

# グレープフルーツの香りがマウスの行動に及ぼす影響

上江洲 香代子, 林 由香, 藤本 麻里, 芳野 紗嬉

Scent of grapefruit affects memory in adult mice

Kayoko Uezu, Yuka Hayashi, Mari Fujimoto, Saki Yoshino,

## Abstract

In this study, we examined the effects of scent of grapefruit on behavior in adult mice. Ten weeks old male ddY mice were presented scent of the skin of grapefruit for 5 weeks. From the 3rd week to the 5th week, several behavioral tests were performed. Mice presented grapefruit showed decreased number of walking and rearing, but increased time of grooming, in open-field test. They entered significantly fewer times into the open arm on elevated plus maze. The retention time in the step-through type passive avoidance test was significantly longer. These results suggest that scent of skin of grapefruit may improve memory.

## I. 緒言

グレープフルーツ (*Citrus X paradisi*) は、亜熱帯を原産とするミカン科ザボン類の大形柑橘類である。ブドウのように房状に生えるのでこの名がつけられており、種子の有無や果肉の色により品種が別れている。白肉と赤肉があり、赤肉の色素はカロテンの一種であるリコピンである。主な香気成分はリモネンやヌートカトンで、苦味成分はナリンギンである。

グレープフルーツ精油は、交感神経活動を促進し、脂肪分解や熱産生の促進、摂食行動の抑制や体重減少の効果が見られたという報告がある<sup>1)</sup>。また、グレープフルーツ精油は状態不安を軽減し、リラックス効果と覚醒度が上昇するという報告<sup>2)</sup>や、抑うつ状態を示したという報告がある<sup>3)</sup>。グレープフルーツの香りを嗅ぎ続けることにより、運動中のパフォーマンスを向上したという報告<sup>4)</sup>や、グレープフルーツの香気成分であるヌートカトンには交感神経を活発にさせ運動持久力を向上させる効果があるとの報告もある。

一方、現代人の抱える問題として高齢化社会に伴いアルツハイマー型認知症や脳血管性認知症をはじめとする学習記憶に関連する疾患の増加がある。また、食生活の乱れや運動不足、ストレスなどが関与すると考えられる生活習慣病の増加も問題となっており、対策が望まれる。

今回の研究は、生のグレープフルーツ果皮の香りが、マウスの脳機能を初めとする種々の行動にどのような影響を及ぼすのかを検討する目的で実験した。

## II. 実験方法

### 1) 動物と飼育条件

動物は10週齢の雄 ddY マウス (日本SLC株式会社, 静岡) を使用した。グレープフルーツ群とコントロール群のそれぞれを10匹ずつの2群用意しプラスチックケージで飼育した。飼育環境はコンベンショナルで、室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12時間明暗周期 (8:00~20:00) に保ち、餌は固形飼料 (MF2, オリエンタル酵母, 大阪) を与えた。実験期間を通して餌・水は自由摂取とし、餌の摂取量は毎日、体重は週2回測定した。グレープフルーツ群にはグレープフルーツ果皮5gを小瓶に入れ、ケージ上部のステンレス蓋の餌の傍に逆さまに設置し、毎日新鮮な果皮に交換した。なお、グレープフルー

ツの果皮の表面に包丁で浅く無数の切り込みをつけた。グレープフルーツの品種は特に限定しなかった。匂い分子の揮発性を考えて、グレープフルーツ群は飼育棚の上段で、コントロール群は下段で飼育した。動物実験は動物の福祉に配慮して行われた。

## 2) 行動試験

実験食投与開始後3週目から5週目にかけて、一般活動性試験(①オープンフィールド試験)、抗不安作用試験(②高架式十字迷路試験)、学習記憶試験(③ステップスルー型受動的回避試験)の行動試験を実施した。

### ①オープンフィールド試験

マウスを全く経験したことのない新しい環境(オープンフィールド)に置いたときのさまざまな行動は、マウスの運動活動性、探索行動および種々の情動反応を反映するものといわれている。種々の薬物の行動への影響を見るうえで最も基本的な指標として応用されている。

実験装置は、44×44×33cm(縦×横×高さ)のダンボール箱の床面に5.5×5.5cm(縦×横)の区画を25個引いたものを使用した。観察時間は、マウスをホームケージから取り出し、箱の中に入れてから3分間とした。観察項目として、(1)床面の区画から区画へ移動したときの通過区画の数(=歩行数とする)、(2)立ち上がった回数、(3)洗顔・毛づくろいの時間、(4)脱糞の数、(5)尿の有無について測定した。(1)と(2)の数が多いほど探索行動が多いことを示す。一般的にオープンフィールドに置かれた直後は探索行動が活発である。(3)は数が多いほど情動が安定していることを示す。オープンフィールドに慣れてくると増える。(4)(5)は強いストレスなどの極端に情動の不安定な状態で増加する。

### ②高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験は、げっ歯類が高い位置にある解放された場所を嫌う習性を利用して、マウスやラットの恐怖心を評価するための装置として開発された物であり、抗不安薬などのスクリーニングなどに用いられている。床上60cmの高架にある十字路は、一対は高さ10cmの壁のある30×5cmの細長い通路(クローズドアーム)が向かい合い、もう一対は壁がない30×5cmの細長い通路(オープンアーム)が向かい合う装置を使用した(YTS山下技研, 徳島)。

アームが交わった中央部分にマウスを置いてから3分間を観察時間とし、それぞれのアームへの進入回数及び滞在時間を計測して、恐怖心の度合いを観察した。オープンアームへの進入回数多ければ、または滞在時間が長ければ、恐怖心が低下している(抗不安作用がある)と判断した。

### ③ステップスルー型受動的回避試験

ステップスルー型受動的回避試験は、マウスの〈暗い場所を好む〉という行動特性を、電気ショックによって抑制することを利用する簡便な学習記憶実験である。実験装置は白色光で照明した明室(10×10×10cm)と床にグリットを取り付けた暗室(15×15×15cm)からなり、二室の間は可動式の上下開閉ドアで仕切られているものを使用した(YTS山下技研, 徳島)。

マウスを明室に入れて10秒後に仕切りのドアを開け、マウスが暗室に移動し、四肢を完全に暗室に移動したところでドアを閉め0.2mA、0.5秒間の電気ショックを1回付加した(一試行型)。この時点で電気ショック回避反応の習得が完成すれば、以後暗室内に入ることにはないが、記憶が弱まれば暗室に入っていくという考えの下に、同一のマウスについて24時間後、1週間後、2週間後に再生試行を行い、記憶試験とした。マウスが明室に入れられ暗室へ移動するまでの時間を反応潜時として測定し、180秒を最高反応潜時とした。潜時が長い程、記憶が保たれていると判断した。

3) 統計処理

データは平均値±標準誤差で表した。有意差検定は Microsoft Excel X を用い、スチューデントの *t* 検定により行った。

Ⅲ. 結 果

図1には体重の変化および食餌摂取量を示した。実験期間を通しての体重増加量は、コントロール群 (2.2g±0.75g) とグレープフルーツ群 (2.6g±1.16g) の間で差はなかった。食餌摂取量においても両群で差はなかった。3週目以降に、コントロール群で一時的に体重と摂食量のわずかな低下が見られたが、すぐに回復した。これは、行動試験を実施したためのストレスにより、一時的に変動したと考えられる。飼育期間中の観察では、両群ともに異常な行動や外観を示す動物はなかった。

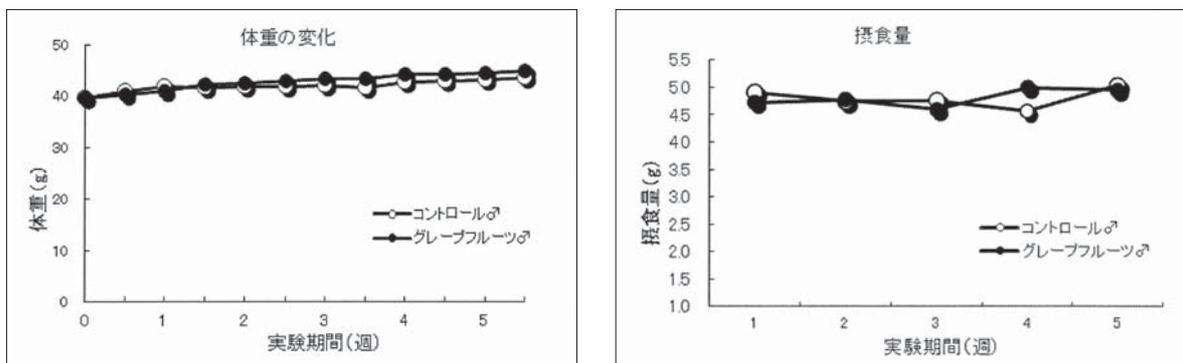


図1. 体重の変化と摂食量の変化

図2にはオープンフィールド試験の結果を示した。探索行動は、コントロール群の方が多く、立ち上がり回数は有意に高くなった。情動の指標となる洗顔・毛づくろい時間はグレープフルーツ群が有意に長く、脱糞数は少なかった。これらのことから、グレープフルーツ群は新しい環境での探索行動は活発ではないが、慣れていない場所における適応能力が優れ、情動が安定していたと考えられる。

図3には高架式十字迷路試験の結果を示した。オープンアームでの滞在時間は、両群間で差が見られなかったが、進入回数においては、オープンアーム、クローズドアーム共にコントロール群の方が多くなった。コントロール群は活発に行動するため、両アームへの進入回数多くなったと考えられ、活動的で、恐怖心を抱くことが少ないと思われる。

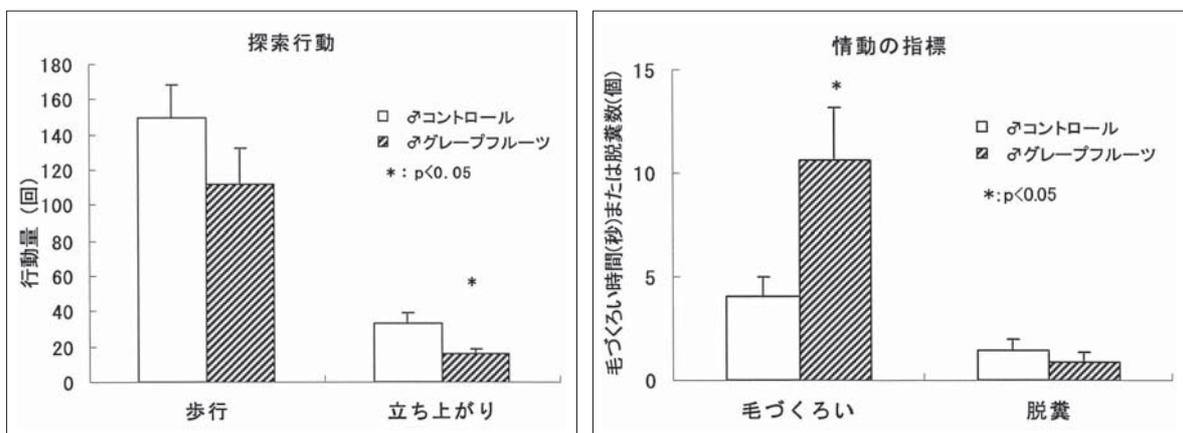


図2. オープンフィールド試験

図4に示したステップスルー型受動的回避試験では、グレープフルーツ群で高い反応潜時が見られた。コントロール群は24時間後、1週間後、2週間後と学習試験後の経時とともに、反応潜時が短縮したのに比べ、グレープフルーツ群では反応潜時に変化が見られず、2週間後には両群で有意差が見られた。このことから、グレープフルーツ群は記憶保持能力が高いことが示唆された。

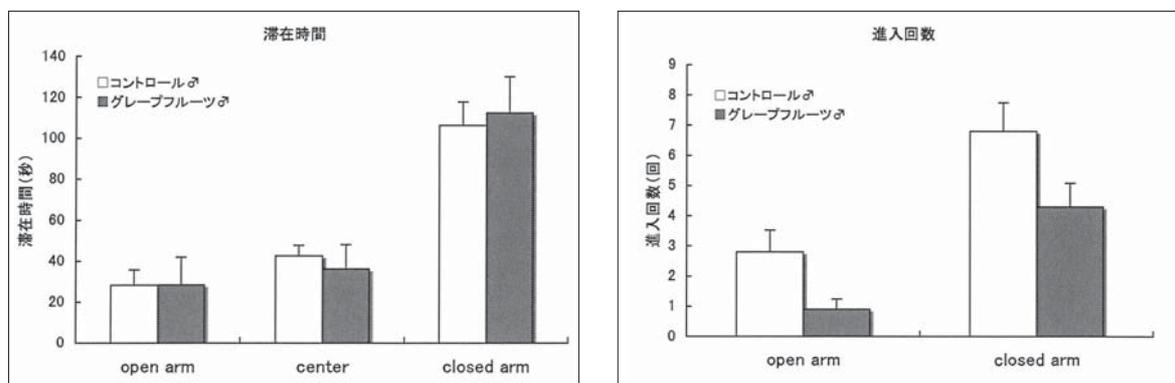


図3. 高架式十字迷路試験

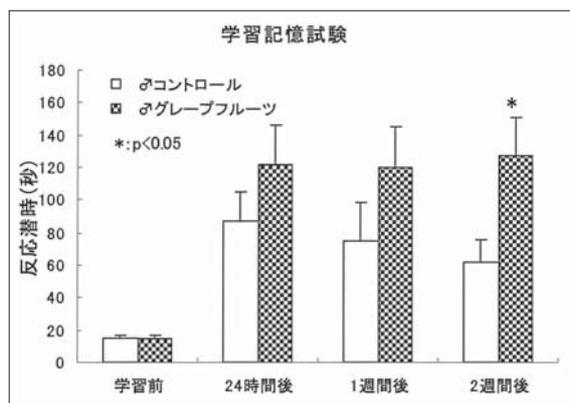


図4. ステップスルー型受動的回避試験

#### IV. 考 察

今回の実験では、体重増加量や食餌摂取量、飼育期間中の様子観察においてグレープフルーツ群とコントロール群の間に差は見られなかった。グレープフルーツ精油は交感神経を活性化する作用があり、交感神経の興奮は白色脂肪組織では脂肪分解を、褐色脂肪組織ではUCPIを介する熱産生を、副腎からはアドレナリン分泌を、それぞれ促進し、また、消化吸収機能低下、食欲減退による体重減少が見られるとの報告がある<sup>1,5)</sup>。これらの報告は、グレープフルーツ精油混濁液に浸したガーゼを、週3回15分間ケージの上に置く方法では効果があったが、毎日の刺激は食欲および体重の変化に影響を与えなかったとしている。今回の実験では、生のグレープフルーツの果皮を24時間嗅がせたという香りの提示方法を取ったために、体重や摂食量にほとんど差がみられなかったと考えられる。

オープンフィールド試験では、グレープフルーツ群は新しい環境での探索行動は活発ではないが、慣れていない場所における適応能力が優れ、情動が安定していたことが示唆された。グレープフルーツ精油には交感神経の活動を促進する作用があることから、オープンフィールドでの探索行動も増加すると予測されたが逆の結果であった。リモネンの香りを提示した場合、精神的負荷状態における状態不安を軽減し、リラックス効果を示す可能性があることが報告されており<sup>2)</sup>、今回の結

果は、そのリモネンの作用により新奇場所においても情動が安定し、探索行動は増加しなかったことが推測される。

抗不安作用を調べる高架式十字迷路試験では、通常は恐怖を感じるであろうと考えられるオープンアーム、または不安回避の場所であると考えられるクローズドアームの両方への進入回数が、コントロール群の方が多かった。滞在時間には差がなかった。このことから、今回のグレープフルーツの香りの提示方法では、抗不安作用を明確に示すことはできなかった。オープンフィールドの結果からは、情動の安定性が示唆されており、さらに検討を重ねる必要があると考えられる。

ステップスルー型受動的回避試験における学習記憶試験では、グレープフルーツ群で高い反応潜時が見られた。コントロール群は24時間後、1週間後、2週間後と経時とともに、反応潜時が短縮したのに比べ、グレープフルーツ群では反応潜時に変化が見られず、2週間後には両群で有意差が見られた。このことから、グレープフルーツ群は記憶保持能力が高いことが示唆された。これは、グレープフルーツの香りにより交感神経が興奮しノルアドレナリン系が刺激され<sup>1)</sup>、学習記憶能が向上したと考えられる<sup>6)</sup>。

今回の実験におけるグレープフルーツの香りの提示は、マウスの学習記憶能を向上させる可能性が示唆された。また、情動の安定性を高めること示唆されたが、抗不安作用への影響は明確ではなかった。

#### [参考文献]

- 1) 永井克也：嗅覚刺激の自律神経と生理機能に与える影響, *日本味と匂学会誌*, 13(2), 157-168, (2006)
- 2) 松本仁, 他：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*, 17, (2009)
- 3) Umezu T. : Evaluation of the effects of plant-derived essential oil on central nervous system function using discrete shuttle-type conditioned avoidance response in mice. *Phytother Res*, 26(6), 884-891, (2011)
- 4) 筒井孝子：グレープフルーツの香りが運動パフォーマンスに及ぼす影響, *日本体育学会雑誌*, 15(1),133, (2009)
- 5) 永井克也：匂い刺激のエネルギー代謝に対する影響とその機構－グレープフルーツとラベンダーの芳香の効果－, *肥満研究*, 11(2),92 (206) -94 (208), (2005)
- 6) 恐怖学習における扁桃体の役割, *細胞工学*, 21,1022-1029, (2002)