

## Mg 欠乏食-甘味料溶液継続摂取がマウス脳内セロトニン濃度に及ぼす影響

隅 田 有公子<sup>1,2)</sup>, 川 村 美笑子<sup>1,3)</sup><sup>(1)</sup> 高知県立大学大学院健康生活科学研究科\*, <sup>(2)</sup> 愛媛大学医学部付属病院栄養部\*\*,<sup>(3)</sup> 高知県立大学健康栄養学部栄養学研究室\*)

## Effects of continuous intake of Mg-deficient diet with sweetener solution on serotonin levels in the brains of mice

Yukiko SUMIDA<sup>1,2)</sup> and Mieko KAWAMURA<sup>1,3)</sup><sup>1)</sup> Ehime University Hospital<sup>2)</sup> Graduate School of Human Health Sciences, University of Kochi<sup>3)</sup> Laboratory of Nutrition, Faculty of Human Life and Environmental Science, University of Kochi

## Summary

Focusing on magnesium (Mg), insulin, and the neurotransmitter serotonin, we conducted an animal experiment on serotonin secretion in the brain under the conditions of continuous intake of Mg-deficient diet both with and without intake of sweetener solution, which has been shown to affect insulin metabolism.

Experimental animals comprised 5 or 6-weeks male ddY mice. As Mg-deficient diet groups, AIN-93G Mg-deficient diet was given accompanied by the following solutions: ① distilled water; ② sucrose; ③ aspartame; ④ stevioside; ⑤ minerals-trehalose; or ⑥ trehalose. As controls, groups corresponding to the Mg-deficient diet groups ① through ⑥ were set using AIN-93G diet. Each diet was provided *ad libitum*, and each sweetener solution was prepared to have a sweetness level of 10%. Levels of serotonin and protein in the brain were then measured.

As a result, under the present experimental conditions, continuous intake of Mg-deficient diet tended to reduce serotonin levels in the brains of mice. The present findings also suggest a tendency for this phenomenon to be promoted with simultaneous continuous intake of sweetener solution.

脳は活発で複雑な神経活動を営み、情報処理や精神活動といった高次な機能を有している。脳も臓器の一つであり、活動のためにはエネルギーが必要で、それは食物から供給されている。また、脳の構成成分も脳内で合成される神経伝達物質も材料は食物から供給されている。脳への栄養物質の取り込みは血液脳関門<sup>1,2)</sup>を通じて行われている。摂取する食物、また栄養状態は、脳および脳機能の維持において重要な役割を担っているといえる。近年、脳機能と栄養についての研究が行われるようになり、栄養により神経伝達物質の分泌に変化があることが明らかになってきた<sup>3)</sup>。栄養が神経伝達物質に影響し、精神状態に影響することも明らかになってきている<sup>4,5)</sup>。

神経伝達物質の1つであるセロトニンは、怒りや攻撃性、不安、恐怖といった情動以外にも、認知、学習・記憶、睡眠、摂食、性行動の抑制、痛覚の抑制、体温上昇などの多岐にわたる脳機能に関わっている。体内におけるセロトニ

ンは、消化管に約90%が存在し、血小板には約8%、脳にはわずか1~2%しか存在しない。しかし、この脳内セロトニンは上記のように多くの脳機能に関わっていることが明らかとなっており、脳において重要な役割を担っている。脳内セロトニンは、血液脳関門にセロトニンのキャリアが存在せず、血中のセロトニンは脳内に入ることが出来ないため、神経細胞が合成したものである。セロトニンの原料であるトリプトファンは体内で合成されない必須アミノ酸であり、食物を摂取することによって体内に取り入れている<sup>6,7)</sup>。

現在、我が国では、うつ病、また、進行する高齢化社会に伴いアルツハイマー病やパーキンソン病といった認知症等の脳疾患が深刻な問題となっている。近年、うつ病と神経伝達物質の動態変化が問題とされ、脳内セロトニンやカテコールアミン等、モノアミン欠乏がうつ病の成因として注目され、血糖、インスリンやMgとの関連も示唆され

\*所在地：高知市池2751-1 (〒781-8515)

\*\*所在地：愛媛県東温市志津川454 (〒791-0204)

ている<sup>8-28)</sup>。一方、ミネラル摂取不足が依然として指摘されているが、代謝疾患、循環器疾患や中枢疾患などMg栄養ついての問題が再燃してきている。マグネシウム(Mg)の摂取不足だけでなく、摂取する糖質の種類によりセロトニン分泌が異なることが報告<sup>29)</sup>されており、Mg摂取量や食品中糖質の種類や量などの状態も何らかの関わりを有していることは十分考えられる。

本研究では、Mgと神経伝達物質であるセロトニンおよびインスリンに焦点をあてて、Mg欠乏食-甘味料溶液継続摂取による脳内セロトニンについて検討した。

## 実験方法

### 1. 実験動物

マウスは、室温25℃、湿度約55%、12時間明暗サイクル(8時点灯・20時消灯)の動物室でステンレスケージを用いて飼育した。飼育期間中は実験動物の体重および食餌摂取量を経時的に測定した。飼料は、AIN-93G組成を基本とし、Mg欠乏群にはMgを含まない飼料を用いた。

動物の飼育は、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和55年総理府告示第6号)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年文部科学省告示第71号)ならびに「実験動物の飼養および保管ならびに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月環境省告示第88号)および「高知県立大学動物実験委員会規定」を遵守して行った。

1) Mg欠乏食継続摂取が脳内セロトニン濃度に及ぼす影響  
生後5週齢ddY系雄マウス30匹を、対照群(n=15)、Mg欠乏群(n=15)の2群に分け、それぞれの群に、正常合成飼料、Mg欠乏飼料を投与し、13日間飼育した。飼育期間中、飼料と水は自由摂取とした。経日的(欠乏食投与開始1, 4, 7, 10, 13日目)に各群のマウスを解剖した。

2) 食餌摂取およびMg欠乏食の継続摂取がマウス脳内セロトニン濃度に及ぼす影響

生後6週齢ddY系雄マウス25匹を、対照群(n=8)、Mg欠乏群(n=9)、pair-feeding群(n=8)の3群に分け、それぞれの群に、正常合成飼料、Mg欠乏飼料、正常合成飼料を投与し、食餌は全ての群にmeal-feeding(明期18:00-19:00)、蒸留水は自由摂取、とし、飼育開始8日目のmeal-feeding前後にマウスを解剖した。

3) Mg欠乏-甘味料溶液継続摂取と脳内セロトニン

Exp.1 Mg欠乏食-甘味料溶液継続摂取が脳内セロトニン濃度に及ぼす影響

生後6週齢ddY系雄マウス36匹を、18匹ずつ対照群、Mg欠乏群に分けた。Mg欠乏群を3匹ずつ6群(①Mg欠乏-蒸留水、②Mg欠乏-スクロース溶液、③Mg欠乏-アスパルテーム溶液、④Mg欠乏-ステビオシド溶液、⑤Mg欠乏-ミネラルトレハ溶液<sup>30)</sup>、⑥Mg欠乏-

トレハロース溶液)に分け、対照群を、Mg欠乏群①~⑥に対応する群に分けた。飼育期間中、飼料と蒸留水あるいは溶液は自由摂取とした。飼育1週間後、解剖日明期開始と共に絶食を開始し、絶食8.5~9時間後の明期において、各群のマウスを解剖した。各甘味料溶液は、甘味度10%に相当するよう調製した。

Exp.2 Mg欠乏食-甘味料溶液継続摂取後の単回糖負荷がマウス脳内セロトニン濃度に及ぼす影響

生後6週齢ddY系雄マウス36匹を、18匹ずつ対照群、Mg欠乏群に分けた。Exp.1と同条件にて飼育した12群のマウスを用いて、解剖日明期開始と共に絶食を開始し、絶食8.5~9時間後の明期において、糖負荷(グルコース2g/体重kg/0.1mL;経口投与)を行い、糖負荷30分後、各群のマウスを解剖した。

### 2. 測定試料調整及び測定方法

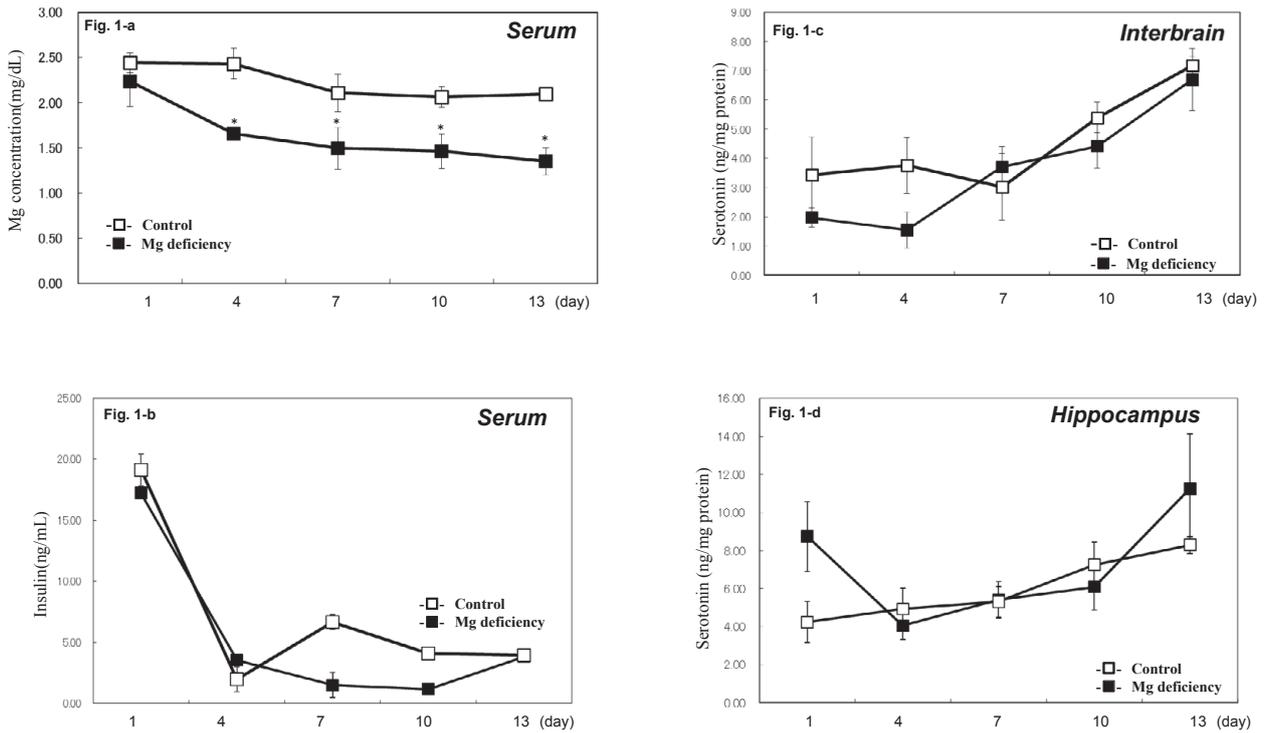
マウスを断首し、血清を試料として、血清Mg濃度をキシリジルブルー法にて測定した。断首後、頸部血管より、血液を自然滴下により採取し、遠心分離を行い、血清を得た。血清中のセロトニン濃度をELISA法にて、タンパク質濃度をBradford法にて、インスリン濃度をELISA法にて、グルコース濃度をGOD法にて測定した。また、屠殺後、脳の摘出を行い、脳は摘出後直ちにドライアイスにて凍結させ、測定まで-80℃にて保存した。保存した脳の間脳および海馬を摘出し、緩衝溶液(pH7.4 25mM Tris-HCl 1mM EDTA, 1mM EGTA)1mlにてホモジナイズし、遠心分離(11000g 30min 4℃)を行い、上澄液をフィルター(0.20μm)を用いて濾過し、濾液を脳内セロトニン濃度測定試料とした。脳内セロトニン濃度をELISA法にて、タンパク質濃度をBradford法にて測定した。

3. 実験結果の入力・解析にはMicrosoft社製エクセル2003を使用し、実験群間の比較には母平均の差の検定(t検定)あるいはTurkeyによる多重比較検定を用いた。危険率5%未満を有意とした。

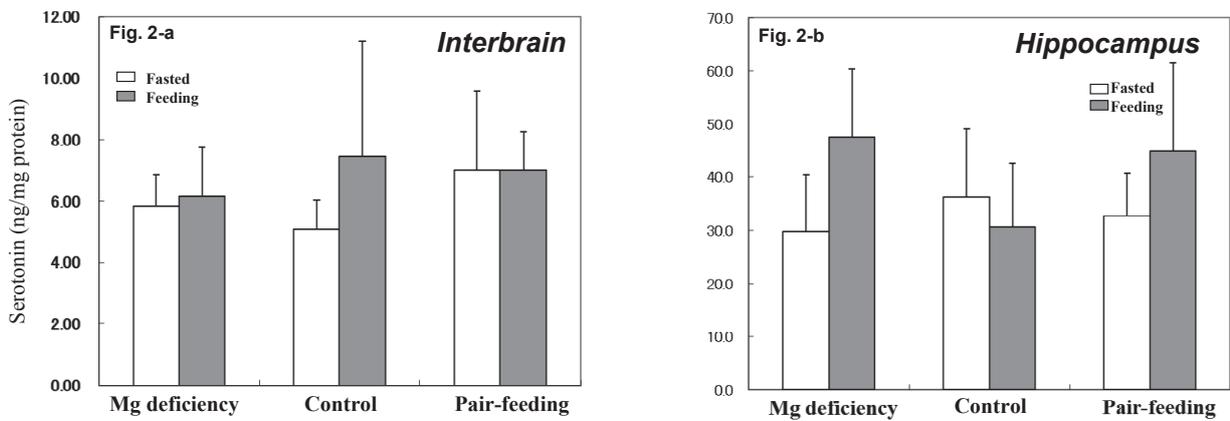
## 結果および考察

Mg欠乏飼料13日間飼育では、Mg欠乏群は対照群と比較し、体重および摂食量に有意な差はみられなかった。Mg欠乏群の血清Mg濃度は対照群と比較して4日目より有意に低下し、4日目より1.8mg/dLを下回り、Mg欠乏状態であった(Fig. 1-a)。Mg欠乏群および対照群間で血清インスリン、脳内セロトニン濃度に有意な差は認められなかった(Fig. 1-b, c, d)。

摂食条件および明暗条件等の条件を一定とするためにmeal-feeding(摂食時間を一定化)およびpair-feeding(実験群と同量の飼料を対照群に供給し摂食量を一定化)条件下で実験を行った。Mg欠乏群およびpair-feeding群、



**Fig. 1** Magnesium (Mg) or insulin concentration of serum, serotonin concentration of brain in mice fed Mg- deficient or sufficient diet for 13 days. Data are means  $\pm$  SE, (n = 3-4). Deficient group vs control group (\*:  $P < 0.025$ ) in Fig. 1-a.



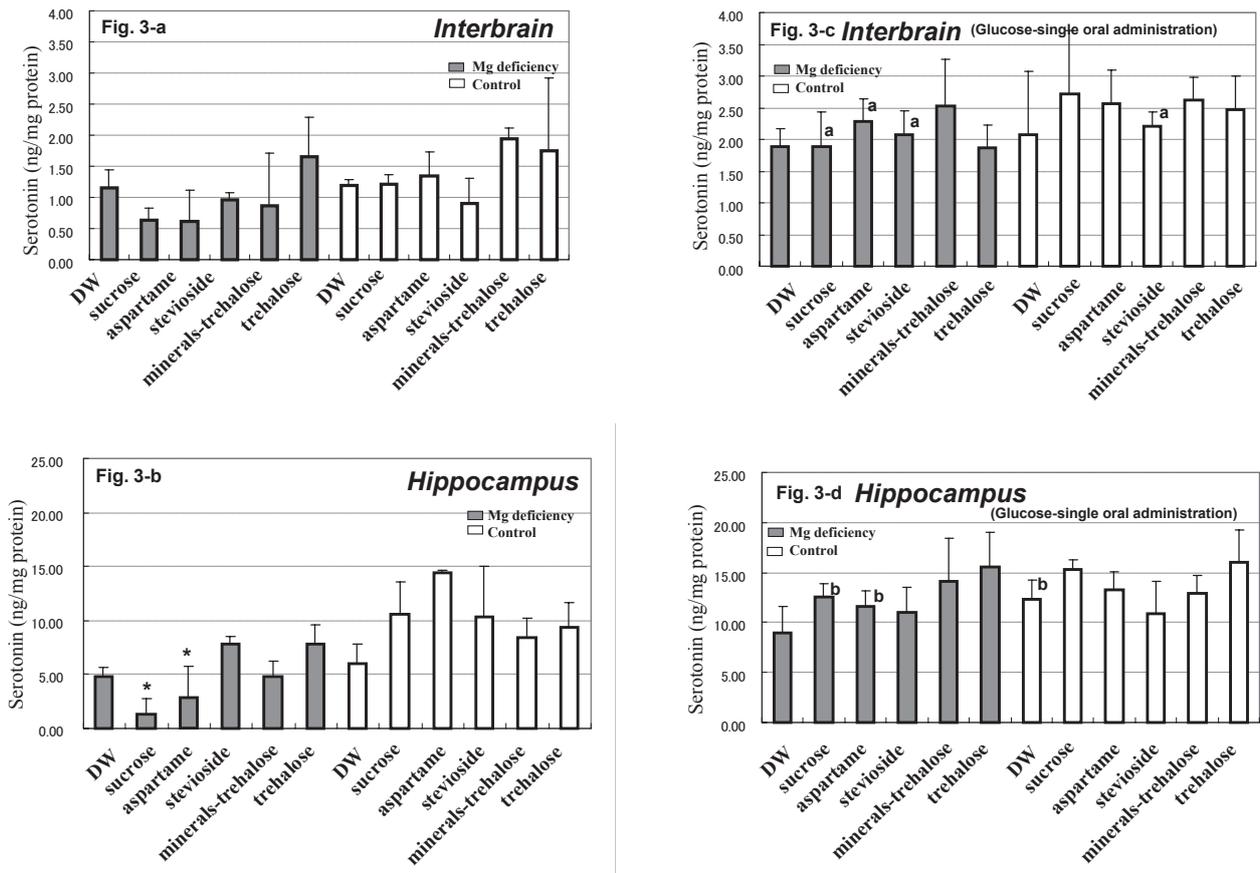
**Fig. 2** Effect of intake pattern of Mg- deficient or sufficient diet on serotonin levels in the brain in mice fed Mg- deficient or sufficient diet for 7 days.

対照群の各群において、meal-feeding 前後（絶食時および摂食後）での間脳および海馬の脳内セロトニン濃度に有意な差は認められなかった (Fig. 2-a, b)。脳内セロトニンは摂食により増加することが明らかとなっている。摂食により脳内セロトニン濃度は増加すると推察されたが、摂食前後で有意な差はみられなかった。このことは、動物実験を用いた先行研究<sup>31)</sup>において、meal-feeding によってインスリンの学習反応による分泌が起こるとの報告があり、このため、絶食時においてインスリンの分泌が起こり、脳内セロトニン濃度は摂食時と比較しても明らかな差は認められなかったとも考える。

脳内セロトニン濃度は、間脳では、Mg 欠乏-スクロー

ス溶液群、Mg 欠乏-アスパルテーム溶液群、Mg 欠乏-ミネラルトレハ溶液群において、対応する対照群と比較して、Mg 欠乏により減少する傾向があったが、多重比較検定では差が見られなかった (Fig. 3-a)。海馬では、Mg 欠乏-スクロス溶液群、Mg 欠乏-アスパルテーム溶液群において、対応する対照群と比較して、Mg 欠乏により有意 (危険率 0.01) に低値を示した (Fig. 3-b)。Mg 欠乏-ステビオシド溶液群、Mg 欠乏-ミネラルトレハ溶液群において、対応する対照群と比較して、Mg 欠乏により減少する傾向があったが、多重比較検定では差が見られなかった。

Mg 欠乏食-甘味料溶液継続摂取後の単回糖負荷による



**Fig. 3** Effect of continuous of Mg- deficient or sufficient diet with sweetener solution on serotonin levels in the brain in mice fed Mg-deficient or sufficient diet for 7 days(Fig. 3-a, b). Date are means  $\pm$  SE. (n = 3-4). Deficient group vs control group (\*:  $P < 0.01$ ) in Fig. 3-b. Effect of glucose-single oral administration following the continuous of Mg- deficient or sufficient diet with sweetener solution for 7days on serotonin levels in the brain in mice fed Mg- deficient or sufficient diet for 7 days (Fig. 3-c, d). Date are means  $\pm$  SE.(n = 3-4). Glucose load for deficient group vs deficient group (a:  $P < 0.01$ ) in Fig. 3c and Fig. 3a. Glucose load for sufficient group vs sufficient group (a:  $P < 0.01$ ) in Fig. 3c and Fig. 3a. Glucose load for deficient group vs deficient group (b:  $P < 0.01$ ) in Fig. 3d and Fig. 3b. Glucose load for sufficient group vs sufficient group (b:  $P < 0.01$ ) in Fig. 3d and Fig. 3b.

脳内セロトニン濃度を Fig. 3-c, d に示す。間脳及び海馬では、Mg 欠乏下でも、Mg 充足下でも、糖負荷により 12 群の全群において脳内セロトニン濃度の上昇あるいは上昇する傾向がみられた。

間脳では、Mg 欠乏-スクロース溶液群、Mg 欠乏-アスパルテーム溶液群、Mg 欠乏-ステビオシド溶液群において、Mg 欠乏下の対応する群に比較して有意（危険率 0.01）に高値を示した。Mg 充足（コントロール）-ステビオシド溶液群も、Mg 充足下の対応する群に比較して有意（危険率 0.01）に高値を示した。

海馬では、Mg 欠乏-スクロース溶液群、Mg 欠乏-アスパルテーム溶液群、Mg 充足-蒸留水群において脳内セロトニン濃度の有意（危険率 0.01）な上昇がみられた。

このように、糖負荷による脳内セロトニン濃度の上昇は、糖負荷により血中グルコース濃度が上昇し、それに応じて血中インスリン濃度が高まることで、タンパク質合成に必要なアミノ酸量が増加し、セロトニンの合成材料であるトリプトファンの脳内取り込みが促進され、脳内セロトニ

ン濃度が上昇したと考える。本実験では、Mg 欠乏食-甘味料溶液継続摂取という食歴により、Mg 欠乏により惹起されるインスリン代謝異常に加えて、甘味料溶液継続摂取によりその代謝異常を起因・充進すると推測した。換言すれば、インスリン動態が異なることにより、糖負荷の際の脳内セロトニン濃度の反映に何らかの違いが生じるのではないかという仮説のもと実験を行った。

本実験条件下において、Mg 欠乏単独では脳内セロトニン濃度に影響を及ぼさなかったが、甘味料の種類によっては、Mg 欠乏-甘味料溶液の継続摂取により脳内セロトニン濃度が減少することが明らかになった。これらの知見は、脳の部位によって異なることも分かった。

先行研究において、Mg 欠乏および脳内セロトニンに関する研究では、Mg 欠乏が脳内セロトニンに及ぼす影響は、明確な結論が導き出されていない。この理由としては、実験により Mg 欠乏期間が異なること、用いた実験動物の系統が異なること等が因子として考えられる。また、ヒトにおいては低 Mg 血症の際、低 Ca 血症となることが明ら

かとなっているが、Mg 欠乏状態において例えばマウスとラットでは異なる Ca 状態を示すことが報告されており、このようなミネラル動態の動物種による違いは、欠乏状態によって起因される状態にも大きな違いが生じてくると考えられる。

しかし、多くの研究より、精神疾患において Zn および Mg の恒常性維持の重要性を示唆する報告がされている。Mg が精神疾患において有効とされる機序については、明確にはなっておらず、グルタミン酸や脳由来神経栄養因子 (BDNF) やグリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 (GSK-3) 等との関わりが仮説として考えられている<sup>32)</sup>。Mg 欠乏-甘味料溶液継続摂取により脳内セロトニンが減少するメカニズムについては今後の課題<sup>33-36)</sup>と考え、現在検討中である。

### 参考文献

- 1) Mooradian AD (1988) Effect of aging on the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging*, Jan-Feb, 9, 1, 31-9. Review.
- 2) Cornford EM, Cornford ME. (1986) Nutrient transport and the blood-brain barrier in developing animals. *Fed Proc*, Jun, 45, 7, 2065-72. Review.
- 3) Bradford J, Scanlan, Blaine Tuft, Justin E. Elfrey, Allen Smith, Aiping Zhao, Motoko Morimoto, Joanna J. Chmielinska, Maria Isabel Tefero-Taldo, Iu Tong Mak, William B. Weglicki, Terez Shea-Donohue. (2007) Intestinal inflammation caused by magnesium deficiency alters basal and oxidative stress-induced intestinal function. *Mol Cell Biochem*, 306, 59-69.
- 4) W. Zimowska, J.P. Giradeau, J. Kuryszko, D.Bayle, Y. Rayssiguire, A. Mazur. (2002) Morphological and immune response alterations in the intestinal mucosa of the mouse after short periods on a low-magnesium diet. *British Journal of Nutrition*, 88, 515-522.
- 5) Kaplan BJ, Crawford SG, Field CJ, Simpson JS. (2007) Vitamins, minerals, and mood. *Psychol Bull*, Sep, 133, 5, 747-60. Review.
- 6) Pardridge WM (1983) Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiol Rev*. Oct;63, 4, 481-535. Review.
- 7) Yokogoshi H, Wurtman RJ.(1986) Meal composition and plasma amino acid ratios: effect of various proteins or carbohydrates, and of various protein concentrations. *Metabolism*. Sep, 35, 9, 837-42.
- 8) 木村修一, 小林修平 翻訳監修, 最新栄養学第9版, 建帛社, 2007 東京
- 9) 小佐野美香, 藤原薫, 鈴江緑衣郎 (1998) 日本人の糖尿病と微量元素に関する栄養学的研究 昭和女子大学大学院生活機構研究科紀要 7, 15-28.
- 10) 横越英彦 編, 脳 機能と栄養, 幸書房, 2004 東京
- 11) Marilyn E. Morris (1992) Brain and CSF magnesium concentrations during magnesium deficit in animals and humans: neurological symptoms. *Magnesium Research*, Vol.5, 4, 303-313.
- 12) Christina R. Whitehouse, Joseph Boullata, Linda A. McCauley. (2008) The Potential Toxicity of Artificial Sweeteners. *AAOHN Journal*, June, Vol. 56, 6, 251-261.
- 13) Bardgett ME, Schultheis PJ, McGill DL, Richmond RE, Wagge JR.(2005)Magnesium deficiency impairs fear conditioning in mice. *Brain Res*, Mar 15, 1038, 1, 100-6.
- 14) Lecrubier Y (2001) The burden of depression and anxiety in general medicine. *J Clin Psychiatry*, 62 Suppl 8, 4-9, discussion 10-1. Review.
- 15) Eby GA 3rd, Eby KL.(2009) Magnesium for treatment-resistant depression: A review and hypothesis. *Med Hypotheses*, Nov 26.
- 16) George A. Eby, Karen L. Eby. (2006) Rapid recovery from major depression using magnesium treatment. *Medical Hypotheses*, 67, 362-370.
- 17) Xing Sun, Jie Deong, Tiechenig Liu, Jimo Borjigin. (2002) Circadian 5-HT production regulated by adrenergic signaling. *Pinas*, April 2, Vol.99, 7, 4686-4691.
- 18) Kyiaki Gerozissis (2008) Brain, insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *European Journal of Pharmacology*, 585, 38-49.
- 19) Szewczyk B, Poleszak E, Sowa-Kućma M, Siwek M, Dudek D, Ryszewska-Pokrańiewicz B, Radziwoń-Zaleska M, Opoka W, Czekał J, Pilc A, Nowak G. (2008) Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action. *Pharmacol Rep*, Sep-Oct, 60, 5, 588-9. Review.
- 20) Kawakami N, Takatsuka N, Shimizu H, Ishibashi H. (1999) Depressive symptoms and occurrence of type 2 diabetes among Japanese men. *Diabetes Care*, Jul, 22, 7, 1071-6.
- 21) Tashiro A, Hongo M, Ota R, Utsumi A, Imai T. (1997) Hyper-insulin response in a patient with depression. Changes in insulin resistance during recovery from depression. *Diabetes Care*, Dec,20,12,1924-5.
- 22) Poleszak E. (2007) Modulation of antidepressant-like activity of magnesium by serotonergic system. *J Neural Transm*. Sep, 114, 9, 1129-34.

- 23) Cardoso CC, Lobato KR, Binfaré RW, Ferreira PK, Rosa AO, Santos AR, Rodrigues AL. (2009) Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like effect of magnesium. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, Mar 17, 33, 2, 235-42.
- 24) Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, Pols HA, Hofman A, Breteler MM. (1999) Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology*, Dec 10, 53, 9, 1937-42.
- 25) Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P. (2006) Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol*. Jan, 5, 1, 64-74. Review.
- 26) Fishel MA, Watson GS, Montine TJ, Wang Q, Green PS, Kulstad JJ, Cook DG, Peskind ER, Baker LD, Goldgaber D, Nie W, Asthana S, Plymate SR, Schwartz MW, Craft S. (2005) Hyperinsulinemia provokes synchronous increases in central inflammation and beta-amyloid in normal adults. *Arch Neurol*. Oct, 62, 10, 1539-44.
- 27) Craft S (2005) Insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease: age- and obesity-related effects on memory, amyloid, and inflammation. *Neurobiol Aging*. Dec, 26 Suppl 1, 65-9. Review.
- 28) Anna Mendlin, Francisco J.Martin, Lynee E. Ruetter, Barry L.Jacobs. (1996) Neuronal Release of Serotonin in the Cerebellum of Behaving Rats: An In Vivo Microdialysis Study. *Journal of Neurochemistry*, Vol.67, No.2, 617-622.  
5-HT Brain Microdialysis and Behavior. *Reviews in the Neurosciences*, 8, 117-137.
- 29) Copani A, Koh JY, Cotman CW. (1991) Beta-amyloid increases neuronal susceptibility to injury by glucose deprivation. *Neuroreport*, Dec2, 12, 763-5.
- 30) 隅田有公子, 矢吹朋美, 合田一二三, 渡邊慶子, 義基帯刀, 島田郁子, 川村美笑子 (2008) 海洋深層水から精製した海水由来の新素材—トレハロース／ミネラル複合体の血清マグネシウム回復および血糖低下作用—. *Trace Nutrient Research* 25 : 114-121
- 31) Woods SC, Vasselli JR, Kaestner E, Szakmary GA, Milburn P, Vitiello MV. (1997) Conditioned insulin secretion and meal feeding in rats. *J Comp Physiol Psychol*, Feb, 91, 1, 128-33.
- 32) Craft S. (2006) Insulin resistance syndrome and Alzheimer disease: pathophysiologic mechanisms and therapeutic implications. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, Oct-Dec, 20, 4, 298-301. Review.
- 33) Arvind T. Modak, Josue Montanez, William B. Stavinoha. (1979) Magnesium Deficiency: Brain Acetylcholine and Motor Activity. *Neurobehavioral Toxicology*, Vol.1, 187-191.
- 34) Nicole Amyard, Annie Leyris, Claire Monier, Henriette Frances, Roger G. Boulu, Jean-Georges Herrotte. (1994) Brain catecholamines, serotonin and their metabolites in mice selected for low (MGL) and high (MGH) blood magnesium levels. *Magnesium Research*, 8, 1, 5-9
- 35) S.Poenaru, S.Rouhani, J.Durlach, N. Aymard, F.Belkahl, Y. Rayssiguier, M.Iovino. (1984) Vigilance States and Cerebral Monoamine Metabolism in Experimental Magnesium Deficiency. *Magnesium*, 3, 145-151.
- 36) J.G.Chutkow, G.M.Tyce. (1979) Brain Norepinephrine, Dopamine, and 5-Hydroxytryptamine in Magnesium-Deprivation Encephalopathy in Rats. *J. Neural Transmission*, 44, 297-302.