

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25年5月16日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22680051

研究課題名（和文） 精神疲労の客観的評価手法の確立と精神的健康の増進

研究課題名（英文） Establishment of the objective evaluation of mental fatigue, and improvement of mental health

研究代表者

七里 元督（MOTOTADA SHICHIRI）

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究員

研究者番号：20434780

研究成果の概要（和文）：

精神疲労を客観的に評価することを可能にするバイオマーカーの探索のため、マウスに精神的なストレス（水浸拘束負荷）を負荷したところ、血液中で顕著に増加する脂質酸化生成物を同定した。さらにこの脂質酸化生成物が活性酸素による非特異的な酸化によって生じるのではなく、脂質酸化酵素に触媒されて特異的に生成されることを見出した。精神疲労の客観的評価指標として有望な脂質酸化生成物を同定することができた。

研究成果の概要（英文）：

We searched for the biomarker which makes it possible to evaluate mental fatigue. A lipid oxidation product which increases notably in plasma was identified by mouse model of mental stress, water immersion and restraint stress. It found out that this lipid oxidation product generated specifically via lipid oxidation enzyme not by arising nonspecific oxidation through reactive oxygen species. This lipid oxidation product is a potential biomarker for objective evaluation of mental fatigue.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 6,300,000 | 1,890,000 | 8,190,000 |
| 2011年度 | 6,700,000 | 2,010,000 | 8,710,000 |
| 2012年度 | 5,800,000 | 1,740,000 | 7,540,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 18,800,000 | 5,640,000 | 24,440,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学

キーワード：心身の健康、精神疲労、バイオマーカー、酸化ストレス、脂質

1. 研究開始当初の背景

我々はヒト検証試験により精神ストレス負荷時の疲労感と脂質酸化に関連するバイオマーカーに有意な相関性があることを見出していた。ラットに対する精神ストレス負荷実験（水浸拘束負荷4時間）においても脂質酸化生成物の顕著な増加を認めており、以上の結果より、血漿中脂質酸化生成物を測定す

ることで精神ストレス時の疲労度の評価が出来る可能性に着目していた。疲労を媒介する因子としては血液中の乳酸、トリプトファン、脳内のモノアミン（ノルアドレナリン、セロトニン）、インターフェロンや TGF β （Transforming growth factor- β ）などがあげられる。特に TGF β 3 は運動負荷ラットの髄液中に増加しており、この髄液を他のマ

ウスの脳室内に投与することで顕著な疲労感が認められるという実験結果から、疲労感を引き起こす重要な因子と考えられている。

一方、脂質酸化生成物一種の生成過程には活性酸素による酸化だけでなく、脂質酸化酵素によって触媒される酵素的酸化による生成過程が存在する。さらに糖尿病性腎症モデル動物において TGF β と脂質酸化酵素が相互に活性化していることも知られている。活性化型 TGF β は疲労との関連が考えられているものの、その測定は一般的な手法 (ELISA 等) では困難である。そこで脂質酸化物の測定によって TGF β 活性を推測し、精神疲労度を客観的に評価できる可能性があるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、「精神ストレスにより脂質酸化酵素が活性化され脂質酸化生成物が増加される」という仮説を立て、その実証として動物実験を行う。この目的のため精神ストレス負荷時における脂質酸化生成物の生成メカニズムを解明する。また、ヒトでも同様に精神疲労時に脂質酸化生成物の変動するのをも解析を行った。

3. 研究の方法

① マウスに精神的なストレスとして薬理的実験でもストレス性胃潰瘍のモデルとして使用されている水浸拘束負荷を3時間行い、その後、血液、各種臓器の採取を行った。採取した血液から血漿を分離し、また各組織から脂質を抽出し脂質酸化物を質量分析装置 (LC-MS/MS, GC-MS) にて測定した。また、脂質酸化酵素を欠損したマウスにも同様の水浸拘束を負荷し、血液のサンプリングを行い、脂質酸化生成物の測定解析を行った。

② ダウン症はストレスに対して脆弱であることが知られている。そこで、ダウン症モデル動物 (Ts65Dn マウス) における血漿中、脳内脂質酸化とビタミンEの効果の検証を行った。ダウン症では胎児期から脳内の脂質酸化が生じていることが報告されてきたため、今回は胎児期から離乳期を通して慢性的にビタミンEを投与してその効果を検討した。特に行動異常を改善することができるかを検討するためにモリス水迷路により記憶学習能力を評価し、不安行動の評価を高架式十字迷路にて行った。脳内および血中の脂質酸化生成物の測定解析は質量分析装置 (LC-MS/MS, GC-MS) および脳組織切片の免疫組織染色にて評価した。

③ ヒトに精神的なストレス・疲労を負荷して脂質酸化生成物の変動を解析する。今回、疲労モデルとして、終夜のデスクワーク負荷

を行った。具体的には成人男性15名の被験者に、午後2:30~翌朝8:30まで終夜のデスクワーク、その後約4時間の仮眠休息を課した。6時間毎に採血を行い、脂質酸化生成物および抗酸化物質の測定解析を行った。ストレス・疲労の評価として、主観的な疲労評価として、質問紙法とビジュアルアナログスケール法 (VAS) を行い、さらに視覚認知を利用した精神的疲労指標であるフリッカー値の測定も行い、バイオマーカーとの相関性を解析した。

4. 研究成果

① マウスに対するストレス負荷 (水浸拘束負荷) 時に変動する脂質酸化生成物の解析結果

マウスに対して水浸拘束負荷を行った後、採取した血漿を質量分析装置 (LC-MS/MS, GC-MS) にて測定解析したところ、顕著に増加する、ある脂質酸化生成物を同定することができた。この脂質酸化生成物は、他の脂質酸化生成物が約1.5-2倍に増加しているのに対して、6-10倍とその増加率は非常に顕著であり、再現性も認められた。さらに、よりストレス強度の低い、水浸を伴わない拘束だけのストレス (3時間) を連日5日間行った場合にも約2倍に増加することを認めた。

この脂質酸化生成物は、活性酸素による非特異的な酸化反応によっても生成されるが、脂質酸化酵素に触媒されて特異的に生成されることも知られている。そこで、この脂質酸化酵素の欠損したマウスを用いて、同様の水浸拘束負荷を行ったところ、この脂質酸化生成物の増加が認められなかった。

また、この脂質酸化酵素はマウスのマクロファージに強く発現されており、その細胞内局在を超遠心分離法によって解析した。すると、この脂質酸化酵素は本来細胞質内に発現が認められるが、水浸拘束負荷によって細胞膜へ移行し活性化することが明らかとなった。

この結果より、水浸拘束負荷により生成される脂質酸化生成物の増加は、この脂質酸化酵素の活性化を介するものであることが明らかとなった。

水浸拘束を負荷した場合、マウスに精神的なストレスが負荷されその結果胃潰瘍が形成される。この脂質酸化生成物の産生が、精神的なストレスに起因するのか、胃潰瘍に起因するものなのかを明らかにする必要があった。そこで、胃潰瘍の生成を抑制することを目的に胃潰瘍治療薬 (プロトンポンプ阻害剤) を前投与した上で水浸拘束を負荷した。結果として、プロトンポンプ阻害剤の前投与によって、水浸拘束負荷に伴う胃潰瘍の形成

は完全に抑制された。にもかかわらず、血漿中に脂質酸化生成物の生成は抑制されなかった。この結果より、脂質酸化生成物の生成は胃潰瘍に起因するのではなく、精神的なストレスに起因することが明らかとなった。

本研究成果については新規ストレス評価手法として現在、特許申請しており、研究の結果は、当該特許の記載内容となるため、特許公開以降において本成果のより詳細な内容を報告する予定である。

また、本研究成果は現在論文投稿に向け準備を進めている。

②ダウン症モデル動物における血漿および脳内脂質酸化とビタミンEの効果

ダウン症モデルマウスである Ts65Dn マウスはダウン症で見られるような外表奇形や内臓奇形は持たないが、顕著な記憶学習障害、不安障害が認められることが知られている。このマウスに対して、今回は、系胎盤移行、系母乳移行があり、さらに血液脳関門を通過し脳にも移行することが知られているビタミンE (α -トコフェロール) を投与した。投与した方法は、Ts65Dn マウスのメスと正常マウスのオスを交配する時から餌として投与し、胎児期から母乳時、離乳後も継続して餌として与え続けた。

Morris 水迷路による記憶学習能力評価の結果では、コントロール餌を与えられていた Ts65Dn マウス (Ts) では野生型のマウス (B6) に対して顕著な学習障害が観察される (図1)。しかしながら、ビタミンEを与えられていたマウス (E 添加食投与群) では学習障害に改善効果が認められた。

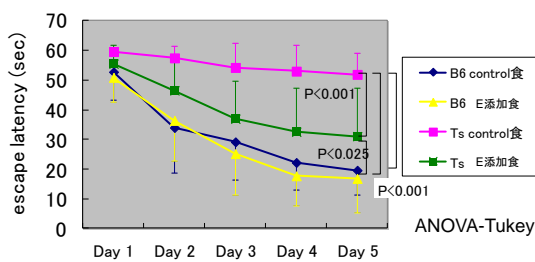


図1 Morris 水迷路による記憶学習能力の評価とビタミンEの効果

Morris 水迷路は1セット60秒間で1日に4セット連日5日間施行した。

また、不安の評価として薬理学的実験でもしばしば行われる高架式十字迷路検査を行ったところ、Ts65Dn マウスは解放脚に滞在している時間が有意に長いことが明らかとなり、さらにビタミンEの投与によってこれも改善

されることが分かった (図2)。

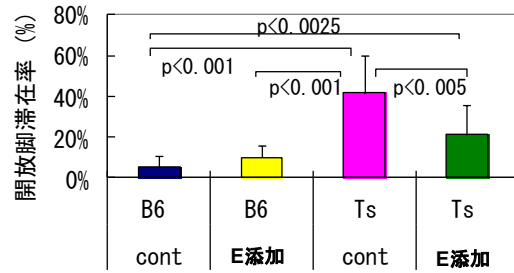


図2 高架式十字迷路による不安の評価とビタミンEの効果

以上の行動評価終了後に血液、脳の採取を行い、脂質酸化生成物を測定した。

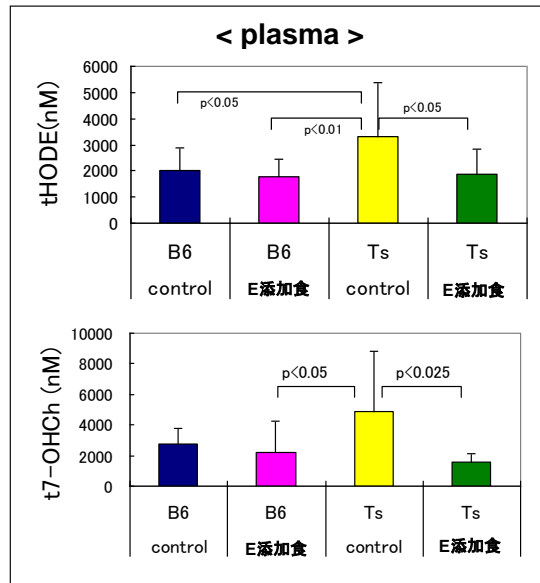


図3 血漿中脂質酸化生成物

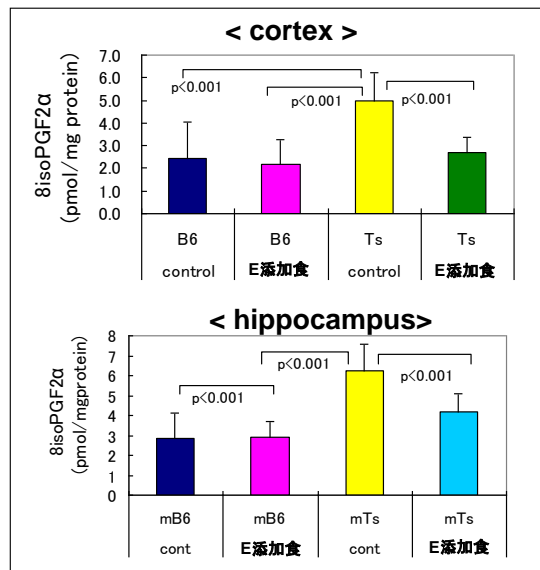


図4 大脳と海馬の脂質酸化生成物

脂質酸化物を測定した結果、Ts65Dn マウスでは、コントロールマウスに比較して、血漿中ではリノール酸由来の脂質酸化生成物の tHODE (total hydroxyoctadecadienoic acid) と t7-OHCh (total 7-hydroxycholesterol) が増加し (図 3)、脳組織 (大脳と海馬) では 8isoPGF2 α (8-isoprostagrandin F2 α) が増加している (図 4) ことを見出した。さらにビタミン E を投与していた Ts65Dn マウスではこれら脂質酸化生成物が減少していた。

さらに脳組織内の脂質酸化物の生成部位を観察することを目的に脳組織のパラフィン切片を作製し、脂質酸化物アクロレインの抗体を用いた免疫染色を行った。Ts65Dn マウスでは海馬の歯状回 (DG) 領域が濃染された (図 5 中断)。しかし、ビタミン E を投与していた場合にはこの DG 領域の染色性が減じていた (図 5 下段)。

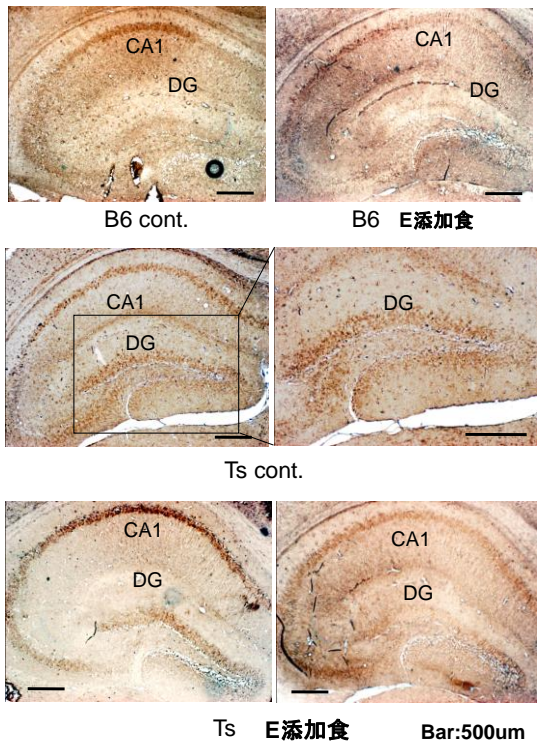


図 5 Ts65Dn マウスにおける脳内脂質過酸化物の増加と抗酸化ビタミン投与による抑制効果 (アクロレインの組織染色)

上段 左 control マウス
 上段 右 control マウス ビタミン E 投与
 中断 Ts65Dn マウス
 下段 Ts65Dn マウス ビタミン E 投与

本マウスおよびダウン症の病態に海馬の障害が報告されており、この Ts65Dn マウスでは海馬の細胞数の減少が観察される。そこで、海馬の細胞障害をビタミン E が抑制できたのかを検証するために海馬切片中の神経

細胞の数を測定した。その結果、表 1 に示すように海馬の DG 領域で Ts65Dn マウスでは顕著な細胞数の減少が観察されるが、ビタミン E の投与によって改善していることを見出した。

| | Control mice | | Ts65Dn mice (/mm ²) | |
|--------|---------------|------------|---------------------------------|-------------|
| | control (n=8) | E添加食 (n=8) | control (n=8) | E添加食 (n=10) |
| DG | 3034 ± 360 | 3091 ± 292 | 2446 ± 211* | 2828 ± 522* |
| CA1 | 1172 ± 111 | 1274 ± 159 | 1117 ± 125 | 1157 ± 62 |
| CA3 | 999 ± 140 | 1001 ± 111 | 821 ± 68* | 922 ± 53 |
| cortex | 380 ± 41 | 372 ± 58 | 388 ± 85 | 367 ± 41 |

DG, dentate gyrus; CA, cornu ammonis.
 Data are expressed as mean ± S.D.
 *P<0.01, compared with control feeding WT mice (ANOVA, Duncan)
 **P<0.05, compared with control feeding Ts mice (ANOVA, Duncan)

表 1 海馬組織の神経細胞数の比較

以上の結果より、Ts65Dn マウスでは行動異常と脳内の脂質酸化傷害が生じており、ビタミン E を胎児期から慢性的に継続的に投与することで、脳内の脂質酸化傷害を抑制することで海馬神経細胞の減少を抑制でき、その結果、記憶学習障害など行動異常が改善されるということを見出し、論文を発表した。

また、本研究成果は各学会で高い評価を受け、下記受賞を獲得することができた。

・ Young investigator award
 International symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine
 2011 年 1 月 21 日

・ 日本酸化ストレス学会 学術奨励賞
 第 64 回日本酸化ストレス学会学術集会
 2011 年 7 月 2 日 (土) ~ 7 月 3 日 (日)

・ 優秀ポスター賞
 第 36 回日本医用マスメクトル学会
 2011 年 09 月 15 日

・ 奨励賞
 第 64 回日本ビタミン学会
 2012 年 06 月 22 日

③ ヒトに対するストレス・疲労負荷実験の結果

まず、終夜のデスクワーク負荷での疲労の蓄積度合いを主観的な評価とフリッカー値にて評価した。実験開始後から、主観的な評価方法である VAS 値は増加し、フリッカー値は低下した。8:30 でピークを示し、仮眠休息後、初期値と同程度まで回復した (図 6)。フリッカー値と VAS 間には有意な相関が見られ、疲労の蓄積を反映しているとすいさつされる。おり、本負荷によって疲労が適切に負

荷されていることを確認した。

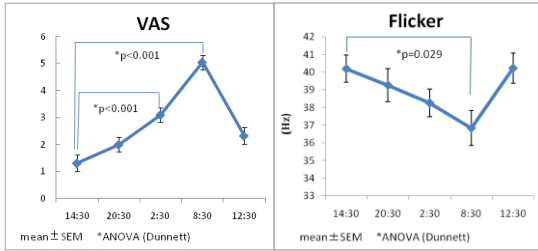


図6 VAS とフリッカー値の変動

VAS (左) は疲労の蓄積とともに増加する傾向、フリッカー値 (右) は減少する傾向が見られた。

HODE は 2:30 にピーク値を示し、その後、一旦低下した後、上昇した。

抗酸化物質のビタミン E (aT 図 7) とコエンザイム Q10 (CoQ10 図 8) は経時的に減少を示した。

また、ビタミン E の酸化体 (キノン体) である α トコフェリルキノン (α TQ) は、2:30 以降増加する傾向が認められ (図 7)、フリッカー値と相関を示した (図 9)。これは疲労に伴う酸化傷害昂進に対し、抗酸化物質が消費されたことを表している。

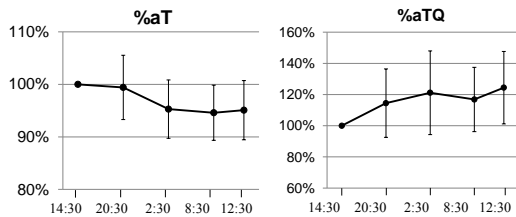


図7 ビタミン E である α -トコフェロール (aT) と α -トコフェリルキノン (aTQ) の変動

図は、ストレス負荷開始前のデータを 100% としての変動率を記している。

データは mean \pm SEM で表示。

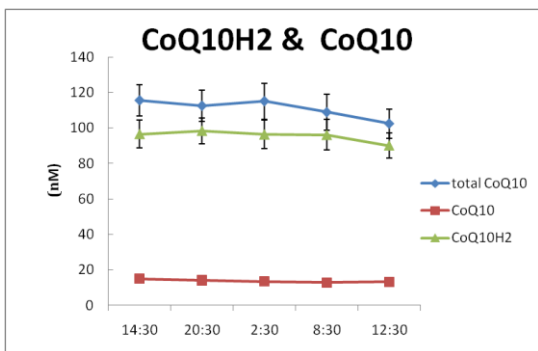


図8 コエンザイム Q10 の変動

図は、ストレス負荷開始前のデータを 100% としての変動率を記している。

データは mean \pm SEM で表示。

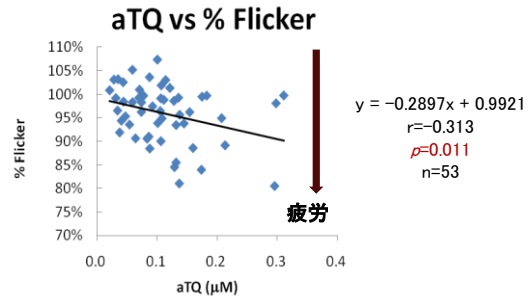


図9 α -トコフェリルキノン (aTQ) の変動とフリッカー値の変動の相関性

以上の結果から、終夜作業による疲労に伴って酸化ストレスが昂進する可能性が考えられた。また、抗酸化物質が HODE の上昇に伴い消費されている可能性が示されたことから、抗酸化物質を疲労する前に摂取することで、脂質酸化及び疲労が抑制できる可能性も示唆された。

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) Shichiri M, Yoshida Y, Ishida N, Hagihara Y, Iwashashi H, Tamai H, Niki E. α -Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairments in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Free Radic Biol Med.* 査読有, 50(12), 2011, 1801-1811
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 七里 元督、マウスへの水浸拘束負荷による血漿中脂質酸化生成物の変動 2、第 66 回日本酸化ストレス学会、2013 年 6 月 13-14 日、ウイנק愛知 (愛知)
- ② 石田 規子、七里 元督、マウスへの水浸拘束負荷による血漿中脂質酸化生成物の変動 1、第 66 回日本酸化ストレス学会、2013 年 6 月 13-14 日、ウイנק愛知 (愛知)
- ③ 七里 元督、 α -トコフェリルキノンの酸化ストレスバイオマーカーとしての有用性の検討、第 24 回ビタミン E 研究会、2013 年 01 月 11 日、慶應義塾大学芝共立キャンパス (東京)
- ④ 七里 元督、alpha-Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral impairment in mouse model of Down syndrome、19th International

- Mass Spectrometry Conference、2012年9月18日、国立京都国際会館（京都）
- ⑤ 七里 元督、Vitamin E suppresses lipid peroxidation and behavioral impairment in mouse model of Down syndrome、第54回日本小児神経学会総会、2012年5月17日、ロイトン札幌（北海道）
 - ⑥ 石田 規子、七里 元督、連続疲労負荷時における酸化ストレスマーカーおよび抗酸化物質の変動、日本薬学会第132年会、2012年3月29日、北海道大学（北海道）
 - ⑦ 七里 元督、マウスへの水浸拘束負荷による血漿中脂質酸化生成物の変動とトコトリエノールの影響、第9回トコトリエノール研究会、2012年11月12日、（東京）
 - ⑧ 高島 瑞紀、七里 元督、抗酸化物の活性を定量的に評価する方法の開発と検証、第23回ビタミンE研究会、2012年1月27日、ホテル JAL シティ田町（東京）
 - ⑨ 吉田 康一、七里 元督、トコフェロール・トコトリエノール類の中樞神経疾患抑制の可能性、第8回トコトリエノール研究会、2011年10月4日、東京
 - ⑩ 七里 元督、ダウン症モデル Ts65Dn マウスへの α -Tocopherol 経口投与効果の検討 - 脂質酸化生成物 (hydroxyoctadecadienoic acid、8-isoprostane) の測定による評価 -、第36回日本医用マスペクトル学会年会、2011年9月15日、大阪
 - ⑪ 七里 元督、ダウン症モデル Ts65Dn マウスへの α -Tocopherol 経口投与における α -Tocopherylquinone および α -Tocopheryl hydroquinone の変動、第64回日本酸化ストレス学会、2011年7月2日、ルスツリゾートホテル&コンベンション（北海道）
 - ⑫ 石田 規子、七里 元督、終夜作業時の酸化ストレスマーカーとフリッカー値の変動解析、第64回日本酸化ストレス学会、2011年07月02日、ルスツリゾートホテル&コンベンション（北海道）
 - ⑬ 高島 瑞紀、七里 元督、抗酸化物の活性を定量的に評価する方法の開発と検証、第64回日本酸化ストレス学会、2011年07月02日、ルスツリゾートホテル&コンベンション（北海道）
 - ⑭ 高島 瑞紀、七里 元督、AOB の in vitro 抗酸化活性の定量的評価について、第11回 AOB 研究会、2011年07月01日、ルスツリゾートホテル&コンベンション（北海道）
 - ⑮ 七里 元督、ダウン症モデル Ts65Dn マウスへの α -Tocopherol 経口投与効果の検

- 討、日本ビタミン学会第63回大会、2011年6月5日、安田女子大学（広島）
- ⑯ 原田 暢善、七里 元督、連続疲労負荷過程における血漿中の酸化ストレスバイオマーカー tHODE の変動、第7回日本疲労学会学術集会、2011年5月21日、名古屋大学医学部（愛知）
 - ⑰ 原田 暢善、七里 元督、連続疲労負荷過程における血漿中の酸化ストレスバイオマーカー tHODE の変動についての検討、第84回日本産業衛生学会、2011年5月19日、ニューピアホール（東京）
 - ⑱ 七里 元督、 α -Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairment in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. International symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine、2011年1月21日、京都
 - ⑲ 七里 元督、ダウン症に対するビタミンEの作用、第27回臨床フリーラジカル会議、2010年12月3日、烟河（京都）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：脂質酸化生成物の測定によるストレス、疲労の客観的評価方法

発明者：七里元督

権利者：独立行政法人産業技術総合研究所

種類：特許権

番号：特願 2013-081500

出願年月日：2013年4月9日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

七里 元督 (MOTOTADA SHICHIRI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究員

研究者番号：20434780