

副腎摘出がストレス負荷ラットの行動に与える影響

西森敦子¹⁾ 松岡伴実¹⁾ 仁後亮介^{2,3)}
大和孝子^{1,2)} 青峰正裕^{1,2)}

The Influence of Adrenalectomy on the Behavior of Stress-Loaded Rats

Atsuko Nishimori¹⁾ Tomomi Matsuoka¹⁾ Ryosuke Nigo^{2,3)}
Takako Yamato^{1,2)} Masahiro Aomine^{1,2)}

(2013年11月27日受理)

【序 論】

ストレスについては、日常生活の中においても、“ストレスを感じる”、“ストレスがたまる”、“ストレス状態にある”、“ストレスを発散できない”、などと言うことがあり、その内容についても、育児ストレス、介護ストレス、環境ストレスなど、その種類は多彩である。現在、「ストレス」という言葉は、曖昧に使用されていることが多いが、元来は、物理学・工学の分野においては「力によって物体に生ずる歪み」を意味する。最初に医学・生物系で用いたのは、ホメオスタシスの概念を提唱したキャノン (Walter B. Cannon; 1871~1945) であると云われ、今日広く知られているストレスの概念の基礎を築いたのはセリエ (Hans Selye; 1907~1982) である。セリエは、生体によるストレス反応について研究を遂行し、動物を用いて、生体に有害な様々な刺激 (寒冷、外傷、過剰な筋肉運動、ホルマリンなどの有害物質など) を与えると、副腎肥大、胸腺・リンパ節の萎縮、胃・十二指腸潰瘍という三大徴候が出現することを見出し、これを全身適応症候群と名付けた¹⁾。これは一種の生体防御反応であり、刺激に対する生体の適応現象である。そして、生体にとって有害な刺激をストレスラー (stressor)、その刺激により生体に生じる反応をストレス (stress) と定義した。ストレスラーは、寒さ、暑さ、明暗、騒音、放射線、悪臭等の物理

的・化学的要因、飢餓、酸素欠乏、感染、外傷、出血等の身体的要因、および恐怖、怒り、不安、焦燥等の精神的要因がある。ストレスラーが生体に作用すると、まず副腎髓質や全身の交感神経末端からアドレナリンやノルアドレナリンが分泌され、これらが、視床下部-下垂体前葉系に働いて副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の分泌を促し、糖質コルチコイド、電解質コルチコイドの血中濃度が高まる。これらの糖新生を促す作用がストレスに対する反応を緩和する²⁾。

現代社会においては、ストレスは大きな社会問題であり、ストレス抵抗性低下のメカニズムを知ること、如何にストレスに対応するかにもつながり、それは結果としてQOL (Quality of Life) の向上や、うつ病の改善、さらには精神性疾患の予防にもつながる可能性がある。

ストレス反応の測定方法は、ホルモン測定、モノアミン定量、胃潰瘍など消化器疾患の有無の確認、また、ストレス刺激の影響を調べる手法として、細胞形態、神経新生、行動などがある³⁾。特に行動は、ストレスにより不安傾向が亢進することが知られており、様々な行動試験があるため、ストレス刺激の影響を調べるのには最も簡便な方法といえ、糖尿病モデルマウスでのストレス抵抗性試験でも用いられている⁴⁾。そのため、実験動物を対象とした行動解析は、精神障害による行動異常の研究において大きく発展し、ストレスと行動の関係の研究に貢献

別刷請求先：西森敦子，中村学園大学栄養科学部，〒814-0198 福岡市城南区別府5-7-1

E-mail：nisiyama@nakamura-u.ac.jp

1) 中村学園大学栄養科学部 2) 中村学園大学大学院栄養科学研究科 3) 中村学園大学短期大学部食物栄養学科
鈴木はる江：ストレスと健康 改訂第1版。人間総合科学大学，p.45 (2008)

2) 青峰正裕，大澤得二，清末達人，熊井まどか，竹嶋美夏子，能見光雄，藤田守，大和孝子：イラスト解剖生理学。東京教学社，pp.184-185，p.190 (2012)

3) 高雄啓三，宮川剛：ストレスの科学と健康。共立出版，pp.304-310 (2008)

4) 宮田茂雄，大澤匡弘，亀井淳三：高架式ブラットホーム試験法：ストレス抵抗性の評価に適した簡便な行動解析法。日薬理誌，132，213-216 (2008)

してきた。ラットを用いた行動実験の一つとして、Open field 試験がある。Open field 試験は、単純かつ基本的な行動観察法で、ラットの様々な行動を経時的に観察でき、それを定量化することで、行動の変化や試薬の影響、または精神活動の評価ができる特徴を持つ。動物に麻薬や覚醒剤等を連続投与して、異常行動を誘発させ、その病態の分析や異常行動の抑制に関する研究などにも使用されている⁵⁾。

一方、副腎を摘出した場合についての動物実験は昔から為なされており、ラットの摂餌行動における副腎皮質ホルモンの影響、血圧反応に関する薬理学的研究、雌性ラット内分泌系に及ぼす影響、さらに情動行動を調べたものなどがある⁶⁻⁹⁾。また、副腎摘出ラットおよび偽手術での走行活動に対する糖質コルチコイド（コルチコステロン）の影響を示した研究¹⁰⁾もあるが、副腎摘出ラットにストレスを負荷した場合のラットの行動変化についての報告は、我々が知る限り、為されていない。

そこで本研究では、ストレス負荷により副腎を摘出したラットがどのような行動変容をもたらすのかを副腎を摘出していないラットと比較検討した。

【方 法】

1. 実験動物

ラットは中村学園大学アニマルセンターで飼育した Wistar 系雄性ラット（実験開始週齢：9 週、体重：300.4g ± 10.7g, n=14）を使用した。まず、何も手術を行っていないラットをコントロールラット（C 群）として 5 匹、偽手術群として Sham operation ラット（S 群）を 5 匹、副腎摘出群として Adrenalectomy ラット（A 群）を 4 匹とし、実験に用いた。

実験に使用したラットは、室温約 24℃、湿度 45～50%、12 時間明暗サイクルの飼育室にて、ステンレス製の個別ケージに入れ、飼育繁殖用固形飼料で飼育した。また飼育中の食餌と水は自由摂取とした。本研究は、中村学園大学（含む短期大学部）動

物実験委員会の倫理審査の承認を得、その指針に基づいて実施した。

2. 手術

ラットは、チオブタバルビタールナトリウム（30～50mg/kg, Wako, 大阪）にて麻酔し、背部をバリカンで剃毛後、背面部をエタノールで消毒した。次に、腰椎上の皮膚を縦に約 2 cm 切開し、切開創を左側に移動させ、肋骨のすぐ背中側の腹膜をピンセットではさみ、直剪刀で約 1.5 cm 切開後、左側の副腎を摘出した。右側も同様に行い、副腎摘出後、切開部を縫合した¹¹⁾。これらを副腎摘出群（A 群）とした。一方、偽手術群（S 群）では、副腎摘出群と同じ方法で切開し、副腎を摘出せずにそのまま縫合した。その後、縫合箇所の消毒を行い、感染症予防のためペニシリンを皮下注射した。

3. 行動解析

行動解析には、ビデオ画像行動解析装置である SMART (Panlab, スペイン) を用いた。

< Open field 試験 >

Open field の大きさは、縦 45 cm × 横 45 cm × 高さ 42 cm である。この空間におけるラットの移動距離を測定した。Open field では、Corner / Side / Center と、3 区画に設定し（図 1 A）、10 分間における行動をモニタリングした（図 1 B）。なお、測定開始 5 秒間は、結果に含めず解析を行っている。また、測定項目は、ラットの総移動距離 (cm) および各区画における移動距離 (cm) について解析した。

< 高架式十字迷路実験 >

高架式十字迷路は、壁のない走行路 (Open arm) と壁に囲まれた走行路 (Closed arm) を組み合わせた装置で、ラットの不安状態を評価するものである。ラットは、暗所を好むため、壁のある Closed arm の方へ移動する。不安が強くなると Closed arm の滞在時間が長くなり、その不安が強いほど

⁵⁾ 佐藤徳光：動物実験の基本。西村書店，pp.84-85（1986）

⁶⁾ 鎌田邦栄，林信義，道佛昌子，中村幹雄，村川章一郎，千野一郎，青柳利雄，稲葉稔：種々薬物によるラット摂餌行動亢進効果に対する血中副腎皮質ホルモンの影響。杏林医会誌，24（2），183-190（1993）

⁷⁾ 友利正行：副腎髓質摘出ラットの血圧反応に関する薬理学的研究（I）。日薬理誌，87，67-76（1986）

⁸⁾ 石井久一，山下明，平川公昭，浜田陽一郎，能勢尚志：Dehydroepiandrosterone sulfate の副腎摘出雌性ラット内分泌系におよぼす影響。日薬理誌，76，201-212（1980）

⁹⁾ 小林雅文，若松佳子，由井孝，荒井悦郎，篠原正弘，山崎友次，北山善之進：ラットにおける Methamphetamine の脳内移行度と情動行動におよぼす副腎摘出の影響—特に ACTH 長期投与の効果—。日薬理誌，69，403-408（1973）

¹⁰⁾ A.I. レシュナー：行動内分泌学。理工学社，pp.48-51（1982）

¹¹⁾ 辻紘一郎：初心者のための動物実験手技 I—マウス・ラット—。講談社，pp.163-172（1981）

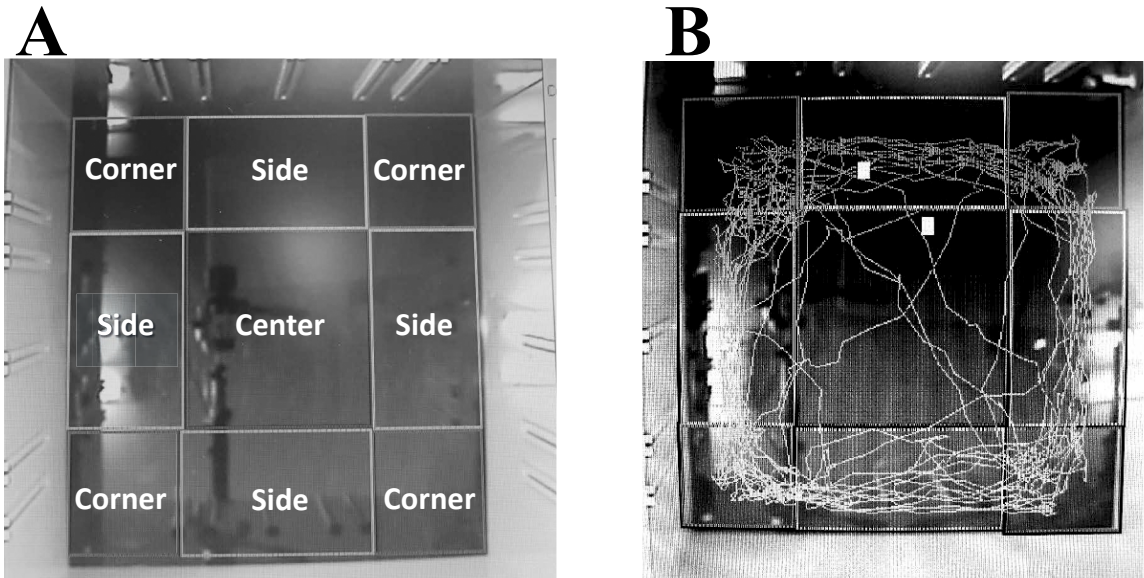


図1 Open field 試験における行動解析の一例

- A : Open field を3区画 (Corner / Side / Center) に設定した。
 B : ラットが実際に移動した軌跡の一例を示す。

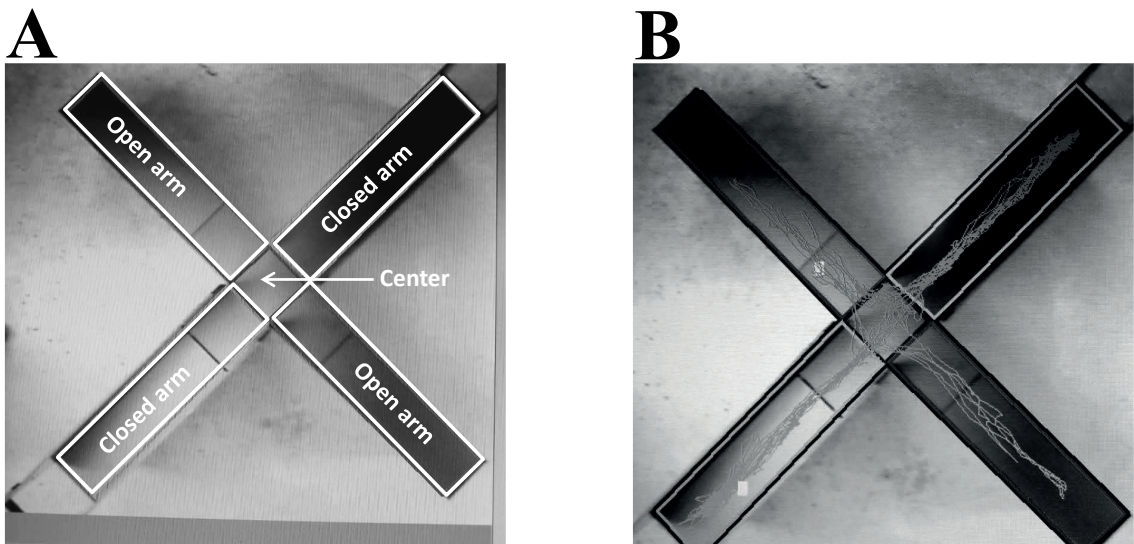


図2 高架式十字迷路実験における行動解析の一例

- A : 高架式十字迷路を3区画 (Open arm / Closed arm / Center) に設定した。
 B : ラットが実際に移動した軌跡の一例を示す。

その傾向が強くなる。また、逆に不安が減弱すれば Open arm の滞在時間が長くなる。

行動解析においては、高架式十字迷路を Open arm / Closed arm / Center と、3区画に設定し (図2 A)、10分間における行動をモニタリングした (図2 B)。この場合においても、測定開始5秒間は、結果に含めず解析を行った。また、測定項目

は、ラットの総移動距離 (cm) および各区画における移動距離 (cm) について解析した。

4. 実験手順

まず1日目は、ストレス負荷を与えず、Open field と高架式十字迷路において行動解析を行った (「ストレス前」)。2~4日目は、1日1回30分間

のストレスを3日連続して負荷し、5日目に上記と同様に行動解析を行った（「ストレス1回目」）。さらに、6～8日目においても、同様にストレス負荷を行い、9日目に行動解析を行った（「ストレス2回目」）。結果は、「ストレス前」、「ストレス1回目」、「ストレス2回目」におけるラットの行動変化を比較した。

なおストレス負荷は、コミュニケーションボックス（シンテクノ、福岡）を使用し、電気刺激による身体的ストレスを与えた。電気刺激の強さは0.5mAであり、刺激時間は10秒間の電気ショックと50秒間のインターバルを1サイクルとし、30分間（30サイクル）行った。

5. コルチコステロン測定

コルチコステロンの定量には、ラットの尾静脈より採血した血清を用いた。採血後、遠心分離機にて遠心し（3000回転、10分間）、上清を -80°C にて保存した。血液サンプルは、手術20日後のものである。なお、コルチコステロンの定量には、コルチコステロンELISA Kit (ab108821) (ABCOM, UK)を用いた。

6. 統計処理

全てのデータは、平均値±標準偏差で表し、統計処理は、統計解析ソフトSPSS 19.0 Jを用いた。なお、検定は多重比較で、その後の検定にはTukeyを用いて危険率5%未満で有意と判定した。

【結果】

手術開始から行動解析測定まで、手術開始日（9週齢）の体重を基準とした場合の体重変化値を図3に示す。手術10日後および20日後の体重は、C（コントロール）群と比べて、S（偽手術）群およびA（副腎摘出）群の体重増加が有意に減少していた。また、S群とA群の間には、手術10日後と20日後において体重の有意な差（S群がA群より減少）が認められた。

次に、Open field 試験による総移動距離の結果を示す（図4）。総移動距離の実測値（図4A）において、まずC群の「ストレス前」、「ストレス1回目」、「ストレス2回目」を比較すると、ストレスを受けた場合、総移動距離が有意に減少した。しかしながら、「ストレス1回目」と「ストレス2回目」の総移動距離に大きな変化はなかった。S群で

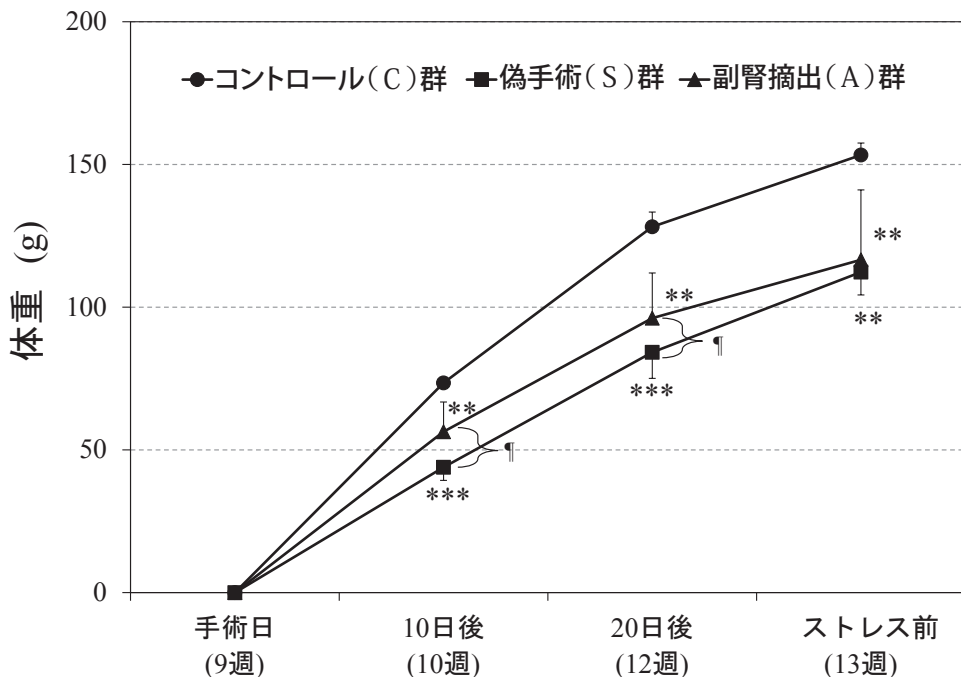


図3 コントロール（C）群，偽手術（S）群および副腎摘出（A）群における体重の変化
手術開始0日（9週齢）を基準にした場合の、手術10日後，20日後，「ストレス前」（行動解析開始時）までの体重変化の比較を示す。

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. C群, ¶ $P < 0.05$ S群 vs. A群

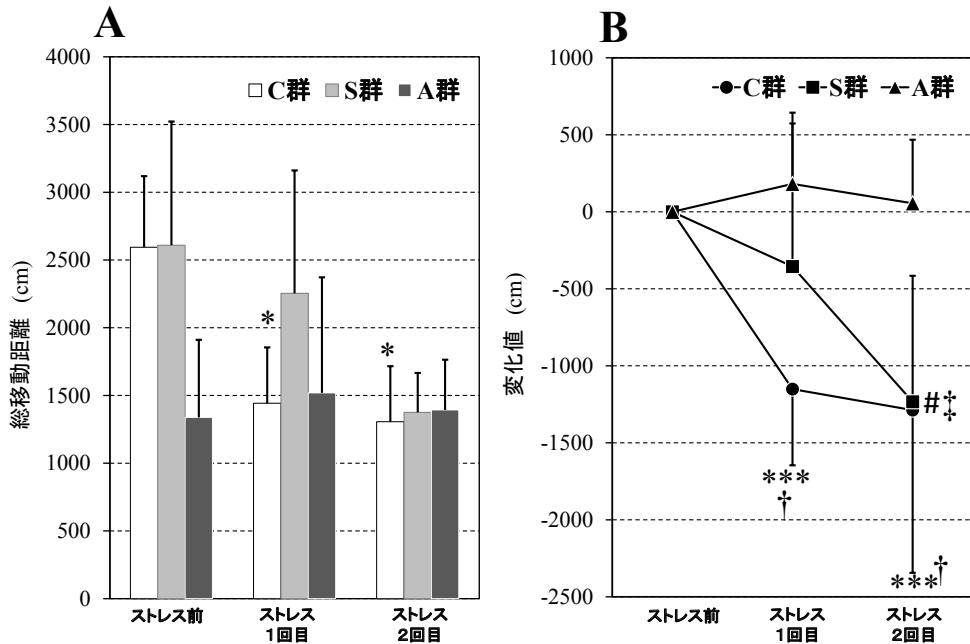


図4 Open field 試験における総移動距離

A: 「ストレス前」, 「ストレス 1 回目」, 「ストレス 2 回目」における C 群, S 群, A 群の総移動距離の実測値を示す。B: 「ストレス前」の総移動距離を基準にした場合の変化値を示す。

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. 「ストレス前」(C 群), # $P < 0.05$ vs. 「ストレス前」(S 群), † $P < 0.05$ C 群 vs. A 群, ‡ $P < 0.05$ S 群 vs. A 群

は、ストレスを与えることで総移動距離が減少する傾向がみられた。それは「ストレス 1 回目」よりも「ストレス 2 回目」の方が影響が大きく、有意差はみられなかったが総移動距離は「ストレス前」と比べて「ストレス 2 回目」では約半分に減少した。一方、A 群の場合、「ストレス前」で、副腎摘出手術の影響が大きかったのか総移動距離は C 群と S 群の半分で、「ストレス 1 回目」, 「ストレス 2 回目」でも、ほぼ同程度であった。

また、「ストレス前」の総移動距離を基準とした場合の変化値で比較したところ (図 4 B), C 群では「ストレス 1 回目」で顕著な総移動距離の減少が見受けられた。しかし、A 群ではストレス負荷前後に変化はなく、C 群と S 群は、「ストレス前」とストレス負荷後で総移動距離が減少していた。また、「ストレス 2 回目」を比較すると、C 群と S 群は A 群に比べて総移動距離が有意に減少しているのがわかる。

次に Open field における 3 区画別 (Corner, Side, Center) での移動距離を比較した場合 (図 5), ラットは大半、Corner (図 5 A) と Side (図 5 B) を移動しており、どの群においても Center での移動はほとんどみられなかった (図 5 C)。

Corner での移動距離の実測値は、3 群間での「ストレス前」, 「ストレス 1 回目」, 「ストレス 2 回目」をそれぞれ比較した場合、殆ど差はみられなかったが (図 5 A), Side での移動距離においては、「ストレス前」で A 群は有意に他の 2 群よりも減少していた (図 5 B)。ストレスによる変化については、図 5 A, B, C のデータを「ストレス前」を基準として表した図 5 D, E, F を参照されたい。C 群における Corner での移動距離、および Side での移動距離は、「ストレス 1 回目」, 「ストレス 2 回目」において「ストレス前」よりも有意な減少であった (図 5 D, E)。S 群の場合、Corner での移動距離は、「ストレス 2 回目」で「ストレス前」および「ストレス 1 回目」よりも有意な減少を示し (図 5 D), Side での移動距離においては、有意差はみられなかったが「ストレス 1 回目」, 「ストレス 2 回目」と徐々に移動距離が減少する傾向がみられた (図 5 E)。一方、A 群では「ストレス前」, 「ストレス 1 回目」, 「ストレス 2 回目」による移動距離の変化は、Corner, Side, Center と 3 つの区画別で殆ど差はなかった (図 5 D, E, F)。

次に、高架式十字迷路実験による総移動距離を図 6 に示す。C 群における総移動距離の実測値は、ス

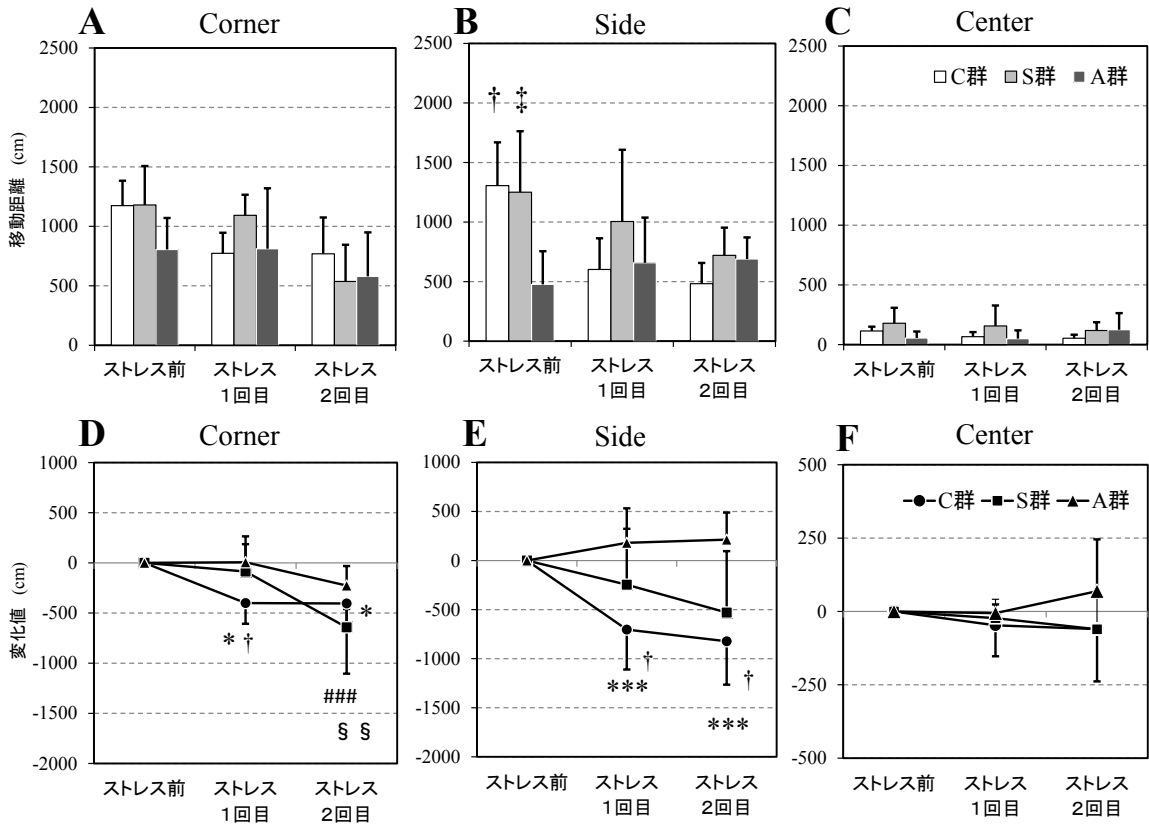


図5 Open field を3区画 (Corner / Side / Center) に分けた場合の「ストレス前」, 「ストレス1回目」, 「ストレス2回目」におけるC群, S群, A群の各移動距離の実測値 (A~C) と, 「ストレス前」を基準とした変化値 (D~F)

A: Corner における移動距離の実測値。B: Side における移動距離の実測値。C: Center における移動距離の実測値。D: Corner における移動距離の変化値。E: Side における移動距離の変化値。F: Center における移動距離の変化値。

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. 「ストレス前」(C群), ### $P < 0.001$ vs. 「ストレス前」(S群), § § $P < 0.01$ vs. 「ストレス1回目」(S群), † $P < 0.05$ C群 vs. A群, ‡ $P < 0.05$ S群 vs. A群

トレス負荷により減少傾向を示した (図6 A)。しかし, 「ストレス1回目」と「ストレス2回目」についての差はみられなかった。一方, S群とA群では「ストレス前」と比べて「ストレス1回目」ではほとんど変化はなく, 「ストレス2回目」において若干の減少傾向を示した (図6 A)。「ストレス前」を基準とした場合の変化値において (図6 B), C群は「ストレス前」に比べて「ストレス1回目」では, 総移動距離は減少し, それはS群とA群に比して有意な減少であった。しかし, C群の「ストレス2回目」ではデータのばらつきが大きく標準偏差値が大きかったため, 「ストレス前」およびS群, A群と比較しても有意な差は得られなかった。また, S群とA群は, 「ストレス前」と「スト

レス1回目」に変化はなく, 「ストレス前」と「ストレス2回目」を比較した場合, 若干の減少傾向を示しただけであった。

さらに, 高架式十字迷路を3区画別 (Open arm, Closed arm, Center) に分けて解析を行うと (図7), ラットは大半, Closed armを移動しており (図7 B), Open arm (図7 A) およびCenterでの移動距離は短いことがわかる (図7 C)。「ストレス前」を基準とした場合の変化値をそれぞれの区画別でみると, まず, C群では, 「ストレス1回目」でのOpen armの移動距離が「ストレス前」に比べて有意に減少しており (図7 D), さらに, Closed armでは「ストレス2回目」で有意な減少を示した (図7 E)。一方, S群とA群でのOpen

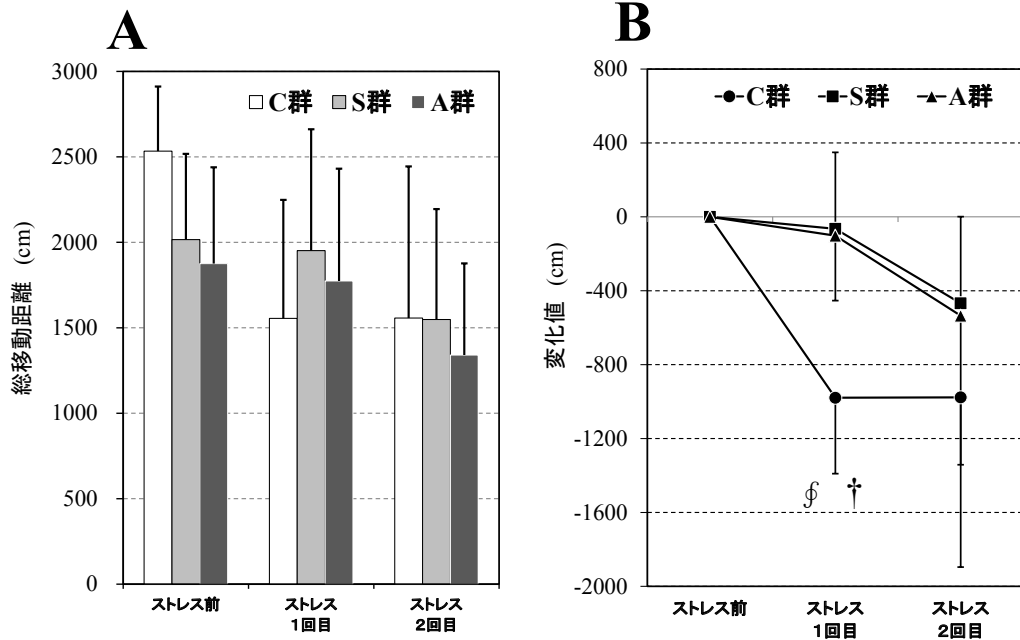


図6 高架式十字迷路実験における総移動距離

A: 「ストレス前」, 「ストレス 1回目」, 「ストレス 2回目」におけるC群, S群, A群の総移動距離の実測値を示す。B: 「ストレス前」の総移動距離を基準にした場合の変化値を示す。

§ $P < 0.05$ C群 vs. S群, † $P < 0.05$ C群 vs. A群

armの移動距離の変化値は、ストレス負荷前後で変化はなく(図7D)、Closed armで若干の減少傾向がみられた(図7E)。Centerでの移動距離は、実測値およびその変化値とも3群間にストレス負荷による変化はみられなかった(図7C, F)。

最後に、手術20日後における血清コルチコステロン濃度についての結果を示す(図8)。3群間では有意差はみられなかったがS群が最もコルチコステロン濃度が高く、やはり副腎を摘出したA群において最も低値を示した。

【考 察】

手術10日後および20日後の体重変化値において、A(副腎摘出)群およびS(偽手術)群は、C(コントロール)群に比して体重が減少していた(図3)。また、S群とA群の間に体重の差がみられ、回復期間中である手術10日後、20日後のS群の体重が最も低値を示していた。これまでの研究に

において、副腎皮質ホルモン(コルチコステロン)が摂餌行動に影響を与えることが以前より知られており^{12,13)}、副腎摘出群では、コルチコステロン投与により摂餌量は回復したという報告がある⁶⁾。このため、摂餌量から考えると、A群の摂餌量は減少し、回復期間中や行動解析開始時において副腎摘出手術を行ったA群の体重は最も低値を示すと考えられた。S群については偽手術のため、副腎は体内に存在しており、今回のように手術回復(10日後、20日後)時における体重が最も低値を示した原因がはっきりしない。回復期間中における摂餌量および摂水量の測定を行っていないため、実際に摂餌量の違いが体重の差に繋がったとは判断できない。また一方で、行動解析開始(13週齢)時においてのS群とA群の体重差がなくなっていることから、測定を延長した場合、体重が逆転する可能性も十分に考えられる。体重の変化については長期的な測定と同時に摂餌量の測定が必要であったと思われる。

次に、Open field試験において、C群とS群の総

¹²⁾ Castonguay T.W.: Glucocorticoids as modulators in the control of feeding. *Brain Research Bulletin*, 27, 423-428 (1991)

¹³⁾ 柳沢研一: ラットのコルチコステロン日内リズム発生に及ぼす摂餌行動の影響. *金沢大学十全医学会雑誌*, 92 (3), 475-489 (1983)

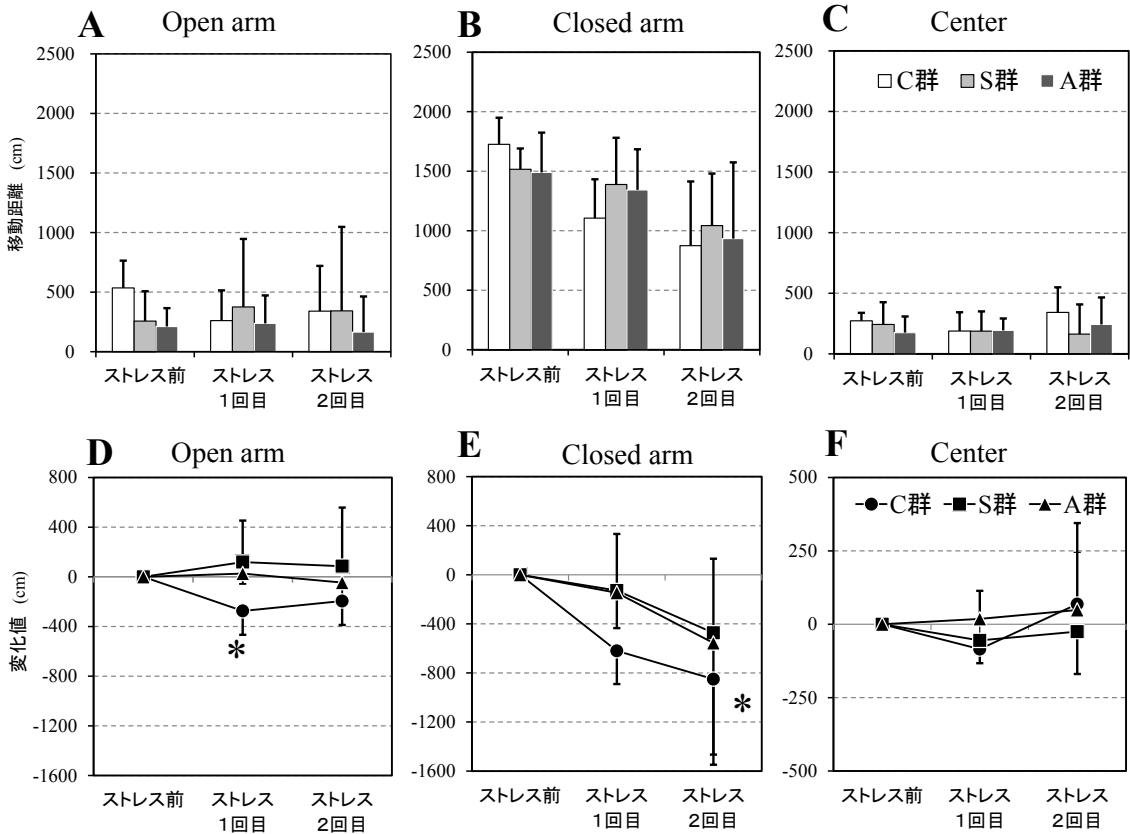


図7 高架式十字迷路を3区画 (Open arm / Closed arm / Center) に分けた場合の「ストレス前」, 「ストレス1回目」, 「ストレス2回目」におけるC群, S群, A群の各移動距離の実測値 (A~C) と, 「ストレス前」を基準とした変化値 (D~F)

A : Open arm における移動距離の実測値。 B : Closed arm における移動距離の実測値。 C : Center における移動距離の実測値。 D : Open arm における移動距離の変化値。 E : Closed arm における移動距離の変化値。 F : Center における移動距離の変化値。

* P<0.05 vs. ストレス前 (C群)

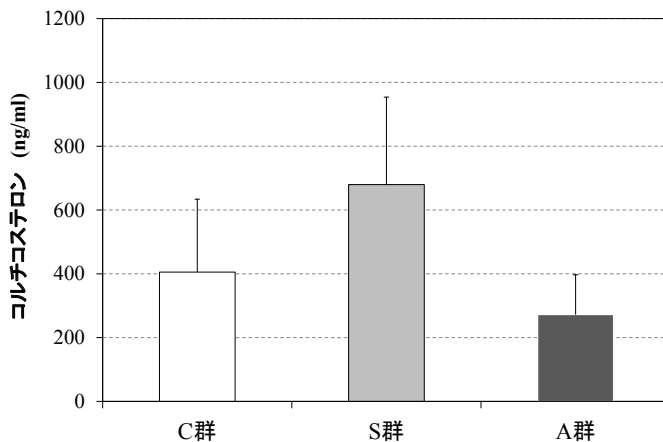


図8 血清コルチコステロン濃度

3群間における血清コルチコステロン濃度の比較を示す。血液サンプルは手術20日後のものを使用した。

移動距離が減少したのは、ストレス負荷による影響の可能性がある。しかし、A群では、総移動距離に変化はなかった(図4A)。A群は、副腎を摘出したため、ストレスによる影響を受けにくく、総移動距離において変化がなかったと考えられる。しかしながら、「ストレス前」のA群の総移動距離の実測値は、他の2群と比較すると、約半分であった。副腎を摘出したことで、根本的な活動量の減少を招いた可能性が示唆された。副腎皮質ホルモンが走行の維持にも関わっているとの報告がある¹⁰⁾。Leshner¹⁴⁾は、副腎摘出ラットは実際に走行距離を減らし、中等量のコルチコステロン補充療法を行うと、正常レベルの活動量までに回復することを報告している。一方、正常ラットへのグルココルチコイド処理(コルチコステロンや炎症治療剤などの薬物投与)は、少量であれば走行を刺激し、大量投与となれば逆に抑制を示す^{14,15)}。副腎摘出がなぜ走行活動を減少させるのかは、体脂肪量の減少によるとLeshner¹⁴⁾は提唱している。つまり、グルココルチコイド(ラットではコルチコステロン)の消失は、体脂肪量の低下を含め、多くの中間代謝の変化を引き起こす。事実、副腎摘出ラットは正常ラットの走行運動と同じ比率で脂肪量が減少するが、すでに体脂肪量が減少している副腎摘出ラットでは、走る必要がないということである^{10,14)}。また、コルチコステロンの変化が運動の活動レベルに影響するだけでなく、走行活動が副腎皮質ホルモンレベルを変える可能性もある。つまり、2種類の関係性(グルココルチコイド[ラットではコルチコステロン]が活動レベルに影響することと逆に、走行活動がグルココルチコイドに影響すること)が示唆される¹⁰⁾。本実験では、回転かごを用いておらず、走行レベルについては不明である。しかしながら、今回の実験におけるOpen field試験での副腎摘出ラットの活動量が減少した結果は、コルチコステロンが活動レベルに影響した可能性が高いと考えられる。これはMobergら¹⁶⁾も、回転かごでの走行実験において副腎摘出ラットでは活動量が減少していることを報告している。また、副腎皮質ホルモンは、ラットの走行運動には影響するが、サーカディアンリズムの神経調節には関与していないことを示唆している。

次に、3区画別(Corner, Side, Center)では、ラットは大半、Corner(図5A)とSide(図5B)で活動していることがわかった。3区画別で解析を行った場合においてもA群ではストレス負荷の有無や、3区画の場所の違いというものにも大きな変化は観察できなかった。一方、副腎が存在するC群およびS群については、ストレス負荷によりCornerとSideの移動距離が減少した。S群の「ストレス2回目」におけるCornerの移動距離は、「ストレス前」と比較して有意に減少し(図5D)、Sideの移動距離においては「ストレス1回目」と「ストレス2回目」で徐々に減少傾向を示した(図5E)。C群のCornerおよびSideの「ストレス1回目」および「ストレス2回目」の移動距離は、「ストレス前」と比較して有意に減少した(図5D, E)。特にSideの「ストレス1回目」と「ストレス2回目」の移動距離は、A群に比して有意な減少であり、やはり副腎を摘出したA群は、C群やS群のようにストレスの影響は移動距離には明確に現れていないことがわかる。

高架式十字迷路実験においても、「ストレス前」におけるC群の総移動距離は、ストレスによる影響から減少傾向を示したが、「ストレス1回目」と「ストレス2回目」の総移動距離の違いは、ほとんどなかった(図6A)。一方、S群とA群においては、「ストレス前」と「ストレス1回目」を比較した場合、変化はなく、「ストレス2回目」において若干の減少傾向を示した。S群とA群については、手術と高架式十字迷路という特殊な環境に置かれたことで、C群とは異なる結果になった可能性がある。一方、その総移動距離を「ストレス前」を基準として表した変化値において(図6B)、「ストレス1回目」の結果を3群で比較したところ、C群は他の2群と比較して有意な減少を示した。やはり、C群はストレスの影響を受けやすいと考えられる。しかし、S群については副腎が存在しているにも関わらず、ストレス負荷の影響について、むしろA群に似た結果を示した。A群とS群に共通することといえば、手術を行ったことであるが、全てが手術による影響のためという結論で片づけられない。高架式十字迷路は、不安(anxiety)行動について測定さ

¹⁴⁾ Leshner A. I.: The adrenals and regulatory nature of running wheel activity. *Physiology and Behavior*, 6, 551-558 (1971)

¹⁵⁾ Beatty, W. W., Scouten, C. W., and Beatty, P.A.: Differential effects of dexamethasone and body weight loss on two measures of activity. *Physiology and Behavior*, 7, 869-871 (1971)

¹⁶⁾ Moberg P.G. and Clark R.C.: Effect of adrenalectomy and dexamethasone treatment on circadian running in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 4, 617-619 (1976)

れており、従来の測定法に加え、さらに詳細な分析法が提唱されている¹⁷⁾。つまり、ラットが暗い部屋から明るい部屋に、あるいは Closed arm から Open arm を覗く行動、身体を伸ばして注意深く這うように前進する行動等、動物の不安情動をより適切に測定する指標と考えられている^{18,19)}。しかし今回の実験結果における行動解析は、ラットの動いた軌跡のみを捉えるだけであり、上記のような解析はビデオ撮影を行う必要がある。

3区画別では、Open arm や Center での移動距離において、3群間で大きな差はみられず(図7 A, C)、ラットは大半、Closed arm に滞在している(図7 B)。この理由については、ラットなどのげっ歯類は暗所や閉所を好む傾向があるため、壁のある Closed arm により多く滞在したと考えられる。つまり、“接触走行: thigmotaxis” という行動パターンを示す²⁰⁾。これは、Open field 試験において、ラットが Side と Corner を移動していることにも当てはまる。また、Closed arm での移動距離において、C群は「ストレス2回目」と「ストレス前」と比較して有意に減少した(図7 E)。また Open arm においても「ストレス1回目」で有意な減少であった(図7 D)。S群およびA群の Open arm での移動距離の変化値はストレスを負荷しても変化はみられなかった。Closed arm の場合では、ストレスを負荷する毎に有意な差はみられないが、減少傾向を示した。不安関連行動を評価する方法は Open field 試験や高架式十字迷路実験が最も簡便に測定でき、多くの研究者によって広く用いられてきたため、膨大な情報の蓄積があるという有用性は、他の不安水準の評価系に類をみない。しかしながら、行動測定には測定前の影響(飼育環境や実験前の処理)、照明強度、実験装置の材料や形状等も影響してくるため、実験条件の設定が結果に大きく影響することからその結果の解釈には注意を払う必要がある^{20,21)}。また、行動学的な指標以外にも、測定中の生体内変化(血圧、心拍数、脳血流量、電気生理学的応答等)を同時にモニタリングすることに

よって、さらに不安・恐怖・ストレスについて包括的に評価できると考えられる。

最後に、ストレスに関してのホルモンの指標であるコルチコステロン濃度を測定した。濃度が高い順に、S群、C群、A群であった。A群は、副腎を摘出しているため、副腎皮質ホルモンであるコルチコステロンが分泌されず、最も低値を示したが、3群間では、有意な差は認められなかった。今回、定量の際のスタンダード曲線から近似曲線の R²を求めた値は、0.9835であり、1に近いことから、測定にはまず問題ないと考えられる。3群間に違いが生じなかったのは、単純に採血のみを行い定量したためだと考えられた。ホルモンのはっきりとした分泌量の差をみるためには、ストレス負荷30分後に採血を行うというように、一定のストレスを負荷した後に採血を行う必要があり、また一方で、採血によるストレス感受性も個体差があるため採血実施には注意を払う必要がある。今後の課題としては、3群のホルモン分泌量が明確にわかるように、ストレス負荷30分後に採血を行うこと、採血の実施についても一定の条件を保つことが必要である。しかし、単純な採血の場合であっても、副腎摘出群のA群では最も低値を示した。これは、副腎摘出の差がこの結果に反映されていると思われる。

結論として、私達は、今回の実験で、3日間連続のストレスを2回与えた。ストレスを受け続けると、生体がストレスサーに對抗できなくなり、ストレスサーに対する抵抗力が低下する。さらに、疲労が長期にわたって継続すると、生体はさらに衰弱する(疲憊期)ため、C群とS群は行動量が減少した。しかし、A群は、副腎を摘出したことで、汎適応症候群が生じず、行動量に変化がみられなかったと考えられる。今回のように、副腎摘出ラットにストレス負荷を2回行い、行動量と不安行動を調べた研究は、筆者らが知る限り見当たらない。今後の課題として、コルチコステロン濃度以外の生体応答として ACTH 濃度、アドレナリン、ノルアドレナリン、および脳内神経伝達物質を測定することにより

¹⁷⁾ Dalvi A. and Rodgers R.J.: GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. *Psychopharmacology*, 128, 380-397 (1996)

¹⁸⁾ Grewal S.S., Shepherd J.K., Bill D.J., Fletcher A. and Dourish C.T.: Behavioural and pharmacological characterization of the canopy stretched attend posture test as a model of anxiety in mice and rats. *Psychopharmacology*, 133, 29-38 (1997)

¹⁹⁾ Griebel G., Perrault G. and Sanger D.J.: Characterization of the behavioral profile of the non-peptide CRF receptor antagonist CP-154,526 in anxiety models in rodents. Comparison with diazepam and buspirone. *Psychopharmacology*, 138, 55-66 (1998)

²⁰⁾ 山口拓, 吉岡充弘: 不安関連行動の評価. *日薬理誌*, 130, 105-111 (2007)

²¹⁾ 山口拓, 富樫広子, 松本真知子, 吉岡充弘: 高架式十字迷路試験を用いた不安水準の評価とその応用. *日薬理誌*, 126, 99-105 (2005)

さらに詳しいストレス応答の機序が見えてくるかもしれない。