

## 24 時間明期刺激が ICR 雌マウスの 発育と性周期に及ぼす影響

浅野 友香\*・門田 卓磨\*・松浦 宏治\*,\*\*

\*岡山理科大学工学部生命医療工学科

\*\*岡山理科大学生命科学部生物科学科

(2022年10月17日受付、2022年12月5日受理)

### 1. 緒言

げっ歯類における性周期の主要な環境シンクロナイザーとして、光周期が報告されている(1)。ラットでは、恒明および恒暗環境において体重が増加するという報告が得られている(2)。また、動物実験において夜行性であるマウスの雌では、明暗周期が失われた際、ホルモンバランスが乱れることによって性周期が不安定になり、排卵がうまくいかないと考えられる状況が散見された。明暗周期が失われた場合、代謝系と生殖系に影響が及ぶことが考えられた。しかし、明暗周期の喪失や光刺激が雌マウスに与える影響についてあまり研究されておらず未だ良く分かっていない。

そこで本研究では、明暗周期の喪失や光刺激が雌マウスに与える影響について明らかにするために、ICR雌マウスを通常の明暗周期下と恒明環境の2群に分けて飼育実験を行うことで、発育と性周期に及ぼす影響を検討した。

### 2. 材料および方法

#### 2-1 実験動物

日本クレア株式会社から購入した生後4週齢のクローズドコロニー系 Jcl:ICR 雌マウスを使用した。ICR雌マウスの飼育期間については生後4-12週齢とし、明暗系と恒明系の2つのグループに分け各10匹ずつ計20匹を飼育した。また、1ケージに1匹だけ飼育する個別飼育(夏目製作所 KN-628 W175×L255×H125mm)と1ケージに5匹飼育する集団飼育(夏目製作所 KN-600 W220×L320×H135mm)に分け、床敷きにはステンレス製の網を用い飼育した(図1)。しかし、個別飼育と集団飼育間における大きな変化は見られなかったため、一部の実験については、個別飼育と集団飼育の両方の結果を合わせて、明暗系と恒明系の2群で比較を行った。餌はペレット状である日本クレア株式会社の CE-2 を使用し自由給餌法で行い、給水瓶に水道水を入れてマウスに与えた。ケージの洗浄と交換は1週間に1度の頻度で行った。水と餌の減少量を1日ごと、体重については1週間に1度の頻度で計測を行った。本実験は、岡山理科大学動物実験管理委員会承認(実2018-13)された計画に基づき実施した。

#### 2-2 実験環境

雌マウスを明暗系と恒明系のグループに分けて、明暗系は12時間の明暗周期(明期 8:00-20:00)を有する環境で、恒明系は24時間蛍光灯の光を照射し続ける環境で飼育を行った。本条件の明暗系を対照とした理由は、実験用マウスの飼育は通常この明暗期にて行われることが多いためである。両環境共に照度 800 lux の光強度で、気温  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  に設定した。恒明環境を作成するにあたって、飼育棚に照度が均等になるようにライトを設置した。照度は CUSTOM のデジタル照度計 LX-1330D を用いて計測した。夜間、他の棚のマウスに光刺激が届かないように暗幕を被せて光が漏れないよう配慮した。また、明暗環境においても恒明環境と照度を合わせるため、乳白半透明のポリエチレンで棚上を覆った。

### 2-3 性周期の確認

生後 8-12 週齢を用い 4 週間行った。性周期の確認は、膣垢の形状から周期の判断を行う膣スメア検査を用いた。手順として、はじめにマウスを保定し、Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-free Phosphate Buffered Saline (PBS(-))溶液を入れたスポイトを用いて膣口から膣垢を採取した。次に採取したサンプルをスライドガラス上で風乾させ、Diff-quick 染色(シスメックス株式会社)によって核と細胞質を染色したのち(膣垢塗抹標本作製)、光学顕微鏡で観察を行った(3, 4)。ホルモンバランスの乱れによって性周期が不安定になると性周期が休止期で止まったままになることから、本研究においては明暗系と恒明系の休止期数を比較した。

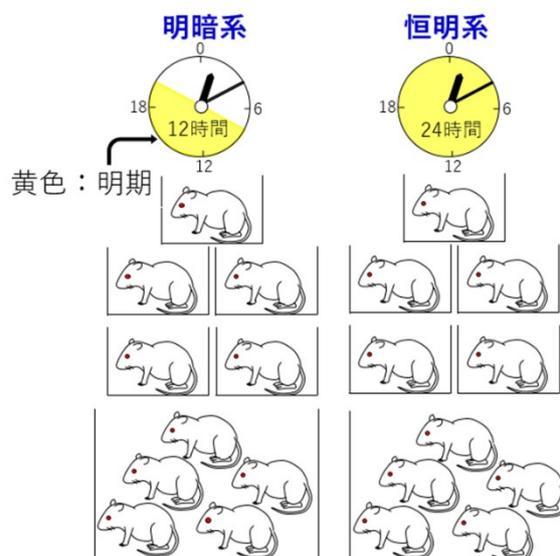


図1 飼育条件の模式図

### 2-4 マウス性周期とその判定基準

性周期には、完全性周期と不完全性周期があり、ヒトは完全性周期、マウスやラットは不完全性周期に分類される(5)。マウスの性周期は通常 4-5 日であり、発情前期、発情期、発情後期、休止期の 4 期からなる。休止期の膣垢(スメア)像を図 2 に示す。スメア像から観察できる細胞の形状として、発情前期 (proestrus) は有核細胞、発情期 (estrus) は無核角化細胞が見られる。そして発情後期 (metestrus) に入ると、変性した有核細胞や無核角化細胞、白血球などが特徴として観察され、最後の休止期 (diestrus) においては白血球と粘液が見られる。性周期の段階の判定は、これらの細胞の有無、割合、密度等により行った(3, 4)。

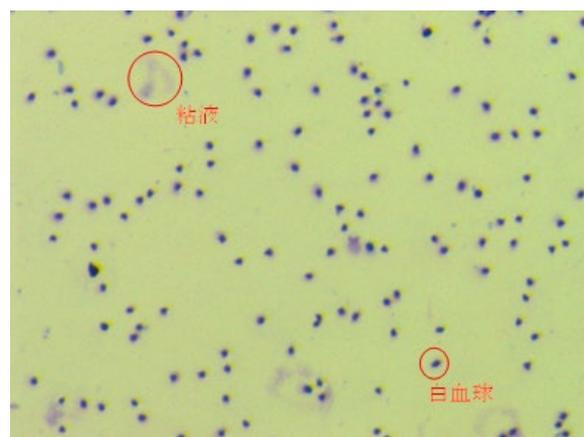


図2 休止期のスメア像

### 2-5 ELISA サンプルの調整と分析

マウスへの侵襲性を少なくするため、ELISA に使用するための試料を血液からでなく糞から採取した。糞試料の回収は 1 週間に 1 度の頻度で行った。また、糞試料回収作業性や屑の混入を考慮し、床敷はチップではなくステンレス製の網を使用した。

生後 5-12 週齢に至るうち、1 週間分の糞をそれぞれ回収して分析を行った。採取した糞試料を粉碎し、0.2 g の試料をエッペンドルフチューブに計量した。そしてエタノール 2 ml を加え、30 分間シェーカーを用いて激しく振とうした。その試料を 5000 rpm で 15 分間遠心し、上清を別のチューブへ移した。取り出した上清を、吸引ポンプを用いて陰圧下で蒸発乾固させ、乾燥した抽出サンプルを -80°C で保存した。実験に用いる際には、100 μL のエタノールでこのサンプルを溶解させてから使用した(6, 7)。

プロゲステロンとコルチコステロンの定量はそれぞれ Abnova Progesterone ELISA Kit KA3392 と DetectX® CORTICOSTERONE Enzyme Immunoassay Kit K014-H1 を使用した。検量線を作成するため、キット内の標準液を希釈してスタンダードを用意した。抗体を固相化した 96 ウェルプレートにスタンダードと抽出サンプルを添加し、30 分間静置した後、停止溶液を加えて反応を停止した。反応後のプレートにおける 450 nm の吸光度をプレートリーダーで計測し、得られた検量線を用いて、それぞれのホルモン濃度を算出した。

## 2-6 統計学的処理

有意差の検定は Tukey HSD test と  $t$  検定を用い、検定結果が  $P < 0.05$  を示した場合に、統計学的に有意性があると判定した。

## 3. 実験結果

### 3-1 発育評価

図2の左側と右側のグラフはそれぞれ全飼育期間56日間における1匹当たり1日の水と餌の減少量を示す。1匹当たりの水減少量の平均値は恒明系で7.9g、明暗系で7.4gであった。1匹当たりの1日の餌減少量の平均値は恒明系で5.8g、明暗系で5.9gであった。恒明系の群と明暗系の群で  $t$  検定を行った結果、水と餌の減少量ともに統計学的有意差は見られなかった。

マウス体重平均値を図3に示す。明暗系と恒明系について週齢ごとに Tukey HSD test で比較すると、12週齢の恒明系においてのみ体重が有意( $P < 0.05$ )に増加した。

### 3-2 性周期

生後8-12週齢の雌マウスにおける休止期数の平均値比較を図4に示す。明暗系と恒明系におけるそれぞれの平均休止期数について  $t$  検定を行うと、恒明系において休止期数の有意な増加( $P < 0.05$ )が見られた。休止期の日数および各性周期日数において両群間での差は無かったため、この恒明系における休止期数の増加は性周期が光周期による攪乱を受けたものとする(1)。

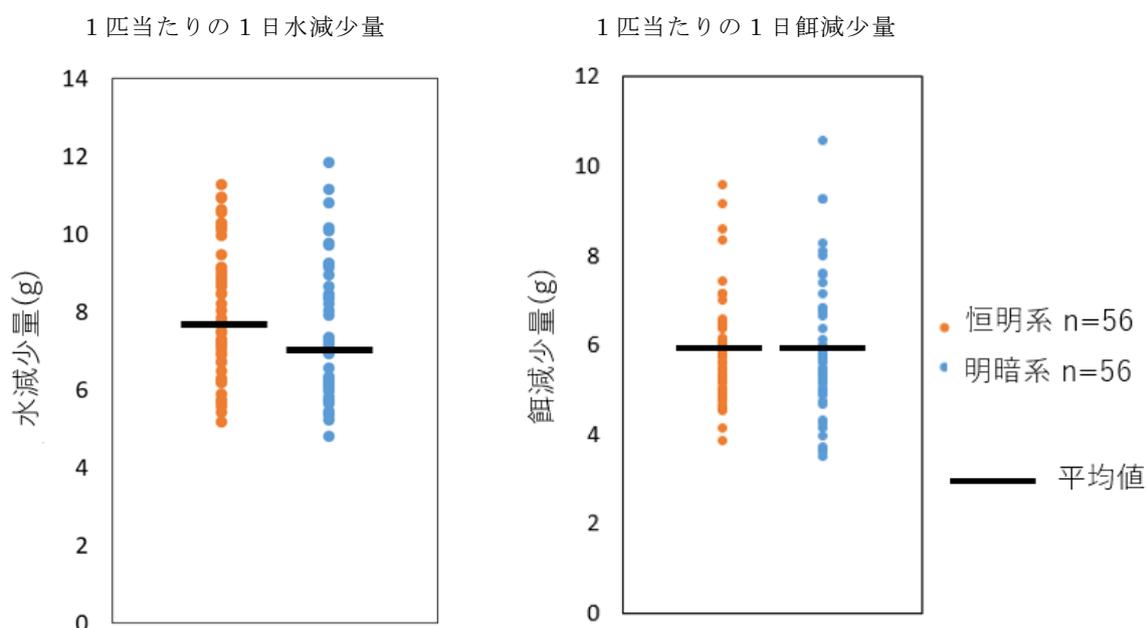


図2 1匹当たりの1日の水減少量(左)と餌減少量(右) これらのグラフにおける標本数は56日間飼育実験を行っていることからn=56である。

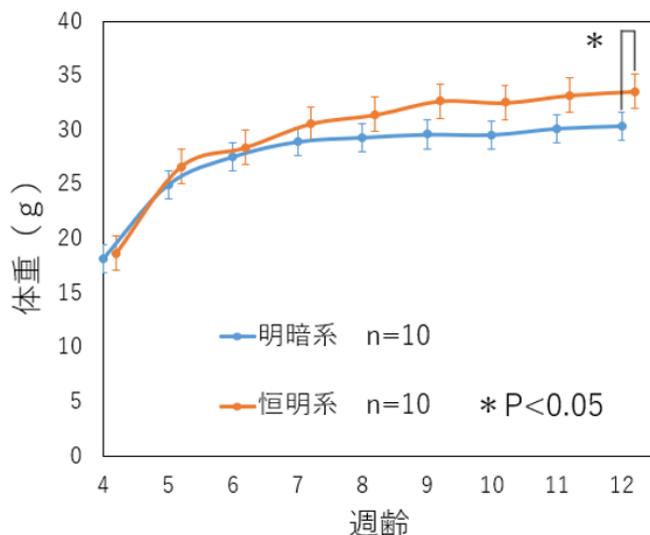


図3 平均体重値の比較 エラーバーは標準偏差を示す。

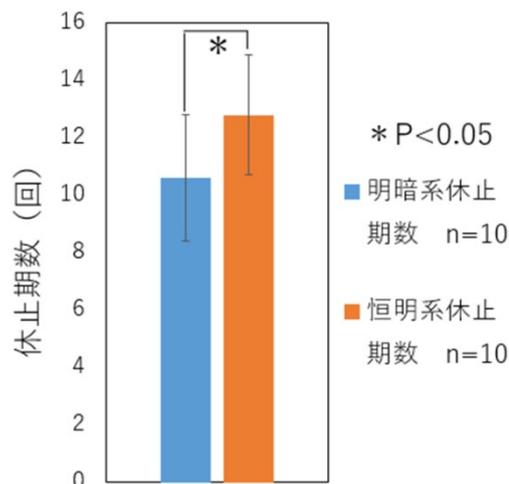


図4 性周期休止期数の平均値比較 エラーバーは標準偏差を示す。

### 3-3 ホルモン分析

回収した糞試料のプロゲステロンとコルチコステロン濃度を図5に示す。プロゲステロン濃度は明暗系の集団飼育で 5360 pg/ml、個別飼育の 5 匹分の平均値では 5358 pg/ml であった。恒明系では集団飼育で 4033 pg/ml、個別飼育の 5 匹分の平均値では 7949 pg/ml であった。本結果は、恒明飼育系において血漿中プロゲステロン濃度の有意な増加がみられている結果と対応する(1)。コルチコステロン濃度は明暗系の集団飼育で 5945 pg/ml、個別飼育の 5 匹分の平均値では 2557 pg/ml であった。恒明系では集団飼育で 7141 pg/ml、個別飼育の 5 匹分の平均値で 4989 pg/ml であった。個別飼育の恒明系群と明暗系群 (それぞれ n=5) を比較した結果、糞中のプロゲステロンとコルチコステロン濃度ともに有意差は見られなかった。

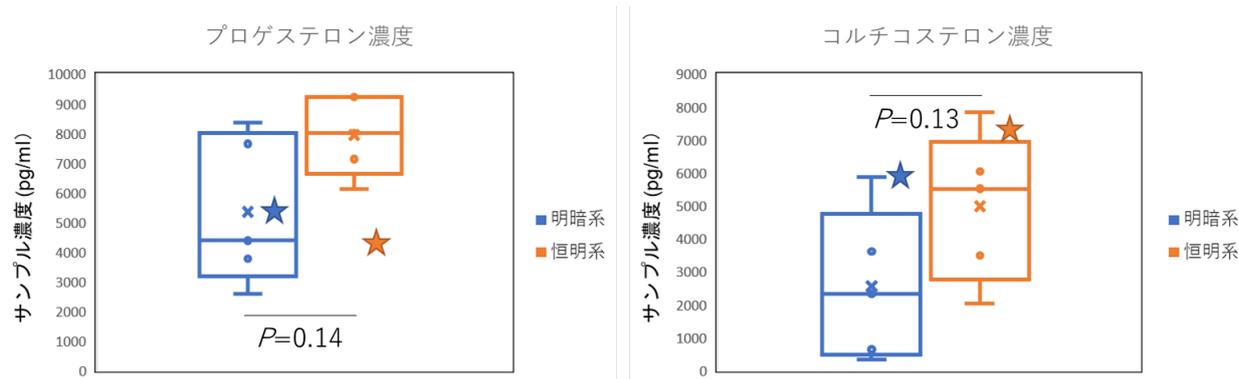


図5 プロゲステロン (左) とコルチコステロン (右) 濃度

星印は集団飼育の結果を示す(n=1)。箱ひげ図において、×印は平均値を示す。箱の中央に棒が示されている部分は中央値である。t検定によるP値は個別飼育と集団飼育のサンプル各群6ずつの値について算出した。

#### 4. 考察

本実験系においては、明暗系と恒明系を比較して水と餌の減少量とホルモン濃度に変化がなかったが、恒明系において性周期の休止期数と体重が増加した。光刺激から体重増加に至る機序として、はじめに恒常的な光刺激によって網膜からの光刺激に関する情報が視交叉上核から松果体に神経を介して伝達(8)され、松果体からのメラトニン分泌が減少したと推測する。ヒトにおいて前夜にメラトニンを摂取しなかった場合、食後の血糖値が緩和されずに体重が増加したという報告(9)がある。この報告結果を本研究と対応させてみると、恒明系の群においてはメラトニン分泌が減少し、明暗系の群よりもエネルギー消費が低下し、その結果体重が増加する可能性があると考えられる。日長が増すと、メラトニンの分泌が減少することが知られており、メラトニンは黄体機能維持ホルモンであるプロラクチンの脳下垂体からの分泌を抑制する(10)。恒明系の群における性周期休止期の数が増えたことから、光周期とホルモンと性周期の関連があると思われる。しかし、本実験結果を過去に見られた恒明系で排卵が促されない現象と関連づけるのは難しく、概日リズムや卵胞成熟や排卵への影響を評価できるような研究デザインが必要となる。

#### 5. 結論

今回、24時間明期がICR雌マウスに及ぼす影響についての計測を行い、明暗系群と恒明系群間で比較検討した。その結果、恒明系の群で12週齢における体重と、性周期の休止期数が有意に増加した。有意に増加した理由として、恒明刺激によって松果体からのメラトニン分泌が抑制されたことが原因であると示唆される。本研究において、恒常的な光刺激によって視交叉上核が刺激されてホルモンバランスが乱れることから、恒明環境がICR雌マウスにおけるストレスファクターの1つとして働いていると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Constance S. Campbell, Kathleen D. Ryan, Neena B. Schwartz, *Estrous Cycles in the Mouse: Relative Influence of Continuous Light and the Presence of a Male*, *Biology of Reproduction*, 14, 3, pp 292-299 (1976)
- 2) 岡林誠士、木村裕:概日リズムと行動に関する分析への試み(ラット)、日心第70回大会、(2006)
- 3) Shannon L Byers, Michael V Wiles, Sadie L Dunn, Robert A Taft, *Mouse estrous cycle identification tool and images*, *PLoS One*, 7, 4, (2012)
- 4) Michelle C Cora, Linda Kooistra, Greg Travlos, *Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears*, *Toxicol Pathol*, 43, 6, pp 776-93 (2015)
- 5) 株式会社医学生物学研究所、ELISAの原理と方法  
<http://ruo.mbl.co.jp/bio/support/method/elisa.html>
- 6) 九州大学附属図書館、動物実験の基礎(マウス): マウスの生活環境  
<https://guides.lib.kyushu-u.ac.jp/c.php?g=775132&p=5558113>
- 7) 佐々木義之編者:動物遺伝育種学実験法、朝倉書店(1998)
- 8) 川口ちひろ、磯島 康史、馬場 明道、動物個体を用いた概日リズム解析法、日薬理誌 (*Folia Pharmacol. Jpn.*)、130, pp 193-199 (2007)
- 9) Mari Ogura, Fuka Okuda, Atsuhiko Hattori, Wakako Takabe, Masayuki Yagi, Yoshikazu Yonei, *Effect of melatonin intake on postprandial blood glucose in the breakfast*, *Glycative Stress Research*, 5, pp 75-81, (2018)
- 10) 星野佑太、小野ひろ子、吉村崇、哺乳類の光周性におけるメラトニンの作用機構、比較内分泌学、36, 137, pp 96-101 (2010)

# Growth and estrous cycle changes of ICR female mouse under continuous light stimuli

Yuka Asano\*, Takuma Kadota\*, and Koji Matsuura\*,\*\*,

*\*Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering,*

*\*\*Department of Biosciences, Faculty of Life Sciences*

*Okayama University of Science,*

*1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

(Received October 17, 2022; accepted December 5, 2022)

Loss of periodic light stimuli to female mice induce stresses and/or change of their estrous cycle, which may affect their metabolism and reproductive function. To clarify the influence of the light stimuli to female mice, we housed ICR female mice under light cycle from 8:00 to 20:00 (LD) or continuous light stimuli (CL). Average weight of mice after 8 weeks (12 weeks age) housed under CL condition was higher than that under LD condition. In estrous cycle results, number of resting periods under CL increased compared to that under LD. We could not find significant difference of progesterone and corticosterone concentration extracted from the feces between the two groups. We consider that these phenomena under CL may be induced by decreased secretion of melatonin, and that the melatonin related stress hormone pathway may be contributed to increase weight of mouse housed under CL.

**Keywords:** ICR female mouse, continuous light stimuli, estrous cycle, ELISA, stress factor.