

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 曹 承睦

睡眠は健康を維持する上で最も重要な生理現象のひとつであり、その障害は免疫機能、認知機能などを低下させ、生活の質に影響を与える。不眠症の人は世界中で約 30%にも上ると言われており、社会的にも大きな経済的損失を生み出す睡眠障害は、国民の保健の中で最も重要な課題の一つと認識されている。

不眠症治療に用いられる代表的な睡眠剤として γ -aminobutyric acid type A-benzodiazepine 受容体 ($GABA_A$ -BZD R) を標的としたものが開発されているが、欧米では睡眠剤の副作用と依存性を避けるために、Valerian, St. John's wort などの天然サプリメントが近年好んで利用されるようになってきている。本研究は、日本や韓国で利用されている植物資源から睡眠誘導効果を持つ植物を新たに探索するとともに、活性成分を同定し、その作用機構を明らかにすることを目指して行われたもので 3 章からなる。

序論に続く第 1 章では、睡眠誘導作用の分子標的である $GABA_A$ -BZD R に対する結合活性を指標に、30 種類の陸上植物と 30 種類の海藻類の抽出物の中から睡眠誘導活性をもつ可能性のあるものを探索している。その結果、海藻類ではカジメ (*Ecklonia cava*)、陸上植物では甘草 (*Glycyrrhiza glabra*) に最も高い結合活性が見出された。カジメのエタノール抽出物 (ECE) および甘草のエタノール抽出物 (GGE) はマウスの入眠時間の減少と睡眠時間の増加を誘導し、その効果は睡眠サプリメントとして利用されている Valerian 抽出物とほぼ同等であった。

第 2 章では、カジメ抽出物 ECE の睡眠誘導効果および睡眠構造に及ぼす影響を検討している。睡眠を誘導しない濃度の pentobarbital で処理したマウスに ECE を投与した結果、ECE 濃度に依存して睡眠時間の増加と入眠時間の減少が観察された。そこで、response surface method を用いて活性成分抽出条件の最適化を行った。睡眠誘導効果を最大化する抽出条件 (エタノール濃度 81.6%、抽出時間 52.2hr、抽出温度 43.7°C) で調製した ECE は、既存の抽出物バンクで製造されたものよりも高い睡眠誘導効果を示した。次に、ECE が睡眠の構造および質に及ぼす影響をマウスの脳波 (EEG) および筋電図を計ることにより調べたところ、ECE は濃度依存的にノンレム睡眠 (NREMS) を増加させ、500 mg/kg の濃度で、睡眠剤である diazepam (DZP) 2 mg/kg とほぼ同じ効果を示した。ECE の投与は、睡眠の質を表す EEG powder density の delta 波の活性を有意に減少させた。ECE の delta 波活性の観察から、ECE は睡眠の質を低下させることなく、正常状態の生理的睡眠を誘導することが示唆された。

ECE 中の睡眠誘導物質が $GABA_A$ -BZD R に直接作用することを確認するために、 $GABA_A$ -BZD R の抑制剤である flumazenil (FLU) を利用した *in vivo* 実験を行った。FLU を投与したマウスでは ECE は睡眠誘導効果を示さなかったため、ECE は DZP と同じく

GABA_A-BZD R のアゴニストとして作用しているものと考えられた。GABA_A-BZD R との結合活性を指標に活性成分の単離・分析を進め、eckstolonol (ETN) など 6 種の phlorotannin が活性成分として同定された。単離成分の効果は FLU によって抑制されたことから、これらは GABA_A-BZD R のアゴニストとして作用することが示唆された。

第 3 章では、甘草抽出物である GGE の睡眠誘導効果、睡眠構造について同様に検討している。GGE についても活性成分抽出条件の最適化を行い、最大の睡眠誘導効果を与える抽出条件（エタノール濃度 79.8%、抽出時間 12.0hr、抽出温度 48.0℃）を見出した。GGE は睡眠の構造および質についても ECE とほぼ同じ効果を示した。また、FLU を用いた実験の結果、活性成分は GABA_A-BZD R のアゴニストとして作用しているものと考えられた。GGE からは glabridin など 3 種のフラボノイドが活性成分として単離・同定され、それらの成分は GABA_A-BZD R を活性化させ、50 mg/kg の濃度で有意に NREMS を増加させた。

以上、本研究はカジメおよび甘草の睡眠誘導効果とその有効成分を明らかにするとともに、これらの活性成分の作用機構について検討したものである。特に海藻類からの睡眠誘導物質の発見は初めて報告されたものであり、学術的、応用的に貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。