

身体活動による骨格筋の形態学的変化は
脳の健康増進に寄与するか？
：認知機能と情動の改善を目指した戦略の構築

公益財団法人
明治安田厚生事業団
体力医学研究所 須藤 みず紀

**Do Physical Activity Induced Morphological Changes in Skeletal Muscle
Contribute to Improvement in Brain Health: Development of Strategic Measures
Towards Improvement of Cognitive Function and Mood**

by

Mizuki Sudo

*Physical Fitness Research Institute,
Meiji Yasuda Life Foundation of Health and Welfare*

ABSTRACT

The purpose of the present study was to examine whether environmental enrichment (EE) that enables facilitation of wheel running activity and locomotor activity (LA) increase skeletal muscle mass and mitigate anxiety-like behaviors. The present EE consisted of a running wheel, a slope, a tunnel, and a hut. Wistar rats were divided into four different housing groups (standard environment: SE; only running wheel group: EEW; EE without running wheel group: EENW; and EE, n=7-12, each). The LA of each rat was continuously recorded using a three-axis accelerometer that was implanted subcutaneously at the back of the rat. After exposure to each housing environment for 30 days, the animal was transferred to the an elevated plus maze to evaluate the anxiety level. All experimental data were expressed as mean \pm standard deviation. The level of significance was set at $P < 0.05$. A two-way ANOVA found the statistically significant main effect of group ($P = 0.001$). The post-hoc analysis showed that locomotor

activity of the EE group was significantly higher than other groups ($P < 0.001$). Anxiety-like behavior was reduced in the EEW and the EENW groups. Soleus muscle were greater in the EE, EEW, EENW groups compared with the SE group. Hence, the present study suggested that both wheel running activity and LA in the absence of wheel running reduce anxiety-like behavior, but LA in the SE does not despite the same amount of LA.

キーワード

身体活動, 情動, 骨格筋, 環境エンリッチメント, 不安様行動

Keyword

locomotor activity, mood, skeletal muscle, environmental enrichment, anxiety-like behavior

要 旨

本研究は、自発的な身体活動が骨格筋に及ぼす影響と情動の関係を検証した。本実験は、Wistar系ラットを用い、4条件の飼育環境として、自発的な身体活動誘導環境モデル（遊具+ホイール群、ホイールのみ群、遊具のみ群）、通常環境モデル）を作成した。30日間の飼育期間中、各個体における身体活動レベルを計測した。飼育期間終了後に、不安様行動、及び、後肢骨格筋の形態変化を検証した。その結果、身体活動レベルは、環境エンリッチメント（遊具+ホイール）条件群が有意に高い値を示した。一方で、ヒラメ筋における骨格筋量は、通常環境条件群と比較して全群において有意な増加を示した。また、不安様行動は、ホイールのみ群、及び遊具のみ群において通常環境群よりも有意な低下を示した。以上のことから、自発的な身体活動による不安様行動の改善は、身体活動レベルに依存するとは限らず、骨格筋の形態が関連している可能性が示唆された。

緒 言

近年、“いかに心身ともに健やかな状態で老いるか”が重要視されているが、COVID-19の世界

的なパンデミックによる「身体活動」の低下に伴い、認知機能やメンタルヘルスが加速度的に悪化することが懸念されており、「身体活動」が脳の健康維持のために如何に重要であることを再認識させられている。身体活動は、認知機能や情動・感情といったメンタルヘルスを維持・向上させるだけでなく、予防策としても有力なツールとして認識されていることから、「運動による脳の健康増進効果」の作用機序を解明すべく、脳や骨格筋といった単一の臓器/細胞に焦点を当てた研究が多く行われてきた。一方、運動の健康増進効果は全身に及ぶにもかかわらず、臓器間のクロストークに焦点を当てた研究は少なく、骨格筋と脳の関係性を示すエビデンスも乏しいのが現状である。

これまでの先行研究より、身体活動が認知機能の向上やメンタルヘルスの安定をもたらすことは知られている¹⁻⁵⁾が、未だ不明な点が多い。

動物モデルにおいては、飼育環境と脳機能の関係を検証した先行研究として、環境エンリッチメント (Environmental Enrichment: EE) モデルが挙げられる。環境エンリッチメントには、標準的な飼育条件と比較して、感覚、認知、運動刺激を強める飼育条件が含まれる⁶⁾。これまで、EE条件は動物の探索、社会的相互作用、認知機能の向

上、身体活動を誘導し、うつ病や不安様行動の改善につながる事が示唆されている⁷⁻¹⁰⁾。一方で、EE条件による脳機能への有益な効果は、部分的にはEE条件により誘発される身体活動量の増加と関連している可能性が高い。しかしながら、各個体の活動量の評価を集団で飼育から定量することは、技術的に困難であるため、我々の知る限り、EE条件における各個体の身体活動量を直接的に評価した研究は皆無である。

また、近年、「健康寿命の長さ」は「骨格筋量」と強く相関することが示されている¹¹⁾ことから、骨格筋が身体全体に対して健康増進に重要な役割であることが示唆されている。さらに、歩行速度と認知機能¹²⁾との関係性も指摘されていることから、筋の動員そのものが脳への求心的な刺激となり、脳の機能を保つ可能性が予想されるが、身体活動量と脳機能と骨格筋の3方向の視点からの知見はほとんどない。したがって、本研究は、自発的且つ継続的な身体活動による骨格筋の形態的变化が脳の機能維持に寄与するという仮説を立てた。本研究は、動物を対象に環境エンリッチメント条件における、1) 自発的な身体活動レベルを

個体ごとに定量し、2) 骨格筋の形態的变化と行動科学テストによる情動変化の関係を明らかにすることを目的とした。

1. 研究方法

1. 1 実験動物と飼育環境条件

本研究は、(公財)明治安田厚生事業団体力医学研究所動物実験委員会の倫理審査に則り実験を行った(No.2014002)。対象は、雄性のWistar rat (6週齢, SLC, 各群N = 7-12)とし、12時間の明暗サイクルで一定の温度、及び湿度が保たれた部屋で飼育を行った。餌と水は自由摂取とした。ラットは以下の4つの異なる条件下で飼育を行った(図1): 通常の飼育ケージ(40×25×20 cm)内にて飼育する通常環境条件群(standard environmental condition; SE条件群)、大型のケージ(60×40×40 cm)に遊具(スロープ、小屋、トンネル)とランニングホイールを設置して飼育する環境エンリッチメント条件群(enriched environmental condition; EE条件群)、EE条件群から遊具を省いて飼育するホイールのみ群(EE-Wheel; EEW条件群)、EE条件群からランニン

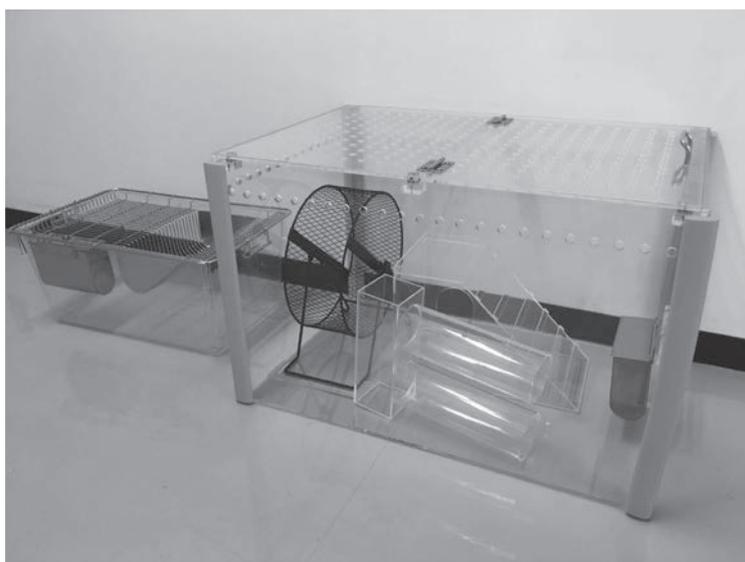


図1 通常飼育ケージ(左)と環境エンリッチメントケージ(右)

グホールを省いて飼育する遊具のみ群 (EE- No-Wheel; EENW 条件群). 全群は1ケージ2匹ずつの複数飼いと、飼育期間は30日間 (順化期間は1週間) とした。

1. 2 身体活動レベルの評価

身体活動レベルは、小動物専用の3軸加速センサー (Nano-Tag: 15 mm × 14.2 mm × 7.1mm, 2.5g, キッセイコムテック社, 日本) を用いた。イソフルランによる吸引麻酔下で背部皮下にセンサーを埋め込み、縫合の処置をおこなった。センサーは、埋め込んでから30日間の飼育終了後に体内から回収した。加速度センサーは、事前に設定した閾値以上の動きを感知し振動数として記録することができる。本研究では、暗期における一日当たりの総振動数における週ごとの平均値を算出し、身体活動レベル (Locomotor Activity :LA) として評価した。

1. 3 不安様行動の評価

不安様行動は、飼育期間終了後に、高架式十字迷路テスト (Elevated Plus-Maze Test: EPM) より評価した。この迷路は、25 × 5cmのオープンアームと高さ15cmの黒色の壁に囲まれたクローズアームが交差しており、床からアームまで70cmの高さを有している。アームには、高さ3 mmのプラスチック製の板がつけられており、動物が落下する可能性を限りなく低くした。対象動物は、中央部よりスタートし、10分間の行動を継続的に動画記録した。取得した動画より各アームの滞在時間を、二次元動画解析ソフトウェア (Move-tr/2D, Library) を用いて解析をおこなった。

1. 4 後肢骨格筋の形態学的評価

全測定終了後に、麻酔下において、前脛骨筋 (tibialis anterior: TA), ヒラメ筋 (soleus: Sol), 足底筋 (plantaris: Pla) を摘出し、直ちに筋湿

重量を測定した。筋重量の統計結果をふまえた上で、Sol筋を対象に組織染色を行なった。筋サンプルは、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結した。クライオスタット (-20℃, Leica, CM1510) で10 μmの横断切片を作成し、免疫組織学染色後を施した。一次抗体は、Mouse monoclonal slow MHC抗体 (Novocastrate Laboratories, Univ.of Iowa, 1 : 40), Mouse fast MHC monoclonal抗体のアイソフォーム IIA型 (Studies Hybridoma Bank, Univ.of Iowa, SC-71, 1 : 1000) を用いた。全ての切片は、一次抗体処理後、Vectastain ABCキット (Vector Laboratories, Funakoshi, Japan) を用いて免疫組織化学反応を施し、光学顕微鏡下にて観察・撮影を行なった。筋線維横断面積 (cross-sectional are: CSA) は、撮影画像を筋線維ごとにトレースした後、NIHの画像処理ソフト (Image J) を用いて測定を行なった。

1. 5 統計解析

全ての値は、平均値 ± 標準偏差で示した。グループ間の統計的比較はGraphPad Prism 9 (version 9, GraphPad Software, La Jolla, CA) を用いた。身体活動レベルは、各群における週ごとの変化を二元配置の分散分析を行い、不安様行動、及び筋重量は各群に対する一元配置の分散分析を行なった。また、CSAの統計解析は、Student' s t-testを用いた。全て有意水準は5%未満とし、交互作用が見られた場合、Tukey-Kramerによる多重比較検定を実施した。

2. 結果

2. 1 体重

飼育終了後の体重は、各群間に有意な差異はなかった (EE: 273 ± 10g, EEW: 272 ± 10g, EENW: 275 ± 12g, SE: 279 ± 15g)。

2. 2 身体活動量

暗期における週ごとの身体活動レベルを算出した(図2)。身体活動レベルは、群において主効果が認められた ($F_{3,24} = 7.137, P < 0.001$)。また、多重比較検定の結果、EE条件群の身体活動レベルは、各群よりも有意に高い値を示した ($P < 0.0001$)。一方で、EENW条件群はSE条件群と比べて有意に低い値を示した ($P < 0.0001$)。

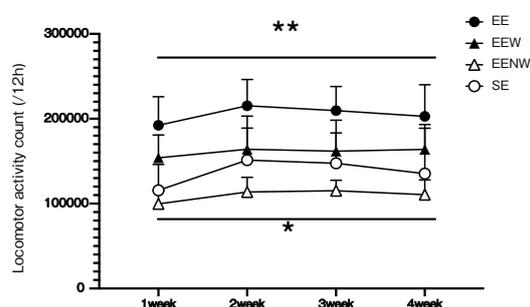


図2 暗期における週ごとの身体活動レベル mean \pm SD. ** $P < 0.0001$ vs. SE, EEW, EENW, * $P < 0.05$ vs. SE

2. 3 不安様行動の評価

EPMテストによる不安様行動は、各アームにおける滞在時間によって評価された(オープンアーム;不安様水準が低い, クローズアーム;不安様水準が高い)。オープンアーム滞在時間は、EEW条件群 (185 ± 31 sec), 及びEENW条件群 (233 ± 22 sec) ではSE条件群 (103 ± 16 sec) と比較して有意に高い値を示した (EEW; $P < 0.0001$, EENW; $P = 0.042$) が、EE条件群 (82 ± 14 sec) に差異はみられなかった。また、それぞれのアーム滞在時間の比(オープンアーム/クローズアーム)を算出した結果、群における主効果がみら

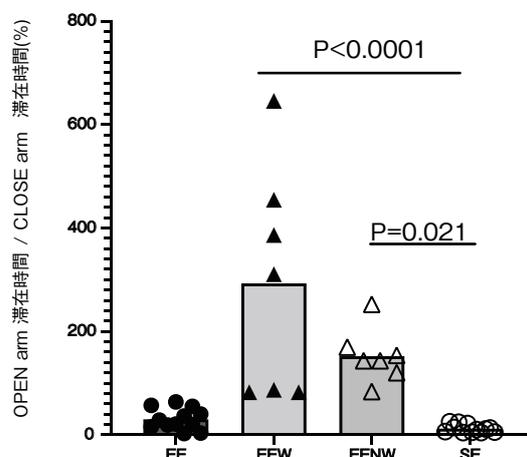


図3 高架式十字迷路における各アームにおける滞在時間比

れ ($F_{3,35} = 33.37, P < 0.0001$)、EEW条件群、及びEENW条件群においてSE条件群よりも有意に高い値を示した (EEW; $P < 0.0001$, EENW; $P = 0.021$, 図3)。

2. 4 骨格筋湿重量

飼育終了後に摘出した後肢骨格筋は、体重あたりの筋湿重量 (mg / g) として算出した(表1)。体重あたりのSol筋において群間における主効果がみられ ($F_{3,20} = 10.66, P = 0.0002$)、SE条件群と比較してEE条件群、EEW条件群、EENW条件群において有意な高値を示した。TA筋とPla筋においては、群間における差異はみられなかった。

2. 5 筋線維タイプ型の割合と筋線維横断面積

体重あたりの骨格筋湿重量において、Sol筋のみ有意差が得られたことから、本報告書では、解析が終了したEE条件群とSE条件群両群間にお

表1 UV-visible absorption spectra of UV absorbers in DMF and on cellulose acetate film

Skeletal Muscle	EE	EEW	EENW	SE	P value
TA / BW, mg / g	1.57 \pm 0.03	1.60 \pm 0.03	1.59 \pm 0.03	1.56 \pm 0.04	$P = 0.79$
Sol / BW, mg / g	0.45 \pm 0.01*	0.42 \pm 0.01*	0.40 \pm 0.01*	0.36 \pm 0.01	$P = 0.0002$
Pla / BW, mg / g	0.96 \pm 0.02	0.95 \pm 0.01	0.96 \pm 0.02	0.92 \pm 0.03	$P = 0.34$

mean \pm SD. * $P < 0.05$ vs SE

る筋線維タイプの割合と筋線維横断面積を定量した。

筋線維タイプの割合は、MHC slow型、及びMHC IIA型の両方においてSE条件群 (slow; $84.3 \pm 7.1\%$, IIA; $22.3 \pm 7.2\%$) とEE条件群 (slow; $84.0 \pm 5.0\%$, IIA; $25.2 \pm 4.1\%$) の間に有意な差は見られなかった。

CSAは、slow型、及びMHC IIA型において、EE条件群はSE条件群と比較して有意に高い値を示した (slow型; $P = 0.04$, 図4, MHC IIA型; $P = 0.02$, 図5)。

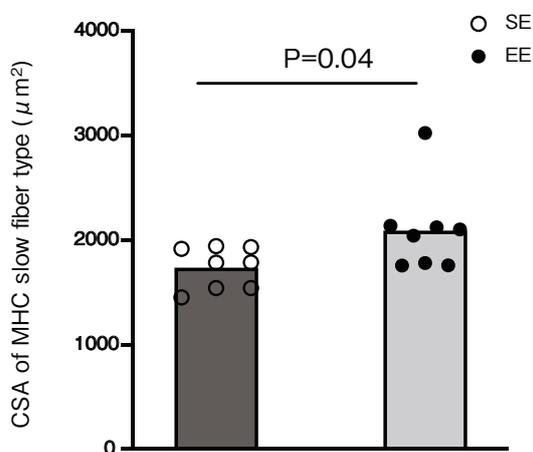


図4 ヒラメ筋におけるMHC slow型筋線維横断面積

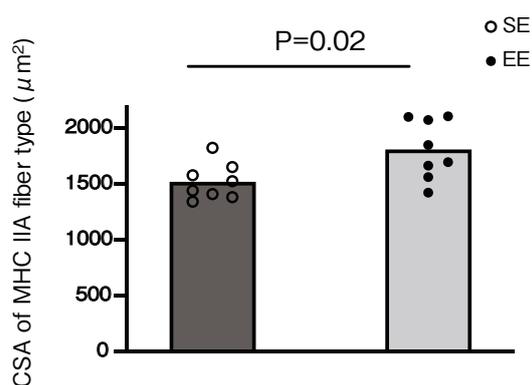


図5 ヒラメ筋におけるMHC IIA型筋線維横断面積

3. 考察

本研究は、自発的な身体運動を促す環境エン

リッチメントが身体活動レベルに及ぼす影響を定量的に検証し、それに伴う情動と骨格筋の形態学的変化について動物モデルを用いて評価することを目的として実施した。

その結果、1) 暗期における身体活動レベルは、ホイールと遊具を設置した環境エンリッチメント条件群において、通常環境条件群、ホイールのみ条件群、遊具のみ条件群よりも高いことが明らかとなった。一方で、2) 不安様行動は、ホイールのみ条件群と遊具のみ条件群の両方において抑制されていることが示唆された。骨格筋の形態学的変化は、SE条件以外の群では、3) ヒラメ筋において筋重量の増加がみられ、EE条件群における横断面積が増加したことが明らかとなった。

身体活動レベルの増加は、環境エンリッチメント条件が自発的な身体活動量を促すことを示唆しており、特に持久的な運動と視覚、感覚刺激を与える遊具の設置条件の組み合わせにおいて身体活動レベルが増加することが本研究より示唆された。これまで、ラットにおいて身体活動量は赤外線レーザーを用いた方法による評価が多かった。レーザーを用いた場合、X, Y, Z軸方向の身体的動きを感知することで身体活動量を算出することができる。しかしながら、レーザーの場合、複数匹の動きに対して分別した解析が不可能であるため、単独での飼育中の身体活動量しか測定することができない。単独飼育により、ラットの情動はうつ状態に類似した応答が観察される可能性が高い。したがって、単独飼育は、ネガティブな状態に起因した身体活動量の減少が予想され、健全なラットにおける身体活動量と比較して過小評価される可能性が高い。よって、環境エンリッチメント条件における本研究の結果は、自発的な身体活動量と脳機能の関係性を詳細に検証する上で重要なデータとなることが予想される。

本研究における不安様行動は、環境エンリッチメント条件では変化がみられなかったが、ホイー

ルのみ条件と遊具のみ条件にて不安様水準の低下が示唆された。これまでの先行研究では、ホイール、トレッドミル運動などによる身体活動量の増加は、ポジティブな情動を誘発することが報告されてきた^{13, 14)}ことから、情動の改善には効果的であると予想していた。しかしながら、本研究では、ホイールと遊具を組み合わせた環境エンリッチメント条件における身体活動レベルが上昇したにもかかわらず不安様行動の変化はみられず、ホイール運動を伴わない遊具のみ条件においても情動の改善が見られたことは興味深い。遊具のみ条件は、身体活動レベルは通常飼育群よりも低下していることが本研究の結果より示されている。ホイールによる有酸素的な運動を伴わない遊具のみの環境が、探索行動や視覚刺激を促し、脳機能に影響を及ぼすことは、これまでの先行研究^{9, 10, 15)}を加味すると起こりうる現象である。したがって、本研究の飼育環境において、身体活動レベルに依存しない情動の安定がもたらされた可能性がある。

また、本研究より、全ての群において身体活動レベルに依存せず、通常環境条件よりヒラメ筋における筋重量と筋線維横断面積の増加がみられた。従来、走行運動による筋の肥大は誘発しにくいとされてきたが、運動負荷の違いが走行中の筋の動員に関連した知見も報告されている¹⁶⁾。本研究にて設定した環境条件が、ホイールランニング、立ち上がり、歩行といった複数の行動を自発的に実施したことで、複合的に筋の動員に作用している可能性がある。また、先行研究では、実施頻度の多い低負荷レジスタンストレーニングが高負荷レジスタンストレーニングと比較して同等の筋肥大効果をもたらすことが指摘されている¹⁷⁾。本実験モデルは、遊具のみ条件群では、スロープ、トンネル、立位可能なケージのサイズなどの環境の設置が、後肢の骨格筋に対して高頻度の低強度筋活動となり、ヒラメ筋量の増加に寄与した可能

性があるため、身体活動レベルに依存しない筋肥大がもたらされた可能性がある。

本研究では、身体活動レベルと筋重量の増加が最も顕著であった環境エンリッチメント条件におけるヒラメ筋を対象とした筋線維タイプの割合と筋線維横断面積を定量した。ラットのヒラメ筋は、MHC IIA型とMHC slow型が主なものである¹⁸⁾が、その割合に変化は見られなかった一方で、両方の型における筋線維横断面積は増加し、肥大したことが示唆された。すなわち、この筋線維の肥大が筋重量に反映されていると考えられる。筋線維横断面積の増加の要因は、先述した身体活動における筋の動員が要因として推測されるが、今後、筋タンパク質の合成機構についての詳細を検証する必要があると考えている。

本研究より、環境エンリッチメント条件による自発的な身体活動レベルは増加したが、ポジティブな情動への変化と骨格筋の形態学的変化は非依存である可能性が示唆された。現状では、骨格筋における形態学的変化が、脳機能の維持に影響するか否かは断定することはできない。しかし、マイオカインにより脳への影響を考慮した場合、自発的な身体活動レベルの上昇が筋肥大をもたらし、筋より放出される物質が求心的に脳の神経活動に作用する可能性は十分に考えられるだろう。本研究のモデル用いたさらなる検証が必要である。さらに、脳機能の認知機能についても現在、解析を進めており、自発的な身体活動による効果の検証を深めたい。

4. 結 論

本研究より、環境エンリッチメント条件はランニングホイールを伴うことで身体活動レベルが増加することが示された。一方で、ヒラメ筋量と横断面積は、環境エンリッチメント条件におけるホールランニングの有無にかかわらず、不安様行動の低下をもたらすことが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団および関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ando, S., Komiyama, T., Sudo, M., Higaki, Y., Ishida, K., Costello, J. T. and Katayama, K. The interactive effects of acute exercise and hypoxia on cognitive performance: A narrative review. *Scand J Med Sci Sports*, **30**, 384-398 (2020)
- 2) Bourke, M., Patten, R.K., Klamert K., Klepac, B., Dash, S. and Pascoe, M.C.: The acute affective response to physical activity in people with depression: A meta-analysis. *J. Affect. Disord.*, **311**, doi: 10.1016/j.jad.2022.05.089 (2022)
- 3) Chang, Y.K., Labban, J.D., Gapin, J.I. and Etnier, J.L.: The effects of acute exercise on cognitive performance: a meta-analysis. *Brain Res.*, **1453**, 87-101 (2012)
- 4) McMorris, T. The acute exercise-cognition interaction: From the catecholamines hypothesis to an interoception model. *Int. J. Psychophysiol.*, **170**, 75-88 (2021)
- 5) Sudo, M., Ando, S. and Nagamatu, T.: Effects of acute static stretching on visual search performance and mood state. *Journal of Physical Education and Sport*, **15**, 651-656 (2015)
- 6) Nithianantharajah, J. and Hannan, A.J.: Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews: Neuroscience*, **7**, 697-709 (2006)
- 7) Baumans, V.: Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR J.*, **46**, 162-170 (2005)
- 8) Birch, A.M. and Kelly, A.M.: Lifelong environmental enrichment in the absence of exercise protects the brain from age-related cognitive decline. *Neuropharmacology*, **145**, 59-74 (2019)
- 9) Birch, A.M., McGarry, N.B., and Kelly, A.M.: Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus*, **23**, 437-450 (2013)
- 10) Harati, H., Majchrzak, M., Cosquer, B., Galani, R., Kelche, C., Cassel, J.C., and Barbelivien, A.: Attention and memory in aged rats: Impact of lifelong environmental enrichment. *Neurobiology of Aging*, **32**, 718-736 (2011)
- 11) Ortega, F.B., Silventoinen, K., Tynelius, P. and Rasmussen, F.: Muscular strength in male adolescents and premature death: cohort study of one million participants. *BMJ*, **345**, e7279 (2012)
- 12) Sui, S.S., Williams, L.J., Holloway-Kew, K.L., Hyde, N.K. and Pasco J.A.: Skeletal Muscle Health and Cognitive Function. A Narrative Review. *Int. J. Mol. Sci.*, **255**, doi: 10.3390/ijms22010255 (2020)
- 13) Novak, C.M., Burghardt, P.R. and Levine, J.: The use of a running wheel to measure activity in rodents: relationship to energy balance, general activity, and reward. *Nurosci. Biobehav. Rev.*, **16**, 1001-1014 (2012)
- 14) Svensson, M., Rosvall, P., Boza-Serrano, A., Andersson, E., Lexell, J. and Deierborg, T.: Forced treadmill exercise can induce stress and increase neuronal damage in a mouse model of global cerebral ischemia. *Neurobiol Stress*, **5**, 8-18 (2016)
- 15) Singhal, G., Morgan, J., Jawahar, M.C., Corrigan, F., Jaehne, E.J., Toben, C., Breen, J., Pederson, S.M., Hannan, A.J., and Baune, B.T.: The effects of short-term and long-term environmental enrichment on locomotion, mood-like behavior, cognition and hippocampal gene expression. *Behavioural Brain Research*, **368**, 111917 (2019)
- 16) Legerlotz, K., Elliott, B., Guillemin, B., and Smith, H.K.: Voluntary resistance running wheel activity pattern and skeletal muscle growth in rats. *Exp. Physiol.*, **93**, 754-762 (2008)
- 17) Mitchell, C.J., Churchward-Venne, T.A., West, D.W., Burd, N.A., Breen, L., Baker, S.K., and Phillips, S.M.: Resistance exercise load does not determine training-mediated hypertrophic gains in young men. *J. Appl. Physiol.* (1985), **113**, 71-77 (2012)
- 18) Bloemberg, D. and Quadrilatero, J. Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis : **7**, e35273. (2012)