

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560383

研究課題名(和文)アロマセラピーを用いたCOPD治療の新たな選択肢の提案

研究課題名(英文)The proposal of new options in COPD treatment using aromatherapy

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) 1,500,000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抗炎症作用を、マウス慢性閉塞性肺疾患(COPD)モデルを用いて検討した。ラベンダー精油またはユーカリ精油をエラスターゼ誘発COPDマウスに経気道的に吸入曝露し、肺機能測定、肺胞洗浄液中の細胞数、摘出肺の病理組織標本の画像解析や肺組織におけるmRNAの発現を調べた。これらの結果、ラベンダー精油には肺胞破壊抑制作用が認められた。ユーカリ精油には、マウスCOPD進行過程の初期において、肺胞への炎症細胞浸潤抑制と肺胞破壊抑制作用が認められた。以上の結果から、ラベンダー精油やユーカリ精油は、マウスCOPDモデルにおいて抗炎症作用を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined the inflammatory effects of the essential oils used in aromatherapy with murine model of elastase induced chronic obstructive pulmonary disease (COPD). We exposed the COPD mice to lavender essential oil or eucalyptus essential oil by inhalation, and then measured pulmonary functions, total cell numbers in bronchoalveolar lavage fluids, histological analysis and mRNA expressions in lungs of mice. Lavender essential oil suppressed alveolar damage in COPD mice. Eucalyptus essential oil suppressed the infiltration of inflammatory cells into BALF and the alveolar damage in early phase of pathologic process of murine COPD. We found that lavender essential oil and eucalyptus essential oil had the anti-inflammatory effects in murine model of COPD.

研究分野：血液検査学、補完代替医療学

キーワード：COPD 精油 炎症 アロマセラピー

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD : chronic obstructive pulmonary disease) とは、タバコ煙や大気汚染中の有害物質や活性酸素による炎症によってサイトカイン、ケモカイン及びプロテアーゼが炎症細胞から放出され、気道下組織肥厚・粘液細胞過形成が生じ気道閉塞及び肺胞壁の破壊が生じる疾患である。現在の COPD 治療は症状の緩和を目的としており、革新的な治療法は存在しない。そこで COPD の進展抑制にアロマセラピーを応用することを考えた。

アロマセラピーとは植物から抽出された芳香性揮発性有機化合物である精油を用いて様々な症状を緩和しようとする補完代替医療である。我々は、ラベンダー精油がマウス喘息モデルにおいて抗アレルギー性炎症作用をもち、好酸球の肺胞組織への浸潤を抑制することを見出した。また、マウス血管内皮腫細胞株において精油処置により炎症性サイトカインである TNF- α 誘導性の細胞接着分子の発現抑制が生じる事を見出した。炎症細胞の組織浸潤に關与する細胞接着分子の発現を抑制できれば、COPD 進展抑制に精油は効果を発揮する可能性がある。

エラスターゼ誘発マウス COPD モデルを用いて、精油の COPD 進展抑制作用を明らかにする事で、COPD の治療に精油を利用することができればアロマセラピーを用いた新たな治療法の選択肢を提案できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、まず小動物用肺機能測定装置を用いた肺機能測定や気管支肺胞洗浄液中の細胞数、摘出肺の病理組織画像解析及び肺組織などの mRNA 発現を検討し、マウス COPD モデルにおける、ラベンダー精油やユーカリ精油の抗炎症作用を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス COPD モデルの作製

マウスは生後 8 週齢の雌 BALB/c マウスを用いた。対照群 (Non-COPD)、COPD 群 (Control-COPD)、5 μ L 精油処置 COPD 群、20 μ L 精油処置 COPD 群に分けた。ブタ膵エラスターゼ (porcine pancreatic elastase ; PPE) を生理食塩水に溶解し、100 μ L を気管内投与した。Non-COPD 群には生理食塩水を 100 μ L 気管内投与した。ラベンダー精油の作用を検討した実験では 6.75 U の PPE をマウスに投与した。ユーカリ精油の作用を検討した実験では、5.0 U の PPE をマウスに投与した。

(2) 精油の経気道的吸入曝露

精油は真正ラベンダー精油 (*Lavandula angustifolia* ; LEO) とユーカリ・ラジアータ精油 (*Eucalyptus radiata* ; EEO) を用いた。LEO の吸入曝露は PPE 投与の 6 日前から開始し、PPE 投与後 10 日目まで連日行

った。EEO の吸入曝露は PPE 投与の 6 日前から開始し、PPE 投与後 7 日目まで連日行った。7 日目以降は 18 日目まで隔日で行った。5L のボックスを用意し、ボックスの蓋に濾紙を貼り付け、精油をそれぞれ 5 μ L または 20 μ L 滴下し、その中にマウスを入れ 20 分間吸入させた。LEO の吸入曝露は 20 μ L のみ行った。Non-COPD 群及び Control-COPD 群には蒸留水を吸入させた。

(3) 肺機能測定及び BALF 中細胞数計測

小動物用肺機能測定装置フレキシベントを用いてマウスの肺機能を測定した。肺機能測定後、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluids ; BALF) を採取し細胞数を計測した。LEO の作用を検討した実験では、PPE 投与後 10 日目に、肺機能測定した後、BALF や肺組織を採取した。EEO の作用を検討した実験では、PPE 投与後 4 日目と 18 日目に、肺機能測定した後、BALF や肺組織を採取した。

(4) 病理組織画像解析

採取した肺組織を固定後、パラフィン切片を作製し HE 染色した。肺の気管近位部、肺中心部、肺辺縁部から画像を取り込んだ。画像は、Image J を用いて平均肺胞壁間距離 (mean linear intercept ; Lm) を求めた。

(5) 肺組織及び血管内皮細胞における mRNA 発現の解析

マウス肺組織及びヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells ; HUVEC) における細胞接着分子の発現は、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 後の cDNA を用いて PCR を行い、PCR 産物を電気泳動し、泳動像の画像解析により定量した。

4. 研究成果

(1) LEO の COPD マウスへの作用

PPE 投与後 10 日目における肺機能測定では、Non-COPD 群と比較して Control-COPD 群 ($P < 0.05$) 及び 20 μ L LEO 処置 COPD (LEO20-COPD) 群 ($P < 0.05$) で、肺の柔らかさの指標である肺胸郭コンプライアンス (Crs) が有意に高値であった。一方、Control-COPD 群と比較して、LEO20-COPD 群では、LEO 処置による Crs の低下は認められなかった。

BALF 中の細胞数は、総細胞数とマクロファージ数において、Non-COPD 群と比較して Control-COPD 群 (各 $P < 0.0001$) と LEO20-COPD 群 (各 $P < 0.001$) で有意に高値であった。Control-COPD 群と比較すると LEO20-COPD 群では減少傾向 ($P < 0.06$) が認められた。

Lm は、Non-COPD 群と比較して Control-COPD 群 ($P < 0.0001$) は、有意に高値であった。一方、Control-COPD 群に比較して、LEO20-COPD 群 ($P < 0.01$) で有意に低値であった。この結果は、肺胞に浸潤する炎症細胞が LEO 処置により減少したこと

によって肺胞破壊抑制が生じていた可能性を示している。

(2) 肺組織及び血管内皮細胞における LEO の細胞接着分子 mRNA 発現への影響

PPE 投与 4 日目における肺組織での細胞接着分子 E-selectin、P-selectin、vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)、intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) の発現を RT-PCR で検出した。しかし、Non-COPD 群と比較して Control-COPD 群において mRNA 発現が上昇していなかったため Control-COPD 群と比較しても LEO20-COPD 群で有意な変化は認められなかった。これは肺組織を採取するタイミングによるところが大きいと考えられた。そこで、in vitro において HUVEC を用い、LEO の tumor necrosis factor α (TNF- α) 誘導性細胞接着分子抑制効果を検討したところ、LEO 処置により TNF- α が誘導する E-selectin mRNA 発現は有意に低かった ($P < 0.001$) が、VCAM-1 や ICAM-1 の mRNA 発現には変化を認めなかった。

(3) EEO の COPD マウスへの作用

これらの実験結果を受けて、EEO の COPD マウスへの作用を検討した。PPE 投与後 4 日目における肺機能測定では、Non-COPD 群と比較して Control-COPD 群、5 μ L EEO 処置 COPD (EEO5-COPD) 群及び 20 μ L EEO 処置 COPD (EEO20-COPD) 群で、Crs の有意な変化は認められなかった。

BALF 中の総細胞数及びマクロファージ数は、Non-COPD 群と比較すると Control-COPD 群は有意に高値であった (各 $P < 0.0001$)。また、Control-COPD 群と比較すると、EEO5-COPD 群 (各 $P < 0.01$) 及び EEO20-COPD 群 ($P < 0.001$ 、 $P < 0.01$) は有意に低値であった。

Lm は、4 日目において既に、Non-COPD 群と比較して、Control-COPD 群は有意に高値であった ($P < 0.05$)。Control-COPD 群と比較して EEO5-COPD 群では、有意に低値であった ($P < 0.05$)。これは、COPD 進行過程の初期における炎症細胞の肺胞浸潤が EEO 処置によって抑制されたため、Lm 低値によって示される肺胞破壊抑制が生じたと考えられる。

また、PPE 投与後 18 日目の肺胞破壊形成期を観察した。Crs は、Non-COPD 群と比較して、Control-COPD 群 ($P < 0.01$)、EEO5-COPD 群 ($P < 0.05$) 及び EEO20-COPD 群 ($P < 0.05$) において、有意に高値を示した。一方、Control-COPD 群と比較して、EEO5-COPD 群及び EEO20-COPD 群は Crs に有意な変化を認めなかった。Control-COPD 群と比較して、EEO5-COPD 群及び EEO20-COPD 群は、BALF 中の総細胞数、マクロファージ数及び Lm に有意な変化を認めなかった。

(4) まとめ

マウス COPD モデルにおいて LEO は炎症

細胞の肺胞浸潤の抑制傾向や肺胞破壊の抑制作用を示した。また、HUVEC において LEO は TNF- α 誘導性 E-selectin の発現を抑制する作用を示した。一方、EEO は、COPD 進行過程の初期において炎症細胞肺胞浸潤抑制と肺胞破壊抑制を示した。これらのことから、LEO や EEO は、マウス COPD モデルにおいて、抗炎症作用を示すことが明らかとなった。

マウス COPD モデルを用いた LEO や EEO の抗炎症作用を検討した報告は、我々の調べた限りではなされていない。今後は、これらの精油の抗炎症作用のメカニズムの違いを、in vitro で検討して行く予定である。

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 1 件)

柴倉 美砂子、飯尾 友愛

「マウス肺気腫モデルを用いたユーカリ精油の抗炎症作用の検討」、第 19 回日本統合医療学会、2015 年 12 月 13 日、山口市

〔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

飯尾 友愛 (UEO-HIO, Tomoe)
岡山大学・大学院保健学研究科・助教
研究者番号：80613158

(3)連携研究者

片岡 幹男 (KATAOKA, Mikio)
岡山大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：50177391