トレーニングの違いがラット脳内側坐核ドパミン代謝および c-fos 蛋白質発現に及ぼす影響

松原 大* 吉田 眞美** 田中正敏**

EFFECT OF TRAINING ON DOPAMINE METABOLISM AND APPEARANCE OF C-FOS IN RAT BRAIN

FUTOSHI MATSUBARA, MASAMI YOSHIDA and MASATOSHI TANAKA

Abstract

Changes induced by physical training were examined by *in vivo* microdialysis monitoring of extracellular dopamine and its metabolites in the rat nucleus accumbens, and by an immunohistochemical staining for fos protein as an index of nerve cell excitation.

The exercise training consisted of running on a treadmill 5 days/week for 4 weeks, with gradually increasing the running speed from 10 to 20 m/min for 20 min. The control group performed forced treadmill running for 3 days.

The sulpiride-induced increase in both dopamine release and dopamine metabolism was significantly attenuated in the nucleus accumbens of training rats in comparison with the controls, which indicated that physical training induced subsensitive DA D₂ receptors in the central dopaminergic neurons.

Fos protein expression following 1 h running was weaker in neurons of the raphe dorsalis, the locus ceruleus and the amygdala of trained rats than in those of controls. The present findings suggest that both neurochemical response to various stimuli, and adaptation induced by physical training differ from those in untrained animals.

(Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 1998, 47: 333~338)

key words : Training, Sulpiride, Dopamine, c-fos

目 的

運動習慣の違いは、生体機能および代謝にさまざまな変化を引き起こす。末梢組織では、骨格筋において筋重量、筋断面積などの形態的变化及び筋力などの機能的変化に加えて、グリコーゲン蓄積や乳酸産生の違いなども認められ、筋持久力、瞬発力の違いなどとして現れる^{1,2)}。また、運動、特にトレーニングによる中枢神経系の変化についても、norepinephrine (NE), dopamine (DA) の変化などから検討されている。

Chaouloff ら³⁾、Bailey ら⁴⁾は、トレーニングの違いと脳内アミンの変化との関係について、ラッ

ト全脳ホモジネートで主に serotonin 系の関与について検討しており、ランニングにより、脳内 tryptophan と serotonin 代謝回転が上昇することを示唆する報告をしている。また、MacRae ら⁵⁾は、6ヶ月の持久的トレーニングにより、spiperone 感受性線条体 DA D₂ 受容体数の増加を認めている。しかしながら、彼らの報告は、*in vitro* の試験系であることから、より生体を反映した試験系が要求される。また、Hattori ら⁶⁾は、低強度運動負荷時の脳内アミン代謝を *in vivo* microdialysis 法により測定しているが、トレーニングによる脳神経系の変化については言及していない。Meeusen ら⁷⁾も同様にトレーニングに伴う線状体

*大塚製薬(株)佐賀研究所
〒842-0195 佐賀県神埼郡東脊振村
大字大曲字東山5006-5

Saga Research Institute, Otsuka Saga Pharmaceutical Co., Ltd

**久留米大学医学部薬理学講座
〒830-0011 福岡県久留米市旭町67

Department of Pharmacology, Kurume University School of Medicine

の DA, NE および GABA を *in vivo* microdialysis 法により測定しているが, トレーニングによる変化を認めていない。

神経細胞の活動状況を把握する方法として, Immediately Early Gene の発現を観察することで神経細胞の活動状態を見ることができる^{8,9)}。今回は, 代表的なタンパク質として *c-fos* 蛋白質を調べた。運動のみならずトレーニングによる *c-fos* の変化から脳内神経活動の状態を把握している報告は極めて少ない。

そこで, トレーニングに伴う中枢神経系の変化について, DA D₂ 受容体アンタゴニストである sulpiride^{10,11)} を投与した時の DA 放出及び DA 代謝の変化について *in vivo* microdialysis 法を用いて調べるとともに, 運動に伴う脳内神経活動の状態を *c-fos* 蛋白質を指標として検討することにより, トレーニングによる脳内神経活動の変化について検討した。

方 法

実験には, Wistar 系雄性ラット 8~12 週令を使用した。トレッドミル負荷を 3 日間もしくは 4 週間負荷したラットを作成し, 各々コントロール群, トレーニング群とし, 各々の群のラットは, 6 匹とした。

実験 1) では, トレーニング後, pentobarbital 麻酔下, microdialysis 用プローブ (膜長 4.5 mm, 外径 0.25 mm, MW cutoff 5000) を Paxinos ら¹²⁾ の脳地図に従い, 左側の側坐核 (NAC; +1.9 mm, L 1.5 mm, D 8.5 mm) に埋め込み手術 2 日後に実験に使用した。自由に活動できる覚醒状態で, 人工脳脊髄液を 2.0 μ l/分の流速で灌流した。1 時間の安定期の後, 10^{-5} M の (-)-sulpiride を人工脳脊髄液に溶解し透析膜を介して側坐核に投与し 1 時間後, 再び人工脳脊髄液に戻して回復状況を観察した。回収された透析液中の DA, 3-, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA) の測定は, オートインジェクターを介して 20 分毎に注入し, HPLC-ECD 法により分析した。分析カラムは, Eicomac MA 5 ODS (4.6 mm i. d. $\times$ 150 mm), ECD には, WE-

3G グラファイト電極 (+570 mV vs Ag/AgCl 参照電極) を用いた。移動相は, 15% methanol を含む 50 mM 酢酸バッファー (pH 4.0) に 30 μ M EDTA, 0.6 mM octanesulfonic acid を加えた。透析灌流実験の最後に, tetrodotoxin (TTX 300 nM) を灌流液に混ぜその反応を見た後に, 頸椎脱臼にてラットを屠殺し, その後の変化も併せ見た。その後, 脳を取り出し, ホルマリン固定した後, 50 μ m の側坐核を含む前頭断切片を作成し, toluidine blue (0.5%) で染色し, プローブの位置を同定した。

実験 2) では, *c-fos* 蛋白質発現に関する実験を行った。コントロール群, トレーニング群のラットに 1 時間のトレッドミル走を負荷した後静置し, 正確に 1 時間半後に過量の pentobarbital 麻酔下開腹し, 心臓下部切除後大動脈からの 4% formaldehyde 溶液灌流によって固定後, 脳を摘出した。マイクロスライサー (DTK-1000, Dosaka EM, Japan) で 50 μ m に切った脳切片を, *c-fos* タンパク質抗体反応性 ABC 法 (Vector; フナコシ, ベクタステイン, ABC-PO (ウサギ IgG) キット) により染色した。染色後, プレパラートに包埋した検体を顕微鏡下で写真を撮り肉眼的に観察して比較検討した。

群間および測定時点の検定は, 二元配置分散分析で有意性が確認された項目について, Fischer's PLSD 法による多重比較検定を行い, 5% 以下を有意差ありとした。

結 果

細胞外 dopamine (DA) 及び代謝物の濃度は, sulpiride 投与により上昇した。DA は, トレーニング群では, sulpiride 投与直後有意に高値を示した後, 徐々に低下して sulpiride 投与終了時には, basal level に戻っていたが, コントロール群は, sulpiride 投与後徐々に上昇し, 投与終了に伴い徐々に低下する傾向であった。DOPAC, HVA は, トレーニング群よりもコントロール群の方が変化率が大きい傾向であったが, 両群ともに DOPAC の上昇は DA よりも遅れ, HVA の上昇はさらに DOPAC よりも遅れるのが認められた。

Fig. 1. Effect of (-)-sulpiride (10^{-5} M) on extracellular concentration of DA, DOPAC and HVA in the NAC in trained or control rats.

Sulpiride (10^{-5} M) was perfused through the dialysis membrane for 1 h. Sulpiride produced a significant increase in extracellular concentration of dopamine. Data indicates % changes of 3 points of basal level. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * denotes a significant increase compared to baseline ($p < 0.05$). —●—; Trained, ---○---; Control

Fig. 2. Photograph showing the placement of the microdialysis probes in the NAC.

Arrow shows the tip of the track of the microdialysis probe. NAC, nucleus accumbens.

(図1)。

また、図2にプローブの位置を示した。側坐核内側部にプローブの先端部を確認した。

コントロール群は、脳のいずれの部位においても顕著に c-fos 蛋白質の発現が認められたのに対し、トレーニング群においては、全体的に c-fos 蛋白質発現がコントロール群よりも少なかった。特に扁桃核と縫線核においては、c-fos 蛋白質の発現がコントロール群に比べて顕著に少なかった(図3)。

考 察

sulpiride は、dopamine (DA) D_2 受容体アンタゴニストであり、抗潰瘍・精神安定剤として広く使われている^{10,11,13)}。その作用機序は、sulpiride が神経終末にある DA オートレセプターの作用を阻止することによると考えられている^{10,11)}。つまり、神経終末からの DA 放出を抑制するフィードバック自己調節機構を阻害することにより、DA 放出が亢進することになる。

Fig. 3. Fos-like immunohistochemistry in the NAC of rats treated with forced Treadmill running with trained or control rats. mPFC, NAC, RD and AM indicates pre frontal cortex, nucleus accumbens, raphe dorsalis, and amygdaloid, respectively.

今回我々は、運動中の脳内アミンの変動ではなく、トレーニングに伴う脳内神経活動状態の変化を把握することで、運動中には観察されなかったトレーニング効果を把握することができた。つまり、両群に DA D₂ 受容体拮抗薬である sulpiride を脳内膜透析法により側坐核に投与したところ、トレーニング群において sulpiride で誘発された DA 放出と代謝の亢進が減弱しており、D₂ 受容体の感受性の低下が認められた。MacRae らは、若齢ラットに比べ老齢ラットでは、spiperone 感受性 DA D₂ 受容体の有意な減少を認め、これに対し、老齢ラットではトレーニングにより受容体が増加することを報告している⁵⁾。また、Hattori ら¹⁴⁾は、7日間のトレーニングによりチロシン水酸化酵素やモノアミン酸化酵素などの酵素活性の上昇を認めている。これらのことは、トレーニングに伴い脳内アミン代謝が生体の適応反応として順応していることを示している。Meeusen ら⁷⁾も同様に6週間のトレーニングによる線状体の運動中の DA、NE および GABA を *in vivo* microdialysis 法により測定しているが、トレーニングによる変化を認めておらず、急な運動に伴う反応性に対する適応現象として捉えられている。

我々は、microdialysis 用プローブを左側の側坐核に設置した。側坐核は、線条体の吻内側部に位置しており、腹側被蓋野に起始する中脳辺縁 DA 神経系の投射部位であり、特に、運動などの動機や快行動などに関係が深いと考えられている。トレーニングに伴う反復刺激により、運動に対する動機づけができ順応性が生じるものと思われる¹⁵⁻¹⁷⁾。

側坐核の DA レベルは、また、嫌悪性状況であるストレスに対しての反応性は少ないが、報酬性行動の一つである摂食行動に伴って著しく上昇すると考えられている¹⁴⁻¹⁶⁾。このことは、中脳辺縁 DA 系が脳内の報酬過程と密接に関連する神経路である事実と一致する¹³⁾。

また、DA 放出調節機序には、ATP 感受性 K⁺ チャンネルが DA のオートレセプターを介するという説もある。運動トレーニングにより、これらの調節がどのように変化したのかについては、

nicorandil や cromakalim などの K_{ATP} チャンネルオープナーなどにより確認する必要がある¹¹⁾。

実験終了後に TTX を灌流により投与したところ、ほぼ完全に DA の消失が認められ、致死後、DA の急激な上昇が認められた。このことから、今回測定した DA 及び代謝物は、神経伝達物質として神経インパルスに依存して放出された DA であることを示している。なお、測定部位も側坐核に位置していることが確認されている。

ある刺激に対する反応として、脳のどの領域が賦活されるかという神経回路網の解明に神経細胞の興奮のマーカーとして、Immediately Early Genes (IEGs)、特に c-fos をマーカーとして用いる報告が多くみられ^{8,11)}、c-fos mRNA をマーカーとして用いる場合と c-fos 蛋白質を用いる場合がある。c-fos mRNA は、刺激後30~45分でピークに達し、c-fos 蛋白質は、1~2時間でピークに達する⁹⁾。今回は、運動終了1.5時間後にホルマリン灌流固定しており、同定した c-fos 蛋白質は、1時間の運動のうち後半の神経活動状況を反映しているものと思われる。

また、トレーニング群において、縫線核、扁桃体での発現が少なかったが、これらの部位が情動、不安などに関与していることから¹⁸⁾、ラットがトレーニングによって、走ることに恐怖、不安などといった負の情動的要素が減弱した状態で走行した結果かもしれない。一方、コントロール群において、ほとんどの部位で発現したのは、3日間のトレーニングでは、十分な走行能力及び環境適応を獲得していないため、緊急反応として、c-fos が脳内各部位で強く出現したものと思われる。今後、c-fos の発現を定量化することにより神経活動状態をより明確に把握できるように検討する必要がある。

要 約

トレーニングに伴う中枢神経系の変化について、*in vivo* microdialysis 法による側坐核の dopamine (DA) 代謝と神経細胞の興奮の指標として用いられる c-fos 蛋白質の脳内の発現について検討した。トレッドミル負荷を3日間(コントロー

ル群)もしくは4週間(トレーニング群)負荷したラットを作成し, 両群に DA D₂ 受容体拮抗薬である sulpiride を脳内膜透析法により側坐核に投与したところ, トレーニング群において sulpiride で誘発された DA 放出と代謝の亢進が減弱しており, D₂ 受容体の感受性の低下が認められた. また, 両群に1時間のトレッドミル負荷をした時の c-fos 蛋白質の発現を免疫組織化学的方法にて検討したところ, トレーニングによる発現の抑制が扁桃核と縫線核で顕著に認められた.

以上のことから, トレーニングによる脳内の神経活動に変化が生じることが示唆された.

(受理日 平成10年2月26日)

参 考 文 献

- 1) Turcotte, L. P., Richter, E. A. and Kiens, B., Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs. untrained humans. *Am. J. Physiol.*, (1992), **262**, (6Pt 1), pE 791-799
- 2) Favier, R. J., Constable, S. H., Chen, M. and Holloszy, J. O., Endurance exercise training reduces lactate production. *J. Appl. Physiol.*, (1986), **61** (3), 885-889
- 3) Chaouloff, F., Elghozi, J. L., Guezennec, Y. and Laude, D., Effects of conditioned running on plasma, liver and brain tryptophan and on brain 5-hydroxytryptamine metabolism of the rat. *Br. J. Pharmac.* (1985), **86**, 33-41
- 4) Bailey, S. P., Davis, J. M. and Ahlborn, E. N., Neuroendocrine and substrate responses to altered brain 5-HT activity during prolonged exercise to fatigue. *J. Appl. Physiol.*, (1993), **74** (6), 3006-3012
- 5) MacRae, P. G., Spirduso, W. W., Walters, T. J., Farrar, R. P. and R. E. Wilcox, Endurance training effects on striatal D₂ dopamine metabolites in presenescent older rats. *Psychopharmacology*, (1987), **97**, 236-240
- 6) Hattori, S., Naoi, M. and Nishino, H., Striatal dopamine turnover during treadmill running in the rat: Relation to the speed of running. *Brain Research Bulletin*, (1994), **35** (1), 41-49
- 7) Meeusen, R., Smolders, I., Sarre, S., De Meirleir, K., Keizer, H., Serneels, M., Ebinger, G. and Michotte, Y., Endurance training effects on neurotransmitter release in rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Acta. Physiol. Scand.*, (1997), **159**, 335-341
- 8) 仙波恵美子, 神経-免疫連関と immediate early genes. *ブレインサイエンス*, (1995), **6** (2), 167-173
- 9) Morgan, J. I. and Curran, T., Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early gene, *TINS*, (1989), **12** (11), 459-462
- 10) Tanaka, T., Yoshida, M., Yokoo, H., Mizoguchi, K. and Tanaka, M., ATP-sensitive K⁺ channel openers block sulpiride-induced dopamine release in the rat striatum. *Europ. J. Pharmacol.*, (1996), **297**, 35-41
- 11) 田中隆彦, 吉田真美, 横尾秀康, 溝口克弘, 田中正敏, ATP 感受性 K⁺ チャンネルオープナーの線条体ドパミン放出に及ぼす影響. *神経精神薬理* (1995), **17** (5), 345-352
- 12) Paxinos, G. and Watson, C., *The rat brain in stereotaxic coordinate*. 2nd edit., London Academic Press (1986)
- 13) Westerink, B. H. C. and De Vries, J. B., *Neurosci. Lett.*: On the mechanism of neuroleptic induced increase in striatal dopamine release: brain dialysis provides direct evidence for mediation by autoreceptors localized on nerve terminals. (1989), **99**, 197-202
- 14) Hattori, S., Naoi, M. and Nishino, H., Striatal dopamine turnover during treadmill running in the rat: relation to the speed of running. *Brain Research Bulletin*, (1994), **35** (1), 41-49
- 15) Yoshida, M., Yokoo, H., Mizoguchi, K., Kawahara, H., Tsuda, A., Nishikawa, T. and Tanaka, M., Eating and drinking cause increased dopamine release in the nucleus accumbens and ventral tegmental area in the rat: measurement by in vivo microdialysis. *Neuroscience Letters*, (1992), **139**, 73-76
- 16) Radhakishum, F. S., Van Ree, J. M., Westerink, B. H. C., Scheduled eating increases dopamine release in the nucleus accumbens of food-deprived rat as measured with on-line brain dialysis. *Neurosci. Lett.*, (1988), **85**, 351-356
- 17) Fibiger, H. C., Phillips, A. G., Reward, motivation and cognition: psychobiology of mesotelencephalic dopamine systems. In *Handbook of Physiology: The nervous system IV*, Bloom FE, Geiger SR. Eds. American Physiological Society, Bethesda, M. D. (1986), 647-675
- 18) Handley, S. L., 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmac. Ther.*, (1995), **66**, 103-148