

# ルイボスティーまたは緑茶投与がマウスの行動および 血中脂質に与える影響

上江洲 香代子

## Effects of rooibos tea or green tea on behavior and serum lipid in mice

Kayoko Uezu

### Abstract

In this study, the effects of rooibos tea (*Aspalathus Linearis*) or green tea (*Camellia sinensis*) on behavior in adult mice were examined. Ten weeks old male ddY mice were divided into three groups, and given rooibos tea or green tea, or hot water as control for eight weeks. Between the third week and fifth week, some behavioral tests were performed. There were no differences between three groups on exploratory behavior such as walking and rearing in open-field test. On the elevated plus maze test, rooibos tea group and green tea group stayed in the open arms longer time than control group. On the T maze test, rooibos tea group showed less trial times than others. Green tea group showed inhibited body weight gain and lower level of serum triglyceride. These results suggest that rooibos tea may have anti-anxiety effect and improve memory in mice, and green tea may have the suppressive effects of body weight gain and serum triglyceride.

Keywords: rooibos tea, green tea, memory, triglyceride, mice

### I. 諸言

ルイボスティー (*Aspalathus Linearis*) は南アフリカ産発酵茶で、原料となる植物はマメ科の灌木である。ルイボスティーには高い抗酸化活性があることが報告されており<sup>1)</sup>、便秘改善作用やアレルギー軽減効果などの報告もある<sup>1)</sup>。緑茶や紅茶に比べ、タンニン含量が低く、カフェインが含まれないことやフラボノイド類が含まれているという報告がある<sup>1)</sup>。現在、生活習慣病の増加が深刻な問題となっており、なかでも動脈硬化や癌、糖尿病の一因として、また認知症にも関与するとして生体内で生成される活性酸素による酸化障害が注目されている。ルイボスティーには抗酸化物質が多量含有しているが、学習記憶に及ぼす影響の報告は少ない。緑茶には、抗酸化、抗腫瘍、抗高血圧などのさまざまな生理作用を持つことがわかっている<sup>2)</sup>。そこで今回は、ルイボスティーまたは緑茶投与がマウスの学習記憶などの行動にどのような影響を及ぼすかを検討する目的で実験を行った。また、マウスの血清脂質を測定し、さらに投与した試験飲料の抗酸化活性も測定した。

### II. 方法

#### 1) 動物と飼育条件

動物は10週齢雄の ddY/SPF マウス (日本 SLC、静岡) を購入した。4日間馴化させた後、コントロール群、ルイボスティー群、緑茶群の3群に分け、各群10匹ずつを熱湯浸出液の各試験飲料で8週間飼育した。飼育環境はコンベンショナルで、室温は $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、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と飲料は自由摂取とし、摂取量を毎日、体重を週2回測定した。

## 2) 試験飲料の調整

飲料は毎週月曜日と木曜日に調整し冷蔵庫保存したものを毎日投与した。ルイボスティーは市販のティーバッグを購入し、浸出時間は抗酸化作用があると示唆される時間<sup>1)</sup>に設定し、1パック(4g)の茶葉を100°Cの熱湯500mlで15分間浸出させた。緑茶は、市販の嬉野茶を購入し、商品に記載されている浸出方法により、茶葉2gを沸騰後80°Cまでに冷ました熱湯100mlで浸出させた。コントロール群には、沸騰の白湯を用い、それぞれ室温に冷まして与えた。

## 3) 行動試験

飼育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テスト)、抗不安作用試験(②高架式十字迷路試験)、学習記憶試験(③T字迷路試験)を実施した。

### ① オープンフィールドテスト<sup>3)</sup>

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間の数(歩行数)、(2)立ち上がった回数、(3)洗顔・毛づくろい時間、(4)脱糞数、(5)尿の有無とした。(1)と(2)の数が多き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)は数が多き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<sup>4)</sup>

高架式十字迷路試験は、げっ歯類が高い位置にある開放された場所を嫌うという習性を利用して、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ものであり、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(山下技研、徳島)を使用した。

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が増ければ、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 T字迷路試験

動物の学習能力を調べる方法の一つで、マウスに選択(弁別)反応を行わせ、正確な位置選択ができるようになるまでどの程度の時間または回数がかかるのかを調べるため、Floodら<sup>5)</sup>の方法を一部変更して行なった。装置はアルファベットのTの形をしており、通路(46cm)の手前側にドアで仕切られたスタートボックスと、向こう側左右に分かれた通路(17.5cm)の先のゴールボックスから成る。通路の幅は9.8cm、高さは12.5cmである。

マウスをスタートボックスに入れると、ブザーと同時にドアが開く。5秒後に床から0.2mAの電流が流れ、ゴールボックスに回避することができる。最初に入った方向と反対側を正方向として、45秒間隔で5回試行して、正方向へ回避するまでの各回の反応潜時を測定した。1週間後に同様に実施し、5秒以内に回避できるまで繰り返して、反応潜時と試行回数を測定した。

反応潜時が短いほど、または試行回数が少ないほど記憶が良いとした。

#### 4) 血清脂質の測定

試験飲料で 8 週間飼育した後、ペントバルビタールの腹腔内投与による全身麻酔下で開腹し、下大静脈より採血した。血液を 3000rpm で 10 分間遠心分離し、血清を分取して脂質の分析に用いた。

分析用試薬は、富士フィルム和光純薬(株)の測定キット (トリグリセライド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコー、HDL-コレステロールテストワコー) を用いた。

#### 5) 抗酸化活性の測定

抗酸化活性測定のための試料として、動物実験時と同様に試験飲料を調整した。これを原液として、1/2、1/4、1/8 の各希釈液も測定をした。さらに、週 2 回調整して冷蔵庫保存して投与していたことから、原液のみを冷蔵保存 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目についても測定し、経日的変化も見た。

DPPH (ジフェニールピクリルヒドラジル) ラジカル消去法を用いて以下の手順で測定した。DPPH は不飽和脂肪酸ラジカルのモデルとして安定なフリーラジカルであり、ラジカル消去作用をもつ物質と反応すると水素を引き抜き非ラジカルになり、紫色から無職に変化する。この性質を利用したのが DPPH による抗酸化活性の測定である。

①0.1mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) をエタノールで調整した。②全ての試験管に 0.05M トリス液 0.95ml を入れた。③エタノールを標準試験管とサンプル試験管に各 1ml ずつ、ブランク試験管には 2ml ずつ入れた。④0.1mM DPPH を標準試験管とサンプル用試験管に各 1ml 入れた。⑤各希釈試料液 0.05ml を全ての試験管に入れ攪拌した。⑥反応させた 30 秒後と 30 分後に分光光度計(波長 570nm) を用いて吸光度を測定し、DPPH 消去率を計算した。

消去率が高いということは、抗酸化作用が高いと判断できる。

### III. 結果

飼育期間中の観察では、緑茶群のマウスにおいて時々喧嘩らしき行動が見られた。体重増加 (図 1) は緑茶群で抑制される傾向が見られた。図 2 には、実験期間を通しての食餌摂取量を 1 日あたり 1 匹あたりで示した。緑茶群で他の 2 群に比べて摂取量がやや多い傾向にあった。試験飲料摂取量 (図 3) も実験期間を通しての摂取量を 1 日あたり 1 匹あたりで示した。コントロール群に比べてレイボスティー群と緑茶群の摂取量が少ない傾向がみられた。

オープンフィールドテスト (図 4) における歩行数・立ち上がり回数・毛づくろい時間・脱糞数は、3 群間において差がなかった。

高架式十字迷路 (図 5) におけるオープンアームへの進入回数・滞在時間は、レイボスティー群と緑茶群で、コントロール群に較べて有意に高くなった。

T 字迷路学習試験 (図 6) では、学習時の反応潜時 (図 6 A) が、レイボスティー群において試行を重ねるにつれ、より短くなる傾向がみられた。1 週間後における回避達成までの試行回数 (図 6 B) はレイボスティー群が少なかった。

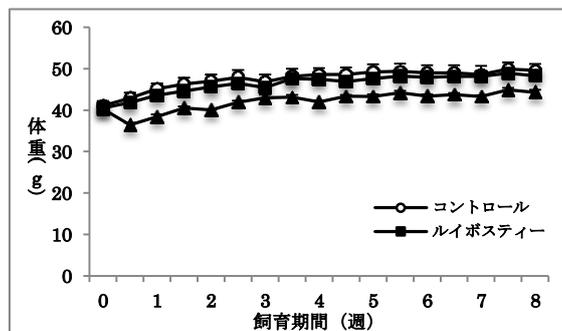


図 1. 体重の変化

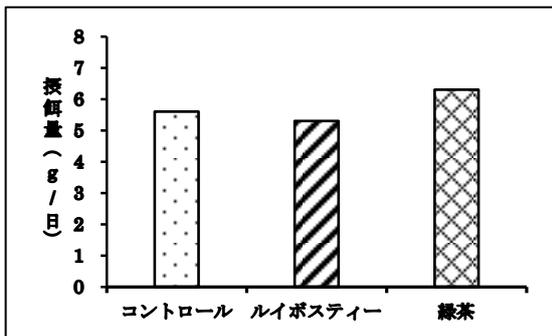


図 2. 食餌摂取量

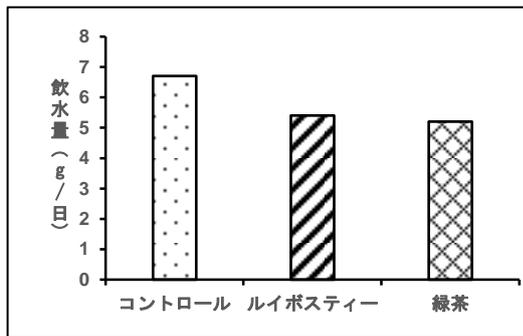


図 3. 試験飲料摂取量

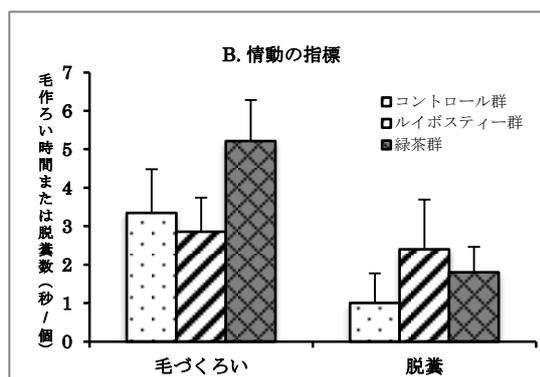
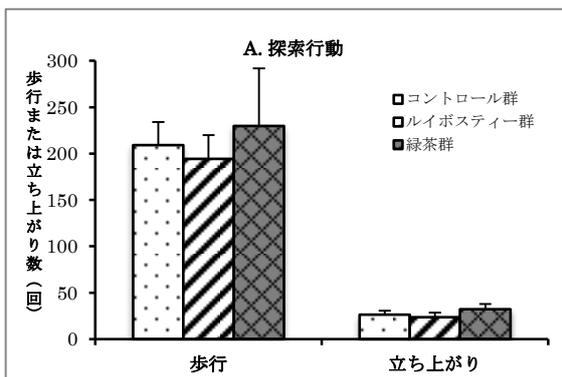


図 4. オープンフィールドテスト

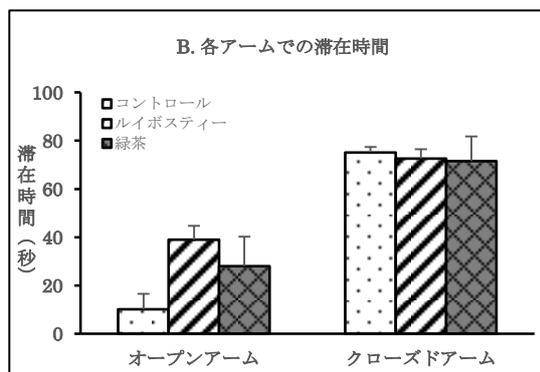
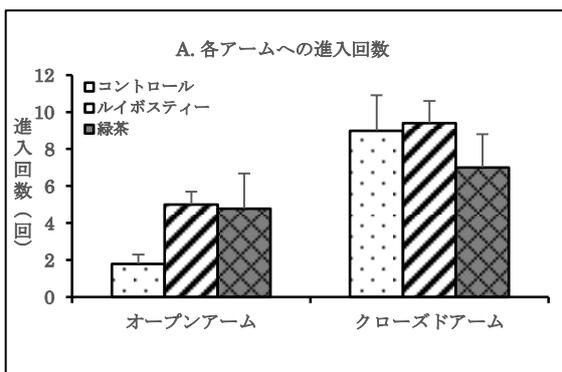


図 5. 高架式十字迷路

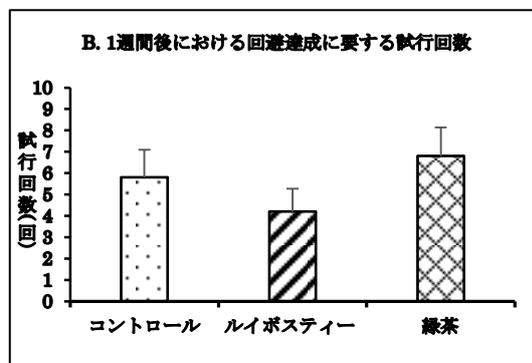
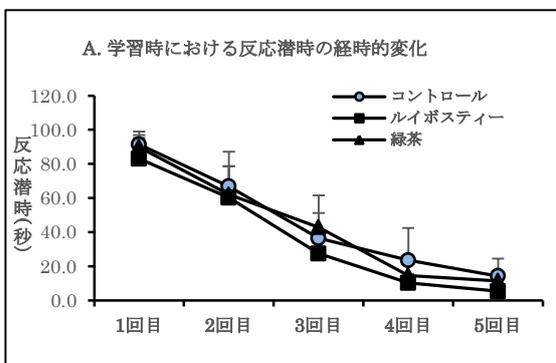


図 6. T字迷路学習記憶試験

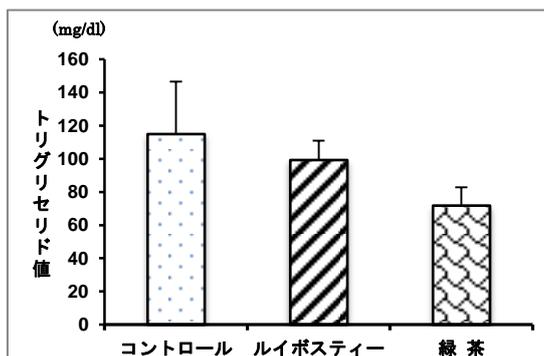


図 7. 血清トリグリセリド濃度

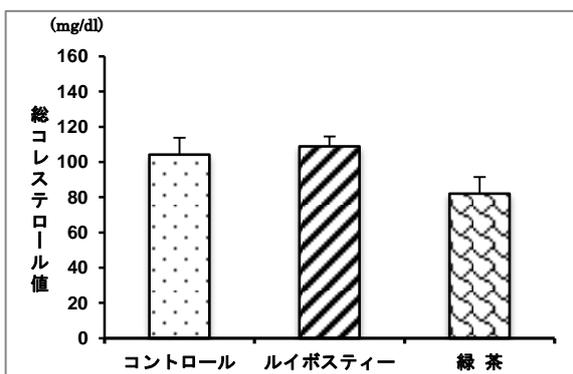


図 8. 血清総コレステロール濃度

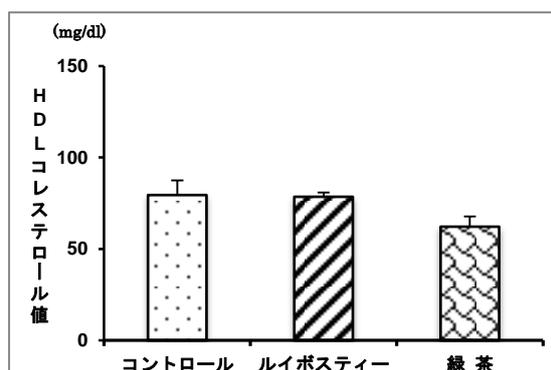


図 9. 血清 HDL-コレステロール濃度

血清トリグリセリド (図 7) は、緑茶群が低い傾向を示した。総コレステロール (図 8) も緑茶群が低い傾向を示したが、HDL-コレステロール (図 9) においては 3 群間で差は見られなかった。

図 10 A にはルイボスティーと緑茶の DPPH 反応 30 秒後における消去率の比較を示した。原液での消去率は 60%~70%と比較的高く、緑茶の方が僅かに高いものの、大きな差は見られなかった。各希釈倍率における変化を比較すると、緑茶は 1/4 希釈までは高い活性を維持し、1/8 希釈で少し低下した。ルイボスティーは 1/2 から低下を始め、1/8 希釈では大きく低下した。

図 10 B には反応 30 分後の消去率を示した。30 秒後の時点では活性が低下したルイボスティーの 1/2 希釈、1/4 希釈が 30 分後では原液と同程度の 60%ほどの活性を示し、緑茶とも差がないほどであった。緑茶群・ルイボスティー 群ともに高い抗酸化活性 (図 10) を示した。図 11 には、DPPH 消去率の冷蔵保存期間における経日変化を示した。両群の間に差は見られず、4 日程度の間には消去率に大きな変化は見られなかった。

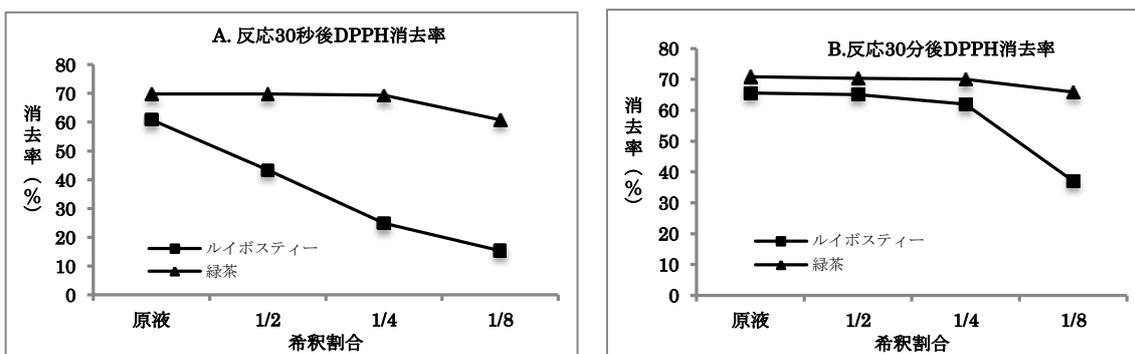


図 10. 反応時間および希釈倍率による DPPH 消去率の変化

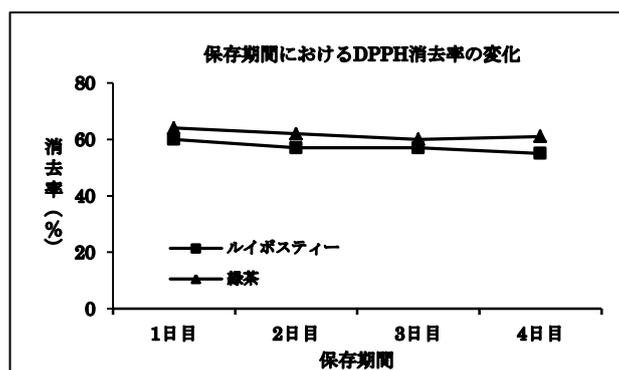


図 11. 冷蔵保存期間における DPPH 消去率の変化

#### IV. 考察

今回の実験では、高架式十字迷路試験において、オープンアームへの進入回数・滞在時間が、ルイボスティー群と緑茶群で、コントロール群に比べて有意に高くなったことから、ルイボスティーや緑茶には抗不安作用があることが示唆された。緑茶に含まれるテアニンはリラックス効果があることが知られているが、その効果があったのかも知れない。

T字迷路試験では、初回学習時と1週間後の記憶試験のいずれにおいても、ルイボスティー群が反応潜時(秒)、試行回数ともに低い傾向にあったことから、ルイボスティーは学習記憶の保持または改善に効果があると考えられる。ルイボスティーには、抗酸化作用をもつフラボノイド類であるルチン、ケルセチンが含まれている<sup>1)</sup>。ルチンには、海馬の神経細胞に対する抗炎症作用があり、神経細胞障害を保護することが報告されており<sup>6)</sup>、記憶力低下を抑制すると言われている。ケルセチンにはアルツハイマー型認知症の原因物質であるアミロイドβの産生経路を抑制することが示唆されており、マウスやヒトを対象とした実験においても認知機能改善が報告されている<sup>7)</sup>。このことから、ルイボスティー群では他の2群に比べて反応潜時(秒)、試行回数ともに低い傾向になったと推測される。

緑茶にも記憶力改善効果があることが言われており、カテキン投与によりラットの海馬での活性酸素を減少させ、空間認知機能を改善したという報告<sup>8)</sup>や、マウスのコリン作動性神経に参与して記憶を改善したという報告<sup>9,10)</sup>、マウスの脳萎縮が軽減されたという報告<sup>11)</sup>など、多くの学習記憶や認知機能に関するカテキンの効果報告がある。テアニン投与もラットの脳虚血による記憶障害を改善するという報告<sup>12)</sup>や、高齢者の認知症予防効果があるという報告<sup>13)</sup>等がある。しかし、今回の実験では緑茶による記憶力改善はみられなかった。テアニンは20~70°Cにおいて最も溶出率が高いため、今回の実験の浸出温度ではテアニンはそれほど溶出されず、カテキンが多く浸出された可能性が高い。カテキンが過剰であったため緑茶の摂取量が他の2群と比較して減少した可能性も考えられ、その結果学習記憶改善効果が得られなかったことが推測される、試験飲料中のカフェイン、カテキン、ポリフェノールや抗酸化ビタミン類などの含有量も測定しみる必要があると思われる。

緑茶群において餌の摂取量が多い傾向にあるにも関わらず体重の増加が抑制される傾向にあった。緑茶にはカフェインが多く含まれており、このカフェインには食欲抑制作用があることが報告されているが、今回はその効果はみられなかった。緑茶に含まれるカテキンなどは脂肪の吸収を抑え、肥満を予防する効果があることがわかっている。

今回の実験より、ルイボスティー及び緑茶には強い抗酸化作用があることが示された。特に2種類を比較すると緑茶の方が高い抗酸化作用を示した。

緑茶に含まれる抗酸化作用を示すビタミンとして、ビタミンE、ビタミンC、β-カロテンが含まれると言われている。これらのうちビタミンEとβ-カロテンが脂溶性ビタミンであり、ビタミンC

は水溶性ビタミンである。今回の実験では茶葉を熱湯に抽出し飲料としたことから、水溶性であるビタミンCが水に溶け出し抗酸化作用を強く示す要因となったのではないかと考えられる。

ルイボスティーの特徴として、タンニン含有量が低くカフェインが含まれない、主な抗酸化成分としてフラボノイド類が含まれている点が挙げられる<sup>1)</sup>。フラボノイド類の中でも、特にルテリオン、ケルセチン、アスパラチン、ルチンが含まれているとのことである。ルチンとケルセチンは熱水に溶け出しやすいことから、ルイボスティーの抗酸化作用に関係していると考えられる。

抽出してからの経日変化についての実験も行った。その結果、今回実験を行った4日目まではルイボスティーと緑茶は共に高い抗酸化作用を示し、保存期間による変化は見られなかった。

これらのことから、今回用いた飲料は、4日間冷蔵庫保存したのものも含め、高い抗酸化作用を示し、動物実験においても効果が期待できると推測される。

今回の実験からルイボスティーには抗不安作用または学習記憶を改善する可能性のあること、緑茶には抗不安作用と体重増加の抑制および血清脂質の低下作用があることが示唆された。ルイボスティーについてはその作用のメカニズムについてさらなる研究が必要である。

#### [参考文献]

- 1) 人見英里 他、ルイボスティー (*Aspalathus linearis*) の抗酸化性、*日本食品科学工学会誌* 46 (12)、779-785 (1999)
- 2) 小國伊太郎、緑茶の機能性-がん予防機能を中心に-、*静岡県立大学短期大学部研究紀要* 14 (1)、77-88 (2000)
- 3) 山田勝士、オープンフィールドテスト、*生体の科学* 45 (5)、426-427 (1994)
- 4) 岩崎勝則、ステップスルー型受動的回避試験、*生体の科学* 45 (5)、496-497 (1994)
- 5) Flood J F, et al., Amnestic effects on mice of four synthetic peptides homologous to amyloid  $\beta$  protein from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3363-3366 (1991)
- 6) 小宇田智子 他、浦上財団研究報告書 Vol 16、55-62 (2007)
- 7) 小堀真珠子、*オレオサイエンス* 17 (10)、13-19 (2017)
- 8) Haque A M, et al., Long-term administration of green tea catechines improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr* 136, 1043-1047 (2006)
- 9) Kim M, et al., Effects of green tea polyphenol on cognitive and acetylcholine activities. *Biosci Biochem Biochem*, 68 (9), 1977-1979 (2004)
- 10) Kaur T, et al., Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. *Brain Cogn*, 67 (1), 25-30 (2004)
- 11) Unno K, et al., Suppressive effects of green tea catechine on morphological and functional regulation of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10), *Exper Gerontol*, 39 (7) 1027-1037 (2004)
- 12) Egashira N, et al., Theanine prevents memory impairment induced by repeated cerebral ischemia in rats. *Phytother Res*, 22 65-68 (2008)
- 13) 片岡洋祐 他、テアニン高含有緑茶摂取による高齢者の認知症予防効果、*日本未病システム学会雑誌* 15 (1)、17-23 (2009)