

## 緑の香りの抗うつ作用の脳内機序

生理学講座 統合生理学分野 (主任 渡邊達生教授)

河野久美子, 渡邊達生

### Mechanisms underlying anti-depressant effects exerted by green odor in rats

Kumiko KONO, Tatsuo WATANABE

*Division of Integrative Physiology, Department of Functional, Morphological and Regulatory Science,  
Tottori University Faculty of Medicine, Nishi-cho 86, Yonago, Tottori, 683-8503, Japan*

#### ABSTRACT

Clinical studies have shown altered activity of the prefrontal cortex (PFC) and the hippocampal atrophy in depressed patients. Recently, effects of anti-depressant on PFC and hippocampus attract attention. It has been reported that inhalation of green odor (a 50:50 mixture of trans-2-hexenal and cis-3-hexenol) alleviate experimentally induced depressive-like states in rats. Using one behavioral models of depression, the forced-swim test, we investigated the immediate early genes (IEGs) expression (c-Fos and Zif268; indicators of neuronal activity) by real time RT-PCR in depressive rats inhaling green odor. We also examined the hippocampal neurogenesis by immunohistochemistry analysis for doublecortin, a neurogenesis marker. The present results showed that there are no significant differences in the IEGs expression and in neurogenesis, among green odor, vehicle and the control groups of rats. Roles of PFC, hippocampus and other brain areas such as amygdala need to be further investigated to clarify the mechanism underlying effects exerted by green odor in the depressive rats. (Accepted on June 20, 2012)

**Key words :** Green odor, Depression, Medial prefrontal cortex, Dentate gyrus, Neurogenesis

#### はじめに

近年、海馬や前頭前皮質 [prefrontal cortex (PFC)] がうつ病の病態発生に関与している事実が注目されている。例えば、うつ病患者ではPFCの活動が遺伝子転写レベルで変化することが報告されており、immediate early gene (IEG) の一つで神経可塑性に関係していると考えられているZif268発現が前頭前皮質で減少することが報告さ

れている<sup>1)</sup>。Zif268の発現低下はラットにおいてmPFCの神経活動の低下と関係がある可能性が示唆されている (social defeat stress)<sup>2)</sup>。また、うつ病モデルの一種chronic social defeat stressマウスのmPFCでもZif268の発現の低下が見られるが、mPFCを光遺伝学的に刺激すると、うつ病行動の減少とともに、mPFCのZif268発現が上昇することが報告されている<sup>1)</sup>。さらに、前頭前野を経頭蓋磁気刺激する方法がうつ病治療に有効であ

ることが知られており、うつ病治療と前頭前皮質活動増加の関連が示唆される。一方、うつ病患者では海馬の体積減少や海馬の機能低下が見られる<sup>3)</sup>。また、ストレスが海馬神経新生を抑制することが報告されている<sup>4)</sup>。抗うつ薬や電気痙攣刺激は海馬の神経新生を促進すると言われており<sup>5,7)</sup>、現在うつ病の治療と海馬神経新生の関連が考えられている。

最近、強制水泳試験によるうつ病モデルラットに緑の香り（青葉アルコール / 青葉アルデヒド）を吸入させると、強制水泳試験の無動時間が減少すると報告されている。この結果から、緑の香りには、抗うつ作用があるものと推察される<sup>8)</sup>。しかし、この作用発現のメカニズムは未だ明らかではない。

そこで今回、緑の香りが抗うつ作用を及ぼす脳内機序を検討するため、うつ病の病態生理学に関係していると考えられているmPFCと海馬に着目した。前者では神経活動の指標とされているc-FosとZif268の発現解析を行った。後者では抗ダブルコルチン抗体で免疫組織化学染色を行って神経新生を調べた。特に、神経新生を活発に行っている歯状回のsubgranular zone (SGZ) について検討した。

## 材料および方法

### 実験動物

10-13週齢のオスのWistar rat（清水実験材料株式会社）を使用した。ラットはウッドチップを敷いたプラスチックケージ（縦40 cm×横25 cm×深さ25 cm）で室温25±1℃、12時間ずつの光周期の下で飼育し、水とラット用飼料は常時摂取できるようにした。

本プロトコールは、鳥取大学医学部の動物実験委員会により認定され、実験は鳥取大学医学部の動物実験のガイドラインや日本政府の定めた法律・通達に従って行われた。

### 緑の香り

くえん酸トリエチル（和光純薬工業株式会社）に青葉アルデヒド（trans-2-hexenal：和光純薬工業株式会社）と青葉アルコール（cis-3-hexenol：和光純薬工業株式会社）を等量溶解したものを緑の香りとして用いた（最終濃度は0.03 %）。この濃度の緑の香りは、ラットにimmobilizationスト

レスを負荷した際に起こる血症ACTH濃度上昇反応を抑制すると報告されている<sup>9)</sup>。さらに、青葉アルデヒドと青葉アルコールとを等量混合することで単独より効果が大幅に増加することが明らかにされている<sup>10)</sup>。

### 強制水泳試験

ラットに対して、1日3分間の強制水泳試験を7日間行った。水泳は、10:30-11:30 amの間に負荷した。

強制水泳試験では、円柱状の容器（直径 38 cm×深さ 46 cm）に水温25±1℃の水を33 cmの高さまで入れ、その中でラットを泳がせた。この条件で、水泳中のラットの後肢や尾は容器の底に付かない。ラットの水泳の様子はデジタルカメラで記録した。無動時間（immobility time）を測定し、これをうつ病様行動（絶望状態）の指標とした。ラットが逃げ道の探索や潜水を含め積極的に逃げようとする動作（swimming）や水面から上下に前肢を動かす動作（climbing）をせず、ほとんど運動を行わず水に浮いている状態をimmobilityとした。測定は3回ずつ行い、その平均値をデータとした。床替えは週一回行った。

7日間の強制水泳試験を行うと、ラットはうつ病様状態になった（7日目の無動時間が1日目のそれより有意に増加した）。これ以降、水泳は負荷せず8日目朝（10:30-11:30 am）から、緑の香りを吸入させる群と vehicle（くえん酸トリエチル）を吸入させる群に分けた。緑の香りとvehicleの吸入は、それぞれの香り物質の0.2 mlをしみ込ませた綿球を1ケージにつき前後5個ずつ設置することにより行った。香りの吸入は9日間続け、17日目に再度、強制水泳試験を行い、ラットのうつ病様状態への香りの効果を調べた。

### リアルタイムRT-PCRと免疫組織化学染色

#### 組織採取

18日目に緑の香り群とvehicle群の脳を採取した。具体的には、生理食塩水で灌流した後、すばやく脳を取り出した（深麻酔下；ペントバルビタール、腹腔内投与）。medial prefrontal cortex (mPFC) を切り出して液体窒素で瞬間凍結し、リアルタイム RT-PCRを行うまで-80℃で保存した。同時に、残りの脳を粉末ドライアイスで急速凍結した。脳は免疫組織化学染色を行なうまで、

-80℃で保存した。また、強制水泳試験と香り吸入を行わない群をコントロール群とし、上記と同様にmPFCや脳を取り出した。

### RNA抽出, リアルタイムRT-PCR

採取したmPFCはQIAzol Lysis reagent (QIAGEN) を用いてホモジナイズしたのち、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN) のプロトコールに従って、RNAを抽出、精製した。精製したRNAは吸光度を測り、 $A_{260} / A_{280} > 1.8$ であることを確かめた後、全RNAをFirst Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) を用いて逆転写し、cDNAを合成した。リアルタイムPCRはLightCycler480を使用してTaq Man Probe法にて行った。プライマー (eurofins operon) は次のものを使用した。c-Fos left (GCACAGACCTCACGCAGA) と right (ATGTGGCCACCCACAGTT); Zif268 left (CGAACAACCCTACGAGCAC) と right (GCGCCTTCTCGTTATTCAGA)

定量は検量線を用いて行い、各データを比較するため、 $\beta$  actinのmRNA量を測定して相対定量を行った。

### 免疫組織化学染色

採取した脳は、クリオスタットを用いて14  $\mu$ mの新鮮凍結切片にし、APSコートスライドガラス (松浪硝子工業株式会社) に貼り付けた。脳切片は冷風乾燥後、4%パラホルムアルデヒドで15分間、4℃で固定した。TBS (0.1 M Tris-HCl

pH 7.5, 0.15 M NaCl) で洗浄後、過ヨウ素酸溶液 (HISTOFINE, ニチレイ) で内因性ペルオキシダーゼを不活化した。TBS-T (0.1% Triton X-100を含む) で洗浄後、10%正常ウサギ血清でブロッキングを30分間、室温で行った。抗ダブルコルチン抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を1%正常ウサギ血清で50倍に希釈後、室温で一晩、脳切片と反応させた。TBS-Tで洗浄後、シンプルステインラットMAX-PO (G) (HISTOFINE, ニチレイ) を60分間反応させた。TBS-T洗浄後、DAB (DAB 基質キット, HISTOFINE, ニチレイ) で発色させ、エタノールとキシレンで脱水、脱脂後、切片を封入した。

### 解析

免疫組織化学染色を行った標本は、顕微鏡 (NIKON, E800, 東京, JAPAN) で観察を行い、顕微鏡用デジタルカメラ DXM1200F (Nikon) を利用して組織画像をPCに取り込んだ。ダブルコルチン (DCX) 陽性細胞のカウントは歯状回のsubgranular zone (SGZ) で行い、ラット一匹あたり3つの脳半球について解析を行った。各切片の陽性細胞数はSGZの長さで割り、SGZ 1 mmあたりの個数で表わした<sup>11)</sup>。画像解析にはImage Jを利用した。

### 統計

すべてのデータは平均値 $\pm$ 標準誤差で表している。

データは、one-way ANOVAで検定を行った

表1. ラットのうつ病様状態に及ぼす vehicle 吸入の効果

		immobility time (sec)
before vehicle	day 1	22.62 $\pm$ 2.30
	day 7	87.74 $\pm$ 19.01*
after vehicle	day 17	89.23 $\pm$ 19.65*

} ns

無動時間 (immobility time) の平均値 ( $\pm$ S.E.M.; n=6 each) を示す。

ラットに1日3分間の強制水泳試験を7日間 (days 1-7) 行い、8日目朝からvehicleを9日間 (days 8-17) 吸入させ、17日目に再度3分間の強制水泳試験を行った。1, 7, 17日目にimmobility timeを測定した。

\*p < 0.05 vs. day 1.

7日目と17日目のimmobility timeの比較は角括弧の右隣に示す (ns; non-significance)。

後, Fisher's PLSD test (post-hoc test) を行った。あるいは, Student t-testで解析した後, ボンフェローニ補正を行った。

**結 果**

**ラットのうつ病様状態に及ぼす香りの効果**

ラットに強制水泳試験を負荷すると開始1日目と比較して7日目では無動時間が有意に増加した(うつ病様状態)。その後, 9日間vehicleを提示しても17日目の無動時間に変動は観察されなかった(表1)。一方, 緑の香りを9日間吸入させた群では, 17日目の無動時間が7日目のそれと比べて有意に減少した(表2)。

**ラットのmPFCのIEG発現量に及ぼす香りの効果**

緑の香り群, vehicle群とコントロール群のIEG(c-FosとZif268)の発現量に有意な差を認めることはできなかった(図1)。

**ラットの歯状回SGZのDCX発現に及ぼす香りの効果**

緑の香り群, vehicle群とコントロール群のSGZにおけるDCXタンパクの発現細胞数を比較したが, 有意な差は観察されなかった。

**考 察**

本研究では, 緑の香りの抗うつ効果の脳内機序を調べた。その結果, mPFCのIEGsの発現に関しては, 緑の香り群, Vehicle群とコントロール群

の3群間で有意な差が認められなかった。すなわち, Wistarラットを用いた強制水泳試験うつ病モデルではmPFCのIEGs発現に変化が生じないものと考えられる。強制水泳のストレスは注意欠陥多動性障害のモデルである高血圧自然発症ラットの海馬Zif268の発現を増やすことが報告されているが, Wistar KyotoラットやSprague-Dawleyラットでは強制水泳試験を行っても海馬Zif268の発現は変化せず, 系統差があることが報告されている<sup>12)</sup>。前頭前皮質のZif268発現量についてもこの3系統で差があることが報告されている<sup>12)</sup>。今回, うつ病モデルラットのmPFCでc-Fosの発現に有意差が見られなかったことは別の先行研究(マウス)と一致する<sup>1)</sup>。一方, 今回の研究でmPFCのIEGsの発現に有意差が見られなかった他の要因として, 全ての実験終了後に組織採取を実施したことが考えられる。social defeat stressを与えたマウスでは刺激になると考えられるsocial interaction testの24時間後に組織を採取し, ストレスに感受性があった群でmPFCのZif268発現は減少するという報告がなされているが<sup>11)</sup>, Zif268やc-FosなどのIEGs発現をmRNAレベルで調べる際には, 何らかの刺激後, 数分から数十分以内に組織採取を行なっているものが多い(しかし, ヒトでは, うつ病患者の死後の脳のPFCで, IEGが低下していると報告されている<sup>1)</sup>。種差が考えられる。)。今回の実験では強制水泳試験後11日後にラットの脳を採取したので, IEGsの発現に3群で変化が見られなかった可能性が考えられる。私た

表2. ラットのうつ病様状態に及ぼす緑の香り吸入の効果

		immobility time (sec)
before green odor	day 1	15.20 ± 5.66
	day 7	61.87 ± 14.50*
after green odor	day 17	35.04 ± 14.54 †

無動時間 (immobility time) の平均値 (±S.E.M.; n=6 each) を示す。

ラットに3分間の強制水泳試験を7日間 (days 1-7) 行い, 8日目朝から緑の香り (green odor) を9日間 (days 8-17) 吸入させ, 17日目に再度3分間の強制水泳試験を行った。1, 7, 17日目にimmobility timeを測定した。

\*p < 0.05 vs. day 1.

7日目と17日目のimmobility timeの比較は角括弧の右隣に示す (†p < 0.05)。

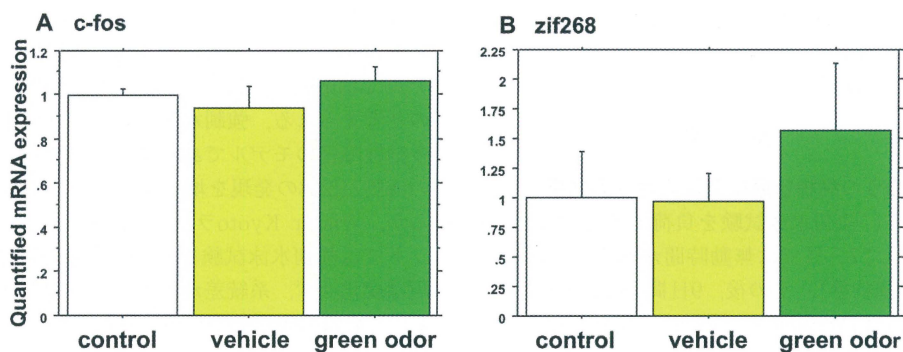


図1 mPFCでのIEGsの発現に及ぼす緑の香りの効果

IEG (c-fosとzif268) の平均値 ( $\pm$ S.E.M.; n=6 each) を示す。

ラットに3分間の強制水泳試験を7日間 (days 1-7) 行い、8日目朝から、vehicleあるいは緑の香り (green odor) を9日間 (days 8-17) 吸入させた。17日目に再度3分間の強制水泳試験を行った (表1と2参照)。18日目に採取したmPFCのIEGsの発現をreal-time RT-PCR法にて測定した。何も処置しないcontrol群でも同様に、mPFCにおけるIEGsの発現を測った。Control群のIEG発現の平均値を1とした。

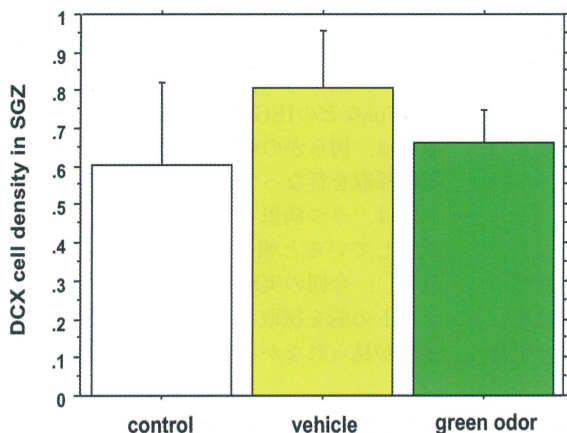


図2 歯状回subgranular zone (SGZ) の神経新生に及ぼす緑の香りの効果

歯状回SGZにおけるdoublecortin (DCX) 陽性細胞数の平均値 ( $\pm$ S.E.M.; n=6 each) を示す。

ラットに3分間の強制水泳試験を7日間 (days 1-7) 行い、8日目朝から、vehicleあるいは緑の香り (green odor) を9日間 (days 8-17) 吸入させた。17日目に再度3分間の強制水泳試験を行った (表1と2参照)。18日目に採取した脳で、抗DCX抗体を用いた免疫染色を行い、歯状回のSGZでの神経新生を比較した。何も処置しないcontrol群でも同様に、歯状回のSGZでの神経新生を調べた。

ちは、緑の香りによるうつ病様状態への予防効果発現に6日かかることを報告している<sup>9)</sup>。また最近、私たちは、緑の香りによるうつ病様状態への治療効果の生じる時期を調べた。具体的には、ラットをうつ病様状態にした後、2日おきに強制水泳試験を行って無動時間を計測した。その結果、香り吸入開始後、6日目から無動時間の減少が見られ

た (unpublished observation)。今後、緑の香りを吸入させて抗うつ効果が発現する、強制水泳試験後6日目以降に脳組織を取り出し、IEGsの発現に変化が見られるかどうかについて検討する必要がある。

海馬神経新生について緑の香り群とvehicle群はコントロール群と差がなかったことから、水泳

試験うつ病モデルでは海馬神経はダメージを受けないか、あるいは、水泳試験をやめてから11日が経つのでvehicle群で海馬の神経新生が増加している可能性が考えられる。vehicle群の無動時間は17日目の水泳試験においても変化なく高いが、この時点で成熟した神経の数は緑の香り群と比べてvehicle群で少ないのかもしれない。前述の様に、完成されたうつ状態に対する緑の香りの抗うつ効果は香り吸入後6日目から現れる。この6日間というtime-delayは、ヒトで抗うつ薬の海馬神経新生促進作用に数週間(2-4週間)かかるという事実(一定の時間を要する事実)と一致する。これらの事実を踏まえ、今後、vehicle群で神経新生が回復しているという可能性を考慮して、緑の香り吸入期間を短くし、緑の香りに海馬神経新生促進作用があるかどうかについて検討する必要がある。

前頭前皮質や海馬の他にうつ病と関係があると考えられている脳部位には扁桃体がある。扁桃体を電気刺激すると恐怖や不安が引き起こされることが知られている<sup>13)</sup>。実際、うつ病患者に負のemotional stimuliを与えると扁桃体が過活動になり、逆に正のemotional stimuliに対しては正常と比較しその活動が鈍くなることが報告されている<sup>13)</sup>。扁桃体は前頭前皮質や海馬同様に抗うつ治療のエンドポイントとなる可能性も想定されている<sup>14)</sup>。今後、緑の香りの作用機序の解明には前頭前皮質や海馬のさらなる検討に加え、扁桃体など脳の他の部位にも焦点を当てていく必要がある。

### 結 語

うつ病モデルラットに対する緑の香りの抗うつ作用の脳内機序解明に向けて、mPFCの活動と歯状回の神経新生に着目したが、緑の香りの吸入ではこの両者に変化は見られなかった。緑の香りの作用機序解明へのさらなる検討は、緑の香りの抗うつ作用発現に抗うつ薬同様のtime delayが生じるという事実と合わせて、今後うつ病の病態を理解し、治療していく上で重要であると考えられる。

なお本研究は、科学研究費補助金、基盤研究(C)21590255を受けて実施した。本稿を終えるに当たり、鳥取大学医学部機能形態統御学講座統合生理学分野木場智史講師、三好美智夫助教、ならびに鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻生体機能医工学

講座生体高次機能学部門 畠義郎教授、大村菜美様をはじめ、多くの先生方の御指導、御協力に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Covington HE, Lobo MK, Maze I, Vialou V, Hyman JM, Zaman S, Laplant Q, Mouzon E, Ghose S, Tamminga CA, Neve RL, Deisseroth K, and Nestler EJ. Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 2010; **30** (48): 16082-16090.
- 2) Covington HE, Kikusui T, Goodhue J, Nikulina EM, Hammer RP Jr, and Miczek KA. Brief social defeat stress: long lasting effects on cocaine taking during a binge and Zif268 mRNA expression in the amygdale and prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 2005; **30**: 310-321.
- 3) MacQueen GM, Campbell S, McEwen BS, Macdonald K, Amano S, Joffe RT, Nahmias C, and Young LT. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *PNAS* 2003; vol.100: no.3: 1387-1392.
- 4) Dranovsky A and Hen R. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry* 2006; **59**: 1136-1143.
- 5) Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 2003; **301**: 805-809.
- 6) Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, and Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000; **20** (24): 9104-9110.
- 7) Segi-Nishida E, Warner-Schmidt JL, and Duman RS. Electroconvulsive seizure and VEGF increase the proliferation of neural stem-like cells in rat hippocampus. *PNAS*; 2008: vol. 105: no.32: 11352-11357.

- 8) Watanabe T, Fujihara M, Murakami E, Miyoshi M, Tanaka Y, Koba S, Tachibana H. Green odor and depressive-like state in rats: toward an evidence-based alternative medicine. *Behav Brain Res* 2011; **224**: 290-296.
- 9) Nakashima T, Akamatsu M, Hatanaka A, Kiyohara T. Attenuation of stress-induced elevations in plasma ACTH level and body temperature in rats by green odor. *Physiol Behav* 2004; **80**: 481-488.
- 10) Sano K, Tsuda Y, Sugano H, Aou S, and Hatanaka A. Concentration effects of green odor on event-related potential (P300) and pleasantness. *Chem. Senses* 2002; **27**: 225-230.
- 11) Kraus KS, Mitra S, Jimenez Z, Hindoja S, Ding D, Jiang H, Gray L, Lobarinas E, Sun W, and Salvi RJ. Noise trauma impairs neurogenesis in the rat hippocampus. *Neuroscience* 2010; **167**: 1216-1226.
- 12) Clements KM, Wainwright PE. Swim stress increases hippocampal Zif268 expression in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res Bull* 2010; **82**: 259-263.
- 13) Murray EA, Wise SP, and Drevets WC. Localization of dysfunction in major depressive disorder: prefrontal cortex and amygdale. *Biol Psychiatry* 2011; **69**: 43-54.
- 14) Tanti A and Belzung C. Open questions in current models of antidepressant action. *Br J Pharmacol* 2010; **159**: 1187-1200.