

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05515

研究課題名(和文) 抗ストレス食品成分が神経活動を介して生体に与える影響

研究課題名(英文) Effect of anti-stress ingredients on rat endocrine system via nerve

研究代表者

中村 浩蔵 (Nakamura, Kozo)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：20345763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、テレメトリー法で自律神経活動と血圧を測定、内因性ストレス物質を分析し、抗ストレス食品成分(GABA、テアニン、アセチルコリン(ACh)、ラクティルコリン、イソクエルシトリン(IQ)、ゲニポシド酸(GEA))が自律神経活動を介して生体へ与える影響を調査した。試験動物には正常血圧のSprague-Dawleyラットと高血圧自然発症ラット(SHR)およびSHRの正常血圧対照であるウイスター京都(WKY)ラットを用いた。その結果、ACh、IQ、GEAで効果が見られ、WKYラットよりSHRでより強い作用がみられた。この効果の差異には交感神経活動の亢進と圧受容反射機能が関与していると考察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって抗ストレス食品成分が正常血圧状態では作用しにくく、交感神経活動が亢進した高血圧状態により効果が高い可能性が示され、抗ストレス食品の安全利用のための知見を提供することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, effects of orally ingested anti-stress food ingredients (GABA, theanine, acetylcholine (ACh), lactoylcholine, isoquercitrin (IQ), geniposidic acid (GEA)) on the living body through autonomic nervous activity were investigated using the telemetry method. The autonomic nervous activity and blood pressure of test animals were measured, and endogenous stress substances (adrenaline, noradrenaline, dopamine, corticosterone) were analyzed. In order to clarify the difference in the effect of the anti-stress food ingredients, normotensive Sprague-Dawley rats and Wistar Kyoto (WKY) rats, and hypertensive spontaneously hypertensive rats (SHR) were used and single oral doses of were performed. As results, ACh, IQ, and GEA reduced endogenous stress-related substances. The effects in SHR were stronger than those in WKY rats. It was considered that the increase in sympathetic nerve activity and the baroreceptor reflex function were involved in the difference in effect.

研究分野：食品分子工学

キーワード：抗ストレス 機能性食品 神経活動 テレメトリー法 血圧

## 1. 研究開始当初の背景

機能的食品は、経験則に基づく”医食同源“の東洋思想を科学的エビデンスで裏付けた日本発の概念である。今や、食品研究の主流となり、大きな経済価値を生み出している。また、世界的な高齢化が急速に進展する中で、健康増進、疾病予防の一翼を担うことが期待される。ストレス（生体の非特異的応答の総称）は、多くの疾患の原因であると考えられている。現代はストレス社会であり、「日頃ストレスを感じている」日本人割合は56.9%に達する<sup>1)</sup>。過度のストレスは、まず不健康状態（未病）を生じさせ、未病が疾病へと発展する。そのため、未病を改善して健康を保つことが疾病予防にとって重要である。ストレスは、精神的な緊張、不安、恐怖、興奮などによって引き起こされるため、神経活動が直接深く関与している。本研究では、抗ストレス食品成分摂取が神経活動を介して生体に与える影響を検討する。そのために、神経にセンサを装着して試験動物の体内に留置し、従来法では困難であった生体恒常性が機能している無麻酔・無拘束状態の神経活動をテレメトリー法で測定すると共にストレス性内分泌物質を評価する。

報告者は降圧作用を有するソバ乳酸発酵物の有効成分として、神経伝達物質としてよく知られたアセチルコリン（ACh）とラクトイルコリン（LCh）を発見した<sup>2)</sup>。LChは天然物としては初めて単離例である。その後、AChを豊富に含むナス粉末が高血圧自然発症ラット（SHR）への経口投与で交感神経活動を抑制して優れた抗高血圧作用を示すことを明らかにし<sup>3)</sup>、臨床試験でAChの血圧改善作用を実証した<sup>4)</sup>。他、GABA<sup>5)</sup>、イソクエルシトリン（ケルセチン-3-O-β-グルコシド、IQ）<sup>6)</sup>、テアニン<sup>7)</sup>、ゲニポシド酸（GEA）<sup>8)</sup>などの食品由来降圧成分の自立神経活動への関与が示唆されている。しかし、これらの食品成分の覚醒状態の神経活動への影響は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、テレメトリー法で、テレメトリーセンサを埋め込んだラットの自律神経活動と血圧を測定、内因性ストレス物質分析によって、経口摂取した抗ストレス食品成分が自律神経活動を介して生体

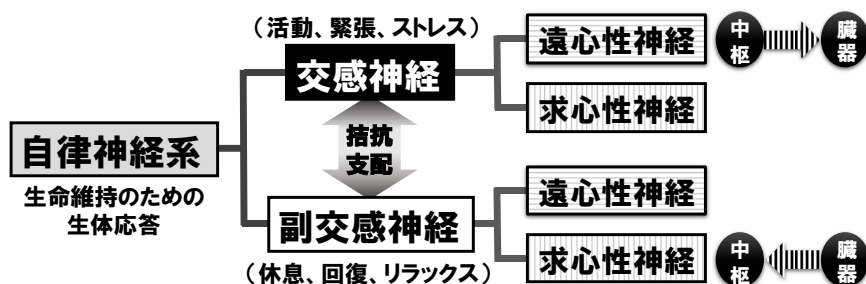


図1. 自律神経系の構成

へ与える影響を明らかにする。生命を維持する臓器や腺を支配する自律神経は、交感神経と副交感神経とに分類される。交感神経は活動、緊張、ストレス時に、副交感神経は休息、回復、リラックス時に働く。そして、一方の亢進が他方を抑制するという拮抗作用によって生体恒常性を維持している。さらに神経は、遠心性神経と求心性神経に分類される。求心性神経は、臓器や組織に生じた神経刺激を脳や脊髄などの中枢神経系に伝達する。そして、自律神経反射によって生命活動維持に必要なシグナルを、遠心性自律神経を通じて生体組織に発信する（図1）。ストレスは、過度な交感神経亢進によって生じるため、ストレス性未病改善には、交感神経活動抑制が必要である。テレメトリー法は、現在、最も客観的に神経活動を評価できる手法である。また、神経活動は、覚醒状態で測定することが重要である。麻酔下では、生体恒常性が失われるため、通常状態の神経活動を測定できない。これまで、麻酔下での食品成分の神経活動研究はみられるが、覚醒状態での神経活動を直接測定した研究事例はなく、本申請研究のオリジナルである。テレメトリー法では自律神経活動と密接な関係がある血圧（動脈圧）も同時に測定できる。ストレス性神経である交感神経末梢などから内因性ストレス物質であるアドレナリン（AD）、ノルアドレナリン（NAD）、ドーパミン（DA）コルチコステロンが放出される。血中に放出されたこれらの内因性ストレス物質は、一部が尿中に排出されるため、尿中含量を調べることで生体内での交感神経活動を推定できる。また、抗ストレス成分として知られるGABAは、ラット種によって感受性が異なり、交感神経活動が亢進している病態モデルラットである高血圧自然発症ラット（SHR）は、ストレスの影響を受けやすいことが報告されている<sup>9)</sup>。そこで試験には、正常血圧のスプラウグ・ドローラット（SDR）とSHRおよびSHRの正常血圧対照であるウィスター京都（WKY）ラットを用いて差異を検証しそのメカニズムを考察する。

## 3. 研究の方法

### (1) テレメトリーセンサを埋め込み手術

ラット（SDR、SHR、WKYラット）に、麻酔下でKaha社製のテレメトリーセンサ（TRM56SP）装着手術を行った。まず右大腿動脈から腹部大動脈に圧力センサ部を挿入した。その後左背部を切開し神経電位センサ部を腎交感神経に装着し、センサ本体はラットの腹腔内に留置した。1日以上の回復期間後、単回経口投与試験に用いた。

### (2) 単回経口投与試験

SDR、SHRに微量給水瓶を用いて6種類の抗ストレス成分GABA、ACh、LCh、テアニン、IQ、GEAおよび純水（コントロール）を、微量給水瓶を用いて $10^{-6}$  mol/kg (b. w.) の用量で投与した。

WKY ラットへの ACh 投与、SHR への安定同位体標識 ACh 投与も同様の方法で行った。

(3) テレメトリー法によるデータ測定

テレメトリー法の概略を図 2. にまとめた。テレメトリー法では無麻酔・無拘束で生体データを直接測定し、24 時間連続記録する。データのサンプリング周波数を 1kHz に設定、腎交感神経活動および腰部交感神経活動は、得られた活動電位を時定数積分 20 ms で曲線下面積を算出し、血圧は得られた動脈圧波形のトップを収縮期血圧、ボトムを拡張期血圧とした。投与の影響を受けると考えられる投与後 30 分間のデータを除き、その後の平均収縮期血圧、拡張期血圧および神経活動面積を 24 時間まで算出、投与前 30 分間を基準とした変動値も求めた。

○ テレメトリー法 = 現在、最も客観的・精確な生体測定法

- ・ 無拘束、無麻酔で測定
- ・ 神経活動を複数個体で同時、連続記録

【研究代表者研究室で確立】

- ・ センサ埋込手術法
- ・ 膨大なデータ解析法

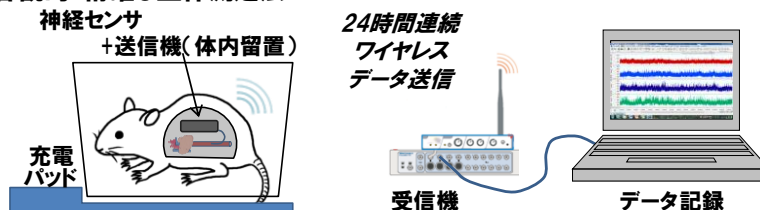


図 2. テレメトリー法

(4) ストレス性内分泌物質分析

抗ストレス食品成分がストレス性内分泌物質に与える影響を調べるために、ラット (SDR, SHR, WKY ラット) への各抗ストレス成分または純水 (対照) の単回経口投与後に採取した尿中のカテコールアミン類 (AD, NAD, DA) を LC-MS/MS で、コルチコステロンを市販の ELISA キット (ARBOR ASSAYS, Corticosterone ELISA Kit) で定量した。代謝ケージで飼育し一夜絶食したラットに経口ゾンデで各抗ストレス成分の経口投与を行い、カテコールアミン類の分解を防ぐために 5N 塩酸 250  $\mu$ L を添加したメスシリンダーで尿を採取、尿量を記録し、測定日まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。測定前に、尿サンプルを解凍して遠心分離した上清を、コルチコステロン定量にはそのまま、カテコールアミン類定量にはシリカモノリスカラムで前処理したものをを用いた。分析サンプル中カテコールアミン類の LC-MS/MS 分析条件は次の通り：カラム YMC-Triart PFP (4.6  $\times$  250 mm)、移動相 25 mM ギ酸-15%メタノール含有水、流速 0.50 mL/min、分離温度  $40^{\circ}\text{C}$ 、注入量 20  $\mu$ L、ESI (+) MRM モード、キャピラリー電圧 4.0 kV、インターフェイス温度  $300^{\circ}\text{C}$ 、多重反応モニタリングモード遷移 m/z AD 166.05  $\rightarrow$  107.15, NAD 152.00  $\rightarrow$  107.10, DA 154.05  $\rightarrow$  137.15。

(5) 経口投与 ACh 体内動態分析

安定同位体標識した ACh (水素置換 ACh, ACh-d9) を SHR に経口投与後、門脈血を経時的に採取し LC-MS/MS で定量した。安定同位体標識 ACh は、通常の ACh と同じ物理化学的性質を有するが、分子量が異なるため LC-MS/MS で選択的に定量できる。ラットへの門脈カニューレーション手術は、麻酔下で開腹後、腸間膜静脈および胃静脈間を駆血しポリウレタン製カテーテルチューブを挿入、固定した後、皮下トンネルを通して背部から採血口を露出させて切開部を縫合した。手術 1 週間の回復期間後、単回経口投与を行った後に経時的に採血した血液サンプルを直ちに除タンパクして酵素失活させ、遠心分離で得た上清を弱酸性陽イオン交換カートリッジで前処理し、標準添加法で ACh-d9, ACh, コリン (Ch), Ch-d9 (重水素置換 Ch, ACh-d9 の分解物) を LC-MS/MS で定量した。LC-MS/MS 定量条件は次の通り：カラム YMC-Triart PFP (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m)、分析溶媒 0.01% (v/v) ギ酸-33%メタノール含有水、流速 0.50 mL/min、注入量 1  $\mu$ L、分離温度  $40^{\circ}\text{C}$ 、分析時間 17 min、イオン化モードは ESI (+) MRM、インターフェイス温度  $250^{\circ}\text{C}$ 、多重反応モニタリングモード遷移 m/z ACh-d9 155.20  $\rightarrow$  69.20; ACh 146.15  $\rightarrow$  87.10; Ch-d9 113.20  $\rightarrow$  69.20; Ch 104.20  $\rightarrow$  45.05。

4. 研究成果

SDR および SHR への GABA、テアニン、ACh, LCh, IQ, GEA の  $10^{-6}$  mol/kg の単回経口投与を行いテレメトリー法で腎交感神経活動と血圧への影響を評価した。その結果、SDR では GABA および ACh で腎交感神経活動が低値を示したものの有意差はなく、GABA で収縮期血圧が上昇、GEA で尿中 DA が低下した。SHR では GABA では血圧に変化は無く腎交感神経活動が有意に上昇し、ACh で腎交感神経活動および収縮期血圧が低下し尿中 AD と NAD が低下、IQ で尿中 NAD が有意に低下した。いずれのラットでも尿中コルチコステロンの変化はなかった。試験した用量で神経活動に作用し内因性ストレス関与物質を低下させたのは ACh, IQ, GEA であったが、SHR でより強い作用がみられた。ACh と IQ は高血圧状態の SHR で効果的に作用し、ACh は SHR の腎交感神経活動を有意に抑制した。交感神経活動が亢進していると報告されている高血圧状態では、正常血圧に比べて食品成分で交感神経活動が抑制されやすい可能性が明らかとなった。

ACh が高血圧状態の SHR に強く作用するメカニズムをより詳細に解明するために、SHR と SHR の対照正常血圧系統である WKY ラットを用いて、異なる血圧状態での経口投与 ACh 効果の差異を調査した。また、経口投与 ACh の体内動態を調べるために門脈カニューレ SHR への重水素置換 ACh (ACh-d9) を単回経口投与して門脈血を分析した。その結果、SHR では正常血圧 WKY ラット

に比べて尿中 AD・NDA が有意に高く交感神経活動の異常亢進が認められた。SHR では、ACh によって収縮期血圧および拡張期血圧が有意に低下、尿中 AD・NDA が有意に低下、腰部交感神経活動が持続的に低下したが腎交感神経活動の低下は一過性であり大部分の神経活動は維持された。一方、WKY ラットではこれらの効果は認められなかった。また、門脈血中の ACh-d9 濃度に変化はなく経口投与 ACh は体内にほとんど吸収されないと考えられた。このように抗ストレス食品成分である ACh は高血圧状態でのみ作用することが明らかになったが、そのメカニズムは次のように考察された。経口投与 ACh は、消化管に作用して消化管迷走神経（副交感神経）活動を亢進させると、拮抗作用によって高血圧状態で異常亢進した交感神経活動を抑制され AD・NDA 分泌を減少させて血圧を低下させる。血圧低下に対応するため圧受容反射によって血圧を上げて維持しようとするが、SHR では圧受容反射機能が低下しており血圧を上昇、維持することができず、血圧低下が持続した。一方、WKY ラットでは圧受容反射が正常であり血圧が維持された。

本研究によって抗ストレス食品成分が正常血圧状態では作用しにくく、交感神経活動が亢進した高血圧状態でもより効果が高い可能性が示された。

#### 引用文献

- 1) 内閣府平成 20 年度国民生活選好度調査.
- 2) K. Nakamura et al., Food Chem., 201, 185-9, 2016
- 3) S. Yamaguchi et al., Food Chem., 276, 376-382, 2019.
- 4) M. Nishimura et al., Nutrients, 11, 2797, 2019.
- 5) Xie, SW. et al., Aquaculture Nutrition, 23(1), 54-62, 2017.
- 6) He, RR. et al., J. Health Sci., 57(3), 255-263, 2011.
- 7) Gong, Y. et al., J. Funct. Foods, 4(4), 988-993, 2012.
- 8) S. Hosoo et al., Molecules, 20, 21971-21981, 2015.
- 9) Nakamura, H. et al., British J. Nutr., 92(3), 411-7, 2004.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 翔平, 早坂 柚実, 鈴木 美穂, 小山 正浩, 椿 和文, 西村 三恵, 西平 順, 中村 浩蔵
2. 発表標題 新規食品機能性成分ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）の血圧改善効果と抗高血圧作用メカニズム
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度（令和3年度）大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口翔平、早坂柚実、坂本希加子、野澤周吾、中村浩蔵
2. 発表標題 ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）の降圧作用メカニズム
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早坂 柚実、山口 翔平、中村 浩蔵
2. 発表標題 テレメトリー法による経口投与アセチルコリンの降圧作用と自律神経活動評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年（令和2年）度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早坂 柚実、高橋 佑介、山口 翔平、中村 浩蔵
2. 発表標題 テレメトリー法を用いた抗ストレス成分の自律神経、血圧調節作用評価
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年（平成31年）度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究成果のインターネット公開：信州大学農学部 / 大学院総合理工学研究科 / 大学院総合医理工学研究科食品分子工学研究室HP  
<https://nasucon.wixsite.com/knakamura-lab>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中  鷹  岳  郎  (Nakajima Takero)  (30581011)	信州大学・学術研究院医学系・助教    (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------