

|||||||
特 集
|||||||

拘束ストレスの反応性におけるラットの系統差

獨協医科大学 実験動物センター

藤平 篤志 篠田 元扶

要 旨 ストレスは様々な疾患の発症に関与することが知られている。また個体がストレスを受けたときに起こる最も顕著な生体反応の一つが視床下部・下垂体・副腎軸の活性化である。視床下部・下垂体・副腎軸におけるラットの系統差を明らかにすることはストレスに対する生体反応、例えば免疫抑制、行動変化および高血圧などの研究を行う上でも意義がある。本特集ではSD（日本チャールズ・リバー：Crj）、F344（Crj）、Wistar（Crj）、Wistar-Imamichi（WI、動物繁殖研究所：Iar）、およびLE（Iar）のそれぞれ成熟雄ラットを用いて、視床下部・下垂体・副腎軸の機能評価を行った我々の研究データを示すと共に、ストレス反応におけるラットの系統差について紹介する。

緒 言

ストレスが様々な疾患の発症に関与することは最近、広く認識されている。例えば鬱病や不眠症などの中枢性の障害^{1, 2)}の他にも、胃潰瘍・十二指腸潰瘍などの消化器疾患³⁾、生殖機能障害⁴⁾、また、高血圧^{5, 6)}や糖尿病⁷⁾などの生活習慣病の発症頻度がストレスにより増大することも知られている。

個体がストレスを受けると様々な生体反応が起こるが、ストレス反応の中心的役割を担うのが視床下部・下垂体・副腎軸である⁸⁾。ストレスに関連した疾患においても、その発症に視床下部・下垂体・副腎軸の反応性が密接に関与する場合がある。例えば鬱病の場合は副腎から分泌されるコルチゾールの分泌異常が認められ¹⁾、ストレスにより引き起こされる生殖機能障害では、ストレスにより視床下部から分泌される副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）が生殖機能を中枢で調節する性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）の分泌を抑制することに起因することが明らかになっている⁴⁾。

ストレスに対する視床下部・下垂体・副腎軸の反応性に関して実験動物の系統差を明らかにすることは、ストレスのメカニズムを解明する研究分野、生理学や内分泌学において重要である。また、ストレス関連疾患の研究分野においても効率的にモデル動物が作製できる可能性を含んでいるが、この研究分野において実験動物の系統差を検討した報告は少ない。これまでのストレス反応におけるラットの系統差に関する研究は、Spontaneously Hypertensive Rat（SHR）、Wistar Kyoto（WKY）、Fischer344（F344）、Lewis、Sprague Dawley（SD）、

Brown Norway、Wistar（W）およびLong Evans（LE）を用いた研究が報告⁹⁻¹²⁾されており、F344はSD、LewisおよびBrown Norwayと比べてストレスに対し高い反応性を示すことが知られている^{9, 12)}。しかしながら、これまでに報告されている研究では系統間の比較は1つの研究で2-3系統を比較する断片的なものであり、主要な系統を総合的に比較した研究はほとんど存在しない。また、報告によっては、事前にカニューレの留置を行わず、採血そのものがストレスとなる方法でストレス負荷前の採血を行なっている研究も見受けられる¹³⁾。さらに、ストレス負荷後の採血時間の設定も副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）およびコルチコステロンの分泌パターンを考慮していない研究も報告されている¹²⁾。ストレス反応に関する研究では、比較対照となるストレス負荷を受けていない状態のサンプリングが重要であるが、技術的に問題があったり、実験のプロトコルに問題のある研究が行われ、発表されていることもある。このような背景から本特集ではストレス反応におけるラットの系統差について我々のデータを含めて紹介する。

動物の選択

実験動物は、その研究目的により適切な動物種を選択すべきであるが、我々が用いているラットは、適度な大きさがあり、マウスでは行なうことが困難な連続採血も容易に行える利点がある。一口にラットと言ってもF344およびLewisなどの小型の系統と、SDおよびWなどの大型の系統では成熟時の同じ週齢での体重に2倍程度の差が認められる。

我々の研究では、ストレスに対して高い反応および低

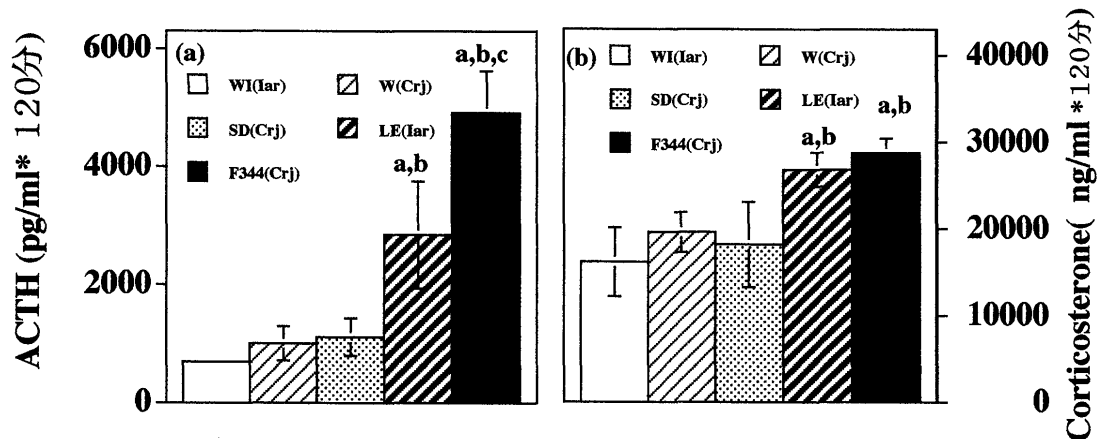


図1 拘束ストレス負荷後のACTH分泌反応 (a) およびコルチコステロン分泌反応 (b) の曲線下面積。結果は平均±標準誤差で表した。aはWIとの有意差を、bはW (Crj) との有意差を、cはSD (Crj) との有意差をそれぞれを示す (分散分析を行った後、FisherのPLSD試験にて検定)。

い反応、それぞれを示す系統を検索するために、研究で用いるラットの系統を以下の条件を基に選択した。まず、系統の選択にあたり、実験の際に比較を容易にするため、個体の体重・成長曲線が類似している系統であること、を考慮した。また、小型の系統であるF344とLewisおよびBrown Norwayのストレス反応に差があることは過去に報告^{9, 12)}されているので、大型の系統を用いて系統差の検索を行なった。小型の系統は老化研究・慢性毒性を含む長期間にわたって動物を飼育する研究には適するが、生理学および薬理学分野の研究でサンプル量を多く採取したい場合には大型の系統が適すると考えられる。また、神経科学分野の研究を行う際に、脳地図を用いる機会も多いが、脳地図の適応体重は250 - 300 g程度である。大型の系統を用いれば、雄では9週令程度で適応体重に達するが、小型のF344では脳地図の適応体重になるには雄で15週令程度まで待たなければならず、脳地図をもとに脳手術を行う研究でも、早く成長する大型の系統を用いることが有利なこともある。次に系統選択の基準として多目的な研究に用いられている主要な系統であることを考慮した。以上の視点からまず、大型の系統であるW, SDおよびLEを選択し、過去の報告からストレスに対し副腎軸が高い反応性を示すことが報告されている小型のF344も加えた。また、Wistar-Imamichi (WI) 系は安定した性周期を示し性質も温順であることから、内分泌学・生殖生理学の研究分野では広く用いられているが、WIと他の系統を比較した研究は少ない。そこでWIも加え、WI, W, SD, LEおよびF344の5系統を用いて下垂体・副腎軸について検討を行った。

なお、系統は実験の目的に合ったものを選択するべきで、仮に長期間の飼育を伴うような実験である場合は、

我々の研究で選択した系統とは逆に小型の系統を中心に選択するべきである。

視床下部・下垂体・副腎軸の機能評価

a 基礎値の測定

基礎値の確認を目的として、各系統の体重および副腎重量を測定し、ACTHおよびコルチコステロンについて血中濃度と下垂体および副腎組織中含量を測定した。採血は断頭により行った。その結果、各系統の9-10週令における個体の体重はF344が他の系統と比べて有意に低い結果となった。一方、F344以外の系統間では類似した値を示した。副腎重量は絶対値ではF344が他の系統と比べて30%程度低い値を示したが、副腎重量を体重100gあたりの相対値で表すと、個体重量が小さいためF344のみが有意に高い値となった。副腎重量についても、F344以外の系統間では類似した値を示した。

断頭採血した際の血中コルチコステロン濃度および副腎のコルチコステロン含有量はともに各系統間で有意差は認められなかった。ACTHについても同様の結果であり、基底値では副腎軸の活性に今回検討した系統間で差は認められないことが明らかとなった。

b 拘束ストレス負荷

拘束ストレス用ビニールサック (DecapiCone BRAIN-TREE SCIENTIFIC INC., MA, U.S.A.) を用いて、雄ラットに120分間の拘束ストレスを負荷した^{14, 15)}。拘束ストレス負荷直前、負荷後15, 30, 60および120分に頸静脈カニューレから採血を行い、血漿中のACTHおよびコルチコステロンを測定した。その結果、120分の拘束

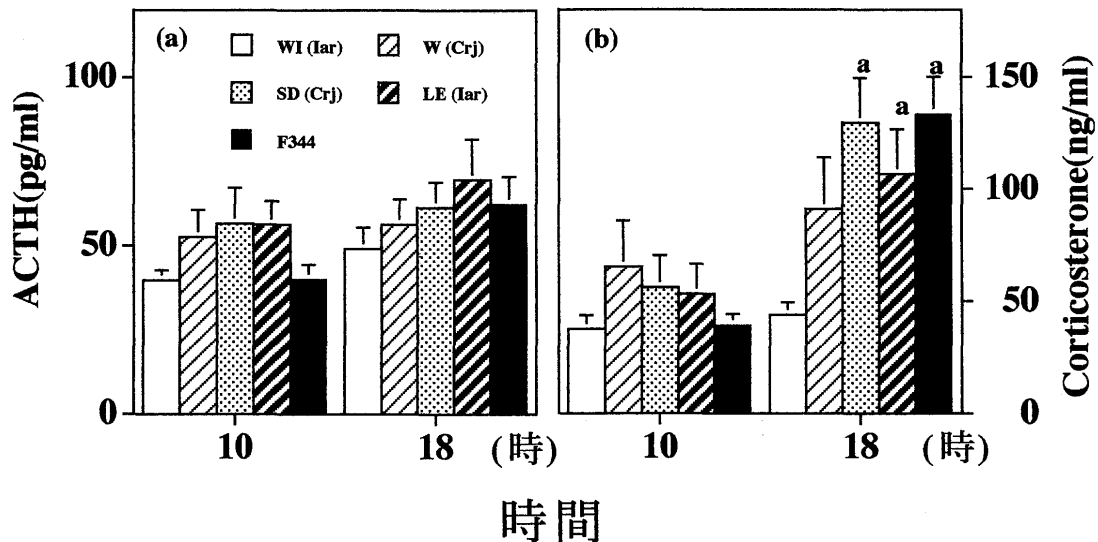


図2 ACTHおよびコルチコステロン濃度の日内変動. 10:00および18:00の血中濃度を示す. 結果は平均±標準誤差で表した. *aはWIとの有意差 ($P < 0.05$) を示す (反復測定分散分析を行った後, FisherのPLSD試験にて検定).

ストレス負荷に反応して, 全ての系統でコルチコステロンおよびACTHの血中濃度が上昇した. コルチコステロンの分泌反応は, WIで低くLEおよびF344で高い反応を示した. WとSDはその中間程度の反応を示した. 曲線下面積を用いて解析するとWI, W, SDが低い値を示し, LEとF344が高値を示した (Fig. 1-b). ACTHの分泌反応についてもコルチコステロンの分泌反応と同様の結果となった (Fig. 1-a).

c 日内変動

ACTHおよびグルココルチコイドの分泌は日内変動を示すことが知られているが, ラットにおいて, これらホルモンは夕方ピークとする血中濃度の日内変動が認められる¹⁶⁾. 副腎軸の活性における日内変動の系統差を検討する目的で, 10時と18時に頸静脈カニューレから採血を行い, 血漿中のACTHおよびコルチコステロンを測定した. 照明条件は明期14時間, 暗期10時間 (5:00点灯, 19:00消灯) でラットを飼育し実験を行った. その結果, 10:00に比べて18:00ではACTHおよびコルチコステロンともに血中濃度は高い値を示したが (Fig. 2), コルチコステロンでより明瞭な結果が得られた (Fig. 2-b). また, 系統間の比較ではWIに比べてSD, LEおよびF344が18:00にコルチコステロンの血中濃度が有意に高い値を示した (Fig. 2-b).

d ACTH負荷試験

大型の系統であるWI, W, LEおよびSDについて副腎の反応性を検討する目的で, ACTHに対するコルチコ

ステロン分泌反応を検討した. 頸静脈カニューレからACTH (20もしくは200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を投与し, 投与直前および投与後15, 30, 60および120分に頸静脈カニューレから採血を行い, 血漿中のACTHおよびコルチコステロンを測定した. その結果, 各系統でACTHの用量依存的にコルチコステロンの分泌反応が確認された. またLEが最も高いコルチコステロン分泌反応を示し, ACTHの高用量 (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 投与に対する反応ではWIに比べてLEは有意に高い反応が認められた.

まとめ

我々が研究に用いた5系統の成熟雄ラットにおいて, 基礎値での副腎活性には明らかな系統差は認められないものと考えられる. 基礎値では副腎系に系統差は認められなかったが, 拘束ストレスに反応したコルチコステロンおよびACTH分泌は系統差が認められ, WIで低くLEおよびF344で高い反応を示した. WとSDは低~中間程度の反応を示した. これまでの報告では1つの研究で2-3系統のストレス反応を断片的に比較し^{9~12)}, F344はSD, LewisおよびBrown Norwayと比べてストレスに対し高い反応性を示すことが報告されている^{9, 12)}. 本研究においては, F344が拘束ストレスに対して高い反応性を示すことが確認されたことに加えて, 大型の系統であるLEもF344と同様にストレスに対し高い反応性を示すことが明らかとなった¹⁵⁾.

拘束ストレス負荷試験に加えて, 下垂体・副腎軸活性のラット系統差をより明らかにする目的でコルチコステロンおよびACTH分泌の日内変動について検討した結

果、各系統で消灯前の18:00の血中濃度がコルチコステロンおよびACTHともに10:00の血中濃度よりも高い値を示した。さらに系統間の比較では拘束ストレス負荷試験と類似した結果となり、WIに比べてSD、LEおよびF344が18:00にコルチコステロンの血中濃度が有意に高い値を示した。

これらの結果から、本研究で用いたラットの5系統は副腎軸が活性化していない基礎値 (basal) の状態では系統間に差は認められないが、拘束ストレス負荷もしくは日内変動のピークなど副腎軸が活性化した際には系統差が認められ、副腎軸の活性はWIが最も低く、F344およびLEが高いことが明らかとなった。F344以外の4系統は成長曲線および成熟個体の重量が類似していることを考慮すると、副腎軸の低活性系の系統としてWIを、そして高活性系の系統としてLEを選択することが良い実験モデルとなることが示唆された。

さらにコルチコステロン分泌で認められる系統差が内因性のACTH分泌で認められた系統差を反映しただけのものか、副腎の反応性そのものに系統差が認められるのかを検討する目的で、体重あたり等量のACTH (20もしくは200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 負荷試験を行った。その結果、WIと比べてLEではACTH負荷に対するコルチコステロン分泌反応が高いことが明らかとなり、LEでは視床下部・下垂体・副腎軸のそれぞれの活性が高いことが示唆された¹⁵⁾。

過去に報告された一つの研究に、WとLEに拘束ストレスを負荷しコルチコステロン濃度を測定した結果、両系統に差は認められなかったとする報告が存在する¹³⁾。我々の結果と反する報告であるが、この報告では事前にカニューレを留置することなく、無麻酔で保定しストレス負荷前の採血を行っており、ストレス負荷前の基底値とするコルチコステロン濃度が200 ng/ml程度と既に高値となっている¹³⁾。このことから、過去の報告と本研究で得られた結果の相違は、実験手技の差によるものと考えられる。また、WはSDと同様に世界各国で最も多目的に用いられる系統であるが、亜系統化してしまったため、国によってまた生産者 (ブリーダー) によって表現型が異なることもある。過去の報告で用いられたWと本研究で用いたW (Crj) の副腎軸に差があった可能性も完全には否定できない。

結果をまとめると、拘束ストレスに反応した下垂体・副腎軸の活性は、今回検討した系統の中ではLEおよびF344が高く、SDおよびWが中程度の反応であり、WIは低い反応性を示すことが明らかとなった。副腎軸活性の日内変動を検討した結果でも類似した結果であった。また、ACTH負荷試験の結果からストレスに高い反応

性を示すLEはストレスに反応した際、中枢および末梢ともに副腎軸がより活性化することが示唆された。個体の大きさおよび成長曲線はF344以外の系統、すなわちWI、W、SDおよびLEでは類似していることを考慮すると、大型系統のラットを用いたストレス関連実験にはLEを高反応系として、WIを低反応系として比較することが有効な実験モデルとなることが示唆された。今後の課題として、拘束以外のストレスに対する反応性およびストレス関連疾患の発生に系統差が認められるかについても明らかにする必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Mello Ade A, Mello MF, Carpenter LL, Price LH. : Update on stress and depression : the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Rev Bras Psiquiatr*, **25** : 231-238, 2003.
- 2) Willner P. : The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, **83** : 1-16, 1984.
- 3) Spirt MJ. : Stress-related mucosal disease : risk factors and prophylactic therapy. *Clin Ther*, **26** : 197-213, 2004.
- 4) Rivest S, Rivier C. : The role of corticotropin-releasing factor and interleukin-1 in the regulation of neurons controlling reproductive functions. *Endocr Rev*, **16** : 177-199, 1995.
- 5) Bunker SJ, Colquhoun DM, Esler MD, Hickie IB, Hunt D, Jelinek VM, Oldenburg BF, Peach HG, Ruth D, Tennant CC, Tonkin AM. : "Stress" and coronary heart disease : psychosocial risk factors. *Med J Aust*, **178** : 272-276, 2003.
- 6) Pickering TG. : The effects of environmental and lifestyle factors on blood pressure and the intermediary role of the sympathetic nervous system. *J Hum Hypertens, Suppl 1* : S9-18, 1997.
- 7) Vallis M, Ruggiero L, Greene G, Jones H, Zinman B, Rossi S, Edwards L, Rossi JS, Prochaska JO. : Stages of change for healthy eating in diabetes : relation to demographic, eating-related, health care utilization, and psychosocial factors. *Diabetes Care*, **26** : 1468-1474, 2003.
- 8) Antoni FA. : Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion : advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev*, **7** (4) : 351-378, 1986.
- 9) Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL. : Stress response, adrenal steroid receptor levels and corticoste-

- roid-binding globulin levels--a comparison between Sprague-Dawley, Fischer 344 and Lewis rats. *Brain Res*, **616** : 89-98, 1993.
- 10) Gomez F, Lahmame A, de Kloet ER, Armario A. : Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains : differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology*, **63** : 327-337, 1996.
- 11) Sowers J, Tuck M, Asp ND, Sollars E. : Plasma aldosterone and corticosterone responses to adrenocorticotropin, angiotensin, potassium, and stress in spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology*, **108** : 1216-1221, 1981.
- 12) Sternberg EM, Glowa JR, Smith MA, Calogero AE, Listwak SJ, Aksentjevich S, Chrousos GP, Wilder RL, Gold PW. : Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. *Brain Res*, **570** : 54-60, 1992.
- 13) Sinton CM, Fitch TE, Petty F, Haley RW. : Stressful manipulations that elevate corticosterone reduce blood-brain barrier permeability to pyridostigmine in the Rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, **15** : **165** : 99-105, 2000.
- 14) Tohei A, Akai M, Tomabechi T, Mamada M, Taya K. : Adrenal and gonadal function in hypothyroid adult male rats. *J Endocrinol*, **152** : 147-154, 1997.
- 15) Tohei A, Mogi Y, Kon H, Hokao R, Shinoda M. : Strain difference in pituitary-adrenal axis between Wistar-Imamichi and Long Evans adult male rats. *Exp Anim*, **52** : 437-439, 2003.
- 16) Kaneko M, Hiroshige T, Shinsako J, Dallman MF. : Diurnal changes in amplification of hormone rhythms in the adrenocortical system. *Am J Physiol*, **239** : R309-316, 1980.