

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15878

研究課題名(和文)更年期障害に対する新しい看護ケア開発のための基礎的研究

研究課題名(英文)The fundamental research of alternative care for menopausal symptoms.

## 研究代表者

松本 裕 (MATSUMOTO, Yutaka)

東海大学・健康科学部・講師

研究者番号：80609230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)： クラリセージオイルを用いたアロマセラピーが更年期症状の緩和に有効であるとされ、スクラレオールがその特性成分として注目されている。スクラレオールは女性ホルモン様作用があるとされるが、そのエビデンスは十分ではなく、血中への移行も証明されていない。

本研究ではマウスを用いた実験研究を行い、スクラレオールが経皮吸収されること、そして肝臓に集積されることを明らかにした。さらに、スクラレオールの作用として、体重増加を緩やかにする作用、血清総コレステロールの減少作用を見いだした。遺伝子発現の解析から、肝臓でのLDLコレステロールの取り込み促進、肝臓での中性脂肪分解などがそのメカニズムとして示唆された。

研究成果の概要(英文)： Physical symptoms associated with menopause may negatively affect women's quality of life. Hormone replacement therapy is the established method for treating menopausal symptoms, but there are many women seeking alternative therapy because they fear side effects, such as breast cancer. Thus, aroma massage using clary sage oil has been provided as one of the useful alternative therapies. The assumed active ingredients in the oil is sclareol.

We analyzed serum and liver samples following the topical application of sclareol to the dorsal skin of mice. Sclareol was not only detected by GC-MS in the serum samples ( $0.36 \pm 0.08$  ppm) but also concentrated in the liver samples ( $1.69 \pm 0.32$  ppm). Furthermore, as biological effects of sclareol, we found (1) an action to moderate weight gain, and (2) a decreased serum total cholesterol. From gene expression analysis, promoting uptake of LDL cholesterol and enhanced lipolysis in the liver were suggested as mechanisms of lipid metabolism.

研究分野：解剖生理学

キーワード：経皮吸収 スクラレオール アロマセラピー 更年期症状 補完代替医療 脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

更年期は閉経の前後 5 年の合計 10 年間 (45 歳-55 歳) であり、エストロゲンの分泌低下に様々な社会的・心理的要因が加わって更年期障害を発症する女性が多い。「ほてり、のぼせ、不眠、頭痛、手足のしびれ、肩こり」などの症状を更年期女性の 80% が訴え、さらにその半数は日常生活に影響が出て治療を要する。治療としてホルモン補充療法 (HRT) が更年期障害に対する第一選択であるが、乳がんリスクの上昇、静脈血栓塞栓症のリスク上昇、虚血性脳卒中のリスク上昇などの副作用があり、HRT を希望しない更年期女性も少なくない。

一方、更年期女性のホットフラッシュや寝汗の緩和に対してクラリセージオイルが有効であり、ホルモン様作用を示す成分によるとの報告がある。クラリセージオイル中のエストロゲン様作用を有する成分として、構造式の類似性からスクラレオールが想定されている。医学的に HRT が禁忌となる患者や HRT を希望しない更年期女性に対しては、クラリセージオイルによるアロマセラピー療法の活用が期待できるが、経験的に用いられている現状がある。

## 2. 研究の目的

更年期障害に対する安全な代替療法として経験的に施行されているアロママッサージが科学的根拠をもった看護ケアとなる可能性に着目し、クラリセージオイルの特性成分であるスクラレオールが経皮吸収されて血中に移行するかどうか、エストロゲン様作用の 1 つである脂質代謝制御に着目し、スクラレオールが脂質代謝作用をもつかどうか、の 2 点を動物実験にて明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究は横浜市立大学医学部動物実験委員会 (承認番号 F-A-15-026)、および東海大学動物実験委員会 (承認番号 171096) の承認を得て実施した。

### (1) 【スクラレオールの経皮吸収の検討】

#### 試薬等

スクラレオールの標準物質は、Sigma-Aldrich より購入した。また、有機溶剤としてメタノール (HPLC 用、和光純薬工業) 及びクロロホルム (特級、和光純薬工業) を用いた。超純水は、日本ミリポア製の DIRECT-Q システムより採取したものをを使用した。

#### 試料

#### a) クラリセージオイル含有スクラレオールの定量分析

クラリセージオイル (プラナロム) をメタノールで 1,000 倍希釈し、試料とした。

#### b) クラリセージオイル塗布後の血中スクラレオールの定量分析

ddY マウス血清を Bligh & Dyer 法にて前処理を行い、血清中の脂質抽出物を蒸発乾固さ

せた後にメタノールで再溶解し、5 倍濃縮した試料を用いた。

#### c) スクラレオール塗布後の血中および肝臓中スクラレオールの定量分析

HR-1 マウス血清の前処理として、8 倍量のメタノールを用いた除タンパク操作後にサイズ排除濾過を行った。また、HR-1 マウス肝臓組織片を 8 倍量のメタノール中でホモジナイズし、除タンパク操作後にサイズ排除濾過にて前処理を行った。

血清、肝臓ホモジネートともに脂質抽出物を蒸発乾固させた後にメタノールで再溶解し、それぞれ 15 倍濃縮、10 倍濃縮した試料を GC-MS 分析に用いた。

#### 装置と GC-MS 分析条件

GC-MS (ガスクロマトグラフ質量分析計) 分析には、ガスクロマトグラフ (GC-17A、島津製作所) 及びガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS-QP5050A、島津製作所) を用いた。分析用カラムは Restek 製 Stabilwax (長さ 25m、内径 0.25mm、膜厚 0.25  $\mu$ m) を用いた。オープン温度は 40 で 2 分間保持後、240 まで毎分 7 で昇温し、最後に 240 で 10 分間保持した。キャリアガスには超高純度ヘリウムを用い、注入口圧力 60.9 kPa、カラム流量 1.4 mL/min とした。注入口温度は 250 とし、注入法はスプリット法 (スプリット比 30) を用いたマニュアル注入 (注入量 1.0  $\mu$ L) を行った。インターフェース温度は 230 に設定した。

MS の測定条件は、電子イオン化法 (70 eV)、測定範囲  $m/z$  45-500 とした。また、インターバル時間は、SCAN モードで 0.5 sec、SIM モードで 0.2 sec とした。なお、毎回の分析前にブランク測定を行い、キャリアオーバーがないことを確認した。

#### 使用動物

クラリセージオイル中のスクラレオールの経皮吸収の検討には、8 週齢の雄性 ddY マウス (日本エスエルシー) を用いた。また、スクラレオール塗布前後の血中および肝臓中のスクラレオール定量には、8 週齢の雄性 HR-1 マウス (星野動物飼育所) を用いた。いずれも飼育環境は温度 23  $\pm$  1、湿度 55  $\pm$  5%、照明時間 12 時間に調節されており、餌及び飲料水は自由に摂取させた。

#### 動物実験

#### a) クラリセージオイル塗布後の血清スクラレオールの定量分析

オイルを塗布する 24 時間前に電気バリカンでマウスの背部を剃毛した。皮膚に傷がないことを確認後、クラリセージオイル原液 1.43  $\mu$ L/g をマウス背部に塗布した。採血のタイミングは塗布前および塗布後 30 分であり、イソフルラン深麻酔下で心臓採血により血液を採取した。血液を遠心分離 (1,118  $\times$  g、15min、4 ) し、得られた血清を -80 の冷凍庫で保管した。

#### b) スクラレオール塗布後の血清および肝臓中スクラレオールの定量分析

ホホバオイルにスクラレオールを溶解し、266,666 ppm に調整した溶液 4 $\mu$ l/g をマウス背部に塗布した。塗布前 (n=4) および塗布後 30 分 (n=4) にイソフルラン深麻酔下で心臓採血により血液を採取した。血液を遠心分離 (1,118 $\times$ g, 15min, 4 ) し、得られた血清を -80 の冷凍庫で保管した。

#### 検量線の作成と定量

標準原液は、スクラレオール標準品 10mg をメタノールに溶解し、10mL に定容した (スクラレオールとして 1,000ppm)。検量線用標準液は、標準原液をメタノールで希釈し、0.1-10ppm の範囲で 4 濃度の溶液を調製した。これらの標準液を SIM モードで測定し、絶対検量線を作成した。

#### 統計解析

得られたデータは、2 群間の比較では等分散の検定を行った後、等分散の場合はスチューデントの *t* 検定、不等分散の場合はウェルチの *t* 検定をそれぞれ行った。データは平均値  $\pm$  標準誤差で示し、危険率  $p < 0.05$  の場合に有意差があるとした。

## (2) 【スクラレオールの脂質代謝作用の検討】

### 試薬等

スクラレオールの標準物質は、Sigma-Aldrich より購入した。スクラレオールの溶媒には、カルボキシメチルセルロースナトリウム (和光純薬工業) を超純水で溶解して 0.5% に調整したものをを用いた。超純水は、日本ミリポア製の DIRECT-Q システムより採取したものをを使用した。

### 装置

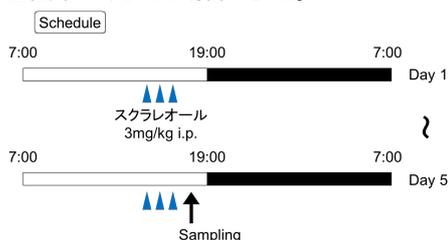
cDNA 合成には、T100 Thermal Cycler (Bio Rad) を用い、リアルタイム PCR には、CFX96/384 (Bio Rad) を使用した。

### 使用動物

7 週齢の雄性 ddY マウス (日本エス エル シー) 19 匹をコントロール群 (n=10) とスクラレオール群 (n=9) に分けた後に個別飼育し、明暗条件 (明期 7:00-19:00、温度 24 $\pm$ 2、湿度 55 $\pm$ 5%) で少なくとも 1 週間の馴化の後、実験に用いた。飼育環境は温度 23  $\pm$  1、湿度 55 $\pm$ 5%、照明時間 12 時間に調節されており、餌及び飲料水は自由に摂取させた。

### 動物実験

スクラレオール 3 mg/kg を腹腔内に 5 日間投与した (1 日 3 回 16:00、16:30、17:00)。5 日目の最終投与 1 時間後に腹部大静脈より採血、肝臓を採取し、血中、肝臓の脂質量、リアルタイム PCR による肝臓の脂質代謝関連遺伝子の発現を解析した。



## total RNA 抽出、cDNA 合成およびリアルタイム PCR

トータル RNA の抽出は、タカラバイオから購入した RNAiso Plus を用い、指定の方法で行った。

cDNA 合成は、タカラバイオから購入した PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) を用い、サーマルサイクラーで 37 30 分 85 5 秒 4 の条件で反応させた。

リアルタイム PCR は SYBR Green I (Fast SYBR Breen Master Mix, Applied Biosystems) を用いたインターカレーター法で行い、PCR 反応を行った。PCR 反応は、95 10 秒間 (95 5 秒 57 10 秒 72 10 秒)  $\times$  45 サイクル 95 10 秒 65 10 秒 95 5 秒の条件で行い、PCR 反応終了後に PCR 産物の解離曲線を求めた。

相対発現量は検量線法により、コントロールの発現量を 1.0 となるよう算出した。内部標準遺伝子として、*-actin* を用いた。

### 統計解析

得られたデータは、等分散の検定を行った後、等分散の場合はスチューデントの *t* 検定、不等分散の場合はウェルチの *t* 検定をそれぞれ行った。データは平均値  $\pm$  標準誤差で示し、危険率  $p < 0.05$  の場合に有意差があるとした。

## 4. 研究成果

### (1) 【スクラレオールの経皮吸収の検討】

#### クラリセージオイル中のスクラレオール濃度の定量分析

クラリセージオイル 1000 倍希釈溶液中のクラリセージオイル濃度は 6.79 ppm であった。すなわち、クラリセージオイル原液のスクラレオール濃度は約 6800 ppm である。

なお、スクラレオールの 4 点検量線は、0.1-10ppm の濃度範囲で  $r^2=0.9990$  (相関係数  $r=0.9995$ ) の良好な直線性を示した。検量線の直線回帰式は  $y=2.2 \times 10^4x + 6.4 \times 10^1$  だった ( $y$  はピーク面積、 $x$  はスクラレオール濃度 [ppm])。

#### クラリセージオイル塗布後の血清スクラレオールの定量分析

クラリセージオイル塗布前後の全イオンクロマトグラム (図 1) より、クラリセージオイル塗布後には塗布前にはみられないピークが多数検出されたことから、同オイル中の複数成分が経皮吸収されたことが分かる。

一方、クラリセージオイル塗布前後の SIM クロマトグラム (図 2) の形状が同様かつ標準品の保持時間にピークが未検出であることから、スクラレオールの経皮吸収は確認されなかった。しかし、スクラレオール (分子量 308) は、500 Dalton rule に適合しており、検出下限の濃度であると思われる。そのため、クラリセージオイルに含有されるスクラレオール濃度およびベースラインノイズをもとに S/N 6 を検出目標感度として計算し、投与量、試料の濃縮率を再検討した。ま

た、マウス系統を変更して、下記 に示すスクラレオール塗布の実験につなげた。

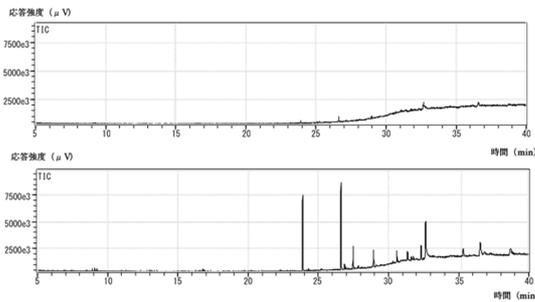


図 1 クラリセージオイル塗布前（上）と塗布後 30 分（下）の血清試料の全イオンクロマトグラム

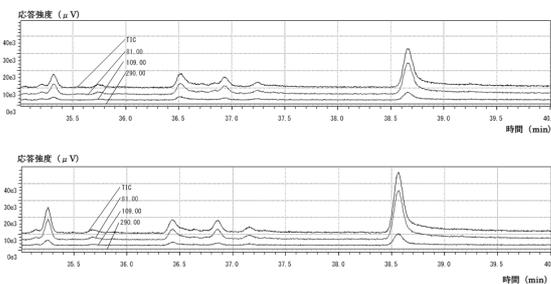


図 2 クラリセージオイル塗布前（上）と塗布後 30 分（下）の血清試料の SIM クロマトグラム

### スクラレオール塗布後の血清および肝臓中スクラレオールの定量分析

スクラレオール塗布 30 分後の血清試料および肝臓試料を SIM モードで分析した。その結果、スクラレオール標準品と同様の保持時間にピークがみられ、3 種類のモニターイオンが全て検出された。

また、定量分析の結果、血清試料は  $2.51 \pm 0.55$  ppm、肝臓試料は  $7.93 \pm 1.50$  ppm であった。試料の濃縮率および添加回収試験で確認した回収率（46.8%）をもとに算出したスクラレオールの血清濃度は  $0.36 \pm 0.08$  ppm、肝臓中スクラレオール濃度は  $1.69 \pm 0.32$  ppm であった（図 3）。

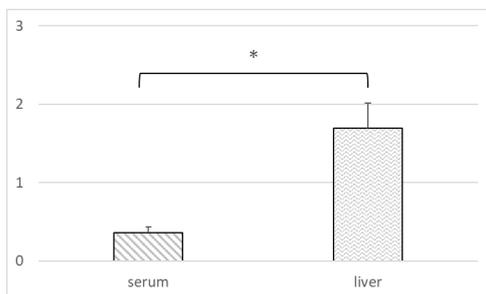


図 3 スクラレオール塗布 30 分後の血清および肝臓中スクラレオール濃度（ppm）

## (2) 【スクラレオールの脂質代謝作用の検討】

スクラレオールは、摂餌量に影響せず、体重増加を緩やかにし、また、血中コレステロールおよび肝臓の総脂質量の低下を促させた（表 1）。スクラレオール投与により、表現型に変化がみられたことから、脂質代謝に関連する遺伝子群の発現を解析した結果を表 2 に示す。

表 1 スクラレオール投与による体重増加率および血中パラメーターの変化

	Control	Sclareol	p
Food intake /Body weight (x 10 g/day)	1.46±0.04	1.43±0.05	n.s.
Weight gain (%)	8.28±1.11	4.66±0.93	*p<0.05
Blood glucose (mg/dL)	138.93±8.61	136.92±11.01	n.s.
<b>Plasma</b>			
Triglyceride (mg/mL)	1.34±0.15	1.02±0.07	p=0.08
Total cholesterol (mg/mL)	1.81±0.12	1.36±0.07	†p<0.01
Free fatty acid (x 10 <sup>3</sup> mEq/g)	2.41±0.05	2.27±0.08	n.s.
<b>Liver</b>			
Total lipid (mg/g tissue)	20.0±1.40	13.53±1.18	†p<0.01
Triglyceride (mg/g tissue)	8.69±1.61	7.58±1.31	p=0.61
Total cholesterol (mg/g tissue)	4.53±0.23	5.21±0.18	*p<0.05
Free fatty acid (x 10 <sup>3</sup> mEq/g)	5.47±0.26	6.03±0.56	n.s.

Data are shown as means ± SEM (n = 10 and 9 for control and Sclareol, respectively).

\*p < 0.05, †p < 0.01 compared with Control. n.s.; not significant.

表 2 脂質代謝関連遺伝子の発現解析

	Control	Sclareol	p
<b>Liver</b>			
<i>lipogenesis-related genes</i>			
<i>hmg-CoA reductase (hmgcr)</i>	1.00±0.11	1.03±0.13	n.s.
<i>fatty acid synthase (fasn)</i>	1.00±0.11	0.95±0.12	n.s.
<i>acetyl-CoA carboxylase (acc)</i>	1.00±0.05	1.06±0.06	n.s.
<i>lipolysis-related genes</i>			
<i>adipose triglyceride lipase (atgl)</i>	1.00±0.08	1.39±0.06	†p<0.01
<i>hormone sensitive lipase (hsl)</i>	1.00±0.08	1.39±0.12	*p<0.05
<i>lipoprotein lipase (lpl)</i>	1.00±0.12	1.01±0.10	n.s.

Data are shown as means ± SEM (n = 10 and 9 for control and Sclareol, respectively).

\*p < 0.05, †p < 0.01 compared with Control. n.s.; not significant.

スクラレオールによって、脂肪分解に働くリパーゼをコードする遺伝子（*hsl* や *atgl*）の発現が促されたが、肝臓の脂肪酸量がコントロール群と同等であったことから、脂肪分解によって生成された脂肪酸は、ミトコンドリアでの酸化による消費あるいはアセチル CoA からコレステロールへの合成を経て胆汁酸へ排泄されると考えられた。

また、スクラレオールによって、血中コレ

ステロール濃度の低下と肝臓コレステロール量の増加が認められた。しかし、コレステロール合成の律速酵素である *hmgcr* の遺伝子発現に変化が認められなかったことから、肝臓コレステロール量の増加には、肝臓へのコレステロールの取り込みが関与していることが示唆された。

脂肪酸の代謝に関しては、酸化によるアセチル CoA への変換とその逆反応(脂質合成)が行われている。アセチル CoA は脂肪酸やコレステロールの前駆体(すなわち体内のすべてのステロイドの前駆体)であり、アセチル CoA からのコレステロール合成やケトン体生成、または TCA サイクルでの代謝など複数の pathway が知られている。このうち、脂肪酸合成の調節において最も重要な酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼをコードする遺伝子 (*acc*) および脂肪酸合成酵素をコードする遺伝子 (*fasn*) の発現に変化はみられなかった。以上より、酸化によりアシル CoA から産生されたアセチル CoA は、TCA サイクルに入って完全に酸化される経路がコレステロール合成に利用される経路に利用されることが考えられた。

今後、便中へのコレステロール排泄について、そして白色脂肪組織および褐色脂肪組織における脂質代謝を検討することで脂質代謝の全体像を評価する予定である。

## 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1件)

1. 松本裕、日下真咲代、大久保みづき、藤本千尋、堀川和政、伊吹愛、赤瀬智子: クラリセージオイルの経皮吸収に対する検討 - 更年期症状に対する看護ケアの確立に向けて - , 日本未病システム学会雑誌, Vol.22(2), 72-76, 2016 (査読あり)

〔学会発表〕(計6件)

1. 松本裕、堀川和政: シソ科ジテルペンを用いた代替医療の可能性, 東海大学看護研究会 第8回学術集会(神奈川), 2018
2. 伊吹愛、堀川和政、前沢美佳、松本裕、赤瀬智子: 肥満による創傷治癒遅延への影響 - 皮下脂肪組織の低酸素に着目して - , 第25回日本創傷・オストミー・失禁管理学会(金沢), 2016
3. 伊吹愛、前沢美佳、松本裕、赤瀬智子: 肥満および老化マウスにおける皮膚組織の構造変化, 第4回看護理工学会(岩手), 2016
4. 堀川和政、後藤千鶴、小此木辰輝、松本裕、赤瀬智子: 軽度肥満者における皮膚リモデリング関連遺伝子の発現動態, 第46回日本創傷治癒学会(東京), 2016

5. 堀川和政、大久保みづき、松本裕、赤瀬智子: スクラレオールによる脂質代謝の促進と血中コレステロールの低下作用, 第23回日本未病システム学会(福岡), 2016

〔その他〕(計1件)

1. 伊吹愛、藤本千尋、松本裕、堀川和政、赤瀬智子: 更年期女性のホットフラッシュに対するクラリセージ精油の経皮吸収効果の検討, 一般財団法人横浜総合医学振興財団 平成27年度財団助成研究等報告書抄録集

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 裕 (MATSUMOTO, Yutaka)  
東海大学・健康科学部・講師  
研究者番号: 80609230

### (2) 研究分担者

赤瀬 智子 (AKASE, Tomoko)  
横浜市立大学・医学部・教授  
研究者番号: 50276630

伊吹 愛 (IBUKI, Ai)

横浜市立大学・医学部・助教  
研究者番号: 60738805

### (3) 研究協力者

堀川 和政 (HORIKAWA, Kazumasa)