

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380070

研究課題名(和文) 疲労の生成及びそれが行動する動機の減弱に関わる脳内機序の解明と食品によるその調節

研究課題名(英文) Studies on the mechanism of manifestation of fatigue and its effects on the attenuation of motivation to move and on the possibility of their control by ingestion of foods/food components

研究代表者

井上 和生 (Inoue, Kazuo)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80213148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 脳内自己刺激(ICSS)を応用した定量法により、実験動物での運動による疲労、および精神的ストレスによる疲労を測定できる可能性を示した。(2) トレッドミル走行時の脳報酬系側坐核でのドーパミン作動性神経活動を明らかにした。(3) 運動時血中乳酸濃度増大が脳および肝臓で検知され、これらが脳脊髄液中TGF- β 活性化につながり、疲労様行動を起こすことを示した。(4) マウス遊泳能力測定を応用し、カテキンが持久運動能力を延長すること、およびラットICSSを用いた疲労度測定により、有機酸(酒石酸)が運動負荷で引き起こされた疲労感の生成、あるいは行動する動機の低下を減弱することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：(1) Intra-cranial self-stimulation could be used for determination of fatigue (or attenuation of the motivation to move) induced by both physical and psychological load in rat. (2) By using this system force-feeding of tartrate suggested to attenuate manifestation of fatigue/decrease in the motivation to move caused by treadmill running. Time course changes in extracellular concentration of dopamine (DA) in nucleus accumbens shell and core during treadmill running in rat were determined. (3) The increase in blood lactate induced by physical exercise was detected by both the brain and the liver, and this lead the activation of TGF- β in cerebrospinal fluid. Increase in the concentration of active form of TGF- β has already been shown to cause fatigue-like behavior in animals. (4) Force-feeding of catechin was suggested to increase endurance capacity in mice by using adjustable-current swimming pool system.

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

1. 研究開始当初の背景

日本において疲労が原因となって様々な社会的損失が起こ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。しかしながら、疲労や疲労感をうまく調節する有効な手段が開発されたとは未だいえない。昨年度までの研究により、著者は肉体的及び精神的な疲労を実験動物で測定する手段として脳内自己刺激を利用する方法が、動物の自発的な行動や運動を利用する方法と併せて有用なものであることを明らかとしてきた。そこで、これらの成果を用いて、身体での消耗を検知し、これを疲労感として個体に認識させ、休息を促す脳内機構を明らかにするとともに、抗疲労・疲労回復効果を食品で得ることが可能である事を示すことが求められていた。

2. 研究の目的

日本人の抱える疲労は多くの場合肉体的疲労というよりはストレスに起因する精神的疲労が多いと考えられる。本研究では、疲労のモデルとして肉体的疲労を引き起こす運動による負荷をコントロールとして援用し、精神的疲労としてコミュニケーションボックスを用いた精神的負荷を供する実験を行った。また疲労度の測定には自発行動量、自発運動量、及び脳内自己刺激測定による行動する動機の大さを測定する方法などを用いた。さらに、脳報酬系を構成するドーパミン作動性神経の活動が疲労負荷中にどのように変化するかを明らかにするため、これら神経の投射先のひとつである側坐核においてラットのトレッドミル走行中の細胞外液中ドーパミン濃度の変化をマイクロダイアリシスを用いて検討した。これらの方法を用いて、疲労様行動が生じる脳内機構を明らかにするとともに、食品中に抗疲労・疲労回復効果を持つもののスクリーニングを行うことを目的とした。

3. 研究の方法

疲労の生成：京大松元式流水プール(改)を用い、流量増加のプロトコールに (1) 10L/分でスタートし、5分ごとに1L/分ずつ増大する、(2) 10L/分でスタートし、10分ごとに0.5L/分ずつ増大するものでマウスの限界遊泳時間がどの程度になるかを検討した。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。ラットの精神的疲労生成にはコミュニケーションボックスによる曝露を用いた。

疲労度の測定：自発行動量を用いた測定：幅240×奥380×高さ200mmのラット飼育用カゴをオープンフィールドとし、ここ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、自発行動量とした。自発運動量を用いた測定：直径30センチメートルの回転カゴを設置した飼育ケージで動物を飼育し、回転カゴを回した回数を記録することで自発運動量とした。ICSS：ラット内側前脳束

(medial forebrain bundle)に単電極を設置し、レバーを押すことで電流が流れ、快感が得られることを学習させた。レバー押しのトレーニングを行い、安定してレバー押し行動をするようになったラットに対し電流の強度を変化させてそれぞれの値でのレバー押し回数を測定し、電流強度-レバー押し回数曲線を得た。これを行動する動機の強さの標準曲線とした。

疲労時の脳内機構の解明：ラット側坐核のシェル部分、あるいはコア部分にマイクロダイアリシスプローブを設置した。トレッドミルによる走行運動を課し、その間のドーパミン作動性神経の活動を該当する側坐核部分での細胞外液中ドーパミン濃度変化として測定した。

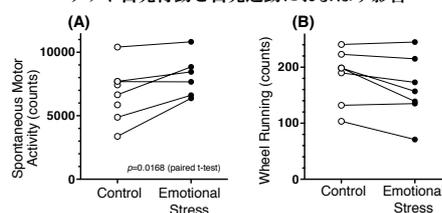
抗疲労・疲労回復効果をもつ食品のスクリーニング：マウス遊泳運動前に茶の成分であるカテキンを胃内強制投与し、その後持久運動能力への影響を検討した。遊泳プロトコールには(2)の10L/分でスタートし、10分ごとに0.5L/分ずつ増大するものを用いた。ラットに30分のトレッドミル走行を課す前に、胃内強制投与によりクエン酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸を投与し、トレッドミル走行による疲労負荷後にICSSで測定した脳報酬閾値がどのように変化するかを検討した。

4. 研究成果

様々な疲労負荷における ICSS での疲労度測定：ICSSにおいて、 κ -アゴニスト投与はこれまでの報告通り (Todtenkopf et al., 2004) 刺激-反応曲線を右にシフトさせ、個々のラットから算出した脳報酬閾値の増大を起こし、運動負荷によって疲労させたラットにおける反応と同様の結果が得られた。しかしながら κ -アンタゴニストを投与したのち運動疲労負荷した場合、はっきりとした脳報酬閾値増大阻止は観察されなかった (Data not shown)。本実験で用いたラットはICSS実験に供して6ヶ月以上経過しており、運動負荷に対する疲労度が若年期に比べて大きくなっている可能性がある。

コミュニケーションボックスを用いたストレス負荷後、オープンフィールドでのラット自発行動は増大したが、回転カゴでの自発運動は減少した(図1A, B)。運動負荷による疲労では両者とも減少することが明らかとなっているため、精神的なストレスについては必

図1 コミュニケーションボックス負荷がラット自発行動と自発運動におよぼす影響



(A)自発行動, (B)自発運動

ずしも同様な応答を示すわけではなく、行動する動機の発現パターンが異なることが明らかとなった。ICSS での応答では、刺激-反応曲線の右シフトと脳報酬閾値の増大が観察され、肉体的疲労負荷時と同様の反応が観察された(図 2A, B)。このことから、ICSS を用いた疲労度測定では肉体的疲労と同様に精神的疲労についても測定しうる可能性が示された。

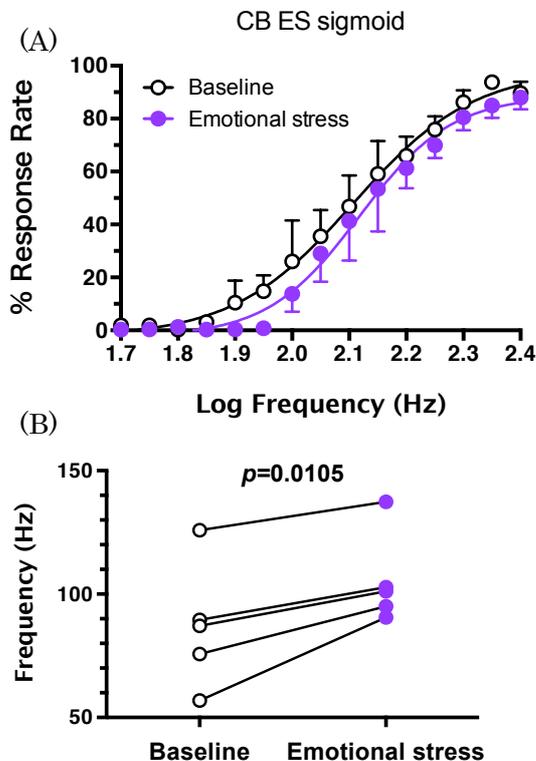


図 2 コミュニケーションボックスによる心理的負荷が脳報酬閾値におよぼす影響 (A)刺激-反応曲線, (B) 脳報酬閾値の変化

運動時の脳報酬系での神経活動の検討: ラット treadmill 走行時に側坐核シェル部、およびコア部とも細胞外液中ドーパミン濃度が増大することが明らかとなった(図 3)。コア部でのドーパミン濃度は運動終了後にベースラインレベルに復帰したが、シェル部では運動終了後も継続した。このことから、側坐核シェル部とコア部では運動中、および運動後の機能が異なることが予測されるが、詳細については不明である。同様にセロトニン濃度についても検討したが、有意な濃度変化は観察されなかった(Data not shown)。

運動による血中乳酸濃度増大と脳内 TGF- β 活性化: 運動時と同レベルの血中乳酸濃度となるよう乳酸をラット腹腔内に投与すると、脳脊髄液中の活性型 TGF- β 濃度が増大し、これが疲労様行動の発生に関与すると考えられた(Yamada et al., 2012)。この TGF- β 活性化は、肝門脈に乳酸を投与することでも達成された。しかし迷走神経肝枝を切断して

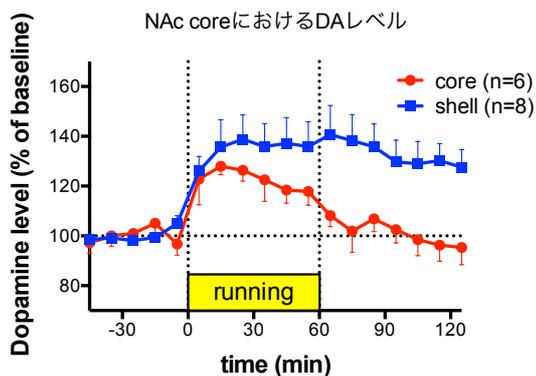


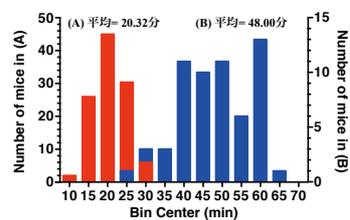
図 3. 走行中ラット側坐核でのドーパミンレベル変化

おくこの効果は消失した。さらに第三脳室、第四脳室、大槽に直接乳酸を投与しても TGF- β 活性化は起こらなかった。迷走神経肝枝を上行性に電気刺激しても TGF- β 活性化は起こらなかった。しかしながら、第四脳室に乳酸投与し、同時に迷走神経刺激を行うと TGF- β 活性化が起こった。これらのことから、運動時の疲労感生成に血中乳酸濃度増大が関与し、それは脳脊髄液中での濃度増大検出と肝臓での濃度増大検出が迷走神経活動亢進として脳に伝えられることの両者が同時に起こって初めて TGF- β 活性化が起こるものと考えられた(論文投稿中につきデータ不掲載)。

抗疲労・疲労回復効果を持つ食品のスクリーニング: (a) マウス遊泳能力測定を応用したスクリーニング。マウス最大遊泳時間の分布は遊泳能力測定プロトコールによって異なり、(1)の平均が 20.32 分、(2)の平均が 48.00 分となった。前者に比べて後者の方が血中ケトン体濃度が高くなり、貯蔵脂肪の動員が大きいことがわかった(図 4)。

図 4 目的別流量変更プロトコール

* 両プロトコールでの遊泳時間分布比較



ヒストグラム赤はプロトコール 1, 青は同 2 のデータを示す

(2)のプロトコールを用い、カテキン摂取が最大遊泳時間におよぼす影響を検討した。予備実験的には 200mg/kg 体重のカテキン投与が運動能力を増大する可能性があることが分かった(Data not shown)。

(b) ラット ICSS 測定を利用したスクリーニング。ラットにおいてトレッドミル走行負荷前に酒石酸を 100mg/600g 体重の割合で胃内強制投与した場合、ICSS で測定したによる刺激-反応曲線の肉体的疲労による右シフトが緩和され(図 5A)、脳報酬閾値の統計的に有意な増大が阻止された(図 5B)。このことから、酒石酸が運動負荷で引き起こされた疲労感の生成、あるいは行動する動機の低下を減弱することが示唆された。酒石酸の効果がどのような機構によって得られたかはまだ不明であり、今後の検討を要する。

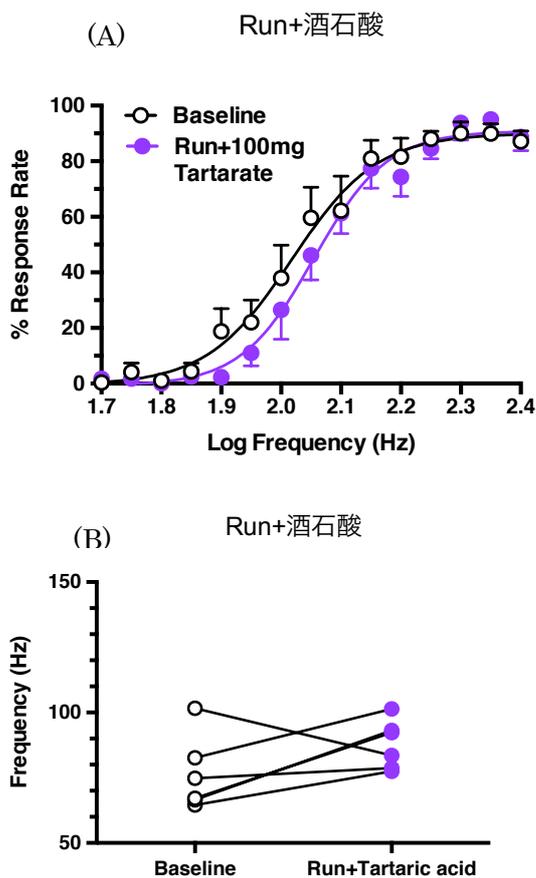


図 5 酒石酸投与が運動負荷による脳報酬閾値増大におよぼす影響 (A)刺激-反応曲線, (B) 脳報酬閾値の変化

引用文献

Todtenkopf, M.S., Marcus, J.F., Portoghese, P.S. & Carlezon, W.A. Jr. Effects of k-opioid ligands on intracranial self-stimulation in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 172, 463-470 (2004).

Yamada, H.; Iwaki, Y.; Kitaoka, R.; Fujitani, M.; Shibakusa, T.; Fujikawa, T.; Matsumura, S.; Fushiki, T.; Inoue, K. Blood lactate functions as a signal for enhancing fatty acid metabolism during exercise via TGF-beta in the brain. *J.Nutr.Sci.Vitaminol.(Tokyo)*, 2012, 58, 2, 88-95

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Inoue, K., Central Fatigue and TGF-β. *Adv. Neuroimmune Biol.*, 2013, 4, 229-236

Yamada, H.; Iwaki, Y.; Kitaoka, R.; Fujitani, M.; Shibakusa, T.; Fujikawa, T.; Matsumura, S.; Fushiki, T.; Inoue, K. Blood lactate functions as a signal for enhancing fatty acid metabolism during exercise via TGF-beta in the brain. *J.Nutr.Sci.Vitaminol.(Tokyo)*, 2012, 58, 2, 88-95

[学会発表] (計 6 件)

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、2015、岡山市、岡山大学津島キャンパス
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、2015、岡山市、岡山大学津島キャンパス
井樋 聡美、上野 聡子、永吉 宏充、井上 和生、伏木 亨、Intracranial Self-Stimulation (ICSS) を用いた新規中枢性疲労測定法の確立、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014、川崎市、明治大学生田キャンパス
横山 小夜香、井上 和生、伏木 亨、持久運動時の NAc shell における神経活動の解明、第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014、江別市、酪農学園大学
横山 小夜香、井上 和生、伏木 亨、持久運動時の報酬系の機能に関する研究、第 25 回マイクロダイアリシス研究会、2014、東京、お茶の水女子大学
横山 小夜香、井上 和生、伏木 亨、持久運動時の NAc shell における神経活動の解明、第 24 回マイクロダイアリシス研究会、2013、東京、お茶の水女子大学

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
[http://www.nutrchem.kais.kyoto-u.ac.jp/
nutrjoom/](http://www.nutrchem.kais.kyoto-u.ac.jp/nutrjoom/)

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・准教授
研究者番号：80213148

(2) 研究分担者

都築 巧 (TSUZUKI SATOSHI)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：50283651

(3) 連携研究者

()

研究者番号：