

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の拘束ストレスに 対するフィトンチッドの影響

川上 浩平, 下崎 俊介, 頓宮 美樹, 野村 正人,
小林 裕太, 並河 徹, 山田高也

Kohei KAWAKAMI, Shunsuke SHIMOSAKI, Miki TONGU, Masato NOMURA,
Yuta KOBAYASHI, Toru NABIKA, Takaya YAMADA

原 著

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) の拘束ストレスに
対するフィトンチッドの影響川上浩平¹⁾, 下崎俊介^{1,2)}, 頓宮美樹¹⁾, 野村正人³⁾, 小林裕太⁴⁾, 並河 徹⁵⁾, 山田高也¹⁾Kohei KAWAKAMI¹⁾, Shunsuke SHIMOSAKI^{1,2)}, Miki TONGU¹⁾, Masato NOMURA³⁾,
Yuta KOBAYASHI⁴⁾, Toru NABIKA⁵⁾, Takaya YAMADA¹⁾

(Received 3 July 2007 / Accepted 20 September 2007)

Summary

Phytoncides are volatile substances released from trees. They are mainly composed of organic compounds such as terpenoids. In this study, we examined whether phytoncides reduced stress response in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). Male SHRSP and Wistar rats were employed. To examine the response to restraint stress, rats were placed in the holders for the tail-cuff blood pressure measurement for 5h. Heart rate (HR), systolic blood pressure (SBP), and diastolic blood pressure (DBP) were monitored every 1h by the tail-cuff method (Softtron Inc). When the water immersion stress was applied, the rats were kept in warm water (30°C) for 4h. At the end of the experiments, the rats were sacrificed to evaluate gastric erosion histological. The results were as follows: 1) under the restraint stress, the blood pressure of SHRSP exposed to phytoncides was significantly lower than that of SHRSP without the exposure. Moreover, the plasma levels of adrenaline and noradrenalin were lower in the rats exposed to phytoncides. 2) Under the water immersion stress, SHRSP exposed to phytoncides showed less gastric mucosal lesions than those without the exposure. Based on these results, we concluded that phytoncides may have relaxing effects on SHRSP.

Key words: phytoncide, stress, SHRSP

緒 言

現代社会においてストレスは様々な疾患の原因となっている。生体に非特異的な刺激（ストレッサー）が加わるとき、その大きさによっては修復困難な心的外傷が生じる場合もある^[12,13]。ストレス状態における代表的な症状としては、胃潰瘍や過食症・拒食症を始めとする心身症が挙げられるが免疫機能の低下によって生じる二次的

な疾患や様々な神経症も重要である^[4]。このような中で人々が求めるものは精神的な安らぎであり、自然の香りでストレスを解消したいと思う人が増加している^[8,14]。

林野庁が「森林浴」^[3]という言葉を出して25年が経過した。近年では、森林浴がもつ快適性増進効果^[19]も広く国民に知られるようになり、森林のもつ癒し効果を活かした健康増進やリハビリテーションも注目されてい

1) 島根大学総合科学研究支援センター実験動物分野
〒693-8501島根県出雲市塩冶町89-1
Department of Experimental Animals, Center for
Integrated Research in Science, Shimane
University, 89-1 Enya-cho, Izumo 693-8501, Japan
2) 島根大学プロジェクト研究推進機構
〒690-8504島根県松江市西川津町1060
Research Project Promotion Institute, Shimane
University, 1060 Nishikawatsu-cho, Matsue 690-
8504, Japan
3) 近畿大学工学部生物化学工学科
〒739-2116広島県東広島市高屋町
Department of Biotechnology and Chemistry,

School of Engineering, Kinki University, Takaya-
cyo, Higashi-Hiroshima 739-2216, Japan
4) 島根大学医学部基礎看護学
〒693-8501島根県出雲市塩冶町89-1
Department of Fundamental Nursing, Faculty of
Medicine, Shimane University, Izumo, Shimane 693-
8501
5) 島根大学医学部病態病理学
〒693-8501島根県出雲市塩冶町89-1
Department of Functional Pathology, Faculty of
Medicine, Shimane University, Izumo, Shimane 693-
8501

る。この森林浴は、森林の自然を利用した大気浴の一種で、森林から分泌発散するフィトンチッドという揮発性の物質により精神的な安らぎを与えているとされている^[20]。このフィトンチッドの成分はテルペン類とよばれる有機化合物であり、生物活性を有する植物の二次的代謝成分である^[1]。

今までに著者らが行ったフィトンチッドに関する研究では、高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Rat, 以下SHR) にフィトンチッドを噴霧した場合、生体への悪影響は認められないことを確認した^[7]。

本研究では、このフィトンチッドがラットのストレスを緩和あるいは軽減するか否かを実証するためにストレス感受性が高い疾患モデル動物の脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rat, 以下SHRSP) を用いて、各種ストレスに対するフィトンチッドの影響について検討を行った。

材料および方法

1. 実験動物および飼育条件

実験には12週齢の雄性SHRSP/Izm (SLC, Inc.) および対照ラットとしてWistar (日本クレア) を用いた。飼育環境は室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、照明は12時間毎の明暗切り替え (7時点灯, 19時消灯) の条件下において飼育した。飼料は飼育繁殖用固形飼料 (MF, オリエンタル酵母製) を、飲水には水道水を自由摂取させた。居住環境は金網型ケージ (260W×330D×170Hmm, 夏目製作所製) の中に1匹飼育とした。

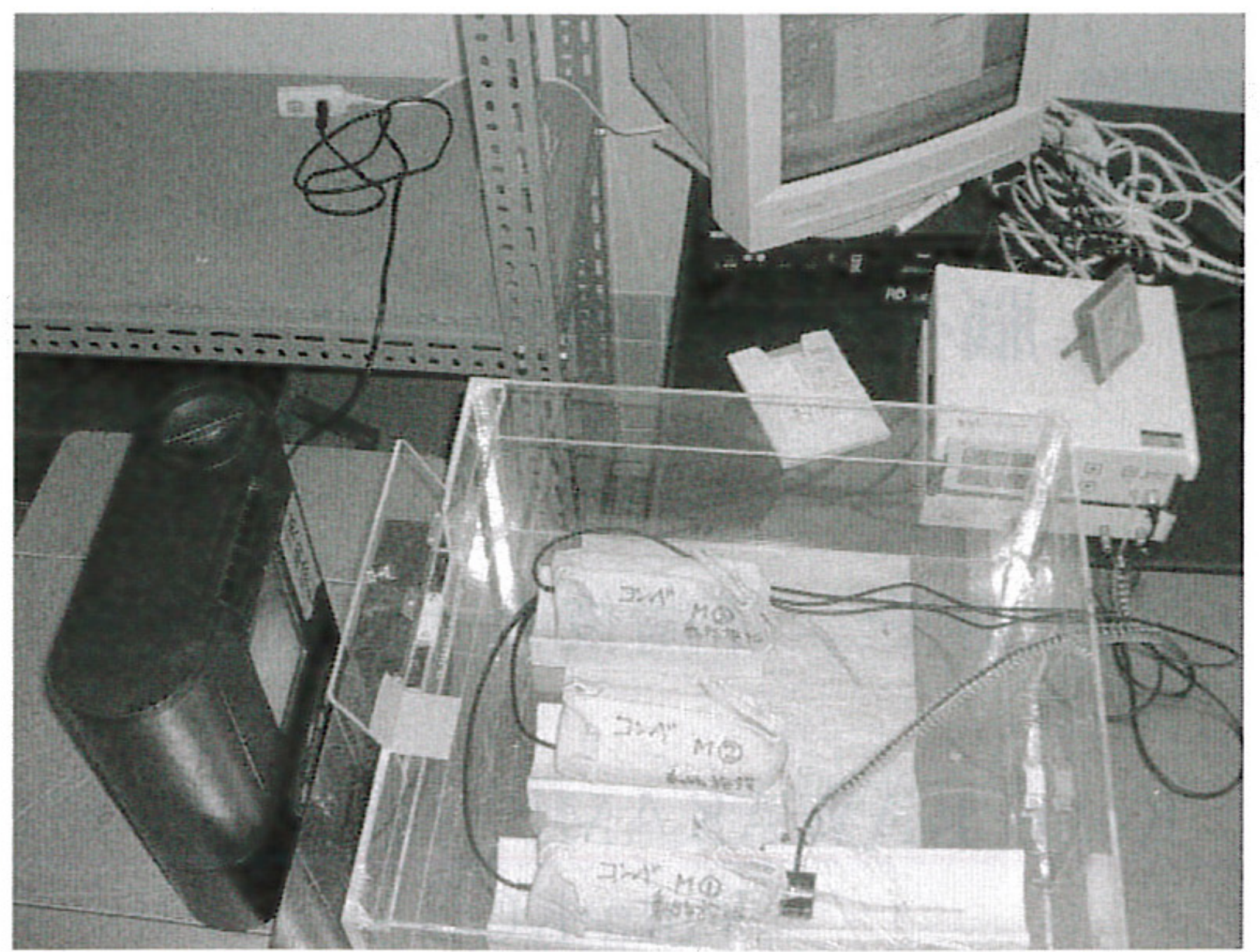
本実験は島根大学総合科学研究支援センター動物実験専門部会による承認を受け、動物の管理ならびに処置については島根大学動物実験に関する指針に従って行った。

2. フィトンチッド液

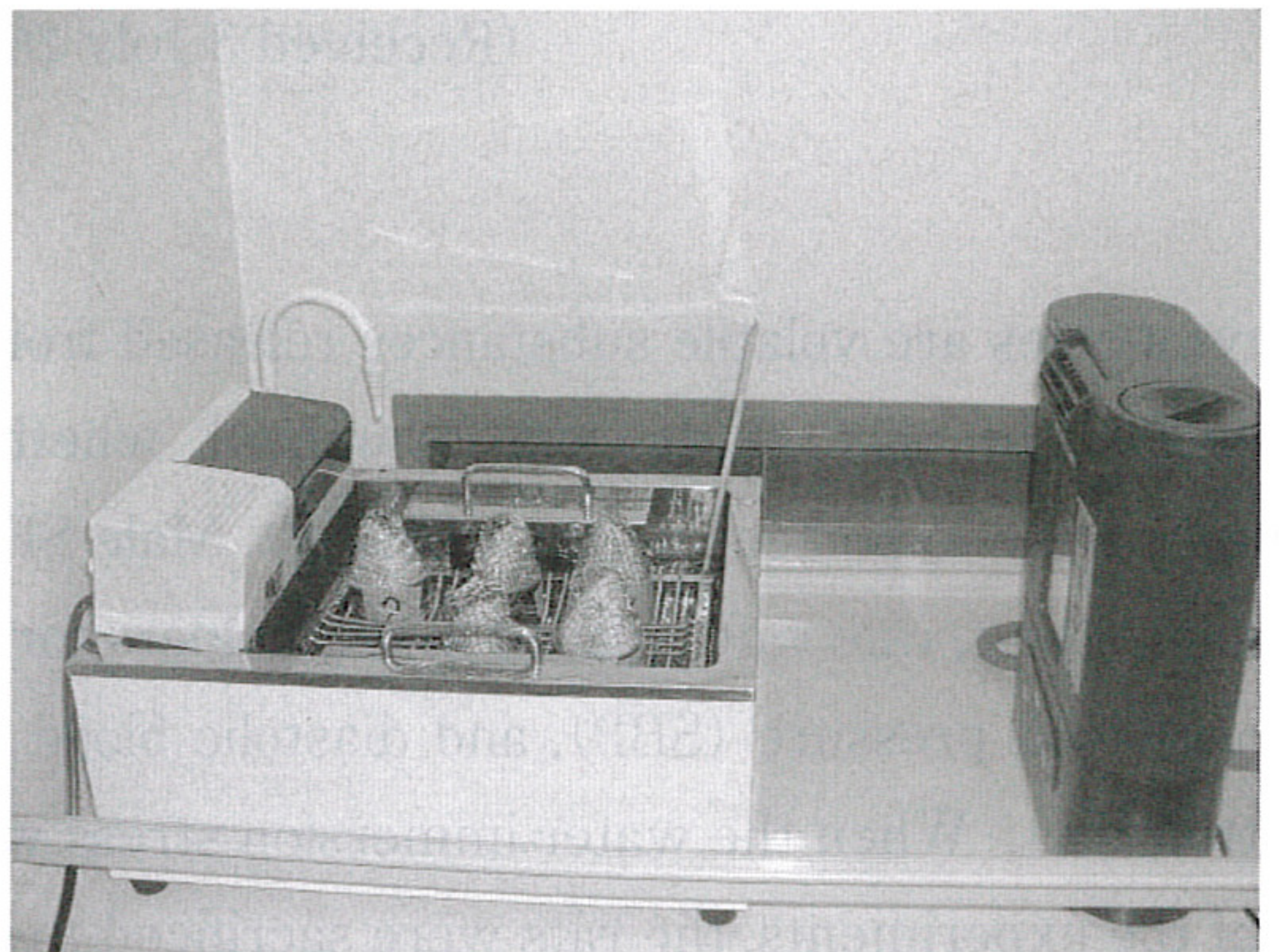
使用したフィトンチッド液 (PT-150, フィトン・タオ118製) は118種類の植物エキスを原料とし、各々の特性にあった抽出法で精製した混合液である^[1]。この主な成分であるテルペン類はD-limonene (18.7%), α -terpineol (15.2%), methyl salicylate (11.1%), 3-phenyl propenal (10.7%), α -pinene (7.3%) などである。

3. SHRSP/IzmおよびWistarにおける拘束ストレスに対するフィトンチッドの影響 (実験1)

SHRSP/Izm (n = 15) およびWistar (n = 12) を体



A. 拘束ストレス装置



B. 水浸拘束ストレス装置

図1 実験装置

重と血圧を基準に均等な各々2群に分けた。血圧測定用の布製ホルダー (70×70×170mm, ソフトロン製) を用いて動物を拘束し、透明の亚克力ケース内に設置した。5時間の拘束ストレスを負荷しながら、対照群に対しては蒸留水を、実験群に対しては前報^[6]と同様にフィトンチッドを1-2.3ppmで拡散器 (ファインミストマスター, フィトン・タオ118製) を用いて噴霧した (図1-A)。実験中はtail-cuff法による血圧測定を行い、心拍数 (Heart Rate, 以下HR), 収縮期血圧値 (Systolic Blood Pressure, 以下SBP) および拡張期血圧 (Diastolic Blood Pressure, 以下DBP) を1時間毎に測定した。実験終了時に尾静脈より採血を行い、10000r.p.mで20分間遠心分離を行った。得られた血漿は測定までの間、 -80°C で保存した。血漿中のカテコールアミン濃度はHigh Performance Liquid Chromatography (HPLC) により測定した。

4. SHRSP/Izmにおける水浸拘束ストレスに対するフィトンチッドの影響 (実験2)

水浸拘束ストレスは、岡部らの方法^[18]に従って行った。また、均一に噴霧ができるようにすべてドラフト

内 (1000×570×1000mm) に設置して排気ダクトを閉めて行った。SHRSP/Izm (n = 10) は体重を基準にして均一な 2 群に分けた。ラットは24時間絶食後に、金属製ホルダー (60×60×170mm, ウエダ製作所製) に入れ、30℃の恒温槽に剣状突起の高さまで浸して、水浸拘束ストレスを4時間負荷した (図1-B)。対照群は蒸留水を噴霧し、実験群はフィトンチッドを拡散器によって噴霧した。実験終了後、ラットをエーテル麻酔下で開腹して放血致死させ、胃の摘出を行った。1%ホルマリン10mLを噴門部より胃内に注入し固定を行った。固定された胃を大弯に沿って切開し生理的食塩水で洗浄後、粘膜標本を作成し測定のためデジタルHDマイクロスコープ (VH-7000, キーエンス製) で写真撮影した。粘膜標本の判定は津村の方法^[21]に準じて行った。すなわち、腺胃部の出血斑の個数は1mm²を1個と数えて数値化して、出血損傷の面積をデジタル測定し、一匹当たりの損傷の総和を損傷係数として比較を行った。

5. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で示した。平均値の差の検定はStudents t-testにより行い、p < 0.05を有意と判定した。

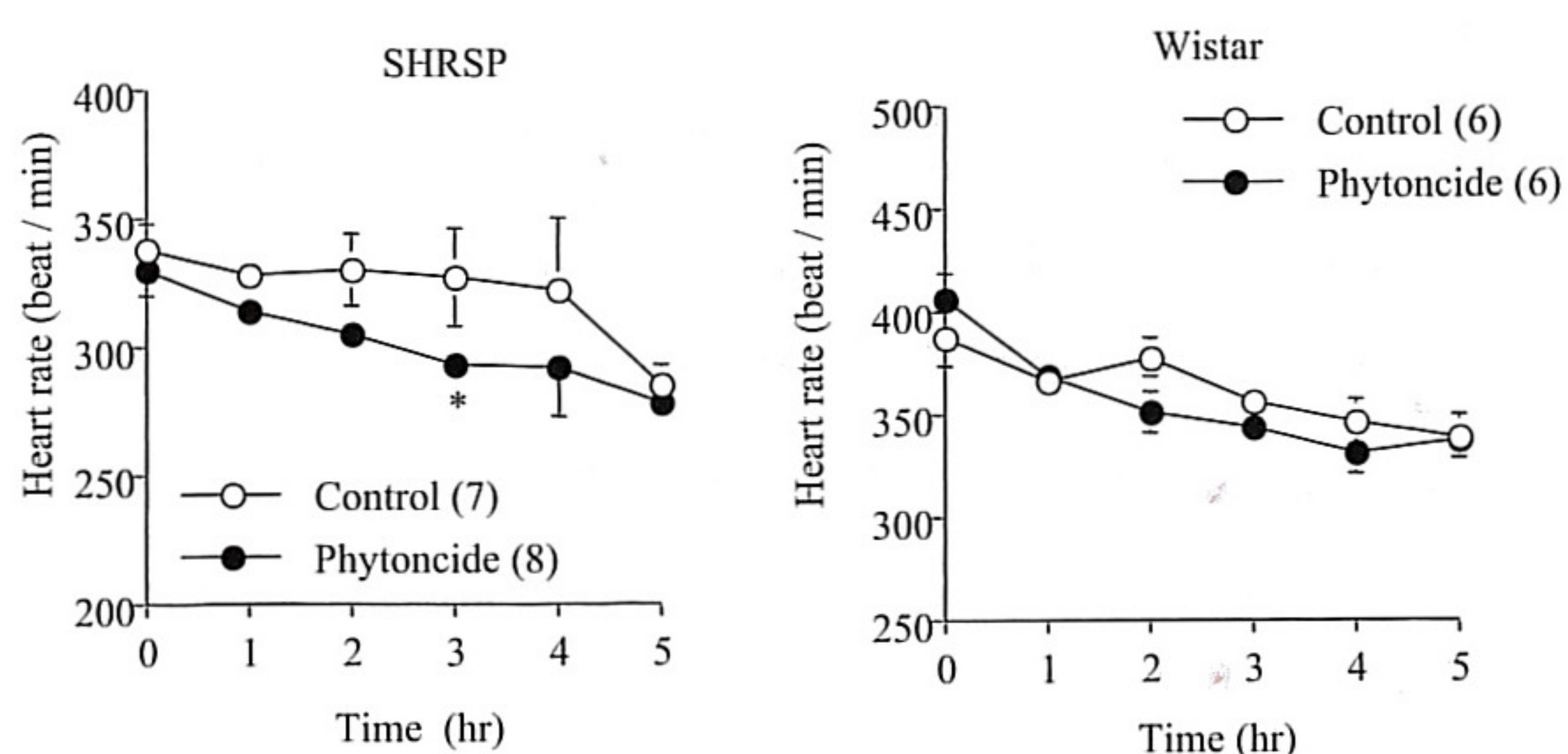


図2 拘束ストレス負荷状態によるラットの心拍数の変化
Mean ± SEM, * p < 0.05

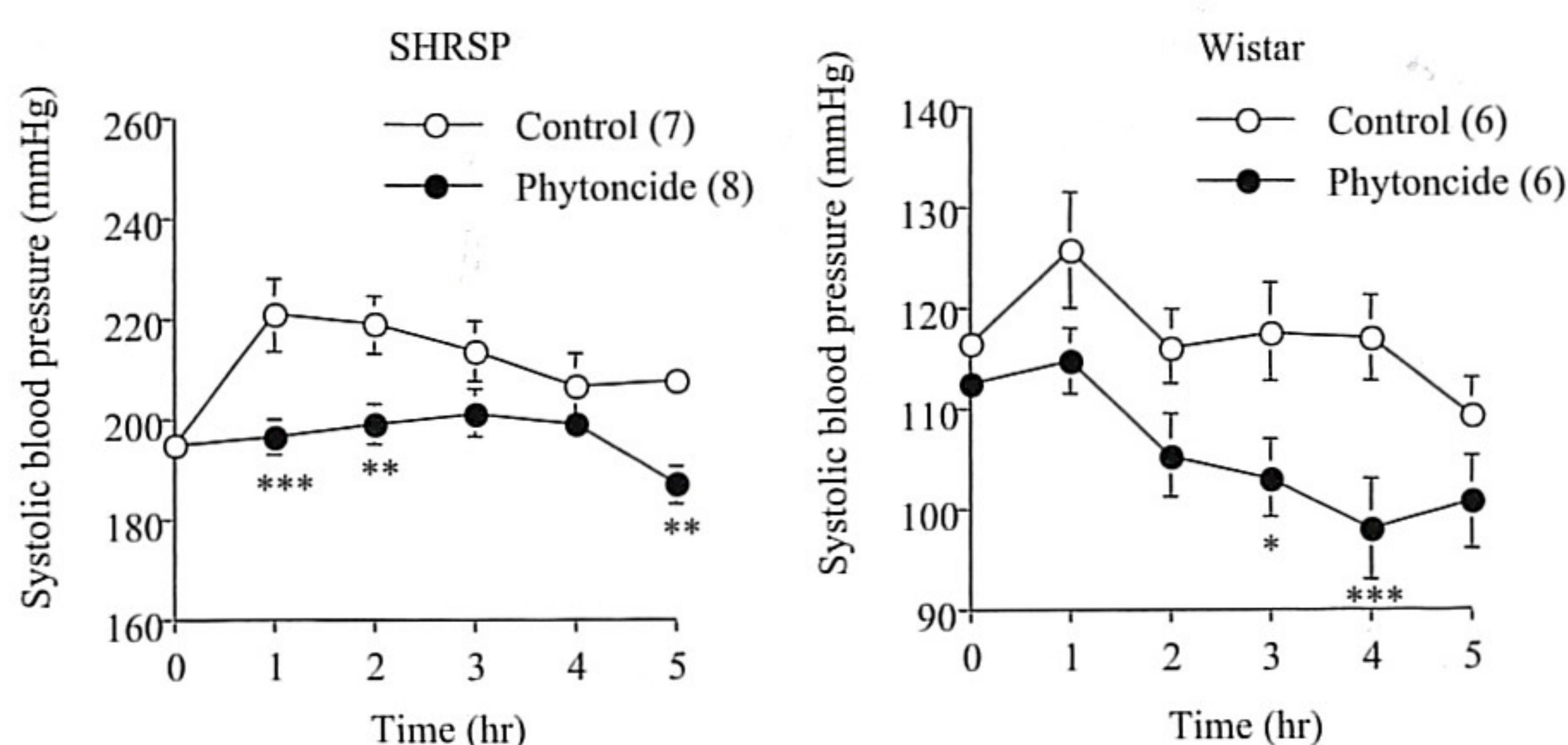


図3 拘束ストレス負荷状態によるラットの収縮期血圧の変化
Mean ± SEM, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

成績

1. SHRSP/IzmおよびWistarにおける拘束ストレスに対するフィトンチッドの影響 (実験1)

図2はHRを示した。SHRSP/Izmでは実験群が対照群に比べて低い傾向を示し、3時間後には有意差が認められた (p < 0.05)。Wistarでは実験群と対照群は同じ傾向を示し、有意差は認められなかった。両系統ともに拘束開始時より経時的に減少傾向を示した。図3にSBPを示した。SHRSP/Izmでは対照群が1時間後に20mmHg上昇し、その後、時間の経過に伴い緩やかな減少を示した。実験群は拘束中においても血圧上昇が殆ど認められず、対照群に比べて1時間後 (p < 0.001), 2時間後 (p < 0.01) および5時間後 (p < 0.01) に低く有意差が認められた。Wistarにおいても対照群は1時間後に約10mmHg上昇し、その後、緩やかな減少傾向を示した。実験群は対照群より低い傾向を示し、3および4時間後 (p < 0.001) に有意差が認められた。

図4にDBPを示した。SHRSP/Izmでは実験群が対照群に比べて1, 2および3時間後に低く有意差が認められた。Wistarにおいても実験群が対照群よりも低い値を示し、3および4時間後に有意差が認められた。血漿中カテコールアミン濃度を図5に示した。

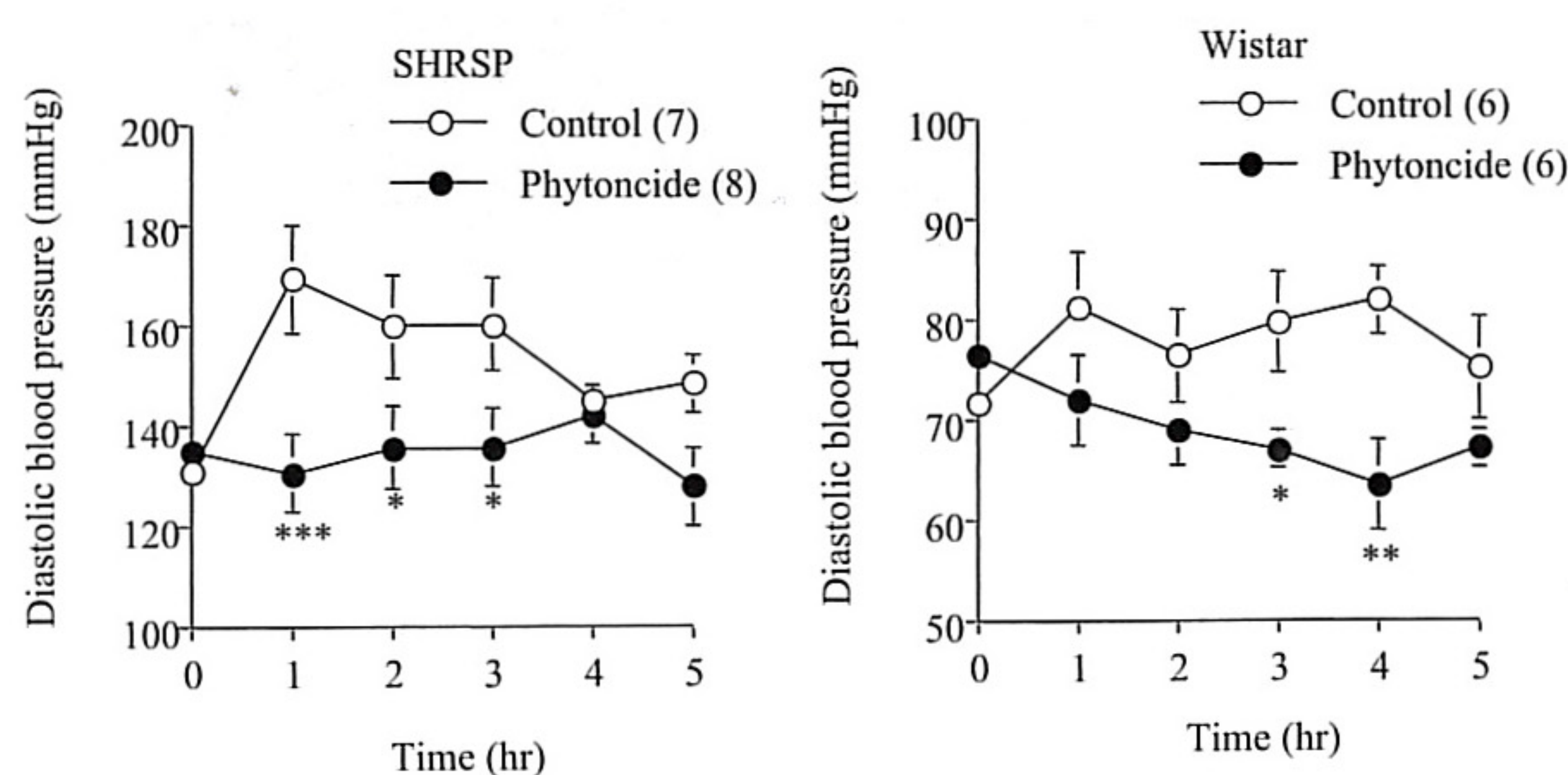


図4 拘束ストレス負荷状態によるラットの拡張期血圧の変化
Mean ± SEM, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

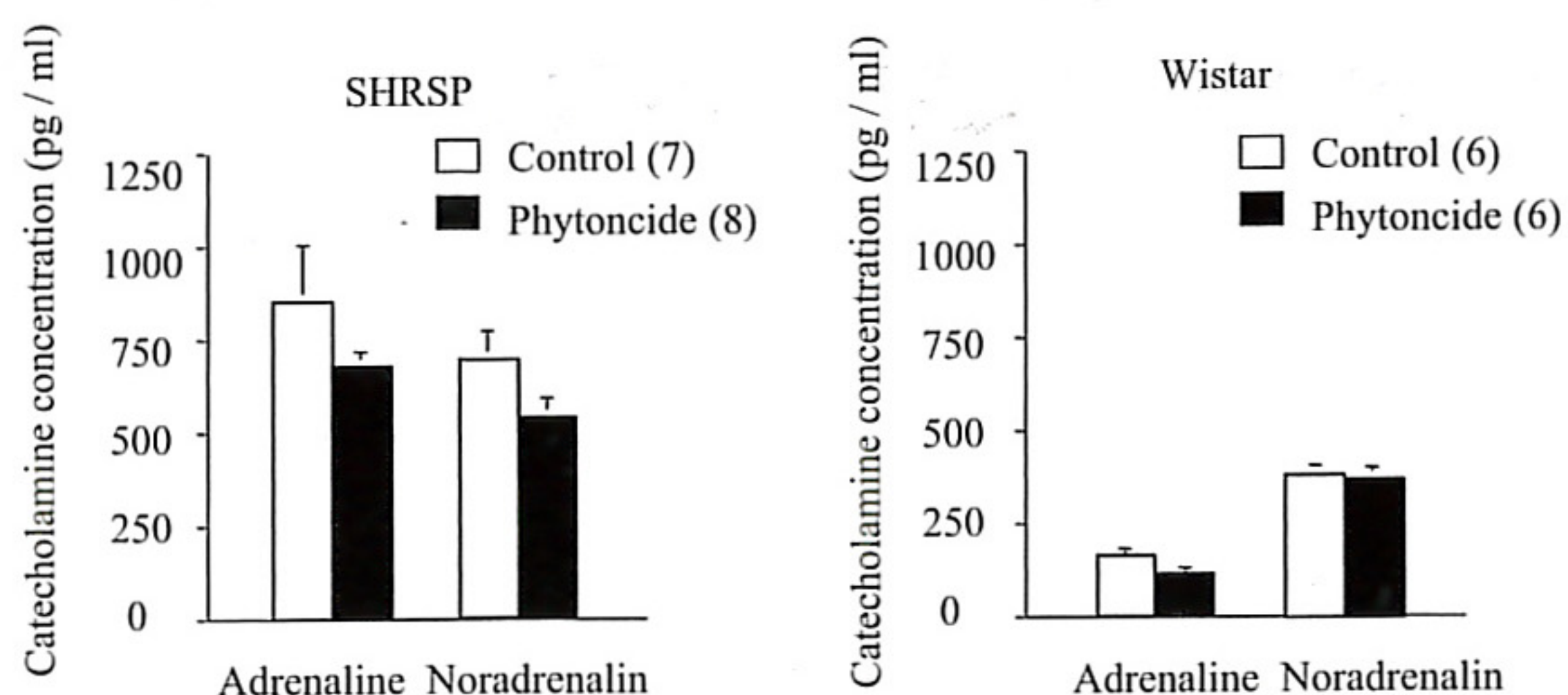


図5 拘束ストレス負荷状態によるラットの血漿カテコールアミン濃度
Mean ± SEM

SHRSP/Izmではアドレナリン濃度およびノルアドレナリン濃度ともに対照群と実験群の間には有意差は認められなかった。しかしながら、実験群は対照群より約20%の減少を示し低い傾向であった。Wistarでは実験群が対照群よりアドレナリン濃度が僅かに低い傾向を示したが有意差は認められなかった。ノルアドレナリン濃度は、実験群と対照群との間で差は認められなかった。

2. SHRSP/Izmにおける水浸拘束ストレスに対するフィトンチッドの影響 (実験2)

出血部位のあるSHRSP/Izmの対照群の胃粘膜標本を図6に示した。胃粘膜損傷と出血数を図7に示した。胃粘膜損傷は、対照群に損傷部位が多くみられたが、実験群は有意に減少していた ($p < 0.001$)。出血数は対照群と比較して実験群が少なく有意差が認められた ($p < 0.01$)。

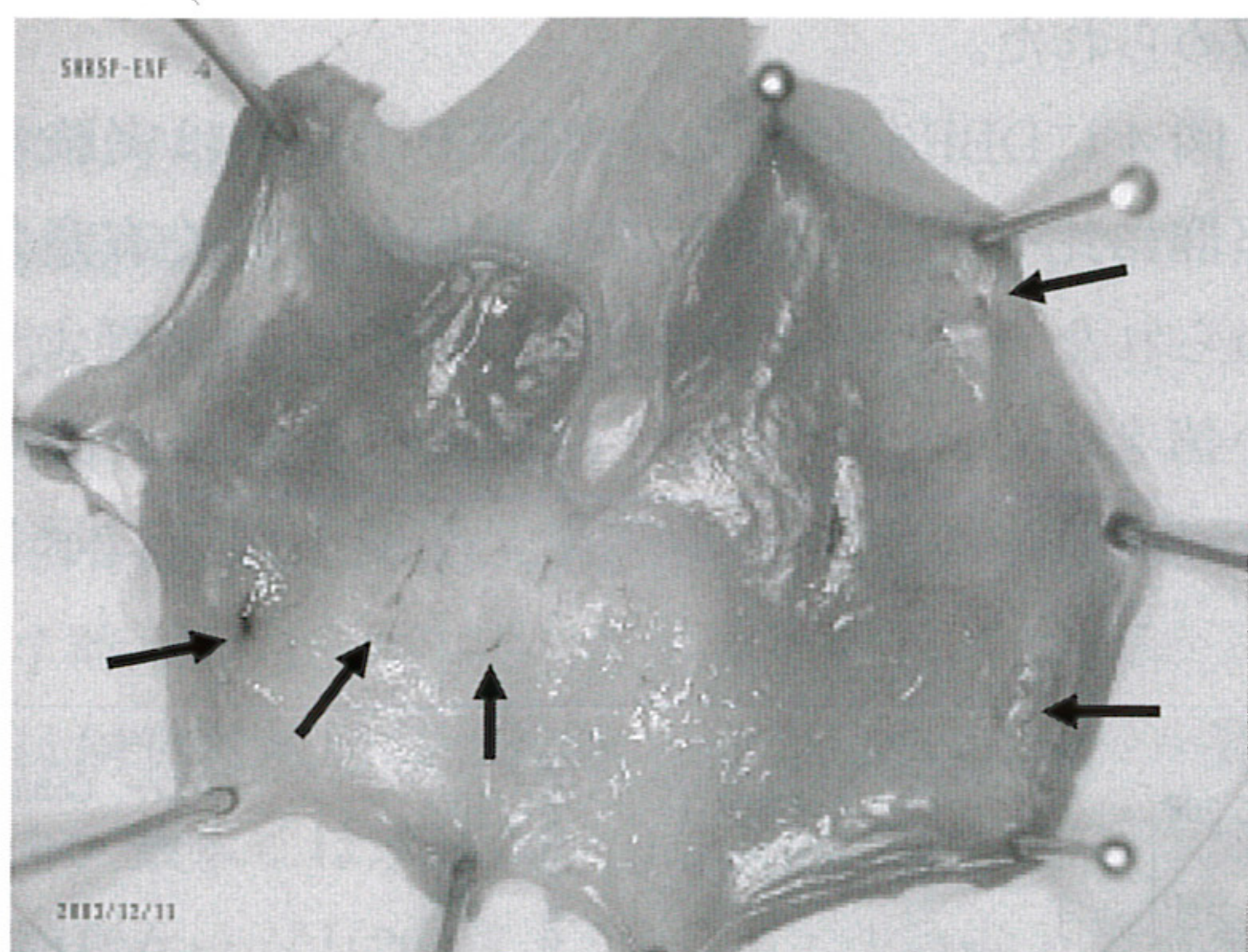


図6 胃粘膜の標本
矢印は出血部位

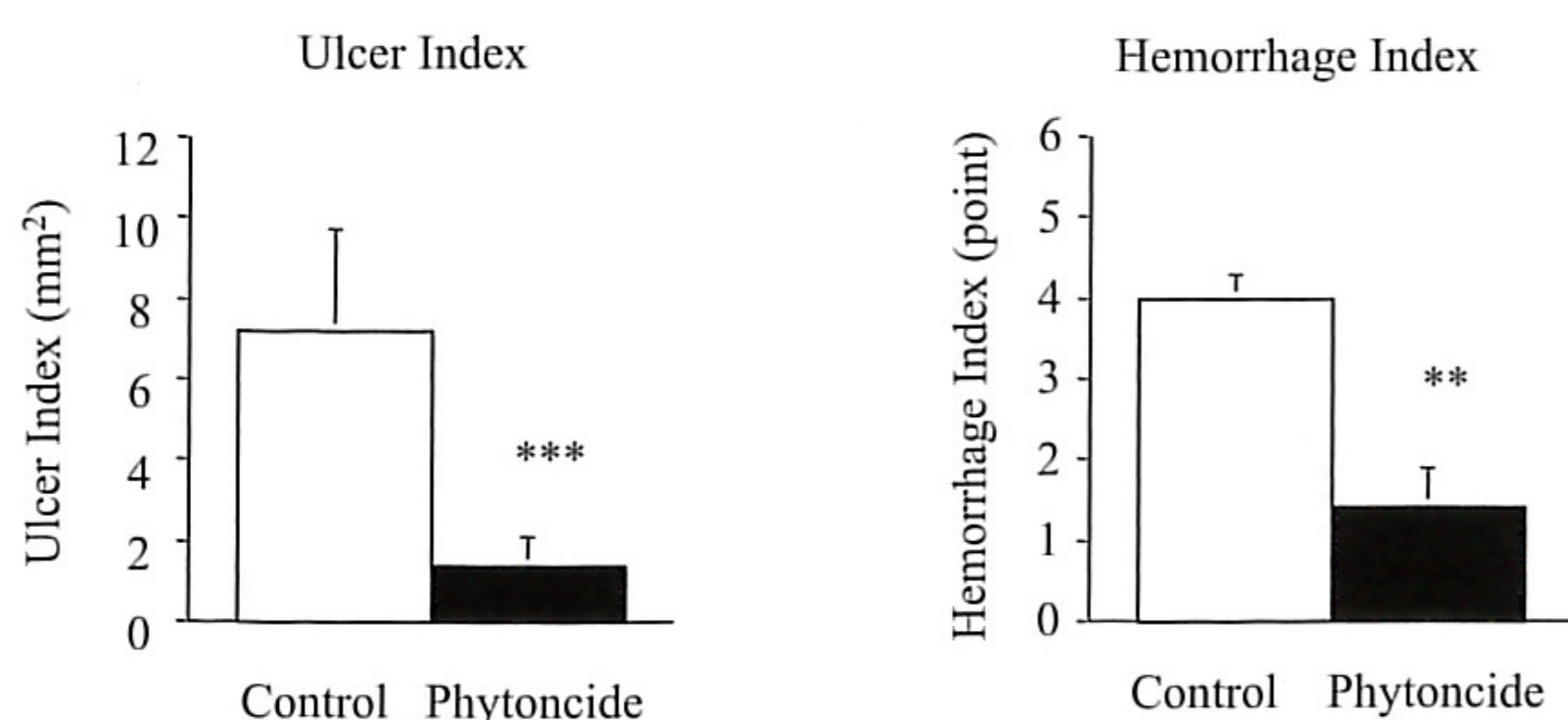


図7 水浸ストレス負荷後におけるSHRSPの胃潰瘍および出血数

Mean ± SEM, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

考 察

著者らは前報^[7]でフィトンチッド噴霧が通常飼育のSHRの循環動態には負の影響は認められないことを報告した。今回は、フィトンチッド噴霧がストレス反応を緩和することを血圧や心拍数の変化などを指標にして実

証した。すなわち、フィトンチッド噴霧が拘束ストレス下におけるSHRSP/IzmおよびWistarラットの心拍数、血圧値の上昇を抑制させた。また、水浸拘束ストレス下においても胃粘膜損傷と出血数の軽減が認められた。これらのことはテレメトリーシステムを用いたストレス評価で、拘束ストレスを負荷したSHRにフィトンチッド噴霧した場合、心拍数が有意に軽減して安定値を示した既報^[6]とほぼ同様な結果であった。

フィトンチッドはアロマセラピー (芳香療法) にも用いられることから、エッセンシャルオイルの一つとして考えてもよいと思われる。ラットやマウスを用いた動物実験で、ラベンダーや柑橘系などのエッセンシャルオイル吸入には鎮静効果があることが報告されている^[9,11]。これらのエッセンシャルオイルは脳内のGABA (gamma-aminobutyric acid) システムを経由して、中枢神経系に作用し鎮静する^[2,5]。自律神経系は環境ストレスに対し、生体の恒常性を保つための循環の神経性調節機能を司っている。そして、交感神経と副交感神経系の瞬時的なバランスの上に調節されている循環の反射性応答に重要な役割を果たしていると考えられている^[10,17]。これらからフィトンチッドにおいても循環の神経性調節機能に何らかの作用を促し、拘束ストレス下で上昇するはずの心拍数あるいは血圧値を有意に軽減して、その結果としてストレスを緩和し、リラックス状態を生み出すことが推察された。

一般的に、ストレス反応とは生体が刺激によって生じた歪みに対して、適応しようと内分泌系、脈管系、神経系、筋肉系、免疫系などを機能させて生体の恒常性を維持しようとする働きの現れとみなされる^[4]。この働きの中心となる機構が、交感神経—副腎髄質系と視床下部—下垂体—副腎皮質系である^[14]。この2つのストレス応答系の活動が高まり、ストレスホルモンとしてそれぞれカテコールアミンおよびコルチゾールが分泌され、心拍の亢進や血糖の上昇を促し、生体のストレス対処能力を高めるように作用する^[16]。

今回はストレスによって分泌される生理活性物質の中でもカテコールアミンを指標に検討した。カテコールアミンはコルチゾールよりもストレスに対する反応性が高く、微弱なストレスの早期検出に適していると期待されている^[15]。今回の結果において、フィトンチッド噴霧群が有意差は認められないにしても対照群に比べ低下する傾向が見られた。しかし、血液サンプリング行為自体がストレスとなっている可能性も否定できず、本来の値を示しているか疑問も残る。これに対して唾液は頻繁なサンプリングが可能で、非侵襲性も高いと考えられて

いる。ストレス反応性は劣るが唾液で測定可能なコルチゾールをストレス評価に利用することも今後の検討課題であると思われた。

以上より今回の一連の実験では、ストレス下においてフィトンチッド吸入はラットの循環生理値や交感神経系の活性化を抑制し、ストレスを緩和させ精神機能の改善に寄与しているものと示唆された。

謝 辞

本研究に対してご協力、ご助言を頂いた(有)フィトン・タオ118の三原安経氏に深謝致します。

文 献

- [1] 阿部智, 野村正人. (2006). フィトンチッドの化学成分とその抗酸化作用. *Aroma Research*, 25, 56-62.
- [2] Aoshima, H., and Hamamoto, K.(1999). Potentiation of GABAA receptors expressed in *Xenopus oocytes* by perfume and phytoncide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 743-748.
- [3] 朝日新聞, 「林野庁が森林浴構想」, 1982, 7. 29
- [4] 林千嘉子, 片岡裕美, 扇間昌規, 伊藤誉志男. (2001). アレルギー反応におけるストレスの影響, *YAKUGAKU ZASSHI*, 121, 753-759
- [5] Hossain, S. J., Aoshima, H., Koda, H., and Kiso, Y. (2002). Potentiation of the ionotropic GABA receptors response by whiskey fragrance. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6828-6834.
- [6] Kawakami, K., Kawamoto, M., Nomura, M., Otani, H., Nabika, T., and Gonda, T.(2004). Effects of phytoncides on blood pressure under restraint stress in SHRSP. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 31, S27-28.
- [7] 川上浩平, 下崎俊介, 石田勇, 言美昇, 野村正人, 並河徹. (2006). テレメトリーシステムを用いたSHRの循環生理値に対するフィトンチッドの影響. *九州実験動物雑誌*, 22, 23-27.
- [8] 古賀良彦. (1987). ストレスとアロマセラピー. *フレグランスジャーナル*. 86, 25-28.
- [9] 小森照久. (1999). 柑橘系香気 of 精神科医療への応用, *果実日本*, 54, 70-72.
- [10] Koo, B. S., Park, K. S., and Ha, J. H.(2003). Inhibitory effects of the fragrance inhalation of essential oil from *acorus gramineus* on central nervous system. *Biol Pharm Bull.*, 26, 978-982.
- [11] Lis-Balchin, M., and Hart, S.(1999). Heart rate variability in healthy volunteers during normobaric and hyperbaric hyperoxia. *Acta Physiol Scand.*, 167, 29-35.
- [12] 丸野廣. (1994). ストレスコントロールとリラクセーション. *Aromatopia*, 6, 14-17.
- [13] 問田直幹, 他編. (1982). 新生理学, 第5版上巻, pp. 786-834, 医学書院, 東京
- [14] 中川正, 永井元. (1991). 香りによるストレス解消効果. *フレグランスジャーナル*. 11, 44-49.
- [15] 中根秀雄. (1999). 新規精神的ストレス指標としての唾液中クロモグラニンA, 豊田中央研究所 R & D レビュー, 34, 17-22.
- [16] 織田敏彦, 出村博. (2001). ストレスと神経内分泌系, *日医雑誌*, 126, 353-358.
- [17] 大久典子, 山家智之, 吉田克巳. (2004). 香り刺激による心拍変動と脳神経細胞の酸素代謝, *自律神経*, 41, 439-443.
- [18] 岡部進, 竹内孝治, 高木敬次郎. (1976). ストレス潰瘍. 実験潰瘍. 東京, 日本メデイカルセンター, pp. 25-33.
- [19] 住友和弘, 前田冷子, 土屋里美, 猪苧冬樹, 茨木康彦, 長谷部直幸, 菊池健次. (2006). 森林浴は高血圧治療代替療法となりうるか. *森林科学*, 48, 21-25.
- [20] 谷田貝光克. (2006). フィトンチッドーその実態と健康に効果的な作用とは. *Aromatopia*, 15, 11-15.
- [21] 津村秀憲. (1983). 水浸拘束ストレスラット胃の生理学的ならびに電顕学的研究, *日消外会誌*, 16, 1313-1323.

要 約

森林の香りの成分はフィトンチッドと呼ばれ、生物活性を有する植物の二次的代謝成分である。本実験ではフィトンチッドがラットの各種のストレスを緩和あるいは軽減するか否かを実証するためにストレス感受性が高い疾患モデル動物の脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) を用いて検討を行った。実験1ではSHRSPに拘束ストレスを負荷してフィトンチッドを噴霧し血圧測定を行った。HR, SBP, DBPともにフィトンチッド群が低く有意差が認められた。また、血漿中のアドレナリンおよびノルアドレナリン濃度ともにフィトンチッド群は対象群よりも低い傾向であった。実験2では水浸拘束ストレスを負荷してフィトンチッド噴霧の影響を確認した。胃粘膜損傷および出血数が、対照群と比較してフィトンチッド群は有意に減少していた。以上から、フィトンチッド吸入には交感神経系の活性化を抑制し、ストレスを緩和させる効果があることが示唆された。