

# カフェイン摂取による生活リズムの夜型化のメカニズム解明

広島大学大学院 医系科学研究科 公衆衛生学  
田原 優

## Caffein-induced Behavioral Rhythm Changes in Mice

Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University  
Yu Tahara

Caffeine intake exhibits various effects, such as wakefulness, prevention of cardiovascular diseases, and sports performance enhancement. The circadian clock is a nearly 24-hour biological system driven by clock genes, and it helps maintain homeostasis by creating daily rhythms in various physiological functions. Previous studies have shown that caffeine can extend the period (length of a day) and change the phase (timing) of the circadian clock, as demonstrated in cell and animal experiments. In this study, we added sweetness to caffeine, allowed mice to drink it freely, and examined changes in their behavioral rhythms. The caffeine water caused the mice to shift from nocturnal to diurnal activity, and some mice exhibited long-period behavioral rhythms. Experiments disrupting the central clock revealed that this behavior was independent of the central clock. Furthermore, the peripheral clocks lost synchronization between organs, and their amplitudes were reduced. Given that studies have shown that night owls tend to consume more caffeine, the findings of this study provide important insights for reconsidering the impact of caffeine beverages on the circadian clock in daily life.

### 1. 研究の目的と背景

カフェインは、覚醒、心血管疾患予防、パフォーマンス向上（スポーツ栄養で昨今話題）といった様々な作用を持つ。我々の研究では、カフェインは時計遺伝子で駆動される概日時計に対し、周期（1日の長さ）を延長させたり、投与タイミングによって位相（時刻）を変化させることを、細胞実験や動物実験で明らかにしてきた（Narishige *et al.* 2014）。一方で、若者のカフェイン過剰摂取による中毒症状が昨今問題であり、カフェインの長期摂取や高濃度摂取の影響をしっかりと議論する必要がある。さらに、夜型な人は朝型な人に比べてカフェイン摂取量が多いことも報告されている。

本研究では、苦味のあるカフェインに甘味を追加することで、マウスにカフェイン飲水をより促した結果、偶然にも興味深い行動リズム変化が見られたため、その行動リズムの特性を調べることを目的とした。

### 2. 研究材料

#### 2-1. 実験動物と試薬投与

全ての実験結果は、早稲田大学、広島大学における動物実験倫理委員会、遺伝子組み換え実験委員会において承認を得た上で実施した。マウスは、C57BL/6J または ICR マ

ウス、PER2LUC ノックインマウスのオス、8-12 週齢を用いた。マウスは通常の明暗環境（12 時間ごとの明暗）だけでなく、恒明環境、恒暗環境でも飼育を行った。カフェイン（0.05-0.1%）、スクロース（1-5%）、サッカリン（0.1-0.5%）を水道水に混ぜて、自由飲水投与した。また、実験によってはカフェインを腹腔内投与した（20、50、100 mg/kg）。

#### 2-2. 行動リズム計測方法

行動リズムは、赤外線センサーをケージ上に設置し、データを専用装置 (Clocklab) に記録した。

#### 2-3. 中枢時計の破壊

イソフルラン麻酔下にて、脳位固定装置を用いて、中枢時計（視交叉上核）へ電極を挿入し、電気を流すことで中枢時計を破壊した。破壊は、10V、0.5A を 10 秒流した。実験終了後に脳スライスを作成し、中枢時計の破壊を確認した。

#### 2-4. in vivo imaging による末梢時計の計測

PER2LUC マウスに麻酔下で Luciferin を皮下投与し、In vivo imaging 装置を用い、生体内の発光を計測した。露光時間は 1 分間として、撮影を 4 時間おきに 24 時間連続で行うことで、末梢時計（腎臓、肝臓、顎下腺）を可視化した。

### 3. 研究結果

水、1%スクロース、0.1%サッカリン、0.1%カフェイン、0.05%カフェイン+1%スクロースの自由飲水では、活動リズムの位相後退は見られなかった。一方で、0.1%カフェイン+1%スクロース水、または0.1%カフェイン+0.1%サッカリン水の自由飲水では、活動リズムの有意な後退が見られ、マウスによっては完全に昼夜逆転した行動を示した。さらに、マウスによっては、約28-30時間周期の活動リズムが明暗環境にも関わらず確認された (Fig. 1)。これらの活動リズム変化は、恒暗条件下でも継続した。一方で、この時の飲水量は、水に比べて半分程度であった。

カフェイン水の投与を辞めると、暗期開始時に活動を始

める通常の行動リズムがすぐに復活することも分かった。この結果は、中枢時計はカフェインには影響を受けていない可能性を示すものであった。同様の行動リズムの変化は、明期開始時期のカフェインの腹腔内投与でも見られた。つまり、カフェイン投与による急性な活動量増加が明期に起こり、昼行性化した行動を作り出すことができた。また、その行動は投与を辞めた日にすぐに消失した。

カフェインによる長周期な行動リズムは、中枢時計の機能を阻害した場合でも見られた。つまり、恒明条件下で飼育したマウス、または中枢時計を破壊したマウスでも、不安定ながら長周期リズムが出現することを確認した。

さらに、カフェイン飲水により昼行性化したマウスの末梢時計を計測した結果、各臓器における時計遺伝子PER2の発光リズムは継続しているものの、振幅が有意に低下し

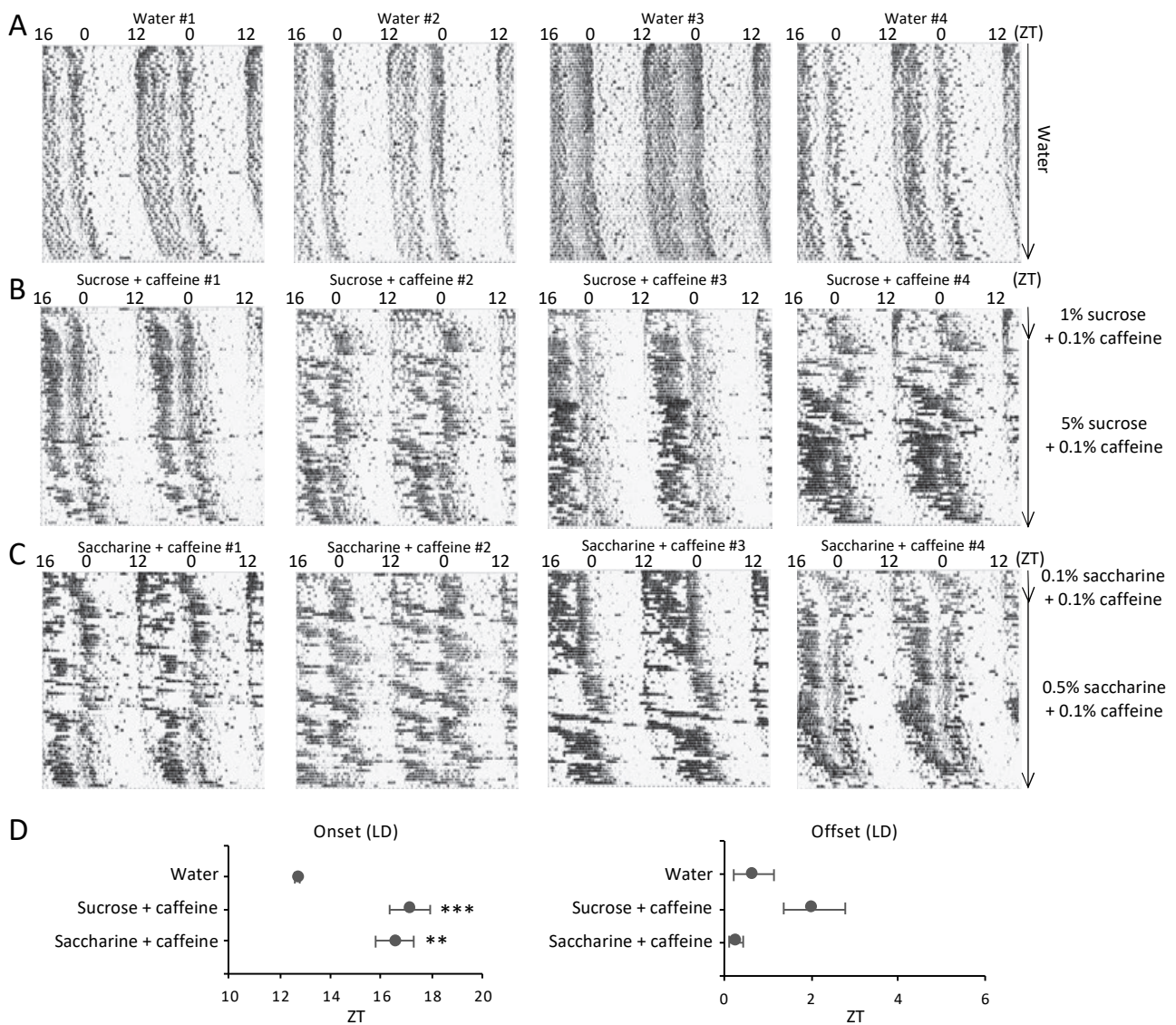


Fig. 1 カフェイン摂取による行動リズムの変化。赤外線センサーによりマウス行動リズムを計測した。(A) 水、(B) スクロース+カフェイン、(C) サッカリン+カフェインをそれぞれ自由飲水させている。途中から明暗環境から恒暗環境に変化させた。カフェインの濃度は0.1%と統一し、スクロース、サッカリンの濃度は途中で増やした。

ており、かつ臓器間の位相差がコントロール群よりも有意に増加していた。

#### 4. 結論・考察

カフェインは苦味があるので、甘みを付けたらよく飲むのでは、といった発想からマウスに飲水させた結果、偶然にも興味深い行動を見出すに至った。夜行性のマウスが昼行性になってしまうほど効果が大きく、興味深いものであった。実験で使用したカフェインの濃度 (0.1%) は、一般的なドリップコーヒーの2倍程度であった。飲水量そのものは甘みによって増加は実際には見られなかった。よって、本研究で見られた行動変化は、カフェイン摂取の増加によるものとは考えづらく、スクロースによる何らかの相乗効果ではないかと考えた。

本研究では、カフェイン飲水により、行動リズムが後退しただけでなく、長周期 (約 30 時間) の行動リズムが別に観測され、さらにその行動は中枢時計を破壊しても確認できた。似たような中枢時計非依存的な行動リズムは、過去にも報告されている。その1つは、覚醒剤であるメタンフェタミンの飲水投与による長周期行動である (Homma *et al.* 1986)。このメタンフェタミンによる行動リズムのメカニズムは分かっていないが、ドーパミン神経の関与は報告されている。カフェインやスクロースも、報酬系シグナルであるドーパミン神経の活性化を促すことが知られていることから、これらの共通のメカニズムの関与を考察として考えている。

#### 5. 今後の課題

本研究で見られたカフェイン誘導性の行動リズムに関して、脳内のドーパミンシグナルの変化を計測すること、ドーパミン受容体阻害剤の投与による応答を見ることで、さらなるメカニズム解明に進める可能性がある。

#### 6. Acknowledgments

本研究に助成金を贈呈して下さった公益財団法人東洋食品研究所に、この場を借りて感謝申し上げます。

#### 7. 参考文献

- Honma, K.; Honma, S.; Hiroshige, T., 1986, Disorganization of the rat activity rhythm by chronic treatment with methamphetamine. *Physiol. Behav.*, **38**, p. 687-695, DOI: 10.1016/0031-9384(86)90265-9.
- Narishige, S.; Kuwahara, M.; Shinozaki, A.; Okada, S.; Ikeda, Y.; Kamagata, M.; Tahara, Y.; Shibata, S., 2014, Effects of caffeine on circadian phase, amplitude and period evaluated in cells *in vitro* and peripheral organs *in vivo* in PER2::LUCIFERASE mice. *Br. J. Pharmacol.*, **171**, p. 5858-5869, DOI: 10.1111/bph.12890.