

立教大学コミュニティ福祉研究所学術研究推進資金
大学院生研究 2017年度研究成果報告書

研究科名	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	
指導教員	所属・職名	氏名
	コミュニティ福祉学研究科・准教授	石渡貴之 印
研究課題名	長暗期の明暗周期がラットの生理指標、脳内神経伝達物質に及ぼす影響	
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年	氏名
	コミュニティ福祉学研究科・コミュニティ福祉学専攻・博士課程前期課程2年	川田輝 印
研究期間	2017年度	
研究経費	100千円	

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

現代は照明環境の発達で 24 時間活動可能な社会になり、生活リズムが多様化している。本研究ではラットを 4 週間飼育する時の明暗周期を 4h:20h の長暗期に設定し、通常の 12h:12h と比べて、生理指標 (体温・活動量・体重)、脳内神経伝達物質 (セロトニン: 5-HT、ドーパミン: DA、ノルアドレナリン: NA) に及ぼす影響を調べた。

体温と活動量は、それぞれの明暗周期に同調したため、異なるリズムを示した。通常群と比べて、長暗期群は長暗期に曝露後 5 日間で体重が急激に増加し、運動調節を司る線条体で DA の増加、情動を司る扁桃体で NA の増加傾向が見られた。以上より、生体リズムの変化が体重増加と脳内神経伝達物質の乱れを惹起することが示唆された。

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。)

[明暗周期] [脳内神経伝達物質] [生体リズム]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)**研究背景**

現代は照明環境が発達し、夜でも明るい環境に曝されるようになった (Cinzano et al., 2001)。活動の時間帯に幅が利くようになり便利な社会になったが、生活リズムが不安定なシフトワーカーの精神疾患や生活習慣病といった心身の不調も問題となっている (Lin et al., 2015, Bager et al., 2017)。そして、近年ではスマートフォンの急速な普及で、生活リズムの変化がより引き起こりやすい環境となった。そこで、本研究ではラットを 4h:20h の長暗期で飼育し、12h:12h の通常の明暗周期と比べて、ラットの生理指標と脳内神経伝達物質にどのような影響を及ぼすのかを調べた。

研究目的

長暗期の明暗周期がラットの生理指標、脳内神経伝達物質に及ぼす影響を明らかにする。

研究方法

実験には 7 週齢の雄 Wistar ラットを 10 匹用いた。飼育するラットの条件は、12h : 12h (19:00~7:00 点灯) の明暗周期の通常群 5 匹、4h : 20h (3:00~7:00 点灯) の長暗期群 5 匹で、両群とも水・エサの摂取は自由とし、環境温を 23±1℃ に設定した。ラットは各ゲージに 5 匹ずつで飼育した。

・生理指標

ラットの腹腔内に体温・活動量計測装置 (nanotag, キッセイコムテック) を埋め込む手術を行った。手術の手順は、まずラットに気化麻酔 (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) 注入した。麻酔が効いた後は開腹し、nanotag を腹腔内に縫い付けて固定した後、縫合して腹を閉じた。縫合後は麻酔薬と同量の拮抗薬 (メドトミジン) をラットの腹腔内に注入し、ラットは 10 分前後で目覚めて動き始めた。手術後 1 週間は回復期とし、全てのラットを通常条件で飼育した。その後ラットを無作為に通常群、長暗期群に分けて 4 週間飼育した。

体温と活動量の測定は 5 分に 1 度計測するように nanotag を設定し、体重測定は 5 日に 1 度行った。飼育後はラットを気化麻酔にかけて意識が朦朧としている中、心臓にペントバルビタールナトリウムを注入して安楽死させ、その後開腹して nanotag を取り出した。

・脳内神経伝達物質

通常または長暗期のそれぞれの明暗周期でラットを 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 9:00~15:00 の暗期の間、光の影響を最小限にするために赤色照明下にて行われた。脳取り出しから脳内神経伝達物質 (NA、DA、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, CaCl₂ : 0.33g) でマイクロスライサー (PR07, 堂阪イーアム) にて厚さ 300µm 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) 160µl 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℃) にかけて、上澄みを採取して 0.45µm 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 40µl 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% にした。

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、生体リズムを司る視交叉上核、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、情動を司る扁桃核といった投射先 10 部位で、計 15 部位である。

実験結果

・生理指標

通常群と長暗期群ともに、明暗の切り替わりの時間帯で体温と活動量に有意な変動が見られたため、それぞれの明暗周期に同調し、群間で異なるリズムを示した。1 日の平均活動量は、4 週目に長暗期群が有意に増加した。体重は 4 週間に渡って群間で有意差は見られなかったが、体重増加量に着目すると、それぞれの群に分けた 1~5 日間で、通

研究成果の概要 つづき

常群と比べて長暗期群が有意に大きかった。

・脳内神経伝達物質

通常群と比べて、長暗期群は運動調節を司る線条体で DA の増加と、情動を司る扁桃体で NA の増加傾向 ($p=0.051$) が見られた。他の脳部位では、通常群と長暗期群との間で有意差は見られなかった。

考察

通常群と長暗期群ともに、体温と活動リズムはそれぞれの明暗周期に同調したと考えられる。しかしながら、長暗期群は暗期通常群と比べて、明期に著しく体温が低下するのが観測された。また、活動量においては、3、4週目に明期から暗期の切り替わりの時間帯で活動量に有意差がないため、少しずつリズムが後退したと考えられる。

体重においては、暗期通常群と比べて、長暗期群は1-5日目の間で体重と体重の増加量が有意に大きかった。マウスやラットを飼育する時の明暗周期を変化させることによる体重増加は、先行研究とも一致する (Aubrecht et al., 2015)。本研究では通常群と長暗期群との間に、1週目において1日の活動量の差は出ていないので活動によるエネルギー消費以外の原因が考えられるが、活動リズムの変化により、食事のタイミングが変化して体重増加に繋がった可能性がある。マウスやラットにおいて、食事のタイミングを安静している明期のみにすると体重増加が見られる (Deanna et al., 2009; García et al., 2017)。インスリン感受性は日内変動があり、活動期に高く安静期に低いリズムを示し (Shi et al., 2013)、食事摂取量や運動量が変わらなくても、食事のタイミングの変化で体重増加が観測されている (Fonken et al., 2010)。長暗期での飼育により活動する時間帯が広がったが、食事の時間帯が本来は安静期でインスリンの感受性が低い時に食べる割合が増えてしまった可能性が示唆される。

ラットにおいて線条体における DA 増加は活動量を増加させることが分かっており (Charntikov et al., 2011)、本研究で脳を取り出した4週目において、ラット達の活動量が有意に増加した結果と一致している。すなわち、線条体での DA 増加が活動量の増加を引き起こしたと考えられる。扁桃体において NA の増加が見られたが、低血糖を再発したラットの研究では、通常と比べて高架十字路テストで不安様行動の増加と、テスト中に扁桃体で NA 増加が報告されている (McNay, 2015)。つまり、扁桃体での NA 増加は不安様行動を引き起こす可能性が示唆される。

まとめ

本研究より、長暗期の明暗周期でラットを飼育すると、通常と比べて異なる体温・活動リズムを示し、急激な体重増加、線条体で DA の増加と扁桃体で NA の増加傾向が見られた。長暗期での飼育が線条体で DA 増加を引き起こし、体温と活動リズムを変化させ、食事のタイミングを変えることによる体重増加や、扁桃体での NA 増加を引き起こしたと考えられる。以上より、長暗期での飼育が生活習慣病や精神疾患を増長する可能性が示唆された。

照明環境の発達やスマートフォンの普及で生活リズムが多様化している現代の社会において、本研究は多様な生活リズムの一例として、大きな意義があるものだと考えられる。本研究の内容は、2017年度に研究会や国内外での学会発表で研究成果を発信し、2017年度修士論文に記した。今後は、本研究と2016年度の研究成果を英語論文にまとめ、海外のジャーナルに論文投稿する予定である。

参考文献

- Cinzano et al. *Mon. Not. R. Astron. Soc.* 328, 689-707, 2001.
- Lin et al. *BMC Cancer* 15:757, 2015.
- Barger et al. *J. Am. Heart Assoc.* 2017;6: e006959. DOI: 10.1161/JAHA.117.006959, 2017.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed. Sydney: Academic Press, Inc., 1986.
- Aubrecht et al. *Chronobiol. Int.* 32:557-560, 2015.
- Deanna et al.. *Obesity (Silver Spring)*. 17(11): 2100-2102, 2009.
- García et al. *J. Endocrinol.* 232(1):15-28, 2017.
- Shi et al. *Curr. Biol.* 23(5):372-81, 2013.
- Fonken et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:18664-18669, 2010.
- Charntikov et al. *Neuroscience.* 183:121-133, 2011.
- McNay E. *Front Endocrinol. (Lausanne)*. 6:175, 2015.

研究発表 (研究によって得られた研究経過・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。)

①雑誌論文 (著者名、論文標題、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)

④ 学会・研究会での発表

運動生理学会 (小の月会)、(電気通信大学)、2017年9月、明暗周期の違いがラットの生理指標、脳内神経伝達物質、不安様行動に及ぼす影響 川田輝、金田雄太、安松幹展、中川晃、松長大祐、石渡貴之

第31回運動と体温の研究会 (松山大学)、2017年9月、明暗周期の違いがラットの生理指標、脳内神経伝達物質、情動行に及ぼす影響 川田輝、金田雄太、安松幹展、中川晃、松長大祐、石渡貴之

第72回日本体力医学会 (松山大学)、2017年9月 長明期の明暗周期がラットの生理指標、不安様行動、脳内神経伝達物質に及ぼす影響 川田輝、金田雄太、安松幹展、石渡貴之

Neuroscience 2017 (Washington DC), 2017.11, A long photoperiod affects core body temperature, anxiety-like behaviors, and monoaminergic neurotransmitters in rat brains. Akira Kawata, Yuta Kaneda, Mikinobu Yasumatsu, Takayuki Ishiwata

