

Basic Study on Marble-Burying Behavior as an Animal Model of Obsessive-Compulsive Disorder

Michihiko MATSUSHITA¹⁾, Nobuaki EGASHIRA²⁾, Satoko HARADA²⁾
Ryoko OKUNO²⁾, Hiroshi NAGAI¹⁾, Shozo CHIDORI¹⁾,
Kenichi MISHIMA²⁾, Katsunori IWASAKI²⁾, Michihiro FUJIWARA²⁾
and Ryoji NISHIMURA¹⁾

¹⁾ Department of Psychiatry, Fukuoka University School of Medicine, Fukuoka University

²⁾ Department of Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University

Abstract : In this study, we examined the characteristics of marble-burying behavior, which has been considered an animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). ICR male mice exhibit a marble-burying behavior in comparison to ddY and DBA/2 male mice. However, we did not observe any significant differences between the ICR male mice and the ICR female mice regarding the marble-burying behavior. In addition, selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), such as fluvoxamine and paroxetine, which has been used to treat human OCD symptoms, inhibited such marble-burying behavior without affecting the locomotor activity in ICR male mice. In contrast, milnacipran had no effect on the marble-burying behavior in ICR male mice. These findings suggest that fluvoxamine and paroxetine exhibit an anti-OCD activity in clinical use, and that the serotonergic neuronal system may also be involved in the marble-burying behavior in mice.

Key words : Marble-burying behavior, Obsessive-compulsive disorder, Fluvoxamine, Paroxetine, Milnacipran

強迫性障害の動物モデルである Marble-burying 行動の基礎的研究

松下 満彦¹⁾ 江頭 伸昭²⁾ 原田 聡子²⁾
奥野 良子²⁾ 永井 宏¹⁾ 千鳥 正三¹⁾
三島 健一²⁾ 岩崎 克典²⁾ 藤原 道弘²⁾
西村 良二¹⁾

¹⁾ 福岡大学医学部精神医学教室

²⁾ 福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室

要旨 : 我々は強迫性障害の動物モデルである marble-burying behavior (ガラス玉覆い隠し行動) 実験の特性について検討を行った。まず、ICR 系マウスと ddY 系マウスおよび DBA/2 系マウスを比較検討したところ、ICR 系マウスは最もガラス玉覆い隠し行動を起こすことが判った。次に、性差については、雌マウスの運動量が雄マウスより有意に高かったが、ガラス玉覆い隠し行動では有意差がみられなかった。また、Fluvoxamine と Paroxetine は運動量の抑制を伴うことなくガラス玉覆い隠し行動を有意に抑制したが、Milnacipran ではガラス玉覆い隠し行動を有意に抑制しなかった。これらの所見から、ガラス玉覆い隠し行動試験は特にセロトニン神経系が関与する強迫性障害モデルとして評価できることが示唆された。

キーワード : ガラス玉覆い隠し行動, 強迫性障害, フルボキサミン, パロキセチン, ミルナシプラン

はじめに

強迫性障害 (Obsessive-Compulsive Disorder : OCD) の臨床的特徴は、反復的、持続的な思考などが強い不安や苦痛を生じる「強迫観念」と、苦痛や不安を緩和するために反復的行動が駆り立てられる「強迫行為」である。米国国立精神衛生研究所の調査によると、OCD は一般人口の1.3~2.0%にみられ、生涯有病率は1.9~3.0%である¹⁾。わが国でも多賀ら²⁾の報告によると、OCD 患者の外来受診率は0.51~1.37%であり、従来考えられてきたほど稀な疾患ではなく、多くの患者が様々な強迫症状を呈している。

これまで、OCD は難治性の疾患と考えられてきたが、認知行動療法や薬物療法などが有効とされている。とくに薬物療法では、1968年に OCD 患者の強迫症状に対する塩酸クロミプラミンの有効性が Renynghe de Voxrie³⁾ によって初めて報告されて以来、1980年代にはプラセボとの二重盲検比較法ならびに他の抗うつ薬との二重盲検比較試験が多数行われ、ほとんどの研究において塩酸クロミプラミンの有効性が確認され、OCD に対する塩酸クロミプラミンの改善効果は国際的に認められるようになった。

さらに、近年では Hollander⁴⁾⁵⁾ らにより強迫スペクトラム障害 (Obsessive-Compulsive Spectrum Disorder : OCS) という概念が提唱されて、セロトニン系の機能異常に関心が寄せられ注目されている。現在では臨床現場において選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor : SSRI) を中心とした薬物療法が行われているが⁶⁾、現実的には治療抵抗性あるいは難治性の症例もみられ、生物学的にもまだ不明な点が多く残っている。

ところで、我々は OCD の動物モデルである、マウスを用いた marble-burying behavior (ガラス玉覆い隠し行動) に注目している。

この動物モデルが確立する経緯は、Wilkie らは、ラットが不快な食べ物に対して隠してしまう行動がみられることを報告し⁷⁾、Pinel らは同種動物の死骸に対しても隠してしまう行動が観察されると報告した⁸⁾。そして、このような隠してしまう行動について、Treit らは抗不安薬が、低い電撃で条件づけされた嫌悪的な金属棒を埋める行動を抑制すると報告し⁹⁾、抗不安薬のスクリーニングテストとして用いられることになった。また Broekkamp らも抗不安薬がガラス玉覆い隠し行動を抑制する¹⁰⁾ ことを証明し、さらに彼らはセロトニン再取り込み阻害薬 (Serotonin Reuptake Inhibitor : SRI) もガラス玉覆い隠し行動を抑制することを証明した¹¹⁾。そして、Njung'e と Handley によって、SRI はガラス

玉覆い隠し行動の運動量を減らすことなく選択的に抑制すると報告した¹²⁾。

このようにガラス玉覆い隠し行動は不安障害の動物モデルで、同時に抗 OCD 効果も検出できるとされ、現在では、OCD の動物モデルとして評価されるようになった。そこで今回我々は、この動物モデルが OCD の動物モデルとしての妥当性について行動薬理的に検討し、その作用機序について若干の考察をした。

実験方法

実験動物ならびに飼育方法

実験動物は、5-6 週齢 (体重 25-35g) の ICR 系雌性・雄性マウス (日本 SLC 株式会社, 静岡), ddY 系雄性マウス (九動株式会社, 佐賀), DBA/2J Jcl (DBA/2) 系雄性マウス (日本クレア株式会社, 東京) を用いた。マウスは、プラスチックケージ (30×35×17cm) の中で群飼育し、室温 25±2℃, 湿度 60±2% および 12 時間の明暗サイクル (7:00 AM 点灯) の実験室で飼育した。なお、水および餌 (CE-2 ; 日本クレア株式会社, 東京) は自由に摂取できるようにした。実験動物の取り扱いについては、福岡大学動物実験委員会の取り扱い細則に準じた。

実験装置

実験装置は上方が開放された透明な箱 (30×30×28 cm) に、おがくず (BEST CHIP ; 九動) を深さ 5 cm 程敷き、その上に直径 1.5cm のガラス玉を 25 個使用し、均一な間隔に配置したものを使用した (Fig. 1. A)。さらに、その箱のすぐ上部に、放出赤外線検出型センサー (NS-AS01, Neuroscience Inc, 東京) を設置し、インターフェイスを介してコンピューターに随時出力カウントを記録し、解析ソフト (マルチデジタル 32 ポート カウントシステム 1.05.0002, 株 NMR) でマウスの運動量を解析した (Fig. 1. B)。

使用薬物と調製方法

Fluvoxamine (Solvay, Tokyo) は精製水で調製し経口投与した。また、Paroxetine (Glaxo Smith Kline, Tokyo) は生理食塩水で調整し経口投与し、Milnacipran (旭化成, 東京) は生理食塩水で調整し腹腔内投与した。

測定方法

各種薬物をマウスに投与し、経口投与は 60 分後、腹腔内投与は 30 分後に、上記の透明な箱に移し、ガラス玉覆い隠し行動を 30 分間観測した。そして、実験終了後、マウスを取り出し、おが屑に 3/4 以上覆い隠されたガラス

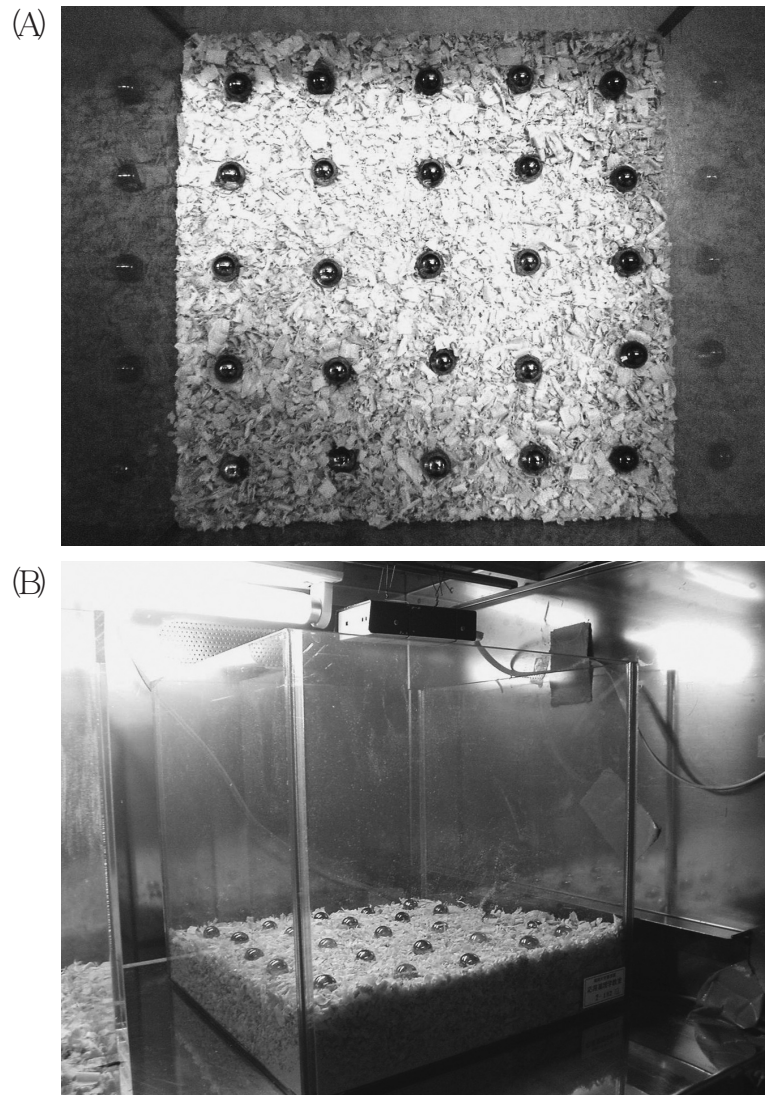


Fig. 1. (A), (B) The clear plastic boxes (30×30×28 cm) containing 25 glass marbles (1.5 cm in diameter) evenly spaced on sawdust 5 cm deep. At the same time, the locomotor activity of mice was measured using an automated activity counter (NS-AS01, Neuroscience Inc., Tokyo) above the same plastic boxes.

玉の数をガラス玉の覆い隠し数として評価した。また同時にマウスの運動量は、30分間の自発運動量を全運動量として評価した。

統計処理

ガラス玉覆い隠し行動については、Kruskal-Wallis test と Mann-Whitney *U*-test を用いた。マウスの運動量は One-way analysis of variance (ANOVA) と Bonferroni test を用い検定した。

実験結果

ガラス玉覆い隠し行動におけるマウス系統差について

は、ICR 系、ddY 系、DBA/2 系の 3 系統の雄性マウスのうち、ICR 系マウスに最も高いガラス玉覆い隠し行動がみられ、次いで ddY 系、DBA/2 系の順に高かった (Fig. 2. A, B)。

ICR 系マウスの性差では、ガラス玉の覆い隠し数や全運動量ともに有意差は見られなかったが、雌性マウスが高い傾向であった (Fig. 3. A, B)。

ICR 系雄性マウスを用いた 6 連日間のガラス玉覆い隠し行動の変化については、期間中ガラス玉覆い隠し行動は変わらず一定して認められた (Fig. 4.)。

ガラス玉覆い隠し行動に対する薬物の影響について、性周期が影響する可能性を考慮し、ICR 系雄性マウスを用いて行った。Fluvoxamine は 30, 60mg/kg の用量で

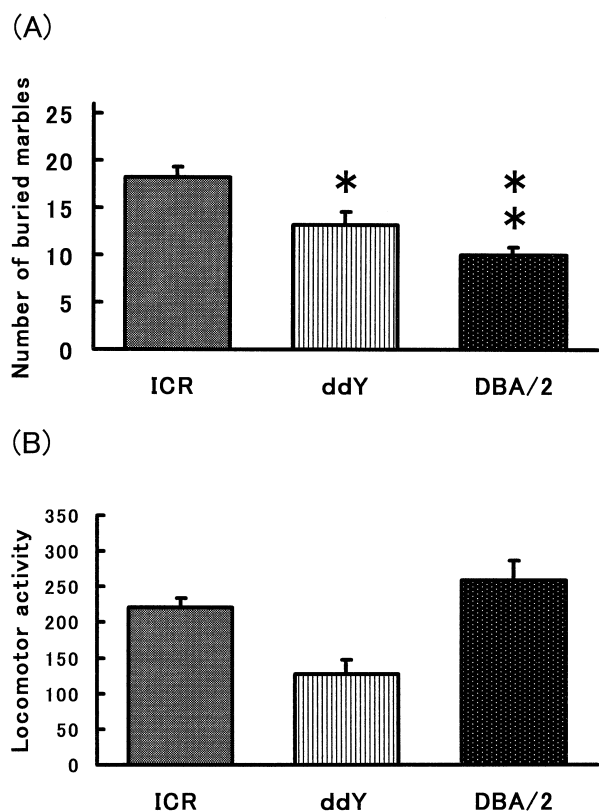


Fig. 2. Comparison of marble-burying behavior in ICR, ddY or DBA/2 mice. (A) marble-burying behavior, (B) locomotor activity. The values are expressed as the means \pm SEM of $n=12-21$ mice per group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared to the group treated with ICR mice. (Mann-Whitney test)

ガラス玉覆い隠し行動の抑制がみられたが (Fig. 5. A, B), 全運動量の低下はみられなかった。また, Paroxetine も 1, 3mg/kg の用量において有意にガラス玉覆い隠し行動の抑制がみられたが (Fig. 6. A, B), 全運動量の低下はみられなかった。一方, セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (Selective Noradrenalin Reuptake Inhibitor : SNRI) である Milnacipran は 30, 60mg/kg のいずれもガラス玉覆い隠し行動の抑制はみられなかった (Fig. 7. A, B)。

考 察

まずガラス玉覆い隠し行動におけるマウス系統差による比較検討では, ICR 系, ddY 系, DBA/2 系マウスを用いたところ, ICR 系マウスが最も強く発現した。これは, 梶原ら¹³⁾ の 7 系統マウスを用いたガラス玉覆い隠し行動の検討と一致するものであった。臨床的には佐藤ら¹⁴⁾ の双生児研究から報告されるように, OCD には何らかの遺伝的要因が関与すると考えられ, 同一遺伝子で

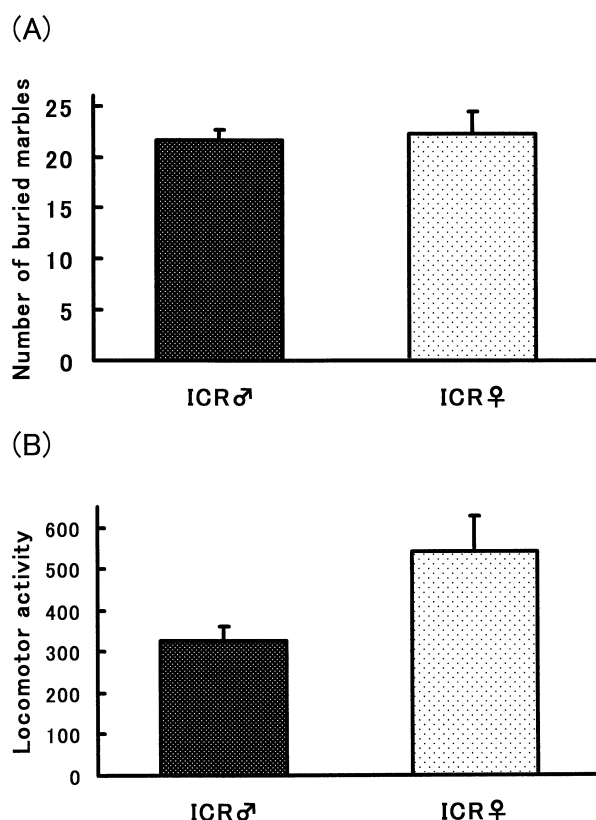


Fig. 3. Comparison of marble-burying behavior in male and female mice. (A) marble-burying behavior, (B) locomotor activity. The values are expressed as the means \pm SEM of $n=10$ mice per group.

持つ ICR 系マウスだけにガラス玉覆い隠し行動が多くみられるということに矛盾しない結果であった。

次に, ICR 系マウスのガラス玉覆い隠し行動に対する性差を検討したところ, 運動量は雄性よりも雌性の方が有意に高かったが, ガラス玉覆い隠し行動には有意な差はみられなかった。これは, OCD の疫学上では男女ほぼ同数あるいは女性が若干多いという報告と一致する。しかし, 本実験では, 運動量の低下によるガラス玉覆い隠し行動の抑制は指摘できても, 評価されるガラス玉覆い隠し数が最大 25 という上限があるため, 運動量の増加に伴うガラス玉覆い隠し行動の増加についての検出は難しい。よって, 本実験ではガラス玉覆い隠し数における性差に有意差はみられなかったが, 今後さらなる検討が必要であると考えられた。

次に, ICR 系雄性マウスを用いた連日のガラス玉覆い隠し行動の変化については, Broekkamp ら¹⁰⁾ が行った 4 日間連続のガラス玉覆い隠し行動の結果と同様であった。そして, 今回我々の実験結果では, 彼らの研究よりさらに多い 6 日連日間のガラス玉覆い隠し行動においても有意な変化はみられない結果となり, マウスの新奇性や慣れの問題との関係は低いことを証明し, これらの習

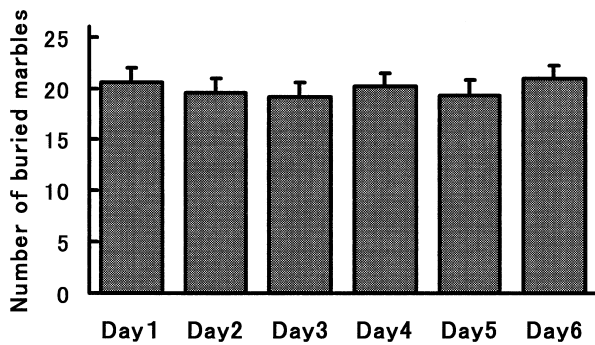


Fig. 4. Effect of marble-burying behavior in mice on 6 successive days. (A) marble-burying behavior, (B) locomotor activity. The data are expressed as the means \pm SEM of $n=8$ mice per group.

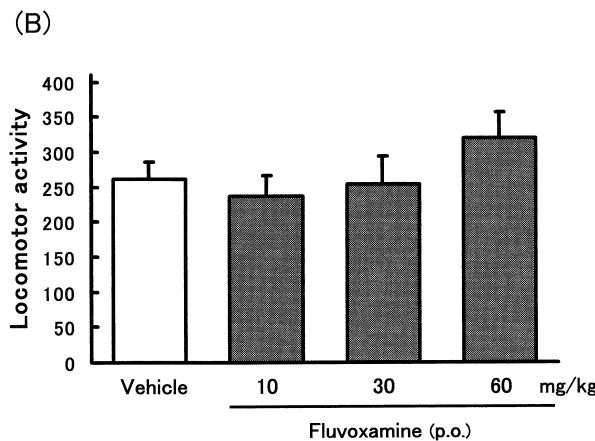
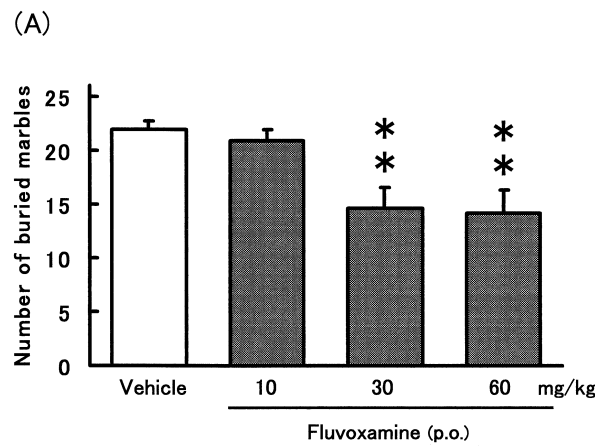


Fig. 5. Effect of Fluvoxamine on the marble-burying behavior in mice. (A) marble-burying behavior, (B) locomotor activity. The data are expressed as the means \pm SEM of $n=9-13$ mice per group. ** $P < 0.01$ compared to the group treated with vehicle. (Mann-Whitney test)

慣的あるいは本能的な行動は、OCDの反復的、持続的な行動であることが示唆された。ガラス玉覆い隠し行動が反復的に、持続的な行動であることでは、強迫行為と一致すると考えられる。

次にガラス玉覆い隠し行動に対する薬物の影響につい

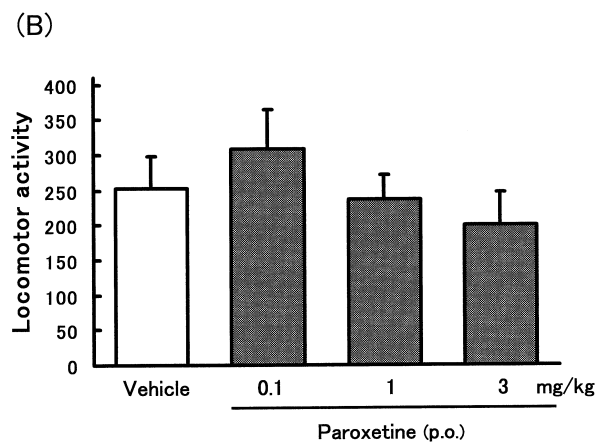
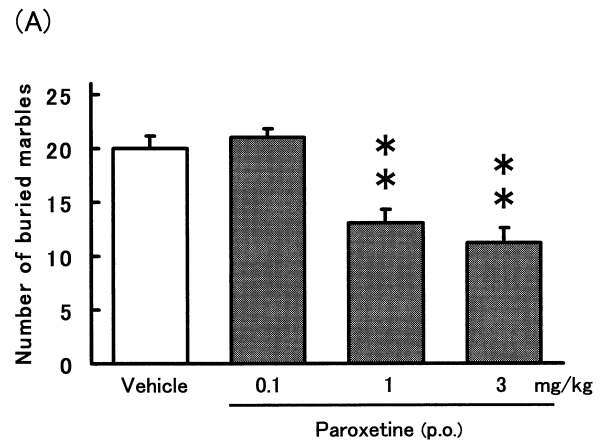


Fig. 6. Effect of Paroxetine on the marble-burying behavior in mice. (A) marble-burying behavior, (B) locomotor activity. The data are expressed as the means \pm SEM of $n=8-9$ mice per group. ** $P < 0.01$ compared to the group treated with vehicle. (Mann-Whitney test)

て検討した。まず、臨床的にOCDに対して最もよく使われるFluvoxamineは、本実験で30と60mg/kgの用量で全運動量の低下を伴わずにガラス玉覆い隠し行動を抑制することを確認した。この実験におけるガラス玉覆い隠し数の減少は臨床的には強迫行為の抑制に相当すると考えられ、OCDに効果のあるSSRIがガラス玉覆い隠し行動においても運動量に影響することなく特異的にガラス玉覆い隠し数を抑制するので、ガラス玉覆い隠し行動実験はOCDの動物モデルとして有用であると考えられる。Ichimaruら¹⁵⁾の先行研究でも、Fluvoxamineが30と60mg/kgの用量でガラス玉覆い隠し行動を抑制する効果があると報告しており、再現性の高いOCDの動物モデルとして有用であると考えられる。

次にParoxetineは、現在わが国においてOCDに対する保険適応はないが、すでに臨床経験的に効果の高い薬物として使用されている。本研究では、Paroxetineも1と3mg/kgの用量において、全運動量の低下を伴わずにガラス玉の覆い隠し数を特異的に抑制した。これ

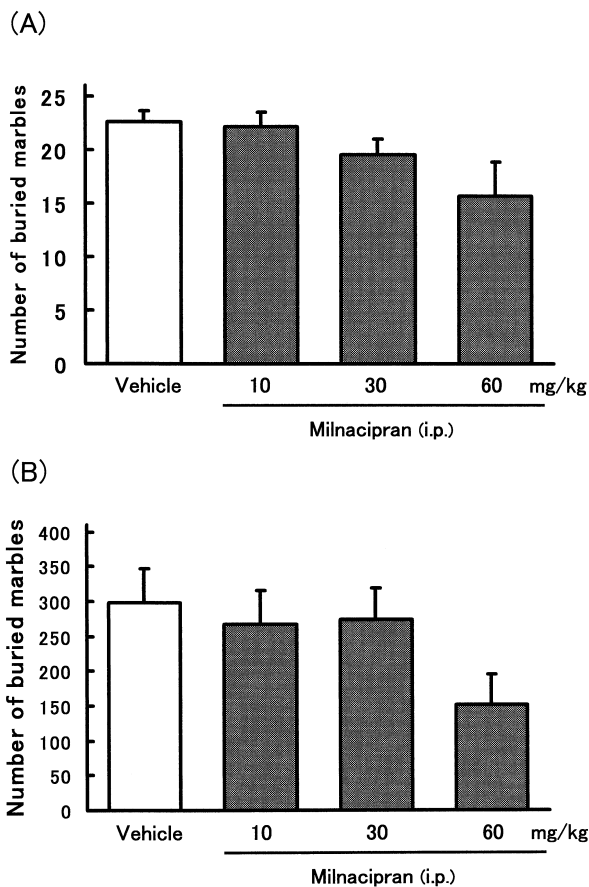


Fig. 7. Effect of Milnacipran on the marble-burying behavior in mice. (A) marble-burying behavior, (B) locomotor activity. The data are expressed as the means \pm SEM of $n=8-9$ mice per group.

は Paroxetine が臨床的に OCD に対して有効であることを裏付けし、支持する結果となった。一方、SNRI である Milnacipran はガラス玉覆い隠し行動に対して明らかな抑制効果はみられなかった。しかしながら、臨床的に SNRI は SSRI 治療抵抗性 OCD に対して効果があるという報告もあり¹⁶⁾、今後、更なる検討が必要であると考えられる。また、これらの薬物の反応性から、ガラス玉覆い隠し行動は特にセロトニン神経系が関与するものと考えられた。

最後にガラス玉覆い隠し行動の抑制機序についてであるが、SSRI はセロトニンの再取り込み阻害作用によりシナプス間隙のセロトニン量を上昇させるため¹⁷⁾、ガラス玉覆い隠し行動の抑制はセロトニン神経系の賦活化が関係していると考えられる。そして、DBA/2 系マウスと比較して ICR 系マウスは、セロトニントランスポーター結合数や解離定数が高い可能性があり、臨床的に OCD にも何らかのセロトニントランスポーター結合の異常が関係している可能性も考えられる。従って、ガラス玉覆い隠し行動試験はセロトニン神経系に関係してい

る OCD の治療薬スクリーニングとして活用できる可能性が高く、セロトニンを含む脳内モノアミンについてガラス玉覆い隠し行動を用いたさらなる検討は OCD の病態解明や治療薬の開発に対して有用であることが示唆された。

文 献

- 1) Myers JK, Weissman MM, Tischler GL, Holzer CE 3rd, Leaf PJ, Orvaschel H, Anthony JC, Boyd JH, Burke JD, Jr Kramer M, et al: Six-month prevalence of psychiatric disorders in three communities. *Arch Gen Psychiatry* 41: 959-967, 1984.
- 2) 多賀千明, 宮岡 等, 永田利彦, 西村伊三男, 金山秀彦, 中村道彦, 中嶋輝夫, 松永寿人, 西浦竹彦, 切池信夫・他: 三大学病院外来における強迫性障害患者実態調査. *精神医学* 40: 547-553, 1998.
- 3) Van Renynghe de Voxxrie: Use of anafranil (G 34586) in obsessive neuroses. *Acta Neurol Psychiatr Belg* 68: 787-92, 1968.
- 4) Hollander E, Wong CM: Obsessive-compulsive spectrum disorders. *J Clin Psychiatry* 56: 3-6, 1995.
- 5) Hollander E, Kwon JH, Stein DJ, Broatch J, Rowland CT, Himelein CA: Obsessive-compulsive and spectrum disorders; overview and quality of life issues. *J Clin Psychiatry* 57: 3-6, 1996.
- 6) Greist JH, Bandelow B, Hollander E, Marazziti D, Montgomery SA, Nutt DJ, Okasha A, Swinson RP, Zohar J; World Council of Anxiety: WCA recommendations for the long-term treatment of obsessive-compulsive disorder in adults. *CNS Spectr* 8: 7-16, 2003.
- 7) Wilkie DM, MacLennan AJ, Pinel JP: Rat defensive behavior; burying noxious food. *J Exp Anal Behav* 31: 299-306, 1979.
- 8) Pinel JP, Gorzalka BB, Ladak F: Cadaverine and putrescine initiate the burial of dead conspecifics by rats. *Physiol Behav* 27: 819-824, 1981.
- 9) Treit D, Pinel JP, Fibiger HC: Conditioned defensive burying; a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav* 15: 619-626, 1981.
- 10) Broekkamp CL, Rijk HW, Joly-Gelouin D, et al: Major tranquillizer can be distinguished from minor tranquillizer on the basis of effects on marble-burying and swim-induced grooming in mice. *Eur J Pharmacol* 126: 223-229, 1986.
- 11) Broekkamp CL, Berendsen HH, Jenck F, et al: Animal models for anxiety and response to serotonergic drugs. *Psychopathology* 22: 2-12, 1989.
- 12) Njung'e K and Handley SL: Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 38: 63-67, 1991.
- 13) 梶原良修, 杉本由美, 山田 潤: 7 系統マウスにおける

- Marble burying behavior の系統差について. 日本神経精神薬理学雑誌 22 : 323, 2002.
- 14) 佐藤 新, 飯田 眞, 佐久間友則, 佐藤哲哉 : 神経症の臨床遺伝学研究. 精神医学 31 : 904-917, 1989.
 - 15) Ichimaru Y, Egawa T, Sawa A : 5-HT_{1A}-Receptor Subtype Mediates the Effect of Fluvoxamine, a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, on Marble-burying Behavior in Mice. Jpn J Pharmacol 68 : 65-70, 1995.
 - 16) Hollander E, Friedberg J, Wasserman S, Allen A, Birnbaum M, Koran LM : Venlafaxine in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder. J Clin Psychiatry 64 : 546-50, 2003.
 - 17) Bel N and Artigas F : Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei ; an in vivo microdialysis study. Eur J Pharmacol 229 : 101-103, 1992.

(平成17. 8.9 受付, 17.10.5 受理)