

騒音を伴うネガティブラック飼育環境における実験動物の適応性： 1 週間の予備飼育の有効性

井上恒志郎・岡本正洋・イミンチョル・松井 崇・
町田正直・石倉恵介・武田哲子・大森 肇・
麻見直美・武政 徹・坂入洋右・征矢英昭

Noise adaptation of animals underwent a week of preliminary rearing in a Negative Rearing Rack System

INOUE Koshiro, OKAMOTO Masahiro, LEE Min Chul, MATSUI Takashi,
MACHIDA Masanao, ISHIKURA Keisuke, TAKEDA Satoko, OHMORI Hajime,
OMI Naomi, TAKEMASA Tohru, SAKAIRI Yousuke and SOYA Hideaki

Abstract

The negative rearing rack system is useful tool to minimize adverse effects of fecal and urinary odors on rearing animals. However, its ventilation noise generated by this system may have further unpleasant effects on the animals. It has been reported that noises over 50–70 dB cause stress responses in laboratory animal and human. Generally, one week of preliminary rearing (PR) has often been used to minimize the stress effects in animal studies, but the proper period of PR remains uncertain. We addressed this issue by examining the effects of PR on stress adaptation to the noise originating from the rack system during the rearing of animals. In this study, three strains of rats (Wistar, SD, and F344) and mice (BALB/c, C57BL/6, and ICR) were exposed to the negative rack (NR; around 70 dB) or a normal rack (control; approximately 45 dB) for 3 or 7 days under PR condition, stress levels were evaluated by adrenals/thymus wet weight and plasma concentration of stress hormones (corticosterone; CORT and adrenocorticotrophic hormone; ACTH) were measured in each animals. Compared with the control group, Wistar rats and all strains of mice in NR group showed the higher weight of adrenals and lower weight of the thymus after 3 days. However, there was no difference in these parameters between the control and the experimental animals after 7 days. In addition, although it was not statistically significant, plasma CORT and ACTH tended to decrease in a time-dependent manner with all rats regardless of using the NR. The present study shows that one week of PR under NR condition decreases stress effects on rearing animals, suggesting that the period of PR protocol is suitable for the NR system.

キーワード：デシベル、副腎/胸腺、ストレスホルモン、動物種、系統差

Key words: dB, adrenal/thymus, stress hormone, species, strain difference

I. 緒 言

生体を取り巻く環境には種々のストレス要因が存在し、音環境もその一つに挙げられる。たとえば、音の大小（音量：dB）で生体に生じるストレス反応も異なる。健常なヒト⁹⁾や動物^{3,4,5,8)}では、50–70dB 以上の音で PVN（視床下部の大細胞）神経の興奮と、HPA（視床下部–脳下垂体–副腎皮質）軸の活性化に伴う血中 ACTH（副腎皮質刺激ホルモン）および GC（グルココルチコイド、げっ歯類ではコルチコステロン；CORT）濃度が増加することから^{6,7)}、音も大きさ（音量）によってはストレスとなる。

今回、我々は実験環境においてネガティブラック（排気式飼育柵：Oriental, CAQ-IV）が発する音に着目した。ネガティブラックは、室内空気を外気に排出する空気の流れを利用し、飼育ケージを積むラック内を常に陰圧（negative pressure）に保つことからこの名前が付けられた。この装置の利用は、動物の糞尿による悪臭や細菌感染の拡大防止につながり、飼育環境の衛生保持に有用なため、多くの飼育室に配備されている。一方、空気排出の過程で約 70dB の風きり音が生じ、それが飼育動物にストレスとして作用することも懸念される。

ストレスにより血中 GC 濃度が高まると、豊富な受容体を介して海馬の神経細胞への作用が高まり、細胞の障害や細胞死など負の効果を招くことも示唆される¹¹⁾。これまで、我々は最小限のストレス応答を伴う乳酸閾値程度の運動でも、海馬に正の作用を及ぼし、海馬歯状回での神経新生を促進することを明らかにしている¹⁰⁾。しかし、ネガティブラックの発する 70dB の音が加味されることで、低・中強度運動時のストレス応答が増大すれば、海馬への正の効果が減弱したり、負の効果が優勢となる可能性も考えられる。したがって、ネガティブラックを用いる場合、実験期間を通じて、この装置が発する音に留意し、風きり音に起因したストレスの負の効果が発現するかどうかを確認し、もしその可能性がある場合は音の発生を調節するなどの措置を取らねばならない。

一般に、動物実験を開始する際、予備飼育を一週間程度設けることで、温度や明暗サイクルなど飼育環境に存在する種々のストレス要因を最小限にする工夫がなされる。しかし、ネガ

ティブラックの発する音に対し、1 週間の予備飼育で動物のストレス耐性が向上するか明らかではない。実験動物は 85–105dB の強力な音に対し、1–4 日目ではストレス反応の亢進がみられるが、1–2 週間程度でストレス耐性が向上する（同環境下で血漿 CORT 濃度が低下する）^{3,5)}。このことから、先行研究の条件を下回る 70dB でネガティブラックを使用した場合、1 週間の予備飼育で十分適応効果を得られる可能性がある。

本研究では、ネガティブラック使用時における 1 週間の予備飼育の有効性を明らかにするために、飼育環境における音量の違い（ネガティブラックの有無）が動物のストレス耐性に及ぼす影響について、ストレスの指標となる副腎・胸腺湿重量および血漿 CORT・ACTH 濃度の経時的（予備飼育 3 日および 7 日目）変化から検討する。

II. 方 法

2.1 被験動物および実験環境

実験動物として雄の Wistar, Sprague Dawley (SD)、F344/N (F344) 系のラットならびに BALB/c、C57BL/6、ICR 系のマウスをそれぞれ用いた（日本エスエルシー、静岡、各群 N=20）。動物の週齢は、搬入時で 11 週齢とした。体重測定後、実験動物をネガティブラック群（Negative Rack; NR、音量の平均 68.8dB (Max; 86.8dB, Min; 67.2dB)、N=10）ならびに未使用群（Control; CONT、音量の平均 45.2dB (Max; 64.7dB, Min; 40.3dB)、N=10）の 2 群に分けて飼育し、3 日（N=5）もしくは 7 日間（N=5）の予備飼育（実験前の飼育）を行った。飼育環境は、7：00–19：00 の明暗サイクルとし、温度は $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度は $50 \pm 10\%$ にそれぞれ調節した。飼料には動物固形飼料（MF、オリエンタル酵母、日本）、飲水には蒸留水を用い、ともに 24 時間自由摂取させた。飼育時には、毎日 17：00–19：00 の間でハンドリングと体重・摂食量の測定を行った。

2.2 音量（dB）の測定

実験期間中、飼育環境の音量レベルを測定した。測定には、騒音計（SL-1371、アズワン）を使用し、24 時間の音量（dB）の最大値、最

小値および平均値を測定した。なお、測定間隔は10秒間とした。

2.3 サンプルング

各環境下で3日および7日間の予備飼育の後、被験動物を断頭により屠殺した。屠殺後すぐに断頭血を採取し、副腎と胸腺を摘出した。断頭血は、ヘパリン 25–50 単位（ノボヘパリン注 1000、持田製薬、東京）により血液凝固を防いだ。副腎と胸腺は電子天秤を用いて湿重量を測定した。

2.4 血漿コルチコステロン・ACTH 測定

ラットでは測定に必要な血漿量を確保できるため、血漿 CORT と ACTH 濃度を測定した。

<血漿 CORT>

血漿 CORT 濃度の測定には、放射性免疫測定法（radio immunoassay, RIA）の一つである Dextran-coated charcoal（チャコール）法を用いた。なお、この時の標識ホルモンには [^3H]-CORT（第一化学薬品、日本）、抗体には抗 CORT 抗体（コスモバイオ、日本）を使用した。手順は以下の通りである。

- ①血漿サンプル 20 μl をエタノールと混ぜ、タンパク質を分解する。
- ②遠心分離機（3,000rpm \times 10min、4 $^{\circ}\text{C}$ ）にかけ、固体成分（結合型）と液体成分（遊離型）を分離させる。
- ③液体成分である上澄み液を 100 μl 取り出し、乾燥させる。
- ④緩衝液（0.05M Na_2PO_4 、0.1% Gelatin、0.2% Sodium Azide、pH=7.4）を 500 μl 加える。
- ⑤200 倍に希釈した抗 CORT 抗体 100 μl を加える。
- ⑥緩衝液で希釈した [^3H]-CORT を 100 μl 加える。
- ⑦37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートした後、さらに 4 $^{\circ}\text{C}$ で約 16 時間インキュベートする。
- ⑧チャコール溶液（Charcoal suspension solution: 0.025% Dextran T70、0.25% Charcoal）を 500 μl 加える。
- ⑨遠心分離（3,000rpm \times 15min、4 $^{\circ}\text{C}$ ）を行い、上清 600 μl を液体シンチレーション用溶媒（クリアゾル、ナカライテスク、日本）4ml とバイアル内で混和する。

- ⑩液体シンチレーションカウンター（LS6000、Beckman、アメリカ）で比放射活性を測定する。

最終検出濃度は、スタンダードカーブを基に 0.9–62.5ng/ml の値のみを使用し、1 サンプルあたり 2 回の平均値で示した。

<血漿 ACTH>

血漿 ACTH 濃度の測定はエスアールエル（株）に外注し、電気化学発光免疫測定法（Electro Chemiluminescence Immunoassay, ECLIA）により測定した。この時の最小検出濃度は 2.1pg/ml であった。

2.5 統計処理

体重の変化は搬入時（0 日目）とサンプルング時（予備飼育 3 日および 7 日目）の体重の比較から算出した体重増加量で示した。摂食量以外の測定項目は予備飼育 3 日および 7 日目のデータを平均値 \pm 標準誤差で示した。摂食量は 3 日および 7 日間の一日あたりの摂食量を平均値 \pm 標準誤差で示した。統計処理は、環境（NR vs. CONT）および予備飼育期間（3 日目 vs. 7 日目）の条件を要因とする二元配置分散分析（two-way ANOVA）を行った後、Bonferroni post-hoc テストを行った。有意水準は 5% とした。

Ⅲ. 結果

全実験期間を通じて NR 群の音量は平均 68.8dB（Max; 86.8dB, Min; 67.2dB）であった。また、CONT 群の音量は平均 45.2dB（Max; 64.7dB, Min; 40.3dB）であった。

表 1 に予備飼育 3 日および 7 日目における体重増加量、表 2 に予備飼育 3 日および 7 日間の一日あたりの平均摂食量を示した。体重増加量は、全系統のラットにおいて環境条件に関係なく 3 日目と比較して 7 日目で有意に高値を示した。しかし、これらの変化はマウスでは明らかではなかった（表 1）。また、SD ラットでは、7 日目において CONT 群と比較して NR 群で体重増加量が有意に低値であった。摂食量はいずれの群間でも変化はみられなかった（表 2）。

図 1 にラット、図 2 にマウスの副腎および胸腺湿重量の経時的変化を示した。本実験において、予備飼育 3 日目の Wistar ラットおよび

BALB/c、C57BL/6、ICR マウスで、CONT 群と比較して NR 群では有意に副腎が肥大し、胸腺は萎縮した（図 1、2）。しかし、これらの項目について、7 日目ではいずれの群間でも有意差はなかった（図 1、2）。また、CONT 群の ICR マウスでは 3 日目と比較して 7 日目で有意に胸腺が萎縮した（図 2）。

血漿 CORT および ACTH の経時的变化を図 3 に示した。血漿 CORT および ACTH はいずれの群間でも変化は認められなかった。しかし、ラットの系統および環境条件に関係なく予備飼育 3 日目に比べ 7 日目で血漿 CORT・ACTH 濃度が減少する傾向を示した（図 3）。

Ⅳ. 考 察

本研究では、飼育施設でネガティブラックを使用した際に生じる 70dB の音に対し、生体へのストレスを最小限にとどめるための手段として 1 週間の予備飼育の有効性を明らかにすることを目的とした。実験では、飼育環境における音量の違い（NR 群；約 70dB vs. CONT 群；約 45dB）が動物のストレス耐性に及ぼす影響について、ストレスの指標となる副腎・胸腺湿重量および血漿 CORT・ACTH 濃度の経時的变化（予備飼育開始後 3 日および 7 日目）から検討した。

本研究では、まず飼育環境および予備飼育期間の違いが体重増加量および摂食量に与える影

表 1 各時点における体重増加量の変化

体重増加量 (g)	搬入時体重	CONT		NR	
	0 日 目	3 日 目	7 日 目	3 日 目	7 日 目
Rat					
Wistar	252.4 ± 1.1	22.4 ± 2.7	38.8 ± 2.4***	22.4 ± 2.7	35.2 ± 1.2**
SD	328.1 ± 1.8	40.2 ± 1.9	72.7 ± 2.9***	37.2 ± 1.3	60.2 ± 4.2 [#] ***
F344	182.1 ± 1.5	19.8 ± 1.8	35.0 ± 2.3***	24.2 ± 1.2	37.4 ± 1.8***
Mouse					
BALB/c	23.5 ± 0.2	2.2 ± 0.2	3.1 ± 0.6	2.2 ± 0.3	2.4 ± 0.3
C57BL/6	24.1 ± 0.2	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.6	1.8 ± 0.3	2.5 ± 0.4
ICR	36.8 ± 0.3	3.3 ± 0.4	4.3 ± 0.4	3.9 ± 0.6	3.9 ± 0.3

黒帯部分には搬入時の体重を示した。また、この値と比較して CONT 群および NR 群の各時点における体重増加量の変化を示した。

CONT；対照群、NR；ネガティブラック群

※データは全て平均値 ± 標準誤差で表示している（各群 N=5）

*** vs 3 日目 P<0.001, ** vs 3 日目 P<0.01, # vs CONT P<0.01 (Bonferroni)

表 2 各動物の経時的な摂食量の変化

摂食量 (g)	3 日間		7 日間	
	CONT	NR	CONT	NR
Rat				
Wistar	20.7 ± 2.2	20.3 ± 0.8	19.5 ± 0.5	19.9 ± 0.9
SD	24.9 ± 5.3	24.9 ± 0.8	24.6 ± 0.6	24.7 ± 0.6
F344	18.3 ± 2.0	16.4 ± 0.3	15.5 ± 0.8	22.0 ± 1.1
Mouse				
BALB/c	2.9 ± 0.5	3.2 ± 0.6	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.4
C56BL/6	2.9 ± 0.0	2.6 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.3 ± 0.1
ICR	5.2 ± 0.5	5.5 ± 0.7	5.2 ± 0.2	4.9 ± 0.1

CONT；対照群、NR；ネガティブラック群

※データは全て平均値 ± 標準誤差で表示している（各群 N=5）

響を検討した。その結果、いずれの動物種・系統においても、音量および飼育期間の違いは摂食量に影響を与えなかった。一方、体重増加量は全てのラットで3日目と比較して7日目で有意に高値を示し、この変化はマウスでは明らか

ではなかった。動物種による違いは見られるものの、これらの変化は飼育環境に関係なく起った発育に伴う体重の増加と考えられる。環境の違いに着目すると、SD ラットにおいて7日目で CONT 群と比較して NR 群で体重増加量が

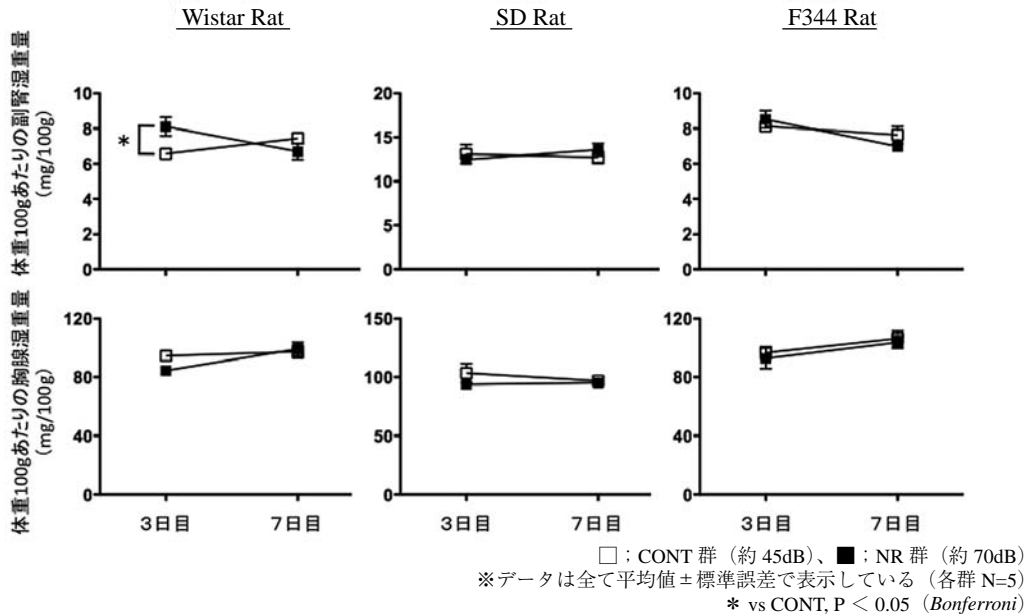


図1 ラット副腎・胸腺湿重量の経時的な変化

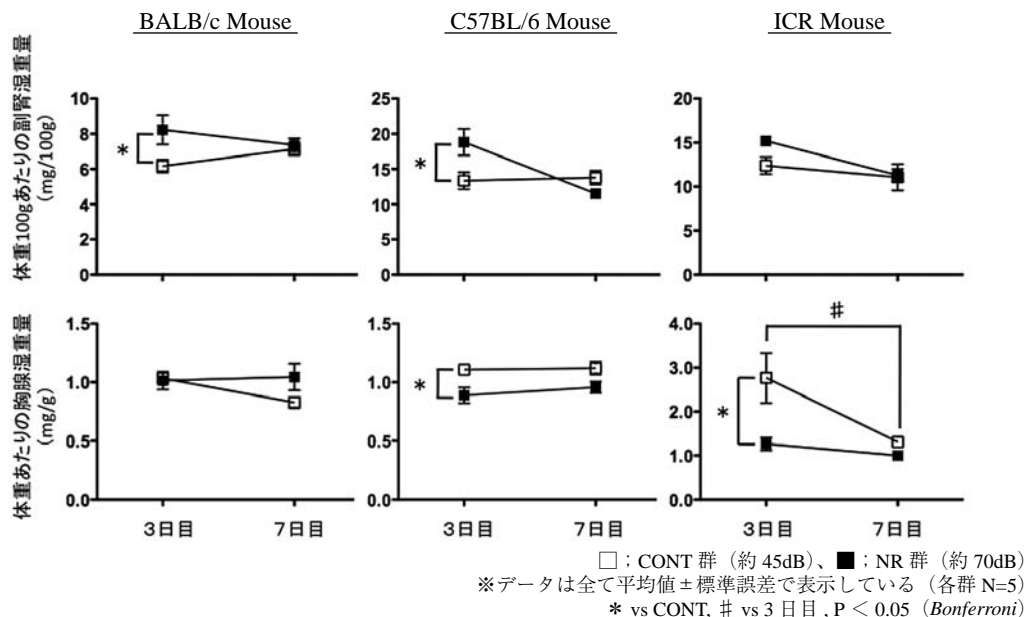


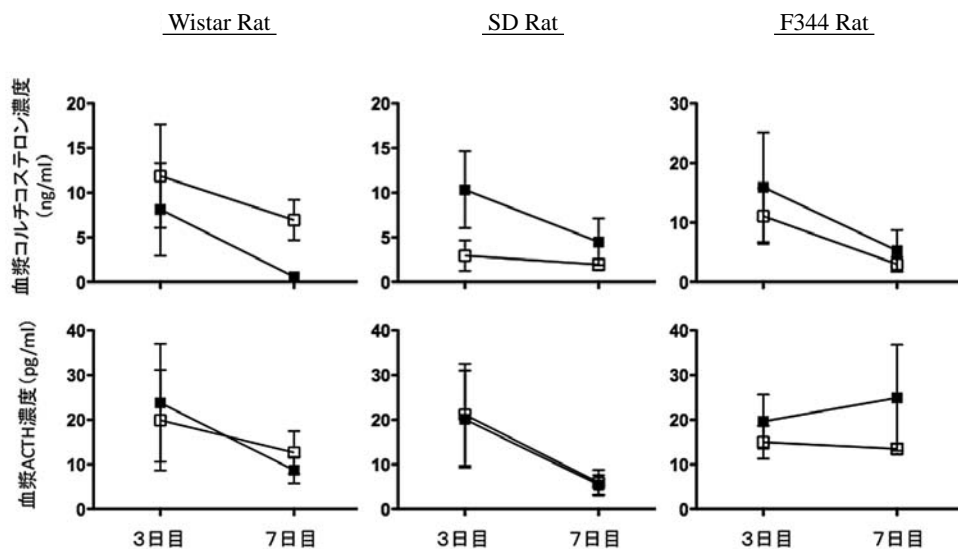
図2 マウス副腎・胸腺湿重量の経時的な変化

有意に低値を示した。つまり、SD ラットでは 3-7 日目にかけてネガティブラックの発する音により体重増加が抑制された可能性がある。これまで、騒音が摂食量および体重変化に与える影響を報告した研究は少なく、Wistar ラットを 30 日の長期間騒音 (2640Hz, 30W の出力の音源装置による騒音: 音量 (dB) は不明) に暴露した実験で、騒音暴露群における摂食量 (約 25%) および体重増加 (約 22%) の抑制と副腎の肥大が報告されているのみである¹⁾。しかし、本研究では摂食量に変化は見られないため、この結果とは一致しない。この原因として音量や期間の違いが想定されるが、決定的な要因は明らかではない。

副腎・胸腺湿重量の経時的な変化の比較から、予備飼育 3 日目において NR 群の Wistar ラットおよび全系統のマウスでストレス反応の亢進が明らかとなった。本研究では、ラットおよびマウスの全系統で予備飼育 3 日目では CONT 群と比較して、NR 群でストレス反応が惹起されると予想した。しかし、SD および F344 ラットでは 3 日目でもストレス反応の亢進はみられなかった。この理由には以下の二点が考えられる。一つは、これらのラットは音がストレス反

応を引き起こす際の音量の閾値が他の動物と比較して高い系統であり、70dB 程度の音ではストレス反応が惹起されないことが想定される。事実、Wistar ラット²⁾では 70dB、SD ラット⁴⁾では 80-95dB 付近から PVN 神経が活性化され、ストレス反応の亢進に伴う血漿 CORT・ACTH 濃度の増加がみられている。F344 ラットを対象とした研究は未だ報告されていないが、このようにラットでは系統が異なることで、音量により生体に与える生理作用が異なる可能性がある。二つ目は、SD、F344 ラットでは既に 3 日目の時点でネガティブラックの発する音に適応していたことである。この点については、搬入時 (0 日目) の群を設定し、より詳細に検討する必要がある。

しかし、NR 群でストレス反応の亢進が認められた動物でも、7 日目ではネガティブラックの音によるストレス反応の亢進が抑制された。これは、本研究と同系統の動物を 80-105dB の強力な音に暴露した研究^{3,5)}とも一致する。すなわち、飼育動物がネガティブラックの発する音 (70dB) 環境に対しストレス耐性を形成するには、1 週間程度の予備飼育期間が必要とする仮説を強く支持するものとなった。また、統



□: CONT 群 (約 45dB)、■: NR 群 (約 70dB)
※データは全て平均値±標準誤差で表示している (各群 N=5)

図3 ラット血漿 CORT・ACTH 濃度の経時的な変化

計的有意差はなかったものの、血漿 CORT および ACTH 濃度が飼育期間の増加（3 日目 vs. 7 日目）に伴い減少傾向を示したことは、上記の見解を更に支持するものと考えられる。

NR 群の全ての動物で 7 日目にストレス反応の亢進が抑制されたことから、これらの動物では予備飼育初期の音刺激がストレスとなったことで 7 日目では返ってストレス耐性が高まっている可能性がある。つまり、本実験程度の飼育環境の音ならむしろ適応することでストレス耐性が強まり、より好ましい生理状態に安定できるかもしれない。たとえば、騒音により分泌低下が起こるラット成長ホルモン³⁾の内因性分泌リズムを見る際、個々の飼育箱に小さな扇風機を取り付け、ラットをその小さな音に適応させた状態で初めて測定が可能になる。本実験でも、CONT 群の ICR マウスにおいて 3 日目と比較して 7 日目で有意に胸腺が萎縮した。これは無音で飼育しても、実験時には運動に用いるトレッドミルや実験者が発する音を消すことができず、これらの音が動物のストレス反応の亢進を招く可能性があることを示唆しているのかもしれない。むしろ、一定の音環境に適応させた予備飼育を準備する方が、運動生理・生化学系の実験には適しているのかもしれない。問題は、動物のコンディショニングを行う上で、環境音の大きさが 1 週間程度の予備飼育で適応可能なレベルに調整されているかどうかである。少なくとも、実験を通じて体重変化や摂食量をモニタリングし、常に飼育環境のアセスメントを行うことが重要だと思われる。

なお、本研究の限界として、実験パラダイムが同一環境で音量の違い（ネガティブブラックの有無）を検討した内容になっていないため、CONT 群および NR 群の飼育環境が異なっている点が挙げられる。そこで、本研究では、環境条件および予備飼育期間を要因とした二元配置分散分析で厳密な統計解析を行った。その結果、予備飼育期間の要因を含んだ場合にも NR 群では Wistar ラットおよび BALB/c、C57BL/6、ICR マウスで 3 日目にみられたストレス反応の亢進が 7 日目までに回復した。このことから、飼育環境が異なるものの、少なくとも 1 週間の予備飼育を行えば、動物は NR 環境に適応可能であるといえる。また本研究では、両飼育環境

の温度や湿度、明暗サイクル、餌、水、実験者、飼育頭数などネガティブブラック使用の有無を除いて、環境条件を厳密に統制し、音量以外の要因による結果への影響を最小限に抑えた。したがって、本研究では環境条件の中でも特に音量の違い（ネガティブブラックの有無）が結果に影響を与える主要因であったと考えられる。

V. 結 論

本研究では、ネガティブブラック使用時における 1 週間の予備飼育の有効性を検証した。実験では、飼育環境における音量の違い（ネガティブブラックの有無）が動物のストレス耐性に及ぼす影響について、ストレスの指標（副腎・胸腺湿重量および血漿 CORT・ACTH 濃度）の経時的（予備飼育開始後 3 日および 7 日目）変化から検討した。その結果、NR 群（70dB）では CONT 群（45dB）と比較して、予備飼育から 3 日目のラット（Wistar）およびマウス（全系統）でストレス反応の亢進が認められたが、7 日目にはそれらの兆候が CONT 群レベルまで回復した。以上のことから、70dB の音を発するネガティブブラックを用いた飼育環境でも、SD および F344 ラットでは 3 日間、その他の種・系統のラットおよびマウスでは 1 週間の予備飼育が生体へのストレスを排除するために有効であることが明らかとなった。

VI. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、運動生理、生化学、栄養学に所属する多くの学生諸氏から多大な協力を得たことを付記し、心からお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Alario P, Gamallo A, Beato MJ, *et al.* (1987): Body-Weight Gain, Food-Intake and Adrenal Development in Chronic Noise Stressed Rats. *Physiol Behav* 40: 29–32.
- 2) Amemiya S, Yanagita S, Suzuki S, *et al.* (2010): Differential effects of background noise of various intensities on neuronal activation associated with arousal and stress response in a maze task. *Physiol Behav* 99: 521–528.
- 3) Armario A, Castellanos JM and Balasch

- J (1984): Adaptation of Anterior-Pituitary Hormones to Chronic Noise Stress in Male-Rats. *Behav Neural Biol* 41: 71–76.
- 4) Burow A, Day HEW and Campeau S (2005): A detailed characterization of loud noise stress: Intensity analysis of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis and brain activation. *Brain Res* 1062: 63–73.
 - 5) Campeau S, Dolan D, Akil H, *et al.* (2002): c-fos mRNA induction in acute and chronic audiogenic stress: possible role of the orbitofrontal cortex in habituation. *Stress* 5: 121–130.
 - 6) Campeau S and Watson SJ (1997): Neuroendocrine and behavioral responses and brain pattern of c-fos induction associated with audiogenic stress. *J Neuroendocrinol* 9: 577–588.
 - 7) Campeau S and Watson SJ (2000): Connections of some auditory-responsive posterior thalamic nuclei putatively involved in activation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in response to audiogenic stress in rats: An anterograde and retrograde tract tracing study combined with fos expression. *J Comp Neurol* 423: 474–491.
 - 8) Engeland WC, Miller P and Gann DS (1990): Pituitary-Adrenal and Adrenomedullary Responses to Noise in Awake Dogs. *Am J Physiol* 258: R672–R677.
 - 9) Evans GW, Lercher P, Meis M, *et al.* (2001): Community noise exposure and stress in children. *J Acoust Soc Am* 109: 1023–1027.
 - 10) 飯村美歩 (2008): 異なる強度のトレッドミル走運動がマウス海馬神経細胞の成熟に及ぼす影響: 走運動ストレスに着目して、修士論文.
 - 11) McEwen BS, Gould EA and Sakai RR (1992): The Vulnerability of the Hippocampus to Protective and Destructive Effects of Glucocorticoids in Relation to Stress. *Brit J Psychiat* 160: 18–24.