

平成 25 年度 修士学位論文

自発運動が摂食行動に及ぼす影響
-ストレスとの関連性-

首都大学東京大学院 人間健康科学研究科 人間健康科学専攻
ヘルスプロモーションサイエンス学域

田村 愛

修士学位論文

自発運動が摂食行動に及ぼす影響 -ストレスとの関連性-

平成 26 年 1 月 8 日 提出

首都大学東京大学院

人間健康科学研究科 博士前期課程 人間健康科学専攻

ヘルスプロモーションサイエンス学域

学修番号： 12899605

氏名： 田村 愛

(指導教員名： 北 一郎)

要旨

ストレスにより摂食抑制が生じることはよく知られている。ストレス性の摂食抑制には、視床下部-下垂体-副腎皮質軸（HPA 軸）の活性化や視床下部コルチコトロピン放出因子（CRF）ニューロンの賦活が関与していることが示唆されている。HPA 軸は神経内分泌系のひとつであり、また CRF ニューロンは HPA 軸の惹起に加え自律神経系や情動反応を調節しており、いずれも生体における主要なストレス反応系である。これまでいくつかの研究から、運動により摂食抑制が生じることが報告されている。強制運動や高強度の運動では HPA 軸や CRF ニューロンの活性化が引き起こされることが知られていることから、ストレス性の摂食抑制が生じていると考えられる。しかし一方で、自発運動では、強制運動でみられるようなストレス反応系の応答はほとんど生じていないにもかかわらず、摂食抑制が生じることが報告されている。このことは、自発運動による摂食抑制のメカニズムは、必ずしもストレス性の摂食抑制とは一致しない可能性を示唆する。そこで本研究では、自発運動による摂食行動への影響がストレス性の摂食抑制と異なるかどうかを明らかにすることを目的とし、自発運動とストレス負荷による摂食行動、ストレス関連行動、および摂食関連脳部位の神経活動の変化について比較検討した。

実験には、Wistar 系雄ラットを用い、通常飼育群（コントロール群）、自発運動群（ランニングホイールへの自由アクセス）、ストレス群（拘束ストレス：2 時間/日）の 3 群に分け 4 週間飼育し、摂食量の経時的変化、ストレス関連行動および摂食関連脳部位の神経活動について比較検討した。ストレス関連行動は高架式十字迷路テスト（不安様行動評価テスト）を用いて評価し、脳内神経活動については免疫組織化学的方法により同定した（実験 1）。また、実験 1 の結果が短期間の飼育条件でもみられるかどうかを確認するために、飼育期間を 1 週間として同様の実験方法により検討した（実験 2）。さらに、CRF 受容体阻害薬の脳室内慢性投与が自発運動による摂食行動に影響するかどうかについて行動薬理学的観点から検討した（実験 3）。

実験の結果、自発運動群、ストレス群ともに飼育開始 1 週目から摂食抑制がみとめられた（実験 1, 2）。しかし、ストレス群ではその後も摂食量が抑制されたままであったにもかかわらず、自発運動群では飼育 3 週目から摂食量は回復する傾向にあった（実験 1）。ストレス関連行動については、自発運動群で低下あるいはストレス群で増加す

る傾向がみとめられた。また神経活動については、ストレス反応および情動反応と関連する摂食関連脳部位（視床下部室傍核、扁桃体）の神経活動に自発運動群とストレス群の間に差がみられた。興味深いことに、末梢の栄養状態を脳に伝える脳部位（視床下部弓状核）にも自発運動群とストレス群に差異がみとめられた（実験 1, 2）。さらに行動薬理学的実験から、CRF 受容体阻害薬の脳室内慢性投与は自発運動による摂食抑制を阻害しなかった（実験 3）。

これらの結果から、自発運動は、ストレス負荷と同様に摂食抑制を引き起こすが、摂食量の経時的変化、ストレス関連行動、摂食関連脳部位の神経活動はストレス負荷による反応と異なることが示唆された。また、自発運動による摂食抑制には CRF 神経系の関与は少なく、ストレス性の摂食抑制メカニズムを介していない可能性が示唆された。以上のことから、自発運動は一過性に摂食抑制を引き起こすが、その摂食抑制はストレス性のものとは異なるものと考えられる。

目次

第1章 緒言	1
第2章 研究の背景	4
第1節 摂食行動の調節に関与する神経機構	4
第2節 ストレスによる摂食への影響	9
第3節 運動と摂食行動	14
第4節 免疫組織化学染色法	17
第5節 行動学的方法	19
第3章 実験1.	20
3.1 目的	20
3.2 方法	20
3.3 結果	27
3.4 考察	45
第4章 実験2.	49
4.1 目的	49
4.2 方法	50
4.3 結果	52
4.4 考察	70
第5章 実験3.	72
5.1 目的	72
5.2 方法	72
5.3 結果	75
5.4 考察	83
第6章 総合考察	85
謝辞	89
引用文献	90
補足資料	96

第1章 緒言

摂食行動は、生体内のエネルギー状態の変化によって決定されることはよく知られている。生体における主なエネルギー源はグルコースや遊離脂肪酸であるが、血液中のこれらの変化に応じて摂食行動が調節されている。さらに長期的には、体内に貯蔵されている脂肪組織からの情報(例えばレプチン)によっても影響を受けている。通常、摂食量はこれらのシグナルをもとに消費エネルギーと摂取エネルギーが等しくなるように調節されており、その調節には視床下部が重要な役割を果たしている。

視床下部による摂食行動の調節において、特に重要な脳部位は視床下部外側野(lateral hypothalamus: LH)と視床下部腹内側核(ventromedial hypothalamus: VMH)である。LHの損傷は深刻な摂食量の低下を引き起こすことから摂食行動の促進に重要な脳部位である。一方、VMHの損傷は過食と肥満を引き起こすことから満腹中枢ともいわれ、摂食行動の抑制に重要な脳部位である。これらのLH、VMHは血中の遊離脂肪酸やグルコースの状態を感受し、摂食行動に対して拮抗的に作用することによりエネルギーバランスを調節している(Anand and Brobeck, 1951; Bell et al., 2007)。また、これらの脳部位へは視床下部弓状核(hypothalamic arcuate nucleus: Arc)から内的エネルギー状態に関する情報が送られており、脂肪組織から分泌されるレプチン、すい臓から分泌されるインスリン、胃から分泌されるグレリンなど、末梢の栄養状態に関わるホルモンを受容して、その情報をLHおよびVMHに伝えている。このようにLHおよびVMHは、エネルギー状態の恒常性が維持されるよう摂食行動を調節する基盤となる脳部位であるといえる。

摂食調節に影響を及ぼす要因として、エネルギーバランスの維持以外のものも明らかとなってきた。例えば、ストレスを感じると食欲の低下あるいは過剰亢進が生じることがある。このストレス性の摂食行動の変化には、ストレス応答において重要な脳部位である視床下部室傍核や、情動や恐怖反応において重要な脳部位である扁桃体の関与が示唆されている(Smagin et al., 1999; Jochman et al., 2005)。また、何を食べるかによっても摂食行動は変化し、嗜好性の高い食物は摂食行動を促進することが知られている。これは様々な行動に対する動機づけおよび快の感覚において重要な腹側被蓋野のドーパミン神経活動の亢進によるものであることが示唆されている(Avena et al., 2008; Kudo et al., 2012; Ciccocioppo et al., 2003)。さらに、摂食障害、例えば神経性大食症や神経性無食欲症を示す患者では、食欲に異常が生じており、これらの患者ではセロトニンレベルの長期的な低下が生じていることが報告されている(Kaye et al., 2005; Kaye et al., 2008)。セロトニンは気分の調節や免疫系の反応を変化さ

せ、摂食行動に影響するものと考えられている(Kopf et al., 2011)。これらのことから、摂食行動は内的なエネルギー状態の変化だけでなく、情動性の変化や嗜癖などによっても影響を受けることが考えられる。

このように、摂食行動は複雑なメカニズムにより制御されているが、摂食行動の調節は肥満解消やダイエットに密接に関わり、社会的にも注目を浴びている。近年、肥満の予防・改善や体重管理に、運動が身近で効果的な方法として用いられている。一般的に、運動はエネルギー消費量を増加させることにより体重の減少を引き起こすと考えられている。しかし、運動による体重減少および肥満予防への効果はエネルギー消費量の増大のみによるものではないことを Ebal ら(2006)は指摘した。彼らは、ラットに低強度の運動を課すと主に体脂肪率の低下による体重減少がみられたが、この体重減少は運動によるカロリー消費量の増加で計算上期待される体重減少量よりも遥かに大きかった。運動を課した群において、コントロール群よりも摂食量が 11%低下しており、大幅なカロリー摂取量の減少が生じていたことを示した。このことから彼らは、運動による体重減少は、摂食量の低下によるところが大きいことを示唆した。すなわち、運動はエネルギー代謝だけでなく摂食行動自体にも影響するものと考えられる。しかし、運動が摂食行動に与える影響については、未だ不明な点が多い。これまで運動と摂食量の関係に焦点を当てた研究は少ないが、運動がストレス応答を引き起こし、ストレス性の摂食抑制を生じている可能性が示唆されている(Zhao et al., 2011)。

これまで多くの先行研究からストレス負荷が摂食量を低下させることが知られており(Chiba et al., 2012)、このストレス性の摂食抑制のメカニズムとして、大きく内分泌系と神経系の機構の関与が示唆されている。

内分泌系としては、ストレス応答において中心的な働きをする視床下部-下垂体-副腎軸(hypothalamic-pituitary-adrenal axis:HPA 軸)の活動がストレス性の摂食抑制において重要な役割を担うことが明らかになってきている。HPA 軸とは、ストレス刺激によって PVN のコルチコトロピン放出因子(corticotropin-releasing factor:CRF)神経活動が亢進され、血中へ放出された CRF が下垂体において副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone:ACTH)の血流への分泌を促進し、ACTH を受容する副腎においてグルココルチコイドの分泌が促進されるストレス反応系である(Dallman et al., 1994; Herman et al.,1997)。CRF や ACTH がストレス性の摂食抑制に関与することが多くの先行研究により示唆されている(Hotta et al., 1991; Richard et al., 2002 ; Krahn et al., 1986; Ferrari et al., 1992)。また、グルココルチコイドには摂食促進効果(Tataranni et al., 1996; Uchoa et al., 2010)と摂食抑制効果(Won Jahng et al., 2008)両方の報告がなされている。これらのことから、ストレス性の摂食行動の

調節に対して HPA 軸の活動が重要であり、CRF や ACTH、グルココルチコイドが直接的・間接的に摂食調節を司る脳部位に作用してストレス性の摂食抑制に関わると考えられる。

また、神経系によるストレス性の摂食調節のメカニズムとしては、CRF 神経の関与がよく知られている(Hotta et al. , 1991; Richard et al. , 2002; Krahn et al. , 1986; Smagin et al. , 1999; Ohata and Shibasaki, 2011; Sekino et al. , 2004)。CRF は HPA 軸反応の引き金として働くだけでなく、神経伝達物質として脳内の広範囲に存在する受容体に作用し、様々なストレス反応を調節している。摂食との関連では、PVN のオキシトシン神経や LH のオレキシン神経といった摂食調節に重要な神経に CRF 受容体が発現しており、ストレス性の摂食抑制との関連が示唆されている(Olson et al. , 1991; 小澤、2008)。また、扁桃体に存在する CRF 受容体もストレス性の摂食抑制において重要な役割を担うと考えられている(Jochman et al. , 2005; Ciccocioppo et al. , 2003)。

実際、強制運動や高強度運動は他のストレス刺激と同様に HPA 軸および CRF 神経を活性化することが知られており(Contarteze et al. , 2007)、先述のように、これらが運動による摂食抑制に関与している可能性が考えられる。しかしながら、運動による HPA 軸や CRF 神経の活性化は、運動のタイプ(強制・自発)、強度、時間に依存して異なることも示唆されている。運動のタイプに関して、Yanagita ら(2007)は、ラットの実験で 1 時間の自発運動および強制運動による PVN CRF 神経の活動について検討し、同一の運動量(走行距離)においても強制運動のほうが自発運動よりも CRF 神経の活動が高く、自発運動の CRF 神経活動には運動をしないコントロール群との違いはみられなかったことを報告している。また Soya ら(2007)はラットのトレッドミル走において、運動強度が乳酸性作業閾値(約 20m/min の走行速度)をこえると血しょう中の ACTH が上昇することを明らかにしている。また、Kawaguchi ら(2005)はラットをランニングホイールで自由に走行できる状況で飼育し、自発運動によっても摂食抑制が生じることを報告した。これらのことから、強制運動や高強度運動では HPA 軸の活性化や CRF 神経活動の亢進が摂食抑制に関与している可能性が考えられるが、自発運動においてはこれらのストレス反応系の関与は小さいと考えられる。すなわち、自発運動による摂食抑制のメカニズムは必ずしもストレス性の摂食抑制メカニズムとは一致しない可能性が考えられる。

そこで本研究では、自発運動による摂食行動への影響がストレス負荷によりみられる摂食抑制と異なるかどうかを明らかにするために、摂食量、ストレス関連行動、脳内神経活動の観点から比較検討することとした。

第2章 研究の背景

第1節 摂食調節に関与する神経機構

摂食行動は、内的なエネルギー状態の変化に基づいて決定されており、我々がエネルギー源とするグルコースや遊離脂肪酸の血液中での変化が引き金となり摂食行動が調節されている。さらに長期的には、体内に貯蔵されている脂肪からの情報によっても影響を受けている。通常、これらのシグナルをもとに消費エネルギーと摂取エネルギーが等しくなるように摂食量は調節されており、これには視床下部外側野(lateral hypothalamus: LH)、視床下部腹内側核(ventromedial hypothalamus: VMH)が重要な役割を担う。また、これらの脳部位へは視床下部弓状核(hypothalamic arcuate nucleus: Arc)から内的エネルギー状態に関する情報が送られており、Arcは末梢の栄養状態に関わるホルモンを受容して、その情報を視床下部外側野および腹内側核に伝えている。このように視床下部外側野および腹内側核は、エネルギー状態の恒常性が維持されるよう摂食行動を調節する基盤となる脳部位であるといえる。

摂食行動に影響を与える要因として、エネルギーバランスの調整以外のものも明らかになってきている。例えば、ストレスを感じると食欲の低下あるいは過剰亢進が生じることがある。このストレス性の摂食行動の変化には、ストレス応答において重要な脳部位である視床下部室傍核(paraventricular nucleus: PVN)や、情動や恐怖反応において重要な脳部位である扁桃体の関与が示唆されている (Smagin et al., 1999; Jochman et al., 2005; Cottone et al., 2009)。また、何を食べるかによっても摂食行動は変化し、嗜好性の高い食物は摂食行動を促進することが知られている。これは様々な行動に対する動機づけおよび快の感覚において重要な腹側被蓋野(ventral tegmental area: VTA)のドーパミン神経活動の亢進によるものであることが示唆されている (Avena et al., 2008)。さらに、摂食障害、例えば神経性大食症や神経性無食欲症を示す患者では食欲に異常が生じており、これらの患者ではセロトニンレベルの長期的な低下が生じていることが報告されている (Kaye et al., 2005; Kaye et al., 2008)。セロトニン神経は縫線核に密集しており、気分の調節や免疫系の反応を変化させ、摂食行動に影響するものと考えられている (Kopf et al., 2011)。これらのことから、摂食行動は内的なエネルギー状態の変化だけでなく、情動性の変化や嗜癖などによっても影響を受けることが考えられる。この節では、これらの摂食調節に関連する神経機構について述べる。

視床下部外側野(lateral hypothalamus: LH)、視床下部腹内側核(ventromedial hypothalamus: VMH)

通常の摂食行動は、内的なエネルギー状態の変化に影響を受ける。我々はグルコースや脂肪酸をエネルギー源として活動するが、これらはグリコーゲンおよび中性脂肪として体内に貯蔵される。エネルギー源が消費されるエネルギー量と同じ割合で使用されるなら、生体は適切なバランス状態にある。エネルギー源の摂取と貯蓄が一貫して消費を上回ると過剰な体脂肪が増え続け、肥満に至る。反対にエネルギー源の摂取が消費量に追いつかなければ、脂肪組織は減少し、飢餓の状態になる。生体がバランスを保つためには、エネルギー源の貯蓄量と供給量に基づいて摂食行動を調節する手段が不可欠である。視床下部は内的エネルギー状態に従った摂食調節に関与することが知られており、LHは摂食中枢、VMHは満腹中枢として働き、これらの脳部位が摂食行動の制御において中心的な働きを持つと考えられている。

LHおよびVMHは、血中のブドウ糖、インスリン、遊離脂肪酸を受容してモニタリングするとともに (Tsuneki et al., 2010)、末梢の内的エネルギー状態に関する情報を Arc から受け取る。これらの情報を受けて LH および VMH はエネルギー状態の恒常性が維持されるよう摂食行動を調節する。Arc は、脂肪組織から分泌されるホルモンであるレプチンや、血中グルコース濃度が上昇するとすい臓から分泌されるインスリン、胃に食物が無い状態の時に胃から分泌されるグレリンなど、末梢の栄養状態に関わるホルモンを受容して、その情報を LH よび VMH に伝える。

LH の損傷は深刻な摂食量の低下を引き起こし、反対に電気刺激を与えると満腹の状態であっても摂食行動がみられることから、摂食行動の促進に重要な脳部位であるといわれる。LH はオレキシンや MCH (メラニン凝集ホルモン: melanin-concentrating hormone) 分泌などの機構を介し、体内の様々な器官に作用して摂食を促進する (van Dijk et al., 2011)。LH の MCH 神経は脳の広範囲に連絡しており、特にエネルギー状態を大脳皮質に伝える上で重要な役割を担っていると考えられている。また、LH のオレキシン神経は摂食促進ペプチドとして知られており、摂食行動を促進する。

対照的に、VMH の損傷は過食と肥満を引き起こすことから、摂食行動の抑制に重要な脳部位である。VMH には脂肪組織から分泌されるホルモンであるレプチン受容体が多く発現しており、このレプチン受容体を欠損させると肥満を生じることが報告されている。

このように視床下部外側野及び腹内側核は摂食調節の中心的な役割を担い、内的エネルギー状態をモニタリングして摂食行動を調節している。

視床下部弓状核(hypothalamic arcuate nucleus: Arc)

Arc は、末梢のエネルギー状態に関する情報を受け取る脳部位として知られる。Arc には摂食調節や基礎代謝に重要なメラノコルチン系が存在する(Maniam and Morris, 2012)。メラノコルチン 4 型受容体(MC4 受容体)は視床下部、海馬、視床に発現し、摂食行動の調節に関与することが知られる。MC4 受容体の活性化によって摂食行動が抑制されることが知られており、特に LH、PVN に分布する MC4 受容体がこの摂食抑制に関与すると考えられている。MC4 受容体に対して促進的に働くのが proopiomelanocortin(POMC)の分解産物であり、Arc に細胞体が存在する α MSH である。また、MC4 受容体の内因性阻害物質として知られるアグーチ関連ペプチド(agouti-related protein:AgRP)の細胞体も Arc に存在する。末梢の脂肪細胞から分泌されるレプチンが Arc において受容されると、 α MSH の前駆体である POMC の合成が促進される一方で AgRP の合成が抑制され、食欲減少や代謝亢進に働く。肥満者においては AgRP の過剰産生や AgRP、MC4 受容体および POMC の遺伝的異常が関与する可能性があると考えられている(清水、2002)。

また、Arc に存在するニューロペプチド Y(NPY)神経の細胞体も摂食調節において重要な役割を担う。空腹時には NPY の分泌は増加し、また、NPY の脳室内投与は強い摂食亢進を引き起こすことが知られる(河野、矢田、2007)。NPY 神経細胞はレプチン、グレリン、インスリンなどの受容体を持ち、これらの摂食行動への影響を介在すると考えられている。空腹時に胃から分泌されるグレリンは NPY 神経活動を亢進させ、摂食行動を促進させると考えられている。また、脂肪細胞から分泌され、摂食抑制に働くレプチンの受容体が弓状核 NPY 神経細胞に豊富に発現しており、Arc の NPY 神経活動の抑制を介してレプチンが摂食抑制を引き起こすと考えられている。NPY 神経は POMC 神経細胞に抑制性の投射を持ち、POMC 神経細胞の活動を抑制することも知られる。

このように、Arc に存在する α MSH、AgRP、NPY などの神経細胞の活動は末梢からのエネルギーバランスに関連する情報を受け取り、摂食調節に働く。

視床下部室傍核(paraventricular nucleus of hypothalamus:PVN)

PVN はストレス応答において重要な役割を担う脳部位であるが、エネルギーバランスの調節のための摂食調節にも関与することが知られる。PVN は、Arc の NPY、AgRP、および POMC 神経の投射先として重要な部位である。PVN には MC4 受容体が豊富に発現しており、PVN での MC4 受容体発現を低下させると肥満が生じることが報告されている(Balthasar et al., 2005)。

また、PVNのCRF神経は、全身でのストレス応答を引き起こす視床下部-下垂体-副腎軸(hypothalamic-pituitary-adrenal axis;HPA軸)のトリガーとして働き、ストレス応答において重要な役割を担うが、PVNのCRF神経と摂食行動との関連性が示唆されている。例えば、PVNおよびその周辺に存在するCRF2型受容体の賦活化により、摂食抑制と体重減少が生じることが示唆されている(Smagin et al., 1999)。一方で、PVNのCRF神経活動がトリガーとなりHPA軸を活性化すると、グルココルチコイド(ヒトではコルチゾール、マウス・ラットではコルチコステロン)が副腎皮質から分泌され、糖新生や脂肪分解が促されるとともに摂食行動が促進されるという報告もある(Gluck, 2006; Wolkowitz et al., 2001)。また、ラットに嗜好性の高い餌を与えると視床下部におけるCRF mRNAの発現レベルが低下することや、うつ病患者において過食が脳脊髄液中のCRFレベルを低下させること(Dallman et al., 2003)が示唆されていることから、高嗜好食の摂取がPVNのCRF神経の活動を抑制し、ストレスを緩和する可能性が示唆されている。

扁桃核

扁桃核は不安や恐怖などの負の情動の発現に重要な脳部位であることが知られるが、扁桃核が摂食行動にも関与することが明らかとなってきた。Jochmanら(2005)は、ラットの扁桃核外側基底核(basolateral amygdala; BLA)にCRFを局所注入すると摂食量が低下すること、その摂食量変化のパターンがストレスを負荷した場合にみられる場合と類似していたこと、及びBLAにCRF受容体の阻害剤を注入することでストレス負荷をしても摂食量低下が生じなくなったことから、BLAがストレス性の摂食抑制に関与していると報告した。

また、扁桃核の亜核であり、不安や恐怖、嫌悪といった負の情動の生成に関わることが知られる分界条床核にCRFを投与すると摂食抑制が生じることが報告されている(Ciccocioppo et al., 2003)。分界条床核は快の感覚や動機づけに関わるVTAにGABA性の神経投射を持つ。分界上床核の神経活動が亢進するとVTAの活動が抑制されること(Kudo et al., 2012)から、摂食行動に対する動機づけに対する情動性の影響を介在する役割を持つ可能性が考えられている。また、扁桃核は嗜好性に関わる摂食行動においても重要な役割を担うことが報告されており、部分的に味覚情報が扁桃核に送られ快・不快についての価値判断が行われると考えられている(Olsen, 2011)。これらのことから、摂食行動の調節系として扁桃核が大きな役割を果たすことがわかってきている。

腹側被蓋野

腹側被蓋野は行動に対する動機づけや報酬、快の感覚の発現などにおいて重要な役割を担う脳部位として知られる(Avena et al., 2009)。摂食に影響する要因の一つに、嗜好性、つまり飲食物摂取に伴う快感がある。このような食物に対する嗜好性とそれに関わる摂食行動は、腹側被蓋野ドーパミン神経系を中心に構成される脳内報酬系の神経活動によって生じると考えられている(山本, 2006)。すなわち、腹側被蓋野ドーパミン神経の活動により快の感覚が生じ、嗜好性に基づいた摂食が促進されることが示唆されている(Avena et al., 2008; Berridge, 1996)。腹側被蓋野のドーパミン神経は主に側坐核に投射する。側坐核からは主に腹側淡蒼球への投射経路が存在し、腹側淡蒼球を介して腹側被蓋野のドーパミン神経活動は摂食中枢として知られる視床下部外側野を活性化させると考えられている。視床下部外側野の活動が亢進するとオレキシンが産生され、脳内に広く作用して覚醒、摂食、消化管機能などが促進される(Furudono et al., 2005; Kobashi et al., 2002)。神経性拒食症の患者では、腹側被蓋野ドーパミン神経系に異常が生じていることが示されている。長期に渡って過食を経験したラットでは、嗜好性の高い食べ物を摂食しているとき以外の側坐核ドーパミンレベルが過食を経験していないラットよりも低下していることが報告されており、ドーパミンレベルの低下が過食を促している可能性が指摘されている(Geiger et al., 2009)。

側坐核

側坐核は腹側被蓋野とともに快の感覚や動機づけを司る脳内報酬系を構成する脳部位であり、腹側被蓋野からドーパミン神経の投射を受ける。また、味覚情報および嗅覚や口腔感覚といった摂食時の感覚の統合において重要な役割を担う大脳の島皮質や眼窩前頭皮質からの神経投射も確認されており、摂食行動における快の感覚や報酬価値に基づいた摂食促進に関与する可能性が示唆されている(Saper et al., 2002)。

縫線核

縫線核にはセロトニン神経の細胞体が多く存在し、気分や覚醒の調節に関わることが知られている。摂食障害、例えば神経性大食症および神経性無食欲症を呈する患者には食欲の異常が生じているが、神経性大食症および神経性無食欲症のどちらにおいても脳脊髄液中の5-HIAA濃度の低下がみられることが報告されている(Kaye et al., 2005; Kaye et al., 2008)。5-HIAAはセロトニンの要代謝産物であり、セロトニンレベルの長期的な低下が摂食行動に影響を及ぼすことが示唆されている。

また、縫線核は免疫反応の調節にも関与しており、初期の免疫反応として生じる摂食抑制に

縫線核セロトニン神経が重要であることが示唆されている。Kopfら(2011)は、細胞毒素であるリポポリサッカロイド(LPS)の投与によって生じる摂食量の低下に縫線核の神経活動が重要であることを報告した。

また、縫線核セロトニン神経にはレプチン受容体が多く発現しており、このレプチン受容体と縫線核セロトニン神経特異的に欠損させた動物では摂食行動の亢進や肥満を呈することが示されており、縫線核セロトニン神経が摂食抑制に働くことが示唆されている(Yadav et al., 2009)。

第2節 ストレスによる摂食への影響

第1節では、エネルギーバランスの調節の調節以外にも摂食行動に影響を及ぼす様々な要因が存在し、それらの影響を介在する摂食行動の複雑な制御機構のいくつかに触れた。そのような摂食行動に影響を与える要因の一つとして、我々の社会において身近な問題となっているのがストレスによる摂食行動の変化である。ストレスと摂食行動の関係に着目した先行研究から、ストレス負荷が摂食量を低下させることが広く知られている。Chibaら(2012)は、ラットを4週間に渡り毎日拘束ストレスに曝露すると、摂食量および体重増加量が継続的に低下することを報告した。このようなストレス性の摂食抑制には、大きく分類して視床下部-下垂体-副腎軸(HPA軸)と呼ばれる内分泌系の機構の関与と、中枢神経系の機構の関与が示唆されている。この節では、ストレス負荷による摂食抑制のメカニズムについて概略を述べる。

ストレス負荷による摂食抑制

Chibaら(2012)は、6-7週齢の雄性Wistar系ラットに、4週間に渡り毎日拘束ストレスを負荷した。これをストレス群とし、毎日5分間ハンドリングを行っただけの動物をコントロール群とした。ストレス群とコントロール群に飼料と水を自由に摂取させ飼育したときの摂食量、体重増加量、不安様行動、うつ様行動、ストレス応答の指標にどのような変化が生じるかについて検討した。が継続的に低下することを報告した。4週間の測定期間における週毎の摂食量において、4週全てでコントロール群と比較してストレス群の摂食量が有意に低下した。飲水量においてはコントロール群とストレス群に違いはみられなかった。体重増加量において、コントロール群に対してストレス群の体重増加が4週に渡り継続的に抑制された。不安状態を調べるテストとしてよく用いられる高架十字式迷路テストでは不安傾向が低い状態にあるとオ

オープンアームにより長く滞在し、不安傾向が高いとクローズドアームにより長く滞在するとされるが、コントロール群と比較してストレス群のオープンアーム滞在時間が有意に減少し、クローズドアーム滞在時間が有意に増加した。また、ストレス群では、うつ様状態を示す指標の一つとしてよく用いられる甘味に対する動機づけの低下(無快楽症:anhedonia)がみられた。4週間の各条件の飼育後、ストレス群において拘束ストレス負荷を行った直後の血しょう中グルココルチコイドレベルが、ストレス負荷を行わなかったコントロール群と比較して有意に上昇していた。

これらのことから、ストレス負荷により生理学的なストレス応答が慢性的に生じ、情動状態にネガティブな影響を与えるとともに、長期的な摂食抑制を引き起こすと考えられる。

視床下部-下垂体-副腎軸(HPA 軸)を介したストレス性の摂食抑制のメカニズム

HPA 軸はストレス応答において中心的な働きをする神経内分泌系である。 ストレス刺激によって視床下部室傍核 CRF 神経の活動亢進が生じ、CRF が血中へ放出されると CRF は下垂体において副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の血流への分泌を促進し、ACTH は副腎におけるグルココルチコイドの分泌を促進する (Dallman et al., 1994; Herman et al.,1997)。グルココルチコイドは血流により全身に運ばれ、様々な器官に作用しストレス応答を引き起こす。視床下部室傍核の CRF 神経の活動が、ストレス反応を全身に引き起こすトリガーとなっている。このようにストレス反応を調節するシステムが、視床下部—下垂体—副腎軸 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis ,HPA 軸) と呼ばれる。慢性的なストレス状態では視床下部室傍核から過剰に CRF が分泌され、それに伴ってグルココルチコイドレベルが慢性的に高い状態にあることが報告されており、HPA 軸の活動が過剰に亢進していると考えられる (Arborelius et al. , 1999)。

HPA 軸によるストレス応答において主要な役割を担う CRF、ACTH、グルココルチコイドのそれぞれが摂食行動に与える影響について多くの検討がなされている。視床下部室傍核における CRF 神経の活動亢進は、HPA 軸の活動を誘発させるほか、他の脳部位に作用して摂食抑制に働くと考えられている。たとえば、CRF の脳室内投与により摂食抑制が生じることや (Hotta et al. , 1991; Richard et al. , 2002)、CRF の受容体の非選択的阻害薬(alpha-helical CRF(9-41))の脳室内投与によって CRF 誘発性の摂食抑制およびストレス誘発性の摂食抑制が軽減されること(Krahn et al. , 1986)が報告されている。さらに、CRF の脳室内投与により視床下部室傍核のオキシトシン(OT)神経の活動が亢進することが知られており、CRF に誘発された摂食抑制が OT 受容体阻害薬の脳室内投与によって完全に消失すること(Olson et al. ,

1991)から、視床下部室傍核の CRF 神経活動の亢進により OT 神経活動が誘発され、満腹中枢であり OT の受容体を多く持つ視床下部腹内側核に作用して摂食抑制を引き起こす可能性が指摘されている。このように、HPA 軸の活動の誘発において重要な CRF には摂食抑制効果が確認されており、ストレスと摂食抑制の関連において重要な役割を担うといえる (Smagin et al., 1999; Ohata and Shibasaki, 2011; Sekino et al., 2004)。

ACTH の摂食抑制効果についても報告がなされている。Ferrari ら(1992)は、十字迷路に飼料を置き、ACTH および溶媒を脳室内投与したラットに迷路を探索させたときの摂食行動および不安様行動を検討し、ACTH ノ投与により摂食量が低下したことを報告した。この実験で使用された ACTH の投与量はオープンアーム・クローズドアーム滞在時間やグルーミング行動といった不安様行動、および活動量には影響しなかったことから、不安様行動の増加などにより相対的に摂食行動に割かれる時間が減少したのではなく、ACTH 投与が摂食行動への動機づけを低下させたことが示唆されている。さらに、彼らは ACTH により摂食抑制が生じるモデルおよび拘束ストレスにより摂食抑制が生じるモデルを作成し、前もって両群に抗不安・抗うつ効果を持つドーパミン D2 型受容体の選択的アゴニストである B-HT 920 を腹腔内投与したところ、どちらの群においても摂食抑制が消失したことを報告した。

グルココルチコイドも摂食調節に深く関わることが知られている。グルココルチコイド投与により摂食量と体重増加量が増えたという報告や(Tataranni et al., 1996)、 ACTH の標的器官であり、グルココルチコイドを分泌する器官である副腎を摘出すると摂食量が低下し、副腎摘出を行った動物にグルココルチコイドを投与するとこの摂食抑制が消失する(Uchoa et al., 2009)などの報告から、グルココルチコイドは摂食行動の維持に重要であるといわれている。また、肥満のヒトにおいては、血しょう中グルココルチコイド濃度の上昇と HPA 軸の過剰亢進がみられることが知られている(Weaver et al., 1993)。一方で、ストレス負荷や人工的に合成されたグルココルチコイドであるデキサメタゾンの投与により血しょう中グルココルチコイドレベルが高い状態において摂食量が低下するとの報告もなされていることから(Won Jahng et al., 2008)、グルココルチコイドが摂食亢進・摂食抑制の双方向の影響を併せ持つと考えられている。これは、グルココルチコイドにより摂食亢進に働くメカニズム(CRF の抑制、NPY の増加など)と摂食抑制に働くメカニズム(レプチンの増加、メラノコルチン系の制御)の両方の分泌が調節され、それらの複雑なバランスや相互作用によって摂食への影響が決定されるからであるといわれる。

ストレス状態においてグルココルチコイドが分泌されると、海馬に多く存在するグルココルチコイド受容体がこれを受容し、HPA 軸応答の中枢におけるトリガーとして働く視床下部室

傍核の CRF 神経に対してネガティブフィードバックが生じ、結果的に CRF 神経の活動が抑制され、HPA 軸の活動抑制に働く。このグルココルチコイド受容体は摂食調節において重要な役割を担う視床下部の弓状核や外側野、室傍核といった脳部位にも分布しており、これらの脳部位を介したグルココルチコイドの摂食への影響も示唆されている。

また、グルココルチコイドレベルの上昇により血中のインスリンが増加し、視床下部弓状核において摂食促進効果を持つアミノ酸ペプチド神経伝達物質であるニューロペプチド Y (NPY) の発現を増加させ、摂食を増進させることが知られる(Sato et al. , 2005)。

Won Jahng ら(2008)は、デキサメタゾン投与すると摂食抑制に働くペプチドホルモンであるレプチンが末梢の脂肪細胞から分泌され、投与したデキサメタゾンの濃度依存的にレプチンの血しょう中濃度高まることを報告した。レプチンは視床下部弓状核に細胞体を有する摂食抑制ペプチド α MSH/CART の活動亢進させ、 α MSH が視床下部外側野の MC4 受容体に作用し、摂食抑制に働く。また、MC4 受容体の内因性阻害物質であり、視床下部弓状核に細胞体が存在する摂食促進に働くアグーチ関連ペプチド (AgRP) はレプチンレベルの上昇により分泌が抑制される。したがって、グルココルチコイドレベルの上昇によるレプチンの分泌促進は、摂食抑制に働く。

これらのことから、グルココルチコイドは摂食調節に関わる脳部位に直接作用して、あるいは末梢の器官のストレス応答を介して摂食調節に関わることが報告されている。

以上のことから、生理学的なストレス応答を引き起こす HPA 軸を構成する CRF、ACTH、グルココルチコイドにおいてそれぞれの摂食行動に対する影響が指摘されており、HPA 軸の活動がストレス性の摂食抑制に関連すると考えられる。

中枢神経を介したストレス負荷による摂食抑制のメカニズム

中枢神経においてストレス性の摂食抑制に関わるメカニズムについても先行研究により検討されている。ストレスの摂食行動への影響を介在する神経伝達物質として注目されているものの一つに、CRF が挙げられる。CRF は脳内で神経伝達物質として広範囲にわたり受容体を持つが、CRF の脳室内投与により摂食抑制が生じることや(Hotta et al. , 1991; Richard et al. , 2002)、CRF の受容体の非選択的阻害薬(α -helical CRF(9-41))の脳室内投与によって CRF 誘発性の摂食抑制およびストレス誘発性の摂食抑制が軽減されること(Krahn et al. , 1986)をはじめ、ストレス性の摂食抑制に CRF 神経が関与していることが多くの先行研究により示唆されている(Smagin et al. , 1999; Ohata and Shibasaki, 2011; Sekino et al. , 2004)。

視床下部室傍核の CRF 神経は、HPA 軸応答において重要な役割を担うだけでなく、中枢神

経系における摂食抑制のメカニズムにも関与していることが示唆されている。摂食行動が生じた後に視床下部室傍核 CRF の神経活動が生じることや、視床下部室傍核 CRF 神経の活動により摂食抑制が生じることなどが示唆されており、視床下部室傍核の CRF 神経の活動が摂食抑制や満腹感を生む反応において重要な脳部位であることが示唆されている(Uchoa et al. , 2010)。また、CRF を脳室内投与すると摂食量が減少することを先に述べたが、この CRF 投与により視床下部室傍核のオキシトシン(OT)神経の活動が亢進することが知られており、さらに CRF に誘発された摂食抑制が OT 受容体阻害薬の脳室内投与によって完全に消失すること(Olson et al. , 1991)から、視床下部室傍核の CRF 神経活動の亢進により OT 神経活動が誘発され、満腹中枢であり OT の受容体を多く持つ視床下部腹内側核に作用して摂食抑制を引き起こす可能性が指摘されている。視床下部外側野とその周辺に細胞体を持ち摂食調節に関わるオレキシンニューロンには、CRF ニューロンの投射が確認されており、このことからストレス反応系の神経ネットワークがオレキシンニューロン系に連絡し、ストレスと摂食を結び付けている可能性が示唆される(小澤、2008)。

ほかにも、扁桃体外側基底核に CRF を局所投与すると摂食量が低下し、CRF1 型受容体の選択的阻害薬を局所投与するとストレス性の摂食抑制が消失することから、扁桃体外側基底核の CRF1 型受容体のストレス性の摂食抑制への関与が示唆されている(Jochman et al. , 2005)。また、扁桃体の亜核であり、腹側被蓋野に抑制性の神経投射を持つ分界条床核に CRF を投与すると摂食抑制が生じ、CRF の阻害薬投与により CRF 性の摂食抑制が消失することが報告されている(Ciccocioppo et al. , 2003)。また、この先行研究では ACTH および拘束ストレスによる摂食抑制に対するドーパミン受容体の作動薬投与の効果についても検討しており、ドーパミン受容体の作動薬が摂食抑制を軽減させることを示唆している。分界条床核は不安や恐怖、嫌悪といった負の情動の生成に関わる脳部位であり、快の感覚や動機づけに関わる腹側被蓋野に GABA 性の神経投射を持つ。分界上床核の神経活動が亢進すると腹側被蓋野の活動が抑制されること(Watanabe et al. , 2012)から、ストレス性の摂食抑制では腹側被蓋野の神経活動が抑制されることにより摂食への動機づけが低下している可能性が考えられる。

また、急性の拘束ストレス負荷により、視床下部弓状核において摂食抑制に働くニューロペプチドである POMC (プロオピオメラノコルチン) の mRNA 発現が高まることが示唆されている(Calvez et al. , 2011)。また、急性の拘束ストレス負荷および強制水泳ストレス負荷により、POMC 陽性神経細胞の神経活動が亢進する一方で、POMC の摂食抑制作用に対して拮抗的に働き、摂食を亢進させる作用を持つ AgRP (アグーチ関連ペプチド) の陽性細胞の神経活動は変化しないという報告もなされており(Liu et al. , 2007)、視床下部弓状核におけるこれら

のメラノコルチン系の働きがストレス性の摂食抑制に関与していることが示唆されている。

第 3 節 運動と摂食行動

一般的に、運動はエネルギー消費量を増加させることにより体重の減少を引き起こすと考えられている。しかし、運動による体重減少および肥満予防への効果はエネルギー消費量の増大のみによるものではなく、運動による体重減少は、摂食量の低下によるところが大きいことが示唆されており(Ebal et al., 2006)、運動はエネルギー代謝だけでなく摂食行動自体にも影響するものと考えられる。しかし、運動が摂食行動に与える影響については、未だ不明な点が多い。これまで運動と摂食量の関係に焦点を当てた研究は少ないが、運動がストレス応答を引き起こし、ストレス性の摂食抑制を生じている可能性が示唆されている(Zhao et al., 2011)。実際、強制運動や高強度運動は他のストレス刺激と同様に HPA 軸および CRF 神経を活性化することが知られており(Contarteze et al., 2007)、先述のように、これらが運動による摂食抑制に関与している可能性が考えられる。しかしながら、運動による HPA 軸や CRF 神経の活性化は、運動のタイプ(強制・自発)、強度、時間に依存して異なることも示唆されており、強制運動や高強度運動に比較して、自発運動や低強度運動ではストレス応答が低いことが示唆されている(Yanagita et al., 2007; Soya et al., 2007) 自発運動や低強度運動においても摂食抑制が生じる可能性が示唆されているが(Ebalet al., 2006; Kawaguchiet al., 2005)、自発運動による摂食抑制においては HPA 軸の活性化や CRF 神経活動といったストレス反応系の関与は小さいと考えられる。すなわち、自発運動による摂食抑制のメカニズムは必ずしもストレス性の摂食抑制メカニズムとは一致しない可能性が考えられる。

運動の摂食への影響

Ebal ら(2006)は、ラットに短時間で低強度の運動として尾に重り(0-200g まで徐々に重くする)をつけた状態で網にしがみつかせる運動(30 秒間、3 分おきに 3 回)を 5 週間課し、摂食量、体重および体組成の変化、またそれに伴う摂食関連ホルモンの変化を調べた。その結果、運動により主に体脂肪率の低下による体重減少がみられた。また、この体重減少は運動によるカロリー消費量の増加で計算上期待される体重減少量よりも遥かに大きかった。運動を課した群において、コントロール群よりも摂食量が 11%低下しており、大幅なカロリー摂取量の減少が生じていたことから、彼らは運動による体重減少は摂食量の低下によるところが大きいこと

を示唆した。また、彼らは5週間の運動によりインスリンおよびグレリンの血中レベルが低下したことを示し、運動により摂食関連ホルモンの応答が変化する可能性を示した。これらのことから彼らは、運動がエネルギー代謝だけでなく摂食行動自体にも影響することを示唆した。

ほかにも、Katchら(1979)は、ラットに酸素摂取量のデータを用いてカロリー消費量を求め、高強度(16m/min)および低強度(5m/min)のトレッドミル走において運動時間を調整してカロリー消費量を等しく統制し、それぞれの運動強度における摂食量の変化を調べた。その結果、彼らはどちらの運動強度においても摂食量の低下および体重増加率の低下がみられることを示した。また、低強度運動に比較して、高強度運動における摂食抑制の程度がより大きかった。このことから、彼らは運動の強度に関わらず摂食抑制はみられるが、その抑制効果の大きさは運動の強度によって影響を受ける可能性を示唆した。

自発運動の摂食への影響

自発運動による摂食抑制について検討した先行研究は少ないが、自発運動によっても摂食行動が低下したとの報告がなされている(Fediuc et al. , 2006, Kawaguchi et al. , 2005)。Kawaguchiら(2005)は、ランニングホイールが使用できる条件と使用できない条件でラットを7日間飼育したときの摂食量および体重増加量を示した。ランニングホイールを使用できる運動群では、使用できないコントロール群に比べて摂食量が運動開始から5日間に渡って有意に減少し、その後の2日間にも統計的に有意な差ではないものの、運動群の摂食量がコントロール群よりも減少する傾向がみられた。また、7日間の飼育期間中全ての日において運動群の体重増加量がコントロール群よりも有意に低下したことを示唆した。

Fediucら(2006)の先行研究は自発運動による摂食への影響に焦点を当てたものではないが、約1ヶ月間にわたり自発運動を経験させた群とさせなかった群における摂食量の変化を示した。この報告からは、ランニングホイールでの自発運動開始4日間は自発運動群の摂食量が自発運動をさせなかったコントロール群よりも有意に低下したが、その後自発運動群の摂食量は増加し13日目以降はほとんどの日において自発運動群の摂食量がコントロール群よりも有意に増加することが示されている。

運動によるストレス応答

運動によりHPA軸が活性化することが報告されている。Contartezeら(2008)は、乳酸性作業閾とほぼ同強度、および乳酸性作業閾値よりも約25%高い強度で、2種類の強制運動(強制水泳およびトレッドミル走)をラットに行わせ、これら4条件の運動におけるストレス応答に

ついて検討した。彼らは、運動の強度および強制運動の方法に関わらず、コントロール群に比較して全ての運動条件で血しょう中 ACTH 濃度および血しょう中コルチコステロン濃度に有意な上昇がみられたことを示した。また、Soya ら(2007)はラットのトレッドミル走において、運動強度が乳酸性作業閾値(約 20m/min の走行速度)をこえると血しょう中の ACTH が上昇することを明らかにしている。このように、運動がストレス応答を引き起こすことから、運動がストレッサーとして働き摂食量の低下を生じさせる可能性が考えられる。

自発運動の特性

自発運動は高い報酬性を持つなどの特性を持つことが示唆されている。たとえば、自発運動は摂食行動に匹敵する報酬値を持ち、摂食行動の報酬値を代償する可能性が示唆されている。Pierce ら(1986)は、レバーを必要回数押すと食餌が得られる装置を用い、自発運動のレバー押し行動に対する影響について検討した結果、事前に自発運動を行わせておくと、レバー押しの回数が減少することを示した。また、レバー押しによって自発運動ができる環境が与えられることを学習させたラットにおいて、テスト直前に食餌を与えなかった場合、食餌を与えたラットに比べ、レバー押し行動の回数が増加することを示した。このことから彼らは、自発運動は摂食行動に匹敵する報酬値を持ち、摂食行動の報酬値を代償する可能性を示唆した。

また、Greenwood ら(2011)は、自発運動を 4 週間経験させたラットにおいて、自発運動に対する嗜好性を調べるテスト(場所嗜好性テスト)を行った。ラットに自発運動を行うことのできる場所(縦縞模様のチャンバー)と自発運動を行うことのできない場所(横縞模様のチャンバー)があることを前もって学習させ、テストにおいてどちらのチャンバーにより長く滞在するかを調べることにより、ラットが自発的にどちらを選択するか(より好むか)を調べた。その結果、高い割合で自発運動ができるチャンバーが選択されたことから、かれらはラットにとって自発運動が好ましい事象であることを示唆した。これらのことから、自発運動はラットにとって好ましいものであり、また、自発運動は摂食行動に匹敵する報酬値を持ち、摂食行動の報酬値を自発運動が持つ報酬値で代償できる可能性が考えられる。

自発運動が報酬や快感に関わることが神経活動からも示唆されている。先述の Greenwood らの先行研究において、自発運動の開始から 6 週間の時点で Acb の Δ FosB/FosB 蛋白質発現を調べ、自発運動条件においてコントロール条件よりも Acb 神経活動が亢進したことを示唆した。また、自発運動条件において、VTA のドーパミン産生の指標(チロシン水酸化酵素)がコントロール群よりも増加したことから、VTA のドーパミン神

経活動が亢進したことを示唆した。VTA、Arc は快の感覚や動機づけを司る脳内報酬系を構成する脳部位であり、報酬刺激によって VTA のドーパミン神経活動が亢進し、この神経投射を受ける Acb の活動も亢進することが知られる。これらのことから、自発運動が快や報酬といった感覚に影響し、摂食行動にも影響する可能性が考えられる。

自発運動および強制運動のストレス応答との比較

しかし、運動のタイプや強度によって、ストレス応答の大きさが異なることが示唆されている。Yanagita ら(2007)はランニングホイールで自発運動を行わせる自発運動群に加え、ランニングホイールで走行させるが実験者がラットをつつくことによって強制的に走運動を行わせる強制運動群を設定し、両群の走行量を同程度に統制することによって自発運動群および強制運動群のストレス応答の違いを検討した。その結果、自発運動群、走運動を行わせない群、および走運動を行わせずつづくだけの群のいずれと比較しても、強制運動群において HPA 軸活性化の指標となる視床下部室傍核の CRF 神経活動が有意に高いことを報告している。

また、Leasure と Jones(2008)は、ランニングホイールで自発運動を行わせる群と、モーターにより強制的に回転するランニングホイールを用いて強制運動を行わせる群において、走行距離を等しく統制した場合のストレス関連行動の違いについて検討した。彼らは、8 週間の運動期間の後、歩行運動量および不安様行動を計測する行動テストであるオープンフィールドテストを行い、その結果、自発運動群および強制運動群において歩行運動量の差はみとめられなかったが、強制運動群では自発運動群よりも不安傾向が高まることを示唆した。また彼らは、走行距離を等しくした場合、自発運動群の平均走行速度は強制運動群よりも有意に速く、走行する時間は自発運動群において強制運動群よりも有意に短いことを示し、ラットは自発走行をさせた場合、頻繁に休息を繰り返しながら、短時間に速い速度で走運動を行う性質を持つことを示唆した。

第 4 節 免疫組織化学染色法

生理学的、医学的研究領域において、c-Fos タンパク質などに対する免疫組織化学的方法が脳機能を評価する方法としてよく用いられている (Sagar et al., 1998)。

脳機能を評価する方法として、形態的特徴に着目する方法がある。この方法は大きく区分し

て「脳の形態観察」と「神経細胞の観察」に分けられる。「脳の形態観察」は、脳機能障害や神経機能障害の患者における行動と脳解剖や脳画像などの脳形態を比較し、脳の特定部位の機能を直接推論する方法である。この方法では時間解像度は低いといえる。「神経細胞の観察」は個々の神経細胞を直接調べる方法であるが、侵襲的であるためヒトはなく動物実験で用いられることが多い。具体的な方法としては、特定の神経細胞のみを染めるなどの染色法や、神経細胞に電極を挿して直接電位を測る微小電極法などがある。脳機能を測定する方法には、このような方法以外にも血流や代謝の測定や電磁計測などを用いて脳の活動を非侵襲的にリアルタイムで調べイメージングする方法もある。

様々な脳機能の評価方法がある中で、前述したように免疫組織化学的方法は生理学的、医学的研究領域において多く用いられている (Sagar et al., 1998)。免疫組織化学的方法は「神経細胞の観察」に属し、特異的な抗原抗体反応を利用して特定の神経細胞や核のみを染色する方法である。特に神経生理学実験系においては、*c-fos* mRNA や *c-Fos* タンパク質、 Δ FosB タンパク質が神経活動の指標として利用されることが多い。*c-fos* は細胞最初期遺伝子と呼ばれているものの一つで、神経活動に伴い新しいタンパク質発現を必要とせず、神経細胞の種類に対して非選択的に発現する遺伝子群である。*c-Fos* タンパク質の発現する機序は、神経伝達が起こると細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、続いて、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇により cAMP 応答配列結合タンパク (cAMP response element binding protein: CREB) のリン酸化が誘発される。CREB のリン酸化により *c-fos* の転写が亢進され、その後 *c-fos* は細胞質で翻訳され *c-Fos* タンパク質が発現する。翻訳された *c-Fos* タンパク質は核内に移動し、Jun タンパク質と二量体を形成し、標的遺伝子群の遺伝子転写を誘導する。このことから、*c-Fos* タンパク質の発現は神経活動の指標として多くの研究で用いられている。*c-Fos* タンパク質発現には一定時間が必要であり、その時間は与えられる刺激の条件に依存すると考えられるが、先行研究により *c-Fos* タンパク質の発現が刺激後約 60~90 分で最大になると報告されている (Morgan et al., 1987)。*c-Fos* タンパク質の発現に一定の時間がかかることから、非侵襲的な状態で行った行動実験後の脳活動を実験後に推測することが可能となる。

Δ FosB は Fos ファミリーの 1 つである FosB タンパク質が分断された (truncated) 形であり、神経活動に依存して FosB タンパク質が発現すると、その後細胞体内に Δ FosB が長期間残存し、蓄積されていく。 Δ FosB は長期的な神経活動による神経の可塑性などに影響するといわれ、慢性的な刺激によりその刺激に関連する脳部位において Δ FosB の発現が高まると考えられている (Kaplan et al., 2011)。このことから、免疫組織化学染色法を用いて Δ FosB の発現を定量することによって、慢性的な刺激により影響を受けた脳部位の長期的な神経活動を調べ

ることができると考えられている。

免疫組織化学的方法は、直接脳を破壊したときの行動を観察して破壊した部分の脳機能を推測する脳破壊実験とは異なり、非侵襲的な状態で行動を観察することができるため、正常な状態での行動を記録することが可能である。この免疫組織化学的方法は、脳波や MRI などを用いた方法のようにリアルタイムで脳活動を観察することは難しいが、異なる抗体を用いて二重に染色を行うことなどにより、脳波や MRI といった方法では特定不可能な個々の神経細胞の活動を特定することが可能である (Korb et al., 2010)。

免疫組織化学的方法は神経細胞を直接染色し観察することから、空間解像度において非常に優れた方法であり、動物を用いた行動実験において神経活動を評価するのに有効であるといえる。

第 5 節 行動学的方法

高架十字式迷路テストは実験動物の情動状態を評価する行動学的テストとして広く用いられている (Kanai et al., 2011; Zheng et al., 2006)。

高架十字式迷路テストは 2 本の直線状のアームを十字に組み合わせた形状で、3 方を壁で囲まれた辺 (closed arm) と約 5 mm の縁のみがついた辺 (open arm) で構成されており、実験動物の新規環境に対する不安様行動を測定するテストとして広く用いられている (Liu et al., 2007)。動物はセンターゾーンに置かれ、設定された時間 (多くは 5 分間) の間の open arm 滞在時間が記録される。通常はテスト時間のうち 20-25 % を open arm 滞在時間が占めるといわれているが、抗うつ薬投与により open arm 滞在時間が延長することが示唆されており (Fernandes and File, 1996)、不安緩解の効果を測定する上で高架十字式迷路テストが有効であると考えられている。

これらのことから、高架十字式迷路テストはラットの情動状態の評価に有効であるといえる。

第 3 章

実験 1. 自発運動の摂食行動への影響とストレス性の摂食抑制との比較

3.1 目的

動物に強制運動をさせると摂食量の低下が生じることが報告されており、この運動による摂食量の低下は、ストレスとの関与が示唆されている(Zhao et al., 2011)。ストレス性の摂食抑制のメカニズムには視床下部-下垂体-副腎軸(hypothalamic-pituitary-adrenal axis:HPA 軸)の活動(内分泌系)およびコルチコトロピン放出因子(corticotropin releasing factor: CRF)神経の活性化が重要な役割を担うことが示唆されている。実際に強制運動や高強度運動は他のストレス刺激と同様に HPA 軸および CRF 神経を活性化させることが知られており(Contarteze et al., 2007)、このような運動はストレス応答を引き起こし、ストレス性の摂食抑制を生じさせる可能性が示唆されている。しかしながら、運動によるストレス応答は運動のタイプや強度によって異なり、自発運動では強制運動のようなストレス応答は生じないことが示唆されているにもかかわらず(Yanagita et al., 2007)、自発運動でも摂食抑制が生じることが報告されている(Ebal et al., 2006; Kawaguchi et al., 2005)。これらのことから、自発運動による摂食抑制のメカニズムは必ずしもストレス性の摂食抑制メカニズムとは一致しない可能性が考えられる。

摂食行動は、エネルギーバランスを維持するために視床下部によって調節されている。加えて、エネルギーバランス維持以外にも、ストレス、情動、気分、動機づけなどによっても摂食行動は変化し、これらに関連する神経系を介したより複雑な摂食調節のメカニズムが示唆されている。自発運動は、これらの脳部位に対してストレス負荷とは異なる影響を及ぼし、摂食行動を変化させる可能性が考えられる。

そこで本実験では、自発運動による摂食行動への影響がストレス負荷によりみられる摂食抑制と異なるかどうかを明らかにすることを目的とし、長期的な自発運動が摂食量に及ぼす影響とともに、ストレス関連行動からみたストレス反応および神経活動について、ストレス負荷によるそれぞれの変化と比較することとした。

3.2 方法

3.2.1 実験動物

実験動物として 8 週齢の雄性 Wistar 系ラットを用いた。これらのラットは動物飼育施設において、1 匹ずつケージ (280×440×180 mm) に入れ、12 時間ごとの明暗サイクル (05:00 点灯、17:00 消灯) 、24 °C の条件下で飼育し、水と食餌は自由摂取であった。

ラットをランダムに 3 つのグループに分け、それぞれを運動群、ストレス群、コントロール群とした。運動群は飼育ケージ内に走行滑車 (ランニングホイール) を設置した。ストレス群には実験期間中毎日拘束ストレスを負荷した。運動およびストレス負荷の方法に関する詳細については次節において述べる。

なお、本研究における動物の取り扱いおよび研究計画については、首都大学東京研究安全倫理委員会(南大沢キャンパス)の承認を得た。

3.2.2 飼育条件

運動群では飼育ケージ内にランニングホイール (内径 310 mm 幅 84 mm、有限会社メルクエスト) を設置し、4 週間にわたって自発運動が可能な条件で飼育した。走行距離は、ランニングホイールに内蔵されたマイクロスイッチの接点信号を自動的にカウントする表示カウンター (有限会社メルクエスト) を用い、24 時間ごとに計測した。

ストレス群に対して、本研究では、ストレス負荷の方法として拘束ストレスを用いた。拘束ストレスは、ACTH やコルチコステロンの分泌を促進することが知られ (Chiba et al., 2008; Haas and George, 1988)、急性および慢性の負荷によって摂食行動の抑制が生じることが報告されていることから、本研究において拘束ストレスを用いた (Dal-Zotto et al., 2004; Chiba et al., 2008)。ストレス群においては、1 日 2.5 時間の拘束ストレスを 4 週間に渡り負荷した。明期に点灯下で 2.5 時間拘束した後、直ちに飼育ケージにラットを戻した。拘束器具は、内径 64 mm、外径 70 mm、長さ 200 mm のアクリルパイプを用いて作成した (図 1)。アクリルパイプの片方の端には約 8 mm 四方のアクリル板を接着し、アクリル板に空気穴をあけてラットに十分な酸素が供給されるようにした (拘束時こちらが頭側となる)。他方のアクリルパイプの口は、内径 18 mm、外径 60 mm のウレタンパイプを長さ 25 mm に切断したものを蓋とし、ラットの体長に合わせて固定位置を調節できるようにした。蓋となるウレタンパイプの直径上に 2 箇所穴を開け、さらにアクリルパイプの直径上に 2 箇所ずつ、20 mm 間隔で約 6 mm の穴を開けて、ネジをこれらの穴に通すことでアクリルパイプに蓋が固定できるようにした。穴を開けた部分は、拘束時の痛みや出血を防ぐため、表面をヤスリで滑らかに整えた。

拘束を行うときは、頭からラットを拘束具に入れ、蓋の穴の部分に尾を通し、窒息などに陥らない程度に蓋を押し込み、2 つのねじで蓋を固定した。

3.2.3 摂食量および体重の測定

個体ごとの摂食量および体重を 24 時間おきに測定し、1 週間ごとに平均した。ストレス群に拘束を負荷している間は飲水および摂食が不可能となることから、拘束を行わない運動群及びコントロール群の給水ボトル及び食餌をケージから取り除き、2.5 時間後に再び呈示した。この 2.5 時間を除き、食餌および水は自由摂取であった。

3.2.4 行動学的テスト

4 週間の飼育後、各群のストレス状態を検討するために、実験動物の情動状態の評価方法として広く用いられている高架十字式迷路テストを行った。高架十字式迷路は 2 本の直線状のアーム(10.5cm×110.5cm)を十字に組み合わせた形状で、3 方を壁(高さ 40cm)で囲まれたアーム (closed arm) と約 5 mm の縁のみがついたアーム (open arm) で構成されたものを高さ約 55cm の位置に固定して用いた(図 2)。

テストは暗期に行い、個体間でテストを行う時間帯に差が生じないように、動物を何グループかにランダムに分け、数日かけて同じ時間帯(17:00-18:00)でテストを行った。テストはラットを飼育している部屋とは別の部屋で行い、気温 (24℃)、照明の強さを一定に保った状態で行った。テスト前の 3 日間、30 分間ずつ実験を行う部屋に動物を移動させ、新規環境に動物を慣れさせた。実験に用いた高架十字式迷路は、各個体のテストが終わるごとに適度に薄めたエタノール溶液で排泄物や体毛を拭き取り乾燥させ、個体ごとに嗅覚的な刺激が異ならないように配慮した。

高架式十字迷路のセンターゾーンにラットを頭部がオープンアームを向くようにして置き、5 分間ビデオカメラで撮影した映像を用いて測定を行った。測定項目としては、①オープンアーム滞在時間および侵入回数、②クローズドアーム滞在時間および侵入回数、③毛づくろい回数を記録した。なお、両後肢までアームの領域に入った場合にのみ、そのアームに侵入したと判断した。

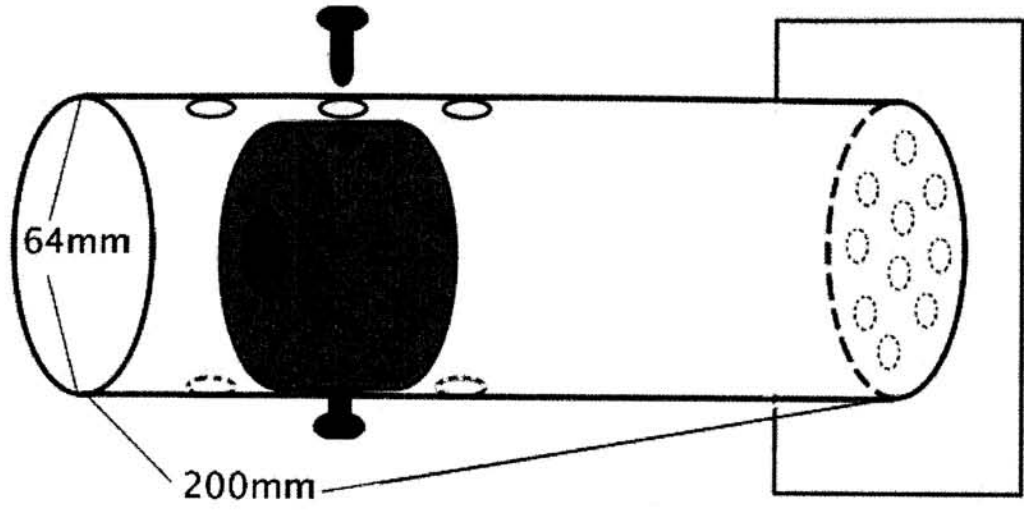


图 1.拘束器具

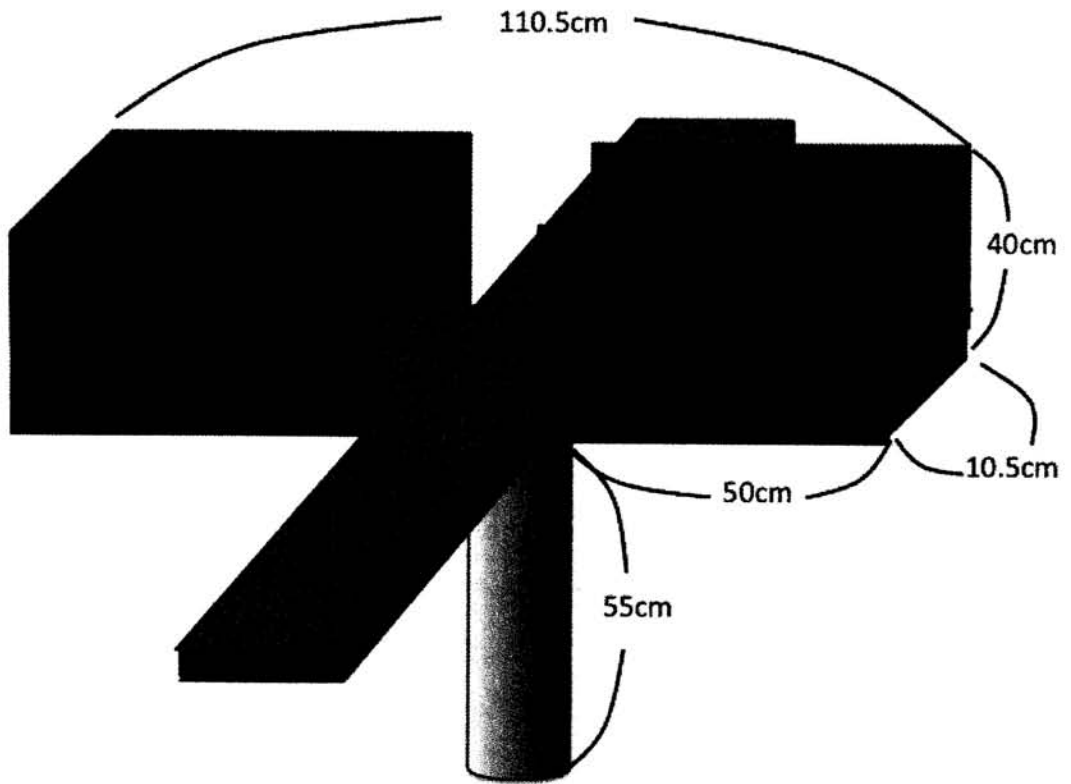


图 2.高架式十字迷路

3.2.5 実験手順

動物の搬入後、飼育環境に動物を慣れさせるため、ホームケージにて5日間通常飼育を行った。その際、摂食量と体重を測定し、5日間の平均値をベースラインとした(ベースライン期間)。ベースライン期間の後、4週間にわたって各条件での飼育を行った。ストレス負荷は毎日午前10:30から開始し、2.5時間行った。4週間の飼育中は、毎日の摂食量および体重を測定し、

運動群では走行量も測定した。4週間の飼育後、行動学的テストを行った。

摂食に関連する脳部位の神経活動の検討を行うため、行動テストの5日程度後に還流固定および脳摘出を行い、免疫組織化学染色法を用いて Δ FosB/FosB蛋白質の発現量を調べた。

3.2.6 免疫組織化学染色法

還流固定

麻酔薬 (sodium pentobarbital; ペントバルビタールナトリウム/ 大日本住友製薬株式会社、50 mg/kg) を腹腔内投与し、深麻酔状態であることを確認しながら、開胸した。ヘパリン含有生理食塩水を経心臓的に還流し、続いて固定液を還流し組織固定を行った。還流のために用いるヘパリン含有生理食塩水は、0.9% saline に 1000 units/ml ヘパリンナトリウム溶液を添加し作成した。固定液は以下の手順で作成した。蒸留水 (60 °C) に 4%パラホルムアルデヒドを加え、2N NaOH 溶液を数滴加えて攪拌した。0.2%ピクリン酸(飽和溶液)と1Mリン酸緩衝液; NaCl 1.4 M, KCl 26.8mM, Na₂HPO₄ 91 mM, KH₂PO₄ 20mM) を加えた後、pH メーターを用いて pH 7.4 となるように 2N NaOH および 1N HCl で調整した。その後 0.1%グルタルアルデヒドを加え、4 °C で保存した。還流固定後直ちに脳を摘出した。取り出した脳は、後固定液 (固定液作成過程で 0.1%グルタルアルデヒドを加える前の段階で別容器に取り分けたもの) に浸け、後固定を一昼夜行い、その後 30%スクロース溶液と 0.1% アジ化ナトリウムを含む 0.1 M PBS に浸けて脱水処理をした。

脳切片の作成

摘出した脳は、凍結マイクロトーム (MS-31 滑走式マイクロトーム/ 大和光機株式会社) を用いて厚さ 40 μ m にスライスし、脳断片を作成した。このとき全ての切片は、アジ化ナトリウムを加えた 0.1 M PBS の入った 6 つの容器に順番に取り分け、1 容器中

に 240 μm おきの切片が含まれるようにした。

免疫染色

神経活動の指標である $\Delta\text{FosB}/\text{FosB}$ の抗体に対する免疫染色を行った。1 容器分の浮遊切片を 10 分間ずつ 3 回 0.1 M PBS で洗った後、内因性ペルオキシターゼ活性を失活させるために 0.3 % 過酸化水素/0.1 M PBS に 30 分浸した。再度 0.1 M PBS で洗い、続いて 0.1 % Triton X-100・10% 正常マウス血清・ $\Delta\text{FosB}/\text{FosB}$ 一次抗体

(Rabbit polyclonal Ig-G/ Santa Cruz Biotechnology Inc.、濃度 1:600) を含む 0.1 M PBS に 14 時間以上浸した。次に、PBS-TX (0.1 % Triton X-100/0.1 M PBS) で 10 分間ずつ 3 回洗った後、0.1 % Triton X-100・10% 正常マウス血清・二次抗体 (Donkey anti-rabbit Ig-G/ CHEMICON INTERNATIONAL、濃度 1:800) を含む 0.1 M PBS に 1.5~2 時間浸した。PBS-TX での洗浄に続いて、アビジオンービオチン標識酵素複合体 (VECTASTAIN Elite ABC Standard Kit/ フナコシ株式会社) / PBS-TX (濃度 1:250) で 2~4 時間処理した。この溶液は、浮遊切片を移す前にあらかじめ振とう器に 20 分かけた。さらに PBS-TX で洗浄し、0.5 M Tris-HCl・10 % ニッケル飽和溶液・0.04 % DAB (0.04 % 3,3-Diaminobenzidine; アミノベンチジン) に 0.3 % 過酸化水素/0.1 M PBS を加えた水溶液に、浮遊切片を移し発色させた。発色後は PBS-TX で洗い、アジ化ナトリウム含有の 0.1 M PBS に移し、4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

標本作成

免疫組織化学的処理を終えた切片は、ゼラチンコーティングをしたスライドグラスに載せて 2~3 日乾燥させた後、エタノールとキシレンによる脱水処理を行った。脱水処理は 50 %・75 %・95 %・100 % の各濃度のエタノール (各 2 分) に引き続き、エタノールとキシレンが 1:1 の割合の混合溶液 (30 分)、100 % キシレン (30 分) の順番でそれぞれの溶液にスライドグラスごと浸けた。その後スライドグラスに封入剤 (Parmount/ ファルマ株式会社) を用いてカバーガラスを被せ、乾燥させた。

標的脳部位

摂食行動の調節に関与する脳部位を標的脳部位とした。ストレス応答において重要な役割を持つとともに、摂食抑制に働くことが示唆されている視床下部室傍核 (paraventricular nucleus; PVN) (Smagin et al., 1999)、エネルギーバランスに関

する情報を末梢から受け取り、摂食行動を修飾する視床下部弓状核(hypothalamic arcuate nucleus: Arc),情動に関わりストレス性の摂食抑制への関連が示唆されている扁桃体中心核(central nucleus of amygdala: CeA)および扁桃体基底外側核(basolateral amygdala: BLA) (Jochman et al. , 2005)、快の感覚や報酬に関わり、動機づけにもとづいた摂食行動の促進に働くことが示唆されている腹側被蓋野(ventral tegmental area; VTA)や側坐核(nucleus accumbens: Acb) (Avena et al. , 2009)、気分の調節に関わるセロトニン神経が存在し、摂食抑制に働くことが示唆されている背側縫線核(dorsal raphe; DR) (Kopf et al. , 2011)を標的脳部位とし、それぞれの脳部位における Δ FosB/FosB 陽性細胞数を計測した。

神経活動の定量化

各飼育条件における脳内神経活動の評価を行うために、各標的脳部位の Δ FosB/FosB 陽性細胞数を計測した。各脳部位を含む脳切片 2-3 枚を対象とした。該当部位の光学顕微鏡下の画像を顕微鏡用デジタルカメラを用いてパソコンに取り込み、その画像から Δ FosB/FosB 陽性細胞数を計測した。それぞれの脳部位で計測対象となる面積が等しくなるよう一定の範囲を決め、各切片の計測を行い、個体ごとの切片 1 枚あたりの値を算出した。

3.2.7 統計分析

全てのデータは平均値±標準誤差で表した。摂食量および体重においては飼育条件による経時的変化の違いを評価するために、2 要因の分散分析 (すなわち、[飼育条件 (運動群 vs. ストレス群 vs. コントロール群)] × [週 (ベースライン vs. 1 週目 vs. 2 週目 vs. 3 週目 vs. 4 週目)]) を用いて検討した。行動テストの各指標および神経活動においては、3 水準の 1 要因の分散分析を用いて検討した。分散分析において有意な主効果が得られた場合は、さらに Tukey's multiple comparisons test を行った。本研究において統計的有意水準は全て 5%以下とした。

3.3 結果

3.3.1 自発運動およびストレス負荷の摂食量への影響

図 3 にコントロール群、運動群およびストレス群における 1 日あたりの摂食量の週毎の平均値の推移を示した。コントロール群の各週の摂食量はほぼ横ばいであったのに対し、運動群およびストレス群では飼育期間中に摂食量がベースライン期間よりも低下した。また、ストレス群の摂食量低下は継続的であったのに対し、運動群の摂食量の低下は飼育期間の後半に向けて回復する傾向がみられた。

3 群における週毎の摂食量の変化において、分散分析の結果、群と週の交互作用がみられた($F(8, 52) = 8.838, p < 0.05$)。また、週の主効果($F(4, 52) = 7.883, p < 0.05$)、および群の主効果がみられた($F(2, 13) = 16.78, p < 0.05$)。

各週の 3 群の摂食量について多重比較検定を行ったところ、運動群では飼育期間の 1、2、3 週目において、コントロール群と比較して摂食量が低下していた(各週 $p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。また、ストレス群では飼育期間中全ての週においてコントロール群と比較して摂食量の低下がみられた(各週 $p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。運動群の摂食量は、3 週目($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)、4 週目($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)にはストレス群よりも有意に多かった。

また、各群の時間要因について、いずれの群においても時間要因の単純主効果がみとめられたため、多重比較検定により各群のベースライン期間と 1~4 週目の間に差がみられるかどうかを検討した。コントロール群の摂食量は、ベースライン期間と比較して 2 週目に有意な増加がみられた ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。運動群において、1 週目の摂食量がベースライン期間よりも有意に低下したが、2 週目以降にベースライン期間との有意な摂食量の違いはみられなかった($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。ストレス群では、1 週目および 3 週目の摂食量がベースライン期間よりも有意に低下していた。

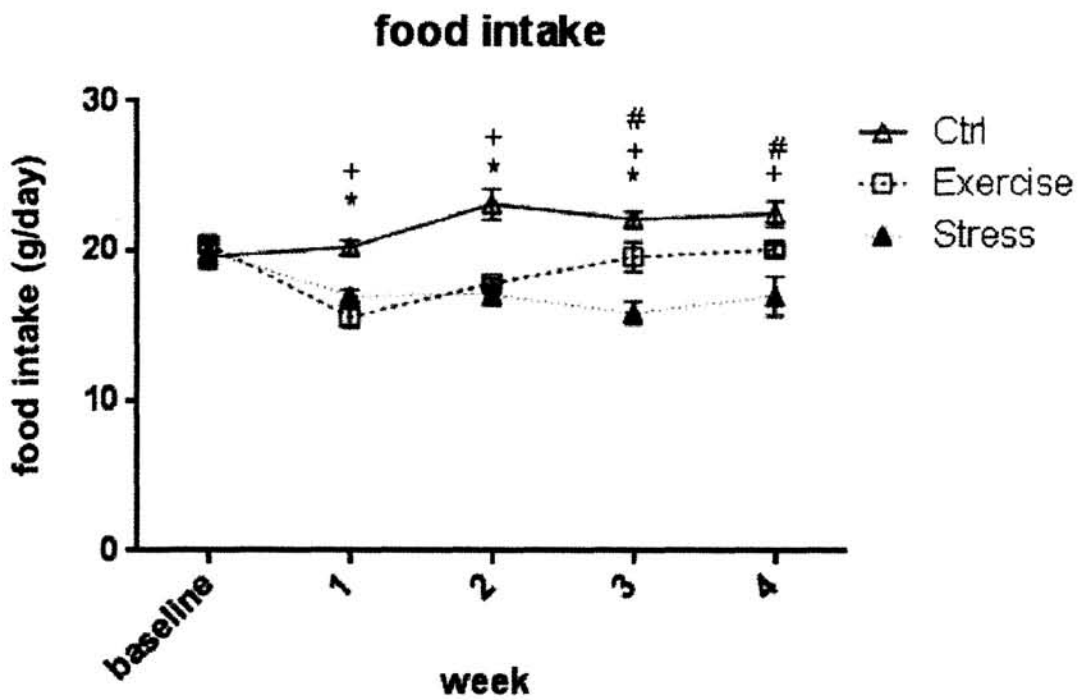


図 3. ベースライン期間および4週間の飼育期間におけるコントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)の摂食量の変化

*: Ctrl vs. Exercise ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)

+ : Ctrl vs. Stress ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)

: Exercise vs. Stress ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)

3.3.2 自発運動およびストレス負荷の体重への影響

コントロール群、運動群およびストレス群の体重を毎日測定し、週毎に平均した(図4)。どの飼育条件においても体重は増加傾向にあったが、運動群およびストレス群の体重はコントロール群よりも低下した。ストレス群の体重は飼育期間の後半にコントロール群よりも低下し、4週間の飼育期間中に回復はみられなかった。運動群においても4週にわたりコントロール群よりも体重が低下したが、1、2週目はストレス群と同程度の体重であったのに対して、3、4週目には体重増加の抑制が軽減し、ストレス群よりも体重が増加した。

3群における週毎の体重の変化において、群と週の交互作用がみられた($F(8, 52) = 17.84, p < 0.01$)。また、週の主効果 ($F(4, 52) = 308.6, p < 0.01$)および群の主効果がみられた($F(2, 13) = 14.51, p < 0.01$)。

それぞれの週において3群の体重を比較した。運動群の体重は、コントロール群と比較して、4週間の飼育期間のうち全ての週において有意に低かった(各週 $p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。また、ストレス群の体重は飼育期間の2、3、4週目においてコントロール群よりも有意に低かった(各週 $p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。また、3週目($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)、4週目($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)には運動群の体重はストレス群よりも有意に増加した。

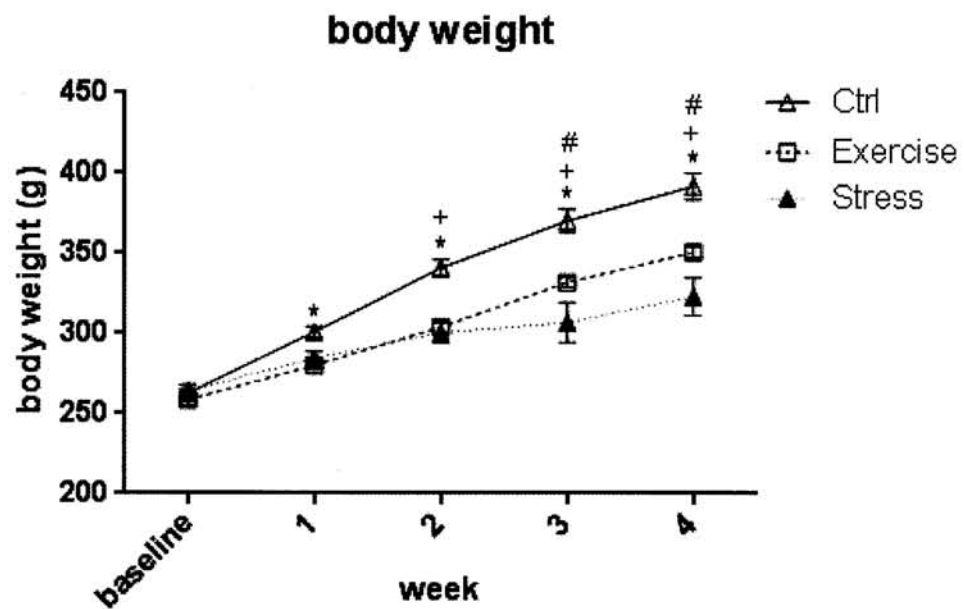


図 4. ベースライン期間および4週間の飼育期間におけるコントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)の体重の変化

*:Ctrl vs. Exercise($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)

+ :Ctrl vs. Stress($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)

:Exercise vs. Stress($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)

3.3.3 自発運動量

飼育期間中の運動群におけるホイールランニングでの走行距離を示した (図 5)。運動群が自発的に走運動を行っていることが確認された。また、週の効果について一元配置分散分析を行ったところ、週による走行量に有意な変化はみられなかった($F(1.105, 4.421) = 3.807$ $P = 0.1154$)。

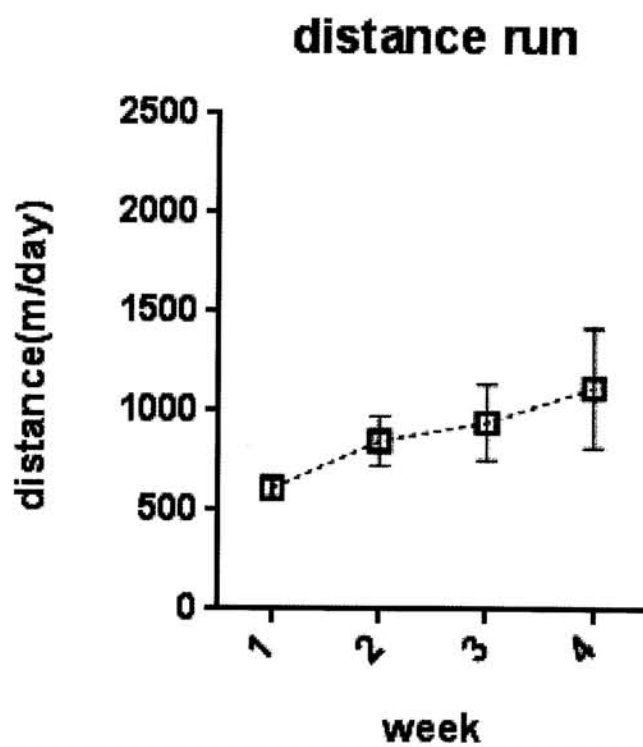


図 5. 4週間の飼育期間における運動群の1日当たりの走行量の週毎の平均値

(n = 5)。

3.3.4 自発運動およびストレス負荷の不安様行動への影響

高架十字式迷路テストにおいて、オープンアーム侵入回数および滞在時間(図 6)、クローズドアーム侵入回数および滞在時間(図 7)、高架十字式迷路を行っているときにみられたグルーミング行動の頻度および時間(図 6)を示した。

不安傾向が低いことを示すオープンアーム侵入回数に群の主効果がみられ ($F=8.163, p<0.05$)、ストレス群のオープンアーム侵入回数がコントロール群および運動群よりも少なかった($p<0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。また、オープンアーム滞在時間においても群の主効果がみられ ($F=8.675, p<0.05$)、ストレス群のオープンアーム滞在時間が他の2群よりも有意に短かった($p<0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。

不安傾向が高いと増加がみられるクローズドアーム滞在時間($F=14.74, p<0.05$)において主効果がみられた。多重比較検定の結果、ストレス群のクローズドアーム滞在時間がコントロール群および運動群に比較して有意に長かった($p<0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。クローズドアーム侵入回数には群の主効果はみられなかった($F=1.409, p=0.27$)。

グルーミング行動において、頻度($F=2.565, p=0.12$)および時間($F=3.283, p=0.07$)ともに群の主効果はみられなかったが、コントロール群と比較して運動群ではグルーミング行動が減少し、ストレス群ではグルーミング行動が増加する傾向がみられた。

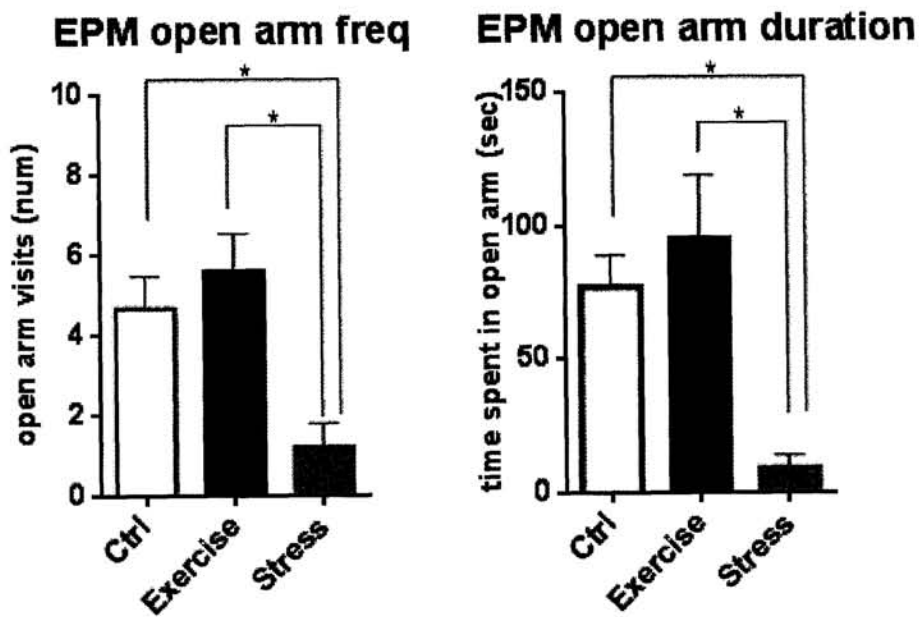


図 5.高架十字式迷路テストにおけるコントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)のオープンアーム侵入回数 (左図) およびオープンアーム滞在時間 (右図)。

*:2 群間に有意差があることを示す($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。

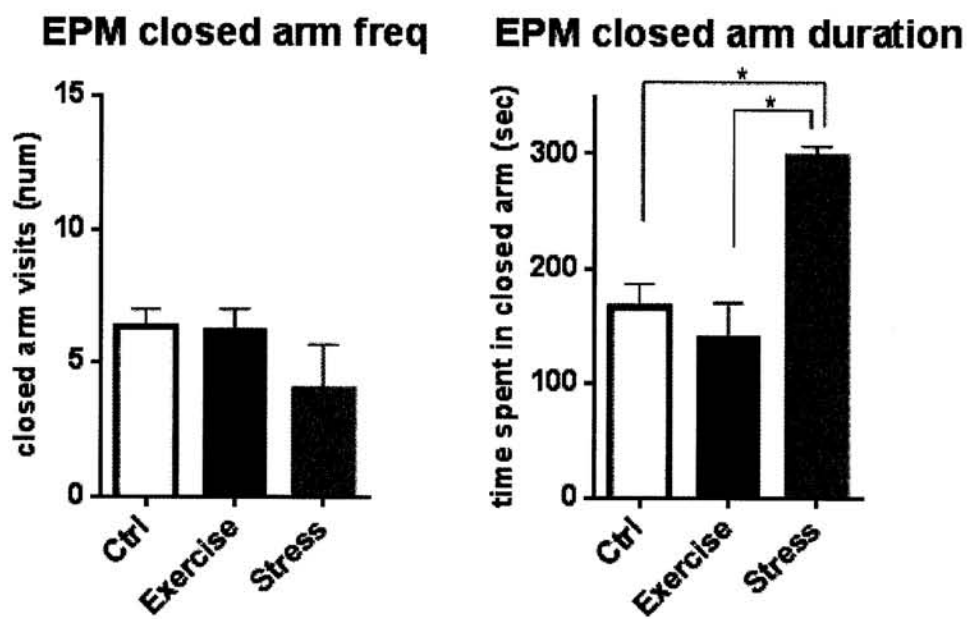


図 6.高架十字式迷路テストにおけるコントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)のクローズドアーム侵入回数 (左図) およびクローズドアーム滞在時間 (右図)。

*:2 群間に有意差があることを示す($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。

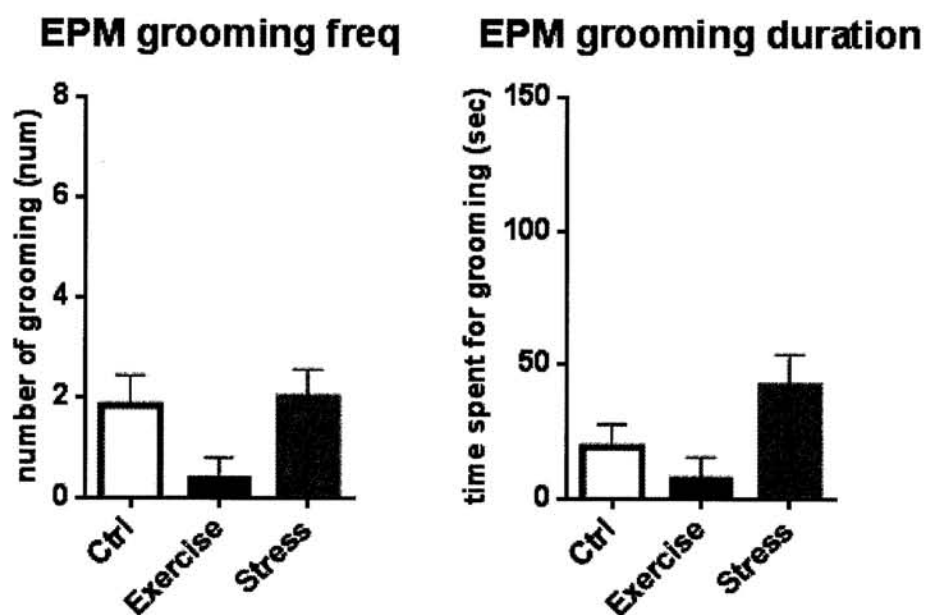


図 7.高架十字式迷路テストにおけるコントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)のグルーミング頻度 (左図) およびグルーミング時間 (右図)。

3.3.4 自発運動およびストレス負荷の神経活動への影響

視床下部室傍核(paraventricular nucleus; PVN) (図 8) において、群の主効果がみられ($F(2, 13) = 15.76, p < 0.05$)、ストレス群の $\Delta\text{FosB}/\text{FosB}$ の陽性細胞数がコントロール群および運動群と比較して有意に増加していた(Tukey's multiple comparisons test, $p < 0.05$)。視床下部弓状核(hypothalamic arcuate nucleus: Arc) (図 9) では、群の主効果がみられ($F(2, 13) = 5.292, p < 0.05$)、ストレス群の $\Delta\text{FosB}/\text{FosB}$ 陽性細胞数がコントロール群と比較して減少していた(Tukey's multiple comparisons test, $p < 0.05$)。

扁桃体中心核(central nucleus of amygdala: CeA) (図 10) において群の主効果がみられ($F(2, 13) = 10.65, p < 0.05$)、ストレス群の $\Delta\text{FosB}/\text{FosB}$ 陽性細胞数がコントロール群および運動群と比較して増加した(Tukey's multiple comparisons test, $p < 0.05$)。扁桃体基底外側核(basolateral amygdala; BLA) (図 11) では、 $\Delta\text{FosB}/\text{FosB}$ 陽性細胞数に群による顕著な違いはみられなかった ($F(2, 13) = 0.9890, p = 0.3983$)。

中脳に存在する腹側被蓋野(ventral tegmental area; VTA)(図 12)においては、群の主効果はみられなかったが($F(2, 13) = 1.251, p = 0.3184$)、ストレス群の $\Delta\text{FosB}/\text{FosB}$ 陽性細胞数がコントロール群および運動群と比較して減少する傾向がみられた。側坐核(nucleus accumbens: Acb) (図 13)においては群の主効果がみられ($F(2, 13) = 6.504, p < 0.05$)、ストレス群の $\Delta\text{FosB}/\text{FosB}$ の陽性細胞数が運動群と比較して有意に減少していた(Tukey's multiple comparisons test, $p < 0.05$)。

背側縫線核(dorsal raphe; DR)においては、統計的に有意な差はみとめられなかったが ($F(2, 13) = 1.489, p = 0.2618$)、ストレス群の $\Delta\text{FosB}/\text{FosB}$ の陽性細胞数がコントロール群および運動群と比較してわずかに減少する傾向がみられた(図 14)。

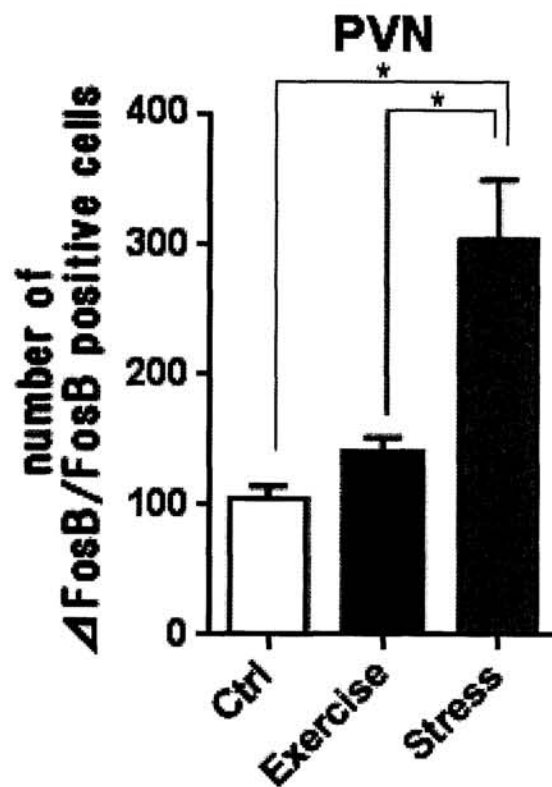


図 8. コントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)の PVN における Δ FosB/FosB 陽性細胞数。
*:2 群間に有意差がみられたことを示す(p<0.05, Tukey's multiple comparisons test)。

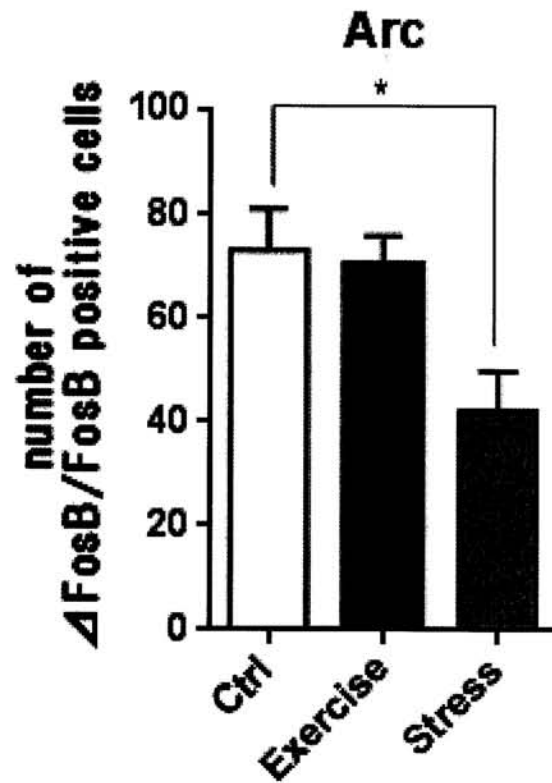


図 9. コントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)の Arc (右図) における Δ FosB/FosB 陽性細胞数。

*:2 群間に有意差がみられたことを示す(p<0.05, Tukey's multiple comparisons test)。

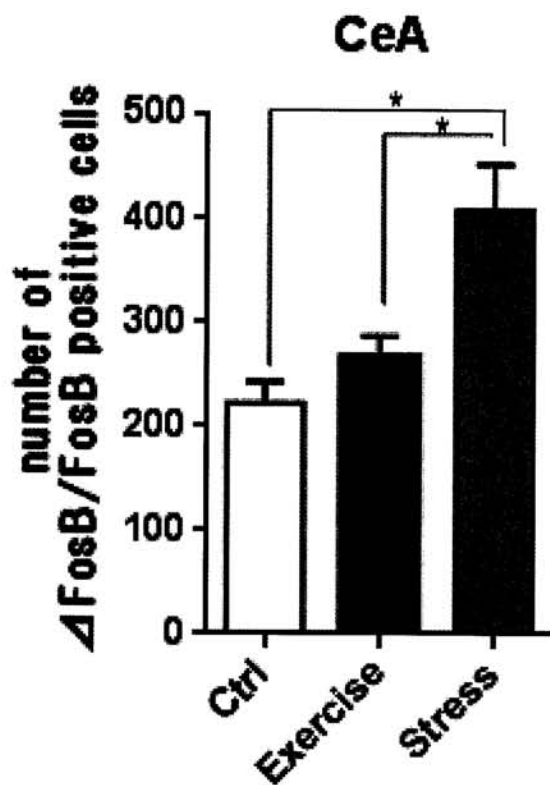


図 10. コントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)の CeA における Δ FosB/FosB 陽性細胞数。

*:2 群間に有意差がみられたことを示す(p<0.05, Tukey's multiple comparisons test)。

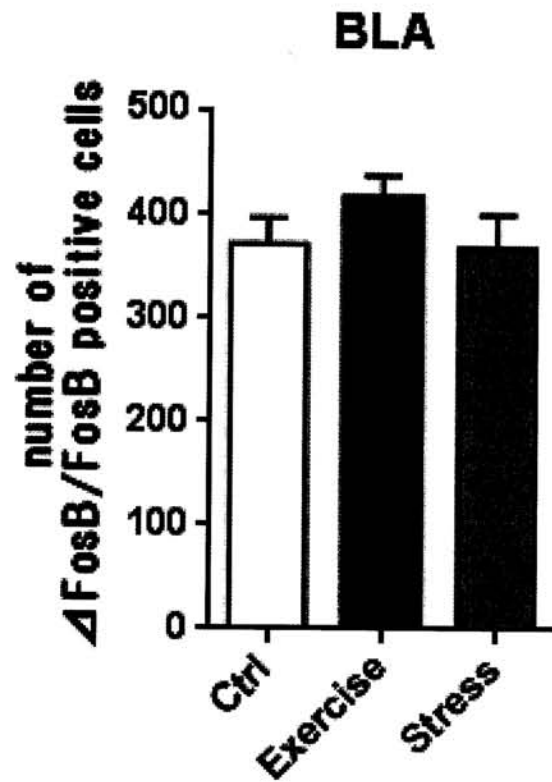


図 11. コントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) および ストレス群(Stress, n = 5)の BLA における Δ FosB/FosB 陽性細胞数。

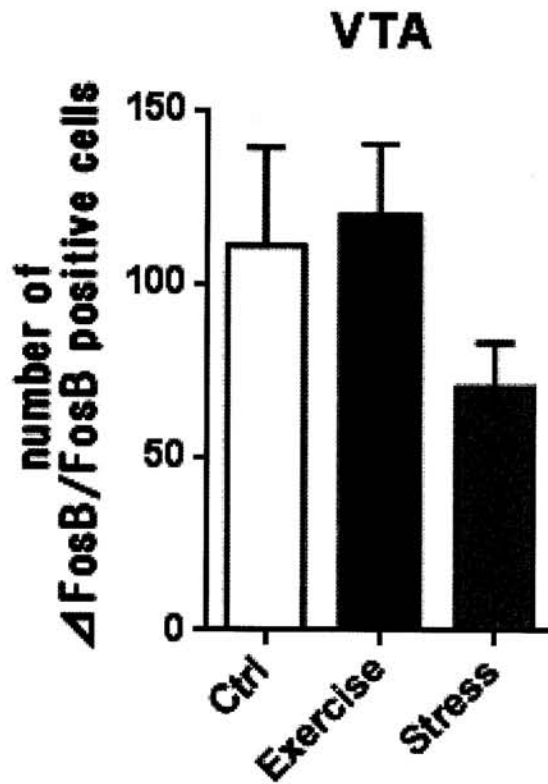


図 12. コントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)の VTA における Δ FosB/FosB 陽性細胞数。

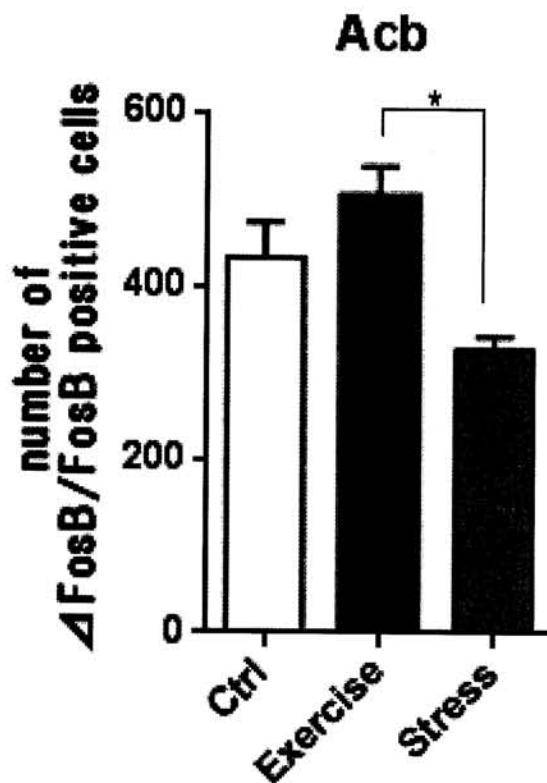


図 13. コントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)の Acb における Δ FosB/FosB 陽性細胞数。

*:2 群間に有意差がみられたことを示す(p<0.05, Tukey's multiple comparisons test)。

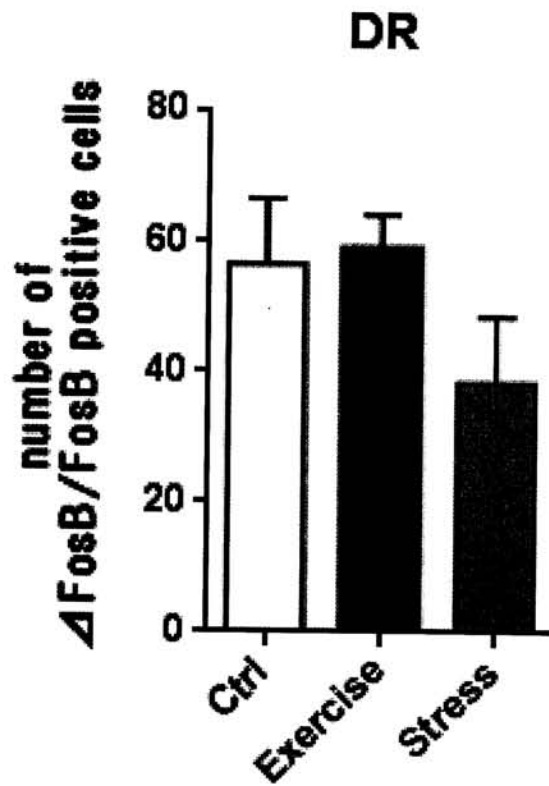


図 14. コントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)の DR における Δ FosB/FosB 陽性細胞数。

3.4 考察

本実験では、自発運動による摂食行動への影響がストレス負荷によりみられる摂食抑制と異なるかどうかを明らかにするために、それぞれの条件で4週間ラットを飼育し、摂食量の経時的变化およびストレス関連行動、摂食行動に関連する脳神経活動について比較検討した。自発運動群では、飼育開始直後から摂食量、体重の減少がみられ、ストレス群でも同様の減少がみられた。しかし、自発運動群では、ストレス群とは異なり2週目以降から摂食量が回復する傾向にあり、体重減少についてもストレス群よりも穏やかであった。また、自発運動群における4週間の飼育後のストレス関連行動(不安様行動)はストレス群より低く、コントロール群との間に有意な差はみられなかった。さらに、脳神経活動については、ストレス、情動に関連するPVN、CeAにおいてストレス群で活動亢進がみられたが、自発運動群ではコントロール群との間に有意な差はみとめられなかった。また、エネルギーバランスに関わる情報を受け取るArc、快情動・報酬に関わるVTA、Acb、気分に関わるDRにおいて、ストレス群では他の群より神経活動が低い傾向にあった。これらのことから、自発運動ではストレス負荷と同様に摂食抑制を引き起こすが、摂食量および体重の経時的变化、不安状態、摂食関連脳部位の神経活動の結果から、自発運動による摂食行動への影響はストレス負荷による摂食抑制とは異なる特徴を有する可能性が考えられる。

本研究において、ラットに自発運動を行わせると一過性の摂食抑制が生じることが示唆された。自発運動による摂食行動への影響に焦点を当てた先行研究は多くないが、Kawaguchiら(2005)はランニングホイールが使用できる条件(運動群)と使用できない条件(コントロール群)で1週間ラットを飼育した結果、運動群では、コントロール群に比べて摂食量が有意に減少したことを示した。また、Fediucら(2006)は5週間にわたり自発運動を経験させた群とさせなかった群における摂食量の変化を測定し、ランニングホイールでの自発運動開始後4日間で摂食量が有意に低下したことを報告した。しかし、その後自発運動群の摂食量は回復する傾向にあり、13日目以降は自発運動群の摂食量がコントロール群よりも有意に増加することを示した。本研究では飼育後3週間目まで自発運動群の摂食量はコントロール群よりも低く、この結果とは一致しなかった。この相違は、ラットの系統の違いや週齢によるものかもしれない。しかし、これらの先行研究の結果は、少なくとも自発運動により摂食量が一過性に低下することを報告しており、本研究の結果と一致している。これらのことから、自発運動によって一過性の摂食抑制が生じる可能性が考えられる。

運動による摂食抑制効果に関しては、運動はストレッサーとしてストレス応答を引き起こし、ストレス性の摂食抑制を生じさせる可能性が示唆されている。これまで多くの先行研究から、

ストレス負荷が摂食量を低下させることが知られており、その摂食抑制のメカニズムとして、HPA 軸の活動(内分泌系)および CRF 神経系の関与が示唆されている。HPA 軸の活性化によって分泌される CRF や副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotropic hormone: ACTH)、グルココルチコイドが直接的・間接的に摂食調節を司る脳部位に作用してストレス性の摂食抑制に関わると考えられている(Hotta et al. , 1991; Richard et al. , 2002 ; Krahn et al . , 1986; Ferrari et al. , 1992 ; Tataranni et al. , 1996; Uchoa et al. , 2010; Won Jahng et al. , 2008)。また、神経系メカニズムとして CRF 神経の関与がよく知られている(Uchoa et al. , 2010; Hotta et al. , 1991; Richard et al. , 2002; Krahn et al . , 1986; Smagin et al. , 1999; Ohata and Shibasaki, 2011; Sekino et al . , 2004)。例えば、ストレス刺激により PVN の CRF 神経活動が高まると、CRF 受容体の活性化を介して PVN オキシトシン神経の活動を引き起こすことが示唆されている。オキシトシン神経は満腹中枢である視床下部腹内側核(ventromedial nucleus of hypothalamus: VMH)に作用して摂食抑制を引き起こすといわれている(Olson et al. , 1991; 小澤、2008)。また、扁桃体に存在する CRF 受容体もストレス性の摂食抑制において重要な役割を担うことが報告されている(Jochman et al. , 2005; Ciccocioppo et al. , 2003)。

運動でもこれらのストレス反応系が活性化することが示唆されている。Contarteze ら(2007)は、ラットに強制的にトレッドミル走および水泳を経験させると、HPA 軸の活動が亢進することを示した。また、乳酸性作業閾値以上の高強度でより強い HPA 軸応答がみられることを示唆した。このことから、運動による摂食抑制には先に述べたストレス性の摂食抑制メカニズムが関与する可能性が考えられる。しかしながら、運動による HPA 軸や CRF 神経の活性化は運動のタイプや強度、時間に依存して異なることも示唆されている。Yanagita ら(2007)は自発運動および強制運動による PVN の CRF 神経活動を検討し、同一の運動量(走行距離)においても強制運動のほうが自発運動よりも CRF 神経の活動が高く、自発運動の CRF 神経活動には運動をしないコントロール群との違いはみられなかったことを報告している。したがって、自発運動では HPA 軸や CRF 神経を介したストレス反応系の活動はあまり高くない可能性が考えられる。本研究で得られた神経活動の結果からも、ストレス負荷(ストレス群)により PVN および CeA の神経活動は亢進したが、自発運動ではコントロール群との差は生じなかった。さらに、ストレス関連行動の結果からも、ストレス負荷によりストレス関連行動が増加したが、自発運動群ではコントロールとの違いはみられなかった。これらのことから、自発運動による摂食抑制はストレス負荷による摂食抑制とは異なる可能性が示唆される。

自発運動により摂食抑制が生じるメカニズムは本研究からは明らかにできないが、先行研究により示された自発運動の特性から、いくつかの可能性が考えられる。たとえば、自発運動は

摂食行動に匹敵する報酬値を持ち、摂食行動の報酬値を代償する可能性が考えられる。Pierceら(1986)は、レバーを必要回数押すと食餌が得られる装置を用い、自発運動のレバー押し行動に対する影響について検討した結果、事前に自発運動を行わせておくと、レバー押しの回数が減少することを示した。また、レバー押しによって自発運動ができる環境が与えられることを学習させたラットにおいて、テスト直前に食餌を与えなかった場合、食餌を与えたラットに比べ、レバー押し行動の回数が増加することを示した。このことから彼らは、自発運動により摂食行動に対する動機づけが低下することを示唆した。また、Greenwoodら(2011)は、自発運動を4週間経験させたラットにおいて、自発運動を行うことのできる場所(縦縞模様のチャンバー)と自発運動を行うことのできない場所(横縞模様のチャンバー)を選択させると、高い割合で自発運動ができるチャンバーを選択することを示し、ラットにとって自発運動が好ましい事象であることを示唆した。これらのことから、自発運動はラットにとって好ましいものであり、また、自発運動は摂食行動に匹敵する報酬値を持ち、摂食行動の報酬値を自発運動が持つ報酬値で代償できる可能性が考えられる。したがって、自発運動を行うことにより、摂食行動と同等の報酬値が得られ、結果的に摂食行動が減少するのかもしれない。

自発運動が報酬や快感に関わることが神経活動からも示唆されている。先述のGreenwoodらの先行研究において、自発運動の開始から6週間の時点でAcbの Δ FosB/FosB蛋白質発現を調べ、自発運動条件においてコントロール条件よりもAcb神経活動が亢進したことを示唆した。また、自発運動条件において、VTAのドーパミン産生の指標(チロシン水酸化酵素)がコントロール群よりも増加したことから、VTAのドーパミン神経活動が亢進したことを示唆した。VTA、Arcは快の感覚や動機づけを司る脳内報酬系を構成する脳部位であり、報酬刺激によってVTAのドーパミン神経活動が亢進し、この神経投射を受けるAcbの活動も亢進することが知られる。これらのことから、自発運動が快や報酬といった感覚に影響し、摂食行動にも影響する可能性が考えられる。

他に自発運動の摂食抑制効果を介在するメカニズムとして、縫線核セロトニン神経の活動が関連する可能性が考えられる。縫線核セロトニン神経の神経活動は気分の調節に関与することが知られており、摂食行動にも影響することが示唆されている。例えば神経性大食症や神経性無食欲症などの摂食障害を示す患者では、食欲に異常が生じており、これらの患者ではセロトニンレベルの長期的な低下が生じていることが報告されている(Kaye et al., 2005; Kaye et al., 2008)。また、Kopfら(2011)は、免疫反応の初期に生じる摂食抑制が、縫線核の神経活動に介在されていることを示唆した。さらに、縫線核セロトニン神経は自発運動により亢進すること、可塑的な神経の変化が生じることが報告されている。Dishmanら(2006)は慢性的な

ホイールランニングが腹側縫線核でのセロトニンレベルを上昇させ、皮質でのセロトニン代謝を高めることを明らかにし、自発運動により縫線核セロトニン神経の活動が亢進することを示唆した。また、Greenwoodら(2005)は、ラットに自発運動を6週間経験させ、セロトニン1B自己受容体の mRNA が縫線核において減少したこと、及び5HTT mRNA の減少がみられたことを示した。これらのことから、自発運動は縫線核セロトニン神経活動を惹起させ、それを介して摂食抑制を引き起こす可能性が考えられる。

これらのことから、自発運動により摂食抑制が生じるメカニズムが示唆される。本研究では摂食関連脳部位の神経活動を検討するため、長期的な神経活動の指標である Δ FosB/FosB 蛋白質の発現を調べたが、VTA、Acb、およびDRの神経活動において自発運動による顕著な影響はみとめられなかった。神経活動の検討方法や他の脳神経メカニズムの関与などについて、今後検討する必要がある。

本研究では、長期的な摂食行動のパターン、神経活動および情動状態の観点に着目し、自発運動がストレス性の摂食抑制とは異なる特徴を示した。このことから、自発運動による摂食抑制はストレス性の摂食抑制とは異なる特徴を持ち、その背景にあるメカニズムが異なる可能性が示唆された。しかし、自発運動による摂食抑制がストレス性の摂食抑制とは異なることを示すためには、さらなる検討が必要である。本研究において、4週間の飼育期間のうち、はじめの1週間に自発運動によって引き起こされた摂食量の低下はストレス負荷による摂食量の低下と類似していた。その後自発運動群にのみ回復傾向がみられたことから長期的な摂食行動のパターンについてはストレス負荷との違いが示されたものの、短期的な摂食行動への影響については自発運動とストレス負荷の違いを示すことはできなかった。すなわちストレスの関連を否定できない。

また、コントロール群と運動群に顕著な神経活動の違いがみとめられた脳部位はなかったことから、自発運動の摂食抑制効果を介在する可能性のある脳部位を特定することはできなかった。今回は4週間の飼育の神経活動における蓄積的な効果を検討したことから、自発運動による摂食抑制効果が顕著にみられた1週間の時点ではコントロール群と運動群の神経活動の違いが生じていた可能性が考えられるが、自発運動による摂食抑制が回復する過程においてその違いが消失したのかもしれない。各条件での飼育1週間の時点で神経活動をしらべ、この点について検討する必要がある。

そこで、次の実験においては飼育開始後1週間でみられる自発運動およびストレス負荷による摂食抑制効果に着目し、自発運動およびストレス負荷が神経活動および情動状態に与える違いを検討することとした。

第 4 章

実験 2. 自発運動およびストレスによる初期段階の摂食抑制の比較

4.1 目的

実験 1 の結果より、4 週間の自発運動はストレス負荷と同様に摂食抑制を引き起こしたが、自発運動による摂食抑制はストレス負荷と異なり飼育期間の後半において回復する傾向にあった。また、4 週間の飼育後の行動テストでは、運動群のストレス関連行動はコントロール群との違いはみられなかったが、ストレス群では増加していた。さらに、摂食関連脳部位の長期的な神経活動は、ストレス応答において重要な視床下部室傍核(paraventricular nucleus: PVN)、情動に関連する扁桃体中心核(central nucleus of amygdala: CeA)において自発運動群ではコントロール群との間に有意な差はみとめられなかったが、ストレス群で活動亢進がみられた。また、エネルギーバランスに関わる情報を受け取る視床下部弓状核(hypothalamic arcuate nucleus: Arc)、快情動・報酬に関わる腹側被蓋野(ventral tegmental area; VTA)や側坐核(nucleus accumbens: Acb)、気分の調節に関わる背側縫線核(dorsal raphe; DR)において、ストレス群ではコントロール群と比較して神経活動が低い傾向にあったが、運動群にはコントロール群との違いはみとめられなかった。

これらのことから、自発運動はストレス負荷と同様に摂食抑制を引き起こすが、摂食量および体重の経時的変化、不安状態、摂食関連脳部位の神経活動の結果から、自発運動による摂食行動への影響はストレス負荷による摂食抑制とは異なる特徴を有する可能性が考えられる。しかし、4 週間の飼育期間のうち、はじめの 1 週間(飼育期間の初期段階)に自発運動によって引き起こされた摂食量の低下はストレス負荷による摂食量の低下と類似しており、また、実験 1 では各条件での飼育を 4 週間行った後にストレス関連行動および摂食関連脳部位の神経活動の検討をおこなったため、自発運動およびストレス負荷による初期段階の摂食抑制における情動状態および神経活動については比較できていない。これらのことから、自発運動でみられる一過性の摂食抑制がストレス性の摂食抑制である可能性は否定できない。

そこで実験 2. においては、摂食抑制の初期段階において、自発運動による摂食抑制がストレス負荷による摂食抑制と異なる特徴を有するかどうかをストレス関連行動および摂食関連脳部位の神経活動から検討した。

4.2 方法

4.2.1 実験動物

実験動物として 8 週齢の雄性 Wistar 系ラットを用いた。飼育環境は実験 1 と同様とした。

ラットをランダムに 3 つのグループに分け、それぞれを運動群、ストレス群、コントロール群とした (各 $n=5$)。ストレス群には実験期間中毎日拘束ストレスを負荷した。運動群では飼育ケージ内に走行滑車 (ランニングホイール) を設置した。

4.2.2 飼育条件

飼育条件は、実験 1 と概ね同様であった。ただし、各条件での飼育期間を 1 週間とした。

4.2.3 摂食量および体重の測定

摂食量および体重の測定の方法は実験 1 と同様とした。

4.2.4 行動学的テスト

各条件での 1 週間の飼育後、高架十字式迷路テストを行った。その方法は実験 1 と同様とした。

4.2.5 実験手順

飼育環境に動物を慣れさせること、および摂食量と体重のベースラインの測定のため、ホームケージにて 5 日間通常飼育を行った (ベースライン期間)。ベースライン期間中は運動群の各ケージに設置されたランニングホイールは固定され、動物はランニングホイールを用いた走行運動ができない状態であった。ベースライン期間の後、各条件での飼育を 1 週間行った。運動群の各ケージに設置されたランニングホイールは動物が自由に使用できる状態にした。ストレス負荷は毎日午前 10:30 から開始し、2.5 時間行った。1 週間の飼育中は、毎日の摂食量および体重を記録し、運動群のみ走行量を測定した。その後、行動学的テストを行った。テストを行う部屋の環境に動物を 3 日間慣らした後、高架式十字迷路テストを行った。個体間でテストを行う時間帯に差が生じないように、動物を何グループかにランダムに分け、複数日に渡り同じ時間帯(暗期)でテストを行った。c-Fos タンパク質の免疫組織化学染色を行うため、行動テストの約 100 分後に還流固定および脳摘出を行った。これは、行動テストに対する神経活動を検討するためである。実験 1 では長期的

な神経活動の指標である Δ FosB/FosB タンパク質の免疫組織化学染色法を用いたが、摂食関連脳部位においてストレス刺激に対する反応性の違いが生じている可能性が考えられることから、実験 2 においてはストレス刺激として行動テスト時の神経活動を調べることとし、神経活動の指標に c-Fos タンパク質発現を用いて、自発運動およびストレス負荷での飼育後の行動テスト時の神経活動(ストレス刺激に対する反応性の変化)について検討した。麻酔を処置した後、還流固定を行った。還流固定を含めた免疫組織化学染色法の方法については以下に記す。

4.2.6 免疫組織化学染色法

還流固定

還流固定の方法は、実験 1 と同様とした。

脳切片の作成

切片作成の方法は、実験 1 と同様とした。

免疫染色

免疫染色の方法は実験 1 と同様であったが、一次抗体には c-Fos 一次抗体(Rabbit polyclonal Ig-G/Santa Cruz Biotechnology Inc.; 濃度 1:600)を用いた。

標本作成

標本作製の方法は、実験 1 と同様とした。

標的脳部位

標的脳部位は、実験 1 と同様とした。

4.2.7 統計分析

統計分析の方法は、実験 1 と同様とした。

4.3 結果

4.3.1 自発運動およびストレス負荷の初期段階における摂食量への影響

図 15 にコントロール群、運動群およびストレス群における 1 日あたりの摂食量のベースライン期間および 1 週目の平均値を示した。

3 群におけるベースライン期間および 1 週目の摂食量において、群と週の交互作用がみられた($F(2, 24) = 13.26, p < 0.05$)。また、週の主効果 ($F(1, 24) = 5.841, p < 0.05$) および群の主効果がみられた($F(2, 24) = 11.20, p < 0.05$)。

各群においてベースラインと 1 週目の摂食量を比較したところ、コントロール群ではベースライン期間に比較して飼育期間の摂食量が有意に増加しており ($F(4, 1) = 60.976, p < 0.05$)、ストレス群 ($F(4, 1) = 22.593, p < 0.05$) および運動群 ($F(4, 1) = 14.224, p < 0.05$) ではベースライン期間と比較して 1 週目の摂食量が低下していた。

また、1 週間目の摂食量を群間で比較したところ、コントロール群と比較して運動群 ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test) およびストレス群 ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test) の摂食量は有意に少なかった。



図 15. ベースライン期間および 1 週間の飼育期間におけるコントロール群(Ctrl, n = 5)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)の 1 日当たりの平均摂食量

*: Ctrl vs. Exercise ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)

+: Ctrl vs. Stress ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)

4.3.2 自発運動およびストレス負荷の初期段階における体重への影響

図 16 にベースライン期間、飼育期間における各群の平均体重を示した。

3 群のベースライン期間および飼育 1 週間での体重において、群と週の交互作用がみられた($F(2, 24) = 3.458, p < 0.05$)。また、週の主効果 ($F(1, 24) = 53.74, p < 0.05$)および群の主効果がみられた($F(2, 24) = 15.25, p < 0.05$)。

各群においてベースラインと 1 週目の体重を比較したところ、コントロール群($F(4,1) = 396.954, p < 0.05$)、ストレス群($F(4,1) = 207.439, p < 0.05$)および運動群($F(4,1) = 74.067, p < 0.05$)のいずれにおいてもベースライン期間と比較して各条件での飼育期間の体重は増加していた。

また、1 週目において各群の体重を群間で比較したところ、コントロール群と比較して運動群(各週 $p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)およびストレス群(各週 $p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)の体重が有意に低かった。

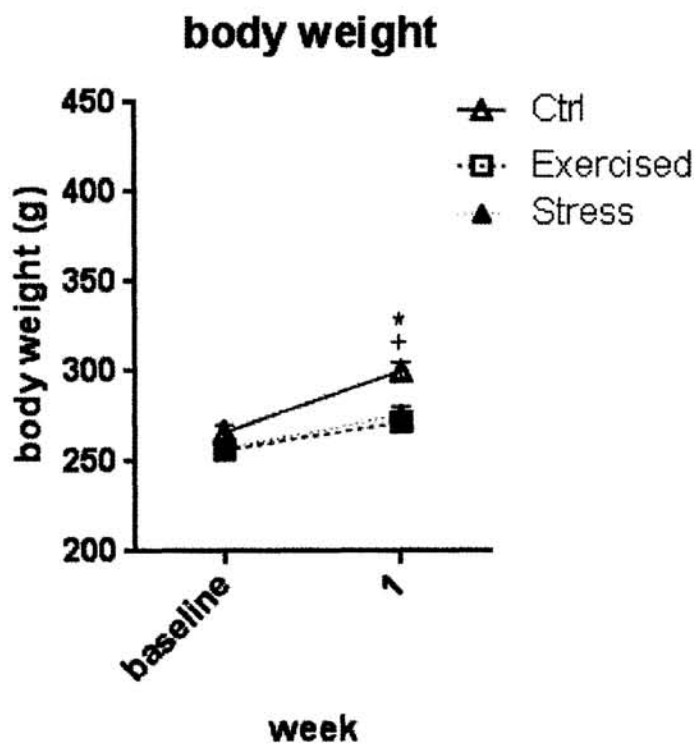


図 16. ベースライン期間および 1 週間の飼育期間におけるコントロール群(Ctrl, n = 5)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)の体重の平均値

*:Ctrl vs. Exercise($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)

+:Ctrl vs. Stress($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)

4.3.3 自発運動量

図 17 に飼育期間中の運動群におけるホイールランニングでの走行距離を示した。1 週間の経時的変化について 1 元配置分散分析を行ったところ、日による走行量の変化はみられなかった($F(1.105, 4.421) = 3.807, p = 0.1154$)。

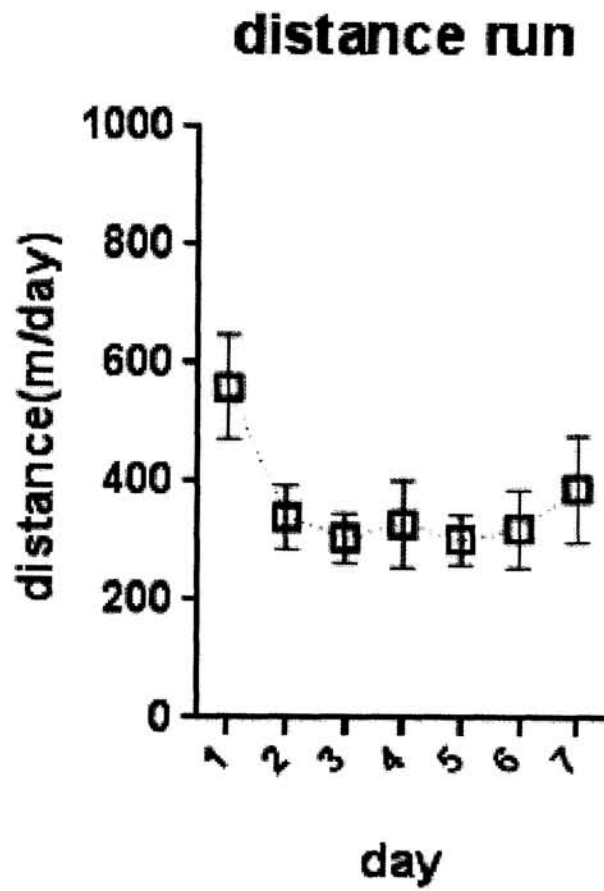


図 17. 1 週間の飼育期間における運動群の 1 日の平均走行量 (n = 5)。

4.3.4 自発運動およびストレス負荷の不安様行動への影響

図 18-20 に高架十字式迷路テストにおけるオープンアーム侵入回数および滞在時間、クローズドアーム侵入回数および滞在時間、高架十字式迷路テスト中のグルーミング行動の回数および時間を示した。

オープンアーム侵入回数 ($F=1.118, p=0.358$) および滞在時間 ($F=0.7865, p=0.48$) において一元配置分散分析を行ったところ群による有意な主効果はみられなかったが、オープンアーム侵入回数、滞在時間ともに運動群において他の 2 群よりも増加する傾向がみられた。

クローズドアーム侵入回数 ($F=0.2643, p=0.77$)、および滞在時間 ($F=3.769, p=0.054$) においても群による有意な主効果はみられなかったが、運動群のクローズドアーム滞在時間がコントロール群およびストレス群よりもわずかに減少する傾向がみられた。

グルーミング行動においても、回数 ($F=0.1458, p=0.866$) および時間 ($F=0.2483, p=0.784$) に有意な主効果はみられなかったが、ストレス群のグルーミング時間が他の 2 群よりもわずかに増加する傾向がみられた。

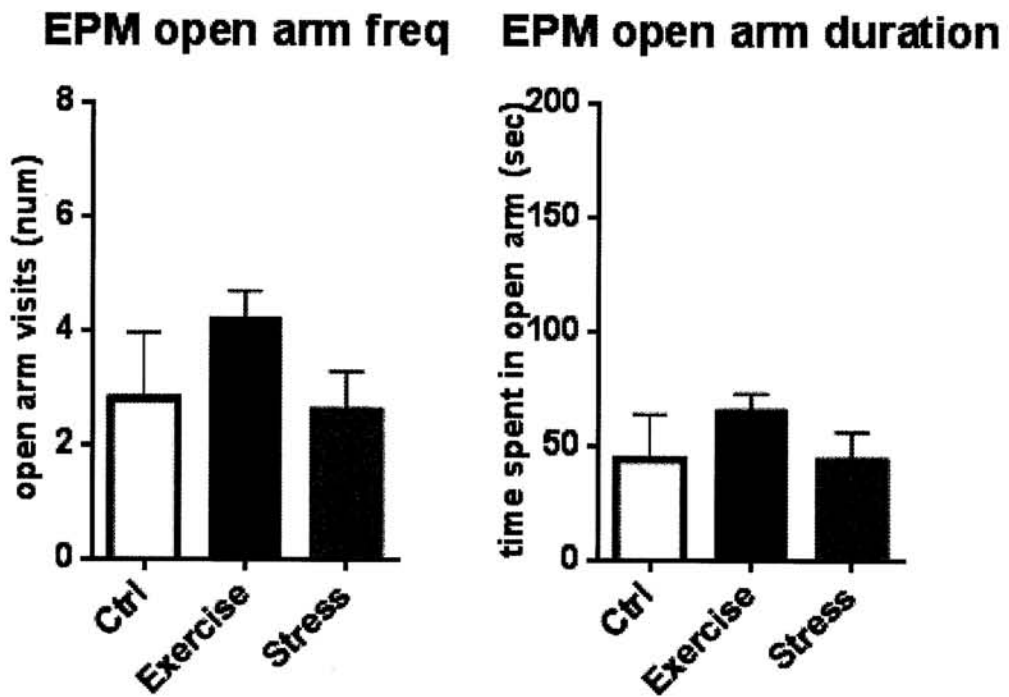


図 18.高架十字式迷路テストにおけるコントロール群(Ctrl, n = 5)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)のオープンアーム侵入回数 (左図) およびオープンアーム滞在時間 (右図)。

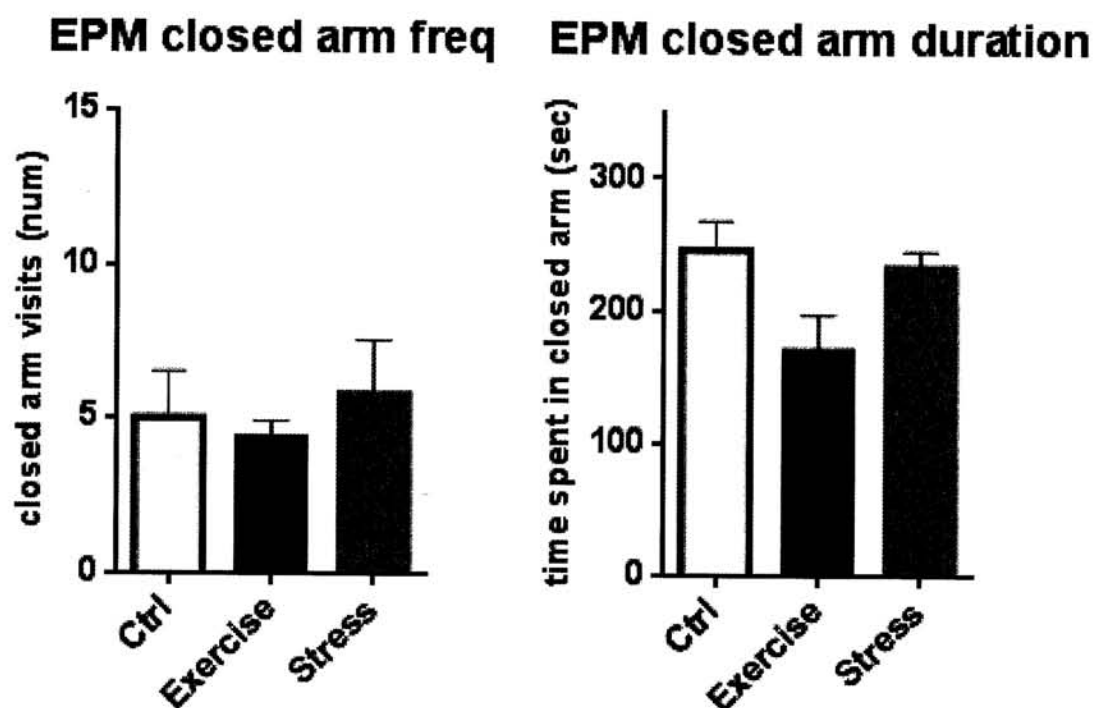


図 19.高架十字式迷路テストにおけるコントロール群(Ctrl, n = 5)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)のクローズドアーム侵入回数 (左図) およびクローズドアーム滞在時間 (右図)。

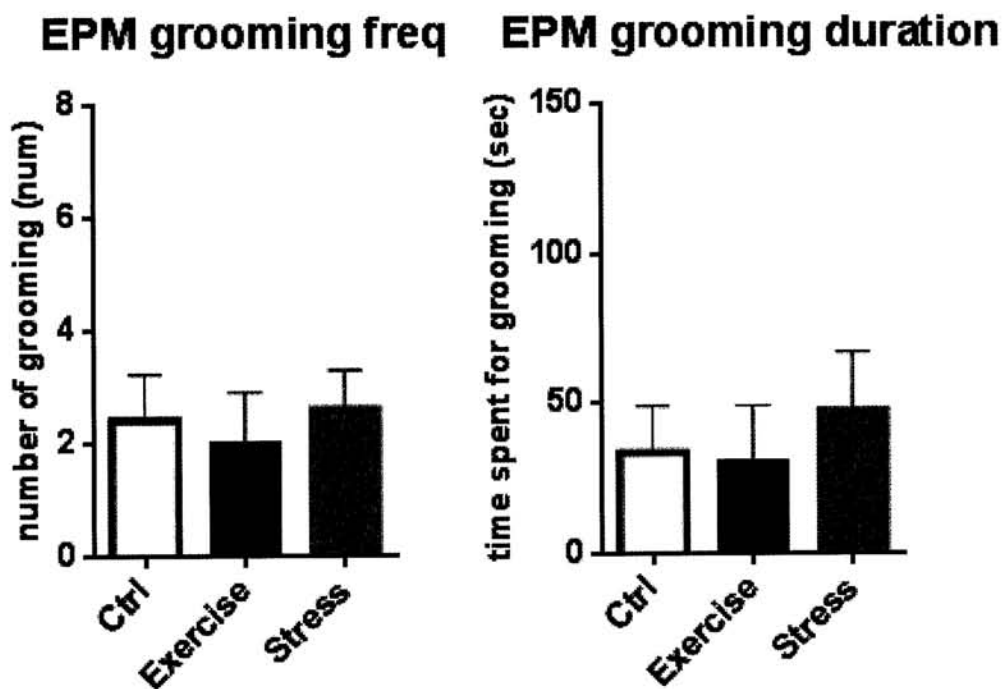


図 20.高架十字式迷路テストにおけるコントロール群(Ctrl, n = 5)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)のグルーミング回数 (左図) およびグルーミング時間 (右図)。

3.3.4 自発運動およびストレス負荷の神経活動への影響

4週間の飼育後に行動テストを行った直後に脳を摘出し、c-Fosの免疫化学染色を行った結果を図21-27に示した。

PVN (図21)においては群の主効果がみられ($F(2, 12) = 5.005, p < 0.05$)、ストレス群のc-Fosの陽性細胞数は運動群と比較して有意に増加していた(Tukey's multiple comparisons test, $p < 0.05$)。Arc (図22)においては群による主効果がみられ ($F(2, 12) = 5.425, p < 0.05$)、運動群のc-Fos陽性細胞数がコントロール群よりも有意に増加し(Tukey's multiple comparisons test, $p < 0.05$)、ストレス群よりも増加する傾向がみられた。

CeA (図23)においてコントロール群に比較して運動群およびストレス群のc-Fos陽性細胞がわずかに少ない傾向がみられたが、群の主効果はみられなかった($F(2, 12) = 1.657, p = 0.2315$)。BLA (図24)において群による顕著なc-Fos陽性細胞数の違いはみられず、群の主効果はみられなかった($F(2, 12) = 0.2714, p = 0.7668$)。VTA(図25)においてコントロール群に比較して運動群およびストレス群のc-Fos陽性細胞がわずかに多い傾向がみられたが、群の主効果はみられなかった($F(2, 12) = 2.115, p = 0.1633$)。Acb(図26)のc-Fosの陽性細胞数には、群による顕著な違いはみられず、群の主効果はみられなかった($F(2, 12) = 0.05900, p = 0.9430$)。DR(図27)においては、群による顕著な違いはみられず、群の主効果はみられなかった($F(2, 12) = 0.1386, p = 0.8719$)。

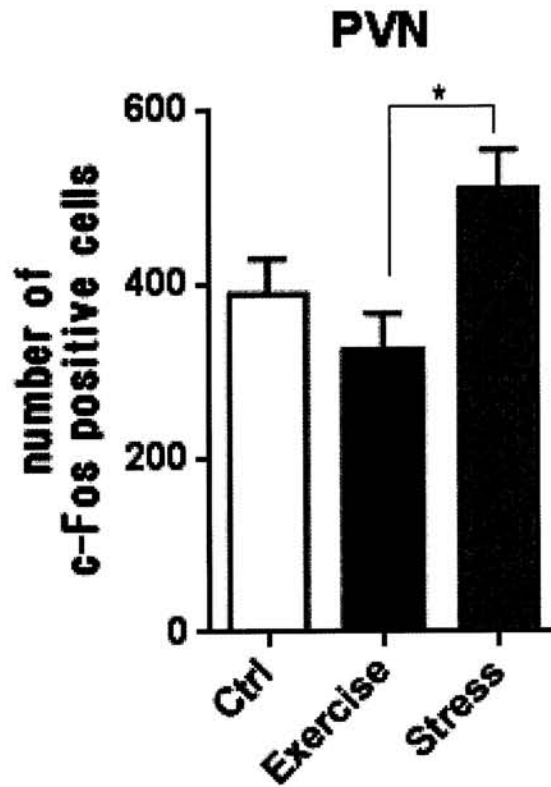


図 21. コントロール群(Ctrl, n = 5)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)における行動テスト時の PVN における c-Fos 陽性細胞数
*:群間に統計的に有意な差がみられたことを示す(p<0.05, Tukey's multiple comparisons test)。

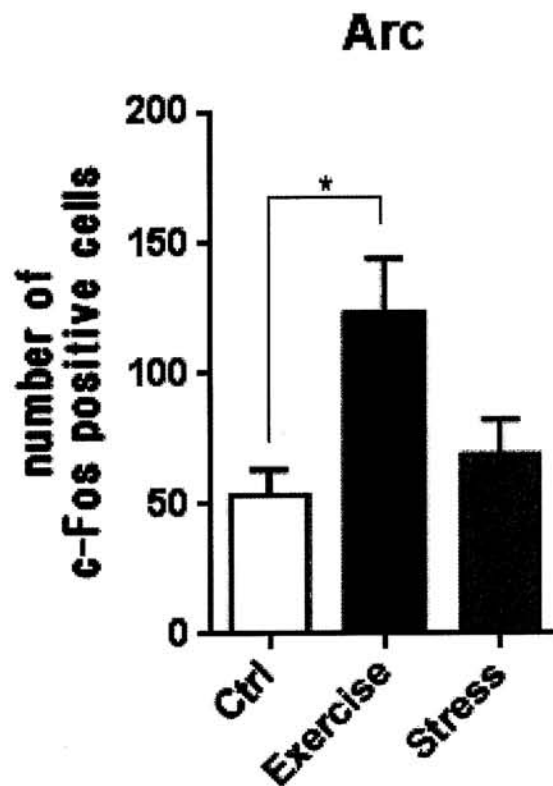


図 22. コントロール群(Ctrl, n = 5)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)における行動テスト時の Arc における c-Fos 陽性細胞数
*:群間に統計的に有意な差がみられたことを示す(p<0.05, Tukey's multiple comparisons test)。

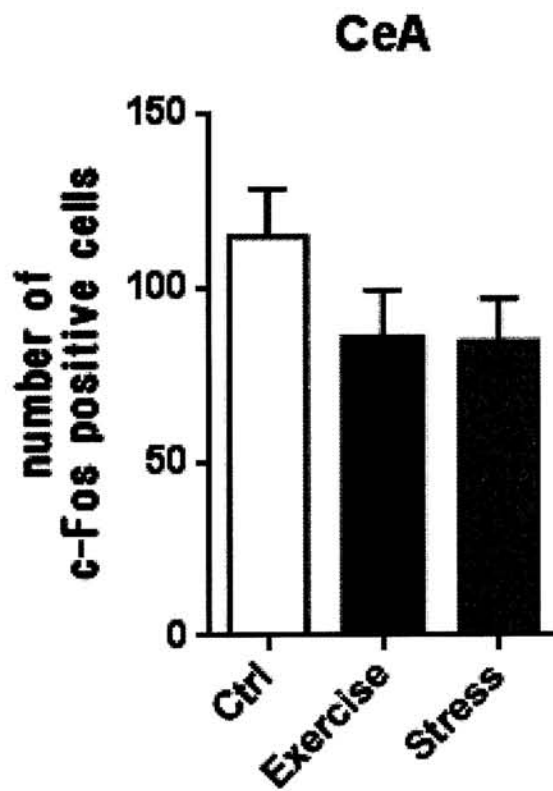


図 23 コントロール群(Ctrl, n = 5)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)における行動テスト時の CeA における c-Fos 陽性細胞数

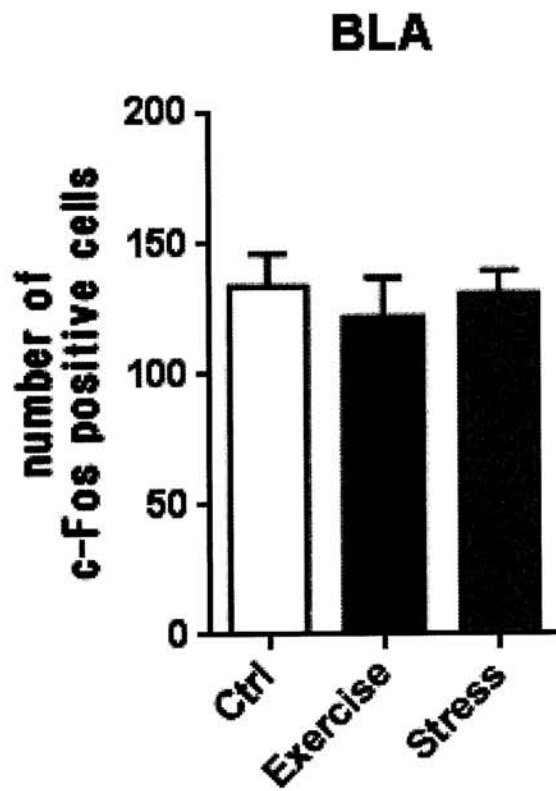


図 24. コントロール群(Ctrl, n = 5)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)における行動テスト時の BLA における c-Fos 陽性細胞数

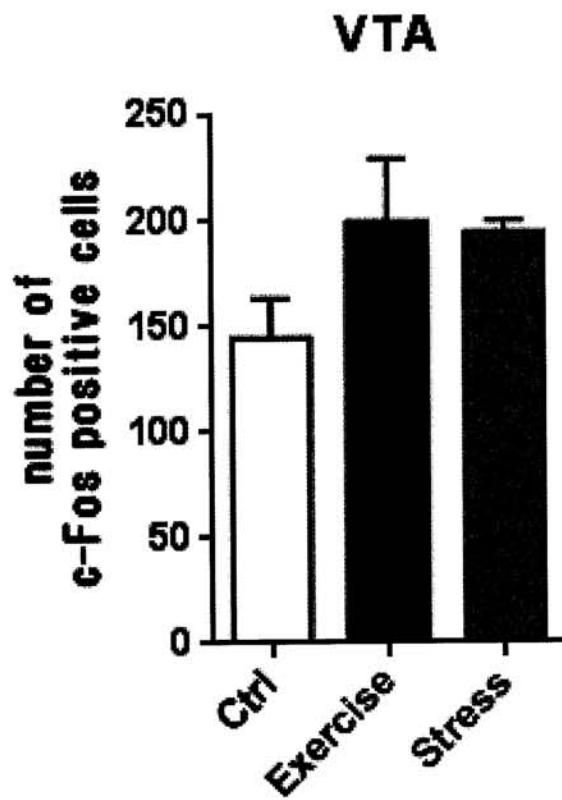


図 25. コントロール群(Ctrl, n = 5)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)における行動テスト時の VTA における c-Fos 陽性細胞数

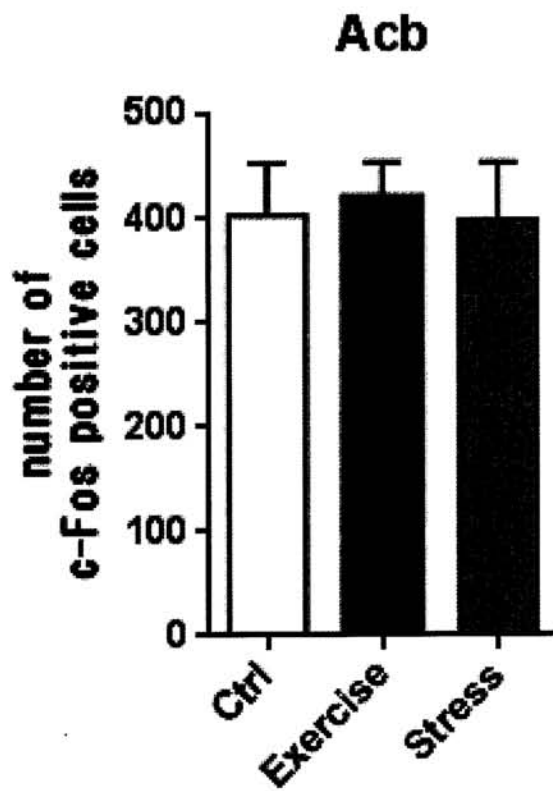


図 26. コントロール群(Ctrl, n = 5)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)における行動テスト時の Acb (右図) における c-Fos 陽性細胞数

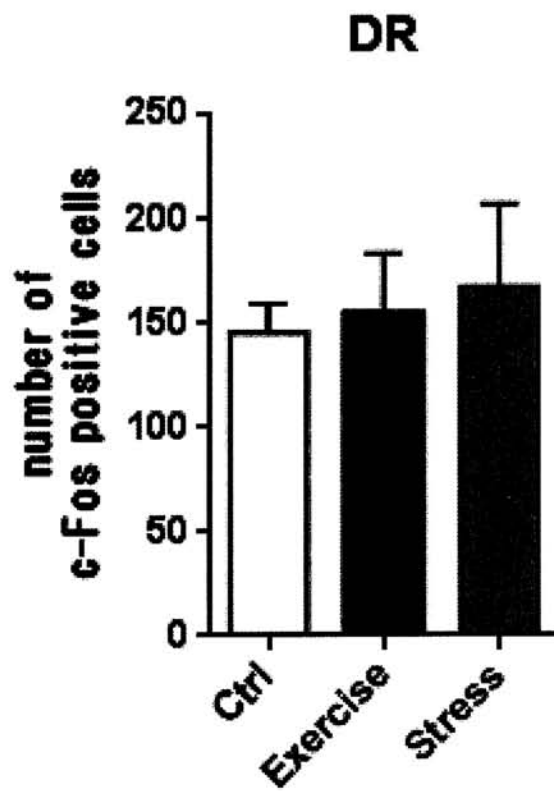


図 27 コントロール群(Ctrl, n = 5)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)における行動テスト時の DR における c-Fos 陽性細胞数

3.4 考察

本実験の結果から、運動群およびストレス群ともに1週間の摂食量はコントロール群よりも低下することが示された。行動テストの結果から、運動群のストレス関連行動が他の2群よりも減少する傾向がみられた。行動テスト時の神経活動については、ストレス応答に重要なPVNにおいてストレス群の神経活動は運動群よりも有意に増加し、運動群の神経活動はコントロール群とほとんど変わらなかった。また、情動に関与することで知られるCeA、BLA、報酬や快の感覚に関わるVTA、Acb、気分の調節に関わるDRにおいてストレス群と運動群に顕著な差はみられなかったが、末梢からの栄養状態に関する情報を受け取るArcにおいて、運動群のc-Fos陽性細胞数が他の2群と比較して増加した。これらのことから、1週間の自発運動およびストレス負荷後のストレス関連行動および神経活動は異なり、自発運動による一過性の摂食抑制はストレス性の摂食抑制ではない可能性が示唆される。

ストレス性の摂食抑制には、視床下部-下垂体-副腎軸(hypothalamic-pituitary-adrenal axis;HPA 軸)の活動 (Hotta et al. , 1991)およびCRF神経系(Jochman et al. , 2005; Ciccocioppo et al. , 2003)が重要な役割を担うことが報告されているが、自発運動ではこれらのストレス反応系の活動はあまり高くない可能性が示唆されている(Yanagita et al. , 2007)。このことは、自発運動による摂食抑制はストレス負荷による摂食抑制とは異なる可能性を示唆している。

行動テストの結果において、運動群においてわずかにストレス関連行動が減少する傾向がみられた。実験1では、4週間の飼育後、ストレス群でのみストレス関連行動が増加していた。これらのことから、1週間各条件での飼育を行った時点でのストレス関連行動においては、あまり大きな差ではなかったが、長期間の飼育を行った実験1と同様に、自発運動がストレス関連行動に与える影響がストレス負荷とは異なる可能性が考えられる。

神経活動に関して、1週間の各条件での飼育後、ストレス応答において重要な役割を担うPVNにおいて、ストレス群の神経活動が運動群よりも有意に増加していた。実験1で検討した長期的な神経活動においても、PVNにおいて自発運動群ではコントロール群との間に有意な差はみとめられなかったが、ストレス群で活動亢進がみられた。これらのことから、ストレス群では1週間のストレス負荷によりストレス応答が増大し、その影響は4週間持続され、自発運動では1週間および4週間の時点でストレス応答の増大は生じていないことが考えられる。

以上のことから、自発運動およびストレス負荷では行動および神経活動の観点からみたストレス応答に異なる特徴が示唆され、自発運動による摂食抑制はストレス性のものではない可能性があると考えられる。

興味深いこととして、本実験では運動群において行動テスト時の Arc の神経活動がコントロール群およびストレス群よりも亢進することが示された。Arc はインスリン、グレリン、レプチンなどの末梢からの栄養状態に関する情報を受け取る脳部位であり、エネルギーバランスの調節に関わる摂食行動の変化において重要な役割を担う (Maniam and Morris, 2012)。このことから、自発運動は Arc の反応性を変化させ、エネルギーバランスに基づいた摂食調節機構に影響し、自発運動による摂食抑制に関与している可能性が考えられる。実験 1 でも同様にストレス群と比較して運動群において Arc 神経活動の亢進がみられ、これらのことから、自発運動による摂食抑制において、Arc の神経活動亢進が関与する可能性が考えられる。

そのほかに自発運動により摂食抑制が生じるメカニズムとして、たとえば、VTA や Acb などの報酬や快感に関わる脳部位の関連や (Pierce et al., 1986; Greenwood et al., 2011)、気分や免疫系の応答に関わり摂食調節に関与する縫線核セロトニン神経の活動が関連する可能性が考えられる (Kaye et al., 2005; Kaye et al., 2008; Kopf et al., 2011)。本研究では実験 1 において長期的な神経活動を調べたが、VTA、Acb、および DR の神経活動において自発運動による顕著な影響はみとめられなかった。また、実験 2 においても、これらの脳部位において自発運動による顕著な影響がみとめられなかった。これらの脳部位は、自発運動が行われているときに活動の変化を示し、自発運動による摂食抑制効果を介在していた可能性が考えられるが、実験 2 ではストレス刺激に対する神経活動の反応性の違いを検討したことから、自発運動を行っているときにどのような神経活動が生じていたかについては検討することができなかった。今後、自発運動時の VTA、Acb、および DR といった脳部位の活動と自発運動による摂食抑制との関係について検討が必要である。

実験 2 において、実験 1 と同様に行動テストから運動群のストレス状態がストレス群とは異なる可能性が示唆され、また、神経活動からもストレス応答に関わる脳部位の神経活動がストレス群では亢進したが、運動群では変化しなかった可能性が示唆された。これらのことから、自発運動による初期段階の摂食抑制はストレス負荷によるものと異なる特徴を有するものと考えられる。また、自発運動により Arc 神経活動が変化する可能性が示唆されたことから、Arc が自発運動による摂食抑制に関与する可能性が考えられる。

第 5 章

実験 3. 運動による摂食抑制に対する CRF の関連性の検討

5.1 目的

実験 1.および 2.において、摂食行動および体重の経時的変化、ストレス関連行動、摂食関連脳部位の神経活動の観点から、自発運動による摂食抑制はストレス性の摂食抑制とは異なる特徴を有することが示された。さらに実験 3.では、自発運動による摂食抑制およびストレス性の摂食抑制を引き起こす神経メカニズムが異なるかどうかを調べるため、ストレス性の摂食抑制に重要な役割を果たしている CRF の関与について検討することとした。CRF の脳室内投与により摂食抑制が生じることや(Hotta et al. , 1991; Richard et al. , 2002)、CRF の受容体の阻害薬の脳室内投与によってストレス性の摂食抑制が軽減されること(Krahn et al . , 1986)などから、ストレス性の摂食抑制において CRF が重要な役割を担うことが示唆されている。

そこで、本実験では自発運動による摂食抑制がストレス性の摂食抑制と異なるかどうかを検討することを目的とし、自発運動による摂食抑制に CRF が関与するかどうかを検討した。実験では行動薬理的な方法を用い、自発運動による摂食抑制に対する CRF 受容体阻害薬の慢性的脳室内投与の効果について検討した。

5.2 方法

5.2.1 実験動物

実験動物として 8 週齢の雄性 Wistar 系ラットを用いた。飼育環境は実験 1,2 と同様とした。

ラットをランダムにコントロール群(Ctrl群:C群)および運動群(Exercise群:E群)に分け、さらにそれぞれの半分に溶媒のみ (Vehicle 群:V群)、もう半分に CRF 受容体の非選択的阻害薬(alpha-helical CRF(9-41))を脳室内へ投与した(alpha-helical CRF 群:A群)。それぞれを CV 群、CA 群、EV 群、EA 群とした。EV 群および EA 群においては飼育ケージ内に走行滑車 (ランニングホイール) を設置した。

5.2.2 飼育条件

運動条件は実験 2 と同様とした。

5.2.3. 摂食量および体重の測定

摂食量および体重の測定の方法は実験 2 と同様とした。

5.2.4 実験手順

動物の搬入後、飼育環境に動物を馴れさせるための通常飼育期間を数日おき、カニューレおよび浸透圧ポンプ留置手術を行った(手術方法の詳細については後述する)。摂食量と体重のベースラインの測定のため、ホームケージにて 5 日間通常飼育を行った(ベースライン期間)。ベースライン期間の 5 日間の摂食量および体重の平均値をベースライン値とした。ベースライン期間の後、各条件での飼育を 1 週間行った。運動群の各ケージにランニングホイールを設置し、動物が自由に使用できる状態にした。1 週間の飼育中は、毎日の摂食量および体重を測定し、運動群では走行量も測定した。

また、本実験では摂食量および体重の変化率を求めた。変化率の算出方法として、1 日ごとの摂食量および体重のベースライン値からの差分を 1 日ごとに求め、その値のベースライン値に対する比率をパーセント表示した($(1 \text{ 日ごとの摂食量および体重}-\text{ベースライン値})/\text{ベースライン値} \times 100$)。得られた 7 日分の変化率を平均し、1 週間の変化率として示した。

5.2.5 実験試薬および投与方法

実験期間中、慢性的に試薬を脳室内投与した。投与試薬として、0.9%生理食塩水(CV 群および EV 群)および非選択的ペプチド性 CRF 受容体阻害薬である alpha-helical CRF(9-41)(SIGMA-RBI, USA; $0.16 \mu\text{g}/\mu\text{l}$)(CA 群および EA 群)を用いた。

脳室内投与には、小型の浸透圧ポンプ(model 2002, Alzet, USA; $0.5 \mu\text{l/h}$ for 14 day)にチューブを取り付け、その先端に脳室内に留置するカニューレ(BRAIN INFUSION KIT2, Alzet, USA)が接続されたものを用いた。カニューレの先端は脳室に留置されるよう固定し、浸透圧ポンプはラットの皮下に留置した。このことにより、動物の行動を妨げることなく飼育期間中常に試薬が投与された。

5.2.6 カニューレおよび浸透圧ポンプ留置手術

ペントバルビタール(ソムノペンチル、大日本住友製薬株式会社)によって麻酔を行い(50 ml/kg 、腹腔内注射)、麻酔の深度が不十分な場合は必要に応じて 0.1 ml ずつ追加した。深麻酔状態であることを確認した後、頭部を清潔にし、剃毛した。電気メスで頭皮を

切開した後、ラットを脳定位固定装置に固定した。頭蓋骨から骨膜を剥離し、骨面が水平になるようブレグマ（矢状縫合と冠状縫合の交点）とラムダ（矢状縫合と冠状縫合の交わる小泉門の部位を指す点）の高さを合わせた。右側脳室に相当する位置（ブレグマを起点とし、AP-1.8mm, ML1.5mm）の頭蓋骨を歯科用ドリルの先端で穿孔した後、アンカービスを骨面に埋め込んだ。薬物を注入するためのカニューレを挿入し、歯科用レジンとアンカービスを用いて頭蓋骨に固定した。カニューレの深さは、側脳室に相当する位置（頭蓋骨から 3mm）にカニューレの先端が位置するようにした。カニューレに接続された浸透圧ポンプを左右の肩甲骨の間の皮下に留置するため、皮膚と結合組織を剥離した。これによって作成した皮下のポケットにポンプを留置し、皮膚の切開部の縫合及び消毒を行った。

5.2.7 統計分析

統計分析の方法は、実験 2 と同様とした。

5.3 結果

5.3.1 自発運動による摂食抑制に CRF 受容体阻害薬の脳室内投与が与える影響

図 28 に CV 群、CA 群、および EV 群 EA 群のベースライン期間および 1 週間の飼育期間における摂食量を示した。CV 群および CA 群の摂食量はベースライン期間と比較して 1 週間目に増加し、EV 群および EA 群において 1 週間の摂食量がベースライン期間よりも低下した。CA 群の摂食量には CV 群との顕著な違いはみられず、EA 群においても EV 群との摂食量との顕著な違いはみられなかった。

ベースライン期間および 1 週間の飼育期間における摂食量の変化において、群と週の交互作用がみられた($F(3, 8) = 26.01, p < 0.05$)。また、群の主効果がみられた($F(3, 8) = 6.848, p < 0.05$)が、週の主効果はみられなかった($F(1, 8) = 0.2891, p = 0.6054$)。

各群においてベースライン期間の摂食量と 1 週間目の摂食量を比較したところ、CV 群($F(2,1) = 19.867, p < 0.05$)および CA 群($F(2,1) = 10.105, p < 0.05$)ではベースライン期間と比較して飼育期間の摂食量が有意に増加しており、EV 群($F(2,1) = 134.237, p < 0.05$)および EA 群($F(4,1) = 16.212, p < 0.05$)ではベースライン期間と比較して飼育期間の摂食量が低下していた。

また、1 週間目の摂食量を群間で比較したところ、CV 群に比較して EV 群の摂食量が有意に低く($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)、CA 群に比較して EV 群の摂食量が有意に低かった($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。また、CA 群と CV 群の摂食量に有意な差はみられず、EA 群と EV 群の間にも有意な差はみとめられなかった。

さらに、摂食量の変化率について飼育条件および alpha-helical CRF 投与の有無の 2 要因について分散分析を行ったところ、交互作用はなく($F(1, 8) = 0.5717, p = 0.4713$)、飼育条件の要因に主効果がみられたが($F(1, 8) = 55.57, p < 0.05$)、alpha-helical CRF 投与の有無の要因には主効果はみられなかった($F(1, 8) = 2.838, p = 0.1305$)。(図 29)

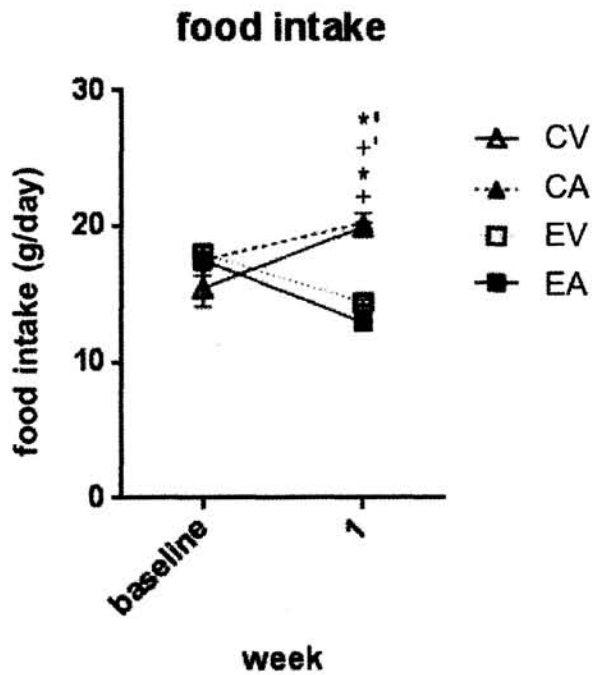


図 28. ベースライン期間および1週間の飼育期間における CV 群(n = 3)、CA 群(n = 3)、EV 群 (n = 3) および EA 群 (n = 3) の1日当たりの平均摂食量

*: CV vs. EV (p < 0.05, Tukey's multiple comparisons test)

** : CV vs. EA (p < 0.05, Tukey's multiple comparisons test)

+ : CA vs. EV (p < 0.05, Tukey's multiple comparisons test)

+ : CA vs. EA (p < 0.05, Tukey's multiple comparisons test)

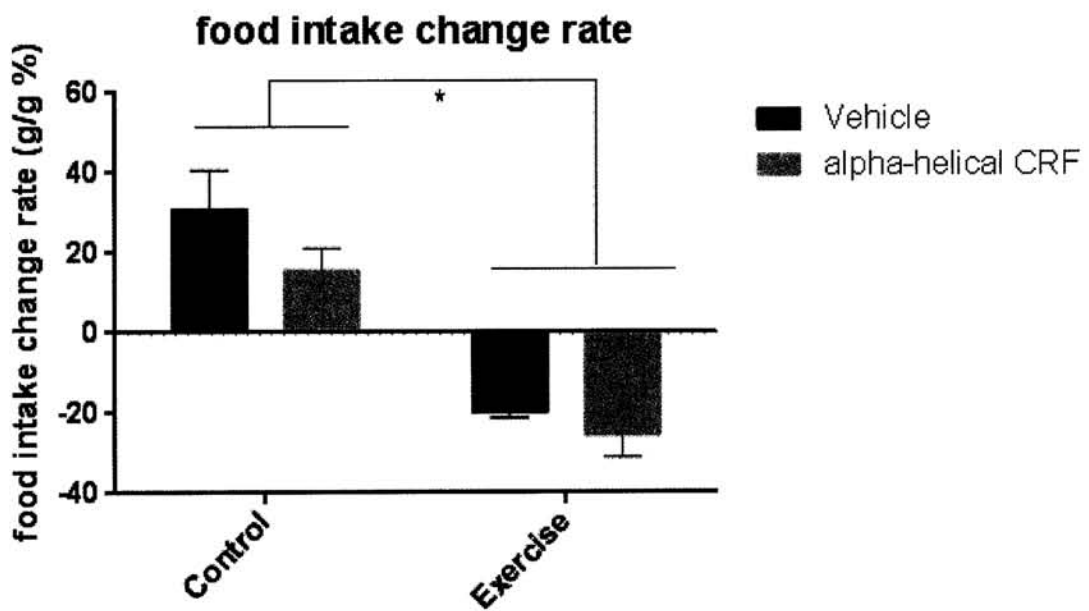


図 29. 1 週間の飼育期間における CV 群(左の黒色のバー, n = 3)、CA 群 (左の灰色のバー, n = 3)、EV 群 (右の黒色のバー, n = 3) および EA 群 (右の灰色のバー, n = 3)のベースライン期間に対する摂食量変化率
*:飼育条件により主効果がみとめられたことを示す(F (1, 8) = 55.57, p<0.05)

5.3.2 自発運動による体重増加抑制効果に CRF 受容体阻害薬の脳室内投与が与える影響

図 30 に CV 群、CA 群および EV 群、EA 群のベースライン期間および 1 週間の飼育期間における体重の変化を示した。CV 群および CA 群の体重はベースライン期間と比較して 1 週間目に増加した。EV 群および EA 群においても体重はベースライン期間と比較して 1 週間目に増加したが、その経時的な変化は CV 群および CA 群よりも小さい傾向がみられた。

4 群における体重の変化において、群と週の交互作用がみられた($F(3, 8) = 20.51, p < 0.05$)。また、週の主効果がみられ($F(1, 8) = 249.0, p < 0.05$)、群の主効果はみられなかった($F(3, 8) = 0.6809, p = 0.5881$)。

各群においてベースラインおよび 1 週目における体重を比較したところ、CV 群($F(2,1) = 90.445, p < 0.05$)および CA 群($F(2,1) = 341.101, p < 0.05$)ではベースライン期間に比較して飼育期間の体重が有意に増加していた。また、EV 群の体重はベースライン期間と比較して飼育期間に有意に増加し ($F(2,1) = 31.855, p < 0.05$)、EA 群においては増加する傾向はみられたものの、有意差はみられなかった($F(4,1) = 12.039, p < 0.0740$)

また、1 週間目において群間で体重を比較したところ、いずれの群の間にも有意な差はみとめられなかった ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。

さらに、体重の変化率について飼育条件および alpha-helical CRF 投与の有無の 2 要因について分散分析を行ったところ、交互作用はなく ($F(1, 8) = 0.004135, p = 0.9503$)、飼育条件の要因に主効果がみられたが ($F(1, 8) = 69.41, p < 0.05$)、alpha-helical CRF 投与の有無の要因には主効果はみられなかった ($F(1, 8) = 0.0005815, p = 0.9814$)。 (図 31)

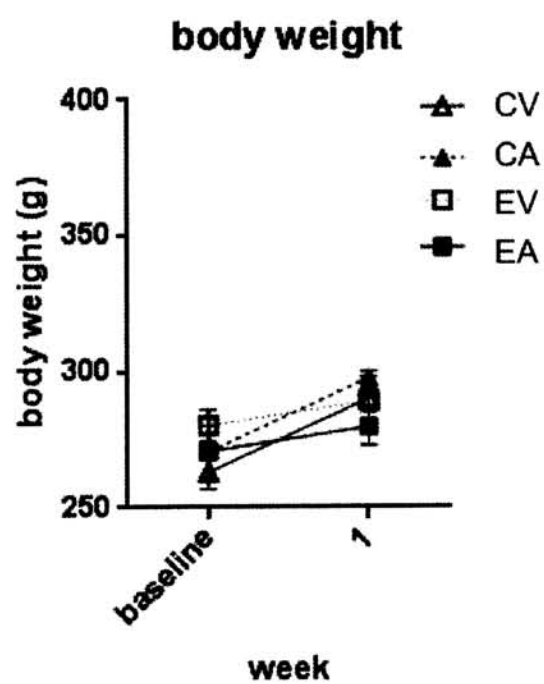


図 30.ベースライン期間および1週間の飼育期間における CV 群(n = 3)、CA 群(n = 3)、EV 群(n = 3)および EA 群(n = 3)の体重の平均値

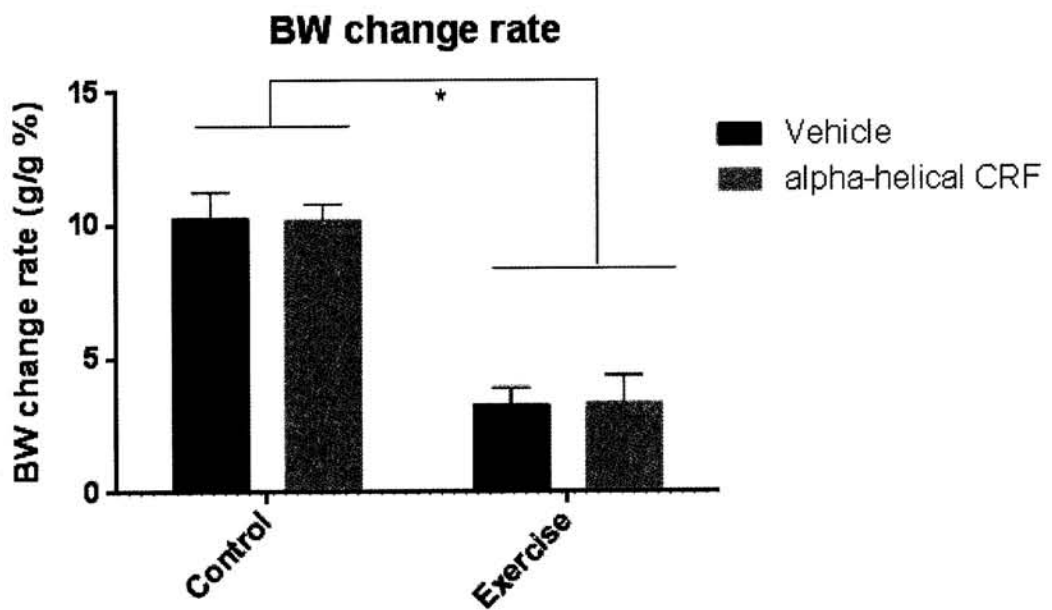


図 31. 1 週間の飼育期間における CV 群(n = 3)、CA 群(n = 3)、EV 群 (n = 3) および EA 群 (n = 3)のベースライン期間に対する体重変化率
 *:飼育条件により主効果がみとめられたことを示す(F (1, 8) = 69.41, p<0.05)

5.3.3 自発運動量に CRF 受容体阻害薬の脳室内投与が与える影響

図 32 に、EV 群および EA 群における 1 週間の走行量を示した。

分散分析の結果、群および日の要因について交互作用はみとめられず($F(6, 24) = 1.036, p = 0.4269$)、群の主効果($F(1, 4) = 0.02675, p = 0.8780$)、日の主効果($F(4, 24) = 8.003, p = 0.0003$)もみられなかった。

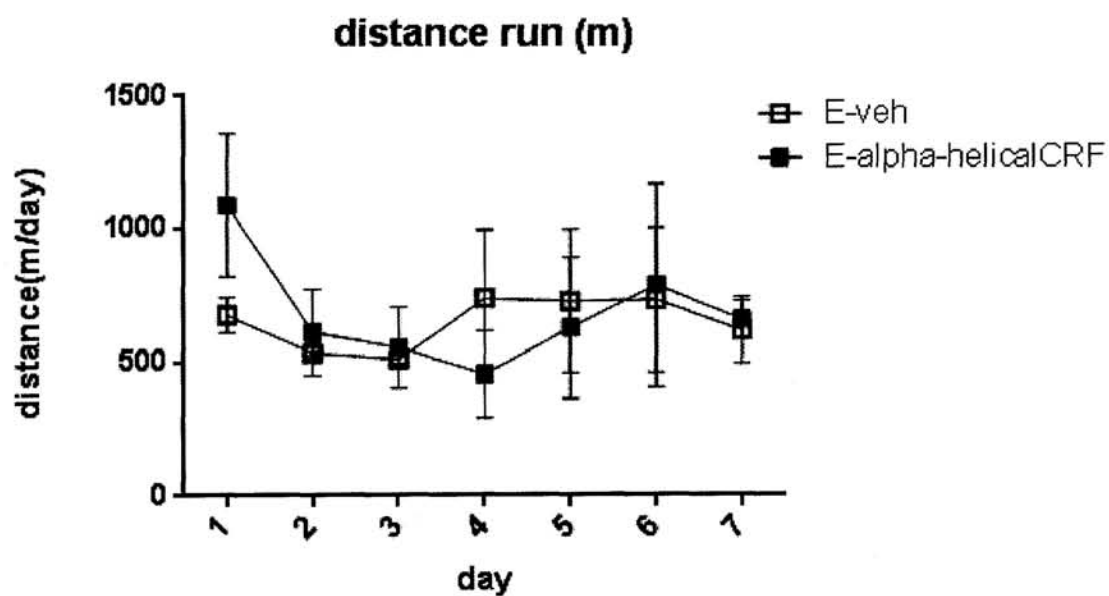


図 32. 1 週間の飼育期間における EV 群(n = 3)および EA 群(n = 3)の 1 日あたりの走行量

5.4 考察

摂食量の結果から、コントロール条件(CV 群および CA 群)と比較して、運動条件(EV 群および EA 群)では摂食量が低下し、また、いずれの条件においても CRF 容体阻害薬脳室内投与による変化はみとめられなかった。また、自発運動による体重増加の抑制効果および走行量における CRF 受容体阻害による影響はみられなかった。これらのことから、自発運動により摂食抑制が生じ、その摂食抑制効果は CRF 受容体阻害薬の脳室内投与により影響を受けないことが示唆され、自発運動による摂食抑制は CRF 神経系を介したものではない可能性が考えられる。

ストレス性の摂食抑制が生じる神経メカニズムにおいて、CRF 受容体の活性化が重要な役割を担うことが示唆されている。CRF の脳室内投与により摂食抑制が生じることや(Hotta et al., 1991; Richard et al., 2002)、CRF の受容体の非選択的阻害薬(alpha-helical CRF(9-41))の脳室内投与によって CRF 誘発性の摂食抑制およびストレス誘発性の摂食抑制が消失すること(Krahn et al., 1986)が報告されている。CRF は HPA 軸反応の引き金として働くだけでなく、神経伝達物質として脳内の広範囲に存在する受容体に作用し、様々なストレス反応を調節している。摂食との関連では、視床下部室傍核(paraventricular nucleus: PVN)のオキシトシン神経や視床下部外側野のオレキシン神経といった摂食調節に重要な神経に CRF 受容体が発現しており、ストレス性の摂食抑制との関連が示唆されている(Olson et al., 1991; 小澤, 2008)。また、扁桃体に存在する CRF 受容体もストレス性の摂食抑制において重要な役割を担うと考えられている(Jochman et al., 2005)。さらに、CRF による扁桃体の活動亢進は VTA の活動を抑制し、摂食への動機づけを低下させる可能性も示唆されている(Ciccocioppo et al., 2003)。これらのことから、CRF 阻害薬の脳室内投与は PVN や扁桃体の CRF 受容体を阻害することにより、ストレス性の摂食抑制を消失させると考えられる。本研究においても、実験 1 において、コントロール群に比較してストレス群の PVN および CeA の活動亢進がみられ、VTA の活動が低下する傾向がみられた。本実験では CRF 受容体の阻害薬がこれらの脳部位に作用していたと考えられるが、さらに脳神経活動に関して検討する必要がある。

先に述べた CRF 受容体阻害薬の摂食抑制に対する影響を調べた先行研究では、あらかじめカニューレを脳室内に留置しておき、マイクロシリンジを用いて、1 回の投与による単発の効果を検討したものが多く、本研究では、飼育期間中継続的に CRF 受容体阻害を行ったときの摂食行動への影響を検討するために、CRF 受容体阻害薬の慢性的な脳室内投与を行った。Toriya ら(2010)は、本研究と同様の慢性的な投与方法を用い、CRF 受容体阻害薬を同じ投薬量($0.16 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0.5 \mu\text{l}/\text{h}$ for 14 day)でラットに投与したところ、CRF 誘発性の摂食抑制が消失

したことを報告した。本研究では同様の方法により運動による摂食抑制に対する CRF 受容体阻害の効果はみられなかったことから、自発運動による摂食抑制はストレス性の摂食抑制を生じる CRF 神経系とは異なるメカニズムを介して生じる可能性が示唆された。

本実験における課題として、本実験では実際にポンプから脳室内に CRF 受容体阻害薬が投与されていたかどうかについて確認することができなかった。この点については、ストレス負荷を行う群において、同様の方法で α -helical CRF(9-41)の脳室内投与の摂食抑制に対する効果を検討し、自発運動における摂食抑制に対する α -helical CRF(9-41)の脳室内投与の効果と比較検討することにより、自発運動による摂食抑制に CRF 受容体阻害の効果을明らかにできると考えられ、今後の検討が必要である。

第6章 総合考察

運動により摂食抑制が生じることが報告されており、ストレス性の摂食抑制との関連が指摘されている。ストレス性の摂食抑制には視床下部-下垂体-副腎軸(hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA 軸)の活動およびコルチコトロピン放出因子(corticotropin releasing factor: CRF)神経の活性化が重要な役割を担うことが示唆されている。強制運動や高強度運動は HPA 軸および CRF 神経を活性化させることが知られていることから、このような運動がストレス性の摂食抑制を生じている可能性が示唆されている(Contarteze et al. , 2007; Zhao et al. , 2011)。自発運動でも摂食抑制が生じることが報告されているが(Kawaguchi et al. , 2005)、自発運動では強制運動でみられるほどの HPA 軸や CRF 神経の活性化といったストレス応答は生じないことが示唆されており(Yanagita et al. , 2007)、自発運動による摂食抑制にはストレス反応系の関与は小さいと考えられる。また、摂食行動は、情動、気分、動機づけなどによっても変化し、これらと関連する神経系を介したより複雑な摂食調節のメカニズムも示唆されており、自発運動による摂食抑制はこれらのメカニズムを介して生じる可能性も考えられる。これらのことから、自発運動による摂食抑制のメカニズムは必ずしもストレス性の摂食抑制メカニズムとは一致しない可能性が考えられる。

そこで本研究では、自発運動による摂食行動への影響がストレス負荷によりみられる摂食抑制と異なるかどうかを明らかにすることを目的とした。

実験 1.では、通常飼育条件、自発運動条件、ストレス負荷条件で 4 週間ラットを飼育し、摂食量の経時的变化およびストレス関連行動、摂食行動に関連する脳神経活動について比較検討した。自発運動群では、飼育開始直後から摂食量、体重の減少がみられ、ストレス群でも同様の減少がみられた。しかし、自発運動群では、ストレス群とは異なり 2 週目以降から摂食量が回復する傾向にあり、体重減少についてもストレス群よりも緩やかであった。また、自発運動群における 4 週間の飼育後のストレス関連行動(不安様行動)はストレス群より低く、コントロール群との間に有意な差はみられなかった。さらに、摂食調節に関連する脳部位の神経活動については、ストレス、情動に関連する視床下部室傍核(paraventricular nucleus: PVN)、扁桃体中心核(central nucleus of amygdala: CeA)においてストレス群で活動亢進がみられたが、自発運動群ではコントロール群との間に有意な差はみとめられなかった。また、視床下部弓状核(hypothalamic arcuate nucleus: Arc)、腹側被蓋野(ventral tegmental area: VTA)、側坐核(nucleus accumbens: Acb)、背側縫線核(dorsal raphe: DR)において、ストレス群では他の群より神経活動が低い傾向にあった。これらのことから、自発運動はストレス負荷と同様に摂食

抑制を引き起こすが、摂食量および体重の経時的変化、不安状態、摂食関連脳部位の神経活動の結果から、自発運動による摂食行動への影響はストレス負荷による摂食抑制とは異なる特徴を有する可能性が考えられた。

実験 1 の結果より、自発運動による摂食行動への影響はストレス負荷による摂食抑制とは異なる特徴を有する可能性が考えられたが、4 週間の飼育期間のうち、はじめの 1 週間(飼育期間の初期段階)に自発運動によって引き起こされた摂食量の低下はストレス負荷による摂食量の低下と類似しており、実験 1 では摂食抑制がみられた飼育期間の初期段階において、自発運動およびストレス負荷による情動状態および神経活動への影響が異なるかどうかについては検討できない。そこで実験 2.においては、飼育期間の初期段階において、自発運動による摂食抑制がストレス負荷による摂食抑制と異なる特徴を有するかどうかをストレス関連行動および摂食関連脳部位の神経活動から検討した。その結果、1 週間の各条件での飼育により、運動群およびストレス群の摂食量はコントロール群よりも低下した。また、行動テストの結果から、運動群のストレス関連行動が他の 2 群よりも減少する傾向がみられた。神経活動の応答を調べた結果、ストレス応答に重要な PVN においてストレス群の神経活動が運動群よりも有意に増加したが、運動群の神経活動にはコントロール群との差はみられなかった。これらのことから、自発運動およびストレスによる初期段階の摂食抑制において、ストレス関連行動および神経活動が異なる特徴を有する可能性が示唆された。また、末梢からの栄養状態に関する情報を受け取る Arc において、運動群の神経活動が他の 2 群よりも亢進しており、Arc が運動による摂食抑制に関連する可能性が考えられた。

実験 1.および 2.において、摂食行動および体重の経時的変化、ストレス関連行動、摂食関連脳部位の神経活動の観点から、自発運動による摂食抑制はストレス性の摂食抑制とは異なる特徴を有することが示された。さらに、実験 3 で自発運動による摂食抑制がストレス性の摂食抑制と異なるかどうかを検討するために、ストレス性の摂食抑制を介在する CRF の機能が関与するかどうかを調べた。方法としては、自発運動およびストレスによる摂食抑制における CRF 受容体阻害の効果について検討した。通常飼育および自発運動条件で飼育する群のそれぞれに、CRF 受容体阻害薬(alpha-helical CRF(9-41))または溶媒のみを飼育期間中継続的に脳室内投与した。その結果、実験 2 と同様に自発運動により摂食抑制が生じ、さらに、この摂食抑制は CRF 受容体阻害薬の脳室内投与により影響を受けなかった。このことから、自発運動による摂食抑制はストレス性の摂食抑制とは異なり、CRF 神経系のメカニズムを介さない可能性が示唆された。

ストレス性の摂食抑制において CRF が作用すると考えられる脳部位には、PVN(Uchoa et

al., 2010)や扁桃体(Jochman et al., 2005)などが考えられる。また、CRFによる扁桃体の活動亢進によってVTAの活動が抑制され、摂食への動機づけを低下させる可能性も示唆されている(Ciccocioppo et al., 2003)。長期的な神経活動の違いを検討した実験1においても、コントロール群に比較してストレス群のPVNおよびCeAの活動亢進がみられ、VTAの活動が低下する傾向がみられた。本研究でもCRFの阻害薬がこれらの脳部位に作用していたと考えられるが、さらに神経活動について検討する必要がある。

自発運動における摂食抑制にはCRF受容体阻害薬投与の効果がみられなかったことから、自発運動における摂食抑制はストレス性の摂食抑制とは異なり、CRF神経系の摂食抑制メカニズムを介さない可能性が示唆された。

実験1、2、3の結果から、自発運動ではストレス負荷と同様に摂食抑制を引き起こすが、摂食量および体重の経時的変化、不安状態、摂食関連脳部位の神経活動の結果から、自発運動による摂食行動への影響はストレス負荷による摂食抑制とは異なる特徴を有する可能性が考えられた。また、自発運動による摂食抑制メカニズムが、ストレス性の摂食抑制とは異なりCRF神経系を介さないものである可能性が示唆された。

自発運動により摂食抑制が生じるメカニズムは本研究からは明らかにできないが、先行研究により示された自発運動の特性から、いくつかの可能性が考えられる。たとえば、自発運動はラットにとって好ましいものであり、摂食行動に匹敵する報酬値を持ち、摂食行動の報酬値を自発運動が持つ報酬値で代償できる可能性が示唆されている(Pierce et al., 1986; Greenwood et al., 2011)また、実際に脳内報酬系であるVTA、Acbの神経活動が自発運動によって高まることが示唆されている(Greenwood et al., 2011)。したがって、自発運動を行うことにより、摂食行動と同等の報酬値が得られ、結果的に摂食行動が減少するのかもしれない。また、DRが気分や免疫反応を介した摂食抑制に関わり(Kaye et al., 2005; Kaye et al., 2008; Kopf et al., 2011)、自発運動によりDR神経活動の亢進や神経の可塑的な変化が生じることが示唆されていることから(Greenwood et al., 2005; Dishman et al., 2006)、自発運動による摂食抑制にDRが関与する可能性も考えられる。

本研究では実験1において長期的な神経活動を調べたが、VTA、Acb、およびDRの神経活動において自発運動による顕著な影響はみとめられなかった。また、実験2においても、これらの脳部位において自発運動による顕著な影響がみとめられなかった。これらの脳部位は、自発運動が行われているときに活動の変化を示し、自発運動による摂食抑制効果を介在していた可能性が考えられるが、実験2では行動テスト時の神経活動を検討したことから、自発運動を行っているときにどのような神経活動が生じていたかについては示すことができない。このこ

とから、VTA、Acb、およびDRといった脳部位が自発運動による摂食抑制に関与する可能性が考えられるが、神経活動の検討方法や他の神経メカニズムの関与などについて、今後検討する必要がある。

また、本研究では自発運動による摂食抑制に対するCRF受容体阻害の効果を検討したが、今回の実験ではCRF受容体阻害薬が脳室内に確実に投与されていたかについて確認をとることができなかった。行動や神経活動の指標により、CRF受容体阻害薬投与の効果を示す方法を確立する必要がある。また、ストレス負荷を行う群において、同様の方法を用いてCRF受容体阻害薬脳室内投与の効果を検討し、摂食抑制が軽減されることを確認することにより、今回用いた方法によりCRF受容体阻害薬が脳室内に確実に投与されていたことを示すことができると考えられる。これらの課題については、今後検討が必要である。

謝辞

本修士論文を作成するにあたり、実験の計画や手技、論文の書き方まで手厚いご指導をいただきました北一郎先生に、心から感謝申し上げます。研究に関する考え方を丁寧に教えて下さるだけでなく、いつも学生のことを思い暖かく見守って下さった先生のご指導を受けることができたからこそ、現在まで研究を続け、今回の論文提出に至ることができました。また、ご多忙の中本研究の副査を引き受け、丁寧にご指導くださった今中先生、篠田先生に厚く御礼申し上げます。

さらに、実験全般にわたりいつも協力的に相談に乗っていただくだけでなく、常に明るい笑顔で私に元気をわけてくださった北研究室のメンバーに感謝致します。

HPS 棟におられる皆様のおかげで、本研究を成し遂げることができました。この2年間を支えてくださった全ての方に出会えたことを、心より幸せに感じます。

最後に、本研究に多大な貢献を残した実験動物たちに深く感謝すると共に、心よりご冥福を申し上げます。

2014 年 1 月 9 日

田村 愛

引用文献

- Anand, B K., Brobeck J R. (1951). Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Nutrition Reviews*, 42(10):354-6
- Arborelius, L., Owens, M. J., Plotsky, P. M., & Nemeroff, C. B. (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *The Journal of endocrinology*, 160(1), 1-12.
- Avena, N. M., Bocarsly M. E., Rada, P., Kim, A. & Hoebel, B. G. (2008). After daily bingeing on a sucrose solution, food deprivation induces anxiety and accumbens dopamine/acetylcholine imbalance. *Physiology & Behavior*, 94, 309-315.
- Avena, NM, Rada P, Hoebel BG. (2009). Sugar and fat bingeing have notable differences in addictive-like behavior. *Journal of Nutrition*, 139, 623-628.
- Balthasar, N., Dalgaard, L. T., Lee, C. E., Yu, J., Funahashi, H., et al. (2005). Divergence of Melanocortin Pathways in the Control of Food Intake and Energy Expenditure. *Cell*, 123, 493-505.
- Bell, R. R., & Sherriff, M. J. S. A. L. (1995). Nutrient Metabolism Diet-Induced Obesity in Mice Can Be Treated without Energy Restriction Using Exercise And / Or a Low Fat Diet1 2. *Nutrient Metabolism*, 2356-2363.
- Berridge, K. C. (1996). Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 20(1), 1-25.
- Calvez, J., Fromentin, G., Nadkarni, N., Darcel, N., Even, P., Tomé, D., ... Chaumontet, C. (2011). Inhibition of food intake induced by acute stress in rats is due to satiation effects. *Physiology & behavior*, 104(5), 675-83.
- Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Richards, M. C., Wakabayashi, C., & Kunugi, H. (2012). Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*.
- Ciccocioppo, R., Fedeli, A., Economidou, D., Policani, F., Weiss, F., et al. (2003). The bed nucleus is a neuroanatomical substrate for the anorectic effect of corticotropin-releasing factor and for its reversal by nociceptin/orphanin FQ. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23, 9445-51.
- Contarteze, R V., Manchado, D B., Gobatto, C A., De Mello M A. (2008). *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 151:415 - 422
- Dallman, M. F., Pecoraro, N., Akana, S. F., La Fleur, S. E., Gomez, F., et al. (2003). Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 11696-701.

- Dallman, M. F., Akana, S. F., Levin, N., Walker, C. D., Bradbury, M. J., Suemaru, S. & Scribner, K. S. (1994). Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 746, 22-31.
- Dallman, M. F., Pecoraro, N., Akana, S. F., La Fleur, S. E., Gomez, F., Houshyar, H., ... Manalo, S. (2003). Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11696–701.
- Dishman, R. K., Bunnell, B. N., & Yoo, H. S. (1998). Activity Wheel Running Blunts Increased Plasma Adrenocorticotrophin (ACTH) after Footshock. *Physiology & Behavior*, 63, 911–917.
- Dishman, R. K., Renner, K. J., Youngstedt, S. D., Reigle, T. G., Bunnell, B. N., et al. (1997). Activity wheel running reduces escape latency and alters brain monoamine levels after footshock. *Brain research bulletin*, 42, 399–406.
- Droste, S. K., Collins, A., Lightman, S. L., Linthorst, A. C. E., & Reul, J. M. H. M. (2009). Distinct, time-dependent effects of voluntary exercise on circadian and ultradian rhythms and stress responses of free corticosterone in the rat hippocampus. *Endocrinology*, 150(9), 4170–9.
- Ebal, E., Cavalie, H., Michaux, O., Lac, G. (2007). Effect of a moderate exercise on the regulatory hormones of food intake in rats. *Appetite*, 49, 521-524
- Ekstrand, J., Hellsten, J., & Tingström, A. (2008). Environmental enrichment, exercise and corticosterone affect endothelial cell proliferation in adult rat hippocampus and prefrontal cortex. *Neuroscience letters*, 442(3), 203–7.
doi:10.1016/j.neulet.2008.06.085
- Fediuc, S., Campbell, J. E., & Riddell, M. C. (2006). Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 100(6), 1867–75.
- Fernades, C., File, S. E., (1996) The Influence of Open Arm Ledges and Maze Experience in the Elevated Plus-Maze., *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54(1).
- Ferrari, F., Pelloni, F., & Giuliani, D. (1992). B-HT 920 stimulates feeding and antagonizes anorexia induced by ACTH and immobilisation. *European journal of pharmacology*, 210, 17–22.
- Furudono Y, Ando C, Kobashi M, Yamamoto C, Yamamoto T. (2005). The role of orexigenic neuropeptides in the ingestion of sweet-tasting substances in rats. *Chemical Senses* 30 Suppl, 1, i186-i187.

- Geiger BM, Haburcak M, Avena MN, Moyer MC, Hoebel BG, Pothos EN.(2009). Deficits of mesolimbic dopamine neurotransmission in rat dietary obesity. *Neuroscience*, 2009 April 10; 159(4): 1193–1199.
- Gluck, M. E. (2006). Stress response and binge eating disorder. *Appetite*, 46(1), 26–30. doi:10.1016/j.appet.2005.05.004
- Greenwood, B. N., Foley, T. E., Day, H. E. W., Burhans, D., Brooks, L., et al. (2005). Wheel running alters serotonin (5-HT) transporter, 5-HT1A, 5-HT1B, and alpha 1b-adrenergic receptor mRNA in the rat raphe nuclei. *Biological psychiatry*, 57, 559–68.
- Greenwood, B. N., Foley, T. E., Le, T. V, Strong, P. V, Loughridge, A. B., Day, H. E. W., & Fleshner, M. (2011). Long-term voluntary wheel running is rewarding and produces plasticity in the mesolimbic reward pathway. *Behavioural brain research*, 217(2), 354–62.
- Gutman, D. a, Owens, M. J., Thirivikraman, K. V, & Nemeroff, C. B. (2011). Persistent anxiolytic affects after chronic administration of the CRF₁ receptor antagonist R121919 in rats. *Neuropharmacology*, 60(7-8), 1135–41.
- Herman, J. P., & Cullinan, W. E. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends in neurosciences*, 20(2), 78–84.
- Jochman, K. A., Newman, S. M., Kalin, N. H., & Bakshi, V. P. (2005). Corticotropin-Releasing Factor-1 Receptors in the Basolateral Amygdala Mediate Stress-Induced Anorexia, 119(6), 1448–1458.
- Kanai M, Funakoshi H, Takahashi H, Hayakawa T, Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. (2009). Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Molecular brain*, 2, 8.
- Kaplan, G.B., Leite-Morris, K.A., Fan, W., Young, A.J., Guy, MD. (2011) .Opiate Sensitization Induces FosB/ Δ FosB Expression in Prefrontal Cortical, Striatal and Amygdala Brain Regions. *PLoS ONE*, 6(8): e23574.
- Katch, L. (n.d.). Effects of exercise intensity on food consumption in the male rat1, 1401–1407.
- Kawaguchi, M., Scott, K. A., Moran, T. H., & Bi, S. (2013). Dorsomedial hypothalamic corticotropin-releasing factor mediation of exercise-induced anorexia Dorsomedial hypothalamic corticotropin-releasing factor mediation of exercise-induced anorexia, (January 2005).
- Kaye, W. (2008). Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. *Physiology & behavior*, 94(1), 121–35.
- Kaye, W. H., Frank, G. K., Bailer, U. F., Henry, S. E., Meltzer, C. C., Price, J. C., ... Wagner, A. (2005). Serotonin alterations in anorexia and bulimia nervosa: new insights from imaging studies. *Physiology & behavior*, 85(1), 73–81.

- Kobashi M, Furudono Y, Matsuo R, Yamamoto T. (2002). Central orexin facilitates gastric relaxation and contractility in rats. *Neuroscience Letters*, 332, 171-174.
- Kopf, B. S., Langhans, W., Geary, N., Hrupka, B., & Asarian, L. (2011). Evidence that PGE2 in the dorsal and median raphe nuclei is involved in LPS-induced anorexia in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 99(3), 437-43.
- Korb, A., Bonetti, L. V., da Silva, S. A., Marcuzzo, S., Ilha, J., et al. (2010). Effect of treadmill exercise on serotonin immunoreactivity in medullary raphe nuclei and spinal cord following sciatic nerve transection in rats. *Neurochemical research*, 35, 380-9.
- Kudo, T., Uchigashima, M., Miyazaki, T., Konno, K., Yamasaki, M., Yanagawa, Y., Minami, M., Watanabe, M. (2010). Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. *Journal of Neuroscience*, 32(50):18035-46.
- 河野 大輔、矢田 俊彦. (2007). グレリン、レプチンの弓状核 NPY ニューロンに対する直接作用, シグナル伝達と相互作用. 「肥満研究」, 13(2), 215-219
- Krahn, D. D., Gosnell, B. a, Grace, M., & Levine, a S. (1986). CRF antagonist partially reverses CRF- and stress-induced effects on feeding. *Brain research bulletin*, 17, 285-9.
- Leasure, J. L., & Jones, M. (2008). Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience*, 156, 456-65.
- Liu, J., Garza, J. C., Truong, H. V, Henschel, J., Zhang, W., & Lu, X.-Y. (2007). The melanocortinergic pathway is rapidly recruited by emotional stress and contributes to stress-induced anorexia and anxiety-like behavior. *Endocrinology*, 148(11), 5531-40.
- Maniam, J., Morris M. (2012). The link between stress and feeding behavior. *Neuropharmacology*, 1-14
- Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237(4811):192-7.
- Ohata, H., Shibasaki, T. (2011). Involvement of CRF2 receptor in the brain regions in restraint-induced anorexia. *Neuroreport*, 13:22(10):494-8.
- Olsen, C. M. (2011). Natural rewards, neuroplasticity, and non-drug addictions. *Neuropharmacology*, 61(7), 1109-22.
- Olson, B.R., Drutarosky, M. D., Stricker E. M, Verbalis JG. (1991) Brain oxytocin receptor antagonism blunts the effects of anorexigenic treatments in rats: evidence for central oxytocin inhibition of food intake. *Endocrinology*, 129(2):785-91.
- Pijlman, F. T. A., Wolterink, G., & Ree, J. M. Van. (2003). Physical and emotional stress have differential effects on preference for saccharine and open field behaviour in rats, 139.

- Pierce, W.D., Epling, W.F., Boer, D.P. (1986). Deprivation and satiation: The interrelations between food and wheel running. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 46,199-210
- Richard, D., Lin, Q., Timofeeca, E. (2002). The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. *European Journal of Pharmacology*, 440, 189-197
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, 240(4857):1328-31.
- Saper, C. B., Chou, T. C., Elmquist, J. K., & Homeostasis, W. (2002). The Need to Feed: Homeostatic and Hedonic Control of Eating Leptin: A Peripheral Signal Regulating Body. *Neuron*, 36, 199–211.
- Sato, I., Arima, H., Ozaki, N., Watanabe, M., Goto, M., et al. (2005). Insulin inhibits neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus through GABAergic systems. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25, 8657–64.
- Sekino, A., Ohata, H., Mano-Otagiri, A., Arai, K., & Shibasaki, T. (2004). Both corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 are involved in stress-induced inhibition of food intake in rats. *Psychopharmacology*, 176(1), 30–8.
- 清水 弘行. (2002).メラノコルチン系・臨床へのアプローチ. 「肥満研究」 8(1)80-81.
- Smagin, G. N., Howell, L. a, Redmann, S., Ryan, D. H., & Harris, R. B. (1999). Prevention of stress-induced weight loss by third ventricle CRF receptor antagonist. *The American journal of physiology*, 276(5 Pt 2), R1461–8.
- Soya, H., Mukai, A., Deocaris, C. C., Ohiwa, N., Chang, H., et al. (2007). Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neuroscience research*, 58, 341–8.
- Tataranni, P. A., Larson, D.E., Snitker, S., Young, J.B., Flatt, J.P., Ravussin, E. (1996). Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *The American journal of physiology*, 271(2 Pt 1):E317-25.
- Van Dijk, G., Evers, S. S., Guidotti, S., Thornton, S. N., Scheurink, A. J. W., et al. (2011). The lateral hypothalamus: a site for integration of nutrient and fluid balance. *Behavioural brain research*, 221, 481–7.
- Toriya, M., Maekawa, F., Maejima, Y., Onaka, T., Fujiwara, K., et al. (2010). Long-term Infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor Reduces Food Intake and Body Weight via a Corticotrophin-Releasing Hormone Pathway in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus *Neuroendocrinology*. *Journal of Neuroendocrinology*, 987–995.
- Tsuneki, H., Wada, T., Sasaoka, T. (2010). Role of orexin in the regulation of glucose homeostasis. *Acta Physiologica*, 198(3):335-48

- Uchoa, E. T., da Silva, L. E. C. M., de Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., & Elias, L. L. K. (2010). Corticotrophin-releasing factor mediates hypophagia after adrenalectomy, increasing meal-related satiety responses. *Hormones and behavior*, 58, 714–9.
- Vinícius, R., Contarteze, L., Manchado, F. D. B., Gobatto, C. A., Alice, M., & Mello, R. De. (2008). Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises ☆, 151, 415–422.
- Wolkowitz OM, Epel ES, Reus VI. (2001). Stress hormone-related psychopathology: pathophysiological and treatment implications. *World Journal of Biological Psychiatry*, 2(3):115-43.
- Yadav, V. K., Oury, F., Suda, N., Liu, Z., Gao, X., et al. (2010). NIH Public Access. *Cell*, 138, 976–989.
- Zhao, J. H. (2006). Drawing pedigree diagrams with {R} and graphviz. *R News*, 6, 38–41.
- Yanagita, S., Amemiya, S., Suzuki, S., & Kita, I. (2007). Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats. *Life sciences*, 80(4), 356–63.
- Zheng H, Liu Y, Li WB, Chen D, Wang X, Jiang Z, Wang H, Wang Z, Cornelisson G. (2006). Beneficial effects of exercise and its molecular mechanisms on depression in rats. *Behavioural brain research*, 168(1):47-55
- Won Jahng, J., Kim, N Y., Ryu, V., Yoo, SB., Kim, B., Kang, D., Lee J. (2008). *European Journal of Pharmacology*, 581:64 – 70
- 山本 隆. (2006) . おいしいとなぜ食べ過ぎてしまうのか?—脳内報酬系の働き—. *日本味と匂学会誌*, 13, 119-124
- Yanagita, S., Amemiya, S., Suzuki, S., Kita, I. (2007). Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats. *Life sciences*, 80(4), 356–63.

補足資料 1

ストレス負荷による摂食抑制に対する CRF の関連性の検討

CRF 受容体阻害の効果がストレス負荷による摂食抑制に影響するかどうかを検討した。実験 3.と同様の方法を用い、溶媒のみ (SV, n = 2)、および CRF 受容体阻害薬 (SA, n = 2)を慢性投与した動物にストレス負荷を 1 週間(2.5h/day)行い、摂食量を測定した。

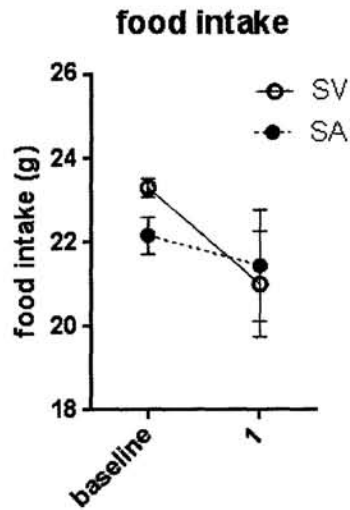


図 33. ベースライン期間および 1 週間の飼育期間における SV 群(n = 2)および SA 群 (n = 2)の 1 日当たりの平均摂食量

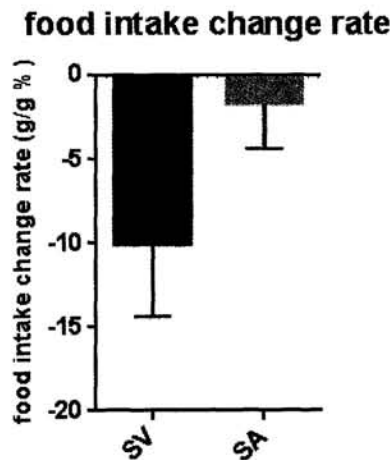


図 34. 1 週間の飼育期間における SV 群(左の黒色のバー, n = 2)、SA 群(右の灰色のバー, n = 2)のベースライン期間に対する摂食量変化

補足資料 2

実験 1.における各群の摂食効率

実験 1 における各群の摂食効率(体重増加量/摂食量×100)を 1 日ごとに求め、その値を週毎に平均した。3 群における週毎の摂食効率の変化において、分散分析の結果、群と週の交互作用がみられた($F(8, 75) = 4.910, p < 0.05$)。また、週の主効果($F(4, 75) = 17.37, p < 0.05$)、および群の主効果がみられた($F(2, 75) = 10.57, p < 0.05$)。

各週の 3 群の摂食量について多重比較検定を行ったところ、運動群では飼育期間の 1 週目において、コントロール群と比較して摂食効率が低かった(各週 $p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。また、ストレス群では 1 週目および 4 週目においてコントロール群と比較して摂食効率が低かった(各週 $p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。

また、各群の時間要因について、いずれの群においても時間要因の単純主効果がみとめられたため、多重比較検定により各群のベースライン期間と 1~4 週目の間に差がみられるかどうかを検討した。コントロール群の摂食効率は、ベースライン期間と比較して 3 および 4 週目に有意な低下がみられた ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。運動群において、1 および 4 週目の摂食効率がベースライン期間よりも有意に低下した。 ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)。ストレス群では、全ての週の摂食効率がベースライン期間よりも有意に低下していた。

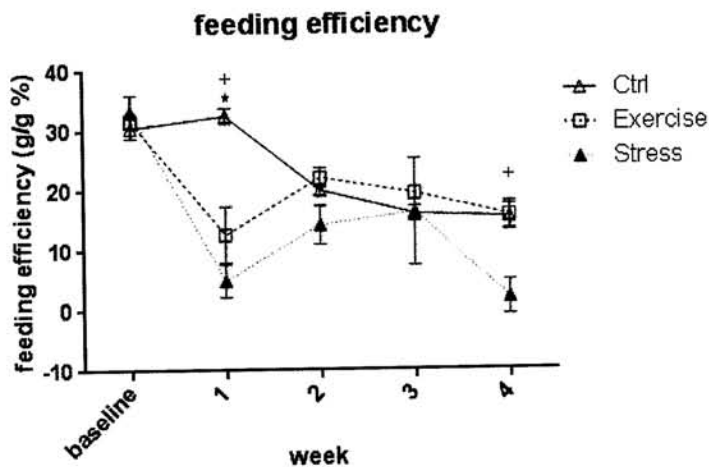


図 3. ベースライン期間および 4 週間の飼育期間におけるコントロール群(Ctrl, n = 6)、運動群 (Exercise, n = 5) およびストレス群(Stress, n = 5)の摂食効率の変化

*: Ctrl vs. Exercise ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)

+: Ctrl vs. Stress ($p < 0.05$, Tukey's multiple comparisons test)

