

## 2. 疲労及び疲労感の分子・神経メカニズムの解明

### 2.2. 生体信号と神経・免疫・内分泌相関の調整

#### 2.2.3. 疲労等による摂食及び高次脳機能変調様式の解明

富山大学工学部 佐々木和男

#### (1) 要 約

慢性疲労患者の情動に関係した脳部位で有意に減少しているアセチルカルニチンに関し、1)末梢性及び中枢性に摂食を抑制し、これが視床下部外側野（摂食中枢）ニューロン活動の抑制による可能性があること、2)フェントン反応によるヒドロキシルラジカルの発生や培養細胞のヒドロキシルラジカルによる細胞死を抑制するなど抗酸化作用を示すこと、3)老化促進モデルマウス (SAMP8) 脳における脂質過酸化を抑制し、学習・記憶能の低下を防ぐこと、が判明した。また、「みどりの香り」が拘束時のセロトニン代謝の増大を有意に抑えることも明らかになった。

#### (2) 研究目的

疲労関連物質として慢性疲労症候群の患者脳、とくに情動に関連する脳部位で有意にその濃度が低下していることが知られているアセチルカルニチンに着目し、アセチルカルニチンがラットの摂食行動に与える影響並びに摂食中枢及び視床下部腹内側核（満腹中枢）ニューロン活動に与える影響につき検討するとともに[1]、Electron Spin Resonance (ESR)や培養細胞を用いてアセチルカルニチンの抗酸化作用についても調べる。さらに、高い酸化ストレスにさらされ、学習・記憶が障害されている SAMP8 に慢性的にアセチルカルニチンを投与し、脳の脂質過酸化物質や学習・記憶についても検討する。また、疲労や疲労感を軽減する観点から、拘束ストレス時のアミン代謝や摂食量に対する「みどりの香り」の作用についても調べ、疲労、ストレス、疲労関連物質による摂食及び高次脳機能の変調様式並びにその変調防御策の一端を明らかにすることを目的とする。

#### (3) 研究方法

##### 1) 摂食量の測定

ラットの摂食に対する腹腔内及び脳室内投与アセチルカルニチンの作用につき検討した。実験には7または8週令の Wistar 系雄性ラットを用い、12 h/12 h( 明期:6:00~18:00 )の明暗サイクル下で粉末食により飼育した。腹腔内投与 (n=10) の場合には0.1 ml の生理食塩水中に25 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 及び200 mg/kg のアセチルカルニチンを溶解し、投与した。脳室内投与 (n=7) の場合には、麻酔下で第3脳室内に薬物投与用カニューレを慢性的に留置し、術後1週間してから実験を行った。アセチルカルニチンは3 nmol 及び30 nmol の濃度で生理食塩水に溶解し、1 µl/min の速度で10 µl を投与した。腹腔内投与及び脳室内投与いずれの場合でも薬物投与前日の摂食量を対照として用いた。摂食量としては3時間 (18:00~21:00)、夜間 (18:00~6:00)、昼間 (6:00~18:00) 及び1日摂食量 (18:00~18:00) を測定した。

##### 2) 電気生理

実験には5週令の Wistar 系雄性ラットを用いた。エーテルで麻酔後、断頭し、脳を摘出した。摘出した脳からさらにピプラトームで摂食中枢及び満腹中枢を含む厚さ400 µm の前額断脳切片標本を作製した。脳切片標本は95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>ガスでバブリングした室温のリンガー液中で少なくとも1時間プレインキュベーションした後、記録槽に移した。記録槽には1 ml/min の流速で95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>ガスでバブリングしたリンガー液を灌流した。ニューロン活動はガラス微小電極を用いて細胞外記録し、前置及び主増幅器により増幅した。さらに、増幅した信号をパソコンに取り込み、1秒間あたりのスパイク数をカウントし、ハードディスクに連続的に記録した。アセチルカルニチンは1、10 及び100 nM の濃度になるようリンガー液に溶解し、3分間投与した。

##### 3) Electron Spin Resonance (ESR)を用いたスピントラッピング法

鉄 - 過酸化水素フェントン反応系で発生するヒドロキシルラジカルを5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) でトラップし、ヒドロキシルラジカルとDMPOの付加体を指標に、アセチルカルニチン及びカルニチンの抗

酸化作用を検討した。1.5 ml のマイクロテストチューブに、0.1、0.5、1、5、10、20 mM のアセチルカルニチン溶液またはカルニチン溶液を 100  $\mu$ l、10 mM の DMPO 溶液を 800  $\mu$ l、20 mM の過酸化水素溶液を 50  $\mu$ l、2 mM の塩化鉄( )溶液を 50  $\mu$ l の順で添加し、ボルテックスで 10 秒間攪拌した。攪拌後、直ちに 2 本の毛細管に反応液を 25  $\mu$ l ずつ (全量 50  $\mu$ l) 分取し、毛細管の底を粘土で閉じて毛細管に付いた余分な水分をキムワイプでふき取り、ESR チューブに入れ ESR 測定装置にセットした。測定条件を設定した後、反応開始 (塩化鉄溶液の添加時を反応開始とした) から、3 分後に ESR 測定を行なった。各濃度におけるシグナルの強度は、コントロールであるフェントン反応のみを 100% としたときの相対値として表した。

#### 4) モデル神経細胞の培養

光フェントン試薬 NP- [2] に紫外線を照射するとヒドロキシルラジカルが発生し、PC-12 細胞の細胞死を招く。この PC-12 細胞の細胞死に対するアセチルカルニチン及びカルニチンの保護作用につき検討した。まず、紫外線の照射時間並びに NP- の濃度を決定することを試みた。照射時間の決定では、24 穴プレートに PC-12 細胞が接着しているのを確認後、培養液を吸い取り、PBS を加えた。CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 30 分間静置後ピペティングし、それぞれをマイクロチューブに移し、トランスイルミネータで紫外線を 1 から 5 分間照射した。照射後 1200 rpm で 8 分間遠心し、細胞を沈殿させ上清を吸い取り、これに 1 ml の培養液を加え、ボルテックスで攪拌した。その後 24 穴プレートに戻し、24 時間培養後ヘモサイトメータで生細胞数を計測した。結果は対照の生細胞数を 1 としたときの割合で表した。その結果、1、2、3、4 分の照射では生細胞数の割合は対照に比べ有意に変化しなかったが、5 分間の照射ではその割合は有意に減少した。そこで、以後の実験では照射時間を平均値が対照と同程度であった 2 分間とした。NP- の濃度に関しては、PBS に 1 から 5  $\mu$ M の NP- を加えたこと及び紫外線照射時間を 2 分間としたこと以外、上と同様の実験手順であった。

#### 5) 脂質過酸化物の測定

1-naphthylidiphenylphosphine (NDPP) が脂質過酸化物 (LOOH; Lipid hydroperoxides) と定量的に反応して 1-naphthylidiphenylphosphine oxide (NDPPO) になることを利用し、生成した NDPPO を HPLC で高感度に測定することにより、そのピーク高さから脂質過酸化物量を定量することができる [3]。この方法により SAMP8 脳における脂質過酸化物の量を調べた。すべての作業は氷上で行き、室内は暗くし、室温 20 以下で行なった。また、実験に使用する器具類はすべて 5% (v/v) 硝酸溶液に 8 時間以上浸し、脱金属処理した。脳を 5 倍量の PBS (-) 溶液の中でホモジナイズ (2000 rpm  $\times$  10 回) した。ホモジネート 1 ml を脂質過酸化物測定に使用し、残りはタンパク質定量に用いた。ホモジネート 1 ml とクロロホルム : メタノール (2 : 1, 0.01% BHT 含有) 溶液 3 ml をテフロン製遠心管 (5 ml 容量) に移し入れ 1 分間手でよく振り混ぜた。遠心分離 (2000 rpm, 2 分) を行った後、クロロホルム相をあらかじめ窒素置換 (30 秒) しておいたナスフラスコ (25 ml 容量) に分取した。クロロホルム相を移し入れたナスフラスコ内を再び窒素ガスで 30 秒置換した。テフロン製遠心管にクロロホルム 2 ml を添加再度 1 分間よく振り、遠心分離 (2000 rpm 2 分) を行なった。再びクロロホルム相をナスフラスコに分取し、ナスフラスコ内を窒素ガスで 30 秒置換した。集めたクロロホルム相をエバポレーターを用いて常温で減圧乾固した。残渣に 300  $\mu$ l クロロホルムを加えて再溶解した (これを脂質抽出液とした)。脂質抽出液 100  $\mu$ l と 2 mM NDPP 100  $\mu$ l を褐色試験管に加え、ボルテックスで 10 秒攪拌した。遠心分離 (2000 rpm, 2 分) した後、60 で 1 時間反応させた。反応溶液を氷中で冷却した後、攪拌、遠心分離 (2000 rpm, 2 分) した。反応溶液は使用するまで氷中で保存した。各試料溶液中の脂質過酸化物量は既知濃度の NDPPO (40  $\mu$ M) 溶液のピーク高さとの比較により算出した。毎時測定において、標準物質として 25  $\mu$ M、50  $\mu$ M クメンヒドロペルオキシドを NDPP と反応させた溶液を調製し、反応率の確認を行った。HPLC のカラムには、Cosmosil 5 C<sub>18</sub> カラム (4.6  $\times$  150mm; ナカライテスク, Code No. 390-47) を使用した。HPLC 測定条件は UV 検出波長 292 nm、移動相 85% メタノール (メタノール : 蒸留水 = 85:15)、流速 1 ml/分、注入量 10  $\mu$ l で行った。測定終了後、移動相を 100% メタノールに交換し、流速 1 ml/分で 1 時間カラムの洗浄を行った。

蛋白質の定量は次のように行った。脳ホモジネートを PBS (-) 溶液で 400 倍希釈した。この希釈溶液 400  $\mu$ l に試薬 A 液 200  $\mu$ l、試薬 B 液 1600  $\mu$ l を添加し、ボルテックスで 10 秒攪拌した。分光光度計で 750 nm の吸光度を測定した。スタンダードには牛血清アルブミン (BSA) を用いた。BSA 10 mg を PBS (-) 溶液 10 ml に溶解させ 1 mg/ml の BSA 溶液を調製し、この溶液を希釈して 40、80、120、160、200  $\mu$ g/ml の BSA 溶液

を調製した。各濃度 BSA 溶液 400  $\mu$ l に試薬 A 液 200  $\mu$ l、試薬 B 液 1600  $\mu$ l を添加し、検量線を作成した。

#### 6) 受動的回避学習

SAMP8 を 3 群に分け、それぞれに生理食塩水、100 mg/kg 及び 400 mg/kg のアセチルカルニチンを投与した。投与方法は腹腔内投与で、生後 3 週目から隔日に 4 ヶ月齢まで続けた。4 ヶ月後、ステップスルー型の受動的回避学習課題[4]を用いて、学習・記憶能力を測定した。十分実験装置に慣れさせた後、明室に SAMP8 を置き、暗室に入るまでの時間を測定した(獲得試行、acquisition trial)。暗室にはいると直ちに明室と暗室のドアを閉め電気ショックを与えた。電気ショックの強度は 1mA であった。24 時間後、再び SAMP8 を明室に入れ、暗室へはいるまでの時間を測定した(想起試行、retention trial)。

#### 7) マイクロディアリーシス

ネブタール麻酔下ラットの摂食中枢に透析膜をもつマイクロディアリーシスプローブを慢性的に植え込んだ。手術侵襲から回復後、透析液をプローブに灌流し、回収液中のセロトニン(5-HT)、5-HT 代謝産物(5-HIAA)、ドーパミン(DA)、DA 代謝産物(HVA、DOPAC)量を高速液体クロマトグラフで拘束前(200 分)、中(200 分)、後(200 分)にわたり 25 分間隔で測定した。「みどりの香り」は拘束中ラットの鼻先のチップに 200  $\mu$ l たらした。

### (4) 研究成果

#### 1) 摂食行動に対するアセチルカルニチンの作用

25 mg/kg、50 mg/kg 及び 100 mg/kg のアセチルカルニチンを腹腔内投与しても対照(生理食塩水投与群)と比較して夜間及び 1 日摂食量には変化が認められなかった。しかし、200 mg/kg のアセチルカルニチンを投与すると両摂食量は有意に減少した。減少の程度は夜間量及び 1 日量で同じく 3.7 g であった。いずれの投与量でも 3 時間及び昼間摂食量に変化はなかった。

3 nmol アセチルカルニチンの脳室内投与は有意に夜間及び 1 日摂食量を抑制した。抑制の程度は夜間量で 6.6 g、1 日量で 8.0 g であった。一方、30 nmol のアセチルカルニチン投与は夜間量のみを抑制し、1 日量には変化がなかった。夜間摂食量の減少の程度は 3.3 g であった。いずれの濃度においても 3 時間及び昼間摂食量に変化はなかった。

#### 2) 摂食中枢及び満腹中枢ニューロン活動に対するアセチルカルニチンの作用

16 個の摂食中枢ニューロンに 1 nM のアセチルカルニチンを投与したところ、11 個(69%)は促進・抑制、1 個(6%)は促進された。残りの 4 個(25%)は無変化であった。また、65 個の摂食中枢ニューロンに 10 nM のアセチルカルニチンを投与したところ、9 個(14%)が促進・抑制、8 個(12%)が抑制、1 個(2%)が促進された。47 個(72%)は無変化であった。100 nM のアセチルカルニチンの場合には記録した 38 個の摂食中枢ニューロン中 3 個(9%)が促進・抑制、1 個(3%)が抑制され、残りの 34 個(89%)は無変化であった。摂食中枢とは異なり、満腹中枢のニューロンはアセチルカルニチンにほとんど反応しなかった。1 nM のアセチルカルニチンは記録した 20 個のニューロン中 1 個(5%)だけを促進、他の 19 個(95%)のニューロンには無効であった。10 nM のアセチルカルニチンも記録した 20 個のニューロン中 1 個(5%)だけを促進し、残りの 19 個(95%)には無効であった。

#### 3) 鉄-過酸化水素フェントン反応系におけるアセチルカルニチン及びカルニチンの抗酸化作用

図 1 はカルニチン(左)及びアセチルカルニチン(右)の濃度変化に対する DMPO-OH の ESR スペクトルの変化を示したものである。各スペクトル両側のシグナルは標準物質マンガンに対するもので、中の 4 つが DMPO-OH のシグナルである。この内、左から 2 番目のシグナルを見ると、カルニチンの場合その濃度が 0.1 mM 及び 0.5 mM ではシグナルの大きさは対照に比べ小さいが、1 mM から 20 mM にかけて次第に大きくなることわかる。一方、アセチルカルニチンの場合、シグナルの大きさは 0.1 mM から 20 mM にかけて小さいままである。1 mM からのカルニチンで DMPO-OH シグナルの強度が大きくなる理由として、2 価の鉄と過酸化水素によるフェントン反応によって発生した 3 価の鉄がカルニチンと錯体を形成し、これに過酸化水素がさらに作用することによってよりヒドロキシルラジカルを発生させることが考えられる。そこで UV スペクトロメータで吸収係数を測定することにより 3 価の鉄とカルニチンあるいはアセチルカルニチンとの間での錯体形成を調べた。図 2 がその結果である(左:カルニチン、右:アセチルカルニチン)。カルニチンの場合、高濃度になると波長

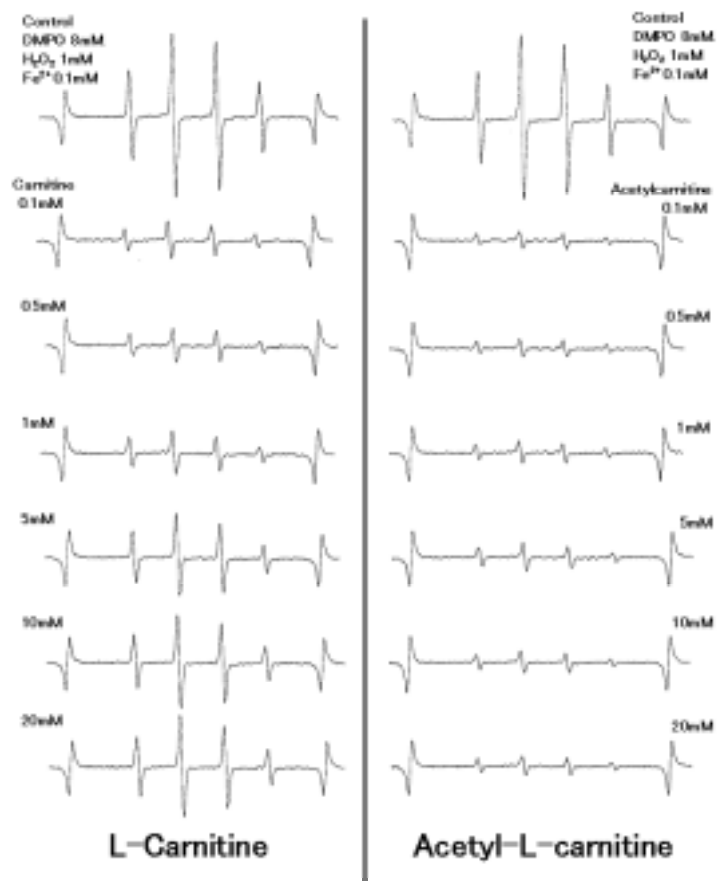


図1 カルニチン（左）及びアセチルカルニチン（右）の濃度変化に対する ESR スペクトル

300 nM での吸収係数が減少し、350 nM での吸収係数は増加した。一方、アセチルカルニチンの場合には 300 nM での吸収係数が減少するだけであった。

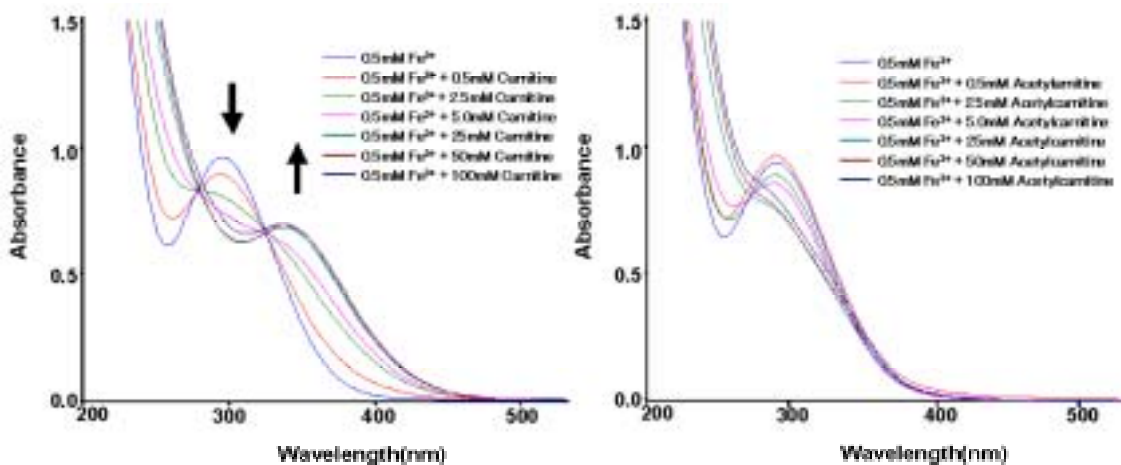


図2 3価の鉄とカルニチン(左)及びアセチルカルニチン(右)との錯体形成 (スペクトル変化)

4) ヒドロキシルラジカルによるモデル神経細胞 PC-12 の細胞死に対するアセチルカルニチンの保護作用  
 NP- の濃度に関し、1 μM では生細胞数の割合に対照と比べ有意な変化はなかったが、2 から 5 μM の濃度で

は生細胞数の割合は有意に減少した。さらに、0.5 から 2  $\mu\text{M}$  の範囲で紫外線を照射（ヒドロキシルラジカルが発生）した場合としなかった（ヒドロキシルラジカル発生せず）場合につき、生細胞数の割合を調べた。その結果、使用した NP- のいずれの濃度でも紫外線を照射した群で有意に生細胞数の割合が減少した。そこで、以後の実験では NP- の濃度として 1  $\mu\text{M}$  を用いることにした。なお、NP- の溶媒であるアセトニトリルは PC-12 細胞の生存に全く影響を及ぼさなかった。

紫外線照射時間 2 分、NP- の濃度 1  $\mu\text{M}$  という条件下でアセチルカルニチン並びにカルニチンのヒドロキシルラジカルに対する抗酸化作用を PC-12 細胞の生細胞数の割合で検討した。アセチルカルニチン及びカルニチンは PBS に NP- と同時に加えた。濃度はいずれの場合でも 25、50、75、100  $\mu\text{M}$  であった。アセチルカルニチンを加えない場合（0  $\mu\text{M}$ ）生細胞数の割合は約 0.6 であった。アセチルカルニチンを 25  $\mu\text{M}$  及び 50  $\mu\text{M}$  加えると生細胞数の割合はそれぞれ約 0.7 及び 0.8 と増加した。しかし、アセチルカルニチンの濃度をさらに 75  $\mu\text{M}$  及び 100  $\mu\text{M}$  と増加すると、逆に生細胞数の割合はそれぞれ約 0.7 及び 0.6 と減少した。統計的検定の結果、25  $\mu\text{M}$  での生細胞数の割合はアセチルカルニチンを加えない場合の生細胞数の割合に比べ有意に高かった ( $p < 0.001$ )。カルニチンの場合、25  $\mu\text{M}$  で生細胞数の割合は約 0.7 とカルニチン投与群では最も高かったが、カルニチンを投与しない場合に比べ有意な増加ではなかった。

#### 5) SAMP8 脳における脂質過酸化物の定量

1 及び 2 ヶ月齢の SAMR1 及び SAMP8 脳における脂質過酸化物量を調べると、1 ヶ月齢では SAMR1 及び SAMP8 の脂質過酸化物量はそれぞれ 92.7 及び 93.1 pmol/mg protein で、両者の間には有意な差がなかった。一方、2 ヶ月齢ではそれらは 119.9 及び 188.1 pmol/mg protein になり、SAMP8 での脂質過酸化物は SAMR1 に比べ有意に高かった ( $p < 0.05$ )。1 ヶ月齢と 2 ヶ月齢の比較では、SAMR1 には有意な差はなかったが、SAMP8 で有意な差が認められた ( $p < 0.01$ )。すなわち、SAMP8 では 2 ヶ月齢から脳組織が酸化的損傷を受け、結果として脂質過酸化物が増加するということが明らかになった。

#### 6) SAMP8 の受動的回避学習及び脂質過酸化物に対するアセチルカルニチンの作用

上述の研究でアセチルカルニチンには抗酸化作用があり、また SAMP8 の脳が酸化的ストレスを受けていることが明らかになった。そこで、SAMP8 にアセチルカルニチンを投与することにより、その抗酸化作用で酸化的ストレスが緩和され、結果的に学習・記憶が改善されるか否かを検討した。図 3 がその結果である。獲得試行ではいずれの群でもその潜時は 20 から 30 秒にあり、各群間に有意な差はなかった。一方、想起試行では生理食塩

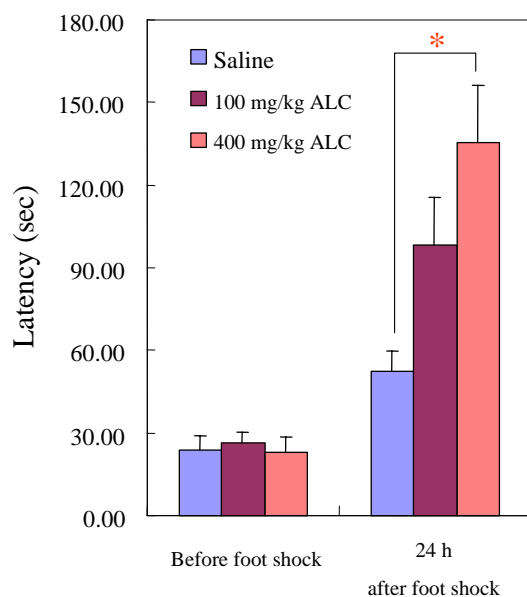


図 3 アセチルカルニチンによる回避学習潜時の増大

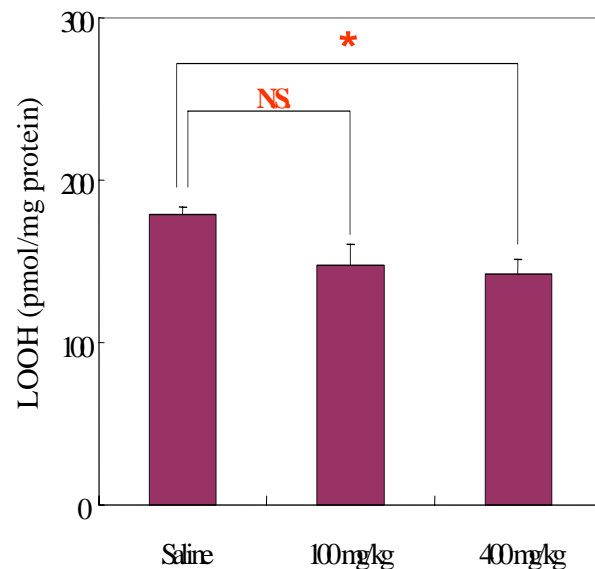


図 4 アセチルカルニチンによる脂質過酸化の減少

水投与群 (n=6) の潜時は 52.2 秒、100 (n=11) 及び 400 mg/kg (n=6) アセチルカルニチン投与群の潜時はそれぞれ 98.1 及び 135.5 秒であった。統計的検定の結果は 400 mg/kg 投与群の潜時が生理食塩水投与群の潜時に比べ有意に長いことを示す。脂質過酸化物は対照群に比べ 400 mg/kg 投与群で有意に低かった (図 4)。

#### 7) 拘束時ラットの 5-HT 及び DA 代謝に対する青葉アルデヒドの作用

ラットを拘束すると 25 分後に摂食中枢の 5-HT 代謝は有意に増加し、50 分後にはほぼ対象のレベルに戻った。一方、5-HT の代謝産物である 5-HIAA は拘束開始時から拘束後も増大した。拘束時に青葉アルデヒドを嗅がせると、5-HT 及び 5-HIAA の増大は有意に減少した。拘束時、DA 代謝産物の HVA 及び DOPAC も増大したが、青葉アルデヒドはこの増大には効果がなかった。摂食に関し、拘束は 3 時間摂食量を有意に減少した。しかし、拘束時に青葉アルデヒドを嗅がせると摂食量の減少は消失した。

#### (5) 考 察

アセチルカルニチンの末梢投与及び中枢投与で摂食量が低下した。したがって、アセチルカルニチンには摂食抑制作用があることが明らかになった。中枢投与の場合には 30 nmol の投与に比べ、3 nmol の投与において摂食抑制の程度が大きかった。したがって、アセチルカルニチンの摂食抑制作用には至適濃度がある可能性が示唆された。末梢投与による摂食抑制の機序は本実験からは明らかでないが、アセチルカルニチンが脳血液関門を通ることから、中枢性に作用している可能性がある。

アセチルカルニチンによる摂食抑制の中枢機序を知るため、摂食中枢及び満腹中枢ニューロンに対するアセチルカルニチンの作用を調べた。満腹中枢のニューロンはほとんどアセチルカルニチンに反応しなかったが、摂食中枢のニューロンはアセチルカルニチンに反応した。反応様式としてはアセチルカルニチン投与後ニューロン活動が一過性に促進されその後強力に抑制されるものが多かった。この反応の主効果を抑制と考えれば、1 nM のアセチルカルニチンで抑制されるニューロンは 69%、10 nM で 26%、100 nM で 12% であった。これまでの研究で摂食中枢ニューロン活動の抑制は摂食の低下に結びつくと考えられていることから [5]、本実験の結果はアセチルカルニチンが摂食を中枢性に抑制する機序はアセチルカルニチンが摂食中枢ニューロン活動を抑制することによると考えられる。低濃度のアセチルカルニチンでより強い摂食抑制が起こるという事実も、低濃度のアセチルカルニチンがより多くの摂食中枢ニューロンを抑制するという本実験結果で説明できると考えられる。

アセチルカルニチン存在下で鉄 - 過酸化水素によるフェントン反応を引き起こすと、アセチルカルニチン濃度が 0.1 から 20 mM の範囲で DMPO とヒドロキシルラジカルの付加体の量が 1/5 から 1/10 に減少することが明らかになった [6]。一方、カルニチンの場合 0.1 から 1 mM の範囲では付加体の量は 1/5 から 1/3 に減少したが、5 から 20 mM の範囲では減少の程度は減弱し、アセチルカルニチンの場合と比較すると有意に高い値を示した。すなわち、アセチルカルニチンは低濃度から高濃度までラジカルの発生を抑える抗酸化作用を示すが、カルニチンは高濃度になるとラジカルの発生を逆に促進する作用をもつことが判明した。このカルニチンの作用と同様の作用を示す物質が乳酸である。Ali ら [7] は、乳酸が鉄 - 過酸化水素フェントン反応系で発生する 3 価の鉄と錯体を形成し、これに過酸化水素が作用することでより多くのヒドロキシルラジカルが発生することを明らかにした。そこで錯体が形成されると、300 nm での吸光係数が減少し、350 nm での吸光係数が増大することを指標に、カルニチンによる錯体形成を UV スペクトロメータで調べたところ、乳酸の場合と同様であった。したがって、カルニチンが高濃度で生体内に存在することは生体にとって好ましい状態ではない可能性が示唆された。

アセチルカルニチン及びカルニチンが実際神経細胞に対し抗酸化作用を示すか否かを PC-12 細胞の培養系で調べた結果、アセチルカルニチンには 50  $\mu$ M で確かに抗酸化作用があり、ヒドロキシルラジカルによる細胞死が抑制されることが明らかになった。これまでの慢性疲労に関する研究によると、慢性疲労症候群の患者の脳では情動に関係する部位でアセチルカルニチンの濃度が低下していることが知られている。本実験の結果は、常に酸化的ストレスにさらされている脳部位でアセチルカルニチン濃度が低下すると、その抗酸化作用が十分発揮できず、その部位での組織に障害が生じ、結果的に神経回路が機能しなくなる可能性を示唆するのかもしれない。

SAMP8 は生後 2 から 3 ヶ月目で学習・記憶機能が低下することで知られている。これが酸化的ストレスによるのかどうかを調べるため、脳の脂質過酸化物の量を測定したところ、2 ヶ月齢のラットで有意に増加していた。実際、抗酸化作用をもつアセチルカルニチンを 3 ヶ月にわたり SAMP8 腹腔内に投与しておくと、脂質過酸化物

量は有意に低下し、学習・記憶機能は有意に改善された。Prickaerts ら[8]も、ストレプトゾトシンを投与するとラットの空間学習は障害されるが、アセチルカルニチンを慢性的に投与しておくことが改善されることを報告している。Caprioli ら[9]も、アセチルカルニチンを慢性的に投与しておくことで低下した老齢ラットの空間学習能力が改善されることを報告している。これらの結果は、アセチルカルニチンが抗酸化作用等をおして脳組織の障害を保護し、結果的に学習・記憶を改善する作用をもつことを示唆する。

疲労や疲労感を和らげる伝統療法に森林浴がある。森林では木々の葉が、いわゆる「みどりの香り」をだす。そこで、「みどりの香り」の成分の一つである青葉アルデヒドをラットの拘束中に嗅がせたところ、拘束時に増大する 5-HT 代謝が有意に減弱することが判明した。減弱の機序は現在明らかでないが、嗅細胞にウイルスを感染させると 5-HT を産生する背側縫線核の細胞が障害されることから[10]、青葉アルデヒドにより背側縫線核の 5-HT 細胞の活動が抑制され、5-HT 代謝が抑えられる可能性がある。

#### (6) 引用文献

- [1] Oomura Y.: Significance of glucose, insulin, and free fatty acid on the hypothalamic feeding and satiety neurons. In D. Novin, W. Wyrwicka and G.A. Bray (Eds.), *Hunger: Basic Mechanisms and Clinical Implications*, Raven Press, New York, pp.145-157, 1976.
- [2] Matsugo S., Mizuno M. and Konishi T.: Free radical generating and scavenging compounds as a new type of drug. *Cur. Med. Chem.*, 2:763-790, 1995.
- [3] Tokumaru S., Tsukamoto I., Iguchi H., Kojo S.: Specific and sensitive determination of lipid peroxides with chemical derivatization into 1-naphtyldiphenylphosphine oxide and high-performance liquid chromatography. *Anal. chem. Acta.*, 307:97-102, 1995.
- [4] Sasaki K., Tooyama I., Li A.-J., Oomura Y. and Kimura H.: Effects of an acidic fibroblast growth factor fragment analog on learning and memory and on medial septum cholinergic neurons in senescence-accelerated mice. *Neurosci.*, 92:1287-1294, 1999.
- [5] Oomura Y., Ooyama H., Naka F., Yamamoto T. Ono T. and Kobayashi N.: Some stochastic patterns of single unit discharges in the cat hypothalamus under chronic conditions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 157:666-689, 1969.
- [6] Yasui F., Imai Y., Matsugo S., Sasaki K. and Konishi T.: Antioxidant and/or prooxidant activities of carnitine and its derivative on the hydroxyl radical generation by the Fenton reaction. *ITT Lett. Batt. New Technol. & Med.*, in press.
- [7] Ali M.A., Yasui F., Matsugo S. and Konishi T.: The lactate-dependent enhancement of hydroxyl radical generation by the Fenton reaction. *Free Radic. Res.*, 32: 429-438, 2000.
- [8] Prickaerts J., Blokland A., Honig W., Meng F. and Jolles J.: Spatial discrimination learning and choline acetyltransferase activity in streptozotocin-treated rats; effects of chronic treatment with acetyl-L-carnitine. *Brain Res.*, 674:142-146, 1995.
- [9] Caprioli A., Markowska A.L. and Olton D.S.: Acetyl-L-carnitine: chronic treatment improves spatial acquisition in a new environment in aged rats. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 50: B232-236, 1995.
- [10] Mohammed A.K., Maehlen J., Magnusson O., Fonnun F. and Kristensson K.: Persistent changes in behaviour and brain serotonin during ageing in rats subjected to infant nasal virus infection. *Neurobiol. Aging*, 13:83-87, 1992.

#### (7) 成果の発表

##### 1) 原著論文による発表

##### ア) 国外誌

1. Leptin effects on feeding-related hypothalamic and peripheral neuronal activities in normal and obese

- rats. Shiraishi T., Sasaki K., Nijima A. and Oomura Y., *Nutrition* 15:576-578, 1999.
2. Effects of leptin and orexin-A on food intake and feeding related hypothalamic neurons. Shiraishi T., Oomura Y., Sasaki K. and Wayner M.J., *Physiol. & Behav.*, 71:251-261, 2000.
  3. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice. Matsugo S., Kitagawa T., Minami S., Esashi Y., Oomura Y., Tokumaru S., Kojo S., Matsushima K. and Sasaki K., *Neurosci. Lett.*, 278:105-108, 2000.
  4. Yasui F., Imai Y., Matsugo S., Sasaki K. and Konishi T.: Antioxidant and/or prooxidant activities of carnitine and its derivative on the hydroxyl radical generation by the Fenton reaction. *ITE Lett. on Batt. New Technol. & Med.*, 3: 58-62, 2002.
  5. Yasui F., Matsugo S., Ishibashi M., Kajita T., Ezashi Y., Oomura Y., Kojo S. and Sasaki K.: Effect of chronic acetyl-L-carnitine treatment on brain lipid hydroperoxide level and passive avoidance learning in senescence-accelerated mice. *Neurosci. Lett.*, 334: 177-180, 2002.

## 2) 原著論文以外による発表

### ア) 国内誌

1. 佐々木和男、白石武昌、大村 裕、オレキシンと摂食調節. *Clin. Neurosci.*, 19:85-86, 2001.

## 3) 口頭発表

### イ) 応募・主催講演等

1. Oomura Y., Hori N., Shiraishi T., Sasaki K. and Takeda H.: Leptin suppresses food intake through the hypothalamus and facilitates learning and memory through the hippocampus. 25<sup>th</sup> SEIRIKEN Int. Symp. on Ion Channels & Receptors in Cell Physiol., Okazaki, Jan., 1999.
2. Sasaki K., Ishibashi M., Kawahara N., Yamato T., Shiraishi T. and Oomura Y.: Actions of leptin on neurons of arcuate nucleus in Wistar and Zucker rats. 8<sup>th</sup> Annual Meeting of Int. Behav. Neuroscience Society, Nancy, June, 1999.
3. Shiraishi T., Sasaki K., Nijima A. and Oomura Y.: Roles of leptin and orexins as an endogenous feeding modulators in rats: behavioral and electrophysiological evidence. Satellite Symp. on Brain Mechanisms and Ingestion, Nancy, June, 1999.
4. Oomura Y., Hori N., Shiraishi T., Sasaki K., Aou S. and Li X.-L.: Endogenous satiety substances, 2-buten 4-olide, aFGF and leptin facilitate learning and memory through the hippocampus. 8<sup>th</sup> Annual Meeting of Int. Behav. Neuroscience Society, Nancy, June, 1999.
5. Oomura Y., Hori N., Shiraishi T., Sasaki K. and Takeda H.: Endogenous satiety substances, 2-buten-4-olide, acidic fibroblast growth factor (aFGF) and leptin facilitate learning and memory through the hippocampus. Int. Conf. devoted to 150<sup>th</sup> anniversary of Prof. Pavlov's birth, St. Petersburg, Sept., 1999.
6. Sasaki K., Kawahara N., Ishibashi M., Kow L.-M., Shiraishi T., Muramoto K. and Oomura Y.: Effects of leptin and orexin-A on the neuronal activity of the arcuate nucleus(ARC) in rats. 29<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, Miami, Oct., 1999.
7. Oomura Y., Hori N., Aou S., Li X., Sasaki K. and Shiraishi T.: Learning, memory and the hippocampal



- activity in genetically obese rodents. 29<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience, Miami, Oct., 1999.
8. 大村 裕、粟生修司、李学良、堀 伸顕、佐々木和男：内在性摂食調節物質及び空腹物質の学習記憶に対する作用機構．第16回微量栄養素研究会抄録集、18、1999．
  9. 大村 裕、堀 信顕、白石武昌、佐々木和男、武田弘志、辻 稔：満腹物質レプチンの海馬を介する学習記憶促進．第9回日本病態生理学会大会、岡山、1999年1月.
  10. 白石武昌、佐々木和男、新島 旭、大村 裕：ラット摂食行動とニューロン活動に対する内在性摂食調節物質レプチンとオレキシンの作用．第76回日本生理学会大会、長崎、1999年3月.
  11. 一ノ瀬充行、澤田正史、佐々木和男、大村 裕：免疫担当細胞マクロファージに対するオレキシンの作用．第76回日本生理学会大会、長崎、1999年3月.
  12. 佐々木和男、堀 信顕、白石 武昌、大村 裕：学習・記憶に対する内在性摂食調節物質レプチンの作用．第76回日本生理学会大会、長崎、1999年3月.
  13. 松郷誠一、南 誠賢、江指慶春、佐々木和男：加齢に伴う老化促進マウスの脳の酸化損傷．日本化学会春季年会、横浜、1999年3月.
  14. 大村 裕、粟生修司、李 学良、堀 信顕、佐々木和男：内在性満腹及び空腹物質の学習記憶に対する作用機構．第26回日本脳科学会、岡山、1999年5月．
  15. 佐々木和男、石橋 賢、河原伸行、白石武昌、大村 裕：ラット弓状核ニューロンに対するレプチンの作用．第22回日本神経科学大会、大阪、1999年7月.
  16. 大村 裕、堀 信顕、粟生修司、李 学良、佐々木和男、大村 裕：遺伝性肥満Zucker ラットおよびdb/dbマウスの学習記憶．第22回日本神経科学大会、大阪、1999年7月.
  17. 松郷誠一、南 誠賢、北川隆洋、得丸定子、小城勝相、松島綱治、大村 裕、江指慶春、佐々木和男：SAMの加齢に伴う脂質過酸化物量変化 - 新評価システムの構築と応用．第15回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、徳島、1999年7月．
  18. 白石武昌、新島 旭、佐々木和男、大村 裕：内在性摂食調節物質レプチンとオレキシンの行動科学．第20回日本肥満学会、東京、1999．
  19. 大村 裕、粟生修司、李 学良、堀 伸顕、佐々木和男、白石武昌：遺伝性肥満Zuckerラット及びdb/dbマウスと学習記憶の関連．第20回日本肥満学会、東京、1999．
  20. 佐々木和男、河原伸行、石橋 賢、白石武昌、大村 裕：ラット弓状核ニューロン活動に対するレプチン及びオレキシンの作用．第20回日本肥満学会、東京、1999．
  21. Sasaki K, Matsugo S, Tokumaru S. and Oomura Y: Lipid peroxide levels in brain and peripheral organs in senescence-accelerated mice. 9th International Behavioral Neuroscience Society Meeting, Denver, Apr., 2000.
  22. Shiraishi T., Sasaki K. and Oomura Y: Effects of various endogenous feeding regulating substances on the hypothalamic neuronal activity and feeding in rats. 9th International Behavioral Neuroscience Society Meeting, Denver, Apr., 2000.
  23. Sasaki K., Kawahara N., Ishibashi M., Shiraishi T. and Oomura Y: Effects of neuropeptide-Y (NPY), leptin and orexin-A on the activity of the arcuate neurons in rats. 9th International Behavioral Neuroscience Society Meeting, Denver, Apr., 2000.
  24. Oomura Y., Aou S., Li X.L., Li A.J., Sasaki K. and Shiraishi T.: Orexin-A suppresses spatial memory

- formation and LTP in Schaffer collatera/commissural affernt-CA1 synapses. 9th International Behavioral Neuroscience Society Meeting, Denver, Apr., 2000.
25. Matsugo S., Tokumaru S., Matsushima K. and Sasaki K.: Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence-accelerated mice. 10th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International, Kyoto, Oct. 2000.
  26. Sasaki K., Kawahara N., Ishibashi M., Shiraishi T., Muramoto K. and Oomura Y.: Effects of orexin-A and -B on neuronal activity of the ventromedial part of the arcuate nucleus in rats. 30th Annual Meeting Society for Neuroscience, New Orleans, Nov. 2000.
  27. Oomura Y., Aou S., Li X.L., Li A., Sasaki K., Shiraishi T. and Wayner M.J.: Suppression of spatial memory and long-term potentiation by orexin-A. 30th Annual Meeting Society for Neuroscience, New Orleans, Nov., 2000.
  28. Kow L.-M., Otsubo S., Shibuya I., Phaff D.W. and Sasaki K.: Selective estrogenic influence on inhibitory actions of opioids in ventromedial hypothalamic neurons. 30th Annual Meeting Society for Neuroscience, New Orleans, Nov., 2000.
  29. 大村 裕、粟生修司、李 学良、李 愛軍、佐々木和男、白石武昌：空腹物質オレキシンの学習記憶に対する作用。第10回日本病態生理学会、福島、2000年1月。
  30. 佐々木和男、河原伸行、白石武昌、大村 裕：ラット弓状核腹内側部ニューロン活動に対する orexin-A 及び orexin-B の作用。第2回オレキシン研究会 東京、2000年2月。
  31. 白石武昌、佐々木和男、大村 裕：視床下部性摂食調節機構に対するオレキシンの役割：視床下部諸核の神経活動と摂食行動。第2回オレキシン研究会、2000年2月。
  32. 佐々木和男、河原伸行、石橋 賢、白石武昌、大村 裕：オレキシンは弓状核ニューロン活動を促進す。第23回日本神経科学学会・第10回日本神経回路学会合同大会、横浜、2000年9月。
  33. 白石武昌、佐々木和男、大村 裕：視床下部性エネルギーの代謝調節機構におけるニューロペプチド系の役割。第23回日本神経科学学会・第10回日本神経回路学会合同大会、横浜、2000年9月。
  34. 河原伸行、塚田 章、佐々木和男：視床下部弓状核腹内側部のニューロン活動におけるオレキシンの作用。平成12年度電気関係学会北陸支部連合大会、金沢、2000年9月。
  35. 江指慶春、斎藤益満、塚田 章、松郷誠一、磯部正治、佐々木和男：アセチルカルニチンの神経組織障害保護作用に関する研究。平成12年度電気関係学会北陸支部連合大会、金沢、2000年9月。
  36. 佐々木和男、河原伸行、石橋 賢、白石武昌、大村 裕：ラット弓状核腹内側部ニューロン活動に対する orexin-A 及びB の作用。第21回日本肥満学会、名古屋、2000年10月。
  37. 大村 裕、粟生修司、李 学良、堀 信顕、Armstrong D. 佐々木和男、白石武昌：ob/ob、db/db マウスおよび Zucker ラットの学習・記憶。第21回日本肥満学会、名古屋、2000年10月。
  38. 白石武昌、佐々木和男、大村 裕：視床下部ニューロンと内在性 neuropeptides のエネルギー代謝調節機構における役割。第21回日本肥満学会、名古屋、2000年10月。
  39. Oomura Y., Hori N., Shiraishi T., Aou S., Li A., Fukunaga K. and Sasaki K.: Central mechanism of the effect of leptin on learning and memory. Soc. for Study on Ingestive Behavior, Philadelphia, June, 2001.
  40. Oomura Y., Hori N., Shiraishi T. Aou S., Li A., Fukunaga K. and Sasaki K.: Endogenous satiety substances facilitate learning and memory. Chinese-Japanese Pathophysiology Cong. II, Chontsu, Aug., 2001.

41. Oomura Y., Hori N., Shiraishi T., Fukunaga K., Takeda T. and Sasaki K.: Leptin activates the brain function. 13<sup>th</sup> Int. Cong. Physiol. Food and Fluid Intake, Queensland, Aug., 2001.
42. Ishibashi M. Oomura Y. Sasaki K. and Shiraishi T.: Ionic mechanism of the effect of endogenous food intake control substances on the hypothalamic neurons. 34<sup>th</sup> Int. Cong. on Physiol. Sci., Christchurch, Aug., 2001.
43. Sasaki K., Yamada Y., Ishibashi M., Nakazato M., Shiraishi T., Oomura Y. and Muramoto K.: Effect of Ghrelin and orexin on neuronal activity in the medial arcuate nucleus of rats. 31st Annual Meeting of Soc. for Neurosci., San Diego, Nov., 2001.
44. Oomura Y., Sasaki K., Ishibashi M. and Shiraishi T.: Effect of leptin and orexin on receptor channels of hypothalamic neurons in rats. 31st Annual Meeting of Soc. for Neurosci., San Diego, Nov., 2001.
45. 大村 裕、白石武昌、武田弘志、福永浩司、佐々木和男：内在性満腹物質レプチンによる高次脳機能 - 学習記憶の促進。第 11 回日本病態生理学会大会、福岡、2001 年 1 月。
46. 白石武昌、佐々木和男、大村 裕：NPY の摂食誘発はどのような作用機序によるのか。第 11 回日本病態生理学会大会、福岡、2001 年 1 月。
47. 佐々木和男、河原伸行、山田泰英、石橋 賢、白石武昌、大村 裕：ラット弓状核腹内側核ニューロン活動に対する MCH、オレキシン及びレプチンの作用。第 78 回日本生理学会大会予稿集、148、京都、2001 年 3 月。
48. 松郷誠一、安井文彦、江指慶春、佐々木和男、松島綱治：老化促進モデルマウスの脳及び末梢臓器における脂質酸化物量の加齢変化。日本化学会、2001 年。
49. 大村 裕、白石武昌、武田弘志、福永浩司、矢田俊彦、佐々木和男：レプチンは脳の高次機能を促進させる。第 24 回日本神経科学、第 44 回日本神経化学合同大会、京都、2001 年 9 月。
50. 佐々木和男、山田泰英、石橋 賢、白石武昌、中里雅光、大村 裕：ラット弓状核腹内側核ニューロン活動に対する種々の新規摂食調節物質の作用。第 24 回日本神経科学、第 44 回日本神経化学合同大会、京都、2001 年 9 月。
51. 大坪靖一、山田泰英、塚田 章、馬場欣哉、佐々木和男：腹側被蓋野ニューロン活動に対する CART の作用。平成 13 年度電気関係学会北陸支部大会、富山、2001 年 10 月。
52. 山田泰英、塚田 章、馬場欣哉、佐々木和男：視床下部弓状核ニューロン活動に対するグレリンの作用。平成 13 年度電気関係学会北陸支部大会、富山、2001 年 10 月。
53. 川本康治、塚田 章、馬場欣哉、佐々木和男：拘束ストレス下ラットの脳機能に対する緑の香りの作用。平成 13 年度電気関係学会北陸支部大会、富山、2001 年 10 月。