

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月21日現在

機関番号：37122

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780130

研究課題名（和文） 網羅的解析システムによる食品成分の精神機能性探索

研究課題名（英文） Identification of the improvement effects in mental functions caused by dietary constituents with comprehensive analysis system

研究代表者

大貫 宏一郎（OHNUKI KOICHIRO）

九州栄養福祉大学・食物栄養学部・講師

研究者番号：50378668

研究成果の概要（和文）：網羅的解析システムを確立し機能性食品成分の探索を行った。その結果、特定のペプチド摂取マウス群では、タンパク質摂取群よりも鬱や不安傾向が低下し、脳重量の増加や神経新生が促進された。また、PC12細胞培養液に添加した特定のペプチドが神経突起を伸長させた。その他、ヤマブシタケ含有食品はプラセボ食よりも摂取2週間後において有意に主観的な不安感を低下した。以上より、網羅的解析システムが食品成分の精神機能性評価に有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, comprehensive analysis system was used to identify improvement effects in mental functions by dietary constituents. As a result, depression and anxiety were more declined in certain peptide-fed mice than in protein-fed mice. Then, brain weight was more increased and neurogenesis was more prompted in the former. In addition, certain peptide added to culture medium of PC12 cells induced neurite elongation. Furthermore, H. herinaceus intake has the possibility to reduce depression and anxiety. These results suggest that comprehensive analysis system is useful to evaluate the improvement effect of dietary constituents in mental functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：精神機能・機能性食品・動物行動・生理心理・ペプチド・香り・ヤマブシタケ

1. 研究開始当初の背景

日本ではこの11年間に連続して自殺者が3万人を超え、その原因の第1位がうつ病である。うつ病や心身症といった精神疾患は深刻な社会問題であり、対策に必要な福祉医療費が国庫を圧迫しつつあるのが現状である。予防医学の観点からストレスやうつ病に対処する必要性が今後ますます重要視されることは想像に難くない。市場には、抗不安、抗うつといった精神機能性を謳ったサプリメントや食品が出回っているが、確たるエビデンスを持った食品はほとんどない。

2. 研究の目的

本研究は、ストレスやうつを改善する、エビデンスをベースとした食品の開発に寄与することを目指し、マウスの行動テストバッテリー及びヒトの総合的な生理心理解析システムを用いて、精神機能に影響を与える機能性食品成分の探索を行った。

3. 研究の方法

(1) マウスの行動テストバッテリーのセットアップを行った。

小原医科産業社製 ImageJ OF2 for Open field test:

オープンフィールド試験では、30cmの高さの壁に囲まれた50×50cmの広く明るい開かれた場所（オープンフィールド）にマウスを置き、マウスの動いた軌跡や滞在時間を記録し、その行動を観察する。マウスは、広い場所や明るい場所を忌避し、周囲の壁に沿って移動する性質（接触走性）を示す。接触走性は、不安様行動として捉えられ、不安感が低下したマウスは、オープンフィールドの中央に滞在する時間が長くなる。

小原医科産業社製 ImageJ LD1 for Light / dark transition test:

明暗選択試験では、連結した2つの白・黒の装置内にマウスを入れ、マウスが明暗の箱を往来した回数や軌跡を記録し、活動量や情動性を測定する。マウスは、暗い場所を好む性質を示すが、明箱と暗箱を自由に往来できるようにした装置内でのマウスの活動量や往来回数などにより、不安感を評価する。不安感が低下したマウスは、明箱に滞在する時間が長くなる。

小原医科産業社製 ImageJ EP1 for Elevated plus maze:

高架式十字迷路試験では、高い場所に設置された十字状のステージに実験動物を置いてその行動を観察する。十字状のステージの対称的な位置にある2つのプラットフォームには壁が装着されており（クローズドアーム）、残り2つの対照的な位置にあるプラットフォームには壁がない（オープンアーム）つくりとなっている。アームの長さは一辺45cm、幅5cmで、クローズドアームの壁の高さは15cmである。マウスは、高所における恐怖と狭い場所を好む性質から、通常は、ほとんどの時間をより安全なクローズドアームで過ごす。不安感の低下したマウスは、オープンアームに滞在している時間が長くなる傾向を示す。それぞれのアームにマウスが行った回数や滞在期間を記録し、不安感を定量的に比較する。

小原医科産業社製 ImageJ TS1 for Tail suspension test:

ポーソルトの強制水泳試験では、マウスが水を嫌う性質を利用し、水に入れた場合の逃避行動の有無や活動量、持続時間により、鬱の度合いを評価する。装置はマウスが逃げられない構造になっているため、時間が経つとマウスは逃避行動を止めてしまい（無気力状態）、諦めの心理的背景が反映される。従って、不動時間を測定することによって、鬱状態の程度を定量的に比較することができる。

小原医科産業社製 ImageJ TS1 for Tail suspension test:

テールサスペンション試験では、天井のフックにマウスの尻尾を引っ掛け、マウスを逆さ吊りにし、マウスが手を動かさない状態（無気力状態）の回数と時間を記録し、鬱の度合いを評価する。装置はマウスが逃げられない構造になっているため、時間が経つとマウスは逃避行動を止めてしまう。これには、諦めの心理的背景が反映されているものと考えられ、不動時間を測定することによって、鬱状態の程度を定量的に比較することができる。解析には、Image Jをもとに作られたImage J XX(0' Hara & Co., Ltd.)を使用した。

(2) 5週齢のC57BL/6J雄マウス24匹を2群に分け、各12匹ずつに酵素分解ペプチド、粗分解ペプチドを飲用水に混合させて、自由摂取させた。3週間摂取後、8週齢より実験を開始した。実験開始後も摂取は継続させた。マウスの行動テストバッテリー装置（オープンフィールド、明暗箱、高架式十字迷路、ポーソルト強制水泳、テールサスペンション）に入れ、その行動を10分間観察した。酵素分解ペプチド摂取マウス、粗分解ペプチド摂取マウスについてそれぞれ12匹を試験した。さらに、9週齢の雄マウスを用いて、拘束ストレスによる血中コルチゾール濃度の変化を測定した。酵素分解ペプチド摂取マウスと粗分解ペプチド摂取マウスについて、それぞれコントロール群（ストレス負荷前）、ストレス群（ストレス負荷後）に分けた（8匹/群）。ストレス群のマウスはプラスチック製の円筒容器（直径3cm、長さ11cm、呼吸用の空気穴有）に挿入され1時間の拘束ストレスを受けた。酵素分解ペプチド摂取マウス、粗分解ペプチド摂取マウスの各2群から血液を採取し、遠心分離により血清を回収した。これらの標本から血中コルチゾール濃度をELISA法にて定量的に測定した（Cayman, Cortisol Express EIA Kit, Cat:10006791）。

9週齢の酵素分解ペプチド摂取マウスおよび粗分解ペプチド摂取マウスから脳組織を摘出し、脳重量と体重について比較した。

9週齢の雄マウスを用いて実験を行った。酵素分解ペプチド摂取マウス、粗分解ペプチド摂取マウスについてそれぞれ8、6匹を使用した。マウスの海馬を含む領域を200 μmおきに冠状切片を得て（領域：海馬の吻側末端から600 μmの位置に始まって1400 μmの位置まで）

1 個体あたり4切片を実験に用いた。抗 BrdU抗体による免疫組織染色と syto13greenによる核染色、Dcx免疫染色の3重染色を施し、各切片の左右の海馬歯状回について写真を撮った（一片あたり8枚の画像）。LSM Image Browser (Carl Zeiss MicroImaging社製) を使用し、取得した画像から顆粒下細胞層 (SGZ) の距離を測定し、その後、ImageJソフトを使用して画像解析を行い、可視にてBrdU陽性細胞数をカウントした。

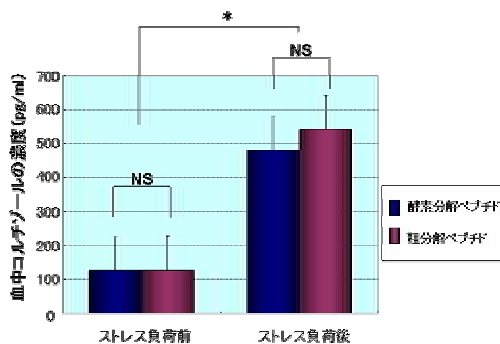
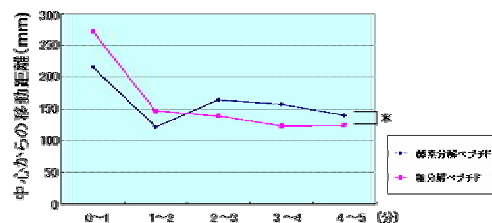
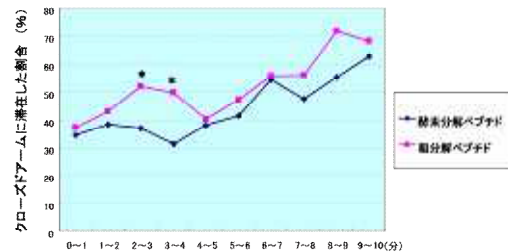
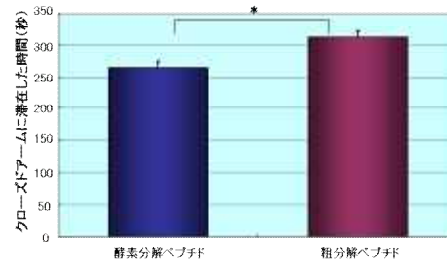
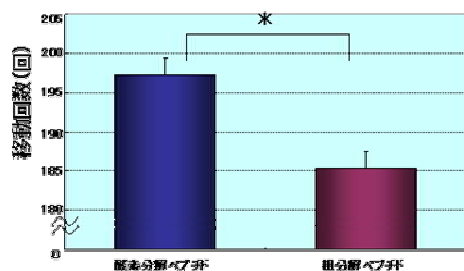
(3) ペプチドのいくつかをPC12細胞培養液に添加してその影響を観察した。評価方法として、神経様の突起を染色し、ImageJソフトによる画像解析を使用して、その数と長さを定量化した。

(4) 治療を要する疾患がないものの、様々な不定愁訴を有する中年女性30名（年齢31～49歳）を対象として、4週間の試験食品摂取による無作為化二重盲検比較試験を実施した。試験開始前にヤマブシタケ摂取群（ヤマブシタケ群）、ヤマブシタケを含まない食品摂取群（プラセボ群）に無作為に割り付けた。ヤマブシタケ群は一日8個（ヤマブシタケ乾燥粉末4g）のヤマブシタケ乾燥粉末入りチョコレート味クッキー（0.5g/個）を毎日摂取した。プラセボ群は、ヤマブシタケが入っていないクッキーを同量摂取した。両群に対してクッパーマン更年期障害指数、CES-D(セスデー)うつ病(抑うつ状態)自己評価尺度、ピッツバーグ睡眠質問票、生活と健康に関するアンケートを行った。

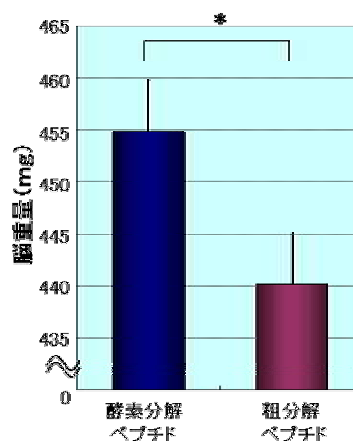
4. 研究成果

(1) 精神機能性を測定するマウスの行動テストバッテリーおよび網羅的なヒトの主観的評価方法を確立した。

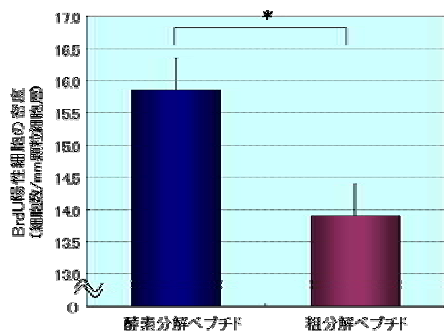
(2) コラーゲンを特定の酵素で分解したペプチドを継続的に摂取したマウスの行動を、同量のタンパク質を摂取したマウスと比較したところ、鬱や不安傾向が低下した。



ペプチド摂取マウス群で脳重量の増加が見られた。



ペプチド摂取マウス群で神経新生の促進が観察された。



ペプチドのいくつかをPC12細胞培養液に添加してその影響を観察したところ、特定のペプチドが神経突起を伸長させる結果を得た。

NGF産生を向上させると言われるヤマブシタケを含有する食品について、含有しないプラセボ食との比較で検討したところ、摂取2週間後において有意に主観的な不安感を低下する結果が得られた。

以上の結果より、動物行動実験系やヒトの主観的評価方法が、食品の機能性検出に効果的であることが示され、このシステムが食品成分の精神機能性評価に有用であることが示唆された。

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2件)

Matsubara E, Fukagawa M, Okamoto T, Ohnuki K, Shimizu K, Kondo R.

(-)-Bornyl acetate induces autonomic relaxation and reduces arousal level after visual display terminal work without any influences of task performance in low-dose condition.

Biomedical Research

査読有、32巻、2011、151-157、

[DOI:10.2220/biomedres.32.151](https://doi.org/10.2220/biomedres.32.151)

Haramizu S, Kawabata F, Ohnuki K, Inoue N, Watanabe T, Yazawa S, Fushiki T.

Capsiate, a non-pungent capsaicin analog, reduces body fat without weight rebound like swimming exercise in mice.

Biomedical Research

査読有、32巻、2011、279-284、

[DOI:10.2220/biomedres.32.279](https://doi.org/10.2220/biomedres.32.279)

[学会発表] (計2件)

大植康司、大貫宏一郎、熊谷秋三
新規レスベラトロール2量体の骨格筋代謝に及ぼす影響、
日本体力医学会、2011.9.18、
海峡メッセ(山口県下関市)

古田祥子、大貫宏一郎他7名
ヤマブシタケの卵巣摘出マウスにおける抗肥満効果、
日本木材学会、2012.3.17、
北海道大学(北海道札幌市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大貫 宏一郎 (OHNUKI KOICHIRO)

九州栄養福祉大学・食物栄養学部・講師

研究者番号：50378668