

マウス行動分析によるL-オルニチン長期投与の効果について

Behavioral analysis of the effects of long-term treatment with L-ornithine in mice

曾我部 咲, 鈴木 真奈美, 佐伯 綾希子, 井上 里加子, 林 泰資
Saki Sogabe, Manami Suzuki, Akiko Saiki, Rikako Inoue, Yasushi Hayashi

ノートルダム清心女子大学大学院人間生活学研究科食品栄養学専攻
Graduate School of Human Life Sciences, Department of Foods and Human Nutrition,
Notre Dame Seishin University

Summary

L-ornithine has recently received considerable attention as an anxiolytic-like or antifatigue agent in both human and animal studies. However, most previous results were obtained from a single administration of L-ornithine. Accordingly, this study was designed to clarify the effects of long-term L-ornithine treatment on psychological stress and locomotor activity in mice using a variety of behavioral pharmacology methods. In a stress-induced hyperthermia test, 10 days of L-ornithine treatment induced hyperthermia elevation. Pentobarbital-induced sleep time was shortened by the treatment. However, no significant effects were detected in the elevated plus-maze, running wheel, or forced swim tests. These results suggest that long-term treatment with L-ornithine elevates stress sensitivity and arousal level in mice.

はじめに

L-オルニチンは肝臓における尿素回路の主要な構成成分であり、生体にとって有害なアンモニアの解毒に深く関わっている(1)。アンモニアは疲労物質の一つと考えられており(2, 3)、エネルギー代謝の低下や神経伝達物質の機能不全を引き起こすことが報告されている(4, 5)。L-オルニチンの摂取は、体内のアンモニア解毒を促進することで、エネルギー産生系を活性化させ、疲労の抑制や改善をもたらすことが推測されている(6)。

一方、最近、L-オルニチンとストレスの関連性が注目されている。Kurataら(7)は、マウスに経口投与したL-オルニチンが、高架式十字迷路試験で評価できる不安を緩和すること、および拘束ストレスによって増加した血中コルチコステロン濃度を減少させることを明らかにしている(8)。また、ヒトに対する精神的ストレスが、オルニチン摂取により軽減されることも報告されている(9)。しかし、これらの報告はL-オルニチン単回投与による作用を観察したものがほとんどであり、長期投与の影響を検討した研究、特に動物モデルによる報告は見当たらない。

本研究では、標準的な群飼育環境下のマウスに対してL-オルニチンを長期経口投与した後、行動薬理学的方法を用いてストレスや運動機能に及ぼす効果について検討した。

方法

実験動物

5週齢のICR雄性マウス(日本クレア)を購入して使用した。透明なプラスチック製の飼育ケージ(21×31×13 cm)を用い、実験前に1週間以上飼育した。動物飼育室の温度は23±1℃とし、12時間周期で部屋の照明を点灯(7:00-19:00)あるいは消

灯した。餌および水は自由摂取とした。マウスの取り扱いについては「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日環境省告示第88号)を順守し、「ノートルダム清心女子大学動物実験指針」に則って実施した。

L-オルニチン投与と実験プロトコール

1週間以上、群飼育を行った後、L-オルニチン(特級、ナカライテスク)を投与した。L-オルニチンは水道水100 mlあたり、10 mg (Orn10群)、30 mg (Orn30群)、100 mg (Orn100群)をそれぞれ溶かして、給水瓶から10日間(ワイヤレス回転ホイールによる実験は8日間)、群飼育マウス(5匹/ケージ)に自然摂取させた。コントロール群には水道水を摂取させた。L-オルニチン溶液は2日に1回新しいものに交換した。その後、ワイヤレス回転ホイールによる実験を除いて、以下の実験を10:00-16:00の間に行った。なお、強制水泳試験とペントバルビタール睡眠試験はデジタルビデオカメラ(DCR-100, Sony)に録画し、後日分析を行った。

体重とL-オルニチン溶液摂取量の測定

電子天秤を用いて、マウス体重とL-オルニチン溶液摂取量を2日に1回測定した。

高架式十字迷路試験

装置は、直交する4本のアーム(各々50×300 mm)とそれらが交差する部分のセンターエリア(50×50 mm)から構成されている。2本のクローズドアームには高さ150 mmの側壁があり、オープンアームには滑り止めとして高さ2.5 mmの返しがついている。側壁および返しは厚さ2 mmの灰色プラスチック製である。迷路全体は木製で、走行路が床から50 cmの高さに設定されている。マウスはセンターエリア

で頭部をクローズドアームに向けた状態で放し、5分間の行動観察を行った。観察と解析は、ビデオ行動解析システムであるエソビジョン 2.3 (Noldus) を用い、オープンアームおよびクローズドアームへの進入回数と滞在時間、移動距離を測定した。

ワイヤレス回転ホイールによる運動量測定

1週間以上、群飼育したマウスを通常の飼育ケージ (20×31×13 cm) に1匹ずつ分けた。飼育ケージ内にワイヤレス回転ホイール (ENV-044, Med Associates) を設置し、装置から送信されるデータをインターフェース (DIG-804, Med Associates) と解析ソフトウェア (SOF-860, Med Associates) を用いて、8日間昼夜連続 (測定開始時刻, 19:00) で測定・解析した。運動量の指標は1日あたりのホイール回転数とした。実験期間中、実験群には前述の Orn100 群と同様の L-オルニチン溶液を給水瓶から自由に摂取させた。コントロール群には水道水を与えた。

強制水泳試験

直径 10 cm, 高さ 30 cm の透明な円筒形のプラスチックリンダーに 24-25°C の水を 20 cm の深さまで入れ、その中にマウスを放し、6 分間観察した。全観察時間のうち、後半 3 分間について、前肢を動かさずに静かに浮いている時間 (無動時間) を測定した。

ストレス性高体温試験

Olivier らの方法 (10) に準じて、実験を行った。群飼育マウスに L-オルニチン溶液を 9 日間摂取させた後、直腸温測定の前日、マウスを小飼育ケージ (14×22×13 cm) に移し、個別飼育した。L-オルニチン溶液の投与は継続した。直腸温測定はデジタル直腸温度計 (TH-5, Physitemp) を用いた。プローブの先端をマウス直腸に約 2 cm 挿入し、15 秒後に測定した。さらに 10 分後に 2 回目の測定を行った。1 回目を基礎体温 (T_1) と定め、この測定操作をストレスアとみなした。2 回目をストレス負荷後の体温 (T_2) とし、 T_1 と T_2 の差を体温変化量 (ΔT) とした。

ペントバルビタール睡眠試験

ペントバルビタールナトリウム (ナカライテスク) を生理食塩水に溶解し、マウス腹腔内に投与した (50 mg/kg)。薬物投与後、マウスを仰臥位で木製台の上に配置し、正向反射の消失から回復までの時間を睡眠時間として測定した。

統計方法

統計処理は、一元配置および二元配置分散分析と Dunnett 法による多重比較を行った。データは平均値±標準誤差で表示し、有意差の基準は $p < 0.05$ とした。

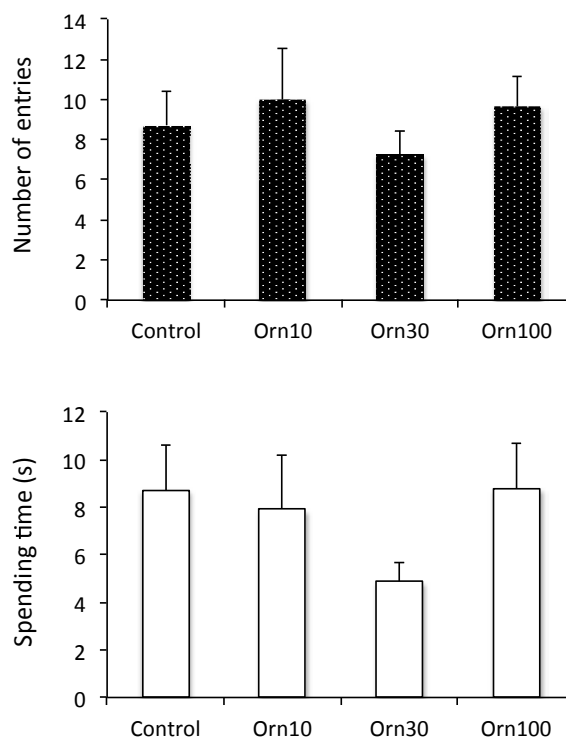


図 1 高架式十字迷路試験におけるオープンアームへの進入回数 (上) と滞在時間 (下) に及ぼす L-オルニチン長期投与の影響 (n=7-9)。

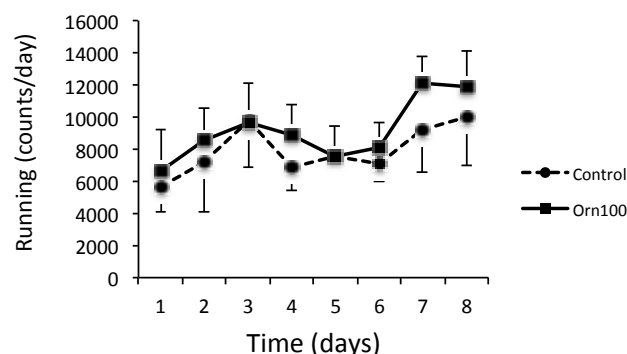


図 2 ワイヤレス回転ホイールの回転数に及ぼす L-オルニチン長期投与の影響 (n=5)。

結果

10 日間の L-オルニチン投与によって異常行動や下痢などはみられず、マウスは健康な状態であった。L-オルニチン溶液および水道水の摂取量は、1 匹あたり平均 7~8 ml/日であり、各群の間で差はみられなかった。また体重は、L-オルニチン投与前で、33.6±0.2 g (コントロール群), 34.8±0.2 g (Orn10 群), 34.4±0.4 g (Orn30 群), 33.5±0.4 g (Orn100 群) であり、投与後は 37.2±0.7 g (コントロール群), 38.2±0.4 g (Orn10 群), 38.4±0.4 g (Orn30 群), 37.1±0.4 g (Orn100 群) であった。L-オルニチン投与前後において、各群の体重およびその増加量に差はみられなかった。

図 1 に高架式十字迷路試験の結果を示す。L-オル

ニチンの投与によって、オープンアームへの進入回数および滞在時間に変化はみられなかった。クローズドアームへの進入回数および滞在時間も差はなかった（データ省略）。また、高架式十字迷路上の移動距離は、 1344 ± 71 cm（コントロール群）、 1380 ± 107 cm（Orn10 群）、 1225 ± 81 cm（Orn30 群）、 1483 ± 72 cm（Orn100 群）であり、各群間に差はなかった。

ワイヤレス回転ホイールによる測定結果を図 2 に示す。各測定日および 8 日間連続の総運動量において、Orn100 群とコントロール群の間に差はみられなかった。

強制水泳試験の結果を図 3 に示す。L-オルニチン投与はマウス前肢の無動時間に全く影響を及ぼさなかった。

ストレス性高体温試験の結果を図 4 に示す。それぞれの群の基礎体温 (T_1) は、 $37.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ （コントロール群）、 $37.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$ （Orn10 群）、 $37.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$ （Orn30 群）、 $36.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$ （Orn100 群）であり、各群間に差はみられなかった。L-オルニチン投与により、Orn100 群においてストレス性高体温の上昇がみられた。

ペントバルビタール睡眠試験の結果を図 5 に示す。ペントバルビタールによる睡眠時間は、L-オルニチンの投与量に依存して減少した。

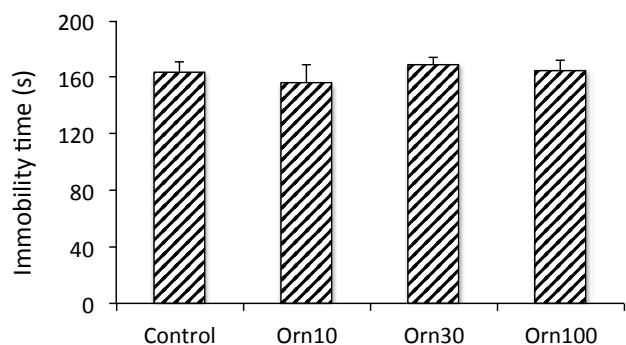


図 3 強制水泳試験における L-オルニチン長期投与の影響 (n=10)。

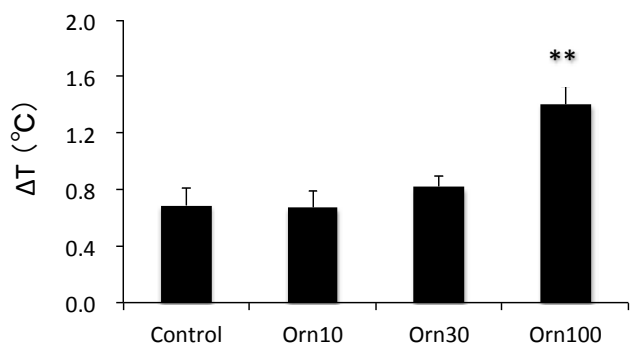


図 4 ストレス性高体温試験における L-オルニチン長期投与の影響 (n=6-10)。**p<0.01 は、コントロール群との比較。

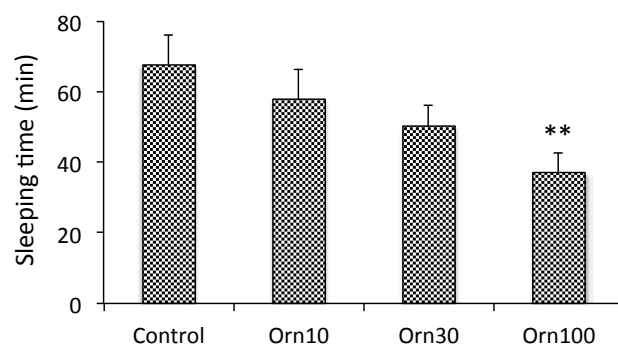


図 5 ペントバルビタール睡眠試験における L-オルニチン長期投与の影響 (n=10-13)。**p<0.01 は、コントロール群との比較。

考 察

本研究では、実験期間中のストレスをできるだけ軽減するために、ワイヤレス回転ホイールによる実験を除いて、標準的な群飼育の環境下で L-オルニチンを自発的に摂取させた。L-オルニチン溶液の投与量は、実験期間中のマウスの体重を約 35g と仮定すると、Orn30 群の場合、1 匹あたり約 60~70 mg/kg 体重/日になる。これは、単回投与による先行研究 (7, 8) と同程度である。

L-オルニチン投与は高架式十字迷路試験におけるオープンアームへの進入回数および滞在時間に影響を与えなかった。このことは、長期投与した L-オルニチンが本試験で評価できる不安を軽減しないことを示しており、単回投与による先行研究の結果と異なっている (7)。単回投与の場合、抗不安作用の発現に適量が指摘されており、高用量では作用がみられないことが示されている (7)。したがって、本実験のような長期投与の場合、抗不安作用の発現には、より少量の L-オルニチンを投与するのが適しているのかもしれない。

ワイヤレス回転ホイールによる運動量測定システムは、通常の飼育ケージ内で動物の運動量が測定できるシステムであり、動物へのストレスを最小限に抑えることができる。本装置を用いて、個別飼育のマウスに L-オルニチンを摂取させながら運動量を測定したが、顕著な変化はみられなかった。また、ビデオ行動解析システムを用いて測定した高架式十字迷路上の移動距離においても、L-オルニチン投与の効果はみられなかった。これらの結果は、L-オルニチン投与がマウスの運動活性に影響を与えないことを示している。さらに強制水泳試験において、L-オルニチン投与はマウス前肢の無動時間に影響を及ぼさず、抗うつ様作用も有しないことが明らかになった。

ストレス性高体温は、ヒトを含めた動物がストレス状態に置かれたとき、深部体温が上昇する現象である (10)。マウスの場合、動物種や実験時刻によって 0.5-1.5°C の体温上昇がみられることが知られている (11)。また、ベンゾジアゼピンや 5-HT_{1A} 受容体作動薬などの抗不安作用を有する薬物が、ストレス

性高体温を抑制することも報告されている(10)。本実験において、コントロール群のストレス性高体温の上昇値は平均 0.7°Cであり、Orn100 群では平均 1.4°Cの体温上昇がみられた。この結果は、L-オルニチン投与によりストレス感受性が上昇したことを示している。

ペントバルビタール睡眠試験は動物の覚醒レベルを評価する試験である。本試験による睡眠は、心理的ストレスなどによって覚醒水準が上がった場合、著しく短縮することが知られている(12)。前述したように、L-オルニチンの投与は用量依存的にペントバルビタール睡眠時間を短縮した。このことは、L-オルニチンがマウスの覚醒レベルを上昇させたことを示している。

以上より、長期経口投与したL-オルニチンがストレス感受性および覚醒レベルを上昇させることが示された。また、抗不安作用、抗うつ作用、運動活性亢進作用を有しないことも示唆され、単回投与と長期投与の違いも明らかになった。

本研究でみられたL-オルニチンの作用メカニズムに関しては不明である。Kurataら(7)の報告によれば、単回経口投与したL-オルニチンが脳内L-オルニチン濃度を上昇させることが示されている。したがって、L-オルニチン自体が脳内で作用している可能性がある。また、L-オルニチンはプトレッシン、スペルミジン、スペルミンなどのポリアミンの前駆物質として知られていることから(13)、ポリアミン代謝と関連して作用しているのかもしれない。これらの作用メカニズムの解明については更なる研究が必要である。

謝 辞

本研究の一部は、2013年度ノートルダム清心女子大学研究助成金の支援を受けて実施された。

文 献

- 1) Morris SM Jr. (2002) Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* 22:87-105.
- 2) Wilkinson DJ, Smeeton NJ, Watt PW (2010) Ammonia metabolism, the brain and fatigue; revisiting the link. *Prog Neurobiol* 91:200-19.
- 3) Banister EW, Cameron BJC (1990) Exercise-induced hyperammonemia: Peripheral and central effect. *Int J Sports Med* 11:S129-S142.
- 4) McCandless DW, Schenker S (1981) Effect of acute ammonia intoxication on energy stores in the cerebral reticular activating system. *Exp Brain Res* 44:325-330.
- 5) Butterworth RF, Lavoie J, Giguère JF, Layrargues GP, Bergeron M (1987) Cerebral GABA-ergic and glutamatergic function in hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* 6:131-144.
- 6) Sugino T, Shirai T, Kajimoto Y, Kajimoto O (2008) L-ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism. *Nutr Res* 28:738-743.
- 7) Kurata K, Nagasawa M, Tomonaga S, Aoki M, Morishita K, Denbow DM, Furuse M (2011) Orally administered L-ornithine elevates brain L-ornithine levels and has an anxiolytic-like effect in mice. *Nutr Neurosci* 14:243-248.
- 8) Kurata K, Nagasawa M, Tomonaga S, Aoki M, Akiduki S, Morishita K, Denbow DM, Furuse M (2012) Orally administered L-ornithine reduces restraint stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in mice. *Neurosci Lett* 506:287-291.
- 9) 秋月さおり, 菱田幸宏, 青木麻美, 倉田幸治, 長澤麻央, 古瀬充宏, 森下幸治 (2012) L-オルニチンのストレス抑制作用. *アミノ酸研究* 6:47-49.
- 10) Olivier B, Bouwknecht JA, Pattij T, Leahy C, van Oorschot R, Zethof TJ (2002) GABA_A-benzodiazepine receptor complex ligands and stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Pharmacol Biochem Behav* 72:179-188.
- 11) Peloso E, Wachulec M, Satinoff E (2002) Stress-induced hyperthermia depends on both time of day and light condition. *J Biol Rhythms* 17:164-170.
- 12) Ojima K, Matsumoto K, Tohda M, Watanabe H (1995) Hyperactivity of central noradrenergic and CRF systems is involved in social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep. *Brain Res* 684:87-94.
- 13) Hayashi Y, Tanaka J, Morizumi Y, Kitamura Y, Hattori Y (2004) Polyamine levels in brain and plasma after acute restraint or water-immersion restraint stress in mice. *Neurosci Lett* 355:57-60.