

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01766

研究課題名(和文) 自発運動が社会的隔離ストレス下の生理指標、脳内神経伝達物質、情動行動に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of voluntary exercise on physiological indices, brain neurotransmitters, and emotional behavior under social isolation stress

研究代表者

石渡 貴之 (ISHIWATA, Takayuki)

立教大学・コミュニティ福祉学部・教授

研究者番号：40435235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、社会性に関連する生育環境の違い(隔離飼育vs.集団飼育)に注目し、生理指標、脳内神経伝達物質、情動行動に及ぼす影響や、自発運動による各指標への効果を解明することを目的とした。隔離飼育は集団飼育と比較してストレスが高いと考えられ、安静時の体温上昇や脳内のセロトニンとノルアドレナリンに変化をもたらし、社会性の低下も誘発した。集団飼育における自発運動は、体重や脳内神経伝達物質の結果から、身体的に良い影響を与えることが分かったが、体温や情動行動の結果からは逆に精神的なストレスを増大させる可能性が示された。今後、自発運動の効果を最大限に発揮できるより適切な飼育方法を考える必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、生育環境の違いによる生理指標、脳内神経伝達物質、情動行動の関係性や、自発運動による各指標への効果の一部を明らかにした。これらの結果は、近年増加傾向にある鬱病をはじめとする精神疾患の原因や発症メカニズムの解明の手掛かりにもなる。今後更に社会性に関連する生育環境の重要性、及び運動の効果を生理神経科学や行動科学の観点から検討し、教育やスポーツの現場に還元することが望まれる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the effects of house rearing on physiological indices, brain neurotransmitters, and emotional behavior, and the effects of voluntary exercise on each index, by focusing on the difference in the growth environment (isolation vs. group rearing) related to sociality. Isolation rearing was considered to be more stressful than group rearing, causing an increase in body temperature at rest and changes in the serotonin and noradrenaline in the brain, and also inducing a decrease in sociability. The results of body weight and brain neurotransmitters showed that voluntary exercise in group rearing had a positive effect on physical health, but the results of body temperature and emotional behavior indicated that it may increase mental stress. In the future, it is necessary to consider more appropriate breeding methods that maximize the effects of voluntary exercise.

研究分野：環境生理学

キーワード：脳内神経伝達物質 生理指標 情動行動 自発運動 社会的隔離 ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

現代社会の急速な発展は、人間の生活環境までも大きく変化させた。科学技術の進展、経済の発展で生活が便利になり、子供の生活全体が歩いたり、外で遊んだりするなどの日常的な身体運動が減少する方向に変化している。その結果、報道でも多く行われているように、子供の体力低下が顕著となっている。また、教育現場で問題になっている低体温の子供達の増加も日常運動量の減少や体温調節機能の低下が原因と考えられる。低体温児童の行動特徴として、落ち着きがない、やる気が出ないなど、情緒的問題が報告されており、これらの状況は子供の発育発達状況に悪影響を及ぼすことが危惧される。この低体温の現象は明らかに熱産生機能の低下が原因であり、子供達を取り巻く生活環境の変化に起因すると考えられる。特に最近の子供達は、以前と比較して一人で何もかもできる時代になってきている。テレビ、ゲームを長時間していたり、外で遊ばなくなったり、家に1人でずっと過ごしていたりなどといったことが挙げられ、筋肉量の減少や、筋活動低下による体内温度変化の欠如だけでなく、社会で必要なコミュニケーション能力の欠如にも繋がっている。

生活環境に関して、幼い頃の生育環境がその後の身体的発達や知的発達に大きく影響を与えるということがわかっている (O'Connor et al., 1998)。動物実験においては、集団飼育環境でのラットは知能が高いことが知られているが、反対に4週間隔離飼育されたラットを新奇環境下におくと、過剰活動や不安行動、攻撃性が増加するといった報告がある (Meng et al., 2010)。また、幼若期のラットを母親や兄弟と引き離してストレスを与えると、将来の脳機能に異常が生じることも報告されており、社会的隔離ストレスが神経系や内分泌系の発達形成に障害をきたすことが分かっている (Benner et al., 2014)。一方で、このような精神疾患や情動障害の発現率を低下させる方法や運動の効果についてはこれまで十分に検討されていない。

そこで、本研究ではラットの幼若期の生育環境の違い(隔離飼育 vs. 集団飼育)に着目し、生理指標、脳内神経伝達物質、情動行動に及ぼす影響や、自発運動による各指標への効果を解明することを目的とした。今後、益々産業化に伴う運動量や他者との関わりの減少が進み、心の衰退が叫ばれている中で、精神調節機能の維持、向上は重要な課題であり、その中枢における基本的なメカニズムや運動の効果を解明することは喫緊の課題である。

脳内の様々な調節機構には、神経細胞を促進または抑制する神経伝達物質の働きが極めて重要である。その中でも、セロトニン(5-HT)、ドーパミン(DA)、ノルアドレナリン(NA)は様々な生体調節において主要な神経伝達物質であることが示唆されている。年々増加傾向である躁鬱状態はこれらの神経伝達物質のバランスの乱れによって誘発されるとの報告例が多々存在し、運動パフォーマンスを左右する中枢性疲労においては、5-HTとDAのバランスによって決定されることが報告されてきた (Roelands and Meeusen, 2010)。この様に、行動レベルは脳内の複数の神経伝達物質の相互作用によって調節され、更に、運動は神経伝達物質の調節に影響を及ぼすと考えられる。本研究での結果は、世界中で社会問題になっている鬱病をはじめとする精神疾患の原因や発症メカニズムの解明の手掛かりにもなり得ると考えられる。

本研究者はこれまで脳内の体温調節機構において重要な部位である視索前野/前視床下部 (PO/AH)の役割 (Ishiwata et al., 2001, 2002, 2005) や、脳内の5-HTやガンマアミノ酪酸の役割について明らかにしている (Ishiwata et al., 2004, 2005, 2014, 2016)。更に、近年は不規則な照明環境や高温環境が生理指標、脳内神経伝達物質、不安行動に及ぼす影響を明らかにしている (Matsumura et al., 2015, Nakagawa et al., 2016)。また、運動中のPO/AHの役割や神経伝達物質の変動に関しても共同研究にて明らかにしている (Hasegawa et al., 2005, 2008, 2011; Takatsu et al., 2010)。運動についてはこれまで主にトレッドミルによる強制運動を用い、運動中の神経伝達物質の測定を行っていたが、今回はより自然な状態で、更に動物にかかるストレスを最小限に抑え、運動効果を測定したいため、回転ケージによる自発運動を用い、運動群と非運動群を設定し、比較検討を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、社会性に関連する生育環境の違い(隔離飼育 vs. 集団飼育)に着目し、生理指標、脳内神経伝達物質、情動行動に及ぼす影響や、自発運動による各指標への効果を解明することを目的とした。具体的には、幼若期に隔離飼育したラットと集団飼育したラットを運動群・非運動群に分けて、生理指標(深部体温、心拍数、活動量)の変化に関する検討、脳内神経伝達物質(5-HT, DA, NA)の変化に関する検討、情動行動(不安、攻撃性、社会性)の変化に関する検討を行い、社会的隔離ストレスに対する運動と生理指標、脳内神経伝達物質、情動行動との関連性について明らかにする。

## 3. 研究の方法

生育環境と情緒的關係を探る研究はこれまで盛んに行われているが、生理指標、脳内神経伝達物質、情動行動の3つの観点からの検討や運動の効果について研究する点が独創的である。また、本研究では、実験手法も独自の工夫を凝らしている。これまで行われてきた研究では実験手

法に問題があり、動物への直腸温測定プローブの挿入や、脳内への薬物投与など、その操作自体が動物の体温や行動を容易に変動させてしまっていた。これらの要因を排除するため、麻酔動物を用いる研究が中心になったが、麻酔により体温が下降することや、行動が抑えられることなど、麻酔下では不都合な点が多い。本研究者はこれらの実験手法に伴う問題点を最小限に排除し、より生理的状态に近い生体反応を測定するために、テレメトリー法とマイクロダイアリシス法を同時に用いる。また、運動の効果測定には自発運動を用いる。テレメトリー法は予めデータロガー式又は無線式小型体温計を腹腔内に埋め込むため、実験時に動物に与える侵襲性や恐怖感を最小限に抑え、無麻酔・無拘束下の動物の深部体温、心拍数、活動量を生理的状态に近い状態で測定することが出来る方法である。マイクロダイアリシス法は微量透析プローブを用い、同じく無麻酔・無拘束下の動物における薬理刺激、そして神経伝達物質を *in vivo* で経時的にサンプリングする簡便にして効率的な方法であり、従来用いられてきたマイクロインジェクション法よりも脳組織への損傷が少ないと考えられている。特にマイクロダイアリシス法は脳科学の研究分野において、現在欠かすことの出来ない実験手法の一つである。しかしながら、きわめて限局された部位へ挿入する必要があるため、その実験手法は非常に高い技術が求められるため困難であり、体温調節や行動研究の分野において、これらの手法を用いて神経薬理的刺激又は神経伝達物質の回収を行った研究は極めて少ない。神経科学の研究分野で注目されているマイクロダイアリシス法を体温調節、行動の研究分野に応用する本研究者の研究は、国際的に見ても先駆的であり技術的には他の追隨を許さないレベルにある。

#### (1) 2017 年度：生育環境の違いによる生理指標、脳内神経伝達物質、不安行動の比較

##### 実験動物：

実験には雄 Wistar ラットを使用した。4 週令（幼若モデル）で購入し、その後、ホモジネート実験用と行動実験用に、隔離飼育群と集団飼育群に分けて 1 ヶ月間飼育した。飼育環境は 12h:12h の明暗サイクル（7:00-19:00 明期）、環境温 23℃、湿度 50% で飼育した。実験中以外の時間は、水、餌の摂取を自由とした。なお本研究は、立教大学ライフサイエンスに係る研究・実験の倫理および安全委員会の審査・承認を得た上で行った。

##### データロガー式小型体温計手術：生理指標計測

各群の深部体温、活動量を測定するために、データロガー式小型体温計（nanotag®, キッセイコムテック, Japan）を腹腔内へ埋め込む手術を行った。気化麻酔（イソフルラン）の後、3 種混合麻酔（塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファンール）によって麻酔をかけ、データロガー式小型体温計を腹腔内へ挿入し、移動しないように縫合糸を用いて腹直筋へ縫い付けた。深部体温、活動量は 1 分毎に連続測定し、体重は 1 週間毎に計測した。

##### ホモジネート実験手順：脳内神経伝達物質分析

飼育開始 1 か月後に隔離飼育群と集団飼育群の脳をそれぞれ素早く取り出し、マイクロサイザーにて 300 μm の切片を作成し、マイクロパンチにて 1mm 四方の大きさで体温調節、運動、情動に関連する領域を取り出し、即座にホモジナイザーにて磨り潰した。5-HT, DA, NA は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC System, Eicom, Japan）を用いて分析した。

##### 行動実験：情動行動測定

各群 1 ヶ月間飼育した後、オープンフィールドテスト（不安の評価）、ソーシャルインタラクショントテスト（攻撃・社会性の評価）を行った。

#### (2) 2018 年度：生育環境の違いによる生理指標、脳内神経伝達物質、不安行動に対する運動の効果

実験動物、データロガー式小型体温計手術は基本的に 2017 年度と同じ条件で行った。飼育条件は、隔離飼育群と集団飼育群ともに、自発運動が可能な回転かご付きケージ内で 1 ヶ月間飼育した。ホモジネート実験と行動実験のプロトコルも、2017 年度と同じ条件で行った。最終的に、2017 年度に行った安静環境下とのデータ比較を行った。

#### (3) 2019 年度、2020 年度：生育環境の違い、運動の有無がストレス耐性に及ぼす影響

実験動物の飼育は 2017、2018 年度と同じ条件で行う。リアルタイムに深部体温、心拍数、活動量を測定するために、無線式小型体温計（TA10ETA-F20, Data sciences, USA）を用いた。更に、マイクロダイアリシス法により、新奇及び温熱ストレス環境下の PO/AH の 5-HT, DA, NA 放出量の経時的変化を測定し、ストレス耐性を検討した。最終的に、2017、2018 年度に行ったデータとの比較を行い、社会的隔離ストレスに対する運動の効果を検討した。

##### マイクロダイアリシス手術：

ガイドカニューラ（AG-8, Eicom, Japan）を PO/AH へ挿入する手術を実験の少なくとも 3 日前に行った。3 種混合麻酔のもと、ガイドカニューラを挿入するためドリルを用いて頭蓋骨に穴を開け、プローブ先端の透析膜の位置が PO/AH（bregma から後位 0.4mm, 側位 0.3mm, 腹位 8.2mm; Paxinos and Watson, 1982）となるように挿入した。2 本のステンレス製ネジをアンカーとして頭蓋骨に埋め込み、これをプローブと共にデンタルセメントで頭蓋骨に固定した。麻酔と傷口の回復、及び動物を実験環境下に慣れさせる為に、動物に 2~3 日間の安静期間を与えた。

実験当日にイソフルラン麻酔の下、マイクロダイアリシスプローブ（A-I-8-01, Eicom, Japan）を挿入した。プローブ先端の透析膜はカットオフ分子量 6,000 のセルロース製で、膜長 1.0mm、外形 0.22mm の形状のものを使用した。

#### 実験プロトコル：

実験は先行研究と比較するため、全て明期(7:00-19:00)の間に行った。尾部皮膚温測定用の無線式体温計(TH100, Techno Science, Japan)をキネシオテープで接着し、カバーで保護した後、人工脳脊髄液の灌流を開始した。リキッドシーベル(TCS2-23, Eicom, Japan)とコイルチューブ(JT-101B, Eicom, Japan)を用いて、実験中の動物の自由な行動を妨げることなく測定を行った。灌流液はダイアリスポンプ(ESP-64, Eicom, Japan)を用いて流速1 $\mu$ l/minで灌流した。灌流液の灌流と同時に、深部体温、心拍数、尾部皮膚温および活動量をリアルタイムに1分毎に連続測定した。

ラットを実験用の新奇環境下に置き、動物の深部体温、心拍数、尾部皮膚温および脳内神経伝達物質の変動を観察した。その後、全ての指標が安定した時点から1時間を安静期間とし、暑熱暴露(35 $^{\circ}$ C)を3時間行った。暴露終了後は通常的环境温(23 $^{\circ}$ C)に戻し、測定を続けた。安静期間の各指標を基準値として統計分析を行った。

脳内神経伝達物質(5-HT, DA, NA)は20分毎(20 $\mu$ l)にon-line液体クロマトグラフィー(HTEC-500, Eicom, Japan)に直接注入し、高感度分析を行った。分析時間は1サンプルにつき15分であった。実験終了後、プロモフェノールブルー(0.2%)を灌流させてダイアリスプローブ先端の透析膜近傍の組織を染色し、脳を摘出した。脳をホルマリンで固定後、厚さ100 $\mu$ mの切片標本作製しプローブ挿入位置を組織学的に確認した。

#### 4. 研究成果

安静時の深部体温については、隔離飼育群が集団飼育群よりも有意に高い結果となった。脳内神経伝達物質は、飼育環境の違いが脳内NAと5-HTに影響を及ぼすことを明らかにした。集団飼育群と比較して隔離飼育群で室傍核や海馬におけるNA含有量の増減が観察され、線条体、扁桃体では5-HTの減少が観察された。ラットは本来群れで生活し、その群れの他個体と共に行動する動物であるため、隔離という本来在るべき環境とは異なる環境に置かれたことがストレスで、その分泌が乱された可能性がある。情動行動にも変化が見られ、隔離飼育群は社会的行動の減少や過剰行動が増加することも示した。

安静時の結果と異なり、隔離飼育でも運動が可能な環境下に置かれた場合には、それほどネガティブな影響が出ない可能性が深部体温、脳内神経伝達物質、情動行動の結果から示唆された。しかしながら、非運動群のラットでは顕著な体重増加がみられた。これは、運動不足により脂肪を蓄積しやすくなっていたからだと考えられる。また、非運動群におけるNAの減少も見られ、摂食量を適切にコントロールすることを妨げ、代謝が抑制されたと考えられることから、体重の顕著な増加に関連している可能性があると考えられた。

集団飼育群では、運動群と非運動群の活動量に差がないにも関わらず、体温は運動群が有意に高い傾向にあった。これは運動群のラットがストレスを感じていた可能性も考えられる。運動群では本来安静にしているはずの明期に、ペアのラットが運動をしていることで明期の休息を十分にとれず、慢性的なストレス状態に陥っていた可能性がある。行動テストにおいても、オープンフィールドテストでの立ち上がり回数、区画移動数で運動群が有意に低値であったことから、ペアでの自発運動はストレスを増大させる可能性が示された。

ソーシャルインタラクションテストでは非運動群と比較して運動群のほうが一回の接触時間が長かったことから、運動群は他の個体に対してより積極的であり、攻撃性が高いことが示唆された。活動量においても運動群が有意に高いことから、ペアのラットと多く活動することによって他の個体に対して積極的になったのだと考えられる。

集団飼育における自発運動は、体重や脳内神経伝達物質の結果から、身体的に良い影響を与えることが分かった。しかし、体温や情動行動の結果から、集団飼育における自発運動は精神的なストレスを増大させる可能性が示された。人間の生活では今回のラットのペア飼育のような状況は考えにくく、結果がそのまま当てはまるとは言い難い。より人間の生活に近い実験方法を考える必要がある。ただ、ラットの実験という観点から考えたとき、ラットの集団飼育に自発運動という要素を加えると余計なストレスを与えてしまう可能性がある。今後、自発運動の効果を最大限に発揮させるためのより適切な飼育方法を考える必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsunaga Daisuke, Nakagawa Hikaru, Ishiwata Takayuki	4. 巻 744
2. 論文標題 Difference in the brain serotonin and its metabolite level and anxiety-like behavior between forced and voluntary exercise conditions in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2020.135556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneda Yuta, Kawata Akira, Suzuki Kota, Matsunaga Daisuke, Yasumatsu Mikinobu, Ishiwata Takayuki	4. 巻 63
2. 論文標題 Comparison of neurotransmitter levels, physiological conditions, and emotional behavior between isolation housed rats with group housed rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Psychobiology	6. 最初と最後の頁 452-460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dev.22036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hikaru Nakagawa, Daisuke Matsunaga, Takayuki Ishiwata	4. 巻 87
2. 論文標題 Effect of heat acclimation on anxiety-like behavior of rats in an open field	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Thermal Biology	6. 最初と最後の頁 102458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtherbio.2016.03.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Daisuke Matsunaga, Hikaru Nakagawa, Takayuki Ishiwata
2. 発表標題 Difference in the brain serotonin level and anxiety-like behavior in rats between forced and voluntary exercise conditions.
3. 学会等名 Federation of European Neuroscience Societies 2020 Virtual Forum（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hikaru Nakagawa, Diasuke Matsunaga, Takayuki Ishiwata
2. 発表標題 Changes in brain monoamine levels in the preoptic area and physiological indices in a heat acclimated rat during heat exposure
3. 学会等名 14th ICPA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松長大祐, 中川晃, 石渡貴之
2. 発表標題 自発運動と強制運動の違いがラットの生理指標及び情動行動へ及ぼす影響
3. 学会等名 第27回日本運動生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石渡貴之
2. 発表標題 環境ストレスが生理指標, 脳内神経伝達物質, 情動行動に及ぼす影響
3. 学会等名 第73回日本体力医学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石渡貴之, 金田雄太, 川田輝, 安松幹展
2. 発表標題 幼若期における社会的隔離がラットの生理指標, 脳内神経伝達物質, 情動行動に及ぼす影響
3. 学会等名 第73回日本体力医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daisuke Matsunaga, Hikaru Nakagawa, Akira Kawata, Takayuki Ishiwata
2. 発表標題 Forced and voluntary exercise affect brain monoaminergic neurotransmitters and behavior differently in rats.
3. 学会等名 11th FENS forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Ishiwata, Yuta Kaneda, Akira Kawata, Mikinobu Yasumatsu
2. 発表標題 Comparison of physiological indices, emotional behaviors, and monoaminergic neurotransmitters in rat brains in isolation or group-rearing environments
3. 学会等名 11th FENS forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

立教大学 研究者情報 <a href="https://univdb.rikkyo.ac.jp/view?l=ja&amp;u=1179&amp;n=%E7%9F%B3%E6%B8%A1&amp;sm=name&amp;sl=ja&amp;sp=1">https://univdb.rikkyo.ac.jp/view?l=ja&amp;u=1179&amp;n=%E7%9F%B3%E6%B8%A1&amp;sm=name&amp;sl=ja&amp;sp=1</a> Welcome to Ishiwata's Homepage! 環境生理学研究室 <a href="https://sites.google.com/rikkyo.ac.jp/rikkyo-univ-ishiwata-lab/welcome-researchmap">https://sites.google.com/rikkyo.ac.jp/rikkyo-univ-ishiwata-lab/welcome-researchmap</a> <a href="https://researchmap.jp/read0136618">https://researchmap.jp/read0136618</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------