

修士学位論文

急性運動が炎症誘発性うつ様行動と ミクログリア活性に及ぼす影響

(西暦) 2023 年 1 月 6 日 提出

東京都立大学大学院

人間健康科学研究科 博士前期課程 人間健康科学専攻

ヘルスプロモーション・サイエンス学域

学修番号：21899704

氏名：杉本 俊太郎

(指導教員名：北 一郎)

目次

第 1 章	緒言	3
第 2 章	文献 review	
	2. 1 うつ病の概要	5
	2. 2 うつ病の神経病態.....	5
	2. 3 炎症性うつ病	5
	2. 4 うつ病発症に対するミクログリア活性の作用	6
	2. 5 ミクログリア活性によるうつ病発症の機序.....	7
	2. 6 運動の抗炎症作用.....	7
	2. 7 急性運動を用いた運動強度の違いによる抗うつ効果の検証....	8
	2. 8 炎症性うつ病モデル動物の作成.....	9
	2. 9 活性型ミクログリアマーカー.....	9
第 3 章	実験的検討	
	3.1 実験 1	11
	3.1.1 目的	11
	3.1.2 方法	11
	(1) 被験動物および飼育環境.....	11
	(2) 行動テスト	12
	(3) ミクログリア活性の評価	14
	(4) 統計解析.....	16
	3.1.3 結果	17

(1) 行動テスト	17
(2) ミクログリア活性	20
3.1.4 考察	20
3.2 実験2	25
3.2.1 目的	25
3.2.2 方法	25
(1) 被験動物および飼育環境	25
(2) 行動テスト	25
(3) ミクログリア活性の評価	26
(4) 運動条件	26
(5) 統計解析	26
3.2.3 結果	27
(1) 行動テスト	27
(2) ミクログリア活性	29
3.2.4 考察	31
謝辞	33
引用文献	32

第1章 緒言

近年、がんや感染症といった炎症性疾患とうつ病発症との関わりが報告されている (Raison and Miller 2003, Foster and Neufeld, 2013, Bravo et al., 2011, Singh et al., 1997)。このことは末梢での炎症が脳機能を変化させ、うつ病の発症に関わることを示唆している。動物実験において、炎症性サイトカインを放出する細菌毒素である lipopolysaccharide (LPS) の投与が、一過性に疾病行動を発現させ、その後うつ様行動を生じさせることが報告されている (Dantzer, O'Connor et al., 2008)。免疫応答により末梢で生じた炎症性サイトカインは、血液を通して、直接、血液脳関門を通過し、また血管周囲のマクロファージの活性化や迷走神経のサイトカイン受容体への結合などにより間接的に脳へサイトカインシグナルを伝達することが報告されている (Miller et al., 2009)。脳へ伝達されたサイトカインは、Toll 様受容体を介して中枢神経系の免疫担当細胞であるミクログリアの活性化を誘発し、中枢神経系の免疫応答を生じさせると考えられる (Zhao et al., 2017)。ミクログリアは、活性化すると細胞体の肥大化と突起の短縮という形態変化を引き起こし、脳内に炎症性サイトカインや活性酸素種を放出する。このミクログリアの活性化は、脳の機能、構造に影響し、うつ病発症に関わることを示唆されている (本研究では「炎症性うつ病」と定義する)。したがって、ミクログリア活性をコントロールする、すなわち抑制することができれば、うつ病発症の予防および治療方法の確立に貢献すると考えられる。

これまで、急性運動は抗炎症作用をもたらすことが報告されている (Starkie et al., 2003)。また急性運動は、炎症と細胞生存の調節に作用する Sirtuin-1 (SIRT 1) の産生を促進し、ミクログリア活性の抑制に関わる可能性があることが報告されている (Onanong et al., 2019)。これらのことから、運動は、炎症性うつ病に対する抗うつ効果をもたらす可能性が考えられる。しかし、炎症性うつ病発症の予防、改善に運動が効果的であるか、どのような運動条件が有効であるかについては明らかになっていない。

本研究は、ミクログリア活性に焦点を当て、急性運動が炎症性うつ病とミクログリア活性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。この目的を達成する

ために、実験 1 では、ラットに LPS を投与し、疾病行動およびうつ様行動が誘発されることを確認し（炎症性うつ病モデルラットの作製）、同時に LPS 投与後に誘発される疾病行動及びうつ様行動とミクログリア活性に及ぼす影響を検討した。実験 2 では、LPS 投与後の急性運動が、炎症性うつ様行動に対して抗うつ効果およびミクログリア活性に及ぼす影響を検討した。

第2章 文献レビュー

2.1 うつ病の概要

うつ病は生涯有病率の高い精神疾患である。世界で3億人(4.4%)以上がうつ病に罹患していると報告されており(Qiu, Cai et al., 2021)、日常生活活動やQuality of life(生活の質)の低下、社会的、経済的生産性の低下につながっている。さらに、うつ病は自殺率を高めることが報告されており(Wada, Ishine et al., 2004)、特に若年者や中高年の高い死因と関連している(厚生労働省 2017)。そのため予防や治療などの対策を講じることは喫緊の課題となっている。

2.2 うつ病の神経病態

うつ病の生理的要因は多様であり、まだ十分に明らかにされていないが、うつ病患者の脳脊髄液中ではセロトニン代謝産物である5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)やセロトニン前駆物質であるトリプトファンの濃度が減少していること(Stockmeier, 2003)や選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬(SNRI)がうつ病治療に用いられ効果を上げていることから、脳内モノアミン濃度の低下が関与しているとみられている。また、うつ病患者は非うつ病患者に比べ、海馬の体積が減少しており(Bremner and Narayan et al., 2000)、血清のBDNF(brain derived neurotrophic factor: 脳由来神経栄養因子)レベルの低下(Li et al., 2017)、HPA軸(Hypothalamic-pituitary-adrenal axis: 視床下部-下垂体-副腎軸)の過剰活性(Keller and Gomez et al., 2017)および前頭前野の機能低下がみられている(Pizzagalli and Roberts, 2021)といった報告がある。これらのことから、うつ病の発症や経過は、単一ではなく、いくつかの要因が関連しているとみられており、治療方法が確立していない。

2.3 炎症性うつ病

近年では、炎症もうつ病に関連していることが報告されてきており、うつ病患者では、急性炎症マーカーであるC反応性タンパク質やInterleukin(IL)-6、IL-1

β 、TNF- α (tumor necrosis factor - α)といった炎症性サイトカインが上昇している(Shelton and Miller,2011)。また動物を用いた研究では、LPS を生体内に投与することにより、全身性の炎症が生じ、うつ様行動が出現することが報告されている(Dantzer,O'connor et al.,2008)。これらのことから炎症はうつ病発症の一因といえる(本研究計画書では「炎症性うつ病」と定義する)。

2.4 うつ病発症に対するミクログリア活性の作用

末梢からの炎症によるうつ病発症の機序として脳内のミクログリアの活性化が関わることが示唆されている(Hurley et al.,2013)。炎症とは感染あるいは細胞の損傷により組織で起こる生体の防御反応であり、生体が感染や組織の損傷などを受けると、局所的に血管透過性の亢進、マクロファージの遊出、浸潤、増殖が生じる。これらの一連の反応にはIL-1、IL-6、TNF - α などの炎症性サイトカインが関与している(笠原,1990)。さらに炎症性サイトカインは末梢のみでなく、血液脳関門の透過性を亢進させ、中枢における神経炎症の誘発にも関わることが知られている(Erickson et al.,2021)。炎症性サイトカインは、中枢神経系においてミクログリアの活性を引き起こすことが報告されている(Na,Jung et al.,2014)。ミクログリアは中枢神経系の生体防御機構を担う自然免疫細胞であり、病原体や異物、脳内の損傷、虚血、出血、神経細胞死など脳の病的変化を検知すると、その部位に遊走し、突起を短縮した大型の細胞体に形態を変え、活性型ミクログリアとなる。ミクログリア活性は、組織に損傷を与える異物や損傷を受けた組織の不活性化や除去を目的に生じ、活性したミクログリアは、貪食能や抗原提示能が亢進しており、病原体や組織の除去を担う一方で、IL-1、IL-6、TNF- α 、INF(interferon)- γ などの炎症性サイトカインを放出することが報告されている(Streit et al.,2004, Smith et al.,2012)。また、慢性的なミクログリア活性は神経変性のみならず神経心理学的な変化を引き起こし、精神疾患の発症や経過に関わることが指摘されている(Hurley et al.,2013, Belen et al.,2005, Doorn et al.,2012)。

2.5 ミクログリア活性によるうつ病発症の機序

近年では、うつ病に関連する因子としてミクログリア活性が注目されている (Zhang et al.,2018.,Barites and Fernandes,2015)。ミクログリア活性によって生じた炎症性サイトカインは、脳内セロトニン濃度、HPA 軸、神経変性および海馬神経新生などの、うつ病発症に関わる様々な経路に影響を与えることが知られている。

脳内セロトニン濃度に関わる経路としては、炎症性サイトカインが、セロトニントランスポーター活動レベルを上昇させることによりセロトニン再取り込み量が増加し、シナプス間隙のセロトニン濃度が減少する経路と、キヌレニン経路の律速酵素である IDO (indoleamine 2,3 dyoxygenase : インドールアミン酸素添加酵素)を活性化し、セロトニン生合成の前駆物質であるトリプトファンをキヌレニンに代謝することにより、セロトニン合成量が減少する経路がある。

HPA 軸は、ストレス反応が過剰にならないようグルココルチコイド受容体を介した負のフィードバック機構により制御されているが、炎症性サイトカインは、グルココルチコイド受容体の適切な応答を阻害し、負のフィードバックを低下させることで HPA 軸の不調を引き起こすことが報告されている (Silverman and Sternberg,2012)。

神経変性および神経新生に関わる経路では、炎症性サイトカインにより、神経保護の役割をもつ BDNF の発現量が低下することや、NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)受容体のサブユニット構成が変化すること、炎症と密接に関連する酸化ストレスによりアポトーシスが生じ、神経新生が減少することが知られている (Song and Wang,2011,古賀ら,2019)。これらのことから、炎症性うつ病は、ミクログリア活性により生じていると考えられている。

2.6 運動の抗炎症作用

近年、うつ病の治療法として運動療法が注目されている。動物を用いた研究では、慢性的な低強度の運動により抗うつ効果が得られることが報告されており、ヒトを対象とした研究においても、慢性的な有酸素運動により、うつ病患者の症

状が軽減することが報告されている。また運動は、脳内のセロトニン神経系の活性化や、HPA 軸の活性を惹起する視床下部の CRF (corticotropin-releasing factor: コルチコトロピン放出因子ニューロン) 神経の過剰活性の抑制、BDNF 発現および海馬の神経新生に関わり、抗うつ効果が得られることが知られている (Ignacio et al.,2019,Luo et al.,2019)。炎症に対しても運動の効果についての知見が蓄積されてきている。ヒトを対象とした研究では、慢性的な有酸素運動は、血中の炎症性サイトカインを減少するという報告や(Kohut et al.,2006)、急性の中等強度の有酸素運動が血中の炎症性サイトカインを減少させるといった報告がある (Pedersen et al.,2017)。また動物を用いた研究では、LPS 投与前後に慢性的なホイールランニングを行ったマウスは、海馬神経新生および BDNF 発現ミクログリア数の減少が抑制されるという報告や (Littlefield et al.,2015)、CUMS(Chronic Unpredictable Mild Stress: 慢性予測不能軽度ストレス)によるうつモデルマウスは、慢性的な低強度運動を行うことで海馬や迷走神経背側運動核のミクログリア活性が抑制され、抗うつ効果を示すことが報告されている (Liu et al.,2020)。これらのことから、運動は、炎症性サイトカインおよびミクログリア活性を抑制し、抗うつ効果をもたらすと考えられる。しかし、炎症反応と運動の関係についての従来の研究では、運動強度が統一されていない。そのため、中枢神経系における抗炎症作用に効果的な運動強度についても明らかになっていない。

2.7 急性運動を用いた運動強度の違いによる抗うつ効果の検証

当研究室では、これまで運動強度の違いによる運動の抗うつ効果について検討してきており、セロトニン神経活動や HPA 軸の反応に関わる CRF 神経活動から、LT (Lactate Threshold: 乳酸性作業閾値) 以下の低強度運動が、効果的に抗うつ作用をもたらすことを明らかにしてきた (Otsuka, et al.,2016,Morikawa et al.,2021)。またヒトを対象とした研究においては、LT レベルでの 30 分間の急性の運動によりうつ症状が改善されることが報告されている (Bartholomew et al.,2005)。しかし炎症性うつ病に対しての運動強度の違いによる運動の抗うつ効

果については明らかになっていない。またうつ病に関連する脳部位としては、海馬や視床下部以外にも中脳背側縫線核、前頭前野腹内側部、大脳辺縁系、背側線条体などが知られているが(Maier et al.,2016)、これらの脳部位における運動とミクログリア活性との関係および運動強度依存性についても明らかではない。

うつ病に関わる脳部位における運動とミクログリア活性との関係を明らかにすることは、うつ病に対する効果的な運動療法を示すうえで重要な課題である。

2.8 炎症性うつ病モデル動物の作製

炎症性うつ病のモデル動物の作成には、LPS が多くの研究で用いられている。LPS は、グラム陰性菌の外膜に存在する多糖質に脂質が共通結合した化合物である。腹腔投与することにより全身性の炎症を引き起こし、投与後2時間から6時間頃をピークに疾病行動といわれる摂食および飲水抑制、身体活動量の低下、体重減少などの感染後に出現する典型的な症状がみられる(Dantzer et al.,2008)。疾病行動は、24時間頃には消失するが、学習性無力感やスクロース嗜好性の低下などうつ様行動は残存することが報告されている(Fernois et al.,2007)。疾病行動の出現は、末梢の炎症が脳内の炎症性サイトカインを誘発したことを表していると考えられている(Konsman et al.,2002)。

2.9 活性型ミクログリアマーカー

ミクログリアには多種のマーカーが存在する。Iba1 (Ionized calcium binding adapter protein 1) は、ミクログリアの免疫組織化学分析において最も広く使用されているマーカーであり、ミクログリアの機能的な区別はできないが、ミクログリアの形態変化の染色が可能であるため (Lier et al.,2021)、ミクログリア活性のマーカーとして使用されている(Pierezan et al.,2014,Cotel et al.,2015)。TMEM119は、ミクログリアで常在マクロファージとミクログリアを区別することができるが、ミクログリア活性の際に発現が減少することがある (Lier et al.,2021)。P2RY12 は、脳実質のミクログリアに特異的であり、ミクログリアの寿命の間、持続的に発現するためミクログリアの恒常性マーカーとして使用さ

れる (Mildner et al.2017,Amadio et al.2012) 。CD74 は、癌や多発性硬化症の特定の活性状態を示唆している可能性があり (Ghoochani et al.,2016,Benedek et al.,2013) 、形態学的に特異的なミクログリアマーカーではないことが報告されている (Lier et al.,2021) 。

第3章 実験的検討

3.1 実験1：LPS投与による疾病行動/うつ様行動の誘発とミクログリア活性の定量化

3.1.1 目的

実験1は、ラットにLPSを投与し、疾病行動およびうつ様行動を誘発させ、炎症性うつ病モデルラットを作製すると同時に、ミクログリア活性を定量化することを目的とした。さらに、LPS投与後に誘発されるうつ様行動とミクログリア活性との関わりを検討した。この目的を達成するために、ラットをコントロール群とLPS群に分けた。さらに疾病行動群とうつ様行動群に分け、LPS投与後の行動とミクログリア活性をコントロール群と比較した。実験スケジュールを図1に示す。

3.1.2 方法

(1) 被験動物および飼育環境

被験動物として、Wistar系雄性ラット（実験開始時7週齢）を22匹用いた。ラットは動物飼育施設において12時間ごとの明暗サイクル（明期4:00から16:00）、室温 $22^{\circ}\text{C}\pm 2$ 、湿度 $50\pm 10\%$ の条件下で飼育し、水と餌は自由摂取とした。また、ラットを実験者に慣らすために、1日数分間のハンドリングを3日間程度行なった。ラットは、1ケージに3匹ずつ集団飼育し、行動テストの前日に仕切りを用いた個別飼育とし、コントロール群には、生理食塩水=saline, 1 ml/kgを腹腔投与し、LPS群には、LPSを0.83mg/ml/kgを腹腔投与した。

(2) 行動テスト

saline/LPS 投与 4 時間後の疾病行動および 24 時間後のうつ様行動を行動テストを用いて評価した。

疾病行動

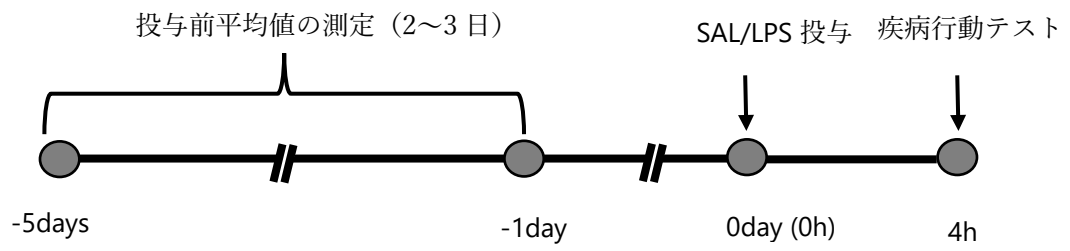
疾病行動の評価には、体重、摂食量、飲水量、活動量を用いた。LPS の投与が各測定項目に与える影響を検討するために、saline/LPS 投与前の各測定値の平均値と、投与後の各測定値を比較した。また投与後のコントロール群と LPS 群の各測定項目の変化量を比較した。投与前の測定は、投与前 5 日間のうちの 2~3 日に行った。測定開始時刻および終了時刻は、ともにラットの活動期である暗期とした。活動量は、ホームケージと同型の飼育ケージ (370 mm×210 mm×200 mm) に 6 分間ラットを放し、ビデオカメラ (SONY、HDR-CX520V、Web カメラ) で撮影した。撮影した画像は、パソコンに取り込み、飼育ケージを 4 等分した区画を設定して、区画横切り回数を測定した。

うつ様行動

うつ様行動の評価には、強制水泳試験を用い、不動時間を測定した。試験には、円柱形の水槽 (直径 23 cm×高さ 50 cm) を用い、水深は 38 cmとした。前日学習として強制水泳を 15 分、翌日に本試験として 6 分行い、2 日目の試験の最初の 1 分を除いた 5 分を解析の対象とした。不動時間は、水面から鼻を出すためだけの最小限の動作のみ行なっている時間とした。記録には、ビデオカメラ (SONY、HDR-CX520V) を用いた。

強制水泳試験は、Porsolt et al.(1997)により開発されたうつ様行動を評価する行動テストである。水の入った水槽に動物を入れ、水槽からの逃避が不可能であると学習させたうえで、通常 24 時間後に再度動物を水槽に入れ、うつの指標となる学習性無力感を評価する。抑うつ行動の増加と学習性無力感の関連が知られており、学習性無力感によって逃避行動などの自発的行動が低下すると考えられている (Kamahara et al.,1983、Tsuji et al.,2007)。

疾病行動群



うつ様行動群

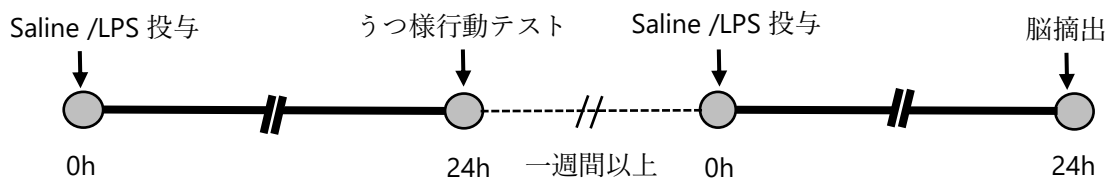


図1：実験スケジュール

(3) ミクログリア活性の評価

ミクログリア活性の評価は、行動テストを行ってから一週間以上経過後、saline/LPS 投与 24 時間後に脳摘出を行い、ミクログリアの形態変化を定量化した。

脳領域

対象とした脳領域は、うつ様行動に関わることが報告されている視床下部室傍核、海馬歯状回、扁桃体中心核、中脳背側縫線核とした。

灌流固定および脳サンプルの採取

ラットは生理食塩水/LPS 投与から 4 時間/24 時間後にペントバルビタールナトリウム (sodium pentobarbital/大日本住友製薬株式会社) の腹腔投与によって麻酔し、その後灌流固定を行った。灌流固定の手順としては、開胸後にヘパリン含有 saline を経心臓的に全身に灌流し、続いて固定液を灌流し組織固定を行った。灌流のために用いるヘパリン含有 saline は、1000ml の 0.9%saline に、1000units/ml ヘパリンナトリウム (Heparin) sodium/Wako,Japan) 溶液を 2 ml 添加し、作製した。固定液は、以下の通りに作製した。蒸留水 (60°C) に 4%パラホルムアルデヒドを加え、2 N NaOH 溶液を数滴加えて、液が透明になるまで攪拌した。0.2%ピクリン酸 (飽和溶液) と 1M PBS (1M リン酸緩衝液; NaCl 1.4M、KCl 26.8M、Na₂HPO₄ 91mM、KH₂PO₄ 2mM) を加えた後、pH メーターを用いて pH 7.4 となるように 2 NaOH を滴下して調整した。さらに 0.1%グルタルアルデヒドを加え、4°Cで保存した。灌流固定後、直ちに脳を摘出した。取り出した脳は、後固定液 (固定液作製過程で 0.1%グルタルアルデヒドを加える前の段階で別容器に取り分けたもの) に浸け、後固定を一昼夜以上行い、その後 30%スクロース/0.1M PBS1 溶液に浸けて脱水処理を行った。

脳切片の作成

摘出した脳は、凍結マイクロトーム (MS-31 滑走性マイクロトーム/大和光機株式

会社)を用いて厚さ 40 μ m にスライスし、脳切片を作製した。このとき全ての切片は、アジ化ナトリウムを加えた 0.1M PBS の入った 6 ウェルプレートに順番に取り分け、1 ウェル中に 240 μ m おきの切片が含まれるようにした。

免疫組織化学染色

ミクログリアの細胞体を同定するために、一次抗体として、ミクログリア特異的マーカーである抗 Iba1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1) 抗体を用いて免疫染色を行った。2 ウェル分 (120 μ おき) の浮遊切片を 5 分間ずつ 3 回 0.1M PBS で洗浄した後、1%過酸化水素水/0.1M PBS に 30 分間浸し、内因性ペルオキシダーゼ活性を失活させた。再度浮遊切片を 0.1M PBS で洗浄し、続いて 0.1%Triton X-100、10%正常ウマ血清、抗 Iba1 抗体 (Rabbit anti Iba1 antibody/Wako, Japan,濃度 1:2000) を含む 0.1%PBS に 14 時間以上インキュベーションした。次にその切片を PBS-TX (0.1%Triton X-100、100/0.1M PBS) で 5 分間ずつ 3 回洗浄した後、0.1%Triton X-100、10%正常馬血清、二次抗体 (Donkey Rabbit IgG/CHEMICON INTERNATIONAL、濃度 1:800) を含む 0.1% PBS に 2 時間インキュベーションした。切片を PBS-TXsw5 分間ずつ 3 回洗浄した後、アビジン-ビオチン標識酵素複合体 (VECTASTAIN Elite ABC Standard Kit・フナコシ株式会社) /PBS -TX で 4 時間処理した。さらに切片を PBS-TX で洗浄し、1M Tris-HCl・DAB (0.04% 3,3-Diaminobenzidine ; アミノベンチジン) に 1%過酸化水素水/0.1M PBS を加えた水溶液に浮遊切片を移し発色させた。発色を終えた切片は 0.1M PBS1 で洗浄し、アジ化ナトリウム含有の 0.1M PBS に移し、4°Cで保存した。

標本作製

免疫組織化学的処理を終えた切片を、4%ゼラチンをコーティングしたスライドガラスに並べ乾燥させた後、エタノールによる脱水処理およびキシレンによる脱脂処理を行った。処理は 50%、75%、95%、100%の各濃度のエタノールに引き続き、エタノールとキシレンが 1 : 1 の割合の混合溶液・100%キシレンの順

番で 30 分ずつそれぞれの溶液にスライドガラスごと浸けた。その後、封入剤 (Permaunt、ファルマ株式会社) を用いてカバーガラスを被せ、乾燥させた。

ミクログリア活性の定量化

ミクログリア活性を定量化するために、抗 Iba1 抗体陽性ミクログリアの面積を算出した。120 μ m おきの切片に対して、各脳領域 3 枚ずつの切片を抽出し、1 切片あたり 3 枚の 40 倍画像をデジタルカメラ (DP27/オリンパス株式会社) 付き光学顕微鏡 (BX53 オリンパス株式会社) を用いて、パソコンに取り込んだ。取り込んだ画像は、画像解析ソフト (imageJ、National Institutes of Health ; NIH) を用いて、画像 1 枚あたりの抗 Iba1 抗体陽性ミクログリア面積を算出した後、ミクログリア 1 個あたりの面積を算出した。

(4) 統計解析

全ての結果は、平均値 \pm 標準誤差で示した。saline/LPS 投与前の各測定項目の平均値と、投与後の測定値との比較には、対応のある t 検定を用いた。投与後の、コントロール群と LPS 群の変化量の比較には、対応のない t 検定を用いた。コントロール群と LPS 群のミクログリア活性の比較には、各脳領域ごとに対応のない t 検定を用いた。統計的有意水準は、全て 5%未満とした。

3.1.3 結果

(1) 行動テスト

疾病行動

疾病行動テストの結果より、LPS 群の方が、saline 群よりも摂食量、飲水量、体重、活動量が、投与前の平均値に比べて有意に減少していた (図 2 a~d)。投与前の測定値の平均値と投与後の測定値の比較をするために、対応のある t 検定を行った。その結果、摂食量は、コントロール群では、 $t(5) = 1.214$, $p = .279$ となり、投与前後の変化量に有意な差は認められなかった。一方、LPS 群では、 $t(5) = 4.316$, $p = .008$ となり、投与後の摂食量の方が有意に減少した。飲水量は、コントロール群では、 $t(5) = -3.501$, $p = .017$ となり、投与後の飲水量の方が有意に減少した。一方、LPS 群では、 $t(5) = -5.479$, $p = .003$ となり、投与後の飲水量の方が有意に減少した。体重は、コントロール群では、 $t(5) = 7.78$, $p = .467$ となり、投与前後の変化量に有意な差は認められなかった。一方、LPS 群では、 $t(5) = 5.648$, $p = .002$ となり、投与後の体重の方が有意に減少した。活動量は、コントロール群では、 $t(5) = 3.478$, $p = .018$ となり、投与後の活動量の方が有意に減少した。一方、LPS 群では、 $t(5) = 5.280$, $p = .003$ となり、投与後の活動量の方が有意に減少した。

次に、コントロール群と LPS 群の投与後の体重、摂食量、飲水量、活動量の減少量を比較するために、対応のない t 検定を行った。その結果、摂食量は、 $t(10) = -2.713$, $p = .011$ となり、コントロール群より LPS 群の方が有意に摂食量が減少した。飲水量は、 $t(10) = 2.742$, $p = .010$ となり、コントロール群より LPS 群の方が有意に摂食量が減少した。体重は、 $t(10) = 2.560$, $p = .014$ となり、コントロール群より LPS 群の方が有意に摂食量が減少した。活動量は、 $t(10) = -3.154$, $p = .005$ となり、コントロール群より LPS 群の方が有意に摂食量が減少した。

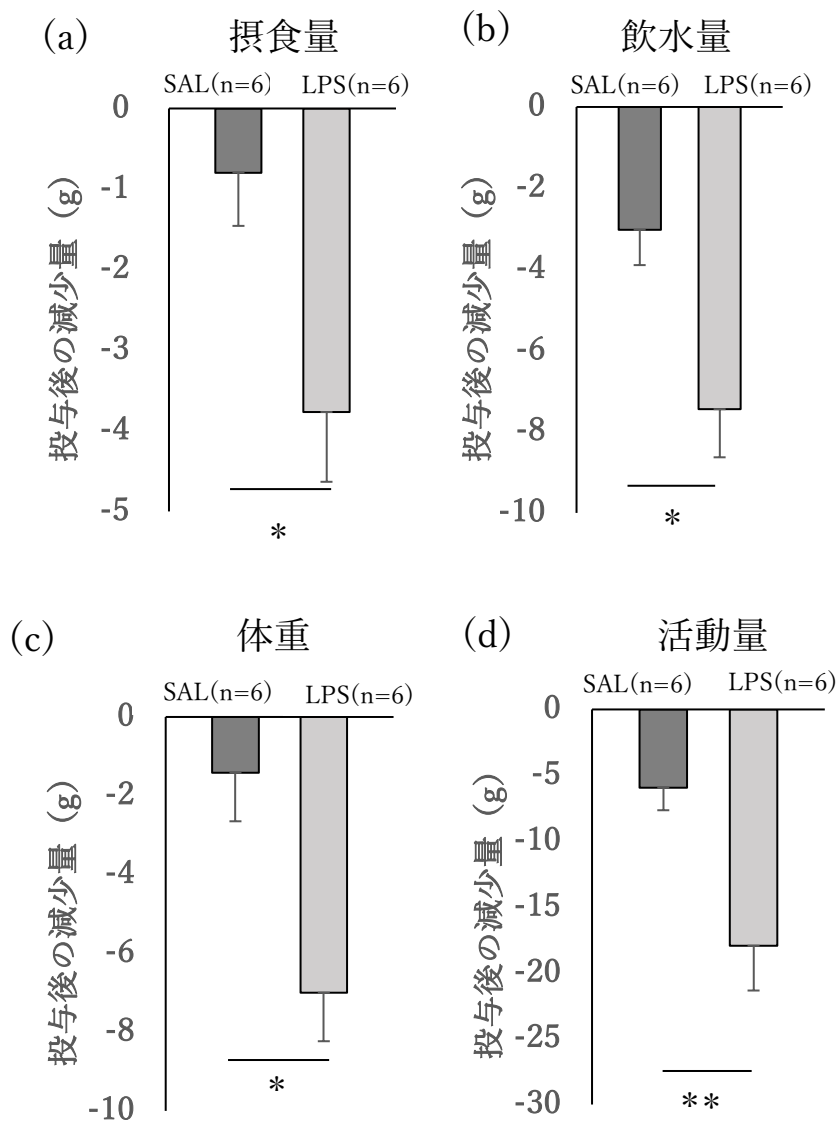


図3：摂食量、飲水量、体重、活動量の減少量の比較

Mean ± SE； * p < 0.05、** p < 0.01

SAL；コントロール (saline) 群、LPS；LPS 群

うつ様行動

LPS 群の不動時間は、コントロール群に比べ、長かった (図 4)。コントロール群と LPS 群の不動時間を比較するために、対応のない t 検定を行った。その結果、 $t(8) = -5.061$, $p < .001$ となり、LPS 群の不動時間は、コントロール群に比べ、有意に長かった。

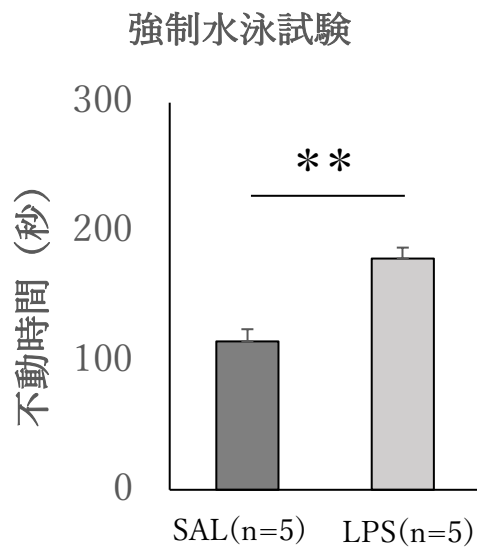


図 4：強制水泳試験の不動時間の比較

Mean \pm SE ; * * $p < 0.01$

SAL ; コントロール (saline) 群、LPS ; LPS 群

(2) ミクログリア活性

すべての脳領域で、LPSの方がコントロール群に比べ、ミクログリア面積は大きかった(図6)。コントロール群とLPS群のミクログリア面積を比較するために、各脳領域ごとに対応のないt検定を行った。その結果、PVNでは、 $t(8) = -2.609$, $p=.031$ となり、コントロール群よりLPS群の方が、有意にミクログリア面積が大きかった。Hippでは、 $t(8) = -5.378$, $p<.001$ となり、コントロール群よりLPS群の方が、有意にミクログリア面積が大きかった。Amでは、 $t(8) = -0.728$, $p=.487$ となり、コントロール群とLPS群に有意な差は認められなかった。DRNでは、 $t(8) = -1.937$, $p=.089$ となり、コントロール群よりLPS群の方がミクログリア面積が大きい傾向がみられた。

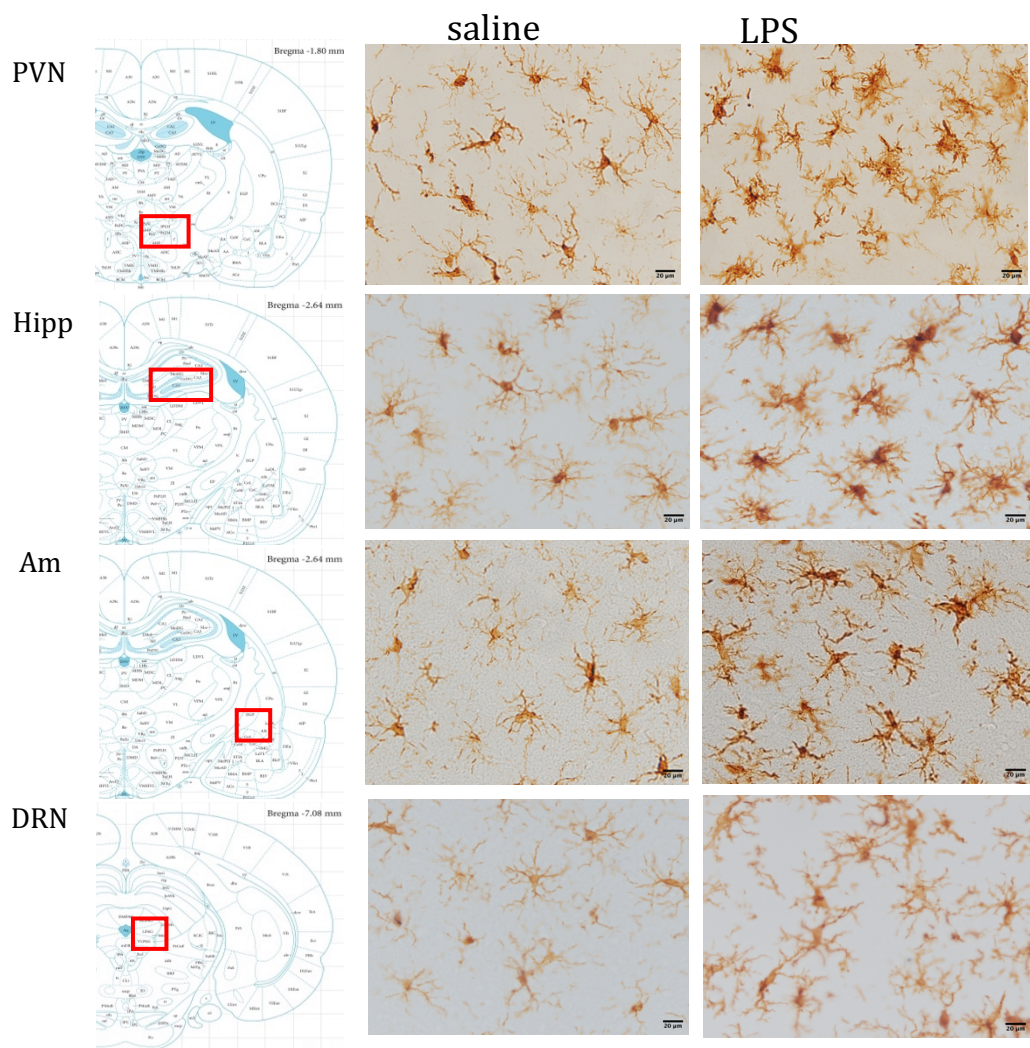


図 5 : 各脳領域のミクログリア活性の典型例 (scale bar = 20 μ m)

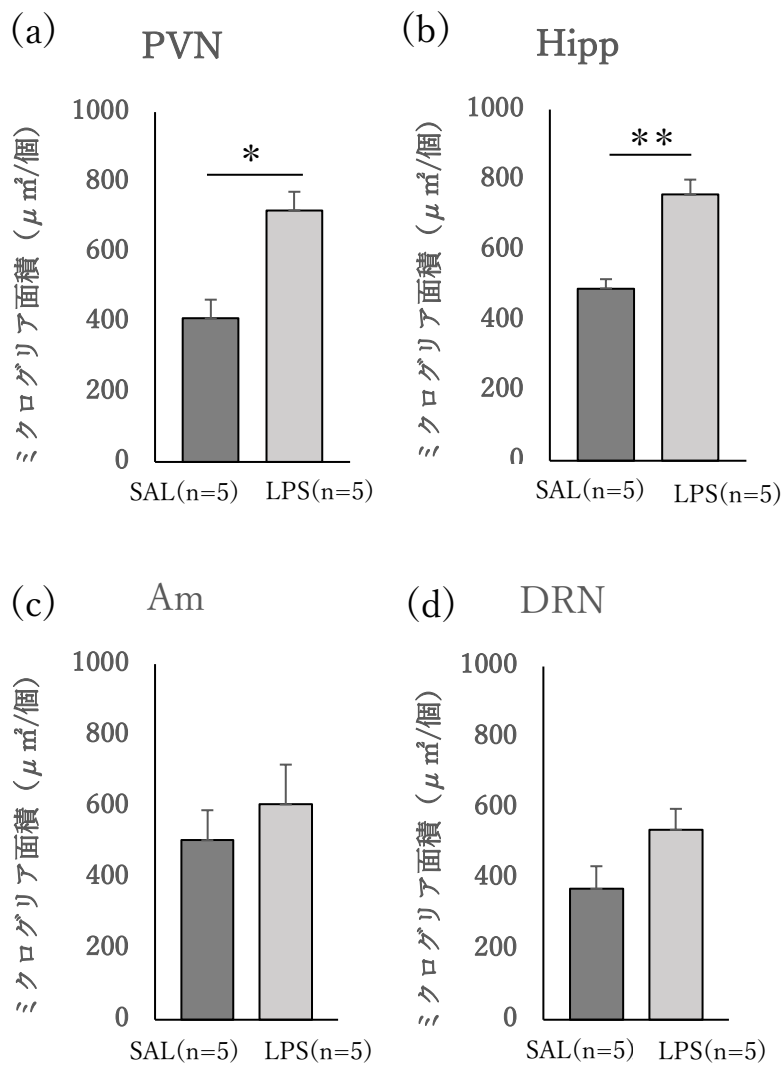


図6：うつ病に関わる脳領域における saline/LPS 投与後のミクログリア面積

PVN；視床下部室傍核， hipp；海馬歯状回

Am；扁桃体中心核， DRN；中脳背側縫線核

Mean ± SE； * p < 0.05、 ** p < 0.01

3.1.4 考察

実験 1 の結果より、疾病行動のテストでは、saline /LPS 投与前後の摂食量、体重の変化量は、コントロール群では差がなく、LPS 群では有意に減少した。一方、飲水量、活動量は、コントロール群及び LPS 群の両方で有意に減少した。またコントロール群と LPS 群間での摂食量、飲水量、体重、活動量の変化量は、saline 群に比べ、LPS 群の方が有意に減少していた。さらに強制水泳試験では、コントロール群に比べ、LPS 群では有意に不動時間が長かった。そして saline /LPS 投与から 24 時間後のミクログリア活性の評価では、コントロール群に比べ、LPS 群のミクログリアは、PVN と Hipp において、有意に面積が大きいことが示された。一方、Am では有意な差は認められず、DRN では有意ではないものの LPS 群の方が面積が大きい傾向がみられた。これらのことから、LPS 投与により、疾病行動およびうつ様行動が誘発され、炎症性うつ病モデルラットの作製に成功したと考えられる。またミクログリア活性の評価から、LPS 投与から 24 時間後のミクログリア活性は脳領域特異的に生じることが示された。

行動テストの結果より、炎症性うつ病モデルラットの作製に成功したと考えられる。先行研究では、疾病行動は、LPS 投与から 2～6 時間頃をピークに誘発され、摂食量、飲水量、体重、活動量が減少することが報告されている (Dantzer et al.,2008, Henry et al.,2008, Ssnggeeta et al.,2011)。また LPS 投与から 24 時間後にはうつ様行動が誘発されることが報告されている (Dantzer et al.,2008, Fernois et al.,2007)。本実験では、LPS 投与から 4 時間後に摂食量、飲水量、体重、活動量がコントロール群と比較して有意に減少していることから、LPS 投与による疾病行動が再現されたと考えられる。うつ様行動においても、強制水泳試験における不動時間は、LPS 群の方が、コントロール群よりも有意に長くなっており、LPS 投与後の強制水泳試験の不動時間を比較した先行研究 (Zhang et al.,2019, Bruna et al.,2013) と同様であった。これらのことから、LPS 投与により、炎症誘発性のうつ病モデルラットの作製に成功したと考えられる。

ミクログリア活性の評価より、ミクログリア活性の定量化が可能となった。また LPS 誘発性のミクログリア活性は、脳領域特異的に誘発されることが示唆さ

れた。本実験では、LPS 投与から 24 時間後のミクログリアは、PVN と Hipp において、面積が拡大することが示された。また DRN では、統計的有意水準には達しないものの、LPS 群の方が、コントロール群に比べ、ミクログリア面積が大きい傾向がみられた。Norden et al. (2015) は、LPS 投与から 24 時間後の前頭前野と海馬では、一定範囲内のミクログリア面積に差があることを報告しており、Yang et al. (2013) は、22 の脳の核/領域における LPS 投与後のミクログリアの密度と面積を掲示的に比較した研究において、LPS 投与後の Iba-1 陽性ミクログリア密度および面積は、脳領域や時間経過により異なることを示している。これらの先行研究は、本実験において、ミクログリア活性が脳領域特異的に誘発されることを支持している。これらのことから、本実験において、LPS 投与による炎症性うつ病モデルが再現と、ミクログリア活性の定量化が可能となったと考えられる。また LPS 誘発性のミクログリア活性は、脳領域特異的に誘発されることが示唆された。

3.2 実験2：急性運動がLPS誘発性うつ様行動およびミクログリア活性に及ぼす影響

3.2.1 目的

実験2では、LPS投与後の急性運動が、炎症性うつ様行動に対して抗うつ効果およびミクログリア活性の抑制効果を示すのか検討することを目的とした。この目的を達成するために、実験1で確立した手法を用いて、炎症性うつ病モデルラットを作製し、異なる強度での30分間の急性トレッドミル走後のうつ様行動とミクログリア活性を評価した。運動条件は、コントロール群；saline投与+非運動（0m/min）、LPS+非運動、LPS投与+低強度運動（15m/min）、LPS+高強度運動（25m/min）の4条件とした。

3.2.2 方法

（1）被験動物および飼育環境

被験動物として、Wistar系雄性ラット（実験開始時7週齢）を35匹用いた。ラットは動物飼育施設において12時間ごとの明暗サイクル（明期4:00から16:00）、室温 $22^{\circ}\text{C}\pm 2$ 、湿度 $50\pm 10\%$ の条件下で飼育し、水と餌は自由摂取とした。また、ラットを実験者に慣らすために、1日数分間のハンドリングを3日間程度行なった。ラットは、1ケージに2～3匹ずつ集団飼育し、行動テストおよび脳サンプル採取の前日に仕切りを用いて個別飼育とし、コントロール群には、生理食塩水=saline, 1 ml/kgを腹腔投与し、LPS群には、LPSを0.83mg/ml/kgを腹腔投与した。

（2）行動テスト

saline/LPS投与24時間後のうつ様行動を強制水泳試験を用いて評価した。手順は実験1と同様とした。

(3) ミクログリア活性の評価

ミクログリア活性の評価は、行動テストを行ってから一週間以上経過後、saline/LPS 投与 24 時間後に脳摘出を行い、ミクログリアの形態変化を定量化した。

(4) 運動条件

本実験では、異なる運動条件で、30 分間の急性トレッドミル走を、ラットの活動期である暗期 (17:00 以降) に行った。運動強度は、トレッドミルに置くだけの非運動 (0m/min; コントロール)、低強度運動 (15m/min)、高強度運動 (25m /min) の 3 条件とした。saline/LPS 投与 2 時間後に、各運動強度での急性トレッドミル走を行った。運動強度については、ラットの乳酸性作業閾値 (Lactate threshold: LT) がおよそ 20m /min であることから (Saito et al.,2004)、LT 以下と LT 以上の運動強度として設定した。運動条件は、saline + 非運動群、LPS + 非運動群、LPS + 低強度運動群、LPS + 高強度運動群の 4 群とした。

(5) 統計解析

全ての結果は、平均値±標準誤差で示した。行動テストの統計解析は、対応のない t 検定で行った。ミクログリア活性の統計解析は、運動条件を要因とした一要因分散分析で行った。統計的有意水準は、全て 5%未満とした。

3.2.3 結果

(1) 行動テスト

行動テストの結果より、LPS+非運動群の不動時間は、saline+非運動群およびLPS+低強度運動群よりも長かった。また、LPS+高強度運動群の不動時間は、LPS+低強度運動群よりも長かった（図7）。に強制水泳試験の結果を示した。一元配置分散分析の結果、 $F(3, 19) = 8.808$, $p < .001$ となり、運動条件の主効果が認められた。Tukey HSD 法による多重比較の結果、LPS+低強度運動群は、LPS+非運動群に対し、有意に不動時間が短いことが認められた ($p < .001$)。また LPS+非運動群は saline+非運動群に対し、不動時間が有意に長く ($p = 0.45$)、LPS+高強度運動群は、LPS+低強度運動群に対し、有意に不動時間が長いことが認められた ($p = .013$)。

強制水泳試験

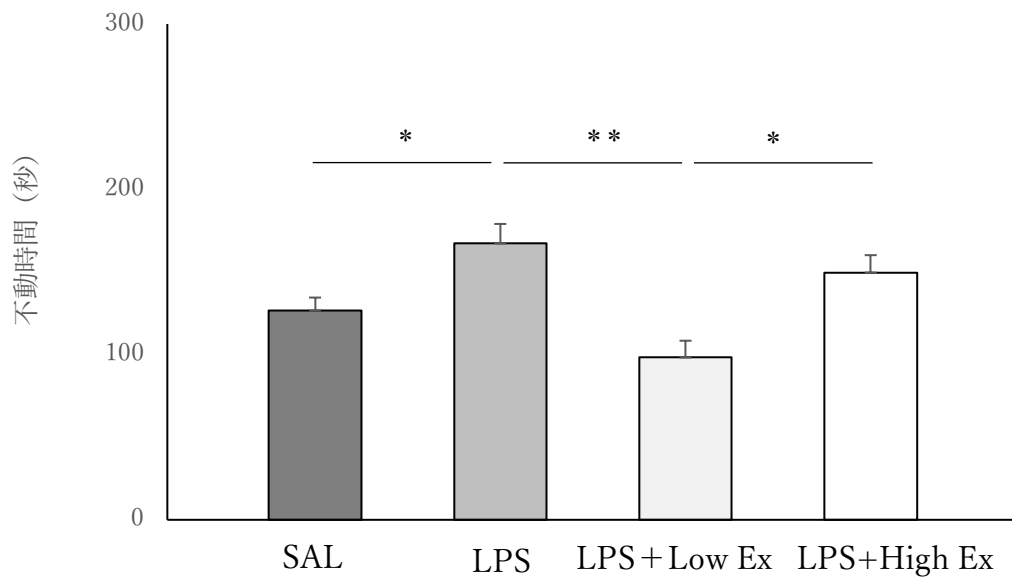


図 7 : LPS 投与後の異なる運動強度での 30 分間のトレッドミル走がうつ様行動に及ぼす影響

SAL ; saline + 非運動群、LPS ; LPS + 非運動群

LPS + Low Ex ; LPS + 低強度運動群、LPS + High Ex ; LPS + 高強度運動群

Mean ± S, * p < 0.05、* * p < 0.01

(2) ミクログリア活性

ミクログリア活性の評価より、評価した全ての脳領域で、他の3条件に比べ、LPS+非運動群の方がミクログリア面積が大きかった。またLPS+低強度運動群は、PVNではLPS高強度運動群と比べ、ミクログリア面積が大きかったが、Hippでは小さく、AmとDRNでは大きな差はみられなかった(図8)。一元配置分散分析の結果、PVNでは、 $F(3, 21) = 3.211$, $p < .048$ となり、運動条件の主効果が認められた。Tukey HSD法による多重比較の結果、LPS+非運動群は、saline+非運動群に対し、有意にミクログリア面積が大きいたことが認められた($p = .032$)。Hippでは、 $F(3, 21) = 4.677$, $p < .014$ となり、運動条件の主効果が認められた。Tukey HSD法による多重比較の結果、LPS+低強度運動群は、LPS+非運動群に対し、有意にミクログリア面積が小さく($p = .045$)、LPS+非運動群は、saline+非運動群に対し、有意にミクログリア面積が大きいたことが認められた($p = .019$)。Amでは、 $F(3, 21) = .430$, $p < .734$ となり、運動条件の主効果は認められなかった。DRNでは、 $F(3, 21) = 4.270$, $p < .019$ となり、運動条件の主効果が認められた。Tukey HSD法による多重比較の結果、LPS+非運動群は、saline+非運動群に対し、有意にミクログリア面積が大きいたことが認められた($p = .023$)。またLPS+低強度運動群とLPS+高強度運動群は、LPS+非運動群に対し、ミクログリア面積が小さい傾向がみられた(LPS+低強度運動群; $p = .082$, LPS+高強度運動群; $p = .060$)。

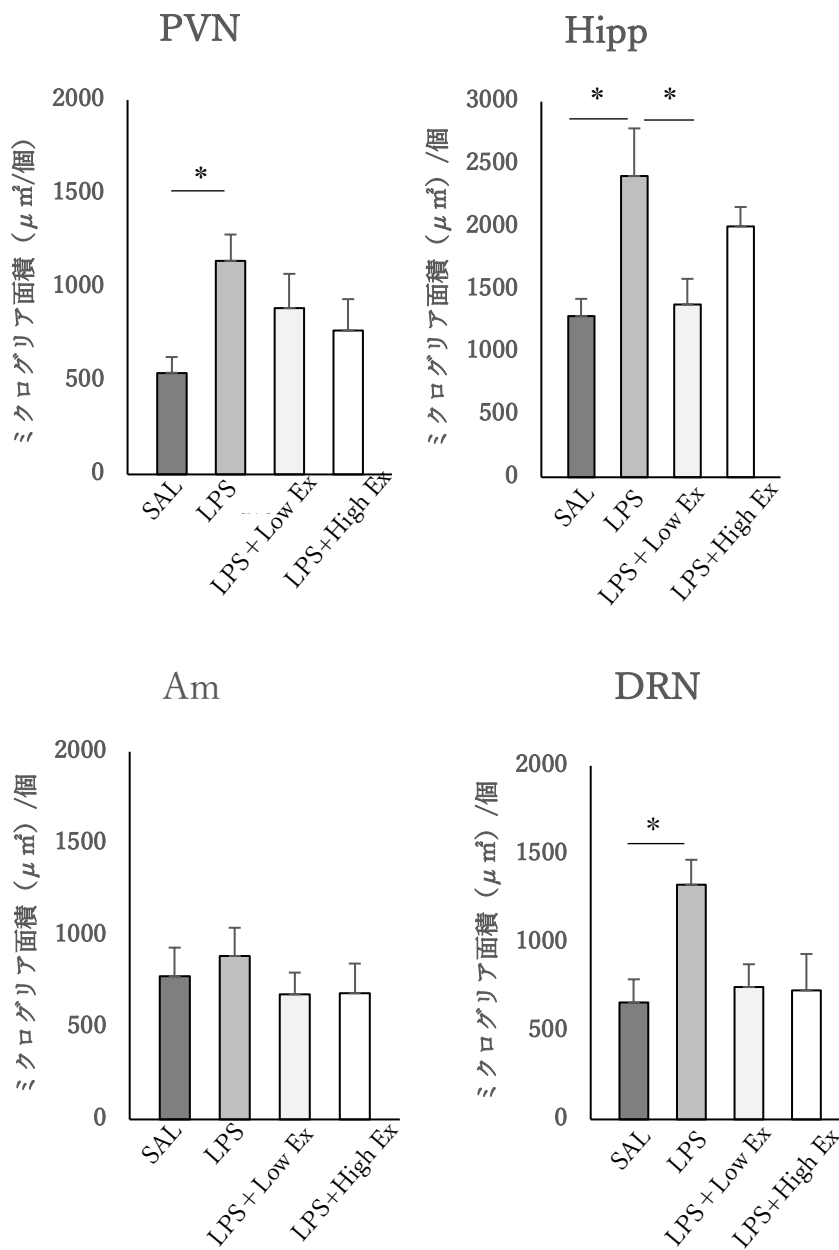


図 8 : LPS 投与後の異なる運動強度での 30 分間のトレッドミル走がマイクログリア面積に及ぼす影響

SAL ; saline + 非運動群、LPS ; LPS + 非運動群

LPS+Low Ex ; LPS + 低強度運動群、LPS+High Ex ; LPS + 高強度運動群

Mean ± S, *p < 0.05

3.2.4 考察

実験2では、LPS誘発性の炎症性うつ様行動に対する運動の抗うつ効果とミクログリア活性に対する抑制効果を、異なる運動強度を用いて検討した。強制水泳試験の結果より、実験1と同様に、saline+非運動群に比べ、LPS+非運動群の不動時間は有意に長かった。また、LPS+低強度運動群は、LPS+非運動群およびLPS+高強度運動群に比べ、有意に不動時間が短かった。ミクログリア活性の評価では、Hippにおいて、LPS+低強度運動群は、LPS+非運動群に比べ、有意にミクログリア面積が小さかった。

強制水泳試験の結果より、LPS投与により、saline+非運動群に比べLPS+非運動群の不動時間は有意に長いことが示された。このことは、先行研究(Dantzer et al.,2008, Fernois et al.,2007)および実験1と同様の結果を示しており、本実験においてLPS誘発性のうつ様行動は再現されていると考えられる。また、LPS+低強度運動群は、LPS+非運動群およびLPS+高強度運動群に比べ、有意に不動時間が短かった。このことは、急性低強度運動はLPS誘発性の炎症性うつ様行動に対して、抗うつ効果をもたらすことを示している。

ミクログリア活性の評価では、Hippにおいて、LPS+低強度運動群では、LPS+非運動群に比べ、ミクログリア活性が抑制されていることから、低強度運動によるLPS誘発性のうつ様行動に対する抗うつ効果は、Hippのミクログリア活性の抑制と関連している可能性があると考えられる。海馬は、血中のグルココルチコイドの増加により負のフィードバックによりHPA軸に作用し、ストレス反応を調節する機能を持つ。本実験においては、海馬のミクログリア活性が抑制されており、海馬の負のフィードバック機構の低下を抑制したことが、うつ様行動の改善に繋がった可能性がある。また海馬歯状回は、成体脳においても神経新生が生じ、その神経新生の阻害とうつ病との関連が報告されている脳部位である(Jacobs et al.,2000,Elizabeth et al.,2017, Hung et al., 2020)。活性化ミクログリアは、海馬歯状回の新生ニューロンの生存率を低下させることが報告されており(Monje et al.,2003)、低強度運動によるミクログリア活性の抑制は、長期的にみれば海馬歯状回における新生神経細胞の生存率を高め、うつ病発症の予防につ

ながる可能性があると考えられる。また、本実験では、DRN において、低強度運動および高強度運動ともにミクログリア活性を抑制する傾向がみられた。DRN は、5-HT (5-hydroxytryptamine : セロトニン) 神経系の起始核であり、急性低強度運動により 5-HT 神経活動が高まり、うつ様行動が抑制されることが報告されている (Morikawa et al.,2021) 。このことから、本実験では、DRN におけるミクログリア活性の抑制により、5-HT 神経活動が保たれ、抗うつ効果を示す可能性があることを示唆していると考えられる。また、DRN においては、高強度運動でもミクログリア活性は抑制されている傾向がみられているが、行動テストでは抑制されていない。Morikawa et al. (2021) は、ラット対して異なる運動強度での急性トレッドミル運動を用いた実験において、30 分間の低強度急性トレッドミル走が、うつ様行動を減少させる一方で、高強度トレッドミル走は、うつ様行動の減少させないことを報告している。これらのことから、運動のミクログリア活性に対する抑制効果は、運動強度依存的、脳領域特異的に作用していると考えられる。

本実験においては、ミクログリア活性の定量化の方法として、ミクログリア一個あたりの面積を用いたが、ミクログリア活性は、炎症促進的に作用する M1 タイプと抗炎症的に作用する M2 タイプに大別されることが報告されており (Cherry et al .,2014) 、ミクログリア面積の拡大のみでは M1/M2 タイプの区別することはできていない。今後の課題として、M1/M2 特異的マーカーを用いて、いずれのタイプのミクログリア活性の誘発および抑制が生じているのかを検討する必要がある。

謝辞

本修士論文を作成するにあたり、研究テーマを言葉にして表現するところから、実験計画の策定、知識・技術のご教授、論文の書き方に至るまで、手厚くご指導いただきました北一郎先生に心より感謝を申し上げます。理学療法士として病院勤務をする一方で、生命科学系の実験研究を行っていくことは、想像以上に多忙でしたが、社会人を続けながらも自分の想いを形にできるよう、多岐に渡りご配慮していただきました。自分の想いや疑問を実験研究という形で追求できたこの2年間の経験は、理学療法士としての技能の向上に繋がったというだけでなく、今後の人生においても大きな自信を与えてくれると思います。また大変ご多忙な中、副査を引き受けてくださり、懇切丁寧にご指導してくださいました西島先生、山内先生に厚く御礼申し上げます。

さらにヘルスプロモーションサイエンス学域の先生方、事務の皆様、院生の皆様、最愛の家族の温かい支えのおかげで、本研究を成し遂げることができました。この研究生活で得られた多くのことを、これから患者や地域社会に還元していきたいと思います。

最後に、本研究において犠牲となられた実験動物たちを謹んで哀悼し、多大な貢献をもたらしてくれた動物たちの尊い命に深く感謝の念を表します。

2023年1月6日

杉本 俊太郎

引用文献

- Amadio S.,Parisi C., Carrubba A.S.,Apolloni S,Volonte C.(2014).P2Y12 receptor on the verge of neuroinflammatory breakdown.Mediat. Inflamm 2014,1-15.
- Barites D. and Fernandes A.(2015).Neuroinflammation and depression:microglial activation , extracellular microvesicles and microRNA dysregulation.Frontiers in Cellular Neuroscience 9.
- Bartholomew, J. B., David Morrison, Joseph t. Ciccolo(2005). Effects of acute exercise on mood and well-being in patients with major depressive disorder. Medicine and science in sports and exercise 37(12): 2032
- Belen G.Ramirez, Cristina Blazquez, Teresa Gomez del Pulgar, Manuel Guzman and Maria L de Ceballos(2005). Prevention of Alzheimer's disease pathology by Cannabinoids:Neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. The journal of neuroscience 25(8:1904-1913).
- Bededek G., Meza-Romero R., Andrew S., Leng L., Burrows G.G., Bourddette D., Offner H., Bucala R., Vandenbark A.A.,(2013).Partial MHC class II constructs inhibit MIF/CD74 binding and downstream effects.Eur. J. Immunol 43:1309-1321.
- Bravo J.A., Paul Forsythe, Marianne V. Chew, Emily Escaravage, Helene M Savignac, Timothy G. Dian, John Bienenstock and John F. Cryan(2011).PNAS 108(38).
- Bremner, J. D., Meena Narayan, Eric R.Anderson, Lawrence H.Staib, Helen L. Miller, Dennis S Charney(2000). Hippocampal volume reduction in major

depression. *American Journal of Psychiatry* 157(1): 115-118.

Bruna Stefânia Ferreira Mello, Aline Santos Monte, Roger S. McIntyre, Joanna K. Soczynska, Charlyany Sabino Custódio, Rafaela Carneiro Cordeiro, JoãoHenrique Chaves, Silvânia Maria Mendes Vasconcelos, Hélio Vitoriano Nobre Júnior, Francisca Cléa Florenço de Sousa, Thomas N. Hyphantis, André Férrer Carvalho, Danielle Silveira Macêdo(2013). Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide(LPS) administration. *Journal of psychiatric research*, 47, 1521-1529.

Cherry D.J. John A. Olschowka, M.K.O'Banion.Neuroinflammation and M2 microglia:the good, the bad, and the inflamed.*Journal of Neuroinflammation* 11(98)

Cotel, M.-C, Ewelina M. Lenartowicz, Sridhar Natesan, Michel M. Modo, Jonathan D.Cooper, Steven C.R.Williams, Shitij Kapur, Anthony C. Vernon(2015). Microglial activation in the rat brain following chronic antipsychotic treatment at clinically relevant doses. *European neuropsychopharmacology* 25(11): 2098-2107.

Christopher J Henry, Yan Huang, Angela Wynne, Mark Hanke, Justin Himler, Michael T Bailey, John F Sheridan, Jonathan P Godbout (2008) . Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *Journal of Neuroinflammation*, 5:15 .

Diana M. Norden, Paige J. Trojanowski, Emmanuel Villanueva, Elisa Navarro, Jonathan P. Godbout (2016). Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity

following systemic immune challenge. *GLIA*, 64, 300-316.

Dantzer, R., Jason C.O'onnor, Gregory G.Freund, Rodney W.Johnson, Keith W.Kelley(2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain." *Nature reviews neuroscience* 9(1): 46-56.

Doorn K.J., Lucassen P.J.,Boddeke H.W.,Prins M.,Berendse H.W.,Drukarch B., Anne-Marie van Dam(2012).Emerging roles of microglial activation and non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 98(2):222-238.

Elizabeth Gould, Patima Tanapat, Bruce S.Mcewen, Gabriele Flugge, Eberhard Fuchs(1997). Proliferation of Granule cell Precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,95,3168-3171

Erickson A. M., Kenji Dohi, William A. Banks(2012).Neuroinflammation:A common pathway in CNS diseases as mediated at the blood-brain barrier. *Neuroimmunodulation* 19,121-130

Foster J.A.and Neufield K-A.M(2013).Gut brain axis: how the microbiome influenced anxiety and depression.*Trends in Neuroscience* 26(5)

Frenois,F.Maite Moreau, Jason O'Connor, Marc Lawson, Charlotte Micon, Jacques Lestage, Keith W.Kelley, Robert Dantzer, Nathalie Castanon(2007). Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the depression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology* 32(5): 516-531.

Ghoochani A., Achwarz M., Yakubov E., Engelhorn T., Doerfler A., Bu exchfelder M., Bucala R., Savaskan N., Eyupoglu I.Y.(2016).MIF-CD74 signaling impedes microglial M1 polarization and facilitates brain tumorigenesis.Oncogene 35:6246-6261

Han Yue, Zhang Lijuan, Wang Qiaozhi, Zhang Dingding, Zhao Qiuying, Zhang Jinqiang, Lei Xie, Liu Guangyi, You Zili(2019).Minocycline inhibits microglial activation and alleviates depressive-like behaviors in male adolescent mice subjected to maternal separation.Psychoneuroendocrinology 107:37-45.

Huang Y.L., Zeng N.X., Chen J., Niu J., Luo W.L., Liu P., Yan C., Wu L.L.(2020). Dynamic changes of behaviors, dentate gyrus neurogenesis and hippocampal miR-124 expression in rats with depression induced by chronic unpredictable mild stress

Hurley, L. L., Y. Tizabi (2013). Neuroinflammation, neurodegeneration, and depression. Neurotoxicity research 23(2): 131-144.

Ignácio, Z. M., Renato S. da Silva, Marcos E. Plissari, Joao Quevedo, Gislaïne Z. Reus(2019). Physical exercise and neuroinflammation in major depressive disorder. Molecular neurobiology 56(12): 8323-8335.

Jacobs B.L., H. van Praag, F.H.Gage(2000). Adult brain neurogenesis and Psychiatry:a novel theory of depression. Molecular Psychiatry 5,262-269.

Keller, J., R Gomez, G Williams, A Lembke, L Lazzeroni, G M Murphy Jr, A F Schatzberg(2017). HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. Molecular psychiatry

22(4): 527-536.

Kohut, M., D.A.McCann, D.W.Russell, D.N.Konopka, J.E.Cunnick, W.D.Franke, M.C.Castillo, A.E.Reighard, E.Vanderah(2006). Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of β -blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults. *Brain, behavior, and immunity* 20(3): 201-209.

Konsman, J. P., Patricia Parnet, Robert Dantzer.(2002). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends in neurosciences* 25(3): 154-159.

Li, Y.-J., Mei Xu, Zong-Hua Gao, Ya-Qi Wang, Zhen Yue, Yan-Xia Qiang, Xin-Xin Li, Can Zhang, Shu-Yang Xie, Ping-Yu Wang.(2013). Alterations of serum levels of BDNF-related miRNAs in patients with depression. *PLoS One* 8(5): e63648.

Lier J., Streit W., Bechman I.(2021).Beyond activation:characterizing microglial functional phenotypes.*Cells* 10(9),22236

Littlefield, A. M.,Sharay E.Setti, Carolina Priester, Rachel A.Kohman(2015). Voluntary exercise attenuates LPS-induced reductions in neurogenesis and increases microglia expression of a proneurogenic phenotype in aged mice. *J Neuroinflammation* 12: 138.

Liu, Y.,Fenghua XU, Shuang Liu, Gang Liu, Xiaohan Yang, Wenting Gao, Kai Fan, Henan Zhao, Jianmei Ma(2020). Significance of gastrointestinal tract in the therapeutic mechanisms of exercise in depression: Synchronism between brain

and intestine through GBA. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 103: 109971.

Luo, L., Congqin Li, Xinxin Du, Qilin Shi, Qiao Huang, Xiangyu Xu, Qiang Wang(2019). Effect of aerobic exercise on BDNF/proBDNF expression in the ischemic hippocampus and depression recovery of rats after stroke.*Behavioural Brain Research* 362: 323-331.

Maier, S. F., M. E. Seligman (2016). Learned helplessness at fifty: Insights from neuroscience. *Psychol Rev* 123(4): 349-367.

Mildner A., Huang H., Radke J., Stenzel W., Priller J.,P2Y12 receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases.*Glia* 65:375-387

Miller A.H.,Maletic V.,and Raison C.L.(2009).Inflammation and its discontents:the role of cytokines in the pathophysiology of major depression.*Biol Psychiatry* 65:732-741

Monje M. L., H.Toda, Theo D.Palmer(2003). Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302,1760-1765

Morikawa R, Natsuko Kubota, Seiichiro Amemiya, Takeshi Nishijima, Ichiro Kita(2021). Interaction between intensity and duration of acute exercise on neuronal activity associated with depression-related behavior in rats. *The Journal of Physiological Sciences* 71(1): 1-11.

Na, K. S., Han-Yong Jung, Yong-Ku Kim(2014). The role of pro-inflammatory

- cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 48: 277-286. *Cells* 8(7):691.
- Onanong Mee-inta, Zi-Wei Zhao and Yu-Min Kuo(2019).Physical exercise inhibits inflammation and microglial activation.
- Otsuka, T., Ayu Nishi, Seiichiro Amemiya, Natsuko Kubota, Takeshi Nishijima, Ichiro Kita (2016). Effects of acute treadmill running at different intensities on activities of serotonin and corticotropin-releasing factor neurons, and anxiety- and depressive-like behaviors in rats. *Behavioural Brain Research* 298: 44-51.
- Pedersen, B. K. (2017). Anti - inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. *European journal of clinical investigation* 47(8): 600-611.
- Pierezan, F., J. Mansell, Ambrus, A.Rodrigues Hoffmann(2014). Immunohistochemical expression of ionized calcium binding adapter molecule 1 in cutaneous histiocytic proliferative, neoplastic and inflammatory disorders of dogs and cats. *Journal of comparative pathology* 151(4): 347-351.
- Pizzagalli,D.A. and A.C.Roberts(2022).Prefrontal cortex and depression. *Neuropsychopharmacology* 47,225-246
- Raison C.L. and Miller A.H.(2003).Depression in cancer:New developments regarding diagnosis and treatment.*Biol Psychiatry* 54:283-294
- Sangeeta Pilkhwal Sah, Naveen Tirkey, Anurag Kuhad, Kanwaljit Chopra (2011) . Effext of quercetin on lipopolysaccharide induced-sickness behavior and

- oxidative stress in rats. *Indian J Pharmacol*, 43(2): 192-196
- Shelton, R. C. , A. H. Miller (2011). Inflammation in depression: is adiposity a cause?. *Dialogues in clinical neuroscience* 13(1): 41
- Singh N, Gayowski T, Wangener M.M., Marino I.R(1997). Vulnerability to psychologic distress and depression in patients with end-stage liver disease due to hepatitis C virus. *Clinical Transplantation* 11:406-411.
- Silverman M. N. and Sternberg E.M.(2012). Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1261(1):55-63.
- Smith, J. A., Arabinda Das, Swapan K.Ray, Naren L.Banik(2012). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain research bulletin* 87(1): 10-20.
- Song C. and Wang H.(2011). Cytokines mediated inflammation and decreased neurogenesis in animal models of depression. *Progress in Neuro Psychopharmacology & biological psychiatry* 35:760-768.
- Soya H, Mukai A, Deocaris C, Ohiwa N, Chang H, Nishijima T, Fujikawa T, Saito(2007). Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: Establishment of a minimum running stress(MRS) rat model. *Neuroscience Research* 58:341-348
- Stockmeier, C. A. (2003). Involvement of serotonin in depression: evidence from postmortem and imaging studies of serotonin receptors and the serotonin

transporter. *Journal of psychiatric research* 37(5): 357-373.

Streit, W. J., Robert E Mrazek, W Su T Griffin.(2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *Journal of neuroinflammation* 1(1): 1-4.

Wada, T., Masayuki Ishine, Teiji Sakagami, Kiyohito Okumura, Michiro Fujikawa, Shogo Murakami, Kuniaki Otsuka, Shoki Yano, Toru Kita, Kozo Matsubayashi (2004). Depression in Japanese community-dwelling elderly—prevalence and association with ADL and QOL. *Archives of Gerontology and geriatrics* 39(1): 15-23.

Zhang L., Zhang J and Zili You(2018). Switching of the microglial activation phenotype is a possible treatment for depression disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12.

Zhao S., MA L., Chu Z., XU H., WU W., LIU F.(2017) Regulation of microglial activation in stroke. *Acta Pharmacologica Sinica* 38:445-458.

笠倉 新. (1990). 炎症とサイトカイン. *炎症* 10(1): 9-16.

古賀 濃人, 戸田 裕之, 木下学, 吉野相英(2019). うつ病の病態における神経炎症仮説と治療ターゲットとしての可能性. *エンドトキシン・自然免疫研究* 22: 30-34