

- 2 . 疲労および疲労感の分子・神経メカニズムの解明
- 2 . 2 . 疲労生体信号と神経・免疫・内分泌相関の調整
- 2 . 2 . 2 . 疲労等による神経内分泌機構変調の動態解明

京都工芸繊維大学大学院・工芸科学研究科・中島敏博

(1) 要約

疲労および疲労感発現の原因のひとつに長期の中枢性変調が考えられる。近年、ストレスが長期間にわたり脳内情報伝達系に変調を惹起することが報告されている。そこで本研究は、ストレスによる神経・免疫・内分泌系における即時のおよび長期的変調の両面から解析してきた。本年度は特に疲労回復因子の開発を目指し、ヒトおよびラットにリフレッシュ感があるとされる“みどりの香り”の作用を調べたところ、ラットの血漿 ACTH と体温変動との双方において即時のみならず長期的ストレス応答に対し軽減効果があることを見出した。

(2) 目的

1 回のストレスが 2 ~ 3 週間の長期間にわたり室傍核などの脳内情報伝達系に変調を引き起こすことがラットで報告されている。慢性疲労の原因の一つにストレスによる長期の中枢性変調が考えられる。そこで内分泌系や免疫系をはじめとする生体防御系調節に主要な役割を果たす CRH-ACTH 分泌系のストレスに起因する動態を解析してきた。これまで、1) 1 回の拘束ストレスはストレス直後のみならず、6 日後でも血漿 ACTH 濃度を上昇させること、2) 脳内オキシトシンはストレスにより分泌され、ストレス後の長期間に及ぶ ACTH 動態にストレス時に分泌された脳内オキシトシンが関与していること[1]、3) 脳内解熱物質であることが解明されつつある [2 , 3] アラキドン酸カスケード・チトクローム P-450 (CYP-450) 代謝産物である EET がストレスにより賦活される CRH-ACTH 系に作用し、血漿 ACTH 濃度を増加させること。この EET による修飾はストレスの種類 (拘束ストレスと IL-1 ストレス) に依存し、EET はストレス直後の ACTH 応答のみならず、長期応答にも作用することを見出してきた。

本年度は、疲労回復の手法開発を目指し、リフレッシュ効果があるとされる「みどりの香り」の即時のおよび長期的ストレス応答に対する作用をラットを用いて解析し、疲労回復法開発への基礎的、科学的根拠を提供する目的で研究を遂行した。ストレス

応答の解析は、これまでの血漿 ACTH 濃度測定に加えて、深部体温を連続的に測定することにより、生体防御の3調節系である内分泌系、免疫系及び自律神経系の動態を総合的に解析した。

嗅覚系を介した情報は、個および種の保存に重要な役割を果たしているが、これらの情報は食物摂取や生殖における場合を除き意識下のレベルで処理されることが多く、嗅覚情報の関与に気付かない場合がほとんどである。そのため、意識することなく、生理活性を持つ多様なにおい物質を化学合成し、ヒトを取り巻く化学環境を変化させてきた。本来、緑葉と共存してきたヒトがコンクリートと化学合成物質の檻の中に閉じ込められたことが疲労感を訴えるヒトの増加の原因のひとつではないかと考えられる。

緑葉が放つみどりの香りは炭素数が6のアルコールおよびアルデヒド8種類からなり、植物における生合成系が証明されている[4]。そのうち「新緑の香り」は青葉アルデヒドと青葉アルコールの比率が高く、「新茶の香り」は青葉アルコールの濃度が特に高いことが知られている。みどりの香りはヒトに鎮静作用があることが明らかにされ、ヒト事象関連電位(P-300)の抑制がその鎮静作用と関係するとの報告がある[5]。この研究において、青葉アルコール、青葉アルデヒドともに0.03%の濃度で作用し、同じ濃度で等量混合すると効果が大幅に増加することが見出された。次いで、緑の香りのリフレッシュ作用がヒトとラットを用いて調べられた[5]。リフレッシュ作用を、1)快情動の促進、2)身体的感覚運動機能の促進、3)不快情動の軽減、4)身体的不快感の軽減に分類して研究が行われ、1)については、みどりの香りが報酬刺激として快感を誘発することはなく、そのリフレッシュ作用が快情動の促進によるものでないことがヒトの嗜好性試験、ラットの接近行動実験から示された。2)は、ヒトの画像刺激に対する単純反応潜時および視覚弁別課題に対する選択反応時間と、ラットのオープンフィールド試験の結果より、みどりの香りは簡単な視覚認知、運動反応機能および一般活動性に影響を及ぼさないことが明らかにされた。3)不安尺度試験であるSTAI1とSTAI2、および顔スケールを用いてヒトの情動に及ぼす影響、高架プラス迷路試験でラットの不安レベルを調べたところ、みどりの香りは不安レベルに影響を及ぼさないことがわかった。4)アナログジメーターを用いてヒトの痛覚閾値を調べたところ、みどりの香りは痛覚閾値を上昇させ、鎮痛効果があることが明らかにされた。さらに、ラットのIntruder testにより、警戒行動が緑の香りにより減少することが示された。これらの研究結果により、みどりの香りは一般的感覚運動機能や情動性に対しては明らかな作用を示さないが、ストレスに対する反応を軽減することがヒトおよびラットで共通して観察された。さらに、強制水泳後にみどりの香りをかがせると、ラットの活動性の減少が軽減することから、緑の香りに疲労回復効果があると示唆されている。

これらの研究成果に立脚し、みどりの香りによるストレス応答軽減効果をラットの血漿 ACTH 濃度および体温変動を測定することにより、生理学的に実証する目的で本

研究を企画した。ACTHは副腎皮質からの糖質コルチコイド、鉱質コルチコイド、性ホルモンの分泌を促進し、蛋白質、糖、脂質代謝、電解質代謝に影響を及ぼす内分泌系への作用ばかりでなく、免疫系へ抑制的に作用することが知られている。体温は、脳温が視床下部の視索前野および前視床下部（PO/AH）で検知されるばかりでなく、末梢からの入力もPO/AHにおいて統合される。体温調節情報はPO/AHから主として自律神経系に出力され、血管収縮および拡張反応や発汗を引き起こす。これとは別の経路でPO/AHからの情報は下垂体前葉からのTSH分泌に影響を及ぼし、甲状腺ホルモン分泌を調節することにより、基礎代謝を制御し体温を調節している。つまり、血漿ACTHおよび体温を計測することにより、脳から内分泌系、免疫系および自律神経系の3調節系への出力の全体像を解析することができる（図1）。

（3）研究方法

ウィスター系雄ラット（体重170 - 250g）を用いた。ラットは12時間明、12時間暗（6時点灯、18時消灯）の明暗周期で 24 ± 1 に保たれた部屋で飼育した。水と固形飼料は自由に与えた。

1）みどりの香り

みどりの香りは青葉アルデヒド（trans-2-hexenal）と青葉アルコール（cis-3-hexenol）のおのおの0.03%をtriethyl citrateに溶解した液を等量混合して用いた。この液を0.2 ml 脱脂綿に吸わせ、ラットの鼻先1 cmに30分間置くことにより匂い刺激とした。

2）血漿ACTH測定

拘束ストレスは10時から12時までの2時間とし、ACTH濃度測定のための採血は拘束直後の12時（0 day グループ）、2日後の12時（after 2 days グループ）に行い、血漿ACTHの日周変動による影響を排除した。拘束時間以外は水と固形飼料を自由に与えた。コントロールグループのラットにはストレスを与えず、12時に採血した。

0 day グループのラットは、拘束開始前1時間、30分、開始時、開始後1時間からおのおの30分間みどりの香りを嗅がせた。コントロール群はストレスを与えず10時から香りを30分間かがせ、12時に採血した。after 2 days グループは、拘束開始前1時間、30分、開始時、開始後1時間、2時間、4時間、6時間からおのおの30分間みどりの香りを嗅がせ、コントロール群は10時から匂いを嗅がせた2日後の12時に採血した。

採血はラットを保持後5秒以内に断頭し、血液をEDTAコートしたチューブに採取、遠沈し（5000 rpm, 5 min）上清を採取し - 20 で保存した。保存した血漿はACTH

IRMA (Mitsubishi Chemical) キットを用いてラジオイムノアッセイした。この手法の検出感度は 5 pg/ml である。

データは平均 ± 標準誤差で示し、有意差検定は一元配置分散分析で行い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判断した。

3) 体温測定

体温測定 1 週間前にペントバルビタール麻酔下で (50 mg/kg ip) 腹腔内へ温度センサー/送信機 (PDT-4000, MiniMitter) を挿入した。拘束ストレスは 10 時から 12 時まで与えた。拘束時間以外は水と固形飼料を自由に与えた。体温データは体温送信機を腹腔内に挿入されたラットを、チップを敷いたラットケージに 1 匹ずつ飼育しておき、ケージごと体温受信ボード (ER-4000) に乗せ、受信ボードに接続したマイクロコンピュータ (PC/AT コンパチブル) に Dataquest システムを用いて取り込んだ。

体温はストレスを与える前日 10 時からストレス後 2 日の 12 時まで 10 分間隔で連続して測定した。ただし、拘束ストレス中は拘束器具がステンレス製であることからデータを受信できず、その間の体温は測定できなかった。体温データは ASCII ファイルに変換し、Microsoft Excel を用いて 2 次処理を行った。データは平均 ± 標準誤差で示し、 $P < 0.05$ を有意差ありと判断した。

(4) 研究成果

1) 血漿 ACTH 動態

ア) 即時応答におけるみどりの香りの作用

みどりの香りがストレス直後の血漿 ACTH 濃度に及ぼす影響を調べた。図 2 の赤色のバーはみどりの香りを嗅がせなかったラット、緑のバーはみどりの香りを嗅がせたラットのデータである。まず、みどりの香りがないと、通常 42.2 ± 2.7 pg/ml である血漿 ACTH 濃度がストレスにより 444.2 ± 36.8 pg/ml と、約 10 倍に増加する。この結果はこれまでの報告とよく一致する [7]

ここで、みどりの香りをストレス前 1 時間および 30 分に嗅がせても増加した ACTH 濃度に影響がなかった (1 時間前: $F(1, 11) = 0.103, P = 0.75$, 30 分前: $F(1, 11) = 0.136, P = 0.72$)。ところが、ストレス開始時およびストレスを与えている途中であるストレス開始後 1 時間でみどりの香りをかがせると有意に ACTH 濃度増加を抑制した (開始時: $F(1, 11) = 5.06, P < 0.05$, 1 時間後: $F(1, 11) = 5.78, P < 0.05$)。この実験結果より、みどりの香りはストレス前に嗅いでも効果がなく、ストレスを受けているときに嗅ぐとストレスによる ACTH 濃度上昇を軽減する効果があることがわかった。

ストレス後のみどりの香りの影響は実験のスケジュール上調べるのが不可能である。また、ストレスを与えないラットにみどりの香りを嗅がせても ACTH 濃度に変

化はなかった ($F(1, 11) = 0.212, P = 0.61$)。よって、みどりの香りが血漿 ACTH 濃度に及ぼす作用はストレス応答に特異的であると考えられる。

イ) 長期応答におけるみどりの香りの作用

拘束ストレスを 1 回 2 時間だけ与えると、血漿 ACTH がその後ストレスを与えないでも高いレベルを保ち、ストレス後 6 日においてもコントロールラットに比べ、有意に高い値を示すことを本研究 1 年目に発見した [1]。そこで、ストレス後 2 日のコントロールに比べ有意に高いレベルの ACTH 濃度が、ストレスの前後に嗅がせたみどりの香りにより影響を受けるか否かを調べ、ストレスが引き起こす内分泌系の長期にわたる変調に対するみどりの香りの効果を調べた。

みどりの香りをストレス前 1 時間、30 分、ストレス開始時、ストレス後 1 時間、2 時間、4 時間、6 時間の各タイミングで嗅がせ、ストレス終了後 4 8 時間での血漿 ACTH 濃度を測定した (図 3)。図中、緑のバーはみどりの香りを嗅がせたグループ、赤色のバーは嗅がせなかったグループを示す。ストレス直後のデータと同様に、ストレス前 1 時間と 30 分にみどりの香りを嗅がせても、香りを嗅がせなかった群と比較して有意差は見られなかった (1 時間前 : $F(1, 11) = 884.0, P = 0.70$, 30 分前 : $F(1, 11) = 0.689, P = 0.42$)。これに対し、ストレス後 0 分 ($F(1, 12) = 14.2, P < 0.05$)、1 時間 ($F(1, 11) = 8.94, P < 0.05$)、2 時間 ($F(1, 11) = 5.63, P < 0.05$)、4 時間 ($F(1, 11) = 29.0, P < 0.05$) および 6 時間 ($F(1, 10) = 24.9, P < 0.05$) において ACTH 濃度上昇を軽減した。この軽減された値とストレスを与えずにみどりの香りを嗅がせただけの群と比較するとストレス後 1 時間 ($F(1, 11) = 4.86, P = 0.05$)、4 時間 ($F(1, 11) = 0.419, P = 0.53$)、6 時間 ($F(1, 10) = 0.983, P = 0.35$) において有意差がなかった。この結果は、ストレスに対する長期応答、少なくともストレス後 2 日ではみどりの香りはストレスを受けなかった動物と同レベルまで血漿 ACTH 濃度を回復させていることを示している。なお、ストレスを与えないラットにみどりの香りを嗅がせても ACTH 濃度に変化はなかった ($F(1, 11) = 0.272, P = 0.61$)。

2) ストレスによる体温変化とみどりの香り

ア) 体温へのストレスの影響

ストレス前日の 10 時から 24 時間体温を測定し、これをコントロールとしてストレス直後の 12 時 20 分から測定を再開し、2 日後の 12 時つまり長期応答の血漿 ACTH 濃度を測定したタイミングまで体温を測定した (図 4)。ラットはヒトとは逆に明期に体温が低く、暗期に高い日周リズムを示す [8]。測定した最低体温は 12 時 30 分の 37.0 ± 0.10 で、最高体温は 2 時 50 分の 38.1 ± 0.12 であった。ストレス直後の体温は 38.6 ± 0.13 で、コントロールの 37.1 ± 0.09 に比べ 1.5 上昇した。この拘束ストレスによる高体温は以前より知られており [9]。脳内オピオイド系の関与が議論されている。このストレスによる高体温は 21 時 40 分までストレス後約

10時間持続する。その後、コントロールと同様の体温変動を示すが、翌日の明期における体温の下降が見られず、11時20分から20時40分にわたりコントロールとの間に有意差が見られた。この間、最大の体温差は約0.5 高い値を示した。その後はコントロールとの間に差は見られず、血漿 ACTH 濃度に差があるストレス2日後の12時においても 37.6 ± 0.17 と、コントロールの 37.2 ± 0.10 に対して差がなかった。

イ) みどりの香りと体温

1日間の体温測定後、ストレス開始時にみどりの香りを嗅がせたグループと嗅がせなかったグループを比較した(図5)。12時に拘束ストレスを終了し、12時20分から体温測定を再開したが、12時20分は香りを嗅がせていないラットが高体温を示したが、12時30分からは両グループの体温に差は見られなかった。即時応答の採血は12時に行うので、この時期にはおそらく両グループ間に体温差があるものと考えられる。その後、14時10分から22時にかけてみどりの香りを嗅がせたラットは嗅がせなかったものより低体温つまりコントロールに近い値を示した。この実験結果より、体温のストレスに対する即時応答のほぼ全期間において応答を軽減する働きがみどりの香りにあると考えられる。暗期の後半0時50分から2時10分のみどりの香りを嗅がせたグループは低い体温を示した。

さらに、次の日の明期において7時50分から10時20分と15時40分から16時20分にわたりみどりの香りを嗅がせたグループは、嗅がせなかったグループと比較して低い体温を示し、体温のストレスに対する長期応答にもみどりの香りが応答軽減作用を示すことが解明された。

(5) 考察

本年度の研究により、緑葉が発する香りの主成分である“みどりの香り”がラットにおいて血漿 ACTH および深部体温で観察されるストレス応答を軽減することを解明した。血漿 ACTH は免疫系と内分泌系、深部体温は内分泌系と自律神経系の出力を反映するとされるので、みどりの香りは三つの生体調節系すべてに対し効果があると考えられる。

昨年までの研究過程において、1回の拘束ストレスに対しストレス後6日間も血漿 ACTH 濃度に異常が持続することを発見した[1]。これまではスエーデン・カロリンスカ研究所から報告された、オキシトシンが長期にわたり血漿コルチコステロン・レベルを抑制することが知られているのみである[10]。本研究によりストレスと疲労を結ぶ接点を見出したと考えられる。そこで、ストレス後2日目の長期応答に対するみどりの香りの効果を解析したところ、ACTH 濃度はみどりの香りにより有意に抑制され、ストレス応答の軽減効果が見られたが、この時深部体温はみどりの香りの

有無により差が見られなかった。この結果について、体温では ACTH 応答よりストレスに対する長期応答が小さいのか、あるいは自律神経系の長期応答が短期間に終了し、かつ、内分泌系の応答については、ホルモンの種類によりみどりの香りによる効果が異なることが考えられる。あるいは内分泌系内において長期応答には ACTH が主に関与しており、甲状腺ホルモンの関与が少ないためかもしれない。体温調節で主要な役割を果たすホルモンは甲状腺ホルモンであり、ACTH との関係は今後検討すべき課題である。

血漿 ACTH 濃度における即時および長期応答の研究過程で、みどりの香りはストレス前に嗅いでもほとんど効果が無いが、ストレスを受けている最中、さらにストレス後に嗅ぐと効果があることを発見した。ラットはストレス終了後 4 時間でみどりの香りを嗅ぐと ACTH 応答が軽減した。この成果はヒトに臨床的にみどりのかおりを用いる際に非常に有用であろう。なぜならストレスは予想できる場合が少なく、ストレスの悪影響を軽減したい場合ストレス後に対処する場合がほとんどであると考えられる。

ACTH も体温も日周リズムがあるので、その影響を避けるためストレスを 10 時から 12 時まで与え、それに対する応答を解析してきた。しかし、異なる時間帯に与えたストレスに対する応答およびみどりの香りの効果は未知である。今後の研究課題として、異なる時間帯にストレスを与え、その応答に対するみどりの香りの作用解析が急務である。

ストレス応答は生体防御反応の一部である。当然の危惧として、みどりの香りという化学物質を嗅ぐことで、本来発現する生体防御反応を修飾し生体に悪影響が出るのではないかと思うのは当然である。しかし考えてみると、みどりの香りは緑葉の成分である。我々は元々みどりの香りの中で生活していたので、動物の生体調節系はこの香りの存在を前提に成り立っている可能性がある。さらに推測すると、現在この香りと離れて生活しているのでストレスの影響が長く続き、慢性的に疲労感を感じるヒトが多いのではないだろうか。

(6) 引用文献

[1] T. Nakashima, T. Noguchi, T. Furukawa, M. Yamasaki, S. Makino, S. Miyata and T. Kiyohara: Brain oxytocin augments stress-induced long-lasting plasma adrenocorticotrophic hormone elevation in rats, *Neurosci. Lett.*, in press (2002).

[2] T. Nakashima, Y. Harada, S. Miyata and T. Kiyohara: Inhibitors of cytochrome P-450 augment fever induced by interleukin-1 β , *Am. J. Physiol.*, 271, R1274-R1279 (1996).

[3] T. Nakashima, Y. Yoshida, S. Miyata and T. Kiyohara: Hypothalamic 11,12-epoxyeicosatrienoic acid attenuates fever induced by central interleukin-1 β in the rat, *Neurosci. Lett.*, 310, 141-144 (2001).

- [4] A. Hatanaka: Biosynthesis of so-called “green odor” emitted by green leaves, in *Comprehensive natural products chemistry*, eds. D. Barton & K. Nakanishi, Klsevier Sci., Vol. 1, chap. 4, 83-116 (1999).
- [5] 菅野久信、内田誠也、佐藤信茂、畑中顯和、佐野孝太：緑の香りの事象電位に関する効果、*日本味と匂い学会誌* , 3 , 6 7 2 - 6 7 4 (1 9 9 6) .
- [6] 粟生修司、畑中顯和：緑の香りの生理作用と効用、*Aroma Research 臨時増刊* 1 , (2 0 0 1) .
- [7] G. Aguilera: Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress, *Front. Neuroendocrinol.*, 15, 321-350 (1994).
- [8] R. Refinetti and M. Menaker: The circadian rhythm of body temperature, *Physiol. Behav.*, 51, 613-637 (1992).
- [9] C. Vidal, C. Suaudeau and J. Jacob: Regulation of body temperature and nociception induced by non-noxious stress in rat, *Brain Res.*, 297, 1-10 (1984).
- [10] M. Peterson, A. Hulting and K. Uvnäs-Moberg: Oxytocin causes a sustained decrease in plasma level of corticosterone in rats, *Neurosci. Lett.*, 264, 41-44 (1999).

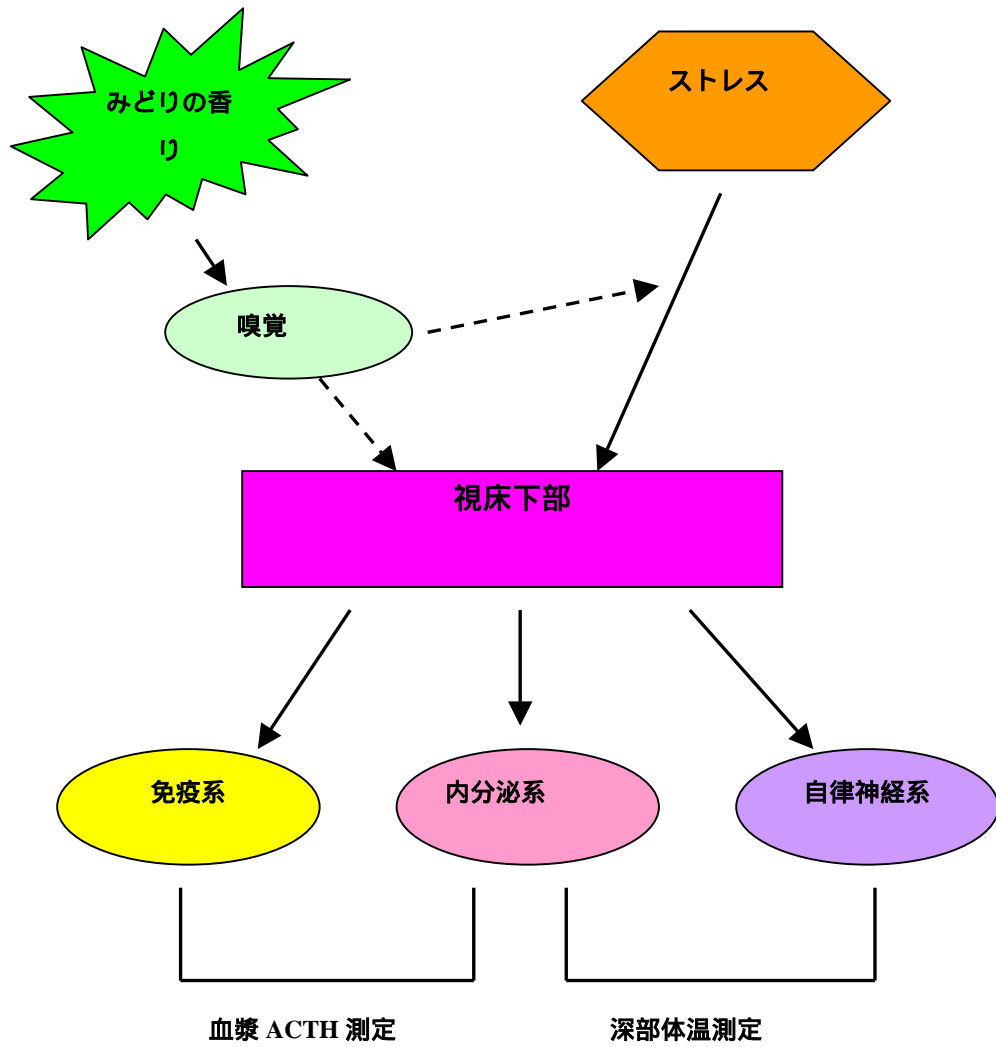


図1. みどりの香りの予想作用部位とその出力

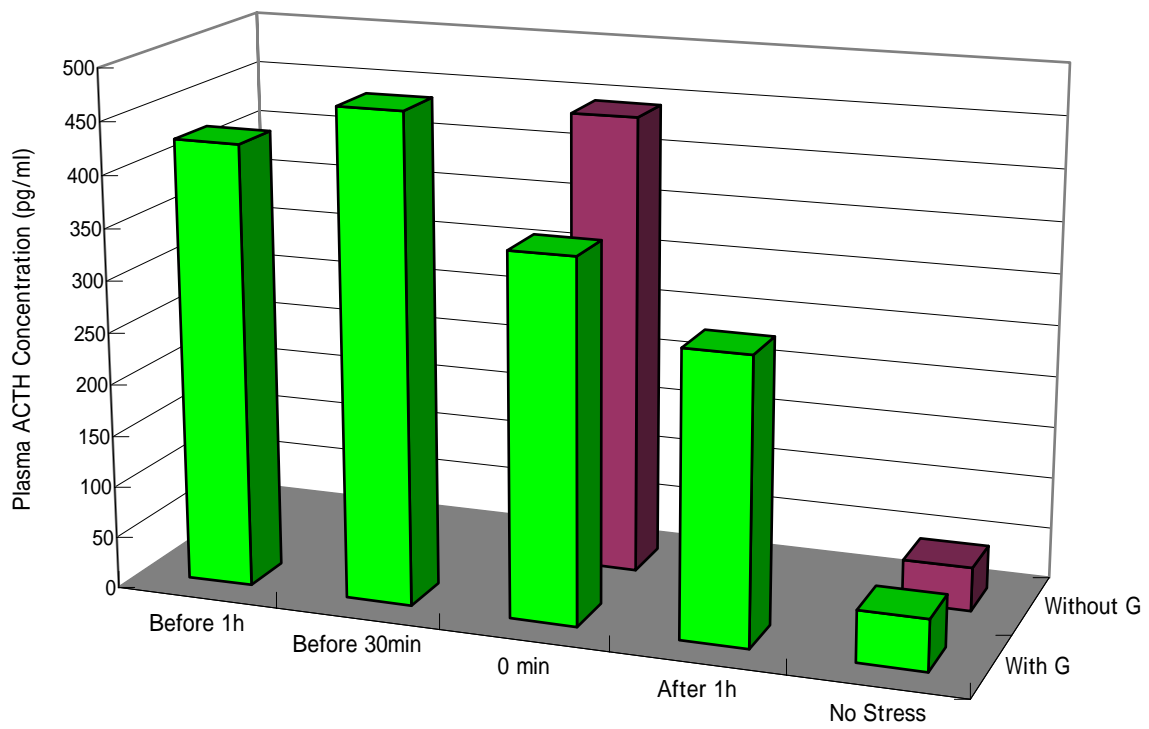
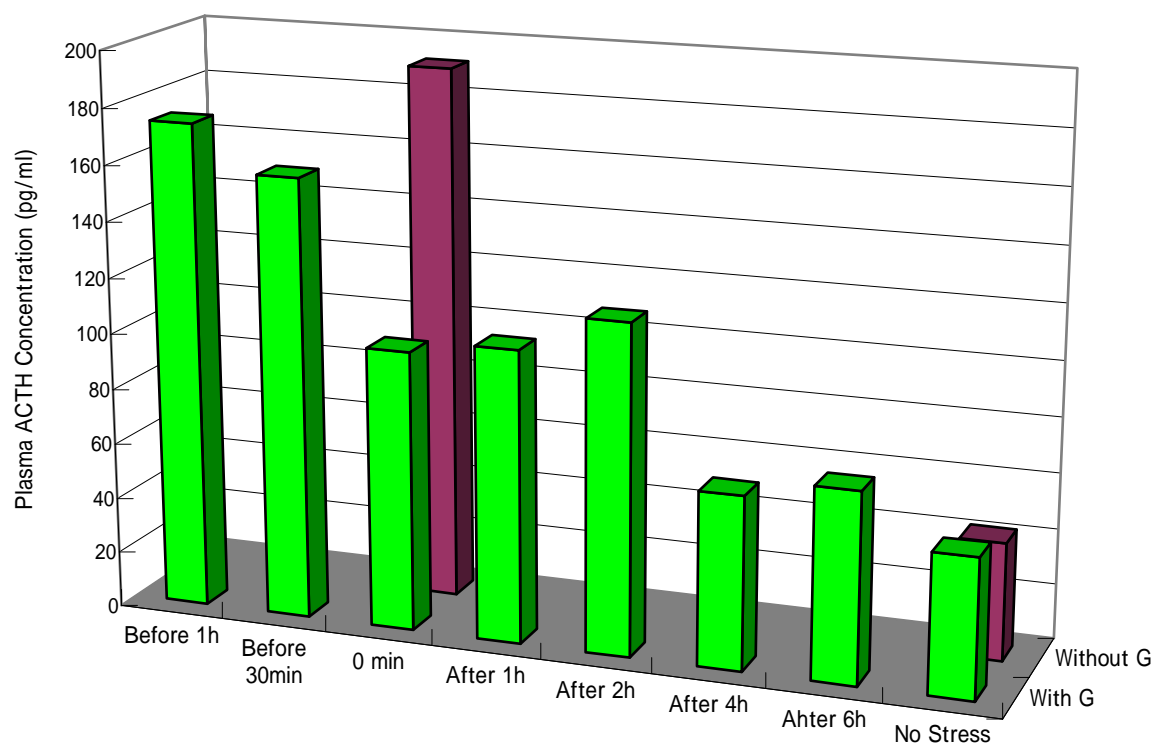


図2 . みどりの香りの血漿 ACTH 即時ストレス応答に対する効果

図3 . みどりの香りの血漿 ACTH 長期ストレス応答に対する効果



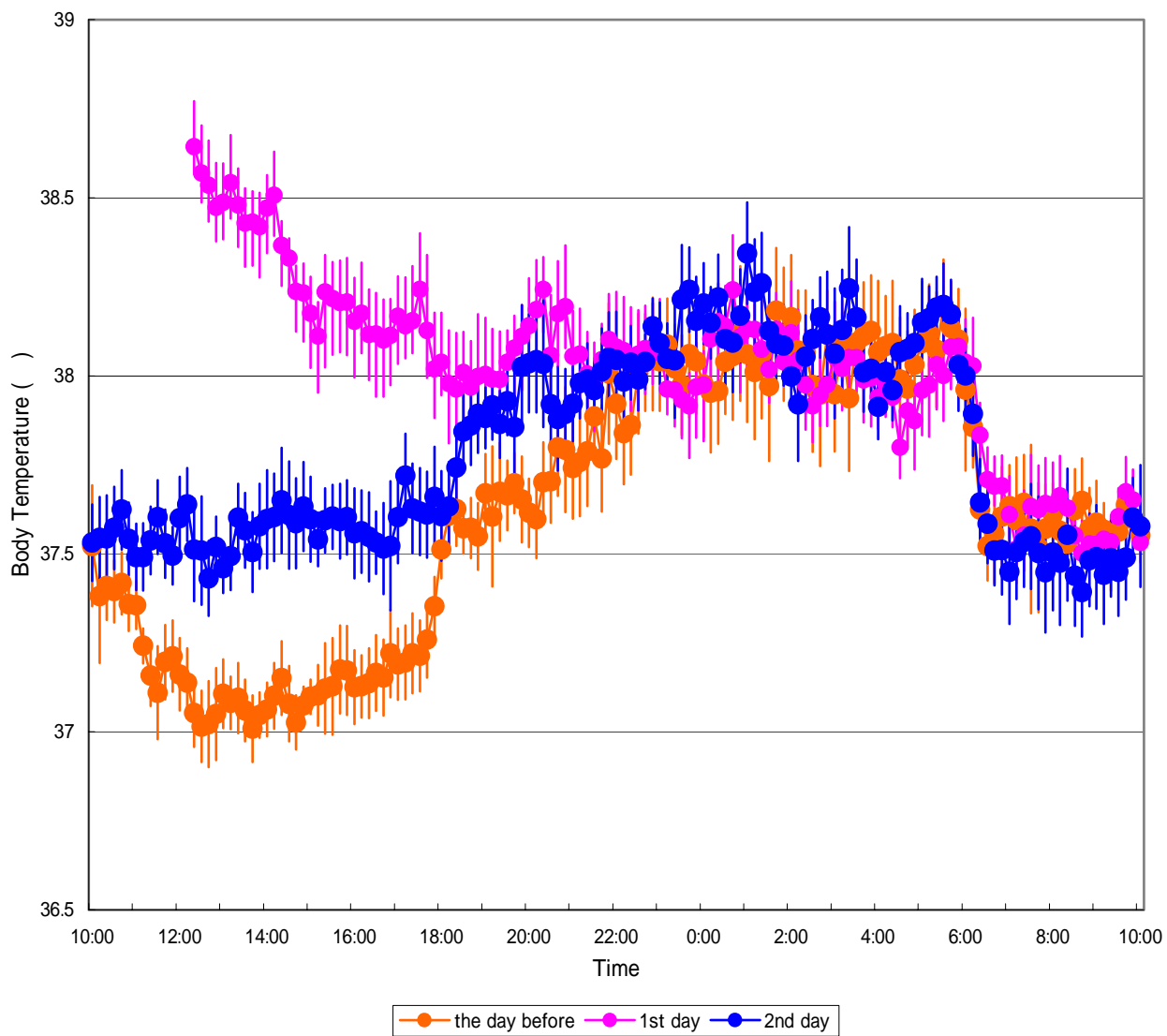


図4 . ストレスが体温に及ぼす影響

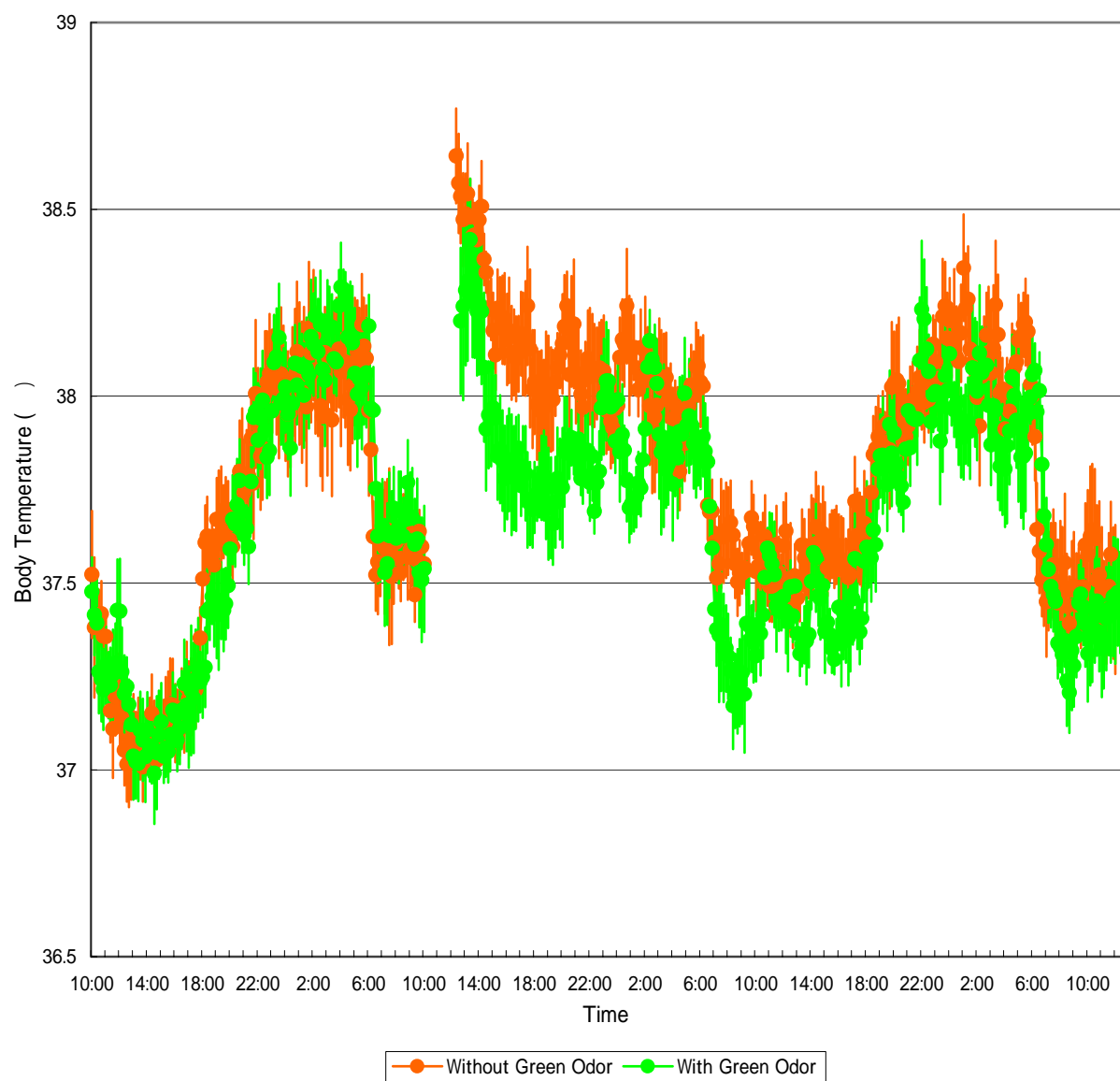


図5 . みどりの香りが体温に及ぼす影響

(7) 成果の発表

1) 原著論文による発表

イ) 国外誌

T. Nakashima, Y. Yoshida, S. Miyata and T. Kiyohara: Hypothalamic 11,12-epoxyeicosatrienoic acid attenuates fever induced by central interleukin-1 β in the rat, *Neurosci. Lett.*, 310: 141-144 (2001).

T. Nakashima, T. Noguchi, T. Furukawa, M. Yamasaki, S. Makino, S. Miyata and T. Kiyohara: Brain oxytocin augments stress-induced long-lasting plasma adrenocorticotrophic hormone elevation in rats, *Neurosci. Lett.*, 321: 161-164 (2002).

3) 口頭発表

イ) 応募・主催講演等

T. Nakashima, T. Noguchi, T. Furukawa, S. Makino and T. Kiyohara: Modulation of the HPA axis by oxytocin and cytochrome P-450 metabolite, Christchurch, New Zealand [XXXIV International Congress of Physiological Sciences, August 2001]

赤松真理子、中島敏博、清原壽一：ストレス応答に対するみどりの香りの作用、広島 [第79回日本生理学会大会、2002年3月]