

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：37109

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501019

研究課題名(和文) カテキンは糖尿病由来の抑うつを予防改善するかー脳内神経伝達物質測定による検討ー

研究課題名(英文) Does catechin improve diabetes-induced depression? : a study by the levels of brain neurotransmitters

研究代表者

大和 孝子 (YAMATO, Takako)

中村学園大学・栄養科学部・准教授

研究者番号：70271434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：カテキン類(EGC、ECG、EGCG)が、脳海馬セロトニン(5-HT)と一酸化窒素(NO)放出に及ぼす影響及びストレス負荷時における高濃度カテキン緑茶飲料投与による血糖値、血清中のコルチコステロン、酸化ストレス度を健常及び糖尿病ラットを用いて調べた。試みた全てのカテキン類が、健常及び糖尿病ラットともに5-HTの放出を増加させたが、5-HTとNOとの関連については不明である。また、ストレス負荷時における緑茶飲料を投与した糖尿病群では、健常群に比べ、コルチコステロンを有意に低下させ、酸化ストレス度を軽減したことから、緑茶飲料は糖尿病に対しストレス抑制効果があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied the effects of catechins (EGC, ECG and EGCG) from tea leaves on the hippocampal serotonin (5-HT) and nitric oxide (NO) release in both normal and diabetic rats which were loaded with stress, using in vivo microdialysis techniques. In addition, the effects of green tea beverage containing high concentration of catechins on the fasting blood glucose, corticosterone and oxidative stress in the serum of both rats were examined. Catechins significantly increased 5-HT release from the hippocampus in both rats, more or less. However, the relations between releases of 5-HT and NO were unclear. Administration of beverage with high catechin in diabetic rat loaded with stress suggests the decreased level of the oxidative stress. Further, the level of corticosterone, a stress hormone was decreased by catechin intake in only diabetic group. These findings suggest that catechin may ameliorate the diabetic state, because the compound reduced the level of oxidative stress.

研究分野：応用栄養学

キーワード：カテキン ストレス 脳内神経伝達物質 食行動

1. 研究開始当初の背景

カテキン類には、抗がん作用をはじめ、様々な生活習慣病を予防する効果があることが次々と明らかにされている。しかしながら、脳機能（行動をも含む）へのカテキンの効果に関してはほとんど検証がなされていない。そこで申請者らはこのことに注目し、抗不安、抗ストレスに対して脳内に放出される神経伝達物質のセロトニン（5-HT）に焦点をあて、カテキンがラット脳海馬の 5-HT 放出に及ぼす影響をマイクロダイアリシス法により調べてみた。その結果、日常飲用する量で、茶葉に含まれる 5 種類のカテキン類（EC、EGC、ECG、EGCG、CAT）全てにおいて 5-HT 放出を著しく増加し、その放出には構造特異性があった。つまり没食子酸（gallic acid）が結合すると放出量は、やや低下する傾向があった。さらに EC と光学異性体の関係にある CAT では、約 50 倍も 5-HT 放出量は違った。また、5-HT 放出は経口投与によっても認められた。

一方、5-HT 放出増加を引き起こす茶葉のカテキンが、糖尿病動物においても健常動物でみられた 5-HT 放出増加を引き起こすかどうか、そしてその結果、糖尿病患者においてもうつ症状の改善に茶葉カテキンが奏効するかどうか、また、日常摂取する緑茶で、糖尿病性うつ病の発症予防効果と改善効果を期待するものである。

2. 研究の目的

(1) 茶葉カテキンが、脳機能に対してどのような影響を及ぼすのか、糖尿病動物を用いて脳内神経伝達物質である 5-HT を指標として調べる。まずは茶葉カテキンが 5-HT 放出を引き起こすかどうか、そしてその結果、糖尿病患者においてもうつ症状の改善に茶葉カテキンが奏効するかどうかを検討する。また、申請者らの過去の研究（Kino *et al.*, 2004）では、インスリンなどによる血糖値の低下が、脳内一酸化窒素（NO）レベルの低下を導き、5-HT レベルを逆に増加したことから、血糖レベルや NO レベルも糖尿病と関与していることが考えられるため、脳内 NO レベルも同時にモニターして、それらの関連性を追及する。

(2) うつ状態が持続すると 5-HT 量が減少し、満腹中枢への伝達障害が起こり、食欲が満足できずに肥満を招くことが知られている。そこで健常および糖尿病ラットを用いて、ストレスを負荷した状態での摂食量および摂水量の経時的変化を調べ比較検討する。また、糖尿病の高血糖状態ではスーパーオキシドを生成し、酸化ストレスを起し、活性酸素によるダメージを招くことが報告（中野, 1993）されている。そこで健常および糖尿病ラットの血清中の酸化ストレス度、抗酸化力

およびのコレステロールの測定を行い、それらの関連性を追及することを目的とする。

(3) 近年、遺伝的要因に環境要因（虐待、ストレスなど）が加わることで、人の生涯を通じてうつ病を発症しやすくなると考えられている。特に小児期は環境要因によりうつ病の発症リスクが高まることが知られている（Hein & Binder, 2012）。そこで生活習慣病に功を奏するとされるカテキンが、発達期のマウスに環境ストレス（隔離飼育ストレス）を負荷した場合、自発運動量（行動量）にどのような影響を及ぼすかストレス負荷無しとされる集団飼育マウスと比較検討する。また、両群マウスの生体内の酸化ストレス度および抗酸化力の測定を行い、それらの関連性を追及することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 健常（体重；270～310g、週齢；8～10 週、Wistar、雄性）および糖尿病（体重；280～310g、週齢；8～10 週、STZ 投与 Wistar、雄性）ラットを用いた。ラットは脳地図（Paxinos & Watson, 1986）を用いて、両側の脳海馬を標的とした脳の定位手術を行った。約 1 週間の回復期間を置き、マイクロダイアリシス分析システム（DAM-300、EICOM）を用いて *in vivo* マイクロダイアリシス（透析）法により、カテキン類（EGC、ECG、EGCG）を蓄積的（1、10、100 μ M）に灌流させた。それぞれの灌流時間は 100 分とした。脳内神経伝達物質は、カテキン類灌流時における同一個体の左右の脳海馬の 5-HT と NO の同時測定を行い、糖尿病ラットと健常ラットで比較した。

(2) 健常（体重； 274 ± 10 g、週齢；8 週、Wistar、雄性、以下健常ラット）および糖尿病（体重； 264 ± 6 g、週齢；10 週、STZ 投与 Wistar、雄性、以下 DM ラット）ラットを用いて、それぞれ水摂取群（以下水群）と市販の高濃度カテキン茶（カテキン含量 154mg/dl）摂取群（以下茶群）を 14 日間自由摂取させた。その後さらにそれぞれの水および茶群にストレス〔電気ショック（0.5mA、10 秒/分、30 回/日）〕を 7 日間負荷した群をそれぞれ水 + ストレス群、茶 + ストレス群とした。それぞれの群の体重、食餌量および飲水量の測定は、3 週間毎日行った。血糖値は実験開始前後にグルテスタース（三和化学研究所）を用いて測定した。実験終了後に血液を採取し、血清中の酸化ストレス度は d-ROMs テストキット、抗酸化力は BAP テストキットを用いてそれぞれフリーラジカル評価システム（F.R.E.E.）により測定を行った。血清中の一酸化窒素（NO）は、酸化窒素分析システム（ENO-20）を用い

で測定した。コルチコステロンの測定は、(株)矢内原研究所に依頼した。健常およびDMラットのそれぞれの水摂取群を対象として比較した。

(3) 第2の実験動物として、健常(体重:12.8±0.8g、C57BL/6N、5週齢、雄性)マウスを用いた。投与物は市販の緑茶飲料および水を用いた。投与方法は、集団飼育健常マウスを水摂取群(以下水群)と緑茶飲料摂取群(以下茶群)に分け、自由摂取とした。さらに水および茶群にストレス(隔離飼育)を3週間負荷した群をそれぞれ水+ストレス群、茶+ストレス群とした。3週間の緑茶飲料投与飼育後2日間の馴化期間を置いたのち、それぞれ回転かご式測定器(シナノ製作所)を用いて自発運動量の測定を2週間毎日行った。併せて体重、食餌量、飲水量の測定も同様とした。空腹時血糖値は、自発運動量測定開始前後に測定した。実験終了後の血清中の酸化ストレスおよび抗酸化力は、それぞれフリーラジカル評価システムにより測定を行った。

4. 研究成果

(1) Wistar系雄性健常ラットおよび糖尿病(STZ)ラットを用いて、*in vivo*マイクロダイアリシス法により、カテキン類(EGC、ECG、EGCG)を蓄積的(1、10、100 μM)に灌流させた場合の同一個体の左右の脳海馬における5-HTとNOの同時測定を行い、DMラットと健常ラットで比較した。EGC:5-HTは健常及びDMラットともに濃度依存的に増加し、10 μMでは健常ラットで約4倍、DMラットでは約2.5倍であった。NOは、健常およびDMラットともに約20%増加したが、いずれも濃度依存性はみられなかった。ECG:5-HTは健常およびDMラットともに濃度依存的に増加し、10 μMでは、健常ラットは約10%の増加に留まったが、DMラットでは約80%増加した。NOは健常ラットではほとんど変化はみられなかったが、DMラットでは濃度依存的に約20%ずつ増加した。EGCG:5-HTは健常ラットで濃度依存的に約2倍に増加したが、DMラットは1 μMで約5倍、100 μMで約8倍増加した。NOは健常およびDMラットともに濃度依存的に増加し、健常ラットで約30%、DMラットで約60%とDMラットの方が顕著であった。以上のことから、5-HTは健常、DMラットともに、いずれのカテキン類も1 μMではほとんど放出量に変化はなく、10 μMで増加(最大約10倍)、100 μMでは測定不能まで増加した。一方、NOは、ECG、EGCGなど特に没食子酸が結合した場合、健常ラットよりもDMラットの方が放出量は濃度依存的に増加した。これらのことから5-HT放出増加を引き起こす茶葉のカテキンは、糖尿病動物に

においても健常動物でみられた5-HT放出増加を引き起こすことがわかった。一方、5-HTとNO放出の関連については今後の課題である。

(2) 健常(Wistar)および糖尿病(STZ)ラットを用いて、高濃度のカテキンを含む緑茶飲料の摂取が、ストレスを負荷した糖尿病ラットに及ぼす影響について調べた。測定項目は体重、食餌量、飲水量、血糖値、血清中の酸化ストレス度、抗酸化力、一酸化窒素(NO)である。体重は7日間のストレス群において健常ラットでは水、茶群ともに体重の抑制がみられた。一方、DMラットはいずれの群間においても変化はみられなかった。血糖値は健常ラットではストレス負荷により水、茶群ともに有意に上昇したが、DMラットでは変化はなかった。コルチコステロンはDMラットでは茶+ストレス群で健常ラットより有意に低下した(図1-A)。NOはDMラットが健常ラットより低値を示し、さらに茶の摂取により水群より有意に減少した(図1-B)。抗酸化力はいずれの群間においてもDMラットの方が有意に低値を示した。ストレスホルモンであるコルチコステロンが茶の摂取により減少する傾向がみられたことから、茶はストレス抑制効果があることが考えられる。また、1型糖尿病において過剰なNO産生は、糖尿病悪化や合併症に関与していることが知られていることから、茶の摂取によりNOが有意に減少したことは、糖尿病状態を少なからずとも改善した可能性が示唆された。

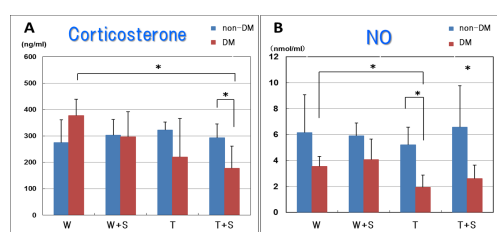


図1 健常およびDMラットにおける血清コルチコステロン(A)およびNO(B)の比較
W:水群、W+S:水+ストレス群、T:茶群、T+S:茶+ストレス群を示す。

(3) 緑茶が発達期の心理的ストレスに対してどのような影響を及ぼすか、隔離飼育ストレスを負荷した発達期マウスを用いて集団飼育マウスと比較検討した。その結果、体重は3週間の隔離飼育ストレスを負荷することで、水+ストレス群は低下傾向を示したが、茶+ストレス群はほとんど変化はなかった。また、2週間の自発運動量測定期間中の体重は、ストレスを負荷した両群ともに低下傾向を示した。食餌量、飲水量においても体重同様ストレス負荷により、水、茶群ともに低値

を示した。測定期間における自発運動量の平均値は、水群ではストレス負荷により減少したが(図2-A)、茶群ではストレス負荷による変化はみられなかった(図2-B)。血糖値は、3週間の隔離飼育ストレスにより茶群が水群に比べ有意に低下した(図3-A)。一方、2週間の自発運動量測定後の血糖値(図3-B)および抗酸化力は、いずれの群間においても有意差は認められなかった。酸化ストレスは茶群が水群に比べ、有意に高値を示し、さらにストレス負荷により茶、水群ともに酸化ストレスは上昇傾向がみられたが、これらについては今後の検討課題である。

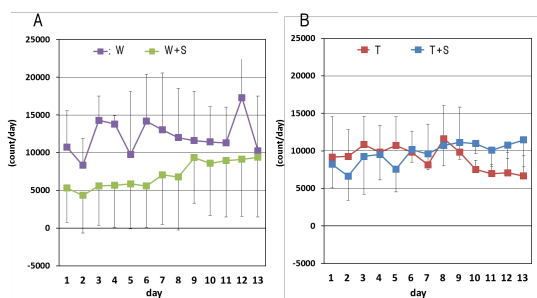


図2 水群および茶群における自発運動量の経時変化

W:水群、W+S:水+ストレス群、T:茶群、T+S:茶+ストレス群を示す。

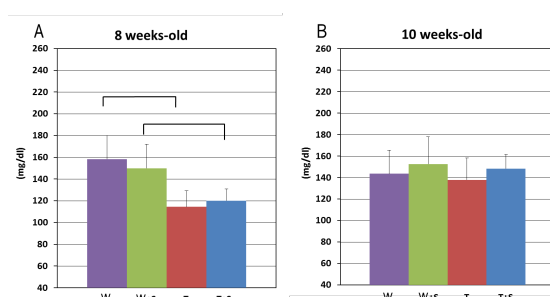


図3 水および緑茶投与後(A)およびストレス負荷後(B)の空腹時血糖値

W:水群、W+S:水+ストレス群、T:茶群、T+S:茶+ストレス群を示す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

大和孝子、松岡伴実、西森敦子、仁後亮介、青峰正裕: 発達期における隔離飼育ストレス負荷マウスの自発運動量に及ぼす緑茶飲料の影響、中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要、査読有、第47号、187-195(2015)

Itoh K., Moriguchi R., Yamada Y., Fujita M., Yamato T., Oumi M., Holst J.J., Seino Y.: High saturated fatty acid intake induces insulin secretion by

elevating gastric inhibitory polypeptide levels in healthy individuals, *Nutr. Res.*, 査読有, 34, 653-660 (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2014.07.013>

西森敦子、松岡伴実、仁後亮介、大和孝子、青峰正裕: 副腎摘出がストレス負荷ラットの行動に与える影響、中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要、査読有、第46号、165-175(2014)

大和孝子、松岡伴実、西山敦子、平山隼人、仁後亮介、太田英明、青峰正裕: 高濃度カテキンが青年期女性の精神的ストレスに及ぼす影響、中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要、査読有、第45号、173-181(2013)

永田瑞生、西山敦子、大和孝子、平山隼人、仁後亮介、青峰正裕: Acute effects of ethanol on spontaneous locomotor activity in both experimental diabetic and non-diabetic rats (実験的糖尿病ラットおよび非糖尿病ラットにおける自発運動量に及ぼすエタノールの急性効果) 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要、査読有、第45号、157-165(2013)

西山敦子、平山隼人、仁後亮介、大和孝子、青峰正裕: 認知症モデルラットの自発運動量、記憶、不安に対する糖尿病の影響、中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要、査読有、第45号、167-172(2013)

永田瑞生、西山敦子、平山隼人、仁後亮介、大和孝子、青峰正裕: 高血糖はストレス抵抗性を減弱するか、福岡歯科大学・福岡医療短期大学研究紀要、査読無、第39号、1-11(2012)

[学会発表](計 25件)

大和孝子、松岡伴実、西山敦子、仁後亮介、青峰正裕: 幼若期ストレス負荷マウスの摂食・摂水・運動量に及ぼす嗜好飲料の影響、第92回日本生理学会、神戸国際会議場(兵庫)、3月21-23日(2015)
Yamato T., Matsuoka T., Nishimori A., Nigo R., Aomine M.: Catechin-rich beverage reduces oxidative stress in stress-loaded diabetic rats. The 6th Asian Congress of Dietetics, Taipei (Taiwan), August 21-24 (2014)

Nigo R., Nishimori A., Matsuoka T., Yamato T., Aomine M. : The relationships between estrogen decrease by ovariectomy and cold constitution . The 6th Asian Congress of Dietetics, Taipei (Taiwan), August 21-24 (2014)

松岡伴実、仁後亮介、大和孝子 : 発達期におけるストレス負荷マウスの自発運動量に及ぼす緑茶飲料の影響、第61回日本栄養改善学会、パシフィコ横浜(神奈川)、8月20-22日(2014)

Yamato T., Nishimori A., Matsuoka T., Hirayama H., Nigo R., Aomine M. : Ameliorating effects of green tea on the diabetes-induced oxidative stress, IUNS 20th International Congress of Nutrition, Granada (Spain), September 15-20 (2013)

Nishimori A., Hirayama H., Matsuoka T., Nigo R., Yamato T., Aomine M. : Catechin increases the serotonin release in the rat hippocampus, IUNS 20th International Congress of Nutrition, Granada (Spain), September 15-20 (2013)

大和孝子、松岡伴実、西森敦子、平山隼人、仁後亮介、青峰正裕 : 青年期女性における精神的ストレス緩和とカテキン含有緑茶飲料との関係、第67回日本栄養・食糧学会、名古屋大学(愛知)、5月24-26日(2013)

平山隼人、西山敦子、松岡伴実、仁後亮介、大和孝子、青峰正裕 : 糖尿病ラットにおける脳海馬一酸化窒素とセロトニンの関係、平成24年度日本農芸化学会西日本支部および日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部合同大会、鹿児島大学(鹿児島)、9月28-29日(2012)

西山敦子、平山隼人、仁後亮介、永田瑞生、大和孝子、青峰正裕 : アルツハイマー様ラットの運動、記憶、不安状態に対する糖尿病の影響、第66回日本栄養・食糧学会、東北大学(宮城)、5月18-20日(2012)

大和孝子、西山敦子、平山隼人、仁後亮介、三隅幸子、青峰正裕 : 高濃度のカテキン含有緑茶飲料がストレス負荷糖尿病ラットに及ぼす影響、第66回日本栄養・食糧学会、東北大学(宮城)、5月18-20日(2012)

〔図書〕(計 3件)

田村明、天本理恵、熊原秀晃、藤木理代、三田有紀子、大和孝子、東京教学社、イラスト応用栄養学、157-204/289(2014)

吉岡慶子、三成由美、徳井教孝、熊原秀晃、柴田瑠美子、田中弘之、三好恵美子、森口里利子、安武健一郎、大和孝子、建帛社、ライフステージ別栄養管理・実習、39-48、50-56、149-156、187-191、200-204、208-212/227(2013)

城田知子、内田和宏、大里進子、小川洋子、瓦林信子、寺澤洋子、林辰美、松本明夫、宮崎貴美子、森口里利子、大和孝子、東京教学社、イラスト栄養教育・栄養指導論、64-82/205(2012)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 脳内セロトニン増加剤

発明者: 青峰正裕、大和孝子、西山敦子、磯村遼、菅野範、吉田圭司郎、志村進

権利者: 株式会社ロツテ、学校法人中村学園
種類: 特許

番号: 特願 2011-164454

出願年月日: 2011年7月27日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大和 孝子 (YAMATO, Takako)

中村学園大学・栄養科学部・准教授

研究者番号: 70271434

(2) 研究分担者

青峰 正裕 (AOMINE, Masahiro)

中村学園大学・栄養科学部・名誉教授

研究者番号: 60091261

西森 敦子 (NISHIMORI, Atsuko)

中村学園大学・栄養科学部・助手

研究者番号: 90461475

仁後亮介 (NIGO, Ryosuke)

中村学園大学短期大学部・助教

研究者番号: 20565767

松岡伴実 (MATSUOKA, Tomomi)

中村学園大学・栄養科学部・助手

研究者番号: 80637033