

氏名	ふじさわ たかこ 藤澤 貴子		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1865 号		
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	Effects of inhaled linalool on anxiety-related behaviors and frontal cortical serotonin levels in mice （吸入リナロールのマウスにおける抗不安作用および前頭皮質セロトニンレベルに及ぼす効果）		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	岩本 隆宏
	（副査） 福岡大学	教授	秋吉 浩三郎
	福岡大学	講師	津川 潤

内 容 の 要 旨

【目的】

アロマセラピーは、エジプト、アラビア半島、ヨーロッパなどで古くから行われてきた伝統医学・民間療法の一形態であり、心身のリラクゼーションやストレスの緩和などを目的として、様々な植物由来の精油が用いられている。香りによる不安の軽減は、現行の薬物療法の補助的な手段と考えられ、一般的に広く利用されている。精油の香気成分は複数の化学物質から構成されており、その効果について様々な研究が行われている。今回我々が実験に用いたリナロールは、ラベンダー等いくつかの芳香族植物種の精油の主要な揮発性成分である。先行研究ではリナロールの鎮静作用、抗不安作用、抗うつ作用、社会相互作用の増加・攻撃行動の減少効果などが報告されているが、精油の吸入が感情や行動を変化させる脳内のメカニズムに関する研究は乏しいのが現状である。本研究では、高架式十字迷路試験を用いた行動解析実験を行い、不安に関連すると考えられる脳領域である PL-PFC（内側前頭前野前辺縁皮質）の脳内セロトニン濃度をマイクロダイアリシス法によって測定し、マウスにおけるリナロールの吸入による抗不安作用の機序や、リナロールの吸入による脳内伝達物質への影響の機序を調べた。

【対象と方法】

36 匹の雄 C57BL / 6N マウス (6 週齢) をリナロール吸入群 12 匹、ジアゼパム注射群 12 匹、対照群 12 匹にランダムに振り分け実験を行った。実験はプラスチック製コンテナの

中にアルミ製のパンチングボードで2重底を作った装置の中で実施した。リナロール吸入群では完全揮発した際にコンテナ内のリナロール濃度が1mg/Lとなるよう、2重底の下にリナロールを滴下した濾紙片を置き蒸散させた。ジアゼパム注射群では、ジアゼパムを10mg/kgの濃度となるよう腹腔内注射を行った。マイクロダイアリシス法では、マウスを定位固定装置に固定後に微小透析ガイドカニューレをPL-PFCの該当部に埋め込み、骨アンカーねじや歯科用レジンを用いて頭蓋骨に固定し、処置前120分から処置後60分までの計180分間、10分ごとに連続的にマウスのサンプルを採取し、得られたサンプルを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)アッセイを行い、マウスの脳内セロトニン濃度を測定した。その後、行動実験として高架下十字迷路試験を行った。高架式十字迷路試験では、プラスチック製の十字型に交差した壁のないオープンアーム(30×5cm)、壁のあるクローズドアーム(30×5×25cm)、中央の正方形(5×5cm)で構成された装置を高さ60cmに設置したものを使用し、迷路上でのマウスの5分間の行動を記録し、自発的な運動量や不安感を評価した。

【結果】

高架式十字迷路試験では、総移動距離においてリナロール吸入群、ジアゼパム注射群、対照群の間に有意差は認められなかった。また、分散分析による比較では有意な結果が得られたため、Tukey-kramerのSD検定による群間比較を行ったが有意差は認められなかった。したがって鎮静効果を示すとは言えないと結論づけた。(ANOVA : $p=0.048$, Tukey-Kramer : $p=0.060$ (Sal vs Lin), $p=0.113$ (Sal vs Dzp), $p=0.949$ (DZP vs Lin))

また、リナロール吸入群では対照群と比較して開放腕での滞在時間が有意に増加した($P < 0.05$)。この傾向はジアゼパム注射群でも観察されたが、これは有意差を示さなかった。また、オープンアーム内の移動距離もリナロール吸入群とジアゼパム注射群で対照群に比べて有意に増加した($P < 0.05$)

マイクロダイアリシス実験では、処置前後の回収したサンプル中のセロトニン濃度を算出し、投与後のセロトニン濃度の変化を投与前と投与群間で比較した。その結果、ジアゼパム注射群では対照群に比べてセロトニンのピークが有意に増加していることが確認された一方、リナロールを吸入した群では、対照群に比べて優位ではないが、セロトニンピークの減少が認められた。

【結論】

まず、高架式十字迷路試験では、対照群と他の2群の間に総移動距離に有意差はなく、リナロール吸入群もジアゼパム注射群も行動実験時に鎮静効果を有していなかったことが示された。ベンゾジアゼピン系薬剤は通常、抗不安作用と鎮静作用があるが、本研究のベンゾジアゼピン系薬剤群では抗不安作用はあっても鎮静作用はなく、リナロール吸入群では、香りの拡散によりリナロールの効果が減衰するものの、吸入投与経路に

より比較的長時間の連続投与が可能であり、鎮静作用を伴わないことがわかった。

次にリナロール吸入群ではオープンアームでの滞在時間と移動距離が有意に増加し、対照群やジアゼパム注射群よりも強い抗不安作用を示した。リナロール吸入による抗不安作用は広く報告されているが、そのメカニズムは不明なことが多い。本研究では、対照群、ジアゼパム注射群、リナロール吸入群についてマイクロダイアリシス実験を行った。その結果、ジアゼパム腹腔内投与後の脳内セロトニン濃度は対照群に比べて有意に上昇していた。この結果は、先行研究で報告されているように、ジアゼパムの抗不安作用を反映している可能性がある。

一方、リナロール群の吸入期間中の PL-PFC における脳内セロトニン濃度は、対照群と比較して有意差はないものの、低下傾向にあった。リナロール吸入による抗不安作用は、5-HT_{1A} 受容体に関連したセロトニン作動性伝達ではなく、例えば GABA 受容体に関連した機序、あるいは海馬などの非 PL-PFC に関連しない機序に基づいている可能性が示唆される。したがって、これらのターゲットをさらに研究することで、アロマセラピー誘発性抗不安症のメカニズムの理解が深まると考えられる。

審査の結果の要旨

本論文は、リラクゼーション効果が期待されるアロマセラピーで使用される精油成分の一つであるリナロールについて、マウス行動観察による高架式十字迷路試験により抗不安作用を実験的に確認し、さらに、不安への関連が示唆されている内側前頭前野前辺縁皮質 (PL-PFC) 領域のセロトニン濃度をマイクロダイアリシス法により測定することで、その薬理効果を調べることを目的とした研究である。高架式十字迷路試験では、総移動距離 (鎮静作用の指標) においてリナロール吸入群、ジアゼパム注射群、対照群の間に有意差はなかったが、オープンアームでの滞在時間 (抗不安作用の指標) においてリナロール吸入群では、対照群と比較して有意な増加が認められた。一方、マイクロダイアリシス実験において、ジアゼパム注射群では処置後のセロトニン濃度が対照群と比較して有意に増加していたが、リナロール吸入群ではセロトニン濃度の減少傾向が認められた。

これらの結果から、リナロール吸入は鎮静作用を伴わない抗不安作用を示すことが実験的に示された。また、リナロール吸入による抗不安作用は、5-HT_{1A} 受容体に関連したセロトニン作動性伝達ではなく、例えば GABA 受容体に関連した機序、あるいは海馬などの PL-PFC 領域外の機序に基づく可能性が示唆された。

以下に本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭性、主な質疑応答の内容について記載する。

1. 斬新さ

アロマセラピーの抗不安作用については多く報告されているが、そのメカニズムについては十分な検討がなされていない。本研究では、精油成分の一つであるリナロールをマウスに吸入させ、マイクロダイアリシス法を用いて、PL-PFC 領域のセロトニン濃度に対する直接的な薬理効果を評価した最初の研究である。

2. 重要性

不安障害の治療では、従来の薬物療法では十分な効果が得られない場合や、特にベンゾジアゼピン系抗不安薬の副作用や依存の問題が存在している。アロマセラピーで使用される精油成分の一つであるリナロールの抗不安作用とそのメカニズムを検討することは、不安に対する治療やセルフケアの選択肢を増やすことにつながると考えられ、本研究の重要性は高いと考える。

3. 研究方法の正確性

本研究では、実験動物の不安関連行動を評価する実験系として汎用されている高架式十字迷路試験を用いて、さらに、不安への関連が示唆されている PL-PFC 領域のセロトニン濃度を測定するマイクロダイアリシス実験を併用して、精油成分の一つであるリナロールの抗不安作用を評価していることから、十分な正確性が担保されている。

4. 表現の明瞭性

研究の背景や実験目的、方法、結果については明瞭かつ分かりやすく記載されている。また、結果の考察に当たっては適切な統計学的手法を用いて評価している。

5. 主な質疑応答

以上の研究内容の説明に対して、審査員により研究方法、結果の解釈、臨床的な意義に関する質疑が行われた。下記のような質問があり、活発な討議が行われた。

Q：リナロール吸入において、実際にマウスがどれくらい吸入できているのか？また、吸入濃度はどのようにして決めたのか？

A：実験環境内のリナロール濃度（空气中）を直接測定することはできなかったため、先行論文を参考にして自然蒸発による吸入で一定の効果がでている濃度を実験に用いた。

Q：ジアゼパムの腹腔内投与量はどれくらいであったか？

A：10mg/kg であったため、論文の実験方法に記載する。

Q：ジアゼパムの腹腔内投与において、高架式十字迷路試験では鎮静作用が認められていないが、比較する群として適切であるか？

A: 本研究ではジアゼパム投与の 60 分後に高架式十字迷路試験を行っている。先行研究において、ジアゼパムの鎮静作用は 20 分程度で軽減することが報告されており、今回評価した投与 60 分後ではジアゼパムの鎮静作用が減弱した可能性がある。今後、理想的には、高架式十字迷路試験とマイクロダイアリス実験を同時に実施できるように検討していきたい。

Q: マイクロダイアリス実験で実際には PL-PFC 領域にプローブが刺入されていない場合はなかったか? 今後、実験の例数をさらに増やすと異なる結果が出てくる可能性はあるか?

A: 今回データに使用したサンプルについては実験後に断頭して、プローブの先端が PL-PFC 領域に刺入されていたことを確認している。例数の追加や実験技術が向上すると、より精度の高い実験が実施できると考えている。

Q: セロトニン系ではジアゼパムと異なる作用を示すと記載しているが、今後どのようにして実験を進めていくつもりか?

A: 今後、セロトニン以外のモノアミン系、アセチルコリンやノルアドレナリン、ドーパミンなどを測定したい。また、今回は PL-PFC 領域を対象としたが、今後は扁桃体や海馬など他の部位での測定も行っていきたい。

Q: GABA 系については測定しないのか?

A: GABA 系は非常に重要な脳内神経伝達物質であるため、今後、GABA 系も調べていきたい。

Q: リナロール吸入の 5-HT1A 受容体に対する影響について考察しているが、5-HT1B 受容体や 5-HT3 受容体に対する影響の可能性はないか?

A: 今後、それらの可能性も検討していきたい。

Q: 先行研究でもアロマセラピーにおいて脳内セロトニン濃度を測定しているものはあるのか?

A: 先行研究でも脳内セロトニン濃度を測定している実験はあるが、マイクロダイアリス法を用いて脳内セロトニン濃度を測定した実験は初めてである。

本論文は、リナロール吸入による抗不安作用を実験的に確認し、PL-PFC 領域のセロトニン濃度に対する影響をマイクロダイアリス法で測定した最初の研究である。内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭性及び主な質疑応答の内容の結果を踏まえ、審査員で討議の結果、本論文は学位論文に値すると評価された。