

2020 年度 博士論文

暑熱順化に伴うラットの生理指標, 情動行動,  
脳内モノアミンの関係解明

立教大学大学院 コミュニティ福祉学研究科  
コミュニティ福祉学専攻 博士課程後期課程

17WD003L 中川 晃

## 目次

第1章 短期及び長期間暑熱曝露が齧歯類の脳内モノアミンと情動行動に及ぼす影響	p2
第1節 背景	p2
第2節 暑熱曝露に伴う脳内モノアミン含有量の変化	p2
第3節 暑熱曝露に伴う情動行動の変化	p5
第4節 暑熱曝露並びに暑熱順化に伴う情動行動と脳内モノアミン含有量の関係性	p6
第5節 先行研究の課題及び本研究の目的	p7
第2章 暑熱順化に伴うラットの生理指標と脳内モノアミンの変化	
～ホモジネート法を用いた検討～	p17
第1節 背景	p17
第2節 方法	p18
第3節 結果	p19
第4節 考察	p24
第3章 暑熱順化が新奇環境下のラットの不安様行動に及ぼす影響	
～オープンフィールドテストを用いた検討～	p29
第1節 背景	p29
第2節 方法	p30
第3節 結果	p31
第4節 考察	p34
第4章 暑熱順化に伴うラットの視索前野と海馬における脳内モノアミンと生理指標	
の即時的測定～マイクロダイアリシス法を用いた検討～	p41
第1節 背景	p41
第2節 方法	p42
第3節 結果	p43
第4節 考察	p51
第5章 総合考察	p57
第1節 本論文のまとめと研究意義	p57
第1項 本論文のまとめ	p57
第2項 本論文の総合考察及び研究の意義	p58
第2節 本研究の限界と今後の展望	p58
謝辞	p60

## 第1章 短期及び長期間暑熱曝露が齧歯類の脳内モノアミンと情動行動に及ぼす影響

### 第1節 背景

ヒトを含む哺乳類は、様々な環境において深部体温を一定に保つ機能を持っている。近年は特に過酷な暑熱環境下での生活を強いられているが、我々は優れた体温調節機能を持っており、過酷な暑熱環境においても生活することが可能となっている。体温調節機能は大きく2つに分類されており、行動性体温調節と自律性体温調節に分けられる (Tan & Knight, 2018; Tansey & Johnson, 2018)。行動性体温調節の例として、哺乳類は身体活動や食事を減らすことで産熱量を減らし、冷涼環境に移動して身体を伸ばして休めることで放熱量を増加させる (Tan & Knight, 2018; Tansey & Johnson, 2018)。自律性体温調節の例としては、皮膚血管の拡張による血流量の増加や、発汗の増加による熱放散の増加、代謝を落とすことで熱産生量を減少させる (Tan & Knight, 2018; Tansey & Johnson, 2018)。行動性体温調節と自律性体温調節は中枢神経システムにより調節されており (Madden & Morrison, 2019)、環境温の変化に伴う深部体温(脳温)の変化が関わっている (Kiyatkin, 2018, 2019; Matsuzaki et al., 2015)。先行研究において、体温調節は脳内の視床下部により行われていることが明らかとなっている (Siemens & Kamm, 2018)。特に視床下部の視索前野/前視床下部 (PO/AH) が熱産生や熱放散に対して重要な役割を担っている (Nakamura, 2011; Tan & Knight, 2018; Tansey & Johnson, 2018)。加えて、モノアミンなどの脳内神経伝達物質が重要な役割を担っている (Nicastro & Greenwood, 2016; Roelands & Meeusen, 2010; Takatsu et al., 2010; Zheng et al., 2018)。

モノアミンについて、先行研究においては情動や認知などに関わる行動との関連性が示されている (Suri et al., 2015)。従って、暑熱曝露による深部体温の変化や暑熱順化は、脳内モノアミン含有量の変化することにより認知や情動に影響を及ぼすことが考えられる。本章では、齧歯類において短期間、長期間暑熱曝露を行った際の脳内モノアミン含有量の変化と情動行動の変化について言及する。そして、最後に暑熱順化に伴う情動行動と脳内モノアミン含有量の関係性について考察を行う。

### 第2節 暑熱曝露に伴う脳内モノアミン含有量の変化

先行研究において、様々な脳部位における暑熱曝露による脳内モノアミン含有量の変化が示されている (Chauhan, 2017; Ghosh & Poddar, 1993; Gonzalez, 1986; Hahn & Szelényi, 1979; Harikai et al., 2003; Harri & Tirri, 1969; Hasegawa et al., 2008; Ingenito & Bonnycastle, 1967; Ishiwata et al., 2004; Kim et al., 2013; Menon & Dandiya, 1969; Tempel & Parks, 1982; Sharma & Dey, 1984, 1987; Sharma et al., 1992; Takatsu et al., 2010; Yeghiayan et al., 2004; Zheng et al., 2018)。初期の実験は1960年代に行われており、短期間の暑熱曝露による脳内モノアミンの含有量の変化を調べている (Harri & Tirri, 1969; Ingenito & Bonnycastle, 1967; Menon & Dandiya, 1969)。また、初期の実験では脳全体の脳内モノアミン含有量の変化に

焦点を当てている(Harri & Tirri, 1969; Menon & Dandiya, 1969; Sharma & Dey, 1984, 1987; Sharma et al., 1992; 表 1). これらの実験では、齧歯類を 38°C もしくは 40°C の環境で 1~4 時間曝露した際の脳内の変化を調べている. 結果として、暑熱曝露により脳内のセロトニン(5-HT)が増加することが明らかとなっている(Harri & Tirri, 1969; Menon & Dandiya, 1969; Sharma & Dey, 1984, 1987; Sharma et al., 1992). 一方で、ノルアドレナリン(NA)は実験により異なる結果となっており(Harri & Tirri, 1969; Menon & Dandiya, 1969), 原因として実験動物(ラットもしくはマウス)の種類が異なることが考えられる. 従って、齧歯類は暑熱環境下において脳全体で多くの 5-HT (もしくは NA) が必要となり、5-HT (もしくは NA) を増加させることにより、行動や体温を調節していることが考えられる. しかしながら、脳機能は領域により細分化されていることから、暑熱曝露に伴う脳内モノアミンの変化を様々な脳部位毎に調べる必要がある.

その後、視床下部における暑熱曝露に伴う脳内モノアミン含有量の変化を調べる実験が行われた(Chauhan et al., 2017; Ghosh & Poddar, 1993; Hahn & Szelényi, 1979; Harikai et al., 2003; Ingenito & Bonnycastle, 1967; Tempel & Parks, 1982; 表 2). いくつかの実験では、短期間の暑熱曝露において脳内モノアミンの増加が示されており、特に 5-HT の含有量が増加している(Ghosh & Poddar, 1993; Harikai et al., 2003). 先行研究をまとめると、視床下部において、脳内モノアミンの含有量は 37°C 以上の環境に曝されることで増加することが考えられる. 視床下部は体温調節機能に代表される様々な生理機能を司っており、5-HT の含有量により影響されていることが示されている(Ishiwata, 2014). 従って、視床下部における 5-HT の増加は暑熱曝露に対応するために重要である可能性が考えられる. しかしながら、Ingenito & Bonnycastle (1967) は短期間の暑熱曝露による脳内モノアミン含有量の変化が見られなかったと報告している. 加えて、Chauhan et al. (2017), は短期間の暑熱曝露により視床下部における 5-HT の含有量が減少することを報告している. これらの実験結果の差異は、暑熱曝露の期間や実験に用いた被検体の違い(マウスもしくはラット、または Sprague-Dawley もしくは COBS)によるものであると考えられる. 更に、視床下部は脳機能を詳細に調べるためには領域的に大き過ぎることが考えられる. 従って、視床下部を更に細分化し、機能毎に調べる必要がある.

短期間の暑熱曝露とは異なり、視床下部の 5-HT は 1 週間以上の長期間の暑熱曝露により減少することが示されている(Hahn & Szelényi, 1979; Tempel & Parks, 1982). これらの実験で用いられた被検体は暑熱順化が生じていることが考えられる. 一般的に 5-HT の含有量の減少は生理、心理機能に悪影響を及ぼすと考えられるが、熱放散を増加させることで暑熱環境において活動することが可能となるなどの利点につながることも考えられる(Rodrigues et al., 2009). この仮説は、熱放散と熱産生が視床下部の PO/AH において調節されていることから説明することができる(Ishiwata et al., 2004; Ishiwata, 2014). 従って、視床下部は領域として大き過ぎるため、暑熱順化に伴う視床下部の細分化された領域における脳内モノアミンの含有量の変化を調べる必要がある.

視床下部は機能毎に多くの小領域に分類することができる(Haller, 2012). PO/AH は体温調節に最も関わる領域である(Nakamura, 2011; Tan & Knight, 2018; Tansey & Johnson, 2018). 多くの実験で暑熱曝露に伴う PO/AH におけるモノアミンの含有量が変化することが報告されている(Gonzalez et al., 1986; Hasegawa et al., 2008; Ishiwata et al., 2004; Takatsu et al., 2010; Zheng et al., 2018; 表 3). 更に, 多くの実験で短時間の暑熱曝露や運動中の体温上昇によりドーパミン(DA)と NA の含有量が増加することが報告されている(Hasegawa et al., 2008; Takatsu et al., 2010; Zheng et al., 2018). 従って, PO/AH においては 5-HT ではなく, NA と DA が短時間の暑熱曝露により影響を受けることが考えられる. 興味深いことに, 短期間の暑熱曝露で視床下部の 5-HT は増加した報告が多いが, PO/AH では変化を示さなかった. これらの結果は, 視床下部全体ではなく, 小領域ごとに脳内モノアミン含有量の測定をする必要性を示している.

他方で先行研究において PO/AH の長期間暑熱曝露による脳内モノアミン含有量の変化を調べた研究はこれまでに行われていない. 長期間の暑熱曝露を行うことで暑熱順化が生じることから, 体温調節中枢である PO/AH のモノアミン含有量に変化が生じていることが考えられるため, 今後明らかにする必要がある.

身体活動や意欲に関わる脳部位である線条体 (Buzás et al., 2019; Gemikonakli et al., 2019) において, 暑熱曝露に伴うモノアミンの含有量の変化は一貫していない(Gonzalez, 1986; Kim et al., 2013; Yeghiaya et al., 2004; 表 4). 環境温 41~43°Cの暑熱曝露では, 深部体温が 2°C上昇するため, 線条体の DA が増加することが考えられる(Kim et al., 2013; Yeghiaya et al., 2004). また, 先行研究において, 線条体における DA の含有量が身体活動に関連していることが報告されている(Charntikov et al., 2011; Der-Ghazarian et al., 2015). 従って, 短期間の暑熱曝露による DA の増加は暑熱環境下からの逃避行動に関わることが考えられる. しかしながら, より高温環境である 45°Cの曝露では DA の含有量が変わらないという報告もある(Gonzalez et al., 1986). この差異については, 実験動物の種類の違い(マウスもしくはラット, または Sprague-Dawley もしくは Fischer 344) が影響していることが考えられる. 更に, 過度な高温環境に曝された場合には, 活動量を低下させて体温の上昇を防ぐために線条体における DA の含有量を変化させない可能性が考えられる.

短期間の暑熱曝露とは対照的に, 長期間の暑熱曝露では DA の減少が報告されている(Kim et al., 2013). この結果は, 熱産生を減らすために身体活動量を減少させることが考えられる(Shido et al., 1991). しかしながら, 線条体における暑熱曝露及び暑熱順化に伴うモノアミンの変化についてはまだ十分な研究がなされていないため, 更なる実験が必要である.

その他の部位における暑熱曝露に伴う脳内モノアミン含有量の変化については, 側坐核 (Gonzalez et al., 1986), 腹側海馬(Lieberman et al., 2005), 腹側被蓋野(Ishiwata et al., 2017), 分界条床核(Minami et al., 2018)でのみ報告されている. 先行研究の結果より, 短期間の暑熱曝露において, 腹側海馬と分界条床核の NA 含有量が増加し, 腹側被蓋野の 5-HT

含有量が増加している。興味深いことに、DA 含有量は PO/AH や線条体とは対照的に、腹側海馬、腹側被蓋野、側坐核において変化を見せなかった。これらの結果から、短期の暑熱曝露においては、NA と 5-HT の含有量を増加させることが重要となる領域が多い可能性が考えられる。例えば、分界条床核は恐怖や不安に関わる脳部位であることが報告されている (Cecchi et al., 2002)。従って、短期の暑熱曝露によるストレス反応として、分界条床核で NA が増加したことが考えられる。そして、暑熱ストレスがかかることで「闘争・逃走反応」が起こり、暑熱環境から逃走するための反応である可能性が示唆される。また、腹側被蓋野における 5-HT の増加は、暑熱曝露に伴う深部体温の上昇を抑制するための熱放散に関わっている可能性が示唆されている (Ishiwata et al., 2017)。従って、NA と 5-HT の増加は、暑熱曝露による即時的な体温調節反応として重要な役割を担っていると考えられる。

まとめると、暑熱曝露に伴う脳内モノアミン含有量の変化は、脳部位と暑熱曝露期間、曝露温度により異なる影響を受ける。暑熱曝露の期間は短期（1 週間未満）、暑熱順化前（約 1—2 週間）、暑熱順化後（3 週間以上）で分類することができる。暑熱順化後はほとんどの部位で脳内モノアミン含有量の増加が観察されたが、線条体の DA の変化に代表される様に、部位により異なる結果が得られた。従って、体温調節や行動に関わる部位において、暑熱順化に伴う脳内モノアミン含有量の変化についての更なる研究を行う必要がある。

### 第 3 節 暑熱曝露に伴う情動行動の変化

暑熱曝露に伴う齧歯類の行動の変化についての研究は、2000 年代から行われている (Chen et al., 2019; Gruene et al., 2014; Hale et al., 2019; Lee et al., 2015; Lieberman et al., 2005; Martinez et al., 2007; Mete et al., 2012; Yeghiayan et al., 2004; 表 5)。これらの研究は、暑熱曝露の期間で大きく 2 つに分類することができる。短期間の暑熱曝露では、1 週間未満暑熱曝露した際の変化を調べている (Chen et al., 2019; Gruene et al., 2014; Lee et al., 2015; Lieberman et al., 2005; Martinez et al., 2007; Mete et al., 2012; Yeghiayan et al., 2004)。これらのほとんどの研究では、短期間の暑熱曝露により情動行動に悪影響を及ぼすことを報告している (Chen et al., 2019; Gruene et al., 2014; Lieberman et al., 2005; Mete et al., 2012; Yeghiayan et al., 2004)。例えば、暑熱曝露により高架式 O 字迷路において不安様行動が増加し (Mete et al., 2012)、そして異常な恐怖行動が増える (Gruene et al., 2014)。これらの結果は、深部体温の上昇が関わっていることが考えられる。深部体温の上昇は焦燥感を増加させ、不安様行動の増加や記憶などの脳機能の低下につながる (Lieberman et al., 2005; Yeghiayan et al., 2004)。しかしながら、短期間の暑熱曝露が齧歯類の行動に影響を及ぼさない、もしくは好影響を及ぼすという報告もある (Lee et al., 2015; Martinez et al., 2007)。これらの研究結果の差異は、環境温や深部体温の変化、曝露時間の違いによるものであると考えられる。齧歯類が 40°C 以上の温熱環境に曝される、もしくは深部体温が 41°C を超えると齧歯類の不安様行動が増加し、認知や記憶が低下することが報告されている (Lee et al., 2015; Lieberman et al., 2005; Mete et al., 2012; Yeghiayan et al., 2004)。従って、暑熱曝露に伴う過度な深部体温の上昇が齧歯類の行動に悪

影響を及ぼすことが考えられる。また、Chen et al., (2019)は暑熱曝露された齧歯類がオペラント条件付けにおいて反応性が低下することを報告している。これらの実験のプロトコルでは、35°Cの環境に2時間曝露している。従って、認知や記憶、学習の様な高次脳機能は短期の暑熱曝露でより影響を受けやすいことが考えられる。短期の暑熱曝露は情動行動に悪影響を及ぼすが、暑熱順化につながる長期の暑熱曝露は、暑熱環境における情動行動に対して好影響を与えることが考えられる。しかしながら、長期の暑熱曝露による影響を調べた実験はほとんど行われていない。

長期の暑熱曝露は、結果として暑熱順化につながる(Matthew, 1997; Wendt et al., 2007)。Lee et al., (2015)は、複数日暑熱曝露することにより認知機能が低下することを明らかにしたが、彼らの実験手法では1日15分の暑熱曝露であったため、暑熱順化に至ったとは考えにくい。つまり、この実験結果は、長期間の暑熱ストレスを断続的にかけられた結果のものと推測できる。そのため、暑熱順化に伴う行動の変化についての研究はまだ研究数が乏しいため完全に結論づけることは難しく、多くの研究を必要とする。

#### 第4節 暑熱曝露並びに暑熱順化に伴う情動行動と脳内モノアミン含有量の関係性

これまでの研究において、脳内モノアミンが脳機能や生理機能を調節していることを示している(Gu et al., 2018; Suri et al., 2015)。Gu et al., (2018)は脳内モノアミンと認知、情動の関係を報告している。彼らはDAは喜び、NAは恐怖や怒り、5-HTは悲しみなどの感情に関わる物質であることを報告している。更に、Suri et al., (2015)は脳内モノアミンと情動行動との関連性を報告している。特に、5-HTとDAは攻撃的な行動に関わっている。従って、脳内モノアミンが基本的な情動感情をコントロールしていると考えられる。加えて、齧歯類は暑熱曝露により脳内モノアミン含有量の変化が生じていることから(Kim et al., 2013; Minami et al., 2018)、情動行動に変化が起こることが推測できる。しかしながら、ほとんどの研究において暑熱曝露による脳内モノアミンと情動行動を同時に測定していない。

先行研究においては、2つの実験において深部体温の上昇と脳内モノアミン含有量、情動(鬱様)行動の関連性を合わせて報告している(Lieberman et al., 2005; Yeghiayan et al., 2004)。Yeghiayan et al. (2004)とLieberman et al. (2005)は短期の暑熱曝露により、NAとDAが腹側海馬と腹側線条体にて、それぞれ増加することを報告している。加えて、過度な深部体温の上昇が鬱様行動を増加させることを明らかにしている。従って、腹側海馬と腹側線条体におけるNAとDAが情動行動に関わることが推測される。これまでに線条体のDAが、短期の暑熱曝露により増加することを示している(Kim et al., 2013; Yeghiaya et al., 2004)。線条体のDAの変化は、身体活動やモチベーションに関連することが先行研究より示されている(Bamford et al., 2018; De Corte, 2019)。従って、線条体のDA含有量が暑熱環境下で重要な役割を担っていると考えられる。更に、海馬においては、NAが短期暑熱曝露で増加する(Lieberman et al., 2005)。海馬におけるNAの増加は、記憶に関わることが示されて

いる(Lima et al., 2019). 従って, 暑熱曝露により海馬の NA が増加することは, 暑熱環境下における記憶機能を保つために重要であると考えられる. 以上の結果より, これらの2つの部位については, 暑熱曝露により脳内モノアミンが変化し, 情動行動が惹起されることの関連が明らかとなっている.

一方で, 長期間の暑熱曝露により暑熱順化した齧歯類の脳内モノアミンの変化と情動行動の変化を同時に測定した実験は行われていない. 暑熱順化することにより脳内モノアミン含有量の適応的な変化が生じ, 身体活動や情動, 認知や記憶に好影響を及ぼすことが考えられる. 近年の過酷な暑熱環境での生活に適應するためにも暑熱順化は重要となることから, この様な実験をより深めていくことが重要となっていくと考えられる.

## 第5節 先行研究の課題及び本研究の目的

本章においては, 様々な期間暑熱曝露を行った際の脳内モノアミン含有量と情動行動の変化について文献閲読を行い, 暑熱曝露の影響についてまとめた. 結果として, 暑熱曝露に伴う脳内モノアミン含有量の変化は, 脳部位と暑熱曝露期間, 曝露温度により異なる影響を受けることが明らかとなった. 暑熱曝露を 37°C よりも高い環境温度で行い, 深部体温が 2°C 以上上昇することにより, 情動行動に悪影響を及ぼすことが示唆された. また, 暑熱曝露の期間は短期 (1 週間未満), 暑熱順化前 (約 1–2 週間), 暑熱順化後 (3 週間以上) で分類することができる. 暑熱順化後は, ほとんどの部位で脳内モノアミン含有量の増加が観察されたが, 線条体の DA の変化に代表される様に, 部位により異なる結果が得られた. 従って, 体温調節や行動に関わる部位において, 暑熱順化に伴う脳内モノアミン含有量の変化についての更なる研究を行う必要がある. しかしながら, 先行研究においては長期間暑熱曝露を行い, 暑熱順化した際の脳内モノアミンの含有量と情動行動の関係性について報告を行った研究はまだない.

そこで, 本研究論文においては, 様々な期間暑熱曝露を行った際の生理指標, 情動行動, 脳内モノアミンの変化を明らかにした後, 暑熱順化の有無に伴う体温調節領域 (視索前野) と記憶領域 (海馬) の脳内モノアミンの即時的な変化を明らかにすることを目的に実験を行う.



著者	気温	実験動物	曝露期間	結果
Sharma & Dey (1984)	38°C	CF rat	4 時間	深部体温 3.5°C 上昇 5-HT ↑
Sharma & Dey (1987)	38°C	CF rat	1, 2, 4 時間	深部体温 3.6°C 上昇 5-HT ↑
Sharma et al. (1992)	38°C	Male Wistar rat	1, 2, 4 時間 7 日 (1 日 1 時間)	深部体温 2°C 以上 上昇 5-HT ↑
Harri & Tirri (1969)	40°C	NMRI male mouse	1 時間	深部体温 3°C 以上 上昇 NA ↓ 5-HT 初期 ↓, 後半 ↑
Menon & Dandiya (1969)	40°C	Haffkine and CDRI male rat	1 時間	深部体温 3°C 上昇 NA ↑, 5-HT ↑

表1: 暑熱曝露に伴う全脳のモノアミン含有量の変化

著者	気温	実験動物	曝露期間	結果
Ingenito & Bonnycastle (1967)	40°C 34°C	Female COBS rat	1, 3 時間, 24 時間	深部体温 3°C上昇 影響なし
Harikai et al. (2003)	34°C85%, 37°C60%, 37°C85%, 38.5°C 60%	Male ddY mouse	60 分	深部体温 3°C上昇 5-HT↑
Ghosh & Poddar (1993)	40°C	Charles Foster rat	2 時間	深部体温 2.8°C上昇 5-HT↑
Chauhan et al. (2017)	45°C	Sprague-Dawley rat	22-26, 42-48 分	深部体温 40°Cまたは42°C DA↑, NA↑ (40°C) , 5-HT ↓ (40°C)
Hahn & Szelényi (1979)	30~31°C	Male CFY rat	1, 2, 4, 6 weeks	深部体温 変化なし 5-HT↓
Tempel & Parks (1982)	34°C	golden hamster	5 weeks	深部体温 変化なし NA, 5-HT↓

表2: 暑熱曝露に伴う視床下部のモノアミン含有量の変化

著者	気温	実験動物	曝露期間	結果
Hasegawa et al. (2008)	30°C	Male Wistar rat	-	深部体温 3.4°C上昇 NA, DA↑
Takatsu et al. (2010)	30°C	Male Wistar rat	120分	深部体温 1°C上昇 NA, DA↑
Zheng et al. (2018)	30°C	Male Wistar rat	60分	深部体温 3°C上昇 NA, DA↑
Ishiwata et al. (2004)	35°C	Male Wistar rat	2時間	深部体温 1.6°C上昇 5-HTに影響なし
Gonzalez et al. (1986)	45°C	Male SD rat	40分	DA↑

表3: 暑熱曝露に伴う視索前野のモノアミン含有量の変化

著者	気温	実験動物	曝露期間	結果
Yeghiayan et al. (2004)	41°C	Male Fischer 344 rat	-	深部体温 2°C上昇 DA↑
Kim et al. (2013)	43°C	Male ICR mouse	1~28日 (1日15分)	DA↑ (4日) DA↓ (28日)
Gonzalez et al. (1986)	45°C	Male SD rat	40分	DAに影響なし

表4: 暑熱曝露に伴う線条体のモノアミン含有量の変化

著者	環境温	種族	期間	行動テスト	結果
Grune et al. (2014)	31°C	Long Evans rat	1日	すくみ行動	不安様行動の増加
Martinez et al. (2007)	34°C	Wistar rat	96時間	高架式十字迷路	影響なし
Chen et al. (2019)	35°C	Wistar rat	2時間	オペラント行動 自発行動 高架式T字迷路	オペラント行動の 反応性低下
Hale et al. (2019)	37°C	Wistar rat	85分	強制水泳	深部体温 約0.5°C上昇 鬱様行動に影響なし
Yeghiayan et al. (2004)	41°C	Fischer 344 rat	-	強制水泳	深部体温 2°C上昇 鬱様行動の増加
Lieberman et al. (2005)	41°C	Fischer 344 rat	-	強制水泳 モリス水迷路	深部体温 2°C上昇 鬱様行動の増加, 記憶の低下
Lee et al. (2105)	43°C	Male imprinting control region mouse	15分/7, 14, 42日	Y字迷路 明暗ボックス フットジョック 新奇物体認識	認知機能の低下, 不安の増加
Mete et al. (2012)	-	Sprague-Dawley rat	-	高架式O字迷路	深部体温 39°C, 41°C 不安様行動の増加

表5: 暑熱曝露に伴う情動行動の変化

## 引用文献

- Bamford, N.S., Wightman, R.M., Sulzer, D., 2018. Dopamine's effects on corticostriatal synapses during reward-based behaviors. *Neuron*. 97, 494–510.
- Buzás, A., Bokor, P., Balangó, B., Pintér, D., Palotai, M., Simon, B., Csabafi, K., Telegdy, G., Szabó, G., Bagosi, Z., 2019. Changes in striatal dopamine release and locomotor activity following acute withdrawal from chronic nicotine are mediated by CRF1, but not CRF2, receptors. *Brain Res*. 1706, 41–47.
- Cecchi, M., Khoshbouei, H., Javors, M., Morilak, D.A., 2002. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. *Neuroscience*. 112, 13–21.
- Charntikov, S., Der-Ghazarian, T., Herbert, M.S., Horn, L.R., Widarma, C.B., Gutierrez, A., Varela, F.A., McDougall, S.A., 2011. Importance of D1 and D2 receptors in the dorsal caudate-putamen for the locomotor activity and stereotyped behaviors of preweanling rats. *Neuroscience*. 183, 121–133.
- Chauhan, N.R., Kapoor, M., Singh, L.P., Gupta, R.K., Meena, R.C., Tulsawani, R., Nanda, S., Singh, S.B., 2017. Heat stress-induced neuroinflammation and aberration in monoamine levels in hypothalamus are associated with temperature dysregulation. *Neuroscience*. 358, 79–92.
- Chen, S., Chuang, C., Chao, C., Yang, Y., Chu, C., Yao, C., Su, Y., Huang, Y., Liao, R., 2019. Task-dependent differences in operant behaviors of rats with acute exposure to high ambient temperature: a potential role of hippocampal dopamine reuptake transporters. *Front. Behav. Neurosci*. 13, 15.
- De Corte, B.J., Wagner, L.M., Matell, M.S., Narayanan, N.S., 2019. Striatal dopamine and the temporal control of behavior. *Behav. Brain. Res*. 356, 375–379.
- Der-Ghazarian, T., Gutierrez, A., Varela, F.A., Herbert, M.S., Amodeo, L.R., Charntikov, S., Crawford, C.A., McDougall, S.A., 2012. Dopamine receptor inactivation in the caudate-putamen differentially affects the behavior of preweanling and adult rats. *Neuroscience*. 226, 427–440.
- Gemikonakli, G., Keay, K.A., Kendig, M.D., Kang, J.W., Corbit, L.H., Mor, D., 2019. Altered monoamine levels in the dorsal striatum of the rat are associated with alterations in behavioural selection and motivation following peripheral nerve injury and acute stress. *Eur. J. Neurosci*. 50, 2786–2800.
- Ghosh, S., Poddar, M.K., 1993. Higher environmental temperature-induced increase in body temperature: involvement of serotonin in GABA mediated interaction of opioidergic system. *Neurochem. Res*. 18, 1287–1292.
- Gonzalez, M.C., Arevalo, R., Castro, R., Diaz-Palarea, M.D., Rodriguez, M., 1986. Different

- roles of intrahypothalamic and nigrostriatal dopaminergic systems in thermoregulatory responses of the rat. *Life Sci.* 39, 707–715.
- Gruene, T.M., Lipps, J., Rey, C.D., Bouck, A., Shansky, R.M., 2014. Heat exposure in female rats elicits abnormal fear expression and cellular changes in prefrontal cortex and hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 115, 38–42.
- Gu, S., Gao, M., Yan, Y., Wang, F., Tang, Y., Huang, J.H., 2018. The neural mechanism underlying cognitive and emotional processes in creativity. *Front. Psychol.* 9, 1924.
- Hahn, Z., Szelenyi, Z., 1979. Changes in hypothalamic noradrenaline and 5-hydroxytryptamine levels during the development of warm-and cold-adaptation in the rat. *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* 54, 245–249.
- Hale, M.W., Lukkes, J.L., Dady, K.F., Kelly, K.J., Paul, E.D., Smith, D.G., Heinze, J.D., Raison, C.L., Lowry, C.A., 2019. Interactions between whole-body heating and citalopram on body temperature, antidepressant-like behaviour, and neurochemistry in adolescent male rats. *Behav. Brain. Res.* 359, 428–439.
- Haller, J., 2013. The neurobiology of abnormal manifestations of aggression—a review of hypothalamic mechanisms in cats, rodents, and humans. *Brain. Res. Bull.* 93, 97–109.
- Harikai, N., Tomogane, K., Miyamoto, M., Shimada, K., Onodera, S., Tashiro, S., 2003. Dynamic Responses to Acute Heat Stress between 34°C and 38.5°C, and Characteristics of Heat Stress Response in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 701–708.
- Harri, M., Tirri, R., 1969. Brain monoamines in the temperature acclimation of mice. *Acta. Physiol. Scand.* 75, 631–635.
- Hasegawa, H., Piacentini, M.F., Sarre, S., Michotte, Y., Ishiwata, T., Meeusen, R., 2008. Influence of brain catecholamines on the development of fatigue in exercising rats in the heat. *J. Physiol. (Lond.)* 586, 141–149.
- Ingenito, A.J., Bonnycastle, D.D., 1967. The effect of exposure to heat and cold upon rat brain catecholamine and 5-hydroxytryptamine levels. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 45, 733–743.
- Ishiwata, T., 2014. Role of serotonergic system in thermoregulation in rats. *J. Phys. Fitness. Sports. Med.* 3, 445–450.
- Ishiwata, T., Hasegawa, H., Greenwood, B.N., 2017. Involvement of serotonin in the ventral tegmental area in thermoregulation of freely moving rats. *Neurosci. Lett.* 653, 71–77.
- Ishiwata, T., Saito, T., Hasegawa, H., Yazawa, T., Otokawa, M., Aihara, Y., 2004. Changes of body temperature and extracellular serotonin level in the preoptic area and anterior hypothalamus after thermal or serotonergic pharmacological stimulation of freely

- moving rats. *Life. Sci* 75, 2665–2675.
- Kim, H.G., Kim, T.M., Park, G., Lee, T.H., Oh, M.S., 2013. Repeated heat exposure impairs nigrostriatal dopaminergic neurons in mice. *Bio. Pharm. Bull.* 36, 1556–1561.
- Kiyatkin, E.A., 2019. Brain temperature and its role in physiology and pathophysiology: Lessons from 20 years of thermorecording. *Temperature.* 6, 271–333.
- Kiyatkin, E.A., 2018. Brain temperature: from physiology and pharmacology to neuropathology. *Handb. Clin. Neurol.* 157, 483–504.
- Lee, W., Moon, M., Kim, H.G., Lee, T.H., Oh, M.S., 2015. Heat stress-induced memory impairment is associated with neuroinflammation in mice. *J. Neuroinflammation.* 12, 1–13.
- Lieberman, H.R., Georgelis, J.H., Maher, T.J., Yeghiayan, S.K., 2005. Tyrosine prevents effects of hyperthermia on behavior and increases norepinephrine. *Physiol. Behav.* 84, 33–38.
- Lima, K.R., de Vargas, Liane da Silva, Ramborger, B., Roehrs, R., Sevenster, D., Izquierdo, I., D’Hooge, R., Mello-Carpes, P.B., 2019. Noradrenergic and dopaminergic involvement in novelty modulation of aversive memory generalization of adult rats. *Behav. Brain. Res.* 371, 111991.
- Madden, C.J., Morrison, S.F., 2019. Central nervous system circuits that control body temperature. *Neurosci. Lett.* 696, 225–232.
- Martinez, R., Garcia, A., Lamprea, M.R., Morato, S., 2007. Thermal stress decreases general motor activity of rats in the elevated plus-maze but does not alter aversion to the open arms. *Behav. Brain Res.* 182, 135–139.
- Matsuzaki, K., Katakura, M., Sugimoto, N., Hara, T., Hashimoto, M., Shido, O., 2015.  $\beta$ -amyloid infusion into lateral ventricle alters behavioral thermoregulation and attenuates acquired heat tolerance in rats. *Temperature.* 2, 418–424.
- Matthew, C. B., 1997. Heat acclimation in telemetry equipped rat. *J. Therm. Biol.* 22, 275–280.
- Menon, M.K., Dandiya, P.C., 1969. Behavioural and brain neurohormonal changes produced by acute heat stress in rats: influence of psychopharmacological agents. *Eur. J. Pharmacol.* 8, 284–291.
- Mete, F., Kilic, E., Somay, A., Yilmaz, B., 2012. Effects of heat stress on endocrine functions & behaviour in the pre-pubertal rat. *Indian. J. Med. Res.* 135, 233.
- Minami, S., Nomura, H., Minami, M., 2018. Exposure to hot and cold environments increases noradrenaline release in the bed nucleus of the stria terminalis in rats. *Neuropsychopharmacol. Rep.* 38, 214–218.
- Nakamura, K., 2011. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am. J.*

- Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 301, R1207-R1228.
- Nicastro, T.M., Greenwood, B.N., 2016. Central monoaminergic systems are a site of convergence of signals conveying the experience of exercise to brain circuits involved in cognition and emotional behavior. *Curr. Zool.* 62, 293–306.
- Rodrigues, A.G., Soares, D.D., Marubayashi, U., Coimbra, C.C., 2009. Heat loss during exercise is related to serotonin activity in the preoptic area. *Neuroreport.* 20, 804–808.
- Roelands, B., Meeusen, R., 2010. Alterations in central fatigue by pharmacological manipulations of neurotransmitters in normal and high ambient temperature. *Sports. Med.* 40, 229–246.
- Sharma, H.S., Dey, P.K., 1984. Role of 5-HT on increased permeability of blood-brain barrier under heat stress. *Indian. J. Physiol. Pharmacol.* 28, 259–267.
- Sharma, H.S., Dey, P.K., 1987. Influence of long-term acute heat exposure on regional blood-brain barrier permeability, cerebral blood flow and 5-HT level in conscious normotensive young rats. *Brain. Res.* 424, 153–162.
- Sharma, H.S., Westman, J., Nyberg, F., Cervos-Navarro, J., Dey, P.K., 1992. Role of serotonin in heat adaptation: an experimental study in the conscious young rat. *Endocr. Regul.* 26, 133–142.
- Shido, O., Sakurada, S., Nagasaka, T., 1991. Effect of heat acclimation on diurnal changes in body temperature and locomotor activity in rats. *J. Physiol. (Lond.)* 433, 59-71.
- Siemens, J., Kamm, G.B., 2018. Cellular populations and thermosensing mechanisms of the hypothalamic thermoregulatory center. *Pflügers. Arch.* 470, 809–822.
- Suri, D., Teixeira, C.M., Cagliostro, M.K.C., Mahadevia, D., Ansorge, M.S., 2015. Monoamine-sensitive developmental periods impacting adult emotional and cognitive behaviors. *Neuropsychopharmacology.* 40, 88–112.
- Takatsu, S., Ishiwata, T., Meeusen, R., Sarre, S., Hasegawa, H., 2010. Serotonin release in the preoptic area and anterior hypothalamus is not involved in thermoregulation during low-intensity exercise in a warm environment. *Neurosci. Lett.* 482, 7–11.
- Tan, C.L., Knight, Z.A., 2018. Regulation of Body Temperature by the Nervous System. *Neuron.* 98, 31–48.
- Tansey, E.A., Johnson, C.D., 2015. Recent advances in thermoregulation. *Adv. Physiol. Educ.* 39, 139–148.
- Tempel, G.E., Parks, L.H., 1982. Brain norepinephrine and serotonin in the golden hamster during heat and cold acclimation and hypothermia. *Comp. Biochem. Physiol. C. Comp. Pharmacol.* 73, 377–381.
- Wendt, D., van Loon, L. J., Lichtenbelt, W. D., 2007. Thermoregulation during exercise in



the heat. *Sports Med.* 37, 669–682.

Yeghiayan, S.K., Georgelis, J.H., Maher, T.J., Lieberman, H.R., 2004. Beneficial effects of a protein free, high carbohydrate meal on rat coping behavior and neurotransmitter levels during heat stress. *Nutr. Neurosci.* 7, 335–340.

Zheng, X., Takatsu, S., Ishikawa, R., Hasegawa, H., 2018. Moderate intensity, exercise-induced catecholamine release in the preoptic area and anterior hypothalamus in rats is enhanced in a warm environment. *J. Therm. Biol.* 71, 123–127.

## 第2章 暑熱順化に伴うラットの生理指標と脳内モノアミンの変化 ～ホモジネート法を用いた検討～<sup>1</sup>

### 第1節 背景

近年は地球温暖化の影響により、暑熱環境下での生活が強いられている。その結果、熱中症による死亡事故が世界中で増加している (Singh et al., 2013)。また、暑熱環境に長期間曝露されることにより高体温状態となり、認知や記憶能力が低下することが報告されている (Gaoua et al., 2012; Puumala & Sirviö, 1998; Racinais et al., 2008)。しかしながら、我々ヒトを含む哺乳類は、暑熱環境において自律的に体温を調節する機能を持っており、更に哺乳類が長期間暑熱曝露されると体温調節機能に適応が生じる。この反応が暑熱順化と呼ばれる (Matthew, 1997; Wendt et al., 2007)。数週間に渡る暑熱曝露により発汗が早くなり (Buono et al., 2009)、唾液分泌機能が向上し (Horowitz et al., 1983)、深部体温が低下する (Buono et al., 1998) などの体温調節機能が変化することが報告されている。また、視床下部や皮質、海馬において暑熱曝露に伴う c-fos 発現が確認されている (Bratincsak & Palkovits, 2004; Kiyohara et al., 1995; Patronas et al., 1998)。従って、これまでの研究においては、暑熱環境下における深部体温の調節などに関わる生理機能を調節する様々な脳部位が暑熱曝露により影響を受けることが考えられる。

視床下部における視索前野 (PO) は、体温調節機能に重要な役割を担っている (Ishiwata et al., 2005; Nagashima et al., 2000; Nakayama et al., 1985)。加えて、近年の研究において視床下部背内側核 (DMH) が褐色脂肪細胞に関連する非ふるえ産熱に関わることが報告されている (Dimicco & Zaretsky, 2007; Nakamura, 2011; de Menezes et al., 2006; Zaretskaia et al., 2002)。また、短期の暑熱曝露による生理的变化が起きる前に、動物は日陰や水辺に移動して体温の上昇を抑制する。この行動は行動性体温調節と呼ばれる。脳内においては線条体 (CPu) が行動に関連しており、特にドーパミン (DA) の受容体に関連していることが指摘されている (Charntikov et al., 2011; Der-Ghazarian et al., 2012)。また、認知や記憶も高体温により低下することが明らかとなっており (Gaoua et al., 2012; Puumala & Sirviö, 1998; Racinais et al., 2008)、前頭前野 (FC) と海馬 (Hip) がこれらの機能を調節していることが分かっている (Kesner & Churchwell, 2011; Warburton & Brown, 2015)。

ノルアドレナリン (NA) や DA、セロトニン (5-HT) といったモノアミンは、体温調節機能や行動、認知機能、記憶などの様々な機能の基本的な役割を担っている (Clark & Lipton, 1985, 1986)。モノアミンは視索前野において体温調節に重要な役割を担っており、先行研

---

<sup>1</sup> 本研究は、博士課程前期課程に行った実験、及び下記に記載した論文を基に加筆、修正を行った。

Nakagawa, H., Matsumura, T., Suzuki, K., Ninomiya, C., Ishiwata, T., 2016. Changes of brain monoamine levels and physiological indexes during heat acclimation in rats. *J. Therm. Biol.* 58, 15–22.

究において DA と NA が運動中のラットの体温調節に関わっていることが指摘されている (Hasegawa et al., 2008). また, PO における 5-HT が体温調節に重要な役割を担っていることも報告されているが (Ishiwata, 2014; Jacobs & Azmitia, 1992), 寒冷曝露や暑熱曝露, 視索前野/前視床下部 (PO/AH) への 5-HT の再取込阻害剤の投与による深部体温の変化は観察されなかった (Ishiwata et al., 2004). DMH は褐色脂肪細胞における産熱反応に関与しており,  $\gamma$ -アミノ酪酸が関与していることが報告されているが (Nakamura, 2011), 暑熱曝露と暑熱順化によるモノアミンとの関連性は報告されていない. Puumala & Sirviö (1998) は選択時間反応課題において FC における DA と 5-HT が重要な役割を担っていることを報告している. また, Hip における 5-HT は学習や記憶に関連していることが報告されている (Adams et al., 2008). 従って, 暑熱曝露に伴う多くの脳部位におけるモノアミン含有量の変化は体温調節機能などに関連する生理機能や神経機能に影響を与えることが考えられる.

しかしながら, 暑熱順化に伴う脳の様々な部位におけるモノアミン含有量の変化と生理的適応については明らかになっていない. そこで, 本研究では様々な期間暑熱曝露した際の複数の脳領域における NA, DA, 5-HT の変化と深部体温, 心拍数, 活動量の変化を調べることを目的に研究を行った.

## 第 2 節 方法

生理指標の測定には合計 7 匹のラットを用いて 4 週間の測定を行った. ソムノペンチル (50mg/kg) により麻酔をかけたラットの腹腔内に無線式小型体温計 (TA11TA-F40, Data science, USA) を埋め込み, 1 週間の回復期間を設けてから暑熱曝露を行った. 回復期間から深部体温と心拍数, 活動量を連続測定した. ラットは個別にプラスチック製のケージで飼育し, 12h:12h の明暗サイクル (7:00 点灯) で, 飼育中の水, 餌の摂取は自由とした. 回復期間は環境温を 23°C とし, 暑熱曝露期間は 32°C の環境温に設定した. なお, 本実験は本学のライフサイエンスに係る研究・実験及び安全委員会より承認を受けて行った (承認番号: LS13027A).

脳内モノアミンの測定には合計 42 匹のラットを用いた. ラットを 6 匹毎にケージに分け, 生理指標の測定実験と同一の暑熱環境下にて 3 時間, 1 日, 7 日, 14 日, 21 日, 28 日それぞれ飼育した. 比較対象には通常環境で飼育を行った群を用いた. 全てのラットは飼育期間終了後の週齢が 10 週齢で統一されるように飼育を行った. 暑熱曝露終了後にラットをジエチルエーテルにて気化麻酔をかけ, ソムノペンチルにて安楽死をさせた. その後, 素早く脳を取り出し, マイクロスライサー (PRO7, Dosaka EM, Japan) にて 300  $\mu$ m の切片を作成し, マイクロパンチ (BP-10F, Kai Medical, Japan) にて半径 1mm の大きさで, FC, CPu, PO, DMH, Hip を取り出し, マイクロチューブ (Kimble Kontes, USA) に試料を入れた後, ホモジナイザーにて磨り潰した. 磨り潰した試料を 0.2M PCA (過塩素酸) にて除タンパクを行い, 除タンパクを完全なものにするために冷蔵庫で 30 分間の冷却を行った. 冷却終了後 20,000G, 0°C の設定で 15 分間遠心分離 (CF15RX II, Hitachi Koki, Japan) にか

け、上清を摂取した。摂取した上清を  $0.45\ \mu\text{m}$  のフィルター (Millipore, Bedford, MA) を使用して濾過を行った。その後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC, ECD-700 system, Eicom, Japan) を用いて分析した。カラムは EICOMPAK SC-50DS ( $3.0\text{mm id} \times 150\text{ mm}$ , Eicom, Japan) を使用した。

統計分析は IBM 社製 SPSS を用い、一元配置分散分析にて行った。統計上有意な差があるとみなされたものには、その後の検定でフィッシャーの最小有意差法を用いた。有意水準は  $p < 0.05$  とした。表記は全て平均値  $\pm$  標準偏差とした。

### 第3節 結果

暑熱曝露に伴う生理指標の変化について、図 1 に記す。まず、明期において深部体温は第 1, 2 週目に有意な上昇を見せた。しかしながら、約 2 週間経過後に深部体温は暑熱曝露前の水準まで回復した。一方で、暗期における深部体温は暑熱曝露により有意な上昇を示し、2 週間経過後も継続して有意に高い値を示した。心拍数は暑熱曝露により明期暗期双方で有意に低下する結果となった。活動量においては、暑熱曝露の後半で有意な増加を示した。

脳内モノアミンの変化について、図 2-図 4 に記す。脳内における様々な部位で有意な変化を示した。まず、CPU においては NA の含有量が 3 時間と 28 日暑熱曝露した群で有意な増加を示した。DA は暑熱曝露 1 日以上群で有意な減少を示したが、5-HT は有意な変化が認められなかった。

PO においては、DA が 28 日暑熱曝露群において有意な増加を示し、5-HT は 1 日から 21 日まで暑熱曝露した群で減少し、NA には変化が認められなかった。

DMH においては、NA と DA が 21 日と 28 日暑熱曝露した群でそれぞれ増加したが、5-HT は 1, 7, 14 日暑熱曝露した群で減少する結果となった。

FC においては、DA の含有量が 28 日暑熱曝露することにより増加し、5-HT は 28 日を除く暑熱曝露群で減少した。NA はいずれの曝露群においても有意な変化は認められなかった。

Hip においては、5-HT の含有量が 21, 28 日暑熱曝露により増加し、NA と DA は 28 日暑熱曝露群のみ増加する結果となった。

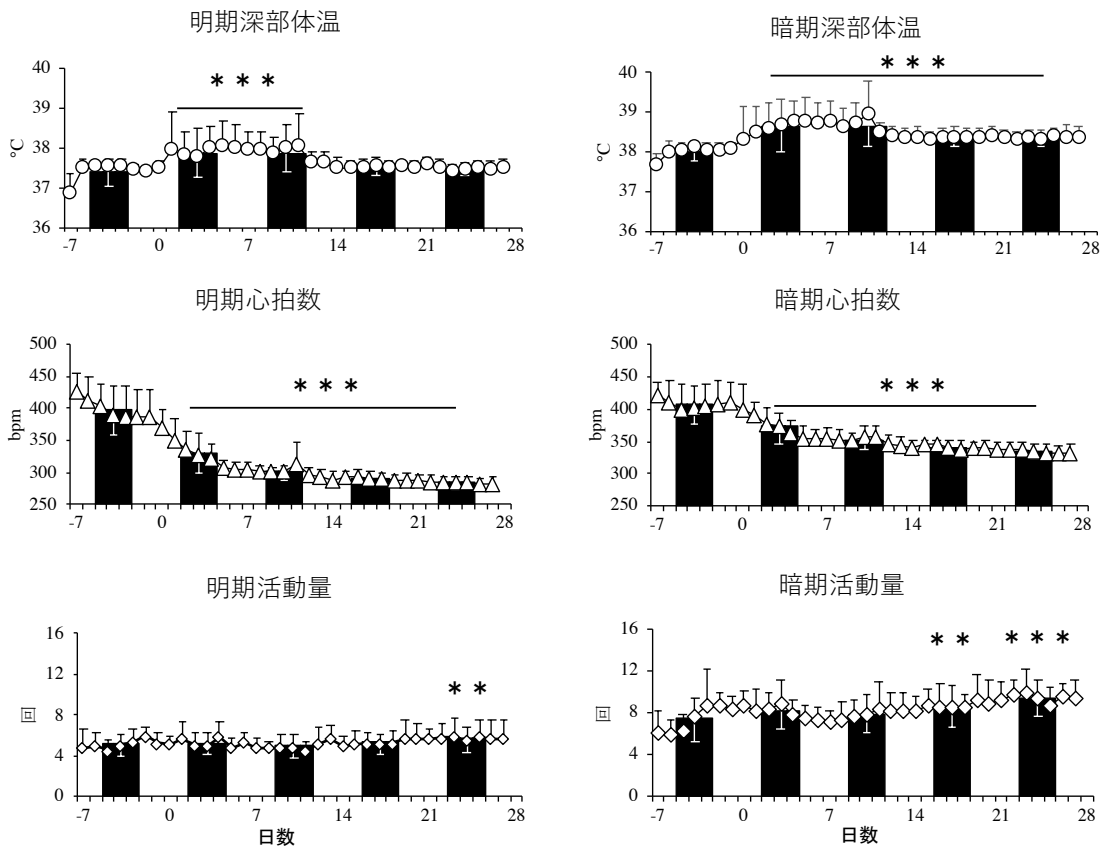


図1: 暑熱曝露に伴う生理指標の変化. 平均値±標準偏差  
 \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 vs 曝露前

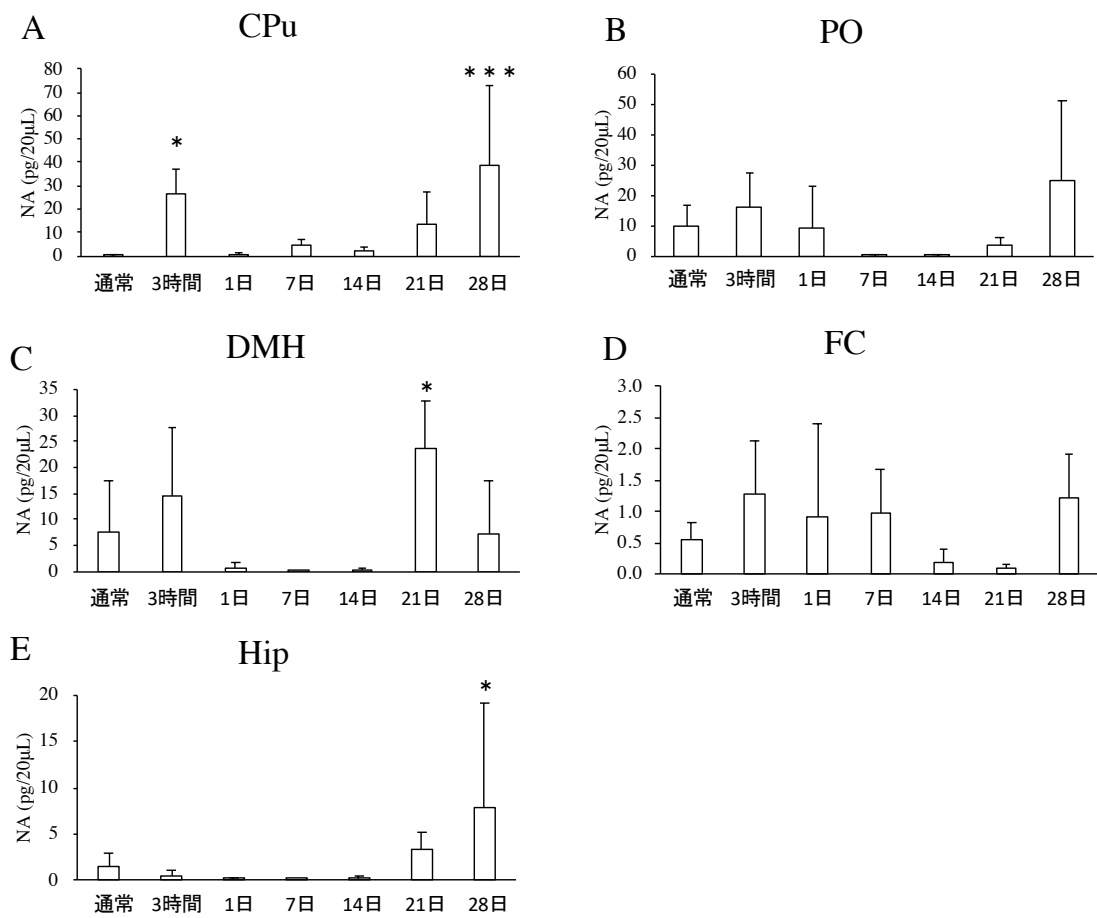


図2: 暑熱曝露に伴うNAの含有量の変化  
 平均値±標準偏差, \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 vs 通常

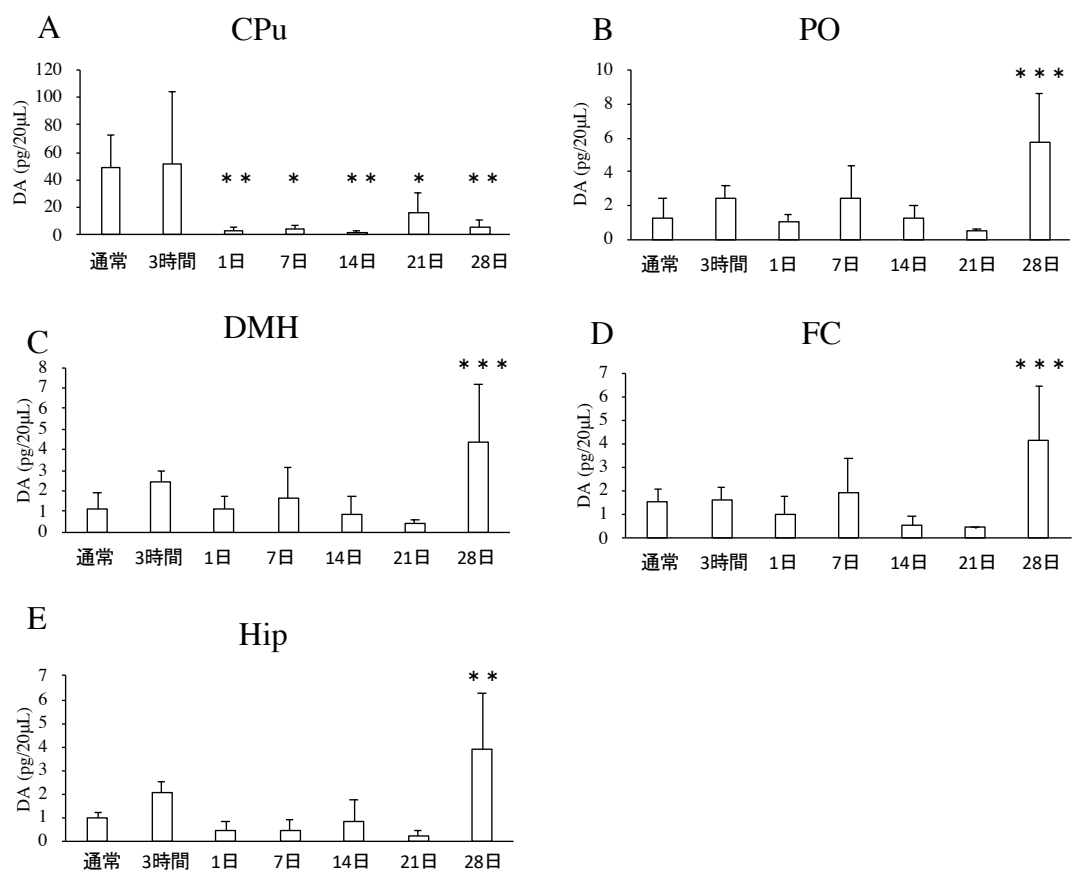


図3: 暑熱曝露に伴うDAの含有量の変化  
 平均値±標準偏差, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs 通常

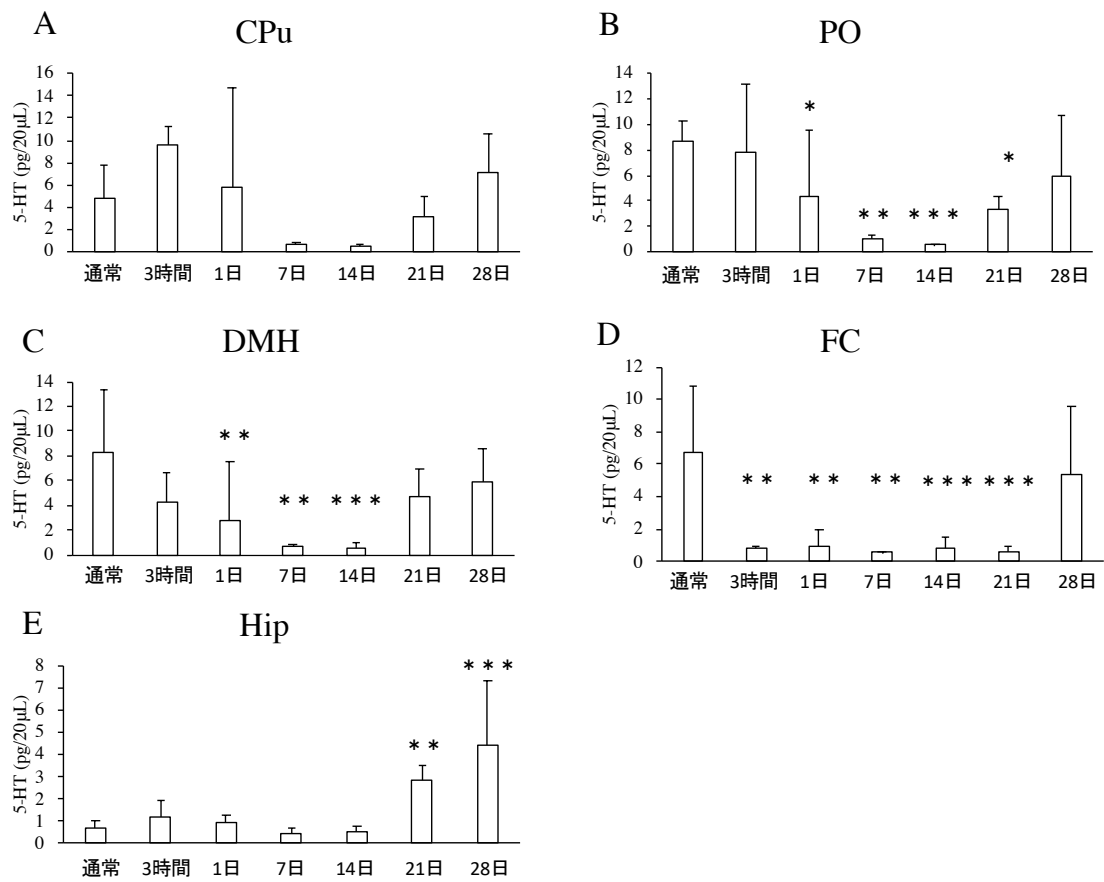


図4: 暑熱曝露に伴う5-HTの含有量の変化  
 平均値±標準偏差, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs 通常



#### 第4節 考察

本研究の重要な知見として、暑熱順化に伴い様々な脳領域において脳内モノアミン含有量に変化が生じることが明らかとなった。加えて、深部体温が暑熱曝露開始 2 週間は上昇した。心拍数は暑熱曝露により暑熱曝露前と比較して有意に低い値を維持し続けるが、深部体温は約 2 週間経過後に暑熱曝露開始前の水準まで回復したことから、2 週間以上の暑熱曝露を行うことにより暑熱順化が生じることが示唆された。

脳内モノアミンの含有量の変化について、先ず 3 時間の暑熱曝露により CPu における NA の含有量が増加した。NA の増加は一般的にストレス反応であると言われているが、侵害受容に関わっていることも報告されている (Zhang et al., 2010a, 2010b)。従って、短期暑熱曝露による CPu における NA の増加は、暑熱環境からの逃避行動を起し、行動性体温調節を行うために重要になる可能性が考えられる。更に、CPu の DA は暑熱曝露 1 日以上で減少した。CPu における DA は身体活動に関連していることが広く示されており (Charntikov et al., 2011; Der-Ghazarian et al., 2012)、暑熱曝露により DA を減少させることにより身体活動量を減少させることで産熱を減らし、高体温を抑制していることが考えられる。そして、暑熱順化が生じたと考えられる 2 週間以上の暑熱曝露を行うことで飼育中の身体活動量が増加し、NA も再び増加していることから、暑熱順化により CPu の NA 含有量が増加することが行動性体温調節や身体活動量に影響することが考えられる。

PO と DMH において、5-HT が 1 日暑熱曝露から 14 日もしくは 21 日間の暑熱曝露により減少した。これら 2 部位は体温調節に重要な役割を担っていることが示されている (Dimicco & Zaretsky, 2007; Ishiwata et al., 2005; Nagashima et al., 2000; Nakamura, 2011; Nakayama, 1985)。先行研究において、PO における 5-HT が産熱反応に関わっていることが指摘されているが (Ishiwata, 2014; Jacobs & Azmitia, 1992)、PO/AH への 5-HT 再取込抑制剤の投与や寒冷、暑熱曝露により深部体温の急激な変化は認められなかった (Ishiwata et al., 2004)。更に、近年の研究において DMH における  $\gamma$ -アミノ酪酸が褐色脂肪細胞による産熱反応に重要な役割を担っていることが報告されている (de Menezes et al., 2006; Nakamura, 2011; Zaretskaia et al., 2002)。先行研究では暑熱曝露や暑熱順化による DMH のモノアミンの変化について研究は行われていないものの、PO と DMH の 5-HT が暑熱環境における熱産生の抑制に関わっていることが考えられる。興味深いことに、28 日間の暑熱曝露により PO と DMH の 5-HT はコントロール群と同程度の水準に戻り、同時に DA の含有量が増加している。先行研究においては PO における DA が熱放散に関わっていることが報告されている (Hasegawa et al., 2008)。本研究の結果から、暑熱曝露による熱放散に PO と DMH が関わっている可能性が示唆された。

FC においては、5-HT の含有量が暑熱曝露により減少し、28 日まで暑熱曝露することにより回復した。5-HT とは異なり、DA は 28 日間の暑熱曝露により増加した。Puumala & Sirviö (1998) は、FC における DA と 5-HT が選択反応時間課題において重要な役割を担っていることを明らかにしている。また、ヒトを対象とした実験においては、暑熱曝露や高体

温が認知機能を悪化させることが示されている(Gaoua et al., 2012). 従って, 5-HT と DA の変化が暑熱環境における認知機能の低下に関与していることが示唆された. Hip においては, 暑熱曝露の初期段階においてはモノアミンの含有量に有意な変化は認められなかった. しかしながら, 28 日間暑熱曝露することにより, NA, DA, 5-HT が有意に増加する結果となった. Hip におけるモノアミンは特に 5-HT が学習や記憶に関連していることが報告されている(Adams et al., 2008). 先行研究においては, 高体温がヒトの短期記憶を低下させることも明らかにされている(Racinais et al., 2008). FC と Hip におけるモノアミンの増加は, 暑熱環境における認知機能や記憶を維持するために必要であることが考えられる.

まとめとして, 暑熱順化に伴い脳内モノアミン含有量は, 先ず CPu において行動性体温調節を行うために変化が生じる. 続いて, PO と DMH における 5-HT の含有量を減少させることにより熱産生を抑制する. 最後に, CPu における NA, PO と DMH における DA を増加させることで身体活動と熱放散を調節する. 加えて, FC と Hip におけるモノアミンの含有量を増加させることで暑熱環境下での認知や記憶能力を維持する. これらのことから, 暑熱曝露を行い, 暑熱順化が生じることで脳内において適応的な変化を起し, 生理的, 心理的变化を起すことが考えられる.

しかしながら, 本研究においては様々な期間暑熱曝露を行った際の情動行動の変化については明らかにしていない. また, 脳内モノアミンの含有量の変化についてはラットを安楽死させた後に測定を行っているため, 暑熱曝露による即時的な影響については明らかにすることはできていない. 今後の研究では, 本研究において浮かび上がった課題を解決する必要がある.

## 引用文献

- Adams, W., Kusljic, S., vanden Buuse, M., 2008. Serotonin depletion in the dorsal and ventral hippocampus: effects on locomotor hyper activity, prepulse inhibition and learning and memory. *Neuropharmacology* 55, 1048–1055.
- Bratincsak, A., Palkovits, M., 2004. Activation of brain area in rat following warm and cold ambient exposure. *Neuroscience* 127, 385–397.
- Buono, M. J., Heaney, J. H., Canine, K. M., 1998. Acclimation to humid heat lowers resting core temperature. *Am. J. Physiol.* 274, R1295–R1299.
- Buono, M. J., Martha, S. L., Heaney, J. H., 2009. Peripheral sweat gland function is improved with humid heat acclimation. *J. Therm. Biol.* 34, 127–130.
- Charntikov, S., Der-Ghazarian, T., Herbert, M.S., Horn, L. R., Widarma, C. B., Gutierrez, A., Varela, F. A., McDougall, S. A., 2011. Importance of D1 and D2 receptors in the dorsal caudate-putamen for the locomotor activity and stereo typed behaviors of pre weanling rats. *Neuroscience* 183, 121–133.
- Clark, W. G., Lipton, J. M., 1985. Changes in body temperature after administration of amino acids, peptides, dopamine, neuroleptics and related agents: II. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9, 299–371.
- Clark, W. G., Lipton, J. M., 1986. Changes in body temperature after administration of adrenergic and serotonergic agents and related drugs including antidepressants: II. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 10, 153–220.
- Dean, J. B., Boulant, J. A., 1989. In vitro localization of thermosensitive neurons in the rat diencephalon. *Am. J. Physiol.* 257, R57–R64.
- de Menezes, R. C., Zaretsky, D. V., Fontes, M. A., DiMicco, J. A., 2006. Microinjection of muscimol into caudal periaqueductal gray lowers body temperature and attenuates increases in temperature and activity evoked from the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res.* 1092, 129–137.
- Der-Ghazarian, T., Gutierrez, A., Varela, F. A., Herbert, M. S., Amodeo, L. R., Charntikov, S., Crawford, C. A., McDougall, S. A., 2012. Dopamine receptor inactivation in the caudate-putamen differently affects the behavior of preweanling and adult rats. *Neuroscience* 226, 427–440.
- Dimicco, J. A., Zaretsky, D. V., 2007. The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292 (1), R47–R63.
- Gaoua, N., Grantham, J., Racinais, S., Massioui, F., 2012. Sensory displeasure reduces complex cognitive performance in the heat. *J. Environ. Psychol.* 32, 158–163.
- Hasegawa, H., Piacentini, F., Sarre, S., Michotte, Y., Ishiwata, T., Meeusen, R., 2008. Influence of brain catecholamines on the development of fatigue in exercising rats in the heat. *J. Physiol.*

586, 141–149.

- Horowitz, M., Argov, D., Mizrahi, R., 1983. Inter relationships between heat acclimation and salivary cooling mechanism in conscious rats. *Biochem.Physiol.* 74A, 945–949.
- Ishiwata, T., 2014. Role of the serotonergic system in thermoregulation in rats. *J. Phys. Fit. Sports Med.* 3, 445–450.
- Ishiwata, T., Saito, T., Hasegawa, H., Yazawa, T., Kotani, Y., Otokawa, M., Aihara, Y., 2005. Changes of body temperature and thermoregulatory responses of freely moving rats during GABAergic pharmacological stimulation to the preoptic area and anterior hypothalamus in several ambient temperatures. *Brain Res.* 1048, 32–40.
- Ishiwata, T., Saito, T., Hasegawa, H., Yazawa, T., Otokawa, M., Aihara, Y., 2004. Changes of body temperature and extracellular serotonin level in the preoptic area and anterior hypothalamus after thermal or serotonergic pharmacological stimulation of freely moving rats. *Life Sci.* 75, 2665–2675.
- Jacobs, B. L., Azmitia, E. C., 1992. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 72, 165–229.
- Kesner, R. P., Churchwell, J. C., 2011. An analysis of rat prefrontal cortex in mediating executive function. *Neurobiol. Learn Mem.* 96, 417–431.
- Kiyohara, T., Miyata, S., Nakamura, T., Shido, O., Nakashima, T., Shibata, M., 1995. Differences in fos expression in the rat brains between cold and warm ambient exposures. *Brain Res. Bull.* 38, 193–201.
- Matthew, C. B., 1997. Heat acclimation in telemetry equipped rat. *J. Therm. Biol.* 22, 275–280.
- Nagashima, K., Nakai, S., Tanaka, M., Kanosue, K., 2000. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton. Neurosci.* 85, 18–25.
- Nakamura, K., 2011. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 30, R1207–R1228.
- Nakayama, T., 1985. Themosensitive neurons in the Brain. *Jpn. J. Phys.* 35, 375–389.
- Patronas, P., Horowitz, M., Simon, E., Gerstberger, R., 1998. Differential stimulation of c-fos expression in hypothalamic nuclei of the rat brain during short-term heat acclimation and mild dehydration. *Brain Res.* 798, 127–139.
- Puumala, T., Sirviö, J., 1998. Changes in activities of dopamine and serotonin systems in the frontal cortex under lie poor choice accuracy and impulsivity of rats in an attention task. *Neuroscience* 83, 489–499.
- Racinais, S., Gaoua, N., Grantham, J., 2008. Hyperthermia impairs short-term memory and peripheral motor drive transmission. *J. Physiol.* 586, 4751–4762.
- Singh, L. P., Kapoor, M., Singh, S. B., 2013. Heat: not black, not white. It's gray!!!. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 24 (4), 209–224.

- Wendt, D., van Loon, L. J., Lichtenbelt, W. D., 2007. Thermoregulation during exercise in the heat. *Sports Med.* 37, 669–682.
- Warburton, E. C., Brown, M. W., 2015. Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav. Brain Res.* 285, 131–139.
- Zaretskaia, M. V., Zaretsky, D. V., Shekhar, A., DiMicco, J. A., 2002. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. *Brain Res.* 928, 113–125.
- Zhang, G. W., Yang, C. X., Zhang, D., Gao, H. E., Zhang, Y., Jiao, R. S., Zhang, H., Liang, Y., Xu, M. Y., 2010a. Micro injection of different doses of norepinephrine into the caudate putamen produces opposing effects in rats. *Neurosci. Lett.* 471, 125–128.
- Zhang, G. W., Yang, C. X., Zhang, D., Gao, H. E., Zhang, Y., Jiao, R. S., Zhang, H., Liang, Y., Xu, M. Y., 2010b. Noradrenaline mechanism involved in the nociceptive modulation of nociceptive-related neurons in the caudate putamen. *Neurosci. Lett.* 480, 59–63.
- Zhang, Y. H., Yanase-Fujiwara, M., Hosono, T., Kanosue, K., 1995. Warm and cold signals from the preoptic area: which contribute more to the control of shivering in rats? *J. Physiol. (Lond.)* 485, 195–202.

### 第3章 暑熱順化が新奇環境下のラットの不安様行動に及ぼす影響

#### ～オープンフィールドテストを用いた検討～<sup>2</sup>

#### 第1節 背景

近年は気候変動が世界的に重大な問題となっており、結果として熱中症被害が増加している (Rossati, 2017). 地球温暖化は今後も継続して起こり、その結果として、暑熱曝露による犠牲者は将来的に 2.5 倍まで膨れ上がることが予測されている (Argaud et al., 2007). そのため、暑熱環境下における体温調節機能や脳機能、不安様行動についての研究を行うことが重要となる。

我々ヒトを含む哺乳類が暑熱環境に曝された際に、生理機能は深部体温を維持するための変化を見せる。例えば、皮膚血管が拡張し、皮膚血流量を増加させることで熱放散を促し、ヒトの場合は発汗を増加させる (Chiesa et al., 1985). 暑熱曝露されたラットは血漿中のアドレナリンとノルアドレナリン (NA) の含有量が増加する (Veening et al., 2004). これは深部体温を一定に保ち、温熱ストレスに対応するための生理的反応であると示唆される。

また、哺乳類は長期間暑熱曝露されると環境に順応するために生理機能を変化させる。この変化を暑熱順化という (Horowitz et al., 1983). ラットが暑熱順化した際、体温の過度な上昇を抑制するために唾液塗布能力の向上などの変化が起こる (Horowitz et al., 1983). 更に、暑熱順化により暑熱曝露初期では深部体温の上昇が認められるものの、2 週間経過で曝露前の水準までに戻ることが明らかとなっている (Nakagawa et al., 2016). 加えて、脳機能は暑熱環境により影響を受けている。例えば、高体温が記憶や認知、実行機能や不安様行動といった様々な脳機能に悪影響を及ぼすことが明らかとなっている (Gaoua et al., 2012; Mete et al., 2012; Racinais et al., 2008). 長期間 (28 日) の暑熱曝露により、NA やドーパミン (DA)、セロトニン (5-HT) といった脳機能を働かせるために重要な脳内モノアミンの含有量が、様々な脳領域で変化することが分かっている (Clark & Lipton, 1985, 1986; Nakagawa et al., 2016). 従って、暑熱曝露の期間に伴い、脳内モノアミンは脳領域ごとに特徴ある変化を示し、暑熱順化することにより生理的、神経的な変化を起こす。

暑熱環境は行動にも影響を及ぼす。ラットを高温環境で飼育すると熱放散を盛んにするために全身への唾液塗布を増やし、身体を伸ばす (Hainsworth, 1967; Roberts et al, 1974). これらの行動は暑熱曝露期間において 2 段階に分けられることが示されている (Michel et al., 2010). 暑熱曝露初期 (曝露 0–15 分) においては、新奇環境に曝されているために活動量が増加し、第 2 段階 (曝露 45–60 分) では、暑熱環境からの逃避行動のために活動量を増加させる。しかし、暑熱曝露に伴う不安様行動の変化を調べた実験はまだ乏しい (Gruene et al., 2014; Martinez et al., 2007; Mete et al., 2012). Martinez et al. (2007) は 34°C の環境に 96 時

<sup>2</sup> 本章は、下記の論文の内容を基に加筆・修正をして記載した。

Nakagawa, H., Matsunaga, D., Ishiwata, T., 2020. Effect of heat acclimation on anxiety-like behavior of rats in an open field. *J. Therm. Biol.* 87, 102458.

間曝露したラットにおいて、高架式十字迷路における不安様行動に影響はみられなかったことを明らかにしている。一方で、雌ラットを 31°C の環境に 1 日曝露した場合には、音刺激やフットショックによるすくみ行動が増加することが報告されている (Gruene et al., 2014)。加えて、ラットを 30 分間暑熱曝露を行い、深部体温を 39°C または 41°C まで上昇させた際には、血漿中のコルチコステロン含有量が増加し、高架式 O 字迷路における不安様行動が増加することが示されている (Mete et al., 2012)。これらの実験結果は、短期の暑熱曝露が不安様行動に影響を及ぼすことを示している。

これまでの研究においては、短期の暑熱曝露による生理指標、脳機能、情動行動の変化に着目している。私の知る限りにおいて、長期の暑熱曝露、そして暑熱順化による不安様行動の変化を通常環境と暑熱環境で調べた研究はまだない。そこで、本研究では異なる気温におけるオープンフィールド中の不安様行動の変化を暑熱順化したラットを用いて調べることを目的に実験を行った。

## 第 2 節 方法

実験には雄の Wistar 系ラットを 20 匹用いた。飼育環境は気温 23°C、湿度 50%、12h:12h の明暗サイクル (07:00 点灯) で水と餌の摂取は自由とした。行動テストを行う際には全てのラットは 10 週齢となる様に飼育を開始した。ラットの体重は 10 週齢となった際に計測を行った。23°C の環境で 1 週間の飼育を行った後、15 匹のラットを 3 群に群分けし、先行研究 (Nakagawa et al., 2016) を参考に気温 32°C、湿度 50% の環境で 3 時間、14 日、28 日暑熱曝露を行った。残りの 5 匹は通常環境で飼育を継続し、暑熱曝露は行わなかった。3 時間の暑熱曝露は 09:00-12:00 の時間帯で行い、曝露終了後にオープンフィールドテスト (OFT) を行った。14 日、28 日暑熱曝露群は飼育期間中、終日暑熱環境で飼育を行った。なお、本実験は本学のライフサイエンスに係る研究・実験及び安全委員会より承認を受けて行った (承認番号: LS17025A)。

OFT は不安様行動の測定を行うテストで、新奇環境にラットを入れた際の行動を分析するテストである (Hall, 1934; Zimcikova et al., 2017)。本研究においては、75cm 四方、高さ 50cm のフィールドを用いて、フィールド内を縦横 4 マスずつに分割した。OFT は気温 32°C の暑熱環境と気温 23°C の通常環境で 2 回行い、実験は最低 2 日空けて行った。全ての実験は最初に暑熱環境でのテストを行い、その後、通常環境でテストを行った。3 時間暑熱曝露群は OFT を始める前の 09:00-12:00 で暑熱曝露を行い、14 日、28 日暑熱曝露群は次の OFT まで再度暑熱曝露を行った。実験は 10 分間行い、明期の 10:00-14:00 の間で行った。実験では行動回数、立ち上がり回数、毛繕い時間、中央滞在時間、中央進入回数、中央行動回数を測定した。

行動の変化と体重の変化は一元配置分散分析により統計的な差を調べ、その後の検定においてはフィッシャーの最小有意差法を用いた。結果は平均値 ± 標準偏差で示し、 $p < 0.05$  を統計的有意差とした。

### 第3節 結果

暑熱曝露による体重の変化について、14日、28日暑熱曝露した群が通常群と3時間暑熱曝露を行った群と比較して有意に体重が減少した。

暑熱環境における行動の変化について、3時間、14日暑熱曝露群で毛繕い時間が通常群と比較して有意に増加した。中央進入回数においては、14日、28日暑熱曝露群で増加する傾向が見られ、中央行動回数は14日、28日暑熱曝露群で有意に増加した。その他の指標においては、有意な差は認められなかった。

通常環境におけるOFTの行動の変化について、3時間、28日暑熱曝露群において、通常群と比較して中央滞在時間が増加し、暑熱曝露を行った全てのラットで毛繕い時間が増加した。更に28日暑熱曝露を行ったラットにおいて、立ち上がり回数の増加が認められた。中央行動回数は暑熱曝露を行うことにより増加する傾向が見られた。

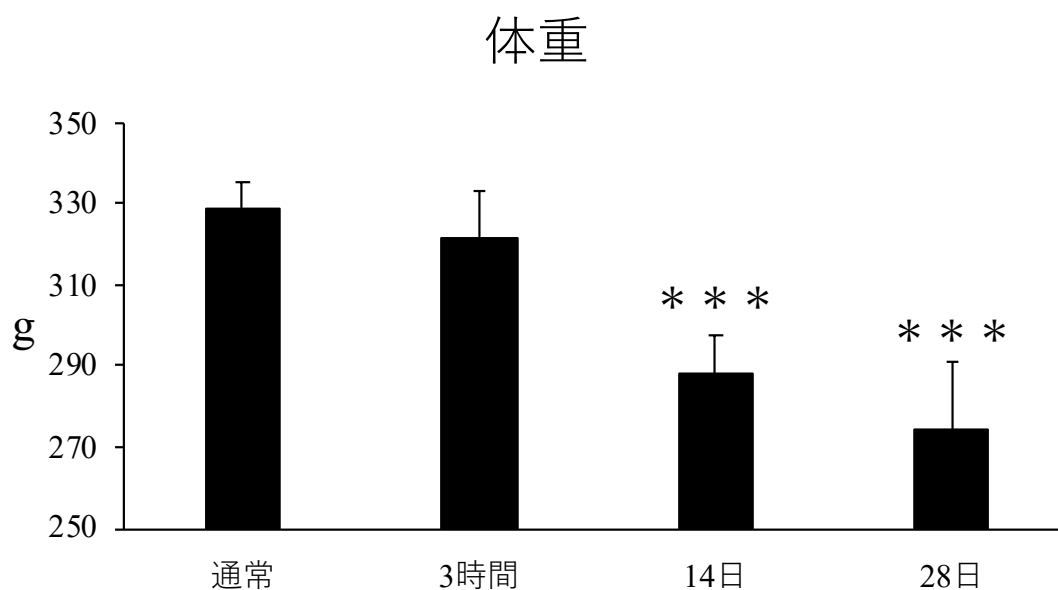


図5：体重の変化。平均値±標準偏差，  
\*\*\* $p<0.001$  vs 通常



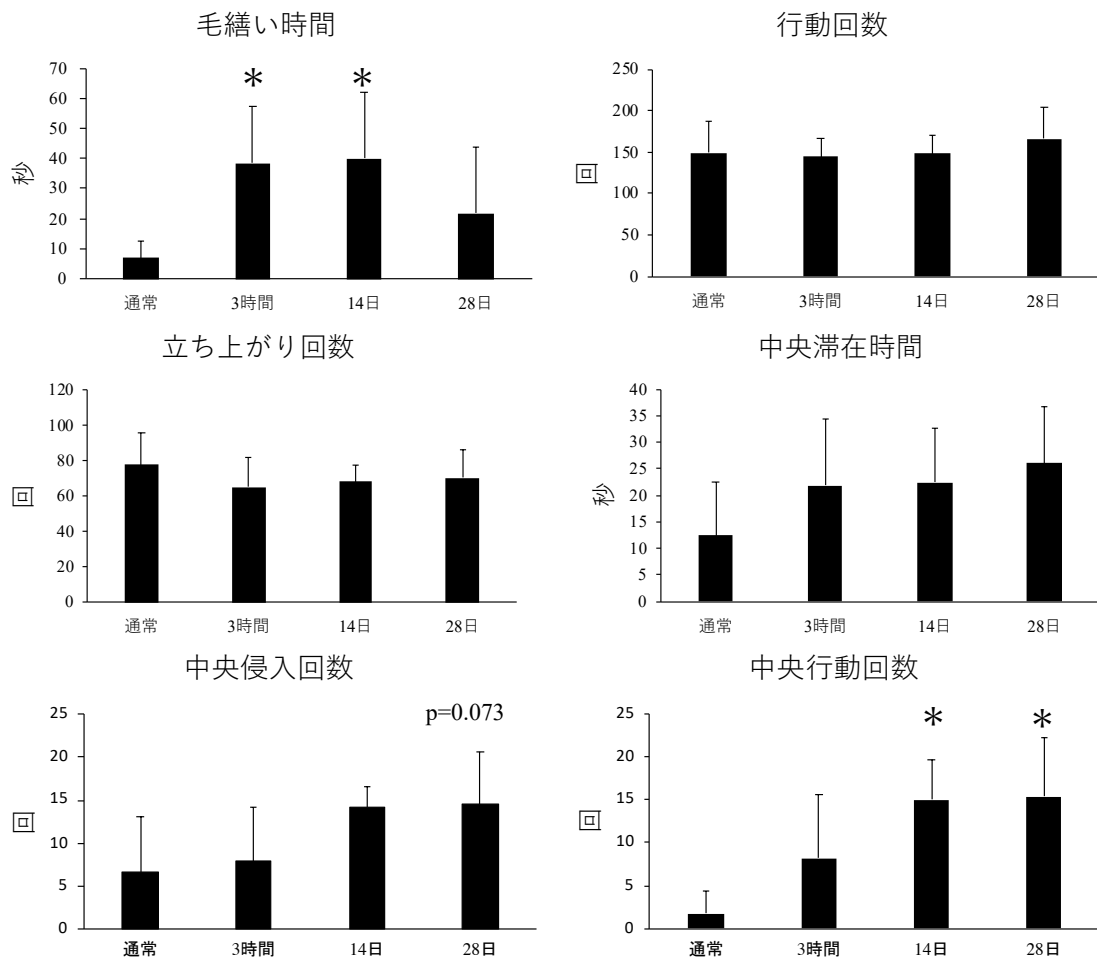


図6：暑熱環境における不安様行動の変化  
 平均値±標準偏差, \* p<0.05 vs 通常

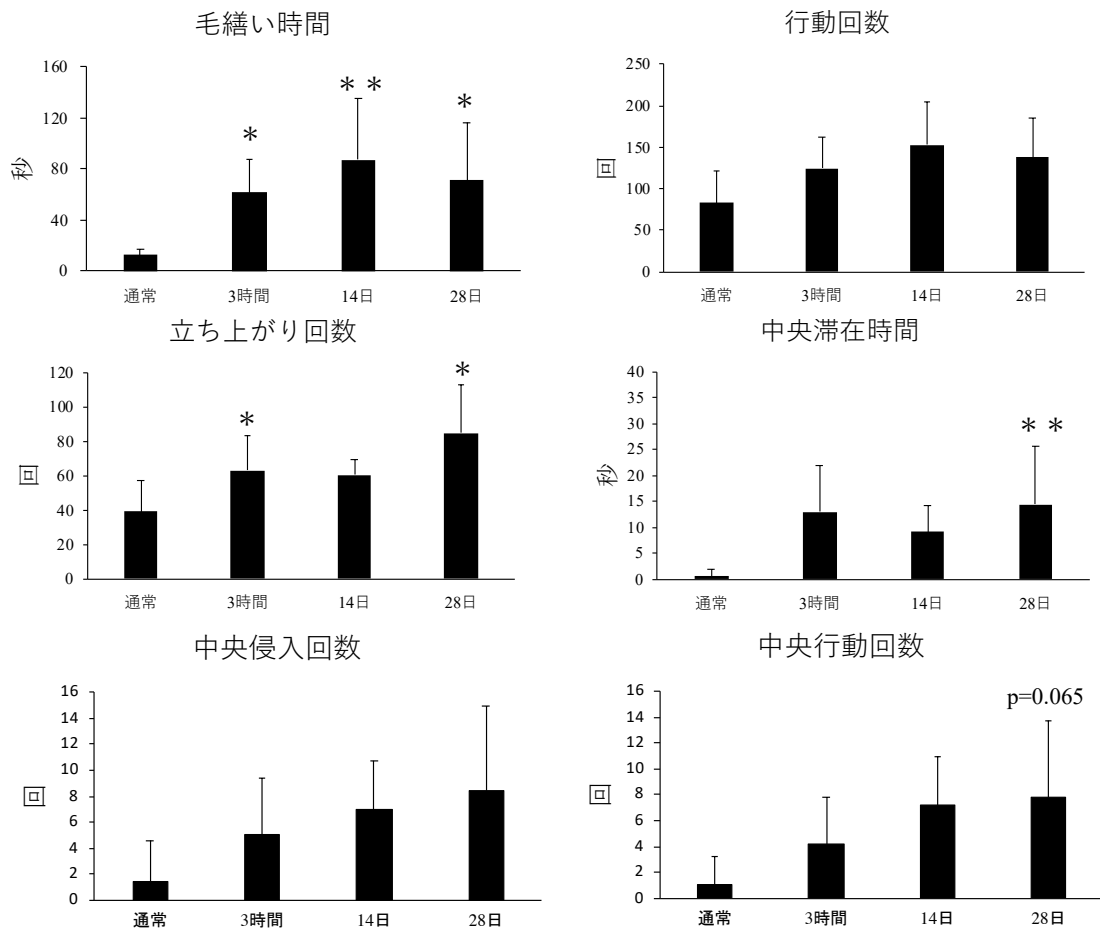


図7：通常環境における不安様行動の変化  
 平均値±標準偏差，\* p<0.05，\*\* p<0.01 vs 通常

#### 第4項 考察

本実験は暑熱環境と通常環境の OFT を用いて、暑熱順化が生じたラットの不安様行動の変化を調べるために実験を行った。暑熱順化したラットの不安様行動は暑熱環境と通常環境で異なる行動を見せた。加えて、ラットの体重は暑熱曝露を 14 日、28 日行ったラットで有意に低くなる結果となった。

私たちはこれまでに暑熱順化に伴うラットの脳内モノアミンの変化について報告している (Nakagawa et al., 2016)。例えば、3 時間の暑熱曝露により前頭前野における 5-HT の含有量が減少する一方で、線条体における NA の含有量は増加した。中期間の暑熱曝露では線条体の DA と前頭前野と視床下部背内側核の 5-HT が減少し、長期の暑熱曝露においては線条体における NA と海馬における NA, DA, 5-HT が増加した。本実験では私たちの先行研究と同様に実験条件で飼育を行ったため、同様の脳内モノアミンの変化が生じていると推測できる。

深部体温は暑熱曝露により上昇するが、2 週間経過後に暑熱曝露前の水準まで回復する (Nakagawa et al., 2016)。これらの結果は、ラットが 2 週間の暑熱曝露で環境に順化することを意味する。本実験において、14 日、28 日暑熱曝露を行ったラットは、他の群と比較して有意に体重が減少した。これは先行研究における暑熱順化マウスの体重が低下した報告と同じである (Sareh et al., 2011)。Jahng et al. (2008) はラットの摂餌行動と脳内モノアミン含有量の関係性を指摘している。視床下部の 5-HT の減少が摂餌行動の減少につながり、ひいては体重の低下に関係する。先行研究では摂餌行動に関わる視床下部背内側核における 5-HT の含有量が 14 日暑熱曝露することにより減少することを報告されている (Nakagawa et al., 2016; Zhang & Bi, 2018)。更に、多くの研究により暑熱曝露された齧歯類の摂餌行動の減少が報告されている (Sareh et al., 2011; Shido et al., 1994)。これらのことから、中期間の暑熱曝露による視床下部背内側核の 5-HT の減少は摂餌行動を減らし、食事誘発性熱産生を減らすために起こっており、その結果体重が減少していると推測できる。先行研究において、肥満ラットの不安様行動の誘発が示唆されており、原因として視床下部背内側核の神経伝達物質に変化が生じていることが挙げられている (De Noronha et al., 2017)。従って、暑熱順化に伴う体重の低下は間接的にはあるが不安様行動の抑制につながると考えられる。

暑熱環境における OFT において、3 時間、14 日暑熱曝露群において有意な毛繕い時間の増加が確認された。暑熱環境における毛繕いは、全身に唾液塗布し体温を維持するための行動である (Horowitz et al., 1983)。このことから、3 時間、14 日暑熱曝露群の毛繕い時間の増加は体温調節のための行動であると推測できる。私たちの先行研究において、暑熱順化が曝露開始後 14 日で起こり、暑熱順化前には視床下部背内側核の 5-HT の含有量が減少することに言及している (Nakagawa et al., 2016)。先行研究において視床下部背内側核 5-HT は熱産生に関わっている可能性が示唆されている (Ishiwata & Greenwood, 2018)。更に、暑熱順化により脳内の様々な領域、特に視床下部背内側核や PO/AH といった体温調節中枢に

おける神経新生が促進されることが指摘されている(Shido et al., 2018). 興味深いことに, 28 日間の暑熱曝露群においては, 毛繕い時間の増加が認められなかった. この変化は暑熱順化ラットの尾部などの熱放散機関の発達が起こり, 動静脈吻合の密度が増加することにより唾液塗布なしで熱放散を活発化させていることが示唆される(Demicka & Caputa, 1993a, b).

暑熱曝露を 14 日, 28 日行った群において, 中央進入回数が増加する傾向が見られ, 中央における行動回数は通常群と比較して有意に増加する結果を得ることができた. この結果はラットの不安が減少していることを示している. しかし, 先行研究においては反対に, 暑熱曝露により不安様行動が増加することが報告されている(Gruene et al., 2014; Martinez et al., 2007). この実験結果の違いとして, 暑熱曝露の期間が影響していることが考えられる. 先行研究は暑熱曝露を短時間のみ行っているのに対して, 本研究では長期間暑熱曝露を行うことにより暑熱順化に至っている. つまり, 暑熱順化が新奇環境における不安を低減させる可能性が示唆される. しかしながら, 本研究の結果のみで結論づけることは難しいため, 将来的に暑熱順化に伴う認知行動や記憶に変化が生じるかどうか, 高架式十字迷路やモリス水迷路などの行動テストを複数行い, ラットの行動の変化を調べていく必要がある.

通常環境の OFT においては, 暑熱曝露期間により不安様行動が異なる変化を示した. 暑熱曝露を 3 時間, 14 日, 28 日行った群は通常群と比較して毛繕い時間が有意に長くなった. 通常環境下での毛繕い行動はストレス対処行動の方法であることが先行研究より示されている(Spruijt et al., 1992). 従って, 暑熱曝露がラットのストレス対処行動を促進させる可能性が考えられる. また, 先行研究において前頭前野における 5-HT の減少が DA システムを活性化させ, 毛繕い時間を延長させることが報告されている(Puglisi-Allegra & Andolina, 2015). 私たちのこれまでの研究において, 3 時間, 14 日暑熱曝露することで前頭前野における 5-HT が減少し, 28 日間暑熱曝露した結果, DA が増加することを報告している(Nakagawa et al., 2016). この結果から, 暑熱曝露が前頭前野における 5-HT と DA に影響を及ぼした結果, ストレス対処行動である毛繕い時間が増加したと考えられる.

探索行動の指標として考えられる中央滞在時間は(Zimcikova et al., 2017), 3 時間暑熱曝露群で通常群より有意に増加した. 私たちのこれまでの研究結果から, 線条体における NA が 3 時間曝露群において有意に増加することを明らかにしている(Nakagawa et al., 2016). また, 線条体への NA の投与がラットの有害な温度刺激に対する抗侵害受容の効果を与えることが明らかとなっている(Zhang et al., 2010a,b). これらの結果から, 3 時間暑熱曝露ラットは NA を増加させることで抗侵害受容を高め, 探索行動を増加させる可能性が示唆された.

また, 28 日間暑熱曝露群において, 中央環境下での OFT で立ち上がり回数と中央滞在時間が有意に増加した. 更に, 14 日, 28 日間暑熱曝露を行った群において, 中央進入回数, 中央行動回数が増加する傾向が見られた. 私たちの先行研究から, 28 日間暑熱曝露を行ったラットは, 海馬における NA, DA, 5-HT の含有量が増加する結果となった(Nakagawa et

al., 2016). 慢性的ストレスを与えられたラットに 5-HT 再取り込み抑制剤を投与した際には, OFT 中における立ち上がり回数が増加することが報告されている (Matchkov et al., 2015). また, Płaźnik et al. (1983) は, 海馬内への NA 投与がオープンフィールドにおける探索活動を増加させることを報告している. 更に, Li et al. (2018) は海馬内の DA がオープンフィールドの立ち上がり行動に影響していることを報告し, Tu et al. (2014) は腹側海馬における 5-HT が高架式十字迷路における不安様行動に対して重要な役割を担っていることを報告している. これらの知見をまとめると, 28 日間暑熱曝露群の立ち上がり回数の増加は, 暑熱順化に伴う海馬のモノアミンの増加に起因し, 不安様行動の減少につながっていることが考えられる.

本研究において, 異なる期間暑熱曝露を行ったラットが異なる温度環境における不安様行動の測定を行った. その結果, 暑熱曝露によりオープンフィールドにおける不安様行動が影響を受けることが明らかとなった. これらの実験結果は, 暑熱順化が気候変動による不安などを含んだ脳機能への悪影響を抑制することにつながると考えられる. しかしながら, 本実験では OFT のみ行っており, また, 実験デザインもカウンターバランスで行っていない. 先行研究においては 1 回目と 2 回目の OFT における行動に有意な差は認められないとしているものの (Golozoubova et al., 2014), 実験の繰り返しによる影響がなかったと言い切ることにはできない. 将来的な研究においては高架式十字迷路などを含んだ複数の実験を元にカウンターバランスデザインで実験を行い, 暑熱順化に伴う行動の変化を測定することがより望まれる.

## 引用文献

- Argaud, L., Ferry, T., Le, Q.H., Marfisi, A., Ciorba, D., Achache, P., Ducluzeau, R., Robert, D., 2007. Short- and long-term outcomes of heatstroke following the 2003 heat wave in Lyon, France. *Arch. Intern. Med.* 167, 2177–2183. <https://doi.org/10.1001/archinte.167.20.ioi70147>.
- Chiesa, S.T., Trangmar, S.J., González-Alonso, J., 1985. Temperature and blood flow distribution in the human leg during passive heat stress. *J. Appl. Physiol.* 120 (9), 1047–1058. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00965.2015>.
- Clark, W.G., Lipton, J.M., 1985. Changes in body temperature after administration of amino acids, peptides, dopamine, neuroleptics and related agents: II. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9, 299–371. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(85\)90052-1](https://doi.org/10.1016/0149-7634(85)90052-1).
- Clark, W.G., Lipton, J.M., 1986. Changes in body temperature after administration of adrenergic and serotonergic agents and related drugs including antidepressants: II. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 10, 153–220. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(86\)90025-4](https://doi.org/10.1016/0149-7634(86)90025-4).
- Demicka, A., Caputa, M., 1993. Effect of warm rearing on the development of thermolytic effectors in rats. *J. Therm. Biol.* 18 (4), 251–256. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(93\)90010-q](https://doi.org/10.1016/0306-4565(93)90010-q).
- Demicka, A., Caputa, M., 1993. Different effects of warm rearing and heat acclimation on the development of cutaneous arteriovenous anastomoses in rats. *J. Therm. Biol.* 18 (4), 257–262. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(93\)90011-h](https://doi.org/10.1016/0306-4565(93)90011-h).
- De Noronha, S.R., Campos, G.V., Abreu, A.R., De Souza, A.A., Chianca Jr., D.A., De Menezes, R.C., 2017. High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. *Behav. Brain Res.* 1 (316), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.042>.
- Gaoua, N., Grantham, J., Racinais, S., Massiou, F., 2012. Sensory displeasure reduces complex cognitive performance in the heat. *J. Environ. Psychol.* 32, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.jenvp.2012.01.002>.
- Golozoubova, V., Brodersen, T.K., Klastrup, S., Oksama, M., Løgsted, J., Makin, A., 2014. Repeated measurements of motor activity in rats in long-term toxicity studies. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 70 (3), 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.06.007>.
- Gruene, T.M., Lipps, J., Rey, C.D., Bouck, A., Shansky, R.M., 2014. Heat exposure in female rats elicits abnormal fear expression and cellular changes in prefrontal cortex and hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 115, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.05.004>.
- Hall, C.S., 1934. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp. Psychol.* 18, 385–403. <https://doi.org/10.1037/h0075811>.

[doi.org/10.1037/h0071444](https://doi.org/10.1037/h0071444).

- Hainsworth, F.R., 1967. Saliva spreading, activity, and body temperature regulation in the rat. *Am. J. Physiol.* 212, 1288–1292. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1967.212.6.1288>.
- Horowitz, M., Argov, D., Mizrahi, R., 1983. Interrelationships between heat acclimation and salivary cooling mechanism in conscious rats. *Biochem. Physiol.* 74A, 945–949. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(83\)90374-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(83)90374-2).
- Ishiwata, T., Greenwood, B.N., 2018. Changes in thermoregulation and monoamine release in freely moving rats during cold exposure and inhibition of the ventromedial, dorsomedial, or posterior hypothalamus. *J. Comp. Physiol. B.* 188 (3), 541–551. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1130-5>.
- Jahng, J.W., Kim, N.Y., Ryu, V., Yoo, S.B., Kim, B.T., Kang, D.W., Lee, J.H., 2008. Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 581 (1-2), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.029>.
- Li, L., Kang, Y.X., Ji, X.M., Li, Y.K., Li, S.C., Zhang, X.J., Cui, H.X., Shi, G.M., 2018. Finasteride inhibited brain dopaminergic system and open-field behaviors in adolescent male rats. *CNS Neurosci. Ther.* 24 (2), 115–125. <https://doi.org/10.1111/cns.12781>.
- Martinez, R.C., Garcia, A.M., Lamprea, M.R., Morato, S., 2007. Thermal stress decreases general motor activity of rats in the elevated plus-maze but does not alter aversion to the open arms. *Behav. Brain Res.* 182 (1), 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.04.015>.
- Matchkov, V.V., Kravtsova, V.V., Wiborg, O., Aalkjaer, C., Bouzinova, V.E., 2015. Chronic selective serotonin reuptake inhibition modulates endothelial dysfunction and oxidative state in rat chronic mild stress model of depression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 309, R814–R823. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00337.2014>.
- Mete, F., Kilic, E., Somay, A., Yilmaz, B., 2012. Effects of heat stress on endocrine functions & behaviour in the pre-pubertal rat. *Indian. J. Med. Res.* 135, 233.
- Michel, V., Peinnequin, A., Alonso, A., Fidler, N., Maury, R., Drouet, J.B., Buguet, A., Cespuoglio, R., Canini, F., 2010. The relationship between locomotion and heat tolerance in heat exposed rats. *Behav. Brain Res.* 211 (1), 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.006>.
- Nakagawa, H., Matsumura, T., Suzuki, K., Ninomiya, C., Ishiwata, T., 2016. Changes of brain monoamine levels and physiological indexes during heat acclimation in rats. *J. Therm. Biol.* 58, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.03.010>.
- Plaźnik, A., Danysz, W., Kostowski, W., 1983. Some behavioral effects of microinjections of noradrenaline and serotonin into the hippocampus of the rat. *Physiol. Behav.* 31 (5), 625–631. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(85\)90037-x](https://doi.org/10.1016/0031-9384(85)90037-x).

- Puglisi-Allegra, S., Andolina, D., 2015. Serotonin and stress coping. *Behav. Brain Res.* 277, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.052>.
- Racinais, S., Gaoua, N., Grantham, J., 2008. Hyperthermia impairs short-term memory and peripheral motor drive transmission. *J. Physiol.* 586, 4751–4762. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.157420>.
- Roberts, W.W., Mooney, R.D., Martin, J.R., 1974. Thermoregulatory behaviors of laboratory rodents. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86, 693–699.
- Rossati, A., 2017. Global warming and its health impact. *Int. J. Occup. Environ. Med.* 8 (1), 7–20. <https://doi.org/10.15171/ijocem.2017.963>.
- Sareh, H., Tulapurkar, M.E., Shah, N.G., Singh, I.S., 2011. Hasday JD. Response of mice to continuous 5-day passive hyperthermia resembles human heat acclimation. *Cell Stress Chaperones* 16 (3), 297–307. <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0240-8>.
- Shido, O., Sakurada, S., Kohda, W., Nagasaka, T., 1994. Day-night changes of body temperature and feeding activity in heat-acclimated rats. *Physiol. Behav.* 55 (5), 935–939. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90082-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90082-5).
- Shido, O., Matsuzaki, K., Katakura, M., 2018. Neurogenesis in the thermoregulatory system. *Handb. Clin. Neurol.* 156, 457–463. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00028-X>.
- Spruijt, B.M., Van Hooff, J.A., Gispen, W.H., 1992. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol. Rev.* 72 (3), 825–852. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.3.825>.
- Tu, W., Cook, A., Scholl, J.L., Mears, M., Watt, M.J., Renner, K.J., Forster, G.L., 2014. Serotonin in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behavior during amphetamine withdrawal. *Neuroscience* 281, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.019>.
- Veening, J.G., Bouwknecht, J.A., Joosten, H.J., Dederen, P.J., Zethof, T.J., Groenink, L., Van der Gugten, J., Olivier, B., 2004. Stress-induced hyperthermia in the mouse: c-fos expression, corticosterone and temperature changes. *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 699–707. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.05.007>.
- Zhang, N., Bi, S., 2018. Effects of physical exercise on food intake and body weight: role of dorsomedial hypothalamic signaling. *Physiol. Behav.* 192, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.03.018>.
- Zhang, G.W., Yang, C.X., Zhang, D., Gao, H.E., Zhang, Y., Jiao, R.S., Zhang, H., Liang, Y., Xu, M.Y., 2010. Noradrenergic mechanism involved in the nociceptive modulation of nociceptive-related neurons in the caudate putamen. *Neurosci. Lett.* 480 (1), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.003>.
- Zhang, G.W., Yang, C.X., Gao, H.R., Zhang, D., Zhang, Y., Jiao, R.S., Zhang, H., Liang, Y., Xu, M.Y., 2010. Microinjection of different doses of norepinephrine into the caudate putamen



produces opposing effects in rats. *Neurosci. Lett.* 471 (2), 125–128. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.01.025>.

Zimcikova, E., Simko, J., Karesova, I., Kremlacek, J., Malakova, J., 2017. Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: are the effects on mood and behavior detectable in open-field test? *Seizure* 52, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2017.09.015>.

## 第4章 暑熱順化に伴うラットの視索前野と海馬における脳内モノアミンと生理指標の即時的測定

### ～マイクロダイアリシス法を用いた検討～

#### 第1節 背景

近年の気候変化の影響により、過酷な暑熱環境での生活を強いられる機会が増えており、今後も更に暑熱環境が過酷になることが見込まれている (Argaud et al., 2007) . 暑熱環境に長時間曝されることにより、熱中症に罹ってしまい、最悪の場合死に至る可能性がある (Singh et al., 2013) . 暑熱環境下においては、冷たい水を飲むことや日陰に移動して身体を休めるなどの行動性体温調節と、発汗や皮膚血管拡張など自律性体温調節により深部体温の上昇を抑制する (Tan & Knight, 2016; Tansey & Johnson, 2015) . そして、暑熱環境下に長期間曝されることにより暑熱環境に適応する生理的適応を見せる。この適応を暑熱順化という (Matthew, 1997; Wendt et al., 2007) . 暑熱順化が生じると、深部体温の低下や発汗能力や唾液分泌能力の向上などの生理的变化が生じる (Buono et al., 2009, 1998; Horowitz et al., 1983; Shido et al., 2018) .

これらの体温調節機能は脳内で調節されており、特に視床下部における視索前野 (PO) が重要な役割を担っている (Hasegawa et al., 2008; Takatsu et al., 2010) . そして、視床下部におけるノルアドレナリン (NA) やドーパミン (DA) , セロトニン (5-HT) などのモノアミンが調節に関わっており、これらの物質が増減することで体温調節を行っている (Hasegawa et al., 2008 ; Ishiwata et al., 2004 ; Rodrigues et al., 2009) . 私たちはこれまでに、暑熱曝露を様々な期間行ったラットの生理指標と脳内モノアミン含有量の変化について報告した (Nakagawa et al., 2016) . 結果として、暑熱順化は暑熱曝露開始後、約2週間で生じることが判明した。POにおけるモノアミンは中期の暑熱曝露において5-HTの含有量が減少するが、暑熱順化が生じると5-HTの含有量が回復し、DAの含有量が増加した。これらのことから、暑熱順化に伴いPOにおけるモノアミンの含有量が増加し、体温調節機能に影響を与えていることが考えられる。また、暑熱順化したラットを新奇環境下に離した際の行動の変化を調べた結果、暑熱順化したラットは暑熱環境下における毛繕い時間の延長が見られなくなる結果が得られた (Nakagawa et al., 2020) . このことから、暑熱順化により熱放散の増加が起こり、暑熱環境下における過度な体温上昇を抑制していることが考えられる。

一方、脳内において記憶や行動には、海馬 (Hip) が重要な役割を担っている (Chauhan et al., 2020; Liu et al., 2019) . 暑熱曝露により深部体温の過度な上昇が生じると、認知機能や記憶能力の低下など脳機能に悪影響が起こることが示されている (Chauhan et al., 2020; Yeghiayan et al., 2004) . そして、Hipにおけるモノアミンの含有量が増加することにより、行動に変化が起こることが先行研究により示されている (Lieberman et al., 2005) . 私たちのこれまでの研究で、様々な期間暑熱曝露を行ったラ

ットの Hip におけるモノアミンの変化を調べたところ、短期間、中期間の暑熱曝露ではモノアミン含有量に変化が認められなかったが、長期間暑熱曝露を行うことによりモノアミン含有量が増加することが明らかとなった (Nakagawa et al., 2016) . そして、オープンフィールド中の立ち上がり回数の増加などの行動の変化が生じることが明らかとなった (Nakagawa et al., 2020). これらのことから、暑熱順化が生じることにより Hip における脳内モノアミン含有量の変化が起り、身体活動の変化が起きたと考えられる。

これらの脳内モノアミンは、暑熱曝露により即時的に変化が生じることが明らかとなっている (Hasegawa et al., 2008; Ishiwata et al., 2017; Takatsu et al., 2010) . しかしながら、暑熱順化が生じたラットが暑熱曝露された際の脳内モノアミン放出量の即時的な変化については明らかとなっていない。そこで本研究では暑熱順化したラットの PO と Hip における脳内モノアミン放出量と生理指標の即時的変化を調べることを目的に実験を行った。

## 第2節 方法

雄の Wistar 系ラットを 24 匹用いて実験を行った。ラットは実験室に搬入後、3 種混合麻酔(メドミジン, ミダゾラム, ブトルファノール)(2.5mg/kg)により麻酔をかけた後、腹部を開き、無線式小型体温計(TA11TA-F40, Data science, USA)を埋め込んだ。埋め込んだ無線式小型体温計で深部体温、心拍数、活動量の測定を継時的に行った。1 週間の回復期間を設けた後、ラットを無作為に 2 群に分類し、それぞれ通常環境下 (気温 23°C, 湿度 50% : 通常群 12 匹) , もしくは暑熱環境下 (気温 32°C, 湿度 50% : 順化群 12 匹) で 28 日間飼育を行った。飼育期間中には体重、摂餌量、飲水量を 4 日毎に測定した。飼育期間中は 12h:12h の明暗サイクルとして、水と餌の摂取は自由とした。なお、本実験は大学のライフサイエンスに係る研究・実験及び安全委員会より承認を受けて行った(承認番号 : LS18029A, LS20015A)。

飼育期間終了後、マイクロダイアリスプローブ挿入用のガイドカニューラ (CXG-10 (PO 用) , CXG-4 (Hip 用) , Eicom, Japan) を脳内に埋め込む手術を行った。ガイドカニューラの手術は、先ずラットに 3 種混合麻酔(メドミジン, ミダゾラム, ブトルファノール)(2.5mg/kg)をかけた後、ガイドカニューラの挿入箇所となる頭部の体毛をバリカンにて刈り、消毒液でラットの頭部を消毒した。ラットを脳固定装置に装着した後、頭頂部の皮膚を約 1cm 切開し、頭頂骨を露出させた。露出した頭頂骨が見えるように皮膚をクリップで左右に広げ、ガイドカニューラの挿入位置に印をつけた。その後、直径 1mm ほどの穴を頭頂骨に開けた。穴の両側にガイドカニューラを固定するためのアンカー用の穴を開け、2 本のビスを骨に固定した。ガイドカニューラ挿入部位の硬膜を注射針で血管を切らないように注意しながら切った後、ガイドカニューラを挿入し、ガイドカニューラをデンタルセメントにて固定した。切開した皮膚を接合し、ラットをケージに戻した。

2 日以上回復期間の後、実験当日にイソフルランにて気化麻酔をかけた後、マイクロダイアリスプローブ (CX-I-10-1 (PO 用), CX-I-4-1 (Hip 用), Eicom, Japan) を PO (ブレグマから前後-0.5 mm; 左右, + 0.3 mm; 硬膜から深さ, -8.4 mm) (通常群 6 匹, 順化群 6 匹), Hip (ブレグマから前後-4.0 mm; 左右, + 2.0 mm; 硬膜から深さ, -3.0 mm) (通常群 6 匹, 順化群 6 匹) に挿入を行った。マイクロダイアリスプローブの挿入後、ラットの尾部にデータロガー式体温計 (TSDL-HT3, TECHNO NEXT, Japan) を装着し、熱放散の指標となる尾部皮膚温の測定を行った。測定機器の装着後、プローブにテフロンチューブを繋げ、シリンジポンプ (ESP-64, Eicom, Japan) にて毎分 1  $\mu$ l の流速でリンゲル液 (147 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.3 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.0) を灌流させた。ラットの各脳部位から脳内モノアミンを回収したリンゲル液は、on-line 高速液体クロマトグラフィー (HPLC, ECD-500 system, Eicom, Japan) を用いて 20  $\mu$ l 毎に分析した。カラムは EICOMPAK CAX (2.0mm id  $\times$  200 mm, Eicom, Japan) を使用した。

脳内モノアミンの測定条件は気温 23°C, 湿度 50% のコントロール条件で 1 時間ベースラインを取得した後、気温 32°C, 湿度 50% の暑熱環境で 3 時間測定し、その後回復期として 2 時間、気温 23°C, 湿度 50% の環境で測定を行った。実験終了後、脳内のプローブの先端の部分を標識するためにプロモフェノールブルーにて染色を行った。染色後、脳を摘出し、ホルマリンで固定し、厚さ 100  $\mu$ m の切片をマイクロスライサー (PRO7, DOSAKA EM, Japan) にて作成し、プローブの挿入位置を確認した (図 8)。本研究では、プローブの挿入位置が目的の部位に挿入されていたラットのデータのみを比較した。

統計処理は飼育期間中の体重、摂餌量、飲水量の変化とマイクロダイアリスによる脳内モノアミンの測定中の深部体温、心拍数、活動量、尾部皮膚温の変化と NA, DA, 5-HT の各部位における放出量の変化について、それぞれ時間経過における値の比較を二元配置分散分析にて比較を行い、交互作用及び主効果が有意であった場合には、その後の検定としてフィッシャーの最小有意差法を用い、 $p < 0.05$  を統計的有意水準とした。

### 第 3 節 結果

飼育期間中の体重、摂餌量、飲水量の変化を図 9 に記す。ラットの体重について、飼育期間 ( $F[7, 70] = 645.55$ ,  $p < 0.001$ ) と条件間 ( $F[1, 10] = 31.69$ ,  $p < 0.001$ ) の主効果が認められ、飼育期間と条件による交互作用が認められた ( $F[7, 70] = 41.80$ ,  $p < 0.001$ )。多重比較の結果、飼育開始 4 日以降で暑熱曝露をすることにより体重が有意に減少する結果となった。飼育期間中における摂餌量は飼育期間 ( $F[6, 60] = 3.82$ ,  $p < 0.01$ ) と条件間 ( $F[1, 10] = 119.48$ ,  $p < 0.001$ ) の主効果が認められ、飼育期間と条件による交互作用 ( $F[6, 60] = 8.18$ ,  $p < 0.001$ ) が認められた。多重比較の結果、飼育日数に伴い、通常群の摂餌量は飼育開始時と比較して増加したが、暑熱順化群では飼育期間の中盤で飼育開始時の摂餌量と比較して有意に減少した。そして、全ての測定時において暑熱順化群の摂餌量が通常群よりも有意に少ない結果となった。飲水量は飼育期間 ( $F[6, 48] = 4.29$ ,

$p < 0.01$ ) と条件間 ( $F[1, 8] = 147.24$ ,  $p < 0.001$ ) の主効果が認められ、飼育期間と条件による交互作用 ( $F[6, 48] = 2.60$ ,  $p < 0.05$ ) が認められた。多重比較の結果、通常群においては飼育開始時と比較して飼育 16 日以降で有意に飲水量が増加したが、暑熱順化群では飼育開始時と比較して 8 日、12 日時点でのみ有意な増加が認められた。また、全ての飼育期間で暑熱順化群が通常群よりも有意に飲水量が多かった。

マイクロダイアリス実験時における生理指標の変化を図 10 に記す。まず、深部体温の変化について暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 255] = 49.07$ ,  $p < 0.001$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 17] = 4.14$ ,  $p > 0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 255] = 0.44$ ,  $p > 0.05$ ) は認められなかった。多重比較の結果、暑熱順化群では暑熱曝露開始後に有意な深部体温の低下が認められた。その後、両群で暑熱曝露により有意な上昇を見せ、回復期において再び有意な低下を示した。一方、熱放散の指標となる尾部皮膚温は暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 210] = 87.49$ ,  $p < 0.001$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 14] = 1.92$ ,  $p > 0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 210] = 0.59$ ,  $p > 0.05$ ) は認められなかった。多重比較の結果、両群で暑熱曝露により有意な上昇を見せ、回復期の前半まで有意に高い値となった。心拍数は暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 240] = 6.89$ ,  $p < 0.001$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 16] = 2.33$ ,  $p > 0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 240] = 2.75$ ,  $p < 0.001$ ) は認められた。多重比較の結果、暑熱順化群において、暑熱曝露後有意な低下を見せ、一度暑熱曝露前の水準に戻るが暑熱曝露後半から再び有意な低下を見せ、回復期の後半に暑熱曝露前水準に戻った。通常群は暑熱曝露前半に心拍数の低下が起こり、中盤以降に暑熱曝露前水準に戻り、回復期においても同様の変化を示した。活動量において暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 255] = 5.58$ ,  $p < 0.001$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 17] = 1.24$ ,  $p > 0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 255] = 1.81$ ,  $p < 0.001$ ) は認められた。多重比較の結果、暑熱曝露により通常群では暑熱曝露前と比較して有意に活動量が増加する時間帯が複数あったが、暑熱順化群では一つの時間帯のみであった。

マイクロダイアリス実験時における生理指標の変化量を図 11 に記す。まず、深部体温の変化量について暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 255] = 49.065$ ,  $p < 0.001$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 17] = 1.398$ ,  $p > 0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 255] = 0.438$ ,  $p > 0.05$ ) は認められなかった。多重比較の結果、暑熱順化群では暑熱曝露開始後に有意な深部体温の低下が認められた。その後、両群で暑熱曝露により有意な上昇を見せ、暑熱順化群は緩やかな上昇を見せた。回復期において暑熱順化群が早期に曝露前と有意差が認められなくなるまで変化量は低下し、後半には曝露前よりも有意な低下を再び示した。一方、熱放散の指標となる尾部皮膚温の変化量は暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 240] = 26.287$ ,

$p < 0.001$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 16] = 0.343, p > 0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 240] = 0.082, p > 0.05$ ) は認められなかった。多重比較の結果、両群で暑熱曝露により有意な上昇を見せ、回復期の前半まで有意に高い値となった。暑熱順化群は回復期においてより早く曝露前と同等の水準に回復した。熱産生の指標となる心拍数の変化量は暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 240] = 6.893, p < 0.001$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 16] = 0.290, p > 0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 240] = 2.753, p < 0.001$ ) は認められた。多重比較の結果、暑熱順化群は暑熱曝露によって心拍数は有意な低下を見せ、回復期に至るまで低い値となった。一方通常群は暑熱曝露前半に心拍数の低下が起こったが、中盤以降に暑熱曝露前水準に戻り、回復期において再び低下を示した。活動量の変化量は暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 255] = 5.577, p < 0.001$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 17] = 0.007, p > 0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 255] = 1.809, p < 0.05$ ) は認められた。多重比較の結果、暑熱曝露により通常群では暑熱曝露前と比較して有意に活動量が増加する時間帯が複数あったが、暑熱順化群では一つの時間帯のみであった。

PO における脳内モノアミンの変化を図 12 に記す。まず PO における NA の放出量は暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 90] = 10.93, p < 0.001$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 16] = 0.003, p > 0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 90] = 1.29, p > 0.05$ ) は認められなかった。多重比較の結果、暑熱曝露による変化は両群で認められなかったが、回復期後半に両群で有意な低下を示した。DA は暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 90] = 3.97, p < 0.001$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 16] = 2.01, p > 0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 90] = 1.53, p > 0.05$ ) は認められなかった。多重比較の結果、暑熱曝露により暑熱順化群において複数の時間帯で有意に増加したが、通常群には有意な変化は認められなかった。5-HT の放出量は暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 60] = 1.87, p < 0.01$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 4] = 0.004, p > 0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[5, 60] = 1.36, p > 0.05$ ) は認められなかった。両群で暑熱曝露前と比較して有意な増減は認められなかった。

次に Hip における脳内モノアミンの放出量の変化を図 13 に記す。まず、NA の放出量は暑熱曝露及び、回復期における時間の主効果 ( $F[15, 75] = 1.555, p > 0.05$ ) は認められず、飼育条件の主効果 ( $F[1, 5] = 1.414, p > 0.05$ ) も認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 75] = 0.665, p > 0.05$ ) は認められなかった。DA の放出量は暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 150] = 4.197, p < 0.001$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 10] = 0.419, p > 0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 150] = 0.913, p > 0.05$ ) は認められなかった。多重比較の結果、暑熱曝露により両群で有意に増加し、暑熱順化群は回復期において暑熱曝露前と同等の水準まで戻った

が、通常群は暑熱曝露前より有意に低下した。5-HT は暑熱曝露及び回復期による時間の主効果 ( $F[15, 150]=4.231, p<0.001$ ) が認められたが、飼育条件の主効果 ( $F[1, 10]=1.179, p>0.05$ ) は認められなかった。そして時間と条件の交互作用 ( $F[15, 150]=0.946, p>0.05$ ) は認められなかった。多重比較の結果、暑熱曝露による有意な変化は両群で認められなかったが、回復期において両群で有意に低下する結果となった。

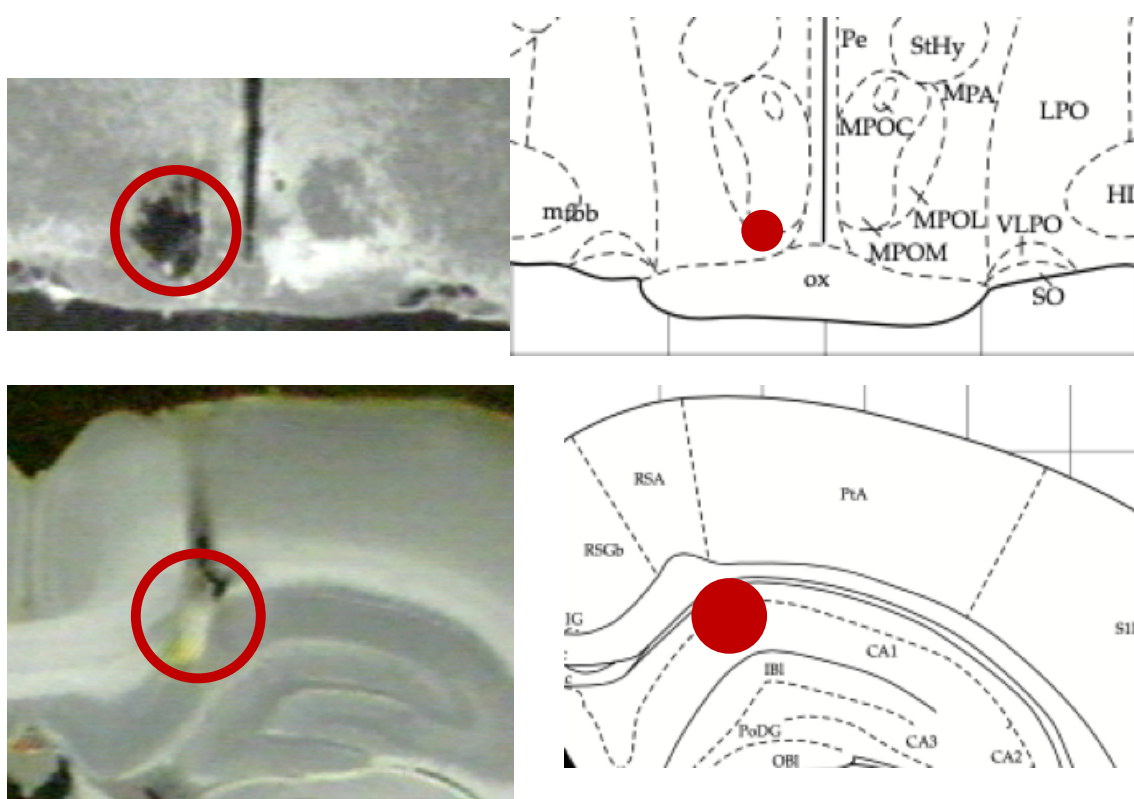


図8：視索前野及び海馬のプローブ挿入位置及び脳地図

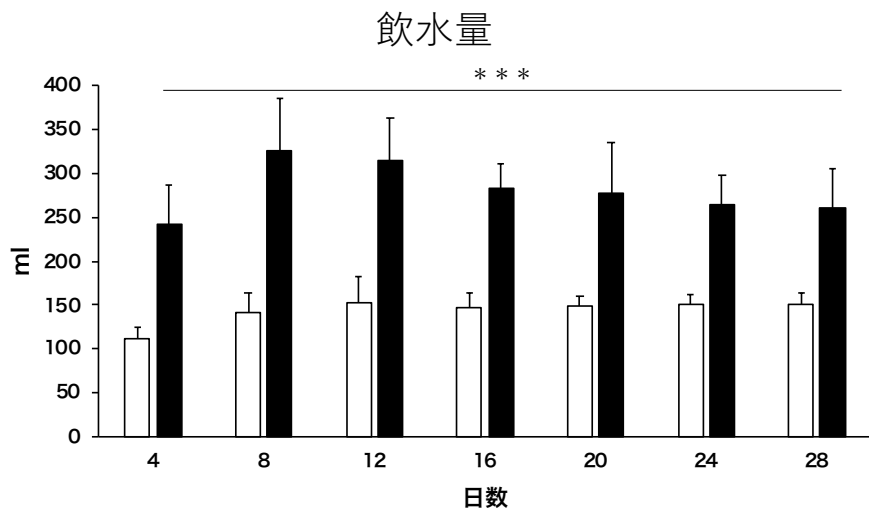
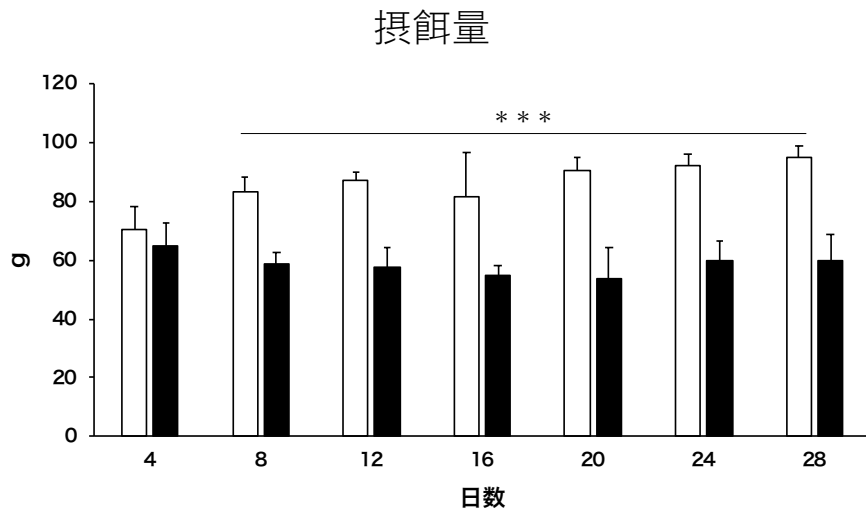
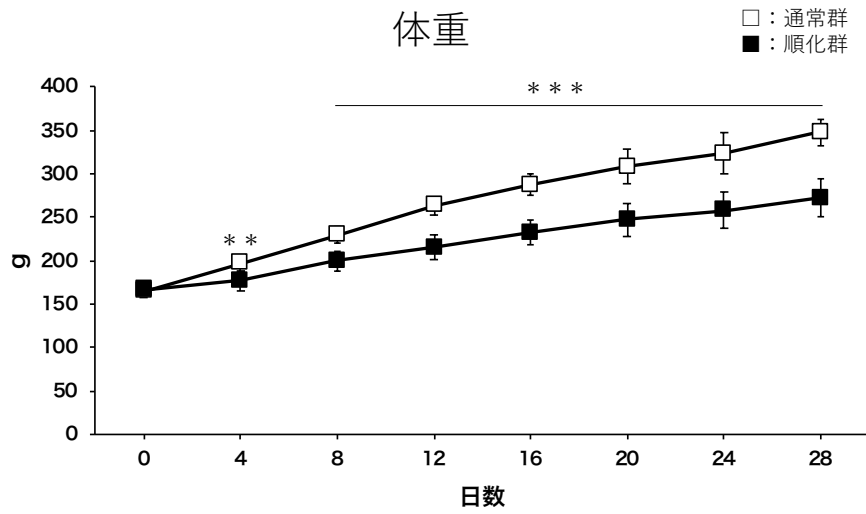


図9：飼育時における体重，摂餌量，飲水量の変化。平均値±標準偏差  
 \*\*  $p < 0.01$ ，\*\*\*  $p < 0.001$  通常群 vs 順化群



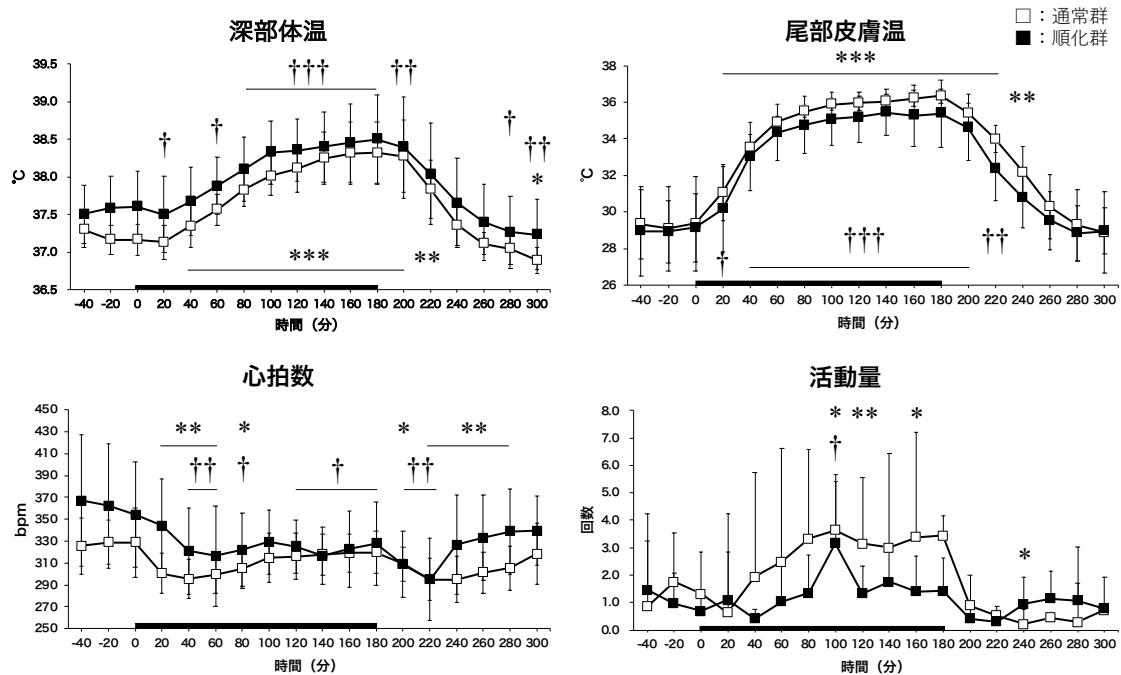


図9：測定時における深部体温，心拍数，活動量，尾部皮膚温の変化。  
 平均値±標準偏差。 \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs 通常群曝露前  
 † p<0.05, †† p<0.01, ††† p<0.001 vs 順化群曝露前

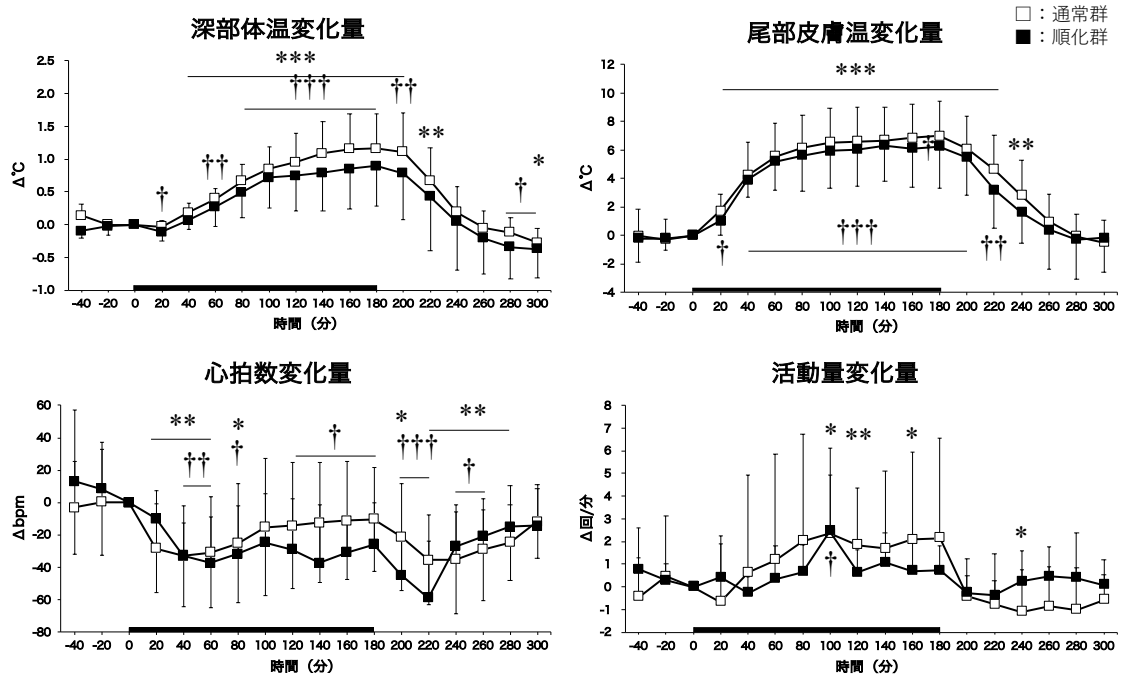


図10：測定時における深部体温，心拍数，活動量，尾部皮膚温の変化量。  
 平均値±標準偏差。 \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs 通常群曝露前  
 † p<0.05, †† p<0.01, ††† p<0.001 vs 順化群曝露前

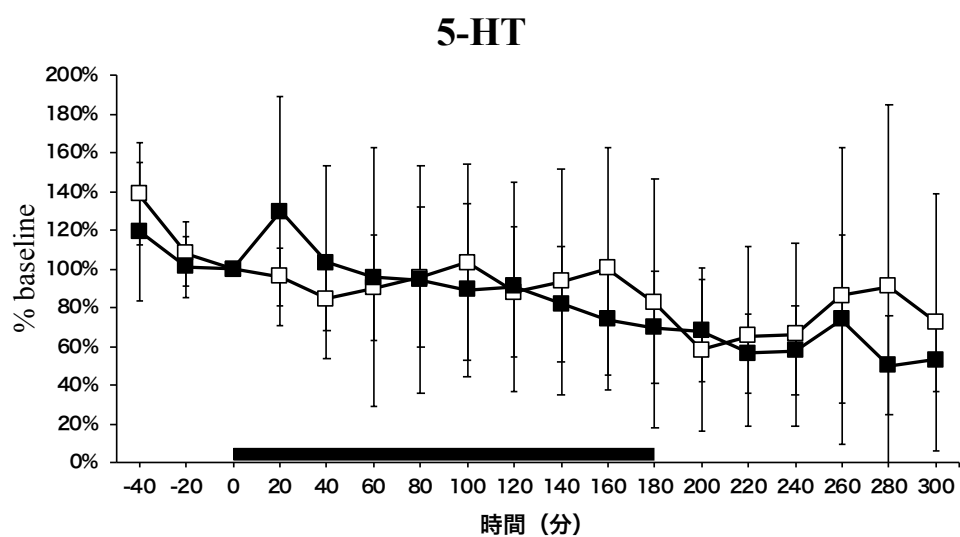
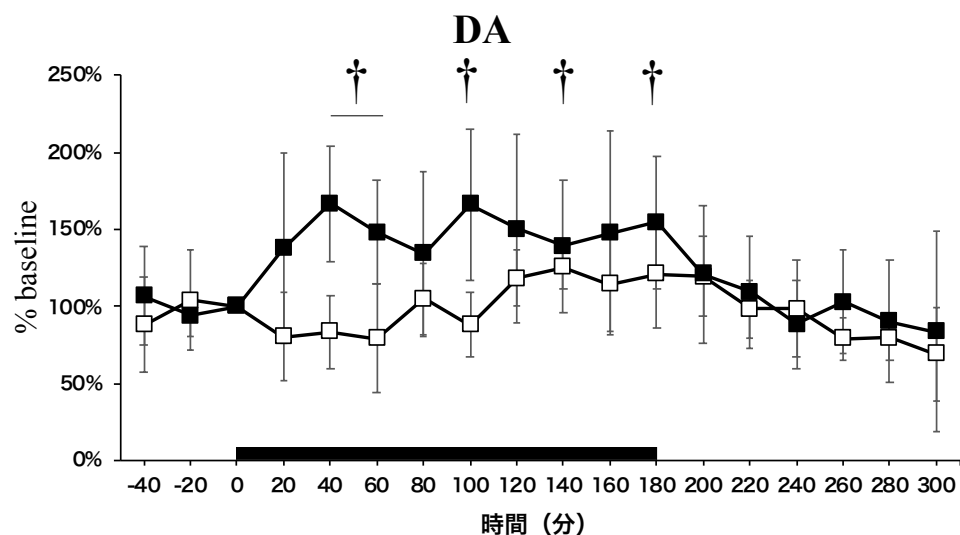
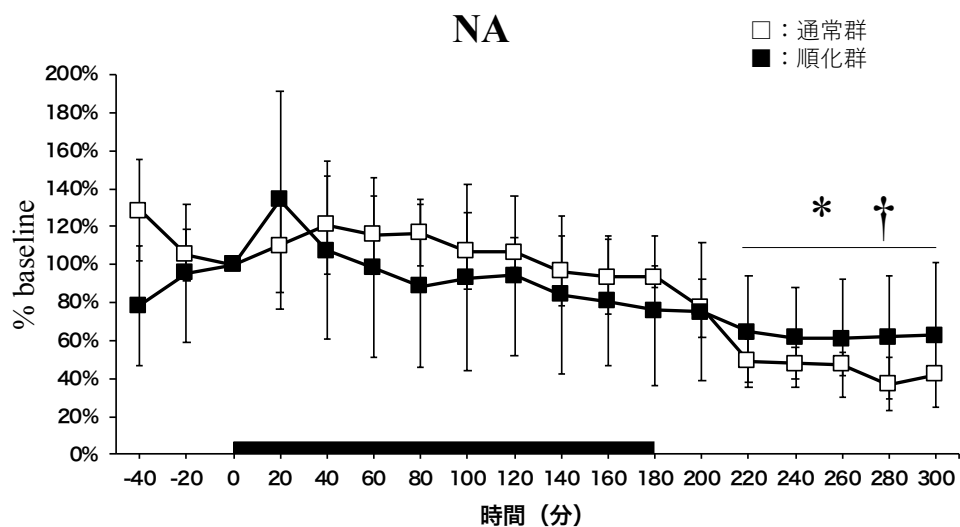


図11：視索前野におけるNA, DA, 5-HTの変化。平均値±標準偏差  
\* p<0.05 vs 通常群曝露前, † p<0.05 vs 順化群曝露前

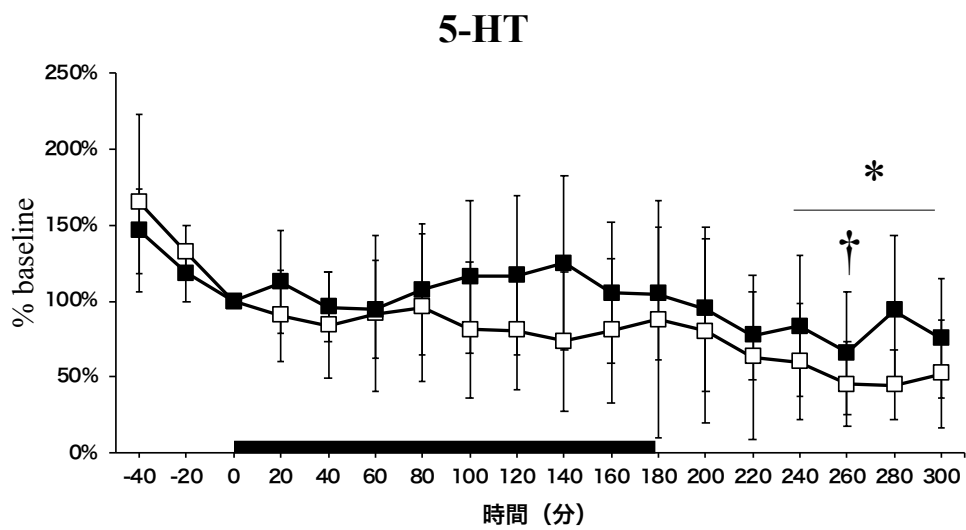
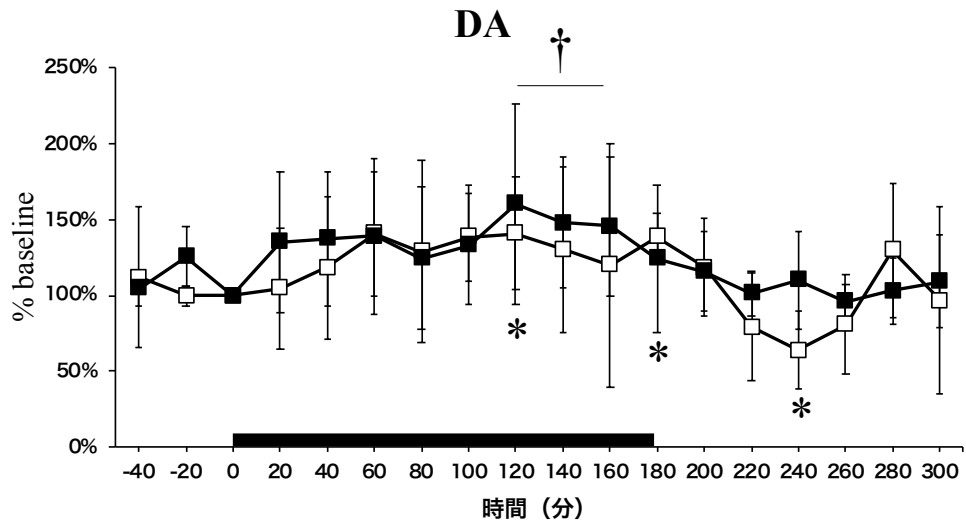
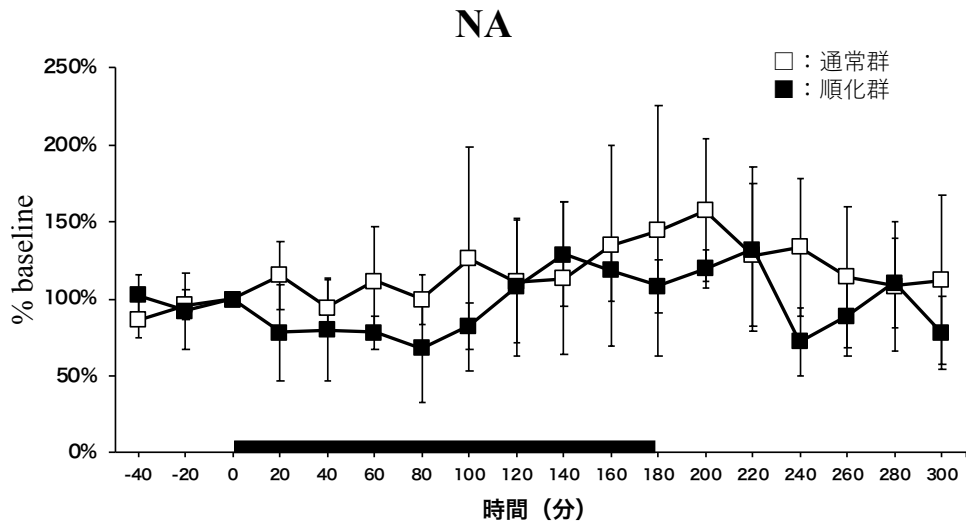


図12：海馬におけるNA, DA, 5-HTの変化。平均値±標準偏差  
 \* p<0.05 vs 通常群曝露前, † p<0.05 vs 順化群曝露前

#### 第4項 考察

本研究において、暑熱順化によるラットの暑熱曝露による脳内モノアミンの変化と生理指標の変化を測定した。重要な知見として、長時間の暑熱曝露により暑熱順化が生じているにも関わらず、暑熱曝露中の深部体温と尾部皮膚温は群間に差が見られなかったが、暑熱曝露による深部体温の変化量が暑熱順化することによって緩やかになったことが挙げられる。そして、脳内モノアミンの変化について、POにおいて暑熱順化群のみ暑熱曝露期間においてDAの有意な増加を示した。Hipにおいて両群でDAは暑熱曝露により増加が見られたが、通常群は回復期に有意な低下を示した。そして5-HTは両群において回復期に有意な減少を示した。

一般的に、暑熱順化が生じると深部体温の低下が生じることが先行研究より示されている(Shido et al., 1994)。しかしながら、本研究において深部体温は通常群と暑熱順化群とで有意差は認められなかったが、暑熱順化群で高い値を示した。この結果の要因として、先ず気温23°Cの環境はラットの温熱中立帯と比較して低い温度であるため(Gordon, 1990; Maloney et al., 2014)、暑熱順化したラットは気温23°Cの環境が寒く感じていることが考えられる。これは暑熱曝露前や回復期において、熱産生の指標となる心拍数(Chambers et al., 2000; Hasegawa et al., 2005; Ishiwata et al., 2005)が、暑熱順化群で高い値を保っており、熱産生が増加していることが窺える。そのため、暑熱順化ラットは通常環境においては熱産生を増加させ、深部体温を上昇させている可能性が考えられる。一方深部体温の変化量は暑熱順化することによって上昇が緩やかになるという結果が得られた。この変化が暑熱順化による暑熱環境での優位性を示していることが考えられる。

次に、尾部皮膚温は暑熱曝露により両群ともに有意な上昇を示し、回復期の序盤においても高い値となった。尾部皮膚温の変化量も同様の变化を示したが、暑熱順化することで回復期の上昇が早く見られなくなった。ラットは尾部血管を拡張させることにより熱放散を行っていることが示されており(Aydin et al., 2011; Hasegawa et al., 2008; Zheng et al., 2018)、本研究でも先行研究と同様の反応を見せた。心拍数は暑熱曝露により両群ともに有意に減少した。また、前述の様に心拍数は熱産生の指標となるため、暑熱曝露中に心拍数を低下させることで熱産生を低下させ、過度な深部体温の上昇を防いでいることが考えられる。特に暑熱順化することで暑熱曝露中の心拍数は低く変化を続けた。このことから暑熱順化することで暑熱曝露中の熱産生を低下させ続けていることが考えられる。また、回復期においても、心拍数は低い値となっており、これは通常環境に戻った際にも熱産生を抑制して深部体温を早急に通常状態に戻すための反応であると推測できる。

活動量は暑熱曝露期間において通常群で特に増加した。先行研究において、暑熱曝露を行うことにより逃避行動として自発活動量が増加することが報告されている(Michel et al., 2010)。先行研究と同様に、本研究においてもラットは暑熱環境下からの逃避行動として活動量を増加させていることが考えられる。一方で、暑熱順化群においても暑熱曝露による活動量の増加が認められたものの、通常群よりも低い値となった。一般的に、深部体温

の上昇に伴い、逃避行動としての活動量が増加することが考えられる。暑熱順化群は、深部体温が通常群と比較して高い値を示しているにもかかわらず、大幅な活動量の増加は認められなかった。この結果については、暑熱順化に伴い熱耐性を獲得したため、暑熱環境下からの逃避行動を行う必要がなかったことが考えられる。

脳内モノアミンの変化について、体温調節中枢である PO において、DA の放出量が暑熱順化群において暑熱曝露中に有意に増加した。先行研究では暑熱環境下でトレッドミル運動を行ったラットの DA が増加していることが示されており、深部体温の過度な上昇を防いでいることが報告されている (Hasegawa et al., 2008; Zheng et al., 2018)。本研究において、暑熱順化によって暑熱曝露中の深部体温の上昇率が低下しており、熱産生の指標である心拍数も低下している。このことから、PO の DA は暑熱順化することにより暑熱環境下において代謝性熱産生をより低下させている可能性が考えられる。

次に、PO における NA は回復期において両群において有意な低下を示した。先行研究において、PO の NA の放出が熱産生に関わっていることが示されている (Beckman, 1970; Veale & Whishaw, 1976)。このことから、回復期において熱産生を低下させ、暑熱曝露後の高い深部体温を通常状態まで戻すための反応である可能性が考えられる。

PO において、5-HT は暑熱曝露による影響を両群ともに受けていなかった。先行研究において、PO における 5-HT は急性の体温調節に影響を与えないことが報告されており (Ishiwata et al., 2004; Takatsu et al., 2010)、暑熱順化も同様に 5-HT は急性の体温調節機能に影響を与えないことが示唆された。

Hip において、NA は暑熱順化の有無により有意差は認められなかったが、暑熱曝露前半の放出量に差が見られた。暑熱順化することで暑熱曝露前半の NA 放出量が減少したが、通常群では微増する傾向が見られた。Płaźnik et al. (1983) は Hip に NA を投与することでオープンフィールド中の活動量が増加することを報告している。このことから、通常群の NA の増加は暑熱曝露による環境の変化に対して活動量を増加させることで環境からの逃避を行っている可能性が考えられる。そのために、通常群は暑熱曝露前半から活動量が増加している。一方で順化群では暑熱曝露前期においては NA の放出量が減少している。このことは暑熱環境に適応していることから活動量を増加させず、熱産生を増加させないための変化である可能性が考えられる。

次に、DA は暑熱曝露により両群ともに有意な増加を見せ、回復期において、暑熱順化群は暑熱曝露前と同水準に回復したが、通常群では有意な低下を示した。先行研究において、Hip における DA の含有量と記憶との関係性が報告されている (Kempadoo et al., 2016; Takeuchi et al., 2016)。このことから、暑熱曝露により Hip における DA を増加させ、環境の変化について記憶している可能性が考えられる。

また、順化群において 5-HT が、通常群において DA と 5-HT が回復期に有意な低下を生じた。この変化は回復期における身体活動を抑制させるための変化である可能性が考えられる。先行研究では、鬱様ラットにおいて Hip のモノアミン含有量が低下し、自発活動

が減少することを報告している (Khadrawy et al., 2017) . このことから、回復期において身体活動量を低下させて身体活動による熱産生を抑制している可能性が考えられる。また、Hip におけるモノアミン含有量は認知記憶と関わっていることも報告されている

(Kempadoo et al., 2016; Stancampiano et al., 1999; Takeuchi et al., 2016) . 本研究では、暑熱曝露後に DA と 5-HT の含有量が低下していることから、暑熱曝露による深部体温の上昇が Hip におけるモノアミン含有量を低下させてしまい、認知記憶能力を低下させてしまうことが考えられる。一方で、暑熱順化群では回復期におけるモノアミン放出量の減少が起こったのは一部のみであった。これらのことから、暑熱順化することにより、暑熱曝露によるモノアミンの低下を防ぎ、記憶の低下を抑制している可能性が示唆される。しかしながら、本研究においては暑熱順化によるラットの記憶について実際に測定をしていない。そのため結論づけることは難しく、今後モリス水迷路や物体認識試験、位置認識試験を用いて、暑熱順化に伴う記憶能力の変化を調べていく必要がある。

まとめると、本研究は暑熱曝露を一定期間行い、暑熱順化したラットを暑熱曝露した際の脳内モノアミンと生理指標の変化を調べた。暑熱曝露を行うことにより深部体温と尾部皮膚温は両群で有意に増加を示した。暑熱順化することで深部体温の上昇率は緩やかとなっており、このことが暑熱順化の効果であることが考えられる。心拍数は暑熱曝露により両群ともに減少し、暑熱曝露期間において暑熱順化群が通常群よりも低下する時間が増えた。活動量は暑熱曝露中盤以降で両群ともに有意な増加を示し、通常群が暑熱順化群よりも高い値を示した。また、回復期においては通常群と比較して暑熱順化群が有意に高い活動量を示しており、暑熱曝露による悪影響が排除されている可能性が考えられる。そして、脳内モノアミンは PO における暑熱曝露中における DA の有意な増加と回復期における Hip の DA と 5-HT の減少の抑制が暑熱順化により起こることが明らかとなった。これらの中枢における変化が生理指標に影響を及ぼすことで暑熱環境への順応が起こっていることが示唆された。

## 引用文献

- Argaud, L., Ferry, T., Le, Q.H., Marfisi, A., Ciorba, D., Achache, P., Ducluzeau, R., Robert, D., 2007. Short- and long-term outcomes of heatstroke following the 2003 heat wave in Lyon, France. *Arch. Intern. Med.* 167, 2177–2183.
- Aydin, C., Grace, C.E., Gordon, C.J., 2011. Effect of physical restraint on the limits of thermoregulation in telemetered rats. *Exp Physiol.* 96, 1218–1227.
- Beckman, A.L., 1970. Effect of intrahypothalamic norepinephrine on thermoregulatory responses in the rat. *Am. J. Physiol.* 218, 1596–1604.
- Buono, M. J., Martha, S. L., Heaney, J. H., 2009. Peripheral sweat gland function is improved with humid heat acclimation. *J. Therm. Biol.* 34, 127–130.
- Buono, M.J., Heaney, J.H., Canine, K.M., 1998. Acclimation to humid heat lowers resting core temperature. *Am. J. Physiol.* 274, R1295–R1299.
- Chambers, J.B., Williams, T.D., Nakamura, A., Henderson, R.P., Overton, J.M., Rashotte, M.E., 2000. Cardiovascular and metabolic responses of hypertensive and normotensive rats to one week of cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279, R1486–R1494.
- Chauhan, N.R., Kumar, R., Gupta, A., Meena, R.C., Nanda, S., Mishra, K.P., Singh, S.B., 2020. Heat Stress induced oxidative damage and perturbation in BDNF/ERK1/2/CREB axis in hippocampus impairs spatial memory. *Behav Brain Res.* 112895.
- Gordon, C. J., 1990. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol. Behav.* 47, 963–991.
- Hasegawa, H., Piacentini, M.F., Sarre, S., Michotte, Y., Ishiwata, T., Meeusen, R., 2008. Influence of brain catecholamines on the development of fatigue in exercising rats in the heat. *J Physiol.* 586, 141–149.
- Horowitz, M., Argov, D., Mizrahi, R., 1983. Inter relationships between heat acclimation and salivary cooling mechanism in conscious rats. *Biochem.Physiol.* 74A, 945–949.
- Ishiwata, T., Hasegawa, H., Greenwood, B.N., 2017. Involvement of serotonin in the ventral tegmental area in thermoregulation of freely moving rats. *Neurosci Lett.* 653, 71–77
- Ishiwata, T., Saito, T., Hasegawa, H., Yazawa, T., Kotani, Y., Otokawa, M., Aihara, Y., 2005. Changes of body temperature and thermoregulatory responses of freely moving rats during GABAergic pharmacological stimulation to the preoptic area and anterior hypothalamus in several ambient temperatures. *Brain Res.* 1048, 32–40.
- Ishiwata, T., Saito T., Hasegawa, H., Yazawa, T., Otokawa, M., Aihara, Y., 2004. Changes of body temperature and extracellular serotonin level in the preoptic area and anterior hypothalamus after thermal or serotonergic pharmacological stimulation of freely moving rats. *Life Sci.* 75, 2665–2675.

- Kempadoo, K.A., Mosharov, E.V., Choi, S.J., Sulzer, D., Kandel, E.R., 2016. Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113, 14835-14840.
- Khadrawy, Y.A., Sawie, H.G., Abdel-Salam ,O.M.E., Hosny, E.N., 2017. Cannabis exacerbates depressive symptoms in rat model induced by reserpine. *Behav Brain Res.* 324, 41–50.
- Lieberman, H.R., Georgelis, J.H., Maher, T.J., Yeghiayan, S.K., 2005. Tyrosine prevents effects of hyperthermia on behavior and increases norepinephrine. *Physiol Behav.* 84, 33–8.
- Liu, Y., Liu, J., Jiao, S.R., Liu, X., Guo, Y., Zhang, J., Yang, J., Xie, W., Wang, H.S., Zhang, L., 2019. Serotonin1A receptors in the dorsal hippocampus regulate working memory and long-term habituation in the hemiparkinsonian rats. *Behav Brain Res.* 376, 112207.
- Maloney, S. K., Fuller, A., Mitchell, D., Gordon, C., Overton, J. M., 2014. Translating animal model research: does it matter that our rodents are cold? *Physiology* 29, 413–420.
- Matthew, C. B., 1997. Heat acclimation in telemetry equipped rat. *J. Therm. Biol.* 22, 275–280.
- Michel, V., Peinnequin, A., Alonso, A., Fidier, N., Maury, R., Drouet, J.B., Buguet, A., Cespuglio, R., Canini, F., 2010. The relationship between locomotion and heat tolerance in heat exposed rats. *Behav. Brain Res.* 211, 41–47.
- Nakagawa, H., Matsumura, T., Suzuki, K., Ninomiya, C., Ishiwata, T., 2016. Changes of brain monoamine levels and physiological indexes during heat acclimation in rats. *J. Therm. Biol.* 58, 15–22.
- Nakagawa, H., Matsunaga, D., Ishiwata, T., 2020. Effect of heat acclimation on anxiety-like behavior of rats in an open field. *J Therm Biol.* 87, 102458.
- Płaźnik, A., Danysz, W., Kostowski, W., 1983. Some behavioral effects of microinjections of noradrenaline and serotonin into the hippocampus of the rat. *Physiol. Behav.* 31, 625–631.
- Rodrigues, A.G., Soares, D.D., Marubayashi, U., Coimbra, C.C. 2009. Heat loss during exercise is related to serotonin activity in the preoptic area. *Neuroreport.* 20, 804–808.
- Shido, O., Sakurada, S., Kohda, W., Nagasaka, T., 1994. Day-night changes of body temperature and feeding activity in heat-acclimated rats. *Physiol. Behav.* 55, 935–939.
- Shido, O., Matsuzaki, K., Katakura, M., 2018. Neurogenesis in the thermoregulatory system. *Handb. Clin. Neurol.* 156, 457–463.
- Singh, L. P., Kapoor, M., Singh, S. B., 2013. Heat: not black, not white. It's gray!!!. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 24, 209–224.
- Stancampiano, R., Cocco, S., Cugusi, C., Sarais, L., Fadda, F., 1999. Serotonin and acetylcholine release response in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Neuroscience.* 89, 1135-1143.



- Takatsu, S., Ishiwata, T., Meeusen, R., Sarre, S., Hasegawa, H. 2010. Serotonin release in the preoptic area and anterior hypothalamus is not involved in thermoregulation during low-intensity exercise in a warm environment. *Neurosci. Lett.* 482, 7-11.
- Takeuchi, T., Duszkievicz, A.J., Sonneborn, A., Spooner, P.A., Yamasaki, M., Watanabe, M., Smith, C.C., Fernández, G., Deisseroth, K., Greene, R.W., Morris, R.G., 2016. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature.* 537, 357-362.
- Tan, C.L., Knight, Z.A., 2018. Regulation of Body Temperature by the Nervous System. *Neuron.* 98, 31-48.
- Tansey, E.A., Johnson, C.D., Recent advances in thermoregulation. 2015. *Adv Physiol Educ*, 39, 139-48.
- Veale, W.L., Whishaw, I.Q., 1976. Body temperature responses at different ambient temperatures following injections of prostaglandin E1 and noradrenaline into the brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4, 143–150.
- Wendt, D., van Loon, L. J., Lichtenbelt, W. D., 2007. Thermoregulation during exercise in the heat. *Sports Med.* 37, 669–682.
- Yeghiayan, S.K., Georgelis, J.H., Maher, T.J., Lieberman, H.R., 2004. Beneficial effects of a protein free, high carbohydrate meal on rat coping behavior and neurotransmitter levels during heat stress. *Nutr. Neurosci.* 7, 335–340.
- Zheng, X., Takatsu, S., Ishikawa, R., Hasegawa, H., 2018. Moderate intensity, exercise-induced catecholamine release in the preoptic area and anterior hypothalamus in rats is enhanced in a warm environment. *J. Therm. Biol.* 71, 123–127.

## 第5章 総合考察

本章では、第2章から第4章までに行われた研究1から研究4の結果について概観し、本研究の意義について述べる。次に、暑熱順化が脳内モノアミン、生理指標、情動行動に与える影響について述べる。最後に本研究の限界と、今後の研究に向けた展望について述べる。

### 第1節：本論文のまとめと意義

#### 第1項：本論文のまとめ

本研究は暑熱順化に伴うラットの脳内モノアミン、生理指標、情動行動の関係を解明することを目的に行った。

先ず、第1章において、研究背景となるこれまでに行われていた暑熱曝露による脳内モノアミンの変化と情動行動の変化についての先行研究を体系的にまとめた。結果として、暑熱曝露により脳内モノアミンは部位毎で異なる変化が起きることが明らかとなり、過度な暑熱曝露や長時間に及ぶ暑熱曝露により、深部体温が過度に上昇することで情動行動に悪影響を及ぼすことが明らかとなった。先行研究の問題点として、1) 先行研究の数がまだ少なく、暑熱曝露による脳内モノアミンと情動行動の変化についての知見が不足している、2) 暑熱順化による脳内モノアミンと情動行動の変化についての研究例がほとんどない、という2点が大きく挙げられた。そのため、本研究では不足している知見である暑熱順化が起きたラットの脳内モノアミンと生理指標、情動行動を調べることを目的に研究を行った。

第2章(研究1)では、暑熱曝露を継続的に行ったラットが暑熱順化に至るまでの変化を調べた後、様々な期間暑熱曝露を行ったラットの脳内の複数部位における脳内モノアミンの変化を調べた。結果として、暑熱順化は暑熱曝露開始2週間で起こり、脳内モノアミンは暑熱順化に伴い、部位毎に特異的な変化を示すことが明らかとなった。

第3章(研究2)では、異なる期間暑熱曝露を行ったラットのオープンフィールドテスト中における不安様行動の変化を調べた。暑熱曝露は、第2章で明らかとなった暑熱順化に要する期間を元に、3時間、14日、28日とした。結果として、暑熱順化によりラットの不安様行動が減少することが明らかとなった。継続的に暑熱ストレスを与えることが新奇環境における不安を低減させ、適応しやすくなる可能性が示唆された。

第4章(研究3, 研究4)では、第2章で明らかとなった暑熱順化に伴う脳内モノアミンと生理指標の変化を、暑熱順化の有無により暑熱曝露中にどの様な変化が起こるのかを調べた。脳内モノアミンの測定は、第2章で暑熱順化による特異的な変化が明らかとなった体温調節中枢である視索前野と記憶中枢である海馬の2部位で測定を行った。生理指標の変化として、暑熱順化による暑熱曝露中の深部体温と尾部皮膚温の変化に通常群との差は見られなかったが、深部体温の上昇が緩やかになることが明らかとなった。そして、暑熱順化することにより暑熱曝露中に心拍数を低下させ、活動量を増加させないことで熱産生を低下させていることが確認された。一方で通常群は暑熱曝露前半では心拍数が低下したものの、後半では暑熱曝露前と同等になり、活動量の増加が見られた。この心拍数と活動量の

変化の差が暑熱順化の効果であると考えられる。脳内モノアミンは暑熱順化することにより、視索前野における DA が暑熱曝露中に増加し、海馬における DA と 5-HT が回復期において低下を抑制させるという特徴が見られた。これらの結果から、暑熱順化することで暑熱曝露中の視索前野の DA 放出量を増加させることで深部体温の過度な上昇を抑制させ、暑熱曝露による悪影響を排除させ、記憶などに関わる海馬のモノアミン放出量を維持させていることが考えられた。

## 第 2 項：本論文の総合考察及び研究の意義

本論文では暑熱順化に伴う脳内モノアミン、生理指標、情動行動の関係を複数の研究を元に多角的に分析を行った。先行研究においては、暑熱順化を行うことによる脳内モノアミンと情動行動の変化を調べている研究はまだ報告されていなかった。本論文ではこれらの先行研究の問題点や不足点を補完し、新たな知見を得ることができた。

本研究において、複数の脳領域における脳内モノアミンの変化が暑熱曝露期間により異なることが明らかとなった。この脳内モノアミンの変化が情動行動に影響を及ぼす可能性が考えられる。そして、暑熱環境における活動の優位性を獲得することにつながると考えられる。

## 第 2 節：本研究の限界と今後の展望

本研究では暑熱順化に伴うラットの脳内モノアミン、生理指標、情動行動の関係を解明することを目的に行い、暑熱順化に伴う脳内モノアミンの変化が与える影響について検討した。しかし、本研究には大きく 3 点の問題が挙げられる。1 点目に暑熱曝露に伴う細胞体における脳内モノアミンの含有量や代謝物の変化や受容体の変化、形態的变化や血液組成などの変化が不明である点、2 点目に情動行動や認知記憶能力についての知見がまだ少なく、更なる実験が必要である点、3 点目に暑熱順化したラットを通常環境から暑熱環境に曝した際の生理指標の優位性が統計的な有意差として確認されなかった点が挙げられる。

1 つ目の課題の解決方法として、今後も暑熱順化に伴う脳内モノアミンと生理指標の変化を調べる研究を網羅的に進めていくことが望まれる。特に、暑熱順化することにより脳内モノアミンの代謝に影響が起きていることや受容体の数に変化が起きていることが考えられ、このことが暑熱環境の活動の優位性につながると推測できる。しかしながら、これらの研究はまだ行われておらず、脳内における変化がどの様に影響を及ぼしているのかを明らかにする必要がある。更に、暑熱ストレスは血中コルチコステロンの増加や副腎の肥大などを引き起こすことが推察されるが、暑熱順化に至ることでこれらストレス反応が軽減することが考えられる。この様な実験を複合的に行うことで、より多角的に暑熱順化の効果を分析することができるようになる。

2 つ目の課題の解決方法として、情動行動と認知記憶に関連する更なる行動実験を行うことで、暑熱順化に伴う行動の変化を明らかにすることができる。特に、暑熱環境下での情動

行動を調べた研究はこれまでにほとんど行われていない。そこで、強制水泳テストやモリス水迷路、フットショックなど様々な行動テストを複合的に行うことが求められる。

3つ目の問題点である暑熱順化の優位性が確認されなかった原因として、私たちの研究室でこれまで通常環境として設定している環境温 23°Cが暑熱順化ラットにとっては寒すぎるため、熱産生が高まってしまった可能性が考えられる。先行研究においてラットの温熱中立帯が 28°C前後であることが示されており (Gordon, 1990) , 本研究の通常環境よりも 5°C 高い値となっている。これらのことから、暑熱順化は温熱中立帯以上の温度帯での活動を優位にすることが考えられるが、知見が不足しているため、更なる実験が求められる。

近年はスポーツにおける国際大会が世界各地で開催されている。その中で、暑熱環境の地域から寒冷環境の地域に移動してプレーを行うことやその逆の条件でスポーツを行うことがある。このような場面における暑熱順化の優位性や寒冷順化した動物が暑熱曝露された際の変化について明らかにすることが更なる競技力向上につながると考えられる。また、私たちは夏季においても終日暑熱曝露されることはなく、屋外の暑熱環境と屋内の冷涼環境で生活を行っている。暑熱環境に曝された事による深部体温の上昇が、屋内の冷涼環境に戻ってからの仕事や学業へのパフォーマンスに悪影響を及ぼすことが考えられるが、暑熱順化することにより悪影響を排除することができると考えられる。本研究は暑熱順化に伴う変化の基礎研究であるが、今後ヒトを対象とした暑熱順化に伴う運動や認知記憶の変化を調べる研究を発展させるための一助となることを期待する。

## 引用文献

Gordon, C. J., 1990. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol. Behav.* 47, 963–991.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、立教大学大学院コミュニティ福祉学研究科の石渡貴之教授には、多大なるご指導やご助言を頂きました。心より御礼申し上げます。また、副指導教員として立教大学大学院コミュニティ福祉学研究科の大石和男教授、加藤晴康教授には実験データの解釈や実験の方法について様々な視点からのご指導ご助言を頂きました。そして立教大学大学院コミュニティ福祉学研究科の諸先生方からは研究発表の場において多くのご意見を賜りました。心より御礼申し上げます。

更に、広島大学大学院総合科学研究科の長谷川博教授にはお忙しい中、本博士論文の外部副査を快く引き受けてくださり、専門的観点からのご指導やご指摘を頂きました。厚くお礼申し上げます。

下記の方々には研究の場のみならず、公私にわたって広くサポートをして頂きました。特に立教大学大学院コミュニティ福祉学研究科 大石研究室にて博士号を取得されました遠藤伸太郎博士、嘉瀬貴祥博士、木村駿介博士、坂内くらら博士の4名には研究に対する率直な意見を賜りました。そして立教大学大学院コミュニティ福祉学研究科博士課程後期課程にて同じ石渡研究室に在籍している松長大祐さんには研究を遂行するにあたり、多くのサポートをして頂きました。心より御礼申し上げます。

最後に仕事を退職して大学院で研究を行うことを理解し、応援をしてくれた家族に深く感謝いたします。