攻撃性および非攻撃性選抜系マウスの免疫能の比較

鈴木啓一¹・竹本美紀¹・大友由紀子¹・及川卓郎²・佐藤勝紀²・西田 朗¹

¹ 東北大学大学院農学研究科, 仙台市青葉区 981-8555

² 岡山大学農学部, 岡山市 700-8530

(2009. 7. 9 受付, 2009. 12. 18 受理)

要 約 攻撃性に関して高(H)と低(L)方向に34世代にわたって選抜されたマウス系統について、免疫能に違いがあるかどうかを明らかにするため、単飼と2匹群飼下での食細胞の活性、抗原感作による抗体産生能と臓器重量を比較した。3週齢で離乳した両系統の雄と雌をそれぞれ24匹と28匹、合計52匹ずつ用い、単飼(雄12匹、雌14匹)と2匹群飼(雄12匹、雌14匹)の2区に分けて飼育した。3, 5, 8週齢で採血し免疫能を測定し、9週齢でと殺後臓器重量を測定した。5週齢と8週齢で、L系(それぞれ43.9と68.8RUL)がH系(それぞれ31.5と46.4RUL)より有意に高い食細胞活性を示し、雄が雌より有意に高い値を示した。同様に、顆粒球数/リンパ球数割合は5および8週齢ではいずれもL系はH系より有意に高く、また、雄が雌より有意に高かった。さらに、8週齢時の顆粒球数/リンパ球数割合について、性と飼育条件の交互作用が有意となった。5週齢で1次抗原としてBCGワクチン、7週齢で2次抗原としてPPD抗原を皮下注射し、68時間後に測定した抗体産生能はH系(84.0)がL系(51.4)より有意($P < 0.05$)に高い値を示した。また、2匹群飼の抗体産生能は単飼と比べ有意($P < 0.001$)に低かった。さらに、胸腺重量について系統と飼育条件の交互作用が有意となり、H系は2匹群飼区が単飼区より比体重値が大きい、L系は2匹群飼区が単飼区より比体重値が小さかった。以上の結果から、攻撃性に関して高方向に選抜されたH系は低方向に選抜されたL系と比べ自然免疫能が低く、液性免疫である抗体産生能は高いこと、2匹群飼により抗体産生能は低下することが明らかとなった。

日本畜産学会報 81 (2), 113-120, 2010

動物の攻撃性は、家畜化にとっては邪魔な形質であり、攻撃性の高い動物は家畜化の過程で淘汰され、人間にとって都合の良いおとなしい動物のみが家畜として代々飼育されてきたと考えられる(上村と盛政1994)。内田と水間(1983)はマウスの攻撃性に関する分系育種を行い、それらのマウスを群飼すると、個体間競合が起こり、体重、副腎重量で単飼と比べ有意な差が見られ、攻撃行動により、ストレスを感じることを報告している。一方、河本ら(1993)も攻撃性(H系)および非攻撃性(L系)に関して34世代にわたる選抜を行い、攻撃性の異なるマウス系統を作出した。これらのマウスについて、攻撃行動に及ぼす飼育密度(離乳後にケージ当たり1, 3, 6, 12匹の異なる飼育密度で飼育)の影響を検討した結果、H系は個別飼育(1匹飼育)が最も高い攻撃行動を示した。これに対し、L系では個別飼育でもほとんど攻撃行動が認められなかった。この結果から河本ら(1993)は、個別飼育によるH系での攻撃行動の増加は、個体同志の闘争抑制機構の欠如が原因と判断し、選抜の結果、闘争抑制機構に遺伝的差異が生じことが示唆されたとし

ている。また、Oikawaら(2000)は、これらのマウスを高飼育密度(12匹)で25日から60日齢まで飼育した場合、H系とL系では体重の変異に差が見られ、H系で変異が大きいのは、高飼育密度による攻撃行動の抑制に起因すると報告している。これらのマウスについて脳内神経伝達物質であるセロトニンやドーパミンの違いも報告されている(盛政ら1994)。攻撃行動を受けた動物はストレス、不安などを引き起こし自律神経支配下にある免疫能にも影響すると考えられる。しかし、攻撃性と免疫能との関連を研究した報告は少なく(Azpirozら2003)、河本ら(1993)の作成した攻撃性高低選抜系マウスに関しても免疫能の比較はなされていない。免疫能には自然免疫系と獲得免疫系がある。好中球、マクロファージなどの貪食細胞とNK細胞、補体系要素と他の炎症の伝達物質を含む血漿タンパク質、自然免疫の細胞の活動の多くを制御し調整するサイトカインが主要な構成要素であるのが自然免疫系であり、Bリンパ球が産生する抗体による液性免疫とTリンパ球による感染した細胞内微生物の破壊と感染細胞の傷害促進などの細胞性免疫と呼ば

連絡者: 鈴木啓一 (fax: 022-717-8692, e-mail: k1suzuki@bios.tohoku.ac.jp)

れる2種類の型の免疫系が獲得免疫系である(松島と山田 2008)。本研究では、岡山大学で攻撃性および非攻撃性に関して34世代にわたって選抜されたマウス系統について、単飼と2匹群飼のストレスを与えた条件下での末梢血の食細胞活性、抗原感作に対する抗体産生能および免疫担当臓器重量などの系統間比較を行い、攻撃性と免疫能、さらにストレスとの関連について検討した。

材料および方法

本実験はすべて東北大学大学院農学研究科の動物実験指針規定に従って行った。

1. 攻撃性および非攻撃性マウスの攻撃性および運動量の比較

供試したマウスは、4近交系を基礎集団として河本ら(1993)により攻撃性と非攻撃性に関して20世代以上にわたって選抜された攻撃性(H)系と非攻撃(L)系のマウスである。攻撃性の選抜のため、BALB/C, C57BL/6, C3H/He, DBA/2の4近交系マウスの4元雑種を選抜基礎集団とした。攻撃性の試験は雄のみを用いて7週齢時にいき、同じ週齢のddY系マウスを対戦相手として1:1で5分間対戦させ、その間の攻撃行動を測定した。選抜はF-スコア(個体ごとの頻度指数)に従って行われた。F-スコアは高い攻撃性を示す行動(0点:相手に対して何ら関心を示さなかった場合, 1点:10秒未満相手を嗅ぐ行動を示した婆, 2点:10秒以上相手を嗅ぐ行動を示した場合, 4点:10秒以上相手を噛んで攻撃した場合, 5点:相手を激しく攻撃し出血させた場合の6段階)に基づいている。この選抜は34世代まで行われ、その後は数年間、各系統内でランダム交配により岡山大学動物実験施設で維持されていた。このマウスを東北大学大学院農学研究科動物実験施設に導入し、実験に供した。なお、選抜を終了した34世代での近交係数は、H系が68.2%, L系が67.1%であり、その後、集団のサイズを雄15匹、雌15匹で維持している。選抜実験では、人為選抜を中止した場合、自然選抜により選抜反応と逆の方向への反応が観察される場合がある(FalconerとMackay 1996)。そこで、はじめに攻撃性に関して系統間に差があるかどうかを確認した。攻撃性試験の方法は、選抜で用いられたのと同じ方法(河本ら 1993)で行った。ただし、対戦相手は、選抜試験のddY系ではなく、攻撃性高と低系統を戦わせることとした。なお、雌では、攻撃性行動は見られないので、雄のみ各系統10腹から各1匹ずつの計10匹で合計20匹を用いて行った。まず、攻撃系(H系)から1匹、非攻撃系(L系)から1匹を同じケージに入れ、5分間群飼させ、選抜実験と同じF-スコアを評価した。この作業を1日1回、日時を違えて計2回行い各個体の平均値を得た。

2. 攻撃系および非攻撃系マウスの飼育方法と免疫能との関連

攻撃系および非攻撃系マウスの免疫能の比較には、両系統の雄と雌マウスを用いた。出生後3週齢で離乳させ、群飼による飼育条件下での免疫反応の違いを見るため離乳後は単飼と2匹群飼の条件に置いた。群飼区は、いずれも同系統の異なる腹から生まれた同性同士の群飼とした。両系統の性と試験区ごとの匹数は以下の通りである。H系は単飼区雄12匹、雌14匹、群飼区は雄12匹(6ペア)、雌14匹(7ペア)の合計52匹、L系も単飼区雄12匹、雌14匹、群飼区は雄12匹(6ペア)、雌14匹(7ペア)の合計52匹である。

マウスの飼育はすべて、東北大学農学部動物飼育実験棟小動物飼育室で行った。飼育環境条件は以下の通りである。室温は $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は無調整である。照明は午前7時から午後7時までの12時間点灯(85ルクス)である。さらに、換気は1時間に10回となっている。動物棟では飼育実験室ごとに1年に1回、6種類の病原体(Mouse hepatitis virus, Sendai virus, Tyzzer's organism, Salmonella spp, Corynebacterium kutscheri, Mycoplasma pulmonis)に対する抗体検査を行い、感染の有無を調べている。この結果、飼育期間中、どの病原体に対する抗体も検出されていない。

マウスは、アルミニウム製ケージ(縦30cm×横17cm×高さ11cm)に高圧滅菌した木のチップを床敷きとして、飼育した。床敷きの交換、およびケージの洗浄は週に1度、行った。餌入れと水のみも週1度、洗浄と消毒を行った。飼料はオリエンタル酵母株式会社のマウス・ラット・ハムスターの飼育用飼料を用いた。ただし、交配から妊娠、離乳(3週齢)までは、オリエンタル酵母株式会社のマウス・ラット・ハムスター用の繁殖用飼料を用いた。飼育用と繁殖用飼料の粗蛋白質、粗脂肪、粗灰分、粗繊維および可溶性無窒素物の割合は、それぞれ23.6, 5.3, 6.1, 2.9および54.4%と27.8, 4.9, 7.7, 4.4および48.4%である。また、カロリー含量はそれぞれ3.6 kcal/gと3.49 kcal/gである。水は自由摂取とした。

3. 免疫能の測定

3.1 食細胞活性の測定

末梢血中の食細胞活性をケミルミネッセンス法により測定した。ケミルミネッセンス法は、食細胞が異物であるザイモザンを貪食する際に放出する活性酸素種の発光をルミノールで増幅し、測定する方法である。各系統のマウスについて3, 5, 8週齢の各時期に各個体から尾静脈より採血した。採血後の血液10 μL を培地990 μL (E-MEMにL-グルタミン, 10% NaHCO₃, HEPESを加えて調整)で100倍希釈し、低温で保存しつつ速やかに測定した。希釈したサンプルを白色のマイクロプレートに100 μL /well加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で2分間静置した。ルミノール(純水50 mLに5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-pyridazin-3(2H)-one

100 mg とトリエチルアミン 50 μ L を加えて調整) を 20 μ L/well 加え、10 分間発光量を測定して上昇しないことを確認した後、ザイモザン (10 mg/mL, 1 g を 100 mL の生理食塩水で希釈、オプソニン化した後、HEPES, E-MEM を加えて調整) を 10 μ L/well 加え、1 時間発光量をマイクロルーマット LB96P (EG&G BERTHOLD 社製、東京) で測定した。経時的に描かれた発光量の積分値を発光総量 (RLU) とし、1 個体につき 2 回測定してその平均値をケミルミネッセンスによる食細胞活性の強さとして評価した。

3.2 顆粒球数/リンパ球数割合

3, 5, 8 週齢時期に各マウス個体の尾静脈から採血し、3 μ L をスライドガラス上に塗抹、乾燥させたものを染色液 (国際試薬株式会社製) でディフ・クイック染色し顕微鏡下で白血球をカウントした。白血球はリンパ球、好中球、好酸球、好塩基球、単球に分類して 100 個、1 個体につき 2 枚のスライドガラスから計 200 個測定し、顆粒球数 (好中球、好酸球、好塩基球) とリンパ球数の割合を算出した。顆粒球の大部分を占める好中球は食細胞であり、顆粒球数/リンパ球数割合は食細胞活性など自然免疫の指標として採用した。

3.3 抗体産生能の測定

抗体産生能は抗原を二度接種し、抗原に対する特異的抗体産生能を測定した。すなわち 5 週齢で 1 次抗原として凍結乾燥させた BCG ワクチン (日本 BCG 製造株式会社、東京) 40 mg を生理食塩水 10 mL に溶解したものを、7 週齢で 2 次抗原として PPD 抗原 (日本 BCG 製造株式会社、東京) 500 μ g を滅菌生理食塩水 0.5 mL に溶解したものを、いずれも皮下注射し、その 68 時間後に尾静脈より採血した。採血した血液は遠心分離後、分析まで -80°C で凍結保存した。抗体産生能の測定は以下の通りである。抗原と同様の手順で調整した PPD 溶液 0.45 mL を PBS 19.5 mL で希釈し、96 ウエルプレートに 100 μ L ずつ加え、 30°C で 2 時間培養する。その後 PPD を除き、PBS Tween で 3 回洗浄したプレートに Block Ace (DS フォーマバイオメディカル、大阪) を 200 μ L ずつ加え 2 時間培養する。培養後、同様に 3 回洗浄したプレートに

スタンダードとサンプルを 100 μ L ずつ加え、 30°C で 2 時間培養する。培養後、前述と同様に 5 回洗浄し、アルカリフォスファターゼでラベルした抗マウス IgG+IgM+IgA ヤギ抗体 (KLP, Gaithersburg, 米国) を Block Ace で 2000 倍希釈して 100 μ L ずつ加え、 5°C で 24 時間培養した。培養後、PBS Tween で 5 回洗浄し、調整した酵素基質を加えたプレートを遮光して室温で 30 分静置し、マイクロプレートリーダーを用いて 405 nm の波長で、15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 分まで経時的に吸光度を測定した。得られたデータのうち 150 および 180 分後のデータを用いた。なおスタンダード血漿には予め、サンプルマウスと同様に抗原を 2 度接種したマウスから麻酔下で心臓採血し、遠心分離した血漿を Block Ace で希釈して用い検量線を作成した。得られたデータを検量線に当てはめて濃度を推定した。

3.4 総白血球数と赤血球数の測定および臓器重量の測定

9 週齢マウスの尾静脈よりヘマトクリット毛細管を予め凝固剤を塗布して採血し、冷蔵保存した。希釈液 10 mL に血液 10 μ L を加え、よく攪拌後、さらに希釈し、溶血剤を加え、よく攪拌した。その後、総白血球数および赤血球数について自動血球測定装置 (Celltac MEK-4100; NIHONKOH DEN 社製、東京) を用いて測定した。採血したマウスは頸骨脱臼により屠殺し、肝臓、脾臓、胸腺、副腎重量を測定し、体重に対する比体重値を計算した。

4. 統計処理

食細胞活性、顆粒球数/リンパ球数割合、抗体産生能、総白血球数について、系統、性、飼育条件とそれぞれ二つの要因の交互作用を含むモデルの分散分析を SAS の PROC GLM を用いて行った。また、運動量、攻撃性については、系統間の比較を行った。

結 果

1. 攻撃性および非攻撃性選抜系マウスの攻撃行動および運動量

攻撃行動、運動量の系統間比較の結果を表 1 に示した。1 回目、2 回目の両方で H 系が L 系よりも有意に高

Table 1 F-score and locomotion score of the mice selected for high and low aggressiveness

Traits	Trial	Line	
		H	L
F-score	First	3.3 $\pm$ 0.4*	2.1 $\pm$ 0.4 ¹⁾
	Second	3.7 $\pm$ 0.3**	1.7 $\pm$ 0.3
Locomotion score cm		665.2 $\pm$ 37.5***	321.5 $\pm$ 37.5

¹⁾ Mean $\pm$ SD

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

いスコアであった。攻撃試験の際、両系統のマウスを同じケージに入れると、H系はケージの中を動き回り、かつ、ケージの外を見るように伸び上がる行動が多く見られた。一方、L系はケージの片隅でじっとし、ケージの側面に沿って移動する様子が観察された。攻撃試験の際、L系はH系のマウスに攻撃されても反撃せず、一方的に攻撃され、鳴く様子が観察された。におい嗅ぎ行動においても、L系は積極的に嗅ぎにいく行動ではなく、相手が接近したので嗅ぐといった消極的で、追跡行動もほとんど観察されなかった。5分間の攻撃試験の際、ビデオ撮影を行い、ケージを縦、横、対角線の距離の移動距離を記録した。そして、2回の試験で動いた距離の合計を運動量とした。その結果、系統間で有意な差が認められ、H系がL系の約2倍の運動することが明かとなった。以上の結果より、攻撃性に関して34世代選抜後、系統内で無作為交配、自然選抜により数年間維持されてきたH、L系統間に攻撃性の違いが存在することが確認され、さらに、H、L系統間には行動活動においても差があることが明らかになった。

2. 攻撃性および非攻撃性マウスの免疫能および内臓の比体重値の比較

表2には3、5および8週齢時の末梢血中の食細胞活性と顆粒球数/リンパ球数割合、BCGに対する抗体産生能、総白血球数と総赤血球数について、系統、性および飼育方法に関する分散分析の結果と、要因ごとの最小自乗平均値を示した。食細胞活性についてみると3週齢時では系統間差は認められなかったが、5週齢、8週齢時点ではL系がH系より有意に高い値を示した。また、3週齢時点では性間差が認められなかったが、5週齢、8週齢時点では雄が雌より有意に高い値を示した。3週齢時点で群飼が単飼よりも有意に高い食細胞活性値となった。しかし、5、8週齢時点では群飼と単飼間に有意差は認め

られなくなった。次に末梢血中の顆粒球数/リンパ球数割合では、3週齢時点では、系統、性において有意な差が認められなかったが、5週齢および8週齢時点ではL系がH系より有意に割合が高かった。また、雄が雌より有意に割合が高かった。さらに、8週齢時点での顆粒球数/リンパ球数割合において性と飼育条件の交互作用が有意となった。これは、雄では2匹群飼の時よりも単飼の時の値が有意に高く、一方、雌では単飼よりも群飼育の時の値が高かったためである。抗体産生能についてみると、系統の効果は5%水準で有意であり、H系がL系より高かった。また、飼育条件の効果も有意であり、2匹群飼により単飼と比べ有意に低い値を示した。総白血球数では系統と性の効果が有意であり、L系がH系より有意に多く、雌が雄より有意に多かった。最後に、赤血球数では飼育条件の効果が有意であり、単飼が群飼より有意に多かった。

表3には試験が終了した8週齢時点での殺したマウスの脾臓、胸腺、肝臓および副腎重量の比体重値を示した。H系はL系と比較し脾臓が有意に大きく胸腺は小さい。また、雌はH系、L系ともに雌が雄より脾臓、胸腺および副腎が有意に大きかった。さらに、単飼区が2匹群飼区よりも脾臓と肝臓が有意に大きかった。胸腺について、系統と飼育条件の交互作用が有意であり、H系では2匹群飼区が単飼区より大きな胸腺の比体重値だったが、L系では2匹群飼区が単飼区より小さくなり、胸腺の萎縮が示された。

考 察

1. 免疫能の系統間差

本実験では、マウスを単飼と2匹群飼の条件下で飼育し免疫能を調べた。群飼の場合、居住者と侵入者の関係を作らないように新たなケージにそれぞれ別の腹からの

Table 2 Least square means for immune traits by line, sex and condition and the statistical significance for their interactions

Traits	Age	Line (L)		Sex (S)		Condition (C)		Interaction		
		H	L	Male	Female	Single	Twin	L*S	S*C	L*C
Phagocyte activity $\times 10^4$ RLU	3w ²	17.2	19.7	18.6	18.3	12.3	24.6***	NS	NS	NS
	5w	31.5	43.9***	40.9*	34.4	37.9	37.5	NS	NS	NS
	8w	46.4	68.8**	66.0*	49.1	56.4	58.8	NS	NS	NS
GLR ¹	3w	0.43	0.49	0.46	0.47	0.46	0.46	NS	NS	NS
	5w	0.38	0.54***	0.50*	0.42	0.47	0.45	NS	NS	NS
	8w	0.48	0.65*	0.64*	0.5	0.59	0.55	NS	*	NS
IgG Titer	7w+2d	84.0*	51.4	61.7	73.7	99.2***	36.2	NS	NS	NS
Number of WBC/ μ L	9w	8403	9728*	8295	9837*	9623	8508	NS	NS	NS
Number of RBC $\times 10^4$ / μ L	9w	938.9	838.1	871.8	905.3	951.2*	825.9	NS	NS	NS

¹ Ratio of granular leukocyte to lymphocyte

² weeks of age

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Table 3 Least square means for organ weight traits by line, sex and condition and the statistical significance for their interactions

Traits	Line (L)		Sex (S)		Condition (C)		Interaction		
	H	L	Male	Female	Single	Twin	L*S	S*C	L*C
Spleen mg/g	5.48*	5.01	4.48	6.00***	5.46*	5.02	NS	NS	NS
Thymus mg/g	1.48	1.97***	1.51	1.94**	1.71	1.74	NS	NS	*
Liver g/g	5.2	5.11	5.07	5.24	5.32*	4.99	NS	NS	NS
Adrenal mg/g	0.28	0.23	0.19	0.32***	0.25	0.26	NS	NS	NS

¹ Each figure shows percentage of organ weight to body weight.

² $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

マウスを同時に同居させる方法とした。また、H系、L系とも2匹群飼区の2個体のマウス間で優劣関係は観察されず、両者の行動に差が認められないことから、同一ケージの2匹のデータを同様の処理区のデータとして扱った。その結果、攻撃性に関して高方向に選抜されたH系は、低方向に選抜されたL系と比べ、3週齢を除く5および8週齢でいずれも自然免疫の指標である食細胞活性と顆粒球数/リンパ球数割合は有意に低く、一方、液性免疫の抗体産生能はH系がL系より有意に高い ($P < 0.05$) 結果が得られた。

近年、免疫担当臓器である胸腺やリンパ組織などには自律神経の末端が届いており、免疫能が自律神経の刺激を受けていることが明らかにされている (Chrousos 1995)。免疫を調節する機序として、交感神経系と視床下部-下垂体-副腎系が密接に関連している。ほとんどのリンパ組織は直接、交感神経支配を受けており、リンパ組織を通過する血管を通して、リンパ球に対して神経支配が行われている (足立と佐藤 1993)。本研究に供試した攻撃性高に選抜されたH系統マウスは、行動性と運動の比較観察で見られたように行動が活発であり、絶えず周囲に注意を払うと思われる行動を示したが、L系は動きが少なく、ケージの隅にうずくまっている行動を示した。L系は、H系よりもストレスを感じやすく、交感神経優位となり、顆粒球数/リンパ球数割合が高くなり、それによって、末梢血中の食細胞活性も上昇したと考えられる。L系の総白血球数がH系より有意に多いことも食細胞活性が高い原因の一つと思われる。Petittoら (1999) は、ICR系マウスから攻撃性を選抜指標として高低方向に31世代選抜された系統について、単飼、系統内群飼、系統間群飼の条件で飼育後、脾臓リンパ球のNK細胞障害活性を比較した。その結果、雄雌の性と飼育条件のNK細胞障害活性に及ぼす影響は有意でなく、系統の効果だけ有意であり、飼育条件と性にかかわらず、攻撃性高系統が低系統よりNK細胞障害活性が高いことを報告している。NK細胞障害活性は自然免疫機能に分類されるが、Petittoら (1999) は脾臓リンパ球を対象としている。

本試験では末梢血の自然免疫と獲得免疫能を測定しているので、脾臓と末梢血とは異なる可能性もある。

一方、骨髄由来リンパ球であるB細胞が作る抗体産生能はL系がH系より有意に劣る結果となった。ストレスに伴い放出されたコルチコイドなどの副腎皮質ホルモンにより、一般にB細胞による抗体産生などの液性免疫が低下する (Salak と McGlone 2007)。L系はストレス感受性が高く、副腎ホルモンなどの分泌により液性免疫が抑制されたと考えられる。また、Azpirozら (2003) は、攻撃行動、免疫能活性と疾病感受性との関連研究をまとめた総説の中で、攻撃性の劣るマウスやラットは攻撃性の優れる個体と比較するとSRBC特異的IgG量は低下し (Beden と Brain 1982 ; Bohusら 1993)、攻撃試験で敗北回数が増加するにつれて液性免疫低下が促進されること (Beden と Brain 1982) を紹介している。家畜の豚でも攻撃性に優れた豚が劣る豚よりも免疫グロブリンの生産が増加することが報告されている (Tuchschererら 1998)。本試験で得られた攻撃性低方向に選抜されたL系が高方向へ選抜されたH系よりSRBC特異的IgG量が低い結果は、これらの報告の内容と一致する。

攻撃性低方向に選抜されたL系は、ストレス感受性系統と考えるとむしろ胸腺重量はH系より小さいことが予想されたが、胸腺重量はL系の比体重値がH系より有意に大きかった。攻撃性に関する選抜が相関反応として胸腺重量の差を引き起こしたと思われる。このことから胸腺で分化する細胞性免疫のヘルパーT細胞やキラーT細胞などの細胞性免疫は、L系がH系より高い可能性が考えられる。ヘルパーT細胞やキラーT細胞の指標となるCD4⁺、CD8⁺の割合などの比較が必要と思われる。

免疫能全般と攻撃性との関係は、生体のエネルギーバランス (消費か蓄積か) の観点から免疫系だけでなく、自律神経系も含めたすべての生体調節の点から考察することが重要であることが指摘されている (Azpirozら 2003)。攻撃性高系統マウスは、攻撃行動に優れた (高) 系統で、本実験でも観察されたように絶えず周囲に注意を払い運動も活発なために筋肉運動に全体のエネルギーの多くを

消費あるいは消費する可能性が高いと思われる。そのため、自然免疫能は通常は低く抑えている。しかし、いざ、異物等が進入した際は液性免疫能を活性化させる能力を保持している。一方、攻撃性低系統マウスは、ストレス感受性が高く、自然免疫系の食細胞活性が高く維持されているため、行動学的にも動きが鈍いのかかもしれない。

2. 飼育条件が免疫能に及ぼす影響

試験開始の3週齢時、H系とL系の雄、雌ともに、単飼区よりも2匹群飼区では一時的に有意に食細胞活性が高くなった。山田ら(1989)は、あらかじめ頸動脈留置カテーテルを外科的に装着した子豚から鼻保定採血を行い、各種血液成分に及ぼす影響を検討した結果、保定25分後の血漿中コルチゾール濃度、60分後の急激な好中球の増加とリンパ球や好塩基球や好酸球の減少を確認している。3週齢の試験開始時点ではマウスを同居後に採血して測定したが、2匹群飼により一時的にストレスを受けこれが好中球やマクロファージによる食細胞の活性を高めたと考えられる。しかし、5、8週齢時点では群飼と単飼間に有意差は認められなくなったことから、同居に慣れるに従い食細胞活性は単飼と同じ程度になったと考えられる。

試験開始の3週齢を除いて食細胞活性は単飼と2匹群飼条件では差が認められなく、抗体産生能は両系統とも単飼が2匹群飼条件よりも高い結果が得られた。また、系統と飼育条件の交互作用は有意ではないので、両系統とも飼育条件が免疫能に及ぼす影響は同じように作用していると考えられる。このことは、他個体との同居が、系統に関係なく抗体産生能を低下させたと考えられる。この結果から、2匹群飼は食細胞活性には影響しないが、獲得免疫能の液性免疫能には影響することが示唆された。一般に、ストレス下や緊張状態では交感神経が優位に働き、顆粒球などの自然免疫は交感神経の支配下にあるので増加する。また、ストレスは視床下部-下垂体-副腎系から副腎皮質刺激ホルモン、副腎ホルモンのコルチコイドの分泌を促し、胸腺を萎縮させTリンパ球の成熟を妨げるなど免疫応答を抑制する(安保2001)。離乳直後からの2匹群飼がマウスにとってどの程度のストレスなのかどうかは、本実験ではストレスの生理的指標を測定していないので判断できないが、本実験の場合、約5週間の群飼が相対的には穏やかな慢性ストレスとなり、獲得免疫能の発現に影響をもたらしたと思われる。

胸腺重量について、系統と飼育状況の交互作用が有意であり、H系の単飼区(0.13%)は2匹群飼区(0.16%)より有意に小さく、L系は2匹群飼区(0.18%)が単飼区(0.21%)より小さいことが原因だった。このことは、L系では2匹群飼のストレスにより胸腺が萎縮したことが示唆されるが、H系では2匹群飼によりむしろ胸腺重量は増加することから系統によりストレスの感じ方に差があることが示唆される。本実験の結果では、H系はむしろ

単飼の方がストレスと同じ作用をもたらす胸腺を萎縮させたと考えられる。しかし、H系でも2匹群飼の方が単飼よりも液性免疫の抗体産生能が低下しているので、矛盾が生じる。H、L系統ともに2匹群飼により単飼と比べ抗体産生能低下していることからストレスにより液性免疫能は同じように低下したと考えられる。そして、L系は2匹群飼により単飼と比べ胸腺重量が減少したことから細胞性免疫も低下したと考えられる。一方、H系は2匹群飼が単飼区より胸腺重量が増加したことから細胞性免疫は活性化された可能性が高いと考えられる。つまり、両系統は飼育条件によって細胞性免疫能が異なる反応を示すことが示唆されるのである。異なる飼育条件下での両系統の細胞性免疫能の比較が課題となる。

3. 顆粒球数/リンパ球数割合について性と飼育条件の有意な交互作用

8週齢時点での顆粒球数/リンパ球数割合について、性と飼育状態との交互作用が有意となった。これは、雄では単飼が群飼より高い傾向だが、雌では群飼が単飼より高い傾向だったためである。図1に、3、5および8週齢時における顆粒球数/リンパ球数割合について、雄と雌の単飼と群飼ごとに示した。5週齢から8週齢までの変化を見ると、雄は単飼と比べ、群飼での顆粒球数/リンパ球数割合が低下し、逆に雌は、群飼が単飼よりも上昇した。de Grootら(2001)は、ブタについて、混合飼育による社会的ストレスが免疫能に及ぼす影響を検討した結果、コントロールの単飼と比べ免疫能が抑制されるが、雌では免疫能は変化しないことを報告している。また、StefanskiとGruner(2006)は、ラットを用い、2時間の攻撃ストレスを与えたときの雄と雌の免疫能を調べた。その結果、ストレスを受けた雄は対照区より顆粒球数が増加し、雌では変化しなかった。同様に、ストレス

Figure 1 Change of phagocyte activity and the ratio of granular leukocyte to lymphocyte of male-single (—■—), male-group (---□---), female-single (—●—) and female-group (---○---) at 3, 5 and 8 weeks of age.

を受けた雄は、ストレスを受けた雌よりも食細胞の活性が高かったことを報告している。本実験では、3週齢から8週齢までの5週間にわたる長期のストレスだが、一方、StefanskiとGruner(2006)の実験は、侵入ラットに対して攻撃的な居住ラットを2時間同居させた後、侵入ラットから採血して免疫能を測定するなど、短時間の心理的社会ストレスを課している。ストレスの種類が異なる可能性があるものの、本実験の結果は、雄と雌の違いにより単飼か2匹同居の群飼による心理社会ストレスが明らかに免疫能に異なる影響を及ぼすことを示唆している。

以上、本研究では、攻撃性に関して高低に選抜されたマウスについて、5週間の2匹群飼のストレスを与えた場合と、単独飼育下での免疫能を比較検討した。その結果、飼育期間の経過とともに攻撃性の劣るL系が攻撃性の優れるH系より食細胞活性が高いこと、抗原接種に対する抗体産生能については逆にH系がL系より高く、攻撃性に関する選抜がその相関反応として異なる免疫応答の系統となっていることが明らかとなった。また、2匹群飼の比較的緩やかな同居ストレスが抗体産生能を低下させることも明かとなった。ストレスは食細胞の活性を高めることから、攻撃性低系統は、絶えずストレスに対する感受性が高いため食細胞の活性が絶えず高く維持されており、一方、攻撃性高系統のマウスは、相対的にストレスに対する感受性が低いため食細胞の活性は低く維持されていると考えることができる。さらに、胸腺重量の変化から推察される細胞性免疫は系統により飼育条件の影響が異なることが示唆された。今後、飼育条件を変えて細胞性免疫や内分泌、各種サイトカインの応答の比較をすることで、攻撃性と免疫能との関連をさらに明らかにすることが必要と思われる。

文 献

- 足立健彦, 佐藤昭夫. 1993. 免疫と自律神経. 東京女子医科大学雑誌 **63**, 26-32.
- 安保 徹. 2001. 絵でわかる免疫. 講談社, 東京.
- Azpiroz A, Garmendia L, Fano E, Sanchez-Martin JR. 2003. Relations between aggress behavior, immune activity, and disease susceptibility. *Aggression and Violent Behavior* **5**, 433-453.
- Beden SN, Brain PF. 1982. Studies on the effects of social stress on measures of disease resistance in laboratory mice. *Aggressive Behavior* **8**, 126-129.
- Bohus B, Koolhaas J, Heijnen CJ, de Boer O. 1993. Immunological responses to social stress Dependence on social environment and coping abilities. *Neuropsychobiology* **28**, 95-99.
- Chrousos GP. 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England Journal of Medicine* **332**, 1351-1362.
- de Groot J, Ruis MAW, Scholton JW, Koolhaas JM, Boersma WJA. 2001. Long-term effects of social stress on antiviral immunity in pigs. *Physiology & Behavior* **73**, 145-158.
- Falconer DS, Mackay TFC. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4th edn. pp. 233-235. Longman, England.
- 河本泰生, 盛政忠臣, 長尾淳二, 庄盛敏廉. 1993. マウスにおける攻撃性の高, 低への選抜効果. *Neuroscience* **19**, 1-4.
- 松島綱治, 山田幸宏 (監訳). 2008. 分子細胞免疫学 原書第5版. pp. 4-6. エルゼビア・ジャパン, 東京.
- 盛政忠臣, 金行孝雄, 長尾淳二, 上村尚人, 河本泰生, 庄盛敏廉. 1994. 攻撃行動に関するモデル動物の作成および攻撃行動に対するセロトニン神経系の関与. *Neuroscience* **20**, 213-216.
- Oikawa T, Kawamoto Y, Nakamura S, Morimasa T, Sato K. 2000. Body weight of high and low aggression mice under various population densities. *Journal of Applied Genetics* **41**, 35-42.
- Petit JM, Garipey JL, Gendreau PL, Rodriguiz R, Levis MH, Lysle KT. 1999. Difference in NK cell function in mice bred for high and low aggression : Genetic linkage between complex behavioral and immunological traits? *Brain, Behavior, and Immunity* **13**, 175-186.
- Salak JL, McGlone JJ. 2007. Making sense of apparently conflicting data : Stress and immunity in swine and cattle. *Journal of Animal Science* **85**, E81-E88.
- Stefanski V, Gruner S. 2006. Gender difference in basal and stress levels of peripheral blood leukocytes in laboratory rats. *Brain, Behavior, and Immunity* **20**, 369-377.
- Tuchscherer M, Puppe B, Tuchscherer A, Kanitz E. 1998. Effects of social status after mixing on immune, metabolic, and endocrine responses in pigs. *Physiology & Behavior* **64**, 353-360.
- 内田 宏, 水間 豊. 1983. マウスの攻撃性に関する分系育種. 日本畜産学会報 **54**, 439-446.
- 上村尚人, 盛政忠臣. 1994. 実験動物の攻撃性モデルとセロトニン神経系の関与. 日本神経精神薬理学雑誌 **14**, 1-8.
- 山田稻生, 高橋秀之, 大石浩之. 1989. 子豚における鼻保定採血の各種血液成分に及ぼす影響. 日本獣医師会雑誌 **42**, 855-858.

Comparison of immunity of the mice selected for high and low aggressiveness

Keiichi SUZUKI¹, Miki TAKEMOTO¹, Yukiko OHTOMO¹, Takuro OIKAWA²,
Katsunori SATO² and Akira NISHIDA¹

¹ Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aoba, Sendai 981-8555, Japan

² Faculty of Agriculture, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan

Corresponding : Keiichi SUZUKI (fax : +81 (0) 22-717-8692, e-mail : k1suzuki@bios.tohoku.ac.jp)

The immunity of the mice that had been selected for high and low aggressiveness over 34th generation were compared under single and group housing. Mice were weaned at 3 weeks of age and 24 males and 28 females (total 52 mice) from each line were used for single (12 males, 14 females) and 2 group housing (12 males, 14 females) group. Blood were collected at the 3, 5 and 8 weeks of age and the immunity was measured. The phagocyte activity of L lines of mice at 5 and 8 weeks of age (43.9 and 68.8 RUL) showed significantly higher than that of H line (31.5 and 46.4 RUL). In addition, the ratio of granular leukocytes to lymphocytes of L line higher than that of H line, and also that of male was higher than females at each age. At 5 and 7 weeks of age, BCG vaccine and PPD antigen was hypodermic injected as the first and second antigen, respectively, and after 68 hours, blood was collected and the antibody value was measured. H line (84.0) was significantly ($P < 0.05$) higher in the antibody production than L line (51.4). Moreover, antibody production of the group housing mice was significantly ($P < 0.001$) lower than single housing mice. Significant Line×housing interaction suggest that H line had large thymus weight in 2 group than single housing but L line had small thymus weight in 2 group than single housing. These results suggest that the H line selected for high aggressiveness was lower natural immunity and higher acquired immunity than L line, and the mice of group housing decreased acquired immunity compared with single housing.

Nihon Chikusan Gakkaiho 81 (2), 113-120, 2010

Key words : aggressiveness, immunity, mice.