

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

ラベンダー精油の基原と精油成分による抗不安作用の解析

東邦大学薬学部 高橋 瑞穂 ㊦

【背景・目的】

ラベンダー（ラバンデュラ属物（*Lavandula spp.*））は、地中海沿岸を原産とするシソ科（*Lamiaceae*）の常緑生低木である。ヨーロッパでは薬用植物としての歴史が古く、日々の生活に多くの恩恵をもたらしてきた植物である。ラベンダーから得られる精油、Lavender essential oil（LvEO）は、リラックス作用や心身の調子を整える効果によって、民間での利用が普及し、不安に対する作用は、医療や介護現場における活路も期待されている。一方、精油の吸入により向精神作用を期待する芳香療法では、作用発現の普遍性や再現性の担保が十分ではないために、LvEOの不安への効果は、“結論の一致を見ていない”と評されるなど、問題点も指摘される。LvEOの効果を最大限に活用するためには、有効性発現にバラツキを生じうる各因子についての追究、および、学際的評価による生理活性作用の全体像解明が重要である。そこで、LvEOの基原および精油成分と抗不安作用との関係を明らかにすることを目的として、前半では、効果の発現、特に再現性に影響を与えうる要因として精油側の因子に着目した。ラベンダーの形態学的な多様性と精油構成成分の違いが効果に影響を及ぼすのかを調べるため、不安関連行動評価を行った。また、確認されたLvEOの抗不安様作用を精油中の特定の成分に帰することが可能かを検討した。さらに、LvEOによる抗不安作用の発現に、不安や不安による行動との関連が注目されているセロトニン(5-HT)神経系が関与しているかを検討し、作用機序の解明を試みた。後半は、精油の効果発現に影響を与えうる要因として、摂取する側の状態に着目し、中等度のストレス負荷をかけた病態動物モデルと正常群との間で抗不安作用に差があるかを比較検討した。評価には、行動薬理学的アプローチに加え、ストレスマーカーとしての機能を期待されている脳内遺伝子およびタンパク質の発現量を解析する神経科学的アプローチを採択した。

【方法】

①ラベンダーの種差と化学成分に関する検討 関東近郊のラベンダー栽培地より、*Angustifolia* 系、*Hybrid*（*Lavandin*）系、*Stoechas* 系の3群に分類されるラベンダーについて種・品種・産地の異なる合計24種、それぞれ花部・茎・葉の試料を入手し、ヘキサン抽出により得られた試料についてGC/MS分析を行い、主要構成成分であるリナロール(LO)、酢酸リナリル(LA)の含有量・組成比を比較検討した。**②LvEO吸入による不安関連行動の評価** 基原植物が異なり、上記3群にSpike Lavender系を加えた計4群に分類される全6種のLvEO（仏産および西産、本邦にて購入）を対象として構成成分の解析を行った。（定性分析には、非極性キャピラリーカラムEquity-1を装着し、Claus 500GC/Claus 500 MSを使用、定量分析には、Equity-1を装着しGC2100 Plusを使用し水素炎イオン化検出器(FID)を用いた。不安関連行動の評価には、ICR系5週齢雄マウスに前述の6種の精油（4 μ L/L）を90分吸入投与後、高架式十字迷路(EPM)試験を実施した。**③不安関連行動と5-HT神経系活動性評価** 5-HTの前駆体である5-HTP（5-hydroxytryptophan）10 mg/kgをEPM試験の開始30分前に腹腔内投与し、5-HT神経系活性化状態でEPM試験を実施した。試験終了直後に断頭し、不安関連部位とされる前頭皮質、線条体、海馬の3分画における5-HT、ならびにその代謝物(5-HIAA)の濃度を蛍光HPLCにより測定し、代謝回転率(= [5-HIAA] / [5-HT])を神経系活動性の指標とした。次に、LvEO (*L. officinalis*) 吸入群、水吸入群（対照群）、ジアゼパム(DZP) 3mg/kg（ポジティブコントロー

ル) 腹腔内投与群と同様に EPM 試験を行い、代謝回転率を算出し 3 群間での結果を比較検討した。④水浸ストレス負荷モデルを用いた LvEO の活性評価 ICR 系 5 週齢雄マウスを、24 時間の水浸ストレス負荷および精油吸入の有無により 4 群に分け、精油 (or 水) 吸入投与後、各群において、EPM 試験による不安関連行動の変化、および、採取した脳におけるストレスに関連する脳内遺伝子発現量の変化を評価した。【mRNA の発現量評価】採取した脳を液体窒素中で粉碎後トータル RNA 抽出を行った。RT-PCR には、GeneAmp PCR System 9700 を用い、電気泳動後、定量を行った。【タンパク質の発現量評価 (免疫組織化学)】作成した切片標本 (海馬の歯状回部分) への前処理後、一次抗体 (GLK1 ab37796、BDNF H-117) との反応、ビオチン標識二次抗体液との反応を経て、ABC 液を添加し反応させた。DAB 液を添加し発色させ、クレシルバイオレット水溶液にて対比染色を行った。

【結果・考察】

①ラベンダーの種差と化学成分に関する検討 主要構成成分である LO および LA の分布を見ると、部位別では花部に、種別では、LO は Hybrid 系 (1.07 ± 1.41 mg/g)、LA は Angustifolia 系 (1.53 ± 1.90 mg/g) で最も多く分布していた。LvEO による抗不安作用の活性本体を LO に帰す既報に基づく、抗不安作用を応用するには Hybrid 系が優れていたと言える。一方の LA の含量は、精油の品質評価上で重要視されるが、今回の試料における組成比は、Angustifolia 系ではほぼ 0.5:1、Hybrid 系では 1:1 で、エステル含有率・量とも前者の方が高かった。全体的にバラツキが大きいことの原因に、どのような要因が影響しているのかを検討するため、試料採取場所の高度 (海拔) と主要 2 成分含有量との関係を調べたところ、海拔と LA 含有量との間に $r=0.65$ となる中等度の正の相関が確認された。

② LvEO 吸入による不安関連行動の評価 形態学上 4 系統に分類され、種の異なるラベンダー精油、計 6 種の解析結果を表 1 に示す。マウスを対象とした EPM 試験において、OA (オープンアーム) での滞在時間延長で示される抗不安様作用は、Spike Lavender 系に分類される *L.latifolia* で最大であった。この種における LO と LA の組成比は、およそ 2.5 : 1 であり、本邦で採取した試料では、長野県池田町の Hybrid 系 *L. intermedia* 'Grosso' の組成比に最も近い。次に、6 種の LvEO 中の LO、LA、LO+LA の含有率と上述の抗不安様作用との関係を検討すると、LO 単独よりも、LO と LA とが共存した場合の方が相関は大きく、両者の含有率の和と抗不安様作用との間に、統計学的に有意な相関が認められた ($r=0.82, p < 0.05$)。さらに、LO 単独、LA 単独、LO+LA 混合 (混合比は、LI における LO:LA 比に近い 2:1 とした) 群に分類しそれぞれの抗不安様作用を比較した実験により、LO と LA との混合は、抗不安様作用の発現において相乗的に作用している可能性が示唆された。

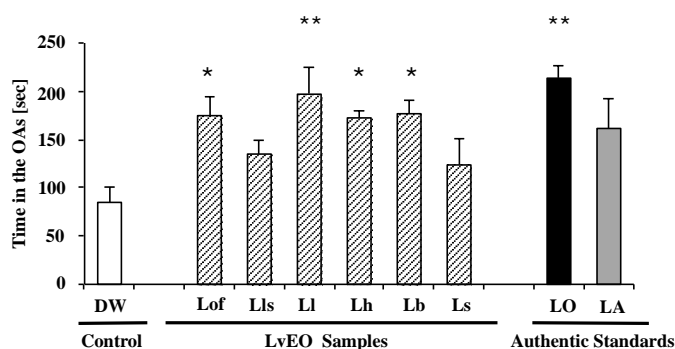


図 1. 6 種のラベンダー精油吸入時の EPM 試験結果 ※ Mean ± SEM **: $p < 0.01$ vs. control (DW: 蒸留水)

表 1. *Lavandula* 属植物 6 種から得られた精油の成分組成

Compound	Quantitative Data (g/L)						
	Lof	Lls	Ll	Lh	Lb	Ls	
	Angustifolia	Latifolia		Lavandin (Hybrid)		Stoechas	
1	α -Pinene	0.5	9.4	—	2.9	1.9	13.8
2	Camphene	0.6	3.4	0.5	1.8	1.9	17.6
3	β -Pinene	—	10.0	—	3.0	—	1.4
4	3-Octanone	3.1	—	—	—	9.1	—
5	β -Myrcene	2.6	3.1	2.0	4.5	3.1	—
6	<i>p</i> -Cymene	0.5	1.5	—	1.0	—	3.7
7	Limonene	—	—	2.4	—	—	—
8	1,8-Cineol	13.3	147.9	5.6	44.1	39.3	119.9
9	β -cis- <i>O</i> cimene	10.3	2.4	2.8	3.9	5.7	—
10	β -trans- <i>O</i> cimene	6.5	—	2.1	1.5	14.3	—
11	<i>cis</i> -Linalool oxide	1.5	—	1.1	—	—	—
12	Fenchone	—	—	—	—	—	339.6
13	<i>trans</i> -Linalool oxide	1.0	—	1.3	—	—	—
14	Linalool	233.2	384.0	344.8	244.9	370.7	6.5
15	Camphor	9.2	114.2	161.7	58.6	46.9	246.3
16	Borneol	18.0	13.0	6.8	22.6	22.0	—
17	Lavandulol	—	—	—	trace	—	—
18	Telphin-4-ol	6.8	4.8	—	28.8	3.5	—
19	α -Terpineol	10.1	7.7	4.6	13.2	—	—
20	Linalyl acetate	311.0	—	131.0	207.9	383.3	—
21	Bornyl acetate	—	—	—	—	—	19.8
22	Lavandulyl acetate	18.3	—	3.1	18.1	12.9	—
23	Myrtenyl acetate	—	—	—	—	—	22.7
24	Neryl acetate	2.1	—	1.2	2.5	—	—
25	Geranyl acetate	5.3	—	2.2	—	—	—
26	β -Caryophyllene	24.2	15.5	7.9	11.6	11.6	2.1
27	β -Farnesene	6.0	4.6	3.8	9.4	7.7	—
28	Germacrene D	—	—	1.4	—	—	—

Lof: *Lavandula officinalis*, Lls: *L. latifolia spica*, Ll: *L. latifolia*, Lh: *L. hybrida*, Lb: *L. burnatii super acetate*, Ls: *L. stoechas*

③不安関連行動と5-HT神経系活動性評価

両者の関連を明らかにするため、EPM試験30分前に5-HTPを腹腔内投与し、5-HT神経系の活動性を亢進させEPM試験を実施した。その結果、不安関連パラメータであるOA滞在時間に減少傾向が認められた(図2.)。5-HTP投与による一過性の5-HT上昇は、不安行動を“誘発”あるいは増強させたことを示しているものと考えられる。この時、5-HTP投与群の5-HT代謝回転率が、対照のDW吸入群と比較し有意に上昇しており(図3. $p < 0.01$)、5-HTP投与による5-HT神経系活性化状態は、十字迷路における不安行動を促す方向に働くことがわかる。図2には、この試験系でポジティブコントロールとされるジアゼパムとLvEOをそれぞれ腹腔内投与、吸入投与した場合のOA滞在時間を示したが、両者とも、対照群より有意に上昇しており、顕著な抗不安様作用が認められる(ともに $p < 0.01$)。一方、代謝回転率をみると、対照群に比し、有意な低下が確認され($p < 0.01$)、LvEOは5-HT神経系の機能を低下させる方向に働いていると判断される。この点については、ポジティブコントロールとしたDZPでも同様の傾向が見られており、LvEOによる5-HT神経系の活性低下作用が、精油の直接的作用によるものなのか、ベンゾジアゼピン系の作用機序($GABA_A$ /BDZ系)を介したものであるのか、今後確認が必要である。

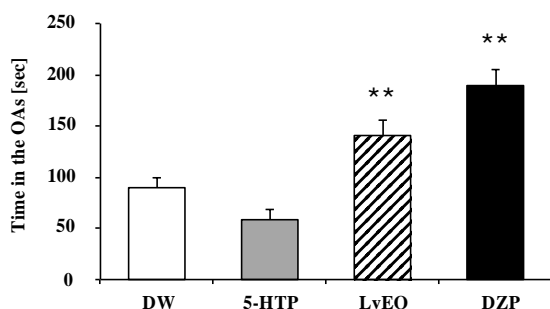


図 2. 5-HTP、LvEO 投与マウスにおける EPM試験結果
※ Mean±SEM **: $p < 0.01$

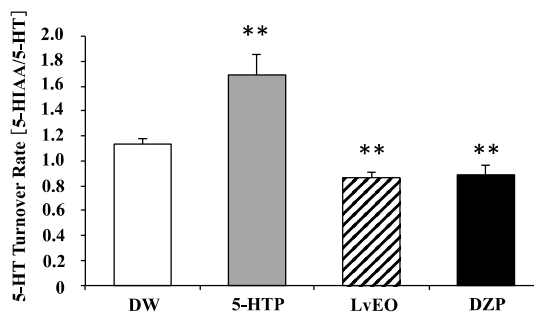


図 3. 5-HTP、LvEO 投与マウスにおける 5-HT 代謝回転率
※ Mean±SEM **: $p < 0.01$

④水浸ストレス負荷モデルを用いたLvEOの活性評価

行動薬理試験において、LvEO吸入群ではストレス負荷の有無によらず、LvEO/Stress(-)、LvEO/Stress(+)の両群で抗不安様作用が認められたが、その効果は、ストレス負荷群においてより顕著であった(図4A)。次に、遺伝子発現量の解析では、ストレス負荷によりNGFR mRNA(図4B)およびArc mRNAの発現レベルに顕著な低下が認められたが、LvEOの吸入はこの変化を逆転させており、LvEOが、ストレスによる遺伝子発現レベルへの影響を消失させていたことが示された。GLK1は、既報により、ストレスの存在により発現量が上昇する傾向にあることが示されているが、今回の評価でも同様の結果が得られた(図4C)。さらに、ストレス負荷によるGLK1発現レベルの上昇が精油吸入群では認められなかったことから、精油の吸入がストレス負荷による影響を緩和したものと考察される。一方、ストレス負荷なしの精油吸入群(LvEO/stress(-)群)において、ストレスレベルの上昇を示す結果が得られた。(図4B)。この結果は、LvEOがストレスレスラーとして働いていたことを示唆するものであり、LvEOの効果は、対象動物のストレスレベルに対応し、作用の方向性が変化する可能性のあることが示唆された。

【結語】LvEOの基原と精油成分による抗不安作用について

検討した結果、(1)形態学的分類による系統間及び系統内に、量的・質的な含有成分の相違が認められ、抗不安様作用にも顕著な影響がみられた、(2)LvEO吸入による抗不安様作用発現には、従来活性本体とされてきたLOに加えLAの共存が必要で、両者は相乗的に作用している可能性がある、(3)LvEOによる抗不安様作用には、5-HT神経系の機能を低下させる(代謝回転を低下させる)作用が寄与している、(4)LvEO吸入によって現れる不安関連行動ならびに脳内遺伝子・タンパク質発現量の変化は、対象動物が置かれたストレスレベルに応じその方向性が変わりうる点が明らかとなった。精油の構成成分は、形態学的分類をはじめ種々の要因で変化しうるものであり、“効果”という観点での品質管理が重要であると考えられる。また、期待する作用を特定の成分に帰することができる今回のような場合には、それらの最適な配合比を求める等して規格化を図り、標準化を進めることが効果発現の再現性に繋がるだろう。対象動物の状態により精油の作用の方向が変化しうるという結果は、精油の利用や効果の検証時に、被験者の状態を明確に分類・統制した上で実施すべきであることを示唆している。こうした点は、LvEO以外の精油とその作用についても応用ができるものであり、近年注目されている補完代替医療(CAM)をはじめ、医療や介護の場における利用を考慮する際にも、有用な知見になりうると期待している。

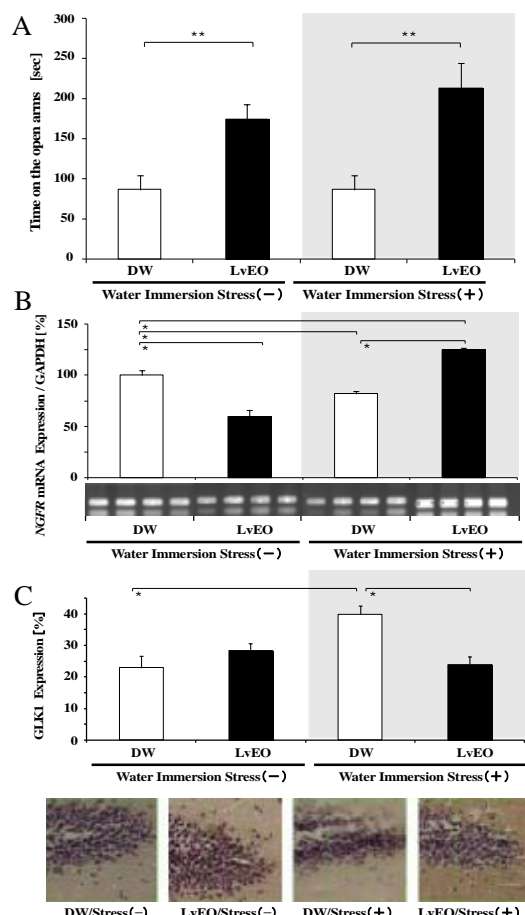


図4. ストレス負荷による情動行動と脳内遺伝子・タンパク質発現量の変化にLvEOが及ぼす影響
A: 情動行動における変化. B: 遺伝子(NGFR mRNA)発現量における変化. C: タンパク質(GLK1)発現量における変化
※ Mean±SEM *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

【対象論文】 Takahashi M et al., *Nat Prod Commun.* 6(11): 1769-74. 2011
Takahashi M et al., *Nat Prod Commun.* 7(11): 1539-44. 2012
Takahashi M et al., *Nat Prod Commun.* 9(7): 1023-26. 2014

論 文 審 査 結 果

高橋瑞徳氏 学位論文

「ラベンダー精油の基原と精油成分による抗不安作用の解析」

ラベンダー精油は抗不安作用を有するとされ、不安の解除などを目的にラベンダー精油を用いたアロマセラピーが民間療法として利用されている。ラベンダー精油が抗不安作用を示すことについては、動物を用いた行動薬理的試験により証明されてきたが、メディカルアロマセラピーとして臨床応用を推進していくためには、メカニズムに関するエビデンスの蓄積が重要である。一般にアロマセラピーで使用される精油の成分は単一なものではなく、多成分系であるために基原植物の種類に基づいた構成成分の量および存在比の違いが効能効果の差として出現する可能性が指摘されている。本研究で対象としたラベンダー精油についても、産地や栽培環境により精油の構成成分に差異が生じると考えられるが、ラベンダー精油の基原植物であるラバンデュラ属植物には 39 種が存在することに加えて、品種改良を目的とした交配により新たな栽培種も増え続けているという事実も知られている。高橋氏は、ラベンダー精油をメディカルアロマセラピーとして効果的に使用するためには、入手および利用可能な基原植物と構成成分との関係を明確にし、さらに構成成分と薬理作用およびメカニズムとの関連性を神経薬理的に解析する必要があると考えて研究を進め、学位論文「ラベンダー精油の基原と精油成分による抗不安作用の解析」にまとめている。本論文は、(1) 基原植物の種による違いと構成成分との関係、(2) 基原植物の種による抗不安作用の効力の違いと抗不安作用のメカニズム解析、および(3) 精油の作用発現に及ぼすストレスの影響、の 3 点を中心に構成されている。

第 1 章では、基原植物と構成成分との関係を明らかにすることを目的として検討を進めている。関東近郊のラベンダー栽培地でフィールド調査を行い、*Angustifolia* 系、*Hybrid (Lavandin)* 系および *Stoechas* 系の 3 系統から 24 種の植物サンプルを採取し、花部、茎部および葉部よりヘキサン抽出した各試料を GC/MS 分析した。その結果、主要構成成分であり、従来から抗不安作用との関連性が指摘されているリナロールと酢酸リナリルの含有量とその組成比は 24 種の植物サンプルの間で大きな差異が認められることを示した。また、産地証明がなされている精油試料を用いた検討においても、系統及び産地が異なる 6 種類の試料で同様な結果が得られている。以上の結果より、基原植物の系統の相違と生育環境の両者が精油成分の含有量とその組成比に影響すると考察している。ラバンデュラ属植物が品種改良を含めて多くの異なる種で構成されている事実に関する認知度は非常に低く、市販品の“ラベンダー精油”の全てが同列扱いられていることが現状である。フィールド調査と産地証明がなされている精油試料を用いた前述の試験成績は、ラベンダー精油をアロマセラピーとして効果的に使用する上で十分に配慮すべきポイントと考えられる。また本章におけるキラルカラムを用いた検討で、リナロールの光学異性体組成比はサンプル間での差異が小さく、*Stoechas* 系のサンプルを除き、95%以上が (-) 体で構成されていたことを明らかにしている。

第 2 章では、基原植物の違いと抗不安作用との関係を明らかにすることを目的に、第 1 章で用いた 6 種の精油試料をマウスに吸入させ、抗不安作用を高架式十字迷路試験により検討している。ラベンダー精油吸入によりオープンアーム滞在時間が延長したため、ラベンダー精油による抗不安作用が本実験系で認められたが、この作用出現には上述した主要 2 成分両者の存在が不可欠であり、両者の含有率の和との間に有意な正の相関があることを示している。さらに、リナロールと酢酸リナリルをマウスに吸入させた実験において、リナロールと酢酸リナリルの組成比を 2:1 とした場合に、各々を単独で吸入させた場合の効果をしのご作用があることを見出している。最適な配合比については今後の検討課題であるが、精油における多成分の化合物の配合比を最適化することや規格化を進めることにより、ラベンダー精油をアロマセラピーとして効果的に使用することが可能になると期待される。本章ではさらに、精油による抗不安作用の機序を明らかにする目的で神経生理学的な手法を用いて検討を進めている。その結果、ラベンダー精油吸入後に高架式十字迷路試験で認められる抗不安様作用発現時に、線条体や海馬においてセ

ロトニン代謝回転率が低下し、セロトニン神経系機能が低下する可能性を示しており、その作用はジアゼパムに類似していると述べている。これらの試験成績はラベンダー精油吸入による効果発現のメカニズム解明に新たな糸口を与えるものである。

第3章では、マウスにおけるラベンダー精油の抗不安作用がストレス負荷条件の有無により影響しうるかを検討している。高架式十字迷路試験では水浸ストレスの有無にかかわらずラベンダー精油の吸入によりオープンアーム滞在時間が延長することが確認された。さらに、近年にストレスマーカーとして報告されている **nerve growth factor receptor (NGFR)** の mRNA レベルと **galactokinase 1 (GLK 1)** のタンパク発現レベルの変化を検討したところ、ストレス負荷により **NGFR mRNA** の減少と **GLK 1** の増大が認められたが、ラベンダー精油の吸入によりこれらの変化が打ち消されることが示された。一方、ストレスを与えない条件でラベンダー精油を吸入させたところ、**NGFR mRNA** の減少と **GLK 1** の増大傾向が認められ、ラベンダー精油によるこれらの作用はストレス負荷の有無により逆方向に向かうことも示されている。これらの結果を統合的に解釈することは本研究で得られた情報のみでは難しい点もあるが、精油摂取者が置かれている状況に応じてラベンダー精油による抗不安作用の効果に差異が生じる可能性を示しているものと考えられる。ラベンダー精油が健常人だけでなく高度なストレス条件下にある人などの幅広い層で利用されている点を考慮すると、精油の効果的な臨床応用を考える上で重要な知見と思われる。

高橋氏による上記の一連の研究結果は、3報の学術論文として公表済みである。これらの報告および申請論文の内容は、高橋氏が目的としたラベンダー精油の適正使用に大きく貢献するものであるとともに、アロマセラピーで使用される他の多くの精油の効果やその有効利用法に関する研究に対しても幅広く適用可能な方法論を示しており、価値ある知見を与え得るものと考えられる。以上より、高橋氏の申請論文を博士（薬学）の授与に値するものと判断する。

平成27年6月24日
高原 章