

帝塚山大学大学院

心理科学研究科 心理科学専攻 博士後期課程

2015 年度 博士学位論文

Tryptophan 感受性疲労認知回路の特定

－ グリアーニューロン回路応答の実験心理学的解明 －

博士学位申請者：山下 雅俊

指導教官：山本 隆宣 教授 帝塚山大学心理学部

目次

論文要旨	1
第 1 章 研究課題	6
第 2 章 序論	9
第 1 節 中枢性疲労に関する概論	9
1-1. 中枢性疲労の定義	9
1-2. 中枢性疲労の臨床症状	12
第 2 節 中枢性疲労発症のメカニズム	13
2-1. 末梢における Tryptophan のダイナミックな変化	13
2-2. 中枢性疲労の誘発メカニズムに関与する遊離型 Tryptophan の脳内運命	15
2-3. ヒトにおける術後疲労時の Tryptophan 動態の変化	16
2-4. 睡眠障害と中枢性疲労との関係性	17
2-5. 中枢性疲労のメカニズムに関する Tryptophan 研究の最近の動向	18
第 3 章 中枢性疲労の誘発機構に関する実験心理学的解明	21
第 1 節 <第 1 研究> Tryptophan の行動薬理学的操作による自発的行動量と 脳内疲労物質動態の検討	21
1-1. 目的	21
1-2. 実験方法	21

1-3. 結果	24
1-4. 考察	27
第 2 節 <第 2 研究> 慢性的な睡眠障害により誘発した中枢性疲労モデル動物の確立と脳内過剰 Tryptophan の観察	30
2-1. 関連発表	30
2-2. 目的	30
2-3. 実験方法	30
2-4. 結果	33
2-5. 考察	37
第 3 節 <第 3 研究> Tryptophan と Kynurenic acid の同時亢進と中枢性疲労の成因との関係性	39
3-1. 関連発表	39
3-2. 目的	39
3-3. 実験方法	39
3-4. 結果	41
3-5. 考察	47
第 4 節 <第 4 研究> Kynurenine の行動薬理学的操作による空間認知記憶の成立過程の検討	50

4-1. 目的	50
4-2. 実験方法	50
4-3. 結果	53
4-4. 考察	56
第 5 節 <第 5 研究> 生体システムにおける Tryptophan 感受性と中枢性／精神性疲労のグリア-ニューロン回路	59
5-1. 関連発表	59
5-2. 目的	59
5-3. 実験方法	60
5-4. 結果	65
5-5. 考察	78
第 4 章 全体的考察	84
第 5 章 今後の検討課題	90
第 6 章 引用文献	92
謝 辞	105
付 録	106

論文要旨

中枢性疲労は慢性疲労症候群の病的疲労状態と関係し (Castell, Yamamoto, Phoenix, & Newsholme, 1999)、認知機能の抑制、社会生活の破綻、精神疾患の発症、脳機能の障害を導く。例えば不登校児童において、慢性的な睡眠障害を基盤とした中枢性／精神性疲労の罹患率は 40%–80%を占め、復学の困難や脳機能の障害を引き起こす (Farmer, Fowler, Scourfield, & Thapar, 2004; 三池, 2009)。本研究課題は、これらの病理状態の根底にある中枢性疲労の誘発機構について、著者が開発した慢性的な睡眠剥奪により作製した睡眠障害型中枢性疲労 (Central Fatigue induced by chronic Sleep Disorder: CFSD) モデルラット (Yamashita & Yamamoto, 2013) を用い、関与する脳内疲労物質を特定し、その誘発機構を明らかにすることである。

従来の中枢性疲労研究ではラットの運動後疲労モデルにおいて、Tryptophan の脳内取り込みが Serotonin 生成への亢進を誘導した結果、トレッドミルパフォーマンスが抑制される Serotonin 仮説が報告されてきた (Acworth, Nicholass, Morgan, & Newsholme, 1986; Cermak, Yamamoto, Meeusen, Burke, Stear, & Castell, 2012; Melancon, Lorrain, & Dionne, 2012; Newsholme & Blomstrand, 2006)。しかしながら Serotonin 生成以外にも、脳内疲労物質 Tryptophan はもう一つの代謝経路を持つ。即ち、Tryptophan 代謝の 5%が Serotonin 経路、95%が Kynurenine 経路に代謝されることから (Schwarcz & Pellicciari, 2002)、中枢性疲労研究において Kynurenine 経路の重要性も指摘されている。最近、ラットに Kynurenine 最終代謝産物 Kynurenic acid を投与すると、トレッドミル、オーブ

ンフィールド、Morris 型水迷路課題におけるパフォーマンスが抑制され、Kynurenic acid が中枢性疲労に関与することも報告されている (Yamamoto, Azechi, & Board, 2012)。また、脳を構成する細胞としてニューロンは全体の 10%程度であり、90%がグリアで占めることから (Allen & Barres, 2009)、従来の脳機能解析ではグリアとニューロンが混在する可能性があり、グリアとニューロンにおける Tryptophan 代謝産物を含めた分離解析が重要である。

以上から、中枢性疲労における Tryptophan の脳内取り込みが Serotonin だけでなく、Kynurenic acid に代謝されることも推測できる。それゆえ、著者は脳内疲労物質候補として Tryptophan-Kynurenine 経路の重要性に着目してきた。

第 1 研究では Tryptophan の行動薬理学的操作をラットに行うことで、脳内 Tryptophan および Serotonin 動態の変化と自発的行動量との関係性について検討した。Tryptophan 誘導体薬 D,L- β -(1-naphthyl)alanine は Tryptophan 水酸化酵素活性を抑制することで Serotonin 生成を阻害する (Corgier, Tappaz, & Pacheco, 1971)。また、Non-REM 睡眠を増大させ、REM 睡眠を減少させることも報告されている (Rogemont, Sarda, Gharib, & Pacheco, 1988)。その結果、D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与により、視床下部内 Tryptophan 濃度は上昇傾向であったが、Serotonin 濃度は減少傾向であることを明らかにした。さらに、D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与により自発的行動量も減少傾向であった。このような結果は、Tryptophan が Kynurenine 経路への代謝増大を導き、Tryptophan-Kynurenine 経路の感受性変化が行動の抑制に関与すると考えられる。

第 2 研究では睡眠障害を基盤とした中枢性疲労に特化したモデルを確立するため、CFSD モデルラットを開発した。その結果、トレッドミルテストと社会相互作用テストにより観察された CFSD モデルの疲労は明らかに中枢性由来であり、社会行動の抑制を有した。さらに、CFSD モデルは Tryptophan 脳内取り込みの亢進を伴うが、Serotonin 生成への亢進は関係しない神経科学的特性を有した。

第 3 研究では中枢性疲労の誘発機構として推測される Kynurenine 代謝経路の可能性を検討するために、CFSD モデルラットを用い、脳内 Tryptophan と Kynurenic acid 動態を観察した。さらに、中枢性疲労からの回復を検討するために、CFSD モデルラットを用い、 β -Endorphin の薬理効果を検討した。 β -Endorphin は中枢性疲労の抑制因子として報告されており (Yamamoto & Newsholme, 2005)、 β -Endorphin 生成は視床下部により制御されている (Herz & Millan, 1990; Suganuma, Suzuki, Oshimi, & Hanano, 1998)。まず、CFSD モデルでは Tryptophan 脳内取り込みの上昇により、Kynurenic acid 生成が亢進することを明らかにした。さらに、 β -Endorphin は中枢性疲労により誘発された精神運動と社会行動の抑制を改善させる可能性を示した。このような研究成果は、脳内 Tryptophan 濃度の上昇とそれに伴う Kynurenic acid 生成の亢進による増幅効果が中枢性疲労により誘発された社会行動や精神運動の認知機能不全の根底をなす新たな知見を示すものである。

第 4 研究では Kynurenine の行動薬理学的操作をラットに行うことで、脳内 Kynurenic acid 動態の変化と空間認知記憶の獲得および想起過程との関係性を検討した。その結果、

L-kynurenine の末梢投与は海馬内 Kynurenic acid 生成を亢進し、それは保持した空間認知記憶の想起の抑制と関連することを明らかにした。また、脳内 Kynurenic acid 生成の亢進を誘導する経路として、末梢由来 Tryptophan の脳内移行により生じることも報告されている (Coppola, Wenner, Ilkayeva, Stevens, Maggioni, Slotkin, Levin, & Newgard, 2012; Kim, Miller, Stefanek, & Miller, 2015; Schwarcz & Pellicciari, 2002; Yamamoto et al., 2012; Yamashita & Yamamoto, 2014)。即ち、末梢由来の Kynurenine と Tryptophan の脳内取り込みが脳内 Kynurenic acid 生成を亢進し、それらの増幅効果が中枢性疲労の成因に関与し、認知機能不全のトリガーとなることが推測される。

第 5 研究では CFSD モデルラットを用い、末梢中 Tryptophan と Kynurenine 動態の変化を観察した。また、オリゴデンドロサイトとニューロンシナプトゾーム内（シナプス前）Tryptophan および Monoamine とそれらの代謝産物動態の変化を観察し、認知機能との関係性を検討した。その結果、CFSD モデルは空間認知記憶の想起が不正確であり、多動性と衝動性を有した。また末梢中 Tryptophan と Kynurenine のダイナミックな変化が中枢性疲労の誘発機構の起源となり、視床下部と海馬組織のニューロンシナプス前 Tryptophan-Kynurenine-Kynurenic acid 経路の代謝亢進を誘導した。さらに、CFSD モデルのオリゴデンドロサイトには Tryptophan 濃度の上昇傾向が認められた。従来の Tryptophan 研究から、脳内 Tryptophan 濃度の上昇は活動電位の低下 (Gallager & Aghajanian, 1976) や認知機能の抑制に関与することが報告されている (Coppola et al., 2013)。また跳躍伝導を担うオリゴデンドロサイトの破綻は活動電位の伝導速度を低下

させ、認知機能障害を導くことも報告されている (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Fields, 2013)。即ち、オリゴデンドロサイトでの Tryptophan の蓄積状態は、跳躍伝導機能を阻害する可能性を示唆する。このように、中枢性疲労の誘発機構には血中 Tryptophan と Kynurenine の脳内への相乗取り込みの促進が起源となり、視床下部と海馬組織のグリア-ニューロン回路間で Tryptophan-Kynurenine-Kynurenic acid 経路の代謝亢進が生じた結果、認知機能を抑制すると考えられる。

本研究の特色として、従来の中枢性疲労研究はトレッドミル走により作製した運動後疲労モデルラットを用いて、Serotonin 仮説に重きを置くものであった。これに対して、著者が開発した CFSD モデルラットを用いた実験心理学的研究から、Tryptophan-Kynurenic acid の増幅効果が中枢性疲労の成因に関与することを明らかにした。しかし、これまでの中枢性疲労研究の成果では、中枢性疲労の誘発機構が「グリア-ニューロン間相互機構」の役割を含めた末梢-中枢連関の特性によるものかが不明瞭であった。このような問題点に対して、血中およびグリアとニューロンシナプス前 Tryptophan 代謝産物の観察の両視点を導入することで、中枢性疲労の誘発機構について、グリア-ニューロン間相互機構を含めた末梢-中枢連関に立脚した検討を可能にした。このようなアイデアと研究成果は内外を通じて全く報告がなく、本研究の独創性はこの点に集約することができる。本研究による中枢性疲労の解明は、その病理的危険性に対処し、実験心理学や神経科学の研究分野にも大きな示唆を与えるものとなる。

第 1 章 研究課題

中枢性疲労は慢性疲労症候群の病的疲労状態と関係し (Castell et al., 1999)、認知機能の抑制、社会生活の破綻、精神疾患の発症、脳機能の障害を導く。また、不登校児童において、慢性的な睡眠障害を基盤とした中枢性／精神性疲労の罹患率は 40%–80% を占め、復学の困難に加え、脳機能の障害を引き起こす (Farmer et al., 2004; 三池, 2009)。本研究課題は、これらの病理状態の根底にある中枢性疲労の誘発機構について、著者が開発した CFSD モデルラット (Yamashita & Yamamoto, 2013) を用い、関与する脳内疲労物質を特定し、その誘発機構を明らかにすることである。

従来の中枢性疲労研究は、トレッドミル走により作製した運動後疲労モデルラットにおいて、血中遊離型 Tryptophan の脳内流入が Serotonin 生成を亢進した結果、トレッドミルパフォーマンスが抑制される Serotonin 仮説が報告されてきた (Acworth et al., 1986)。しかしながら、Tryptophan は二つの代謝経路を持ち、その 5% が Serotonin 経路、95% が Kynurenine 経路に代謝される (Schwarcz & Pellicciari, 2002)。最近、ラットに Kynurenine 最終代謝産物 Kynurenic acid を投与すると、トレッドミル、オープンフィールド、Morris 型水迷路課題におけるパフォーマンスが抑制され、Kynurenic acid が中枢性疲労に関与することも報告されている (Yamamoto et al., 2012)。以上から、Tryptophan の脳内取り込みが Kynurenic acid にも代謝されることが推測できる。

さらに、脳を構成する細胞としてニューロンは全体の 10% であり、90% がグリアで占めることから (Figure 1: Allen & Barres, 2009, p.675, FIGURE 1)、従来の脳機能解析で

はグリアとニューロンが混在する可能性がある。例えばグリアの一種、オリゴデンドロサイトはニューロンの軸索周囲に髓鞘を形成することで神経活動電位の跳躍伝導¹を可能にし、軸索を保護している (Barres & Raff, 1999)。また、オリゴデンドロサイトは脳内 Kynurenic acid 生成の調節に関与し、その濃度はシステム L-トランスポーターから輸送された Tryptophan により濃度依存的に変化する (Wejksza, Rzeski, Okuno, & Kandefer-Szerszen, 2005)。

以上から、脳内で過剰状態にある Tryptophan がどのような挙動でグリア-ニューロン回路において中枢性疲労を誘発しているのか未だ明らかでない。さらに、中枢性疲労時のグリア-ニューロン間の Monoamine とそれらの代謝産物動態もまた明らかでない。

第 1 研究では Tryptophan の行動薬理学的操作をラットに行うことで、脳内 Tryptophan および Serotonin 動態の変化と自発的行動量との関係性について検討した。第 2 研究では睡眠障害を基盤とした中枢性疲労に特化したモデルを確立するため、CFSD モデルラットを開発した。第 3 研究では中枢性疲労の誘発機構として推測される Kynurenine 代謝経路の可能性を検討するために、CFSD モデルラットを用い、脳内 Tryptophan と Kynurenic acid 動態の変化を観察した。さらに、中枢性疲労からの回復を検討するために、CFSD モデルラットを用い、 β -Endorphin の薬理効果を検討した。第 4 研究では Kynurenine の行動薬理学的操作をラットに行うことで、脳内 Kynurenic acid 動態の変化と空間認知記憶の獲得および想起過程との関係性について検討した。第 5 研究では CFSD

¹ 髓鞘化されていない軸索では活動電位は連続的に伝わるが、髓鞘化された軸索では活動電位がランビエ絞輪の部分のみを経由して跳び跳びに伝わる。このような現象を跳躍伝導と呼び、髓鞘の存在によって電位の伝導速度の上昇が可能となる (吉村・池中, 2013)。

モデルラットを用い、末梢中 Tryptophan と Kynurenine 動態の変化を観察した。次に、オリゴデンドロサイトとニューロンシナプス前 Tryptophan および Monoamine とそれらの代謝産物動態の変化を観察し、認知機能との関係性を検討した。

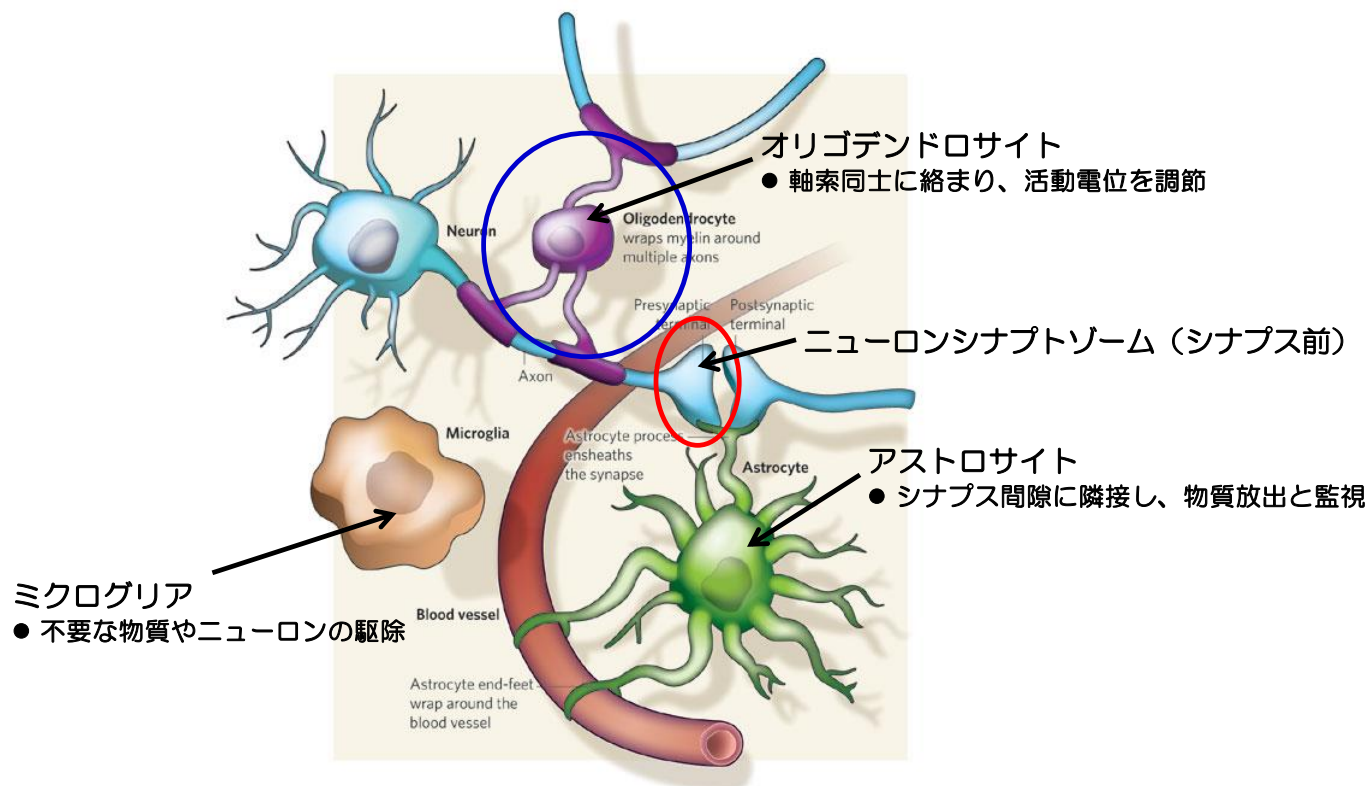


Figure 1. Glia-neuron interactions (Allen & Barres, 2009, p.675, FIGURE 1).

Notes: 本図は Allen & Barres., Nature. 2009; 457: 675-677. (p.675, FIGURE 1) の論文を引用・一部改変し、それぞれのグリア機能を示したものである。

第 2 章 序 論

第 1 節 中枢性疲労に関する概論

1-1. 中枢性疲労の定義

現代社会の特徴でもある情報過多社会による昼夜逆転の生活や長時間労働によるワークライフバランスの変化は、慢性的な疲労を誘発し、人々の心身を疲弊させる。例えば、2014 年 9 月 8 日付の朝日新聞デジタルの掲載記事において、日本国内の慢性疲労症候群患者は約 30 万人にも上ると紹介されている。このような状態は成人に限らず、小児にまで波及し、疲労を克服するためには、そのメカニズムを明らかにすることが重要である。

疲労は、「連続的な身体的あるいは精神的負荷の蓄積により生じる一過性の運動パフォーマンスの低下や中枢神経系活動の抑制」と定義される。主に、疲労は肉体疲労（末梢性疲労）、精神性疲労（中枢性疲労）、免疫学的疲労²に分類できる（Figure 2）。特に、中枢性疲労は慢性疲労症候群の病理的疲労状態と関係し（Castell et al., 1999）、社会生活の困難、脳機能の障害を導く。例えば、不登校を含めた学童期において、慢性的な睡眠障害を基盤とした中枢性疲労の罹患率は 40%–80%を占め（Farmer et al., 2004; 三池, 2009）、復学の困難（Tomoda, Miike, Uezono, & Kawasaki, 1994; Tomoda, Miike, Yonamine, Adachi, & Shiraishi, 1997）、精神疾患の発症（Farmer et al., 2004; 三池, 2009）、脳機能

² 免疫学的疲労とは、風邪やインフルエンザなどの感染症から誘発する疲労を指す。ウィルス感染のモデルに用いられる合成二重鎖 RNA である Polyribonucleosinic: polyribocytidylic acid をラットに投与すると、脳内局所の Interferon- α や Interleukin- 1β などの Cytokine の mRNA 産生が増大し、自発的運動量の低下や Serotonin トランスポーターの過剰な発現による Serotonin 濃度の低下を報告している（Katafuchi, Kondo, Take, & Yoshimura, 2005）。これは脳内 Cytokine 産生と疲労の発現との関連性を指摘している。

の障害を生起することを報告している (Tomoda, Miike, Yamada, Honda, Moroi, Ogawa, Ohtani, & Morishita, 2000)。このように、多くの老若男女において精神作業能力の低下を伴う中枢性疲労が存在し、休職（休学）あるいは退職（退学）に追い込まれることに加え、交通事故や産業事故の引き金ともなる。

そこで、著者は脳神経系を主体とする疲労現象、即ち、中枢性疲労を誘発するメカニズムを解明するために、CFSD モデルラットを開発し (Yamashita & Yamamoto, 2013)、関与する脳内疲労物質の特定と精神機能との関係性を解明することを研究課題としている。そして、著者は脳内疲労物質の候補として、必須アミノ酸 Tryptophan の生体運命に注目している。Tryptophan とは生体の成長に必要なアミノ酸であり、肉類や魚類、乳製品に含まれる。しかし、Tryptophan の高含量摂取に伴う好酸球増多筋痛症候群の発症など (Crofford, Rader, Dalakas, Hill, Page, Needham, Brady, Heyes, Wilder, & Gold, 1990; Love, Rader, Crofford, Raybourne, Principato, Page, Trucksess, Smith, Dugan, & Turner, 1993; Silver, Ludwicka, Hampton, Ohba, Bingel, Smith, Harley, Maize, & Heyes, 1994)、Tryptophan には危険性もあり、我々の精神活動に支障を来す存在でもある。また、Tryptophan をヒトに経口投与した結果、眠気と疲労感が出現するなども報告されている (Lieberman, Corkin, Spring, Growdon, & Wurtman, 1982)。そして、体内で増大した Tryptophan は触媒反応により Serotonin に変化することで、Serotonin もまた眠気の誘発や精神機能の変化を引き起こす (Jacobs & Azmitia, 1992)。即ち、Tryptophan や Serotonin 生成のダイナミックな変化により中枢性疲労様症状が生起することを示唆する。以上か

ら、Tryptophan が中枢性疲労のバイオアラーム機構の一翼を担うと考えられてきた。

疲労は社会的・経済的損失を招き、精神疾患を発症させる前病気段階でもある。従って、中枢性疲労の成因に関与する Tryptophan 感受性疲労の認知回路の解明とその制御法を確立するには動物を用いた研究が必要不可欠であり、得られた知見はヒトの疲労現象を理解し、還元することができるかを考える重要な位置づけとなる。

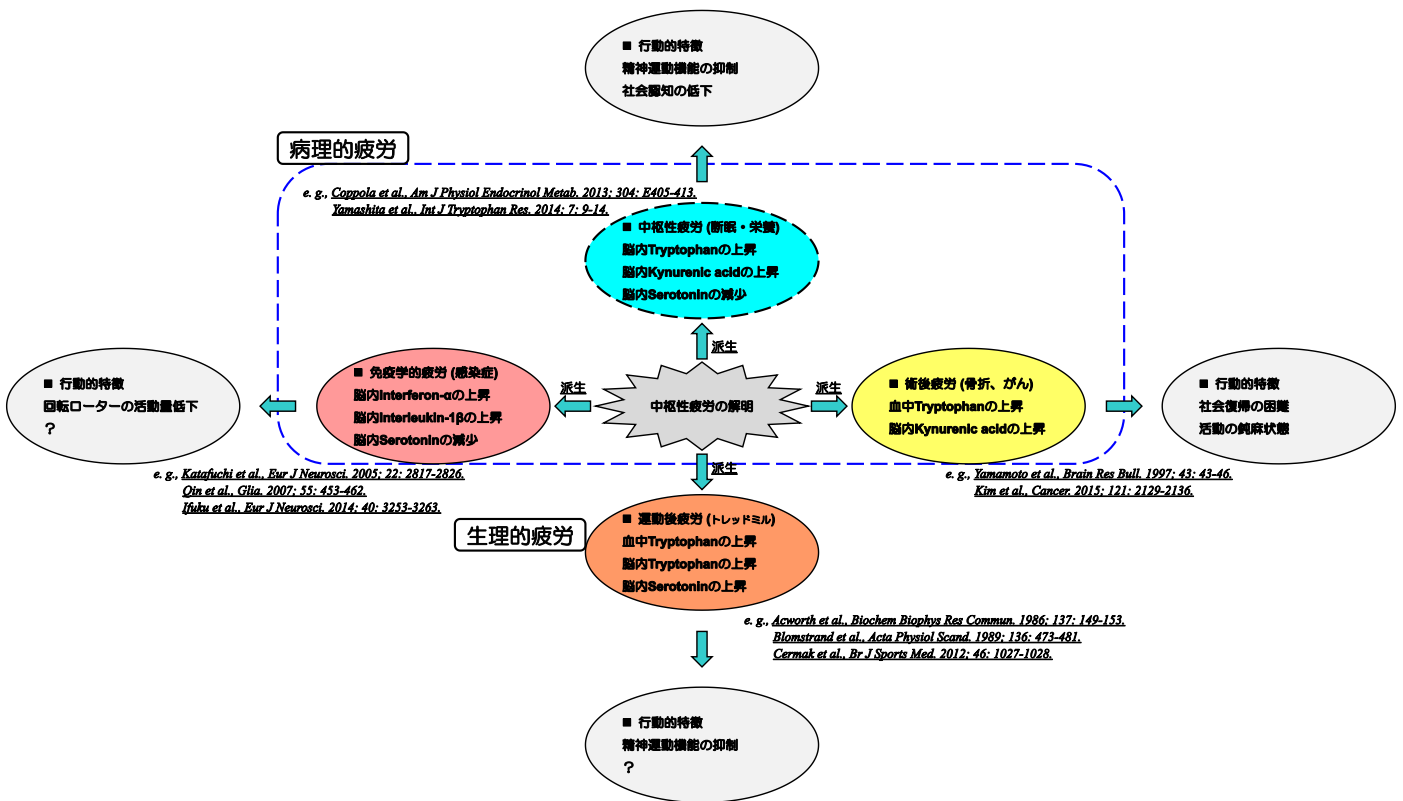


Figure 2. Previous research in central fatigue and its positions.

1-2. 中枢性疲労の臨床症状

Table 1 より、小児における精神性疲労の問題は睡眠リズムの異常を中心に、疼痛、自律神経症状、認知機能不全などを呈する (Farmer et al., 2004, p.479, TABLE 1)。さらに、疲労の持続は精神疾患の発症率を上昇させるなど (Table 2: Farmer et al., 2004, p.480, TABLE 2; 三池, 2009)、精神性疲労が病理的な危険性を孕んでいることを推測できる。

Table 1. Frequencies of symptoms associated with prolonged fatigue in boys and girls (Farmer et al., 2004, p.479, TABLE 1).

Symptom	Frequency (%) in boys	Frequency (%) in girls
Lack energy	94	86
Rest more	85	88
Multiple joint pain *	85	78
Unrefreshing sleep *	85	73
Post-exertional malaise *	76	69
Difficulty starting things	76	69
Poor concentration *	76	64
Headaches *	64	65
Feel weak	52	61
Fatiguability	45	42
Muscle pain *	39	39
Tender lymph nodes *	39	52
Difficulty thinking	33	45
Sore throats *	27	45
Slips of the tongue	24	22
Poor memory	18	23
Eyestrain	18	34

Notes: 本表は Farmer et al., Br J Psychiatry. 2004; 184: 477-481. (p.479, TABLE 1) の論文を引用・一部改変し、用いた。*マークは成人の慢性疲労症候群の診断適用時に用いられる必須項目を示す。

Table 2. Number of fatigued boys and girls, mean age at onset and % with comorbid depression for five categories: any duration, at least 1 month, 3 months or more, 3 months and at least four minor symptoms and 6 months or more and at least four minor symptoms (Farmer et al., 2004, p.480, TABLE 2).

Duration of fatigue (± 4 minor symptoms)	No. of boys	No. of girls	Age at onset in months in boys (s.e.)	Age at onset in months in girls (s.e.)	% Boys with depression ¹	% Girls with depression ¹
More than a few days	32	64	133.50 (7.93)	135.41 (6.23)	38%	39%
At least 1 month	19	50	143.84 (10.71)	136.42 (6.99)	42%	46%
3 months	17	44	144.82 (11.70)	136.75 (7.72)	41%	48%
3 months (± 4)	14	36	149.21 (8.75)	134.78 (9.09)	36%	53%
6 months (± 4)	9	26	148.22 (10.99)	140.38 (11.22)	56%	50%

Notes: 本表は Farmer et al., Br J Psychiatry. 2004; 184: 477-481. (p.480, TABLE 2) の論文を引用・一部改変し、用いた。1: 実験参加者のパーセンテージは疲労の持続期間において、DSM-IVによる大うつ病の診断基準を満たしていることを示す。

第 2 節 中枢性疲労発症のメカニズム

2-1. 末梢における Tryptophan のダイナミックな変化

中枢性疲労の誘発機構として、Acworth et al. (1986) により提唱された Serotonin 仮説が最も有名である。Serotonin は末梢血管収縮に関与し、消化管に多く存在する (Rapport, Green, & Page, 1984)。一方、脳神経系に存在する Serotonin は神経伝達物質としての役割を担い、睡眠-覚醒サイクルや概日リズム、体温調節や摂食行動に加え、精神機能にも深く関与する (Jacobs & Azmitia, 1992)。さらに Serotonin は生体内必須アミノ酸である Tryptophan が前駆体であり、中枢性疲労もまた睡眠の誘発が現れるという共通のメカニズムが存在することから、これらは疲労物質として注目されてきた。

通常、遊離型 Tryptophan は血中でアルブミンとの結合型で存在し運搬されるが、脂

脂肪酸もまたアルブミンに結合し、輸送されている (Figure 3)。しかし、長時間運動により血中遊離型脂肪酸濃度が上昇し、親和性がより高いアルブミンと脂肪酸の結合量が増加した結果、血中に遊離型 Tryptophan が増加する。また同様の運動により血中の分枝鎖アミノ酸がエネルギー源として利用される。Tryptophan と同様に、分枝鎖アミノ酸の脳内取り込みはアミノ酸トランスポーターの一種であるシステム L-トランスポーターが利用される。従って、これらのアミノ酸は競合するため、Tryptophan の脳内への流入は分枝鎖アミノ酸濃度にも依存することになる。

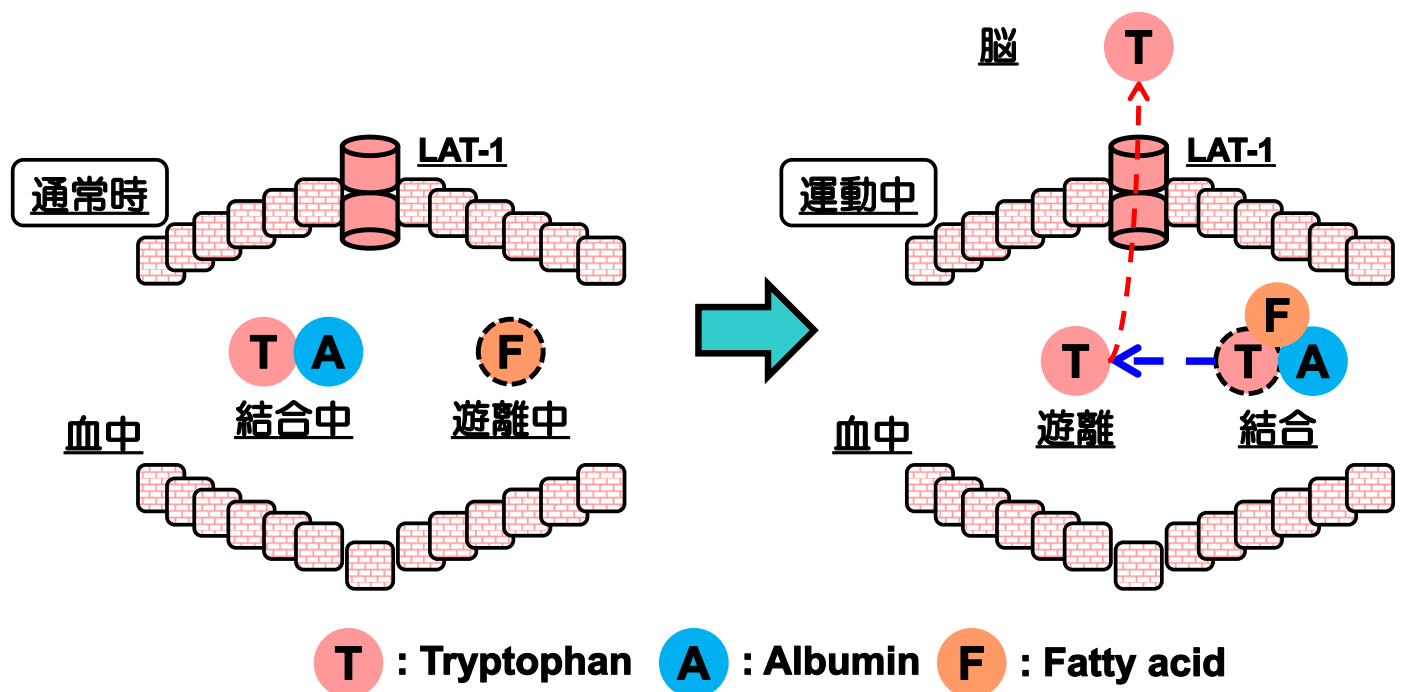


Figure 3. The role of plasma tryptophan.

Notes: 生体において通常時、Tryptophan は血中でアルブミンと結合し、存在する。それゆえ、Tryptophan の脳内取り込みは必要最低限しか行われない。しかし、疲労時、血中遊離型脂肪酸濃度が上昇し、親和性がより高いアルブミンと脂肪酸の結合量が増加した結果、Tryptophan が追い出される形になる。即ち、血中で遊離型 Tryptophan が増加し、優勢となった今、脳内への取り込みは自由となってしまう。

2-2. 中枢性疲労の誘発メカニズムに関与する遊離型 Tryptophan の脳内運命

運動後疲労モデルラットにおいて、血中の分枝鎖アミノ酸濃度が低下し、且つ遊離型 Tryptophan 濃度の上昇により、システム L-トランスポーターでの競合関係に優勢となった Tryptophan は脳内に取り込まれ、脳内の広範囲に亘り Serotonin 生成を亢進させる (Acworth et al., 1986; Blomstrand, Perrett, Parry-Billings, & Newsholme, 1989; Cermak et al., 2012; Fernstrom & Fernstrom, 2006; Melancon et al., 2012; Newsholme & Blomstrand, 2006)。また、Yamamoto & Newsholme (2001) はトレッドミル走行を課した無アルブミンラット (Nagase analbuminemic rat: NAR) とその Control である Sprague-Dawley (SD) ラットのニューロンシナプス前 Tryptophan 代謝産物含量を検討した結果、NAR の脳・脊髄領域の広範囲で Tryptophan および 5-hydroxytryptophan 含量の増加を報告している。さらに、*in vivo* マイクロダイヤリシス法を用い、NAR と SD ラットの細胞外液 Tryptophan 動態を比較検討した結果、疲労中の線条体内 Tryptophan 濃度は NAR で常時、高レベル状態を維持し、疲労負荷に対して鋭敏に応答することを明らかにしている (Yamamoto & Newsholme, 2001)。また、このダイナミックな生化学的変化は疲労困憊に至るまでの時間にも表現され、NAR の持久力は SD ラットの 71% にしか相当しなかった。

NAR は SD ラットに由来する高脂血症ラットの育成中に、Nagase, Shimamune, & Shumiya (1979) により発見された。NAR は遺伝的に血中のアルブミンを欠損しているため、60% の Tryptophan が血中に遊離型として存在する。この事実は SD ラットに比べ、NAR が疲労困憊に陥るための生理的特性を兼ね備えていると推測できる。

このように、アルブミンの制御下でない NAR の遊離型 Tryptophan と脳内 Serotonin 代謝の亢進過程は中枢性疲労を誘発する機構としての 1 つの証拠を示している。

2-3. ヒトにおける術後疲労時の Tryptophan 動態の変化

ヒトの中枢性疲労においても、Tryptophan が疲労に対して鋭敏に応答することが確認されている。例えば、Yamamoto, Castell, Botella, Powell, Hall, Young, & Newsholme (1997) は大腿部骨折を有する高齢者を対象に、術後療養期間における血中遊離型およびアルブミン結合型 Tryptophan 濃度を検討している。術後療養中 2 日目において術前と比較した結果、遊離型 Tryptophan 濃度は上昇し、アルブミンへの結合親和性も低下していた。さらに、分枝鎖アミノ酸との濃度比も有意に増加したことから、Tryptophan が脳内へ流入するための条件が整っていることを確認できる。そして、Tryptophan の役割における実験的証拠として、Lieberman et al. (1982) の研究がある。Lieberman et al. (1982) は Tryptophan をヒトに経口投与した結果、眠気および疲労感の出現が認められたことを報告している。

Hopkins & Cole (1901) により、カゼイン（乳製品に含まれるたんぱく質）の腭液消化から Tryptophan が世界で初めて発見され、今日までに約 115 年を経過する。その間、Tryptophan に関する生体寄与の見聞は深められてきた。Tryptophan は生体の成長に必要なアミノ酸であることから (Harper, 1977; Osborne & Mendel, 1914; Willcock & Hopkins, 1906)、Tryptophan 高含量の食料品や医薬品が世界中のマーケットで販売され、一種の

健康サプリメントとして爆発的な人気を博した。しかし、Tryptophan 高含量摂取が原因である好酸球増多筋痛症候群に見られるように、Tryptophan には紛れもなく特異性と危険性が備わっている。さらに、これまでの研究成果から、必須アミノ酸 Tryptophan は疲労物質的な側面も有し、日常生活において、我々の精神活動に支障を来す存在であることも忘れてはならない。

2-4. 睡眠障害と中枢性疲労との関係性

中枢性疲労と睡眠は表裏一体の関係にある。睡眠には深い徐波睡眠を含む Non-REM 睡眠と、身体の休息や記憶の固定化を図る REM 睡眠に分類される。これらは約 90 分周期で 1 日数回繰り返し、疲労した脳機能の回復に努めている。即ち、日中での膨大な情報処理により疲労した脳は睡眠を摂ることで初めて休息し、翌日の精神活動に備えている。ところが、睡眠不足は日中の眠気を招き、中枢性疲労の誘発による精神作業能力の低下、注意力や集中力の欠如を誘導し、交通事故や産業事故などの社会問題に繋がる。また、不登校児童において睡眠障害を基盤とした中枢性疲労の罹患率は 40%–80% を占めるなど (Farmer et al., 2004; 三池, 2009)、睡眠障害を背景とした中枢性疲労は社会生活を容易に破綻し、誰もが発症し得る「前病気段階的疾患」としても考えられる。従って、睡眠障害を背景とした中枢性疲労の誘発機構を解明し、その制御法(予防と治療)を確立するためには適切な動物モデルを必要とする。

また、記憶学習に関連する睡眠の重要性について、Guzman-Marin, Sutsova, Stewart,

Gong, Szymusiak, & McGinty (2003) は海馬歯状回の細胞増殖に關与する睡眠の役割を検討している。Guzman-Marin et al. (2003) はトレッドミル走行を 96 時間課すことで作製した断眠ラットを用い、断眠が背側海馬歯状回の神経細胞増殖を抑制することを報告している。また Yang, Lai, Cichon, Ma, Li, & Gan (2014) は睡眠が運動学習後のポストシナプスの樹状突起棘の形成を促進し、7 時間の断眠はスパイン形成³を抑制することを報告している。このように、睡眠が新生スパインの増殖やその維持に關連し、記憶の保持に寄与することを説明している。

2-5. 中枢性疲労のメカニズムに關する Tryptophan 研究の最近の動向

最近、Serotonin 生成の上昇が中枢性疲労の唯一の原因ではないことも確認されている。従来の中枢性疲労研究では急性運動や術後経過に見られるように、脳内に移行した遊離型 Tryptophan により、脳内 Serotonin 生成が亢進した結果、中枢性疲労を生起すると考えられてきた (Acworth et al., 1986; Cermak et al., 2012; Melancon et al., 2012; Newsholme & Blomstrand, 2006)。しかしながら、哺乳類において Serotonin 生成以外に、脳内に取り込まれた Tryptophan の 95% が Kynurenine 経路に代謝され、Kynurenic acid および Quinolinic acid を生成する (Schwarcz & Pellicciari, 2002)。Quinolinic acid は N-メチル-D-アスパラギン酸型グルタミン酸 (NMDA) 受容体のアゴニストとして作用し、Kynurenic acid は NMDA および $\alpha 7$ ニコチン型アセチルコリン ($\alpha 7$ nACh) 受容体アンタ

³ ニューロンには多くの樹状突起が存在し、その樹状突起上には隆起した棘 (スパイン) が存在する。そして、スパインは他のニューロンの軸索終末と結合することで興奮刺激の受け取りを可能とする (シナプス)。スパインは運動や記憶学習、睡眠により形態や数は可塑的に変化する (Yang et al., 2014)。

ゴニストとして作用する（Hilmas, Pereira, Alkondon, Rassoulpour, Schwarcz, & Albuquerque, 2001; Schwarcz & Pellicciari, 2002）。このように、中枢性疲労の誘発メカニズムに Tryptophan-Kynurenine 経路の関与も指摘されている。例えば、Kynurenic acid の投与実験による精神運動機能や記憶成績の低下、術後疲労や断眠疲労における脳内 Tryptophan と Kynurenic acid 濃度の上昇は、中枢性疲労の誘発機構を説明する上での証拠を示している（Coppola et al., 2012; Kim et al., 2015; Yamamoto et al., 2012; Yamashita & Yamamoto, 2014）。

以上から、Figure 4（Essa, Subash, Braidy, Al-Adawi, Lim, Manivasagam, & Guillemin, 2013, p.22, FIGURE 2）に示すように、中枢性疲労時の Tryptophan 脳内流入が Serotonin だけでなく、Kynurenine 経路にも代謝されることが推測できる。また、Tryptophan 自体が中枢性疲労の引き金となる主役を担う可能性も極めて高い。このように、本研究課題は脳内疲労物質としての Tryptophan 代謝産物の重要性に着目した。

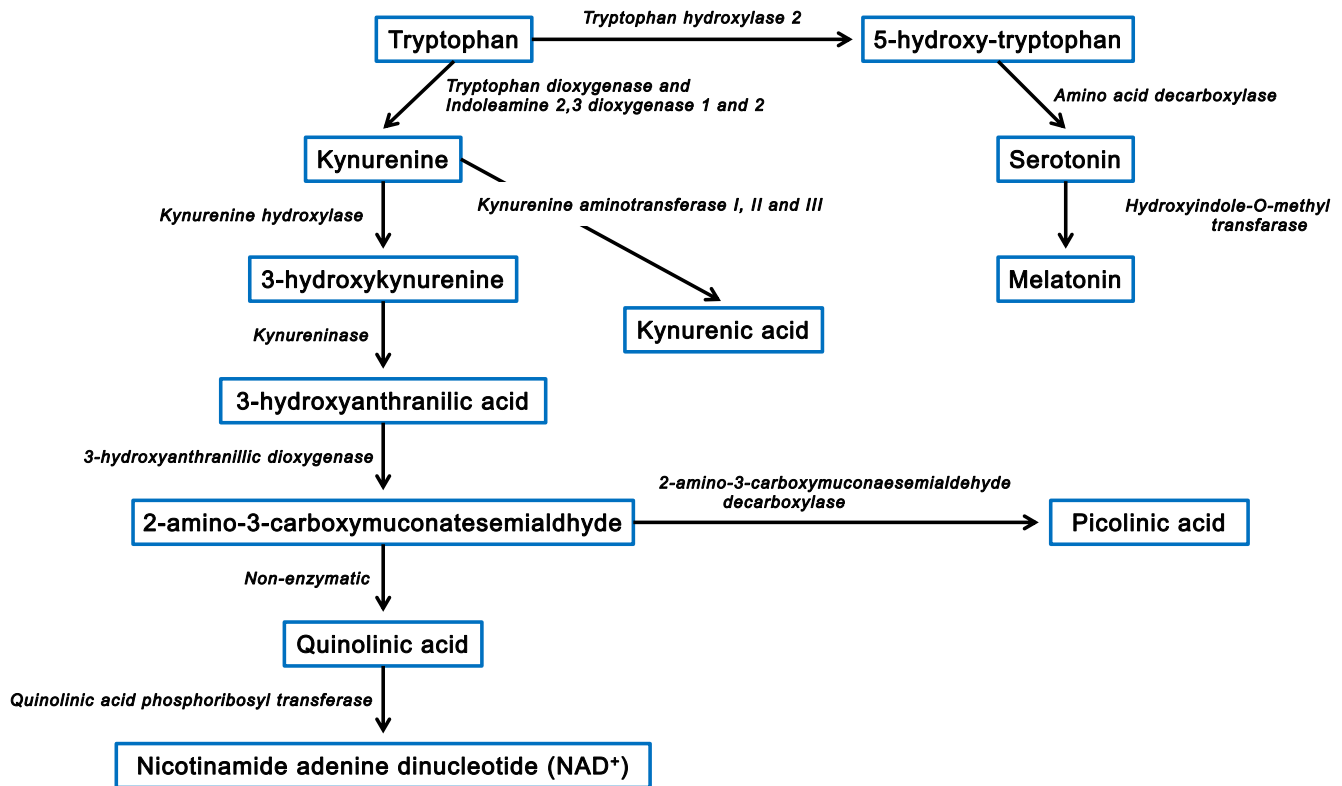


Figure 4. Catabolic pathway of tryptophan (Essa et al., 2013, p.22, FIGURE 2).

Notes: 本図は Essa et al., Int J Tryptophan Res. 2013; 6: 15-28. (p.22, FIGURE 2) の論文を引用・一部改変し、用いた。Tryptophan は 5% が Serotonin 経路へ、残りの 95% が Kynurenine 経路へ代謝される。

第 3 章 中枢性疲労の誘発機構に関する実験心理学的解明

第 1 節 <第 1 研究> Tryptophan の行動薬理学的操作による自発的行動量と 脳内疲労物質動態の検討

1-1. 目的

第 1 研究では Tryptophan の行動薬理学的操作をラットに行うため、Tryptophan 誘導体薬 D,L- β -(1-naphthyl)alanine を用い、脳内 Tryptophan と Serotonin 動態の変化と自発的行動量との関係性を検討した。

1-2. 実験方法

実験計画

実験は、薬理効果条件 2 水準（Vehicle 投与群・D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与群）による 1 要因実験参加者間計画であった。

実験動物

本実験は日本神経科学学会の「神経科学における動物実験に関する指針」に基づき、また帝塚山大学動物実験倫理委員会の承認を得て、帝塚山大学心理学部神経生理学研究室で行われた。Wistar 系雌性ラット（14 週齢，200–230 g, Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan, n = 10）は Vehicle 投与群（n = 5）および D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与群（n = 5）

に振り分けた。また、ラットは 12 時間毎の明暗サイクル（明期：8:00–20:00）、湿度 55%、室温 23°C の環境下で飼育した。飲料水および固形飼料（CLEA Japan Inc., Osaka, Japan）は自由に摂取させた。また、ハンドリングは 5 日間行った。

Tryptophan 誘導体薬の投与

Tryptophan の行動薬理学的操作には、Tryptophan 誘導体薬 D,L- β -(1-naphthyl)alanine（Bachem Inc）を用いた。D,L- β -(1-naphthyl)alanine は Tryptophan 水酸化酵素の活性を抑制することで、Serotonin 生成を阻害し（Corgier et al., 1971）、non-REM 睡眠を増大させ、REM 睡眠を減少させることが報告されている（Rogemont et al., 1988）。19.2 mg から 24.0 mg までの D,L- β -(1-naphthyl)alanine は、Phosphate-buffered saline を含む 0.1% の Hydrochloric acid で溶解した。そして行動実験開始の 30 分前に、D,L- β -(1-naphthyl)alanine（500 μ L/kg）はラットの腹腔内へ投与した。

脳摘出

視床下部内 Tryptophan、Serotonin、Dopamine および Noradrenaline 濃度を測定するために、ラットを 14 週齢で断頭致死し、素早く脳を摘出した。脳は氷で覆われたシャーレ上で、Glowinski & Iversen（1966）の方法を一部改変し、視床下部を摘出した。視床下部組織は、1 mM Na₂SO₅、0.2% EDTA-2Na を含む 3% Perchloric acid でホモジナイズを行い、得られたホモジネートは 10,000 rpm、4°C で 10 分間の遠心分離を行った。遠

心後、得られた上層を検体とした。検体は高速液体クロマトグラフィ (High performance liquid chromatography: HPLC) を用いた測定まで -80°C で凍結保存した⁴。

Tryptophan、Serotonin、Dopamine、Noradrenaline の微量分析

視床下部内 Tryptophan、Serotonin、Dopamine および Noradrenaline (Sigma-aldrich Inc., Tokyo, Japan) 濃度はクロマトレコーダーをセットした電気化学的検出器付き HPLC (Irica, Japan) で測定した。測定カラムには 5- μM Octadecyl carbon chain-bonded silica 80-TM C18 カラム (150 mm \times 4.6 mm, Tosoh, Japan) を使用した。測定方法は、Yamamoto et al. (1997) の方法を参考にし、移動相には 30 mM Citric acid、10 mM Na_2HPO_4 、0.5 mM Octyl sodium sulfate、50 mM NaCl および 0.05 mM EDTA を含む 15% Methanol (NaOH により pH 4.13 に調整) を使用した。流速は 700 $\mu\text{L}/\text{min}$ に設定し、印加電圧は 700 mV (Noradrenaline, Dopamine, Serotonin 分析) および 800 mV (Tryptophan 分析) で行った。

行動観察

自発的行動量の観察は、円形型オープンフィールド (SHINANO-SEISAKUSHO, Japan) を用いた。まず、新規環境下に慣れるように計測 5 分前から、ラットを装置内に置いた。行動指標には移動時間、移動距離、移動速度、伸展回数を Video-tracking system (VAS/CAD, MUROMACHI KIKAI CO., LTD.) により 10 分間、観察した。

⁴ 第 1 研究から第 5 研究での脳組織の調製法は困難な場合があり、例えば遠心分離後のペースト状のペレットを回収できないこともある。血液では少量しか回収できない場合、回収率の低下や凝固性により、サンプルとして用いることができない。そのため、分析時のサンプル数に変動がある。

1-3. 結果

オープンフィールド内の自発的行動量の観察

各群におけるオープンフィールド内の自発的行動量は Figure 5 に示す。薬理効果条件を独立変数、自発的行動量を従属変数にした対応のない t 検定を行った結果、条件間で有意差は認められなかった（移動時間 (Figure 5A) : $t(8) = 1.32$, $p = 0.22$, $d = 0.84$, 移動距離 (Figure 5B) : $t(8) = 1.38$, $p = 0.21$, $d = 1.95$, 移動速度 (Figure 5C) : $t(8) = 0.081$, $p = 0.94$, $d = 0.05$, 伸展回数 (Figure 5D) : $t(8) = 1.59$, $p = 0.15$, $d = 1.01$)。

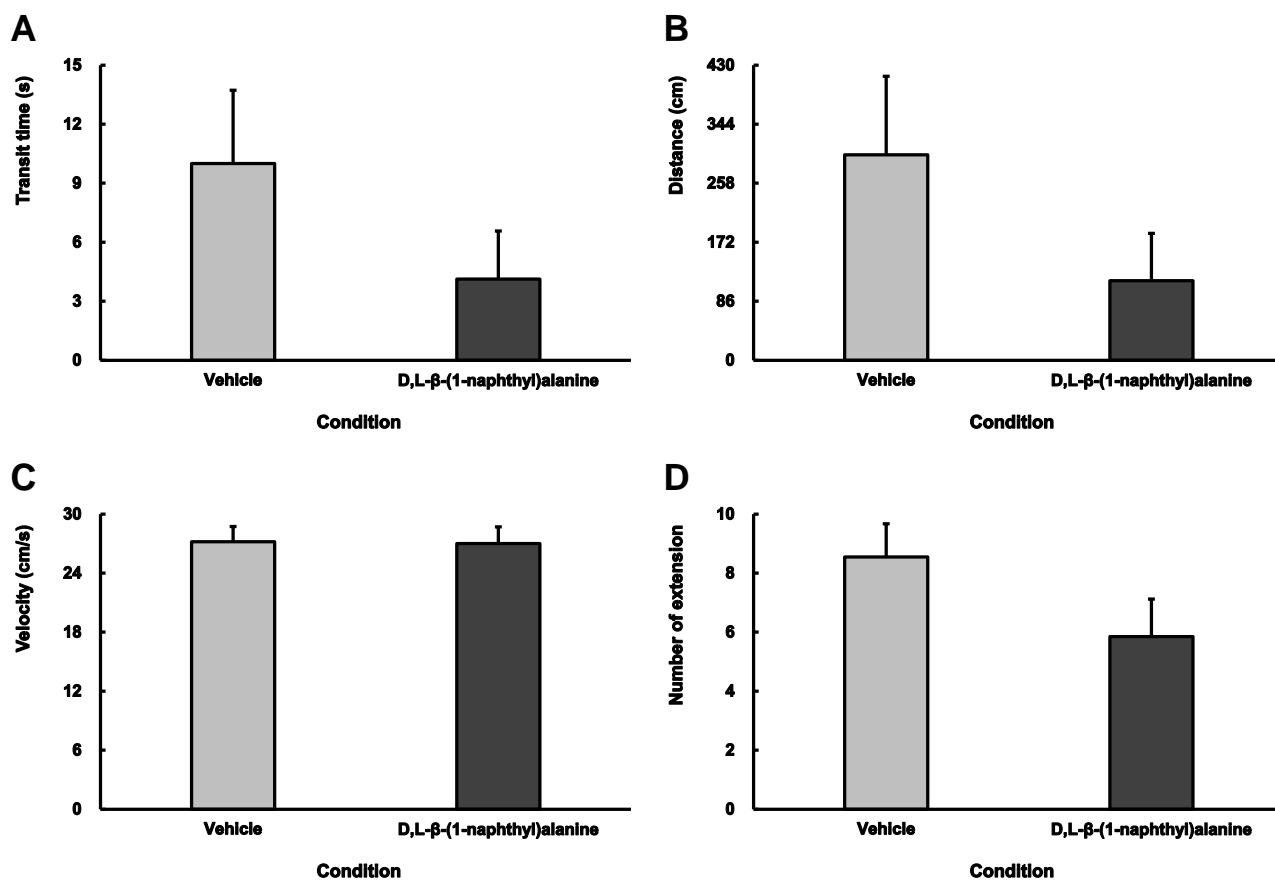


Figure 5. Effect of tryptophan analog on open-field.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM.

各群の個体別における自発的行動量は Table 3 に示す。D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与群におけるラット F、G、I、J（5 匹中 4 匹）の移動時間は Vehicle 投与群の移動平均時間（Figure 5A）と比較し、短い傾向であった。また、D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与群におけるラット F、G、I、J（5 匹中 4 匹）の移動距離は Vehicle 投与群の移動平均距離（Figure 5B）と比較し、短い傾向であった。さらに、D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与群におけるラット F、G、I（5 匹中 3 匹）の伸展回数は Vehicle 投与群の伸展平均回数（Figure 5D）と比較し、減少傾向であった。

Table 3. Effect of tryptophan analog for an individual difference in groups.

Behavior	Groups									
	Vehicle					D,L- β -(1-naphthyl)alanine				
	Rat A	Rat B	Rat C	Rat D	Rat E	Rat F	Rat G	Rat H	Rat I	Rat J
Transit time (s)	17.03	1.05	1.20	17.88	12.85	0.20	1.90	13.50	0.80	4.25
Distance (cm)	531.85	26.13	27.50	525.08	386.58	4.30	45.60	378.90	24.30	126.28
Velocity (cm/s)	30.18	23.95	22.90	29.35	29.58	21.50	24.67	28.58	30.40	29.88
Extension (t)	6.00	11.25	11.00	8.25	6.25	2.50	7.75	8.00	3.00	8.00

視床下部内 Tryptophan、Serotonin、Dopamine、Noradrenaline 濃度の観察

視床下部内 Tryptophan、Serotonin、Dopamine および Noradrenaline 濃度における D,L- β -(1-naphthyl)alanine の薬理効果は Figure 6 に示す。薬理効果条件を独立変数、Tryptophan、Serotonin、Dopamine、Noradrenaline 濃度を従属変数にした対応のない *t* 検

定を行った結果、条件間で有意差は認められなかった（Tryptophan(Figure 6A) : $t(3) = 0.601$, $p = 0.59$, $d = 0.55$, Serotonin(Figure 6B) : $t(3) = 0.99$, $p = 0.39$, $d = 0.91$, Dopamine(Figure 6C) : $t(3) = 0.92$, $p = 0.42$, $d = 0.85$, Noradrenaline(Figure 6D) : $t(3) = 0.94$, $p = 0.42$, $d = 0.86$)。

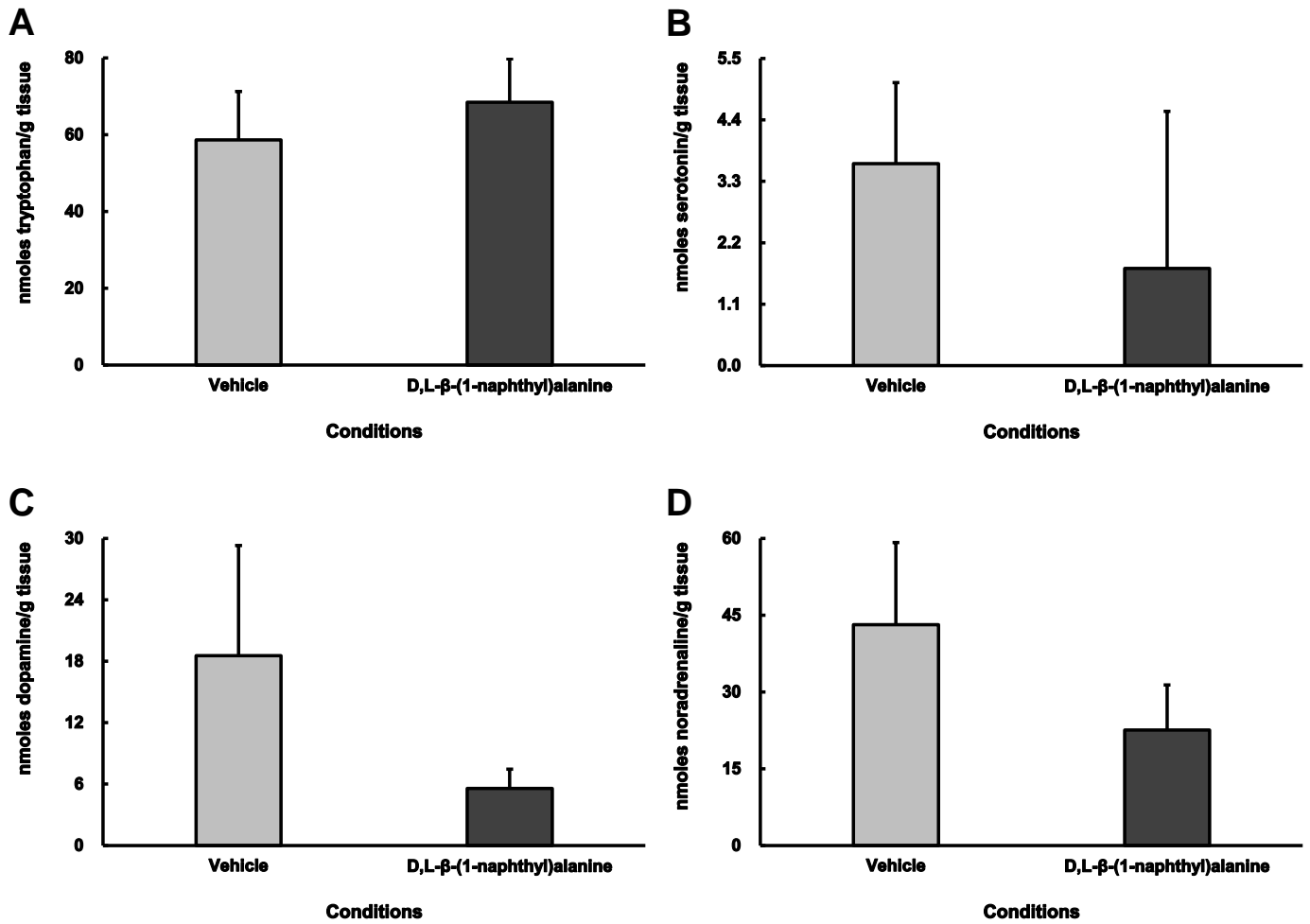


Figure 6. Effect of tryptophan analog on the concentrations of tryptophan, serotonin, dopamine, and noradrenaline in the hypothalamus for vehicle and D,L-β-(1-naphthyl)alanine i.p. groups.

Notes: Parameters are expressed as mean ± SEM.

各群の個体別における Tryptophan、Serotonin、Dopamine、Noradrenaline 濃度は Table 4 に示す。Vehicle 投与群と比較し (Figure 6)、D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与群におけるラット F、G の Tryptophan 濃度は上昇傾向であり、Serotonin、Dopamine、Noradrenaline 濃度は減少傾向であった。

Table 4. Effect of tryptophan analog on the concentrations of tryptophan, serotonin, dopamine, and noradrenaline in the hypothalamus for an individual difference in groups.

	Groups				
	Vehicle			D,L- β -(1-naphthyl)alanine	
	Rat A	Rat B	Rat C	Rat F	Rat G
Tryptophan and monoamine					
Tryptophan	74.80	67.31	33.83	69.59	67.29
Serotonin	6.10	3.69	1.07	2.02	1.46
Dopamine	39.73	11.25	4.67	7.45	3.71
Noradrenaline	68.49	47.50	13.40	31.38	13.75

Notes: Concentration is expressed as nmol/g tissue.

1-4. 考察

従来の中枢性疲労研究は、トレッドミル走により作製した運動後疲労モデルラットにおいて、Tryptophan の脳内取り込みが Serotonin 生成を亢進した結果、トレッドミルパフォーマンスが抑制される Serotonin 仮説が報告されている (Acworth et al., 1986; Blomstrand et al., 1989)。本研究において、Tryptophan 誘導体薬 D,L- β -(1-naphthyl)alanine

をラットに投与した結果、Vehicle 投与群と比較し、視床下部内 Tryptophan 濃度は上昇傾向であり、Serotonin 濃度は減少傾向であった (Figures 6A, B & Table 4)。さらに、D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与群の移動時間、距離、速度および伸展回数は Vehicle 投与群と比較し、有意差は認められなかった (Figures 5A-D)。しかしながら、Vehicle 投与群の移動平均時間と移動平均距離と比較し、D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与群の各個体において 5 匹中 4 匹に減少傾向が観察された (Table 3)。D,L- β -(1-naphthyl)alanine は PCPA のように、Tryptophan 水酸化酵素の活性を抑制することで、Serotonin 生成を阻害し、脳幹および線条体機能を抑制する (Weicker et al., 2001)。また、Serotonin 仮説によれば、Tryptophan 脳内取り込みによる Serotonin 生成の亢進がトレッドミル走のような精神運動量を抑制することが報告されている (Acworth et al., 1986; Blomstrand et al., 1989)。このような知見から、D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与による自発的行動量の減少傾向には Serotonin よりもむしろ、Tryptophan 自体がその引き金となることを示唆する。しかしながら、Katafuchi et al. (2005) は免疫学的疲労モデルを用いて、Serotonin 濃度の減少による中枢性疲労仮説を報告している。本研究結果における Serotonin 濃度の減少傾向は Katafuchi et al. (2005) の研究報告と一致するが、濃度の上昇傾向を呈した Tryptophan はその主な代謝経路である Kynurenine 経路に代謝される可能性を推測できる。最近、ラットに Kynurenine 経路の最終代謝産物 Kynurenic acid を投与すると、トレッドミル、オープンフィールド、Morris 型水迷路課題のパフォーマンスを抑制することが報告されている (Yamamoto et al., 2012)。それゆえ、D,L- β -(1-naphthyl)alanine

投与により誘発された自発的行動量の減少傾向には Kynurenic acid の変化もまた、その行動抑制に関与するかもしれない。

D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与群の視床下部内 Dopamine 濃度は Vehicle 投与群と比較し、減少傾向であった (Figure 6C & Table 4)。Dopamine 神経系の抑制は無動症や強硬症を生起し、感覚-運動系機構を破綻させる (Marshall, Richardson, & Teitelbaum, 1974)。従って、D,L- β -(1-naphthyl)alanine は運動実行系に関与する視床下部-背側線条体-内側淡蒼球回路機能を抑制するかもしれない。さらに、線条体内 Kynurenic acid 濃度の上昇はシナプス間隙の Dopamine 放出を抑制する (Rassoulpour, Wu, Ferre, & Schwarcz, 2005)。このような知見は、Tryptophan および Kynurenic acid の同時変化が行動抑制を生起することを示唆する。

今後の検討課題として、D,L- β -(1-naphthyl)alanine の薬理効果を更に追究するために、投与処置数を増やし、脳内 Tryptophan 代謝産物を網羅的に解明する必要がある。また、特異的な中枢性疲労モデル動物を開発することで、内在性 Tryptophan および Kynurenic acid 動態と中枢性疲労との関係性を詳細に明らかにしなければならない。

第 2 節 <第 2 研究> 慢性的な睡眠障害により誘発した中枢性疲労モデル動物の確立と脳内過剰 Tryptophan の観察

2-1. 関連発表

Yamashita & Yamamoto. *Japanese Journal of Cognitive Neuroscience*. 2013: 15, 67-64.

2-2. 目的

第 1 研究では Tryptophan の行動薬理学的操作をラットに行うことで、脳内 Tryptophan 濃度の上昇傾向と自発的行動量の減少傾向が明らかにされた。次に、特異的な中枢性疲労モデル動物を開発し、内在性 Tryptophan 代謝産物と中枢性疲労との関係性を明らかにしなければならない。第 2 研究では睡眠障害を基盤とした中枢性疲労に特化した CFSD モデル動物を開発し、その神経科学的特性を検討した。

2-3. 実験方法

実験計画

実験は、負荷条件 2 水準（参加者間：Control 群・CFSD 群）と断眠疲労負荷期間 5 水準（参加者内：断眠疲労 1 日目・2 日目・3 日目・4 日目・5 日目）による 2 要因混合計画であった。

実験動物

本実験は日本神経科学学会の「神経科学における動物実験に関する指針」に基づき、また帝塚山大学動物実験倫理委員会の承認を得て、帝塚山大学心理学部神経生理学研究室で行われた。Wistar系雌性ラット（7週齢，100–120 g, Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan, $n = 11$ ）は Control 群（ $n = 5$ ）および CFSD 群（ $n = 6$ ）に振り分けた。ラットの飼育環境は第 1 研究と同様である。

走運動学習

ラットの走運動学習はトレッドミル（SN-460, SHINANO-SEISAKUSHO, Japan）を用いて 7 日間、行った。具体的に、速度は分速 5–25 m/min を漸増的に上昇させ、15–60 分間、走行できるように順応させた。また、走運動学習中はトレッドミル上のベルト末端部に電極を設置し、微量の電圧を流した（20 V 以下）。

睡眠障害型中枢性疲労モデルの作製

CFSD モデルは Yamashita & Yamamoto（2013）の方法に従い作製した。即ち、プラスチック製観察箱（18.5 cm × 31.5 cm × 24.4 cm）に逃避台（6.5 cm × 5 cm）を固定し、床から 4.8 cm の高さまで水を張り、ラットを逃避台上に乗せた。このような環境下において、ラットに睡眠–覚醒サイクル障害を課し、これを 5 日間実施することで作製した（Figure 7）。なお、この断眠疲労負荷法はラットが REM 睡眠時に筋弛緩状態になると

逃避台から水中に落下し、覚醒状態となることを応用している。

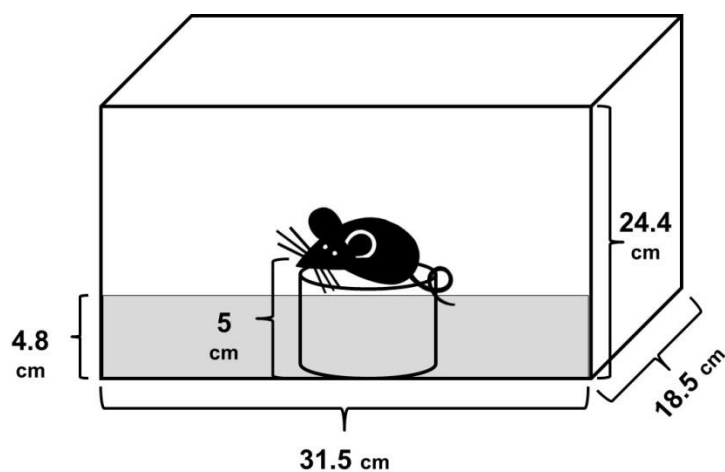


Figure 7. Inducement of CFSD for the central fatigue model.

Notes: This method did not result in any deaths.

脳摘出と脳内 Tryptophan、Serotonin 濃度の定量

脳内 Tryptophan と Serotonin 濃度を測定するために、ラットを行動実験終了後に断頭し脳摘出後、視床下部、海馬、線条体の 3 部位に分けた。脳組織の調製および Tryptophan と Serotonin 濃度の測定は、第 1 研究と同様の方法を用いた。

行動観察

トレッドミルテストは 15 分間のランニングを達成できた時に 100%とした。即ち、断眠疲労負荷期間において、疲労レベルは分速 25 m/min、傾斜 7°の下、トレッドミル走行により測定した。なお、走運動学習期間で用いた電気刺激は行わなかった。

能動的な社会行動は社会相互作用テストにより観察した。研究ラットは木製観察箱

(45 cm × 45 cm × 39 cm) にこれまで面識のないラットと入れ、これまでの研究方法を参考にし (File, 1980; File & Seth, 2003; Starr, Price, Watson, Atkinson, Arban, Melotto, Dawson, Hagan, Upton, & Duxon, 2007)、社会相互作用テストを行った。即ち、ラットの能動的な社会行動として知られる匂い嗅ぎ、追尾、毛繕い、伸し掛かりおよび潜り込みを示した時間 (s) は、Video-tracking camera (IVIS HF R21, Canon Inc., Tokyo, Japan) を用いて 10 分間、観察した。

2-4. 結果

睡眠欠乏状態によるランニングパフォーマンスへの影響

トレッドミルテストにおけるランニング遂行率は Figure 8 に示す。負荷条件 (2 水準: Control 群、CFSD 群) と断眠疲労負荷期間 (5 水準: 断眠疲労 1-5 日間) の 2 要因分散分析を行った。条件に有意な主効果が認められた ($F(1, 5) = 10.45, p < 0.05, \eta_p^2 = 0.67$)。また、有意な交互作用が認められた ($F(4, 20) = 4.092, p < 0.05, \eta_p^2 = 0.45$)。単純主効果検定の結果、断眠 3 日目 (Control 群: $99.9 \pm 0.04\%$, CFSD 群: $50.2 \pm 15.6\%$) と 5 日目 (Control 群: $99.4 \pm 0.6\%$, CFSD 群: $7.3 \pm 5.3\%$) における CFSD 群のトレッドミルパフォーマンスは Control 群と比較し、有意に抑制した (断眠 3 日目: $p < 0.05$, 断眠 5 日目: $p < 0.001$)。

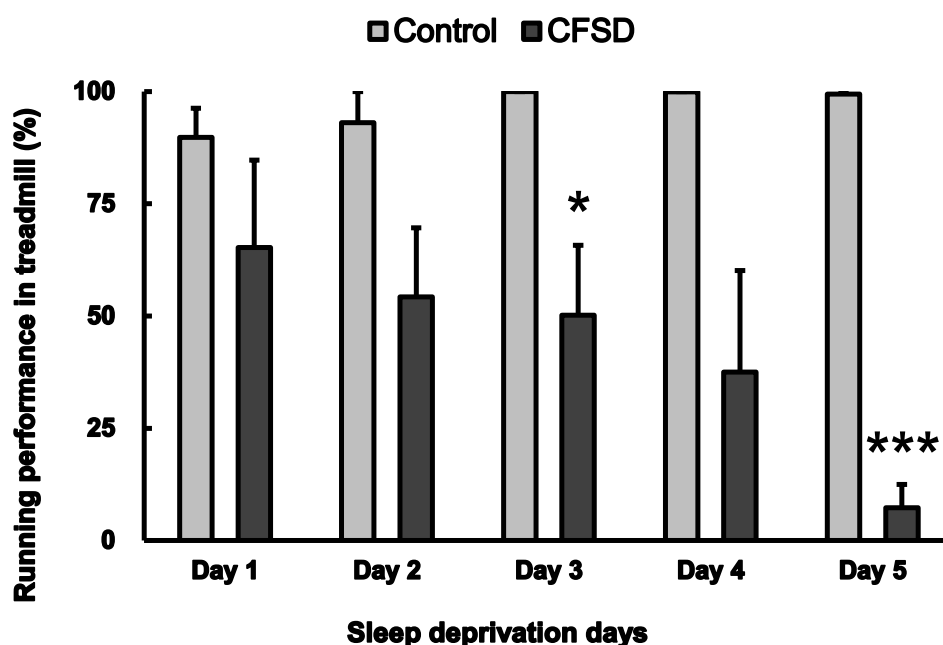


Figure 8. Effect of sleep disturbance on running performance.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

睡眠欠乏状態による能動的な社会接触への影響

社会相互作用テストにおける相互作用時間は Figure 9C に示す。負荷条件（2水準：Control 群、CFSD 群）と断眠疲労負荷期間（5水準：断眠疲労 1–5 日間）の 2 要因分散分析を行った。条件に有意な主効果が認められた（ $F(1, 5) = 1013.56$, $p < 0.001$, $\eta_p^2 = 0.99$ ）。また、有意な交互作用が認められた（ $F(4, 20) = 3.44$, $p < 0.05$, $\eta_p^2 = 0.40$ ）。単純主効果検定の結果、断眠 1 日目（Control 群： 90.8 ± 8.6 s, CFSD 群： 26.8 ± 3.8 s）、2 日目（Control 群： 107.6 ± 14.3 s, CFSD 群： 20.7 ± 3.1 s）、3 日目（Control 群： 79.8 ± 4.9 s, CFSD 群： 32.9 ± 2.6 s）、4 日目（Control 群： 84.7 ± 6.5 s, CFSD 群： 32.3 ± 2.5 s）と 5 日目（Control 群： 69.9 ± 9.7 s, CFSD 群： 24.8 ± 1.8 s）における CFSD 群の社会相互作用

用時間は Control 群と比較し、有意に短縮した（断眠 1 日目： $p < 0.01$ ，断眠 2 日目： $p < 0.01$ ，断眠 3 日目： $p < 0.001$ ，断眠 4 日目： $p < 0.001$ ，断眠 5 日目： $p < 0.01$ ）。このような結果は、CFSD モデルラットから観察された疲労が中枢性由来であり、社会行動を抑制することを示唆する。

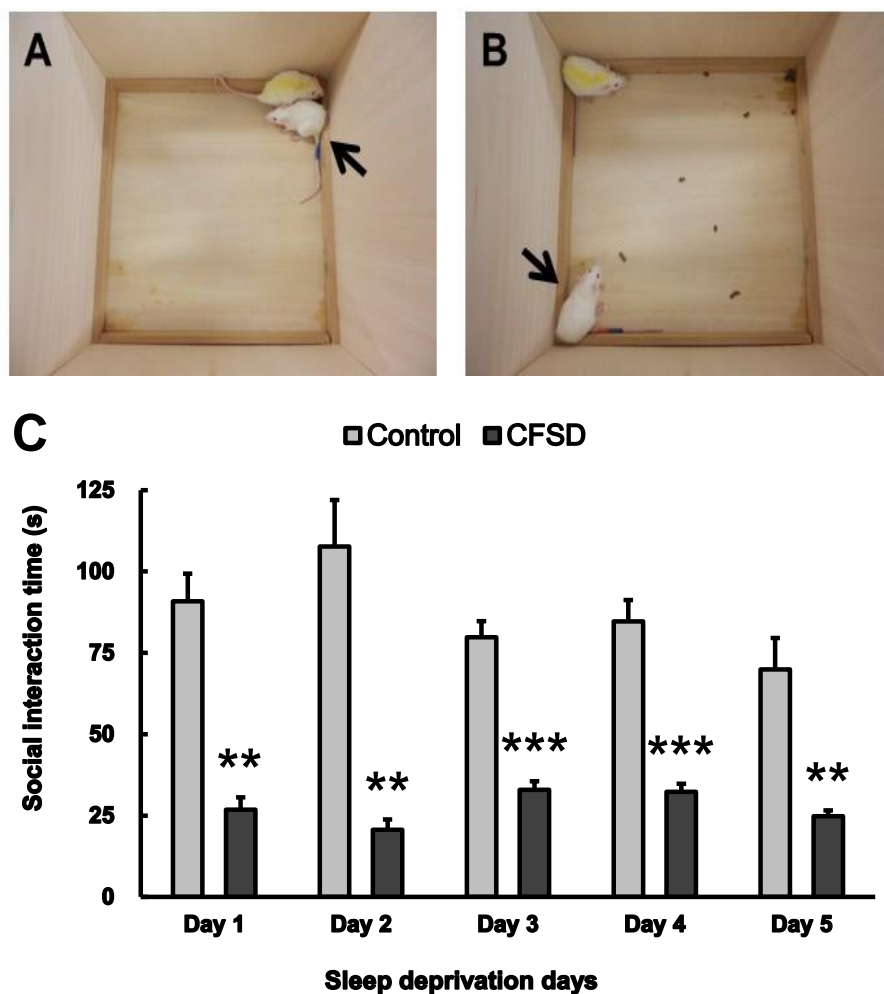


Figure 9. Effect of sleep disturbance on social interaction.

Notes: (A) Normal rat showed a typical social interaction on sleep deprivation day 1, but (B) CFSD rat demonstrated impairment of social interaction. (C) Parameters are expressed as mean \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

睡眠欠乏状態による脳内 Tryptophan と Serotonin 濃度への影響

脳内 Tryptophan 代謝産物を測定するために、ラットは断眠 5 日目に断頭した。Control 群および CFSD 群における脳内各組織 Tryptophan と Serotonin 濃度は Figure 10 に示す。負荷条件を独立変数、Tryptophan と Serotonin 濃度を従属変数にした対応のない t 検定を行った結果、CFSD 群の視床下部と海馬内 Tryptophan 濃度は Control 群と比較し、有意に上昇した (Figure 10A, 視床下部 : $t(4) = 5.29, p < 0.01, d = 4.32$, 海馬 : $t(4) = 4.061, p < 0.05, d = 3.32$)。また、CFSD 群の視床下部と線条体内 Serotonin 濃度は Control 群と比較し、有意に減少した (Figure 10B, 視床下部 : $t(4) = 10.21, p < 0.01, d = 8.34$, 線条体 : $t(4) = 2.96, p < 0.05, d = 2.42$)。このような結果は、CFSD 群の視床下部と海馬内 Tryptophan 濃度は Control 群と比較し、2.5 倍の濃度上昇を呈したが、Serotonin 濃度は上昇しないことを示唆する。

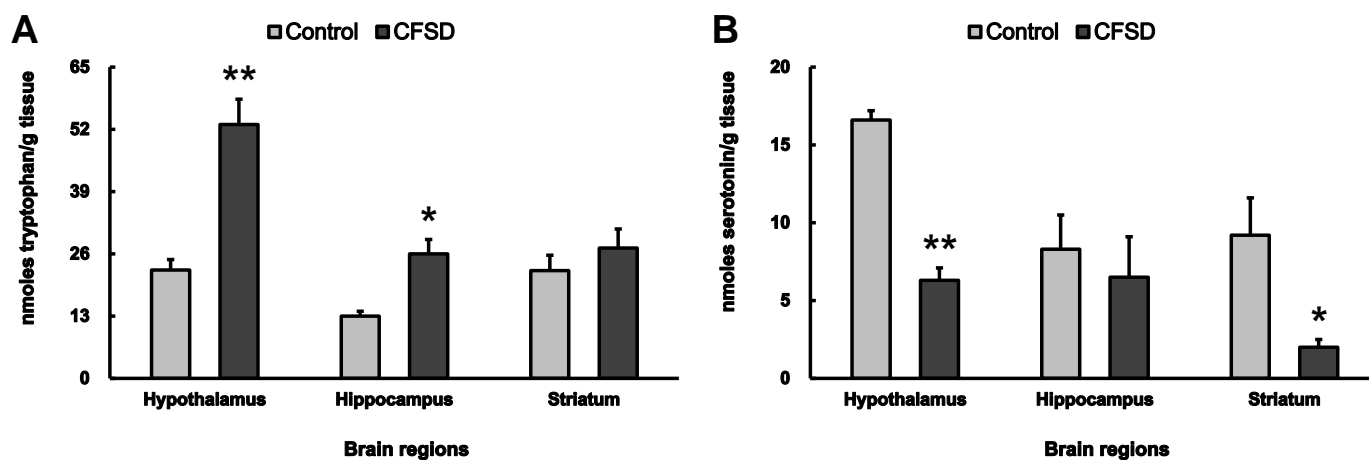


Figure 10. Effect of biological rhythm disturbance on the concentrations of tryptophan and serotonin in several areas of the brain for control and CFSD rats.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2-5. 考察

第 1 研究では Tryptophan の行動薬理的操作をラットに行うことで、脳内 Tryptophan 濃度の上昇傾向と自発的行動量の減少傾向が明らかにされた。次に、特異的な中枢性疲労モデル動物を開発し、内在性 Tryptophan 代謝産物と中枢性疲労との関係性を明らかにしなければならない。第 2 研究では睡眠障害を基盤とした中枢性疲労に特化した CFSD モデル動物を開発し、その神経科学的特性を検討した。

従来の中枢性疲労研究では、トレッドミル走により作製した運動後疲労モデルラットにおいて、Tryptophan の脳内取り込みが Serotonin 生成を亢進した結果、トレッドミルパフォーマンスが抑制される Serotonin 仮説が報告されている (Acworth et al., 1986; Cermak et al., 2012; Melancon et al., 2012; Newsholme & Blomstrand, 2006)。しかしながら、従来の中枢性疲労研究の中心モデルであった運動後疲労モデルラットは末梢性疲労が一部混在する点に問題がある。これに対して、第 2 研究では慢性的な睡眠-覚醒サイクル障害を課すことで、特異的な中枢性疲労モデルを確立した。具体的に CFSD モデルラットにおいて、二つの行動評価により観察された疲労は明らかに中枢性由来 (Figure 8) であり、社会行動の抑制 (Figure 9) を伴うことを明らかにした。このように、CFSD モデルラットは複雑な疲労困憊状態であり、疲労回復にはホームケージでの休息だけでなく、中枢性疲労の誘発因子をブロックするような改善薬を必要とするかもしれない。

さらに CFSD モデルラットを用いて、脳内各組織 (視床下部、海馬、線条体) の Tryptophan と Serotonin 濃度を観察した。その結果、Control 群と比較し、CFSD 群の視

床下部と海馬内 Tryptophan 濃度は 2.5 倍の濃度上昇を呈した (Figure 10A)。このような結果は、運動後疲労モデルラットの視床下部と海馬組織のニューロンシナプス前 Tryptophan 濃度の上昇 (Yamamoto & Newsholme, 2002) と一致する。しかし、CFSD モデルラットにおける線条体内 Tryptophan 濃度の不変性は従来報告 (Blomstrand et al., 1989; Yamamoto et al., 1997; Yamamoto & Newsholme, 2002) と一致しない。このような知見は、CFSD モデルラットが Tryptophan の視床下部と海馬内取り込みの上昇を伴う特異的な中枢性疲労を誘発することを示唆する。さらに、CFSD モデルラットにおいて脳内 Serotonin 濃度は上昇しなかった (Figure 10B)。Serotonin 仮説によると、Tryptophan の脳内取り込みの上昇により Serotonin 生成が亢進することを報告している (Acworth et al., 1986; Cermak et al., 2012; Melancon et al., 2012; Newsholme & Blomstrand, 2006)。即ち、CFSD モデルは Tryptophan 脳内取り込みの亢進を伴うが、Serotonin 生成への亢進は関係しない神経科学特性を有していた。

以上より、第 2 研究から得られた結果は、中枢性疲労の誘発機構として推測される Tryptophan-Kynurenine 代謝経路の重要な役割を示唆する。

第 3 節 <第 3 研究> Tryptophan と Kynurenic acid の同時亢進と中枢性疲労の成因との関係性

3-1. 関連発表

Yamashita & Yamamoto. *International Journal of Tryptophan Research*. 2014: 7, 9-14.

3-2. 目的

第 2 研究では CFSD モデルラットの開発に成功し、CFSD モデルは Tryptophan 脳内取り込みの亢進を伴うが、Serotonin 生成への亢進は関係しない神経科学特性を有することを明らかにした。第 3 研究では中枢性疲労の誘発機構として推測される Kynurenine 代謝経路の可能性を検討するために、CFSD モデルラットを用い、脳内 Tryptophan と Kynurenic acid 動態を観察した。さらに、中枢性疲労からの回復を検討するために、CFSD モデルラットを用い、 β -Endorphin の薬理効果を検討した。

3-3. 実験方法

実験計画

実験は、負荷条件 3 水準（参加者間：Control 群・CFSD 群・CFSD+ β -Endorphin 投与群）と断眠疲労負荷期間 5 水準（参加者内：断眠疲労 1 日目・2 日目・3 日目・4 日目・5 日目）による 2 要因混合計画であった。

実験動物

本実験は日本神経科学学会の「神経科学における動物実験に関する指針」に基づき、また帝塚山大学動物実験倫理委員会の承認を得て、帝塚山大学心理学部神経生理学研究室で行われた。Wistar系雌性ラット(7週齢, 100–120 g, Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan, $n = 15$)はControl群($n = 5$)、CFSD群($n = 6$)およびCFSD+ β -Endorphin投与群($n = 4$)に振り分けた。ラットの飼育環境は第1研究と同様である。

睡眠障害型中枢性疲労モデルの作製

CFSDモデルはYamashita & Yamamoto (2013)の方法に従い、第2研究と同様の方法で作製した。

β -Endorphin 投与

β -Endorphin (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan, 2.5 $\mu\text{g/kg}$)は0.9%の生理食塩水で溶解した。そして断眠疲労1、3、5日目の行動実験開始の30分前に、 β -Endorphinはラットの腹腔内へ投与した。

走運動学習と行動観察

走運動の学習方法、トレッドミルテストおよび社会相互作用テストは、第2研究と同様の方法を用いた。

脳摘出と Tryptophan 代謝産物の定量

脳内 Tryptophan 代謝産物濃度を測定するために、ラットを行動実験終了後に断頭し脳摘出後、視床下部、海馬、大脳辺縁系、線条体、小脳の 5 部位に分けた。脳組織の調製と Tryptophan、Serotonin、5-hydroxyindole acetic acid の測定は第 1 研究と同様の方法を用いた。視床下部、海馬、線条体内 Kynurenic acid 濃度は Pocivavsek, Wu, Elmer, Bruno, & Schwarcz (2012) と Swartz, Matson, MacGarvey, Ryan, & Beal (1990) の方法を参考とし、蛍光検出器 (Nanospace S1-3, 3013, Shiseido, Japan) に接続した HPLC を用いて測定した。蛍光検出器は励起波長 344 nm および蛍光波長 398 nm に合わせ、クロマトレコーダー (C-R8A, Shimadzu, Japan) をセットした。分析方法は、第 1 研究と同様の方法を用いた。なお、流速は 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、カラム恒常槽は 40°C に設定した。

3-4. 結果

断眠疲労による精神運動機能の抑制と β -Endorphin の薬理効果

各群におけるトレッドミルテストのランニング遂行率の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件 (3 水準: Control 群、CFSD 群、CFSD+ β -Endorphin 投与群) と断眠疲労負荷期間 (5 水準: 断眠疲労負荷 1-5 日間) の 2 要因分散分析を行った (Figure 11)。負荷条件と断眠疲労負荷期間のそれぞれで有意な主効果が認められた (負荷条件: $F(2, 8) = 6.59, p = 0.02, \eta_p^2 = 0.62$, 断眠疲労負荷期間: $F(3.88, 31.02) = 3.021, p = 0.034, \eta_p^2 = 0.27$)。また、有意な交互作用が認められた ($F(7.75, 31.02) = 2.74, p = 0.022, \eta_p^2 = 0.40$)。単純

主効果検定の結果、断眠 3 日目における CFSD 群のトレッドミルパフォーマンスは Control 群と比較し、抑制傾向であった ($p = 0.058$)。また、断眠 5 日目における CFSD 群のトレッドミルパフォーマンスは Control 群および CFSD+ β -Endorphin 投与群と比較し、有意に抑制した (Control 群 vs. CFSD 群 : $p < 0.001$, CFSD 群 vs. CFSD+ β -Endorphin 投与群 : $p < 0.001$)。さらに、CFSD+ β -Endorphin 投与群のトレッドミルパフォーマンスは Control 群と比較し、抑制傾向であった ($p = 0.059$)。

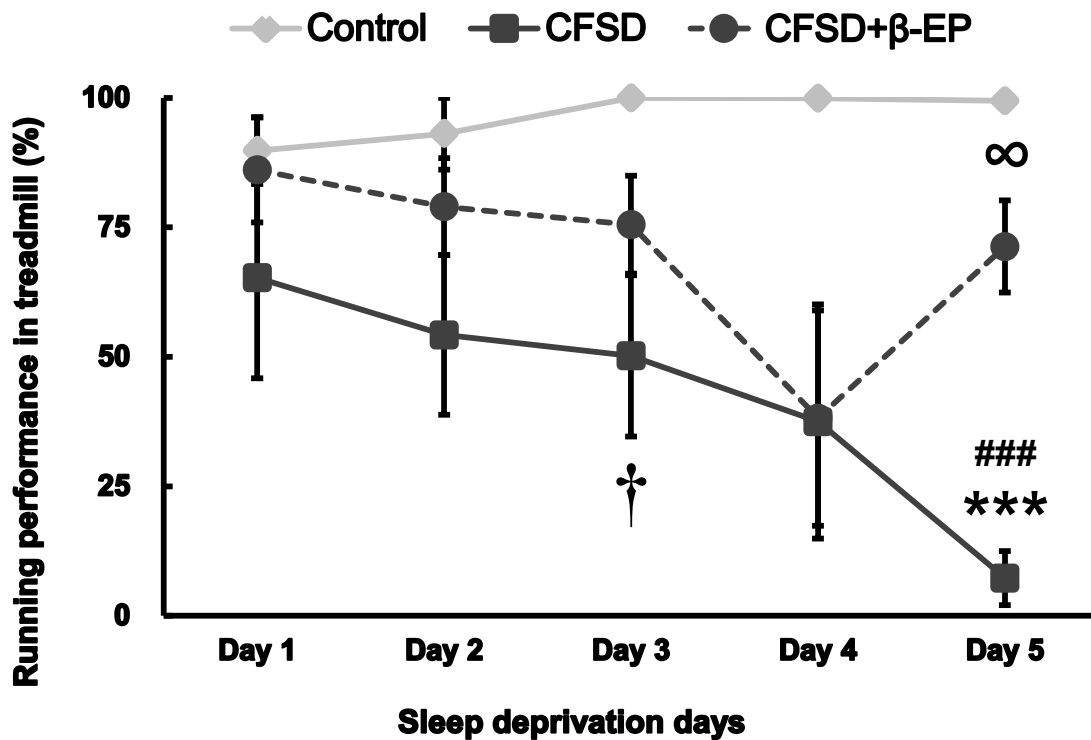


Figure 11. Effect of sleep disorder on running performance.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM. Control versus CFSD: $\dagger p < 0.10$, $*** p < 0.001$, CFSD versus CFSD+ β -Endorphin: $### p < 0.001$, control versus CFSD+ β -Endorphin: $\infty p < 0.10$.

断眠疲労による社会行動の抑制と β -Endorphin の薬理効果

各群における社会相互作用時間の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件（3 水準：Control 群、CFSD 群、CFSD+ β -Endorphin 投与群）と断眠疲労負荷期間（5 水準：断眠疲労負荷 1-5 日間）の 2 要因分散分析を行った（Figure 12）。負荷条件に有意な主効果が認められた（ $F(2, 8) = 24.54, p < 0.001, \eta_p^2 = 0.86$ ）。また、有意傾向の交互作用が認められた（ $F(8.00, 32.00) = 1.99, p = 0.079, \eta_p^2 = 0.33$ ）。単純主効果検定の結果、断眠 1 日目における CFSD 群の社会相互作用時間は Control 群および CFSD+ β -Endorphin 投与群と比較し、有意に短縮した（Control 群 vs. CFSD 群： $p < 0.001$, CFSD 群 vs. CFSD+ β -Endorphin 投与群： $p = 0.009$ ）。断眠 2 日目における CFSD 群の社会相互作用時間は Control 群および CFSD+ β -Endorphin 投与群と比較し、有意に短縮した（Control 群 vs. CFSD 群： $p = 0.001$, CFSD 群 vs. CFSD+ β -Endorphin 投与群： $p = 0.013$ ）。断眠 3 日目における CFSD 群の社会相互作用時間は Control 群および CFSD+ β -Endorphin 投与群と比較し、短縮傾向であった（Control 群 vs. CFSD 群： $p = 0.071$, CFSD 群 vs. CFSD+ β -Endorphin 投与群： $p = 0.083$ ）。断眠 4 日目における CFSD 群の社会相互作用時間は Control 群および CFSD+ β -Endorphin 投与群と比較し、有意に抑制した（Control 群 vs. CFSD 群： $p = 0.006$, CFSD 群 vs. CFSD+ β -Endorphin 投与群： $p = 0.026$ ）。断眠 5 日目における CFSD 群の社会相互作用時間は CFSD+ β -Endorphin 投与群と比較し、有意に抑制した（ $p = 0.015$ ）。このような結果は CFSD モデルラットが複雑な疲労困憊状態であり、それは β -Endorphin 投与により改善された。

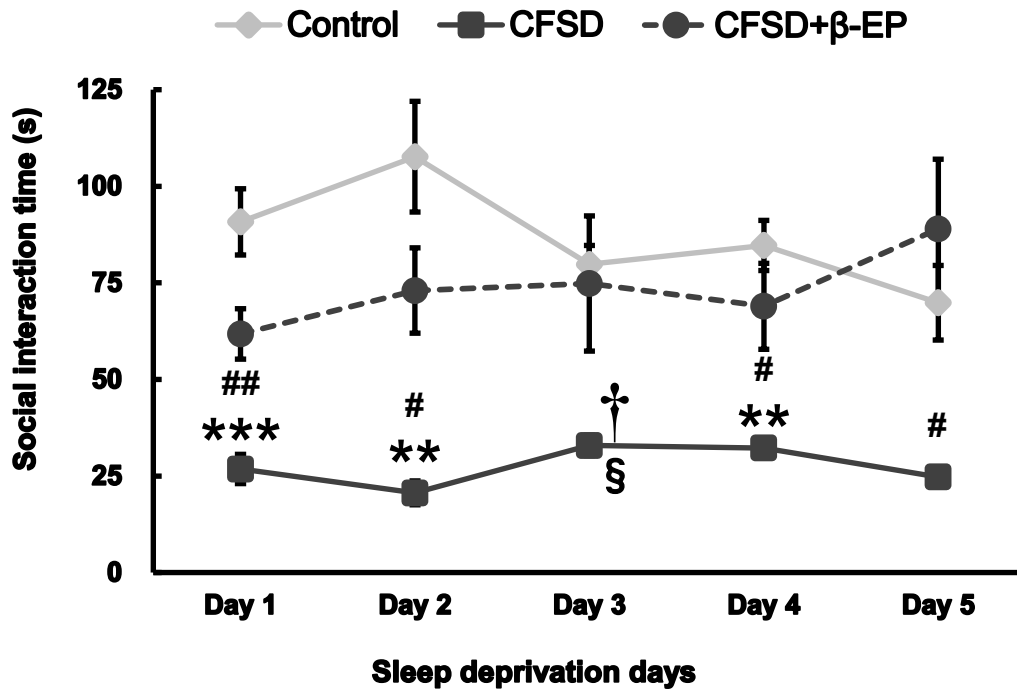


Figure 12. Effect of sleep disorder on social interaction.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM. Control versus CFSD: † $p < 0.10$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, CFSD versus CFSD+β-Endorphin: § $p < 0.10$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$.

断眠疲労による Tryptophan と Kynurenic acid 濃度の増幅効果

各群における脳内各組織の Tryptophan 代謝産物濃度の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件を独立変数、Tryptophan、Serotonin、5-hydroxyindole acetic acid 濃度を従属変数にした対応のない t 検定を行った (Table 5)。その結果、CFSD 群の視床下部と海馬内 Tryptophan 濃度は Control 群と比較し、有意に上昇した (視床下部: $t(4) = 5.29$, $p = 0.006$, $d = 4.32$, 海馬: $t(4) = 4.061$, $p = 0.015$, $d = 3.32$)。CFSD 群の大脳辺縁系内 Tryptophan 濃度は Control 群と比較し、上昇傾向であった ($t(4) = 2.77$, $p = 0.05$, $d = 2.26$)。また、CFSD 群の視床下部、線条体と小脳内 Serotonin 濃度は Control 群と比較し、有意

に減少した（視床下部： $t(4) = 10.21$, $p = 0.001$, $d = 8.34$, 線条体： $t(4) = 2.96$, $p = 0.041$, $d = 2.42$, 小脳： $t(4) = 3.55$, $p = 0.024$, $d = 2.90$ ）。さらに、CFSD 群の視床下部と大脳辺縁系内 5-hydroxyindole acetic acid 濃度は Control 群と比較し、上昇傾向であった（視床下部： $t(4) = 2.47$, $p = 0.069$, $d = 2.02$, 大脳辺縁系： $t(4) = 2.57$, $p = 0.062$, $d = 2.09$ ）。

Table 5. Effect of biological rhythm disturbance on the concentrations (nmol/g tissue) of tryptophan, serotonin, and 5-hydroxyindole acetic acid in several regions of the brain for control and CFSD rats.

Brain regions	Group	Tryptophan metabolite concentrations [nmol/g tissue]		
		Tryptophan	Serotonin	5-hydroxyindole acetic acid
Hypothalamus	Control	22.6 ± 2.2	16.6 ± 0.6	11.6 ± 4.1
	CFSD	53.0 ± 5.3 **	6.3 ± 0.8 **	25.1 ± 3.7 †
Hippocampus	Control	13.0 ± 1.0	8.3 ± 2.2	12.5 ± 1.3
	CFSD	26.0 ± 3.0 *	6.5 ± 2.6	19.2 ± 5.3
Limbic system	Control	11.8 ± 2.1	6.7 ± 1.7	7.5 ± 2.2
	CFSD	29.6 ± 6.1 †	5.9 ± 2.6	14.9 ± 1.9 †
Striatum	Control	22.5 ± 3.2	9.2 ± 2.4	12.0 ± 1.6
	CFSD	27.2 ± 4.0	2.0 ± 0.5 *	16.2 ± 2.1
Cerebellum	Control	9.1 ± 2.3	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.4
	CFSD	9.7 ± 1.3	0.4 ± 0.01 *	1.0 ± 0.01

Notes: Parameters are expressed as mean ± SEM. † $p < 0.10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

次に、各群における脳内各組織の Kynurenic acid 濃度の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件を独立変数、Kynurenic acid 濃度を従属変数にした対応のない t 検定を行った (Figure 13)。その結果、CFSD 群の視床下部と海馬内 Kynurenic acid 濃度は Control 群と比較し、有意に上昇した (視床下部 : $t(9) = 8.4$, $p < 0.001$, $d = 5.05$, 海馬 : $t(9) = 3.6$, $p = 0.006$, $d = 2.17$)。このような結果は、CFSD 群の視床下部と海馬内 Tryptophan および Kynurenic acid 濃度が Control 群と比較し、2.5–5 倍の上昇を呈することを示唆する。

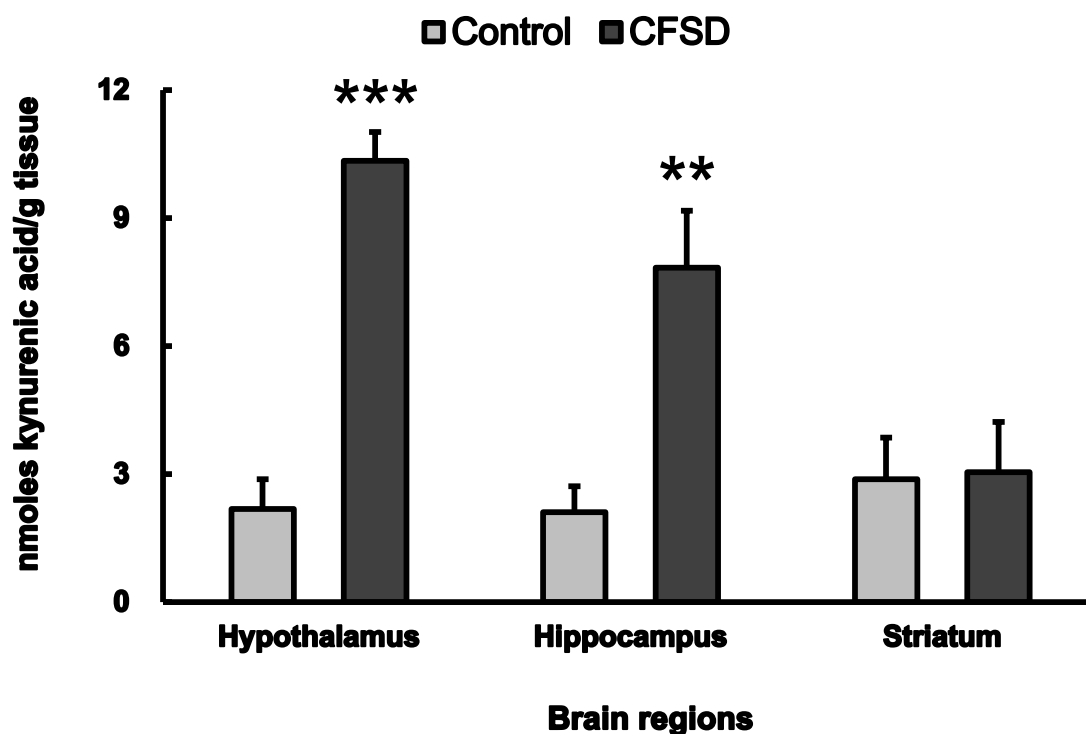


Figure 13. Kynurenic acid concentration in several regions of the brain for control and CFSD rats.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3-5. 考察

第 2 研究では CFSD モデルラットの開発に成功し、CFSD モデルは Tryptophan 脳内取り込みの亢進を伴うが、Serotonin 生成への亢進は関係しない神経科学特性を有することを明らかにした。第 3 研究では中枢性疲労の誘発機構として推測される Kynurenine 代謝経路の可能性を検討するために、CFSD モデルラットを用い、脳内 Tryptophan と Kynurenic acid 動態を観察した。さらに、中枢性疲労からの回復を検討するために、CFSD モデルラットを用い、 β -Endorphin の薬理効果を検討した。まず、Control 群と比較し、CFSD 群の視床下部や海馬の限定的な部位にのみ、Tryptophan 濃度の有意な上昇を呈したが、Serotonin 生成は亢進しなかった (Table 5)。ところが、CFSD 群の視床下部や海馬内 Kynurenic acid 濃度は Control 群と比較し、有意な濃度上昇を呈した (Figure 13)。このように、CFSD モデルが視床下部や海馬において、特異的な Tryptophan 取り込みと Kynurenic acid 生成の亢進を誘導することを示唆する。

また、視床下部は社会認知記憶、社会行動機能を担う (Dombret, Nguyen, Schakman, Michaud, Hardin-Pouzet, Bertrand, & De Backer, 2012; Lopatina, Inzhutova, Salmina, & Higashida, 2012)。電気生理学的に、Tryptophan 濃度の上昇は縫線核ニューロンの発火を抑制する (Gallager & Aghajanian, 1976)。従って、CFSD モデルにおける Tryptophan レベルの上昇もまた、縫線核ニューロンから入力される視床下部や海馬での神経発火を抑制しているかもしれない。さらに薬理的に、脳内 Kynurenic acid レベルの上昇はアンタゴニストとして NMDA および $\alpha 7$ nACh 受容体機能を抑制し、グルタミン酸レベル

を減少させる (Hilmas et al., 2001; Schwarcz & Pellicciari, 2002; Wu, Pereira, Bruno, Pellicciari, Albuquerque, & Schwarcz, 2010)。グルタミン酸レベルの低下は記憶学習機能の抑制 (Curzon, Anderson, Nikkel, Fox, Gopalakrishnan, Decker, & Bitner, 2006)、トレッドミルパフォーマンスの低下 (Yamamoto et al., 2012)、社会行動の障害 (Iaccarino, Suckow, Xie, & Bucci, 2013) に関連した認知・社会機能障害を生起する。従って、CFSD モデルの Kynurenic acid レベルの上昇とそれに伴うグルタミン酸レベルの抑制は、視床下部機能を中心とした社会認知 (Figure 12) や精神運動 (Figure 11) における認知機能不全の根底をなすかもしれない。このように、Tryptophan 脳内取り込みの上昇と Kynurenic acid 生成の亢進が中枢性疲労における増幅効果を生起することを示唆する。さらに疲労における Kynurenic acid の役割について、Coppola et al. (2012) は Tryptophan 高含量摂取のラットに分枝鎖アミノ酸を投与した結果、脳内 Kynurenic acid 濃度の上昇を抑制することを報告している。即ち、中枢性疲労により誘発された認知機能不全における Tryptophan-Kynurenine 経路の重要な役割を定義する直接的な証拠となる。

さらに、CFSD モデルラットは複雑な疲労困憊状態であり (Figures 11 & 12)、疲労回復にはホームケージでの休息だけでなく、中枢性疲労の誘発因子をブロックするような改善薬を必要とするかもしれない。それゆえ、中枢性疲労からの回復を検討するために、 β -Endorphin を用いた。その結果、 β -Endorphin は CFSD により誘発した精神運動機能や社会機能の抑制を改善した (Figures 11 & 12)。脳内で生成される β -Endorphin は心理的ストレスや疲労を相殺するような役割を持つことが報告されているが (見正・林・柴田・

吉武・西嶋・森谷, 1996; Sforzo, 1989)、末梢由来の β -Endorphin は血液脳関門を通過することができない。しかし、心理的ストレスや疲労は血液脳関門の透過性を上昇させるため (Esposito, Gheorghe, Kandere, Pang, Connolly, Jacobson, & Theoharides, 2001; Friedman, Kaufer, Shemer, Hendler, Soreq, & Tur-Kaspa, 1996)、本研究結果における末梢由来の β -Endorphin は血液脳関門を通過することができるかもしれない (Figures 11 & 12)。さらに、CFSD モデルラットにおいて、大脳辺縁系を中心とした脳組織での Tryptophan 取り込みの上昇が認められている (Table 5)。末梢由来の Tryptophan は通常あるいは疲労時、システム L-トランスポーターを利用することで血液脳関門を通過し、脳内に取り込まれる。しかし、心理的ストレスや疲労が血液脳関門の透過性を上昇させるように (Esposito et al., 2001; Friedman et al., 1996)、Tryptophan はシステム L-トランスポーターを利用することなく、脳内に直接侵入することができるかもしれない。即ち、CFSD モデルラットでは血液脳関門機能が抑制することで透過性が上昇し、あらゆる物質が脳内に侵入する可能性を示唆する。このように CFSD モデルラットにおいて、末梢由来の β -Endorphin は大脳辺縁系-視床下部領域に作用し、疲労の閾値を上昇させた結果、精神運動や社会認知機能を改善する可能性を示唆する。

今後の検討課題として、末梢で増加した Kynurenine 自体が脳内 Kynurenic acid 生成を導くことで中枢性疲労の引き金となるのかを明らかにする必要がある。

第 4 節 <第 4 研究> Kynurenine の行動薬理学的操作による空間認知記憶の成立過程の検討

4-1. 目的

第 3 研究では、Tryptophan と Kynurenic acid の増幅効果が中枢性疲労の誘発機構に関与することを明らかにした。次に、末梢に存在する Kynurenine 自体が脳内 Kynurenic acid 生成を導き、中枢性疲労の引き金となるのかを明らかにする必要がある。第 4 研究では、Kynurenine の行動薬理学的操作をラットに行うことで、脳内 Kynurenic acid 動態の変化と空間認知記憶の獲得および想起過程との関係性を検討した。

4-2. 実験方法

実験計画

記憶獲得実験は、薬理効果条件 2 水準（参加者間：Vehicle 投与群・L-kynurenine 投与群）と記憶獲得訓練期間 11 水準（参加者内：獲得訓練 1-11 日目）による 2 要因混合計画であった。プローブテストは、投薬日条件 5 水準（参加者間：Vehicle 投与 1 日目・L-kynurenine 投与 2 日目・Vehicle 投与 3 日目・L-kynurenine 投与 4 日目・Vehicle 投与 5 日目）の 1 要因実験参加者間計画であった。

実験動物

本実験は日本神経科学学会の「神経科学における動物実験に関する指針」に基づき、また帝塚山大学動物実験倫理委員会の承認を得て、帝塚山大学心理学部神経生理学研究室で行われた。SD 系雌性ラット（20 週齢, 200–210 g, Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan, $n = 10$ ）は Vehicle 投与群（ $n = 5$ ）および L-kynurenine 投与群（ $n = 5$ ）に振り分けた。ラットの飼育環境は第 1 研究と同様である。

薬理投与

投与薬物により 2 群設定した。即ち、L-kynurenine (100 mg/kg) または Vehicle (Phosphate buffered saline) の腹腔内慢性投与（訓練テスト：11 日間、プローブテスト：5 日間）を開始し、投与完了の 90 分後に Morris 型水迷路課題を行った。なお、2 群間の記憶獲得成績に有意差が認められないため、プローブテストでは両群に Vehicle または L-kynurenine の投与を 1 日毎に繰り返した（Figure 14）。

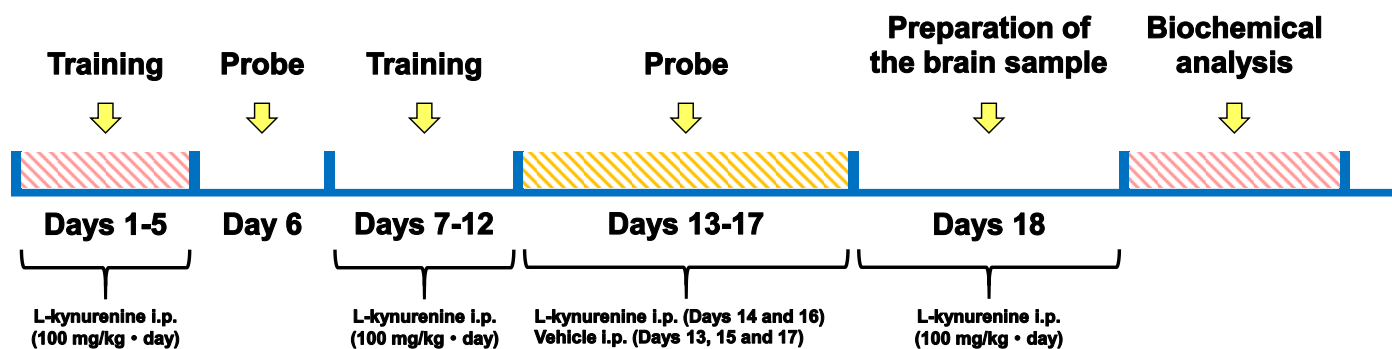


Figure 14. Experimental schedule.

Morris 型水迷路課題

空間認知記憶の獲得と想起は Morris 型水迷路課題を用いて測定した。本装置は、ポリエステル製円形プール（147 cm × 43 cm）とプラスチック製円柱型プラットフォーム（12 cm × 25 cm）を使用し、プラットフォームから 1 cm の高さまで水を張った。視覚的な空間手掛かりには 2 種類の四角柱（赤色：12.5 cm × 17.5 cm × 26 cm、青緑色：30.5 cm × 23 cm × 23.5 cm）、ポリエチレン製袋（水色：23 cm × 43 cm × 15 cm）、提灯（白色：25 cm）を用い、実験室内の四方に設置した。行動観察は円形プール上に設置された観察用カメラ（VAS/CAD, MUROMACHI KIKAI CO., LTD.）で撮影し、解析はビデオトラッキングシステム（CompACT VAS Ver. 3.19）を用いた。

訓練テストとプローブテスト

訓練は、プール内の一定の位置にあるプラットフォームを探索させる場所課題（11 日間 × 4 試行）であった。訓練はラットに薬理投与処置の 90 分後、水迷路内を探索させた。ラットが水面下のプラットフォームに到達した時、プラットフォームの空間位置学習を 10 秒間課し、これを 1 試行とした。ラットが 60 秒経過してもプラットフォームに到達できない場合、ラットを強制的にプラットフォームに移動させ、10 秒間の空間位置学習を課した。プラットフォームの位置は 4 箇所設定し、4 試行 1 ブロックとして、ブロック内の 4 試行のスタート位置はカウンターバランスした。なお、試行間隔は 30 分とし、逃避潜時を測定した。

プローブテストはプラットホームを取り除いたプール内を 60 秒間自由遊泳させ、訓練時にプラットホームが存在した四分円の目標像限時間と横切り回数を計測した。

脳摘出と Kynurenic acid の定量

脳内 Kynurenic acid 濃度を測定するために、ラットを薬理実験終了後に断頭致死し、海馬を摘出した。脳組織の調製と Kynurenic acid 濃度の測定は、第 1・3 研究と同様の方法を用いた。

4-3. 結果

Morris 型水迷路課題における空間認知記憶の獲得過程の検討

各群における Morris 型水迷路課題の記憶獲得訓練成績の平均値と標準誤差を算出し、薬理効果条件（2 水準：Vehicle 投与群、L-kynurenine 投与群）と記憶獲得訓練期間（11 水準：獲得訓練 1-11 日間）の 2 要因分散分析を行った（Figure 15）。記憶獲得訓練期間に有意な主効果が認められた（ $F(10, 80) = 8.50, p < 0.001$ ）。多重比較の結果、獲得訓練 1 日目の逃避潜時は 8-12 日目以降の逃避潜時と比較し、有意に延長した。

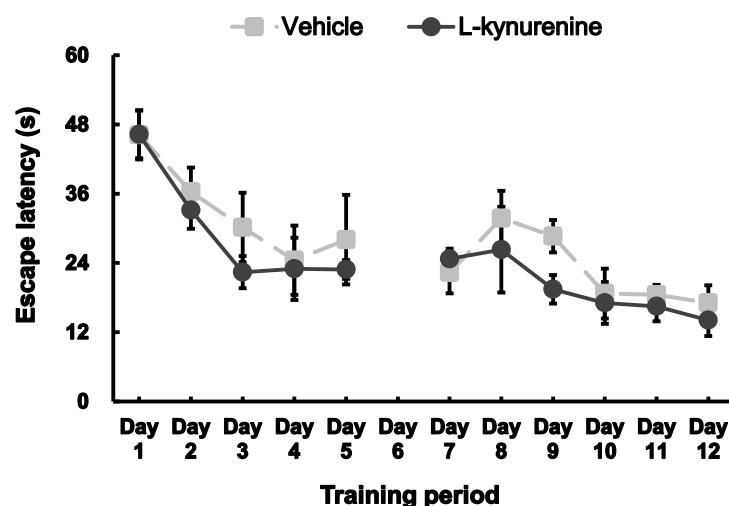


Figure 15. Effect of kynurenine injection on training test for Morris water maze.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM.

Morris 型水迷路課題における空間認知記憶の想起過程の検討

Morris 型水迷路課題の記憶獲得訓練成績において、薬理効果条件に有意な主効果が認められないため、プローブテストでは両群に Vehicle または L-kynurenine 投与を 1 日毎に繰り返した。各投与日における想起成績の平均値および標準誤差を算出し、投薬日条件を独立変数、目標像限時間とプラットホーム横切り回数を従属変数にした 1 要因分散分析を行った (Figure 16)。まず、目標像限時間における投薬日に有意な主効果が認められた ($F(4, 36) = 4.45, p < 0.05$)。多重比較の結果、1 日目の目標像限時間は 3 日目よりも有意に短く、2 日目の目標像限時間は 3 日目よりも有意に短く、4 日目の目標像限時間は 3 日目よりも有意に短く、5 日目の目標像限時間は 3 日目よりも有意に短かった (Figure 16A)。

次に、プラットホーム横切り回数における投薬日に有意な主効果が認められた ($F(4,$

36) = 3.24, $p < 0.05$)。多重比較の結果、2 日目のプラットホーム横切り回数は 1 日目と 3 日目よりも有意に減少した (Figure 16B)。このような結果は L-kynurenine 末梢投与により、保持した空間認知記憶の想起の抑制 (Figure 16A) と想起の不正確性 (Figure 16B) を誘発することを示唆する。

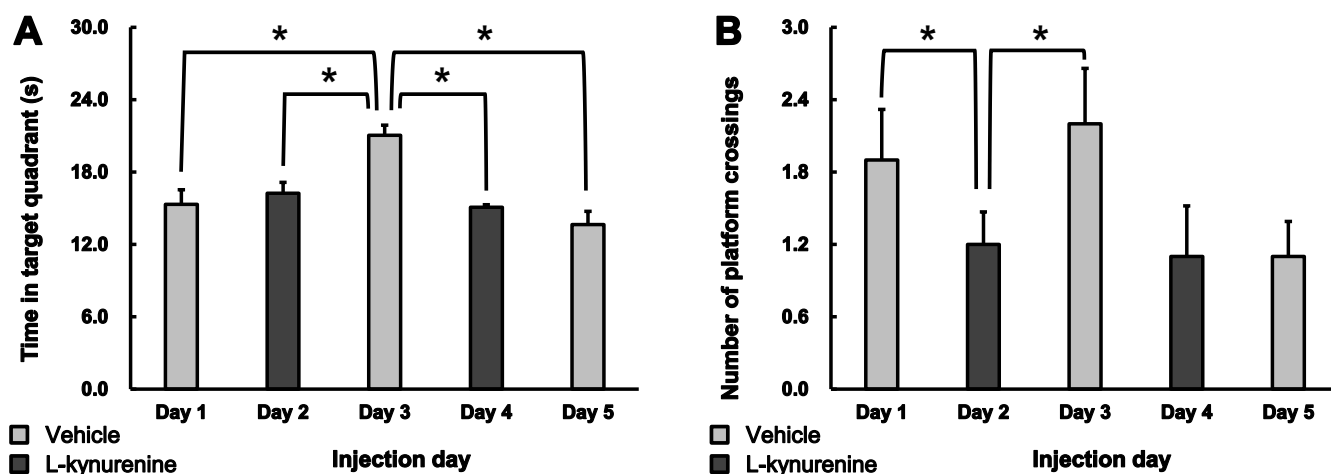


Figure 16. Effect of kynurenine injection on probe test for Morris water maze.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

海馬内 Kynurenic acid 動態の検討

各群における海馬内 Kynurenic acid 濃度の平均値と標準誤差を算出し、薬理効果条件を独立変数、Kynurenic acid 濃度を従属変数にした対応のない t 検定を行った (Figure 17)。その結果、L-kynurenine 投与群の海馬内 Kynurenic acid 濃度は Vehicle 投与群と比較し、有意に上昇した ($t(8) = 5.97$, $p < 0.05$)。即ち、L-kynurenine の末梢投与が海馬内 Kynurenic acid 生成を亢進することを示唆する。

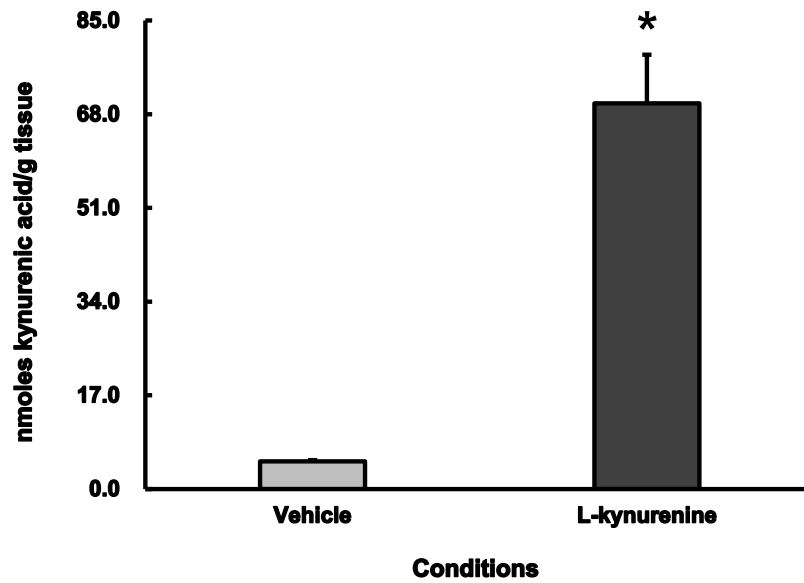


Figure 17. Effect of kynurenine injection on the concentration of kynurenic acid in the hippocampus.

Notes: Parameters are expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$.

4-4. 考察

第3研究では、TryptophanとKynurenic acidの増幅効果が中枢性疲労の誘発機構に関与することを明らかにした。次にTryptophanだけでなく、末梢に存在するKynurenine自体が脳内Kynurenic acid生成を導き、中枢性疲労の引き金となるのかを明らかにする必要がある。第4研究ではKynurenineの行動薬理的操作をラットを行うことで、脳内Kynurenic acid動態の変化と空間認知記憶の獲得および想起過程との関係性を検討した。まず、Morris型水迷路課題の空間認知記憶の獲得訓練成績において、L-kynurenine投与群はVehicle投与群と比較し、逃避潜時に有意差は認められなかった (Figure 15)。しかし、プローブテストにおいて、2日目のL-kynurenine投与時の目標像限時間は3日目のVehicle投与時よりも有意に短く、4日目のL-kynurenine投与時の目標像限時間は

3 日目の Vehicle 投与時よりも有意に短かった (Figure 16A)。また、2 日目の L-kynurenine 投与時のプラットホーム横切り回数は 1 日目と 3 日目の Vehicle 投与時よりも有意に減少した (Figure 16B)。このような結果は L-kynurenine の末梢投与により、保持した空間認知記憶の想起の抑制 (Figure 16A) と想起の不正確性 (Figure 16B) を誘発することとを示唆する。さらに、海馬内 Kynurenic acid 含量を測定した結果、L-kynurenine 投与群は Vehicle 投与群と比較し、15 倍の有意な濃度上昇を呈した (Figure 17)。即ち、本研究結果は L-kynurenine の末梢投与が海馬内 Kynurenic acid 生成を亢進し、それは保持した空間認知記憶の想起の抑制と関連することとを示唆する。

脳内疲労物質 Tryptophan は二つの代謝経路を持ち、その 5% が Serotonin 経路、95% が Kynurenine 経路に代謝される (Schwarcz & Pellicciari, 2002)。また、脳内 Kynurenine の 40% が中枢神経系で生成され、残りの 60% は末梢に起源を持つ (Gal & Sherman, 1978; Wu, Nicolazzo, Wen, Chung, Stankovic, Bao, Lim, Brew, Cullen, & Guillemin, 2013)。さらに、Kynurenine が血液脳関門を急速に通過することも報告されている (Gal & Sherman, 1978; Wu et al., 2013)。そして、Kynurenine は二つの代謝経路を持ち、Kynurenine アミノ基転移酵素 (Kynurenine aminotransferase, KATs) により触媒反応した Kynurenic acid 生成が最初に誘導される (Schwarcz, Bruno, Muchowski, & Wu, 2012)。生成された Kynurenic acid は NMDA および $\alpha 7$ nACh 受容体アンタゴニストとして作用し、多くの神経免疫疾患や神経変性疾患の病理生理的状態において重要な役割を担う (Baran, Jellinger, & Deicke, 1999; Coppola et al., 2012; Pocivavsek et al., 2012; Wu et al., 2013;

Yamashita & Yamamoto, 2014)。さらに、脳内 Kynurenic acid 生成の亢進を誘導する経路として、本研究結果以外に、末梢由来 Tryptophan の脳内移行により生じることも報告されている (Coppola et al., 2012; Kim et al., 2015; Schwarcz & Pellicciari, 2002; Yamamoto et al., 2012; Yamashita & Yamamoto, 2014)。即ち、末梢由来の Kynurenine と Tryptophan の脳内取り込みにより、脳内 Kynurenic acid 生成が亢進し、その三者間の増幅効果が中枢性疲労の病理的疲労状態に関与し、認知機能不全のトリガーとなることが推測される。

今後の検討課題として、Tryptophan と Kynurenine がどのような疲労認知回路で中枢性疲労を誘発しているのか、末梢-中枢連関の特性を含めて解明する必要がある。

第 5 節 <第 5 研究> 生体システムにおける Tryptophan 感受性と中枢性／精神性疲労のグリア-ニューロン回路

5-1. 関連発表

Yamashita & Yamamoto. *Proceeding of the 33rd International Australasian Winter Conference on Brain Research*. 2015: 33, 64.

5-2. 目的

第 4 研究では L-kynurenine の末梢投与が海馬内 Kynurenic acid 生成を亢進し、それは保持した空間認知記憶の想起の抑制と関連することを明らかにした。次に、脳に移行し、過剰状態にある Tryptophan と Kynurenine がどのような疲労認知回路で中枢性疲労を誘発しているのか、末梢-中枢連関の特性を含めて解明する必要がある。第 5 研究では、CFSD モデルラットを用い、末梢中 Tryptophan と Kynurenine 動態の変化を観察した。また、オリゴデンドロサイトとニューロンシナプス前 Tryptophan および Monoamine とそれらの代謝産物動態の変化を観察し、認知機能との関係性を検討した。

5-3. 実験方法

実験計画

実験は、負荷条件 2 水準（参加者間：Control 群・CFSD 群）と断眠疲労負荷期間 3 水準（参加者内：断眠疲労 1 日目・3 日目・5 日目）による 2 要因混合計画であった。

実験動物

本実験は日本神経科学学会の「神経科学における動物実験に関する指針」に基づき、また帝塚山大学動物実験倫理委員会の承認を得て、帝塚山大学心理学部神経生理学研究室で行われた。Wistar 系雌性ラット（7 週齢，100–150 g, Japan SLC Inc., Hamamatsu, Japan, $n = 33$ ）は Control 群（ $n = 14$ ）および CFSD 群（ $n = 19$ ）に振り分けた。ラットの飼育環境は第 1 研究と同様である。

睡眠障害型中枢性疲労モデルの作製

CFSD モデルは Yamashita & Yamamoto（2013）の方法に従い、第 2 研究と同様の方法で作製した。

高架式一字迷路課題

本試験は不安・衝動的行動を指標とした高架式十字迷路課題をモデルに応用・改変し、使用した。高架式一字迷路課題を用いた最近の研究において、袴田・山本（2014）は

NAR における衝動的行動の増大を報告している。

高架式一字迷路は地上から 50 cm の高さに設置し、壁のないオープンアーム (60 cm)、あるいはそうでないエンクローズドアーム (60 cm) の 2 本で構成されている。高架式一字迷路課題は断眠 1、3 および 5 日目において 10 分間、実施した (Figure 18)。

Y 字迷路課題

本試験は、迷路装置内を探索させた際に認められる自発的交替行動を短期記憶として評価し、具体的に海馬機能に依存した注意を伴う空間作業記憶や多動性を指標とする (袴田・山本, 2014; Shipton, El-Gaby, Apergis-Schoute, Deisseroth, Bannerman, Paulsen, & Kohl, 2014)。

本装置は正三角形の板 (15 cm) を中心に、3 本のアーム (60 cm × 15 cm × 40 cm) を結合し、角度は全て 120°で構成されている。測定条件として、1 つのアームにラットの 4 本の足が侵入した時、それをアーム侵入の定義とした。ラットは何れかのアーム末端に配置し、3 つの異なるアームに連続した侵入行動 (交替行動) を断眠 1、3 および 5 日目において 8 分間、観察した (Figure 18)。

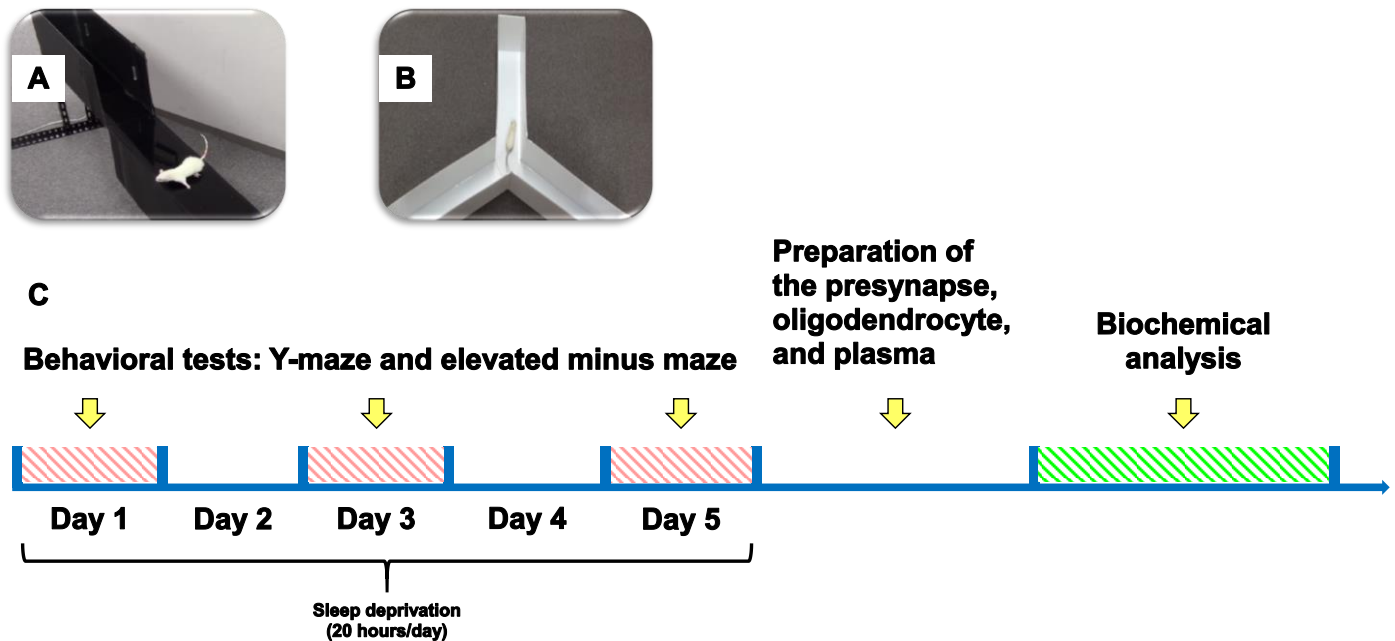


Figure 18. Experimental schedule.

血中 Tryptophan と Kynurenine の定量

ラットは断頭により致死し、血清は 25 μ L の 0.15% EDTA-2Na を含むマイクロチューブにおいて採集した。血清は上清と血液細胞を分離するために、300 g \times 15 分間の遠心分離を行った。得られた上清は分析まで -80°C で凍結保存した。分析時、100 μ L の血清には 25 μ L の 6% Perchloric acid を添加し、12,000 g \times 10 分間の遠心分離を行った。20 μ L の上清は HPLC に注入した。

Yamamoto et al. (1997) の分析方法を参考にし、Tryptophan の定量は第 1 研究と同様の方法で行った。Tryptophan の保持時間は約 17 分であった。Pocivavsek et al. (2012) の分析方法を参考にし、Kynurenine の定量は 250 mM Zinc acetate、50 mM Sodium acetate、3% Acetonitrile (Acetic acid により pH 6.2 に調整) を含めた移動相を用い、流速 500

$\mu\text{L}/\text{min}$ の下、5- μM Kinetex EVO C18 カラム (150 mm \times 4.6 mm, Phenomenex, USA) から分析した。また、Kynurenine は蛍光化学的に検出した (Excitation: 365 nm; Emission: 480 nm; Nanospace SI-2 3001, Shiseido, Japan)。Kynurenine の保持時間は約 5 分であった。

ニューロンシナプトゾーム内 Tryptophan と Monoamine 代謝産物の定量

ラットは断頭により致死し、素早く脳を摘出した。脳は氷で覆われたシャーレ上で Glowinski & Iversen (1966) の方法を一部改変し、視床下部、海馬、大脳皮質、線条体、小脳および延髄を摘出した。各組織は 320 mM Sucrose (5 mM Tris buffered saline により pH 7.4 に調整) を添加し、Potter 型テフロンホモジェナイザーにより 10 回ストロークした。得られたホモジネートは 1,000 g \times 10 分間の遠心分離を行い、さらにその上清のみを 15,000 \times 30 分間で遠心分離した。その後、沈殿物に 320 mM Sucrose を添加し、15,000 \times 5 分間の遠心後、Krebs-Henseleit buffer (125 mM Sodium chloride, 3 mM Potassium chloride, 1.2 mM Calcium chloride, 1.2 mM Magnesium sulfate, 1 mM Sodium dihydrogenphosphate, 22 mM Sodium bicarbonate, 1 mM D-Glucose による組成) により再懸濁した (P_2 フラクション)。再懸濁後、250 μL の 3% Perchloric acid を添加し、遠心分離を行った。20 μL の上清は Tryptophan 代謝産物および Monoamine 代謝産物を定量するために HPLC により分析した。

ニューロンシナプス前 Tryptophan は第 1 研究の分析方法で説明されたように溶離した。Tryptophan の保持時間は約 12 分であった。ニューロンシナプス前 Serotonin は第 1

研究の分析方法で説明されたように溶離し、電気化学的に検出した (Voltage: 700 mV; Nanospace SI-2 3005 electrochemical detector, Shiseido, Japan)。Serotonin の保持時間は約 26 分であった。ニューロンシナプス前 Kynurenine と Kynurenic acid は血中 Kynurenine の分析方法で説明されたように溶離し、蛍光化学的に検出した (Kynurenic acid, excitation: 344 nM, emission: 398 nm)。Kynurenic acid の保持時間は約 6 分であった。

ニューロンシナプス前 5-hydroxyindole acetic acid、Noradrenaline、Dopamine、3,4-dihydroxy-phenylacetic acid および Homovanillic acid は第 1 研究の分析方法で説明されたように溶離し、電気化学的に検出した。各保持時間は Noradrenaline で約 7 分、3,4-dihydroxy-phenylacetic acid で約 11 分、Dopamine で約 13 分、5-hydroxyindole acetic acid で約 17 分、Homovanillic acid で約 21 分であった。

オリゴデンドロサイト内 Tryptophan 代謝産物および Monoamine の定量

オリゴデンドロサイト内 Tryptophan 代謝産物および Noradrenaline、Dopamine を測定するために、ラットは断眠疲労負荷期間終了後に断頭し、脳摘出後、視床下部と海馬の 2 部位に分けた。各組織には Hank's balanced salt solution (HBSS) を加え、1,000 rpm、4°C で 5 分間の遠心分離を行った。遠心後、Enzyme mix 1 および Enzyme mix 2 を加え、37°C で 10 分間インキュベーションした。そのサンプルは HBSS 10 mL をサスペンド後、100 μ m メッシュフィルター (BD Falcon) に通し、4°C で 300 g \times 10 分間の遠心を行い、上層を除去した。その後、HBSS 5 mL にサスペンドし、40 μ m メッシュフィルター (BD

Falcon) に通すことで、サンプルを調製した。セルカウントしたサンプルには O4 Microbeads を加え、4°C で 15 分間インキュベーションした。インキュベーション後、MACS buffer 1 mL を加え、4°C で 300 g × 10 分間の遠心を行い、MACS buffer 500 µL にサスペンドした。そして、MACS separation unit、MACS multistand、MACS columns、MACS tube racks、MACS pre-separation filters と MACS buffer を用い、Hand MACS による細胞分離を行った⁵。

視床下部と海馬由来オリゴデンドロサイト内 Tryptophan 代謝産物および Monoamine 代謝産物濃度は蛍光化学的、あるいは電気化学的に検出した。

5-4. 結果

高架式一字迷路課題における衝動性の検討

各群における高架式一字迷路課題のオープンアーム滞留時間の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件（2 水準：Control 群、CFSD 群）と断眠疲労負荷期間（3 水準：断眠疲労 1 日目、3 日目、5 日目）の 2 要因分散分析を行った（Figure 19A）。負荷条件と断眠疲労負荷期間のそれぞれで有意な主効果が認められた（負荷条件： $F(1, 6) = 73.65, p < 0.001, \eta_p^2 = 0.93$, 断眠疲労負荷期間： $F(1.39, 8.33) = 16.41, p = 0.0022, \eta_p^2 = 0.73$ ）。また、有意な交互作用が認められた（ $F(1.39, 8.33) = 13.75, p = 0.0037, \eta_p^2 = 0.69$ ）。単純主効果検定の結果、断眠 1 日目における CFSD 群のオープンアーム滞留時間は Control

⁵ オリゴデンドロサイトの抽出は 2 匹の実験ラットから摘出した脳組織 2 ペレットを 1 サンプルとしてカウントした。その理由として、1 匹の実験ラットから摘出した脳組織は非常にミクロなサイズとなるため、細胞分離が極めて困難なためである。

群と比較し、短い傾向であった ($p = 0.074$)。また、断眠 5 日目における CFSD 群のオープンアーム滞留時間は Control 群と比較し、有意に長かった ($p = 0.00104$)。

次に、各群における高架式一字迷路課題のオープンアーム侵入総回数の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件 (2 水準: Control 群、CFSD 群) と断眠疲労負荷期間 (3 水準: 断眠疲労 1 日目、3 日目、5 日目) の 2 要因分散分析を行った (Figure 19B)。負荷条件と断眠疲労負荷期間のそれぞれで有意な主効果が認められた (負荷条件: $F(1, 6) = 17.26$, $p = 0.006$, $\eta_p^2 = 0.74$, 断眠疲労負荷期間: $F(2, 12) = 17.90$, $p < 0.001$, $\eta_p^2 = 0.75$)。また、有意な交互作用が認められた ($F(2, 12) = 14.90$, $p = 0.00056$, $\eta_p^2 = 0.71$)。単純主効果検定の結果、断眠 5 日目における CFSD 群のオープンアーム侵入総回数は Control 群と比較し、有意に上昇した ($p < 0.001$)。このような結果は、CFSD モデルが行動の衝動性を有することを示唆する。

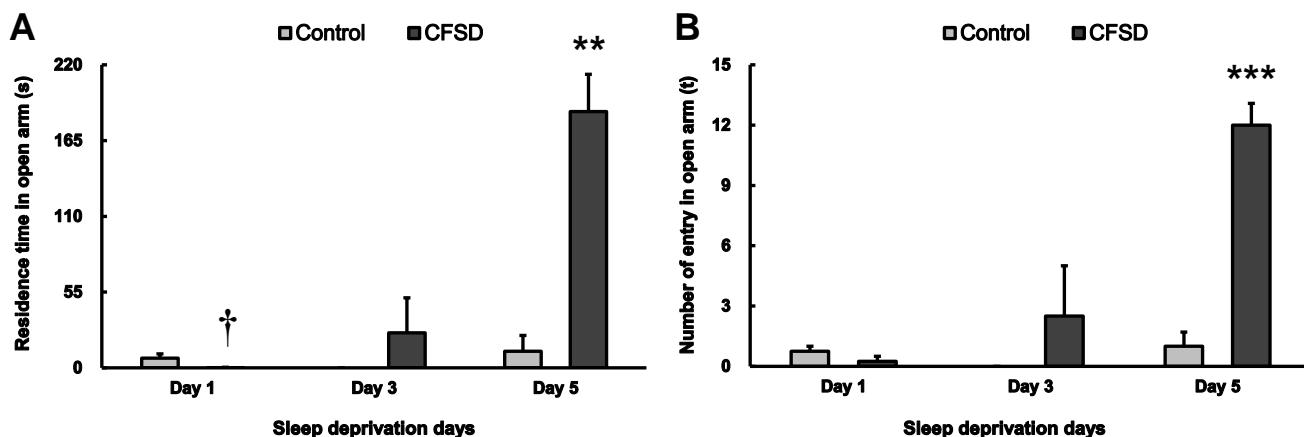


Figure 19. Effect of sleep disorder on elevated minus-maze.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM. $\dagger p < 0.10$, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$.

Y 字迷路課題における空間認知記憶と多動性の検討

各群における Y 字迷路課題の自発的交替行動率の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件（2 水準：Contol 群、CFSD 群）と断眠疲労負荷期間（3 水準：断眠疲労 1 日目、3 日目、5 日目）の 2 要因分散分析を行った（Figure 20A）。負荷条件に有意な主効果が認められた（ $F(1, 6) = 11.27, p = 0.015, \eta_p^2 = 0.65$ ）。また、有意傾向の交互作用が認められた（ $F(1.38, 8.29) = 3.56, p = 0.087, \eta_p^2 = 0.37$ ）。単純主効果検定の結果、断眠 3 日目における CFSD 群の自発的交替行動率は Control 群と比較し、抑制傾向であった（ $p = 0.072$ ）。断眠 5 日目における CFSD 群の自発的交替行動率は Control 群と比較し、有意に抑制した（ $p = 0.048$ ）。

次に、各群における Y 字迷路課題のアーム侵入総回数の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件（2 水準：Contol 群、CFSD 群）と断眠疲労負荷期間（3 水準：断眠疲労 1 日目、3 日目、5 日目）の 2 要因分散分析を行った（Figure 20B）。負荷条件と断眠疲労負荷期間のそれぞれで有意な主効果が認められた（負荷条件： $F(1, 6) = 25.19, p = 0.0024, \eta_p^2 = 0.81$ ，断眠疲労負荷期間： $F(2, 12) = 7.57, p = 0.0075, \eta_p^2 = 0.56$ ）。また、有意傾向の交互作用が認められた（ $F(2, 12) = 3.42, p = 0.067, \eta_p^2 = 0.36$ ）。単純主効果検定の結果、断眠 3 日目と断眠 5 日目における CFSD 群のアーム侵入総回数は Control 群と比較し、有意に上昇した（断眠 3 日目： $p = 0.014$ ，断眠 5 日目： $p = 0.00055$ ）。このような結果は CFSD モデルが空間認知記憶に関する想起の困難性を表出し（Figure 20A）、想起する際の確認作業をより多く必要とする（Figure 20B）ことを示唆する。

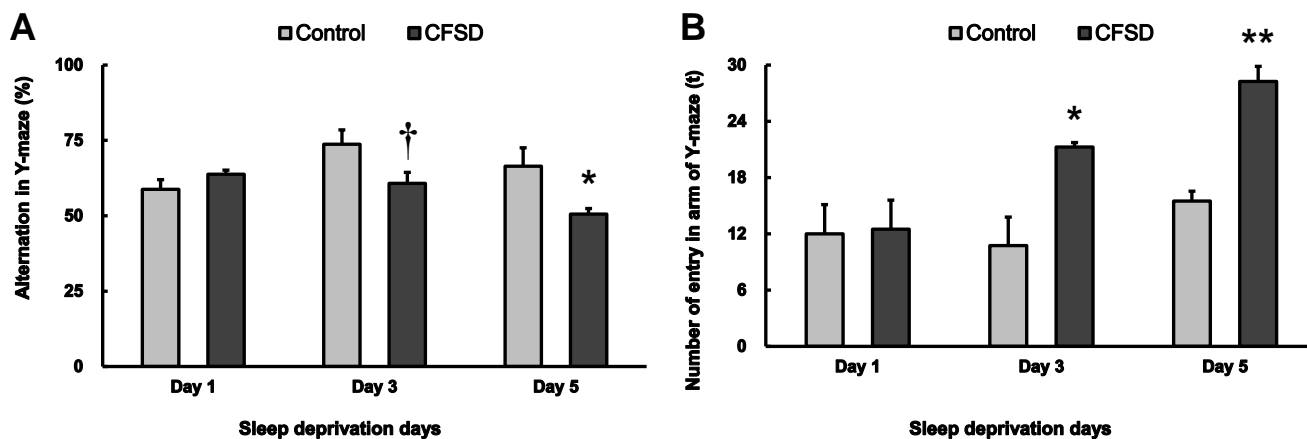


Figure 20. Effect of sleep disorder on Y-maze.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM. [†] $p < 0.10$, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$.

血中 Tryptophan および Kynurenine 動態の検討

各群における血中 Tryptophan と Kynurenine 濃度の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件を独立変数、Tryptophan 代謝産物濃度を従属変数にした対応のない t 検定を行った (Figure 21)。その結果、CFSD 群の血中 Tryptophan 濃度は Control 群と比較し、有意に上昇した (Figure 21A: $t(13) = 2.84$, $p = 0.014$, $d = 1.50$)。また、CFSD 群の血中 Kynurenine 濃度は Control 群と比較し、有意に上昇した (Figure 21B: $t(7) = 2.93$, $p = 0.022$, $d = 1.97$)。このような結果は CFSD モデルにおいて末梢で増大した Tryptophan と Kynurenine がシステム L-トランスポーターを介し、脳内に取り込まれることを示唆する。

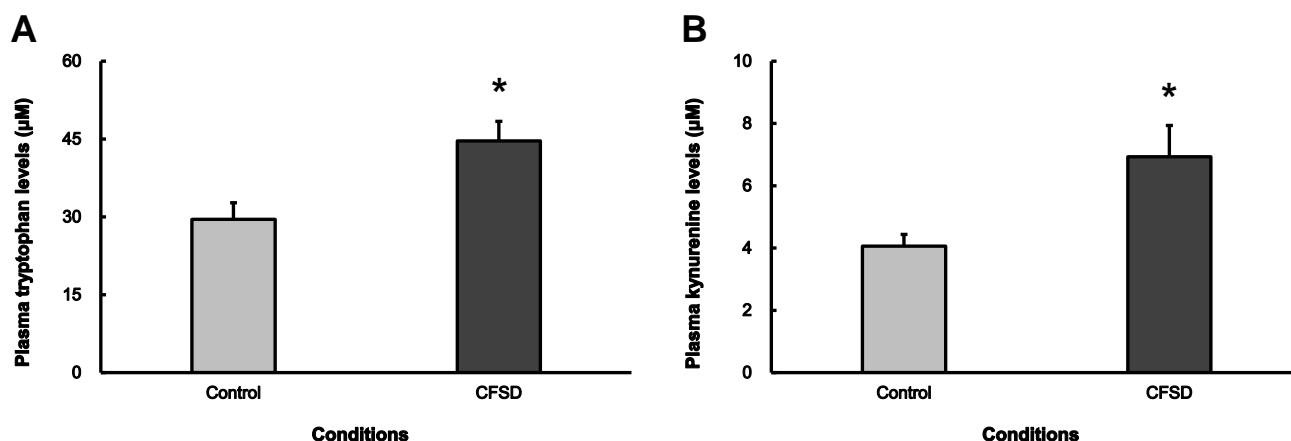


Figure 21. Effect of sleep disorder on the concentrations of tryptophan and kynurenine in plasma for control and CFSD groups.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

脳内各組織のニューロンシナプトゾーム内 Tryptophan 代謝産物動態の変化

各群における脳内各組織のニューロンシナプス前 Tryptophan、Serotonin、Kynurenine および Kynurenic acid 濃度の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件を独立変数、Tryptophan、Serotonin、Kynurenine、Kynurenic acid 濃度を従属変数にした対応のない t 検定を行った (Figure 22)。その結果、CFSD 群の視床下部と海馬組織のニューロンシナプス前 Tryptophan 濃度は Control 群と比較し、有意に上昇した (Figure 22A, 視床下部 : $t(15) = 2.55$, $p = 0.022$, $d = 1.29$, 海馬 : $t(15) = 2.18$, $p = 0.046$, $d = 1.10$)。次に、CFSD 群の視床下部、海馬、大脳皮質、線条体および延髄組織のニューロンシナプス前 Serotonin 濃度は Control 群と比較し、有意に減少した (Figure 22B, 視床下部 : $t(14) = 4.24$, $p = 0.00083$, $d = 2.19$, 海馬 : $t(5.90) = 2.87$, $p = 0.029$, $d = 1.84$, 大脳皮質 : $t(4.61) = 4.037$, $p = 0.012$, $d = 2.95$, 線条体 : $t(13) = 2.94$, $p = 0.011$, $d = 1.72$, 延髄 : $t(14) = 4.58$, $p < 0.001$,

$d = 2.37$)。さらに、CFSD 群の海馬と大脳皮質組織のニューロンシナプス前 Kynurenine 濃度は Control 群と比較し、有意に上昇し、視床下部組織のニューロンシナプス前 Kynurenine 濃度は上昇傾向であった (Figure 22C, 視床下部 : $t(8) = 2.26, p = 0.054, d = 1.46$, 海馬 : $t(10) = 2.25, p = 0.048, d = 1.32$, 大脳皮質 : $t(10) = 3.31, p = 0.008, d = 1.94$)。そして、CFSD 群の視床下部と海馬組織のニューロンシナプス前 Kynurenic acid 濃度は Control 群と比較し、有意に上昇し、大脳皮質組織のニューロンシナプス前 Kynurenic acid 濃度は上昇傾向であった (Figure 22D, 視床下部 : $t(6.45) = 2.45, p = 0.047, d = 1.26$, 海馬 : $t(9) = 2.63, p = 0.028, d = 1.65$, 大脳皮質 : $t(8) = 2.20, p = 0.059, d = 1.42$)。このような結果は、脳内に取り込まれ過剰状態にある Tryptophan (Figure 22A) が Serotonin 生成 (Figure 22B) ではなく、Kynurenine (Figure 22C) および Kynurenic acid 生成 (Figure 22D) を亢進することを示唆する。

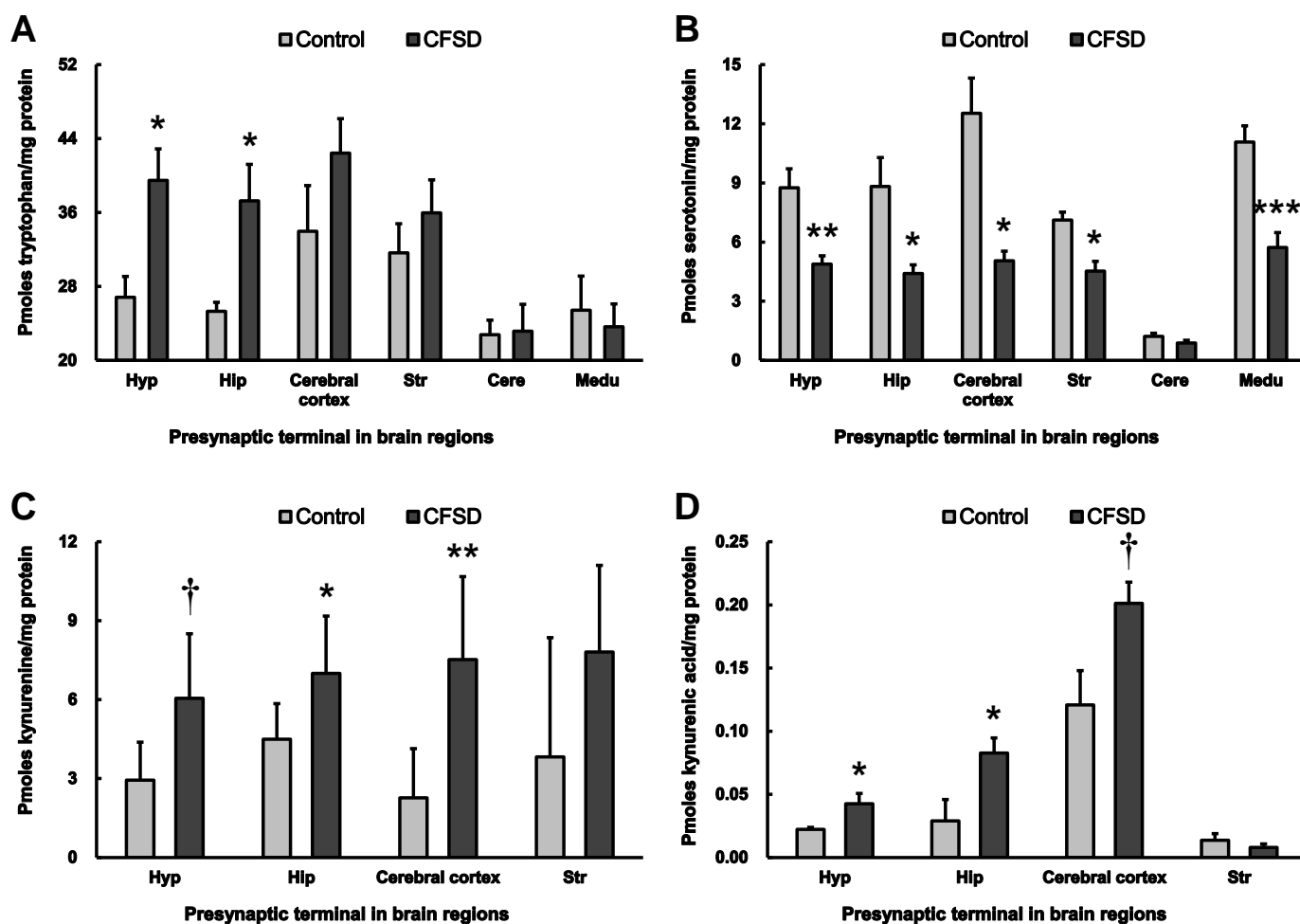


Figure 22. Effect of sleep disorder on the concentration of tryptophan, serotonin, kynurenine, and kynurenic acid in presynaptic terminal of brain regions for control and CFSD groups.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM. † $p < 0.10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Presynaptic terminal in brain regions are abbreviated as Hyp; hypothalamus, Hip; hippocampus, Str; striatum, Cere; cerebellum and Medu; medulla oblongata, respectively.

脳内各組織のニューロンシナプトゾーム内 Monoamine 代謝産物動態の検討

各群における脳内各組織のニューロンシナプス前 5-hydroxyindole acetic acid、Noradrenaline、Dopamine および 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid 濃度の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件を独立変数、Monoamine 代謝産物濃度を従属変数にした対応のな

い t 検定を行った (Figure 23)。その結果、CFSD 群の脳皮質組織のニューロンシナプス前 5-hydroxyindole acetic acid 濃度は Control 群と比較し、有意に減少し (Figure 23A : $t(14) = 2.17, p = 0.047, d = 1.17$)、視床下部組織のニューロンシナプス前 5-hydroxyindole acetic acid 濃度は減少傾向であった (Figure 23A : $t(14) = 1.89, p = 0.079, d = 0.98$)。次に、CFSD 群の海馬、脳皮質、線条体および延髄組織のニューロンシナプス前 Noradrenaline 濃度は Control 群と比較し、有意に減少した (Figure 23B, 海馬 : $t(15) = 2.41, p = 0.029, d = 1.22$, 脳皮質 : $t(14) = 2.73, p = 0.016, d = 1.47$, 線条体 : $t(12) = 2.63, p = 0.022, d = 1.71$, 延髄 : $t(14) = 2.25, p = 0.041, d = 1.16$)。さらに、CFSD 群の視床下部、海馬および線条体組織のニューロンシナプス前 Dopamine 濃度は Control 群と比較し、有意に減少した (Figure 23C, 視床下部 : $t(14) = 4.60, p < 0.001, d = 2.38$, 海馬 : $t(15) = 3.89, p = 0.0014, d = 1.98$, 線条体 : $t(12.49) = 2.28, p = 0.041, d = 0.86$)。そして、CFSD 群の視床下部と海馬組織のニューロンシナプス前 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid 濃度は Control 群と比較し、有意に減少した (Figure 23D, 視床下部 : $t(14) = 2.52, p = 0.025, d = 1.30$, 海馬 : $t(15) = 3.11, p = 0.007, d = 1.58$)。なお、脳内組織のニューロンシナプス前 Homovanillic acid 動態は両群において検出できなかった。

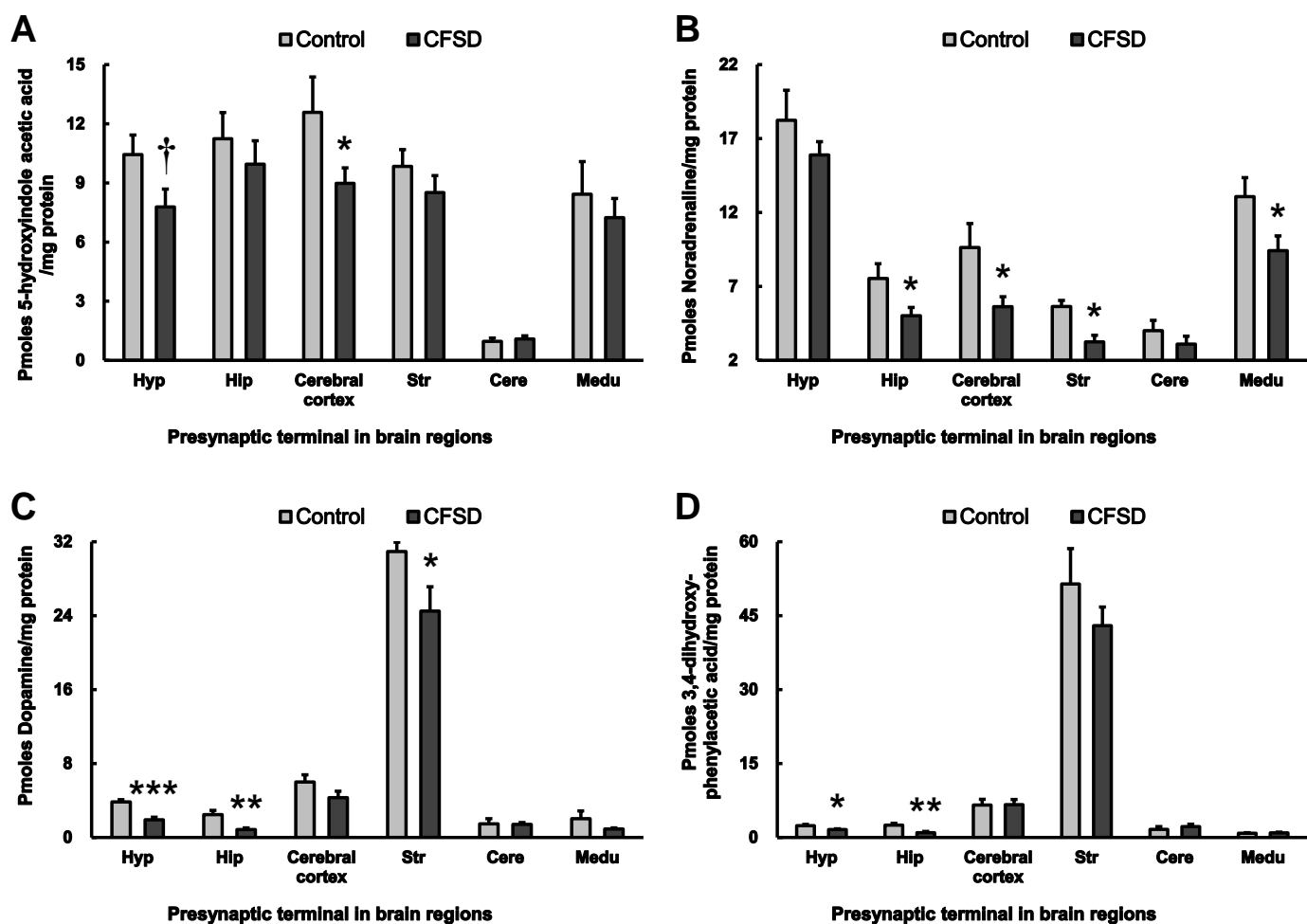


Figure 23. Effect of sleep disorder on the concentrations of monoamine metabolites in presynaptic terminal in brain regions for control and CFSD groups.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM. $\dagger p < 0.10$, $* p < 0.05$, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$.

Presynaptic terminal in brain regions are abbreviated as Hyp; hypothalamus, Hip; hippocampus, Str; striatum, Cere; cerebellum and Medu; medulla oblongata, respectively.

Serotonin および Kynurenine 経路に対する Tryptophan 代謝率の検討

各群における脳内組織のニューロンシナプス前 Serotonin 経路および Kynurenine 経路に対する Tryptophan 代謝率の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件を独立変数、Tryptophan 代謝率を従属変数にした対応のない t 検定を行った (Figure 24)。その結果、

CFSD 群の視床下部、海馬および大脳皮質組織のニューロンシナプス前 Serotonin 経路に対する Tryptophan 代謝率は Control 群と比較し、有意に低下した (Figure 24A, 視床下部 : $t(15) = 5.77, p < 0.001, d = 2.93$, 海馬 : $t(6.29) = 3.68, p = 0.0095, d = 2.29$, 大脳皮質 : $t(14) = 5.25, p < 0.001, d = 2.83$)。次に、CFSD 群の大脳皮質組織のニューロンシナプス前 Kynurenine 経路に対する Tryptophan 代謝率は Control 群と比較し、有意に上昇した (Figure 24B : $t(10) = 3.09, p = 0.011, d = 1.81$)。このような結果は、脳内に取り込まれ過剰状態にある Tryptophan が Serotonin 経路ではなく、Kynurenine 経路への代謝を亢進することを示唆する。

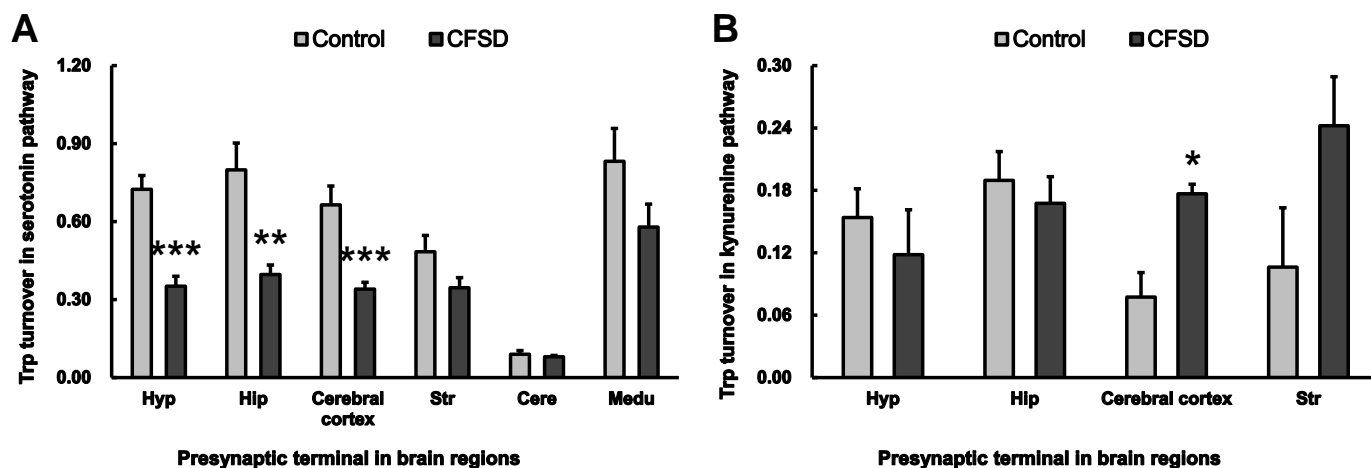


Figure 24. Effect of sleep disorder on tryptophan (Trp) turnover in presynaptic terminal in brain regions for control and CFSD groups.

Notes: Parameters are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Presynaptic terminal in brain regions are abbreviated as Hyp; hypothalamus, Hip; hippocampus, Str; striatum, Cere; cerebellum and Medu; medulla oblongata, respectively.

Serotonin、Kynurenine および Dopamine 生成量の検討

各群における脳内組織のニューロンシナプス前 Serotonin、Kynurenine および Dopamine 生成量の平均値と標準誤差を算出し、負荷条件を独立変数、Serotonin、Kynurenine および Dopamine 生成量を従属変数にした対応のない t 検定を行った (Figure 25)。その結果、CFSD 群の視床下部と大脳皮質組織のニューロンシナプス前 Serotonin 生成量は Control 群と比較し、有意に減少した (Figure 25A, 視床下部 : $t(13) = 2.92, p = 0.012, d = 1.60$, 大脳皮質 : $t(14) = 4.27, p = 0.00078, d = 2.30$)。また、CFSD 群の延髄組織のニューロンシナプス前 Serotonin 生成量は Control 群と比較し、減少傾向であった (Figure 25A : $t(13) = 1.93, p = 0.076, d = 1.06$)。さらに、CFSD 群の大脳皮質組織のニューロンシナプス前 Kynurenine 生成量は Control 群と比較し、有意に上昇した (Figure 25B : $t(7) = 2.54, p = 0.039, d = 1.70$)。そして、CFSD 群の視床下部と海馬組織のニューロンシナプス前 Dopamine 生成量は Control 群と比較し、有意に減少した (Figure 25C, 視床下部 : $t(13) = 4.30, p = 0.00086, d = 2.36$, 海馬 : $t(14) = 3.49, p = 0.0036, d = 1.88$)。このような結果は、CFSD モデルが Serotonin および Dopamine 生成量の減少を導く一方、Kynurenine 生成量は亢進することを示唆する。

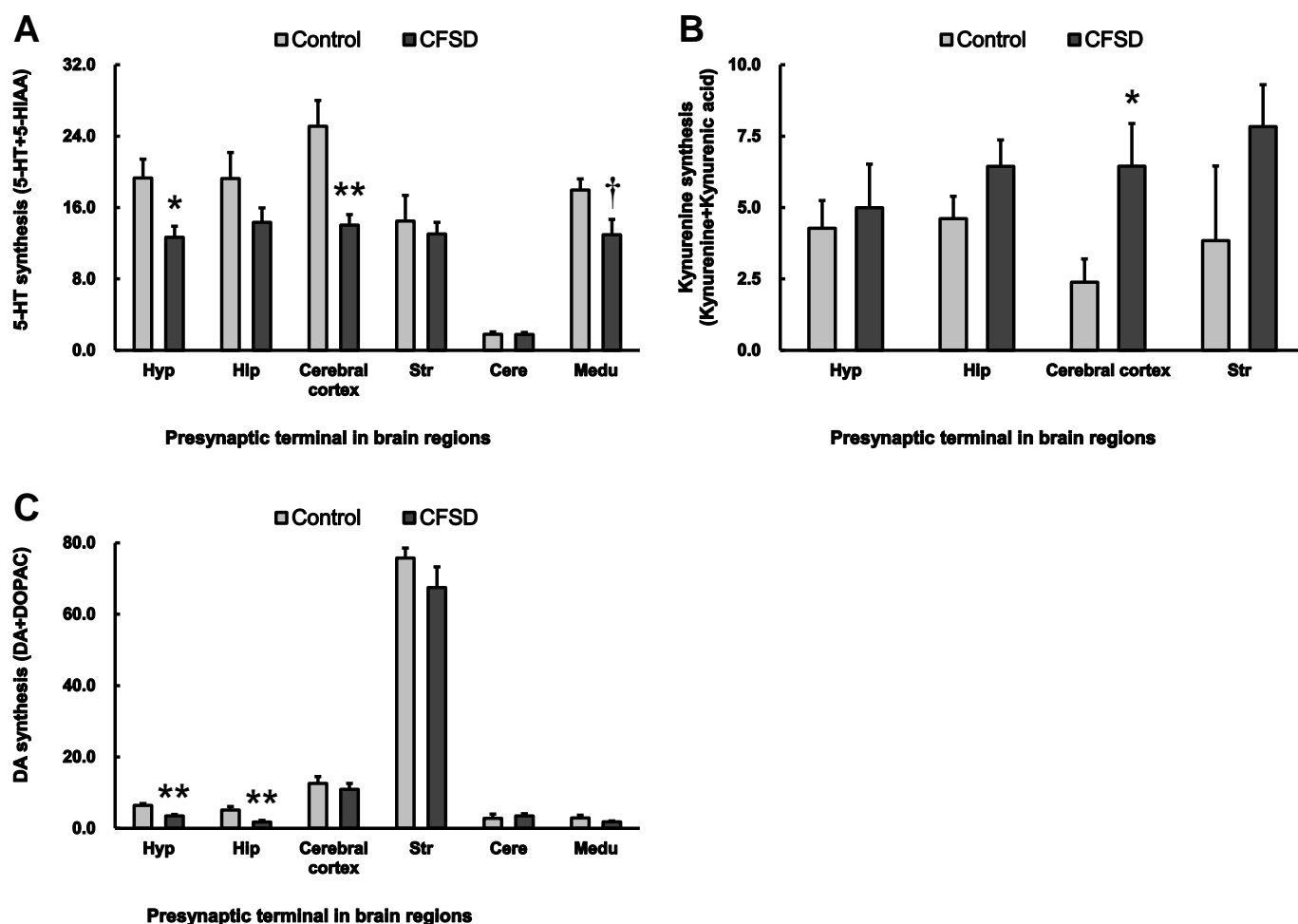


Figure 25. Effect of sleep disorder on the syntheses of serotonin (5-HT), kynurenine, and dopamine (DA) in presynaptic terminal of brain regions for control and CFSD groups.

Notes: Parameters are expressed as mean ± SEM. † $p < 0.10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Presynaptic terminal in brain regions are abbreviated as Hyp; hypothalamus, Hip; hippocampus, Str; striatum, Cere; cerebellum and Medu; medulla oblongata, respectively. Monoamine metabolite are abbreviated as 5-HIAA; 5-hydroxyindole acetic acid and DOPAC; 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid.

オリゴデンドロサイト内 Tryptophan および Kynurenic acid 動態の検討

各群におけるオリゴデンドロサイト内 Monoamine 代謝産物濃度は Table 6 に示す。

Control 群および CFSD 群の視床下部、海馬由来オリゴデンドロサイトには Monoamine

代謝産物動態は検出できなかった。

Table 6. Effect of sleep disorder on the concentrations of monoamine metabolite in oligodendrocyte for control and CFSD groups.

Glial cells in brain regions	Group	Monoamine metabolite			
		Serotonin	5-hydroxyindole acetic acid	Noradrenaline	Dopamine
Hypothalamic oligodendrocyte	Control	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	CFSD	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Hippocampal oligodendrocyte	Control	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	CFSD	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Notes: “Not detect” is named as “n. d.”.

各群における視床下部と海馬由来のオリゴデンドロサイト内 Tryptophan と Kynurenine acid 濃度を Figure 26 に示す。Control 群と比較し、CFSD 群の視床下部と海馬由来のオリゴデンドロサイト内 Tryptophan 濃度は上昇傾向であった（Figure 26A）。

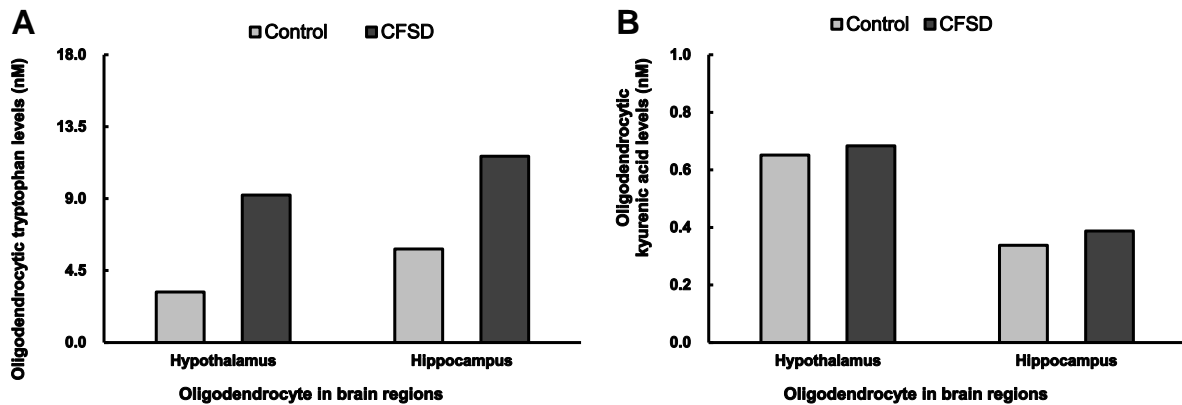


Figure 26. Effect of sleep disorder on the concentrations of tryptophan and kynurenine acid in oligodendrocyte of brain regions for control and CFSD groups.

5-5. 考察

第 4 研究では L-kynurenine の末梢投与が海馬内 Kynurenic acid 生成を亢進し、それは保持した空間認知記憶の想起の抑制と関連することを明らかにした。次に、脳に移行し、過剰状態にある Tryptophan および Kynurenine がどのような疲労認知回路で中枢性疲労を誘発しているのか、末梢-中枢連関の特性を含めて解明する必要がある。第 5 研究では、CFSD モデルラットを用い、末梢中 Tryptophan と Kynurenine 動態の変化を観察した。また、オリゴデンドロサイトとニューロンシナプス前 Tryptophan および Monoamine とそれらの代謝産物動態の変化を観察し、認知機能との関係性を検討した。高架式一字迷路課題において Control 群と比較し、CFSD 群の断眠 5 日目でオープンアーム滞留時間が有意に延長し (Figure 19A)、また、オープンアーム侵入総回数も有意に増大した (Figure 19B)。さらに、Y 字迷路課題において Control 群と比較し、CFSD 群の断眠 5 日目で自発的交替行動率が有意に減少した (Figure 20A)。また、CFSD 群の断眠 3 日目と 5 日目でアーム侵入総回数が有意に増大した (Figure 20B)。このような結果は、CFSD により空間認知記憶の想起が不正確であり (Figure 20A)、多動性 (Figure 20B) と衝動性 (Figures 19A & B) を有した。

Guzman-Marin et al. (2003) はトレッドミル走行を 96 時間課すことで作製した断眠ラットを用い、断眠が背側海馬歯状回の神経細胞増殖を抑制することを報告している。また Yang et al. (2014) は、睡眠が運動学習後のポストシナプスの樹状突起棘の形成を促進し、記憶保持に寄与することを報告している。即ち、CFSD モデルラットもまた、

断眠により神経細胞新生が抑制された結果、記憶の想起や保持能力、さらにはその質自体（正確性）が低下しているかもしれない。

次に、Control 群と比較し、CFSD 群の血中 Tryptophan と Kynurenine 濃度は有意に上昇した（Figures 21A & B）。このような結果は CFSD モデルラットにおいて、血中（末梢中）に遊離型として存在し、増加した Tryptophan と Kynurenine が血液脳関門を介し、脳内に相乗的に取り込まれることを示唆する。また脳内 Kynurenine の 40%が中枢神経系で生成され、残りの 60%は末梢に起源を持つ（Gal & Sherman, 1978; Wu et al., 2013）。まず、末梢中 Kynurenine は遊離型 Tryptophan が肝臓内でインドールアミン-2,3-酸化還元酵素（indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO）の触媒反応により生成される（Schrocksnadel, Wirleitner, Winkler, & Fuchs, 2006）。そして、末梢中に増加した Kynurenine は血液脳関門を介し、脳内に急速に取り込まれる（Fukui, Schwarcz, Rapoport, Takada, & Smith, 1991）。一方、中枢神経内で直接、Kynurenine が生成される場合、末梢中 Kynurenine とは異なるメカニズムを持つ。即ち、Kynurenine は Tryptophan の IDO 触媒反応以外にも、最近、Tryptophan 2,3-酸化還元酵素（Tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO）が末梢および中枢神経内の Tryptophan 代謝産物のホメオスターシスに重要な役割を担うことが報告されている（Kanai, 2010; Platten, Wick, & Van den Eynde, 2012; Schwarcz et al., 2012）。このような知見を踏まえ、末梢中 Tryptophan と Kynurenine のダイナミックな変化が中枢性疲労の誘発機構の起源となり、その引き金となる主役を担うことが示唆される。

ここで、末梢中 Tryptophan と Kynurenine の脳内取り込みを実証するため、著者は CFSD

モデルラットの脳内各組織の Tryptophan 代謝産物動態を観察した。その結果、Control 群と比較し、CFSD 群の視床下部と海馬組織のニューロンシナプス前 Tryptophan 濃度および視床下部、海馬と大脳皮質組織のニューロンシナプス前 Kynurenine 濃度は有意に上昇した (Figures 22A & C)。このような結果は、末梢中 Tryptophan と Kynurenine が確実に、限定された脳内組織のニューロンシナプス前において存在し、中枢性疲労時に Tryptophan と Kynurenine の増幅効果が生起していることを示唆する。

従来の中枢性疲労研究ではラットの運動後疲労モデルにおいて、Tryptophan 脳内取り込みが Serotonin 生成への亢進を誘導した結果、トレッドミルパフォーマンスが抑制される Serotonin 仮説が報告されてきた (Acworth et al., 1986; Cermak et al., 2012; Melancon et al., 2012; Newsholme & Blomstrand, 2006)。ところが本研究結果において、Control 群と比較し、CFSD 群の脳内各組織のニューロンシナプス前 Serotonin 濃度は減少した (Figure 22B)。このような結果は、中枢性疲労の Tryptophan-Kynurenine 経路仮説を提唱する上で、強固となる証拠を示す。即ち、脳内に取り込まれた Tryptophan は Serotonin 生成ではなく、Kynurenine 経路に代謝されることを示唆する。

また、脳内に取り込まれた Tryptophan と Kynurenine は CFSD 群において、視床下部、海馬、大脳皮質組織のニューロンシナプス前 Kynurenic acid 生成の亢進のために代謝されることが示された (Figure 22D)。脳内 Kynurenic acid はアストロサイト内に局在する KATs により Kynurenine が触媒反応し、生成される (Schwarcz et al., 2012)。そして、生成された Kynurenic acid は NMDA および $\alpha 7$ nACh 受容体アンタゴニストとして作用し、

多くの神経免疫疾患や神経変性疾患の病理生理的状態において重要な役割を担う (Baran et al., 1999; Coppola et al., 2012; Pocivavsek et al., 2012; Wu et al., 2013; Yamashita & Yamamoto, 2014)。また、Kynurenic acid 濃度の上昇はシナプス間隙の Dopamine 放出を抑制する (Rassoulpour et al., 2005)。本研究結果においても、CFSD 群の視床下部と海馬組織のニューロンシナプス前 Dopamine およびその代謝産物 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid 濃度が減少している (Figures 23C & D)。即ち、ニューロンシナプス前 Kynurenic acid 濃度の上昇がニューロンシナプス前からの Dopamine 放出を抑制するかもしれない。さらに最近、海馬内 Kynurenic acid 濃度の上昇が空間認知記憶を抑制し (Pocivavsek et al., 2012)、前頭前野内 Tryptophan 濃度の上昇が衝動性の増大 (Coppola et al., 2013) に関与することを報告している。これに対し、本研究の独創性として、Tryptophan-Kynurenine-Kynurenic acid 経路の三者間の増幅効果が認知機能の抑制に関与するという点にある。さらに、従来の脳機能解析ではニューロンとグリアが混在するため、その分離解析が重要であるが、本研究ではその解析を行い、ニューロンシナプス前の Tryptophan-Kynurenine-Kynurenic acid 経路の動態特徴を詳細に明らかにした。これは中枢性疲労研究を含め、Tryptophan 代謝産物を包括的に検討した研究の中では世界で初めてとなるエビデンスである。

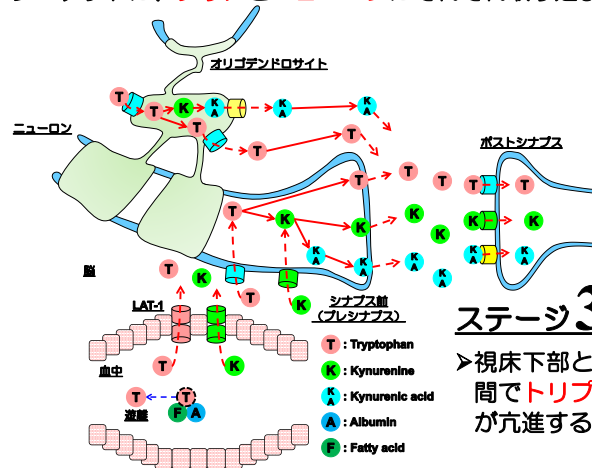
さらに、中枢性疲労時のオリゴデンドロサイトには Tryptophan 濃度の上昇傾向が認められた (Figure 26A)。従来の研究において、オリゴデンドロサイトは脳内 Kynurenic acid 生成の調節に関与し、その濃度は L-システムから輸送された Tryptophan により濃

度依存的に変化することが報告されている (Wejksza et al., 2005)。さらに、Wejksza et al. (2005) は KATs がオリゴデンドロサイトにおいても存在することを報告している。今回、中枢性疲労時のオリゴデンドロサイト内 Tryptophan 濃度の上昇と Kynurenic acid の存在は現時点で不明な点が多いため、その解釈は困難であるが、中枢性疲労における何らかの原因を担うかもしれない。例えば、オリゴデンドロサイトはニューロンの軸索周囲に髄鞘を形成することで、神経活動電位の跳躍伝導を可能にし、軸索を保護している (Barres & Raff, 1999)。そのため、髄鞘の障害は神経伝達速度の低下による認知機能障害を誘発する (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Fields, 2013)。また電気生理学的に、Tryptophan 濃度の上昇はニューロンの発火を抑制することが報告されている (Gallager & Aghajanian, 1976)。このような知見を踏まえ、本研究結果における視床下部と海馬由来オリゴデンドロサイト内 Tryptophan 濃度の上昇は視床下部と海馬ニューロンの神経活動電位の跳躍伝導を阻害し、軸索障害や認知機能障害の根底をなすかもしれない。

このように、中枢性疲労の誘発機構には血中 Tryptophan と Kynurenine の脳内への相乗取り込みの促進が起源となり、その取り込みのターゲットとなる視床下部と海馬組織のグリア-ニューロン回路間で Tryptophan-Kynurenine-Kynurenic acid 経路の代謝亢進が生じ、認知機能を抑制すると考えられる。従って、グリア-ニューロン間相互機構を含めた末梢-中枢連関における Tryptophan-Kynurenine-Kynurenic acid 経路感受性の疲労認知回路の特定は内外を通じて全く報告がなく、本研究の独創性はこの点に集約することができる (Figure 27)。

ステージ2：脳内疲労物質の過剰状態

▶脳内に侵入したトリプトファンとキヌレニンが視床下部と海馬をターゲットに、グリアとニューロンにそれぞれ取り込まれる



ステージ3：認知機能の停滞、社会生活の障害

▶視床下部と海馬組織を中心としたグリアーニューロン回路間でトリプトファンーキヌレニンーキヌレン酸経路感受性が亢進する

ステージ1：中枢性疲労のトリガー

▶血中で増加したトリプトファンとキヌレニンが急速に脳内に侵入する

Figure 27. Tryptophan circuit in fatigue: from blood to brain and behavior.

第 4 章 全 体 的 考 察

中枢性疲労は慢性疲労症候群の病理的疲労状態と関係し (Castell et al., 1999)、精神作業能力の低下、社会生活の困難、脳機能の障害を導く。また不登校状態に認められる慢性的な睡眠障害を基盤とした中枢性疲労の罹患率は 40%-80%を占め (Farmer et al., 2004; 三池, 2009)、復学の困難 (Tomoda et al., 1994; Tomoda et al., 1997)、精神疾患の発症 (Farmer et al., 2004; 三池, 2009)、脳機能の障害を生起することを報告している (Tomoda et al., 2000)。本研究課題はこれらの病理的疲労状態の根底にある中枢性疲労の誘発機構について、著者が開発した CFSD モデルラット (Yamashita & Yamamoto, 2013) を用い、その具体的なメカニズムを、グリア-ニューロンの役割を含めた末梢-中枢連関で明らかにすることである。

従来の中枢性疲労研究ではラットの運動後疲労モデルにおいて、Tryptophan 脳内取り込みが Serotonin 生成を亢進した結果、トレッドミルパフォーマンスが抑制される Serotonin 仮説が報告されてきた (Acworth et al., 1986; Cermak et al., 2012; Melancon et al., 2012; Newsholme & Blomstrand, 2006)。また、ヒトの術後疲労においても血中 Tryptophan 濃度の上昇が認められ (Yamamoto et al., 1997)、これを支持している。また、脳内疲労物質 Tryptophan は二つの代謝経路を持ち、その 5%が Serotonin 経路、95%が Kynurenine 経路に代謝される (Schwarcz & Pellicciari, 2002)。さらに、脳内 Kynurenine の 40%が中枢神経系で生成され、残りの 60%は末梢に起源を持つ (Gal & Sherman, 1978; Wu et al., 2013)。そして、Kynurenine が血液脳関門を急速に通過することも報告されて

いる (Gal & Sherman, 1978; Wu et al., 2013)。Kynurenine はさらに二つの代謝経路を持ち、KATs により触媒反応した Kynurenic acid 生成が最初に誘導される (Schwarcz et al., 2012)。最近、ラットに Kynurenine 最終代謝産物 Kynurenic acid を投与すると、トレッドミル、オープンフィールド、Morris 型水迷路課題におけるパフォーマンスが抑制され、Kynurenic acid が中枢性疲労に関与することを報告している (Yamamoto et al., 2012)。

以上から、中枢性疲労における Tryptophan の脳内流入が Serotonin だけでなく、Kynurenic acid に代謝されることも推測できる。また、Kynurenic acid 生成の誘導は Tryptophan の脳内流入による触媒反応だけでなく、末梢中に存在する Kynurenine から直接生成される。それゆえ、著者は脳内疲労物質候補として Tryptophan-Kynurenine 経路の重要性に着目してきた。

第 1 研究の成果として、Tryptophan 誘導体薬 D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与により、視床下部内 Tryptophan 濃度は上昇傾向であったが、Serotonin 濃度は減少傾向であることを明らかにした。また、D,L- β -(1-naphthyl)alanine 投与により、自発的行動量は減少傾向であった。この成果は、免疫学的疲労モデルを用いた Serotonin 濃度低下による疲労仮説を報告した研究 (Katafuchi et al., 2005) と一致する。しかしながら、濃度の上昇傾向を呈した Tryptophan はその主な代謝経路である Kynurenine 経路へ代謝増大を導く可能性も示唆される。このような知見から、Tryptophan-Kynurenine 経路が脳機能や行動の抑制に関与するかもしれない。次に、睡眠障害を基盤とした病理的な中枢性疲労モデルを確立し、具体的な中枢性疲労の誘発機構を明らかにしなければならない。

第 2 研究の成果として、CFSD モデルラットの開発に成功し (Yamashita & Yamamoto, 2013)、CFSD モデルは Tryptophan 脳内取り込みの亢進を伴うが、Serotonin 生成への亢進は関係しない神経科学特性を有することを明らかにした。この成果は、中枢性疲労の誘発機構として推測される Tryptophan-Kynurenine 代謝経路の重要な役割を示唆する。

第 3 研究の成果として、CFSD モデルラットから Tryptophan の脳内取り込みは Serotonin 生成ではなく、Kynurenic acid 生成を亢進することを明らかにした。このような研究成果は、脳内 Tryptophan 濃度の上昇とそれに伴う Kynurenic acid 生成の亢進による増幅効果が中枢性疲労により誘発された社会行動や精神運動の認知機能不全 (Yamashita & Yamamoto, 2014) の根底をなす新たな知見を示すものである。さらに、中枢性疲労の抑制因子として、末梢由来の β -Endorphin は大脳辺縁系-視床下部領域に作用し、疲労の閾値を上昇させた結果、社会行動や精神運動を改善する可能性を示唆した。次に Tryptophan だけでなく、末梢の Kynurenine 自体が脳内 Kynurenic acid 生成を導くことで、中枢性疲労を誘発するトリガーとなるのかを明らかにする必要がある。

第 4 研究の成果として、L-kynurenine の末梢投与は海馬内 Kynurenic acid 生成を亢進し、それは保持した空間認知記憶の想起の抑制と関連することを明らかにした。また、脳内 Kynurenic acid 生成の亢進を誘導する経路として、本研究結果以外に、末梢由来 Tryptophan の脳内移行により生じることも報告されている (Coppola et al., 2012; Kim et al., 2015; Schwarcz & Pellicciari, 2002; Yamamoto et al., 2012; Yamashita & Yamamoto, 2014)。即ち、末梢由来の Kynurenine と Tryptophan の脳内取り込みにより、脳内 Kynurenic

acid 生成が亢進し、その三者間の増幅効果が中枢性疲労の病理的疲労状態に関与し、認知機能不全のトリガーとなることが推測される。しかしながら、脳に移行し、過剰状態にある Tryptophan および Kynurenine がどのような疲労認知回路で中枢性疲労を誘発しているのか、末梢-中枢連関の特性を含めて解明する必要がある。

第 5 研究の成果として CFSD モデルラットを用い、末梢中 Tryptophan と Kynurenine のダイナミックな変化が中枢性疲労の誘発機構の起源となることを明らかにした。また、末梢で増加した Tryptophan と Kynurenine の脳内取り込みは脳内の広範囲に亘り、Tryptophan と Kynurenine 動態の上昇を誘導しなかった。まず、視床下部と海馬組織のニューロンシナプス前 Tryptophan-Kynurenine-Kynurenic acid 経路の代謝亢進を誘導した。最近、海馬内 Kynurenic acid 濃度の上昇が空間認知記憶を抑制し (Pocivavsek et al., 2012)、前頭前野内 Tryptophan 濃度の上昇が衝動性の増大 (Coppola et al., 2013) に関与することを報告している。これに対し、本研究の独創性として、ニューロンシナプス前 Tryptophan-Kynurenine-Kynurenic acid 経路の三者間の増幅効果が CFSD モデルの認知神経科学的特性としての空間認知記憶の抑制や多動性・衝動性の誘発に関与するという点にある。さらに、従来の脳機能解析ではニューロンとグリアが混在するため、その分離解析が重要であるが、著者はさらにグリアの一種オリゴデンドロサイトの抽出に成功し、Tryptophan 代謝産物の包括的観察を行った。その結果、CFSD モデルのオリゴデンドロサイトには Tryptophan 濃度の上昇傾向が認められた。従来の研究成果から、脳内 Tryptophan 濃度の上昇が活動電位の低下 (Gallager & Aghajanian, 1976) や認知機能の

抑制に関与することを報告している（Coppola et al., 2013）。また、跳躍伝導を担うオリゴデンドロサイトの破綻は活動電位の伝導速度を低下させ、認知機能障害を導くことも報告されている（Baumann & Pham-Dinh, 2001; Fields, 2013）。即ち、オリゴデンドロサイトでの Tryptophan の蓄積状態は、跳躍伝導機能を阻害する可能性を示唆する。このように、中枢性疲労の誘発機構には血中 Tryptophan と Kynurenine の脳内への相乗取り込みの促進が起源となり、視床下部と海馬組織のグリア-ニューロン回路間で Tryptophan-Kynurenine-Kynurenic acid 経路の代謝亢進が生じた結果、認知機能を抑制すると考えられる。

本研究の特色として、従来の中枢性疲労研究はトレッドミル走により作製した運動後疲労モデルラットを用いて、Serotonin 仮説に重きを置くものであった。これに対して、著者が開発した CFSD モデルラットの実験心理学的研究から、Tryptophan-Kynurenic acid の増幅効果が中枢性疲労の成因に関与することを明らかにした。しかし、これまでの中枢性疲労研究の成果では、中枢性疲労の誘発機構が「グリア-ニューロン間相互機構」の役割を含めた末梢-中枢連関の特性によるものかが不明瞭であった。このような従来の問題点に対して、血中およびグリアとニューロンシナプス前 Tryptophan 代謝産物の観察の両視点を導入することで、中枢性疲労の誘発機構について、末梢-中枢連関に立脚した検討を可能にした。その研究成果として、グリア-ニューロン間相互機構を含めた末梢-中枢連関における Tryptophan-Kynurenine-Kynurenic acid 経路感受性の疲労認知回路の特定に成功した。このようなアイデアと研究成果は内外を通じて全く報告がなく、

本研究の独創性はこの点に集約することができる。そして、本研究の成果は不登校児童に認められる慢性的な睡眠障害を基盤とした中枢性／精神性疲労状態を理解するための新しい観点からの基礎的知見を提供できる可能性に期待できる。本研究は、社会に潜む心の問題の科学的解明に大きく貢献するといえる。

第 5 章 今 後 の 検 討 課 題

中枢性疲労は慢性疲労症候群の病的疲労状態と関係し、精神疾患の発症を導く「前病気段階」でもある。その危険性は多くの老若男女に認められ、驚くべきことは、未来を担う子どもにも及ぶことである。従って、心理的・社会的問題として、中枢性疲労の存在は無視できないものである。

本研究成果により、中枢性疲労の誘発機構には血中 Tryptophan と Kynurenine の脳内への相乗取り込みが起源となり、その取り込みのターゲットとなる視床下部と海馬組織のグリア-ニューロン回路間で Tryptophan-Kynurenine-Kynurenic acid 経路の代謝亢進が生じ、認知機能を抑制することを明らかにした。このように、グリア-ニューロン間相互機構の役割を含めた末梢-中枢連関の解明に成功したが、それでもなお、多くの問題と仮説が存在する。

第一に、中枢性疲労時に末梢において増加した Tryptophan や Kynurenine は血液脳関門上に発現する中性アミノ酸トランスポーター（LAT-1 など）を介し、容易に脳内へ移行する。特に、脳内に取り込まれた Tryptophan は神経終末上の細胞膜に発現する高親和性輸送系により、ニューロンにアクセスし、精神機能に影響する。このように、Tryptophan や Kynurenine の運命は血液脳関門上に発現した中性アミノ酸トランスポーターにより制御されている。また、Esposito et al. (2001) や Friedman et al. (1996) の研究から、心理社会的ストレスにより、血液脳関門の透過性が上昇することが報告されている。即ち、中枢性疲労時、末梢で増加した Tryptophan や Kynurenine の大半が透過

性を増した血液脳関門を直接、通過することが考えられる。従って、CFSD モデルラットを用い、血液脳関門の透過性を含めた中枢性疲労からの回復（予防と治療）を検討することが重要である。

第二に、中枢性疲労時のニューロン新生について検討することである。Guzman-Marin et al. (2003) はトレッドミル走行を 96 時間課すことで作製した断眠ラットを用い、断眠が背側海馬歯状回の神経細胞増殖を抑制することを報告している。また Yang et al. (2014) は、睡眠が運動学習後のポストシナプスの樹状突起棘の形成を促進し、7 時間の断眠はスパイン形成を抑制することを報告している。即ち、不登校児童において睡眠障害を基盤とした中枢性疲労状態ではニューロンの新生およびその維持の崩壊に繋がり、脳発達の観点からも危険性を孕むと考えられる。このような可能性を伴うとすれば一刻も早く、中枢性疲労からの回復を考えなければならない。従って CFSD モデルラットを用い、中枢性疲労時のニューロンの新生状態を確認し、睡眠-覚醒サイクル障害の予防と治療薬について検討することは重要である。

中枢性疲労は社会生活の障害を導く基盤である。中枢性疲労の解明は、その病理的危険性に対処し、社会に潜む心の問題の科学的解明に寄与するものと考ええる。その点で、基礎的・科学的な知見と社会問題の距離を有機的に結び付けることができる。

第 6 章 引 用 文 献

- Acworth, I., Nicholass, J., Morgan, B., & Newsholme, E. A. (1986). Effect of sustained exercise on concentrations of plasma aromatic and branched-chain amino acids and brain amines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **137**, 149-153.
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Neuroscience: Glia-more than just brain glue. *Nature*, **457**, 675-677.
- 朝日新聞デジタル (2014). 原因不明の慢性疲労症候群、厚労省が実態調査へ 2014 年 9 月 8 日 〈<http://apital.asahi.com/article/news/2014090800010.html>〉 (2014 年 9 月 8 日)
- (The Asahi Shimbun Digital)
- Baran, H., Jellinger, K., & Deecke, L. (1999). Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, **106**, 165-181.
- Barres, B. A., & Raff, M. C. (1999). Axonal control of oligodendrocyte development. *The Journal of Cell Biology*, **147**, 1123-1128.
- Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews*, **81**, 871-927.
- Blomstrand, E., Perrett, D., Parry-Billings, M., & Newsholme, E. A. (1989). Effect of sustained exercise on plasma amino acid concentrations and on 5-hydroxytryptamine metabolism in six different brain regions in the rat. *Acta Physiological Scandinavica*,

136, 473-481.

Castell, L. M., Yamamoto, T., Phoenix, J., & Newsholme, E. A. (1999). The role of Tryptophan in different conditions of stress. *Advance in Experimental Medicine and Biology*, **467**, 697-704.

Cermak, N., Yamamoto, T., Meeusen, R., Burke, L. M., Stear, S. J., & Castell, L. M. (2012). A-Z of nutritional supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance: part38. *British Journal of Sports Medicine*, **46**, 1027-1028.

Chess, A. C., Landers, A. M., & Bucci, D. J. (2009). L-kynurenien treatment alters contextual fear conditioning and cotext discrimination but not cue-specific fear conditioning. *Behavioral Brain Research*, **201**, 325-331.

Chess, A. C., Simoni, M. K., Alling, T. E., & Bucci, D. J. (2007). Elevations of endogenous kynurenic acid produce spatial working memory deficits. *Schizophrenia Bullten*, **33**, 797-804.

Coppola, A., Wenner, B. R., Ilkayeva, O., Stevens, R. D., Maggioni, M., Slotkin, T. A., Levin, E. D., & Newgard, C. B. (2012). Branched-chain amino acids alter neurobehavioral function in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology Metabolism*, **304**, E405-413.

Corgier, M., Tappaz, M., & Pacheco, H. (1971). Etude in vitro de nouveaux inhibiteurs de la

synthese de la serotonine cerebrale [In vitro study of new inhibitors of brain serotonin synthesis]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*, **273**, 2361-2364.

- Crofford, L. J., Rader, J. I., Dalakas, M. C., Hill, R. H. J., Page, S. W., Needham, L. L., Brady, L. S., Heyes, M. P., Wilder, R. L., & Gold, P. W. (1990). L-tryptophan implicated in human eosinophilia-myalgia syndrome causes fasciitis and perimyositis in the Lewis rat. *Journal of Clinical Investigation*, **86**, 1757-1763.
- Curzon, P., Anderson, D. J., Nikkel, A. L., Fox, G. B., Gopalakrishnan, M., Decker, M. W., & Bitner, R. S. (2006). Antisense knockdown of the rat alpha7 nicotinic acetylcholine receptor produces spatial memory impairment. *Neuroscience Letter*, **410**, 15-19.
- Dombret, C., Nguyen, T., Schakman, O., Michaud, J. L., Hardin-Pouzet, H., Bertrand, M. J., & De Backer, O. (2012). Loss of Maged1 results in obesity, deficits of social interactions, impaired sexual behavior and severe alteration of mature oxytocin production in the hypothalamus. *Human Molecular Genetics*, **21**, 4703-4717.
- Esposito, P., Gheorghe, D., Kandere, K., Pang, X., Connolly, R., Jacobson, S., & Theoharides, T. C. (2001). Acute stress increases permeability of the blood-brain barrier through activation of brain mast cells. *Brain Research*, **888**, 117-127.
- Essa, M. M., Subash, S., Braid, N., Al-Adawi, S., Lim, C. K., Manivasagam, T., & Guillemin, G. J. (2013). Role of NAD(+), oxidative stress, and tryptophan metabolism in autism

- spectrum disorders. *International Journal of Tryptophan Research*, **6** (Suppl 1), 15-28.
- Farmer, A., Fowler, T., Scourfield, J., & Thapar, A. (2004). Prevalence of chronic disabling fatigue in children and adolescents. *The British Journal of Psychiatry*, **184**, 477-481.
- Fernstrom, J. D., & Fernstrom, M. H. (2006). Exercise, serum free tryptophan, and central fatigue. *Journal of Nutrition*, **136**, 553S-559S.
- Fields, R. D. (2013). Neuroscience: Map the other brain. *Nature*, **501**, 25-27.
- File, S. E. (1980). The use of social interaction as a methods for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *Journal of Neuroscience Methods*, **2**, 219-238.
- File, S. E., & Seth, P. (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *European Journal of Pharmacology*, **463**, 35-53.
- Friedman, A., Kaufer, D., Shemer, J., Hendler, I., Soreq, H., & Tur-Kaspa, I. (1996). Pyridostigmine brain Penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response. *Nature Medicine*, **2**, 1382-1385.
- Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S. I., Takada, Y., & Smith, Q. R. (1991). Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *Journal of Neurochemistry*, **56**, 2007-2017.
- Gal, E. M., & Sherman, A. D. (1978). Synthesis and metabolism of 1-kynurine in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, **30**, 607-613.
- Gallager, D. W., & Aghajanian, G. K. (1976). Inhibition of firing of raphe neurons by

tryptophan and 5-hydroxytryptophan: blockade by inhibiting serotonin synthesis with Ro-4-4602. *Neuropharmacology*, **15**, 149-156.

Glowinski, J., & Iversen, L. L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H] norepinephrine, [3H] dopamine and [3H] dopa in various regions of the brain. *Journal of Neurochemistry*, **13**, 655-669.

Guzman-Marin, R., Sutsova, N., Stewart, D. R., Gong, H., Szymusiak, R., & McGinty, D. (2003). Sleep deprivation reduces proliferation of cells in the dentate gyrus of the hippocampus in rats. *Journal of Physiology*, **549**, 563-571.

袴田 康佑・山本 隆宣 (2014). 注意欠陥／多動性障害（AD/HD）動物モデルとしての無アルブミンラットに関する検討 認知神経科学, **16**, 67-76.

(Hakamada, K., & Yamamoto, T. (2014). The nagase analbuminemic rats as an animal model of AD/HD. *Japanese Journal of Cognitive Neuroscience*, **16**, 67-76.)

Harper, A. E. (1977). Human amino acid and nitrogen requirements as the basis for evaluation of nutritional quality of protein. In J. R. Whitaker & S. R. Tannenbaum (Eds.), *Food Proteins*. Avi Publishing Co., Inc., Westport, pp. 363-386.

Herz, A., & Millan, M. J. (1990). Opioids and opioid receptors mediating antinociception at various levels of the neuraxis. *Physiologia Bohemoslovaca*, **39**, 395-401.

Hilmas, C., Pereira, E. F., Alkondon, M., Rassoulpour, A., Schwarcz, R., & Albuquerque, E. X. (2001). The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor

- activity and increases non- α 7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *Journal of Neuroscience*, **21**, 7463-7473.
- Hopkins, F. G., & Cole, S. W. (1901). A contribution to the chemistry of proteids. Part I. A preliminary study of a hitherto undescribed product of tryptic digestion. *Journal of Physiology*, **27**, 418-428.
- Iaccarino, H. F., Suckow, R. F., Xie, S., & Bucci, D. J. (2013). The effect of transient increases in kynurenic acid and quinolinic acid levels early in life on behavior in adulthood: Implications for schizophrenia. *Schizophrenia Research*, **150**, 392-397.
- Ifuku, M., Hossain, S. M., Noda, M., & Katafuchi, T. (2014). Induction of interleukin-1 β by activated microglia is a prerequisite for immunologically induced fatigue. *European Journal of Neuroscience*, **40**, 3253-3263.
- Jacobs, B. L., & Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, **72**, 165-229.
- Kanai, M. (2010). Implication of tryptophan 2,3-dioxygenase and its novel variants in the hippocampus and cerebellum during the developing and adult brain. *International Journal of Tryptophan Research*, **3**, 141-149.
- Katafuchi, T., Kondo, T., Take, S., & Yoshimura, M. (2005). Enhanced expression of brain interferon- α and serotonin transporter in immunologically induced fatigue in rats. *European Journal of Neuroscience*, **22**, 2817-2826.

- Kim, S., Miller, B., Stefanek, M., & Miller, A. (2015). Inflammation-induced activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway: Relevance to cancer-related fatigue. *Cancer*, **121**, 2129-2136.
- Lieberman, H. R., Corkin, S., Spring, B. J., Growdon, J. H., & Wurtman, R. J. (1982). Mood, performance, and pain sensitivity: changes induced by food constituents. *Journal of Psychiatric Research*, **17**, 135-145.
- Lopatina, O., Inzhutova, A., Salmina, A. B., & Higashida, H. (2012). The roles of oxytocin and CD38 in social or parental behaviors. *Frontiers in Neuroscience*, **6**, 182.
- Love, L. A., Rader, J. I., Crofford, L. J., Raybourne, R. B., Principato, M. A., Page, S. W., Trucksess, M. W., Smith, M. J., Dugan, E. M., & Turner, M. L. (1993). Pathological and immunological effects of ingesting L-tryptophan and 1,1'-ethylidenebis (L-tryptophan) in Lewis rats. *Journal of Clinical Investigation*, **91**, 804-811.
- Marshall, J. F., Richardson, J. S., & Teitelbaum, P. (1974). Nigrostriatal bundle damage and the lateral hypothalamic syndrome. *Journal Comparative & Physiological Psychology*, **87**, 808-830.
- Melancon, M., Lorrain, D., & Dionne, I. (2012). Exercise increases tryptophan availability to the brain in older men age 57-70 years. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, **44**, 881-887.
- 三池 輝久 (2009). 小児型慢性疲労症候群と不登校 医学のあゆみ, **228**, 710-716.

(Miike, T. (2009). Childhood chronic fatigue syndrome and school phobia.

Igakunoayumi, **228**, 710-716.)

三正 富美子・林 達也・柴田 真志・吉武 康栄・西嶋 泰史・森谷 敏夫 (1996). 有酸素運動における脳波・血中 β -エンドルフィンの動態 体力科学, **45**, 519-526.

(Mimasa, F., Hayashi, T., Shibata, M., Yoshitake, Y., Nishijima, Y., & Moritani, T. (1996). Movement of electroencephalogram and plasma β -endorphin in the aerobic exercise. *Japanese Journal of Physiology. Fitness sports medicine*, **45**, 519-526.)

Nagase, S., Shimamune, K., & Shumiya, S. (1979). Albumin-deficient rat mutant. *Science*, **205**, 590-591.

Newsholme, E. A., & Blomstrand, E. (2006). Branched-chain amino acids and central fatigue. *Journal of Nutrition*, **136**, 274S-276S.

Osborne, T. B., & Mendel, L. B. (1914). Amino acids in nutrition and growth. *Journal of Biological Chemistry*, **17**, 325-349.

Platten, M., Wick, W., & Van den Eynde, B. (2012). Tryptophan catabolism in cancer: Beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Research*, **72**, 5435-5440.

Pocivavsek, A., Wu, H. Q., Elmer, G. I., Bruno, J. P., & Schwarcz, R. (2012). Pre- and postnatal exposure to kynurenine causes cognitive deficits in adulthood. *European Journal of Neuroscience*, **35**, 1605-1612.

Rapport, M. M., Green, A. A., & Page, I. H. (1984). Crystalline serotonin. *Science*, **108**,

329-330.

Rassoulpour, A., Wu, H. Q., Ferre, S., & Schwarcz, R. (2005). Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum. *Journal of Neurochemistry*, **93**, 762-765.

Rogemont, C., Sarda, N., Gharib, A., & Pacheco, H. (1988). Change in the rat sleep-wake cycle produced by D,L-beta-(1-naphthyl)alanine, a tryptophan analog. *Neuroscience Letter*, **93**, 287-293.

Schrocksnadel, K., Wirleitner, B., Winkler, C., & Fuchs, D. (2006). Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clinica Clinica Acta*, **364**, 82-90.

Schwarcz, R., Bruno, J., Muchowski, P., & Wu, H. (2012). Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nature Reviews Neuroscience*, **13**, 465-477.

Schwarcz, R., & Pellicciari, R. (2002). Manipulation of brain kynurenines: Glial target, neuronal effect, and clinical opportunities. *Perspectives in Pharmacology*, **303**, 1-10.

Sforzo, G. A. (1989). Opioids and exercise. An update. *Sports medicine*, **7**, 109-124.

Shipton, O. A., El-Gaby, M., Apergis-Schoute, J., Deisseroth, K., Bannerman, D. M., Paulsen, O., & Kohl, M. M. (2014). Left-right dissociation of hippocampal memory processes in mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **111**, 15238-15243.

Silver, R. M., Ludwicka, A., Hampton, M., Ohba, T., Bingel, S. A., Smith, T., Harley, R. A.,

- Maize, J., & Heyes, M. P. (1994). A murine model of the eosinophilia-myalgia syndrome induced by 1,1'-ethylidenebis (L-tryptophan). *Journal of Clinical Investigation*, **93**, 1473-1480.
- Starr, K. R., Price, G. W., Watson, J. M., Atkinson, P. J., Arban, R., Melotto, S., Dawson, L. A., Hagan, J. J., Upton, N., & Duxon, M. S. (2007). SB-649915-B, a novel 5-HT_{1A/B} autoreceptor antagonist and serotonin reuptake inhibitor, is anxiolytic and displays fast onset activity in the rat high light social interaction test. *Neuropsychopharmacology*, **32**, 2163-2172.
- Suganuma, T., Suzuki, T., Oshima, M., & Hanano, M. (1998). Change of beta-endorphin concentration in rat brain after administration of indomethacin or carrageenin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **21**, 756-760.
- Swartz, K. J., Matson, W. R., MacGarvey, U., Ryan, E. A., & Beal, M. F. (1990). Measurement of kynurenic acid in mammalian brain extracts and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with fluorometric and coulometric electrode array detection. *Analytical Biochemistry*, **185**, 363-376.
- Tomoda, A., Miike, T., Uezono, K., & Kawasaki, T. (1994). A school refusal case with biological rhythm disturbance and melatonin therapy. *Brain & Development*, **16**, 71-76.
- Tomoda, A., Miike, T., Yamada, E., Honda, H., Moroi, T., Ogawa, M., Ohtani, Y., & Morishita, S. (2000). Chronic fatigue syndrome in childhood. *Brain & Development*, **22**,

60-64.

Tomoda, A., Miike, T., Yonamine, K., Adachi, K., & Shiraishi, S. (1997). Disturbed circadian core body temperature rhythm and sleep disturbance in school refusal children and adolescents. *Biological Psychiatry*, **41**, 810-813.

Weicker, H., & Struder, H. K. (2001). Influence of exercise on serotonergic neuromodulation in the brain. *Amino acid*, **20**, 35-47.

Wejksza, K., Rzeski, W., Okuno, E., Kandefer-Szerszen, M., Albrecht, J., & Turski, W. A. (2005). Demonstration of kynurenine aminotransferases I and II and characterization of kynurenic acid synthesis in oligodendrocyte cell line (OLN-93). *Neurochemical Research*, **8**, 963-968.

Willcock, E. G., & Hopkins, F. G. (1906). The importance of individual amino acids in metabolism: Observations on the effect of adding tryptophane to a diet in which zein is the sole nitrogenous constituent. *Journal of Physiology*, **35**, 88-102.

Wu, H. Q., Pereira, E. F., Bruno, J. P., Pellicciari, R., Albuquerque, E. X., & Schwarcz, R. (2010). The astrocyte-derived alpha7 nicotinic receptor antagonist kynurenic acid controls extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex. *Journal of Molecular Neuroscience*, **40**, 204-210.

Wu, W., Nicolazzo, J. A., Wen, L., Chung, R., Stankovic, R., Bao, S. S., Lim, C. K., Brea, B. J., Cullen, K. M., & Guillemin, G. J. (2013). Expression of tryptophan 2,3-dioxygenase

and production of kynurenine pathway metabolites in triple transgenic mice and human Alzheimer's disease brain. *PLoS One*, **8**, e59746.

Yamamoto, T., Azechi, H., & Board, M. (2012). Essential role of excessive tryptophan and its neurometabolites in fatigue. *The Canadian Journal of Neurological Science*, **204**, 40-47.

Yamamoto, T., Castell, L. M., Botella, J., Powell, H., Hall, G. M., Young, A., & Newsholme, E. A. (1997). Changes in the albumin binding of tryptophan during postoperative recovery: a possible link with central fatigue? *Brain Research Bulletin*, **43**, 43-46.

Yamamoto, T., & Newsholme, E. A. (2001). Tryptophan modulates striatal serotonergic activity relative to fatigue. *The 7th International Congress on Amino Acids and Proteins*, **21**, 55. (Abstract)

Yamamoto, T., & Newsholme, E. A. (2005). Tryptophan and central fatigue. *Fatigue science*, **204**, 35-41.

Yamashita, M., & Yamamoto, T. (2013). Establishment of a rat model of central fatigue induced by chronic sleep disorder and excessive brain tryptophan. *Japanese Journal of Cognitive Neuroscience*, **15**, 67-74.

Yamashita, M., & Yamamoto, T. (2014). Tryptophan and kynurenic acid may produce an amplified effect in central fatigue induced by chronic sleep disorder. *International Journal of Tryptophan Research*, **7**, 9-14.

Yamashita, M., & Yamamoto, T. (2015). Role of glial-neuron interactions in central fatigue

induced by alteration of tryptophan sensitivity. *Proceeding of the 33rd International Australasian Winter Conference on Brain Research*, **33**, 64.

Yang, G., Lai, C. S., Cichon, J., Ma, L., Li, W., & Gan, W. B. (2014). Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning. *Science*, **344**, 1173-1178.

吉村 武・池中 一裕 (2013). 髄鞘 脳科学辞典 2013 年 12 月 7 日

〈<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/%E9%AB%84%E9%9E%98>〉 (2013 年 12 月 7 日)

(Yoshimura, T., & Ikenaka, K.)

謝 辞

本博士学位論文の執筆にあたり、帝塚山学園を始めとした多くの方々のお力添えを頂きました。また、本研究で用いました実験動物に深謝致します。私が学部3年生時に、山本隆宣先生の研究室に受け入れて頂いてから6年間に亘り、先生から御指導を賜りました。今日に至るまで、神経科学に関する基礎知識と応用、研究の着想、研究者の在り方、国内外での研究成果の発表構成などを情熱的、且つきめ細かく御指導頂きました。終始暖かく見守って下さいましたことを心より御礼申し上げます。

本論文の副査である蓮花一己先生には、心理科学的な着眼点を意識した論文構成や執筆に関する貴重な御指導を賜りまして深く感謝申し上げます。思い出の一つに当時、フランスのパリで開催された国際会議にて、私は蓮花先生の招待講演を拝聴した時のことです。私は講演される先生のお姿に、圧倒されたことを忘れることはできません。このモチベーションは、博士後期課程を過ごす上での重要な励みになっております。

同じく副査の同志社大学の竹原卓真先生には、心理学を意識した論文の執筆方法や発信、構成に関する貴重な御指導を賜りまして深く感謝申し上げます。思い出の一つに当時、博士前期課程1年生であった私が竹原先生の講義を受講した時のことです。マンツーマンで御指導を頂きました先生のご専門である複雑系理論は、私の研究における着眼・着想と独創性、仮説の構築の基盤となっております。

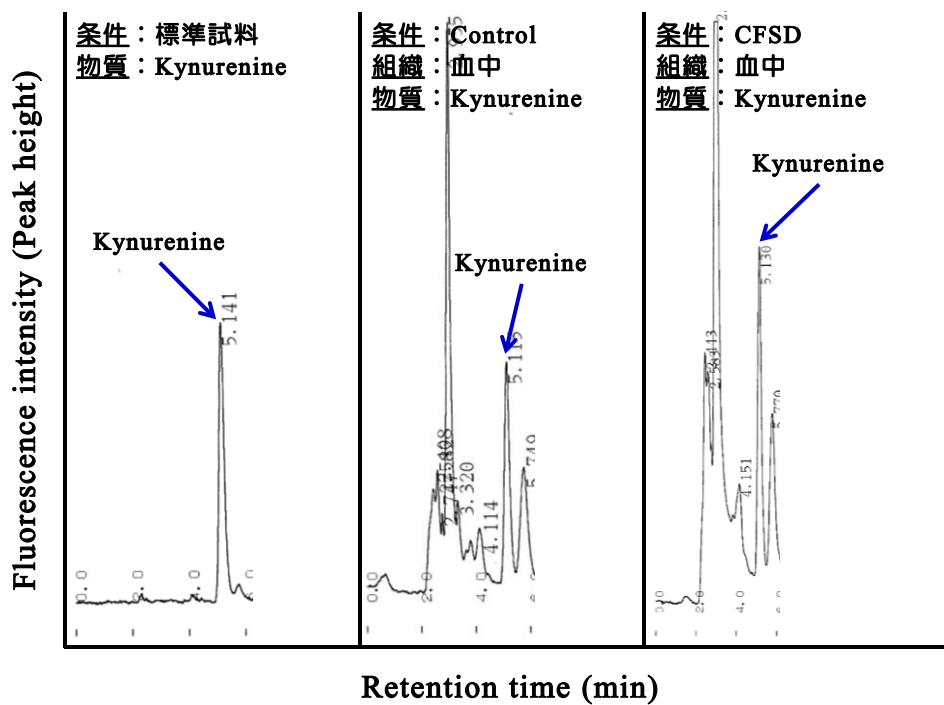
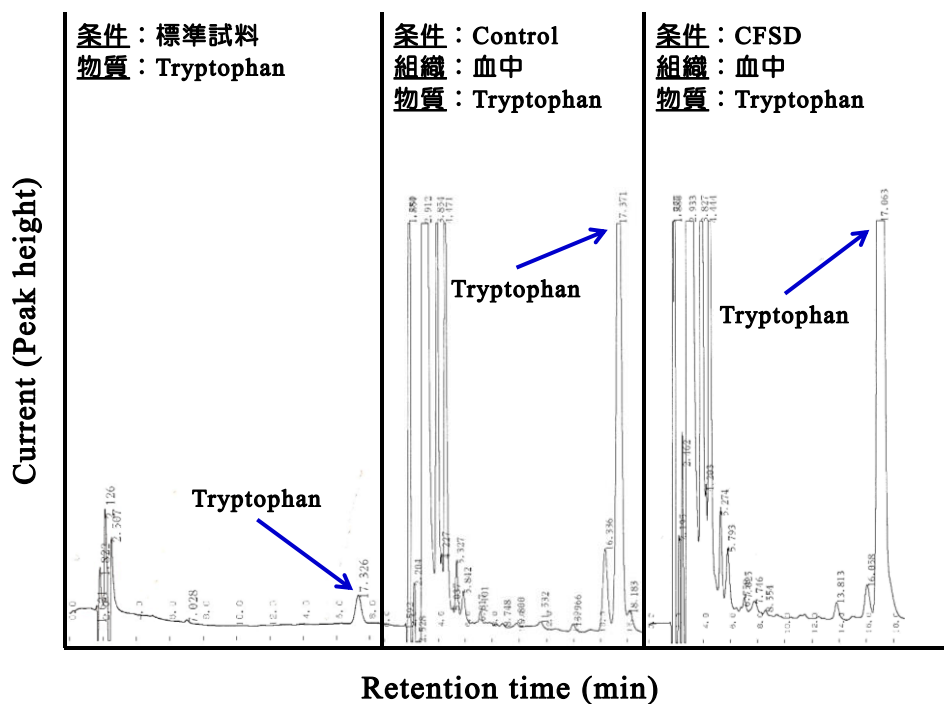
帝塚山大学大学院の院生や修了生、山本研究室で学び卒業した学部生の後輩の皆様にも研究活動に関する情熱的な議論と支援を頂きましたこと深く感謝申し上げます。

最後に、見守ってくれた家族、高校の恩師、友人に御礼申し上げます。

2016年3月31日

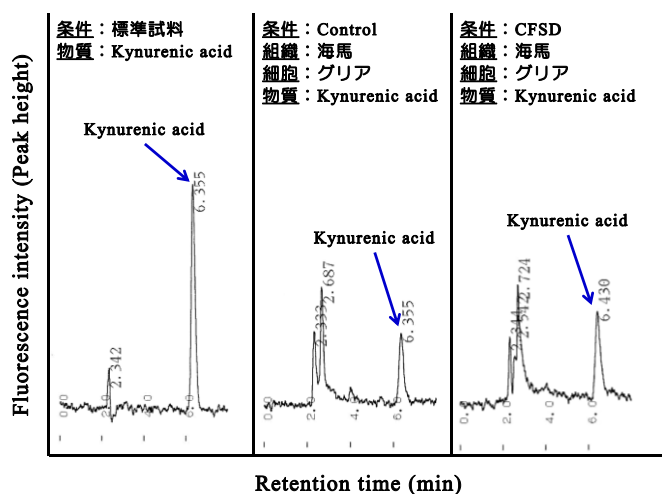
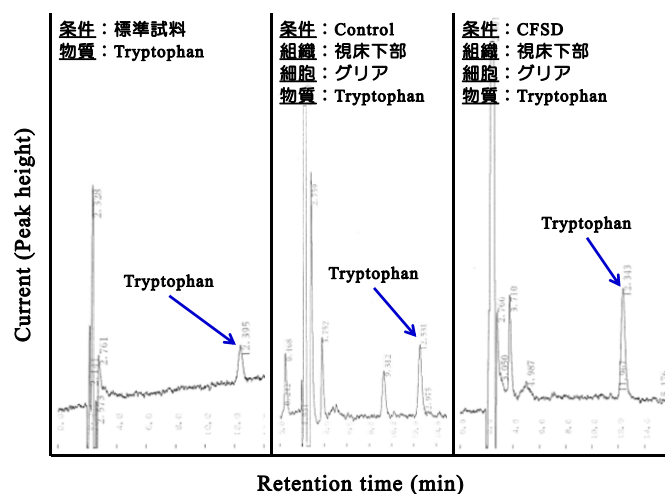
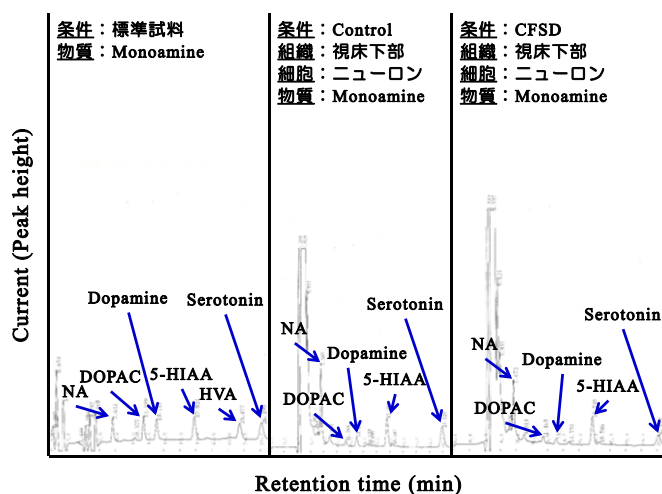
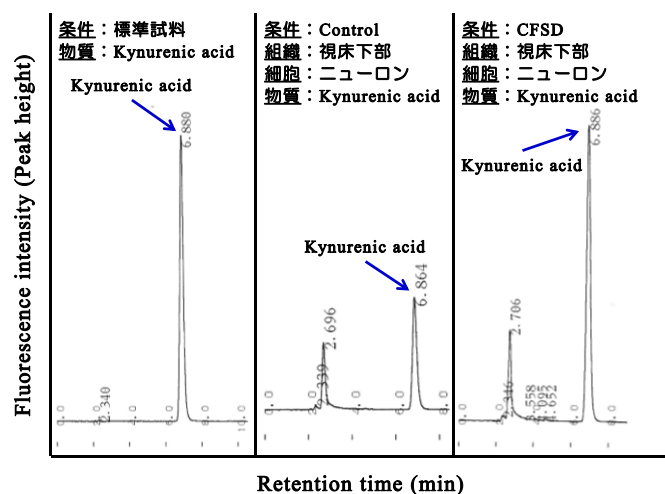
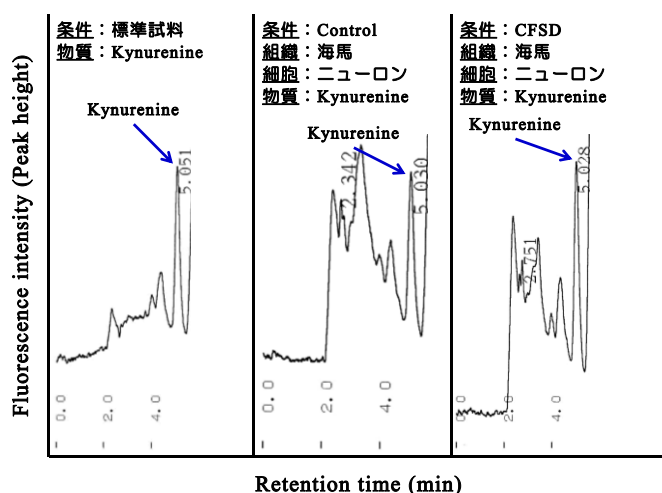
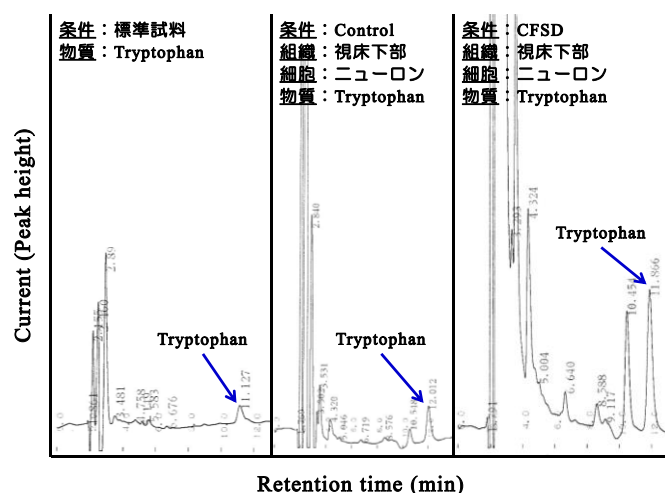
山下 雅俊

付 録



Supplement 1. Chromatograms of standard and plasma samples.

Notes: 生体の物質動態は標準試料の保持時間により同定する（標準試料濃度：Tryptophan 1 μmol , Kynurenine 100 nmol）。



Supplement 2. Chromatograms of standard, tryptophan and kynurenine in neuron and glia.

Notes: 生体の物質動態は標準試料の保持時間により同定する（標準試料濃度：Tryptophan 100 nmol, Kynurenine 100 nmol, Kynurenic acid 1 nmol, Monoamine 100 nmol, NA; noradrenaline, DOPAC; 3,4-dihydroxy-phenylacetic acid, HVA; homovanillic acid, 5-HIAA; 5-hydroxyindole acetic acid）。