実験技術

マウス排尿機能の無麻酔・無拘束・昼夜連続測定法

山本 巖, 甲斐菜穂子, 白崎 哲哉, 副田二三夫, 高濱 和夫

要約: 排尿障害は、超高齢化社会を迎え患者数が増加の一途をたどっている疾患である。しかしながら、排尿障害治療薬の開発は他分野に比べて遅れている。その一因として、排尿機能に関する基礎研究の遅れがあり、排尿障害治療薬の薬効評価系を含む実験手法が十分開発されていないことが挙げられる。その実験手法の一つに、無麻酔・無拘束の動物を用いた昼夜連続の排尿活動測定があり、これまでラットにおいてはよく検討されてきたが、マウスの微量な尿を正確に測定することは困難であり、未だ数報の報告にとどまっている。そこで、我々は既報の問題点を考慮し、これらとは独立して、マウスにおいて昼夜連続して排尿活動を記録できる新しい方法を開発した。この新規測定システムは、マウス用代謝ケージの下に採尿用のロートを設置せず、尿と糞を天秤上にセットしたプレート上に直接落下させ、その重量をコンピューターで処理するというものである。ここまでは既報に見られるが、我々の方法は尿のデータのみを抽出するためのソフトウェアを独自に開発し、これにより以下の詳細な解析が可能になったことが特徴である。1 回ごとの排尿量、排尿時刻および排尿回数を昼夜にわたって正確に測定できることに加え、これまで評価が困難であった、1 回の排尿における尿重量の経時的推移や 1 回の排尿にかかる時間、1 回の排尿における排尿速度が測定できるようになった。また、24 時間以上連続した測定が可能であるため、12 時間交替の明暗サイクル下において、マウスの活動時間帯である暗時間に排尿活動のピークがくる日内変動をとることが見出せた。さらに、1 回の排尿の初期速度が雌雄のマウスで違うことなど、排尿機能における雌雄差も見出せた。本システムは、遺伝子改変動物や病態モデル動物を用いた測定や薬効評価への応用が期待され、今後の研究に広く貢献すると

考えられる。

1. はじめに

WHO は、21 世紀に克服すべき三大疾患として、認知症、骨粗しょう症に加えて排尿障害を掲げている。排尿障害には、過活動膀胱に際して見られる頻尿や尿失禁など様々な症状があるが、いずれに対しても臨床的に十分満足いく治療薬はないといってよい。このために患者の QOL を著しく損ない高齢者における不満足度が高い疾患の一つである (1)。優れた治療薬の開発が遅れている原因の一つとして、排尿機能に関する基礎研究の遅れがあり、正常動物や病態モデル動物における排尿機能やそれに対する薬効評価系の構築が十分でないことが挙げられる。ところで、排尿機能は、尿を膀胱に蓄積する蓄尿反射系と、膀胱にたまった尿を排泄する排尿（排出）反射系およびそれらを調節している脳・脊髄の蓄尿・排尿反射中枢の働きによって行われている。これらの機能の表現型としての排尿活動は、ストレスや精神的な影響を受けやすく、昼夜で異なっている。従って、昼夜連続して排尿活動を記録し、病態や薬物の効果を評価することは、治療薬開発の上で重要と言える。特に、排尿機能を分子レベルで詳細に解析していくためには、遺伝子の導入やノックアウトなどの手法は必要で、この場合、マウスの排尿活動を無麻酔無拘束下で昼夜連続で記録できる方法の開発は不可欠である。

そこで、我々は無麻酔・無拘束の動物を用い、数日間以上に亘り昼夜連続で自動的に自然な排尿活動を計測する方法の開発を試みた。本稿では、まず排尿機能およびそれに対する薬効評価の実験系の現状と問題点に触れ、次に我々が開発した新規排尿活動測定システムについて概説する。

キーワード：無麻酔・無拘束・昼夜連続、マウス、排尿活動、1 回排尿時間、排尿速度
 熊本大学 大学院医学薬学研究部 環境分子保健学 (〒862-0973 熊本市大江本町 5-1)
 E-mail: takahama@gpo.kumamoto-u.ac.jp 原稿受領日：2009 年 3 月 2 日、依頼原稿
 Title: A novel method of sequential urine collection and recording in freely moving mice
 Author: Gen Yamamoto, Nahoko Kai, Tetsuya Shirasaki, Fumio Soeda, Kazuo Takahama

2. 排尿機能および薬効評価の実験系の現状と問題点

これまで、動物における排尿機能の測定法としては、大別して二つの手法がとられてきた。第1は、1881年に Mosso および Pellacani により考案された膀胱内圧測定法（シストメトリー）である。これは膀胱内に生理食塩水または空気を持続的に注入し、その注入量と膀胱内圧との関係を記録するもので、その後多くの研究者によって改良が加えられてきた(2)。第2は、1975年に加世田ら(3)により初めて報告された等容量性膀胱収縮測定法で、尿道を結紮し、尿が膀胱外へ排出することを防いで膀胱のみの律動的な収縮を記録するものである。これらは、主に排尿（排出）反射を反映した実験モデルとして薬効評価によく用いられている。しかし、これらの手法は、排尿機能の変化を数日間あるいはそれ以上連続して測定することができない。また、これらの方法は、ふつう麻酔下や拘束下に行われるために、それらの影響が避けられない。さらに、膀胱内に強制的に生理食塩水を注入して排尿機能を測定しているため、自然な排尿活動の記録とは言い難い。

ところで、動物の排尿活動の無麻酔、無拘束下での記録は、ラットを用いて、また一部マウスを用いても行われてきた。しかし、主にラットを用いて代謝ケージで排尿量を測定する方法(4-7)は、一定時間間隔で溜まった尿の量を測定するもので、1回ごとの排尿量やその排尿量の経時変化、排尿した時間、単位時間当たりの排尿回数など詳細なパラメーターを正確に測定することは難しい。これまで、マウスの排尿活動を無

麻酔、無拘束下で検討したものとして、Wood らの報告がある(8)。彼らは、尿を天秤上にセットしたプレート上に直接落下させ、その重量をコンピューターで処理することにより測定しているが、1回の排尿の持続時間や、1回の排尿における時間当たりの排尿量、すなわち排尿速度は測定できていない。その後、同グループは落下する尿をカメラで測定し、それをコンピューターで処理することにより尿量を測定する方法を発表(9)しているが、この方法でも排尿速度は測定されていない。他に、2005年の Chen らの報告(10)や2008年の Lin らの報告(11)があるが、いずれも1回の排尿時間や排尿速度は測定されていない。我々はこれらとは独立して、マウスの1回の排尿時間や排尿速度も容易に記録できる、無麻酔、無拘束下で昼夜連続して排尿活動を記録できる新しい方法を開発した。

3. 無麻酔・無拘束動物における昼夜連続排尿活動測定システムの開発

1) 測定装置および解析ソフトウェアの開発

本システムの模式図を図1に示す。開発にあたって、達成すべきまた検討すべき事項として以下の項目を掲げた。

- 1) 各回の排尿開始の時刻と排尿終了の時刻が記録できること
- 2) 各回の排尿に要する時間(1回排尿時間)が記録できること
- 3) 各回の排尿量(1回排尿量)が記録できること
- 4) 各回の排尿における尿重量の経時的推移が測定可能なこと

図1 無麻酔・無拘束動物における昼夜連続排尿活動測定システムの模式図

- 5) 尿と糞および飼料くずとの識別が可能なこと
- 6) 各回の排尿活動を昼夜連続で数日間にわたって自動的に測定できること
- 7) マウスの尾が受け皿につかず, かつ尿滴下時のリバウンドによるエラーを生じないように, ケージと受け皿の距離を最適にすること
- 8) 風, 振動, 温度の影響が遮断できること
- 9) マウスおよびラットの両方で使用可能であること
- 10) 複数の動物の排尿活動を個別に同時にリアルタイムで測定できること

まず, 上記の問題を解決するために最も重要なことは, 測定器の精度である. そこで, 読み取り限度 0.001 g の精密電子天秤 (PB303-S, Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) を尿量測定に用いた. また, 第1～4の問題の解決には, ラットまたはマウスが排尿した全量を天秤で受け取る必要がある. そこで, 代謝ケージの下に採尿用のロートを設置せず, 尿を直接受け皿に落下させることとした. また, ケージの底に設置する金属製の網に尿が付着しないように, 網をテフロンでコーティングして撥水加工を施した. 第7の問題であるケージと電子天秤との距離について, 30 mm ではマウスの尾が天秤の受け皿に接触することが多かった. 100 mm では尾が天秤に接触することはなかったが, 尿が落ちてくるまでにタイムラグが生じ, 尿や糞が受け皿でリバウンドして, 正確な尿量が測定できないこともあった. これに対して 50 mm では, 尾が受け皿に接触することもなく, 上記のようなエラーもほとんどなかったので, ケージと電子天秤の距離は 50 mm とした.

第8および第9の問題については, 本システムで使用する電子天秤の読み取り精度が高く, わずかな気流に対しても影響を受けるため, 天秤を覆う風防を作製した. このとき, ラットおよびマウスの両方のケージが設置できるように, 高さ 380 mm, 幅 270 mm, 奥行き 420 mm のサイズで作製し, 測定装置を設置する部屋の明暗の影響を評価できるように, 風防の材質には透明アクリルを使用した. 風防の正面を開き戸にし, 上方は蓋のように取り外し可能にすることで, ケージや受け皿の設置および取り外しをスムーズに行えるようにした. 風防内と部屋の温度差を検討したところ, 室温が 24～27℃において風防内の温度は室温 $\pm$ 1℃であり, 測定室の温度を 25 $\pm$ 1℃とすることで, 風防内の温度を一定に保つことができた. マウスおよびラット用のケージは, 電子天秤の受け皿上面から 50 mm の高さに設置したステンレス板に固定した. このステンレス板は, マウスあるいはラットのケージ底面と同じ面積分をくり抜いた専用のものをそれぞれ作製し, そこにケージをフィットさせた. 尿および糞の受け皿は, マウス用は, 底面が1辺 130 mm の正方形で高さ 25 mm のプラスチック容器を, ラット用は, 底面が 300 mm と 230 mm の長方形で高さ 35 mm のアルミ容器を使用した. これらの工夫により, マウスおよびラットの両方に使用可能で, 気流, 振動および温度変化の影響を避けることができた.

本測定システムを開発する上で, 最も重要なのが第5の問題である. 本システムでは, 天秤の出力を RS232L を介して Windows XP が起動するコンピューターに接続し, 重量の増加があったときデータをエク

図2 各マウス毎の1回の尿および蓄積量(重量)およびそれらの1秒あたりの増加量の推移

A: 1回の尿および糞の蓄積量の推移

B: Aの点線部分の拡大図

C: 1回の尿および糞の1秒あたりの増加量の推移

実線は尿 (n = 7), 点線は糞 (n = 5) を示す.

セル上に記録させた。また、天秤から送られてくるデータを1 Hzの頻度で取得できるようにした。これにより、1回ごとの排尿量、排尿時刻および排尿回数が正確に測定できるようになった。尿をそれ以外の糞や飼料くずから識別するために、尿、糞、飼料くずの落下による重量の変化に着目して尿重量の変化のみを選択するソフトウェアを開発した。ddYマウスを用いた目視による検討結果(図2)に示されるように、尿の重量変化曲線と糞のそれとは明らかに異なり、ddYマウスの場合、1回の排尿時の尿の最終重量は0.1 gを越えていることがわかる。また、1秒あたりの増加量(g/s)をみると、糞が3秒以内に0になっているのに対し、尿は4秒以上にわたり0.01 g/s以上の値を示した。一方、飼料くずは、粉状で重量が明らかに少ないか、固形状で重量が極端に重いかのどちらかであり、固形状の増加量も3秒以内に0になった。そこで、ソフトウェア上で1秒あたりの増加量とその持続時間の2つのパラメーターを設定することで尿のみを抽出することとした。このパラメーターは随時変更可能とし、例えば、目視で得た測定データからddYマウスでは、増加量を0.01 g/s以上、持続時間を3秒以上に設定した。この場合のデータの抽出は、0.01 g/s以上の重量変化が起きた時間(排尿開始地点)の1秒前から開始し、0.01 g/s以上の重量変化が停止した時間(排尿終了地点)まで行う。さらに、このソフトウェアで工夫した点は、時計上の時間とともに、各抽出データの抽出開始時を0秒、そのときの重量を0 gにして重量変化を毎秒ごとに表記させ、併せて1秒あたりの重量変化も表記できるようにプログラミングしたことである。これにより、データ解析が容易になったことに加え、これまで評価が困難であった、1回の排尿における尿重量の経時的推移や1回の排尿にかかる時間(1回排尿時間)、1回の排尿における排尿速度が測定できるようになった。

第10の問題については、動物5匹の排尿活動を個別に同時にリアルタイムで測定することにした。これについては、5台の天秤の出力をRS232Cを介してマルチインターフェイス(8 channel)に接続し、これをRS232Cでコンピュータに接続することで、5台同時にかつ個別にデータを取得することができた。データ取得にあたっては、重量値の前後の差が、予め設定した閾値よりも大きくなった場合のみ出力するようにした。その閾値は予備検討から、マウスの場合0.001 g、ラットの場合0.005 gに設定すると、各天秤から24時間に取得する全データ数が10,000個以内となり、5台からの入力全て合わせても、エクセルに入力できる上

限の60,000個を下回ることができた。よって、24時間毎にソフトを再起動させれば、長時間連続的に測定が可能となった。

2) マウスにおける24時間排尿活動の測定

実験例を示したい。6~8週齢のddY系雄性マウス(32~38 g)を使用し、測定を午前10時に開始し、12時間/12時間の明暗サイクル下で翌朝10時まで測定を行った。1個の測定ケージにマウス1匹を入れ、5匹同時に測定した。飼料および飲料水は自由に摂取できるようにした。

24時間測定したデータから、1回排尿量を排尿した時間に対してプロットした代表例が図3Aである。この散布図から、マウスの活動時間帯である暗時間(20時から翌朝の8時)に排尿が集中しているのがわかった。24時間における総排尿量、総排尿回数、平均1回排尿量および平均1回排尿時間は、それぞれ 2.04 ± 0.16 g, 6.33 ± 0.57 回, 0.32 ± 0.01 g, 7.27 ± 0.18 秒であった。これらのパラメーターを暗時間帯と明時間帯で比べてみると、総排尿回数や総排尿量は暗時間帯で多かったが、平均1回排尿量や平均1回排尿時間は両群間で差はみられなかった(図3B)。

また、排尿活動を4時間ごとに区切って各時間帯で排尿量と排尿回数を求めてみると、明時間の16時~18時付近で値が1番低くなり、暗時間の22時~24時付近でピークとなる日内変動があることがわかった(図4)。

4. 新規排尿活動測定システムの有用性と今後の展開

本システムの有用性を確かめるために、いくつかの基礎検討を行った(12)。その結果、ddYマウスを用いた雌雄差の検討から、メスは、オスに比べて1回排尿量が少なく、排尿開始から2秒後までの排尿速度が速いこと、また1回排尿時間が有意に短いことなどが示された。特に、排尿速度に違いが見られたことは興味深い。さらに、ddYマウスよりも、体重が軽く尿量が多い少ないC57BL/6Jマウスにおいても、サンプリングの条件を適切に設定することで、精度の高い排尿活動の測定が可能であった。エストロゲン受容体欠損マウスや加齢促進モデルマウス(SAM)、脳梗塞モデルマウスなど、遺伝子改変動物や病態モデル動物の場合も測定可能で、興味深い知見も得ている。

例えば、脳梗塞モデルマウスの排尿活動を術後7日間にわたって記録したところ、術後4日目以降、平均1回排尿量は術前の値に対して60%程度まで減少した。この成績や他の系統のマウスでの成績などから、病態により尿量が減少している場合も正確に測定できると

図3 ddY 雄性マウスにおける 24 時間排尿活動の解析

A: 横軸は時間, 縦軸は排尿量を示し, 黒三角は各回の排尿を示し, 排尿した時間とそのときの排尿量を示す. B: 総排尿量, 総排尿回数, 平均 1 回排尿量および平均 1 回排尿時間の統計分析. それぞれの値は 24 時間記録したデータから抽出した ($n = 15$). Whole: 明時間と暗時間の合計, Light: 明時間 (8 時から 20 時), Dark: 暗時間 (20 時から翌 8 時). *** $P < 0.005$ (Student's t test).

図4 ddY 雄性マウスにおける排尿活動の日内変動

4 時間ごとの平均排尿量 (A) および平均排尿回数 (B) を示す. 黒丸と黒四角は同一データであり, 2 時間ずらして平均したものである. それぞれのデータはプロットした時間の前後 2 時間を平均した.

考えられる. さらに, 脳梗塞モデルマウスの平均 1 回排尿量は, 術後 2 日目に一旦増加しその後減少を示した. このことは, 本システムが従来のシストメトリーなどの手法では見出せなかった, 病態後の排尿活動の

経時的变化を捉えられる可能性も示している.

また, 9 カ月齢の加齢促進マウスを用いた検討で, 検討例の半数以上で 24 時間の総排尿回数が対照群の約 4 倍を示し, 頻尿も記録できることも確認している. 頻尿を示した加齢促進マウスに, 代表的な頻尿治療薬のオキシブチニンを投与すると, 投与後 30 分からの 60 分間において平均排尿回数は顕著に減少した. このように, 本システムは薬効評価にも適していると考えられる.

なお, 本法の原理は, 脱糞の量や回数として反映される排便・腸管機能の評価法としても応用が見込まれ, 有用性が高いと思われる.

文 献

- 1) 国内基盤技術調査報告書—高齢患者の排尿障害に対する医療の実態調査—. (財) ヒューマンサイエンス振興財団. 2004.
- 2) Yaksh TL, et al. Am J Physiol. 1986;251:R1177-R1185.
- 3) 加世田正和, 他. 臨床生理. 1975;5:540-547.
- 4) Yoshimura Y, et al. BJU Int. 2000;86:879-885.
- 5) Schmidt F, et al. Neurourol Urodyn. 2001;20:287-295.
- 6) Ranson RN, et al. Brain Res. 2003;988:130-138.
- 7) Haas M, et al. J Pharmacol Toxicol Methods. 1997;38:47-51.
- 8) Wood R, et al. J Urol. 2001;165:653-659.
- 9) Leung YY, et al. Urology. 2004;64:378-382.
- 10) Chen Q, et al. J Urol. 2005;174:370-374.
- 11) Lin YH, et al. BJU Int. 2008;102:1724-1730.
- 12) 山本巖, 他. 日薬理誌. 2006;127:35P.