

脳内セロトニン放出増加とストレス緩和 —カカオ成分の作用—

青峰 正裕

中村学園大学 栄養科学部 教授

【はじめに】

一般に、ストレスに関する脳内神経伝達物質にはセロトニン (5-hydroxytryptamine ; 5-HT)、 γ -アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid ; GABA)、ドーパミン (dopamine ; DA) およびノルアドレナリン (noradrenaline ; NA) などがある¹⁾。なかでも5-HTは、精神の安定に関わる物質であり、脳内5-HTの増加はストレスに対しそれを軽減させる効果がある。5-HTが不足すると、気分が不安定となり、寝付きや寝起きが悪くなる等、精神的に不安定な状態になる。目覚めとともに5-HTの増加が起り、5-HTが増加すると脳が活性化し、すっきりした状態となり、精神的にも前向で、落ち着いた気分になることが一般的に知られている²⁾。

一方、カテキン類には、体脂肪の蓄積抑制、動脈硬化抑制、血圧上昇抑制、その他にも抗菌、消臭、がんの予防など様々な作用があることが知られており³⁾、近年その生理機能について大変注目されている。これらカテキン類はカカオに多く含まれており、なかでもエピカテキンの比率は高い⁴⁾。カカオポリフェノールには、自律神経のバランスを図り⁵⁾、ストレスを軽減する作用⁶⁾などが報告されている。しかし、カテキン類が脳機能に及ぼす影響、とくにストレス緩和に関してはほとんど知られていない。そこで今回は、5種類のカテキン類が脳海馬からの5-HT放出にどのような影響を与えるのか、そしてそのストレス緩和作用との関わりを検討した。

【方法】

1. 実験動物

本研究ではWistar系雄性ラット (270~310g、8~10週齢) を用いた。ラットは、室温約24°C、湿度45~50%、12時間明暗サイクルの飼育室にて、ステンレス製の個別ケージに入れ、飼育繁殖用固形飼料で飼育した。また飼育中の食餌と水は自由摂取とした。

2. 脳定位手術

ラットをペントバルビタール・ナトリウムで麻酔し、脳定位固定装置に固定し、ガイドカニューレを海馬を目標にドリルで穴を開けて埋め込み、歯科用デンタルセメントでしっかりと固定した。埋め込む位置は、PaxinosとWatsonの脳地図⁷⁾により、インター-オーラルラインより、前方へ3.2mm、左へ5.0mm、脳表面（硬膜）より深さ2.5mmとした。ガイドカニューレが完全に固定されていることを確認し、ダミーカニューレを挿入した。ラットは手術約3-5日後にマイクロダイアリシス実験に供した。

3. *in vivo*マイクロダイアリシス実験

3-1. HPLC分析条件

マイクロダイアリシス実験には、マイクロダイアリシス分析システム (DAM-300、EICOM)

を使用した。手術約3-5日後、ガイドカニューレに透析用プローブを挿入して、透析液（標準リンゲル液）[組成：NaCl 147mM、KCl 4mM、CaCl₂ 2mM]を灌流し、5-HT量を測定した。移動相 [組成：80% 0.1Mリン酸緩衝液 (Na⁺)、20%メタノール、2.3mM 1-オクタスルホン酸ナトリウム、0.13mM EDTA (2Na)、pH6.0]は、流速0.23ml/minで灌流し、加電圧は400～450mV vs Ag/AgCl、カラムはEicompak CA-5ODS (2.1mm φ × 150mm)を用い、カラム温度は25°Cとした。また、サンプリング間隔は20分間で、本実験ではI字型透析プローブ (A-I-4-03、EICOM) を用いた。この条件下での5-HTの回収率は約20～25%である。

3-2. 透析プローブ装着

ダミーカニューレを取り外し、透析プローブを装着した後にリンゲル液で灌流しながら（灌流速度1 μl/min）、5-HTを含む透析液の回収を行った。5-HTのベースラインが安定した後、各試薬を投与した。なお、全ての実験は、行動等の影響を避けるため、ペントバルビタール・ナトリウムを腹腔内投与し、麻酔下で実施した。

3-3. 試薬類

カテキン類は脳内灌流および胃内投与にてその効果を調べた。今回用いたカテキン類は、(+)-カテキン [CAT]、(-)-エピカテキン [EC]、(-)-エピガロカテキン [EGC]、(-)-エピカテキンガレート [ECG]、(-)-エピガロカテキンガレート [EGCG] およびカテキンミックスチャーミックス [Mix, EGCG約36.2%、EGC約23.2%、ECG約10.6%、EC約7.4%、CA約2.4%、(-)-ガロカテキン 約5.7%、(-)-ガロカテキンガレート約1.6%など] であった。脳内灌流実験ではこれらを標準リンゲル液 (N.R.) に混和して、1 μM～1mMの範囲で使用した。また、モノアミンオキシダーゼ (MAO) 阻害剤のclorgyline (1mM) やpargiline (0.1mM)、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) のfluvoxamine (1mM)、Naイオンチャネル阻害剤のtetrodotoxin (TTX、1 μM) も使用した。なお、これらの試薬類はWako (大阪) より購入した。その他、高K⁺液 (100mM)、低K⁺液 (1mM) 下でも行った。その際浸透圧はNaClにて調節した。また、胃内投与実験においては、CAT、EC、Mixをそれぞれ1mg/kg、10mg/kg、50mg/kg、100mg/kgとなるよう調整し、0.5mlもしくは1mlの生理食塩水 (0.9% NaCl) に溶解させ、ゾンデを使用し直接胃内に投与した。なお、コントロールとして同量の生理食塩水を用いた。

3-4. プロトコール

灌流実験では、5-HTベースライン安定後、カテキン類を100分間灌流し、5-HT放出量を測定した。阻害剤等の実験ではこれらを100分間灌流後、CATを添加した。胃内投与実験では、カテキン類投与後から、5-HT放出の最大値が得られるまで測定を続けた。

3-5. 統計処理

データはすべて平均値 (mean) ± 標準偏差値 (SD) で表し、統計処理は、統計解析ソフト SPSS17.0Jを用いMann-Whitney検定 (non-paired and non-parametric) および一元配置分散分析を用い、危険率5%未満で有意差ありと判定した。

【結果】

図1は5種類のカテキン類 (CAT、EGCG、EGC、ECG、EC) の10 μMを100分間脳内に灌流した際の5-HT增加作用の最大値を比較したものである。全てのカテキン類は標準リンゲル液 (N.R.) 灌流下と比較して有意に5-HT放出量を増加したが、とくにECにおいては約600倍増加した。

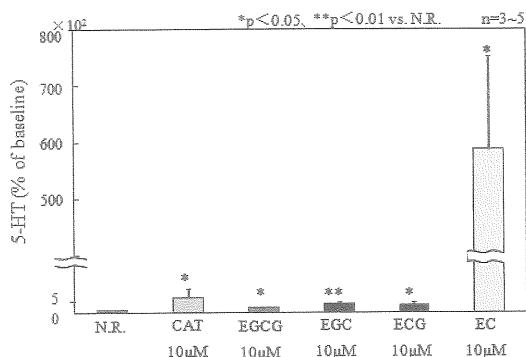


図1 カテキン類の5-HTレベル増加の比較

ECは加熱処理によりCATに変化するので、以降の脳内灌流実験ではCATを用いた。

図2は、CATを $1\mu M$ から $1mM$ まで段階的に濃度を上げてwashout（100分間）を挟んでそれぞれ100分間作用させた場合の最大5-HT放出量との関係を示したものである。 $1mM$ 以上の5-HT濃度ではwashoutに100分間以上の時間がかかるため $1mM$ で最大値が得られたとして、その場合の EC_{50} は約 $0.1mM$ であり、5-HTの放出増加の閾値濃度は $1\mu M$ 近辺であった。

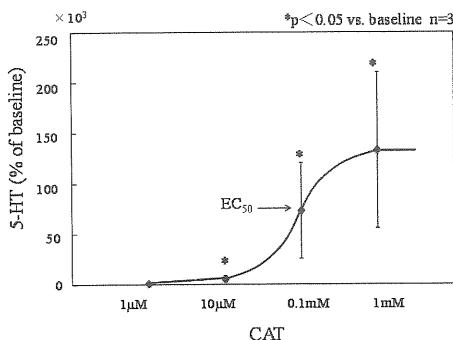


図2 5-HTレベル増加のCAT濃度依存性

次に、どのような機序で5-HT放出増加が起こるのかを調べた。図には示していないが、 Na^+ チャネル阻害剤のTTX $1\mu M$ 作用で100分後には5-HT放出量は60%抑制された。この状態で新たにCAT $1mM$ を添加すると、CAT単独とほぼ同様な5-HT放出増加が観察された。また、N.R.を $100mM$ K溶液、あるいは $1mM$ K溶液で100分間灌流後、CAT $1mM$ を添加してみても、CAT単独とほぼ同様な増加が観察され、TTXの作用と併せて、CATの作用は膜電位依存性ではないことが示唆された。

シナプス間隙に放出された5-HTは、最終的には、モノアミンオキシダーゼ(MAO)により代謝されるか、モノアミントランスポーターにより神経終末に再取り込みされる。MAO-Aは、5-HTやNAレベル調節に、MAO-BはDAレベル調節に関与することが知られている。ここでは、MAO-A阻害剤のclordyline $1mM$ と、MAO-B阻害剤のpardyline $0.1mM$ 存在下でのCATの効果を調べた(図3)。clordyline $1mM$ 単独作用では5-HTレベルは約6倍増加したが、pardyline $0.1mM$ では有意な増加はみられなかった。これらの阻害剤存在下にCAT $1mM$ を添加するとclordylineの場合、その単独の

場合と比較して放出量は低下した。一方、parylineではCAT 1mMの添加でparyline単独と比較して変化なかった。clordylineの場合、clordylineとCATの作用順番を入れ替えた場合でも、同様な結果が得られた。このことはclordylineとCATが類似の効果をもたらす可能性を排除するものではないことを示唆している。

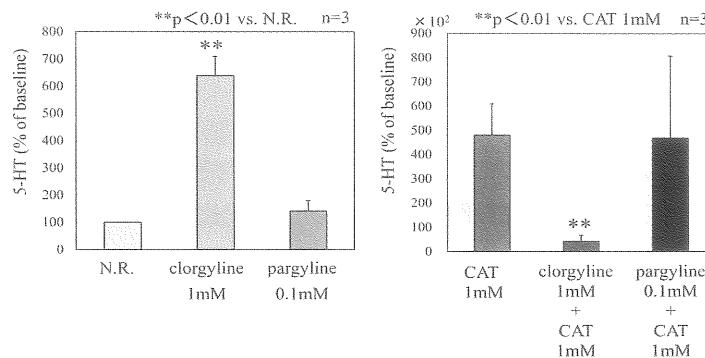


図3 MAO阻害剤存在下における5-HTレベル

さらに、5-HTの再取り込み阻害剤（SSRI）であるfluvoxamine 1mM存在下でCATを加えてみた。図4に示すように、まず、fluvoxamine単独作用では予期されたように5-HT放出量は有意に増加した。この状態でCATを1mM添加すると、MAO阻害剤実験と同様に放出量の低下が観察された。fluvoxamineとCATの作用順番を入れ替ても、同様な結果が得られた。

つぎに、図5、6に示すのは胃内にカテキン類を投与した場合の結果を示している。図5にはCAT 2.3mg/kg体重を胃内に投与後140分間の脳海馬での5-HT放出量を調べたものである。使用した

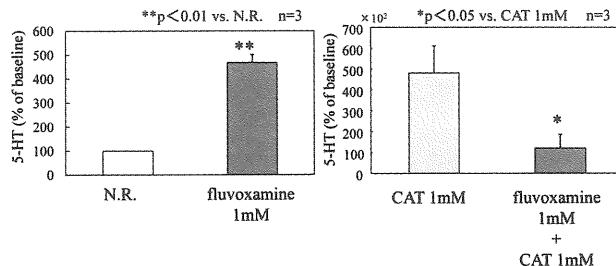


図4 SSRI存在下における5-HTレベル

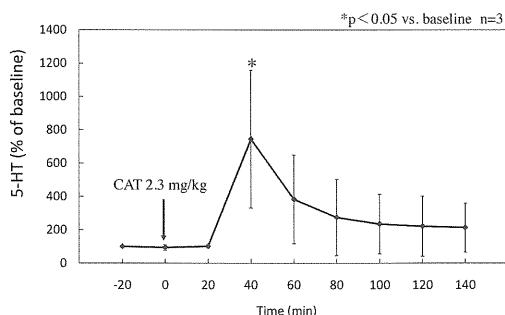


図5 CAT胃内投与による5-HTレベルの増加

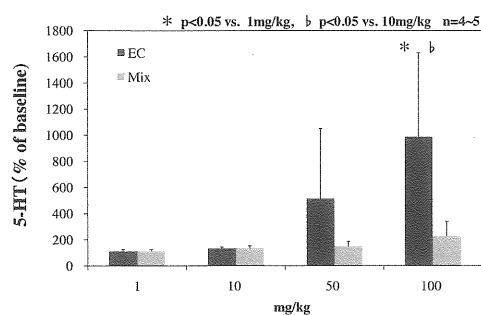


図6 ECとMixの胃内投与における5-HT放出レベルの比較

CATの濃度は、投与されたCATが全て血液中に存在すると仮定して、CATのEC50の値に達するために必要な投与量を計算したものを用いた。投与後40分において5-HT放出量はピークに達し、その後緩やかに低下していった。

カテキン類を脳内灌流した場合、最も5-HT放出効果が著しかったのはECであった（図1）ので、ECと様々なカテキン類の混合物である市販のカテキン類ミックスチャーチ（Mix）を胃内投与して5-HT放出効果を比較した（図6）。100mg/kg投与で比べると、Mixで約2倍の増加であるのに対して、ECで約10倍の増加であった。脳内灌流の場合とほぼ同様にECの著しい5-HT放出増強作用があることが示された。

【考察】

今回5種類（CAT、EC、EGC、ECG、EGCG）のカテキン類を用いて、直接脳海馬内に同濃度を作用した場合（脳内灌流実験）の5-HT放出効果は、ECが最も顕著で、次いでCAT、EGC、ECG、EGCGの順であった（図1）。ECとCATは光学異性体の関係であり、ガレート（没食子酸、gallate）が結合したECGやEGCGにおいての放出効果は他のカテキン類に比して低かった。このことは5-HT放出にはカテキンの立体構造が深く関与していることを示唆している。

ECは加熱処理によりCATに変化するので、CATを用いてその作用機序を調べた。EC₅₀は約0.1mMであり、5-HT放出を引き起こす閾値濃度は1μM近辺にあった（図2）。高K⁺液、低K⁺液等において膜を脱分極あるいは過分極させた場合でも、CATの5-HT放出には何の影響も及ぼさなかった。さらに、TTXによるNa⁺チャネル阻害下、すなわち神経の活動電位を発生させなくても影響がなかったことは、CATの作用は膜電位依存性ではないことを示唆した。

つぎにCATの5-HT放出増加効果に、CATがMAO活性を阻害するか、あるいは何らかの修飾を加えることによって起こしているかもしれない可能性を調べた（図3）。もし、CATの作用機序とMAO阻害剤のそれが異なるものであるならば、5-HT放出は相加的であることが期待されるが、実際は、むしろCATとMAO-A阻害剤であるclorgylineの共存が逆に5-HT放出を有意に低下させた。このことは少なくともCATの作用機序とMAO-A阻害剤のそれが大きく異なるものではないことを示していると思われる。一方、pargylineは効果がなかったが、これはpargylineがDAのレベルに関与するMAO-B阻害剤であることで納得できるものである。実際に、カテキンがMAO阻害剤に似た働き⁸⁾やMAO活性を弱める⁹⁾ことが報告されている。また、CATがSSRIの作用をも保持する可能性を調べたが（図4）、この場合もclorgylineの場合と同様な結果が示された。すなわち、CATはSSRIとしての働きを決して否定できるものではないということが示唆された。

一方、胃内投与実験においても、脳海馬における有意な5-HT放出を引き起こすことがわかった（図5、6）。ヒトにおいては経口摂取されたカテキンの消化管からの吸収量は摂取量の5~8%で血中には2%程度が移行するとされ¹⁰⁾、腸管からの吸収時、あるいは肝臓などにおける代謝過程で抱合化やメチル化反応などを受け¹¹⁾、血漿中では遊離体のほか、グルクロロン酸抱合体や硫酸抱合体として存在していることが報告されている¹²⁾。図5に示すようにCATの胃内投与から40分後には有意な5-HT放出の増加が観察されたが、ヒトにEGCGや茶カテキン抽出物を経口的に投与した場合の血中濃度でも1~4時間後の最大値が観察されている¹³⁾。ラット¹⁴⁾やマウス¹⁵⁾でもほぼ同様であった。このことからカテキンはカテキンやその代謝産物の少なくとも一部は、脳の血液脳関門を通過して海馬における5-HT放出に関与している可能性が示唆された。図6に示すようにECの5-HT放出増加

作用はカテキン混合物（Mix）よりも顯著であり、他のカテキン類と比べてECの5-HT放出増強効果の優位性が胃内投与の場合においても示された。

以上のことから、カテキン類は経口摂取された場合でも、脳内の5-HT放出増加作用を示し、その作用機序としてはMAO阻害剤やSSRI阻害剤として働き、脳内の5-HT放出増加をもたらす可能性が示唆された。

【まとめ】

うつ発症時には脳内の情動や睡眠に関係する中枢のセロトニン作動性神経において5-HT放出低下が生じ、その結果、化学的伝達が不十分となり、抑うつの症状が心身両面に起こると考えられている¹⁶⁾。特に抑うつに関与する主要な因子は5-HTであると考えられており¹⁷⁾、自殺者の脳では5-HT濃度が低下していることも知られている¹⁸⁾。5-HTを増加させることができれば、気分を落ち着かせ、ストレス緩和（不安緩和）、抑うつの改善につながるのではないかと考えられる¹⁹⁾。今回、カテキン類が脳内投与（脳内灌流）のみならず胃内投与においても有意に脳海馬5-HT放出を増加することがわかった。カテキン類のなかでもエピカテキン（EC）は他に比べて100倍以上の効果を示したことは大変興味深い。食物のなかでECを多く含むものとしてカカオがある。チョコレートやココアにはカカオマスが多く含まれ、今回の結果からもチョコレートを例に取ると通常摂取する量（せいぜい板チョコレート1枚程度；約60g）よりも少し多めに摂取した場合、十分に脳内5-HT放出を増加することが期待され、それによって気分の安定、沈静化を図れる可能性があることがわかった。

【参考文献】

1. 坂内四郎,「新バイオサイエンスシリーズ ストレス探求－分子レベルでみると－」,科学同人, pp.81-91, 京都 (1994)
2. 有田秀穂, セロトニン欠乏脳－キレる脳・鬱の脳を鍛え直す－, pp.49-56, 日本放送出版協会, 東京 (2003)
3. 竹尾忠一, 植物資源の生理活性物質ハンドブック (谷村顕雄監修), サイエンスフォーラム, pp.237-248, 東京 (1998)
4. 第15回チョコレート・ココア国際栄養シンポジウム資料 (2010)
5. 横越英彦, 岡野康代, 酒井美智子, 第8回チョコレート・ココア国際栄養シンポジウム, pp.8-13 (2003)
6. 武田弘志, 第6回チョコレート・ココア国際栄養シンポジウム, pp.31-33 (2000)
7. Paxinos G., Watson C., The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, New York (1986)
8. Rocha FF., Lima-Landman MT., Souccar C., Tanae MM., De Lima TC., Lapa A., Phytomedicine, 14 (6), 396-402 (2007)
9. Mazzio EA., Harris A., Soliman KF., Planta Med., 64 (7), 603-606 (1998)
10. 宮澤陽夫, 仲川清隆, 浅井明, 化学と生物, 38, 104-114 (2000)
11. Piskula MK., Terao J., J. Nutr., 128, 1172-1178 (1998)

12. Yang CS., Chen L., Lee MJ., Balentine D., Kuo MC., Schntz SP., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 7, 351-354 (1998)
13. 佐野満昭, 芳野恭士, 茶の化学成分と機能 (伊奈和夫, 坂田完三, 富田勲, 伊勢村謹編著), pp.165-177, アイ・ケイコーポレーション, 川崎 (2002)
14. Wang ZY., Wang LD., Lee MJ., Ho CT., Huang MT., Conney AH., Yang CS., Carcinogenesis, 16, 2143-2148 (1995)
15. Sano M., Suzuki M., Yoshino K., Miyase T., Tachibana H., Yamamo M., Proceedings of Polyphenols Communications 2000, p.453 (2000)
16. 河野友信, 筒井末春 編, 「うつ病の科学と健康－一般医のための－」, 朝倉書店, 東京, pp.15-20 (1987)
17. Kang M., Pyun KH., Jang CG., Kim H., Bae H., Shim I., J. Pharm. Pharmacol., 57, 651-656 (2005)
18. Shaw DM., Camps FE., Eccleston EG., Br. J. Psychiatry, 113 (505), 1407-1411 (1967)
19. Yamato T., Yamasaki S., Misumi Y., Kino M., Obata T., Aomine M., Neurosci. Lett., 332, 87-90 (2002)