

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380082

研究課題名（和文）中枢性および末梢性疲労発生機構の統合的解明と抗疲労・疲労回復機能を持つ食品の開発

研究課題名（英文）Integrative studies on the mechanism of central and peripheral fatigue manifestation and the development of foods that have effects of anti-fatigue and fast restoration from fatigue

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

研究成果の概要（和文）：脳内自己刺激をラットが自発的に行うことによりその行動する意欲を定量する方法を用いて、疲労を引き起こす肉体的負荷が意欲の低下、即ち脳報酬閾値の増大を引き起こすことを示した。さらにラットへの精神的負荷も同様に脳報酬閾値の増大を引き起こし、疲労様の感覚が生じていることを示唆した。内因性オピオイドの一種である κ -オピオイドが脳報酬閾値を増大し、自発行動を低下させること、また肉体的負荷の少ない運動疲労において κ -オピオイドアンタゴニストが自発行動の低下を抑制することを明らかとした。これらのことから、疲労感の生成に κ -オピオイドが関与している可能性が示された。末梢組織で脂肪からのエネルギー産生を阻害するとこれが肝臓からの迷走神経を介して脳に伝えられ、脳内 TGF- β の活性化を引き起こし、疲労様の行動を引き起こすことを示した。

研究成果の概要（英文）：

By using spontaneous lever-pressing behavior for intracranial self stimulation in rats, behavioral motivation could quantitatively be determined. Physical loads which caused fatigue in rats has also been shown to cause decreases in motivation, in other words, increases in brain reward threshold. Additionally psychological loads to rats has caused increases in brain reward threshold and this suggested the manifestation of feeling of fatigue by psychological stress.

κ -opioid, a kind of endogenous opioids, was elucidated to increase brain reward threshold and to decrease spontaneous motor activities in rats. On the other hand, κ -opioid antagonists depressed the decreases in spontaneous motor activities after low-intensity exercise load. These findings suggested the involvement of endogenous κ -opioid to manifestation of feeling of fatigue.

The inhibition of energy production from fat in peripheral tissues was elucidated to cause activation of transforming growth factor - beta in the brain via vagus nerve and to lead to fatigue-like behavior in rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	11,700,000	3,510,000	15,210,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：疲労、脳内報酬系、エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

現代の日本では多くの人が疲労を自覚している(1999年厚生省調査など)。このような状態はその個人にとって、また社会にとっても大きな損失となりうる深刻な問題である。この状況は社会的な要因に起因する部分も多いことは否めない。一方、生物学的な疲労発生の機構は次第に明らかにされつつあるが、それでもその発生、特に中枢性疲労をコントロールするようなレベルにはほど遠く、更なる研究が必要である。ヒトでは肉体的な消耗があまり大きくない精神的な疲労(中枢性疲労とする)が明らかに存在するが、これを実験動物で再現することはあまり容易ではない。これと関連して疲労を測定する方法も肉体的消耗を測定するものは整備されているが、中枢性疲労を測定できる系は動物実験としては実質的には存在しない。このため中枢性疲労を軽減するための方法を開発するために、適切な動物モデルによる中枢性疲労測定法の確立が必要であった。

2. 研究の目的

(1) 疲労度を測定する新たな方法として脳内自己刺激を用いた動機の強さを測定する方法を確立する。

脳内自己刺激によって報酬を受けることにより行動を動機付けられた動物を用い、その行動が様々な原因の疲労や疲労感を引き起こす物質の投与によって影響を受けるかどうかを明らかにし、疲労度の測定として応用することができるかどうかを明らかにする。新たに開発した疲労度測定法も応用し、これまで疲労感を引き起こす機構の一員であることを明らかにした脳内 TGF- β の作用の確認、および同様に疲労感を引き起こす可能性がある κ -オピオイドの作用について検討する。

(2) 中枢性疲労発生に関わる脳内機構の解明

κ -オピオイドは鎮痛作用をもつという意味でオピオイドであるが、例えば μ -オピオイドが報酬系のうちでも快楽を生成するのに対し κ -オピオイドは不快感を引き起こす。この作用は疲労時の感覚との類似を想起させる。そこで脳内の κ -オピオイド受容体に特異的なアゴニストが結合することで疲労様の行動が引き起こされるかどうかを検討する。これらの物質の脳内での作用点を明らかにし、疲労発生機構について未知の経路を明らかにする。

(3) 末梢組織の消耗が中枢性疲労を引き起こす機構の解明

末梢組織のエネルギー代謝状態が中枢神経系に伝達される機構を検討し、エネルギー状態の低下が疲労感を引き起こす機構を検討する。

(4) 抗疲労・疲労回復機能を持つ食品のスクリ

ーニング

これら知見を基にし、抗疲労・疲労回復に効果を持つ食品の開発に資することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 行動する動機の強さの測定を利用した新たな疲労度定量法の開発

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。トレッドミルによる走行運動、コミュニケーションボックスによる精神的ストレスがレバー押し行動の閾値にどのような影響を与えるかを検討し、肉体的疲労と精神的ストレスが行動する動機の強さにどのように影響するかを検討した。さらに、疲労感の生成に関与することが予測された κ -オピオイドの脳室内投与などを行い、それぞれがレバー押し行動の閾値にどのような影響を与えるかを検討した。用いた疲労(あるいはストレス)負荷それぞれの評価が、オープンフィールドでの自発行動量、および自発回転カゴを用いた自発運動量による評価とどのような関係にあるかを比較し、脳内自己刺激が疲労度を測定する系として適切かどうかを検討した。

(2) 脳内報酬／報酬系の疲労感の発生への関与に関する研究

κ -オピオイドの内因性リガンドはダイノルフィンであるが、 κ -オピオイド受容体(KOR)以外のオピオイド受容体にも親和性に差はあれど結合する。このため、より KOR への親和性の高い、特異的なアゴニスト(U50488, U69593 など)を脳室内微量投与に用いた。ラット第三脳室、もしくは第四脳室に溶液投与のためのカニューレを施し、 κ -オピオイドアゴニストを微量投与した。疲労の指標としてオープンフィールドでの自発行動量、および回転カゴにおける自発運動量を測定し、アゴニスト投与の影響を検討した。また κ -アンタゴニストを投与しておくことにより疲労様行動が低減されるかどうかを検討した。さらに、脳内自己刺激を用いた疲労度測定法によって κ -オピオイドの作用を測定し、疲労様の行動と行動する動機、 κ -オピオイドとの関係を検討した。

(3) 末梢組織のエネルギーレベル低下が中枢性疲労を発生する機構の解明

末梢組織におけるエネルギー獲得状態を薬物投与によって修飾し、これによって疲労様の行動の発現、即ち自発行動量の低下が引き

起こされるかを検討した。脂肪酸酸化の阻害剤であるメルカプト酢酸(MA)を腹腔内投与し、自発行動量を測定した。同様にグルコース酸化の阻害剤である2-デオキシグルコース(2-DG)を投与し、自発運動量に及ぼす影響を検討した。疲労時の自発行動の低下や脂肪酸酸化の亢進に脳内のTGF- β が関与することを以前に報告したが、それぞれの処理を行った状態でラットの脳脊髄液を採取し、活性型TGF- β 濃度を測定し、自発行動の低下が観察されたときに脳内TGF- β が関与するかどうかを検討した。

エネルギー産生に深く関与している肝臓を含め消化・吸収にかかわる臓器群の状態は迷走神経によって中枢神経系に伝えられている。MA, および2-DGによるエネルギー産生阻害が起きている状況は迷走神経によって伝達される可能性があった。そこで、横隔膜直下両側で迷走神経を切断し、迷走神経を介した腹腔内臓器のモニタリングを行えないように処置したラットを用い、MAおよび2-DGを投与して自発行動の測定と、脳脊髄液中活性型TGF- β の定量を行った。これらの薬物投与で観察された自発行動の抑制に対して迷走神経切断がどのような影響を及ぼすかを検討した。

(4) 中枢性疲労に対する抗疲労・疲労回復機能を有する食品スクリーニングの理論的基盤の構築

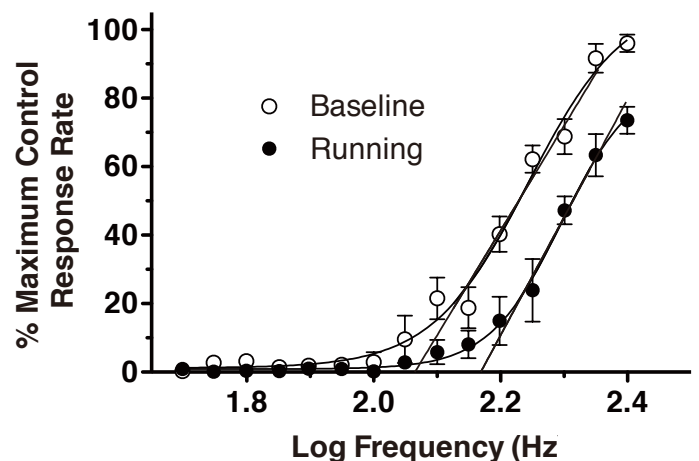
様々な条件での疲労を再現し、これに応じた抗疲労・疲労回復機能を持つ食品のスクリーニングを行うことを目的とした。疲労のうちでもこれが慢性的に蓄積した状態を再現することは、疲労に対して著効を持つ成分のスクリーニングに必要と考えられた。そこで我々が開発した表面流速が一定となる流水プール中において疲労困憊までマウスを遊泳させる負荷を毎日行い、疲労が蓄積するモデル構築を試みた。抗疲労・疲労回復機能を持つ食品として、肝臓に対してその機能を強化することが示唆されているウコンを用いて効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 行動する動機の強さの測定を利用した新たな疲労度定量法の開発

脳内自己刺激によって報酬を受けることにより行動を動機づけられた動物を用い、その行動が様々な原因の疲労や疲労感を引き起こす物質の投与によって影響を受けるかどうかを検討し、疲労度の測定として応用することができるかどうかを検討した。手術の際にガイドカニューレを用いることで精度良くラット内側前脳束に電極設置することが可能となった。刺激電流として電流量を100~300mAに固定し、周波数が最大251Hzの矩形波を供与することで、ラットは安定して自己刺激のレバー押しを行うことがわかった。

周波数を約10%ずつ減少することでレバー押し回数が徐々に減少し、これを50Hz程度までシリーズで行うことで、周波数に対する応答(レバー押し回数)曲線が得られた。30分間のトレッドミル走行負荷したラットでは、この曲線が左側にシフトし、脳報酬閾値が高くなることがわかった。即ち、運動によって疲労させた場合、同じレバー叩き応答を引き起こすためにはより強い電気刺激が必要であることが明らかとなった。図には一例として、21m/minで走行させたラットのベースライン(走行前)と負荷後の応答曲線を示した。さらに、コミュニケーションボックスによる精神的負荷を与えられたラットでも脳内自己刺激の閾値が上昇し、自己刺激を継続するためには高い周波数の電気刺激が必要であることが分かった。また低強度運動での疲労感に関与すると予測している κ -オピオイドを脳室内に投与すると同様に脳内自己刺激の閾値が上昇することが確認された。コミュニケーションボックスによる精神的負荷を与えられたラットは、回転カゴによる自発運動量は減少するが、新規環境での自発行動量は上昇することが明らかとなっており、疲労様の行動が生じるか否か判断が難しかったが、今回新たに脳内自己刺激の閾値が上昇することがわかった。これはラットの行動する動機の強さが減少していると考えられ、精神的負荷で疲労様の感覚が生じていると推察された。



(2) 脳内報酬/鎮痛系の疲労感の発生への関与に関する研究

κ -オピオイドは鎮痛作用を持つという意味でオピオイドであるが、 μ -オピオイドとは対照的に κ -オピオイドは不快感を引き起こす。この作用は疲労時の感覚との類似を想起させる。そこで脳内の κ -オピオイド受容体に特異的なアゴニストが結合することで疲労様の行動が引き起こされるかどうかを検討した。 κ -アンタゴニストであるU69593を第三脳室に投与するとラット自発行動が有意に抑制

され、疲労様の行動が引き起こされることが示された。ラットに 15m/min の弱い運動強度でトレッドミル走行をさせると自発行動が低下し、疲労様の行動が観察された。この条件では脳脊髄液中活性型 TGF- β の量は増大しておらず、その疲労様行動には TGF- β 以外の別の物質が関与していると予測されていたが、同じ運動負荷の条件で、 κ -オピオイドのアンタゴニストである norBNI を予め投与しておく、自発行動の低下が抑制されることがわかった。このことは肉体的疲労を伴わない中枢性疲労において、脳内での κ -オピオイドが関与する可能性を示すものだと考えられた。

(3) 末梢組織のエネルギーレベル低下が中枢性疲労を発生する機構の解明

末梢組織におけるエネルギー獲得状態を薬物投与によって修飾し、これによって疲労様の行動が発現するかを検討した。脂肪酸酸化の阻害剤であるメルカプト酢酸、およびグルコース酸化の阻害剤である 2-デオキシグルコースをラットの腹腔内に投与するといずれも自発行動が抑制され、疲労様の行動が引き起こされることが明らかとなった。その時脳脊髄液中の活性型 TGF- β 濃度を測定したが、前者ではその濃度増大が見られたが後者では変化はなかった。エネルギー獲得の阻害によっていずれも疲労様の行動が見られたが、その行動発生機構は異なると考えられたメルカプト酢酸(MA)、および 2-デオキシグルコース(2-DG)をラット腹腔内に投与するといずれも自発行動量の抑制を引き起こし、疲労様の行動を示す。この自発行動の抑制は、脳内に抗 TGF- β 抗体を投与することで MA については阻止された。一方 2-DG 投与による抑制には影響しなかった。さらに、迷走神経を切除しておく、MA による効果は起こらなくなるが、2-DG による抑制には影響しない。脳脊髄液中の活性型 TGF- β 濃度は MA 投与により増大するが、迷走神経切除しておくところの増大は見られなくなる。これらの結果から、MA 投与により脂肪からのエネルギー獲得が阻害されるような状態では、この情報が迷走神経を介して脳に伝えられ、脳脊髄液中活性型 TGF- β に変換されて自発行動の抑制が引き起こされていると考えられた。同様の現象は、別の脂肪酸代謝阻害剤である etomoxir 投与によっても観察された。2-DG による糖質代謝阻害で引き起こされる自発行動抑制にはこれらの機構は関与していないと考えられた。

(4) 中枢性疲労に対する抗疲労・疲労回復機能を有する食品スクリーニングの理論的基盤の構築

流水プールにおいて疲労困憊までマウスを遊泳させる負荷を毎日行い、疲労が蓄積するモデル構築を試みた。限界までの遊泳時間を

疲労度の指標としたが、3~4 日まで遊泳時間が減少し、疲労の蓄積が示唆された。しかしながらそれ以降はトレーニング効果の方が勝り、遊泳時間が延長して疲労が蓄積しているかどうか判別できなかった。このため 1 日 1 回の遊泳を 2 回に増やす、あるいは負荷の期間を延長することなどが必要と考えられた。一方、ホームケージでの自発行動量は運動負荷によって有意に低下することがわかったため、運動負荷とこれを組み合わせて疲労度を評価できる可能性が示された。

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 1 件)

- 1 **Fujikawa T, Fujita R, Iwaki Y, Matsumura S, Fushiki T, and Inoue K.** Inhibition of fatty acid oxidation activates transforming growth factor-beta in cerebrospinal fluid and decreases spontaneous motor activity. *Physiol Behav* 101: 370-375, 2010. (査読あり)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.06.006>

[学会発表] (計 2 件)

1. **上野聡子.** Intracranial self-stimulation (ICSS, 脳内自己刺激)を用いた新規疲労測定法の確立. 第50回 日本栄養・食糧学会近畿支部大会. 2011年10月15日, 奈良. 近畿大学
2. **Inoue K.** Exercise, fatigue and activation of TGF-beta in the brain. 第33回 日本分子生物学会年会 第83回 日本生化学会大会 合同大会. 2010年12月10日, 兵庫, 神戸, 神戸ポートアイランド.

[図書] (計 1 件)

- 1 **Inoue K, and Fushiki T.** Springer, *Fatigue Science for Human Health*, 2008, p. 187-202.

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：