

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350822

研究課題名(和文) 自発運動が体温調節及び視索前野/前視床下部の脳内神経伝達物質に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of voluntary exercise on neurotransmitters in the preoptic area and anterior hypothalamus and thermoregulation in rats

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・准教授

研究者番号：40435235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：体温調節機構においては視床下部の視索前野/前視床下部(PO/AH)が特に重要な部位であり、セロトニン(5-HT)が熱放散機構、そしてドーパミン(DA)、ノルエピネフリン(NE)が熱産生機構に関与していることが示されている。本研究では、自発運動によるPO/AHの脳内神経伝達物質の変動及び体温調節に及ぼす影響を解明することを目的とした。自発運動群は非運動群に比べて、安静時の心拍数が低いという結果が得られた。また、深部体温に関しても、昼夜の高低の変動がハッキリしており、メリハリがあることが明らかであった。更に自発運動群のPO/AHのDAとNEが非運動群と比べて有意に高い結果であった。

研究成果の概要(英文)：The preoptic area and anterior hypothalamus (PO/AH) is considered to be the primary locus for thermoregulatory system. In addition, serotonin (5-HT), dopamine (DA) and norepinephrine (NE) are very important monoaminergic neurotransmitter and its system has been involved in the regulation of thermoregulation. In this study, we investigated in the effects of voluntary exercise on brain monoaminergic neurotransmitters and thermoregulation in rats. Results showed that the heart rate in the voluntary exercise group were lower level compared with control group. Furthermore, core body temperature in the exercise group also showed clear circadian rhythm during the day compared with control group. The levels of NE and DA in the PO/AH in voluntary exercise group were higher than control group significantly. These results indicate that voluntary exercise may affect on the health and condition in the brain neurotransmitters.

研究分野：環境生理学

キーワード：脳内神経伝達物質 自発運動 体温調節

### 1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む恒温動物は、個体内部の熱産生量が増えた時や外界の温度が変動した時に、深部体温を一定の範囲内に保つ体温調節機能を備えている。しかし、近年の異常気象は留まる事を知らず、今年度も猛暑日、真夏日の日数が30日超を記録するなど、結果として熱中症の増加が屋外でのスポーツ中に限らず室内や就寝時にも起こり、重要な問題となっている。

熱中症の事故は、地球温暖化の影響もあるが、体温調節機能の低下、特に熱放散機能の低下が一因になっていると考えられる。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は、“朝起きられない”、“やる気が出ない”などであり、これらの状況は子供の発育発達状況に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、子供たちを取り巻く生活環境の変化に起因すると考えられる。特に最近の子ども達は外で遊ぶことが少なくなっているため、筋肉量の減少や、筋活動低下による体内温度変化の欠如、更には外気温に暴露されないため、温度感知器である皮膚への刺激が減少し、体温調節が積極的に働かなくなっていることが要因と考えられる。その結果、脳内の制御を司る神経伝達物質の放出量の減少またはバランスの乱れが起きていると考えられる。

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り、これまで体温調節機構における神経伝達物質の役割に関する研究においても、様々な報告がなされている (Clark and Lipton, 1986)。その中でも、5-HT, DA, NE は体温調節機構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。神経伝達物質の役割が完全に解明されれば、最終的には現在世界中で問題となっている統合失調症などの病気の解明にもつながる。近年増加傾向である“躁鬱状態”は5-HT, DA, NE 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 Meusen, 2010)。この様に近年、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ていると考えられ、更に、行動レベルは脳全体の神経伝達物質のバランスではなく、特定領域の神経核での神経伝達物質のバランスによって調節されていると考えられるようになってきた。

本研究では特に体温調節機構において重要な部位である視床下部の PO/AH に注目し、自発運動による PO/AH の脳内神経伝達物質の変動及び体温調節に及ぼす影響を解明することを目的としている。今後益々地球温暖

化や産業化に伴う運動不足化が進む中で、体温調節機能の維持、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を解明する必要がある。

本研究者はこれまで体温調節機構において重要な部位である PO/AH の役割が主に熱産生の抑制であることや (Ishiwata et al., 2002, 2005)、体温調節機構における PO/AH の 5-HT やガンマアミノ酪酸 (GABA) の役割についても明らかにしている (Ishiwata et al., 2004, 2005)。

また、体温調節機構における DA, NE の役割 (Saito et al., 2005, 2008) や、運動中の PO/AH の役割や神経伝達物質の変動 (Hasegawa et al., 2005, 2008; Takatsu et al., 2010) に関しても共同研究にて明らかにしている。

### 2. 研究の目的

本研究では、体温調節機構において重要な部位である視床下部の PO/AH に注目し、自発運動による PO/AH の脳内神経伝達物質 (5-HT, DA, NE) の変動及び体温調節に及ぼす影響を解明することを目的とする。

1 年目は先ず自発運動群と非運動群の生理指標の差異に着目する。飼育中の体重変化や深部体温、心拍数、活動量の日内リズムの差異に注目し、最終的に運動群と非運動群の脳をそれぞれ取り出し、ホモジネート法により PO/AH の 5-HT, DA, NE を測定し、比較検討する。2 年目はマイクロダイアリシス法を用いて体温調節が活発になる暑熱暴露時 (35 ) 及び寒冷暴露時 (5 ) の体温調節反応および 5-HT, DA, NE 放出量の経時的变化を運動群と非運動群において測定し、短期的な温熱刺激に対する運動の効果を検討する。3 年目は同じく運動群と非運動群に対して 1 か月間の温熱暴露 (5 または 35 ) を行い、ホモジネート法とマイクロダイアリシス法を組み合わせ、長期的な温熱刺激に対する運動の効果を体温調節反応と 5-HT, DA, NE 放出量から検討する。最終的に、自発運動が体温調節及び PO/AH の 5-HT, DA, NE に及ぼす影響を明確にする。

### 3. 研究の方法

これまで運動と中枢制御に関する研究において、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た研究はあるが、動物にストレスがかかることが問題であった。そこで、本研究ではストレスのかからない自然な状態での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、体温調節反応と脳内神経伝達物質の比較検討を行う。実験手法も従来行われてきたホモジネート法に加え、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。これらの手法の組み合わせに加え、on-line 液体クロマト

グラフィー法により、視床下部の PO/AH の脳内神経伝達物質放出量 (5-HT: セロトニン, DA: ドーパミン, NE: ノルエピネフリン) の計測を高感度で測定することができる。

(1) 平成 26 年度: 自発運動群と非運動群の生理指標の日内リズムおよび神経伝達物質量の比較

#### 実験動物:

実験には雄 Wistar ラットを使用した。6 週齢で購入し、その後運動群と非運動群に分けて 1 ヶ月間飼育する。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% で飼育する。実験中以外の時間は、水、餌の摂取を自由とする。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 (承認番号: LS14027A)。

#### 無線式小型体温計手術:

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) を腹腔内へ埋め込む手術を行った。ソムノペンチル麻酔 (50 mg/kg, intraperitoneal, 共立製薬 (株), Japan) のもと、無線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。心拍数測定用の電極線は胸部筋肉及び腹部筋肉に縫合糸で縫い付けた。

#### 実験プロトコル:

深部体温、心拍数、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。飼育開始 1 か月後に運動群と非運動群の脳をそれぞれ素早く取り出し、マイクロスライサーにて 300  $\mu\text{m}$  の切片を作成し、マイクロパンチにて 1mm 四方の大きさを PO/AH を取り出し、即座にホモジナイザーにて磨り潰した。脳内神経伝達物質 (5-HT, DA, NE) 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。

(2) 平成 27 年度: 自発運動群と非運動群の短時間温熱暴露に対する体温調節反応と 5-HT, DA, NE 放出量の比較

実験動物、無線式小型体温計手術は基本的に平成 26 年度と同じ条件で行った。マイクロダイアリス法により、体温調節が活発になる暑熱暴露時 (35℃) 及び寒冷暴露時 (5℃) の体温調節反応及び PO/AH の 5-HT, DA, NE 放出量の経時的变化を測定し、温熱刺激に対する反応を検討した。

#### マイクロダイアリスプローブ手術:

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。ソムノペンチル麻酔のもと、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; Paxions and Watson, 1982) となるように挿入する。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 (1.5~4.0%, 0.8 L/min, 武田薬品工業 (株), Japan) の下、マイクロダイアリスプローブ (A-1-8-01, 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:

実験はすべて明期 (7:00-19:00) の間に行った。実験開始前に動物に挿入されたダイアリスプローブのインレットにマイクロインジェクションポンプを繋ぎ、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する。リキッドシーベル (TCS2-23, Eicom, Japan) とコイルチューブ (JT-10IB, 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  $\mu\text{l}/\text{min}$  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 1 分毎に連続測定した。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が安定した時点を測定開始時間とした。すべての実験は測定開始から 1 時間を安静期間とした。測定開始 60 分後の各指標を基準値として統計分析を行った。

暑熱暴露 (35℃) および寒冷暴露 (5℃) はそれぞれ 3 時間行った。暴露終了後は通常的环境温 (23℃) に戻し、測定を続けた。

脳内神経伝達物質 (5-HT, DA, NE) は 20 分毎 (20  $\mu\text{l}$ ) 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  $\mu\text{m}$  の切片標本を作製しプローブ挿入位置を組織学的に確認した (Ishiwata et al., 2004)。

(3) 平成 28-29 年度: 自発運動群と非運動群の長期間温熱暴露に対する体温調節反応と 5-HT, DA, NE 放出量の比較

基本的に平成 27 年度と同じ条件で実験を行った。運動群と非運動群のラットに対して、1 か月間の温熱暴露 (5℃ または 35℃) を行

い、ホモジネート法とマイクロダイアリシス法を組み合わせ、長期的な温熱刺激に対する運動の効果と体温調節反応と 5-HT, DA, NE 放出量から検討した。

#### 4. 研究成果

運動群は非運動群に比べて、安静時の心拍数が低いという結果が得られた。また、深部体温に関しても、昼夜の高低の変動がハッキリしており、メリハリがあることが明らかであった。体重についても運動群の方が軽く、運動の効果が生体に関して良好であることを確認出来る結果であった。

注目すべきは運動群と非運動群の脳内神経伝達物質の差であったが、PO/AH の DA と NE が非運動群と比べて有意に高い結果であった。5-HT は各部位で統計的な有意差は認められなかった。DA と NE は「やる気」や「行動」に関連する物質、すなわち興奮性の物質と考えられている。すなわち、運動により視床下部の神経活動が活発になり、脳内神経伝達物質の放出を促進したと思われる。

また、暑熱暴露に対する反応については、運動群の方が非運動群と比べてベースの体温が高く、過度の体温上昇が起きる可能性が考えられたが、暑熱暴露中の体温上昇の差異は特に無かったため、運動群において体温調節機能が向上した可能性が考えられた。また、今までのところそれに関わる神経伝達物質は DA が特に関与することが示唆された。今後、更に詳細な分析を進め、自発運動による生体に及ぼす影響を詳細に検討していきたい。

#### 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)

[雑誌論文](計 3 件)

Brian A. Lloyd, Holly S. Hake, Takayuki Ishiwata, Caroline E. Farmer, Esteban C. Loetz, Monika R. Fleshner, Sondra T. Bland, Benjamin N. Greenwood, Exercise increases mTOR signaling in brain regions involved in cognition and emotional behavior, Behavioural Brain research, 323, 56-67, 2017. (査読有) Takayuki Ishiwata, Arisa Oshimoto, Takehito Saito, Yasunori Kotani, Shigeki Nomoto, Yasutsugu Aihara, Hiroshi Hasegawa, Benjamin N. Greenwood, Possible mechanisms of hypothermia after inhibition of the median or dorsal raphe nucleus of freely moving rats, NeuroReport, 27, 1287-1292, 2016. (査読有)

Hikaru Nakagawa, Takeru Matsumura, Kota Suzuki, Chisa Ninomiya, Takayuki Ishiwata\*, Changes of brain monoamine levels and physiological indexes

during heat acclimation in rats, Journal of Thermal Biology, 58,15-22, 2016. (\*Corresponding author)(査読有)

[学会発表](計 3 件)

石渡貴之(招待講演), ラットの体温調節機構における脳内セロトニンの関与~マイクロダイアリシス, テレメトリー, ホモジネート, 行動実験によるアプローチ~, 第 31 回運動と体温の研究会, 愛媛, 平成 29 年 9 月

石渡貴之(オーガナイザー, シンポジスト), 環境ストレスに対する生理指標, 脳内神経伝達物質, 情動行動の連関(シンポジウム:「脳-身体-環境の連関について、行動神経科学的アプローチからの知見を運動生理学に生かす」), 第 25 回日本運動生理学会大会, 横浜国立大学, 平成 29 年 7 月

Brian A. Lloyd, Holly S. Hake, Takayuki Ishiwata, Caroline E. Farmer, Esteban C. Loetz, Jennifer C. Burns, Monika R. Fleshner, Sondra T. Bland, Benjamin N. Greenwood, Exercise increases mTOR signaling in brain regions involved in cognition and emotional behavior, Neuroscience 2016, San Diego, USA.

[その他]

ホームページ等

<http://univdb.rikkyo.ac.jp/view?l=ja&u=1179&n=%E7%9F%B3%E6%B8%A1&sm=name&sl=ja&sp=1>

[http://www2.rikkyo.ac.jp/web/ishiwata/Ishiwata\\_Lab/Welcom.html](http://www2.rikkyo.ac.jp/web/ishiwata/Ishiwata_Lab/Welcom.html)

#### 6. 研究組織

(1)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・准教授  
研究者番号: 4 0 4 3 5 2 3 5

(2)研究分担者

(3)連携研究者

長谷川 博(HASEGAWA, Hiroshi)  
広島大学・総合科学研究科・教授  
研究者番号: 7 0 3 1 4 7 1 3

柳田 信也(YANAGITA, Shinya)  
東京理科大学・理工学部・助教  
研究者番号: 8 0 4 6 1 7 5 5

(4)研究協力者

鈴木 航太(SUZUKI, Kota)  
松村 健(MATSUMURA, Takeru)  
中川 晃(NAKAGAWA, Hikaru)