

## アロマセラピー精油の不死化視床下部神経細胞に対する作用

大 城 なつき<sup>1)\*</sup>, 小 山 裕 也<sup>1)</sup>, 中 村 亜紀子<sup>2)</sup>, 大河原 晋<sup>1)</sup>, 川 原 正 博<sup>1)</sup><sup>(1)</sup>九州保健福祉大学薬学部分析学講座\*, <sup>(2)</sup>九州保健福祉大学 QOL 研究機構薬学研究所\***Effects of essential oils on the degeneration of immortalized hypothalamic neurons induced by hydrogen peroxide**Natsuki OHSHIRO<sup>1)</sup>, Akiko NAKAMURA<sup>1, 2)</sup>, Hironari KOYAMA<sup>1)</sup>, Susumu OHKAWARA<sup>1)</sup> and Masahiro KAWAHARA<sup>1)</sup><sup>1)</sup>Dept. Analytical Chemistry, Kyushu University of Health and Welfare,<sup>2)</sup>Quality of Life Research Institute in Kyushu University of Health and Welfare,

1714-1 Yoshino-cho, Nobeoka-shi, Miyazaki 882-8508, Japan

**Summary**

Aromatherapy and the plant-based essential oils are widely used for the complementary and alternative therapies of symptoms including anxiety and depression. Furthermore, it was reportedly effective for the care of patients of Alzheimer's disease. To investigate the pharmacological effects of essential oils, we have developed an in vitro assays system using GT1-7 cells (immortalized hypothalamic neurons). Among tested 21 essential oils, we found that the neuronal death induced by hydrogen peroxide was attenuated by lemon, black pepper, geranium, juniper berry, majoram, eucalyptus, lavender, vanilla, and clarysage. We also examined the radical scavenger activity using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and the SOD (super oxide dismutase)-like activity. Our developed in vitro assay system could be useful for the neuropharmacological study of essential oils.

アロマセラピーは、植物や果実から抽出した芳香成分である精油 (essential oil) を用いて心身の健康増進を行う療法であり、近年ではストレス解消など心身の不快な状態を改善する為に一般にも広く使用されている<sup>1)</sup>。さらに、最近では、うつ病やアルツハイマー病など様々な疾患に対する治療効果が注目されている<sup>2)</sup>。アロマセラピーに用いられる精油の作用については、主に、ヒトに対する臨床試験や生理心理学的な研究による報告が多いが、患者の心身の状態や嗜好などの個人差が大きく、また、精油の濃度や投与方法等によっても様々に変化しうるために不明な点が多い。また、精油が、抗菌作用、女性ホルモン作用、抗不安作用、自律神経系調節作用などを持つことも報告されているが、動物実験では精油の投与方法等に関して実験的な困難が多い。

アロマセラピーによって、芳香成分が鼻腔を經由して嗅上皮に侵入し、嗅細胞の匂い受容体と結合することによって嗅覚神経系を刺激する。匂いの情報は、嗅球から、大脳辺縁系、視床下部などに伝えられ、様々な中枢効果を現し、心身に影響するのではないかと考えられている。しかしながら、嗅覚系は、外界の情報のみならず物質の脳内への侵入経路でもあり得る。嗅上皮から嗅球に至る経路では逆行

性軸索輸送によって物質輸送が行われることが古くから知られている。Kanayamaらは、マルチトレーサー法を用いて金属イオンの脳内移行における投与経路の違いについて詳細に検討した結果、鼻腔に投与されたRb<sup>+</sup>、TI<sup>+</sup>などの金属イオンは、投与6時間後には嗅球に移行し、さらに視床下部や海馬にまでも移行することを報告している<sup>3)</sup>。従って、脂溶性の芳香成分は、嗅覚系を經由して中枢に移行し、神経細胞に直接作用し得る。また、芳香浴やマッサージなどによって皮膚から吸収され血管内に侵入した精油成分が末梢神経系や中枢神経系に直接影響する可能性も考えられる。

そこで我々は、実験条件のコントロールが容易な培養神経細胞系を用いて、精油成分の作用について検討した。GT1-7細胞 (不死化視床下部神経細胞) は、マウス視床下部神経細胞の腫瘍化によって得られた細胞株であり、増殖能を持つために取り扱いが容易である一方で、神経細胞としての性質を保持しており、特にGnRH (gonadotropin-releasing hormone) 分泌能を持つことから神経内分泌系のモデル系として広く使用されている<sup>4)</sup>。GT1-7細胞は、血清除去によって神経突起伸展を生じ、神経伝達物質受容体、女性ホルモン (E2:β-estradiol) 受容体 (ERα, ERβ) など

\*所在地：宮崎県延岡市吉野町1714-1 (〒882-8508)

多くの受容体や MAP2 (microtubule associated protein 2), neurofilament などの神経特異的蛋白を発現することが報告されている。さらに、演者らは、E2によって GT1-7 細胞の突起伸展や細胞増殖が生じることや E2 のアンタゴニストである tamoxifen (TMX) によって顕著な細胞死が生じることから、GT1-7 細胞が内分泌攪乱作用を持つ化学物質の研究の良いモデル系となりうることを報告しており<sup>5)</sup>, アルツハイマー病や脳血管性認知症の実験モデル系としても使用している<sup>6,7)</sup>。このような GT1-7 細胞の有用な性質から、我々は、GT1-7 細胞が、精油が神経内分泌系に及ぼす影響を検討する良い *in vitro* モデル系になりうるのではないかと考え、検討を行った。その結果、これまでに geranium, lavender, grapefruit, mandarin などの精油が GT1-7 細胞の細胞生存維持・増殖に影響することを見いだしている。また、このような効果は、神経細胞のモデル系として汎用されている PC-12 細胞では観察されず、E2 受容体を介していることが示唆され、さらに、geranium 精油が E2 のアンタゴニスト様作用を持つ可能性を示唆する結果を得ている<sup>8)</sup>。

本研究では、精油の抗酸化能について検討するために、21 種類の精油について過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) によって生じる GT1-7 細胞の細胞死に及ぼす影響を検討した。さらに、安定なラジカルを生成する DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) を用いて、精油自体のラジカル消去能についても比較し、さらに SOD (super oxide dismutase) 様活性についても比較検討した。

## 材料及び方法

### 1. 試薬

精油は (株) GAIA/NP 社より購入し、原液を 99.5% ethanol によって希釈して実験に用いた。Table 1 に使用した精油の種類と、主な構成成分を示す。クロロゲン酸、DPPH は Sigma-Aldrich より購入した。

### 2. 細胞培養

GT1-7 細胞は University of California at San Francisco, Dr. R. Weiner より恵与され、既報に従い培養を行った<sup>6)</sup>。培養液として FBS (fetal bovine serum) 添加 Dulbecco's modified Minimum Essential Medium (DMEM) を用い、7% CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、細胞が confluent になった後、trypsin-EDTA 処理を行った。細胞は、無血清 DMEM に分散させた後、96 well プレートに 4 × 10<sup>4</sup> cells/well の濃度で播き、7% CO<sub>2</sub> 存在下で培養し、培養 1 日後、試薬投与を行った。

### 3. 過酸化水素による細胞死保護活性

GT1-7 細胞を 24 時間培養した後、well に精油 (10 ~ 100 ppm) を投与し、直後に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 25 μM を投与した。投与 24 時間後にミトコンドリア内の酵素活性を指標とする WST-1 法によって生存細胞数の測定を行った (Cell counting kit, 同仁化学)。Control として、1.0% ethanol を投与し、細胞生存率に影響ないことを確認した後、生存率を比較検討した。

Table 1 Characteristics of essential oils

Name	Scientific name	Major component
Blackpepper (BP)	<i>Piper nigrum</i>	β-pinene, sabinene
Cinnamon (CI)	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	cinnamaldehyde, eugenol
Clary Sage (CS)	<i>Salvia sclarea</i>	myrcene, limonene
Eucalyptus (EU)	<i>Eucalyptus globulus</i>	1,8-cineole
Frankincense (FR)	<i>Boswellia carteri</i>	α-pinene, di-pentene, cadinene
Geranium (GE)	<i>Pelargonium graveolens</i>	citronerol, geraniol, limonene, β-caryophyllene
Grapefruit (GR)	<i>Citrus paradisi</i>	limonene, myrcene, α-pinene
Hinoki (HI)	<i>Cbamaecyparis obtusa</i>	α-pinene, cadinol, cadinene
Juniper Berry (JB)	<i>Juniperus communis</i>	α-pinene, α-thujene, sabinene
Lavender (LA)	<i>Lavandula angustifolia</i>	linanool, linalyl acetate
Lemon (LE)	<i>Citrus limon</i>	limonene, α-pinene, β-pinene
Mandarin Green (MG)	<i>Citrus reticulata ar. mandarin</i>	γ-terpinene, α-pinene, β-pinene
Marjoram (MJ)	<i>Origanum majorana</i>	terpinen-4-ol, γ-terpinen, α-terpinenol
Neroli (NE)	<i>Citrus aurantium var. amara</i>	linanool, limonene, trans-ocimene
Patchouli (PA)	<i>Pogostemon cablin</i>	patchoulene, pogostol
Peppermint (PE)	<i>Mentha piperita</i>	menthol, menthone
Rosemary (RM)	<i>Rosmarinus officinalis</i>	camphene, α-pinene, β-pinene
Rosewood (RW)	<i>Aniba rosaeodora</i>	linanool, α-terpineneol
Tea Tree (TT)	<i>Melaleuca alternifolia</i>	terpinen-4-ol, γ-terpinene
Vanilla (VA)	<i>Vanilla planifolia</i>	vaniline, hydroxybenzaldehyde, eugenol
Ylang Ylang (YY)	<i>Cana gaodorata var. genuina</i>	germacrene D, β-caryophyllene, methylbenzoate, linalol

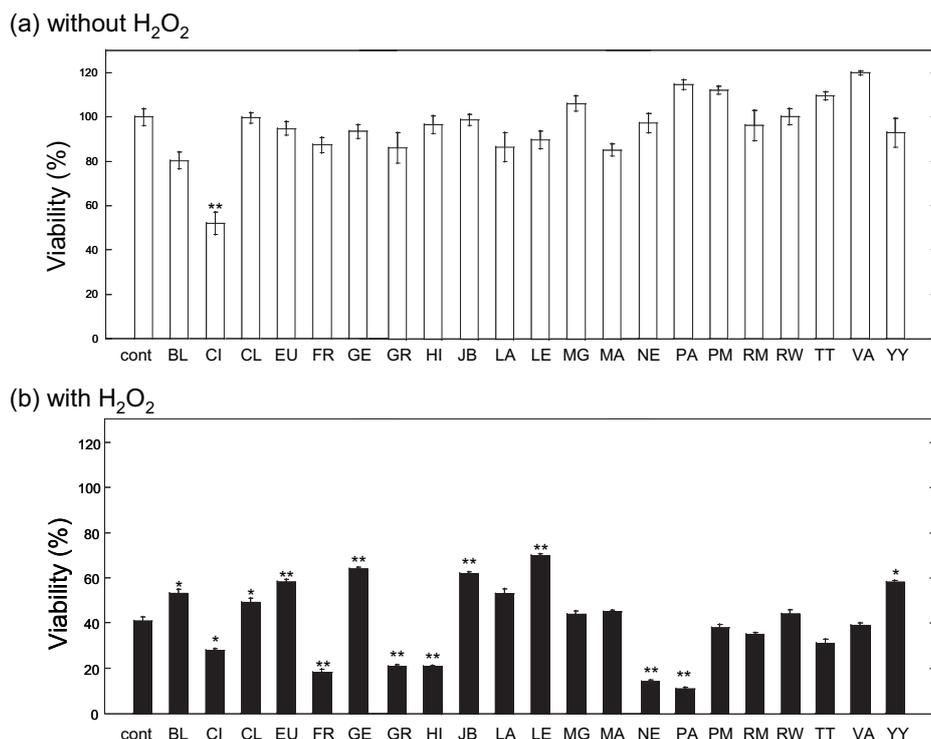


Fig. 1 Viability of GT1-7 cells after exposure to various essential oils

GT1-7 cells were preadministered with 100 ppm of various essential oils without (a) or with (b) the cosistence of 25  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After 24 h, the viability was analyzed using WST-1 method. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 6). \* p < 0.05, \*\* p < 0.001.

BL: black pepper, CI: cinnamon, CL: clary sage, EU: eucalyptus, FR: frankincense, GE: geranium, GR: grapefruit, HI: hinoki, JB: juniper berry, LA: lavender, LE: lemon, MG: mandarin green, MA: marjoram, NE: neroli, PA: patchouli, PE: peppermint, RM: rosemary, RW: rosewood, TT: tea tree, VA: vanilla, YY: ylang ylang.

#### 4. 形態観察

GT1-7細胞をポリエチレンイミンコートしたカバーガラス上に  $4 \times 10^4$  cells/well の濃度で播き、上記条件にて培養を行った後、生細胞を染色する carboxy fluorescein および死細胞のDNAを染色する propidium iodide を投与した後、蛍光顕微鏡 (Olympus IX71) を用いて形態観察を行った。

#### 5. フリーラジカル消去能

DPPH ラジカルの消去能に関しては、DPPH 溶液 (100 ppm) に対して、精油 100 ppm を加え、10 分間攪拌した後、吸光度 (520 nm) を測定した。コントロールとして、クロロゲン酸 (25 ppm) による活性を 100% として、ラジカル消去能を比較した。

また、ホルマザン塩を用いる WST-1 法 (SOD assay kit, 同仁化学) によって 450nm での吸光度を測定することによって精油の SOD 活性を比較した。SOD (MP Biomedicals) 1 unit における活性を 100% として、各精油の SOD 活性を表した。

#### 6. 統計処理

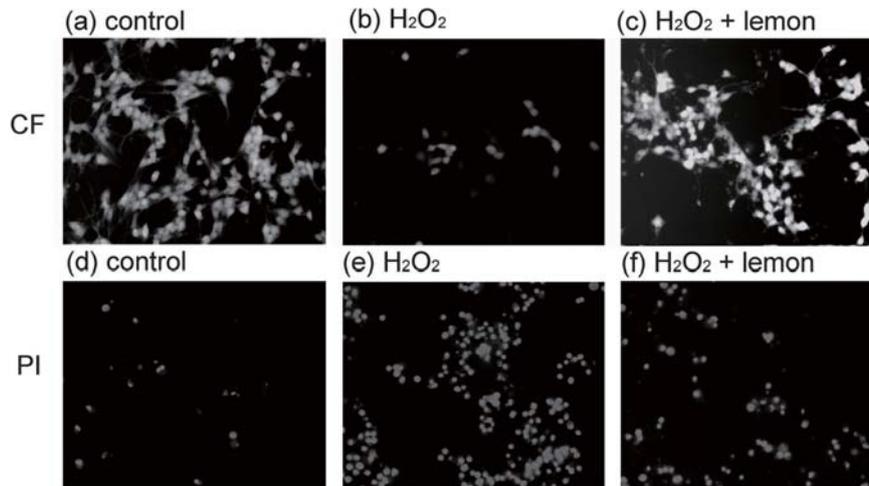
得られた結果は、解析ソフトウェア Kareida Graph (ver 4.0J, Synergy Softwear) を用いて、Student's t-検定を行った。

## 結果

### 1. 過酸化水素による細胞死に及ぼす影響

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は、ヒドロキシラジカルを生成し、細胞毒性を持つことが知られている。この培養条件下で、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は濃度依存的な GT1-7 細胞の細胞死を引き起こし、25  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下 24 時間後の細胞生存率は  $41.0 \pm 1.8\%$  であった (mean  $\pm$  S.E.M., n = 6)。しかしながら、表 1 に示す 21 種類の精油 (100 ppm) を前投与した後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を投与した結果、Fig. 1 (b) に示すように、lemon, black pepper, geranium, juniper berry, majoram, eucalyptus, lavender, vanilla, clarysage など 9 種類の精油に、有意な細胞死保護効果が観察された。特に効果が顕著であった lemon 精油の場合には、細胞生存率は  $70.0 \pm 0.7\%$  に回復した。また、Fig. 2 に示すように、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与によって、carboxy fluorescein で染色される生細胞数は減少し、神経突起の縮退や、propidium iodide で染色される死細胞の DNA が多数観察されるが、lemon 精油を前投与した細胞では、細胞死が抑制されていることが形態的にも観察された。

一方、cinnamon 精油のみを投与した場合には有意な細胞生存率の低下が観察された。これはおそらくは含まれる何らかの精油成分に細胞障害活性があるためと考えられる。また、patcheli, vanilla などいくつかの精油では生存率の上昇傾向が観察された。既に、grapefruit, mandarin な



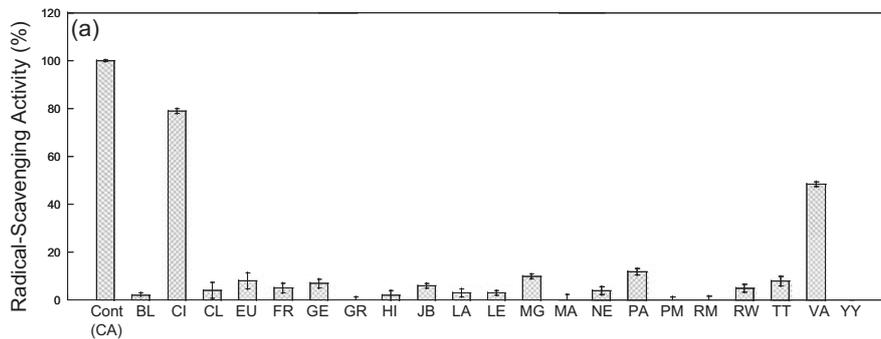
**Fig. 2** Morphological changes of GT1-7 cells

GT1-7 cells were double-stained by carboxy fluorescein (CF: (a)–(c)) and propidium iodide (PI: (d)–(f)) after the exposure to 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  with or without lemon oil (100 ppm). Bar represents 25  $\mu\text{m}$ .

どの精油を投与してより長期間の培養を行った場合には、無血清培養条件下での神経細胞死に対する保護効果を持ち、顕著な細胞生存率の上昇を引き起こすことを報告している<sup>8)</sup>。しかしながら、frankinsense, grapefruit, hinoki, neroli, patcheliなどの精油を前投与した場合には、精油のみでは細胞死を引き起こさないにもかかわらず、 $\text{H}_2\text{O}_2$ による細胞死を増強する結果が得られた。

## 2. フリーラジカル消去能

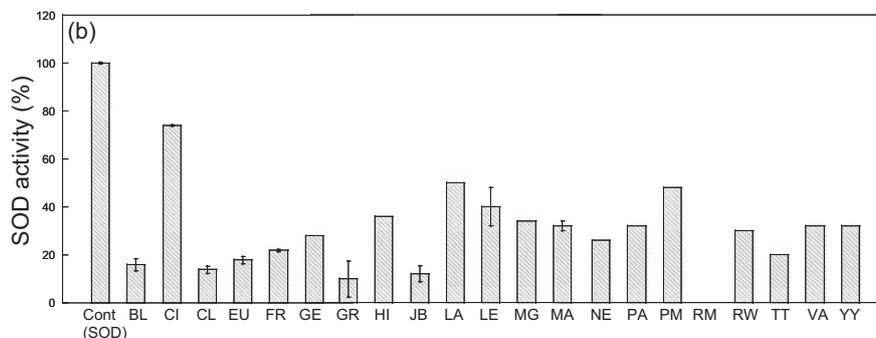
$\text{H}_2\text{O}_2$ による細胞死に対する精油の保護効果をさらに検討するために、精油自体のラジカル消去能について検討した。まず、DPPHラジカルの消去能を調べた結果、cinnamon, vanillaなどの精油に顕著なラジカル消去活性が観察された。次に、SOD活性を調べた結果、cinnamon, lavender, peppermintなどの精油に活性が観察された。



**Fig. 3(a)** Radical scavenging activity of various essential oils

The solution of 100 ppm DPPH and various essential oils (each 100 ppm) were mixed and their absorbancy at 520 nm was analyzed. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 4).

Cont (CA): chlorogenic acid (25 ppm), BL: black pepper, CI: cinnamon, CL: clary sage, EU: eucalyptus, FR: frankincense, GE: geranium, GR: grapefruit, HI: hinoki, JB: juniper berry, LA: lavender, LE: lemon, MG: mandarin green, MA: marjoram, NE: neroli, PA: patchouli, PE: peppermint, RM: rosemary, RW: rosewood, TT: tea tree, VA: vanilla, YY: ylang ylang (each 100 ppm).



**Fig. 3(b)** SOD activity of various essential oils

The solution of WST-1 and various essential oils (each 100 ppm) were mixed and their absorbancy at 450 nm was analyzed. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. (n = 4).

Cont (SOD): SOD (1 unit), BL: black pepper, CI: cinnamon, CL: clary sage, EU: eucalyptus, FR: frankincense, GE: geranium, GR: grapefruit, HI: hinoki, JB: juniper berry, LA: lavender, LE: lemon, MG: mandarin green, MA: marjoram, NE: neroli, PA: patchouli, PE: peppermint, RM: rosemary, RW: rosewood, TT: tea tree, VA: vanilla, YY: ylang ylang (each 100 ppm).

## 考 察

21種類の精油について、 $H_2O_2$ による細胞死を指標にして保護活性を検討した結果、lemonなどの精油に細胞保護活性が観察された。しかしながら、これらの精油の保護活性と、DPPHラジカル消去能やSOD様活性は相関しておらず、lemon精油はほとんど抗酸化活性を示さない。 $H_2O_2$ による細胞死のメカニズムとしては、Feラジカル生成、ミトコンドリア異常などが示唆されているが、今回明らかになったlemon精油などの保護効果のメカニズムについては、これらとは関係しない可能性もあり、現在検討中である。

本研究で開発したGT1-7細胞を用いる *in vitro* アッセイ系は、取り扱いが簡便であり、様々な神経系、神経内分泌系の機能変化を観察することが可能である。既に報告したように、女性ホルモン系関連作用については神経系の研究に広く使用されているPC12細胞と異なる応答を示すことも明らかになっており、アロマセラピー精油の薬理作用研究に応用していきたいと考えている。

## 参考文献

- 1) Cooke B, Ernst E. (2000) Aromatherapy: a systematic review. *Br J Gen Pract.* 50: 493-6.
- 2) Jimbo D, Kimura Y, Taniguchi M, Inoue M, Urakami K. (2009) Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease. *Psychogeriatrics.* 9: 173-9.
- 3) Kanayama Y, Enomoto S, Irie T and Amano R (2005) Axonal transport of rubidium and thallium in the olfactory nerve of mice. *Nucl Med Biol* 32: 505-512.
- 4) Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, et al. (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5: 1-10.
- 5) Kawahara M and Kuroda Y (2002) Effects of endocrine-disrupting chemicals on the proliferation and the toxicity of immortalized hypothalamic neurons. *Environmental Sciences* 9: 319-328.
- 6) Kawahara M, Arispe N, Kuroda Y, Rojas E (2000) Alzheimer's  $\beta$ -amyloid, human islet amylin and prion protein fragment evoke intracellular free-calcium elevations by a common mechanism in a hypothalamic GnRH neuronal cell-line. *J Biol Chem*, 275: 14077-14083.
- 7) Kawahara M, Konoha K, Nagata T, Sadakane Y (2007) Protective substances against zinc-induced neuronal death after ischemia: carnosine a target for drug of vascular type of dementia, *Recent Patents on CNS Drug Discovery* 2: 145-149.
- 8) 中村亜紀子, 永田哲也, 川原正博 (2007) アロマセラピー用精油による不死化視床下部神経細胞 (GT1-7細胞) の生存維持及び細胞死に及ぼす影響, 日本味と匂い学会誌 (*Jpn. J. Taste Smell Res.*) 14 : 535-538.