日本栄養・食糧学会誌　第64巻　第5号　323–327（2011）

研究ノート

マウス行動分析によるコーヒー揮発性成分のストレス緩和作用

林　泰資*,[1]，曽我部　咲[1]，服部幸雄[1]

（2011年4月11日受付；2011年6月28日受理）

要旨：コーヒー飲用によるストレス緩和作用についてはよく知られているが，その揮発性成分の効用に着目した研究は数少ない。本研究では，焙煎したコーヒー豆の揮発性成分とストレスとの関連性を明らかにするために，マウスを用いて種々の行動薬理学的実験を行い，コーヒー揮発性成分のストレス緩和作用について検討した。高架式十字迷路試験において，コーヒー揮発性成分は自発運動量に影響を及ぼすことなく，オープンアームへの滞在時間および進入回数を増加させた。また，ペントバルビタールによる睡眠時間は，コーヒー揮発性成分の曝露により明らかに延長した。オープンフィールド試験および強制水泳試験では，コーヒー揮発性成分の効果は見られなかった。以上より，焙煎したコーヒー豆の揮発性成分はマウスの覚醒水準を低下させ，抗不安様のストレス緩和作用を発揮することが示唆された。

キーワード：コーヒー揮発性成分，マウス，ストレス，高架式十字迷路試験，ペントバルビタール睡眠試験

コーヒーは世界的に最も好まれている飲料であり，その消費量は他の嗜好飲料に比較して非常に多い[1)]。長年，飲用されてきたコーヒーの中枢作用に関する研究は多く，自殺やうつ病リスクの軽減[2)3)]，パーキンソン病予防[4)]，ストレス緩和[5)]などが報告されている。しかし，これまでの大部分の研究はコーヒーの不揮発性成分に焦点をあてたものであり，約900種類にものぼる揮発性成分[6)]に関する研究は数少ない。

古賀ら[7)]によれば，コーヒーはその香りによってリラックス効果を有し，コーヒー豆の種類や焙煎の程度により効果に差があることが報告されている。また，コーヒー香気は覚醒水準や認知機能を高め，この効果もコーヒー豆の種類により異なることが報告されている[8)]。さらに最近，ラットの脳を用いたジェノミクスおよびプロテオミクス解析により，コーヒー揮発性成分が抗酸化やストレス緩和作用に関連する遺伝子やタンパク質発現を誘発することが示されている[9)]。しかし，コーヒー揮発性成分が動物の一般活動性に及ぼす影響について研究した報告はほとんど見あたらない。本研究では，焙煎したコーヒー豆の揮発性成分をマウスに曝露した後，種々の行動薬理学的実験を行い，コーヒー揮発性成分のストレス緩和作用について検討した。

方　法

1. 実験動物

体重35–40 gのICR雄性マウス（日本クレア(株)）を使用した。透明なプラスチック製の飼育ゲージ（20×31×13 cm）に1ケージあたり5–6匹ずつ分け，実験前に少なくとも1週間以上飼育した。動物飼育室内の温度は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）を遵守し，「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。

2. コーヒー試料

コーヒー試料として，焙煎したグアテマラコーヒー豆の粉末（中煎り，中挽き），400 gあるいは1,200 gを使用した。コーヒー豆粉末はプラスチック製の箱（20×31×13 cm）に約80 gずつ分け，室温25±1℃のテストルーム（3.8×2.8×2.4 m）内にその揮発性成分を充満させた。なお，グアテマラコーヒーを選んだ理由は，ヒトの脳波を指標とした研究で，最もリラックス効果が高いことが示されているからである[7)]。

3. 実験プロトコール

マウスは，コーヒー豆粉末400 gの揮発性成分に曝露した群（Coffee 400群），1,200 gの揮発性成分に曝露した群（Coffee 1200群），および曝露しなかった群（Control群）の3群に分けた。いずれの群もテストルーム内で4時間過ごさせた後，以下の行動実験を行った。なお，実験環境への順応を避けるため，マウスはそれぞれの行動実験について1回のみ使用し，別の行動実験に再使用す

* 連絡者・別刷請求先（E-mail: yhayashi@post.ndsu.ac.jp）
[1] ノートルダム清心女子大学人間生活学部食品栄養学科（700–8516 岡山県岡山市北区伊福町2–16–9）

る場合は1週間以上の間隔をあけた。また，すべての実験はデジタルビデオカメラ（DCR-SR100，SONY）に録画し，終了後に詳細に分析した。画像分析者は実験遂行者とは別人とし，マウスに対するコーヒー揮発性成分の曝露の有無は知らせないように配慮した。

4. 行動実験

4.1　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。オープンアーム上の明るさは約420ルクスである。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。クローズドアームおよびオープンアームの滞在時間と進入回数を測定した。なおアームへの進入は，マウスの四肢全部がそれぞれのアーム領域に入ることを基準として判断した。

4.2　オープンフィールド試験　装置は，底面の直径が75 cmの円形で，壁の高さ35 cm，壁上部の直径は87 cmである。なお，底面は木製，側壁はプラスチック製である。底面中央部には直径45 cmの円が描かれており，底面全体および中央部の円は，中心点を通る4本の直線で8等分されている（すなわち，16領域に区画されている）。全体は灰色に塗装されており，底面の明るさは約170ルクスである。マウスは装置中央に放し，5分間行動観察した。各領域を区画した線の通過（ambulation）回数，立ち上がり（rearing）回数，脱糞（defecation）数および中央部円内での滞在時間を測定した。

4.3　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(株)）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，マウスを仰臥位で灰色に塗装された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。

4.4　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製シリンダーに25±1℃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。

5. 統計方法

統計処理にはStatcel2を使用し，一元配置分散分析とBonferroni法による多重比較検定を用いた。ただし，高架式十字迷路試験の結果については，分散分析としてKruskal-Wallis検定を用いた。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。

結果および考察

1. 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験は，動物が本質的に有する探索動因に基づく接近行動と，不安や恐怖が動因となった回避行動とが平衡状態にあるコンフリクトモデルである[10]。正常な動物では，オープンアーム上にいる状態，すなわち絶壁を臨む状態において不安や恐怖を感じ，オープンアームへの滞在時間および進入回数は少なくなる[11]。また，照度もオープンアームへの探索行動に密接な関連があり，明るい条件では減少し，暗いと増加することが知られている[12]。Table 1に示すように，本実験においてControl群におけるオープンアームへの滞在時間および進入回数の割合は，全体の2.1%と3.6%であり，不安レベルが高い状態にあることを示している。このことは抗不安様のストレス緩和作用が期待される試料の評価において，本研究の実験条件が適切であったことを示している。

コーヒー揮発性成分の曝露により，オープンアームでの滞在時間は用量依存的に増加し，Coffee 1200群ではControl群の2.7倍に延長した。また，オープンアームへの進入回数も，Coffee 1200群において4.6倍の増加が観察された。これらの結果は，コーヒー揮発性成分がマウスの不安や恐怖を減少させる作用を有することを示唆している。また，オープンおよびクローズドアームへの進入回数の和であるアームエントリー合計数は，自発運動量の指標となることが知られている[13]。本研究において，アームエントリー合計数の平均値は，それぞれ，8.3±1.4回（Control群），7.7±1.3回（Coffee 400群）および8.4±1.2回（Coffee 1200群）であり，有意な変化は見られなかった。この結果は，本実験条件においてコーヒー揮発性成分がマウスの自発運動量に影響を及ぼさないことを示唆している。

Table 1　Effects of coffee volatiles on mouse behavior in the elevated plus-maze test.

	Open arms		Closed arms	
	Spending time (s)	Number of entries	Spending time (s)	Number of entries
Control	6.2±3.1	0.6±0.2	148.1±4.7	16.3±0.7
Coffee 400	11.7±5.0	1.9±0.5	139.7±7.1	13.5±1.1
Coffee 1200	16.6±3.4*	2.8±0.6*	146.3±8.2	14.1±1.0

Mice were exposed to coffee volatiles from 400 g ($n=14$) or 1,200 g ($n=16$) of coffee powder for 4 h before the test. Control mice ($n=16$) were maintained in the test room without coffee volatiles. Behavior was observed for 5 min, and the time spent and numbers of entries in the open and closed arms were counted. Data are the mean±SEM. *$p<0.05$ compared to the control.

Table 2 Effects of coffee volatiles on mouse behavior in the open-field test.

	Ambulation	Rearing	Defication	Time spent in the center circle (s)
Control	114.2 ± 6.2	52.6 ± 3.1	1.8 ± 0.4	48.4 ± 4.1
Coffee 400	105.6 ± 5.2	48.1 ± 2.4	1.6 ± 0.5	35.9 ± 5.1
Coffee 1200	118.1 ± 4.8	58.1 ± 3.4	3.1 ± 0.6	46.7 ± 2.9

Mice were exposed to coffee volatiles from 400 g ($n = 20$) or 1,200 g ($n = 17$) of coffee powder for 4 h before the test. Control mice ($n = 20$) were maintained in the test room without coffee volatiles. Behavior was observed for 5 min. The numbers of line-crossing (ambulation), rearing, defication and time spent in the center circle were counted. Data are the mean ± SEM.

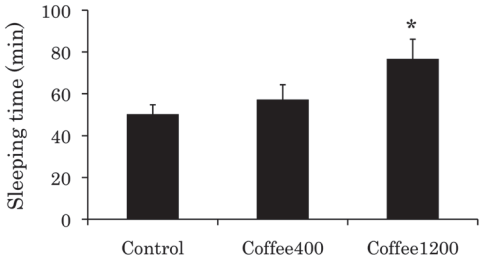

Figure 1 Effect of coffee volatiles on the pentobarbital-induced sleeping time. Mice were injected with pentobarbital-Na (50 mg/kg, i.p.) 4 h after exposure to coffee volatiles from 400 g ($n = 10$) or 1,200 g ($n = 9$) of coffee powder. Control mice ($n = 10$) were maintained in the test room without coffee volatiles. The sleeping time was taken as the period between the loss of the righting reflex and its return. Data are the mean ± SEM. * $p < 0.05$ compared to the control.

Table 3 Effects of coffee volatiles on mouse behavior in the forced swim test.

	Immobility time (s)
Control	148.6 ± 10.7
Coffee 400	155.6 ± 9.0
Coffee 1200	165.5 ± 5.3

Mice were exposed to coffee volatiles from 400 g ($n = 16$) or 1,200 g ($n = 11$) of coffee powder for 4 h before the test. Control mice ($n = 16$) were maintained in the test room without coffee volatiles. The total period of immobility during the 3-min testing period was recorded. Data are the mean ± SEM.

2. オープンフィールド試験

オープンフィールド試験は，動物の自発運動量や活動性，一般行動を測定する場合に汎用されるが，動物の不安や恐怖などの情動機能を評価する試験系としても利用されている[14]。通常，動物はオープンフィールド装置という新奇環境に曝された場合，rearing や ambulation などを繰り返して探索行動を行うが，この時，壁に触れながら，装置内の周辺部をより好んで歩行する行動パターンを示す。また，defication や排尿（urination）が見られる場合もある。ベンゾジアゼピン系抗不安薬などの投与により不安水準が低下すると，装置中央部での探索行動が認められ，探索行動量は増加することが知られている[15]。Table 2 に示したように，本実験では ambulation, rearing, defication および中央部円内での滞在時間を指標として検討したが，コーヒー揮発性成分の曝露による行動変化は観察されなかった。この結果は，コーヒー揮発性成分の情動機能への作用が薬物のように強いものではなく，マウスの一般的な活動性に影響を及ぼさないことを示している。

3. ペントバルビタール睡眠試験

ペントバルビタールはバルビツール酸系の鎮静・催眠薬であり，動物の覚醒を維持している網様体賦活系の生理機能を抑制して睡眠に至らせる。その作用は，Cl^-チャンネルを構成する $GABA_A$ 受容体の一部分に結合し，この受容体の作用を増強することによって発揮される[16]。ペントバルビタールによって誘発される睡眠は，心理的ストレスにより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[17]。Figure 1 に示すように，本研究においてコーヒー揮発性成分への曝露によりペントバルビタールによる睡眠時間が明らかに延長した。この結果は，コーヒー揮発性成分がペントバルビタールの薬理作用を増強することによって，動物の覚醒水準を下げ，ストレス軽減作用を発揮した可能性を示唆している。

4. 強制水泳試験

強制水泳試験は，現在最も汎用されている抗うつ評価法である[18]。逃避不可能な水槽内において動物に強制水泳を負荷すると，前肢および後肢を激しく動かす逃避行動が観察された後，無動となる。これは動物が水槽からの逃避を放棄した絶望状態を意味すると解釈されている。強制水泳試験が，抑うつ状態や抗うつ効果の検出に有用と考えられている理由は，臨床上有効性が認められている既存の抗うつ薬が，本試験で観察される無動行動を特異的に抑制することにある[19]。Table 3 に示すように，コーヒー揮発性成分の曝露により，それぞれの群で無動時間の違いは見られなかった。この結果は，コーヒー揮発性成分が抗うつ様作用を有しないことを示している。

5. ま と め

本研究により，コーヒー揮発性成分がマウスの覚醒水準を下げ，抗不安様のストレス緩和作用を有することが示唆された。これまでヒトによる研究で，コーヒー揮発

性成分のリラックス効果が報告されてきたが[7]，そのメカニズムは明らかではない。本研究は，コーヒー揮発性成分と動物の一般活動性について検討した初めての報告であり，ストレス緩和作用の脳内メカニズムを検討する上で，有用な結果であると思われる。今後，コーヒー揮発性成分がストレスに関連した脳内情報伝達に及ぼす影響について，更なる研究が必要である。

文　　献

1）Schilter B, Cavin C, Tritscher A, Constable A（2001）Health effects and safety consideration. In: Coffee Recent Developments（Clarke RJ, Vitzthum OG, eds）, p 165–83. Blackwell Science, London.

2）Kawachi I, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE（1996）A prospective study of coffee drinking and suicide in women. *Arch Intern Med* **156**: 521–5.

3）Ruusunen A, Lehto SM, Tolmunen T, Mursu J, Kaplan GA, Voutilainen S（2010）Coffee, tea and caffeine intake and the risk of severe depression in middle-aged Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Public Health Nutr* **13**: 1215–20.

4）Ascherio A, Zhang SM, Hernan MA, Kawachi I, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC（2001）Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. *Ann Neurol* **50**: 56–63.

5）大和孝子，紀麻有子，小畑俊男，太田英明，青峰正裕（2002）ラットにおける拘束ストレスに伴う神経伝達物質放出に対するコーヒーの抑制作用．日本栄養・食糧学会誌 **55**, 85–91.

6）Buffo RA, Cardelli-Freire C（2004）Coffee flavour: an overview. *Flavour Fragr J* **19**: 99–104.

7）古賀良彦，小長井ちづる，濱田麻由子，黒坂英夫（2001）コーヒー豆の種類の違いによる香りのリラクゼーション効果の差異．日本味と匂学会誌 **8**，343–6.

8）小長井ちづる，古賀良彦（2002）コーヒーの香りが認知機能に与える影響：豆の種類による効果の差異の検討．日本味と匂学会誌 **9**, 561–4.

9）Seo HS, Hirano M, Shibato J, Rakwal R, Hwang IK, Masuo Y（2008）Effects of coffee bean aroma on the rat brain stressed by sleep deprivation: a selected transcript- and 2D gel based proteome analysis. *J Agric Food Chem* **56**: 4665–73.

10）Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M（1985）Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* **14**: 149–67.

11）Treit D, Menard J, Royan C（1993）Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* **44**: 463–9.

12）Griebel G, Moreau JL, Jenk F, Martin JR, Misslin R（1993）Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behav Process* **29**: 37–48.

13）山口　拓，富樫広子，松本真知子，吉岡充弘（2005）高架式十字迷路試験を用いた不安水準の評価とその応用．日本薬理学雑誌 **126**, 99–105.

14）山口　拓，吉岡充弘（2007）不安関連行動の評価法．日本薬理学雑誌 **130**, 105–11.

15）Bruhwyler J（1990）Anxiolytic potential of a microgram dose of chlordiazepoxide in the open-field test. *Eur J Pharmacol* **187**: 547–9.

16）Rabow LE, Russek SJ Frab DH（1995）From ion currents to genomic analysis: recent advances in $GABA_A$ receptor research. *Synapse* **21**: 189–274.

17）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.

18）Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M（1977）Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* **266**: 730–2.

19）辻　稔，宮川和也，竹内智子，武田弘志（2007）一般行動および抑うつ様行動の評価法．日本薬理学雑誌 **130**，97–104.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **64**: 323–327 (2011)

Research Note

Behavioral Analysis of the Stress-reducing Effects of Coffee Volatiles in Mice

Yasushi Hayashi,*[,1] Saki Sogabe,[1] and Yukio Hattori[1]

(Received April 11, 2011; Accepted June 28, 2011)

Summary: Although numerous studies have focused on the stress-reducing effects of coffee drinking, few reports have addressed the beneficial effects of coffee volatiles. To clarify the relationship between volatile compounds in roasted coffee beans and psychological stress, this study investigated the stress-reducing potential of coffee volatiles using several behavioral pharmacology methods in mice. In the elevated plus-maze test, exposure to coffee volatiles increased the time spent and the numbers of entries into the open arms without spontaneous ambulation activity. In addition, pentobarbital-induced sleep time was prolonged. No significant effects were detected in the open-field and forced swim tests. These results suggest that the volatile compounds in roasted coffee beans lower the levels of arousal and exert anti-anxiety-like, stress-reducing effects in mice.

Key words: coffee volatiles, mouse, stress, elevated plus-maze test, pentobarbital-induced sleep test

* Corresponding author (E-mail: yhayashi@post.ndsu.ac.jp)
[1] Department of Foods and Human Nutrition, Faculty of Human Life Sciences, Notre Dame Seishin University, 2–16–9 Ifuku-cho, Kita-ku, Okayama 700–8516, Japan