

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00823

研究課題名(和文) 精神的ストレスによる疾病リスクに対するローズマリー成分の効果

研究課題名(英文) The effect of rosemary components on the stress-related disease risk

研究代表者

萱島 知子 (KAYASHIMA, Tomoko)

佐賀大学・教育学部・准教授

研究者番号：90452599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、精神的ストレスによる疾病リスクに対するローズマリー成分の効果을明らかにすることを目的とし、拘束によりストレス状態にしたマウスに対するカルノシン酸(CA)及びローズマリー葉抽出物(RLE)の効果を調べた。その結果、一定時間の拘束処置によって引き起こされた血清IL-6及びコルチコステロンの増大が、CA摂取により軽減されることがみられた。また拘束処置による小腸の杯細胞数の減少と肝臓脂質含量の変動が、RLE摂取により改善されることがみられた。以上より、CAが抗ストレス効果を有することが示唆された。精神的ストレスによる疾病リスクに対して、CAが有効な軽減効果を示す可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of carnosic acid (CA) and CA-containing rosemary leaf extract (RLE) on restraint-stressed mice. The increases in serum IL-6 and corticosterone levels caused by restraint treatment were alleviated by intake CA. In addition, the decrease in intestinal goblet cell number caused by restraint treatment was improved by RLE intake. Furthermore, we found that the restraint-stress effect on liver lipid content was alleviated by RLE. Our results suggest that CA has the beneficial anti-stress effect. It is possible that the CA might exert an alleviation effect against the stress-related disease risk.

研究分野：食生活学

キーワード：カルノシン酸 ローズマリー ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

現代はストレス社会といわれ、厚生労働省による平成 25 年国民生活基礎調査では、12 歳以上の国民の約半数が日常生活での悩みやストレスがあると回答している。ストレスは、カナダの生理学者であるハンス・セリエ (1907~1982) によって、「外部の刺激に対して生じる生体の非特異的反応の総称」と定義されている。過度のストレスは、うつ病のような精神的な症状のみならず、自律神経系や免疫系の乱れにより、がん、糖尿病、高血圧といった疾病リスクにつながる。したがって、心身の健康を維持するためにストレスへの対応を考える必要がある。

ストレスへの対応の一つとして、食品成分により生体のストレス状態を軽減することが考えられる。これまで、 $\gamma$ -アミノ酪酸やテアニンのようにストレス軽減効果を示す食品成分が見出されており、機能性表示食品に含有されているものもある。このような効果を示す食品成分を日常的に摂取することにより、ストレスが関与する疾病リスクの低減が期待できる。

一方、ハーブは、アロマセラピーやハーブティーのように、リラックス効果によるストレス軽減を期待するものとして、古くから経験的に用いられてきた。近年、シソ科のハーブであるローズマリーについて、機能性成分であるカルノシン酸に関する研究が進み、脳機能保護作用、血管新生抑制作用、抗肥満作用、抗炎症作用といった好ましい効果を示すことが明らかになっている。しかしながら、カルノシン酸の抗ストレス効果については、うつ病のような精神的な症状の報告に限られており、腸内環境の悪化のような身体的な疾患につながる影響については十分には明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

以上より、本研究では、精神的ストレスによる疾病リスクに対するローズマリー成分の効果を検討することを目的とした。具体的には、ストレス状態でのマウスの腸内環境の変化に対して、カルノシン酸摂取の影響を調べた。

ここで腸内環境に注目した理由は、カルノシン酸は脳機能保護効果が明らかになっており、脳と腸は自律神経系やホルモン、サイトカインを介して密に関連 (脳腸相関) していること、腸内環境が全身の健康に影響することからである。

なお、本研究では、精神的な苦痛を与えることでの生体内のストレス反応を精神的ストレスとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) カルノシン酸摂取の影響

balb/c 雄マウスを用い、カルノシン酸を飲み水に溶かしたものを摂取させた。実験最終日の前日までの間で連続 5 日間 (実験 1) ま

たは 7 日間 (実験 2)、1 日あたり 3~5 時間の拘束を行うことで、精神的な苦痛を与え、ストレス状態とした。その後、盲腸内容物の腸内細菌叢の解析、小腸・大腸での遺伝子発現の分析、組織化学的評価、血液・肝臓成分の分析を行った。また、強制水泳試験により行動評価を行った (実験 3)。

#### (2) ローズマリー葉抽出物摂取の影響

ローズマリー葉抽出物は、葉の乾燥物から 70%エタノールにて抽出し、遠心乾燥にて濃縮したものをを用いた。この抽出物は、1.3%程度のカルノシン酸を含むことが予想される

(Sasaki K, *et al.*, Behav Brain Res. 2013)。(1)と同様に、balb/c 雄マウスを用い、ローズマリー葉抽出物を飲み水に溶かしたものを摂取させた。実験最終日の前日までの間で連続 5 日間、1 日あたり 3 時間拘束した。その後、小腸・大腸での遺伝子発現の分析、組織化学的評価、血液・肝臓成分の分析を行った。

なお、本研究の全ての動物実験は、佐賀大学または広島大学の動物実験委員会の承認を得ており、各大学の動物実験安全管理規則に従い動物愛護に配慮し実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) カルノシン酸摂取の影響

##### 1) 実験 1

5 日間拘束したストレス群及びカルノシン酸摂取群において、ノーマル群と比べて有意な体重減少がみられた (Fig.1)。これは、有意差はなかったもののカルノシン酸摂取群ではやや抑制される傾向がみられた (Fig.1)。さらに、血清 IL-6 について、ストレス群でみられた増大が、カルノシン酸摂取群では抑制されていた (Fig.2)。IL-6 のような炎症性

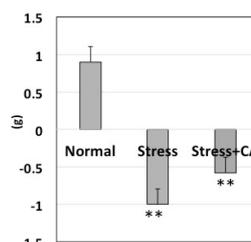


Fig.1 Gain in body wt.

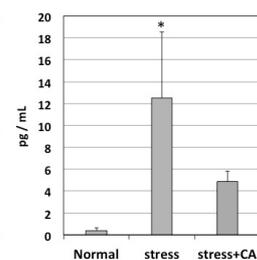


Fig.2 Serum IL-6

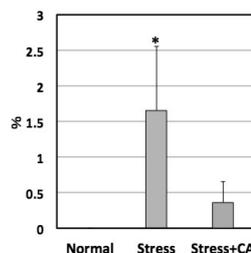


Fig.3 Clostridium cluster XI

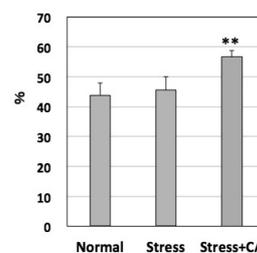


Fig.4 Lactobacillales

Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 6). Statistical significance compared with the control group was determined by the Bonferroli test (\* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01). CA, Carnosic acid

サイトカインは、炎症・免疫系に影響を与え、ストレス応答を担う重要因子である。カルノシン酸摂取によりストレス応答が軽減される可能性が考えられた。

次に腸内細菌叢について、ノーマル群では検出されなかった *Clostridium cluster XI* が、ストレス群では検出され、占有率の有意な増大がみられた (Fig.3)。この増大はカルノシン酸摂取群では抑制されていた (Fig.3)。また、拘束処置の影響はみられなかったが、カルノシン酸摂取群では *Lactobacillales* の占有率の増大がみられた (Fig.4)。*Clostridium cluster* は発ガン因子である二次胆汁酸の代謝に関わっているとされ、また *Lactobacillales* はいわゆる善玉菌として有用性が認められている。このため、ストレスによる腸内細菌叢の変動に対して、カルノシン酸摂取が好ましい影響を与える可能性が考えられた。

一方、肝臓脂質含量について、拘束処置による影響がみられたものの、カルノシン酸摂取による改善はみられなかった。

## 2) 実験 2

7日間拘束したストレス群において、ストレスホルモン的一种であるコルチコステロンについて、有意な増大がみられた (Fig.5)。これは拘束終了から約 20 時間後に採血を行ったため著しい増大ではないものの、カルノシン酸摂取群では軽減がみられた (Fig.5)。コルチコステロンを含むグルココルチコイド (副腎皮質ホルモン) やアドレナリン・ノルアドレナリン (副腎髄質ホルモン) といったストレスホルモンを分泌する副腎は、過度のストレス状態によりその重量が増大することが報告されている。今回は有意差がなかったものの、副腎重量がノーマル群と比べストレス群で増大し、カルノシン酸摂取群では減少する傾向がみられた (Fig.6)。

一方、肝臓脂質含量については、今回もストレス群での変動が確認されたものの、カルノシン酸摂取の影響はみられなかった。

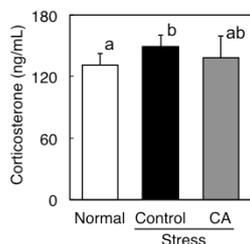


Fig.5 Serum corticosterone

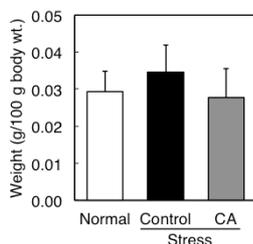


Fig.6 Adrenal gland weight

Mean  $\pm$  SD (n=6). Means within the columns followed by different letters are significantly different by Bonferroni method ( $p < 0.05$ ).

CA, Carnosic acid

## 3) 実験 3

予備的に強制水泳試験を行った結果、カル

ノシン酸摂取後に不動時間が短くなることが観察された (n=3, t-test,  $p < 0.05$ )。

以上の検討より、カルノシン酸が好ましいストレス軽減効果を示す可能性が示唆された。今回明らかになったカルノシン酸のストレス軽減効果として、視床下部-脳下垂体-副腎皮質系 (HPA 系) への作用からグルココルチコイドの分泌が抑制され、IL-6 といった炎症性サイトカイン分泌の抑制が生じたことが考えられた。ストレス状態が慢性的に続くと、免疫反応の障害や海馬ニューロンの低下といったグルココルチコイドの副作用が生じることが知られている。カルノシン酸のストレス軽減効果の有効性を評価するためには、より長期的なストレス状態への影響を明らかにする必要がある。

## (2) ローズマリー葉抽出物摂取の影響

カルノシン酸の食品中での効果を複合的に評価するために、カルノシン酸及び他の機能性成分や香り成分を含むローズマリー葉抽出物を作製し、その抗ストレス効果を検討した。その結果、5日間拘束したストレス群において、ノーマル群と比べ小腸の杯細胞数の減少がみられたが、この減少はローズマリー葉抽出物摂取群ではみられなかった (Fig.7)。杯細胞は腸管バリアにおいて重要な粘液を分泌しており、ストレス状態において副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの影響によりその数が減少することが報告されている。副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンは HPA 系において視床下部により分泌されるホルモンであるため、ローズマリー葉抽出物中のカルノシン酸が HPA 系に作用することで、ストレス状態での杯細胞の減少が改善された可能性が考えられた。

さらに、肝臓脂質含量について、ストレス群でみられた変動が、ローズマリー葉抽出物摂取群では改善されていた。このストレスによる変動は小腸の機能障害による脂質吸収阻害により生じたと考えられた。この改善効果は、カルノシン酸摂取では確認されなかったことから、カルノシン酸の小腸におけるストレス軽減効果は他のローズマリー成分と共存することでより効果的に発揮される可

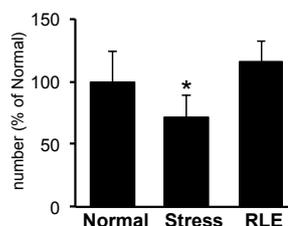


Fig. 7 intestinal goblet cell

Values are presented as means  $\pm$  SD (n = 6). Statistical significance compared with the control group was determined by the Dunnett's test ( $*p < 0.05$ ).

RLE, rosemary leaf extract

能性が考えられた。

以上より、ローズマリー成分であるカルノシン酸が抗ストレス効果を有することが示唆された。精神的ストレスによる疾病リスクに対して、カルノシン酸が軽減効果を示す可能性が考えられた。そのメカニズムとしては、HPA系への影響が考えられた。さらにローズマリー葉抽出物のように他の機能性成分と混在することで、より有効な機能を発揮することが示唆された。

本研究では、カルノシン酸の効果の詳細なメカニズム、より長期的なストレス状態での評価、カルノソールやロスマリン酸といったローズマリー葉抽出物の各成分の関与については明らかにすることができなかった。また、具体的な疾病の発症・進行への関連についても示すことができなかった。今後はヒトへの応用を念頭に、これらの課題について検討していきたい。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計4件)

1. Nong Quynh Nga, 萱島知子、畑中悠花、柴田紗知、上野純弥、永尾晃治、松原主典、「拘束ストレス負荷マウスに対するカルノシン酸の抗ストレス効果の検討」日本家政学会第69回全国大会(奈良女子大学、奈良)、2017-05-28
2. Shibata, S., Kayashima, T., Ishitobi, H., Miyaki, S., Kawaoka, T., Matsubara, K., “Comparison of biological activities between carnosic acid and piciferic acid.”, FFC’s 21st International Conference and Expo on Functional Foods, San Diego, CA, USA, 2017-03-25 – 2017-03-26
3. 畑中悠花、萱島知子、筆本悠希、柴田紗知、上野純弥、永尾晃治、松原主典、「ローズマリー成分カルノシン酸の摂取が拘束ストレス負荷マウスに与える影響」日本家政学会第68回全国大会(金城学院大学、名古屋)、2016
4. 柴田紗知、石飛博之、味八木茂、萱島知子、川岡知博、松原主典「カルノシン酸の新規作用機構と脳機能保護効果」日本農芸化学会2016年大会(札幌コンベンションセンター、北海道)、2016

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

萱島 知子 (Tomoko KAYASHIMA)

佐賀大学・教育学部・准教授

研究者番号：90452599

### (2) 研究分担者

松原 主典 (Kiminori MATSUBARA)

広島大学・大学院教育学研究科・准教授

研究者番号：90254565