

ストレスとローヤルゼリー

池田 勇五・鷺塚 昌隆・古市 浩康・福田 陽一・桑原 優

近年、人類はこれまでに経験することのなかったさまざまな形のストレスに悩まされている。すなわち、老齡化、インスタント食品、高カロリーのグルメ、大気汚染、過度の冷暖房、夜間照明、時差ぼけ、さらに社会構造がもたらす精神的ストレスなども一つの生命体にとっては重大なストレスである。このようなストレスに満ちた環境下における日常的な健康管理は重要な課題の一つとなっている。一方、数千年の歴史の過程において、人類は種々の植物や動物の生み出す物質をより自然の状態で「食品」としてあるいは「薬」として利用し続けながら少なからず健康管理に役立ててきている。利用され始めた当初は今でいう科学的な根拠というよりも、試行錯誤の経験から定着していった利用法であったと思われる。そして今尚利用されている物質の中にミツバチが作り出すローヤルゼリー (royal jelly; 以下 RJ と略す) がある。

RJ は「自然食品」あるいは「健康食品」の名のもとに広く利用されている他に、「医薬品」として品質と薬効の科学的保証の基に登録され (日本医薬情報センター, 1995), 広く紹介されている (陳, 1995)。また, RJ の効能については古代エジプトの時代よりさまざまに語り伝えられてきているが、とくに 1954 年の「ローマ法王ピオ 12 世の奇跡の蘇生」以来、より科学的な解析が始められるようになった。

しかしながら、その数千年にわたる利用にもかかわらず、公表されている科学的データは充分とはいえない。また, RJ のように寿命の長い医薬品はその時代の最新の科学的手法によって見直すことが望まれる。そこで本報では、現代のストレスに注目して実験動物モデルを作製

し, RJ の効果の確認および作用機序の一端の解明を試みることにした。

1. 環境温度ストレスモデル

(鷺塚ら, 1996)

高温多湿の夏季にみられる、いわゆる「夏ばて」のモデルとして、通常 23℃ で飼育している Fischer 344 系雄性ラット (9 週齡, 体重 195 g) に対して、飼育温度を 32~33℃, 相対湿度 90% 以上に設定した高温ストレスモデルを作製した。また、秋口や春先における気温の不安定期や、冷暖房の完備された室内から外気への接触など、急激な温度変化に曝されることによって生じるストレス状態のモデルとして、飼育温度を 4℃ と 23℃ の間で 1 時間毎に交互に 1 日 4 回交代させる環境温度交代ストレスモデルを作製した。

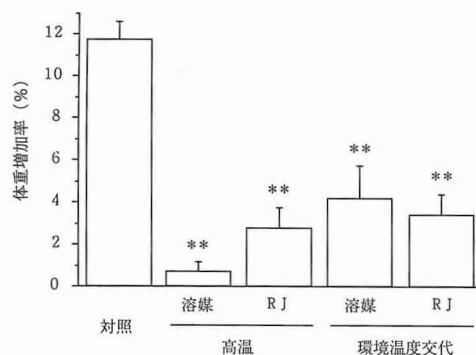


図 1 高温および環境温度交代ストレスモデルにおける体重増加率に対する影響

平均±標準誤差 (n=8)

RJ: ローヤルゼリー 1g/kg×11 日, 経口投与
対照群に対する有意性; **p<0.01

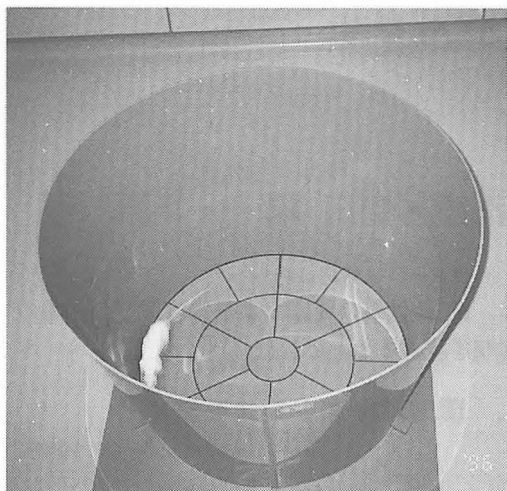


図2 オープンフィールド

それぞれのストレスを10日間連続して負荷しながら、ストレス負荷期間およびそれに引き続く行動観察日の計11日間1日1回、RJ (1g/kg) を経口投与した。ストレスの程度を測る指標として、体重測定および行動観察をおこなった。

ストレス負荷前の体重を基準とした体重増加率を図1に示した。対照群は平均11.8%の増加であったのに対して、高温ストレス負荷群においては0.7%の増加に留まった。これに対しRJ投与群の増加率は2.8%であり、改善傾向を示した ($p < 0.1$)。

オープンフィールド (床面直径60cmの円形空間、床面に描かれた線によって区画されている、図2) における動物の行動に関しては、解放空間という新規環境に対する情動性の亢進 (高不安あるいは緊張状態) により、「すくみ」を生じて活動量が減少し、逆に情動性の低下 (低不安あるいはリラックス状態) により活動量が増加するものと解釈されている。オープンフィールド行動における通過区画数を図3に示した。対照群の平均通過区画数は87.0回であったが環境温度交代ストレス負荷群は90.1回で、有意な変化は認められなかった。しかし、RJ投与によって121.3回まで有意に増加した

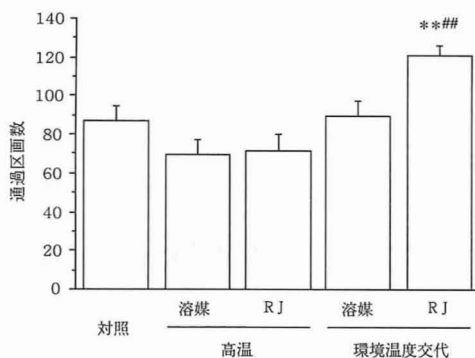


図3 高温および環境温度交代ストレスモデルにおけるオープンフィールド行動の通過区画数に対する影響

平均±標準誤差 (n=8)。

RJ: ローヤルゼリー 1g/kg×11日、経口投与
対照群に対する有意性: ** $p < 0.01$

溶媒群に対する有意性: ## $p < 0.01$

($p < 0.05$)。

強制水泳試験および尾懸垂試験はともに抗うつ薬の薬効評価に広く用いられている方法である。水槽 (30cm×30cm×水深30cm、水温23℃) の水中に15分間入れる、あるいはV字型のスロープに、動物の前肢が僅かに触れる高さで尾の中央を固定して6分間吊り下げるという不快な状態からの逃避を停止した無動状態が、動物の絶望状態 (うつ状態) を反映すると解釈されている。強制水泳試験および尾懸垂試験における無動時間を図4に示した。対照群は尾懸垂試験では187.9秒、強制水泳試験では143.4秒であったが、高温ストレス負荷群はそれぞれ223.2秒、230.6秒と有意な延長が認められた (それぞれ、 $p < 0.05$, $p < 0.01$)。これに対してRJ投与群はそれぞれ189.2秒、160.8秒と有意な改善効果を示した (それぞれ、 $p < 0.01$, $p < 0.05$)。一方、環境温度交代ストレス負荷群はそれぞれ215.4秒、129.4秒であり、尾懸垂試験において延長傾向を認めた ($p < 0.1$)。これに対して、RJ投与群はそれぞれ188.5秒、161.5秒と尾懸垂試験において有意な改善効果を示した ($p < 0.01$)。

これらの結果より、RJはストレスの負荷により生じる精神的、肉体的疲弊に対して改善効

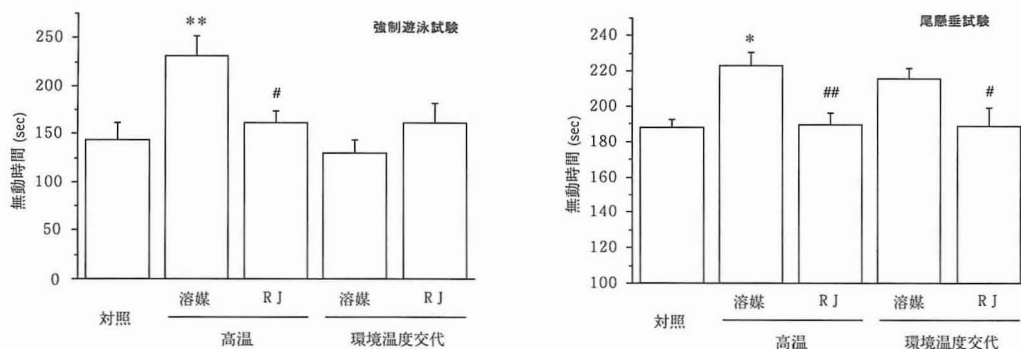


図4 高温および環境温度交代ストレスモデルにおける強制遊泳試験および尾懸垂試験の無動時間に対する影響
平均±標準誤差 (n=8) RJ: ローザゼリー 1g/kg×11日, 経口投与
対照群に対する有意性; * p<0.05, ** p<0.01 溶媒群に対する有意性; # p<0.05, ## p<0.01

果を示すことが示唆された。すなわち、「夏ばて」時の体重減少や精神的疲労（無気力、情緒不安定など）の改善および季節の変わり目やいわゆる冷房病など急激な温度変化が繰り返された場合に生じる自律神経の不調により現れる症状の改善などのいわゆる滋養強壮効果が期待される。本試験結果は九嶋ら（1965, 1975）によって臨床的に明らかにされている不定愁訴症候群や自律神経失調症に対するRJの改善効果を支持しているものと考えられる。

2. 加齢モデル（古市ら、未発表）

九嶋ら（1962）は、閉経した雌性老齢ラットにおいて自律神経中枢である間脳、視床下部神経の老化傾向の発現をアクリジンオレンジ染色の蛍光顕微鏡法で明らかにし、RJの投与でこの老化傾向の発現を抑制することを報告している。このように雌性動物の自律神経中枢の老化にRJは有効であるが、雄性動物においても同様に効果を示すかを明らかにした。

実験には Fischer 344 系雄性ラット（老齢：26カ月齢および若齢：6週齢）を用いた。ラットの寿命はおおよそ2～3年程度である。老齢ラットを2群に分けて1群に21日間にわたり1日1回、RJ（1g/kg）を経口投与した。他の老齢群および若齢群には溶媒（水道水）を投与した。最終投与後、ペントバルビタール麻酔下で、10%ホルマリン緩衝液を用いて経心的に脳を

灌流固定した。視索上核部位（Supraoptic hypothalamic nucleus: SO, 間脳、視床下部）の環状切片を0.003%アクリジンオレンジで15分間染色し、落射型蛍光顕微鏡でSOの神経細胞の二次蛍光を観察した。九嶋らの老化蛍光表現法に準じて蛍光の色調をスコア化した（表1）。これによると、若い神経細胞では緑色調を、老いた神経細胞では赤色調を呈する。

視索上核のアクリジンオレンジ染色による二次蛍光のスコアを表2に示した。神経細胞の原形質の若齢群、老齢対照群およびRJ投与群の蛍光スコアは、それぞれ3.0, 3.3および3.0であった。また、核における蛍光スコアは、それぞれ3.1, 3.7および2.7であった。老齢対照群は若齢群に比較して赤色調が強まったが、原形質での変化は極めて小さかった。RJ投与群ではSO部位の神経細胞の原形質および核の赤色調蛍光が老齢対照群に比較して減弱し、若齢群とほぼ同色調であった。

本実験において、雄性老齢ラットの間脳、視床下部神経のアクリジンオレンジ染色による蛍光は若齢ラットと比較して原形質および核のスコアで0.3および0.6赤色調側に強まった。しかし、九嶋ら（1962）が報告した閉経した雌性老齢ラットでは原形質および核ともにスコアで2赤色調側に強まっており、雄性老齢ラットの変化は極めて小さいものであった。このことは老齢の雄性ラットではほとんど生理的変化は少

表1 蛍光スコア

色調	緑	黄緑	黄	橙	褐	赤
スコア	0	1	2	3	4	5

表2 視索上核のアクリジンオレンジ染色による二次蛍光

	N	原形質	核
若 齢 対 照 群	4	3.0	3.1
老 齢 対 照 群	3	3.3	3.7
老 齢 RJ 投与群	4	3.0	2.7

ないが、雌性老齢ラットでは閉経などの生理的機能変化との関連が考えられる。また、雄性老齢ラットへの RJ 投与によって赤色調の減弱がみられ、雄性動物においても九嶋ら (1962) が報告した雌性動物の結果と同様に自律神経中枢の老化傾向の発現が RJ 投与によって低くなることを確認した。

アクリジンオレンジは DNA, RNA の二重鎖部分では挿入 (intercalation) を起こし黄緑色 (約 530nm) を発し、単鎖部分では静電的結合 (stacking) により色素重合 (dye aggregation) を起こし赤色 (約 640nm) の傾向を発することが明らかにされている (Baradley et al., 1959; Lerman, 1963)。このことから、老齢ラットの自律神経中枢細胞では単鎖 DNA, RNA の比率が大きくなっていること、RJ 投与によりこれらの比率が小さくなっていることが考えられる。

3. 高脂血症モデル (福田ら, 未発表)

RJ の脂質低下作用については古くから知られ (三淵ら, 1962), 最近では動物の高コレステロール血症モデルにおいて, 100~1000mg/kg (経口および皮下投与) の用量で効果があることが証明されている (中陳ら, 1982; 藤井ら, 1986)。臨床的には, 高コレステロール血症および高トリグリセリド血症の患者に RJ を 1 ティースプーン/回×2 回/日×14 日間投与した結果, コレステロールおよびトリグリセリドのレベルが低下することが報告されている (Cho, 1977)。しかしながら、高トリグリセ

リド血症の実験動物モデルでの報告はなされていないので、今回このモデルに対する RJ の効果を検討することにした。

Sprague-Dawley 系雄性ラット (7 週齢) に 20%フルクトース含有飲料水を 2 週間負荷することによって高トリグリセリド血症を誘発した。RJ は 0.5%メチルセルロースに懸濁し、フルクトース含有飲料水負荷期間中、1 日 1 回夕方経口投与した。投与量は、100, 300 および 1000mg/5ml/kg とした。投与期間中は、体重、摂餌量および摂水量を測定した。

血清脂質の測定においては、RJ 最終投与後 18 時間絶食し、エーテル麻酔下、腹部大動脈より採血し、血清中のトリグリセリド、総コレステロール、遊離コレステロール、 β -リポ蛋白、リン脂質およびグルコース濃度を市販のキットを使用して測定した。また、採血後肝臓を摘出して、重量を測定した。

RJ300mg/kg 投与群において、溶媒投与群に比べて有意ではないが、体重、摂餌量および摂水量の減少がみられた。他の用量では変化はみられなかった。肝重量は、100 および 300mg/kg 投与群で減少傾向がみられた。

血清中の各脂質パラメーターの変化を図 5 に示した。血清トリグリセリドは 100 および 300mg/kg 投与群で有意ではないものの用量依存的な低下傾向を示した。1000mg/kg 投与群では溶媒投与群と同等であった。総コレステロール、 β -リポ蛋白、リン脂質およびグルコースは 100 および 1000mg/kg 投与群で溶媒投与群に比べて、有意ではないが若干の増加を示し、300mg/kg 投与群では溶媒投与群と同等であった。遊離コレステロールは 100~1000mg/kg の各群で増加傾向がみられ、とくに、1000mg/kg 投与群では有意な増加であった。

今回は RJ を 14 日間投与して血清トリグリセリドの減少傾向を認めたが、前述の報告のように RJ 投与期間を 4 週間あるいは 7 週間に延長すれば更なる効果が期待できるかもしれない。また、1000mg/kg 投与群のトリグリセリドは溶媒投与群と同等であったが、RJ 自体に

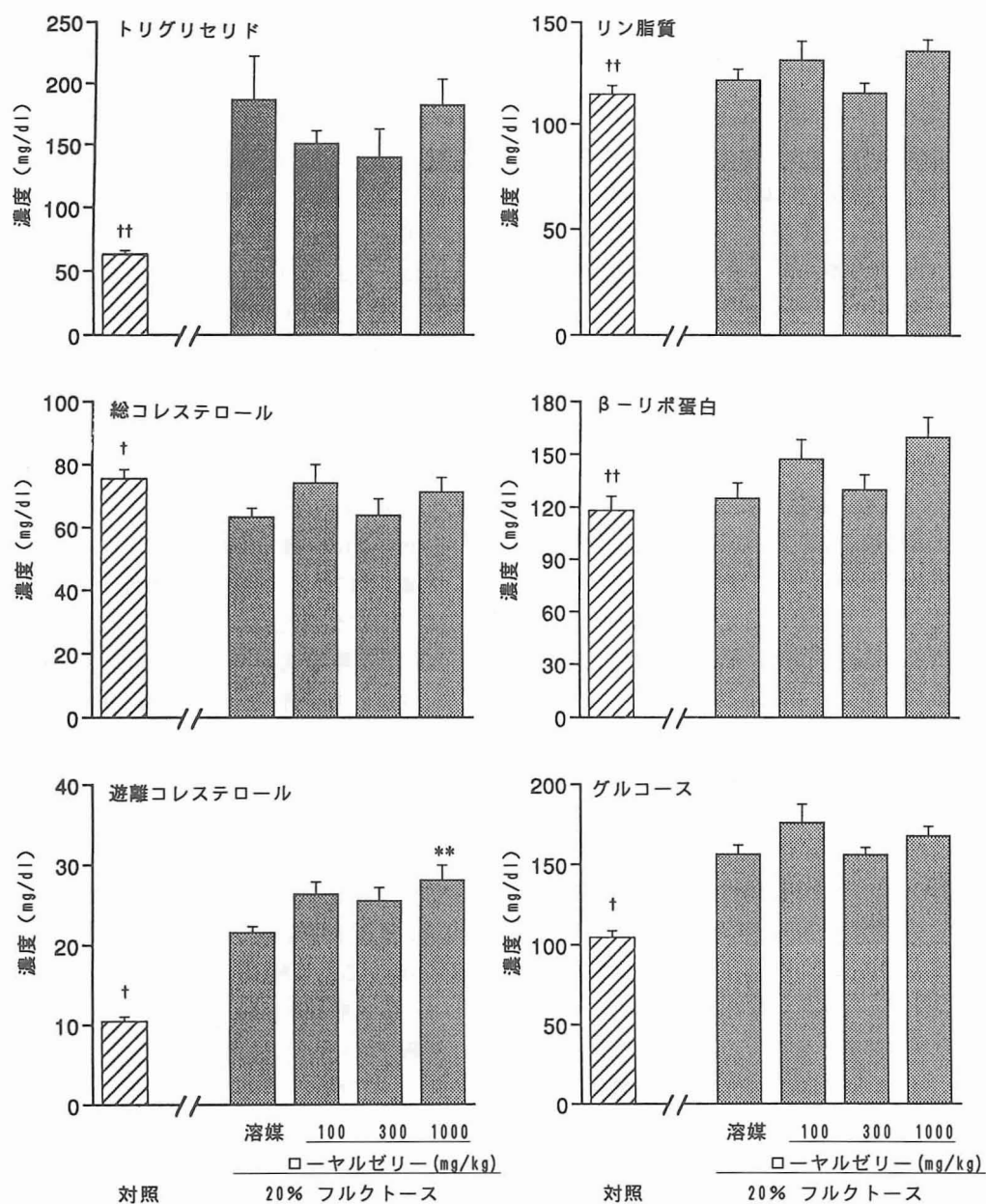


図5 フルクトース飲料水負荷高脂血症モデルにおける血清中の各脂質パラメーターに対する影響
平均±標準誤差 (n=8) ローヤルゼリー 14 日間経口投与
溶媒群に対する有意性; ** p<0.01

+, ++: それぞれ武井峰男ら, 福田陽一らの未発表データより引用

脂質や糖質が多く含まれており、高用量では脂質低下作用が相殺されたことが考えられる。このような現象は田村ら（1987）や藤井ら（1995）も報告しており、RJには最適用量があることを示唆している。

4. 抗酸化作用（桑原ら，1996）

生体にとって、酸素は不可欠なものであるため、酸素毒やラジカル反応の制御が生命維持の必須条件である。生体に取り入れられた酸素分子は4電子還元を受けて水までに代謝される過程で非常に多くのエネルギーを産生する半面、そのエネルギー状態が高いために反応性に富む。このように、酸素分子よりも反応性に富む活性化された酸素とその関連化合物を活性酸素という。活性酸素は生体内において、その発生と消去系のバランスが崩れたときにその毒性を示し、過酸化脂質の増加、蛋白質や糖質の変性、DNA鎖の切断などが引金となって、種々の病的状態を生み出し、細胞や組織障害につながっていく。すなわち、老化、動脈硬化、虚血性心疾患、脳血管障害、癌などさまざまな病態や疾患を引き起こす原因ともなっているものと考えられている（吉川，1988）。RJの薬理作用としては、上述した抗ストレス効果、老化防止効果および脂質低下効果に関連する作用の他にも多くの作用がすでに報告されているが（藤井，1995）、これらはいずれも活性酸素・フリーラジカル反応の関与が示唆されている作用でもある（吉川ら，1990）。しかし、RJの抗酸化作用については明らかにされていないので、さまざまな病態にかかわっている活性酸素に着目して、RJの抗酸化作用について、抗酸化ビタミンであるビタミンEおよびビタミンAの前駆体であるβ-カロチンと比較検討した。

Hypoxanthine-xanthine oxidase系により産生するスーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$) をCLA依存性化学発光法により、過酸化水素 (H_2O_2) をスコポレチン法により、ヒドロキシルラジカル (HO^{\cdot}) を Fe^{3+} -EDTA-ascorbate産生系を用い、2-deoxy-D-ribose 分解法により、一重項酸素 (1O_2) を H_2O_2 -NaOCl系を用

い、CLA依存性化学発光法によりそれぞれ測定した。

活性酸素分子種に対するRJ、ビタミンEおよびβ-カロチンの消去作用の結果を図6に示した。それぞれの消去作用は被験薬物無添加の反応系を対照とし、被験薬物添加時の抑制率として表示している。 $O_2^{\cdot-}$ の50%抑制濃度はRJが $2.4 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ 、ビタミンEが $1.4 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ およびβ-カロチンが $8.7 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$ と推定された。 H_2O_2 の50%抑制濃度はRJが 1.0mg/ml 、ビタミンEが $3.1 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ およびβ-カロチンが $1.5 \times 10^{-2} \text{mg/ml}$ と推定された。 HO^{\cdot} の50%抑制濃度はRJが 1.8mg/ml およびビタミンEが $9.3 \times 10^{-2} \text{mg/ml}$ と推定されたが、β-カロチンは検討可能な $5.4 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$ までの濃度で消去作用は認められなかった。 1O_2 の50%抑制濃度はRJが $6.2 \times 10^{-1} \text{mg/ml}$ およびβ-カロチンが $5.5 \times 10^{-3} \text{mg/ml}$ と推定されたが、ビタミンEは検討可能な 4.7mg/ml までの濃度で消去作用は認められなかった。

RJは4種の代表的な活性酸素分子種すべて、すなわち脂質過酸化の開始に重要な働きをしていると考えられる $O_2^{\cdot-}$ 、非常に反応性の高い HO^{\cdot} およびその前駆物質となる H_2O_2 、不飽和脂肪酸の二重結合の直接付加で過酸化反応を起こすといわれている 1O_2 に対して同程度の消去作用強度を示した。このことから、上述したRJのさまざまな効果はその一機序としてRJの有する活性酸素消去作用に基づいて発現している可能性が推察される。

本報で取り上げた抗酸化ビタミンは純品であるため、抗酸化作用強度はいずれもRJと同等以上（1.7～110倍）の効果であった。一方、RJの成分としては、蛋白質、炭水化物、アミノ酸あるいはビタミンB類などの存在は確認されているが、抗酸化作用のあるビタミンA、CあるいはEは含まれていない（松香，1980）。このようなRJが単品で4種の活性酸素分子種すべてをほとんど同じ強度で消去する作用を有していることから、バランスのとれた有効性の高い抗酸化物質であると考えられる。

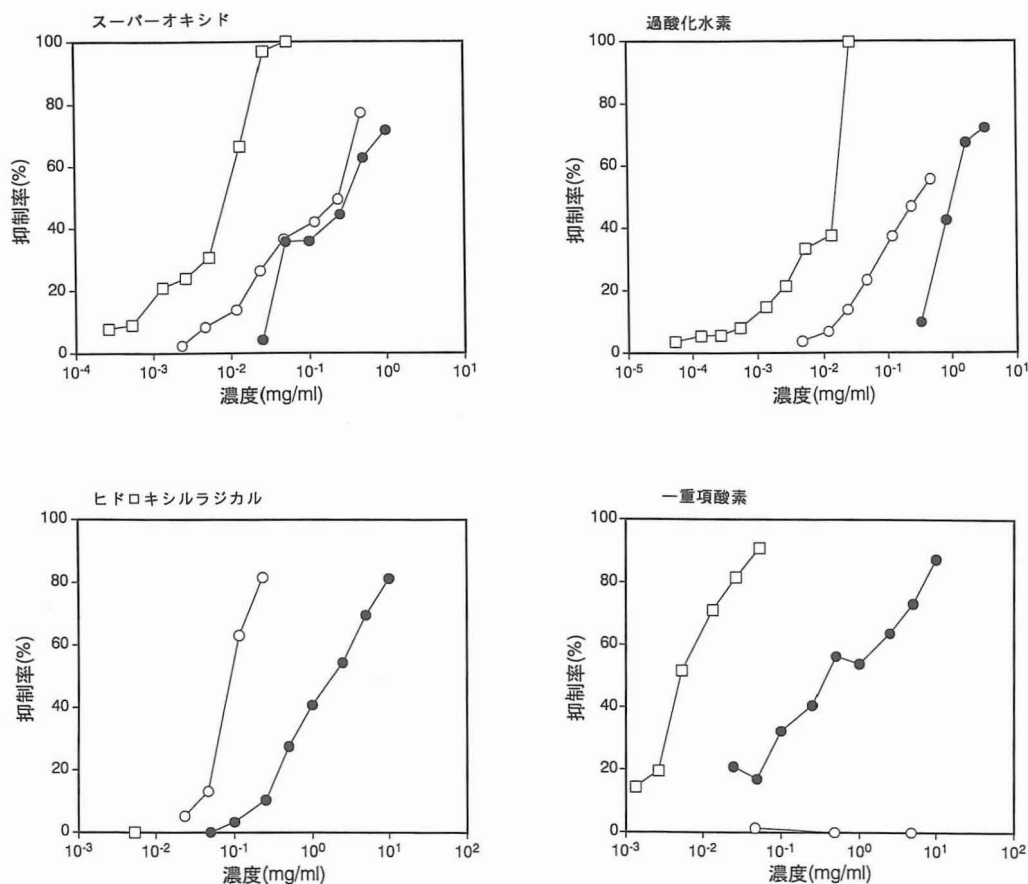


図6 各種活性酸素分子種に対するローヤルゼリーおよび抗酸化ビタミン類の消去作用

●: ローヤルゼリー, ○: ビタミンE, □: β-カロチン. 平均値 (n=3)

以上の結果より, さまざまなストレスから誘発される身体的あるいは精神的障害に対するRJの改善効果発現機序の一つとして, RJの抗酸化作用がなんらかの役割を演じている可能性が示唆された。

(〒360-01 埼玉県大里郡江南町押切 2512-1
ゼリア新薬工業株式会社 中央研究所 薬理研究部)

主な参考文献

- Baradley, D. F. and M. K. Wolf. 1959. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 45: 944-952.
陳瑞東. 1995. NHK「今日の健康」9: 38-39.
Cho, Y. T. 1977. Am. Bee J. 177 (1): 36-38.
藤井彰ら. 1986. 第74回日本薬理学会関東部会 Abstr. No. 54.
九嶋勝司ら. 1962. 老年病. 6(1): 27-30.
九嶋勝司ら. 1965. 診断と新薬 2: 347-357.
九嶋勝司ら. 1973. 産婦人科の世界 25(4): 439-

443.

- 桑原優ら. 1996. 薬理と治療. 24(7): 1463-1467.
Lerman, L. S. 1963. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 49: 94-102.
松香光夫. 1980. ミツバチ科学 1(1): 31-41.
三淵一二ら. 1962. 薬学研究 34: 674-675.
中陳静男ら. 1982. 生薬学雑誌 36(1): 65-69.
日本医薬情報センター編. 1995. 一般薬日本医薬品集. 薬業時報社.
田村豊幸ら. 1987. 日本薬理学雑誌 89: 73-80.
吉川敏一. 1988. フリーラジカル. メディカルレビュー社.
吉川敏一ら. 1990. J. Act. Oxyg. Free Rad. 1: 83-102.
鷲塚昌隆ら. 1996. 薬理と治療. 24(7): 印刷中.
IKEDA, Y., M. WASHIZUKA, H. FURUICHI, Y. FUKUDA and Y. KUWABARA. Stress and royal jelly. Honeybee Science 17(3): Central Research Laboratories, Zeria Pharmaceutical Co., Ltd.,

2512-1 Oshikiri, Kohnan-machi, Ohsato-gun, Saitama, 360-01, Japan.

1. Environmental temperature stress in rats

Rats were exposed to high temperature (33°C) or alternation of high and low temperature ([23°C, 1h-4°C, 1h] x4/day) for 10 days. The rats showed inhibition of body weight gain and immobility in the forced swimming and tail suspension tests, which are generally employed for evaluation of antidepressant activities. Royal jelly [RJ] (1g/kg/day during exposure to stress) improved the inhibition of body weight gain, the immobility in both tests mentioned above, and increased ambulation in the open-field test.

2. Aging of neural cell in rat brain

Supraoptic hypothalamic nuclei of aged rats (26 months old) were dyed red by acridine orange. Those of aged rats treated with RJ (1g/kg x 21days) tended to be tinged with yellow which was seen in those of young rats.

3. Hyperlipidemia model in rats

The model with high triglyceride level was induced by loading with 20% fructose in drinking water for 14 days. The triglyceride level was lowered in the model rats treated with RJ (100-300mg/kg x 14 days).

4. Antioxidative action in vitro

The antioxidant properties of RJ in vitro were compared with those of antioxidative vitamins such as α -tocopherol and β -carotene. RJ scavenged anion radicals ($O_2^{\cdot-}$) hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals (HO^{\cdot}), and also quenched singlet oxygen (1O_2). RJ showed an equivalent potency against these active oxygen species. In contrast, α -tocopherol scavenged $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and HO^{\cdot} , but not 1O_2 . β -carotene scavenged only $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and 1O_2 .

These findings suggest that the antioxidative actions demonstrated here may play some important role in the preventive effects of RJ on aging and various physical stress.

