

Development of Ultrasonic Vocalizations in ICR Mice: Acoustic Features and Syllable Patterns

Ryo NISHIBORI*, Yuki ITO**, Saori INAGAKI***, Jun MOTOYAMA**** and Kohta I KOBAYASI*

(Received April 15, 2022)

Ultrasonic vocalizations (USV) of mouse pup trigger nurturing behavior of parents and are quantifiable indicator of urge for maternal care. In this study, we analyzed development of acoustic characteristics of USV in ICR mouse pups and compared them to those in other strains. Their USVs were able to classify into 12 patterns based on their acoustic characteristics such as presence of frequency modulation (FM). Pups of ICR mouse produced calls with similar acoustic characteristics comparable to those in other strains. Furthermore, syllable repertoire composition was similar to other strain; syllables with distinct FM accounted for more than half of vocalizations. Our results show that ICR strain shares the similar USV developmental patterns with other strains, and that USV with multiple FMs may be an important call for maternal care, regardless of mouse strain.

Key words : ultrasonic vocalizations (USV), syllable pattern

キーワード : 超音波発声, 音声パターン

ICRマウスにおける超音波発声の発達：音響的特徴と発声パターン

西堀 諒, 伊藤 優樹, 稲垣 沙織, 元山 純, 小林 耕太

1. はじめに

音声コミュニケーションは多くの種で確認されているが、げっ歯類は人間の聴覚閾値である 20 kHz を超える周波数の超音波発声 (Ultrasonic Vocalizations: USV) を知覚することができる¹⁾。その中でも幼獣が親から隔離された時に発する USV は、親による回収や授乳等の母性行動を誘発することがわかっており、USV は母子間インタラクションにお

いて重要な情報伝達手段といえる¹⁻³⁾。

マウス幼獣の隔離誘発性 USV 研究は近交系 (inbred) マウスを中心に行われてきた。近交系マウスは遺伝的差異を原因とする個体差が生じにくく、実験精度の向上が期待される。一方、非近交系 (outbred) マウスは個体間で遺伝的性質の変異が大きいが、仔の出生数が多く哺育能が高いことから、親の養育行動研究によく用いられる⁴⁻⁵⁾。しかし非近

*Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto
Telephone: +81-774-65-6020, FAX: +81-774-65-6019, E-mail: ctug1025@mail4.doshisha.ac.jp
**Organization for Research Initiatives and Development, Doshisha University, Kyoto
Telephone: +81-774-65-6223, FAX: +81 774-65-6773, E-mail: yuito@mail.doshisha.ac.jp
***Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto
Telephone: +81-774-65-6020, FAX: +81-774-65-6019
****Graduate School of Brain Science, Doshisha University, Kyoto
Telephone: +81-774-65-6053, FAX: +81-774-65-6099, E-mail: jmotoyam@mail.doshisha.ac.jp

交系マウスの隔離誘発性 USV の音響特徴は、母子間インタラクションにおいて重要であるにもかかわらず定量的な報告は未だなされていない。

そこで本実験では、非近交系マウスにおいて代表的な系統である ICR マウス幼獣の隔離誘発性 USV の音響特徴を解析し近交系マウスと比較することで、マウス幼獣に共通する特徴を検討した。

2. 実験方法

2.1 被験体

動物を用いた実験は同志社大学の動物実験ガイドラインに基づいて実施された(許可番号:第 1344 号). 7 週齢の ICR 雌マウス(清水実験材料株式会社, 京都)を妊娠させ出産後のマウス幼獣 10 匹を用いた(2 匹の母親から同時に生まれた 5 匹ずつ合計 10 匹). 母獣および新生児マウスは空調の効いた部屋(温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 相対湿度 50~60%)で 12 時間の明暗サイクル(午前 7 時から午後 7 時まで点灯)で床敷き(クリーンチップ SP, クレアジャパン株式会社, 大阪)を入れ, 餌(CE2, クレアジャパン, 大阪)と水を自由に摂取できるように維持された.

2.2 USV の録音

USV の録音は全て防音箱の中で行われ, 生後(Postnatal day: P)4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 24, 30 日で 5 分間録音した.

隔離誘発性 USV を記録する際には, ビーカーに幼獣を 1 匹ずつ入れ, 超音波マイクロフォン(CMPA-P48/CM16 SN34, Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany)を設置し, サウンドカード(UltraSoundGate, 116Hb, Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany)によりサンプルレート 300 kHz, 16 ビット/サンプルで USV を録音した. ビーカーの底からマイクロフォンまでの距離を 30 cm とした.

2.3 USV の解析および音声パターンの分類

得られた音声から幼獣の動き等による広域帯の背景音を除去するために, MATLAB スクリプト(USVSEG)を用いて音声ファイルをスペクトログラムに変換し, USV を自動的抽出した後に解析をおこなった⁶⁾.

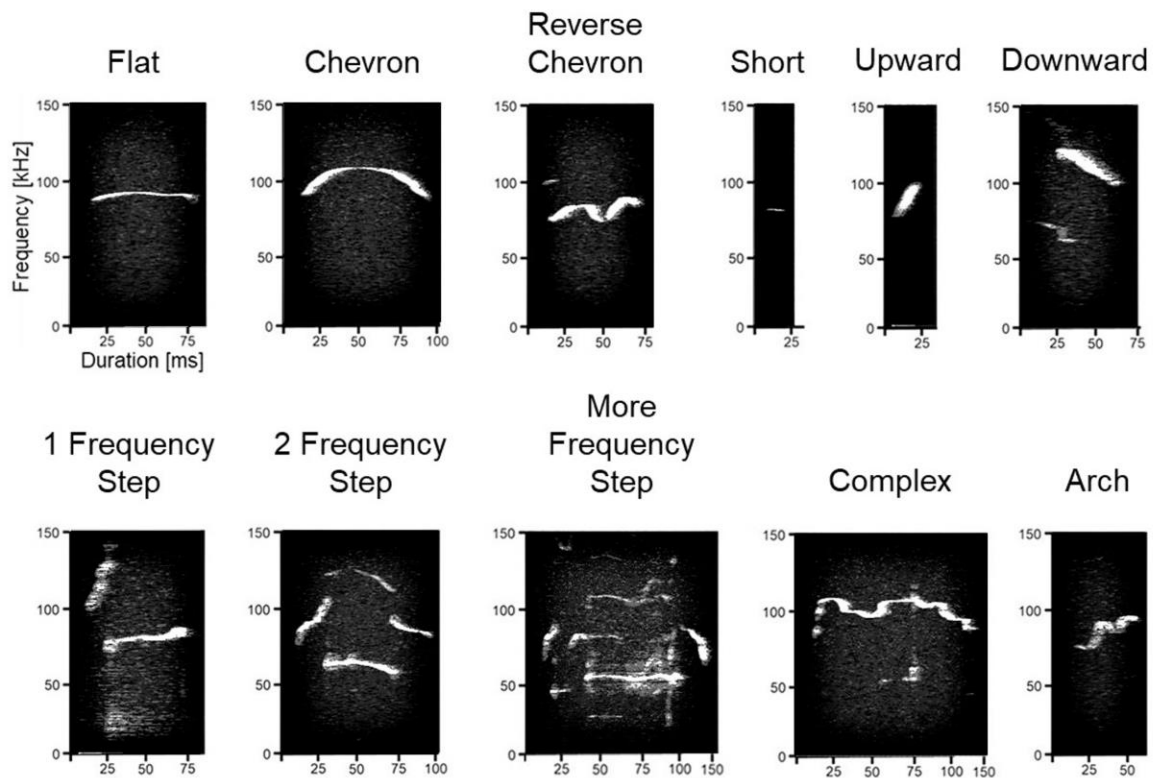


Fig. 1. Sonograms of typical patterns of USV.

また、音声の長さ、開始時の周波数、終了時の周波数、最大周波数、最小周波数、音声内の周波数の不連続な変異（ステップ）の数 (frequency modulation) を用いて12種類の音声パターンに分類した (Fig. 1). 音声の分類は Scattoni ら (2012) の手法に基づいておこなった⁷⁾. 以下に音声分類の定義の詳細を示す.

- (1) *Flat* 音声内の最大周波数と最小周波数の差が 5 kHz 以下.
- (2) *Chevron* 音声内の最大周波数と開始時の周波数の差が 5 kHz 以上かつ最大周波数と終了時の周波数の差が 5 kHz 以上.
- (3) *Reverse chevron* 音声内の開始時の周波数と最小周波数の差が 5 kHz 以上かつ終了時の周波数と最小周波数の差が 5 kHz 以上.
- (4) *Short* 音声の長さが 5 ms 以下.
- (5) *Upward* 音声内の終了時の周波数と開始時の周波数の差が 5 kHz 以上.
- (6) *Downward* 音声内の開始時の周波数と終了時の周波数の差が 5 kHz 以上.
- (7) *1 frequency step* 音声内の 10 kHz 以上の周波数ステップが 1 つ.
- (8) *2 frequency step* 音声内の 10 kHz 以上の周波数ステップが 2 つ.
- (9) *More frequency step* 音声内の 10 kHz 以上の周波数ステップが 3 つ以上.
- (10) *Complex* 音声内の周波数ピッチの変化が 5 kHz 以上.
- (11) *Arch* 音声内の最大周波数と開始時の周波数の差が 3 kHz 以上かつ終了時の周波数と開始時の周波数の差が 7 kHz 以上.
- (12) *Other* 上記以外の音声パターン.

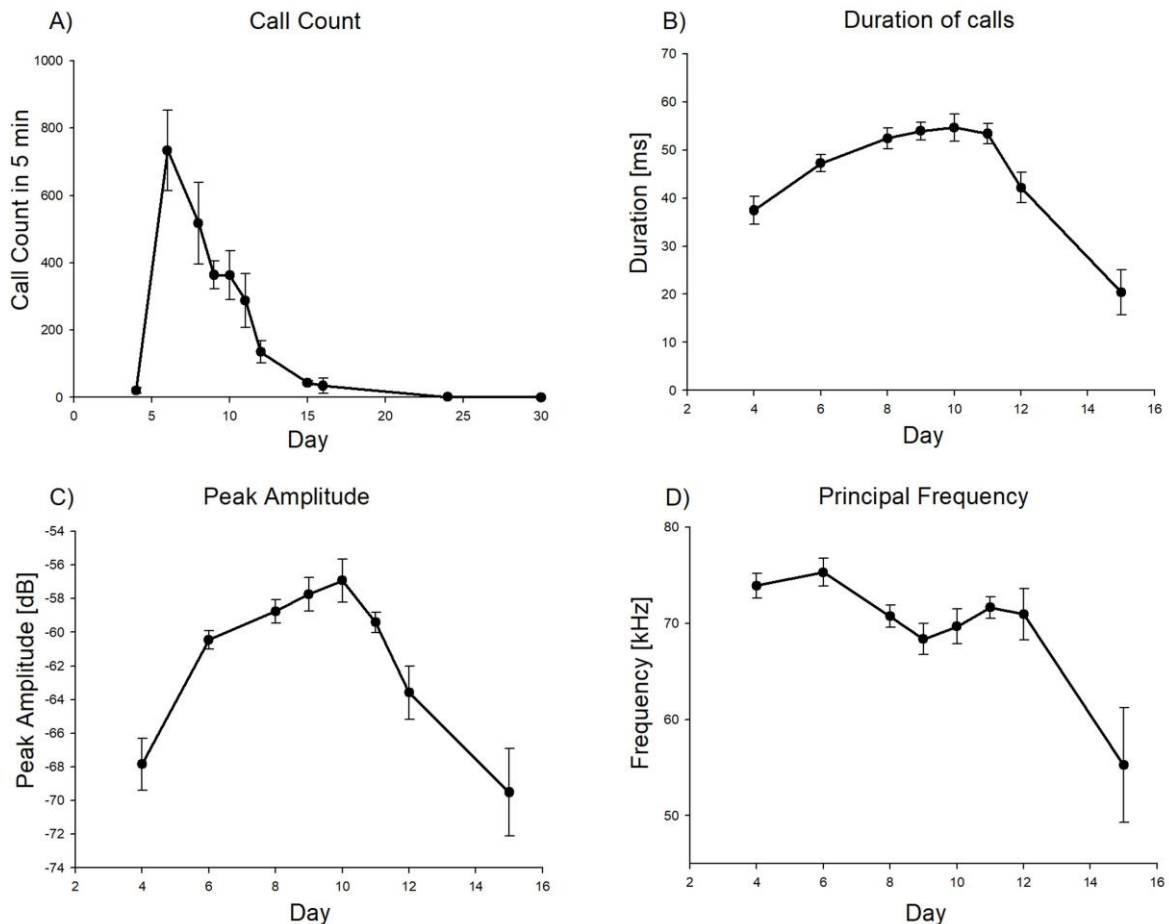


Fig. 2. Developmental trajectory of USV.

2.4 統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。グラフは MATLAB, SigmaPlot 10.0 を用いて作成した。

3. 結果および考察

3.1 発達による発声の変化

5 分間に鳴いた USV の平均発声回数を Fig. 2A に示した。P4 での発声回数は少ないが、P6 でピークとなった。その後発声回数は減少し、P15 でほぼ消失した。そのため、以下の音響特徴（発声時間、ピーク振幅、主要周波数）に関しては、P15 までのデータを示した。USV の平均発声時間を Fig. 2B に示した。発声時間は成長とともに長くなり、P10 をピークとしてその後減少した。USV の平均ピーク振幅を Fig. 2C に示した。P4 での鳴き声は小さいが成長とともに大きな声で鳴いていた。発声時間と同様、ピーク振幅も P10 で最大となりその後減少した。USV の主要周波数を Fig. 2D に示した。主要周波数は P4 から P12 まで徐々に減少し、P15 で急激に減少した。

これまで複数の系統で USV の音響解析が調査されている。Branchi ら(2001)は ICR 系統では平均発声回数が P1 から次第に増加し、P7 でピークを迎えその後減少したと報告している⁸⁾。本実験と Branchi ら(2001)の結果には、ピークの時期に違いは見られたものの、幼獣の発達に伴う経時的な変化は同様の結果が得られた。また、Scattoni ら(2012)や Xiaowen ら(2016)は近交系マウスである C57BL/6, 129X1, FVB/NJ 系統のマウス幼獣の USV について次のように報告している^{7, 9)}。平均発声回数は 3 系統において P6~7 でピークに達しその後減少した。平均発声時間は FVB/NJ では P6, C57BL/6, 129X1 では P8 でピークに達しその後減少した。平均ピーク振幅は C57BL/6, 129X1, FVB/NJ で P8 がピークであった。主要周波数は 129X1, FVB/NJ では P2 から上昇しその後徐々に減少した。C57BL/6 では P6 または P7 でピークに達し、その後減少した。先行研究と本実験の結果を比較する (Table 1) と、発声回数のピークは全ての系統で同様であった。音響特徴量に関しても、系統に依らず全て類似した発達の時系列パターンを示した。その一方でピークの時期は ICR 系統が数日遅れた。また

系統に依らず音響特徴のピークは発声回数のピークよりも数日遅れていた。これは、発声回数を増やすことが幼獣マウスにとって安定して USV を発声するための訓練となっていた可能性がある。

Table 1. Comparison of peaks with previous studies.

	Author	Strain	Call Count	Duration	Peak Amplitude	Principal Frequency
This study		ICR	P6	P10	P10	none
Previous studies	Xiaowen (2016)	C57BL/6	P6	P8	P8	P7
	Scattoni (2008)	129X1	P6-7	none	none	P6
		FVB/NJ	P6	P6	P8	none

3.2 音声パターンごとの発声の変化

本研究で分類した 12 個の音声パターンを観察できた P8 における、各音声パターンの発声割合を Fig. 3 に示した。特に発生割合の高い 3 種類 (1 Frequency Step, 2 Frequency Step, Chevron) の発声割合は全体の 69.1 % を占めていた。また、1 Frequency Step を除く周波数変調が 2 つ以上のパターン (2 Frequency Step, More Frequency Step, Chevron, Complex, Revere Chevron) の発声割合は全体の 54.7 % と約半数を占めていた。

マウス幼獣の USV を本研究と同様に分類した先行研究では、C57BL/6, 129X1, FVB/NJ は様々な音声パターンで鳴いたと報告している⁷⁾。中でも 2 Frequency Step と Chevron が占める割合は C57BL/6 : 46%, 129X1 : 44%, FVB/NJ : 49% と全体の約半数を占めていた。本実験と先行研究と比較すると音声パターンの発声割合も系統に依らず一様である可能性が示された。また先行研究での近交系マウスである 3 系統も 2 変調以上の音声パターンが約半数を占めていたことから、幼獣が母親の養育行動を誘発するには系統に依らず変調を含む音声が必要である可能性が示唆された。

4. まとめ

本研究では、非近交系マウスである ICR マウス幼獣の隔離誘発性 USV の音響特徴を解析した。近交系マウスでの先行研究と比較すると、発声回数、発声時間、ピーク振幅、主要周波数の発達に伴う時間的

変化は両者で共通していた。また音声パターンの発声割合も両者で一致しており、2変調以上の音声パターンが約半数を占めていた。以上から、系統に依らず複数の周波数変調を含む USV は養育行動を誘発する可能性があり、今後は母子間インタラクションにおける指標の一つとなる可能性があると考えられる。

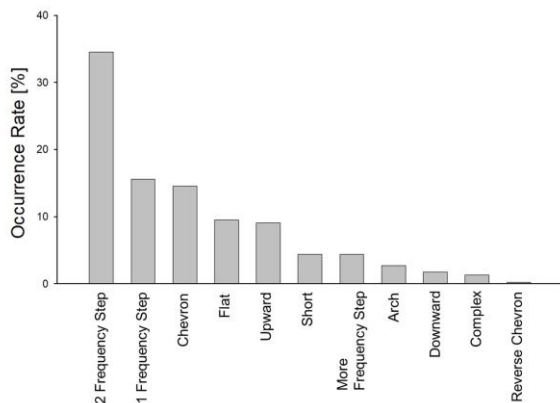


Fig. 3. Production of USV by syllable pattern at postnatal day 8.

参考文献

- 1) M. Wöhr and R. Schwarting, “Affective Communication in Rodents: Ultrasonic Vocalizations as a Tool for Research on Emotion and Motivation”, *Cell Tissue Research*, **354**, 81-97 (2013).
- 2) F. D’Amato, E. Scalera, C. Sarli and A. Moles, “Pups Call, Mothers Rush: Does Maternal Responsiveness Affect the Amount of Ultrasonic Vocalizations in Mouse Pups?”, *Behavior Genetics*, **35**, 103-112 (2005).
- 3) S. Okabe, M. Nagasawa, T. Kihara, M. Kato, T. Harada, N. Koshida, K. Mogi and T. Kikusui, “Pup Odor and Ultrasonic Vocalizations Synergistically Stimulate Maternal Attention in Mice.”, *Behavioral Neuroscience*, **127**, 432-438 (2013).
- 4) L. Lu, T. Mamiya, P. Lu, M. Niwa, A. Mouri, L.B. Zou, T. Nagai, M. Hiramatsu and T. Nabeshima, “The Long-Lasting Effects of Cross-Fostering on the Emotional Behavior in ICR Mice”, *Behavioral Brain Research*, **198**, 172-178 (2009).
- 5) W. Cai, H. Ma, Y. Xun, W. Hou, L. Wang, X. Zhang, Y. Ran, W. Yuan, Q. Guo, J. Zhang, L. Li, Y. Yang, Y. Li, Z. Lv, Z. He, R. Jia and F. Tai, “Involvement of the Dopamine System in Paternal Behavior Induced by Repeated Pup Exposure in Virgin Male ICR Mice”,

Behavioral Brain Research, **415**, (2021).

- 6) R. O. Tachibana, K. Kanno, S. Okabe, K. I. Kobayashi and K. Okanoya, “USVSEG: a Robust Method for Segmentation of Ultrasonic Vocalizations in Rodents”, *PLoS ONE*, **15**, 1-16 (2020).
- 7) M. L. Scattoni, S. U. Gandhi, L. Ricceri and J. N. Crawley, “Unusual Repertoire of Vocalizations in the BTBR T+tf/J Mouse Model of Autism”, *PLoS ONE*, **3**[8], 48-52 (2008).
- 8) I. Branchi, D. Santucci and E. Alleva, “Ultrasonic Vocalisation Emitted by Infant Rodents: a Tool for Assessment of Neurobehavioural Development”, *Behavioural Brain Research*, **125**, 49-56 (2001).
- 9) X. Yin, L. Chen, Y. Xia, Q. Cheng, J. Yuan, Y. Yang, Z. Wang, H. Wang, J. Dong, Y. Ding and X. Zhao, “Maternal Deprivation Influences Pup Ultrasonic Vocalizations of C57BL/6J Mice”, *PLoS ONE*, **11**[8], 1-20 (2016).