

行動試験の時間帯および照明色がマウスに与える影響

山本 紗由美・田上 凌・森田 裕奈

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

(2017年9月20日受付、2017年12月4日受理)

マウスは夜行性であり、活発となる時間帯は夜であることが知られている。しかし、マウスの行動試験を行う時間帯は、我々測定者が活動する日中となる。また、マウスは光においても敏感であり、光量はマウスの行動試験に大きな影響を与えることが明らかとなっている。しかし、照明の色が与える影響については不明な点が多い。今回、マウスの行動試験において実験を行う時間帯の影響を解析するため、9時、15時、21時において様々な行動試験を行い検討した。また、照明の色がどのような影響を与えるかを明らかにするため、光量を60 luxに設定した白色光、赤色光、青色光の照明を用いた検討も行った。時間帯の影響においては、21時において一般行動の増加傾向が見られたが、短期記憶試験、抑うつ行動試験、社会的行動試験においては変化が見られなかった。また、照明色の影響においては、赤色光において一般行動の有意な増加、およびうつ様行動の有意な減少が認められた。以上のことから、マウスの行動試験を行うにあたり、時間帯は影響を示さなかったが、照明の色はマウスの行動に大きく影響を与える可能性があることが示唆された。

1. 緒言

同じ遺伝子型をもつ系統のマウスやラットを使った動物実験で再現性がない場合が見受けられることがある。近年、あるマウス群で成功した治療法が、別のマウス群でうまくいかないことがあり、これがマウスの飼育状態が原因であることが報告された (Reardon, 2016)。マウスの行動試験においても、飼育環境および行動試験を行う環境を一定に整えることは重要であり、それらの環境は大きな影響を与えると考えられる。飼育環境においては、どの群のマウスにも同じ飼料を十分量与え、1ケージ当たりのマウスの飼育数も同一にし、どのケージの清掃も毎週同じように行い、毎日決まった時間に照明が点灯・消灯するように設定しているため、ほぼ一定の環境を整えていると考えられる。しかし、行動試験においては、試験を行うマウスの匹数によって行う時間帯が変わることがある。また、設置されている照明器具の色も多少異なることがあり、影響を及ぼす可能性は否定できない。

今回、行動試験を行う時間帯がマウスの行動にどのような影響を与えるか明らかにすることを目的とし、異なる時間帯 (9時、15時、21時) において、それぞれの群のマウスの行動試験を行った。また、照明の色がマウス行動試験に与える影響を明らかにすることを目的とし、異なる色 (白、赤、青) の照明を用いて行動試験を行い解析した。

2. 実験材料および実験方法

2-1 実験動物

実験動物には、7週齢の雄性ICRマウスを用い、ケージ内に5匹ずつ分けて飼育を行った。自由給餌法にて飼育し、飲料水は水道水を与えた。また、C57BL/6を社会的行動試験時に使用した。

2-2 実験環境

試験を行う時間帯の影響の実験では、9時、15時、21時にマウスの行動試験を行った。照明色の影響の実験では、白 (蛍光灯色)、赤、青の電球を用い、マウスおよびマウス周辺に光を当てて行動試験を行った。また、各実験の測定ごとに照度計で60 luxに光量を合わせてから測定を行った。

2-3 行動試験による評価

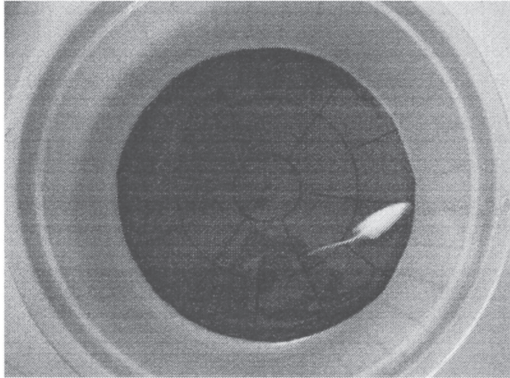
【一般行動の評価】

Open field test; オープンフィールド試験

一般行動 (自発行動量や探索行動、不安行動) 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) を用いた。19区画にほぼ等面積となるように中央の円から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。

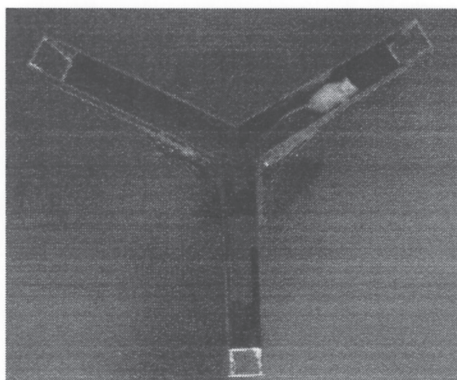


【記憶行動の評価】

Y-maze test; Y字型迷路試験

短期記憶を評価する方法である。

マウスを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した。Y字迷路は、黒色のアクリル板にて作成した（幅15 cm、壁の高さ15 cm、アームの長さ45 cm）。また、アームの先端は、マウスの視界を遮らないように透明のアクリル板を使用し、測定を行う前にY字迷路の各アーム先端の外側に新規物を置き、マウスが方向を認識できるようにした。測定は、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行った。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。

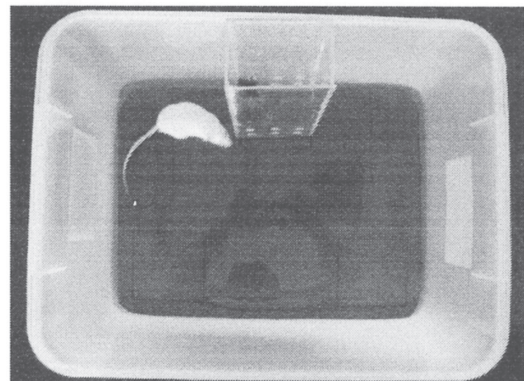


【社会性の評価】

Social interaction test; 社会的行動試験

社会的行動を評価する方法である。

四角形のオープンフィールド（46 × 36 cm）の一角に小さい透明なケージを配置し、最初にケージだけを置いた状態でマウスがケージの周囲に滞在した時間を測定した。その後、そのケージに異なる系統であるC57BL/6マウスを入れ、同様に測定した。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もつとされ、逆に比率が低いと社会的行動が低く、相手に恐怖をもちやすい、または相手への興味が低いとされる。

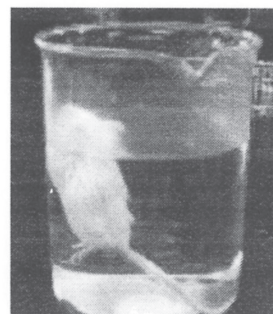


【抑うつ行動の評価】

Forced swim test; 強制水泳試験

抑うつ行動を評価する方法として最も使用される方法である。

1 Lのビーカーに10 cm程度28℃の水を入れ、1分後から5分間のマウスの行動を測定した。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。



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。また、One-way ANOVAを用いて統計的处理を行い、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 時間帯によるマウス行動試験への影響

行動試験を行う時間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。行動試験を行う時間を9時、15時、21時に設定し、測定を行ったところ、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) において、9時、15時では有意な差は見られなかったが、21時で増加傾向が見られた (Fig. 1A, B, C)。短期記憶試験であるY-maze test、社会的行動試験であるsocial interaction test、および抑うつ行動試験であるforced swim test では時間帯による影響は見られなかった (Fig. 1D, E, F)。

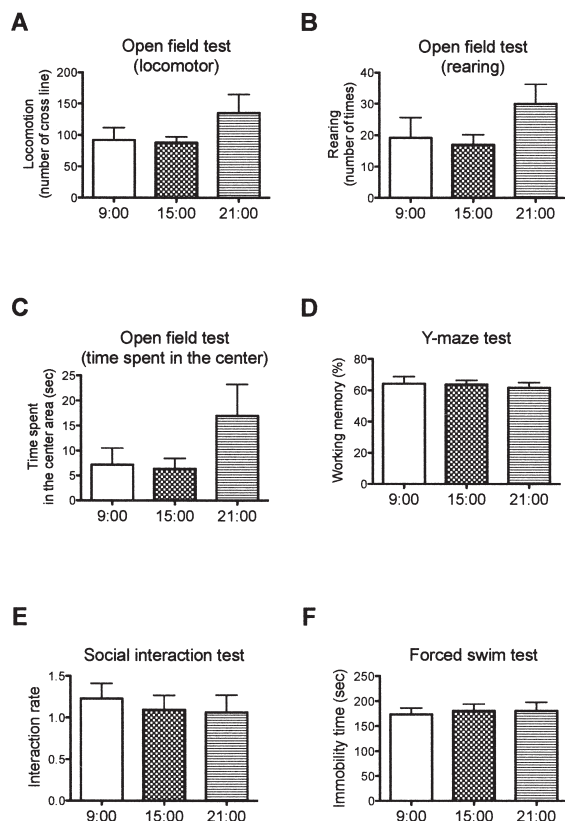


Fig. 1 Effect of time zone on the behavioral tests of mice. (A) Locomotor activity (n=5). (B) Rearing activity (n=5). (C) Time spent in the center area (n=5). (D) Y-maze test (n=5). (E) Social interaction test (n=5). (F) Immobility time in the forced swim test (n=5). Each bar indicates the mean \pm S. E. M.

3-2 照明色によるマウス行動試験への影響

行動試験を行う際、照明の色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。

行動試験時の色を白、赤、青色に設定し、測定を行ったところ、区画横切り回数 (locomotor activity) では、白・青色に比べて赤色で有意な増加が見られた。立ち上がり回数 (Rearing activity) では、青色に有意な減少が見られ、中央区画滞在時間 (time spent in the center area) では、赤色に有意な増加が見られた (Fig. 2A, B, C)。短期記憶試験であるY-maze testでは、照明色による有意な変化は見られなかった。また、社会的行動試験であるsocial interaction testにおいても有意な変化は見られなかった (Fig. 2D, E)。しかし、抑うつ行動試験であるforced swim testでは、赤色照明で有意な不動時間の減少が認められた (Fig. 2F)。

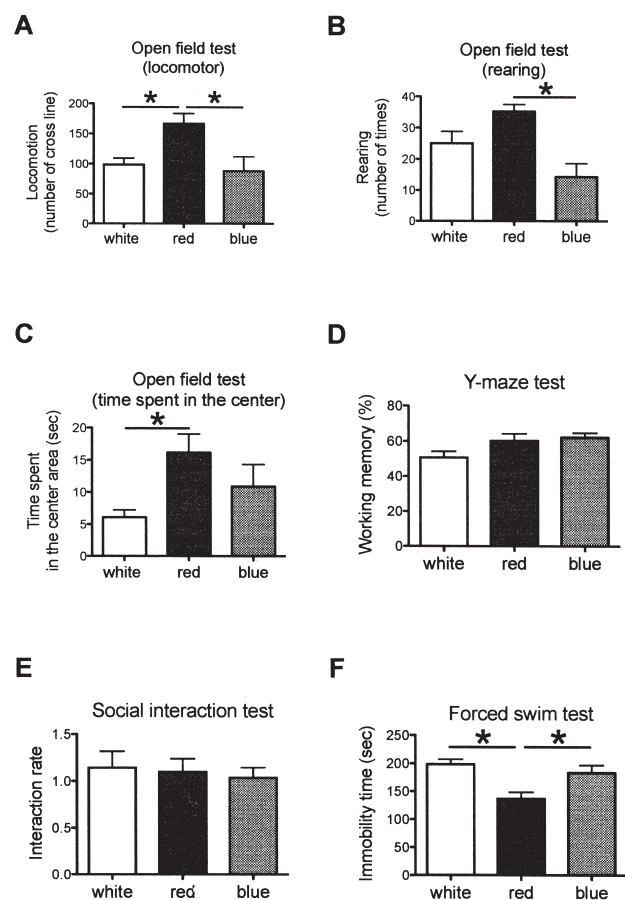


Fig. 2 Effect of light illumination color on the behavioral tests of mice. (A) Locomotor activity (n=5). (B) Rearing activity (n=5). (C) Time spent in the center area (n=5). (D) Y-maze test (n=5). (E) Immobility time in the forced swim test (n=5). (F) Social interaction test (n=5). Each bar indicates the mean \pm S. E. M. * $P < 0.05$ (One way ANOVA)

4. 考察

7週齢雄性ICRマウスを用いて時間帯によるマウスの行動試験への影響、および照明の色がマウスに与える影響の解析を行った。マウスは夜行性であることが知られており、マウスの長期記憶においては、活動期前半（夜の前半）での学習獲得が最も効率が良くなるという報告がある（Shimizu et al., 2016）。今回の時間帯を変えた実験では、21時がマウスの活動期前半にあたるが、短期記憶を評価するY字迷路試験では影響は見られなかった（Fig. 1D）。短期記憶は海馬が中心となり行われるが、長期記憶は海馬が前頭連合野と連携し、必要であると判断された記憶が脳皮質に保持されることで行われる。逆に保持する必要がないと判断された記憶は即座に抹消される。つまり、長期記憶は短期記憶が整理されて脳皮質に保持された記憶である。今回の実験により、海馬を中心とした短期記憶の学習においては、時間帯の影響を受けないと考えられることから、長期記憶において、時間帯は海馬から前頭連合野への連携、もしくは脳皮質での記憶の貯蔵に影響を及ぼす可能性があると考えられる。また、抑うつ行動試験、社会的行動試験においても時間帯の影響は見られなかった（Fig. 1E, F）。マウスの行動実験はマウスの活動時間帯である夜中に行わず、我々の活動時間帯である日中に行うことが多いが、今回の結果より、短期記憶の評価、抑うつ様行動の評価、および社会性の評価は、時間帯にとらわれずに行っても問題がないと考えられる。しかし、一般行動試験では21時が最も活動的になる傾向が見られたため（Fig. 1A）、活動性が関係する行動試験においては注意が必要である。

以前の我々の研究により、光量はマウスの行動試験に大きな影響を与えることが明らかとなっている（森田他, 2016）。しかし、光量以外にもマウスの行動試験に影響を及ぼす可能性が考えられ、今回は照明の色の影響を解析した。鳥類、爬虫類、両生類、魚類といった脊椎動物では、錐体細胞の種類が3種類である3色型色覚、もしくは4種類もつ4色型色覚である動物が多く知られている。しかし多くの哺乳類は青と緑（黄緑色）の2種類の錐体細胞しかもたず、2色型色覚であることが言われている（岡部他, 2002）。ヒトは3色型色覚であるが、マウスは2色型色覚である。よってマウスでは赤色は見えず、暗いと認識されると考えられている。今回の実験では白、赤、青の照明を用いてそれらの照明が与える影響について解析を行った。赤色の照明を用いた実験では、一般行動の有意な増加、および抑うつ行動試験の有意な減少が認められた。以前の我々の研究において、光量が低いほど抑うつ行動試験の不動

時間は増加傾向にあったことが明らかとなっている（森田他, 2016）。赤色照明が暗いと認識されたと考えた場合、抑うつ行動試験の不動時間は増加するはずであるが、今回、逆に減少するという結果になった。赤色ダイオードがマウスの概日周期に影響を与えるという報告もあるため（Hofstetter et al., 2005）、赤色照明が色識別に関わらずに脳に直接影響を与えた可能性も考えられるが、今後さらに検討する必要がある。青色は目に見える光の中で最も波長が短く、エネルギーが強いといわれており、そのシグナルは網膜から脳へとダイレクトに届けられ、メラトニン、アドレナリン、セロトニン、コルチゾールといった精神活動や記憶に影響するさまざまなホルモンを刺激するといわれている（West et al., 2011, Gabel et al., 2013）。しかし、白色照明と比較し青色照明はすべての行動試験に影響を与えなかった。今回の結果により、照明の色がマウスの行動試験に影響を与える可能性があることが明らかとなった。白色である昼白色と、青色を含む昼光色、オレンジ色を含む電球色など、様々な照明色が一般的に使用されているが、照明色が行動に影響を与える可能性があるため、マウスの行動試験を行う際には照明の色にも注意が必要であると考えられる。

参考文献

- 1) Reardon S., A mouse's house may ruin experiments., *Nature* 530 (7590): 264, 2016
- 2) Shimizu K., Kobayashi Y., Nakatsuji E., Yamazaki M., Shimba S., Sakimura K., Fukada Y., SCOP/PHLPP1 β mediates circadian regulation of long-term recognition memory., *Nature Commun.* 7: 12926, 2016
- 3) 森田裕奈、宇高裕太、田上凌、山本紗由美、橋川成美、橋川直也 光量がマウス行動試験に与える影響 *岡山理科大学紀要* 52 A: 51-54, 2016
- 4) 岡部正隆、伊藤啓 色覚の原理と色盲のメカニズム *細胞工学* 21 (7), 2002
- 5) Hofstetter J. R., Hofstetter A. R., Hughes A. M., Mayeda A. R., Intermittent long-wavelength red light increases the period of daily locomotor activity in mice., *J. Circadian Rhythms* 3 (8), 2005
- 6) West K. E., Jablonski M. R., Warfield B., Cecil K. S., James M., Ayers M. A., Maida J., Bowen C., Sliney D. H., Rollag M. D., Hanifin J. P., Brainard G. C., Blue light from light-emitting diodes elicits a dose-dependent suppression of melatonin in humans., *J. Appl. Physiol.* 110 (3): 619-626, 2011
- 7) Gabel V., Maire M., Reichert C. F., Chellappa S. L., Schmidt C., Hommes V., Viola A. U., Cajochen C., Effects of artificial dawn and morning blue light on daytime cognitive performance, well-being, cortisol and melatonin levels., *Chronobiol. Int.* 30 (8): 988-997, 2013

Effects of time zone and illumination color on the behavioral tests of mice

Sayumi YAMAMOTO, Ryo TANOUE, Yuna MORITA, Narumi HASHIKAWA
and Naoya HASHIKAWA

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

(Received September 20, 2017; accepted December 4, 2017)

It is known that mice are nocturnal and the activity time is nighttime. In general, mice behavioral tests are carried out during the daytime because the researcher is working in daytime. Furthermore, although it is clear that the mice are sensitive to light and the light intensity has been reported to have a great influence on the behavioral tests of mice, the influence of illumination color on various behavioral tests of mice remains unclear. In the present study, to clarify the influence of the time zone on the behavioral tests of mice, we examined various behavioral tests at 9:00, 15:00, and 21:00. In addition, to elucidate the influence of illumination color, we investigated the behavior tests of mice using white light, red light and blue light. In the study of time zone, general behavior tended to increase at 21:00, but did not affect the short-term memory test, depression behavior test, and social behavior test. In contrast, in the study of illumination color, red light had a great influence on behavioral tests of general behavior and depression behavior. These results suggest that although the time zone has little effect in the behavioral test of mice, but the color of the illumination may have an influence on the behavior of mice.

Keywords: time zone; illumination color; behavioral test; mouse.