

## 実験的不安モデルマウスの行動薬理学的特徴と 脳内モノアミン作動性神経との関連

山田悦郎<sup>1,2)</sup> 武田弘志<sup>1)</sup> 辻 稔<sup>1)</sup>  
松宮輝彦<sup>1)</sup> 高山雅臣<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東京医科大学薬理学講座 難病治療研究センター (創薬部門)

<sup>2)</sup>東京医科大学産科婦人科学講座

**【要旨】** 本研究では、実験的不安モデルマウスの行動薬理学的特徴とその発現機序における脳内モノアミン作動性神経の役割について検討した。拘束ストレス刺激の 60-120 分間負荷およびベンゾジアゼピン (BZP) 受容体逆作用薬である不安惹起物質 N-methyl- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (FG7142) の 5, 10 mg/kg あるいは methyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate ( $\beta$ -CCM) の 1, 2 mg/kg 腹腔内投与により、自動 hole-board 試験装置内での自発運動活性、立ち上がり行動に影響を与えることなく、穴のぞき行動 (head-dip 行動) の回数と時間の減少および head-dip 潜時の増加が認められた。また、この行動変化を生じさせる拘束ストレス刺激の 60 分間負荷と FG7142 10 mg/kg、 $\beta$ -CCM 2 mg/kg の腹腔内投与は、共通して大脳皮質前頭部のドーパミン (DA) 作動性神経および視床下部におけるノルエピネフリン (NE) と DA 作動性神経の活性を亢進した。以上の結果より、拘束ストレスパラダイムと不安惹起物質の投与が誘発する head-dip 行動の変化は、不安を反映する情動行動の一つであることが考えられる。また、この行動の発現機序の一部には、大脳皮質前頭部や視床下部における NE と DA 作動性神経が関与し、その活性調節に  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)<sub>A</sub> 受容体/BZP 受容体/Cl<sup>-</sup> チャネル複合体が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

### はじめに

現代社会における多種多様なストレス状況は、ストレス関連疾患を急増し、医療上のみならず大きな社会問題の一つとしても取り上げられるようになってきている。ストレス関連疾患の一つである不安障害の発症機序の考究やその予防薬あるいは治療薬の創薬研究を推進する上で、不安という情動変化を客観的に評価しその生理機構を解明することは極めて重要である。現在、基礎医学研究において、不安に類似した情動変化を実験動物に生じさせる方法として、諸種のストレスパラダイム<sup>1-4)</sup> や薬物により惹起する方法<sup>5-10)</sup> が繁用されている。しかし、これらの不安惹起パラダ

イムで作製された実験的不安モデルの有用性とその特徴、さらには、発現機序についての報告<sup>11,12)</sup> が少なく、未だ明らかにされていない。

本研究では、実験的不安モデルの行動薬理学的特徴とその発現機序を解明する一環として、Takeda ら<sup>13)</sup> および Tsuji ら<sup>14,15)</sup> が開発した自動 hole-board 試験装置を用いて、拘束ストレスパラダイムあるいは不安惹起物質が誘発する情動行動の変化とその特徴を検討すると共に、この情動変化の発現機序における脳内モノアミン作動性神経の役割について考究した。

2003 年 1 月 27 日受付、2003 年 2 月 5 日受理

キーワード：不安、情動行動、ホールボード試験、モノアミン、マウス

(別刷請求先：〒160-8402 東京都新宿区新宿 6-1-1 東京医科大学薬理学講座 山田悦郎)

## 研究材料および方法

### 1. 実験動物

実験には、健全な体重25~30gのICR系雄性マウス(日本チャールスリバー)を用いた。マウスは、予備飼育および実験期間を通じて、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、明暗条件12時間サイクル(7時点灯、19時消灯)の環境下で、1ケージ8~10匹で集団飼育した。また、固形飼料(MF固形飼料、オリエンタル酵母工業)および飲料水(水道水)は自由摂取とした。

### 2. 不安惹起パラダイム

マウスの不安状況は、ストレス刺激の負荷あるいは不安惹起物質の投与により誘発した。

#### 1) 急性拘束ストレス刺激負荷

ストレス刺激の負荷は、室温( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ )で60分間の間、プラスチック製の円筒(直径3cm、長さ7cm)内に強制拘束することにより施した。尚、コントロール群(非ストレス負荷群)は、ホームケージ内に放置した。

#### 2) 不安惹起物質の投与

不安惹起物質には、ベンゾジアゼピン(benzodiazepine: BZP)受容体の逆作動薬であるN-methyl- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (FG7142) (Research Biochemicals, USA)<sup>5,6)</sup>およびmethyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate ( $\beta$ -CCM) (Research Biochemicals, USA)<sup>7,8)</sup>を用いた。また、 $\beta$ -CCMは生理食塩液、FG7142は5% Tween 20溶液を溶媒として用時溶解して用いた。尚、各薬物は、それぞれの溶媒をコントロールとして、10 ml/kgの用量で腹腔内(i.p.)投与した。

### 3. 情動行動の評価

急性拘束ストレス刺激の負荷および不安惹起物質(FG7142、 $\beta$ -CCM)の投与による情動行動の変化は、open-fieldおよびhole-board試験を同時施行できる自動hole-board試験装置<sup>13-15)</sup>(model ST-1、室町機械)を用いて評価した。

#### 1) 自動hole-board試験装置

自動hole-board試験装置は、hole-board装置本体(model HT-001)、カラービデオ・トラッキング・システム(Comp ACT vas) (CCDカラーカメラ、カラートラッカーCAT-10、映像用モニター)およびデータ解析用パーソナルコンピューター(オペレーション・ソフトウェアComp ACT HBS、解析用モニター)の

3システムから構成されている。また、hole-board装置本体は、縦500mm、横500mm、高さ400-490mm(可変)の灰白色角形ケージで、床面には中央より等距離に直径30mm(マウス用)の穴が4箇所設けられており、装置上方にはCCDカラーカメラが、また床面の上方および下方には赤外線スキャニング方式の高性能センサーが取り付けられている。このCCDカラーカメラを介してマウスの行動距離(locomotion)が、また、床面上方の赤外線センサーにより立ち上がり行動(rearing行動)の回数および時間が自動的に測定される。さらには、マウスが穴をのぞき込み赤外線をカットし、かつその時穴の位置にマウスの頭が存在することがCCDカラーカメラを介して確認された時のみ穴のぞき行動(head-dip行動)としてみなされ、その回数と時間およびhead-dip潜時(マウスがhole-board装置内に入れられた後、最初にhead-dip行動を示すまでの時間)が測定される。赤外線センサーおよびCCDカラーカメラを介して得られた信号は全てデータ解析用のパーソナルコンピューターに取り込まれ最終データが算出される。

#### 2) 情動行動の測定

マウスに急性拘束ストレス刺激(30、60および120分間)を負荷し、拘束解除30分後にhole-board装置内における情動行動の変化を5分間測定した。また、FG7142(2.5、5、10 mg/kg, i.p.)あるいは $\beta$ -CCM(0.5、1、2 mg/kg, i.p.)による情動行動の変化は、投与30分後にhole-board試験を5分間行った。

### 4. 脳内モノアミンおよびその代謝物量の測定

マウスに拘束ストレス刺激を60分間負荷し、その30分後に、また、FG7142(10 mg/kg, i.p.)あるいは $\beta$ -CCM(2 mg/kg, i.p.)投与後30分にマウスを断頭により屠殺し、脳を摘出した。さらに、ドライアイスで冷却したアルミニウム板上で摘出した脳よりFranklin and Paxinosの脳図譜<sup>16)</sup>に従い、大脳皮質前頭部、海馬、扁桃体、視床下部を分画し、組織サンプルとした。尚、脳組織サンプルは、抽出まで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

各脳組織部位は、湿重量測定後、0.1 M 過塩素酸(1 ml)、0.1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(30  $\mu\text{l}$ )および0.5 M 亜硫酸水素ナトリウム(30  $\mu\text{l}$ )の混合液中にて、超音波細胞破碎器(大岳製作所)を用い、氷冷条件下で30秒間ホモジナイズした。その後、遠心分離(20,000 $\times$  g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 15分間)を行い、そ

の上清液 10  $\mu$ l を、酸化還元スクリーン検出モードを導入した多重クローメトリー高速液体クロマトグラフィシステム<sup>17)</sup>に直接注入し、ノルエピネフリン (norepinephrine: NE)、ドパミン (dopamine: DA)、セロトニン (serotonin: 5-HT) および関連代謝産物 4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニールグリコール (4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol: MHPG)、3,4-ジヒドロキシフェニール酢酸 (3,4-dihydroxyphenylacetic acid: DOPAC)、ホモバニリン酸 (homovanillic acid: HVA)、5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-hydroxy-indole-3-acetic acid: 5-HIAA) 量を同時測定した。さらに、測定した各物質質量から MHPG/NE、DOPAC+HVA/DA、5-HIAA/5-HT の値を算出し、NE、DA および 5-HT 代謝回転を解析評価した。

5. 統計処理

実験結果は、平均値±標準偏差で表示し、対照群との統計学的有意差検定には一元配置分散分析および Dunnett's test を用いた。

結 果

1. マウスの情動行動に及ぼす拘束ストレス刺激あるいは不安惹起物質の影響

1) 急性拘束ストレス刺激負荷の影響

拘束ストレス刺激の 30 分間負荷は、マウスの情動行動には何等影響を示さなかった。一方、60 分あるいは 120 分間負荷により、総行動距離、立ち上がり行動の回数および時間には変化が生じなかったが、head-dip 行動の抑制が認められた。特に、60 分間負荷群で最も顕著な抑制が認められ、head-dip 行動の回数および時間が有意に減少するとともに head-dip 潜時が有意に延長した (Table 1)。

2) 不安惹起物質投与の影響

FG7142 (2.5-10 mg/kg, i.p.) および  $\beta$ -CCM (0.5-2 mg/kg, i.p.) の投与は、急性拘束ストレス刺激の負荷と同様に、総行動距離、立ち上がり行動の回数および時間には特記すべき影響を与えなかった。一方、これら薬物の投与では、共に、head-dip 行動の回数と時間が用量に依存して著明に減少し、かつ head-dip 潜時の著しい延長を生じさせた。特に、この head-dip 行動 (3

Table 1. Effect of acute restraint stress on exploratory behavior in mice tested on the hole-board

Group	Locomotion (cm)	Rearing		Head-dips			
		Counts	Duration (sec)	Counts	Duration (sec)	Latency (sec)	
Non-stress	1792.6±163.7	16.0±1.5	16.6±2.5	21.6±3.3	11.3±3.0	40.5±6.2	
Stress	(30 min)	1807.6±137.4	14.9±1.8	16.9±2.6	18.4±3.8	8.9±2.6	75.5±11.9
	(60 min)	1615.6±178.1	17.0±2.6	17.2±3.1	9.7±2.5*	3.6±1.0*	120.3±24.7**
	(120 min)	1482.0±116.5	16.1±1.5	15.7±1.8	9.4±1.8*	4.4±1.2	81.4±21.5

Mice were exposed to acute restraint stress for 30, 60 or 120 min. Thirty minutes later, exploratory behavior was measured. Each data represents the mean with S.E.M. of 11-12 mice. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs. non-stressed group.

Table 2. Effects of FG7142 and  $\beta$ -CCM on exploratory behavior in mice tested on the hole-board

Drug treatment	Locomotion (cm)	Rearing		Head-dips			
		Counts	Duration (sec)	Counts	Duration (sec)	Latency (sec)	
5% Tween 20	1912.6±155.3	24.0±4.2	31.8±8.1	14.8±3.3	5.3±1.1	52.1±16.7	
FG7142	(2.5 mg/kg, i.p.)	2113.2±170.6	27.8±4.1	34.7±6.1	7.8±1.7	2.5±0.6	93.6±22.3
	(5 mg/kg, i.p.)	1497.7±82.5	20.2±2.7	27.0±4.4	6.5±1.6*	2.5±0.8	132.1±27.1*
	(10 mg/kg, i.p.)	1634.6±167.0	16.4±3.0	18.3±3.4	5.1±1.8*	1.4±0.5*	160.3±35.3*
Saline	2302.6±92.6	22.7±1.9	25.9±2.4	34.0±3.6	19.0±2.7	27.8±5.9	
b-CCM	(0.5 mg/kg, i.p.)	2335.8±86.6	30.1±2.2	38.9±4.3	27.1±3.1	14.3±2.0	53.0±7.7
	(1 mg/kg, i.p.)	2117.9±87.5	23.1±1.3	31.5±2.0	22.2±2.8##	12.9±2.2	59.9±10.1
	(2 mg/kg, i.p.)	2082.4±101.8	26.7±2.0	33.6±2.5	20.2±2.8##	10.4±2.3##	65.6±12.6##

FG7142 (2.5-10 mg/kg, i.p.), b-CCM (0.5-2 mg/kg, i.p.) or vehicle (5% tween 20 or saline) was injected 30 min prior to the measurement of exploratory behavior. Each data represents the mean with S.E.M. of 10-12 mice. \* $P$ <0.05 vs. 5% Tween 20-treated group. ## $P$ <0.01 vs. saline-treated group.

つのパラメーター) の変化は、FG7142 (10 mg/kg, i.p.) あるいは  $\beta$ -CCM (2 mg/kg, i.p.) の投与で有意であった (Table 2)。

## 2. マウス脳内モノアミン代謝回転に及ぼす拘束ストレス刺激あるいは不安惹起物質の影響

### 1) 急性拘束ストレス刺激負荷の影響

拘束ストレス刺激の60分間負荷により、MHPG/NE値で示されるNE代謝回転とDOPAC+HVA/DA値で示されるDA代謝回転は、大脳皮質前頭部および視床下部において有意に増加した。しかし、扁桃体および海馬におけるMHPG/NEあるいはDOPAC+HVA/DA値には変化が生じなかった (Fig. 1A, B)。また、5-HT代謝回転を表わす5-HIAA/5-HT値は、60分間の拘束ストレス刺激の負荷により、大脳皮質前頭部、視床下部、扁桃体、海馬のいずれの脳部位においても有意な増加が認められた (Fig. 1C)。

### 2) 不安惹起物質投与の影響

FG7142 (10 mg/kg, i.p.) あるいは  $\beta$ -CCM (2 mg/kg, i.p.) の投与により、共通して、視床下部のMHPG/NE値と大脳皮質前頭部および視床下部におけるDOPAC+HVA/DA値の有意な増加が認められ

た。しかし、扁桃体や海馬におけるこれらの値は特記すべき変化を示さなかった (Fig. 2A, B; Fig. 3A, B)。また、検討した大脳皮質前頭部、視床下部、扁桃体、海馬の4つの脳部位における5-HIAA/5-HT値には変化が生じなかった (Fig. 2C, 3C)。

## 考 察

従来、不安の神経機構に関する研究は、主として  $\gamma$ -アミノ酪酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid: GABA) 作動性神経や GABA<sub>A</sub> 受容体/BZP受容体/Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体に焦点があてられてきた<sup>18,19)</sup>が、近年、新たに5-HT作動性神経と5-HT<sub>1A</sub>受容体の役割<sup>20,21)</sup>に注目が集まり、この研究分野は飛躍的な発展を遂げてきている。しかしながら、研究の進歩に伴いより複雑な問題点が浮き彫りにされてきているのも事実である。その一つに、不安の発現機構を解明するには基礎医学的研究の推進が必須となるが、実験動物にヒトと類似した不安状況を設定することが可能かどうかである。言い換えれば、アメリカ精神医学会による精神疾患の診断統計マニュアル第4版 (DMS-IV)<sup>22)</sup>などで分類されている多様な不安状況を実験動物に設定できるかである。また、実験動物に設定したこれらの不安状況をいかにして適切な指標を用いて客観的に評価するかである。

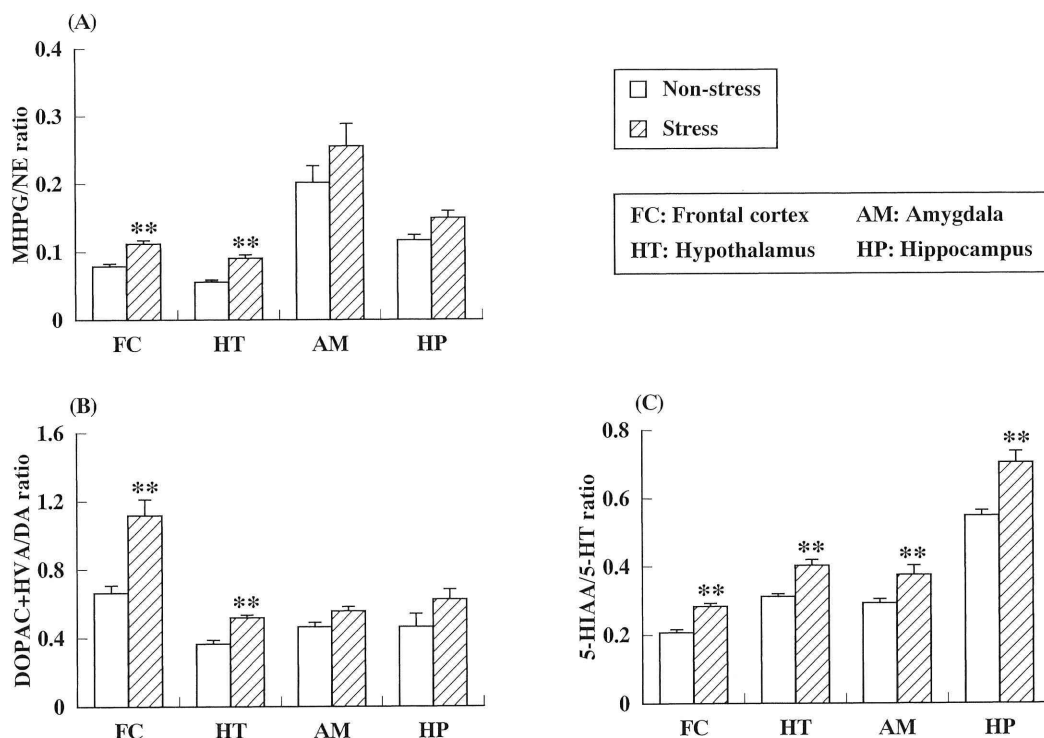
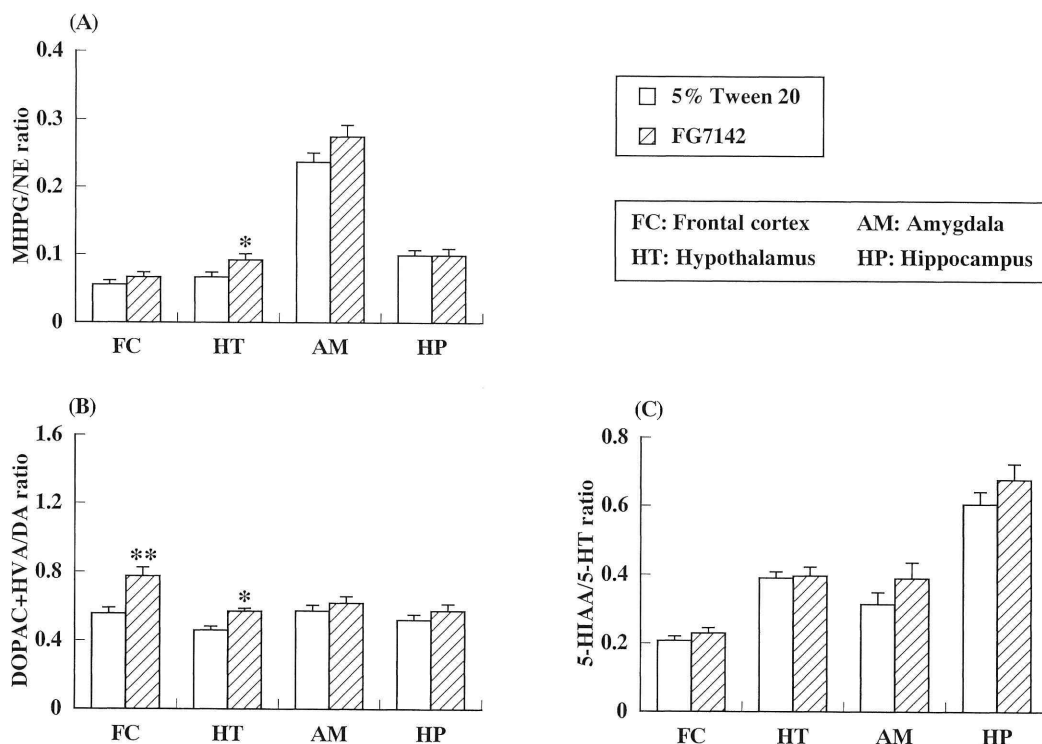
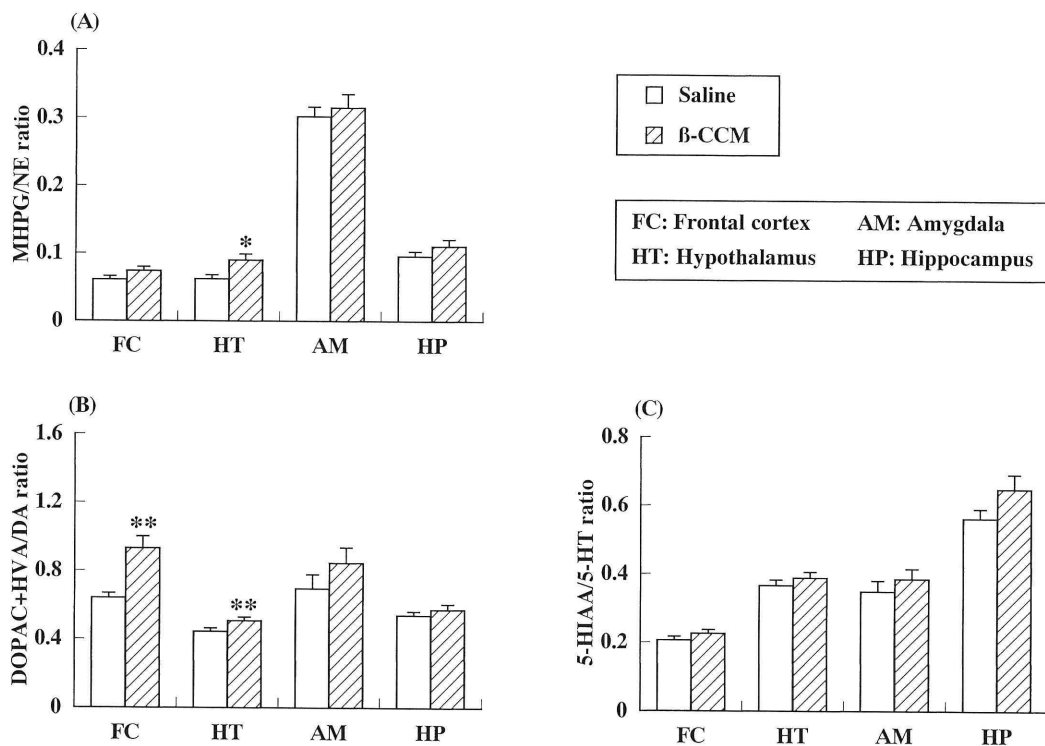


Fig. 1 Effect of exposure to acute restraint stress (60 min) on norepinephrine (A), dopamine (B) and serotonin (C) turnover in mouse brain regions. Each column represents the mean with S.E.M. of 10-13 mice. \*\* $P < 0.01$  vs. non-stressed group.



**Fig. 2** Effect of treatment with FG7142 (10 mg/kg, i.p.) on norepinephrine (A), dopamine (B) and serotonin (C) turnover in mouse brain regions. Each column represents the mean with S.E.M. of 8-12 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 5% Tween 20-treated group.



**Fig. 3** Effect of  $\beta$ -CCM (2 mg/kg, i.p.) on norepinephrine (A), dopamine (B) and serotonin (C) turnover in mouse brain regions. Each column represents the mean with S.E.M. of 8-12 mice. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. saline-treated group.

現在、基礎医学的研究において、実験動物に不安に類似した情動変化を惹起する方法として、主に拘束ストレス<sup>1)</sup>、電撃フットショックストレス<sup>2)</sup>、心理的ストレス<sup>3)</sup>あるいは恐怖条件付けストレス<sup>4)</sup>刺激などのストレスパラダイムを利用する方法やFG7142<sup>5,6)</sup>、 $\beta$ -CCM<sup>7,8)</sup>、ethyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate ( $\beta$ -CCE)<sup>9)</sup>などの $\beta$ -カルボリン系のBZP受容体逆作動薬、 $\alpha_2$ -アドレナリン受容体拮抗薬のヨヒンビン<sup>9)</sup>および乳酸<sup>10)</sup>などの薬物を投与することによって誘発する方法が繁用されている。また、不安や恐怖に伴う情動行動の変化を評価する方法としては、social interaction test<sup>23)</sup>、two compartment exploration test<sup>24)</sup>、hole-board test<sup>13-15,25)</sup>、elevated T-maze test<sup>26)</sup>、elevated plus-maze test<sup>27)</sup>、light/dark test<sup>28)</sup>などが開発され繁用されている。本研究では、Takedaら<sup>13)</sup>およびTsujiら<sup>14,15)</sup>が開発した自動hole-board試験装置を用いて、拘束ストレスパラダイムあるいは不安惹起物質のFG7142、 $\beta$ -CCMの投与により誘発される情動行動の変化、すなわち不安様行動とその特徴について詳細に検討した。さらに、これらの不安様行動の発現機構における脳内モノアミン作動性神経の役割についても考究した。

本研究の行動薬理学的検討において、拘束ストレス刺激の60分あるいは120分間負荷により、自発運動活性と立ち上がり行動には特記すべき変化が認められないにも関わらず、head-dip行動の回数と時間の有意な減少やhead-dip潜時の著明な増加が観察された。また、拘束ストレス刺激の効果が、60分間負荷群よりも120分間負荷群の方が弱かったことから、後者ではストレス刺激に対する慣れ(適応)が生じている可能性が考えられる。さらに、FG7142(5および10 mg/kg, i.p.)および $\beta$ -CCM(1および2 mg/kg, i.p.)の投与においても、前記した拘束ストレス刺激が誘発する情動行動の変化と同様の変化が用量依存的に認められた。これらの結果から、拘束ストレスパラダイムや不安惹起物質の投与によってhole-board試験装置内で共通して確認されるhead-dip行動の変化は、不安状況を反映する行動(不安様行動)であることが考えられる。1998年、Takedaら<sup>13)</sup>は、BZP受容体作動薬であるDZPおよびchlordiazepoxideが、マウスの自発運動活性と立ち上がり行動に影響しない用量で探索行動の中でもhead-dip行動のみを増加させることを報告した。これらの報告を踏まえると、本研究で得た結果から、head-dip行動は不安様行動の一つであること、さらにこの行動の発現には、GABA<sub>A</sub>受容体/BZP

受容体/Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体を介する機構が関連することが考えられる。

神経化学的検討において、拘束ストレス刺激の60分間負荷により、大脳皮質前頭部、視床下部でのNEおよびDA代謝回転の有意な亢進と大脳皮質前頭部、視床下部、扁桃体、海馬における5-HT代謝回転の著明な亢進が認められた。一方、FG7142 10 mg/kgあるいは $\beta$ -CCM 2 mg/kgのi.p.投与は、共通して視床下部のNE代謝回転と大脳皮質前頭部、視床下部でのDA代謝回転の有意な亢進を誘発したが、検討したいずれの脳部位においても5-HT代謝回転には特筆すべき変化を認めなかった。これらの神経化学的結果から、拘束ストレスパラダイムは、NE、DAおよび5-HT神経の活性を促進するのに対して、不安惹起物質であるFG7142および $\beta$ -CCMは、NEとDA作動性神経の活性のみを促進することが明らかとなった。また、拘束ストレスパラダイムと不安惹起物質の投与に共通して生じるNEとDA作動性神経の活性促進は、大脳皮質前頭部あるいは視床下部の特定の脳部位のみ生じる神経化学的特徴であることを確認した。さらに、これらの神経化学的結果を誘発する拘束ストレス刺激の60分間負荷とFG7142 10 mg/kg、 $\beta$ -CCM 2 mg/kgのi.p.投与は、前記したようにhead-dip行動を著明に変化させることを考えあわせると、head-dip行動の発現には大脳皮質前頭部のDA作動性神経と視床下部におけるNEおよびDA作動性神経が関与することが示唆された。また、ストレスパラダイムが誘発する不安様行動の発現において、脳内5-HT作動性神経の重要性を示唆する報告<sup>20,21)</sup>が見られることや本研究で得た結果は、不安の多様性を裏付けているのかもしれない。

以上を総括すると、head-dip行動は不安状況を反映する情動行動の一つであることが考えられる。また、この行動の発現機序の一部には、大脳皮質前頭部や視床下部におけるNEとDA作動性神経系が関与し、その活性調節にGABA<sub>A</sub>受容体/BZP受容体/Cl<sup>-</sup>チャンネル複合体が重要な役割を担っている可能性が示唆される。

## 結 論

本研究では、実験的不安モデルマウスの行動薬理学的特徴とその発現機序を考究する一環として、ストレスパラダイムあるいは不安惹起物質の投与により誘発される情動行動とその特徴を検索すると共に、この

情動変化の発現機序における脳内モノアミン作動性神経の役割について検討し、次の結果を得た。

1. 拘束ストレスパラダイムおよび不安惹起物質である  $\beta$ -カルボリン系の BZP 受容体逆作動薬 (FG-7142、 $\beta$ -CCM) の投与は、hole-board 試験装置内においてマウスの自発運動活性、立ち上がり行動には特筆すべき影響を与えることなく、head-dip 行動のみを変化させる。
2. 拘束ストレスパラダイムあるいは FG7142、 $\beta$ -CCM の投与によって生じる head-dip 行動の変化には、行動回数と時間の減少および行動潜時の増加などの共通した特徴が認められる。
3. 拘束ストレスパラダイムあるいは FG7142、 $\beta$ -CCM の投与が誘発する head-dip 行動は、不安状況を反映する情動行動 (不安様行動) の一つである。
4. 拘束ストレスパラダイムは、大脳皮質前頭部、視床下部の NE および DA 作動性神経の活性と、大脳皮質前頭部、視床下部、扁桃体、海馬における 5-HT 作動性神経活性の亢進を誘発する。
5. FG7142 あるいは  $\beta$ -CCM の投与により、大脳皮質前頭部の DA 作動性神経と視床下部における NE および DA 作動性神経の活性亢進が認められる。
6. 拘束ストレスパラダイムおよび FG7142、 $\beta$ -CCM の投与により、共通して生じる大脳皮質前頭部の DA 作動性神経や視床下部での NE と DA 作動性神経の活性亢進は、不安様行動の一つである head-dip 行動の発現に関与することが示唆される。

## 文 献

- 1) Tanaka M, Kohno Y, Tsuda A, Nakagawa R, Ida Y, Iimori K, Hoaki Y, Nagasaki N: Differential effects of morphine on noradrenaline release in brain regions of stressed and non-stressed rats. *Brain Res* **275**: 105-115, 1983
- 2) Iimori K, Tanaka M, Kohno Y, Ida Y, Nakagawa R, Hoaki Y, Tsuda A, Nagasaki N: Psychological stress enhances noradrenaline turnover in specific brain regions in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **16**: 637-640, 1982
- 3) Tanaka M, Tsuda A, Yokoo H, Yoshida M, Mizoguchi K, Shimizu T: Psychological stress-induced increases in noradrenaline release in rat brain regions are attenuated by diazepam, but not by morphine. *Pharmacol Biochem Behav* **39**: 191-195, 1991
- 4) Miyamoto J, Tsuji M, Takeda H, Nawa H, Matsumiya T: Pretreatment with diazepam suppresses the reduction in defensive freezing behavior induced by fluvoxamine in the conditioned fear stress paradigm in mice. *Eur J Pharmacol* **409**: 81-84, 2000
- 5) Dorow R, Horowski R, Paschelke G, Amin M: Severe anxiety induced by FG 7142, a beta-carboline ligand for benzodiazepine receptors. *Lancet* **2**: 98-99, 1983
- 6) Lader M, Bruce M: States of anxiety and their induction by drugs. *Br J Clin Pharmacol* **22**: 251-261, 1986
- 7) Fryer RI, Cook C, Gilman NW, Walser A: Conformational shifts at the benzodiazepine receptor related to the binding of agonists antagonists and inverse agonists. *Life Sci* **39**: 1947-1957, 1986
- 8) Sarter M, Schneider HH, Stephens DN: Treatment strategies for senile dementia: antagonist  $\beta$ -carbolines. *Trends Neurosci* **11**: 13-17, 1988
- 9) Charney DS, Heninger GR, Redmond DE Jr: Yohimbine induced anxiety and increased noradrenergic function in humans: effects of diazepam and clonidine. *Life Sci* **33**: 19-29, 1983
- 10) Pitts FN Jr, McClure JN Jr: Lactate metabolism in anxiety neurosis. *N Engl J Med* **277**: 1329-1336, 1967
- 11) 小口雅申: 不安惹起作用を持つ薬物のラット脳内 noradrenaline 代謝に及ぼす影響。久留米医誌 **51**: 943-957, 1988
- 12) Bradberry CW, Lory JD, Roth RH: The anxiogenic beta-carboline FG7142 selectively increases dopamine release in rat prefrontal cortex as measured by microdialysis. *J Neurochem* **56**: 748-752, 1991
- 13) Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T: Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur J Pharmacol* **350**: 21-29, 1998
- 14) Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T: Different effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and benzodiazepine anxiolytics on the emotional state of naïve and stressed mice: A study using the hole-board test. *Psychopharmacology* **152**: 157-166, 2000
- 15) Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T: Protective effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists against emotional changes produced by stress stimuli are related to their neuroendocrine effects. *Br J Pharmacol* **134**: 58595, 2001
- 16) Franklin KBJ, Paxinos G: The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, 1997
- 17) Takeda H, Matsumiya T, Shibuya T: Detection and identification modes for the highly sensitive and simultaneous determination of various biogenic amines by coulometric high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **515**: 265-278,

- 1990
- 18) Breier A, Paul SM: The GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor: implication for the molecular basis of anxiety. *J Psychiatr Res* **24**: 91-104, 1990
- 19) 渋谷 健、武田弘志：抗不安薬の前臨床。心身医療 **3**: 5-10, 1991
- 20) De Vry J: 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists: recent development and controversial issues. *Psychopharmacology* **121**: 1-26, 1995
- 21) 辻 稔、武田弘志、松宮輝彦：不安の多様性とセロトニン神経系。日薬理誌 **115**: 29-38, 2000
- 22) Liebowitz MR, Barlow DH, Ballenger JC, Davidson J, Foa E, Fyer A: 7 不安障害。DSM-IV精神疾患の診断・統計マニュアル (高橋三郎、大野 裕、染谷俊幸訳) 399-450、医学書院 (東京) 1996
- 23) File SE: The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J Neurosci Methods* **2**: 219-238, 1980
- 24) Colpaert FC, Meert TF, Niemegeers CJ, Janssen PA: Behavioral and 5-HT antagonist effects of ritanserin: a pure and selective antagonist of LSD discrimination in rat. *Psychopharmacology* **86**: 45-54, 1985
- 25) File SE, Wardill AG: Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacology* **44**: 53-59, 1975
- 26) Viana MB, Tomaz C, Graeff FG: The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem Behav* **49**: 549-554, 1999
- 27) Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M: Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* **14**: 149-167, 1985
- 28) Belzung C, Misslin R, Vogel E, Dodd RH, Chapouthier G: Anxiogenic effects of methyl-beta-carboline-3-carboxylate in a light/dark choice situation. *Pharmacol Biochem Behav* **28**: 29-33, 1987



## Relationship between behavioral and pharmacological characteristics of mice in an anxiogenic state and brain monoaminergic nervous systems

Etsuro YAMADA<sup>1,2)</sup>, Hiroshi TAKEDA<sup>1)</sup>, Minoru TSUJI<sup>1)</sup>,  
Teruhiko MATSUMIYA<sup>1)</sup>, Masaomi TAKAYAMA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pharmacology and Intractable Diseases Research Center, Tokyo Medical University

<sup>2)</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical University

### ABSTRACT

Behavioral and pharmacological characteristics of mice in an anxiogenic state and the role of brain monoaminergic nervous systems in the mechanism of appearance of anxiety were investigated in this study. Exposure to acute restraint stress for 60–120 min decreased both the number and duration of head-dips, and increased the latency to head-dipping in an automatic hole-board apparatus. Moreover, decreases in the number and duration of head-dips, and an increase in the latency to head-dipping, were also observed in mice that were treated with the typical anxiogenic drugs [benzodiazepine (BZP) receptor inverse agonists] N-methyl- $\beta$ -carboline-3-carboxamide (FG7142, 5–10 mg/kg, i.p.) and methyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate ( $\beta$ -CCM, 1–2 mg/kg, i.p.). The treatments with acute restraint stress, FG7142 or  $\beta$ -CCM did not significantly modify locomotor activity and the number or duration of rearing behaviors. Following exposure to acute restraint stress (60 min) and treatment with FG7142 (10 mg/kg, i.p.) or  $\beta$ -CCM (2 mg/kg, i.p.), significant increases in dopamine turnover (3,4-dihydroxyphenylacetic acid+homovanillic acid/dopamine ratio) in the frontal cortex, and dopamine and norepinephrine turnovers (4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol/norepinephrine ratio) in the hypothalamus were produced. These findings suggest that the head-dipping behavior in the hole-board test is one of the emotional behaviors reflecting the anxiogenic state of mice. Also, the dopaminergic and/or noradrenergic nervous in the frontal cortex and hypothalamus may be involved, at least in part, in the expression of head-dipping behavior, and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)<sub>A</sub> receptor/BZP receptor/Cl<sup>-</sup> channel complex may play an important role in the modulation of these nervous activities.

---

<Key words> Anxiety, Emotional behavior, Hole-board test, Monoamine, Mouse

---