

手技療法に植物精油を付加することによる抗炎症作用増強効果の基礎的検証

森 美侑紀¹⁾、川畑 浩久^{1,2)}

1) 森ノ宮医療学園専門学校柔道整復学科

2) 森ノ宮医療大学保健医療学部

要旨

【目的】外傷後や変形性関節症などの関節炎では、滑膜組織に炎症が生じることで疼痛や関節水腫などの症状を呈する。これに対して安静や固定、手技療法、物理療法などの施術により症状の軽減を図るが、これらは滑膜組織に生じている組織学的な変化を直接改善するものではなく、多くの場合症状に対する対症療法として用いられている。一方で、アロマセラピーで用いる植物精油は皮膚や粘膜から血中に浸透することで直接炎症部位に作用し、より強力に炎症を抑制するとされている。したがって、植物精油の作用を手技療法などに組み合わせることができれば、柔道整復術の効果をさらに向上させることが期待できる。しかしながら植物精油の作用については現在十分な検討が行われておらず、evidence が得られているとはいえない。

そこで本研究では関節炎モデルラットをもちいて、植物精油が膝関節滑膜炎に対して抗炎症作用を有するかについて、組織学的・分子生物学的手法により検証を行った。

【方法】8週齢雄SDラット膝関節に0.1%カラゲニン¹⁾を50 μ l投与し、関節炎モデルラット(n=12)を作成し、その直後に膝関節に生理食塩水を50 μ l注入したSaline群(n=6)と0.5% *Eucalyemon* (*Eucalyptus citriodora*; プラナロム社)を50 μ l注入した *Eucalyemon*群(n=6)に分けた。そして1週間後に膝関節部を採取し、滑膜の病態の進行過程をHE染色、免疫組織学的染色などで観察した。また炎症性サイトカインであるIL-1 β やIL-6、マクロファージの遊走を促進するケモカインMCP-1などの遺伝子発現についても、分子生物学的手法(real time-PCR法)をもちいて検討した。なお本研究は森ノ宮医療学園の動物実験倫理委員会の承認を経て実施した。

【結果】組織学的検討において *Eucalyemon*群はSaline群に比べ、滑膜での細胞増殖、マクロファージの浸潤が抑制されていた。またIL-1 β 、IL-6、MCP-1などの遺伝子発現も *Eucalyemon*群で有意に抑制されていた。

【結論】今回の結果から、*Eucalyemon*精油が滑膜炎におけるマクロファージの遊走や炎症性サイトカインの産生を制御することで、炎症を抑制することが示唆された。

キーワード：

滑膜炎，炎症性サイトカイン，植物精油，*Eucalyplemon*，抗炎症作用

1) 緒言

外傷後や変形性関節症（以下 OA）などの関節炎では、滑膜組織に炎症が生じることで疼痛や関節水腫などの症状を呈する。これに対して柔道整復においても安静や固定、手技療法、物理療法などの施術により症状の軽減を図るが、これらは滑膜組織に生じている組織学的な変化を直接改善するものではなく、多くの場合症状に対する対症療法として用いられている。

すなわち OA などでみられる滑膜組織の炎症は、炎症性サイトカインや基質分解酵素などの分泌を亢進し、関節軟骨の退行性変性を進展させることから、その治療においては滑膜炎を十分に抑制することが鍵となる。

一方で近年医療現場において、アロマセラピーが疾患治療や症状緩和の手段としてもちいられる機会が増加しており、膝 OA などの疼痛の軽減や可動域の改善などに有効であることが報告されている^{1, 2)}。

しかしながらこれらの報告は、希釈した精油をマッサージとして使用しているため、その効果が植物精油の直接的効果か否かは明らかでない。また炎症に対する植物精油の影響については、ユーカリやラベンダーなどの精油がアレルギー症状や薬剤による足底浮腫を抑制すること^{3, 4)}や、ティートリーが人の皮膚組織におけるヒスタミン誘導性の浮腫を抑制する⁵⁾ことなどの報告が散見されるものの、関節炎に対する精油の作用機序についての詳細な検討もほとんどみられない。

そこで本研究では関節炎モデルラットをもちいて、植物精油が膝関節滑膜炎に対して抗炎症作用を有するかについて、組織学的・分子生物学的手法により検証を行った。

2) 材料と方法

2.1 使用精油および薬剤

プラナロム社の *Eucalyplemon* 精油（PRANAROM、Belgium）を使用した。*Eucalyplemon* 精油を 0.1 %DMSO 溶液（Sigma. Chemicals Co., Inc., U.S.A）と Tween20（和光株式会社、大阪）にて 0.5 %濃度に希釈した。関節炎を惹起する薬剤としてカラゲニン（和光株式会社、大阪）を蒸留水で 0.1%濃度に希釈し使用した。また *Eucalyplemon* 精油の対照薬剤として生理食塩水を使用した。

2.2 実験動物

8週齢の雄のSDラット（清水実験材料株式会社）を使用した。動物の飼育条件は、室温 25℃、湿度 50±5%、12時間の明暗サイクルで、原則として1ケージに2匹のラットを入れ、飼料や水は自由摂取として一週間飼育した。使用したラットの数はいずれの群も6匹ずつの3群、計18匹であった。なお、本動物実験は森ノ宮医療学園動物実験倫理審査会の承認を受けた（承認番号2013A001）ものである。

2.3 膝 OA ラットの作成

SDラットは、1.5%ハロセンによる吸入麻酔およびペントバルビタール 0.2mlの腹腔内投与による深麻酔を行った。膝関節周辺の剃毛後、膝蓋靭帯外側部の皮膚を約1cm切開し、蒸留水にて0.1%濃度に希釈したカラゲニン（以下:CA）50 μ lを両膝関節の膝蓋靭帯外側の関節裂隙部より注入し、膝OAモデルラットを作成した。このモデルラットの両膝関節に生理食塩水50 μ lを注入したCA+Saline群（6匹）、DMSO, Tween20にて0.5%濃度に希釈した*Eucalyplemon*精油50 μ lを注入したCA+*Eucalyplemon*群（6匹）、何も投与しないnormal群（6匹）の3群を作成し比較検討を行なった。

2.4 組織学的観察

CAならびに各種薬剤の注入後、一週間後に横径計測の後、組織を採取した。なお膝関節の横径は筋肉や靭帯などの組織を除去し、関節裂隙部で測定し、その結果をone way ANOVAを用いて統計学的処理を行った。

さらに採取した組織は、4%パラフォルムアルデヒドで浸漬固定、通常の過程でパラフィン包埋を行い、5 μ mで薄切し、HE染色、免疫組織化学染色などを行った。なお免疫組織化学染色についてはマクロファージの特異的な抗体である抗RM-4抗体（株式会社トランスジェニック）を使用した。

2.5 分子生物学的観察

炎症性サイトカイン（IL-1 β やIL-6）やマクロファージ遊走因子（MCP-1）などの遺伝子発現状況をreal time-PCR法にて検討した。

具体的には各群の膝関節から滑膜組織を採取し、ISOGENE IIにてtotal RNAを抽出後、逆転写を行い、cDNAを得た。その後cDNAサンプル1 μ gについて、Sso Fast EvaGreen Supermix（BioRad）とそれぞれの遺伝子配列に基づき作成したプライマーをもちいてreal time-PCRを実施した。

なお遺伝子発現量については、サンプル間の誤差を補正するため、GAPDH（ハ

ウスキーピング遺伝子)で除した割合で示した。また遺伝子発現解析については one way ANOVA を用いて統計学的処理を行った。

3) 結果

3.1 3群間の膝関節横径と体重増加率の比較

CA投与後1週目の膝関節横径は、CA+Saline群に比べCA+*Eucalyplemon*群が有意に小さく ($P < 0.01$)、*Eucalyplemon*精油が関節炎による腫脹を抑制している可能性が示唆された(表1)。なお3群間での体重増加率に差はみられなかった(NS)。

3.2 滑膜の組織学的変化

normal群では、表面の滑膜内皮細胞(関節腔側)は1~数層の細胞により構成され、そのすぐ外側は少数の細胞と基質で構成される線維性の組織がわずかにあり、さらにその外側は脂肪組織に富んだ脂肪性滑膜により構成されていた(図1左:上・下段)。

一方CA+Saline群では、滑膜表面の内皮細胞は脂肪性滑膜に達するほど著しく増殖し、滑膜組織の肥厚を認めた。また肥厚した滑膜組織にはマクロファージも広く浸潤しており、明らかに滑膜炎を生じていた。(図1中央:上・下段)。

これに対してCA+*Eucalyplemon*群では、滑膜細胞の増殖は滑膜の表層部に局限しており、マクロファージの浸潤も表層付近でとどまっており、CA+Saline群と比較しても滑膜炎は抑制されていた(図1右:上・下段)。

3.3 炎症マーカーの遺伝子発現状況

IL-1 β やIL-6、MCP-1のいずれもnormal群に比べ、CA+Saline群において遺伝子発現の有意な上昇が認められ、CA+*Eucalyplemon*群ではその上昇が有意に抑制されていた ($P < 0.01$) (図2)。

4) 考察

膝OAの発症や進展において滑膜炎は中心的な病態変化であり、滑膜組織にマクロファージが浸潤し、基質分解酵素などを分泌することで、滑膜組織の炎症、肥厚や関節軟骨の変性を惹起する。またこの際マクロファージによりIL-1 β 、IL-6の発現が強く誘導されることで、さらに滑膜炎がより強くなることも報告されている⁶⁻¹⁰⁾。本研究においても、CAの投与は滑膜組織へのマクロファージの浸潤や、炎症性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6)やケモカイン(MCP-1)遺伝子発現を上昇させ、滑膜炎を惹起しており、本関節炎モデルは膝OAの病

態を正確に再現していた。

さらに本研究では *Eucalyplemon* 精油が滑膜炎を直接抑制する作用を持つかについて検討を行ったところ、滑膜組織へのマクロファージの浸潤や、炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6) やケモカイン (MCP-1) 遺伝子発現は抑制されており、*Eucalyplemon* 精油が滑膜炎を抑制する作用を持つことが示めされた。

先行研究においても *Eucalyplemon* 精油が一定の鎮痛効果や抗炎症効果をもつことが報告されており¹¹⁾、我々も *Eucalyplemon* 精油がスポーツ選手における筋疲労や over use による関節痛に一定の効果があることを経験している。

今回の研究結果と先行研究の結果をあわせて考えると、*Eucalyplemon* 精油はマクロファージなどの炎症細胞に作用することで抗炎症効果や鎮痛効果を発揮することが示唆された。

今回の研究では生体内における精油の直接的な作用を明確にする目的で、精油を関節内に直接注入したが、実際には精油は塗布など皮膚を介して投与するため、今回示した結果が直接臨床における有効性に繋がるか否かは不明であるが、*Eucalyplemon* 精油が生体内において抗炎症作用を発揮するという結果は、精油が炎症部位に到達すれば、炎症を抑制できることが期待できるものである。

したがって本研究の結果を基礎とし、今後至適濃度や病期と精油の投与時期、効果的な成分の検証などを追加し、さらに詳細なメカニズムの解明が必要であると考えられる。

またアロマセラピーでもちいる精油については、*Eucalyplemon* 精油以外にもゼラニウム精油が関節炎の炎症抑制に作用すること¹²⁾、ティートリー精油が培養マクロファージからのサイトカイン発現を抑制することなどが報告されており¹³⁾、これらの精油も抗炎症効果をもつことが示唆されていることから、*Eucalyplemon* 精油とあわせて使用することでより強い効果を発揮することも期待される。

さらに今回もちいた CA は関節内投与すると滑膜炎を惹起するだけでなく、Matrix metalloproteinase -13 (以下 MMP-13) などの基質分解酵素の分泌も促進し関節軟骨の変性・破壊を生じることが報告されており^{8, 14, 15)}、これはヒトにおける変形性関節症の病態が進展する際の現象と酷似している。したがって *Eucalyplemon* 精油により滑膜炎を抑制し MMP-13 の発現を抑制することができれば、関節軟骨の変性・破壊を抑制することも可能となることから、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

5) 結論

Eucalyplemon 精油はマクロファージの遊走や炎症性サイトカインの産生を

抑制し、関節炎を軽減させることから、*Eucalyptus*精油が関節炎に対する非侵襲的で効果的な予防・治療への介入方法のひとつとして、柔道整復術にも活用できる可能性が示唆された。

6) 引用文献

- 1) 柴 伸昌, 並木文代: 変形性膝関節症に対する精油使用施術 (マッサージ) の有効性について-外用消炎鎮痛剤を対照としたランダム化比較試験 - : 日本アロマ学会誌, 9 (1), 36-42, 2010.
- 2) 柴 伸昌, 並木文代: 変形性膝関節症に対するアロマセラピーの経験. 日本アロマ学会誌, 7 (1) : 28-35, 2008.
- 3) Silva J1 et al.: Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. J Ethnopharmacol., 89(2-3): 277-83, 2003.
- 4) Hajhashemi V1, Ghannadi A, Sharif B: Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. J Ethnopharmacol., 89(1): 67-71, 2003.
- 5) Koh KJ1 et al.: Tea tree oil reduces histamine-induced skin inflammation. Br J Dermatol., 147(6): 1212-7, 2002.
- 6) Hansra P1 et al.: Carrageenan-induced arthritis in the rat. Inflammation., 24(2): 141-55, 2000.
- 7) Valenti C1 et al.: Fasitibant chloride, a kinin B2 receptor antagonist, and dexamethasone interact to inhibit carrageenan-induced inflammatory arthritis in rats. Br J Pharmacol., 166(4): 1403-10, 2012.
- 8) Hansra P1 et al.: Carrageenan-induced arthritis in the rat. Inflammation., 24(2): 141-55, 2000.
- 9) Silván AM1 et al.: Aggravation of adjuvant arthritis by carrageenan. Gen Pharmacol., 27(4): 639-42. 1996.
- 10) Santer V, Sriratana A, Lowther DA: Carrageenin-induced arthritis: V. A morphologic study of the development of inflammation in acute arthritis. Semin Arthritis Rheum., 13(2): 160-8. 1983.
- 11) Silva J1 et al.: Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. J Ethnopharmacol., 277-83. 2003.
- 12) Maruyama N1 et al.: Suppression of carrageenan- and collagen II-induced inflammation in mice by geranium oil. Mediators Inflamm., 1-7. 2006.
- 13) Ninomiya K1 et al.: Suppression of inflammatory reactions by

terpinen-4-ol, a main constituent of tea tree oil, in a murine model of oral candidiasis and its suppressive activity to cytokine production of macrophages in vitro. *Biol Pharm Bull.*, 838-44. 2013.

14) Loeser RF1 et al.: Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 64(6): 1697-707. 2012.

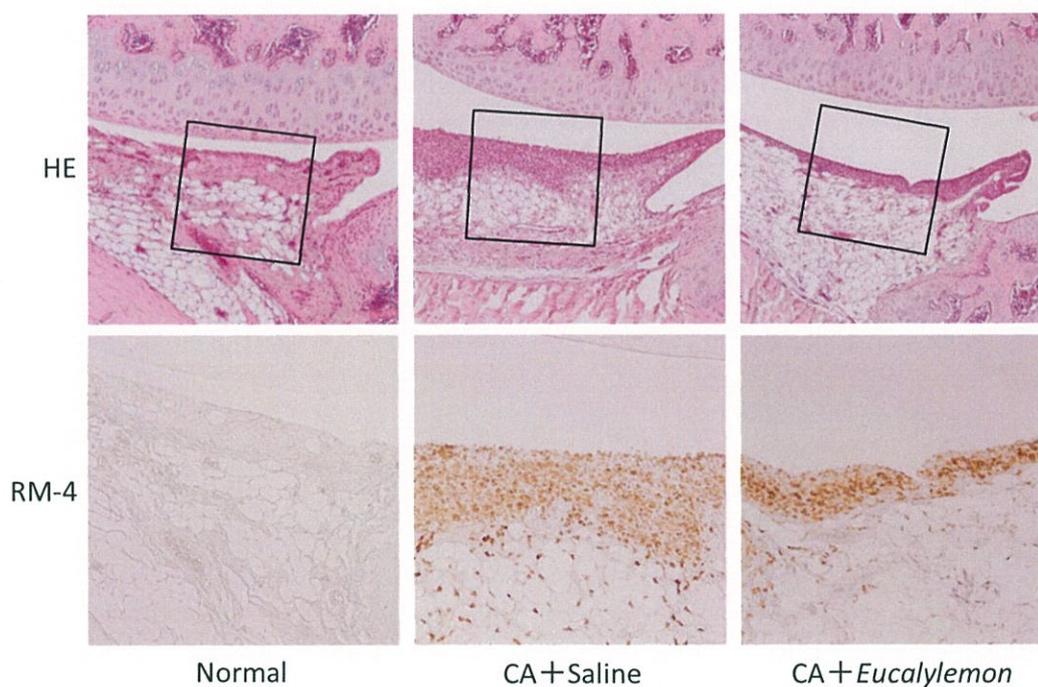
15) Kato T et al.: Exosomes from IL-1 β stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 16(4): R163. 2014.

【表 1】 3 群間の膝関節横径比較

CA+Saline 群に比べ CA+Eucalyplemon 群が有意に小さい ($p < 0.01$ VS CA+Saline)。normal 群と CA+Eucalyplemon 群間に有意差は認めなかった (NS)。

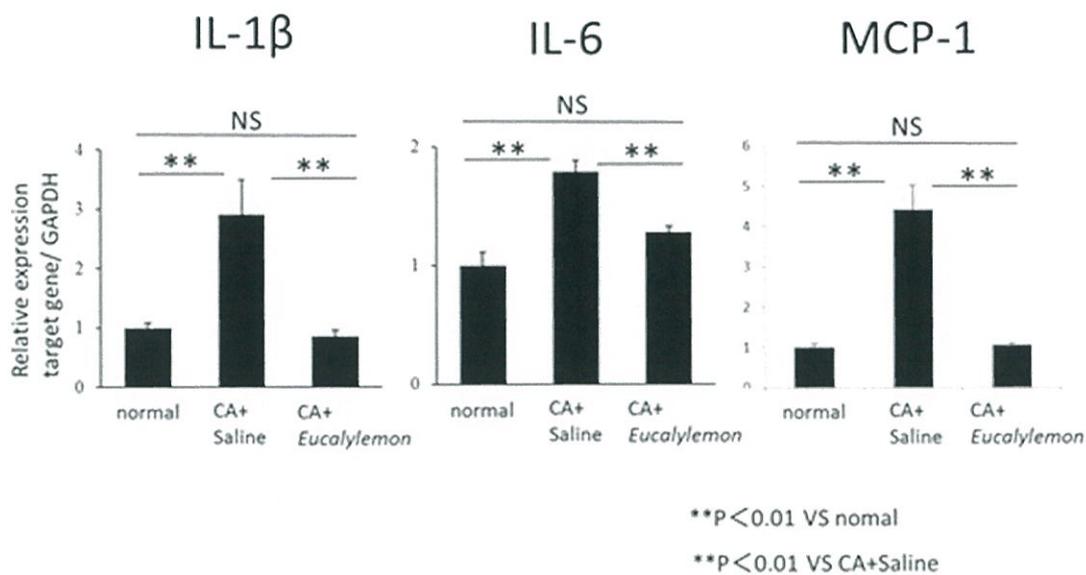
	normal	CA±Saline	CA±Eucalyplemon
Average	8.47 ± 0.1	9.5 ± 0.2	8.5 ± 0.2

【図 1】 滑膜の組織学的変化 ($\times 100$)



CA+Saline 群では、正常滑膜組織と比べ滑膜内皮細胞の増殖と広範なマクロファージの浸潤を認めた (図 3 中央:上・下段)。これに対し CA+Eucalyplemon 群では、わずかに滑膜細胞の増殖は認めるものの、マクロファージの浸潤も表層付近に限局されていた (図 3 右:上・下段)。

【図 2】 炎症マーカーの遺伝子発現状況



IL-1 β , IL-6, MCP-1 の遺伝子発現が CA+Saline 群に比べ、CA+Eucalyplemon 群で有意に減少していた。