原 著

強制運動負荷によるラット自発行動量の変化について

本 間 寛*, 岸 原 千 秋*, 本 谷 宣 彦*
 渡 部 秀 雄*, 越 智 仁 司*, 菅 原 正 夫*
 村 松 宰*, 高 桑 栄 松*

STUDIES ON THE CHANGE OF SPONTANEOUS LOCOMOTOR ACTIVITIES IN RATS DUE TO FORCED EXERCISE

Hiroshi HOMMA†, Chiaki KISHIHARA†, Norihiko MOTOYA†,
 Hideo WATANABE†, Hitoshi OCHI†, Masao SUGAWARA†,
 Tsukasa MURAMATSU† and Eimatsu TAKAKUWA†

The authors have devised an apparatus for monitoring the spontaneous locomotor activity of rats, with which the patterns of locomotor activity under the condition of light-dark cycle (light period: twelve hours from 6 a.m., dark period: the other half of the day) were analysed. In addition, changes in locomotor activities due to forced exercise (swimming) were recorded. The results obtained were as follows:

1. The patterns of locomotor activities in rats recorded by the monitor showed the same patterns as reported already by other researchers. The authors believe that this new apparatus can be used practically as a locomotor activity monitor.
2. Due to exhaustive exercise by swimming, changes of the ultradian rhythm in rats were observed.
3. By loading of swimming, locomotor activities in rats decreased significantly, especially in the dark period.

These results suggest that this newly devised apparatus is useful as a locomotor activity monitor, and that the fatigue in rats caused by physical load can be shown as the change in locomotor activities.

I. は じ め に

動物の有する生理機能について, Halberg¹⁾ は種々のリズムを分類し, これらは外部環境の影響による外因性リズムと, 動物固有の本来有しているいわゆる「生物時計」による内因性リズムより成立しているとした. さらにこれらのリズムのうち約 24 時間周期のものを circadian rhythm とよび, 20 時間以内の周期については ultradian rhythm とし, また Dierschke²⁾, Knobil³⁾ らは 40~90 分の周期性を示す circorhal rhythm も存

在することを報告している. これらのリズムはいずれも, 動物固有の生物時計によりコントロールされていると考えられている.

一方疲労研究は, 産業疲労の観点から人間については種々の研究がなされているが, その判定方法も現在必ずしも明快に評価しうる方法は少ない状態である. このことは動物についても同様であり, 動物における疲労の評価方法も確立されたとはいえない. したがって疲労自身の本態はまだ解明されたわけではない.

一般に疲労現象およびその回復過程はこれら動物の生理機能が示す各種のリズムを攪乱し, 一時的にその失調をきたすことが推測される.

本実験は, ラット用自発行動量監視記録装置を作成し, これを用いて明らかな日周リズムがあると報告⁴⁾ されて

* 北海道大学医学部衛生学教室
 昭和53年9月6日受付

† Department of Hygiene and Preventive Medicine,
 Hokkaido University School of Medicine
 Received for publication, September 6, 1978

いるラットの自発行動量と強制運動負荷によるその変化とを観察し、ラットにおける疲労の評価を行なおうとしたものである。

II. 実験方法

実験動物として Wistar 系雄性ラット 12 匹 (体重 290~500 g) を用いた。ラットは一定の環境制御 (室温 20°C, 湿度 50%) をされた部屋において個別ケージで飼育した。このさい circadian rhythm を考慮して照明条件を一定にし、午前 6 時より午後 6 時までを明期とし、その他を暗期とした。水および飼料 (オリエンタル MF) は自由摂取させた。これらの条件で約 3 週間以上飼育し、環境に十分適応させた後実験に供した。

1. ラットの自発行動監視記録装置の試作

ラットの自発行動量は、試作した記録装置を用いて測定した。本装置の測定原理は、自発的行動に伴う体重の移動を固別ケージの下に設置した 4 個の加速度型ピックアップにより検出し、これを増幅して原波形をコナグラフ (三栄測器製, 8 A 11 型) に記録した。この波形の 5 分間積分値をトレンドレコーダー (三栄測器製, 6135 A) でヒストグラムとして表示し、同時にトレンドレコーダ部からの出力をシグナルプロセッサ (三栄測器製, 7 T 07 型) で入力計測させて数値としてプリントした (Fig. 1)。

2. 強制運動負荷

12 匹のラットについて個体別に自発行動量の対照値を記録した後、水泳負荷実験を行なった。すなわちラットの尾部に体重の 3% の重りを付け、水温 30°C の水中で午前 10 時より完全に消耗状態となるまで強制的に水泳をさせた。その後ただちに行動監視記録装置により行動量の観測を行なった。

3. データ処理

ラットの自発行動量について、その生体リズムを解析するための周期性の検出ならびに水泳負荷による行動量変動の検定を行なうため繰返しのある二元配置分散分析を行なった。すなわち周期性については、ラットの自発行動量を 15 分間ごとのデータとして一括し、この時系列データについて自己相関分析により周期性の有無の検討を行ない、これをフーリエ変換して周波数成分 (frequency/min) ごとにパワースペクトルとして表示した。繰返しのある二元配置分散分析は、体重と水泳時間を変動要因として用い、水泳負荷前日の暗期と水泳負荷後の暗期の自発行動量の差および各時間帯ごとの比較を主効果として行なった。これらの計算には、FORTRAN プログラムにより北海道大学大型計算機センター

Fig. 1. Monitoring system of locomotor activities of rats.

Fig. 2. Circadian rhythms of locomotor activities in a free running rat (Rat No. 4).

upper graph: accumulated frequency of locomotor activities in a rat, lower graph: relative frequency of locomotor activities during each 5 minutes in a rat

light period: from 6 o'clock to 18 o'clock, dark period: from 18 o'clock to 6 o'clock

FACOM 230-75 システムを用いた。

III. 成績

1. 試作自発行動監視装置によるラットの日周リズム

Fig. 2 は、ラットの自発行動量について試作監視装置のトレンドレコーダーによる連続 3 日間の記録である。各日ごとの上段は、自発行動量を累積したものを下段には 5 分間ごとの行動量を表示した。

ラットの自発行動は、累積度数のパターンの変化からみると明期においてほとんど変動を示さず、これに比し暗期においては、激しい変動を示していた。このことは、5 分間ごとの行動量の様子からも同様のことが認められた。したがってラットの自発行動は、累積度数のパターンの変化の度合および、5 分間ごとの行動量の出現の割合からみても暗期に多く明期に少なく、明らかな日周変動を示しており、この自発行動量の日内パターンは 3 日間ほぼ同様であることが観察された。

Fig. 3. Power spectral density of the locomotor activity in a rat (Rat No. 10).

f/m: frequency per minute

Fig. 4. Changes of locomotor activities in a rat (Rat No. 10) due to exhaustive exercise by swimming.

1st day: the day of free running before the load of swimming, 2nd day: the day beginning with the load of swimming till exhaustion and after, 3rd day: consecutive to the 2nd day
upper graph: accumulated frequency of locomotor activities in a rat, lower graph: relative frequency of locomotor activities during each 5 minutes in a rat

light period: from 6 o'clock to 18 o'clock, dark period: from 18 o'clock to 6 o'clock

Fig. 3 は、3日間連続記録した自発行動量について周期性の検出を行なった結果である。ラットの自発行動量のパワースペクトル分析からは、本例において約 11 時間ごとのピーク (0.0015 frequency/min) と約 1 時間ごとのピーク (0.0149 frequency/min) の二つのピークが判別された。すなわち行動量の周期は約 11 時間と 1 時間の 2 種が、最も顕著であった。他の例についても同様の周期性が観察された。

2. 水泳負荷によるラット自発行動量の変化

Fig. 4 は、ラットの水泳負荷前 1 日と水泳負荷後 2 日間の自発行動量を示したものである。水泳負荷後ラッ

Table 1. Body weight, loading time by swimming and periodic time before and after the swimming in rats.

Rat No.	Body weight (g)	Loading time (min)	Periodic time (min)	
			pre	post
1	290	120	100	150
2	245	50	60	(-)
3	334	295	100	150
4	360	295	80	100
5	378	235	150	150
6	380	250	80	100
7	384	209	80	100
8	390	360	150	(-)
9	410	275	(-)	(-)
10	414	350	60	150
11	480	146	80	60
12	500	296	(-)	80

トをケージに戻すと、ラットは短時間安静にしているが、その後ただちに毛繕いを行ったり、またケージ内を落着きなく移動している様子が観察された。その結果 5 分間ごとの行動量の様子からみると水泳負荷後 2~3 時間は、水泳負荷前日の同時期に比較し自発行動量の一時的増加が認められた。しかしながら、水泳負荷後 1 日目の暗期の自発行動量は水泳負荷前 1 日の暗期の自発行動量に比較して明らかに減少していくことが観察された。さらに、自発行動量の累積度パターンからみると、水泳負荷前日の暗期におけるパターン変動は、2 時間以内が大半であり、明期では 7 時間にも達するのに比して、水泳負荷直後より 2~3 時以内の変化を除けば、それ以降約 28 時間 (負荷後第 2 日目の明期の終わる 18 時ごろ) くらいまで 2~4 時間のパターン変動を示した。水泳負荷後第 2 日目の暗期に達すると、累積度数のパターン変動は、水泳負荷前のそれに近似するようになり、暗期が 9 時間ぐらゐ経過すると水泳負荷による影響から回復し、ラットは元の状態に達したように観察された。なお、この傾向は、他のラットも同様であった。

Table 1 は、各ラットの自発行動量について、水泳負荷前日と水泳負荷後 1 日目の暗期 12 時間 (18:00~6:00) の自発行動量の周期を計算した結果である。顕著な周期性を示さなかった 2 例を除くと全例に 60~150 分の周期性が観察された。水泳負荷による周期性の変動についてみると、12 例中 10 例に変動があり、その変動は符

Table 2. Two-way analysis of variance of locomotor activities between spontaneous running before and after the swimming.

Source of variation	Sum of squares	d.f.	Mean of squares	F	Level of sig.
Main effects					
time	80,546.959	3	26,848.986	5.720	0.001
free and post	36,427.504	1	36,427.504	7.761	0.005
Interaction					
Time×free and post	24,181.281	3	8,060.427	1.717	0.160
Covariates					
body weight	278,060.578	1	278,060.578	59.239	0.001
loading time	4,054.973	1	4,054.973	0.864	0.999
Residual	5,360,407.750	1,142	4,693.877		
Total	5,783,679.045	1,151	5,140.199		

time : every 3-hour locomotor activity during dark period, free : before swimming, post : after swimming, level of sig. : level of significance

Fig. 5. Changes of locomotor activity ratio (%) of the pre-swimming to post-swimming in the dark period.

The line of 100 (%) means every 1-hr locomotor activity in rats during dark period of the 1st day. Circles mean the ratio of every one hour locomotor activities of rats during dark period of the 2nd day compared with those of the corresponding one-hour period of the 1st day.

号検定において有意であった ($p < 0.05$).

Fig. 5 は水泳負荷前日の暗期 (18:00~6:00) のラット自発行動量の各1時間の値に対して、負荷後1日目の同時間の値を比較したものである。ラットの自発行動量は水泳負荷後早期においては、毛繕いなどの行動が盛んなため一時的に行動量の増加が認められるが、時間の経過に従い、前値に対して行動量の減少していくことがうかがわれる。

Table 2 は、ラットの自発行動量について水泳負荷前日と負荷後1日目の暗期の行動量を繰返しのある二元配置分散分析を行なった結果である。主効果として、18時

より6時までの各3時間ごとの自発行動量および水泳前・後の行動量の変動をみると、それぞれ $F=5.720$ および $F=7.761$ で、危険率1%以下で有意差を認めた。また共変数としての体重は $F=59.24$ 、水泳時間は $F=0.87$ でこのような生体リズムに関する実験において体重——ラットにおいては週齢と相応するとみなされるが——を十分に考慮に入れるべきことが示された。

IV. 考 察

ラットの自発行動は、明らかな日周リズムを示すとされているが⁴⁾、このリズムはラットの視交差上核を破壊すると消失し⁵⁾、同時にラット血中コルチコステロン⁶⁾のリズムおよび睡眠覚醒サイクル、松果体の NAT (N-acetyltransferase) のリズム⁷⁾も消失することから、これらを支配する特異的構造が中枢神経系内にあることが推定されている。

本研究において、試作した自発行動量監視装置による自発行動変動が、従来報告されている結果^{4-6,8-10)}と一致していることなどからみても、本装置がラット自発行動を正確に記録しており、実用化しうることが確認された。この装置を用いて、水泳負荷を行なった前後のラットの自発行動を記録した結果、Halberg の ultradian rhythm³⁾に属する帯域でその周期性の乱れが認められたが、これは、水泳負荷のストレスとしての影響の現れと認められる。

また、ラットの自発行動量において、水泳負荷前の明期に累積度数のパターン変化が少なかったことは、このような条件におけるラットの有する特性、すなわち光環

境の変動に同調した結果として、明期に少ない自発行動量を示し、暗期に活発な活動を行なう¹⁰⁾ということを裏づけているように考えられる。さらに、明期における水泳負荷により水泳負荷後に発現した自発行動量の減少および比較的長時間にわたる累積度数パターンの変動は、生物自身のもつ内因性因子に支配された自発行動のリズム¹¹⁾を強制的な水泳負荷が外因性因子として作用しそのリズムを乱した結果とも考えられる。すなわち、いわゆる内因性因子としての体内時計に支配された自発行動などの自由継続リズムの周期は、明暗条件や温度条件などの外因性因子により影響を受けることはよく知られた事実である^{12,13)}。したがって本研究における累積度数のパターン変化は、水泳負荷が肉体的なストレスとして外因性因子となって作用した結果、本来有していた自発行動リズムの位相を変化させ、サーカディアンリズムを構成¹⁰⁾しているウルトラディアンリズムの周期にも変化をきたしたものと解される。

ラットの自発行動の ultradian rhythm について、Borbély¹⁴⁾ らはとくに光環境の変動により自発行動に変化がみられ、また絶食を含めた給餌時間制限も睡眠リズムの変化をもたらすと報告している。また Aschoff¹⁰⁾ は、この ultradian rhythm が発育期で暗期に徐々に集合形成されて circadian rhythm となると報告している。また、自発行動リズムのみならず睡眠覚醒リズム、副腎皮質ホルモン分泌リズム等の発現機構として、視床下部の視交叉上核が深い関係をもっていること⁵⁾ が明らかとなっている。また、この視交叉上核の機能を論ずるにさいしては、その背景となる脳内神経伝達物質やさらに上部機構に存在が仮定されている生物時計の中枢制御のことも考慮する必要がある。

V. 結 論

ラットの自発行動監視装置を試作し、その実用性の検討を行ない、さらにこれを用いて強制運動（水泳）負荷によるラットの日周リズムの変化を観察した。その結果次のことが明らかとなった。

1) 試作した本装置は、記録されたラットの自発行動のパターンが他の報告とも一致しており、自発行動監視装置として用いることが認められた。

2) 水泳負荷後にラットの自発行動の示す ultradian rhythm が、変化することが認められた。

3) 水泳負荷後にラットの自発行動量はとくに暗期において減少することが観察された。

以上の結果より、試作したラット自発行動監視装置の実用化が確かめられ、また強制運動負荷によるラットの

疲労現象をその自発行動量の変化として表現しうることが明らかとなった。

本論文の一部は、昭和53年6月第51回日本産業衛生学会で発表した。

稿を終えるにあたり、三栄測器株式会社伊藤修造氏および当教室石村三郎技官の協力に謝意を表す。

文 献

- 1) Halberg, F.: Infradian changes of circadian rhythms in clinically healthy female volunteers, *Proc. Int. Union Physiol. Sci.*, 12: 777, 1977.
- 2) Dierschke, D.J., Bhattacharya, A.N., Atkinson, L. E. and Knobil, E.: Circoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey, *Endocrinology*, 87: 850—853, 1970.
- 3) Knobil, E.: On the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey, *Rec. Progr. Hormon Res.*, 30: 1—36, 1974.
- 4) Bünning, E.: The physiological clock: circadian rhythms and biological chronometry, 5—22, *The English Universities Press Ltd.*, London, 1973.
- 5) Stephan, F.K. and Zucker, I.: Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69: 1583—1586, 1972.
- 6) Moore, R. Y. and Eichler, V. B.: Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat, *Brain Res.*, 42: 201—206, 1972.
- 7) Grandjean, E.: Fatigue: its physiological and psychological significance, *Ergonomics*, 11: 427—436, 1968.
- 8) Ibuka, N. and Kawamura, H.: Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesion, *Brain Res.*, 96: 76—81, 1975.
- 9) 本間研一: 内因性生体リズムの同調機序に関する研究 I. ラットの自発行動、体温血漿コルチコステロンの日周リズムの同調様式とその解析, *北海道医学雑誌*, 52(3): 213—236, 1977.
- 10) Aschoff, J.: Exogenous and endogenous components in circadian rhythms, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25: 11—28, 1960.
- 11) Moore-Ede, M. C., Schmelzer, W. S., Kass, D. A. and Herd, J. A.: Internal organization of the circadian timing system in multicellular animals, *Federation Proc.*, 35: 2333—2338, 1976.
- 12) DeCoursey, G. and DeCoursey, P. J.: Adoptive aspects of activity rhythm in bats, *Biol. Bull.*, 126: 14—27, 1964.
- 13) Bruce, V. G.: Environmental entrainment of circadian rhythms, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 25: 29—48, 1960.
- 14) Borbély, A. A.: Sleep and motoractivity of the rat during ultra-short light-dark cycles, *Brain Res.*, 124: 457—471, 1977.

著者への通信先： 本間 寛, 〒 060 札幌市北区北 15 条西 7 丁目 北海道大学医学部衛生学教室
Reprint requests to Department of Hygiene and Preventive Medicine, Hokkaido University
School of Medicine, Kita 15-jo Nishi 7-chome, Kita-ku, Sapporo, 060 Japan (H. Homma)