

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04500

研究課題名(和文) 疲労に抗して行動する意欲を維持する脳内機構の解明と食品によるその調節の可能性

研究課題名(英文) Studies of brain mechanisms underlying the maintenance of motivation for action resilient to fatigue load and their regulation by food

研究代表者

井上 和生 (Inoue, Kazuo)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80213148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：レバーを押すことで脳報酬系に快刺激が得られる脳内自己刺激(ICSS)を用い疲労度測定法を検討した。刺激強度を変動させ脳報酬閾値を算出するRF法、所定時間内のレバー押し回数を記録するFR法、同じ刺激を得るためのレバー押し回数が漸増するPR法を比較した。運動負荷で各方法ともICSSの動機が減退した。情動ストレスではRF法でのみ動機の減退が検出された。運動意欲に報酬系側坐核に投射するドーパミン作動性神経が関与し、カフェイン投与によってその意欲の持続が引き起こされることを明らかとした。トレーニングによって持久能力が増大すると、同一運動負荷に対する疲労度が抑制されることをICSSを用いて明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The determination of fatigue with intra-cranial self stimulation (ICSS) was studied in rats. Rate-frequency, fixed ratio and progressive ratio protocol were evaluated. All protocols detected the decrease in motive for acquiring reward stimulus after exercise load with treadmill running, however, only the RF protocols revealed the reduced motivation after emotional stress. The dopaminergic projection to nucleus accumbens was demonstrated to be related to the formation and maintenance of exercise will. The administration of caffeine caused the enhancement of continuing motivation for running in rats. Exercise training increased endurance capacity. After successful exercise training, it was determined by rate frequency protocol of ICSS that rats showed the lesser extent of fatigue to the same intensity of exercise load compared with those of non-trained rats.

研究分野：栄養化学

キーワード：疲労 脳内自己刺激 脳報酬系 ストレス 運動

## 1. 研究開始当初の背景

日本において疲労が様々な社会的損失の原因となっていることが認識されるようになってからかなりの年数が経つ。定量的に疲労度を測定することは、抗疲労・疲労回復効果をもつ食品を開発し、その効果を証明するうえで非常に重要である。代表者は精神的疲労についてもオペラント行動の一種である脳内自己刺激 (intra-cranial self stimulation; ICSS) を用いた測定の応用可能性を示したが、その妥当性にはさらに検討が必要だった。また動物が運動中に脳報酬系の活動が増加することをin vivo マイクロダイアリシスで明らかにしたが、この現象がどのような意義を持つかは不明であった。これが運動による労苦を緩和する役割を持つことは予測される。疲労と行動する意欲(運動する動機)は互いにブレーキとアクセルの役割を果たすと考えられるが、運動時脳報酬系活動亢進の動機維持への関与は疲労対処において標的とする過程となりうるか解明する必要があった。

## 2. 研究の目的

疲労によって行動する意欲が減退することは個人としても社会としても大きな損失である。このため行動する意欲がどのように生成/維持されるかを解明し、疲労に抗する手段を開発することは非常に重要な意義を持つ。本申請研究では、疲労が生じるような負荷の後にどれだけ行動する意欲=動機が残っているか定量する系を確立する。行動する意欲、動機の生成/維持に脳報酬系が関与していることが示されているが、その構成要素である側坐核コアでのドーパミン作動性神経系の活動を明らかにし、その寄与を薬理的に詳細な検討を行う。これら脳内機構の解明を基に、持久能力を向上させる作用を持つ食品によって動機の維持を図ることができるかを明らかにする。またトレーニングによる持久運動能力の増大は疲労負荷後の動機の維持に寄与するかも明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 脳内自己刺激 (ICSS) 法

ラット脳内の内側前脳束に電気刺激を行うための電極を設置し(刺激電極設置コーディネートAP: -2.8mm, ML: 1.7mm, DV: 7.9mm from bregma)。レバーを押して自己刺激する個体を選抜し、実験に供した。

### ICSS 刺激プロトコール

**rate-frequency (RF) 法**: rate-frequency 法は電気刺激する強度を段階的に変化させ、強度毎のレバー押し行動数を測定し、刺激-応答曲線から、ICSSを開始する最小刺激強度=脳報酬刺激閾値を算出した。

**fixed ratio (FR) 法**: fixed ratio 法は1回の電気刺激報酬を受けるために必要なレバー押し回数を固定する方法で、FR3であればレバー押し回数3回で、FR15であればレバー押し回数15回で報酬刺激が1回得られるとする方法である。本研究では20分以内にレバー押し回数の総数を測定した。

**progressive ratio (PR) 法**: progressive ratio 法は報酬電気刺激を得るためのレバー押し回数が徐々に増加していくプロトコールで、本研究では3, 4, 6, 7, 9, 11, 14, 16, 19, 22, …と増加させた。10分以内に所定のレバー押し回数に達しなかったとき、その前回のレバー押し回数をブレイクポイントとし、どれくらい労力を払ってもその報酬刺激を得ようとするかを測定した。

### ■疲労負荷の方法

#### 肉体的疲労を負荷する方法

**流水プール**: 京大松元式流水プール(改)を用い、マウスの限界遊泳時間で評価した。

**トレッドミル走行**: ラットの肉体的疲労生成にはトレッドミル走行を用い、速度15m/分・傾斜角3°を標準の強度とした。

**コミュニケーションボックス**: ラットの精神的ストレス負荷はコミュニケーションボックスによる曝露を用いた

**拘束ストレス**: 拘束ストレスは500mLのペットボトルを底部で切断し、ラットを挿入できるようにしたものを用いた。

### ■自発行動量の測定

**自発行動量を用いた測定**: 幅24×奥38×高さ20cmのオープンフィールドでの動物の自発的な移動を赤外線センサーによって測定した。

### 自発運動量の測定

自発運動量を用いた測定: 回転カゴを設置した飼育ケージで動物を飼育し、これを回した回数を記録することで自発運動量とした。回転カゴと居住区との間に仕切りを設置し、1日のうち3時間だけ回転カゴに移動できるようにした。これを6日間連続して行い、4日目と5日目の運動量を平均してベースラインとし、6日目に所定の疲労負荷を行った後に測定した運動量と比較した。

### 走行意欲の測定

ラットに15m/分、傾斜角3度でトレッドミル走行を行わせた。走行時間は60分とし、運動を強制するベルト後端部での電気刺激は行わなかった。ラットの走行開始から停止するまでの時間を測定し、生存曲線でグラフ化した

### ■マイクロダイアリシス

ラット側坐核にガイドカニューレを設置する手術を行った。shell部のコーディネートはAP: -1.6mm, ML: 0.85mm, DV: 6.5mm from bregma、core部はAP: -1.65mm, ML: 1.60mm, DV: 6.30mm from bregmaとした。走行中サンプリングは10分毎とした。

### ■脳内微量投与

ラット側坐核への薬剤投与は側坐核両側に対して行った。

## 4. 研究成果

**I. ICSS (intracranial self-stimulation, 脳内自己刺激) を用いた疲労度測定法の最適化**  
**薬理的な確認** ICSSでの3種のプロトコールにおいて、行動する動機に影響する薬理的処置がどのような結果を示すかを明らかにした。ノミフェンシンは脳内でのドーパミン、およびノルアドレナリン濃度を高める作用を

持ち、動物の自発的行動を増大させる作用を持つ。U-69593は $\kappa$ -オピオイド受容体アゴニストであり、動物の自発的行動を低下させることが知られている。

RF法ではノミフェンシン投与で脳報酬閾値は用量依存的に低下することが明らかとなった (Fig.1)。

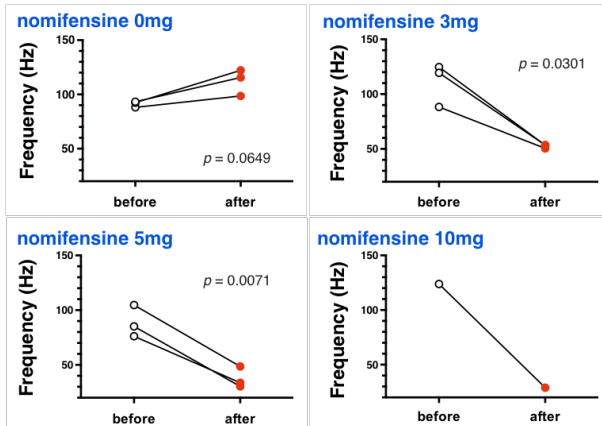


Fig. 1

またU-69593投与では脳報酬閾値は増大し、同じ刺激の強さではレバー押し回数が低下することがわかった (Fig.2)。

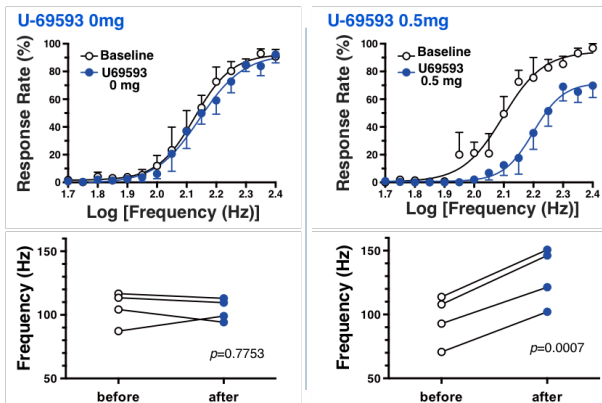


Fig. 2

FR法においては、FR3では報酬を得るための努力が少なく済み、レバー押し回数が多かったためノミフェンシンの効果は有意ではなかったが、それでもレバー押し回数は増加する傾向であった。一方U-69593投与でレバー押し回数は有意に減少した (Fig. 3)。

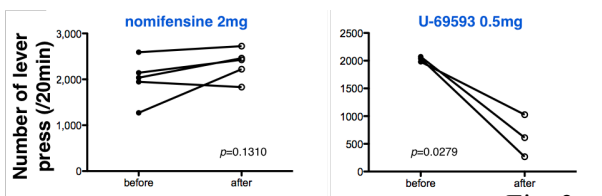


Fig. 3

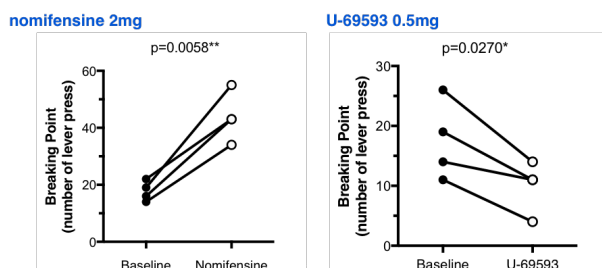


Fig. 4

ミフェンシン投与でブレイクポイントは有意に増大し、U-69593投与で有意な減少を示した (Fig. 4)。

いずれの方法でも脳報酬系を活性化するような処理は脳報酬閾値の低下を、脳報酬系を抑制するような処置は閾値の低下を示した。

これらの結果からICSSにおいて検出力の差はあると考えられるが、動物に負荷を与えた場合、脳報酬系への作用による動機の大さを定量的に評価しうる可能性が示された。

疲労負荷 3種類の疲労(を引き起こすと考えられる)負荷を実験動物に与え、ICSSに及ぼす影響からそれぞれのプロトコルの妥当性を評価した。

運動：速度15m/分、傾斜角3度、30分間の運動負荷を与えた場合にICSSでの脳報酬閾値への作用を検討した。RF法では群平均の応答曲線が右にシフトし、個体毎の脳報酬閾値の増大が見られた。このことから運動負荷によって行動する動機(レバー押しによって報酬を得ようとする意欲)が低下し、同一の応答を得るためにはより大きな報酬刺激が必要であることがわかった (Fig. 5)。

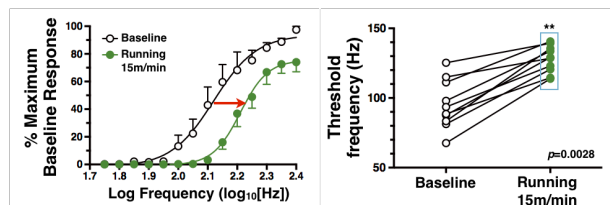


Fig. 5

FR法では、報酬を得るためのレバー押し回数が少ない場合 (FR=3) は有意な低下が見られなかったが、報酬を得るための努力が必要な場合 (FR=15) 大きなレバー押し回数の減少が見られた (Fig. 6)。

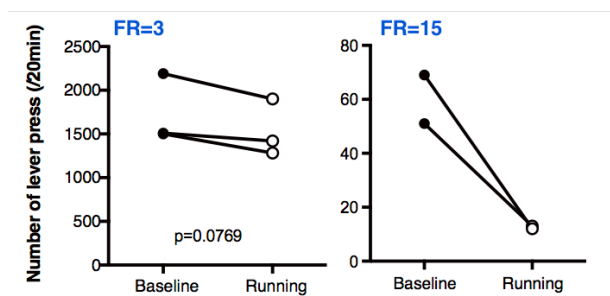


Fig. 6

PR法では運動負荷によってブレイクポイントの値が低下し、報酬を得ようとする意欲が低下することがわかった (Fig. 7)。

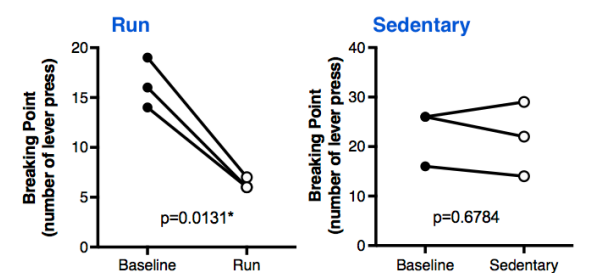


Fig. 7

いずれも報酬を得るために大きな努力が必要な条件は忌避されることが明らかとなった。同一の報酬刺激ではRF法、PR法で応答が低下したが、FR=3では有意なレバー押し回数の低下を示さなかったことから、FR法では報酬獲得の条件を調節しなければ検出感が妥当なものとならないことがわかった。  
 コミュニケーションボックス：コミュニケーションボックスで30分間の情動ストレスを与えた後、各ICSSプロトコルでの応答の変化を検討した。RF法では群間の平均に大きな変動は見られなかったが、個体毎の脳報酬閾値では統計的に有意な上昇が見られた (Fig. 8)。

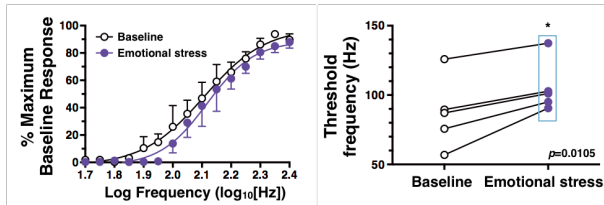


Fig. 8

FR法での検討はまだデータが得られておらず、PR法では有意な変動は観察されなかった (Data not shown)。コミュニケーションボックス負荷での自発運動量なども変動の個体差が大きく (後述)、ストレスに対する抵抗性の違いが影響しやすい負荷なのかも知れない。  
拘束ストレス：拘束ストレスに対するICSS応答はPR法のみ予備検討的なデータが得られているが、拘束によるブレイクポイントの値の低下傾向が観察された (data not shown)。

自発行動、自発運動との比較 疲労負荷に対しICSSで観察された行動の変化の意味を検討するため、以前から疲労様行動の評価に用いていた自発行動や自発運動の変化との比較を行った。

オープンフィールドでの自発行動：オープンフィールドでの自発行動は新規環境での測定の場合、探索行動を含むため、疲労があっても安全確認を行うことで行動量が高くなる傾向がある。運動負荷後の自発行動は負荷に用いた速度の15m/分、20m/分 (いずれも傾斜角3度) どちらも自発行動量は低下し、疲労によって動きたくない感覚が生じているものと考えられた (Fig. 9)。

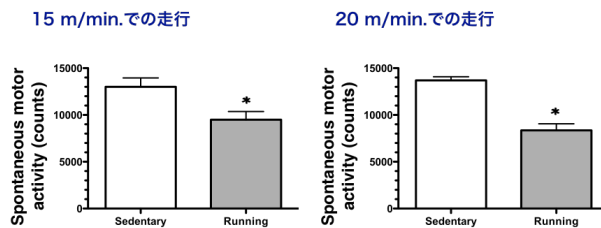


Fig. 9

疲労負荷としてコミュニケーションボックスでの情動負荷を与えた場合、新規ストレスを避けるために予め1時間測定環境 (オープン

フィールド) に馴化した条件では自発行動量が増大した (Fig. 10)。

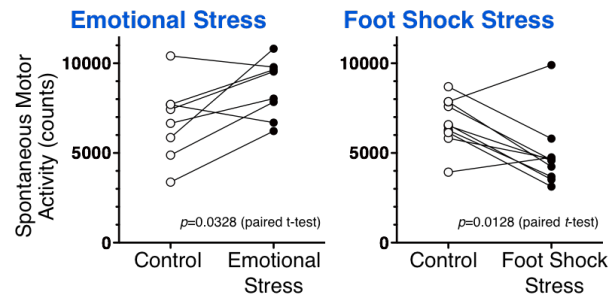


Fig. 10

情動負荷では肉体的疲労はないと考えられるが、自発行動が増加した理由は不明である。拘束負荷後の自発行動測定はまだ行っていないためデータはない。

自発回転カゴ運動：オープンフィールドでの測定とは異なり、自発回転カゴでの運動量測定は十分な馴化を行っており、探索行動は含まれない。この運動量は完全に自発的なもので、疲労をおして行動を促す要因はない。運動負荷後の自発運動は肉体的疲労による自発的な行動を抑制し、どの走行速度であっても有意に自発回転カゴでの自発運動を抑制した (Fig. 11)。

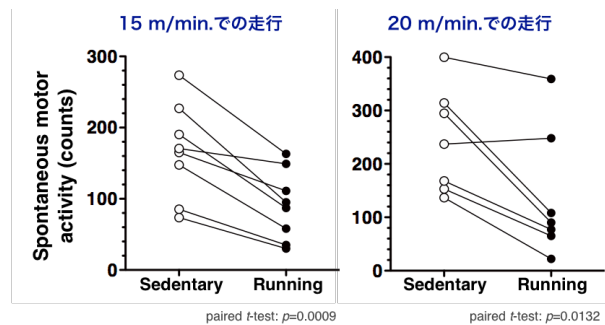


Fig. 11

コミュニケーションボックスによる情動負荷後の自発運動はわずかに減少傾向は見られるが統計的に有意なものではなかった (Fig. 12)。

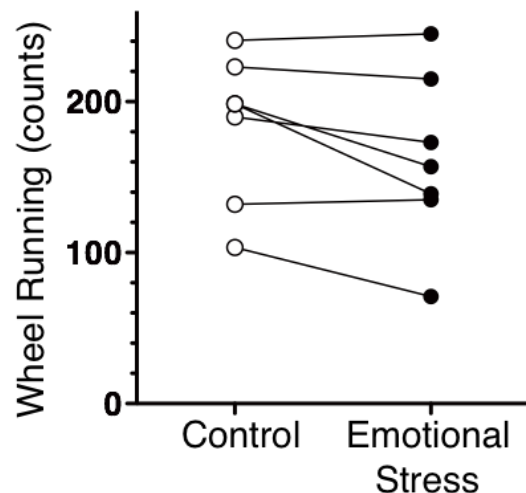


Fig. 12



拘束負荷に関して、拘束時間が1時間の場合自発運動の増減は個体毎によって異なり、統計的な傾向は認められなかった。拘束時間が2時間の場合、回転カゴにおける自発運動は有意に減少し、行動する意欲が低下していたことが明らかとなった (Fig. 13)。

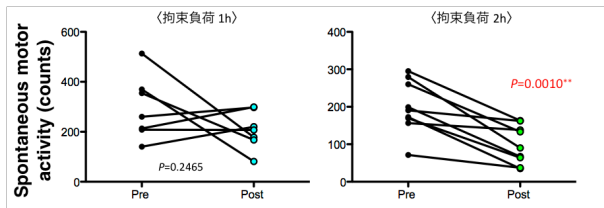


Fig. 13

運動負荷、および拘束負荷ではいずれのICSSプロトコルでも行動する意欲の低下(傾向)が観察された。自発行動量、自発運動量においても減少が見られ、肉体的疲労および疲労感によって行動/運動量が低下していた。これらに対し情動ストレスでは、行動する意欲の現れ方は測定法によって異なり、ICSSでrate frequency法による測定で行動する意欲の低下が観察されたが、他の自発行動量、自発運動量では肉体的疲労時のような応答は見られず、疲労感が生じているか否か明確に判断できなかった。拘束負荷は肉体的な疲労は少ないと考えられるが、ヒトでの疲労を模し、精神的な疲労が生じているとみなしうる実験動物での疲労負荷法をさらに検討する必要がある。

## II. 運動負荷時の側坐核ドーパミン(DA)動態のマイクロダイアリシスによる検討

脳報酬系を構成する側坐核はそのshell部とcore部で機能が異なると考えられている。これまで動物の走行中に側坐核shellでDA濃度が増大することを既に明らかにしていた。側坐核へ投射するDA作動性神経の活動亢進が脳での報酬となることから、側坐核のshellとcoreでのDA作動性神経の活動を細胞外液中DA濃度を測定することで評価した。細胞外液のDAはマイクロダイアリシスで回収し、定量を行った。Fig. 14に側坐核shellおよびcoreでの細胞外液中DA濃度の変化を示した。

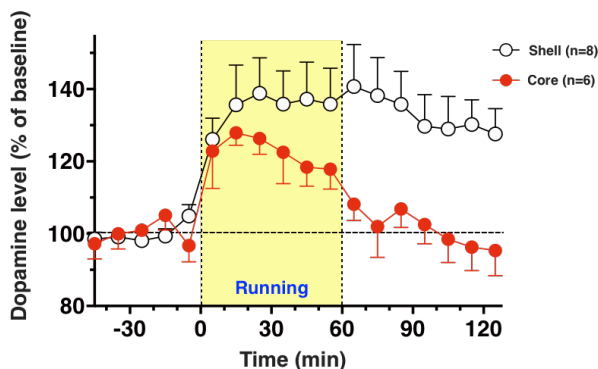


Fig. 14

ラットの走行開始後いずれの部位でもDA濃度

は増大した。shell部では走行終了後もDA濃度が高い状態が続いたが、core部では走行終了後ベースラインレベルに復帰し、両部位間で異なる挙動が観察された。

## III. 動機の生成/維持に対して側坐核D1およびD2受容体が果たす役割の解明

DAの受容体のうち側坐核で発現しているものは主としてD1受容体とD2受容体であるため、それぞれの受容体に特異的な阻害剤をshell部あるいはcore部に投与して機能を抑制したときに、ラットの走行にどのような影響を与えるかを検討した。shell部にD1アンタゴニスト(SCH23390)、あるいはD2アンタゴニスト(Eticlopride)を投与した場合、いずれもコントロール群に比べ走行時間の短縮を引き起こした (Fig. 15)。

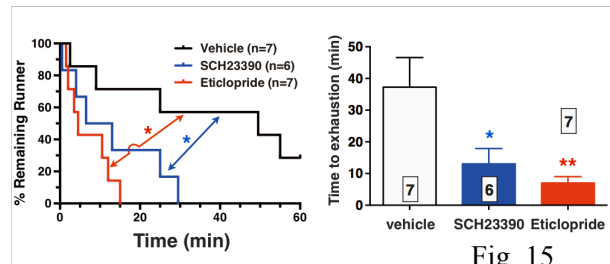


Fig. 15

D1に比べD2受容体を抑制した方がより走行時間が短くなる(ラットの走行意欲が小さくなる)傾向を示したが、アンタゴニストを投与した群間には統計的に有意な差はなかった。一方core部にアンタゴニストを投与した場合、いずれもコントロール群に比べて走行時間の有意な短縮が観察されたが、D1、D2アンタゴニスト間で走行時間に差異は認められなかった (Fig. 16)。

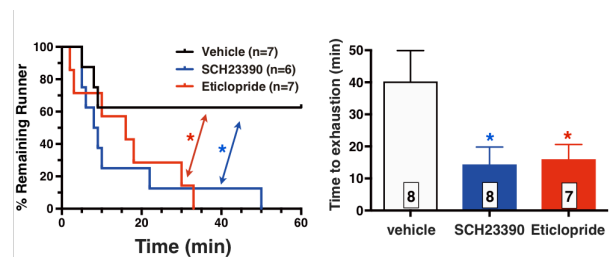


Fig. 16

本実験では薬物の拡散範囲をshell部とcore部各々に完全に限定することが困難、およびD1とD2アンタゴニストの各々の作用が完全に受容体特異的とはいえ、部分的に作用している可能性が否定できないことから側坐核各部位でのD1およびD2受容体の役割の差異について明らかになったとは考えにくい。異なる薬物を用いて同様の実験結果が得られるかなどを他の方法を試みる必要がある。

## IV. 食品によって抗疲労・疲労回復効果が認められるものは動機の維持に寄与するか抗疲労効果を持つ食品の探索の一環としてカフェインが持久運動に及ぼす影響を検討した。

限界までの持久運動能力を測定できる流水プールを用いた遊泳運動ではカフェインの効果は観察されず、コントロール群マウスとの遊泳時間の差はなかった(data not shown)。これに対し運動を止めても生命の危険が生じないトレッドミル走行では、コントロール群ラットの走行時間に対しカフェイン投与群の方が有意に走行時間が延長した(Fig. 17)。遊泳運動と走行運動でのカフェインの効果の現れ方の違いから、(本実験で投与した濃度での)カフェインは限界に至るまでの持久運動能力そのものを向上するのではなく、走行を維持する意欲を高める効果を示したものと考えられる。

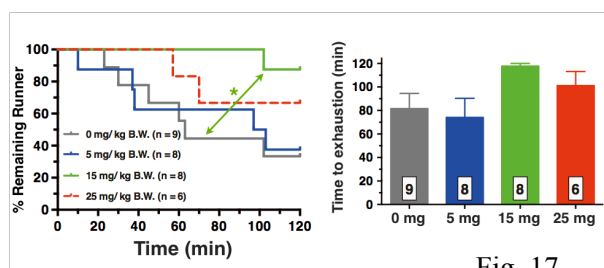


Fig. 17

#### V. トレーニングによる持久運動能力の増大は動機の維持に寄与するか

6日間のトレーニングによって15m/分、傾斜角3度でのトレッドミル走行を30分遂行可能なラットでは、トレーニングなしで同じ時間走行した場合に比べて脳報酬閾値の増大が有意に抑制され、走行負荷が行動する意欲の低下を引き起こしていないことが示された(Fig. 18)。トレーニングによって同一の運動負荷であれば疲労の程度が低くなることは経験的に理解できるが、その現象がICSSによって定量的に明らかにされた例と考えられる。

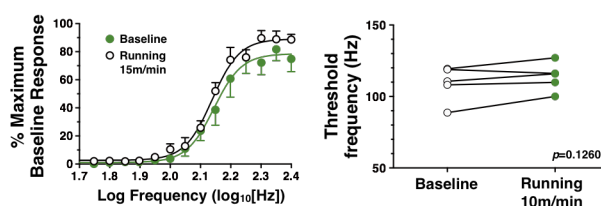


Fig. 18

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0件)

〔学会発表〕 (計 8件)

1. Kazuo Inoue, Satomi Ihi, Satoko Ueno, Miki Isono, Hiromitsu Nagayoshi, Fushiki Tohru, Development of a new method for determination of central fatigue with intracranial self-stimulation, 12th Asian Congress of Nutrition
2. 石井 仁、横山 小夜香、井上 和生、伏木 亨、持久運動時の脳報酬系機能に関する研究、日本農芸化学会2015年度大会
3. 井樋 聡美、井上 和生、伏木 亨、脳内

自己刺激を用いた中枢性疲労の新規測定法確立とその応用、日本農芸化学会2015年度大会

4. 井上和生、栄養/運動に対する中枢神経性調節を探る、日本栄養食糧学会2016年度大会
5. 井本 優衣、井上 和生、横山 小夜香、石井 仁、高谷 亮典、坐核に投射するドーパミン作動性神経による運動に対する動機の調節、日本栄養食糧学会2016年度大会
6. 高谷 亮典、横山 小夜香、伏木 亨、井上 和生、運動の動機形成における脳内報酬系の役割、日本農芸化学会2016年度大会
7. 阪本 奈津実、井本 優衣、横山 小夜香、高谷 亮典、石井 仁、井上 和生、持久運動する動機の生成と維持にカフェインが及ぼす効果とその機構、日本栄養食糧学会2017年度大会
8. 志村 広樹、井上 和生、中枢性疲労を軽減する食品成分の探索、日本農芸化学会2018年度大会

〔図書〕 (計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

○取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井上 和生 (INOUE KAZUO)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：80213148

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )