

熱ストレスに対するマウスの感受性の系統間比較

山元 昭二¹⁾・佐藤 勝紀²⁾・安藤 満¹⁾

¹⁾国立環境研究所地域環境研究グループ・²⁾岡山大学農学部

はじめに

実験動物・獣医・畜産学領域において、高温環境は動物実験成績や動物の繁殖、育成、生理機能、免疫機能等に影響を及ぼすことが知られており[3, 4, 12-15]、特に実験動物施設においては飼育環境の温度制御は動物試験の再現性や動物の繁殖・育成上、重要な因子とされてきた[9]。一方、地球温暖化によるヒトの健康影響がIPCC（気候変動に関する政府間パネル）[8]やWHO[10]によって予測されており、そこでは、熱ストレスによる健康影響研究の必要性が指摘されている。著者らはこれまでに、実験動物としてラットやマウスを用いて温熱暴露実験（35-35.5℃、最長2週間）を行い、高温によるラット肝での脂質過酸化障害や熱ショック蛋白質の誘導[1, 2]、マウスでのウイルス抗原に対するIgG抗体応答の抑制[17]、肺の殺菌活性低下[18]等を明らかにしている。一般に、BALB/cやC3H/He、C57BL/6等の近交系由来のマウスは免疫系への高温影響研究[3, 4, 6, 7, 11]でよく用いられているが、これらのマウスの生存率や体温、体重、摂餌量、飲水量等への高温影響の系統間差を調べた報告は少ない。本研究では、熱ストレスに対するマウス系統間での感受性の差異を明らかにするために、BALB/cA, C57BL/6J, C3H/HeJの生存率や体温、体重、臓器重量、摂餌量、飲水量、血液学的性状等への高温影響について比較検討した。

材料と方法

- ①使用動物：日本クレア（富士）よりSPFのJCL BALB/cA, C3H/HeJ, C57BL/6Jの6週齢雄マウスを各24匹導入し、8週齢時に温熱暴露実験に供した。各系統共に温熱暴露群は各18匹とし、対照群は各6匹とした。
- ②温熱環境条件：温熱暴露実験には、温熱暴露チャンバー（柴田科学器械工業 BECSEA-S、1,650 mm W×700 mm D×1,830 mm H）2台を用いた。なお、本チャンバーはセミクリーンルーム内に設置した。温熱暴露群はチャンバー内温度を36℃に設定し、対照群は23℃に設定した。両チャンバー共に湿度50±5%、風速毎秒50cm以下に制御した。
- ③飼育条件：飼育ケージは暴露用ステンレス製金網

ケージ（260 mm W×205 mm D×140 mm H）を用い1ケージ当たり6匹飼いと、受皿には床敷用ペーパーを敷いた。飼料と飲水はマウス用固形飼料（CE-2、日本クレア）と蒸留水を用い、共に非滅菌のものを自由摂取させた。

- ④生存率：温熱暴露期間中、各系統のマウスの生死の有無を点検し、死亡個体については剖検を行った。暴露終了後、各系統毎の生存率を算出した。
- ⑤体温の測定：温熱暴露期間中、3～4日間隔で直腸温を毎回同一時刻（午後3時）に手保定で測定した。直腸温は肛門入口より約2 cmの部位をサーミスター温度計（芝浦電子TD-300）を用いて測定した。
- ⑥体重・摂餌量・飲水量の測定：温熱暴露期間中、3～4日間隔で体重・摂餌量・飲水量を毎回同一時刻（午前9時）に測定した。餌・水の給与量から24時間後のそれぞれの残量を引いた値を摂餌量および飲水量とした。
- ⑦臓器重量測定および血液学的検査：14日間の温熱暴露終了後、全てのマウスをチャンバーより搬出し、エチルエーテル麻酔下で心臓穿刺により採血を行うとともに心臓、肺、胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、精巣を摘出し、これらの重量を電子天秤（島津LIBROR ED-200）を用いて測定した。血液学的検査（白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値）は、EDTA加血について多項目自動血球計数装置（シスメックスSE9000）を用いて測定した。

結果

- ①生存率：BALB/cAでは暴露6日目より死亡例が見られ、14日間の暴露終了迄に18匹中9匹が死亡し生存率は50%であった。C3H/HeJとC57BL/6Jでは、それぞれ18匹全て生き残り生存率は100%であった（Fig. 1）。なお、BALB/cAの死亡個体の剖検では感染が疑われるような肉眼所見はなく、又、生存マウスの血清学的診断でも指定病原体に対する抗体は検出されなかった。
- ②直腸温：直腸温は3系統のマウスいずれも温熱暴露によって39.5℃付近へと上昇した。しかしながら、C3H/HeJとC57BL/6Jでは暴露7日目以降直腸

温が39℃以下へと低下したのに対し、BALB/cAは39.5℃付近で推移した (Fig. 2)。

③体重および臓器重量：BALB/cAとC3H/HeJの体重は、温熱暴露の経過とともに徐々に減少し暴露14日目において最小となったのに対し、C57BL/6Jでは暴露3日目迄は減少したがそれ以降顕著な体重減少は見られなかった (Fig. 3)。14日間の暴露によってBALB/cA、C3H/HeJ、C57BL/6Jの体重はそれぞれ対照群の70.6%、77.8%、83.1%へと減少し、BALB/cAの体重減少が最も顕著であった (Table 1)。BALB/cAでは胸腺、肝臓、腎臓、精巣の重量 (体重比) が温熱暴露によって減少したの

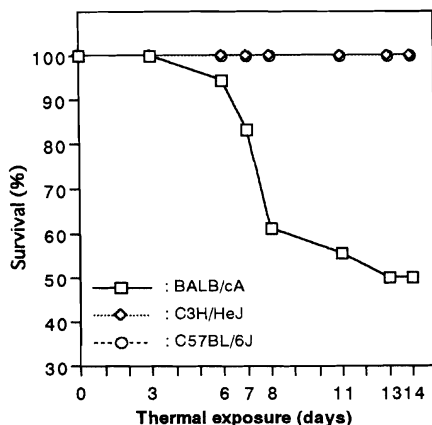


Fig. 1 Survival in mice exposed to high temperature (36°C) for 14 days. $n=18$

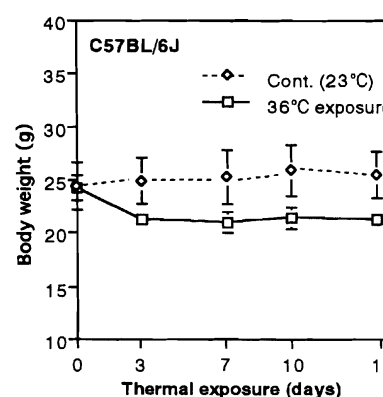
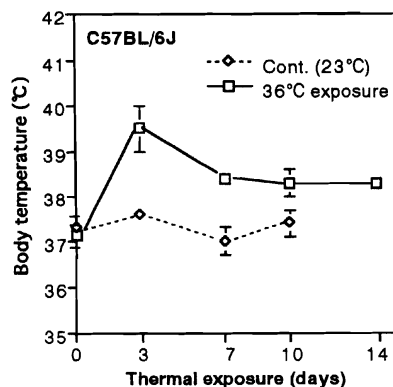
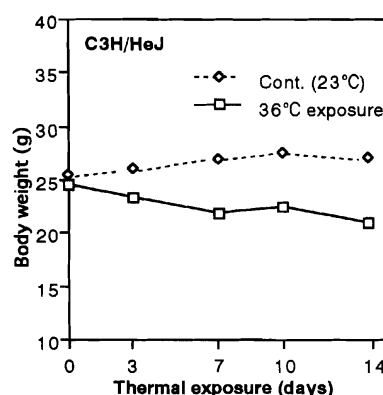
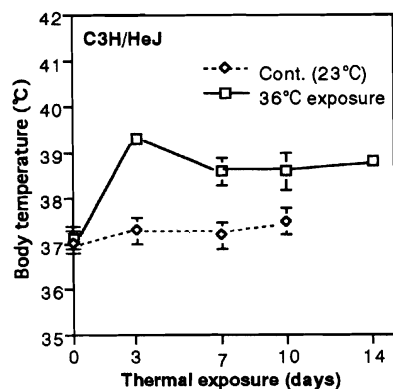
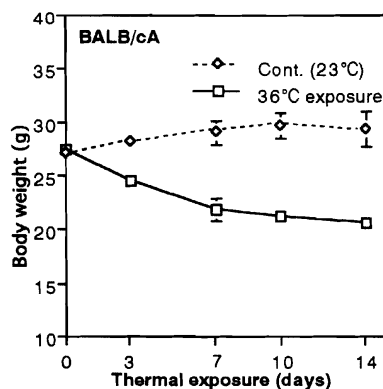
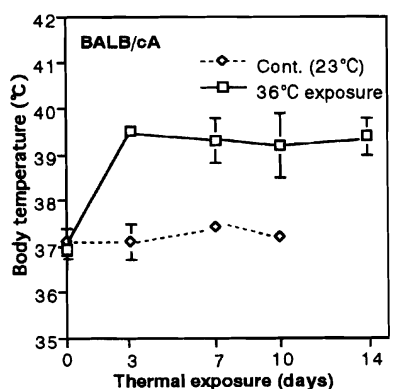


Fig. 2 Changes of rectal temperature in mice exposed to high temperature (36°C) for 14 days. The values are expressed as $M \pm SD$ ($n=6$).

Fig. 3 Changes of body weight in mice exposed to high temperature (36°C) for 14 days. The values are expressed as $M \pm SD$ ($n=6$).

Table 1 The ratios of the organ to body weight in mice exposed to high temperature (36°C) for 14 days

11

	BALB/cA		C3H/HeJ		C57BL/6J	
	Control	36°C exposure	Control	36°C exposure	Control	36°C exposure
Heart (%)	0.502 ± 0.027	0.579 ± 0.079*	0.377 ± 0.047	0.410 ± 0.029	0.524 ± 0.045	0.520 ± 0.062
Lungs	0.545 ± 0.024	0.686 ± 0.028**	0.517 ± 0.034	0.648 ± 0.053**	0.548 ± 0.030	0.652 ± 0.047**
Thymus	0.170 ± 0.020	0.077 ± 0.006**	0.154 ± 0.031	0.162 ± 0.019	0.163 ± 0.018	0.159 ± 0.025
Spleen	0.280 ± 0.020	0.241 ± 0.083	0.347 ± 0.051	0.409 ± 0.042*	0.235 ± 0.018	0.255 ± 0.025
Liver	5.997 ± 0.219	5.024 ± 0.213**	5.271 ± 0.295	4.627 ± 0.201**	5.477 ± 0.316	4.458 ± 0.170**
Kidney (L)	0.893 ± 0.045	0.764 ± 0.044**	0.923 ± 0.047	0.687 ± 0.068**	0.675 ± 0.039	0.528 ± 0.034**
Testis (L)	0.371 ± 0.021	0.158 ± 0.012**	0.270 ± 0.017	0.134 ± 0.011**	0.367 ± 0.028	0.179 ± 0.015**
B. W. (g)	29.3 ± 1.6	20.7 ± 0.9(70.6)	27.0 ± 0.4	21.0 ± 0.6(77.8)	25.5 ± 2.2	21.2 ± 0.8(83.1)

The values are expressed as $M \pm SD$ (n=6). Significance was determined in comparison with the control (23°C) group.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

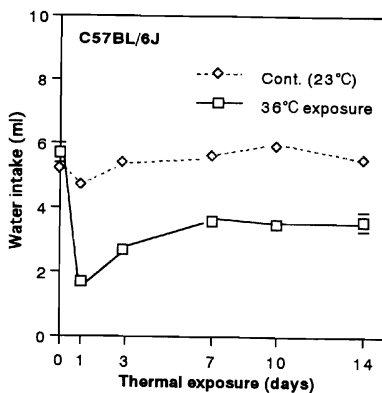
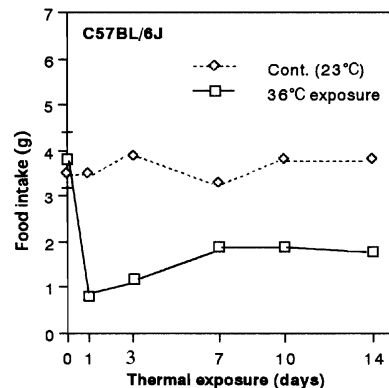
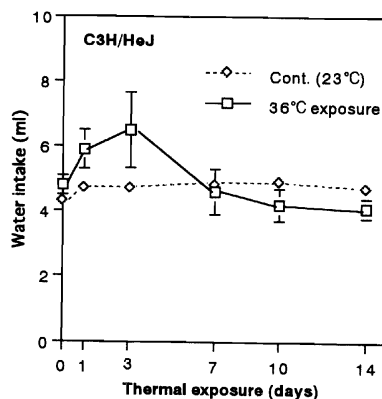
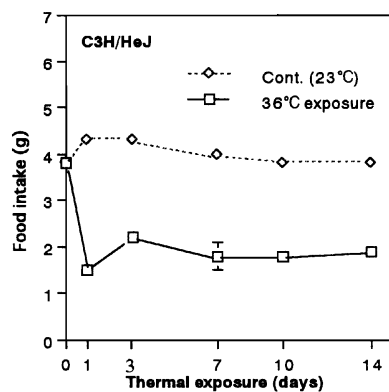
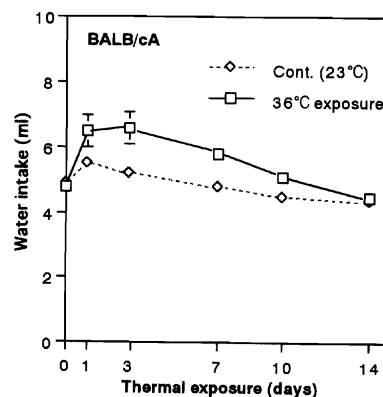
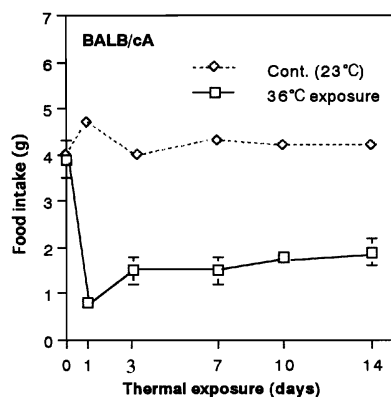


Fig. 4 Changes of food intake in mice exposed to high temperature (36°C) for 14 days.

Fig. 5 Changes of water intake in mice exposed to high temperature (36°C) for 14 days.

Table 2 Hematological values in mice exposed to high temperature (36°C) for 14 days

	BALB/cA		C3H/HeJ		C57BL/6J	
	Control	36°C exposure	Control	36°C exposure	Control	36°C exposure
Leukocytes (/mm ³)	3175 ± 499	2540 ± 662	3220 ± 597	4360 ± 467*	2660 ± 1014	2660 ± 428
Erythrocytes (10 ⁶ /mm ³)	1029 ± 26.8	963 ± 21.7**	918 ± 35.6	824 ± 24.9**	982 ± 17.0	1070 ± 20.4**
Hematocrit (%)	59.8 ± 1.15	55.3 ± 1.13**	61.0 ± 1.18	53.4 ± 1.28**	62.9 ± 1.54	67.4 ± 1.54**
Hemoglobin (g/dl)	16.1 ± 0.33	15.0 ± 0.19**	15.0 ± 0.27	13.8 ± 0.51**	15.0 ± 0.35	16.7 ± 0.42**

The values are expressed M±SD (n=6). Significance was determined in comparison with the control (23°C) group.

*: p<0.05, **: p<0.01.

に対し、C3H/HeJやC57BL/6Jでの減少は肝臓、腎臓、精巣のみであった (Table 1)。

- ④摂餌量：摂餌量は各系統共に暴露によって減少し、暴露3日目以降、各々対照群の摂餌量の50%前後の値で推移した (Fig. 4)。
- ⑤飲水量：BALB/cAとC3H/HeJの飲水量は暴露によって一時的に増加したが、暴露7日目以降、対照群と近似の値へと減少した。一方、C57BL/6Jでは、暴露によって飲水量は減少し、全暴露期間を通して対照群より低い値で推移した (Fig. 5)。
- ⑥血液性状：暴露14日後のBALB/cAとC3H/HeJの赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値はいずれも対照群に比べて有意に低く、一方、C57BL/6Jでは有意に高い値を示した。白血球数はC3H/HeJで対照群に比べ有意に高い値が示されたが、BALB/cAとC57BL/6Jでは対照群との間に差は見られなかった (Table 2)。

考 察

本研究では、熱ストレス (36°C、2週間) に対するマウス系統 (BALB/cA、C3H/HeJ、C57BL/6J) 間の感受性の差異を明らかにするために生存率や体温、体重、臓器重量、摂餌量、飲水量、血液学的性状等への高温影響について比較検討した。その結果、BALB/cAはC3H/HeJやC57BL/6Jに比べて熱ストレスに対し感受性が高いことが、生存率や体温、体重、臓器重量等の成績から示唆された。

C3H/HeJとC57BL/6Jは高温環境下で全例が生き残ったのに対し、BALB/cAでは半数が死亡した。温熱生理学 [5] の分野では、体温上昇が過度かつ長時間持続する場合、二次的に中枢機能の器質的あるいは機能的変化を起し、体温調節機能が失われ悪循環的に致命的な高体温を招来することが云われていることから、BALB/cAの死因としては体温調節機能の破綻による熱中死であることが考えられた。さらに、C3H/HeJとC57BL/6Jでは暴露7日目以降体温が

39.5°C付近から39°C以下へと低下したのに対し、BALB/cAは39.5°C付近で推移したが、このような、体温調節の相違が系統間による生存率の結果に反映されたものとする。

BALB/cAやC3H/HeJでは温熱暴露によって体重、摂餌量が減少し、飲水量は反対に増加した。これらのことはマウスやラットでの高温影響に関する従来の報告 [12-15] と一致する。しかしながら、C57BL/6Jでは飲水量の増加は見られなく、対照群より低い数値で推移した。一般に、高温環境下での摂餌量減少の理由としては熱ストレスによる身体生理機能の低下および熱産生を抑制しようとする消極的な化学調節の結果であること、又、飲水量増加は体温上昇に伴う蒸散促進による体内水分の不足を補うためであること等が云われている [12, 15]。我々のC57BL/6Jにおける飲水量低下は、従来の報告とは逆の矛盾したものとなった。ただし、山内ら [15] のヌードマウスでの実験では飲水量と環境温度 (16-30°C) の間には負の相関が見られており、今回のC57BL/6Jでの結果はこのヌードマウスでの結果に類似したものとなった。

高温環境下では精巣が萎縮し繁殖機能が低下することが知られている [12]。我々の実験でも、温熱暴露によって各系統共に顕著な精巣重量の低下が見られた。なお、近年の研究では、熱ストレスによる生殖細胞のアポトーシス [19] が報告され、精巣重量低下や生殖細胞減少との関連性が明らかになっている。

上田ら [3] は7～8週齢のBALB/cAを32°C環境に最長14日間暴露した場合、胸腺重量は7日目迄は小さい傾向を示し14日目では逆に大きくなったことを報告している。本研究での、36°Cで2週間暴露したBALB/cAの胸腺重量は小さいままであり、前述の報告とは異なった結果が得られた。一方、C3H/HeJやC57BL/6Jの胸腺重量は対照群との間に差は見られなかった。これらの相違の理由としては温熱条件や系

統が異なるため暑熱による影響もしくはその回復に違いが生じたものと考えられる。又、上田ら[3]は白血球数並びにTリンパ球数の暴露初期での減少と7日目、14日目での増加を報告し、これらの白血球系細胞の増減に関して暴露初期ではストレスに反応して分泌される副腎皮質ホルモンの関与を挙げ、又、暴露後期では特異的な自律神経系の作用との関連性を指摘している。本研究においては暴露初期の白血球数は未検索であるので白血球数の変動パターンは定かではないが、14日間の暴露終了直後におけるBALB/cAやC3H/HeJ、C57BL/6Jの血中の白血球数の値というのは自律神経系の作用によって回復または増強した値を示しているのかもしれない。

山内ら[14]はICR雄マウスを32℃で16週間飼育した場合、赤血球数、ヘマトクリット値の減少とヘモグロビン量の増加を報告している。我々の結果では、BALB/cAとC3H/HeJの赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値はいずれも対照群に比べて有意に低く、一方、C57BL/6Jでの値はいずれも対照群に比べて有意に高い値を示した。一般に急性の高温障害である熱射病患者においては脱水による血液濃縮が起こることが知られている[16]が、C57BL/6Jでの赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値の上昇理由としては、同マウスでは水分補給が他の2系統に比べて少なかったため血液がやや濃縮方向へ傾いたものと考えられる。

以上、高温にマウスを暴露した結果、生存率や体温、体重、臓器重量等の成績からBALB/cAは、他の2系統に比べ熱ストレスに感受性であることが示唆された。一方、C57BL/6Jの飲水量や赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値は他の2系統とは逆の応答を示し、熱ストレスに対する生体応答に系統間による違いがあることが示唆された。C57BL/6Jで観察された暑熱耐性と飲水量減少との関係は一見相容れないようにも思われるのでこれについては、今後の検討課題としたい。

要約

熱ストレス(36℃、2週間)に対するマウス系統(BALB/cA, C3H/HeJ, C57BL/6J)間の感受性の差異を明らかにするために、生存率、体温、体重、臓器重量、摂餌量、飲水量、血液性状等への高温影響について比較検討した。温熱暴露マウスの生存率は、C3H/HeJとC57BL/6Jの100%に対し、BALB/cAは暴露6日目より死亡例が見られ最終的な生存率は50%であった。又、体温はいずれの系統も温熱暴露によって上昇した。しかしながら、C3H/HeJとC57BL/6Jでは暴露7日目以降体温が39.5℃付近から39℃以下へと低下したのに対し、BALB/cAは39.5℃付近で推移した。BALB/cAでは胸腺、肝臓、腎臓、精巣でその重量(体重比)が減少したのに対し、C3H/HeJや

C57BL/6Jでの減少は肝臓、腎臓、精巣のみであった。摂餌量はいずれの系統も温熱暴露によって減少し、対照群の50%前後の摂餌量で推移した。飲水量はBALB/cAとC3H/HeJでは暴露初期に増加傾向が見られた。C57BL/6Jでは全暴露期間を通して対照群(23℃)より低値で推移した。BALB/cAとC3H/HeJの赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値は対照群に比べて有意に低く、C57BL/6Jでは対照群に比べて有意に高い値を示した。生存率や体温、体重、臓器重量等の結果から、BALB/cAはC3H/HeJやC57BL/6Jに比べて熱ストレスに対し感受性が高いことが示唆された。一方、C57BL/6Jの飲水量や赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値は他の2系統とは逆の応答を示し、熱ストレスに対する生体応答に系統間による違いがあることが示唆された。

文 献

- [1] Ando, M., Katagiri, K., Yamamoto, S., Asanuma, S., Usuda, M., Kawahara, I. and Wakamatsu, K. (1994). Effect of hyperthermia on glutathione peroxidase and lipid peroxidative damage in liver. *J. Therm. Biol.*, 19, 177-185.
- [2] Ando, M., Katagiri, K., Yamamoto, S., Wakamatsu, K., Kawahara, I., Asanuma, S., Usuda, M. and Sasaki, K. (1997). Age-related effects of heat stress on protective enzymes for peroxides and microsomal monooxygenase in rat liver. *Environ. Health. Perspect.*, 105, 726-733.
- [3] 上田智之・山内忠平(1986). マウスの胸腺・脾臓重量及び血液中のリンパ球に対する環境温度の影響. 実験動物, 35, 479-483.
- [4] Ueda, T. (1990). Effects of environmental temperature on the population of T-cell subsets, the blastogenic responses of lymphocytes in blood and spleen and splenic NK cell activity in mice. *Exp. Anim.*, 39, 389-396.
- [5] 大原孝吉(1981). 高体温による障害. 温熱生理学, pp467-468, 中山昭雄編, 工学社, 東京.
- [6] 菊池正一(1988). マウスの免疫応答に及ぼす環境温熱条件の影響. 日衛誌, 43(3), 833-844.
- [7] 杉山雅俊(1981). 温熱反復暴露のマウス抗体産生能に及ぼす影響. 日衛誌, 36(3), 613-620.
- [8] 西岡秀三 [監訳] (1992). 気候変動が人の健康に及ぼす影響についての要約. 地球温暖化の影響予測. IPCC第2作業部会報告書, pp158-

- 162, IPCC第2作業部会編, 中央法規出版, 東京.
- [9] 実験動物施設基準研究会 編(1983). ガイドライン「実験動物施設の建築および設備」昭和58年度版, pp45-53, 清至書院, 東京.
- [10] McMichael, A. J., Haines, A., Slooff, R. and Kovats, S. (eds) (1996). Heat, cold and air pollution. In *Climate change and human health*, pp43-70, WHO, Geneva.
- [11] 村上雅健・垣本毅一・矢永尚士(1980). マウスの免疫能に及ぼす環境温度の影響. 日生氣誌, 17(2), 72-77.
- [12] 山内忠平・野村達次(1970). 狭義の環境. 実験動物学総論, pp151-184, 田島嘉雄 編, 朝倉書店, 東京.
- [13] Yamauchi, C., Fujita, S., Obara, T. and Ueda, T. (1981). Effects of room temperature on reproduction, body and organ weights, food and water intake, and hematology in rats. *Lab. Anim. Sci.*, 31, 251-258.
- [14] Yamauchi, C., Fujita, S., Obara, T. and Ueda, T. (1983). Effects of room temperature on reproduction, body and organ weights, food and water intakes, and hematology in mice. *Exp. Anim.*, 32, 1-11.
- [15] 山内忠平(1985). 気候的要因. 実験動物の環境と管理, pp7-61, 出版科学総合研究所, 東京.
- [16] 山下衛(1997). 高温による障害. 新臨床科学第7版, pp1699-1700, 高久史磨・尾形悦郎 監修, 医学書院, 東京.
- [17] Yamamoto, S., Ando, M. and Suzuki, E. (1999). High-temperature effects on antibody response to vial antigen in mice. *Exp. Anim.*, 48(1), 9-14.
- [18] Yamamoto, S., Katagiri, K. and Ando, M. (1999). The effect of high temperature on pulmonary antibacterial defense in mice. *Jpn. J. Biometeor.*, 36(4), 145-151.
- [19] Yin, Y., Hawkins, K.L., DeWolf W.C. and Morgentaler A. (1997). Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J. Androl.*, 18(2), 159-165.