

解 説

脳機能と栄養における動物行動学的アプローチ

山田貴史

中部大学応用生物学部食品栄養科学科

要 旨

中枢神経機能は厳密に制御されているために、血液脳関門をもちいて中枢に侵入する成分を制御している。一方で、食品の影響を観察する栄養学においては、経口的に摂取した成分は消化器における消化、吸収あるいは体内での代謝を経て体内で作用する。すなわち、栄養学的研究においては、食品成分の体内動態を考慮した効果を評価する事が必要になり、実験動物を用いた研究手法は非常に有効である。特に、現在もそのメカニズム解明が進められている高次脳機能への影響を評価するためには、生体を用いた研究により脳機能変化の現象を観察する事は研究を進める上で非常によいアプローチとなる。そこで近年は、認知機能や情動行動を評価するための様々な実験動物行動手法が開発され、高次脳機能評価に利用されている。ここでは、これら高次脳機能の評価のための動物行動実験手法を紹介するとともに、これらを用いた栄養学的研究の実施例を紹介する。

キーワード: 実験動物行動試験, 脳機能, 栄養学

1. はじめに

近年、脳機能研究の発展により中枢神経系機能の解明あるいは脳疾患のメカニズムが少しずつ明らかになっている。しかしながら、アルツハイマー病などをはじめとした高次脳機能疾患を治療する事は非常に難しく、このような脳機能疾患は外科的手術により改善できるような血管性疾患などを除き、投薬治療においても根治できるものは少ない。したがって、現在では疾患に罹患するリスクを軽減するための予防が重要であると考えられる。罹患リスクを軽減するためには生活習慣の改善がひとつの有効な手段であり、特に食生活の改善は高い有効性があるのではないかと考えられる。例えば、認知症のひとつであるアルツハイマー病は、外科的手術方法はなく、アリセプトなどの治療薬によりアルツハイマー病の症状の悪化速度を緩和するための対処療法がとられる。対処治療に用いる薬は、脳内神経伝達物質であり記憶学習を司るアセチルコリンの分解を抑制することでアルツハイマー病の症状を緩和する。一方で、ヨーロッパを中心とする世界の様々な国ではイチヨウ葉から抽出されるエキスをアルツハイマー病に対する薬として用いている。

イチヨウ葉エキスは、その特有成分であるギンコライドに血管拡張効果や抗酸化能を有し、その作用により神経細胞の機能低下を抑制することで脳機能を維持できると考えられる。その他にも、アルツハイマー病では、タウタンパク質の異常凝集がその原因であるという説、神経栄養因子の分泌低下による神経細胞活性の低下、あるいは、要因はまだ明らかではないがアルツハイマー病特異的な脳糖代謝の低下が見られるなど、その病因および、予防・治療ターゲットは多岐にわたる。すなわち、アルツハイマー病治療に関する研究のターゲットも多岐にわたっており、様々な研究が進められている。精神疾患を含め、脳疾患治療のための技術は現在も模索状態であり、疾患にみられる現象を実験により詳細に再評価する事で、その予防・治療ターゲットが鮮明になる可能性もあると考えられる。

一方で、栄養学的研究では基本的に経口的な摂取による効果の有無が重要な要素のひとつになると考えられる。すなわち、経口的に栄養素を摂取し、消化管における消化・吸収を経た後に体内輸送あるいは体内で代謝され標的の組織に運ばれ作用を発揮する。また、サプリメント

ント等を除き、薬のように一定濃度の純品を決められた量摂取するわけではなく、様々な食品とともに継続的に摂取する事を基本的な考えとする。当然、作用機序解明のための基礎研究や有効濃度の検討などの基礎研究は必須であるが、実際に生体に栄養学的に摂取させた時の影響を観察し、期待される効果が得られるかを観察する事が必要である。

以上の事から、栄養学研究においては実験動物を用いた評価系が必要であり、特に脳の高次機能に関する研究では行動実験を用いた現象の観察が重要となる。そこで、次に高次脳機能評価のための評価系を紹介する。

2. 記憶学習能評価のための行動実験系

記憶学習能を評価するための実験系は非常に様々な種類がある。代表的な実験系としてまず、八方迷路試験、オペラント試験等がある。八方迷路試験はマウスなどのげっ歯類を用い、八方向に分かれた通路の先に置かれた餌のところに順次たどり着けるかを評価する試験であり、オペラント試験はパブロフの犬で知られているようにレバーを押す事により餌を得る事が出来るという因果関係を学習できるかを評価する試験系である。これらの評価系では、動物の摂食行動・食欲が影響するため、栄養学的研究においては、評価する栄養素によっては食欲の変化の有無などに対する注意が必要である。

その他に昔から広く用いられる研究法として、モリス水迷路試験や電気刺激回避試験がある。モリス水迷路試験とは、ラットやマウスなどを広めのプールに泳がせる試験である。動物はプールから回避しようと水泳するが、強制的な水泳から回避するためにはプール内の水面下にある僅かな足場の位置を覚える必要がある。この試験では、毎日の水泳を繰り返すことで、如何に足場のある位置まで時間をかけずに到達できるかを評価する。電気刺激回避試験においても、一定の大きさのフィールド内に電気刺激があるエリアと電気刺激がないエリアを設置し、如何に電気刺激があるエリアを回避できるかを評価する試験である。これら二つの試験に共通する因子は、情動に関するもので、特に不安感や恐怖感といった精神活動が影響する可能性がある。この場合、評価する群

間において、精神活動の変化があるようであれば、その変化が見かけ上記憶学習能の変化として表れる可能性があるため注意が必要である。加えて、モリス水迷路試験においては水泳能力など運動能力も評価要因のひとつとなってくる。栄養学的研究においては、情動に与える影響に加え、摂食量の変化や体重増加の変化による筋肉量の変化や運動能力の変化を確認する必要がある。体重の変化などは経過観察をすることができるが、運動量の変化については、別途運動量を評価する行動試験を併用するとよい。行動意欲や不安感に関する自発的行動量の測定については、オープンフィールドと呼ばれる天井の開いたような空間に動物を入れ、自発的に行動する距離や行動パターンを評価する。また、運動機能を評価するためには、ローターロッドと呼ばれる回転する棒の上に動物がどのくらい留まり続けることができるかを評価する。あるいは、トレッドミルと呼ばれるルームランナーのような装置でどのくらいの時間歩行運動を続ける事ができるかを評価する。

上述したように、動物行動試験では記憶学習を評価するための要因として、食欲、不安感あるいは行動量などが関わってくるため、記憶学習能の評価には注意が必要であり、可能であれば数種の実験系を組み合わせで評価する事が推奨される。近年ではこのような記憶学習能の評価に関わる要因が軽減された評価系も作成されている。その一つに、新奇物質探索試験がある。この評価系では、マウスやラットなどげっ歯類を用いる。マウスやラットを平坦かつ何も置かれていないある程度の広さのボックスに入れるとともに、動物よりやや小さめの物体（つみきのような物体）をボックス内に設置する。げっ歯類は新奇物体を探索して認識する習性があるため、数回のトレーニングによりこの物体を記憶させると物体に対する探索行動が減少していく。この探索行動のパターンを解析することで記憶学習能を評価する実験系である。この評価系は、動物の食欲には頼らず、不安感や運動能力などの因子も極力関与しない、実験動物へのストレス負荷も低い実験系であると考えられる。

新奇物質探索試験を用いた栄養学研究の実施例を一つ挙げる。緑茶葉中には、茶葉およびごく一部のきのこ類にしか含まれていないアミノ酸であるテアニン

(L-theanine)を含んでいる。このテアニンは血液脳関門を通過できることや、代謝型グルタミン酸受容体に親和性を持っている事が報告されており、グルタミン酸系神経伝達を介した脳高次機能に影響を及ぼす可能性がある(Yokogoshi H, et al., 1998)。そこで我々は、テアニンを2%含んだ飲用水を14日間連続で5週齢Wistar雄ラットに摂取させた後に新奇物質探索試験を実施した。この時、対照群であるテアニンを含まない水を摂取した群と比較し、テアニンを摂取した群の飼料摂取量および体重増加量には有意な変化は観察されなかった。新奇物質探索試験では、まず最初に観察する物質を記憶するためのトレーニングセッションを1日5分間で連続3日間行った。トレーニングでは、全く同じ形状の物体を二つボックス内に設置し、その両方を均等に認識するようにした。その後、トレーニングで使用した物質の片方だけを新奇物質に変え、3分間のテストセッションを3日間連続で行った。その結果、テアニン水摂取群で新奇物質に対する探索行動量の有意な増加が観察された。またこの時に、オープンフィールド試験により自発行動量および行動パターンを評価したが、両群に自発運動量および行動様式の差は観察されなかった。以上のことから、テアニンの摂取による記憶学習能の向上効果が示唆された(Yamada T, et al., 2008)。

3. 情動評価のための行動実験系

情動行動を評価する実験系としては主に、不安行動を評価する実験系とうつ症状を評価する実験系がある。抗不安行動を評価する実験系として代表的なものには高架式十字迷路試験、うつ症状を評価する実験系として代表的なものには強制水泳試験がある。

高架式十字迷路では、高さのある十字型の通路を用意し、その十字通路の2方向には壁を設置し、残りの2方向は壁のない通路となる。迷路という名称であるが十字になっており複雑な曲がり角などはない作りになっている。この迷路の上に動物を置き、滞在するエリアの滞在時間を観察する。げっ歯類が不安感を強く感じていると壁の存在する通路であるクローズドアームに滞在する割合が高くなり、逆に不安感が低いと、この装置上からの逃避を図るために壁のないオープンアームに侵入し、脱出経

路を探索する行動を取るため、オープンアームに滞在する割合が高くなる。

強制水泳試験は動物行動実験においてうつ様行動を評価する代表的な実験方法であり、抗うつ薬の評価にも利用されている。この試験では円筒状の筒に、動物(げっ歯類)の足が着かない深さに水を入れ、その中にげっ歯類を泳がせた時の逃避行動(水泳行動)の程度を評価する。通常の動物を筒に入れると、状況を回避しようとして水泳行動を続けようとするが、うつ様行動が観察される動物では、筒に入れた後に水泳行動をやめて浮かんだ状態からそれに近い行動を取る。この試験では、この回避行動を行わない無道時間の長さを用いてうつ様行動を評価する。

情動行動試験を用いた栄養学研究の実施例の一つ挙げる。ココアやチョコレートの原料となるカカオマスはカカオ豆から抽出される成分であるが、カカオマス中にはテオブロミン(theobromine)という情動や集中力に影響を及ぼすとされる物質が含まれる。そこで我々は、カカオマスの単回投与、または継続的摂取が情動行動に及ぼす影響を、高架式十字迷路を改良した試験である高架式T字迷路試験を用いて評価した。高架式T字迷路試験は十字迷路と同じく不安行動の評価ができる実験系であるが、思考を伴う不安の尺度である条件不安(回避行動評価)と、パニック性の不安のような思考を伴わない不安の尺度である無条件不安(逃避行動評価)の2つを分離して評価する事ができる事が特徴である。高架式T字迷路実験は、高架式十字迷路のようなオープンアームが2経路とクローズドアーム1経路からなるT字型の装置である。条件不安(回避行動評価)では、まず動物をクローズドアームに投入する。げっ歯類は本能的に壁のないオープンアームに出ることに非常に強い不安を感じるが、その習性を利用し、動物が置かれた状況から回避するためにオープンアームに侵入できるかを評価する。すなわち、オープンアームへ侵入するまでの時間が短ければ条件不安が低いと評価する。一方で、無条件不安(逃避行動評価)では、まず動物をオープンアームに投入する。この時動物は無条件に不安を感じる事となり、不安強度が強いほど飛び出すように走り出しクローズドアーム入口に到達すると速やかに壁のあるエリアへ

逃げ込む行動をとる。すなわち、無条件不安の評価ではクローズドアームに逃避するまでの時間が短いほど不安尺度が高いと評価される。我々は Wistar 雄ラット 10 週齢を用い、単回投与実験ではゾンデを用いた経口投与の 1 時間後に行動試験を実施し、継続摂取実験では 2% カカオマスを含んだ飼料を 14 日間継続摂取させた後に行動試験を実施した。まず、無条件不安(逃避行動評価)については、単回摂取および継続摂取の両方でカカオマス摂取の影響は観察されなかった。一方で、条件不安(回避行動)の評価では、カカオマスの単回投与では不安は抑制されたが、長期摂取では反対に不安行動が惹起されるという現象が観察された。これは、カカオマスの適度な摂取では不安は軽減されるが、慢性的な摂取では、中毒様症状が引き起こされる可能性を示している。この結果については、どの程度の量の摂取あるいは期間で作用が反転するかを精査する必要があるが、栄養学的に興味深い知見である(Yamada T, et al., 2009)。

4. まとめ

上述した以外にも、脳機能の評価するための動物行動実験は様々ある。これらの実験を実施する上で注意すべき事は、記憶学習能を評価するためにどのような因子が記憶学習能の評価に関係しているかを理解し、必要であれば別の実験系を用いて、例えば記憶学習試験と情動行動試験を併用するなど多角的に評価する事も必要である。また、複数の記憶学習試験を実施する事も有効である。また、その他にも実験に用いる月齢や性別、系統などにも注意を払う必要がある。例えば、Fisher 系ラットは、Wistar 系ラットや SD 系ラットよりも行動量が多く、迷路試験などではその特性を理解して用いる必要がある。

最後に、今回は行動実験系の栄養学的研究ツールとしての利用法を、実験例を挙げ示してきた。動物行動実験は、動物を屠殺することなく評価できることが利点の一つであるため、本来中長期的な摂取を想定する食品あるいは機能性栄養素摂取の影響を評価するためには非常に有効なツールの一つではないかと考えられる。特に脳機能のように、多様な要素によりその機能が発揮される臓器をターゲットにした場合には、食品摂取の効果を

現象として捉える事は、我々が食品の影響を正しく理解し、摂取する食品を正しく選択するための有効な情報の一つになり得ると考える。

参考文献

- Yokogoshi H, et al., Effect of theanine, r-glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rat. *Neurochemical Research*, 23 (5), 667-73, 1998
- Yamada T, et al., Effects of theanine, a unique amino acid in tea leaves, on memory in a rat behavioral test. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72, 1356-1359, 2008.
- Yamada T, et al., Anxiolytic effects of acute and chronic administrations of cacao mass in rats elevated T-maze test. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 948-955, 2009.
- Title :** Ethological approaches for nutritional brain sciences.
- Author :** Takashi Yamada
- Address:** Department of Food & Nutritional Sciences
College of Bioscience and Biotechnology
- Keywords :** behavioral analysis of experimental animals, brain function, nutritional science