

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：34412

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21257

研究課題名（和文）マイクロダイアリス法を用いた自発運動と強制運動の効果解明に関するアプローチ

研究課題名（英文）An approach to elucidating the effects of voluntary and forced exercise using microdialysis method

研究代表者

松長 大祐 (Daisuke, Matsunaga)

大阪電気通信大学・医療健康科学部・特任講師

研究者番号：30963508

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、マイクロダイアリス法を用いて、自発運動と強制運動が脳内神経伝達物質（セロトニン：5-HT、ノルアドレナリン：NA、ドーパミン：DA）に及ぼす即時的な反応を明らかにすることであった。

作成したマイクロダイアリス測定専用の飼育ケージを用いて、自発運動中の脳内神経伝達物質の測定を試みた。自由に活動する実験動物の制御が困難であり、測定を実施することができた9匹のうち、脳内神経伝達物質のデータを取得することができたのは、6匹であった。しかし、これまでの実験において、測定方法に改善を重ね、実験方法を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自発運動と強制運動の効果の違いは明らかとなっていないことが多い。マイクロダイアリス法を用いて、自発運動と強制運動の効果と比較する実験は、国内外の先行研究の動向からみても先駆的であり、独創性も高いことから、本研究において得られた自発運動用回転ホイールを用いた自発運動中の脳内神経伝達物質のデータは価値の高いものである。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the immediate responses of voluntary and forced exercise to neurotransmitters (serotonin: 5-HT, noradrenaline: NA, and dopamine: DA) in the brain using the microdialysis method.

We tried to measure neurotransmitters in the brain during voluntary exercise using a cage specially designed for microdialysis measurement. It was very difficult to control the experimental animal with freely active. The nine rats for which measurements were performed, six were able to obtain data on neurotransmitters in the brain. However, through this study, improvements were made to the measurement method and an experimental method was established.

研究分野：行動神経科学

キーワード：自発運動 強制運動 脳内モノアミン マイクロダイアリス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自発運動(自発的な運動)と強制運動(強いられる運動)の神経科学的、行動学的変動の差異は十分に明らかとなっていない。齧歯類を用いて自発運動と強制運動を比較した先行研究では、どちらにおいてもストレス抵抗性を獲得することや脳内の報酬系回路を活性化することが報告されており、どちらの運動においても共通の効果を得ることを示唆している。しかし、両運動で異なった効果を示す研究結果も報告されている。本研究者がこれまで行った実験動物(ラット)の安楽死後の脳の分析では、自発運動により脳内セロトニンの含有量が背側縫線核、正中縫線核、線条体、室傍核において増加し、不安様行動を抑制することを明らかにしている¹⁾。

自発運動と強制運動を比較した研究では、運動の効果や自発運動と強制運動の潜在的な差異を明らかにする上で、実験方法上の課題が多くあったことについて注視すべきであると本研究者は考えている。具体的には、「自発運動と強制運動の運動方法や運動量が統一されていない点」や「多く実験は実験動物が安静となる明期に行われている点」である。また、マイクロダイアリシス法を用いて、運動中における脳内神経伝達物質の即時的に測定し、自発運動と強制運動を比較したようなデータは報告されていない。

マイクロダイアリシス法を用いて、運動中の脳内神経伝達を測定する過去の先行研究においては、自発運動用回転ホイールによる運動時の測定がデータの報告例が特に少ない。これは、おそらく「走行距離の個体差が大きいこと」や「自由に動きまわる実験動物の管理が困難なこと」などの実験方法上の課題があったためではないかと考えられる。

2. 研究の目的

上述した背景より、自発運動と強制運動には異なった効果があると仮定し、本研究ではマイクロダイアリシス法を用いた脳内神経伝達物質の測定を行うための処置(ガイドカニューラ等の埋め込み)をラットに施し、暗期下で自発運動または強制運動を行い、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて脳内神経伝達物質(ノルアドレナリン(NA)、ドーパミン(DA)、セロトニン(5-HT))の動態を分析することを目的とした。

3. 研究の方法

実験には雄のWistar系雄ラットを用いた。自発運動と強制運動のマイクロダイアリシス法を用いた脳内神経伝達物質の測定時のイメージは図1に示した通りである。自発運動群(n=6)と強制運動群(n=6)は12h:12hの明暗周期下で個別飼育を行った。水とエサの摂取は自由とし、環境温は 23 ± 1 に設定した。

実験プロトコルは図2に示した通りである。それぞれのラットは搬入後、自発運動または強制運動を3日間継続した後、マイクロダイアリシスプローブ挿入用のガイドカニューラを脳内の線条体に埋め込む手術(MD手術)を行った。手術は、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あたりドミトール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、十分に麻酔を効かせた状態で行った。手術後、予備実験を含む3日間の回復期間の後、マイクロダイアリシスプローブを挿入し、運動中の脳内神経伝達物質の即時的変化の測定を暗期に実施した。手術から4日後の測定日は運動前安静時(2時間)、運動時(2時間)、運動後安静時(2時間)の計6時間の測定を行った。なお、強制運動時の走行距離および走行速度は、自発運動時の走行データを当てはめた。脳内神経伝達物質の測定にはエイコム社製の「HPLC-ECD, HTEC-510」を使用した。

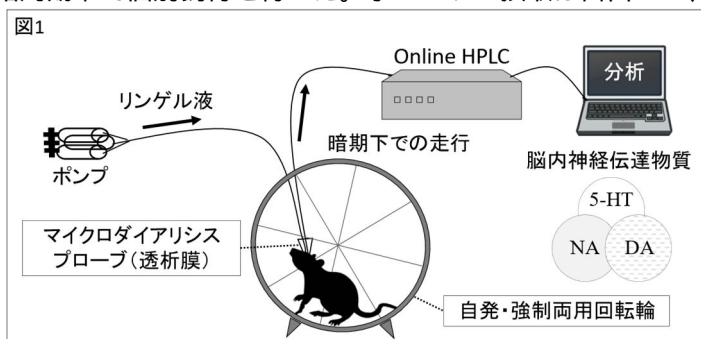


図2: 実験プロトコルのタイムライン。搬入後3日間条件飼育、MD手術後3日間回復期、測定(6時間)と採血(6時間)を行う。

4. 研究成果

(1) 研究計画の進捗

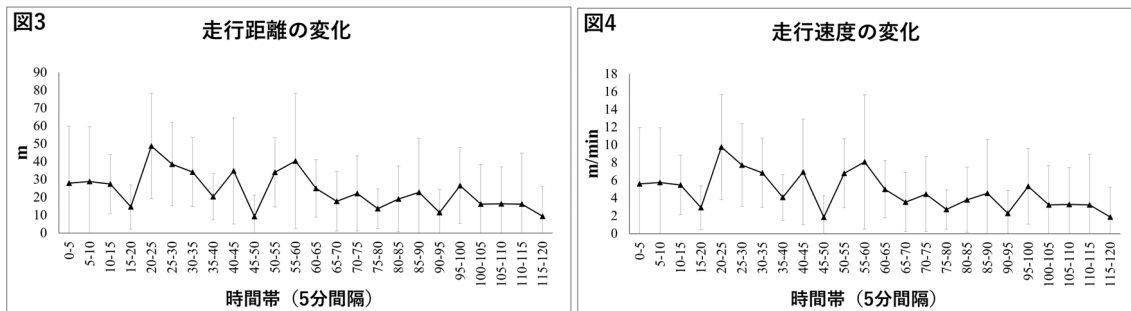
本研究は、当初の実験計画では自発運動群と強制運動群のデータを取得する予定であったが、強制運動群の実験は実施できなかった。その理由としては、本研究では、自発運動と強制運動の条件を一致させるために独自の回転ホイールを作成し、実験を遂行する予定であったが、初年度はその設計と作成に時間を要したためである。また、想定していたものの自発運動中の脳内神経伝達物質の測定は困難であり、測定中にマイクロダイアリシスプローブが外れてしまい、実験を中断せざるを得ないことがあったことも実験の遂行が滞ってしまった理由の一つであった。

しかし、測定方法を改善する中で、マイクロダイアリシスプローブが測定開始から終了するま

で間に外れないよう固定する方法を実施してから、実験を中断することは少なくなり、測定の成功率も確実なものとなってきた。下記の(2)および(3)の結果は、測定に成功した自発運動群のラット 6 匹のデータである。自発運動用回転ホイールによる運動中の脳内神経伝達物質のデータは報告例が存在せず、貴重なものである。

(2) 走行距離および走行速度

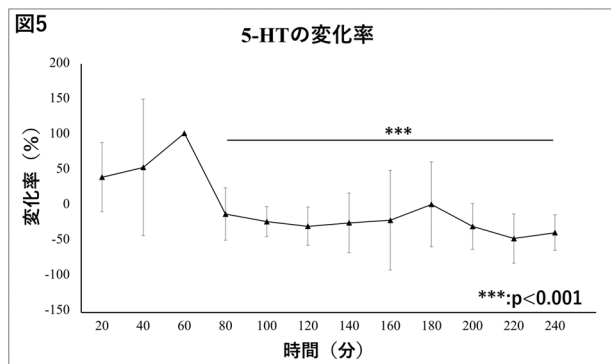
図3は、運動時2時間の5分ごとの走行距離であり、図4は走行速度を示したグラフである。ラットは、運動時に5分間で最大平均48.8m 走行した。なお、2時間の平均総走行距離は、575.5 ± 365.7m であった。最大平均走行速度は、9.76m であった。



(3) 脳内 5-HT の変化

図5は、線条体に挿入されたマイクロダイアリスプローブから回収された脳内 5-HT の変化率を示したグラフである。60分時点までは、安静状態であり、60分時点から180分時点までの間は自発運動を実施している時間帯である。統計処理は、60分時点と各時間帯において対応のある T 検定を実施し、有意水準は5%とした。

脳内 5-HT は、自発運動を開始してから有意に減少し、自発運動を中断し、安静状態となった場合においても減少した状態から元に戻ることはなかった。5-HT 以外の神経伝達物質は、分析器の不調による欠損が多いため、公開しないこととした。



(4) 考察

本研究者が過去に実施した研究では、自発運動によって脳内 5-HT が増加する結果が得られている¹⁾。しかし、当時のデータは、安楽死後の脳における細胞内外の 5-HT を含むサンプルであり、本研究のデータは運動中のデータである。マイクロダイアリス法によって回収される脳内神経伝達物質は、細胞外に存在しているものとされているため、自発運動中は線条体における 5-HT の放出が抑制されることが示唆された。

実験動物の中には、測定時の走行距離が飼育時の走行距離と比較して、著しく減少した個体もいた。本研究では、MD 手術による回復期間を 3 日間としたが、運動させる場合においては、回復期間を延長する必要性が考えられた。また、短期間と長期間の運動では、中枢神経系の及ぼす効果や神経細胞同士の構造が異なることも想定されるため、測定前に実施する運動を短期間(3日)である場合に加えてと長期間(4週間)の実験も実施する必要性が考えられた。

(5) 今後の研究計画

マイクロダイアリス法を用いて、自発運動と強制運動の効果を比較する実験は、国内外の先行研究の動向からみても先駆的である。また、双方の運動負荷条件を可能な限り一致させる実験手法も独創的な点である。今後は、本研究によって得ることが出来た自発運動の走行データを強制運動群に当てはめて引き続き実験を実施する。

引用文献

- 1) Matsunaga D., Nakagawa H., Ishiwata T., Difference in the brain serotonin and its metabolite level and anxiety-like behavior between forced and voluntary exercise conditions in rats. *Neuroscience letters* 744: 135556, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------