# 長時間運動時の脳グリコゲン減少と中枢性疲労

# 征矢英昭

# 目次

要約	
第1章	緒言2
第2章	研究目的および課題4
第3章	長時間運動は脳グリコゲンを減少させるか?(研究課題1)
第4章	運動時の脳グリコゲン減少は持続時間依存性か? (研究課題2)12
第5章	総合討論20
第6章	総括
研究成果	上一覧
謝辞	
参考文献	

長時間運動時の脳グリコゲン減少と中枢性疲労

# 征矢英昭、松井 崇

## 要約

【目的】運動時の脳では骨格筋と同様に,貯蔵糖質であるグリコゲンが細胞の活動に不可 欠とされるが,その代謝についての情報は皆無である.その原因として,脳グリコゲン は代謝が極めて早く,摘出した脳グリコゲン定量が難しいことが挙げられる.本研究で は,脳グリコゲン定量のゴールデンスタンダードであるマイクロ波照射法を導入し,長 時間運動による脳グリコゲン動態を明らかにすることを目的とした.

【対象と方法】まず、マイクロ波照射法を用いた運動時の正確な脳グリコゲン定量法を開発し、その上で、脳グリコゲンが運動時に利用されるかどうかを明らかにするため、低血糖ならびに筋・肝グリコゲンの枯渇をもたらす長時間運動モデルを用い、脳グリコゲン枯渇が起こるかどうかを異なる持続時間から詳細に検討した(研究課題1).その際、 グリコゲン分解の指標となる脳内乳酸、グリコゲン分解を促し、その代謝過剰が中枢疲労の原因になるとされるセロトニン(5-HT)、ノルアドレナリン(NA)の代謝動態について も筋・肝との比較から検討した(研究課題2).

【結果】運動時でも正確な脳グリコゲン定量が可能となり、その方法を用いると、長時間 運動時に血糖値の低下度と比例して脳グリコゲンの減少が起こること、その変化は脳内 乳酸と負の相関を示すこと、更に、脳内 5-HT/NA はグリコゲン減少と負の相関を示すこ とが明らかとなった.

【結論】本研究では,脳グリコゲンが長時間運動時に利用され,その後の迅速な再合成を 基盤としたトレーニング適応を起こすことが初めて明らかになった.これらの現象を応 用することで,中枢(脳)疲労予防や認知機能の向上を目的とした新たな運動・栄養処方 「脳グリコゲンローディング」を開発できるかもしれない.

代表者所属:筑波大学·体育系

## 第1章 緒言

運動時,脳は筋と同様に活性化し,脳におけるエネルギーや酸素の需要は増加する (Nybo & Secher, 2004). 脳はアデノシン三リン酸(adnosine triphosphate, ATP)を合成するた めに糖質のみを酸化利用するとされる.しかしながら,運動により脳内の糖代謝がどう 機能するかはほとんど明らかにされていない.骨格筋では,貯蔵糖質であるグリコゲン の解糖系を通した分解が運動時の素早い ATP 産生のために重要で(Romijn *et al.*, 1993), 運動中の活動筋のグリコゲン濃度は筋活動レベル(運動の強度や持続時間)に依存して減 少し,その枯渇は末梢(筋)疲労の原因となる(Gollnick *et al.*, 1974).一方,脳のグリコゲ ンは,脳を構成する神経細胞(neuron,ニューロン),神経膠細胞(glia,グリア),血管の うち,グリアの一種である星状膠細胞(astrocyte,アストロサイト)に限局して貯蔵される (Wender *et al.*, 2000).しかしながら,運動時に脳内貯蔵エネルギーとしての脳グリコゲ

脳グリコゲンはアストロサイト内で乳酸に分解され、その乳酸がニューロンに供給さ れることで"アストロサイト-ニューロン乳酸シャトル(Pellerin & Magistretti, 1994)"に おける重要な役割を担っている(Gruetter, 2003; Brown, 2004; Benarroch, 2010). 従来, 脳 のエネルギー基質は血液由来のグルコースのみであると考えられてきたが、最近の in vitro 研究により、アストロサイトにおいてグルコースを基に産生された乳酸がニューロ ンに供給され酸化利用されるとする"アストロサイト-ニューロン乳酸シャトル"の存在 が想定されるようになった. さらに最近の in vivo 研究では、ニューロンを活性化させる 記憶課題, 脳疲労モデルである断眠, そして血液からのエネルギー供給不足を招く絶食, 脳虚血、インスリン誘発性低血糖などによって、脳グリコゲンが利用され減少し、その 後再補充されることが報告されている(Garriga & Cusso, 1992; Kong et al., 2002; Gibbs et al., 2006; Suh et al., 2007; Herzog et al., 2008; Suzuki et al., 2011). 加えて, 脳グリコゲン 濃度が高ければ、低血糖時の神経活動持続時間が延長し、その際に生じる神経細胞死が 抑制されることも報告されている(Suh et al., 2007). これらの知見から、アストロサイト のグリコゲンはニューロンの活性化に伴うエネルギー需要の増加、並びに血液由来のグ

ルコース供給不足によって、ニューロンに乳酸を供給するために乳酸に分解され減少し、 その後再補充されると考えられる.

運動はニューロンを活性化し(Vissing *et al.*, 1996; Saito & Soya, 2004; Nishijima & Soya, 2006; Ohiwa *et al.*, 2006; Soya *et al.*, 2007a; Soya *et al.*, 2007b; Nishijima *et al.*, 2011b), 長時間運動は低血糖を引き起こすことから(Tabata *et al.*, 1984; Winder *et al.*, 1987), 運動時には脳グリコゲンが利用され,減少する可能性が想定される. さらに, コペンハーゲン大学のグループは, ヒトにおける疲労困憊運動の終盤と終了後には, 脳の血中グルコース取り込みが実際に代謝されたグルコースよりも過剰になること(Ide *et al.*, 2000), そして, それが脳グリコゲン分解の亢進に関与するβアドレナリン受容体を阻害することにより消失することを報告した(Larsen *et al.*, 2008). 彼らはこの知見を基に, 脳グリコゲンは疲労困憊運動時に利用され減少るという仮説を提唱している(Nybo & Secher, 2004; Quistorff *et al.*, 2008; Secher *et al.*, 2008). しかしながら, ヒトでも動物でも脳グリコゲン定量が困難であったことから, この仮説はこれまで検証されてこなかった.

脳グリコゲンの代謝速度は速いため、一般的に動物実験で用いられる断頭や灌流固定 などの屠殺法では死後5分以内に枯渇してしまうことから、生理的変化を観察すること が困難だった(Hutchins & Rogers, 1970a). この問題の解決策として、実験動物屠殺時のマ イクロ波照射法が導入された.マイクロ波照射法はラットの脳温を1秒間で約90℃に上 昇させることにより、グリコゲン代謝関連酵素を失活させ、死後の脳グリコゲン分解を 防ぐことで、脳本来のグリコゲン濃度の定量を可能にする(Kong *et al.*, 2002).

そこで本研究では、マイクロ波照射法を導入し、長時間運動時の脳グリコゲン動態を 明らかにすることを目的とする.もし想定した通りの結果が得られれば、運動時の脳内 エネルギー代謝には、血液由来のグルコースと乳酸だけでなく、脳内の貯蔵糖質である グリコゲンも貢献することが明らかになる.これは、運動生理・生化学における新たな 概念を加えることになるだけでなく、脳グリコゲンを指標とした脳機能の維持・増進の ための運動処方やサプリメントの開発につながる可能性もあることから、意義深い研究 になりうると考える.

# 第2章 研究目的および課題

# 1. 研究目的

長時間運動時の脳グリコゲン動態をマイクロ波照射法を用いて明らかにする.

#### 2. 研究課題

本研究の目的を達成するため、以下の研究課題を設定した.また、各研究課題にはそれぞれ複数の小課題を設定した.

#### 【研究課題1】長時間運動は脳グリコゲンを減少させるか?

マイクロ波照射により、長時間の激運動が脳グリコゲン濃度に及ぼす影響を検討する. 運動時に脳グリコゲンが利用されるのであれば、脳グリコゲンが長時間の激運動により 減少するはずである.

# 【研究課題2】運動誘発性脳グリコゲン減少は運動持続時間依存性か?

異なる持続時間の走運動が脳グリコゲン濃度に及ぼす影響と脳グリコゲン濃度の制御 因子である血糖や脳内モノアミンとの関係を検討する.運動時に脳グリコゲンが利用さ れるのであれば,低血糖や脳内モノアミン濃度の増加により,脳でも筋同様にグリコゲ ンが運動持続時間依存的に減少するはずである.

# 第3章 長時間運動は脳グリコゲンを減少させるか? (研究課題1)

#### 1. 目的

従来,脳のエネルギー源は血糖由来のグルコースのみであると考えられてきたが,最近のマイクロ波を用いた研究によって,アストロサイトのグリコゲンが解糖系を通して 乳酸に分解され,ニューロンのエネルギー基質として利用される可能性が示唆されてい る(Gruetter, 2003; Brown, 2004; Benarroch, 2010). 実際,脳グリコゲン濃度についてラッ トを用いて検討した研究では,皮質,海馬,視床下部,小脳などのグリコゲン量が 24 時 間の絶食(Garriga et al., 1992), 覚醒(断睡眠)時間の増加(Kong et al., 2002), 脳虚血(Suh et al., 2007),インスリン誘発性低血糖(Herzog et al., 2008)により減少することが分かった. 加えて,脳において,正常血糖時にはグリコゲン分解を阻害するが,低血糖時にはグリ コゲンの分解を阻害しない特殊な脳グリコゲン分解酵素阻害薬を用いて,事前に脳グリ コゲン濃度を増加させておくことにより,低血糖時の神経活動持続時間が約 90 分間延長 した(Suh et al., 2007). これらの事実から,脳グリコゲンは血糖由来のグルコース供給が 不十分な場合,および脳の神経活動(エネルギー需要)の増加により相対的に周囲のグルコ ースが不足した場合において,ニューロンへエネルギー基質としての乳酸を供給するた めに分解され,貯蔵量が減少すると考えられる(Brown et al., 2004).

運動は脳神経活動を活性化し(Saito & Soya, 2004; Nishijima & Soya, 2006; Ohiwa *et al.*, 2006; Soya *et al.*, 2007a; Soya *et al.*, 2007b; Nishijima *et al.*, 2011b), 長時間運動は低血糖を 引き起こすことから(Tabata *et al.*, 1984; Winder *et al.*, 1987), 脳グリコゲン濃度を減少さ せる可能性がある.

そこで研究課題2-1では、低血糖を伴う長時間運動がラットの脳グリコゲン濃度に 及ぼす影響を検討する.運動によって、筋同様に脳でもグリコゲン濃度の減少が起こる か否かを検討することは、運動時の脳内エネルギー代謝に新たな概念を加えることにな り、運動生理・生化学領域において新たな概念や課題の開拓につながる可能性があるた め、非常に意義深い研究になりうると考える.

# 2. 方法

## 2-1. 被験動物および飼育条件

本研究は,筑波大学動物実験指針の基づき,動物実験倫理委員会の承認を得て行われた.実験には11週齢のWitar系雄性ラット(250-300g,SLC,Japan)を用いた.飼育環境は室内温度 22±2℃,湿度 60±10%,7:00~19:00 を明期とした明暗サイクルを維持した. 飼料には動物用固形飼料(MF,オリエンタル酵母,Japan)を,飲料水には蒸留水をそれぞれ用い,ともに 24 時間自由摂取とした.

# 2-2. 走行学習

ラットには1週間の予備飼育のあと、トレッドミル走運動に慣れさせるため、6日間の 走行学習を施した.走行学習は小動物用トレッドミル(KN-73、夏目製作所、Japan)を用 いて、1日30分間を計5日間行った(Table 1). このプロトコールで走行学習を行ったラ ットのLTは、およそ15~20 m/min であることが確認されている(Nishijima & Soya, 2006; Soya *et al.*, 2007a; Nishijima *et al.*, 2011b).

Day	Running speed and time
1	Rest, 10 min + 5 m/min, 10 min + 10 m/min, 10 min
2	Rest, 5 min + 5 m/min, 10 min + 10 m/min, 10 min + 15 m/min, 10 min
3	Rest
4	Rest, 5 min + 10 m/min, 10 min + 15 m/min, 10 min + 20 m/min, 10 min
5	Rest, 5 min + 15 m/min, 10 min + 20 m/min, 10 min + 25 m/min, 10 min
6	Rest, 5 min + 15 m/min, 10 min + 20 m/min, 10 min + 25 m/min, 10 min

Table 1 The protocol for habituation to treadmill running exercise.

# 2-3. 運動実験

ラットを非運動群(Sedentary,トレッドミル上に安置)と運動群(Exercise)の2群に分け, 分速20m,120分間のトレッドミル走運動を行わせた.運動開始120分の時点でマイク ロ波照射(10kW,1.2秒)による屠殺のあと断頭し,体幹血と脳,筋,肝臓を採取した. 実験の2時間前からラットを絶食状態にし,実験はすべて午前中に行われた.

# 2-4. マイクロ波照射

無麻酔群は覚醒状態において、ペントバルタール群およびイソフルラン群は全身麻酔のあと、Kong et al. (2002)の方法に従って、マイクロ波照射装置(NJE-2606、新日本無線株式会社、Japan)を用い、10 kW のマイクロ波を 1.2 秒間照射しラットを屠殺した.

# 2-5. 組織の採取

マイクロ波照射のあと脳を採取し、Hirano *et al.* (2006)の方法に従い、皮質、中隔、線 条体、海馬、視床、視床下部、中脳、小脳、脳幹の9部位に分画した (Fig. 1). 同時にヒ ラメ筋、足底筋、肝臓も採取した. 採取した組織は液体窒素で凍結させ、グリコゲンの 定量に用いるまで-80℃で保存した.



Figure 1 Rat whole brain and its regions.

# 2-5. 血糖値の定量

採取した体幹血(ヘパリン処理)を用いて,研究課題1-2と同様にグルコース/ラクテ ートアナライザー(2300 STAT PLUS, YSI, USA)で血糖値を測定した.

# 2-6.グリコゲン濃度の定量

脳のグリコゲンおよびグルコースの抽出はKong *et al.* (2002) に, グルコース濃度の測定はPassonneau & Lauderdale (1974)の方法に従った. 手順は以下の通りである.

## 2-6-1. グルコースの抽出

- 組織を6%過塩素酸/1 mM EDTA溶液(perchloric acid solution)を用い氷上でホモジナイズした.
- ② ①のホモジネートを25,000g,4℃で10分間遠心分離し、上澄みを水酸化カリウム溶液(3 M水酸化カリウム(KOH),0.3 Mイミダゾール(imidazole),0.4 M塩化カリウム (KCl))でpH 6~8の間に調整した.
- ③ 14,000 g, 4℃で10分間遠心分離し、上澄みを加水分解をしていない(組織内にもとから存在する)グルコースサンプルとした.

## 2-6-2.グリコゲンの抽出

- ① 組織を6%過塩素酸(perchloric acid)/1 mM EDTA溶液を用い氷上でホモジナイズした.
- ② グリコゲンをグルコースに加水分解するため、①のホモジネート100µlに1 mlの0.2 M 酢酸ナトリウム(sodium acetate)、20µlの1.0 M炭酸水素カリウム(KHCO<sub>3</sub>)、20 U/mlの アミログルコシダーゼ(amyloglucosidase)を加え、室温で16時間安置した。
- ③ 500µlの6%過塩素酸/1 mM EDTA溶液を加え加水分解反応を止めた.25,000g,4℃で
   10分間遠心分離し、上澄みを水酸化カリウム溶液(3 M水酸化カリウム(KOH),0.3 M
   イミダゾール(imidazole),0.4 M塩化カリウム(KCl))でpH 6~8の間に調整した.
- ④ 14,000 g, 4℃で10分間遠心分離し、上澄みを加水分解した(グリコゲンが分解された)
   グルコースと組織内にもとから存在するグルコースの両方を含んだサンプルとした.

# 2-6-3. グルコース濃度の測定

グルコースの測定には96ウェルプレートと蛍光マイクロプレートリーダー(Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, USA)を用いた.

 それぞれのウェルへ200µlの反応液(50 mMトリス-塩酸溶液(Tris-HCL)pH 8.1, 0.5 mM アデノシン三リン酸(ATP), 0.5 mM ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP), 0.5 mM硫酸マグネシウム(MgSO<sub>4</sub>), 0.1 U/mlグルコース6リン酸脱水素酵素 (glucose-6-phosphatede hydrogenase))を加えた.

- ② それぞれのウェルに、30µlのスタンダードおよびサンプルと0.3 Uのヘキソキナーゼ (Hexokinase)を加えた.
- ③ ウェルプレートを蛍光マイクロプレートリーダーで撹拌し、30分間室温で安置した あと、励起355 nm、発光420 nmで結晶したジヒドロニコチンアミドアデニンジヌク レオチドリン酸(NADPH)の量からグルコース量を計算した。
- ④ グルコースはmol濃度で表し、組織の湿重量で補正して $\mu$ mol/g wet tissueで示した.

# 2-6-4. グリコゲン量の計算

グリコゲン濃度は、加水分解したサンプルのグルコース濃度から加水分解していない サンプルのグルコース濃度を差し引いた値をとし、グルコース同様 µmol/g wet tissue で示 した.

## 2-7. 統計処理

データはすべて平均値±標準誤差で示し,統計処理については対応のない t 検定を行った. 有意水準は 5%とした.

## 3. 結果

# 3-1. 血糖並びに筋・肝・脳グリコゲン濃度

分速 20 m, 120 分間のトレッドミル走運動直後の血糖および筋・肝・脳グリコゲン濃度を Figure 2 に示す. 血糖値は Exercise 群において Sedentary 群と比べて 45 %低かった(p < 0.01). 筋と肝臓のグリコゲンは Exercise 群において sedentary 群と比べて約 90 %減少した. 皮質,海馬,視床下部,小脳,脳幹のグリコゲン濃度が exercise 群において sedentary 群と比べて約 50 %減少した(p < 0.05). 一方,中隔,線条体,視床,中脳のグリコゲン濃度は減少傾向を示したものの,有意な変化は見られなかった.



Figure 2 Blood glucose, and glycogen levels in the liver, skeletal muscles, and the brain after 2 h of exercise. A, Blood glucose; B, Liver glycogen; C, Skeletal muscles glycogen; D, Brain glycogen. Data represent the mean  $\pm$  standard error (n = 5-11 rats). \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01 compared to sedentary rats (unpaired t-test).

# 4. 考察

本実験では、研究課題 1 で確立した脳グリコゲン定量法を用いて、低血糖を引き起こ す長時間(120分間)の激運動がラットの脳グリコゲン濃度に及ぼす影響を検討した.運動 により血糖値は 45%低下し、筋と肝臓のグリコゲンは 90%減少した.運動時の低血糖や 筋・肝グリコゲンの枯渇は疲労の指標とされることから(Nybo & Secher, 2004)、本実験で 用いた運動は非常に厳しい運動条件であったことが分かる.このとき、皮質、海馬、視 床下部、小脳、脳幹のグリコゲン濃度が運動により約 50%減少した.これにより、運動 時より脳グリコゲンが減少することが初めて明らかになった.皮質は筋への収縮命令や 運動のプログラミング、海馬は運動時の認知、視床下部は体温やエネルギー代謝の調節、 小脳は筋の強調や姿勢の維持,脳幹は呼吸や心拍の調節など,運動時に活性化すると考 えられる部位である.この結果は,走運動時に脳で増加したエネルギー需要を満たすた めに解糖系が亢進した可能性を示す.しかし,このとき同時に低血糖も起こっているこ とから,本実験で観察された運動による脳グリコゲンの減少は運動時の神経活動の増加 によるものなのか,低血糖によるものなのか明らかでなかった.

運動により皮質,海馬,視床下部,小脳,脳幹のグリコゲンが減少した一方で,中隔, 線条体,視床,中脳のグリコゲン濃度は減少傾向にあったものの統計的な差は見られな かった.これらの部位も運動の発現に関与する部位であるが,重要な部位であるからこ そ,その機能を維持するために脳グリコゲンを減少させない機構があるのかもしれない.

# 第4章 運動時の脳グリコゲン減少は持続時間依存性か?(研究課題2)

#### 1. 目的

運動時のエネルギー供給において,筋のグリコゲンは非常に重要な役割を果たす.骨格筋のグリコゲンは運動時にエネルギー需要が増加した場合に,解糖系を通して筋自身に ATP を供給するために代謝される(Romijn et al., 1993).実際,筋グリコゲン濃度は運動中にその運動強度や持続時間に依存して減少する(Gollnick et al., 1974).一方,研究課題 2-1 により,脳グリコゲンが低血糖を伴う長時間運動により減少することが明らかになったが,その減少に対する運動持続時間の影響は不明である.

運動時,脳の血中乳酸取り込みは血中乳酸濃度が増加する乳酸性作業閾値(lactate threshold, LT)を越える強度において起こるが,LTより低い強度では起こらないことが分かっている(Ide *et al.*, 2000). 一方,我々の研究室では,マイクロダイアリシス法を用いた研究により,走運動時のラット海馬内乳酸が血中乳酸の増加しないLTより低い強度の運動においても増加することを見出した(未公表データ). このことから,LTより低い強度の運動で増加した海馬内の乳酸は,血中由来ではなく,脳原生のグリコゲンが分解されたことによって生じた乳酸である可能性が考えられる.このLTより低い強度の運動時に低血糖は起こっていないことから,運動時には低血糖が起こらない場合においても、神経活動の増加に伴って脳グリコゲン量が減少する可能性がある.

そこで研究課題2-2では、脳グリコゲンは筋同様に運動持続時間依存的に減少する かどうか明らかにすることを目的とし、異なる持続時間の運動が脳グリコゲン濃度に及 ぼす影響を検討した.

## 2. 方法

#### 2-1. 被験動物および飼育条件

本研究は、筑波大学動物実験指針の基づき、動物実験倫理委員会の承認を得て行われた.実験には11週齢のWitar系雄性ラット(250-300g, SLC, Japan)を用いた.飼育環境は室内温度 22±2℃,湿度 60±10%,7:00~19:00 を明期とした明暗サイクルを維持した. 飼料には動物用固形飼料(MF,オリエンタル酵母,Japan)を、飲料水には蒸留水をそれぞ れ用い、ともに24時間自由摂取とした.

# 2-2. 走行学習

ラットには1週間の予備飼育のあと、トレッドミル走運動に慣れさせるため、6日間の 走行学習を施した.走行学習は小動物用トレッドミル(SN-460, Shinano, Japan)を用いて、
1日 30 分間を計5日間行った(表 1). このプロトコールで走行学習を行ったラットのLT は、およそ15~20 m/min であることが確認されている(Nishijima & Soya, 2006; Soya *et al.*,
2007a; Nishijima *et al.*, 2011b).

## 2-3. 外頸静脈カテーテル留置手術

1週間の予備飼育のあと、ストレスのない麻酔薬の静脈投与を可能とするために、ペント バルビタール群の外頸静脈にシリコン製カテーテルを留置した. ラットにペントバビタ ール麻酔(50 mg/kg B.W., i.p.)を施し、右鎖骨上部の皮膚を切開した. 右外頸静脈を露出 後、その一部をマイクロせん刀で切開し、その切開部から右心房にむけ 10%へパリン生 理食塩水で満たしたカテーテルを 32 mm 挿入した. 続いてカテーテルを糸で外頸静脈に 固定後、後頭骨直下約 1 cm を切開し、そこからカテーテルを露出させた. 血液が抜ける ことを確認したあと、切開部を縫合した. その後、感染症を防ぐために抗生物質(動物用 マイシリンゾル、明治製菓株式会社, Japan)を 100µl 皮下に注射した. 術後 2 日間の回 復期間のあと実験を行った.

# 2-4. 運動実験

ラットを運動前群,非運動群(トレッドミル上に安置),運動 30 分群,運動 60 分群,運 動 120 分群の 5 群に分け,分速 20 m,120 分間のトレッドミル走運動を行わせた.運動 開始 0 分(運動前),30 分,60 分,120 分の時点でマイクロ波照射(10 kW,1.2 秒)による 屠殺のあと断頭し,体幹血と脳,筋,肝臓を採取した.実験の2 時間前からラットを絶 食状態にし,実験はすべて午前中に行われた.走運動実験のプロトコールを Figure 12A に示した.

## 2-5. 組織の採取

研究課題1と同様にマイクロ波照射装置(NJE-2606,新日本無線株式会社,Japan)を用 い,10kWのマイクロ波を1.2秒間照射したあと脳を採取した. 脳はHirano et al. (2006) の方法に従い,皮質,中隔,線条体,海馬,視床,視床下部,中脳,小脳,脳幹の9部 位に分画した.同時にヒラメ筋,足底筋,肝臓も採取した.採取した組織は液体窒素で 凍結させ,グリコゲンの定量に用いるまで-80℃で保存した.実験には皮質,海馬,視 床下部,小脳,脳幹の5部位を用いた.

## 2-6. 血液成分の測定

留置したカテーテルからの静脈血(ヘパリン処理)を用いて, にグルコース/ラクテート アナライザー(2300 STAT PLUS, YSI, USA)で血糖値と血中乳酸値を測定した.

# 2-7. グリコゲンおよびグルコース濃度の定量

脳のグリコゲンおよびグルコースの抽出はKong et al. (2002)に, グルコース濃度の測定はPassonneau & Lauderdale (1974)の方法に従った. 手順は研究課題1と同様に行った.

# 2-8. 脳乳酸濃度の定量

Passonneau & Lauderdale (1974)の方法によるキット(DiaSys, Germany)により定量した.

# 2-9. 脳内モノアミンの定量

Takeda et al. (1990)の方法により高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した.

# 2-10. 統計処理

データはすべて平均値±標準誤差で示し,統計処理については一元配置分散分析のあと, post-hoc テスト(Dunnet)を行った.相関分析は Pearson を用いた.有意水準は 5%とした.

# 3. 結果

# 3-1. 血糖, 血中乳酸, 並びに筋・肝・脳グリコゲン濃度

分速 20 m, 30, 60, 120 分間のトレッドミル走運動直後の血糖, 血中乳酸, 並びに筋・ 肝・脳グリコゲン濃度を Figure 3 に示す. 血糖値は運動 30 分群と 60 分群において運動 前群と比較して減少しなかったが, 運動 120 分群で 46 %低下した. 筋・肝グリコゲン濃 度は運動持続時間依存的に減少した. 血糖と同様に, 皮質, 海馬, 視床下部, 小脳, 脳 幹のグリコゲン濃度は運動 30 分群と 60 分群において運動前群と比較して減少しなかっ たが, 運動 120 分群でのみ減少した.



Figure 3 Blood parameters and glycogen levels in the skeletal muscle, liver, and brain after exercise for 0, 30, 60, and 120 min. A, Experimental procedure. B, Blood glucose and lactate levels. C, Glycogen levels in skeletal muscles. D, Liver glycogen levels. E, Brain glycogen levels. Data represent the mean  $\pm$  SEM (n = 5-6 rats). \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01 compared to pre-exercised rats (Dunnett's post hoc test).

# 3-2. 脳内グルコース並びに乳酸濃度

分速 20 m, 30, 60, 120 分間のトレッドミル走運動直後の脳内グルコース並びに乳酸 濃度を Table 2 に示す.皮質,海馬,視床下部,小脳,脳幹のグルコース濃度は血糖と同 様に,運動 30 分群と 60 分群において運動前群と比較して減少しなかったが,運動 120 分群でのみ減少した.皮質,海馬,視床下部,小脳,脳幹の乳酸濃度は運動 120 分群で 有意に高かった.

Table 2 Glucose and lactate levels in five brain loci after exercise for 0, 30, 60, and 120 min (µmol/g wet tissue).

Brain region		0 min	30 min	60 min	120 min
Contox	Glucose	2.6 ± 0.1	3.3 ± 0.1*	3.2 ± 0.2	1.3 ± 0.4*
COElex	Lactate	1.1 ± 0.0	1.9 ± 0.3*	1.9 ± 0.3	2.5 ± 0.2**
Hinnocompus	Glucose	2.8 ± 0.1	3.4 ± 0.1*	3.5 ± 0.1*	1.6 ± 0.3*
hippocallipus	Lactate	1.3 ± 0.0	$2.2 \pm 0.3$	$2.0 \pm 0.3$	2.7 ± 0.4**
Hypotholomuo	Glucose	2.8 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.0 ± 0.1	1.9 ± 0.3*
пурошалатиз	Lactate	1.1 ± 0.1	1.9 ± 0.3*	1.8 ± 0.3	2.4 ± 0.2**
Caraballum	Glucose	3.1 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.4 ± 0.1	1.9 ± 0.4*
Cerebellulli	Lactate	0.9 ± 0.1	1.5 ± 0.2*	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.2**
Proinctom	Glucose	2.7 ± 0.1	3.2 ± 0.1	$3.3 \pm 0.2$	1.6 ± 0.3*
Drainstein	Lactate	1.1 ± 0.1	1.9 ± 0.3*	1.9 ± 0.3	2.5 ± 0.2***

Data represent the mean  $\pm$  standard error (n = 5 - 6 rats). \*, p < 0.05 compared to 0 min (Dunnett's *post hoc* test).

# 3-3. 血糖, 脳内グルコース, 脳内乳酸と脳グリコゲンの相関

血糖, 脳内グルコース, 脳内乳酸と脳グリコゲンの相関を Figure 5 に示す. 血糖並び に脳グルコースと脳グリコゲンとの間には全ての部位で非常に高い正の相関が認められ た. 脳乳酸と脳グリコゲンとの間には視床下部を除く全ての部位で負の相関が認められ た.





Figure 5 Correlation between brain glycogen levels and blood glucose, brain glucose and brain lactate. Correlation between brain glycogen levels and A; blood glucose, B; brain glucose, and C; brain lactate (Pearson's product-moment correlation test).

3-4. 皮質モノアミン濃度,並びに皮質モノアミンとグリコゲン濃度の相関

ノルアドレナリンの代謝産物である メトキシヒドロキシフェニルグリコー ル(MHPG)は運動 60 分群で運動前群と比 較して増加し、運動 120 分群では運動前 群,運動 60 分群の両群と比較して有意 な高値を示した. セロトニンの代謝産物 である 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA)は運動 60 分群と 120 分群で運 動前群と比較して有意な高値を示した. しかしながら,ジヒドロキシフェニル酢 酸 (DOPAC)は 増 加 傾 向 に あ る も の の 有 意な変化はしなかった.その他の測定項 目にも有意な変化は見られなかった(Fig. MHPG および 5-HIAA とグリコゲ 6A). ンとの間には高い負の相関が認められ たが, DOPAC とグリコゲンの間には相 関は見られなかった(Fig. 6B).



Figure 6 Monoamines and their metabolites in the cortex after exercise for 0, 60, and 120 min. A, Monoamines and their metabolites. Data represent the mean  $\pm$  standard error (n = 4-6 rats). \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01 compared to 0 min; #, p <0.05 compared to 60 min of exercise (Tukey's post hoc test). B, Correlation between monoamine metabolites and glycogen levels (Pearson's product-moment correlation test).

# 4. 考察

本実験では、研究課題1で確立した脳グリコゲン定量法を用いて、30、60、120分間の 走運動がラットの脳グリコゲン濃度に及ぼす影響を検討した. 30および 60分間の走運 動では血糖は減少せずに血中乳酸も増加しないが、運動120分では血糖が46%低下し血 中乳酸は約5倍に増加した.このとき筋と肝臓のグリコゲンは持続時間依存的に約90% 減少した.運動30、60分の時点では筋・肝グリコゲンは低下しているが、血糖が低下し ておらず、疲労せずに運動を継続しているフェーズであると考えられる.一方、運動120 分の時点では低血糖が起こり、筋や肝臓のグリコゲンも枯渇している.これは研究課題 2-1の状況とほぼ同様で運動により疲労しているフェーズであると思われる.

このとき、皮質、海馬、視床下部、小脳、脳幹のグリコゲン濃度は予想に反し運動 30, 60分では減少せず、運動 120分でのみ約 50%減少した.これにより、脳グリコゲンは低 血糖を伴う長時間運動時にのみ減少することが初めて明らかとなった.このとき減少し た血糖並びに脳グルコースと脳グリコゲンの間に非常に高い正の相関が確認された.こ のことから、血糖や脳グルコースは運動時の脳グリコゲン減少の決定因子である可能性 がある.さらに、このとき脳内で増加した乳酸と脳グリコゲンの間に視床下部以外の4 部位で負の相関が見られた.この結果は、運動時に脳グリコゲンが乳酸に分解され、ニ ューロンに供給された可能性を示す.

加えて、本実験では皮質内モノアミンとその代謝産物も定量したところ、ノルアドレ ナリンの代謝産物である MHPG とセロトニンの代謝産物である 5-HIAA が運動 120 分群 で増加した.ノルアドレナリンやセロトニンは脳グリコゲンの分解促進因子であり (Benington & Heller, 1995a; Brown, 2004; Benarroch, 2010)、運動時に増加することも報告 されている(Newsholme *et al.*, 1992; Pagliari & Peyrin, 1995).本実験では皮質の MHPG と グリコゲン,および 5-HIAA とグリコゲンの間に負の相関が見られた.これは、脳グリコ ゲン代謝に関与しないドーパミンの代謝産物である DOPAC では見られないことから、低 血糖を引き起こす長時間運動による脳グリコゲンの減少にはノルアドレナリンとセロト ニンの代謝亢進が関与している可能性がある.

運動中の低血糖や脳内セロトニン濃度の増加は運動時の中枢疲労の原因とされる (Nybo & Secher, 2004).本実験において、血糖やセロトニンが運動時の脳グリコゲン減少 の決定因子として見出された.これらの結果は、低血糖やセロトニンの増加に伴う脳グ リコゲンの減少が運動時の中枢疲労の統合要因でらう可能性を示唆する.今後、事前に 脳グリコゲン濃度を高めた場合に持久性パフォマンスが向上するかどうか検討する必要 がある.

# 第5章 総合討論

運動時,脳は筋と同様に活性化し,脳におけるエネルギーや酸素の需要は増加する (Nybo & Secher, 2004).脳は糖質のみをエネルギー基質としているとされるが,運動により脳内の糖代謝がどう機能し,適応するかはほとんど明らかにされていない.

運動時の骨格筋では、貯蔵糖質であるグリコゲン濃度が活動レベル(運動の強度や持続 時間)に依存して減少する(Gollnick *et al.*, 1974). 一方, 脳にもグリコゲンは存在し(Wender *et al.*, 2000), それはニューロンの活性化や血液由来のグルコース供給不足時に利用され 減少する(Brown, 2004). 運動はニューロンを活性化し(Vissing *et al.*, 1996; Saito & Soya, 2004; Nishijima & Soya, 2006; Ohiwa *et al.*, 2006; Soya *et al.*, 2007a; Soya *et al.*, 2007b; Nishijima *et al.*, 2011b), 長時間運動は低血糖を引き起こすことから(Tabata *et al.*, 1984; Winder *et al.*, 1987), 脳グリコゲンを筋グリコゲン同様に減少させる可能性がある. そこ で本研究では, 脳グリコゲン定量のゴールデンスタンダードであるマイクロ波照射法を 導入し,長時間運動時に脳グリコゲンが減少するがどうかを明らかにすることを目的と した.

アストロサイトに存在する脳のグリコゲンは、血液由来のグルコース供給不足(低血糖) 時に利用され減少するとされる. 長時間運動は低血糖を引き起こすことから, 脳グリコ ゲンが利用され減少すると考えられるが, これは全く不明だった. そこで研究課題 2-1 では, 低血糖を伴う長時間運動時の脳グリコゲン濃度をマイクロ波照射法を用いて検討 した. 120分間の長時間運動により血糖値は 45%低下し, 筋と肝臓のグリコゲンは 90% 減少した. 運動時の低血糖や筋・肝グリコゲンの枯渇は疲労の指標とされることから (Nybo & Secher, 2004), 本実験で用いた運動は非常に厳しい運動条件であったことが分か る. このとき, 脳グリコゲンは脳全体で減少傾向を示し, 皮質, 海馬, 視床下部, 小脳, 脳幹のグリコゲン濃度が有意に約 50%減少した. これにより, 低血糖を伴う長時間運動 が脳グリコゲンを減少させることが初めて明らかになった. 低血糖は脳グリコゲンを減 少させる要因としてよく知られていることから, この結果は, 長時間運動時に引き起こ された低血糖が血液から脳へのエネルギー供給不足を招き, その不足を補うためにアス



**Figure 7 Brain glycogen metabolism during prolonged exhaustive exercise.** G-6-P; glucose-6-phosphate, GLUT; Glucose transporter, MCT; monocarboxylic acid transporter. Energy sources for neurons include not only blood glucose but also lactate. Astrocytic glycogen is synthesized from blood glucose and degraded into lactate by excitatory neurotransmitters such as noradrenaline and serotonin. Lactate is uptaken neurons and changed to pyruvate, which is used for ATP synthesis in the mitochondria. The effect of exercise on GLUTs and MCTs in the brain is not elucidated yet.

トロサイトでグリコゲン分解が亢進した可能性を示す.しかしながら,本実験において 有意なグリコゲン減少が確認されたのは脳全体ではなく,皮質,海馬,視床下部,小脳, 脳幹の5部位であった.皮質は筋への収縮命令や運動のプログラミング,海馬は運動時 の認知,視床下部は体温やエネルギー代謝の調節,小脳は筋の協調や姿勢の維持,脳幹 は呼吸や心拍の調節など,運動時に活性化すると考えられる部位である.したがって, 長時間運動時の脳グリコゲン減少には低血糖だけでなく運動時のニューロンの活性化も 関与しているのかもしれない.しかしながら,この点に関しては明らかでなかった.

この問題に迫るため、研究課題2-2では、異なる持続時間(30,60,120分間)の運動がラットの脳グリコゲン濃度に及ぼす影響を検討した.脳グリコゲンが運動時のニュー

ロン活動に応じて利用され減少するなら,筋グリコゲンが運動持続時間(筋活動レベル) に依存して減少するように、脳グリコゲンも運動持続時間依存的に減少すると考えられ る. 低血糖は運動開始から 30,60分の時点では起こらず,120分の時点でのみ生じた. 筋と肝臓のグリコゲンは先行研究の通り,運動持続時間に依存して減少した. 脳(皮質, 海馬,視床下部,小脳,脳幹)のグリコゲンは全ての部位において,低血糖の生じない運 動開始から30,60分の時点では減少せず,低血糖を招いた120分の時点でのみ減少した. このとき、減少した血糖と脳グリコゲンの間に非常に高い正の相関が確認された.これ らの結果は、血糖が運動時の脳グリコゲン減少の決定因子である可能性を示唆する.さ らに、このとき視床下部以外の4部位において、脳内で増加した乳酸と脳グリコゲンと の間に負の相関が見られた.この結果は、長時間運動時に脳グリコゲンが乳酸に分解さ れたことを示し、長時間運動時の"アストロサイト-ニューロン乳酸シャトル(Pellerin & Magistretti, 1994)"における乳酸の供給源としてグリコゲンが貢献している可能性を示唆 する.加えて、アストロサイトのグリコゲン分解促進因子として知られるノルアドレナ リンとセロトニンの代謝を皮質において定量したところ、ノルアドレナリンの代謝産物 である MHPG とセロトニンの代謝産物である 5-HIAA が運動 120 分群で増加し, 減少し たグリコゲン濃度と負の相関を示した. ノルアドレナリンやセロトニンとそれらの代謝 は、運動時に増加することが先行研究において報告されており(Pagliari & Peyrin, 1995), 本研究の結果を支持する.さらに、脳グリコゲン代謝に関与しないドーパミンの代謝産 物である DOPAC と脳グリコゲン濃度に相関はないことから,低血糖を伴う長時間運時の 脳グリコゲン減少には興奮性神経伝達物質であるノルアドレナリンとセロトニンの代謝 亢進が関与している可能性がある(Fig.7).

本実験において、血糖やセロトニンが運動時の脳グリコゲン減少の決定因子である可 能性が見出されたが、これらは長時間運動時の中枢疲労の要因としても知られる.した がって、脳グリコゲンは長時間運動時の脳内セロトニン代謝の亢進や血糖値の低下によ り利用され減少し、その減少が長時間運動時の中枢疲労の統合因子となるのかもしれな い(Fig. 8). これについては、今後、運動前に脳グリコゲン濃度を高めた場合に持久性パ フォマンスが向上するかどうかを検討する必要がある.



Figure 8 Hypothetical diagram showing the brain glycogen decrease as an integrative factor of central fatigue during prolonged exercise. Prolonged exercise induces glycogen depletion in the muscles and liver, and hypoglycaemia, which causes peripheral fatigue. Hypoglycaemia elicits energy shortages in the brain, and likely induces central fatigue. Increase in brain serotonin due to rise in tryptophan/BCAA ratio in blood also induces central fatigue by eliciting lassitude (serotonin hypothesis). Furthermore, increases in body and brain temperature attributed dehydration induce central fatigue directly and/or indirectly through increases in brain noradrenaline and serotonin. Hypoglycaemia and serotonin are not only inducing factors of central fatigue but also enhancing factors of astrocytic glycogen degradation. Indeed, we observed that brain glycogen levels after running were correlated with the respective blood glucose and increased serotonin metabolism (Matsui et al., 2011). Exercise-induced brain glycogen decrease could be an integrative factor of central fatigue.

本研究により、長時間運動により脳は血液由来のグルコースと乳酸だけでなく、脳内 の貯蔵糖質であるグリコゲンを利用し、さらに、運動後の脳グリコゲン超回復が筋グリ コゲンと同様に起こり、トレーニングに伴う脳の代謝適応に重要である可能性が明らか になった.これは長時間運動時の中枢疲労や運動トレーニングにる脳機能向上のメカニ ズムの解明につながるかもしれない.しかしながら、本研究において、運動による脳グ リコゲン減少並びに超回復の分子機構や生理的意義を直接的に検討することはできなか った.今後は脳グリコゲン代謝に関与する因子(ノルアドレナリン、セロトニン、インス リンなど)の阻害剤を用いた運動による脳グリコゲン減少並びに超回復の分子機構を解 明する研究,そして脳グリコゲン分解酵素阻害薬を用いた運動時の脳グリコゲンの生理 的意義を明らかにする研究が必要となる.研究がさらに進めば,脳グリコゲンを指標と した脳機能の維持・増進のための運動処方やサプリメントの開発につながるかもしれな い.

## 第6章 総括

運動時の骨格筋では、貯蔵糖質であるグリコゲン濃度が活動レベル(運動の強度や持続 時間)に依存して減少する(Gollnick *et al.*, 1974). 一方, 脳にもグリコゲンは存在し(Wender *et al.*, 2000), ニューロンの活性化や血液由来のグルコース供給不足時に利用され減少し, その後再補充される(Brown, 2004). 運動はニューロンを活性化し(Vissing *et al.*, 1996; Saito & Soya, 2004; Nishijima & Soya, 2006; Ohiwa *et al.*, 2006; Soya *et al.*, 2007a; Soya *et al.*, 2007b; Nishijima *et al.*, 2011b), 長時間運動は低血糖を引き起こすことから(Tabata *et al.*, 1984; Winder *et al.*, 1987), 脳グリコゲンを筋グリコゲン同様に減少させる可能性がある. そこで本研究では, 脳グリコゲン定量のゴールデンスタンダードであるマイクロ波照射 法を導入し、長時間運動時に脳グリコゲンが減少するかどうかを明らかにすることを目 的とした.本研究により,以下の成果を得た.

## 【研究課題2】長時間運動時に脳グリコゲンは減少するか?

## 研究課題2-1.長時間運動は脳グリコゲンを減少させるか?

脳グリコゲンは長時間運動時に利用され減少するかどうかを明らかにするため、低血 糖を伴う長時間運動がラットの脳グリコゲン濃度に及ぼす影響を検討した.その結果、 低血糖を伴う長時間運動は運動に関与するとされる脳部位のグリコゲンを筋グリコゲン と同様に減少させることが明らかになった.

## 研究課題2-2.運動誘発性脳グリコゲン減少は運動持続時間依存性か?

脳グリコゲンは筋グリコゲンと同様に運動持続時間依存的に減少するかどうかを明ら かにすることを目的とし,異なる持続時間の運動が脳グリコゲン濃度に及ぼす影響を検 討した.その結果,低血糖を伴う長時間運動でのみ脳グリコゲンが減少し,その減少に は長時間運動により引き起こされた低血糖や脳内のノルアドレナリンとセロトニン代謝 の亢進が関与する可能性が明らかとなった.低血糖や脳内セロトニンの増加は運動時の 中枢疲労の要因とされることから,これらによって生じる脳グリコゲン減少が長時間運 動時の中枢疲労の統合要因としてかもしれない.

本研究により,脳グリコゲンが筋グリコゲンと同様に長時間運動時に分解・利用され減 少することが明らかになった.今後,運動による脳グリコゲン減少の分子機構や生理的 意義を明らかにする研究が進めば,脳グリコゲンを指標とした持久性パフォマンスや認 知機能(記憶・学習能力)の維持・増進のための運動・栄養処方,並びにサプリメントの 開発につながる可能性がある. 原著論文

- Takashi Matsui, Taro Ishikawa, Hitoshi Ito, Masahiro Okamoto, Koshiro Inoue, Min-chul Lee, Takahiko Fujikawa, Yukio Ichitani, Kentaro Kawanaka, and Hideaki Soya (2012). Brain glycogen supercompensation following exhaustive exercise. J Physiol 590, 607–616.
- Takashi Matsui, Shingo Soya, Masahiro Okamoto, Yukio Ichitani, Kentaro Kawanaka, and Hideaki Soya (2011). Brain glycogen decreases during prolonged exercise. J Physiol 589, 3383-3393.

# 総説論文

- 1. Takashi Matsui and Hideaki Soya (2012). Brain glycogen metabolism and central fatigue during prolonged exercise. *Physiol News* In press.
- 2. 松井 崇, 征矢英昭(2010). 脳内グリコーゲンの減少と中枢性疲労. 体育の科学 60, 797-804.

# 受賞

- 1. 第 65 回日本体力医学会大会 若手研究者奨励賞, 日本体力医学会, 2010年9月
- 第5回メタボロミクスシンポジウム トラベルアワード,慶應義塾大学生命科学研 究所,2010年9月
- 3. 2010 ACSM International Student Award, American College of Sports Medicine (ACSM, 米国スポーツ医学会) (June 2010)

#### 謝 辞

本研究は,第7回上月スポーツ·教育財団スポーツ研究助成事業の援助により行われました.ここに深い感謝の意を表します.

# 参考文献

Benington JH & Heller HC (1995a). Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol* 45, 347-360.

Bergstrom J & Hultman E (1966). Muscle glycogen synthesis after exercise: an enhancing factor localized to the muscle cells in man. *Nature* 210, 309-310.

Brown AM (2004). Brain glycogen re-awakened. J Neurochem 89, 537-552.

Cruz NF & Dienel GA (2002). High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 1476-1489.

Garriga J & Cusso R (1992). Effect of starvation on glycogen and glucose metabolism in different areas of the rat brain. *Brain Res* 591, 277-282.

Gibbs ME, Anderson DG & Hertz L (2006). Inhibition of glycogenolysis in astrocytes interrupts memory consolidation in young chickens. *Glia* 54, 214-222.

Gollnick PD, Piehl K & Saltin B (1974). Selective glycogen depletion pattern in human muscle fibres after exercise of varying intensity and at varying pedalling rates. *J Physiol* 241, 45-57.

Gruetter R (2003). Glycogen: the forgotten cerebral energy store. J Neurosci Res 74, 179-183.

Hasegawa H, Piacentini MF, Sarre S, Michotte Y, Ishiwata T & Meeusen R (2008). Influence of brain catecholamines on the development of fatigue in exercising rats in the heat. *J Physiol* 586, 141-149.

Herzog RI, Chan O, Yu S, Dziura J, McNay EC & Sherwin RS (2008). Effect of acute and recurrent hypoglycemia on changes in brain glycogen concentration. *Endocrinology* 149, 1499-1504.

Hutchins DA & Rogers KJ (1970a). Physiological and drug-induced changes in the glycogen content of mouse brain. *Br J Pharmacol* 39, 9-25.

Ide K, Schmalbruch IK, Quistorff B, Horn A & Secher NH (2000). Lactate, glucose and O2 uptake in human brain during recovery from maximal exercise. *J Physiol* 522, 159-164.

Kong J, Shepel PN, Holden CP, Mackiewicz M, Pack AI & Geiger JD (2002). Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep. J

Neurosci 22, 5581-5587.

Larsen TS, Rasmussen P, Overgaard M, Secher NH & Nielsen HB (2008). Non-selective beta-adrenergic blockade prevents reduction of the cerebral metabolic ratio during exhaustive exercise in humans. *J Physiol* 586, 2807-2815.

Morgenthaler FD, Koski DM, Kraftsik R, Henry PG & Gruetter R (2006). Biochemical quantification of total brain glycogen concentration in rats under different glycemic states. *Neurochem Int* 48, 616-622.

Nelson SR, Schulz DW, Passonneau JV & Lowry OH (1968). Control of glycogen levels in brain. J Neurochem 15, 1271-1279.

Newsholme EA, Blomstrand E & Ekblom B (1992). Physical and mental fatigue: metabolic mechanisms and importance of plasma amino acids. *Br Med Bull* 48, 477-495.

Nishijima T, Okamoto M, Matsui T, Kita I & Soya H (2011a). Hippocampal functional hyperemia mediated by NMDA receptor/NO signaling in rats during mild exercise. *J Appl Physiol*, in press.

Nishijima T, Piriz J, Duflot S, Fernandez AM, Gaitan G, Gomez-Pinedo U, Verdugo JM, Leroy F, Soya H, Nunez A & Torres-Aleman I (2010). Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron* 67, 834-846.

Nybo L & Secher NH (2004). Cerebral perturbations provoked by prolonged exercise. *Prog* Neurobiol 72, 223-261.

Obici S & Rossetti L (2003). Minireview: nutrient sensing and the regulation of insulin action and energy balance. *Endocrinology* 144, 5172-5178.

Ohiwa N, Chang H, Saito T, Onaka T, Fujikawa T & Soya H (2007). Possible inhibitory role of prolactin-releasing peptide for ACTH release associated with running stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R497-R504.

Ohiwa N, Saito T, Chang H, Nakamura T & Soya H (2006). Differential responsiveness of c-Fos expression in the rat medulla oblongata to different treadmill running speeds. *Neurosci Res* 54, 124-132.

Oz G, Kumar A, Rao JP, Kodl CT, Chow L, Eberly LE & Seaquist ER (2009). Human brain glycogen metabolism during and after hypoglycemia. *Diabetes* 58, 1978-1985.

Oz G, Tesfaye N, Kumar A, Deelchand DK, Eberly LE & Seaquist ER (2011). Brain glycogen content and metabolism in subjects with type 1 diabetes and hypoglycemia unawareness. *J* Cereb Blood Flow Metab.

Pagliari R & Peyrin L (1995). Norepinephrine release in the rat frontal cortex under treadmill exercise: a study with microdialysis. *J Appl Physiol* 78, 2121-2130.

Passonneau JV & Lauderdale VR (1974). A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues. *Anal Biochem* 60, 405-412.

Pellerin L & Magistretti PJ (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10625-10629.

Phelps CH (1972). Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain Res* 39, 225-234.

Pitsiladis YP & Maughan RJ (1999). The effects of exercise and diet manipulation on the capacity to perform prolonged exercise in the heat and in the cold in trained humans. *J Physiol* 517, 919-930.

Quistorff B, Secher NH & Van Lieshout JJ (2008). Lactate fuels the human brain during exercise. Faseb J 22, 3443-3449.

Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E & Wolfe RR (1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol* 265, E380-391.

Saito T & Soya H (2004). Delineation of responsive AVP-containing neurons to running stress in the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R484-R490.

Secher NH, Seifert T & Van Lieshout JJ (2008). Cerebral blood flow and metabolism during exercise: implications for fatigue. *J Appl Physiol* 104, 306-314.

Soya H, Mukai A, Deocaris CC, Ohiwa N, Chang H, Nishijima T, Fujikawa T, Togashi K & Saito T (2007a). Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neurosci Res* 58, 341-348.

Soya H, Nakamura T, Deocaris CC, Kimpara A, Iimura M, Fujikawa T, Chang H, McEwen BS &

Nishijima T (2007b). BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 961-967.

Suh SW, Bergher JP, Anderson CM, Treadway JL, Fosgerau K & Swanson RA (2007). Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R\*,S\*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmet hyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). J Pharmacol Exp Ther 321, 45-50.

Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ & Alberini CM (2011). Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144, 810-823.

Swanson RA (1992). Physiologic coupling of glial glycogen metabolism to neuronal activity in brain. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl, S138-144.

Swanson RA, Sagar SM & Sharp FR (1989). Regional brain glycogen stores and metabolism during complete global ischaemia. *Neurol Res* 11, 24-28.

Takeda H, Matsumiya T & Shibuya T (1990). Detection and identification modes for the highly sensitive and simultaneous determination of various biogenic amines by coulometric high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 515, 265-278.

Vissing J, Andersen M & Diemer NH (1996). Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 729-736.

Wender R, Brown AM, Fern R, Swanson RA, Farrell K & Ransom BR (2000). Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 6804-6810.

Winder WW, Yang HT, Jaussi AW & Hopkins CR (1987). Epinephrine, glucose, and lactate infusion in exercising adrenodemedullated rats. *J Appl Physiol* 62, 1442-1447.