高強度運動時における抗酸化物質投与が海馬脳由来神経栄養因子(BDNF)発現に及ぼす影響

饗場 千夏¹, 韓 宝宝¹, 木内 政孝², 安藤 大輔³, 山北 満哉⁴, 小山 勝弘⁵

Effects of high-intensity exercise and antioxidant administration on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the rat hippocampus

Chinatsu Aiba¹, Baobao Han¹, Masataka Kiuchi², Daisuke Ando³, Mitsuya Yamakita⁴ and Katsuhiro Koyama⁵

¹山梨大学大学院教育学研究科, 〒400-8510 山梨県甲府市武田4-4-37 (*Graduate School of Education, University of Yamanashi, 4-4-37 Takeda, Kofu, Yamanashi 400-8510, Japan*)

²山梨大学大学院医学工学総合教育部人間環境医工学専攻, 〒400-8510 山梨県甲府市武田4-4-37 (*Department of Health Sciences, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, 4-4-37 Takeda, Kofu, Yamanashi 400-8510, Japan*)

³防衛大学校体育学教室, 〒239-8686 神奈川県横須賀市走水1-10-20 (*Department of Physical Education, National Defense Academy, 1-10-20 Hashirimizu, Yokosuka, Kanagawa 239-8686, Japan*)

⁴山梨県立大学看護学部, 〒400-0062 山梨県甲府市池田1-6-1 (*School of Nursing, Yamanashi Prefectural University, 1-6-1 Ikeda, Kofu, Yamanashi 400-0062, Japan*)

⁵山梨大学教育人間科学部, 〒400-8510 山梨県甲府市武田4-4-37 (*Faculty of Education & Human Sciences, University of Yamanashi, 4-4-37 Takeda, Kofu, Yamanashi 400-8510, Japan*)

Received: May 18, 2011 / Accepted: October 18, 2011

Abstract The purpose of this study was to investigate the effect of attenuation of exercise-induced oxidative stress by antioxidant administration on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the rat hippocampus. Wistar rats were assigned to four groups: non-exercise (Cont), exercise (Ex), or the combination of exercise with antioxidant administration (small dose: SP, large dose: LP) group. Exercise groups were subjected to treadmill running for 10 consecutive days. The exercise load increased gradually by 5 m/min per day for the first 5 days (10 m/min-30 m/min), and maintained at 30 m/min for the last 5 days. In addition, SP and LP were injected with N-tert butyl-a-phenyl nitron (PBN) 1h prior to exercise. High-intensity exercise resulted in increased hippocampal 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) contents compared with Cont. But this elevation was completely suppressed by a large dose of PBN. In Ex and SP, serum total antioxidative power were significantly decreased compared with Cont, whereas no changes were observed in LP. There was a significant negative correlation between hippocampal 4-HNE contents and serum total antioxidative power in SP and LP, suggesting the hypothesis that exercise-induced reduction in total antioxidant power might lead hippocampal 4-HNE accumulation. Furthermore, there was a significant increase of hippocampal BDNF level in LP compared with Cont and Ex. These findings indicate that an increase of oxidative stress might not have a beneficial effect on hippocampal BDNF expression. Our results of this study also suggest that attenuation of exercise-induced oxidative stress by some antioxidants contributes to BDNF expression in the hippocampus.

Jpn J Phys Fitness Sports Med, 61(1): 111-117 (2012)

Keywords : BDNF, oxidative stress, hippocampus, exercise

緒 言

記憶力低下の要因の一つとして脳の萎縮が考えられている。記憶障害を主な症状とする認知症においても脳の萎縮が深く関連することが明らかになっており¹⁾, その中でも海馬の萎縮がアルツハイマー型認知症 (Alzheimer's disease: AD) を導くという可能性が指摘されている²⁾。海馬は直接的に記憶の貯蔵を行っている

わけではないが、脳内で記憶を司る器官として重要な役割を担っている。最近の研究では、習慣的な運動が脳において有益な効果、特に認知機能改善効果を持つということが示唆されている³⁾。そして、脳の中でも最も可塑性の高い部位である海馬は運動により刺激され、その結果として認知機能が向上すると多くの研究が報告している⁴⁻⁶⁾。ヒトを対象にした追跡調査からも、習慣的な運動が認知症、特にADの発症を遅らせる可能性が指摘さ

れている⁷⁾.

また, 以前から老化メカニズムの一つとして酸化ストレスの関与が指摘されており, さらに海馬の萎縮危険因子の一つとしても挙げられている⁸⁾. 通常, 活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) は, 生体内の殺菌作用, 情報伝達, あるいは体タンパクの更新時における組織の破壊に寄与しており, 生体にとって必須のものである. しかし, 虚血再灌流や紫外線照射などの様々な要因によるROSの過剰生成や, それに対して生体が具備している抗酸化能力の低下などにより, ROS生成と消去のバランスが崩れると酸化ストレス状態となる. 酸化ストレス状態の継続は, 様々な疾患, あるいは老化の助長など生体にとってネガティブな現象を引き起こすと考えられ, Nunomura et al.²⁾は, 脳内の酸化ストレスがADを含めた神経変性疾患の病態に密接に関与していることを示唆している.

一方, ROSによる刺激が, 神経細胞の分化, 生存, 機能維持などに貢献し, さらに学習や記憶, 情動, 摂食, 糖代謝などに関連するタンパク質である脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) の産生を増大させるという報告⁹⁾がある. このことから, 酸化ストレスは生体にとってポジティブな作用を有する因子であると捉えることもできる. BDNFは, 記憶や学習において重要な役割を果たすと考えられており¹⁰⁾, ADやうつ病患者の脳でその発現量が減少していることが確認されている¹¹⁾. また, 運動が脳内のBDNF発現量を増加させる¹²⁾とともに, 学習や記憶のパフォーマンスを改善させることも動物モデルの実験により報告されている¹³⁾. 一般に, 運動時は酸素摂取量の増加等の影響により生体内でのROS生成が高まり, 酸化ストレスが生じやすいと思われる. さらに, 強制運動を課したラットの海馬は, 運動48時間後においても酸化ストレス状態にあるとされている¹⁴⁾ことから, 運動に伴う酸化ストレスは運動中から運動後の比較的長時間にわたり継続するものと考えられる. したがって, 運動による記憶学習能力の増強, あるいは脳内神経新生は, 運動誘発性酸化ストレスに強く修飾されるものであると考えられる.

以上のことから, 酸化ストレスは脳をはじめとした生体に対する正負の作用を有し, それが適度であればホルミシス効果をもたらす刺激となり, その刺激の欠如, あるいは過剰な刺激が海馬の機能低下をもたらす可能性があるといえる. Siamilis et al.⁹⁾は, ROSによる刺激がBDNF発現量を増大させると報告しており⁹⁾, 低レベルの酸化ストレス刺激は脳内においてポジティブな影響を及ぼすことが支持されてきている. これまでに運動と脳内BDNF発現量の関連を検討した先行研究は多数存在し^{12,13,15,16)}, 最近では, 海馬BDNF発現量は低強度運動で十分に増大すると示唆されている¹⁷⁾. しかし, ホル

ミシス説に従えば, 運動による適度な酸化ストレスはBDNF発現に関して有益な効果を持つが, 高レベルの酸化ストレス刺激は好ましくない結果になると考えられる. このことから, 海馬BDNF発現に対して, 高強度運動によって誘発される可能性がある過剰な酸化ストレスは有益な効果をもたらさず, それを減弱させる何らかのアプローチが重要になると考えられる.

そこで本研究は, 高強度運動に伴う酸化ストレスを抗酸化物質投与により減弱させることが海馬BDNF発現量へ及ぼす影響を検討することを目的とした.

方 法

被験動物 被験動物として, 12週齢Wistar系雄ラット (n=22) を用いた. すべての被験動物を個別の小動物飼育用ケージにて12時間の明暗サイクル下 (明期 6:00–18:00) で3日間の予備飼育を行った後, 体重を考慮した上でランダムに非運動群 (Cont群: n=6, 331.7±23.0g), 運動群 (Ex群: n=6, 337.5±20.7g), 運動+抗酸化物質 (N-tert butyl- α -phenyl nitron: PBN) 投与群 (PBN群: n=10) に分類した. さらに, PBN群は低用量投与群 (SP群: n=5, 340.8±25.6g), 高用量投与群 (LP群: n=5, 334.7±24.1g) の2群に分類し, 投与する抗酸化物質に差異をつけた. 餌と水は自由摂取とした. なお本研究は, 山梨大学動物実験専門委員会の承認を得て実施した (承認番号 19-90).

運動負荷 本実験ではEx群, PBN群に, 小動物用トレッドミル (TM-N1-V100 大阪マイクロシステム, Osaka, Japan) を用いた走行運動を10日間行わせた. 運動負荷 (60分間) は, 実験1~5日目は走速度を5 m/minずつ漸増し (1日目 10m/min, 5日目 30m/min), 6~10日目は30m/min (LT以上) に固定して実施した. Cont群に対してはEx群, およびPBN群と運動以外の条件を統一するため, 走行運動は課さずにトレッドミル上に60分間乗せた. 各種組織サンプル採取のための解剖は本実験最終運動負荷終了の24時間後に行った.

抗酸化物質投与 抗酸化物質としてPBNを用いた. PBNは元来スピントラップ剤として用いられるが, ROSに対して捕捉作用を持つ抗酸化物質としてもよく知られている. PBN群 (LP, SP群) に対しては, saline中に溶解したPBNを高強度運動を課した6日目から毎日, 走行運動1時間前に腹腔内投与した. LP群へのPBN投与量は, ラット体内において有効に作用するとされる上限量¹⁸⁾である150mg/kg body weight (BW) とし, SP群はその2分の1の量 (75mg/kg BW) を投与した. また実際の投与については, 先行研究¹⁹⁾に倣い, PBN濃度が120mMになるようsaline中に溶解して行った. Cont群, Ex群に

はplaceboとして等量のsalineを投与した。

サンプル摘出方法 対象サンプルは海馬、および血清とした。海馬は本実験最終日の運動終了24時間後に腹腔動脈から採血し、脱血死させた後に摘出した。摘出した海馬は速やかに湿重量を測り、液体窒素にて凍結させ測定までの間-80℃で凍結保存した。血清サンプルは腹腔動脈から採血した血液を遠心分離（15分、3,000rpm、室温）して採取し、測定まで-20℃で凍結保存した。

測定項目、および測定方法 実験期間中は、飼料の摂餌量、および体重を10日間毎日測定した。解剖後、海馬BDNF、脂質酸化損傷マーカーである4-ヒドロキシノネナール（4-hydroxy-2-nonenal: 4-HNE）、および血清総抗酸化能を測定した。

海馬BDNF 海馬1mgに対してホモジナイズバッファ（phosphate buffered saline: PBS containing 1% protease inhibitor）10μlを加え、十分にホモジナイズした後等量のProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent（Fermentas, USA）を加えた。その後遠心分離（3分、14,000rpm、4℃）を行い、上清を測定試料とした。上清は測定時まで-20℃で凍結保存した。海馬BDNFは、Rat BDNF ELISA Kit（Boster Biological Technology, China）を用いて測定した。

海馬4-HNE 海馬1mgに対してホモジナイズバッファ18μlを加え、十分にホモジナイズした後等量のPBSを加えた。その後遠心分離（10分、3,000g、4℃）を行い、上清を測定試料とした。上清は測定時まで-20℃で凍結保存した。海馬4-HNEは、BCA Protein Assay Kit（Thermo Scientific, USA）を用いサンプル内のタンパク質濃度を測定し、サンプルのタンパク質濃度が10μg/mlになるようPBSで希釈した後、OxiSelect™ HNE-His Adduct ELISA Kit（Cell Biolabs, USA）を用いて測定した。

血清総抗酸化能 PAO抗酸化能測定キット（日本老化制御研究所, Shizuoka, Japan）を用いて測定した。PAOに含まれる試薬は、ビタミンCやグルタチオンなどの水溶性抗酸化物質、ビタミンEなどの脂溶性抗酸化物質を幅広く検出し、銅イオンの還元反応（ $\text{Cu}^{++} \rightarrow \text{Cu}^+$ ）を利用してサンプルの抗酸化能を測定する。尿酸1mMは2,189μmol/Lの銅イオンの還元力を持つことから、サンプルの吸光度から算出した尿酸相当濃度（mmol/L）に2,189を掛け、その数値をCu還元力とし、総抗酸化能の指標として用いた。

統計処理 各項目の結果は、平均±標準誤差（mean±SE）で示した。測定結果の比較には一元配置分散分析（One-factor ANOVA）を用い、有意差が認められた場

合において多重比較検定（TukeyのHSD検定）を行った。また、海馬4-HNE量と血清総抗酸化能の関連においては相関分析を行った。有意水準は $P<0.05$ とした。統計処理にはJMP（SAS, USA）を用いた。

結果

海馬BDNF量 Fig 1に海馬BDNF量を示した。Cont群、およびEx群と比較してLP群で有意な高値（ $P<0.05$ ）を示した（ $F=3.51$, 自由度3）。（Fig 1）

Fig 1. The effect of high-intensity exercise training and PBN administration on hippocampal BDNF contents. * and # indicate significant differences compared to Cont and Ex respectively ($P<0.05$).

海馬4-HNE量 Fig 2に海馬4-HNE量を示した。各群間に有意な変化は認められなかったものの、Ex群ではCont群と比べて33.6%の増加が観察された。一方、LP群の4-HNE量はCont群とほぼ同レベルであった（ $F=1.74$, 自由度3）。（Fig 2）

Fig 2. The effect of high-intensity exercise training and PBN administration on hippocampal 4-HNE contents. No significant differences were found among the groups.

血清総抗酸化能 Fig 3に血清総抗酸化能を示した。Cont群と比較し、Ex群、SP群で有意な減少（ $P<0.05$ ）がみられた。一方、LP群では有意な減少は確認されなかった（ $F=4.29$, 自由度3）。（Fig 3）

海馬4-HNE量と血清総抗酸化能の関連 海馬4-HNE量と血清総抗酸化能について、PBN群を抽出して両者の相

関関係をFig 4に図示した. PBN群において海馬4-HNE量と血清総抗酸化能の間に有意な負の相関 ($P < 0.05$) が観察され, PBN投与条件下では血清総抗酸化能の低下に伴い4-HNE量は増加していた. (Fig 4)

Fig 3. The effect of high-intensity exercise training and PBN administration on serum total antioxidative power. * indicates significant differences compared to Cont ($P < 0.05$).

Fig 4. The correlation between hippocampal 4-HNE contents and serum total antioxidative power in PBN groups.

考 察

生体内では, マロンジアルデヒド (malondialdehyde: MDA) や4-HNEなど, 不飽和脂肪酸の過酸化によって酸化二次生成物である過酸化脂質分解物が生成される. MDA, または4-HNEによるタンパク質変異は, 酸化タンパク質の構造・機能的な変化を引き起こす可能性があり, 老化や種々の疾病と関連している. 特に4-HNEはその生成量, 反応性, 生理作用などから生体内の酸化ストレスレベルを鋭敏に反映するため, 本研究において, 海馬内の酸化ストレスレベルの評価指標とした.

これまでに, 運動が海馬の酸化ストレスレベルに及ぼす影響をみた研究がいくつかある. Cechetti et al.²⁰⁾ は, トレッドミル走 (20min/day, 2weeks) を行かせたラットの海馬内フリーラジカル含有量は変化せず, 非運動群と運動群でMDAや4-HNEなどのチオバルビツール酸反応性物質 (thiobarbituric acid reactive substance:

TBARS) レベルにも差異が現れないとしている. 同様に, Acikgoz et al.²¹⁾ も疲労困憊に至るトレッドミル走 (25m/min, slope of 5°) 0~48 時間後, いずれの時点においても海馬TBARSレベルは変化しないと報告しており, 海馬における酸化ストレスパラメーターは運動により変化しないと示唆している. さらに, 生体にはROSによる傷害から身を守るための抗酸化システムが具備されているが, その中心となる抗酸化酵素, スーパーオキシドジスムターゼ活性やグルタチオンペルオキシダーゼ活性も, 海馬においては急性・慢性運動により有意な変化を示さず, 酸化ストレスは惹起されなかったという報告がある²²⁾.

その一方で, Rosa et al.²³⁾ は, 10日間毎日疲労困憊までトレッドミル走を行かせたマウス脳内MDA, タンパク質酸化損傷マーカーであるcarbonyl量は, 最終運動24時間後に有意に増加するとしている. また, 水泳トレーニング (5days/week, 8weeks), あるいは疲労困憊に至る一過性の水泳運動を課したラットの大脳皮質内において, 運動終了直後のTBARS, carbonyl量は増加するという報告もある²⁴⁾. 同様に, 走速度30m/minのトレッドミル走 (1h/day, 5days/week) を1週間行かせたマウスにおいて, 運動後に海馬の4-HNEレベルが増大したとする報告²⁵⁾ もあり, 短期間の高強度運動が海馬神経細胞へもたらす影響の一つとして酸化ストレスが指摘されている. このように, 運動による海馬内酸化ストレスマーカーの変動の有無を報告した先行研究を概観すると, 海馬における運動誘発性酸化ストレスは, 負荷する運動強度・期間, すなわち運動プログラムに強く依存しているものと考えられる. 本研究では酸化ストレスレベルの海馬への影響を検討するため, 酸化ストレスに曝される実験条件を設定する必要があった. そこで, 住谷ら²⁵⁾ がマウスを用い, 1週間の走行運動 (走速度30m/min, 60min/day) を行かせた結果, 脂質過酸化マーカーである4-HNEが海馬神経細胞で強く発現したとする先行研究に倣い, 本実験においては, 運動負荷10日間のうち後半の5日間は, 走速度30m/min, 60min/dayの走行運動を行かせた. 征矢らは, 成熟ラット (Wistar 系, 雄) のLTを20m/min付近としており²⁶⁾, 設定した走速度30m/minはLT以上の高強度負荷であったと考えられる. このことから, 本研究で課した運動負荷は高強度運動に相当すると考えられる. 走行運動の結果, 海馬4-HNE量はCont群とEx群の間に有意な差は認められなかったが, Cont群に比較しEx群では33.6%増加した (Fig 2). 有意差が認められなかった理由として, 本研究の被験動物数が各群で5~6匹と少なかったため, ややばらつきが大きかったことが考えられる.

高強度運動を課した5日間, PBN群には運動1時間前にPBNを腹腔内投与した. PBNは元々スピントラップ

剤の一種であり、生体内のラジカル定量法である電子スピン共鳴法を行う際、不安定なヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドなどのラジカルを安定なラジカルに変えるために使用する物質である。その作用を利用し、抗酸化物質として多くの研究で用いられており^{27,28)}、脳内に投与することによって海馬でもPBNの持つ抗酸化効果が現れることが確認されている²⁹⁾。また、PBNは脂溶性であり、腹腔内投与によっても血液-脳関門を通過し脳にまで達することが観察されている³⁰⁾。以上の理由から、PBNは運動誘発性のROSを減少させる目的でも用いられている⁹⁾。しかし、本研究においては、海馬4-HNE量に対するPBNの明らかな抗酸化効果は認められなかった (Fig 2)。

運動によって海馬の抗酸化酵素活性は変動しないとする先行研究が多く存在する^{22,31)}。また、脳以外の部位で酸化ストレスマーカーが有意に変動する運動条件であっても、脳では顕著な変動はしないという報告もある³²⁾。つまり、海馬をはじめとする脳の抗酸化能や酸化ストレスマーカーの変動は捉えにくいといえる。これに対し、具ら³³⁾は、老化促進モデルマウスを用いて、抗酸化物質の摂取で血清レベルの酸化ストレスを軽減すると、加齢に関連した海馬神経細胞死が抑制され、空間記憶機能が改善されると示唆している。Radak et al.³⁴⁾も、運動誘発性の酸化的刺激に対する生体応答は各部位で異なるため、全身性の反応を統合的に評価することが大切であると指摘している。これらのことから、本研究ではPBN投与による抗酸化能の変動を、全身の抗酸化能を反映する血清を用いて評価した。その結果、血清総抗酸化能は、Cont群と比較しEx、SP群に有意な低下 ($P<0.05$) が示されたが、LP群では有意な差異がみられなかった (Fig 3)。さらに、我々はPBNの持つ抗酸化作用によりEx群とPBN群の間にも有意な差が認められるという仮説を持っていたが、それに反する結果となった。この点に関して、本研究の血清総抗酸化能はサンプリングのタイミング (最終運動終了24時間後) の影響を強く受けている可能性があると思われる。血清などの体液レベルの総抗酸化能は、過酸化物質などの酸化マーカーと比べると運動に対する応答性が鋭敏な指標と考えられ、高強度運動の24時間後は、運動の直接的な影響を受けた後の回復局面に相当すると思われる。つまり、本研究における血清総抗酸化能は、運動とPBN投与の影響が若干減じられて表出した結果であると推察される。そこでCont群との比較を行ってみると、Ex群とSP群の総抗酸化能は有意に低下したものの、LP群では有意な差異が示されなかった。このことから、運動時、あるいは運動後の早い段階では高強度運動の影響として総抗酸化能が低下し、高用量PBN投与によってその低下がある程度抑制された可能性が考えられる。また、PBN投与を行った2群 (SP

群、LP群) で血清総抗酸化能の結果に差異が認められたのは、PBNの抗酸化効果が投与量に依存して現れたためと推察される。さらに、海馬4-HNE量と血清抗酸化能の結果にはPBNの抗酸化効果が現れ、相互に関連した可能性が高いと予測した。各群内でややばらつきが大きかったことから両者の関連を個体データに着目してみると、PBN群において有意な負の相関 ($P<0.05$) が示された (Fig 4)。PBNの影響を体液レベル、または組織レベルで評価した血清と海馬におけるPBNの抗酸化効果の現れ方は必ずしも一致しない可能性もあるが、以上の結果から、高強度運動により惹起されたと考えられる全身性の総抗酸化能の低下を、抗酸化物質であるPBNが抑制し、そのことが海馬4-HNE量増加の抑制に関与したと推察される。

身体活動に伴うBDNF発現を検討した研究は多くあり、脳や脊髄のBDNFや、それに関連した受容体はアップレギュレートされると示唆されている¹⁵⁾。運動とBDNF発現量との関連をみた研究では、自発運動、強制運動によりBDNF mRNAが増加すると報告されている^{12,16)}が、BDNFタンパク量は1回の運動では増加しないとの報告もあり³⁵⁾、タンパク質発現に関する急性運動の結果は一致していない。また、1週間以下の短期トレーニングにおいても、海馬のBDNF mRNA発現量は高まるとする報告が多いものの^{12,35)}、タンパク質発現に関しては統一した見解が得られていない³⁵⁾。一方、長期トレーニングにおいては、トレーニング期間が2週間以上であれば、海馬内BDNFのタンパク質、およびmRNAともに発現量が増加するという結果で一致している^{16,35)}。住谷ら⁸⁾は、長期的な持久運動が海馬神経細胞に与える影響の要因として酸化ストレスを指摘しており、このことから運動誘発性酸化ストレスが海馬に対しポジティブに影響する因子である可能性も考えられる。Siamilis et al.⁹⁾は、ラット脊髄内においてROS生成を完全に阻害してしまうとBDNF発現量は上昇しないと指摘しており、BDNF発現にはROSによる刺激が必須であると示唆している。したがって、BDNF発現の亢進には生体内の酸化ストレスレベルが影響する可能性もある。

本研究においてEx群ではCont群と比較してBDNF発現量に有意な変化がなかった (Fig 1)。海馬4-HNE量の結果からEx群ではROSが増大した可能性が推測でき、酸化ストレスの増大はBDNF発現にポジティブな効果を与えないと考えられる。したがって、BDNF発現を亢進させるためには刺激となる酸化ストレスを一定程度減弱させることが重要であると推測できる。また、海馬BDNF量はLP群ではCont群、およびEx群と比較して有意に高い値 ($P<0.05$) を示した (Fig 1)。血清総抗酸化能においてLP群でPBNの抗酸化効果が示唆されたこと、さらに、PBN群において海馬4-HNEレベルと血清総抗

酸化能に有意な負の相関 ($P<0.05$) がみられた (Fig 4) ことから, LP群ではPBN投与が海馬で生じた運動誘発性酸化ストレスを減弱させた可能性が考えられる. 以上のことから, 高強度運動により誘発される酸化ストレスを減弱させることにより, BDNF発現にポジティブな効果をもたらす可能性が示唆された.

本研究では, 認知機能に関わる可能性が高い海馬BDNF発現量に着目して, 運動誘発性の酸化ストレスレベルの相違が及ぼす影響を検討した. しかし, 走運動トレーニングにより空間学習能力は向上するが, その効果は低強度のみでみられたという報告³⁶⁾や, その一方で, 海馬神経細胞に障害が確認される程の激運動を行った場合に, 運動前よりも記憶学習能力が改善されたという報告もある³⁷⁾ことから, 今後はBDNF発現量と同時に機能面での変化も観察していく必要があると考える. さらに, 運動に対する生体応答は脳内の別の部位でも生じていることを考えると, 対象とする組織を海馬のみとせず, 記憶に関わる複数の組織で同時に検討していくことも今後の課題である. また, 本研究の限界として実験計画上の理想的な群設定がなされなかったことが挙げられる. 本来ならばPBN投与そのものが海馬BDNF発現量に与える効果や, PBNと運動との相互作用を検討するため, 非運動+抗酸化物質投与群をさらに2群 (高用量, 低用量) 設けることが求められた. しかしながら本研究では, 「山梨大学動物実験規程 (平成19年制定)」に基づき, 被験動物数を最少限に抑えるという倫理的配慮から当該群の設定を行わなかった. Siamilis et al.⁹⁾は, ラットを用いて運動トレーニング (27m/min, 60分間) とPBN投与の影響を検討する研究を行い, 非運動安静群へのPBN単独投与は, 脊髄内BDNF発現量をコントロール群 (非運動安静群) よりも低下させると報告している. そのため, 本研究において, 運動の影響と無関係にPBN投与自体が海馬BDNF発現量を増加させた可能性は低いと考えられる.

結 語

本研究はホルミシス説に基づき, 高強度運動に伴う酸化ストレスを抗酸化物質投与により減弱させることが海馬BDNF発現量へ及ぼす影響を検討することを目的とし, 海馬BDNF量, 4-HNE量, 血清総抗酸化能を観察した. Wistar系雄ラット ($n=22$) を非運動 (Cont) 群, 運動 (Ex) 群, 運動+抗酸化物質投与 (低用量: SP, 高用量: LP) 群に分類し, 走行運動を10日間行わせた. 運動負荷 (60分間) は, 本実験開始1~5日目は走速度を5 m/minずつ漸増し (1日目 10m/min, 5日目 30m/min), 6~10日目は30m/min (LT以上) に固定して実施した. その結果, 海馬4-HNEはEx群で有意ではないものの運動により増加し (+33.6%), LP群でCont群レベルまで抑

制される傾向が観察された. 血清総抗酸化能はCont群と比較しEx群, SP群に有意な減少 ($P<0.05$) が示されたが, LP群でその抑制がみられた. BDNF量はLP群でCont群, Ex群と比較し有意な高値 ($P<0.05$) を示した. これらのことから, 高強度運動により誘発される酸化ストレスを抗酸化物質投与により減弱させることによって, 海馬BDNF発現を亢進しやすい環境を構築できる可能性が示唆された.

参 考 文 献

- 1) Cardenas VA, Boxer AL, Chao LL, Gorno-Tempini ML, Miller BL, Weiner MW, and Studholme C. Deformation-based morphometry reveals brain atrophy in frontotemporal dementia. *Arch Neurol*, 64: 873-877, 2007.
- 2) Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, and Smith MA. Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65: 631-641, 2006.
- 3) Cotman CW and Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci*, 25: 295-301, 2002.
- 4) Van Praag H, Kempermann G, and Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2: 266-270, 1999.
- 5) Van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, and Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Natl Acad Sci*, 96: 13427-13431, 1999.
- 6) Trejo JF, Carro E, and Torres-Aleman I. Circulation insulin-like growth factor 1 mediates exercise-induced increase in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 21: 1628-1634, 2001.
- 7) Larson EB, Wang L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Crane P, and Kukull W. Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med*, 144: 73-81, 2006.
- 8) 住谷和則, 宮本修, 山神眞一, 岡田泰士, 板野俊文, 村上哲英, 根本哲郎, 長期的持久運動がマウス海馬神経細胞に及ぼす影響について, 日生誌, 64: 152-158, 2002.
- 9) Siamilis S, Jakus J, Nyakas C, Costa A, Mihalik B, Falus A, and Radak Z. The effect of exercise and oxidant-antioxidant intervention on the levels of neurotrophins and free radicals in spinal cord of rats. *Spinal Cord*, 47: 453-457, 2009.
- 10) Lu B and Figurov A. Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev Neurosci*, 8: 1-12, 1997.
- 11) Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramée GR, Johnson SA, and Winslow JW. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron*, 7: 695-702, 1991.
- 12) Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Choi J, and Cotman CW.

- Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res*, 726: 49–56, 1996.
- 13) Cotman CW and Berchtold NC. Physical activity and the maintenance of cognition: Learning from animal models. *Alz Dem*, 3: 30–37, 2007.
 - 14) 岩月宏泰, 鈴木孝夫, 強制運動による酸化ストレスがラット海馬神経細胞に及ぼす影響, 理学療法学, 34: 244, 2007.
 - 15) Radak Z, Chung HY, and Goto S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontol*, 6: 71–75, 2005.
 - 16) Huang AM, Jen CJ, Chen HF, Yu L, Kuo YM, and Chen HI. Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neural Transm*, 113: 803–811, 2006.
 - 17) Soya H, Nakamura T, Deocaris CC, Kimpara A, Imura M, Fujikawa T, Chang H, McEwen BS, and Nishijima T. BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun*, 358: 961–967, 2007.
 - 18) Janzen EG, Poyer JL, Schaefer CF, Downs PE, and DuBose CM. Biological spin trapping II. Toxicity of nitron spin traps: dose-ranging in the rat. *J Biochem Biophys Meth*, 30: 239–247, 1995.
 - 19) Kawai A, Nishinaka Y, Arai T, Hirota K, Mori H, Endo N, Miyoshi T, Yamashita K, and Sasada M. α -Phenyl-N-tert-butyl nitron has scavenging activity against singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) and attenuates $^1\text{O}_2$ -induced neuronal cell death. *J Pharmacol Sci*, 108: 545–549, 2008.
 - 20) Cechetti F, Fochesatto C, Scopel D, Nardin P, Gonçalves CA, Netto CA, and Siqueira IR. Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain Res*, 1188: 182–188, 2008.
 - 21) Acikgoz O, Aksu I, Topcu A, and Kayatekin BM. Acute exhaustive exercise does not alter lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett*, 406: 148–151, 2006.
 - 22) Aksu I, Topcu A, Camsari UM, and Acikgoz O. Effect of acute and chronic exercise on oxidant- antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett*, 452: 281–285, 2009.
 - 23) Rosa EF, Takahashi S, Aboulafia J, Nouailhetas VL, and Oliveira MG. Oxidative stress induced by intense and exhaustive exercise impairs murine cognitive function. *J Neurophysiol*, 98: 1820–1826, 2007.
 - 24) Aydin C, Sonat F, Sahin SK, Cangul IT, and Ozkaya G. Long term dietary restriction ameliorates swimming exercise-induced oxidative stress in brain and lung of middle-aged rat. *Indian J Exp Biol*, 47: 24–31, 2009.
 - 25) 住谷和則, 宮本修, 山神眞一, 岡田泰士, 激運動による酸化ストレスのマウス海馬神経細胞への影響, 体力科学, 55: 184, 2006.
 - 26) Soya H, Mukai A, Deocaris CC, Ohiwa N, Chang H, Nishijima T, Fujikawa T, Togashi K, and Saito T. Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neurosci Res*, 58: 341–348, 2007.
 - 27) Lancelot E, Revaud M, Boulu RG, Plotkine M, and Callebort J. α -phenyl-n-tert-butyl nitron attenuates excitotoxicity in rat striatum by preventing hydroxyl radical accumulation. *Free Radic Biol Med*, 23: 1031–1034, 1997.
 - 28) Kim HK, Park SK, Zhou JL, Taglialatela G, Chung K, Coggeshall RE, and Chung JM. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 111: 116–124, 2004.
 - 29) Fan LW, Tien LT, Mitchell HJ, Rhodes PG, and Cai Z. α -Phenyl-n-tert-butyl-nitron ameliorates hippocampal injury and improves learning and memory in juvenile rats following neonatal exposure to lipopolysaccharide. *Eur J Neurosci*, 27: 1475–1484, 2008.
 - 30) Cheng HY, Liu T, Feuerstein G, and Barone FC. Distribution of spin-trapping compounds in rat blood and brain: in vivo microdialysis determination. *Free Radic Biol Med*, 14: 243–250, 1993.
 - 31) Radak Z, Asano K, Kizaki T, Oh-ishi S, Inoue M, and Ohno H. Acute bout of exercise does not alter the antioxidant enzyme status and lipid peroxidation of rat hippocampus and cerebellum. *Pathophysiology*, 2: 243–245, 1995.
 - 32) Liu J, Yeo HC, Overvik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW, Brooks GA, and Ames BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol*, 89: 21–28, 2000.
 - 33) 具然和, 糸川由佳, 井上登太, 田中順子, 丸山源司, 山口倫直, 伊藤秀隆, 鈴木典子, 大嶋正己, Kang KM, 山下剛範, 石田寅夫, 老化促進モデルマウス (SAMP8) の加齢に対するGinkgo bilobaの効果: 酸化ストレス状態, 脳内セロトニン量, 空間認知学習及び海馬神経細胞の定量的解析, 鈴鹿医療科学大学大学紀要, 15: 13–32, 2008.
 - 34) Radak Z, Chung HY, and Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*, 44: 153–159, 2008.
 - 35) Adlard PA, Perreau VM, Engesser-Cesar C, and Cotman CW. The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. *Neurosci Lett*, 363: 43–48, 2004.
 - 36) Lou SJ, Liu JY, Chang H, and Chen PJ. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. *Brain Res*, 1210: 48–55, 2008.
 - 37) 花岡勇太, 征矢英昭, 西島壮, 異なる強度のトレッドミル走運動がラットの空間学習能力と海馬局所血流量に及ぼす影響, 体力科学, 55: 591, 2006.