

ラットのトレッドミル運動に対する循環応答

鳥取大学医学部生理学講座統合生理学分野 (主任 渡邊達生教授)

今岡直毅, 木場智史, 渡邊達生

Cardiovascular responses to treadmill exercise in rats.

Naoki IMAOKA, Satoshi KOBA, Tatsuo WATANABE

*Division of Integrative Physiology, Tottori University Faculty of Medicine
86 Nishi-cho, Yonago, Tottori 683-8503, Japan*

ABSTRACT

This report demonstrates time-course changes in arterial pressure (AP) and heart rate (HR) observed during 30-min treadmill exercise in conscious rats. Collections of baseline AP and HR for 10 min was followed by a buzzer sounded for 1 min. Then, the rats started running on the treadmill at an exercise intensity of 15 m/min, 0 degrees (15-0), 20 m/min 5 degrees (20-5), or 25 m/min 0 degrees (25-0). At all exercise intensities, AP and HR were significantly elevated by means of exercise in comparison with a baseline (pressor response: $+12 \pm 2$, $+15 \pm 2$, and $+14 \pm 2$ mmHg, tachycardia response: $+87 \pm 5$, $+120 \pm 10$, and $+118 \pm 11$ beats/min, at 15-0, 20-5, 25-0, respectively). It was noted that the elevations in AP and HR by exercise at 20-5 reached at the steady state within 10 min after the onset of exercise. The pressor response to running was not influenced by the exercise intensity while the tachycardia response was significantly larger at 20-5 than that at 15-0. The experimental model established in this work will be helpful for future investigations to understand regulatory mechanisms responsible for cardiovascular function during voluntary exercise. (Accepted on April 4, 2013)

Key words : cardiovascular system, conscious rats, exercise

はじめに

運動を行うと、交感神経活動が増加し循環系が亢進する。運動時に交感神経活動を増加させる神経メカニズムとして、遠心性の中樞コマンドと求心性の活動筋反射とがある。中樞コマンドとは、運動時に運動発現の意思に伴って運動皮質野から惹起し、運動系とともに自律神経系を調節するメカニズムである¹⁾。活動筋反射とは、筋収縮によって発生される代謝産物と筋収縮に伴う機械的な刺

激とが、筋求心性神経線維 (III, IV群) の発火を増大させることで惹起するメカニズムである²⁾。運動時にはこれらの神経信号が脳内で統合・処理された結果として、自律神経応答が出力される。中樞コマンド・活動筋反射の個々の役割は、麻酔・除脳動物を用いた実験から解明されてきた^{1,2)}。しかし、随意運動時に中樞コマンド・活動筋反射が脳内の「どこで」「どのように」統合・処理されるかについては未だ未解明である。この課題に取り組むには、“随意運動時の脳”を調査する必

要がある。

これまで、イヌ³⁾、ネコ⁴⁾、ラット⁵⁾、そしてマウス⁶⁾の随意運動時の循環応答が観察されている。イヌやネコといった中動物と違い、ラットやマウスといったげっ歯類では生体機能発現メカニズムを分子レベルで調査するための分子生物学的な実験手法（例：ウェスタンブロット法によるタンパク質発現解析）が幅広く応用できるという研究的利点がある。ラットやマウスの随意運動時の動脈圧・心拍数を計測した過去の報告を俯瞰すると、運動中の動脈圧・心拍数の時系列変化を示した研究がない。運動時には自律神経を調節する脳機能などの生体機能はホメオスタシス維持のために時々刻々と適応する。この生体機能メカニズムというブラックボックスの解明には、ブラックボックスからの出力信号である循環系パラメータの時系列的变化の情報を解析することが必要である。そこで本研究では、ラットトレッドミル運動時の動脈圧・心拍数を計測し、循環応答の時系列変化を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

実験動物

鳥取大学動物実験委員会の許可を得（12-Y-10, 12-Y-61）、鳥取大学動物実験規則および日本生理学会が提示した「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」に従い、実験を行った。オスSprague-Dawleyラット（清水実験材料株式会社）（6-9週齢、体重200-300 g, N=12）を用いた。9:00から10:00の間に、トレッドミル（MK-680MU, 室町機械）上で走行訓練（速度: 25 m/min, 傾斜: 0度, 30-40分間/1日）させることで、トレッドミル運動に慣れさせた。ラットが走行を止めると、電気刺激（2-6 mV）を受けるようにした。

ラットがトレッドミル運動に慣れるまで十分に訓練された後（5-10日間）、心電図（ECG）測定のための計測電極と動脈圧（AP）測定のためのカテーテルとを挿入する手術を行った⁵⁾。酸素と気化麻酔（イソフルラン, 1-2 %）との混合ガスによってラットを麻酔した。腹側の尾（付け根から1 cm）を切開して尾動脈を露出し、尾動脈からカテーテル（SP 8, 夏目製作所）を挿入した。挿入したカテーテルの先端が腹部大動脈との境界部に届くように7 cm挿入した。もう一方のカテーテルの先端を別のカテーテル（SP 28, 夏目製作所）

とシールした。カテーテルを背側の皮下からラット背側の頸部まで通し、そこから体外に露出させた。胸部の皮下を切開し、ECGの記録電極のプラス極を剣状突起に、マイナス極を胸骨柄の脂肪組織に固定した。アース線を胸骨体付近の脂肪組織に固定した。これらの電線を皮下から背側の頸部まで通した。頸部から露出しているカテーテルとECGの計測電線をアルミ製バネの中に通した。麻酔から回復後、一般的なロドントケージに飼育した（12h/12h, 明/暗, 1ケージに1匹）。カテーテル内で血液が詰まるのを防ぐために、毎日、午前と夕方にヘパリン含有生理食塩水（1000 U/ml, 0.1 ml以下）をカテーテルに注入した。

実験プロトコル

手術からの回復期間として2-3日程度置いた後、トレッドミル運動時の循環応答計測実験を行った。カテーテルを圧トランスデューサ（P23-XL, アルゴン）に接続し、APを測定した。作動増幅器（P511, Grass Instruments）を介してECGの出力信号を増幅し、ECGのRR間隔を検出することで、心拍数（HR）を算出した。運動強度は1) 15 m/min 0 degree（15-0）、2) 20 m/min 5 degrees（20-5）、および3) 25 m/min 0 degree（25-0）、の三種類であった。計測は、一日に一回、9:00から16:00までの間に行った。トレッドミル内で一時間以上の安静期間をとった後にAPとHRの計測を開始した。10分間の安静期間をとった後、ブザー（60 beats/min）を1分間鳴らした。その後、上記三種類の運動強度のうち一つの強度でのトレッドミル運動を30分間行わせた。そして、30分間の回復期間をとった。データ取得中には、電気刺激を与えないようにした。

データ取得と解析

手術・実験中にはAP, ECG, およびHRをA/D変換器（Powerlab）を介して継続的にコンピューター画面に表示した。平均動脈圧（MAP）およびHRを1分および5分毎に平均した。

平均値±標準誤差で値を示した。安静値としてブザーが鳴る直前10分間の平均値を用いた。運動時の各応答と安静時との差異の有意性を、繰り返しのある一元配置分散解析を用いて検定した。有意なF値が得られた場合にはDunnnett法を用いて事後検定を行った。運動時の各応答に対する時間

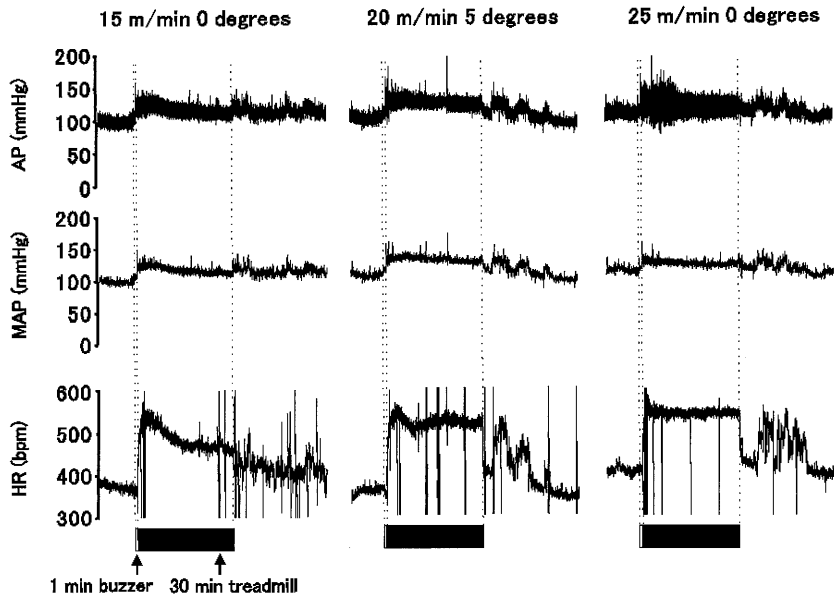


図1 AP, MAP, およびHRの応答例.
ブザー時間(1分間)を空白の四角形,トレッドミル運動時間(30分間)を黒の四角形で示した.左から,15 m/min 0 degrees, 20 m/min 5 degrees, および25 m/min 0 degrees.

経過に対する影響の有意性を,繰り返しのある一元配置分散解析を用いて検定した.有意なF値が得られた場合にはTukey法を用いて事後検定を行った.有意水準を危険率5%未満とした.

結 果

三つの運動強度(15-0, 20-5, 25-0)でのAP, MAP, およびHRの時系列変化の応答例を図1に, N=12の平均値を図2に, それぞれ示した. 15-0, 20-5, 25-0でのMAPおよびHRの安静値はそれぞれ, 107±2, 106±2, 106±2 mmHg, および362±9, 394±9, 387±11拍/分, であった. MAPはブザー音によって有意に(p < 0.05)上昇した一方で, HRはブザー音に影響されなかった(図2). どの運動強度でも,トレッドミル運動によってMAPおよびHRが安静値から有意に増加した(図2).

MAP・HRの増加応答の大きさに対する運動時間の影響を検討するために, 応答の5分毎の平均値を運動開始からの経過時間で比較した(図3). 15-0での昇圧応答の大きさは, 運動開始から5分間での平均値と比較すると時間とともに有意に減

少した. この減少傾向は, 運動時間30分が終わるまで続いた. 頻脈応答も同様に, 運動開始から5分間での平均値から時間とともに有意に減少し, この減少傾向は運動時間30分が終わるまで続いた.

20-5での昇圧・頻脈応答は運動開始後5分間で最大値をとったのち, 有意に減少した. ただし, 運動開始後5分以降では, 時間変化によって有意に変化しなかった(図3). すなわち, 運動開始から5分以降においてAP・HRは定常であった.

25-0での昇圧応答は(図3), 運動時間とともに有意に減少した. ただし特徴として, 単調減少ではなく, 運動後15-20分間に応答が増加傾向を示した. 頻脈応答は, 運動中盤(10-20分)に有意に減少した後, 再び有意に増加した.

運動によるMAPおよびHRの安静時からの増加量(30分間の平均値)を運動強度間で比較した(図4). 昇圧応答は運動強度に影響されなかった一方で, 頻脈応答は, 15-0よりも20-5で有意に大きかった.

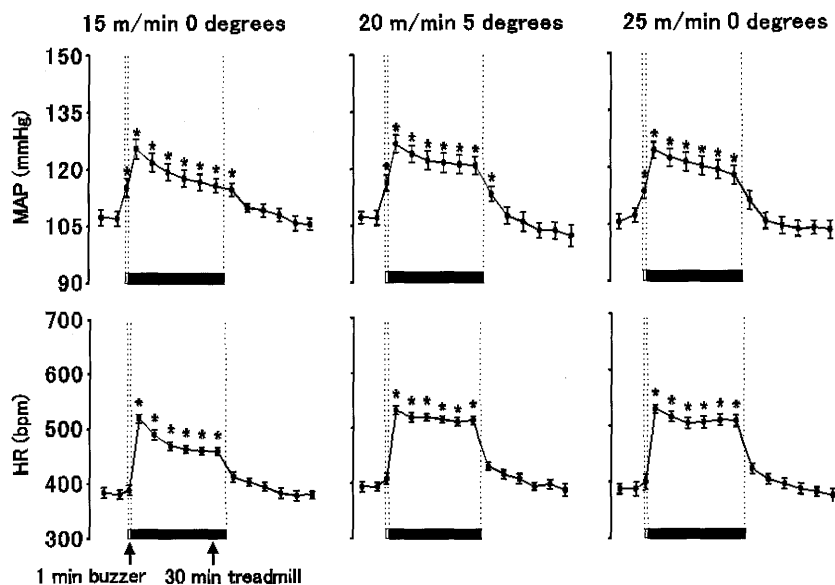


図2 MAPおよびHRの時系列変化 (5分間の平均値±標準誤差, N=12).

1分間のブザー時間中の応答のみ, 1分間の平均値±標準誤差. ブザー時間 (1分間) を空白の四角形, トレッドミル運動時間 (30分間) を黒の四角形で示した. 左から, 15 m/min 0 degrees, 20 m/min 5 degrees, および25 m/min 0 degreesの運動強度を示した. *: $p < 0.05$ vs. 安静値.

考 察

本研究では, ラットトレッドミル運動時の動脈圧および心拍数の時系列変化を観察した. 以下が主な知見である. 1) トレッドミル運動によってMAPおよびHRは安静時に比べて有意に増加した. 2) 運動強度は昇圧応答に影響しなかった. 頻脈応答は15-0に比べて20-0で有意に大きかった. 3) 20-5での昇圧および頻脈応答は運動開始から10分以内に定常状態をとった.

動脈圧・頻脈応答に対する運動強度の影響

本研究では昇圧応答に対する運動強度の影響はなかった (図4). 本研究で用いた三種類の運動強度の“範囲内”では, 昇圧応答の大きさに差異をもたらすほどの影響の差がなかったと考えられる. ただし有意差は検出されなかったが, 15-0で観察された昇圧応答の平均値が最も小さかった. 本研究で用いた強度よりも走行速度and/or角度を上げると, 昇圧応答がさらに大きくなるかもしれない.

運動時の頻脈応答は, 15-0よりも20-5で有意に大きく, 25-0でも大きい傾向にあった ($0.05 < p < 0.06$) (図4). この結果は, ネコ随意運動の強度に依存する頻脈応答を示した先行報告と一致するものであり^{7,8)}, そのメカニズムとして心交感神経活動・副交感神経活動の強度依存の興奮および抑制が推察されている^{7,8)}.

運動中の動脈圧・心拍数のダイナミクス

15-0では, 運動時間の経過とともに動脈圧応答が抑制された. 運動時間の経過とともに, 末梢血管コンダクタンスが増加したと考えられる. 運動時に骨格筋細胞や内皮細胞から産出される血管拡張因子として一酸化窒素やプロスタグランジンがある¹¹⁾. これらの物質が骨格筋中の血管を拡張させた結果, 昇圧応答が抑制された可能性が考えられる. また, 動的運動により筋が収縮すると, 筋ポンプの作用によって心臓への静脈還流が促進される. その結果, 骨格筋循環内で毛細血管が拡張して血管コンダクタンスが増加した可能性が考えられる¹²⁾. このように, 運動時間の経過とともに,

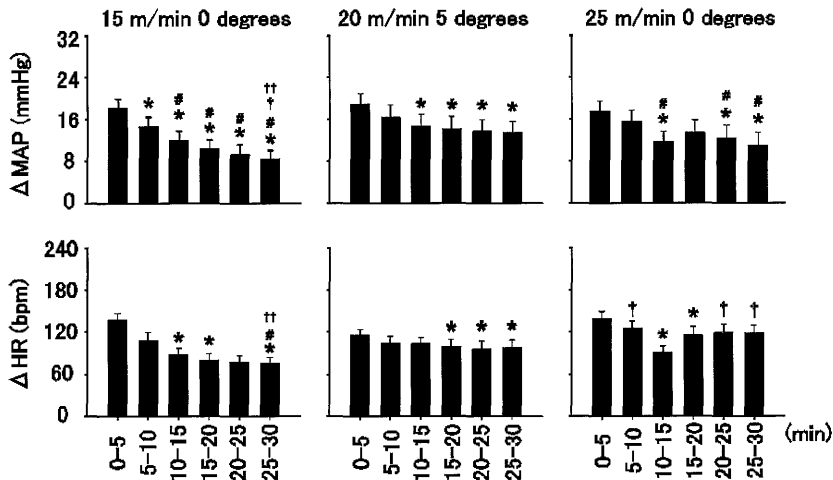


図3 各運動強度でのMAPおよびHRの安静時からの変化量（5分間の平均値±標準誤差，N=12）。
 *：p < 0.05 vs. 0-5. #：p < 0.05 vs. 5-10. †：p < 0.05 vs. 10-15. ††：p < 0.05 vs. 20-25.

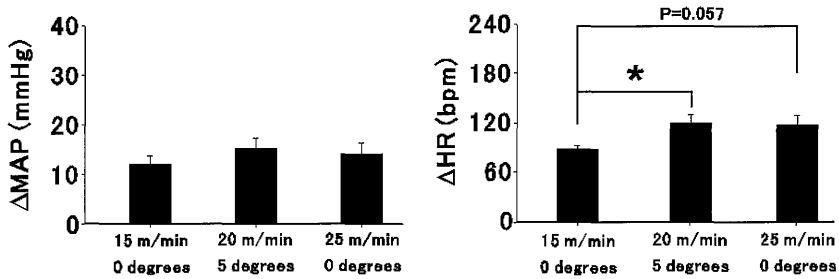


図4 各運動強度でのMAPおよびHRの安静時からの変化量（30分間の平均値±標準誤差，N=12）。
 *：p < 0.05 vs. 15 m/min 0 degrees.

局所血管拡張機構と筋ポンプによる静脈環流の促進作用とがより作動することで、動脈圧応答が抑制されたと推察される。筋ポンプによる静脈還流の促進作用は心拍数も抑制する働きもあり⁹⁾、運動時間の経過とともに頻脈応答が抑制されるという現象を説明するものかもしれない。

25-0では、その運動強度に順応できず、一定の速度で運動を行うことが出来ないラットが多数いた。そのために個体間で走行状態が一定でなく、動脈圧・心拍数のダイナミクスにバラつきが生じた。結果として、循環応答が定常にならなかったと考えられる。

20-5では動脈圧・頻脈応答は、15-0、25-0と違っ

て長時間定常状態であった。この要因は明らかではない。しかし、以下の推察を考えている。5度の傾斜を設定することによって体重にかかる重力の影響が増加し、四肢の骨格筋にかかる負荷が増大したと考えられる。その結果、骨格筋中に代謝産物がより蓄積し、筋代謝受容器からの反射が惹起して、前述の循環応答を維持したかもしれない。さらに、運動時に出力される中枢コマンドを、骨格筋および呼吸筋からの代謝受容器反射が増強する作用があるという仮説が提示されている¹⁰⁾。すなわち、骨格筋・呼吸筋由来の代謝受容器反射が賦活することで中枢コマンドの出力が増大し、その結果、昇圧応答が増強される可能性が指摘され

ている。本研究では、運動に伴って増大する筋代謝受容器反射の惹起が中枢コマンドを増強し、循環応答が維持されたのかもしれない。

結 語

本研究では、三種類の運動強度（15-0, 20-5, 25-0）で30分間のラットトレッドミル運動時の動脈圧と心拍数の時系列変化を観察した。トレッドミル運動によって動脈圧および心拍数は増加した。運動強度は昇圧応答に影響しない一方で、頻脈応答には影響した。20-5では、循環応答が定常状態になった。本研究で構築した実験系は、随意運動時の循環調節機能を解明する今後の研究、例えば随意運動時の中枢コマンド・活動筋反射の役割・機序の解明、に有効に用いられることが期待される。

本稿を終えるにあたり、多くの先生方のご指導、御協力に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Williamson JW. The relevance of central command for the neural cardiovascular control of exercise. *Exp Physiol* 2010; **95**: 1043-1048.
- 2) Kaufman MP, Hayes SG. The exercise pressor reflex. *Clin Auton Res* 2002; **12** (6) : 429-439.
- 3) Rodman JR, Henderson KS, Smith CA, Dempsey JA. Cardiovascular effects of the respiratory muscle metaboreflexes in dogs: rest and exercise. *J Appl Physiol* 2003; **95**(3): 1159-1169.
- 4) Matsukawa K, Mitchell JH, Wall PT, Wilson LB. The effect of static exercise on renal sympathetic nerve activity in conscious cats. *J Physiol* 1991; **434**: 453-467.
- 5) Miki K, Kosho A, Hayashida Y. Method for continuous measurements of renal sympathetic nerve activity and cardiovascular function during exercise in rats. *Exp Physiol* 2002; **87** (1) :33-39.
- 6) Masuki S, Nose H. Arterial baroreflex control of muscle blood flow at the onset of voluntary locomotion in mice. *J Physiol* 2003; **553** :191-201.
- 7) Tsuchimochi H, Matsukawa K, Komine H, Murata J. Direct measurement of cardiac sympathetic efferent nerve activity during dynamic exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **283** (5) : 1896-1906.
- 8) Murata J, Matsukawa K. Cardiac vagal and sympathetic efferent discharges are differentially modified by stretch of skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; **280**: H237-H245.
- 9) Laughlin MH. Cardiovascular response to exercise. *Am J Physiol* 1999; **277** :S244-S259.
- 10) Dempsey JA. New perspectives concerning feedback influences on cardiorespiratory control during rhythmic exercise and on exercise performance. *J Physiol* 2012; **590**: 4129-4144.