、明箱における探索行動を測定した。また、同試験を連続 3 日間行い、各計測パラメータへの馴化による効果をみた。その結果、明箱、暗箱及びその境界における滞在時間の分布は正規分布に従わず、それらには個体差がみられた。また、明暗境界滞在時間および明暗箱間移動回数が馴化に伴って変動していく過程には個体間において有意な相違がみられた。

第 3 章での尾懸垂試験は、マウスの尾を固定して一定時間吊り下げ、その間に生じる体動を計測するテストであり、その不動時間は抗うつ薬の効果検証に広く用いられている。不動・動時間のそれぞれの長さ、および動・不動という状態遷移の回数を調べた。動時間の総計によって群分けしたところ、短い群では計測時間の後半では、動時間は顕著に低下したが、長い群でその長さはほぼ維持されていた。

第 4 章でのマイルドフットショック試験では、実験動物をチャンバー(箱)内に置き、ランダムなタイミングで床の金属グリッドから弱い電撃ショック刺激を繰り返し呈示しつつ、行動反応を計測した。特に、グルーミング行動に着目した。グルーミング行動は通常状態では頭部から体幹・尾までを毛づくろいするという一連の行動連鎖が生じる。一方、ストレス負荷条件ではその連鎖は途中で停止してしまい、それはストレス誘導性自己グルーミングと呼ばれている(Song et al., 2016)。本試験では、このストレス誘導性グルーミングが頻発する特徴的なグルーミング行動の群発(グルーミングバースト)が生起するまでの時間(潜時)の

度数分布を調べたところ、その分布は二峰性様となり、かつ、潜時には大きな個体差がみられた。

第 5 章での味覚嫌悪学習試験では、サッカリン溶液(条件味刺激)をマウスに摂取させた後、塩化リチウム溶液の腹腔内投与を対呈示して、サッカリンへの味覚嫌悪記憶を形成させた。給水制限下における飲水動機づけと、味覚嫌悪記憶に基づくサッカリン忌避という拮抗した動機づけによるコンフリクト条件下で、マウスのサッカリン摂取行動の時間構造をリック(ペロペロ舐め)試験で調べた。記憶保持指数における分散は大きく、そして、最も長いリック持続を示すまでの潜時は二峰性様分布を示した。

第 6 章での新奇性食欲低下試験は、新奇な環境に動物を置くと摂食量が減少するので、その減少度を不安傾向として評価するものである(Zheng et al., 2008)。しかしながら、試験方法は未だ確立されていないので、本研究では通常飼料を用いながら、給餌器の有無といった基本的な実験条件についても調べた。その結果、給餌器の有無に関係なく、新奇環境下では通常飼料の摂取量は減少し、特に、給餌器不使用群での摂取量減少度は、正規分布に従わず、個体差がみられた。

第 7 章では、食物新奇性恐怖試験および D-セリン投与試験を行った。動物に新奇な食物を呈示すると、その摂取を控える。この現象は食物新奇性恐怖と呼ばれている。そこで、マウスに新奇な高脂肪食を呈示したところ、その摂取は通常飼料の摂取量の基準レベルよりも有意に減少した。その高脂肪食の反復呈示後にその摂取が増える食物新奇性恐怖の減弱の程度を調べたところ、個体毎での程度は正規分布せず、個体差がみられた。D-セリンをマウスに腹腔内投与すると高脂肪食の摂取量が減少し、その減少度には個体差がある(Sasaki et al., 2017)。そこで、上記の高脂肪食への馴化後に各マウスに D-セリンを投与したが、各個体の摂食量は著しく低下し、床効果のため、その減少度には個体差はみられなかった。

第 8 章では、前章までの各試験で得られた行動データ指標の間における相関性を分析した。異なる試験における指数間の個々の相関係数を吟味したところ、2 つの指数間の幾つかの組み合わせにおいて有意な相関がみられた。加えて、異なる試験での 3 つの指数がそれぞれ有意に相関する関係性を見出した。すなわち、明暗箱試験における明暗境界滞在時間、マイルドフットショック試験における特徴的なグルーミング行動(グルーミングバースト)が生起するまでの潜時、および味覚嫌悪学習試験における記憶保持指数の 3 つの指数間であった。この 3 項相関性は、接近一回避コンフリクトを処理できる度合い、すなわち葛藤処理能力の高低に相応すると考えた。そこで、それらの 3 指数において全てのマウスを高応答群と低応答群に二分する操作をその 3 つ指数にて行い、全てが高・低応答のいずれかに分類された個体をそれぞれ高応答群($n = 7$)と低応答群($n = 8$)とした。両群に属するマウス個体のみに着目して、全ての行動試験における全指標を群間比較したところ、高応答群と低応答群の間には、それらの 3 つの指数のみならず、明暗箱試験における暗箱滞在時間と、味覚嫌悪学習試験における最大リッキングバースト内リック数の 2 つの指数においても有意差が見られた。

本研究の結果から、従来は個体差を無視できると考えられてきた単一系統マウス個体群であっても、個々のマウス個体をさまざまな行動試験から比較すると、ストレス応答における接近一回避コンフリクト状況下での行動反応には個体差があると示唆された。本研究で見出した 3 項相関性を用いると、ストレス負荷時における接近一回避コンフリクト状態での葛藤処理能力が有意に異なる個体を選別できることが示唆された。さらに、不安傾向の程度によって、接近と回避のいずれかに行動が方向づけられる可能性が示唆された。ヒトにおけるストレス反応への個人差を生み出す生物基盤においては、さまざまな要因が多重に、しかも、複雑な相関を持ちながら相互作用していると考えられる。本研究で示されたマウスでの個体差の計測・分析法を発展させれば、ヒトの個人差の生物基盤の理解に資する情報が得られると期待される。(行動生理学)