15 日間のストレス負荷が ICR マウスに及ぼす行動と脳海馬神経細胞への影響

坂本祐介, 小川琢未, 小川真実, 松尾由美, 橋川直也, 橋川成美*

Effects of 15-day Chronic Stress on Behavior and Neurological Changes in the Hippocampus of ICR Mice

Yusuke Sakamoto, Takumi Ogawa, Mami Ogawa, Yumi Matsuo,
Naoya Hashikawa, and Narumi Hashikawa*

Department of Life Science, Okayama University of Science; 1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan.

(Received June 22, 2014; Accepted September 27, 2014)

Numerous rodent models of depression have been reported, most requiring a long experimental period and significant effort. We explored a new potential mouse model for depression by investigating whether exposure to a 15-day chronic stress paradigm could induce depression-like behavior in ICR mice. Animals in the stress-exposed groups were subjected to 3 h of restraint while immersed in a 28°C water bath daily for 15 consecutive days. Immobility time in the forced swim test was increased in the chronic stress-exposed mice compared with the controls. Serum corticosterone levels were also much higher in the stressed mice than in the control mice. Hippocampal cell survival (BrdU-positive cells) and neurotrophic factor (NGF, TrkA) mRNA levels were significantly decreased in the chronic stress-exposed mice compared with controls. Administration of the anti-depressant drugs clomipramine (20 mg/kg/d) or imipramine (30 mg/kg/d) did not change the immobility time in the forced swim test, but treatment with lithium (100 mg/kg/d) did result in slight improvement. These results suggest that this 15-day chronic stress paradigm can induce depression-like behavior and neurological changes, in a short time and with minimal effort, facilitating the assessment of treatments for depression.

Key words—depression; chronic stress; forced swim test; neurotrophic factor; antidepressant-drug

緒 言

うつ病は、感情がなんらかの理由で抑制され、社会生活をおくるだけの気力が起こらず、社会的に適応し難くなる病気である。うつ病患者若しくはうつ病予備軍とされている人は増加の一途をたどっており、近年 15 人に 1 人が生涯に 1 度は“うつ病”にかかる可能性があると報告されている。ストレスはうつ病などの精神疾患のリスク因子として考えられており、人のうつ病発症のリスクファクターとなり得るストレス刺激の多くは、精神的ストレス刺激と考えられている。

動物を用いたうつ病モデルは、主に成体へストレスを負荷するものと、若齢期でのストレス負荷とがある。回避・逃避が不可な電撃ストレス刺激を負荷

する学習性無力試験 (Learned helplessness test)¹⁾や、比較的軽微な様々なストレスを長期間 (6–8 週間) 負荷する慢性緩和ストレスモデル (Chronic mild stress)²⁾や、攻撃的な動物と同じケージで飼育する社会的敗北ストレスモデル (Social defeat stress)³⁾などがある。若齢期でのストレス負荷は、生後間もない頃母親と引き離して生育させる母子分離モデル (Maternal deprivation)⁴⁾など様々である。特に慢性緩和ストレスモデルは、うつ病の研究において主流なモデルとして使用されており、運動量の低下、強制水泳試験における不動時間の増加、スクロース摂取量の減少といった、うつ病症状に類似した行動変化が認められる。またこれらの行動変化は、ストレス負荷後 1 ヶ月間近く持続すること、抗うつ薬を短期間ではなく、長期間投与することによって改善されることなどによりヒトの臨床症状に近い状態を再現する。しかしながらこの方法は、うつ様症状を呈するまでに一ヶ月以上要し、手間が煩

雑である。実験者の負担を考えると、2週間程度のストレス負荷期間でうつ様症状をみるのが望ましいとわれわれは考えた。8時間マウスを50 mLチューブにつめる拘束ストレスを14日続けると不安とうつ様症状がでるが、2時間の拘束ストレスを14日間続けただけでは、わずかにうつ様症状がみられるだけという報告がある。⁵⁾一方、2時間の拘束ストレスを10日続けることで、不安とうつ様症状を示す報告もある。^{6,7)}これらの報告は、拘束ストレスという同じ方法を取りつつも、ストレス負荷時間によってうつ様行動の発現に影響を与える可能性を示唆している。われわれは、拘束ストレスだけでは、行動の変容に影響を与えるには不十分であると考えた。そこで、拘束ストレスに水ストレスを追加し、新たなストレスモデルの作製を試みた。このモデルマウスについて行動薬理学的及び分子生物学的検討を行った。

実験材料及び実験方法

1. 実験動物 実験に用いたすべての動物は岡山理科大学動物実験管理委員会の承認を得ており、規定に従った条件下において飼育した。6週齢の雄性ICRマウス（清水実験材料より購入）を購入し、馴化のため岡山理科大学の飼育施設にて8週齢になるまで育てたのち、実験に用いた。動物はケージ内に4-6匹ずつ分けて飼育した。室内は $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ に保ち、明暗サイクルは12時間毎（朝7時点灯、夜7時消灯）とし、自由給餌法にて飼育し、飲料水として水道水を与えた。ストレス負荷方法として、マウスを50 mLチューブの先端を切断し空気穴を作ったものに入れ、 28°C の温浴に朝10時より3時間浸し、ストレス負荷を15日間行った。温浴の深さは、50 mLチューブに入れた状態のマウスの胸のあたりまで水につかるくらいとした。ストレス負荷群マウスをストレス負荷中は、コントロール群マウスを、ストレス負荷をかける部屋に移動し、絶飲、絶食を行った。

2. 行動試験による評価 15日間のストレス負荷後、各種行動試験を行い、マウスの状態を評価した。オープンフィールド試験、Y字型迷路試験をストレス負荷後の16日目に、ガラス玉覆い隠し試験、強制水泳試験をストレス負荷後の17日目に行った。各試験は朝10時からと昼2時からそれぞれ

を行い、最後の行動試験を強制水泳試験とした。

2-1. Open-field test ; オープンフィールド試験

円形上のオープンフィールド槽（直径57.5 cm, 高さ32 cm）を用いた。床は19区画にほぼ等面積となるよう線で仕切り、2つの円（直径13.5 cm, 35.5 cm）を槽の中央に描きその中央の円から18等分にするように放射状の線を引いた。すべての区分は面積が大体直径13.5 cmの円と同じになるようにした。中央区間は直径35.5 cmの円とした。このオープンフィールドの中央にマウスを入れ3分間の行動を測定した。測定項目は、自発行動量（locomotor activity ; 区画を横切った回数）、立ち上がり行動（rearing）、中央滞在時間（time spent in the center area）の3つを観察した。

2-2. Forced swim test ; 強制水泳試験

マウスを 28°C の水を10 cmまで入れた1 Lビーカー（高さ15 cm, 直径11.5 cm）に6分間つけ、1分後の行動を5分間観察した。暴れることなく浮かんでいる時間（マウスが水から頭を出すのに必要なわずかな動きをしている時間も含む）を不動時間として記録した。

2-3. Y-maze test : Y字型迷路試験

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（空間作業記憶）として評価した。Y字型の装置は黒色のアクリル板にて作製した（幅15 cm, 壁の高さ15 cm, アームの長さ45 cm）。またY字型アームの先端はマウスからの視界を遮らないように透明のアクリル板を用いて筒状とした。測定を行う前にY字の各アーム先端の外側に新規物を置き、マウスが方向を分かるようにした。測定は8分間行った。マウスをY字迷路のいずれかのアームの先端に置き、迷路内を自由に探索させ、進入したアームを順に記録し、マウスの行動量とした。また、3方向のアームに進入する順序を観察し3回連続して異なるアームへ進入した回数を空間作業記憶として評価した。

2-4. Marble-burying test ; ガラス玉覆い隠し試験

マウスのケージ（高さ13.5 cm, 幅20.5 cm, 長さ31 cm）に床敷（木くず）を5 cmの高さになるまで敷き、その上に24個のガラス玉を均等に配置した。マウスをガラス玉を配置したケージ内に入れ、30分経過後マウスが隠したガラス玉の個数を測定し、不安行動の指標とした。

すべての動物の行動はビデオにて録画し、解析を二重盲検的にカウンターあるいはストップウォッチを用いて行った。

3. 血清中のコルチコステロン濃度測定 コルチコステロン測定のための血液は、15日間のストレス負荷後、行動試験を行わず16日目の夕方4時より採取を行った。血液サンプルは pentobarbital-Na (50 mg/kg, i.p.) にて麻酔をかけ腋窩動脈より採取した。サンプルを4℃にて遠心し、血清サンプルは測定するまで-30℃にて保存した。コルチコステロン ELISA キット (Assay pro) により測定した。方法はキットのプロトコルに準じた。

4. 免疫組織化学 脳の海馬における細胞生存能を観察するために、5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU; 50 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) を2回朝10時と夕方6時にストレス負荷時の最初の5日間連続で腹腔内投与した。行動試験後、マウスを pentobarbital-Na (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて開胸し右心房に切り込みを入れた後、心室から生理食塩水を20 mL 流し込むことにより脱血を行った。続いて4%パラホルムアルデヒドと0.35%のグルタルアルデヒドを0.1 M リン酸緩衝液で作製した固定液で灌流固定を行った後、脳のサンプルを採取した。採取した脳は4%パラホルムアルデヒドを0.1 M リン酸緩衝液で作製した固定液中に4℃で24時間保存した後、3日間毎日15% sucrose 溶液に置換し、4℃にて保存した。

マウスの脳を台座にとりつけ、-25℃のクリオスタット庫内にて凍結した。-15℃に設定したクリオスタットを用いてマウスの脳を海馬が見えたところから20 μ m の厚さで12枚薄切したものを染色に用いた。薄切した切片はまずPBSで3回洗浄し、2N HCl で30分45℃で賦活化を行った。その後、PBSで3回洗浄し1% bovine serum albumin (BSA) を含んだ10%ヤギ血清にて60分間ブロッキングを行った。その後、切片をマウスモノクローナル抗体 BrdU 抗体(1:300, Roche Diagnostics K.K., Tokyo) にて4℃でovernight incubateを行った。PBSで洗浄後切片をhorse radish peroxidase (HRP)-labeled goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) を1%BSA入りPBSにて1:300に希釈した溶液で室温にて60分間 incubate した。PBS洗浄後、diaminobenzidine 溶液にて発色

させた。

5. BrdU 陽性細胞数の測定方法 BrdU 陽性細胞数の測定は海馬歯状回全体における細胞を測定した。BrdU 陽性細胞として、diaminobenzidine により茶色く染まった箇所の細胞をカウントした。各切片毎の BrdU 陽性細胞数をそれぞれのグループでの平均値 $\pm$ S.E.として表した。測定者によるばらつきを防ぐため、二重盲検的に3人で測定し、各測定者の平均値をデータとして示した。

6. Real-time PCR による脳内遺伝子の検討方法

6-1. RNA 抽出 Pentobarbital-Na (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下にて摘出したマウス脳を RNA later (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo) に浸けて48時間保存した。トータル RNA は acid guanidinium-phenol-chloroform (AGPC) 法にて抽出した。抽出の最後に RNA サンプルは diethyl pyocarbonate water (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) にて溶かし、260 nm の吸光度を測定した。Reverse transcription は M-MLV (和光純薬) を用いてプロトコルに従って行った。

6-2. Real-time PCR 解析 Real-time PCR は Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo) のプロトコルに従って行った。解析は Eco Real-Time PCR system (Illumina, Inc., Tokyo) を用いた。使用したプライマー (Eurofins MWG Operon Inc., Tokyo) は glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), nerve growth factor (NGF), tyrosine kinase receptor (TrkA), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin-3 (NT-3) である (Table 1)。GAPDH を内因性のコントロールとして用いた。それぞれの遺伝子は GAPDH にて補正を行い、 $\Delta\Delta C_t$ 法にて解析を行った。

7. 薬物 ストレス負荷マウスに薬剤を投与するにあたって、それぞれの薬剤の適正濃度を検討するため、10週齢 ICR マウスに Clomipramine, Imipramine, Lithium をそれぞれ用量依存的に腹腔内注射あるいは強制経口投与し、薬物投与後30分後に Forced swim test を行った。Clomipramine では20 mg/kg, Imipramine では30 mg/kg, Lithium では100 mg/kg で不動時間が減少した。したがって、Clomipramine では20 mg/kg, Imipramine では30 mg/kg, Lithium では100 mg/kg を適正濃度とし

Table 1. Oligonucleotide Sequences for Real-time PCR Amplification

	Forward	Reverse
GAPDH	5'-GCCATTTGCAGTGGCAAAGTGG-3'	5'-GATGGGCTTCCCGTTGATGACAAGC-3'
NGF	5'-CACAGCCACAGACATCAAGGGC-3'	5'-CTGCTTCTCATCTGTTGTC-3'
TrkA	5'-GATACGGTGACCACTGTGATGGG-3'	5'-GCTTGCAGCTGTTCCATCTCTTG-3'
BDNF	5'-TGGCTGACACTTTTGAGCACGTC-3'	5'-GCTCCAAAGGCACTTGACTGCTGA-3'
NT-3	5'-TGCAACGGACACAGAGCTACTACG-3'	5'-CATAATCCTCCATTAGGTATAAGG-3'

た。ストレス負荷マウスには、上記の方法で決定した適正濃度の薬物をストレス負荷期間中朝 10 時に Imipramine を腹腔内注射で、Lithium, Clomipramine をゾンデにて 15 日間投与した。

8. 統計学的解析 得られたデータ値は平均値 ± 標準誤差 (Mean ± S.E.M.) で表した。得られた結果はスチューデントの *t* 検定あるいは一元配置分散分析 (one way analysis of variance; ANOVA) 後, Tukey の多重比較検定法を用いて統計学的処理を行った。いずれも危険率 5% 以下を有意差ありと判定した。

結 果

1. ストレス負荷によるマウスの行動変化 ストレス負荷によるマウスの基本的な行動変化を見るため、Open-field test を行った。自発行動量はコントロールと比べストレス負荷により有意な増加がみられた。しかし、立ち上がり行動、中央滞在時間においては変化がみられなかった。また、うつ様行動の変化を評価するため、Forced swim test を行った。ストレス負荷によりコントロールと比べ有意な不動時間の延長がみられ、うつ様症状を示した。さらに、マウスの不安行動をみるため、ガラス玉覆い隠し試験を行った。ストレス負荷により有意な不安行動を示した。Y-maze test による短期記憶の影響はストレス負荷により変化がみられなかった (Fig. 1)。

2. ストレス負荷による海馬神経細胞数と血清コルチコステロン濃度変化 脳の海馬における細胞生存能をみるために BrdU を用いて免疫組織学染色を行った。ストレスを負荷した海馬切片においては、BrdU 陽性免疫反応がコントロールに比べて弱い染色結果となった [Fig. 2(A)]。海馬歯状回全体の BrdU 陽性細胞数をカウントした結果、ストレス負

Fig. 1. Effects of 15-d Chronic Stress on Mice Behavior

Locomotor activity, rearing activity, time spent in the center area in the open field test, immobility time in the forced swim test, the number of buried marble ball in the marble-burying test, spatial memory following 8 min of exploration in the Y-maze test (control *n*=30, stress *n*=25). Each bar indicates the mean ± S.E.M. **p*<0.05 vs. control.

荷によりコントロールと比べ有意な細胞生存数の減弱がみられた [Fig. 2(B)]。また、ストレス負荷により増加することで知られている、血清中のコルチコステロン濃度を測定した。ストレス負荷によりコントロールと比べ有意な増加がみられた [Fig. 2(C)]。

3. Real-time PCR による脳内遺伝子の検討

マウス脳の海馬での mRNA 発現量の変化を real-time PCR 法にて検討を行った。BDNF や NT-3 では有意な変化がみられなかったが減弱傾向がみられ、NGF や NGF 高親和性受容体の TrkA ではストレス

Fig. 2. Effects of 15-d Chronic Stress on Cell Survival of the Hippocampal Dentate Gyrus and Serum Corticosterone Level

(A) Representative images showing BrdU immunopositive cells expressing in the hippocampus dentate gyrus in the wild type mice and stressed mice. Arrows mean BrdU immunopositive cells. (B) 15-d chronic stress significantly decreased BrdU-positive cells (control $n=3$, stress $n=3$). (C) 15-d chronic stress exposed mice significantly increased serum corticosterone level (control $n=20$, stress $n=20$). Each bar indicates the mean $\pm$ S.E.M. * $p<0.05$ vs. control.

負荷により有意な減弱がみられた (Fig. 3).

4. 薬物投与によるストレス負荷マウスのうつ様行動の変化 ストレス負荷マウスの基本的な行動に薬物投与による影響があるかどうか検討するため、Open-field test を行った。自発行動量、立ち上がり行動、中央滞在時間いずれにおいても薬物投与により有意な変化はみられなかった (Fig. 4)。また、Forced swim test によりみられたストレス負荷による不動時間の延長は Lithium 投与により有意に減弱した (Fig. 4)。

考 察

本実験では 8 週齢の ICR マウスを 50 mL チューブの先端を切断し空気穴を作ったものに入れ、28°C

の温浴に 3 時間浸し、ストレス負荷を 15 日間行ううつ病モデルマウスを作製し、このモデルマウスがうつ病モデルマウスとして有用であるかということを薬理的及び分子生物学的に検討した。本モデルは、より短期間で簡便なストレスモデルを作製するために、Torner らの慢性ストレスモデルを参考にした。⁸⁾ ストレス負荷期間を 21 日から 15 日に短縮し、チューブを用いた拘束ストレスに水ストレスを追加した。本モデルよりも短期間で抑うつ様症状を示すモデルとして、社会的敗北ストレスモデルが存在する。これは攻撃的なマウスあるいはラットと接触を続けることで、ストレスを与える方法である。10 日間連続で 5 分間の接触を繰り返すことにより、うつ様症状を示す。⁹⁾ しかしながら、最初に攻

Fig. 3. Changes of Neurotrophic Factors mRNA Levels in Stressed Mice Hippocampus

Level of NGF, TrkA, BDNF and NT-3 mRNA were determined by quantitative real-time PCR analysis in the hippocampus (control $n=5$, stress $n=10$). Each bar indicates the mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$ vs. control.

Fig. 4. Effects of 2 w of Anti-depressant Drugs Treatment on Behavior of 15-d Chronic Stress Mice

Locomotor activity, rearing activity, time spent in the center area in the open field test, immobility time in the forced swim test. Clomipramine (CLO; 20 mg/kg/d), Imipramine (IMI; 30 mg/kg/d) and Lithium (LIT; 100 mg/kg/d) were administered orally or intraperitoneally to stress mice once daily for 15 d. Each bar indicates mean $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$ vs. control (one-way ANOVA Tukey test) ($n=5-20$).

撃性の高い動物を選出するために、その動物が攻撃を開始する時間が30秒以下かどうか、3回連続してスクリーニングテストを行う必要があること、⁹⁾ 実験マウスと攻撃動物を1匹ずつケージに入れる必要があることから、多くのストレスモデルマウスを一度に作製することは困難であると考えられる。本

モデル方法では、50 mL チューブとチューブ立てと温浴槽を用意すれば、20-30匹のストレスモデルを同時に作製することが可能であり、実験者の負担が軽く、使用し易いモデルであると考えられる。

15日間のストレス負荷後に行動試験を行った結果、Open-field test においては、ストレス負荷により自発行動量の有意な増加がみられていたのに対し、Forced swim test では有意な不動時間の延長がみられた。これは、自発行動量が高い活性を示しているにもかかわらず、水泳環境下においては無気力になり易いこと、ストレスに対する反応性が強いことを示していると考えられる。一方、不安関連行動を評価するために行った Marble-burying test において、有意な不安行動がみられた。マウスなどの小動物は、恐怖や嫌悪を感じる対象や、新奇で奇異な異物に対して防御的な埋め隠し行動を示す。マウスのガラス玉覆い隠し行動は、強迫性障害の症状の一端を評価することが可能な試験系として考えられている。¹⁰⁾ しかしながら、Open-field test における行動量が亢進しており、不安関連行動の指標である中央滞在時間においては変化がみられなかったことから、Marble-burying test において多くのガラス玉を埋めることが不安行動を引き起こしていると単純に結論づけることは難しい。この点においては、更なる検討が必要であると考えられる。Y-maze test を用いて学習・記憶行動の評価を行った。これはマウスを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空間・短期記憶として評価する方法である。網目状の袋を用い慢性ストレスを与えたラットではY-maze test による空間・短期記憶の低下が報告されている。¹¹⁾ しかし、本実験ではストレスによる空間・短期記憶の変化はみられなかったことから、本実験で用いたストレス負荷は短期記憶に影響を及ぼさないことが示唆される。

コルチコステロンはストレス負荷により増加することが知られており、不安症やうつ病や統合失調症との関係が示唆されている。¹²⁾ コルチコステロンを慢性投与した CD-1 マウスでは有意な不安行動やうつ様行動を示す報告もある。¹³⁾ CD-1 マウスは ICR 同様アルビノマウスであり、本結果におけるストレスによるコルチコステロン増加を支持するものである。また、コルチコステロンを慢性投与することにより海馬の萎縮がみられるという報告や、慢性的な

ストレス負荷により海馬歯状回における神経新生が阻害されるという報告がなされている。¹⁴⁾そこで、脳内の海馬歯状回における細胞生存を免疫組織化学的手法にて検討したところ、ストレス負荷で有意な減弱がみられた。

次に、海馬歯状回における細胞生存能が減弱していたことから、神経栄養因子になんらかの変化があるのではないかと考え、海馬における mRNA の発現量を測定した。神経栄養因子の一種である NGF には、神経軸索の伸長及び神経伝達物質の合成促進作用、神経細胞の維持作用、細胞損傷時の修復作用、脳神経の機能回復を促し老化を防止する作用がある。今回の結果では、ストレス負荷マウスにおいて NGF やその高親和性受容体である TrkA において有意な減弱がみられた。最近ではマウスに NGF を鼻腔内投与することで抗うつ作用を示したという報告¹⁵⁾や NGF を投与することで Forced swim test により不動時間の改善がみられたことから、抗うつ効果を示したという報告もある。¹⁶⁾さらにラットの海馬に BDNF 若しくは NT-3 を投与すると Forced swim test において抗うつ効果を示したという報告がある。¹⁷⁾BDNF、NT-3 も NGF と同様神経栄養因子の仲間である。BDNF は脳由来の神経栄養因子であり、脳細胞における神経細胞の生存・成長・シナプスの機能亢進などの神経細胞の成長を調節する作用が、NT-3 は海馬や小脳のような中枢神経系のニューロンに発現し、既存のニューロンの生存及び分化、また新生ニューロン及びグリア細胞の成長と分化の補助的作用がある。Lakshminarasimhan らはストレス負荷やコルチコステロン投与により BDNF が有意に減弱することを報告している。¹⁸⁾今回の結果においてはマウス海馬における BDNF、NT-3 は変化がみられなかった。これらのことから、本ストレス負荷方法は海馬の BDNF や NT-3 よりも NGF を減弱させ、細胞生存を抑制し、うつ様行動を示すモデルであることが示唆される。

さらに抗うつ薬投与が、本ストレス負荷によるうつ様行動を抑制するかどうか検討した。今回抗うつ薬として利用した三環系抗うつ薬である Imipramine、Clomipramine には脳内の神経伝達物質であるノルアドレナリンやセロトニンの再取り込みを阻害し、シナプス間のモノアミン量を増やす作用がある。Imipramine は最初に開発された三環系抗うつ

薬である。Clomipramine は若干の中枢神経抑制作用を示すが、Imipramine より弱いことが報告されている。また、三環系抗うつ薬の中では強迫神経症に対して特異的に有効とされている。一方、Lithium は躁うつ病、うつ病、パニック障害の患者に古くから使われている気分安定薬であるが、いまだ作用機序は完全に解明されていない。¹⁹⁾三環系などの抗うつ薬では十分な効果が得られない場合、強化療法として Lithium を併用投与することがあり、難治性のうつ病患者によく用いられている。マウスをラットのケージに入れストレスを与える社会敗北ストレスを与えたものや、²⁰⁾慢性ストレス (Chronic unpredictable stress)²¹⁾では Imipramine 投与により Forced swim test における不動時間の有意な減少がみられる報告がなされている。このように、臨床で広く用いられている三環系抗うつ薬の効くモデルマウスは既に多く報告されている。しかしながら治療抵抗性うつ病モデルの報告は adrenocorticotrophic hormone (ACTH) を慢性投与して作製したモデルラット²²⁾以外にほとんど報告がされていない。慢性 ACTH 投与モデルラットでは Imipramine と Lithium の併用投与により Forced swim test における不動時間の有意な改善がみられている。²²⁾また、拘束ストレスを 2 時間 14 日間連続して負荷したモデルマウスにおいて、Imipramine 投与により強制水泳試験における不動時間が有意に改善されている報告がある。⁷⁾今回作製したモデルマウスは拘束ストレスだけでは、行動に影響を示さない可能性が考えられたため、水負荷ストレスを追加した結果、Clomipramine や Imipramine の投与では Forced swim test における不動時間の有意な改善がみられなかったが、Lithium 投与でうつ様行動の改善がみられた。これらの結果は、薬剤に対する効果に抵抗性があるモデルマウスである可能性が示唆され、治療抵抗性うつ病改善薬のスクリーニングとして有用ではないかと考えられる。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Overmier J. B., *J. Exp. Psychol.*, **78**, 340–343 (1968).
- 2) Willner P., Muscat R., Papp M., *Neurosci.*

- Biobehav. Rev.*, **16**, 525–534 (1992).
- 3) Kudryavtseva N. N., Bakshtanovskaya I. V., Koryakina L. A., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **38**, 315–320 (1991).
 - 4) Meaney M. J., *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 1161–1192 (2001).
 - 5) Kim K. S., Han P. L., *J. Neurosci. Res.*, **83**, 497–507 (2006).
 - 6) Ihne J. L., Fitzgerald P. J., Hefner K. R., Holmes A., *Neuropharmacology*, **62**, 464–473 (2012).
 - 7) Seo J. S., Park J. Y., Choi J., Kim T. K., Shin J. H., Lee J. K., Han P. L., *J. Neurosci.*, **32**, 9690–9699 (2012).
 - 8) Torner L., Karg S., Blume A., Kandasamy M., Kuhn H. G., Winkler J., Aigner L., Neumann I. D., *J. Neurosci.*, **29**, 1826–1833 (2009).
 - 9) Berton O., McClung C. A., Dileone R. J., Krishnan V., Renthal W., Russo S. J., Graham D., Tsankova N. M., Bolanos C. A., Rios M., Monteggia L. M., Self D. W., Nestler E. J., *Science*, **5762**, 864–868 (2006).
 - 10) Njung'e K., Handley S. L., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **38**, 63–67 (1991).
 - 11) Conrad C. D., Galea L. A., Kuroda Y., McEwen B. S., *Behav. Neurosci.*, **110**, 1321–1334 (1996).
 - 12) Wolkowitz O. M., Burke H., Epel E. S., Reus V. I., *Ann. NY Acad. Sci.*, **1179**, 19–40 (2009).
 - 13) Kutiyawalla A., Terry A. V. Jr., Pillai A., *PLoS One*, **6**, e26153 (2011).
 - 14) Hayashi H., Doi M., Onoue Y., Kuwatsuka K., Miyake A., Koyama T., Shinomiya K., Miyazaki I., Aasanuma M., Kitamura Y., *Yakugaku Zasshi*, **132**, 173–178 (2012).
 - 15) Shi C. G., Wang L. M., Wu Y., Wang P., Gan Z. J., Lin K., Jiang L. X., Xu Z. Q., Fan M., *Neurochem. Res.*, **35**, 1302–1314 (2010).
 - 16) McGeary J. E., Gurel V., Knopik V. S., Spaulding J., McMichael J., *Neuropeptides*, **45**, 317–322 (2011).
 - 17) Shirayama Y., Chen A. C., Nakagawa S., Russell D. S., Duman R. S., *J. Neurosci.*, **22**, 3251–3261 (2002).
 - 18) Lakshminarasimhan H., Chattarji S., *PLoS One*, **7**, e30481 (2012).
 - 19) Furukawa T., *Seishin Igaku*, **24**, 211–221 (1982).
 - 20) Cline B. H., Steinbusch H. W., Malin D., Revishchin A. V., Pavlova G. V., Cespuglio R., Strekalova T., *BMC Neurosci.*, **13**, 110 (2012).
 - 21) Elsayed M., Banasr M., Duric V., Fournier N. M., Licznarski P., Duman R. S., *Biol. Psychiatry*, **72**, 258–265 (2012).
 - 22) Kitamura Y., Araki H., Gomita Y., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **71**, 63–69 (2002).