

母マウスが望む環境エンリッチメントとは？ ～環境エンリッチメント選びを考える～

What kind of environmental enrichment does mother mouse want?

石原 すみれ
Sumire Ishihara

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

Environmental enrichment, whose material is commercially available, is today thought to improve animal welfare, for instance, control of stress. There were some reports that these report contribution of suppression of stress, which the mother mice suffer during nursing their pup. However, the effects on stress-suppression by introducing the enrichment materials is unknown. In this study, determined plasma and urinary corticosterone in the mother mice with or without the materials from their making to weaning.

1. 目的

動物実験施設では、実験動物の飼育に多くの資金と時間が費やされている。しかし、母マウスによる仔食殺や哺育放棄により、思うようにこれが維持できないことも珍しくない。その原因は、飼育環境をめぐるストレスが引金となっていると言われており¹⁾、その改善が日常業務の大きな課題の一つとなっている。

近年、実験動物のストレスを軽減するための方策として環境エンリッチメントの使用が推奨されており¹⁾、様々な形状及び材質の環境エンリッチメント製品が数多く市販されている(図1)。

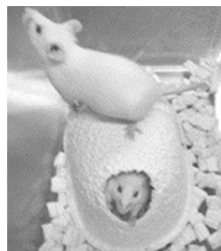


図1. 環境エンリッチメント製品の一例(ドーム型)

著者は仔食殺や哺育放棄を行うマウスにおいて紙製のマウス用ドーム型製品をケージに入れ経過を観察したところ、母マウスは好んでドームの中に入って過ごすことを好むように思われた。また、体外受精させた胚を仮親に移植し個体作出する上で、環境エンリッチメント製品としての巣箱の使用が仮親の食殺防止に効果があるとの報告もある²⁾。このようにマウスの系統維持における環境エンリッチメント製品の活用は、仔食殺や哺育放棄抑制の上で何らかの効果があることが考えられる。しかし、製品の使用によるストレス軽減効果と仔食殺や哺育放棄抑制の関連性については不明である。

本研究では、ストレスに応答して副腎皮質より放出される糖質コルチコイドであるコルチコステロンに着目し、妊娠中・出産後に複数の

環境エンリッチメント製品を使用した時の母親マウスの血中及び尿中コルチコステロン濃度と仔の離乳率を比較検討した。

2. 方法

(1) 供試動物

遺伝子組換えマウスのバックグラウンドとして数多く使用されている C57BL/6Jcl (日本クレア株式会社) の雌雄を 7 週齢で購入し、8 週齢から実験に使用した。

(2) 飼育環境

マウスは 24°C±1°C、明:暗=1:1 (8 時 ON, 20 時 OFF) で一方向式クリーンラック (Ap 型アニコン飼育ラック:株式会社精研) で飼育した。飼育ケージは、カードケージ (日本クレア株式会社) に床敷 (エコチップ:日本クレア株式会社) を敷き、オートクレーブ滅菌後使用した。給水は飼育ラック付属の自動給水装置から水道水を、飼料は MF (オリエンタル酵母株式会社) を自由摂取で与えた。

(3) 環境エンリッチメント製品

環境エンリッチメント製品は、木製 (マウスハウス W110×D110×H70mm : TAPVEI)、ポリカーボネート樹脂製 (Mouse Igloo Red φ107.95×H57.15mm : Bio Serv)、紙製 (Shepherd Shack Dome W146×D98×H54mm : Shepherd Specialty Papers) の 3 素材によるドーム型製品を用いた。

(4) 交配方法と群構成

夕方に雌マウスの外陰部を確認し、腫脹の程度から発情前期と判断した雌マウスを、それぞれ雄 1 匹と同居させ交配した。翌朝、膣栓確認により交配成立が確認された段階で雄マウスを取り除き、雌マウスを 1 匹 1 ケージにして、

木製 (WO 群) (n=6)、ポリカーボネート樹脂製 (PC 群) (n=5)、紙製 (PA 群) (n=4) の 3 種類の環境エンリッチメント製品使用群及び環境エンリッチメント製品を使用しない群 (Control 群) (n=6) の 4 群に分けて個別飼育を行った。

(5) 尿中及び血中コルチコステロン濃度の測定

サンプルは、交配前 (D0)、妊娠 10 日目 (D10)、15 日目 (D15) と、産後 5 日目 (D25)、10 日目 (D30)、15 日目 (D35)、20 日目 (D40) を採取日とし、各日午前 8 時から採取した。なお、妊娠 5 日目は着床日付近、妊娠 20 日目は出産予定日のため、採血及び採尿は実施しなかった。

まず始めに、マウスを保定し仙骨刺激でアルミホイル上に尿を排泄させ尿サンプルを 50 μ l 採取した。その後マウスを保定器に入れ、約 40℃の温湯で湿らせたキムタオルで尾を 1 分間保温し静脈を怒張させ 50 μ l 採血した。採血には、尾静脈用翼状針 (実験動物用翼付採血針: 日本クレア株式会社) にヘマトクリット毛細管 (ヘパリン処理ヘマトロン: 池本理化工業株式会社) を付け行った。採取したヘマトクリット毛細管を、15,000rpm で 5 分間遠心分離し、血漿を採取した。

尿及び血漿中コルチコステロン濃度は、EIA 法 (ARK Checker CORT EIA: アーク・リソース株式会社) を用いて測定した。データは、D0 に採取したサンプル値に対しての相対比を算出し、平均 $\pm$ 標準偏差で示した。

なお本研究は、岡山大学動物実験委員会によって承認された動物実験計画書 OKU-2015538 に基づいて実施した。

3. 結果

(1) 血中及び尿中コルチコステロン濃度の比較

図 2 は血中コルチコステロン濃度、図 3 は尿中コルチコステロン濃度を交配前 (D0) のコルチコステロン濃度を 1 としたときの相対値の平均をプロットしたものである。なお、産後 10 日目以降に死亡した Control 群の 1 例と、サンプル採取途中で尾の壊死が確認された PC 群 2 例と PA 群 1 例は、血液の採取が困難でサンプル量が足りず、測定できない時点があったので、これらのサンプルポイントの値は省いて計算した。

多少のバラツキが認められるが、血中及び尿中コルチコステロン濃度の推移は同様の傾向を示し、出産前の妊娠期間中の方が高いレベルで推移していた。しかしながら、各群において

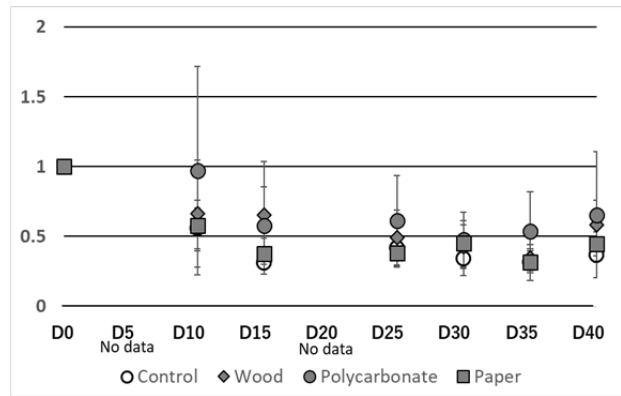


図 2. 血中コルチコステロン濃度の推移
(交配前を 1 とした比率)

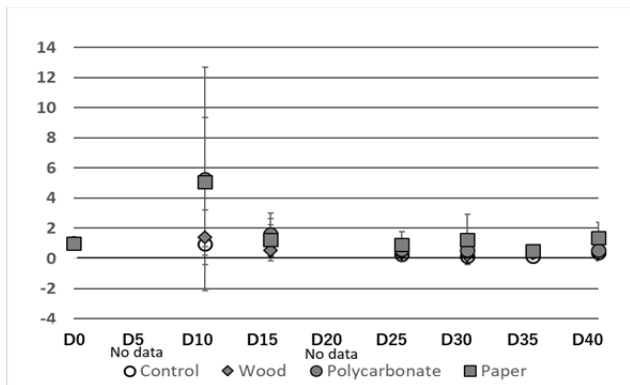


図 3. 尿中コルチコステロン濃度の推移
(交配前を 1 とした比率)

採取日による変動や、素材の違いによる差は認められなかった。あえて順位をつけるとしたら素材による血中コルチコステロン濃度は、PA 群と Control 群は、WO 群、PC 群に比べて低い傾向を示した。尿中コルチコステロン濃度は、WO 群と Control 群が同程度のレベルで推移した。そして次いで PC 群、PA 群の順で高い傾向を示した。

(2) 仔の食殺及び哺育放棄を行った個体におけるコルチコステロン濃度の推移

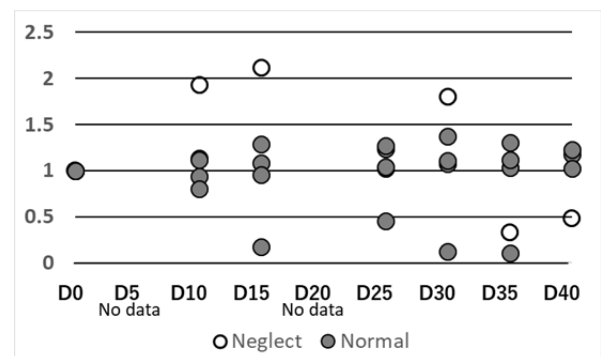


図 4. 仔の食殺及び哺育放棄を行った個体とその他の個体の尿中コルチコステロン濃度の推移
(交配前を 1 とした比率)

図4では、Control群で観察された産仔全ての哺育放棄が起きた個体(Neglect)とその他のControl群の個体(Normal)の尿中コルチコステロン濃度を比較した。Neglectでは、D20に2匹の死亡が観察され、D25にはすべて食殺されていた。わずか一例ではあるが、離乳まで哺育を行った個体より妊娠・哺育中の尿中コルチコステロン濃度は高値を示した。

(3) 環境エンリッチメント製品と離乳率の比較

離乳率は相対値が算出できなかった個体も含めて算出した。なおControl群とWO群はn=6、PC群とPA群はn=5であった。各群の離乳率は、各個体の離乳率を産仔数のうち離乳した匹数の割合で計算し、それら離乳率の平均を群ごとで算出した。その結果、Control群：79%、WO群：96%、PC群：97%、PA群：100%であった。これは、血中及び尿中コルチコステロン濃度の推移と異なる傾向となった。

各群においてコルチコステロン濃度を採取日による変動・素材の違い・仔の食殺及び哺育放棄を行った個体と比較しても差は確認されなかった。しかし、離乳率は環境エンリッチメント製品を使用した方が高い結果となった。

4. 考察

本研究は、実験動物に身を隠すことができるような環境エンリッチメント製品を妊娠期及び哺育期のマウスに与えることによって、実験実施者や他の実験動物からの視線等の暴露によるストレスを軽減し、仔の食殺や哺育放棄を抑制するのではないかと作業仮説に基づいて実施した。しかし、本研究において妊娠期及び哺育期のマウスの血中及び尿中コルチコステロン濃度は、環境エンリッチメント製品導入の有無で違いが認められなかった。一方で、離乳率は環境エンリッチメント製品を使用する方が良い傾向がみられた。さらに床敷きと同じ紙素材のものが最も離乳率が高い結果となった。ただし、そのほとんどで噛み砕かれ、床敷きと一体となって巣の凹地の一部として使用されていたことが特徴的であった。

この結果からは二つの可能性が考えられる。一つは視線等の暴露によるストレスは、そもそも血中及び尿中コルチコステロン濃度に変化を与えるような大きなストレス因子ではないということである。

もう一つは、実験動物化されたマウスでは、離乳成績の向上のためには、身を隠すことができる場所を用意して、視線の暴露を軽減することよりも、営巣のための凹地を作りやすい環境

を提供することがより重要ではないかと考えられたことである。本実験では、PC群では、4例、WO群及びPA群でそれぞれ1例において、母マウスが環境エンリッチメント製品の外で出産していた。しかしながら、PC群では通常はドームの外にいて、ヒトから身を隠したい時に中に入るといった使われ方が多いように思われた。これに対してPA群では、かみ砕いて巣の凹地の一部として使用している例もみられたことが、この可能性を示唆している。

このように離乳成績の向上のためには巣として環境エンリッチメント製品が使われているだけでなく、営巣のための環境条件を整えることがより重要であることが示唆される結果を得た。

このことは、環境エンリッチメント製品を導入することによって離乳成績が向上するという先行研究の結果²⁾と一致している。さらに注目すべきは、この離乳率は使用した床敷きと同じ素材のものが最も高く、そのほとんどでかみ砕かれ、床敷きと一体となって巣の凹地の一部として使用されていたということである。このことは、床敷量が母マウスによる仔の食殺や哺育放棄と関連性があることが示唆される。この点については今後の課題としたい。

また、妊娠前後でサンプリングした尿中コルチコステロン濃度の比較を行なったところ、出産前後でこのレベルに差は認められないが、妊娠期間中のコルチコステロン濃度は哺育期間中のそれに比べてわずかに高いレベルを維持する結果となった。このことから、妊娠期間中は妊娠そのものがストレス負荷を誘発する可能性があることが考えられる。

一例ではあるが育児放棄を行ったコントロール群の個体で、妊娠・哺育期間を通じて尿中コルチコステロン濃度レベルは高値で推移しているのもこの仮説を示唆している。いずれにせよ、妊娠そのもののストレスの評価は、今後の課題としたい。

5. 結論

本研究では、環境エンリッチメント製品を入れることで離乳率が改善することが示されたが、その使用によるストレス軽減効果と仔食殺や哺育放棄抑制との関連性については明らかにすることができなかった。

実験動物関係の解説書等^{1),3)}では環境エンリッチメントの重要性が強調されている。環境エンリッチメントといえば「環境エンリッチメント製品」というイメージが先行しがちである。だが今回の結果から、単に床敷量を増やすだけ

でも母マウスの営巣に適した環境を提供できるのではないかと考えられる。環境エンリッチメント製品の広告には、「哺育放棄しているマウスに」とうたうものもあるが、そう書いてあるから入れるのではなく、また環境エンリッチメント製品を使いさえすればよいというのではなく、それがどのように利用されているのか、それにより求められる効果が得られているのか、そして何よりも動物の **well-being** にとって良いものなのかどうかという面を考えて使用しなければ、ヒトの側の自己満足に終わりがねないのではないだろうか。今回は、マウスが身を隠せるドーム型を選択したが、今後は凹地環境について焦点を当て、サンプル数、サンプル採取方法及びサンプル検出方法についても再検討したいと考えている。

謝辞

本研究の立案・実施過程で岡山大学自然生命科学研究支援センター・樺木勝巳教授、平山晴子助教にご指導をいただきました。またサンプル採取や ELISA キットによる分析に際して同センター・矢田範夫技術専門職員、橋本春菜技術職員、赤木佐千子技術職員、東瞳技術職員より多大なご支援を、アーク・リソース株式会社・仮屋博敬様より助言をいただきました。心より深く感謝いたします。

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金（奨励研究 16H0047219）を受け実施いたしました。

参考文献

- 1)環境省自然環境局総務課動物愛護管理室編（2017）『実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準の解説』。株式会社アドスリー
- 2)陶山晴香（2013） 胚移植仮親マウスの妊娠・出産・保育に及ぼす巣箱の効果。 科研研究助成事業データベース 2013 年度実績報告書
- 3)社団法人日本実験動物協会編（2016）『実験動物の技術と応用 実践編』。株式会社アドスリー