

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700800

研究課題名(和文)アロマセラピーによるヘルスプロモーション：精油の抗アレルギー作用機序解明

研究課題名(英文)Health promotion by aromatherapy: Elucidation of the mechanism of anti-allergic effects of essential oil.

研究代表者

柴倉 美砂子 (Shibakura, Misako)

岡山大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：30314694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アロマセラピーに用いられる精油の作用を、マウス喘息モデルを用いて検討した。精油を喘息マウスにそれぞれ投与して、気道抵抗測定、肺胞洗浄液中の細胞分画およびサイトカイン濃度、血清IgE値、病理組織学的検査、肺組織の遺伝子発現を調べ、喘息マウスに対する精油の効果を評価した結果、喘息症状の軽減作用が認められた。特定の精油には喘息マウスの症状軽減作用があり、Th2サイトカインや粘液分泌関連遺伝子の発現抑制が関係していることが明らかとなった。本研究結果は、これまで伝統的に用いられてきた精油のアレルギー性疾患に対する作用機序の一端を解明するものである。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of the essential oils used in aromatherapy in a murine asthma model. The effect of essential oil was evaluated for asthma mice by airway resistance, total cell number and cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluids, serum IgE, histology, and mRNA expression in lungs. The essential oil had an attenuating effect of murine asthma symptom by suppression of Th2 cytokine gene expression and mucous secreting related gene expression in lungs. The results of this study have elucidated the mechanism of essential oil on allergic disease which has been used traditionally.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：アロマセラピー 精油 喘息 ヘルスプロモーション マウス喘息モデル

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息の患者数は増加傾向にあり、小児から成人・高齢者にいたるまで高頻度に見られる疾患である。急激な喘息発作の悪化により喘息で死にいたる場合があり、わが国においてもその対策が急務とされ、現代医学に基づいた治療の研究は進んでいる。気管支喘息は可逆性の気道閉塞と気道過敏性の亢進を特徴とするが、この病態形成には慢性的なアレルギー性炎症が関与しており、発作の悪化防止や予防のためにも、日々のライフスタイルを改善していくことが必要である。現在日本では、吸入ステロイドが長期管理薬として使用されているが、このような現代医学を取り入れつつ、補完代替医療を取り入れる人が喘息患者や、がん患者の半数近くになることが米国やわが国の最近の調査でわかっている。

現代医学以外の医療を補完代替医療と呼び、伝統医療・民間療法のほかに保険適応外の新治療や健康食品が含まれる。その中でも私はアロマセラピーに注目した。アロマセラピーは芳香療法とも呼ばれ、植物より精製した精油の芳香を吸う事や、精油を溶かしたオイルで体をマッサージして効果を得る伝統療法の一種である。近年、メディカルアロマセラピーとして病院でも取り入れられ、精油の持つ薬理作用を狙った利用がなされている。精油は強い薬理作用を持つにもかかわらず、現在の日本では万人が利用可能であり、様々な情報が氾濫している。しかし、精油の疾患や症状に対する作用を裏付ける科学論文は非常に少ない。このような背景から、私は、マウス喘息モデルを用いて、精油のアレルギー性疾患に対する作用機序を解明し、アレルギー性炎症に効果のある精油の作用を科学的に検証した。

2. 研究の目的

マウス喘息モデルを用いて、精油のアレルギー性疾患への効果を検討し、精油の抗アレルギー性炎症作用の機序を明らかにすることを目的とする。そして、将来的に、精油を用いたアレルギー性疾患の予防や症状軽減が出来れば、アロマセラピーによるヘルスプロモーションを社会に発信していく事が出来る。

3. 研究の方法

急性期喘息マウスの作製には、8週齢雌のBALB/cマウス(チャールズリバー)を用いた。非喘息群、喘息群、ラベンダー精油処置群を用意した。喘息群、精油処置群にはOVA(卵白アルブミン)をImject Alum(PIERCE)と等量混合して、OVAを20 μ g腹腔内投与した。1回目のOVA投与から14日目にも同様に腹腔内投与した。非喘息群には、生理食塩水を腹腔内投与した。最初のOVAアルブミンの腹腔内投与開始から、28、29、30日目に、すべての群のマウスを、超音波ネブライザーで1%

OVAに曝露した。曝露から48-72時間後に小動物用呼吸機能検査装置フレキシベントを用いて気道抵抗を測定した。測定後に切開した気道から生理食塩水を注入して、肺胞洗浄液(BALF)を採取した。BALF中の細胞数を計測し、サイトカイン濃度はフローサイトミックスを用いて測定した。肺はホルマリン固定して病理組織切片を作成しHE染色及びPAS染色を行った。肺組織の一部からtotal RNAを抽出してcDNAを合成し、RT(reverse transcriptase)-PCRを行った。血清中IgE濃度は、ELISA法にて測定した。統計処理は、気道抵抗をtwo-way ANOVAで処理し、その他の項目はone-way ANOVAで処理した。それぞれの測定値はMean \pm SEMで表した。

4. 研究成果

(1) 研究結果

3つの精油の効果の検討：予備実験においてラベンダー(*Lavandula angustifolia*; ヴィダローム、ロート製薬)、ユーカリ(*Eucalyptus globulus*; メドウズ)、ゼラニウム(*Pelargonium asperum*; ヴィダローム、ロート製薬)を経口投与して、急性期喘息マウスに対する精油の効果を検討した。その結果、ラベンダー精油の経口投与によって、喘息マウスに比較して気道抵抗の抑制傾向が認められた。また、BALF中の総細胞数や好酸球数は、喘息マウスで上昇しているが、それぞれの精油処置によって有意な減少は認められなかったが、ラベンダー精油とゼラニウム精油による減少傾向が認められた。また、PAS陽性細胞数にもラベンダー精油とユーカリ精油投与により減少傾向が認められた。ゼラニウム投与では、PAS陽性細胞数は増加傾向が認められた。これらの予備実験の結果を基に、ラベンダー精油を用いてその後の実験を行う事にした。

ラベンダー精油の気道抵抗抑制作用：マウスは非喘息群と、喘息群、喘息マウスをラベンダー精油で処置した精油処置群に分けた。これまでの実験では、ラベンダー精油をマウスに連日経口投与していたが、より人が用いる形に近い吸気による投与を行った。精油の投与は、2回目のOVA感作後から週に5日間実験前日まで行った。5 μ Lまたは20 μ Lの精油をしみこませた濾紙を5Lの容器に張り付け、その容器にマウスを20分間入れて吸引させた。この実験条件で、気道抵抗を測定した。メサコリン濃度25mg/mlの時点において、非喘息群では、4.68 \pm 0.53(%変化率)、喘息群13.1 \pm 1.53(%変化率)に比べて、喘息マウスに20 μ Lの精油を吸引させた精油処置群では8.83 \pm 0.86(%変化率)であり、喘息群に比較して有意な気道抵抗の抑制が認められた(P<0.001)。そこで、これ以降の検討は、20 μ Lの精油を吸引させる精油処置を行った。

肺胞洗浄液中への細胞浸潤抑制：喘息マウスの総細胞数は非喘息群 $4.80 \pm 0.54 \times 10^4$ 個/ml、喘息群 $9.64 \pm 1.98 \times 10^4$ 個/ml、精油処置群 $4.45 \pm 0.86 \times 10^4$ 個/ml となり、喘息群に比べて精油処置群では有意に低下していた ($P < 0.05$)。また好酸球数も、非喘息群 0×10^4 個/ml、喘息群 $4.06 \pm 1.15 \times 10^4$ 個/ml、精油処置群 $0.65 \pm 0.26 \times 10^4$ 個/ml で、喘息群に比べて精油処置群では有意な好酸球数の減少が認められた ($P < 0.05$)。

炎症細胞の浸潤抑制：マウスの肺の病理組織切片を HE 染色して、肺胞周囲組織及び血管周囲組織への浸潤炎症細胞数を計測した。リンパ球、好中球、好酸球を含んだ総細胞数が非喘息群では 158.9 ± 21.78 /mm²、喘息群では 1194 ± 74.73 /mm²、精油処置群では 834.9 ± 64.78 /mm² であり、喘息群に比較して、精油処置によって有意に浸潤細胞は抑制された ($p < 0.05$)。また浸潤好酸球数は、非喘息群では 1.95 ± 1.05 /mm²、喘息群では 1011 ± 72.0 /mm²、精油処置群では 668.4 ± 61.09 /mm² であり、喘息群に比較して精油処置によって有意に浸潤好酸球は抑制された ($p < 0.01$)。

粘液分泌細胞の抑制：マウス肺の病理組織切片を用いて PAS 染色を行い、粘液分泌杯細胞を検出した。肺胞周囲径 1 mm あたりの PAS 陽性細胞数を計測した。非喘息群では 0 個/mm、喘息群では 65.71 ± 3.31 個/mm、精油処置群では 37.40 ± 5.50 個/mm であり、喘息群に比較して精油処置群では有意に低下していた ($p < 0.001$)。また肺胞周囲径 1 mm あたりの PAS 陽性面積は、非喘息群では $0 \mu\text{m}^2/\text{mm}$ 、喘息群では $2475 \pm 288.7 \mu\text{m}^2/\text{mm}$ 、精油処置群では $1262 \pm 244.3 \mu\text{m}^2/\text{mm}$ となり、喘息群と比較して精油処置群で有意に陽性面積が減少した ($p < 0.05$)。また粘液分泌を制御する遺伝子の Muc5ac と Muc5b の肺組織における発現を RT-PCR を用いて検出した。PCR 産物を電気泳動して、バンドの輝度を画像解析し、Gapdh で補正した。Muc5ac は精油処置によっても喘息群で上昇した遺伝子発現を抑制しなかったが、Muc5b は精油処置により喘息群で上昇した遺伝子発現を有意に低下させた ($p < 0.05$)。

サイトカインの抑制：BALF 中の IL-4、IL-5、IL-13 の Th2 サイトカイン濃度をフローサイトメトリックにて測定した。IL-4 は非喘息群で 5.4 ± 3.4 pg/ml、喘息群で 11.7 ± 8.2 pg/ml、精油処置群で 0 pg/ml であった。IL-5 は非喘息群で 16.6 ± 4.8 pg/ml、喘息群で 65.1 ± 4.7 pg/ml、精油処置群で 28.3 ± 6.8 pg/ml となり喘息群に比較して有意に低下した ($p < 0.01$)。IL-13 は非喘息群で 51.0 ± 1.7 pg/ml、喘息群で 144.8 ± 35.7 pg/ml、精油処置群で 64.6 ± 3.1 pg/ml となり喘息群に比較して有意に低下した ($p < 0.05$)。また肺組織における Th2 サイトカインの mRNA 発現は、IL-4、

IL-5 が喘息群で上昇し、精油処置により有意に低下した ($p < 0.05$ 、 $p < 0.01$)。

血清中 IgE 濃度：血清中の OVA 特異的 IgE 濃度は、非喘息群で 9.66 ± 3.01 ng/ml、喘息群で 4545 ± 1611 ng/ml、精油処置群で 4397 ± 853.9 ng/ml であり、精油処置による抑制効果は認められなかった。

まとめ：～ までの結果から、ラベンダー精油はマウス喘息モデルにおける喘息の諸症状を軽減することが証明された。また、2 度目の OVA 感作と同時に精油への曝露を開始しているが、喘息発症の予防にまでは至らなかった。これらの効果は、Th2 サイトカインの分泌を抑制し、杯細胞の粘液形成を抑制するために生じると考えられた。

(2) 今後の展望

これまでの結果からラベンダー精油のマウス喘息症状軽減効果を証明することができた。今後は、ラベンダー精油がどのような機序で喘息症状を軽減させているのか、好酸球の細胞浸潤への作用を細胞接着分子の方面から解明して行く。またラベンダー精油の主成分の喘息マウスへの効果も検討していく。さらにラベンダー精油と類似した成分を含む精油のアレルギー性炎症への効果も検討して行けば、経験的に用いられてきた精油の効果を科学的に証明していく事が出来る。

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 0 件)

[学会発表](計 8 件)

飯尾友愛、柴倉美砂子、兵田朋子、青江伯規、小原実甫子、横田佳那代、片岡 幹男
マウス喘息モデルによる精油の抗アレルギー作用機序の解明

第 60 回日本臨床検査医学会学術集会(神戸)、2013 年 11 月 1 日

青江伯規、柴倉美砂子、飯尾友愛、兵田朋子、小原実甫子、横田佳那代、片岡 幹男
ラベンダー精油の血管内皮細胞における TNF- α 誘導性細胞接着分子の発現抑制作用

第 60 回日本臨床検査医学会学術集会(神戸)、2013 年 11 月 1 日

飯尾友愛、柴倉美砂子
マウス喘息モデルによる精油の抗アレルギー作用機序の解明

第 16 回日本アロマセラピー学会学術総会(熊本)、2013 年 10 月 13 日

青江伯規、柴倉美砂子、飯尾友愛、兵田朋子、小原実甫子、横田佳那代、片岡 幹男
ラベンダー精油の血管内皮細胞における炎症性サイトカイン誘導性細胞接着分子の発現抑制作用

第 14 回日本検査血液学会学術集会（東京）
2013 年 7 月 28 日

Study of essential oil for anti-allergy
effect in murine asthma model.

Tomoe Ueno Iio, Misako Shibakura,
Michinori Aoe, Tomoko Hyoda, Mihoko Kohara,
Naohisa Nakagawa, Takako Nakahara, Mikio
Kataoka

The 11th International Congress of the
Asian Society of Clinical Pathology and
Laboratory Medicine, 京都, 2012 年 12 月 1 日

飯尾友愛、柴倉美砂子、青江 伯規、兵田
朋子、中川 尚久、中原 貴子、小原実甫子、
片岡 幹男

マウス喘息モデルによる精油の抗アレルギー
作用機序の解明

第 59 回日本臨床検査医学会学術集会（京都）
2012 年 11 月 30 日

飯尾友愛、柴倉美砂子、青江伯規、兵田朋
子、小原実甫子、片岡 幹男

アレルギー性炎症における精油の好酸球動
員抑制効果の検討

第 13 回日本検査血液学会学術集会（大阪）
2012 年 7 月 29 日

飯尾友愛、柴倉美砂子、兵田朋子、青江伯
規、中川 尚久、中原貴子、片岡幹男

マウス喘息モデルによる精油の抗アレルギー
作用機序の解明

第 58 回日本臨床検査医学会学術集会（岡山）
2011 年 11 月 19 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴倉 美砂子 (SHIBAKURA MISAKO)

岡山大学・大学院保健学研究科・准教授

研究者番号：30314694

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：