

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K02357

研究課題名（和文）腸内環境に着目したストレス軽減効果を有する食品素材の探索と有効性評価

研究課題名（英文）Exploration and evaluation of anti-stress effects of food materials on the intestinal environment

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腸内環境において抗ストレス効果を示す食品素材を見出し、それらが脳機能に与える影響を明らかにすることを目的とした。拘束処置によりストレス状態としたマウスを用いた検討により、ローズマリー（*Rosmarinus officinalis* L.）抽出物の摂取が、ストレス状態の初期段階での体重減少を抑え、腸内環境因子に影響を及ぼすことを見出した。また、ローズマリー抽出物の摂取により強制水泳試験での不動時間及び脳内のミクログリア細胞活性化が抑制されることを明らかにした。以上より、ローズマリーは抗ストレス食品素材として、腸機能と脳機能への有効性が期待できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腸と脳機能が互いに影響し合う「脳腸相関」の関係性が明らかになっており、腸機能を維持することは、脳機能の健全化に寄与し、さらには全身の健康にも有効な可能性がある。本研究では、食品素材のストレス軽減効果を腸という一つの器官に限定せずに、脳腸相関に注目し脳機能への効果も検証したことに学術的意義がある。また、ストレス社会といわれる現代において、ストレスへの対処を日々の食事からも考える必要がある。本研究により、ローズマリーをストレス軽減効果を示す食品素材として見出した点に社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed food materials for their anti-stress effects on the intestinal environment and explored their effects on brain function. We found that rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) intake prevented weight loss during the early stages of stress and affected intestinal environmental factors in restrained mice. Rosemary intake was found to decrease the immobility time in the forced-swimming test and activation of microglia in the brain. These results suggest that rosemary might serve as an anti-stress food material, with beneficial effects on both intestinal and brain functions.

研究分野：食物学

キーワード：ストレス 腸機能 脳機能 ローズマリー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

過度のストレス状態は、精神的な疾患の発症リスクのみならず、腸の機能障害を引き起こしたり、がんや糖尿病といった疾病を進行させる一因となる。一方、腸と脳の機能は密接に関連し合っており、相互に影響を及ぼし合う「脳腸相関」の関係にあることが明らかになっている。したがって、ストレスによる腸内環境の悪化を抑制または軽減することは、腸機能の健全性を維持するだけでなく、脳の機能、さらには全身の健康維持や疾病予防につながる可能性がある。そこで、本研究では、ストレスによる腸内環境の悪化を軽減する食品素材を見出し、それらが脳機能に与える影響を明らかにすることを目的とした。

本研究では、食品素材として、古代より活用され薬用効果が言い伝えられており、近年多くの機能性が報告されているハーブ類のローズマリー (*Rosmarinus officinalis* L.) に着目した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ストレスによる腸内環境の悪化を軽減する食品素材を見出し、それらがストレス状態における脳機能に与える影響を明らかにすることである。具体的には、ローズマリー摂取がストレス状態に与える影響、ローズマリー摂取が脳機能に与える影響について、マウスを用いて検証した。また、ローズマリー以外の食品素材についても有用性を検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ローズマリー及び薬草摂取が短期・長期ストレス状態のマウスに与える影響

実験動物として、balb/c系雄マウスを用いた。実験食はAIN-93精製固形飼料を与え、飲み水はローズマリー群にはローズマリー抽出物を添加した。ストレス群は、マウスを絶食・絶水下で金属製ケージに拘束することでストレス状態とした。飼育終了後、小腸の遺伝子解析(RT-PCR法)、糞中コルチコステロン定量(ELISA法)、盲腸内容物のIgA(ELISA法)を解析した。

実験1は、ストレス群とローズマリー群を設定し、ローズマリー群は飲み水に、ローズマリー葉の70%エタノール抽出物を添加した。両群とも14日間飼育後、連続5日間、1日3時間の拘束処置を行った。実験2では、ローズマリーと同様に強い抗酸化活性を有する食品素材として、ヤマモモ(*Myrica rubra* Sieb. Old & Zucc.)とアカメガシワ(*Mallotus japonicus*)の葉乾燥物<sup>(1,2)</sup>をご提供いただき、用いた(提供元:島根大学 鶴永陽子教授)。ノーマル群、ストレス群、ローズマリー群、ヤマモモ群、アカメガシワ群を設定し、ローズマリー群、ヤマモモ群、アカメガシワ群は飲み水として、それぞれの1%熱水抽出物を与えた。ノーマル群以外の4群には14日間飼育後、10日間1日3時間の拘束処置を行い、処置最終日の翌日に解剖した。

#### (2) ローズマリー及び薬草摂取が急性ストレス状態のマウスに与える影響

実験動物として、balb/c系雄マウスを用いた。実験食はAIN-93精製固形飼料を与え、拘束処置によりストレス状態とした。処置終了後、直ちに解剖し、小腸の遺伝子解析(RT-PCR法)、盲腸内容物のIgA(ELISA法)、有機酸含量(HPLC法)を解析した。

実験1は、ノーマル群、ストレス群、ローズマリー群を設定し、ローズマリー群は飲み水として1%熱水抽出物を与えた。ノーマル群以外の2群には飼育最終日の14日目に90分間の拘束処置を行った。実験2は、ノーマル群、ストレス群、ヤマモモ群を設定し、ヤマモモ群は飲み水として1%熱水抽出物を与えた。ノーマル群以外の2群は飼育最終日の21日目に90分間の拘束処置を行った。

#### (3) ローズマリー摂取がマウスの脳機能に与える影響

実験動物として、balb/c系雄マウスを用いた。実験食はAIN-93精製固形飼料を与えた。強制水泳試験を行い、飼育終了後、脳の組織化学的分析を行った。強制水泳試験では、無動時間を計測し、抑うつ様状態の指標とした。

実験1は、コントロール群とローズマリー群を設定し、ローズマリー群の飲み水に70%エタノール抽出物を添加した。実験2は、コントロール群とローズマリー群を設定し、ローズマリー群にはローズマリー葉の香りを暴露した。

### 4. 研究成果

#### (1) ローズマリー及び薬草摂取が短期・長期ストレス状態のマウスに与える影響

実験1では、ローズマリーエタノール抽出物が、短期ストレス状態のマウスに与える影響を検討した。その結果、ストレス群では処置前と比べ、処置期間における体重増加量の低下がみられたが、ローズマリー群ではこの減少はみられなかった。拘束処置中に排泄された糞量について、処置2日目まではストレス群と比べ、ローズマリー群にて低下する傾向がみられた。しかし、拘束処置中に排泄された糞中のコルチコステロン総量は、ストレス群とローズマリー群の間に有意な差はみられなかった。ローズマリーエタノール抽出物摂取がストレスホルモン分泌に作用している可能性は低いと考えられた。また、小腸の絨毛あたりの杯細胞数は、ストレス群と比べてローズマリー群にて増大がみられた。

実験2では、より摂取しやすい形態としてローズマリー、ヤマモモ、アカメガシワの熱水抽

出物をそれぞれ作製し、比較的長期のストレス状態のマウスに与える影響を検討した。その結果、ストレス群はノーマル群と比べ、拘束処置翌日から体重増加量の有意な低下がみられたが、この低下はローズマリー群とヤマモモ群では処置4日目、アカメガシワ群では処置7日目までみられなかった。長期間のストレス状態に対してのローズマリー熱水抽出物の効果は限定的である可能性が考えられた。また、ストレス群はノーマル群と比べ、小腸の腸内環境因子の mRNA 発現量の有意な増大がみられたが、熱水抽出物摂取の3群ではこの増大が抑えられていた (Fig.1)。小腸内容物及び糞中 IgA 濃度は、熱水抽出物群で増大傾向がみられたものの、各群間に有意な差は確認されなかった (Fig.1)。

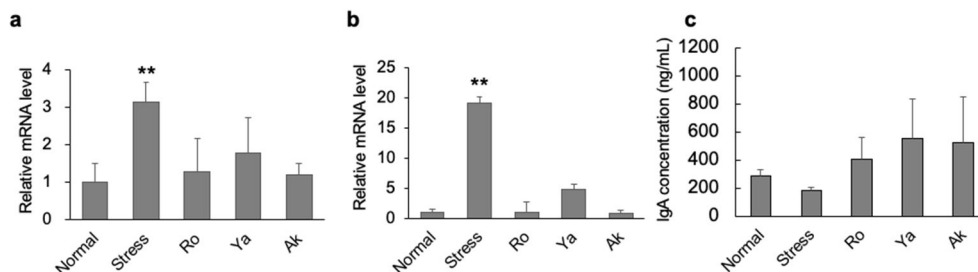


Fig 1. Small intestinal gene expression of MUC3(a) and Reg3b(b), cecal IgA concentration(c) in restrained mice.

Values are means  $\pm$  SD (n=4). Statistical significance compared with the normal group was determined by the Dunnett's test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). Ro, Rosemary; Ya, *Myrica rubra* Sieb. Old & Zucc.; Ak, *Mallotus japonicus*.

### (2) ローズマリー及び薬草摂取が急性ストレス状態のマウスに与える影響

実験1では、ローズマリー熱水抽出物の摂取が、急性ストレス状態のマウスに与える影響を検討した。その結果、ストレスホルモンである血清コルチコステロン濃度については、ノーマル群と比べストレス群では有意な増大がみられ、ローズマリー群では増大が8割程度に抑えられていた。ローズマリー熱水抽出物のストレスホルモンへの作用は、エタノール抽出物とは異なる可能性が考えられた。小腸内容物のIgA濃度は、各群間での差はみられなかった。一方、ローズマリー群では対照群と比べ摂水量の減少が観察されたことから、今後の課題としてローズマリー熱水抽出物に対するマウスの嗜好性を考慮することが考えられた。

実験2では、ヤマモモ熱水抽出物の摂取が、急性ストレス状態のマウスに与える影響を検討した。その結果、盲腸内容物中の酪酸濃度、IgA濃度について、ノーマル群と比べストレス群で減少がみられたが、ヤマモモ群ではこの減少はみられなかった。ストレス指標である血中過酸化脂質濃度についても、ノーマル群と比べストレス群での変動がみられたが、ヤマモモ群ではみられなかった。

### (3) ローズマリーがマウスの脳機能に与える影響

実験1では、ローズマリーエタノール抽出物が脳機能に与える影響を評価した<sup>(3, 4)</sup>。その結果、強制水泳実験にて、コントロール群では無動時間の増大がみられたが、ローズマリー群ではこの増大が抑えられていた (Fig.2)。したがって、ローズマリーエタノール抽出物の摂取が、抑うつ様行動の抑制に有効であることが示唆された。さらに、脳内炎症に関与している活性型ミクログリアの減少がみられたことから (Fig.2)、ローズマリーエタノール抽出物の摂取が脳内の神経細胞損傷を抑制することにより脳機能保護に期待できる可能性も考えられた。

実験2では、ローズマリーのかおりが脳機能に与える影響を評価した。その結果、ローズマリーのかおりの暴露により強制水泳実験での不動時間の短縮、海馬の免疫染色において活性化していないミクログリアが多い傾向が観察された。しかし、両結果とも有意な影響は認められず、ローズマリーによるうつ様行動改善効果に対して香り成分の寄与は小さい可能性が考えられた。

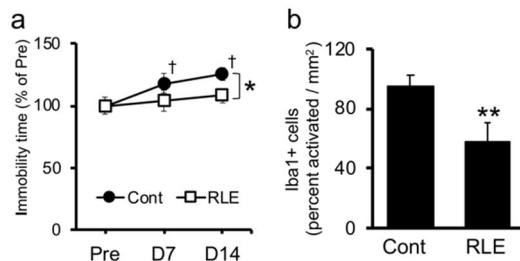


Fig 2. Immobility time by FST and the activation of microglial cells in BALB/c mice<sup>(3)</sup>. The graphs show the immobility time on the day before (Pre), day 7 (D7), and day 14 (D14) of sample intake (a), and activation of microglial cells in the brain. Statistical significance compared to respective Pre values († $p < 0.05$ ) or to Cont group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) was determined using the t-test. Values are the means  $\pm$  SD (n = 6, 7). RLE, Rosemary.

本研究により、ローズマリーは、ストレス状態の初期の体重減少を抑え、腸内環境因子に作用することで有用な効果を示す可能性が示唆された。また、ローズマリーは、抑うつ様行動を抑制し、脳機能保護が期待できる可能性も示唆された。今後は、ローズマリー抽出液の比較により効果の寄与成分を明らかにすると共に、腸内環境因子の経日的変化を分析することで効果のメカニズムを解明したい。さらに、本研究では腸内環境因子と脳機能の関連性を検証するには至らなかったため、今後はストレス状態のマウスを用いてローズマリー摂取による腸内環境因子の変動が脳機能に与える影響を明らかにしたい。

#### 引用文献

- (1) 鶴永陽子、山下稚香子、三島晶太、松本敏一「蒸熱および焙煎処理の温度および時間がアカメガシワ葉茶に及ぼす影響」日本食生活学会誌、25、13-19 (2014)
- (2) 鶴永陽子「カキおよびヤマモモ葉の機能性ならびに茶への利用に関する研究」日本食品保蔵科学会誌、35、85-94 (2009)
- (3) Tomoko Kayashima, Koji Nagao, Mituki Umino, Hiroko Kaikiri, Sachi Shibata, Kiminori Matsubara “Anti-stress effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaf extract on intestinal goblet cells and immobility of forced-swimming test in BALB/c mice.” Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 84, 2385-2389 (2020)
- (4) 萱島知子、海野美月、町田正直、松原主典「ローズマリー抽出物における心身への影響」aromatopia、167、34-39 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 萱島知子、海野美月、町田正直、松原主典	4. 巻 167
2. 論文標題 ローズマリー抽出物における心身への影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 aromatopia	6. 最初と最後の頁 34-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kayashima Tomoko, Nagao Koji, Umino Mituki, Kaikiri Hiroko, Shibata Sachi, Matsubara Kiminori	4. 巻 84
2. 論文標題 Anti-stress effects of rosemary ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) leaf extract on intestinal goblet cells and immobility of forced-swimming test in BALB/c mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2385 ~ 2389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1800445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 萱島知子、鶴永陽子、海野美月、海切弘子、柴田紗知、松原主典
2. 発表標題 薬草の熱水抽出物が拘束ストレスマウスの腸内環境因子に与える影響—ローズマリー、ヤマモモ、アカメガシワを用いて—
3. 学会等名 （一社）日本家政学会九州支部第66回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萱島知子、海野美月、海切弘子、松原主典
2. 発表標題 ローズマリー抽出物摂取による抗ストレス効果の検討
3. 学会等名 日本農芸化学2020年度（令和2年度）大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 萱島知子、嘉村菜名子、蕨野捺菜、永尾晃治、柴田紗知、松原主典
2. 発表標題 拘束ストレスマウスに対するローズマリー葉抽出物の抗ストレス効果;
3. 学会等名 一般社団法人日本家政学会 第71回大会(四国大学)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萱島知子、海野美月、海切弘子、松原主典
2. 発表標題 ローズマリー抽出物摂取による抗ストレス効果の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会大会2020(九州大学)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	松原 主典  (MATSUBARA Kiminori)  (90254565)	広島大学・人間社会科学研究科(教)・教授    (15401)	

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
---------	---------