

## マイクロバブル炭酸浴のストレスコーピング効果

酒井 駿<sup>1)</sup>, 長谷川裕晃<sup>1)</sup>, 上村佐知子<sup>2)</sup>, 増田 豊<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>秋田大学大学院工学資源学研究科機械工学専攻

<sup>2)</sup>秋田大学大学院医学系研究科保健学専攻理学療法学講座

<sup>3)</sup>秋田大学医学部附属病院 心療センター

(received 18 November 2015, accepted 24 December 2015)

### Stress-coping effect induced by microbubble carbonated bathing

Shun Sakai<sup>1)</sup>, Hiroaki Hasegawa<sup>1)</sup>, Sachiko Uemura<sup>2)</sup> and Yutaka Masuda<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Mechanical Engineering, Akita University Graduate School of Engineering and Resource Sciences,

<sup>2)</sup>Department of Physical Therapy, Akita University Graduate School of Health Sciences,

<sup>3)</sup>Psychosomatic Division, Graduate School of Medicine, Akita University

#### Abstract

Forced-swimming gives mouse continuous stress. Mouse given the stress shows different stress-coping behaviors, climbing for escaping from the stressful situation and motionlessness for keeping the physical strength. The former is induced by humoral GalNac $\alpha$ <sub>1-3</sub>GalNAC-ceramide fractionated with 150 mM NaCl and the latter is done by other humoral lipid fractionated with 100 mM NaCl. In the present study, the authors investigate productions of these humoral lipids of mouse given forced swimming stress in CO<sub>2</sub>-bubble bathing. GalNac $\alpha$ <sub>1-3</sub>GalNAC-ceramide reactivity was increased in serum of mouse given the stress in microbubble CO<sub>2</sub> bathing and in serum of mouse given the stress in pressured CO<sub>2</sub> bathing. Motionlessness duration was increased in mouse treated with 100 mM NaCl fraction of mouse given the stress in microbubble CO<sub>2</sub> bathing, but was not in mouse treated with the fraction of mouse given the stress in pressured CO<sub>2</sub> bathing. These suggest that CO<sub>2</sub> bathing induced stress-coping effect on mice given forced-swimming stress, and that CO<sub>2</sub>-bubble form was related to quality of the effect.

**Key words :** CO<sub>2</sub>-bubble bathing, forced-swimming stress, humoral lipids, mouse, stress-coping effect

#### 緒 言

強制水泳ストレスを与えられたマウスは、そのストレス状況から逃れるための壁のぼり行動 climbing, あるいは体力を保全するための無動行動 motionlessness を見せる。これらの相反するかに見える行動はいずれ

もストレスコーピング行動であり、前者は 150M NaCl で分画されるところの血中糖脂質 GalNac $\alpha$ <sub>1-3</sub>GalNAC-ceramide によってもたらされ<sup>1)</sup>, 後者は 100 M NaCl で分画されるところの同定されていない血中脂質でもたらされる<sup>2)</sup>。一方、マイクロバブル浴は成長促進効果をもたらし<sup>3)</sup>, リラックス効果をもたらす<sup>4)</sup>とされている。本稿において、我々はマイクロバブル炭酸浴における強制水泳マウスのストレスコーピング血中糖脂質とストレスコーピング血中脂質の産生状況を検討する。

Corresponding author : Y. Masuda

Department of Psychosomatic Division, Akita University  
Graduate School of Medicine, 1-1-1, Hondo, Akita 010-  
8543 Japan

Fax : 81-18-884-6445

Tel : 81-18-884-6122

E-mail : y-masuda@med.akita-u.ac.jp

## 実験装置, 実験環境および実験操作

### 1. 実験動物

9 および 13 週齢の雌性 DDY マウスを日本クレア (株) より購入した。これらは、室温 21~25°C、湿度 50~60%、7:00~19:00 点灯、餌や水分は自由摂取という環境のもとで 1 週間飼育された後、実験に用いられた。なお、動物の飼育および実験はすべて秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター動物実験部門において行った。また本実験は「国立大学法人秋田大学動物実験規程」を遵守し、秋田大学動物実験委員会の許可を受けて行った。

### 2. 実験装置

#### ① マイクロバブル発生装置

図 1 に本実験で用いたマイクロバブル発生装置<sup>5)</sup>を示す。この装置はポンプで装置内に水を高速で送ることにより装置内が負圧になる構造となっている。装置内が負圧になることで気体を装置内へ自吸させることが可能である。発生装置内では、スリットを設けることによる流路変化を利用し、せん断効果を得て気泡を微細化する。本実験条件において発生する気泡の平均気泡径は約 55 μm である。本発生装置によって発生する気泡の詳細は既報<sup>6)</sup> に示してある。

#### ② 強制水泳実験装置

図 2 に強制水泳試験装置を示す。実験装置は水泳槽、マイクロバブル発生装置、駆動用ポンプ、空気流量計、炭酸ガスボンベから構成されており、発生装置への供給気体は炭酸ガスである。水泳槽には内径 0.16 m、高さ 0.55 m のアクリル製透明円筒容器を用いている。水泳槽内には水を 0.5 m の高さまで入れている。またポンプは全ての条件下において稼働させている。このとき、ポンプの駆動がマウスの動作に影響を与えないように、マイクロバブル発生装置と駆動用ポンプの吸引側ホースは水泳槽底部に取り付けた。

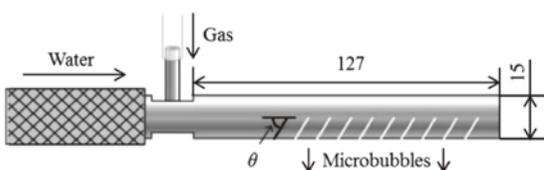


Fig. 1. Microbubble generator

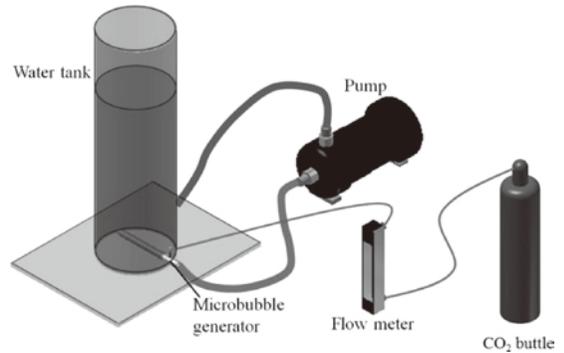


Fig. 2. The examination system

### 3. 実験環境

強制水泳試験は水温 20.5°C±0.5°C の水道水を用いて行った。実験は水のみでの試験であるコントロール環境 (Control)、炭酸ガスを水中に吹き込んだ圧力炭酸浴環境 (Pressured CO<sub>2</sub> Bathing: PCB)、内包気体を炭酸ガスとしたマイクロバブル炭酸浴環境 (Microbubble CO<sub>2</sub> Bathing: MCB) の 3 条件を設定した。MCB における水泳槽内の炭酸ガス濃度は高濃度炭酸泉 1,000 ppm に相当する pH 4.5 + 0.1 に調整した。PCB における炭酸ガス濃度は実験環境における溶解限度であった pH 5.4 + 0.1 に調整している。

### 4. ストレスコーピング量の測定

水を入れた水泳槽においてマウスは不断のストレスに暴露されている。このマウスのストレスコーピング行動はその不快状況から逃避するための壁のほり行動 climbing と体力を保全するための無動行動 motionlessness に分別される。水泳槽内で測定されるのは climbing の持続時間 climbing duration である。motionlessness の持続時間 motionlessness duration は強制水泳試験時間 5 分間から climbing duration を引いたものと設定した<sup>2)</sup>。

### 5. 統計学的検討

Kruskal-Wallis rank test は各群の統計学的相違の検出のために用いられた。その相違が認められたとき Mann-Whitney U test が用いられた。

### 6. 血中脂質の採取

#### ① 実験環境とマウス

前処理として実験 1 日前に、15 匹の 13 週齢マウス

に Control 環境において 15 分間の強制水泳ストレスを与えた。実験では MCB, PCB および Control 環境において各 5 匹, 1 匹あたり 5 分間の強制水泳ストレスを与えた。各マウスの motionlessness duration をこの 5 分間の実験試行中に測定した。

## ② 血中脂質の分画

試行終了後直ちに各群のマウスから血液を採取し、その血清を集めた。その血清からメタノール・クロロホルム分画法を用いて血中脂質を得た。すなわち、血清 2 ml に 2.5 ml のメタノールと 1.25 ml のクロロホルムを加え 3 分間激しく混和した。10 分間室温で放置した後、それに 1.25 ml のクロロホルムを加え 30 秒激しく混和した。さらにそれに水 2 ml を加え 30 秒激しく混和した後 150 g で 5 分間遠心した。下層にあるクロロホルム層を採取、風乾し、残された血中脂質を 2 ml の水に溶解した。この脂質溶液をあらかじめ 10 mM, NaHCO<sub>3</sub> pH8.3 で飽和そ水で洗浄した 500 μm の DE-52 (Whatman Co Maidstone, ULC) に吸着させた。溶出は 50・100・150・200・250 および 300 mM NaCl を持って行い、100 mM および 150 mM で溶出した分画を水をもって 2 ml に調整した。

## 7. climbing をもたらす血中糖脂質の活性

150 mM NaCl 溶出分画は climbing duration を増加させる GalNacα<sub>1-3</sub>GalNAc-ceramide を含む。この活性を測定すべく、GalNacα<sub>1-3</sub>GalNAc に反応する lectin DBA を用いた 50% ethanol-lectin ELISA<sup>1)</sup> を行った。すなわち実験操作 5 で得られた 150 mM NaCl 分画の 50 μl をエタノール 50 μl とともに 96 穴 ELISA プレート (Sumitomo Bakelite Co. Osaka) の well に入れ、2 時間室温で放置した。各 well は 5% borne serum albumin (Sygma-Aldciob Co. USA) をもって 30 分間 block した後、生理食塩水 (physiological saline, PS) をもって 5 回洗浄し、100 μl の biotinized DBA (Seikagaka Co. Tokyo) を入れた。45 分間放置した後、PS をもって 5 回洗浄し、100 μl の horseradish peroxidase-conjugated avidin (Seikagaku Co.) を入れた。5 分間放置した後 peroxidase-coloring kit (Sumitomo Bakelite Co.) を用いて発色させ、455/600 nm でその吸光度を測定した。

## 8. motionlessness をもたらす血中脂質の活性

100 mM NaCl 溶出分画は motionlessness duration を増加させる血中脂質を含む。この脂質は同定されていないのでこの活性を検討するのに bioassay 法を用いた<sup>2)</sup>。

すなわち 9 週齢マウス各 5 匹に実験操作 5 で得られた 100 mM NaCl 分画 200 μl あるいはコントロールとして PS 200 μl を腹腔内投与した。投与 20 分後、各マウスの 5 分間の試行時間内の motionlessness duration を Control 環境において測定した。

## 実験結果

### 1. 各実験環境における motionlessness duration

マウスの motionlessness duration は MCB において有意に増加した (表 1)。

### 2. ストレスコーピング血中糖脂質の活性

150 mM NaCl 溶出分画における GalNacα<sub>1-3</sub>GalNAc 活性は MCB 環境群及び PCB 環境群において増加していたが、前者において著明であった (表 2)。

### 3. ストレスコーピング血中脂質の活性

MCB 環境のもとで強制水泳ストレスを与えられた

Table 1. Motionlessness duration (sec) of mice in different situations

The duration (sec) in 5min		
Situation		
MCB	PCB	Control
293.8±5.3*	284.8±7.1	279.7±8.2

The value in the table is the mean±SD of the duration of the 5 mice.

\* p<0.05 compare to Control (Mann-Whitney U test)

MCB: Microbubble CO<sub>2</sub> bathing

PCB: Pressured CO<sub>2</sub> bubble bathing

Control: bathing without CO<sub>2</sub> bubble

Table 2. Lectin DBA binding affinity in lipid fraction eluted with 150 mM NaCl

Light absorbance			
The fraction obtained from mice in situation of			
MCB	PCB	Control	Blank (PS)
0.339	0.225	0.148	0.028

Light absorbance (dual-ware length 455/600 nm)

Lectin DBA recognizes GalNacα<sub>1-3</sub>GalNAc

PS: physiological saline

(28)

stress-coping effect CO<sub>2</sub> bubble bathing

Table 3. Motionlessness duration (sec) of 9 weeks-old mice treated with the 100mM NaCl fraction

The duration (sec) in 5min			
The fraction obtained from mice in situation of			
MCB	PCB	Control	The control (treated with PS)
290.4±5.1*	264.0±11.0	284.8±0.8*	274.2±2.3

The value in this table is the mean±SD of the duration of the 5 mice

K=3 n1=n2=n3=5 H=9.48 p<0.05 (Kruskal-Wallis rank test)

P<0.05 compared to the control (Mann-Whitney U test)

PS: physiological saline

マウスの 100 mM NaCl 溶出分画を投与されたマウスの motionlessness duration は有意に増加した。一方、PCB 環境のもとでそのストレスを与えられたマウスから得られた 100 mM NaCl 溶出分画を投与されたマウスにおいては motionlessness duration の増加は見られなかった (表 3)。

### 考 察

今回の検討で以下が明らかになった。強制水泳ストレスを与えられたマウスは異なる二つの内因性ストレスコーピング物質を産生する。micro bubble CO<sub>2</sub> は両者の産生を促進する。一方、pressured bubble CO<sub>2</sub> は climbing 誘導物質の産生を促進するが motionless 誘導物質の産生を抑制した。これらは、内因性ストレスコーピング物質の産生に対し CO<sub>2</sub> bubble の形状が深く関わっていることを示唆している。

炭酸泉の癒し効果は十分な科学的検討を経ないながら一般に認知されてきた。その癒し効果は気力回復と体力温存に分別される。前者がマウスの climbing をもたらす GalNacα<sub>1-3</sub>GalNac-ceramide の産生と同義であり後者が motionlessness をもたらす血中脂質の産生と同義であると前提したとき、今回の検討により炭酸泉の癒し効果の生理的妥当性が説明されるだけでなく、その CO<sub>2</sub> bubble の形状により異なる癒し効果が期待されることが示唆された。その血中出現のメカニズムは不明だが、GalNacα<sub>1-3</sub>GalNac-ceramide の産生が alpha2-adrenoceptor 活性に関わることは報告されている<sup>7)</sup>。motionlessness をもたらす血中脂質の化学構造は同定されていないが、体力保全の前提なるリラ

クゼーションに beta-adrenoceptor 活性が関わる<sup>8)</sup> ことからその薬理活性は示唆されるかもしれない。

adrenoceptor 活性がうつ状態に深く関わりをもつことは知られている。本研究における検討は薬物を用いないうつ状態の改善に対し科学的研究視野を開くものであると思われる。

### 謝 辞

本研究は秋田大学における医工連携の先駆けと位置づけられるものであります。かような研究機会を与えていただいた秋田大学名誉教授杉山俊博先生には末尾ながら記して深謝いたします。

### 文 献

- Masuda, Y. and Sugiyama, T. (2000) The effect of globopentaosylceramide on a depression model, mouse forced swimming. *Tohoku J. Exp. Med.*, **191**, 47-54.
- Masuda, Y. (2015) A humoral lipid inducing stress-coping behavior motionlessness on mouse given forced swimming stress. *Akita. J. Med. (in print)*
- 大成博文 (2007) マイクロバブル技術の特徴と可能性. *Journal of MMJ*, **123**, 29-96.
- 清水祐樹, 河原ゆう子, 小粥文雄ら (2007) 入浴中の湯のマイクロバブル性状が温熱効果と入浴後のイメージに及ぼす影響. *The autonomic nervous system*, **44** (4), 418-424
- 長谷川裕晃 (2012) マイクロバブル発生装置. 日本国特許第 4884693 号
- Hasegawa, H., Nagasaka, Y. and Kataoka, H. (2008) Electrical potential of microbubbles generated by shear flow in pipe with slits. *Fluid Dynamic Research*, **40**, 554-564.
- Masuda, Y., Ohnuma, S. and Sugiyama, T. (2001) Alpha2-adrenoceptor activity induces the antidepressant-like glycolipid in mouse forced swimming. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **23**, 19-21.
- Marsland, A.L., Salmon, P., Terry, P. and Stanford, S.C. (1990) Effects of propranolol on, and noradrenergic correlates of, the response to nonreward. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **35**, 41-46.