

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01988

研究課題名（和文）リナロール香気の抗不安作用と中枢神経回路基盤の解明

研究課題名（英文）Linalool odor-induced anxiolytic effects and central neuronal mechanisms

研究代表者

柏谷 英樹 (Kashiwadani, Hideki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：70328376

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本助成金により、申請者はリナロール香気が惹起する抗不安効果を、野生型マウスを用いた不安関連行動試験により実証した。また、リナロール香気誘発性抗不安効果には、臨床抗不安薬でしばしば問題となる運動機能低下が生じないこと、この抗不安効果はリナロール香気により生じる嗅覚入力によりトリガーされること、この抗不安効果は脳内の内在性ベンゾジアゼピンを介して生じることが明らかになった。これらの結果は従来より信じられてきた香気の抗不安効果を生じる脳内メカニズムの一端を明らかにするものであり、新たな抗不安治療戦略の足掛かりになることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

香気を持つ抗不安作用は古代ギリシャ時代より知られており、現在でもアロマセラピー等として広く普及している。一方、その科学的検証と基盤となる神経回路機構についての検証は進んでおらず、民間療法の域を今だ出していない。本研究では複数の行動試験を組み合わせ、客観的行動学的指標に基づきリナロール香気の抗不安効果を実証した点に意義がある。また臨床抗不安薬として広く用いられているベンゾジアゼピン系薬剤が作用する受容体をリナロール香気が内在性物質を介して刺激することが明らかになり、より安全な抗不安薬開発の大きな手掛かりとなりうる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the anxiolytic effects of linalool odor with anxiety-related behavior test of wild type mouse. Light/Dark box test and elevated plus maze test revealed that linalool odor exposure induced significant anxiolytic effects in mice. Furthermore, the anxiolytic effects did not accompany with the motor dysfunction, was triggered by olfactory input evoked by linalool odor, and was mediated by benzodiazepin receptors activated by olfactory input evoked by linalool odor.

研究分野：行動生理学

キーワード：リナロール ベンゾジアゼピン受容体 香気誘発性抗不安 香気 嗅覚

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

香気を持つ抗不安作用は古来より記述されており、現代でもアロマセラピー等の民間療法で広く用いられている。しかしながらその効果についての科学的検証は進んでおらず、とくに「香り」により惹起される抗不安作用の基盤となる神経回路機構は明らかになっていない。申請者は抗不安作用を有すると信じられているラベンダー香気的主要香気成分の一つ、リナロールに着目し、その抗不安作用と関与する神経機構の解明を目指した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は

- (1) リナロール香気抗不安作用を、マウス不安関連行動を用いて検証する。
- (2) 香気誘発性抗不安作用の嗅覚依存性を検証する。
- (3) 香気誘発性抗不安作用が鎮静効果(運動能低下)を伴うか検証する。
- (4) 香気誘発性抗不安作用に、ベンゾジアゼピン受容体及びセロトニン1A受容体が涵養するか検証する

の4点を検証することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### 【香気暴露】

香気暴露時に嗅覚入力以外の感覚入力を極力除外する為、リナロール 200  $\mu$ L をしみ込ませた 2cm 角のろ紙をステンレス製ティーボールに入れ、これをアクリルボックス(25 cm  $\times$  25 cm  $\times$  25 cm)の底四隅に配置した。ここへホームケージ(12 cm  $\times$  20 cm  $\times$  10 cm)に入ったマウスを静置し、30分間香気に暴露した。その直後に不安関連行動を計測し、香気抗不安効果を評価した。

#### 【不安関連行動試験】

抗不安効果の評価は抗不安薬のスクリーニング法として広く用いられている高架式十字迷路試験及び明暗箱試験を用いた。これらの試験は動物が本質的に持つ新奇環境に対する接近・探索欲求と不安が原因となる回避行動とが平衡状態にある接近-回避型のコンフリクトモデルであり、動物の探索行動を指標に不安水準を容易に測定することが可能である。高架式十字迷路試験では高さ 40cm の場所に十字型に 30cm の壁無走行路(オープンアーム)と壁有走行路(クローズドアーム)をそれぞれ向かい合わせに配置したものである。マウスはオープンアームのような高所開放所(ヒトで例えるならビルの屋上のへり)に対して生得的に不安を感じるため、オープンアームの探索行動は少ないが、抗不安薬を投与すると不安軽減の結果、オープンアームの探索行動が増加する。一方明暗箱試験においては 25 cm  $\times$  18 cm  $\times$  21 cm の箱を 2 つ接続し、マウスが自由に行き来できるアリーナを作成する。片方の箱は 400LUX の LED ランプで照明してある為非常に明るく他方の箱は無照明で 10LUX 程度の照度に設定してある。マウスは明所に対する生得的不安により明室を避けるが、抗不安薬投与により明室の探索行動が増加する。

#### 【嗅覚遮断試験】

香気誘発性抗不安効果の嗅覚依存性を検証するため、嗅上皮を薬理的に脱落させた嗅覚失調マウスを用いてリナロール香気抗不安効果を検証した。3-methylindole (3-MI) (300mg/kg) を腹腔内に投与し嗅上皮を脱落させる。3-MI 投与後数日で嗅上皮の脱落は観察され、1週間後には嗅覚失調をきたし、少なくとも3週間後まで嗅覚失調状態は持続することが報告されている。3-MI 投与2週間後、不安関連行動試験を行った。

#### 【行動薬理的試験】

香気誘発性抗不安効果に対するベンゾジアゼピン受容体及びセロトニン1A受容体の関与を検証するため、フルマゼニル(ベンゾジアゼピン受容体阻害薬; 3 mg/kg 腹腔内投与)またはWAY100635(セロトニン1A受容体阻害薬; 0.5 mg/kg)を不安関連行動試験30分前に投与し、香気誘発性抗不安効果を検証した。対照群にはvehicle(2% Tween80 加生理食塩水)を投与した。

### 4. 研究成果

#### 【リナロール香気抗不安作用】

リナロール香気は本当に抗不安効果を有するのかを検証するため、野生型マウス(C57BL6系統)雄マウスを用い、不安関連行動試験を行った。リナロール香気暴露後に明暗箱試験を行った結

果、明室滞在時間は無臭空気暴露群と比較して有意に増加していた ( $p < 0.001$ , Tukey's multiple comparison test)。また明室侵入回数も同様に有意な増加を示した ( $p < 0.01$ , Tukey's multiple comparison test)。次に高架式十字迷路試験を用いて抗不安効果を検証したところ、リナロール香気暴露群では開放腕滞在時間は無臭空気暴露群と比較して有意に増加していた ( $p < 0.05$ , Tukey's multiple comparison test)。また開放腕侵入回数も同様に有意な増加を示した ( $p < 0.05$ , Tukey's multiple comparison test)。これらの結果から、リナロール香気暴露によりマウスでは有意な抗不安効果が観察されることが明らかになった。

#### 【リナロール香気の運動能力への影響】

臨床で用いられる抗不安薬では摂取による運動機能低下をきたすこと可能性があることが報告されている。リナロール香気暴露と同様な運動機能低下があるかを検証するため、リナロール香気暴露後に、加速式ロータロッド試験を行った。その結果、ロータロッドの回転に追従できず落下するまでの潜時はリナロール香気暴露群と無臭空気暴露群では有意な差異は観察されず、協調運動に対してリナロール香気暴露は影響を及ぼさないことが明らかになった。また、先の高架式十字迷路における自発総歩行距離にもリナロール香気暴露の有意な影響は観察されなかった。これらの結果から、リナロール香気暴露は有意な運動能力の低下を示さず、リナロール香気による不安関連行動試験の結果は、香気暴露による運動機能低下（鎮静）効果ではなく、抗不安効果によるものであることが示唆された。

#### 【リナロール香気の嗅覚依存性】

リナロール香気誘発性抗不安効果が、本当に嗅覚入力により惹起されたものであるかを検証するため、嗅上皮を薬理的障害した 3-MI 誘発性嗅覚失調マウスを用いてリナロール香気誘発性抗不安効果を調べた。その結果、嗅覚失調マウスでは明暗箱試験、高架式十字迷路試験ともにリナロール香気誘発性抗不安効果は消失していることが明らかになった。この結果は、吸入したリナロールが血中に取り込まれることによって抗不安効果を惹起したのではなく、リナロール香気により生じた嗅覚が抗不安効果を惹起したことを意味している。また今回用いた嗅覚失調マウスで本当にリナロール香気を検出できなくなっているかを検証するため、habituation/dishabituation test を行った。その結果、リナロールで臭い付けした綿棒の探索行動回数は嗅覚失調マウスで有意に減少し ( $p < 0.0001$ , Bonferroni's multiple comparison test)、綿棒嗅ぎ回数も有意に減少していた ( $p < 0.0001$ , Bonferroni's multiple comparison test)。これらの結果から、3-MI 処理により確かにマウスはリナロール香気に対して嗅覚失調をきたしていることが確認された。

#### 【リナロール香気誘発性抗不安効果はベンゾジアゼピン受容体が関与する】

リナロール香気誘発性抗不安効果に、ベンゾジアゼピン受容体の活性化が寄与するかを検証するため、ベンゾジアゼピン受容体阻害薬であるフルマゼニル (3mg/kg, i.p.) を事前投与したマウスでリナロール香気誘発性抗不安効果に対する影響を高架式十字迷路試験により検証した。その結果、リナロール香気により惹起された抗不安効果は、フルマゼニル事前投与により消失することが明らかになった (開放腕滞在時間:  $p < 0.001$ , 開放腕侵入回数:  $p < 0.001$ , リナロール/vehicle 群とリナロール/フルマゼニル群の比較, Tukey's multiple comparison test)。この結果は、リナロール香気暴露が脳内の内在性ベンゾジアゼピン様物質のリリースを介してベンゾジアゼピン受容体を活性化し、その結果抗不安作用を惹起したことを意味している。先の実験で嗅覚失調マウスではこの抗不安効果は生じないことから、体内に取り込まれたリナロールが直接ベンゾジアゼピン受容体に作用したわけではない点は留意しておく必要がある。

次に、リナロール香気誘発性抗不安効果にセロトニン 1A 受容体が関与するかを検証するため、セロトニン 1A 受容体阻害薬 WAY100635 (0.5mg/kg, i.p.) を事前投与したマウスでリナロール香気誘発性抗不安に対する影響を高架式十字迷路試験により検証した。その結果、リナロール香気により惹起された抗不安効果は、WAY100635 事前投与により有意な変動を示さず、リナロール誘発性抗不安効果は維持されていた (開放腕滞在時間:  $p < 0.001$ , 開放腕侵入回数:  $p < 0.001$ , 無臭空気/WAY100635 群とリナロール/WAY100635 群の比較, Tukey's multiple comparison test)。これらの結果から、リナロール香気誘発性抗不安に対するセロトニン 1A 受容体の寄与は証明されなかった。

#### 【リナロール香気誘発性抗不安に対するオレキシン神経系の寄与】

リナロール香気に誘発される鎮痛効果にはオレキシン神経系を介したシナプス伝達が必須である。抗不安効果も同様にオレキシン神経系を介した伝達が必須であるかを検証するため、オレキシンペプチド欠損マウスを用いてリナロール香気誘発性抗不安効果を検証した。その結果、オレキシン欠損マウスでは、野生型マウス同様香気誘発性抗不安効果を示し、オレキシン神経系は香気誘発性抗不安効果の発現には必ずしも必要ないことが明らかになった。この結果は、リナロール香気刺激が、オレキシン神経を介する内因性鎮痛神経回路とオレキシン神経を介さない、内因性抗不安神経回路を独立して駆動できることを意味している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Harada Hiroki, Kashiwadani Hideki, Kanmura Yuichi, Kuwaki Tomoyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Linalool Odor-Induced Anxiolytic Effects in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 241
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2018.00241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Li, M., Kuwaki, T., Kashiwadani, H.
2. 発表標題 Orexinergetic transmission on the anxiolytic effects of linalool odor in mice
3. 学会等名 自律神経研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li, M., Kuwaki, T., Kashiwadani, H.
2. 発表標題 Contribution of orexinergic systems in anxiolytic effects of linalool odor in mice
3. 学会等名 第47回自律神経生理研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yurina Higa, Mitutaka Sugimura, Tomoyuki Kuwaki, Hideki Kashiwadani
2. 発表標題 Descending orexinergic inhibition contributes to the linalool odor-induced analgesia in mice
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress: FAOPS 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yurina Higa, Mitutaka Sugimura, Tomoyuki Kuwaki, Hideki Kashiwadani
2. 発表標題 Duration of linalool odor-induced analgesia in mice
3. 学会等名 15th International Dental Congress on Anesthesia, Sedation and Pain Control: IFDAS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Harada, Yuichi Kanmura, Tomoyuki Kuwaki, Hideki Kashiwadani
2. 発表標題 Linalool exposure showed anxiolytic effects in mice
3. 学会等名 American society of anesthesiologist annual meeting: ASA2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柏谷英樹
2. 発表標題 香気誘発性鎮痛と抗不安作用
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田浩輝、上村裕一、桑木共之、柏谷英樹
2. 発表標題 リナロール香気に誘発される抗不安効果
3. 学会等名 第68回西日本生理学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 柏谷英樹、井上和男、他37名	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 287
3. 書名 抗疲労・抗ストレス・睡眠改善食品の開発	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>「香り」が不安を軽減する脳の仕組みを発見  <a href="https://www.kagoshima-u.ac.jp/pickup/2018/10/post-1379.html">https://www.kagoshima-u.ac.jp/pickup/2018/10/post-1379.html</a>                  鹿児島大学大学院医歯学総合研究科統合分子生理学ホームページ  <a href="http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol1/">http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol1/</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	桑木 共之  (Kuwaki Tomoyuki)  (80205260)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	