

アキノワスレグサ投与がマウスの行動に及ぼす影響

上江洲 香代子

Effects of Akinowasuregusa on behavior in adult mice

Kayoko Uezu

Abstract

In this study, the effects of Akinowasuregusa (*Hemerocallis fulva* L. var *sempervivone* M. Hotta) on behavior in ddY mice were examined. Ten weeks old male ddY mice were fed experimental diet containing 0.4% air-dried and ground flower of Akinowasuregusa or control diet. After 1 month of feeding, some behavioral tests were performed. There were no differences between the two groups on exploring behavior such as walking and rearing in open-field test. There was no difference in entering to the open arm in elevated plus maze, but mice fed experimental diet entered to the closed arm more than control. Akinowasuregusa group showed increased retention time in stepthrougtype passive avoidance task. These results suggest that Akinowasuregusa may not have anti-anxiety effects, but may improve long term memory in adult mice.

I. 緒 言

アキノワスレグサ (*Hemerocallis fulva* L. var *sempervivone* M. Hotta) は、ユリ科の植物の萱草の一種で、沖縄や台湾、中国などでは、その花や若芽が食用として用いられており、また葉や根茎部も含めて民間薬としても利用されている。薬用植物図鑑^{1,2)}などには、その効用として解熱や利尿作用、不眠症の改善効果などがあげられている。これまでの研究には、アキノワスレグサ花の乾燥粉末を投与したマウスでは、暗期において徐波睡眠と逆説睡眠が共に増加したという報告³⁾や、抗酸化物質の高い含有量などの報告⁴⁾がある。筆者らもこれまでにアキノワスレグサの花からの抽出物を成熟マウスの脳室内に投与すると学習記憶が改善されること⁵⁾や、腹腔内投与により抗不安作用が示唆されること⁶⁾、またアキノワスレグサ花の料理での活用方法などについて報告してきた。

今回の研究では、アキノワスレグサの花の乾燥粉末を食餌として投与した場合に、普通の成熟マウスの行動にどのような影響を及ぼすかを調べることを目的として実験を行った。

動物実験は、活水女子大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

II. 実験方法

1) アキノワスレグサ花の採取と試料の調整

アキノワスレグサの花は朝咲いて夕方にはしぼむ1日花で、8月から10月頃まで採取できる。今回使用した花はこの期間の夕方に摘み取ったもので、熱風乾燥した後に、餌の調整時にミルサー (IFM-700G, Iwatani) で粉末状に粉碎して使用した。

2) 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。3日間の環境馴化の後、コントロール群 (10匹) とアキノワスレグサ群 (10匹) の2群を設定して、実験食で8週間飼育した。

表1には、コントロール群の食餌組成を示した。アキノワスレグサ群には、これに重量の0.4%の割合で花の乾燥粉末を添加したものを与えた。餌の投与は月～土曜に行い、毎回新しい餌を与えた。飼育環境はコンベンショナルで、室温 25 ± 1 ℃、12時間明暗周期（8:00～20:00）に保ち、実験期間を通して餌と水は自由摂取とし、摂餌量を毎日、体重を週2回測定した。

表1. コントロール群食餌組成

カゼイン	24g
α -コーンスターチ	42g
スクロース	21g
セルロース	2g
ミネラル混合（オリエンタル配合）	5g
ビタミン混合（オリエンタル配合）	1g
大豆油	5g
計	100g

実験食群には、アキノワスレグサ花の乾燥粉末を0.4%の重量比で添加した。

3) 行動試験

実験食投与開始後5週目から8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⁷⁾。

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が増加する。

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⁸⁾。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⁹⁾。実験装置は白色光で照明した明室（10×10×10cm）と床にグリッドを取り付けた暗室（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時間後と1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。

4) 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（8.5g±0.75g）とアキノワスレグサ群（7.3g±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。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2にはオープンフィールド試験の結果を示した。歩行数や立ち上がりの探索行動がわずかにアキノワスレグサの方が多いが、毛づくろい時間や脱糞数の情動の指標のいずれにおいても、両群の間に差はなかった。

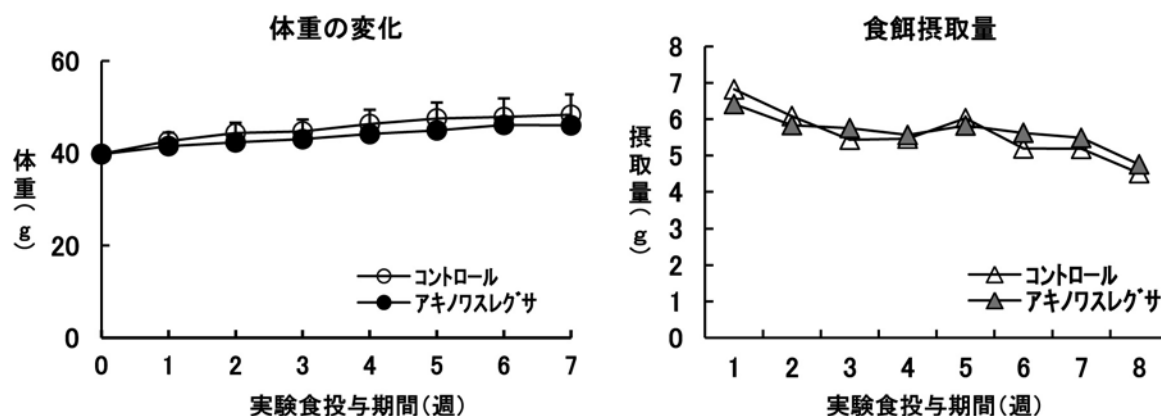
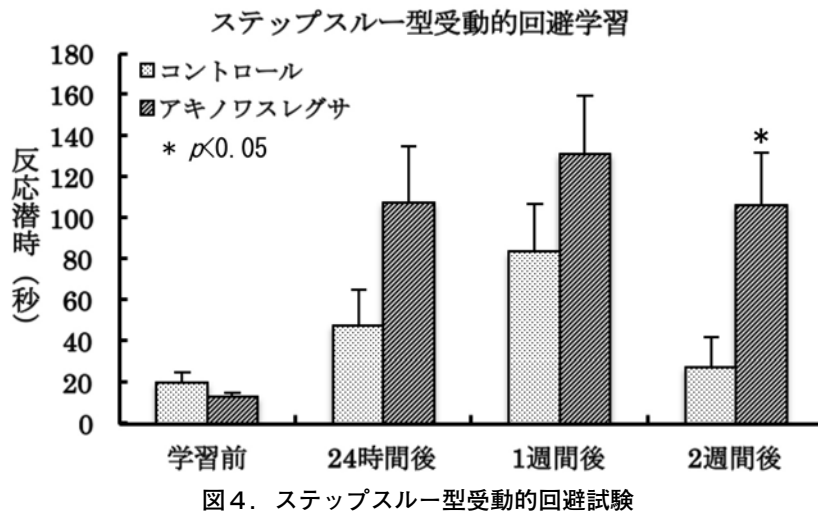
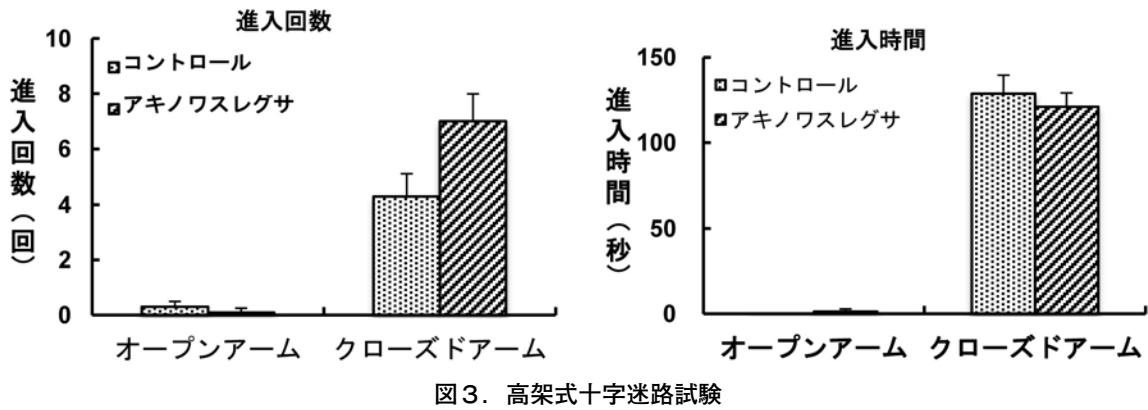
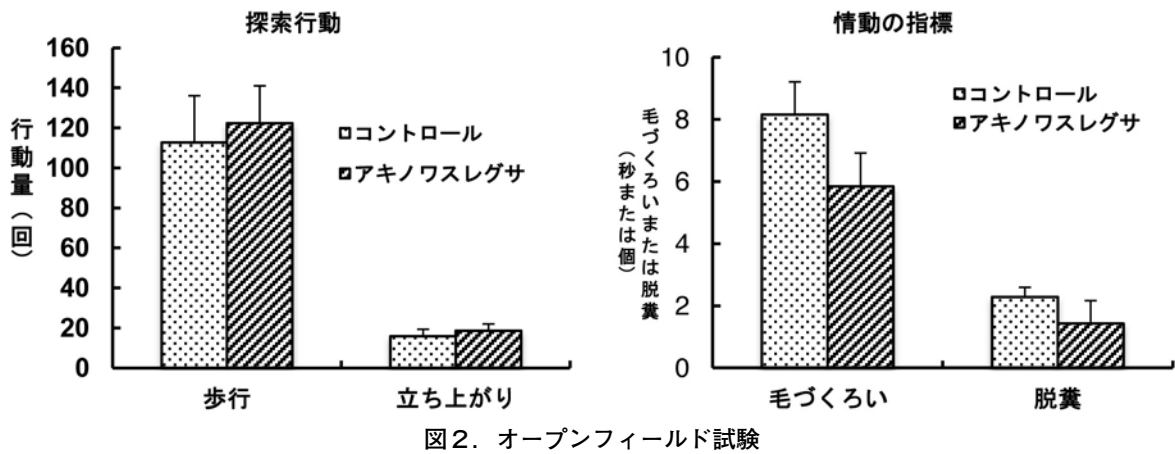


図1. 体重の変化と摂餌量の変化

図3には高架式十字迷路試験の結果を示した。オープンアームへの進入回数と進入時間においては両群の間に差は見られなかった。クローズドアームへの進入回数はアキノワスレグサ群の方が多い傾向が見られたが、進入時間においては差がみられなかった。

図4に示したステップスルー型受動的回避試験では、アキノワスレグサ群で24時間後、1週間後とも反応潜時が長く、2週間後は有意に長くなった。このことから、アキノワスレグサ0.4%添加は記憶保持を改善したと考えられる。



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アキノワスレグサ群とコントロール群の間に差は見られなかった。またオープンフィールド試験では、アキノワスレグサ群でやや高い探索行動が見られたが統計的有意差はなく、情動の安定性にも差が見られなかった。これらのことから、アキノワスレグサ0.4%投与はマウスの成長や一般活動性、感覚機能、運動機能、情動などへの悪影響はなかったと考えられる。

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への進入回数、滞在時間ともに両群において非常に少なく、ほとんど抗不安作用を示さなかった。一方、クローズドアームへの進入回数はアキノワスレグサ群で多く見られた。一般活動性を見るオープンフィールド試験でもアキノワスレグサ群の探索行動がわずかながら多く見られたことを合わせて考えると、活動性はやや高まっているとも言える。

アキノワスレグサ花の水抽出物を、マウスの腹腔内に持続的に投与することにより、オープンフィールドテストや高架式十字迷路で抗不安作用を示す報告⁶⁾や、ワスレグサ属の根のエタノール抽出物をラットに経口投与すると脳内モノアミン濃度が減少し行動量も低下したという報告がある¹⁰⁾。実験的うつ状態のラットにワスレグサ属の花のエタノール抽出物を投与した研究では、脳内モノアミン濃度が増加し抗うつ作用が見られたという報告¹¹⁾、コルチコステロン投与による脳由来神経栄養因子 (BDNF) と TrkB 受容体タンパク質の減少を弱めて抗うつ作用を示すという報告¹²⁾ などもある。また、アキノワスレグサ花は抑制性神経伝達物質の γ -アミノ酪酸 (GABA) を多く含まれている¹³⁾。これらのことから、今回の実験でも抗不安作用または行動量の低下が予測されたが、今回の投与量および方法ではその効果は見られなかった。先行研究での報告は水またはエタノールによる抽出物の投与実験である。今回の実験は、通常ヒトが食事として利用する場合を想定して、花の乾燥粉末を餌に混合して投与した。今後投与量や投与期間などの変更や経口摂取後の体内動態、神経伝達物質の変化なども合わせて抗不安作用に及ぼす影響を検討す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学習試験の結果からは、長期記憶が改善される可能性が示唆された。アキノワスレグサ花の乾燥粉末を投与したマウスでは、暗期の睡眠が増加したという報告³⁾や花の水抽出物を、マウスの腹腔内に持続的に投与することによりノンレム睡眠が増加したことが報告されている⁶⁾。睡眠は学習・記憶過程に重要な役割を担っていることは良く知られており、長期記憶の統合や固定には様々な睡眠状態が関与していることが指摘されている¹⁴⁻¹⁷⁾。今回の実験では、睡眠状態は分析していないが、GABA受容体の活性化は睡眠誘発に寄与することから、GABAが多く含まれるアキノワスレグサ花の摂取により睡眠状態が改善され、学習・記憶能力が高まった可能性が推測される。また、アキノワスレグサ花には β -クリプトキサンチンや β -カロテン、などのカロテノイドも豊富に含まれており⁴⁾、アキノワスレグサ花の摂取はヒトにおける血清中抗酸化ビタミン濃度が増加したと言う報告がある¹⁸⁾。これらの抗酸化作用によりマウスの脳神経組織などが酸化ストレス障害から守られた結果、学習・記憶が改善されたことも考えられる。

今回の実験において、アキノワスレグサ花の乾燥粉末0.4%重量比を餌としてマウスに経口投与した場合、抗不安作用には影響がみられなかったが、学習記憶が改善される可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) 多和田 真淳 他: 沖縄の薬草百科, 新星図書出版, 沖縄, (1985)
- 2) 中田 福市 他: これでわかる薬用植物, 新星図書出版, 沖縄, (1985)
- 3) Uezu E.: Effects of Hemerocallis on sleep in mice. *Psychiatry Clin Neurosci*, 52(2), 136-137(1998)
- 4) 上江洲 榮子: 離島におけるアキノワスレグサの利用について, *島嶼科学*, 3, 41-45 (2010)
- 5) Uezu K., et al.: Effects of Hemerocallis on memory in mice, *Abstracts of 21st Pacific Science Congress*, 350, (2007)
- 6) Sano A., et al.: Hypnotic and anxiolytic effects of Hemerocallis in mice, *Abstracts of 21st Pacific Science Congress*, 348, (2007)
- 7) 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)
- 8) Pellows S, et al.: Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 24(3), 525-529, (1986)
- 9) 岩崎 克典: 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)

- 10) Hsieh M.-T., et al.: Effects of *Hemerocallis flava* on motor activity and the concentration of central monoamines and its metabolites in rats, *J Ethnopharmacol*, 52, 71-76, (1996)
- 11) Gu L., et al.: Role for monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of ethanol extracts from *Hemerocallis citrina*, *J Ethnopharmacol*, 139(3), 780-787, (2012)
- 12) Yi L.-T., et al.: Ethanol extracts from *Hemerocallis citrina* attenuate the decreases of brain-derived neurotrophic factor, TrkB levels in rat induced by corticosterone administration, *J Ethnopharmacol*, 144(2), 328-334, (2012)
- 13) Uezu K., et al: Effects of *Hemerocallis* on memory in mice, *Abstracts of 5th Asian Congress of Dietetics*, 179, (2010)
- 14) Stickgold R., et al.: Sleep and memory: the ongoing debate, *Sleep*, 28(10), 1225-1227, (2005)
- 15) Payne J.D., et al.: The role of sleep in false memory formation, *Neurobiol Learn Mem*, 92(3), 327-334. (2009)
- 16) Rasch B., et al.: About sleep's role in memory, *Physiol Rev*, 93(2), 681-766. (2013)
- 17) Spencer R.M.: Neurophysiological Basis of Sleep's Function on Memory and Cognition, *ISRN Physiol*, (2013)
- 18) 上江洲 榮子, 他: 中城本「御膳本草」における“くわんそう”の活用, 国際琉球沖縄論集, 創刊号, 1-8, (2012)