

シソ科植物由来芳香成分の鎮静活性に関する研究

2013

伊藤 謙

<目次>

緒言	3
本論	
第一章 シソ科薫香生薬類精油の吸入投与による鎮静活性の検討	5
第一節 芳香性生薬類の自発運動量抑制活性	6
第二節 藿香精油の自発運動量抑制活性成分の探索	11
第三節 藿香精油由来成分の中樞神経系への作用	17
考察	21
第二章 シソ科植物冠唇花(<i>Microtoena patchoulii</i>)精油の吸入投与による鎮静活性および 活性化化合物の探索	23
第一節 冠唇花精油の自発運動量抑制活性	24
第二節 冠唇花精油の自発運動量抑制活性成分の探索	26
第三節 匂い応答における化合物間の相互作用	33
考察	34
第三章 シソ科植物由来芳香成分の鎮静活性発現経路の解明および構造活性相関につい ての研究	37
第一節 嗅上皮傷害マウスでの香気成分の作用	39
第二節 藿香由来化合物についての構造活性相関研究	42
第三節 冠唇花由来化合物についての構造活性相関研究	49
考察	58
実験方法	61
総括および結論	64
謝辞	65
発表論文目録	66
引用文献	67

緒言

近年、先進国、特に欧米では、補完代替医療(Complementary and Alternative Medicine:CAM)の利用頻度が急速に増加している¹⁾。特に1990年代以降、欧米諸国では、医療費高騰などの理由から、予防医療やガンの終末医療といった領域で、CAMを選択するケースが増えているといわれる。

CAMのひとつに、香りを吸入することにより、精油成分のもつ薬理作用を利用して、心身の疾病予防や治療を行なう芳香療法(Aromatherapy)がある。また日本にも香道に代表される香りを楽しむ伝統的習慣がある。そして特に日本では、香りを楽しむことに加え、集中力の向上、眠気の打破、抗不安、リラックスに代表される「香十徳」と呼ばれる効能をも期待し、様々な芳香性生薬類が用いられてきた。

日本の伝統的な香の利用方法のひとつに香袋(匂い袋)がある。香袋とは、芳香性生薬を和紙や布で作った袋に入れ、火を使わずに長時間香りが持続するよう工夫されたものである。この香袋を構成する代表的な生薬は藿香、甘松香、桂皮、山奈、大茴香、丁子、白檀、龍腦の8種類であるが、その多くはエキスに防虫、殺菌作用があること^{2) 3)}が知られている。しかし、これら8種の香り、即ち揮発性成分の吸入による作用についての検討は充分なされているとはいえない。そこで、本研究ではマウスを用いた簡便な実験系で生薬芳香成分の鎮静作用とその活性成分の検討を行った。

白檀に関しては、マウス吸入投与による鎮静作用が報告されており⁴⁾、甘松香に関しては、マウス自発運動量抑制作用が主成分である calarene などの化合物によっておこることを著者らのグループが報告した⁵⁾。藿香は、芳香療法材料(素材)や香料として多用され、エキスに ROS (Reactive oxygen species) Scavenger 様作用⁶⁾ や抗トリパノゾーマ活性⁷⁾が見いだされているほか、オイルをヒトに吸入投与した場合の作業効率改善が報告されている⁸⁾。

また、藿香の主成分である patchouli alcohol を主成分とする植物は少なく、藿香以外では冠唇花のみであり、本植物の精油はこの他にも多種のユニークなテルペン化合物を含んでいる⁹⁾。冠唇花は中国原産のシソ科植物で、雲南省では現地住民が、伝統的に民間薬として煎液を咳止め・アレルギー性喘息・腹痛などに用いている。

本研究において著者は、1) 吸入投与を用いた、藿香および冠唇花精油の持つ鎮静活性に関する検討、2) 藿香および冠唇花精油に含まれる鎮静活性を有する化合物の探索、3) 藿香および冠唇花由来化合物およびその類縁体の構造活性相関についての検討、を行ない、以下の新知見を得た。

- (1) 芳香療法において精神的ストレス緩和に頻用される藿香生薬類精油の吸入投与による効果について、行動薬理的評価を試みた。まずストレス緩和に多く用いられるシソ科植物 ラベンダー (*Lavandula angustifolia*) 精油を用いてマウス自発運動量の減少を指標とした評価系を構築した。次に、香料として伝統的に使用されるシソ科植

物 藿香(*Pogostemon cablin* BENTH.)精油の吸入投与による鎮静作用をマウスの自発運動量を指標に検討し、精油の鎮静活性およびその活性化化合物として patchouli alcohol と diacetone alcohol を見いだした。加えて両化合物が、caffeine 誘発興奮抑制作用および pentobarbital 誘発睡眠延長作用を有することを明らかにした。

- (2) 藿香精油と共通する patchouli alcohol を主成分として含み、中国で民間薬として腹痛治療に用いるシソ科植物 冠唇花(*Microtoena patchoulii*)の新たな利用方法を探るべく、この精油の吸入による鎮静作用をマウスの自発運動量を指標に検討した。Patchouli alcohol を主成分とする植物は少なく、藿香以外では冠唇花のみがこれを含む。行動薬理実験の結果、冠唇花精油に鎮静活性を見だし、1-octen-3-ol および terpinolene を活性化化合物として新たに見出した。また両化合物が、caffeine 誘発興奮抑制作用および pentobarbital 誘発睡眠延長作用を示したことから、中枢神経系を介した作用発現の可能性が示唆された。以上より、冠唇花は芳香療法に用いる創薬シーズとしての可能性が示された。
- (3) 特に顕著な活性を示した diacetone alcohol と terpinolene について、活性発現に重要な構造を明らかにするため構造活性相関実験を行った。その結果、diacetone alcohol の活性発現には2位に存在するケトン基が、terpinolene の活性発現には側鎖二重結合が、それぞれ重要な役割を担っている可能性が示された。また diacetone alcohol より炭素数が少なく、構造が直鎖状の化合物は diacetone alcohol の 100 分の 1 の投与量で同等の活性を有することが見いだされた。さらに活性発現経路解明のために、嗅上皮傷害マウスを用い嗅上皮を介して活性を発現している可能性を明らかにした。

これらの研究成果について以下に三章に分けて論述する。

第一章

シソ科薫香生薬類精油の吸入投与による鎮静活性の検討

以下、投稿中のため論文の要約を公表する

Effects of inhaled essential oil components of *Pogostemon cablin* leaves and their structure-activity relationships

補完代替医療(Complementary and Alternative Medicine:CAM)は、近年、先進国、特に欧米での利用頻度が増加している。そのひとつに、香りを吸入することにより、精油成分のもつ薬理作用を利用して、心身の疾病予防や治療を行なう芳香療法 (Aromatherapy) がある。

芳香療法で用いられる薫香生薬類の多くにエキスに防虫、殺菌作用があることが知られているが、香り、即ち揮発性成分の吸入による作用についての検討は充分なされていないとはいえ、活性化合物や作用の証明などにおいて未解明な点も多い。そこで、本研究ではマウスを用いた簡便な実験系で生薬芳香成分の鎮静作用とその活性成分の検討を行った。

前述の芳香療法に繁用される芳香性生薬類のうち、芳香療法材料や香料だけでなく漢方薬原料としても多用されるシソ科植物 藿香 (*Pogostemon cablin*) について、吸入投与による活性成分の詳細な検討を行ない、マウスの自発運動量に対する活性について検討した。藿香ヘキサンエキスの吸入による鎮静作用を、マウスの自発運動量を指標にして検討したところ、自発運動量の低下が観察された。活性を指標にエキスを分画したところ、patchouli alcohol および diacetone alcohol を含む画分に鎮静作用がみられた。これら 2 種の化合物をそれぞれ単独でマウスに吸入投与したところ、両化合物でマウス自発運動量の有意な低下が認められた。また嗅覚傷害マウスを用い、吸入投与により鎮静作用

のみられた化合物群の作用発現には鼻腔からの化合物吸収が主要な経路であることを確認した。

さらに、本研究で見いだした強い自発運動量抑制活性を持つ diacetone alcohol の活性に寄与する構造について検討した。直鎖状構造を有する diacetone alcohol に類似する化合物の自発運動量抑制活性には、構造中のケトン基および主鎖の炭素数が重要であることを見いだした。本実験では、吸入投与により自発運動量抑制活性を発現する化合物の、活性に影響する構造の一部が明らかになったことは、今後自発運動量抑制活性を有する化合物を探索する重要な手掛かりとなりうると期待される。

非侵襲的な香気成分の吸入投与により、自発運動量抑制作用という中枢神経抑制活性を得られることは、副作用や傷害に対しデリケートな要因を多分に有する、老人性の睡眠障害に対する睡眠補助剤や幼児の ADHD（注意欠陥多動障害）などへの対処法として応用することが期待される。

本実験で、鎮静などを期待し古来より多用される植物精油から自発運動量抑制活性を持つ化合物を得、それらの活性に重要な構造を見いだした。本研究は、睡眠障害や ADHD の安全性の高い効果的な対処法を開発するための有用な知見を与えると考えられる。

第二章

シソ科植物冠唇花(*Microtoena patchoulii*)精油の吸入投与による 鎮静活性および活性化合物の探索

1章において、吸入投与を用いた検討を行い、芳香療法に多用され、香袋構成生薬であり香料として伝統的に使用されるシソ科植物 藿香の持つ鎮静活性に関する、マウス自発運動量抑制効果を見いだした。

藿香が主成分として含有する patchouli alcohol を含む植物は少なく、シソ科植物冠唇花 (*Microtoena patchoulii*) 以外には報告されていない⁹⁾。冠唇花は中国原産のシソ科植物で、雲南省では現地住民が、伝統的に民間薬として煎液を咳止め・アレルギー性喘息・腹痛などの治療に用いる薬用植物である。

著者は、京都大学薬学部附属薬用植物園にて、挿し木によるクローンにより遺伝子的ばらつきの少ない植物群を作成し、その新鮮葉から水蒸気蒸留にて水蒸気蒸留画分を抽出し、GC-MSによる成分の精査を行ったのち使用した。冠唇花(*Microtoena patchoulii*)の新たな利用方法を探るべく、水蒸気蒸留画分の吸入による鎮静作用をマウスの自発運動量を指標に検討した。

実験結果

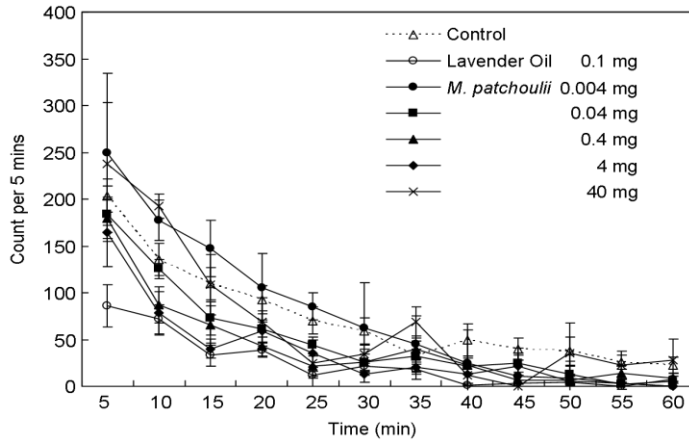
1 節 冠唇花精油の自発運動量抑制活性

冠唇花新鮮葉蒸留画分のマウス自発運動量への影響

0.0004 ~ 40 mg/cage の冠唇花新鮮葉蒸留画分を用いてアッセイを行った。その結果、0.004 ~ 4 mg/cage 投与群で、投与後 20 分から抑制が観察された。特に 4 mg/cage 投与群で、投与後 20 分以降の自発運動量は、control 投与群の 5 分の 1 以下に低下し、35 分以降の運動量がほぼ 0 となる強い抑制が観察された。一方、40 mg/cage 投与群で有意な活性は観察されなかった(Fig. 11-a)。また 60 分間の AUC は、0.04 ~ 4 mg/cage 投与群で用量依存的に増大し、0.4 および 4 mg/cage 投与群で有意差が認められた (Fig. 11-b、 $p < 0.01$)

Fig. 11

a



b

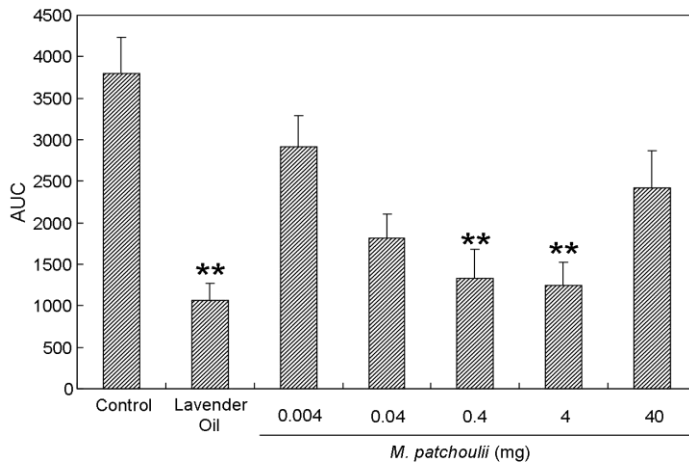


Fig. 11. Locomotor activity transition (a) and total spontaneous motor activity (b) of mice treated with *M. patchoulii* oil (0.004, 0.04, 0.4, 4, or 40 mg/cage). Data are shown as the mean values \pm SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

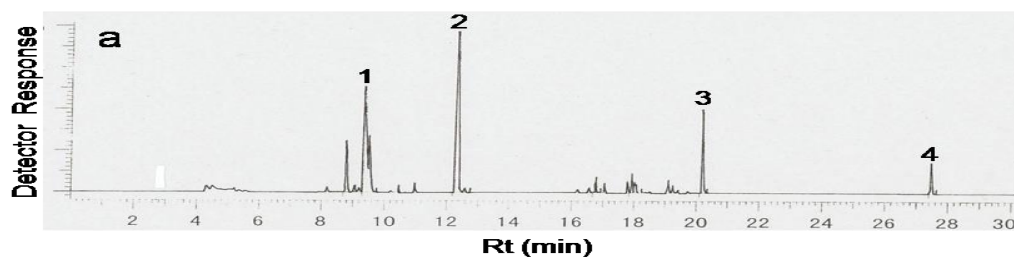
2 節：冠唇花精油の自発運動量抑制活性成分の探索

冠唇花新鮮葉蒸留画分の分画

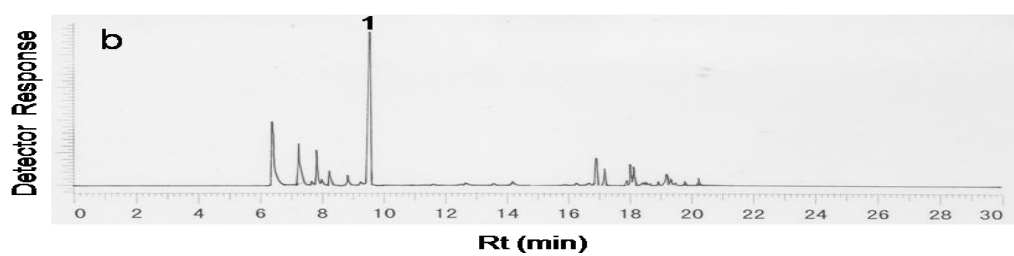
冠唇花新鮮葉蒸留画分を分画し、fr.1、fr.2 および fr.3 を得た。各画分の SPME-GC-MS 分析により、主たる揮発性成分として、fr. 1 には主に terpinolene が、fr. 2 には patchouli alcohol と methyl salicylate が、fr. 3 には 1-octen-3-ol が含まれていることが明らかとなった (Fig. 12 and 13)。

Fig. 12

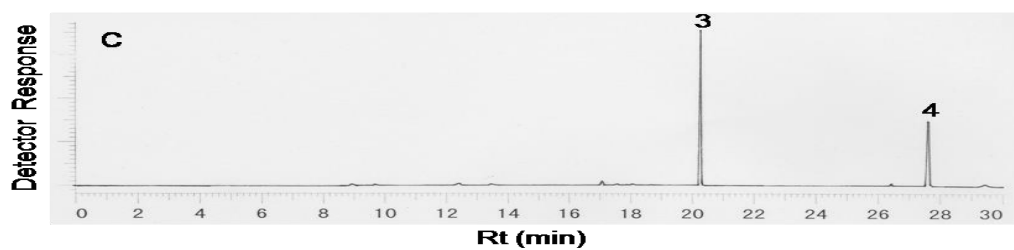
a.



b.



c.



d.

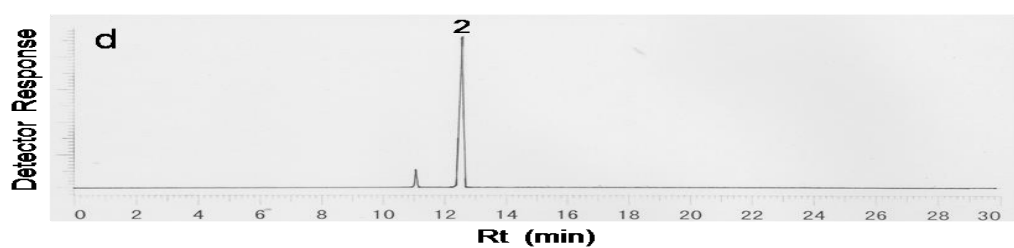


Fig. 12. Total ion chromatograms of SPME-GC-MS analysis of the whole oil of *M. patchoulii* and its fractions 1, 2, and 3 of *M. patchouli* oil (a, b, c, and d, respectively). Numbered peaks are as follows: 1. terpinolene; 2. 1-octen-3-ol; 3. methyl salicylate; 4. patchouli alcohol. Chromatograms show the detection of $m/z = 93$. Rt, retention time.

Fig. 13

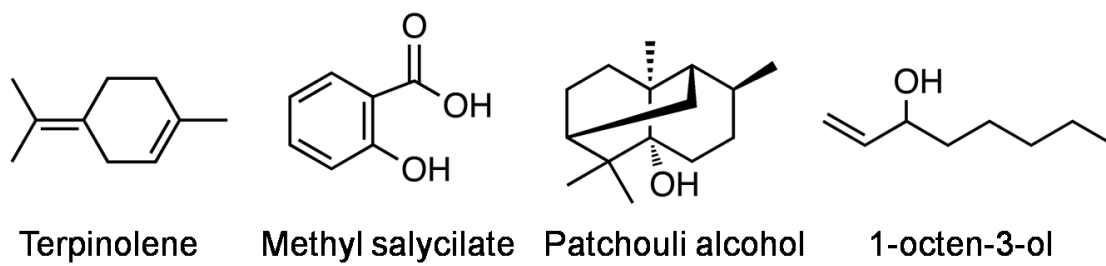


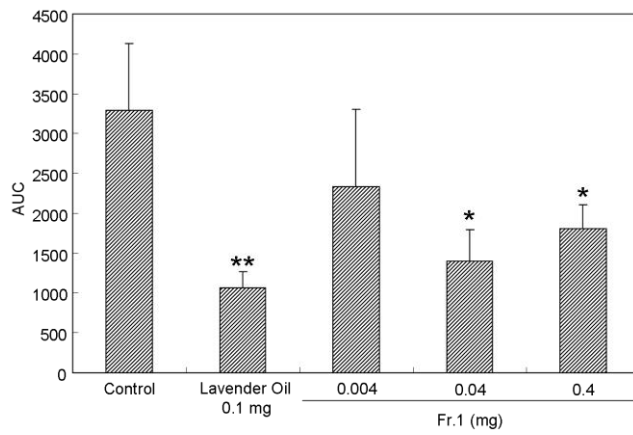
Fig. 13. Chemical structures of compounds from *M.patchoulii* oil.

冠唇花新鮮葉蒸留画分各分画の自発運動抑制活性

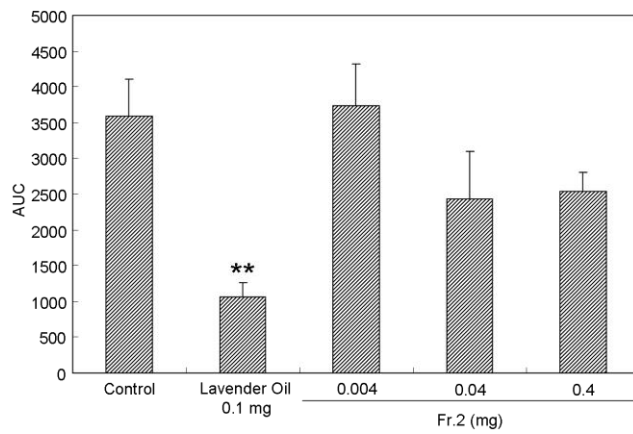
Fr. 1 投与群では、投与後 30 分以降の自発運動量はほぼ 0 になった。Fr.2 投与群では自発運動量抑制が観察されなかった。Fr. 3 投与群では、自発運動量抑制が観察された (Fig. 14-a)。また、60 分間の AUC は、fr. 1 および fr. 3 投与群で、有意に減少し、それぞれコントロール群の約 49、46%の総運動量であった (Fig. 14-b、 $p<0.05$)。

Fig. 14

a



b



c

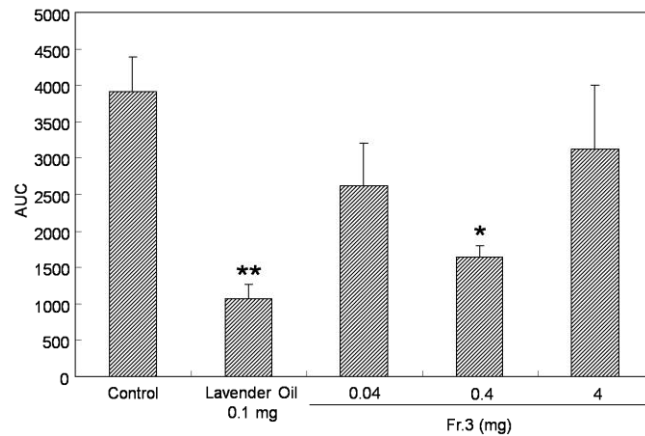


Fig. 14. Total spontaneous motor activity of mice treated with fraction 1, 2, or 3 of *M.patchouli* oil (a, b, and c, respectively). Data are shown as the mean values \pm SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Terpinolene の自発運動量活性

Fr. 1 の主揮発性成分である terpinolene の単独投与を行った。0.04 mg/cage、0.4 mg/cage および 4 mg/cage 投与群で、投与後 10 分以降、自発運動量抑制が観察された (Fig. 15-a)。60 分間の AUC は、0.04、0.4 mg/cage および 4 mg/cage 投与群で、有意に減少しており、それぞれコントロール群の約 45、43 および 52%の総運動量であった (Fig. 15-b、 $p < 0.05$, $p < 0.01$)。

Fig. 15

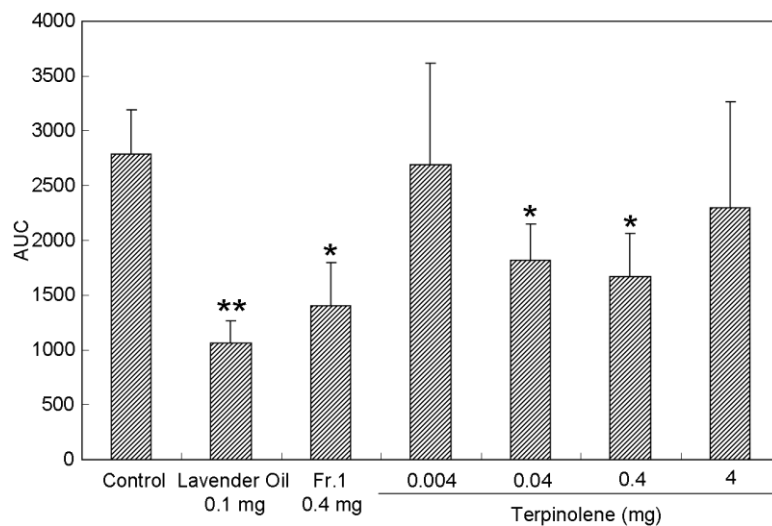


Fig. 15. Total spontaneous motor activity of mice treated with terpinolene (0.004, 0.04, 0.4, or 4 mg/cage). Data are shown as the mean values \pm SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

1-octen-3-ol の自発運動量活性

fr. 3 の主揮発性成分である 1-octen-3-ol 単独投与を行った。0.04 および 0.4 mg/cage 投与群で投与後 10 分以降に自発運動量抑制が観察された (Fig. 16-a)。60 分間の AUC は 0.04 および 0.4 mg/cage 投与群で有意に減少しており、0.04 mg/cage 投与群ではコントロール群の約 50%で、冠唇花新鮮葉蒸留画分 0.4 mg/cage 投与群とほぼ同程度の作用であった (Fig. 16-b、 $p < 0.05$)

Fig. 16

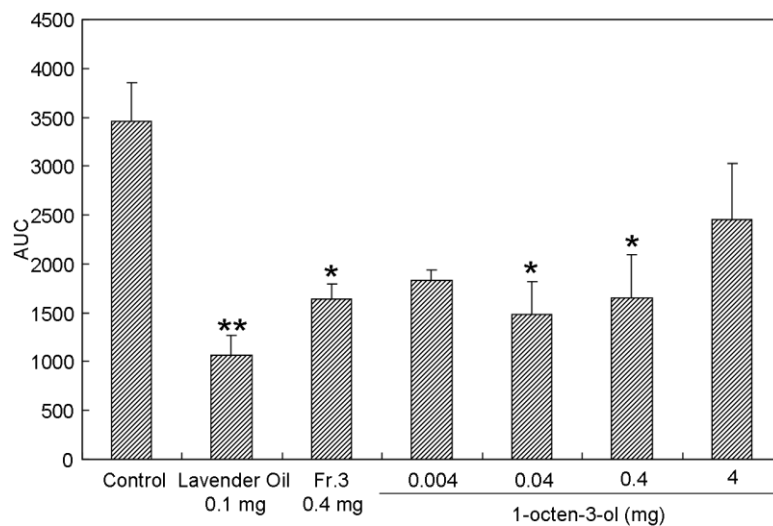


Fig. 16. Total spontaneous motor activity (b) of mice treated with 1-octen-3-ol (0.004, 0.04, 0.4, or 4 mg/cage). Data are shown as the mean values \pm SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3節：匂い応答における化合物間の相互作用

Fr. 2 の自発運動量活性消失について

Patchouli alcohol 単独投与は有意な運動量抑制作用を有するが、patchouli alcohol および methyl salicylate の混合物である fr.2 には有意な作用が見られなかった。この理由を考察するために、0.4 mg/cage methyl salicylate を単独でマウスに投与したが、有意な活性は観察されなかった (Fig. 14-b)。Fr.2 に含まれる patchouli alcohol と methyl salicylate の含有質量比率を GC/MS 分析の TIC 面積比をもとに算出すると、約 19:1 であった。そこで、この比率で両化合物を混合し、その 0.4 mg/cage をマウスに投与した。0.4 mg/cage 投与群の 60 分間の AUC は、fr. 2 と同程度であり、有意な活性は認められなかった (Fig. 17)。

Fig. 17

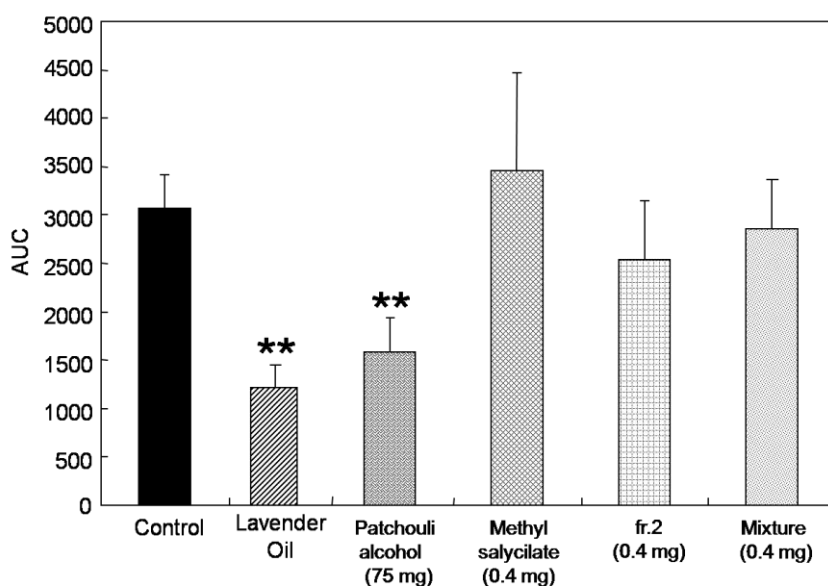


Fig. 17. Total spontaneous motor activity of mice treated with patchouli alcohol (75 μ g/cage), methyl salicylate (0.4 mg/cage), fr.2 (0.4 mg/cage), or a mixture (0.4 mg/cage; patchouli alcohol:methyl salicylate=19:1). Data are shown as the mean values \pm SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

考察

本章で、藿香と共通する主成分を有する同じシソ科植物である冠唇花に着目し、その水蒸気蒸留画分についても検討を行った。冠唇花は、原産地である中国南部では、主に葉の煎液を民間薬として用いるが、その新鮮葉は、特異な爽やかな芳香を有している。また藿香と同じ主成分の patchouli alcohol を含む、唯一の植物であるが、その薬理活性など作用に関する報告はなく、著者らのグループがその精油成分の詳細についての分析を報告しているのみである⁹⁾。また藿香と同じ主成分を含むことから、冠唇花精油を香料原料や芳香療法などに新たに利用することが考えられる。本植物は藿香と異なり、多年草で比較的栽培が容易であるという利点もある。

冠唇花新鮮葉水蒸気蒸留画分は、吸入投与により藿香ヘキサンエキス同様のマウス自発運動量抑制活性を示した。また、0.4 および 4 mg/cage という比較的 low 容量において、有意な自発運動量抑制活性が見いだされ、4 mg/cage 投与群において、最も強い抑制効果をしめした。冠唇花新鮮葉水蒸気蒸留画分も藿香ヘキサンエキス同等の作用を示したことから、冠唇花の芳香療法材料としての新たな利用方法が期待される。

続いて、マウス自発運動量抑制作用を見いだした冠唇花水蒸気蒸留画分の分画投与から、terpinolene および 1-octen-3-ol を活性化化合物として見出した。さらに両化合物が caffeine により惹起された興奮に対する自発運動量抑制活性および pentobarbital 誘発睡眠時間延長作用を発現した。このことは、冠唇花水蒸気蒸留画分由来成分が中枢神経系への作用を有している可能性を示唆している。

冠唇花新鮮葉蒸留画分に含まれる terpinolene は、ライム様の芳香を持ち、柑橘類に多く含まれ、抗酸化作用を持つことが知られている¹⁷⁾。本化合物と(R)-(+)-limonene は、いずれもシクロヘキセン環を持つ単環性モノテルペンであり、構造の類似性が高い。limonene を主成分とする lemon oil の吸入投与は、不安症モデルマウスで抗不安作用を示す事が報告されている¹⁸⁾。嗅細胞は、1つの匂い分子を特異的に認識するのではなく、

匂い分子の構造の一部を識別していることが電気生理学的研究により明らかになっている¹⁹⁾ことを考え合わせると、limonene と terpinolene に共通する構造である 1-methylcyclohexene 構造が、鎮静活性に関与している可能性が考えられる。

1-octen-3-ol は、マツタケオールとも呼ばれ、キノコ類の香り成分中や多くのシソ科植物精油中に見出される低分子化合物である。マッシュルーム様の芳香を持ち、真菌類の発芽抑制作用²⁰⁾や、昆虫誘引作用^{21) 22)}を持つことが報告されており、Bovine Odorant-binding Protein (bOBP)のリガンドであることも報告されている²³⁾。その構造は、8つの炭素から構成される主鎖を持つ直鎖状構造を有しており、linalool と類似している。linalool については、吸入投与によるマウスの自発運動量抑制作用が報告されている²⁴⁾。Linalool は、3位および7位の炭素にメチル基を有し6位と7位の炭素間に二重結合を有する点が 1-octen-3-ol の構造と異なるが、両化合物とも自発運動抑制活性があることから、両化合物に共通する骨格、すなわち 1-octen-3-ol の構造そのもの、あるいはその部分構造が活性発現に必要な構造である可能性が示唆された。

Patchouli alcohol 単独投与では自発運動抑制作用が観察されたが、patchouli alcohol と methyl salicylate の両方を含む画分である、冠唇花新鮮葉蒸留画分 fr.2 では自発運動抑制作用が確認されなかった。この画分のヘッドスペースについての SPME-GC-MS 分析では、methyl salicylate のピークは patchouli alcohol の約 1.57 倍の面積で示された (data not shown)。Patchouli alcohol および methyl salicylate の 20°Cにおける蒸気圧は、それぞれ 0.001 mmHg 未満および 1.4 mmHg である^{25) 26)}。よって、これら 2種の化合物を 20°Cの室温で拡散させた場合、空気中へと揮散する化合物の割合は蒸気圧の高い methyl salicylate がより大きい。このことは、fr.2 に methyl salicylate の約 19 倍の質量の patchouli alcohol が存在しているにも関わらず、この画分を自然拡散させたヘッドスペースに patchouli alcohol を上回る methyl salicylate が存在したことの理由と言える。Methyl salicylate は、消炎鎮痛作用を目的に塗布薬として広く用いられ、浮腫抑制作用、血管透過性抑制作用などを通じた炎症抑制作用及び鎮痛作用を局所的にあらわすことがわかっており²⁷⁾、テレピン油との混合物の吸入に鎮咳作用のあることが米国特許に示されている²⁸⁾が、吸入によるマ

ウス自発運動量の変化についての報告はない。本報告で methyl salicylate の吸入投与は、マウス自発運動量抑制作用を持たないことが示された。冠唇花新鮮葉蒸留画分 fr.2 に自発運動量抑制作用が見いだされなかった理由として、水槽内の空気中に大量に存在する自発運動抑制作用を持たない methyl salicylate が patchouli alcohol の持つ自発運動抑制作用に影響を与えたことが考えられ、これは patchouli alcohol および methyl salicylate の混合物投与の実験により裏づけられる。

本研究により、冠唇花新鮮葉水蒸気蒸留画分が、吸入投与により、マウス自発運動量抑制作用を示すことが明らかとなった。また、冠唇花水蒸気蒸留画分より terpinolene および 1-octen-3-ol を活性化化合物として見出した。さらに、匂い応答において化合物間の相互作用が存在することの一端を明らかにした。

第三章

シソ科植物由来芳香成分の鎮静活性発現経路の解明

および構造活性相関についての研究

1章および2章では、吸入投与を用いた検討を行い、香袋構成生薬である藿香および伝統的に民間薬として用いられる冠唇花の水蒸気蒸留画分にマウス自発運動量抑制効果を見いだした。そして、これら芳香性生薬類から見いだした化合物の中で、特に顕著な活性を示した diacetone alcohol と terpinolene について、鎮静活性発現経路の解明および構造活性相関についての研究を行った。

まず、最初に吸入投与により効果のあった化合物の作用経路を解明する目的で、硫酸亜鉛により嗅上皮を傷害させたマウスを作成し、鎮静効果の見られた化合物群を用いた検討を行った。

続いて、活性発現に重要な構造を明らかにし、分子構造と活性との関係についての探索に、役立つ目的として構造活性相関実験を行った。

分子構造が類似した匂い分子を体系的に調査した研究から、匂い受容体は匂い分子の炭素数と官能基を認識することが明らかにされており^{29) 30)}、ウサギを用いた実験では直鎖状化合物に存在するケトン基が嗅球背側領域のニューロンの活性化に重要な役割を担っている事³¹⁾が報告されている。Diacetone alcohol は直鎖状構造を持ち、また2位にケトン基を有していることから嗅覚ニューロンを活性化することが予想され、その活性発現には中枢神経系の関与が予想される。

嗅覚受容体を強制発現させた HEK293 細胞における電気生理学的検討における構造活性相関実験において、直鎖状化合物に存在する官能基が嗅覚受容体の活性化に重要な役割を担っている事が報告されており、特に水酸基やアルデヒド基が活性化の増大に重要な役割を担っていることが示唆されている³²⁾。Diacetone alcohol は直鎖状構造を持ち、また4位に水酸基を有していることから嗅覚受容体を活性化する作用を有していることが考

えられる。

一方、イヌを用いた検討では、官能基が同じ直鎖状化合物間で主鎖が短くなると嗅覚への刺激が増し、官能基により結果は異なるが、炭素数が3もしくは4個の化合物が最も強い嗅覚刺激を有することが示されている³³⁾。Diacetone alcoholは5つの炭素から成る主鎖を有しているが、さらに炭素数が減少することにより嗅覚への刺激が増すことが予想される。

冠唇花新鮮葉蒸留画分より見出したマウス自発運動量抑制活性を有する *terpinolene* は、ライム様の芳香を持ち、柑橘類に多く含まれ、抗酸化作用を持つことが知られている³⁴⁾。本化合物と(+)-(4*R*)-Limoneneは、いずれもシクロヘキセン環を持つ単環性モノテルペンであり、構造の類似性が高い。(+)-(4*R*)-Limoneneを主成分とする lemon oilの吸入投与は、不安症モデルマウスで抗不安作用を示す事が報告されている¹⁸⁾。嗅細胞は、1つの匂い分子を特異的に認識するのではなく、匂い分子の構造の一部を識別していることが電気生理学的研究により明らかになっている³⁵⁾ことを考え合わせると、limoneneと *terpinolene* に共通する構造である 1-methylcyclohexene 構造が、鎮静活性に関与している可能性が考えられる。この可能性を裏付けるため、*terpinolene* の類縁体の活性について検討した。

実験結果

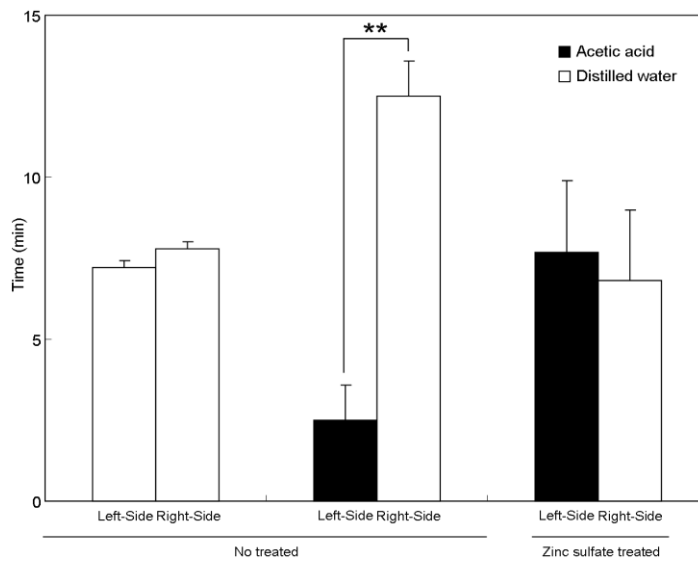
1 節 : 嗅上皮傷害マウスでの香気成分の作用

嗅上皮傷害マウスにおける terpinolene の活性

未処置のマウスでは、酢酸の存在する左側の滞在時間が有意に減少するが、硫酸亜鉛処置をおこなったマウスでは左右の領域の滞在時間に有意な差は認められなかった。このことにより、硫酸亜鉛処置により嗅上皮が傷害を受け、嗅覚が損傷していることがわかる (Fig. 18-a)。さらに、嗅上皮障害により、鎮静活性を有する terpinolene の作用は消失した (Fig. 18-b)。なお benzalacetone は既報にある化合物で、本実験の positive control として用いている³⁶⁾。

Fig. 18

a



b

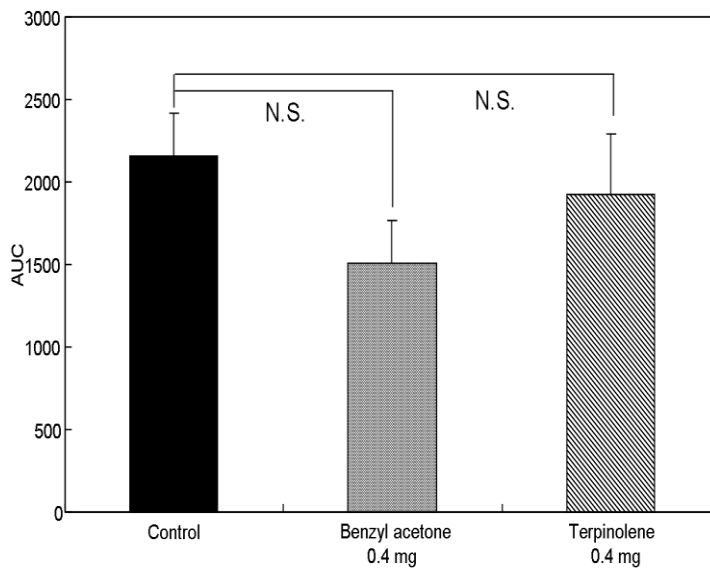


Fig. 18. (a) Evaluation of olfaction in zinc sulfate treated mice. On left-side in glass cage, acetic acid (filled squares) or distilled water (open squares) were placed. Time spent in each side was counted. Data are shown as the mean \pm SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated by the Student's *t*-test. * $P < 0.05$ vs. the control group. (b) Total spontaneous motor activity of benzyl acetone (0.4 mg/cage) and terpinolene (0.4 mg/cage) in zinc sulfate treated mice. Data are shown as the mean values \pm SEM of five mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. N.S.(not significant) $P > 0.05$.

嗅上皮傷害マウスにおける diacetone alcohol の活性

さらに、diacetone alcohol の嗅上皮障害マウスにおける作用について検討したところ、無処置マウスにおいて低濃度で発現していた顕著な活性が消失した (Fig. 19)。これにより、吸入により著明なマウス自発運動量抑制活性が観察された diacetone alcohol は、嗅上皮を介して作用を発現している可能性が示唆された。

Fig. 19

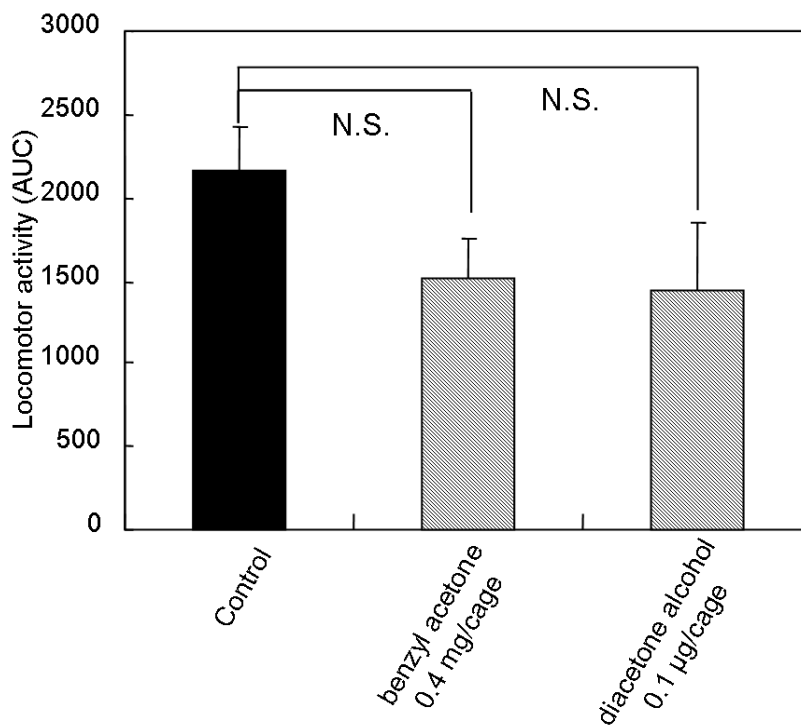


Fig. 19. Total spontaneous motor activity of 6 mice with dysfunction of olfactory epithelium treated with benzyl acetone or diacetone alcohol. Mice were treated with zinc sulfate to impair their olfactory epithelium. Data are shown as the mean values \pm SEM of five mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. N.S. not significant.

2節：麝香由来化合物についての構造活性相関研究

Diacetone alcohol の構造活性相関について

既報²⁹⁻³³⁾より、diacetone alcohol の2位に存在するケトン基が自発運動量抑制活性に影響を与えていること、直鎖状化合物に存在する水酸基やアルデヒド基が嗅覚受容体活性化の増大に重要な役割を担っていること、および炭素数が減少することにより嗅覚への刺激が増すことが、予想される。

以上の3点について、2位のケトン基が水素に置換した構造を有する 1,1-dimethyl-1-butanol、水酸基が水素に置換された構造を有する isobutyl methyl ketone および2つの4位のメチル基が水素に置換された構造を有する 4-hydroxy-2-butanone について検討を行った (Fig. 20a-b)。

Fig. 20

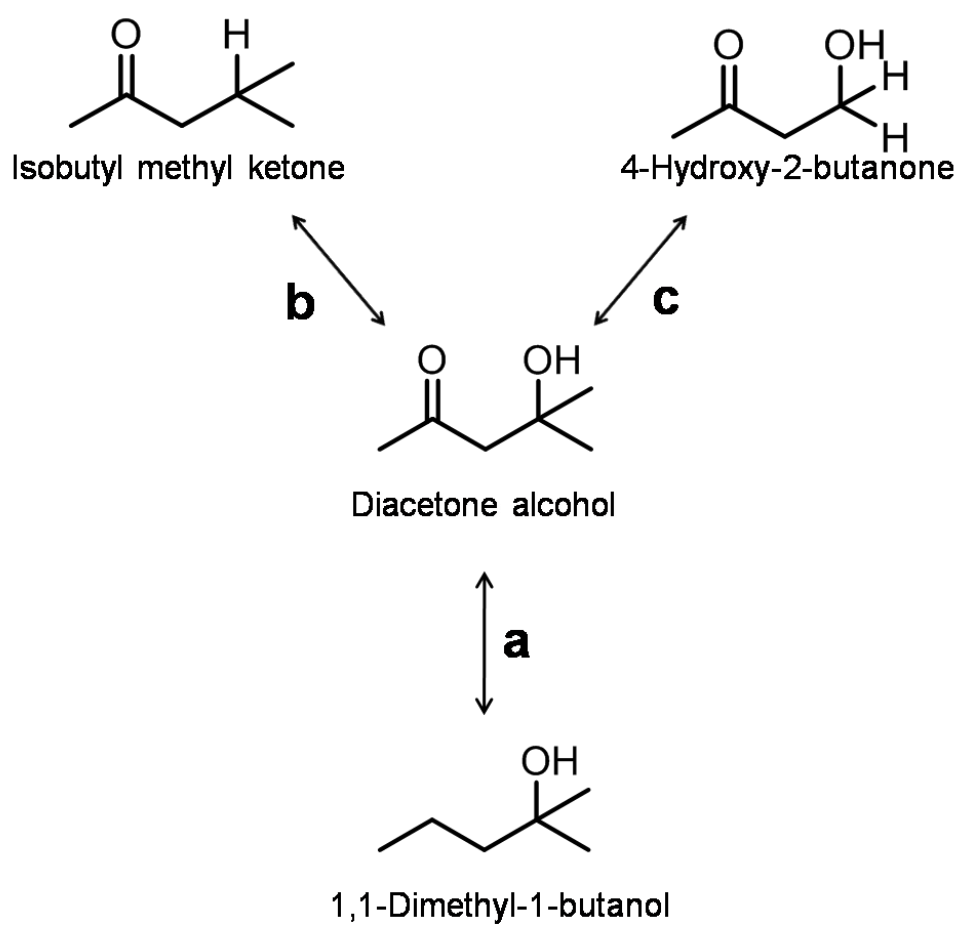


Fig. 20. Chemical structure of analogues of diacetone alcohol.

Diacetone alcohol の構造活性相関について (ケトン基の影響)

Diacetone alcohol の活性に、2 位のケトン基が関与するか否かを検討するために、diacetone alcohol のケトン基を水素に置換した構造を有する 1,1-Dimethyl-1-butanol について検討を行った (Fig. 20)。1,1-Dimethyl-1-butanol を単独投与したところ、0.01、0.1 および 1 μg 投与群のいずれにおいても有意な自発運動量抑制は観察されなかった (Fig. 21)。この結果より、diacetone alcohol の活性には、2 位のケトン基が重要であることが示唆された。

Fig. 21

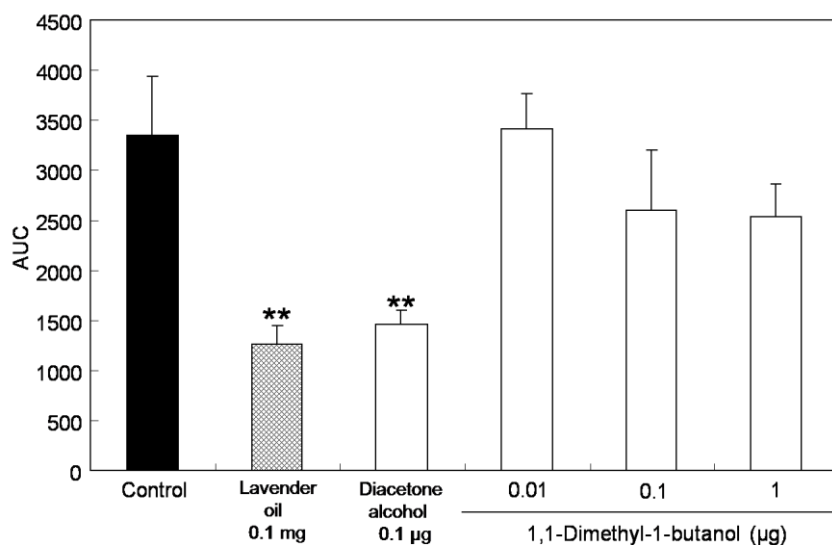


Fig. 21. Total spontaneous motor activity of mice treated with 1,1-dimethyl-1-butanol (0.01, 0.1 or 1 $\mu\text{g}/\text{cage}$). Data are shown as the mean values \pm SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. ** $P < 0.01$

Diacetone alcohol の構造活性相関について (水酸基の影響)

Diacetone alcohol の活性に、4位の水酸基が関与するか否かを検討するために、diacetone alcohol から水酸基が水素に置換された構造を有する Isobutyl methyl ketone について検討を行った (Fig. 20)。Isobutyl methyl ketone を単独投与したところ、diacetone alcohol が有意な活性を示した 0.1 μg 投与群において活性は観察されず、より高濃度である 1 および 10 μg 投与群においてのみ有意な自発運動量抑制が観察された (Fig. 22, * $p < 0.05$)。この結果より、水酸基が消失することで diacetone alcohol と比較して活性が低下したと考えられ、4位の水酸基は diacetone alcohol が低用量で発現する活性の一端を担っている可能性が示唆された。

Fig. 22

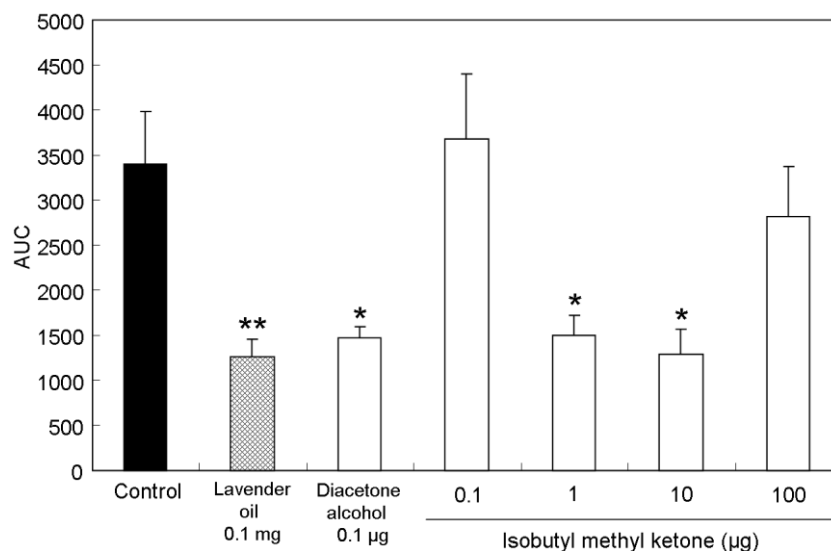


Fig. 22. Total spontaneous motor activity of mice treated with isobutyl methyl ketone (0.1, 1, 10 or 100 $\mu\text{g}/\text{cage}$). Data are shown as the mean values \pm SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. * $P < 0.01$

Diacetone alcohol の構造活性相関について (炭素数の影響)

炭素数の違いが、マウス自発運動量抑制作用にどのように影響するのかを考察するため、diacetone alcohol から2つの4位のメチル基が水素に置換された構造を有する4-hydroxy-2-butanone について検討を行った (Fig. 20)。4-Hydroxy-2-butanone を単独投与したところ、diacetone alcohol が有意な活性を示した0.1 μg 投与群において活性は観察されず、より低濃度である0.001 および0.01 μg 投与群においてのみ有意な自発運動量抑制が観察された (Fig. 23, * $p < 0.05$)。この結果より、炭素数が減少し、直鎖構造になることで活性が、100分の1の容量でも活性を有するほど顕著に上昇することが示唆された。

Fig. 23

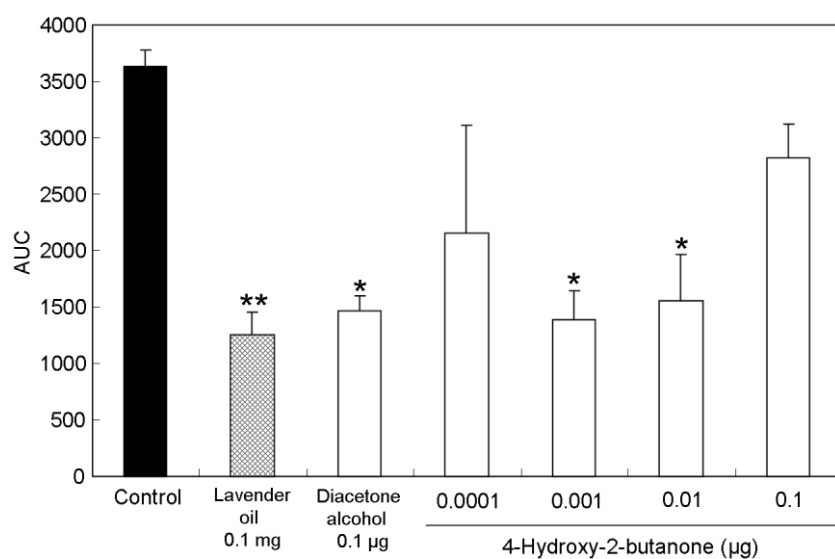


Fig. 23. Total spontaneous motor activity of mice treated with 4-hydroxy-2-butanone (0.0001, 0.001, 0.01 or 0.1 $\mu\text{g}/\text{cage}$). Data are shown as the mean values \pm SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. * $P < 0.01$

Diacetone alcohol の構造活性相関について (水槽中蒸発量の検討)

Diacetone alcohol、1,1-dimethyl-1-butanol、isobutyl methyl ketone および 4-hydroxy-2-butanone (4 mg/cage) をろ紙に染みこませ、1 時間あたりのガラスケージ中における蒸発量について検討した結果、isobutyl methyl ketone が最も蒸発量が多く 2.22 mg、4-hydroxy-2-butanone が最も少なく 1.24 mg という結果となった (Fig. 24)。

Fig. 24

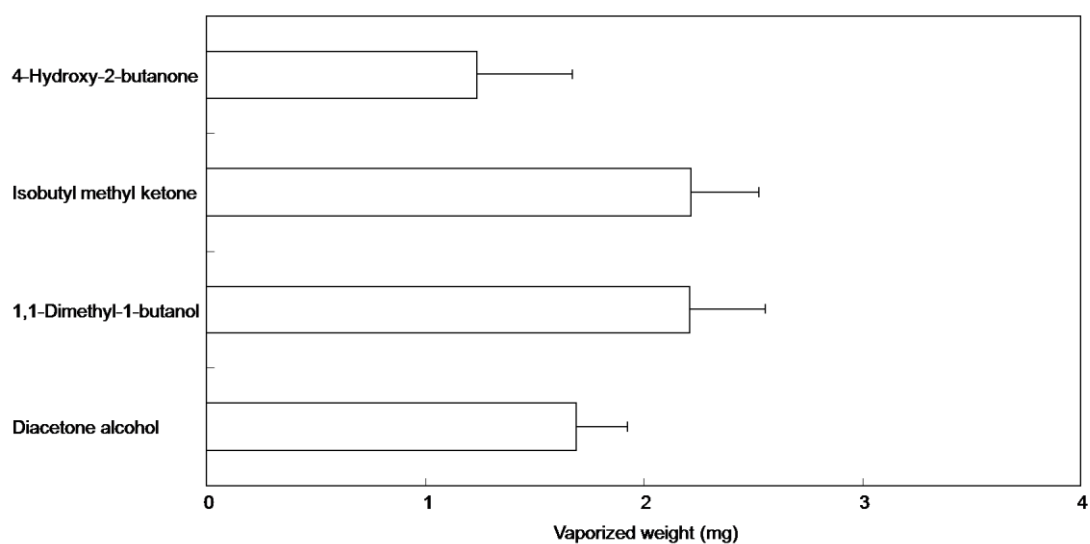


Fig. 24. Evaporated weight of diacetone alcohol, 1,1-dimethyl-1-butanol, isobutyl methyl ketone and 4-hydroxy-2-butanone (4 mg/cage) administration in glass cage. Data are shown as the mean values \pm SEM of 3 trials.

Diacetone alcohol の構造活性相関について (脂溶性と活性との関係)

Diacetone alcohol、1,1-dimethyl-1-butanol、isobutyl methyl ketone および 4-hydroxy-2-butanone のそれぞれについて脂溶性を n-octanol/水の分配係数 (LogP) を指標にして比較したところ³⁷⁾、それぞれ 0.22、1.50、1.54 および -0.47 であった (Table. 1)。

Table. 1.

Logarithm of n-octanol/water partition coefficient (LogP) of diacetone alcohol, 1,1-dimethyl-1-butanol, isobutyl methyl ketone and 4-hydroxy-2-butanone calculated by Marvin Sketch.®.

	LogP
Diacetone alcohol	0.22
1,1-Dimethyl-1-butanol	1.50
Isobutyl methyl ketone	1.54
4-Hydroxy-2-butanone	-0.47

3節：冠唇花由来化合物についての構造活性相関研究

Terpinolene の構造活性相関について

既報^{18,35)}より、terpinolene、limonene、(+)-(*R*)- および(+)-(*S*)-carvone に共通する構造である 1-methylcyclohexene 構造が、鎮静活性に関与し中枢神経抑制作用に強く影響していることが予想される。そこで、terpinolene の類似化合物の活性について検討した (Fig. 25)。

Fig. 25

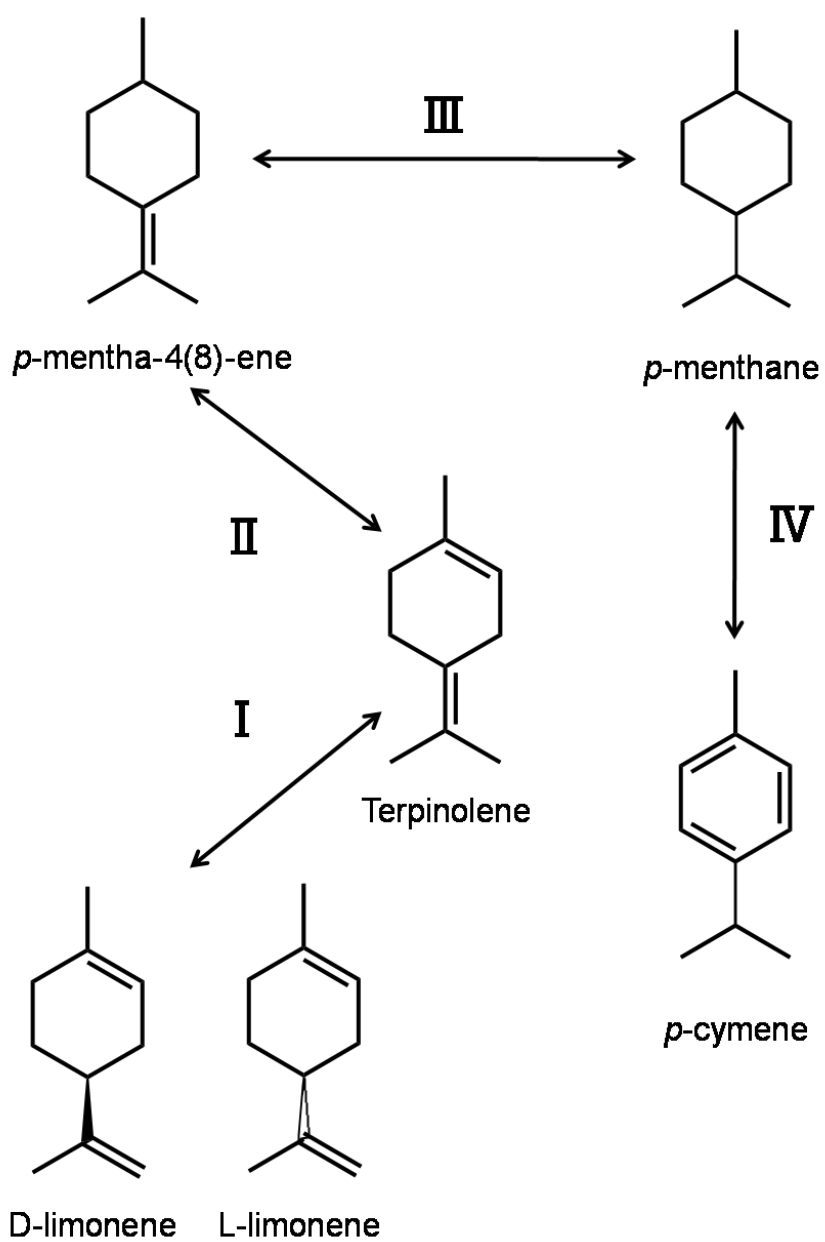


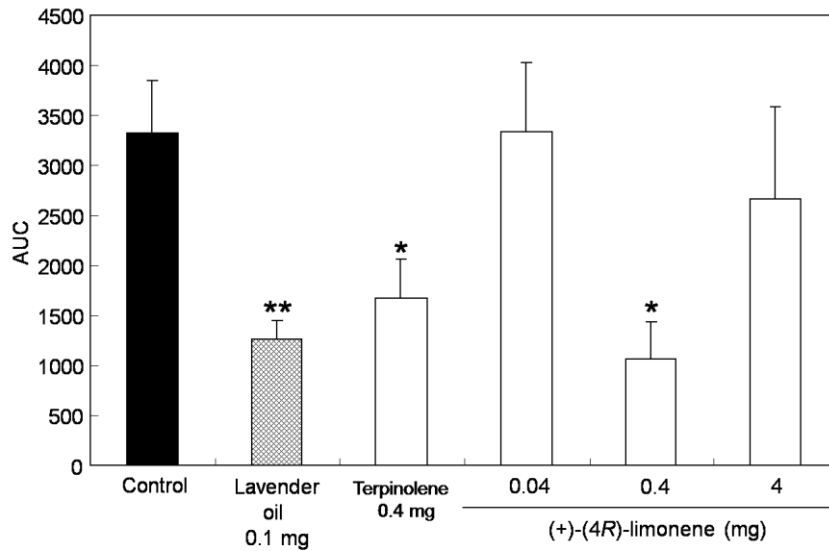
Fig. 25. Chemical structure of analogues of terpinolene.

Terpinolene の構造活性相関について（側鎖二重結合の位置の影響）

まず、terpinolene とは、側鎖二重結合の位置のみが異なる類縁体である(+)-(4R)-および(-)-(4S)-limonene の活性について検討した (Fig. 25)。(+)-(4R)-および(-)-(4S)-limonene のみを投与したところ、0.04 および 0.4 mg/cage 投与群で、60 分間の AUC は、コントロール群と比較して有意に減少しており、特に、(+)-(4R)-limonene は 0.4 mg/cage 投与群で、terpinolene および(-)-(4S)-limonene よりも強い活性を有する傾向が認められた (Fig. 25, * $p < 0.05$)。0.04 および 0.4 mg/cage 投与群は、terpinolene 投与時に有意な活性が認められた容量であった。この結果により、側鎖二重結合の位置は活性への影響は少ないと考えられ、terpinolene、(+)-(4R)-および(-)-(4S)-limonene が有する他の共通する構造が活性に影響している可能性が示唆された。

Fig. 25

a.



b.

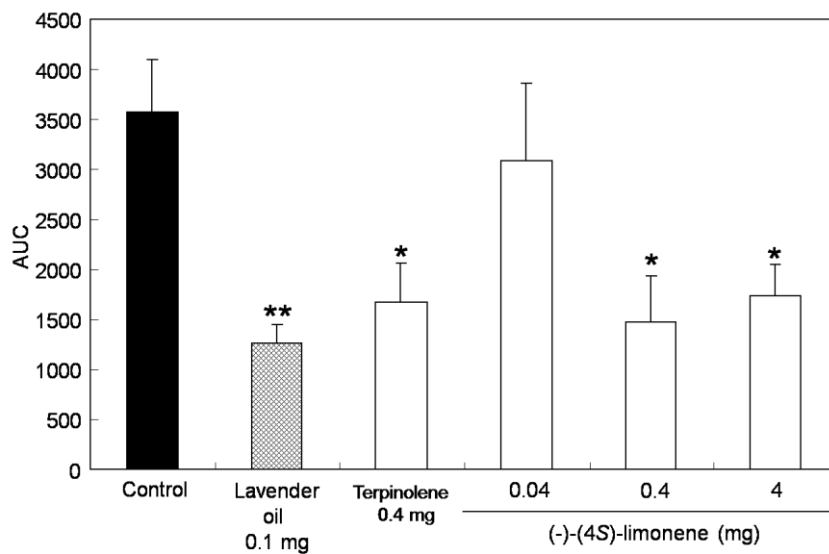


Fig. 25. Total spontaneous motor activity of mice treated with (+)-(4R)- and (-)-(4S)-limonene (a and b, 0.04, 0.4 or 4 mg/cage). Data are shown as the mean values \pm SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. * $P < 0.05$.

Terpinolene の構造活性相関について (シクロヘキセン環の二重結合の影響)

Terpinolene、(+)-(4*R*)-および(-)-(4*S*)-limonene に共通するシクロヘキセン環の二重結合が活性に影響している可能性が考えられる。この可能性について検討するため、terpinolene の持つシクロヘキセン環に存在する二重結合がない類縁体である、*p*-mentha-4(8)-ene を合成し、その活性について検討した (Fig. 25)。*p*-Mentha-4(8)-ene (0.04、0.4 および 4 mg/cage) のみを投与したところ、0.04 および 0.4 mg/cage 投与群で、60 分間の AUC は、コントロール群と比較して有意に減少しており、特に 0.4 mg/cage 投与群では、同量の terpinolene と比較してより強い活性が観察された (Fig. 26, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。この結果より、terpinolene の活性発現には、シクロヘキセン環の二重結合の影響は少ないと考えられ、terpinolene、(+)-(4*R*)-, (-)-(4*S*)-limonene および *p*-mentha-4(8)-ene が有する他の共通する構造が活性発現に重要である可能性が示唆された。

Fig. 26

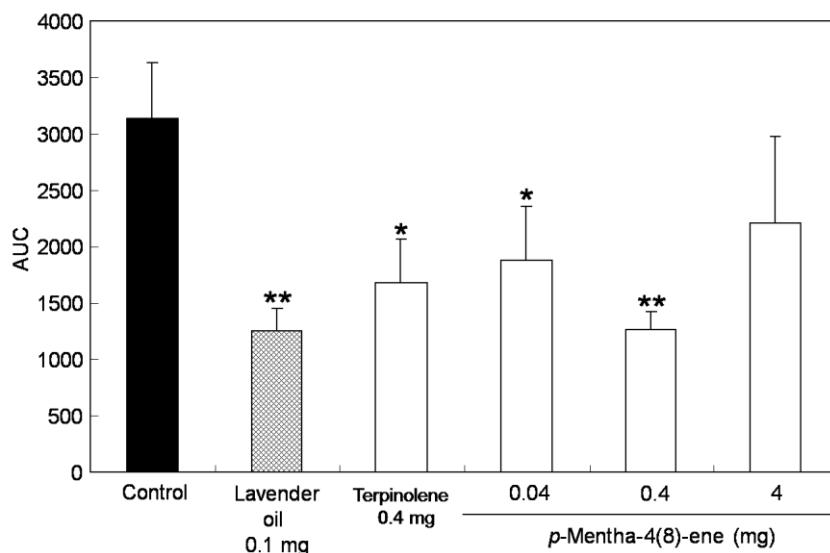


Fig. 26. Total spontaneous motor activity of mice treated with *p*-mentha-4(8)-ene (0.04, 0.4 or 4 mg/cage). Data are shown as the mean values \pm SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Terpinolene の構造活性相関について (シクロヘキセン環の側鎖二重結合の影響)

Terpinolene、(+)-(4*R*)-, (-)-(4*S*)-limonene および *p*-mentha-4(8)-ene に共通する側鎖二重結合が活性に影響している可能性が考えられる。この可能性について検討するため、活性を有する *p*-mentha-4(8)-ene とは、側鎖二重結合を持たないことのみが異なる類縁体である *p*-menthane の活性について検討を行った (Fig. 25)。*p*-Menthane (0.04、0.4 および 4 mg/cage) のみを投与したところ、いずれの投与群においても、60 分間の AUC は、コントロール群と比較して有意な差異は観察されず (Fig. 27)、運動量の経時変化もコントロール群と似た傾向が観察された (Data not shown)。この結果より、terpinolene、(+)-(4*R*)-, (-)-(4*S*)-limonene および *p*-mentha-4(8)-ene の持つ自発運動量抑制活性には、側鎖二重結合の影響が大きい可能性が明らかとなった。

Fig. 27

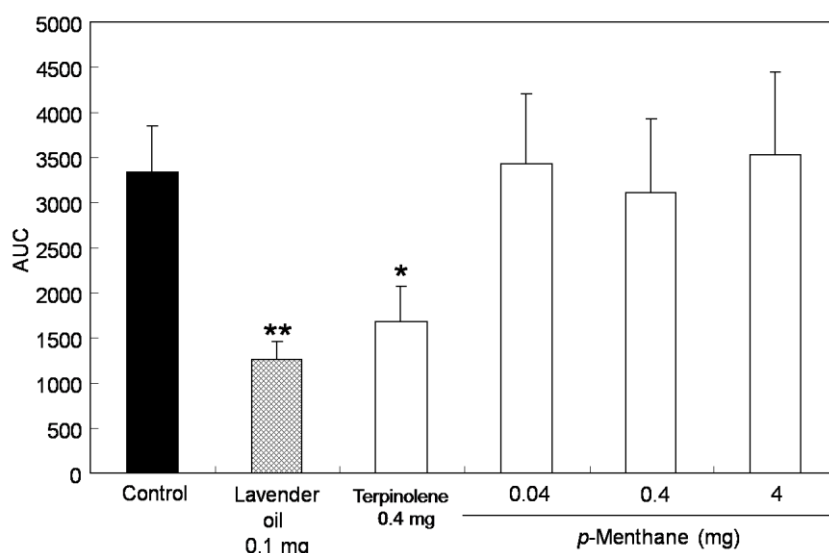


Fig. 27. Total spontaneous motor activity of mice treated with *p*-menthane (0.04, 0.4 or 4 mg/cage). Data are shown as the mean values \pm SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. * $P < 0.05$.

Terpinolene の構造活性相関について (環構造の影響)

芳香環の有無が活性に与える影響について検討するため、*p*-menthane と、芳香環を有することが異なる *p*-cymene について検討した (Fig. 25)。*p*-Cymene (0.0004、0.004、0.04 および 0.4 mg/cage) を単独投与したところ、terpinolene の有効投与量より低濃度である 0.004 および 0.04 mg/cage 投与群において有意な自発運動量抑制が観察された (Fig. 28)。この結果より、環構造が芳香環であると 100 分の 1 の容量で活性を有することが示された。

Fig. 28

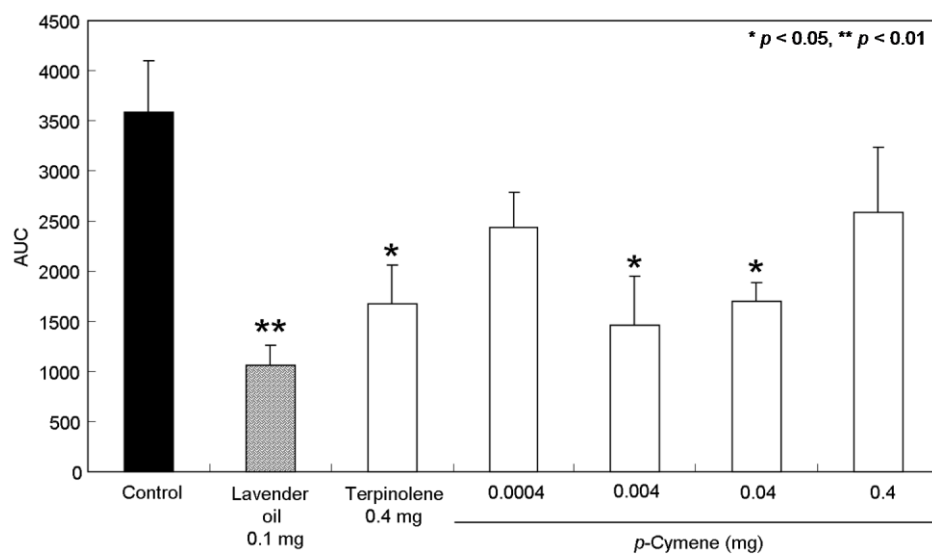


Fig. 28. Total spontaneous motor activity of mice treated with *p*-cymene (0.0004, 0.004, 0.04 or 0.4 mg/cage). Data are shown as the mean values ± SEM of six mice. Statistical differences vs. the control group were calculated using ANOVA, followed by Dunnett's test. * $P < 0.05$.

Terpinolene の構造活性相関について (水槽中蒸発量の検討)

以上の実験において用いた terpinolene、(+)-(4*R*)-, (-)-(4*S*)-limonene, *p*-mentha-4(8)-ene, *p*-menthane および *p*-cymene (4 mg/cage) の1時間あたりのガラスケージ中の蒸発量について検討した。その結果、*p*-mentha-4(8)-ene が最も蒸発量が多く 2.86 mg、*p*-cymene が最も少なく 1.14 mg という結果となった。活性の強かった *p*-cymene の蒸発量は比較した化合物中では最も少なく、ほとんど活性が無かった *p*-menthane のそれは2番目に多かった (Fig. 29)。

Fig. 29

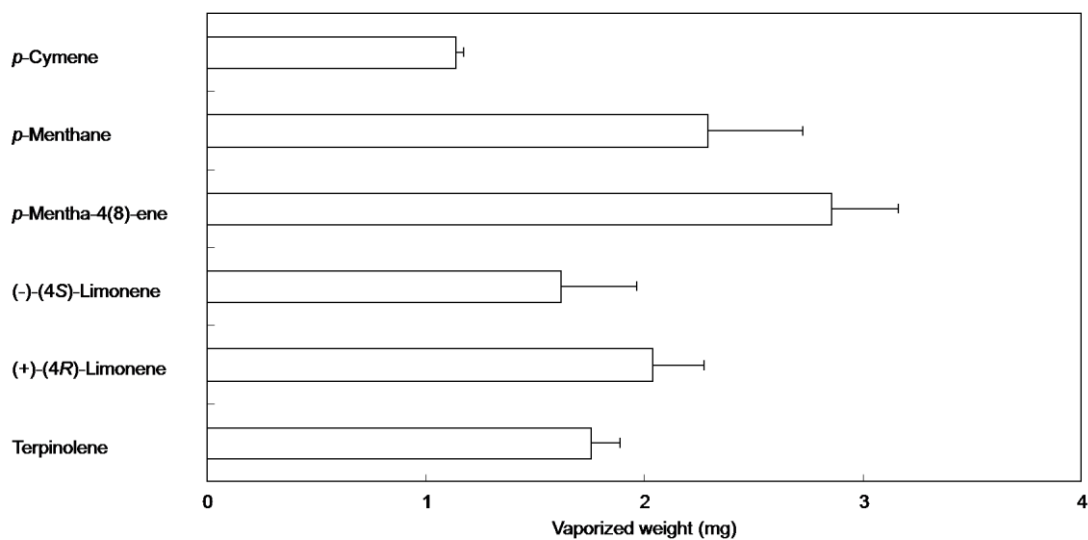


Fig. 29. Vaporized weight of terpinolene, (+)-(4*R*)-, (-)-(4*S*)-limonene, *p*-mentha-4(8)-ene, *p*-menthane and *p*-cymene (4 mg) administration in glass cage. Data are shown as the mean values \pm SEM of 3 trials.

Terpinolene の構造活性相関について (脂溶性と活性との関係)

Terpinolene、(+)-(4*R*)-, (-)-(4*S*)-limonene, *p*-mentha-4(8)-ene, *p*-menthane および *p*-cymene のそれぞれについて、脂溶性を LogP を指標にして比較したところ、3.12、3.22、3.22、3.52、3.97 および 3.73 であった (Table. 2)。

Table. 2.

Logarithm of n-octanol/water partition coefficient (LogP) of Terpinolene, (+)-(4*R*)-, (-)-(4*S*)-limonene, *p*-mentha-4(8)-ene, *p*-menthane and *p*-cymene calculated by Marvin Sketch®.

	LogP
Terpinolene	3.12
(+)-(4 <i>R</i>)-Limonene	3.22
(-)-(4 <i>S</i>)-Limonene	3.22
<i>p</i> -Mentha-4(8)-ene	3.52
<i>p</i> -menthane	3.97
<i>p</i> -Cymene	3.73

考察

第3章では、第1章および第2章で見いだした強い自発運動量抑制活性を持つ diacetone alcohol および terpinolene の鎮静活性発現経路の解明および構造活性相関についての研究を行った。

嗅上皮障害マウスを用いた検討により、吸入により鎮静活性を発現する diacetone alcohol および terpinolene の作用は消失した。マウスが呼吸と共に吸収した化合物群が自発運動量抑制活性を発現するには、①嗅覚細胞を介する、②嗅上皮から直接血中へと移行する、③肺から吸収される可能性、の3経路が考えられる。嗅覚障害マウスで自発運動量抑制作用が見られなかったことから、化合物の作用発現には嗅上皮における嗅覚刺激もしくは化合物吸収が主要な経路であることが示唆された。

続いて行った構造活性相関研究により、直鎖状構造を有する diacetone alcohol に類似する化合物3種を用いて検討を行った。その結果、diacetone alcohol の自発運動量抑制活性発現には、2位のケトン基、4位の水酸基が影響していることがわかった。特に、ケトン基の影響は大きいものであった。一方、炭素数が減少し、直鎖構造になることで活性が、100分の1の容量でも活性を有するほど顕著に上昇することがわかった。官能基が同じ直鎖状化合物間で、主鎖が短くなると、嗅覚への刺激が増すことが報告されている³³⁾。4-Hydroxy-2-butanone および diacetone alcohol の飽和蒸気圧は、25°Cにおいて、それぞれ0.857 および 1.71 mmHg であり^{38) 39)}、同じ条件でろ紙に染みこませたサンプルであれば空気中に存在する化合物量は、4-hydroxy-2-butanone は diacetone alcohol よりも少ないと考えられる。このことは実際の蒸散量を測定した場合の結果でも同じ結論が示されている。即ち、4-hydroxy-2-butanone が高い活性を示した理由は、空気中に存在する化合物量が増加したためではなく、化合物の構造の差異である可能性が高いと考えられる。

加えて、水槽内における各化合物間の蒸発量を調べたところ、化合物間の活性の強さと蒸発量には正の比例関係は見いだされず、活性には化合物の構造が大きく影響してい

ることを裏付ける。

さらに、各化合物間の脂溶性と活性との関係について検討したところ、低濃度で強い活性を有していた diacetone alcohol および 4-hydroxy-2-butanone の両化合物は他の 2 つと比較して脂溶性が非常に低かった。7 つの炭素からなる主鎖を有する直鎖状化合物である valpronic acid の類似化合物の腹腔内投与による検討により、LogP が 1.84 から 2.64 の範囲にある時に高い抗痙攣作用を示すことが報告されている⁴⁰⁾。体内に直接投与され活性を発現する化合物が高い脂溶性を有しているのに比べ、吸入投与により活性を示す化合物は高い水溶性を有していたことから、投与経路が異なると、活性を発現する化合物の性質に大きな違いがあることが示された。

鼻腔内に吸い込まれた匂い分子は、最初に嗅上皮を被う粘液に溶け、嗅細胞の絨毛が有する匂い受容体に結合すると考えられ、嗅上皮への化合物の吸収は嗅覚応答に重要であることが示されている⁴¹⁾。また、官能基に酸素を含む化合物間の検討では、水溶性の高い化合物ほど嗅球糸球体応答を強く上昇させることが報告されている⁴²⁾。本実験において、diacetone alcohol 類似化合物間では水溶性が上昇することで活性が顕著に上昇した。鼻腔内に存在する嗅上皮は表面が粘液で潤され多くの水分が存在しており、吸入された化合物はまずこの粘液に溶解し、組織に移行することが考えられる。以前の報告とあわせると、水溶性が増し、より多くの化合物が嗅上皮へと吸収され、嗅覚応答上昇および嗅上皮から体内への化合物の吸収の増加により活性が上昇したことが予想される。

続いて、terpinolene に類似する化合物 6 種を用いて検討を行った。その結果、terpinolene の持つ自発運動量抑制活性発現には、側鎖ジメチル基上の二重結合の影響が大きく、6 員環の上の 2 重結合は影響がない可能性が示唆された。さらに環構造が芳香環であると 100 分の 1 の容量で活性を有することが示された。以前の報告において、環状構造を持つ化合物間で芳香環が存在するか否かによって、嗅覚上皮細胞における電氣的応答が異なることが示されている⁴³⁾。

加えて、水槽内における各化合物間の蒸発量を調べたところ、化合物間の活性の強さと蒸発量には正の比例関係は見いだされず、活性には化合物の構造が影響していること

を裏付けた。

さらに、各化合物間の脂溶性と活性との関係について検討したところ、terpinolene 類似化合物間においては活性の違いが観察されたにも関わらず、化合物間の脂溶性には大きな差異は認められなかった。これは前述の直鎖状化合物群についての考察と異なる結果である。このことは構造の違いにより生じる脂溶性以外の性質、例えば安定配座や電気的性質の違いなどが活性発現により大きく影響を与えている可能性を示唆している。

本研究により、terpinolene に類似する官能基を持たない単環式モノテルペンの自発運動量抑制活性発現には、二重結合の位置や有無が自発運動量抑制活性に重要な役割を持つことが示された。匂い物質の嗅覚応答に関する構造活性相関については、単離した嗅球細胞による電気生理学的検討³⁵⁾ やマウスやウサギを用い嗅球細胞からの電氣的刺激を受ける嗅球糸球体の応答を見た検討^{31) 41)} がなされているが、本研究のように匂い物質と自発運動抑制活性の構造活性相関について、吸入投与を用いて検討した報告はない。本実験では、吸入投与により自発運動量抑制活性を発現する化合物の、活性に影響する構造の一部が明らかになったことは、今後自発運動量抑制活性を有する化合物を探索する重要な手掛かりとなりうると期待される。

鎮静活性を持つ化合物の構造活性相関については、1,4-benzodiazepine の類似化合物の GABA_A 受容体への結合性の違いなどについて、腹腔内投与といった侵襲的な方法について検討をされているにすぎない⁴⁴⁾。非侵襲的な香気成分の吸入投与により、自発運動量抑制作用という中枢神経抑制活性を得られることは、副作用や傷害に対しデリケートな要因を多分に有する、老人性の睡眠障害に対する睡眠補助剤や幼児の ADHD（注意欠陥多動障害）などへの対処法として応用することが期待される。

本実験で、鎮静などを期待し古来より多用される植物精油から自発運動量抑制活性を持つ化合物を得、それらの活性に重要な構造を見いだした。本研究は、睡眠障害や ADHD の安全性の高い効果的な対処法を開発するための有用な知見を与えられたい。

実験方法

試薬

本章で用いた試薬は以下の通りである。

藿香、甘松香、桂皮、山奈、大茴香、丁子、白檀は三星製薬株式会社より購入した。冠唇花は、京都大学薬学研究科付属薬用植物園にて栽培したものをを用いた。冠唇花証拠標本 (ESM-4967) は、京都大学薬学研究科付属薬用植物園標本室に保管されている。ラベンダーオイル、および龍腦の主成分であり代用品として一般的に用いられている borneol は、ナカライテスク株式会社(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)より購入した。Diacetone alcohol、1,1-dimethyl-1-butanol、isobutyl methyl ketone、4-hydroxy-2-butanone、terpinolene、4-methyl-cyclohexane、iPr-PPh3I、NaH、zinc sulfate、corn oil および DMSO (dry) は、和光純薬工業株式会社、藿香オイルはガイア・エヌピー株式会社、triethylcitrate は Merck 株式会社よりそれぞれ購入した。その他の実験試薬は全て特級以上を使用した。カフェインによる興奮惹起および pentobarbital 誘発睡眠延長モデルにおける positive control として用いた chlorpromazine hydrochloride は、田辺三菱製薬株式会社から購入した。

実験動物

動物実験は、京都大学動物実験委員会の承認を受けて行った。同委員会の許可は、文部科学省の研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針に基づく京都大学における動物実験の実施に関する規程に依っている。4 週齢の ddY 系雄性マウス (体重約 25 g) を日本エスエルシー株式会社(Japan SLC, Inc, Shizuoka, Japan) より購入し、実験に用いるまで飲水、飼料を自由摂取にて与え、室温 23 °C、湿度 50 ~ 60%、12 時間の明暗サイクルの下で飼育した。吸入投与する際、全ての香気成分は、無臭性溶媒である triethylcitrate に溶解した。自発運動量の測定は、以下の方法による。測りとったエキス、オイルまたは化合物は、全量が 400 μ l となるように無臭性溶媒である triethylcitrate に溶解し、4 枚のろ紙に吸着させ、これをガラスケージ内にテープで固定して自然拡散で香りを 60 分間充満させた。実験で用いている精油および化合物の容量は、1 つのケージに投入した量を示している。腹腔内投与する際はいずれの化合物も corn oil に溶解して投与した。マウスをケージ内に入れた後、ケージ内でのマウスの行動をビデオカメラにより 60 分間撮影して解析し、ケージ底面に 10 cm 間隔に描かれた線をマウスが横切る回数を数え、5 分間毎の総数を自発運動量の測定値とした。AUC (the area under the curve) の算出方法は既報を参照にした⁵⁾。以下の数式による。但し、5 分間あたりのマウス自発運動量を、0~5 分 : a₁、5~10 分 : a₂、・・・、55~60 分 : a₁₁、とする。

$$AUC = \sum_{k=1}^{11} \frac{5(a_k + a_{(k+1)})}{2}$$

嗅上皮傷害マウスの作製

硫酸亜鉛処置は既報に従い⁴⁵⁾、4週齢の ddY 系雄性マウスにペントバルビタール麻酔下、仰臥位にて左側鼻腔にのみ注意深く 1%硫酸亜鉛溶液 0.1 ml をガイドカニューレを用いて点鼻した。十分に嗅上皮に作用させるため、硫酸亜鉛溶液を点鼻後、10 分間仰臥位のまま保持した。処置後 2 日目にマウスの嗅覚が十分に障害されていることを確認した後実験に用いた。嗅覚が十分に障害されていることの確認は、酢酸による嗅覚試験によった。即ち、既報に従い⁴⁶⁾、ガラスケージの一端に 100%酢酸 500 μ l を滴下した脱脂綿を置き、他方の端には蒸留水 500 μ l を滴下した脱脂綿を置いて、ケージ底面のまん中に線をひいてエリアを分け、このガラスケージ内でのマウスの行動を 15 分間観察し、酢酸エリアと蒸留水エリアそれぞれのマウスの滞在時間を記録した。

GC-MS Analysis

主揮発性成分の同定：SPME (Solid Phase Micro Extraction) を用いた揮発性成分の吸着、脱離は既報の通りである⁴⁷⁾。GC-MS 装置は、G7000-M9000/ 3DQMS (HITACHI, Tokyo, Japan) を使用した。測定条件は以下である。測定条件を次に示す。Column : fused silica capillary column TC-WAX (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), 60 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m film thickness ; column temperature : 40–120 $^{\circ}$ C (16 $^{\circ}$ C/ min で昇温), 120–150 $^{\circ}$ C (1 $^{\circ}$ C/ min で昇温), 150–200 $^{\circ}$ C (20 $^{\circ}$ C/ min で昇温), 200 $^{\circ}$ C で 20 分保持 ; carrier gas : He, 147.1 kPa ; ionization energy : 15 eV である。

主揮発性成分の定量：GC 装置は、G5000 (HITACHI, Tokyo, Japan) を使用した。測定条件は以下である。GC 装置は、G5000 (HITACHI, Tokyo, Japan) を使用した。測定条件は以下を除き、上記の GC-MS の GC 条件と同一である。200 $^{\circ}$ C での保持は 30 分とし、injector : 190 $^{\circ}$ C, detector : 210 $^{\circ}$ C ; carrier gas : helium, 37 cm/ min ; injection volume : 1 μ l である。

主揮発性成分の定量：GC および MS 装置は、Hewlett Packard 5890 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) および AUTOMASS (JEOL, Tokyo, Japan) を使用した。測定条件は以下である。測定条件を次に示す。Column : fused silica capillary column TC-WAX (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), 60 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m film thickness ; column temperature : 40–130 $^{\circ}$ C (2 $^{\circ}$ C/ min で昇温), 130 $^{\circ}$ C で 25 分保持, 130–140 $^{\circ}$ C (2 $^{\circ}$ C/ min で昇温), 140 $^{\circ}$ C で 15 分保持, 140–200 $^{\circ}$ C (15 $^{\circ}$ C/ min で昇温), 200 $^{\circ}$ C で 30 分保持; injector : 180 $^{\circ}$ C, carrier gas : helium, 45 cm/ min ; column head pressure: 100 kPa; injection volume : 1 μ l; ionization energy: 70 eV である。

藿香へキサンエキスの抽出および分画

藿香 5 kg を、室温にて hexane により二晩、静置抽出し、これを 3 回繰り返す、藿香へキサンエキス 197.5 g を得た。藿香へキサンエキス (13.7 g) を hexane : AcOEt = 4 : 1 の条件下、カラムクロマトグラフィーにより分画し、極性の低い順に fr. 1 (4.3 g)、fr. 2 (5.3 g)、fr. 3 (3.4 g) を得た。

Patchouli alcohol の単離

市販の藿香オイルから、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wakogel[®] C-200, Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)により単離した。得られた patchouli alcohol は GC 分析により純度を、NMR により構造を確認した。Patchouli alcohol については、市販品が入手できなかったため、藿香オイル (市販品) について、カラムクロマトグラフィーを用いて単離を行い、patchouli alcohol を 3.6 g 得た。得られた patchouli alcohol は GC 分析により純度を、NMR により構造を確認したところ、¹³CNMR のケミカルシフトが文献値とほぼ一致した⁴⁸⁾。NMR スペクトルを以下に示す。

¹³C NMR spectral data (100 MHz, CDCl₃) : δ□75.62 (C-1), 43.67 (C-5), 40.06 (C-11), 39.05 (C-7), 37.60 (C-10), 32.62 (C-2), 28.79 (C-9), 28.53 (C-3), 28.04 (C-4), 26.76 (C-14), 24.50 (C-6), 24.40 (C-8), 24.21 (C-15), 20.54 (C-13), 18.47 (C-12)

冠唇花新鮮葉の水蒸気蒸留および分画

日本薬局方に定める精油定量法に従い⁴⁹⁾、冠唇花新鮮葉 1.8 kg について、3 時間水蒸気蒸留を行い、hexan 3ml で捕集した。その結果、702 mg の冠唇花蒸留画分を得た。

冠唇花新鮮葉蒸留画分(700 mg)を、hexane : AcOEt = 4 : 1 の溶媒系を用いて、カラムクロマトグラフィーにより分画し、極性の低い順に fr. 1 (418.2 mg)、fr. 2 (143.2 mg)、fr. 3 (130.2 mg)を得た。

ガラスケージ中の化合物蒸発量の測定

ろ紙上に triethylcitrate に溶解した化合物を滴下し、その重量を正確に測定した後に密閉したガラスケージ中に静置した。1 時間後にろ紙をとりだし、その重量を再び測定し、滴下直後の重量との差を 1 時間あたりのガラスケージ中への化合物の蒸発量とした。

脂溶性の評価

化合物の脂溶性は、Marvin Sketch (ChemAxon, Hungary) を用いて、n-オクタノール・水分係数の常用対数値である LogP 値を基に評価した³⁷⁾。

統計解析

データは全て平均値±標準誤差で表した。統計処理には、GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用い、Student's t-test および Dunnett's test⁵¹⁾ により評価した。全ての実験は、危険率が 5%未満の場合に統計学的な有意差があると判定した。

総括および結論

本研究において著者は、吸入による精油や揮発性化合物の効果を簡便に評価できる open-field test によるマウス運動量変化を観察する実験系を構築し、シソ科植物を対象として、鎮静活性を有する成分の同定および活性発現経路の解明を行った結果、以下の新知見を得た。

1. 伝統的に香料に用いられる藿香ヘキサシエンエキスを、マウスに自然拡散にて吸入投与したところ、マウス自発運動量が低下した。Patchouli alcohol および diacetone alcohol が、藿香エキスの自発運動量抑制活性の一部を担っていること示唆された。加えて、両化合物が caffeine により惹起された興奮に対する自発運動量抑制活性および pentobarbital 誘発睡眠時間延長作用を発現した。特に、diacetone alcohol は低容量で顕著な活性を発現した。
2. 冠唇花水蒸気蒸留画分を、マウスに自然拡散にて吸入投与したところ、マウス自発運動量が低下した。新たな活性化合物として、冠唇花水蒸気蒸留画分中より、terpinolen および 1-octen-3-ol を見だし、両化合物が冠唇花水蒸気蒸留画分の自発運動量抑制活性の一部を担っていることがわかった。加えて、両化合物は、caffeine により惹起された興奮に対する自発運動量抑制活性および pentobarbital 誘発睡眠時間延長作用を発現した。さらに、匂い応答において化合物間の相互作用が存在することの一端を明らかにした。
3. 嗅上皮障害マウスを用いた検討により、diacetone alcohol および terpinolene の鎮静活性発現には嗅上皮における嗅覚刺激もしくは化合物吸収が主要な経路であることが示唆された。Terpinolene の持つ自発運動量抑制活性発現には、側鎖ジメチル基上の二重結合の影響が、大きい可能性が明らかとなり、6員環の上の2重結合は、影響がない可能性が示唆された。Diacetone alcohol の自発運動量抑制活性発現には、2位のケトン基、4位の水酸基が影響していることがわかり、特にケトン基の影響は大きいものであった。一方、炭素数が減少し、直鎖構造になることで活性が、100分の1の容量でも活性を有するほど顕著に上昇した。

以上、著者は、経験的に用いられてきた芳香療法材料の効能を科学的に検証するマウス評価系を用いて、鎮静などを期待し古来より多用される植物精油から自発運動量抑制活性を持つ化合物を得、それらの活性に重要な構造を見いだした。それらを創薬のシーズとして利用できる可能性がある。本研究は「経験知」の蓄積として用いられてきた芳香療法を基に、睡眠障害や小児多動性障害といった現代医学のみでは対処が不十分な精神疾患に対する、安全性の高い効果的な対処法を開発するための有用な知見を与えると考えられる。

謝辞

本研究に際しまして、終始懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 金子周司 教授、掛谷秀昭 教授、高倉喜信 教授および伊藤美千穂 准教授に謹んで感謝の意を表します。直接御指導を賜り、多くの有益な御助言を頂きました京都大学大学院薬学研究 伊藤美千穂 准教授に改めて心から感謝の意を表します。さらに、終始有益な御助言を頂きました、姫路獨協大学 本多義昭 学長、名古屋大学大学院創薬科学研究科 赤池昭紀 教授、京都大学大学院薬学研究科 久米利明 准教授、武田薬品工業株式会社 矢倉徹 博士、北里大学薬学部薬学科 竹元裕明 助教に深く感謝いたします。

また、本研究の実験技術に関しまして有益な助言とご指導を頂きました、同志社女子大学 山本康友 特任助教に心から感謝いたします。

さらに、共に研究生活を送り互いに切磋琢磨し合った、カブール大学 カリミ・ガニ 助教、京都大学大学院薬学研究科 ジョワン・マンジュ・タンカム 修士、受田憲昭 修士をはじめ、薬品資源学分野、生体機能解析学分野、薬品作用解析学分野の教室員の皆様に深く感謝いたします。

加えて、終始ご支援下さいました、大阪大学 江口太郎 副学長、橋爪節也 教授、上田貴洋 教授、高橋京子 准教授をはじめとする、大阪大学総合学術博物館および大阪大学大学院薬学研究科薬用資源学分野の皆様に深く感謝いたします。

最後に、研究・学問の大切さを教えて下さった石河正久 博士(故人)、吞海信雄 博士、松本顕龍 先生、冷泉為人 教授および、研究に専心できるよう支えてくださった祖母 トシ、妻 茜ならびに亡父 啓、亡母 洋子、亡祖父 常三に心から感謝いたします。

発表論文目録

本研究内容の一部は、以下の論文に公表した。

- 1) Sedative activity of essential oils and related compounds from *Pogostemon cablin* via inhalation administration.

Ken Ito, Yasuko Akahoshi, Michiho Ito, Syuji Kaneko

Journal of Essential Oil Research 投稿中

- 2) Sedative effects of vapor inhalation of the essential oil of *Microtoena patchoulii* and its related compounds.

Ken Ito, Michiho Ito

Journal of Natural Medicines, 65, 336 – 343, 2011

- 3) The sedative effect of inhaled terpinolene in mice and its structure-activity relationships.

Ken Ito, Michiho Ito

Journal of Natural Medicines, 67, 833 – 837, 2013

- 4) Approach to evidence-based aromatherapy: pharmacological effects of inhaled aromatic natural medicines.

Ken Ito, Michiho Ito, Kyoko Takahashi

Folia pharmacologica Japonica, 140, 71 – 75, 2012

引用文献

1. World Health Organization WHO Policy Perspectives on Medicines No.2 (2002)
2. Bläske VU, Hertel H, Forschler BT. Repellent effects of isoborneol on subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae) in soils of different composition. *J Econ Entomol.* 96(4):1267-74. (2003)
3. Cava R, Nowak E, Taboada A, Marin-Iniesta F. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *J Food Prot.* 70(12):2757-63. (2007)
4. Gerhard Buchbauer, Leopold Jirovetz, Walter Jáger, Christine Plank, Hermann Dietrich. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. *J. Pharm. Sci* 82 (6):660 – 664 (1993)
5. Hiroaki Takemoto, Michiho Ito, Tomohiro Shiraki, Toru Yagura, Gisho Honda. Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components. *J Nat Med* 62:41-46. (2008)
6. Hyung Woo Kim, Su Jin Cho, Bu-Yeo Kim, Su In Cho and Young Kyun Kim., *Pogostemon cablin* as ROS Scavenger in Oxidant-induced Cell Death of Human Neuroglioma Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* :10.1093. (2008)
7. Kiuchi F, Matsuo K, Itano Y, Ito M, Honda G, Qui T. K, Nakajima-Shimada J, Aoki T. Screening of Natural Medicines Used in Vietnam for Trypanocidal Activity against Epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Natural Medicines*, 56:64—68. (2002)
8. Shinichiro Haze, Keiko Sakai, Yoko Gozu. Effects of Fragrance Inhalation on Sympathetic Activity in Normal Adults. *Jpn. J. Pharm* 90:247 – 2537. (2002)
9. Manami Senpuku, Kazuya Nonaka, Michiho Ito, and Gisho Honda., Chemical Composition of the Essential Oil of *Microtoena patchouli*. *J.Essent. Oil Res* 19:336-337. (2007)
10. D. Shaw, J.M. Annett, B. Doherty, J.C. Leslie.: Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. *Phytomedicine.*, 14, 613-620 (2007)
11. Masataka Hata Tokyo Shoseki Co.Ltd, *Ko-San-Sai* p.108. (2004)
12. Kim Y. S. et al., 2003 (Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd., Japan) application JP JP.:7pp. (2003)
13. Harada N. et al., 2006 (Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd., Japan) application JP JP.:14pp. (2006)
14. Lee J. I. et al., (S. Korea) application JP JP.2006. 12pp. (2006)
15. Kanamori H. et al. (Ses. Co., Ltd., Japan) application JP JP. 23pp. (2005)
16. Kitulagodage M, Astheimer LB, Buttemer WA., Diacetone alcohol, a dispersant solvent, contributes to acute toxicity of a fipronil-based insecticide in a passerine bird. *Ecotoxicol Environ Saf.* 71(2):597-600. (2008)

17. J. Grasmanna, S. Hippelib, R. Spitzenbergerc, E.F. Elstnerc The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with a-tocopherol and b-carotene effectively prevents oxidation of LDL. *Phytomedicine* 12(6-7):416-23. (2005)
18. Migiwa Komiya, Takashi Takeuchi, Etsumori Harada Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. *Behavioural Brain Reserch* 172:240-249. (2006)
19. Mathews DF. Response patterns of single neurons in the tortoise olfactory epithelium and olfactory bulb. *J Gen Physiol.*, 60, 166-180 (1972)
20. Gilma S. Chitarra, Tjakko Abee, Frank M. Rombouts, Jan Dijksterhuis 1-Octen-3-ol inhibits conidia germination of *Penicillium paneum* despite of mild effects on membrane permeability, respiration, intracellular pH, and changes the protein composition. *FEMS Microbiology Ecology* 54:67-75. (2005)
21. C. McMahon, P.M.Guerin, Z. Syed1-octen-3-ol Isolated from bont ticks attracts *Amblyomma variegatum*. *Journal of Chemical Ecology*, 27, No.3:471-486. (2001)
22. Takuo Sawahata, Satoshi Shimano, Masahiro Suzuki *Tricholoma matsutake* 1-Ocen-3-ol and methyl cinnamate repel mycophagous *Proisotoma minuta* (Collembola: Insecta). *Mycorrhiza* 18, 2:111-114. (2008)
23. Roberto Ramoni, Florence Vincent, Stefano Grolli, Virna Conti, Christian Malossei, Francois-Didier Boyeri, Patricia Nagnan-Le Meillouri, Silvia Spinelli, Christian Cambillau, and Mariella Tegoni The Insect Attractant 1-Octen-3-ol Is the Natural Ligand of Bovine Odorant-binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 276,10, 7150-7155. (2001)
24. Linck VD, da Silva AL, Figueiró M, Luis Piato A, Paula Herrmann A, Dupont Birck F, Bastos Caramão E, Sávio Nunes D, Moreno PR, Elisabetsky E. Inhaled linalool-induced sedation in mice. *Phytomedicine*. 16(4):303-307 (2008)
25. Osakada F, Ooto S, Akagi T, Mandai M, Akaike A, Takahashi M.: Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J. Neurosci.*, **27**, 4210-4219 (2007)
26. The Physical and Theoretical Chemistry Laboratory, Oxford University, England Chemical Safety Information Glossary Safety data for methyl salicylate. (2009)
27. Taniguchi Y, Deguchi Y, Saita M, Noda K Antinociceptive effects of counterirritants *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 104(6):433-46. (1994)
28. Block; Leslie L., Goon; David J. W., Rolf; David Inhalation therapy decongestant with foraminous carrier. United States Patent:6,090,403. (1998)
29. Guerrieri F, Schubert M, Sandoz JC, Giurfa M. Neural Olfactory Similarity in Honeybees. *PLoS Biol.*, 3(4):e60 (2005)
30. Kaluza JF, Breer H Responsiveness of olfactory neurons to distinct aliphatic aldehydes. *Journal of Experimental Biology*. 203 (5):927-33. (2000)

31. Imamura K, Mataga N, Mori K. Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. I. Aliphatic compounds. *Journal of Neurophysiology*. 68(6):1986-2002. (1992)
32. Ricardo C. Araneda, Abhay D. Kini and Stuart Firestein. The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nature Neuroscience*. 3, 12 1248-1255. (2000)
33. Keiichi Tonosaki and Don Tucker. Olfactory Receptor Cell Responses of Dog and Box Turtle to Aliphatic n-Acetates and Aliphatic n-Fatty Acids. *Behavioral and Neural Biology*. 35, 187-199. (1982)
34. J. Grasmanna, S. Hippelib, R. Spitzenbergerc, E.F. Elstnerc The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with a-tocopherol and b-carotene effectively prevents oxidation of LDL. *Phytomedicine*. 12(6-7):416-23. (2005)
35. Donald F. Mathews. Response Patterns of Single Neurons in the Tortoise Olfactory Epithelium and Olfactory Bulb. *The Journal of General Physiology*. 60:166-180. (1972)
36. Takemoto H, Ito M, Shiraki T, Yagura T, Honda G. Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components. *J Nat Med*. 62(1):41-46. (2007)
37. Sugano K. Fraction of a dose absorbed estimation for structurally diverse low solubility compounds. *Int J Pharm*. 28;405(1-2):79-89. (2011)
38. Fuge, E.T.J., Bowden, S.T., Jones, W.J. Some Physical Properties of Diacetone Alcohol, Mesityl Oxide and Methyl Isobutyl Ketone. *J Phys Chem*. 56:1013-1016. (1952)
39. Dreisbach R.R., Shrader S.A. Vapor Pressure–Temperature Data on Some Organic Compounds. *Ind Eng Chem*. 41:2879-2880. (1949)
40. M.M.A.Elmezaz, R.-S. Hauck, and H.Nau Anticonvulsant and Neurotoxic Activities of Twelve Analogues of Valproic Acid. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 82,12, 1255-1258. (1992)
41. Yang GC, Scherer PW, Zhao K, Mozell MM. Numerical modeling of odorant uptake in the rat nasal cavity. *Chem Senses*. 32:273-284. (2007)
42. Johnson BA, Arguello S, Leon M. Odorants with multiple oxygen-containing functional groups and other odorants with high water solubility preferentially activate posterior olfactory bulb glomeruli. *J Comp Neurol*. 502:468-482. (2007)
43. Damiao Pergentino De Sousa, Franklin Ferreira De Farias No Brega, and Reinaldo No Brega De Almeida. Influence of the Chirality of (R)-(+)- and (S)-(-)-carvone in the Central Nervous System: A Comparative Study. *Chirality*. 19:264–268. (2007)
44. Maddalena Guido, Antonella Loche, and Vincenzo Perlini. Synthesis of 2-Amino-5-sulfanyl-1,3,4-thiadiazole Derivatives and Evaluation of Their Antidepressant and Anxiolytic Activity. *J. Med. Chem*. 44, 931-936. (2001)
45. Kimura Y, Furukawa M, Kamide M, Sakumoto M, Miwa T, Umeda R. Experimental study on the effect of the topical application of steroids on olfactory disturbance in mice. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 92:1869-1875. (1989)

46. Chuah MI, Tennent R, Jacobs I. Response of olfactory Schwann cells to intranasal zinc sulfate irrigation. *J Neurosci Res.* 42:470-478. (1995)
47. Bais HP, Dattatreya BS, Ravishankar GA. Production of volatile compounds by hairy root cultures of *Cichorium intybus* L. under the influence of fungal elicitors and their analysis using solid-phase micro extraction gas chromatography–mass spectrometry. *J Sci Food Agric.* 83:769-774. (2003)
48. Aleu J, Hanson JR, Galan RH, Collado IG. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoid patchoulol by botrytis cinerea. *J Nat Prod.* 62(3):437-40. (1999)
49. Ministry of Health, Labour and Welfare. The Japanese Pharmacopoeia 15th edition p.90 5.01. Crude Drugs Test, Essential oil content, Essential oil determination. (2006)
50. Sylvan Wallenstein, Christine L. Zucker, and Joseph L. Fleiss. Some Statistical Methods Useful in Circulation Research. *Circulation Research.* 47;1-9. (1980)