エーテル暴露ラットの血漿ホルモンおよび マウス麻酔持続時間に及ぼす γ -アミノ酪酸 高含有カボチャ加工品の影響

奥山知子[§], 塚田陽康, 鶴澤昌好, 山田健二*

株式会社ロッテ中央研究所
* 東京薬科大学薬学部

Effect of Squash Product Enriched with γ -Aminobutyric
Acid on Relief of Stress of Rats and Mice

Satoko Okuyama[§], Kiyoyasu Tukada,
Masayoshi Uzawa and Kenji Yamada*

Central Laboratory, LOTTE Co., LTD.,
3-1-1, Numakage, Minami-ku,
Saitama-shi, Saitama 336-8601

* School of Pharmacy, Tokyo University of
Pharmacy and Life Science,
1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0392

Squash products are rich in γ -Aminobutyric acid. Animal experiments were performed in order to investigate that stress of rats and mice could be reduced by oral ingestion of a squash product. Oral administration of the squash product to rats were carried out single time and multiple times. Then the rats were given stress of smelling ether, and the quantities of adrenal-cortex stimulus hormone, serotonin and thyroid hormone in blood were measured as stress indices. As compared with the a control group without oral ingestion of the squash product, in the rats that had oral ingestion of 600 mg/kg/day squash product for 6 days, the amount of adrenal-cortex stimulus hormone fell significantly and the reduction in the amounts of serotonin and thyroid hormone was eased. Oral administration of the squash product to mice were also carried out, and then thiopental anesthesia time was measured. As compared with mice that didn't have oral ingestion of the squash product, thiopental anesthesia time was extended in the test group. We concluded that when provided to rats and mice, the squash product acted on their central nerves and had the effect of relieving their stress.

(Received Apr. 16, 2004 ; Accepted Sep. 10, 2004)

γ -アミノ酪酸はGABAと略称され、神経抑制作用などの機能があることがわかっている。さらに、血圧降下作用¹⁾、脳の新陳代謝促進作用²⁾、精神安定作用³⁾、腎機能改善作用等⁴⁾に効果がある物質としても近年注目されている。特にGABAの精神安定作用は、ストレス社会と言われる現代において、非常に注目されており、その効果確認のため

に、動物やヒトを対象とした実験が多数行なわれている⁵⁾。

今回我々は、当社で開発したGABA高含有カボチャ加工品(商品名: パンプキンギャバ)に精神安定作用、なかでもストレスを軽減する作用があることを確認するために、動物試験を行なった。カボチャ加工品は、カボチャに水とグルタミン酸を加えて攪拌し、カボチャ中の酵素の働きで、グルタミン酸をGABAに変換した、GABAを10%含む食品素材である⁶⁾。このカボチャ加工品をラットに投与し、血液中に分泌されるストレス指標ホルモン(副腎皮質刺激ホルモン、セロトニン、甲状腺ホルモン)量を測定することによって、中枢神経に対する影響を調査した。また、GABA高含有カボチャ加工品をマウスに投与し、チオペンタール麻酔持続時間を測定して、睡眠への影響を調査した。これらの結果、いくつかの知見が得られたので報告する。

1. 実験方法

被験試料にはカボチャ加工品を用いた。このカボチャ加工品は、カボチャに水とグルタミン酸を加えて攪拌し、カボチャ中のグルタミン酸脱炭酸酵素の働きで、グルタミン酸をGABAに変換した後、カボチャの固形分を取り除き、デキストリンを加えて乾燥させ、GABAが10%になるように調製した⁶⁾。成分組成を表1に示す。

実験動物は、生後7週令の雌性ラット(Wister系)及び生後6週令の雄性マウス(ddY系)を日本医科学動物資材研究所より購入し、実験用動物室(室温22±1℃、湿度53±3%)にて、1週間から2週間、固形飼料、自由飲水条件下で予備飼育した後実験に用いた。

薬理学的試験⁷⁾の単回投与は、ラットを1群5匹ずつに群分けし、各群(平均体重250.6±1.54~252.8±1.93g)にカボチャ加工品200, 600, 6000, 14400 mg/kgを5mlの水懸濁液とし、ゾンデを用いて強制経口投与した(14400 mg/kgはラットへの経口最大投与量)。投与1時間後にエーテル3mlをしみ込ませた脱脂綿入り小ビーカーを置いた蓋付プラスチックケージ(H 13 cm×W 20.5 cm×L 32 cm)に入れ、20分間放置した後、ヘパリン入り小試験管内に断頭採血した。血液は15分間放置後、遠心分離(3000 rpm, 15分間)を行って血漿を得た。対照群には、カボチャ加工品水懸濁液の代わりに5mlの水を強制経口投与し、カボチャ加工品投与群と同様エーテルストレスを与えた後に採血して血漿を得た。また、正常群は同様に5mlの水を投与した後、エーテルストレスを与えずに採血して血漿を得た。

また、連続投与はラットを1群5匹ずつに群分けし、各群(平均体重274.0±3.54~283.4±2.56g)に1日1回カボチャ加工品200, 600 mg/kgを単回投与と同様にして、3日間および6日間の連続投与を行なった。最終投与1時間後に単回投与と同様にエーテルストレスを与えた後採血

〒336-8601 埼玉県さいたま市南区沼影3-1-1

* 〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), okuyama_satoko@lotte.co.jp

し、血漿を得た。対照群は 5 ml の水を投与した後同様の操作を行った。また、正常群は同様に 5 ml の水を投与した後、エーテルストレスを与えずに採血を行なった。

採取した血漿については副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone: ACTH), セロトニン (5HT), 甲状腺ホルモン (遊離トリヨードサイロキシン: FT₃, 遊離サイロキシン: FT₄) を SRL (八王子, 東京) にて測定した。

行動学的試験では、マウスを 1 群 5 匹ずつに群分けし、各群 (平均体重 26.2±0.37~27.0±0.71 g) にカボチャ加工品 200, 600 mg/kg を水懸濁液として 3 日間及び 6 日間経口投与した。カボチャ加工品最終投与 1 時間後にチオペンタール (ラボナール 5G, 田辺製薬株式会社) 45 mg/kg を腹腔内投与後、正向反射がマイナスとなつてからプラスと

なるまでの時間を測定し、麻酔持続時間とした。

なお、実験結果の有意差検定は ANOVA によって行った。

2. 実験結果

カボチャ加工品の単回・連続投与時のラット血中 ACTH 量を図 1 に示した。ストレス負荷により血漿中 ACTH 量は急激に上昇し、正常群の約 15 倍となった。これに対してカボチャ加工品 200, 600 mg/kg の単回投与で ACTH 量の低下傾向が観察された。しかし、6000 mg/kg では変化がなかったが 14400 mg/kg では、無投与よりわずかに増加した。また、カボチャ加工品 200, 600 mg/kg の 3 日間連続投与によつては血漿中 ACTH 量に大きな変化を与えなかったが、6 日間連続投与によつて、600 mg/kg で、エーテルストレスにより増加した血漿中 ACTH 量

表 1 カボチャ加工品の成分組成

	エネルギー (Kcal/100 g)	水分 (g/100 g)	蛋白質* (g/100 g)	γ-アミノ酪酸 (g/100 g)	脂質 (g/100 g)	炭水化物**			灰分 (g/100 g)
						合計 (g/100 g)	カボチャ由来 (g/100 g)	デキストリン由来*** (g/100 g)	
カボチャ加工品	384	2.3	12.1	10.0	0.0	83.9	27.8	56.1	1.7

カボチャ加工品は、カボチャと L-グルタミン酸の混合物を反応させたものに、デキストリンを添加して γ-アミノ酪酸が 10% になるよう調製した。

* 蛋白質は遊離アミノ酸を含む。

** 炭水化物は 100 から水分、蛋白質、脂質、灰分の測定値を差し引いて算出した。

*** デキストリン由来の炭水化物はデキストリン添加量から算出し、カボチャ由来の炭水化物は炭水化物全体からデキストリン由来の炭水化物を差し引いて算出した。

図 1 ラット血漿中の副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 分泌量に対するカボチャ加工品投与の影響

A, 単回投与 □, 正常群 (カボチャ加工品無投与, ストレス負荷なし); □, ストレス負荷群; B, 連続投与 □, 正常群 (カボチャ加工品無投与, ストレス負荷なし); ■, 3 日間投与, ストレス負荷群; ■, 6 日間投与, ストレス負荷群。バーは標準誤差を示す。

* 6 日間投与・ストレス負荷群でのカボチャ加工品無投与および 200 mg/kg 投与群に対し、600 mg/kg 投与群は、危険率 5% 未満で有意差あり。

が有意に低下した。

カボチャ加工品の単回・連続投与時のラット血中5HT量を図2に示した。ストレス負荷により5HT量は正常群の半分に低下した。カボチャ加工品200, 600, 6000及び14

400 mg/kgの単回投与によって、いずれの投与量とも5HT量の低下を抑制する傾向にあり、6000 mg/kgでは正常群の80%以上まで回復した。また、3日間連続投与によつては、カボチャ加工品200, 600 mg/kgとも、エーテ

図2 ラット血漿中のセロトニン(5HT)分泌量に対するカボチャ加工品投与の影響

A, 単回投与 □, 正常群(カボチャ加工品無投与, ストレス負荷なし); ▨, ストレス負荷群; B, 連続投与 □, 正常群(カボチャ加工品無投与, ストレス負荷なし); ▨, 3日間投与, ストレス負荷群; ▩, 6日間投与, ストレス負荷群。バーは標準誤差を示す。

*6日間投与・ストレス負荷群でのカボチャ加工品無投与および200 mg/kg投与群に対し、600 mg/kg投与群は、危険率5%未満で有意差あり

図3 ラット血漿中の甲状腺ホルモン(FT₃, FT₄)分泌に対するカボチャ加工品投与の影響

A, 単回投与; B, 連続投与 □, 正常群(カボチャ加工品無投与, ストレス負荷なし)のFT₃; ▨, ストレス負荷群のFT₃; ▨, 正常群(カボチャ加工品無投与, ストレス負荷なし)のFT₄; ▩, ストレス負荷群のFT₄。バーは標準誤差を示す。

図 4 マウスのチオペンタール麻酔持続時間に対するカボチャ加工品投与の影響

□, 3日間投与; ■, 6日間投与. バーは標準誤差を示す.

ルストレスにより低下した 5HT 量の回復は観察できなかったが, 600 mg/kg の 6 日間連続投与によって, 5HT 量は有意に正常量まで戻った.

カボチャ加工品の単回・連続投与時のラット血中 FT₃, FT₄ 量を図 3 に示した. FT₃, FT₄ ともエーテル吸入により血漿中量は低下する傾向を示した. カボチャ加工品の単回投与においては, 投与量が多くなると両ホルモンとも低下傾向を示した. また, 3 日間連続投与によっては変化しないが, 6 日間連続投与によって正常レベルに戻った.

図 4 にカボチャ加工品連続投与時のマウスのチオペンタール麻酔持続時間の変化を示した. チオペンタール麻酔持続時間は対照群とカボチャ加工品投与群に有意差は認められなかった. しかし対照群に比較して, 投与群は麻酔持続時間が増加する傾向にあり, 600 mg/kg, 6 日間投与では無投与の 1.3 倍まで延長した.

3. 考 察

中枢神経系に多量に存在する GABA は, 抑制性のアミノ酸の一つとして知られている. 医薬品として, 現在までに抗不安薬, 抗てんかん薬, 睡眠導入薬等広く使用されている⁸⁾. また, GABA を含有する食品に精神安定作用があることも報告された³⁾.

今回は被験試料のカボチャ加工品に GABA が含まれていることを考え, ストレス抑制効果の有無についてエーテルストレスを中心に実験した. 実験動物がストレス状態にあるのかどうかは, 外観だけでは区別できないが, 血中に放出される副腎皮質刺激ホルモン, セロトニン, 甲状腺ホルモンなどの量の変動を観察することにより, 間接的に把握することができる⁹⁾. ラットにエーテルストレスを与えると, 血中の ACTH 量が上昇し, カテコールアミン量は減少することがわかっている⁷⁾. 今回の実験においても, エーテル吸入 20 分後に, 血漿中 ACTH 量は急激に増加

し, 5HT 量は有意に低下した. また, 基礎代謝レベルの指標である甲状腺ホルモン量も低下傾向を示したことから, エーテルストレスを与えることで, ラットがストレス状態になることが把握できた. このような血中ホルモン, 神経伝達物質の変化に対して, カボチャ加工品の前投与がいかなる効果をもつのかを観察すれば, 抗ストレス効果の有無が推察できると考えて実験を行った.

その結果, カボチャ加工品 600 mg/kg (GABA として 60 mg/kg) を 6 日間連続投与することによって, ACTH 量の有意な低下や, 低下した 5HT の回復, 甲状腺ホルモンの回復が観察できた. カボチャ加工品 14 400 mg/kg の単回投与によって, ACTH 量はわずかに増加したが, これは最大投与量であるため, 反対にラットに負荷をかけたと思われる.

実験の結果 ACTH 分泌抑制が認められ, カボチャ加工品にストレスを軽減作用があると思われた. 断定はできないが, この結果から推測すると, 投与されたカボチャ加工品中の GABA の一部は脳内に移行し, 中枢・視床下部へ作用していると考えられる. データは載せていないが, 今回ラットに試薬の GABA を 20 および 60 mg/kg を 6 日間連続投与して, カボチャ加工品と同様の試験を行なった. その結果, 血漿中の ACTH 量は対照群より減少し, 5HT 量と FT₃, FT₄ 量は対照群より増加しており, カボチャ加工品と同様の結果が得られた.

一方, マウスを用いたチオペンタール麻酔持続時間に及ぼす影響については, 対照群の結果のバラツキが大きく, 投与群の麻酔持続時間との有意差が認められなかった. しかし, 投与量に応じて麻酔持続時間が延長する傾向が認められた. 被験試料に催眠・鎮静作用があれば, マウスの麻酔持続時間は延長することがわかっている¹⁰⁾. このことから, カボチャ加工品には催眠・鎮静作用があると思われる.

以上のことから, カボチャ加工品にはストレスを緩和してリラックスさせる, 抗ストレス効果があるものと考えられる.

4. 要 約

GABA 高含有カボチャ加工品のストレスに対する効果を調べるために動物試験を行なった. カボチャ加工品をラットに投与し, エーテルストレス時のストレス指標とした, 血中のホルモン量を測定した結果, カボチャ加工品無投与群と比較して, 600 mg/kg の 6 日間連続投与をした場合には, ACTH 量の有意な低下と 5HT 量, 甲状腺ホルモン量の低下抑制が観察された. また, カボチャ加工品をマウスに投与した時のチオペンタール麻酔持続時間は無投与群に比べて延長した. これらの結果から, カボチャ加工品にはストレスを緩和する抗ストレス効果があるものと考えられた.

文 献

- 1) Takahashi, H., Sumi, M. and Koshino, F., Effect of γ -Aminobutyric Acid (GABA) on Normotensive or Hypertensive Rats and Men., *Jpn. J. Physiol.*, **11**, 89-95 (1961).
- 2) 塚田裕三, 脳の生理化学と臨床応用, 日本医師会雑誌, **42**, 571-579 (1959).
- 3) 岡田忠司, 杉下朋子, 村上太郎, 村井弘道, 三枝貴代, 堀野俊郎, 小野田明彦, 梶本修身, 高橋 励, 高橋丈夫, γ -アミノ酪酸蓄積脱脂コメ胚芽の経口投与における更年期障害及び初老期精神障害に対する効果, 食科工, **47**, 596-603 (2000).
- 4) 林 智, 斉藤ひろみ, 大森正司, 猪股智夫, 加藤みゆき, 澤井祐典, 深津修一, 袴田勝弘, 食塩負荷ラットの血圧および腎機能におよぼす嫌気処理茶(ギャバロン茶)の影響, 家政誌, **51**, 265-271 (2000).
- 5) 堀江典子, 東口伸二, 堀江健二, 金 武祚, 横越英彦, 早川 潔, GABA 高含有食品素材「ファーマギャバ」の開発, 食品工業, **46**, 60-66 (2003).
- 6) 鶴澤昌好, 奥山知子, 村田真由美, 佐藤良二, 大森正司, γ -アミノ酪酸高含有カボチャ加工品製造とそのラット血圧上昇抑制作用, 食科工, **49**, 573-582 (2002).
- 7) Ina, H., Yamada, K., Matsumoto, K. and Miyazaki, T., Effect of Benzyl Glucoside and Chlorogenic Acid from *Prunus mume* on Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) and Catecholamine Levels in Plasma of Experimental Menopausal Model Rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 136-137 (2004).
- 8) 西川 徹, GABA 系, *Clinical Neuroscience*, **14**, 404-407 (1996).
- 9) 井奈波良一, 渡辺信哉, 岡田 晃, 諸治隆嗣, マイクロ波全身暴露のラット血漿副腎皮質刺激ホルモン, 甲状腺刺激ホルモンおよび甲状腺ホルモンへ及ぼす影響, 日本衛生学雑誌, **46**, 639-645 (1991).
- 10) Bjeldanes, L.F., Kim, I.S. and Sedative Activity of Celery Oil Constituents. *J. Food Sci.*, **43**, 143-144 (1978)

(平成 16 年 4 月 16 日受付, 平成 16 年 9 月 10 日受理)