

ストレスがn-3系脂肪酸摂取ラットの攻撃・不安行動に及ぼす影響

坂井 恵子, 湯田 有紗, 白澤 優, 川平恵里奈
森 美奈子, 迫田 美穂, 海老原綾子

要 旨

血漿脂質上昇抑制や体脂肪蓄積抑制の機能を持つn-3系脂肪酸が、ストレス状態における攻撃行動と不安行動に及ぼす影響について同様の機能を持つ1,3 ジアシルグリセロール（以下1,3DG）と比較検討を行った。ラットは4週令より、n-3系脂肪酸を含む鰵節群、魚油群、1,3DG群に分け、それぞれの群でコレステロール添加の有無により飼育された。

ストレス状態では、ラットの体重はストレス無し群に比べて各食餌群ともに低い傾向であった。攻撃行動は、コレステロール添加により鰵節群は変化しなかったが、魚油群と1,3DG群では有意に低下したのが認められた。魚油群のストレスがない状態での攻撃性は、コレステロール添加に関わらず1,3DG群より有意に低いのが明らかとなった。ストレスがかかると魚油群の攻撃性はストレス無群より低下し、コレステロール添加でも6週目以降では減少した。しかし、長期のストレス状況下になると、コレステロール添加の魚油群は、ストレス無群の各群に対してよりも強い攻撃性を示した。一方、不安行動では、鰵節群と魚油群は、コレステロール無し群に比べてコレステロール添加群の方に強い不安傾向が認められた。対照的に、1,3DG群では、ストレス無しの状況ではコレステロール添加により逆に不安の軽減が認められた。

血漿中の総コレステロール量は、ストレスが加わると各群ともに上昇傾向が認められた。対照的に、肝臓ではコレステロール添加により各群とも著しく有意に増加したが、ストレスが加わるとさらに鰵節群と魚油群での有意な増加が認められた。一方、1,3DG群ではコレステロール添加により有意に増加したがストレスの影響はみられなかった。トリグリセライド（TG）は、肝臓においてストレスにより各群とも有意な増加が認められた。血漿中のHDL-コレステロール量はストレスにより各群とも有意に低下し、特にコレステロール添加群で著しいのが認められた。

以上の結果より、血漿脂質上昇抑制機能を持つn-3系脂肪酸、鰵節、1,3DGであるが、ラットの攻撃行動や不安行動では異なる機能を持っていた。そして、ストレスおよびコレステロール添加により変化することが示された。コレステロール添加により血漿脂質の変化はみられなかったが、肝臓では各群ともに著しいコレステロールの有意な増加やTGの増加をみた。結論として、血漿脂質上昇抑制機能のある脂質でもストレス状況下では攻撃行動や不安行動において異なることから、目的に応じた脂質の選択をすることにより行動の制御につながる可能性が示唆された。

キーワード：ストレス、攻撃行動、不安行動、n-3系脂肪酸、コレステロール

緒 言

うつ病が最近では社会的に増加してきている。それは、診断方法が「うつ状態を呈する症候群」である大うつ病に分類されるようになったため患者数が増えたこととうつ病の原因がまだあきらかになっていないことにあるとされている。いづれにしても脳に病的な変化が起きた状態である。さらに、ストレスは神経細胞突起を縮小したり¹⁾、脳由来神経栄養因子（Brain-derived Neurotrophic Factor : BDNF）を減少させたり^{2,3)}して脳機能に変化を起こしている可能性が示唆されている。ストレスに対する感受性が高いとわずかなストレスで発症するが、ストレスが強いとどんな人でも発症の危険性は高くなる⁴⁾。ストレスを受けると交感神経が緊

張し、恐怖などをともない「闘争か逃走」のどちらかが強くなるといわれている。言い換えれば攻撃・不安などの情動行動である。一方では、ストレスの情報は視床下部からコルチコトロピン放出ホルモン（Corticotropin-Releasing Hormone : CRH）を放出し、それが下垂体から副腎皮質刺激ホルモン（Adrenocorticotrophic hormone : ACTH）の分泌を促し、次に副腎からコルチコステロン（コルチゾール）の放出に伝達され、ストレスに対して防御の体制をつくるのである。コルチコステロンはコレステロールから体内で合成される。

そこで、本研究ではストレス状態における脂質栄養の関与について、特に血漿脂質上昇抑制・体脂肪蓄積抑制機能を持つn-3系脂肪酸と1,3DGについてコレステロール有無との関係を介してストレス状況下における攻撃行動・不安行動について明らかにし、ヒトでの食生

活を通してうつ病を予防する基礎データとすることを目的とした。

方 法

動物実験：Sprague-Dawley（以下SD）系雌ラット（SLC, 静岡）の4週令を無作為に各食餌群（各群4～6匹）に分け、実験飼料（図1-A,B）にて4～11週間飼育した。実験飼料は脂質6%を含む鰹節群、魚油群、1.3DG群とこれらの群の脂質の2%をコレステロールに置き換えた各群で行った。鰹節は枕崎産の新鮮なもの、魚油はJ.R.Carlson Laboratories Inc.(Norway), 1.3DG

は植物性ステロール含有：1.3DG(+)と含有していない：1.3DG(-)の市販品を使用した。たんぱく質は20%として鰹節群は鰹節由来のたんぱく質であり、その他の群はたんぱく質源としてカゼインを用いた。これら以外の栄養素はすべて全群共通の試薬を使用して調製したのち、-20℃に保存し1週間以内に消費した。餌は各群同量を毎日投与し、残量を記録した。水は自由に与えた。飼育は25℃、12時間明暗周期の室温条件下で行った。本報の動物実験は鹿児島純心女子大学動物実験指針に従って行われた。

ラットの各食餌群を含むグループはストレス無し群

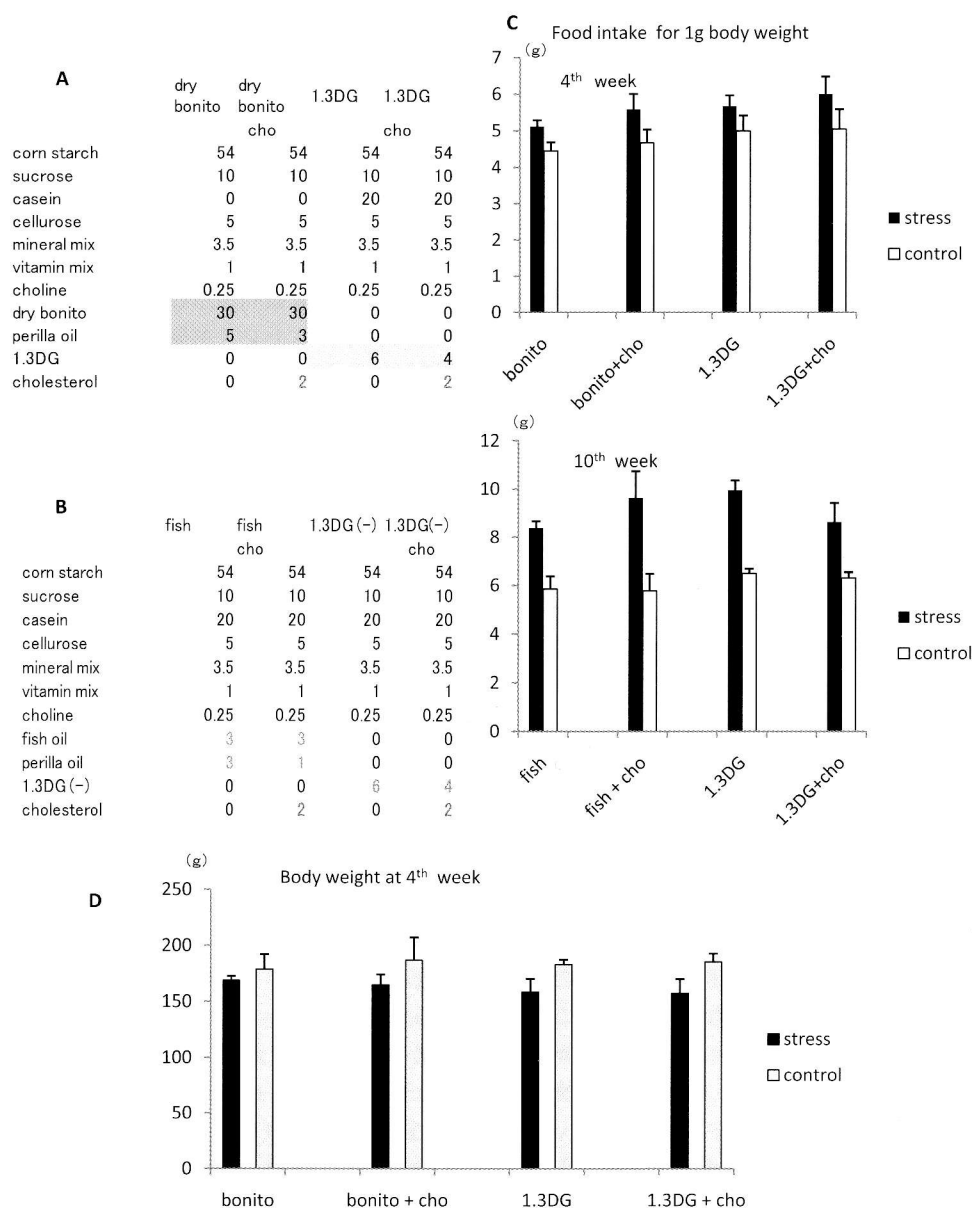


Fig. 1

A, B : Experimental diet for rats

1.3 DG : sn1,3-diacylglycerol containing plant sterol, 1.3DG(-): without plant sterol

C : Food intake to get 1g body weight by stress

Rats in each group were feeded same amount of diet everyday, and measured the remained food on the next day. The values were calculated by consumed food/ increased body weight

D : Body weight at 4th week by stress

(コントロール群) とストレス負荷群とに分けた。ストレス負荷群は、ラットを飼育全期間メタルの格子のみで造られたケージで飼育し、コントロール群は全期間を木片チップ床のプラスチックケージで飼育を行った。

体重測定：一週間1回、4週令から実験最終週まで行った。

行動実験：実験飼料で飼育後2週目より攻撃行動実験および不安行動実験を開始した。攻撃行動実験はラットの胴体の大きさと等しい筒の中に両側から同時に放ち入れ、先に押し出されるかあるいは退却によって筒から出た方を負けとして行った(図2-A)。対戦時間は最大3分間とし、勝負がつかないときは引き分けとした。不安行動実験は、高架式ゼロ迷路試験(図2-B)と高架式十字迷路試験(図2-C)を用いて行った。いずれも実験時間は5分間とし、床から60cm~100cmの高所から壁のない領域部分(open field)に滞留した時間および退却回数・立ち上がり・毛づくろい・髭の動きなどの行動の観察を行った。

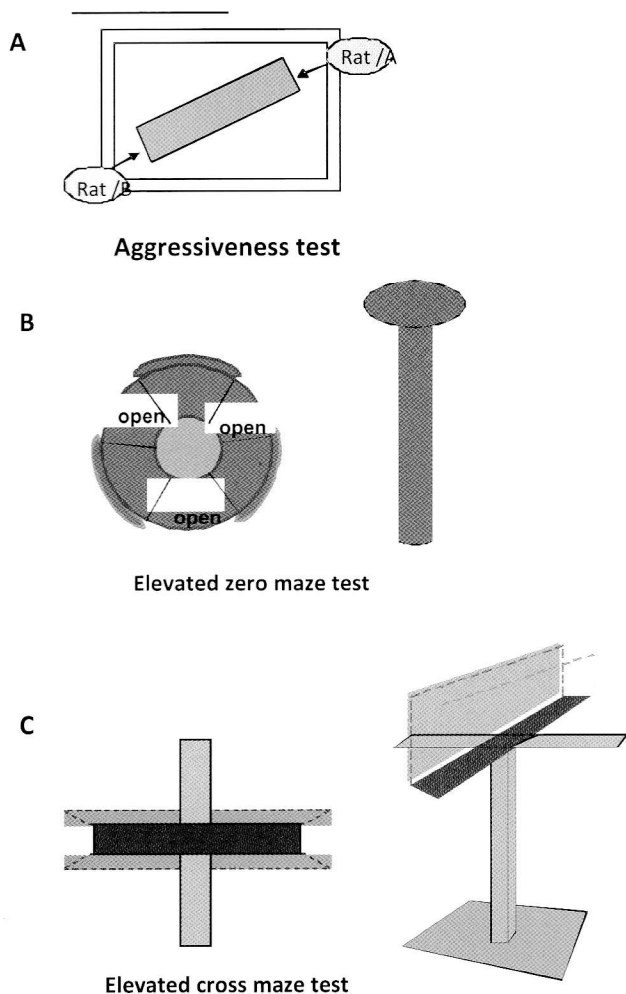


Fig.2 Experimental equipment for the behavior test

- A : Aggressive test
- B : Elevated zero maze test
- C : Elevated cross maze test

生化学的測定：ラットは実験終了後ネブタール麻酔下で、ヘパリンを抗凝固剤として心臓採血により失血死した。その後、肝臓を摘出し測定するまで血液とともに -80°C にて保存した。

総コレステロール、HDL-コレステロール、トリアシルグリセライド(TG)の定量はそれぞれWakoのキットで会社のプロトコールに従って行った。

結 果

体重：飼料は毎日各群ともに同量を投与して翌日残量を測定した。各群ともストレスが加わると1g当りの体重の増加に必要な摂取量がストレス無(コントロール)群に比べてより多量であった。(図1-C)。この結果、体重はストレス負荷群はストレス無し群に比べて減少傾向であった(図1-D)。鰵節群と魚油群に比べて1.3DG群の体重は低い傾向であったが有意な差はみられなかった(data not shown)。

攻撃行動実験：ストレス無しの場合、魚油群と1.3DG群はコレステロール添加により攻撃性が有意に低下したのが認められたが、鰵節群はコレステロール添加により攻撃性が増える傾向がみられた(図3-A)。そして、ストレス無しの場合、魚油に比べて1.3DGはコレステロール添加の有無に関わらず攻撃性が有意に高いのがみられた(図3-B)。ストレス状況下の攻撃性は、魚油群がコレステロール添加の有無に関わらず低下する傾向が認められた(図3-C)。ストレス状況下の1.3DG群でも攻撃性はストレス無群に比べて低下傾向であった。この結果、魚油群と1.3DG群では、ストレス状況下の攻撃性にコレステロール添加の影響は少ないことが明らかとなった。しかしながら、長期のストレス状況下のコレステロール添加の魚油群のラットはコントロール群の魚油群や1.3DG群のコレステロール添加の有無に関わらず攻撃性が著しく強くなることが認められた(図3-D)。

不安行動実験：床上60cmに位置する高架式ゼロ迷路試験では、ストレス無しの時、魚油群と鰵節群ではコレステロール添加により不安行動が有意に増加した。対照的に、1.3DG群は、ストレス無しの場合コレステロール添加により不安の減少傾向がみられた(図4-A)。次に、もっと強い恐怖を感じる高架式十字迷路試験では、ストレスによって魚油群および1.3DG群の不安が少し増す傾向がみられたものの影響は少ないことが明らかとなった。ストレスの有無に関わらず魚油群の方が1.3DG群に比べてコレステロール添加の有無ともに不安が軽減された傾向であった(図4-B)。

総コレステロール量：血漿では、コレステロール添加により増加したが、ストレスによる変化は非常に少なかった(図5-A, B)。その中で1.3DG群は魚油群と

鰹節群に比べてコレステロール添加により増加したのが目立った。逆に、肝臓では、コレステロール添加により魚油群と鰹節群、1.3DG 群とも有意に増加し、ストレスにより $n-3$ 系の魚油群と鰹節群は著しく増加した (図 6 - A,B)。対照的に、1.3DG 群はストレスによる変化は認められなかった。

TG 量：肝臓では、ストレス無しで各食餌群ともコレ

ステロール添加により有意に増加し、ストレスが加わると魚油群と鰹節群においてさらに有意な増加を示した (図 7 - A,B)。TG 量としては、 $n-3$ 系脂肪酸群と 1.3DG 群の間に有意な差は認められなかった。一方、血漿の TG 量はストレスやコレステロール添加により各群間に上昇は認められなかった (data not shown)。

HDL- コレステロール量は、コレステロールの添加に

Aggressive Behaviour

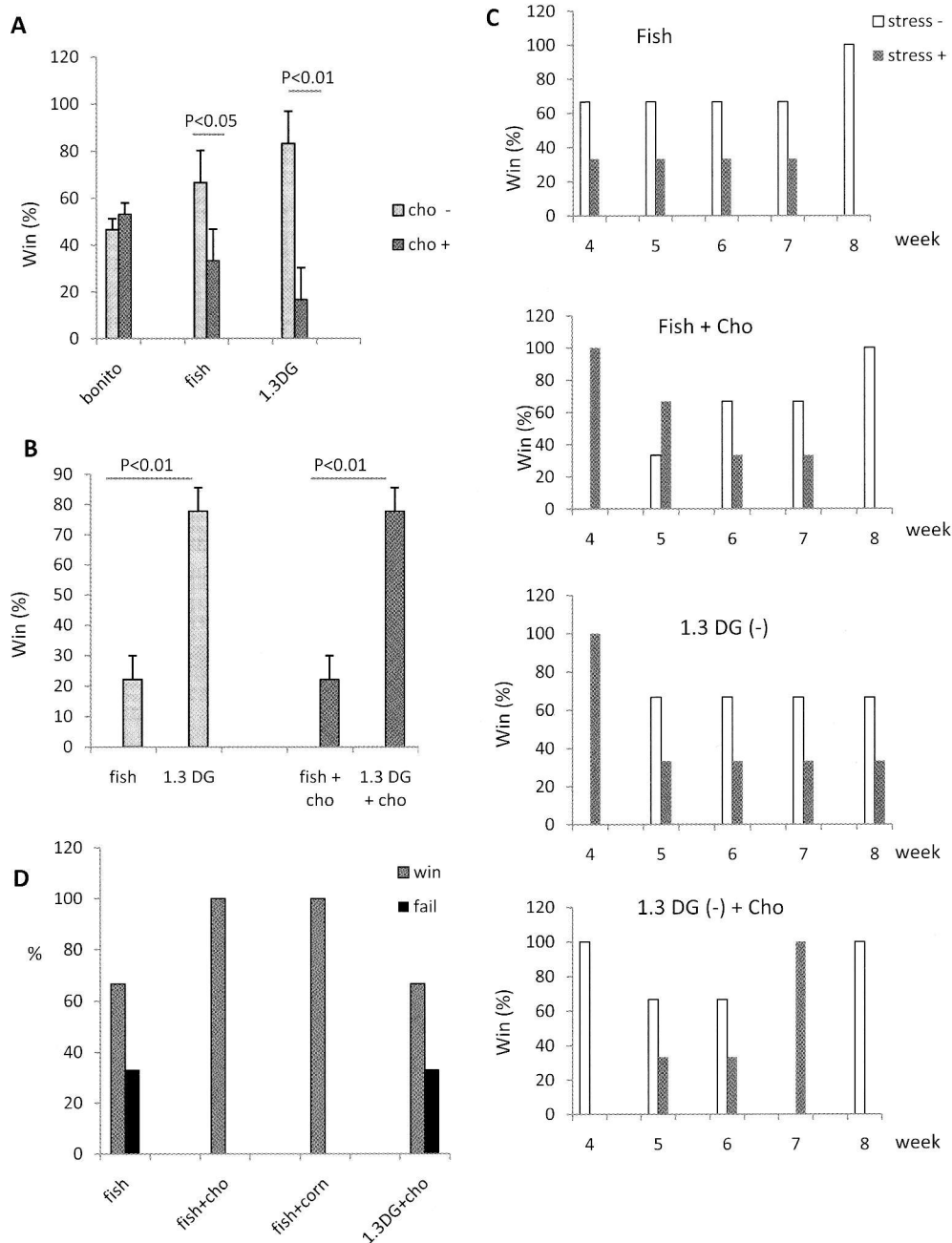


Fig.3 Aggressive Behaviour change by stress

A : Effect of cholesterol (cho) compared with control (without cholesterol feeding)

B : Compared with fish oil and 1.3DG

C : Effect of stress on the aggressiveness

D : The aggressiveness of fish oil containing cholesterol under stronger stress

より各食餌群ともに有意に減少し、ストレス状況下ではさらに著しく有意に減少したのが明らかとなった(図8-A,B)。n-3系の魚油群と鰹節群に比べて1,3DG群の方が減少傾向であった。

考 察

攻撃行動がコレステロール添加により魚油群と1,3DG群で緩和され、鰹節群ではみられなかったことは、餌のたんぱく質組成に由来する可能性が示唆された(図3-A)。魚油群と1,3DG群はカゼインであり、鰹節群は鰹節由来のたんぱく質であったためアミノ酸組成の関与が考えられる。魚油群は1,3DG群よりもコレステロール添加の有無の両群とも攻撃性が低いことも示された(図3-B)。しかしながら、長期のストレス状況下ではコレステロール添加の魚油群は、コレステロール無しの魚油群や1,3DG群のコレステロール添加に比べて攻撃性が著しく高くなった(図3-D)。このことは、

強いストレスが加わる場合は、通常のコレステロール量では攻撃性抑制の効果が薄れると考えられる。魚油群と1,3DG群では、ストレスがかかるとコントロール群より攻撃性が低くなる傾向がみられたことは、闘争の興味を失い逃走との見方も考えられる(図3-C)。

不安行動の評価方法には条件付き行動による評価と生得的・潜在的な行動による評価があり⁵⁾、本研究では後者の方法である高架式ゼロ迷路試験と高架式十字迷路試験を用いた。ゼロ迷路試験の方は穏やかな不安装置であり、高架式迷路試験はより強い不安装置である。ゼロ迷路試験では、魚油群と鰹節群のコレステロール添加群は不安行動を有意に回避した(図4-A)。前報でオープンフィールド試験を行った時、コレステロール添加により行動が積極的になる傾向が示されたが、この方法は非常に軽い不安状況下であった⁶⁾。高架式迷路試験では、コレステロール添加魚油群で不安を回避する傾向が見ら

Anxiety Behaviour

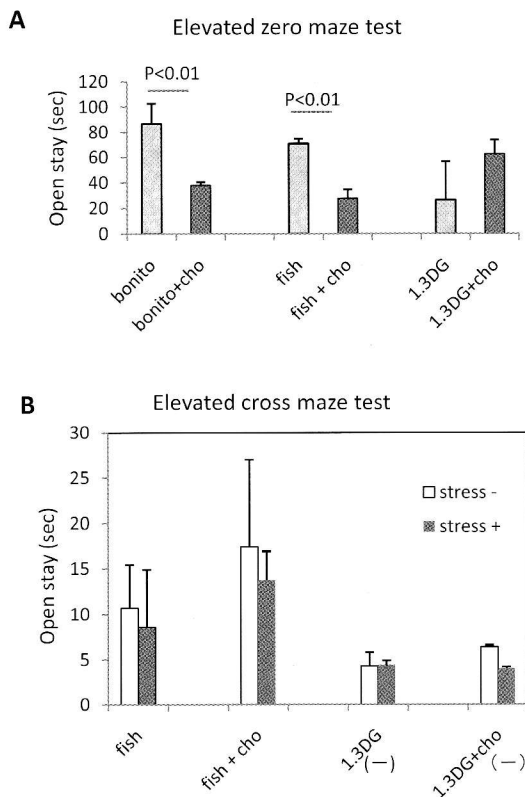


Fig.4 Anxiety Behaviour change by stress

A: Effect of cholesterol (cho) compared with control (without cholesterol feeding). The anxiety behavior of rats fed experimental diet for 6~10 weeks were measured by Elevated zero maze test.

B: Effect of stress on the anxiety. Rats fed experimental diet for 6~10 weeks were measured by Elevated cross maze test.

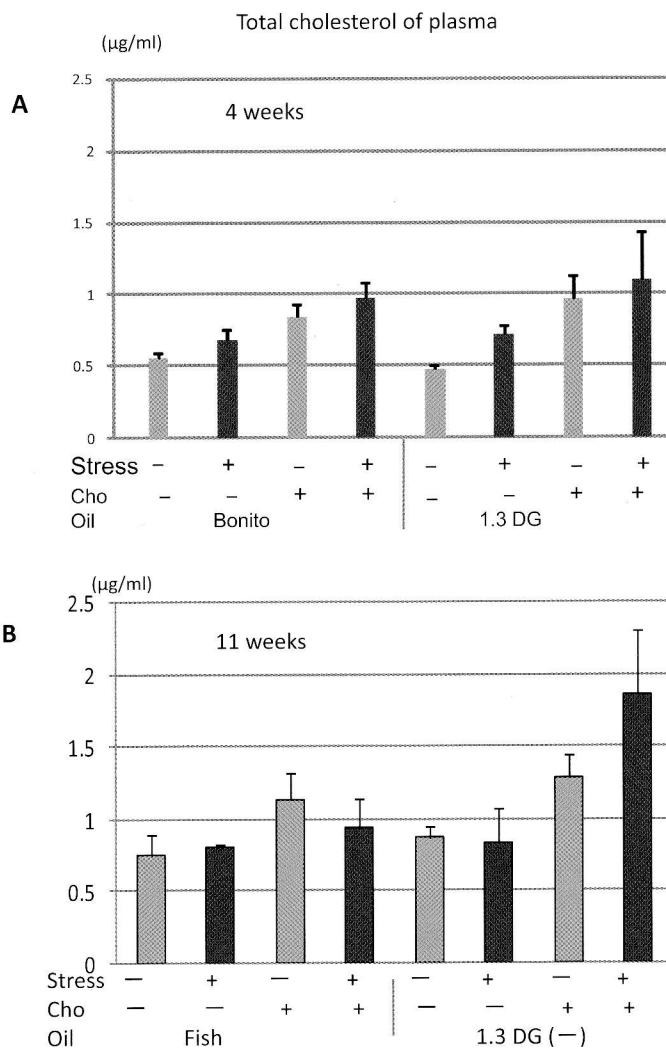


Fig.5 Total cholesterol of plasma

A: Cholesterol was measured as described in method. Rats were fed experimental diet for 4 weeks.

B: Rats were fed experimental diet for 11 weeks.

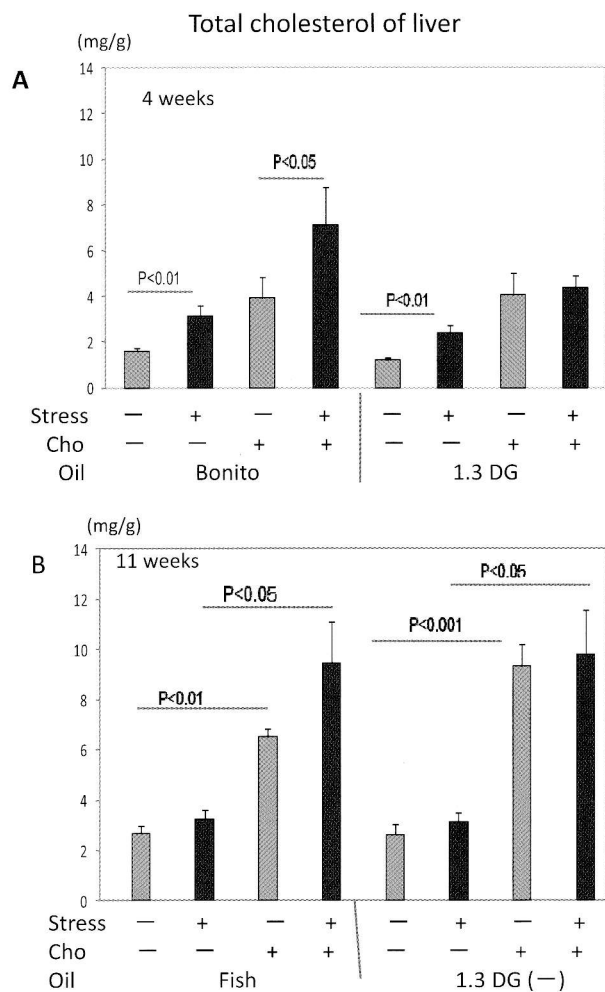


Fig.6 Total cholesterol of liver. A: 4 weeks, B: 11 weeks

れたが、(図4-B)、このことは強いストレス状況下では通常のコレステロール量ではききにくいかもしれない。ただし、不安行動の評価は使う装置により不安強度が異なったり、ラットの行動とマッチしてなかったりなど解釈が単純ではなかった。

ストレスに対する栄養の効果としては、ノルアドレナリン系を増やす目的でチロシン投与の例が報告されている。その他、モノアミン系(セロトニン)、アセチルコリン、GABA(γ-アミノ酪酸)、ビタミンAなどが挙げられている⁷⁾。脂質では、魚油に含まれるDHAは注意欠陥多動(Attention Deficit Hyperactivity Disorder: ADHD)児やストレス状況下の健常人の攻撃性が低下した報告がある^{8,9)}。この機構としてDHAにはセロトニン作動性ニューロンを活性化させ、ノルアドレナリンを制御させるためであると考えられている^{10,11)}。

生化学的検査値では、本研究で使用したn-3系脂肪酸や1.3DGは血漿脂質上昇抑制機能を持つため血漿のコレステロールやTGなどは正常範囲であった。しかし、肝臓では、コレステロール添加群においてコレステロー

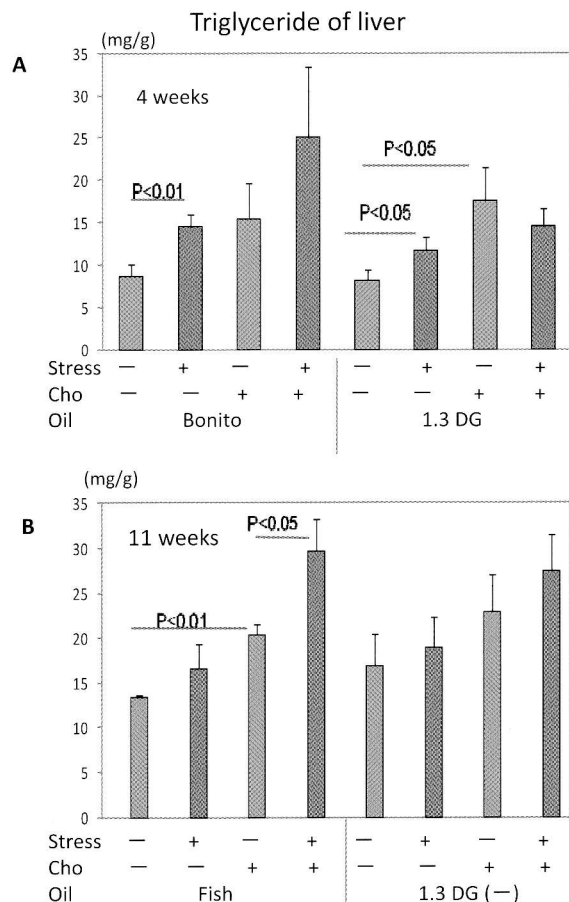


Fig.7 Triglyceride of liver

Triglyceride was measured as described in method. Rats were fed experimental diet for 4 weeks (A) and 11 weeks (B)

ルやTGの有意な蓄積が起っていた。その上、ストレスが加わると、肝臓ではさらに上昇した。また、HDL-コレステロールの有意な低下が生じていたので、これらが行動にどのように関与しているのかの詳細は今後の課題として残された。

参考文献

- McKittrick C.R., Magarinos A.M., Blanchard D.C., Blanchard R.J., McEwen B.S., and Sakai R.R.: Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites, *Synapse*, 2000,36(2): 85-94
- Santarelli L., Saxe M., Cross C., Surget A., Battaglia F., Dulawa S., Weisstaub N., Lee J., Duman R., Arancio O., Belzung C., Hen R.: Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants, *Science*, 2003,301(5634): 805-9
- Kumamaru E., Numakawa T., Adachi N.,

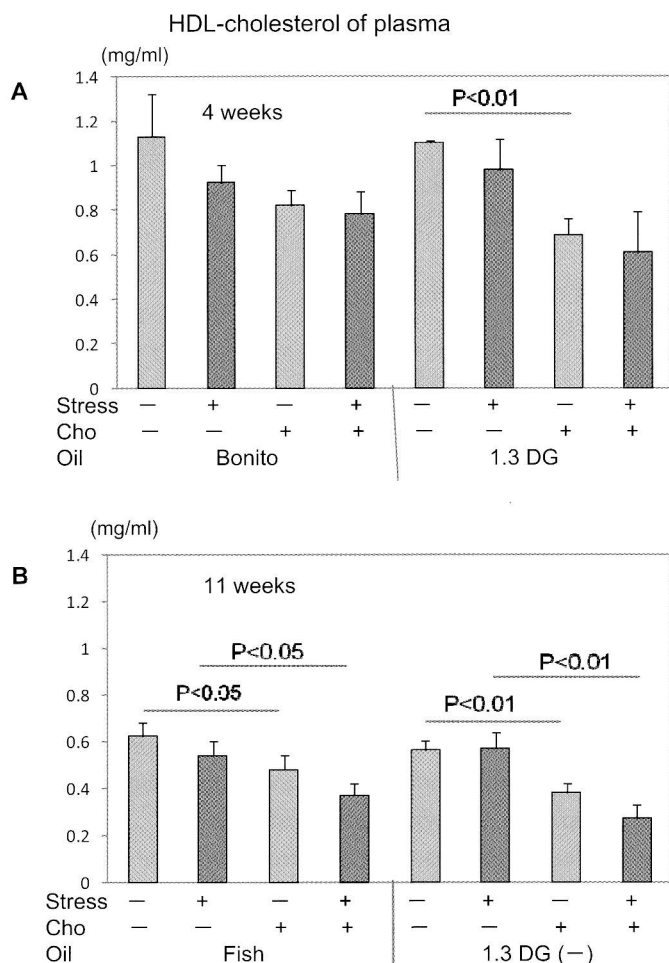


Fig.8 HDL-cholesterol of plasma

HDL-cholesterol was measured as described in method. Rats were fed experimental diet for 4 weeks (A) and 11 weeks (B).

Yagasaki Y., Izumi A., Niyaz M., Kudo M., Kunugi H., Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic

factor mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase, *Mol Endocrinol*, 2008, 22(3) : 546-58

4) Muller M.B., Uhr M., Holsboer F., Keck M.E. : Hypothalamic-pituitary-adrenocortical system and mood disorders, *Neuroendocrinology*, 2004, 79(1) : 1-12

5) 山口 托, 吉岡充弘 : 不安関連行動の評価法, *日薬理誌*, 2007, 130 : 105-111

6) 坂井恵子, 宮脇千尋, 橋口由佳, 海老原綾子, 竹田千重乃 : 鯉節がコレステロール摂取ラットの血中脂質低下及び不安行動に及ぼす影響, *鹿児島純心女子大学看護栄養学部紀要*, 2009, 13 : 7 - 16

7) 横越英彦 編 : 脳 / 機能と栄養, 幸書房, 東京, 2004 : 201-207

8) Kidd P.M. : Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood, *Altern Med Rev*, 2007, 12(3) : 207-227

9) Hamazaki T., Hirayama S. : The effect of docosahexaenoic acid-containing food administration on symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder-a placebo controlled double-blind study, *Eur J Clin Nutr*, 2004, 58(5) : 838

10) Mann J.J. : Neurobiology of suicidal behaviour, *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4 : 819-828

11) Hamazaki K., Itomura M., Huan M., Nishizawa H., Sawazaki S., Tanouchi M., Watanabe S., Hamazaki T., Terasawa K., Yazawa K. : Effect of omega-3 fatty acid-containing phospholipids on blood catecholamine concentrations in healthy volunteers, *Nutrition*, 2005, 21 : 705-710

The Effect of n-3 Fatty Acids Containing cholesterol on Physical Aggression and Anxiety in Rats — Regulation by Stress—

Keiko Sakai, Arisa Yuda, Yu Shirasawa, Minako Mori,
Erina Kawahira, Miho Sakoda, Ayako Ebihara

Department of Nutrition, Faculty of Nursing and Nutrition,
Kagoshima Immaculate Heart University

Key words : stress, physical aggression, anxiety behavior, n-3 series fatty acid, cholesterol

Abstract

We investigated in this study the effect of n-3 fatty acids containing cholesterol on rat's aggressive and anxious behavior regulated by chronic stress. Rat's body weight under the stress was less than that of control group (without stress). Aggressive behavior was not changed in bonito group with cholesterol feeding while fish group with cholesterol feeding reduced significantly from stress.

In contrast, prolonged stress fish group with cholesterol feeding showed more aggressive behavior than any other groups. In anxious behavior without stress, fish and bonito groups with cholesterol feeding avoided a dangerous situation more significantly than both groups without cholesterol feeding. Under the prolonged stress, however, the effect of cholesterol disappeared, and fish group tended not to avoid any dangerous situation when compared with 1.3DG (sn1,3-diacylglycerol) group with and without cholesterol.

Total cholesterol level of plasma caused under stress tended to increase in each group with or without cholesterol feeding. In contrast, total cholesterol and triacylglycerol level of liver increased significantly in both fish and bonito groups with cholesterol feeding under stress. Stress was not influenced in 1.3DG group with cholesterol feeding. HDL-cholesterol level of plasma was reduced significantly in each group especially with cholesterol feeding under stress.

Theses results suggest that the choice of lipids for individual purposes may be able to control their biological values and behavior of aggressive and anxiety and it may be beneficial to maintain dairy psychological health.
