

<平成20年度助成>

## ウコンがアルコール摂取時の記憶・認知機能抑制に及ぼす影響

三木 健 寿

(奈良女子大学 大学院人間文化研究科)

### 緒 言

ウコンの成分であるクルクミンは多様な生理学的作用を有し、その一つに抗認知症効果が知られている。一方、ウコンは飲酒の前に摂取することが古くから行われている。また、飲酒は認知機能の中枢である海馬機能を抑制することが報告されている。すなわち、ウコンが飲酒による海馬機能の低下に影響を及ぼしていることが推察されるが、その詳細は不明である。

アルコールは、どのように海馬機能に影響を及ぼすのか、これまで多くの報告がなされている。Walkerら<sup>1)</sup>は、エタノールを含む流動食を5ヶ月間与えたラットにおいて、海馬CA1領域の錐体細胞数が減少したと報告している。また、Casamentiら<sup>2)</sup>は、長期間エタノールを摂取させたラットは、潜在記憶の指標となる受動的回避反応が著しく弱まると述べている。これらのことから、長期のエタノール摂取は、形態的にも行動的にも認知記憶機能に影響を及ぼす事が明らかである。しかし、その生理的機序については、議論が多い。急性のエタノール摂取は海馬神経活動を抑制することは一致しているが、海馬領域血流量への影響は一致した結果ではない。これらの結果にバラつきがあった理由としては、麻酔された動物を使い、急性の実験であったことが原因の一つと考えられる。麻酔薬とエタノールは作用する受容体を共有している可能性がある。

そこで本実験では、エタノール投与による海馬CA1領域神経活動の応答を無麻酔自由行動下の

ラットを用いて計測した。さらに、その結果を基に、クルクミンがエタノール投与による海馬機能抑制に及ぼす影響について検討した。

### 方 法

Wistar系雄ラットを用い、室温24℃湿度60%に設定された施設で飼育した。ラットをペントバルビタール溶液の腹腔内投与で麻酔し、脳波位固定装置固定し、海馬神経活動とレーザドップラー血流量測定用の複合プローブ(4本のステンレス線硬質直線と2本のガラスファイバーからなる海馬領域血流量測定用プローブ)を、Bregmaより右に2.2 mm、尾側へ3.8 mmを電極挿入点とし、脳表面からの深さが2.0 mm～3.0 mmになるまで挿入した。神経活動を確認の後、デンタルセメントにて固定した。次に頸静脈よりカテーテルを挿入し留置した。

術後2日間の回復期の後、実験を開始した。以下の4群の実験を、乱数表を用いて無作為の順序で行った。

標準飼料を摂取させた後に、

- 1) 1.0g/kg 体重 (10%アルコール溶液) を投与した群、あるいは
- 2) 2.0g/kg 体重 (20%アルコール溶液) を投与した群。

40%クルクミン混合食を摂取させた後に、

- 3) 1.0g/kg 体重 (10%アルコール溶液) を投与した群、あるいは
- 4) 2.0g/kg 体重 (20%アルコール溶液) を投与した群。

実験は以下のように行った。

- ・ 絶飲絶食…………… 投与 18時間前
- ・ 飼料投与…………… 投与 3 時間 30 分前
- ・ 絶飲絶食開始 …… 投与 1 時間 30 分前
- ・ 測定開始…………… 投与 1 時間前
- ・ 生理的食塩水又は 10%あるいは 20%アルコール溶液投与 (5 分間かけて投与)
- ・ 測定終了…………… 投与 3 時間後

実験は、室温 24℃ に管理されたチャンバー (TABAI ESPEC) 内で行った。海馬神経活動は差動型の超低ノイズアンプで増幅し、8ch モニター (VC-680G (株) 日本光電) で原形波を確認した<sup>3,4)</sup>。海馬神経活動の出力は、A/D 変換ボードを介してコンピュータ (Recorder, Plexon Inc) にデータを記録した。

Recorder (Plexon Inc) にて記録したデータより、CA1 神経の発火頻度を、Offline Sorter (Plexon Inc) のコンポーネント解析によりノイズを除き、1秒間に生じた海馬神経活動を算出した。アルコール又は生理的食塩水投与による海馬神経活動の変化を比較するため、出現時間が比較的長く、出力信号が安定している、実験毎の投与前の NREM 期の海馬神経活動を 100% とし、変化率で示した。そして、5 分間の平均値で示した。有意差検定は二要因の分散 (ANOVA) を用いて、実験内と実験間でそれぞれ行った。分散に差がある場合は、個々の平均値について多重比較検定 (Fisher-LSD) を行った<sup>5)</sup>。

## 結 果

### エタノール投与時の海馬 CA1 神経活動 (Hippocampal CA1 neural activity) の経時変化 (図 1)

#### 1.0g/kg エタノール投与群

標準食・1.0g/kg エタノール投与群の投与前の海馬 CA1 神経活動の平均値は  $98.9 \pm 2.8\%$  だった。標準食・1.0g/kg エタノール投与群の海馬 CA1 神経活動は、投与後 10 分で  $78.1 \pm 5.0\%$  に低下した

が、その後徐々に上昇し、投与後 60 分で  $91.33 \pm 5.26\%$ 、投与後 120 分で  $97.85 \pm 5.95\%$ 、投与後 180 分で  $107.36 \pm 7.60\%$  に達した。統計検定の結果、標準食・1.0g/kg エタノール投与群の投与後の海馬 CA1 神経活動は、投与前と比較して、投与後 10 分で有意 ( $p < 0.05$ ) に低い値だった。一方、クルクミン食・1.0g/kg エタノール投与群の海馬 CA1 神経活動は、投与後 10 分で  $76.0 \pm 5.5\%$  に低下したが、その後徐々に上昇し、投与後 60 分で  $85.5 \pm 4.8\%$ 、投与後 120 分で  $95.5 \pm 5.0\%$ 、投与後 180 分で  $99.6 \pm 6.0\%$  に達した。統計検定の結果、クルクミン食・1.0g/kg エタノール投与群の投与後の海馬 CA1 神経活動は、投与前と比較して、投与後 10 分、60 分で有意 ( $p < 0.05$ ) に低い値だった。

#### 2.0g/kg エタノール投与群

標準食・2.0g/kg エタノール投与群の投与前の海馬 CA1 神経活動の平均値は  $101.5 \pm 4.7\%$  だった。標準食・2.0g/kg エタノール投与群の海馬 CA1 神経活動は、投与後 10 分で  $56.9 \pm 5.2\%$  に低下したが、その後徐々に上昇し、投与後 60 分で  $71.4 \pm 5.7\%$ 、投与後 120 分で  $82.5 \pm 7.2\%$ 、投与後 180 分で  $91.7 \pm 7.8\%$  に達した。統計検定の結果、標準食・2.0g/kg エタノール投与群の投与後の海馬 CA1 神経活動は、投与前と比較して、投与後 10 分、60 分、120 分で有意 ( $p < 0.05$ ) に低い値だった。一方、クルクミン食・2.0g/kg エタノール投与群の海馬 CA1 神経活動は、投与後 10 分で  $70.9 \pm 5.8\%$  に低下したが、その後徐々に上昇し、投与後 60 分で  $84.5 \pm 4.6\%$ 、投与後 120 分で  $93.5 \pm 6.5\%$ 、投与後 180 分で  $101.0 \pm 7.3\%$  に達した。統計検定の結果、クルクミン食・2.0g/kg エタノール投与群の投与後の海馬 CA1 神経活動は、投与前と比較して、投与後 10 分、60 分で有意 ( $p < 0.05$ ) に低い値だった。

標準食・2.0g/kg エタノール投与群は標準食・1.0g/kg エタノール投与群と比較して、投与後 10

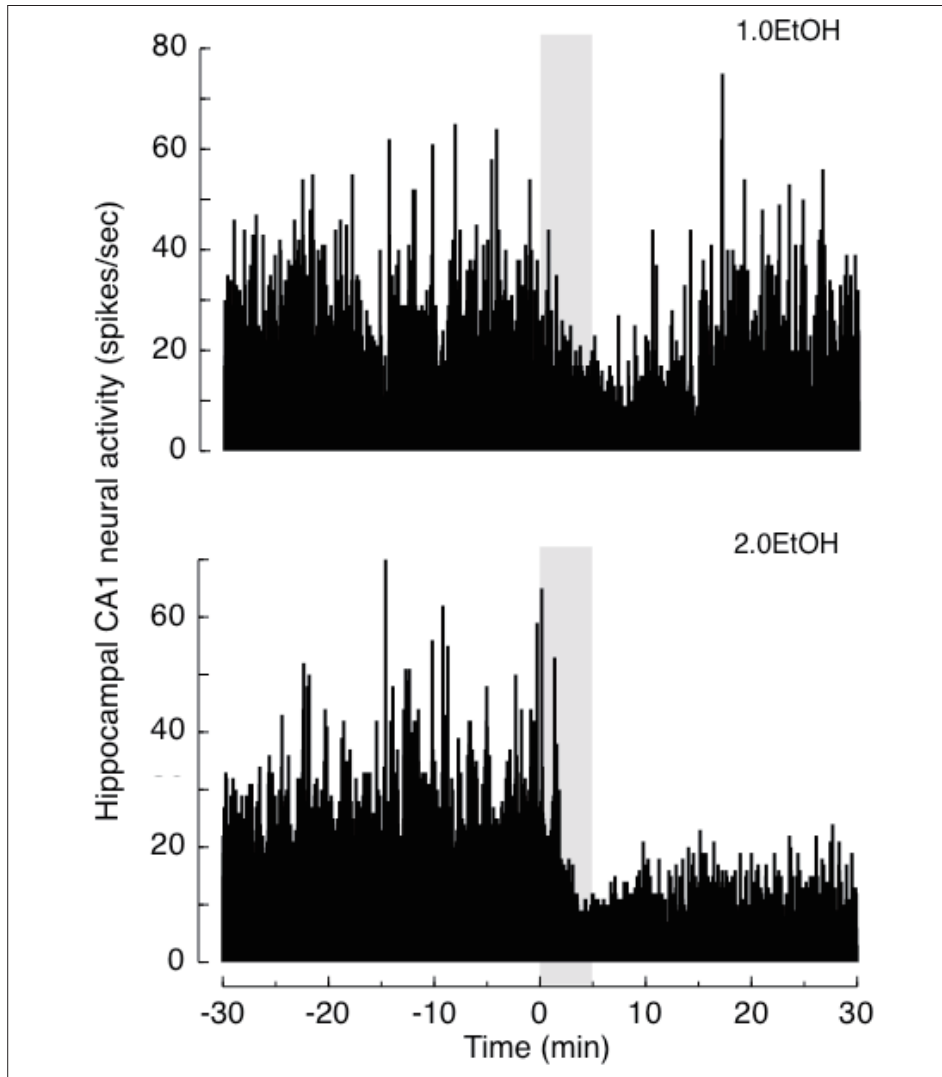


図1 エタノール静脈内投与による海馬 CA1 神経活動応答の測定例  
 1.0EtOH: 1.0g エタノール /kg 体重に投与、2.0EtOH: 2.0g エタノール /kg 体重投与

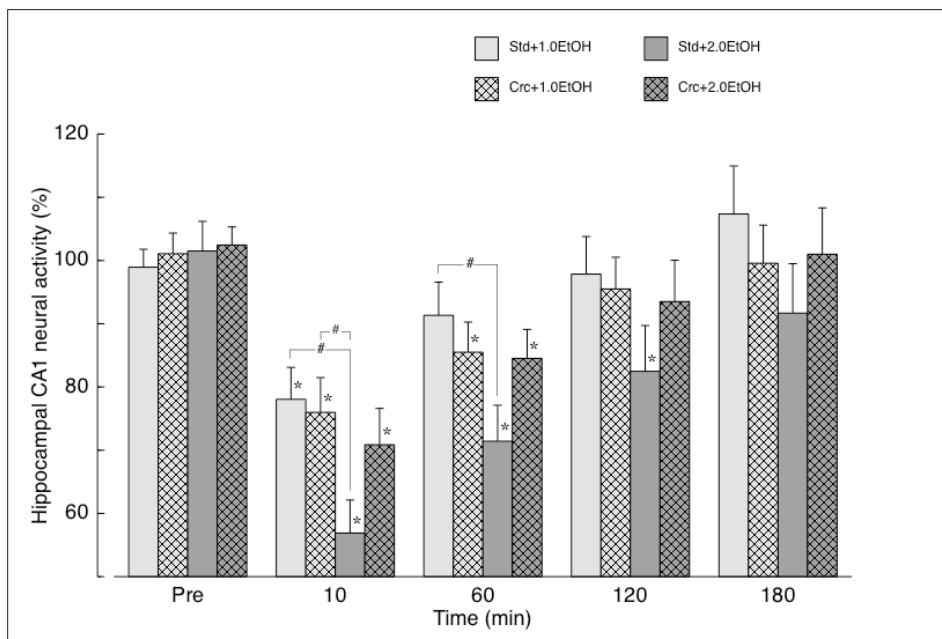


図2 クルクミン摂取がエタノール投与による海馬 CA1 神経活動低下に及ぼす影響  
 Std: 標準食、Crc: クルクミン食 (40%)、1.0EtOH: 1.0g エタノール /kg 体重、2.0EtOH: 2.0g エタノール /kg 体重、  
 Pre: エタノール投与前、☆エタノール投与前との群内比較、#各時間での群間比較

分、60分で有意( $p<0.05$ )に低い値だった。標準食・2.0g/kg エタノール投与群はクルクミン食・1.0g/kg エタノール投与群と比較して、投与後10分で有意( $p<0.05$ )に低い値だった。

## 考 察

本研究は、クルクミンが海馬 CA1 錐体細胞に特異的に作用し、アルコールによる海馬 CA1 神経活動の低下を抑制することを明らかにした。

### エタノールによる海馬 CA1 神経活動の抑制

図1、2に示したように、海馬 CA1 神経活動は、エタノールの濃度に依存して抑制された。エタノール投与により海馬 CA1 神経活動が低下した原因としては、エタノール投与により興奮性シナプス後電位 (EPSP) の発生が抑制された可能性と、抑制性シナプス後電位 (IPSP) の発生が促進された可能性が考えられる。

EPSPとは、興奮性のシナプスから発生する脱分極性のシナプス後電位である。EPSPを発生する興奮性シナプスのほとんどは、グルタミン酸を伝達物質とし、ポストシナプスにはイオンチャンネル型グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体や AMPA 受容体) を発現している。つまり、EPSP の発生にはグルタミン酸受容体の活動が関係している。これらのことから、エタノールにより海馬 CA1 神経活動がエタノールの濃度に依存して抑制されたメカニズムについては次のように推察される。エタノールが、NMDA 受容体や AMPA 受容体の活動を抑制し、その結果 EPSP の発生が抑制され、海馬 CA1 神経活動を抑制した可能性が考えられる。また、EPSP の発生抑制が濃度に依存していた為、海馬 CA1 神経活動の抑制も濃度に依存していた可能性がある。Puglia<sup>6)</sup>により、ラットの海馬スライスに 80mM のエタノール負荷を行った実験では、NMDA 受容体介在 fEPSPs が 21.55%、AMPA 受容体介在 fEPSPs が 15.37%抑制されたことが報告されている。ま

た、同じ実験で AMPA 受容体介在 fEPSPs が 20mM エタノールで 3.77%、40mM エタノールで 8.61%、80mM エタノールで 16.10%抑制されたことも報告されている。

IPSPを発生する抑制性シナプスは、γアミノ酸 (GABA) やグリシンを伝達物質とし、ポストシナプスにはイオンチャンネル型の GABA 受容体やグリシン受容体を発現している。つまり、IPSP の発生には GABA 受容体の活動が関与している。Fleming<sup>7)</sup>により、ラットの培養海馬ニューロンに 50mM のエタノール負荷を行った実験では、mIPSC の持続が 5.9%増加したことが報告されている。また、Weiner<sup>8)</sup>により、ラットの海馬スライスにエタノール負荷を行った実験では、近位部 IPSC 領域が 40mM エタノールで 26.7%、80mM エタノールで 69.9%、160mM エタノールで 128.7%抑制されたことが報告されている。

以上のことから、エタノール投与により、NMDA 受容体や AMPA 受容体の活性化が抑制され、EPSP の発生が抑えられた、または、GABA 受容体が活性化され、IPSP の発生が亢進したことで、海馬 CA1 神経活動は低下したと考えられる。さらに、EPSP の抑制や IPSP の発生がエタノール濃度に依存して変化するため、それらの影響を受ける海馬 CA1 神経活動もエタノール濃度に依存して抑制されたと考えられる。

### クルクミンが海馬 CA1 錐体細胞に特異的に作用し、海馬 CA1 神経活動に選択的に作用する可能性

本実験は、20%エタノール投与では標準食群とクルクミン食群で、エタノール投与後の海馬 CA1 神経活動の低下の程度に有意差があることを示した。以上の結果から、クルクミンはエタノールによる海馬 CA1 神経活動低下に対して特異的に拮抗した可能性が示された。その理由として、前述したように、エタノールは NMDA 受容体や AMPA 受容体、GABA 受容体、グリシン受

容体など、多くの受容体に作用することが解っている。それらの受容体の中で、クルクミンが作用する受容体が海馬 CA1 錐体細胞に多く分布しており、結果的に海馬 CA1 錐体細胞に特異的に作用し、エタノールによる海馬 CA1 神経活動の低下のみが選択的に拮抗されたのではないかと考えられる。

しかし、今回の実験からクルクミンがどの受容体に作用するか不明であり、今後の検討が必要である。

#### 謝 辞

本研究課題に対してご助成を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団に深甚の謝意を表します。

#### 文 献

- 1) Walker DW, Barnes DE, Zornetzer SF, Hunter BE, Kubanis P. Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats. *Science*. 1980;209:711-713
- 2) Casamenti F, Scali C, Vannucchi MG, Bartolini L, Pepeu G. Long-term ethanol consumption by rats: Effect on acetylcholine release in vivo, choline acetyltransferase activity, and behavior. *Neuroscience*. 1993;56:465-471
- 3) Miki K, Kosho A, Hayashida Y. Method for continuous measurements of renal sympathetic nerve activity and cardiovascular function during exercise in rats. *Experimental physiology*. 2002;87:33-39
- 4) Yoshimoto M, Yoshida I, Miki K. Functional role of diverse changes in sympathetic nerve activity in regulating arterial pressure during rem sleep. *Sleep*. 2011;34:1093-1101
- 5) Sachs. *Applied statistics*. New York: Springer-Verlag; 1982.
- 6) Puglia MP, Valenzuela CF. Ethanol acutely inhibits ionotropic glutamate receptor-mediated responses and long-term potentiation in the developing ca1 hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res*. 34:594-606
- 7) Fleming RL, Manis PB, Morrow AL. The effects of acute and chronic ethanol exposure on presynaptic and postsynaptic gamma-aminobutyric acid (gaba) neurotransmission in cultured cortical and hippocampal neurons. *Alcohol*. 2009;43:603-618
- 8) Weiner JL, Gu C, Dunwiddie TV. Differential ethanol sensitivity of subpopulations of gabaa synapses onto rat hippocampal ca1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 1997;77:1306-1312

## Effects of curcumin on the suppression of hippocampal CA1 neural activity induced by ethanol in conscious rats

Kenju Miki

*Department of Integrative Physiology, Nara Women's University*

Curcumin has shown antedementia activity and thus has been suggested to exert some actions on brain functions including memory and cognition, while the detail mechanisms remain unclear. Alcohol ingestion has been shown to suppress memory and cognitive functions. In the present study, we examined effects of the oral ingestion of curcumin on the suppression of hippocampal CA1 neural activity induced by ethanol administration in conscious rats.

Wistar male rats were instrumented chronically with multiple electrodes (100 micrometer stainless steel wire) for measurement of hippocampal CA1 neural activity. Either 10% ethanol in saline solution (1.0g ethanol/kg body weight) or 20% ethanol (2.0g/kg) was infused intravenously in rats (1.0g/kg 2.0g/kg body weight) those fed with 40%curcumin diet and with control diet. Then, response of hippocampal CA1 neural activity was measured continuously. The ethanol administration immediately inhibited hippocampal CA1 neural activity in both control and 40% curcumin diet groups. However the magnitude of decrease in hippocampal CA1 neural activity observed in 40% curcumin diet group was significantly attenuated compared with those in control diet group.

These results suggest that ethanol may activate the inhibitory neuronal activity or suppress the excitatory neuronal activity those innervate CA1 neuron, such that CA1 neural activity decreased due to ethanol infusion. Curcumin may modulate the ethanol actions to CA1 neurons; either activate inhibitory neuron or suppress excitatory neuron or both, such that magnitude of suppression of hippocampal CA1 neural activity induced by the ethanol infusion may be attenuated in 40% curcumin diet group compared with that in control diet group.