

博 士 学 位 論 文

東 邦 大 学

博士論文

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

東邦大学薬学部

高橋 瑞穂

2015年

目次

序論	1
本論	
第1章 ラベンダーの種差と精油成分に関する検討	
第1項 関東近郊におけるラベンダーの種差と主要精油成分の分布	9
第2項 関東近郊におけるラベンダーの種差と主要精油成分の光学分割	15
第3項 4系統6種類のラベンダー精油における定性・定量評価	17
第2章 ラベンダー精油吸入による抗不安様作用の評価	
第1項 4系統6種類のラベンダー精油吸入による抗不安様作用の評価	28
第2項 ラベンダー精油の主要構成成分による抗不安様作用	32
第3項 抗不安様作用発現時のセロトニン神経系活動性	36
第3章 病態モデルマウスを用いた精油吸入の効果	
第1項 水浸ストレス負荷モデルを用いた評価	45
第2項 硫酸亜鉛処置による嗅覚麻痺モデルを用いた評価	54
結語	59
実験の部	63
謝辞	73
参考文献	74

序論

ラベンダー（ラバンデュラ属植物（*Lavandula spp.*））は、地中海沿岸を原産とするシソ科（Lamiaceae）の常緑低木である。原種の *Lavandula angustifolia* をはじめ、天然種の多くは高温多湿を嫌うため、南北 40～45 度の高緯度地方、西岸海洋性気候や亜寒帯湿潤気候などの冷涼な高地に局限して分布している。日本人にとって馴染みの深い北海道富良野地方、本植物の原産地とされる地中海沿岸に位置するフランスのプロバンス地方、および中国の新疆ウイグル自治区霍城县の三地域は、いずれもこれらの条件に適合しているとされ、現在、ラベンダー三大生産地域となっている¹（図 1）。

本植物の薬用植物としての歴史は非常に古く、古代エジプトでミイラ作りの過程において、消毒・防腐薬として乳香や没薬などとともに用いられていた史実を筆頭に、記録に残るだけでも 2000 年前に遡るとされている²。また、本植物およびその芳香には、怒りや不安、執着など“心の汚れ”を除去する効果があると信じられ、古来より儀式や祭典に香料として用いられていたとされている^{2,3}。ラベンダー精油による抗不安作用応用の起源はこの時代に既に存在していたのかもしれない。「ラベンダー（Lavender）」という用語は、複数種存在するラバンデュラ属植物を総称して呼ぶ慣用名であり、ラテン語で「洗う」を意味する単語、「lavare」が語源とされている³。古代ローマ人が公衆浴場の湯や水、洗濯の際の衣類の防虫や香り付けを目的に、本植物を用いていたことに由来すると言われている。その後も、香料や食料、心身のリラクゼーションや安眠を目的とした使用の他、本植物の持つ可憐な外観や芳香が人々を魅了し、観賞用としての栽培も広く普及した。古来より今日に至るまで人々の生活に多くの恩恵をもたらしてきた植物であると言える。

特定の病気を克服する方策としての植物の利用は、それぞれの環境に応じて試行錯誤が繰り返され、その地域特有の医療として確立していったと考えられる。ヨーロッパで発祥し発展した植物療法（Phytotherapy、Herbalism（本草学））もその一つで、ラベンダーは、歴史的にも現在もこれを代表する植物となっていることから、“King of Herbs”（ハーブの王様）と称されることもある^{1,3}。ラベンダーの薬用植物としての利用は、12 世紀に蒸留技術が発達し精油の利用が可能になったことで一層拍車がかかることとなる。シソ科植物であるラベンダーの葉の裏側や花部の表面には油胞（oil glands）と呼ばれる細胞があり、精油が貯蔵されている¹。この精油を水蒸気蒸留して得られるのがラベンダー精油である（本稿では、ラバンデュラ属植物由来の精油を区別なく呼ぶ際、以降、「ラベンダー精油」と呼ぶ。）。植物精油を用いた治療法が、フランスの化学者であるガットフォセ博士により芳香療法（aromatherapy）と命名され、数々の作用について調査研究が進んだのは 1900 年代に入ってからのことであるが、自らが負った熱傷創に対するラベンダー精油の効果に博士自身が強く感銘を受けたことがその契機となったのではないかとされている。

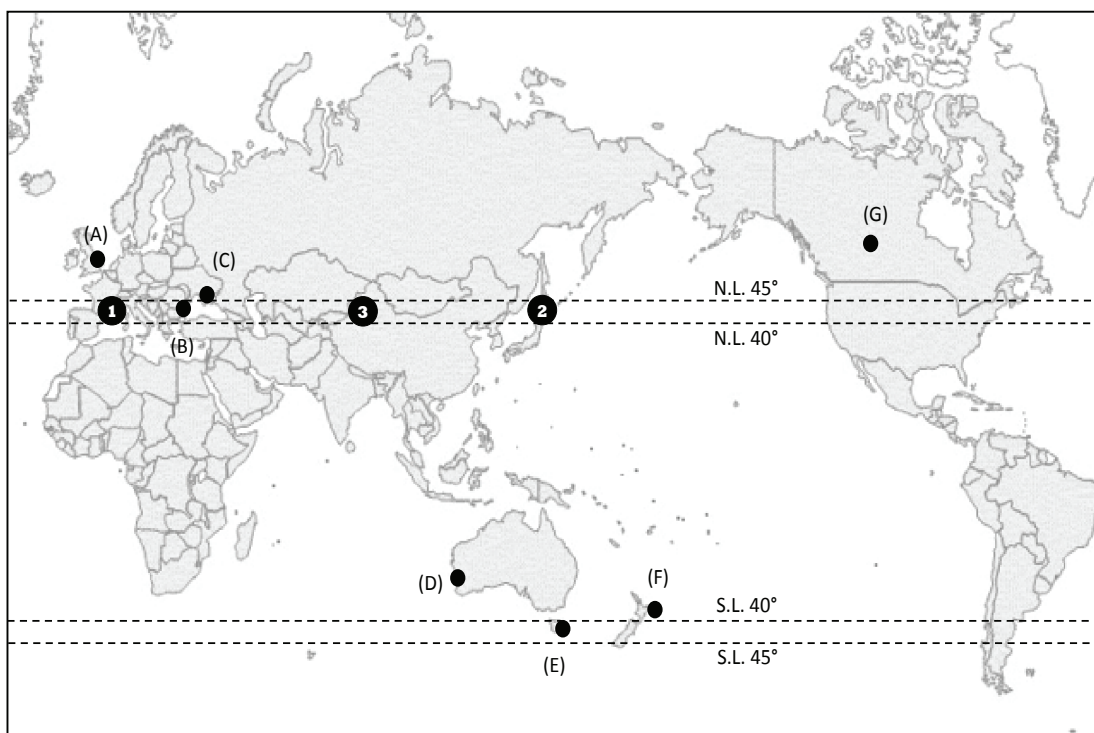


図 1：主要なラベンダー生産地

三大生産地：①プロバンス地方（仏）、②富良野地方（日）、③新疆ウイグル自治区霍城県（中）

主要生産地：A：ノーフォーク地方（英）、B：ブルガリア地方（勃）、C：クリミア地方（露）、D：パース地方（豪）、

E：タスマニア地方（豪）、F：オークランド地方（新）、G：アルバータ地方（加）

その後 19 世紀に入り大躍進を見せた西洋医学の影となり、一時は衰退の一途を辿るかと思われた芳香療法であるが、近年は補完代替医療（Complementary and Alternative Medicine、CAM）と呼ばれるあらたな医療体系の中で再び注目を集めている。医療費の高騰、急性疾患から慢性疾患への疾病構造のシフト、生活習慣病や「心の病気」の急増、予防医学への見識の高まりなどの環境変化に伴い、西洋医学を柱とした従来の医療のあり方では、真に患者の QOL（Quality of Life）を向上させるサービス提供が困難となってきたことが背景にあると考えられる。こうした中、これまでは伝統医療として経験的に用いられてきた植物精油による種々の薬理作用に注目が集まり、遅れの指摘されていた CAM におけるエビデンス構築への取り組みが勢いを増した。ラベンダー精油は芳香療法を代表する精油であり伝承応用例も非常に多岐にわたっていたが、鎮静・催眠作用⁴⁻⁶、抗不安作用⁷⁻¹³、抗癒れん作用^{14,15}、鎮痛作用¹⁶⁻¹⁸、抗炎症作用¹⁷、抗菌・抗真菌作用^{1,19}など、多くの作用について検証が行われている。

精油による薬理作用の検証が加速したことには、行動薬理試験の普及が大きく貢献していると言えるであろう^{20,21}。行動薬理試験とは、化学物質による中枢薬理作用を、げっ歯類をはじめとする動物の行動がどのように変化するかを観察・測定する試験系である。不安関連行動の評価系は、電気ショックなどの不快刺激により動物に葛藤状態を引き起こすことで学習の要素を含んだ不安を評価する場

合と、生来的・潜在的に示す不安や恐怖を利用して評価する方法とに大別される。コンフリクト試験や恐怖条件付け試験などは前者の例、オープンフィールド試験や高架式十字迷路試験 (Elevated Plus Maze 試験、以下 EPM 試験) は後者に属する試験系である。いずれの試験も、簡便な操作により客観的評価が可能なため創薬の現場ではテストバッテリーとして重用されている。レモン (*Citrus limon*)²²⁻²⁴ やジャスミン (*Jasminum grandiflorum*)²⁵をはじめ、ローズ (*Rosa damascena*)²⁶、レモングラス (*Cymbopogon citratus*)²⁷、ベルガモット (*Citrus aurantium*)²⁸、クラリセージ (*Salvia sclarea*)²⁹など、多くの植物精油についてもこの方法を用いて不安に対する効果の検証が行われている。このうちラベンダー精油については報告が最も多く、上述した不安関連行動の複数の試験系を用いた多くの検証結果が報告されている^{7-10,30}。さらに、2010年、Tsangらは、動物(げっ歯類)に対し様々な精油の抗不安作用を網羅的に比較した研究結果を総説として報告しており、ラベンダー精油を用いた複数の研究で不安に対する有効性が確認できたと結論している³¹。

「心の病気」の急増がCAMの普及の一因となっていることについては既に述べたが、これを受け、植物精油の持つ向精神作用には特別な注目が向けられ、医療現場での応用が期待されている。ラベンダー精油については、抗不安作用や鎮静・催眠作用を期待し利用するケースが多く、歯科や産婦人科、がん・緩和ケア領域、介護施設などで一部応用が進められている。ここで着目すべきは、これらの領域におけるいわゆる西洋医学的な対応としてベンゾジアゼピン (BDZ) 系薬剤を用いた薬物治療が主流となっているという点である。BDZ系薬剤には高い効果が認められ汎用されている一方で、副作用である筋弛緩作用や鎮静作用により高齢者における転倒リスクが高まる点、さらには、身体依存性や耐性発現など重大な問題が多く、これに代わる医薬品の出現が切望されているという側面もある。よって、ラベンダー精油の持つ抗不安作用が、動物を用いた基礎実験のみならず、ヒトを対象とした臨床においても科学的に効果が証明され、メディカルアロマセラピーとしての活路を見いだすことができれば、その意義は非常に大きいと考えられるのである。こうした中、2012年には15報のRCT (Randomized Controlled Trial、ランダム化比較試験) をもとにした規模の小さなものではあるが、ラベンダー精油の抗不安作用についてヒトにおける有用性評価を試みたシステマティックレビューが刊行された³²。特定の精油による特定の作用を検証する報告として、システマティックレビューが存在する例は殆どなくラベンダー精油への関心の高さが伺えるが、上述のげっ歯類での評価結果とは対照的に効果の有無・有用性を評価できる結論には至っていない。また、CAMの科学的検証の中核を担う米国の公的機関、NCCAM (National Center for Complementary and Alternative Medicine: 国立補完代替医療センター) では、CAMの有用性に関する多くの研究データを公開しているが、ラベンダーによる不安への効果については、“結論の一致を見ていない”と報告している。研究デザインや実験プロトコルなど方法論上の改善が必要である点、および効果発現の再現性・普遍性が不十分である点が課題とされている。このうち方法論上の問題とされているのは、被験者の心身状態や嗜好などに由来するプラセボ効果の排除が困難となっている点、プラセボ(作用のない芳香物質)のデザインが難しく適正な

対照群を設けることができない点を指していると考えている。著者は、ラベンダー精油による抗不安作用の臨床応用を進めていくためには、学際的評価による抗不安作用の全体像解明ならびに精油吸入による作用発現の再現性・普遍性に影響を与えうる因子についての十分な理解が必要であると考えている。

一般に、芳香療法で用いられる精油成分は多成分系であり、基原植物の種類に基づく構成成分の量および存在比の違いが効果の差として出現する可能性が指摘されている。ラベンダー精油による抗不安作用についても同様のことが言え、効果発現の再現性に影響を与える精油側の因子の一つとなっている。「ラベンダー」が複数種存在するラバンデュラ属植物を総称して呼ぶ慣用名であることは冒頭に述べたが、本属は3つの亜属 (subgenera)、8つの節 (section) にまたがる合計39種もの異なる植物で構成されている^{1,2}。また、植物としての人気が故、観賞用・香料生産を目的とした人工交配が積極的に進められており、開発される栽培種 (cultivar) の種類は日々増え続けている。このように多くの植物で構成されているラベンダーであるが、得られる精油を特徴づける主要構成成分としては、(-)-

リナロール ((-)-linalool、以下 LO) および(-)-酢酸リナリル ((-)-linalyl acetate、以下 LA)の二成分が知られている(図2)。LO はモノテルペンアルコールに分類され、ラベンダー以外にもローズウッド、ネロリ、ベルガモットなど数多くの植物

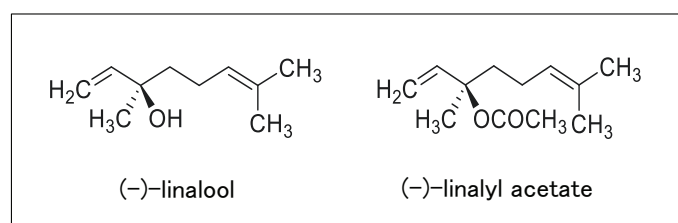


図2：ラベンダー精油の主要構成成分

に含まれる精油成分である。抗菌活性を有するとされ、ラベンダー精油による抗菌・抗真菌作用は本成分に由来すると考えられている^{1,19}。また、梅津らは、ラベンダー精油全体および精油中の主要成分それぞれについてマウスを用いたコンフリクト試験を行い、ラベンダー精油由来の抗不安様作用は精油中の LO に帰することができる結論づけている^{10,33}。一方の LA も、LO とともに多くの植物精油中に存在する成分である。LA をはじめとするエステル類の含有量は精油の品質を評価する上での基準となる場合があり、また、エステル含有量が多い方が鎮静・鎮痙作用に優れていると報告され考えている^{3,15}。LO および LA の二成分はラベンダー精油の香りや作用を特徴づける成分であると考えられているが、これらの含有量および存在比はラベンダーの形態学的な違いによる系統間で大きく異なることが知られている。このように、一口にラベンダー精油と言っても用いる精油により効果に差が現れるだろうことは想像に易い。しかしながら、この点についての一般の認知度は低く、ラベンダー精油の利用者には基原植物の異なる精油を同一のラベンダー精油として用いている人も少なからず存在するとされている。特定の作用を目的としてラベンダー精油を利用するためには、もととなる基原植物を見直し構成成分および効果との関係を解明すること、もしくは再構築することが重要であると考えられる。本研究では、ラベンダー精油の有する抗不安作用を最大限に有効活用するため、これら三者の関係を明らかにすることを目的として調査・検討を行うこととした。

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、関東近郊のラベンダー栽培地におけるフィールド調査を実施した。ラベンダーは元来冷涼で乾燥した気候を好むため、天然種の多くは高緯度で冷涼な高地に限局して分布している。しかし既に述べたように現在は、耐候性や耐湿性を獲得した数多くの栽培種が開発され世界各地で栽培されるに至っている。また、基原植物の種類が同一であっても、栽培地域や土壌、天候や高度など植物の育つ環境の違いにより精油成分の組成に違いを生じる可能性も示唆されている。そこで第1項では、ラベンダー精油の主要構成成分であり、抗不安作用を含む多くの薬理作用の活性本体とされている LO および LA の含量と存在比について、基原植物の系統間での違いおよび栽培条件の差異による系統内の違いを明らかにするため分析調査を行った。モノテルペンアルコールである LO およびその酢酸エステルの LA は、それぞれキラル炭素を1個有しており光学異性体が存在する。光学異性体の構成比は、植物の種類や栽培地によっても異なることから、化学成分から産地や種を推測・判定する際や品質評価を行う際に有用であるとされている。さらに最近では、抗てんかん作用³⁴をはじめ、(+)体と(-)体とで生理活性に違いが見られる場合のあることも報告されている³⁵。そこで第2項では、標準化合物を入手できた LO につき、キラルカラムを用いた GC-MS 分析により光学異性体の分布についての調査を行った。続く第3項では系統ごとの精油成分の差をさらに詳細に調査するため、本邦で入手可能なラベンダー精油のうち、原産地や抽出方法等が明記され、トレーサビリティの高い4系統6種類を精油試料とし、定性・定量分析を行った。

第2章は、前章で明らかにした基原植物と構成成分との関係をもとに、これらの差異が精油の効果に及ぼす影響について調査した。第1項では、前章にて分析を行った4系統6種類のラベンダー精油を用い EPM 試験による抗不安作用の評価を行った。さらに第2項ではラベンダー精油による抗不安作用を主要構成成分である LO および LA に帰することができるのかを検討するため、両者の含有量ならびに含有率と EPM 試験結果との関係を調査した。本項では、これらの成分がどの程度脳へ移行しているのかについても検討を行った。芳香療法における精油の投与方法として最もよく用いられるのは芳香浴である。受動的な吸入投与とも言えるこの経路は、非侵襲的であり高齢者や小児に適用し易いなどの特徴を有する^{11,36,37}。また、精油成分の吸入は、自発呼吸により自然に行われるため、経口投与が困難な患者や拒薬傾向のある患者への投与にも有利である。ただし、精油の投与経路として吸入投与を考える場合、精油成分もしくはその刺激が中枢に至る経路は複数存在し非常に複雑である。本学の生薬学教室では西洋および本邦産の植物精油による向精神作用についての研究が進められているが、さまざまな精油を同一条件で吸入させても、脳への移行は成分の違い等で異なる可能性があることを報告している³⁸。これらのデータは、将来、精油の向精神作用発現にいたる経路の解明や、適正投与量の設定、未知の成分の体内動態の予測において重要な基礎資料になると考えられる。そこで、ラベンダー精油についても、その主要構成成分である LO および LA について評価を行い、文献値等

との比較検討結果と合わせ考察を行うこととした。さらに第3項では、ラベンダー精油吸入による抗不安作用発現のメカニズムについて知見を得るべく、抗不安作用発現時のセロトニン神経系の活動性評価を行った。現在、植物精油による中枢薬理作用の評価の多くに行動薬理試験を用いた動物実験が行われている点は先に述べたとおりである。簡便な操作で客観的評価が可能な試験系であること、均一条件で飼育された実験動物を用いた試験であり、特定の匂いに対する嗜好や経験、プラセボ効果など、ヒトでの臨床試験において問題となる個体差が生じるリスクが低いことなどが大きな利点である。一方、この試験系で観察対象としている“行動”は、精油成分や嗅覚刺激が脳に至り一連の変化の後に最終産物としてみられるものであり、途中の過程については何ら知見を与えるものではない。そこで、本項ではラベンダー精油吸入による EPM 試験での情動変化とそのメカニズムとの関連性を理解するため、マウスの行動変化を不安に関わる神経伝達物質として注目されるセロトニンの挙動とともに神経薬理的に解析し、ラベンダー精油による行動変化と“不安”という病態との関係解明に取り組んだ。

第3章では、精油による作用の普遍性・再現性に影響を与え得る因子のうち、精油を摂取する側の因子に着目し、対象動物の(1)ストレスレベルが異なる場合、ならびに(2)活動レベルが異なる場合において、ラベンダー精油吸入による作用がどのような影響を受けるのかについて検討した。精油への反応性において、“個体差”を生じうる因子としてこれまで知られているものには、精油を摂取する動物の種、年齢、性別および月経周期などがある。さらにヒトの場合、精油に対する嗜好や経験、治療を提供する医療従事者と患者との人間関係など、プラセボ効果に関連する因子の影響も指摘されており植物精油が本来持つ作用の評価を困難にしている。そこで、元来こうした因子に関し個体差は持たないと考えられる飼育実験動物に人為的に条件付けを行いベースラインに差異を生じさせた場合、精油による作用に違いが現れるのかを検討する目的で実験を行った。

2011年、厚生労働省は『4大疾病』と位置付け対策に取り組んできた、がん、脳卒中、急性心筋梗塞、糖尿病に、精神疾患を加え『5大疾病』とする方針を決めた。うつ病をはじめとする精神疾患の患者数急増は著しく、1996年に206万人であった患者数が10年足らずで1.5倍以上となり、2011年には320万人に達したと報告されている。高度情報化が進み、ストレスの時代と呼ばれる現代社会において、教育機関や職場で、児童や学生、従業員のメンタルヘルス対策に苦勞しない施設はないとも聞く。さらに、近年若干の減少傾向が見られるものの、依然、年間自殺者数は3万人に近く(平成25年警察庁調べ)、その大多数が何らかの精神疾患を患っているとの報告もある。いずれにしても「心の病気」への対応が、国を挙げて取り組むべき喫緊の課題であることは明らかである。太古の昔から人々の生活とともにあり、日々の暮らしや健康に寄与を続けてきたラベンダーならびにその精油は、不安という現代人の心の病に対しても力を貸してくれるのだろうか、得られる恩恵を最大限に活用するためにはどのような点に注意が必要なのかを検討していく。



図 3. *Lavandula angustifolia* 'Koimurasaki' (No3 Noushi) (群馬県沼田市玉原高原)

第1章 ラベンダーの種差と精油成分に関する検討

ラベンダー（ラバンデュラ属植物 (*Lavandula spp.*)）を構成する 39 種の植物は、形態学上の相違により *Angustifolia* 系 (*officinalis* 系、*vera* 系とも呼ばれる)、*Spike Lavender* 系、*Hybrid* 系 (*Lavandin* 系) および *Stoechas* 系の 4 系統に分類されている²。分析技術の発展により、ラベンダー精油に含まれるとされる成分の種類は増え続けているが、それぞれの含有量および存在比はこれらの系統間で大きく異なることが知られている。短く細い葉 (= *angustifolia*) や花穂部が短く粗である点を特徴とする *Angustifolia* 系 (*officinalis* 系、*vera* 系とも呼ばれる) は、LO および LA を最も多く含む系統であり、精油全体の 1/2~2/3 程度が両成分で構成されていると報告されている¹。一方、幅の広い葉 (= *latifolia*) を有する *Spike Lavender* 系では、高率で LO を含有するものの LA などエステル類は殆ど含有しない点が特色となっている^{1,2}。*Hybrid* 系 (*Lavandin* 系) は、前二者の自然交配により生じた種であり、形態学上および精油構成成分上とも両者の中間的な特徴を有するとされている¹。*Stoechas* 系は、海に面したケイ質土の丘陵に密生するなど湿度に対し強い耐性を獲得した系統であり、北海道以南の本邦においても栽培し易い種が多いとされている。前三者とは異なる点の多い個性的な系統であり、パイナップル状の形状をした花穂および鋸歯状の葉など非常に特徴的な外観を有している^{1,2}。構成成分的にも、主要構成成分の二成分をほとんど含まないかわりに *fenchone* や *camphor* などのケトン類を高率に含むとされている¹。

一般に、植物精油や漢方薬などの多成分系では、基原植物の違いによる構成成分の差が発現作用に大きく影響を及ぼす可能性があり問題となっている。もともと多くの種の植物で構成されていることに加え人工交配による栽培種の数も増え続けている点¹、基原が同一であっても天候や土壌、高度といった栽培条件の違いが精油成分に影響する可能性も示唆されている点を考慮すると、ラベンダーにおいて基原植物-成分-効果でなる三者の関係を明らかにすることは特に重要であると考えられる。そこで本章ではまず、基原植物および栽培条件の違いによるラベンダー精油の構成成分への影響について調査・解析することとした。

第 1 項 関東近郊におけるラベンダーの種差と主要精油成分の分布

第 1 項では、ラベンダー精油の主要構成成分であり、抗不安作用をはじめ多くの薬理作用の活性本体とされている LO および LA の二成分に着目し、基原植物や栽培条件の違いが両成分の含量や存在比に与える影響を調査した。このフィールド調査においては、精油含有率が最大となる 20~50% 程度の開花時点に合わせて関東近郊の主要なラベンダー栽培地を訪れ (図 4、表 1)、栽培地・栽培種ごとに花部・茎・葉のサンプルを入手し分析試料とした。本属植物の形態学上の違いと精油の構成成分を考える上では、*Angustifolia* 系、*Spike Lavender* 系、*Hybrid* 系 (*Lavandin* 系) および *Stoechas* 系の 4 系統が重要であるとされており¹⁴、これら 4 系統すべてのサンプルを回収できることが期待されたが、今回採取場所とした各施設では *Spike Lavender* 系に属する種の栽培実績がなく、*Angustifolia* 系 10 種、*Hybrid* 系 (*Lavandin* 系) 11 種、*Stoechas* 系 1 種、その他 2 種の合計 24 種が解析対象となった。ヘキサン抽出により得られた各試料について GC/MS 分析を行ない得られた LO および LA の含量を表 2 にまとめた。

両成分の含量を部位ごとに見ると、花部における含量が最も高く、葉や茎には殆ど含まれていないか含まれていてもごく微量であることが明らかとなった (表 2)。形態学的分類による系統別に見ると、LO は *Hybrid* 系 (*Lavandin* 系)、LA は *Angustifolia* 系で最も多く含まれていた。*Angustifolia* 系植物の精油成分に関するこれまでの報告では、LA や *Lavandulyl acetate* などのエステル類が精油成分全体の 50% 弱を占め、モノテルペンアルコール (主として LO) は約 1/3 を占めるとされている^{1,2}。今回の試料における LO・LA の含量平均はそれぞれ 0.78 ± 0.71 mg/g および 1.53 ± 1.90 mg/g であり、存在比としてはおよそ 1:2 で、上記報告と一致したものとなった。ただし、LO・LA それぞれの含量や両者の構成比にはサンプル間で顕著な差異が認められた。*Angustifolia* 系の形態学上の特徴としては、葉が短く細い点、花穂部が短く粗である点などが挙げられるが¹、今回採取した植物試料からランダムに抽出した 10 サンプル分の平均長は、前者が 5.7 ± 2.2 cm、後者は 2.6 ± 1.3 cm であった。また株全体も小さめで全長 50~60 cm 程度のものが殆どであった。

Hybrid (*Lavandin*) 系は、*Angustifolia* 系と *Spike Lavender* 系の自然交配により生まれた交雑種である。葉も花穂部も *Angustifolia* より顕著に長く花穂部が密である点が特徴的である。今回採取できたサンプルにおける花穂部の長さは 10.2 ± 3.9 cm であり、*Angustifolia* 系の約 4 倍の長さであった。株全体も大きく *Angustifolia* 系の倍もしくはそれ以上のものが多く見られた。*Hybrid* 系は、精油の収率向上を目的に作られた経緯もあり、LO・LA の含量は総じて高めであると報告されているが、LO については *Angustifolia* 系よりも高含量であったのに対し LA は *Angustifolia* 系における含量の方が高いという結果であった。LO:LA の存在比は、約 1:2 であった *Angustifolia* に対し *Hybrid* (*Lavandin*) 系ではおよそ 1:1

であった。また、両成分それぞれの含量および構成比は、*Angustifolia* 系同様サンプル間の差異が非常に大きく、例えば、同じ *L. intermedia* ‘Grosso’ であり外観上に大きな差は認められないにもかかわらず、同種の他の試料の 1/10 程度しか LO・LA を含まない種も存在した。

Stoechas 系は、外観上も精油の構成成分的にも非常に特徴的な系であり、LO・LA を殆ど含まないと報告されている¹。今回入手できたサンプルは、*L. stoechas* ‘Avon view’ という花穂部が白色の品種 1 種類のみであったため、系としての特徴を把握するには至らなかったが、花部に 0.03 mg/g、葉に 0.02 mg/g とごく少量の LO を含むのみという結果が得られた。

今回、関東近郊で得られたラバンデュラ属植物において、LO・LA の含有量および組成比について調査を行ったが、形態学的な分類による系統間での成分分布の相違に加え、同一系統内においてもサンプル間に顕著な差異の存在することが明らかとなった。この結果は、精油成分の含有量および組成比に対し、基原植物の系統の違いなど先天的な因子のみならず、生育環境をはじめとする後天的な因子も大きく影響することを示していると考えられた。植物精油の成分分布に影響を与える後天的な因子として一般的に考えられているものには、精油を採取する時期、栽培地の土壌や天候、高度などがある。ただし、先に述べたようにラベンダー精油の多くは花部の水蒸気蒸留で得られているため収穫期は初夏～夏にかけての開花期に限定される。したがって、年間を通して生産される木類の精油などに比べると構成成分の季節間変動は小さいと考えられる。一方、形態学的に分類されたラベンダーの 4 つの系統には、それぞれ生育に適した高度（海拔）のあることが知られており、海拔の高い地域で生育するものほどエステル類の含有率が高いとの報告もある²。そこで、限られた測定点・試料についてはあるが、今回の調査による試料採取場所の高度（海拔）と LO・LA の含量との関係を調べたところ、LA の含有量と高度との間には $r=0.65$ となる正の相関 ($p < 0.01$) が認められた（図 5）。自然交配、人工交配により同属植物内での多様化が進む中、このような相関が保たれていた点は興味深い。

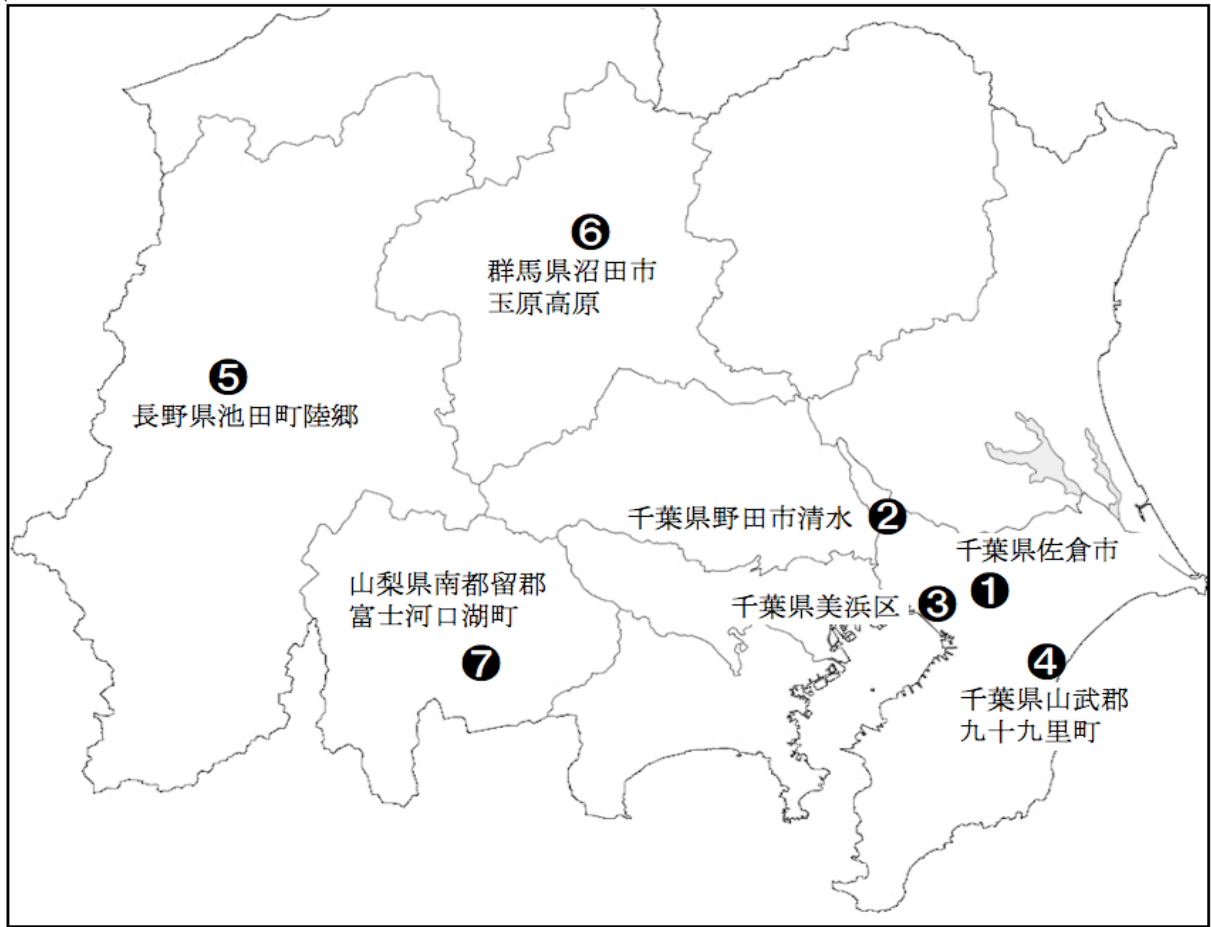


図 4：ラバンデュラ属植物採取場所

表 1： ラバンデュラ属植物の種間・種内構成成分の解析で用いた試料と採取場所

採取場所	緯度（海拔）	採取試料（学名）
佐倉ラベンダーパーク （千葉県佐倉市先崎：①）	N 35°43'7 (7.5 m)	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'
		<i>L. angustifolia</i> 'Okamurasaki'
		<i>L. angustifolia</i> 'Koimurasaki' (No3 Noushi)
清水公園 花ファンタジア （千葉県野田市清水：②）	N 35°57'5 (10 m)	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'
		<i>L. intermedia</i> cv. <i>super sevillean blue</i>
三陽メディアフラワーミュージアム （千葉県美浜区高浜：③）	N 35°36'1 (4 m)	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'
		<i>L. dentata</i>
九十九里ハーブガーデン （千葉県山武郡九十九里町片貝：④）	N 35°53'1 (2 m)	<i>L. intermedia</i> 'Alba'
		<i>L. angustifolia</i> 'Koimurasaki' (No3 Noushi)
		<i>L. stoechas</i> 'Avon view'
		<i>L. pinnata</i>
ラベンダーガーデン夢農場 （長野県池田町陸郷：⑤）	N 36°40'8 (734 m)	<i>L. intermedia</i> 'Provance Blue'
		<i>L. intermedia</i> 'Grosso'
たんばらラベンダーパーク （群馬県沼田市玉原高原：⑥）	N 36°39'2 (1307 m)	<i>L. intermedia</i> 'Provance Blue'
		<i>L. intermedia</i> 'Grosso'
		<i>L. angustifolia</i> 'Okamurasaki'
		<i>L. angustifolia</i> 'Koimurasaki' (No3 Noushi)
		<i>L. angustifolia</i> 'Nana Narisawa'
河口湖ハーブフェスティバル （山梨県南都留郡富士河口湖町：⑦）	N 35°49'0 (855 m)	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'
		<i>L. angustifolia</i> 'Okamurasaki'
		<i>L. angustifolia</i> 'Koimurasaki' (No3 Noushi)
		<i>L. angustifolia</i> 'JYONAN No.1'

表 2 : GC/MS 分析結果

分類	ラバンデュラ属植物の種類	採取場所	採取部位	LO [mg/g]	LA [mg/g]
Angustifolia 系	<i>L. angustifolia</i> 'Okamurasaki'	①	花	0.05	0.38
	<i>L. angustifolia</i> 'Okamurasaki'	⑥	花	1.60	6.73
	<i>L. angustifolia</i> 'Okamurasaki'	⑦	花	1.59	2.47
	(Mean±SD)			1.14±0.78	3.19±3.24
	<i>L. angustifolia</i> 'Koimurasaki'(No3 Noushi)	①	花	0.13	0.25
	<i>L. angustifolia</i> 'Koimurasaki'(No3 Noushi)	④	花	0.61	0.00
			葉	0.01	0.69
			茎	0.01	0.00
	<i>L. angustifolia</i> 'Koimurasaki'(No3 Noushi)	⑥	花	0.50	1.44
	<i>L. angustifolia</i> 'Koimurasaki'(No3 Noushi)	⑦	花	1.01	1.05
	(Mean±SD)			0.38 ± 0.40	0.69±0.59
	<i>L. angustifolia</i> 'Nana Narisawa'	⑥	花	0.49	2.17
	<i>L. angustifolia</i> 'Rosea'	⑥	花	2.18	1.34
<i>L. angustifolia</i> 'JYONAN No.1'	⑦	花	1.04	0.27	
Angustifolia 系 (Mean±SD)				0.78±0.71	1.53±1.90
Hybrid 系 (Lavandin 系)	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'	①	花	0.30	0.28
			葉	0.01	0.00
			茎	0.01	0.00
	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'	②	花	2.07	0.30
			茎	0.01	0.00
	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'	③	花	0.85	1.25
			茎	0.01	0.00
	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'	⑤	花	3.04	1.41
			葉	0.01	0.00
			茎	0.01	0.00
	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'	⑥	花	2.27	3.76
	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'	⑦	花	4.64	0.65
	(Mean±SD)			1.20 ± 1.59	1.28 ± 1.31
	<i>L. intermedia</i> 'Provance Blue'	⑤	花	1.09	0.37
	<i>L. intermedia</i> 'Provance Blue'	⑥	花	0.91	1.46
	<i>L. intermedia</i> cv. <i>super sevillean blue</i>	②	花	2.34	1.18
茎			0.00	0.00	
<i>L. intermedia</i> 'Alba'	④	花	0.69	0.06	
		茎	0.00	0.00	
<i>L. Intermedia</i> 'impress purple'	④	花	2.06	0.26	
		葉	0.00	0.00	
Hybrid 系 (Lavandin 系) (Mean±SD)				1.07±1.41	1.02±1.14
Stoechas 系	<i>L. stoechas</i> 'Avon view'	④	花	0.03	0.00
			葉	0.02	0.00
			茎	0.00	0.00
Stoechas 系 (Mean±SD)				0.02±0.02	-
4 分類以外	<i>L. dentata</i>	③	花	0.09	0.00
			葉	0.17	0.00
			茎	0.00	0.00
	(Mean±SD)			0.08 ± 0.08	-
<i>L. pinnata</i>	④	花	0.00	0.00	

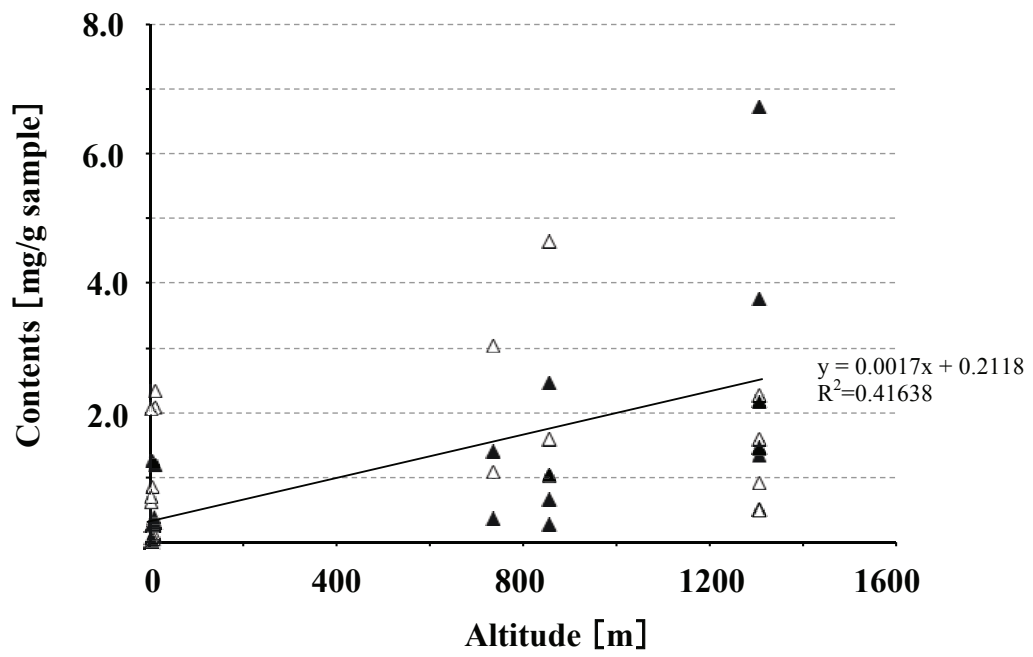


図 5 : LO (Δ) および LA (▲) の含量と試料採取地の高度との関係

第2項 関東近郊におけるラベンダーの種差と主要精油成分の光学分割

LO と LA の C 3 位はキラル炭素であり、それぞれ光学異性体 (-)体と(+)体)を有する。これまでの報告により、両異性体がいずれも自然界に存在すること、LO・LA 共、(+)体に対し(-)体を過剰に含む植物の多いことが明らかになっている^{35,39}。(+)体と(-)体との間に沸点や溶解度といった物理化学的特性の差はないが、芳香に違いを生じる場合があること⁴⁰、抗てんかん作用をはじめ精油投与による作用の有無や強度が異なる例など、生理活性や毒性に違いが見られる場合があることなども報告されている^{34,35}。そこで第2項では、ラベンダーの基原植物の種類や栽培条件の差による異性体の構成比の違いを明らかにすることを目的に、前項の解析でLOの含有が確認された合計24種の試料につき、キラルカラム CYCLOCIL-B (30 m x 0.25 mm ID、0.25 μm) を用いて GC/MS 分析を行った。

Angustifolia 系 10 種、Hybrid 系 11 種、Stoechas 系 1 種、4 分類以外 1 種の合計 23 種を対象として分析を行い、各試料における(-)-linalool と(+)-linalool の構成比を表3にまとめた。Angustifolia 系ならびに Hybrid 系では全試料において 96%以上が(-)体で構成されており、Casabianca および Ozek らによる報告と一致した結果が得られた。一方、Stoechas 系の 1 試料では、(+)体が 82.1%、(-)体が 17.9%と、その他大多数の試料に対し組成比の逆転現象が認められた。この試料が今回のフィールド調査で回収できた唯一の Stoechas 系試料であること、Stoechas 系に属する植物は元来 LO・LA を殆ど含有しないために光学分割についての文献報告もなされていないことなどの理由により、この逆転現象が系としての特徴なのか、*L. stoechas* 'Avon view' と称されるこの栽培種に特異的なものなのか、現時点での判断は困難である。しかしながら、(+)体に対し(-)体を過剰に含む植物が多いと結論している Casabianca らの報告においても、少数ではあるもののジャスミンやオレンジ、カルダモン由来の精油など、基原植物の種類によっては(+)体の方を過剰に含む精油も存在することがわかる。Stoechas 系のラベンダーがこの類に含まれるのか、今後さらなる調査が期待される。また、前項で調査した LO・LA の含有量とその組成比は同一系統内の植物であってもサンプル間で大きな差異が認められ、高度(海拔)と LA の含量とに相関が認められるなど、精油の成分構成が環境因子に影響されることを示していたのに対し、LO の光学異性体組成比における同一系統内のサンプル間の差異は非常に小さいものであった。このことは、精油の成分構成が生育条件をはじめとする環境因子の影響を強く受けて変動する一方で、光学異性体の組成比についてはこうした変化を受けにくく、種としての違いなど、より先天的な因子のみに影響されることを示唆した結果であると言えるのかもしれない。

表 3：キラルカラムを用いた GC/MS 分析結果

形態学的分類	ラバンデュラ属植物の種類	採取場所	(-)-linalool (%)	(+)-linalool (%)
Angustifolia 系	<i>L. angustifolia</i> 'Okamurasaki'	①	97.4	2.6
	<i>L. angustifolia</i> 'Okamurasaki'	⑥	98.0	2.0
	<i>L. angustifolia</i> 'Okamurasaki'	⑦	98.2	1.8
	<i>L. angustifolia</i> 'Koimurasaki'(No3 Noushi)	①	97.5	2.5
	<i>L. angustifolia</i> 'Koimurasaki'(No3 Noushi)	④	100.0	0.0
	<i>L. angustifolia</i> 'Koimurasaki'(No3 Noushi)	⑥	96.0	4.0
	<i>L. angustifolia</i> 'Koimurasaki'(No3 Noushi)	⑦	97.4	2.6
	<i>L. angustifolia</i> 'Nana Narisawa'	⑥	96.1	3.9
	<i>L. angustifolia</i> 'Rosea'	⑥	99.1	0.9
	<i>L. angustifolia</i> 'JYONAN No.1'	⑦	98.4	1.6
Hybrid 系 (Lavandin 系)	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'	①	97.3	2.7
	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'	②	99.5	0.5
	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'	③	97.0	3.0
	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'	⑤	99.3	0.7
	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'	⑥	98.9	1.1
	<i>L. intermedia</i> 'Grosso'	⑦	99.4	0.6
	<i>L. intermedia</i> 'Provance Blue'	⑤	97.7	2.3
	<i>L. intermedia</i> 'Provance Blue'	⑥	96.6	3.4
	<i>L. intermedia</i> cv. <i>super sevillean blue</i>	②	99.2	0.8
	<i>L. intermedia</i> 'Alba'	④	98.2	1.8
	<i>L. Intermedia</i> 'impress purple'	④	99.5	0.5
Stoechas 系	<i>L. stoechas</i> 'Avon view'	④	13.2	86.8
4 分類以外	<i>L. dentata</i>	③	82.1	17.9

第3項 4系統6種類のラベンダー精油における定性・定量評価

本項では、植物形態学的観点で分類された4つの系統（Angustifolia、Spike Lavender、Hybrid（Lavandin）Stoechas）ごとの精油成分の差をより詳細に調査するため、本邦で入手可能なラベンダー精油のうち、原産地や精油抽出方法、基原植物採取年、ロット番号等が明記され、トレーサビリティの観点から确实性の認められたもの計6種（表4）を精油試料とし定性・定量分析を行った。定性分析は、非極性キャピラリーカラム Equity-1 を装着し、ガスクロマトグラフィー質量分析計 Claus 500GC / Claus 500 MS を用いて行った。得られたピークの同定は、保持指標（Retention Index、以下 RI）と文献値との比較、MS のライブラリである NIST MS Search Version 1.7（NIST / EPA / NIH Mass Spectral Library）による MS スペクトルの比較、および標準品による RI・MS スペクトルとの直接比較により行った。定量は、ガスクロマトグラフィー GC2100 Plus にて、水素炎イオン化検出器（FID）、非極性カラム Equity-1 を用いて行った。標準物質には pentadecane を採用し、絶対検量検量線法により6種のラベンダー精油試料中の化学成分量を算出した。

表4：精油試料の概要

Major Division	Lavandula taxon	Country of Origin	Extraction Method (Extracted part)
Angustifolia	<i>L. officinalis</i> (= <i>L. angustifolia</i>)	France	Hydrodistillation (Flower)
Spike Lavender	<i>L. latifolia spica</i>	Spain	Hydrodistillation (Flower)
	<i>L. latifolia</i>	France	Hydrodistillation (Flower, Leaf)
Hybrid (Lavandin)	<i>L. hybrida</i>	France	Hydrodistillation (Flower, Leaf)
	<i>L. burnatii super acetate</i>	France	Hydrodistillation (Flower)
Stoechas	<i>L. stoechas</i>	Spain	Hydrodistillation (Flower)

化学成分分析の結果を図6、図7および表5に示した。4つの系統とそれぞれの精油構成成分において、系統間・系統内の成分分布の違い、および系統ごとの既知報告内容との比較検討結果につき考察を行った。Angustifolia系に属する *L. officinalis* (= *L. angustifolia*) 由来の精油試料中には、主要二成分である LO・LA をはじめ、今回調べた4系統中最多の合計21成分の存在が確認された。ラベンダー精油を芳香療法で用いる場合、特定の精油成分の含量や含有率を規定する基準は現在のところ設けられていない。一方、同精油を香料や食品添加物として用いる場合には、ISO (国際標準化機構) や AFNOR (フランス規格協会) といった公的機関が品質保証のための基準を設けており、エステル (LA) 含有率として 38-58% 含有することを規定している。今回試料として用いた *L. officinalis* 精油中の LA 含有率は6試料中最大の 45.5% であり、これらの基準を満たしていたことがわかる。また、LO:LA の存在

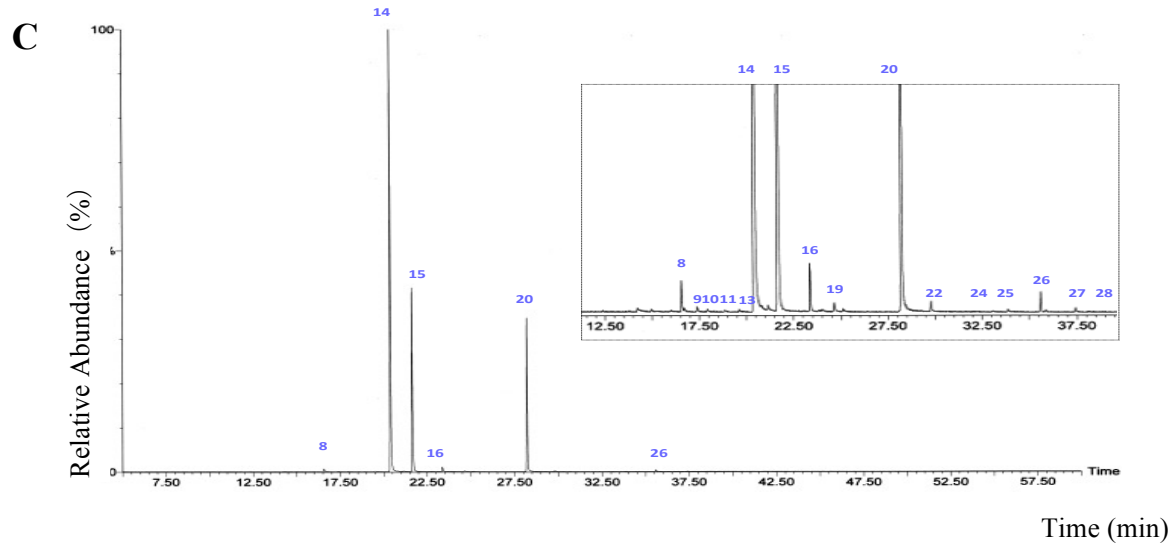
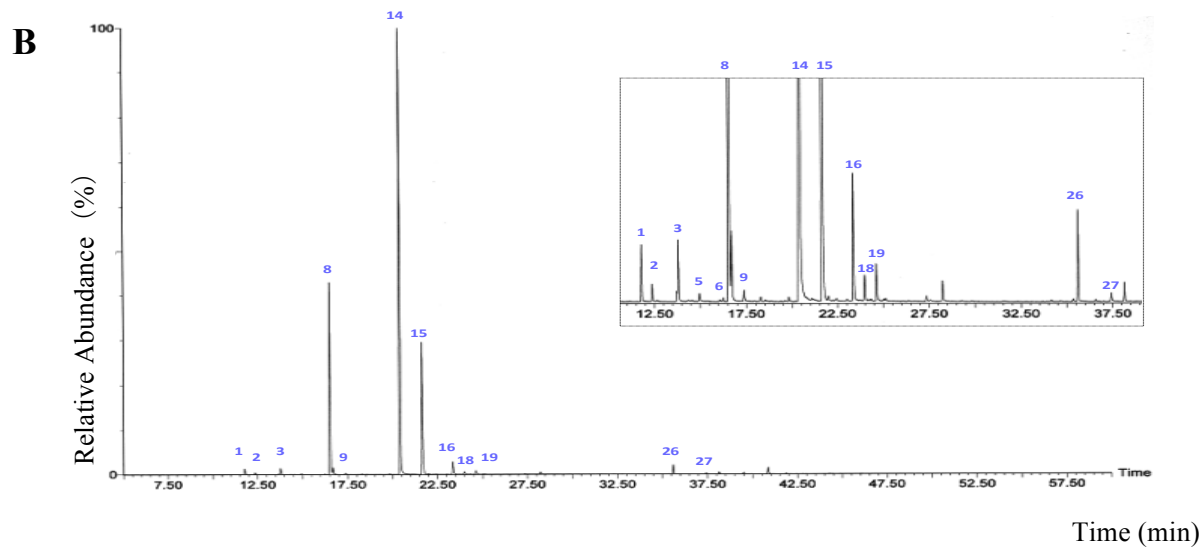
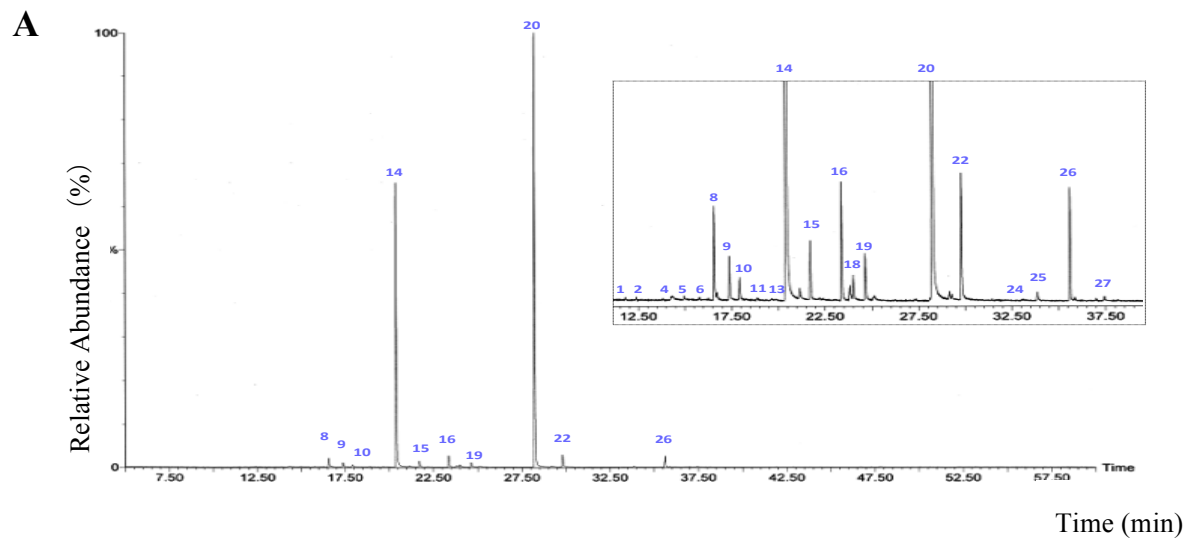
比はおよそ 2:3 であり、第 1 項で得られた存在比 (1:2) 同様、LO に対し LA を多量に含む *Angustifolia* 系の特徴が確認された。LO・LA 以外に多く含有されていた成分には、セスキテルペン類の β -caryophyllene をはじめ、lavandulyl acetate、borneole、cis-ocimene などがあつた。一般に、鎮静作用・抗不安作用などを目的としてラベンダー精油を使用する場合には、LO・LA の含有率が高く刺激成分である camphor を最小限しか含まないものが最適とされている³。今回の試料における camphor の含有量は、全 6 精油試料中最低の 9.2 g/L であり成分構成上、向精神作用を目的とした利用に適した精油であると言える。

Spike lavender 系精油についての既報では、LA の含有が殆ど認められず、1,8-cineole、camphor、 α -及び β -pinene などを高率で含有していることが特徴として挙げられている^{1,2}。芳香療法を行う上で、これらの成分構成は抗菌作用や皮膚障害（尋常性ざ瘡や膿胞など）、脂肪・粘液溶解作用などを期待して用いるのに適すと考えられている。一方、ケトン類の含有率の高い本系統の精油は、神経毒性や墮胎作用があるため乳幼児、妊婦、授乳中の産婦や、てんかん患者や神経機能の弱っている高齢者への使用は避けるべきとされている。今回調査対象とした 2 つの試料中、*L. latifolia spica* 由来の精油についてはほぼ既報通りの成分構成であつたが、*L. latifolia* を基原植物とする精油については、LA が 131.0 g/L と相当量が含まれており上述の報告内容からの乖離がみられた。同一系統内において主要構成成分の分布に大きな差異の認められたこの結果は、第 1 項での調査結果とも一致するものであり、ラベンダー精油の成分分布が植物形態学的な相違以外の後天的な因子により影響されることが再度確認された。

Angustifolia 系と Spike lavender 系の配合種である Hybrid 系（Lavandin 系）としては、*L. hybrida* および *L. burnatii super acetate* の 2 種に由来する精油を試料とした。花穂部が長く密であるため精油の収集効率が *Angustifolia* の 3 倍程度にまで上昇すること、成分構成上は *Angustifolia* 系と Spike lavender 系の中間的な特徴を有することが知られており¹、今回対象とした 2 試料における成分分布もおおよそ既報通りであつた。なお、LO:LA の存在比は第 1 項のフィールド調査で得られた結果同様、両者ともおおよそ 1:1 であり、主要構成成分の分布に限ってみると系統内の差異は確認されなかつた。一方、LO・LA 以外の構成成分を 2 つの試料間で比較をすると、*L. hybrida* 由来の精油に含有の認められたアルコール類の telpenine-4-ol や α -terpineol、エステル類の neryl acetate や geranyl acetate が *L. burnatii super acetate* では殆ど認められなかつた点など、顕著な分布の差異が認められた。

Stoechas 系が形態学的にも含有成分的にも特異である点はすでに述べた通りであり、既報では、LO・LA の含有をほとんど認めず、駆虫・殺虫成分とされる fenchone や camphor などのケトン類を高率に含むとされている¹。今回試料とした *L. stoechas* 由来の精油についても既報と同様の成分分布が確認された。本試料中には、6.5 g/L と微量の LO の含有が見られ、この点は第 1 項のフィールド調査で対象とした試料 (*L. stoechas* 'Avon view') における結果と一致するものであつた。

本項では、形態学上分類に基づく系統ならびに種の異なるラベンダー精油の化学成分の同定及び定量を行った。その結果、系統間の成分分布の差異については概ねこれまでの報告どおりであった。一方、LA は含有しないとされる Spike Lavender 系の試料中に相当量の当該成分を含むものが存在したことなど、同一系統内において顕著な量的・質的相違が認められるケースも存在した。前章および本項で得られた結果より、ラベンダー精油の作用に影響すると考えられる構成成分の存在量・存在比は、ラベンダーの形態学的な違いや種類の相違のみならず基原植物の生育環境等によっても大きく変わり得ることが明らかとなった。本精油の適正使用には、成分分析のなされた精油を用途に応じて正しく選択できることが重要である。



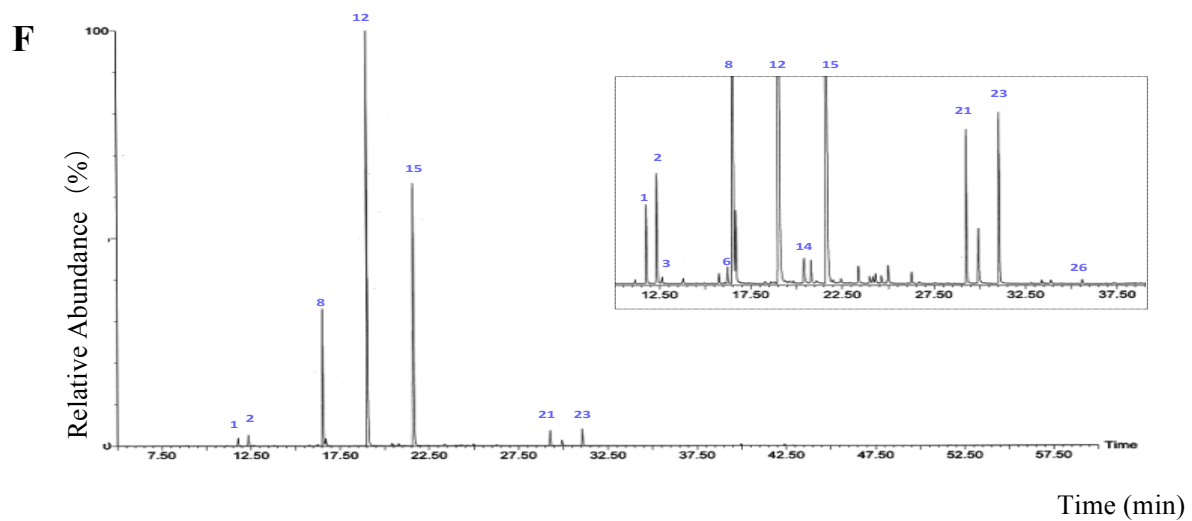
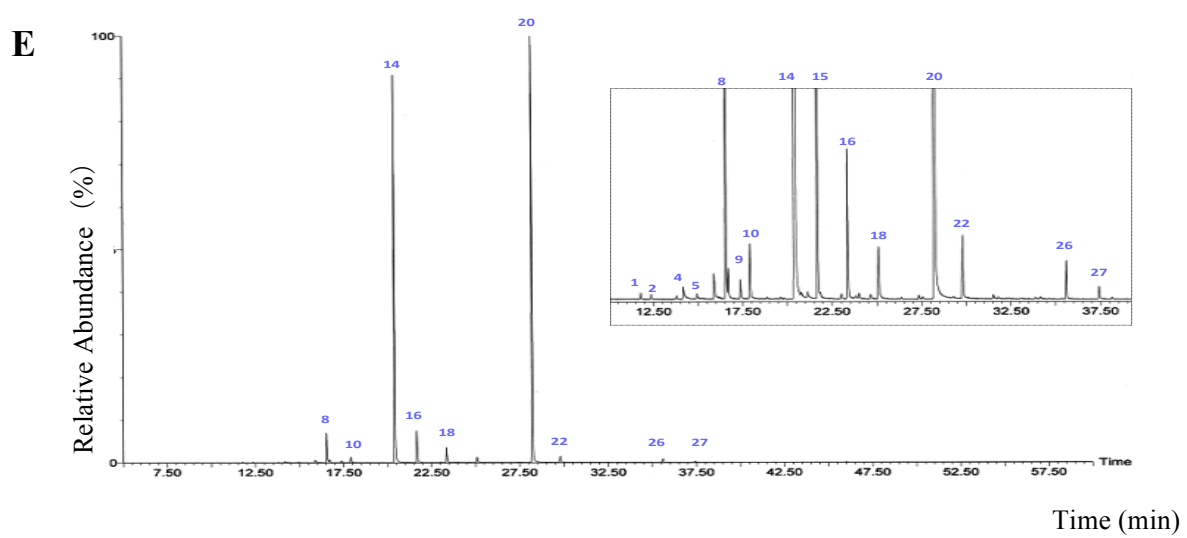
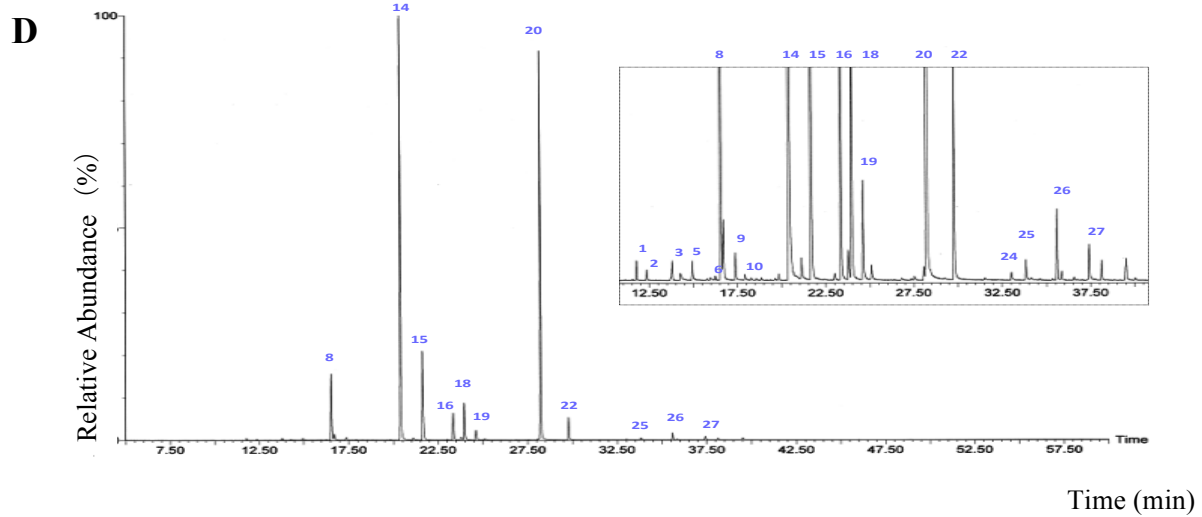
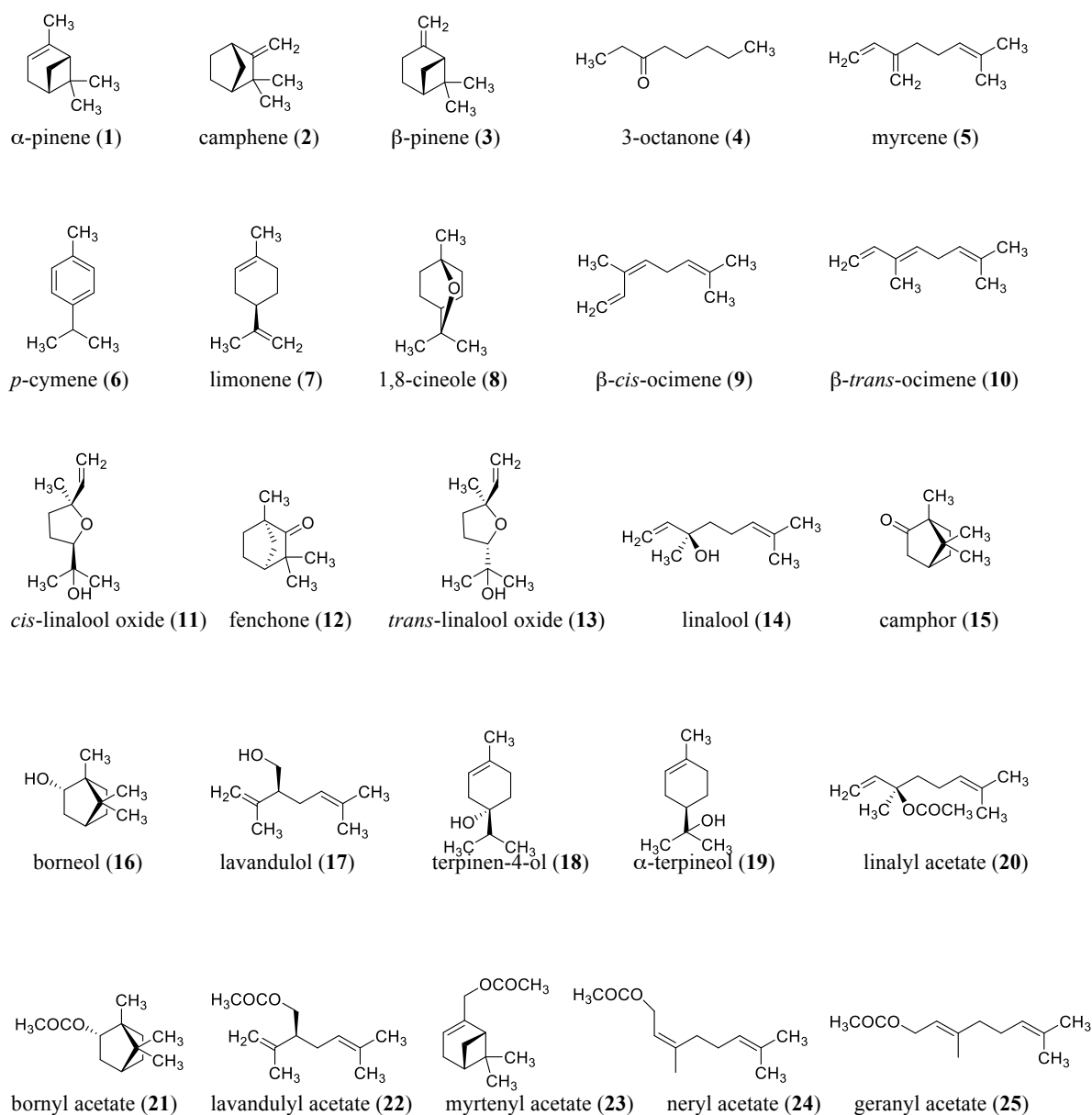


図 6: 系統別6種類のラバンデューラ属植物精油の GC-MS 分析による TIC

A : *L. officinalis*, B : *L. latifolia spica*, C : *L. latifolia*, D : *L. hybrida*, E : *L. burnatii super acetate*, F : *L. stoechas*

モノテルペン類



セスキテルペン類

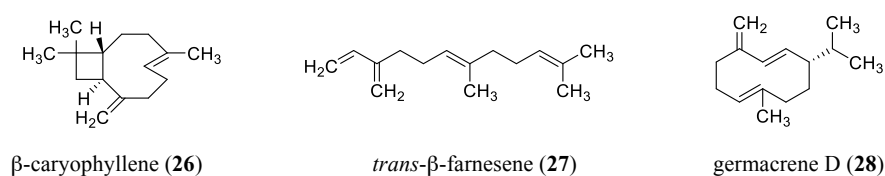


図7: ラベンダー精油が含有する 28 種の化学成分

表 5 : 4 系統別 6 種類のラベンダー精油における成分分析結果

Compound	Identification	LRI ¹⁾	LRI ²⁾	Quantitative Data (g/L)						
				Lof	Lls	Ll	Lh	Lb	Ls	
1	α -Pinene	RI, MS, Std	932	926	0.5	9.4	–	2.9	1.9	13.8
2	Camphene	RI, MS, Std	946	936	0.6	3.4	0.5	1.8	1.9	17.6
3	β -Pinene	RI, MS, Std	974	966	–	10.0	–	3.0	–	1.4
4	3-Octanone	RI, MS	979	971	3.1	–	–	–	9.3	–
5	β -Myrcene	RI, MS, Std	988	984	2.6	3.1	2.0	4.5	3.1	–
6	<i>p</i> -Cymene	RI, MS	1020	1008	0.5	1.5	–	1.0	–	3.7
7	Limonene	RI, MS, Std	1024	1012	–	–	2.4	–	–	–
8	1,8-Cineol	RI, MS, Std	1026	1014	13.3	147.9	5.6	44.1	39.3	119.9
9	β - <i>cis</i> -Ocimene	RI, MS	1032	1018	10.3	2.4	2.8	3.9	5.7	–
10	β - <i>trans</i> -Oimene	RI, MS	1044	1029	6.5	–	2.1	1.5	14.3	–
11	<i>cis</i> -Linalool oxide	RI, MS	1067	1051	1.5	–	1.1	–	–	–
12	Fenchone	RI, MS, Std	1083	1069	–	–	–	–	–	339.6
13	<i>trans</i> -Linalool oxide	RI, MS	1084	1073	1.0	–	1.3	–	–	–
14	Linalool	RI, MS, Std	1095	1088	233.2	384.0	344.8	244.9	370.7	6.5
15	Camphor	RI, MS, Std	1141	1120	9.2	114.2	161.7	58.6	46.9	246.3
16	Borneol	RI, MS	1165	1143	18.0	13.0	6.8	22.6	22.0	–
17	Lavandulol	RI, MS, Std	1165	1144	–	–	–	trace	–	–
18	Telpinen-4-ol	RI, MS, Std	1174	1162	6.8	4.8	–	28.8	3.5	–
19	α -Terpineol	RI, MS, Std	1186	1168	10.1	7.7	4.6	13.2	–	–
20	Linalyl acetate	RI, MS, Std	1254	1245	311.0	–	131.0	207.9	383.3	–
21	Bornyl acetate	RI, MS, Std	1284	1264	–	–	–	–	–	19.8
22	Lavandulyl acetate	RI, MS	1288	1276	18.3	–	3.1	18.1	12.9	–
23	Myrtenyl acetate	RI, MS	1324	1302	–	–	–	–	–	22.7
24	Neryl acetate	RI, MS, Std	1359	1346	2.1	–	1.2	2.5	–	–
25	Geranyl acetate	RI, MS, Std	1379	1364	5.3	–	2.2	4.6	–	–
26	β -Caryophyllene	RI, MS, Std	1400	1404	24.2	15.5	7.9	11.6	11.6	2.1
27	β -Farnesene	RI, MS	1440	1447	6.0	4.6	3.8	9.4	7.7	–
28	Germacrene D	RI, MS	1484	1464	–	–	1.4	–	–	–

Lof: *L. officinalis*, Lls: *L. latifolia spica*, Ll: *L. latifolia*, Lh: *L. hybrid*, Lb: *L. burnati super acetate*, Ls: *L. stoechas*

LRI¹⁾: Reference LRI (DB-5), LRI²⁾: Measured LRI (Equity-1)

小括（第1章）

本章では、ラベンダーの基原植物および構成成分との関係を明らかにすることを目的として調査を行った。第1項では、関東近郊のラベンダー栽培地域より植物サンプルを回収し、ラベンダーの主要構成成分であり抗不安作用への関与も報告されている LO および LA の含量を測定し、形態学的分類による系統間・系統内の両成分分布の違いについて比較検討を行った。LO および LA の含有量は部位的には花部が最も多く、形態学的分類で見ると LO については Hybrid (Lavandin) 系 (1.07 ± 1.41 mg/g)、LA については Angustifolia 系 (1.53 ± 1.90 mg/g) で最も多く分布していた。LO:LA の存在比は、Angustifolia 系で約 1:2、Hybrid 系で約 1:1 となり、主要構成成分分布の系統ごとにみられた特徴は概ねこれまでの報告内容と一致したものであった。一方、無いかあっても小さいと推測していた系統内における差異は当初の推定より大きく、同一系統の異なる試料間で LO 含有量が 10 倍以上異なるケースも見られた。同一系統内のサンプル間に構成成分分布の差異が認められる傾向は、第3項における精油試料を用いた調査でも確認されており、ラベンダー精油の主要構成成分の含有量や組成比は、基原植物の系統のみならず、それぞれの植物の生育環境など後天的な因子も大きく影響することが考えられた。この点に関し、第1項のフィールド調査にて試料採取場所の高度（海拔）と LO・LA の含量との関係を調べたところ、LA の含有量と高度との間には $r=0.65$ となる正の相関 ($p < 0.01$) が認められており、ラベンダー栽培地の高度が得られる精油の成分構成に差異を生じる環境因子の一つであることが確認された。

また、第2項では、キラルカラムを用いた検討により LO の光学異性体の組成比を調査した。その結果、Angustifolia 系および Hybrid 系の全試料において 96%以上が(-)体で構成されていたことが明らかになった。一方、これら大多数の試料における結果とは対照的に、Stoechas 系の1試料においては(+)体が 82.1%、(-)体が 17.9%と組成比の逆転現象が認められた。本試料が唯一の Stoechas 系試料であり、参考となる文献報告等も存在しないため今回の調査結果のみからこの現象を説明するのは困難であった。しかしながら、本項における検討結果のうち、主要構成成分の含有量や組成比と異なり、光学異性体の組成比は系統内の差異が非常に小さかったという点は特筆すべきと考える。光学異性体の組成比は植物の生育環境など後天的因子の影響を受けにくい傾向にあるのではないかと考察しているが、さらに多くの試料を対象とした網羅的調査の結果が待たれる。

希釈が必要な他の多くの精油と異なり原液の皮膚への適用が可能であること、海外では内服で用いる場合があることなどからもわかるように、ラベンダー精油は一般に安全性の高い精油であると考えられている。一方、上述したように fenchone や camphor といったケトン類を含む Spike Lavender 系や Stoechas 系を基原植物とする精油には神経毒性や墮胎作用の恐れがあり、乳幼児や妊産婦・授乳婦などでは使用禁忌とされるなど注意も必要である。また、近年、LO のアレルゲンとしての作用が注目されており、2003 年 European Cosmetics Directives (欧州化粧品規制 [協会]) では、アレルギーを起こす

可能性がある成分として、他の 26 成分とともに LO の表記を義務づけている⁴¹。さらに、ラベンダー精油により健康な男児 3 人に女性化乳房が発症した事例が紹介され、米国立環境衛生科学研究所における調査で、本精油にエストロゲン様作用、および抗アンドロゲン作用を有する可能性があることを報告している。ラベンダー精油をはじめ精油は多成分系で構成されているがゆえに有害作用を含め非常に多くの作用がみられるが、医療現場における適正使用を考える上では、今後、それぞれの作用について寄与成分を特定し機序を解明していくことが重要であると考えられる。

第2章：ラベンダー精油吸入による抗不安様作用の評価

「不安」は、具体的な対象のない恐怖（怖れ）によって生じる情動現象の総称であり、元来は、危険に対する条件反射的な反応として発生したと言われている。よって、「不安」を感じることは正常な反応であり、むしろ生体に備わっているべき危機管理機能であると解釈されている。一方、この応答が過度になり通常機能に影響を及ぼす異常な状態を来すことがある。ヒトの場合、恐怖に対する条件反射反応や動悸、震え、頻尿、頭痛などの身体症状を経験する。これもまた正常な反応であるが、強度・持続性が過度となり生活に支障を来すようになるのがいわゆる不安障害である。ストレスの多い現代社会において本疾患の有病率は高く、本邦では4.8%と報告されている⁴²。また、Kesslerらの報告では、過去12ヶ月間に不安障害を経験した人の割合は18.1%にのぼり、全精神疾患中最も高いとされている⁴³。CAMとしての芳香療法において、向精神作用が注目されていることもこうした背景と無関係ではないだろう。

現在、匂い物質に対する生体の応答に関する研究としては、単離した嗅覚細胞における電気生理学的研究⁴⁴や僧帽細胞からの電気信号に対する糸球体応答を観察する方法⁴⁵、もしくは、ヒトにおいて特定の匂い成分を吸入した後に脳のどの部位が活性化しているかをfMRI(functional magnetic resonance imaging; 機能的磁気共鳴画像法)や脳波、PET(positron emission tomography; ポジトロン放出断層撮影法)などを用いて間接的に観察する方法などが用いられている⁴⁶。これらに加え、EPM試験をはじめとする動物の行動を指標とした評価系、いわゆる行動薬理試験が普及し芳香療法による向精神作用の検証に大きく拍車をかけたことは既に述べた通りである。現在に至るまで、植物油による不安に対する効果の多くがこの方法を用いて検証されている。東邦大学薬学部生薬学教室では、いわゆる西洋産の精油に加え、沖縄産ゲットウ(*Alpinia zerumbet*)⁴⁷⁻⁴⁹、トドマツ(*Abies sachalinensis*)⁵⁰、ユズ(*Citrus junos*)⁵¹など、本邦産精油の抗不安様作用についても有用な知見を多く報告している。第2章では、基原植物-成分-効果でなる三者の関係を明らかにし、ラベンダー精油吸入による不安への効果の全体像解明を目的として調査を行った。はじめに第1項では、第1章で明らかにしたラベンダー精油の基原植物と成分構成の関係、およびこれらの差異が不安への作用に及ぼす影響を調べるため、前章で対象とした6種のラベンダー精油を吸入させた動物にEPM試験を適用し効果の比較を行った。続く第2項では、観察される抗不安様作用をラベンダー精油の主要構成成分であるLO・LAに帰することができるのかを検討すべく両者の含有量および含有率とEPM試験結果との関係を調査した。匂い物質を吸入した場合、これが情動行動となって現れるまでの経路には神経科学的経路、つまり匂い物質が嗅覚伝導路を伝わって行動の変化に至る経路、および呼吸器系から吸収された成分が全身循環に入りBBB(血液-脳関門)を経て脳内に入る薬物学的経路の大きく二つの経路がある。近年では、吸入により鼻腔に到達した低分子自身が、篩骨板を透過して直接脳内に移行し中枢作用を発現する可能性も指摘されている⁵²。植物油の吸入時に向精神作用が見られる場合、一般にはこれらの経路が協同的に

関わっているのではないかと考えられている。ただし、精油の効果における再現性担保のためには、作用発現にかかる経路を明らかにし、安定して効果を得られるようにすることが重要であると考え、本項では、LO・LAの脳への移行量について検討を行った。

昨今の生化学的・神経イメージング研究の進歩により、不安障害の病態の根幹には、扁桃体や海馬の過出力（過活動）があることが示されつつある⁵³。また、抑制性神経伝達物質であるGABAレベルの低下が不安を引き起こすことはよく知られるところであり⁵⁴⁻⁵⁶、GABAの作用を増強するBDZ系薬剤による治療が長い間不安障害治療の主流となっていた⁵³。一方、近年では、不安とセロトニン(serotonin; 以下5-HT)神経系との関連が注目されている⁵⁷⁻⁵⁹。5-HT合成酵素阻害薬である*p*-chlorophenylalanine (PCPA) や5-HTの神経毒である5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT)の投与によりsocial interaction test やコンフリクト試験で抗不安様作用が認められたこと、既に臨床応用されているブスピロンやタンドスピロン(セディール®)が5-HT_{1A}受容体の部分作動薬であり5-HT神経活動を低下させることにより抗不安様作用を呈することなどから、5-HT神経系の過活動が不安を誘発している可能性も示唆されている⁶⁰。こうした背景もあり5-HT神経系に作用する薬剤は現在、これまで主流であったBDZ系薬剤とともに不安障害の治療においてあらたな地位を築きつつある。ラベンダー精油による抗不安作用はEPM試験などの行動薬理試験でポジティブコントロールとして用いられるBDZ系薬剤に類似していると考えられており、その作用機序はGABA_A/BDZ系を介したものであるとの見方が優勢である。しかしながら、他の神経系の寄与を示唆する報告も散見され現時点で統一した見解は得られていない⁶¹⁻⁶⁵。こうした中、2013年、ChiocaらはGABA神経系および5-HT神経系それぞれの遮断を組み合わせた系において、行動薬理試験の一つであるガラス玉覆い隠し試験を実施し、ラベンダー精油による抗不安作用がGABA_Aではなく5-HT神経系を介したものであると結論づけている⁶⁶。ラベンダー精油の主要成分LOについてはあるが、梅津らもまたGABA以外の神経系によるのではないかとの推察をしている²⁰。第3項では、ラベンダー精油による抗不安作用の機序について知見を得る目的で、5-HT神経系が作用発現に寄与しているのか否かを神経生理学的な手法を用いて検討した。

第1項 4系統6種のラベンダー精油吸入による抗不安様作用の評価

前章で報告した4系統6種のラベンダー (*Lavandula officinalis* (**Lof**)、*L. latifolia spica* (**Lls**)、*L. latifolia* (**LI**)、*L. hybrida* (**Lh**)、*L. burnati super acetate* (**Lb**)、*L. stoechas* (**Ls**)) から抽出され販売されている精油、Linalool (**LO**) 標準品、Linalyl Acetate (**LA**) 標準品、および蒸留水(コントロール、DW)、各4 μ L/L airをろ紙に染み込ませ、5Lのガラスコンテナの上蓋内側に配置し、室温にて揮発させた。コンテナ内にICR系雄性マウスを入れて90分間吸入させた後、10分間EPM試験を用いた評価を行った。試験結果は行動解析ソフト ANY-maze を用いて解析した。

EPM試験結果につき、不安関連パラメータであるOA(オープンアーム)滞在時間(秒)を比較したところ(図8A)、コントロール群(蒸留水(DW)吸入群)では、84.9秒であったのに対し、前項での成分分析にてLO及びLAの両方を殆ど含んでいなかった*L. stoechas* (**Ls**)、LAを含有しない*L. latifolia spica* (**Lls**)を除き、全ての精油試料において、有意な滞在時間の延長が認められた($p < 0.05$)。*L. latifolia spica* (**Lls**)と同一系統であるにもかかわらず、成分構成上大きな差異を認めた*L. latifolia*, (**LI**)による滞在時間の延長が最長($p < 0.01$)であり、コントロールの2.32倍に達していた。オープンアーム進入率(%) (図8B)についても概ね同様の傾向が見られ、*Lavandula officinalis* (**Lof**)、*L. latifolia*, (**LI**)ならびに*L. hybrida* (**Lh**)の3精油については、コントロールとの間に有意な差が認められた($p < 0.05$)。EPM試験10分間の試験期間中に試験動物が移動した総距離(図8C)は、自発運動量(locomotor activity)の指標とするパラメータであるが、DW群といずれの精油曝露群との間にも有意な差は認められなかった。自発運動(量)の指標となる他のパラメータ(オープンアームとクローズドアームへの侵入回数合計、クローズドアーム侵入回数⁶⁷⁾)においても差はなく、このことは、これらのラベンダー精油が自発運動量には影響を及ぼさずに抗不安様作用を呈しており、得られた結果が精油の興奮様作用による運動量亢進に付随する見かけ上の変化ではなく、精油がもつ本来の抗不安様作用であることを示している⁶⁸⁾。

さらに、基原の異なる精油の構成成分と得られた抗不安様作用との関係を見ると、有意な抗不安様作用が認められた精油には、いずれもLO及びLAが相当量含まれており、抗不安様作用の発現にはLO・LAの両方の存在が重要であることが示唆された。梅津らは、*L. officinalis*由来の植物精油および同精油中で同定された全6成分についてコンフリクト試験を行い、ラベンダー精油の効果はLOに帰すことができると結論づけている^{10,21)}。本研究においても、LOおよびLAの標準品をいわゆるポジティブコントロールとして用い抗不安様作用の比較対象としていたが、LO投与群では、有意な抗不安様作用が確認され、単一で抗不安様作用を呈することが確認された。しかしながら、今回調査対象とした6種の精油とLO・LAの含量、抗不安様作用との関係を示した表7にあるように、両者と抗不安様作用とに相関は認められず、LO以外にも作用発現に関わる成分があることが推察された。また、本実験で使用した精油がマウスの体内に全て吸収されたと仮定した場合、前章での成分分析結果より、LO

標準品中には 16.5 mg の LO が含まれていたのに対し、6 精油中最も顕著な抗不安様作用を呈した *L. latifolia* 由来の精油中に含まれていた LO は 6.8mg のみと計算される(表 6)。このことから、ラベンダー精油吸入による抗不安様作用の発現には LO 以外にも複数の成分の影響があるものと考えられた。そこで LO および LA の含有量・含有率と抗不安様作用との関係を両者の相関から検討したところ、LO と LA の含有率の和と抗不安様作用とに、有意な正の相関が認められることが明らかになった ($r=0.82, p<0.05$)。LA を単独で吸入させたマウスにおいては作用発現が見られていないことから、LA は LO による抗不安様作用に対し何らかの様式で相互作用を起こしているのではないかと推察された。

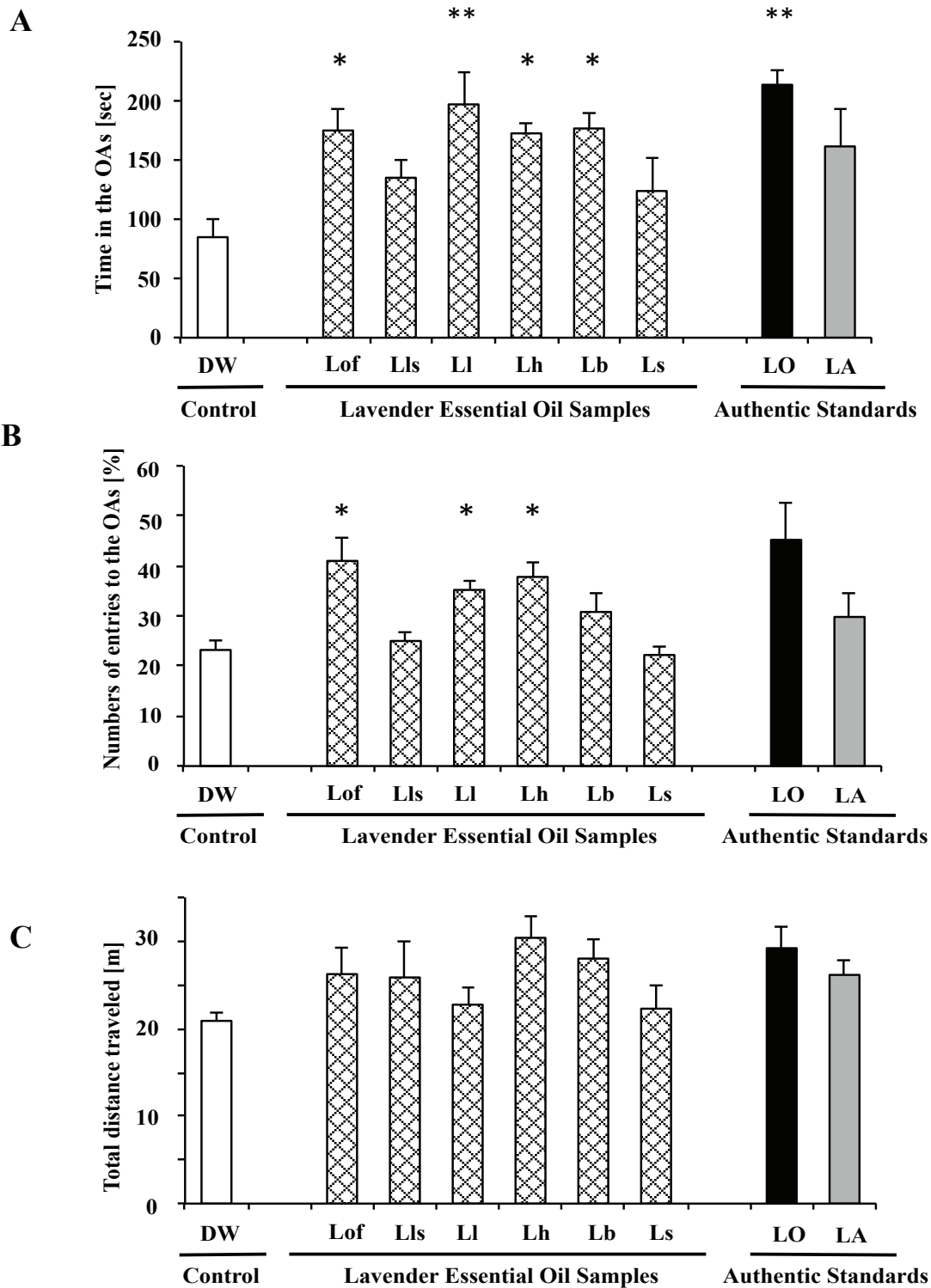


図 8： 4 系統 6 種のラベンダー精油 [4 μ L/L air] 吸入による抗不安様活性

A: OA 滞在時間 (秒)、B: OA 侵入回数 (%)、C: 総移動距離 (m)

*: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$ vs. control (DW)

Lof: *L. officinalis*, Lls: *L. latifolia spica*, Ll: *L. latifolia*, Lh: *L. hybrid*, Lb: *L. burnati super acetate*, Ls: *L. stoechas*
 DW: Distilled water, LO: Linalool, LA: Linalyl acetate

表 6: 4 系統 6 種の精油(4 μ L/L air)および LO・LA 標準品(4 μ L/L air)中に含まれる LO、LA の量

	Lof	Lls	Ll	Lh	Lb	Ls	LO authentic standard	LA authentic standard
LO content in mg	4.7	7.7	6.8	4.9	7.4	0.1	16.5	0
LA content in mg	6.2	0	2.5	4.2	7.6	0	0	18.2

Lof: *L. officinalis*, Lls: *L. latifolia spica*, Ll: *L. latifolia*, Lh: *L. hybrid*, Lb: *L. burnati super acetate*, Ls: *L. stoechas*
 LO: Linalool, LA: Linalyl acetate

表 7: 4 系統 6 種の精油中の主要成分含有率と抗不安様作用との関係

	Lof	Lls	Ll	Lh	Lb	Ls	Correlation
Content in %	LO	34.1	53.2	50.2	35.8	39.7	r = + 0.54
	LA	45.5	0.0	19.1	30.4	41.0	r = + 0.72
	LO+LA	79.5	53.2	69.3	66.1	80.8	r = + 0.82*
Anxiolytic effect in EPM test (Time on the OAs [sec])	175.0	135.1	197.0	172.6	176.7	123.9	

Lof: *L. officinalis*, Lls: *L. latifolia spica*, Ll: *L. latifolia*, Lh: *L. hybrid*, Lb: *L. burnati super acetate*, Ls: *L. stoechas*
 LO: Linalool, LA: Linalyl acetate, OA: Open arm

第2項 ラベンダー精油の主要構成成分による抗不安様作用

ラベンダー精油による抗不安様作用の発現には、LOのみならずLA共存の重要性が示されたため、両者の関係についてさらなる検討を行った。ここでは、LOおよびLAを種々の濃度で単独に投与した場合と両者を混合して投与した場合とで抗不安活性の比較を行う方法を採択した。

表8：LO・LAを単独投与した場合と混合投与した場合のEPM試験結果

Sample	Dose	Time in the OAs [sec]	Number of entry to the OAs [%]	Total distance traveled [m]
Control (DW)	4 μ L/L air	83.8 \pm 16.8	25.0 \pm 1.8	19.8 \pm 0.9
	2 μ L/L air	94.8 \pm 26.8	31.6 \pm 1.4	29.9 \pm 8.1
LO	3 μ L/L air	122.5 \pm 16.7	29.6 \pm 4.3	25.8 \pm 2.7*
	4 μ L/L air	228.7 \pm 18.4**	47.3 \pm 3.8**	29.8 \pm 2.2**
LA	3 μ L/L air	90.1 \pm 34.0	29.2 \pm 4.7	23.0 \pm 2.9
	4 μ L/L air	164.1 \pm 34.6	33.2 \pm 4.6	27.4 \pm 1.5**
LO (2 μ L/L air) + LA (1 μ L/L air)		252.0 \pm 36.5***	51.5 \pm 3.6**	31.0 \pm 2.2

** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. Control (DW)

LO: Linalool, LA: Linalyl acetate, OA: Open arm

LOおよびLAを単独で吸入させた場合と混合して同時に吸入させた場合のEPM試験結果を表8にまとめた。LO吸入時には、濃度依存的に抗不安様活性の増強が認められ4 μ L/Lairではコントロール群(DW吸入群)に比べ、OA滞在時間(秒)、OA侵入回数(%)共に有意な増加が認められた($p < 0.01$)。しかしながら、一方のLAでは4 μ L/Lairにおいても抗不安様作用は認められなかった。次に、LOとLAとの相互作用について検討するため、いずれも単独では抗不安様作用の発現には満たない量(LO 2 μ L/L air + LA 1 μ L/L air)を混合して投与した場合の抗不安活性を測定した。その結果、LO 4 μ L/L air投与時よりもさらに強い抗不安様活性が認められた($p = 0.000947$)。以上の結果より、ラベンダー精油による抗不安様作用発現においてLOとLAとは何らかの形でシナジー効果を発揮しているのではないかと考えられる。また、今回混合投与で用いたLO:LAの比(2:1)は前章で検討した6種の精油のうち最も強い抗不安様作用を呈した*L. latifolia*におけるLO:LAの比を参考に試験的に設定したものであるが、これ以外にも異なるさまざまな比を用いて同様の調査を繰り返し、自発運動量に影響を与えることなく最大の抗不安様作用を発現できる最適な比を求めることができれば、抗不安作用を期待してラベンダー精油を用いる場合におけるLO・LA組成について標準化や規格化も可能になるのではないかと期待される。

ここまでの解析で、ラベンダー精油による抗不安作用の発現には LO・LA の両成分が必要であることが明らかとなったが、吸入投与でラベンダー精油を投与した場合、これらの成分がどの程度どのような経路で生体内に取り込まれるのかについて知見を得るため、両成分の脳への移行性について検討を行った。この検討では、ラベンダー精油中、抗不安作用を目的とした使用においては最も汎用されている *Lavandula officinalis* 由来の精油 (Essential oil from *Lavandula officinalis*、以下 LvEO) を試料とした。また、比較対象とする試料としてトドマツ精油 (Essential oil from *Abies sacchalinensis*、以下、AsEO) を使用した。トドマツは、マツ科モミ属の常緑針葉高木であり、葉から得られる精油には α -pinene、camphene、bornyl acetate、limonene、 β -pinene などが多く含まれる。Satou らは、このトドマツ精油に抗不安様作用を認められ、その作用発現には(-)- α -pinene および(-)-limonene が寄与していることを明らかにしている⁵⁰。AsEO および LvEO 各々4 μ L/L air を90分間吸入させた後、EPM試験を実施した結果が図9である。AsEO 吸入群、ラベンダー精油吸入群では、いずれも蒸留水を吸入させた対照群 (DW 吸入群) に比べ、OA 滞在時間が有意に延長しており、明確な抗不安様作用の発現が確認されている。

続いて、各精油を吸入させたマウスの全脳中に活性成分がどの程度移行しているのかを確認するため、EPM試験終了直後にマウスの頸椎脱臼をし、脳の摘出を行なった。標本はそれぞれ2 mLのhexaneでホモジナイズし、GC/MS GC/FID測定用サンプルとした。両精油において抗不安様作用に寄与する成分を含む主要構成成分を測定することとし、AsEOでは α -pinene、camphene、(-)-limoneneの3成分を、LvEOではLOおよびLAの定量を行った。結果を図10に示す。脳からの検出量 [mg/kg specimen] は、AsEOでは、 α -pinene : 19.7 \pm 1.0、camphene : 20.7 \pm 1.7、 β -pinene : 8.9 \pm 0.5 と、ほぼ精油中の構成比を維持したまま脳から検出されたのに対し、LvEOではLO、LAとも不検出 (検出限界未満) であった。この結果については、①AsEO中の3成分はすべてテルペン類であるのに対し、LvEO中のLO・LAはそれぞれアルコールおよびエステルであり、血液脳関門 (Blood-Brain Barrier、BBB) 透過性が極端に低かったために脳内への移行には至らなかった、②LvEO中のLO・LAが、定量時には既に代謝され脳内から排出されていた、などを理由として考察している。一般に分子量が500以下の低分子化合物の脳への移行には化合物の脂溶性が関与するとされ、1-オクタノール/水分配係数 (P) の対数値が0.9~2.5の時に脳移行率が高くなると報告されている⁶⁹。脂溶性がこれよりも低い (値が小さい) 場合は細胞膜透過性の減少、また値が高い場合には血中タンパクへの結合により脳移行率は低下すると報告されている。今回、測定対象とした精油の構成成分では全てがこの範囲を上回っていたことや、より値の高いAsEOの成分で脳移行性が確認できていることなどから、今回の結果を脂溶性の違いで説明することは困難であると言わざるを得ない。加えて、これまでにLvEOの経口投与⁷⁰や腹腔内投与により血清中および脳中からLOやLAを検出できたという報告をはじめ、LvEOをマッサージにより経皮投与したところ、投与終了後20分前後でLOおよびLAの血漿中濃度が最高となったというヒトにおける報告⁷¹等、両成分が全身循環に入るというエビデンスは少なくない。よって次に、もう一方の「定量時にはLO・LAの代謝が進み脳内から排出されてしまっていた可能性」について考察してみる。10分間のマッサージとともにラベンダー精油 (LO 7.23 mg LA 8.64 mg) を成人皮膚より経皮吸収させた場合の体内動態パ

ラメータとして $t_{1/2}$ =13.76 min (LO)、14.30 min (LA)なるデータが存在する⁷¹。両成分はそれぞれ、18.76 min、19.55 min に最高血中濃度 121.08 ng/mL、100.17 ng/mL に到達している。これらのデータを参考にした場合、EPM 試験 (10 分間) 直後に消失が終了していたとは考え難い。薬剤および化学物質の毒性、環境衛生、毒性排出に関するデータベースの一つ TOXNET には、数少ない吸入投与後の体内動態報告として、20-50 mg の LO を 1 時間かけて吸入させた後に得られたマウスの血中濃度は 4.22 ng/mL であったとする報告、27 mg の LO を 1 時間吸入させた後、30 分、60 分、90 分後の血中濃度が、1.0、2.7、2.9 ng/mL と推移したとする報告が存在する。種差があり単純比較は適切ではないが、LO・LA の吸入投与によるアベイラビリティはかなり低いと言わざるを得ない。O'Neil は、LO の蒸気圧を 0.16 mmHg (22-25°C)、LA の蒸気圧を 0.11 mmHg (25°C)と報告している⁷²。これらの値は、AsEO 由来の主要なモノテルペンである α -pinene (4.75 mmHg (25°C))、Camphene (2.50 mmHg (25°C))、 β -pinene (2.93 mmHg (25°C)) と比較するとかなり低く、LO・LA は精油成分の中でも揮発し難い部類に入るのでないかと考えられる。今後は、精油中の含有量のみならず精油利用時の環境条件を再現した上で MonoTrap®を利用するなどして揮発蒸気中の成分濃度を測定し実際体内に取り込まれる量を明らかにしていく必要があると考えられた。なお、LvEO による抗不安様作用は、経口投与や腹腔内投与をした場合においても報告があるため、吸入投与時に少なくとも一部は薬物学的経路を介して作用を発現しているのではないかと推測してきたが、今回の測定では脳中からの検出ができず、全てが嗅覚受容体を介した神経学的経路を介したものであるという可能性も否定できない結果となった。この点については、第 3 章第 2 項における嗅覚麻痺モデルを使った実験において再検討を行っている。

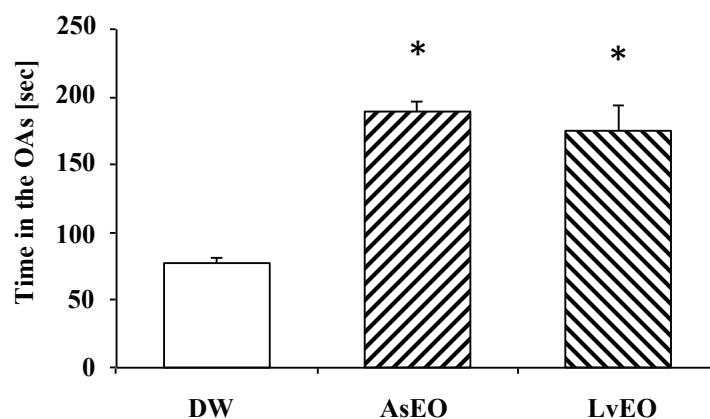


図 9 AsEO および LvEO [各 4 μ L/L air] 吸入時の抗不安様作用

* : $p < 0.05$ vs. control (DW)

DW: Distilled water, AsEO: Essential oil from *Abies sacchalinensis*, LvEO: Essential oil from *Lavandula officinalis*

OA: Open arm

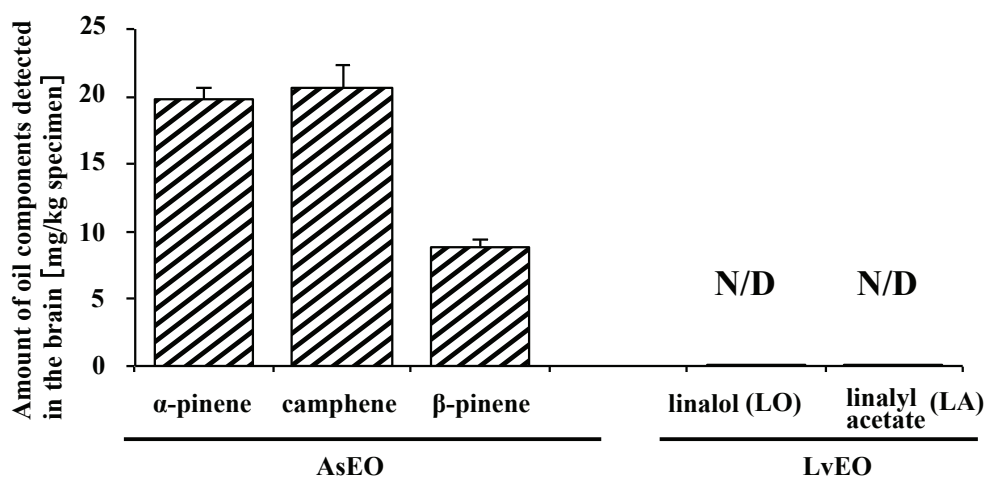


図 10 AsEO および LvEO [各 4 μ L/L air] 吸入時の主要成分の脳への移行性

AsEO: Essential oil from *Abies sacchalinensis*, LvEO: Essential oil from *Lavandula officinalis*

第3項 抗不安様作用発現時のセロトニン神経系活動性

本項では、ラベンダー精油吸入によるEPM試験での情動変化とそのメカニズムとの関連性を神経薬理的に解析することを目的とし、セロトニン(serotonin; 以下5-HT) 神経系の活動性が、ラベンダー精油吸入による不安関連行動の変化に伴ってどのような影響を受けるのかを調査した。まずEPM試験における情動変化と5-HT神経系との関係を明らかにするため、5-HTの前駆物質であるヒドロキシトリプトファン(5-hydroxytryptophan; 5-HTP)をマウスに腹腔内投与し一過性の5-HT神経系活性亢進状態とした上でEPM試験を行った。次に、ラベンダー精油投与時の情動行動変化に伴い5-HT神経系がどのように変化するかを調査した。試験動物は、ネガティブコントロールとして蒸留水を90分吸入させるDW群、ラベンダー精油(*Lavandula officinalis*由来の精油を使用)を吸入させるLvEO群、ポジティブコントロールとしてジアゼパム(DZP) 3 mg/kgを腹腔内投与するDZP群の3群に分類し、それぞれの薬物投与後に10分間のEPM試験を適用した。なお、薬物投与時の侵襲ストレスが情動行動に影響を与えることがあるため、DW群ならびにLvEO群に対し薬理作用のない生食を腹腔内投与し、DZP投与群には90分間のDW吸入を課すことで3群間の侵襲条件を均一化した(図19(実験の部))。いずれの場合も、EPM試験終了後には直ちに脳の摘出を行い11部位に分割したうちの不安関連行動への関連が報告されている前頭皮質、線条体、海馬の3部位を測定標本とした。5-HT神経系の活動性評価には、同時点同部位における5-HT濃度ならびにその代謝物である5-ヒドロキシインドール酢酸(5-hydroxyindoleacetic acid; 5-HIAA)濃度をHPLCにて測定し、両者の比($[5-HIAA] / [5-HT]$)として算出される代謝回転率を指標とした。

5-HTP投与マウスにおけるEPM試験結果(5-HT神経系活性化による情動行動の変化)

EPM試験における不安関連パラメータのOA滞在時間は5-HTP投与群では 58.2 ± 10.1 秒であり、対照としたDW群の 89.8 ± 9.6 秒に比べ36%もの減少傾向を示した(有意差なし)(図11)。このことは、5-HTP投与による一過性の5-HT上昇が高架式十字迷路試験系における対象動物の不安行動を“誘発”あるいは“増加”させたことを示していると考えられる。この結果は、5-HT合成酵素阻害薬や5-HT神経毒により抗不安様作用が認められる事実や5-HT神経系の過活動が不安を誘発している可能性を示唆するMatsumotoらの報告⁶⁰、5-HT神経機能の障害により動物の不安様行動が低下するとしたKahnらの報告⁷³を支持する結果と言える。さらに、2014年、無脊椎動物であるCrayfish(ザリガニ)を用いた水中の十字迷路試験において5-HTの投与が不安様行動を誘発したというFossatらによる報告がScience誌に掲載されたが⁷⁴、この結果とも一致するものである。

5-HTP投与マウスにおける5-HT代謝回転の変化(5-HT神経系活性化と5-HT代謝回転の関係)

図12は、対照のDW吸入群と5-HTP投与により不安行動が“誘発”されたと考えられる群とで代謝回転率を比較した結果である。これをみると、5-HTP投与群の代謝回転率はDW群と比較し有意に上

昇していることがわかる ($p < 0.01$)。以上より、5-HTP 投与による 5-HT 神経系の過活動状態は、EPM 試験における不安行動を促す方向に働き、この時 5-HT 神経系の代謝回転が上昇しているという関係が明らかとなった。

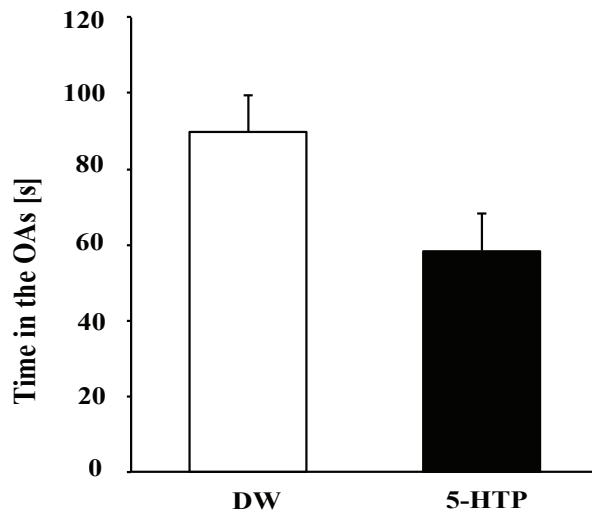


図 11：5-HTP 投与マウスにおける不安活性 [OA 滞在時間 (秒)]

DW: Distilled water, 5-HTP: 5-hydroxytryptophan, OA: Open Arm

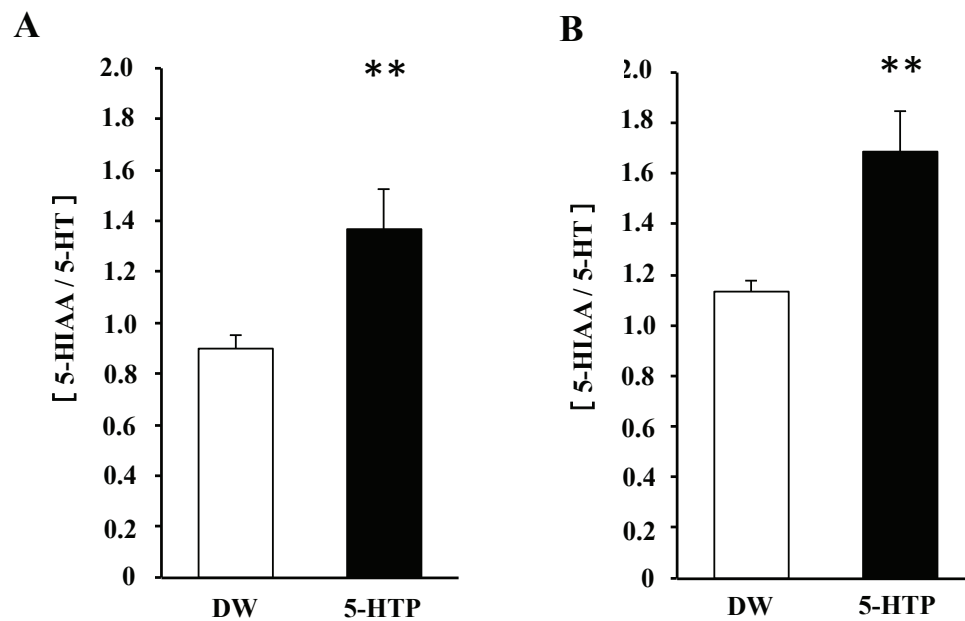


図 12：5-HTP 投与マウスにおける 5-HT 代謝回転率

** : $p < 0.01$ vs. control (DW) A : 線条体、B : 海馬

LvEO 吸入マウスにおける EPM 試験結果 (LvEO による抗不安様作用)

不安関連パラメータである OA 滞在時間は、それぞれ、DW 吸入群：89.8±9.7 秒、DZP 投与群：183.6±15.9 秒、LvEO 吸入群：146.0±14.5 秒であり、コントロールの DW 群に対し LvEO 吸入群および DZP 投与群の両群において有意な延長が認められた ($p < 0.01$) (図 13-A)。OA への侵入回数 [%] (図 13-B) においても同様の傾向が認められた。一方、3 群を総移動距離 (図 13-C) において比較した場合、DW 群、LvEO 群間に差は認められなかったが、DZP 投与群では DW 群との間に有意な距離の延長が認められた ($p < 0.05$)。この結果は、LvEO 精油吸入にみられた行動の変化 (抗不安様作用) が、自発運動量亢進に由来するものではないことを示している。

LvEO 吸入マウスにおける 5-HT 代謝回転の変化 (LvEO による 5-HT 神経系の活動性変化)

5-HT 神経系の活動性指標とした 5-HT 代謝回転率 ($[5\text{-HIAA}] / [5\text{-HT}]$) をみると、LvEO 投与群ならびに DZP 投与群では DW 群に比較し有意な低下が認められた ($p < 0.05$)。このことは、LvEO が 5-HT 神経系の活動性を低下させる方向に働いていることを示唆するものと言える。ただし、代謝回転の低下は DZP 群においても認められており、LvEO による 5-HT 神経系の活動性低下作用が、本精油単独で起きているのか、ベンゾジアゼピン系 (GABA_A/BDZ 系) を介したもののなのかは不明である。

本項における神経薬理的検討により、LvEO による抗不安様作用の少なくとも一部は 5-HT 神経系への作用で説明され、その活動性を低下させることによるものであることが明らかとなった。一般に、EPM 試験やオープンフィールド試験などの行動薬理試験による不安評価系は、動物が生得的・潜在的に示す不安や恐怖を利用し、薬物がこれを“解除する”程度を計測するものである。いわば、試験系そのものが不安を生じさせる仕組みであり、これらの方法では真に“不安のない状態”の行動を観察することができない。つまり、厳密に言うと、図 12 に示した 5-HTP 投与群の代謝回転に関するデータは、不安発現時の生体の状態なのか、不安への応答として起きている生理学的変化なのかを区別することが出来ないのである。今後は、行動薬理試験前の代謝回転率もあわせて測定し、不安発現と 5-HT 神経系の活動状態との関係をより厳密に把握する必要があると考えられる。さらに言えば、自由行動下でマイクロダイアリシスを行うなどの手法を用い、情動行動の変化とこれに伴う生理学的変化を経時的に追うことができればさらに有用な知見が得られるであろう。

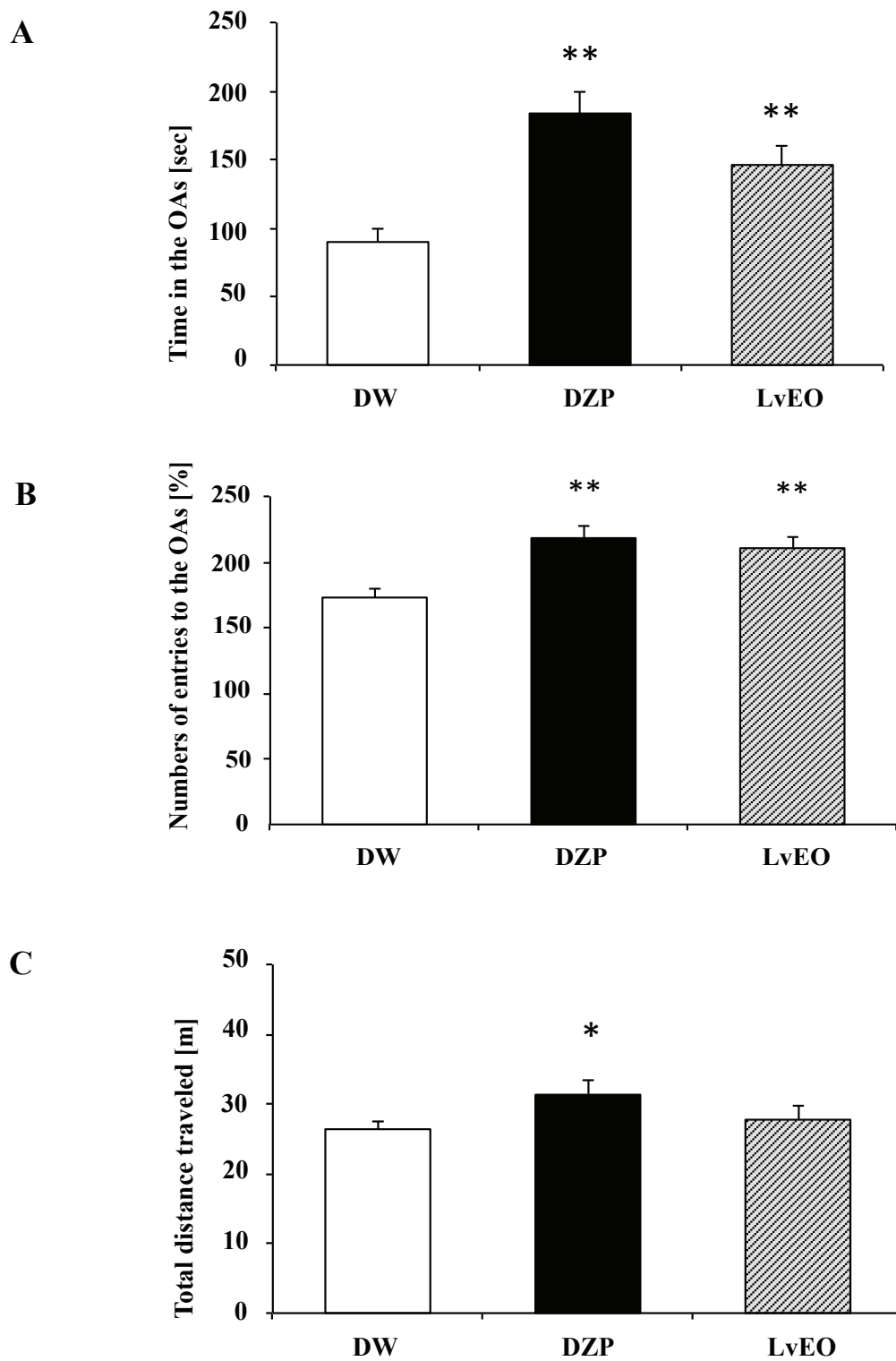


図 13 : DZP 腹腔内投与および LvEO 吸入時の抗不安様作用

A : OA 滞在時間 (秒)、B: OA 滞在率 (%)、C : 総移動距離 (m)

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$

DW: Distilled water, DZP: diazepam, LvEO: Essential oil from *Lavandula officinalis*, OA: Open Arm

表 9：前頭皮質、線条体、海馬における 5-HT 濃度、5-HIAA 濃度、および代謝回転率

Brain Section		前頭皮質	線条体	海馬
DW (4 μ L/L air, inhaled)	[5-HT] (μ g/g specimen)	0.54 \pm 0.04	0.47 \pm 0.06	0.30 \pm 0.03
	[5-HIAA] (μ g/g specimen)	0.30 \pm 0.02	0.41 \pm 0.04	0.34 \pm 0.03
	Turnover Rate ^{a)}	0.57 \pm 0.05	0.90 \pm 0.05	1.13 \pm 0.04
	Relative Turnover Rate ^{b)}	1	1	1
DZP (3 mg/kg i.p.)	[5-HT] (μ g/g specimen)	0.50 \pm 0.03	0.57 \pm 0.07	0.34 \pm 0.04
	[5-HIAA] (μ g/g specimen)	0.29 \pm 0.01	0.38 \pm 0.06	0.31 \pm 0.05
	Turnover Rate ^{a)}	0.59 \pm 0.04	0.64 \pm 0.03 **	0.89 \pm 0.08 **
	Relative Turnover Rate ^{b)} (vs.DW)	1.05	0.72	0.78
LvEO (4 μ L/L air, inhaled)	[5-HT] (μ g/g specimen)	0.61 \pm 0.10	0.80 \pm 0.07 **	0.50 \pm 0.06 **
	[5-HIAA] (μ g/g specimen)	0.26 \pm 0.03	0.54 \pm 0.04	0.42 \pm 0.04
	Turnover Rate ^{a)}	0.44 \pm 0.04 *	0.68 \pm 0.03 *	0.86 \pm 0.04 **
	Relative Turnover Rate ^{b)} (vs.DW)	0.77	0.75	0.6

a) 5-HT 代謝回転率 ([5-HIAA]/[5-HT])

b) 相対 5-HT 代謝回転率 (コントロール群 (DW 吸入群) の代謝回転率を 1 とした時の相対値 (斜体太字部分)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control (DW) group

小括（第2章）

第2章では前章で明らかにしたラベンダー精油の基原植物と構成成分との関係をもとに、これらの違いが精油の有効性発現に及ぼす影響について評価を行った。その結果、抗不安様作用の発現には、ラベンダー精油の主要構成成分であり、品質を評価する上でも重要視されているモノテルペンアルコールのLOおよびその酢酸エステルであるLAの存在が必要であること、ならびに両成分の含有率の和と抗不安様作用との間には強い正の相関があることが明らかとなった。さらに、精油中のLOとLAとの組成比を2:1とした場合には、それぞれを単独に吸入した場合の和を上回る作用を呈することが示された。一般に芳香療法をはじめとする植物療法においては、多成分系を構成する原料をなるべく天然のまま全体で用いることに重きが置かれている。副作用の軽減や効果の増強を期待できることがその理由とされている。実際に、LOやLAを単独で用いるより全精油で使用した方が細胞毒性を弱めることができるというラベンダー精油の例⁷⁵、ローズ精油の構成成分が互いに影響し合い皮膚透過性を高めている例⁷⁶などが報告されている。また、日本産ゲットウ精油中の特定成分について、単独で吸入させるよりも他の成分と混合し組み合わせて吸入させた場合の方が血中や脳内からの検出量が顕著に増加していたという報告も存在する³⁸。このように、植物精油を利用する上で、精油を全体もしくはそれに近い形で用いることには大きなメリットがあると考えられる。今後は、こうした事象がみられる機構を明らかにし、活性成分を除く多くの微量成分が果たす役割や“全体”を用いることの優位性についての科学的なエビデンスを構築していく必要があると考えられる。一方、芳香療法を医療や介護の場で応用していくためには、“効果”という観点からみた精油の品質担保も重要であり、期待する作用発現に再現性があることは必須の要件である。本研究での取り組みのように基原植物-構成成分-薬理作用でなる三者の関係を明らかにし、目的に合った精油の選択を可能にすることはその第一歩であると考えられる。また、ラベンダー精油におけるLOおよびLAのように、特定の薬理作用に対する活性成分を限定できる場合には、それらの最適な組成比を求め、目的に応じた精油構成成分を基準化・標準化していくこともまた芳香療法の普及を考える上で有効なアプローチになりうると考えている。

芳香浴は非侵襲的で高齢者や小児に優しく芳香療法を実践する上で有用性の高い投与方法である。芳香浴により体内に取り込まれた精油成分やその刺激が中枢に至る経路を解明することは容易ではないが、適正な投与量の設定、未知成分の体内動態の予測等において重要な基礎資料になる。ラベンダー精油については、芳香浴以外に腹腔内や経口投与による薬理作用を発現している報告も存在することから、少なくとも活性成分の一部は全身循環を経て中枢に入り薬理作用を呈する薬物学的経路が関与していると考えられる。そこで、第2項では抗不安作用の発現に必要なLOおよびLAがどの程度脳に移行するのかを調査した。この調査では、ラベンダー精油同様、顕著な抗不安様作用を有することがわかっているトドマツ精油(AsEO)の主要構成成分、 α -Pinene、Camphene、および β -Pineneをポジティブコントロールとして比較検討を行った。その結果、EPM試験では両精油において同等かつ有意な抗不安様作用が認められた($p < 0.05$)にもかかわらず、AsEOでは測定した全ての成分が精油中

における構成比を維持したまま検出された一方で、LvEO中のLO・LAはどちらも不検出（検出限界未満）となった。理由として、両精油間で血液脳関門の透過性が異なっていた可能性や中枢に入った両成分がすでに代謝され脳内から排出されていた可能性が考えられたが結論を得るにはさらに詳細の調査が必要である。

不安障害の治療には古くからベンゾジアゼピン系薬剤が用いられてきた。しかし近年、不安と5-HT神経系⁵⁷⁻⁵⁹、特に5-HT神経系の過剰活動状態が不安の発生に関わっている可能性を示唆する報告が散見されるようになってきた⁶⁰。そこで、第3項ではEPM試験による不安関連行動と5-HT神経系の活動性との関係、ならびにLvEOによる不安関連行動の変化に5-HT神経系がどのように関わっているかについて、神経薬理学的アプローチを用いた解析を行うこととした。この解析では5-HT神経系の活動レベルを $[5\text{-HIAA}] / [5\text{-HT}]$ で計算される5-HT代謝回転率を指標に用いて評価した。本調査は大きく2つの過程で構成されており、まずは5-HTの前駆体である5-HTPを腹腔内投与することによりマウスを一過性の5-HT神経系亢進状態とし、この状態での不安関連行動と5-HT神経系の活動性を評価した。その結果、5-HTP投与マウスでは主たる不安関連パラメータであるOA滞在時間の減少傾向が確認され、5-HT神経系の過活動状態が不安関連行動を誘発もしくは増強させたと考えられた。この時、5-HTP投与群の5-HT代謝回転率は、対象のDW吸入群に比べ有意に上昇していることがわかった。つまり、5-HT神経系の過活動状態はEPM試験において動物の不安関連行動を増強させ、この時5-HT代謝回転率は上昇しているという関係が明らかとなった。続いての過程は、LvEOを前投与したマウスについて同様の評価を行い、LvEOによる抗不安様作用の発現に5-HT神経系がどのように関わっているのかを評価する過程である。解析の結果、LvEO吸入群ではOA滞在時間の有意な延長が認められ、この時5-HT代謝回転率は有意に低下していることが明らかとなった。以上の結果をまとめて考察するとLvEOによる抗不安様作用の少なくとも一部は5-HT神経系への作用で説明され、5-HT神経系活動性低下が薬理作用の機序となっていると結論された。ただし、同様の結果がポジティブコントロールのジアゼパム（DZP）についても観察されており、LvEOによる5-HT神経系の活動性低下作用が、本精油単独で起きているのか、ベンゾジアゼピン系（GABA_A/BDZ系）を介したもののかの判定にはさらなる調査が必要である。

第3章：病態モデルマウスを用いたラベンダー精油吸入の効果

ラベンダー精油の利用は、健常人によるリラクゼーションを目的とした利用から病態を呈した患者に対するメディカルアロマセラピーとしての利用まで多岐にわたる。ラベンダー精油の医療応用を考える上では、同じ条件下で精油を使用した場合に抗不安作用の発現を期待できる使用者の範囲について、つまり精油による効果発現の普遍性についての情報が必要であり、健常人のみならず病態を呈した患者においても同様に効果が得られるのか検討を要すると考えられる。

現在、精油による抗不安作用についての動物実験はその大多数が雄性動物のみを対象に行われている。両性を対象とした少数の報告の中には作用発現に性差をみとめたとするものがあり^{77,78}、*Lavandula officinalis* 由来の精油を2週間にわたって吸入させた Bradley らの研究では、雌性マウスにおいてより顕著な抗不安作用が確認されたと報告している⁷⁹。また、女性の嗅覚が排卵期・黄体期で変化し、精油などの匂い物質への感受性が月経周期によって変化する可能性を示唆する報告も存在する⁸⁰。これらの報告は、精油摂取者の性別やホルモン状態により精油の効果が異なって現れる可能性を示していると考えられる。さらに、鼻汁および鼻粘膜中に含まれる酵素群により吸入した揮発性成分が別の物質に変わることで嗅覚糸球体の活性パターンや臭いの知覚が変化しうることを示した報告も存在する⁸¹。この酵素群は加齢や健康状態で変化するものとされており、これらの因子も精油への反応性に個体差を生む原因となりうることが予測される。このように同じ精油を吸入しても得られる作用は精油摂取者側の多くの因子により影響を受ける可能性がある。精油の効果の普遍性を担保する上ではこれらの因子について理解を深める必要があると考えられ、本章では精油摂取者のベースラインの状態が異なる場合、ラベンダー精油吸入による作用がどのような影響を受けるのかを検討することとした。

外部環境の変化に対して恒常性を保つため、生体には多くのストレス応答機構が備わっている。視床下部-下垂体-副腎（HPA系）や、青斑核-副腎髄質-交感神経系（LC-SNS系）および免疫系を介した反応がその中核をなし、受けたストレスを自律神経機能への変化、不安や恐怖等の情動の変化といった形で表出するとされている。つまり、不安症状の発現には外部からのストレスの影響が大きく関わると考えられる。そこで第1項では、24時間の水浸ストレス負荷をかけたモデルマウスと正常マウスとの間で精油吸入の効果を比較する検討を行った。続いて第2項では、希硫酸亜鉛処置により活動性が亢進した状態の動物を評価に用いた。マウスやラット等のげっ歯類において嗅球摘出处置を行うと過活動状態が観察される⁸²⁻⁸⁴。嗅球摘出動物にみとめられる攻撃行動の増加⁸⁵、新奇環境に対する過剰反応⁸⁶、神経伝達物質の変化⁸⁷はいずれもうつ病患者の病態と重複することが知られており、本モデルはうつ病のモデル動物としても汎用されている。ここでは、嗅覚麻痺の方法としてより侵襲性の

低い希硫酸亜鉛溶液を鼻腔に適用する McBride らの方法⁸⁸を用いて多動モデルを作成し、正常動物との間で精油の効果の比較を行った。また、嗅覚麻痺マウスを用いた本実験系は精油吸入による効果発現において神経学的回路を排除した系となっており、ラベンダー精油吸入による抗不安様作用の発現に神経学的回路が関与しているか否かの検証が可能な系である。よって本項では、過活動状態にある動物モデルにおける精油の効果検証と同時に、神経学的回路を排除した場合にも精油の効果が確認されるかについての評価も行った。本章における検討はいずれも *Lavandula officinalis* 由来の精油 (LvEO) を用いて行っている。

第1項：水浸ストレス負荷モデルを用いた評価

本項では、ストレス負荷をかけた病態モデルマウスと正常マウスとで LvEO 精油吸入の効果と比較する検討を行った。評価には、EPM 試験を用いた行動薬理的アプローチに加え、神経科学的アプローチを採択した。後者で用いたのは、さまざまな外部刺激に対応して発現量を変化させるある種の遺伝子やタンパク質をストレスマーカー候補分子として指標に利用する方法である。最初期遺伝子の1つである *c-fos* 遺伝子はこの代表例であり^{89,90}、生体に対する多くの急性刺激（感覚刺激、神経伝達物質、薬物、電流など）に応答して一過性に発現が誘導されることがわかっている。植物精油の効果検証への応用例も散見され、Shaw らは、不安を生じる環境下ではラット脳内の不安関連領域で *c-fos* 発現量の増加が認められたのに対し LvEO 前投与群ではポジティブコントロールとして用いたクロロジアゼボキシド投与群同様に *c-fos* 上昇の抑制効果が認められたことを報告し、LvEO には BDZ 系薬剤様の抗不安作用があるのではないかと結論している⁹¹。本項における検討のうち、精油の作用の神経科学的評価部分は理学部神経科学教室との共同研究内容である。Masuo らのグループでは、コーヒー豆の芳香によるストレスレベルの変化を脳内の遺伝子 17 種およびタンパク質 25 種を用いて網羅的に評価しその結果を論文にまとめている⁹²。今回著者らの検討においてストレスマーカー候補分子に用いたのは、この報告の中でストレスマーカーとしての機能が期待できると判断された 2 種類の遺伝子 [活動依存性細胞骨格関連タンパク質遺伝子 (Activity-regulated cytoskeletal-associated protein、以下 *Arc*) および神経成長因子受容体 (Nerve growth factor receptor、以下 *NGFR*)] と 2 種類のタンパク質 [ガラクトキナーゼ 1 (Galactokinase 1、以下 *GLK1*) および脳由来神経成長因子 (Brain-derived neurotrophic factor、以下 *BDNF*)] である。また、ハウスキーピング遺伝子としては GAPDH を用いた。

実際の検討には 5 週齢の ICR 系雄性マウスを用い、24 時間の水浸ストレス負荷および LvEO 精油吸入の有無により 対照群 [蒸留水吸入/水浸ストレスなし (DW/Stress (-)) 群]、LvEO 吸入群 [LvEO 吸入/水浸ストレスなし (LvEO/Stress (-)) 群]、ストレス負荷群 [蒸留水吸入/水浸ストレスあり (DW/Stress (+)) 群]、ストレス負荷+LvEO 吸入群 [LvEO 吸入/水浸ストレスあり (LvEO/Stress (+)) 群] の 4 群に分けて EPM 試験を実施した (各群 $n=4\sim7$)。神経科学的評価についてもマウスは同様の 4 群に分け (各群 $n=4$)、蒸留水もしくは精油の吸入 (90 分) 後直ちに全脳を摘出し脳内遺伝子およびタンパク質発現量の測定試料 (右脳：遺伝子発現量測定用、左脳：タンパク質発現量測定用) とした。mRNA の発現量評価では、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 を用い電気泳動後に定量を行った。タンパク質の発現量評価には免疫組織化学染色法を用いた。作成した切片標本 (海馬の歯状回部分) に対し前処理を行い、一次抗体 (GLK1ab37796, BDNF H-117) との反応および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クレシルバイレット水溶液により対比染色を行った。

行動薬理的評価（EPM 試験）

EPM 試験において抗不安様作用の主な指標となる OA（オープンアーム）滞在時間は、対照群 [DW/Stress (-) 群] で 84.9 ± 15.2 秒、LvEO 吸入群 [LvEO/Stress (-) 群] で 175.0 ± 18.4 秒、ストレス負荷群 [DW/Stress (+) 群] では 86.8 ± 18.4 秒、ストレス負荷+LvEO 吸入群 [LvEO/Stress (+) 群] で 212.5 ± 31.5 秒であった（図 14A）。LvEO は、水浸ストレスの負荷・非負荷の両方の群で、OA における滞在時間（滞在率）を有意に延長（上昇）させており ($p < 0.01$)、ストレス負荷の有無によらず、抗不安様作用を示していたことがわかる（図 14A,B）。ただし、その効果はストレス負荷時により大きく現れており、対象の置かれたストレスレベルに応じて、精油の効果が変化する可能性が示唆された。なお、総移動距離（図 14C）において、水吸入群と精油吸入群に有意差は無かったことから、LvEO に認められた抗不安様作用は自発運動量の亢進による副次的なものではないと判断できる。一般に不安症状の発現には外部からのストレスの影響が大きく関わると考えられていることから、ストレス負荷により不安関連行動のパラメータが低下する方向、つまり不安を増す方向に変化することを予測していたが、その傾向は確認されなかった。

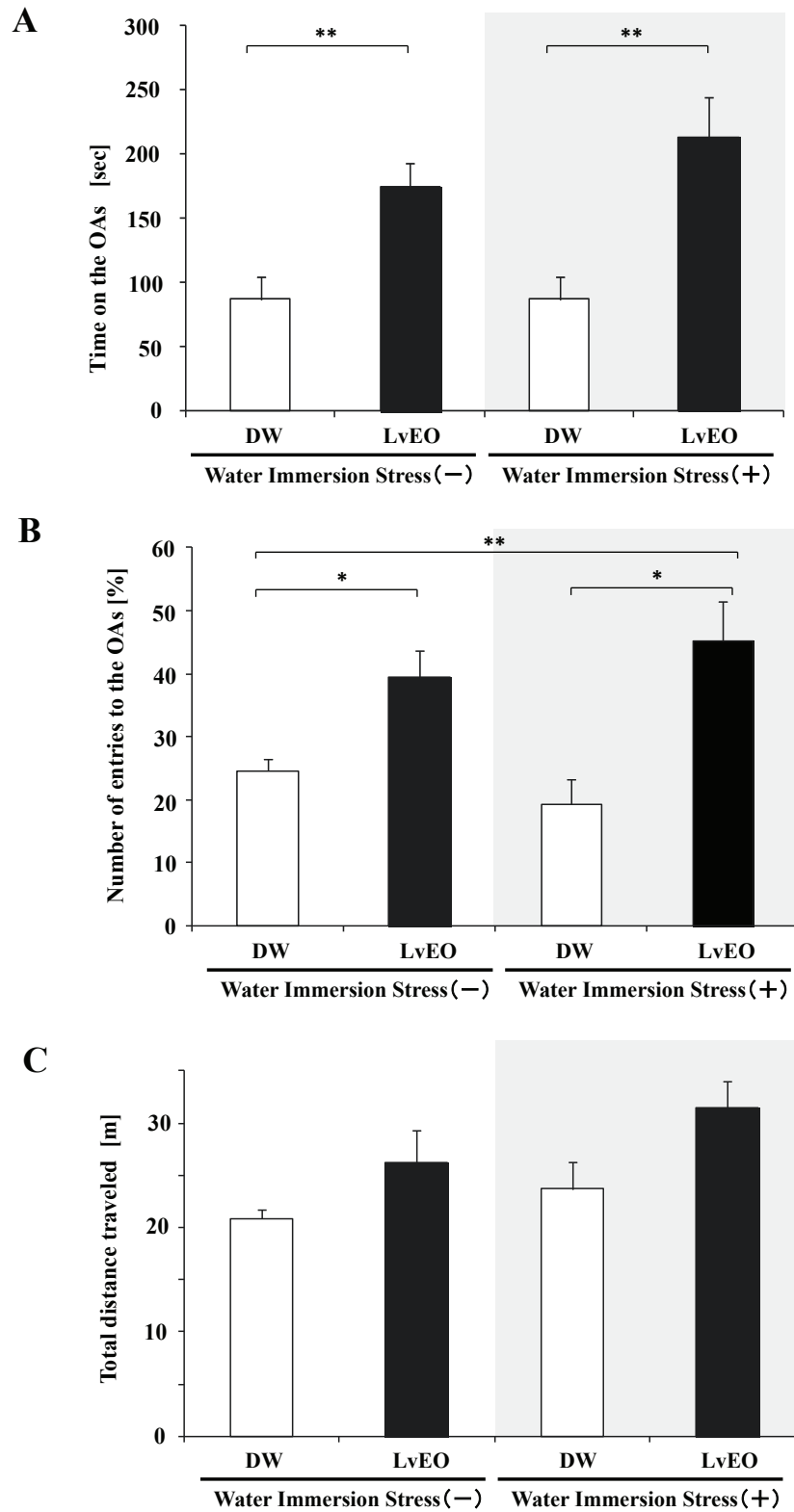


図 14：水浸ストレスの有無と LvEO 吸入による抗不安様作用

A：OA 滞在時間（秒）、B：OA 侵入回数（%）、C：総移動距離（m）

*： $p < 0.05$ 、**： $p < 0.01$

DW: Distilled water, LvEO: Essential oil from *Lavandula officinalis*, OA: Open arm

神経科学的評価（脳内遺伝子およびタンパク質発現量の変化）

① 水浸ストレス負荷およびラベンダー精油吸入の遺伝子発現レベルへの影響

RT-PCR 法により、対照群 [DW/Stress(-)]、LvEO 吸入群 [LvEO/Stress(-)群]、ストレス負荷群 [DW/Stress(+)]、ストレス負荷+LvEO 吸入群 [LvEO/Stress(+)]の 4 群（各群 $n=4$ ）で脳内の mRNA のレベルを比較した。

【NGFR】

神経成長因子受容体 (NGFR) は、酸化ストレスから神経細胞を保護する役割を果たしていることが知られている⁹³。今回の実験では、水浸ストレスの負荷により NGFR (NGF 受容体) の mRNA レベルは有意に低下したが、ストレス+LvEO 吸入群では LvEO 吸入のないストレス負荷群と比べ有意に亢進しており、LvEO の吸入がストレスによって生じる変化を打ち消す方向に作用したことが確認された (図 15-A)。この結果は、ラベンダー精油の前投与が、酸化抑制的に働いていたことを示唆していると考えられる。

【Arc】

一方の Arc は最初期遺伝子の一つでさまざまな刺激に即時に応答して転写が制御される遺伝子である。この Arc 遺伝子の発現についても、NGFR 遺伝子同様、水浸ストレスの負荷により有意な低下が認められた。しかしながら、ストレス負荷前に LvEO を吸入させたストレス+LvEO 吸入群では、ストレスのみの群に比べ遺伝子発現が有意に亢進しており (図 15-B)、LvEO 吸入がストレス応答による変化を打ち消す方向に働いていると考えられる。先に述べた Seo らの報告をみると、ストレス負荷により NGFR および Arc の mRNA レベルはコントロール群に比べ有意に低下していたのに対し、コーヒー豆の芳香成分を吸入したストレス負荷群ではレベルの上昇が確認されている。以上より、コーヒー豆の芳香成分および LvEO の吸入は、ストレスの負荷に対する影響を打ち消す方向に作用することが示されたと考えている。今回得られた結果で興味深いのは、ストレス負荷のないマウスに LvEO を吸入させた群で、遺伝子発現量が低下している点、つまり水浸ストレス同様ストレスラーとして働いていた点である。この傾向は NGFR mRNA および Arc mRNA の両者で確認され、発現量は水浸ストレスによるレベルを上回っていたことがわかる。LvEO 吸入が、水浸ストレス負荷群では遺伝子発現を上昇させる方向に働いたのに対し、ストレス負荷を与えていない群では逆方向に働いていたというこの結果は、LvEO の作用が精油摂取者の置かれている状況により二方向性に働きうることを示していると考えられる。この結果について今回の調査で得られた情報のみで説明することは困難であるが、1) ストレス群とストレス+LvEO 群の遺伝子発現量の変化に、ストレス負荷により低下した発現量が、LvEO 吸入により増加するという逆の変化パターンが認められていること、2) ストレス負荷のないマウスに LvEO を吸入させた場合の EPM 試験の結果、ストレス応答として発現する情動変化 (不安) に対して抑制的な作用 (抗不安様作用) が認められていること、の 2 点より、ストレス負荷の無い状態

での LvEO 吸入はストレッサーとして働き、いわゆる快ストレス(eustress)を引き起こしているのではないかと推測している。なお、今回の検討で使用した 2 種類の遺伝子 *NGFR*mRNA ならびに *Arcm*mRNA は、ストレスへの応答および LvEO 吸入による影響において EPM 試験における不安関連行動と連動した変化を示した。このことより、両分子は将来ストレスマーカーあるいはストレス由来の不安のマーカーとして期待ができるのではないかと考えられる。一方、今回の評価では脳サンプルとして全脳を用いているが、この場合ストレス負荷以外の因子が mRNA の変化に影響した可能性も否定できないため、今後はさらに多くの種類の遺伝子について機能的部位別に網羅的な調査を行う必要があると考えている。

② 水浸ストレス負荷および LvEO 吸入のタンパク質発現レベルへの影響

①同様、対照群 [DW/Stress(-)]、LvEO 吸入群 [LvEO/Stress(-)群]、ストレス負荷群 [DW/Stress(+)]、ストレス負荷+LvEO 吸入群 [LvEO/Stress(+)]の 4 群 (各群 $n=4$) 間で免疫組織化学染色の結果からストレス負荷および LvEO 吸入によるタンパク質発現レベルの変動を解析した。

【*GLK 1*】

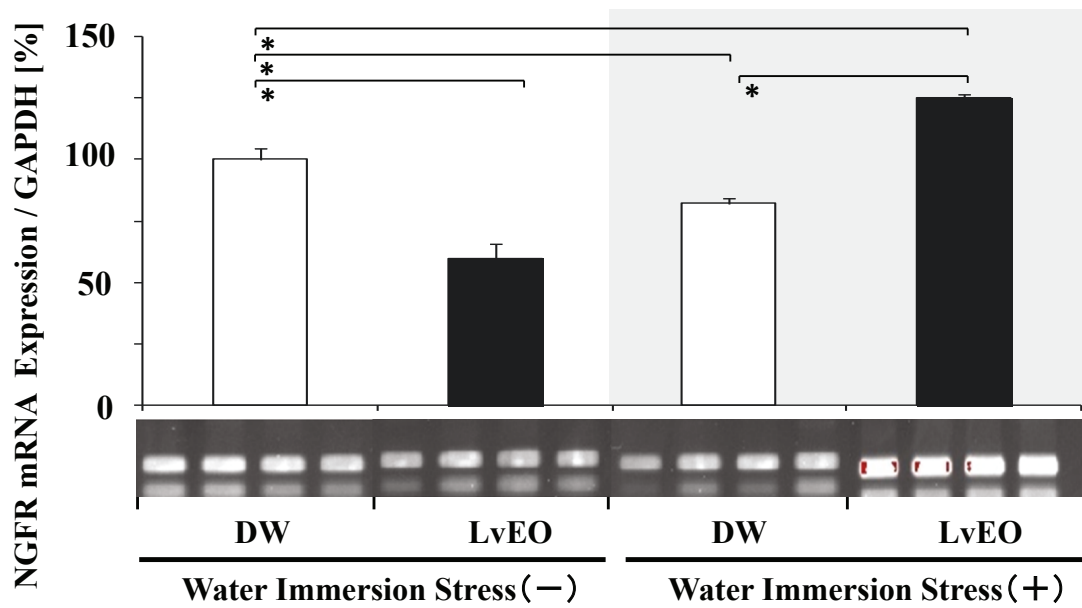
ガラクトキナーゼ 1 は、ガラクトースをグルコース-6-リン酸へと変換するルロワール経路でその一過程を促進する酵素である。エネルギー代謝上重要な酵素であることに加え欠乏によりガラクトース血症を引き起こすことなどから半世紀にわたり広く研究されてきた酵素である⁹⁴。さらに、近年では、細胞内ガラクトース濃度のセンサーとしての役割、各種刺激に応じた転写制御因子としての役割も注目されている⁹⁵。上記 4 群における海馬 (歯状回) 領域のタンパク質発現量 (図 16-A) は、タンパク質の陽性細胞数/ニッスル染色による平均陽性細胞数 x 100 (%) で示している。結果、対照群では、 $22.9\pm 3.8\%$ であったタンパク質発現率が、ストレス負荷群では $39.9\pm 2.6\%$ まで増加し、両者には有意差が認められた。ストレス負荷により亢進がみられた *GLK 1* の発現は、LvEO の前投与により $23.9\pm 2.5\%$ と対照群と同程度まで低下をしており、ストレス負荷群の発現量との間に有意差が認められた。以上より、精油吸入がストレス抑制方向に強く作用したことが示唆される。ストレスなしで LvEO を吸入させた群での発現率は $28.3\pm 2.5\%$ であり、有意差はないものの対照群に比べ増加傾向が認められた。

【*BDNF*】

脳由来神経栄養因子 (*BDNF*) は、神経細胞の発生や維持、成長、神経の可塑性に必須のタンパク質であり、記憶形成の場である海馬に高濃度で存在し学習や記憶、情動において重要な役割を果たしている。各種ストレスにより海馬における発現が減少することが知られており、近年ではうつ病をはじめ不安障害、PTSD (心的外傷後ストレス障害)、薬物中毒、慢性疼痛など多くの中枢性疾患の発症に関与している可能性が示唆されている^{96,97}。今回の解析では、対照群で $79.1\pm 3.8\%$ であった *BDNF* 発現率がストレスの負荷により $67.2\pm 4.9\%$ まで低下する変化が確認されたものの有意差は認められな

った ($p=0.16$)。また、ストレス負荷+LvEO 吸入群での発現率も $63.8\pm 4.4\%$ とストレス負荷群のそれと同等であり LvEO 吸入がストレスによる変化を打ち消す作用ならびにその傾向は確認されなかった。今回得られた結果のみで原因を説明することは困難であるが、ストレス負荷による *BDNF* 発現についての研究報告によれば、ストレスの種類や強度、負荷の持続時間により *BDNF* 発現量の変動に差異がみられる可能性が示唆されており⁹⁸、水浸ストレス負荷により *BDNF* 発現量に変化が見られなかった背景にはこれらの因子が関与していたことが考えられる。一方、*BDNF* 発現量の減少傾向に対し精油吸入の影響が見られなかったことについても精油投与の期間が一因をなしているのではないかと考えている。抗うつ薬として用いられる SSRI は、*BDNF* への作用（発現量増加）が作用機序の一つと考えられているが、SSRI 投与による *BDNF* 発現量の変動もその投与期間によって大きく変動するとの報告がなされており^{99,100}、今回の実験では、いわゆる単回投与であったためにタンパク質発現における変動には至らなかった可能性も考えられる。LvEO の適正使用を考える上でも今後は、長期投与による影響についても解析していきたいと考えている。

A



B

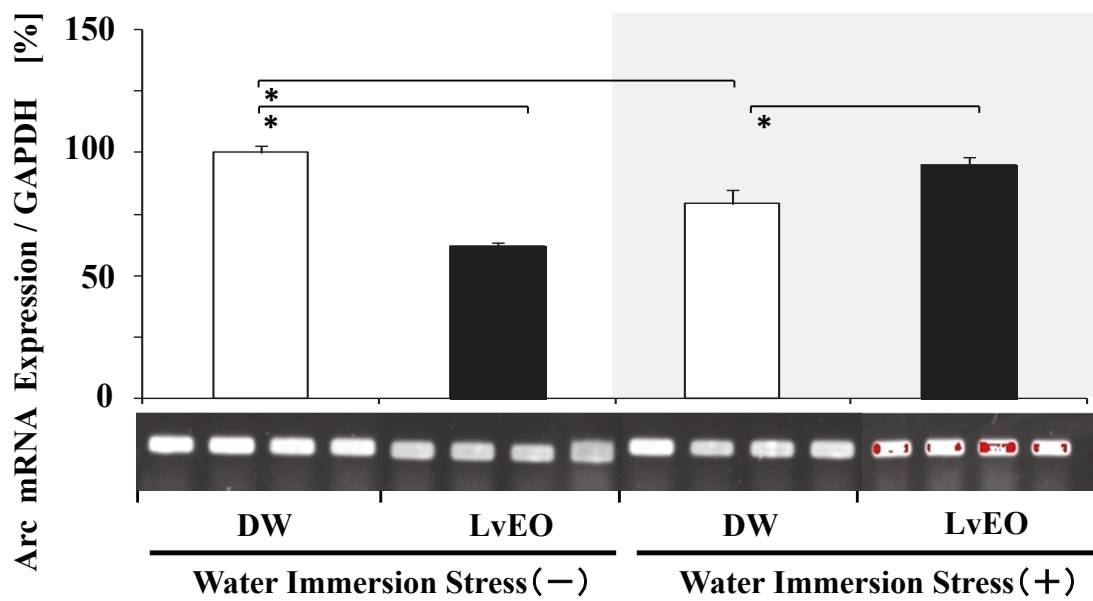


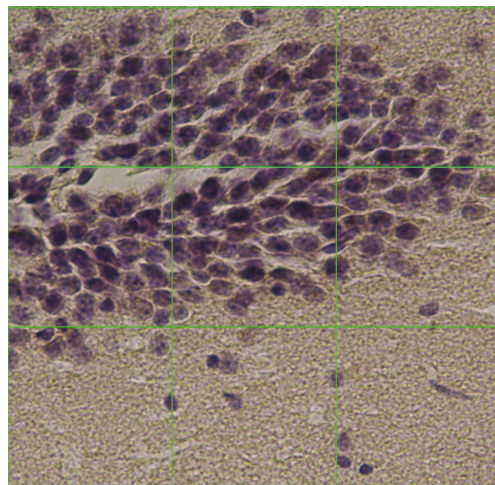
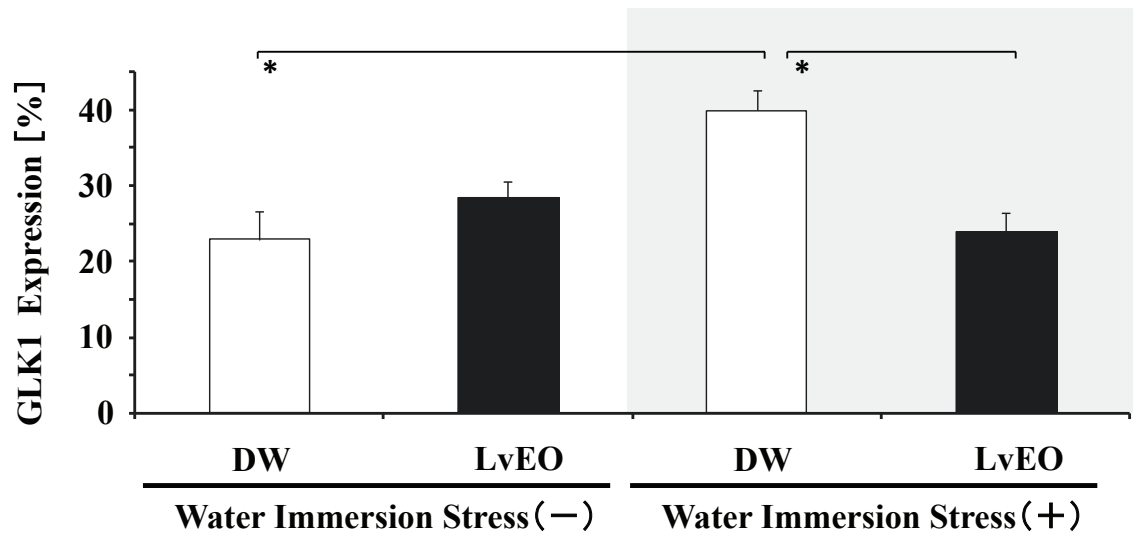
図 15 : 水浸ストレス負荷および LvEO 吸入が遺伝子発現レベルに及ぼす影響

A : *NGFR* mRNA、B : *Arc* mRNA

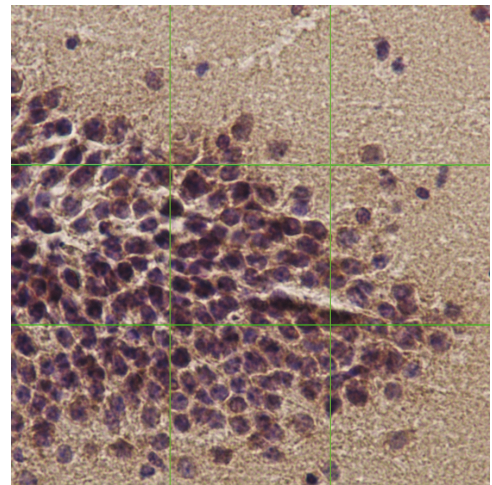
* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$

DW: Distilled water, LvEO: Essential oil from *Lavandula officinalis*

A

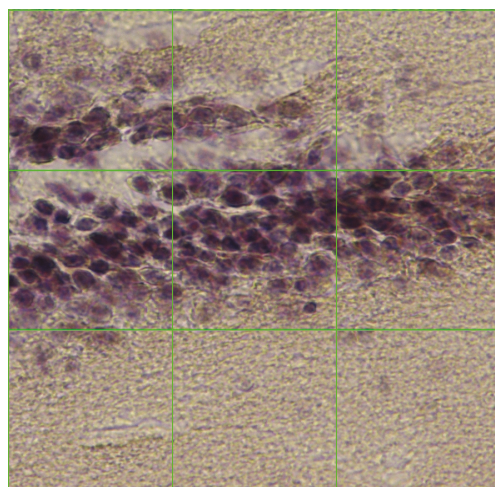


DW/Stress (-)

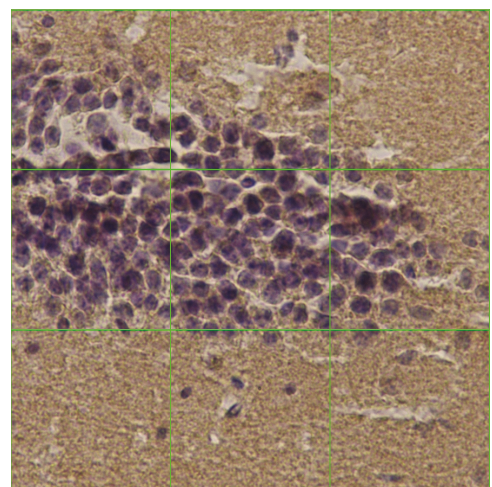


LvEO/Stress (-)

50 μ m

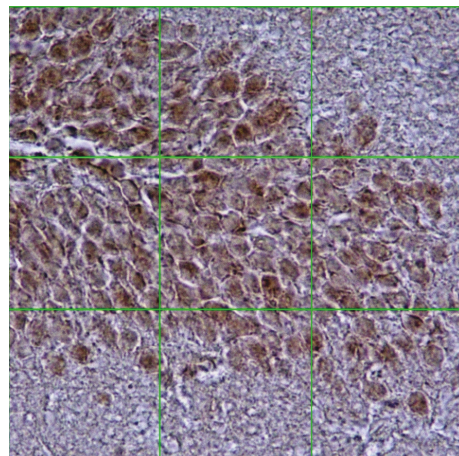
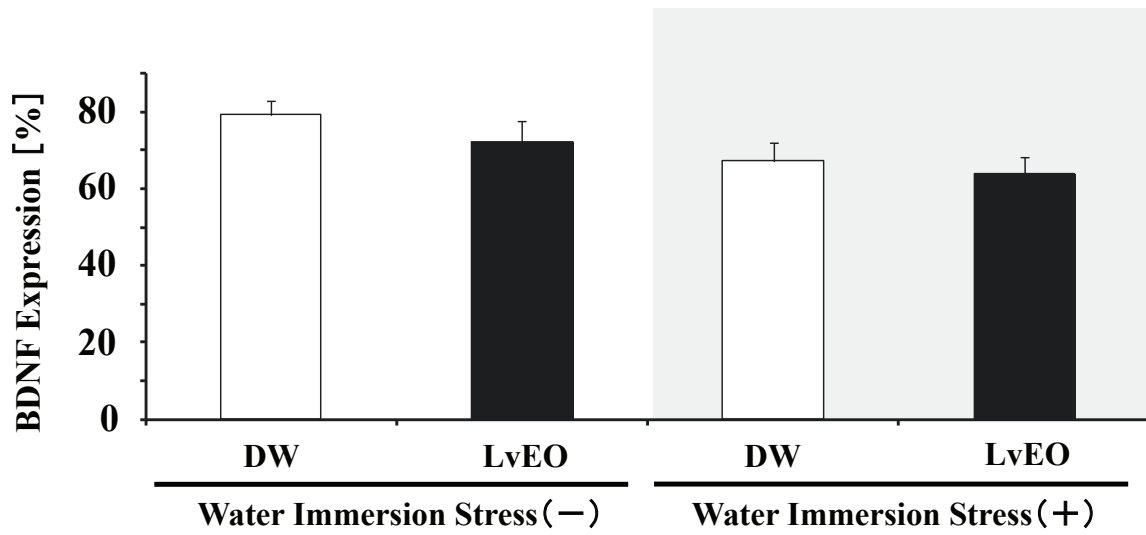


DW/Stress (+)

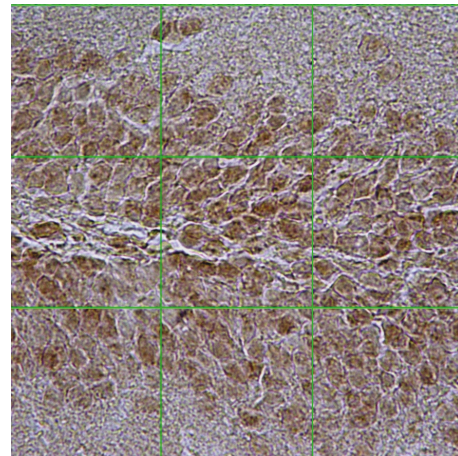


LvEO/Stress (+)

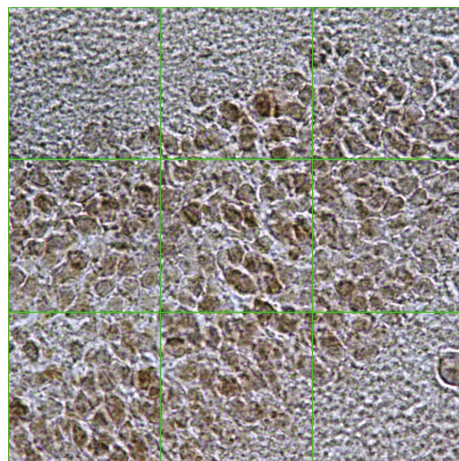
B



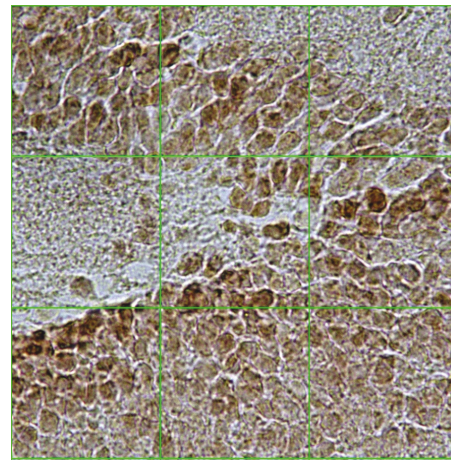
DW/Stress (-)



LvEO/Stress (-)



DW/Stress (+)



LvEO/Stress (+)

図 16：水浸ストレス負荷および LvEO 吸入がタンパク質発現レベルに及ぼす影響

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ A : GLK1、B : BDNF (写真：海馬 (歯状回) 領域)

DW: Distilled water, LvEO: Essential oil from *Lavandula officinalis*

第 2 項：硫酸亜鉛処置による嗅覚麻痺モデルを用いた評価

マウスやラットなどげっ歯類に対し嗅球摘出処置を行うと、内分泌学的・神経科学的・行動科学的に特徴的な変化がみられることが知られている。行動上最も顕著な変化としては過活動が見られ⁸²⁻⁸⁴、この状態が一部の抗不安薬や抗うつ薬の投与により消失するとの報告もなされている^{101, 102}。嗅球の消失と過活動との関連についての詳しいメカニズムはわかっていないが、嗅球摘出動物にみられる攻撃行動の増加⁸⁵や新奇環境に対する過剰反応⁸⁶などの行動上の変化、ならびに神経伝達物質の変化⁸⁷がうつ病患者の病態と重複することから、嗅覚摘出処置はうつ病のモデル動物作製に汎用されている。嗅覚を麻痺させる方法としては物理的に嗅球を切除してしまう上述の方法の他に、希硫酸亜鉛溶液を鼻腔に適用し化学的に嗅覚を麻痺させる方法が存在する⁸⁸。本項ではこの方法により過活動モデル（嗅覚麻痺モデル）を作製し通常マウスとの間でラベンダー精油吸入による効果の比較を行うとともに、作用発現における嗅覚神経系関与の有無についての考察を行った。希硫酸亜鉛溶液処置による活動レベル変化の評価には EPM 試験において試験動物の自発運動量の指標とされている総移動距離、全てのアーム（オープンアームおよびクローズドアーム）への総侵入回数、ならびにクローズドアームへの侵入回数を用いた⁶⁷。また、希硫酸亜鉛溶液処置の成否確認（嗅覚消失の確認）には、Food-finding test (FFT)¹⁰³を適用し本試験をクリアした動物を過活動モデルとして検討に用いた。

本項での検討では、5 週齢の雄性マウスを用い、1 週間隔離飼育をしたのちに無作為に 2 群に分け一方は正常嗅覚を維持する正常嗅覚（Normosmic）群、もう一方は希硫酸亜鉛溶液処置を適用する嗅覚麻痺（Anosmic）群とした。精油の効果と比較する実際の試験では両群をさらに二分し、一方にはラベンダー精油 [*Lavandula officinalis* 由来の精油 (LvEO) を使用]、もう一方には蒸留水を各々 4 μ L/L air、90 分間吸入させ、全 4 群とした上で EPM 試験を実施した。希硫酸亜鉛溶液処置を行った群における EPM 試験の自発運動量評価項目はいずれも有意な上昇が認められ、本処置により過活動状態を呈したことが確認された（図 17-A）。また、FFT 実施の結果、硫酸亜鉛処置群における嗅覚麻痺が確認された。

上記 4 群間で自発運動量の指標である総移動距離を測定した結果を図 17-A に示した。これを見ると、正常嗅覚/DW 吸入群に対し嗅覚麻痺/DW 吸入群における距離が有意に延長しており、希硫酸亜鉛溶液処置群の動物が過活動状態となっていることがわかる。また、正常嗅覚/DW 吸入群と正常嗅覚/LvEO 吸入群とでは距離の変化がみられなかったことから、LvEO の吸入は自発運動量が平常レベルにある場合には変化を及ぼさないことがわかる。一方、嗅覚麻痺/DW 吸入群と嗅覚麻痺/LvEO 吸入群とを比較すると、後者において移動距離の有意な低下が認められ、LvEO 吸入は、嗅覚麻痺処置によって過活動状態となっているマウスにのみ、それを改善する方向に働いていると捉えることができる。前項において、ラベンダー精油吸入が精油利用者の置かれた状況（ストレスレベル）によって、二方向性に変化する可能性があることを報告したが、ラベンダー精油の自発運動量に変化を及ぼす作用（鎮静

作用)においても基線がどのレベルにあるかにより作用の有無・方向が異なる可能性のあることが明らかになった。

ラベンダー精油について、経口投与^{12,13,104}や腹腔内投与^{10,91}による抗不安様作用が認められたとするこれまでの報告を総合すると、本精油による作用発現には、芳香成分が全身循環に入った上で作用を呈する“血流経路(薬理学的経路)”が少なくとも部分的には含まれることが推察される。一方、前章の第2項における検討において、吸入直後の脳から主要構成成分であるLOおよびLAがいずれも検出されず作用のすべてが嗅覚刺激を介したものである可能性も完全には否定できない結果が得られている。本項における嗅覚麻痺マウスを用いた実験系は、精油吸入による効果発現において神経学的回路(嗅覚刺激にはじまり神経経路を介して作用発現に至る系)を遮断した系であり、ラベンダー精油吸入による抗不安様作用の発現に神経学的回路が関与しているか否かの検証が可能な系となっている。その見地から嗅覚正常(Normosmic)マウスと嗅覚麻痺マウス(Anosmic)マウスにおいて、ラベンダー精油の抗不安様作用を比較した結果が図17-Bである。これを見ると、嗅覚正常/LvEO吸入群では、対照群となる嗅覚正常/DW吸入群と比較し非常に顕著なOA滞在時間(秒)の延長が認められている。さらに、嗅覚麻痺/LvEO吸入群においても同様の延長が見られるが、この結果は過活動化による自発運動量亢進に付随する二次的なものであった可能性も考えられる。一方、図17-Aにおいて嗅覚麻痺/DW吸入群で観察されていた過活動状態が嗅覚麻痺/LvEO群では改善しておりLvEOの吸入がこれに寄与したとの解釈が可能である。このようにLvEO吸入が過活動状態を緩和する作用を有すると仮定した場合、LvEO吸入は、嗅覚麻痺のための処置で生じるバックグラウンド変化(過活動状態の発現)を補正した上でさらにOA滞在時間延長が認められていると考えられ、嗅覚麻痺/LvEO群と、嗅覚正常/DW群とのOA滞在時間の有意な差は精油そのものの効果に起因すると結論できるのではないかと考えている。以上をまとめると、嗅覚麻痺/LvEO群での不安関連パラメータの上昇は、精油の持つ抗不安様作用が嗅覚麻痺後も維持されたと解釈され、LvEO吸入によって抗不安様作用が発現する場合、嗅覚刺激とその伝達のプロセス(神経科学的経路)の寄与は必ずしも必要でないと考えられる。尚、ラベンダー精油吸入による作用発現に神経学的経路の寄与があるか否かを検討した報告は、Chiocaらのグループにおいても行われている。彼らは嗅覚麻痺マウスにビー玉覆い隠し試験(Marble-burying test)という行動薬理試験を適用し不安関連パラメータの変動を確認しているが⁶⁶、彼らの結果もからもラベンダー精油の効果発現に嗅覚神経経路の関与は必ずしも必要ない、との結論が得られている。

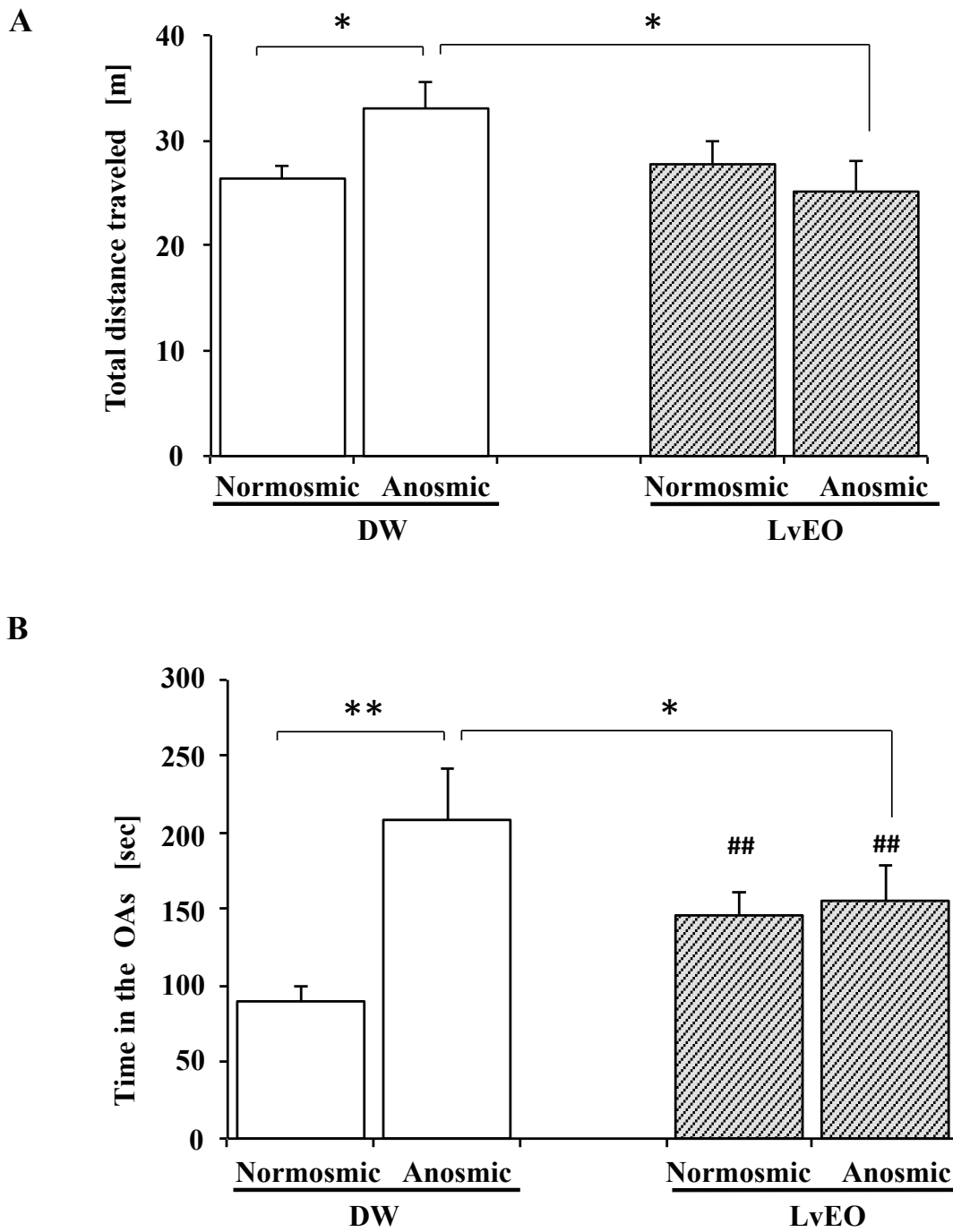


図 17 嗅覚正常(Normosmic)マウスと嗅覚麻痺(Anosmic)マウスにおける自発運動量と抗不安様作用
 A : 総移動距離 (m)、B:OA 滞在時間 (秒)

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ ## : $p < 0.01$ (vs. Normosmic /DW group)

DW: Distilled water, LvEO: Essential oil from *Lavandula officinalis*, OA: Open arm

小括（第3章）

第3章では、ラベンダー精油吸入による抗不安作用は種々の病態レベルにある精油利用者に対しても有効であるかについて2種類の病態モデルを用いて検討を行っている。

第1項では、水浸ストレス負荷モデルを用い、精油利用者のストレス負荷の有無によらず精油の効果が得られるのかを検討した。実験にはICR系5週齢マウスを用いストレス負荷およびLvEO吸入の有無により4群に分けて精油の効果を比較した。評価にはEPM試験による行動薬理学的アプローチ、ならびに種々の外部刺激に応答して発現量を変える遺伝子やタンパク質の発現レベルを指標とする神経科学的アプローチを用いた。EPM試験では、LvEO吸入による抗不安様作用がストレスの有無にかかわらず得られることを確認したが ($p<0.05$)、この効果はストレス負荷時により顕著に認められていた。さらに、Masuoらの先行研究によりストレスマーカーとしての機能が報告されている遺伝子、*NGFR* mRNA および *Arc* mRNA の発現レベルの変化を検討したところ、水浸ストレスの負荷により両者の発現レベルの減少が認められたが ($p<0.05$)、LvEOの吸入はこれらの変化を逆転させておりストレス負荷による遺伝子発現レベルへの影響を打ち消す方向に作用していたことが明らかとなった。次に、タンパク質 *GLK1* 発現量の変化については、Masuoらによる報告同様、ストレスの存在に対し発現量を上昇させる傾向が認められたが、この変化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変化を緩和したものと考察している。一方、ストレス負荷はせずに精油の吸入を行っただけの群において、*NGFR* mRNA、*Arc* mRNA ならびに *GLK-1* のストレス増加方向への変化が認められ、精油吸入がストレスサワーとして作用していたことが示唆された。以上より、LvEOの効果は、精油利用者へのストレス負荷の有無により作用の方向性が変化するようになることが明らかになった。

次に第2項では、希硫酸亜鉛溶液の鼻腔への適用による嗅覚麻痺状態とこれに伴って生じる過活動状態を病態ととらえ、ラベンダー精油吸入がどのような影響を及ぼすのか、ならびにラベンダー精油による抗不安作用発現には神経学的回路が寄与しているのかの2点につき検討を行った。McBrideらの報告を参考に希硫酸亜鉛溶液処置を行いFFTにて嗅覚麻痺が確認されたマウス群では、総移動距離をはじめ自発運動量の指標となるパラメータがいずれも有意に上昇しており、本処置が嗅球摘出動物と同様の過活動状態を呈することが示された。作製した過活動モデルにおけるラベンダー精油の効果は5週齢雄性マウスを嗅覚麻痺ならびにLvEO吸入の有無により分類した4群間での比較検討により評価した。ラベンダー精油には鎮静作用のあることが広く知られているが、今回の検討で、通常の活動レベルにある正常嗅覚/DW吸入群においてはこの作用は認められず、嗅覚麻痺/DW吸入群（過活動モデル群）においてのみこれを軽減する方向に作用したことがわかった。LvEO吸入による作用が精油利用者の置かれた状況により二方向性に变化する可能性があることは前項でも報告したが、同様の傾向は鎮静作用においても認められたと言える。

次に、先般の検討で用いた4群間でのEPM試験結果から、ラベンダー精油吸入による抗不安様作用発現に神経学的回路が関与しているのか否かについての考察を行った。結論から言うと、LvEO吸入により抗不安様作用が発現する場合、嗅覚刺激とその伝達のプロセス(神経科学的経路)の寄与は必ずしも必要ではないと考察している。というのは、対照群の嗅覚正常/DW吸入群に対し、嗅覚正常/LvEO吸入群のみならず嗅覚麻痺/LvEO吸入群においてもOA滞在時間(秒)の顕著な延長が認められていたからである。後者における滞在時間延長は、過活動化による自発運動量亢進に付随する二次的なものではないかとの考えもあるが、LvEO吸入はこの過活動状態を補正した上でさらにOA滞在時間延長を呈していると考えられる。これらの作用が嗅覚神経系を遮断したマウスで見られるということは、作用発現にこの回路が関与していないと考えられる。したがって、嗅覚麻痺/LvEO群と嗅覚正常/DW群とのOA滞在時間の有意な差は吸入後体内循環に入った精油成分によると考えている。

本章における検討では、ラベンダー精油吸入による作用が、ストレスレベルや自発運動量など、精油利用者(動物)の置かれた状態によってその方向性や程度に差異を生じうることを示す結果が随所で確認された。LvEO吸入による抗不安様作用は水浸ストレス負荷の有無にかかわらず認められたが、ストレス負荷時により顕著に認められていたケース(図14-A)、LvEO吸入が水浸ストレス負荷群では*NGFR*mRNAならびに*Arc*mRNAの発現レベルを上昇させる方向に作用していた一方でストレス負荷のない群では逆方向に働いていたケース(図15-A,B)、LvEO吸入がストレス負荷群において*GLKI*発現レベルの低下方向に作用していたのに対し負荷のない群では逆方向に働いていたケース(図16-A)、LvEO吸入が希硫酸亜鉛溶液処置による過活動モデルでは自発運動量を低下させる方向に働いたのに対し通常マウスではこの作用が確認されなかったケース(図17-A)が該当する。ストレスや活動量に適正レベルといったものが存在するのかは分からないが、精油の吸入がこのレベルを維持する方向に作用しているようにも捉えられる。恒常性の維持ともとれるこれらの作用がラベンダー精油によるものなのか、とすればどのような機構によるものなのか、本研究で得られた知見のみで考察することは困難であるが、ラベンダー精油の利用者層が健常人から高度のストレス下にある患者までと幅広いことを考えると、重要な知見であると考えられる。

結語

ラベンダー（ラバンデュラ属植物（*Lavandula* spp.））は、古来より今日に至るまで我々の生活に深く根ざし多くの恩恵をもたらしてきた植物である。本植物を抽出して得られるラベンダー精油もまたリラクセス効果や心身の調子を整える作用を期待して広く重用されており、不安に対する作用は民間での利用が普及するのみにとどまらず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、作用発現の再現性や普遍性が十分ではないために、ラベンダー精油の不安への効果は、“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ている。著者は、将来、ラベンダー精油の効果を最大限に活用し臨床応用を進めるためには有効性発現に差異を生じる因子を追求しその影響を最小限に抑えること、ならびに学際的評価による生物活性作用の全体像解明が重要であると考え研究に着手した。

ラベンダー精油を適正に用いるためには、基原植物の多様性についての理解が必要不可欠である。ラバンデュラ属は 39 種もの植物で構成される属であり、品種改良を目的とした人工交配も盛んなため栽培種（cultivar）の種類も増え続けている。芳香療法で用いられる精油成分は多成分系であり、基原植物の種類に基づく構成成分の量や存在比の違いが効果の差として出現する可能性がある。よって、特定の作用を目的としてラベンダー精油を利用するためには、もとなる基原植物を見直し構成成分および効果との関係を解明すること、もしくは再構築することが重要であると考えられるのである。そこで、本研究では、ラベンダー精油におけるこれら三者の関係を明らかにすることを目的の一つとし、調査・検討を行うこととした。第 1 章では、関東近郊のラベンダー栽培地域から回収した植物サンプルについて、精油の品質評価に用いられ、抗不安作用の活性本体とも考えられているリナロール（LO）および酢酸リナリル（LA）について各植物サンプルにおける分布を比較検討した。その結果、LO・LA の分布は、花部に最も多く、LO は Hybrid（Lavandin）系、LA は *Angustifolia* 系植物に最も多く分布していることが分かった。ラベンダーはその植物形態により 4 系統に分類されているが、両成分の分布は、系統間のみならず系統内においてもサンプル間で大きな差異が認められることが明らかとなった。繰り返される品種改良や植物自身の環境適応能力等により、形態学的分類とそれに基づく構成成分の特徴が少しずつ変化してきているのではないかと考えられた。続いて、4 系統間における構成成分の差異についてさらに詳細に調査するため、4 系統 6 種の精油試料について成分分析を行った。植物試料の時と同様、精油の作用を決定づける構成成分の違いが、系統の違いだけでなく、植物が生育する条件の違い等により大きく異なる可能性があることが明らかとなった。

第 2 章では、前章で明らかにした基原植物と構成成分との関係をもとに、抗不安作用への影響を調べた。実際の調査には、前章で評価した 6 種の精油試料を用い、それぞれについて十字迷路試験により不安への作用を評価した。その結果、LvEO 吸入により抗不安様作用を発現するためには、精油中に LO と LA の両方が含まれていることが必要であり、作用の強さは LO と LA の含有率の和に相関

($r=0.82$, $p < 0.05$) していることが確認された。さらに、LO と LA を単独投与した場合と、混合して使用した場合とを比較した実験により、抗不安様作用発現において LO と LA とが何らかの形でシナジー効果を発揮している可能性、ならびに LO と LA の組成比を 2:1 とした時に各々を単独で吸入させた場合を凌ぐ効果が見られることを明らかにした。また、本章では、LvEO による抗不安様作用の活性本体であることが明らかになった LO と LA がいかなる経路で作用発現に寄与するのかを確認する目的で、両成分の脳への移行性を調べた。この際、LvEO 同様、吸入投与で抗不安様作用を発現することが報告されているトドマツ精油 (AsEO) をポジティブコントロールとして用いた。AsEO、LvEO とも吸入後の EPM 試験では自発運動量に変化を及ぼすことなく抗不安様作用を発現していることが確認された。しかしながら、その直後に断頭し全脳を摘出しホモジナイズの後に濃度測定を行った結果、AsEO 中主要成分は、 α -pinene : 19.7 ± 1.0 、camphene : 20.7 ± 1.7 、 β -pinene : 8.9 ± 0.5 [mg/kg/ specimen] と、ほぼ精油中の組成比を維持したまま脳から検出されたのに対し、LvEO では LO, LA とも不検出 (検出限界未満) であった。すでに代謝を受け脳中から消失していた可能性が一因として挙げられるが、結論に至るには今後さらに経時的な測定データを得る必要がある。本章最終項では、EPM 試験において確認される抗不安様作用に 5-HT 神経系が関与しているか否かを確認する実験を行った。マウスに 5-HT の前駆物質である 5-HTP を前投与することで人工的に 5-HT 神経系亢進状態とし、この状態で EPM 試験を行い行動変化を観察した。その結果、5-HTP 投与群では不安を生じたかもしくは不安が増強したと判断される行動変化が認められた。マウスはこの直後に断頭し不安情動と関連が深いとされる前頭皮質、線条体、海馬の 3 部位を 5-HT およびその代謝物である 5-HIAA の濃度測定用試料とした。HPLC にて得られたデータから代謝回転率を算出したところ、5-HTP 群では、コントロール群に比べ代謝回転率は増加していることが判明し、5-HTP により 5-HT 神経系亢進状態とするとマウスは不安行動を示し、この時マウスの 5-HT 神経の代謝回転率は増加しているという関係が明らかになった。その上でマウスに LvEO を吸入させ同様に EPM 試験を実施したところ、抗不安様作用がみられた際の代謝回転率は低下していることが確認された。よって、LvEO 精油吸入によってみられる抗不安様作用の作用機序の少なくとも一部には、5-HT 神経系の活動性低下が関わっているものと考えられる。なお、この実験は、ベンゾジアゼピン系薬剤であるジアゼパムをポジティブコントロールとして行ったが、同剤使用時にも代謝回転率の低下が見られており、LvEO による 5-HT 神経活動性の低下が LvEO 独自の直接的なものなのか、GABA_A/BDZ 系を介したものであるのか結論は出しておらず、さらなる調査が必要である。

続く 3 章では、LvEO 吸入による抗不安様作用の普遍性に関する検討、つまり同じ条件下で精油を使用すれば精油利用者がどのような状態にあっても効果が期待できるのかについて、特に精油利用者が種々の病態を呈しているような場合の疾病治療効果について検討を行った。第 1 項では水浸ストレス負荷モデルを用いた評価を行った。このモデルは、底部の床敷き (おがくず) のかわりに水深が約 2 cm となるように水を張ったケージ内でマウスを飼育し 24 時間不眠環境に置くことにより作製する。試験動物をストレス負荷および精油吸入の有無により対照群 [DW/Stress(-)]、LvEO 吸入群 [LvEO/Stress(-)群]、ストレス負荷群

[DW/Stress(+)]群]、ストレス負荷+LvEO 吸入群 [LvEO/Stress(+)]に分類し LvEO 吸入の効果を 4 群間で比較する検討を行った。評価指標には、EPM 試験結果およびストレスマーカー候補分子の発現量変化を用いた。当初、ストレス負荷群では EPM 試験結果が不安を促す方向に変化するだろうと予測していたが、実際には対照群との間の不安関連パラメータに変化が見られなかった。LvEO は、水浸ストレス負荷の有無によらず不安関連パラメータである OA 滞在時間を延長させていた ($p<0.01$)。この効果は、ストレス負荷群でより顕著であった。次に、Masuo らの先行研究によりストレス存在下で発現が減少方向に変化することが示されているストレスマーカー候補遺伝子 *NGFR*mRNA および *Arc* mRNA の変化を調査したところ、両分子とも水浸ストレス負荷により有意な発現レベル減少が認められた ($p<0.05$)。一方、LvEO 吸入群における遺伝子発現量の変化は、負荷をかけた時に見られた変化とは逆方向に作用しており、ストレス緩和方向に働いたと考えられる。一方、ストレス負荷はせずに精油の吸入を行った LvEO 吸入群において、ストレス増加方向への変化が認められ、精油吸入がストレスサーとして作用していたことが示唆された。LvEO による作用は、精油利用者のストレスレベルに応じて二方向性に変化する可能性のあることが明らかとなった。タンパク質発現の変化については、*BDNF* はストレスや LvEO による有意な変化を見せなかったが、*GLKI* については、遺伝子での結果同様、LvEO がストレスを緩和する方向に作用したことを示す結果が得られた。

第 2 項では、硫酸亜鉛の経鼻投与により過活動状態となったモデル動物と正常動物との間で LvEO の効果を比較した。その結果、LvEO は、嗅覚麻痺処置にともなって亢進した自発運動量を正常化する作用を有することが確認された。この作用は LvEO の鎮静効果に由来すると推察しているが、対照の通常マウスには認められておらず、対象の置かれた状態に応じて作用が変わるという LvEO による作用の特徴がここでも確認されたと考えている。また、神経学的経路を遮断した場合の精油の効果検証において嗅覚麻痺マウスでも効果が確認されていた結果から、LvEO 吸入による抗不安様作用発現には神経学的経路の寄与は必ずしも必要ではないとの結論に至った。

本研究で得られた主な知見を以下に示す。①ラベンダー精油における主要構成成分の含有量や組成比は、基原植物の系統のみならず植物の生育環境など後天的な因子によっても大きく影響される。栽培地の高度(海拔)はその因子の一つであると考えられる。②LvEO 吸入による抗不安様作用の発現には、LO と LA の共存が必要で、作用の強さは LO と LA の含有率の和に相関する。また、両成分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ある。③LO・LA の両成分は、脳への移行性 (BBB の透過性) が非常に悪いか、脳中からの代謝・排泄が非常にはやい可能性がある。④EPM 試験で観察される LvEO 吸入による行動変化には、5-HT 神経系の関与が考えられ、LvEO は 5-HT 神経系の亢進状態を解除する (代謝回転を低下させる) 方向に作用している可能性がある。⑤LvEO 吸入による抗不安様作用の発現には、嗅覚刺激とその伝達のプロセス (神経科学的経路) の寄与は必ずしも必要でないと考えられる。⑥LvEO 吸入によって現れる作用は、対象の置かれたストレス環境や活動レベルに応じて変化し得るものであり二方向性に作用する可能性がある。⑦LvEO は、嗅覚麻痺処置による過活動に対し、抑制的に

作用する可能性がある。

ラベンダー精油を不安の解除を目的に利用する場合、特に医療目的での利用を考える場合、“効果”という観点での品質管理が重要であると考えられた。期待する作用を特定の成分に帰することができる場合には、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は効果発現の再現性担保への一案となりうるのではないかと考えられる。また、ラベンダー精油の作用の方向が対象動物の状態により変化するという結果は、本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。ラベンダー精油の効果に影響を与えうる因子として、精油側ならびに精油摂取者側で得られたこれらの点は、ラベンダー精油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。

実験の部：

第1章 ラベンダーの種差と精油成分に関する検討

第1項：関東近郊におけるラベンダーの種差と主要構成成分の分布

図4および表1に示した関東近郊のラベンダー栽培地より、植物1種類につき、花部・茎・葉のサンプルそれぞれ1gを秤取し、*n*-hexane（和光純薬工業株式会社，大阪）5 mLによる抽出で得られた試料1 μ Lについてガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）Clarus 500 MS（Perkin Elmer, Inc., Waltham MA, USA）、非極性キャピラリーカラム Equity-1（30m x 0.25 mm ID, 0.25 μ m, Sigma Aldrich, St. Louis MO, USA）を用いて分析を行った。その他の測定条件は以下の通りである。

キャリアガスはHeを1.33 mL/minの流量で用いた。注入モードはSplit mode（1: 30）、注入口温度は250°Cで行った。昇温条件は35°Cで5 min保持した後、3°C/minで昇温し、215°Cで5 min保持を行った。イオン源温度は230°C、イオン化電圧は70 eVとし、MS走査範囲はm/z 40-300、Full scan modeで行った。

GC-MSによる精油成分の同定：

同定は、保持指標（Retention Index、以下RI）の文献値¹⁰⁵との比較、マススペクトル（Mass Spectrum、以下MS）のフラグメンテーション解析、MSのライブラリ（NIST MS Search Version 1.7）によるMSスペクトルの比較、及び標準品による保持時間（Retention Time、以下RT）・MSスペクトルとの直接比較により行った。着目した2成分（LinaloolおよびLinalyl acetate）の定量には、それぞれの標準物質を用いた絶対検量線法を採用した。検量限界、定量限界は、それぞれ、S/N=3（0.075 g/L）、S/N=10（0.3 g/L）とした。

第2項：関東近郊におけるラベンダーの種差と主要構成成分の光学分割

第1項で作成した試料0.1 μ Lもしくは、標準品（ \pm ）-Linalool（東京化成工業株式会社，東京）、(-)-Linalool（Sigma Aldrich）を試料としてキラルカラムを用いてGC-MS分析を行い、光学異性体の存在比率は得られたそれぞれのピーク面積値から算出した。測定条件は以下の通りである。

測定装置はClaus 500 GC/Claus 500 MS、キラルカラム CYCLOSIL-B（30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μ m）（Agilent Technologies, Inc., Santa Clara CA, USA）を用いた。キャリアガスはHeを1.33 mL/minの流量で用いた。注入モードはSplitless、注入口温度は230°Cで行った。昇温条件は40°Cで5 min保持した後、5°C/minで昇温し、230°Cで20 min保持を行った。イオン源温度は230°C、イオン化電圧は70 eVとし、MS走査範囲はm/z 40-300、Full scan modeで行った。

第3項：4系統6種類のラベンダー精油における定性・定量評価 7

表4に示した4系統のラベンダー精油全6種について、1 μLを *n*-hexane（和光純薬工業株式会社）に希釈したものを試料とし、キャピラリーカラム Equity-1（30m x 0.25 mm ID, 0.25 μm, Sigma Aldrich）を用いてGC-MS分析を行った。測定条件は第1項と同様である。

GC-MSによる化学成分の同定：

第1項の該当項目記載に同じ。

使用した標準品：

α-pinene、camphene、camphor、β-pinene、bisabolene、bornyl acetate、carvone、myrcene、limonene、α-terpinene、terpinene-4-ol、γ-terpinene、α-terpineol、borneol、linalyl acetate、linalool、neryl acetate、nerol、及びRIを求めるための直鎖アルカン（C₉-C₁₆）は、東京化成工業株式会社、β-caryophylleneと1,8-cineolは、和光純薬工業株式会社より購入した。

保持指標（RI）：

保持指標（恒温条件で測定した直鎖アルカンの炭素数を基準にして、成分の保持時間を指標化したもの）は、Kovatsによる以下の式を用いて算出した¹⁰⁶。但し、未知成分*i*と直鎖アルカンの保持時間は、 X_Z （炭素数*Z*の直鎖アルカンの保持時間） $\leq X_i$ （未知成分*i*の保持時間） $\leq X_{(Z+1)}$ （炭素数*Z*+1の直鎖アルカンの保持時間）とする。測定条件は、表14に示した。

$$RI=100 \left(\frac{\log X_i - \log X_Z}{\log X_{(Z+1)} - \log X_Z} + Z \right)$$

測定条件は以下の通りである。測定装置は Claus 500 GC/Claus 500 MS（Perkin Elmer）、非極性キャピラリーカラム Equity-1 Capillary Column, 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μm（Sigma Aldrich）を用いた。キャリアガスはHeを1.33 mL/minの流量で用いた。注入モードは Split mode（1: 30）、注入口温度は250°Cで行った。昇温条件は、①35°Cで50 min保持した後、10°C/minで昇温し、205°Cで3 min保持を行った。②55°Cで50 min保持した後、10°C/minで昇温し、205°Cで3 min保持を行った。③60°Cで50 min保持した後、10°C/minで昇温し、210°Cで5 min保持を行った。④80°Cで50 min保持した後、10°C/minで昇温し、230°Cで5 min保持を行った。⑤100°Cで50 minした後、10°C/minで昇温し、230°Cで7 min保持を行った。⑥120°Cで50 min保持した後、10°C/minで昇温し、230°Cで9 min保持を行った。イオン源温度は230°C、イオン化電圧は70 eVとし、MS走査範囲はm/z 40-300、Full scan modeで行った。

GC-FID による化学成分の定量：

6種の精油各1 μLをn-hexane（和光純薬工業株式会社）で希釈したものを試料とし、非極性キャピラリーカラム（Equity-1 Capillary Column）を用いた。定量には、標準物質 pentadecane（東京化成工業株式会社）を用いた絶対検量線法を採用した。検出限界、定量限界は、それぞれ、S/N=3（0.075g/L）、S/N=10（0.3g/L）とした。測定条件は以下の通りである。

測定装置はGC-2010 Plus（株式会社 島津製作所、京都）、非極性キャピラリーカラムはEquity-1 Capillary Column, 30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μm（Sigma Aldrich）を用いた。キャリアガスはHeを1.33 mL/minの流量で用いた。注入モードはSplit mode（1:48.5）、注入口温度は250°Cで行った。昇温条件は35°Cで5 min保持した後、3°C/minで昇温し、215°Cで5 min保持を行った。検出器はFIDを使用し、検出器温度は230°Cで行った。

第2章 ラベンダー精油吸入による抗不安様作用の評価

第1項：4系統6種類のラベンダー精油吸入による抗不安様作用の評価 3

第2項：ラベンダー精油主要構成成分による抗不安様作用

実験動物：

ICR系5週齢雄性マウス（日本クレア株式会社、東京）を一定温度（24±2 °C）、明暗調整（明：08:00-20:00、暗：20:00-08:00）、摂食飲水自由の環境下で1週間隔離飼育した後、実験に用いた。各試験において、精油吸入・行動薬理試験の経験のないマウスを1回のみ実験に使用した。実験は、東邦大学動物実験委員会による動物実験取扱い規定に則って行った。

精油投与：

試料精油を直径55 mmの円形ろ紙（ワットマンジャパン株式会社、東京）に染み込ませ、5Lのガラス製コンテナ（L100 x W250 x H200 mm）の上蓋内側に貼付設置した。マウスをコンテナ内に投入し上蓋を閉め、環境に慣れさせるため30分置いた後、ろ紙に精油（対照群では水）を滴下し、90分間精油曝露下に置いて吸入させた。コンテナ内は、一定温度（24±2 °C）、一定照度（200 Lx）となるよう調整した。

EPM 試験：

EPM試験は、1985年にPellowらによって考案された評価系で¹⁰⁷、Polyethylene terephthalate（PET）製の壁を有する2本の腕（Closed arm：L600 x W50 x H200 mm）と壁のない2本の腕（Open arm：L600 x

W50 mm) とを中央で交差させ、高所 (床上 600 mm) に設置した十字型の迷路構造を有する (図 12)。交差部分へマウスをリリースすることで試験を開始し、その後 10 分間、マウスの行動をウェブカメラ (Web Camera BWC-30L01/SV USB、株式会社バッファロー、愛知) にて撮影・記録した。各マウスについて、Open arm での滞在時間 (分)、進入率 (%) を行動解析ソフト ANY-maze (Stoelting Co., Wood Dale IL, USA) を用いて計測した。照度や評価の時間帯等が結果に影響を与える因子として知られているため、試験室の照度は 200 Lx に維持し、実験はすべて、明時間 (13:00~18:00) に実施した。

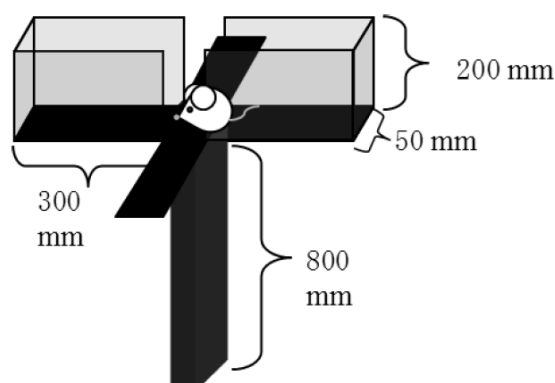


図 18：高架式十字迷路試験 試験装置外観

統計処理：

特別に明記した場合を除き、データはすべて平均値±標準誤差で表す。測定値に関しては、一元配置分散分析 (ANOVA) で有意差検定を行い、コントロール群と試料投与群の比較には、Dunnett の多重比較法、多群間の比較には、Tukey-Kramer 法を用いた。統計解析ソフトは、JMP™ (SAS Institute Japan 株式会社、東京) を用い、有意水準はいずれも、両側検定で 5%未満とした。

ラベンダー精油主要構成成分の脳への移行性

精油：

トドマツ精油 (Essential Oil of *Abies sachalinensis*、以下 AsEO) [positive control として使用] はグリーンフラスコ社より購入したものをを用いた。ラベンダー精油は、表 4 に示した、グリーンフラスコ社の *L. officinalis* 精油を使用した。定性/定量評価結果は第 2 章 表 5 に示したとおりである。

GC-MS、GC-FID によるトドマツ精油の定性/定量評価：

精油 1 μ L を n-hexane (和光純薬工業株式会社) に希釈したものを試料とし、GC-MS については、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) Clarus 500 MS (Perkin Elmer, Inc.)、キャピラリーカラム Equity-1 (30 m x 0.25 mm ID, 0.25 μ m, Sigma Aldrich)、GC-FID については、ガスクロマトグラフ

GC-2010 Plus (島津製作所) にて、非極性キャピラリーカラム (Equity-1 Capillary Column) を用いて、分析を行った。GC-MS、GC-FID の測定条件詳細は第 1 章の実験の部にそれぞれ示した。また、定量には、標準物質 pentadecane (東京化成工業株式会社) を用いた絶対検量線法を採用した。検出限界、定量限界は、それぞれ、S/N=3 (0.075 g/L)、S/N=10 (0.3 g/L) とした。

定量・定性評価に使用した標準品 (トドマツ精油) :

tricyclene、Tricyclene、(+)- α -pinene、(-)- α -pinene、camphene、(-)- β -pinene、myrcene、3-carene、*p*-cymene、(+)-limonene、(-)-limonene、terpinolenek、borneol、bornyl acetate、及び RI を求めるための直鎖アルカン (C₈-C₁₉) は、東京化成工業株式会社、 β -caryophyllene は、和光純薬工業株式会社よりそれぞれ購入した。

実験動物・EPM 試験 :

第 1・2 項 該当項目の記載に同じ。

精油投与 :

試料精油 (トドマツ精油もしくはラベンダー精油各 20 μ L) を直径 55 mm の円形ろ紙 (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) に染み込ませ、5L のガラス製コンテナ (L100 x W250 x H200 mm) の上蓋内側に貼付設置した。EPM 試験開始 2 時間前にマウスをコンテナ内に投入し上蓋を閉め、環境に慣れさせるため 30 分置いた後、ろ紙に精油を滴下し、90 分間精油曝露下に置いて吸入させた。なお、コンテナ内は、一定温度 (24 \pm 2 $^{\circ}$ C)、一定照度 (200 Lx) となるよう調整した。

摘出脳サンプル中の精油成分量測定 :

試料 (全脳) 採取と測定試料の作成 : 精油試料 50 μ L を 5L のガラスコンテナ内で 90 分間吸入投与させた。(この投与量は、精油成分量の測定の確実化のため、各投与方法での最高投与量の 2.5 倍量を算出した量である。) 吸入終了後、マウスを頸椎脱臼により気絶させ、全脳の摘出を行った。得られたサンプルは、成分抽出・測定までの間、-80 $^{\circ}$ C にて保管した。成分量測定用サンプルには、適度に解凍した保存サンプルを、ヘキサン (2 mL) 中で超音波粉碎し、遠心分離 (12000 x g、4 $^{\circ}$ C) 後、硫酸ナトリウムで 2 度脱水操作を行ったものを用いた。

第 3 項 : 抗不安様作用発現時のセロトニン神経系活動性

実験動物・精油投与 :

第 1・2 章の各項目の記載に同じ。

薬物投与（5-HTP 投与マウスにおける EPM 試験と代謝回転の変化）：

5-HT の前駆物質 5-ヒドロキシトリプトタミン（5-hydroxytryptophan；5-HTP）（Sigma Aldrich）の調製及び投与量は Murakami らの報告を参考にした⁴⁷。5-HTP を、0.1% Tween 80（関東化学株式会社）を含有した生理食塩に溶解して使用するものとし、10 mg/kg を EPM 試験開始 30 分前に腹腔内投与した。

薬物投与（LvEO 吸入投与時の EPM 試験と 5-HT 代謝回転変化）：

ジアゼパム（和光純薬工業株式会社）の調製および投与量は Dere らの報告を参考にした¹⁰⁸。ジアゼパムを、0.1% Tween 80 を含有した生理食塩液に溶解して使用するものとし、3 mg/kg を EPM 試験開始 30 分前に腹腔内投与した。本薬剤投与の侵襲性がストレスとなり結果に与える影響を最小限に抑えるため、精油（または水）投与群においても、同じタイミングで薬効のない生理食塩水を腹腔内投与した。また、ジアゼパム投与群には、蒸留水の吸入をさせ、どの群においても吸入・腹腔内投与が等しく行われるよう調整した。薬物投与・精油吸入のタイムスケジュールを図 19 にまとめた。

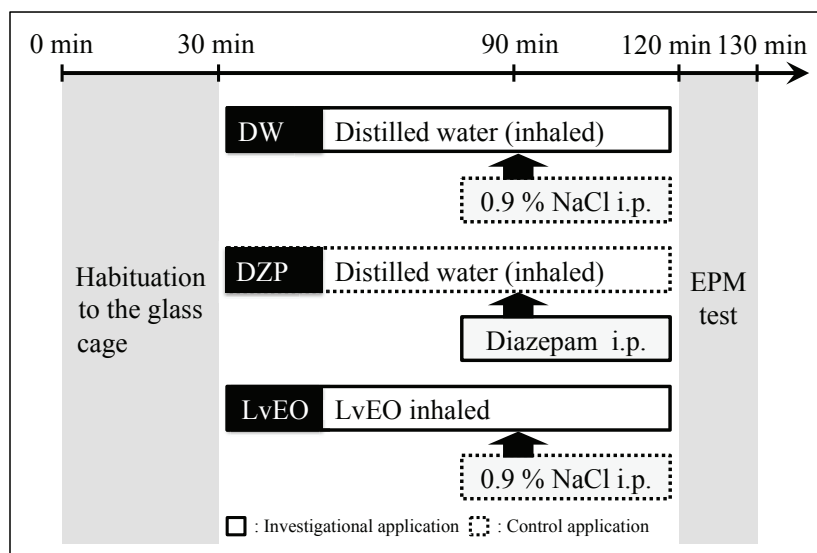


図 19：行動薬理試験（EPM 試験）前の薬物／精油投与スケジュール

HPLC による脳内 5-HT および 5-HIAA 濃度の測定：

精油（または水）の吸入、もしくは、DZP 腹腔内投与終了後、断頭したマウスの脳を摘出し、嗅球、前頭皮質、中隔、線条体、大脳皮質、海馬、視床、視床下部、小脳、延髄、中脳の 11 部位に、氷冷したガラスプレート上で分画した。分画試料は、測定まで -80°C で凍結保存した。測定には、前頭皮質、線条体、海馬分画に 0.15M HClO_4 、0.025 % cysteine、及び 0.025 % EDTA の混合液 500 μL を添加し、超音波ホモジナイザーにてホモジナイズした。これを 13000 x g 30 分間遠心分離し、上澄をメンブランフィルター（Millipore 0.45 μm , Merck, Darmstadt, Deutschland）にてろ過し、測定試料とした。HPLC による測定条件は、以下の通りである。

検出器は RF-10A_{XL}（株式会社島津製作所）、カラムは Capcell pak C18 UG 120 \AA , 4.6 x 250 mm（株式

会社資生堂、東京)を用いた。移動相は、水相 A/アセトニトリルが 2775/225 の割合で用いた。なお、水相 A は、12.15 mM citric acid (6.43 g)、11.60 mM (NH₄)₂HPO₄ (4.25 g)、2.53 mM sodium octylsulphonate (1.52 g)、3.32 mM DBAP (9.21mL)、1.1 mM EDTA 1.15g、DDW を加えて 2775 mL とした。流速は 1.0 mL/min、カラム温度は 40°Cとした。蛍光は Ex : 280 nm、Em : 340 nm とし、測定サイクルを 60 min で行った。

統計処理：

第 2 章の該当項目の記載に同じ。

第 3 章 病態モデルマウスを用いた精油吸入の効果

第 1 項：水浸ストレス負荷モデルを用いた評価

水浸ストレスの負荷・精油吸入方法：

一定温度 (24±2°C)、明暗調整 (明：08:00-20:00、暗：20:00-08:00)、摂食飲水自由の環境下で飼育された ICR 系 5 週齢雄性マウス (日本クレア株式会社) を 1 週間隔離状態で飼育した後、実験に用いた。全 16 匹を無作為に **対照群** [蒸留水吸入/水浸ストレスなし (DW/Stress (-)) 群]、**LvEO 吸入群** [LvEO 吸入/水浸ストレスなし (LvEO/Stress (-)) 群]、**ストレス負荷群** [蒸留水吸入/水浸ストレスあり (DW/Stress (+)) 群]、**ストレス負荷+LvEO 吸入群** [LvEO 吸入/水浸ストレスあり (LvEO/Stress (+)) 群] に分類し実験を行った。水、ラベンダー精油の吸入は、第 2 章に既述した精油吸入方法と同様に行った。ストレス負荷群では吸入に先立ち、ステンレスケージ底部の床敷 (おがくず) のかわりに水を入れ (水深 2cm)、マウスを 24 時間不眠環境に置いた。吸入終了後、頸椎脱臼し、マウスを気絶させ断頭し脳を摘出した。採取した脳は右脳 (遺伝子発現量測定用) と左脳 (タンパク質発現量測定用) に分けてチューブに入れ、測定まで、-80°Cにて保管した。実験は、全て東邦大学動物実験委員会による動物実験取扱い規定に則って行った。

EPM 試験：

ICR 系 5 週齢雄性マウス (日本クレア株式会社) を、上記と同様の条件下にて 1 週間隔離飼育した後、上記同様 4 群に群別し、第 2 章に示した方法で EPM 試験を実施した。

トータル RNA の抽出：

トータル RNA の抽出には、液体窒素で粉碎した試料、QIAGEN 社 (東京) の RNeasy Mini Kit (50) を用いた。試料に QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN 社) を 1000 µL 添加し、30 秒間攪拌した。次に 200 µL のクロロホルム (和光純薬工業株式会社) を添加し 10 秒間攪拌し室温で 5 分反応させた。これを遠心分離し、上澄み 500 µL に同量の 70% エタノール (和光純薬工業株式会社) を加え数回ピペ

ッテングを行い、混合液は、500 μ L ずつに分けて、室温で遠心分離した。沈殿にバッファーRW 1（Wash buffer）を 350 μ L 滴下し、洗浄、遠心分離した。フロースルーを捨て、沈殿に DNase10 μ L+ RDD 70 μ L を滴下し、15 分間インキュベーション。RW1 350 μ L を添加し、遠心分離の後、RPE を 500 μ L 添加し、遠心分離した。フロースルーを捨て、再度 RPE 500 μ L 滴下し遠心分離を行い、最後に、RNase free water 50 μ L を滴下し室温で 1 分間反応させ、遠心分離した。濃度測定（NanoDrop 2000c: Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA）を行い、ろ液を-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

c-DNA の合成と RT-PCR：

使用したマーカー、各々のプライマーを表 19 に示した。各遺伝子のプライマーは、Primer3 を用いてデザインした後、OPERON 社製（ユーロフィンジェノミクス株式会社、東京）のものを使用した。

表 10：実験で使用したマーカーとプライマー

マーカー	プライマー
GAPDH	Fwd : 5'-GCTACACTGAGGACCAGGTTGT-3' Rev : 5'-CTCCTGTTATTATGGGGG-3'
ARC	Fwd : 5'-TGATCCTGCAGATTGG-3' Rev : 5'-TCTCCAGACGGTAGAA-3'
NGFR	Fwd : 5'-GCAAATAAACAAGCA-3' Rev : 5'-AGTCTATATGCTCCGG-3'

cDNA の作成には、AffinityScript QPCR cDNA Synthesis kit（Agilent Technologies, Inc.）を用いた。試料 RNA 1000 ng + SDW + AffinityScript / Block + OligodTPrimer + MasterMix を作製し、Applied Biosystems（Thermo Fisher Scientific）の GeneAmp PCR System 9700 にセットした。設定は、25 $^{\circ}$ C（5 分） \rightarrow 42 $^{\circ}$ C（5 分） \rightarrow 55 $^{\circ}$ C（40 分）、95 $^{\circ}$ C（5 分） \rightarrow 4 $^{\circ}$ Cとした。DNA 増幅には、EmeraldAmp PCR Master Mix（タカラバイオ株式会社、滋賀）を用いた。Emerald + F-primer（10 p mol/ μ L）+ R-primer（10 p mol/ μ L）+Temp cDNA + SDW を作成し、Applied Biosystems の GeneAmp PCR System 9700 にセットした。初期変性（97 $^{\circ}$ C（5 分））後、95 $^{\circ}$ C（45 秒） \rightarrow 55 $^{\circ}$ C（45 秒） \rightarrow 72 $^{\circ}$ C（1 分）のサイクルを経て、10 分間 72 $^{\circ}$ Cで反応させた（GAPDH 28 サイクル、Arc 30 サイクル、NGFR 35 サイクル）。増幅させた DNA を Gel 1.6 % Agarose TAE の 1 レーンに 3 μ L ずつ注入し泳動（Mupid 2X：株式会社ミュピッド、東京）させた（100 V、18 分）。最後に、臭化エチジウムブロマイド（ナカライテスク株式会社、京都）で染色し BIO LAD：ChemiDoc XRS + with Imerge Lab Software で泳動図を撮影した。

切片の作成：

解凍した保存試料を 10%ホルマリン中で固定し（48 時間、4 $^{\circ}$ C）、終了後に PBS にてホルマリンを洗浄（1.5 時間、4 $^{\circ}$ C）。70%エタノール（和光純薬工業株式会社）にサンプルを浸漬し一晩静置し、翌日、80%エタノール（1.5 時間、室温） \rightarrow 90%エタノール（1.5 時間、室温） \rightarrow 99.5%エタノール（1.5 時間、室温） \rightarrow 99.5%エタノール（1.5 時間、室温） \rightarrow 100%エタノール（1.5 時間、室温） \rightarrow 100%ノー

ル（オーバーナイト、室温）の順でサンプルに浸透させた。さらに、キシレン（2時間、4℃）→キシレン（和光純薬工業株式会社）（2時間、4℃）→キシレン（2時間、4℃）→キシレン（オーバーナイト、4℃）の順で浸透させた。翌日に恒温機（Parafin Oven：サクラファインテックジャパン株式会社、東京）内で、キシレンパラフィン混合液（キシレン：パラフィン=1：1、1.5時間、37℃）→パラフィン（Merck）（1.5時間、58℃）→パラフィン（1.5時間、58℃）の順に浸漬させた。紙皿に液体パラフィンを敷き試料を入れ紙皿ごと氷水に浮かせパラフィンを固まらせ、固まったパラフィンをトリミングし木片に接合させた。マイクロトームにて各 10 μm の厚さで連続切片を作成し、スライドガラス（Micro Slide Glass：松浪硝子株式会社、大阪）に張り付け、切片サンプルとした。

免疫組織化学染色：

作製したプレパラートを 25 分、58℃にてインキュベートした後、キシレン I（10分、室温）→キシレン II（5分、室温）→キシレン III（5分、室温）の順に浸漬させ、脱パラフィン処理を行った。続いて、99.5%エタノール（2分、室温）→99.5%エタノール（2分、室温）→95%エタノール（2分、室温）→90%エタノール（2分、室温）→70%エタノール（2分、室温）の順に浸漬し、蒸留水で 30 秒間洗浄後、PBS（30分、室温）に浸漬し、再水和させた。次に、抗原賦活化処理として、切片を 10mM クエン酸ナトリウムバッファーに入れ、熱湯中で湯煎（20分）した。室温下で冷却後、蒸留水にてバッファーを洗い流した後、内在性ペルオキシダーゼの活性除去を目的に、3%過酸化水素水/メタノール（和光純薬工業株式会社）を滴下し 5 分間静置し、水洗後 PBST で振盪した（5分×2回、室温）。続いて余分な PBST をふき取り、LIQUID BLOCKER にて撥水性バリアを形成した後、ブロッキング液（PBST+ヤギ血清 フナコシ S-1000）を滴下室温にて 30 分間反応させた。一次抗体、GLK1 ab37796（アブカム株式会社、東京）及び、BDNF H-117（Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas TX, USA）は、10%ブロッカー液（雪印メグミルク株式会社、北海道）にてそれぞれ 100 倍、200 倍希釈した上で、切片を覆うように滴下し、オーバーナイト、4℃にて反応させた。翌日、室温に戻した後に、PBST で洗浄し PBS に 20 分間浸漬させた。次は、ビオチン標識二次抗体液（10%ブロッカー液+ Biotinylated Anti Rabbit AgG（Vector Laboratories, Burlingame Ca, USA））を滴下し、湿潤箱内で室温下、60 分間、反応させた。余分な二次抗体液の除去、PBS への浸漬（5分×2、室温）後、ABC 液（VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG kit：VECTER）を滴下し、室温にて 30 分反応させた。余分な ABC 液を除去し、PBST にて 10 分洗浄した。続いて、0.175M 酢酸ナトリウム液（和光純薬工業株式会社）に 20 分間浸漬させた後、DAB 液（0.175M 酢酸ナトリウム液+ 5% DAB（和光純薬工業株式会社））を加え、DAB を基質として発色させた。発色反応は、0.175 M 酢酸ナトリウムへの浸漬（10分）により終了させ、PBST にて 10 分洗浄した。さらに、0.1%クリシルバイオレット（株式会社エムピーバイオジャパン、東京）水溶液に 5 分間浸漬させ対比染色（核染色）を行った。水道水による洗浄後は、70%エタノール→90%エタノール→95%エタノール→99.5%エタノール→99.5%エタノールにそれぞれ 2 分ずつ浸漬させて完全に脱水した。また、キシレンに合計 15 分（5分+10分）浸漬させ、透徹処理を行った。封

入には、水溶性の Entellan Neu (Merck) とカバーガラス (Neo Micro Cover Glass (松浪硝子株式会社)) を用いた。光学顕微鏡 (Digital Sight DS-L2 (株式会社ニコン, 東京)) にて鏡検および撮影を行い、海馬・歯状回部分で、50 μm 四方の区画内に存在する細胞をカウントした。

第 2 項：硫酸亜鉛処置による嗅覚麻痺モデルを用いた評価

精油：

ラベンダー精油は、表 4 に示した、グリーンフラスコ社の *L. officinalis* 精油を使用した。定性／定量評価結果は表 5 に示したとおりである。

実験動物・EPM 試験：

第 2 章の該当項目の記載に同じ。

嗅覚麻痺モデルマウスの作製 (硫酸亜鉛処理)：

嗅覚麻痺モデルマウスの作製には、McBride らの方法を用い⁸⁸、毎回必ず 2 日間の絶食後に実施した。まず、ペントバルビタール (50 mg/kg) 投与にて麻酔を行った後、片方の鼻腔に、2%硫酸亜鉛溶液 (硫酸亜鉛七水和物 (和光純薬工業株式会社) を 2%となるように生食に懸濁させたもの) を 20 μL 鼻腔内投与する。2 時間感覚をあけてもう一方の鼻腔に同量を投与する。投与した薬液が口腔を介して拡散するのを防ぐため投与直後は 30~60 秒間、仰向け状態にして休ませた。

嗅覚麻痺状態の確認 (Food finding test; FFT)：

ケージ内の 3 箇所 (対角線上に 2 箇所、中央に 1 箇所) に固形の餌を分け隠し、マウスがこれを 5 分内に見つけられなかった場合、嗅覚麻痺処置にともなう過活動 (多動) モデル化が適正に行われたと判断した。

統計処理：

第 1 章の該当項目の記載に同じ。

謝辞

本研究の機会を与えて下さり、ご指導、ご鞭撻を賜りました東邦大学薬学部 生薬学教室の小池一男教授 並びに元東邦大学薬学部 臨床病態学研究室 定本清美教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に関し多大なるご指導とご鞭撻、並びに終始にわたり温かいご支援を賜りました薬物治療学研究室 高原章教授、生薬学教室 佐藤忠章准教授、李巍准教授に心よりの感謝を申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数多くの有益なご助言を賜りました、グリーンフラスコ代表、東邦大学客員講師 林真一郎氏、訪問研究員 村上志緒博士、田中（旧姓 松浦）真莉子氏に厚くお礼申しあげます。

精油によるストレスマーカー変動の調査に関しまして、有益なご助言を賜りますとともに、多大なご協力を賜りました東邦大学理学部神経科学教室 増尾好則教授 並びに同教室 吉野秋晴氏に心より感謝申し上げます。

実験動物の管理・飼育におきまして大変お世話になりました東邦大学薬学部動物センターの職員の皆さまに御礼申し上げます。

本研究は、東邦大学薬学部 藤代賢亮氏、赤羽満美氏、池川智美氏、江原由里子氏、鈴木寛子氏、緑川麻衣子氏、深山知香子氏、ならびに横山智子氏による先行研究をもとに開始されました。この場をお借りしこれらの皆様に感謝いたします。

本研究の遂行に際して、多大なるご協力を頂きました、東邦大学理学部 大橋麻衣氏、同大学薬学部生薬学教室 粕谷ひかる博士、山中綾子氏、浅沼千尋氏、他、同教室の皆々様、ならびに、臨床病態学研究室の浅野宏子氏に深謝致します。

最後に、いつも温かく支えてくれる家族、友人、医療薬学教育センターの諸先生方に心よりお礼申し上げます。

参考文献

1. Lis-Balchin, M., *Lavender - the genus lavandula*. CRC Press, Taylor & Francis Group: 2002.
2. Upson, T., *The genus lavandula*. Timber Press: 2004.
3. 林, 真., *ハーブと精油の基本事典*. 池田書店: 2010.
4. Linck, V. M.; da Silva, A. L.; Figueiró, M.; Piato, A. L.; Herrmann, A. P.; Dupont Birck, F.; Caramão, E. B.; Nunes, D. S.; Moreno, P. R.; Elisabetsky, E., Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine* **2009**, 16, (4), 303-7.
5. Kuroda, K.; Inoue, N.; Ito, Y.; Kubota, K.; Sugimoto, A.; Kakuda, T.; Fushiki, T., Sedative effects of the jasmine tea odor and (R)-(-)-linalool, one of its major odor components, on autonomic nerve activity and mood states. *Eur J Appl Physiol* **2005**, 95, (2-3), 107-14.
6. Buchbauer, G.; Jirovetz, L.; Jäger, W.; Dietrich, H.; Plank, C., Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z Naturforsch C* **1991**, 46, (11-12), 1067-72.
7. Cline, M.; Taylor, J. E.; Flores, J.; Bracken, S.; McCall, S.; Ceremuga, T. E., Investigation of the anxiolytic effects of linalool, a lavender extract, in the male Sprague-Dawley rat. *AANA J* **2008**, 76, (1), 47-52.
8. Shaw, D.; Annett, J.; Doherty, B.; Leslle, J., Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. *Phytomedicine* **2007**, 14, 613-620.
9. Umezu, T., Behavioral effects of plant-derived essential oils in the geller type conflict test in mice. *Jpn J Pharmacol* **2000**, 83, (2), 150-3.
10. Umezu, T.; Nagano, K.; Ito, H.; Kosakai, K.; Sakaniwa, M.; Morita, M., Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. *Pharmacol Biochem Behav* **2006**, 85, (4), 713-21.
11. Kritsidima, M.; Newton, T.; Asimakopoulou, K., The effects of lavender scent on dental patient anxiety levels: a cluster randomised-controlled trial. *Community Dent Oral Epidemiol* **2010**, 38, (1), 83-7.
12. Kasper, S.; Gastpar, M.; Müller, W. E.; Volz, H. P.; Möller, H. J.; Dienel, A.; Schläfke, S., Silexan, an orally administered *Lavandula* oil preparation, is effective in the treatment of 'subsyndromal' anxiety disorder: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Int Clin Psychopharmacol* **2010**, 25, (5), 277-87.
13. Woelk, H.; Schläfke, S., A multi-center, double-blind, randomised study of the Lavender oil preparation Silexan in comparison to Lorazepam for generalized anxiety disorder. *Phytomedicine* **2010**, 17, (2), 94-9.
14. Lis-Balchin, M.; Hart, S., Studies on the mode of action of the essential oil of lavender (*Lavandula angustifolia* P. Miller). *Phytother Res* **1999**, 13, (6), 540-2.
15. Elisabetsky, E.; Brum, L. F.; Souza, D. O., Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine* **1999**, 6, (2), 107-13.
16. Barocelli, E.; Calcina, F.; Chiavarini, M.; Impicciatore, M.; Bruni, R.; Bianchi, A.; Ballabeni, V., Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon "Grosso" essential oil. *LIFE SCIENCES* **2004**, 213-223.
17. Batista, P. A.; Werner, M. F.; Oliveira, E. C.; Burgos, L.; Pereira, P.; Brum, L. F.; Story, G. M.;

- Santos, A. R., The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. *J Pain* **2010**, 11, (11), 1222-9.
18. Peana, A. T.; De Montis, M. G.; Nieddu, E.; Spano, M. T.; D'Aquila, P. S.; Pippia, P., Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. *Eur J Pharmacol* **2004**, 485, (1-3), 165-74.
19. Al-Mariri, A.; Safi, M., The Antibacterial Activity of Selected Labiatae (Lamiaceae) Essential Oils against *Brucella melitensis*. *Iran J Med Sci* **2013**, 38, (1), 44-50.
20. 梅津, 豊., 植物精油の中樞作用 (Pharmacological effects of plant-derived essential oils on the central nervous system.). *Aroma Research* **2002**, 3, (4), 60-67.
21. 梅津, 豊., 精油の中樞薬理作用の研究と最新動向 (The recent trend of experimental studies on the pharmacological actions of plant-derived essential oils on the central nervous system.). *Japanese Journal of Aromatherapy* **2009**, 9, (1), 1-20.
22. Komiya, M.; Takeuchi, T.; Harada, E., Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. *Behavioural Brain Research* **2006**, 172, (2), 240-9.
23. Komori, T.; Fujiwara, R.; Tanida, M.; Nomura, J., Potential antidepressant effects of lemon odor in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* **1995**, 5, (4), 477-80.
24. Aloisi, A. M.; Ceccarelli, I.; Masi, F.; Scaramuzzino, A., Effects of the essential oil from citrus lemon in male and female rats exposed to a persistent painful stimulation. *Behav Brain Res* **2002**, 136, (1), 127-35.
25. Tsuchiya, T.; Tanida, M.; Uenoyama, S.; Nakayama, Y., Effects of olfactory stimulation with jasmin and its component chemicals on the duration of pentobarbital-induced sleep in mice. *Life Sci* **1992**, 50, (15), 1097-102.
26. Umezu, T.; Ito, H.; Nagano, K.; Yamakoshi, M.; Oouchi, H.; Sakaniwa, M.; Morita, M., Anticonflict effects of rose oil and identification of its active constituents. *Life Sci* **2002**, 72, (1), 91-102.
27. Viana, G. S.; Vale, T. G.; Pinho, R. S.; Matos, F. J., Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *J Ethnopharmacol* **2000**, 70, (3), 323-7.
28. Costa, C. A.; Cury, T. C.; Cassettari, B. O.; Takahira, R. K.; Flório, J. C.; Costa, M., Citrus aurantium L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT(1A)-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. *BMC Complement Altern Med* **2013**, 13, 42.
29. Setzer, W. N., Essential oils and anxiolytic aromatherapy. *Nat Prod Commun* **2009**, 4, (9), 1305-16.
30. Koulivand, P. H.; Khaleghi Ghadiri, M.; Gorji, A., Lavender and the nervous system. *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**, 2013, 681304.
31. Tsang, H. W.; Ho, T. Y., A systematic review on the anxiolytic effects of aromatherapy on rodents under experimentally induced anxiety models. *Rev Neurosci* **2010**, 21, (2), 141-52.
32. Perry, R.; Terry, R.; Watson, L. K.; Ernst, E., Is lavender an anxiolytic drug? A systematic review of randomised clinical trials. *Phytomedicine* **2012**, 19, (8-9), 825-35.
33. 梅津, 豊., ラベンダーオイルの抗不安作用とその有効成分の同定 (Anti-anxiety like effect of lavender oil and identification of its active constituent.). *Aroma Research* **2004**, 5, (2), 38-45.
34. de Sousa, D. P.; Nóbrega, F. F.; Santos, C. C.; de Almeida, R. N., Anticonvulsant activity of the linalool enantiomers and racemate: investigation of chiral influence. *Nat Prod Commun* **2010**, 5, (12), 1847-51.
35. Ozec, T.; Tabanca, N.; Demirci, F.; Wedge, E. D.; Baser, K., Enantiomeric distribution of some

- linalool containing essential oils and their biological activities. *Record of Natural Products* **2010**, *4*, (4), 180-192.
36. Fujii, M.; Hatakeyama, R.; Fukuoka, Y.; Yamamoto, T.; Sasaki, R.; Moriya, M.; Kanno, M.; Sasaki, H., Lavender aroma therapy for behavioral and psychological symptoms in dementia patients. *Geriatr Gerontol Int* **2008**, *8*, (2), 136-8.
 37. Jimbo, D.; Kimura, Y.; Taniguchi, M.; Inoue, M.; Urakami, K., Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics* **2009**, *9*, (4), 173-9.
 38. Satou, T.; Takahashi, M.; Kasuya, H.; Murakami, S.; Hayashi, S.; Sadamoto, K.; Koike, K., Organ Accumulation in Mice After Inhalation of Single or Mixed Essential Oil Compounds. *Phytotherapy Research* **2013**, *27*, (2), 306-311.
 39. Casabianca, H.; Graff, J. B.; Faugier, V.; Fleig, F.; Grenier, C., Enantiomeric distribution studies of linalool and linalyl acetate. *Journal of High Resolution Chromatography* **1998**, *21*, 107-112.
 40. Reisenman, C. E.; Christensen, T. A.; Francke, W.; Hildebrand, J. G., Enantioselectivity of projection neurons innervating identified olfactory glomeruli. *J Neurosci* **2004**, *24*, (11), 2602-11.
 41. Woronuk, G.; Demissie, Z.; Rheault, M.; Mahmoud, S., Biosynthesis and therapeutic properties of Lavandula essential oil constituents. *Planta Med* **2011**, *77*, (1), 7-15.
 42. Kawakami, N.; Takeshima, T.; Ono, Y.; Uda, H.; Hata, Y.; Nakane, Y.; Nakane, H.; Iwata, N.; Furukawa, T. A.; Kikkawa, T., Twelve-month prevalence, severity, and treatment of common mental disorders in communities in Japan: preliminary finding from the World Mental Health Japan Survey 2002-2003. *Psychiatry Clin Neurosci* **2005**, *59*, (4), 441-52.
 43. Kessler, R. C.; Chiu, W. T.; Demler, O.; Merikangas, K. R.; Walters, E. E., Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* **2005**, *62*, (6), 617-27.
 44. Katada, S.; Hirokawa, T.; Oka, Y.; Suwa, M.; Touhara, K., Structural basis for a broad but selective ligand spectrum of a mouse olfactory receptor: mapping the odorant-binding site. *J Neurosci* **2005**, *25*, (7), 1806-15.
 45. Imamura, K.; Mataga, N.; Mori, K., Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. I. Aliphatic compounds. *J Neurophysiol* **1992**, *68*, (6), 1986-2002.
 46. Ito, K.; Ito, M.; Takahashi, K., [Approach to evidence-based aromatherapy: pharmacological effects of inhaled aromatic natural medicines]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* **2012**, *140*, (2), 71-5.
 47. Murakami, S.; Matsuura, M.; Satou, T.; Hayashi, S.; Koike, K., Effects of the essential oil from leaves of *Alpinia zerumbet* on behavioral alterations in mice. *Nat Prod Commun* **2009**, *4*, (1), 129-32.
 48. Satou, T.; Murakami, S.; Matsuura, M.; Hayashi, S.; Koike, K., Anxiolytic effect and tissue distribution of inhaled *Alpinia zerumbet* essential oil in mice. *Nat Prod Commun* **2010**, *5*, (1), 143-6.
 49. Satou, T.; Kasuya, H.; Takahashi, M.; Murakami, S.; Hayashi, S.; Sadamoto, K.; Koike, K., Relationship between duration of exposure and anxiolytic-like effects of essential oil from *Alpinia zerumbet*. *Flavour and Fragrance Journal* **2011**, *26*, (3), 180-185.
 50. Satou, T.; Matsuura, M.; Takahashi, M.; Umezu, T.; Hayashi, S.; Sadamoto, K.; Koike, K., Anxiolytic-like effect of essential oil extracted from *Abies sachalinensis*. *Flavour and Fragrance Journal* **2011**, *26*, (6), 416-420.

51. Satou, T.; Miyahara, N.; Murakami, S.; Hayashi, S.; Koike, K., Differences in the effects of essential oil from *Citrus junos* and (+)-limonene on emotional behavior in mice. *Journal of Essential Oil Research* **2012**, 24, (5), 493-500.
52. Kawaguchi, T., Direct transport of thymidine to the cerebrospinal fluid via the nasal mucous membrane in rats. *Aroma Research* **2000**, 1, 53-57.
53. Dipiro, J. T.; Talbert, R. L.; Yee, G. C.; Matzke, G. R.; Wells, B. G.; Posey, L. M., *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach seventh edition*. 2008.
54. Enna, S. J., Role of gamma-aminobutyric acid in anxiety. *Psychopathology* **1984**, 17 Suppl 1, 15-24.
55. Lydiard, R. B., The role of GABA in anxiety disorders. *J Clin Psychiatry* **2003**, 64 Suppl 3, 21-7.
56. Nemeroff, C. B., The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull* **2003**, 37, (4), 133-46.
57. Maximino, *Serotonin and anxiety: Neuroanatomical, pharmacological, and functional aspects*. Springer: 2012.
58. Barrett, J. E.; Vanover, K. E., 5-HT receptors as targets for the development of novel anxiolytic drugs: models, mechanisms and future directions. *Psychopharmacology (Berl)* **1993**, 112, (1), 1-12.
59. Griebel, G., 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther* **1995**, 65, (3), 319-95.
60. Matsumoto, M.; Yoshioka, M., [Possible involvement of serotonin receptors in anxiety disorders]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* **2000**, 115, (1), 39-44.
61. Elisabetsky, E.; Marschner, J.; Souza, D. O., Effects of Linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochem Res* **1995**, 20, (4), 461-5.
62. Aoshima, H.; Hamamoto, K., Potentiation of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. *Biosci Biotechnol Biochem* **1999**, 63, (4), 743-8.
63. Hossain, S. J.; Hamamoto, K.; Aoshima, H.; Hara, Y., Effects of tea components on the response of GABA(A) receptors expressed in *Xenopus* Oocytes. *J Agric Food Chem* **2002**, 50, (14), 3954-60.
64. Okuyama, S.; Sawasaki, E.; Yokogoshi, H., Conductor compounds of phenylpentane in *Mycocleptodonoides aitchisonii* mycelium enhance the release of dopamine from rat brain striatum slices. *Nutr Neurosci* **2004**, 7, (2), 107-11.
65. Yamada, K.; Mimaki, Y.; Sashida, Y., Effects of inhaling the vapor of *Lavandula burnatii* super-derived essential oil and linalool on plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH), catecholamine and gonadotropin levels in experimental menopausal female rats. *Biol Pharm Bull* **2005**, 28, (2), 378-9.
66. Chioca, L. R.; Ferro, M. M.; Baretta, I. P.; Oliveira, S. M.; Silva, C. R.; Ferreira, J.; Losso, E. M.; Andreatini, R., Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: participation of serotonergic but not GABAA/benzodiazepine neurotransmission. *J Ethnopharmacol* **2013**, 147, (2), 412-8.
67. Hogg, S., A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* **1996**, 54, (1), 21-30.
68. Weiss, S. M.; Wadsworth, G.; Fletcher, A.; Dourish, C. T., Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* **1998**, 23, (2), 265-71.

69. Dishino, D. D.; Welch, M. J.; Kilbourn, M. R.; Raichle, M. E., Relationship between lipophilicity and brain extraction of C-11-labeled radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* **1983**, 24, (11), 1030-8.
70. 井上, 重.; 山口, 英., 芳香浴における精油蒸気のマウス吸入 (Systemic absorption of essential oils in mice by holistic vapor expose.) *Aroma Research* **2000**, 1, (3), 72-79.
71. Jager, W.; Buchbauer, G.; Jirovetz, L.; Fritzer, M., Percutaneous absorption of lavender oil from a massage oil. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* **1992**, 43, (1), 49-54.
72. O'Neil, M. J., *The Merck Index - An encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals (15th Edition)*. Royal Society of Chemistry: 2013.
73. Kahn, R. S.; van Praag, H. M.; Wetzler, S.; Asnis, G. M.; Barr, G., Serotonin and anxiety revisited. *Biol Psychiatry* **1988**, 23, (2), 189-208.
74. Fossat, P.; Bacqué-Cazenave, J.; De Deurwaerdère, P.; Delbecque, J. P.; Cattaert, D., Comparative behavior. Anxiety-like behavior in crayfish is controlled by serotonin. *Science* **2014**, 344, (6189), 1293-7.
75. Prashar, A.; Locke, I. C.; Evans, C. S., Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif* **2004**, 37, (3), 221-9.
76. Schmitt, S.; Schaefer, U.; Sporer, F.; Reichling, J., Comparative study on the in vitro human skin permeation of monoterpenes and phenylpropanoids applied in rose oil and in form of neat single compounds. *Pharmazie* **2010**, 65, (2), 102-5.
77. Bridges, N. J.; Starkey, N. J., Sex differences in Mongolian gerbils in four tests of anxiety. *Physiol Behav* **2004**, 83, (1), 119-27.
78. Wilson, M. A.; Burghardt, P. R.; Ford, K. A.; Wilkinson, M. B.; Primeaux, S. D., Anxiolytic effects of diazepam and ethanol in two behavioral models: comparison of males and females. *Pharmacol Biochem Behav* **2004**, 78, (3), 445-58.
79. Bradley, B.; Starkey, N.; Brown, S.; Lea, R., Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the Mongolian gerbil elevated plus maze. *J Ethnopharmacol* **2007**, 111, (3), 517-25.
80. Watanabe, K.; Umezu, K.; Kurahashi, T., Human olfactory contrast changes during the menstrual cycle. *Jpn J Physiol* **2002**, 52, (4), 353-9.
81. Nagashima, A.; Touhara, K., Enzymatic conversion of odorants in nasal mucus affects olfactory glomerular activation patterns and odor perception. *J Neurosci* **2010**, 30, (48), 16391-8.
82. Harkin, A.; Kelly, J. P.; Leonard, B. E., A review of the relevance and validity of olfactory bulbectomy as a model of depression. *Clinical Neuroscience Research* **2003**, 3, (4-5), 253-262.
83. Song, C.; Leonard, B. E., The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* **2005**, 29, (4-5), 627-47.
84. Zueger, M.; Urani, A.; Chourbaji, S.; Zacher, C.; Roche, M.; Harkin, A.; Gass, P., Olfactory bulbectomy in mice induces alterations in exploratory behavior. *Neurosci Lett* **2005**, 374, (2), 142-6.
85. Noguchi, S.; Inukai, T.; Kuno, T.; Tanaka, C., The suppression of olfactory bulbectomy-induced muricide by antidepressants and antihistamines via histamine H1 receptor blocking. *Physiol Behav* **1992**, 51, (6), 1123-7.
86. Jancsár, S. M.; Leonard, B. E., The effect of (+/-)mianserin and its enantiomers on the behavioural hyperactivity of the olfactory-bulbectomized rat. *Neuropharmacology* **1984**, 23, (9), 1065-70.
87. van der Stelt, H. M.; Breuer, M. E.; Olivier, B.; Westenberg, H. G., Permanent deficits in

- serotonergic functioning of olfactory bulbectomized rats: an in vivo microdialysis study. *Biol Psychiatry* **2005**, 57, (9), 1061-7.
88. McBride, K.; Slotnick, B.; Margolis, F. L., Does intranasal application of zinc sulfate produce anosmia in the mouse? An olfactometric and anatomical study. *Chem Senses* **2003**, 28, (8), 659-70.
89. Bakshi, V. P.; Kalin, N. H., Corticotropin-releasing hormone and animal models of anxiety: gene-environment interactions. *Biol Psychiatry* **2000**, 48, (12), 1175-98.
90. Senba, E.; Ueyama, T., Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res* **1997**, 29, (3), 183-207.
91. Shaw, D.; Norwood, K.; Leslie, J. C., Chlordiazepoxide and lavender oil alter unconditioned anxiety-induced c-fos expression in the rat brain. *Behav Brain Res* **2011**, 224, (1), 1-7.
92. Seo, H. S.; Hirano, M.; Shibato, J.; Rakwal, R.; Hwang, I. K.; Masuo, Y., Effects of coffee bean aroma on the rat brain stressed by sleep deprivation: a selected transcript- and 2D gel-based proteome analysis. *J Agric Food Chem* **2008**, 56, (12), 4665-73.
93. Kamata, H.; Tanaka, C.; Yagisawa, H.; Hirata, H., Nerve growth factor and forskolin prevent H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells by glutathione independent mechanism. *Neurosci Lett* **1996**, 212, (3), 179-82.
94. Holden, H. M.; Thoden, J. B.; Timson, D. J.; Reece, R. J., Galactokinase: structure, function and role in type II galactosemia. *Cell Mol Life Sci* **2004**, 61, (19-20), 2471-84.
95. Reece, R. J., Molecular basis of nutrient-controlled gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Life Sci* **2000**, 57, (8-9), 1161-71.
96. Autry, A. E.; Monteggia, L. M., Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* **2012**, 64, (2), 238-58.
97. Martinowich, K.; Manji, H.; Lu, B., New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci* **2007**, 10, (9), 1089-93.
98. Marmigère, F.; Givalois, L.; Rage, F.; Arancibia, S.; Tapia-Arancibia, L., Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus* **2003**, 13, (5), 646-55.
99. Coppell, A. L.; Pei, Q.; Zetterström, T. S., Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. *Neuropharmacology* **2003**, 44, (7), 903-10.
100. Khundakar, A. A.; Zetterström, T. S., Effects of GABAB ligands alone and in combination with paroxetine on hippocampal BDNF gene expression. *Eur J Pharmacol* **2011**, 671, (1-3), 33-8.
101. Wierońska, J. M.; Papp, M.; Pile, A., Effects of anxiolytic drugs on some behavioral consequences in olfactory bulbectomized rats. *Pol J Pharmacol* **2001**, 53, (5), 517-25.
102. Butler, J.; Tannian, M.; Leonard, B. E., The chronic effects of desipramine and sertraline on platelet and synaptosomal 5HT uptake in olfactory bulbectomised rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **1988**, 12, (5), 585-94.
103. Wall, P. L.; Botly, L. C.; Black, C. K.; Shettleworth, S. J., The geometric module in the rat: independence of shape and feature learning in a food finding task. *Learn Behav* **2004**, 32, (3), 289-98.
104. Bradley, B. F.; Brown, S. L.; Chu, S.; Lea, R. W., Effects of orally administered lavender essential oil on responses to anxiety-provoking film clips. *Hum Psychopharmacol* **2009**, 24, (4), 319-30.
105. Adams, R. P., *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole*

- Mass Spectroscopy, 4th Edition*. Allured Business Media: Carol Stream, IL, USA, 2009; p 456.
106. Kovats, E., Gas chromatographic characterization of organic compounds. I. Retention indexes of aliphatic halides, alcohols, aldehydes, and ketones. *Helvetica Chimica Acta* **1958**, 41, 1915-32.
107. Pellow, S.; Chopin, P.; File, S. E.; Briley, M., Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* **1985**, 14, (3), 149-67.
108. Dere, E.; Topic, B.; De Souza Silva, M. A.; Srejic, M.; Frisch, C.; Buddenberg, T.; Huston, J. P., The graded anxiety test: a novel test of murine unconditioned anxiety based on the principles of the elevated plus-maze and light-dark test. *J Neurosci Methods* **2002**, 122, (1), 65-73.