

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）（一般）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590255

研究課題名（和文）慢性ストレスとうつ病：

香料吸入の予防効果とその機序に関する研究

研究課題名（英文）Chronic stress and depressive disorder：

Research on preventive effect of odorant and its mechanism

研究代表者

渡邊 達生（WATANABE TATSUO）

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：60182929

研究成果の概要（和文）：

本研究では、うつ状態にしたラットに緑の香りをかがせ、香りとうつ病の治癒効果があるか、あるいは、うつ病モデルラット作成時に緑の香りをかがせ、香りとうつ病の予防効果があるか否かについて検討した。その為に、強制水泳試験と学習性無力試験の二つの方法でラットをうつ状態にした。本研究の結果から、緑の香りにはラットのうつ病に対する治療効果と予防効果の両者があることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

We investigated whether inhalation of green odor (a mixture of equal amounts of trans-2-hexenal and cis-3-hexenal) cures and/or prevents the depressive disorders induced in rats. To this end, we used two behavioral models of depression, forced swim test and learned helplessness paradigms. The present results suggest that green odor has not only a therapeutic, but also a preventive effect on depressive-like states in rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：ストレス

1. 研究開始当初の背景

うつ病はストレスを誘因として発症することが多い。実際、慢性ストレスを実験動物に負荷するとうつ病モデル動物が作成できる。一方、ストレスはグルココルチコイド(GC)の産生増加を介して海馬神経を障害したり海馬

神経新生を抑制する。GCは海馬に高密度に分布するステロイド受容体に結合し、視床下部へネガティブフィードバックをかけているので、海馬の障害は視床下部・下垂体・副腎系(HPA系)のフィードバック抑制を減弱させる。その結果、HPA系の活性上昇が起こり、GC分泌がさらに増して海馬がさらに障害されるとい

う悪循環に陥る。近年、海馬の障害とうつ病との関連が注目されている。実際、抗うつ病薬は海馬神経新生を促進して抗うつ作用を示すと報告されている。したがって、慢性ストレスによるHPA系の活性上昇と海馬の障害ならびに海馬の神経新生抑制がうつ病の1つの原因となっていると推察される(事実、うつ病患者では、HPA系の活性上昇と海馬の萎縮が知られている)。

近年私たちは、香料の一つである緑の香り(青葉アルコール/青葉アルデヒド)が慢性ストレスによる皮膚バリアー障害を抑制する事実を発見した。緑の香りはストレスによるACTH 増大反応を抑制するので、緑の香りにはストレス緩和作用があるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、慢性ストレス負荷ラットが香料を嗅ぐことにより、海馬の障害・海馬神経新生抑制が防止でき、うつ病が治癒・予防できるか否かを検討するのを目的とする。本研究では、強制水泳試験と学習性無力試験の二つの方法でラットをうつ状態にさせた。

3. 研究の方法

3-1 緑の香りのうつ病に対する治癒効果

3-1-1 強制水泳試験

1) ラットに1日3分間の強制水泳を負荷した。無動時間 (immobility time) を測定し、これをうつ病様行動 (絶望状態) の指標とした。7日間の強制水泳試験を行うと、ラットはうつ病様状態になった (7日目の無動時間が1日目のそれより有意に増加した)。8日目から、緑の香りを吸入させる群、酪酸を吸入させる群、そして vehicle (くえん酸トリエチル) を吸入させる群に分けた。18日目に再度、強制水泳試験を行い、ラットのうつ病様状態への香りの効果を調べた。19日目に緑の香り群と vehicle 群の脳を採取した。

2) リアルタイム RT-PCR で採取した脳の medial prefrontal cortex (mPFC) の IEGs 遺伝子 (c-Fos ; 神経活動の指標、Zif268 ; 神経可塑性の指標) の発現解析を行った。

3) 神経新生のマーカーであるダブルコルチン (DCX) に対する抗体を用いて採取した脳の海馬の免疫組織化学染色を行った。DCX 陽性細胞のカウントは歯状回の subgranular zone (SGZ) で行った。各切片の陽性細胞

数は SGZ の長さで割り、SGZ 1 mm あたりの個数で表わした。

3-1-2 学習性無力試験

1) 実験は GEMINI Avoidance System (室町機械) を用いて行なった。1日目と2日目には、ラットに避けられない電気ショックをかけた。この両日の刺激により、ラットは逃げても無駄であるという学習性無力状態になる。3日目には、逃げられる電気ショックをラットにかけた。逃れられるにもかかわらず、ラットが逃げなかった回数を failure とし、failure が 30 回の trial の内 20 回以上ならうつ状態であると判定した。また、逃げた場合も逃げるまでにかかった時間 (latency) を測定し判定の材料とした。この判定を active avoidance test とよぶ。

うつ状態であると判定されたラットを2つのグループに分け、一方には緑の香りを、もう一方には vehicle を 11 日間かがせた。

15日目、再び active avoidance test を行ない、failure、latency とともに測定し、両群で比較した。

3-2 緑の香りのうつ病に対する予防効果

3-2-1 強制水泳試験

1) ラットに1日3分間の強制水泳試験を10日間行いながら緑の香りをかがせる群とかがせない群で immobility time を比較した。

4. 研究成果

4-1 緑の香りのうつ病に対する治癒効果

4-1-1 強制水泳試験

1) ラットのうつ病様状態に対する緑の香りの治癒効果

強制水泳1日目から7日目、そして香りをかがせた後 (18日目) の immobility time の結果を Fig. 1 に示す。vehicle 提示の前後では immobility time に差が認められない (Fig. 1A) のに対し、緑の香り群では6日目と18日目、7日目と18日目の immobility time の間に有意の差が認められた (Fig. 1B)。すなわち、緑の香りにはうつ病様状態に対する治癒効果があるものと考えられる。

A vehicle-exposed rats **B** green odor-exposed rats

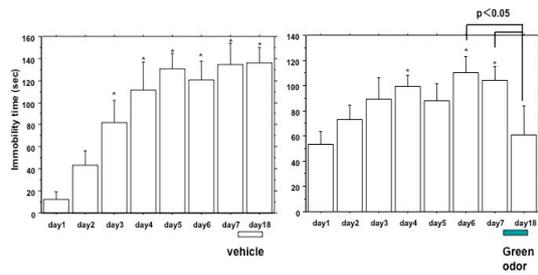


Fig. 1

2) ラットのうつ病様状態に対する酪酸の効果

強制水泳1日目と7日目、そして香りがかがせた後(18日目)のimmobility timeはそれぞれ、27.05±3.55秒、74.19±22.09秒、60.39±15.19秒であった。強制水泳7日目のimmobility timeは1日目のそれより有意に長かったが、7日目と18日目のimmobility timeには有意な差がなかった。すなわち、酪酸ではうつ病様状態が治らなかったものと推察される。強制水泳試験における抗うつ効果は緑の香りに特異的なものであることが分かった。

3) mPFCのIEGs遺伝子(c-Fos、Zif268)の発現

mPFCのIEGsの発現に関しては、緑の香り群、Vehicle群とコントロール群(水泳も香り吸入も行わない群)の3群間で有意な差が認められなかった(Fig. 2)。この結果から、Wistarラットを用いた強制水泳試験うつ病

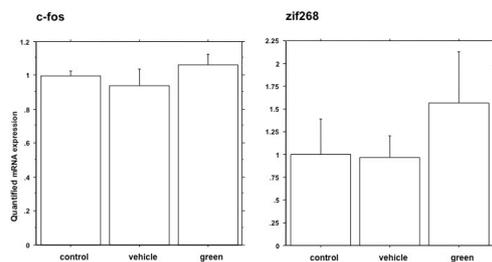


Fig. 2

モデルではmPFCのIEGs発現に変化が生じないものと考えられる。

4) 海馬DCXの免疫組織化学染色

緑の香り群、vehicle群とコントロール群の海馬SGZにおけるDCXタンパクの発現細胞数

を比較したが、差は認められなかった(Fig. 3)。この結果から、緑の香りの抗うつ作用に海馬DCXの神経新生は重要な役割を果たしていないものと推察される。

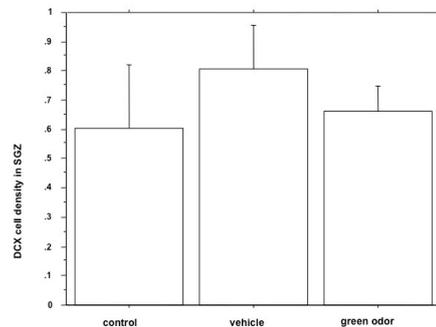


Fig. 3

4-1-2 学習性無力試験

15日目のactive avoidance testでラットが逃げなかった回数(failure)と、逃げるまでにかかった時間(latency)をFig. 4に示す。vehicleをかがせた群で観察されたfailureとlatencyは、緑の香りがかがせた群で有意に抑制された。すなわち、緑の香り

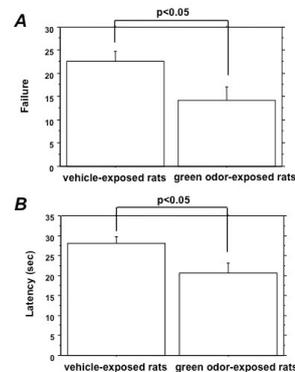


Fig. 4

には学習性無力試験によるうつ病様状態に対しても治癒効果があるものと考えられる。

4-2 緑の香りのうつ病に対する予防効果

4-2-1 強制水泳試験

1日目からの強制水泳中および水泳時以外の時も常時緑の香りがかがせてimmobility timeを測ったものがFig. 5である。vehicle群のimmobility timeは、10日目にかけて増加した。一方、緑の香り群では6日目につ

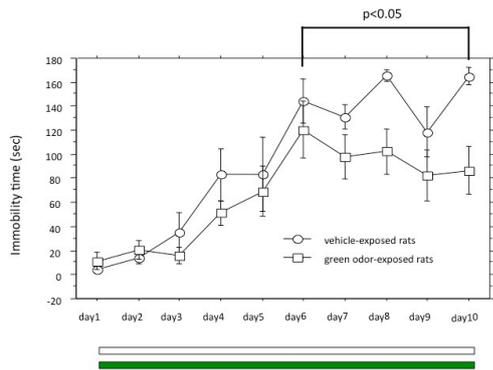


Fig. 5

て immobility time は増加したが 7 日目以降は vehicle 群と比較して有意に抑制された。この結果から、緑の香りにはうつ病様状態に対する予防効果があるものと推察される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Fukada, M., Kano, E., Miyoshi, M., Komaki, R. & Watanabe, T.
Effect of "rose essential oil" inhalation on stress-induced skin-barrier disruption in rats and humans
Chemical Senses 37(4):347-356, 2012 (査読有り) .
- ② Watanabe, T., Fujihara, M., Murakami, E., Miyoshi, M., Tanaka, Y., Koba, S. & Tachibana, H.
Green odor and depressive-like state in rats: Toward an evidence-based alternative medicine?
Behavioural Brain Research 224(2):290-296, 2011 (査読有り) .
- ③ Wang, Z., Hasegawa, J., Wang, X., Matsuda, A., Tokuda, T., Miura, N. & Watanabe, T.
Protective effects of ginger against aspirin-induced gastric ulcers in rats
Yonago Acta medica 54:11-19, 2011 (査読有り) .
- ④ Okamoto, A., Miyoshi, M., Imoto, T., Ryoike, K., and Watanabe, T.

Chronic restraint stress in rats suppresses sweet and umami taste responses and lingual expression of T1R3 mRNA.

Neuroscience Letters 486(3):211-214, 2010 (査読有り) .

- ⑤ Fujita, S., Ueki, S., Miyoshi, M., and Watanabe, T.

"Green odor" inhalation by stressed rat dams reduces behavioral and neuroendocrine signs of prenatal stress in the offspring.

Hormones and Behavior 58(2):264-272, 2010 (査読有り) .

- ⑥ Miyoshi, M. and Watanabe, T.

Role of anterior hypothalamic natriuretic peptide in lipopolysaccharide-induced fever in rats.

European Journal of Applied Physiology 109(1):49-57, 2010 (査読有り) .

- ⑦ Ito, A., Miyoshi, M., Ueki, S., Fukada, M., Komaki, R. and Watanabe, T.

"Green odor" inhalation by rats down-regulates stress-induced increases in Fos expression in stress-related forebrain regions.

Neuroscience Research 65(2):166-174. 2009 (査読有り) .

[学会発表] (計 7 件)

- ① 渡邊達生
うつ病に対する緑の香りの予防・治療効果について ~ラットを用いた検討~
第89回日本生理学会大会
2012. 3. 29. 松本
- ② 橘広人、渡邊達生
緑の香りはラットのうつ病様状態を緩和する第50回日本生気象学会大会
2011. 11. 5. 京都
- ③ 木場智史、渡辺亮介、狩野尚香、渡邊達生
アンジオテンシンII由来高血圧ラットの活動筋反射は活性酸素によって増強される
第63回日本生理学会中国四国地方会
2011. 10. 23. 広島

④ 木場智史、吉永健嗣、藤田小矢香、渡邊達生
性周期は活動筋反射に影響する
第 62 回日本生理学会中国四国地方会
2010. 11. 20. 出雲

⑤ 渡邊達生
発熱とアンジオテンシン II ～炎症性サイトカイン産生促進作用について～
日本麻酔学会中国・四国支部第 47 回学術集会
2010. 9. 11. 米子

⑥ 藤田小矢香、上木史織、三好美智夫、渡邊達生
妊娠ラットの香料吸入で胎生期ストレスによる仔の内分泌・行動異常を抑制できるか？
第 87 回日本生理学会大会
2010. 5. 20. 盛岡

⑦ Miyoshi, M., Watanabe, T.
Hypothalamic natriuretic peptide inhibits fever induced in rats by systemic administration of LPS
The 3rd International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation, 2009. 7. 25. Matsue

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/intgphys/6005.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 達生 (WATANABE TATSUO)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：60182929

(2) 研究分担者

加藤 信介 (KATO SHINSUKE)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：60194817

(3) 研究分担者

三好 美智夫 (MIYOSHI MICHIO)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：20093627