

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

住谷和則¹⁾ 宮本 修²⁾ 山神眞一³⁾ 岡田泰士³⁾
板野俊文²⁾ 村上哲英⁴⁾ 根木哲郎¹⁾

¹⁾ 香川医科大学医学部基礎スポーツ医学教室 ²⁾ 同生物学教室

³⁾ 香川大学教育学部保健体育教室 ⁴⁾ 倉敷芸術科学大学生理学教室

I. はじめに

運動を行うと筋骨格系はもちろんのこと呼吸・循環機能向上に効果があることは、一般的にもよく知られており、生活習慣病における運動療法など医学的にも広く用いられている。一方、運動には弊害もあり、激しい持久運動を長期間に渡り行うとオーバーユースや疲労などが要因になり、様々なスポーツ障害を引き起こすと言われている。これらについては、科学的に解明が進んでおりその原因が明確になりつつある。とともに運動により体全体の酸素消費量は10～15倍に、活動筋への酸素流入量は約100倍に、血流量は約30倍に増加するため [1]、運動時には酸素摂取量が増大し、生体内での活性酸素の生成は平常時よりもかなり増加して酸化ストレスが生じることが予測され、最近では活性酸素の研究が注目されている。活性酸素は呼吸・循環器疾患 [2, 3] や脳神経疾患 [4] など様々な疾患に関与していると言われている。運動は活性酸素の発生を増加させ [5, 6]、心筋では抗酸化作用を補っているものと考えられる還元型グルタチオン (GSH) 濃度が低く [7]、細胞障害を受ける可能性が高い [8, 9] と報告され、骨格筋や呼吸筋である横隔膜では、運動時に活性酸素産生の増加 [10-14] が報告されている。さらに、肝臓においても同様な報告 [15-17] が見られる。

しかしながら運動と脳については、運動を行ったラットの脳幹と大脳皮質でGSH/GSSG比が有意な増加を示した報告 [18] もあるが、一過性の運動において脳の酸化的損傷は認められていない

[19]。運動による酸化ストレスの脳への影響については、見解が一致しておらず不明な点が多く、その報告も少ない。そこで我々は当初、運動期間として、先行実験でよく見られる6週間の運動をマウスに行なったが、脳細胞に変化は見られなかった。そのため本研究では、さらに長期の12週間に設定し、運動が脳神経細胞に及ぼす影響について検討を行った。

II. 実験方法

本実験では、8週齢の雄 ddN 系マウスで、体重が30～35gのものをを用いた。これらを、12時間の明暗サイクルの下で、室温24℃、湿度60%に常時維持し、アルミ製飼育箱で床にホワイトフレーク (オリエンタル酵母社製) を入れ飼育して、飼料 (オリエンタル酵母社製 特殊繁殖用 CMF) と水を自由摂取させ、トレッドミル (サミットメディカル社製) による運動を行った。マウスは非運動群 [Control 群 (C 群), n = 10] と運動群に分けた。非運動群は12週間トレッドミル運動を行わず、通常の飼育を行った。運動群は1日1時間・週5回のトレッドミル走を行わせた。さらに運動群については以下の2つのグループに分けた。1つのグループは12週間10m/minの速度で運動を行わせた。これを Mild Training 群 (MT 群, n = 10) とする。もう1つのグループは12週間25m/minの速度で運動を行わせた。これを Hard Training 群 (HT 群, n = 12) とする。そして12週間運動直後に、Pentobarbital 麻酔下 (50mg/kg/ml 腹腔内投与) で開胸し、左心室より0.1M リン酸緩衝液 (pH = 7.4) を数ml 注入し

て、全身から血液を除去した後に、4%パラホルムアルデヒド加0.1Mリン酸緩衝液にて灌流固定を行い、さらに新鮮同溶液で24時間の後固定後に脳を摘出した。その後マイクロスライサー（堂阪EM社製）により厚さ20 μ mの冠状ビブラトーム切片を作成した。切片の一方は自然乾燥させた後、Hematoxylin-Eosin染色（HE染色）を行い、もう一方は浮遊法にて免疫組織化学染色法を行い組織学的に検討した。

免疫組織化学染色では、0.3% TritonX-100加リン酸緩衝液に1時間、0.01Mのリン酸緩衝液（pH = 7.4）で15分（5分×3回）洗浄した後、0.3% H₂O₂加リン酸緩衝液に30分、同様にリン酸緩衝液で15分洗浄した後1%アルブミン加リン酸緩衝液で10分、そして1次抗体として500倍に希釈した微小管関連タンパク2（MAP-2）及び500倍に希釈した熱ショックタンパク70（HSP/C70）の2種類を4℃で一晩反応させた。その後リン酸緩衝液で25分（5分×5回）洗浄して2次抗体（抗マウスIgG）を室温で30分、リン酸緩衝液で15分（5分×3回）洗浄した後、3次複合体（avidin-biotin-horseradish peroxidase complex：ABCキット，Vectastain社 vector laboratories）を室温で1時間、リン酸緩衝液で15分洗浄した後、DABトリス緩衝液（0.1% diaminobenzidine-tertrachloride mixed 0.02% H₂O₂：DAB基質キット）を室温で5分間反応させ、リン酸緩衝液で15分洗浄し、脱水、透徹した。

また、HT群の一部については、同様に0.1Mリン酸緩衝液（pH = 7.4）で血液を除去した後に、2.5%のグルタルアルデヒド－2%オスミウム酸固定を行い、脳を摘出し電子顕微鏡にて、海馬神経細胞の微細構造の形態的变化を観察した。

なお、運動群の運動強度を確認するために、運動開始3日目と3週間目に運動前と運動開始30分の時点でマウスの尾静脈から血液を採取し、血中乳酸濃度をLactate Pro（簡易血中乳酸測定器：アークレイファクトリー）で測定した。得られたデータはtwo-way ANOVAを用い、多重比較（Scheffe's）を行い統計処理を行った。

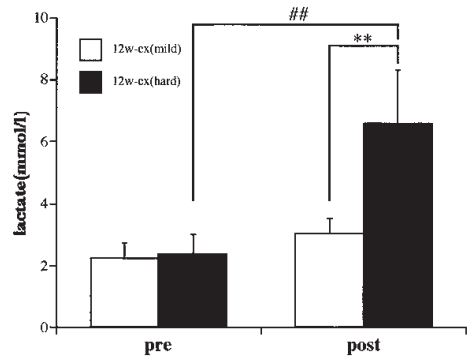


Fig. 1 Bar graphs of blood lactate concentration. Pre: before exercise. Post: after 30 min exercise. ## $p < 0.001$ compared with pre. ** $p < 0.001$ compared with mild (two-way ANOVA followed by Scheffe's).

III. 実験結果

A 体重及び血中乳酸濃度

3群の運動前と12週間運動後の体重は、3群とも運動前より12週間運動後は増加していたが、有意な差はなくC群にのみ有意差（ $p < 0.05$ ）が認められた。次に、MT群とHT群の運動前と運動中の血中乳酸濃度（mean $\pm$ S.D.）は、運動開始3日目と3週間目とではほぼ同様であった。運動前MT群 2.25 ± 0.49 mmol/l，HT群 2.38 ± 0.67 mmol/lであったが、運動中はMT群 3.10 ± 0.46 mmol/l，HT群 6.60 ± 1.73 mmol/lになり両群とも増加していた。特にHT群は、運動前に比べると3倍近く増加しており有意差（ $p < 0.001$ ）が認められ、なお運動中のMT群と比較しても2倍以上濃度が高く、有意差（ $p < 0.001$ ）も認められた（Fig.1）。これは、HT群がMT群に比べて激しい持久運動であることを示している。

B 組織学的検討

HE染色ではC群・MT群の脳の各部位には変化が見られなかったが、HT群の半数のマウスの海馬CA1-CA3領域における錐体細胞に、核の濃縮を伴い、細胞自体が収縮するいわゆる dark cellが確認された（Fig. 2）。次にMAP-2の抗体による海馬の免疫染色では、C群・MT群の両群

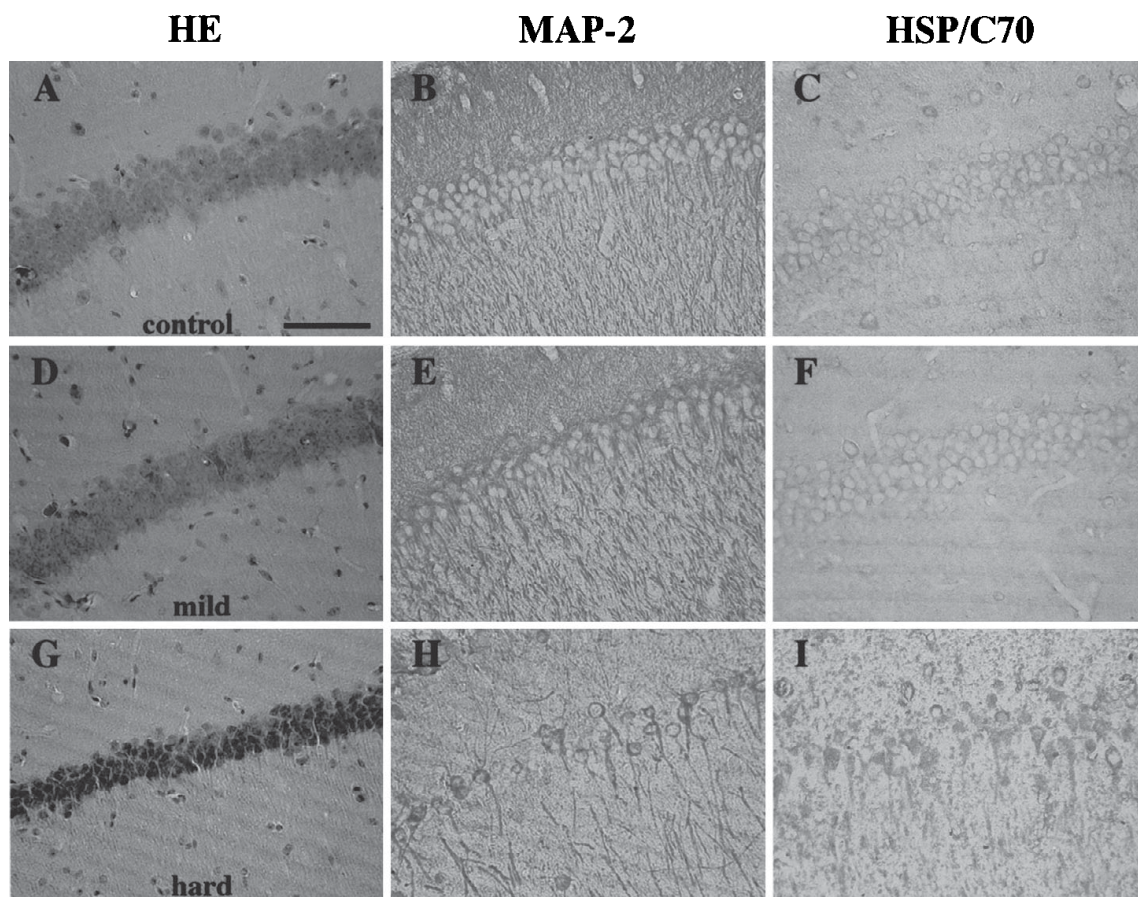


Fig. 2 Control group (aged watched animal without exercise, A, B, C) , mild exercise for 12-week group (10m/min for 1h, D, E, F) and hard exercise for 12-week group (25m/min for 1h; G, H, I) . HE staining (A, D, G) , MAP-2 immuno staining (B, E, H) and HSP/C70 immuno staining (C, F, I) in the CA1 area of mouse hippocampus after 12-week exercise. Scale bar = 50 μ m.

は、海馬 CA1-CA3 領域において核の周囲と樹状突起が正常に染色されているが、HT 群の dark cell の部分は MAP-2 による免疫染色性が消失していた (Fig. 2) . さらに HSP/C70 による免疫染色では、HT 群において細胞体及びデンドライトが強く染色されていた (Fig. 2) . また、海馬の CA1 領域を電子顕微鏡にて詳しく観察してみると、C 群・MT 群の両群は、核やミトコンドリアが正常であったが、HT 群の dark cell では収縮し変形した核や膨化したミトコンドリアが多数見られた。膨化したミトコンドリアではクレステの破壊を伴っていた (Fig. 3) .

IV. 考 察

今回の血中乳酸濃度測定結果では HT 群は MT 群より 2 倍以上、安静時より 3 倍近く有意に上昇していたことから、HT 群は激しい持久運動であると言える。Paffenbarger [20] は、心筋梗塞による死亡率が 1 週間の身体活動量が 3500kcal までは徐々に低下するが、それ以上になると再び増加する兆候を認め、熱ショックなどの種々のストレスが加わった時に、細胞の障害緩和や回復促進に不可欠で重要な役割を持っている HSP/C70 の発現も、本研究で確認されていることから、過度の運動はストレスとなり身体にとって不適切である

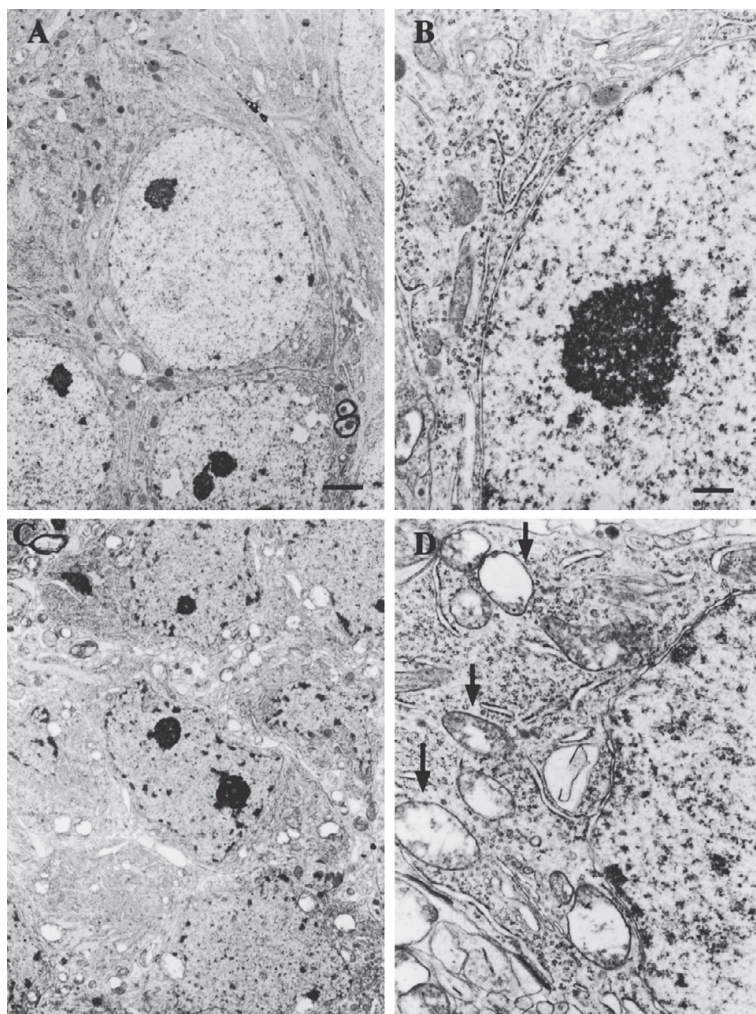


Fig. 3 Electron micrographs in the CA1 pyramidal cell of the mouse hippocampus. High power field of the nucleus (B, D). Control (aged watched animal without exercise, A and B), and hard 12-week exercise (25m/min for 1h, C and D). Scale bars = 2 μ m (A) and 500nm (B). Arrow show imbibition mitochondria.

ことを示唆している。

運動により骨格筋で乳酸が大量に発生するとFenton反応を誘導し、さらに白血球の活性酸素発生能を高め、脂質過酸化を加速する [21, 22] という報告や、10週間のランニングトレーニングによってラットのSODアイソザイム活性が有意に上昇する [23] という報告から、激しい持久運動時には多大な酸素が必要とされるので、当然それに伴い体内での活性酸素の発生は増大してい

ると予想される。

一方、脳の酸素消費量が生体全体の約20%を占めることから、以上の現象は身体だけでなく脳においても同様に考えられ、活性酸素の生成による酸化ストレスが増加すると思われる。ラットのトレッドミル運動により、生体内で発生する活性酸素の一種であるヒドロキシラジカルがサルチル酸と反応して生成される2, 3-ジヒドロキシ安息香酸 (2, 3-DHBA) が脳で増加する報告 [24]

があり、またラットの運動トレーニング (7.5 週) では、SOD 活性が脳幹と線状体で有意に増加し、SOD 活性が最も低い海馬においても増加傾向が認められている [18]。本研究の HE 染色において HT 群の海馬で錐体細胞の障害 (dark cell) が認められ、さらに神経細胞への障害を受けた時に変化するタンパクの一つの MAP-2 による免疫染色性が消失していたので、激しい持久運動が海馬の酸化ストレスを促進したために、消去のための SOD 活性が増加し、酸化ストレスにより脳神経細胞が障害を受けたことを示していると思われる。

また、HT 群の dark cell の電子顕微鏡による観察において、ミトコンドリアのクレステの破壊を伴う膨化が確認された。McCloskey らは、運動により脳細胞での糖代謝が亢進することを報告 [25] している。本研究では、活性酸素を直接には測定していないが、ミトコンドリアは ATP 産生の中心器官であり、神経細胞の機能を保持するためのエネルギーのほとんどを酸化的リン酸化により供給しているので、酸化ストレスの増加により、活性酸素の産生能が増加したのではないかと推測される。Leeuwenburgh ら [26] は、ミトコンドリアが運動中の活性酸素の発生源であることを示唆している。従って、ミトコンドリアは活性酸素による障害を受けやすいと考えられる。

このように、ミトコンドリア障害が神経細胞障害に大きく係っているという報告 [27] もあり、酸化ストレス時にミトコンドリアが障害を受け、障害を受けたミトコンドリアの機能が低下し、ATP 合成能の低下が起こることが、神経細胞障害に関与しているのではないかと推測している。また今回、運動期間については、6 週間では脳細胞において形態的な障害が見られず、酸化ストレス状態がある程度長期に続くことが障害の主要な要因の一つであると考えられる。マウスに 12 週間以上の運動を行った場合に障害の増悪があるか否かについては、今後検討が必要と思われる。

V. まとめ

本研究では、8 週齢の ddN 系の雄マウスを運動

群 (HT 群, MT 群) と非運動群 (C 群) に分け、運動群には 12 週間にわたりトレッドミル走を行わせ、脳への影響を組織学的に検討した。その結果、12 週間運動群 (HT 群) のうち 50 % のマウスに海馬錐体細胞の萎縮変形 (dark cell) が見られ、その dark cell のミトコンドリアに膨化や内部構造の破壊が見られた。このことは、長期間の激しい持久運動により、脳の海馬神経細胞に酸化ストレスがかかり、障害を受けることが示唆された。

今後はそのメカニズムを明らかにするとともに、最終的には脳や身体に効果的且つ快適な運動強度とはどの程度なのかを、この結果をもとに探っていきたい。

文 献

1. Sen CK : Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 79 : 675-686, 1995.
2. Nakayama T, Kaneko M & Kodama M et al : Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature* 314 : 462-464, 1985.
3. Berliner JA & Heinecke JW : The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Rad Biol Med* 20 : 707-727, 1996.
4. Yoshikawa T : Free radicals and their scavengers in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 33 (suppl. 1) : 60-68, 1993.
5. Fukai T, Siegfried MR & Ushio-Fukai M et al : Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest* 105 : 1631-1639, 2000.
6. Higashi Y, Sasaki S, & Kurisu S et al : Regular aerobic exercise augments endothelium-dependent vascular relaxation in normotensive as well as hypertensive subjects. *Circulation* 100 : 1194-1202, 1999.
7. Sen CK, Marin E & Kretzschmar M et al : Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J Appl Physiol* 73 : 1265-1272, 1992.
8. Ji LL : Exercised-induced oxidative stress in the heart : Exercise and Oxygen Toxicity. Sen CK, Packer L and Hanninen O, pp249-267, Elsevier, Amsterdam, 1994.
9. Ji LL, Stratman FW & Lardy HA : Effects of beta 1- and beta 1 + beta 2-antagonists on training-induced myocardial hypertrophy and enzyme adaptation. *Biochem Pharmacol* 36 : 3411-3417, 1987.
10. Tidball JG : Inflammatory cell response to acute mus-

- cle injury. *Med Sci Sports Exerc* 27 : 1022–1032, 1995.
11. Duarte JA, Carvalho F & Bastos MI et al : Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery? *Eur J Appl Physiol* 68 : 48–53, 1994.
12. Dekker JC, Doornen LJP & Kemper HCG : The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med* 21 : 213–238, 1996.
13. Oh-ishi S, Kizaki T & Ookawara T et al : Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress. *Am J Respir Crit Care Med* 156 : 1579–1585, 1997.
14. Nashawati E, Dimarco A & Supinski G : Effects produced by infusion of a free radical-generating solution into the diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med* 147 : 60–65, 1993.
15. Boveris A, Oshino N & Chance B : The cellular production of hydrogenperoxide. *Biochem J* 128 : 617–630, 1972.
16. Ji LL : Antioxidant enzyme response to exercise and again. *Med Sci Sports Exerc* 25 : 225–231, 1993.
17. Kanter MM, Hamilin RL & Unverferth DV et al : Effect of exercise training on antioxidant enzyme and cardiotoxicity of doxorubicin. *J Appl Physiol* 59 : 1293–1303, 1985.
18. Somani SM, Ravi R & Rybak LP : Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol Biochem Behav* 50 : 635–639, 1995.
19. Okamura K : Effect of endurance exercise on the tissue 8-hydroxy-deoxyguanosine content in dogs. *Free Rad Res* 26 : 523–528, 1997.
20. Paffenbarger RS Jr, Wing AL & Hyde RT : Physical activity as an index of heart attack risk in college alumni. *Am J Epidemiol* 142 : 889–903, 1995.
21. Barclay JK & Hanse M : Free radicals may contribute to oxidative skeletal muscle fatigue. *Can J Physiol Pharmacol* 69 : 279–284, 1991.
22. Aruoma OI & Halliwell B : Free radicals in sports. *Sports Nutrition : Minerals and Electrolytes*. Kies CV, Driskell JA, CRC Press, Boca Raton, pp317–324, 1995.
23. Somani SM, Frank S & Rybak LP : Responses of antioxidant system to acute and trained exercise in rat heart subcellular fractions. *Pharmacol Biochem Behav* 51 : 627–634, 1995.
24. Ohkuwa T, Sato Y & Naoi M : Glutathione status and reactive oxygen generation in tissues of young and old exercised rats. *Acta Physiol Scand.* 159 (3) : 237–244, 1997.
25. McCloskey DP, Adamo DS & Anderson BJ et al : Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus. *Brain Res* 891 : 168–175, 2001.
26. Leeuwenburgh C, Hansen PA & Holloszy JO et al : Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radic Biol Med* 27 : 186–192, 1999.
27. Kamiike W, Watanabe F & Hashimoto T et al : Changes in cellular levels of ATP and its catabolites in ischemic rat liver. *J Biochem* 91 : 1349–1356, 1982.

The Influence of Severe Long-Term Exercise on the Mouse Hippocampus.

Kazunori Sumitani¹⁾, Osamu Miyamoto²⁾, Shinichi Yamagami³⁾, Yasushi Okada³⁾,
Toshifumi Itano²⁾, Tetuhide Murakami⁴⁾ and Tetsuro Negi¹⁾.

Departments of ¹⁾Basic Sports Medicine and

²⁾Biology, Kagawa Medical University, 1750-1, Ikenobe, Miki-sho, Kita-gun, Kagawa 761-0793, Japan;

³⁾Departments of Health and Physical Education, Kagawa University, Takamatsu 760-0016, Japan;

⁴⁾Departments of Physiology, Kurashiki University of Science and Arts Kurashiki City, Okayama 712-8002, Japan.

To determine whether severe long-term exercise affects on the brain, we investigated the mice brain after 12-week treadmill exercise. The mice (ddN, male, 25-35g in body weight) were divided into severe, mild, and non-exercise group. Mice in severe groups ran on a treadmill at a speed of 25 m/min for 12 weeks and mice in mild group ran on a treadmill at a speed of 10 m/min for 12 weeks. The mice were killed by transcardial perfusion with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) followed by ice-cold 4%paraformaldehyde in 0.1 M PB. The another sets of mice were fixed by 2.5%glutaraldehyde-2%osmium tetroxide for electromicroscope (EM) . The brains were serially sectioned in the coronal plane at a thickness of 20- μ m with a vibratome and then processed for histology, by means of hematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemistry. Fifty % of mice in severe exercise showed hyperchromatic and shrunken nerve cells with nuclear pyknosis (dark neuron) in the hippocampus, but not in mild exercise and non-exercise groups. The immunoreactivity of microtuble associated protein-2 (MAP-2) decreased, while the heat-shock protein/cognate 70 (HSP/C 70) increased in the hippocampus of severe exercise group. Many destroyed mitochondria were observed in dark neurons by Electron micrograph. These findings suggested that severe long-term exercise might damage hippocampal neurons.

Key words: long-term exercise, hippocampus, MAP-2, mitochondria, mouse.
