

氏名 じゃるがるさいはん うんだるまー
JARGALSAIKHAN UNDARMAA

学位の種類 博士(医学)

学位記番号 富生命博甲第88号

学位授与年月日 平成29年3月23日

専攻名 認知・情動脳科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第3項該当

学位論文題目 Ingestion of dried-bonito broth(dashi) facilitates parvalbumin-immunoreactive neurons in the brain, and affects emotional behaviors in mice
(かつおだし摂取のマウスの情動行動及び脳内パルブアルブミン陽性ニューロンに及ぼす影響)

論文審査委員

(主査) 教授 笹原 正清

(副査) 教授 井ノ口 馨

(副査) 教授 鈴木 道雄

(副査) 教授 奥寺 敬

指導教員 教授 西条 寿夫

【学位論文内容の要旨】

〔目的〕

食物は、迷走神経、栄養素による酸化/抗酸化作用、食物中の特殊栄養素、および腸管マイクロビオーム(細菌叢)等を介して様々な向精神作用を呈することが示唆されている。例えば、1) 食習慣の乱れが発症に関与しているメタボリック症候群はうつ病との相関性が高い、2) 脂肪や糖分を多く含むファーストフードなどは、脳内酸化過程を促進し、うつ病の発症に関与する、3) 不安障害、双極性障害、攻撃行動などの問題行動の発症/発現は小児期に多く、ファーストフードから伝統的食事パターンへの変更により、これらの症状が改善することなどが知られている。一方、パルプアルブミン (PV) 陽性ニューロンの多くは GABA 作動性であり、その障害により攻撃行動やうつ様行動の亢進が起こることが知られている。

一方、日本の伝統的食品であるカツオだし (DBD) の摂取により、ヒトでは肉体的・精神的疲労や気分及び感情状態が改善されることが報告されており、DBD が中枢神経系、特に PV 陽性ニューロンに作用を及ぼしている可能性が示唆される。そこで本研究ではマウスに DBD を摂取させ、情動行動 (攻撃行動試験及び強制水泳テスト) や PV 陽性ニューロンに及ぼす影響を解析した。

〔方法〕

動物

雄性マウス (C57BL/6J、4 週齢) 84 匹を用いた。実験 I (n=46) では、1) 10%DBD 摂取群、2) 100% DBD 摂取群、および 3) 水道水摂取群の 3 群に分けた。実験 II (n=38) では、1) 迷走神経切断後 10% DBD 摂取群、2) 偽手術後 10% DBD 摂取群、3) 迷走神経切断後水道水摂取群、および 4) 偽手術後水道水摂取群の 4 群に分けた。DBD 摂取群には、2 瓶法により DBD と水道水を自由に摂取させ、水道水摂取群には 2 瓶法にて水道水のみを与えた。以上の群分け後、それぞれの溶液を 60 日間摂取させ、ついでに情動行動をテストした。尚、DBD は市販製品を用い、10%DBD が通常の飲用に用いられる濃度である。

情動行動試験

攻撃行動は、居住・侵入マウス試験法により解析した。C57BL/6J 系マウス (居住マウス) の飼育ケージ内に異系統マウス (侵入マウス) (C3H/Hej、4 週齢、雄) を入れ、10 分間の行動をビデオで記録した。C57BL/6J 系マウスによる攻撃行動が観察された場合は、攻撃行動開始までの潜時、回数および持続時間を測定した。

強制水泳試験では、水を入れたアクリル製の円筒にマウスを入れ、赤外線センサーを用いた行動検出装置により遊泳行動を記録した。強制水泳試験は 2 日間行い、1 日目の測定時間は 15 分間とし、2 日目の測定時間は 5 分間とした。データ解析には、2 日目のデータを用いた。

神経化学的解析

脳凍結切片作成後、PV 陽性ニューロンの免疫組織化学的染色ならびにニッスル染色を行なった。ニッスル染色により脳領域を同定後、CCD カメラおよび Z 軸方向のマイクロケータを有

する光学的顕微鏡により、内側前頭前野、扁桃体、海馬体および上丘における PV 陽性ニューロンの 3 次元画像情報を取得し、ステレオロジー解析（脳切片に含まれる細胞総数、細胞密度）を行なった。

統計解析

各群の測定データを、t-test、2-way ANOVA、または 3-way ANOVA により、比較解析した。また、各測定データ間の相関は、Pearson の相関係数を用いて解析した。

【結果】

実験 I では、攻撃行動試験において、10%DBD 摂取により、攻撃行動の潜時の遅延、および攻撃行動の持続時間の短縮が認められた。強制水泳試験では、10%および 100%DBD 摂取により遊泳時間が有意に延長した。神経化学的解析では、10%DBD 摂取により、解析した 4 脳領域すべてにおいて PV 陽性ニューロン密度が有意に増大した。

実験 II では、攻撃行動試験において、10%DBD 摂取により、迷走神経切断に関係なく攻撃行動の潜時の遅延、および攻撃行動の回数の減少が認められた。一方、迷走神経切断により、攻撃行動の持続時間が増大した。強制水泳試験では、10%DBD 摂取により、迷走神経切断に関係なく遊泳時間が有意に延長した。神経化学的解析では、解析した 4 脳領域すべてにおいて、10%DBD 摂取により、PV 陽性ニューロン密度が有意に増大し、また、迷走神経切断により同密度が有意に低下した。

さらに、内側前頭前野における PV 陽性ニューロン密度と攻撃行動の潜時は正相関を、同密度と攻撃行動の回数及び持続時間は負相関を示した。また、扁桃体における PV 陽性ニューロン密度と攻撃行動の潜時は正相関を、同密度と攻撃行動の持続時間は負相関を示した。一方、扁桃体における PV 陽性ニューロン密度と遊泳時間は正相関を示した。

【総括】

DBD 摂取により、攻撃行動が低下し、PV 陽性ニューロン密度が増大した。また、攻撃行動と PV 陽性ニューロン密度は負相関を示した。さらに DBD 摂取により、うつ様行動（遊泳時間の低下）が改善し、遊泳時間と PV 陽性ニューロン密度は正相関を示した。一方、GABA および PV 陽性ニューロンは、攻撃行動およびうつ様行動に抑制的に作用していることが知られている。これらのことから、DBD 摂取により GABA 作動性 PV 陽性ニューロンが賦活され、それにより攻撃行動が低下し、またうつ様行動を改善したことが示唆される。さらに、本実験から、これら DBD の作用経路には、少なくとも迷走神経を介さない経路が関与していることが明らかになった。一方、DBD には様々な抗酸化物質やヒスチジンが含まれ、ヒスチジンは脳内で PV 陽性ニューロンを興奮させるヒスタミンに変換されることから、DBD の効果はこれらの物質によることが示唆された。以上の研究成果はヒトにおいて、食物の脳機能に及ぼす作用メカニズムの解明につながるものと考えられる。

【論文審査の結果の要旨】

〔目的〕

食物は、迷走神経、栄養素による酸化/抗酸化作用、食物中の特殊栄養素、および腸管マイクロバイオーム（細菌叢）等を介して様々な向精神作用を呈することが示唆されている。例えば、1) 食習慣の乱れが発症に関与しているメタボリック症候群はうつ病との相関性が高い、2) 脂肪や糖分を多く含むファーストフードなどは、脳内酸化過程を促進し、うつ病の発症に関与する、3) 不安障害、双極性障害、攻撃行動などの問題行動の発症/発現は小児期に多く、ファーストフードから伝統的食事パターンへの変更により、これらの症状が改善することなどが知られている。一方、パルブアルブミン（PV）陽性ニューロンの多くは GABA 作動性であり、その障害により攻撃行動やうつ様行動の亢進が起こることが知られている。

一方、日本の伝統的食品であるカツオだし（DBD）の摂取により、ヒトでは肉体的・精神的疲労や気分及び感情状態が改善されることが報告されており、DBD が中枢神経系、特に PV 陽性ニューロンに作用を及ぼしている可能性が示唆される。そこで本研究ではマウスに DBD を摂取させ、情動行動（攻撃行動試験及び強制水泳テスト）や PV 陽性ニューロンに及ぼす影響を解析した。

〔方法〕

1. 動物

雄性マウス（C57BL/6J、4週齢）84匹を用いた。実験Ⅰ（n=46）では、1) 10%DBD 摂取群、2) 100% DBD 摂取群、および 3) 水道水摂取群の3群に分けた。実験Ⅱ（n=38）では、1) 迷走神経切断後 10% DBD 摂取群、2) 偽手術後 10% DBD 摂取群、3) 迷走神経切断後水道水摂取群、および 4) 偽手術後水道水摂取群の4群に分けた。DBD 摂取群には、2瓶法により DBD と水道水を自由に摂取させ、水道水摂取群には2瓶法にて水道水のみを与えた。以上の群分け後、それぞれの溶液を 60日間摂取させ、ついで情動行動をテストした。

2. 情動行動試験

攻撃行動は、居住・侵入マウス試験法により解析した。C57BL/6J系マウス（居住マウス）の飼育ケージ内に異系統マウス（侵入マウス）（C3H/HeJ、4週齢、雄）を入れ、10分間の行動をビデオで記録した。C57BL/6J系マウスによる攻撃行動が観察された場合は、攻撃行動開始までの潜時、回数および持続時間を測定した。

強制水泳試験では、水を入れたアクリル製の円筒にマウスを入れ、赤外線センサーを用いた行動検出装置により遊泳行動を記録した。強制水泳試験は2日間行い、1日目の測定時間は15分間とし、2日目の測定時間は5分間とした。データ解析には、2日目のデータを用いた。

3. 神経化学的解析

脳凍結切片作成後、PV 陽性ニューロンの免疫組織化学的染色ならびにニッスル染色を行なった。ニッスル染色により脳領域を同定後、CCD カメラおよび Z 軸方向のマイクロケータを有する光学顕微鏡により、内側前頭前野、扁桃核、海馬体および上丘における PV 陽性ニューロン

の3次元画像情報を取得し、ステレオロジー解析（脳切片に含まれる細胞総数、細胞密度）を行った。

〔結果〕

実験Ⅰでは、攻撃行動試験において、10%DBD摂取により、攻撃行動の潜時の遅延、および攻撃行動の持続時間の短縮が認められた。強制水泳試験では、10%および100%DBD摂取により遊泳時間が有意に延長した。神経化学的解析では、10%DBD摂取により、解析した4脳領域すべてにおいてPV陽性ニューロン密度が有意に増大した。

実験Ⅱでは、攻撃行動試験において、10%DBD摂取により、迷走神経切断に関係なく攻撃行動の潜時の遅延、および攻撃行動の回数の減少が認められた。一方、迷走神経切断により、10%DBD摂取に関係なく攻撃行動の持続時間が増大した。強制水泳試験では、10%DBD摂取により、迷走神経切断に関係なく遊泳時間が有意に延長した。神経化学的解析では、解析した4脳領域すべてにおいて、10%DBD摂取により、PV陽性ニューロン密度が有意に増大し、また、迷走神経切断により同密度が有意に低下した。

さらに実験Ⅰ及びⅡにおいてステレオロジーで解析したすべてのマウスを用いた解析から、内側前頭前野におけるPV陽性ニューロン密度と攻撃行動の潜時は正相関を、同密度と攻撃行動の回数及び持続時間は負相関を示した。また、扁桃体におけるPV陽性ニューロン密度と攻撃行動の潜時は正相関を、同密度と攻撃行動の持続時間は負相関を示した。一方、扁桃体におけるPV陽性ニューロン密度と遊泳時間は正相関を示した。

〔総括〕

DBD摂取により、攻撃行動が低下し、PV陽性ニューロン密度が増大した。また、攻撃行動とPV陽性ニューロン密度は負相関を示した。さらにDBD摂取により、うつ様行動の改善との関連を示唆する結果（遊泳時間の低下）が得られ、遊泳時間とPV陽性ニューロン密度は正相関を示した。一方、GABAおよびPV陽性ニューロンは、攻撃行動およびうつ様行動に抑制的に作用していることが知られている。これらのことから、DBD摂取によりGABA作動性PV陽性ニューロンが賦活され、それにより攻撃行動が低下し、またうつ様行動を改善したことが示唆される。さらに、本実験から、これらDBDの作用経路には、少なくとも迷走神経を介さない経路が関与していることが明らかになった。一方、DBDには様々な抗酸化物質やヒスチジンが含まれ、ヒスチジンは脳内でPV陽性ニューロンを興奮させるヒスタミンに変換されることから、DBDの効果はこれらの物質によることが示唆された。

以上に基づき、本研究は、DBD等の食物による向精神作用の作用部位の一端としてPV陽性ニューロンが重要であることを初めて明らかにした点に新規性があり、またDBD摂取が発達期における攻撃行動やうつ様行動を低減させることを明らかにした点は、臨床医学における重要性も高いと考えられる。これら研究成果はヒトにおいて、食物の脳機能に及ぼす作用メカニズムの解明につながるものと考えられ、本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。