

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号： 32607  
 研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2009～2011  
 課題番号： 21500659  
 研究課題名（和文） 補気・理気生薬の自律神経調節機能評価と抗ストレス食品・化粧品素材の開発  
 研究課題名（英文） The evaluation of plant-derived materials for the usefulness in relaxation and stress management.  
 研究代表者  
 小林 義典（KOBAYASHI YOSHINORI）  
 北里大学・薬学部・教授  
 研究者番号： 60367414

研究成果の概要（和文）：ミカン科の生薬「呉茱萸」および沖縄在来柑橘「カーブチー」の精油成分による芳香刺激は、運動能力に影響せずに、用量依存的にマウス自発運動量を低下させた。本作用は鎮静効果が知られているラベンダー精油と同等以上であった。呉茱萸精油は拘束ストレスで上昇した血清コルチゾール値を顕著に低下させた。一方、カーブチー精油は、ベンゾジアゼピン受容体を介して、ペントバルビタール睡眠の導入短縮・睡眠延長効果を示した。上の結果から、呉茱萸精油およびカーブチー精油が嗅覚の刺激を介してリラックス作用を示すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The dry fruit of *Euodia ruticarpa* (syn. *Evodia rutaecarpa*, Rutaceae) is an aromatic crude drug prescribed in Kampo medicine. Kabuchii (*Citrus keraji* var. *kabuchii* hort. ex Tanaka, Rutaceae) is one of peculiar Okinawan citrus fruits. The vaporized essential oils of these fruits dose-dependently reduced the spontaneous motor activity in the open field test, without affecting the forced motor activity in the rotarod performance test. These effects were comparable to lavender essential oil. In addition, immobilization stress strongly increased serum cortisol, and the Evodia oil remarkably reduced it. The Kabuchii essential oil have shown diazepam-like sleep improving effects in pentobarbital test.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 1403 健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード： ①漢方処方 ②食品 ③ストレス ④生理学 ⑤薬学

## 1. 研究開始当初の背景

現代の日本社会は、高齢化、対人関係、災害や不景気など家庭的、社会的、経済的な生

活環境の変化に起因する心因ストレスに溢れており、自律神経失調症、うつ病、神経症、心身症、動脈硬化、高血圧、脳血管障害など

心因ストレスが関与する生活習慣病やうつ病の発症が重大な問題となってきた。漢方医学では、このような場合、生体システム全体のバランスを重視し、その失調状態を“気血水”の病能として認識する。中でも“気”は、生命活動の機能的側面を司り、生体の機能的・精神的活動を維持する働きがあるとされており、現代風に解釈すると自律神経系の調節機能に相当する部分が大い。しかし、不定愁訴や自律神経失調症、心身症などの治療に有効であるとされている漢方製剤の科学的な評価“エビデンス”はまだ十分ではなく、その有効成分も明らかになっていない。これらの漢方処方には、補気・理気作用を有する生薬が配合されており、これらは古来より人々が体感できる効果を有しているものとして選抜されてきたと考えられる。そこで我々は、本研究を実施することにより、これらの生薬およびそれを配合する漢方処方を科学的に評価することにより、漢方処方の有効性に関する科学的根拠を得るための研究の一端を推進すると共に、本当に病気になる前の未病の状態で、気軽に利用できて精神的・身体的に健全な生活を維持するのに役立つ食品や化粧品素材とその簡便な評価方法を開発すること目的として、本研究を実施する。

## 2. 研究の目的

研究は、(1)急性ないし慢性ストレスを負荷したマウスにおける自律神経調整機能の変調を行動薬理学およびテレメトリーシステムを利用して、心拍、体温、血流、行動などの変化から総合的に解析できる評価系を構築する。(2)本系を活用して補気・理気作用を有する生薬の抗ストレス・抗うつ効果を評価し、不定愁訴に対する有効性や抗うつ効果が期待されている漢方処方の有用性の科学的根拠を取得するとともに、抗ストレス・抗うつ作用を有する食品や化粧品素材およびその簡便な評価方法を開発することを目的とする。(3)活性の認められた素材を、健常人におけるボランティア試験で評価する。

## 3. 研究の方法

### ①精油の「香り」による効果の評価系構築

精油成分0.003~0.3 mgを小型ホットプレートにより揮発・充満させた円筒型ケージ(高さ22 cm × 直径25 cm)内にマウスを投入し、マウスに精油試料を吸入させ、オープンフィールド試験における移所ストレス負荷時の自発運動量、ロータロッド試験における運動能力及びペントバルビタール睡眠延長試験において、vehicle群(トリエチルケトン酸)及びDiazepam投与群と比較し、評価した。ケージの容積は1079 cm<sup>3</sup>であるので

試料0.3mgを全て揮発させた場合の濃度は約30mg/m<sup>3</sup>となる。

### ②オープンフィールド試験

ケージ交換による軽度のストレスによって誘発される自発運動活性を、赤外線センサーを備えた自動計測システムを用いて解析した。

③ロータロッド試験は、回転する丸棒の上にマウスを乗せ強制的に歩行させる試験で、マウスが回転棒上での滞在時間により、運動能力の低下の有無を評価した。

④ペントバルビタール睡眠延長試験では、ペントバルビタール(30mg/kg, i.p.)投与したマウスを、精油成分を充満させた円筒型ケージ内に投入し、自動計測システム及びビデオカメラを用いてマウスの睡眠導入時間及び睡眠時間を解析した。

## 4. 研究成果

### (1)慢性テレメトリーシステムを活用した小動物におけるストレス評価系の構築について

マウスにおけるストレス負荷実験において、慢性テレメトリー装置を心拍変動解析装置と共に活用し、オープンフィールド試験、強制水泳試験、拘束、拘束水浸などによるストレス負荷時の自律神経系の変動の解析を試みたが、個体差が大きく、またセンサーが高価で十分な個体数を確保できなかったため、一定した結果を得るのが困難であった。また、各種ストレスホルモンの脳内、血液中濃度の変動についても解析を試みたが、本研究で採用した比較的マイルドで短期的なストレス負荷では、血液中コルチゾール以外は、安定した顕著な変化が認められなかった。脳内のストレスホルモンについては、これまで全脳で評価してきたが、部位別での測定を行うことによって、また血液についても血小板を分離することによって、感度・精度の向上を図っているところである。

一方、自発運動活性や低温負荷誘発冷えからの回復、ペントバルビタール睡眠に対し、ケージ交換や拘束水浸ストレスなどによるストレス負荷が、顕著な影響を及ぼすことが確認できた。そこで、これらの評価系を利用して、抗ストレス効果ができると予想される生薬・植物素材の評価を行った。

### (2)生薬「呉茱萸」精油の香気による鎮静効果について

呉茱萸(ゴシュユ)(ミカン科 *Evodia sp.*の果実)は特有な芳香を放つ生薬で、平安時代

の宮中では重陽の節句に邪気を払うために呉茱萸の実を袋に詰めた茱萸囊を飾る習慣があった。呉茱萸には、古来より、気を下し、鬱結を宣散し、肝気鬱滞（気分のふさいだ状態、神経症など）を治す作用があるとされてきた。我々は、これらの作用に芳香成分が大きく関わっていると考え、定量的に精油を揮散させたケージ内におけるマウス行動薬理実験系を構築し、その鎮静効果、抗ストレス効果を検討するとともに、活性成分の同定を試みた。

呉茱萸果実の水蒸気蒸留によって得られた精油を試料とし、ホットプレートを用いて精油を充満させた円筒型のケージ内にマウスを投入した。マウスはケージ交換されると、新奇環境に曝されたストレスによって、探索行動が誘発され、自発運動量が一時的に増加する。本研究ではこの自発運動量を指標にして、精油の鎮静効果・抗ストレス効果を解析した。

呉茱萸精油を3~300 $\mu\text{g}/\text{cage}$ の範囲でマウスケージ内に揮散させた結果、用量依存的にマウスの自発運動量を低下させた。この自発運動量低下作用は鎮静効果を有することが知られているラベンダー精油と同等以上であった。また、この自発運動量低下作用は $\text{ZnSO}_4$ 処理で臭覚を破壊することによって消失した。

しかし、単に自発運動量が低下するだけでは、「鎮静効果がある」とは言い切れない。そこで、ロータロッド試験によって、筋弛緩や運動機能障害などによって運動能力が低下していないか調べた。ロータロッド試験は、回転する円柱上にマウスを載せ、円柱から落ちずに留まっている時間を測定し、バランス能力および持久力を評価する試験である。ゴシユ精油は、300 $\mu\text{g}/\text{cage}$ を投与しても運動能力の低下は示さなかった。

さらに、呉茱萸精油は拘束ストレスによって上昇した血清コルチゾール値を顕著に低下させた。

以上の結果から、呉茱萸精油が嗅覚の刺激を介して鎮静作用を示すことが示唆された。

また、呉茱萸精油をGC/MS分析した結果、精油中の主要成分は *trans*-ocimene、myrcene、*cis*-ocimene および linalool であった。これらの成分の自発運動量に及ぼす効果を検討したところ、*trans*-ocimene と linalool が強い鎮静作用を示した。

### (3) 沖縄在来柑橘カーブチー精油の香気による鎮静効果および睡眠改善効果について

カーブチー (*Citrus keraji* var. *kabuchii* hort. ex Tanaka、ミカン科) は、コミカン亜区の芳香類に属する沖縄在来の固有柑橘の一つである。その栽培は沖縄本島中部地域に始まり、現在では本部町の伊豆味地域が県内

第一の主産地であるが、大半は生食用として地元での消費、贈答用に使われている。果皮が厚く、爽やかな香気を有するのが特徴であるが、精油成分に関する報告はほとんどない。また、沖縄の栽培農家の人たちは、その香りでリラックスできると感じていると言うが、その鎮静効果に関する研究行われてない。

そこで、我々は、カーブチー精油の化学成分を精査するとともに、その鎮静作用を検討した。

カーブチーは、*d*-limonene および  $\gamma$ -terpinene を主要成分として含有していた。一般にアロマセラピーで用いられている柑橘系の精油と比較すると、 $\gamma$ -terpinene 濃度が高いことと、少量の thymol を含有することが特徴的であった。また、興味深いことに *p*-cymene に関しては、5.5%~4.8%と比較的多く含有するものと全く含有しないもの及びこれらの中間型の3タイプに分類された。カーブチー精油は、ロータロッド試験には影響することなく、オープンフィールド試験における自発運動量を低下させ、またペントバルビタール睡眠試験においては、用量依存的に睡眠導入を早めると共に、睡眠時間を延長させる効果を示した。これらの結果から、カーブチー精油が鎮静効果を有することが示唆された。

精油を構成する各成分の活性を検討したところ、カーブチーに特徴的な成分である  $\gamma$ -terpinene が主要な活性成分であった。 $\gamma$ -terpinene は、オープンフィールド試験における自発運動量を減少し、また、ペントバルビタール睡眠試験においては、睡眠時間を統計的に有意に延長し、かつ睡眠導入時間を有意に短縮した。また、この効果は Diazepam 1 mg/kg 腹腔内投与とほぼ同等の効果であったが、この用量の Diazepam はロータロッド試験において顕著な運動能力の低下を示した。なお、*d*-limonene、*p*-cymene は効果を示さなかったが、thymol は  $\gamma$ -terpinene には劣るものの同様の効果を示した。

カーブチー精油、 $\gamma$ -terpinene、thymol 30~3000 $\mu\text{g}/\text{cage}$ の範囲でマウスに吸入投与したペントバルビタール睡眠試験の結果、最も効果の見られた精油投与量は 300 $\mu\text{g}/\text{cage}$ であった。なお、呉茱萸精油は、本系においては、特に顕著な作用は示さなかった。

カーブチー精油および  $\gamma$ -terpinene の作用機作を検討する目的で、GABA<sub>A</sub> 受容体阻害剤 flumazenil の前処理を行ったところ、ペントバルビタール睡眠試験における効果が顕著に抑制された。これらの結果から、カーブチー精油の作用には diazepam と同様に GABA<sub>A</sub> 受容体が関与することが示唆された。

以上、本研究において、初期の不安障害やストレスを軽減し、ストレス関連性疾患に防ぐ補充療法としてカーブチーによるアロマ

セラピーの有効性が示唆された。また、その作用機作にはベンゾジアゼピン系薬物と同様に GABA<sub>A</sub> 受容体が関与することが示唆された。

Diazepam などベンゾジアゼピン系薬物は鎮静薬、抗不安薬、睡眠薬などとして、汎用されているがその副作用が問題となっている。カーブチー精油は、安全で手軽な代替療法として、期待できよう。

#### (4) 補気・理気生薬の自律神経調節機能評価について

以上の実験結果から、緩和なストレス負荷と、オープンフィールド試験やペントバルビタール睡眠試験を組み合わせることによって、効率よく自律神経調節系に影響を及ぼす植物素材を見出すことができた。

今後、本系において、より多く補気・理気作用が期待できる生薬の効果を検証して行きたい。

#### (5) 健常人におけるボランティア試験による抗ストレス・鎮静効果の評価について

マウスにおける実験結果から、一般的なアロマセラピーにおける使用法で充分効果が期待できると考えられる呉茱萸精油やカーブチー精油を見出すことができた。しかし、ヒトでの効果を検討するには至らなかった。

今後、健常人を対象として、ヒトにおける効果を検証して行きたい。

#### 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 3 件)

① 小林義典、竹元裕明、菅田佳奈子、府子琪、浅田善久、呉茱萸精油の香気による鎮静効果、AROMA RESEARCH、査読有、Vol. 50、No. 12/02、2012、p. 53-59

<http://www.fragrance-j.co.jp/>

② 小林義典、カプサイシン受容体に作用する薬用ハーブ成分の生理活性、aromatopia、査読無し、No. 107、vol. 20、no. 4、2011、p. 28-32

<http://www.fragrance-j.co.jp/>

③ 小林義典、香りの科学～ちよっぴり学問的に香りのことを勉強してみましよう～第三十二回 薬用ハーブ紹介「ゴシユユ精油」、Column 香羅夢、査読無し、No. 63、2012、in press

<http://www.jaa-aroma.or.jp/>

[学会発表] (計 8 件)

① Yoshinori Kobayashi, Kanako Sugata, Hiroaki Takemoto, Yoshihisa Asada The Sedative Effects of Volatilized Essential Oil from the Evodia Fruit, The 50th Anniversary Meeting of the American Society of Pharmacognosy、平成 21 年 6 月 29 日、ホノルル

② 菅田 佳奈子、竹元裕明、小林義典、浅田善久、呉茱萸精油の吸入による鎮静効果、日本生薬学会第 56 回年会、平成 21 年 10 月 4 日、京都

③ 菅田佳奈子、竹元裕明、浅田善久、小林義典、呉茱萸精油の吸入による鎮静効果、AKPS 集会第 6 回北里化学シンポジウム、平成 21 年 10 月 15 日、神奈川

④ 府子琪、竹元裕明、金城幸隆、小林義典、沖縄在来柑橘カーブチー果実の精油成分分析と吸入法による鎮静効果の検討、日本生薬学会 第 57 回年会、平成 22 年 9 月 25 日、徳島

⑤ 府子琪、清水絵美子、竹元裕明、小林義典、金城幸隆 沖縄在来柑橘カーブチー果実の精油成分分析と吸入法による鎮静効果の検討 第 2 報、日本生薬学会 第 58 回年会、平成 23 年 9 月 24 日、東京

⑥ Yoshinori Kobayashi, Hiroaki Takemoto, Ziqi Fu, Emiko Shimizu, and Yukitaka Kinjo, THE DIAZEPAM-LIKE SEDATIVE EFFECTS OF VAPORIZED ESSENTIAL OIL FROM THE OKINAWAN KABUCHII CITRUS FRUIT, 2012 International Congress on Natural Products Research, 平成 24 年 7 月、ニューヨーク

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小林 義典 (KOBAYASHI YOSHINORI)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：60367414