

A-11

オペラント学習に対する植物由来フラバノール没食子酸エピガロカテキンの影響

The effect of plant derived flavanols on operant conditioning of aerial respiration in *Lymnaea*○吉川由依¹, 戸澤奨¹, 斎藤稔², Ken Lukowiak³, 小松崎良将⁴*Yui Yoshikawa¹, Sho Tozawa¹, Minoru Saito², Ken Lukowiak³, Yoshimasa Komatsuzaki⁴

Abstract: Modulation of memory and neurocognitive performance by flavonoids (plant phytochemicals) has been attracting much attention. Epicatechin (EC), which is a flavanol contained in green tea, has been shown to enhance long-term memory (LTM) formation in *Lymnaea*. Here, we investigated the effect of epigallocatechin galate (EGCg), which is the most abundant in green tea, on long-term memory formation of operantly conditioned aerial respiratory behavior. To study the effect of flavanols, we recorded the activity of RPeD1 neuron, which is a necessary site for long-term memory (LTM) formation. RPeD1 is 1 of 3 neurons that comprise the central pattern generator (CPG) that drives aerial respiratory behaviour. In the preparations 24h after a single 0.5h training session in EC, we found that the firing and bursting rate significantly decreased. These results suggest that flavanols alter RPeD1 excitability in such a way as to make it more difficult for the CPG to drive aerial respiratory behaviour and leads to enhanced LTM formation.

1. はじめに

緑茶, 赤ワイン, チョコレートに含まれるエピカテキン (EC) や没食子酸エピガロカテキン (EGCg) などの植物由来化合物であるフラバノールは様々な生理活性を有する。これらのフラバノールは, 脳機能を向上させることが報告されている^[1]。またげっ歯類にエピカテキン含有餌を与えると脳内のエピカテキンのレベルが増加する^[2]ので, 脳機能に対してエピカテキンが直接作用することが考えられる。そこで本研究では, 記憶学習研究でモデル動物としてよく使用されている淡水生軟体動物であるヨーロッパモノアラガイを用いた。モノアラガイの中枢神経系は 11 個の神経節で構成されており, 神経細胞は全ての神経節を合わせても 10 万程度である。また比較的大きな細胞や色・形に特徴のある細胞が多い。このため組織学的手法による神経回路の同定が用いであり, 回路を構成する細胞から活動を記録できるので, 神経生理学研究において重要な実験動物として用いられてきた。近年このモノアラガイにおいても EC が呼吸に関わるオペラント学習による記憶形成を促進することが報告されている^[3]。本研究では, EC よりも脂溶性の高い EGCg をオペラント条件付け学習直前に腹腔内注射することにより, その後のモノアラガイの記憶形成に対する EGCg 作用を行動実験及び電気生理学的測定を行うことにより評価した。

2. 実験方法

実験には, 実験室で飼育された殻長 21~26mm のヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) を 20 匹用いた。そのうち 10 匹には EGCg を個体注射器で実験開始 1 時間前に投与した。1L のビーカーに飼育水 (Pond water:PW) を

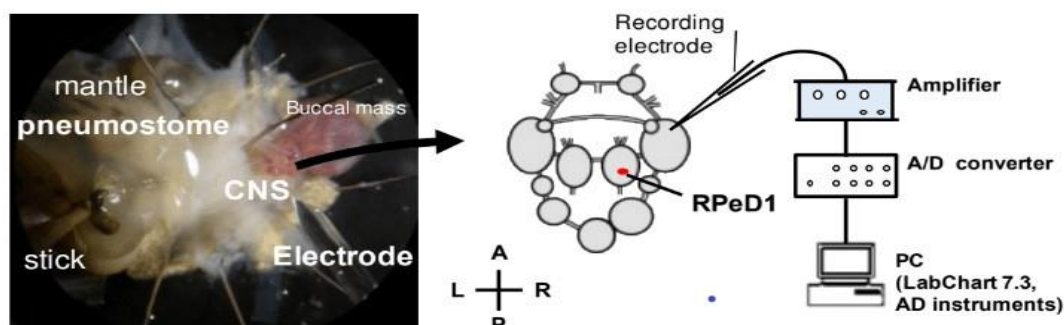


Figure 1. The central nervous system of *Lymnaea stagnalis*

1:日大理工・学部・物理 2:日大文理・教員・生命 3:Hotchkiss Brain Institute, Univ. of Calgary, Canada 4:日大理工・教員・物理

500ml 入れた。呼吸行動を促すため、PW に窒素ガスを 30 分間通気した低酸素水を作成し、その中にモノアラガイを入れ実験を行った。モノアラガイをビーカーに入れて 10 分置いて環境に慣らさせた。呼吸行動の観察は、30 分間での低酸素 PW 環境下で呼吸のために水面まで浮上し、呼吸口を開く。このとき開いた呼吸口に毎回つき棒で接触刺激を加えた。この条件付けを 2 回行った。その後、24 時間後に同様の手順でポストテストを行った。またその個体を解剖によりモノアラガイの脳神経節を単離し、呼吸中枢ニューロン RPeD1 にガラス電極を刺入し膜電位を測定した。本研究では行動実験において EC よりさらに脂溶性の高い EGCg を用いた。

3. 結果・考察

Fig.2, Fig.3 より 2h-TS 後は 72 h も記憶は保持された。

投与なしの個体と投与ありの個体を比較すると投与した個体の方が学習できていない個体が多かった。これは EGCg を投与する際にストレスがかかりすぎてしまったことが原因ではないかと考えられる。にも関わらず、学習成績は両方の群で有意な差は見られなかった。投与量の見直しと投与してから実験開始までの時間をより伸ばすことが改善策として挙げられる。単一トレーニング (EC 未投与群では記憶形成が見られないトレーニング) 施行後 24 時間経った個体の RPeD1 ニューロンを電気生理学的手法により測定したところ、EC 投与群において有意に RPeD1 ニューロンの活動が低下していた。呼吸に関するオペラント学習後、記憶形成が見られる個体の RPeD1 ニューロンでも活動の低下がみられることから、EC は RPeD1 ニューロンに直接もしくは間接的にその活動を調節していると考えられる。

4. 参考文献

- [1] O.I. Aruoma et al., "Low molecular proanthocyanidin dietary biofactor Oligonol: Its modulation of oxidative stress, bioefficacy, neuroprotection, food application and chemoprevention potentials", *Biofactors*. Vol. 27, pp245-65, 2006.
- [2] M. Pervin et al., "Blood brain barrier permeability of (-)-epigallocatechin gallate, its proliferation-enhancing activity of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, and its preventive effect on age-related cognitive dysfunction in mice", Vol.9, pp180-186, 2017.
- [3] L. Fruson et al., "A flavonol present in cocoa [(-)epicatechin] enhances snail memory", *Journal of Experimental Biology*, Vol.215, pp3566-3576, 2012.

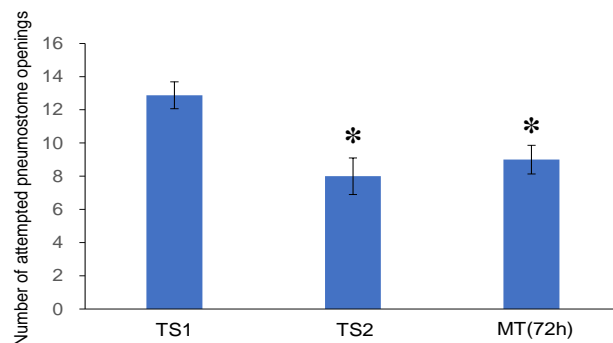


Figure 2. Operant conditioning training without EGCg. Snails were operantly conditioned in pond water. We subjected snails to a procedure consisting of two 0.5h TSs (TS1 and TS2) separated by a 1h interval. Then, we tested LTM following training in PW 72h (MT (72h)) following the two 0.5h TSs. * $p < 0.05$.

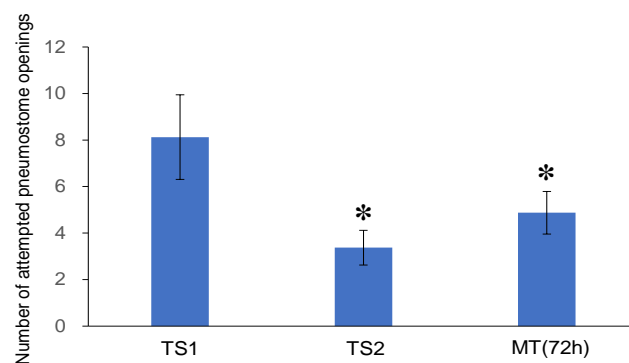


Figure 3. Operant conditioning training with EGCg. Snails were operantly conditioned in EGCg-pond water. * $p < 0.05$.

Activity in RPeD1 24h after 0.5 h training session

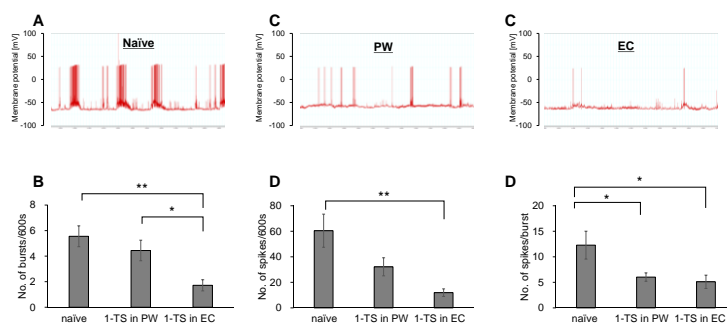


Figure 4. Representative recordings of the bursting behaviour of RPeD1 from a preparation 24 h after the single 0.5 h training session in PW and EC-PW. * $p < 0.05$. ** $p < 0.01$.