

| | | | | |
|---------|---------------------------------|---------|----------|-------|
| 氏名(本籍) | にし 西 | しま 島 | たけし 壮 | (長野県) |
| 学位の種類 | 博士(体育科学) | | | |
| 学位記番号 | 博甲第4112号 | | | |
| 学位授与年月日 | 平成18年3月24日 | | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 | | | |
| 審査研究科 | 人間総合科学研究科 | | | |
| 学位論文題目 | トレッドミル走運動時のラット海馬局所血流量の増加とその調節機構 | | | |
| 主査 | 筑波大学教授 | 学術博士 | 西平賀昭 | |
| 副査 | 筑波大学助教授 | 医学博士 | 征矢英昭 | |
| 副査 | 筑波大学助教授 | 教育学博士 | 西保岳 | |
| 副査 | 筑波大学教授 | 博士(医学) | 一谷幸男 | |

論文の内容の要旨

QOL (Quality of Life) の高い生活を営むためには、身体健康だけでなく脳健康(脳フィットネス)を高めることが望ましいと考えられるが、脳フィットネスを高める手段のひとつとして運動が極めて有用である可能性が多く先行研究により示唆されている。脳高次機能に対する運動効果に関しては特に、記憶・学習を担う海馬を対象とした動物実験が注目を集めており、これまでに回転ホイールを用いた自発運動が脳由来神経栄養因子を増加させ、神経新生を促進すること、さらに空間学習能力を向上させることなどが報告されている。これらの報告から運動が海馬神経活動を活性化することが示唆されており、実際にトレッドミル走運動が神経興奮マーカーである c-Fos タンパク発現を海馬で増加させることが報告されている。しかしながらこの研究ではトレッドミル走運動後に脳を摘出し c-Fos タンパク発現を測定しているため、実際に運動遂行中に海馬神経活動が活性化しているかは明らかでない。運動時の海馬神経活動をモニターすることは海馬に対する運動効果のメカニズムを検討するための重要課題と考えられる。脳神経活動の活性化に伴い速やかに局所脳血流量が増加することから、局所脳血流量の変化は脳神経活動の間接的指標となることが広く認知されており、この合目的な調節機構は Neurovascular coupling と呼ばれている。この局所脳血流量の変化は、比較的新しい血流測定法であるレーザードップラー血流測定法(LDF, laser-Doppler flowmetry)を用いて、リアルタイムで継続的に測定することができる。そこで本研究では、運動が海馬神経活動を活性化させるという作業仮説を、LDFを用いてトレッドミル走運動中のラット海馬局所血流量(Hip-CBF, hippocampal cerebral blood flow)を測定することにより検証することを目的とした(研究課題1)。

Neurovascular coupling の調節メカニズムを明らかにすることは神経科学分野において広く関心を集めている研究課題であり、これまでに麻酔下の被験動物を用いてその調節メカニズムが検討されてきた。そして一連の研究により、特に NMDA 受容体-NO シグナル経路が主要な役割を担うことが明らかにされている。走運動時の Hip-CBF 調節においても、麻酔下と同様に NMDA 受容体-NO シグナル経路が関与することが想定されるが、これまで走運動のような生体活動時における Neurovascular coupling の調節メカニズムを検討した報告はない。走運動時の Hip-CBF 調節メカニズムを検討することは、麻酔下の被験動物で確認

された調節機構が意識下の被験動物においても機能的役割を担っているか検証することであり、極めて意義のある研究になりうると考えられる。そこで本研究ではさらに、トレッドミル走運動時の Hip-CBF 調節に、NMDA 受容体 - NO シグナル経路が関与するか検討することを目的とした (研究課題 2)。

研究課題 1. トレッドミル走運動時に海馬神経活動は活性化するか? : 海馬局所血流量モニタリングからの検討

まず研究課題 1-1 では、トレッドミル走運動モデルを作成することを目的とし、LDF を用いてトレッドミル走運動時の Hip-CBF を長時間、リアルタイムで測定可能であるか検討した。その結果、低強度トレッドミル走運動 (10 m/min × 120 min) により Hip-CBF は平均 26% 増加し、運動時の Hip-CBF は体動によるノイズの影響もほとんどなく安定して測定可能であることが確認された。運動中、ラットの生理的状態は少なくとも 2 時間までは安定していた。これにより、低強度トレッドミル走運動時の Hip-CBF を長時間、安定して測定可能なトレッドミル走運動モデルが確立された。

研究課題 1-2 では、トレッドミル走運動時の薬物局所投与モデルを確立することを目的とした。先行研究において、マイクロダイアリスプローブと LDF プローブの先端を近接するようにラット海馬に挿入することにより局所的な薬物投与が可能であることが報告されていることから、本研究でも LDF 測定部位への薬物局所投与はマイクロダイアリス法により行った。まず麻酔下のラットを用いて実験を行い、先行研究と同様に NMDA (125-500 μM) 局所投与が濃度依存的に Hip-CBF を増加させること、さらに、トレッドミル走運動時にも NMDA (500 μM) 局所投与は Hip-CBF を増加させることが確認された。これにより、トレッドミル走運動時の薬物局所投与モデルの有効性が確認された。

なお、LDF は血流量に加え、その成分である血流速度と血液量の同時測定が可能であることから、麻酔下実験では血流量 (Hip-CBF) と同時に血流速度 (Hip-CBV, velocity) および血液量 (Hip-CBM, mass) を測定し、NMDA 誘発性の血流増加時における血流動態についても検討した。その結果、NMDA 誘発性の Hip-CBF 増加は主に Hip-CBV の増加に依存し、Hip-CBM にはほとんど依存しないことが明らかとなった。この結果は脳深層部位における機能的充血時の血流動態に関する初の知見であり、加えて LDF とマイクロダイアリス法の併用によるこの実験モデルの有用性を示唆している。残念ながら走運動のような行動時に 3 つのパラメーターを同時測定することの妥当性は示されておらず、本博士論文における走運動時の結果は血流量 (Hip-CBF) のみ解析を行ったが、その妥当性を確認することにより今後は走運動時の脳血流変化のダイナミクスについても検討可能となるであろう。

研究課題 1-3 では、低強度トレッドミル走運動時の Hip-CBF 増加が真に海馬神経活動活性化に起因するのか、これまで確立したトレッドミル走運動モデルと薬物局所投与モデルを用いて検証した。ラットには研究課題 1-1 と同様に低強度トレッドミル走運動を課し、走運動開始 30 分から 100 分にかけて、テトロドトキシン (TTX, 15 μM) または人工脳脊髄液 (aCSF, artificial cerebrospinal fluid) を Hip-CBF 測定部位に連続投与した。その結果、aCSF 投与は走運動時の Hip-CBF に影響を及ぼさなかったが、TTX 投与により Hip-CBF 増加は完全に抑制された。これにより、走運動時の Hip-CBF 増加が海馬神経活動活性化に起因すること、すなわち低強度トレッドミル走運動時に海馬神経活動が活性化することが明らかとなった。

研究課題 2. トレッドミル走運動時の Hip-CBF 調節に対する NMDA 受容体 - NO シグナル経路の関与

走運動実験に先立ち、まず研究課題 2-1 では麻酔下ラットを用いて、マイクロダイアリス法により投与された NMDA 受容体阻害薬 (MK-801) および NO 合成酵素阻害薬 (L-NAME) が Hip-CBF 測定部位に確実に作用するか、その有効性を検証した。その結果、1 時間の MK-801 (1 mM) および L-NAME (2 mM) 投与により、その後の NMDA 誘発性の Hip-CBF 増加は抑制された。これにより、マイクロダイアリス法

による MK-801 および L-NAME 投与は、Hip-CBF 測定部位の NMDA 受容体および NO 合成酵素を阻害するために有効であることが確認された。

続いて研究課題 2-2 において、これまで確立したトレッドミル走運動モデルおよび薬物局所投与モデルを駆使し、トレッドミル走運動時の Hip-CBF 増加が NMDA 受容体- NO シグナル経路を介して調節されているのか検証した。ラットには研究課題 1-1 と同様に低強度トレッドミル走運動を課し、走運動開始 20 分から 80 分にかけて、MK-801 (1 mM) または L-NAME (2 mM) を Hip-CBF 測定部位に連続投与した。トレッドミル走運動時の Hip-CBF は MK-801 および L-NAME 投与により漸減し、投与開始 60 分後にはほぼ完全に抑制された。これにより、トレッドミル走運動時の Hip-CBF 増加は、主に NMDA 受容体- NO シグナル経路により調節されていることが示唆された。

以上のことから、以下の結論が導かれた。

- 1) LDF およびマイクロダイアリシス法を併用することにより、トレッドミル走運動時のラット Hip-CBF を測定し、その調節メカニズムを検討可能な実験モデルが確立された。
- 2) 麻酔下において、NMDA 誘発性の Hip-CBF 増加は血液量に比べ血流速度の増加に依存することが示唆された。
- 3) 低強度トレッドミル走運動時に海馬神経活動が活性化し、それに起因して Hip-CBF が増加するところが明らかとなった。
- 4) 走運動時の Hip-CBF 増加は主に、NMDA 受容体- NO シグナル経路により調節されていることが示唆された。

低強度トレッドミル走運動時に海馬神経活動が活性化し、Hip-CBF が増加するという知見は、低強度運動であっても海馬可塑性を高めるために有効である可能性を示唆する。また、トレッドミル走運動のような生体活動時の局所脳血流量の調節メカニズムを検討できる本実験モデルは、体育・スポーツ科学のみならず医科生理学領域においても、これまでにない極めて有用なモデルであると考えられる。本研究で明らかにされたトレッドミル走運動時の Hip-CBF 調節メカニズムはまだ一部であるが、本研究で確立した実験モデルを駆使することにより、今後さらに研究を展開することが期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本博士論文は、走運動が海馬神経活動を活性化させる可能性が示唆されながらも、これまで走運動中の海馬神経活動が検討されていないことに着目し、トレッドミル走運動時のラット海馬局所血流量 (Hip-CBF) を測定することにより、上記仮説が検証された。さらにその Hip-CBF 調節機構のひとつとして NMDA 受容体- NO シグナル経路の関与が検討された。まず、トレッドミル走運動時に Hip-CBF を測定し、かつ血流測定部位へ局所的に薬物投与を行える動物実験モデルが作成され、その妥当性が検討された。麻酔下ラットにおいて、NMDA 誘発性の Hip-CBF 増加は、血液量と比較し血流速度の増加に依存するなど、この実験モデルは血流調節メカニズムを検討するために有用であることが確認された。そしてこの実験モデルを用いて、テトロドトキシン投与が低強度トレッドミル走運動時の Hip-CBF 増加を抑制したことから、低強度トレッドミル走運動が海馬神経活動を活性化させる可能性が示された。つづいて、トレッドミル走運動時の Hip-CBF 調節に対する NMDA 受容体- NO シグナル経路の関与が、NMDA 受容体阻害薬 (MK-801) および NO 合成阻害薬 (L-NAME) を用いて検討された。まず、それぞれの阻害薬の有効性が麻酔下ラットを用いて確認され、さらに、MK-801 および L-NAME 投与が低強度トレッドミル走運動時の Hip-CBF 増加を抑制したことから、低強度トレッドミル走運動時の Hip-CBF 調節に NMDA 受容体-NO シグナル経路が関与することが示唆された。

本博士論文により、トレッドミル走運動時の Hip-CBF を測定し、かつその調節メカニズムを検討可能な独自の動物実験モデルが確立された。そしてこの実験モデルを駆使することにより、低強度走運動が海馬神経活動を活性化させること、さらにこれまで検討されていない走運動時の脳血流調節メカニズムの一端を初めて明らかにした貴重な論文として専門委員会で高く評価された。

審査委員からは、トレッドミル走運動時の Hip-CBF の増加が麻酔下と同様に血流速度の増加に依存するのか検討すること、また海馬を活性化させる神経機構を解明することなどアドバイスがなされたが、これらは今後の課題であり、本論文の重要性を少しもそこなうものではないと思われる。

よって、著者は博士（体育科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。