

マウスを用いたかき抽出物含有食品の抗不安作用に関する評価

増 澤 徹^{1,3)}, 松 井 博 之²⁾, 松 田 芳 和²⁾,
朝 戸 めぐみ³⁾, 池 田 弘 子³⁾, 亀 井 淳 三³⁾

(¹⁾株式会社新薬開発研究所*, (²⁾日本クリニック株式会社中央研究所**, (³⁾星薬科大学薬物治療学教室***)

Evaluation of anxiolytic-like effect of Oyster Exact in mice

Tohru MASUZAWA¹⁾, Hiroyuki MATSUI²⁾, Yoshikazu MATSUDA²⁾,
Megumi ASATO³⁾, Hiroko IKEDA³⁾, Junzo KAMEI³⁾

¹⁾New Drug Development Research Center, Inc.,

²⁾Central Research Institute, Japan Clinic Co., Ltd.,

³⁾Department of Pathophysiology and Therapeutics School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Hoshi University

Summary

Oyster contains much nutrients such as taurin, glycogen and zinc as called “marine milk”. A supplementary food containing oyster extract is reported to possess several physiological effects including anti-oxidative activity and supplementation of zinc. It is also known that “mental disorder” is caused by zinc deficiency, therefore oyster extract containing abundant zinc is expected to show some physiological effects on nervous systems.

Then, we assessed anxiolytic-like effect of Oyster Extract (prepared by Japan Clinic Co., Ltd.) in naïve mice and psychological stressed mice using Hole-Board test method, commonly used in the evaluation studies of anxiolytic activities of chemicals.

As a result, head-dipping behavior in naïve mice was significantly increased by oral administration of Oyster Extract for 28 days. On the other hand, head-dipping behavior in psychological stressed mice was significantly decreased from naïve mice. Oral administration with Oyster Extract significantly increased the number of head-dipping behavior in psychological stressed mice. Psychological stress induced anxiety-like behavior was suppressed by administration of oyster extract.

These results suggest that Oyster Extract have a potential of anxiolytic-like effect.

今日の日本は、「ストレス社会」と言われるように、多様化した価値観、高度な科学技術、複雑な対人関係の中で日常生活を送っている。日本ではストレスが原因で人口の5～7%もの人々が「心の病」に悩まされているとの報告¹⁾があり、それは人数にして650万人以上にものぼることになる。「心の病」はQOLを低下させるため社会問題化しており、それを緩和するための食品が探求されている。

牡蠣は、タウリン、グリコーゲン及び亜鉛などのミネラルを豊富に含有し、海のミルクとも呼ばれている²⁾。

牡蠣を原材料としたかき抽出物含有食品（提供：日本クリニック株式会社）は、広島を中心とした瀬戸内産の牡蠣の身を熱水抽出したもので、抗酸化作用^{3,4)}や亜鉛補給効果⁵⁾など様々な機能が報告されている。亜鉛の欠乏によって精神障害が引き起こされることが知られている⁶⁾ため、亜鉛を多量に含む牡蠣には神経精神系に対する作用を有する可能性が考えられる。

従来より精神障害、特に不安障害に対しては、ベンゾジアゼピン受容体のアゴニストが有効であることが知られている。ベンゾジアゼピン受容体のアゴニストであるジアゼパムは、ホールボード試験法においてマウスの総行動距離及び立ち上がり回数に影響を与えることなくヘッドディップ回数を特異的に増加させることが知られているため、ベンゾジアゼピン受容体の関与する情動性の変化の指標としては、ホールボード試験のヘッドディップ回数が有用であると考えられている^{7,8)}。また、ストレスを負荷したマウスではホールボード試験法における探索行動の低下が報告されており、それを正常化する機序にはベンゾジアゼピン受容体の関与が示唆されている^{8,9)}。よって、ホールボード試験法は、特にベンゾジアゼピン受容体を作用機序とする抗不安薬の評価や、ストレス負荷によって不安状態が惹起された動物の探索行動におこる変化を測定するのに適した試験法であると考えられる。

*所在地：北海道恵庭市戸磯452-1（〒061-1405）

**所在地：京都市右京区太秦開日町10-1（〒616-8555）

***所在地：東京都品川区荏原2-4-41（〒142-8501）

そこで、マウスを用いて不安の評価系で広く用いられているホールボード試験法を用いて、かき抽出物含有食品の抗不安様作用を検討した。

なお、本試験は、星薬科大学内の動物実験委員会が規定する動物実験計画書の審議・承認を得た後に実施した。

実験方法

1 被験物質

本試験の被験物質には、広島を中心とした瀬戸内産の牡蠣の身を熱水抽出した牡蠣抽出物含有食品（提供：日本クリニック株式会社）を用いた。

2 正常動物を用いた抗不安様作用に関する試験

1) 単回投与試験

試験には7週齢のICR系雄性マウスを使用した。群構成は、対照群、かき抽出物含有食品150、300及び600 mg/kg投与群の計4群を設定した。動物には投与前日の夕方より約16時間絶食させた後、媒体あるいはかき抽出物含有食品を経口投与し、その2時間後にホールボード試験を実施した。

2) 5日間反復投与試験

試験には7週齢のICR系雄性マウスを使用した。群構成は、対照群、かき抽出物含有食品50、150及び300 mg/kg投与群の計4群を設定した。動物には1日1回5日間連続で媒体あるいはかき抽出物含有食品を経口投与し、最終投与の2時間後にホールボード試験を実施した。

3) 28日間反復投与試験

試験には7週齢のICR系雄性マウスを使用した。群構成は、基礎飼料MF（オリエンタル酵母工業㈱）を供与した対照群、基礎飼料にかき抽出物含有食品を0.075、0.150及び0.300%配合した飼料を供与した群（それぞれ75、150及び300 mg/kg/dayに相当）の計4群を設定した。動物には28日間連続で基礎飼料あるいはかき抽出物含有食品配合飼料を供与した。混餌投与開始29日目にホールボード試験を実施した。

3 精神的ストレス負荷動物を用いた抗不安作用に関する試験

試験には7週齢のICR系雄性マウスを使用した。群構成は、媒体を投与後コミュニケーションボックスに1時間入れただけの無処置群、媒体を投与後に精神的ストレスを負荷した対照群、かき抽出物含有食品を100、150及び300 mg/kg/dayで投与後に精神的ストレスを負荷した群の計5群を設定した。動物には1日1回5日間連続で媒体あるいはかき抽出物含有食品を経口投与した。動物には最終投与の翌日、コミュニケーションボックス（㈱ニューロサイエンス）を用いて精神的ストレスを1時間にわたって負荷した直後、ホールボード試験を実施した。

4 ホールボード試験（抗不安様作用の評価）

抗不安様作用の評価は、Kameiらの方法⁷⁾に従ってホールボード試験法で実施した。ホールボード試験は、武田らが開発した装置を基に市販されている自動ホールボード試験装置（室町機械㈱）を用いた。

ホールボード試験装置は、縦横高さがそれぞれ50×50×50 cmの箱で床面中央から等距離に直径3 cmの穴が4ヵ所に設けられている。壁面には床面の上方及び下方に赤外線を探知するセンサーが取り付けられている。あらかじめ頭部を黄色でマーキングしたマウスをホールボード装置に入れると、装置上方に設置したCCDカメラによりマーキングした色のみを映像信号としてとらえ、装置内の座標データとする。壁面の赤外線センサーは、装置内の動物の立ち上がり行動や穴のぞき行動（ヘッドディップ行動）を検出する。これらの信号は、解析ソフト（室町機械㈱、Comp ACT HBS）により自動的に演算処理され、探索行動に関する項目が自動計測される⁸⁾。

本実験では、ホールボード装置にマウスを入れてから5分間における総行動距離、ヘッドディップ潜時、立ち上がり回数、ヘッドディップ回数を評価に用いた。

なお、ホールボード試験は10:00～15:00に実施した。

5 精神的ストレスの負荷

精神的ストレスは、Kameiらの方法⁹⁾を参考に市販のコミュニケーションボックス（㈱ニューロサイエンス）を用いて負荷した。

この装置は、25区画（1区画：10×10×70 cm）に分割されており、各区画は透明のプラスチック板で仕切られている。装置の床面は電流の流れるグリッド線で構成されている。

精神的ストレスを負荷する動物は、電流刺激を受けないようにグリッド線の上にプラスチックの板を置き、動物がグリッド線と直接接触しない状態で配置した。その上下左右の区画には、動物がグリッド線の上に直接接触するように1匹ずつ配置し、30秒間隔で2 mAの電流を5秒間流すことを1時間継続した。

なお無処置動物は、この装置内で電流を流さずに1時間配置した。

6 統計処理

得られた数値は各群で平均値及び標準誤差を算出した。

対照群とかき抽出物含有食品投与群間の比較については、Bartlett法により等分散性の検定を行い、等分散の場合は更に一元配置分散分析を行い、有意な場合はDunnett法による平均値の比較を行った。不等分散の場合はKruskal-WallisのH検定を行い、有意な場合はDunnett法による平均順位の比較を行った。

無処置群と対照群間の比較については、F検定により等分散性の検定を行ったところ、等分散であったためStudentのt検定を行った。

F検定、Bartlett法、一元配置分散分析及びKruskal-Wallis

のH検定については有意水準を危険率5%とした。Dunnett法及びt検定については有意水準を危険率5及び1%とした。

いずれの統計処理も、SPSS Statistics (IBM) を用いた。

実験結果

1 正常動物を用いた抗不安作用に関する試験

1) 単回投与試験

単回投与試験では、いずれの測定結果においても対照群とほぼ同様の値を示し、牡蠣抽出物含有食品の投与による影響は認められなかった (Table 1)。

2) 5日間反復投与試験

5日間反復投与試験では、総行動距離、立ち上がり回

数はいずれの群においても変化は認められなかった (Table 2)。ヘッドディップ潜時は、かき抽出物含有食品の投与によって用量依存的な短縮が認められ、最高用量投与群では有意な短縮が認められた。ヘッドディップ回数は、かき抽出物含有食品の投与によって有意な変化ではないものの用量依存的に増加する傾向が認められた。

3) 28日間反復投与試験

28日間反復投与試験では、総行動距離、立ち上がり回数はいずれの群においても変化は認められなかった (Table 3)。ヘッドディップ潜時は、いずれのかき抽出物含有食品の投与群においても減少傾向が認められた。ヘッドディップ回数は、いずれのかき抽出物含有食品の投与群においても有意な増加が認められた。

Table 1 Effect of Oyster extract on exploratory behavior in mice tested on the hole-board
— Single administration study —

Group	Dose (mg/kg)	No. of animals	Locomotion (cm)	Head-dip latency (sec)	Rearing counts	Head-dip counts
Control	0	10	1654.8 ± 158.5	21.9 ± 3.5	37.1 ± 2.8	21.2 ± 1.9
Oyster extract 150 mg/kg	150	10	1350.7 ± 129.6	20.4 ± 5.3	32.5 ± 5.0	20.1 ± 1.8
Oyster extract 300 mg/kg	300	10	1772.3 ± 247.0	15.1 ± 5.4	41.2 ± 4.6	19.9 ± 1.6
Oyster extract 600 mg/kg	600	10	1721.4 ± 123.8	18.3 ± 3.1	32.9 ± 2.1	22.7 ± 3.0

Each value represents the mean ± S.E.M. of 10 mice.

Table 2 Effect of Oyster extract on exploratory behavior in mice tested on the hole-board
— 5 days repeated administration study —

Group	Dose (mg/kg/day)	No. of animals	Locomotion (cm)	Head-dip latency (sec)	Rearing counts	Head-dip counts
Control	0	10	1964.2 ± 109.6	26.9 ± 3.2	37.2 ± 3.1	20.6 ± 2.0
Oyster extract 50 mg/kg	50	10	2208.2 ± 150.5	25.1 ± 3.8	42.2 ± 2.1	24.7 ± 2.4
Oyster extract 100 mg/kg	100	10	2269.1 ± 163.8	24.2 ± 2.8	41.1 ± 2.8	25.4 ± 1.9
Oyster extract 150 mg/kg	150	10	2258.4 ± 139.1	17.1 * ± 2.3	34.4 ± 3.8	29.1 ± 2.2

Each value represents the mean ± S.E.M. of 10 mice.

* p < 0.05, significantly different from control group by Dunnett's multiple comparison test.

Table 3 Effect of Oyster extract on exploratory behavior in mice tested on the hole-board
— 28 days repeated administration study —

Group	Dose (% in food)	No. of animals	Locomotion (cm)	Head-dip latency (sec)	Rearing counts	Head-dip counts
Control	0	5	2168.0 ± 212.5	29.9 ± 5.4	32.0 ± 3.3	18.6 ± 0.6
Oyster extract 0.075%	0.075	5	2146.5 ± 190.0	17.2 ± 4.1	41.0 ± 5.6	28.2 ** ± 2.6
Oyster extract 0.15%	0.15	5	2298.2 ± 119.3	19.2 ± 2.1	36.2 ± 3.0	27.6 ** ± 1.9
Oyster extract 0.3%	0.3	5	2197.3 ± 136.3	19.6 ± 2.3	38.8 ± 3.0	27.6 ** ± 1.4

Each value represents the mean ± S.E.M. of 5 mice

** p < 0.01, significantly different from control group by Dunnett's multiple comparison test.

2 精神的ストレス負荷動物を用いた抗不安作用に関する試験

無処置群と比較して精神的ストレスを負荷して不安状態を惹起した対照群は、総行動距離及び立ち上がり回数には変化が認められなかったものの、ヘッドディップ潜時は増加傾向を示し、ヘッドディップ回数は有意に減少した (Fig. 1)。

ストレス負荷によって延長したヘッドディップ潜時は、かき抽出物含有食品の投与によって用量依存的に短縮する傾向が認められた。

ストレス負荷によって減少したヘッドディップ回数は、かき抽出物含有食品の投与によって用量依存的かつ最高用量では有意に増加させた。

考察

本実験ではかき抽出物含有食品を用いて抗不安作用に

関する検討を行った。

本実験で抗不安様作用の評価に用いたホールボード試験法は、すでにジアゼパムなどの医薬品の評価に広く用いられている⁷⁾。

従来より不安障害に対しては、ベンゾジアゼピン受容体のアゴニストが有効であることが知られている。ベンゾジアゼピン受容体のアゴニストであるジアゼパムは、ホールボード試験法においてマウスの総行動距離及び立ち上がり回数に影響を与えることなくヘッドディップ回数を特異的に増加させることが知られている^{7,8)}。また、不安惹起物質でベンゾジアゼピン受容体のインバーサアゴニストである Methyl- β -carboline-3-carboxamide (β -CCM) は、マウスのヘッドディップ回数を減少させることが知られている⁷⁻⁹⁾。よって、ベンゾジアゼピン受容体の関与する情動性の変化の指標としては、ホールボード試験のヘッドディップ回数が有用であると考えられている⁸⁾。

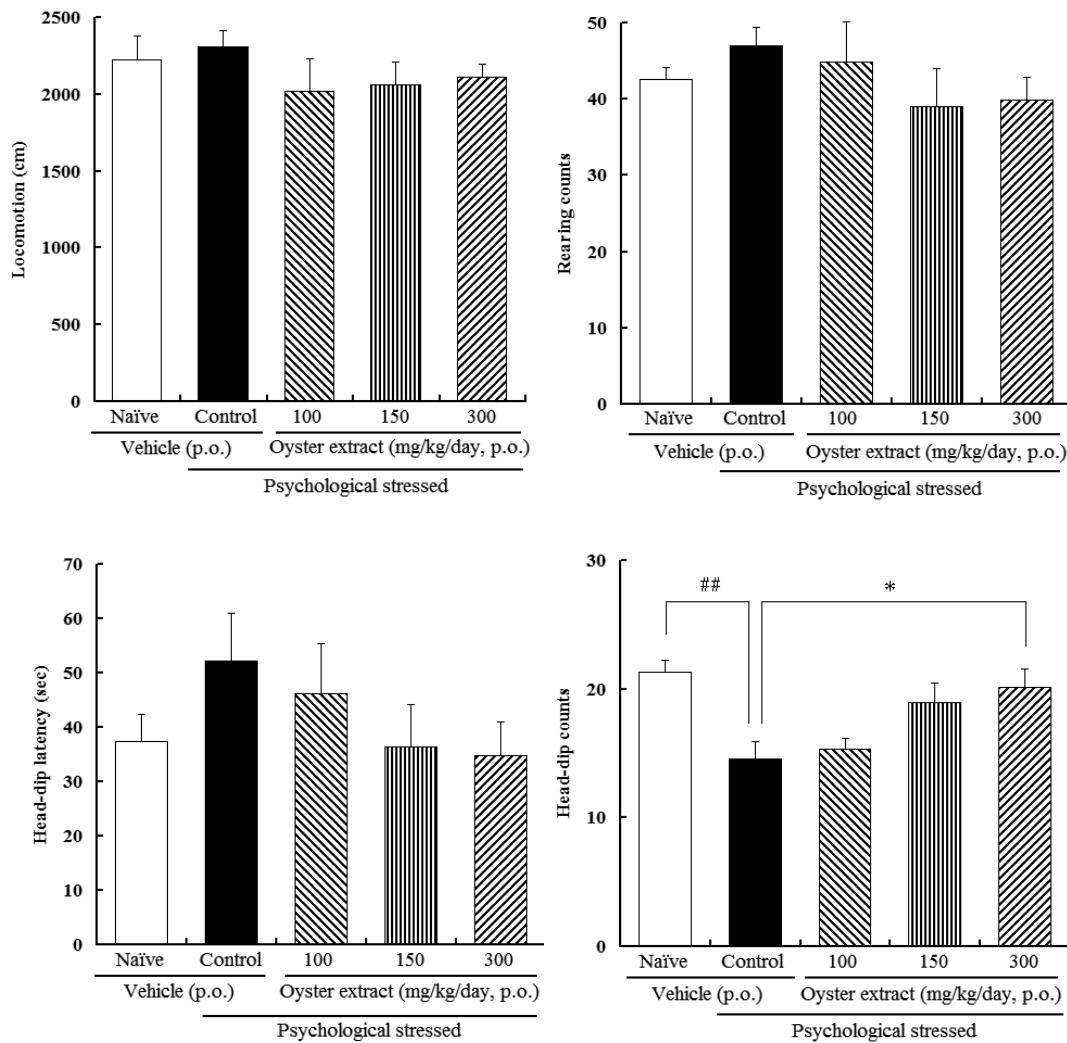


Fig. 1 Effect of Oyster extract on exploratory behavior in psychologically stressed mice tested on the hole-board — 5 days repeated administration study —

Each value with vertical bar represents the mean \pm S.E.M. of 10 mice.

Each animal was housed in the communication box separately for a hour with or without psychological stress before tested on the hole-board.

$p < 0.01$, significantly different from naïve group by Student's t-test.

* $p < 0.05$, significantly different from control group by Dunnett's multiple comparison test.

また、ストレスを負荷したマウスでは、ホールボード試験法において探索行動が低下することが知られている^{8,9)}。この変化はベンゾジアゼピン受容体のアゴニストの投与によって抑制することから、ストレスによって低下した情動性を正常化する機序には、ベンゾジアゼピン受容体が関与していることが示唆されている^{8,9)}。

よって、ホールボード試験法は実験動物が新奇環境において示す種々の探索行動を自動的に測定することが可能な試験法であるが、特にベンゾジアゼピン受容体を作用機序とする抗不安薬の評価や、ストレス負荷によって不安状態が惹起された動物の探索行動におこる変化を測定するのに適した試験法であると考えられる。

そこで、本試験ではかき抽出物含有食品の抗不安様作用の評価にはホールボード試験法を用い、さらに正常動物を用いた試験と精神的ストレスを負荷した動物を用いた実験を実施した。

正常動物を用いた抗不安様作用に関する試験では、かき抽出物含有食品を単回投与してホールボード試験を実施したところ、対照群とほぼ同様の値を示し効果は認められなかった。かき抽出物含有食品を5日間反復投与すると、総行動距離及び立ち上がり回数に影響を与えることなくヘッドディップ潜時は用量に依存して減少し、高用量投与群では対照群と比較して有意差が認められた。ヘッドディップ回数は用量に依存して増加する傾向が認められたことから、抗不安様効果を示す傾向が認められた。かき抽出物含有食品を28日間反復投与すると、総行動距離及び立ち上がり回数に影響を与えることなくヘッドディップ潜時はいずれの群でも減少傾向が認められた。ヘッドディップ回数はいずれの群でも有意に増加し、かき抽出物含有食品の抗不安様効果が認められた。よって、正常動物に対する抗不安様効果は28日間以上の投与で認められることが明らかとなった。

次に精神的ストレスを負荷して不安状態を惹起した動物を用いて抗不安様作用に関する試験を行った。不安状態を惹起した動物でホールボード試験を実施すると、無処置動物と比較してヘッドディップ潜時は増加傾向を示し、ヘッドディップ回数は有意に減少した。このことから、これらが精神的ストレスの負荷により不安状態に陥った動物で認められる変化と考えられた。これらのストレスによって生じた変化は、ストレス負荷前にかき抽出物含有食品を5日間反復投与すると、総行動距離及び立ち上がり回数に影響を与えることなくヘッドディップ潜時は用量に依存して回復する傾向が認められ、ヘッドディップ回数は用量に依存して増加し高用量の投与では統計学的にも有意差が認められ無処置動物とほぼ同様の値にまで回復した。よって、かき抽出物含有食品は精神的ストレスによって惹起される不安様行動を抑制することが明らかとなった。

以上のことから、かき抽出物含有食品には不安を緩和する作用を持つ可能性が示唆された。

最近になって、亜鉛の欠乏が精神障害を誘導することや、

動物試験において亜鉛が神経症状を改善する作用のあることが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。亜鉛の抗不安作用は、グルタミン酸やGABA系のシステムを調節することに関係していると考えられている¹¹⁾。GABAA受容体の主な作動薬の一つがベンゾジアゼピンであることや、本実験で認められた抗不安様作用は、ベンゾジアゼピン受容体を作用機序とする薬物の評価に適した試験系で得られたことから、かき抽出物含有食品に含まれる亜鉛あるいは亜鉛を含むペプチドがベンゾジアゼピン受容体を介して抗不安様作用を示した可能性が考えられた。

かき抽出物含有食品の作用機序に関するより詳細な研究が、今後は重要になると考えられる。

参考文献

- 1) 武田英二, 奥村仙示, 山本浩範, 竹谷豊 (2012), うつ病と栄養。四国医誌, 68: 3-8.
- 2) 杉田浩一, 平宏和, 田島眞, 安井明美 (2008) 日本食品大事典, 医歯薬出版株式会社, 東京: pp.415-416
- 3) 西堀頼史, 鈴木陽子, 岸浪昌礼, 藤澤紘, 永岡茂樹, 山崎則之, 松井博之, 松田芳和 (2011) カキ抽出エキスパウダーの安全性および機能性に関する報告。微量栄養素研究 28: 40-44.
- 4) Gaté L, Schultz M, Walsh E, Dhalluin S, Nguyen Ba G, Tapiero H, Tew KD (1998) Impact of dietary supplement of *Crassostrea gigas* extract (JCOE) on glutathione levels and glutathione S-transferase activity in rat tissues. In vivo 12:299-303.
- 5) 安部麻美子, 松田芳和, 小邨奈未, 吉田宗弘 (2010) カキ肉エキスを投与したラットの血清亜鉛濃度の変化。微量栄養素研究 27: 56-59.
- 6) Whittle N, Lubec G, Singewald N (2009) Zinc deficiency induces enhanced depression-like behavior and altered limbic activation reversed by antidepressant treatment in mice. Amino Acids 36:147-158.
- 7) Junzo Kamei, Masahiro Ohsawa, Minoru Tsuji, Hiroshi Takeda, Teruhiko Matsumiya (2001) Modification of the Effects of Benzodiazepines on the Exploratory Behaviors of Mice on a Hole-Board by Diabetes. Jpn J Pharmacol 86:47-54.
- 8) 辻稔, 武田弘志, 松宮輝彦 (2005) 基礎医学研究における情動性評価法: ホールボード試験の有用性。日薬理誌 126: 88-93.
- 9) Junzo Kamei, Masahiro Ohsawa (2000) Socio-psychological stress-induced antinociception in diabetic mice. Psychopharmacol 149:397-400.
- 10) 西田圭吾 (2011) アレルギー応答における亜鉛トランスポーターの役割。YAKUGAKU ZASSHI 131: 85-92.
- 11) Partyka A, Jastrzebska-Wiesek M, Szweczyk B, Stachowicz K, Slawinska A, Poleszak E, Doboszewska

U, Pilc A, Nowak G (2011) Anxiolytic-like activity of zinc in rodent tests. *Pharmacol Rep* 63:1050-1055.

- 12) Nikseresht S, Etebary S, Karimian M, Nabavizadeh F, Zarrindast MR, Sadeghipour HR (2012) Acute administration of zn, mg, and thiamine improves postpartum depression conditions in mice. *Arch Iran Med* 15:306-311.