

立教大学コミュニティ福祉研究所学術研究推進資金
大学院生研究 2017年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院 コミュニティ福祉学研究科	
指導教員	所属・職名	氏名
	コミュニティ福祉学研究科・教授	石渡 貴之 印
研究課題名	強制運動の経験がラットの生理指標、情動行動、脳内神経伝達物質に及ぼす影響	
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年	氏名
	コミュニティ福祉学研究科・コミュニティ福祉学専攻・博士課程前期課程2年	松長 大祐 印
研究期間	2017年度	
研究経費	100千円	

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

運動は身体機能を向上させるだけでなく、脳へも大きな影響を与える。運動を行う上で身体に発生するストレスと情動的なストレスとの関連は、明らかになっていない。本研究では、運動へのコンディショニングを自発運動と強制運動の2つに分類し、生理指標、情動行動と脳内神経伝達物質の比較、分析を行う。ラットを用いた先行研究では、強制運動は自発運動と比較するとストレスがかかってしまい、情動行動を測るテストではポジティブな反応は見られなかったという報告が数多く存在する。本研究では、各運動群の走行距離を統一し、情動行動と脳内神経伝達物質（ドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニン）の関連を明らかにすることを目的としている。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

{ 自発運動 } { 強制運動 } { 脳内神経伝達物質 }

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)**研究背景**

スポーツウエルネス学において、生涯を通してのスポーツライフの実践は大きなテーマである。2020年に、東京五輪を控えた日本ではスポーツへの関心は、年々高まりつつあるが、同時にスポーツを行う者とそうでない者の二極化の問題、精神疾患を患う者の増加が問題視されている。スポーツ活動による身体活動は、身体的な利益だけでなく、脳へも大きな影響があることが知られている。本研究ではラットを用いて強制的に運動をさせることと自発的に運動をさせることの差異に着目し、運動によるメンタルヘルスの向上と脳神経科学の観点からスポーツや教育の現場に還元することを目指す。

研究目的

強制運動と自発運動を比較し、生理指標、情動行動、脳内神経伝達物質に及ぼす影響の違いを明らかにする。

実験方法

実験にはWistar系雄ラット4821匹を用いた。全てのラットは、12h : 12hの明暗周期下で飼育し、水・エサの摂取は自由とし、環境温は $23 \pm 1^\circ\text{C}$ に設定するした。自発運動群 (Voluntary : V群) は、暗期の一時間のみ回転ホイールを与え、自発的に運動をさせ、強制運動群 (Forced : F群) には自発運動群のラットが走行した平均距離を強制運動用の回転ホイールにて走らせるた。なおV群、F群とも運動は週5回行うこととするした。以上の環境で一か月間飼育し、その後情動や活動性を測る行動テストと脳内神経伝達物質の分析を行い、コントロール群 (C群) の3群で比較するした。

・生理指標

実験を始める前にラットの腹腔内に体温と活動量を測定する nanotag (キッセイコムテック) を埋め込む手術を行い、そのデータを読み込むことで体温、活動量の変化を分析したする。手術ではラットに気化麻酔 (イソフルラン) をかけ、意識が朦朧としているところに三種混合麻酔 (25ml あたりドミツール 1.875ml, ミダゾラム 2ml, ベトルファール 2.5ml) をシリンジで腹腔2カ所に、合計 5ml / 体重 (kg) 注入した。麻酔が効いた後は開腹し、nanotag を腹腔内に縫い付けて固定した後、縫合して腹を閉じた。縫合後は麻酔薬と同量の拮抗薬 (メデトミジン) をラットの腹腔内に注入し、ラットを目覚めさせ、手術の成功を確認するした。手術後1週間は回復期とし、全てのラットを通常条件で飼育するした。その後ラットを無作為に自発運動群、強制運動群とコントロール群に分けるた。

体温と活動量の測定は5分に1度計測するように nanotag を設定した。飼育実験終了後はラットを気化麻酔にかけて意識が朦朧としている中、心臓にペントバルビタールナトリウムを注入して安楽死させ、その後開腹して nanotag を取り出すした。

・オープンフィールドテスト

ラットにとってを新奇な環境である白い箱の中に放ち、その際の行動から不安様行動を調べるテストである。箱は縦横 75cm × 高さ 50cm で、底を黒いペンで 4 × 4 マスに分けた。測定項目は、中央滞在時間 (中央の 4 マス)、区画移動数で、10 分間の測定を行った。当テストはラットが活発となる暗期 (赤色照明下) で行うた。

・脳内神経伝達物質

それぞれの群のラットを一か月飼育した後に安楽死させ、素早く脳を摘出した。全てのラットの脳摘出は 14:00 ~ 2:00 の暗期の間、光の影響を最小限にするために赤色照明下にて行われた。脳取り出しから脳内神経伝達物質 (ノルアドレナリン : NA、ドーパミン : DA、セロトニン : 5-HT) の分析までの手順は以下に記した。

摘出した脳をリンゲル液内 (リンゲル液 1L あたり NaCl : 8.6g, KCl : 0.30g, CaCl₂ : 0.33g) でマイクロスライサー (PR07, 堂阪イーアム) にて厚さ 300 μm の切片を作成し、脳地図 (Paxinos & Watson, 1986) と照らし合わせながら、特定の脳部位をマイクロパンチ (BP-10F, Kai medical) で直径 1mm の大きさで取り出した。取り出した試料はマイクロチューブ内でホモジナイザーにて磨り潰し、0.2M 過塩素酸 (PCA) 160 μl にて除タンパクを行い、除タンパクを完全にするために冷蔵庫で 30 分以上冷却した。冷却した試料は遠心分離 (CF15RX II, Hitachi Koki) (18, 800G

×15分, 0°C) にかき、上澄みを採取して 0.45µm のフィルター (Millipore, Bedford, MA) で濾過した。最後に 1M 酢酸ナトリウム 40µl で pH 調整を行った。

上記の試料は高速液体クロマトグラフィー (HPLC : High Performance Liquid Chromatography, ECD-700 system, エイコム) にて分析を行った。試料内の NA、DA、5-HT を分離する役割を果たすカラムは EICOMPAK SC-50DS (3.0mm id ×150mm, エイコム) を用いた。分析時に用いる緩衝液 (バッファー) は、メタノールの濃度を 17% にした。

脳の分析部位は、NA を合成する青斑核、DA を合成する黒質と腹側被蓋野、5-HT を合成する背側縫線核と正中縫線核の細胞体 5 部位と、認知機能を司る前頭前野、運動調節を司る線条体、体温調節を司る視索前野、内発的な活動を司る側坐核 (shell 領域)、ストレス反応を司る室傍核、摂食中枢のある視床下部外側野、満腹中枢のある視床下部腹内側核、自律神経を司る視床下部背内側核、記憶を司る海馬、情動を司る扁桃体といった投射先 10 部位で、計 15 部位である。

実験結果

最終的には、行動テスト (V 群 n=8, F 群 n=8, C 群 n=8)、脳内神経伝達物質 (V 群 n=8, F 群 n=8, C 群 n=8) の計 48 匹の分析を行うが、実験室の都合上、一度の飼育で V 群 n=4, F 群 n=4, C 群 n=2or3 のペースで実験を行っている。現在は、行動テスト計 10 匹、脳内神経伝達物質計 11 匹、生理指標 (nanotag データ) 計 21 匹の飼育を終え、脳内神経伝達物質は分析中である。当報告書では、行動テストと生理指標の実験結果を報告する。

・行動テスト : オープンフィールドテスト

中央滞在時間では、有意差はなかったものの C 群と比べて V 群、F 群ともに短く不安の増加が見られた。また、区画移動数においても有意差はなかったものの F 群は移動数が少なく、活動性の低下がみられた。

・生理指標

(体重)

飼育期間中、走行距離を統一したことで、F 群と V 群に差は見られなかった。また、飼育から 16 日目から C 群と比較して F 群、V 群の体重が有意に増加した。

(活動量)

自発運動または強制運動を継続して行っても、運動をさせていない時間帯で各群の活動量に差異は認められなかった。また、飼育から 4 週間後の運動を行わない日においても活動量に各群で差はなく、作為的に運動を継続させても運動をさせない日の活動量には影響しないことが分かった。

(体温)

飼育から 4 週間後の F 群の体温が運動を行った日、行っていない日で有意に高くなる時間帯が見られた。また、明期の体温も少し高いことから、強制運動の継続により平均体温のベースが上昇することが分かった。

研究成果の概要 つづき

・脳内神経伝達物質

それぞれの群のラットを一か月飼育した後に安楽死させ、素早く脳を摘出した。全てのラットの脳摘出は 14:00 ~ 2:00 の暗期の間、光の影響を最小限にするために赤色照明下にて行われた。脳取り出しから脳内神経伝達物質 (ノルアドレナリン: NA、ドーパミン: DA、セロトニン: 5-HT) の分析までの手順は以下に記した。

摘出した脳をリンゲル液内 (リンゲル液 1L あたり NaCl: 8.6g, KCl: 0.30g, CaCl₂: 0.33g) でマイクロスライサー (PRO7, 堂阪イーアム) にて厚さ 300 μ m の切片を作成し、脳地図 (Paxinos & Watson, 1986) と照らし合わせながら、特定の脳部位をマイクロパンチ (BP-10F, Kai medical) で直径 1mm の大きさで取り出した。取り出した試料はマイクロチューブ内でホモジナイザーにて磨り潰し、0.2M 過塩素酸 (PCA) 160 μ l にて除タンパクを行い、除タンパクを完全にするために冷蔵庫で 30 分以上冷却した。冷却した試料は遠心分離 (CF15RX II, Hitachi Koki) (18,800G \times 15分, 0 $^{\circ}$ C) にかけて、上澄みを採取して 0.45 μ m のフィルター (Millipore, Bedford, MA) で濾過した。最後に 1M 酢酸ナトリウム 40 μ l で pH 調整を行った。

上記の試料は高速液体クロマトグラフィー (HPLC: High Performance Liquid Chromatography, ECD-700 system, エイコム) にて分析を行った。試料内の NA、DA、5-HT を分離する役割を果たすカラムは EICOMPAK SC-50DS (3.0mm id \times 150mm, エイコム) を用いた。分析時に用いる緩衝液 (バッファー) は、メタノールの濃度を 17% にした。

脳の分析部位は、NA を合成する青斑核、DA を合成する黒質と腹側被蓋野、5-HT を合成する背側縫線核と正中縫線核の細胞体 5 部位と、認知機能を司る前頭前野、運動調節を司る線条体、体温調節を司る視索前野、内発的な活動を司る側坐核 (shell 領域)、ストレス反応を司る室傍核、摂食中枢のある視床下部外側野、満腹中枢のある視床下部腹内側核、自律神経を司る視床下部背内側核、記憶を司る海馬、情動を司る扁桃体といった投射先 10 部位で、計 15 部位である。

実験結果

最終的には、行動テスト (V 群 n=8, F 群 n=8, C 群 n=8)、脳内神経伝達物質 (V 群 n=8, F 群 n=8, C 群 n=8) の計 48 匹の分析を行うが、実験室の都合上、一度の飼育で V 群 n=4, F 群 n=4, C 群 n=2or3 のペースで実験を行っている。現在は、行動テスト計 10 匹、脳内神経伝達物質計 11 匹、生理指標 (nanotag データ) 計 21 匹の飼育を終え、脳内神経伝達物質は分析中である。当報告書では、行動テストと生理指標の実験結果を報告する。

・行動テスト: オープンフィールドテスト

中央滞在時間では、有意差はなかったものの C 群と比べて V 群、F 群ともに短く不安の増加が見られた。また、区画移動数においても有意差はなかったものの F 群は移動数が少なく、活動性の低下がみられた。

・生理指標

(体重)

飼育期間中、走行距離を統一したことで、F 群と V 群に差は見られなかった。また、飼育から 16 日目から C 群と比較して F 群、V 群の体重が有意に増加した。

(活動量)

自発運動または強制運動を継続して行っても、運動をさせていない時間帯で各群の活動量に差異は認められなかった。また、飼育から 4 週間後の運動を行わない日においても活動量に各群で差はなく、作為的に運動を継続させても運動をさせない日の活動量には影響しないことが分かった。

(体温)

飼育から 4 週間後の F 群の体温が運動を行った日、行っていない日で有意に高くなる時間帯が見られた。また、明期の体温も少し高いことから、強制運動の継続により平均体温のベースが上昇することが分かった。

※ この (様式 2) に記入の成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した調書 (A 4 縦型横書き 1 枚・自由様式) を添付すること。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

特になし

