

運動ストレスが脳内の β -エンドルフィンの発現に
及ぼす影響

藤井 寿充

大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学口腔健康政策学
(主指導教員：富田美穂子教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

The influence of exercise stress on β -endorphin expression in
the brain

Nobumi Fujii

Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University
(Chief Academic Advisor : Professor Mihoko Tomida)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

【背景と目的】

生体には様々な生体防御機構が備わっており，ストレスが加わると抗ストレス作用を示す．これを担っている物質の1つに内因性オピオイドの β -エンドルフィンがある．現在までに運動が血漿 β -エンドルフィン濃度を上昇させ，高揚を高める事が明らかとされている．これらの事から，運動により脳内の β -エンドルフィンも増加する事が考えられる．しかし脳内の特定部位での β -エンドルフィンの発現に関する報告は少ない．一方で，内因性オピオイドは下行性痛覚抑制系に関与し，中脳水道周囲灰白質（PAG: periaqueductal gray）がその主要部位である事が報告されている．そこで，運動によるPAGと視床下部弓状核に発現する β -エンドルフィンの量を調べ，運動ストレスとの関係を比較検討した．

【方法】

雄のWistarラットを，速度11.0m/min（高速運動群）あるいは6.6m/min（低速運動群）に設定したローターロード装置に入れ，1回30分を1日2回（AM7:00とPM7:00）7日間負荷した．走行させずに1日2回30分間ずつ装置内に放置したラットをコントロール群とし，各群5匹ずつを対象とした．

7日目の条件負荷後，血液を心臓から採取し，コルチコステロン測定キット（ELISA）を用いて，血漿コルチコステロン濃度を測定した．血液を採取した後，組織を還流固定し，脳を摘出して20 μ mの切片を作製した．PAGの4部位（背内側（DM: dorsomedial），背外側（DL: dorsolateral），外側（L: lateral），腹外側（VL: ventrolateral））および視床下部弓状核部の切片（1匹につき各部位3枚）を免疫染色した．それらの部位を撮影し，画像をモノクロ二階調化した後，100 \times 100 μ mに染色された面積を計測して β -エンドルフィンの発現状態を比較検討した．

【結果】

高速運動群と低速運動群の血漿コルチコステロン濃度は，ともにコントロール群と比較して有意に上昇した．高速運動群と低速運動群の間に有意差は認められなかった．

PAG全体における条件別の β -エンドルフィンの発現状態は，高速運動群が他群と比較して有意に上昇した．低速運動群とコントロール群の間には有意差は認められなかった．各群での部位別の比較では，高速運動群のVLの β -エンドルフィンの発現量はDMとDLより高かった．低速運動群では，VLがDM，DL，Lより高く，LはDMとDLより高かった．コントロール群では，VLとLがDMとDLより高かった．各部位での比較では，DMの β -エンドルフィンの発現は，高速運動群がコントロール群より有意に高く，DLでは高速運動群が低速運動群より有意に高かった．視床下部弓状核での β -エンドルフィンの発現には各群に有意差は認められなかった．

【考察】

運動により血漿コルチコステロン濃度が上昇したことから、運動負荷を与えると、速度に関係なくストレスが発生している事が示唆された。しかし、PAGでの β -エンドルフィンの発現は、高速運動群が他群と比較して上昇していたことから、脳内での β -エンドルフィンの発現には、ある一定以上の負荷が必要である事が明らかとなった。また、部位別での発現状態から、 β -エンドルフィンには、PAGのVLやLに多く発現する等の部位特異性があることがわかった。さらに、運動を負荷すると、DMやDLでの発現も増加する事から、これらは抗ストレス反応を示していることが推測された。視床下部弓状核での発現には各群に有意差が認められなかったことから、PAGに発現する β -エンドルフィンは、扁桃体中心核からの入力に関与していることが示唆された。

緒 言

β -エンドルフィン¹は、下垂体前葉と中葉で合成されるプロオピオメラノコルチン (POMC: pro-opiomelanocortin) を前駆体とした^{1,2}、31個のアミノ酸から成る内因性オピオイドの1つである^{3,4}。ストレスが加わり、視床下部から副腎皮質刺激ホルモン放出因子が分泌されると、POMC から切り離されて副腎皮質刺激ホルモン (ACTH: adrenocorticotropic hormone) と β -エンドルフィンが放出される^{5,6}。この β -エンドルフィンは、交感神経系を活性化し、グルココルチコイド、カテコラミンの分泌を亢進させ⁷、抗ストレス作用を示す^{8,9}。また、 μ 受容体と特異的に結合し、モルヒネ様作用を発揮するために疼痛抑制に関与している¹⁰。

現在までに、運動により血漿 β -エンドルフィン濃度が増加することが明らかになっており¹¹、適度な運動は精神的ストレスを低下させる¹²と報告がある。これは、運動負荷が神経内分泌系(視床下部-下垂体)や交感神経系を活性化し、エネルギー代謝や酸素分圧の変化によるものだと考えられている。またランニングにより、動物では血漿中のカンナビノイドの上昇や前頭葉におけるカンナビノイドレセプターの増加が証明されており¹³、ヒトではオピオイドやカンナビノイドのマイクロRNAの上昇が報告されていることから¹⁴、これらが「ランナーズハイ」と呼ばれる多幸福感に関与していると示唆される。しかし、 β -エンドルフィンは血液脳関門を通過することができないため、血漿中の β -エンドルフィンと脳内での発現とは異なる役割を持つと考えられる。

視床下部弓状核は、 β -エンドルフィン合成細胞体が存在しており、下垂体、扁桃核、腹側被蓋野、中脳水道周囲灰白質 (PAG: periaqueductal gray)、脳幹など様々な領域と連絡している^{15,16}。この中のPAGは、オピオイド受容体を発現し、オピオイドによる疼痛抑制に寄与しているため下行性疼痛抑制系の主要部位である¹⁷。またPAGは、大脳辺縁系や視床下部などの上位と連絡があり、孤束核および脊髄後角経由での末梢からの情報が集約され、それらをもとに運動性、自律神経性および痛覚抑制性の出力が調整されている¹⁸。一方、解剖学的にはPAGは、背内側 (DM: dorsomedial)、背外側 (DL: dorsolateral)、外側 (L: lateral)、腹外側 (VL: ventrolateral) の4つの部位に分けられ、VLは下行性痛覚抑制系において重要な役割を果たし、DLやLは心理的ストレスや恐怖による情動を調節している¹⁹。これらのことから、運動負荷に対して、PAGでの β -エンドルフィンの発現は増加することが考えられる。

そこで本研究では、異なる条件の運動を負荷したときのストレスの度合いを、血漿コルチコステロン濃度で評価するとともに²⁰、PAG全体とPAGの4部位 (DM, DL, L, VL) および視床下部弓状核での β -エンドルフィンの発現量を比較し、運動ストレスとの関係を検討した。

実験材料及び方法

1. 実験動物

本研究では、松本歯科大学実験動物倫理委員会の承認（承認番号 251-14）を受けた後、8~9 週齢（280g）の雄の Wistar ラット（Japan SLC）を使用して実験を実施した。動物実験施設のラットケージで、飼料および水分を自由に摂取させ、12 時間の明暗サイクルで 1 週間順化させた。それらのラットは高速運動群、低速運動群、コントロール群の 3 群（各 n=5）に分けられた。

2. 運動負荷

運動負荷はローターロッド装置（室町機械株式会社）を改造したものを使用した（図 1）。ラットの走行速度を決めるための予備実験をして、30 分間走行可能な最大限の速度 11.0m/min を高速運動群、30 分走行できる最小の速度 6.6m/min を低速運動群と設定した。また、実験開始前の 2 日間、ラットが 2 種類の速度でローターロッドの中で 10 分以上走れるかどうかを確かめ、走行が可能なラットのみを使用した。

運動群は、1 回 30 分間、1 日 2 回（AM7:00 と PM7:00）の走行運動を 7 日間実施した（図 2）。コントロール群は、走行させずに 1 日 2 回 30 分間ずつ装置内に放置した。

3. 血漿コルチコステロン濃度の測定

7 日目の運動負荷後、ペントバルビタールナトリウム（70 mg/kg, i.p.）で麻酔をかけて開腹し、心臓から血液を採取した。その血液を 4℃、3,000rpm で 20 分間遠心分離して血漿を取り、-80℃で保管した。保管した血漿のコルチコステロン濃度は、コルチコステロン ELISA キット（Assaypro LLC）を用いて測定した。これは、各ウェルにコルチコステロン標準液および試料を 25 μ l ずつ加え、すぐにビオチン化コルチコステロン 25 μ l を加え、2 時間培養し、200 μ l のウォッシュバッファーで 5 回洗浄した。続いて、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ抱合体 50 μ l を加え 30 分間培養し、ウォッシュバッファーで洗浄した。次に 50 μ l の発色気質を加え 20 分間培養し、停止液 50 μ l を加え、すぐに 450 nm の波長で吸光度を測定し、検量線を用いてコルチコステロン濃度を検出した。

4. 免疫組織学染色

心臓から採血をした後、0.9% NaCl と 4% パラホルムアルデヒドおよび 0.2% ピクリン酸を含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝溶液（PB, pH6.9）で還流固定を行い、脳を摘出した。さらに同じ固定液に摘出した脳を浸漬し、後固定を 1 日間行った。次に 0.9% NaCl を含む 0.1M PB（PBS, pH7.4）で洗浄し、3 分割した脳を 20% スクロース溶液に 2 日間浸漬した。その後 O.C.T コンパウンド（サクラファインテックジャパン株式

会社)で包埋し, -80°C で急速凍結させて, クリオスタット (Leica, Germany) を用いて厚さ $20\ \mu\text{m}$ の切片を作製した. 切片は, 室温で 0.3% Triton X-100 を含む 0.1M PBS (Triton X PBS, $\text{pH}7.4$) で 2 日間洗浄し, 1% H_2O_2 を含む PBS で 10 分間処理し, 0.1M PBS ($\text{pH}7.4$) で 10 分間ずつ 2 回洗浄した. 1% 牛血清アルブミン (BSA) と 0.3% Triton X-100 を含む 0.1M PBS (PBS-BSAT) で $1:500$ の希釈倍率で希釈した一次抗体 (rabbit anti- β -endorphin polyclonal antibody, Millipore, U.S.A.) に切片を入れて 4°C で 2 日間おいた. その後, Triton X PBS ($\text{pH}7.4$) で 1 時間洗浄し, 抗体希釈液 (PBS-BSAT) $1:200$ に希釈した二次抗体 (Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) affinity purified, Vector Laboratories) に 1 時間半入れた. Triton X PBS ($\text{pH}7.4$) に入れ室温で 1 時間洗浄し, Triton X PBS ($\text{pH}7.4$) で希釈倍率 $1:100$ に希釈した三次抗体 (ABC kit, Vecstain) に 30 分間入れた. Triton X PBS ($\text{pH}7.4$) で 30 分間, 続いて Tris-HCl 緩衝液 (0.05M , $\text{pH}7.4$) で 30 分間洗浄した後, diaminobenzidine hydrochloride (DAB), 0.005% hydrogen peroxide を含む $0.5\ \text{M}$ Tris-HCl 緩衝液 ($\text{pH}7.4$) で 5 分間反応させた. Tris-HCl (0.05M , $\text{pH}7.4$) で 10 分間洗浄し, MAS コートされたスライドガラスに貼付し 1 日以上乾燥させ, アルコールで脱色, キシレンで透徹し, オイキッドで封入した.

5. β -エンドルフィンの発現量の測定

染色した切片を顕微鏡倍率 400 倍 (接眼レンズ 10 倍 \times 対物レンズ 40 倍) で観察し, 顕微鏡に付随したデジタルカメラ (Olympus Corp., Japan) を使用して PAG [DM, DL, L, VL] および視床下部弓状核の部位を撮影した (図 3). 撮影した画像は, ソフトウェア (Adobe Photoshop CS3 Extended, Adobe Systems Inc., U.S.A.) を用いて, すべて同じしきい値でモノクロ二階調化し, $100\ \mu\text{m}\times 100\ \mu\text{m}$ 内に染色された面積を計測しそれを発現量 (μm^2) とした (図 4). 1 匹のラットの同部位を 3 枚ずつ計測して, 各群 5 匹分の計測値を比較検討した.

6. 統計

血漿コルチコステロン濃度および β -エンドルフィンの発現量の比較検定は, spss ver.23 を用いて一元配置分散分析の結果を踏まえ, その後 Dunnett で検定し, 危険率 5% 未満を有意差ありとした.

結 果

血漿コルチコステロン濃度の中央値は, コントロール群が $294.0\ \mu\text{g}/\text{mg}$, 低速運動群が $344.5\ \mu\text{g}/\text{mg}$, 高速運動群が $348.5\ \mu\text{g}/\text{mg}$ であり, 高速運動群と低速運動群の血漿コルチコ

ステロン濃度はコントロール群と比較して有意に高値を示した($p < 0.01$)(図5).

PAG 全体での β -エンドルフィンの発現量の中央値は、コントロール群が $13.40 \mu\text{m}^2$, 低速運動群が $14.9 \mu\text{m}^2$, 高速運動群が $17.6 \mu\text{m}^2$ で高速運動群は低速運動群やコントロール群 ($p < 0.05$)と比較して有意に高値を示した(図6). 低速運動群とコントロール群の間には有意差は認められなかった(図6).

各群の部位別での β -エンドルフィンの発現量の中央値は、コントロール群は、DM: $8.1 \mu\text{m}^2$, DL: $9.8 \mu\text{m}^2$, L: $30.3 \mu\text{m}^2$, VL: $35.8 \mu\text{m}^2$ であり、VLでの発現量は、DM($p < 0.001$)やDL($p < 0.001$)に比べて高く、LはDM($p < 0.001$), DL($p < 0.001$)に比べて高かった(図7, 8). 低速運動群は、DM: $9.5 \mu\text{m}^2$, DL: $4.8 \mu\text{m}^2$, L: $24.5 \mu\text{m}^2$, VL: $38.3 \mu\text{m}^2$ で、VLでの発現量は、DM($p < 0.001$)やDL($p < 0.001$), L($p < 0.05$)に比較して有意に高く、LはDM($p < 0.01$), DL($p < 0.001$)に比べて高かった(図7, 8). 高速運動群のDMは、 $10.9 \mu\text{m}^2$, DL: $6.5 \mu\text{m}^2$, L: $25.6 \mu\text{m}^2$, VL: $34.3 \mu\text{m}^2$ で、VLでの発現量はDM, DLと比較し有意に高かった($p < 0.05$)(図7, 8). これらの結果から、すべての群におけるVLでの発現量は他の部位に比べて最も高いことがわかった.

3群における各部位での比較では、DMの β -エンドルフィンの発現量は、コントロール群より高速運動群が高く($p < 0.05$), DLでは低速運動群より高速運動群が高かった($p < 0.05$). LとVLには各群での有意差は認められなかった(図7).

視床下部弓状核での β -エンドルフィンの発現量の中央値は、コントロール群は $94.0 \mu\text{m}^2$, 低速運動群は $84.5 \mu\text{m}^2$, 高速運動群は $82.2 \mu\text{m}^2$ であり、各群間での有意差は認められなかった(図9).

考 察

本研究では、異なる速度の運動負荷によるストレスの状態と PAG および視床下部弓状核に発現する β -エンドルフィンの状態を調べ、それらの関係を検討した. ストレスがかかると、視床下部を經由して下垂体前葉からACTHが分泌され、それが糖質コルチコイドや電解質コルチコイドの分泌を促進させて、抗炎症作用、糖質の新生等により抗ストレス作用を発揮する. このような過程から、ストレスが負荷されると糖質コルチコイドの一つであるコルチコステロンの分泌が増加する²¹⁾. 本実験で設定した高速運動(11m/min)と低速運動(6.6m/min)の両群での血漿コルチコステロン濃度は、コントロール群より有意な上昇を示した. これは、速度に関係なく運動をするとストレスが負荷されていることが示唆された. 平坦なトレッドミルを使用して、1日1回60分間走行させたラットの実験では、速度が25m/min以上の時の血漿コルチコステロン濃度はコントロールより増加するが、それより低速度では有意差が認められていない. 1日2回60分ずつ走行させた場合は、20-30m/minの走行で血漿コルチコステロン濃度の上昇が認められている²²⁾. 本実験では、速度に関係なく運動後のラットの血漿コルチコステロン濃度が

上昇したことから、今回設定した時間および2種類の速度でのローターロード走行は、トレッドミルを20-30m/minの速度で60分を2回/日走行させたときのストレス程度に相当すると考えられた。これらの結果から、平坦なところを走行するより、車輪上を走行するほうがよりストレスが負荷されることが示唆された。

PAG 全体における高速運動群での β -エンドルフィン²²⁾の発現量は、低速運動群およびコントロール群と比較し高値を示した。血漿 β -エンドルフィン濃度は、コルチコステロンの上昇と関連しており、ラットをトレッドミルで20m/minで1日2回走行させた時に増加するとの報告がある²²⁾。また、ヒトの血漿 β -エンドルフィンは最大酸素摂取量の60%以上の運動強度で増加し、その β -エンドルフィン濃度と運動強度との間には相関関係があることが示されている²³⁾。ヒトとラットを単純に比較はできないが、本実験における運動は最大酸素摂取量60%以上の運動に相当しているのかもしれない。さらに血漿 β -エンドルフィン濃度は、走るより水泳後の方が上昇するという報告²⁴⁾もある事から、エンドルフィンの分泌には、運動の種類や強度が関与していると示唆される。

脳内のエンドルフィンは、中枢神経に作用して血圧調節や体温調節等の自律神経系の維持に関与するとともに、鎮痛作用を発揮する。血漿中のエンドルフィンは、膵臓ホルモンのグルカゴンを上昇させることから糖代謝に影響を及ぼしている²⁵⁾と考えられている。従って、脳内と血漿中の β -エンドルフィンの作用には相違がある。また、運動負荷後7日目から血漿 β -エンドルフィン濃度と視床下部全体での β -エンドルフィンの発現がともに上昇するとの報告がある²⁶⁾ため、それを基に今回運動負荷を7日間継続した。我々の実験では、低速運動群の血漿コルチコステロン濃度はコントロール群に比較して上昇したが、PAGでの β -エンドルフィンの発現はコントロール群に対して有意な増加は認められなかった。これらの結果より、PAGでの β -エンドルフィンの上昇には、ある一定以上の強度の負荷が必要であると示唆された。しかしながら、運動負荷に対する反応には、かなりの個体差が認められたため、今後対象動物の数を増やす等の実験が必要だと考えられる。

部位別で比較すると、高速運動群はVLでの β -エンドルフィンの発現量がDMやDLより高く、低速運動群とコントロール群でも、VLでの発現が他の部位に比較して増加していた。さらに、低速運動群やコントロール群ではLでの発現がDMやDLより高かった。VLは孤束核や脊髄から入力を受け、延髄の腹外側、腹内側に投射しており、Lは脊髄から入力し、延髄の腹外側や腹内側に投射している。DLは直接延髄に投射せず、一旦楔状核を経由して延髄に繋がっている等の経路はわかっている²⁷⁾。役割においても、DLやLが賦活されると、恐怖等からの防御反応、血圧上昇、心拍数上昇、四肢と腎臓の血管収縮、非オピオイド系の痛覚抑制が生じ、VLが賦活されると、自発運動や反応性の低下、血圧低下、心拍数低下およびオピオイド系の痛覚抑制が生じる¹⁸⁾といわれている。本実験においてVLで β -エンドルフィンの発現が多く認められたことは、この部位がオピオイド系鎮痛に関与しているという前述の説明と合致している。しかしながら、非オピオイド系の鎮痛に関与しているといわれているDLやLにおいても β -エンドルフィンの発現が認められた。さらに同部位にお

ける群別の比較では、高速運動群の DM ではコントロール群の同部位より多く、高速運動群の DL では低速運動群の同部位より多く発現している。これらは、抗ストレス作用を発揮している可能性が考えられるが、DM の役割の解明を含め今後さらなる研究が必要である。免疫染色を用いて PAG での β -エンドルフィンの発現を確認した結果から、PAG に発現する β -エンドルフィンには、部位特異性があることが示唆された。

エンドルフィン神経の細胞体は視床下部弓状核に多数存在し、視床下部、間脳、中脳や橋などに投射しており¹⁶⁾、この部位の局所破壊により針鎮痛が出現しなくなる²⁷⁾との報告から、 β -エンドルフィンが鎮痛に関与していることが明らかになっている。トレッドミルでラットを 20m/min の速度で走行させた時、ホモジナイズされた視床下部全体の β -エンドルフィン濃度は、コントロールより増加した²²⁾との報告がある。そのため、運動ストレスを負荷した場合、弓状核における β -エンドルフィンの発現は当然増加すると推測していた。ところが、本研究での弓状核の発現状態は各群間で有意差は認められなかった。これは、弓状核以外からの影響で PAG での β -エンドルフィンの発現が上昇したことが考えられる。PAG への入力、視床下部弓状核や扁桃体中心核からである事や痛みのストレスでは扁桃体での β -エンドルフィンが上昇する事²⁹⁾を考慮すると、運動による PAG での β -エンドルフィンの増加には、扁桃体中心核等からの神経が関与していることが示唆された。

脳内のエンドルフィン、GABA ニューロンを抑制し下行性痛覚抑制が活性化させる役割を担っているため、エンドルフィンが増加すると鎮痛、鎮静作用が期待できる。そこで、慢性痛に対する非薬物療法の1つとして運動療法が用いられており、運動による生体への影響や効果に関する研究が見受けられる。マウスの実験では、20m/min の速度で 60 分間のトレッドミル走行は、血漿 β -エンドルフィンと皮膚における μ オピオイドレセプターを増加させるため、皮膚炎を寛解させる³⁰⁾。また、8m/min で運動させると、マクロファージの極性変化と血管新生が促進されるため創傷治癒が早まるとの報告もある³¹⁾。適度な運動(12m/min)は神経障害におけるアロディニアや痛覚過敏が改善される³¹⁾。自発運動は、吻側延髄腹内側部や PAG における内因性オピオイドやセロトニンを増加させるため、下行性痛覚抑制系が活性化し、鎮痛効果、情動の安定化、認知の改善等を惹起させる³²⁾。

痛みは感覚だけでなく、快、不快といった情動やそれを回避する行動的な要素も含まれ、脳内の多くの領域が痛みの処理に関わっている。自発運動は、背外側被蓋核/脚橋被蓋核の神経を興奮させ、腹側被蓋野 (VTA) から側坐核 (NAc) へのドーパミン放出を促進させるために高揚感を生み出す³²⁾。このような脳報酬系は、鎮痛に対して中心的な役割をしており、それに伴う快情動や活動に対するモチベーションの向上も期待できるため、QOL の改善にも繋がる。

本実験で設定した高速運動が、PAG での β -エンドルフィンの発現を増加させたため、この速度がラットにとって適度な運動であった可能性が考えられる。強制的な強度の運動は、 β -エンドルフィンや μ オピオイドレセプターの発現を低下させ、炎症を悪化させるほか、神経障害性疼痛に関するアロディニアや痛覚過敏を改善させないと言われている^{22,30,31)}。以上のこと

より、持続可能な高速度でのジョギング等の運動を1日30分行うと、脳内での β -エンドルフィンが上昇し、鎮痛効果やドパミンによる多幸感が得られ、健康増進に寄与すると考えられる。今回、運動によるPAGでの β -エンドルフィンの発現には部位特異性がある事が明確になったが、そこからのネットワークや役割に関しては今後の課題として追求していく必要がある。

結 論

30分間持続可能な走行を7日間実施すると、速度に関係なくストレスが発生する事が示唆された。また、可能な範囲の高速度での運動は、中脳水道周囲灰白質の β -エンドルフィンの発現を高めることが証明された。さらに、 β -エンドルフィンの中脳水道周囲灰白質の4領域（背内側、背外側、外側、腹外側）のいずれにも発現するが、どの条件においても腹外側での発現量が多いという部位特異性があることが明らかとなった。これらの結果より、適度なストレスがかかる運動を1日2回30分ずつ実施する事は、鎮痛効果や多幸感の誘発よりQOLの向上が期待できる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり御協力下さいました松本歯科大学教職員の皆様、医療法人社団和平歯科医院の理事長宮森和也先生ならびにスタッフの皆様に深く感謝致します。また稿を終えるに臨み、御懇篤なるご指導ご校閲を賜りました松本歯科大学大学院健康増進口腔科学講座富田美穂子教授に謹んで感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Hiramoto K, Kobayashi H, Sekiyama A, F Sato E, Tsuruta D and Ishii M (2013) Mild exercise suppresses exacerbation of dermatitis by increasing cleavage of the β -endorphin from proopiomelanocortin in NC/Nga mice. *J Clin Biochem Nutr* **52** : 58-63.
- 2) Smith AI and Funder JW (1988) Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr Rev* **9** : 159-79.
- 3) Ückert S, Becker AJ, Bannowsky A, Stief CG and Kuczyk MA (2018) Is β -endorphin significant in the control of the male sexual response? *Andrologia* : e13049.
- 4) Osamura RY, Watanabe K, Nakai Y and Imura H (1980) Adrenocorticotrophic hormone cells and immunoreactive beta-endorphin cells in the human pituitary gland: normal and pathologic conditions studied by the peroxidase-labeled antibody method. *Am J Pathol* **99** :105-24.
- 5) Olson GA, Olson RD and Kastin AJ (1986) Endogenous opiates. *Peptides* **7** : 907-33.
- 6) Morley JE (1981) The endocrinology of the opiates and opioid peptides. *Metabolism* **30** : 195-209.
- 7) 大野 勲 (2009) 精神的ストレスと気管支喘息. *職業・環境アレルギー誌* **16** : 7-13.
- 8) Drolet G, Dumont EC, Gosselin I, Kinkead R, Laforest S and Trottier JF (2001) Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **25** : 729-41.
- 9) McGonigle CE, Nentwig TB, Wilson DE, Rhinehart EM and Grisel JE (2016) β -endorphin regulates alcohol consumption induced by exercise restriction in female mice. *Alcohol* **53** : 51-60.
- 10) Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA and Yu L (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* **44** : 8-12.
- 11) Stagg NJ, Mata HP, Ibrahim MM, Henriksen EJ, Porreca F, Vanderah TW and Philip Malan T Jr (2011) Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model: role of endogenous opioids. *Anesthesiology* **114** : 940-8.
- 12) 見正富美子, 林 達也, 柴田真志, 吉武康栄, 西嶋泰史, 森谷敏夫 (1996) 有酸素運動おける脳波・血中 β -エンドルフィンの動態. *体力科学* **45** : 519-26.
- 13) Fuss J, Steinle J, Bindila L, Auer MK, Kirchherr H, Lutz B and Gass P (2015) A

- runner's high depends on cannabinoid receptors in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 13105-8.
- 14) Hicks SD, Jacob P, Perez O, Baffuto M, Gagnon Z and Middleton FA (2019) The Transcriptional Signature of a Runner's High. *Med Sci Sports Exerc* **51**: 970-8.
 - 15) Chronwall BM (1985) Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides* **6**: 1-11.
 - 16) Pastor R, Font L, Miquel M, Phillips TJ, and Aragon CM (2011) Involvement of the beta-endorphin neurons of the hypothalamic arcuate nucleus in ethanol-induced place preference conditioning in mice. *Alcohol Clin Exp Res* **35** : 2019-29.
 - 17) Lueptow LM, Fakira AK and Bobeck EN (2018) The Contribution of the Descending Pain Modulatory Pathway in Opioid Tolerance. *Front Neurosci* **12** : 886.
 - 18) 橋 綾子, 柳田 諭, 林 美穂, 本村啓介 (2011) 強制水泳の神経科学. *日生物精医会誌* **22** : 117-26.
 - 19) Olango WM, Roche M, Ford GK, Harhen B and Finn DP (2012) The endocannabinoid system in the rat dorsolateral periaqueductal grey mediates fear-conditioned analgesia and controls fear expression in the presence of nociceptive tone. *Br J Pharmacol* **165** : 2549-60.
 - 20) Nohara M, Tohei A, Sato T and Amao H (2016) Evaluation of response to restraint stress by salivary corticosterone levels in adult male mice. *J Vet Med Sci* **78** : 775-80.
 - 21) 坂本祐介, 小川琢未, 小川真実, 松尾由美, 橋川直也, 橋川成美 (2015) 15 日間のストレス負荷が ICR マウスに及ぼす行動と脳海馬神経細胞への影響. *薬学雑誌* **135** : 151-58.
 - 22) 朝比奈茂, 浅野和仁, 須永美歌子, 久光 正, 佐藤三千雄 (2007) 運動がラット視床下部 β -エンドルフィン産生に及ぼす作用. *昭和医会誌* **67** : 414-21.
 - 23) Brooks S, Burrin J, Cheetham ME, Hall GM, Yeo T and Williams C (1988) The responses of the catecholamines and beta-endorphin to brief maximal exercise in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **57**: 230-4.
 - 24) Sinaei M and Kargarfard M (2015) The evaluation of BMI and serum beta-endorphin levels: the study of acute exercise intervention. *J Sports Med Phys Fitness* **55**: 488-94.
 - 25) Fatouros IG, Goldfarb AH, Jamurtas AZ, Angelopoulos TJ and Gao J (1997) Beta-endorphin infusion alters pancreatic hormone and glucose levels during exercise in rats. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **76**: 203-8.

- 26) 朝比奈茂, 浅野和仁, 堀川浩之, 久光 正, 佐藤三千雄 (2003) ラット視床下部 β -
 β -エンドルフィン含有量の運動による増加. 体力科学 **52** : 159-66.
- 27) Bandler R, Keay KA, Floyd N and Price J (2000) Central circuits mediating
patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. Brain
Res Bull **53**: 95-104.
- 28) 郭 試瑜, 佐藤孝雄, 田中正明, 武重千冬 (1988) 視床下部弓状核における針麻酔
鎮痛発現の求心路と遠心路. 昭医会誌 **48** : 493-99.
- 29) Nakamura T, Tomida M, Yamamoto T, Ando H, Takamata T, Kondo E, Kurasawa
I and Asanuma N (2013) The endogenous opioids related with antinociceptive
effects induced by electrical stimulation into the amygdala. Open Dent J **7**: 27-
35.
- 30) Hiramoto K, Kobayashi H, Sekiyama A, F Sato E, Tsuruta D and Ishii M (2013)
Mild exercise suppresses exacerbation of dermatitis by increasing cleavage of
the β -endorphin from proopiomelanocortin in NC/Nga mice. J Clin Biochem Nutr
52: 58-63.
- 31) 仙波恵美子, 川西 誠, 田島文博, 上 勝也 (2017) 慢性痛に対する運動療法の効果
脳報酬系の役割. J Musculoskelet Pain Res **9** : 198-209.
- 32) 上 勝也, 田島文博, 仙波恵美子 (2018) 運動による鎮痛 (Exercise-induced
hypoalgesia) のメカニズム: 最近の知見. ペインクリニック **39** : 981-9.

付図説明文

図1：運動装置

ローターロッド装置を改良したもの

図2：タイムスケジュール

図3：ラットの脳マップ

A 中脳水道周囲灰白質

ピンク：背内側 (DM), オレンジ：背外側 (DL), グリーン：外側 (L),
イエロー：腹外側 (VL)

B 視床下部弓状核 (イエロー)

図4： β -エンドルフィンの発現の評価方法

Adobe Photoshop CS3 Extendedにて標本をモノクロ二階調化した後染色面積を計測

a：染色した標本

b：モノクロ二階調化した画像

図5：血漿コルチコステロン濃度

図6：PAG全体での β -エンドルフィンの発現量

図7：PAG各部位での β -エンドルフィンの発現状態 (スケールバー=20 μ m)

A：DM, B：DL, C：L, D：VL

a. コントロール群 b. 低速運動群 c. 高速運動群

図8：部位別・条件別の β -エンドルフィンの発現量の比較

図9：視床下部弓状核での β -エンドルフィンの発現状態

A：組織図 a. コントロール群 b. 低速運動群 c. 高速運動群

(スケールバー=20 μ m)

B： β -エンドルフィンの発現量のグラフ



図1:運動装置

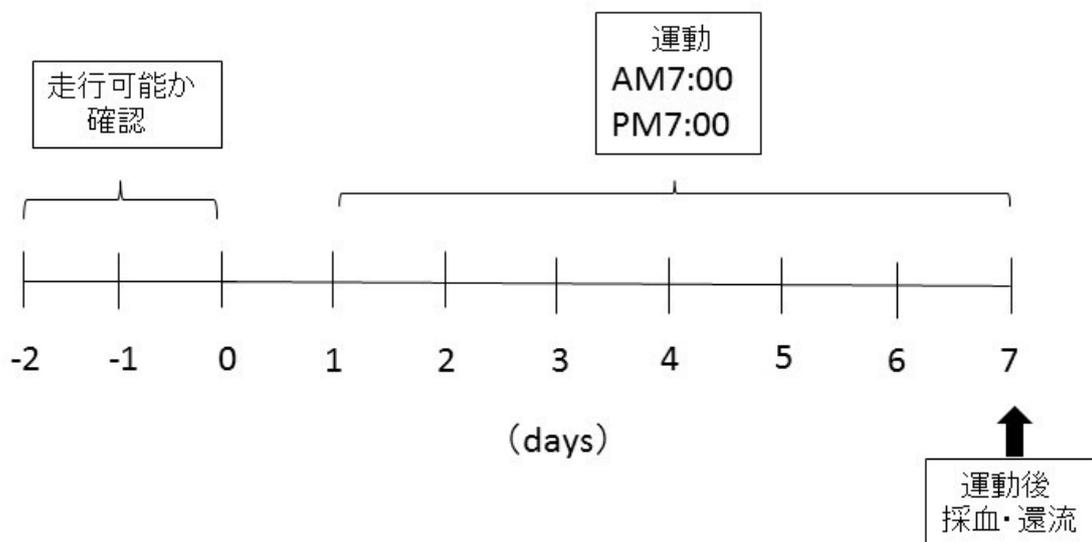
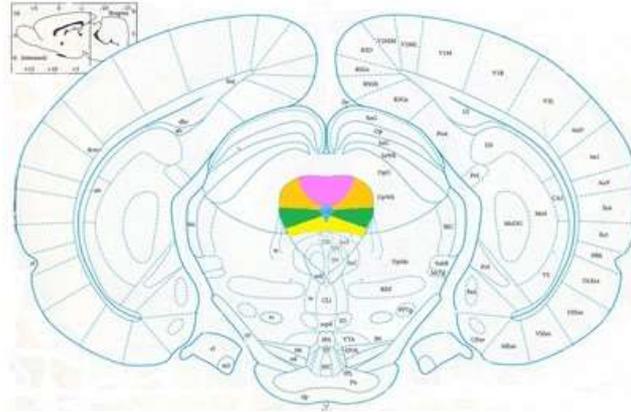


図2:タイムスケジュール

A



B

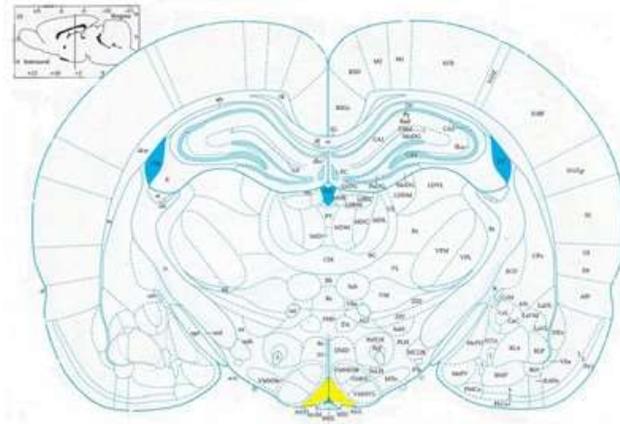


図3: ラットの脳マップ

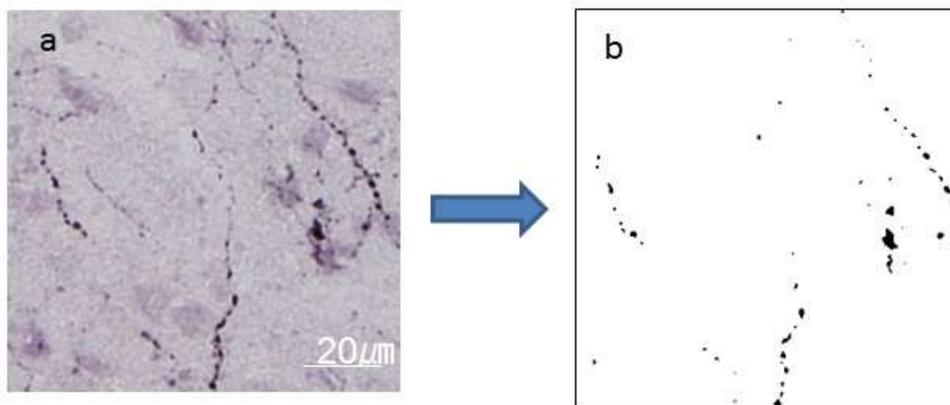


図4: β -エンドルフィンの発現の評価方法

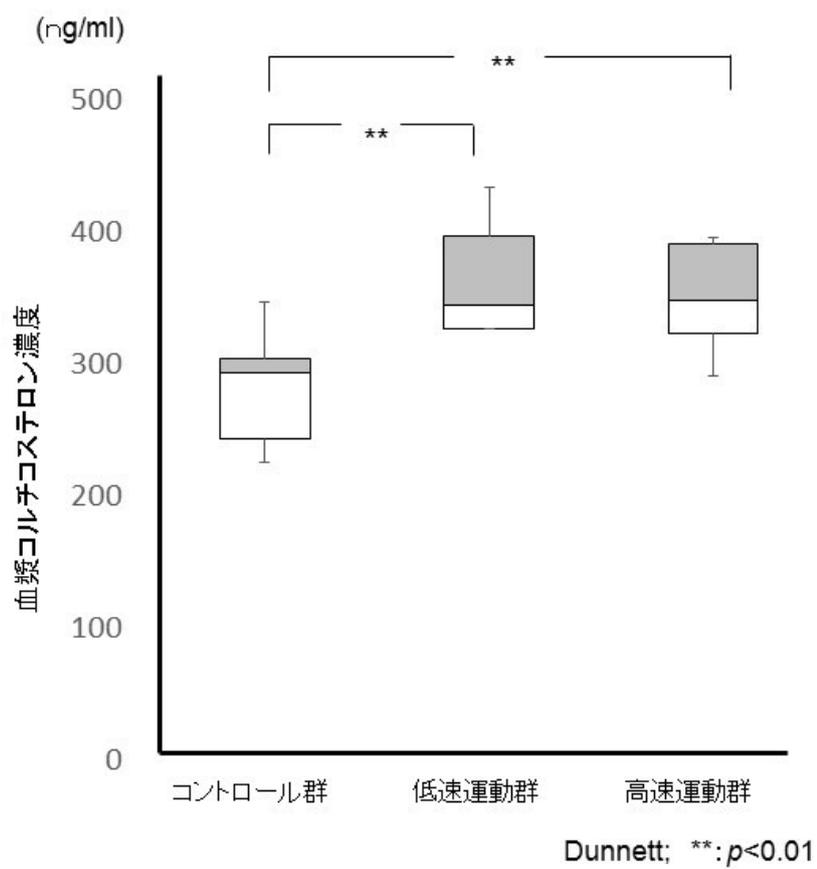


図5: 血漿コルチコステロン濃度

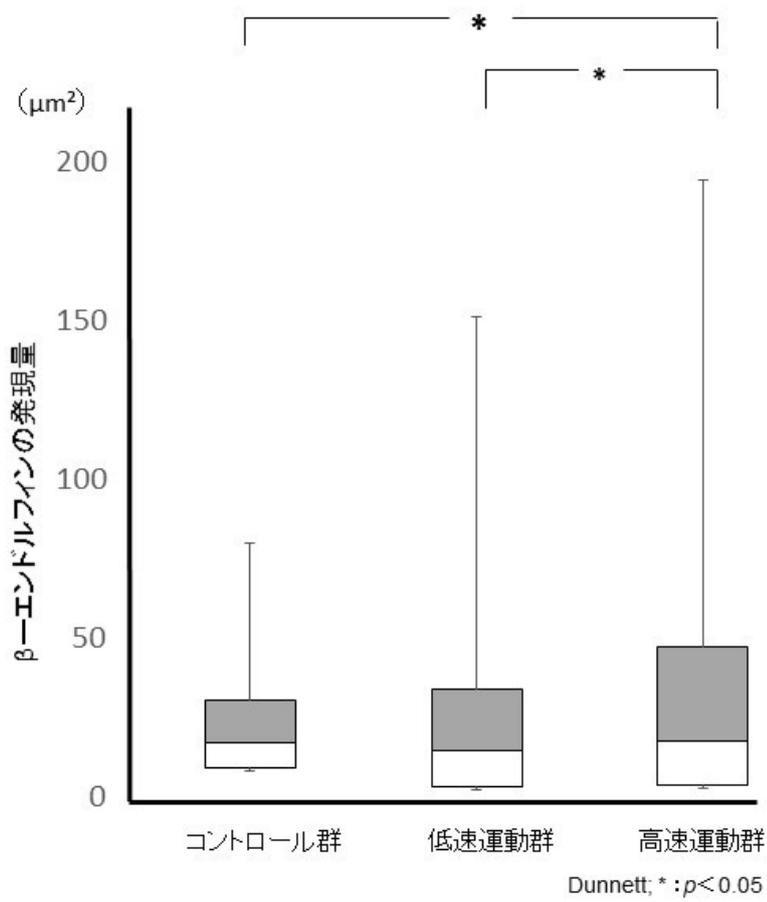


図6: PAG全体でのβ-エンドルフィンの発現量

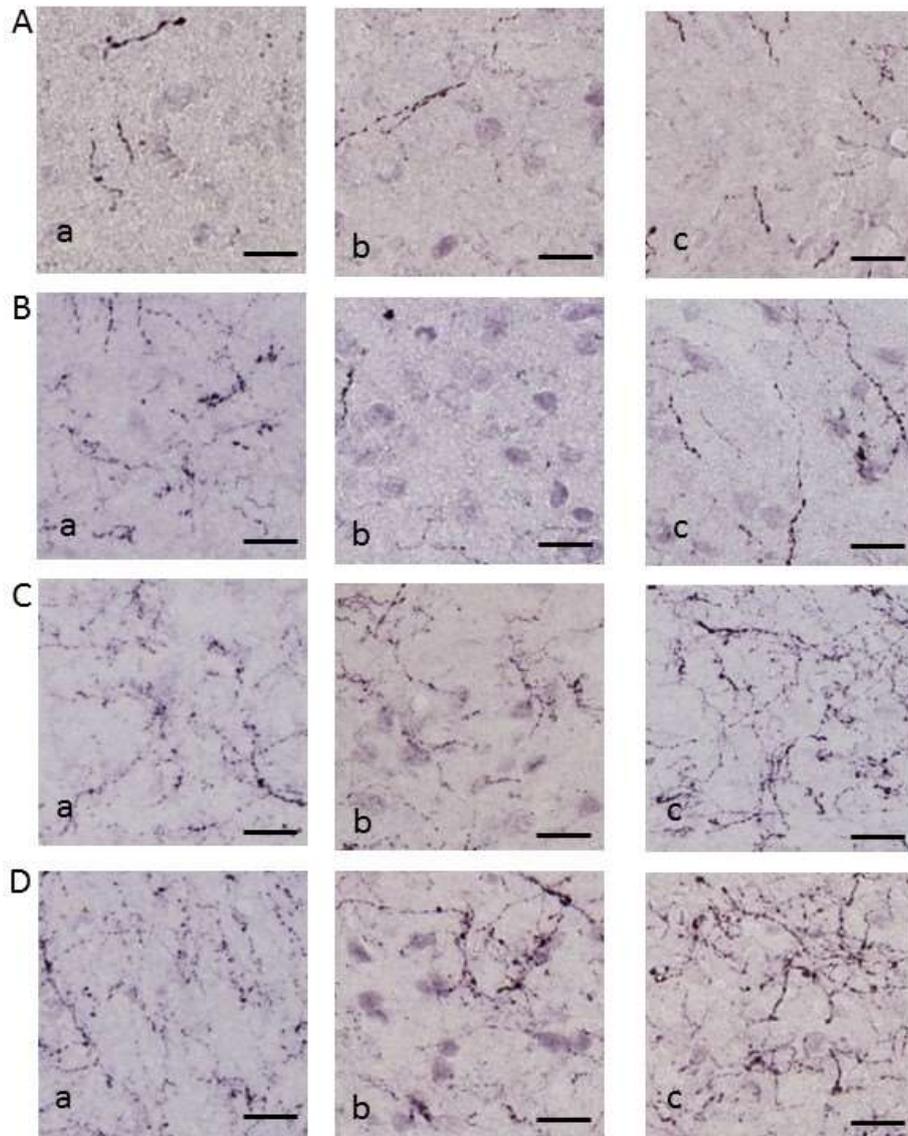


図7: PAGでの β -エンドルフィンの発現状態

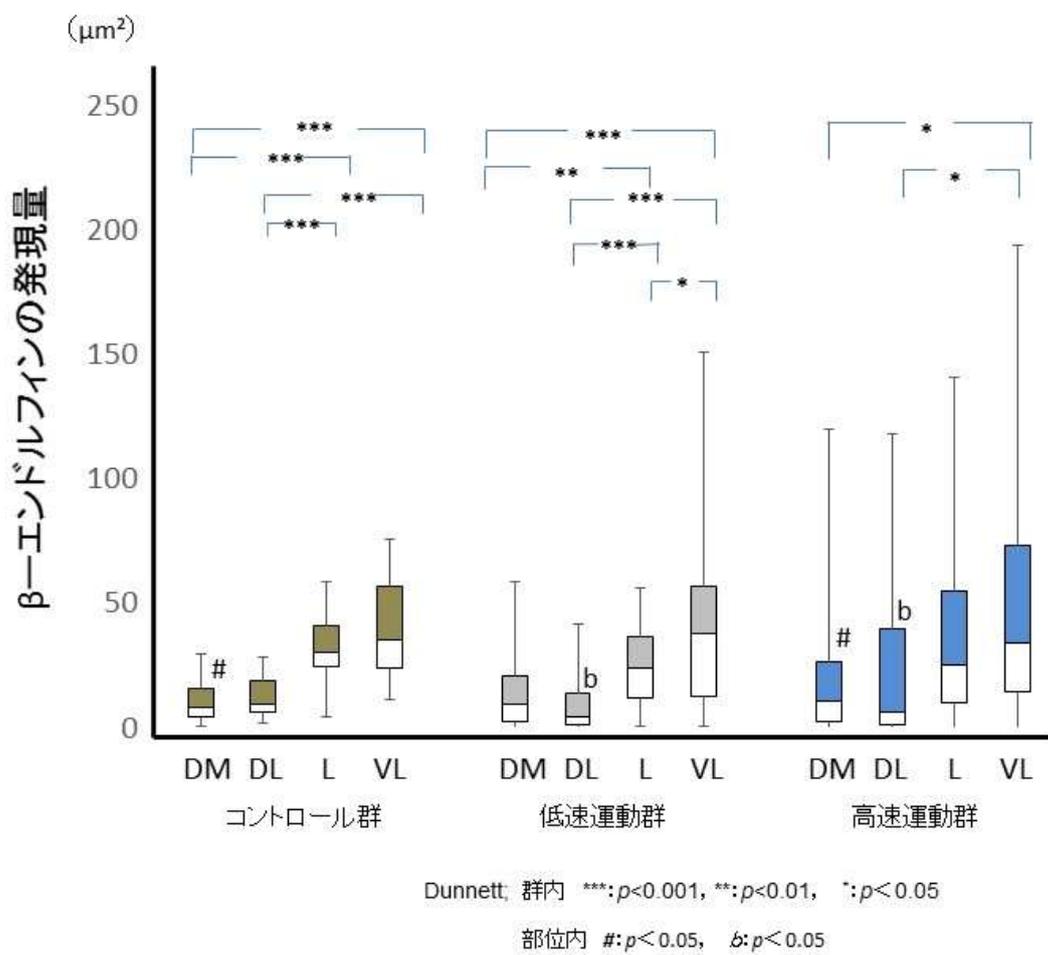


図8: 部位別・条件別のβ-エンドルフィンの発現量の比較

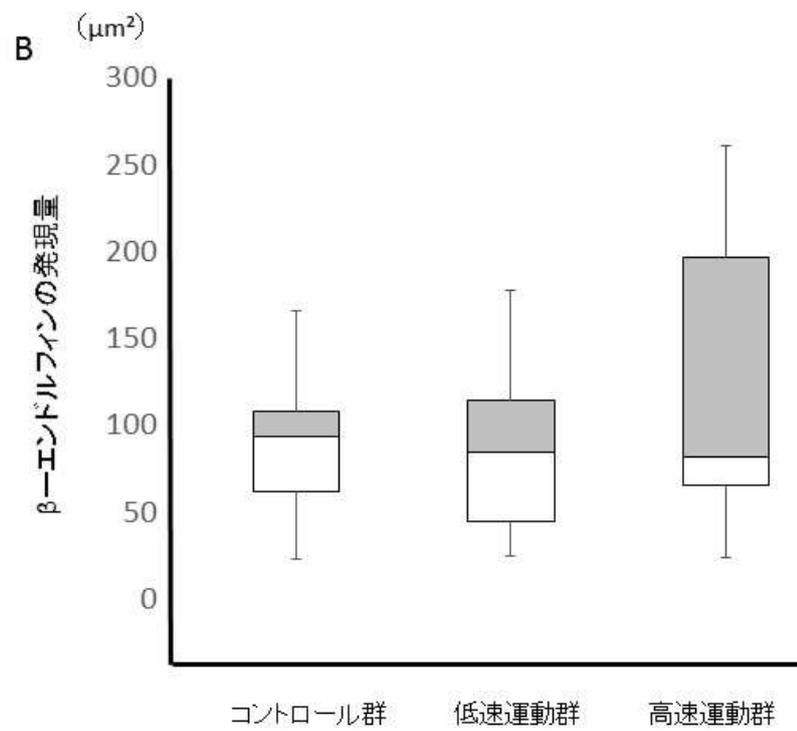
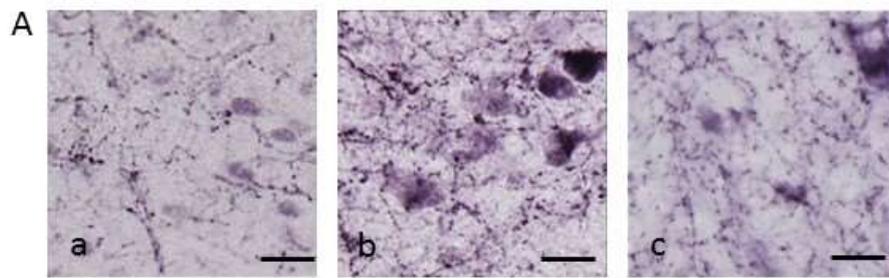


図9: 視床下部弓状核でのβ-エンドルフィンの発現量

運動ストレスが脳内の β -エンドルフィンの発現に
及ぼす影響

藤井 寿充

大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学口腔健康政策学
(主指導教員：富田美穂子教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

The influence of exercise stress on β -endorphin expression in
the brain

Nobumi Fujii

Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University
(Chief Academic Advisor : Professor Mihoko Tomida)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

【背景と目的】

生体には様々な生体防御機構が備わっており、ストレスが加わると抗ストレス作用を示す。これを担っている物質の1つに内因性オピオイドの β -エンドルフィンがある。現在までに運動が血漿 β -エンドルフィン濃度を上昇させ、高揚を高める事が明らかとされている。これらの事から、運動により脳内の β -エンドルフィンも増加する事が考えられる。しかし脳内の特定部位での β -エンドルフィンの発現に関する報告は少ない。一方で、内因性オピオイドは下行性痛覚抑制系に関与し、中脳水道周囲灰白質 (PAG: periaqueductal gray) がその主要部位である事が報告されている。そこで、運動によるPAGと視床下部弓状核に発現する β -エンドルフィンの量を調べ、運動ストレスとの関係を比較検討した。

【方法】

雄のWistarラットを、速度11m/min (高速運動群) あるいは6.6m/min (低速運動群) に設定したローターロッド装置に入れ、1回30分を1日2回7日間負荷した。走行させずに1日2回30分間ずつ装置内に放置したラットをコントロール群とし、各群5匹ずつを対象とした。

7日目の条件負荷後、血液を心臓から採取し、コルチコステロン測定キット (ELISA) を用いて、血漿コルチコステロン濃度を測定した。血液を採取した後、組織を還流固定し、脳を摘出して20 μ mの切片を作製した。PAGの4部位 (背内側 (DM: dorsomedial), 背外側 (DL: dorsolateral), 外側 (L: lateral), 腹外側 (VL: ventrolateral)) および視床下部弓状核部の切片 (1匹につき各部位3枚) を免疫染色した。それらの部位を撮影し、画像をモノクロ二階調化した後、100 \times 100 μ mに染色された面積を計測して β -エンドルフィンの発現状態を比較検討した。

【結果】

高速運動群と低速運動群の血漿コルチコステロン濃度は、ともにコントロール群と比較して有意に上昇した。高速運動群と低速運動群の間に有意差は認められなかった。

PAG全体における条件別の β -エンドルフィンの発現状態は、高速運動群が他群と比較して有意に上昇した。低速運動群とコントロール群の間には有意差は認められなかった。各群での部位別の比較では、高速運動群のVLの β -エンドルフィンの発現量はDMとDLより高かった。低速運動群では、VLがDM, DL, Lより高く、LはDMとDLより高かった。コントロール群では、VLとLがDMとDLより高かった。各部位での比較では、DMの β -エンドルフィンの発現は、高速運動群がコントロール群より有意に高く、DLでは高速運動群が低速運動群より有意に高かった。視床下部弓状核での β -エンドルフィンの発現には各群に有意差は認められなかった。

【考察】

運動により血漿コルチコステロン濃度が上昇したことから、運動負荷を与えると、速度に関係なくストレスが発生している事が示唆された。しかし、PAGでの β -エンドルフィンの発現は、高速運動群が他群と比較して上昇していたことから、脳内での β -エンドルフィンの発現には、ある一定以上の負荷が必要である事が明らかとなった。また、部位別での発現状態から、 β -エンドルフィンには、PAGのVLやLに多く発現する等の部位特異性があることがわかった。さらに、運動を負荷すると、DMやDLでの発現も増加する事から、これらは抗ストレス反応を示していることが推測された。視床下部弓状核での発現には各群に有意差が認められなかったことから、PAGに発現する β -エンドルフィンは、扁桃体中心核からの入力に関与していることが示唆された。