

**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**  
**2019年度研究成果報告書**

<b>研究科名</b>	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		
<b>研究代表者</b> (2020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 1年 (学生番号: 19wd005h)		松長 大祐 印
<b>指導教員</b>	所属部局・職		氏名
	コミュニティ福祉学部・教授		石渡 貴之 印
<b>自然・人文・社会の別</b>	人文	<b>個人・共同の別</b>	個人
<b>研究課題</b>	運動様式の差異による生理指標、情動行動及び脳内神経伝達物質の変容解明		
<b>研究組織</b> (研究代表者・共同研究者) ※2020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1年次		松長 大祐
<b>研究期間</b>	2019 年度		
<b>研究経費</b> (1円単位)	(支出金額) 199,535 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、実験を行う時間帯によって脳内神経伝達物質と情動行動に大きな違いが現れる可能性が考えられた。そこで本実験では、各種運動条件でラットを4週間飼育した後、これまで暗期に実施していた脳の解剖と情動行動テストを明期に行い、明期と暗期の脳内神経伝達物質と情動行動の違いを明らかにすることを目的とした。

**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 ] [ 情動行動 ]

**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 Wistar 系雄ラット 16 匹 (2 匹×4 群×2 実験) を用いた。室温は 23 度、明暗周期 12:12 に設定し、餌と水は自由摂取とした。自発運動制限群 (Voluntary limited: VL 群) は、暗期の一時間のみ回転ホイールを与えることで自発的運動をさせ、強制運動群 (Forced: F 群) には自発運動群のラットが走行した平均距離を強制運動用の回転ホイールにて走らせた。無制限の自発運動群 (Voluntary: V 群) は、VL 群と同じホイールを使用し、自発運動の制限は行わないこととした。なお VL 群、F 群、V 群とも運動は週 5 回行うこととした。以上の環境で一か月間飼育し、その後情動や活動性を測る行動テストと脳内神経伝達物質の分析を行い、コントロール群 (Sedentary Control: SC 群) を含めた 4 群で比較した。

運動プロトコル終了後のラットは実験 1 で脳内神経伝達物質の分析を行い、実験 2 で情動行動テストとしてオープンフィールドテストを行った。情動行動テストの影響がでないように、実験 1 と実験 2 のラットは別の個体を用い、実験はすべて明期に行った。

**実験 1 : 脳内神経伝達物質の測定**

それぞれの群のラットを 4 週間飼育した後に安楽死させ、素早く脳を摘出した。全てのラットの脳摘出は明期の間に行った。脳取り出しから脳内神経伝達物質 (ノルアドレナリン: NA、ドーパミン: DA、セロトニン: 5-HT) の分析までの手順は以下に記した。摘出した脳をリンゲル液内 (リンゲル液 1L あたり NaCl: 8.6g, KCl: 0.30g, CaCl<sub>2</sub>: 0.33g) でマイクロスライサー (PR07, 堂阪イーアム) にて厚さ 300 $\mu$ m の切片を作成し、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 の大きさで取り出した。取り出した試料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 $\mu$ l 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 (CF15RX II, Hitachi Koki) (18, 800G×15 分, 0 $^{\circ}$ C) にかけて、上澄みを採取して 0.45 $\mu$ 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 $\mu$ l で pH 調整を行った。

上記の試料は高速液体クロマトグラフィー (HPLC: High Performance Liquid Chromatography, ECD-700 system, エイコム) にて分析を行った。試料内の NA、DA、5-HT を分離する役割を果たすカラムは EICOMPAK SC-50DS (3.0mm id×150mm, エイコム) を用いた。分析時に用いる緩衝液 (バッファー) は、メタノールの濃度を 17% とした。

脳の分析部位は、NA を合成する青斑核、DA を合成する黒質と腹側被蓋野、5-HT を合成する背側縫線核と正中縫線核の細胞体 5 部位と、認知機能を司る前頭前野、運動調節を司る線条体、体温調節を司る視索前野、内発的な活動を司る側坐核 (shell 領域)、ストレス反応を司る室傍核、摂食中枢のある視床下部外側野、満腹中枢のある視床下部腹内側核、自律神経を司る視床下部背内側核、記憶を司る海馬、情動を司る扁桃体といった投射先 10 部位で、計 15 部位とした。

**実験 2 : オープンフィールドテスト**

ラットを新奇な環境である白い箱の中に放ち、その際の行動から不安様行動を調べるテストを行った。箱は縦横 75cm×高さ 50cm で、底を黒いペンで 4×4 マスに分けている。測定項目は、中央 2×2 マスでの活動 (時間と回数)、総区画移動数、毛づくろいや各種立ち上がり行動などを観察し、10 分間の測定を行った。近年の研究において High-leaning とされる立ち上がり行動が不安を決定づける行動であることが報告されているため、こちらの分析も行った。

本実験は本学のライフサイエンスに係る研究・実験及び安全委員会より承認を受けて行った。(承認番号: LS19036A)

## 研究成果の概要 つづき

## ● 結果

明期実施 (2 匹×4 群×2 実験) =16 匹 ※統計未実施

明期 V 群背側縫線核における 5-HT 含有量が低い傾向を示した。また、正中縫線核における 5-HT 含有量では SC 群が高値を示し、他の運動群は同程度であった。線条体における 5-HT 含有量は V 群が高い傾向を示した。前頭前野、室傍核、扁桃体における DA 含有量は各群で同程度であり、線条体では V 群が他の 3 群と比較して低値を示した。また、室傍核にお

ける NA は V 群が他の 3 群と比較して高値を示した。

オープンフィールドテストにおける中央滞在時間、中央活動回数は SC 群が高値を示し、他の運動群は同程度であった。しかし、F 群では High-leaning が多く観察された。また暗期実施ではほとんど観察されなかった毛づくろい行動が明期実施では全ての群で観察され、V 群が目立って多く観察された。

## 明期実施群と暗期実施群の比較 ※統計未実施

明期実施群における脳内神経伝達物質の測定および情動行動テストの結果は、暗期実施群とは対照的、または異なった傾向の結果が得られた。脳内神経伝達物質において、5-HT 含有量は暗期実施群と比較して、明期実施群の方が高い傾向を示した。また背側縫線核の 5-HT 含有量は暗期 V 群が有意に高い結果を示しており、明期 V 群とは対照的となる結果が得られた。また暗期実施群では NA や DA に有意な差が認められなかったが明期実施群では現段階で差が見られた。

オープンフィールドテストにおける全ての行動は、明期実施群では暗期実施群と比較して大きく減少した。しかし、毛づくろい行動においては明期実施群で多く観察された。暗期実施群と同じ傾向を示したのは High-leaning のみであった。

## ● 考察

博士課程前期課程で行った暗期実施群において V 群の背側縫線核、正中縫線核、線条体、室傍核における 5-HT の含有量が他の 3 群と比較して有意に増加し、それらがオープンフィールドテストにおける中央滞在時間の増加、High-leaning の減少といった不安の低減に関係していることが考えられた為、本実験では、それらの指標が明期に実施した場合でも同じ結果が現れるかを調査した。結果は対照的なものや暗期実施群では得られなかった NA、DA の差が得られた。

実験を行う時間帯による違いを調査した研究、あるいは意図的に異なった時間帯で採取したデータを比較した研究は少なく、多くの研究が明期または暗期に実施したもののみで比較している。しかし、ヒトや齧歯類には概日リズムが機能しており、脳内神経伝達物質や情動行動もその影響が大きいことが考えられる。実際にラットにおけるオープンフィールドテストや高架式十字路課題といった精神状態を推測するものの反応は時刻によって変化し、概日リズムが及ぼす影響は測定項目によって異なることが確認されている (Jones and King, 2001; Andrade et al., 2003)。本実験においても明期と暗期における脳内 5-HT 含有量とオープンフィールドテストによる各種行動は大きく異なる結果となった。これは明期と暗期どちらで実施する方が適しているかの問題ではなく、双方で実施することにより、神経行動学的により深い考察が可能であることを示している。本研究者の研究目的は自発運動と強制運動が情動行動及び脳内神経伝達物質に与える影響の差異を明らかにすることであり、本実験結果から暗期実施だけではわからなかった新しい知見を発見できることが期待される。

## 参考文献

Andrade MM, Tome MF, Santiago ES, Lusía Santos A, de Andrade TG (2003), Longitudinal study of daily variation of rats' behavior in the elevated plus-maze. *Physiology and Behavior* 78:125-133

Jones N and King SM (2001), Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety. *Physiology and Behavior* 72:99-106

**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