

柑橘類香気成分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

The effects of citrus fruits flavor components to
L-glutamate uptake activity of cultured astrocytes in rats.

栗 脇 淳 一¹⁾

キーワード：うつ病 ペリリルアルコール グリア型グルタミン酸トランスポーター

序論

近年、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、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^{1),2)}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^{3),4)}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^{5),6)}。

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柑橘類香気成分の影響について検討した。

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週間の馴化期間をおき実験を開始した。馴化期間後、スミ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、翌日スミ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⁷⁾

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℃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。2mLのfetal bovine

1) 美作大学短期大学部 栄養学科

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 cm^2 のプラスチックフラスコ (corning) に播種して、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 - 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\times 10^4$ cell/ cm^2 の密度で再播種後、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 - 95 % air の条件下で培養した。

3. 薬物処理

リモネンの代謝物であるペリリルアルコール 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 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 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⁸⁾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 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 - 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

ペリリルアルコール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)

ペリリルアルコール暴露群と対照群の間に有意な差は見られなかった。また、ペリリルアルコール暴露濃度の違いによるグルタミン酸トランスポーターの L-glu 取り込み量に有意な差は見られなかった。

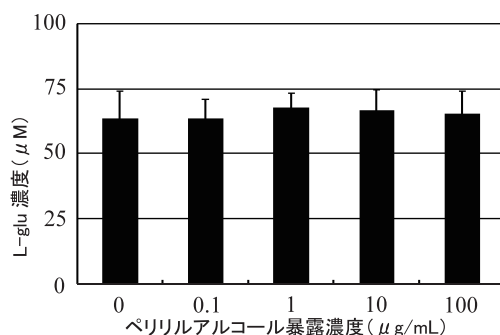


図 1 L-glutamate 取り込み活性の測定における残留 L-glu 濃度

縦軸：残留 L-glu 濃度 (μM)、横軸；ペリリルアルコール暴露濃度 ($\mu\text{g/mL}$ 、 $n=12$) (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、経験的にその薬理的な作用が知られている柑橘類について、その香り成分として代表的なりモネンの代謝物であるペリリルアルコールのアストロサイトグルタミン酸トランスポーターへの影響について検討した。

今回の実験ではリモネンの代謝物であるペリリルアルコール暴露による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は見られなかった。

しかしながら、リモネンの腹腔内投与により脳内のリモネン代謝産物濃度が増加し、神経伝達物質の放出促進効果が報告されている^{1),2)}。また、ヒトを対象とした研究において、精神的なストレスがある状態でリ

モネンを主な香気成分とするグレープフルーツ精油の香りをかいだ場合、状態不安を軽減し、覚醒水準を上昇させるといった報告がある⁹⁾。

これらのことから、リモネン代謝物が人体においてストレス軽減効果および気分改善効果を持つことが推定される。現在、リモネン代謝物の暴露濃度および暴露時間の設定を変更し、ペリリルアルコール暴露による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を検討中である。

今後は、他の食品および植物の香気成分についても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. 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 Feb-Apr; 9(1-2): 73-80.
2. Zhou W, Yoshioka M, Yokogoshi H. Sub-chronic effects of s-limonene on brain neurotransmitter levels and behavior of rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2009 Aug; 55(4): 367-73.
3. 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 Oct 5; 1058(1-2): 44-55. Epub 2005 Oct 5.
4. 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 Jun 3; 380(3): 289-94. Epub 2005 Feb 5.
5. Hashimoto K, Sawa A, Iyo M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry*. 2007 Dec 1; 62(11): 1310-6.
6. 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 Jan 25; 108(4): 1681-6.
7. Sato K, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K. Estrogens inhibit l-glutamate uptake activity of astrocytes via membrane estrogen receptor alpha. *J Neurochem*. 2003 Sep; 86(6): 1498-505.
8. Abe K, Saito H. Possible linkage between glutamate transporter and mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem*. 2001 Jan; 76(1): 217-23.
9. 松村仁、森千鶴、永澤悦伸、福澤等 「精神負荷に対するグレープフルーツの香りの効果」山梨医大紀要. 2000; 17 : 42-7.

