

立教大学学術推進特別重点資金 (立教 S F R)

大学院学生研究

2020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 コミュニティ福祉学専攻		
研究代表者 (2021年3月現在 のものを記入)	在籍課程・学年・学生番号		氏名
	<input type="checkbox"/> 博士前期課程 年 <input checked="" type="checkbox"/> 博士後期課程 2年 (学生番号: 19wd005h)		松長 大祐 印
指導教員	所属部局・職		氏名
	コミュニティ福祉学部・教授		石渡 貴之 印
自然・人文・社会の別	人文	個人・共同の別	個人
研究課題	運動様式の切り替えによる生理指標、情動行動及び脳内神経伝達物質の変容解明		
研究組織 (研究代表者・共同研究者) ※2021年3月現在のものを記入	在籍研究科・専攻・課程・学年		氏名
	研究代表者 コミュニティ福祉学研究科 博士後期課程2年次		松長大祐
研究期間	2020 年度		
研究経費 (1円単位)	(支出金額) 198,802円 / (採択金額) 200,000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。)

本研究者はラットにおける自発運動と強制運動を比較し、脳内神経伝達物質と情動行動へ与える影響の差を研究してきた。これまでの研究において、自発運動量が脳内セロトニン含有量の増加と不安様行動の低減に関係していることが示唆されている。しかし、自発運動と強制運動を組み合わせた影響についての実験は、先行研究も含めて未だ実施されていない。本研究では、自発運動と強制運動を切り替えた際、脳内神経伝達物質と不安様行動に与える影響を明らかにするために実験を行った。

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。)**● 研究方法**

実験には予め 4 週間の自発運動または強制運動をさせていた Wistar 系雄ラットを使用し、2 条件の群を設置した。自発運動を行っていたラットには 1 週間の強制運動を行い(V-F 群: Voluntary-Forced)、強制運動を行っていたラットには 1 週間の自発運動を行った(F-V 群: Forced-Voluntary)。飼育環境は室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、明暗周期 12h:12h に設定し、餌と水は自由摂取とした。また、ラットの健康状態を管理するため、3 日間ごとに体重測定を行った。切り替えを含めた計 5 週間の運動終了後、脳内神経伝達物質(実験 1)と情動行動(実験 2)の測定としてオープンフィールドテストを行った。

(実験 1) 脳内神経伝達物質の測定

飼育期間終了後、ラットに気化麻酔(イソフルラン)をかけた後、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、素早く脳を摘出した。全てのラットの脳摘出は暗期の間に行った。取り出した脳は $300\mu\text{m}$ の厚さに切り出した後、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 の切片を作成した。取り出した切片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(CF15RXII, Hitachi Koki) (18,800G \times 15 分, 0°C)にかけ、上澄みを採取して $0.45\mu\text{m}$ 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 μl で pH 調整を行った。

測定は投射先 11 部位(前頭前野、線条体、視交叉上核、視索前野、視床下部背内側核、視床下部腹内側核、視床下部外側野、視床下部後部、室傍核、海馬、扁桃核)と細胞体 5 部位(青斑核、黒質網様部、腹側被蓋野、背側縫線核、正中縫線核)の合計 16 部位とした。これらの部位におけるノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニンの含有量を測定した。

得られたデータは一元配置分散分析によって統計的な有意差を明らかにした。 $P < 0.05$ を統計的優位水準とした。

(実験 2): オープンフィールドテスト

実験には 7 週齢の Wistar 系雄ラットを使用した。ラットを実験室に搬入後、腹腔内に深部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った。ラットに気化麻酔(イソフルラン)をかけた後、3 種混合麻酔(塩酸メデトミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノール; 2.5mg/kg)によって麻酔をかけ、腹部を開き、nanotag を埋め込んだ。埋め込んだ nanotag によって、飼育期間中の深部体温と活動量の測定を継続的に行った。

飼育期間終了後、ラットを新奇環境である白い箱の中に放ち、その際の不安様行動を調べるオープンフィールドテストを行った。箱は縦横 75cm \times 高さ 50cm で、底を黒いペンで 4 \times 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、立ち上がり行動で 10 分間の測定を行った。情動行動の測定はラットが活発となる暗期に行った。テスト中の行動は実験用のビデオカメラで撮影と記録を行い、テストを終え次第各種行動の分析を行った。

得られたデータは一元配置分散分析によって統計的な有意差を明らかにした。 $P < 0.05$ を統計的優位水準とした。

● 結果

結果は平均 \pm 標準偏差で示した。

2 群間で 4 週目の体重に有意な差は認められなかった。(F-V 群: $356.6\pm 20.6\text{g}$, V-F 群: $376\pm 25.6\text{g}$)

研究成果の概要 (つづき)**(実験 1) 脳内神経伝達物質の測定**

実施サンプル数 (6 匹×2 群) =12 匹

細胞体の一つである正中縫線核において、F-V 群のセロトニンの含有量が有意に増加した (F-V 群 : $7.6 \pm 1.5 \text{ pg}/20 \text{ ul}$, V-F 群 : $4.2 \pm 0.6 \text{ pg}/20 \text{ ul}$)。背側縫線核や前頭前野、線条体、室傍核、扁桃体といった不安や運動に関連する部位において有意な差は認められなかった。

運動と関連の強い線条体のドーパミンの含有量には有意な差は認められなかった。

ストレス反応を司る室傍核では、V-F 群のノルアドレナリンが有意に増加した (F-V 群 : $6.1 \pm 2.4 \text{ pg}/20 \text{ ul}$, V-F 群 : $12.3 \pm 5.1 \text{ pg}/20 \text{ ul}$)。

(実験 2) : オープンフィールドテスト

実施サンプル数 (4 匹×1 群) =4 匹 (V-F 群)

サンプル数が不足しているため、過去に本研究者が行った実験結果 (Matsunaga et al, 2021) を参考値として比較する (V 群 : 4 週間の自発運動, F 群 : 4 週間の強制運動)

V-F 群のオープンフィールドテストにおける中央滞在時間は、4 週間強制運動を行った F 群と比較して有意な差は認められなかったが、V 群と比較すると V-F 群と F 群とも有意に減少した (V 群 : 42.6 ± 16.9 秒, F 群 : 15.3 ± 17.1 秒, V-F 群 : 11.3 ± 6.8 秒)。

全ての立ち上がり行動の合計では、V-F 群が V 群と F 群と比較して有意に増加した (V 群 : 56 ± 17.8 回, F 群 : 65 ± 16.4 回, V-F 群 : 139 ± 11.5 回)。強い不安を示していると考えられる立ち上がり行動 (High-leaning) は F 群が V 群と V-F 群と比較して有意に増加した (V 群 : 8.8 ± 3.0 回, F 群 : 24.4 ± 12.2 回, V-F 群 : 2.2 ± 2.2 回)。

●考察

本研究者はこれまでの研究において自発運動が脳内セロトニン含有量を増加させ、不安様行動を低減させる可能性を示唆している (Matsunaga et al., 2021)。この研究ではこれまでの先行研究と同様に強制運動による不安様行動の増加も確認された。これらの先行研究の結果と本研究の結果を照らし合わせると F-V 群, V-F 群ともに運動様式が切り替わった 1 週間の影響が大きく現れているように考えられる。セロトニンの結果では V 群と比較すると F-V 群, V-F 群と同等の含有量であり、背側縫線核と正中縫線核において、これら 3 群は F 群と比較して有意に増加した。以上の結果から、脳内セロトニン含有量の増加には自発運動を経験させることが重要である可能性が考えられる。

オープンフィールドテストにおける中央滞在時間の結果からは前半の自発運動が後半の強制運動による不安の増加を抑えたとも考えられる。しかし、V-F 群では自発運動から強制運動に切り替わる中で走行距離及び運動量が大幅に減少する。このような環境の変化がストレスとなり、ノルアドレナリンが増加したのではないかと考えられる。立ち上がり行動は、不安様行動を現していると考えられている High-leaning (Kuniishi et al., 2017) を例外に一般的にはラットの探索行動を反映していると考えられている (Lee and Huang, 1988)。V-F 群は強制運動に切り替わることで自発運動による探索行動も制限されたことから、立ち上がり行動が増加したのではないかと考えられる。

【参考文献】

D. Matsunaga, H. Nakagawa, T. Ishiwata, Difference in the brain serotonin and its metabolite level and anxiety-like behavior between forced and voluntary exercise conditions in rats, *Neurosci. Let.* 744(2021)

H. Kuniishi, S. Ichisaka, M. Yamamoto, N. Ikubo, S. Matsuda, E. Futora, R. Harada, K. Ishihara, Y. Hata, Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in the open field test in rats, *Neurosci. Res.* 123 (2017)

E.H. Lee, S.L. Huang, Role of lateral habenula in the regulation of exploratory behavior and its relationship to stress in rats, *Behav. Brain Res.* 30 265-271(1988)

※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。なお、成果発表を確認できる資料を合わせて提出してください。)

- ① 雑誌論文 (著者名、論文タイトル、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)

① 特になし

② 特になし

③ 特になし

④ 特になし

【研究成果のない理由】

今年度は新型コロナウイルスの影響により、例年参加していた学会が中止となった。また、オンライン上で開催した学会等には参加したが、緊急事態宣言等の影響で実験を進めることができなかったため本研究内容の発表は行うことができなかった。

本研究成果は、次年度の体力医学会 (9月中旬) に発表する予定である。