

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16400

研究課題名（和文）日本伝統の芳香性生薬の「香り」による睡眠障害改善に関する研究

研究課題名（英文）Investigation of the ameliorative effect of inhalation of plant-derived fragrances on sleep-disordered stress

研究代表者

竹元 裕明 (Takemoto, Hiroaki)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：40511431

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ICR雄性マウスに対して断眠ストレスを24時間負荷することで睡眠障害モデルマウスとした。本モデルマウスでは、高架式十字迷路試験において不安様行動が観察され、また血清コルチコステロンおよび脳内のストレスマーカー候補遺伝子である二重特異性ホスファターゼ1が増加した。アロマセラピーを用いた睡眠障害改善効果を解析した結果、本モデルマウスにセサミオイルを吸入投与した場合、上記の不安様行動や各ストレスマーカーの減少が認められた。さらに活性成分を同定するため含有される香気成分の単独投与試験を行った結果、2,5-ジメチルピラジンと2-メトキシフェノールに強い抗ストレス作用を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠障害の患者数は近年急増しており、うつ病や不安症状も付随することからQOLの低下に大きく影響している。睡眠薬による長期服用時の依存性や筋弛緩、記憶障害等の副作用が社会問題化となり、より効果的かつ安全性の高い治療法の確立が社会から求められている。本実験で用いた睡眠障害モデルマウスでは、ヒトの症状に近い不安様行動や、血中および脳内のストレスマーカーの上昇が認められた。これら異常に対してセサミオイルの吸入は有意な改善効果を示しており、服用方法も経口投与や腹腔内投与と比較して非侵襲的であることから、睡眠障害患者の中で特に大きい割合を示す高齢者に対しても有効な対処法となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：ICR male mice were subjected to sleep deprivation stress for 24 hours to create a mouse model of sleep disturbance. In this mouse model, anxiety-like behavior was observed in the elevated plus-maze test, and serum corticosterone and dual specificity phosphatase 1, a candidate gene for stress marker in the brain, were increased. As a result, inhalation of sesame oil aroma showed a decrease in anxiety-like behavior and each stress marker mentioned above. In order to identify the active ingredients, the components of sesame oil aroma were inhaled. As for the single component, anxiolytic effects were observed in the 2,5-dimethylpyrazine and 2-methoxy phenol group. These results suggest that these molecules may be powerful anti-stress agents.

研究分野：健康科学、神経科学、行動薬理学

キーワード：アロマセラピー 睡眠障害 ストレス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

睡眠障害は入眠困難、中途覚醒、熟眠障害など不眠症を主とする疾患である。更に、抑うつ・不安など他の精神疾患の合併率が高く、患者の QOL を著しく低下させる。現在日本においては、成人の 20%以上、認知症高齢者に至っては 50%が睡眠障害を患っていると報告されている。睡眠障害の治療は、ベンゾジアゼピンや非ベンゾジアゼピン系などの睡眠薬による薬物療法が中心となっている。しかし、睡眠薬による長期服用時の依存性や筋弛緩、記憶障害等の副作用が社会問題化となり、より効果的かつ安全性の高い治療法の確立が社会から求められている。

一方、植物の香りによる「安眠」効果は古くから知られており、精神安定、睡眠の質を改善する目的で利用されてきており、嗅覚受容体の発見がノーベル生理学・医学賞に繋がり、欧米諸国におけるアロマセラピーの臨床利用の一層の拡大に拍車した。例えば、ラベンダー精油はがんの化学療法における睡眠障害に対する改善効果が無作為化臨床試験によって証明され、がん治療の支持療法として臨床活用されている。また、基礎研究においては、ラベンダー精油の吸入によりマウスの脳内のセロトニン神経系を活性化する作用が報告されている。

本研究では睡眠障害に対して有効な対処法となり得る植物由来の芳香を探索することを目的とした。日本においても古くから植物の「香り」を取り入れた文化があり、様々な芳香が安眠作用を促すとされてきた。そこで、実験材料として日本伝統の芳香性生薬や我々の日常生活で馴染みのある植物由来の芳香を対象として、植物の「香り」の睡眠障害への有用性を基礎科学的アプローチから評価することを目的とした。臨床の難題である睡眠障害に対する有効性が確立されることで、アロマセラピーの有効な臨床応用にフィードバック出来ることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、睡眠障害に対して有効な対処法となり得る植物由来の芳香を見出すために、睡眠障害モデルマウスにおける行動薬理試験により、植物芳香の香気吸入による抑うつや不安症状の改善効果に関する解析を行い、ストレスバイオマーカーに対するアロマセラピーの作用解析を行った。本研究では、植物芳香としてセサミオイル由来の芳香成分の効果に関して以下に報告する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 睡眠障害モデルマウスの作製と吸入投与試験

ICR 雄性マウス (5 週齢) を  $24 \pm 2$ 、12 時間明暗サイクル (明期 08:00-20:00) で 1 週間の馴化飼育を行った。睡眠障害モデルの作製は、マウスの四肢が浸かる程度に水を張ったケージ内 (水深約 1cm) で 24 時間飼育し、断眠ストレスをマウスに負荷することで行った。24 時間後、被験対象とした植物芳香成分を 30~90 分間、吸入投与した。吸入投与は芳香成分を充滿させたガラスケージ内にマウスを投入することで行った。

#### (2) 高架式十字迷路試験

不安様行動は、試料の吸入投与の終了直後から 10 分間、高架式十字迷路試験を行うことで評価した。高架式十字迷路はアーム長 30cm、アーム幅 5cm、床からの高さ 60cm、クローズドアームの壁の高さ 20cm で構成した。マウスの行動はビデオカメラで撮影し、ANY-maze (室町機械、東京、日本) を用いて解析した。オープンアームへの進入回数と滞在時間、クローズドアームへの進入回数と滞在時間を比較した。

#### (3) ストレスバイオマーカーの解析

試料の吸入投与の終了直後に麻酔下で全血を回収し、全脳から線条体および海馬を採取した。血清コルチコステロン濃度は、Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA) を用いて測定した。また、脳内のストレスマーカー候補遺伝子として二重特異性ホスファターゼ 1 (DUSP-1) の発現量を測定した。線条体および海馬を液体窒素中で粉碎した後に、total RNA の回収、cDNA の合成を行い、real time RT-PCR により定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) セサミオイル由来の芳香の抗不安様効果

24 時間のストレス負荷後、マウスにセサミオイルの芳香を 0 分、30 分、60 分、90 分吸入させた。0 分群のオープンアーム進入率の平均値は 23.6%であったが、30 分群では 65.8%、60 分群では 90.2%となり、オープンアーム進入率は吸入時間に伴い上昇した。しかし、90 分群の値は 62.8%とあり、抗不安効果が減少していることが示された。オープンアーム滞在時間の結果は、オープンアーム進入率と同様であった。0 分群のオープンアーム滞在時間の平均値は 128.8 秒で

あったが、30分群では312.7秒、60分群では391.0秒であった。これらの結果から、セサミオイルの芳香には不安抑制作用があることが示唆された。有意なストレス軽減効果は吸入投与30分後に現れ、吸入投与60分後に最大の効果が観察される結果となった(図1)。

#### (2) ストレスバイオマーカーに対するセサミオイルの芳香の作用

血清中コルチコステロン濃度は睡眠障害モデルマウスにおいて著しく増加しており、セサミオイルの芳香を吸入投与した結果、緩やかな減少が認められた。一方、線条体におけるDUSP-1の発現量はセサミオイルの芳香を吸入投与した場合に、有意な発現量の減少が認められた。海馬におけるDUSP-1の発現レベルは、30分吸入群で増加していたが、60分と90分の吸入群では発現レベルが減少した。一方、線条体では、30分および60分吸入後に発現量が有意に減少し、この傾向は90分吸入群でも観察された(図2)。

#### (3) セサミオイルの芳香成分の同定

本研究で使用したセサミオイルの揮発性成分の定性分析は、SPME-GC-MSで行った。セサミオイル中から多数の複素環アミンが検出された。検出された成分の中で、セサミオイルの特徴的な芳香成分である、2,5-dimethylpyrazine、2-methoxy phenol、furfuryl mercaptanの単独投与試験を以下に実施した。

#### (4) 単一成分の吸入投与の抗不安様効果

睡眠障害モデルマウスに各々の単一成分、およびセサミオイルの芳香を30分間、吸入投与した。セサミオイル群のオープンアーム進入率は65.8%、2,5-ジメチルピラジン群は83.3%、2-メトキシフェノール群は88.2%であった。しかし、フルフリルメルカプタンの効果は弱まり、オープンアーム進入率は22.6%にとどまった。同様に、2,5-ジメチルピラジン群(479.7秒)および2-メトキシフェノール群(519.4秒)のオープンアーム滞在時間はセサミオイル群(312.7秒)より長かったが、フルフリルメルカプタン群(118.3秒)は有意に短かった。これらの結果から、2,5-ジメチルピラジンと2-メトキシフェノールがセサミオイルのストレス緩和作用に関与する有効成分であることが示唆された(図3)。

#### (5) ストレスバイオマーカーに対する単一成分の作用

睡眠障害モデルマウスに2,5-ジメチルピラジン、2-メトキシフェノール、またはフルフリルメルカプタンを90分間、吸入投与した。線条体および海馬のDUSP-1発現レベルは、2,5-ジメチルピラジンおよび2-メトキシフェノール群で有意に低下した。一方、フルフリルメルカプタンの効果は他の2つの化合物よりも低く、発現量は減少する傾向にあったが、有意差は認められなかった(図4)。以上の結果から、2,5-ジメチルピラジンと2-メトキシフェノールに強い抗ストレス作用(睡眠障害の改善効果)を見出した。今後の研究から、アロマセラピーにおけるセサミオイルや活性成分の活用が睡眠障害の対処法として有効利用されることが期待される。

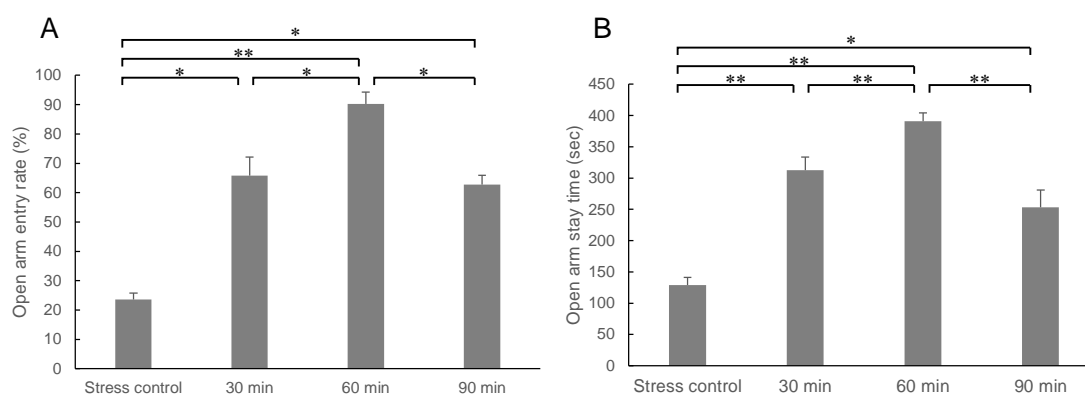


図1. セサミオイルの芳香の吸入投与後の高架式十字迷路試験

(A) オープンアーム侵入率(%), (B) オープンアーム滞在時間(秒)。結果は平均値 ± SEM で表した (n=6)。\* p<0.05、\*\* p<0.01 (Tukey's test)。

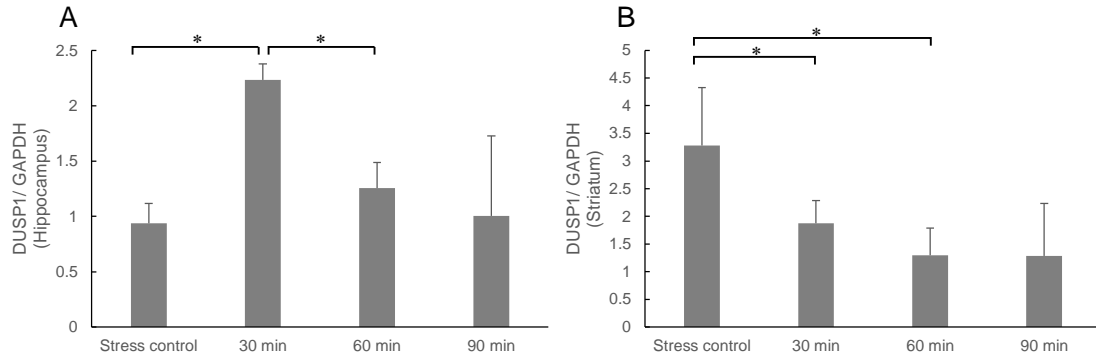


図2 . セサミオイルの芳香の吸入投与後の海馬 (A) と線条体 (B) における DUSP1 の発現レベル  
結果は平均値  $\pm$  SEM で表した (n=6) , \*  $p < 0.05$  (Tukey ' s test )

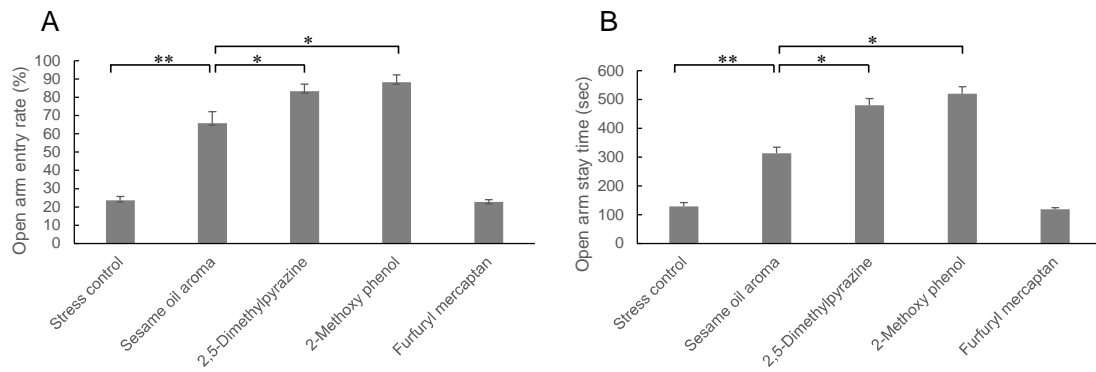


図3 . 単一成分の吸入投与後の高架式十字迷路試験  
(A) オープンアーム侵入率 (%) , (B) オープンアーム滞在時間 (秒) . 結果は平均値  $\pm$  SEM で表した (n=6) , \*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  (Tukey ' s test )

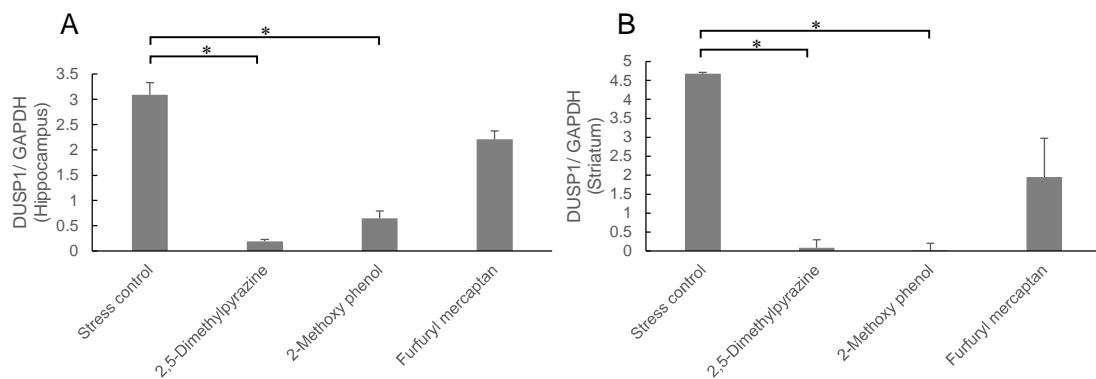


図4 . 単一成分の吸入投与後の海馬 (A) と線条体 (B) における DUSP1 の発現レベル  
結果は平均値  $\pm$  SEM で表した (n=6) , \*  $p < 0.05$  (Tukey ' s test )

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroaki Takemoto, Yuki Saito, Kei Misumi, Masaki Nagasaki, Yoshinori Masuo	4. 巻 27
2. 論文標題 Stress-Relieving Effects of Sesame Oil Aroma and Identification of the Active Components	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2661
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27092661	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 -

1. 著者名 Hiroaki Takemoto, Chiharu Take, Keito Kojima, Yamato Kuga, Tomoya Hamada, Tomoka Yasugi, Nanami Kato, Kazuo Koike, Yoshinori Masuo	4. 巻 25
2. 論文標題 Effects of Sesame Oil Aroma on Mice after Exposure to Water Immersion Stress: Analysis of Behavior and Gene Expression in the Brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5915
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules25245915	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------