

新生児マウスを用いる動物実験が 母マウスにもたらすストレスの生化学的評価

Biochemical Evaluation of Maternal Stress by Separating Infant Mice for Animal Experiments

矢田 範夫
Norio Yata

岡山大学 自然生命科学研究支援センター
Advanced Science Research Center, Okayama University

Summary

Corticosterone, the glucocorticoid in rodents, is released from adrenal cortex in response to stress. Sometimes, for use in experiments, infants may be separated from their mother mouse. We studied the stress of mother mouse when she separates from infants. As a result, the concentration of corticosterone in the blood of the mother mouse tended to increase, by pulling her infants apart. In the case of using infant mice for animal experiments, it was suggested that it is necessary to consider the maternal stress.

1. 目的

著者は大学動物実験施設に技術職員として勤務するとともに、動物実験委員会の委員として年間 900 件を超えて申請される動物実験計画書の審査を担当している。その中で、われわれはマウスやラットなどの授乳中の母親から実験に使用するために産仔を取り上げる行為が母親にとってどのような苦痛をもたらすのであろうかという疑問を抱いた。

動物実験を行なう上で、必要個体数の生産や系統維持のための繁殖は不可欠である。そこでは虚弱個体の排除、哺育個体数の調整などのために出生直後の段階で産仔の一部を安楽死させることがある。また離乳前の個体を実験に用いる場合もある。ところが実験動物の苦痛評価についての一般的な基準として用いられている SCAW (Scientists Center for Animal Welfare) による苦痛のカテゴリー分類では「本来の母親の代わりに不適切な代理母を与えること」との例示があるのみで、母親の側からみた苦痛評価は見当たらない¹⁾。また日本学術会議ガイドラインにおいても、母親から離された新生仔のストレスについて、「毛のない動物の体温管理」という文脈で語られているにとどまっている²⁾。

そこで本研究において、哺育中の産仔を離す際の母親の苦痛について、母性行動の観察に加えてストレスマーカーの一種であるコルチコステロン (CORT) に着目し、苦痛の程度を客観的に評価することを立案した。

2. 方法

(1)使用動物種・系統

繁殖力が高く産仔数も多い Slc : ICR マウス (日本エスエルシー株式会社) を用いた。

(2)交配および繁殖の方法

8 週齢の 5 匹♀ 15 匹♂ を用いて 1 匹♀ 3 匹の組み合わせで交配させた。交配ペア作成の翌朝から膣栓の有無を確認し、交配 12 日前後に目視および触診で妊娠を確認した♀ は個別飼育とし、出産させた。

(3)ストレス評価の方法

前記の方法で出産させた産仔を生後 4 日 (postnatal day 4: pd4) の時点で、母親から①すべての産仔を残す群、②産仔の半数を離す群、さらに③すべての産仔を離す群の 3 群 (各群母マウス 5 匹) に分けた。仔を離す直前 (pre) と 1 時間後に母マウスの尾静脈から各 0.1mL 採血し、いったん離れた仔は 2 回目の採血終



図 1. 母子分離の方法

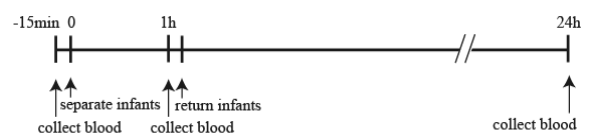


図 2. 実験スケジュール

了後ケージに戻した。母マウスと仔を分離する際は、ケージの間に目隠しを設けて遮蔽した(図1)。ストレスの経時的変化を検討するために、24時間後に再度尾静脈から0.1mL採血を行なった(図2)。これらをサンプルとしてCorticosterone ELISA kit ADI-900-097(Enzo Biochem Inc.)によって血中CORTの測定を行なった。同一個体を用いて同様の実験を生後14日(pd14)、離乳の生後21日(pd21)の時点でも行なった。

(4)動物の苦痛および研究倫理への配慮

21日目の採血を終えた母マウスおよびその仔は速やかに安楽死させた。

出産した仔を実験の過程で一時的にせよ引き離すことについて、本研究によって母マウスのストレスの程度が判定されるまでは、SCAWの苦痛のカテゴリーD(回避できない重度のストレスまたは痛みを伴うと思われる実験)に該当する可能性を想定する必要がある。ここにおいて母マウスの摂水・摂餌量の低下、運動性の低下、授乳行動の異常などその苦痛が耐え難いものと判断された場合には、当該動物を安楽死させ、残った産仔の離乳までの哺育は別の出産後の♀マウスに行なわせることとしたが、本実験の過程では人道的エンドポイントを適用を検討する局面はなかった。

本研究は岡山大学動物実験委員会において、実際に研究を実施する著者を除く12名の委員の審査によって承認された動物実験計画書OKU-2014451号に基づいて実施された。

3. 結果

すべての血液サンプルを用いてELISAによって分析した結果を、図3~5に示す。

(1) 全ての産仔を残す群のCORT濃度の推移(図3)

すべての産仔を残した群については、pre、1時間後、24時間後の3回の採血時のCORT濃度はおおむねほとんど変化しない、もしくは低下する個体も見られた。

(2) 産仔の半数および全部を離す群のCORT濃度の推移(図4および図5)

数値のばらつきが非常に大きい、仔を離して1時間後の母マウスの血中CORT濃度は離す直前の数値よりも上昇する傾向がみられた。とりわけ仔の全数を母マウスから離す場合、離す前の数値に比べて顕著な上昇が見られた。

また後者の群では、生後4日、14日、21日のいずれの時点においても仔を母マウスから離して1時間後にもとに戻したとき、そこか

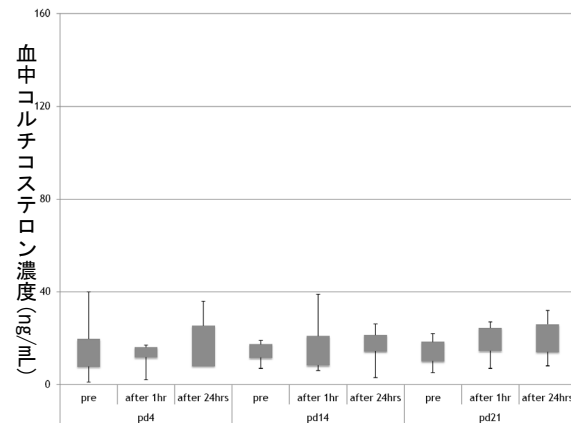


図3. すべての産仔を残す群のCORT濃度の推移

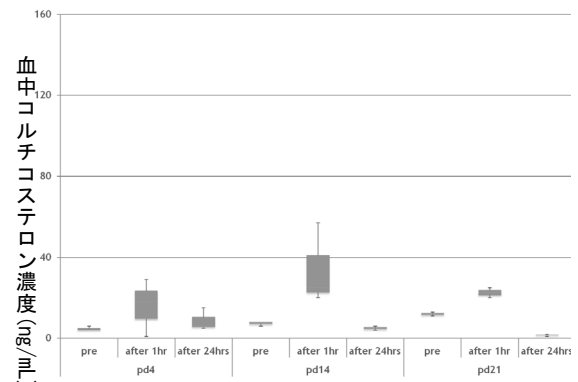


図4. 半数の産仔を離す群のCORT濃度の推移

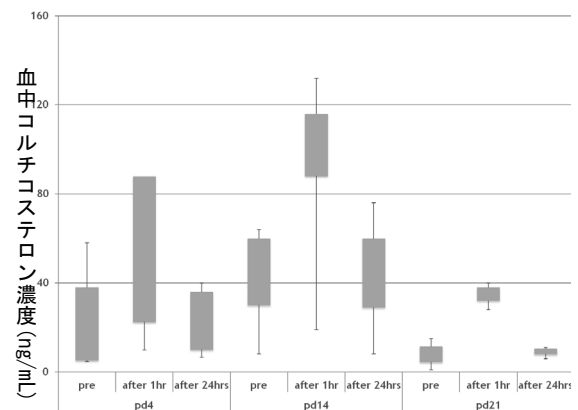


図5. すべての産仔を離す群のCORT濃度の推移

ら23時間後の数値はおおむね仔を離す前の数値にまで減少する傾向が見られた。

4. 考察

齧歯類における主要なグルココルチコイドであるCORTは、ストレスに反応して副腎皮質から放出される。ラット脳内でもステロイドホルモンの生合成に必要な酵素群が見つかっていることから、ストレスによって脳内で生合成されたCORTが海馬萎縮をもたらし、うつ状態を惹起する可能性も示唆されている

3)4)。

生後1日から14日まで毎日、母マウスだけを別の♂マウスが使用した床敷の匂いに曝露したり、新しい床敷のケージに移したりすることによって、離乳時の母マウスの血中CORT濃度は高くなったという報告がある⁵⁾。だがこの報告は、母マウスが毎日新生仔から短時間にせよ離されるストレスと、♂の匂いが付いた床敷や、逆に何の匂いも付いていない床敷にさらされるストレスという二重のストレスに基づくものであり、母子分離が母親にもたらすストレスの程度を直接に示すものとはいえない。

これに対して本研究においては、n数も少なく、測定された血中CORT濃度のレベルも個体によってばらつきが大きいなど、出産から離乳までの期間に新生仔マウスを一時的に母親から分離する際の母マウスのストレスの程度を、血中CORT濃度を指標として厳密に定量することまではできなかった。また仔を引き離されるストレスに加えて、尾静脈からの採血それ自体がストレス要因として影響している可能性も無視することはできない。

しかしながら、本研究で得られた非常に限られた結果の中でも、母マウスから仔を離す前と比較してその1時間後の血中CORT濃度は傾向的に増加を示すこと、1時間後に仔を母マウスのもとに戻して23時間後には傾向的に低減することが示された。これは採血という侵襲によるストレスの要因を割り引いてもなお、仔を引き離すことが母マウスにとってストレスとなることを示唆している。

ただ今回の実験からは、母マウスから仔を離すタイミングとして生後4日、14日、21日のいずれが最もストレスを増加させるのかについても、明らかな結論は得られなかった。

われわれは動物実験計画書の審査の上で、実験の必要から離乳前の仔をやむを得ず親から離す際に、このことによる母マウスのストレスを考慮するよう研究者に求めてきた。今回の実験のように一時的に仔を離してその後再び親のもとに戻すのではなく、実際の動物実験の上では仔は親から離されてそのまま安楽死となる場合がほとんどであることを考えても、母マウスのストレスは相当程度長時間持続することが予想される。したがって離乳前の新生仔を親から離して実験に使用する場合の母マウスのストレスを考慮することは、方向性としては誤りではないということが示されたということができよう。

そのうえで今後の課題として挙げられるの

は、①今回の実験では仔を離す時間は1時間にとどめたが、仔を再び親のもとに戻さない場合、母マウスのストレスの持続時間はどの程度であるのか（一定時間経過後に、母マウスは仔がいなくなってしまうことに「慣れる」ことができるのかどうか）、②CORT値の上昇が母マウスの生理や全身状態にどのような影響を及ぼすのか（学習性無力感、もしくはうつ状態によって、残された仔の哺育そのものに何らかの影響をもたらすかどうか）、③さらに繰り返しの採血という強い侵襲をともなう方法ではなく、サンプル採取にともなうストレスを可能な限り少なくする方法論はどのようなものが考えられるのかといったことが考えられる。

特に③の点については、唾液をサンプルとした低侵襲の方法を用いたCORT検出によってストレス評価を行う試みが報告されている⁶⁾。さらに検討を進めていきたい。

われわれが動物実験計画書を審査する際、SCAWの苦痛のカテゴリーによって明らかに苦痛度の分類が可能なもの以外の実験処置については、「ヒトに置き換えてみたらどのような苦痛・ストレスとなるか」ということをさしあたっての判断基準にする場合がある。だがヒトと実験動物、とりわけヒトとマウスやラットなどの実験用小動物はその生理学的、解剖学的機能や構造が大きく異なるため、ヒトでは大きな問題にならない侵襲であってもマウス・ラットでは無視することができないレベルの苦痛になる場合も、逆にヒトほど大きな苦痛やストレスは感じていないと判断して良い場合も存在しうる。

特に本研究で焦点を当てようと試みた「離乳前の仔を母マウスから離した場合の母マウスのストレス」については、これをそのままヒトに当てはめて判断するならば「避けることのできない重度のストレスや痛みを伴う実験」（苦痛のカテゴリーD）であるにとどまらず、「麻酔していない意識のある動物を用いて、動物が耐えることのできる最大の痛み、あるいはそれ以上の痛みを与えるような処置」（苦痛のカテゴリーE。実験そのものが禁止される）にも該当しかねないような側面すらはらんでいる。

動物実験において動物が受ける苦痛やストレスを主観的にではなく可能な限り客観的に評価し、それに基づいて適正な苦痛軽減措置を講ずることは、実験動物福祉に配慮した適正な動物実験実施体制を構築していくうえで必須不可欠の課題である。本研究によって着

手した実験動物の苦痛・ストレスの生化学的評価という方法論をさらに確立することは、倫理的な実験動物の取り扱いに資するものとなると考えられる。

謝辞

本研究の立案・実施過程でご指導・ご協力をいただいた岡山大学自然生命科学研究支援センター・樺木勝巳教授、平山晴子助教、赤木佐千子技術職員に深く感謝する。

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金(奨励研究 16H00479)の助成を受けて実施された。

参考文献

- 1) Categories of Biomedical Experiments Based on Increasing Ethical Concerns for Non-human Species, (1987), Scientists Center for Animal Welfare (SCAW), Laboratory Animal Science. Special Issue : 11-13
- 2) 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (2006), 日本学術会議 : 17

- 3) 小山内裕美, 鈴木章義, 小松崎良将, 川戸 佳, 斎藤 稔(2008), コルチコステロンがマウス脳海馬に与える急性効果とその作用部位に関する検討, 日本大学文理学部自然科学研究所研究紀要, No.43: 353- 358
- 4) Y. Hojo, T. Hattori, T. Enami, A. Furukawa, K. Suzuki, H. Ishii, J. H. Morrison, W. G. M. Janssen, H. Mukai, S. Kominami, N. Harada, T. Kimoto and S. Kawato (2004), Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017 α and P450 aromatase localized in neurons, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.: 101865-870.
- 5) Moles A, Rizzi R, D'Amato FR. (2004). Postnatal stress in mice: does "stressing" the mother have the same effect as "stressing" the pups?, Dev Psychobiol. 44(4): 230-7.
- 6) Masakatsu NOHARA, Atsushi TOHEI, Takumi SATO, Hiromi AMAO (2016), Evaluation of response to restraint stress by salivary corticosterone levels in adult male mice, J Vet Med Sci. 78(5): 775–780.