

香気成分 (2-Phenylethanol) がグルタミン酸トランスポーター に与える影響について

栗 脇 淳 一

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第62号抜刷）

論 文

香気成分(2-Phenylethanol) が グルタミン酸トランスポーターに与える影響について

Effect of fruits flavor components (2-Phenylethanol) on
L-glutamate uptake activity in cultured rat astrocytes

栗脇 淳一^{1)†}

要 旨

植物等のもつ香りの薬理効果については、古来より経験・伝承的に我々は知っている。しかしながら、最近の研究によりその効果が徐々に科学的に明らかにされてきている。本研究では、うつ病発症とかかわりの深いアストロサイトグルタミン酸トランスポーターの機能に対し、果実香気成分(2-Phenylethanol) がどのような影響を与えるかについて検討を行った。本研究の結果から、2-Phenylethanol の暴露によりアストロサイトグルタミン酸トランスポーターの機能が亢進することが明らかとなった。

キーワード：うつ病 2-Phenylethanol アストロサイトグルタミン酸トランスポーター

序 論

近年、植物の香気成分が人体に様々な影響を及ぼすことが明らかとなっている。例えば、ラベンダーの香り¹⁾およびジャスミン茶の香り²⁾は副交感神経の活動を刺激する作用を持つことが報告されている。また、果実の香りについても柑橘類の香気成分の暴露により脳内の神経伝達物質の濃度に影響を与え、また動物の行動にも影響を与えるという報告^{3),4)}や、交感神経活動を高め、副交感神経(迷走神経)活動を抑制する^{5),6)}といった報告がある。

一方、グルタミン酸は中枢神経系において興奮性神経伝達物質として重要な役割を持つ反面、過剰に分泌されることで、神経細胞障害作用を示し、様々な精神疾患に関与しているということが知られている。脳内におけるグルタミン酸濃度はグリア型グルタミン酸トランスポーターにより厳密に制御されている。それゆえに、グリア型グルタミン酸トランスポーターの異常により精神疾患を発症する患者が一定の割合存在する

ことが報告されている^{7),8)}。

そこで本研究では、脳内のグルタミン酸濃度の制御に重要な働きを持つアストロサイトグルタミン酸トランスポーターのグルタミン酸取り込み機能への果実香気成分(2-Phenylethanol) 暴露の影響について検討した。2-Phenylethanol は、生食用のぶどう品種である竜宝および巨峰などに多く含まれる香気成分である⁹⁾。

方 法

1. 動物

実験には10週齢の雌ラット(Wistar)2匹を用いた。動物は個別のケージで飼育し、室温24℃、湿度60%、明期8時-20時・暗期20時-8時の条件で飼育し、飼育期間中の飼料および水は自由摂取とした。また、動物の飼育および実験は美作大学・美作大学短期大学部動物実験に関する指針に基づいて行った。

1-1. 妊娠ラット

雌ラットは、動物飼育室へ搬入後、1週間の馴化期

1) 美作大学短期大学部 栄養学科 † 責任著者

間をおき実験を開始した。馴化期間後、スメア検査を行い性周期を把握し、同種・同週齢の雄ラットと24時間同一ケージで飼育し、翌日スメアプラグの有無により交配が行われたことを確認した。また、交配を確認した日を妊娠0日として、実験日（脳細胞の採取）まで個別に飼育した。

1-2. 仔ラット

出生後、仔ラットは母ラットと同一のケージで飼育した。出生後3日目に大脳皮質よりグリア細胞を含む脳細胞の採取を行った。

2. アストロサイトの単離と培養¹⁰⁾

氷冷麻酔下、新生3日目のラットの脳を無菌的に摘出した。氷冷したリン酸緩衝液(PBS)中、実体顕微鏡下で大脳皮質領域を切り取った。摘出した大脳皮質をメスで細断し、0.25%トリプシン、0.01% DNase Iの酵素液とともに37°Cの恒温水槽内で40分間インキュベートし、酵素処理を行った。2 mLのfetal bovine serum (FBS)を加えて反応を止め、1500 rpmで5分間遠心後、上澄を除去し、10% FBS、1% PSA含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)を2 mL加え、ナイロンフィルター(40~45 μm)でろ過して単離細胞浮遊液を得た。単離細胞浮遊液は、10% FBS、1% PSA含有DMEM 50 mLで希釈し、底面積75 cm²のプラスチックフラスコ(corning)に播種して、37°C、5% CO₂-95% airの条件下で培養した。播種1日後に全量培地交換を行い、以後3~4日毎に培地交換しアストロサイトが単層石垣状(confluent)になるまで10日から15日間培養を続けた。アストロサイトがフラスコ底面にconfluentになった後、フラスコを振とうさせアストロサイト以外の細胞を除去し、再びconfluentになるまで培養した。0.1% trypsin-EDTA 2.0 mLで10分間37°Cでインキュベートし、酵素処理を行うことによりアストロサイトを剥離し等量の培地を加え、1500 rpmで5分間遠心して得た細胞分画を培地で再分散し、96 wellプレートに4~6×10⁴ cell/cm²の密度で再播種後、37°C、

5% CO₂-95% airの条件下で培養した。

3. 薬物処理

今回の実験では、ブドウの香気成分として2-Phenylethanolを用いた。2-Phenylethanolの100 mMストック溶液を、使用直前にDMEMにて希釈した。薬物の暴露濃度は、0 M、1 pM、1 nM、1 μM、1 mMとし、全量培地交換により24時間薬物暴露を行った。

4. L-glutamate 取り込み活性の測定

Abeらの方法¹¹⁾に従い、アストロサイトのL-glu取り込み活性を評価した。L-gluを100 μMの濃度で添加し、37°C、5% CO₂-95% airの条件下で60分間インキュベート後、各wellから50 μLの培地を96 wellプレートに分取した。分取した培地に50 μLの assay bufferを加え7分後にstop solution 100 μLを加え反応を終了した。96 wellプレートはマイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。測定波長は570 nmとした。既知の濃度のL-glu希釈系列により検量線を引き、残留L-glu濃度を算出した。この条件ではL-glu自然分解が起こらないことは既に確かめられている。

結 果

2-Phenylethanol 暴露によるグルタミン酸トランスポーターへの影響 (図1)

2-Phenylethanol 暴露群と対照群との間で、24時間薬物暴露後の残留L-glu濃度の平均値を比較した。

1 nM、1 μM、1 mMの濃度での2-Phenylethanol 暴露で対照群と比べ残留L-glu濃度が有意に減少した。しかし、1 pMの濃度での2-Phenylethanol 暴露では対照群と比べ残留L-glu濃度に有意な差は見られなかった。また、いずれの濃度においても2-Phenylethanol 暴露による細胞毒性は観察されなかった。

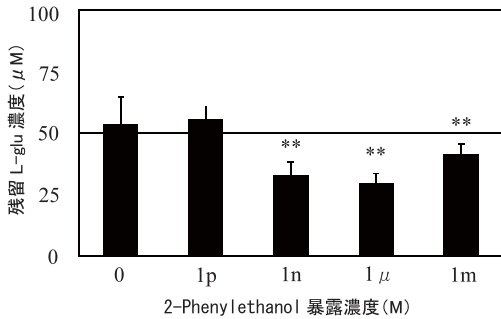


図1 L-glutamate 取り込み活性の測定における残留 L-glu 濃度の比較
 平均値±S.D.、縦軸：残留 L-glu 濃度 (μM)、横軸：2-Phenylethanol 暴露濃度 (M, n = 12) (**: p<0.01, tukey's test following ANOVA)

考 察

本実験では、古来より多くの人々に食されている、ブドウに含まれる香り成分 2-Phenylethanol 暴露がアストロサイトグルタミン酸トランスポーターへ与える影響について検討した。

今回の実験で、1 nM、1 μM、1 mM の濃度での 2-Phenylethanol 暴露により対照群と比べ残留 L-glu 濃度が有意に減少した。これらの結果から、1 nM、1 μM、1 mM の濃度で 2-Phenylethanol を暴露することでアストロサイトグルタミン酸トランスポーターの機能を亢進することが明らかとなった。

うつ病をはじめ統合失調症、強迫性障害、自閉症などの精神疾患には、グリア型グルタミン酸トランスポーターの機能障害により脳内グルタミン酸濃度が上昇することがその要因の一つであることが報告されている¹²⁾。グルタミン酸トランスポーターには 5 種のサブタイプがあることが明らかとなっているが、その中でも脳内の過剰なグルタミン酸の除去には、主に小脳のアストロサイトに存在する GLAST (Glial glutamate transporter) と大脳皮質や海馬のアストロサイトに存在する GLT-1 (glutamate transporter subtype 1) の活性によることが明らかとなっている^{13),14)}。本実験で用いたアストロサイト初代培養細胞は、大脳皮質領域より採取した細胞である。よって、今回の実験結果は 1 nM、1 μM、1 mM の濃度での 2-Phenylethanol の暴露により、アストロサイトグルタミン酸トランス

ポーターのサブタイプの一つである GLT-1 の活性を促進したことを示唆しているものと考えられる。

今回の研究から、植物の香り成分として広く自然界に存在する物質である 2-Phenylethanol が、うつ病の症状改善またはその予防に有用である可能性が *in vitro* の実験系において示唆された。この結果をさらに検証するために、うつ病モデル動物を用いて 2-Phenylethanol の抑うつ行動改善効果について *in vivo* 実験系において検討する予定である。

今後は、他の食品および植物の香り成分についてアストロサイトグルタミン酸トランスポーターのグルタミン酸取り込み機能への影響について検討し、ストレスに苦しむ方々のストレスの軽減および気分の改善に貢献したいと考えている。

参考文献

1. 由留木裕子、鈴木俊明 「ラベンダーの香りと神経機能に関する文献的研究」 関西医療大学紀要. 2012; 6:109-119.
2. Inoue N, Kuroda K, Sugimoto A, Kakuda T, Fushiki T. Autonomic nervous responses according to preference for the odor of jasmine tea. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003; 67(6): 1206-14.
3. Fukumoto S, Sawasaki E, Okuyama S, Miyake Y, Yokogoshi H. Flavor components of monoterpenes in citrus essential oils enhance the release of monoamines from rat brain slices. *Nutr Neurosci.* 2006; 9(1-2): 73-80.
4. Zhou W, Yoshioka M, Yokogoshi H. Subchronic effects of s-limonene on brain neurotransmitter levels and behavior of rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2009 ; 55(4): 367-73.
5. Tanida M, Nijima A, Shen J, Nakamura T, Nagai K. Olfactory stimulation with scent of essential oil of grapefruit affects autonomic

- neurotransmission and blood pressure. *Brain Res.* 2005; 1058(1-2): 44-55.
6. Shen J, Nijima A, Tanida M, Horii Y, Maeda K, Nagai K. Olfactory stimulation with scent of grapefruit oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neurosci Lett.* 2005; 380(3): 289-94.
7. Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2007; 62(11): 1310-6.
8. Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Fujimoto M, Otsuki K, Yamagata H, Hobara T, Abe N, Higuchi F, Shibata T, Hasegawa S, Kida S, Nakai A, Watanabe Y. Impaired hippocampal spinogenesis and neurogenesis and altered affective behavior in mice lacking heat shock factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(4): 1681-6.
9. 平野健、安原正幸、岡本五郎 「生食用ブドウの香り成分について」*岡山大学農学誌.*1994; 83: 1-7.
10. Sato K, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K. Estrogens inhibit l-glutamate uptake activity of astrocytes via membrane estrogen receptor alpha. *J Neurochem.* 2003; 86(6): 1498-505.
11. Abe K, Saito H. Possible linkage between glutamate transporter and mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem.* 2001; 76(1): 217-23.
12. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1988; 1(8): 623-34.
13. T Shibata, M Watanabe, K Tanaka, K Wada, Y Inoue.
Dynamic changes in expression of glutamate transporter mRNAs in developing brain. *Neuroreport.* 1996; 7(3): 705-9.
14. Tanaka K. Role of glutamate transporters in the pathophysiology of major mental illnesses. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* 2009; 29(4): 161-4.