

光量がマウス行動試験に与える影響

森田 裕奈・宇高 裕太・田上 凌・山本 紗由美・橋川 成美・橋川 直也

岡山理科大学大学院理学研究科臨床生命科学専攻

(2016年10月27日受付、2016年12月5日受理)

マウスの行動と光に密接な関係があることが指摘されているが、マウスの行動試験において光量がどのような影響を与えるかについては不明な点が多い。また、マウスの行動試験を行う際の光量は研究者によりかなり異なっている。今回、光量がマウスの行動試験に与える影響を明らかにする為、25, 60, 180, 540 luxの4種類の光量を設定し、ICRマウスにおける一般行動試験、社会的行動試験、作業記憶試験、抑うつ行動試験を行った。その結果、一般行動試験、社会的行動試験、作業記憶試験においては光量によるマウスの行動に変化が認められなかった。一方、抑うつ行動試験のforced swim testにおいて、光量の増加に伴い不動時間の有意な減少が見られた。また、tail suspension testにおいても25 luxと比較し、光量の増加により不動時間の減少傾向が見られた。以上のことから、光量の強弱は抑うつ行動のみに影響を与えることが示唆された。

1. 緒言

行動試験とは、マウスやラットなどの被験体の行動に及ぼす影響を評価する手法で、1990年代以降遺伝子改変マウスや薬物投与マウスなどの表現型解析に、情動や記憶・学習など高次脳機能を評価する目的で用いられるようになってきた。通常、光量の条件を一定にした状態でマウスの行動試験を行うが、どのレベルの光量を選択するかは研究者により異なり、40-500 luxと幅が広い(Kobayashi et al., 2011, Kato, 2015)。マウスは夜行性のため、光により不安になるという報告がある一方、40-250 luxの間ではマウスの行動量は変化しないという報告がある(Hale et al., 2008, Bouwknecht et al., 2007, Martin-Arenas et al., 2014)。しかしながら、光量が様々なマウスの行動試験にどのような影響を与えるのかを詳細に調べたという報告はない。

今回、光量の違いが一般行動、社会的行動、記憶行動、うつ様行動にどのような影響を与えるのかを検討した。

2. 実験材料及び実験方法

2-1 実験動物

実験には、7週齢の雄性ICRマウスを用いた。マウスはケージ内に5匹ずつ分けて飼育した。自由給餌法にて飼育し、飲料水は水道水を与えた。

2-2 実験環境

光量は太陽光と照明を使用して、25, 60, 180, 540 luxの光量に調節した。照明は間接的に当てて光量の調節を行った。また、光量は行動試験前に毎回照度計により調節して実験を行った。

2-3 行動試験による評価

【一般行動の評価】

Open field test; オープンフィールド試験

自発行動量や探索行動、不安行動などの一般行動を測定し、評価する方法である。

円形状のオープンフィールド槽（直径57.5 cm、高さ32 cm）を用い、フィールドの中央から2つの円（直径13.5 cm、35.5 cm）を描き中央の円からほぼ同じ面積の区画ができるように放射状に線を引いた。

測定項目は、区画横切り回数（自発行動量、locomotor activity）、立ち上がり回数（探索行動、Rearing activity）、中央区画滞在時間（不安行動、time spent in the center area）の3つの項目を測定した。測定時間はオープンフィールドの中央にマウスを入れてから3分間の行動を測定した。

【社会性の評価】

Social interaction test; 社会的行動試験

別々の種類の2匹のマウスを同じフィールド内に入れ、2匹が示す社会的行動を観察する方法である。

四角形の槽 (46 × 36 cm) の一角に小さい透明なケージを配置した。最初にケージだけを置いた状態でケージの周囲に滞在した時間を測定し、その後、そのケージに異なる系統であるC57BL6マウスを入れ、同様に測定を行った。結果の解析は、それぞれの測定した結果の比率を算出しを行った。その比率が高ければ社会的行動が高く、新規の相手に対して興味を持つとされ、逆に比率が低いと社会的行動が低く、相手に恐怖を持ちやすい、または相手への興味が低いとされる。

【記憶行動の評価】

Y-maze test; Y字型迷路試験

Y字型の装置内を探索させた際に認められる自発的交替行動を短期記憶として評価する方法である。

マウスをY字迷路のいずれかのアームの先端に置き、8分間迷路内を自由に探索させ侵入したアームの順番を記録した。3回連続して異なる3本のアームに侵入した組み合わせの回数を全アーム侵入数で割り評価した。その比率が高いと短期記憶が高いとされる。

【抑うつ行動の評価】

Forced swim test; 強制水泳試験

抑うつ行動を評価する方法である。

1 Lのビーカーにマウスの足が底につかない程度 (10 cm) に28℃の水を入れ、1分後から5分間の行動を測定した。水の中で動いていない時間を不動時間として評価した。不動時間が長いとうつ様状態とされる。

Tail suspension test; 尾懸垂試験

抑うつ行動を評価する方法である。

尾を固定して逆さ向きに吊るし、1分後から5分間の行動を測定した。空中で動いていない時間を不動時間として評価した。Forced swim testと同様に不動時間が長いとうつ様状態とされる。

2-4 統計学的解析

得られたデータ値を平均値±標準誤差 (Mean±S.E.M.) で表した。得られた結果は、One-way ANOVA、またはOne-tailed Student's t-testを用いて統計的処理を行った。いずれも有意水準5%以下を有意差ありと判定した。

3. 結果

3-1 一般行動試験

光量がマウスの一般行動に与える影響を解析するため、open field testを行った。光量を25, 60, 180, 540 lux

に調節し測定を行ったが、区画横切り回数 (locomotor activity)、立ち上がり回数 (Rearing activity)、中央区画滞在時間 (time spent in the center area) に有意な変化は見られなかった (Fig. 1A, B, C)。

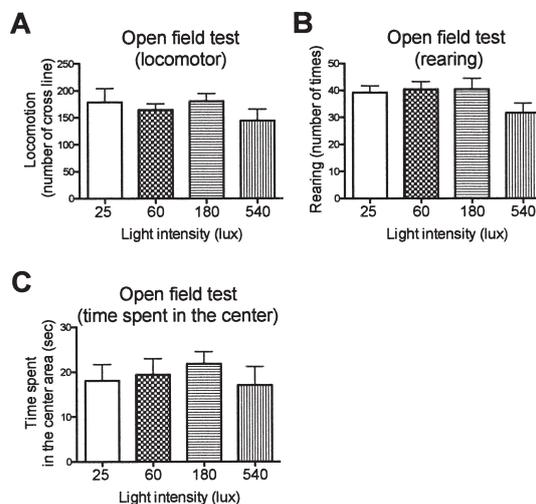


Fig. 1 Effect of light intensity on the general behavior of mice in open field test. (A) Locomotor activity (n=5). (B) Rearing activity (n=5). (C) Time spent in the center area (n=5). Each bar indicates the mean ± SEM.

3-2 社会的行動試験

光量がマウスの社会的行動に与える影響を解析するため、social interaction testを行った。光量を25, 60, 180, 540 luxに調節し測定を行ったが、有意な変化は見られなかった (Fig. 2)。

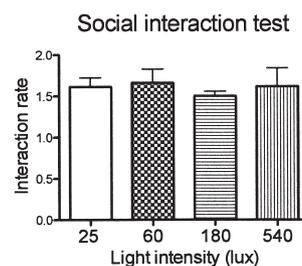


Fig. 2 Effect of light intensity on the social behavior of mice in social interaction test (n=5). Each bar indicates the mean ± SEM.

3-3 記憶行動試験

光量がマウスの短期記憶に与える影響を解析するため、Y-maze testを行った。光量を25, 60, 180, 540 luxに調節し測定を行ったが、交替行動率で示される短期記憶力に有意な変化は見られなかった (Fig. 3)。

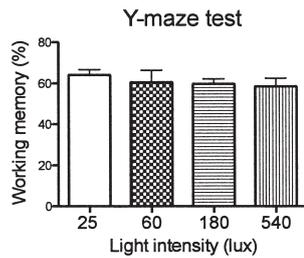


Fig. 3 Effect of light intensity on the working memory of mice in Y-maze test (n=5). Each bar indicates the mean ± SEM.

3-4 抑うつ様行動試験

光量がマウスの抑うつ行動に与える影響を解析するため、光量を25, 60, 180, 540 luxに調節し、forced swim test、およびtail suspension testを行った。forced swim testにおいて光量が増加するほど不動時間の有意な減少が見られた。また、tail suspension testでは25 luxと比較して有意な差は見られなかったものの、減少傾向が見られた (Fig. 4A, B)。

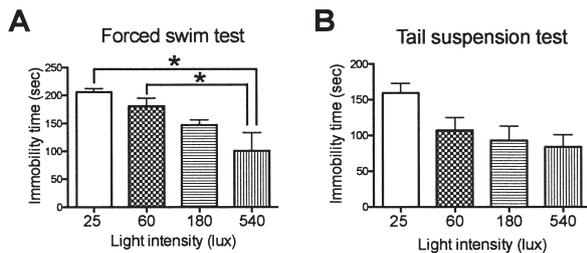


Fig. 4 Effect of light intensity on the depression-like behavior of mice. (A) Immobility time in the forced swim test (n=5). (B) Immobility time in the tail suspension test (n=5). Each bar indicates the mean ± SEM. *P < 0.05 (one way anova).

4. 考察

7週齢雄性ICRマウスを用い、光量を25, 60, 180, 540 luxに調節し、マウスの行動に与える影響の解析を行った。その結果、open field testにおいて光量の違いは、区間横切り回数 (locomotor activity)、立ち上がり回数 (Rearing activity)、中央区画滞在時間 (time spent in the center area) に影響を与えなかった。中央区画滞在時間は不安行動の指標であり、光量により変化が認められなかったことは、これまでの報告とは異なる(Hale et al., 2008, Bouwknecht et al., 2007)。マウスは系統により不安に対する行動が異なることが報告されており (Messiha et al., 1990)、今回の結果は、C57BL6JマウスではなくICRマウスを使用しているため光量による影響が無かった可能性がある。また、social interaction test、

Y-maze testにおいて光量の違いによる有意な変化が認められなかった。しかしながら、forced swim testにおける不動時間は、光量が増加するほど有意な減少が見られた。また、tail suspension testにおいては25 luxと比較して60, 180, 540 luxで減少傾向が見られた。forced swim testと比較し、tail suspension testで顕著な差が認められなかったのは、tail suspension testは逆さに吊るす為、マウス自体が影となり、光量による影響が変化した可能性も考えられる。

以上の結果より、光量の増減は抑うつ様行動試験のみに影響を与えると考えられる。通常、行動試験は一定の光量で行われる。外部光の遮蔽の方法や間接照明の方法により、多少の”光量のムラ”が存在する。今回の結果より、その”光量のムラ”が存在しても一般行動試験、社会的行動試験および短期記憶試験においては、影響が無いと考えられる。しかしながら、抑うつ行動試験では、光量が不動時間に大きな影響を与えることが明らかとなったため、”光量のムラ”がなるべく存在しないように光量の条件を一定にする必要がある。また、設定する光量が研究者によって異っていることより (Kobayashi et al., 2011, Kato, 2015)、抑うつ行動試験においては、他の研究者のデータと単純に比較することは注意が必要であることが示唆される。

今後更なる検討として、C57BL6やBalb/cといった他の系統での検討や、うつ病モデルマウスとして使用されているストレス負荷マウスにおいて光量の変化による行動解析を行うことで、光量とうつ様行動との関係を一層明らかにすることができると考えられる。

参考文献

- 1) Bouwknecht J. A., Spiga F., Staub D. R., Hale M. W., Shekhar A., Lowry C. A. Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res. Bull.*, 72 (1): 32-43, 2007
- 2) Hale M. W., Hay-Schmidt A., Mikkelsen J. D., Poulsen B., Bouwknecht J. A., Evans A. K., Stamper C. E., Shekhar A., Lowry C. A. Exposure to an open-field arena increases c-Fos expression in a subpopulation of neurons in the dorsal raphe nucleus, including neurons projecting to the basolateral amygdaloid complex. *Neuroscience*, 157 (4):733-748, 2008
- 3) Kato K. Differential effects of dietary oils on emotional and cognitive behaviors. *PLoS One*, 10 (3): e0120753, 2015
- 4) Kobayashi K., Ikeda Y., Suzuki H. Behavioral destabilization induced by the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. *Mol. Brain*, 4: 12, 2011
- 5) Martin-Arenas F. J., Pintado C. O. Results of the Open Field Test at different light intensities in C57 mice. *Proceedings of Measuring Behavior*, 2014
- 6) Messiha F. S., Martin W. J., Bucher K. D. Behavioral and genetic interrelationships between locomotor activity and brain biogenic amines. *Gen. Pharmacol.* 21 (4): 459-464, 1990

Relationship between light intensity and mice behavioral tests

Yuna MORITA, Yuta UTAKA, Ryo TANOUE, Sayumi YAMAMOTO,

Narumi HASHIKAWA and Naoya HASHIKAWA

*Graduate School of Science, Okayama University of Science
1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

(Received October 27, 2016; accepted December 5, 2016)

Many studies have reported that there is a close relationship between brightness and mice behavior. However, influence of light intensity on various behavioral tests of mice remains unclear. Furthermore, the light intensity on the behavioral tests of mice is quite different by researchers. In the present study, to clarify the influence of light intensity on several behavioral tests of mice, we have examined open field test, social interaction test, Y-maze test, and depression related behavior tests on four types of light intensity (25, 60, 180, 540 lux) in ICR mice. Light intensity did not affect open field test, social interaction test, and Y-maze test. However, immobility time of the forced swim test decreased with increasing light intensity. In contrast, immobility time on the tail suspension test decreased with 60, 180, 540 lux compared to 25 lux. These results suggest that light intensity affects only the depression related behavior tests in ICR mice.

Keywords: light intensity; behavioral test; mouse; depression related behavior tests.