

早稲田大学審査学位論文(博士)

博士(人間科学)学位論文

ボンペシン様神経ペプチドの行動調節機能  
に関する研究

1999年7月

早稲田大学大学院人間科学研究科

山田 一之

①

博士（人間科学）学位論文

ボンベシン様神経ペプチドの行動調節機能  
に関する研究

1999年7月

早稲田大学大学院人間科学研究科

山田 一之

目次	P. 1
第1章 序論	
1. 遺伝子組換え動物を用いた行動研究の意義	P. 6
2. ボンベシンおよびボンベシン様神経ペプチドについて	P. 9
3. ボンベシン様神経ペプチド(BN-like peptide)の行動薬理学的特性	P. 9
4. 神経ペプチド(neuropeptide)の行動調節機能研究の意義と本研究の目的	P. 12
5. ボンベシン様神経ペプチド受容体欠損マウス(KO マウス)の作製	P. 12
6. 本研究の構成	P. 13
第2章 ガストリン放出ペプチド受容体欠損マウス(GRP-R KO マウス)の行動解析	
第1節 概論	
1. ガストリン放出ペプチド受容体(GRP-R)の脳内分布	P. 14
2. GRP-R KO マウスの一般的行動特性	P. 14
3. GRP-R KO マウスにおける行動解析の方針	P. 17
第2節 実験	
1. 実験1: 社会的相互作用の分析	P. 19
1) 方法	P. 19
2) 結果	P. 24
3) 考察	P. 24
2. 実験2: 攻撃性社会行動の下位分析ー刺激誘発性闘争テスト(shock-induced aggression test)	P. 27
1) 方法	P. 27
2) 結果と考察	P. 28
2. 実験3: 非攻撃性社会行動の下位分析ー嗅覚刺激および標的オブジェクトの導入による自発活動性の変化に関する分析	P. 30

1) 方法	P. 30
2) 結果	P. 32
2)-1. 遺伝子型およびテスト条件の効果	P. 32
2)-2. 遺伝子型の効果	P. 34
2)-3. テスト条件の効果	P. 38
3) 考察	P. 38
4. 実験 4 : 不安および情動性の分析—明暗箱テストと防御的覆い隠し行動テスト	P. 47
1) 方法	P. 47
2) 結果	
2)-1. 明暗箱テスト	P. 48
2)-2. 防御的覆い隠し行動	P. 48
3) 考察	P. 50
第3節 GRP-R の行動調節機能に関する考察	P. 51

### 第3章 ボンベシン受容体サブタイプ3欠損マウス(BRS-3 KO マウス)の行動解析

#### 第1節 概論

1. ボンベシン受容体サブタイプ3(BRS-3)の脳内分布	P. 54
2. BRS-3 KO マウスの表現型	P. 54
3. BRS-3 KO マウスにおける行動解析の方針	P. 58

#### 第2節 実験

1. 肥満および過食と味覚選好性の変化	P. 61
1) 実験 1 : 味覚選好性の分析—Taste preference test	P. 62
1)-1. 方法	P. 62
1)-2. 結果	P. 62
2) 実験 2 : 味覚学習の分析—Conditioned Taste Aversion Test	P. 65
2)-1. 方法	P. 65

2)-2. 結果	P. 66
3) 考察：肥満および過食と味覚嗜好性の変化の神経機構	P. 69
2. 飼育環境と肥満・過食の関係	P. 71
1) 実験1：飼育条件と体重変化および摂食量に関する分析	P. 72
1)-1. 方法	P. 72
1)-2. 結果	P. 72
2) 実験2：飼育条件の自発活動性に与える影響について	P. 77
2)-1. 方法	P. 77
2)-2. 結果	P. 77
3) 実験3：飼育条件が社会性に与える影響について	P. 80
3)-1. 方法	P. 80
3)-2. 結果	P. 80
4) 考察：社会的要因が肥満・過食に与える影響について	P. 82
第3節 BRS-3 の行動調節機能に関する考察	P. 84
第4章 ニューロメジンB受容体欠損マウス(NMB-R KO マウス)の行動解析	
第1節 概論	
1. ニューロメジンB受容体(NMB-R)の脳内分布	P. 87
2. NMB-R KO マウスの一般的行動特性	P. 89
3. NMB-R KO マウスにおける行動解析の方針	P. 92
第2節 実験	
1. ストレス負荷による行動変容	P. 95
1) 実験1：食物剥奪(food deprivation)による行動変容－餌探索行動 (food exploration)の分析	P. 97
1)-1. 方法	P. 97
1)-2. 結果	P. 98

2) 実験 2 : 認知的負荷による行動変容-T 型迷路学習(T-maze learning test)の分析と自発活動性の変化	P. 100
2)-1. 方法	P. 100
2)-2. 結果	
2)-2-1. T 型迷路学習	P. 101
2)-2-2. 自発活動性の分析	P. 104
3) 考察	P. 109
3) 実験 3 : 社会的刺激の剥奪による行動変容-強制水泳テスト(forced swimming test)の分析	P. 111
3)-1. 方法	P. 111
3)-2. 結果	P. 113
3)-3. 考察	P. 116
4) 実験 4 : 育児行動テストおよび育児行動による行動変容-仔引き行動テスト(pup retrieval test)の分析と明暗箱テストの分析	P. 117
4)-1. 方法	P. 117
4)-2. 結果	
4)-2-1. 母性行動の測定	P. 118
4)-2-2. 明暗箱テスト	P. 119
4)-3. 考察	P. 124
5) 考察 : ストレス負荷と NMB-R KO マウスの行動変容	P. 126
2. ストレス負荷と内分泌反応の変化	P. 129
1) 実験 1 : 拘束ストレス負荷による内分泌反応の変化	P. 131
1)-1. 方法	P. 131
1)-2. 結果	P. 131
2) 実験 2 : NMB の脳室内投与による内分泌反応の変化	P. 134
2)-1. 方法	P. 134
2)-2. 結果	P. 134
3) 実験 3 : 拘束ストレス負荷による HPA 系活動の検討-免疫組織化学的解析	P. 137
3)-1. 方法	P. 137
3)-2. 結果	P. 138

3)-3. 考察	P. 138
4) 考察：NMB-R KO マウスにおけるストレス反応性の変化	P. 140
第3節 NMB-R の行動調節機能に関する考察	P. 142
第5章 総括的論議と展望	
第1節 BN 様神経ペプチドによる行動調節機能の総括	P. 145
第2節 本研究における研究成果の臨床的意義と今後の研究の展開	P. 149
1. 研究成果の臨床的意義	P. 149
2. 今後の研究の展開	P. 150
第3節 生命科学における実験心理学の役割—本研究の結語にかえて—	P. 152
【補足】行動解析の技法	P. 157
【発表論文および発表予定論文】	P. 168
【引用文献】	P. 170
【謝辞】	P. 188

## 第1章 序論

### 1. 遺伝子組換え動物を用いた行動研究の意義

行動の遺伝的・生物学的基礎に関する実験的研究は大別して2通りのアプローチが取られてきた。その一つのアプローチは比較心理学(Comparative Psychology)あるいは比較行動学(Ethology)であり、今一つのアプローチは行動遺伝学(Behavior Genetics)である。比較心理学においては、霊長類の行動の野外観察および実験的研究から、ヒトにおける社会行動や言語行動について極めて示唆深い知見が得られてきた(1-5)。また、比較行動学においては、一般的には本能と呼ばれる、高度に組織化されているが、種固有の行動形式について多くの知見が得られてきた。ミツバチにおける社会行動の研究(6,7)やイトヨの攻撃行動および求愛行動の研究(8)、また早成性の鳥類における後追い行動の刷り込み(imprinting)の研究(9,10)等は、複雑な本能的行動が解発刺激と反応の連鎖によって成り立っていることを明らかにしてきた。一方、行動遺伝学においては、選択交配による近交系マウスの作成、およびこれらのマウスの系統比較研究が行われてきた(11-13)。我が国においても牧野順四郎による筑波情動系マウスの作成と解析あるいは関口茂久による長年にわたる研究は、マウスにおける情動性および自発活動性、さらには学習機能等の行動特性が遺伝子レベルで機能・保存されていることを明らかにしている(14)。このような伝統的な手法に対して、近年、組換え遺伝子を胚に組み込むことによって人為的に変異種を作製する技術が確立され、これによって行動の基礎を直接遺伝子レベルで解析することが可能となった。1988年、Mansourらによって初めてHPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 遺伝子を欠損したノックアウトマウス(knockout (KO) mouse)が報告されて以来(15)、今日まで数多くの遺伝子がクローニングされ、またそれらの遺伝子を欠損したノックアウトマウスが作製されてきた(16)。

ノックアウトマウスを始めとした遺伝子組換え動物の出現は、行動遺伝学にその概念を根本から変革し得る衝撃を与えたばかりではなく、生理心理学や動物心理学、行動薬理学や神経行動生物学など、動物行動の神経機構の解明を目指す各研究領域において計り知れない深遠な影響を与えるものである。なぜならば、遺伝子組換え動物を被験体として用いることによって、従来の行動研究において解決が困難とされてきたいくつかの技術的問題を克服し得るからである。遺伝子組換え動物を用いた行動研究にはいくつかの利点がある。まず第一に、従来行われてきた物理的・電氣的あるいは

薬物による脳組織の破壊研究において常に議論の対象とされてきたいくつかの問題点を克服できることである。すなわち、破壊実験では破壊部位の範囲を統制することがきわめて困難であり、また複数の神経連絡・神経伝達系を同時に破壊せざるを得ないという技術的な限界がある。さらに、実験終了後には速やかに動物を殺し、破壊部位の特定・確認を行わなければならない。これらの諸点は、破壊研究において一貫したデータを得ることを困難にし、また被験動物の必要数を増やすという問題を生じさせた。加えて、被破壊部位における神経細胞の変性が、隣接部位あるいは投射部位における細胞の変性を生じさせ得ることから、長期にわたる安定的な研究を極めて困難なものとしてきた。第二に、行動薬理学的研究におけるいくつかの問題点を克服できることがあげられる。すなわち、行動薬理学的研究においては従来、各種神経伝達物質・神経ペプチドおよびホルモンなどの作動薬(agonist)あるいは拮抗薬(antagonist)等の投与による実験的研究が行われてきた。これらの研究では、投与される薬物の量が内在性の物質とは比較にならないほど多量であり、したがって得られた結果は必ずしも動物の正常な状態における生理的機能を反映していない可能性がある。さらに、各種作動薬あるいは拮抗薬が必ずしも特定の受容体に対する排他的な結合の特異性(specificity)を持つとは限らないために、得られた結果が対象とした神経系独自の機能によるものではなく、複数の神経系における活動の相互作用によるものである可能性を否定することはできない。一方、遺伝子組換え動物を用いた行動研究では、研究対象となっている伝達系を伝達物質やホルモン・その受容体あるいはトランスポーターそのものの欠損という形で、直接かつ限定的に制限することが可能である。遺伝子組換え動物と同腹の野生型動物との比較を行なうことによって、破壊研究や行動薬理学的研究では極めて困難であった、破壊部位あるいは薬物の作動部位などの実験的統制に代わる、厳密な実験的統制を容易に行なうことが可能となった。このように遺伝子組換え動物の利用は、伝達物質・ペプチドあるいはホルモンなどの個体レベルの行動における機能解析を大きく進歩させ得るものと考えられる。

いうまでもなく、遺伝子組換え動物による行動研究においても技術的な問題点は存在する。すなわち、特定の伝達物質やホルモン・それらの受容体あるいはトランスポーターなどの欠損によって、関連する他の伝達物質やホルモン・受容体などが増加あるいは減少し、対象となっている伝達系の機能を代替する可能性があるということである。さらに、特定の遺伝子の不活性化が、正常な状態であればその遺伝子の下流に発現するはずの遺伝子(群)の発現パターンを根本的に変化させてしまう可能性もある。したがって、ある一つの遺伝子欠損によって生じた行動変異を、必ずしも欠損した遺

伝子のみ起因するものと断定することはできない。これらの理由から、遺伝子組換え動物を用いた行動解析においては、実験的解析によって特定された行動変異について、欠損した遺伝子だけではなく、少なくともその下流に位置する遺伝子群における発現パタンの変化の可能性をも含めた解釈が必要とされる。同様のことは、ある一つの遺伝子欠損が行動における表現型として捉えられない場合にも当てはまる。その場合、欠損した遺伝子の発現が行動に関与していないのか、あるいは他の遺伝子発現の増加(あるいは減少)による機能代替によるものであるのか、さらには下流にある遺伝子群の発現パタンが複雑に変化してしまったことによる相互作用によるものであるのか、ということを区別することはきわめて困難なことといえる。また、遺伝子組換え動物の遺伝的背景に関する問題もいまだ議論の一致を見ていない(17)。遺伝子組換え動物を作製する際、組換え遺伝子を胚に導入するために利用される ES 細胞(胚幹細胞: embryonic stem cell)は主として 129 系統のマウス由来の細胞が用いられてきた。129 系統のマウスは系統的に回避行動などの学習および記憶課題の成績が低いことが知られている(11,12)。したがって、仮に作製された遺伝子組換えマウスにおいて学習や記憶などに異常が認められたとしても、その結果は単に 129 系統のマウスの行動特性について評価しているに過ぎないという議論もある。現時点では、遺伝子組換え動物における遺伝的背景の問題を完全に克服する方法は見出されていない。そのため、行動実験その他に一般的に利用されている C57BL/6 系統のマウスに対する戻し交配を繰り返すことによって、遺伝子組換え動物の世代を進めることがもっとも効果的な方法と考えられている。さらに現段階では、遺伝子を不活性化する時期および身体・組織部位の限定は極めて困難である。これは遺伝子発現の欠損と表現型としての行動変化について、その因果関係の解釈を困難なものとする可能性がある。なぜならば、遺伝子組換え動物では不活性化された遺伝子の発現が個体発生の段階から個体の全身体組織において欠損しているために、遺伝子不活性化の効果について評価する際、個体発達における影響および全身機能における影響をも視野に入れた評価が必要とされる場合があるからである。しかしこのような問題も、遺伝子不活性化の時期および部位を限定するコンディショナル・ノックアウト(conditional knockout)の技術確立によって、ごく近い将来解決されるはずである。

このように技術的に未解決の問題はあるものの、遺伝子組換え動物を被験体とした行動研究は、関連諸科学領域における研究から得られた知見と比較検討を行うことによって、行動の遺伝的・生物学的基礎の解明に大きな役割を果たすものと期待される。

## 2. ボンベシンおよびボンベシン様神経ペプチドについて

ボンベシン様神経ペプチド(bombesin(BN)-like peptide)は哺乳類の消化管および中枢神経系に広く分布している。その機能は、内分泌および外分泌の調節・平滑筋の収縮・代謝調節および行動機能の調節など、多岐におよんでいる(18)。当初ボンベシンはカエル(*Bombina bombina*)の皮膚から平滑筋の収縮を指標として精製され(19)、その後さまざまな種類の両生類の皮膚から多種のボンベシン様ペプチドが精製された。哺乳類におけるボンベシン様ペプチドは、まずブタの消化管からガストリン放出ペプチド(gastrin-releasing peptide: GRP)が精製され(20)、続いて南野らによってブタの脊髄からニューロメジン B(neuromedin B: NMB)が精製された(21)。

ボンベシン様ペプチドは、G 蛋白結合型の受容体を介して機能する。哺乳類では、ガストリン放出ペプチドに高い親和性を示すガストリン放出ペプチド受容体(gastrin-releasing peptide receptor: GRP-R)、ニューロメジン B に対して高い親和性を示すニューロメジン B 受容体(neuromedin B receptor: NMB-R)、およびこれらのボンベシン様ペプチド受容体と相同性の高いボンベシン受容体サブタイプ 3(bombesin receptor subtype-3: BRS-3)がクローニングされている。BRS-3 についてはいまだに内在性のリガンドは不明であるが、近年親和性の高い合成ペプチドが開発されており、細胞レベルにおける機能の解析が進みつつある(22)。

ボンベシン様ペプチドの機能については、他のペプチドと同様にペプチドの受容体を遺伝子工学的に発現させた株化培養細胞を用いた *in vitro* の解析によって、細胞内カルシウム濃度の変化、あるいは膜電位の変化などが明らかにされている(23)。さらに成長因子として、スイス 3T3 細胞や正常ヒト気管支上皮細胞・肺小細胞癌細胞などの細胞分裂を促進することが知られている(24)。また、主として哺乳類を被験体とした *in vivo* の研究からニューロメディエーターとしての機能も明らかにされている。すなわち、ボンベシン様神経ペプチドの脳内注入によって、摂食行動の調整(減退)や体温降下、身繕い(grooming)や搔爬(scratching)などの自発活動の増加、さらに痛覚刺激に対する反応性の低下などが報告されている。なお、ボンベシン様神経ペプチドの行動薬理学的効果に関しては次項で詳述する。

## 3. ボンベシン様神経ペプチド(BN-like peptide)の行動薬理学的特性

GRP・NMB をはじめとした各ボンベシン様神経ペプチド(BN 様ペプチド)の行動薬

理学的特性は、多様なテストを用いて検討されてきた。その指標としては、体温調節のような生理的反応をはじめとして、自発活動・摂食行動、さらには学習や記憶といった高次脳機能におよんでいる。BN 様ペプチドの投与による体温変化については、各ペプチドの脳内投与によって直腸温を指標とした深部体温の降下が認められているが(25)、我々は GRP が NMB と比較してより強い体温降下作用を示すことを見出した(発表論文 5)。GRP-R KO マウスにおいて GRP の脳内投与による体温降下が見られないことは(26)、視床下部およびその関連領域における GRP-R が神経伝達の調整に関与していることを強く示唆するものである。

また BN 様ペプチドの自発活動に与える効果については、ペプチドの脳内投与によって身繕い反応(grooming)や搔爬反応(scratching)が増加することが報告されている(27,28)。また、ボンベシンおよびニューロメジン類の投与によって自発的移動運動の低下が報告されているが、移動運動量の低下は身繕い反応や搔爬反応の亢進によるものと考えられている(29)。しかし、GRP の腹腔内投与による行動変化については、自発活動量および不安反応などの諸指標について変化が認められていない(30)。

このように BN 様ペプチドの行動薬理学的効果は BN グループのペプチドについて、様々な指標において認められている。しかし、もっとも重点的に検討されてきたのは摂食行動の調節に関してであろう(31-36)。摂食行動調節の典型的な実験手法としては、空腹/非空腹状態のマウスあるいはラットに BN 様ペプチドを腹腔あるいは脳内投与して、非投与群と摂食量を比較するという手続きが用いられてきた。これらの研究から、BN 様ペプチドの投与が空腹/非空腹状態の動物の摂食量を抑制すること、ならびに GRP が BN 様ペプチドの中でも比較的強い摂食抑制作用を示すことが明らかにされている。さらに、Hampton ら(37)は GRP-R KO マウスにおいて GRP の腹腔内投与による摂食抑制作用が消失することを示しているが、この知見は中枢および末梢の GRP-R が摂食調節に深く関与していることを示唆するものと考えられる。

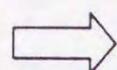
また近年、GRP の腹腔内あるいは脳内投与によって学習や記憶成績が向上するという報告もなされている(38,39)。ボンベシンおよび GRP などの神経ペプチドの投与がいかなるメカニズムによって学習や記憶を促進しているかという点については全く未知であるが、中枢における BN 様ペプチドが摂食調節や体温調節といった恒常性維持機能ばかりではなく、極めて高次の脳機能に関与している可能性を示す知見として興味深い結果といえよう。

## ボンベシン様ペプチドについて

---

### 1. 概要

- ・カエル(*Bombina bombina*)の皮膚より精製 (19)
- ・哺乳類では→ガストリン放出ペプチド(gastrin-releasing peptide: GRP, 20)  
ニューロメジンB(neuromedin B: NMB, 21)



G蛋白結合型の受容体を介して機能している

GRP: ガストリン放出ペプチド受容体(GRP-R)

NMB: ニューロメジンB受容体(NMB-R)

内在性のリガンドが不明の第3のボンベシン様ペプチド受容体

(bombesin receptor subtype-3: BRS-3)

### 2. 機能

#### ・*in vitro*な解析

- 1) 細胞内Ca<sup>2+</sup>の変化・膜電位の変化 (23)
- 2) 成長因子としての機能 (細胞分裂の促進など: 24)

#### ・*in vivo*な解析: 主として行動薬理的な研究から

- 1) 体温降下 (25, 発表論文5)
  - 2) 自発活動性の変化 (27,28,29)
  - 3) 摂食行動の抑制 (31-36)
  - 4) 記憶・学習の促進 (38,39)
-

#### 4. 神経ペプチド(neuropeptide)の行動調節機能研究の意義と本研究の目的

近年急速に発展してきた、神経変性疾患の分子遺伝学的および分子生物学的解析によって、諸種の神経ペプチドおよびその受容体が発見されてきた(40)。これら多くの神経ペプチドが、神経系の構築あるいは神経伝達の調整機能を持つことから、その重要性に対する認識は日増しに高まりつつある。神経ペプチドには TRH(thyrotropin releasing hormone)のごとく、すでに神経変性に起因する運動失調疾患の治療薬として臨床応用されているものもあり(41)、その機能解析は神経変性疾患ならびに精神疾患の治療法の開発にとって極めて重要な意味を持つと考えられる。前 2 項で述べてきたとおり、ボンベシン様神経ペプチドの機能は生理的な調節機能にとどまらず、広範な行動調節機能を有するものと考えられる。したがって、これらの機能の詳細を明らかにすることは、脳-神経系の行動調節機構に関する新たな知見を提示するだけでなく、脳-神経疾患の治療法の開発にも貢献し得るものといえる。

第 3 項で述べたとおり、ボンベシン様神経ペプチドの行動調節機能については、主として行動薬理的検討が行なわれてきたが、内在性の各ペプチドの役割については未解決の点が多い。したがって、さらに詳細な解析を行なうためには、行動薬理学に代わる新たな手法による研究が必要である。第 1 項で述べた諸理由から、内在性のボンベシン様神経ペプチドの行動調節機能の解析には、ボンベシン様神経ペプチド受容体を欠損する遺伝子組換え動物を用いた研究が、現時点において最も有効な手法と考えられる。そこで本研究では、ガストリン放出ペプチド受容体(GRP-R)・ボンベシン受容体サブタイプ 3(BRS-3)およびニューロメジン B 受容体(NMB-R)の各ボンベシン様神経ペプチド受容体を遺伝子工学的に欠損させたノックアウト (KO)マウスを用いて、内在性のボンベシン様神経ペプチドの行動調節機能について明らかにすることを目的とする。本研究においては、従来の手法では明らかにされなかった内在性のボンベシン様神経ペプチドの機能について多くの知見が得られることが期待される。

#### 5. ボンベシン様神経ペプチド受容体欠損マウスの作製

本研究において被験体として用いられた BN 様神経ペプチド受容体欠損マウス(KOマウス)は、以下の手順によって作製された(発表論文 1,2,5)。

GRP-R、BRS-3 および NMB-R の各 BN 様神経ペプチド受容体の遺伝子はともに、129/SV 系統のマウスの genomic library よりクローニングされた。BN 様神経ペプ

チド受容体の遺伝子は 3 つのエクソンからなるが、各受容体の最重要部位をコードしていると考えられる 2 番目のエクソンを、ネオマイシン耐性遺伝子に置換(不活性化)した後に、この組換え遺伝子をターゲティングベクターに結紮(ligate)した。ターゲティングベクターを E14 とよばれる 129/SV 系統のマウス由来の胚幹細胞(ES 細胞)に導入し、相同変換を生じたクローンをスクリーニングした。サザン分析(Southern analysis)によって相同変換を確認後、C57BL/6 系統のマウスの未分化胚芽細胞に注入し、キメラマウスを得た。キメラマウスと C57BL/6 系統のマウスを交配させることによって得られたヘテロ接合体と C57BL/6 系統のマウスの戻し交配(back cross)を重ねることによって、各 KO マウスの遺伝的背景(genomic background)を C57BL/6 系統に近づけている。本研究では、C57BL/6 系統のマウスに戻し交配をした第 4 世代以降のマウス(GRP-R KO マウスおよび BRS-3 KO マウス)、および第 4 世代以降のマウスを同世代同士で掛け合わせて作製したマウス(NMB-R KO マウス)を被験体として用いた。

## 6. 本研究の構成

本研究は以下の 5 章および【補足】で構成されている。第 1 章 序論では、行動科学における遺伝子組換え動物の意義について論じ、またボンベシン様神経ペプチドについて概略を述べ、本研究の目的を提示してきた。第 2 章 ガストリン放出ペプチド受容体欠損マウス(GRP-R KO マウス)の行動解析、第 3 章 ボンベシン受容体サブタイプ 3 欠損マウス(BRS-3 KO マウス)の行動解析、および第 4 章 ニューロメジン B 受容体欠損マウス(NMB-R KO マウス)の行動解析においては、各ボンベシン様神経ペプチド受容体の欠損マウスを用いた行動解析実験から、3 種のボンベシン様神経ペプチドの行動調節機能について考察を加える。そして、第 5 章 総括的論議と展望においては、3 種のボンベシン様神経ペプチドの行動調節機能について総括し、本研究の結論を述べる。また、本研究における研究成果の臨床的意義および今後の研究に関する展望について述べる。さらに、生命科学における実験心理学の役割について筆者の見解を述べ、本研究の結語とする。最後に【補足】行動解析の技法では、各章で詳細に述べるができなかった行動解析実験法についてまとめる。

## 第2章 ガストリン放出ペプチド受容体欠損マウス(GRP-R KO マウス)の行動解析

### 第1節 概論

#### 1. ガストリン放出ペプチド受容体(GRP-R)の脳内分布

GRP-R の脳内分布はラット(42)およびマウス(43)について *in situ hybridization* 法を用いて調べられている。ラット・マウスともにほぼ同様の脳内分布を示しており、分布範囲は脳内の広い領域におよんでいる。マウスにおける GRP-R の脳内分布を Table 2-1.にまとめた。

従来からの研究において行動との対応関係が比較的明らかにされている領域としては、海馬(hippocampus)・扁桃体(amygdala)・および視床下部(hypothalamus)があげられる。海馬(特に CA1 領域)は記憶(主として空間記憶)の処理中枢として知られている(44,45)。また、扁桃体は情動機能の中枢として知られているばかりではなく(46,47)、近年ではヒトにおける脳画像解析の研究から、情緒的情報ならびに社会性に関する情報の記憶の処理中枢としても注目を集めつつある(48,49)。さらに、視床下部は各種情報処理の中継中枢であることから、各神経核および領域についてその機能が細分化されている。すなわち、視床下部室傍核(paraventricular nucleus: PVN)・弓状核(arcuate nucleus)、および視床下部外側部(lateral hypothalamic area: LH)などは摂食や飲水の調節に関与していることが知られており(50-52)、同時に PVN は視床下部-脳下垂体-副腎皮質系(hypothalamus-pituitary-adrenal axis: HPA axis)の始点として各種ホルモンの分泌に関与しており、ストレス反応の制御システムの中核としても位置づけられている(53)。

これらの点から、GRP-R は記憶・情動・摂食・不安反応ならびにストレス反応、および社会的行動の調節に関与している可能性が推測される。

#### 2. GRP-R KO マウスの一般的行動特性

第1項で述べたとおり、GRP-R KO マウスにおいては多様な行動的表現形が期待されたため、反射・運動調整能力・自発活動性・記憶・不安反応などについて標準的なテストバッテリーによる行動解析を行った(Table 2-2.参照)。反射および驚愕反応に関してはプレパルス抑制テスト(prepulse inhibition test :54)によって分析を行

Table 2-1. Distribution of GRP-R gene expression in the mouse brain

Forebrain	Isocortex	+
	Hippocampal formation	
	CA1/CA3	+
	Dentate gyrus	+
	Amygdala	
	Central nucleus	+
	Medial nucleus	+
	Nucleus lateral olfactory tract	++
	Basal ganglia	
	Magnocellular preoptic nucleus	++
	Hypothalamus	
	Suprachiasmatic nucleus	++
	Supraoptic nucleus	++
	Paraventricular nucleus	+
	Arcuate nucleus	+
Dorsal hypothalamic nucleus	+	
Medial preoptic nucleus	++	
Lateral mammillary nucleus	++	
Lateral hypothalamic area	++	
Brainstem	Nucleus solitary tract	+
	Parabrachial nucleus	+

*Note.* ++: moderate signal; +: weak signal (Wada, E. et al. unpublished data.(43))

Table 2-2. Summary of behavioral analysis of GRP-R KO mice

Behavior	Test measurement	Phenotype of mutant
Reflex	Prepulse inhibition test <sup>*4</sup>	Normal
Spontaneous activity	Spontaneous activity in home cage <sup>*4</sup>	Altered
& motor ability	Open field test <sup>*1,4</sup>	Altered*
	Forced swimming test <sup>*3</sup>	Normal
	Motor coordination ability test <sup>*4</sup>	Normal
Ingestive behavior	Feeding & drinking <sup>*4</sup>	Normal
	Bombesin-induced feeding suppression(37) <sup>*4</sup>	Diminished
Perception		
Olfaction	Response to odors from conspecifics <sup>*1</sup>	Altered*
Learning	Water maze learning <sup>*4</sup>	Normal
	One-trial passive avoidance test <sup>*4</sup>	Normal
Anxiety-related	Light-dark box test <sup>*1</sup>	Altered
responses	Elevated plus maze test <sup>*4</sup>	Normal
	Marble burying test <sup>*1</sup>	Normal
Other behaviors	Social interaction test <sup>*1</sup>	Altered
	Shock-induced aggression <sup>*1</sup>	Normal

Note-1. \*: altered partially

Note-2. Table 2-2.に記載された各実験の手続きは以下の章で詳述する。

\*1: 本章; \*2: 第3章; \*3: 第4章; \*4: 【補足】

なった。驚愕反応については GRP-R KO マウスにおいて低下傾向が見られたが有意な差は認められず、プレパルスによる驚愕反応の抑制の程度については変化が認められなかった。また、強制水泳テスト(forced swimming test)によるストレス負荷に対する反応性にも変化は認められなかった。運動調整能力は回転棒テスト(rota-rod test: 55)によって分析を行ったが、運動失調あるいは運動調整能力に変化は認められなかった。自発活動性に関しては飼育ケージ内における 24 時間連続の活動量測定およびオープンフィールドを用いた活動量測定を行い、いずれの測定においても GRP-R KO マウスに有意な活動量の亢進を認めた。24 時間連続測定においては、明・暗 12 時間交替のサイクルで飼育後、2 週間の暗・暗サイクルで飼育し、内在性の概日リズムにあわせて活動期/非活動期に分けて自発活動量を比較した。その結果、非活動期の自発活動量では野生型マウスと GRP-R KO マウスの間に差は認められなかったが、活動期においては GRP-R KO マウスの自発活動量に有意な亢進が認められた。しかし、高架式十字迷路(elevated plus maze test: 56)による不安関連行動の分析においては、野生型マウスと GRP-R KO マウスの間に有意な差が認められなかった。さらに、一試行受動的回避学習(one-trial passive avoidance test)による記憶テスト、およびモリス型水迷路(Morris's water maze test: 57)を用いた空間記憶テストにおいても両者の間には有意な差が認められなかった。

### 3. GRP-R KO マウスにおける行動解析の方針

本節第 1 項で述べた GRP-R の脳内分布および、第 3 項で述べた一般的行動特性の分析結果をもとに、GRP-R KO マウスの行動解析の方針を以下のように設定した。まず第一に、GRP-R が脳内において扁桃体および視床下部に発現しており、特に視床下部において高密度である点に注目した。すでに述べたとおり、扁桃体は情動機能および社会性について重要な役割を果たしていることが知られている。また、視床下部も飲水・摂食・体温調節など恒常性維持機能に加えて、情動反応にも深く関与していることが古くから報告されている。視床下部の破壊によって攻撃性の亢進や怒り反応が生起することは多様な動物種を用いた実験から明らかにされており(58,59)、これらの行動異常は視床下部の機能欠損の有用な指標となる。次に第二の注目点として、第 3 項で述べたとおり、GRP-R KO マウスにおいて自発活動量の亢進が認められていることがあげられる。視床下部等の破壊研究において自発活動量の亢進が共通の行動変化として報告されていることから(60,61)、GRP-R KO マウスに見られる自発活

動量の亢進は、視床下部異常に関連する諸行動（例えば社会的行動）にも影響を与えている可能性が考えられる。GRP-R KO マウスの脳組織における組織学的な解析からは、これらの領域における組織変性は認められていない(発表論文 1)。したがって、GRP-R KO マウスにおける行動変化は、組織学的変性ではなくペプチド受容体の欠損に帰することができるであろう。

これらの点から、本研究では GRP-R KO マウスの社会的行動に関して詳細な行動学的検討を加えることとした。解析の方法として、先ず GRP-R KO マウスと野生型マウスにおける社会的相互作用(social interaction)の異同について分析を行い、続いて社会的行動を非攻撃性社会行動と攻撃性社会行動の2種の下位カテゴリに分け、そのおのおののカテゴリについて別個に下位分析を行った。さらに、社会的行動の調節に深く関与すると考えられる不安関連行動(anxiety-related behavior)および防御行動(defensive behavior)について分析を行った。

## 第2節 実験

### 1. 実験1：社会的相互作用の分析

元来マウスやラットは一部の種類を除いて自然状況下で社会的生活を営む動物種ではない。したがって、マウスやラットにおける社会的反応とは、新奇場面あるいは新奇環境における縄張り獲得のための闘争、あるいは個体の生存空間における縄張り防衛のための防御的反応という色彩が強い。実験室的実験においては、伝統的に2種類の方法が用いられてきた。一つはエンカウンター法 (encounter 法: 対面法) とよばれる方法である。この方法では、別個に飼育されている2個体 (あるいは3個体以上の多個体) を飼育ケージではなく専用の観察用ケージに入れて個体の行動観察を行なう。いま一つは先住者-侵入者法 (resident-intruder 法) とよばれる方法である。この方法では、一方の個体の飼育ケージ内に侵入個体 (intruder) とよばれる個体を導入し、先住個体 (resident) の侵入個体に対する反応の観察を行なう。後者の手法では社会的優劣あるいは縄張りの支配が明瞭であり、社会的相互作用の生起頻度が比較的高いことから、本実験では先住者-侵入者法を採用した。

行動指標は sniffing (侵入者マウスの匂い、特に生殖器付近を嗅ぐ行動)、following (侵入者マウスの後を追いつく行動)、mounting (侵入者マウスの上に乗る行動)、nose-touching (先住者マウスが intruder マウスの鼻先を自分の鼻先でこすったりつついたりする反応)、biting (侵入者マウスの身体に噛み付く反応)、fighting (侵入者マウスと殴り合ったり、取っ組み合ったりする反応)、および vocalization (大きな声を上げて叫ぶ反応) を採用した。なお、受動的接触 (passive body contact : お互いに身体を寄せ合ってじっとしている状態) は無相互作用として観察指標から除外した。

なお、GRP-R KO マウスは2種の独立株の ES 細胞 (11B6 系統と 3D2 系統) 由来の系統があるため、本実験では2系統のマウスについて別個に実験を行った。

#### 1) 方法

**被験体**：11B6 系統は先住者マウスとして雄の GRP-R 欠損マウス 10 匹、および同腹の雄の野生型マウス 10 匹を用いた。GRP-R KO マウスおよび野生型マウスは、C57BL/6 系統に戻し交配を行なった第 4・5 世代 (F4・F5) のマウスで、ともに生後約 3 カ月齢のものを使用した。平均体重はそれぞれ  $27.3 \pm 0.9\text{g}$ 、 $26.0 \pm 0.4\text{g}$  であった。ま

た、侵入者マウスとしては雄の ICR マウス(JCL inc.)20 匹を用いた。ICR マウスは実験開始時に生後 10 週齢で、平均体重は  $34.1 \pm 0.4\text{g}$  であった。また、3D2 系統は先住者マウスとして雄の GRP-R 欠損マウス 7 匹、および同腹の雄の野生型マウス 7 匹を用いた。GRP-R KO マウスおよび野生型マウスは、C57BL/6 系統に戻し交配を行なった第 4・5 世代(F4・F5)のマウスで、ともに生後約 4 カ月齢のものを使用した。平均体重はそれぞれ  $29.6 \pm 1.2\text{g}$ 、 $30.6 \pm 0.8\text{g}$  であった。また、侵入者マウスとしては雄の ICR マウス(JCL inc.)14 匹を用いた。ICR マウスは実験開始時に生後 14 週齢で、平均体重は  $45.5 \pm 0.7\text{g}$  であった。GRP-R 欠損マウスおよび野生型マウスは実験開始 4 週間前から個別飼育を行った。また、侵入者マウスとして用いた ICR マウスは飼育開始時より約 1 ヶ月間、1 ケージあたり 5 匹の集団飼育を行った。なお、摂食および飲水は行動観察時を除いて自由とした。

**装置：**社会的相互作用の観察は通常の飼育ケージ(JCL inc. CL-0103-1pc,  $190 \times 260 \times 125\text{(H)}\text{ mm}$ 、金網性の蓋付きのもの)を用いた。また、実験の記録用に VTR カメラおよび TV モニターを使用した。

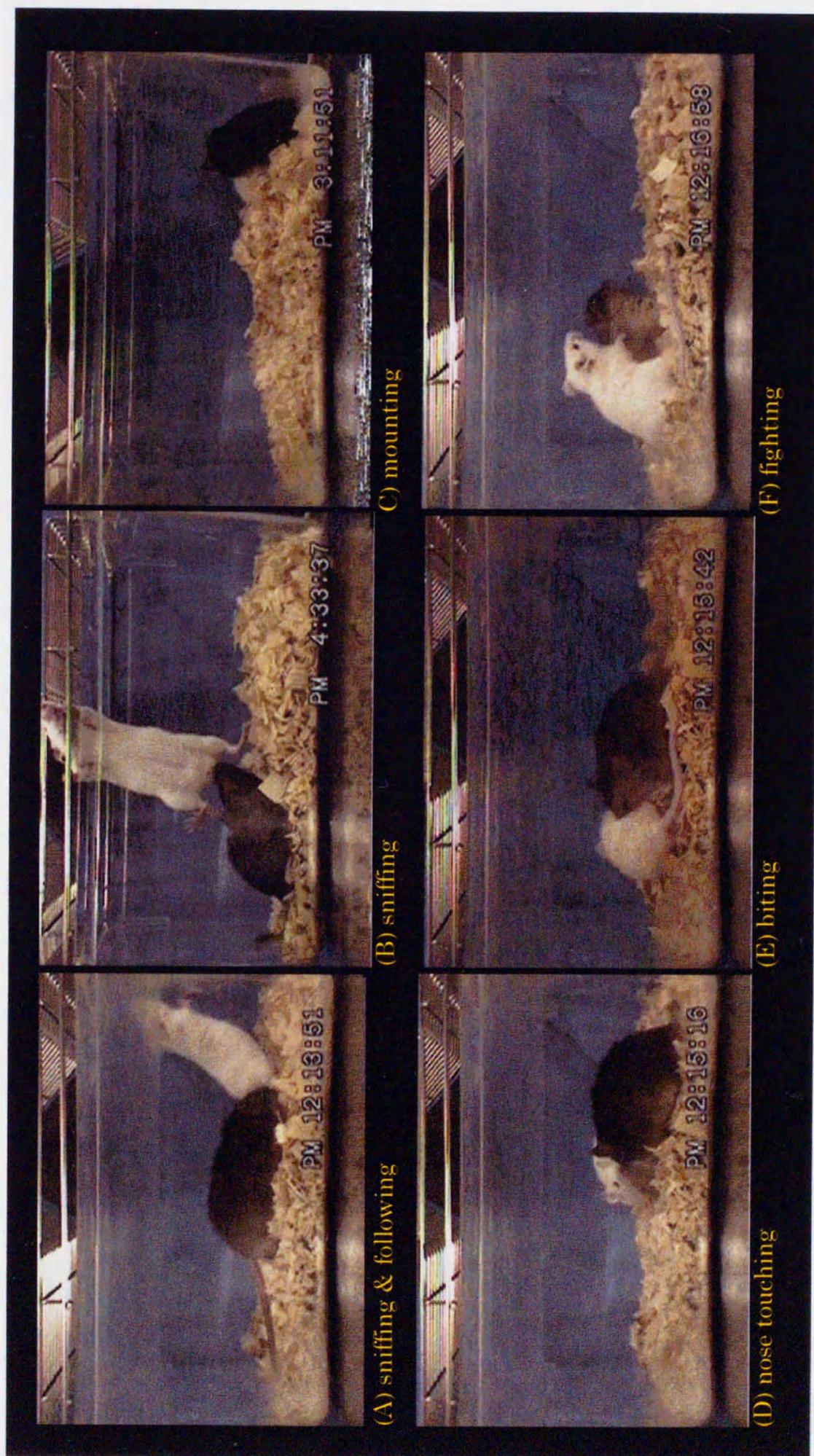
**手続き：**実験方法は Koenig ら(62)に準じ、行動指標は Griebel ら(63)を参考にした。先住者マウスの飼育ケージに侵入者マウスの ICR マウスを入れ、先住者マウスの侵入者マウスに対する行動を 5 分間観察した。行動の指標は非攻撃性社会行動のカテゴリから sniffing & following, approaching to intruder's head (nose touching), mounting の 3 種の指標を、また攻撃性社会行動のカテゴリから biting, fighting & vocalization の 2 種の指標を用いた<sup>\*1</sup>。各行動の採点方法は Koenig ら(62)の方法に従った。すなわち、5 分間の観察時間を 10 秒毎に 30 の観察時間窓(time bin)に分け、各観察時間窓において最低 1 回の標的行動が観察された場合に 1 点、観察されなかった場合に 0 点とカウントした。なお、実験は VTR で記録し、実験終了後に再度各行動指標の計測結果を確認した。

**統計的検定：**統計的分析は F 検定によって等分散性について検定後、Student の t 検定(両側)によって行った。

---

\*1. 行動指標について：sniffing と following および fighting と vocalization は同時に生じることが多いため、本研究においては誤計測を避けるためにこの 2 種の行動を同一の指標として計測した。

## *Indices of Social Behavior*



社会的相互作用実験における典型的な行動指標を示してある。黒～茶色のマウスがレジデントマウス(GRP-R KO)、白色のマウスがイントルーダーマウス(ICR)である。

### Results of Social Interaction Test (11B6 Strain)

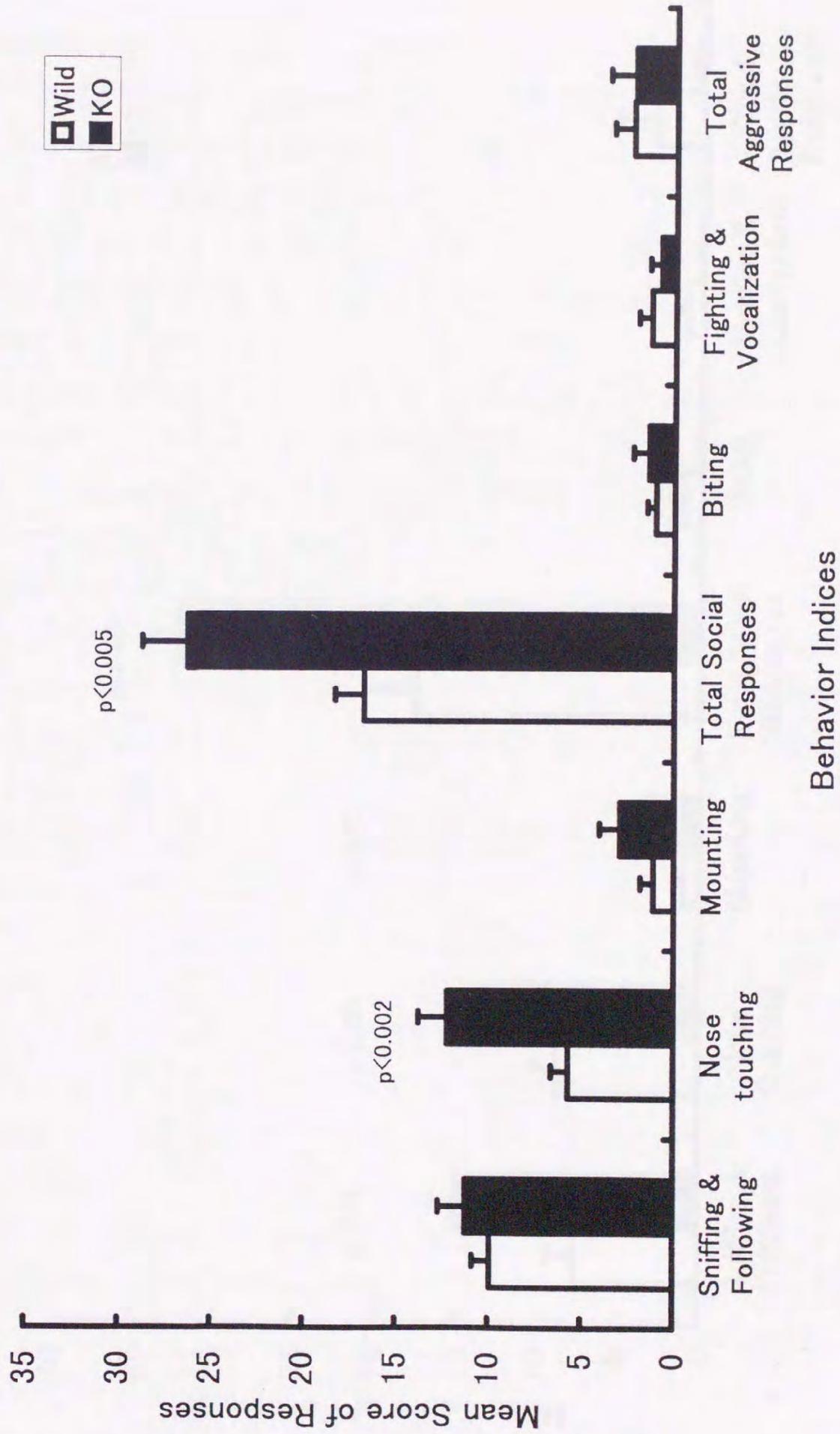


Fig. 2-1 Results of social interaction test in GRP-R KO (11B6 strain) mice and wild type mice. Bars represent SEM. P-values represent statistical differences between GRP-R KO mice and wild type mice.

### Results of Social Interaction Test (3D2 strain)

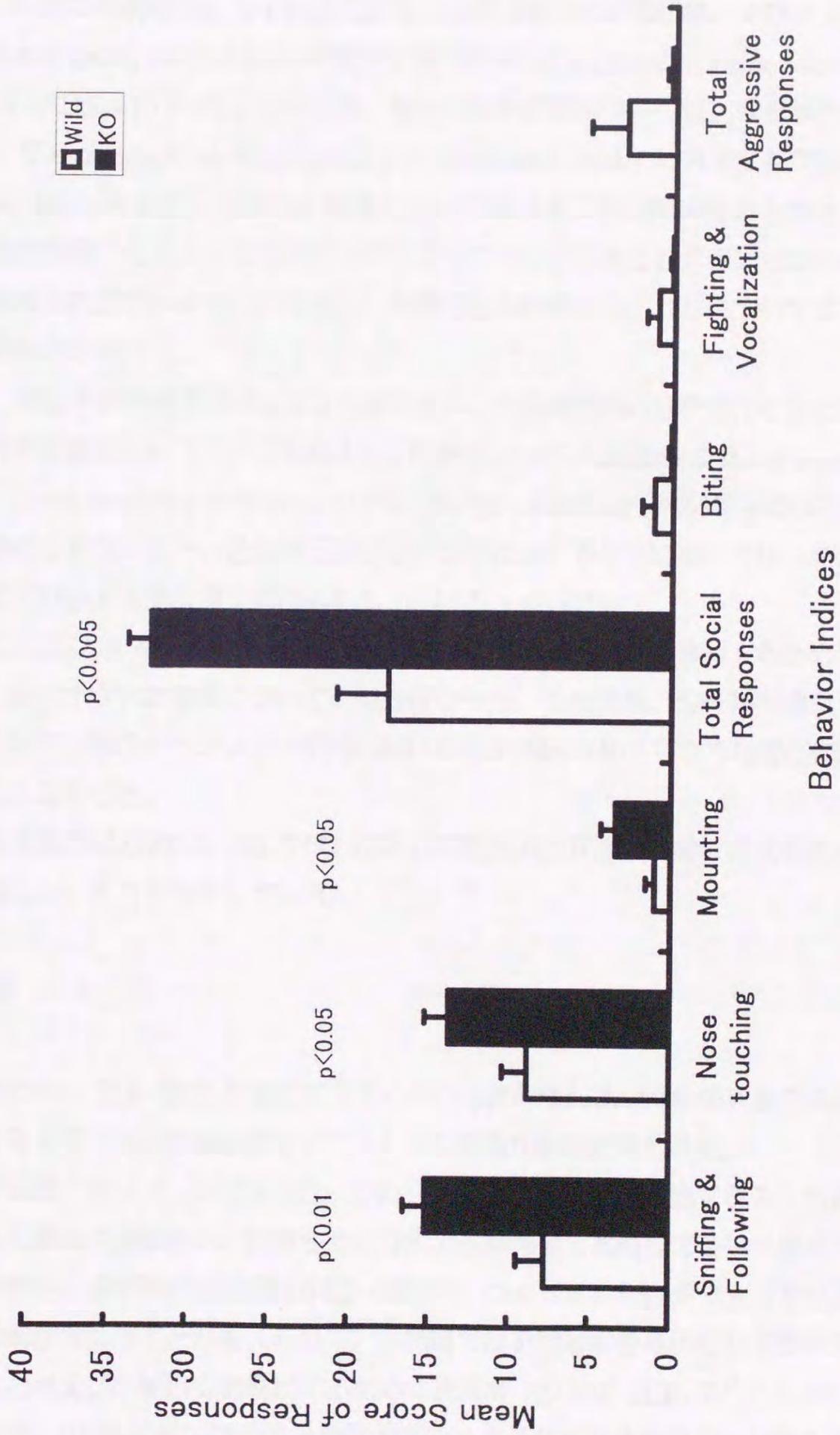


Fig. 2-2 Results of social interaction test in GRP-R KO (3D2 strain) mice and wild type mice. Bars represent SEM. P-values represent statistical differences between GRP-R KO mice and wild type mice.

## 2) 結果

11B6 系統の結果は Fig. 2-1 にまとめた。分析は個別の行動指標および非攻撃性社会行動(total social responses)・攻撃性社会行動(total aggressive responses)の2種のカテゴリについて行った。その結果、個別の行動指標については、非攻撃性社会行動において nose touching (approaching to intruder's head) に有意な差が認められたが ( $t=3.65$ ,  $p<0.002$ )、その他の指標については有意な差は認められなかった。また、社会的行動のカテゴリにおける分析においては、非攻撃性社会行動について有意な差が認められたが( $t=3.31$ ,  $p<0.005$ )、攻撃性社会行動のカテゴリについては有意な差は認められなかった。

また、3D2 系統の結果は Fig. 2-2 にまとめた。上記と同様の分析を行ったところ、個別の行動指標については、非攻撃性社会行動において、sniffing & following ( $t=3.4$ ,  $p<0.01$ )、nose touching ( $t=2.27$ ,  $p<0.05$ )、および mounting ( $t=2.38$ ,  $p<0.05$ )に有意な差が認められた。また、社会的行動のカテゴリにおける分析においては、非攻撃性社会行動について有意な差が認められた ( $t=4.25$ ,  $p<0.003$ )。

さらに、独立2系統の GRP-R KO マウスの系統差について検討するために、両 GRP-R KO マウスの結果について比較を行なった。その結果、全行動指標ならびに2種の社会的行動のカテゴリのいずれにおいても2系統の KO マウス間に有意な差は認められなかった。

これらの結果は GRP-R KO マウスにおいて社会的相互作用、特に非攻撃性社会行動が亢進していることを示している。

## 3) 考察

本実験においては、GRP-R KO マウスにおいて非攻撃性社会行動の亢進が見られ、また異なる2種の ES 細胞由来のマウスともに同様な結果が得られた。

社会的行動のカテゴリ別でみると、GRP-R KO マウス・野生型マウスともに非攻撃性社会行動の生起頻度が、攻撃性社会行動の生起頻度と比較して著しく高くなっている。攻撃性社会行動の生起頻度が低い原因の一つとして、先住者マウスと侵入者マウスの系統が異なることが考えられる。本実験では要因計画を単純化して混交要因を減らすことおよび、観察を容易にするために侵入者マウスに ICR マウスを用いた。なぜならば、GRP-R KO マウスと野生型マウスをそれぞれ先住者および侵入者に用

いた場合、先住者 (GRP-R KO & wild type) × 侵入者 (GRP-R KO & wild type) という 2×2 の要因配置による実験計画が必要となる。しかし、GRP-R の欠損による社会的相互作用の変化について直接的に分析するためには、GRP-R の有無による一要因計画がもっとも望ましい方法と考えられる。そこで、本実験では侵入者マウスとして GRP-R KO マウスおよび野生型マウスとは遺伝的背景が異なる ICR マウスを用いた。ICR マウスは比較的大型のマウスのため、週齢が GRP-R KO マウスよりも若いにもかかわらず GRP-R KO マウスおよび野生型マウスとの体重差が比較的大きかった。侵入者マウスの体重が先住者マウスの体重よりも大きかったことが攻撃行動の生起頻度を低水準にとどめた可能性は否定できない。しかし、GRP-R KO マウスと野生型マウスのいずれにおいても攻撃性社会行動の生起が低水準であったことは、GRP-R の欠損が攻撃性社会行動の亢進因とはならないことを示すものと考えられよう。一方、非攻撃性社会行動は GRP-R KO マウスにおいて著しい亢進が認められた。遺伝子操作マウスの行動研究においては、攻撃性社会行動の亢進例が報告されることが多く(たとえば 62)、非攻撃性社会行動については低下報告があるものの(64)、その亢進は他に類をみないものである。従って、この結果は GRP-R KO マウスの重要な行動的表現型であり、かつ GRP-R の行動調節機能について極めて示唆深いものと考えられる。

次に GRP-R KO マウスにおける 2 種の系統間の差違について述べる。11B6 および 3D2 の 2 種の独立した ES 細胞由来の系統の間で、基本的な結果はほぼ同様のものではあった(Fig.2-2, Fig. 2-3 参照)。すなわち、野生型マウスに対して 11B6 系統と 3D2 系統の GRP-R KO マウスはともに同等の非攻撃性社会行動の亢進を示した。個別の行動指標においては、11B6 系統では nose touching のみにおいて有意な差を得ている。一方、3D2 系統では非攻撃性社会行動の全個別指標において有意な差を得ている。しかしながら、11B6 系統において有意な差が得られなかった sniffing & following および mounting も、GRP-R KO マウスの得点は野生型マウスの得点よりも高い傾向を示しており、t 検定で有意な差が得られなかった原因は、個体間のデータの分散が大きかったことに起因するものと考えられる。ちなみに 11B6 系統のデータを Mann-Whitney's U-test で分析したところ、mounting においては有意な差が得られた(U=27, p<0.05, 両側検定)。さらに、11B6 系統と 3D2 系統の両 GRP-R KO マウスの結果について直接比較を行なったが、個別の行動指標ならびに社会的行動のカテゴリにおいて有意な差は認められなかった。これらの分析結果は、独立 2 系統の GRP-R KO マウスについて、攻撃性社会行動および非攻撃性社会行動における系統

差がないことを示していると同時に、本実験において認められた GRP-R KO マウスの非攻撃性社会行動の亢進が GRP-R の欠損によるものであることの確たる根拠を示すものといえる。

上述のように、2 系統の GRP-R KO マウスにおいて攻撃性社会行動および非攻撃性社会行動における系統差が認められなかったことから、実験 2 以降の各実験においては、被験体を 11B6 系統の GRP-R KO マウスに統一した。

## 2. 実験2：攻撃性社会行動の下位分析－刺激誘発性闘争テスト(shock-induced aggression test)

実験1ではGRP-R KO マウスにおいて攻撃性社会行動の変化が認められなかった。しかしながら、先住者－侵入者法において攻撃性社会行動が認められなくても、これをもって GRP-R が攻撃性全般にわたる調整に関与していないと結論することはできない。

先住者－侵入者法では、個別飼育による社会的刺激の剥奪の結果生じる情動性の変化あるいは抗ストレス性の低下による攻撃性の亢進を、なわばり侵入者に対する同種間攻撃行動の形態で測定するものであるが、攻撃性の亢進は社会的剥奪以外の要因によっても規定され得る。その一つの主要な要因として、痛みや身体的苦痛が考えられる。痛みや身体的苦痛といった刺激が怒りの反応(rage response)や同種他個体あるいは異種個体に対する攻撃行動を誘発することが古くから知られている(65,66)。そこで本実験においては、GRP-R KO マウスの攻撃性について、刺激誘発性闘争テスト(shock-induced aggression test)法を用いて、更なる分析を試みた。

### 1) 方法

**被験体：**雄のGRP-R KO マウス10匹、および同腹の雄の野生型マウス10匹。GRP-R KO マウスおよび野生型マウスは、C57BL/6 系統に戻し交配を行なった第9世代(F9)のマウスを用いた。マウスは生後約4ヶ月齢で、平均体重はそれぞれ  $29.7 \pm 0.4\text{g}$  と  $29.9 \pm 0.8\text{g}$  であった。マウスは両遺伝子型のマウスが混在する状態で、1ケージあたり5匹の集団飼育を行った<sup>\*)</sup>。なお、摂食および飲水はテスト時を除いて自由とした。

**装置：**電撃提示用グリッドフロア(20×20×2 (H) cm)。ステンレス製グリッドの太さは直径5mm、グリッド間の間隔は9mmであった。また、ショックジェネレータ・スクランブラ(室町機械製 SGS-002)およびグリッドフロアにかぶせてマウスの闘争空間を作るためのガラス製ビーカ(1L)を用いた。

**手続き：**Tedeschi ら(65)の標準的手続きに基づいて実験を行った。GRP-R KO マウスおよび野生型マウスをそれぞれ同じ遺伝子型の2匹ずつの組に分けた。2匹のマウスをグリッド上に置き、上からガラスビーカをかぶせ、フロアグリッドより電気

ショック(foot shock)を提示した。電気ショックは 400V 1.3mA の交流電流を 0.2 秒ずつ 1 分間に 60 回の割合で 90 秒間提示した。90 秒間のマウスの行動を観察し、攻撃(闘争)反応の生起回数を測定した。なお、攻撃(闘争)反応は、マウスが後ろ足で立ち上がり、互いに噛み付きあう反応とした(Fig. 2-3(A) 参照)。\*3

**統計的検定:** 統計的分析は F 検定によって等分散性について検定後、Student の t 検定(両側)によって行った。

## 2) 結果と考察

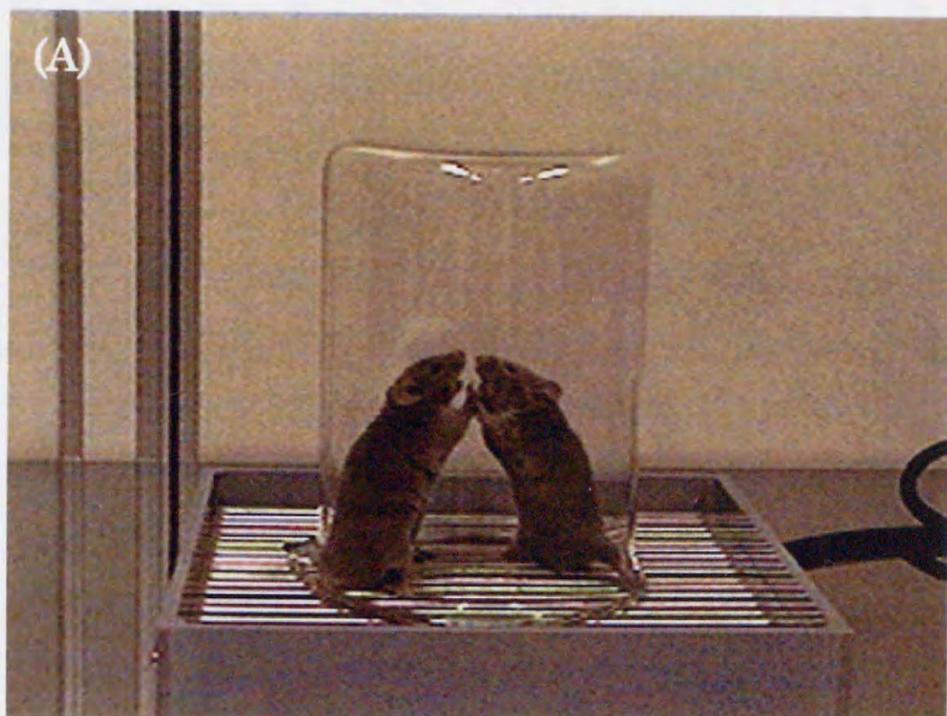
結果は Fig. 2-3 にまとめた。GRO-R KO マウスと野生型マウスの平均攻撃反応数の間には有意な差は認められなかった( $t=0.52$ , n.s.)。

本実験において、電撃提示下という極めてストレス負荷が大きく、かつ情動的な反応の生起しやすい状況下においても GRP-R KO マウスの攻撃性社会行動に変化が認められなかった。この結果は、先住者-侵入者法において GRP-R KO マウスの攻撃性社会行動に変化が認められなかった実験 1 の結果とともに、GRP-R の欠損が攻撃性社会行動に変化をもたらさないことを示すものと考えられる。

---

\*2: 本実験では、電撃提示によって誘発される攻撃行動について、社会的刺激の剥奪による影響を排除するために、マウスを集団飼育条件で飼育した。

\*3: Tedeschi ら(65)の標準的手続きでは、テスト試行に先行して予備試行を行っている。予備試行では測定時間内に最低 1 回の攻撃(闘争)反応が見られた組み合わせだけを選別し、この組み合わせをテスト試行で実験に利用している。これに対して本実験では、この実験系が比較的強い強度の電気ショックを被験体に与えるため、近年の動物実験に関する倫理上の問題に抵触する可能性があることを考慮し、予備試行は行わないこととした。しかしながら、結果的には実験に用いたマウスの全組み合わせにおいて 1 回以上の攻撃(闘争)反応が観察されたので、Tedeschi らの標準的手続きに準拠した実験であるといえる。



(B) Results of Shock-Induced Aggression Test

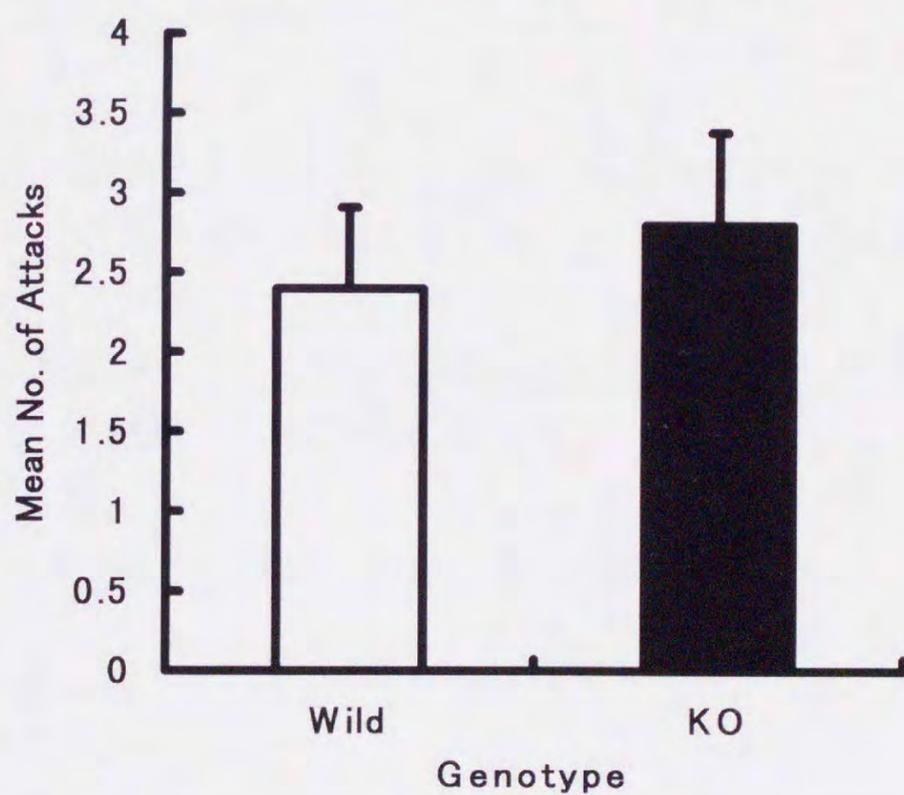


Fig. 2-3 Results of shock-induced aggression test. (A) An example of aggressive behavior (fighting) induced by food shock (photo DBA/2J). (B) Mean number of attacks in *Experiment 2*. Data represent mean + SEM. No significant difference between GRP-R KO mice and wild type mice was observed.

### 3. 実験3：非攻撃性社会行動の下位分析（嗅覚刺激および標的オブジェクトの導入による自発活動性の変化に関する分析）

本実験においては、実験1においてGRP-R KO マウスに認められた非攻撃性社会行動の亢進について下位分析を試みた。本研究においては、sniffing & following、nose touching および mounting の諸行動指標を、非攻撃性社会行動としてカテゴリ化した。マウスにおけるこれらの行動は、飼育ケージ等個体の生存空間内における縄張り支配あるいは社会的順位等に基づいて表出されるものと考えられる。マウスにおける sniffing、following および nose touching 等の行動の解発要因は主として嗅覚刺激であると考えられるが、following、nose touching および mounting 等、身体接触を伴う行動は、接触可能な対象の存在が行動発現の必要条件と考えられる。そこで本実験では、嗅覚刺激および身体接触可能な標的刺激(object)を導入することによって、GRP-R KO マウスと野生型マウスの自発活動性の変化について検討を加えた。

#### 1) 方法

**被験体：**雄のGRP-R KO マウス8匹、および同腹の雄の野生型マウス8匹を用いた。GRP-R KO マウスおよび野生型マウスは、C57BL/6 系統に戻し交配を行なった第9世代(F9)のマウスを用いた。マウスは生後3ヶ月齢で、平均体重はそれぞれ  $24.7 \pm 0.5\text{g}$  および  $25.8 \pm 0.7\text{g}$  であった。マウスは生後10週目より個別飼育条件下で飼育した。なお、摂食および飲水は実験中を除いて自由とした。

**装置：**赤外線ビーム式の活動量測定装置4基（ニューロサイエンス社：オープンフィールドの寸法  $275 \times 275 \times 210\text{(H)mm}$ ）およびデータ記録・解析用パーソナルコンピュータシステム（富士通 FM-V）を用いた。

**材料：**濾紙( $20 \times 20\text{mm}$ 、厚さ  $0.2\text{mm}$ )、マウスと同程度の大きさで、緑色のビニール製のカエルの人形（高さ  $45\text{mm}$ 、幅  $30\text{mm}$ 、厚み  $20\text{mm}$ ）、および尿サンプル。

尿サンプルは C57BL/6 系統のマウスより、通常の保定下および電気ショックを与えた状態で採取した。通常の保定下において雄および雌の尿サンプルを、電気ショック提示下では雄のみの尿サンプルを採取した。尿採取の際に提示した電気ショックは  $400\text{ V } 0.3\text{ mA}$  の交流電流で、 $0.2$  秒ずつ1分間に60回の割合で3秒間提示した。

なお、採取した尿サンプルは200 $\mu$ lずつ分注して-20 $^{\circ}$ Cで凍結保存し、利用分を毎回実験開始直前に氷温にて解凍して使用した。

**手続き**：マウスを活動量測定装置に入れ、5分間の活動量を測定した。測定項目は移動運動量(distance traveled)・移動運動時間(time ambulation)・移動運動カウント(ambulatory counts)、常同行動量(stereotypic counts)・常同行動従事時間(time stereotypy)、立ち上がり反応(vertical counts)、不動時間(time rest)、糞(fecets)の数および尿スポット(urine)の数とした。活動量測定装置(オープンフィールド)は各試行毎に70%アルコールで清掃した。なお、行動測定中の照明はコンピュータディスプレイの明かり以外を消灯し、実験者は別室で待機した。実験は以下の3セッションで構成された。

#### セッション1：馴化訓練

嗅覚刺激および標的刺激を提示せず、嗅覚刺激提示用の濾紙のみを装置床の中央に配置して、中央に直径5mmの穴をあけた紙製の粘着シールによって固定した。馴化訓練は1週間の間隔をおいて2試行行った。

#### セッション2：嗅覚刺激テスト

馴化訓練終了の1週間後から開始した。装置床の中央に濾紙を配置し、中央に直径5mmの穴をあけた紙製の粘着シールによって固定した。中央部の濾紙露出部に尿サンプル10 $\mu$ lを滴下し、嗅覚刺激を提示した。嗅覚刺激の提示順序は、はじめに通常保定下で採取した雄の尿、続いて通常保定下で採取した雌の尿、そして最後に電気ショック提示下で採取した雄の尿とした。嗅覚刺激テストは各1週間の間隔をおいて実施した。

#### セッション3：標的刺激テスト

嗅覚刺激テスト終了の1週間後に行なった。装置床の中央部に標的刺激オブジェクトを横臥状態で配置・固定した。

**統計的検定**：データはテストケージ内全範囲におけるマウスの活動、および嗅覚刺激・標的オブジェクトの配置領域におけるマウスの活動に分け、別個に分析を行った。統計的分析は二元配置の分散分析を用いた。また、多重比較はStudentのt検

定(両側・片側)および対応のある t 検定(両側・片側)を用いた。

## 2) 結果

結果の分析は、まず、装置(テストケージ)全体領域における GRP-R KO マウスと野生型マウスの自発活動性について、各行動指標毎に遺伝子型(GRP-R KO & Wild type) × テスト条件(pretest 1, pretest 2, male odor test, female odor test, stress odor test, object test)の二元配置の分散分析を行ない、同様の分析を装置床中央部の刺激配置領域における自発活動性についても行なった。次に、各テスト条件毎に装置全体領域における個別の行動指標について GRP-R KO マウスと野生型マウスを比較し、同様の分析を装置床中央部の刺激配置領域における自発活動性についても行なった。そして、GRP-R KO マウスおよび野生型マウスの各々におけるテスト条件間の差について個体内比較を行なった。なお、糞(fecets)の数・尿スポット(urine)の数の両指標については、すべての分析において有意な差が認められなかった。そこで、以後これらの指標については記述しない。

### 2)-1. 遺伝子型およびテスト条件の効果

遺伝子型およびテスト条件の効果について、繰り返しのある二元配置の分散分析を用いて分析した。結果は Table 2-3. にまとめた。装置全体領域の活動に関する分析の結果、全ての行動指標についてテスト条件の主効果が有意であった。一方、遺伝子型の主効果については全ての行動指標について有意ではなかったが、不動時間(time rest)および立ち上がり反応(vertical counts)において、有意水準には至らないものの、遺伝子型の効果を示唆する結果が得られた。しかし、遺伝子型×テスト条件の有意な交互作用は認められなかった。これに対して、装置中央部領域における活動に関する分析の結果、全ての行動指標についてテスト条件の主効果が有意であった。また、移動運動時間(time ambulation)および常同行動従事時間(time stereotypy)の両指標において、有意な遺伝子型の主効果が認められた。しかし、遺伝子型×テスト条件の有意な交互作用は認められなかった。

全体領域における分析結果は、嗅覚刺激および標的刺激の導入が、GRP-R KO マウスおよび野生型マウスのオープンフィールド全体における活動に対して同様の効果を持つことを示している。一方、中央部領域における分析結果は、嗅覚刺激および

Table 2-3. Results of Two-way ANOVA

	Whole Area Analysis			Central Area Analysis		
	Test Condition	Genotype	Interaction	Test Condition	Genotype	Interaction
Distance Traveled	F(5,84)=8.75***	n.s.	n.s.	F(5,84)=11.71***	n.s.	n.s.
Time Ambulation	F(5,84)=8.24***	n.s.	n.s.	F(5,84)=15.54***	F(1,84)=4.85*	n.s.
Ambulatory Counts	F(5,84)=8.72***	n.s.	n.s.	F(5,84)=6.92***	n.s.	n.s.
Time Stereotypy	F(5,84)=10.87***	n.s.	n.s.	F(5,84)=19.68***	F(1,84)=4.02*	n.s.
Stereotypic Counts	F(5,84)=9.74***	n.s.	n.s.	F(5,84)=15.97***	n.s.	n.s.
Time Rest	F(5,84)=12.96***	(p<0.10)	n.s.	F(5,84)=9.42***	n.s.	n.s.
Vertical Counts	F(5,84)=4.79**	(p<0.07)	n.s.	F(5,84)=2.58*	n.s.	n.s.

Note. \*\*\*: p<0.0001; \*\*: p<0.01; \*: p<0.05

標的刺激の導入によって、中央部領域における GRP-R KO マウスの活動性が野生型マウスとの比較において異なる変化を生じている可能性を示している。

## 2)-2. 遺伝子型の効果

全体領域および中央部領域の活動について、GRP-R KO マウスと野生型マウスの間に有意な差が得られた指標を Table 2-4. および Fig. 2-4 にまとめた。全体領域において有意な差が認められた行動指標は、馴化訓練第 2 試行(pretest 2)における移動運動の各指標および立ち上がり反応で、GRP-R KO マウスに有意な亢進が認められた。また、標的刺激テスト(object test)における常同行動従事時間においても GRP-R KO マウスに有意な亢進が認められた。一方、中央部領域において有意な差が認められたのは、馴化訓練第 1 試行(pretest 1)における常同行動従事時間および不動時間、馴化訓練第 2 試行における移動運動時間(time ambulation)および移動運動カウント(ambulatory counts)、およびストレス刺激テスト(stress odor test)における移動運動量(distance traveled)と移動運動時間であった。馴化訓練第 2 試行で認められた全体領域における活動性の亢進は、一般的行動特性の分析において認められた結果を追認するものといえる。また、標的刺激テストにおける常同行動従事時間の亢進は、GRP-R KO マウスが新奇な対象と対峙した際、野生型マウスとは異なる反応を示すことを示唆するものである。これらの結果は、実験 1 で認められた非攻撃性社会行動の亢進と何らかの関連を持つ反応と考えられる。一方、馴化訓練第 1 試行および馴化訓練第 2 試行において GRP-R KO マウスに認められた中央部領域における各行動の亢進は、GRP-R KO マウスが野生型マウスとは異なり、オープンフィールド事態において比較的早い段階から中央部領域に進出し、活動をしていることを示している。この結果は、GRP-R KO マウスの不安反応性が野生型マウスとは異なっている可能性を示唆するものである。同様に、ストレス刺激テストにおいて認められた中央部領域における移動運動の亢進は、GRP-R KO マウスがストレス刺激源に対して野生型マウスよりも高い頻度で接近したことを示している。この結果は、GRP-R KO マウスにおいて同種個体の発する嗅覚性のストレスシグナルに対する反応性に変化が生じている可能性を示唆するものといえる。

Table 2-4. Results of activity test with odor stimuli and object stimulus

Behavior indices	test condition	(t-value & p-value)
<i>Whole area analysis</i>		
Distance traveled	pretest 2	(t=2.37, p<0.05)
Time ambulation	pretest 2	(t=2.64, p<0.02)
Ambulatory counts	pretest 2	(t=2.80, p<0.02)
Time stereotypy	object	(t=2.00, p<0.04, one-tailed)
Vertical counts	pretest 2	(t=1.81, p<0.04, one-tailed)
<i>Central area analysis</i>		
Distance traveled	stressed odor	(t=2.69, p<0.02)
Time ambulation	pretest 2	(t=2.13, p<0.05, one-tailed)
	stressed odor	(t=1.89, p<0.04, one-tailed)
Ambulatory counts	pretest 2	(t=2.20, p<0.05)
Time stereotypy	pretest 1	(t=2.05, p<0.03, one-tailed)
Time rest	pretest 1	(t=2.18, p<0.05)

Table 2-5a. Results of within-subject multiple comparisons in whole area analysis

		GRP-R KO										Wild Type				
		DT	TA	AC	TS	SC	TR	VC	DT	TA	AC	TS	SC	TR	VC	
P1	P2															
P1	M	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	**	*	
P1	F				*	*	*	*	*	*	*	*	**	**	**	
P1	S				*	*	*	*	*	*	*	*	**	**	**	
P1	O															
P2	M															
P2	F					*	*	*				**	*	*	*	
P2	S					*	*	*			**	**	**	**	**	
P2	O															
M	F															
M	S															
M	O	*	*	*												
F	S															
F	O															
S	O															

Note. P1: Pretest1; P2: Pretest 2; M: Male Odor; F: Female Odor; S: Stressed Odor; O: Object; DT: distance traveled; TA: time ambulation; AC: ambulatory counts; TS: Time stereotypy; SC: Stereotypic Counts; TR: time rest; VC: vertical counts; \*\*: p<0.01, \*: p<0.05, A: dishabitation to environment

Table 2-5b. Results of within-subject multiple comparisons in central area analysis

	GRP-R KO										Wild Type				
	DT	TA	AC	TS	SC	TR	VC	DT	TA	AC	TS	SC	TR	VC	
P1															
P2															
P1								*	**	*	**				
P1								*	**	*					
P1								**	**	*	**				
P1								**	**	*	**				
P2															
P2								*	*		**	**			
P2								**	*		**	**			
P2								**	**		**	**	*		
M															
M											*				
M								*	*		**	*	*	*	
F															
F															
S															

Note. P1: Pretest1; P2: Pretest 2; M: Male Odor; F: Female Odor; S: Stressed Odor; O: Object; DT: distance traveled; TA: time ambulated; AC: ambulatory counts; TS: Time stereotypy; SC: Stereotypic Counts; TR: time rest; VC: vertical counts; \*\*: p<0.01, \*: p<0.05

### 2)-3. テスト条件の効果

GRP-R KO マウスおよび野生型マウスにおけるテスト条件の効果について多重比較を行なった。結果を Table 2-5.にまとめた(個々の計算値は示していない)。全体領域におけるテスト条件の効果について最も注目すべき点は、嗅覚刺激の導入による自発活動性の低下である(Fig. 2-4 参照)。馴化訓練第 1 試行および馴化訓練第 2 試行と各嗅覚刺激提示条件の間で、GRP-R KO マウス・野生型マウスともに自発活動性の抑制が認められるが、特に野生型マウスにおいてその傾向が顕著である(Table 2-5a. 枠内を参照)。一方、中央部領域におけるテスト条件の効果について最も注目すべき点は、標的刺激の導入による自発活動性の低下である(Fig. 2-4 参照)。馴化訓練第 1 試行および馴化訓練第 2 試行および雄の嗅覚刺激テスト(male odor test)の各テスト条件との比較において、GRP-R KO マウス・野生型マウスともに標的刺激テストにおける自発活動性に有意な低下が認められた(Table 2-5b. 枠内を参照)。しかし、自発活動性の抑制の程度は GRP-R KO マウスと野生型マウスにおいてほぼ同様であった(Fig. 2-4)。これらの結果は、各刺激の導入がマウスの自発活動性に及ぼす効果が、全体領域と中央部領域において異なることを示している。また同時に、これらの刺激の導入による自発活動性の変化の様式が GRP-R KO マウスと野生型マウスの間で異なる傾向があることを示している。

### 3) 考察

本実験においては、装置全体領域におけるマウスの活動の分析から、GRP-R KO マウスの移動運動に亢進が認められ、さらに常同行動および立ち上がり反応にも変化が認められた(Table 2-3,4.)。また、嗅覚刺激の導入によって、GRP-R KO マウス・野生型マウスともに、移動運動の抑制が認められたが、標的刺激の導入によって移動運動の回復がみられた(Fig. 2-4, Table 2-5a.)。さらに、刺激配置領域(中央部領域)におけるマウスの活動の分析から、GRP-R KO マウスの中央領域における活動が野生型マウスよりも亢進していること、およびストレス刺激に対する GRP-R KO マウスの反応性が野生型マウスと比較して亢進していること、が明らかになった(Fig. 2-4)。

GRP-R KO マウスにおける移動運動の亢進は、一般的行動特性の分析結果を追試するものである。本実験においては、馴化訓練第 2 試行において野生型マウスの移動運動が低下傾向であるのに対して、GRP-R KO マウスでは低下の傾向がみられな

かった(Fig. 2-4 (A)~(C))。これは馴化訓練第2試行において GRP-R KO マウスと野生型マウスの中に認められた移動運動の差の原因になっていると考えられる。一般的にオープンフィールド場面における活動性は、試行を繰り返すことによって低下することが知られているので(67)、この結果は GRP-R KO マウスでは新奇な環境に対する馴化の過程に変化が生じている可能性を示唆している。このことは、立ち上がり反応の亢進からも支持されよう(Fig. 2-4 (F))。

次に、嗅覚刺激の導入によって GRP-R KO マウス・野生型マウスともに移動運動の低下および不動時間の亢進が認められた。これは GRP-R KO マウスが野生型マウスと同様に同種個体の匂いに対する正常な反応性を持つことを示している。マウス個体の固有のなわばりとして確立されていない空間において、同種個体のおいの存在は、マウスに対して防御的反応を喚起することが予想される。活動量測定装置に対しては馴化試行およびその後のテスト試行においてある程度馴化が生じていることが予想されるが、飼育ケージと比較した場合マウス個体にとって不慣れな場面であることは変わりがない。従って、嗅覚刺激提示下の移動反応の低下・不動時間の亢進は、新奇場面におけるマウスの社会的防御反応と見なし得るだろう。しかしながら、標的刺激の導入は GRP-R KO マウス・野生型マウスともに移動運動を回復させた(Table 5-2a. 枠 A 参照)。これは標的刺激に対する反応が匂い刺激に対するような社会的反応とは異なり、物理的環境の新奇性が増したことによる、環境に対する脱馴化の反応と考えることができる。この反応に関しても、GRP-R KO マウスは野生型マウスと同様の反応をしており、特に行動変化は認められなかった。

このように全体領域における活動の分析では、GRP-R KO マウスに、移動運動・常同行動および立ち上がり反応の亢進が認められたが、嗅覚刺激および標的刺激の導入による行動変化には野生型マウスとの間に明らかな差は認められなかった。これに対して、中央部領域における活動の分析においては、GRP-R KO マウスにおいて特徴的な行動変化が認められた。すなわち、刺激の有無に関わらず GRP-R KO マウスでは中央領域への進出・中央領域での活動および中央領域における滞在時間などに亢進が認められたことである。一般にマウスやラットでは、オープンフィールド観察において初期の段階ではケージのはじにおける活動が多く、中央領域への進出は少ないとされている(68)。中央部領域への進出および中央部領域における活動は、環境に対する順応の進展に伴って増加する。しかし、GRP-R KO マウスでは Pretest の段階において野生型マウスよりも有意に中央領域へ進出しており、その傾向は刺激を導入しても続いている。これは GRP-R KO マウスにおいて新奇環境への反応性の変化、

すなわち新奇環境に対する不安性が欠如あるいは低下している可能性を示唆するものと考えられる。さらに特筆すべきは、雄のストレス刺激を導入した場合、GRP-R KO マウスの中央部領域における活動が野生型と比較して有意に亢進していることである。マウスやラットではストレス反応や不安反応が匂い刺激を媒介として個体間伝達されることが知られている。すなわち、電気ショックなどのストレスを加えられた個体の尿などを刺激として回避行動を測定すると、被験マウスはブランクあるいは非ストレス事態の匂い刺激を用いた場合と比較して、より強い回避行動を示すことが知られている(69, 発表論文 4)。実験環境は異なるが、本実験において GRP-R KO マウスがストレス刺激の配置領域に野生型マウスよりも有意に進出し活動したことは、GRP-R KO マウスにおける匂い刺激を媒介とした個体間情報伝達に何らかの変化が存在することを示唆するものといえよう。

このように本実験の結果は、実験1において観察された GRP-R KO マウスにおける非攻撃性社会行動の亢進に関して、不安性の欠如や個体間情報伝達あるいは同種他個体認知における変化が関与している可能性を示している。

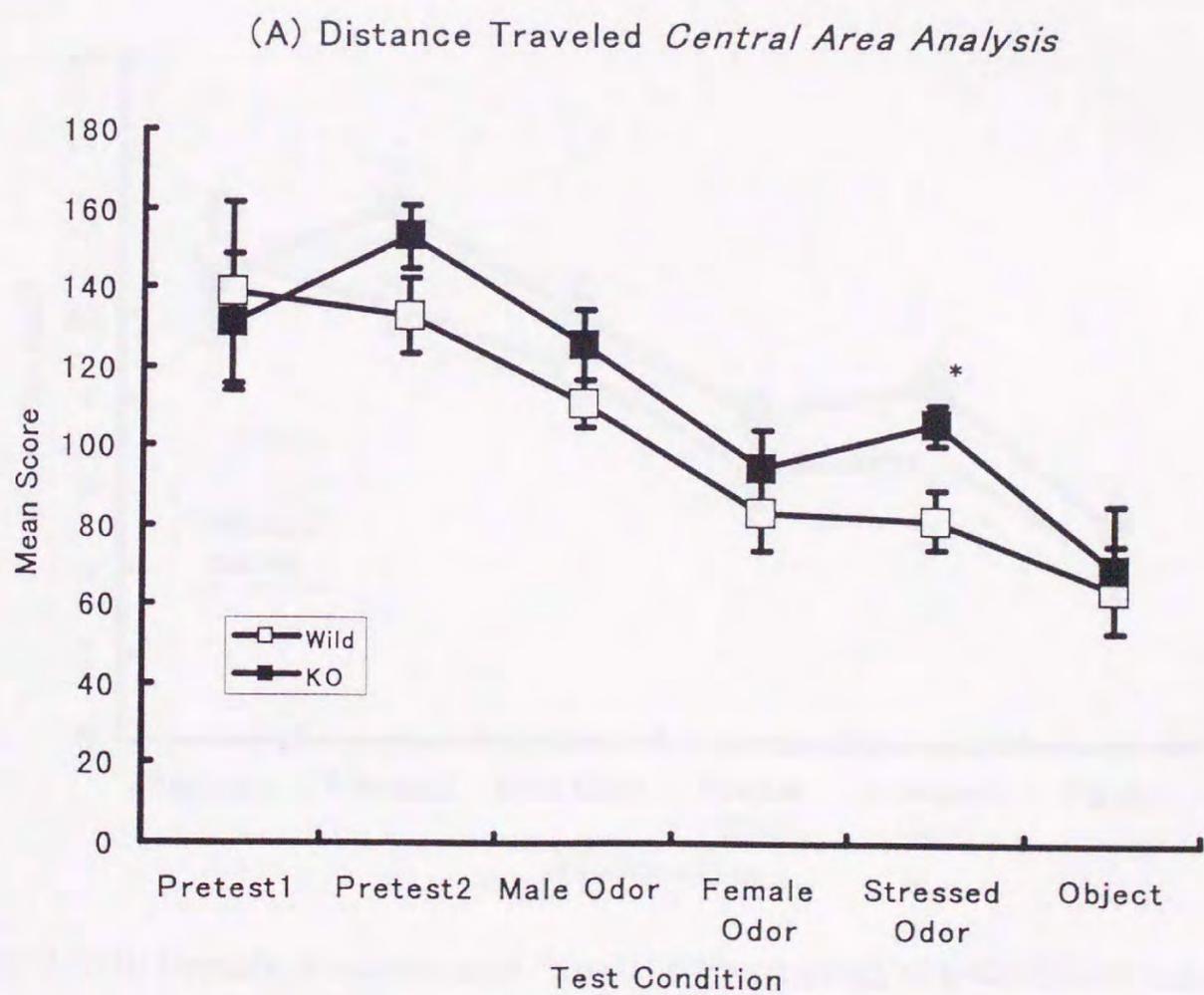
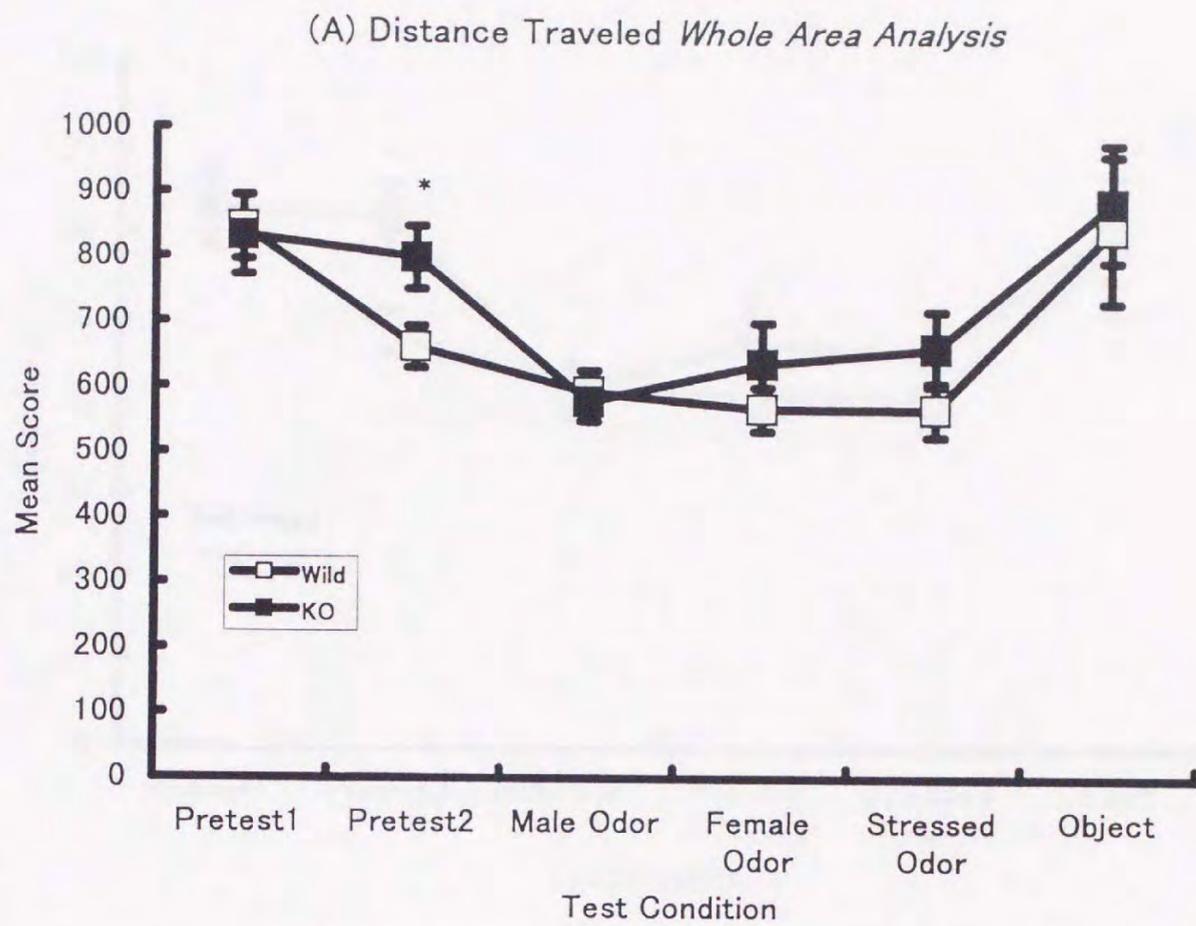
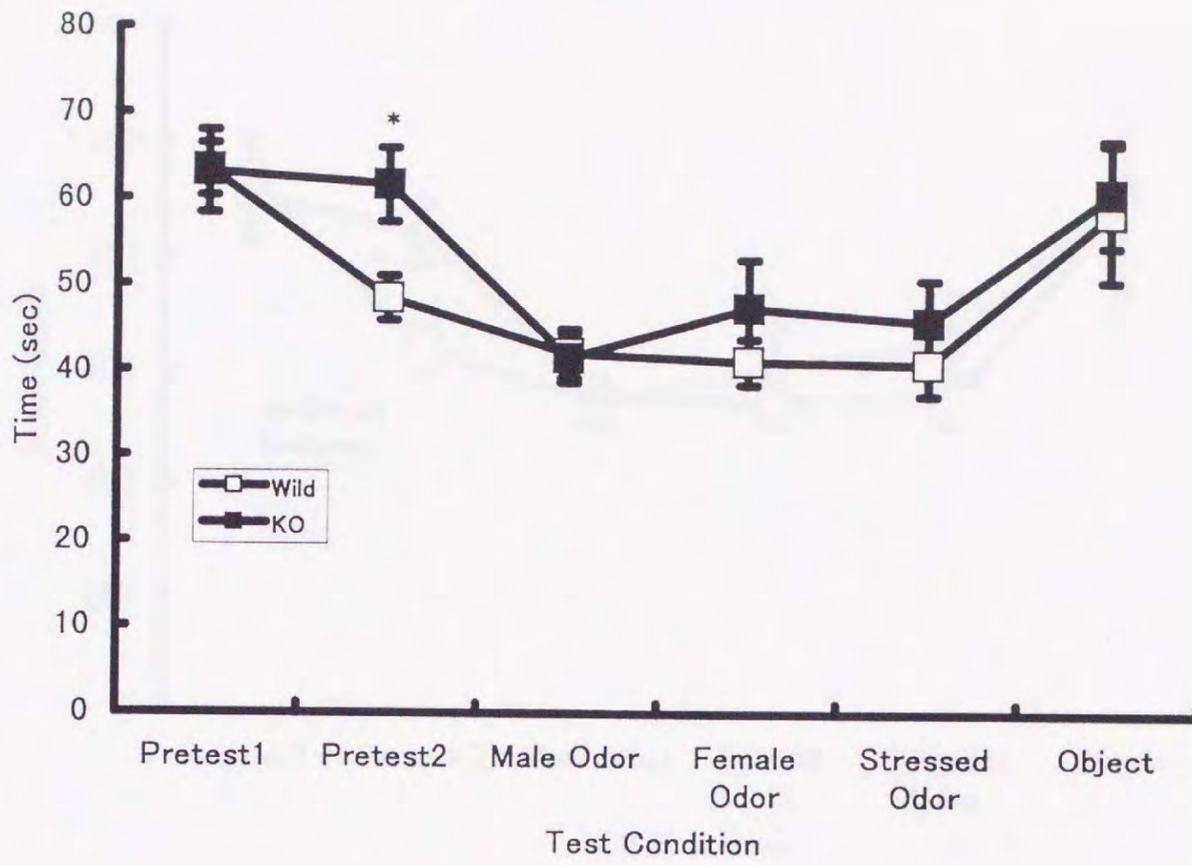


Fig. 2-4 (A) Results of activity test. \*:  $p < 0.05$  (two-tailed)

(B) Time Ambulation *Whole Area Analysis*



(B) Time Ambulation *Central Area Analysis*

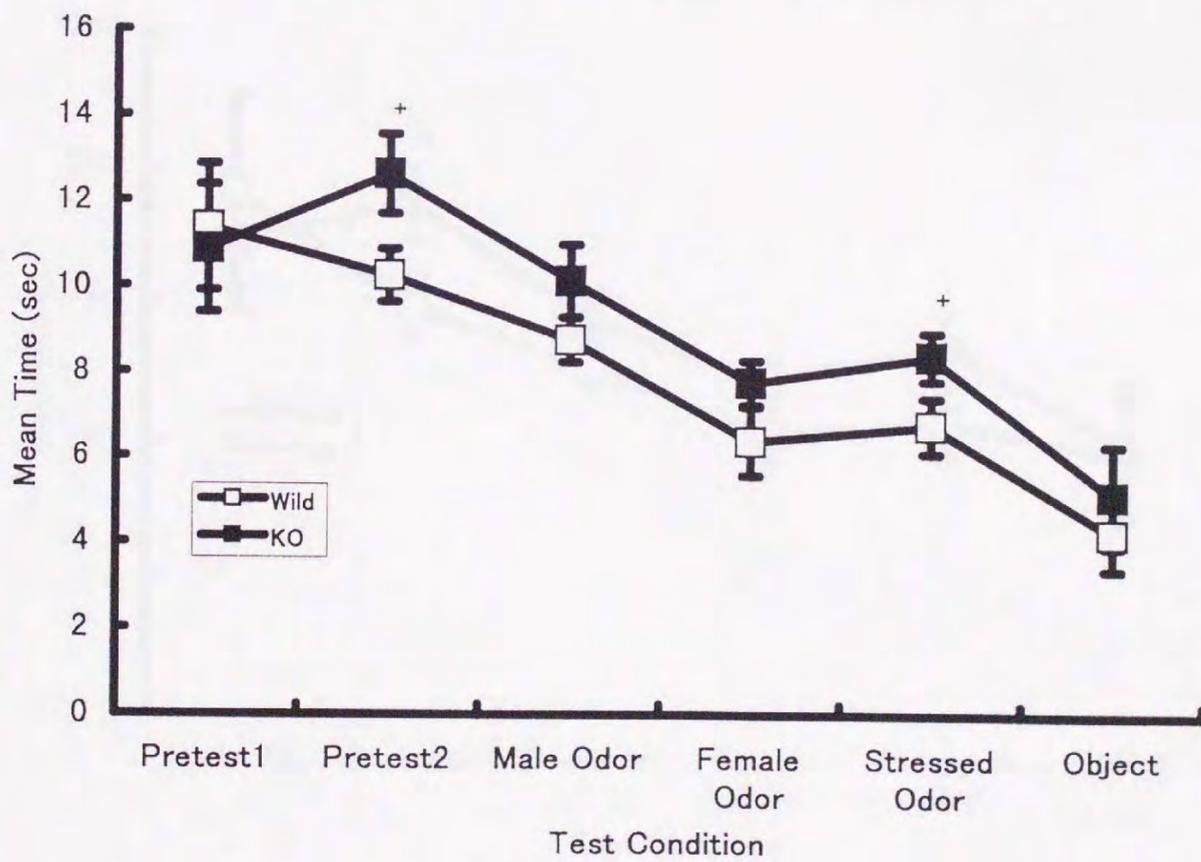
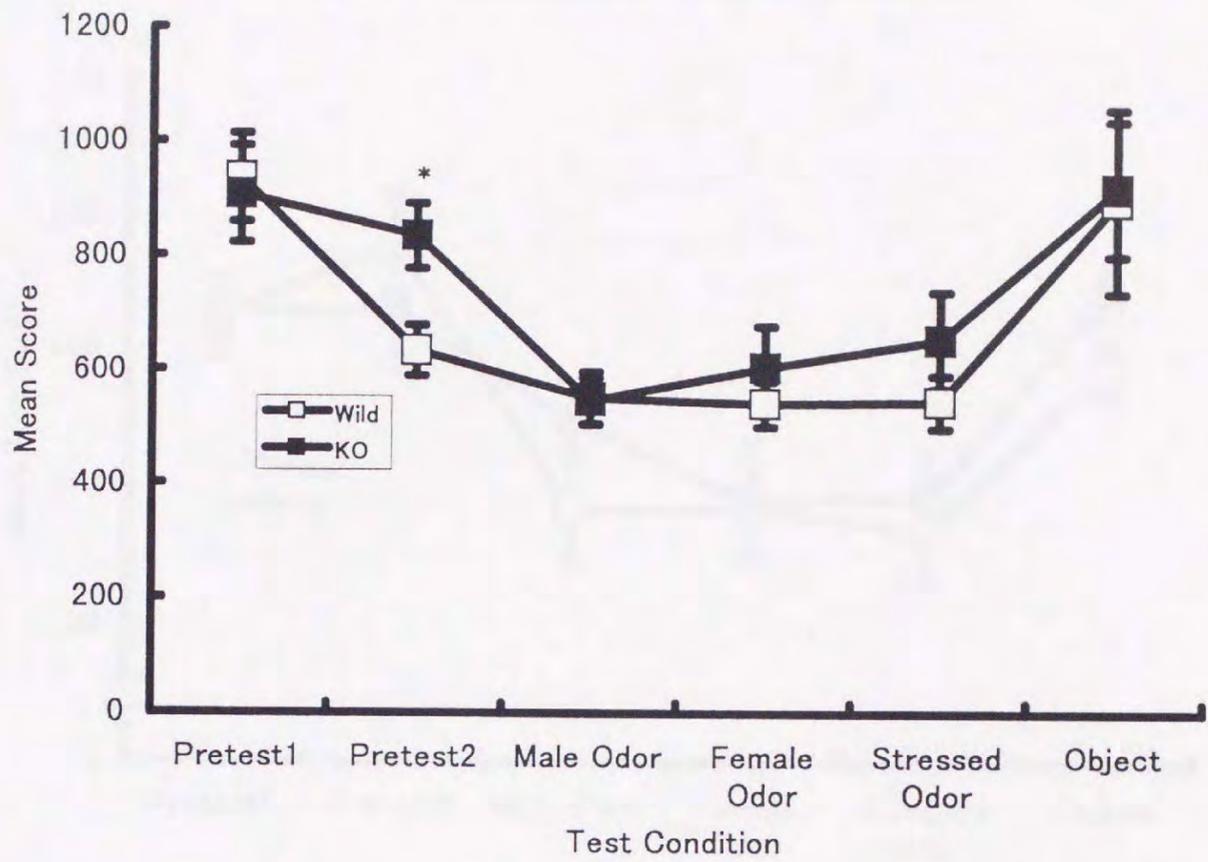


Fig. 2-4 (B) Results of activity test. \*:  $p < 0.05$  (two-tailed), +:  $p < 0.05$  (one-tailed)

(C) Ambulatory Counts *Whole Area Analysis*



(C) Ambulatory Counts *Central Area Analysis*

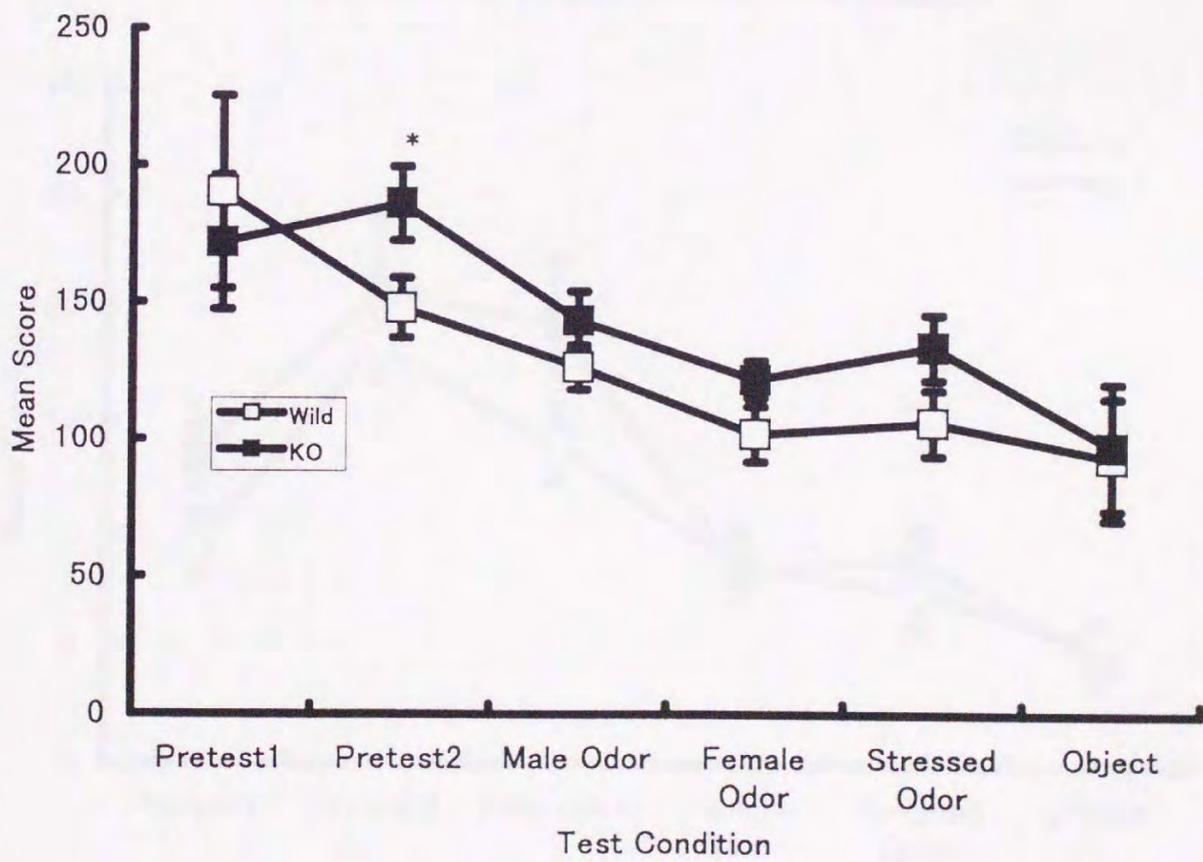
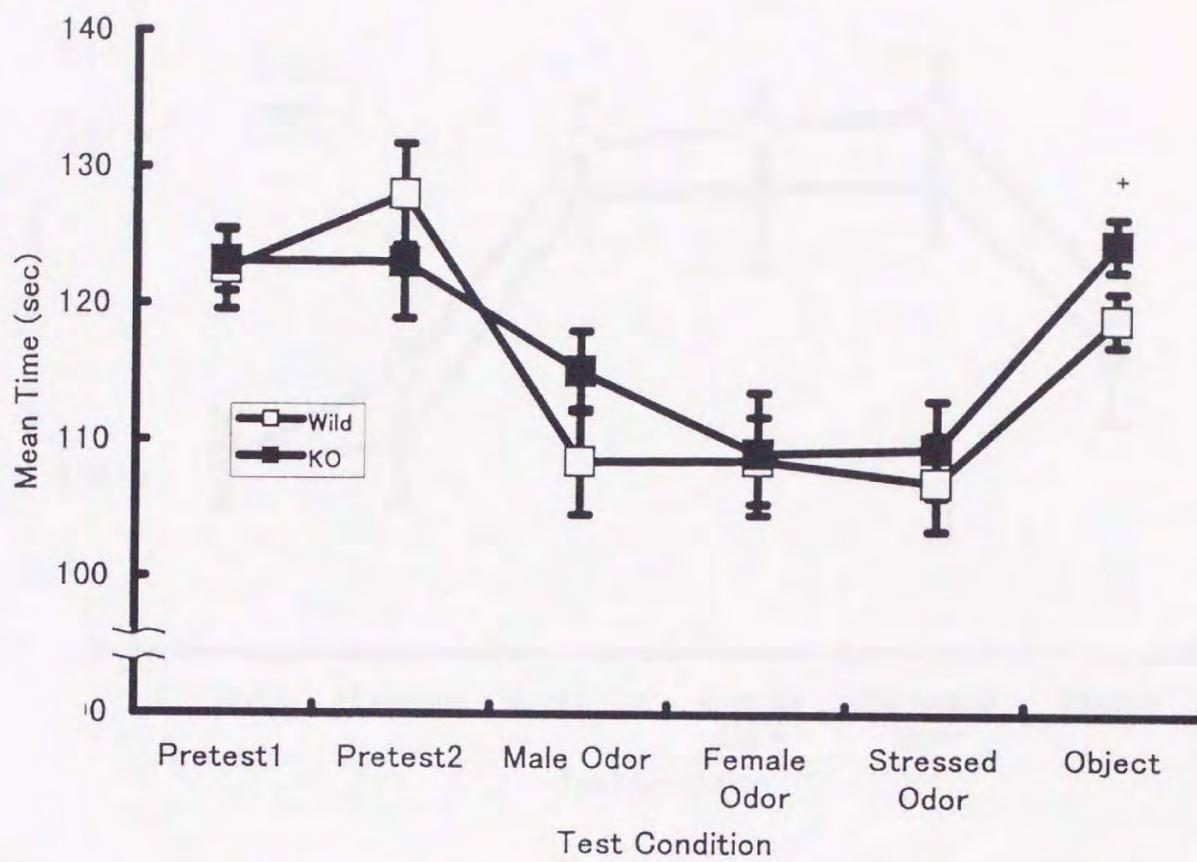


Fig. 2-4 (C) Results of activity test. \*:  $p < 0.05$  (two-tailed)

(D) Time Stereotypy *Whole Area Analysis*



(D) Time Stereotypy *Central Area Analysis*

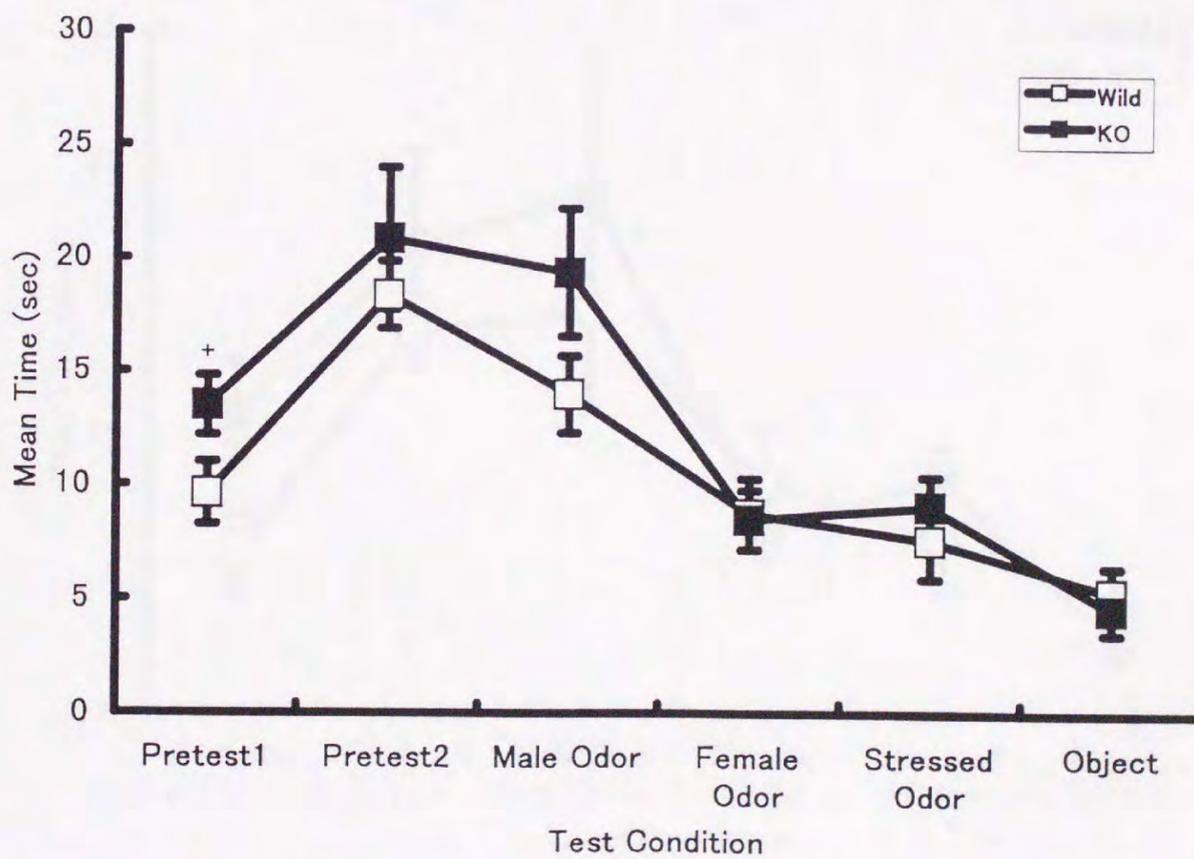
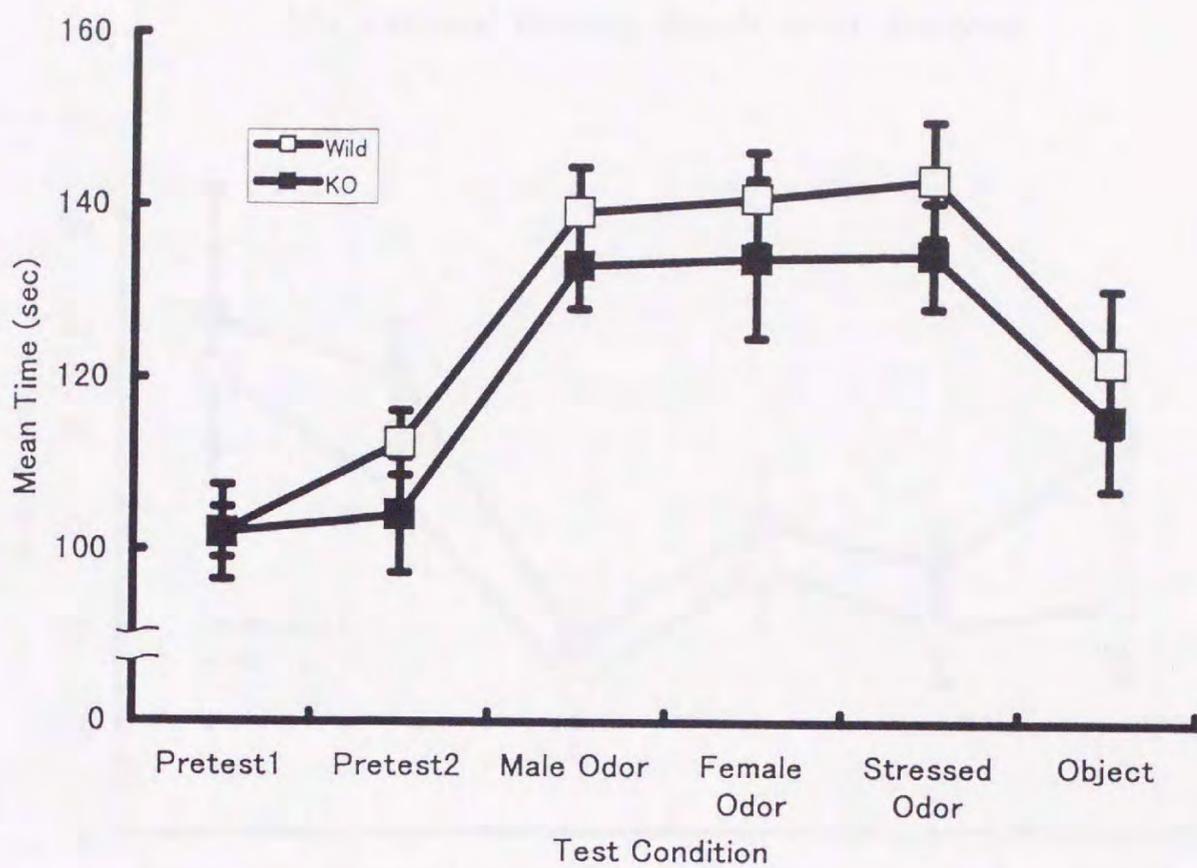


Fig. 2-4 (D) Results of activity test. +:  $<0.05$  (one-tailed)

(E) Time Rest *Whole Area Analysis*



(E) Time Rest *Central Area Analysis*

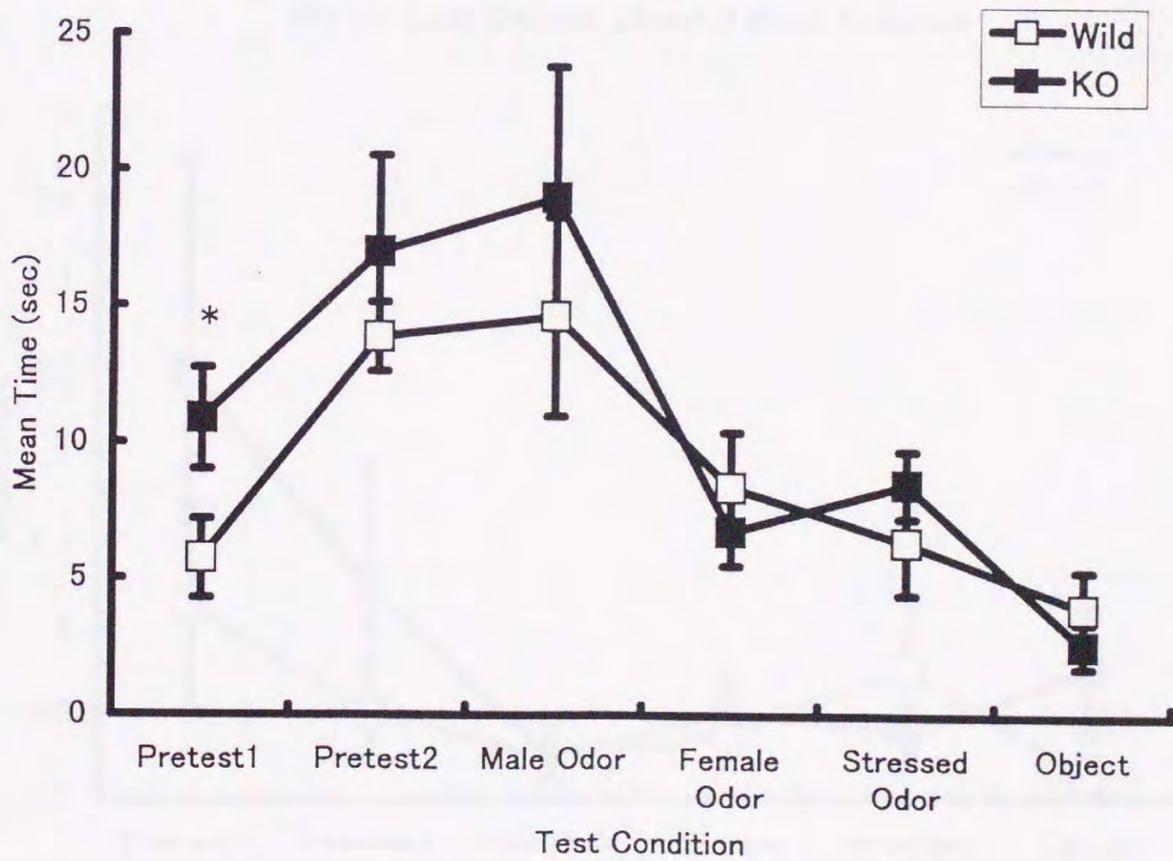
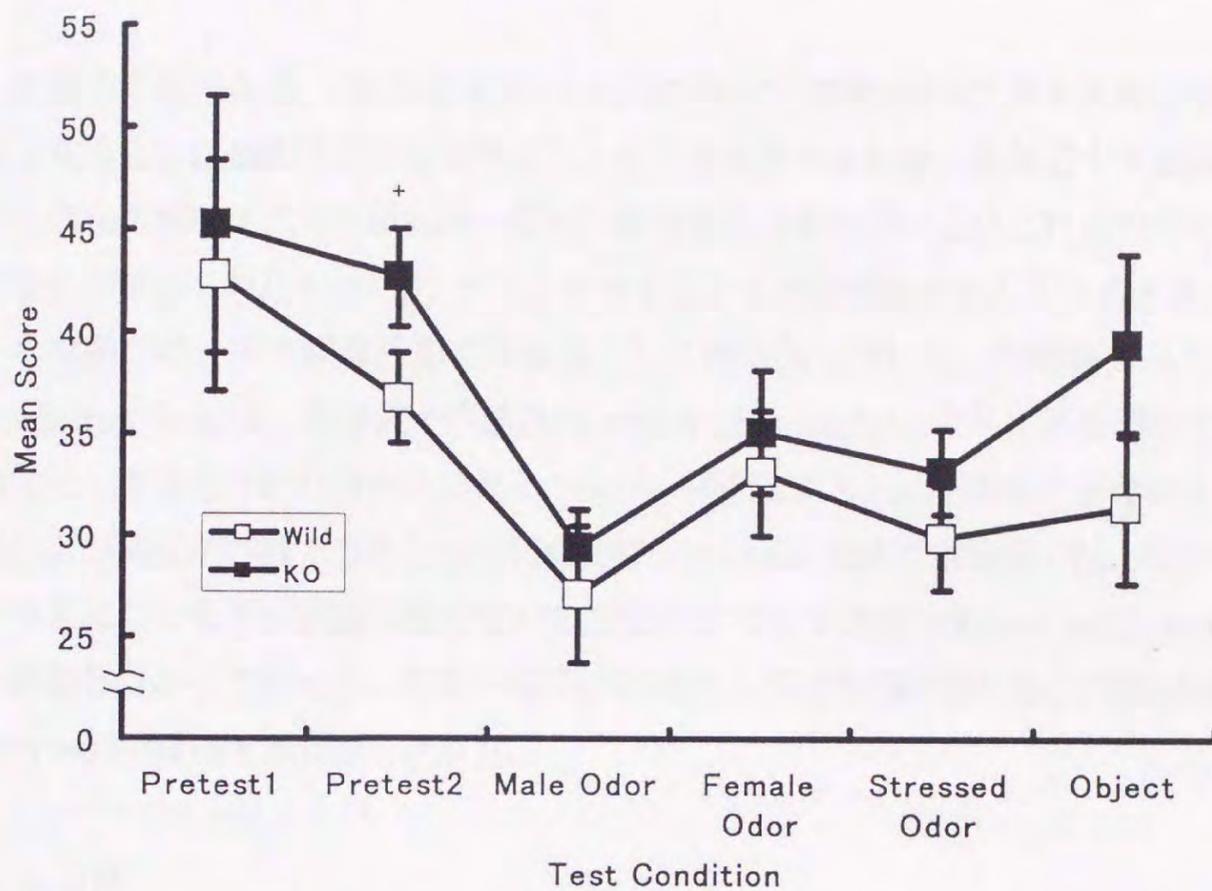


Fig. 2-4 (E) Results of activity test. \*:p<0.05 (two-tailed)

(F) Vertical Counts *Whole Area Analysis*



(F) Vertical Counts *Central Area Analysis*

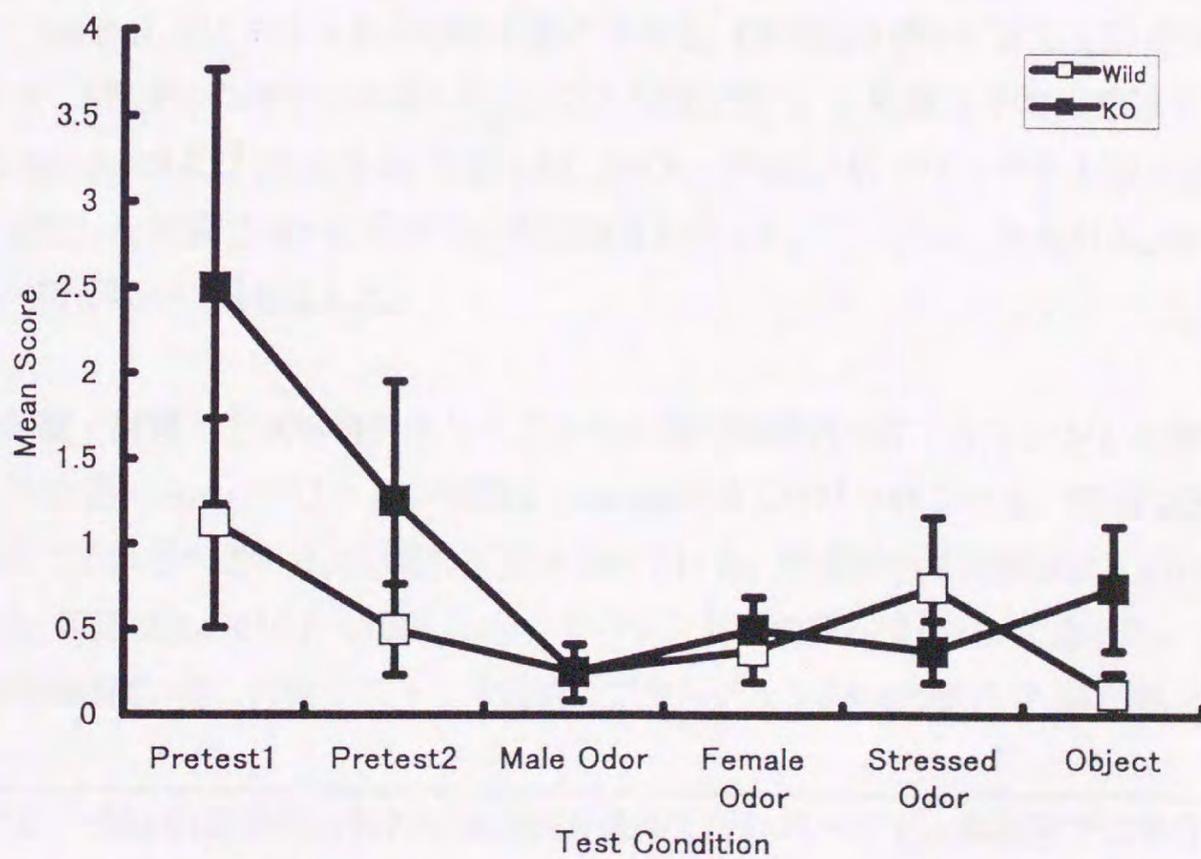


Fig. 2-4 (F) Results of activity test. +:  $p < 0.05$  (one-tailed)

#### 4. 実験4：不安および防御行動の分析—明暗箱テストおよび防御的覆い隠し行動の分析

実験3の結果から、GRP-R KO マウスにおいては野生型マウスと比較して不安関連反応あるいは情動性に変化が生じている可能性が示された。高架式十字迷路およびプレパルス抑制テストを用いた一般的行動特性の分析においてはこれらの反応について変化が認められなかったが、テスト手法を変えて再度検討を加えてみる必要がある。

本実験では、不安関連行動の評価法として明暗箱を用いた。明暗箱テスト(Light-Dark Box Test)は、高架式十字迷路(elevated plus maze)とともに不安関連行動の評価法として確立された方法といえる(70)が、明暗箱テストは高架式十字迷路よりも装置および測定が容易であるという利点を持っている。加えて本実験では、GRP-R KO マウスにおける不安関連行動の変化の可能性について防御行動(defensive behavior)の評価もあわせて行った。防御行動の評価法としては防御的覆い隠し行動(defensive burying behavior)を採用した(71)。

##### 1) 方法

**被験体：**雄の GRP-R KO マウス 9 匹、および同腹の雄の野生型マウス 9 匹を用いた。GRP-R KO マウスおよび野生型マウスは、C57BL/6 系統に戻し交配を行なった第 9 世代(F9)のマウスを用いた。マウスは生後 4 ヶ月齢で平均体重はそれぞれ  $28.7 \pm 0.6$ g および  $28.9 \pm 0.4$ g であった。マウスは GRP-R KO マウスと野生型マウスを混在した状態で 4~5 匹ずつの集団飼育を行った。<sup>\*1</sup> なお、摂食および飲水はテスト時を除いて自由とした。

**装置・材料：**①明暗箱テスト：アクリル製の明暗箱で床にはステンレス製のグリッド(直径 5mm、グリッドの間隔は 10mm)が備え付けられている。明室は白、暗室は黒でそれぞれ透明および黒の天蓋がついている。装置の内寸は明室(9×9.5×16(H) cm)、暗室は(14×10.5×16(H) cm)、ギロチンドアの厚みは 5mm であった。

②防御的覆い隠し行動テスト：不透明なプラスチック製の水槽(内寸 30×36×13(H))

---

\*1: 一般的行動特性の分析が集団飼育条件で行われたので、本実験では飼育条件の効果を排除するために集団飼育条件下で実験を行った。

cm)、空気穴のあけられたビニール製のふた、直径 20mm のガラスビーズ (青色透明)、および鉋屑の床敷であった。

**手続き:** ①明暗箱テスト: マウスを明室に入れ、天蓋を閉め、ギロチンドアを開けてから、3 分間マウスの行動を観察・記録した。行動の指標はマウスが暗室に入るまでの潜時(L-D latency)、明室と暗室の移動回数(No. of L-D movements)とした。なお、L-D latency はテストの翌日に再度同条件で測定を繰り返した。

②防御的覆い隠し行動: 水槽に厚さ 5 cm の床敷を敷き、その中にマウスを入れて天蓋を閉め、30 分間の馴化試行を行った。馴化試行終了後、マウスを一度飼育ケージに戻し、その間にガラスビーズ 20 個を床敷上に 5 cm 間隔で並べ、再度マウスを水槽に戻し、30 分後に床敷に埋められたガラスビーズの数を計測した。なお、ガラスビーズの 2/3 以上が床敷に隠れていた場合を埋められたものと見なした。馴化試行およびテストは通常の照明下で行ない、その間実験者は別室で待機した。

**統計的分析:** 統計的分析はすべて Mann-Whitney の U 検定 (両側) を用いた。

## 2) 結果

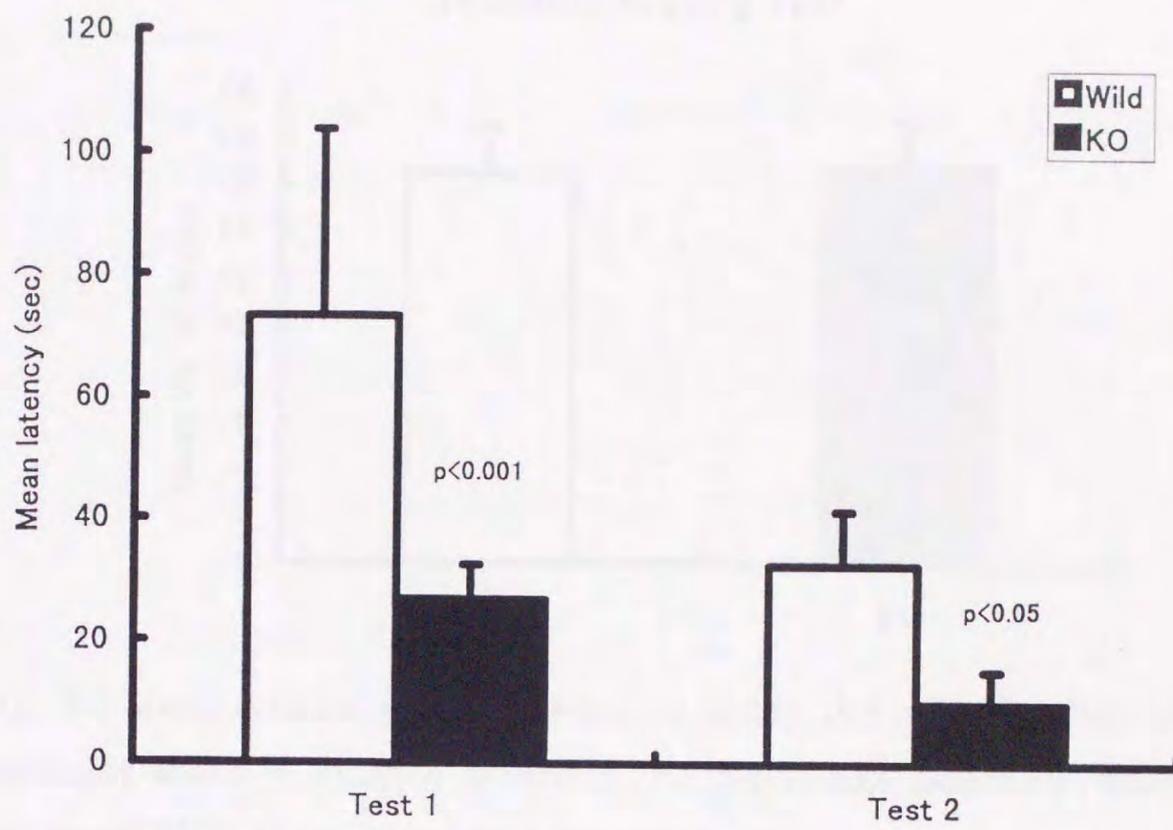
### 2-1. 明暗箱テスト

結果は Fig. 2-5 にまとめた。明暗移動潜時(L-D latency)は 1 回目の測定・2 回目の測定ともに、GRP-R KO マウスが野生型マウスよりも有意に短かった(一回目:  $U=4$ ,  $p<0.001$ ; 二回目:  $U=12$ ,  $p<0.05$ )。また、明暗移動回数(No. of L-D Movements)は GRP-R KO マウスが野生型マウスよりも有意に多かった( $U=8$ ,  $p<0.002$ )。これらの結果は、GRP-R KO マウスにおける不安反応性が野生型マウスと比較して低下していることを示している。

### 2-2. 防御的覆い隠し行動

結果は Fig. 2-6 に示した。埋められたガラスビーズの個数について GRP-R KO マウスと野生型マウスの間には差が認められなかった( $U=35.5$ , n.s.)。この結果は、GRP-R KO マウスの防御的反応性について変化が生じていないことを示している。

(A) Light-Dark Latency



(B) No. of Light-Dark Movements

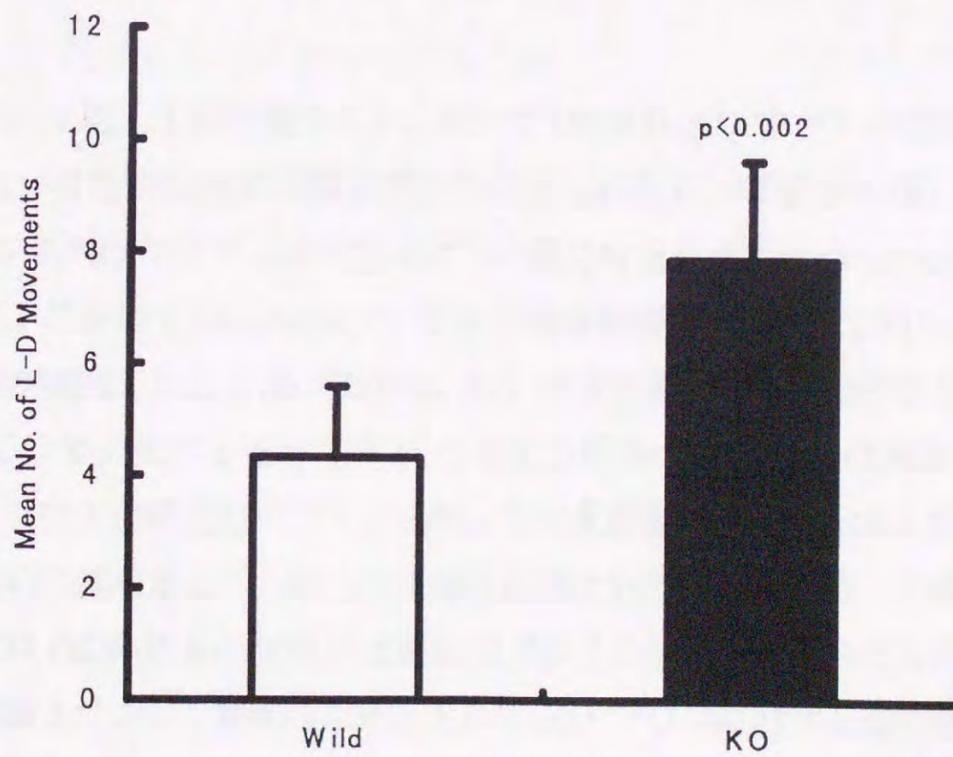


Fig. 2-5 Results of Light-Dark box test. Data represent mean + quartile deviation. P-values represent the difference between GRP-R KO mice and wild type mice (two-tailed).

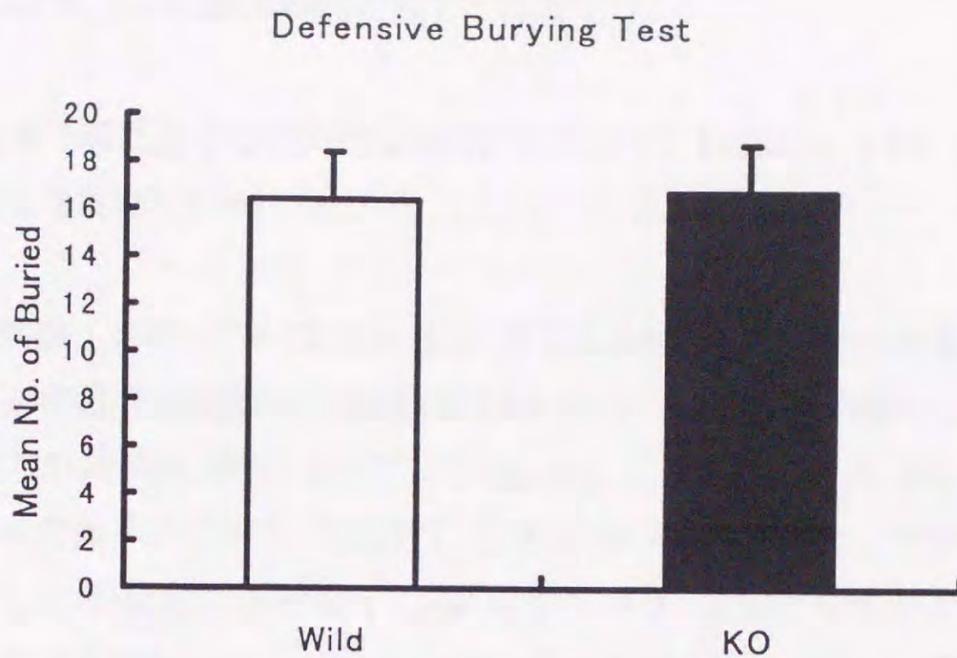


Fig. 2-6 Mean number of marbles buried in the Defensive Burying Test. Data represent mean + quartile deviation. No significant difference was observed between GRP-R KO mice and wild type mice.

### 3) 考察

本実験においては、①明暗箱テストにおいて GRP-R KO マウスの明暗移動潜時に短縮がみられ、また明暗移動回数に増加が認められたが、②防御的覆い隠し行動においては GRP-R KO マウスと野生型マウス間に有意な差は認められなかった。

明暗箱テストにおいて GRP-R KO マウスの明暗移動潜時間が短縮されたことおよび、明暗移動回数が増加したことは、GRP-R KO マウスの不安反応性が野生型マウスと比較して低下していることを示すものと考えられる。この結果は実験3において GRP-R KO マウスが野生型マウスと比較して中央部領域への進出および中央部領域における活動の亢進を示したことと一貫する結果といえよう。一方、防御的覆い隠し行動においては GRP-R KO マウスと野生型マウス間に差は見いだされなかった。この結果は実験1において観察された GRP-R KO マウスにおける非攻撃的社会行動の亢進が必ずしも侵入者に対する防御反応の亢進によって生じたわけではないことを示唆するものといえよう。

### 第3節 GRP-R の行動調節機能に関する考察

本節では第2節における諸実験の結果より、マウスにおける GRP-R の行動調節機能について考察を加える。

第2節の実験1において、GRP-R KO マウスは社会的相互作用の亢進を示した。これまでも神経伝達物質あるいは他の神経ペプチド受容体の欠損マウスにおいて社会的相互作用の亢進例が報告されている(62,72)。しかし、多くの場合は、たとえばセロトニン受容体サブタイプ 1B(5-HT<sub>1B</sub> 受容体)の欠損のように、攻撃性社会行動の亢進を報告しており(72)、本研究で GRP-R KO マウスに認められたような非攻撃性社会行動の亢進は報告されていない。また、第1節で述べたように、視床下部の破壊による行動変化についても、多くの場合攻撃性社会行動の亢進が報告されており(58,59)、例外的な結果においても、社会的場面における活動性の低下に起因する行動変化が報告されているにすぎない(64)。このように GRP-R KO マウスにおける非攻撃性社会行動の亢進はきわめて異例な現象であり、社会行動の神経メカニズムの研究において新たな方向性を示すものと考えられる。

社会行動の神経メカニズムに関しては、行動学的解析法をはじめとして、行動薬理的解析法など諸種の解析手段が考えられるが、GRP の行動薬理学的研究の結果から社会的行動の変化を予見し得る知見が得られていない現状から(第1節2項参照)、本研究においては要因分析による行動学的解析を行なった。すなわち、すでに繰り返し述べてきたように、社会的行動を攻撃性社会行動と非攻撃性社会行動の二つの下位カテゴリに分け、その各々のカテゴリについて、寄与率が高いことが予想されるいくつかの要因に焦点を当てて分析を行ない、そこからさらに下位の要因について分析を行なう方略をとった。

まず、攻撃性社会行動については、苦痛あるいは強度のストレス負荷の効果について検討した(実験2)。しかしながら、電撃提示条件下においても GRP-R KO マウスの攻撃性には変化がみられなかった。電撃の提示によってすべての個体において攻撃性が亢進するわけではないが(65 参照)、この結果は少なくとも GRP-R が攻撃性社会行動の抑制的調節について主要な役割を担っているわけではないことを示している。一方、非攻撃性社会行動に関しては、同種個体の匂い刺激あるいは標的オブジェクトの導入による活動性の変化を指標として分析を行った。匂い刺激の導入はマウスの活動性に大きな影響を及ぼすことが予想されたが、事実 GRP-R KO マウス・野生

型マウスともに活動性の低下が認められた。同種個体の匂いによる活動性の低下は、不安反応あるいは防御反応によるものと考えられるが、同種個体の匂い刺激の導入によって GRP-R KO マウスと野生型マウスの間に差がみられなかったことは、GRP-R KO マウスと野生型マウスの間で不安反応あるいは防御反応に差がないことを示すと思われた。そこでさらに、刺激を配置した中央部領域におけるマウスの活動について分析を行ったところ、GRP-R KO マウスでは雄のストレス刺激が提示された場合に野生型マウスと比較して有意に刺激への接近が亢進することが示された。前節でも述べたとおり、一般にマウスは強いストレスを受けた同種個体の匂いを避ける傾向があることが知られているが(69, 発表論文 4)、GRP-R KO マウスでは逆に接近する傾向が示された。このことは GRP-R KO マウスにおける非攻撃性社会行動の亢進について考察する上できわめて重要な結果といえる。すなわち、先住者-侵入者法による社会的相互作用の場面は、侵入者マウス(intruder)により多くのストレス刺激を負荷するものと考えられる。そのために、同種他個体の既存のなわばりである新奇な環境は侵入者マウスに対して大きな心理的・内分泌学的な負荷を生じることが予想される。侵入者マウスにおけるこの状況は、程度の差は考えられるものの、電撃によるストレス負荷と類似のシグナル(たとえば尿によるストレスシグナル)をマウス個体に生じさせる可能性がある。GRP-R KO マウスが侵入者マウスに対して執拗な接近・接触を繰り返したことは、新奇な環境において侵入者マウスが発するストレスシグナルに対する過剰接近反応と解釈することが可能である。

さらに、オープンフィールド事態における GRP-R KO マウスの中央部領域への進出および中央部領域における活動の亢進は、匂い刺激を提示しない状態においても観察された。匂い刺激の有無に関わらず中央部領域への進出などが亢進していることは、GRP-R KO マウスにおいて不安反応の低下が生じていることも示唆している。本研究では、不安反応および防御反応について別個の下位分析を行った。明暗箱テストによる不安反応の分析においては明らかに GRP-R KO マウスにおいて不安反応の低下を示す結果が得られた。一方、防御的覆い隠し行動を用いた防御反応の分析においては両者の間に差は認められなかった。これらの結果から、GRP-R KO マウスにおいては不安反応が低下しているものの、防御反応は正常であることが明らかにされた。2種のテストにおける結果の違いは、明暗箱のような実験事態で測定される不安反応が具体的な対象が存在しない状況下でも生じ得る反応であるのに対して、防御的覆い隠し行動によって測定される防御反応は具体的な対象が存在することによって解発される反応であることに由来すると考えられる。つまり、防御的覆い隠し行動の内因と

なっている不安反応と明暗箱テストによって評価される不安反応は質的に異なる別個の不安反応であるといえよう。社会的相互作用の実験場面において、侵入者マウスは基本的には先住者マウス(resident)よりも社会的に下位の存在であり、先住者マウスにとって防御の対象ではないと考えるならば、GRP-R KO マウスが侵入者マウスに対して執拗な接近・接触を繰り返したことは、GRP-R KO マウスにおいて不安反応が低下した結果によるものとも考えられよう。

このように、GRP-R の欠損による非攻撃性社会行動の亢進は、他個体の発する嗅覚性のストレスシグナルに対する反応性の変化および不安反応性の低下によって生じたものと考えられる。嗅覚性のストレスシグナルに対する反応性の変化および不安反応性の低下は、GRP-R KO マウスにおいて刺激の情動喚起機能、あるいは刺激の情動性に対する評価機能に変化が生じていることを示すものといえる。これらの点から、内在性の GRP による行動調節機能は、刺激の情動喚起機能あるいは刺激の情動性に対する評価機能の調節と推察される。

### 第3章 ポンベシン受容体サブタイプ3欠損マウス(BRS-3 KO マウス)の行動解析

#### 第1節 概論

##### 1. ポンベシン受容体サブタイプ3(BRS-3)の脳内分布

BRS-3 の脳内分布はラット(42)およびマウス(73)について *in situ hybridization* 法を用いて調べられているが、その発現量は他のポンベシン様神経ペプチド受容体 (GRP-R, NMB-R)と比較して格段に少なく、またその分布部位も限局されている。マウス脳内における BRS-3 の発現部位は、主として視床下部領域であることが報告されているが(73)、さらに詳細な分析を行った。*in situ hybridization* の方法は Imaki らに従った(74)。結果は Table 3-1.にまとめた。BRS-3 は視床下部領域だけではなく、隣接する中隔(septum)・扁桃体(amygdala)にも分布しており(Fig. 3-1 参照)、さらに脳幹においては傍小脳脚核(parabrachial nucleus)の外側(lateral parabrachial nucleus: LPB)にも発現が認められた。これら BRS-3 の分布領域と行動の対応関係については、おおよそ以下のとおりである。すなわち、中隔領域における分界条基底核 (bed nucleus stria terminalis)や視床下部(hypothalamus)領域における室傍核 (paraventricular nucleus: PVN)および視床下部外側部(lateral hypothalamic area: LH)は、摂食行動の調節に深く関与していることが知られている(50,75,76)。また、扁桃体の内側核 (medial amygdaloid nucleus: 特に後背側部 posterodorsal amygdala: MePD)も同様に摂食行動の調節に関与していることが報告されている(77-82)。さらに近年、視床下部領域の破壊によって味覚反応性の変化が生じるという報告もなされている(83-86)。なお、視床下部領域および扁桃体が情動機能や社会性に関しても重要な役割を果たしていることは、第2章第1項で述べたとおりである。

##### 2. BRS-3 KO マウスの表現型

BRS-3 KO マウスの表現型については Table 3-2.にまとめた。第1項で述べたとおり、BRS-3 の脳内分布は主として摂食行動に関連すると考えられる領域であり、また主たる表現型が軽度の過食と肥満であることから、生理学的・内分泌学的分析を行った。経口葡萄糖負荷テスト(Oral Glucose Tolerance Test: OGTTs)においては血中

Table 3-1. Distribution of BRS-3 gene expression in the mouse brain

Septum	bed nucleus stria terminalis	+
	striohypothalamic nucleus	+
Hypothalamus	paraventricular nucleus	+
	arcuate nucleus	+
	medial preoptic area	+
	medial preoptic nucleus	+
	ventromedial nucleus	-
	dorsomedial nucleus	+
	dorsal hypothalamic area	+
	lateral preoptic area	+
	lateral hypothalamic area	+
Amygdala	medial nucleus	+ (pd, pv)
	central nucleus	+ (pv)
Brainstem	lateral parabrachial nucleus	+

Abbreviations: pd, posterodorsal part (see Fig. 3-1); pv, posteroventral part; +, weak to moderate signal

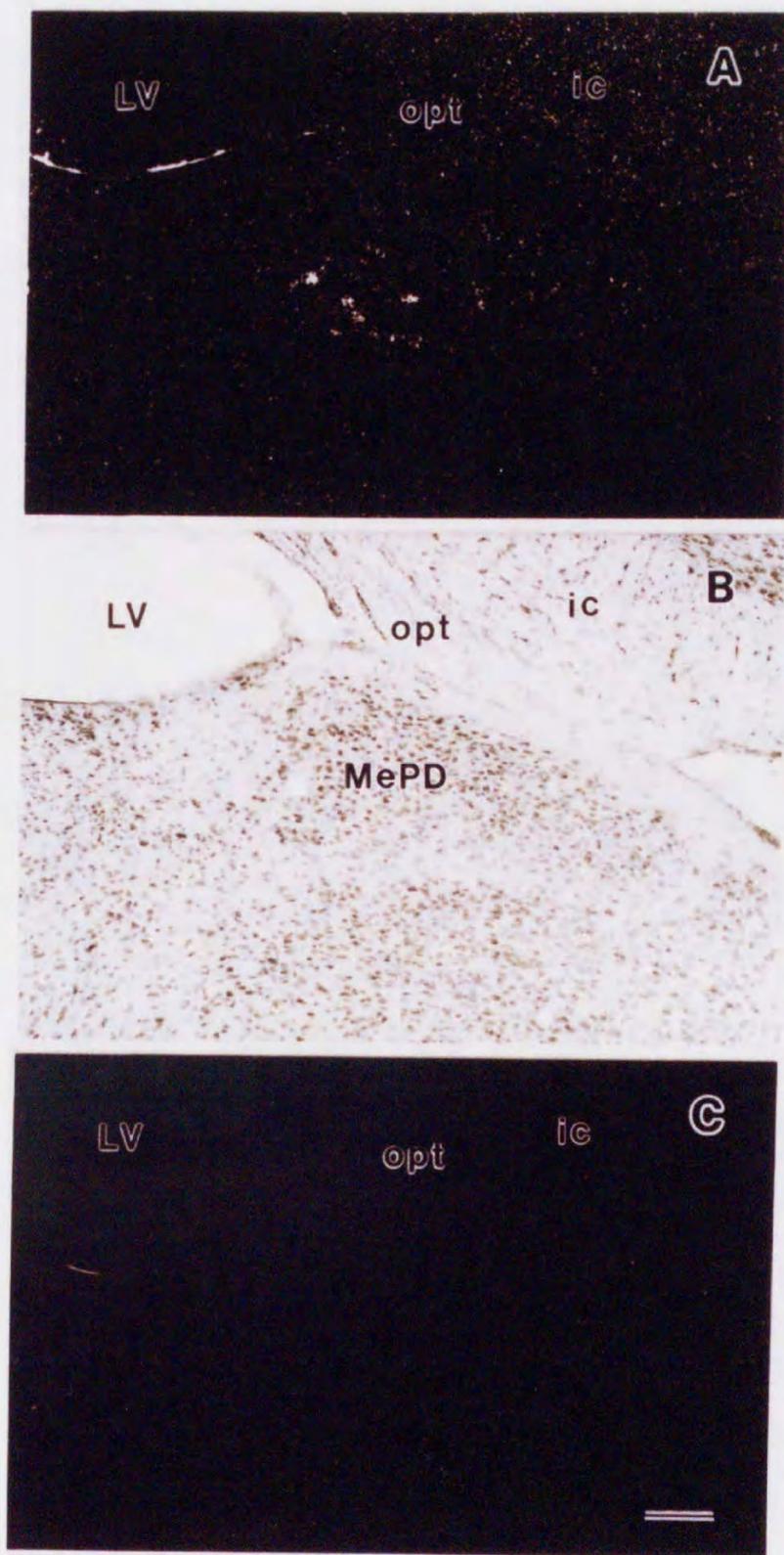
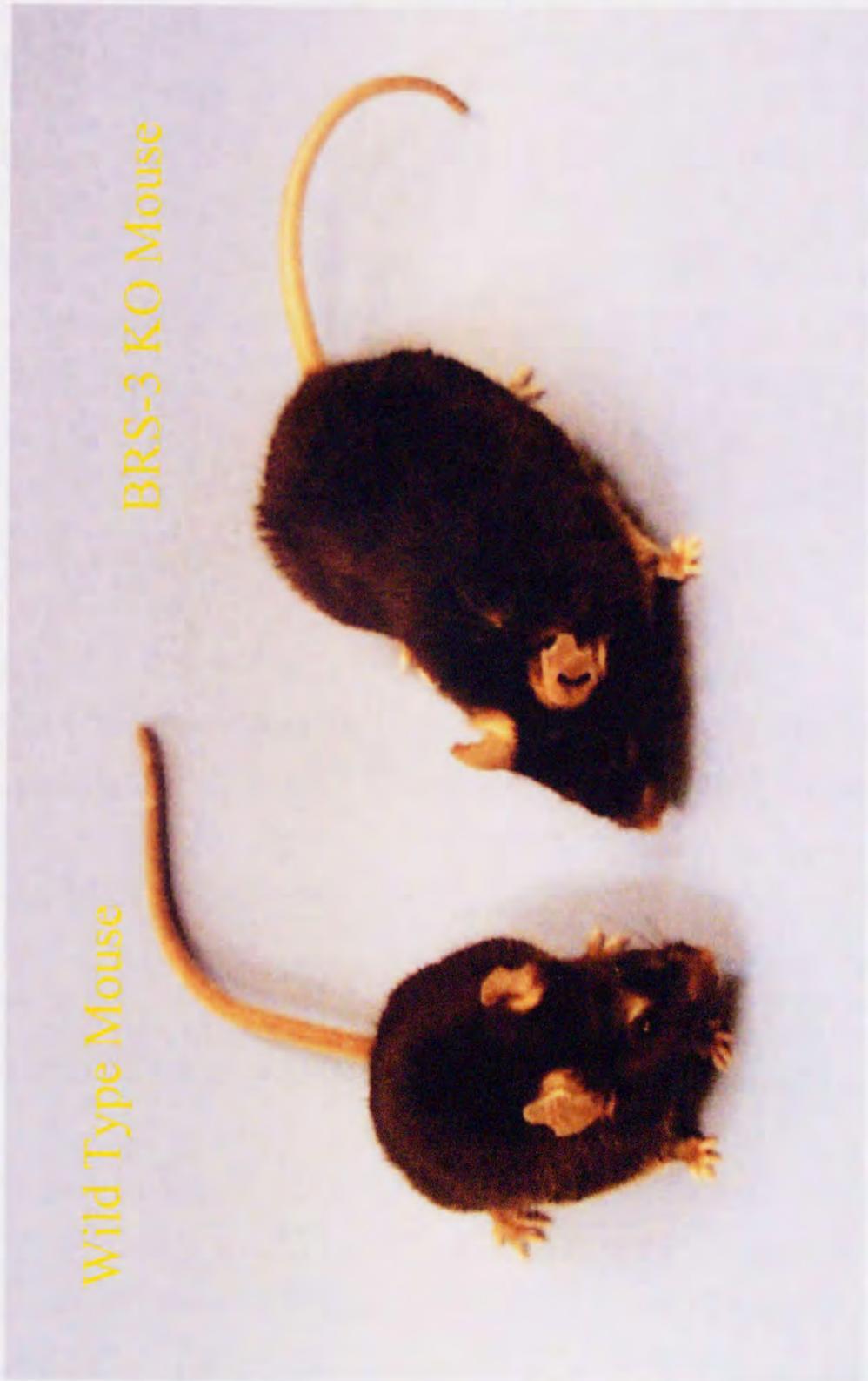


Fig. 3-1 Darkfield photomicrograph of coronal section through thalamohypothalamic region hybridized with BRS-3 antisense probe (A) and sense probe (C). B: Nissl-stained section adjacent to A. Abbreviations: ic, internal capsule; LV, lateral ventricle; MePD, medial amygdaloid nucleus, posterodorsal part; opt, optic tract. Scale bar indicates 0.1 mm.

## *Phenotype of BRS-3 KO Mouse*



3系統のBN様神経ペプチド受容体欠損マウスの中で、形態的な変異が認められたのはBRS-3 KOマウスだけであった。BRS-3 KOマウス(右側)では一見して分かるように軽度の肥満を呈している。

葡萄糖濃度およびインシュリン濃度の上昇が、またインシュリン耐性テスト(Insulin Tolerance Test: ITTs)においては血中葡萄糖濃度の降下が野生型マウスと比較して顕著に減弱していた。これらの結果は BRS-3 KO マウスが糖尿病傾向をもつことを示しており、過食および肥満からの予測を裏付けたものである。また、肥満の原因は過食ばかりでなく、代謝異常にも求められる。BRS-3 KO マウスの安静時酸素消費量は、野生型と比較して有意に低下しており、この傾向は BRS-3 KO マウスに肥満傾向が現れる以前から示されている。また、一日当たりの給餌量を体重の 5%に制限した制限摂食下において体重変化を調べたところ、BRS-3 KO マウスでは、野生型マウスよりも有意に体重減少が緩やかであった。これらの結果は、BRS-3 KO マウスにおいてエネルギーの蓄積効率が亢進していることを示している。一方、飼育ケージ内における自発活動量を測定したところ、BRS-3 KO マウスと野生型マウスの間に有意な差は認められなかった。この結果は、BRS-3 KO マウスの肥満傾向が活動性の低下によるものではないことを示している。これらの点から、BRS-3 KO マウスにおける肥満は、過食傾向およびエネルギー蓄積効率が高まっていることに起因するものと考えられる。

このように BRS-3 KO マウスに見られる血中インシュリン濃度の上昇、および成長ホルモンの低下等の各表現型は、ヒト(特に小児)における視床下部性の肥満の症例と良く類似しており(87)、また従来から報告されてきた各種肥満モデル動物(88-90)と比較して、肥満および過食の程度がヒトの症例に近いことから、BRS-3 KO マウスは肥満の新しいモデルマウスとして、臨床的見地からも極めて有用なものと考えられる。

### 3. BRS-3 KO マウスにおける行動解析の方針

本節第 1 項において述べた BRS-3 の脳内分布および、第 2 項で述べた BRS-3 KO マウスの表現型をもとにして、BRS-3 KO マウスの行動解析の方針を以下のように設定した。まず第一に、BRS-3 が脳内において視床下部および扁桃体に分布しており、かつその部位が摂食行動の調節に深く関与することが示唆されている点に注目した。視床下部の室傍核の破壊が過食および肥満の症状を生起すること(50,76)、また同様な現象が扁桃体内側核の破壊によっても生じることが明らかにされている(77-82)。また、これらの部位の破壊がいわゆる満腹中枢である視床下部腹内側核(ventromedial hypothalamic nucleus: VMH)の破壊によって生じる肥満および過食

Table 3-2. Summary of phenotype observed in BRS-3 KO mice

Measurement of analysis		Phenotype of mutant
Physiological Analysis	Body weight	+ (after 14 weeks)
	Adipose tissue	+
	Blood pressure	+
	Food intake	+ (after 15 weeks)
	Water intake	- (before 10-12 weeks)
Blood analysis and, serum metabolites and hormone level		
	Insulin	+
	Growth hormone	-
	Oral glucose tolerance test (OGTTs)	
	Glucose	+
	Insulin	+
	Insulin tolerance test (ITTs)	
	Insulin tolerance	+ (after 38 weeks)
Metabolic rate and energy expenditure		
	Oxygen consumption	-
	Body weight change under restricted feeding	
		-
Behavior		
	Spontaneous activity	Normal
	Forced swimming test	Normal

Note) +: increased in BRS-3 KO mice; -: decreased in BRS-3 KO mice

とは量的に異なっていることも報告されている(50,77-82)。すなわち、VMH の破壊では極端な過食・肥満が生じるが(90)、PVN や扁桃体後背側核(MePD)の破壊によって生じる過食や肥満はより穏やかなものである。BRS-3 が VMH には分布していないこと、およびその欠損による過食・肥満の程度が穏やかなものであることから、BRS-3 KO マウスにおける肥満や過食は PVN/MePD 由来のものと推測される。第1項で述べたとおり、視床下部領域および扁桃体の破壊によって味覚反応性の変化が生じることが報告されているので、BRS-3 KO マウスにおいても味覚反応性における変化が生じている可能性がある。

次に第二点として、BRS-3 KO マウスにおける社会性の変化に注目した。第2章で述べたとおり、視床下部および扁桃体は情動性や社会性の調節に深く関連している。このことから、BRS-3 KO マウスにおいても社会性あるいは情動性に変化が生じている可能性が考えられる。過食および肥満と情動性あるいは社会性の関係については全く未知であるが、仮にこれらの間に関連があるとすれば、過食・肥満の発症ならびに進行における心理社会的メカニズムの解明に新たな視点を与えるものとなるであろう。

これらの点から、本研究では BRS-3 KO マウスにおける味覚反応性の変化および情動性・社会性について詳細な行動学的検討を加えることとした。解析の方法としては、まず BRS-3 KO マウスと野生型マウスにおける味覚選好性の異同について分析し、さらに味覚学習の異同について分析を加えた。また、情動性・社会性の変化については、飼育条件を独立変数とし、体重変化および摂食量を従属変数とした分析を行い、さらに自発活動量および社会的相互作用について分析を加えた。

## 第2節 実験

### 1. 肥満および過食と味覚嗜好性の変化

肥満および摂食障害は世界的に深刻かつますます拡大しつつある問題となっている。これらの疾患は医学的・心理社会的およびその他さまざまな要因が複雑に交絡することによって発生・進行するものと考えられる。行動療法の観点から、これらの疾患の病理学的発生要因および経過に関与すると考えられる多くの行動要因について、ヒトおよび動物モデルを用いた検討がなされてきた(87-89,91,93)。その中でも特に注目されてきた行動要因が摂食パターン(87-89,91-93)と主要栄養素(炭水化物・脂肪・蛋白質)に関する嗜好(83,89,94-97)である。なぜならば、これらの行動はエネルギー収支と体重増加に直接的に関与することが予想されるからである。摂食パターンに関しては、摂食率(eating rate)・食事間隔(inter-meal interval)・および食物剥奪の効果(effect of deprivation)と肥満・過食の関連が検討されてきた。また、主要栄養素の嗜好および食物の嗜好性に関する諸研究からは、肥満患者あるいはモデル動物が正常個体と比較して「おいしい食物(palatable food)」に対する嗜好性が強いことが明らかにされている(83,84,93,94)。さらに、モデル動物による研究からは、肥満動物における味覚嗜好性の変化も報告されている。VMHを破壊したラットや遺伝的肥満マウス(*ob/ob* mouse)では、甘味に対する嗜好性が亢進している一方、苦味に対する嫌悪性も亢進していることが報告されている(85,98,99)。近年、味覚嗜好性の神経学的・分子生物学的メカニズムについて研究が進展しつつあるが(100-103)、味覚嗜好性の変化と肥満・過食の関係は未知の状態である。これらの関連を明らかにすることは、肥満・過食の予防・病態生理学的解明および行動療法の新たな方向性を開拓する可能性を示すものと考えられる。そこで本研究では、BRS-3 KO マウスにおける味覚嗜好性の変化について、味覚嗜好性テストおよび味覚嫌悪条件づけの手法を用いた行動学的解析を行った。

## 1) 実験 1 : 味覚選好性の分析 - Taste preference test

### 1)-1. 方法

**被験体** : 雄の BRS-3 KO マウス、および同腹の雄の野生型マウス各 8 匹を用いた。BRS-3 KO マウスおよび野生型マウスは C57BL/6 系統のマウスに戻し交配を行った第 5 世代(F5)のものを用いた。マウスは実験開始時に約 7 ヶ月齢で、平均体重はそれぞれ  $41.2 \pm 1.1\text{g}$  および  $32.1 \pm 2.6\text{g}$  であった。なお、マウスは実験開始の 1 ヶ月前から個別飼育条件で飼育をおこない、摂食および飲水は自由とした。

**装置・材料** : 実験はすべて飼育ケージ内で行った。味覚刺激としては、以下のものを用いた。甘味 : サッカリンナトリウム水溶液(0.2%, w/v)、塩味 : 塩化ナトリウム水溶液(0.9%, w/v)、酸味 : クエン酸ナトリウム水溶液(0.1%, w/v)、および苦味 : キニーネ硫酸塩水溶液(0.002%, w/v)。水溶液は実験開始直前に各味覚物質を水道水に溶かして調製・準備した。

**手続き** : 実験に先立ち 2 日間の馴化試行を行った(Day 1-2)。馴化試行では 2 本のプラスチック製のチューブ(15ml)にステンレス製の飲み口をつけたものに水道水を入れ、飼育ケージに取り付けた。馴化試行終了後、2 瓶法による味覚選好テストを行った。テストは 2 日間の休息試行(Day 7-8)をはさんで 2 セッション行い(Day 3-6, Day 9-12)、それぞれのセッションですべての被験体にすべての味覚刺激を提示した。ケージに水道水を入れたチューブと味覚刺激溶液を入れたチューブをともに取り付け、24 時間あたりの水道水および味覚刺激溶液の摂取量を 1/100g 単位で測定した。なお、水および味覚刺激溶液は毎日交換した。また、後半のセッション(Day 9-12)では、水道水と味覚刺激溶液の配置位置を前半のセッション(Day 3-6)と入れ替えた。

**統計的検定** : 統計的分析は F 検定によって等分散性について検定後、Student の t 検定 (両側) によって行った。

### 1)-2. 結果

実験 1 の結果は Fig.3-2 にまとめた。味覚選好性テストの結果は、選好率(preference

ratio)<sup>\*1</sup>によって示してある。BRS-3 KO マウスはサッカリンナトリウム水溶液に対して野生型マウスよりも有意に高い選好率を示し(t=2.89, p<0.02)、またキニーネ硫酸塩水溶液に対して野生型マウスよりも有意に低い選好率を示した(t=2.81, p<0.03)。塩化ナトリウム水溶液およびクエン酸水溶液に対する選好率においては、BRS-3 KO マウスの選好率にやや高い傾向が見られたが、これらの差は有意水準には達しなかった(それぞれ、t=0.29, n.s.; t=1.53, n.s.)。これらの結果はBRS-3 KO マウスにおいて甘味に対する選好性および苦味に対する嫌悪性が亢進していることを示している。

---

\*1: 選好率(preference ratio)は以下の式によって算出した。

$$\text{Preference ratio} = \frac{\text{amount of test solution consumed}}{\{\text{amount of test solution consumed} + \text{amount of water consumed}\}}$$

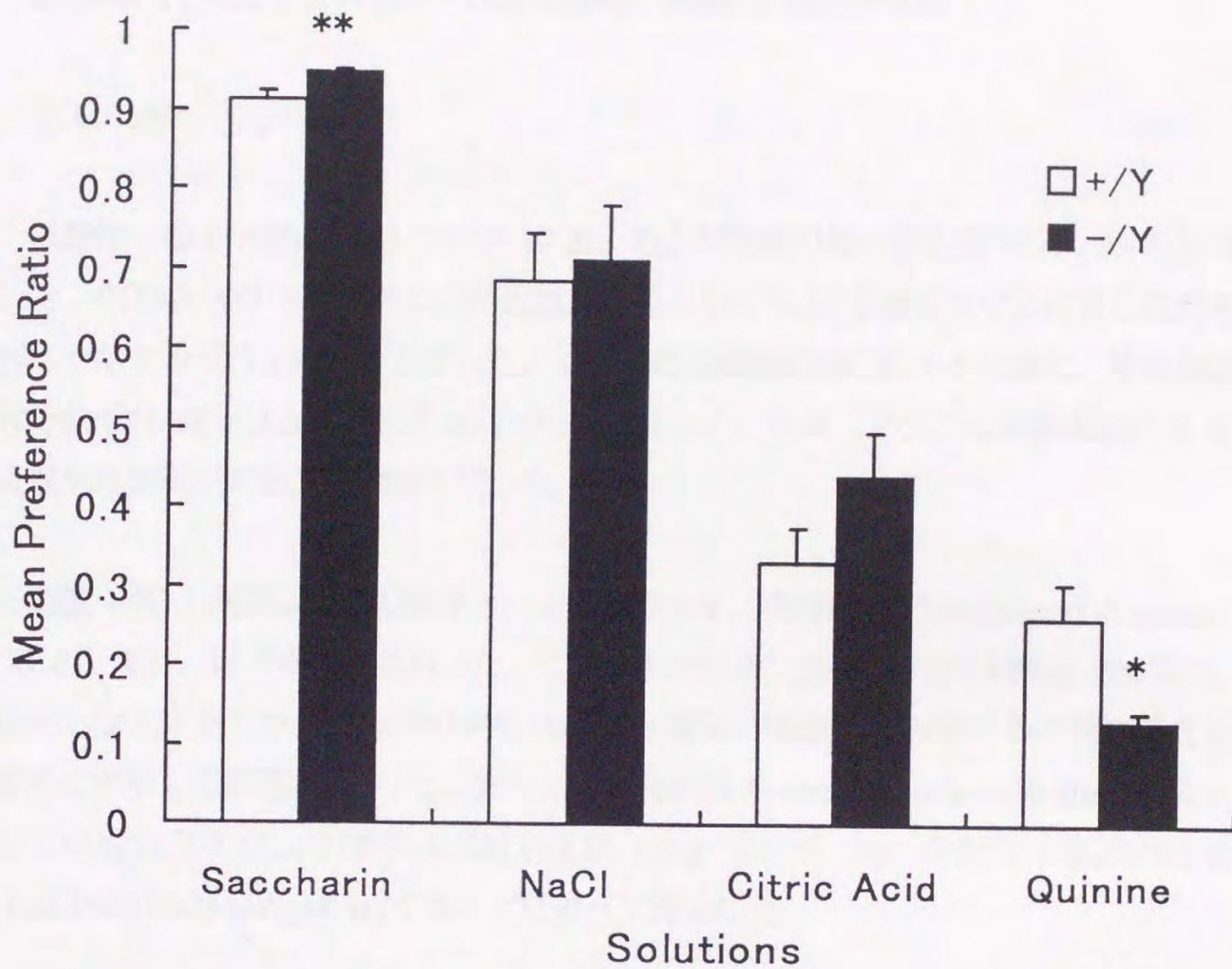


Fig. 3-2 Taste preference profiles of wild type mice (+/Y) and BRS-3 KO mice (-/Y). Data represent means + SEM. Statistical differences between wild type mice and BRS-3 KO mice are indicated with asterisks (\*\*:  $p < 0.02$ ; \*:  $p < 0.03$ , both in two-tailed test).

## 2) 実験 2 : 味覚学習の分析 - Conditioned Taste Aversion Test

### 2)-1. 方法

**被験体** : 雄の BRS-3 KO マウス 36 匹、および同腹の雄の野生型マウス 35 匹を用いた。BRS-3 KO マウスおよび野生型マウスは C57BL/6 系統のマウスに戻し交配を行った第 5 世代(F5)のものを用いた。マウスは実験開始時に約 7 ヶ月齢で、平均体重はそれぞれ  $36.4 \pm 1.0\text{g}$  および  $29.7 \pm 0.5\text{g}$  であった。なお、マウスは実験開始の 1 ヶ月前から個別飼育条件で飼育を行った。

**装置・材料** : 実験はすべて飼育ケージ内で行った。条件刺激(Conditioned stimulus: CS)としては、以下のものを用いた。甘味 : サッカリンナトリウム水溶液(0.2%, w/v)、塩味 : 塩化ナトリウム水溶液(0.9%, w/v)。水溶液は実験開始直前に各味覚物質を水道水に溶かして調製・準備した。また、無条件刺激(Unconditioned stimulus: US)としては塩化リチウム水溶液(0.3M)を体重 100g 当たり 1ml の割合で腹腔内注射(1ml/100g body weight, ip)することによって提示した。

**手続き** : 実験に先立ち 2 日間の馴化試行を行った(Day 1-2)。馴化試行では 1 本のプラスチック製のチューブ(15ml)にステンレス製の飲み口をつけたものに水道水を入れ、飼育ケージに取り付けた。馴化試行終了後、マウスに飲水制限訓練を行った。訓練では、一日約 19 時間の飲水制限を行い、10 分間の飲水訓練を行った。飲水訓練の 4 時間後に制限飲水による水分摂取の不足を補うために 1 時間の補助飲水を許した。7 日間(Day 3-9)の飲水訓練の後、2 日間の条件づけ試行を行った(Day 10-11)。BRS-3 KO マウスおよび野生型マウスはそれぞれ飲水訓練における飲水量に偏りがないように 2 群に分配した。BRS-3 KO マウスおよび野生型マウスそれぞれの 1 群は条件刺激としてサッカリンナトリウム水溶液を、他の 1 群は条件刺激として塩化ナトリウム水溶液を用いた。マウスにはそれぞれ所定の味覚刺激水溶液を 10 分間摂取させ、摂取終了直後に半数の被験体には塩化リチウム水溶液を、残りの半数の被験体には生理食塩水の腹腔内投与を行った。条件づけ試行終了の 4 時間後に 60 分間の補助飲水を許した。2 日間の条件づけ試行に続いて、テスト試行を行った(Day 12)。テスト試行では、すべてのマウスに対して所定の味覚刺激水溶液を 10 分間提示し、その摂取量を 1/100g 単位で測定した。なお、餌は 10 分間の味覚刺激提示中を除いて自由摂

食とした。

**統計的検定**：統計的分析は一元配置の分散分析によって行った。また多重比較はダンカンの方法(Duncan's multiple comparison method、両側検定)を用いた。

## 2)-2. 結果

実験 2 の結果は Fig.3-3 にまとめた。Fig.3-3(A)はサッカリンナトリウム水溶液を条件刺激としたテスト(サッカリンテスト)の結果を、Fig.3-3(B)は塩化ナトリウム水溶液を条件刺激としたテスト(塩化ナトリウムテスト)の結果を示している。なお、味覚嫌悪条件づけの結果は、嫌悪得点(aversion score)<sup>\*2</sup>によって示してある。

サッカリンテストにおいては、一元配置の分散分析においてグループの主効果が有意であった( $F(3,35)=24.43, p<0.001$ )。多重比較の結果、BRS-3 KO マウスでは野生型マウスと比較して有意に嫌悪得点が低下していた( $T=3.22, p<0.05$ )。同様の結果は、塩化ナトリウムテストにおいても観察された。一元配置の分散分析においてグループの主効果が有意であった( $F(3,34)=138.41, p<0.001$ )。多重比較の結果、BRS-3 KO マウスの嫌悪得点は野生型マウスと比較して有意に低下していた( $T=3.39, p<0.05$ )。

これらの結果は、BRS-3 KO マウスにおいて塩化リチウムの腹腔内投与を無条件刺激とした味覚嫌悪条件づけの形成が促進されることを示している。

---

\*2: 嫌悪得点(aversion score)は以下の式によって算出した。

$$\text{Aversion score} = (\text{amount of CS solution consumed in the test trial}) / \{(\text{amount of CS solution consumed in the first conditioning trial}) + (\text{amount of CS solution consumed in the test trial})\}$$

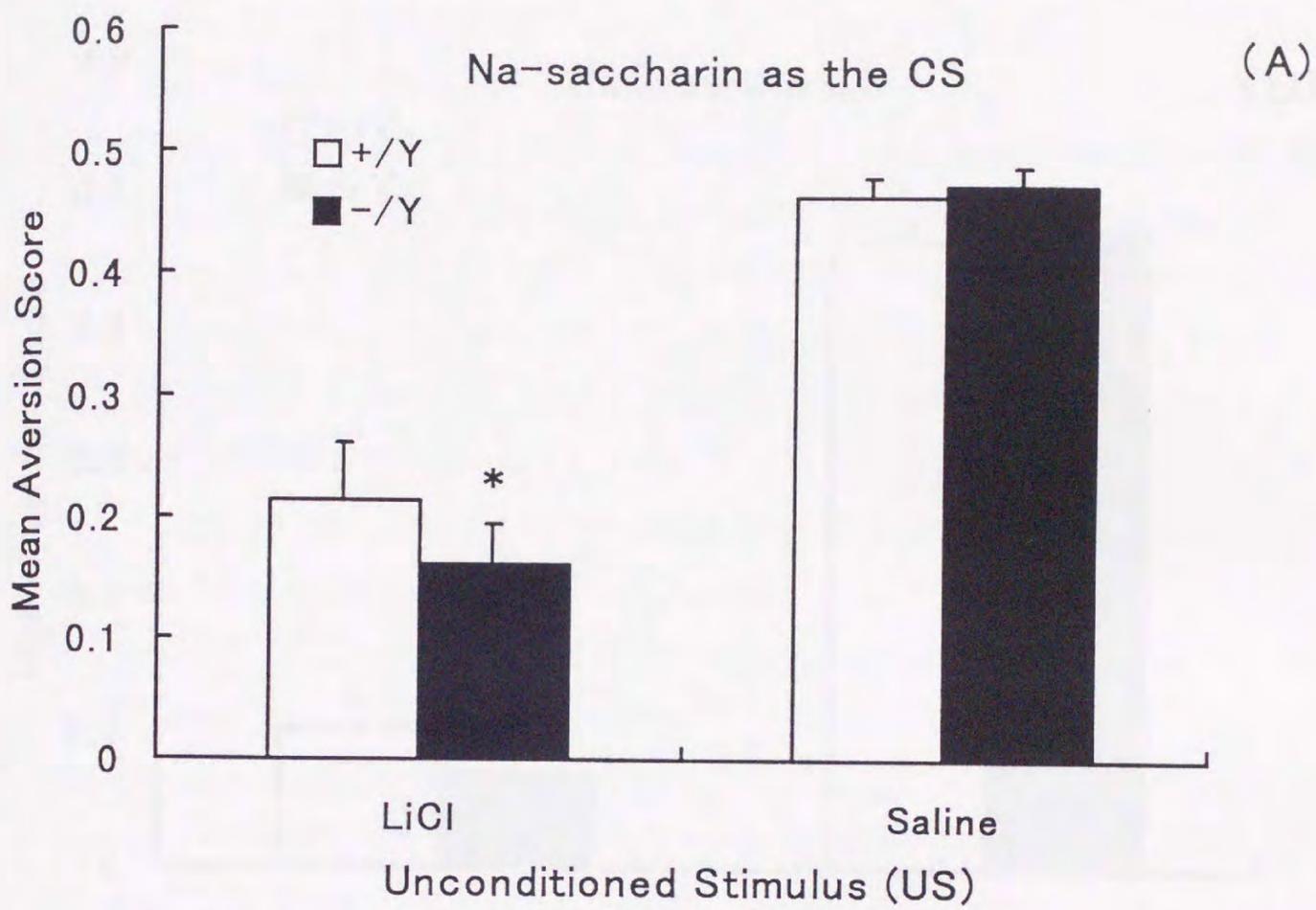


Fig. 3-3(A) Results of conditioned taste aversion (CTA) test in Na-saccharin CS test. Data represent means + SEM. Statistical differences between wild type mice (+/Y) and BRS-3 KO mice (-/Y) are indicated with an asterisk (\*:  $p < 0.05$ , two-tailed test).

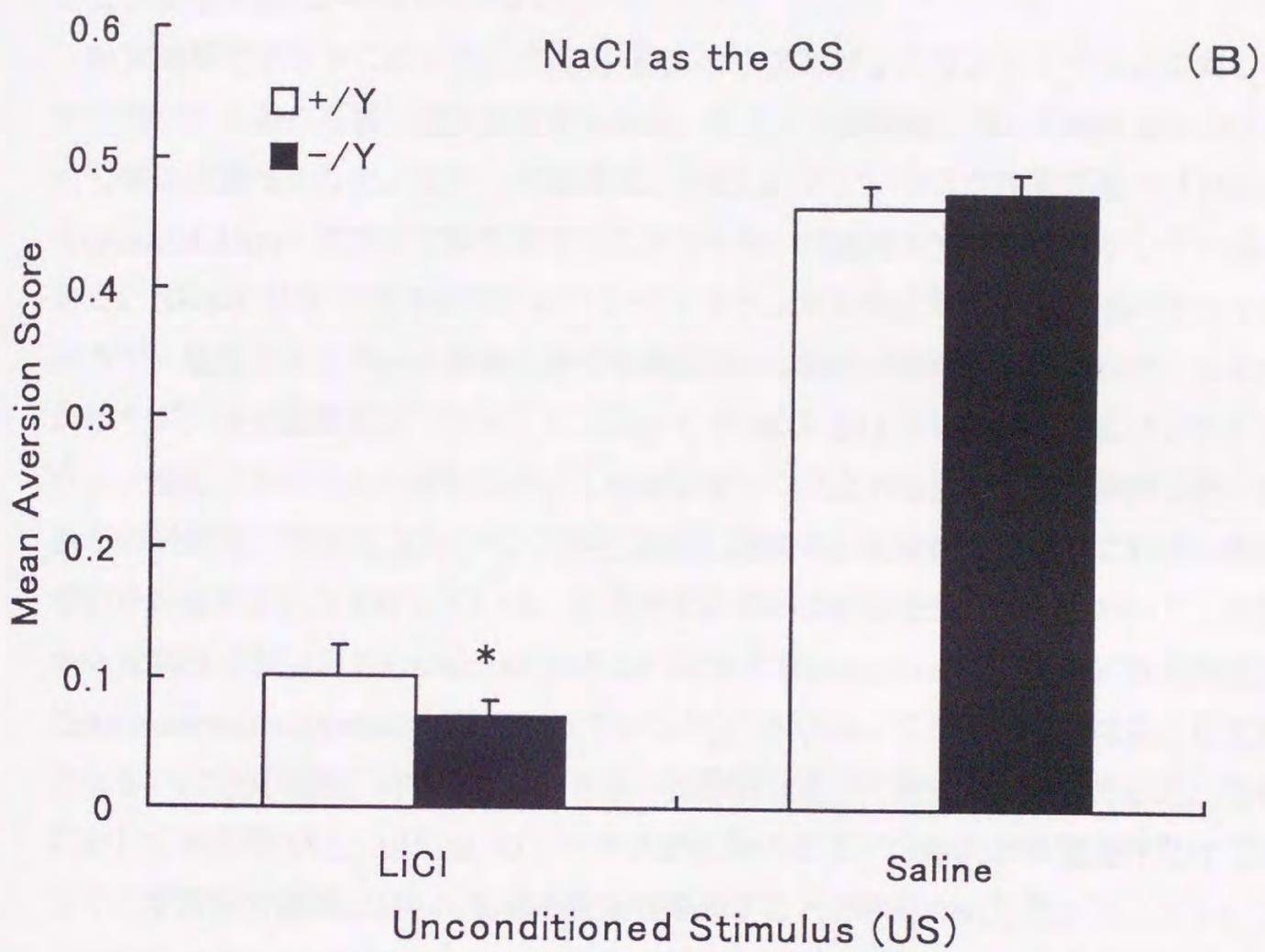


Fig. 3-3(B) Results of conditioned taste aversion (CTA) test in NaCl CS test. Data represent means + SEM. Statistical differences between wild type mice (+/Y) and BRS-3 KO mice (-/Y) are indicated with an asterisk (\*:  $p < 0.05$ , two-tailed test).

### 3) 肥満および過食と味覚選好性の変化の神経機構

本実験においては、BRS-3 KO マウスにおいて味覚選好性に変化が生じていること(Fig.3-2)、および BRS-3 KO マウスにおいて味覚嫌悪条件づけの形成が促進されること(Fig.3-3)、が明らかにされた。

味覚選好性テストにおいて、BRS-3 KO マウスはサッカリンナトリウムに対して野生型マウスよりも強い選好性を示す一方、キニーネ硫酸塩に対して野生型マウスよりも強い嫌悪を示した。これらの結果は、BRS-3 KO マウスが味覚刺激の「おいしさ(palatability)」に対して野生型マウスよりも強い反応性をもつことを示している。また、BRS-3 KO マウスがサッカリンナトリウム水溶液に対して強い選好性を示す一方で、塩化ナトリウム水溶液に対する選好性には変化が認められなかった。にもかかわらず、味覚嫌悪条件づけテストにおいて BRS-3 KO マウスはサッカリンナトリウム・塩化ナトリウムいずれに対しても野生型マウスよりも強い嫌悪を獲得した。これらの結果は、BRS-3 KO マウスが生得的に選好する味覚刺激に対しても強い嫌悪学習を形成することを示している。肥満患者あるいは肥満モデル動物において、食物や味覚刺激のおいしさ(palatability)あるいはまずさ(aversion)に対する過剰反応性(hyperresponsiveness)が報告されているが(87-89,94)、これらの報告は主として食物あるいは味覚刺激に対する生得的あるいは静的な選好に関するものであった。これに対して本実験では、BRS-3 KO マウスが生得的あるいは静的な味覚選好だけではなく、学習性の嫌悪においても過剰反応性を示すことを明らかにした。

本実験で得られた結果は、*ob/ob* マウスの名称で知られている他の遺伝的肥満マウスの研究から得られた結果とほぼ一致するものである。正常マウスと比較した場合、*ob/ob* マウスは甘味に対する反応性が亢進しており(98)、またより強度の条件性味覚嫌悪を形成することが報告されている(104)。*ob/ob* マウスでは、脂肪細胞によって産生されるレプチン(leptin: OB 蛋白(*ob* protein)とも呼ばれる)が欠如している。レプチンは VMH および PVN を含む視床下部領域に分布しているレプチン受容体(leptin receptor)を介して機能している(105)。すでに述べてきたとおり、VMH および PVN は摂食行動の調整に深く関与していることが示されており、動物実験の結果からはこれらの部位の破壊によって肥満が生じることが明らかにされている(50,77,83-86,106)。BRS-3 も視床下部領域に分布しており(73)、第1項に示した *in situ hybridization* 法による詳細な分析から、視床下部領域における BRS-3 が PVN および LH に分布している一方、VMH には分布していないこと、さらに扁桃体領域における MePD・

MePV (posteroventral amygdala: 扁桃体後腹側核)および CeA (central amygdaloid nucleus: 扁桃体中心核)にも発現していることを確認した。

上記の観察結果から、BRS-3 KO マウスと *ob/ob* マウスの間における過食・肥満傾向の量的な差違は、VMH における神経機能の欠損に起因するものと考えられる。しかし、BRS-3 KO マウスにおける過食・肥満傾向が *ob/ob* マウスと比較して穏やかなものではあるものの、味覚刺激に対する反応性の亢進は *ob/ob* マウスに認められるものと同等のものといえる。これらの結果は、過食および肥満と味覚反応性の変化が共存して生起し得ることを示すものである。過食・肥満傾向と味覚反応性の変化はラットにおける PVN の破壊実験からも報告されている(50)。BRS-3・レプチン受容体のいずれもが PVN において発現していることから、両遺伝的肥満マウスに認められた味覚反応性異常は PVN における神経系の異常に起因するものであると説明することが可能であろう。しかしながら、近年扁桃体の破壊が肥満(77-82)および味覚反応性の異常を生起するという報告も多数なされており(100-103,107,108)、また扁桃体および傍小脳脚核が条件性味覚嫌悪の獲得に重要な役割を果たしていることも明らかにされつつある(101,102)。BRS-3 の発現は、扁桃体および傍小脳脚核においても確認されたので、BRS-3 KO マウスにおける味覚反応性の変化に関して PVN 同様、これらの核の関与も考えられる。

本実験の結果は、肥満と味覚反応性の変化が互いに関連していることを示している。しかしながら、味覚反応性の変化が過食および肥満にいかなる寄与をしているのかという点については、現時点では未解決のままである。この点に関する更なる検討が必要である。

## 2. 飼育環境と肥満・過食の関係

飼育環境・条件は動物の行動の決定的な規定因である。この事実は広範な種の動物において明らかにされている。隔離飼育されたマウスは攻撃性社会行動および社会的相互作用の亢進を示し(109)、また移動運動が亢進する一方で探索行動(exploratory behavior)の低下が報告されている(110)。同様に、隔離飼育されたラットにおいても自発活動性の亢進および環境刺激に対する反応性の変化が報告されている(111-113)。伝統的には、隔離飼育による行動および内分泌学的な変化は、社会的に隔離された動物の神経過敏性によるものとみなされてきた(114)。一貫した結果が得られているわけではないが、近年では隔離飼育が血中コルチコステロン濃度の上昇をもたらすなど、個体に生理学的な反応をもたらすことが明らかにされてきた(112,115,116)。もし仮に、隔離飼育による行動学的な変化が内分泌学的変化あるいは代謝機能の変調に起因するものであるのならば、代謝機能に密接に関連していると考えられる摂食行動もまた、隔離飼育によって影響を受けることが予想される。事実ラットでは個別飼育を行うと集団飼育下で飼育されている個体よりも摂食量が減少することが古くから知られている(117)。しかしながら、肥満モデルマウスを用いた研究は行われていないために、隔離飼育が過食および肥満に与える影響については全く未知のままである。したがって、隔離飼育と肥満の関係を調べることは、肥満症の心理-内分泌学的基礎過程について新たな知見をもたらすものと考えられる。

そこで本実験では、隔離飼育が BRS-3 KO マウスの摂食量と体重変化におよぼす影響について検討を加える。まず、BRS-3 KO マウスと野生型マウスについて、個別飼育(隔離飼育)と集団飼育の 2 種の飼育条件を独立変数として、体重変化および摂食量について比較した。次に、飼育条件が自発活動性に与える影響について分析を行い、さらに、個別飼育による社会的行動の変化について分析を行った。

## 1) 実験 1 : 飼育条件と体重変化および摂食量に関する分析

### 1)-1. 方法

**被験体** : 実験 1 と実験 2 は同じ動物を用いて実験を行った。雄の BRS-3 KO マウス、および同腹の雄の野生型マウス各 16 匹を用いた。BRS-3 KO マウスおよび野生型マウスは C57BL/6 系統のマウスに戻し交配を行った第 5 世代(F5)のものを用いた。マウスは生後 4 週まで母親とともに飼育し、離乳および遺伝子型の判定後、実験用の雄の個体だけを選別した。実験 1 および 2 に用いたマウスは、生後 6 週目まで 4 匹あるいは 6 匹の集団飼育を行った。この時点における平均体重は、BRS-3 KO マウス・野生型マウスそれぞれ  $22.3 \pm 0.4\text{g}$  および  $21.8 \pm 0.4\text{g}$  であった。なお、摂食および飲水は自由とした。

**装置・材料** : 実験は通常の飼育ケージ内で行った。また、餌は通常の固形飼料(日本クレア製、CE-2, 342.2 kcal/100g)を用いた。

**手続き** : 生後 6 週目に BRS-3 KO マウス・野生型マウスともに各実験群に偏りのないように振り分けた。実験群は集団飼育群(group-reared、各 8 匹ずつ)および個別飼育群(isolation-reared、各 8 匹ずつ)であった。集団飼育群は 1 ケージ当たり 4 匹の集団飼育とし(BRS-3 KO マウス: Group 4- ; 野生型マウス: Group 4+)、個別飼育群は 1 ケージ当たり 1 匹で飼育を行った(BRS-3 KO マウス: Group 1- ; 野生型マウス: Group 1+)。摂食量および体重は毎週 1 回測定した(毎週水曜日、午前 10 時~11 時の間に測定した)。なお、目視可能な食べ残しが餌かごから落ちていた場合には拾い集めて摂食量から差し引いた。

**統計的分析** : 統計的検定には繰り返しのある二元配置の分散分析および一元配置の分散分析を用いた。また、多重比較は Student の t 検定 (両側) および基準値とサンプルの比較検定(one-sample t-test:両側)を用いた。

### 1)-2. 結果

**体重増加の分析**: 各実験群における 6 週齢から 23 週齢までの平均体重の推移を Fig.

3-4 にまとめた。繰り返しのある二元配置の分散分析の結果、実験条件（群）と週齢の主効果が有意であった(それぞれ、 $F(3,560)=78.99$ ,  $p<0.0001$ ;  $F(19,560)=81.91$ ,  $p<0.0001$ )。また、飼育条件と週齢の間に有意な交互作用が認められた( $F(57,560)=2.36$ ,  $p<0.0001$ )。そこで、さらに週齢と遺伝子型、および飼育条件の間で二元配置の分散分析を行った。結果は Table 3-3. にまとめた。BRS-3 KO マウスにおける体重増加は集団飼育群・個別飼育群ともに野生型マウスよりも大きかった。集団飼育群の野生型マウス(Group 4+)の体重変化は 13 週齢から 20 週齢にかけて個別飼育群(Group 1+)の体重増加よりも大きかったが( $t=2.51$ ,  $p<0.03$ , 13 週齢時)、BRS-3 KO マウスではこれと反対に、23 週齢以降個別飼育群(Group 1-)の方が集団飼育群(Group 4-)よりも体重増加が大きかった( $t=2.21$ ,  $p<0.05$ , 23 週齢時)。このように、野生型マウスの体重増加が集団飼育条件で大きかったのに対して、BRS-3 KO マウスの体重増加は個別飼育条件で大きかった。

**摂食量の分析：**各実験群における 7 週齢から 23 週齢までの摂食量の推移を Fig. 3-5 にまとめた。平均摂食量は 1 週間の摂食量をマウス 1 個体の 1 日当たりの摂取量に換算して分析を行った<sup>3</sup>。個別飼育条件のマウスの摂食量について繰り返しのある二元配置の分散分析を行ったところ、遺伝子型の主効果が有意であった( $F(1,238)=72.05$ ,  $p<0.0001$ )。一方、集団飼育条件のマウスでは、Fig.3-5 に見られるとおり遺伝子型による差は認められなかった<sup>4</sup>。すなわち、個別飼育条件の BRS-3 KO マウスは同じ条件の野生型マウスと比較して食物摂取量が有意に多く、一方集団飼育条件では BRS-3 KO マウス・野生型マウスともにほぼ同様の摂食量を示している。しかしながら、飼育条件の食物摂取量に与える効果については、BRS-3 KO マウスと野生型マウスでは異なる結果を得た。野生型マウスでは、12 週目から 15 週目にかけて集団飼育条件(Group 4+)のマウスの食物摂取量が個別飼育条件のマウス(Group 1+)よりも有意に多く( $F(1,7)=5.62$ ,  $p<0.05$ , 12 週齢時)、一方 BRS-3 KO マウスでは、15 週目以降、個別飼育条件のマウス(Group 1-)の食物摂取量が集団飼育条件のマウス(Group 4-)よりも有意に多かった( $F(1,7)=16.07$ ,  $p<0.01$ , 15 週齢時)。

これらの結果は、野生型マウスの食物摂取量は飼育条件の影響を受けにくい、受けても個別飼育条件でわずかに抑制される程度であるのに対して、BRS-3 KO マウスでは個別飼育条件において有意に増加することを示している。

Table 3-3. Results of two-way analyses of variance about body weight change

	Group 4-	Group 1+
Group 4+	genotype: F(1,280)=37.85 p<0.0001 age: F(19,280)=37.49 p<0.0001 interaction: F(19,280)=0.62 n.s.	rearing condition: F(1,280)=53.45 p<0.0001 age: F(19,280)=29.15 p<0.0001 interaction: F(19,280)=0.10 n.s.
Group 1-	rearing condition: F(1,280)=0.98 n.s. age: F(19,280)=53.64 p<0.0001 interaction: F(19,280)=2.14 p<0.005	genotype: F(1,280)=169.67 p<0.0001 age: F(19,280)=45.12 p<0.0001 interaction: F(19,280)=4.60 p<0.0001

\*3: mean food intake in *group-reared* mice = (amount of weekly food consumption) / 7(days) / 4(number of mice in each cage)

mean food intake in *isolation-reared* mice = (amount of weekly food consumption) / 7(days)

\*4: 集団飼育条件における平均摂食量については、BRS-3 KO マウス・野生型マウスともに2ケージずつのデータなので統計的検定は行っていない。

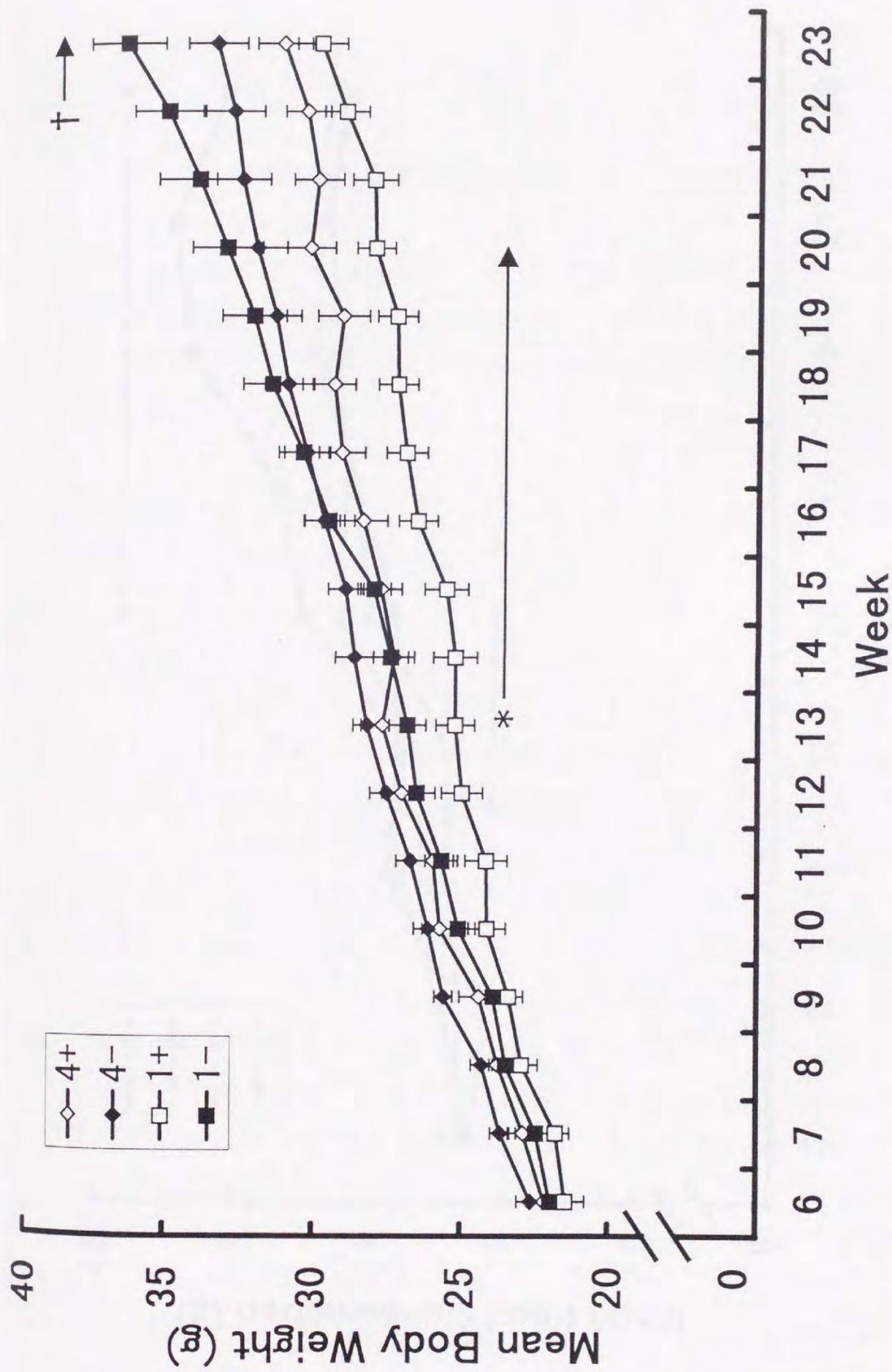


Fig. 3-4 Weekly body weight gain in group-reared wild type mice (Group 4+), group-reared BRS-3 KO mice (Group 4-), isolation-reared wild type mice (Group 1+), and isolation-reared BRS-3 KO mice (Group 1-). Data represent mean  $\pm$  SEM. In post hoc analyses, statistical differences among groups are indicated with symbols (\* between Group 4+ and Group 1+,  $p < 0.03$ ; † between Group 4- and Group 1-,  $p < 0.05$ ; two-tailed Student's t-test)

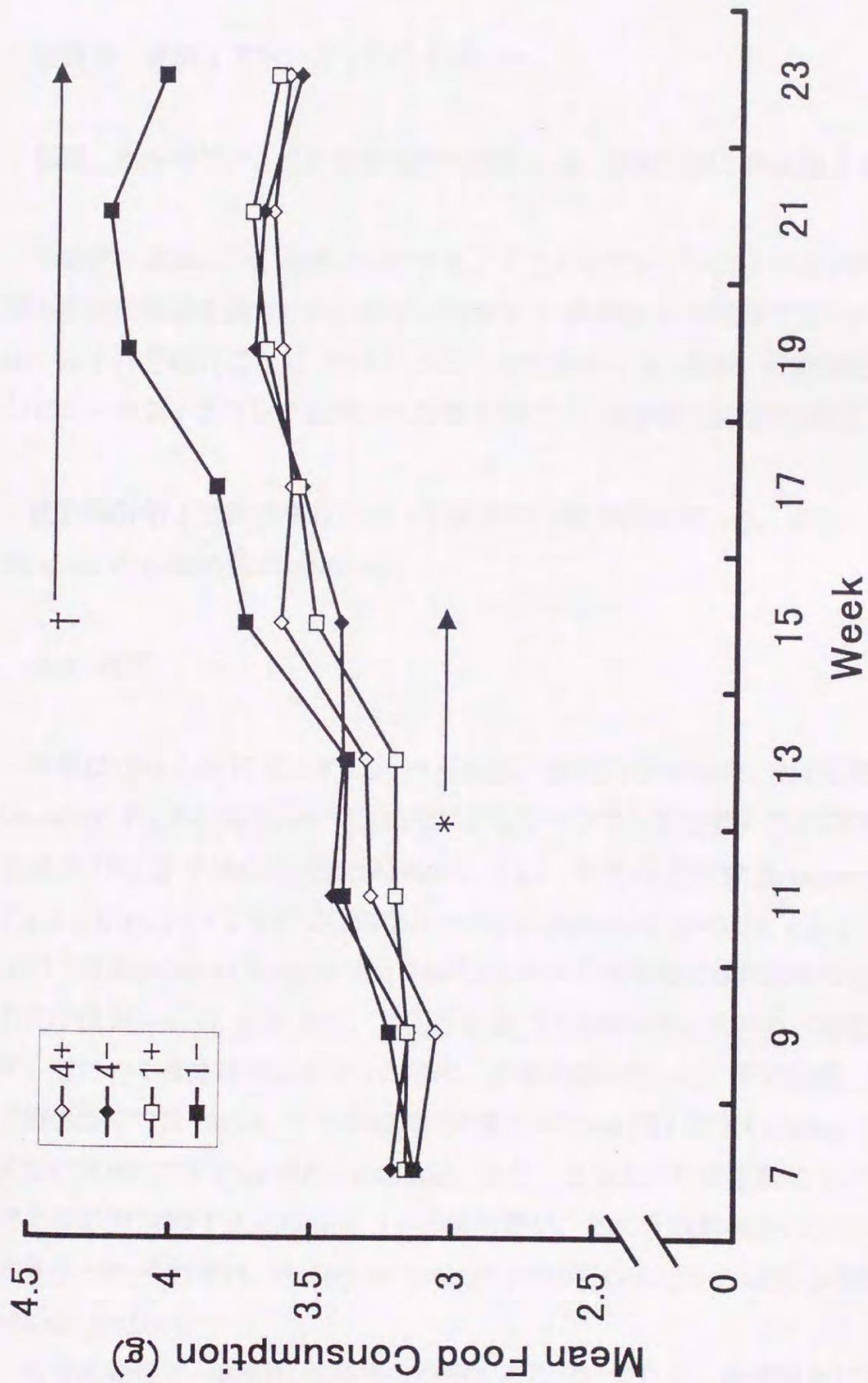


Fig. 3-5 Weekly changes in food consumption in group-reared wild type mice (Group 4+), group-reared BRS-3 KO mice (Group 4-), isolation-reared wild type mice (Group 1+), and isolation-reared BRS-3 KO mice (Group 1-). Data represent mean food consumption (g/day/mouse) biweekly. Statistical differences among groups are indicated with symbols (\* between Group 4+ and Group 1+,  $p < 0.05$ ; † between Group 4- and Group 1-,  $p < 0.05$ ; two-tailed one-sample t-test).

## 2) 実験 2 : 飼育条件の自発活動性に与える影響について

### 2)-1. 方法

**被験体** : 実験 1 で用いたマウスを用いた。

**装置** : 赤外線ビーム式の活動量測定装置 4 基。詳細は第 2 章実験 3 を参照。

**手続き** : 実験は 22 週齢目に行った。マウスをオープンフィールド内に入れ、5 分間の自発活動量を測定した。測定項目は第 2 章実験 3 と同様であった。オープンフィールドは各試行ごとに 70% アルコールで清掃した。なお、行動測定中の照明はコンピュータディスプレイの明かり以外を消灯し、実験者は別室で待機した。

**統計的分析** : 統計的検定には一元配置の分散分析を用いた。また、多重比較には Student の t-検定(両側)を用いた。

### 2)-2. 結果

結果は Fig.3-6 にまとめた。一元配置の分散分析の結果、移動運動量(distance traveled: Fig.3-6(A))においては BRS-3 KO マウスと野生型マウスの間で実験条件の主効果が有意ではなく ( $F(3,28)=0.61$ , n.s.)、また常同行動量(stereotypic counts: Fig.3-6(B))においても有意ではなかった ( $F(3,28)=2.58$ ,  $p<0.08$ , n.s.)。しかし、立ち上がり反応(vertical counts: Fig.3-6(C))においては有意な実験条件の主効果が認められた ( $F(3,28)=5.33$ ,  $p<0.005$ )。常同行動量では実験条件の主効果が有意ではなかったが、きわめて有意水準に近かったため、多重比較を行った。その結果、個別飼育条件で野生型マウス(Group 1+)の常同行動量が BRS-3 KO マウス(Group 1-)と比較して有意に亢進していた ( $t=2.83$ ,  $p<0.02$ )。また、立ち上がり反応量については、個別飼育条件の野生型マウス(Group 1+)の反応量が、他の全実験条件のマウスよりも有意に多かった(それぞれ、Group 4+:  $t=2.92$ ,  $p<0.02$ ; Group 1-:  $t=2.8$ ,  $p<0.02$ ; Group 4-:  $t=2.65$ ,  $p<0.02$ )。

自発活動性は一般的な活動性の指標であるだけでなく、新奇場面における個体の情動性の評価指標とも考えられる。個別飼育条件における BRS-3 KO マウスの常同

行動量および立ち上がり反応量が同じ飼育条件の野生型マウスと比較して低水準であったことは、BRS-3 KO マウスの情動性が個別飼育による社会的隔離の影響を受け難いことを示すものである。

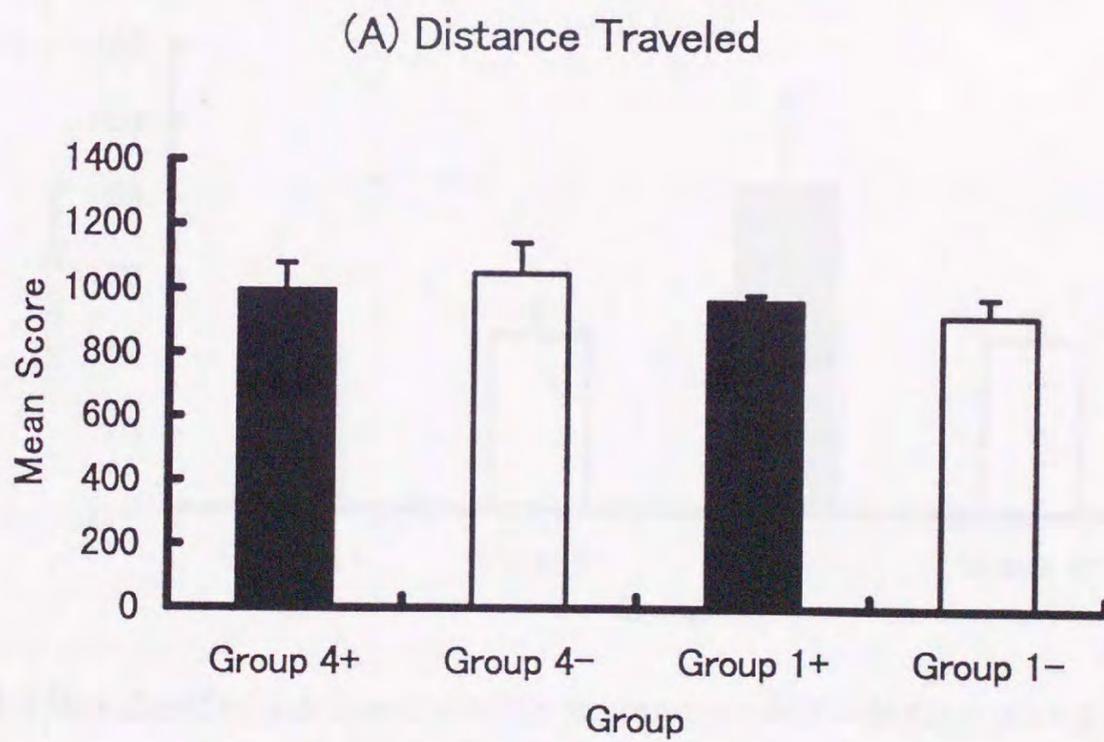


Fig. 3-6(A) Results of spontaneous activity in group-reared wild type mice (Group 4+), isolated-reared wild type mice (Group 1+), group-reared BRS-3 KO mice (Group 4-), and isolation-reared BRS-3 KO mice (Group 1-). Data represent means + SEM. No significant differences were observed among groups.

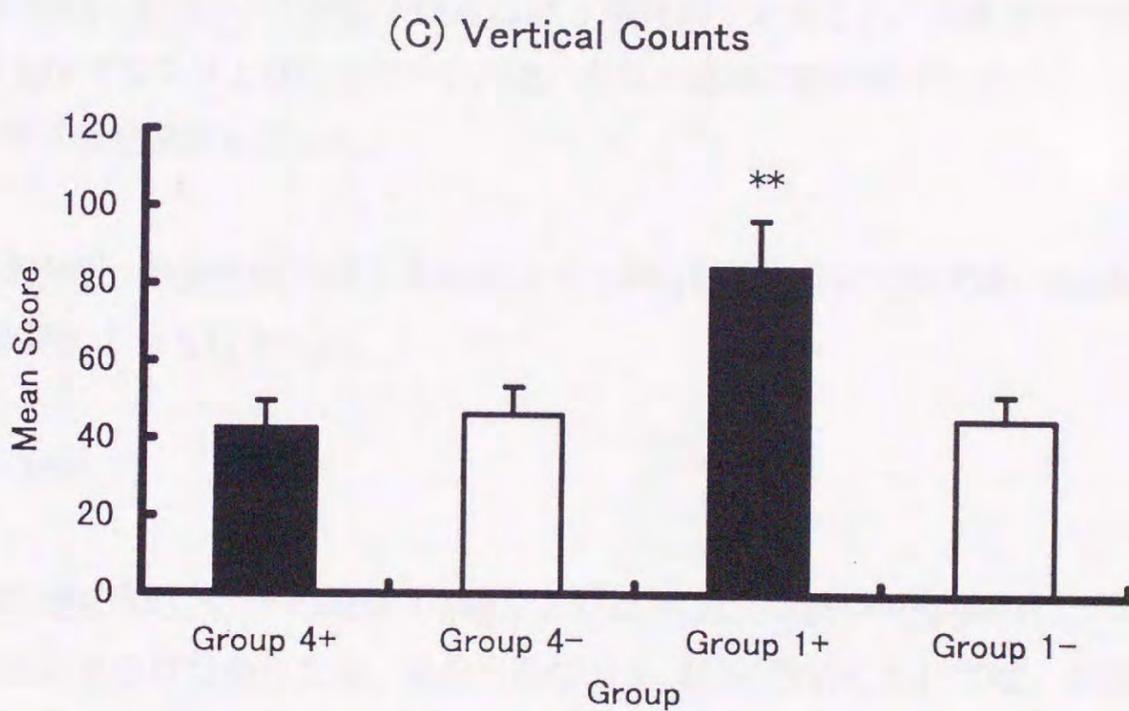
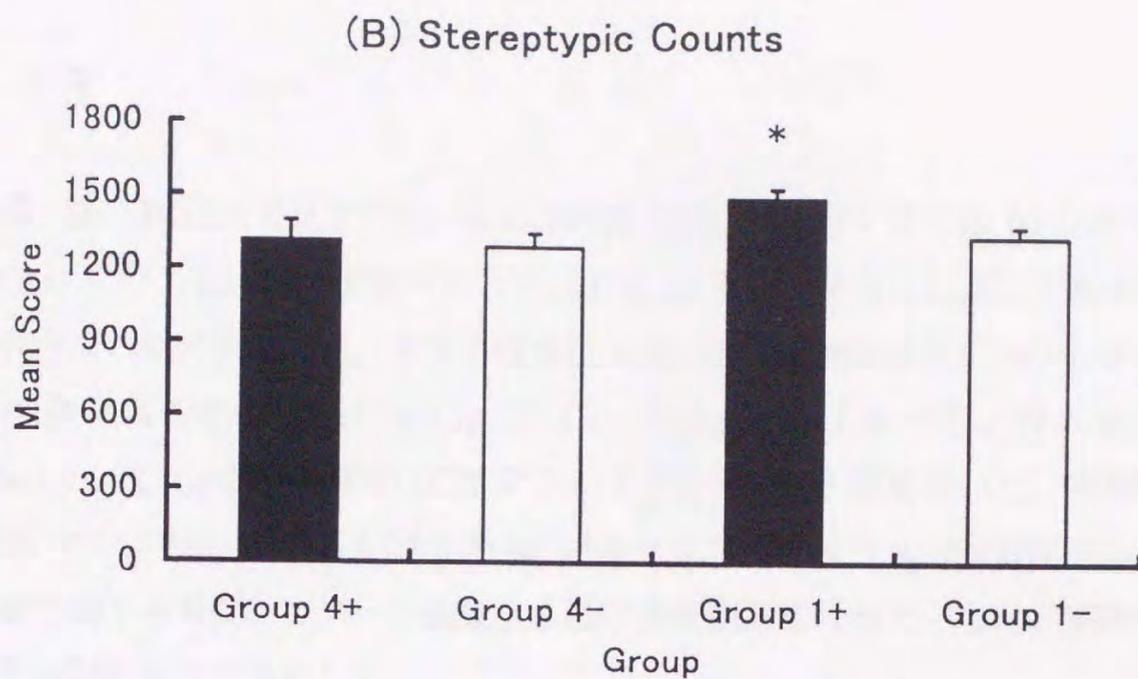


Fig. 3-6 Results of spontaneous activity in group-reared wild type mice (Group 4+), isolated-reared wild type mice (Group 1+), group-reared BRS-3 KO mice (Group 4-), and isolation-reared BRS-3 KO mice (Group 1-). Data represent means + SEM. (B) An asterisk represents difference between Group 1+ and Group 1- ( $p < 0.02$ ). (C) Asterisks represent difference between Group 1+ and other groups ( $p < 0.02$ ).

### 3) 実験 3 : 飼育条件が社会性に与える影響について

#### 3)-1. 方法

**被験体** : 雄の BRS-3 KO マウス、および同腹の雄の野生型マウス各 10 匹を用いた。BRS-3 KO マウスおよび野生型マウスは C57BL/6 系統のマウスに戻し交配を行った第 5 世代(F5)のものを用いた。マウスは生後 8 週目まで集団飼育を行った。その時点での平均体重はそれぞれ  $28.3 \pm 0.7\text{g}$  および  $26.2 \pm 0.2\text{g}$  であった。侵入者マウス (intruder)として 10 週齢の雄の ICR マウス(日本クレア)20 匹を用いた。実験時における ICR マウスの平均体重は  $31.8 \pm 0.4\text{g}$  であった。ICR マウスは飼育開始から実験開始時まで約 1 ヶ月間、1 ケージ当たり 5 匹の集団飼育を行った。なお、実験時以外の摂食および飲水は自由とした。

**装置・方法** : 装置および実験手続きは第 2 章実験 1 に準じた。先住者マウスである BRS-3 KO マウスおよび野生型マウスは、生後 8 週目で個別飼育に移行し、4 週間の個別飼育の後に実験を行った。

**統計的分析** : 統計的検定は F 検定によって等分散性について検定後、Student の t 検定(両側)によって行なった。

#### 3)-2. 結果

社会的相互作用テストの結果は Fig.3-7 にまとめた。個別の行動指標については有意な差は認められなかったが、社会行動のカテゴリの分析においては、BRS-3 KO マウスの非攻撃性社会行動が野生型マウスと比較して有意に低かった(Fig.3-7(A):  $t=2.23, p<0.04$ )。しかし、攻撃性社会行動については両者の間に有意な差は認められなかった(Fig.3-7(B):  $t=0.19, \text{n.s.}$ )。

本実験において、BRS-3 KO マウスの非攻撃性社会行動が野生型マウスと比較して低水準であったことは、実験 2 の結果同様、BRS-3 KO マウスの情動性が社会的刺激の剥奪の影響を受け難いことを示すものである。実験 2 および本実験の結果から、BRS-3 KO マウスでは野生型マウスに見られる個別飼育の正常な効果が低下あるいは欠如しているものと考えられる。

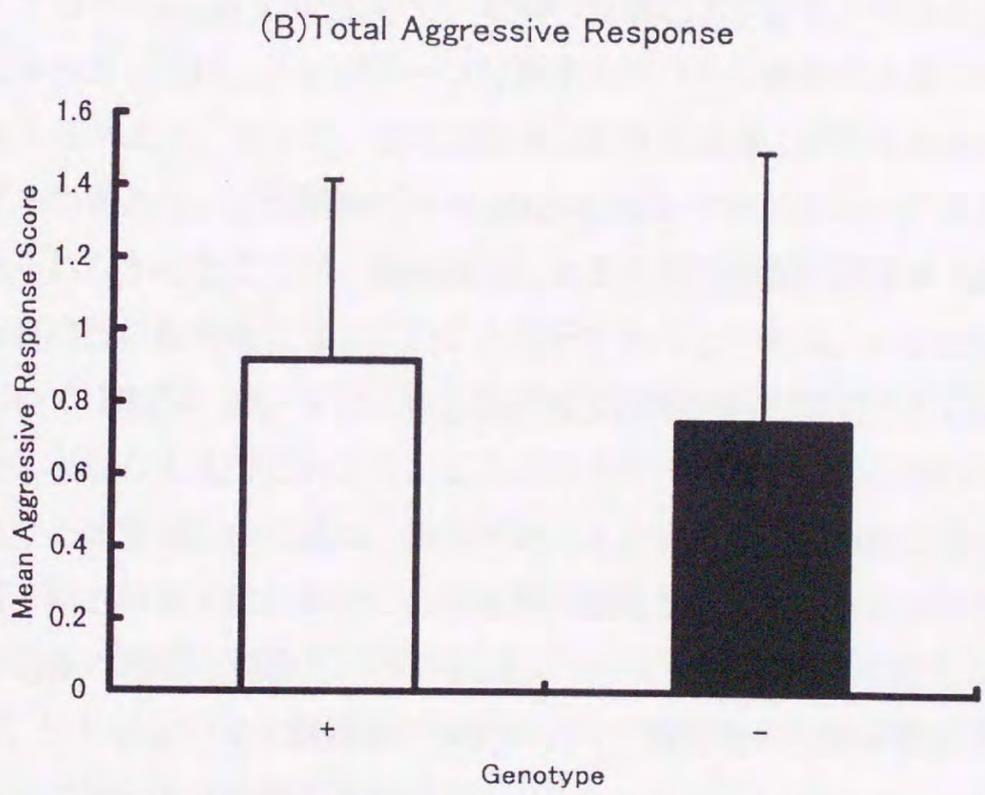
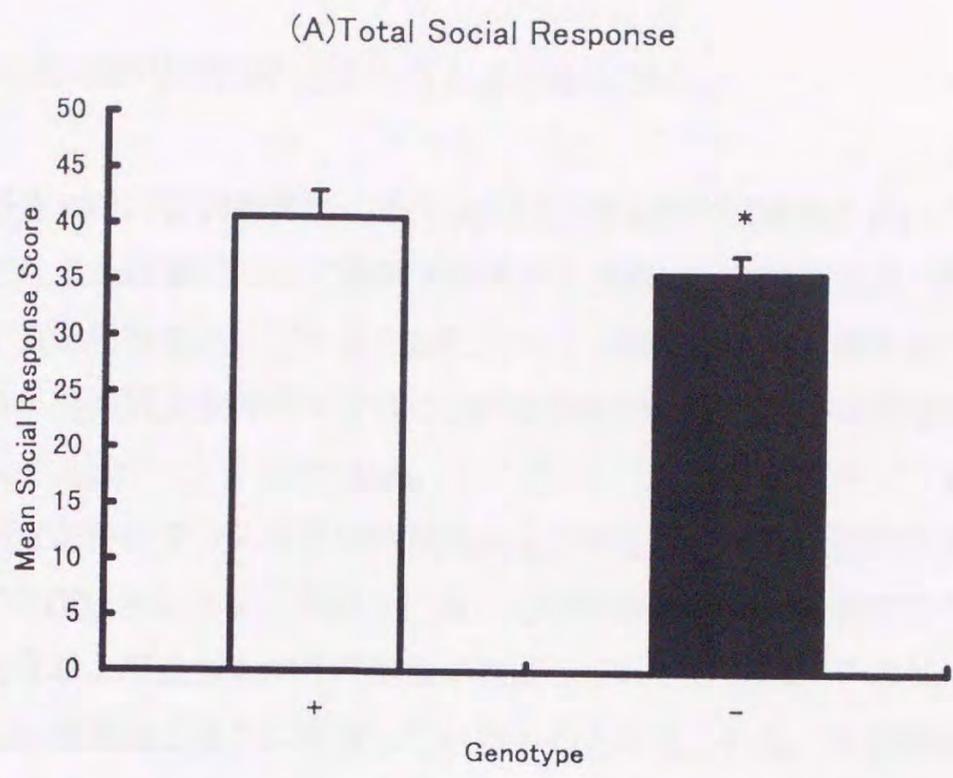


Fig. 3-7 Results of social interaction test of isolation-reared wild type mice (+) and BRS-3 mice (-). Data represent means + SEM. An asterisk represents difference between BRS-3 KO mice and wild type mice ( $p < 0.05$ ).

#### 4) 社会的要因が肥満・過食に与える影響について

本研究では、個別飼育による社会的刺激の剥奪が BRS-3 KO マウスにおける体重増加に与える影響について検討を加えた。実験 1 においては、飼育条件を独立変数として食物摂取量および体重増加について分析を行った。野生型マウスでは予測された通り、集団飼育条件のマウスにおける食物摂取量および体重増加が個別飼育条件のマウスを上回っていた(117,118)。ところが、BRS-3 KO マウスではこれと反対に、個別飼育条件のマウスの食物摂取量および体重増加量が集団飼育条件のマウスを上回っていた(Fig.3-4, 3-5)。実験 2 において個別飼育条件の野生型マウス(Group 1+)の常同行動量および立ち上がり行動量が亢進していたことは、そのグループに属するマウスの食物摂取量の低下に寄与しているものと考えられる。本研究の結果は、個別飼育によってマウスの環境刺激あるいは社会的刺激に対する反応性が亢進するという先行研究(109,113)の結果と一貫するものである。これに対して、個別飼育条件の BRS-3 KO マウス(Group 1-)において、常同行動量および立ち上がり反応量の亢進が認められなかったことは、このグループに属するマウスの食物摂取量の増加に寄与するものと考えられよう。さらに、自発活動性は新奇な環境に対する情動的反応性の指標とも考えられるため、個別飼育条件の BRS-3 KO マウスにおいてこれらの反応の亢進が認められなかったことは、個別飼育による社会的刺激の剥奪が BRS-3 KO マウスの情動反応性に影響を及ぼさないことを示すものといえる。この点については、実験 3 において BRS-3 KO マウスの社会的相互作用が野生型マウスと比較して低水準であったことから支持されよう。これらの点から、個別飼育条件の BRS-3 KO マウスにおける体重増加の亢進は、個別飼育による情動反応性および社会的反応性に対する通常予期される効果の欠失による過食が原因となっているものと考えられる。

扁桃体の機能と情動反応性の関連についてはいくつかの報告がなされている。例えば、ヒトにおいては扁桃体の損傷によって情動性の欠如が報告されており(31,32)、マウスにおいては条件性情動反応(conditioned emotional response: CER)<sup>5</sup>の低下が報告されている(119)。また電気生理学的な研究からも、扁桃体が情動反応の学習(learning of emotional behavior)を媒介あるいは調節していることが示されている(120)。さらに扁桃体内側核を電気刺激すると、雄マウスの社会的行動あるいは性的行動が変化するという報告もある(121)。本研究の結果は、BRS-3 KO マウスに認められた情動反応性および社会的反応性の異常が、扁桃体領域に分布する BRS-3 の欠失の結果であることを示唆するものと考えられる。

本研究では、社会的刺激の剥奪が遺伝的に肥満傾向を示すマウスの過食および肥満の生起と進行に少なからず影響を及ぼすことを明らかにした。本研究から得られた結果は、過食および肥満の予防と治療における集団療法の適用など、行動療法に新しい可能性を示すものと考えられることから、更なる研究の進展が望まれる。

---

\*5: Conditioned Emotional Response (CER):条件性情動反応とよばれる行動で、主としてラットを用いた恐怖の動機づけの研究に用いられてきた。典型的な実験方法は以下のとおりである。ラットにおいて餌を報酬としたレバー押し等の道具的反応の訓練を行っておく。この訓練とは別個にブザーあるいは光といった条件刺激と電気ショックのような嫌悪刺激の対提示による(恐怖の)古典的条件づけを訓練しておく。テスト事態においては、レバー押し反応を行っているラットに対して、先の古典的条件づけに用いた条件刺激を提示し、条件刺激提示中のラットのレバー押し反応頻度を、条件刺激提示直前のレバー押し反応頻度と比較する。条件刺激提示中のレバー押し反応の抑制率を指標として、ラットに条件づけられた情動性(恐怖の動機づけ)の強度を評価する方法である。

### 第3節 BRS-3 の行動調節機能に関する考察

本節では第2節における諸実験の結果より、マウスにおける BRS-3 の行動調節機能について考察を加える。

すでに述べてきたとおり、BRS-3 KO マウスの典型的な表現型は代謝異常を主たる要因とした過食と肥満である。本研究においては、BRS-3 KO マウスに見られる過食および肥満から予想される行動変化として、まず味覚反応性の変化について検討を加えた。

過食および肥満が必ずしも味覚反応性の異常を伴うわけではないが、味覚反応性の異常を報告する例が多い。*ob/ob* マウスに見られるような甘味嗜好性の亢進は、ヒトの摂食障害の症例においても報告されている(106)。もちろん、ヒトの食性は実験室マウスと比較してはるかに多様なものであり、単一味質(味覚)に対する嗜好性の変化を指標とした研究が大きな意味を持つとは考えがたい。しかし、「おいしさ (palatability)」といった心理尺度を導入した研究においては、ヒトにおいても過食・肥満傾向をもつ個体において、その嗜好性が亢進することが知られている(93)。本研究においては、生得的なあるいは非学習性の行動変化として味覚選好性の変化を(第1項実験1)、また学習性の行動変化として条件性味覚嫌悪学習の亢進(第1項実験2)を明らかにした。先にも述べたとおり、従来ラットを用いた脳破壊研究から得られた知見と比較すると、これらの行動変化は視床下部および扁桃体における機能変化(欠損)に由来するものと推測される。

次に、BRS-3 KO マウスの代謝異常から予想される行動変化として、飼育条件による摂食量および体重変化について検討を加えた。飼育条件、特に個別飼育による社会的刺激の剥奪は、各種内分泌系に多大な影響を及ぼすことが知られている(122-126)。例えば、個別飼育が脳内のドーパミンレベルを変化させる(122,123)、あるいは血中コルチコステロン濃度を上昇させる(115,116)ことなどが報告されている。これらの内分泌物は直接的に摂食量あるいは体重変化の調節に関与しているものではないが、間接的ではあるものの摂食行動や体重変化に多大な影響を及ぼし得るものと考えられる。すなわち、ドーパミン系の賦活による自発活動の亢進は個体の全活動に占める摂食行動の比率を低め、かつエネルギー消費を促進するために、体重増加を抑制するという影響が考えられる。また、コルチコステロンは糖代謝を促進する役割を持つともいわれており(38)、その濃度変化は摂食行動ひいては体重変化に影響を与える

可能性がある。ヒトの摂食障害患者の症例からは、各種脳内物質の代謝異常が報告されており(127)、個別飼育による社会的刺激の剥奪が BRS-3 KO マウスの摂食量および体重変化に何らかの影響を及ぼすことが予想された。本研究においては、個別飼育による社会的刺激の剥奪によって、BRS-3 KO マウスの平均摂食量が増加し、さらに体重増加量についても亢進することが明らかにされた。従来の研究では、個別飼育による社会的刺激の剥奪が摂食量および体重増加を抑制することを報告しており(117)、BRS-3 KO マウスにおいてこれらの知見から予測される変化とは逆の結果が得られたことは、きわめて重要なことといえる。そこでさらに本研究においては、この結果を説明すべき変数を同定するために、個別飼育条件における BRS-3 KO マウスの自発活動性および社会的相互作用についても検討を加えた(第 2 項実験 2・3)。その結果、自発活動性においては野生型マウスと比較して立ち上がり反応および常同行動の低下が認められ、また社会的相互作用の低下も認められた。第 2 項実験 1 の結果と同様に、これらの行動指標における BRS-3 KO マウスの結果も、先行研究から予想される結果とは相反するものであった。個別飼育条件下の BRS-3 KO マウスにおける自発活動性の低下および社会的相互作用の低下は、個別飼育による社会的刺激の剥奪による内分泌学的な変化が欠如しているか、あるいは少なくとも野生型マウスとは異なる方向のものであることを示すものであろう。

BRS-3 KO マウスにおいて、味覚反応性の変化(特に嫌悪性反応の亢進)および個別飼育による社会的剥奪の影響の低下(欠如)という、一見無関連に思われる行動変化が認められたことは、扁桃体の多機能性を反映したものと考えられる。扁桃体は扁桃体内部および視床・視床下部ならびに海馬等近接領域に対して極めて複雑に投射していることが知られており(128,129)、扁桃体それ自体に個別の行動の責任中枢を仮定することは難しい。扁桃体内における各神経核の破壊が多様な行動変化をもたらすことから(100,107,108,119-121)、扁桃体は情動価を持つ諸刺激入力について、それぞれ対応する次段階の処理中枢への刺激情報の中継を行なっているものと推測される。一方、第 1 節で示したとおり、BRS-3 の脳内分布は視床下部および扁桃体領域のきわめて限定された部位であり、かつその密度も比較的疎である。にもかかわらず、BRS-3 KO マウスにおいて多様な行動変化が認められたことは、扁桃体における BRS-3 が個別の行動に特殊化された調節機能を果たしているわけではないことを示している。さらに、BRS-3 KO マウスの行動変化が扁桃体の破壊研究において報告されている行動変化と極めて良く対応しているということは、BRS-3 による行動調節機能が主として扁桃体における調節機能であることを示している。本章において BRS-3 KO

マウスに認められた行動変化は、主として嫌悪性味覚刺激に対する過剰反応性および個別飼育による社会的刺激の剥奪に対する過少反応性であった。したがって、扁桃体における BRS-3 の内在性のリガンド(ligand)による行動調節機能は、嫌悪性刺激および社会的刺激情報の中継あるいは評価における調節機能であると考えられる。

## 第4章 ニューロメジン B 受容体欠損マウス(NMB-R KO マウス)の行動解析

### 第1節 概論

#### 1. ニューロメジン B 受容体(NMB-R)の脳内分布

NMB-R の脳内分布はラット(42)およびマウス(43,73)について *in situ hybridization* 法を用いて調べられている。ラット・マウスともにほぼ同様の脳内分布を示しており、その発現は脳内の広範な領域に及んでいる。マウスにおける NMB-R の脳内分布を Table 4-1.にまとめた。NMB-R の脳内分布パターンにおいて特徴的な点は、嗅覚領域(olfactory regions)に極めて高密度に分布していること、および視床領域(thalamus)ならびに縫線核(raphe nuclei)にも多量に発現している点である。発現の密度および分布領域が他のボンベシン様神経ペプチド受容体(GRP-R, BRS-3)とは若干異り、その独自性が注目される場所である。

従来からの研究において行動との対応関係が比較的明らかにされている領域としては、嗅覚領域・海馬・扁桃体・視床および視床下部領域などがあげられる。海馬・扁桃体および視床下部領域、また傍小脳脚核については、他章で述べてきたとおりである。嗅覚領域は言うまでもなく嗅覚と密接な関連があるが(130)、そればかりでなく情動機能あるいは社会行動や性行動にも深く関与していることが示されている(131)。嗅覚機能にとってもっとも重要な部位は嗅球(olfactory bulb)であり、これを破壊すると動物の嗅覚は失われる(132)。しかし、NMB-R は主嗅球(main bulb)には発現が認められておらず、直接的には嗅覚機能が欠失しているとは考えにくい。また、前嗅核(anterior olfactory nucleus: AON)は単純な課題による嗅覚学習および記憶に関与しているという報告がある(133)。一方、副嗅覚系の破壊は動物の情動性に変化をもたらさず。鋤鼻器(vomeronasal organ)の破壊は動物の性行動を減退させることが報告されている(134)。これに対して、視床領域は覚醒水準(arousal level)の調節に深く関与していることが知られており(135)、また縫線核(特に背側縫線核 dorsal raphe)はセロトニン(5-HT)伝達系の始点として知られている(136)。セロトニン系は第2章で述べたとおり、不安や防御行動あるいは攻撃性等の調節に対する関与が示されており(72,137)、NMB-R とこれらの関連も注目される場所である。

これらの点から、NMB-R は一般的な行動全般に関与しており、特に嗅覚関連行動および覚醒水準の調節に深く関与していることが想像される。さらに、セロトニン

Table 4-1. Distribution of NMB-R gene expression in the mouse brain

Forebrain	Isocortex	+
	Olfactory regions	
	Anterior olfactory nucleus	+++
	Olfactory tubercle	+
	Piriform cortex	+++
	Taenia tecta	+++
	Hippocampal formation	
	CA1/CA3	+
	Dentate gyrus	+
	Amygdala	
	Medial nucleus	++
	Amygdalohippocampal area	++
	Basal ganglia	
	Magnocellular preoptic nucleus	+
	Thalamus	
	Paraventricular nucleus	+++
	Central medial nucleus & Central lateral nucleus	+++
	Hypothalamus	
	Medial preoptic nucleus	++
	Ventromedial nucleus	+
Brainstem	Nucleus solitary tract	+
	Parabrachial nucleus	+
	Raphe	
	Dorsal raphe	+++
	Medial raphe	++
	Hindbrain raphe	++

*Note.* +++: strong signal; ++: moderate signal; +: weak signal (Wada, E. et al. unpublished data.(43) and Ohki-Hamazaki, H. et al. (73))

ューロンとの関係から、不安や防御行動および攻撃性との関連も期待される。

## 2. NMB-R KO マウスにおける一般的行動特性

第1項で述べたとおり、NMB-R KO マウスにおいては多様な行動変化が期待されたため、第2章において GRP-R KO マウスについて行なった分析と同様の一般的行動特性の分析を行なった。結果は Table 4-2. にまとめてある。一般的行動特性の分析においては、基本的な反射反応(プレパルス抑制テスト: prepulse inhibition test, 断崖反射テスト: cliff drop avoidance test, 痛覚テスト: tail-flick test)、自発活動性ならびに 8 枝放射状迷路(eight-arm radial maze)を用いた探索行動テストおよび運動調節能力(rota-rod test)などに関して、NMB-R KO マウスにおける行動変化は認められなかった。また摂食量および飲水量についても、NMB-R KO マウスと野生型マウスの間に有意な差は認められなかった。ボンベシン様神経ペプチドの投与による摂食抑制(第2章参照)についても、NMB-R KO マウスと野生型マウスの間に NMB 投与の効果の差は認められず、一方 GRP の投与によっては NMB-R KO マウス・野生型マウスともに摂食量の抑制が認められた(発表論文 5)。嗅覚関連行動に関しては、NMB-R が嗅覚領域に多量に発現しており、またこの領域における NMB-R が細胞内カルシウムイオン( $Ca^{2+}$ )濃度を変動させることで情報伝達している(発表論文 4: Fig. 4-1,2 参照<sup>\*)</sup>)、何らかの行動変化が期待された。中央で 2 個所に仕切られたテストケージ内に、1 週間飼育ケージを交換しないでおいた被験体自身の飼育ケージの床敷と新しい床敷をそれぞれ敷き、各々の床敷を敷いた区画における滞在時間を指標とした場所選好テスト(place preference test with self-odor)においては、NMB-R KO マウスと野生型マウスの場所(匂い)の選好に有意な差は認められなかった。同様に、条件性嗅覚嫌悪学習(conditioned odor aversion test: COA)および嗅覚弁別テスト(odor discrimination test)の各課題においても、NMB-R KO マウスは野生型マウスと全く同等の反応を示した。また、NMB-R が傍小脳脚核に発現していることおよび嗅覚と味覚が相互作用をもつという知見から(138,139)、条件性味覚嫌悪学習についても分析を行なったが、この課題においても有意な変化は認められなかった。

一方、学習や記憶といった高次機能については、Morris 型水迷路および穴に鼻を突っ込む行動(nose poke behavior)を指標とした道具的条件づけ(instrumental conditioning, operant behavior)について分析を行なったが、これらの分析においても有意な変化は見出されなかった。さらに、明暗箱および高架式十字迷路をもちいた

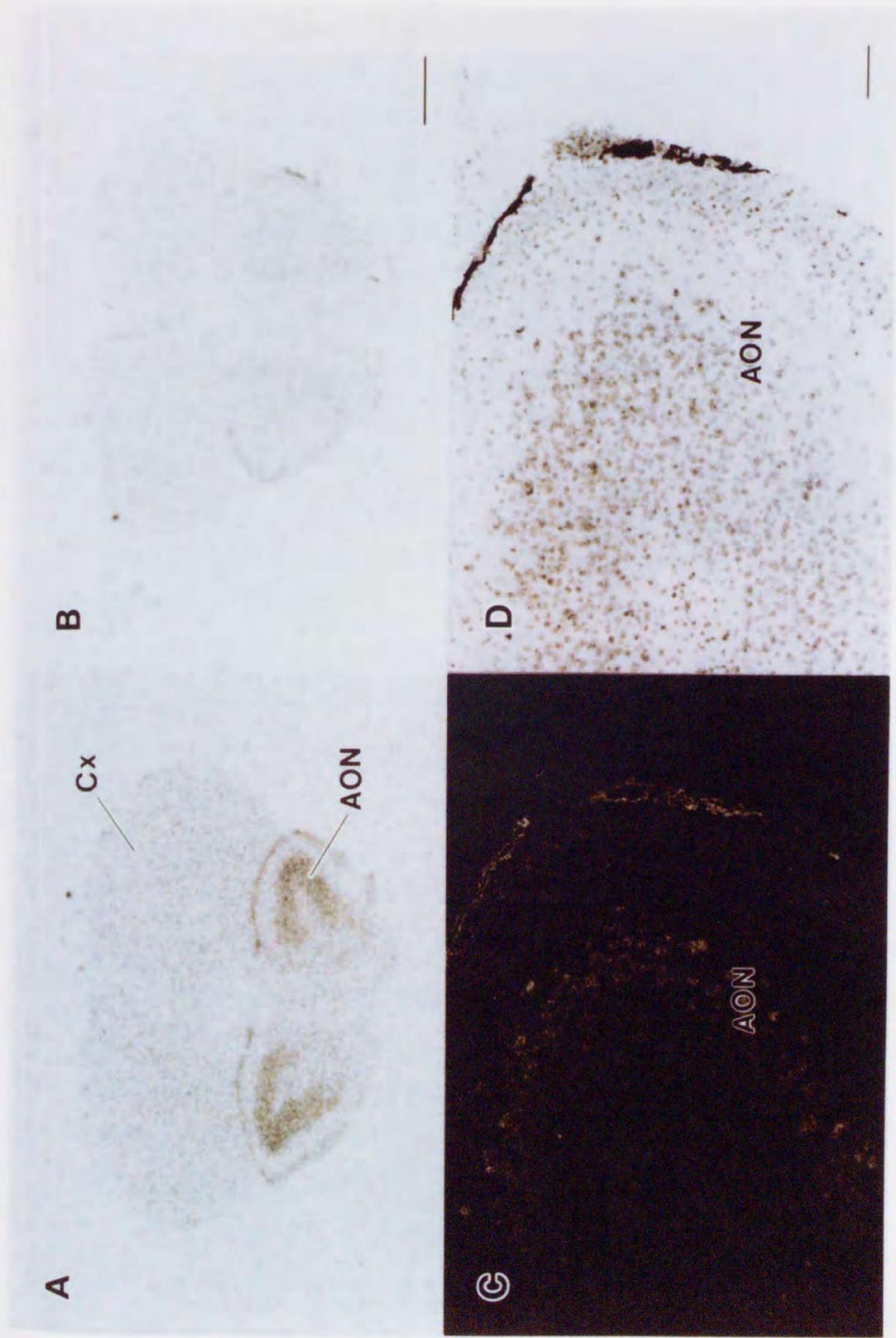


Fig. 4-1 NMB-R mRNA is expressed in the anterior olfactory nucleus (AON). Adjacent coronal sections through the AON of mouse brain were hybridized to NMB-R antisense (A) and sense (B)  $^{35}\text{S}$ -labeled cRNA probe. Darkfield (C) and brightfield (D) photomicrographs of the same section in (A) are shown. Scale bars indicate 1 mm (A,B) and 0.1 mm (C,D).

### NMB induced oscillatory calcium response

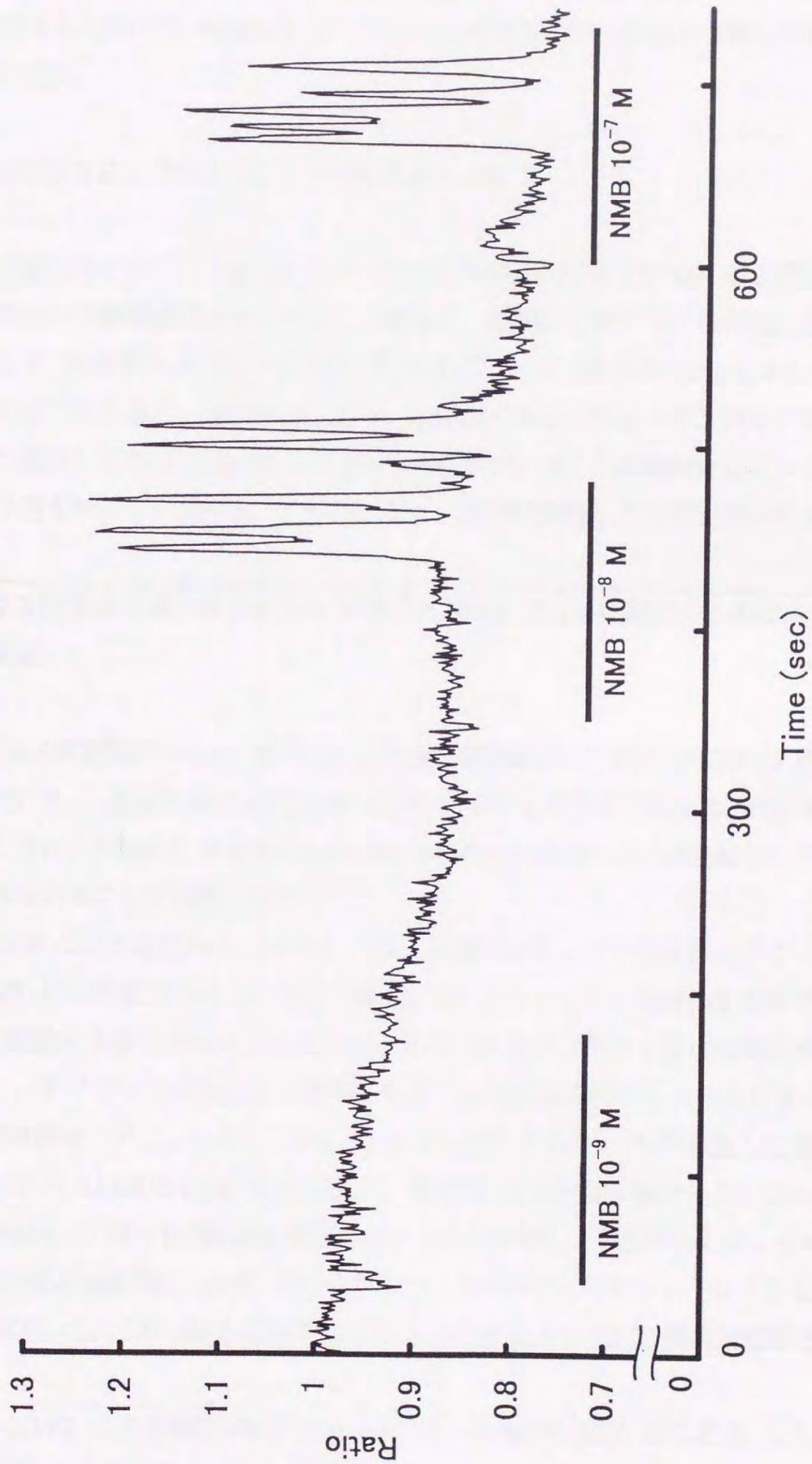


Fig. 4-2 NMB induced oscillatory calcium responses in a cultured AON cell. The action of NMB is dose dependent.

不安反応の測定、あるいは先住者-侵入者法による社会的相互作用の分析(第2章参照)のいずれについても NMB-R KO マウスと野生型マウス間に有意な差は認められなかった。

### 3. NMB-R KO マウスにおける行動解析の方針

前項で述べたとおり、NMB-R KO マウスは脳内における NMB-R の広範かつ高密度な分布という観察結果からの予想とは異なり、広範な行動テストを実施したのにもかかわらず、特筆すべき行動上の表現型を見出すことができなかった。しかしながら、前項でも述べたとおり、脳内の NMB-R は細胞内カルシウムイオン濃度の変動を媒介として機能しており、NMB-R の欠損が神経活動に何らかの関与をしていることは十分に予想されることである。したがって、一般的行動特性の分析において NMB-R

---

#### \*1: マウス嗅覚系における NMB-R の発現と NMB による細胞内カルシウム・イオン動態の測定

1) マウス嗅覚系における NMB-R の発現: 被験体として雄の C57BL/6 系統のマウスを用いた。 *in situ hybridization* は Imaki ら(74)の方法に従った。 Fig. 4-1 に見られるように、NMB-R は前嗅覚(anterior olfactory nucleus: AON)において強い発現が認められることを確認した。

2) NMB による細胞内カルシウム・イオン動態の測定: 1)の結果およびラットにおける NMB-R の発現がマウスと極めて類似していることから、NMB-R の発現が強い AON の細胞を実験に用いることにした。胎生 19 日目のラット胎児の脳から AON を摘出し、トリプシン処理により細胞を分散、これを培養用ディッシュにまいた。7~8 日間培養後、ディッシュに Calcium Green AM を加え 30 分間放置した後、浜松フォトニクス ARGUS-HISCA を用いて、細胞内  $Ca^{2+}$  動態を測定した。ニューロメジン B(NMB:  $10^{-7}M \sim 10^{-9}M$ ) は記録用メディウムに溶解し、灌流投与した。その結果、AON の分散培養細胞に NMB を投与すると、カルシウムのオシレーションを起こす細胞が存在した。この NMB に対する応答は  $10^{-8} M$  以上の NMB 濃度で観察された。

なお、NMB による細胞内カルシウム・イオン動態の測定は 関口正幸 先生 (疾病研究第四部 室長) に実施していただきました。

Table 4-2. Summary of behavioral analysis of the NMB-R KO mice

Behavior	Test measurement	Phenotype of mutant	
Reflex	Prepulse inhibition test <sup>*4</sup>	Normal	
	Cliff drop avoidance test <sup>*4</sup>	Normal	
	Tail flick test <sup>*4</sup>	Normal	
Spontaneous activity & motor ability	Open field test <sup>*1,2,3,4</sup>	Altered after stress	
	Exploratory response in radial maze <sup>*4</sup>	Normal	
	Forced swimming test <sup>*1</sup>	Altered after stress	
	Motor coordination ability test <sup>*4</sup>	Normal	
Ingestive behavior	Feeding & drinking <sup>*4</sup>	Normal	
	Bombesin-induced feeding suppression <sup>*4</sup>	Not Observed	
Perception	Taste	Conditioned taste aversion <sup>*2</sup>	Normal
	Olfaction	Place preference test with self-odor <sup>*4</sup>	Normal
		Conditioned odor aversion <sup>*4</sup>	Normal
		Odor discrimination test <sup>*4</sup>	Normal
		Food exploration test <sup>*1</sup>	Altered
		Learning	Water maze learning <sup>*4</sup>
T-maze learning <sup>*1</sup>	Altered after stress		
Operant behavior <sup>*4</sup>	Normal		
Anxiety-related response	Light-dark box test <sup>*1,2</sup>	Altered after stress	
	Elevated plus maze test <sup>*4</sup>	Normal	
Other behaviors	Maternal behavior test <sup>*1</sup>	Altered Partially	
	Social interaction test <sup>*2,3</sup>	Normal	

Note. Table 4-2.に記載された各実験の手続きは以下の章で詳述する。

\*1: 本章; \*2: 第2章; \*3: 第3章; \*4: 【補足】

KO マウスに行動上の変異が認められなかったという結果は、行動解析における方略選択上の問題である可能性が高い。そこで、NMB-R KO マウスの行動解析に当たって、以下のような方略を用いることにした。

従来遺伝子組換え動物の行動解析の多くは、目視あるいは比較的単純な実験状況における動物の行動の観察を主体として行われてきた。この手法は、被験動物に対して極力人為的な刺激を与えずに、いわば動物本来の行動傾向について遺伝子組換え動物における変異を探るという方略である。これに対して本研究においては、被験動物に対して積極的に働きかけることによって動物の行動に変化を生じさせ、その変化の過程に遺伝子組換え動物と野生型動物の差違を求めるという方略を用いることにした。実験心理学的な研究においては、しばしば被験動物の生理的あるいは内的要因が独立変数として操作されてきた。古典的な多くの実験から、飢えや渇きといった内的動因の操作、社会的刺激の操作(第3章参照)、あるいは実験に先行して行われる課題の難易度などといった諸要因が、動物の行動に大きな影響をもたらすことが明らかにされてきた(140,141)。そこで本研究では、これらの変数操作を用いて、NMB-R KO マウスと野生型マウスの中に生じる行動変容の異同について検討を加えることとした。操作対象変数としては、被験体にとって比較的大きなストレス要因となりえる変数を採用した。すなわち、食物剥奪(food deprivation)による生理的な負荷・個別飼育(isolation-rearing)による社会的刺激の剥奪(social deprivation)や母性行動実験の遂行による負荷・学習課題の遂行による言わば認知的な負荷等を用いて、NMB-R KO マウスと野生型マウスにおける行動変容の異同について詳細な分析を行なった。

## 第2節 実験

### 1. ストレス負荷による行動変容

生体に対するストレス負荷が内分泌に対する効果を持つばかりでなく、精神的・行動学的変化をもたらすことは古くから知られている(142,143)。拘束ストレスや水浸ストレスのような単純なストレス負荷によっても、内分泌に大きな変化をもたらす(144,145)、また自発活動性にも影響を及ぼす(115)。あるいは、持続的なストレス負荷による胃潰瘍や十二指腸潰瘍の形成に関しては、水浸ストレスのような物理的・生理的なストレス負荷によるものばかりでなく、社会的ストレス負荷による実験例もラットおよび霊長類の研究において報告されている(146-148)。また、給餌パタンの実験的操作のようなストレス負荷は、被験体に多くの異常行動を表出させる。一般に強化のスケジュール(schedule of reinforcement)とよばれている給餌パターンによって、ハトの攻撃行動が解発されること(schedule-induced aggression; 149)、ラットのレバー押し反応にきわめて特徴的な反応パターンが出現すること(150)などが知られており、さらにラットにおいて多飲症に類似した異常行動を生じさせることも報告されている。摂食制限下においたラットに対して、一定時間間隔(fixed time (FT) schedule)あるいは変動時間間隔(variable time (VT) schedule)スケジュールによって餌を与えると、その間の飲水量が平常時の数倍にも上がることが明らかにされている(Schedule-induced polydipsia, 151)。また、同様の操作によって回転かごにおける自発活動量も変化することが明らかにされており(152,153)、摂食制限および給餌間隔の操作が動物の行動に強く影響することは間違いのないことといえる。また、個別飼育などによる社会的刺激の剥奪が、動物の発達および行動に重大な影響を与えることは、すでに第3章で述べたとおりである。

一方、学習課題の遂行など言うなれば認知的なストレス負荷についても、動物の行動に重大かつ深刻な影響を及ぼし得ることが知られている。学習課題の困難度を段階的にあげていくと被験動物の行動が変化し、ついには神経症様の異常行動を生じるようになる。一旦神経症様の症状をきたした動物は、その後単純で簡単な課題の遂行すら全く不可能になる。この現象は実験神経症(experimental neurosis, 154)とよばれており、動物に対する過大な認知的負荷が、その動物の精神機能に不可逆的な変化をもたらす得ることを示すものである。類似の現象は個別の刺激によるストレス負荷ばかりでなく、環境刺激のような複合刺激事態においても観察されている。2匹のイ

ヌを被験体とした実験で、一方のイヌには所定の反応の遂行によって回避可能な電撃を与え、他方のイヌには回避不可能な電撃を与える。このような訓練を続けていくと、その後の学習課題の訓練において、前者のイヌでは問題なく獲得できる課題についても、後者のイヌでは全く獲得不能になるという事態を生じる。同時に、後者のイヌでは慢性的な不活動状態(いわゆる「やる気のない」状態)が観察される。この現象は学習性絶望あるいは学習性無力(learned helplessness, 155)とよばれており、環境あるいは問題解決場面における自己効力感(性)の無さに対する認知が、動物の学習能力および動機づけシステムに不可逆的なダメージを与え得ることを示す好例といえる。これら 2 つの例は、学習課題の遂行・獲得に伴う認知的なストレス負荷が動物の行動に重大な影響を及ぼすことを示している。

このように被験体に対する各種ストレス負荷は、その動物の行動に対して多大な影響を与え得るものといえる。そこで本実験では、マウスにこれら各種のストレス負荷をかけることによって、NMB-R KO マウスおよび野生型マウスの行動変容過程における異同の有無について検討を加えた。

1) 実験1 : 食物剥奪(food deprivation)による行動変容—餌探索行動(food exploration)の分析

1)-1. 方法

**被験体** : 雄の NMB-R KO マウス 11 匹、および同腹の雄の野生型マウス 11 匹。NMB-R KO マウスおよび野生型マウスは C57BL/6 系統のマウスに戻し交配を行なった第 4 世代(F4)のマウス同士を掛け合わせたものを用いた。マウスは摂食制限訓練の開始時に 3~4 カ月齢で、平均体重はそれぞれ  $25.3 \pm 0.6\text{g}$  および  $25.9 \pm 0.4\text{g}$  であった。マウスは訓練開始の 2 週間前から個別飼育条件で飼育した。摂食制限訓練では、まず第一日目にマウスの体重の 10% だけ餌を与え、翌日から 1 日 2 時間の制限摂食を行なった。2 時間の摂食時間が終了後、不足分の餌を与えて一日当たりの摂食量を体重の 10% にあわせた。1 週間の摂食制限訓練によってマウスの体重は摂食制限開始直前の 80%~90%<sup>\*1</sup> に減少したので、その後は一日当たりの給餌量をマウスごとに調節することによって<sup>\*2</sup>、この体重水準を維持させた。なお、実験中を除いて飲水は自由とした。

**装置・材料** : 装置は赤外線ビーム式の活動量測定装置(第 2 章参照)を用いた。探索用の餌として、45mg のラット用ペレット餌を用いた。また、装置内に敷いてペレット餌を埋めるために、飼育ケージで用いているものと同様の鮑屑の床敷を用いた。

**手続き** : 実験方法は Klein ら(156)の方法(finding the hidden cookie method)に準拠した。活動量測定装置の床に鮑屑の床敷を 20mm の厚さで敷詰め、一つの角から対角線上で 70mm 中央よりに離れた場所にペレット餌を 1 個埋めた。餌を埋めた角とは反対側の角に装置の外向きにマウスを入れ、ペレット餌を発見するまでの時間を計測した。また、その間の自発活動の各指標について計測した。自発活動の指標については第 2 章の実験と同様であった。

**統計的検定** : 統計的分析は Mann-Whitney の U-test(両側)を用いた。

## 1)-2. 結果

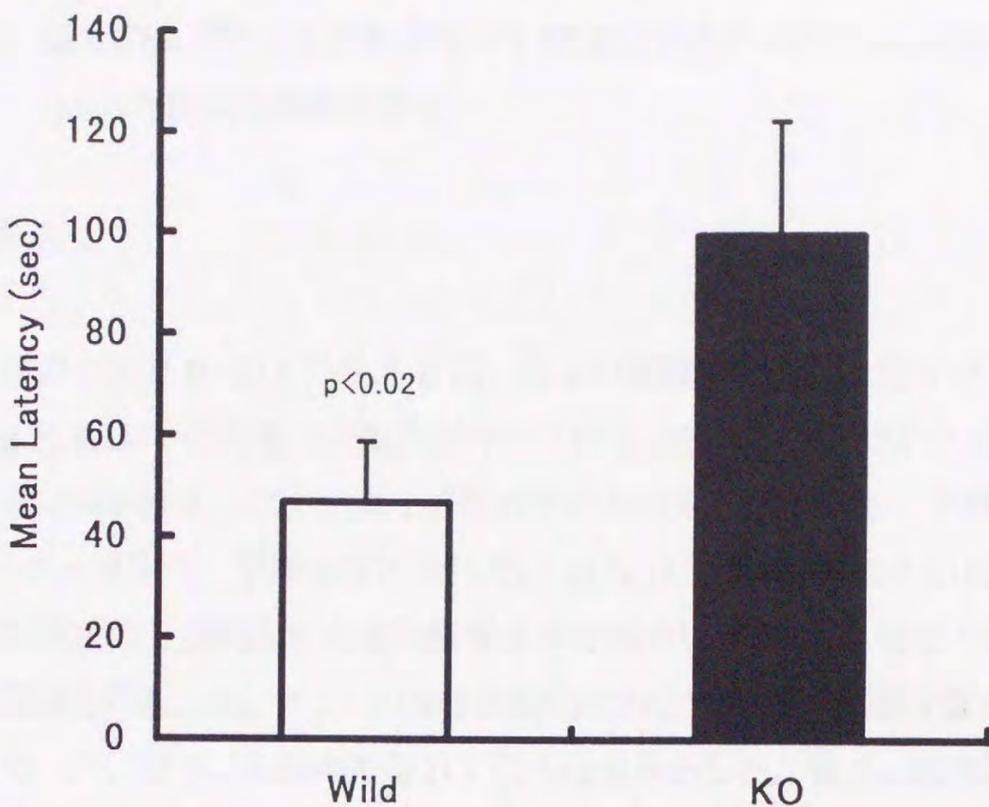
結果は Fig.4-3 にまとめた。NMB-R KO マウスは床敷の下に隠されたペレット餌を発見するまでに、野生型マウスよりも有意に長い時間を必要とした( $U=8, p<0.02$ )。また、自発活動性に関する分析では、NMB-R KO マウスの常同行動量が野生型マウスよりも有意に亢進していた( $U=26, p<0.05$ )。これらの結果は、NMB-R KO マウスが餌探索行動において野生型マウスとは異なる探索方略をとる可能性があること、また制限摂食下において NMB-R KO マウスの常同行動に亢進が見られることを示している。餌探索行動に見られる探索方略の相違が直接制限摂食によるストレス負荷の効果を示しているとは断言できない。しかし、常同行動において亢進が認められたことは、制限摂食によるストレス負荷が、NMB-R KO マウスの行動を変容させ得ることを示すものといえる。

---

\*1:マウスの体重制限はラットよりも難しい。これはマウスとラットの体重差によるところが大きい。ラットでは標準体重の 80%程度の体重制限を行なうことが多いが、この水準で体重を維持することは比較的容易である。しかし、マウスでは 80%の体重制限では体重を維持できなくなる個体が出てくるため、本研究では標準体重の 80%の水準を下回らないように維持飼育をした。その結果、制限摂食訓練中のマウスの平均体重は上記のように 80%(下限)~90%(上限)の間で推移・安定した。

\*2:成体のマウスでは一日の摂食量はおおよそ体重の 15%程度である(日本クレア資料)。したがって、一日当たり体重の 10%の給餌ではマウスの体重は漸減する。そのため、基準体重の範囲に入ったマウスでは、一日当たりの給餌量をマウスごとに体重の 10%~15%の間で調整することによって体重水準を維持した。なお、この給餌量の範囲では、マウスの餌の食べ残しは観察されなかったため、食物剥奪による空腹状態は維持されているものといえる。

(A) Results of Food Exploration Test



(B) Stereotypic Behavior in Food Exploration Test

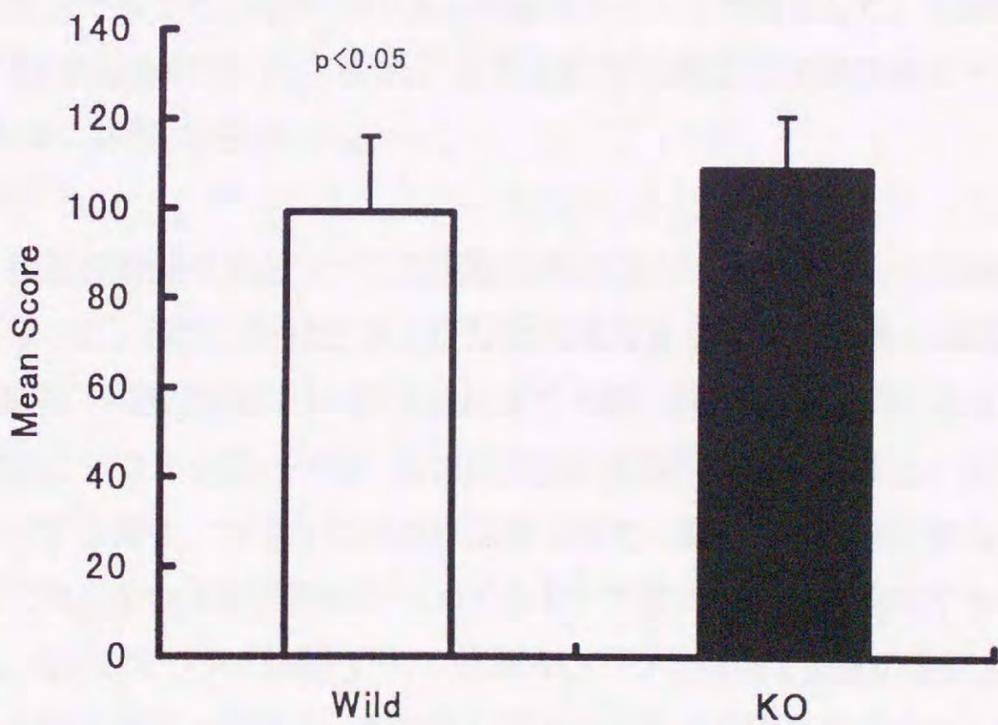


Fig. 4-3 Results of food exploration test. (A) Mean latency of food exploration. (B) Mean counts of stereotypic movement. Data represent mean + quartile deviation. P-values represent the difference between NMB-R KO mice and wild type mice (two-tailed).

## 2) 実験 2 : 認知的負荷による行動変容—T 型迷路学習の分析(T-maze learning test)と自発活動性の変化

### 2)-1. 方法

**被験体** : 雄の NMB-R KO マウス 6 匹、および同腹の雄の野生型マウス 5 匹を用いた。NMB-R KO マウスおよび野生型マウスは C57BL/6 系統のマウスに戻し交配を行なった第 4 世代(F4)のマウス同士を掛け合わせたものを用いた。マウスは実験開始時に約 4~5 ヶ月齢で、平均体重はそれぞれ  $21.6 \pm 0.9\text{g}$  および  $22.8 \pm 0.6\text{g}$  であった。マウスは実験開始の 2 週間前から個別飼育条件で飼育し、また 1 日当たり体重の 10% の制限摂食訓練を行なった。マウスの実験開始時における体重は標準体重の 80~85% に維持されていた。なお、実験中を除いて飲水は自由とした。また、訓練途中(Day 4)で野生型マウス 1 匹の体重が異常減少したためにデータから除外した。

**装置・材料** : T 型迷路訓練には木製の T 型迷路 1 基を用いた。迷路は幅が 9cm・高さが 20cm で、長腕の長さは 26cm・短腕の長さは 13.5cm であった。また、選択点は 9cm×9cm であった。なお、内部は灰色のペイントで塗装した。報酬はラット用のペレット餌(45mg)を用いた。また、自発活動性の測定には赤外線ビーム式の活動量測定装置(第 2 章参照)を用いた。

**手続き** : 自発活動性の測定 1 : T 型迷路訓練に先行してマウスの自発活動性について測定を行なった。測定の手続きおよび行動指標は第 2・3 章の実験と同様であった。

**T 型迷路訓練** : 訓練開始の前日に装置に対する馴化試行を 5 分間行なった。馴化試行では出発箱にマウスを置いた後、自由に装置内を探索させた。また、両短腕ともに端に餌を一つずつ置き、マウスに自由に摂取させた。馴化試行の翌日から訓練を開始した。訓練では、マウスが出発箱から出て左右いずれかの短腕を選択するまでの時間を測定した。なお、マウスの四肢すべてが短腕に入った時点で短腕の選択完了とした。一方の短腕の端に餌を一個置き、餌の置いてある短腕を選択した場合を正解試行、他方の短腕を選択した場合を誤試行とした。正解試行の場合は餌を食べ終わるまでマウスを短腕内に止め、誤試行の場合は直ちに飼育ケージに戻した。餌を置く短腕の位置はセッション中片方に固定し、セッション毎に入れ替えた。マウスが連続 3 回の正解試行を繰り返した場合、学習完了としてそのセッションを終了した。学習の指標と

して、短腕を選択するまでの時間・学習完了基準に達するまでの試行数および正解試行率を用いた。なお、試行間隔は約 15 分とし、一日に 1 セッションの訓練を行なった。装置は 1 試行ごとに 70% アルコールによって清掃した。

自発活動性の測定 2: T 型迷路訓練終了後に再度マウスの自発活動性について測定を行なった。測定の手続きおよび行動指標は自発活動性の測定 1 と同様であった。

**統計的検定:** 統計的分析は F 検定によって等分散性について検定後、Student の t-検定(片側・両側)によって行なった。また個体内比較は対応のある t 検定によって行なった。

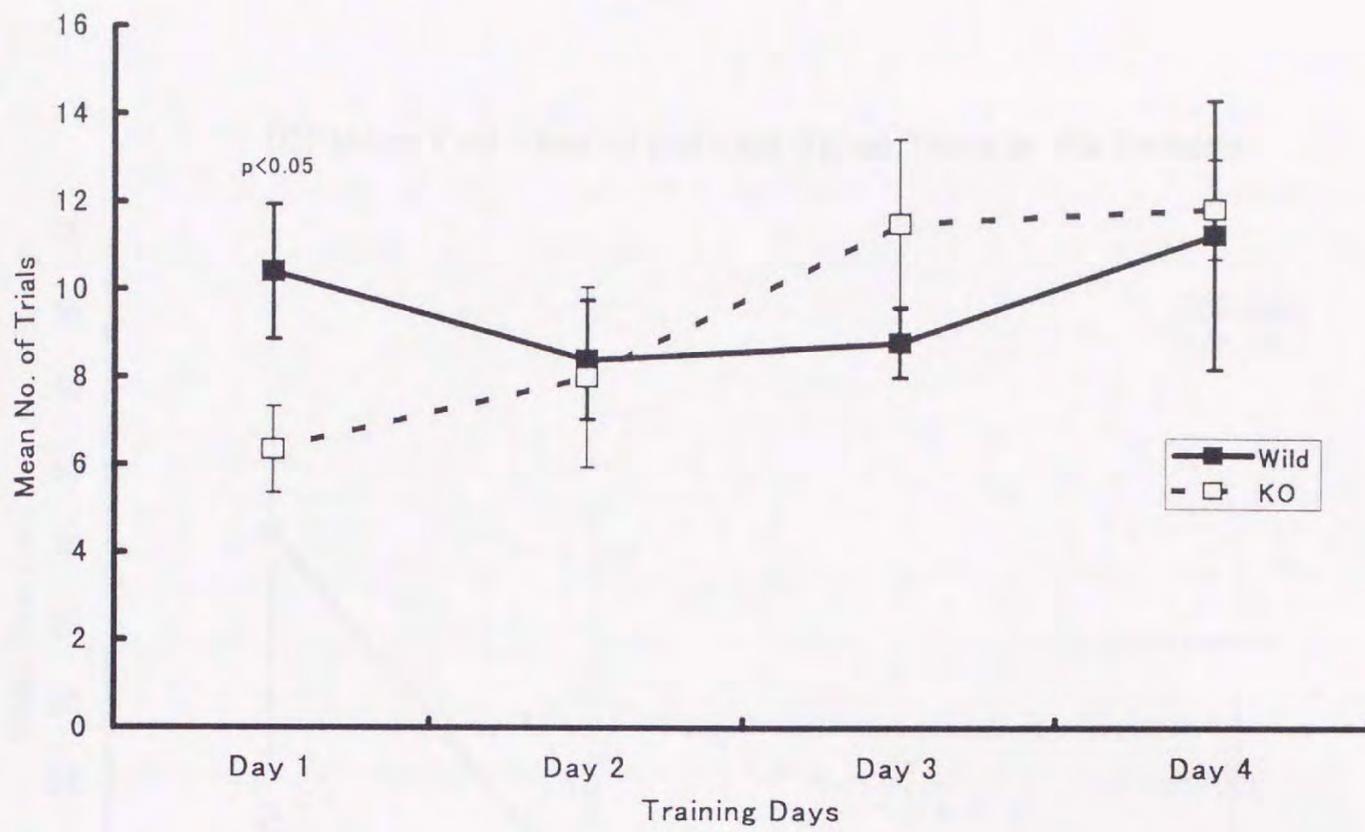
## 2)-2. 結果

### 2)-2-1. T 型迷路学習

T 型迷路学習の成績について、次の 3 通りの分析を行なった。まず、セッションの終了条件である連続 3 回の正解試行を満たすまでのマウスの全試行数について分析を行なった(Fig.4-4(A))。訓練第 1 日目(Day 1)では、NMB-R KO マウスの試行数が野生型マウスの試行数よりも有意に少なかったが( $t=2.30$ ,  $p<0.05$ )、この差は第 2 日目(Day 2)では消失し( $t=0.10$ , n.s.)、第 3 日目以降は両遺伝子型のマウスにおいてほぼ同様の値を得た。次に、セッション中の正解試行数をセッションの全試行数で割った正解率について分析を行なった(Fig.4-4(B))。この分析においても Day1 において NMB-R KO マウスの成績は野生型マウスよりも有意に高かったが( $t=2.81$ ,  $p<0.03$ )、Day 2 以降では有意差こそ得られなかったものの、野生型マウスの成績の方が高い傾向が見られた。さらに、セッション終了直前の 3 回の正解試行における平均試行時間について分析を行なった(Fig.4-4(C))。この分析においては、NMB-R KO マウスの平均試行時間が野生型と比較して有意に長い傾向が認められた( $t=1.90$ ,  $p<0.05$ , 片側検定)。

Day 1 において NMB-R KO マウスの成績が野生型の成績よりも高かったことは、必ずしも NMB-R KO マウスの学習能力が野生型マウスのそれを上回っているためではない。マウスやラットの迷路学習では、自発的交替反応(spontaneous alteration)が特徴的な現象として報告されている(157)。この反応は、マウスあるいはラットが 2 肢選択(あるいは 3 肢以上)課題において、直前の試行で選択した腕あるいは場所を

(A) No. of Trials Needed to Terminate The Session



(B) Rate of Correct Responses

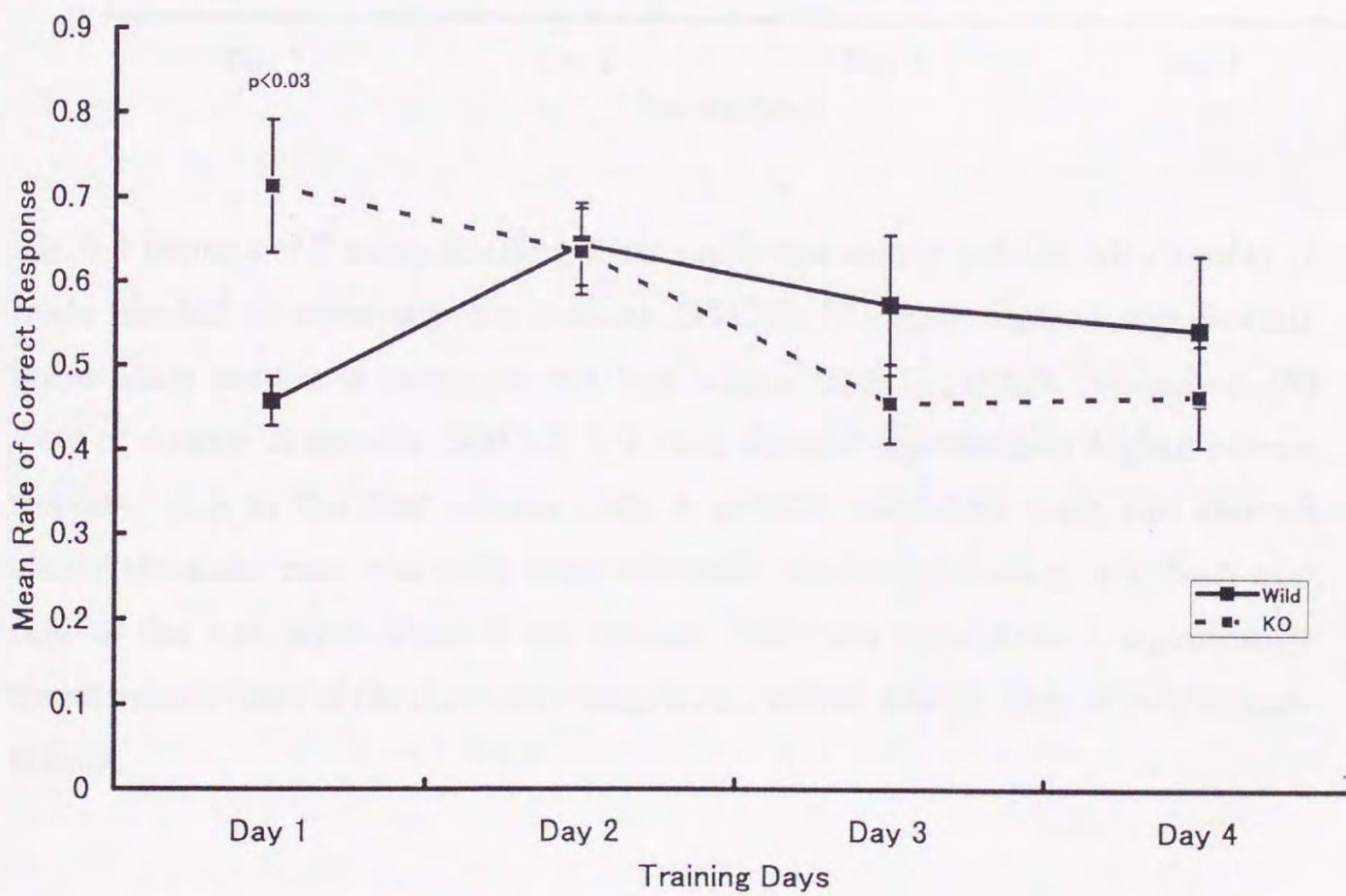


Fig. 4-4 (A), (B)

(C) Mean Trial Time of the Last Three Trials in the Session

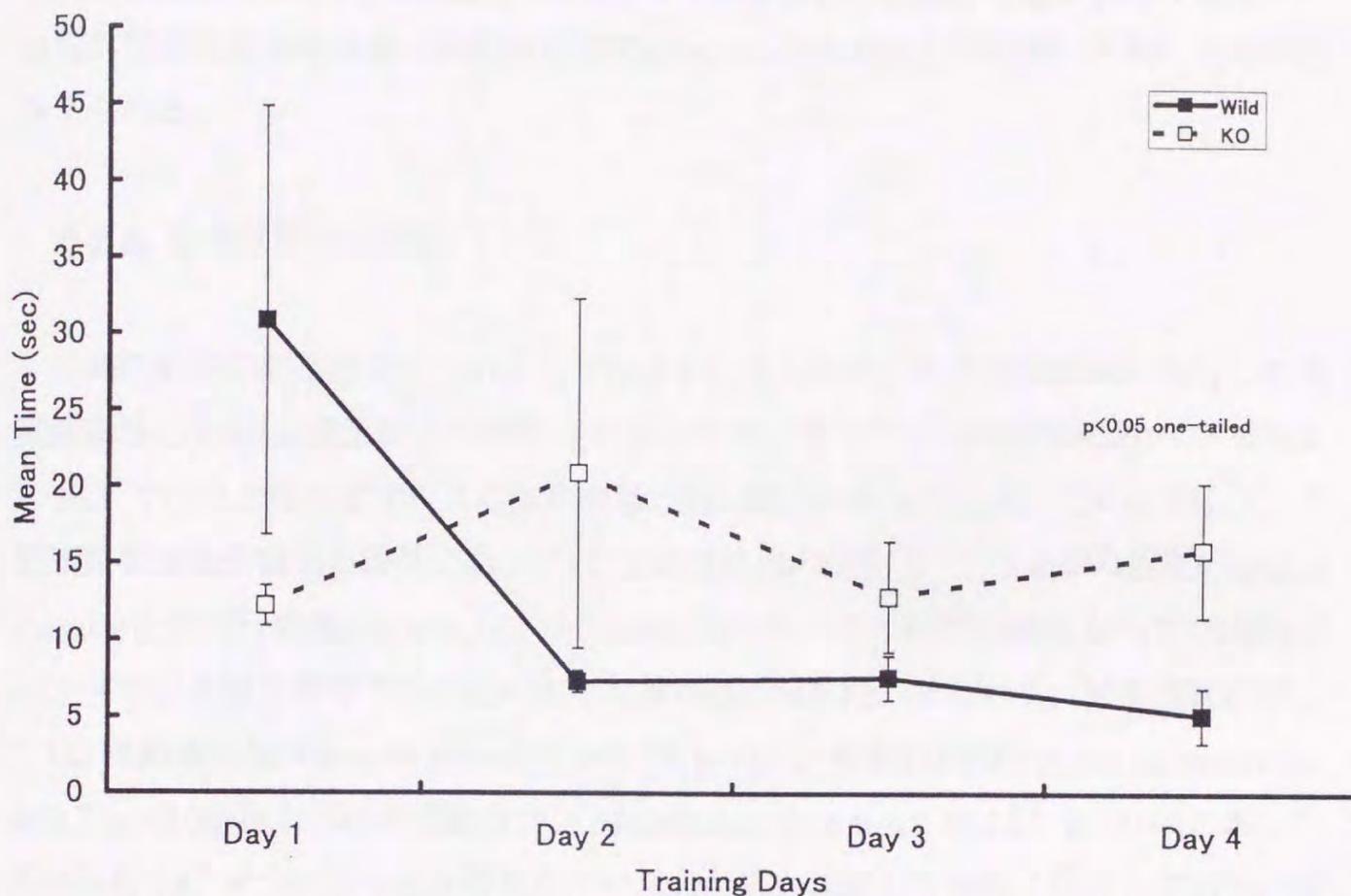


Fig. 4-4 Results of T-maze training. Data represent means  $\pm$  SEM. (A) Number of trials needed to terminate the session. NMB-R KO mice showed significantly fewer trials needed to terminate the first session (Day 1:  $p < 0.05$ , two-tailed). (B) Rate of correct responses. NMB-R KO mice showed significantly higher correct response rate in the first session (Day 1:  $p < 0.03$ , two-tailed test), but showed almost the same rate or slightly lower rate after the second session. (C) Mean trial time of the last three trials in the session. Wild type mice showed significantly shorter mean time of the last three trials in the fourth session (Day 4:  $p < 0.05$ , one-tailed).

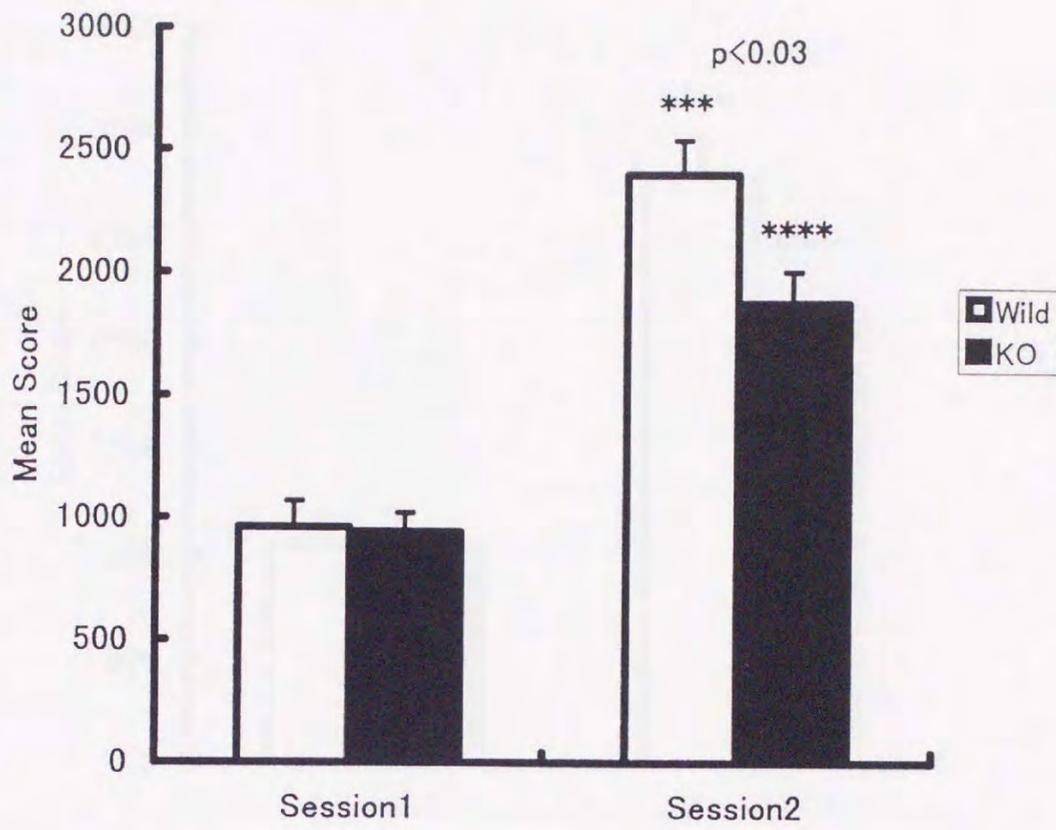
敢えて避ける傾向をもつことを示している。本実験において、NMB-R KO マウスの成績は Day 2 以降、下降する傾向を示していた。したがって、Day 1 において観察された NMB-R KO の好成績は、このマウスの学習能力の高さによるものではなく、自発的交替反応の欠如あるいは反応固定(response fixation)が成績に反映したものと考えられる。

## 2)-2-2. 自発活動性の分析

自発活動性の測定結果については Fig.4-5 にまとめた。T 型迷路訓練に先行した自発活動性の分析(自発活動性の測定 1)においては、すべての行動指標において NMB-R KO マウスと野生型マウス間に有意な差は認められなかった。これに対して、T 型迷路訓練後の自発活動性においては(自発活動性の測定 2)、立ち上がり反応(vertical counts)と常同行動量(stereotypic counts)を除くすべての行動指標において NMB-R KO マウスと野生型マウス間に有意な差が認められた。すなわち、移動運動に関しては、移動運動量(distance traveled:  $t=2.77$ ,  $p<0.03$ )・移動運動時間(time ambulation:  $t=2.7$ ,  $p<0.03$ )および移動運動カウント(ambulatory counts:  $t=2.57$ ,  $p<0.04$ )において NMB-R KO マウスの反応が野生型マウスの反応と比較して有意に低下していた。また、常同行動従事時間(time stereotypy:  $t=1.98$ ,  $p<0.04$ , 片側検定)および不動時間(time rest:  $t=2.0$ ,  $p<0.04$ , 片側検定)において NMB-R KO マウスの反応が野生型マウスの反応よりも亢進している傾向が認められた。

次に自発活動性の測定 1 と 2 の間で、各遺伝子型のマウスの行動変容について個体内比較を行なった。野生型マウスにおいては、移動運動量(distance traveled:  $t=7.14$ ,  $p<0.01$ )・移動運動時間(time ambulation:  $t=4.35$ ,  $p<0.02$ )および移動運動カウント(ambulatory counts:  $t=6.71$ ,  $p<0.01$ )において T 型迷路訓練後の反応が有意に亢進していた。また、T 型迷路訓練後の不動時間(time rest:  $t=2.7$ ,  $p<0.03$  one-tailed)が減少する傾向が認められた。一方、NMB-R KO マウスにおいては、移動運動量(distance traveled:  $t=11.13$ ,  $p<0.001$ )・移動運動時間(time ambulation:  $t=8.48$ ,  $p<0.001$ )・移動運動カウント(ambulatory counts:  $t=13.2$ ,  $p<0.001$ )および常同行動量(stereotypic counts:  $t=2.64$ ,  $p<0.05$ )において T 型迷路訓練後の反応が有意に亢進していた。また、T 型迷路訓練後の不動時間(time rest:  $t=4.04$ ,  $p<0.01$ )が有意に減少していた。

(A) Distance Traveled



(B) Time Ambulation

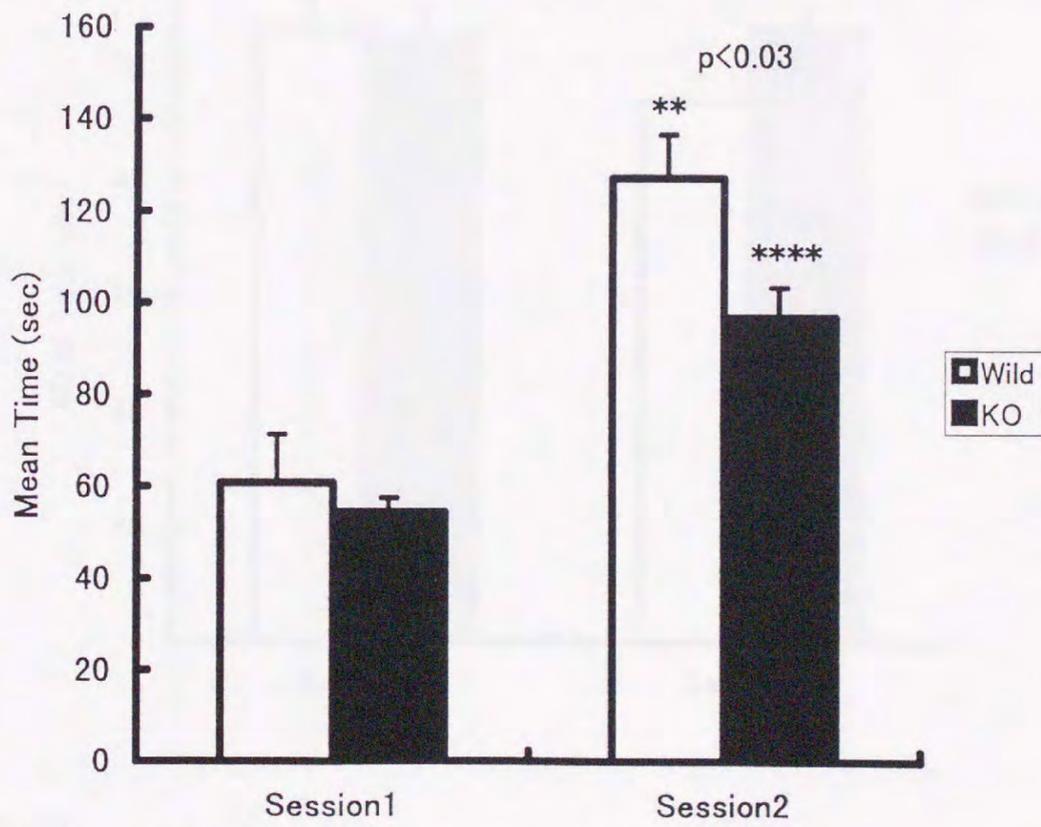
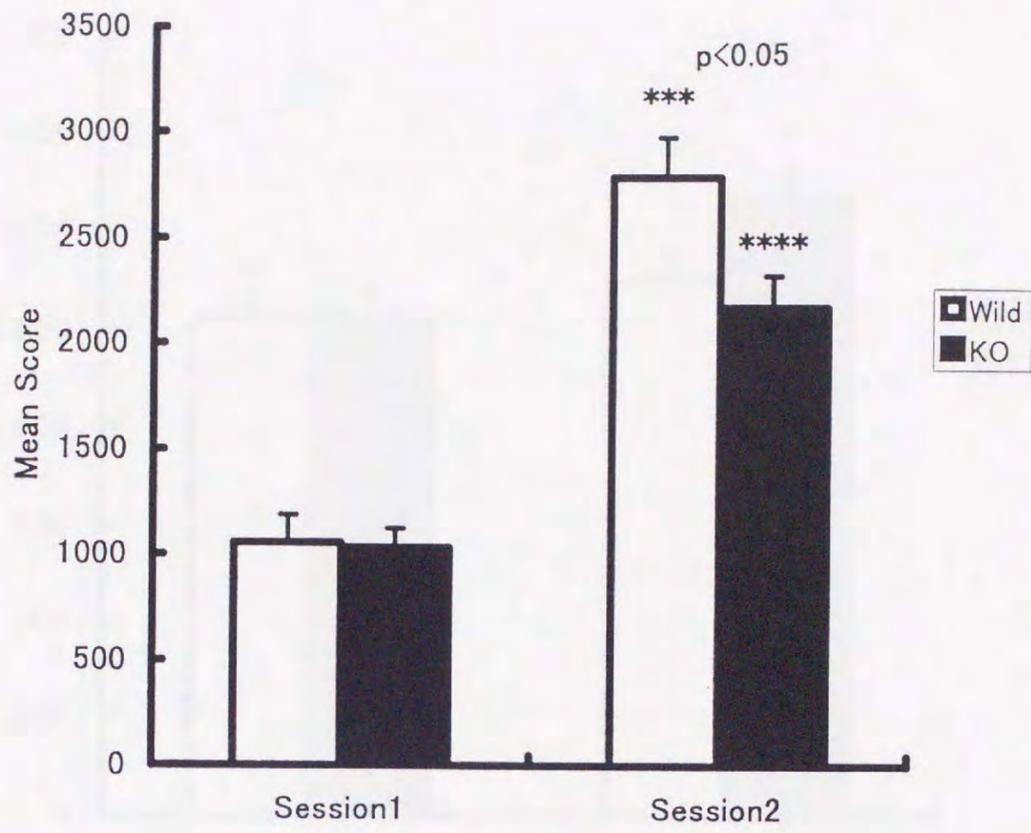


Fig. 4-5 (A), (B)

(C) Ambulatory Counts



(D) Time Stereotypy

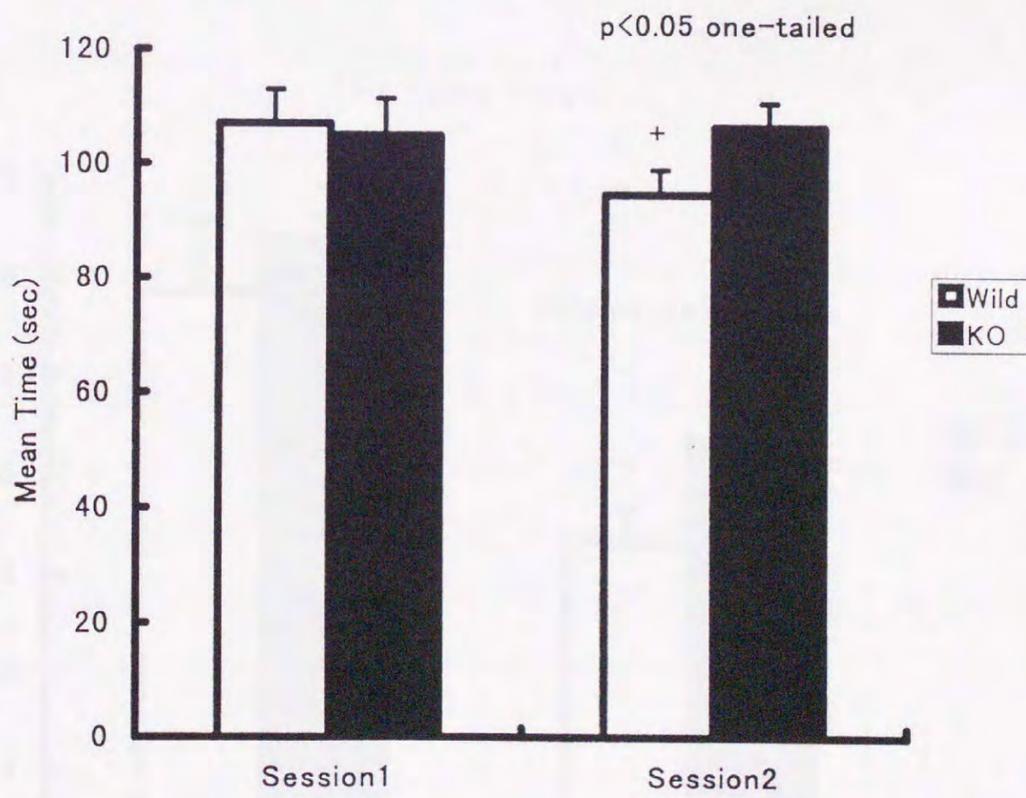
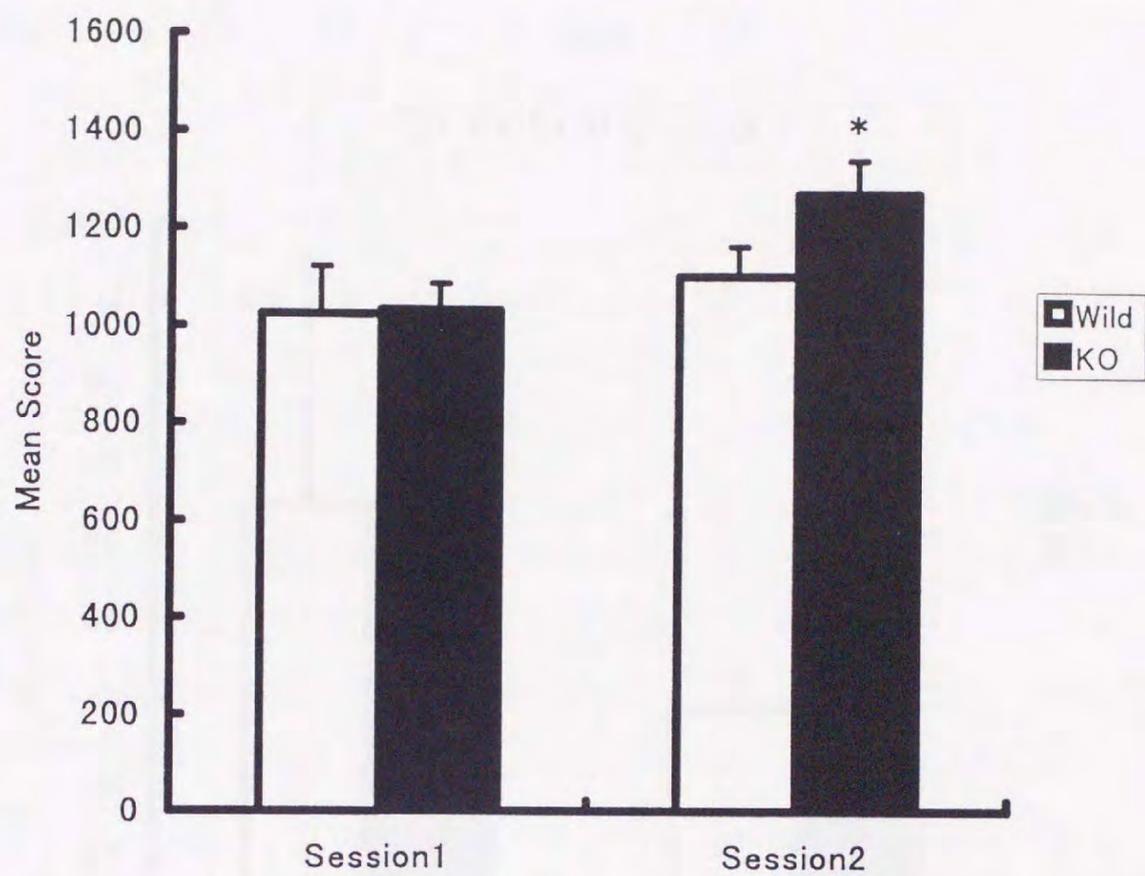


Fig. 4-5 (C), (D)

(E) Stereotypic Counts



(F) Time Rest

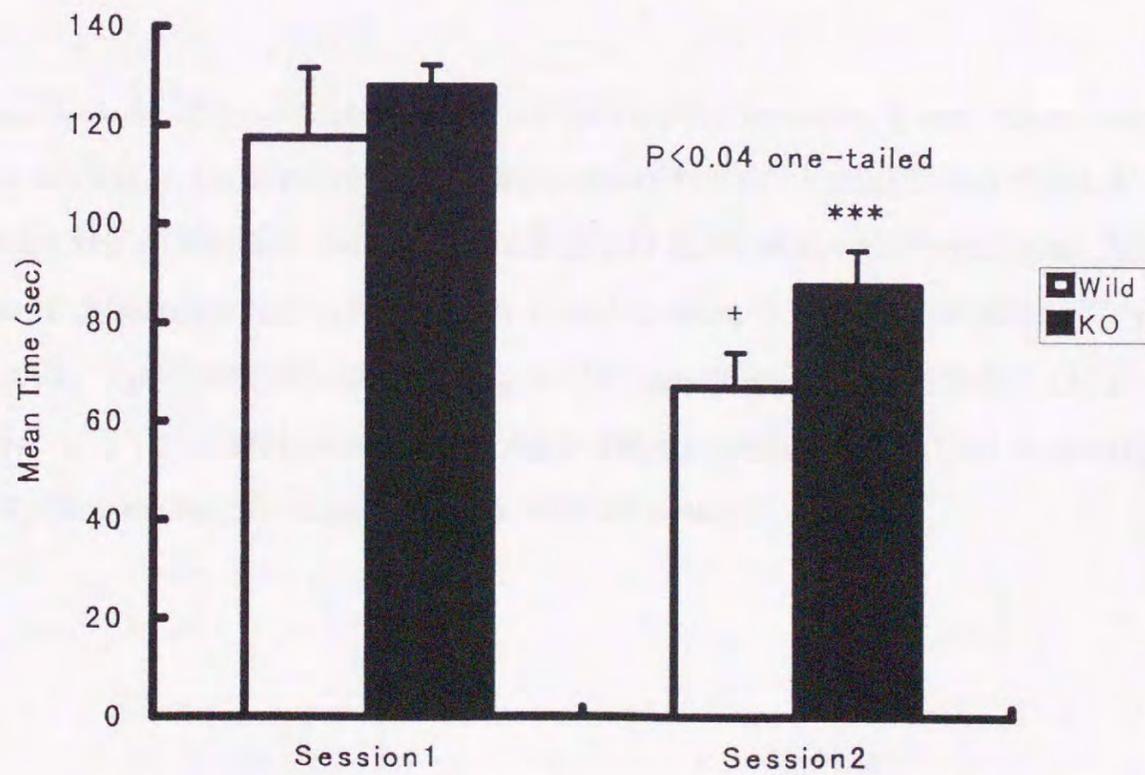


Fig. 4-5 (E), (F)

(G) Vertical Counts

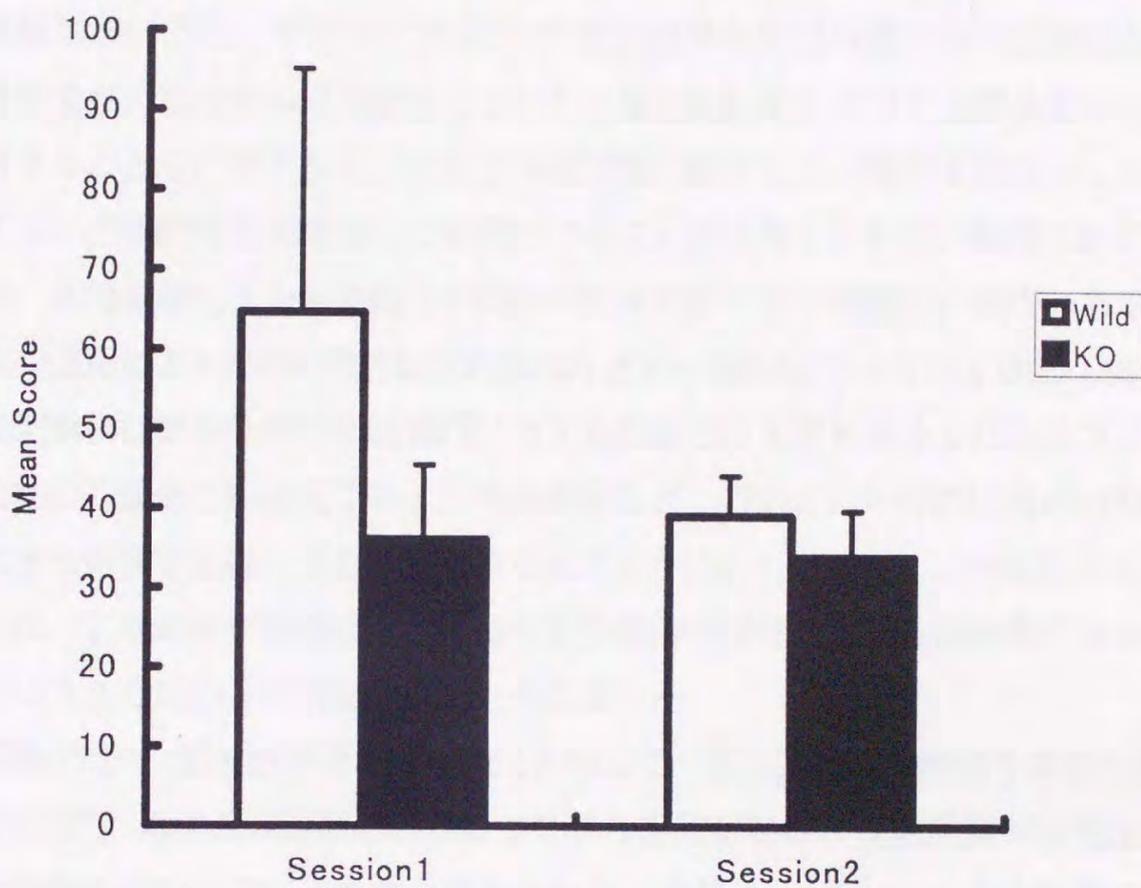


Fig. 4-5 Results of spontaneous activity test before (session 1) and after (session 2) T-maze training. Data represent mean score of behavioral indices + SEM. P-values represent the difference between NMB-R KO mice and wild type mice. Asterisks represent difference between session 1 and session 2 (\*\*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*:  $p < 0.02$ ; \*:  $p < 0.05$  (two-tailed), +:  $p < 0.05$  (one-tailed), respectively). (A) Distance traveled, (B) Time ambulation, (C) Ambulatory counts, (D) Time stereotypy, (E) Stereotypic counts, (F) Time rest, (G) Vertical counts.

### 3) 考察

本実験では、T型迷路学習においてNMB-R KOマウスが野生型マウスとは異なる反応パターンを示すこと、およびT型迷路訓練の前後における自発活動性の変化のパターンがNMB-R KOマウスと野生型マウスの間で異なることが示された。

本実験においては、マウスに対してT型迷路学習課題の遂行および獲得という認知的負荷を与えた場合の行動変化について、NMB-R KOマウスと野生型マウスを比較検討することを目的とした。一般に学習課題の遂行および獲得を目的とした訓練においては、被験動物を課題遂行に動機づけることが必要とされる。動機づけの方法としては、食物剥奪による飢餓動因の操作や飲水制限による渇動因の操作、あるいは嫌悪刺激の提示による恐怖(不安)動因の操作などが一般的に用いられてきた(140)。これらの動因操作は被験動物の課題遂行に対する動機づけ水準を高めるばかりでなく、一般活動性の亢進あるいは低下および情動喚起など、目的とした行動以外の行動に対しても大きな影響を及ぼし得ることは言うまでもない。したがって、本実験から得られた結果は、T型迷路学習課題による認知的な負荷の効果および食物剥奪による負荷の効果という2方向からの解釈が必要とされる。

本実験ではT型迷路学習課題訓練に先行して、自発活動性の測定を実施した(自発活動性の測定 1)。この測定におけるマウスの自発活動は、食物剥奪が自発活動性に及ぼす効果を反映しているものと考えられる。実験1において、食物剥奪を受けたNMB-R KOマウスは、餌探し行動テストにおいて野生型マウスとは異なる反応パターンを示した。しかしながら、本実験の自発活動の測定1においては、NMB-R KOマウスと野生型マウスの自発活動性の間には有意な差は認められなかった。この結果は、実験1において観察されたNMB-R KOマウスの常同行動の亢進が、単に食物剥奪によって生じたものではなく、餌探し行動実験という特殊な実験状況に依拠した食物剥奪の効果の表出と推測される。本実験においては、T型迷路訓練中のマウスの観察において、野生型マウスが選択点における短腕の選択においてためらうことなく一方の短腕を選択したのに対して、NMB-R KOマウスは、選択点において短腕の選択をためらう行動が頻繁に認められた。すなわち、Day 2以降、選択点において2本の短腕の入り口付近における往復反応および入り口付近での停滞のような常同的反応が一貫して観察された。NMB-R KOマウスの選択点における「ためらい行動」すなわち常同行動は、実験1の餌探し行動実験に見られた常同行動と一貫した行動変化と解釈することが可能である。したがって、T型迷路学習課題におけるこのような

NMB-R KO マウスの行動上の変化は、その後の自発活動性における変化を予想させるものである。実験 1 では餌探し行動に見られた常同行動の亢進が通常のオープンフィールド場面においても継続して観察されるか否かという確認が行なわれなかった。そこで本実験では T 型迷路学習課題の終了後に、再度自発活動性の測定を行なった(自発活動性の測定 2)。その結果、移動運動に関する各指標において、T 型迷路訓練の前後における反応変化の傾向は NMB-R KO マウスと野生型マウスともに増加傾向を示しているが、NMB-R KO マウスにおける変化の程度は野生型マウスよりも有意に低かった。また、常同行動に関する各指標において、T 型迷路訓練の前後で野生型マウスでは変化が認められないのに対して、NMB-R KO マウスでは増加する傾向を示した。

これらの結果は、T 型迷路学習課題において NMB-R KO マウスに見られた常同行動の変化が、T 型迷路学習課題を離れて通常のオープンフィールド事態に移行しても持続していることを示している。したがって、NMB-R KO マウスにおける食物剥奪による負荷および認知的負荷による行動変化が、少なくともある程度の持続性をもつものであることが推測される。T 型迷路学習課題の獲得は、マウスに実験神経症や学習性絶望を生起するほど大きな負荷とは考えられない。しかし訓練の推移から推測されるように(Fig.4-4)、必ずしもマウスにとって容易な課題ではない。T 型迷路学習課題訓練後の自発活動性の亢進が野生型マウスにおいても認められたことから、この課題が十分に効果的な認知的負荷をマウスに与えていることは明らかであるといえる。

このように本実験においては、NMB-R KO マウスが T 型迷路学習課題の遂行によって情動性あるいは環境に対する反応性において野生型マウスとは異なる変化を生じていることが明らかになった。

3) 実験 3 : 社会的刺激の剥奪による行動変容—強制水泳テスト(forced swimming test)の分析

3)-1. 方法

**被験体** : 雄の NMB-R KO マウス 16 匹、および同腹の雄の野生型マウス 21 匹。雌の NMB-R KO マウス 20 匹、および同腹の雌の野生型マウス 20 匹。NMB-R KO マウスおよび野生型マウスは C57BL/6 系統のマウスに戻し交配を行なった第 4・5 世代(F4・F5)のマウスを同世代のもの同士掛け合わせたものを用いた。マウスは実験開始時に約 4 ヶ月齢で、平均体重は雄の NMB-R KO マウス  $28.1 \pm 0.45\text{g}$ 、野生型マウス  $28.4 \pm 0.4\text{g}$ 、雌の NMB-R KO マウス  $21.3 \pm 0.38\text{g}$ 、野生型マウス  $21.6 \pm 0.31\text{g}$  であった。なお、摂食および飲水は実験中を除いて自由とした。

**装置** : プラスチック製のビーカー(直径 16cm、高さ 27cm)に水 3000ml(深さ 15cm)を入れたものを用いた。水温は  $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  であった。

**手続き** : 実験開始の 1 ヶ月前に、雄と雌の NMB-R KO マウスおよび野生型マウスを、それぞれ体重に偏りのないように 2 群に分配した。各性別および遺伝子型のマウスそれぞれについて、一群を集団飼育条件に、他の一群を個別飼育条件に振り分けた。集団飼育条件では 1 ケージ当たり 4 匹ずつの集団飼育を行ない(野生型: Group 4+; NMB-R KO: Group 4-)、個別飼育条件では 1 ケージ当たり 1 匹で飼育を行なった(野生型: Group 1+; NMB-R KO: Group 1-)。強制水泳テストの手続きは Porsolt らの原法(158,159)に従い、必要な変更を行なった。マウスをビーカーの中に静かに入れ、5 分間のマウスの行動を観察した。行動の指標はマウスの不動時間とし、5 分間の観察時間内の合計不動時間を測定した。なお、不動状態は 4 肢および全身の不動と定義した。測定は雄のマウスでは連続 2 日間、雌のマウスでは連続 6 日間行なった。

**統計的検定** : 統計的分析は訓練初日と最終日におけるデータについて、一元配置の分散分析を用いて行い、多重比較には Student の t 検定(両側)を用いた。また個体内比較には対応のある t 検定(両側)を用いた。

## *Forced Swimming Test*



マウスの強制水泳場面。マウスが示す不動状態には、ここに示されるような四肢を縮めた状態と、四肢を広げて硬直姿勢をとる場合がある(写真はNMB-R KOマウス)。

### 3)-2. 結果

雄のマウスを用いた強制水泳テストの結果を Fig.4-6 にまとめた。テスト初日(Day 1)における不動時間について一元配置の分散分析を行なったところ、実験条件の主効果が認められた( $F(3,33)=3.25$ ,  $p<0.05$ )。多重比較の結果、個別飼育条件の野生型マウスの不動時間が集団飼育条件の野生型マウスの不動時間よりも有意に短かった( $t=3.23$ ,  $p<0.01$ )。またテスト最終日(Day 2)における不動時間について一元配置の分散分析を行なったところ、実験条件の主効果は有意ではなかったが、極めて有意水準に近かった( $F(3,33)=2.45$ ,  $p<0.09$ )。そこで、多重比較を行なったところ、個別飼育条件の NMB-R KO マウスの不動時間が同条件の野生型マウスの不動時間よりも有意に長かった( $t=2.45$ ,  $p<0.03$ )。また、Day 1 と Day 2 における不動時間の変化について個体内比較を行なったところ、すべての実験条件で不動時間が有意に長くなっていた(それぞれ、Group 1+,  $t=7.73$ ,  $p<0.001$ ; Group 1-,  $t=14.3$ ,  $p<0.001$ ; Group 4+,  $t=9.35$ ,  $p<0.001$ ; Group 4-,  $t=3.71$ ,  $p<0.01$ )。

一方、雌のマウスを用いた強制水泳テストの結果を Fig.4-7 にまとめた。テスト初日(Day 1)における不動時間について一元配置の分散分析を行なったところ、実験条件の主効果が認められた( $F(3,33)=3.25$ ,  $p<0.05$ )。多重比較の結果、個別飼育条件の NMB-R KO マウスの不動時間がその他すべてのグループにおける不動時間よりも有意に短かった(それぞれ、Group 1- and Group 1+,  $t=3.04$ ,  $p<0.01$ ; Group 4+,  $t=4.16$ ,  $p<0.001$ ; Group 4-,  $t=2.5$ ,  $p<0.05$ )。またテスト最終日(Day 6)における不動時間について一元配置の分散分析を行なったところ、実験条件の主効果は有意ではなかったが、極めて有意水準に近かった( $F(3,36)=2.79$ ,  $p<0.06$ )。そこで、多重比較を行なったところ、個別飼育条件の NMB-R KO マウスでは同条件の野生型マウスよりも不動時間が有意に長く( $t=2.62$ ,  $p<0.02$ )、一方集団飼育条件の野生型マウスの不動時間は個別飼育条件の野生型マウスの不動時間よりも有意に長かった( $t=2.52$ ,  $p<0.03$ )。また、Day 1 と Day 6 における不動時間の変化について個体内比較を行なったところ、すべての実験条件で不動時間が有意に長くなっていた(それぞれ、Group 1+,  $t=9.34$ ,  $p<0.001$ ; Group 1-,  $t=18.3$ ,  $p<0.001$ ; Group 4+,  $t=9.78$ ,  $p<0.001$ ; Group 4-,  $t=6.55$ ,  $p<0.001$ )。

Forced Swimming Test in NMBR-Tg male mice

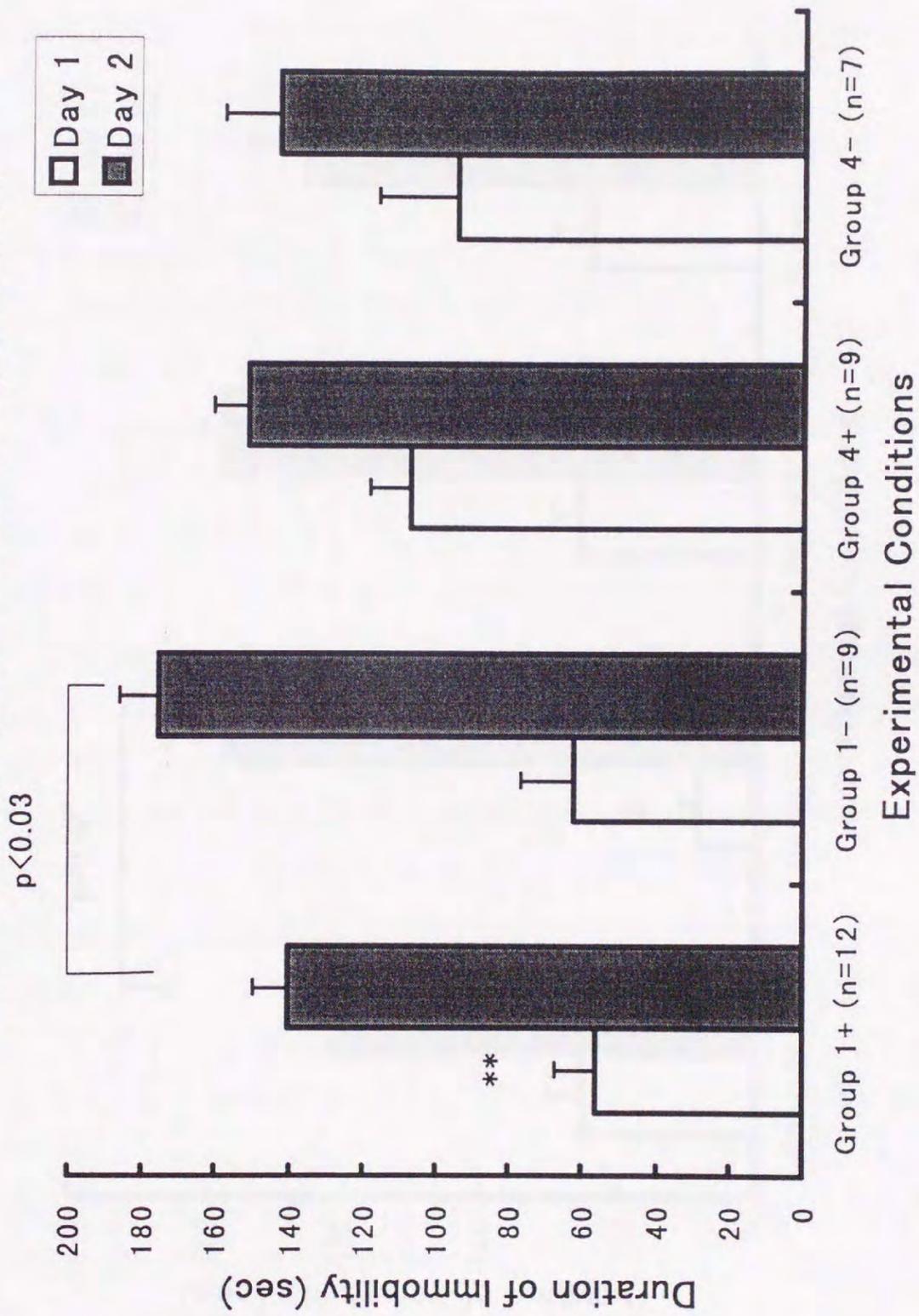


Fig. 4-6 Results of forced swimming test in male NMBR KO and wild type mice. Bars represent SEM. Asterisks represent statistical difference between Group 1+ and Group 4+ ( $p < 0.01$ , two-tailed).

Forced Swimming Test in NMBR-Tg female mice

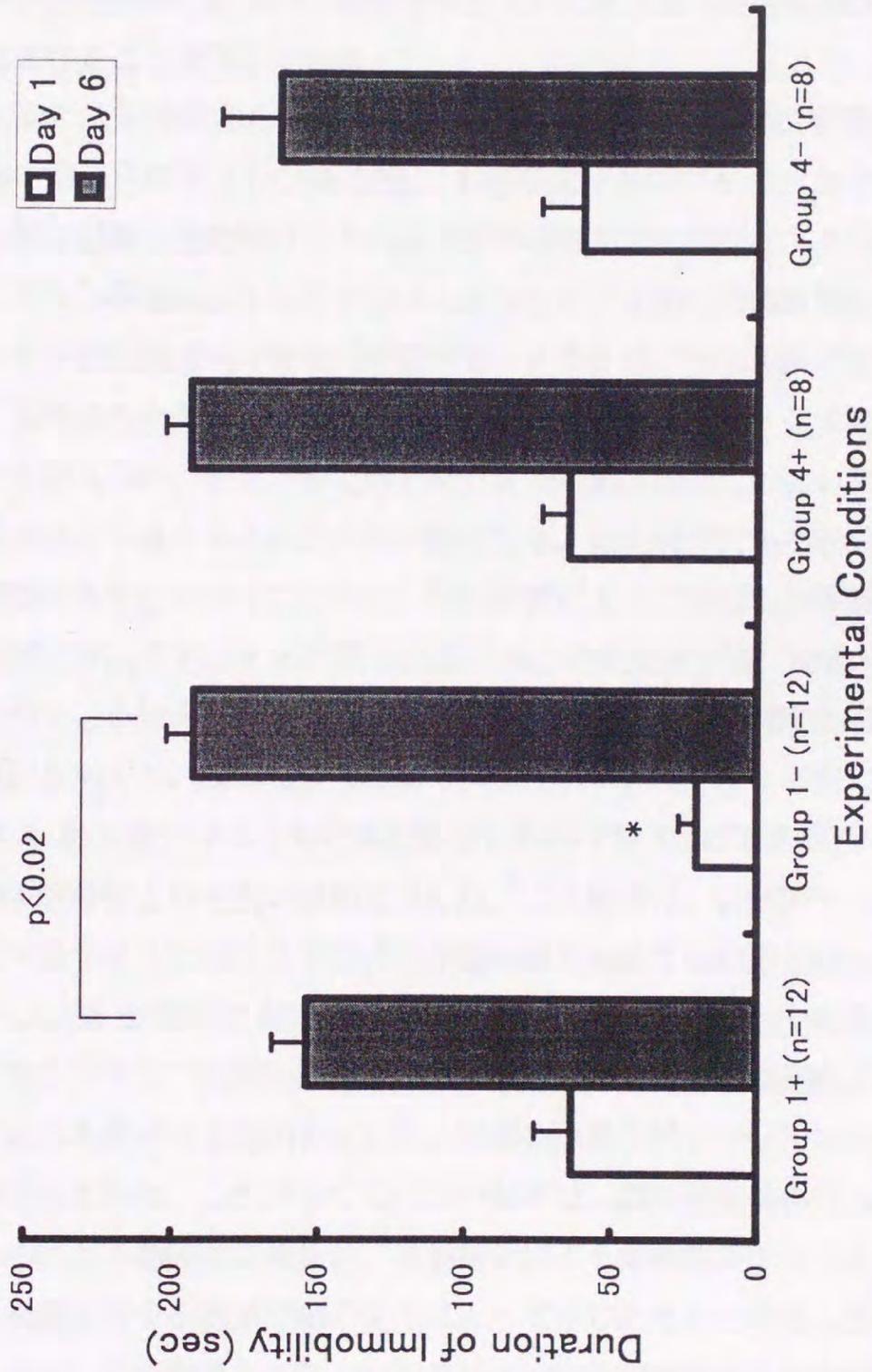


Fig. 4-7 Results of forced swimming test in female NMB-R KO and wild type mice. Bars represent SEM. An asterisk represent statistical difference between Group 1+ and other groups (Group 1+ ( $p < 0.01$ ), Group 4+ ( $p < 0.001$ ), Group 4- ( $p < 0.05$ ), two-tailed, respectively).

### 3)-3. 考察

本実験においては、個別飼育された NMB-R KO マウスにおいて、強制水泳テストにおける不動時間が伸長することを明らかにした。また、この現象が雄のマウスだけでなく、雌のマウスにおいても生じることを明らかにした。これらの結果は、個別飼育による社会的刺激の剥奪が、強制水泳テストにおける NMB-R KO マウスの不動時間を変化させることを示している。

強制水泳テストは鬱あるいは絶望状態の評価法として各種抗鬱薬の薬理評価の目的で頻繁に用いられてきた(158-162)。本節序文においても述べたとおり、不可避免的な苦痛状態を経験した動物は、その後状況が回避可能に変化しても回避しなくなる。強制水泳テスト事態はまさしくマウスにとって不可避免的な苦痛状態といえるため、マウスが示す不動状態はある種の「絶望状態」と考えることも可能であろう。しかし一方では、強制水泳テスト事態はマウスにとって極めて強いストレスを与える環境刺激の一つとも考えられ、テスト中に示すマウスの不動状態はこの強いストレス刺激に対する適応方略の一種と捉えることも可能である。個別飼育による社会的刺激の剥奪が動物の情動性を変化させることから、個別飼育によって強制水泳事態におけるマウスの不動時間が伸長することが予想される。そこで本実験では、NMB-R KO マウス・野生型マウスともに集団飼育条件と個別飼育条件という 2 種類の飼育条件の効果について検討を加えた。雄のマウスによる実験においては、第 1 試行において NMB-R KO マウス・野生型マウスともに集団飼育条件のマウスの不動時間が個別飼育条件のマウスの不動時間よりも長い傾向を示した。この結果は、個別飼育による情動性の亢進が強制水泳テストにおけるマウスの不動時間を短縮する効果を持つことを示している。しかし、第 2 試行において、野生型マウスでは飼育条件の効果が消失し、一方 NMB-R KO マウスでは個別飼育条件のマウスの不動時間が集団飼育条件のマウスの不動時間よりも長くなる傾向を示した。同様の結果は雌のマウスを用いた実験においても観察されている。したがってこれらの結果は、個別飼育条件の NMB-R KO マウスに認められた不動時間の伸長が、個別飼育による情動性の変化によってではなく、ストレス刺激に対する適応方略の変化によって生じたものと考えられる。

このように、個別飼育された NMB-R KO マウスが同条件の野生型マウスよりも長い不動時間を示したことは、個別飼育条件の NMB-R KO マウスにおいてストレス負荷に対する耐性に変化が生じていることを示唆している。

4) 実験 4 : 育児行動テストおよび育児行動による行動変容—仔引き行動テスト  
(pup retrieval test)の分析と明暗箱テストの分析

4)-1. 方法

**被験体および交配** : 雌の NMB-R KO マウス 16 匹、および同腹の雌の野生型マウス 11 匹。NMB-R KO マウスおよび野生型マウスは C57BL/6 系統のマウスに戻し交配を行なった第 4 世代(F4)のマウス同士を掛け合わせたものを用いた。マウスは実験開始時に 3~5 ヶ月齢のものを用いた。交配は仔の遺伝子型が全てヘテロ接合体(NMB-R +/-)にそろうように行った。すなわち、雌の NMB-R KO マウス(-/-)は同世代の雄の野生型マウス(+/+)と、雌の野生型マウス(+/+)は同世代の雄の NMB-R KO マウス(-/-)と交配を行なった。被験体は、育児経験を統制するために出産未経験の雌個体とし、出産した個体のうち仔を 6 匹以上産んだ個体だけを実験に使用した。また、仔の数は母親 1 個体につき 6 匹とし、それ以上の仔は実験から除外した。なお、仔の性別は判定および個体数の統制が困難であるために統制を行なわなかった。

**装置・材料** : 実験装置として T 型迷路(実験 2 参照)を用いた。また、紙製の箱(120 × 90 × 15(H)mm)に床敷(深さ 1cm)を入れ、出発点および目標点に配置した。なお、仔は目標点に配置したこの箱の中に入れた。また、明暗箱テストには、第 2 章で用いた明暗箱を用いた。

**手続き** : 母性行動の測定 : 2 週間の交配期間終了後、被験体を雄個体から分離し、個別飼育に移行した。個別飼育開始後、被験体の出産直前(2~3 日前)に装置に対する馴化試行を行った。馴化試行では被験体を装置内に入れ、5 分間自由に探索させた。被験体の出産を確認した日を Day 1 とし、Day 3 から育児行動の観察と仔引き行動テスト(pup retrieval test)を開始した。なお、これらの方法は Bolivar ら(163)に従い、これに若干の変更を加えた。

イ) 育児行動の観察 : 出産確認日を Day 1 と数え、Day3 より飼育ケージにおいて母親の育児行動の観察を行った。育児行動の観察は実験終了時まで継続して行った。行動指標としては、仔なめ行動(licking)・営巣行動(nesting)・群化行動(grouping)・仔の集団に対するかがみこみ行動(crouching)・仔引き行動(retrieval)および授乳行動とし、遂行の可否を記録した。

ロ) 仔引き行動テスト(pup retrieval test) : Day 3 より Day 6 までの 4 日間行った。T 型迷路の一方の短腕終了部に配置した紙箱内に仔をまとめて置いた後、母親を長腕上に配置した紙箱におき、出発点の扉を開放した時点で試行開始とした。測定時間は最大 10 分間とし、すべての仔を出発点内に移動した時点で試行終了とした。計測を行った指標は以下のとおりである。①1 匹目の仔を移動するまでの時間およびそれまでの移動回数(first retrieval latency & No. of movements)、②くわえた仔を落とした回数(No. of drops)、および③試行終了までの所用時間(total time)。なお、母親マウスの出発点への仔引きを容易にするために、出発点には天蓋をもうけ内部を暗くした。装置のその他の部位には天蓋を設けなかった。また、仔を配置する短腕の位置は一日毎に交替した。装置は 1 試行毎に 70%アルコールで清掃した。

明暗箱テスト：仔引き行動テストの日程終了後に行なった。マウスを明暗箱の暗室に入れ、天蓋をしめた時点から試行を開始した。暗室から明室に出てくるまでの所用時間(L-D latency)・暗室と明室の移動回数(No. of L-D movements)・暗室から明室を覗いた回数(No. of looking out)<sup>\*1</sup>および明室滞在時間(Time Light box)の各指標について 5 分間観察・記録した。なお、装置は 1 試行毎に 70%アルコールで清掃した。

**統計的検定**：統計的分析は F 検定によって等分散性の検定を行なった後、Student の t 検定(片側・両側)を行なった。また、個体内比較は対応のある t 検定(片側・両側)を用いて行なった。

## 4)-2. 結果

### 4)-2-1. 母性行動の測定

育児行動の観察においては、NMB-R KO マウスと野生型マウスの違いは認められなかった。NMB-R KO マウスは野生型マウスと同様な育児行動を行なった。本実験においては出産・育児未経験の雌マウスを用いたため、NMB-R KO マウス・野生型マウスともに出生数の分散が大きく、また生後まもなく死亡する仔が比較的多く見られた。しかし、これらの観察結果の統計的分析において、両遺伝子型のマウスの間には有意な差は認められなかった。

---

\*1: 暗室から明室を覗いた回数(No. of looking out)は、マウスが暗室内から明室に移動することなく鼻先の部分だけを出す反応と定義した。

仔引き行動の結果は Fig.4-8 にまとめた。なお、仔引き行動は第 3 試行以降制限時間内に仔引きを終了しない被験体が現われ、データの欠損値が増えたため、第 1 試行および第 2 試行のデータだけを分析の対象とした。1 匹目の仔を移動するまでの時間(first retrieval latency)においては、Day 1・2 ともに NMB-R KO マウスの方が野生型マウスよりも短い傾向を示したが、有意な差は認められなかった。また、Day 1 と Day 2 の間では、野生型マウスでは 1 匹目の仔を移動するまでの時間に有意な短縮を認めたが( $t=2.43$ ,  $p<0.05$ )、NMB-R KO マウスでは有意な短縮は認められなかった。1 匹目の仔を移動するまでの移動回数(No. of movements)については、NMB-R KO マウスにおける移動回数が野生型マウスよりも多い傾向が見られ、Day 2 において有意な差が認められた( $t=1.84$ ,  $p<0.04$ , 片側検定)。また、Day 1 と Day 2 の間では、野生型マウスでは 1 匹目の仔を移動するまでの移動回数に有意な短縮を認めたが( $t=1.98$ ,  $p<0.04$ , 片側検定)、NMB-R KO マウスでは有意な短縮は認められなかった。くわえた仔を落とした回数(No. of drops)においては、Day 1・2 ともに NMB-R KO マウスの方が多い傾向を示しており、Day 2 において有意な差が認められた( $t=1.93$ ,  $p<0.04$ , 片側検定)。また、Day 1 と Day 2 の間では、野生型マウス・NMB-R KO マウスともに仔を落とした回数に変化は認められなかった。試行終了までの所用時間(total time)については、Day 1 において NMB-R KO マウスが野生型マウスよりも有意に短かった( $t=2.46$ ,  $p<0.03$ )。また、野生型マウスでは Day 2 において有意な時間短縮が認められたが( $t=4.11$ ,  $p<0.01$ )、NMB-R KO マウスにおいては変化が認められなかった。

#### 4)-2-2. 明暗箱テスト

明暗箱テストの結果は Fig.4-9 にまとめた。暗室から明室に出てくるまでの所用時間(明暗移動潜時:L-D latency)・暗室から明室を覗いた回数(No. of looking out)および明室滞在時間(Time Light box)の各指標については、NMB-R KO マウスと野生型マウスの間に有意な差は認められなかった。しかし、暗室と明室の移動回数(No. of L-D movements)においては NMB-R KO マウスの移動回数が野生型マウスの移動回数よりも有意に多かった( $t=2.61$ ,  $p<0.02$ )。NMB-R KO マウスの明暗移動回数が多かったことは、仔引き行動テストにおいて NMB-R KO マウスの移動回数が多かったことと一貫した結果といえる。

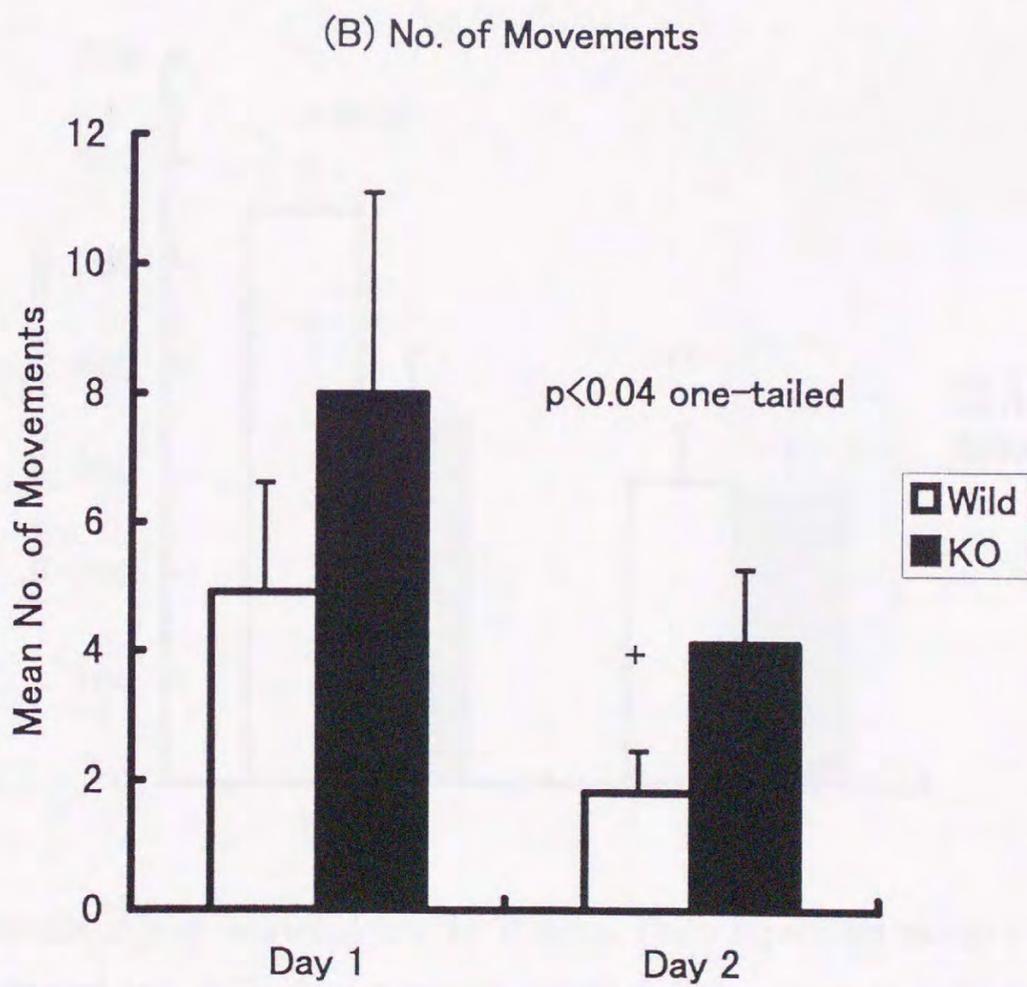
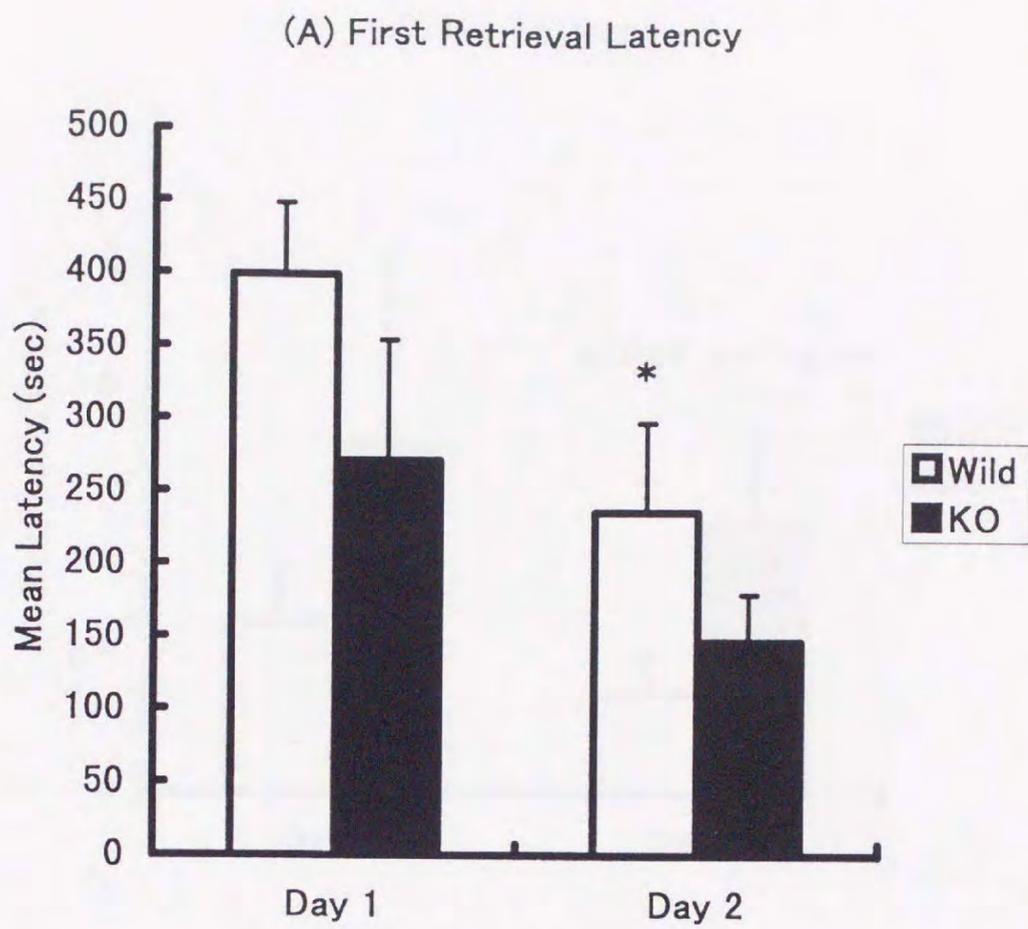


Fig. 4-8 (A), (B)

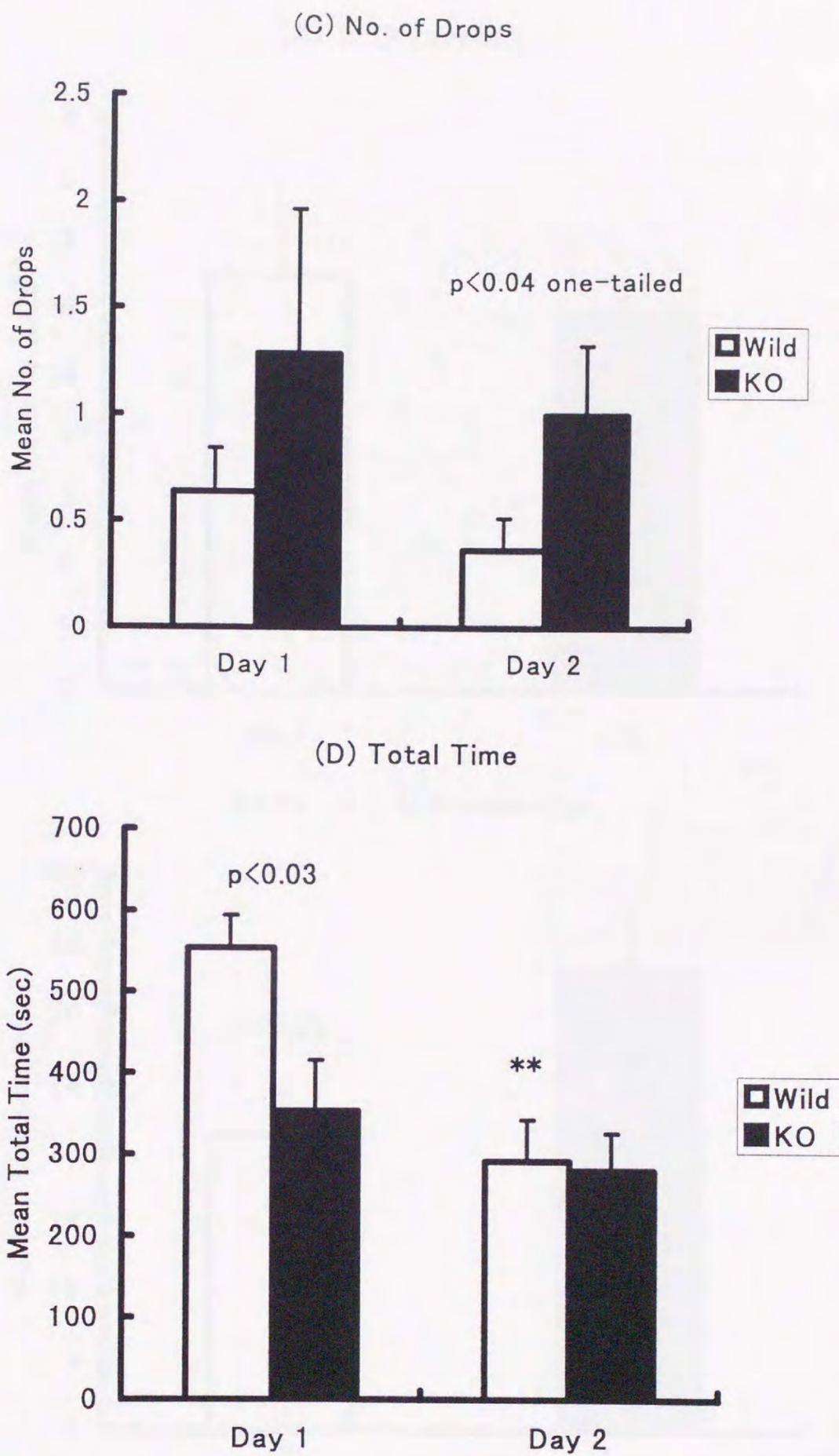


Fig. 4-8 Results of pup retrieval test in T-maze. Data represent mean + SEM. P-values represent the difference between NMB-R KO mice and wild type mice. Symbols represent the difference between Day 1 and Day 2 (\*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.05$ , two-tailed; +:  $p < 0.05$ , one-tailed, respectively).

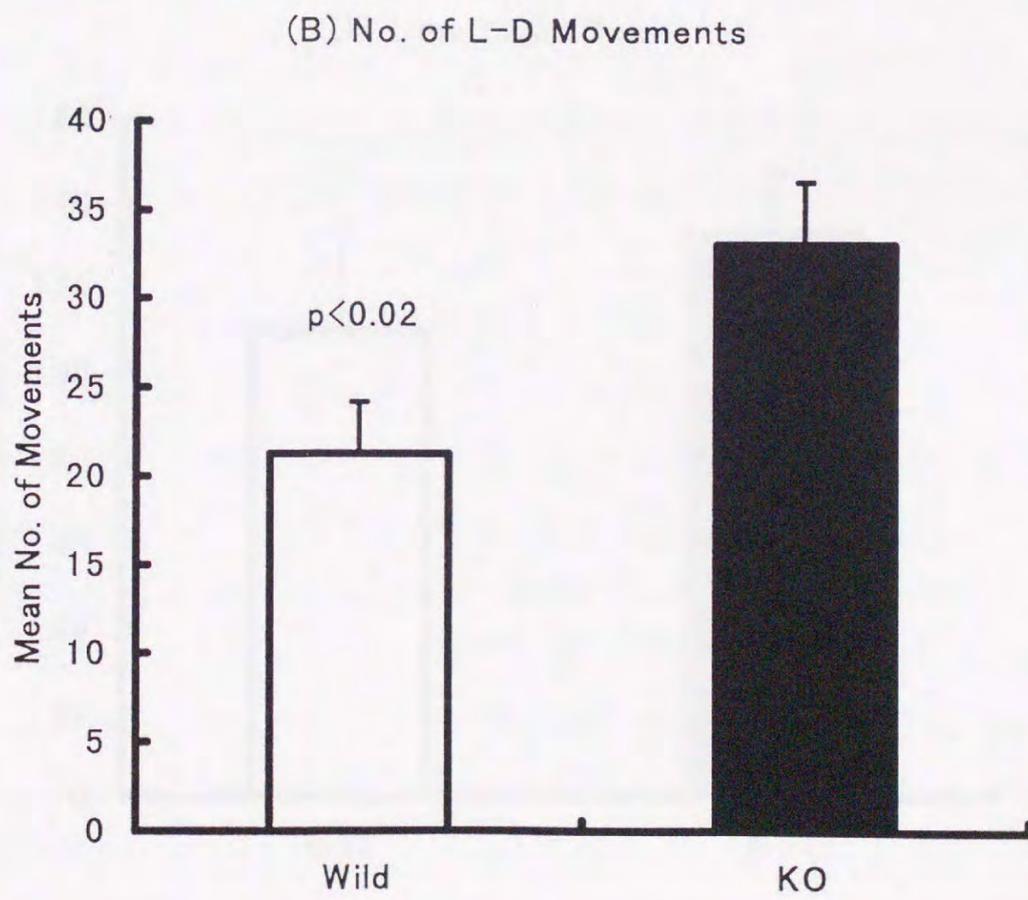
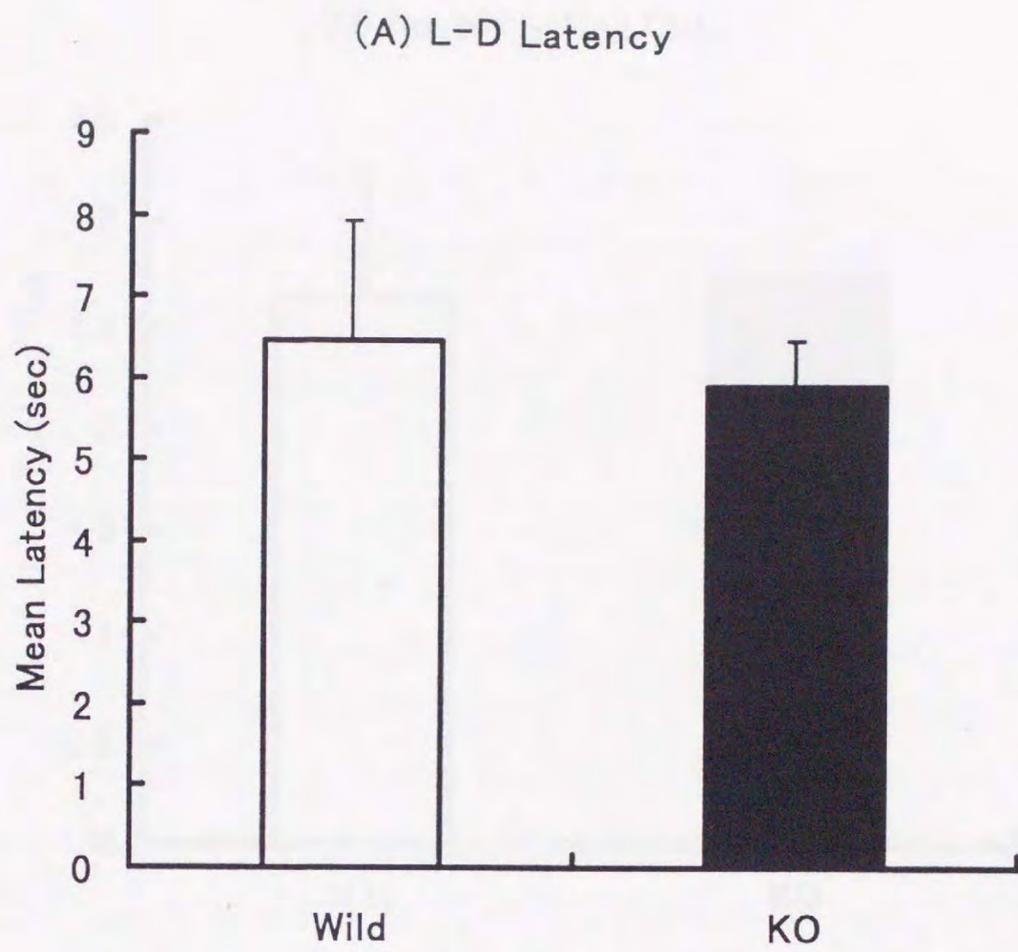
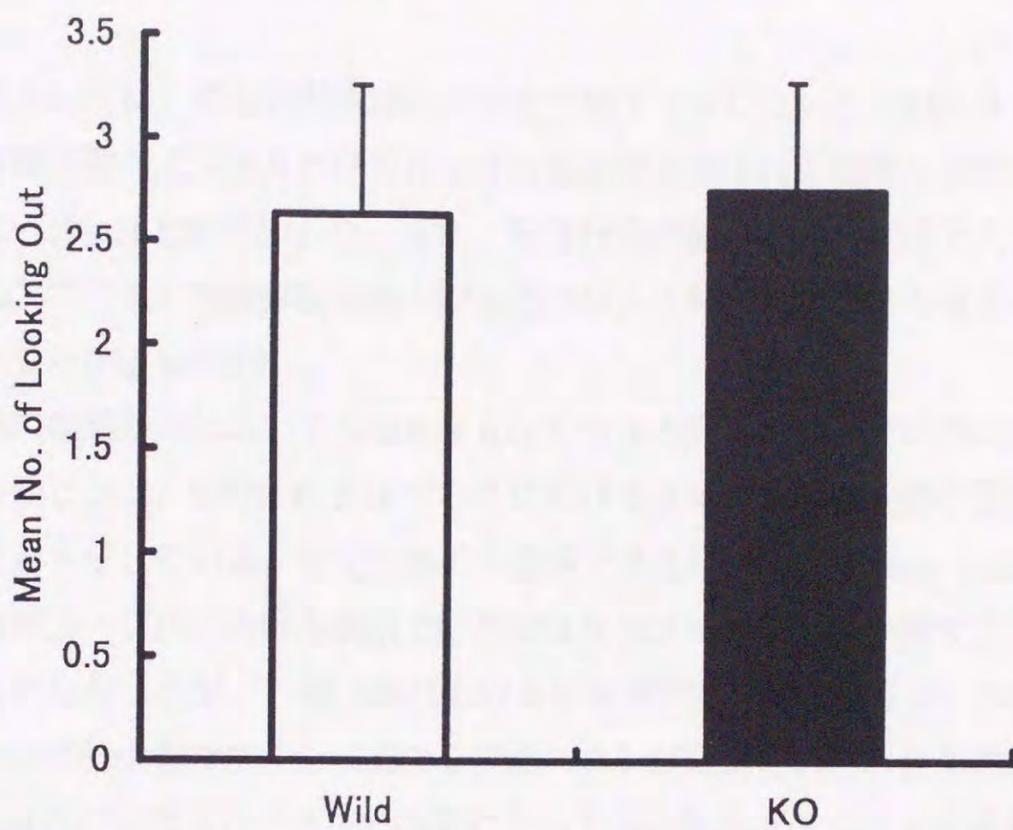


Fig. 4-9 (A), (B)

(C) No. of Looking Out



(D) Time Light Box

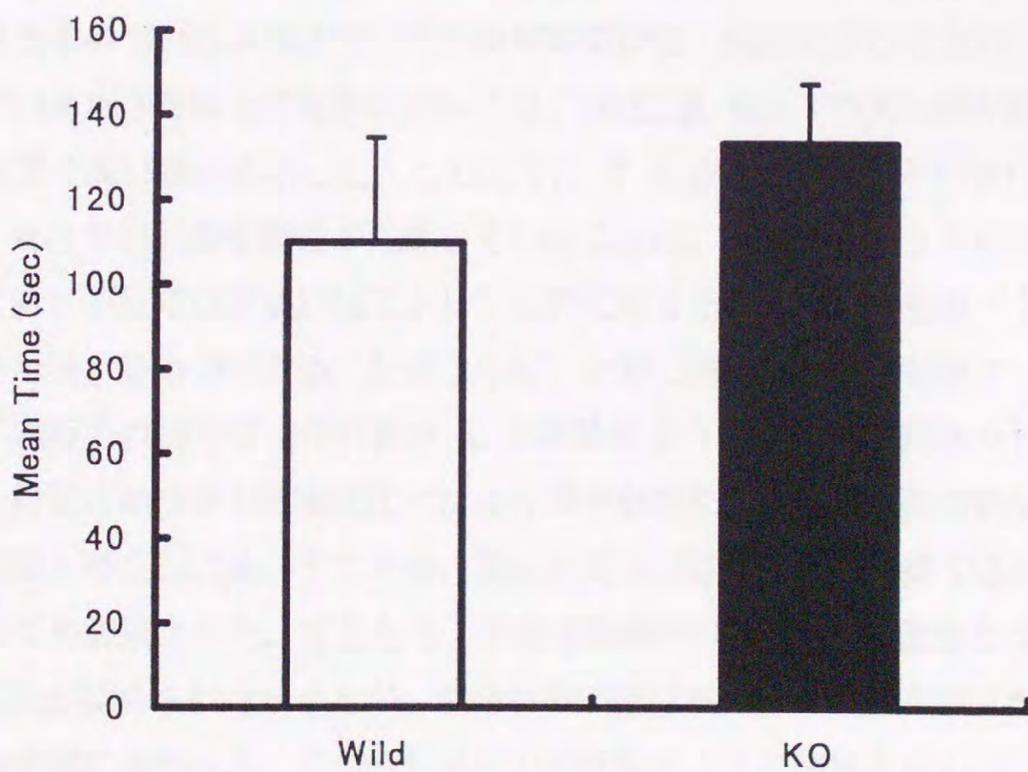


Fig. 4-9 Results of Light-Dark Box test after maternal behavior tests. Bars represent means + SEM. P-value represents the difference between NMB-R KO mice and wild type mice.

#### 4)-3. 考察

本実験においては、母性行動実験の仔引き行動テストにおいて NMB-R KO マウスの装置内移動回数および加えた仔を落とす行動が野生型の反応回数と比較して有意に多かったこと(Fig.4-8)を見出した。また、母性行動実験に続く明暗箱テストにおいて NMB-R KO マウスの明暗移動回数が野生型マウスの移動回数よりも有意に多かったことを見出した(Fig.4-9(B))。

育児行動の観察結果において NMB-R KO マウスと野生型マウスの変化が認められなかったことは、NMB-R KO マウスにおける基本的な育児行動が正常に行なわれていることを示している。育児行動の一要素である仔引き行動(pup retrieval)においても、飼育ケージ内における観察では NMB-R KO マウスと野生型マウスの変化は認められなかったが、T 型迷路における仔引き行動の観察からは、NMB-R KO マウスにおいて野生型マウスとは異なる行動パターンが見出された。全体的な傾向としては、T 型迷路における仔引き行動事態において NMB-R KO マウスの活動性が野生型マウスの活動性よりも高い傾向が認められたことである。すなわち、1 匹目の仔を移動するまでの時間および試行終了までの所用時間においては、有意水準に達しはしなかったものの NMB-R KO マウスの所用時間が短い傾向を示しており、また移動回数および加えた仔を落とす回数においては、NMB-R KO マウスの方が野生型マウスよりも有意に高い傾向を示した。このように T 型迷路における仔引き行動において NMB-R KO マウスの活動性が亢進していたことは、NMB-R KO マウスにおける環境刺激に対する反応性あるいはストレス負荷に対する応答性が野生型マウスとは異なることを示唆するものである。なぜならば、十分に馴致している飼育ケージ内では全く正常に遂行され得る仔引き行動が T 型迷路のような不慣れな環境の下で変容したことは、母性行動自体の機能変化ではなく環境刺激に対する反応性の変化に帰因すべき行動変容と考えられるからである。類似の変化は母性行動実験終了後の明暗箱テストにおいても観察された。すなわち、明暗移動潜時・覗き込み回数および明室滞在時間には変化が認められなかったが、明暗移動回数は NMB-R KO マウスが野生型マウスよりも有意に多かった。この結果は仔引き行動テストの結果とともに、育児行動を行なっている NMB-R KO マウスが不慣れな環境刺激に対してより過敏に反応していることを示すものといえる。

第 1 節第 2 項の一般的行動特性の分析において述べたとおり、NMB-R KO マウスは先行課題を行なわない条件では、明暗箱テストにおいて野生型マウスと有意な差が

認められない。したがって、本実験において得られた明暗箱における NMB-R KO マウスの行動変化は、先行する母性行動実験とくに T 型迷路における仔引き行動テストの影響による行動変化といえよう。この結果は、育児のような特殊な生理的・心理的状況下にある NMB-R KO マウスが新奇な環境および刺激事態にさらされた場合、その行動を変容させる可能性があることを示唆するものである。

## 5) 考察：ストレス負荷と NMB-R KO マウスの行動変容

本項では NMB-R KO マウスに対して諸種の実験的操作、すなわち負荷をかけることによる行動変容について実験的検討を行ってきた。

実験 1 では食物剥奪による行動変化について餌探し行動テスト(food exploration test)を用いて検討を加えた。その結果、NMB-R KO マウスにおいて、床敷の下に隠された餌を発見するまでの所要時間が野生型マウスと比較して有意に長くなっていることを見出した(Fig.4-3)。NMB-R KO マウスの嗅覚が野生型マウスと同様に正常に機能していることはすでに一般的行動特性の分析において述べてきたとおりであり、実験 1 の結果を NMB-R KO マウスの嗅覚欠損に帰因することはできない。実験 1 では同時に、餌探し行動中の NMB-R KO マウスの自発活動性についても分析を加えた。その結果、NMB-R KO マウスの常同行動量が野生型マウスと比較して有意に亢進していることが明らかになった(Fig.4-3)。本研究で用いている活動量測定装置では、常同行動とはオープンフィールド内のある一点上における前後あるいは左右の細かな動作と定義される。すなわち、NMB-R KO マウスは餌探し行動の際、野生型マウスにおいて行われているようなスムーズな探索ではなく、装置内の各所にとどまりながら周りを探索するという方略をとっていることが推察される。

この点については、実験 2 の T 型迷路学習においてより明瞭な形で結果に反映されている。T 型迷路学習の第 1 試行において、NMB-R KO マウスは野生型マウスよりも有意に高い成績を示した。実験 2 の考察において述べたとおり、この結果は NMB-R KO マウスの学習能力が高いことに起因するものではなく、自発的交替反応の欠如あるいは反応固定(response fixation)に起因するものと考えられる。このような定型的な反応の形成あるいはより状況に適合した反応形態への調整機能の低下は、餌探し行動に見られた高い常同行動量と同一あるいは類似の内的変化によって生じているものと推測される。実験 2 では、T 型迷路学習課題の前後において自発活動量の測定を行なった。T 型迷路学習を経験した NMB-R KO マウスでは、自発活動性において野生型マウスとは異なる行動変容を示しており(Fig.4-5)、T 型迷路学習のような認知的課題の負荷が NMB-R KO マウスの行動に重大な影響を与えたことは疑いのないことといえる。

また、実験 3 では個別飼育による社会的刺激の剥奪による行動変容について強制水泳テストを用いて検討を加えた。Table 4-2.に示したとおり、先住者-侵入者法による社会的相互作用の実験においては、NMB-R KO マウスと野生型マウスの社会的相

相互作用の間に変化は認められなかった。しかし、個別飼育は非常に広範な行動に深い影響を及ぼすことが知られているので(第3章参照)、本実験ではマウスに極めて強いストレス負荷を与えることが予想される強制水泳事態を用いて検討を加えた。その結果、性差はあるものの雄・雌どちらにおいても個別飼育条件の NMB-R KO マウスの不動時間が野生型マウスの不動時間よりも有意に長かった(Fig.4-6,4-7)。この結果は、個別飼育による社会的刺激の剥奪の効果が、NMB-R KO マウスと野生型マウスの間で異なる可能性を示している。第3章で述べたとおり、通常個別飼育をおこなった動物は集団飼育をおこなった動物よりも高い情動性あるいは不安性を示すとされている。そのために、強制水泳事態においてはより不動時間が短くなることが予想されるが、個別飼育条件のマウスに不動時間の短縮が認められたのは第1試行においてのみであった。したがって、最終試行において個別飼育条件の NMB-R KO マウスが示した長い不動時間は、単なる情動性の変化によってではなく、社会的刺激の剥奪によってその後のストレス負荷事態に対する反応性が変化したことによるものと考えられる。

さらに、実験4では、育児行動あるいは母性行動といわれる、母親マウスにとって多大な負荷がかかることが予想される実験条件における行動変化について検討を加えた。言うまでもなく、母性行動は妊娠および出産を契機とした劇的な内分泌学的変化によって生じる一連の定型的行動パターンである。近年ではいわゆる授乳ホルモンであるプロラクチン(prolactin)が出産を機に分泌され、そのホルモンによって一連の行動連鎖が解発されることが知られてきた(164)。また同時に、育児行動あるいは母性行動は脳内の麻薬様物質(endorphin)の分泌が重要な機能を果たしていることも示唆されている(165,166)。したがって、育児期間中のマウスにおいては諸種の行動変容が生じていることが予想される。NMB-R KO マウスの飼育ケージ内における育児行動は全く正常に遂行されていたが、T型迷路を用いた仔引き行動においては、装置内の移動行動およびくわえた仔を落とす行動に有意な増加が認められた。実験の観察からは、NMB-R KO マウスは野生型マウスよりもそわそわした態度を示し、また仔引き行動においても極めて慌てた様子が伺われた。NMB-R KO マウスに認められたこれらの行動変化は、育児期間中にマウスに生じている内的変化の影響が、T型迷路における仔引き行動テストというテスト場面に依存して表出されたものと考えられることができる。

このように本研究から得られた結果は、生理的・物理的・社会的あるいは認知的な負荷によって NMB-R KO マウスが行動を変容することを強く示唆するものである。

これら多様な負荷要因は、言うまでもなく多様な生理学的・内分泌学的変化を伴うものである。したがって、NMB-R KO マウスにおけるこれらの生理学的・内分泌学的な変化について検討を加えることによって、NMB の行動調節機能が明らかにされるであろう。

## 2. ストレス負荷と内分泌反応の変化

前項では、各種課題負荷による NMB-R KO マウスの行動変化が野生型マウスにおける行動変化とは質的・量的に異なることを示した。前項で用いた各種負荷課題は、マウスに対して行動のように外的に表出される反応ばかりでなく、さまざまな内的反応を生じさせていることは言うまでもないことである。しかし、マウス個体は食物剥奪・学習課題の遂行・社会的刺激の剥奪・強制水泳および育児行動などの負荷に関して、程度の差こそあれ情動としての評価を行なっていることは容易に推測されることであろう。ストレス刺激を情動として評価するのは主として辺縁前脳である。すなわち、海馬(hippocampus)・帯状回(cingulate gyrus)・前頭前野(prefrontal area)・嗅回(olfactory gyrus)・中隔(septum)および扁桃体(amygdala)の各領域である(143)。これらの領域のうち海馬・扁桃体などには第 1 節において示したように NMB-R が発現しており、NMB-R がストレス刺激の入力あるいは受容の段階で何らかの機能を果たしている可能性もある。

また、ストレス負荷による内分泌学的変化については古くから知られているが、セリエが報告した全身症候群は副腎皮質を中心としたものである。副腎皮質から糖質コルチコイドを分泌させるものは脳下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)であり、この ACTH を分泌させるものは視床下部室傍核(PVN)のニューロンから放出される副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(corticotropin releasing hormone: CRH)である。CRH ニューロンはバソプレッシン(vasopressin: VP)を含むニューロンと含まないニューロンの 2 種類があり、前者では急性ストレス負荷に対して強い反応を生じる一方、後者では反応を生じない(143)。これは、PVN における CRH ニューロンが異なるストレス刺激に対して反応するように機能分化していることを示している。前項における諸実験において NMB-R KO マウスは、食物剥奪や認知的負荷のような慢性的なストレス負荷、および強制水泳のような急性のストレス負荷のいずれにおいても野生型マウスとは異なる行動変化を示した。これは NMB-R の欠損が PVN における 2 種の CRH ニューロン両方に機能変化をもたらしていることを示唆している。Table 4-1. に示したとおり、PVN 自体には NMB-R の発現が認められていないが、PVN には扁桃体その他 NMB-R の発現が認められている諸領域からの入力がある。したがって、NMB の行動調節機能を解明する際、PVN の機能変化に関する検討、および機能変化をもたらす神経経路に関する検討は極めて重要なことと考えられる。

繰り返し述べてきたとおり、前項における行動実験において用いられた各種課題は、マウス個体に対してさまざまなストレス刺激を複合的に与えているものと考えられる。また、NMB-R KO マウスに認められた行動変化は、これら多様なストレス刺激に対する脳内のストレス反応系における神経活動の変異を反映しているものと推測される。脳内のストレス反応系は極めて多岐にわたっており、必ずしもその全体像が明らかにされているわけではない(143)。したがって、ストレス刺激に対する神経系の反応について検討を加える際、負荷するストレス刺激の選定は重要な問題となる。ストレス刺激の負荷による内分泌学的な変化については、従来拘束ストレス法(restraint stress)が頻繁に用いられてきた(115,144)。拘束ストレス法は、実験装置および実験手続きが簡素で利用しやすいこと、またその効果が比較的明瞭に現れることなどの利点がある。そこで本項では、用いるストレス刺激を拘束ストレスに限定し、NMB-R KO マウスのストレス刺激に対する内分泌学的反応について行動生理学的検討を加えた。

## 1) 実験1：拘束ストレス負荷による内分泌反応の変化<sup>1)</sup>

### 1)-1. 方法

**被験体**：雄の NMB-R KO マウス 15 匹、および同腹の雄の野生型マウス 19 匹。NMB-R KO マウスおよび野生型マウスは C57BL/6 系統のマウスに戻し交配した第 5 世代目のマウス(F5)同士を掛け合わせたものを用いた。マウスは実験時に生後 4～7 カ月齢で、平均体重は NMB-R KO マウスが  $28.8 \pm 0.39\text{g}$ 、野生型マウスが  $28.5 \pm 0.47\text{g}$  であった。なおマウスはすべて強制水泳テストに用いたもので、実験時には少なくとも 1 ヶ月以上の期間、個別飼育条件で飼育されていた。

**装置・材料**：拘束ストレス負荷には、プラスチック製の遠沈用チューブ(50ml)の先端を切り取ったものを用いた。また、血液サンプルの採取には 0.5M EDTA 溶液を 5  $\mu\text{l}$  入れた 1.5ml のマイクロチューブを用いた。血漿コルチコステロンおよび副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の測定には、市販の放射性同位元素標識免疫測定 (radioimmunoassay: RIA) キット (Biotrak rat corticosterone assay system, Amersham; DPC ACTH kit, Diagnostic Products Corporation, USA)を用いた。

**手続き**：無麻酔のマウスを拘束用チューブに入れ、拘束開始の 5 分後および 20 分後にマウスの尻尾の先端を切り取り約 100  $\mu\text{l}$  の血液を採取した。なお、ホルモンレベルは日内変動が大きいので、実験はすべて午前 10 時から 12 時の間に行なった。また、採取した血液は氷温で一時保存し、採取終了後に速やかに血漿を遠心分離し、測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。測定は各キット添付のプロトコルにしたがった。

**統計的検定**：統計的分析は F 検定によって等分散性の検定を行なった後、Student の t 検定(両側)を行なった。また、個体内比較には対応のある t 検定(両側)を用いた。

### 1)-2. 結果

ホルモン測定の結果は Fig.4-10 にまとめた。NMB-R KO マウスの血漿コルチコステロン濃度は、拘束開始 20 分後に 5 分後の濃度よりも有意に上昇した( $t=2.71$ ,  $p<0.02$ )が、野生型マウスにおいては有意な上昇は認められなかった。しかし、NMB-R

KO マウスと野生型マウスの間には有意な差は認められなかった。一方、血漿副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)濃度は NMB-R KO マウス・野生型マウスともに同様の上昇傾向を示した(それぞれ、wild type mice:  $t=3.92$ ,  $p<0.01$ ; NMB-R KO mice,  $t=2.84$ ,  $p<0.02$ )。しかし、NMB-R KO マウスと野生型マウスの間には有意な差は認められなかった。

---

\*1: 本実験において、放射性同位元素標識免疫測定は、(財)東京都精神医学総合研究所神経化学部門 浜崎浩子先生(現 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子神経科学 助教授)に実施していただきました。

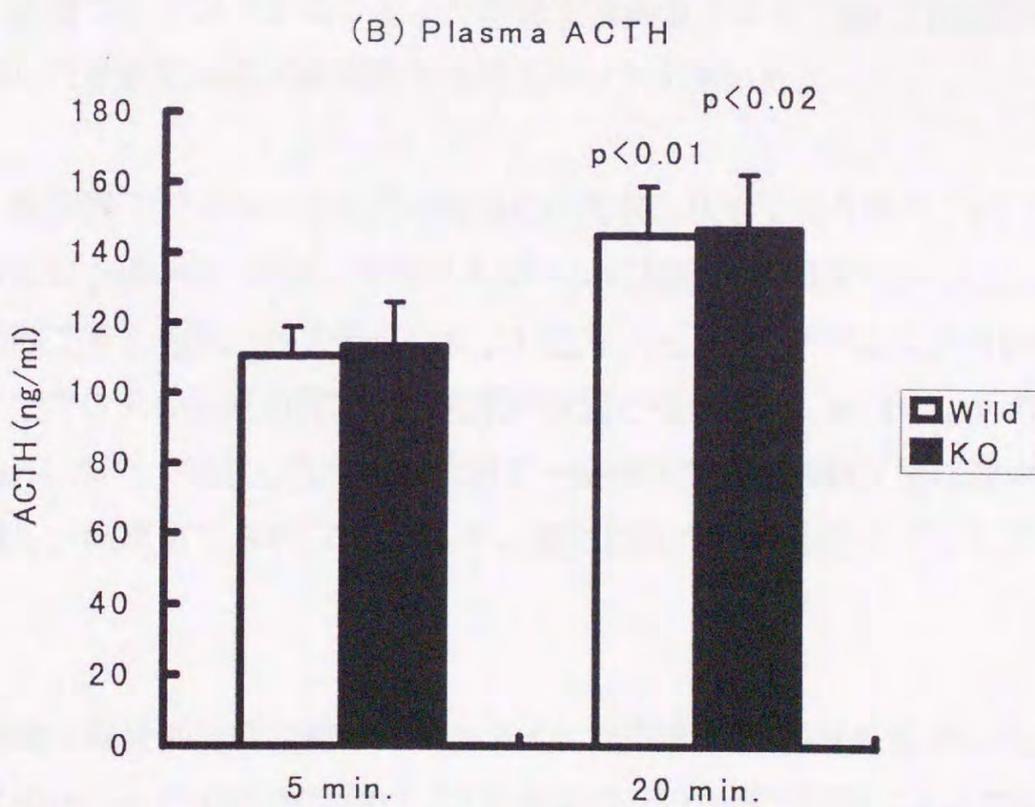
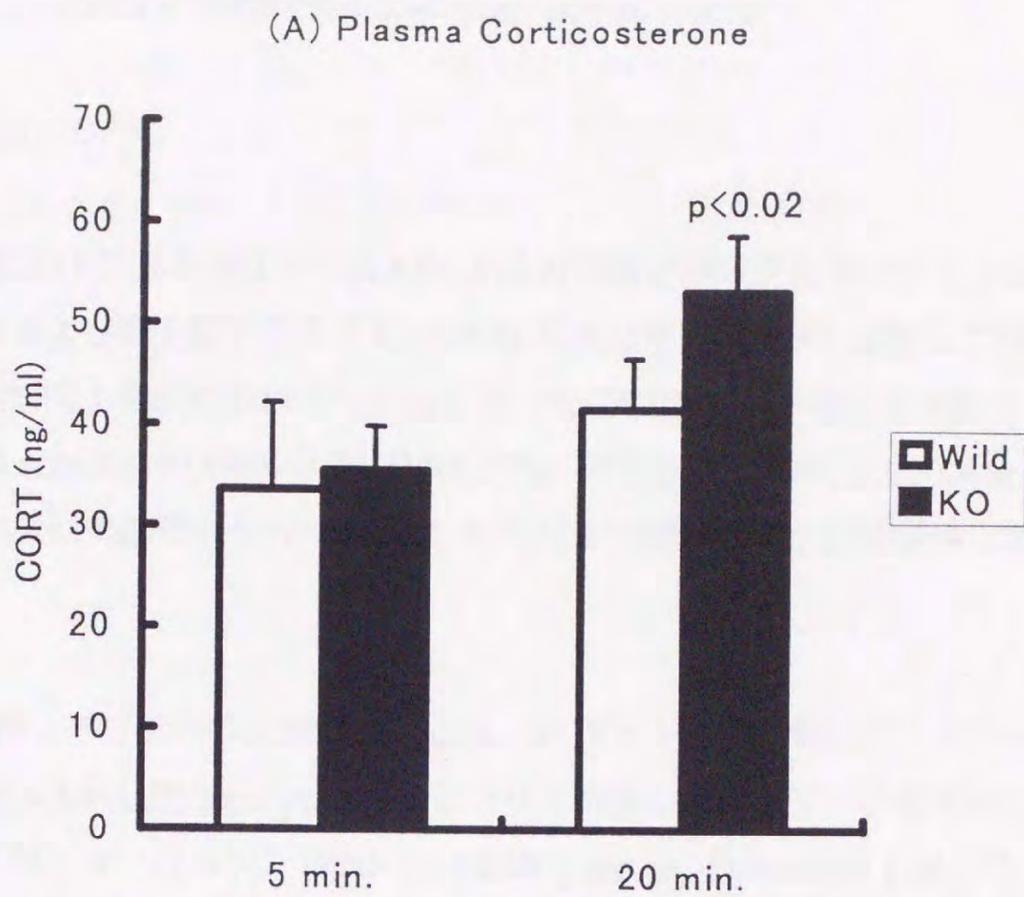


Fig. 4-8 Results of plasma corticosterone and ACTH measurement. Data represent means + SEM. P-values represent the difference between 5 min. and 20 min. No significant difference was observed between NMB-R KO mice and wild type mice.

## 2) 実験 2 : NMB の脳室内投与による内分泌反応の変化<sup>\*1</sup>

### 2)-1. 方法

**被験体:**雌の NMB-R KO マウス 8 匹、および同腹の雌の野生型マウス 8 匹。NMB-R KO マウスおよび野生型マウスは C57BL/6 系統のマウスに戻し交配した第 5 世代目のマウス(F5)同士を掛け合わせたものを用いた。マウスは実験時に生後約 5 カ月齢で、平均体重は NMB-R KO マウスが  $22.3 \pm 0.57$ g、野生型マウスが  $22.0 \pm 0.44$ g であった。なお、マウスは実験時に少なくとも 1 ヶ月以上の期間、個別飼育条件で飼育されていた。

**装置・材料:**ペプチドの脳室内投与には、30 ゲージの注射針にポリエチレンチューブ(PE10: Beckton Dickinson, USA)をつけて作成した注入ゲージを用いた。注入したペプチドはニューロメジン B(NMB: NMB porcine, Peninsula Lab.)で、5  $\mu$ l 当たり 100 pmol の容量になるように精製水(和光純薬)に溶かして調製したものを用いた。なお、血漿コルチコステロンおよび副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の測定には、実験 1 で用いた放射性同位元素標識免疫測定キットを用いた。

**手続き:**無麻酔下でマウスの尻尾の先端を非拘束の状態で切り取り、約 100  $\mu$ l の血液を採取した(before)。次に、マウスをゲージに固定し、頭皮上から注入ゲージを側脳室に向けて差し込み、ペプチドを 5  $\mu$ l 注入した。ペプチド注入の 1 時間後に再度無麻酔下でマウスの尻尾の先端を非拘束の状態で切り取り、約 100  $\mu$ l の血液を採取した(after)。また、採取した血液は氷温で一時保存し、採取終了後に速やかに血漿を遠心分離し、測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。測定は各キット添付のプロトコルにしたがった。

**統計的検定:**統計的分析は繰り返しのある二元配置の分散分析を用いた。また、多重比較は Student の t 検定(両側)および対応のある t 検定(両側)によって行なった。

### 2)-2. 結果

結果は Fig.4-11 にまとめた。血漿コルチコステロン濃度については、繰り返しの

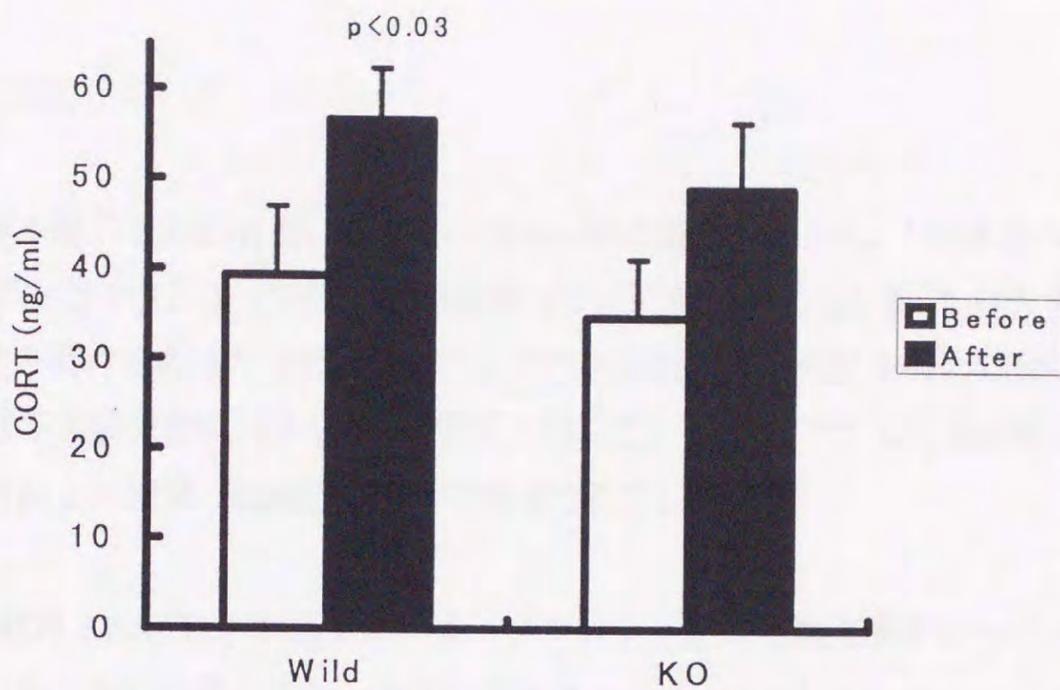
ある二元配置の分散分析の結果、測定の順序の主効果が有意であった( $F(1,28)=5.23$ ,  $p<0.03$ )が、遺伝子型の主効果、および測定の順序×遺伝子型の交互作用は有意ではなかった。多重比較の結果、ペプチド投与前および後のいずれの測定においても、NMB-R KO マウスと野生型マウスの血漿コルチコステロン濃度に有意な差は認められなかった。しかし、ペプチド投与の前後における個体内に比較においては、NMB-R KO マウスでは有意な変動が見られなかったが、野生型マウスではペプチド投与後の血漿コルチコステロン濃度の有意な上昇が認められた( $t=2.85$ ,  $p<0.03$ )。

一方、血漿 ACTH 濃度については、繰り返しのある二元配置の分散分析の結果、測定の順序と遺伝子型の主効果、および測定の順序×遺伝子型の交互作用ともに有意ではなかった。また、多重比較においても有意な差は見出されなかった。

---

\*1: 本実験において、放射性同位元素標識免疫測定は、(財)東京都精神医学総合研究所神経化学部門 浜崎浩子先生（現 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子神経科学 助教授）に実施していただきました。

(A) Effect of NMB infusion on CORT



(B) Effect of NMB infusion on ACTH

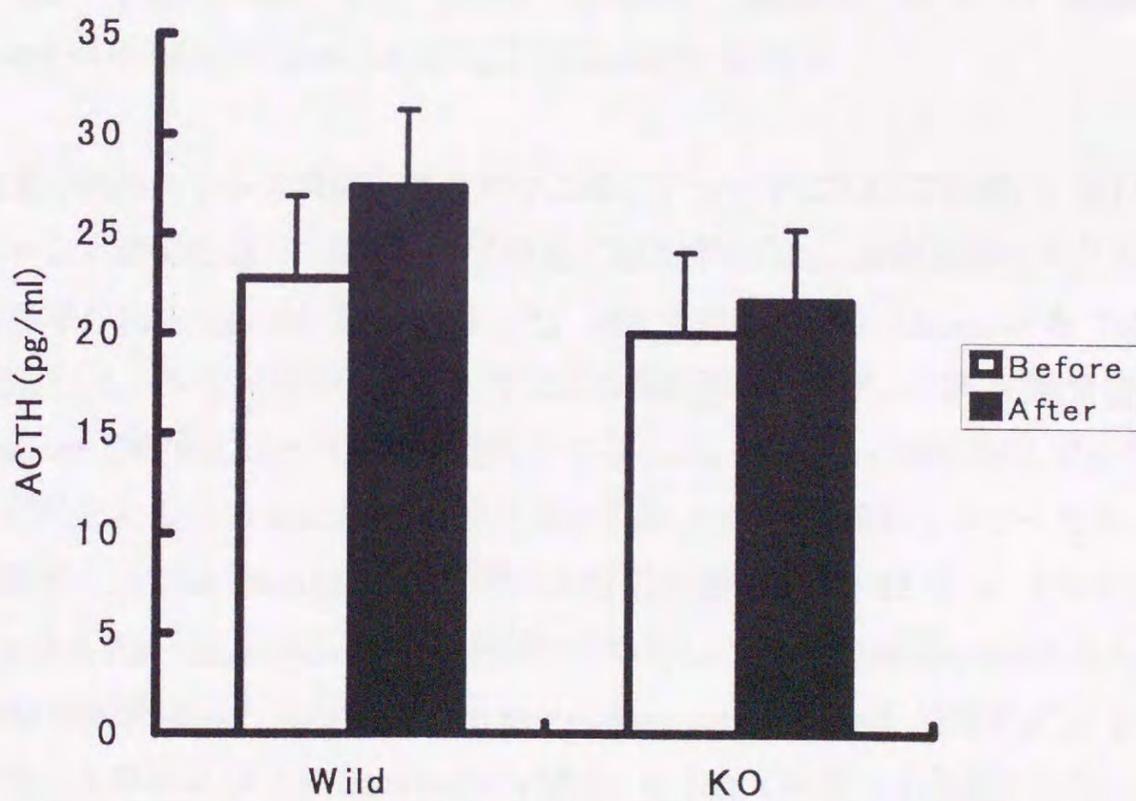


Fig. 4-11 Effect of NMB infusion on corticosterone (CORT) and ACTH secretion in female NMB-R KO and wild type mice. Data represents mean + SEM. P-value represents the difference between before and after NMB infusion. No significant difference was observed between NMB-R KO mice and wild type mice.

### 3) 実験3：拘束ストレス負荷によるHPA系活動の検討—免疫組織化学的解析\*

#### 3)-1. 方法

**被験体**：雄のNMB-R KO、および同腹の雄の野生型マウス。NMB-R KOマウスおよび野生型マウスはC57BL/6系統のマウスに戻し交配した第5世代目のマウス(F5)同士を掛け合わせたものを用いた。マウスは実験時に生後6~8カ月齢であった。被験体は各実験条件につき最低3匹ずつ用いた。なお、マウスは実験時に少なくとも1ヶ月以上の期間、個別飼育条件で飼育されていた。

**装置・材料**：拘束ストレス負荷には、プラスチック製の遠沈用チューブ(50ml)の先端を切り取ったものを用いた。免疫染色には polyclonal c-Fos antiserum (Incstar)・biotinylated anti-rabbit IgG (Vector)・avidin-biotin peroxidase complex (Vecter ABC kit)・polyclonal 5-HT rabbit antibody (Incstar) および fluorescein isothiocyanate-labeled anti-rabbit IgG (MILES)を用いた。

**手続き**：拘束ストレス負荷条件のマウスは、チューブに入れて拘束し、20分間の拘束ストレス負荷を与え、負荷の終了直後に脳を摘出した。統制条件のマウスは、ケージから取り出した直後に脳を摘出した。免疫染色の方法は Yamano & Tohyama (167)に従った。マウスをネンブタールによる深麻酔下におき、0.9%生理食塩水および Zamboni 固定液によって灌流固定をおこなった。Zamboni 固定液は4%パラホルムアルデヒドおよび0.2%ピクリン酸を含有する0.1 M 燐酸バッファーである (PH 7.3)。摘出した脳は Zamboni 固定液によって再固定後、5-18  $\mu$ m の切片にし、polyclonal c-Fos antiserum (3000倍希釈)で処理し、続いて biotinylated anti-rabbit IgG (200倍希釈)および avidin-biotin peroxidase complex (500倍希釈)によって処理後、過酸化水素および3,3'-diaminobenzidine によって処理して可視化した。またセロトニンの染色は、切片を polyclonal 5-HT rabbit antibody (1000倍希釈)で処理後、fluorescein isothiocyanate-labeled anti-rabbit IgG (1000倍希釈)処理によって可視化した。

### 3)-2. 結果

免疫組織化学的解析の結果は Fig. 4-12 に示した。室傍核(PVN)領域における c-Fos の発現については、NMB-R KO マウスにおける発現が野生型マウスよりも強いことが示された(A,C)。また、c-Fos 発現は 20 分間の拘束ストレス負荷後の NMB-R KO マウスにおいてもっとも大きかった(B,D)。また、縫線核(dorsal raphe)におけるセロトニン抗体反応についても、NMB-R KO マウスにおける反応が野生型マウスの反応よりも強く(E,G)、拘束ストレス負荷後には更に反応が強まった(F,H)。

### 3)-3. 考察

本実験では、NMB-R KO マウスにおいて、室傍核における c-Fos 発現および縫線核(dorsal raphe)におけるセロトニン抗体反応が野生型マウスと比較して増強されていることが明らかになった。

情動性の調節にセロトニンが関与していることは一般的に認められており(168)、セロトニン系の機能失調が鬱およびストレス事態に対する適応性に関する各種心理学的疾患の原因とみなされてきた。セロトニン受容体の欠損マウスにおいて攻撃性の亢進(5-TH<sub>1B</sub>, 72)および不安反応性の亢進(5-HT<sub>1A</sub>, 137)が報告されていることは第2章で論じたとおりである。また、 $\alpha$ -calcium-calmodulin-dependent kinase II および他のモノアミン酸化酵素の欠失が脳内のセロトニンレベルを変化させ、攻撃性を亢進させることが明らかにされている(169,170)。ボンベシン様神経ペプチドが縫線核におけるセロトニンニューロンを活性化させるという報告がなされており(171)、また本章第1項で示したとおり、NMB-R が縫線核および周辺に高密度に分布していることから、NMB-R が縫線核におけるセロトニンニューロンの活動について重要な調整機能を果たしていることが推察される。

---

\*1:本実験において、免疫組織化学的実験は大阪府立看護大学医療技術短期大学部 理学療法学科 助教授 山野真利子 先生に実施していただきました。

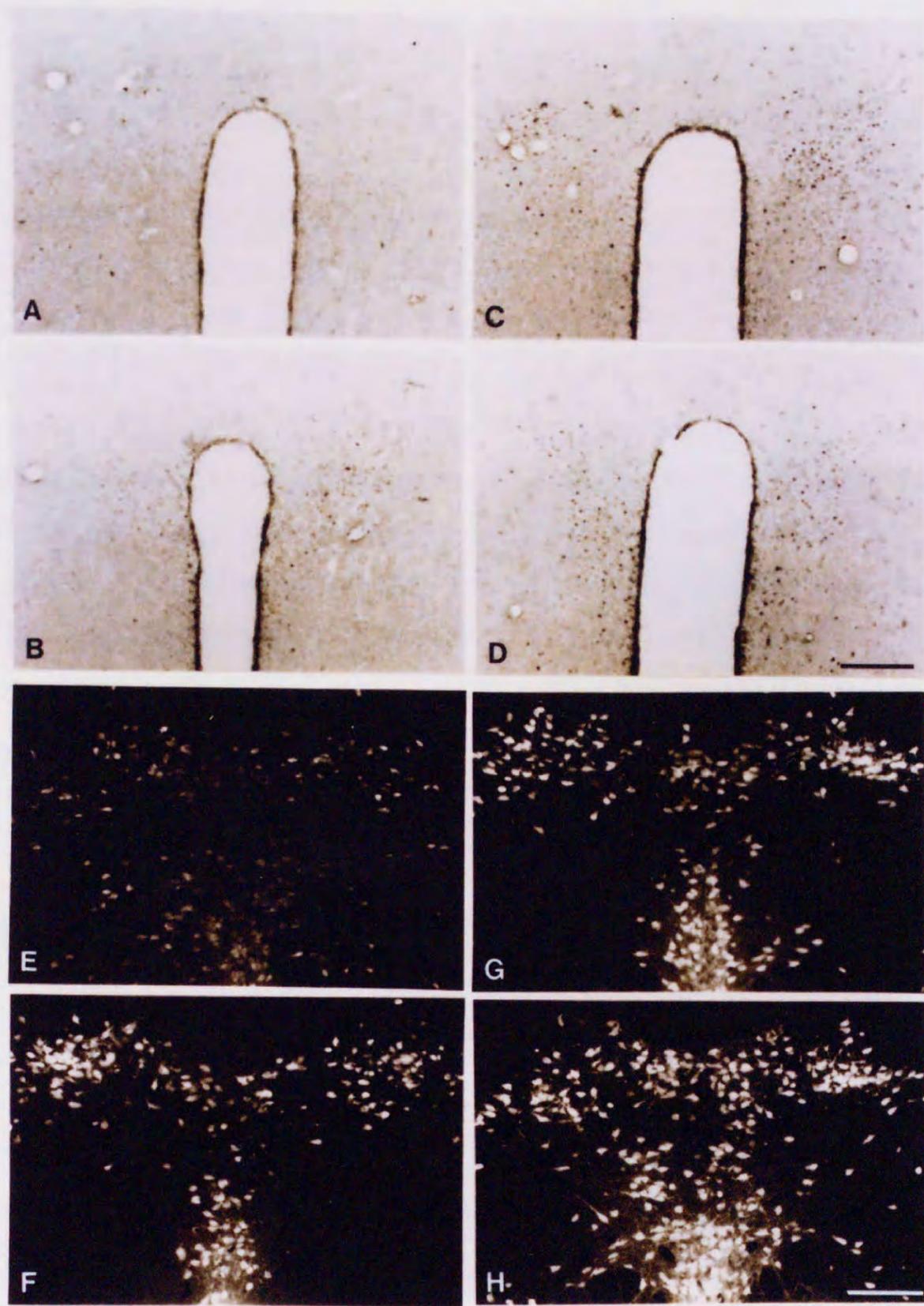


Fig. 4-12 Immunohistological analysis of brain sections. Photomicrographs showing typical patterns of c-Fos-like immunoreactivity in the paraventricular nucleus (PVN) of wild type (A, B) and NMB-R KO mice (C, D), and 5-HT-like immunoreactivity in the dorsal raphe of wild type (E, F) and NMB-R KO mice (G, H). In B, D, F and H, brain sections from mice that underwent physical restraint stress are shown. Note that expression of both c-Fos and 5-HT was higher in NMB-R KO mice than in control wild type mice, and that physical restraint stress enhanced this difference. Bar, 150  $\mu$  m for A-D and 50  $\mu$  m for E-H.

#### 4) 考察：NMB-R KO マウスにおけるストレス反応性の変化

本項では拘束ストレス負荷による NMB-R KO マウスの内分泌反応の変化について行動生理学的検討を行なった。その結果実験 1 では、拘束ストレス負荷後の野生型マウスにおける血漿コルチコステロン濃度の上昇が有意ではなかったが、NMB-R KO マウスでは有意な上昇が認められた(Fig.4-10)。また実験 2 では、NMB の脳室内投与によって野生型マウスの血漿コルチコステロン濃度が有意に上昇したのに対して、NMB-R KO マウスにおいては、有意な上昇は認められなかった(Fig.4-11)。さらに実験 3 では、拘束ストレス負荷後の視床下部領域および縫線核における内分泌学的変化について免疫組織化学的解析を行なったところ、NMB-R KO マウスの室傍核における c-Fos の発現および背側縫線核におけるセロトニン抗体反応の亢進が見出された(Fig.4-12)。

実験 1 において、拘束ストレス負荷による血漿コルチコステロン濃度の有意な上昇が NMB-R KO マウスにおいてのみ観察されたこと、および血漿副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)濃度の有意な上昇が NMB-R KO マウスおよび野生型マウスの両者に認められたことは、NMB-R の欠損がコルチコステロンの分泌を過剰にするのに対して、ACTH の分泌には影響を及ぼさないことを示している。そこで内在性の NMB がコルチコステロンおよび ACTH の分泌にいかなる関与をしているのかという点について検討するために、実験 2 では NMB の脳室内投与によるこれらホルモンの分泌について検討を加えた。その結果、NMB の脳室内投与によって、野生型マウスにおいては血漿コルチコステロン濃度の有意な上昇が、また NMB-R KO マウスにおいても有意水準には達しなかったものの、血漿コルチコステロン濃度の上昇が観察された。野生型マウスにおける血漿コルチコステロン濃度の上昇は、内在性の NMB がコルチコステロンの分泌に何らかの関与をしている可能性を示唆するものである。一方、NMB-R KO マウスにおける血漿コルチコステロン濃度の上昇傾向は、脳室内投与された NMB が他のボンベシン様神経ペプチド受容体に結合した結果と解釈できる。すなわち、実験 2 において脳室内に投与された NMB の量は内在性のリガンドとは比較にならないほど多量であるため、その高濃度のゆえに内在性のリガンドの濃度では結合しない親和性の低い他の受容体に結合し、機能したものと解釈すべきであろう。ボンベシン様神経ペプチドの投与によって、コルチコステロンの分泌が促進されるという報告はすでになされているが(171,172)、実験 2 の結果はその結果と一貫するものである。しかし、上述のように NMB-R KO マウスにおいても有意水準には達しな

かったものの、コルチコステロン濃度の上昇が見られたことから、NMB は急性のストレス侵襲時におけるコルチコステロンの分泌に何らかの関与をしているものの、直接的かつ排他的な調節機能を果たしているわけではないと考えられる。

さらに、本論では取りあげなかったが、拘束ストレス負荷後のマウスの脳から視床下部領域を摘出し、視床下部領域におけるコルチコステロン分泌に関与しているとされる各種ホルモンレベルの測定を行なった。しかしながら、ACTH・副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)・バソプレッシン(VA)およびオキシトシン(oxytosin)など、HPA 系における主要物質は、NMB-R KO マウスと野生型マウスにおいて同程度の水準であった。同様に、モノアミンに関する測定においても、ドーパミン(DA)およびノルアドレナリン(NA)のレベルには変化が認められなかった。これらの結果は、NMB-R KO マウスにおけるコルチコステロン分泌の亢進およびストレス反応性の変化が、HPA 系の機能変化によるものではないことを示すものといえる。

一方、実験 3 において、NMB-R KO マウスの PVN における c-Fos の発現が野生型マウスよりも増加していたこと、およびその増加が拘束ストレス負荷後にさらに際立ったことは、拘束ストレス負荷による NMB-R KO マウスの行動学的および内分泌反応の変化が、視床下部領域における何らかの神経活動を媒介としたものであることを示している。視床下部領域は縫線核、特に背側縫線核(dorsal raphe)からのセロトニンニューロンの投射を受けている(136)。NMB-R KO マウスの背側縫線核におけるセロトニン抗体反応が亢進していたこと、および拘束ストレスによってセロトニン抗体反応が更に増強されたことから、背側縫線核における NMB-R の欠損が投射部位である視床下部の神経活動に影響を与えている可能性があることは容易に推測されよう。未だ推測の域を出ないが、背側縫線核における NMB-R がセロトニン放出を抑制的に調節しており、その結果セロトニンニューロンを介した視床下部の神経活動を調節しているものと考えられる。

これらの結果から、NMB-R KO マウスにおいて観察されたストレス反応の変化は、HPA 系の機能変化ではなく、セロトニンニューロンの機能変化によるものであると考えられる。

### 第3節 NMB-Rの行動調節機能に関する考察

本節では第2節における諸実験結果より、マウスにおける NMB-R の行動調節機能について考察を加える。

第1節において述べたとおり、NMB-R は脳内に広く分布していることから、当初多岐にわたる行動変化が期待された。しかし、一般的行動特性の分析に見られたとおり、予想に反して NMB-R KO マウスには特徴的な行動的表現型を見出すことができなかった。そこで本研究においては、まず NMB-R KO マウスに対して野生型マウスにおいても十分に行動変容が期待される実験的操作、すなわち負荷を与えることによって、行動変容のあり方について野生型マウスとの変異を探るという方略を用いた。

第1項においては、食物剥奪による生理的負荷・学習課題の遂行による認知的な負荷・個別飼育による社会的刺激の剥奪という負荷および育児行動のような身体的・精神的な負荷を与えた場合の行動変容について実験的検討を加えた。これらの負荷によって野生型マウス・NMB-R KO マウスともに行動変容をきたしたが、その中でも NMB-R KO マウスの行動変化は、野生型マウスと量的あるいは質的に異なり得ることを明らかにした。主たる変化は、反応固定に類する変化および常同行動の亢進 (response fixation: Fig.4-3, Fig.4-4; stereotypic behavior: Fig.4-3, Fig.4-5)、反応性の低下 (Fig.4-5, Fig.4-6~7)、および反応安定性の欠如 (Fig.4-8~9) などであった。これらの結果から、NMB-R KO マウスは各種ストレス負荷に対する反応性が行動レベルで変化していることが明らかにされた。しかしながら、これらの実験で用いられた課題は、それぞれ極めて広範かつ特異的な反応を生体内に生じさせ得るものであり、負荷による個々の行動変化は必ずしも NMB-R の欠損を直接反映しているとは限らない。同時に、これらの諸行動変化に関する脳・神経系における責任領域についても多岐に及ぶことが推測されるため、行動学的検討のみによって NMB-R の行動調節機能について統一的な見解を提示することには無理がある。そこで、第2項では与える負荷を拘束ストレスに限定し、その内分泌学的効果について NMB-R KO マウスと野生型マウスの間で比較検討した。

第2項においては、拘束ストレス負荷によって NMB-R KO マウスの血漿コルチコステロン濃度上昇が増強されること (Fig.4-10)、また NMB の脳内投与による実験からこの反応が NMB によって直接調節されているわけではないことを明らかにした (Fig. 4-11)。さらに、免疫組織化学的検討の結果、NMB-R KO マウスにおいて、非

ストレス侵襲時の PVN における c-Fos の発現が増強し、また背側縫線核におけるセロトニン抗体反応も増強していること、およびその傾向が急性のストレス侵襲によってさらに強まることを確認した(Fig. 4-12)。これらの結果は、NMB-R がストレスに対する反応性に関してセロトニンニューロンを介して調節していることを示すものであると同時に、ストレス負荷時における NMB-R KO マウスの行動変容がセロトニンニューロンの異常によって生じていることを示すものといえよう。

上述のように、本章における行動生理学的解析は拘束ストレス負荷時についてのみ行なわれた。したがって、強制水泳テストにおける水浸ストレスのような全身に対する急性のストレス侵襲の場合を除いては、その他各行動実験において認められた NMB-R KO マウスの行動変化のすべてについて、同様の生理学的・内分泌学的変化が生じていると一般化することはできない。しかし、背側縫線核および正中縫線核 (medial raphe) を始点とするセロトニンニューロンの投射が NMB-R の発現領域と極めて良く対応していることも事実である。NMB-R の発現が認められている領域でセロトニンニューロンの投射を受けているのは、背側縫線核を始点とする経路では、扁桃体・視床下部および嗅結節 (olfactory tubercle: OT) であり、一方正中縫線核を始点とする経路では、扁桃体・視床・視床下部および海馬である。このように縫線核を始点とするセロトニンの上行性ニューロンの投射と NMB-R の発現領域の対応は、行動実験において観察された NMB-R KO マウスの行動変化を説明する上で極めて示唆深い。食物剥奪によるマウスの空腹状態 (血糖値の低下) は糖受容体を介して視床下部の活動を喚起する。また、本章の行動実験では空間的課題が多く用いられてきた。実験 1 における餌探索行動テスト、実験 2 における T 型迷路学習課題、実験 4 における仔引き行動テストなどは、程度の差はあるもののすべてマウスの空間記憶能力を利用した課題である。これらの課題が海馬の活動を喚起していることは容易に想像できることである。さらに、餌探索行動では床敷の下に隠された餌を捜さねばならず、また仔引き行動テストにおいては、放置された仔を捜さねばならない。これらの活動を行なう際、嗅覚系の活動が喚起されるであろう。嗅覚系の活動の喚起は、他の情動的刺激とともに扁桃体の活動を喚起する。このように、各種行動実験課題に関する課題特性による分類は、NMB-R KO マウスの行動変化とセロトニンニューロンの関連をより明確に示すものといえる。これらの考察から、NMB によるセロトニンニューロンの調節機能について、以下の 2 通りの説明が可能である。すなわち第一の機能として、NMB の縫線核におけるセロトニン放出および再取り込みに関する調節機能である。免疫組織化学的解析の結果から、NMB-R KO マウスでは背側縫線核におけるセ

ロトニン抗体反応が亢進していた。これは背側縫線核におけるセロトニンの過剰放出あるいは再取り込みにおける異常の結果と考えられる。NMB-R の欠損によってセロトニン抗体反応が亢進したことから、NMB が縫線核においてセロトニンの放出あるいは再取り込みを調節していることが推測される。セロトニンニューロンは主として抑制性のニューロンであることから、NMB-R KO マウスの行動変化は各領域における神経活動の抑制の結果生じたものと解釈できる。一方第二の機能として、セロトニンニューロンの各投射部位における NMB の個別の調節機能が考えられる。背側縫線核におけるセロトニンの過剰放出あるいは代謝異常が直接行動に反映されるならば、NMB-R KO マウスにおいてセロトニンニューロンの過活動による変化が認められるはずである。イミプラミン(imipramine)およびアラプロクレイト(alaproclate)等のセロトニン再取り込み阻害剤(5-HT uptake inhibitor)の投与によってセロトニン活性を上昇させると、マウスの自発活動性が低下する(山田 未発表)など多様な行動変化が認められるが、NMB-R KO マウスにおいては、野生型マウスとの比較においてこのような変化は認められていない。したがって、NMB-R KO マウスの行動変化は、背側縫線核におけるセロトニンの過剰放出あるいは再取り込み機能の異常、すなわち縫線核における NMB-R の欠損だけでは説明が不十分である。非ストレス負荷時において NMB-R KO マウスの行動に変化が認められないことを説明するためには、NMB による各投射部位におけるセロトニンニューロンの過活動の補正を仮定する必要がある。投射部位におけるセロトニン受容体の機能について NMB が果たす調節機能、および NMB によるセロトニン受容体のレギュレーションについては現時点では全く未知の状態であるが、NMB-R KO マウスにおけるセロトニン受容体のレギュレーションに関する分子生物学的解析によって、近い将来明らかにできるであろう。

## 第5章 総括的論議と展望

本研究では第2章から第4章において、3系統のボンベシン(BN)様神経ペプチド受容体欠損マウスについて、各マウスの行動解析に適した解析方針を設定し、多様な実験課題を用いた行動解析を行ってきた。また、これらの諸実験結果から、3種類のボンベシン(BN)様神経ペプチドの行動調節機能について議論を行ってきた。本章では、まずこれらの議論に基づいて3種のBN様神経ペプチドの行動調節機能について総括し、続いて本研究における研究成果の臨床的意義と今後の研究の展開について議論を行なう。そして最後に、生命科学における実験心理学の役割について筆者の見解を述べる。

### 第1節 BN様神経ペプチドによる行動調節機能の総括

本研究においては、ガストリン放出ペプチド受容体欠損マウス(GRP-R KO)・ボンベシン受容体サブタイプ3欠損マウス(BRS-3 KO)およびニューロメジンB受容体欠損マウス(NMB-R KO)という3系統の遺伝子組換え動物を用いて、BN様神経ペプチドの行動調節機能について実験的検討を行ってきた。各受容体の内在性のリガンドについては、ガストリン放出ペプチド(GRP)およびニューロメジンB(NMB)が知られている。この2種のBN様神経ペプチドは高い相同性を持ち、その濃度によっては親和性の低い他方の受容体にも結合し得ることが明らかにされている。BRS-3の内在性のリガンドは依然不明のままであるが、高濃度のGRPおよびボンベシン(BN)はある程度BRS-3に結合することが*in vitro*の実験から明らかにされている(21)。極めて類似した構造を持つ同族のペプチドが類似の行動調節機能を果たしているのか、あるいはそれぞれ固有の機能分化をしているのか、という点について明らかにすることは、単にBN様神経ペプチドの機能解析にとどまらず、既知・未知を問わず他の多様な神経ペプチド/ホルモンの機能解析における一つの指針を提供するものといえる。そこで本研究においては3系統の遺伝子組換え動物について、まず行動薬理学および遺伝子組換え動物の行動解析において比較的一般的に利用されている観察課題および行動課題を用いて、一般的行動特性の分析を行なった。一般的行動特性の分析から明らかにされた行動変化は以下のとおりである。すなわち、GRP-R KOマウスにおいては自発活動性の亢進であり、BRS-3 KOマウスにおいては過食およびそれに伴う軽度の肥満であった。これに対して、NMB-R KOマウスにおいては、一般的行動

特性の分析からは明瞭な行動変化を見出すことができなかった。このような一般的行動特性の分析結果は、すでにこの時点で3種のBN様神経ペプチドの行動調節機能に独自の機能分化が生じていることを示唆している。そこで本研究では敢えて3系統の遺伝子組換え動物について、同一条件・同一課題を用いた横断的解析の方略をとらず、各動物に別個の解析方略を用いることにした。これらの方略は、GRP-R KO マウスについては社会的行動の解析、BRS-3 KO マウスについては味覚関連行動および飼育条件の効果の解析、そしてNMB-R KO マウスについては各種負荷課題の効果の検討であった。このような個別の行動解析方略を用いることによって、各BN様神経ペプチド受容体欠損マウスについてそれぞれ極めて独自の行動変化を見出すことに成功した。各マウスの行動変化についてはTable 5-1.にまとめた。以下、各章における実験について総括する。

第2章ではGRP-R KO マウスについて、先住者-侵入者法による社会的相互作用の実験的検討から、非攻撃性社会行動の亢進を見出した。続いて、刺激誘発性闘争テストによってGRP-Rの欠損が攻撃性社会行動を誘発しないことを確認した。また、非攻撃性社会行動については、嗅覚刺激および標的オブジェクトの導入による自発活動性の変化に関する実験的検討、防御的穴埋め行動を指標とした防御行動の検討および明暗箱による不安関連反応に関する実験的検討を行なった。これらの実験結果から、GRP-R KO マウスにおける非攻撃性社会行動の亢進が、他個体の発する嗅覚性のストレスシグナルに対する反応性の変化および不安性の低下によって生じている可能性を明らかにした。

第3章ではBRS-3 KO マウスについて、まず味覚選好性テストおよび条件性味覚嫌悪学習による味覚反応性の検討を行なった。その結果、甘味に対する嗜好性および苦味に対する嫌悪性の亢進、および条件性味覚嫌悪学習の増強を見出した。次に、飼育条件と過食・肥満の関係に関する実験的検討から、野生型マウスとは対照的にBRS-3 KO マウスにおいては、個別飼育条件において摂食量が多く、また体重増加も著しいことを見出した。続いて、自発活動量の測定および先住者-侵入者法による社会的相互作用の実験的検討から、個別飼育のBRS-3 KO マウスでは、野生型マウスに見られるような自発活動性の亢進が認められず、また社会的相互作用も低下することを見出した。これらの結果から、個別飼育のBRS-3 KO マウスの体重増加が、野生型マウスに見られる正常な個別飼育の効果の欠如によるものである可能性を明らかにした。

第4章ではNMB-R KO マウスについて、各種実験的負荷による行動変化に

Table 5-1. Summary of behavioral attributes in BN-like peptide receptor KO mice

Genotype	Behavioral attributes	Results
GRP-R KO	spontaneous activity	↑
	social responses	↑
	anxiety related responses	↓
BRS-3 KO	feeding behavior	↑
	response to taste stimuli	↑
	effects of social-isolation	— or ↓
NMB-R KO	response to stress stimuli	↑

Notes: ↑ :increased; ↓ : decreased; —: unaffected

ついて検討した。食物剥奪下における餌探索行動テストにおいては、NMB-R KO マウスの探索所要時間が長いことおよび探索時の常同行動が増加することを見出した。また、同様に食物剥奪下における T 型迷路学習課題において、NMB-R KO マウスが自発的交替反応の欠如あるいは反応固定によるものとみられる野生型マウスとは異なる反応パターンを示し、さらに訓練後の自発活動性も変化することを見出した。続く強制水泳テストにおいては個別飼育の NMB-R KO マウスにおいて不動時間の有意な延長を見出した。また、育児中の雌の NMB-R KO マウスが、仔引き行動テストにおいて野生型マウスとは異なる反応パターンを示すこと、およびその後の明暗箱テストにおいても同様の傾向が持続することを見出した。続いて、拘束ストレス負荷時のマウスについて内分泌学および免疫組織化学的検討を行なった結果、NMB-R KO マウスにおいて、コルチコステロン濃度の上昇および縫線核におけるセロトニン抗体反応の亢進を見出した。これらの結果から、NMB-R KO マウスにおける行動変化がセロトニンニューロン活動の変化に基づくストレス反応性の変化によるものである可能性を明らかにした。

このように、3 系統の BN 様神経ペプチドによる行動調節機能は少なくとも表出された行動変化の側面においては、高度に特殊化されたものであるといえることができる。しかし、これらの諸行動変化の心理-行動学的な基盤に着目するならば、BN 様神経ペプチドの行動調節機能は、情動機能の多面的調節と言い換えることが可能である。情動機能とは主として辺縁系を主体とした神経ネットワーク活動に基づく行動学的概念であり、重要な行動調節基盤である。各 BN 様神経ペプチド受容体はこの系に広くかつ高密度に分布している。ボンベシンが元来カエルの皮膚から単離されてきたことから明らかなように、BN 様神経ペプチドの系統発達の起源は古く、脳-神経系の進化の過程を考えた場合、新皮質の発達以前に起源をもつものと考えられる。このような脳-神経系の系統発達の視点からも、BN 様神経ペプチドの行動調節機能を主として旧皮質すなわち大脳辺縁系における機能と考えることは妥当なことであろう。これらの点から、BN 様神経ペプチドの行動調節機能は辺縁系における情動性の調節機能と結論することができる。

## 第2節 本研究における研究成果の臨床的意義と今後の研究の展開

### 1. 研究成果の臨床的意義

第1章で述べたとおり、BN様神経ペプチドの行動調節機能の解析は、脳-神経系の行動調節機構の解明のみならず、脳-神経疾患の治療法の開発という側面も併せ持つものである。本項では、本研究における成果の臨床的意義について議論を行なう。

GRP-R KO マウスにおける主要な行動変化は、自発活動性の亢進・非攻撃性社会行動の亢進および不安性の低下であった。これらの諸行動変化は、臨床的見地において少なからず重要な意義を持つものと考えられる。なぜならば、GRP-R KO マウスに認められたこれらの諸行動変化は、小児精神科臨床においてしばしば報告される「初対面の人に対して不安を示さず、やたらとなれなれしい子供」の症例に酷似しているからである。従来このような症例は、微細脳損傷症候群(minimal brain dysfunction syndrome: MBD, 173)と総称される精神疾患群の一症例と考えられてきた。MBDは診断的地位を持つものの、多分に仮説的要素を含むものであり、言わば複雑な心理学的症状あるいは現象をより単純な生理学的変異によって説明しようとする一つのモデルと考えられる。MBDをはじめとして、多動あるいは自閉などを伴う諸精神疾患群の研究において、GRP-R KO マウスは新しいモデル実験系を提供するものと期待される。

一方、BRS-3 KO マウスは過食および肥満の程度がヒトにおける視床下部性の肥満症と良く類似しているために、過食・肥満など摂食障害について重要なモデル実験系を提供することが期待される。BRS-3 KO マウスについて、本研究では味覚反応性および味覚学習の異常と社会的刺激剥奪の効果の減衰・欠如を見出した。これらはBRS-3 KO マウスにおける過食および肥満から予想される行動変化を実験的に確認したものと見える。これらBRS-3 KO マウスにおける行動上の変化を特定したことは、過食および肥満に関する行動療法の展開に少なからず貢献し得るものと考えられる。なぜならば、ヒトにおける摂食障害の事例において、偏食および社会性の変化が少なからず報告されているからである(93,174)。過食・肥満と食物選好性の変化と社会性の変化の間の因果関係については未だ明らかではないが、これらの関係を明らかにしていくことは、摂食障害の治療法および予防法の開発上重要な意義をもつものと考えられる。もちろんBRS-3 KO マウスの行動解析の臨床的意義は、上述のような

行動療法的側面に限定されるものではない。BRS-3 KO マウスが各種肥満薬(肥満改善薬、いわゆる「痩せ薬」)の開発モデルとして重要であることは言うまでもないことであり、すでに BRS-3 KO マウスをモデル実験系とした肥満改善薬の開発が始められている。

NMB-R KO マウスも他の BN 様神経ペプチド受容体欠損マウスと同様に、重要な臨床的意義を持つと考えられる。有効なストレス・コーピング(stress coping)法の開発は現代社会において急務とされており、ストレスに対する反応性についてはさまざまな観点から研究が行なわれている(142,143)。NMB-R KO マウスの行動解析から得られた結果は、ストレス研究においても重要な知見となり得るものであり、新たな研究の契機を提示するものと考えられる。その一つとして、ストレス耐性に関する発達的研究があげられる。近年、乳幼児期における母子関係、すなわち母親による乳児に対する働きかけが、成長後のストレス耐性に重大な影響を及ぼすことが明らかにされてきた(175)。乳幼児期における緊密な母子関係によって、成長後のストレス侵襲に対する強い抵抗力を獲得する。これは乳児期における緊密な身体接触によって、発達途上の脳が高濃度の糖質コルチコイドにさらされる事態から守られることによるものとされている。個体発達の初期段階において、成体の NMB-R KO マウスにおけるストレス負荷に対する過剰反応性を抑制する要因を探ることは、NMB の行動調節機能およびストレス刺激に対する生体の反応についてさらなる知見をもたらすばかりでなく、ストレスによる各種障害の有効な治療法の確立に貢献するであろう。

## 2. 今後の研究の展開

すでに述べてきたとおり、現時点で 3 系統の BN 様神経ペプチド受容体欠損マウスにおける解析の進捗は必ずしも同等ではない。したがって、今後各マウスについて個別の解析を進展させる必要があることは言うまでもないことである。しかし、BN 様神経ペプチド受容体欠損マウスの行動解析は個別の動物の研究にとどまるべきではない。なぜならば、個別の動物における研究においては、BN 様神経ペプチド間の相互作用について十分な検討を行なうことが困難だからである。そこで、今後の研究においてはさらに少なくとも以下の 2 通りの研究アプローチが必要とされる。

第一に、3 系統のマウスに対して同一条件・同一課題を用いて行動変化を探る横断的研究があげられる。本研究では、各遺伝子組換えマウスにおける行動変異の特定を主たる目的としたために、敢えて横断的研究の方法を用いなかった。したがって、

Table 5-2. Categorization of behavioral attributes in BN-like peptide receptor KO mice

Category (Sub-category)	GRP-R KO	BRS-3 KO	NMB-R KO
Spontaneous activity			
naïve or without			
experimental operations	↑	—	—
under social deprivation	↑	↓ or —	—(↓)* <sup>1</sup>
Social responses			
under social deprivation	↑	↓	—
Anxiety related behaviors			
without experimental operations	↓	—	—
with experimental operations	↓	?	↑
Responses to stressful conditions			
Forced Swimming Test	—	—	+++

Notes. ↑ : increased; ↓ : decreased; — : unaffected; + : affected partially; + + + : strongly affected; ? : no observations or experiments.

\*1: Spontaneous activity was not suppressed only under social deprivation condition, but suppressed after food exploration test or T-maze learning test under food deprivation condition.

すべての行動について 3 系統のマウスを比較することはできないが、比較検討可能な行動については Table 5-2. にまとめた。3 系統のマウスの比較研究は、今後展開される行動薬理的解析ならびに生化学・分子生物学的解析において重要な地位を占めるものと考えられる。

次に第二のアプローチとして、複数の BN 様神経ペプチド受容体を同時に欠損する動物を用いた研究アプローチがあげられる。2 種あるいは 3 種類の受容体を同時に欠損したマウス(double knockout mouse, triple knockout mouse)と単独の KO マウスの行動を比較することによって、各 BN 様神経ペプチドの機能補完や相互作用など多岐にわたる重要な知見が得られるものと考えられる。

これまで述べてきたように、BN 様神経ペプチド受容体欠損マウスの行動解析は今まさに始まったばかりである。上述した 2 種のアプローチ、すなわち横断的研究と複数の受容体を同時に欠損するマウスを用いた解析は、ともに多大な時間と労力を必要とするものである。今後の研究の発展において、各関連学問領域との密接な関係が極めて重要な課題といえる。

### 第 3 節 生命科学における実験心理学の役割—本研究の結語にかえて

誕生から 1 世紀あまりを経た実験心理学は、現在関連諸科学との連携において多様な展開を見せている。電算機技術の進歩にともなう認知科学および情報科学との連携は、人工知能・通信および情報処理研究、さらに脳機能イメージングによるヒトの脳機能研究の領域において目覚ましい貢献をみせている(176,177)。また、経済学・経営学等との連携は、リスクファクターの分析などにおいて重要な社会科学的貢献をしている(178)。このように実験心理学が多面的な展開を見せている状況を顧みると、長年実験心理学とりわけ動物心理学に従事してきた筆者にとって、実験心理学特に動物心理学が関連諸科学との連携においていかなる貢献が可能であるのかという問題について改めて考察する必要性を痛感させられる。そこで本節では本研究の結語にかえて、生命科学における実験心理学の役割について筆者の見解を述べることにする。

近年における行動科学の進歩は目覚ましいものがある。各種精神作動薬物の開発による行動薬理学的研究、また遺伝子工学の発展にともなう人為的に作製された遺伝子組換え動物による遺伝子の機能解析などにおいて、動物個体を被験体とした行動実験が極めて盛んに行なわれるようになってきた。なかでも、マウスやラットといった小

型の哺乳動物は、施設負担が少なく繁殖飼育が比較的容易であること、遺伝子レベルにおいて比較的ヒトに近いことなど、諸般の理由から行動実験において最も頻繁に用いられる動物種である。マウスおよびラットを用いた行動実験は、装置および実験技法そして行動の測定指標の開発と設定において、実験心理学の研究成果に負うところが大きい。行動薬理学などで頻繁に利用されている各種実験装置、例えばオペラント実験装置(スキナー箱)や各種迷路等は、ほぼ全てが行動主義全盛時代の実験心理学的研究において考案・開発されてきたものといっても過言ではない。また、薬理効果・脳破壊の効果などの各種評価には欠くことのできない、動物の安定した行動の形成や、装置・環境その他の刺激に準拠した特殊な行動(反応)パターンに関する行動目録(behavior indices)の作成などもまた、実験心理学的研究の成果である。このような行動科学における実験心理学の歴史的貢献を考慮するならば、現在の生命科学の飛躍的な発展期において、実験心理学は更なる積極的な行動科学的貢献が可能はずである。

実験心理学の一領域である生理心理学においては、早くから心理学的事象と生理学的メカニズムの対応の重要性に注目し、これらの関係について多くの知見を見出してきた。我が国においては二木宏明がサルの前頭連合野における単一ニューロン活動に関する長年の電気生理学的研究によって、記憶・学習といった心理学的事象の神経科学的メカニズムについて数多くの成果をあげている(179)。また近年では、非受容体性タイロシン転換酵素(non-receptor-type tyrosine kinase)である *fyn* を欠損した遺伝子組換えマウスの機能解析においても重要な成果をあげている(180,181)。神経科学および生命科学における二木の成功は、今後実験心理学が生命科学においていかなる貢献をし得るのかという点について、いくつかの示唆を与えるものである。

その一つは、行動実験における課題および行動解析実験系の開発である。遺伝子組換え動物のように行動変異について全く未知の対象については、極めて探索的な解析が必要とされる。したがって、既存の単一課題を用いた実験系は必ずしも有効な解析手段とはなり得ない。基本的な行動観察から得られた漠然とした情報から、確たる変異を明らかにするためには、対象に適した新規課題の開発および既存の諸課題を一つの実験系として再構成する必要がある。

次に、次段階の解析の方向性を示すデータの収集と提示である。従来、実験心理学的研究においては、データの提示および議論が心理学の領域内に限定されることが多く、それゆえに近隣諸科学における研究にその成果が反映されにくい面があった。前述のように、生理心理学的研究が他領域の研究に比較的受け入れられやすかった

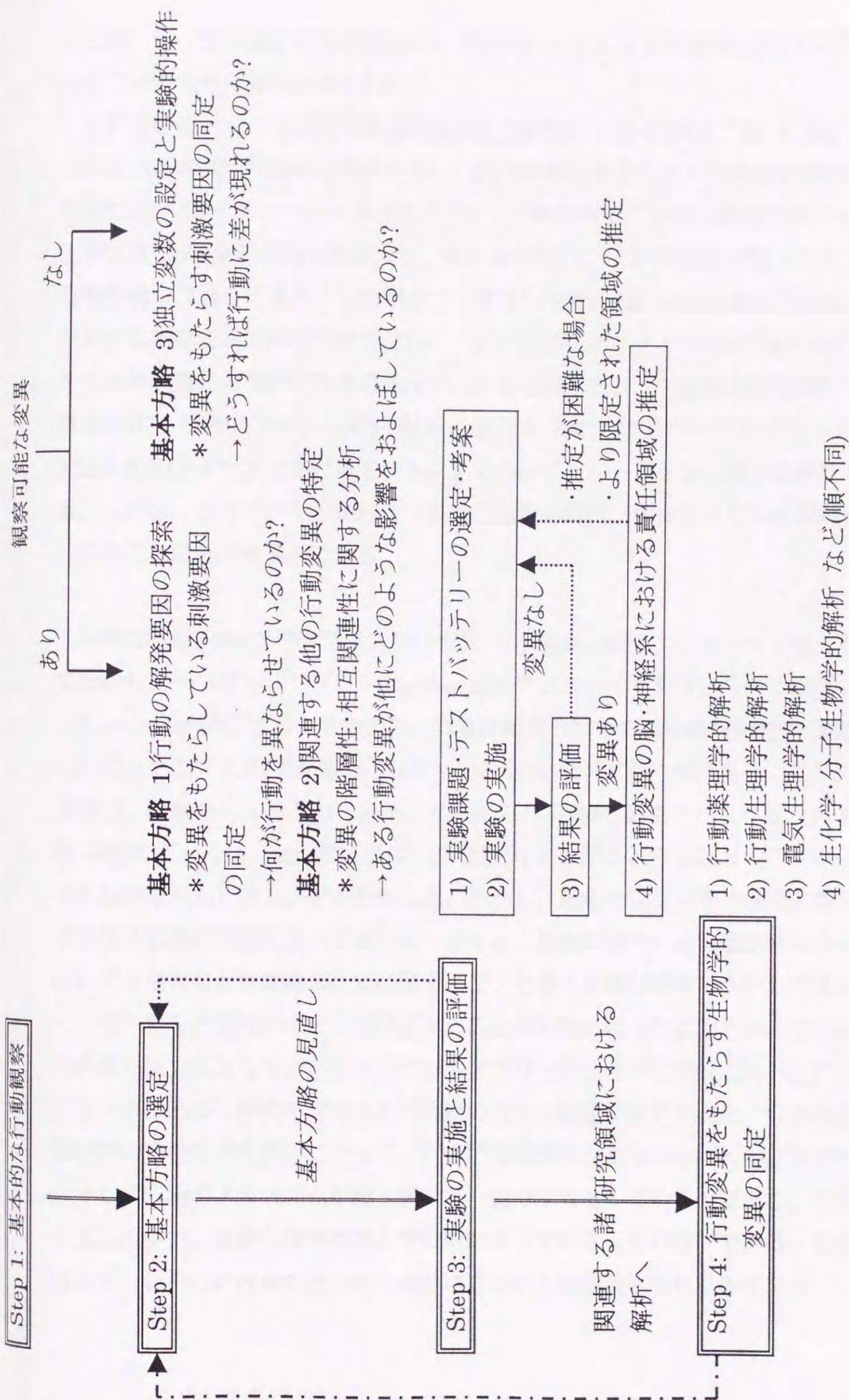


Fig. 5-1 探索的行動解析の方略: 縦の矢印は実験心理学的解析を示している。上記のような行動解析から遺伝子組換え動物の行動変異について明らかになるとともに、関連する諸研究領域における研究の手がかりを示すことが、生命科学における実験心理学の重要な役割であると考えられる。

ことは、データの提示および議論が心理学内にとどまらず他領域に開かれたものであったことが大きな要因と考えられる。

これらの点から、本研究で筆者が用いた行動解析の基本方略について Fig. 5-1 にまとめた。筆者は行動解析が専門であり、国立精神神経センター神経研究所疾病研究第四部における、「ボンベシン様神経ペプチドの機能解析」という研究プロジェクト(主任研究員 和田圭司 部長)において、BN 様神経ペプチド受容体欠損マウスを用いた行動解析を担当してきた。したがって、筆者の研究課題は単に各遺伝子組換えマウスにおける行動変異の探索だけではなく、BN 様神経ペプチドの生理学的・生化学的・分子生物学的機能の解析に利用可能なデータを収集することも重要な研究課題である。残念ながら現時点では、次段の解析に移行する有効な手がかりを得られたものは NMB-R KO マウスにおけるセロトニン系のレギュレーションに関する解析だけである。しかし、少なくとも行動解析-実験心理学的研究が多少なりとも生命科学に貢献し得たことは確かなことである。

生体の機能、特に行動に関しては大別して2通りの研究アプローチが考えられる。すなわち、一つはトップダウン(top-down)的アプローチであり、今一つはボトムアップ(bottom-up)的アプローチである。前者は個体としての動物の行動観察・実験からその内部メカニズムを推測・検証していく *in vivo* なアプローチである。これに対して後者は、細胞レベルあるいは分子レベルにおける実験・観察からより高次の機能を推測・検証していく *in vitro* なアプローチである。長い間これら2通りのアプローチは、その接点を見出すことができなかった。しかし、近年の遺伝子操作技術の確立と遺伝子組換え動物の出現によって状況は一変した。生命の根元である遺伝情報から、個体としての個性豊かな動物の行動に至るまで、大きく多様な研究システムではあるが、一つの一貫した研究体系として確立することが可能になったのである。このような研究体系の確立によって、トップダウン的アプローチに基づく研究とボトムアップ的アプローチに基づく研究の間に初めて共通の目的と課題が設定された。今まさに各研究領域間の密接な相互協力によって、従来では想像もつかなかった壮大なスケールで生体そして行動のメカニズムが解き明かされ始めようとしているのである。そのダイナミズムの中で、実験心理学の果たす役割は決して小さくないはずである。そのためにはまず、われわれ自身がより広い視野に立つことが必要とされるのである。

## 生命科学における実験心理学の役割

---

### 実験心理学の多様な展開

- ・情報科学との連携(人工知能・通信・情報処理研究等)
- ・認知科学との連携(脳機能イメージング等)
- ・経済学や経営学との連携(リスクファクターの分析等)

#### 1) 生命科学における貢献とは？

- ・行動解析実験系の開発
- ・次段階の解析の方向性の提示等

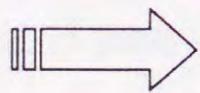
#### 2) そのために必要なことは？

- ・心理学の領域内にとどまらない
- 「開かれた」議論とデータの提示

#### 3) 生命科学との連携がもたらすものは？

- ・旧来の還元論とは異なる、

「実在としての心」に至る道筋



生物学的基盤に立脚した「心」の解明には、より広い視野に立った、関連諸科学との積極的な連携が必要である。

---

## 【補足】 行動解析の技法

補足では本文中で詳しく取り上げなかった諸実験の手続きをまとめる。本文中に記載のない実験および一般的行動特性の分析について、特別な場合を除いては、基本的に陰性実験のため、被験体・結果およびその他については記載しない。被験体については、手続きに記載のない場合には、自由摂食・自由飲水条件で集団飼育中のマウスを用いて実験を行なった。

ここで紹介する行動解析の各技法は、遺伝子組換えマウスの行動解析をはじめとして、その他行動薬理学的研究などマウスおよびラットの行動実験における基本的実験方法である。本文に記載の各実験手法とともに、今後の参考になれば、筆者にとって望外の喜びである。

### 1. 基本的反射および驚愕反応の実験手続き

#### 1) tail-flick test : 痛覚および痛覚反射の測定実験

**装置** : tail-flick 用痛覚刺激装置 (UGO BASIL Biological Research Apparatus 21025 (COMERIO-VARESE, Italy)、およびダンボール製の簡易暗箱。

**手続き** : 手続きは Nishi ら(182)に準拠し、若干の変更を加えた。装置は簡易暗箱の中に入れて使用した。マウスを痛覚刺激装置上に保定し、尻尾の先端から約 2 cm の部位に痛覚刺激用の熱線があたるようにマウスを配置した。痛覚刺激提示から、マウスが尻尾をはじく反射(tail-flick reflex)を示すまでの時間を計測した。なお、約 10 分間の試行間隔で 5~6 回の試行を反復した。

#### 2) cliff drop avoidance test (断崖反射テスト) : 覚醒水準および恐怖性の測定実験

**装置** : 円筒形のプラスチック製プラットフォーム (直径 50 mm、高さ 40 cm)。

**手続き** : 実験手続きは Fox (183)の方法に準拠し、若干の変更を加えた。マウスをプラットフォーム上に配置し、1 分間マウスの反応を観察した。マウスがプラットフォームから転落するまでの時間を測定した。また、マウスがプラットフォームから前

後の脚をはずす反応数を計測した。

### 3) prepulse inhibition test : 驚愕反射(反応)の測定実験

**装置:** 驚愕反射測定装置(SR-LAB, San Diego Instruments, Sa Diego, CA, U.S.A.)4台および防音箱。

**手続き:** 手続きは Zhang ら(54)に従い、若干の変更を加えた。マウスを測定用チャンバーに入れ、測定環境に10分間馴化した。馴化試行終了後、まず P-alone (120 dB 20 msec の pulse)を30秒間隔で3回与えた後、P-alone、PP 70dB & P(70dB 20 msec の prepulse 開始 100 msec 後に 120dB 20 msec の pulse を与える条件)、PP 80dB & P(80dB 20 msec の prepulse 開始 100 msec 後に 120dB 20 msec の pulse を与える条件)の3条件の試行を各10試行ずつ合計30試行をランダムな順序で与えた。なお、試行間間隔は20~60秒でランダムとした。Pulse 開始より100 msec 間における最大値を startle amplitude とした。最初の3回の P-alone の値を除いて、3種の試行それぞれ10回の startle amplitude の平均値を用い、以下の式によって prepulse 70 dB および prepulse 80 dB それぞれにおける % prepulse inhibition (PPI)を算出した。測定用チャンバーの内部には常に 65dB の white noise を流した。また、pulse および prepulse には white noise を用いた。

$$\% \text{ PPI} = (1 - \text{startle amplitude in PP \& P} / \text{startle amplitude in P-alone}) \times 100$$

## 2. 自発活動性の実験

### 4) spontaneous activity in home cage : 飼育ケージ内における自発活動性の測定実験

**装置:** マウスおよびラット用の自発運動測定装置(SCANET SV-10、東洋産業株式会社、富山)。

**手続き:** 透明のプラスチック製の飼育ケージ(30×20×13 cm)にマウスを1匹ずつ入れ、60分間の自発活動量を測定した。11、13、17週齢の各時点でそれぞれ2日間連続して自発活動量の測定を行なった。17週齢2日目の測定では開始1時間後に照

明を消し、部屋を完全に暗くした状態で更に1時間延長して測定を行なった。

5) open field test : オープンフィールドにおける自発活動の測定

**装置** : 木製のオープンフィールド装置(70×70×20 cm)。床面に黒線で10×10 cmの格子を書いた白色ビニールコーティング紙を敷いて観察を行なった。

**手続き** : マウスをオープンフィールドの一つの角にフィールドの外向きに置き、マウスの移動活動を5分間測定した。移動活動は床面に書かれた格子を横切った回数とした。また、立ち上がり反応・糞の数<sup>\*1</sup>および尿の数もあわせて測定した。

6) exploratory response in radial maze : 8枝放射状迷路探索テスト<sup>\*2</sup>

**装置** : 塩化ビニール製の8枝放射状迷路(腕の長さ 305 mm、幅 90 mm、高さ 20 mm、中央のプラットフォームは直径約 20 cm の正八角形であった)。

**手続き** : 自由摂食・自由飲水で飼育中のマウスを用いて実験を行なった。マウスを中央のプラットフォームに置いた時点を試行開始とし、マウスの行動を5分間観察した。なお、各腕には餌などの報酬は置かなかった。測定の指標は、マウスが進入した総腕数、進入した腕の位置および順序とした。

---

\*1. 糞の数 : オープンフィールドテストにおける糞の数はマウスの情動性を評価する一つの重要な指標として扱われてきた(118)。脱糞反応を情動性の指標として扱うことには異論もあるが(143)、環境に対する馴化の進展によって脱糞反応が漸次減少することなどから、新奇場面における被験体の心理的反応の評価法として有効な指標であると考えられる。

\*2. 放射状迷路 : 代表的な放射状迷路は8枝あるいは12枝のものがあげられる。後述の Morris 型水迷路と並んで、空間記憶実験の代表的実験法である(30)。本研究では、8枝放射状迷路を空間探索課題として利用したが、通常は前述のとおり記憶・学習課題として利用されている。空間記憶・学習実験としての手法は Roulet ら(184)等を参照のこと。

### 3. 運動能力および運動調節能力の実験

#### 7) motor coordination ability test : ローターロッド(回転棒: rota-rod)試験

**装置** : ローターロッド・トレッドミル実験装置(KN-75、夏目製作所、東京)。

**手続き** : 手続きは Jiang ら(55)に準拠し、適宜変更を加えた。はじめに制止した棒の上にマウスをのせ、120 秒間落下をしないかどうかを 4 試行観察した。次に、マウスを棒にのせた後、動物の頭と逆の方向に棒を毎分 5 回転で回転させ、落下するまでの時間を 4 試行観察した。なお、1 試行は 120 秒を限度とし、落下しなかった場合は 120 秒で試行終了とした。その後、さらに回転数を毎分 10 回転に上げて、同様の観察を 4 試行繰り返した。それぞれの試行における試行間隔は 5~15 分以上であった。

### 4. 摂食および飲水行動の実験

#### 8) 摂食量および飲水量の測定

**被験体** : 被験体は成長の著しい時期の個体を避け、成長の安定・鈍化した生後 25~30 週齢程度の NMB-R KO および GRP-R KO マウスを用いた。マウスは測定開始の少なくとも 1 週間以上前から個別飼育条件で飼育を行ない、個別飼育に十分に馴化しておいた。

**装置** : ステンレス製のボール入りの飲み口をつけたプラスチック製チューブ(15 ml)。

**手続き** : 測定はすべて飼育ケージ内で行なった。毎日定刻(AM10:00-11:00)に餌および飲料水を与え、24 時間当たりの摂取量を測定した。餌および飲料水の消費量は 1/100 g 単位で測定した。なお、目視可能な餌の食べ残しがケージ内にある場合には、その重量を計測して、摂取量から差し引いた。摂食量および飲水量の測定は 5~10 日程度行い、その間の平均摂取量を求めた。

9) bombesin-induced feeding suppression : ボンベシン誘導性摂食抑制テスト

**被験体** : 雌の NMB-R KO マウス 6 匹、および同腹の雌の野生型マウス 9 匹を用いた。マウスは C57BL/6 系統のマウスに戻し交配した第 5・6 世代のマウスで世代の同じもの同士を掛け合わせたものを用いた。実験開始時の月齢は 4~7 ヶ月であった。

**装置・材料** : ステンレス製のボール入りの飲み口をつけたプラスチック製チューブ(15 ml)。餌として 12.5 % (w/v) のブドウ糖水溶液(約 0.5 kcal/ml)を用いた。

**手続き** : Humpton ら(51)の方法に従った。被験体は 1 週間以上個別飼育条件で飼育し、実験時以外は摂食・飲水ともに自由とした。馴化試行ではマウスに生理食塩水を腹腔内投与し(1 ml/ 100 g body weight)、投与直後にブドウ糖水溶液を 1 時間提示してその摂取量を測定した。なお、馴化試行は各試行 24 時間以上の間隔をあけて 5 試行行なった。馴化試行終了後、ブドウ糖水溶液の摂取量に偏りがないように、それぞれの遺伝子型のマウスを 2 群に分配した。それぞれのグループのマウスは、NMB(32 nmol/kg, 1 ml/ 100 g body weight)あるいは生理食塩水の腹腔内投与直後にブドウ糖水溶液を 1 時間提示しその摂取量を測定した。少なくとも 24 時間以上の間隔をあけて、投与する薬物を入れ替えて再度測定を行なった。この実験を 2 回繰り返した後、NMB の代わりに GRP(32 nmol/kg, 1 ml/ 100 g body weight)の腹腔内投与による同様の実験を行なった。GRP 投与による測定も 2 回繰り返した。ブドウ糖水溶液の摂取量は、測定開始の 30 分後および 60 分後に行なった。

5. 嗅覚関連行動の実験

10) place preference test with self-odor : 場所選好テスト

**被験体** : 被験体は個別飼育中のものを用いた。

**装置・材料** : 透明なプラスチック製の水槽(38×20×29.5 cm)。水槽は中央部に取り付けた透明プラスチック版の仕切りで 2 部屋に区分されており、仕切りの一端に通路(5×5 cm)が設けられている。嗅覚刺激として各マウスが 1 週間使用した床敷および新しい床敷を用いた。使用済みの床敷を敷いた部屋を F (familiar)区分、新しい

床敷を敷いた部屋を N(new)区分とした。

**手続き**：手続きは八木ら(185)に準じ、若干の変更を加えた。

N-F 試行：マウスを新しい床敷を敷いた部屋に入れ、5 分間マウスの行動を観察した。

F-N 試行：マウスを使用後の床敷を敷いた部屋に入れ、5 分間マウスの行動を観察した。なお、マウスは装置内で通路と対角線上の角に頭部を向けて配置した。行動の観察指標は、①N-F あるいは F-N 移動潜時、②通路を横切った回数、および③F 区分に滞在した時間とした。

#### 11) conditioned odor aversion test : 条件性嗅覚嫌悪学習

**被験体**：被験体は個別飼育中のマウスを用いた。

**装置**：ステンレス製のボール入りの飲み口をつけたプラスチック製チューブ(15 ml)。条件刺激としてアーモンド・エッセンス水溶液(0.5% w/v)を用いた。また無条件刺激として塩化リチウム水溶液(0.3 M, 2% volume of body weight)あるいは生理食塩水(2% volume of body weight)の腹腔内投与を行なった。

**手続き**：手続きは山田ら(139)に準じ、若干の変更を加えた。マウスを 1 日 30 分間だけ飲水を許す制限飲水下に置き、7 日間の飲水訓練を行なった。飲水訓練終了後、飲水量に偏りがないようにマウスを 2 群に分配した。条件づけ試行では、マウスに 30 分間条件刺激として嗅覚刺激水溶液(アーモンド・エッセンス水溶液)を提示した。条件刺激の提示終了直後に塩化リチウムあるいは生理食塩水の腹腔内投与を行なった。条件づけの翌日にテストを行なった。テストでは嗅覚刺激水溶液を 30 分間提示して、その摂取量を測定した。

#### 12) odor discrimination test : 嗅覚弁別テスト

**被験体**：被験体は個別飼育中のものを用いた。

**装置・材料**：ステンレス製のボール入りの飲み口をつけたプラスチック製チューブ(15 ml)。嗅覚刺激としてアーモンド・エッセンスおよびバニラ・エッセンス水溶液(各 0.1%)

を用いた。また、嫌悪刺激として硫酸キニーネ水溶液を嗅覚刺激水溶液に添加した。

**手続き**：手続きは Darling ら(186)に準じ、必要な変更を加えた。セッションは 2 試行の訓練試行と 1 試行のテスト試行で構成された。訓練試行では、マウスにアーモンドあるいはバニラ・エッセンス水溶液を 15 分ずつ継時的に提示した。バニラあるいはアーモンドのいずれかの水溶液には、嫌悪刺激としてキニーネ硫酸塩を加えてある。翌日に嗅覚刺激水溶液の提示順序を反転して、再度訓練試行を行なった。2 日間の訓練試行後、テスト試行を行なった。テスト試行では、キニーネ硫酸塩を加えずに、2 種類の嗅覚刺激水溶液を同時に提示し、それぞれの摂取量を 30 分間測定した。なお、2 種類の嗅覚刺激水溶液の位置は実験開始の 15 分後に入れ替えた。実験は 3 セッション繰り返した。

## 6. 記憶・学習テスト

### 13) operant conditioning : 正強化オペラント条件づけ学習

**被験体**：雌の NMB-R KO マウス 7 匹、および同腹の雌の野生型マウス 5 匹を用いた。マウスは C57BL/6 系統のマウスに戻し交配した第 4 世代(F4)同士を掛け合わせたものを用いた。マウスは個別飼育条件におき、一日当たり体重の 10% だけ餌を与える制限摂食条件で飼育し、体重を制限摂食開始時の約 80~85% の水準に維持した。なお、飲水は実験中を除いて自由とした。

**装置・材料**：マウス用オペラント・チェンバー (ニューロサイエンス、東京)を用いた。オペラント・チェンバーには赤外線ビーム式のスイッチのついた直径 20 mm の穴(nose hole)がつけられている。報酬としてマウス用のペレット餌(20 mg)を用いた。

**手続き**：マウスをオペラント・チェンバーに入れ、5 分間の nose poke 訓練を行なった。マウスが穴に鼻先を入れる行動(nose poke behavior)を強化対象反応とし、この行動が生じた場合、自動的にペレット餌を 1 個報酬として与えた。訓練はまず、nose poke の反応形成(shaping)として、nose hole にペレット餌を置いた状態でマウスに装置内の探索行動を行なわせた。マウスが nose hole 内の餌を食べるようになったら、毎回の nose poke 反応生起に対して報酬を与える連続強化スケジュール

(continuous reinforcement schedule: CRF)で訓練を行ない、反応頻度の増加に従って順次間欠強化スケジュール(fixed ratio schedule: FR 2 to FR 4; FR n: n回の反応に対して1回の強化-報酬-を与える間欠強化スケジュール)に移行して訓練を行なった。なお、あわせて訓練中のマウスの反応についての記録も行なった。

#### 14) water maze learning : モリス型水迷路テスト

**装置** : 内壁および底面を白色プラスチックで囲った円形のプール(直径 150 cm、壁高 44 cm)に水(23℃~25℃)を 31 cm の深さにはったものを使用した。プールの周りには視覚的手がかりとして多色のカーテン・ビデオカメラ・スタンドを配置した。プール内の位置は方位を用いて表し、大きく4つに分割した扇形の領域を、北東・北西・南東・南西と名づけた。

**手続き** : 手続きは Morris (57)の原法に準拠した。Hidden platform task の獲得試行では円形の透明アクリル製 platform (直径 12 cm)を南西の扇形領域の中央に水面下 1.0 cm に設置した。実験者はマウスを東西南北のいずれかの位置の壁面から壁に触れないように注意して入水し、platform に到達するまでの時間を最大 60 秒まで観察した。マウスが platform に 60 秒以内に到達した場合には、マウスを platform 上に 30 秒とどまらせた。一日に 4 試行を約 15 分の試行間隔で行い、4 試行を終えた後にマウスを飼育ケージに戻した。テストは 5 日間連続して行ない、2 日間の休みをはさんで更に 2 日間行なった。

#### 15) one-trial passive avoidance test : 一試行受動的回避学習

**装置** : 床に電撃提示用のステンレスグリッドのついた明暗箱、および電撃提示用のショッカー・スクランブラー (室町機械製 SGS-002)。明暗箱は明室が白色、暗室が黒色で、それぞれ透明および黒の天蓋でふたをして実験に用いた(第 2 章 実験 4 参照)。

**手続き** : 実験は①マウススクリーニングのための予備テスト、②条件づけ、③テストの 3 セッションを 3 日間で行った。

①予備テスト : マウスを明暗箱の明室に入れ、明室から暗室へ移動するまでの潜時

を測定した。明室 - 暗室の移動潜時が 50 秒以上の個体を実験から排除した。

②条件づけ：条件づけで試行では、マウスを明暗箱の明室に入れ、マウスが暗室に移動した直後にグリッドより電気ショックを与えた。なお、暗室への移動は、マウスの四肢すべてが暗室に入った時点とした。また、与えられた電気ショックは 0.3 mA (400 V) の交流電流を 0.2 秒ずつ 1 分間に 60 回の割合で 3 秒間提示した。

③テスト：マウスを明暗箱の明室に入れ、暗室へ移動するまでの潜時を測定した。なお、移動潜時の測定は最大 300 秒とし、300 秒を超えた個体のデータはすべて 300 秒と記録した。

なお、装置は各試行毎に 70% アルコールにて清掃した。

## 7. 不安関連行動の実験

### 16) elevated plus maze test : 高架式十字迷路

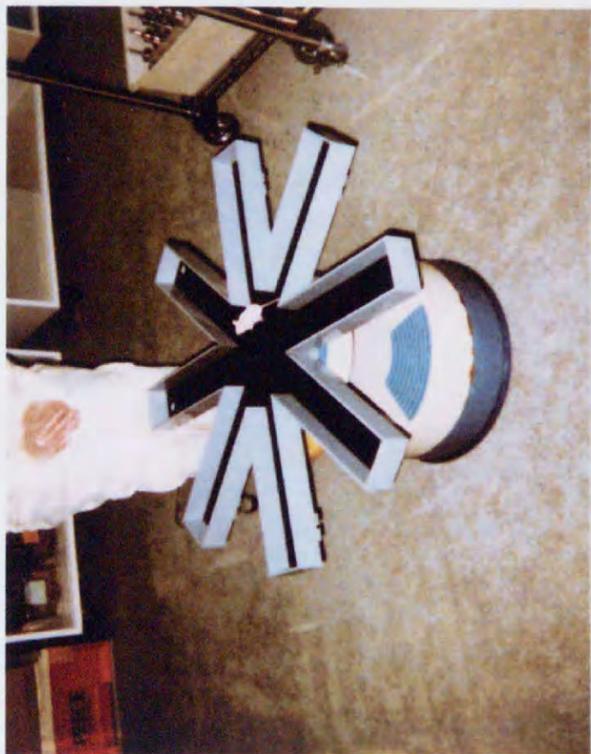
**装置**：中央に platform (5×5 cm) があり、そこから十字状に 4 本の腕 (30×5 cm) が出ている高架式の十字迷路。床からの高さは 45 cm であった。腕は交互に開放腕 (open arm) と閉鎖腕 (closed arm) があり、閉鎖腕には高さ 15 cm の透明プラスチック製の壁が設けられている。その他の素材は白色プラスチックであった。

**手続き**：手続きは Mamiya ら(56)に準じ、若干の変更を加えた。マウスを中央の platform 上に開放腕の方に頭部を向けて置き、立ち上がり回数・開放腕および閉鎖腕への進入回数、開放腕における滞在時間について 5 分間の観察を行なった。装置は一試行毎に水分を含ませたペーパータオルで清掃した。

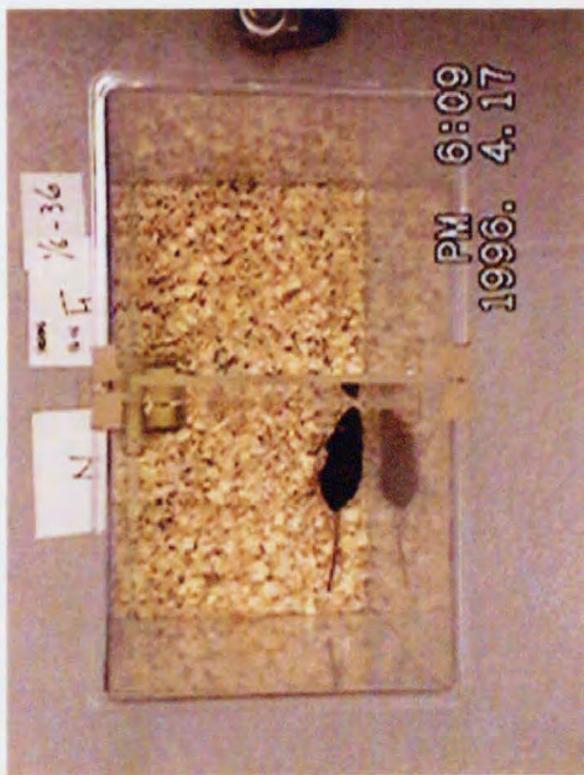
# Appendix:行動解析の技法 1



Open Field Test (p.159)



Exploratory response in radial maze (p.159)

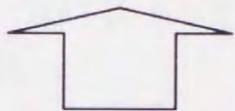


Place preference test with self-odor (p.161)



Nose poke behavior (p.163)

## Appendix: 行動解析の技法 2



### 防衛的覆い隠し行動テスト(Marble burying test)の概略

(A)マウス導入前の実験装置内。5 cm間隔でガラスビーズがならべられている。(B)マウスがガラスビーズに床敷をかぶせて覆い隠しているところ。本文 p.47-50参照。

【発表論文および発表予定論文】

本研究で取り上げた実験は、以下の論文に発表済みあるいは、投稿中および投稿準備中である。

1. Wada, E., Watase, K., Yamada, K., Ogura, H., Yamano, M., Inomata, Y., Eguchi, J., Yamamoto, K., Maeno, H., Mikoshiba, K., Ohki-Hamazaki, H., & Wada, K. Generation and Characterization of Mice Lacking Gastrin-Releasing Peptide Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239: 28-33 (1997)
2. Ohki-Hamazaki, H., Watase, K., Yamamoto, K., Ogura, H., Yamano, M., Yamada, K., Maeno, H., Imaki, J., Kikuyama, S., Wada, E., & Wada, K. Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity. *Nature* 390: 165-169 (1997)
3. Wada, K., Wada, E., Watase, K., Yamada, K., & Ohki-Hamazaki, H. Bombesin, obesity, and social behavior. *Mol. Psychiatry* 3: 204-206 (1998)
4. 山田一之・浜崎浩子・和田恵津子・関口正幸・和田圭司 嗅覚系におけるニューロメジン B 受容体(NMB-R)の機能について *日本味と匂い学会誌* 5: 561-564 (1998)
5. Ohki-Hamazaki, H., Sakai, Y., Kamata, K., Ogura, H., Okuyama, S., Watase, K., Yamada, K., & Wada, K. Functional properties of two bombesin-like peptide receptors revealed by the analysis of mice lacking neuromedin B receptor. *J. Neurosci.* 19: 948-954 (1999)
6. Yamada, K., Wada, E., Imaki, J., Ohki-Hamazaki, H., & Wada, K. Hyperresponsiveness to palatable and aversive taste stimuli in genetically obese (bombesin receptor subtype-3 deficient) mice. *Physiol. Behav.* 66: 863-867 (1999)
7. Yamada, K., Ohki-Hamazaki, H., & Wada, K. Isolation rearing enhanced hyperphagia and obesity in bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) deficient mice.

*Physiol. Behav.* in submission

8. Yamada, K., Yamano, M., Ogura, H., Okuyama, S., Wada, K., & Ohki-Hamazaki, H. Dysregulated stress response in mice with a target disruption of the neuromedin B receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* in submission
9. Yamada, K., Wada, E., & Wada, K. Abnormal environmental and social exploration increased social behaviors in gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) deficient mice. in preparation

【引用文献】

1. Menzel, E. W. Jr. Communication about the environment in a group of young chimpanzees. *Folia Primat.* 15:220-232 (1971)
2. Gardner, R. A., & Gardner, B. T. Teaching sign language to a chimpanzee. *Science*, 162:423-427 (1969)
3. Premack, D. Language in chimpanzee? *Science* 172:808-822 (1971)
4. Rumbaugh, D. M., Gill, T. V., & Glaserfeld, E. C. Reading and sentence completion by a chimpanzee (Pan). *Science* 182:731-733 (1973)
5. Harlow, H. F., & Harlow, M. K. Effects of various mother-infant relationships on rhesus monkey behaviors. In B. M. Foss (eds.) *Determinants of infant behavior*, IV. Methuen. pp.15-35 (1969)
6. Frisch, K. v. *Die Tanzsprache und Orientierung der Bienen*. Springer (1965)
7. Wenner, A. M., & Johnson, D. L. Honey bees: do they use direction and distance information provided by their dancers? *Science* 158:1072-1077 (1967)
8. ティンベルヘン, N. 著) 渡辺宗孝・日高敏隆・宇野弘之 訳) *動物のことば* みすず書房 (1955)
9. ローレンツ, K. 著) 日高敏隆 訳) *ソロモンの指輪* 早川書房 (1963)
10. Hess, E. H. The relationship between imprinting and motivation. *Nebraska symposium on motivation*. Univ. of Nebraska Press. pp.44-77 (1959)
11. Royce, J. R., Yeudall, L. T., & Poley, W. Diallel analysis of avoidance conditioning in inbred strains of mice. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 71:353-358 (1971)
12. Royce, J. R. Avoidance conditioning in nine strains of inbred mice using optimal stimulus parameters. *Behav. Genet.* 2:107-110 (1972)
13. Crawley, J. N., Belknap, J. K., Collins, A., Crabbe, J. C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R. J., Maxson, S. C., Miner, L. L., Silva, A. J.,

- Wehner, J. M., Wynshaw-Boris, A., & Paylor, R. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacol.* 132:107-124 (1997)
14. 牧野順四郎・白崎博長・関口茂久 Open-field behavior に関する行動遺伝学的研究:主として照明条件と発達効果について. 滋賀大学教育学部紀要 21:49-60 (1971)
15. Mansour, S. L., Thomas, K. R., & Capecchi, M. R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336:348-352 (1988)
16. ノックアウトマウス・データブック (黒川清・笹月健彦、監修), Molecular Medicine, Vol.34 臨時増刊号、中山書店 (1997)
17. Gerlai, R. Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci.* 19:177-181 (1996)
18. 和田恵津子 ボンベシン. (御子柴克彦 編) Bio Science 用語ライブラリー 脳神経、羊土社、pp.76-77 (1997)
19. Anastasi, A., Erspamer, V., & Bucchi, M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the european amphibians Bombina and Alytes. *Experientia* 27:166-167 (1971)
20. McDonald, T. J., Jornvall, H., Nilsson, G., Vagne, M., Ghatei, M., Bloom, S. R., & Mutt, V. Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90:227-233 (1979)
21. Minamino, N., Kangawa, K., & Matsuo, H. Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:541-548 (1983)
22. Ryan, R. R., Weber, H. C., Hou, W., Sainz, E., Mantey, S. A., Battey, J. F., Coy, D. H., & Jensen, R. T. Ability of various bombesin receptor agonists and antagonists to alter intracellular signaling of the human orphan receptor BRS-3. *J. Biol. Chem.* 273:13613-13624 (1998)

23. Benya, R. V., Kusui, T., Shikado, F., Battey, J. F., & Jensen, R. T.  
Desensitization of neuromedin B receptor (NMB-R) on native and NMB-R-transfected cells involves down-regulation and internalization. *J. Biol. Chem.* 269:11721-11728 (1994)
24. Lebacqz-Verheyden, A-M., Trepel, J., Sausville, E. A., & Battey, J. F. Bombesin and gastrin releasing peptide: neuropeptides, secretagogues, and growth factors. In Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 95/II. Peptide Growth Factors and Their Receptors II. Springer-Verlag (Berlin) pp.71-124, (1990)
25. Itoh, S., Takahashi, A., Itoh, T., & Morimoto, T. Effects of neuromedins and related peptides on the body temperature of rats. *Jpn. J. Physiol.* 45:37-45 (1995)
26. Wada, E., Yamada, K., Wada, K., et al., in preparation
27. Flynn, F. W. Effects of fourth ventricle bombesin injection on meal-related parameters and grooming behavior. *Peptide* 12:761-765 (1991)
28. Masui, A., Kato, N., Itoshima, T., Tsunashima, K., Nakajima, T., & Yanaihara, N. Scratching behavior induced by bombesin-related peptides. Comparison of bombesin, gastrin-releasing peptide and phyllolitorins. *Eur. J. Pharmacol.* 238:297-301 (1993)
29. Itoh, S., Takahashi, A., Itoh, T., & Morimoto, T. Open-field behavior of rats following intracerebroventricular administration of neuromedin N, neuromedin C, and related peptide. *Jpn. J. Physiol.* 44:271-281 (1994)
30. Yamada, K. Wada, E., Wada, K., et al. unpublished data
31. Stratford, T. R., Gibbs, J., Coy, D. H., & Smith, G. P. Fourth ventricular injection of the bombesin receptor antagonist [D-Phe6]bombesin(6-13) methyl ester, but BW2258U89, increased food intake in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50:463-471 (1995)
32. Stratford, T. R., Gibbs, J., & Smith, G. P. Microstructural analysis of licking

- behavior following peripheral administration of bombesin or gastrin-releasing peptide. *Peptide* 16:903-909 (1995)
33. Kirkham, T. C., Gibbs, J., Smith, G. P., & Geary, N. Meal pattern analysis in rats reveals partial agonist activity of the bombesin receptor antagonist BW2258U89. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52:1011-1106 (1995)
34. Kirkham, T. C., Perez, S., & Gibbs, J. Prefeeding potentiates anorectic actions of neuromedin B and gastrin-releasing peptide. *Physiol. Behav.* 58:1175-1179 (1995)
35. Ladenheim, E. E., Wirth, K. E., & Moran, T. H. Receptor subtype mediation of feeding suppression by bombesin-like peptides. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54:705-711 (1996)
36. Rushing, P. A., Gibbs, J., & Geary, N. Brief, meal-contingent infusions of gastrin-releasing peptide<sub>1-27</sub> and neuromedin B-10 inhibit spontaneous feeding in rats. *Physiol. Behav.* 60:1501-1504 (1996)
37. Humpton, L. L., Ladenheim, E. E., Akeson, M., Way, J. M., Weber, H. C., Sutliff, V. E., Jensen, R. T., Wine, L. J., Arnheimer, H., & Battey, J. F. Loss of bombesin-induced feeding suppression in gastrin-releasing peptide receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:3188-3192 (1998)
38. Flood, J. F., & Morley, J. E. Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Res.* 460:314-322 (1988)
39. Williams, C. L., & McGaugh, J. L. Enhancement of memory processing in an inhibitory avoidance and radial maze task by post-training infusion of bombesin into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res.* 654:251-256 (1994)
40. Bio Science 用語ライブラリー 脳神経、(御子柴克彦 編) 羊土社、(1997)
41. Matsui, K., Wada, K., & Kwak, S. Ataxia-ameliorating effects of YM-14673, a potent analog of thyrotropin releasing hormone, in ataxic mutant mice. *Eur. J. Pharmacol.* 254:295-297 (1994)
42. Wada, E., Wray, S., Key, S., & Battery, J. Comparison of gene expression for

- two distinct bombesin receptor subtypes in rat central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* 3:446-460 (1992)
43. Wada, E., Matsui, K., Ohki-Hamazaki, H., Imaki, J., & Wada, K. unpublished data
44. O'Keefe, J., & Nadel, L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford: Clarendon Press, 1978
45. Olton, D. S., Beckett, J. T., Handelmann, G. E. Hippocampus, space, and memory. *Behav. Brain Sci.* 2:313-365 (1979)
46. Angrilli, A., Mauri, A., Palomba, D., Flor, H., Birbaumer, N., Sartori, G., & Paola, F. D. Startle reflex and emotion modulation impaired after a right amygdala lesion. *Brain* 119:1191-2000 (1996)
47. Gallagher, M., & Chiba, A. A. The amygdala and emotion. *Curr. Opinion Neurobiol.* 6:221-227 (1996)
48. Morris, J. S., Oehman, A., & Dolan, R. J. Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala. *Nature* 393:467-470 (1998)
49. Adolphs, R., Tranel, D., & Damasio, A. R. The human amygdala in social judgement. *Nature* 393:470-474 (1998)
50. Aravich, P., & Sclafani, A. Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndrome. *Behav. Neurosci.* 97:970-983 (1983)
51. Teitelbaum, P., & Epstein, A. N. The lateral hypothalamic syndrome: recovery of feeding and drinking after lateral hypothalamic lesions. *Psychol. Rev.* 69:74-0 (1962)
52. Delgado, J. M. R., & Anand, B. K. Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Amer. J. Physiol.* 72:162-168 (1953)
53. Coleman, M. A., Garland, T. JR., Marler, C. A., Newton, S. S., Swallow, J. G., & Carter, P. A. Glucocorticoid response to forced exercise in laboratory house mice (*Mus domestics*). *Physiol. Behav.* 63:279-285 (1998)

54. Zhang, J., Engel, J. A., Soederpalm, B., & Svenson, L. Repeated administration of amphetamine induces sensitization to its disruptive effect on prepulse inhibition in the rat. *Psychopharmacol.* 135:401-406 (1998)
55. Jiang, M., Gold, M. S., Boulay, G., Spicher, K., Peyton, M., Brabet, P., Srinivasan, Y., Ellison, G., & Birnbauer, L. Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein  $G_0$ . *Proc. Natl. Accd. Sci. USA.* 95:3269-3274 (1998)
56. Mamiya, T., Noda, Y., Nishi, M., Takeshima, H., & Nabeshima, T. Enhancement of spatial attention in nociceptine/orphanin FQ receptor-knockout mice. *Brain Res.* 783:236-240 (1998)
57. Morris, R. G. M. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Lern. Motiva.* 12:239-260 (1981)
58. Roberts, W. W., Steinberg, M. L., & Means, L. W. Hypothalamic mechanisms for sexual, aggressive and other motivational behaviors in the opossum, *Didelphi virginiana*. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 64:1-15 (1967)
59. Wasman, M., & Flynn, J. P. Directed attack elicited from hypothalamus. *Arch. Neurol.* 6:220-227 (1962)
60. Herman, J. P., Thomas, G. J., Wiegand, S. J., & Gash, D. M. Lesions of parvocellular subdivisions of the hypothalamic paraventricular nucleus alter open field behavior and acquisition of sensory and spatial discrimination. *Brain Res.* 550:291-297 (1991)
61. Ingelfield, J. R., Schwarzkopf, S. B., & Kellogg, C. K. Alterations in behavioral responses to stressors following excitotoxin lesions of dorsomedial hypothalamic regions. *Brain Res.* 633:151-161 (1994)
62. Koenig, M., Zimmer, A. M., Steiner, H., Holmes, P. V., Crawley, J. N., Brownstein, M. J., & Zimmer, A. Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature* 383:535-538 (1996)
63. Griebel, G., Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. Evidence that the behaviors

- in the mouse defense test battery relate to different emotional states: a factor analytic study. *Physiol. Behav.* 60:1225-1260 (1996)
64. Lijam, N., Paylor, R., McDonald, M. P., Crawley, J. N., Deng, C-X., Herrup, K., Stevens, K. E., Maccaferi, G., McBain, C. J., Sussman, D. J., & Wynshaw-Boris, A. Social interaction and sensorimotor gating abnormalities in mice lacking *Dvl1*. *Cell* 90:895-905 (1997)
65. Tedeschi, R. E., Tedeschi, D. H., Huncha, A., Cook, L., Mattis, P. A., & Fellows, E. J. Effects of various centrally acting drugs of fighting behavior of mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 125:28-34 (1958)
66. Matray-Devoti, J., & Wanger, G. C. Propranolol-induced increases in target-biting attack. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46:923-925 (1993)
67. Montgomery, K. C. The relation between exploratory behavior and spontaneous alternation in the white rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 44:582-589 (1951)
68. Hall, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp. Psychol.* 18:385-403 (1934)
69. Zalaquett, C., & Thiessen, D. The effects of odors from stressed mice on conspecific behavior. *Physiol. Behav.* 50:221-227 (1991)
70. Costall, B., & Naylor, R. J. The influence of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptor antagonists to modify drug induced disinhibitory effects in the mouse light/dark test. *British J. Pharmacol.* 122:1105-11108 (1997)
71. Broekkamp, C. L., Rijik, H. W., Joly-Gelouin, D., & Lloyd, K. L. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 126:223-229 (1986)
72. Sandou, F., Amara, D. A., Dierich, A., LeMeur, M., Ramboz, S., Segu, L., Buhot, M-C., & Hen, R. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT<sub>1B</sub>

- receptor. *Science* 265:1875-1878 (1994)
73. Ohki-Hamazaki, H., Wada, E., Matsui, K., & Wada, K. Cloning and expression of the neuromedin B receptor and the third subtype of bombesin receptor genes in the mouse. *Brain Res.* 762:165-172 (1997)
74. Imaki, J., Yoshida, K., Yamashita, K., Onodera, H., Harada, T., Shinmei, Y., Matsuda, H., & Yamakawa, A. Presence of ERK2 in rat retinal cells. *Curr. Eye Res.* 16:957-959 (1997)
75. Touzani, K., & Verry, L. Ibotenic acid lesion of the lateral hypothalamus increases preference and aversion thresholds for saccharin and alters the morphine modulation of taste. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36:585-591 (1990)
76. Touzani, K., & Verry, L. Ibotenic acid lesion of the hypothalamic paraventricular nucleus produces weight gain but modifies neither preference nor aversion for saccharin. *Physiol. Behav.* 52:673-678 (1992)
77. King, B. M., Kass, J. M., Eeville, K. L., Sam, H., Tatford, V. A. C., & Zansler, C. A. Abnormal weight gain in rats with amygdaloid lesions. *Physiol. Behav.* 54:467-470 (1993)
78. King, B. M., Kass, J. M., Cadieux, N. L., Sam, H., Neville, K. L., & Arceneaux, E. R. Hyperphagia and obesity in female rats with temporal lobe lesions. *Physiol. Behav.* 54:759-765 (1993)
79. King, B. M., Sam, H., Arceneaux, E. R., & Kass, J. M. Effect on food intake and body weight of lesions in and adjacent to the posterodorsal amygdala in rats. *Physiol. Behav.* 55:963-966 (1994)
80. King, B. M., Arceneaux, E. R., Cook, J. T., Benjamin, A. L., & Alheid, G. F. Temporal lobe lesion-induced obesity in rats: an anatomical investigation of the posterior amygdala and hippocampal formation. *Physiol. Behav.* 59:843-848 (1996)
81. King, B. M., Cook, J. T., Rossiter, K. N., Theobald, L. M., & Sam, H. Posterodorsal amygdaloid lesions in rats: long-term effects on body weight.

- Physiol. Behav.* 60:1569-1571 (1996)
82. King, B. M., Rossiter, K. N., Cook, J. T., & Sam, H. M. Amygdaloid lesion-induced obesity in rats in absence of finickiness. *Physiol. Behav.* 62:935-938 (1997)
83. Corbit, J. D., & Stellar, E. Palatability, food intake, and obesity in normal and hyperphagic rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 58:63-67 (1964)
84. Corbit, J. D. Hyperphagic hyperreactivity to adulteration of drinking water with quinine HCl. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 60:123-124 (1965)
85. Weingarten, H.P. Diet palatability modulates sham feeding in VMH-lesion and normal rats: implication for finickiness and evaluation of sham-feeding data. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96:223-233 (1982)
86. Weingarten, H. P., Chang, P.K., & Jarvie, K. R. Reactivity of normal and VMH-lesion rats to quinine-adulterated foods: negative evidence for negative finickiness. *Behav. Neurosci.* 97:221-233 (1983)
87. Laessle, R. G., Wurmser, H., & Pirke, K. M. A comparison of resting metabolic rate, self-rated food intake, growth hormone, and insulin levels in obese and nonobese preadolescents. *Physiol. Behav.* 61:725-729 (1997)
88. Strohmayer, A. J., & Smith, G. P. The meal pattern of genetically obese (ob/ob) mice. *Appetite* 8:111-123 (1987)
89. Wangsness, P. J., Dilettuso, B.A., & Martin, R. J. Dietary effects on body weight, feed intake and diurnal feeding behavior of genetically obese rats. *J. Nutr.* 108:256-264 (1978)
90. Sclafani, A. Neural pathways involved in the ventromedial hypothalamic lesion syndrome in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 77:70-96 (1971)
91. Elmore, D. K., & de Castro, J. M. Meal patterns of normal, untreated bulimia nervosa and recovered bulimic woman. *Physiol. Behav.* 49:99-105 (1991)
92. Wellman, P. J., & Miller, J. The effects of phenylpropanolamine on food intake and body weight in the genetically obese (ob/ob) mouse. *Appetite* 9:231-236

- (1987)
93. Spiegel, T. A., Shrager, E. E., & Stellar, E. Responses of lean and obese subjects to preloads, deprivation, and palatability. *Appetite* 13:45-69 (1989)
  94. Carlisle, H. J., & Stellar, E. Caloric regulation and food preference in normal, hyperphagic, and aphagic rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 69:107-114 (1969)
  95. Cook, C. B., Shavar, L., Thompson, H., & Prasad, C. Caloric intake and body weight gain of rats depends on endogenous fat preference. *Physiol. Behav.* 61:743-748 (1997)
  96. Drewnowski, A., Bellisle, F., Aimez, P., & Remy, B. Taste and bulimia. *Physiol. Behav.* 41:621-626 (1987)
  97. Ramirez, I., & Sprott, R. L. Diet/taste and feeding behavior of genetically obese mice (C57BL/6J-ob/ob). *Behav. Neural Biol.* 25:449-472 (1979)
  98. Sprott, R. L. Long-term studies of feeding behavior of obese, diabetic, and viable yellow mutant mice under ad lib. and operant conditions. *Psychol. Rep.* 30:991-1003 (1972)
  99. Krasne, F. B. Decreased tolerance of hypothalamic hyperphagics to quinine in drinking water. *Psychonom. Sci.* 4:313-314 (1966)
  100. Lamprecht, R., Hazvi, S., & Dudai, Y. cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory. *J. Neurosci.* 17:8443-8450 (1997)
  101. Yamamoto, T., & Fujimoto, Y. Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. *Brain Res. Bull.* 27:403-406 (1991)
  102. Yamamoto, T. Neural mechanisms of taste aversion learning. *Neurosci. Res.* 16:181-185 (1993)
  103. Yasoshima, Y., & Yamamoto, T. Rat gustatory memory requires protein kinase C activity in the amygdala and cortical gustatory area. *Neuroreport* 8:1363-1367 (1997)
  104. Thompson, C. I., Margules, D. L., Kreider, J. W., Boha, S. P., Rejer, Jr. R.E.,

- Quiery, R. A., & Reitz, J. A. Propensity to form conditioned taste aversions augments anorexia in obese (ob/ob) mice with B16 melanoma. *Behav. Neurosci.* 107:786-798 (1993)
105. Mercer, J. G., Hoggard, N., Williams, L. M., Lawrence, C. B., Hannah, L. T., & Trayhurn, P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett.* 387:113-116 (1996)
106. Graff, H., & Stellar, E. Hyperphagia, obesity, and finickiness. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 55:418-424 (1962)
107. Galaverna, O., De Luca, J. R., L. A., Schulkin, J., Yao, S. -Z., & Epstein, A. N. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res. Bull.* 28:89-98 (1992)
108. Touzani, K., Taghzouti, K., & Velley, L. Increase of the aversive value of taste stimuli following ibotenic acid lesion of the central amygdaloid nucleus in the rat. *Behav. Brain Res.* 88:133-142 (1997)
109. Lister, R. G., & Hilakivi, L. A. The effects of novelty, isolation, light and ethanol on the social behavior of mice. *Psychopharmacol. (Berlin)* 96:181-187 (1988)
110. Hilakivi, L. A., Ota, M., & Lister, R. G. Effect of isolation on brain monoamines and the behavior of mice in tests of exploration, locomotion, anxiety and behavioral 'despair'. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33:371-374 (1989)
111. Harmer, C. J., & Phillips, G. D. Isolation rearing enhances the rate of acquisition of a discriminative approach task but does not affect the efficacy of a conditioned reward. *Physiol. Behav.* 63:177-184 (1998)
112. Jones, G. H., Robbins, T. W., & Marsden, C. A. Isolation-rearing retards the acquisition of schedule-induced polydipsia in rats. *Physiol. Behav.* 45:71-77 (1989)
113. Sahakian, B. J., Robbins, T. W., & Iversen, S. D. The effects of isolation

- rearing on exploration in the rat. *Anim. Learn. Behav.* 5:193-198 (1977)
114. Harlow, H. F.; Harlow, M. K. Social deprivation in monkeys. *Sci. Am.* 207:136-146 (1962)
115. Giralt, M., & Armario, A. Individual housing does not influence the adaptation of the pituitary-adrenal axis and other physiological variables to chronic stress in adult male rats. *Physiol. Behav.* 45:477-481 (1989)
116. Greco, A. M., Gambardella, P., Sticchi, R., D'aponte, D., Di Renzo, G., & De Franciscis, P. Effects of individual housing on circadian rhythms of adult rats. *Physiol. Behav.* 45:363-366 (1989)
117. Zajonc, R. B. Social Facilitation. *Science* 149:269-274 (1965)
118. Goodrick, C. L. The effect of protein malnourishment and caging on growth and behavior of laboratory mice. *Dev. Psychobiol.* 7:249-256 (1974)
119. Desmedt, A., Garcia, R., & Jaffard, R. Differential modulation of changes in hippocampal-septal synaptic excitability by the amygdala as a function of either elemental or contextual fear conditioning in mice. *J. Neurosci.* 18:480-487 (1998)
120. Quirk, G. J., Reppas, C., & LeDoux, J. E. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. *Neuron* 15:1029-1039 (1995)
121. Stark, C. P., Alpern, H. P., Fuhrer, J., Trowbridge, M. G., Wimbish, H., & Smock, T. The medial amygdaloid nucleus modifies social behavior in male rats. *Physiol. Behav.* 63:253-259 (1998)
122. Hall, F. S., Wilkinson, L. S., Humby, T., Inglis, W., Kendall, D. A., Marsden, C. A., & Robbins, T. W. Isolation rearing in rats: pre- and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59:859-872 (1998)
123. Jones, G. H., Hernandez, T. D., Kendall, D. A., Marsden, C. A., & Robbins, T. W. Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats:

- study of behavioral responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43:17-35 (1992)
124. Jones, G. H., Marsden, C. A., & Robbins, T. W. Increased sensitivity to amphetamine and reward-related stimuli following social isolation in rats: possible disruption of dopamine-dependent mechanisms of the nucleus accumbens. *Psychopharmacol. (Berlin)* 102:364-372 (1990)
125. Rilke, O., Freier, D., Jahkel, M., & Oehler, J. Dynamic alterations of serotonergic metabolism and receptors during social isolation of low- and high-active mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 59:891-896 (1998)
126. Rilke, O., Jahkel, M., & Oehler, J. Dopaminergic parameters during social isolation in low- and high-active mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60:499-505 (1998)
127. Ericsson, M., Poston, W. S., & Foreyt, J. P. Common biological pathways in eating disorders and obesity. *Addict. Behav.* 21:733-743 (1996)
128. Kretek, J. E., & Price, J. L. Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J. Comp. Neur.* 178:225-254 (1978)
129. Kretek, J. E., & Price, J. L. A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J. Comp. Neur.* 178:255-280 (1978)
130. Engen, T. 著) 吉田正昭 訳) 匂いの心理学 西村書店 1990
131. 高木貞敬・渋谷達明 編) 匂いの科学 朝倉書店 1989
132. Spector, S. A., & Hull, E. M. Anosmia and mouse killing by rats: a nonolfactory role for the olfactory bulbs. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 80:354-356 (1972)
133. Hamrick, W. D., Wilson, D. A., & Sullivan, R. M. Neural correlates of memory for odor detection conditioning in adult rats. *Neurosci. Lett.* 163:36-40 (1993)

134. Meredith, M. Vomeronasal organ removal before sexual experience impaires male hamster mating behavior. *Physiol. Behav.* 36:737-743 (1986)
135. 川村浩 意識に関する生理学的展望. *臨床医.* 2:930-932 (1976)
136. 西川徹 GABAによる脳内セロトニン伝達の調節 躁うつ病の薬理生化学(II) 躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会 編) 金剛出版 pp.111-128 (1992)
137. Parks, C. L., Robinson, P. S., Sibille, E., Shenk, T., & Toth, M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin<sub>1A</sub> receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10734-10739 (1998)
138. 山田一之 味覚・嗅覚複合刺激をCSとするラットの嫌悪条件づけにおける要素刺激の先行呈示効果 動物心理学年報 第39輯 第2号 51-62 (1989)
139. 山田一之・筒井雄二 先行する嗅覚嫌悪条件づけがラットの新奇刺激に対する忌避行動に与える影響について 基礎心理学研究 第10巻 第2号 121-124 (1992)
140. 心理学研究法 5 動物実験I 八木冕 編) 東京大学出版会 1975
141. 心理学研究法 6 動物実験II 八木冕 編) 東京大学出版会 1975
142. 田中正敏 ストレスその時脳は? 講談社 1987
143. 平野鉄雄・新島旭 著) 脳とストレス ブレインサイエンス・シリーズ 13 共立出版 1995
144. Merali, Z., McIntosh, J., Kent, P., Michaud, D., & Anisman, H. Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central amygdala. *J. Neurosci.* 18:4758-66 (1998)
145. Anisman, H., Lacosta, S., Kent, P., McIntyre, D. C., & Merali, Z. Stressor-induced corticotropin-releasing hormone, bombesin, acth and corticosterone variations in strains of mice differentially responsive to stressors. *Stress* 3:209-20 (1998)
146. Hamamura, Y. Does punishment for biting attenuate gastric lesions in the rat? *Jpn. Psychol. Res.* 24:195-199 (1982)
147. Hamamura, Y., & Kobayashi, J. Some social factors relevant to the stress-

- reducing effect of fighting in rats. *Jpn. Psychol. Res.* 28:87-93 (1986)
148. Brady, J. V., Porter, R. W., Conrad, D. G., & Manson, J. W. Avoidance behavior and the development of gastroduodenal ulcers. *J. Exp. Anal. Behav.* 1:69-72 (1958)
149. Roper, T. J. Schedule-induced behaviour. In Mellgren, R. L. (Eds.) *Animal Cognition and Behavior*. NorthHolland Publishing Company. pp.127-164 (1983)
150. D. E. Blackman *Operant Conditioning*. Methuen & Co., Ltd. 1974 能見義博 監訳) オペラント条件づけ 実験的行動分析 ブレーン出版 1981
151. Falk, J. L. Production of polydipsia in normal rats by an intermittent food schedule. *Science* 133:195-196 (1961)
152. 山田一之・浜村良久・岡田隆 FT スケジュール下における RAT の飲水・走行 反応の研究—強化量の変化が及ぼす効果について— 日本心理学会第 52 回大会 発表論文集 pp.701 (1988)
153. 浜村良久・岡田隆・山田一之 VT スケジュール下における RAT の飲水・走行 反応の研究—給餌間隔の変動が飲水パターンに及ぼす効果について— 日本心理学会第 52 回大会 発表論文集 pp.702 (1988)
154. Pavlov, I. P. conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. Oxford Univ. Press. 林謙 訳) 条件反射学—大脳半球の働きについての講義, (中). 創元文庫 1953
155. Maier, S. F., Seligmann, M. E. P., & Solomon, R. L. Pavlovian fear conditioning and learned helplessness: Effects on escape and avoidance behavior of (a) the CS-US contingency and (b) the independence of the US and voluntary responding. In B. A. Campbell. & McChurch (Eds.), *Punishment and aversive behavior*. Appleton-Cnetury-Crofts. Pp.299-343 (1969)
156. Klein, S. L., Kriegsfeld, L. J., Hairston, J. E., Rau, V., Nelson, R. J., & Yarowsky, P. J. Characterization of sensorymotor performance, reproductive

- and aggressive behaviors in segmental trisomic 16 (Ts65Dn) mice. *Physiol. Behav.* 60:1159-1164 (1996)
157. Gerlai, R., Marks, A., & Roder, J. T-maze spontaneous alternation rate is decreased in S100 $\beta$  transgenic mice. *Behav. Neurosci.* 108:100-106 (1994)
158. Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N., & Jalfre, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47:379-391 (1978)
159. Porsolt, R. D., Bertin, A., Blavet, N., Deniel, M., & Jalfre, M. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. *Eur. J. Pharmacol.* 57:201-210 (1979)
160. Borsini, F., & Meli, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacol.* 94:147-160 (1988)
161. Nishimura, H., Tsuda, A., Oguchi, M., Ida, Y., & Tanaka, M. Is immobility of rats in the forced swimming test "behavioral despair?" *Physiol. Behav.* 42:93-95 (1988)
162. Nishimura, H., Ida, Y., Tsuda, A., & Tanaka, M. Opposite effects of diazepam and  $\beta$ -CCE on immobility and straw-slimbing behavior of rats in a modified forced-swim test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33:227-231 (1989)
163. Bolivar, V. J., & Brown, R. E. Selective retrieval of jimpy mutant pups over normal male littermates by lactating female B6CBACa- $A^{w/j}/A-Ta jp$  mice. *Behav. Genet.* 25:75-80 (1995)
164. Sakaguchi, K., Tanaka, M., Ohkubo, T., Doh-ura, K., Fujikawa, T., Sudo, S., & Nakashima, K. Induction of brain prolactin receptor long-form mRNA expression and maternal behavior in pup-contacted male rats: promotion by prolactin administration and suppression by female contact. *Neuroendocrinol.* 63:559-568 (1996)
165. Mann, P. E., Kinsley, C. H., & Bridges, R. S. Opioid receptor subtype involvement in maternal behavior in lactating rats. *Neuroendocrinol.*

- 53:487-492 (1991)
166. Thomas, S. A., & Palmiter, R. D. Impaired maternal behavior in mice lacking norepinephrine and epinephrine. *Cell* 91:583-592 (1997)
167. Yamano, M., & Tohyama, M. Distribution of corticotropin-releasing factor and calcitonin gene-related peptide in the developing mouse cerebellum. *Neurosci. Res.* 19:387-396 (1994)
168. Graeff, F. G., Guimaraes, F. S., De Andrade, T. G. C. S., & Deakin, J. F. W. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54:129-141 (1996)
169. Chen, C., Rainnie, D. G., Greene, R. W., & Tonegawa, S. Abnormal fear response and aggressive behavior in mutant mice deficient for  $\alpha$ -calcium-calmodulin kinase II. *Science* 266:291-294 (1994)
170. Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Mueller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J. C., & De Maeyer, E. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268:1763-1766 (1995)
171. Pinnock, R. D., & Woodruff, G. N. Bombesin excites a subpopulation of 5-hydroxytryptamine-sensitive neurones in the rat dorsal raphe nucleus *in vitro*. *J. Physiol.* 440:55-65 (1991)
172. Pinnock, R. D., Reynolds, T., & Woodruff, G. N. Different types of bombesin receptors on neurons in the dorsal raphe nucleus and the rostral hypothalamus in rat brain slices *in vitro*. *Brain Res.* 653:119-124 (1994)
173. 山中康裕・野沢栄司 編) 児童精神科臨床 1. 初回面接 星和書店, 1980
174. Abraham, S. & Llewellyn-Jones, D. 著) 中根允文・藤田長太郎 訳) 摂食障害の事実. 星和書店, 1988
175. Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal

- responses to stress. *Science* 277:1659-1662 (1997)
176. 守一雄 現代心理学入門 1 認知心理学 岩波書店, 1995
177. LaBar, K. S., Gatenby, J. C., Gore, J. C., LeDoux, J. E., & Phelps, E. A.  
Human amygdala activation during conditioned fear acquisition and  
extinction: a mixed-trial fMRI study. *Neuron* 20:937-945 (1998)
178. 山岸俊男 セレクション社会心理学 15 社会的ジレンマのしくみ 「自分一人ぐ  
らいの心理」の招くもの サイエンス社, 1990
179. 二木宏明 前頭連合野の研究—回顧と展望. *動物心理学研究*, 46:69-82 (1996)
180. Miyakawa, T., Yagi, T., Watanabe, S., & Niki, H. Increased fearfulness of Fyn  
tyrosine kinase deficient mice. *Mol. Brain Res.* 27:179-182 (1994)
181. Miyakawa, T., Yagi, T., Kitazawa, H., Yasuda, M., Kawai, N., Tsuboi, K., &  
Niki, H. Fyn-kinase as a determinant of ethanol sensitivity: relation to  
NMDA-receptor function. *Science* 278:698-701 (1997)
182. Nishi, M., Houtani, T., Noda, Y., Mamiya, T., Sato, K., Doi, T., Kuno, J.,  
Takeshima, H., Nukada, T., Nabeshima, T., Yamashita, T., Noda, T. &  
Sugimoto, T. Unrestrained nociceptive response and dysregulation of hearing  
ability in mice lacking the nociceptin/orphanin FQ receptor. *EMBO J.*  
16:1858-1864 (1997)
183. Fox, W. M. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Anim.*  
*Behav.* 13:234-241 (1964)
184. Rouillet, P. & Lassalle, J. M. Radial maze learning using exclusively distant  
visual cues reveals learners and nonlearners among inbred mouse strains.  
*Physiol. Behav.* 58:1189-1195 (1995)
185. 八木健, 安田昌弘, 甲斐信行 遺伝子欠損マウスにおける行動解析. *実験医学*  
Vol.12 No.19(増刊), 70-74 (1994)
186. Darling, F. M. C. & Slotnick, B. M. Odor-cued taste avoidance: a simple and  
efficient method for assessing olfactory detection, discrimination and memory  
in the rat. *Physiol. Behav.* 55:817-822 (1994)

## 【謝辞】

本研究をまとめるにあたり、多くの先生方にご指導・ご協力をいただきました。ご指導・ご協力いただいた先生方、学位申請を快くご承諾していただいた共同執筆者の諸先生方に、この場を借りて御礼申し上げます。

早稲田大学大学院人間科学研究科 木村一郎 教授には、本研究をまとめる機会を与えてくださったことに心から御礼申し上げます。

国立精神神経センター 神経研究所 疾病研究第四部の皆様には、並々ならぬご指導・ご協力をいただきました。心から感謝申し上げます。特に、文学部出身の筆者が全く不慣れな自然科学系の研究機関において研究を始めるにあたり、御忙しい中にもかかわらず懇切丁寧なご指導をいただき、また共同研究者として多くの実験をともにしていただいた 浜崎浩子 先生(現 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子神経科学)・和田恵津子 先生、細胞内カルシウム動態の測定をしていただき、また本研究をまとめるにあたり多くの有益な御助言をいただいた 関口正幸 室長に心から御礼申し上げます。

本研究における諸実験を行なうにあたり、各方面の先生方にご協力をいただきました。*in situ hybridization* による BRS-3 の脳内発現分布の確認をしていただいた、今城純子 先生(日本医科大学 第一生理学教室)、免疫組織化学的検討をしていただいた 山野眞利子 先生(大阪府立看護大学 医療技術短期大学部 理学療法学科)、一般的行動特性の分析において各種行動実験をしていただいた 小倉博雄 先生(エーザイ株式会社 筑波研究所)、奥山茂 先生(大正製薬 創薬研究所)に心から御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり絶えず助言・激励をいただき、また草稿に対する御批評と数多くの有益なコメントをいただいた 岩本静男 先生(神奈川大学 工学部 建築学科)、個々の実験における統計的分析と草稿に対して数多くの有益なコメントをいただいた 吉原智恵子 先生(上智大学 文学部 心理学科) に心から御礼申し上げます。

最後に、本研究の母体である「ボンベシン様神経ペプチドの機能解析プロジェクト」の主任研究員であり、また筆者の研究指導者である 和田圭司 疾病研究第四部 部長に、御礼申し上げます。不器用な筆者に絶え間なくかつ辛抱強いご指導をいただきましたことに心から感謝申し上げます。

