

オオヌキ コウイチロウ  
大貫 宏一郎

共同研究者

有働洋

(九州大学 理学研究院 生物化学部門 総合生物学・助教)

略 歴

2002年4月～2004年1月

大塚製薬佐賀栄養製品研究所 研究員

2004年1月～2005年1月

京都大学大学院医学研究科 特任助手

2005年2月～2009年3月

九州大学ユーザーサイエンス機構 特任准教授

2009年4月～現在

九州栄養福祉大学食物栄養学部 講師

動物行動解析を用いた精神機能性を有する食品成分の探索

## Identification of food ingredients with mental function using behavioral tests in mice

Adult neurogenesis is known to be influenced by various environmental factors, and affect some forms of animal behaviors such as hippocampus dependent-learning and antidepressant actions. The purpose of finding food components that affect mental function, in this study, to evaluate the mental function of food components for a comprehensive analysis of animal behavior and whether intake of nutrients might affect the level of hippocampal neurogenesis, endocrine stress response measurement and PC12 cell cultures. For this purpose, two kinds of enzymatically hydrolyzed collagen peptides, the lower or higher molecular weight peptides (LP: below 2000 dalton, HP: about 30000 dalton), were prepared, and were administered orally to C57BL/6 mice for three weeks (about 8.65 mg/day, from 5 to 8 week). When two groups of mice were examined by the open field test, LP mice more often stayed in the center area than HP mice while the total moving distances were similar between groups. We also found in elevated plus maze that LP mice more often explored open arms than LP mice, suggesting that anxiety-like behaviors were improved in LP mice. Also, we found that the density of proliferating cells in subgranular zone of hippocampus showed a 1.2-fold increase in LP mice. Thus, we have demonstrated that the intake of nutrient is affective behaviors in a correlative manner and able to influence the level of hippocampal neurogenesis. On the other hand, the intake of nutrient did not affect the stress response. The nucleotide sequence differences in the peptide, PC12 was suggested that affect cell differentiation.

## はじめに

わが国の健康増進施策として2000年から開始された健康日本21において、身体や心の健康の維持が重要な課題とされている。その背景として、中高年以前、特に20～40歳頃の死因としては自殺が最も多く、平成10年以降毎年合計3万人以上に上っている。自殺の原因としては、特に鬱病との関連が指摘されており、ストレスの軽減やメンタルヘルスの向上が急務であると考えられている。

このような社会情勢を踏まえ、精神機能に影響を与える食品成分を見出すことを目的として、本研究では、包括的な動物行動解析を用いて食品成分の精神機能性を評価する。

## 実験方法および結果

### 1.精神機能性に影響を与える可能性のあるシーズの探索

先行研究より候補とした食品由来香料や食品由来蛋白質について、化学構造やこれまでの文献情報より慎重に行い、先行研究にて経口投与から血液-脳関門を通過することが報告<sup>1)</sup>されている食品由来蛋白質を酵素分解したペプチドを用いることに決定した。

### 2.探索したシーズに対しての総合的なマウス行動解析

シーズ探索にて選択された酵素分解ペプチドについて、被験試料(2000dalton以下)と対照試料(約30000dalton)の2種類を用意し、5週齢のC57BL/6J雄マウス24匹を2群に分け、各12匹ずつにそれぞれのペプチドを飲用水に混合させて、自由摂取させた。3週間摂取させ、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。

不安に対する酵素分解ペプチドの効果を調査するため、オープンフィールド試験、明暗選択試験、高架式十字迷路試験を、また、うつ様行動に対する酵素分解ペプチドの効果を調査するため、ポールの強制水泳試験、テールサスペンション試験を行った。

測定機器：小原医科産業社製

解析：Image Jをもとに作られたImage J XX(O'Hara & Co.,Ltd.)を使用

#### (実施① オープンフィールド試験結果)

中央領域滞在時間、移動距離に2群間で差はなかったが、試験時間(10分)内に移動した回数は、明らかに被験試料摂取マウスが多かった【図1】。

#### (実施② 明暗選択試験結果)

被験試料摂取マウスは、対照試料摂取マウスと比較し、全体の試験時間(10分)内を通して、明箱内での移動距離が長く、6～7分の間では有意差が見られた【図2】

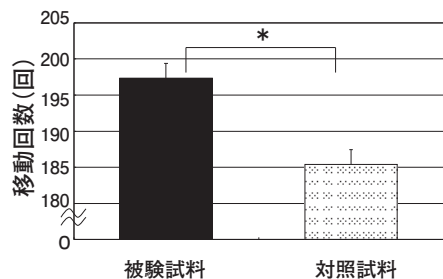


図1 オープンフィールド試験移動回数

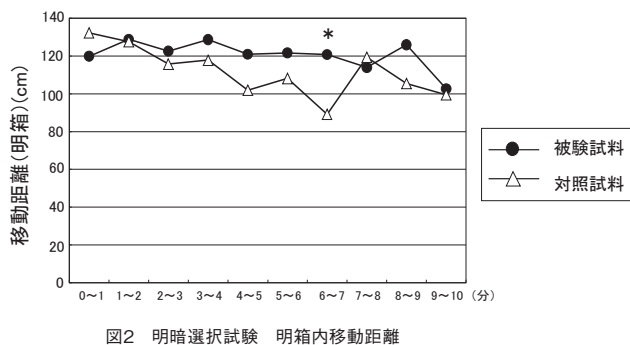


図2 明暗選択試験 明箱内移動距離

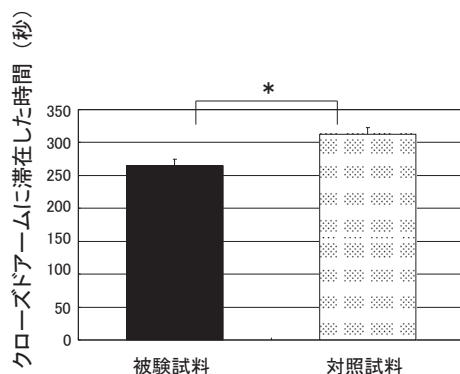


図3 高架十字迷路試験 クローズドアーム滞在時間

### (実施③) 高架式十字迷路試験結果

被験試料摂取マウスは、対照試料摂取マウスと比較し、クローズドアームに滞在した時間が有意に少なかった【図3】。

### (実施④) ポールソルトの強制水泳試験結果

不動時間、移動距離共に、被験試料摂取マウスと対照試料摂取マウスでは、差異が見られなかった。

### (実施⑤) テールサスペンション試験結果

不動時間の割合に差は見られなかったが、被験試料摂取マウスは、対照試料摂取マウスと比較し、時間を追うごとに、中心点からの移動距離が大きくなった【図4】。

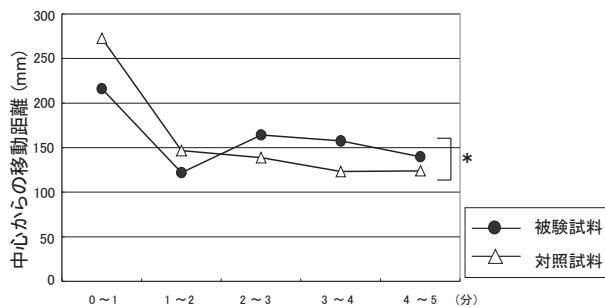


図4 テールサスペンション試験 中心からの移動距離

## 3.不安・鬱様行動に対する効果が見られた食品成分の内分泌系ストレス応答および脳神経系への影響についての検証

### 1) 酵素分解ペプチドの内分泌系ストレス応答の変化

マウスに対するストレスは、拘束ストレスを用い、ストレス応答の生体指標としては、血中コルチゾール濃度を用いた。血液標本は、ストレス負荷前と負荷後の2点から得た。

#### (結果)

ストレス負荷前、拘束ストレス後どちらも、被験試料摂取マウスおよび対照試料摂取マウスに、双方での有意差は得られなかった。

### 2) 酵素分解ペプチドの海馬における神経新生の促進

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を腹腔内投与し、2時間後にマウスをPBS液で還流、固定した。

マウスの海馬を含む領域を200 $\mu$ mおきに冠状切片を得て、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。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。

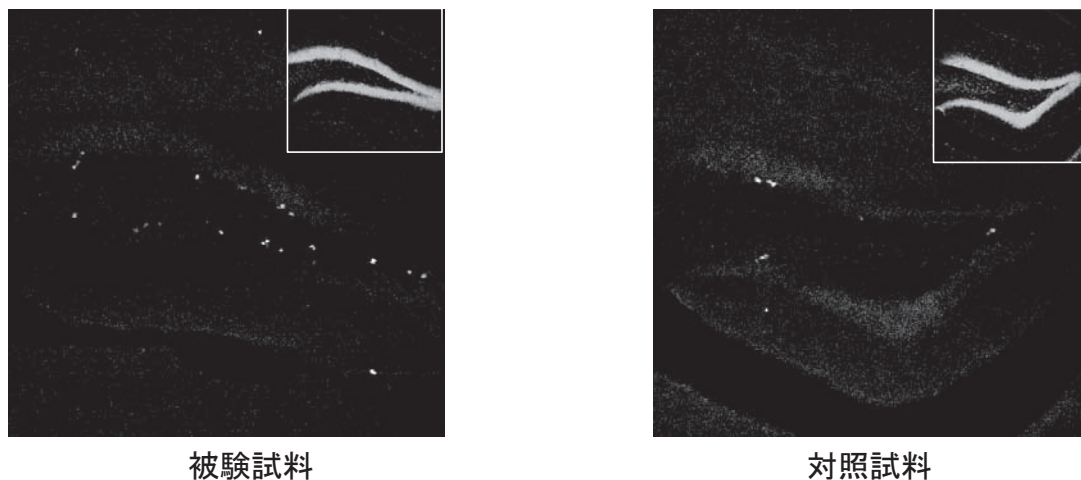


図5 BrdU陽性細胞 免疫染色画像

(結果)

被験試料摂取マウスおよび対照試料摂取マウスの海馬歯状回におけるBrdU陽性細胞の免疫染色画像(白黒)と同一領域の核染色画像(緑色)(右上挿入図)を示す【図5】。これらの画像を元に、各個体からBrdU陽性細胞の密度の平均を求めると、被験試料摂取マウスは対照試料摂取マウスと比較して、海馬歯状回の顆粒細胞下層における分裂細胞の密度が有意に高かった【図6】。

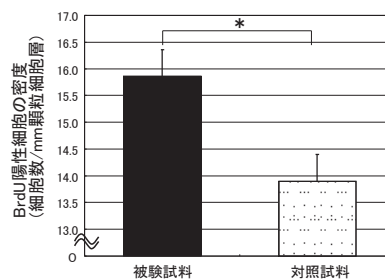


図6 BrdU陽性細胞密度

### 3) ペプチドの神経分化促進作用

以下のペプチド(①GPHyp ②GAHyp ③GAR ④GAS ⑤GPR ⑥GPE ⑦GPA ⑧GPM ⑨GPS ⑩GPVGP ⑪GPSGNA ⑫GPVGAR ⑬GPAGPA ⑭GPVGPA ⑮GPIGSA ⑯GLAGPO ⑰GPSGERGPO ⑱GPRGRTGDAGPV)をラット副腎褐色細胞腫由来のPC12細胞に添加し、神経分化促進作用に及ぼす影響を調査した。

蛍光顕微鏡で細胞を観察し、LSM Image Browserを用いて各画像につき、10 $\mu$ m以上の細胞数、5 $\mu$ m以上の突起が出ている細胞数をカウントし、各サンプルの分化細胞数/総細胞数を求めて、各ペプチドのサンプルの値とNGFのみ添加したサンプルの値を比較した。

(ペプチド1 $\mu$ M(10000倍)結果)

NGFのみを添加したサンプルと比較して、GPE、GPVGPAのペプチドを添加したサンプルについては明らかに分化細胞割合が高く、GPHyp、GAHyp、GAS、GPR、GPVGP、GLAGPO、

GPSGERGPO、GPRGRTGDAGPVのペプチドを添加したサンプルについては、分化細胞割合が有意に低かった【表1】。

(ペプチド10 $\mu$ M(1000倍)結果)

NGFのみを添加したサンプルと比較して、GPS、GPA、GPSGERGPOのペプチドを添加したサンプルについて、明らかに分化細胞割合が高く、GPVGP、GLAGPO、GPRGRTGDAGPVのペプチドを添加したサンプルについては、分化細胞割合が有意に低かった【表2】。

ペプチド1 $\mu$ M	(%)	
GPHyp	20.99	*
GAHyp	21.62	*
GAR	22.49	
GAS	18.86	*
GPR	18.11	*
GPE	37.32	*
GPA	24.56	
GPM	24.95	
GPS	22.89	
GPVGP	18.05	*
GPSGNA	22.64	
GPVGAR	23.39	
GPAGPA	28.48	
GPVGPA	33.67	*
GPIGSA	27.98	
GLAGPO	11.37	*
GPSGERGPO	18.32	*
GPRGRTGDAGPV	17.26	*
NGF	26.52	

表1 ペプチド1 $\mu$ M分化細胞割合

ペプチド10 $\mu$ M	(%)	
GPHyp	28.47	
GAHyp	23.29	
GAR	28.95	
GAS	34.06	*
GPR	21.12	
GPE	30.31	
GPA	38.74	*
GPM	27.03	
GPS	28.16	
GPVGP	14.84	*
GPSGNA	26.54	
GPVGAR	31.18	
GPAGPA	25.8	
GPVGPA	25.12	
GPIGSA	25.1	
GLAGPO	20.8	*
GPSGERGPO	32.03	*
GPRGRTGDAGPV	18.86	*
NGF	26.52	

表2 ペプチド10 $\mu$ M分化細胞割合

## 考 察

本研究では、精神機能に影響を与える食品成分を見出すことを目的として、動物行動解析を用いて食品成分の精神機能性を評価し、その食品成分の高次脳機能への影響についてマウスの内分泌系ストレス応答測定、BrdUによる神経新生、PC12を用いた細胞培養を用いて評価した。その結果、2000dalton以下に酵素分解したペプチドを経口摂取したマウスにおいて、抗不安・抗うつ作用、脳の海馬においては神経新生の促進作用が認められた。一方、ストレス応答には影響を与えなかった。また、ペプチド塩基の配列の違いが、PC12細胞の分化に影響を与える可能性が示唆された。

近年、動物行動解析は、遺伝子改変マウスを被験体として精神疾患関連遺伝子の探索や精神疾患の病態解明に用いられ、とりわけ欧米でそれらの研究が活発である<sup>2)</sup>。しかしながら、マウスの行動解析を用いて、一般食品やその中に含まれる成分が精神機能に与える影響を評価するという試みはほとんど行われていない。本研究では、その新たな試みとして、先行研究にて経口投与から血液脳関門を通過することが報告<sup>1)</sup>されている食品由来蛋白質を酵素分解したペプチドをマウスに経

口摂取させ、動物行動解析を行った。その結果、2000dalton以下に酵素分解したペプチドを経口摂取したマウスに、抗不安・抗うつ作用が認められ、また同時に脳の神経新生促進作用も認められた。従って、感情行動と神経新生に何らかの共通の関連がある可能性が示唆された。

脳の神経新生については、これまで、主に環境条件や運動、ストレスによって影響されることが知られている<sup>3,4,5,6)</sup>。本研究では、摂取した食品によって脳の神経新生に違いが認められたが、経口摂取したペプチドが脳の神経細胞に作用したのかどうかについては、本研究結果のみから言及することはできない。しかしながら、細胞レベルの実験においても、ペプチド塩基の配列によって、PC12細胞の分化に違いが認められたことから、直接的または間接的にペプチドが脳の神経細胞に影響を及ぼした可能性が考えられた。今後の詳細な研究が期待されるが、本研究より特定の食品成分が神経疾患の予防や改善に寄与する可能性が示唆された。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました財団法人アサヒビール学術振興財団に深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Baker A.M, Batchelor D.C, Thomas G.B, et al. Central penetration and stability of N-terminal tripeptide of insulin-like growth factor-I, glycine-proline-glutamate in adult rat. *Neuropeptides* 2005;39:81-87
- 2) Tecott L.H, Nestler E.J. Neurobehavioral assessment in the information age. *Nat Neurosci*. 2004;7:462-466
- 3) Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, et al. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol* 1999;9:569-578.
- 4) Praad H, Kempermann G, Gage F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999;2:266-270
- 5) Gould E, Tanapat P. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 1999; 46:1472-1479
- 6) Kempermann G, Kuhn H.G, Gage F.H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 1998;19:3206-3212