

機関番号：13201
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590227
 研究課題名(和文) 森林揮散物質「みどりの香り」が発現する抗ストレス作用の脳内機構に関する研究
 研究課題名(英文) Brain mechanisms underlying the anti-stress effects of green odor that is emanated from green leaves
 研究代表者
 佐々木 和男(SASAKI KAZUO)
 富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授
 研究者番号：60042826

研究成果の概要(和文)：草木の葉由来の「みどりの香り」が心身をリフレッシュ/リラックスさせる脳内機構について齧歯類で検討した。その結果、「みどりの香り」の主成分である3*Z*-hexenol、2*E*-hexenal あるいはその混合物の香りが、(1)心理的ストレスにより亢進した脳内セロトニン及びドーパミン代謝を抑制する、(2)GABA_A受容体活性薬のように高架式十字迷路及びホールボードテストにおいて抗ストレス・抗不安作用を示す、(3)視床下部外側野(副交感神経系の中核)ニューロンを活性化する、(4)視床下部室傍核において拘束ストレスによるcorticotropin releasing factor mRNA 量の増加を抑制する、ことが示された。

研究成果の概要(英文)：In rodents, we investigated the brain mechanisms underlying the effects of green odor that refreshes and relaxes both mind and body. The results show that 3*Z*-hexenol, 2*E*-hexenal or their mixture (major components of green odor) inhibits serotonergic and dopaminergic metabolisms elevated by psychological stress, expresses anti-stress and anxiolytic effects in elevated plus maze and hole board tests, activates neuron activity in the lateral hypothalamic area, and suppresses an amount of mRNA for corticotropin releasing factor elevated by immobilization stress in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：神経科学

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：みどりの香り、心理的ストレス、不安、セロトニン、ドーパミン、CRF、副交感神経系、視床下部ニューロン

1. 研究開始当初の背景

平成15年、林野庁が行った「森林の健康と癒し効果に関する科学的実証調査報告書」によれば、森林浴はストレスホルモン(コル

チゾール)を減少させると共に疲労を和らげ気分を改善し、心身をリラックス/リフレッシュさせる作用をもつ。一方、同年内閣府が行った「森林と生活に関する世論調査」では、

「心身のリフレッシュや健康のため森林浴をする」という企画に国民の約 40%が参加したいと回答し、補完代替医療としての森林浴に対する国民の期待は極めて大きい。

森林浴が心身のリラックス／リフレッシュをもたらす要因として、樹木の葉や幹から揮散する香気成分があげられる。山口大学の畑中らは葉由来の香気成分「みどりの香り」に注目し、その主要な物質が青葉アルコール (3*Z*-hexenol) と青葉アルデヒド (2*E*-hexenal) であることを明らかにしているが、「みどりの香り」がヒトや動物 (哺乳類) において心身をリラックス／リフレッシュさせる機序、とくに脳内機序については十分研究が進められているとは言えないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、(1)心理的ストレスにより亢進したセロトニン (5-HT、5-hydroxytryptamine) 及びドーパミン (DA、dopamine) 代謝に対する「みどりの香り」の作用、(2)ストレス誘発不安様行動に対する「みどりの香り」の作用とその至適濃度、(3)副交感神経系の中核である視床下部外側野 (LHA、lateral hypothalamic area) ニューロン活動に対する「みどりの香り」の作用、(4)拘束ストレス後の視床下部室傍核組織における corticotropin releasing factor (CRF) mRNA 量に対する「みどりの香り」の作用について検討し、「みどりの香り」が心身をリラックス／リフレッシュさせる脳内機序の一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 心理的ストレスと脳内物質測定

心理的ストレス負荷には、コミュニケーションボックス (60 x 60 cm) を用いた。コミュニケーションボックスは、透明な仕切り板により 16 個の小部屋 (15 x 15 cm) に分けられており、各部屋の床は電気ショック用グリッドあるいはそれを覆う樹脂板になっている。したがって、前者の小部屋に入れられた動物は電気ショック (30 秒毎に 1 秒、2 mA の刺激を 50 分間、物理的ストレス) を受け、後者の小部屋に入れられた動物は電気ショックを受けた動物が発する鳴き声や跳躍等を見聞きする環境 (心理的ストレス) に曝露される。

使用した動物は雄の Wistar ラット 7 週齢である。ラットをペントバルビタールで麻酔し、人工透析膜プローブを刺入するためのガイドカニューレを外科的に LHA に留置した。3 日以上の手術回復期間後、ガイドカニューレを通して人工透析膜プローブを LHA に刺入し、リンガー液でプローブを灌流 (1 μ l/min)

することにより細胞外液を回収した。回収した細胞外液は一定時間 (25 分) 毎に高速液体クロマトグラフィー (HPLC、high performance liquid chromatography) 装置に送り、電気化学検出器により 5-HT、DA 及びその代謝産物濃度を測定した。ストレス負荷前の 200 分間を対照期間とし、この間の各物質濃度の平均レベルをそれぞれ 100%とした。また、ストレスを負荷した 50 分間に加え、さらに 200 分間物質濃度変化を測定し、その値を対照レベルに対する%変化で表した。「みどりの香り」として 2*E*-hexenal (濃度 0.3%) を用いた。2*E*-hexenal の香りは流速 5.5 l/min で心理的ストレス負荷中、ラットのいる小部屋に導入した。対照群のラットには 2*E*-hexenal の代わりに 3*Z*-hexenol や 2*E*-hexenal の溶媒である triethyl citrate (TEC) を用いた。

(2) 高架式十字迷路テスト

高架式十字迷路とは壁のある通路 (クローズドアーム) と壁のない通路 (オープンアーム) を十字状に組み合わせ、マウスに不安を誘発するようそれを高所に設置したものである。雄の ddy マウス 6 週齢を「みどりの香り」が充満した香り用ケージに 30 分間留置した後、マウスを高架式十字迷路に移した。マウスの頭部がクローズドアームに向くよう迷路の中央部 (通路の交差部) に置き、その後の行動を 5 分間 web カメラで撮影、録画した。オープンアームへの進入回数や滞在時間などは、画像をパソコン上で再生し、本研究室で作成したプログラムで解析した。用いた「みどりの香り」は 0.03%及び 0.3%の 3*Z*-hexenol、2*E*-hexenal 及びその等量混合物 (Mixture) である。

(3) ホールボードテスト

ホールボードテスト用ケージ (40 x 40 cm) の床には、各コーナーから中心部へ 14cm の位置に直径 3cm の穴があり、動物の穴のぞき行動などを測定することができる。マウス (ddy 雄 6 週齢) が穴を覗き込む回数や時間は各穴の下に設置した自製の光学式検出器で測定した。ケージ内での移動距離などはケージを動物行動解析装置 (東洋産業、MV-10) の中に設置することにより測定した。測定時間は 5 分間であった。用いた「みどりの香り」や香りの嗅がせ方は (2) の高架式十字迷路テストの場合と同様であった。

(4) LHA ニューロン活動記録

Urethane (1.5g/kg) で麻酔したラット (Wistar 雄 8 週齢) の頭蓋骨に穴を開け、ガラス微少電極を LHA に刺入し、ニューロン活動 (スパイク) を記録した。スパイク信号はパソコンに取り込み、1 秒当たりのスパイク数を連続的にパソコンに記録し、「みどりの香り」とニューロン活動変化との関係を調べた。本実験で用いた「みどりの香り」は (2) の場合と同様で、各溶液 200 μ l を含んだ綿球

を 10ml のシリンジ内に入れ、シリンジ先端から香りをラットの鼻先に 30 秒間投与した。(5) 拘束ストレスと視床下部室傍核組織における CRFmRNA の定量 PCR

ラット (Wistar 雄 8 週齢) を 5 群に分けた。第 1 群 (対照群) のラットは TEC の香りの充滿したケージ内で 1 時間自由に行動した。第 2 及び第 3 群のラットはそれぞれ TEC 及び 3*Z*-hexenol と 2*E*-hexenal の混合した香り (Mixture, 0.03%) が充滿したケージ内で 1 時間拘束した後ホームケージに戻し、2 時間留置した。第 4 及び第 5 群のラットはそれぞれ TEC 及び上の混合香を含むケージ内で 1 時間拘束後ホームケージに戻し、4 時間留置した。その後、各群のラットをセボフルランで麻酔し、断頭後視床下部脳切片標本 (厚さ 300µm) を作製した。脳切片標本から内径 1mm のプラスチックパイプで室傍核をパンチアウトし、室傍核組織における CRFmRNA を PCR 法により定量した。

4. 研究成果

(1) 心理的ストレスによる 5-HT 及び DA 代謝の亢進に対する 2*E*-hexenal の作用

対照群のラット (n=5) では、心理的ストレス負荷後 5-HT の代謝産物である 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 及び DA の代謝産物である homovanillic acid (HVA) と 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) のレベルは次第に上昇し、75 分後には対照レベル (100%) の 1.2 倍 (120%) に達し、その後ほぼその値を維持した。2*E*-hexenal 群のラット (n=5) では、ストレス負荷前後を通して 5-HT 及び DA レベルに変化はなかった。しかし、5-HIAA レベルはストレス負荷後 175 分から、HVA (図 1) 及び DOPAC レベルは 150 分から対照群と比べ有意に減少し、2*E*-hexenal が 5-HT 及び DA 系に作用する可能性を示唆する結果を得た。

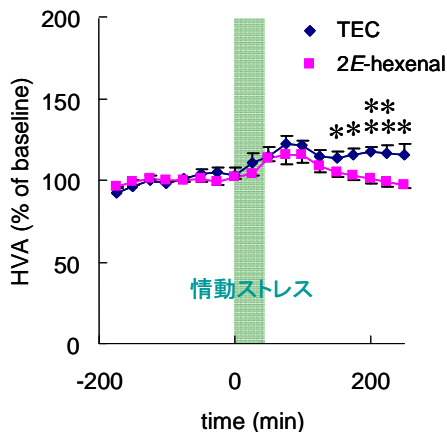


図 1. 心理的ストレス負荷前後における細胞外液中 HVA レベルの変化。*, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$.

(2) 高架式十字迷路テストにおける「みどりの香り」の抗ストレス・抗不安作用

図 2 は対照群 (TEC) 及び混合香 (Mixture) 群のマウスの移動軌跡である。0.03% の 3*Z*-hexenol、2*E*-hexenal 及び Mixture の香りを嗅いだ群ではオープンアームに進入する回数がこの順で増加した (図 3)。TEC の対照群と比較すると、Mixture 群の進入回数の増加は有意であった。オープンアームでの滞在時間も増加したが、対照群と比べ有意な差はなかった (図 4)。0.03% と 0.3% の濃度で比較すると、どの群においてもオープンアームへの進入回数及び滞在時間は 0.03% 群で高かった。本実験結果は 3*Z*-hexenol と 2*E*-hexenal の混合香が抗ストレス・抗不安作用をもち、その至適濃度が 0.03% であることを示唆する。

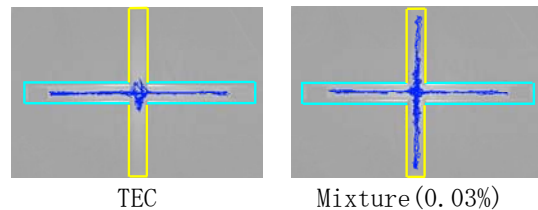


図 2. 高架式十字迷路でのマウスの移動軌跡。黄色はオープンアーム。青色はクローズドアーム。紺色は移動軌跡。

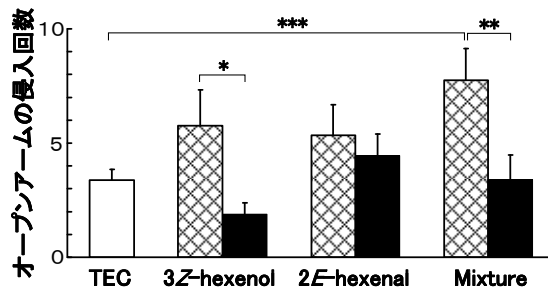


図 3. オープンアームの進入回数。ハッチドコラム、0.03%。ソリッドコラム、0.3%。Mixture, 3*Z*-hexenol と 2*E*-hexenal の混合香。TEC 群、n=32。その他の群、n=8~10。*, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$. ***, $p < 0.001$.

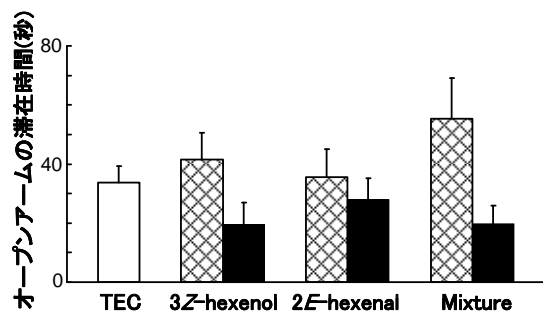


図 4. オープンアームでの滞在時間。他の説明は図 3 と同じ。

(3) ホールボードテストにおける「みどりの香り」の抗ストレス・抗不安作用

対照群 (TEC) と比べ、0.03%の3Z-hexenol群のヘッドディップ回数 (図5) 並びにヘッドディップ時間 (図6) は有意に増加した。同濃度の他の香りを嗅いだ群では、対照群と比べこれらの値に有意な差はなかった。0.3%の香りを嗅いだ群のヘッドディップ回数やヘッドディップ時間は0.03%の場合と同程度かあるいはより少なかった。これらの結果は、ホールボードテストでは0.03%の3Z-hexenolが抗ストレス・抗不安作用を持つことを示す。一般的に、高架式十字迷路やホールボードテストでの抗ストレス・抗不安作用はGABA_A受容体の活性化によると考えられることから、「みどりの香り」が直接あるいは間接的にGABA_A受容体を活性化する可能性が示唆される。

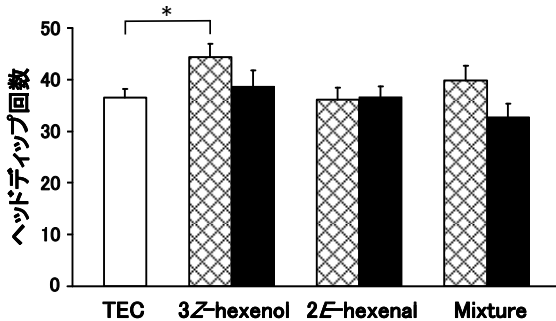


図5. ホールボードテストでのヘッドディップの回数。TEC群、n=39。その他の群、n=18~22。他の説明は図3と同じ。

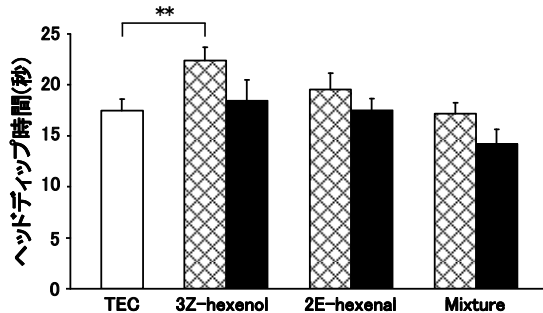


図6. ホールボードテストでのヘッドディップ時間。他の説明は図5と同じ。

(4) LHAニューロン活動に対する「みどりの香り」の作用

LHAニューロン活動を記録しながら、ラットに「みどりの香り」を投与した。36個のニューロン中、3Z-hexenol、2E-hexenol及びMixtureの香りにそれぞれ2個のニューロンが興奮性に反応し、その反応は用量依存性であった (図7)。すなわち、「みどりの香り」が副交感神経系を活性化する作用をもつことを示唆する結果を得た。

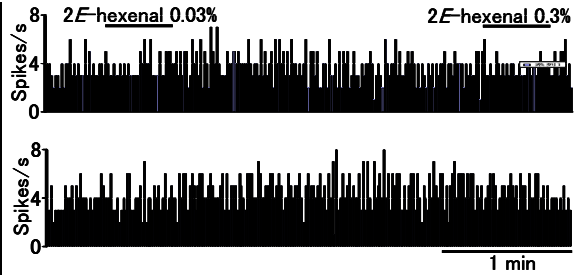


図7. 2E-hexenolに対するLHAニューロンの興奮性反応。縦軸、1秒当たりのスパイク数。横軸、時間。

(5) 拘束ストレス後の視床下部室傍核組織のCRFmRNA量に対する「みどりの香り」の作用

TECの香りが充満したケージで拘束ストレスを受けた後2時間ホームケージに留置した群 (TEC, IM+2h) の室傍核CRFmRNA量は、同様のケージ内で自由行動した対照群 (TEC) に比べ有意に増加した (図8)。この増加したCRFmRNA量は、混合香の充満したケージ内で拘束ストレスを受けた群 (Mixture, IM+2h) では有意に減弱し、ほぼ対照群のレベルに戻った。拘束ストレス後ホームケージに4時間留置した場合、TECの香りが充満したケージで拘束ストレスを受けた群 (TEC, IM+4h) であり、混合香の充満したケージ内で拘束ストレスを受けた群 (Mixture, IM+4h) であり、CRFmRNA量はほぼ対照群のレベルであった。CRFmRNA量の増加はストレスによるCRFの遊離増加を反映していると考えられることから、3Z-hexenolと2E-hexenolの混合香にはCRFの遊離・合成を抑制し、結果的に副腎からのストレスホルモンの遊離を抑制する作用があると推察された。

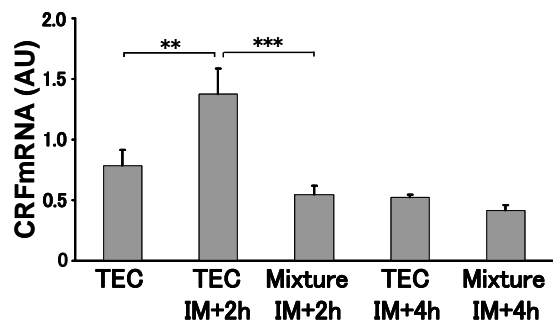


図8. 拘束ストレス後の視床下部室傍核CRFmRNA量に対する「みどりの香り」の作用。IM, immobilization. 2h及び4h、拘束ストレス後のホームケージでの留置時間。AU, arbitrary unit。各群、n=4。**, p<0.01。***, p<0.001。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計1件)

- ① Ogaya M., Kim J., Sasaki K., Ghrelin postsynaptically depolarizes dorsal

raphe neurons in rats in vitro、
PEPTIDES、Vol.32、2011、pp.1606-1616、
査読有

〔学会発表〕(計4件)

- ① 原田史敏、中島一樹、磯部正治、佐々木和男、ホールボードテストにおけるマウスの不安様行動に対する緑の香りの作用、第33回日本神経科学学会大会、P4-m01、2011年9月17日、横浜市
- ② 原田史敏、佐々木和男、高架式十字迷路を用いた不安様行動に対する青葉アルコール、青葉アルデヒド及びそれら混合物の作用、第33回日本神経科学学会大会、P3-j02、2010年9月4日、神戸市
- ③ 佐々木和男、吉村直之、中島一樹、大村裕、情動ストレス下ラット視床下部外側野セロトニン及びドーパミン代謝産物動態に対する「みどりの香り」の作用、第32回日本神経科学学会大会、P2-m12、2009年9月17日、名古屋市
- ④ Sasaki K., Mochizuki T., Kim J., Nakajima K., Shimizu N., Oomura Y. et al., Effects of 2*E*-hexenal on food intake and on brain serotonin metabolism in restrained rats, Annual Meeting of International Behavioral Neuroscience Society, 52P-43, 2008, June 19, St. Thomas, US Virgin Islands

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 和男 (SASAKI KAZUO)
富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授
研究者番号：60042826

(2) 研究分担者

磯部 正治 (ISOBE MASAHARU)
富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授
研究者番号：70211050

中島 一樹 (NAKAJIMA KAZUKI)
富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授
研究者番号：50207776