

自発的輪回し運動による SAMP1 マウスのサーカディアンリズムの改善

柳平坦徳

信州大学医学部・加齢適応研究センター・スポーツ医学分野

Disorders of circadian rhythm on behavioral activity and their improvement during spontaneous wheel running in young SAMP1

Yasunori Yanagidaira

Department of Sports medicine, Research Center on Aging and Adaptation,
Shinshu University School of medicine

Abstract

The behavioral rhythms between senescence-accelerated-prone mouse (SAMP) strains and the SAMR strains, senescence-accelerated-resistant mouse postulate to differ from young age since physiological, psychological characteristics and lifespan are distinct from two strains. Under LD cycle, we studied the differences of circadian rhythms in food and water intakes and spontaneous motor activity (SMA) between young SAMP1 (P1-EX) and young SAMR1 (R1-EX) with spontaneous wheel running (SWR) or without SWR (P1-CONT, R1-CONT). Food and water intakes in P1-CONT exhibited significant increases during the light period ($p < 0.01$) and decreases during the dark period ($p < 0.01$) compared with those in R1-CONT. The percentage nocturnal activity on food and water intakes, SMA counts and SWR revolutions in P1-CONT were significantly lower than in R1-CONT ($p < 0.001$). During SWR exercise for five days, the percentage nocturnal activities of SMA counts and food intake in P1-EX and the activity of the SMA counts in R1-EX were significantly higher ($p < 0.001-0.05$) than those in P1-CONT and R1-CONT. The average VO_2 throughout SWR exercise during light period and the percentage nocturnal activity of VO_2 in P1-EX was significantly higher ($p < 0.05$) than that in R1-EX. These findings indicate that P1 mice has disorders on behavioral rhythms of food and water intakes and SMA circadian rhythms from young age compared with R1, while SWR exercise improves the food intake and SAM rhythms in P1 and the SMA rhythms in R1 mice.

Key words: Food intake, SAMP1, SMA, SWR

食物摂取量、老化促進モデルマウス、自主運動、自発性輪回し運動

はじめに

老化及び種々な生理的、習性的な変化により齧歯類では食物及び水分摂取量や活動性のサーカディアンリズムの乱れがおこる(12, 18)。老化促進モデルマウス SAMP 系統は正常老化の SAMR 系統より寿

命が短く、生理学的、心理学的(気分状態、恐怖感覚、行動等)も全く異なっているため、比較的若い時期に活動性のリズムの乱れがおこる可能性がある。また、ラットなどでは自発的輪回し運動(以下、SWR

と略)などにより寿命の延長効果が知られている。最近、Solberg 等は、SWR がストレスラットの運動リズムを改善させることを報告している(14)。そこで、本実験では SAMP1 マウスと SAMR1 マウスを使用し、明暗周期(LDサイクル、12:12)の基で両者に自主活動量(SMA)サーカディアンリズムに違いが認められるか、違いがあればそれはSWRで改善されるかについて検討した。

材料および方法

実験動物には雄の45日齢SAMP1マウス(n=10;以下P1と略す)、雄の45日齢SAMR1マウス(n=10;以下R1と略す)を用いた。マウスは個々にプラスチックケージ内に飼育し、室温は $24\pm1^{\circ}\text{C}$ に固定、照明時間は午前8時から午後8時までとした。

実験 1.

1.体重、食物・水分摂取量は45-95日齢まで午前8時-8時30分及び午後7時30分-8時の毎日二回測定した。SWR運動は餌箱、吸水瓶及び自発運動装置(直径24.5cm)をもったプラスチックケージ(21.5x32x14cm)内で行われた(活動量測定装置:LCM-10, 東洋産業)。この際、五日間のSWR運動(P1-EX, R1-EX)を行った値とSWR運動前の五日間(P1-CONT, R1-CONT)のこれらの値の比較を行った。
2.SWRを通してのSMAカウントのサーカディアンリズムの比較。

SMA測定には上記の活動量測定装置を使用した。この機器の特徴はSWR活動が全くSMAのカウントに影響を与えないという特殊なSMAカウント装置である(特注)。ただし、光センサーが横3組、縦2組の計5組しかないため測定精度が粗いのが欠点である。SWR回転数とSMAのカウント数は自動的に三十分間隔で記録された。

実験 2.

1.SWRなしの場合の詳細なSMAカウントのサーカディアンリズムの比較。

この測定機器(Scanet-SV-10, 東洋産業)は144組のセンサーを持ち三つのSMA成分に分けて解析できる。すなわち、SMA1(5cm以上の動きをカウント)、SMA2(10cm以上の動きをカウント)、SMA3(立ち上がり回数をカウント)する。この機器(56x38x60cm)内に上記のプラスチックケージから自発運動装置をとりはずしたケージに個々のマウスを入れて、五日間、三十分間隔でSMAカウントを記録した。

2.SWRを通しての詳細なSMAカウントおよび酸素摂取量(VO_2)のサーカディアンリズムの比較。

SWRが三つのSMAカウントに与える効果を検討した。この機器の特徴はSMA2ではSWR活動が殆どSMAのカウントに影響を与えないが、SMA1とSMA3にはSWR活動がSMAカウントに付加される。また、P1とR1に代謝の違いがあるかどうかを

みるために VO_2 の測定を加えた。この実験では、SMA,SWRと VO_2 が同時に測定された。いずれの測定も五日間行われ、2.5日間のリズムが図示された。

結果

実験 1.

図1(Fig.1)は45-95日齢までのP1とR1の食物摂取量を比較したものである。

A図は明期における食物摂取量は明らかに $P1>R1$ ($p<0.01$)となり、B図の暗期では逆に $R1>P1$ となる。この結果は夜行性であるマウスが、P1でそのリズムを乱していることを意味する。図2(Fig.2)は食物摂取量の% nocturnal, dark/(dark+light*100)の値をP1-CONT, P1-EX, R1-CONT および R1-EXの各群間で比較したものである。この図からP1-EX群ではP1-CONT群より有意にその値が増加している($P<0.05$)ことがわかる。即ち、SWR運動は食物摂取リズムを改善する。また、R1群はP1群より有意にその値が高い。

図3(Fig.3)はSWRを通してのP1とR1のSMAとSWRのサーカディアンリズムを比較したものである。A図はP1とR1のSMAカウントのサーカディアンリズムを示す。R1は暗期の終わりに大きなピークを示すが、P1では暗期の終わりと明期の始めに最大のピークをもつ。即ちP1のリズムは1-2時間右側にシフトしている。B図はP1とR1のSWR回数のサーカディアンリズムを示す。R1は暗期の始めに大きなピークを示すが、P1では暗期の始めと暗期の終わりと明期の始めにも山を持つ。

表1(Table 1.)には実験1におけるP1とR1における明期時(light)と暗期時(dark)の生理的なデータの比較が示されている。

実験 2.

図4(Fig.4)はSWRなしとSWRありの際におけるSMA1のサーカディアンリズムを比較したものである。A図はP1のSMA1カウントのサーカディアンリズムを示す。暗期においてSWRありの場合のカウント(P1-EX)はSWRなしの際におけるカウント(P1-CONT)を上まわり、明期では逆の傾向を示す。B図はR1のSMA1カウントのサーカディアンリズムを示す。P1同様、暗期の値は $R1-EX>R1-CONT$ 、明期では逆の傾向を示す。

図5(Fig.5)はP1とR1のSMA1カウントの% nocturnalにおけるSWR効果を示す。SWRなしの際のSMA1カウントをそれぞれP1-CONT, R1-CONTとし、SWRありの際のSMA1カウントをそれぞれP1-EX, R1-EXとし、SMA1カウントの% nocturnal値を図示した。その結果、 $P1-CONT<P1-EX$; $p<0.05$, $R1-CONT<R1-EX$; $p<0.05$ となり、SWR運動がSMAカウントのリズムを改善することを示した。表2(Table 2.)にSAM2, SMA3の明期、暗期及びそれらの% nocturnal値を示したが、いずれもSWR

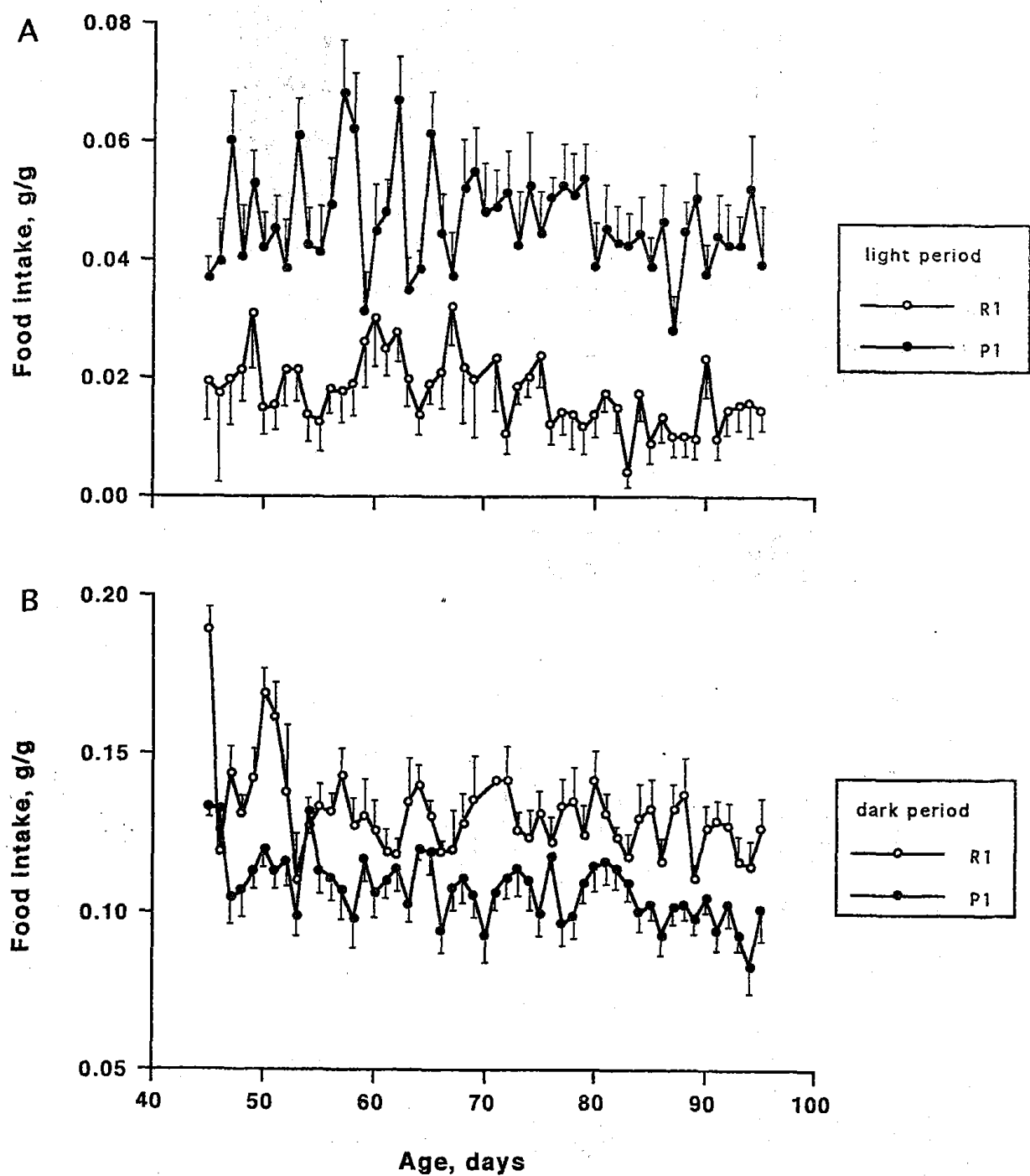


Fig.1. Changes in food intakes between SMAP1 and SAMR1. For clarity, data for light and dark periods are presented on separate panels. Each plot shows the mean food intake per 12 hr for ten mice, respectively. A: food intake during light period. B: food intake during dark period.

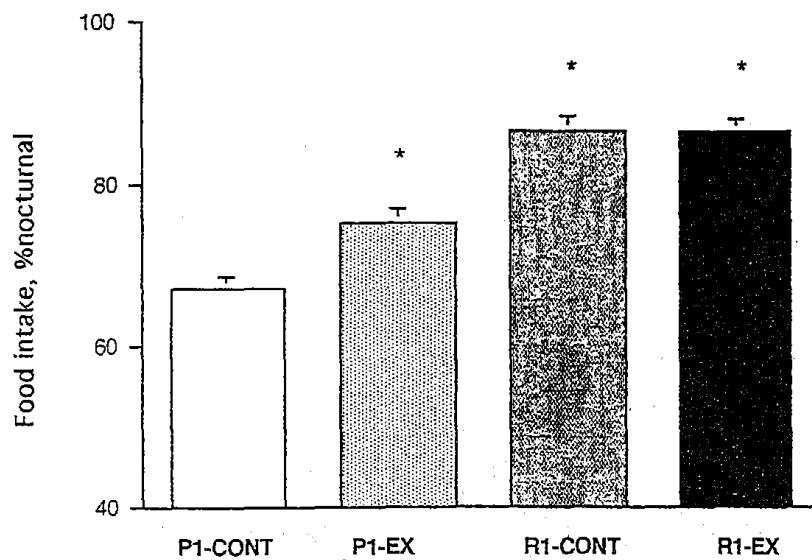


Fig.2. Comparison of percentage nocturnal activity in food intake for four days before spontaneous wheel running activity (P1-CONT; n=10 and R1-CONT; n=10) and for four days during spontaneous wheel running activity (P1-EX; n=10 and R1-EX; n=10), respectively.

*P < 0.05 VS. P-CONT.

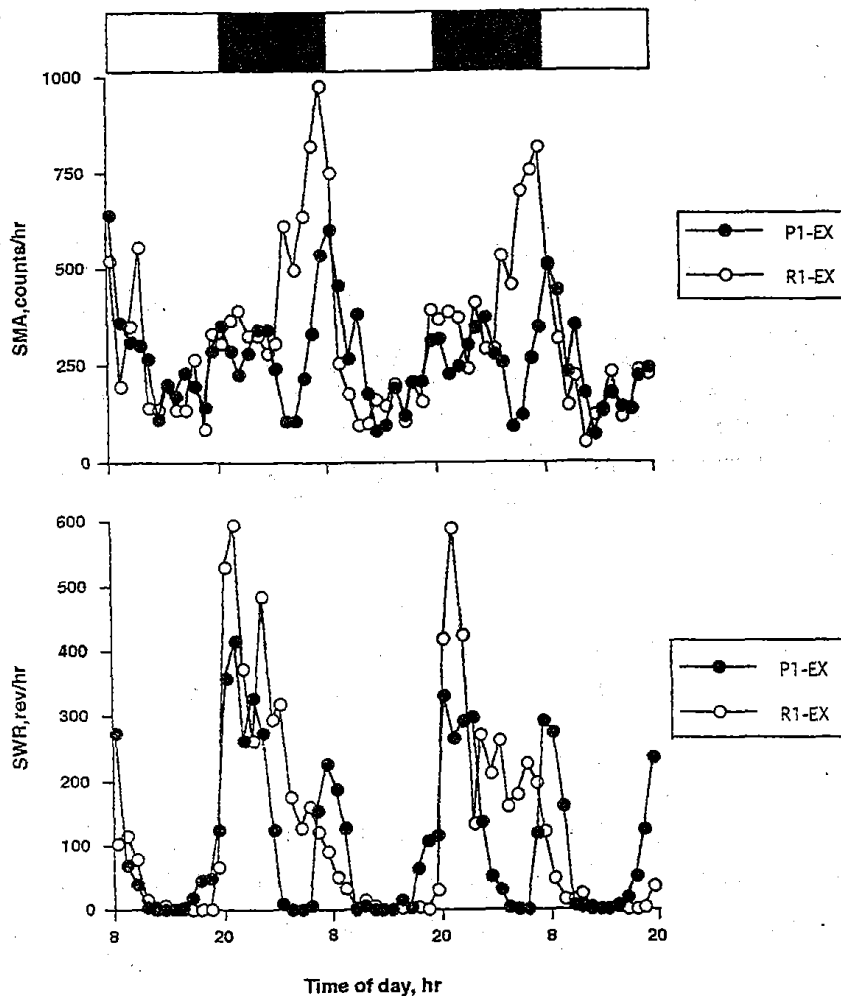


Fig.3. Comparison of the rhythms in spontaneous motor activity (SMA) with wheel running (SWR) and spontaneous wheel running revolutions (SWR) activity between SAMP1 and SAMR1. Each plot shows the mean values per hr for ten mice, respectively.

Table1. Physiological variables during light and dark periods in the P1 and R1 mice

	light	dark	dark/light	% nocturnal
BW, g				
P1	29.81 ± 0.116	30.42 ± 0.120	1.022 ± 0.001	
R1	28.60 ± 0.113 ^b	29.68 ± 0.114 ^a	1.038 ± 0.001 ^b	
FI, g/g				
P1	0.047 ± 0.021	0.107 ± 0.001	3.125 ± 0.132	70.21 ± 0.561
R1	0.017 ± 0.001 ^b	0.145 ± 0.002 ^b	9.304 ± 0.354 ^b	88.49 ± 0.482 ^b
WI, ml/g				
P1	0.081 ± 0.001	0.204 ± 0.022	3.036 ± 0.093	71.46 ± 0.421
R1	0.050 ± 0.002 ^b	0.226 ± 0.002 ^b	5.757 ± 0.190 ^b	82.59 ± 0.441 ^b
SMA, counts / 30min				
P1-EX	112.2 ± 8.06	141.3 ± 9.64	1.30 ± 0.10	58.32 ± 1.80
R1-EX	102.5 ± 13.45	234.5 ± 26.03 ^c	2.34 ± 0.24 ^c	69.94 ± 1.91 ^c
SWR, revolutions / 30 min				
P1-EX	18.9 ± 2.8	68.4 ± 7.0	6.3 ± 3.1	78.0 ± 2.62
R1-EX	6.7 ± 1.4 ^c	169.1 ± 21.7 ^c	34.4 ± 6.5 ^d	97.6 ± 1.12 ^d

Values are means ± SE for 10P1 and 10R1 mice presented as a function of dark and light periods between 45 and 95 days. BW, body weight; FI, food intake per body weight; WI, water intake per body weight.

^a and ^b Significant differences between the P1 and R1 mice: p < 0.05 and p < 0.01, respectively.

^c and ^d Significant differences between the P1-EX and R1-EX mice: p < 0.05 and p < 0.01, respectively.

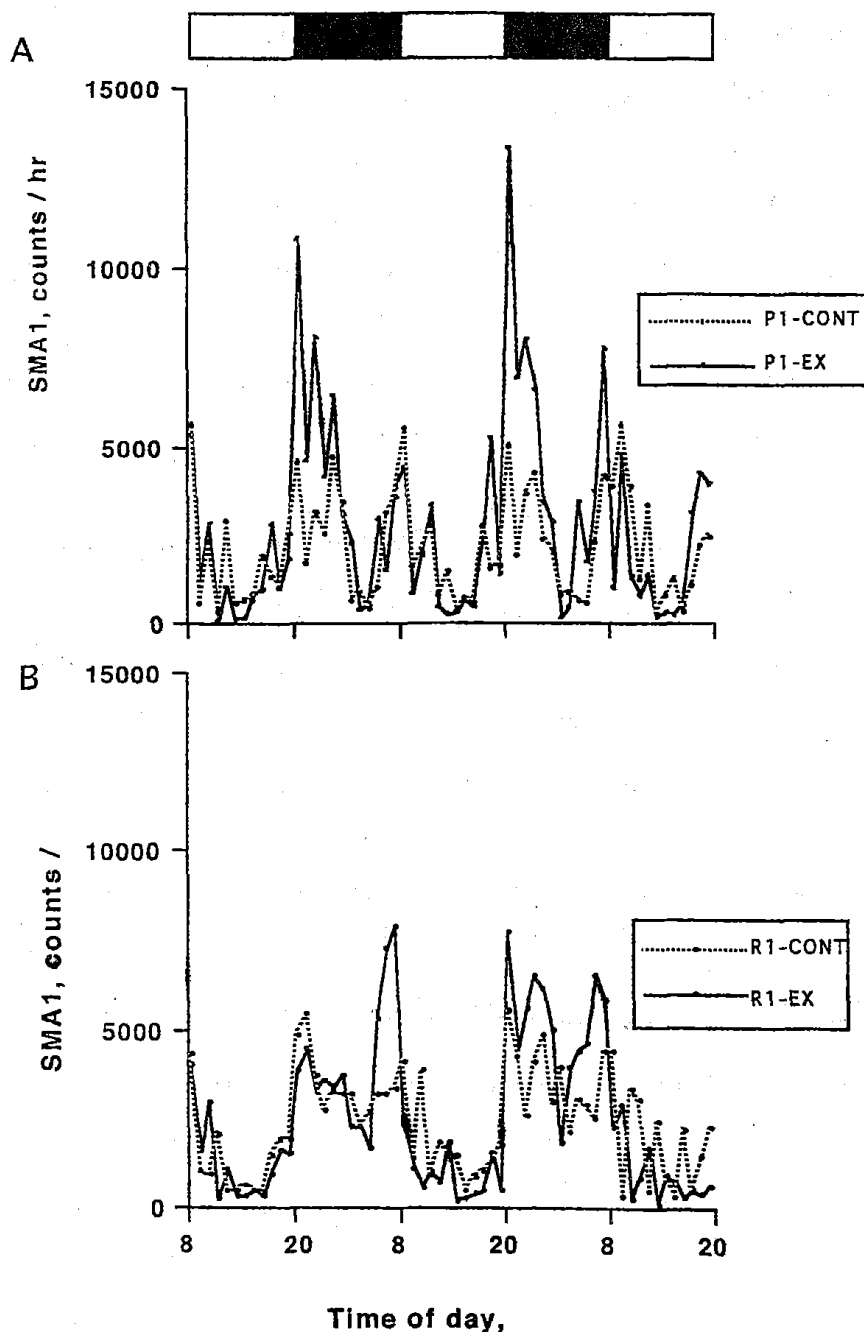


Fig.4. Comparison of the rhythms in SMA1 without wheel running (SAMP1-CONT and SAMR1-CONT) and during wheel running (SAMP1-EX and SAMR1-EX), respectively. Each plot shows the mean spontaneous motor activity counts (SMA1; body movements exceeding 5cm) per hr for five mice, respectively. A: SMA1 counts between with (SAMP1-EX) and without (SAMP1-CONT) wheel running. B: SMA1 counts between with (SAMR1-EX) and without (SAMR1-CONT) wheel running.

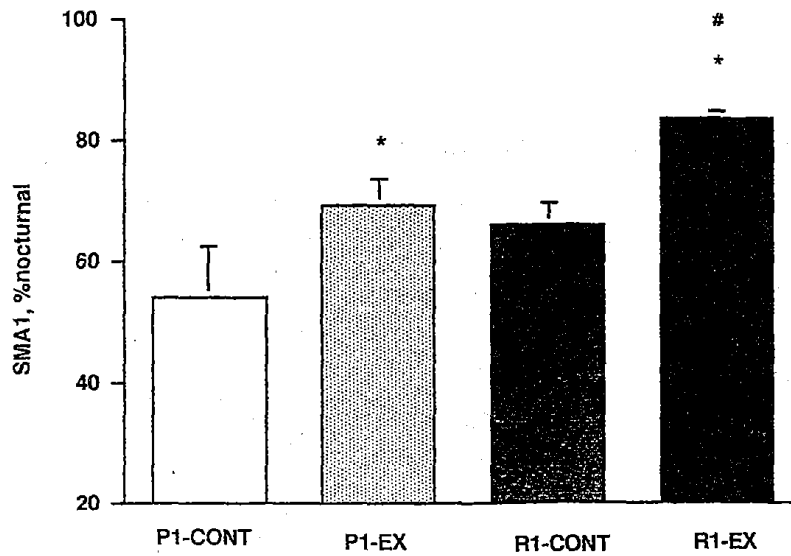


Fig.5. Comparison of percentage nocturnal activity in SMA1 without wheel running (SAMP1-CONT; n=5 and SAMR1-CONT; n=5) and with wheel running (SAMP1-EX; n=5 and SAMR1-EX; n=5), respectively. *P < 0.05 VS. P-CONT, #P < 0.05 VS. R-CONT

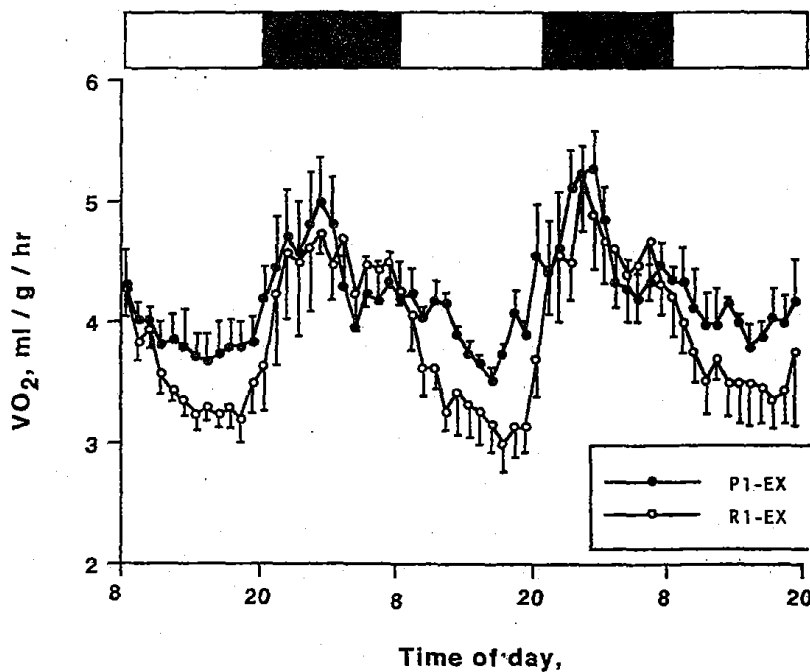


Fig.6. Comparison of the rhythms in VO_2 between SAMP1 and SAMR1 mice during wheel running activity. Each plot shows the mean VO_2 per hr for five mice, respectively.

Table 2. Comparison of behavioral variables to SWR in the P1 and R1 mice

	light	dark	% nocturnal
SMA1, counts / 30 min			
P1-CONT	1117±275	1206±180	54.1±8.6
P1-EX	931± 43	2450±608 ^a	69.4±4.5 ^a
R1-CONT	923±137	1813±255	66.0±3.6
R1-EX	504± 97 ^{a,b}	2614±438 ^{a,b}	83.6±1.5 ^{a,b}
SMA2, counts / 30 min			
P1-CONT	667±232	675±87	55.1±9.2
P1-EX	120± 23 ^a	370±98	73.2±2.8 ^a
R1-CONT	630±147	1289±272	67.5±3.9
R1-EX	146± 22 ^{a,b}	757±164	82.2±2.8 ^{a,b}
SMA3, counts / 30 min			
P1-CONT	8.8±4.2	15.8± 9.0	61.7±6.7
P1-EX	16.2±4.9	50.4±11.3	69.4±4.5
R1-CONT	5.8±1.2	24.4± 5.1	81.1±4.1 ^{a,b}
R1-EX	1.9±0.4	69.3±12.6	97.2±0.4 ^{a,b}
SWR, revolutions / 30 min			
P1-EX	23.0±7.8	65.4±11.0	75.0±4.5
R1-EX	1.1±0.2 ^c	104.7± 9.3 ^c	98.0±0.7 ^c
VO ₂ , ml/g/hr			
P1-EX	4.07±0.04	4.64±0.07	53.3±0.62
R1-EX	3.45±0.06 ^d	4.46±0.08	57.3±0.89 ^d

Values are means ±SE for 5 P1 and 5 R1 mice presented as a function of light and dark periods for 2 days.

SMA1, body movements exceeding 5 cm; SMA2, body movements exceeding 10 cm; SMA3, number of standing position (rearing); SWR, spontaneous wheel running (SWR); P1-CONT and R1-CONT, mice without SWR activity; P1-EX and R1-EX mice with SWR activity. ^a Significant differences between P1-CONT and other three groups in the SMA1, SMA2 and SMA3, respectively: $p < 0.05$. ^b Significant differences between R1-CONT and other three groups in the SMA1, SMA2 and SMA3, respectively: $p < 0.05$. ^c Significant differences between P1 and R1 in the SWR activity: $p < 0.01$. ^d Significant differences between P1 and R1 in the VO₂: $p < 0.01$.

運動の効果は P1, R1 において認められている。

図 6 (Fig.6)は SWR を通しての P1 と R1 の VO₂ のサーカディアンリズムを比較したものである。

明期時の P1 の VO₂-amplitude は R1 のそれと比較して有意に高い。しかし暗期時には P1 と R1 間には差はない。

RI の VO₂, % nocturnal 値は 57.3 ± 0.89 で P1 のそれの 53.3 ± 0.62 を有意 ($p < 0.05$) に上回った (Table2)。

考察

本実験において、若い SAMP1 と SAMR1 の間には生理的、習性的なリズムに大きな差が認められた。まず、実験 1 の P1 の食物および水分摂取量は、R1 のそれらと比較して明期時の有意な増加と暗期時の有意な減少が認められ、夜間活動量を示す %nocturnal 値も当然 $R1 > P1$ ($p < 0.01$) となった。また、SWR 運動をしてもその運動が SMA カウントに付加されない SMA リズムでは、明らかに P1 のリズムは R1 リズムと比較して %nocturnal 値が低下していた。実験 2 においては SMA を詳しく三成分に解析したが、SWR を行わない場合の P1 と R1 との %nocturnal 値は SMA3 (立ち上がり回数) のみに有意差が認められた ($R1 > P1$, $P < 0.01$)。この SMA3 の行動は動物の食餌、生殖、逃避行動などが含まれ、行動力(パフォーマンス)の大きさを現すと想定される。即ちパフォーマンスは $R1 > P1$ と解釈される。以上の P1 のリズムの乱れや行動力の低下を補う方法はあるだろうか？他の SAMP 系統(SAM8)においては薬物の投与により習性リズムの乱れを改善させることに成功している (4,11,10)。しかし、生理的なサーカディアンリズムの改善についての報告はまだない。一方、最近、Solberg 等は、SWR 運動がラットの運動リズムを改善させることを報告している (14)。この報告はヒトにおける運動が有害なストレスを軽減させるという説を支持する (9,15)。本実験においていくつかの生理、習性的な活動リズムは五日間の SWR 運動により有意に改善された。

期待したように、SWR 運動を与えると SAMP1 の食物摂取量に関する %nocturnal 値は SWR を与えない際の値と比較して有意な増加 ($p < 0.05$)を示した。即ち SWR 運動は P1 の食物摂取リズムを改善させた。更に、P1 と R1 の %nocturnal 値は共に SMA1、SMA2、SMA3 のすべてで SWR ありの値が SWR なしの値を有意に上回った。

SWR を通しての P1, R1 の VO₂ 値において、明期時の P1 は R1 のそれを有意に上回った。この結果は P1 の明期時の活動量が R1 のそれを上回っていることを示す。暗期時には両群で差は認められなかったが、全体の暗期時の活動量は $R1 > P1$ である。その結果は P1 の代謝効率が R1 のそれより低い可能性が示された。Asami ら (1) は強制運動と自発運動によるラットの臓器の DNA 損傷指数として 8-ヒドロキシグアニン (8-OHGua) を測定し、運動量の高い強制運動 (VO₂ の増加) はその損傷度が高く、逆に自発運動 (VO₂ の低下) は著しくその値が低いことを報告している。運動は種々のフリーラジカルをうみだすが、サーカディアンリズムを制御する視交叉上核 (SCN) に関与しているメラトニンがその酸化ストレスを防御するという (7,5)。

SAMP1 では若い時期からフリーラジカル、過酸化脂質の増加がおこるが (8,19)、これらの酸化ストレスは SCN にも影響を与えているかもしれない。なぜならば Takahashi ら (16) は SAMP8 を用い、誕生後すぐに抗酸化薬の idebenone を投与する事によりその異常習性行動を防げることを報告している。この SAMP 系統は生理的、心理的な変化 (気分状態、神経状態、行動等) に伴うモノアミン神経伝達物質 (セロトニン; 2,3,13,17、ノルアドレナリン; 6) の不活性化、劣化などが習性リズムの乱れを生み出している可能性が高い。SWR 運動がこれらの劣化機能を修復し異常なサーカディアンリズムを改善したのかもしれない。

文献

1. Asami, S., Hirano, T., Yamaguchi, R., Tsurudome, Y., 1998. Effects of forced and spontaneous exercise on 8-Hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243:678-682.
2. Edgar, D.M., Miller, R.A., Prosser, R.A., Dean, R.R., Dement, W.C., 1993. Serotonin and mammalian circadian system II Phase-shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. *J. Biol. Rhythms*, 8:17-31.
3. Edgar, D.M., Reid, M.S., Dement, W.C., 1997. Serotonergic afferents mediate activity-dependent entrainment of the mouse circadian clock. *Am. J. Physiol.* 273. (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 42:R265-R269.
4. Flood, J.E., Morey, J.E., La Reginna, M., 1993. Age-related changes in the pharmacological improvement of retention in senescence accelerated mouse (SAM). *Neurobiol. Aging* 14, 159-166.
5. Hara, M., Abe, M., Suzuki, T., Reiter, R.J., 1996. Tissue changes in glutathione metabolism and lipid peroxidation

- induced by swimming are partially prevented by melatonin. *Pharmacol. Toxicol.*, 78:308-312.
6. Ida, Y., Tanaka, M., Kohno, Y., Nakagawa, R., Imori, K., Tsuda, A., Hoaki, Y., Nagasaki, N., 1982. Effects of age and stress on regional noradrenaline metabolism in the brain. *Neurobiol. Aging* 3, 233-236.
 7. Klein, D.C.; Moore, R.Y., 1979. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: Control by the retina hypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 174:245-262.
 8. Komura, S., Yoshino, K., Kondo, K., Yagi, K., 1988. Lipid peroxide levels in the skin of the senescence-accelerated mouse. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 5, 255-260.
 9. LaPlante, A., Ironson, G., Antoni, M.H., Schneiderman, N., Klimas, N., Fletcher, M.A., 1994. Exercise and psychoneuroimmunology. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26, 182-190.
 10. LaPlante, A., Ironson, G., Antoni, M.H., Schneiderman, N., Klimas, N., Fletcher, M.A., 1994. Exercise and psychoneuroimmunology. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26, 182-190.
 11. Oomura, Y., Sasaki, A., Li, A., Kimura, H., Tooyama, I., Hanai, K., Nomura, Y., Kitamura, Y., Ygo, H., 1994. Learning and memory facilitation and protection of memory loss in senescence accelerated mice by acidic fibroblast growth factor (aFGF). In: The SAM Model of Senescence, Takeda, T (ed) *The SAM Model of Senescence*. Pp415-418. Excerpta Medica, Elsevier Press B.V., Amsterdam.
 12. Pittendrigh, C.S.; Daan, S., 1974. Circadian oscillations in rodents. : a systematic increase of their frequency with age. *Science*, 186: 548-550.
 13. Shioiri, T.; Takahashi, K.; Yamada, N.; Takahashi, S., 1991. Motor activity correlates negatively with free-running period, while positively with serotonin contents in SCN in free-running rats. *Physiol. Behav.* 49:779-786.
 14. Solberg, L.C., Horton, T.H., Turek, F.W., 1999. Circadian rhythms and depression: effects of exercise in an animal model. *Am. J. Physiol.* 276(Regulatory Integrative Comp. Physiol. 45):R152-R161.
 15. Sothmann, M.S., Buckworth, J., Claytor, R.P., Cox, R.H., White-Welkley, J.E., Dishman, R.K., 1996. Exercise training and the cross-stressor adaptation hypothesis. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 24:267-287.
 16. Takahashi, H., Nishiyama, M., Takami, K., Miyamoto, M., Nagaoka, A., 1994. Effect of chronic administration of idebenone on age-related behavioral disorders in senescence accelerated mouse (SAMP8). In: *The SAM Model of Senescence*, Takeda, T (ed) *The SAM Model of Senescence*. pp427-430, Excerpta Medica, Elsevier Press B.V., Amsterdam.
 17. Tominaga, K.; Shibata, S.; Ueki, S.; Watanabe, S., 1992. Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters. *Eur. J. Pharmacol.* 214:79-84.
 18. Van Gool, W.A.; Mirmiran, M., 1986. Aging and circadian rhythms. In: Swab, D.F. et al., (eds) *Progress in Brain Research*, 70. Elsevier Science Publishers. B.V. pp.255-277.
 19. Yagi, K., Yoshino, K., Komura, S., Kondo, K., Ohishi, N., 1988. Lipid peroxide levels in the senescence-accelerated mouse. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 5, 22-27.