

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：37109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K02233

研究課題名(和文)植物由来機能性成分と脳機能との関連 - 脳内神経伝達物質測定による検討 -

研究課題名(英文) Relationship between Functional Ingredients from Plants and Brain Functions  
- Examination by measurement of neurotransmitters in the brain -

研究代表者

大和 孝子 (Yamato, Takako)

中村学園大学・栄養科学部・教授

研究者番号：70271434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラットを用いて植物由来機能性成分(6-ジンゲロール：6-Gin、アリルイソチオシアネート：AITC)が、ストレス下でどのような影響を及ぼすのか行動学的実験及び脳海馬細胞外セロトニン(5-HT)の放出量を指標として調べた。行動解析により6-Ginの投与は、拘束ストレスを負荷したラットの不安様行動の増加を抑制する可能性が示唆された。また脳海馬細胞外5-HTの放出量を指標とした場合においても6-Ginは不安の発現を抑制する傾向がみられた。これらの成果を踏まえ、今後はどのような作用機序においてストレス下による不安を抑制したのかについて検討が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非栄養素である機能性成分は、ストレス存在下で摂食および不安様行動にどのような影響を及ぼすのか、また神経伝達物質である脳内5-HT量はどのような経時的変化を示すのかについての報告は国内外において殆んどない。動物の行動を観察・記録しながら同時に脳局所から遊離される神経伝達物質放出量の経時的変化をストレス下で測定し、機能性成分投与によるストレス寛解効果と結び付けて研究することは、本研究の独創的なところである。本研究では、6-Ginの投与によりストレス下でのラットの不安様行動の増加を抑制する可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of plant-derived functional ingredients (6-gingerol: 6-Gin and allyl isothiocyanate: AITC) under stress using rats in behavioral experiments and the release of brain hippocampal extracellular serotonin (5-HT) as indicators. The results suggest that 6-Gin administration may suppress the increase of anxiety-like behaviors in rats subjected to restraint stress by behavioral analysis. In addition, 6-Gin tended to suppress the expression of anxiety when the release of 5-HT outside the hippocampal cells of the brain was used as an indicator. Based on these results, it is necessary to investigate the mechanism of action of 6-Gin to suppress anxiety under stress in the future.

研究分野：栄養学および健康科学

キーワード：機能性成分 ストレス 行動 脳内神経伝達物質 自発運動量 ラット

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現代はストレス社会ともいわれ、ストレスを一要因とした生活習慣病をはじめ様々な疾患発症に関する報告がある。一方で、野菜や香辛料等に含まれる機能性成分には、抗がん作用をはじめ、脂質代謝改善作用、抗酸化作用、血小板凝集抑制作用など様々な生活習慣病等の疾病予防効果があることが明らかにされつつあり、ストレスに対する食事からのアプローチの重要性が窺える。本研究ではストレスにより食行動がどのように影響を受けるのか、その際中枢神経系(CNS)での神経伝達物質は質的および量的な関連をもつのか、そしてストレスを寛解する作用を持つ非栄養素(機能性成分)にはどのようなものがあるのか、ラットを用いて行動学的実験とともに脳内神経伝達物質セロトニン(5-HT)放出量を指標として、ストレスと抗酸化作用等が期待される植物由来の機能性成分との関連を調べるものである。CNSの働きや行動に栄養的変動が、重要な役割を果たしていることは既に知られている。長期にわたる栄養欠乏や環境毒性物質暴露は脳機能や行動の変化をきたすが、短期間の栄養的変動も脳や行動を変化させる可能性を最近の研究は示している。より特異的には栄養素利用性が、CNSでの神経伝達物質合成と活性を変化させようと考えられており、食物が神経伝達物質合成を変化させることができ、神経障害およびその治療への食物の可能性を示している。しかしながら、ストレスと非栄養素(機能性成分)との関連については殆んど解明されていない。

### 2. 研究の目的

一般的に不安な状態では、食べる方へ傾き、抑うつ状態では食べない方向へ傾くといわれている。人を取り巻く種々のストレスにより精神的に不安定な状態でいわゆる「やけ食い」によりストレスを解消するという現象が、特に若年女性に多くみられる。このような女性の気晴らし食いの現象として糖質性の食品を摂ることが多いといわれている。高糖質の食事を摂ると間接的に脳内の神経伝達物質であるセロトニン(5-HT)濃度が上昇し、逆に高たんぱく質食の場合は脳内の5-HTは低下することが報告されている。つまり高炭水化物食を与えられた場合、上昇した血糖によりインスリンが分泌され、トリプトファン以外の大量中性アミノ酸の筋肉への取り込みが増加し、その結果血漿中のトリプトファンの割合が上昇し、競合が低下するため脳に入ることができ、5-HTに変換されたためと説明している。一方、ストレス状態での過食の原因としては、ストレス下の実験動物での内因性のオピオイド(モルヒネ様物質)の賦活化およびこの物質の関与が報告されているが、ストレス下で増加するカテコールアミン系が食欲の増加に何等かの役割を果たしている可能性もある。

5-HTには情緒を安定させる効果があることから、食との関わり合いが注目されている。5-HTが摂食の他に睡眠、覚醒、精神活動(学習、記憶、欲望、意欲)など様々な役割を果たしていることは既に知られている。そこで本研究では、実験動物としてラットを用いて、ストレス状態に置き、その前後過程の行動解析および脳内マイクロダイアリシス(微小透析)法によるカテコールアミン系の神経伝達物質である5-HT量を調べる。ストレスと神経伝達物質濃度変化を観察し、ストレス下でどのような行動(摂食行動や不安行動等)をとるのか、そしてその際の神経伝達物質はどのような経時的変化を示すのかを調べる。このストレス状態を寛解できるかもしれない候補物質として、抗酸化作用により様々な生活習慣病予防に功を奏することが期待されている非栄養素である植物由来の機能性成分を投与してその効果を調べることを目的とする。本研究で使用するマイクロダイアリシス法は、無麻酔・無拘束下で動物の行動を観察しながら脳局所から遊離される神経伝達物質の量を測定し、行動と伝達物質の動的変化を同時に観ることが可能な画期的な実験方法である。これらの機器を使用して動物の行動を観察・記録しながら同時に脳局所から遊離される神経伝達物質放出量の経時的変化をストレス下で測定し、機能性成分投与によるストレス寛解効果と結び付けて研究することは、本研究の独創的なところであり、得られる結果はヒトにフィードバックされ、ストレス状態の治療あるいは生活習慣病の予防的側面において効果が期待される。

### 3. 研究の方法

実験動物は、雄性のWistar系雄性ラットを用いた。週齢はマイクロダイアリシス実験の適身体重が270~320gであることから、実験時に8~10週齢のラットを用いた。投与物は、植物由来の機能性成分(ショウガの辛味成分である6-ジンゲロール:6-Gin、ワサビ由来の含硫化合物であるアリルイソチオシアネート:AITC)を用い、投与方法はいずれも腹腔内投与(0.4mg/kg体重)とした。コントロール(Cont)には、生理食塩水(0.3ml/kg体重)を用いた。

#### (1) 行動学的実験

##### 自発運動量の測定

自発運動量の測定は、回転式運動量測定器(直径約40cm、円周約120cm、シナノ)を用いた。3日間の順化期間をおいた後、生水および各投与物質のいずれかを投与し、その後48時間(2日間)の回転数を測定した。引き続き3~5日間の順化期間の後、各投与物質の投与に加え60分間

の拘束ストレス負荷を行い、負荷後 48 時間の回転数を測定した。

オープンフィールド (Open Field : OF) 試験および高架式十字迷路 (Elevated plus-maze : EPM) 試験における行動解析

オープンフィールドは、正方形 (縦 45cm × 横 45cm × 高さ 42cm) のフィールド (シンファクトリー) 高架式十字迷路は走行路が床上 50cm、十字に交差する架橋の幅 10cm、長さ 110cm の装置を使用した。ラットに各投与物を投与し 60 分間安静にさせた後試験を開始した。その後 3~5 日間の順化期間をおき、各投与物の投与に加え拘束ストレス負荷を 60 分間行った後試験を開始した。それぞれの試験は、ビデオ画像解析装置を用いて 10 分間モニタリングした。測定項目はラットの総移動距離 (cm)、静止時間を含まない平均速度 (cm/min)、各区画 (Corner、Side、Center) の滞在時間 (sec) であり、項目ごとに投与物およびストレスの有無別による比較を行った。

(2) In vivo マイクロダイアリシス法による脳内神経伝達物質 5-HT の測定

5-HT の測定は、脳定位手術を行い、1 週間以上の経過観察および回復期間をおいた後に微量生体試料分析システム (HTEC-500、EICOM) を用いて行った。投与物および投与方法は、行動学的実験と同様とした。

投与物投与による還流試験

各投与物を腹腔内に投与し、100 分間の還流実験を行い、5-HT の放出量を各投与物で比較した。

ストレス負荷試験

ストレス負荷方法は、拘束ストレスを採用した。5-HT のベースラインが安定した後、拘束ストレス (1 回目) を 60 分間負荷し、その後 60 分間解放した。続けて各投与物のいずれかを腹腔内投与し、再び 60 分間の拘束ストレスを負荷した後 60 分間解放し、5-HT の放出量を経時的に測定した。

(3) 血清中のコルチコステロン、酸化ストレスおよび抗酸化力の測定

ラットの血清は、大腿静脈より採取した血液を遠心分離機 (H-19F、KOKUSAN) にて遠心 (1460 × g、10 分) し採取した。なお、血清は測定に用いるまで超低温フリーザー (-80 ) にて保存した。コルチコステロンは、矢内原研究所 (静岡) に分析を依頼した。酸化ストレスは d-ROMs テストキット (ウイスマー) および抗酸化力は BAP テストキット (ウイスマー) を用い、フリーラジカル評価システム (F.R.E.E.、ウイスマー) にて測定した。

統計解析は、統計ソフト SPSS Statistics 22 を用い、有意差検定は、Student の unpaired t-test、分散分析 (ANOVA) および多重比較 (Dunnett 法もしくは Tukey 法) を行い、 $p < 0.05$  で統計的に有意差ありと判定した。なお、本研究は中村学園大学 (含む短期大学部) の動物実験に関する規程に基づき、実験動物委員会の承認を受けて実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 行動学的実験

自発運動量の測定

24 時間当たりの総自発運動量は、ストレス負荷の場合、各投与物を投与しても Cont と同様に投与前日に比べ投与 1 日後は有意 ( $p=0.029$ ) に減少したが、2 日後にはストレス無し (-) と同じレベルまで回復した。つまり本研究で用いた 6-Gin、AITC の投与により、ストレスを負荷した場合においてもラットの日内リズムには、ほとんど影響を及ぼさなかった。24 時間における暗期の自発運動量は、Cont ではストレス負荷前日に比べ負荷後は有意 ( $p=0.017$ ) に減少した。一方、各投与物では、暗期の運動量を維持または増加させたが、特に 6-Gin においては、AITC より長時間 (24 時間) 持続させる作用があることが示唆された。

オープンフィールド (OF) 試験および高架式十字迷路 (EPM) 試験における行動解析

OF 試験における総移動距離は、ストレス無し (-) の場合、Cont および各投与物ともにほとんど変化はなかった。しかし、ストレス負荷 (+) の場合には、全ての群において有意 (Cont :  $p=0.001$ 、6-Gin :  $p=0.036$ 、AITC :  $p=0.026$ ) に減少した。静止時間を含まない平均速度では、ストレス有無のいずれの場合においても全ての群間に変化はみられなかった。滞在時間は Cont の場合、ストレス (+) により Corner が有意 ( $p=0.001$ ) に増加し、Side および Center は有意 (それぞれ  $p=0.001$ 、 $p=0.006$ ) に減少した。6-Gin は、Side のみ有意 ( $p=0.032$ ) に減少した。一方、AITC は、Cont と同様の傾向がみられた。EPM 試験における総移動距離は、ストレス (-) では、3 群間にほとんど変化はみられなかった。ストレス (+) の場合には、ストレス (-) に比べ 6-Gin および AITC はいずれも有意 (それぞれ  $p=0.002$ 、 $p=0.027$ ) に減少した。静止時間を含まない平均速度では、ストレス (-) に比べストレス (+) の方が 3 群ともに有意 (Cont :  $p=0.014$ 、6-Gin :  $p=0.006$ 、AITC :  $p < 0.001$ ) に低下し、特に両投与物において顕著であった。滞在時間は、ストレス (+) により Cont では Closed arm で増加傾向を示した。一方、Center は有意 ( $p=0.036$ ) に減少した。6-Gin は、Cont と同様に Closed arm での滞在時間は増加傾向を示したが、いずれの区画においても有意差はみられなかった。AITC では、ストレス (-) に比べて Closed arm は有意 ( $p < 0.001$ ) に増加し、Center および Open arm は有意 (それぞれ  $p < 0.001$ 、 $p < 0.001$ ) に減少した。

## (2) In vivo マイクロダイアリシス法による脳内神経伝達物質 5-HT の測定

### 投与物投与による還流試験

各投与物を腹腔内に投与し、100 分間の還流を行った結果、5-HT の放出量は時間経過とともに減少する傾向であった。また、100 分間の 3 群間における 5-HT 放出量の平均値をベースライン (Time 0) の値を 100% として比較した場合、Cont、6-Gin および AITC はそれぞれ 62.1%、67.3%、63.3% で 3 群間に有意差はみられなかった。

### ストレス負荷試験

ストレス負荷 60 分間の 5 分ごとの 5-HT 放出量の平均値を比較した場合、3 群間に有意差は認められなかった。さらにベースライン (Time 0) の値を 100% として比較した場合、ストレス負荷 (1 回目) を行うと 5-HT の放出量は、Cont (約 2 倍)、6-Gin (約 1.8 倍)、AITC (約 1.6 倍) といずれも増加した。一方、各投与物を投与しストレス負荷 (2 回目) を行ったところ 5-HT の放出量は、ストレス負荷 1 回目と 2 回目の比は、Cont では 1.33、6-Gin は 1.04、AITC は 1.26 と 6-Gin が最も低い傾向を示したが、いずれも有意な変化はみられず、拘束ストレスに対する緩和効果はみられなかった。

## (3) 血清中のコルチコステロン、酸化ストレスおよび抗酸化力の測定

ストレスの有無別比較を行った結果、60 分間のストレス負荷によりコルチコステロンおよび酸化ストレスは、ストレス (-) に比べて有意 (それぞれ  $p=0.049$ 、 $p=0.003$ ) に上昇した。一方、抗酸化力には有意な変化は認められなかった。

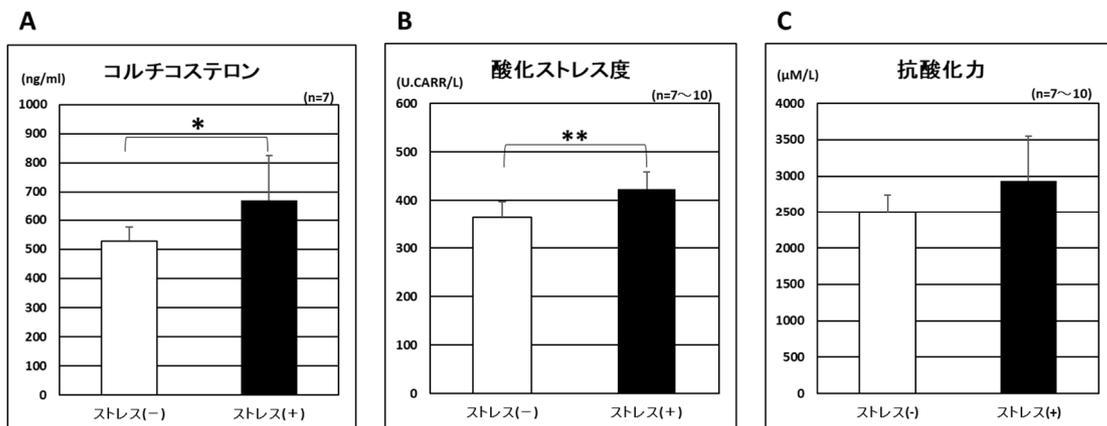


図1 ストレスの有無による血清中のコルチコステロン、酸化ストレスおよび抗酸化力の比較

補助事業期間全体を通して以下の成果が得られた。本研究で用いた 6-Gin、AITC の投与により、ストレスを負荷した場合においてもラットの日内リズムには、ほとんど影響を及ぼさないことがわかった。また、各投与物の投与は、活動期である暗期の運動量を維持または増加させたが、特に 6-Gin は AITC より長時間 (24 時間) 持続させる作用があることが示唆された。OF 試験および EPM 試験の各区画における滞在時間の比較では、Cont および AITC の投与により、ストレス負荷による不安様行動が有意に増加したが、6-Gin では変化はなかった。よって 6-Gin の投与は、不安様行動の増加を抑制する可能性があることが示唆された。さらにマイクロダイアリシス法による脳海馬細胞外 5-HT の放出量を指標とした場合、6-Gin の投与により不安の発現を抑制する傾向がみられた。本研究により 6-Gin は拘束ストレス負荷したラットの不安様行動の増加を抑制させることが明らかとなった。また、脳海馬細胞外 5-HT の放出量において、不安の発現を抑制する傾向がみられた。これらの成果を踏まえ、今後はどのような作用機序においてストレス下による不安を抑制したのかについての検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大和孝子、川崎理香子、安藤優加
2. 発表標題 ストレス負荷ラットの行動に及ぼす植物由来機能性成分の影響
3. 学会等名 第68回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北古賀優紀、中村強、安藤優加、大和孝子
2. 発表標題 植物由来機能性成分投与によるラットの行動および脳内神経伝達物質に及ぼす影響
3. 学会等名 平成30年度日本栄養・食糧学会九州・沖縄支部大会
4. 発表年 2018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	安藤 優加  (Ando Yuuka)  (90760877)	中村学園大学・栄養科学部・助手    (37109)	

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