

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月26日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700591

研究課題名（和文） 幼若期運動による情動形成への影響とその脳内メカニズムの解明

研究課題名（英文） Effects of voluntary exercise during early postnatal periods on the development of emotion regulation.

研究代表者

石川 淳子 (ISHIKAWA JUNKO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30570808

研究成果の概要（和文）：

本研究では、幼若期ストレスである早期離乳を受けた動物は、幼少期・成熟後における新奇環境下における locomotor activity が増加するが、早期離乳直後から自発運動をしていた動物では成熟後の hyper locomotor activity が改善されることを明らかにした。また、早期離乳によって前頭前野モノアミン神経の発達異常と前頭前野錐体細胞の形態変化が起きるが、自発運動をすることでそれらが阻止されることも明らかとなった。以上より、幼若期運動の効果と重要性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：

The present study investigated the effect of voluntary exercise during early postnatal period on the abnormal behaviors and developmental disruption of prefrontal cortex induced by early weaning (EW), which is widely used as early life stress. EW caused hyper locomotor activity in the novelty in juvenile and adult animals, whereas this adverse effect of EW was not observed in adult animals which have been exercised voluntarily began simultaneously with EW until normal weaning period. In addition, voluntary exercise after EW until normal weaning period prevented disruption of monoaminergic axon development and morphological changes of the pyramidal cell in the prefrontal cortex induced by EW. The present study clearly demonstrated the beneficial effects of voluntary exercise during early postnatal period.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・身体教育学

キーワード：幼少期運動、前頭前野、発達

1. 研究開始当初の背景

現在、情動を的確に制御できない子供や若者の増加が深刻な社会問題となっているが、この原因の一つとして、情動制御に重要な役割を担っている『前頭前野』の発達異常が考えられる。前頭前野がまだ発達途中にある幼若期に、ストレスやセロトニン関連機能の異常があると、情動行動異常が起きることが実験動物を用いた研究でわかっている。一方、運動が「脳の発達に良い」と言われてはいるものの、実験動物を用いて直接的に証明した報告はない。

申請者はこれまでに、幼若期ストレスである早期離乳をラットに施すと、『前頭前野』におけるセロトニン神経線維の発育阻害が起きるが、早期離乳と同時に自発運動をした動物では発育阻害が起きないことを発見していた。セロトニンは『前頭前野』の正常な機能発達に重要な役割を担っているため、幼若期ストレスによる情動障害は、セロトニン神経異常を介した前頭前野機能異常が一因として考えられる。また、幼若期の運動には、幼若期ストレスによるセロトニン神経線維発育阻害を改善するという実験結果から、幼若期の運動は前頭前野機能の発達に効果的であると推測された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、幼若期運動には幼若期ストレスによる影響を阻止する効果があることを、「前頭前野の発達」に着目して証明するものである。そのために、(1)幼若期ストレスによって前頭前野の発達障害と情動異常が起きること、(2)幼若期の運動により、幼若期ストレスによる影響が改善されることを検証した。

3. 研究の方法

本研究では、幼若期ストレスである早期離乳による影響とそれに対する幼少期運動の効果を調べるため、(1)正常離乳(control, CNT)、(2)早期離乳(early weaning, EW)、(3)早期離乳直後から運動をさせる(EW+running, EW+R) 動物群を作製し、各群について行動と前頭前野の発達の比較検討を行った。行動はオープンフィールドテスト、高架式十字迷路、報酬獲得のためのレバー押しタスクにより評価を行った。前頭前野の発達は層構造と錐体細胞の形態学的評価を行った。さらに、脳発達に重要な役割を担っているモノアミンの神経線維の前頭前野における発達の評価も行った。

(1) 動物群作製

実験動物は雄性 Sprague-Dawley ラットを用いた。正常離乳は生後 30 日齢に行った。生後14日齢に早期離乳をした動物は生後 14～30 日齢の間、回転式ランニングホイール付きのケージで飼育する群(EW+R) と、回転不可能にするためにロックがかけられた回転式ランニングホイール付きのケージで飼育する群(EW)に分けた。各群について、2日おきに体重測定を行った。また、EW+R 群については、ランニングホイールにカウンターを取り付け、2日間における回転数を計測し、走行距離を算出した(周長:1m×回転数)。生後 30 日齢以降は3群とも、通常ケージにて単独飼育を行った。各群について、生後 30～35 日齢、9週齢の間に、赤外線センサーによる24時間ホームケージ内自発活動量を計測した。

(2) 行動評価 (オープンフィールドテスト、高架式十字迷路、報酬獲得のためのレバー押しタ

スク)

オープンフィールドと高架式十字迷路試験は生後28日齢と9週齢で、報酬獲得のためのレバー押しタスクは生後13~16週齢で行った。オープンフィールドテストでは、自発運動量、情動行動の変化を確認するために、5分間におけるgrooming、rearing、locomotor activity、空間の中央に滞在する時間を記録した。高架式十字迷路ではラットの不安を評価するために、15分間における、壁の有る・無いアームへの侵入回数、滞在時間を解析した。報酬獲得のためのレバー押しタスクでは、音が鳴っている時にレバー押しをすれば報酬(ペレット)が獲得できることを学習させた後、無意味(音が鳴っていない時)なレバー押しや、(音が鳴っている時の)レバー押し失敗回数を解析した。

(3)前頭前野発達の評価(ニッスル染色・Golji染色)

ニッスル染色は、脳を4%パラホルムアルデヒド液で灌流固定した後、前頭前野領域を含んだ40 μ mの冠状切片を作製し、1%トルイジン青にて行った。その後、各群における前頭前皮質の各層の厚さを算出し比較検討した。Golji染色はRamon-Moliner法を用いた。摘出した脳をK₂Cr₂O₇、HgCl₂、K₂CrO₄、K₂WO₄溶液に浸した後、LiOH、KNO₃溶液で処理を行い、前頭前野錐体細胞の突起の全長と分岐数を解析した。ニッスル染色・Golji染色は生後28日齢の脳で行った。

(4)前頭前野モノアミン神経線維の評価

灌流固定後に前頭前野領域を含んだ40 μ mの冠状切片を作製し、抗serotonin transporter抗体、抗dopamine beta-hydroxylase抗体、抗tyrosine hydroxylase (TH)抗体を用いた免疫染色を施すことで、セロトニン神経、ノルアドレナリン神経、TH含有神経を可視化した。tyrosine hydroxylaseはノルアドレナリンとドーパミン神経の両方が含有している酵素であるが、皮質の

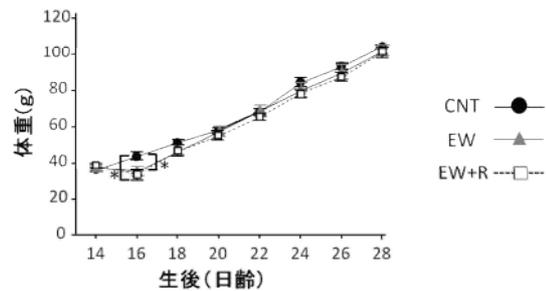
tyrosine hydroxylase含有線維は主にドーパミン神経であることが報告されている(Noack & Lewis, 1989; Akil & Lewis, 1993; Metzger et al., 1996; Pinard et al., 2008)。免疫染色によって可視化されたモノアミン神経線維の前頭前野における密度を算出・評価した。モノアミン神経線維の発達評価は生後28日齢で行った。

4. 研究成果

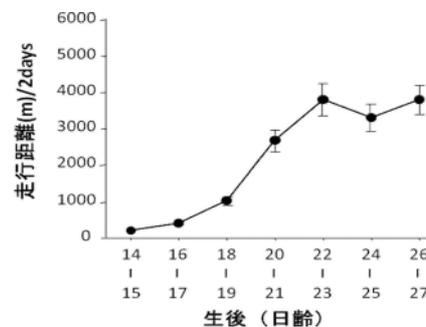
(1) 体重と運動量

早期離乳を受けたラット (EW, EW+R 群) は離乳から2日後 (生後16日齢) に、一時的に体重が減少したものの、その後は正常離乳 (CNT) との間に有意な差は認められなかった (図1)。EW+R 群は早期離乳直後からホイールランニングを行っていることが確認された (図2)。

(図1) 体重変化



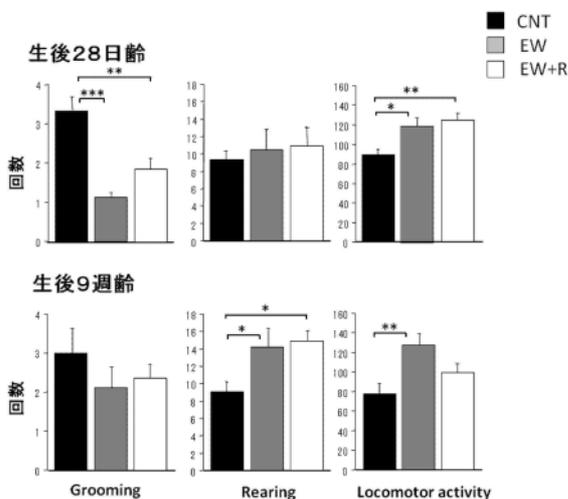
(図2) 走行距離



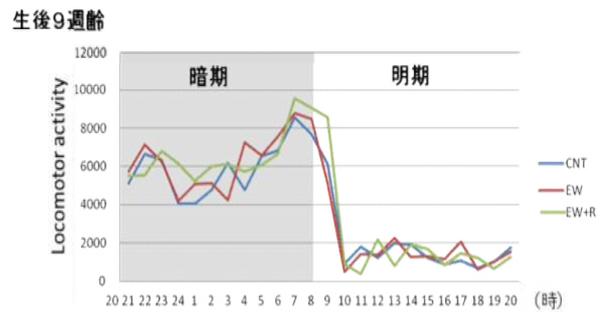
(2) 行動実験

生後28日齢のオープンフィールドテストでは、EW と EW+R 群の grooming 回数減少が認められたが、生後9週齢では3群間に差はなかった。また、生後28日齢では3群間に rearing 回数の差はなかったが、生後9週齢では CNT 群と比較して EW と EW+R 群の回数が増加していた。また、中心部の滞在割合は28日齢、9週齢とも3群間に差は検出されなかった。EW と EW+R 群では生後28日齢における locomotor activity の増加が認められたが、生後9週齢のテストでは EW 群のみに hyper locomotor activity が認められた(図3)。ホームケージ内での24時間自発活動を赤外線モニターにより解析したところ、3群間で差がなかったことから(図4)、EW を受けた動物におけるオープンフィールド内 locomotor activity の増加は、新奇環境下で特異的なものであることが推測された。高架式十字試験では、28日齢、9週齢とも3群間で不安行動に違いは認められなかったが、本試験においても EW 群の過活動が顕著に認められた。以上の結果を受けて、EW を受けた動物が多動症モデルになっていることが示唆された。このため、多動症の治療薬として用いられている methylphenidate hydrochloride を投与した後に、オープンフィールドテストを試行してみたが、過活動は改善されなかった。ま

(図3) オープンフィールドテスト



(図4) ホームケージ内 locomotor activity



た、多動症では「注意欠損」や「衝動性」が伴っていることが、多くの症例で確認されることから、報酬獲得のためのレバー押しタスク試行中における無意味なレバー押しとレバー押し失敗回数についても評価したが、3群間で顕著な差は認められなかった。今回は単純なタスクを用いたために「注意欠損」や「衝動性」が検出されなかった可能性がある。このため、今後はタスクの改善を図り、「注意欠損」や「衝動性」をさらに追及していく。

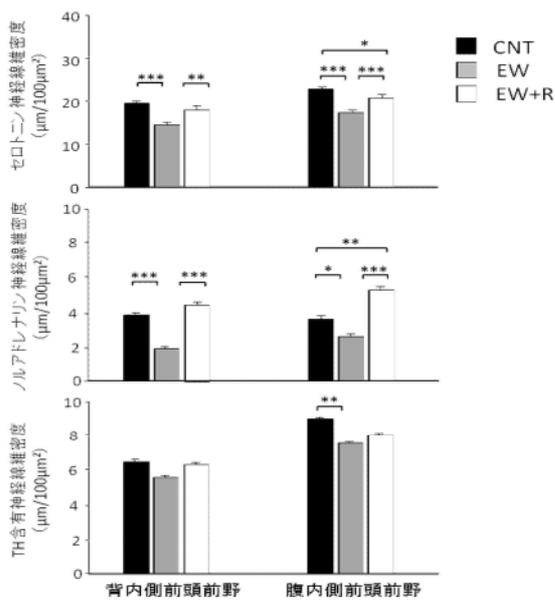
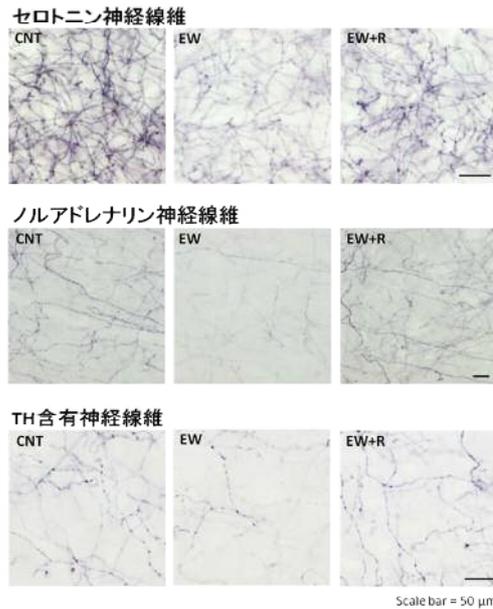
(3) 前頭前野の層構造、錐体細胞の形態

ニッスル染色により、腹側・背側における内側前頭前野の各層の厚さを測定したが、3群間に差は認められなかった。Golgi 染色法により内側前頭前野錐体細胞を可視化して形態学的解析を行ったところ、EW 群では突起の全長と分岐数の減少が確認された。一方、EW+R 群ではこれらの形態変化は認められなかった。

(4) 前頭前野モノアミン神経線維密度

EW 群は背側内側前頭前野セロトニン、ノルアドレナリン神経線維密度が有意に減少していたが、EW+R 群には減少が認められなかった(図5)。腹側内側前頭前野セロトニン神経線維は EW、EW+R 群共に減少が確認されたが、EW+R 群は EW 群よりも有意に高かった。EW 群の腹側内側前頭前野ノルアドレナリン神経線維は減少していたが、EW+R 群は CNT 群よりも有意に増加していた。TH 含有神経線維は、EW 群の腹内

(図5) 前頭前野モノアミン神経線維



側前頭前野で減少が確認されたが EW+R 群では確認されなかった。縫線核セロトニン、青斑核ノルアドレナリン、腹側被蓋野 TH 含有神経細胞の数には3群間で差はなかった。

本研究では、早期離乳によって新奇環境における locomotor activity の増加が起きるが、早期離乳直後から自発運動をしていた動物では、

成熟後の hyper locomotor activity が認められなくなる事が明らかとなった。また、早期離乳は前頭前野錐体細胞の形態変化とモノアミン神経線維の発達異常を引き起こすが、早期離乳をさされても自発運動をしておくことでそれらが阻止されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

① Ishikawa J, Ishikawa A, Dekitani Y, Nakamura S. Exercise prevents increased anxiety behaviors and locomotor activity and decreased monoaminergic axon density in the rat brain induced by early weaning. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting, November 14, 2010 San Diego, USA.

② Ishikawa J, Ishikawa A, Dekitani Y, Nakamura S. Exercise prevents increased anxiety behaviors and decreased serotonergic axon density in the rat brain induced by early weaning. Neuro2010 (第33回日本神経科学大会), September 2, 2010, Kobe Kobe Convention Center, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 淳子 (ISHIKAWA JUNKO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30570808