

甘松香由来セスキテルペノイドの鎮静活性に関する研究

2015

竹元 裕明

〈目次〉

諸言.....	1
本論	
第一章 吸入投与法を用いた沈香及び甘松香香気成分の鎮静活性評価と活性成分探索	5
第一節 沈香オイル及び甘松香ヘキサンエキスの吸入投与による鎮静作用	6
第二節 沈香及び甘松香中の主要揮発性成分の同定	8
第三節 単一成分の吸入投与による鎮静作用	12
考察.....	15
第二章 鎮静活性を有する甘松香由来 valerena-4,7(11)-diene の同定.....	16
第一節 β -Maaliene 及び valerena-4,7(11)-diene の吸入投与による自発運動抑制作用	17
第二節 カフェイン投与マウスに対する valerena-4,7(11)-diene の鎮静作用.....	22
第三節 Valerena-4,7(11)-diene のペントバルビタール誘発睡眠の延長作用.....	23
考察.....	24
第三章 Valerena-4,7(11)-diene 吸入投与による拘束ストレス誘発興奮行動とストレス関連因子変動に対する抑制効果.....	26
第一節 ストレス誘発性の興奮行動に対する valerena-4,7(11)-diene の鎮静作用.....	28
第二節 ストレス関連因子に対する valerena-4,7(11)-diene の抑制作用.....	30
第三節 吸入投与法における作用発現経路の解析	32
考察.....	35
第四章 GABA _A 受容体親和性を有する酸化型セスキテルペノイド aristolen-1(10)-en-9-ol の同定.....	37
第一節 甘松香精油中の酸化型セスキテルペノイドの同定	38
第二節 カフェイン投与マウスに対する酸化型セスキテルペノイドの鎮静作用	39
第三節 Aristolen-1(10)-en-9-ol の鎮静活性における GABA 受容体の関与	40
考察.....	43
総括及び結語.....	45

実験方法.....	47
謝辞.....	58
発表論文目録.....	59
引用文献.....	60

諸言

現代社会における様々なストレス刺激は、不安障害やうつ病等の中枢神経系疾患を発症する要因になる。またストレスによる精神の緊張は、過敏性腸症候群等の心身症や、不安症状、うつ様症状、睡眠障害などのストレス障害を引き起こし、日常生活において支障をきたす¹⁾。この様なストレス障害により医療機関に受診する患者数は増加しており、厚生労働省の統計によれば、平成8年の約90万人に対して、平成23年では約160万人まで増加している²⁾。

上記のストレス障害に対し、薬物療法では不安症状に対してはベンゾジアゼピン系抗不安薬が、うつ様症状に対しては抗うつ薬（三環系抗うつ薬、SNRI、SSRI）が処方され、症状の改善に効果的であるが、ベンゾジアゼピン系薬物の副作用である過鎮静³⁾や筋弛緩⁴⁾、抗うつ薬の副作用として抗コリン作用⁵⁾による排尿障害や便秘が問題となる。ストレス障害に対する有効な対症法が求められている中で、近年では補完療法のひとつである芳香療法が注目されている。香りを吸入することにより精油成分の有する薬理作用を利用して心身の疾病の予防や治療を行うが、実際の利用形態である香気吸入による抗ストレス作用の発現を実験動物レベルで検証している例は少なく、また抗ストレス作用を示す化合物の同定もされていないのが現状である。

ストレス障害や中枢神経系疾患の発症の要因として視床下部－下垂体－副腎皮質系が関与することが報告されている⁶⁾。ストレスに生体が曝されると視床下部からコルチコトロピン遊離促進ホルモン（corticotropin hormone release hormone, CRH）が分泌され、視床下部－下垂体－副腎皮質系を経て副腎皮質からストレスホルモンの一種であるグルココルチコイド（ヒトではコルチゾール、げっ歯類ではコルチコステロン）が放出される。グルココルチコイドは、抗炎症作用や血糖値上昇作用、記憶力増強作用などの生理作用を有しており、ストレスに対する防御因子として通常は機能する。また、放出されたグルココルチコイドは下垂体、視床下部、さらに高位の海馬のグルココルチコイド受容体を介して負のフィードバックを与えることにより、血中グルココルチコイド濃度が正常値に戻りストレス反応が停止する⁷⁾。しかし、持続的なストレスに曝されることで、視床下部－下垂体－副腎皮質系のフィードバック機構が破綻し、グルココルチコイドが持続的に、過剰に分泌される。その結果、グルココルチコイドが海馬の神経細胞やグリア細胞に障害を与え、不安障害やうつ病等の中枢神経系疾患が発症するとされる⁸⁾。ストレス伝達経路である視床下部－下垂体－副腎皮質系に着目した創薬研究が進められており、CRH受容体拮抗薬が最新の中枢抑制薬の創薬ターゲットになっている⁹⁾。また、ストレス軽減効果を示す天然資源から医薬開発のシーズとなる天然化合物の探索も行われており、生理活性成分の同定及び薬理学的作用、体内動態が明らかになることで創薬研究へのアプローチが可能になると考えられている¹⁰⁾。

上記観点から本研究では、補完療法の中で有害事象の報告が少ない芳香療法¹¹⁾に着目し、ストレス緩和作用を示す天然資源の探索と活性成分の同定及び活性評価を目的とした。芳香療法には、植物由来の芳香によりリラクセーションを得ることで、ストレス障害を緩和する効果が期待されている。芳香療法には植物の精油画分が一般的には利用されるが、精油の効果として、抗菌作用、抗ウイルス作用、抗炎症作用の他に、鎮静作用や抗不安作用が報告されている。例えば、ラベンダー精油は鎮静活性を有しており¹²⁾、またジャスミン精油には抑うつを改善する作用が報告されている¹³⁾。またバラの香りを用いて睡眠中に記憶力を上昇させることを試みた報告があり¹⁴⁾、芳香療法をアルツハイマー病や脳神経障害に対する治療に応用できることが期待されている。実際に欧米諸国の臨床現場では芳香療法が取り入れられている。注意欠陥障害 (ADD) や注意欠陥多動性障害 (ADHD) に対してメチルフェニデートによる薬物治療が行われるが、メチルフェニデートの高い依存性や覚醒アミン作用による乱用等は社会的な問題となっている。そこで米国では、メチルフェニデートに替わる対症療法として芳香療法の臨床利用が一般的に認められ、一定の成果も挙げられている¹⁵⁾。芳香療法における植物由来の芳香の臨床利用が近年さらに注目され、香気吸入による薬理活性評価の必要性が上昇している。

日本においては植物由来の香気を楽しむ文化があり、芳香性生薬を練香や香袋として利用してきた。日本に香りを楽しむ風習がもたらされたのは紀元 538 年の仏教伝来の頃とされており、飛鳥、奈良時代では沈香を中心とした香木類が供物として用いられ、平安時代には練香、香袋として日常生活を楽しむ手段として香りが定着したとされる。沈香の他に、練香や香袋において白檀・丁子・乳頭香・麝香・甘松香が当時の香り文化の中で重要な生薬として位置付けられていた¹⁶⁾。これらのうち、沈香や甘松香の芳香には気分を落ち着かせる作用があり、鎮静効果を期待した利用も古くからされてきた。そこで本研究では、沈香、甘松香の芳香に着目した。

沈香はジンチョウゲ科 *Aquilaria* 属植物の幹に沈着した樹脂を指し、これは風雨や虫害等の傷害により自らの防御機構から生成される報告がある¹⁷⁾。効能として鎮静作用、健胃作用があり、喘四君子湯 (体質虚弱、万病回春)、沈香降気湯 (健胃、太平惠民和剂局方)、丁香柿蒂湯 (胃腸虚弱、万病回春) 等の漢方処方構成生薬である。また、沈香を加熱すると特異な芳香を放つことから薫香料としても多用されてきた。特に有名なものには正倉院の蘭奢待があり、高品質の沈香は伽羅と呼ばれ珍重されてきた。世界的にも沈香の人気は高く、アジア各地をはじめ欧米においても沈香油の需要が高くなってきている。沈香に含有される揮発性成分として、**jinkoh-eremol**, **β -agarofuran** などのオイデスマン型やグアイアン型のセスキテルペノイド、また低分子芳香族化合物 **benzylacetone** が報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。沈香が示す薬理作用として腹腔内投与による試験例がある。沈香含有成分 **jinkoh-eremol**、**agarospirol** をマウスに腹腔内投与した結果、マウス酢酸ライジング反応が有意に抑制されたことから、鎮痛活性を有することが報告されている²⁰⁾。

一方、甘松香はオミナエシ科 *Nardostachys* 属植物を基原とし、根及び根茎が薬用部位として利用される。基原植物はヒマラヤ (*N. jatamansi*) から中国南西部 (*N. chinensis*) の高山帯に分布する多年草である。甘松香の効能として鎮静作用²¹⁾、鎮痙作用²²⁾があり、局方生薬の吉草根(カノコソウ, オミナエシ科) やその近縁植物はバレリアンという名称で、婦人科疾患、特に更年期障害やヒステリー症状などに民間薬として世界的に広く使われている。また、甘松香の特異な芳香に安眠作用やリラックス作用を期待して、匂い袋の構成生薬として平安時代から利用されてきた。甘松香が示す薬理作用として経口投与による試験例がある。甘松香エタノールエキスをマウスに経口投与した結果、脳内 GABA 量の増加が観察された報告がある²³⁾。

しかし沈香及び甘松香の香気に関する薬理作用の報告例は無く、これら芳香性生薬の香気吸入により発現する作用を解析することにした。香気吸入による薬理作用の評価において、研究報告の多くはヒト試験が用いられている。しかし、ヒトを対象とした試験においては、化学成分による薬理作用のみではなく、香りの嗜好や記憶と結びついた心理的効果が生理現象に大きく影響することが明らかとなっている。実際に、ラベンダーの香りをヒトに吸入させた際、本来ラベンダー精油は降圧作用を示すが、ラベンダーの香りに否定的な感情を持った被験者群では、吸入後の脈拍上昇傾向が認められている²⁴⁾。

そこで本研究では、気体状態の試料を吸入投与する実験系において記憶や嗜好による心理的効果を排除するために、マウスを用いた実験系を構築することで沈香、甘松香の香気吸入による鎮静作用の発現を検討し、ストレス障害の緩和に効果的となる有用成分の同定及び動物実験による機能解明を目的に研究を行った。

本研究において著者は、1) 吸入投与法を用いた沈香及び甘松香香気成分の鎮静活性評価と活性成分探索、2) 鎮静活性を有する甘松香由来 *valerena-4,7(11)-diene* の同定、3) *valerena-4,7(11)-diene* 吸入投与による拘束ストレス誘発興奮行動とストレス関連因子変動に対する抑制効果、4) GABA_A 受容体親和性活性を有する酸化型セスキテルペノイド *aristolen-1(10)-en-9-ol* の同定、を行うことで鎮静薬開発シーズとしての可能性が期待される2種のセスキテルペノイドを同定した。

以下に本論文の各章の概略を示す。

1. オープンフィールド試験を用いた香気成分の鎮静活性評価系を構築し、沈香、甘松香の芳香にマウス自発運動を抑制する効果が発現することを明らかとした。さらに沈香、甘松香中の活性成分として *benzylacetone*、 α -*gurjunene*、*calarene* を同定した。これら化合物は、*benzylacetone* 0.1%、 α -*gurjunene* 1.5%、*calarene* 0.17% の投与量で強い行動抑制作用を示した。

2. 甘松香から行動抑制効果を示す活性画分を見出し、活性成分として **valerena-4,7(11)-diene** を同定した。**Valerena-4,7(11)-diene** は強い鎮静作用を示し、カフェイン投与 (25 mg/kg; i.p.) により興奮を惹起させたマウスに対して、0.06% 投与群において約 2 倍増加した自発運動量を対照群と同等まで鎮静する効果が認められた。またペントバルビタール (25 mg/kg; i.p.) 睡眠試験を用いた鎮静活性評価において、**valerena-4,7(11)-diene** 0.06% 投与群の睡眠導入時間は顕著に短縮し、また睡眠時間は対照群と比較して 2.7 倍延長した。この作用はアドレナリン α_1 、ドパミン D_2 受容体拮抗作用を有するクロルプロマジン (5 mg/kg; p.o.) の作用と同程度であった。
3. オミナエシ科植物に特異的に含有される **valerena-4,7(11)-diene** の抗ストレス作用を評価した。15 分間の拘束ストレス負荷は、マウスに興奮様状態を惹起し、またストレス関連因子であるコルチコステロン、セロトニン、ドパミン量を増大させた。強制水泳試験及びペントバルビタール睡眠試験において、ストレス負荷により短縮した不動時間及び睡眠時間を **valerena-4,7(11)-diene** (300 μ g/cage) は有意に延長した。この作用はジアゼパム (5 mg/kg; p.o.) 及びクロルプロマジン (5 mg/kg; p.o.) の作用と同程度であった。またストレス関連因子に対して、**valerena-4,7(11)-diene** は血中コルチコステロン量を対照群と同等まで減少させ、また視床下部、線条体におけるセロトニン及びドパミン量を有意に低下させた。さらに視床下部において、ストレス負荷により低下したドパミンの代謝機能が **valerena-4,7(11)-diene** の吸入投与により改善された。以上から、抗ストレス作用を示した **valerena-4,7(11)-diene** のメカニズムとして **GABA** 受容体活性化作用及びドパミン D_2 受容体拮抗作用が示唆された。
4. 甘松香の精油画分を構成する化合物として、酸化型セスキテルペノイドを 6 成分同定した。カフェイン投与マウスに対する吸入投与試験から、強い鎮静活性を有する **patchouli alcohol** 及び **aristolene-1(10)-en-9-ol** を見出した。鎮静活性発現に関わる **GABA** 受容体の関与を検討するためペントバルビタール試験を実施した結果、**aristolene-1(10)-en-9-ol** 吸入投与群 (300 μ g/cage) においてジアゼパム投与群 (1 mg/kg; p.o.) と同程度の睡眠延長作用の発現が認められた。この睡眠延長作用は **GABA_A**-ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬フルマゼニルの前処置 (3 mg/kg; i.p.) により完全に消失したことから、**aristolene-1(10)-en-9-ol** は **GABA** 受容体活性化作用を有することが示唆された。

これらの研究成果について以下に四章に分けて論述する。

第一章

吸入投与方法を用いた沈香及び甘松香香気成分の鎮静活性評価と活性成分探索

鎮静活性評価におけるスクリーニング方法として、本研究ではオープンフィールド試験を用いた。オープンフィールド試験とは、動物が制約を受けることなく自由に行動できる空間（オープンフィールド）内に動物を投入し、一定時間マウスの行動を観察することで動物の情動変化を予測する試験である。オープンフィールド内に投入された動物は、投入直後は新奇環境に対する探索行動及び不安様行動により自発運動量が増大するが、時間経過と共に環境に対する馴化から動物の自発運動量は減少していく。オープンフィールド試験において鎮静薬ジアゼパム (2 mg/kg) をマウスに経口投与すると、自発運動量が対照群と比較して 49% 抑制されることから²⁵⁾、自発運動抑制作用を指標にして香気成分の鎮静効果を評価した。本研究では吸入投与試験における陽性対照としてラベンダーオイルを用いた。ラベンダーオイルの鎮静活性に関する研究は数多くなされており、実際にラベンダーオイルの香気成分が充満するフィールド内ではマウスの自発運動量が低下する報告がある²⁶⁾。

本研究において、実験装置として家庭用観賞魚飼育水槽（奥行 30 cm, 幅 60 cm）を用いた。水槽底面に 10 cm 四方の格子線を引き、格子線をマウスが横切った回数を自発運動量とし、またマウスの行動をビデオカメラにて撮影することで、異常行動等の発現の有無を確認した。吸入投与方法として、水槽上部に香気成分を塗布したろ紙を配置し、ガラスで蓋をした後に自然拡散で 60 分間香気成分を充満させた。このフィールド内にマウスを投入し、オープンフィールド試験を実施した。作成した実験装置の機能に関してラベンダーオイルを用いて確認した後に、沈香オイル及び甘松香ヘキササンエキスの吸入投与による鎮静効果の発現検討を行った。

本章では、沈香オイル及び甘松香ヘキササンエキスの香気吸入による鎮静効果と、活性成分として同定した benzylacetone、 α -gurjunene、calarene の鎮静効果を報告する。

1 節 沈香オイル及び甘松香へキサンエキスの吸入投与による鎮静作用

沈香オイルの吸入投与による自発運動抑制作用

本研究で作成した実験装置の機能確認を行うため、ラベンダーオイル (lavender oil) の吸入投与による自発運動抑制作用を検討した。Figure 1A にはオープンフィールド試験におけるマウス自発行動の 5 分毎の経時変化を、Fig. 1B には 60 分間の総運動量を AUC 値として示した。ラベンダーオイルをマウスに吸入投与した結果、吸入投与後 30 分までに自発運動量は低下し、その後時間経過とともに自発運動抑制効果は増大した (Fig. 1A)。また総運動量に関して、対照群と比較し有意な AUC 値の低下が認められた (Fig. 1B)。60 分間のオープンフィールド試験中、マウスに異常行動は認められなかったことから、ラベンダーオイルの行動抑制効果は鎮静作用発現によることが示唆された。

作成した実験系を用いて吸入投与による沈香オイル (agarwood oil (1) : 産地不明、agarwood oil (2) : ベトナム産) の鎮静効果の発現を検討した。その結果、2 種の沈香オイル投与群共に、投与後 10 分頃からマウスの自発運動量が低下し、時間経過とともに行動抑制効果が増大した (Fig. 1A)。総運動量に関してもラベンダーオイル投与群と同程度の AUC 値を示した (Fig. 1B)。60 分間の試験中にマウスに異常行動は認められず、沈香オイルの香気吸入により鎮静効果が発現したことが示唆された。

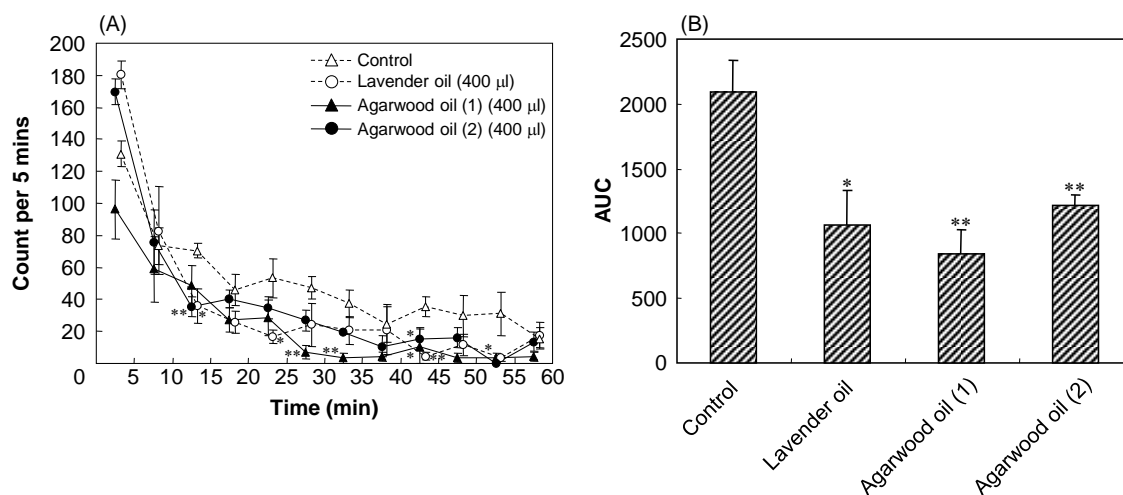


Fig. 1. Locomotor activity transition (A) and total spontaneous motor activity (B) of mice administered agarwood oils (400 µl). Data are shown as means \pm SEM of six mice (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group).

甘松香ヘキサンエキスの吸入投与による自発運動抑制作用

甘松香をヘキサンにて抽出し、得られたヘキサンエキス (spikenard ext.) を無臭溶媒であるトリエチルケエン酸に溶解しマウスに吸入投与した。Figure 2 には甘松香ヘキサンエキスの吸入投与試験の結果を示した。その結果、総運動量に関して、1~100 mg/cage の投与量の範囲で用量依存的な自発運動抑制効果が観察された (Fig. 2B)。特に 100 mg/cage 投与群では、吸入投与後 30 分までにマウス自発運動量が低下し、ラベンダーオイル投与群と類似した行動推移を示した (Fig. 2A)。また 100 mg/cage 投与群の総運動量はラベンダーオイル投与群と同等の AUC 値を示した (Fig. 2B)。一方 1000 mg/cage 投与群では、マウスに対する行動抑制効果は減弱し、60 分間の試験中、跳躍行動や多排泄などの異常行動がマウスに観察された。

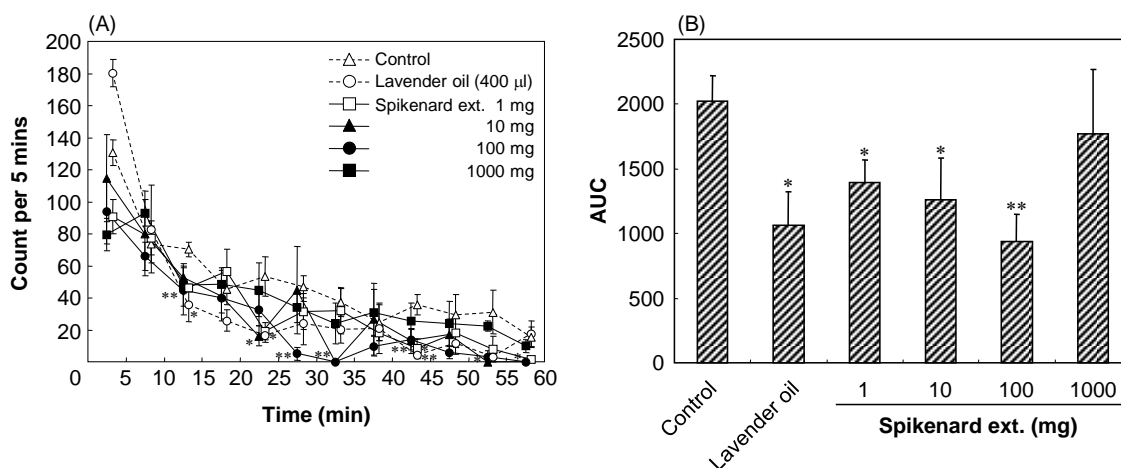


Fig. 2. Locomotor activity transition (A) and total spontaneous motor activity (B) of mice administered spikenard ext. (1, 10, 100, 1000 mg). Data are shown as means \pm SEM of six mice (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group).

2節 沈香及び甘松香中の主要揮発性成分の同定

SPME-GC-MS 分析による沈香オイル中の揮発性成分の同定

沈香オイル中の活性成分を同定するため、沈香オイルの GC-FID 及び GC-MS 分析による揮発成分の定量及び定性解析を行った。GC-MS 分析において、揮発成分の抽出を固相マイクロ抽出 (Solid Phased Micro Extraction : SPME) により行った²⁷⁾。実験には 24 ゲージのニードル内に固定相ファイバー (1 cm) が収納された SPME ファイバーを用いた。サンプルバイアル中のヘッドスペースに蒸散した化合物を SPME ファイバーに吸着させ GC 部に導入することで、揮発性成分を特異的に検出することが可能になる。SPME-GC-MS 分析の結果、沈香オイル ①から主揮発成分として benzylacetone が検出され (Fig. 3,4)、また沈香オイル ②からは α -gurjunene、calarene が検出された (Fig. 3,5)。化合物の同定は、標品との保持時間及び MS パターンの異同を確認することで行った。GC-FID 分析から各化合物の沈香オイル中の組成比を算出した結果、benzylacetone は 0.96%、 α -gurjunene は 15.1%、calarene は 17.3% であった。

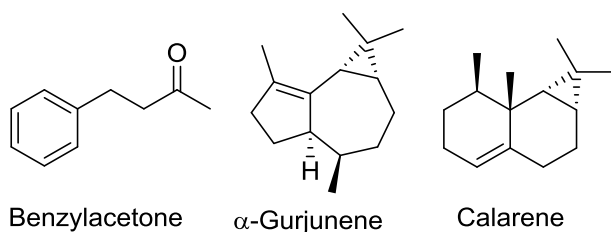


Fig. 3. Structures of compounds from agarwood oils.

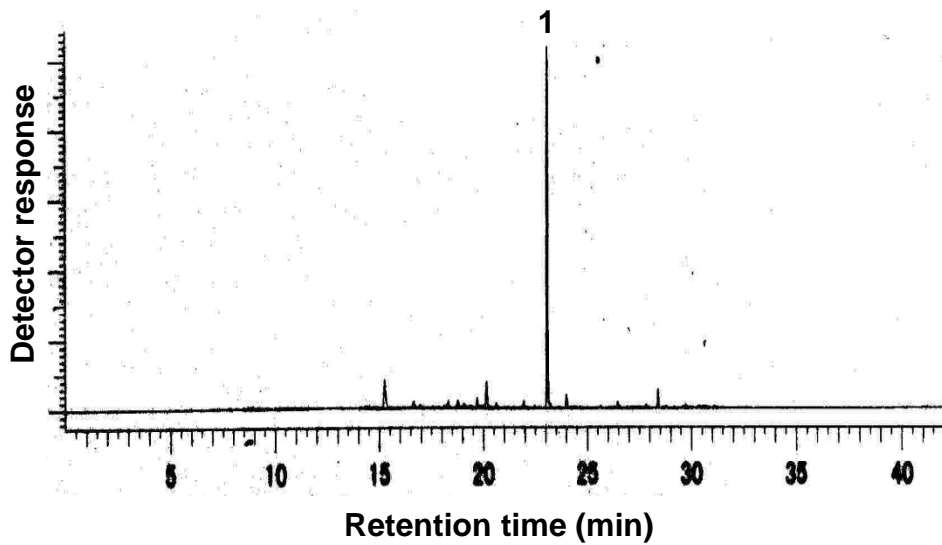


Fig. 4. A total ion chromatogram of the SPME-GC-MS analysis of the type 1 agarwood oil. The numbered peak is as follows: 1. Benzylacetone (peak area: 47.1%).

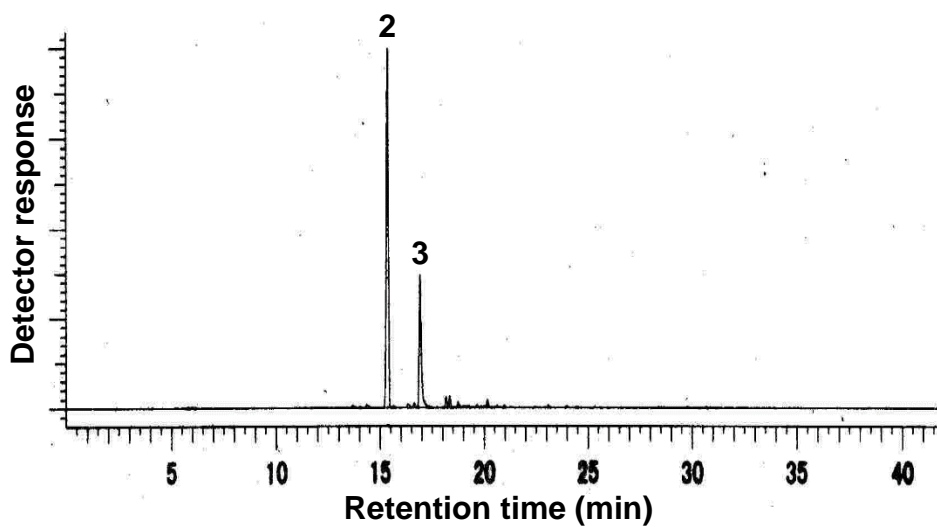


Fig. 5. A total ion chromatogram of the SPME-GC-MS analysis of the type 2 agarwood oil. Numbered peaks are as follows: 2. α -Gurjunene (peak area: 61.5%), 3. calarene (peak area: 24.7%).

SPME-GC-MS 分析による甘松香ヘキサンエキス中の揮発性成分の同定

SPME-GC-MS 分析により甘松香ヘキサンエキス中の揮発性成分を定性解析した結果、7 個のピークがクロマトグラム上で観測され (Fig. 7)、その中で主要ピーク (ピーク No. 3) として calarene を同定した。GC-FID 分析から算出した calarene の甘松香ヘキサンエキス中の組成比は 26.1% であった。

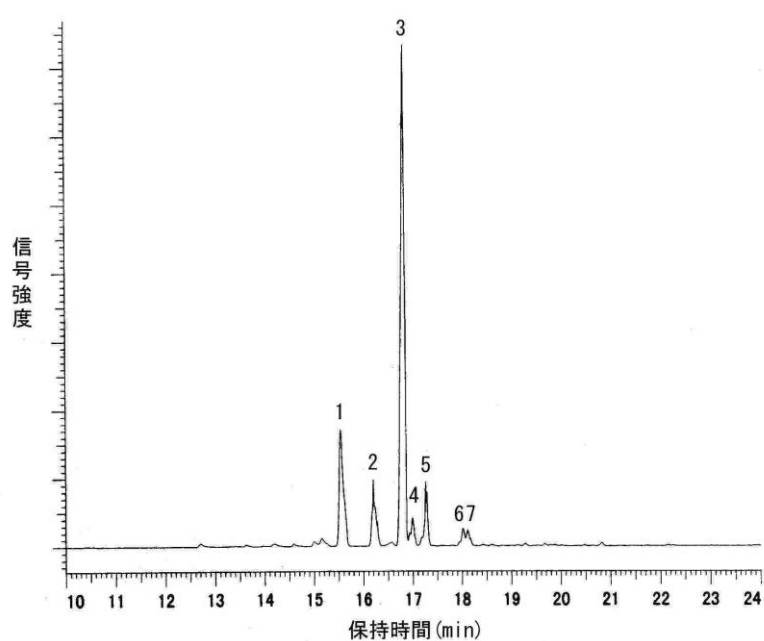
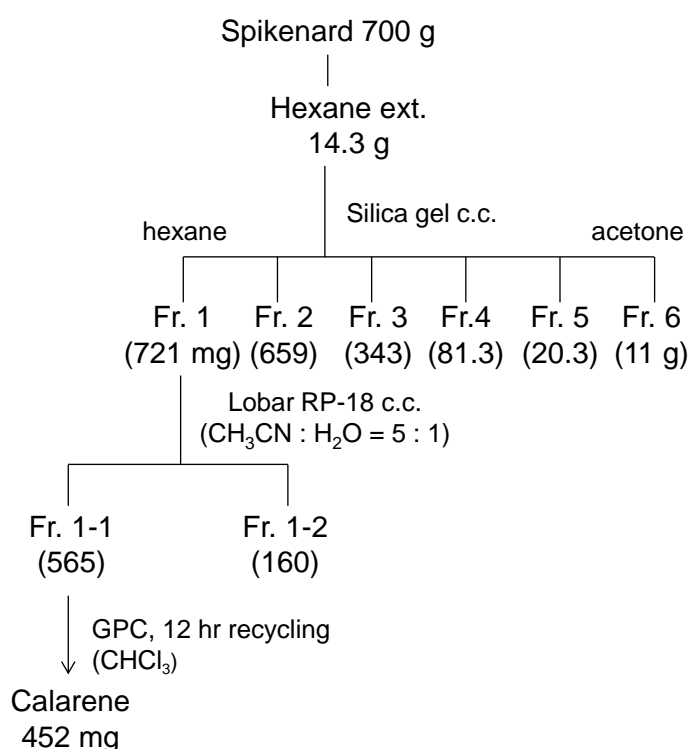


Fig. 7. A total ion chromatogram of the SPME-GC-MS analysis of the spikenard hexane extract. Numbered peaks are as follows: 3. Calarene (peak area: 63.4%).

Calarene の単離精製操作

同定した化合物の単独投与試験の実施において、calarene に関しては活性評価に必要な量を市販品から得ることは困難であったため、甘松香からの単離精製物を実験に用いることにした。甘松香へキサンエキス (14.3 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン及びアセトンにて溶出することで 6 画分を得た。Fraction 1 に関して逆相系 Lobar RP-18 中圧カラム ($\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$, 3 mL/min) にて溶出することで Fr. 1-1 及び Fr. 1-2 を回収し、さらに Fr. 1-1 をゲルろ過カラムにて 12 時間のリサイクル操作を行うことで calarene を 95% 以上の純度 (GC-FID) で 452 mg 得た (Scheme 1)。単離精製した calarene の構造決定は、NMR 構造解析による ^{13}C NMR のケミカルシフトの文献値²⁸⁾ との一致を確認することで行った。



Scheme 1. Separation procedure of calarene from spikenard.

3節 単一成分の吸入投与による鎮静作用

Benzylacetone の単独投与試験

吸入投与法を用いた沈香及び甘松香の鎮静活性を担う化合物を同定するため、同定した化合物の単独投与試験を実施した。投与量は沈香オイル中の組成から決定した。

Benzylacetone (東京化成株式会社, 純度 95%) の吸入投与試験の結果を Fig. 8 に示す。Benzylacetone を 0.001% ~ 10% の用量でマウスに吸入投与した結果、0.001% ~ 0.1% の範囲で用量依存的な自発運動抑制効果が観察された (Fig. 8A, B)。特に 0.1% 投与群では投与後 10 分頃からマウスの自発運動量は低下し、その後時間経過とともに対照群と比較して有意な自発行動抑制効果が認められた (Fig. 8A)。またラベンダーオイル投与群と同程度の AUC 値の低下が 0.1% 投与群に認められた (Fig. 8B)。一方、1.0% 投与群では、対照群と比較して行動量の増加が認められ、AUC 値は対照群と比較して増大する傾向を示した (Fig. 8B)。10% 投与群においては、多排泄等の異常行動がマウスに観察されたが、AUC 値に顕著な変動は認められなかった (Fig. 8B)。

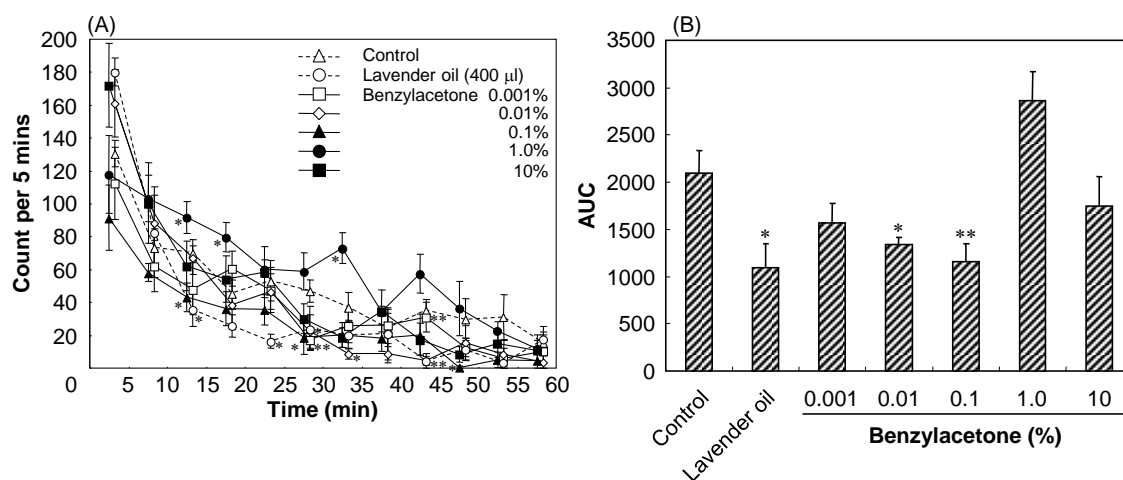


Fig. 8. Locomotor activity transition (A) and total spontaneous motor activity (B) of mice administered benzylacetone (0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10%). Data are shown as means \pm SEM of six mice (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group).

Calarene の単独投与試験

Calarene (単離精製物) の吸入投与試験の結果を Fig. 9 に示す。投与量は 0.085, 0.17, 1.7, 17% とした。Calarene 0.17% 投与群では、投与後 10 分頃からマウスの自発運動量が低下し始め、その後時間経過と共に対照群と比較して運動量の低下が認められた (Fig. 9A)。また 0.17% 投与群の AUC 値は対照群と比較して有意に低い値を示し、ラベンダーオイル投与群と同程度の行動抑制効果が認められた (Fig. 9B)。一方、1.7%, 17% 投与群においてはマウスに跳躍行動や多排泄等の異常行動が観察されており、17% 投与群における有意な AUC 値の低下は、鎮静効果発現に由来しないことが考えられた (Fig. 9B)。

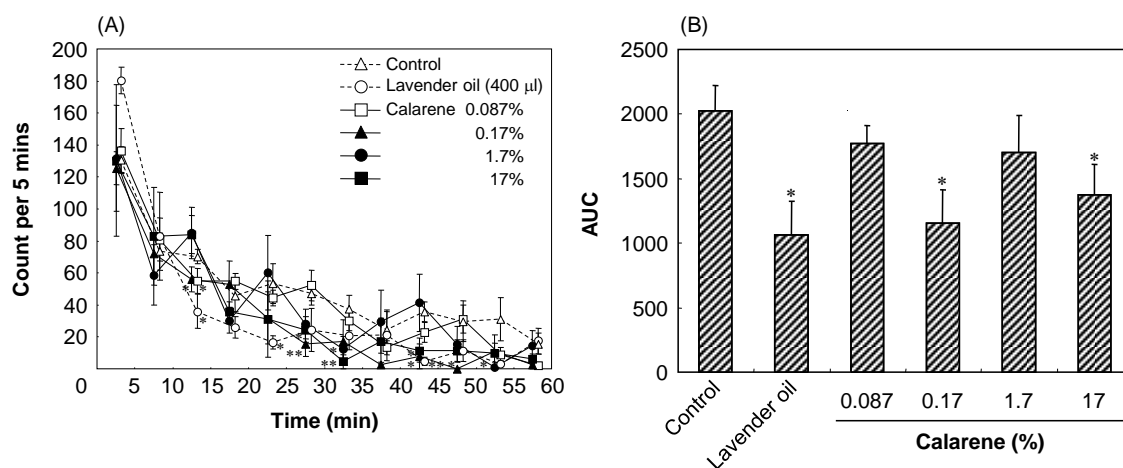


Fig. 9. Locomotor activity transition (A) and total spontaneous motor activity (B) of mice administered calarene (0.087, 0.17, 1.7, 17%). Data are shown as means \pm SEM of six mice (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group).

α -Gurjunene の単独投与試験

α -Gurjunene (Fluka, 純度 95%) の吸入投与試験の結果を Fig. 10 に示す。0.15, 1.5%, 15% の用量で吸入投与した結果、1.5% 投与群において有意な自発運動抑制作用が認められた (Fig. 10)。吸入投与後 10 分頃からマウスの自発運動量は低下し、60 分間を通して対照群と比較して低い行動量を推移した (Fig. 10A)。また AUC 値についても陽性対照であるラベンダーオイル投与群と同程度となり、有意な行動抑制効果が観察された (Fig. 10B)。一方 15% 投与群では、吸入投与後 30 分までの行動量は対照群と比較して有意に増加し (Fig. 10A)、AUC 値は対照群と比較し増加傾向を示した (Fig. 10B)。

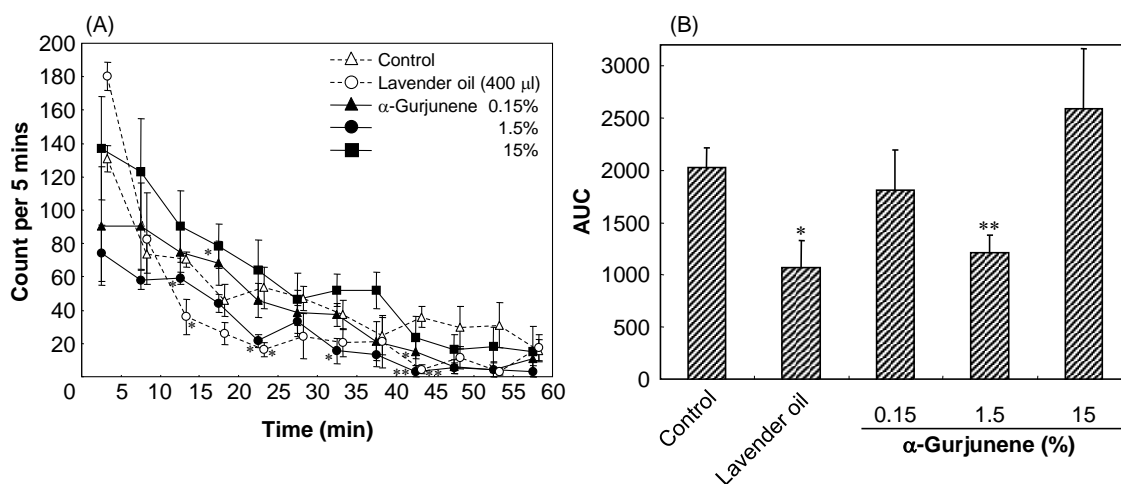


Fig. 10. Locomotor activity transition (A) and total spontaneous motor activity (B) of mice administered α -gurjunene (0.15, 1.5, 15%). Data are shown as means \pm SEM of six mice (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group).

考察

オープンフィールド試験を用いて薬物投与後の実験動物の自発運動変化を観察することで、薬物の有する作用を推定することが可能である。フィールド内へ投入された動物は新奇環境に対する探索行動や不安様行動により自発運動量が増大するが、鎮静薬の投与により自発運動活性は低下し²⁵⁾、一方興奮薬の投与によりマウスの自発運動活性は上昇し²⁹⁾、また興奮行動に伴う跳躍行動や排尿回数が増大も観察される。本章では各種香気試料の充満するケージ内でオープンフィールド試験を実施することで、香気吸入により発現する薬理作用を解析した。

鎮静効果発現が期待されている沈香及び甘松香の芳香に着目し、作成した実験系を用いて沈香オイル及び甘松香ヘキサノエキスの吸入投与試験を実施した結果、陽性対照として用いたラベンダーオイルと同程度の行動抑制作用が発現した。さらにこれら芳香性生薬の鎮静効果に寄与する成分として、沈香オイル及び甘松香ヘキサノエキスから benzylacetone、 α -gurjunene、calarene を同定した。

これら化合物の単独投与試験において、1.0% benzylacetone、1.5% α -gurjunene、0.17% calarene 投与群において有意な行動抑制効果が認められた。一方、行動抑制効果を示した用量より高用量側ではマウスに跳躍行動や多排泄等の異常行動が観察された。跳躍行動や多排泄行動は動物に不安状態や興奮状態が惹起された際に認められる現象であり³⁰⁾、高用量の香気成分の負荷はマウスに異常行動を誘発させたことが示唆された。香気吸入による毒性発現に関しては、ラベンダーオイル中の主要揮発成分であるモノテルペノイド linalool において報告例がある。Linalool の吸入投与試験において、低用量では鎮静効果が発現するが³¹⁾、高用量 (2740 mg/m³) に曝されると神経毒性が発現することが報告されている³²⁾。Calarene 17% 投与群の AUC 値は対照群と比較して有意に低下したが、ろ紙に添加した calarene 全量がフィールド内に揮散した際の単位容積中の濃度は約 1100 mg/m³ となり、毒性を発現する linalool の単位容積中の濃度に近似していることから、行動量の低下は毒性等の影響により引き起こされたことが示唆された。

本章では、香気成分の吸入投与による薬理作用の評価においてマウスを用いた実験系を構築し、沈香及び甘松香から活性成分として3個の化合物を同定した。注意欠陥障害や注意欠陥多動性障害に対して米国では芳香療法の臨床利用が一般的に認められている。近年、芳香療法に関する研究がさらに着目されており、本研究結果から沈香や甘松香の芳香の有効利用が期待される。

第二章

鎮静活性を有する甘松香由来 *valerena-4,7(11)-diene* の同定

第一章ではオープンフィールド試験を用いた鎮静活性評価から、沈香及び甘松香の芳香に鎮静効果が発現することを報告した。またこれら芳香性生薬の活性を担う化合物を同定したが、甘松香ヘキサネキス (100 mg/cage; AUC 値: 939 ± 206) の行動抑制効果は、甘松香ヘキサネキス中の主揮発性成分である *calarene* (0.16%; AUC 値: 1209 ± 168) より強い傾向を示した。そこで第二章では甘松香から *calarene* 以外の活性成分を同定することを目的とした。方法として、GC-MS 分析において *calarene* の次に強度の高いピークを同定するとともに、甘松香ヘキサネキスの粗精製画分から活性画分を見出すことで、鎮静活性を示す化合物の探索を行った。その結果、強い鎮静活性を有する *valerena-4,7(11)-diene* を同定したことを本章で報告する。

さらに第二章ではカフェインにより興奮を惹起したマウスを用いたオープンフィールド試験と、ペントバルビタール睡眠試験を実施することで *valerena-4,7(11)-diene* の鎮静作用を詳細に解析した。ストレス障害である不眠症や不安症状の誘発には、交感神経系の活性化による興奮、緊張の惹起が関与する。そこで、カフェイン処置により興奮状態を惹起させたマウスに対する鎮静効果を検討することで、ストレス障害に対する *valerena-4,7(11)-diene* の有効性を評価した。また鎮静活性の発現メカニズムを推定するためにペントバルビタール睡眠試験を行った。ペントバルビタールは GABA_A 受容体-ピクロトキシン結合部位に結合する薬物として動物に対する麻酔薬として利用されるが、麻酔作用を示す用量 (50 ~ 100 mg/kg) の約 1/3 の用量では催眠作用が誘発される。このペントバルビタール誘発睡眠に対して、植物由来の香気が影響を与える報告がある。レモンは自律神経興奮作用を、バレリアンは鎮静作用を示すが、ペントバルビタールを腹腔内投与したラットをレモンまたはバレリアンの芳香が充満するケージ内に投入すると、レモンの芳香中では睡眠時間が対照群と比較して 22% 短縮し、またバレリアンの芳香中では睡眠時間が 46% 延長した報告がある³³⁾。そこで、ペントバルビタールにより誘発された催眠に対する増強効果を鎮静作用として評価した。

中枢抑制薬の中で GABA 受容体を活性化する薬物の他に、ドパミン D₂ 受容体拮抗作用を有する薬物もペントバルビタール誘発睡眠を有意に増強させる作用がある³⁴⁾。本章ではペントバルビタール睡眠試験を用いて、*valerena-4,7(11)-diene* の吸入による鎮静活性の発現に関わる作用機序を推定した。

1 節 β -Maaliene 及び valerena-4,7(11)-diene の吸入投与による自発運動抑制作用

粗精製画分 (Fr. 1, 3) の吸入投与試験

甘松香ヘキサンエキスの粗精製画分 (Scheme 1) の中で、主要画分 Fr. 1 ~ 3 に関して GC-MS 分析を行った (Fig. 11)。Fraction 2 は Fr. 1 と Fr. 3 の混合画分であったため、Fr. 1 及び Fr. 3 に関して吸入投与試験を実施した。

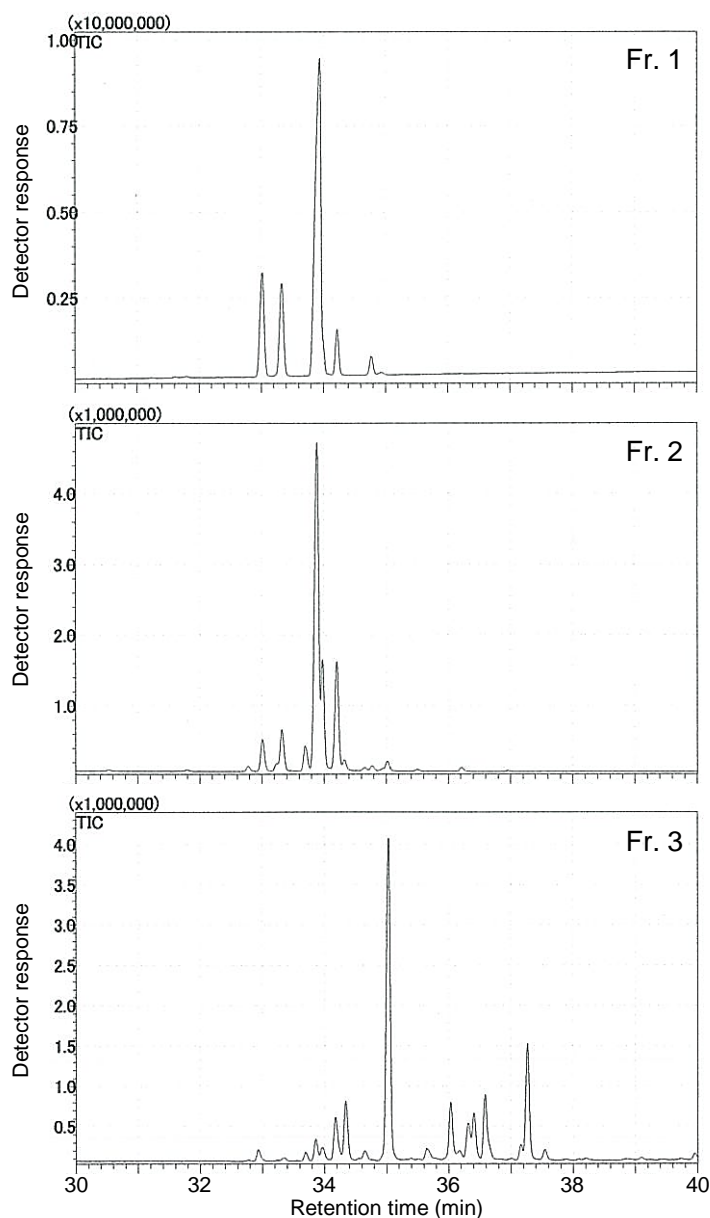


Fig. 11. Total ion chromatogram of GC-MS analysis of fractions 1, 2 and 3 of spikenard hexane extract.

粗精製画分の吸入投与試験の結果を Fig. 12 に示した。第一章で同定した benzylacetone (0.1%) の活性と比較し、Fr. 3 (0.1%) は benzylacetone よりも強い行動抑制作用を示した。活性画分 Fr. 3 中の主要ピークを同定し、また calarene の次に強度の高いピークを Fr. 1 から単離同定することにした。

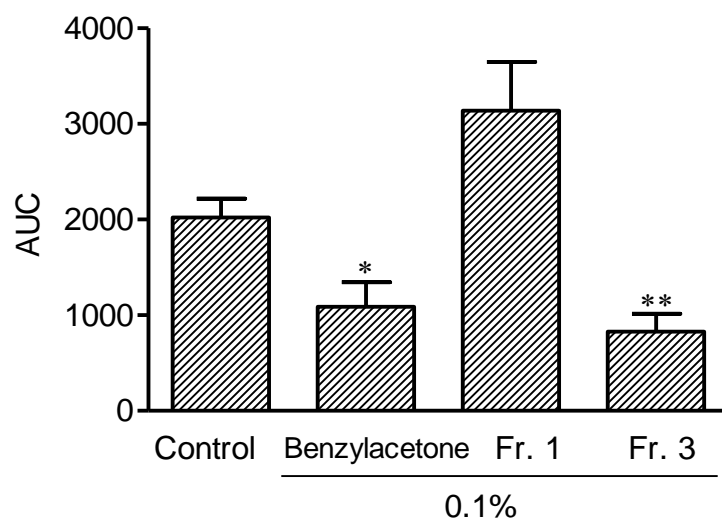
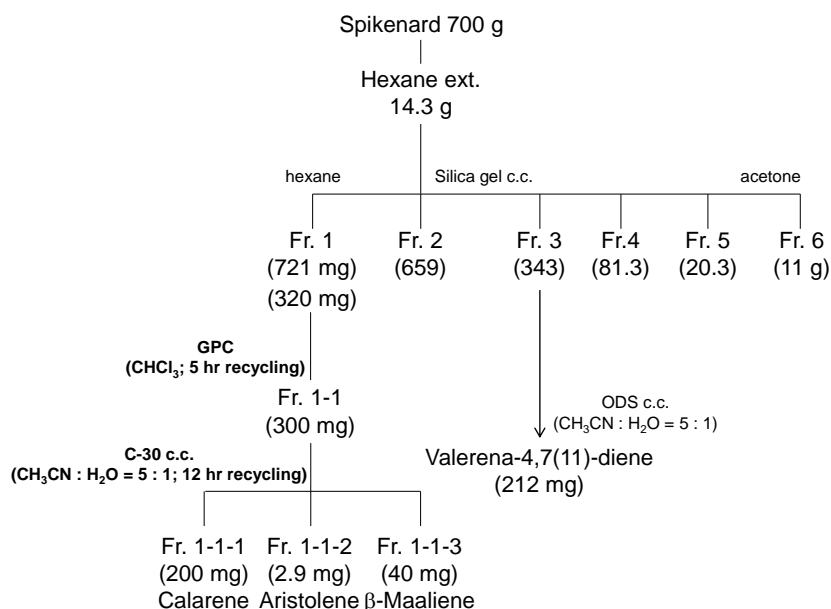


Fig. 12. Total spontaneous motor activity of mice administered Fr. 1 and Fr. 3 (0.1%). Data are shown as means \pm SEM of six mice (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group).

β-Maaliene、aristolene、valerena-4,7(11)-diene の同定

活性画分 Fr. 3 (343 mg) に関して、Lobar RP-18 中圧カラムを用いて CH₃CN : H₂O = 5 : 1 (流速 3 mL/min) にて溶出することで valerena-4,7(11)-diene を 95% 以上の純度 (GC-FID) で 212 mg 得た (Scheme 2, Fig. 13)。また Fr. 1 (320 mg) に関してゲルろ過カラムにて 5 時間のリサイクル操作を行った後に Fr. 1-1 (300 mg) を回収し、続く分取 HPLC (C-30, CH₃CN : H₂O = 5 : 1) を用いて 12 時間のリサイクル操作を行うことで β-maaliene、aristolene を 95% 以上の純度 (GC-FID) で得た (Scheme 2, Fig. 13)。構造決定は ¹³C, ¹H-NMR 及び HMQC, HMBC, ¹H-¹H-COSY スペクトル解析により行い、¹³C-NMR のケミカルシフトの文献値との一致を確認した^{35),36),37)}。GC-FID 分析から各化合物の甘松香へキサニエキス中の組成比を算出した結果、β-maaliene は 14.1%、aristolene は 8.3%、valerena-4,7(11)-diene は 6.3% であった。



Scheme 2. Separation procedure of sesquiterpenoids contained in spikenard hexane extract.

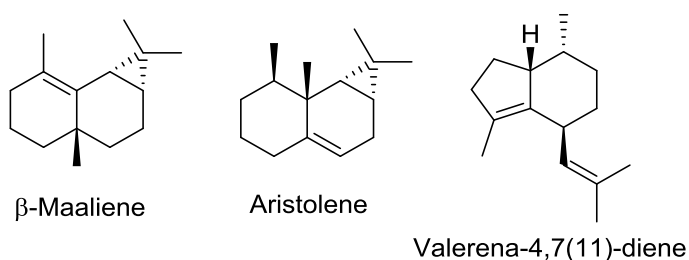


Fig. 13. Chemical structures of isolated compounds from spikenard.

β -Maaliene の単独投与試験

単離精製した β -maaliene 及び valerena-4,7(11)-diene に関して、オープンフィールド試験を用いた吸入投与試験を行った。Aristolene に関しては収量が少なかったため単独投与試験は行わなかった。投与量は甘松香ヘキサンエキス中の組成から決定し、 β -maaliene は 0.014, 0.14%、valerena-4,7(11)-diene は 0.006, 0.06% とした。

Figure 14 に β -maaliene の単独投与試験の結果を示した。0.014% 投与群では投与後 20 分から、0.14% 投与群においては投与後 10 分から経時的な行動抑制効果が認められ、特に 0.14% 投与群において、投与後 25 分以降には対照群と比較して自発運動量の有意な低下が観察された (Fig. 14A)。60 分間の総運動量に関して、0.014%、0.14% 投与群ともにラベンダーオイル投与群と同等の AUC 値を示した (Fig. 14B)。

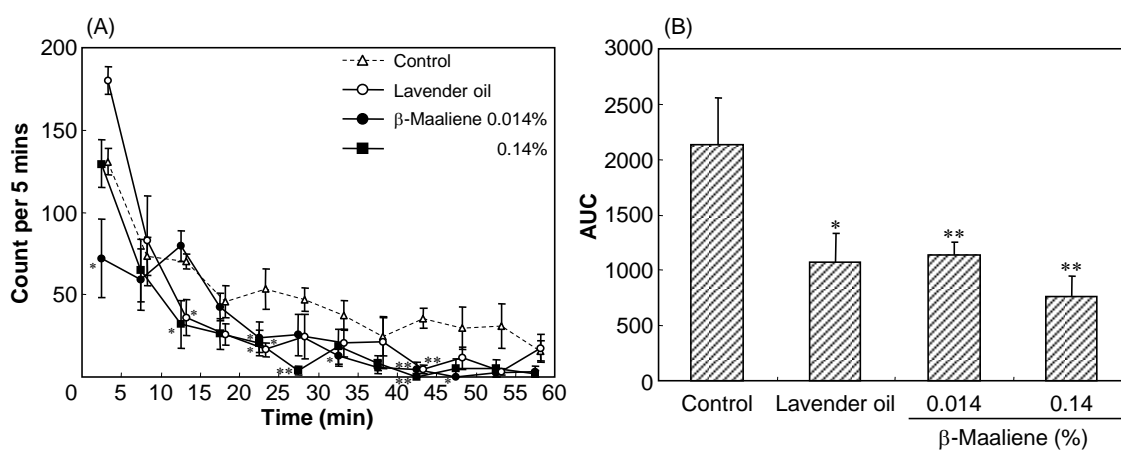


Fig. 14. Change in locomotor activity (A) and total spontaneous motor activity (B) of mice administered β -maaliene. Data are shown as means \pm SEM of six mice (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group).

Valerena-4,7(11)-diene の単独投与試験

Valerena-4,7(11)-diene の単独投与試験の結果を Fig. 15 に示した。0.006% 投与群では投与後 20 分までに自発運動抑制効果が発現したが、0.06% 投与群では投与後 10 分までにマウスの自発運動量が有意に低下し、さらに投与後 25 分以降には顕著な行動抑制効果が観察された (Fig. 15A)。60 分間の総運動量に関して、0.06% valerena-4,7(11)-diene は陽性対照であるラベンダーオイルより強い鎮静作用を示した (Fig. 15B)。

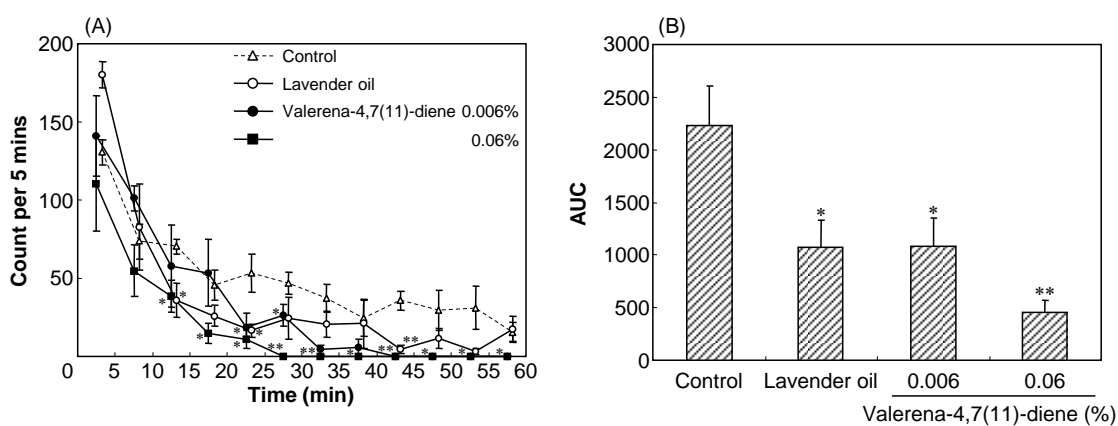


Fig. 15. Change in locomotor activity (A) and total spontaneous motor activity (B) of mice administered valerena-4,7(11)-diene. Data are shown as means \pm SEM of six mice (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group).

2節 カフェイン投与マウスに対する valerena-4,7(11)-diene の鎮静作用

活性画分 Fr. 3 (Scheme 2) 中の主要ピークとして同定した valerena-4,7(11)-diene はラベンダーオイルより強い鎮静作用を示した。Valerena-4,7(11)-diene の強い鎮静活性に着目し、カフェインにより興奮を惹起させたマウスに対して吸入投与試験を実施した (Fig. 16)。興奮を惹起するカフェインの用量を 2.5 mg/kg ~ 40 mg/kg の範囲で検討した結果、カフェイン 25 mg/kg の腹腔内投与によりマウス自発運動量は溶剤群と比較して約 2 倍増加した (data not shown)。カフェイン (25 mg/kg; i.p.) により興奮を惹起させたマウスに 0.06% valerena-4,7(11)-diene を吸入投与した結果、マウスの自発運動量は対照群と同等まで減少した。

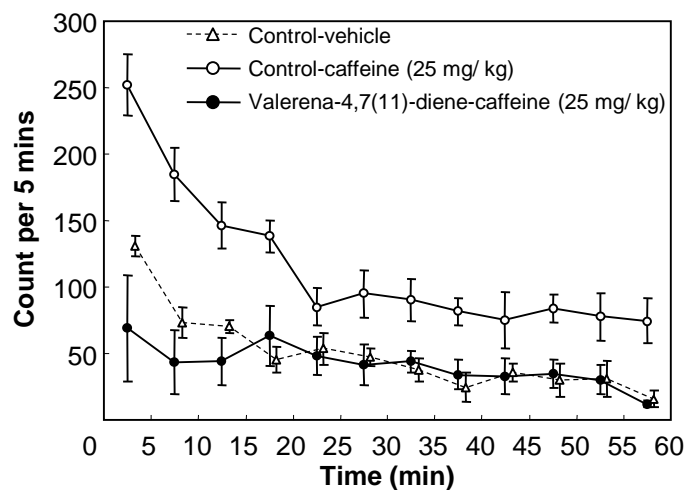


Fig. 16. The effect of valerena-4,7(11)-diene in caffeine-treated mice. Data are shown as means \pm SEM of six mice.

3節 Valerena-4,7(11)-diene のペントバルビタール誘発睡眠の延長作用

ペントバルビタール睡眠試験を用いて valerena-4,7(11)-diene の鎮静効果を詳細に検討した (Fig. 17)。ペントバルビタールを腹腔内投与 (25 mg/kg) したマウスを香気試料の充満するケージ内に投入し、誘発される睡眠までの導入時間と連続した睡眠時間を測定した。本実験において α_1 , D_2 受容体拮抗作用を有するクロルプロマジンを経口投与した (5 mg/kg)。睡眠導入時間に関して、対照群の 5.6 分に対し、ラベンダーオイル吸入投与群、0.1% benzylacetone 吸入投与群では約 5 分となり対照群と差は認められなかったが、0.06% valerena-4,7(11)-diene 吸入投与群の睡眠導入時間は 3.6 分となり有意に短縮した。これはクロルプロマジン投与群と同程度 (3.3 分) であった (Fig. 17A)。また睡眠時間に関して、対照群の 21.6 分と比較してラベンダーオイル投与群では 37.1 分、0.1% benzylacetone 投与群では 31.8 分となり有意な睡眠延長作用が観察された。一方、0.06% valerena-4,7(11)-diene 吸入投与群の睡眠時間は 57.3 分となり対照群と比較し約 2.7 倍の延長作用が認められ、クロルプロマジンと同程度 (52.4 分) の延長作用を valerena-4,7(11)-diene は示した (Fig. 17B)。

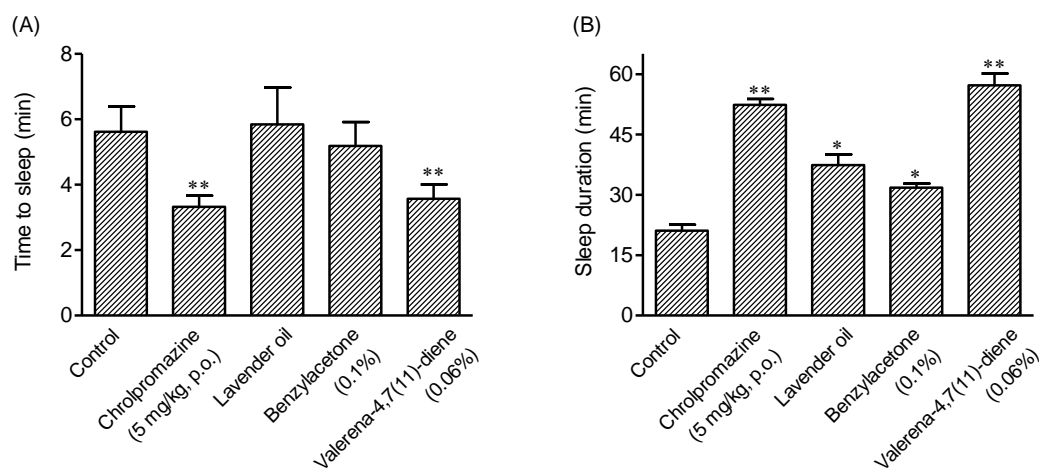


Fig. 17. Effects of the inhalation of various odorants on pentobarbital-induced sleep in mice on time to sleep (A) and sleep duration (B). Data are shown as means \pm SEM of six mice (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group).

考察

甘松香ヘキサンエキス中に含有される揮発性成分として、本章では新たに aristolene、 β -maaliene、valerena-4,7(11)-diene を同定した (Fig. 13)。多環性のセスキテルペノイドの基本骨格は通常 5-7 員環または 6-6 員環であるが、valerena-4,7(11)-diene は 5-6 員環性であることから、オミナエシ科植物に特異的に含有される成分であることが示唆されている。Figure 18 には報告されている valerena-4,7(11)-diene の推定生合成経路を示した。(E,E)-ファルネシルカチオンの環化反応により 10 員環の中間体 (A) が構築される。通常は経路 c, d, e による 1,3-ヒドリドシフトにより 6-6 員環または 5-7 員環化合物が構築されるが、5-6 員環性を構築するための経路 f (C-6, C-8 位間の共有結合を形成) はオミナエシ科植物に特異的に進行する反応であることが報告されている³⁸⁾。Valerena-4,7(11)-diene は *Valeriana officinalis* (オミナエシ科) から新規化合物として単離され³⁷⁾、*V. officinalis* 以外の植物からの単離は本研究が初めてである。

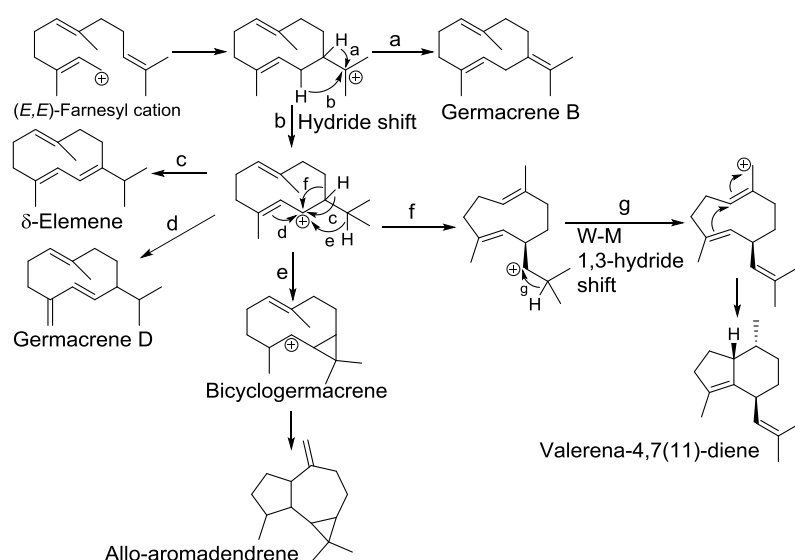


Fig. 18. Putative biosynthetic pathway of valerena-4,7(11)-diene.

オミナエシ科植物に特異的に含有される valerena-4,7(11)-diene は、強い鎮静活性を有することも本章で明らかとした。Valerena-4,7(11)-diene は、カフェイン投与により誘発した興奮行動を有意に鎮静し、またペントバルビタール睡眠試験においてクロルプロマジンと同程度の睡眠延長作用を示した。カフェイン投与による興奮作用はアデノシン受容体拮抗作用、ホスホジエステラーゼ阻害作用から引き起こされるが、この作用は麻酔薬などによる中枢抑制と拮抗する³⁹⁾。Valerena-4,7(11)-diene はペントバルビタール誘発睡眠を顕著に延長し、さらにクロルプロマジンと類似した作用を示したことから、

valerena-4,7(11)-diene の吸入投与による鎮静作用の発現には、中枢神経系の GABA 受容体活性化作用⁴⁰⁾ や、ドパミン D₂ 受容体拮抗作用が関与することが考察された。

日常のストレスによる緊張状態は不眠症や不安症状を引き起こす原因となる。Valerena-4,7(11)-diene の吸入投与による催眠増強作用や鎮静作用を、緊張状態の緩和やストレス障害の改善に効果的に利用できる可能性がある。また多動性障害に対して既に米国では芳香療法が用いられていることから、valerena-4,7(11)-diene の有効利用が期待される。

第三章

Valerena-4,7(11)-diene 吸入投与による拘束ストレス誘発興奮行動と ストレス関連因子変動に対する抑制効果

日常的なストレスは不眠症や不安症状等のストレス障害を引き起こし、また慢性的なストレスの暴露はうつ病等の中枢神経系疾患の発症要因となる¹⁾。抗不安薬や抗うつ薬はストレス障害の軽減に効果的だが、これら薬物の副作用が問題となっている。そこで本章では、芳香療法の利用によるストレス軽減効果を検討した。第二章より valerena-4,7(11)-diene は強い鎮静作用を示したことから、本化合物の抗ストレス作用を評価した。

視床下部－下垂体－副腎皮質系 (hypothalamo-pituitary-adrenal axis : HPA 系) はストレス伝達機構として知られる。ストレス刺激により視床下部室傍核から下垂体前葉にコルチコトロピン遊離ホルモン (CRH) が分泌され、CRH が副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の分泌を促進し、そして ACTH が体内循環を経て副腎皮質からのグルココルチコイドの放出を促進する。通常は、放出されたグルココルチコイドが下垂体、視床下部、海馬のグルココルチコイド受容体を介して、ACTH や CRH の放出に負のフィードバックを与えるが、持続的なストレス刺激により HPA 系のフィードバック機能が破綻する。その結果、グルココルチコイドが過剰分泌されることで中枢が障害を受け、うつ病等が発症するとされる⁸⁾。また、生体がストレスに曝されると防御機構としてモノアミン神経系が活性化され、その結果、交感神経系の機能が亢進し、興奮、緊張状態が惹起される⁴¹⁾⁴²⁾⁴³⁾。そこで本章では、ストレスにより誘発される興奮状態及びストレス関連因子の増大に対する抑制作用を抗ストレス作用として評価した。

本章で用いたストレッサーは Sabban らの報告を参考にして決定した。拘束ストレス負荷中のラットの心拍変動を解析した結果、拘束ストレス負荷後 15 分時点でラットの平均動脈圧及び心拍数が最大値に到達した⁴⁴⁾。そこで本章では、マウスに 15 分間の拘束ストレスを負荷し、ストレス負荷により惹起される興奮状態をオープンフィールド試験、強制水泳試験、ペントバルビタール睡眠試験を用いて解析した。またストレス関連因子として、血清中コルチコステロンを ELISA 法により、脳内モノアミン (アドレナリン、ドパミン、セロトニン) 及びこれらの代謝物 (ホモバニリン酸、5-ヒドロキシインドール酢酸、3,4-ヒドロキシフェニル酢酸) を HPLC-ECD 法により測定した。

さらに本章では、valerena-4,7(11)-diene の吸入投与による作用発現経路の解析を行った。吸入投与による作用発現には香気成分の嗅覚系刺激と、化合物の経肺的な吸収が関与することが考えられている。香気成分が嗅細胞を刺激することで匂い応答が脳に伝達され、大脳辺縁系や視床下部が作動することで自律神経系及びホルモン分泌に影響し様々な薬理効果が発現するとされる⁴⁵⁾。また経肺的に吸収された香気成分は血中に移行し、全身作用により種々の効果が発現するとされる⁴⁶⁾。嗅覚系の関与について、硫酸

亜鉛の鼻腔内投与により作成した嗅覚鈍化モデルマウスを用いたオープンフィールド試験から検討した。また化合物の経肺吸収の関与について、吸入投与後の **valerena-4,7(11)-diene** の組織移行性と尾静脈投与後のオープンフィールド試験から検討した。

1 節 ストレス誘発性の興奮行動に対する valerena-4,7(11)-diene の鎮静作用

強制水泳試験における不動時間延長作用

15 分間の拘束ストレス負荷により惹起される興奮状態を各種行動薬理学試験により解析した。拘束ストレス負荷によりマウスの自発運動量は変化しなかったが (data not shown)、強制水泳試験及びペントバルビタール睡眠試験において興奮様行動が観察された。Figure 19 には 6 分間の強制水泳試験における不動時間の累積時間を示した。強制水泳試験における不動時間の短縮は抗うつ薬の投与により認められるが、興奮薬の投与においても同様の作用が認められる⁴⁷⁾。未処置 (control) の不動時間 235 秒に対して、カフェイン (20 mg/kg) を投与したマウスの不動時間は 104 秒となり、未処置と比較して不動時間が 56% 短縮した。同様の作用はストレスを負荷したマウス (stress) においても観察され、15 分間の拘束ストレスを負荷することで不動時間が 135 秒となり、未処置と比較して 43% 短縮した。また、ストレスを負荷したマウスに対してジアゼパム (5 mg/kg) を前処置することで不動時間が有意に延長したことから、ストレスを負荷したマウスに対する不動時間の延長作用を鎮静作用として評価した。

拘束ストレスを負荷したマウスに対して、valerena-4,7(11)-diene の充満するケージ内で強制水泳試験を実施した。その結果、ストレスを負荷したマウスの不動時間は用量依存的に延長し、特に 300 $\mu\text{g}/\text{cage}$ 投与群の不動時間は 254 秒となりジアゼパム投与群と同程度の延長作用が観察された。

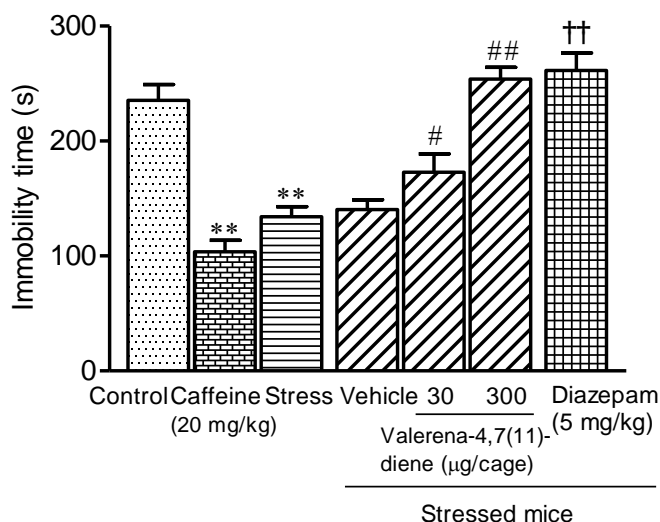


Figure 19. Immobility times in the forced swim test. Data are presented as the mean \pm standard deviation of each group ($n = 8$). Comparisons were made using one-way analysis of variance followed by Tukey's test; ** $P < 0.01$ vs. control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. vehicle group, †† $P < 0.01$ vs. stress group.

ペントバルビタール睡眠試験における睡眠延長作用

Figure 20 にはペントバルビタール睡眠試験の結果を示した。未処置 (control) の睡眠時間 31 分に対して、カフェインを投与したマウスの睡眠時間は 12 分となり、未処置と比較して 61% 短縮した。同様に拘束ストレスを負荷したマウス (stress) の睡眠時間は 16 分 (47% 短縮) となり、ストレス負荷による興奮状態の惹起が観察された。

拘束ストレスを負荷したマウスに対して、valerena-4,7(11)-diene の充満するケージ内でペントバルビタール睡眠試験を実施した。その結果、ストレスを負荷したマウスの睡眠時間は用量依存的に延長し、特に 300 $\mu\text{g}/\text{cage}$ 投与群の睡眠時間は 31 分となり、未処置の睡眠時間と同程度まで延長した。同様の作用はクロルプロマジンの投与によっても観察され、ストレスを負荷したマウスに対してクロルプロマジン (5 mg/kg) を前処置することで睡眠時間が 45 分まで延長した。

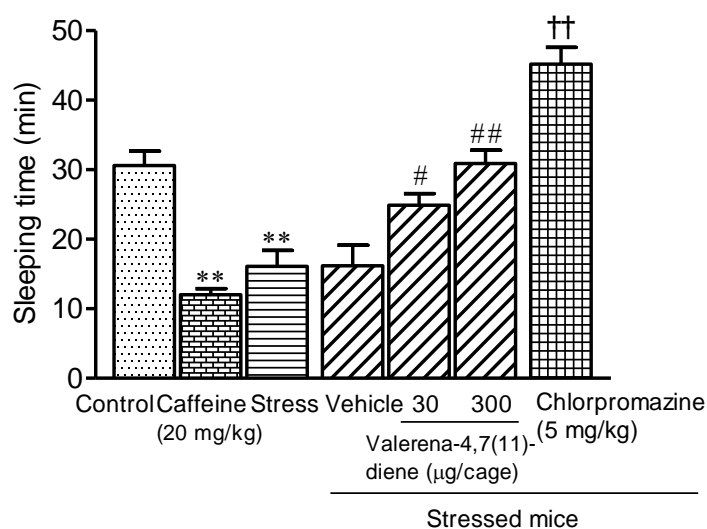


Figure 20. Sleeping times in the pentobarbital sleep test. Data are presented as the mean \pm standard deviation of each group ($n = 8$). Comparisons were made using one-way analysis of variance followed by Tukey's test; ** $P < 0.01$ vs. control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. vehicle group, †† $P < 0.01$ vs. stress group.

第二節 ストレス関連因子に対する valerena-4,7(11)-diene の抑制作用

血清コルチコステロン変動に対する抑制作用

生体組織（血清、視床下部、線条体）は拘束ストレス負荷の終了直後、及び解放 30 分後に回収した。この解放 30 分間に valerena-4,7(11)-diene (300 $\mu\text{g}/\text{cage}$) をマウスに吸入投与することで抗ストレス作用を評価した。Figure 21 には血清中コルチコステロン量の測定結果を示した。未処置 (control) の血清中コルチコステロン量は 1.57 ng/mL であったが、拘束ストレス負荷の終了直後 (stress) の濃度は 2.74 ng/mL となり、拘束ストレスの負荷により約 2 倍増加した。また解放 30 分後の vehicle 群の血清中濃度は 2.29 ng/mL であり、血清コルチコステロン量は高レベルを維持していた。一方、解放 30 分後の valerena-4,7(11)-diene 投与群の血清中コルチコステロン量は 1.41 ng/mL となり、未処置と同等レベルまで低下した。

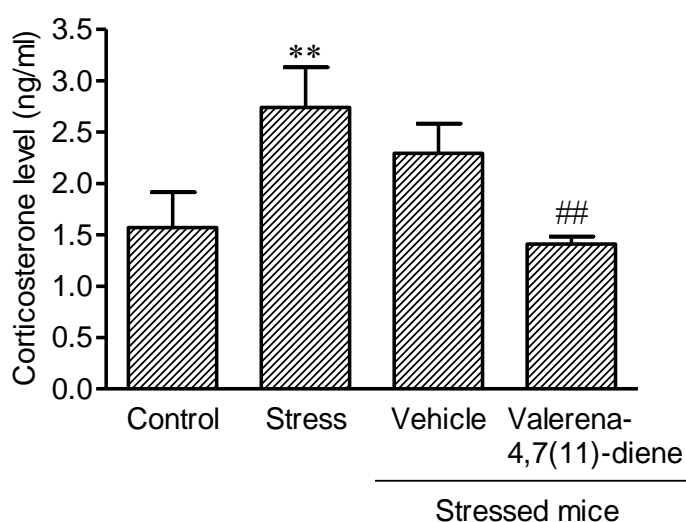


Figure 21. The effect of valerena-4,7(11)-diene on acute restraint stress-induced changes in serum corticosterone levels in mice. Data are presented as the mean \pm standard deviation of each group (n = 6). Comparisons were made using one-way analysis of variance followed by Tukey's test; ** $P < 0.01$ vs. control group, ## $P < 0.01$ vs. vehicle group.

脳内モノアミン変動に対する抑制作用

Table 1 には脳内モノアミン量の測定結果を示した。視床下部及び線条体における NE, DOPAC, 5-HIAA 量ではストレスの負荷による有意な変化は認められなかったが、DA, 5-HT 量に関して顕著な増大が観察された。線条体の DA 量は拘束ストレス負荷の終了直後 (stress) に増加し、また解放 30 分後 (vehicle) においても高レベルを維持していた。また視床下部の DA 量は、解放 30 分後 (vehicle) に有意に増加した。5-HT 量に関しては、視床下部、線条体において拘束ストレス負荷の終了直後 (stress) に増加し、線条体では解放 30 分後 (vehicle) においても高レベルを維持していた。また代謝物との比から算出したドパミン及びセロトニンの代謝回転に関して、DOPAC/ DA の値は視床下部では解放 30 分後 (vehicle) に低下し、線条体では拘束ストレス負荷の終了直後 (stress) に有意に低下した。また視床下部における 5-HIAA/ 5-HT の値は拘束ストレス負荷の終了直後 (stress) に有意に低下した。

Valerena-4,7(11)-diene を 30 分間吸入投与した結果、視床下部における DA 量及び線条体における DA, 5-HT 量の有意な低下が認められた。また視床下部において観察された DA 代謝回転の低下は、valerena-4,7(11)-diene の吸入投与により未処置と同等レベルまで改善した。

Table 1. Effects of valerena-4,7(11)-diene (VLD) on cerebral monoamine and metabolite levels induced by acute restraint stress in mice.

Brain region	Groups	Monoamine and metabolite (ng/mg weight tissue)						Ratio	
		NE	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA	DOPAC/DA	5-HIAA/5-HT
Hypothalamus	Control	2.141±0.110	0.403±0.076	0.089±0.020	1.736±0.292	0.976±0.120	0.400±0.037	0.232±0.086	0.415±0.066
	Stress	2.032±0.141	0.463±0.091	0.094±0.004	2.288±0.326*	1.134±0.122*	0.379±0.022	0.209±0.038	0.336±0.021*
	Vehicle	2.058±0.256	0.620±0.199**	0.102±0.032	1.926±0.706*	0.979±0.131	0.408±0.105	0.188±0.026*	0.415±0.077
	VLD	2.050±0.230	0.432±0.083##	0.098±0.015	2.022±0.315	1.060±0.080	0.440±0.053	0.241±0.099#	0.415±0.034
Striatum	Control	0.228±0.031	5.389±0.471	0.379±0.092	7.870±0.284	0.448±0.044	0.170±0.028	0.064±0.006	0.379±0.050
	Stress	0.228±0.033	6.336±0.677**	0.288±0.094	7.788±1.560	0.534±0.043**	0.180±0.029	0.045±0.010**	0.355±0.038
	Vehicle	0.239±0.015	6.353±0.437**	0.352±0.053	7.689±0.403	0.532±0.046**	0.203±0.014*	0.055±0.006	0.383±0.026
	VLD	0.226±0.057	5.841±0.227#	0.362±0.078	7.732±0.804	0.486±0.021#	0.201±0.038	0.057±0.007	0.414±0.068

Results represent the mean ± standard deviation of each group (n = 6). Comparisons were made using one-way analysis of variance followed by Tukey's test; *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control group, #P < 0.05, ##P < 0.05 vs. vehicle group.

3節 吸入投与方法における作用発現経路の解析

嗅覚鈍化モデルマウスに対する valerena-4,7(11)-diene の吸入効果

吸入投与における嗅覚系の関与を検討するため、嗅覚鈍化マウスに対する valerena-4,7(11)-diene の吸入の効果を検討した。嗅覚鈍化マウスは、硫酸亜鉛溶液をマウスの両鼻腔内へ点鼻する処置を5日間連続で行うことで作成した。処置無しのマウス (control mice) 及び嗅覚鈍化処置したマウス (anosmic mice) を用いてオープンフィールド試験を実施した (Fig. 22)。Valerena-4,7(11)-diene (300 µg/cage) を吸入投与した結果、処置無しのマウスでは自発運動量が vehicle 群と比較して 55% 低下したが、嗅覚鈍化処置したマウスでは 27% 低下した。

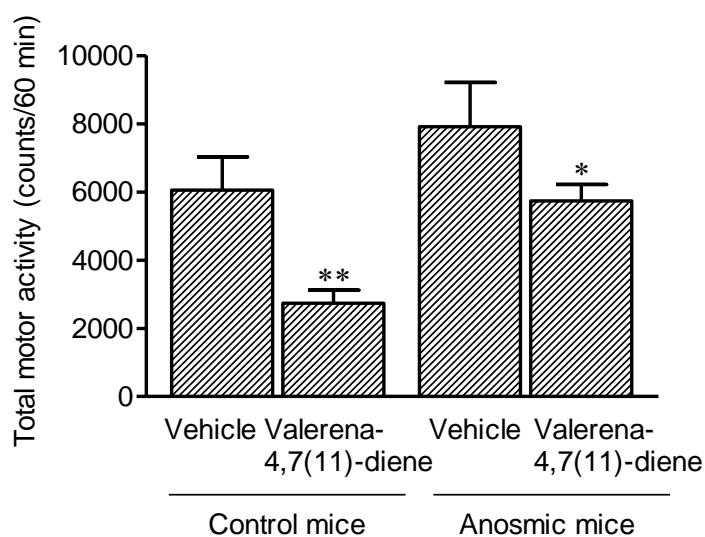


Figure 22. The locomotor reduction effect of valerena-4,7(11)-diene inhalation on anosmic model mice. Data are presented as the mean \pm standard deviation of each group (n = 6). Statistical differences vs. vehicle group indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

吸入投与による valerena-4,7(11)-diene の組織移行性

吸入投与による経肺吸収の関与を検討するため、15分、30分、60分間の valerena-4,7(11)-diene の吸入投与後に全血及び全脳を採取し、これら組織中の valerena-4,7(11)-diene の濃度を測定した (Table 2)。その結果、15分間 valerena-4,7(11)-diene を吸入させた群に血中及び中枢から valerena-4,7(11)-diene が検出され、中枢における濃度は30分間の吸入投与後にプラトーに達したが、血中濃度は吸入時間依存的に増加した。

Table 2. Valerena-4,7(11)-diene concentrations in whole brains and blood at 15-, 30-, or 60-min inhalation, and at 15 min after i.v. administration.

Time after administration (min)	Inhalation administration		i.v. administration		
	Whole brain (ng/g weight tissue)	Blood (ng/mL)	Blood (ng/mL)		
			10 µg/kg	100 µg/kg	1000 µg/kg
15	5.62 ± 0.17	4.04 ± 0.14	nd	2.95 ± 0.45	33.9 ± 0.29
30	11.1 ± 0.27	5.01 ± 0.32			
60	10.9 ± 0.25	8.34 ± 0.35			

Data are presented as the mean ± standard deviation of each group (n = 6).

nd, not detected

Valerena-4,7(11)-diene の尾静脈投与試験

吸収による鎮静効果発現を確認するため、valerena-4,7(11)-diene を 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量で尾静脈投与し、投与 15 分後にオープンフィールド試験を実施した。Figure 23 には 60 分間の総運動量を示した。その結果、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において vehicle 群と比較して有意な行動抑制効果が観察された (vehicle 群 : 4056 counts, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群 : 1861 counts)。また 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 尾静脈投与 15 分後の血中濃度は 2.95 ± 0.45 となり、valerena-4,7(11)-diene の吸入投与後の血中濃度と同等レベルであった (Table 2)。

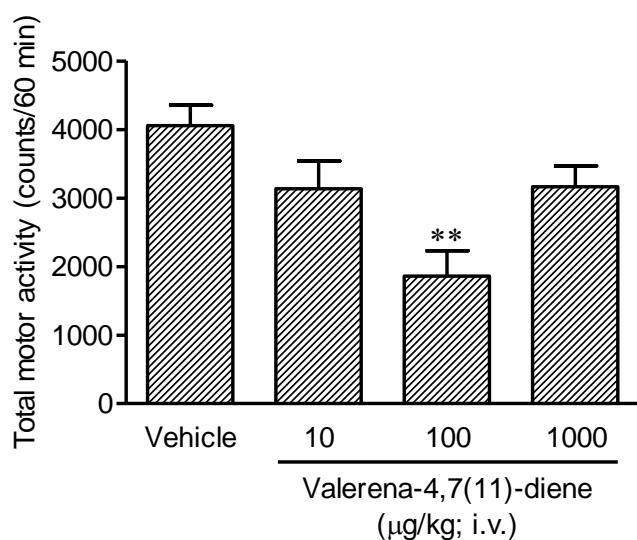


Figure 23. Total motor activities of mice after intravenous administration of valerena-4,7(11)-diene. Data are presented as the mean \pm standard deviation of each group ($n = 8$). Comparisons were made using one-way analysis of variance followed by Tukey's test; ** $P < 0.01$ vs. vehicle group.

考察

第二章において同定した *valerena-4,7(11)-diene* の抗ストレス作用を本章では検討した。拘束ストレスをマウスに 15 分間負荷した結果、強制水泳試験及びペントバルビタール睡眠試験においてカフェイン様の興奮行動がマウスに観察された。またストレス関連因子として、血清中コルチコステロン量及び脳内 DA, 5-HT 量がストレス負荷により増加した。また視床下部及び線条体におけるドパミン代謝回転の低下がストレス負荷により観察されたことから、ストレス負荷により中枢ドパミン神経系が活性化したことで興奮状態がマウスに惹起されたことが示唆された。

ストレス負荷によるモノアミン変動において、視床下部における 5-HT 量の増加は DA 量の増加より早期に観察された。ストレス刺激による HPA 系の活性化にはセロトニン神経系の活性化が中心的役割を担うことが報告されており⁴⁸⁾、またセロトニン神経系の活性化は他のモノアミン神経系の活性化よりも早期に誘導される⁴⁹⁾ ことから、ストレス刺激による HPA 系の活性化とドパミン神経系の活性化はセロトニン神経系の活性化が引き金となり誘発されたことが示唆された。

ストレスを負荷したマウスに *valerena-4,7(11)-diene* を吸入投与した結果、ストレス負荷により惹起された興奮状態を有意に鎮静し、また増加したストレス関連因子を未処置と同等レベルまで低下させた。*Valerena-4,7(11)-diene* の抗ストレス作用の発現メカニズムに関して、陽性対照として用いたジアゼパム及びクロルプロマジンの効果と比較することで考察した。ベンゾジアゼピン系薬物はセロトニン神経系を制御する作用があり⁵⁰⁾、さらに、ジアゼパムがセロトニンの生合成を抑制することでコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) の分泌が抑制される報告がある⁵¹⁾。これらの報告から、*valerena-4,7(11)-diene* の吸入投与により GABA 受容体が活性化され、その結果、セロトニン量が低下し HPA 系が抑制されたことが示唆された。

一方、社会敗北ストレスにより誘発されたうつ様モデルラットに認められたドパミン代謝回転の低下を、ドパミン D₂ 受容体拮抗薬であるアミスルピリドが改善した報告がある⁵²⁾。本研究において *valerena-4,7(11)-diene* のドパミン代謝機能に対する作用から、本化合物のドパミン D₂ 受容体拮抗作用が示唆され、ストレス負荷マウスに対する鎮静作用はドパミン神経系の抑制により発現したことが考察された。

さらに本章では *valerena-4,7(11)-diene* の吸入投与による作用発現経路の解析を行った。嗅覚鈍化処置したマウスに対する *valerena-4,7(11)-diene* の行動抑制効果は、処置無しのマウスに対する効果と比較して有意に減弱したことから、嗅覚系の関与が示唆された。しかし、嗅覚鈍化処置したマウスにおいて若干の行動抑制効果が観察されたことは経肺吸収の関与が示唆され、実際に *valerena-4,7(11)-diene* の吸入投与後にマウスの血中から本化合物が検出された。吸収による鎮静効果の発現を検証するため尾静脈投与試験を実施した結果、*valerena-4,7(11)-diene* 100 µg/kg 投与群において有意な行動抑制効果が観察

された。また尾静脈投与 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 15 分後の血中濃度は吸入投与 (300 $\mu\text{g}/\text{cage}$) 後の濃度と同程度であったことから、吸入投与における経肺吸収の関与が示唆された。抗ストレス作用を示した *valerena-4,7(11)-diene* を利用することで、不安症状やうつ様症状等のストレス障害を効果的に改善できる可能性がある。

第四章

GABA_A受容体親和性を有する 酸化型セスキテルペノイド aristolen-1(10)-en-9-ol の同定

第一章から第三章において、甘松香に含まれる芳香成分から鎮静活性を有するセスキテルペンを同定した。芳香成分はテルペン炭化水素類と官能基を有するテルペン類に分類され⁵³⁾、甘松香ヘキサンエキスから強い鎮静活性を有する、テルペン炭化水素類の valerena-4,7(11)-diene を見出した。そこで本章では、甘松香の精油画分から極性官能基を有するセスキテルペノイドを探索し、鎮静活性を示す化合物を見出すことを目的とした。甘松香精油中からテルペン炭化水素類（ピーク番号 1~4）以外に数種のピークが観測された (Fig. 24)。本章ではこれらピークを同定し、得られた化合物の鎮静活性をカフェイン投与マウスに対する吸入投与試験から評価した。また、鎮静効果発現に関わる GABA 受容体の関与を GABA_A-ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬であるフルマゼニルを併用したペントバルビタール睡眠試験により検討し、さらにベンゾジアゼピン系薬物の副作用である過鎮静³⁾や筋弛緩作用⁴⁾の発現に関してロータロッド走行試験を用いて解析した。

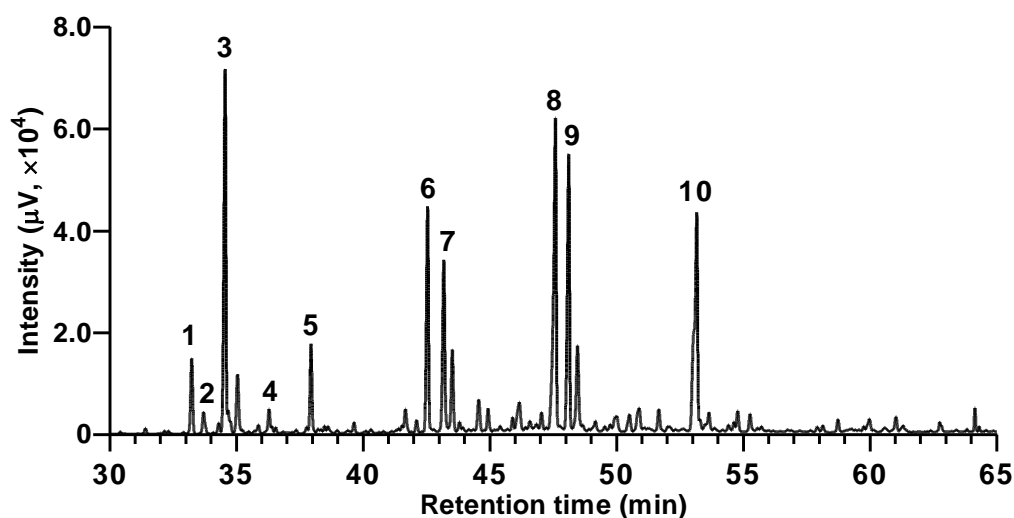
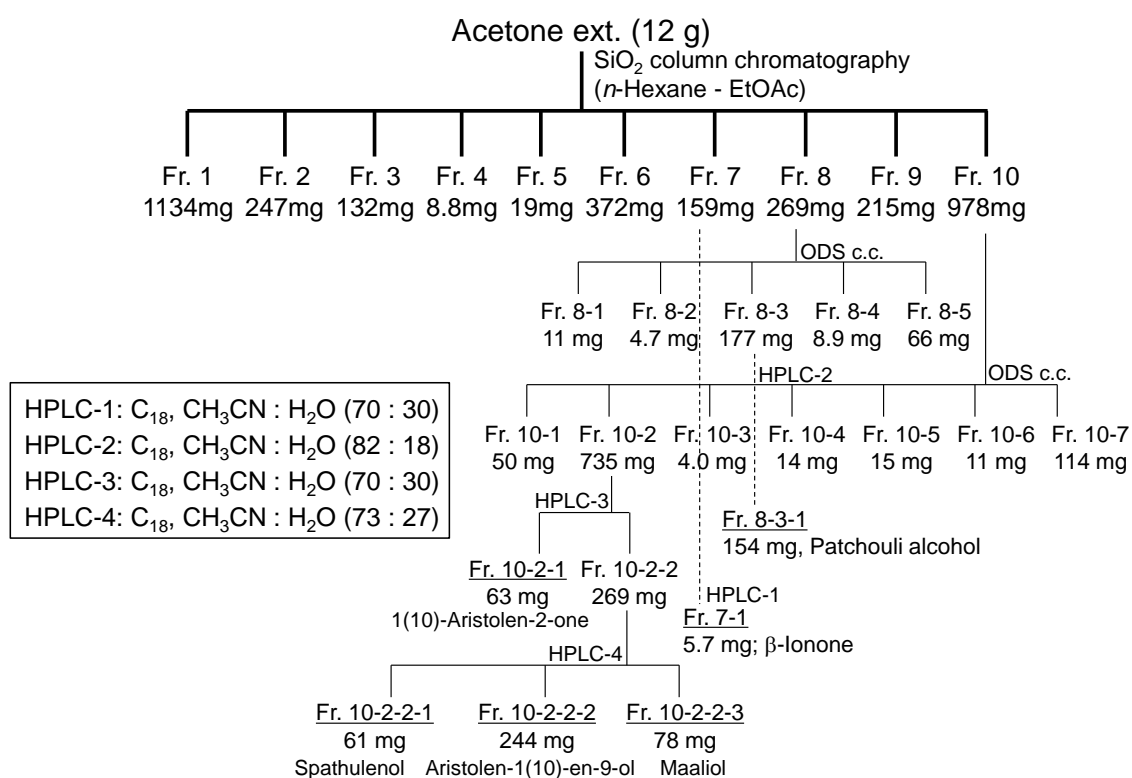


Fig. 24. A GC chromatogram of the GC-FID analysis of the spikenard oil. The retention index (RI) and percent of composition of the ten main peaks are indicated below. 1: β -maaliene, RI 1405, 3.1%; 2: aristolene, RI 1413, 2.1%; 3: calarene, RI 1428, 13.5%; 4: valerena-4,7(11)-diene, RI 1459, 1.9%; 5: β -ionone, RI 1485, 3.6%; 6: maaliol, RI 1562, 6.4%; 7: spathulenol, RI 1573, 5.6%; 8: patchouli alcohol, RI 1650, 11.6%; 9: aristolen-1(10)-en-9-ol, RI 1661, 13.6%; and 10: 1(10)-aristolen-2-one, RI 1754, 4.4%.

1節 甘松香精油中の酸化型セスキテルペノイドの同定

甘松香精油の GC-MS 分析において検出された 6 種のピーク (ピーク番号 5 ~ 10, Fig. 24) を甘松香アセトンエキスから単離精製した。甘松香アセトンエキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、*n*-hexane-AcOEt の混合溶媒で溶出することで 10 画分を得た。続く ODS カラムクロマトグラフィー及び逆相系の分取 HPLC を用いた分離操作により計 6 個の酸化型セスキテルペノイドを得た (Scheme 3, Fig. 25)。構造決定は ^{13}C 、 ^1H -NMR 及び HSQC, HMBC, ^1H - ^1H -COSY スペクトル解析により行い、各化合物の ^{13}C -NMR のケミカルシフトについて文献値との一致を確認した^{54), 55), 56), 57), 58), 59)}。



Scheme 3. Separation procedure of oxidized sesquiterpenoids from spikenard.

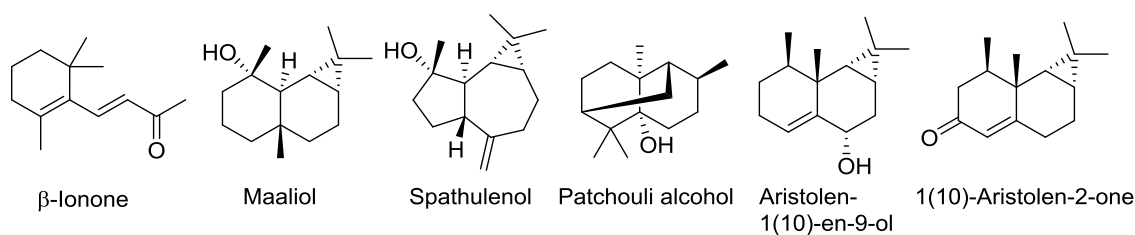


Fig. 25. Chemical structures of isolated sesquiterpenoids.

2節 カフェイン投与マウスに対する酸化型セスキテルペノイドの鎮静作用

単離した酸化型セスキテルペノイドの鎮静活性を、カフェインにより興奮を惹起させたマウスに対する吸入投与試験から評価した。Figure 26 にはオープンフィールド試験における 60 分間の総運動量を示した。陽性対照として用いたジアゼパムの用量依存的な自発運動抑制効果を確認し、1 mg/kg 経口投与群の自発運動抑制率は 60 %、5 mg/kg 投与群の抑制率は 80% を示した。吸入投与試験において、甘松香油の 300 $\mu\text{g}/\text{cage}$ 投与群で有意な自発運動抑制効果が観察された (抑制率 41%)。単独投与試験では、maaliol、 β -ionone は有意な行動抑制作用を示さなかったが、1(10)-aristolene-2-one 及び spathulenol では 300 $\mu\text{g}/\text{cage}$ 投与群において有意な行動抑制効果が認められ、行動抑制率はそれぞれ 34%、53% であった。一方、aristolene-1(10)-en-9-ol 及び patchouli alcohol は用量依存的な行動抑制効果を示し、特に 300 $\mu\text{g}/\text{cage}$ 投与群における行動抑制率はそれぞれ 63%、69% となり、ジアゼパム 1 mg/kg 投与群と同程度の行動抑制効果が観察された。

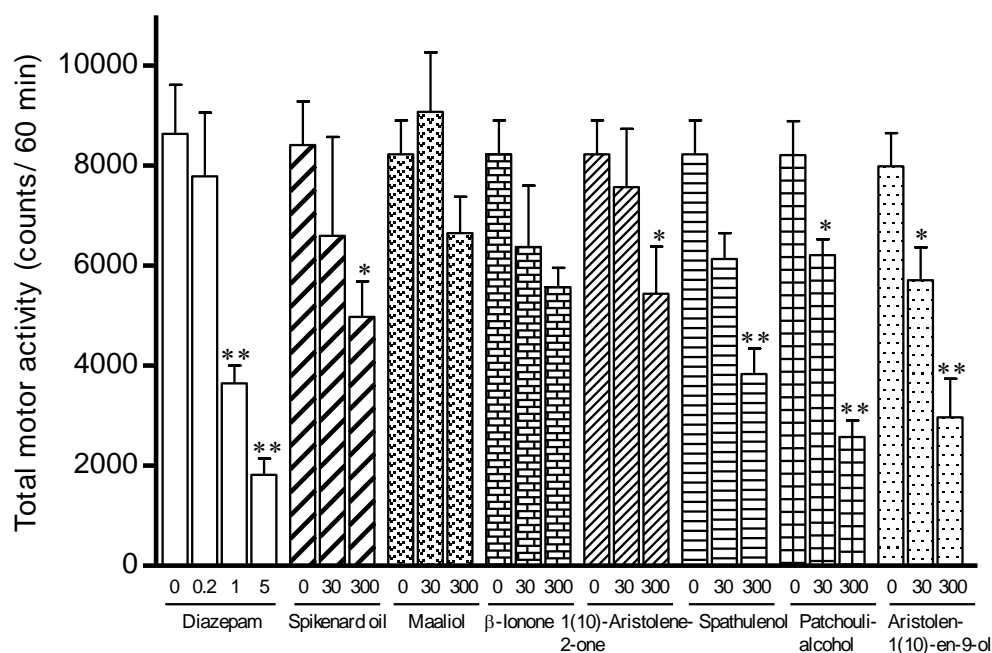


Fig. 26. Total motor activity of caffeine-treated mice exposed to the vapor of oxidized sesquiterpenoids (0, 30, and 300 $\mu\text{g}/\text{cage}$). Results represent mean \pm SD of values for each group ($n = 8$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle group; one-way ANOVA followed by Tukey's test.

3節 Aristolen-1(10)-en-9-ol の鎮静活性における GABA 受容体の関与

ペントバルビタール睡眠試験における睡眠延長作用

Aristolen-1(10)-en-9-ol 及び patchouli alcohol の鎮静効果発現に関わる GABA 受容体の関与を検討するため、ペントバルビタール睡眠試験を実施した。Figure 27 にはペントバルビタール睡眠試験における連続した睡眠時間を示した。陽性対照であるジアゼパム投与群において 1 mg/kg 投与群の睡眠時間は 44 分、5 mg/kg 投与群の睡眠時間は 107 分となり、用量依存的な延長作用が認められた。吸入投与試験において、patchouli alcohol 投与群 (300 μ g/cage) に睡眠延長効果は認められなかった (睡眠時間 25.6 分) が、aristolen-1(10)-en-9-ol 投与群 (300 μ g/cage) の睡眠時間は 47 分となり、ジアゼパム 1 mg/kg 投与群と同程度の睡眠延長作用が認められた。

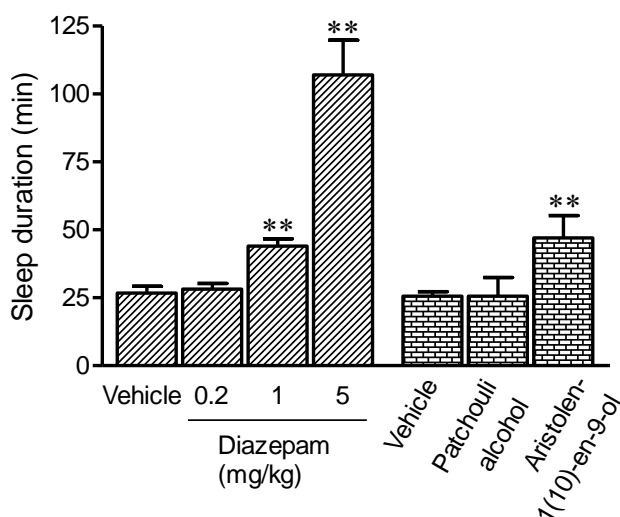


Fig. 27. Effects of vaporized patchouli alcohol and aristolen-1(10)-en-9-ol on sleep duration in a pentobarbital sleep test. Results represent mean \pm SD of values for each group ($n = 8$). ** $P < 0.01$ vs. vehicle group; one way ANOVA followed by Tukey's test.

ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬を併用したペントバルビタール睡眠試験

ベンゾジアゼピン拮抗薬を併用したペントバルビタール睡眠試験を実施した (Fig. 28)。GABA_A-ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬であるフルマゼニルをペントバルビタール処置の 60 分前に腹腔内投与した。ジアゼパム (1 mg/kg) の睡眠延長作用を阻害するフルマゼニルの用量を検討した結果、3 mg/kg の用量においてジアゼパムの催眠増強作用 (睡眠時間 48 分) は完全に消失 (睡眠時間 28 分) し、またフルマゼニル単独投与による睡眠時間に対する影響がないことを確認した。Aristolen-1(10)-en-9-ol の吸入投与による睡眠延長作用 (睡眠時間 47 分) は、フルマゼニル前処置により完全に阻害された (睡眠時間 29 分)。

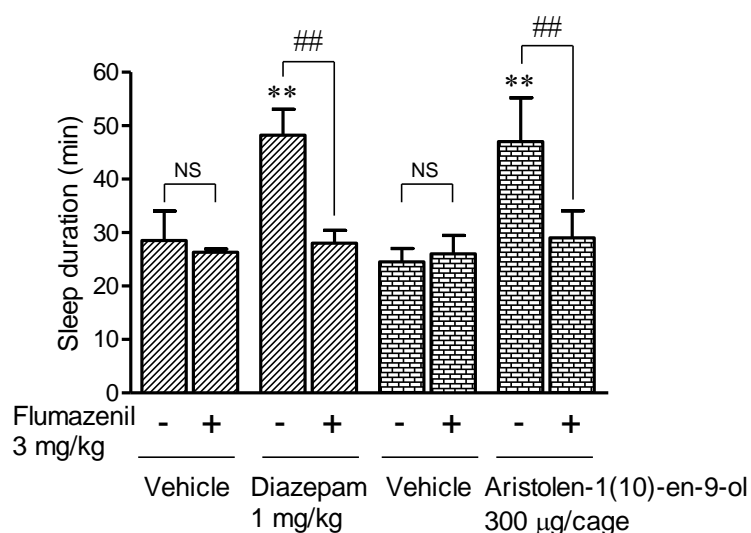


Fig. 28. Effect of flumazenil on sleep duration in mice treated with diazepam (p.o.) and aristolen-1(10)-en-9-ol (inhalation). Results represent mean \pm SD of values for each group ($n = 8$). ** $P < 0.01$ vs. vehicle group (Student's t -test), ## $P < 0.01$ for flumazenil treatment vs. treatment without flumazenil (Student's t -test). NS, not significant.

ロータロッド走行試験

Aristolen-1(10)-en-9-ol にベンゾジアゼピン系薬物と類似した作用が認められたが、ベンゾジアゼピン系薬物の副作用に筋弛緩作用がある。Aristolen-1(10)-en-9-ol 投与後のマウスの運動機能への影響を確認するため、ジアゼパム投与 30 分後及び aristolen-1(10)-en-9-ol の 60 分間の吸入投与後にロータロッド走行試験を 5 分間実施した。Figure 29 には回転ロッド上でのマウスの走行継続時間を示した。ジアゼパム投与群において、1、5 mg/kg 投与群に筋弛緩が発現した。走行継続時間は 1 mg/kg 投与群で 195 秒、5 mg/kg 投与群では 37 秒となり、5 分間の試験において 1 mg/kg 投与群では半数のマウスが回転ロッド上から落下 (4/8) し、5 mg/kg 投与群では全てのマウスが落下した (0/8)。一方、aristolen-1(10)-en-9-ol (300 μ g/cage) の吸入投与群では全てのマウスが完走した。

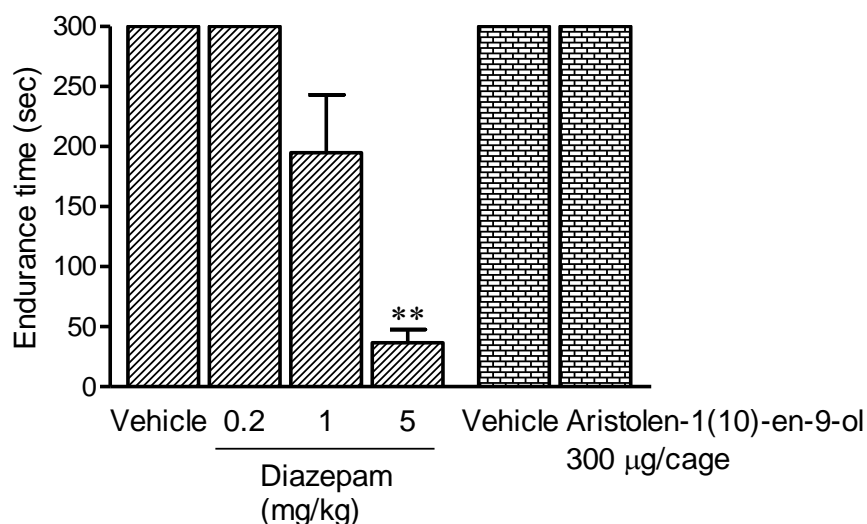


Fig. 29. Effect of aristolen-1(10)-en-9-ol on the rotating rod performance of mice. Each bar represents mean \pm SD of the endurance time during the 5 min rota-rod test ($n = 8$). ** $P < 0.01$ vs. vehicle group; one way ANOVA followed by Tukey's test.

考察

本章では甘松香の精油成分として、極性官能基を有する酸化型セスキテルペノイドを計6個同定し、カフェイン投与マウスを用いて各化合物の鎮静活性を評価した。各化合物の活性強度から構造活性相関に関する考察を行った (Fig. 30)。極性官能基として水酸基またはカルボニル基を有する酸化型セスキテルペノイドを同定したが、鎮静活性は水酸基を有する化合物に強い活性が認められた (Fig. 30A)。また水酸基の位置に関して、*spathulenol* の鎮静活性は *patchouli alcohol*、*aristolen-1(10)-en-9-ol* の活性と比較して弱かったことから、B環部周辺に水酸基を有する化合物に強い活性がある傾向が認められた (Fig. 30B)。しかし *maaliol* には有意な鎮静活性は発現せず、モノテルペン *p-mentha-4(8)-ene* の鎮静活性は二重結合の無い *p-menthane* になることで半減する報告⁶⁰⁾があることから、セスキテルペンの場合も二重結合の存在が鎮静活性の発現に重要である可能性が考察された (Fig. 30C)。

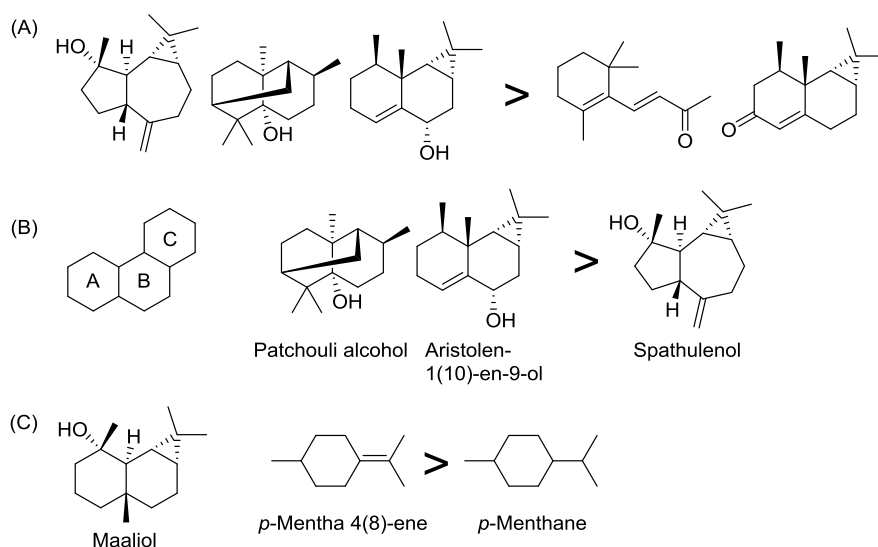


Fig. 30. Structure-activity relationships for sedative activity of oxidized sesquiterpenoids.

強い鎮静活性を示した *aristolen-1(10)-en-9-ol* 及び *patchouli alcohol* に関して、鎮静作用の発現に関わる GABA 受容体の関与をペントバルビタール睡眠試験により検討した。その結果、*aristolen-1(10)-en-9-ol* の吸入投与によりペントバルビタール誘導睡眠が延長され、さらにこの延長作用はフルマゼニルの前処置で完全に消失したことから、*aristolen-1(10)-en-9-ol* は GABA 受容体活性化作用を有することが示唆された。*Aristolen-1(10)-en-9-ol* の活性強度に関して、本化合物 (300 $\mu\text{g}/\text{cage}$) はジアゼパム 1 mg/kg と同程度の活性を示した。ジアゼパム 5 mg/kg の投与ではマウスの睡眠時間が顕著に延長しているが、ロータロッド試験において全てのマウスに筋弛緩が発現したことから、5 mg/kg

は過鎮静が発現する高用量であることが示唆された。Aristolen-1(10)-en-9-ol はジアゼパム 1 mg/kg と同程度の緩やかな鎮静作用を示し、しかしジアゼパムとは異なり筋弛緩を発現しなかったことから、aristolen-1(10)-en-9-ol の有効利用が期待される。

一方、patchouli alcohol は GABA 受容体の活性化以外の作用により鎮静作用を発現することが考察された。Patchouli alcohol を主要構成成分とする *Valeriana wallichii* の精油画分が抗うつ様作用を示した報告があり、さらに *V. wallichii* 精油の腹腔内投与により脳内セロトニン、ノルアドレナリン量の増加が認められたことから、patchouli alcohol はイミプラミンと類似した作用を有していることが示唆されている⁶¹⁾。抗うつ薬イミプラミンの投与によっても鎮静活性が発現することから、patchouli alcohol の作用機序の一つとして脳内モノアミン神経系の関与が推定された。本章では甘松香の鎮静作用を担う化合物を新たに同定し、鎮静薬開発シーズとしての可能性が期待される。

総括及び結語

本研究において著者は、吸入投与法を用いた鎮静活性評価系を構築し、鎮静効果を期待して伝統的に利用されてきた沈香及び甘松香の効果を科学的に立証するとともに、鎮静薬開発シーズとしての可能性が期待される *valerena-4,7(11)-diene* 及び *aristolene-1(10)-en-9-ol* を同定した。以下に、各章で明らかになった結論を示す。

1. オープンフィールド試験による吸入投与法を用いた鎮静活性評価から、沈香オイル及び甘松香ヘキサンエキスの香気がマウスに行動抑制効果を示したことを明らかとした。また活性成分として *benzylacetone*、 α -*gurjunene*、*calarene* を同定し、これら化合物の単独投与試験において *benzylacetone* 0.1%、 α -*gurjunene* 1.5%、*calarene* 0.17% 投与群に強い鎮静効果が発現した。
2. 甘松香ヘキサンエキスから行動抑制効果を示す活性画分を見出し、活性成分として *valerena-4,7(11)-diene* を同定した。*Valerena-4,7(11)-diene* は強い鎮静作用を示し、カフェイン投与により誘発された興奮行動を対照群と同等まで鎮静し、またペントバルビタール睡眠試験においてクロルプロマジンと同程度の睡眠延長作用を示した。
3. *Valerena-4,7(11)-diene* の有する強い鎮静活性に着目し、拘束ストレスを負荷したマウスを用いて抗ストレス作用を検討した。*Valerena-4,7(11)-diene* は拘束ストレスにより惹起された興奮状態を有意に鎮静し、また増加したストレス関連因子（血清コルチコステロン、脳内ドパミン、脳内セロトニン）を未処置と同等レベルまで減少させた。*Valerena-4,7(11)-diene* の示した抗ストレス作用は、GABA 受容体活性化作用、ドパミン D₂ 受容体拮抗作用により発現した可能性が示唆された。また *valerena-4,7(11)-diene* の吸入投与による効果発現経路として、嗅覚刺激と経肺吸収の両経路が関与することを明らかとし、また尾静脈投与試験から鎮静効果が発現する *valerena-4,7(11)-diene* の血中濃度を明らかにした。
4. 甘松香の精油画分を構成する成分として、6 個の酸化型セスキテルペノイドを同定した。カフェイン投与マウスに対する吸入投与試験から、*patchouli alcohol*、*aristolene-1(10)-en-9-ol* に強い鎮静効果が認められた。これら 2 個の化合物のうち *aristolene-1(10)-en-9-ol* (300 μ g/cage) はジアゼパム (1 mg/kg) と同等の睡眠延長作用を示し、またフルマゼニルを併用したペントバルビタール睡眠試験から、*aristolene-1(10)-en-9-ol* はベンゾジアゼピン受容体活性化作用を有することが示唆された。しかし、ジアゼパムとは異なり吸入投与による運動機能への影響は認められなかった。

以上著者は、非侵襲的な吸入投与法を用いた生薬の芳香成分に関する鎮静効果を検討した結果、甘松香からストレス緩和作用、催眠増強作用を示す *valerena-4,7(11)-diene* 及び *aristolen-1(10)-en-9-ol* を見出した。これら化合物の吸入投与により、中枢抑制薬と類似したメカニズムで鎮静効果が発現したが、過鎮静や運動機能の損失は認められなかった。中枢抑制薬の開発において、ストレス軽減効果を有する天然資源からシーズの探索も行われており、本研究から得られた化合物が新たな剤形を考案できる鎮静薬開発シーズとなる可能性が期待される。

実験方法

第 1 章

[実験材料]

使用した 2 種類の沈香オイルは香港マーケットで購入し (沈香オイル①: 産地不明, 沈香オイル②: ベトナム産)、ラベンダーオイルは三星製薬株式会社より購入した。香気成分は無臭溶媒であるトリエチルケエン酸 (MERCK) に溶解し、また GC-MS 分析における標品として benzylacetone (東京化成株式会社)、(-)- α -gurjunene (Fluka)、(+)-calarene (Fluka) を購入して用いた。その他の実験試薬は全て特級以上を使用した。

[植物材料]

甘松香 (*Nardostachys chinensis* Batalin, Valerianaceae) (lot number : 0080) は三星製薬株式会社より購入した。甘松香証拠標本 (No. 3735) は東京都薬用植物園標本室 (東京都健康安全研究センター) に保管されている。

[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方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定に依っている。4 週齢の ddY 系雄性マウス (体重 25 g) を日本エスエルシー株式会社より購入し、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。行動薬理学試験は動物飼育と同一条件下で 10 時から 17 時の間で行った。

[オープンフィールド試験]

香気試料の吸入投与による鎮静活性はオープンフィールド試験を用いて評価した。トリエチルケエン酸に溶解した香気試料 400 μ L を吸着させたろ紙 (直径 8 cm) をフタ付き水槽 (W60 \times L30 \times H34 cm) の上部にテープで固定して配置し、自然拡散で香気成分を 60 分間充満させた。この後にマウスを水槽内に投入し、水槽内でのマウスの行動をビデオカメラにより 60 分間撮影した。自発運動量は、水槽底面に 10 cm 間隔で描かれた格子線をマウスが横切る回数を 5 分毎に計数し、測定値とした。また 60 分間の総自発運動量を下記の数式に従って AUC (area under the curve) として算出した。但し、5 分毎のマウス自発運動量を 0 ~ 5 分 : a_1 、5 ~ 10 分 : a_2 、 \dots 、55 ~ 60 分 : a_{11} とする。

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

[GC-FID 及び GC-MS 分析]

定性解析：揮発性成分の抽出には、固相マイクロ抽出法 (Solid Phased Micro Extraction: SPME) を用いた。SPME ファイバーとして 100 μm polydimethylsiloxane (PDMS) (SUPELCO) を使用した。バイアル中に試料を添加し一定時間経過後、バイアルのヘッドスペースに揮散した揮発性物質を SPME ファイバーに吸着させた。SPME ファイバーを GC の注入口に挿入することで化合物を脱離させ GC 部に導入した²⁷⁾。GC-MS 装置は、G7000-M9000/ 3DQMS (HITACHI) を使用した。測定条件は以下である。カラム：Fused silica capillary column TC-WAX (Hewlett Packard), 60 m \times 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm ; 分析条件：80 – 220 $^{\circ}\text{C}$ (5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温), 220 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分保持, 220 – 240 $^{\circ}\text{C}$ (10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温), 240 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分保持 ; 移動相：ヘリウム (147.1 kPa) ; 注入口温度：200 $^{\circ}\text{C}$; インターフェース：250 $^{\circ}\text{C}$; イオン源：200 $^{\circ}\text{C}$; イオン化 (EI) 電圧：15 eV

定量解析：GC 装置は、G5000 (HITACHI) を使用した。測定条件は以下である。カラム：Fused silica capillary column TC-WAX (Hewlett Packard), 60 m \times 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm ; 分析条件：60 – 180 $^{\circ}\text{C}$ (5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温), 180 $^{\circ}\text{C}$ で 60 分保持 ; 注入口温度：200 $^{\circ}\text{C}$; 移動相：ヘリウム (37 cm/min) ; 検出器：FID (200 $^{\circ}\text{C}$) ; 注入量：1 μL

[Calarene の単離]

甘松香 (700 g) を細片に切断し、ヘキサンによる抽出を室温にて 3 回繰り返した。ヘキサンエキス (14.3 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wakogel[®] C-200) に付し、ヘキサン溶出画分を Fr. 1 (721 mg)、Fr. 2 (659 mg)、Fr. 3 (343 mg)、Fr. 4 (81.3 mg)、Fr. 5 (20.3 mg) に分画し、最後にアセトンにて溶出し Fr. 6 (11 g) を得た。Fr. 1 を Lobar RP-18 カラム (LiChroprep[®] RP-18, 40 ~ 63 μm , MERCK) ($\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 5 : 1$, 流速：3.0 mL/min) を用いて精製し、Fr. 1-1 (565 mg)、Fr. 1-2 (160 mg)、Fr. 1-3 の 3 画分を得た。Fr. 1-1 をヘキサンと共に分液操作を行い、回収したヘキサン層の濃縮物を GPC (LC-918 recycling HPLC system, column : JAIGEL-1H and -2H, 20 \times 600 mm, Japan Analytical Industry) (CHCl_3 , 3.8 mL/min) にて溶出し、一晩リサイクル操作をすることで calarene のピークを回収した (452 mg)。単離した calarene について NMR 構造解析を行い、¹³C NMR のケミカルシフトの文献値との一致を確認した²⁸⁾。

Calarene. ¹³C NMR spectral data (125 MHz, CDCl_3): δ 144.2, 120.3, 36.8, 36.7, 33.5, 29.9, 29.9, 27.2, 25.7, 23.0, 20.8, 19.6, 18.5, 16.5, 16.1

[統計解析]

結果は平均 \pm 標準誤差で表した。3 群間以上の比較は分散分析 ANOVA の後、Bonferroni の多重比較検定法で行った。統計学的に有意水準 $P < 0.05$ を有意差ありとし、また対照群に対する有意差を * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ で示した。

第 2 章

[実験材料]

用いた甘松香、トリエチルクエン酸、ラベンダーオイルは第 1 章と同一である。動物実験用の試薬としてカフェイン (和光純薬工業株式会社)、ペントバルビタール (ネンブタール®) (大日本住友製薬) を購入して用いた。その他の実験試薬は全て特級以上を使用した。

[実験動物]

使用動物、飼育条件、実験施設は第 1 章と同一である。

[オープンフィールド試験]

第 1 章と同一の方法により行った。

[カフェインの投与方法]

リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS, pH 7.4) は、NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g および KH₂PO₄ 0.2 g を精製水に溶解して 1,000 mL にメスアップした。カフェイン-PBS 溶液を 25 mg/kg の投与量でマウスに腹腔内投与し、投与直後に水槽内にマウスを投入しオープンフィールド試験を行った。

[ペントバルビタール睡眠試験]

生理食塩水に溶解したペントバルビタールを 25 mg/kg の投与量でマウスに腹腔内投与し、投与直後に水槽内にマウスを投入した。ビデオカメラでマウスを撮影し、ペントバルビタール投与により誘発される睡眠までの導入時間と連続した睡眠時間を測定した。陽性対照として用いたクロルプロマジン は生理食塩水に溶解し、ペントバルビタール投与 30 分前に 5 mg/kg の投与量でマウスに経口投与した。

[GC 分析]

定量及び定性解析は第 1 章と同一条件下で行った。

[β -Maaliene, valerena-4,7(11)-diene, aristolene の単離]

甘松香 (700 g) を細片に切断し、ヘキサンによる抽出を室温にて 3 回繰り返した。得られたヘキサンエキス (14.3 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wakogel® C-200) に付し、ヘキサンにて溶出した Fr. 1~5 と、最後にアセトンにて溶出した Fr. 6 (11 g) を得た。Fr. 1 (320 mg) を GPC (LC-918 recycling HPLC system, column: JAIGEL-1H and -2H, 20×600 mm, Japan Analytical Industry) (CHCl₃, 3.8 mL/min) を用いて精製し、一晩リサイクル操作をした後に Fr. 1-1 (300 mg) を得た。さらに Fr. 1-1 (300 mg) に関して、C-30 カラム (RP-30, 40 ~ 63 μ m, WAKO) (CH₃CN : H₂O = 5 : 1, 流速 : 3.0 mL/min) を用いて 12 時間リサイクル操作を行うことで β -maaliene (40 mg), aristolene (2.9 mg) を含む画分を回収した。また Fr. 3 (343 mg) を、Lobar RP-18 カラム (LiChroprep® RP-18, 40 ~ 63 μ m, MERCK) (CH₃CN : H₂O = 5 : 1, 流速 : 3.0 mL/min) により精製することで valerena-4,7(11)-diene (212 mg) を含む画分を回収した。構造決定は ¹³C, ¹H-NMR 及び HMQC, HMBC, ¹H-¹H-COSY スペクトル解析により行い、それぞれ ¹³C NMR のケミカルシフトの文献値との一致を確認した^{35), 36), 37)}。

Valerena-4,7(11)-diene. ¹³C NMR spectral data (125 MHz, CDCl₃): δ 136.08, 129.78, 128.4, 47.36, 37.49, 33.61, 33.52, 28.63, 26.49, 26.04, 24.54, 17.69, 13.29, 11.98

β -Maaliene. ¹³C NMR spectral data (125 MHz, CDCl₃): δ 131.68, 129.68, 38.5, 36.72, 32.28, 32.24, 29.09, 24.24, 24.13, 20.46, 19.68, 19.28, 17.84, 16.31, 15.39

Aristolene. ¹³C NMR spectral data (125 MHz, CDCl₃): δ 144.2, 120.3, 37.8, 36.75, 33.01, 32.06, 31.93, 29.91, 27.21, 21.76, 21.43, 19.22, 17.93, 15.99, 15.75

[統計解析]

結果は平均±標準誤差で表した。3 群間以上の比較は分散分析 ANOVA の後、Bonferroni の多重比較検定法で行った。統計学的に有意水準 P<0.05 を有意差ありとし、また対照群に対する有意差を *P<0.05, **P<0.01 で示した。

第3章

[実験材料]

Valerena-4,7(11)-diene をトリエチルケエン酸 (和光純薬工業株式会社) に溶解した試料を吸入投与した。カフェインを和光純薬工業株式会社、ジアゼパムを大洋薬品工業株式会社、クロルプロマジン塩酸塩を Sigma-Aldrich、ペントバルビタールナトリウム塩を東京化成工業株式会社より購入し用いた。カフェインは精製水に、ジアゼパムは 1% CMC-Na 水溶液に、ペントバルビタールとクロルプロマジンは生理食塩水に溶解した。オープンカラムクロマトグラフィーは 60 N シリカゲル (40–50 μm , 関東化学株式会社) を用いて行い、また分取 HPLC は Cosmosil[®] 5C₁₈-AR-2 column (150 mm \times 20 mm i.d.; ナカライテスク) により行い、化合物の検出には UV 検出器 (島津製作所) 及び示唆屈折計 (昭和電工株式会社) を用いて行った。その他の実験試薬は全て特級以上を使用した。

[植物材料]

本章で用いた甘松香は前章までと同一である。

[Valerena-4,7(11)-diene の単離操作]

甘松香 150 g をアセトンにて室温で 3 回抽出した。得られたアセトンエキス (12 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (25 \times 5 cm) に付し、ヘキサン溶出画分を 246.9 mg 得た。得られた画分に関して分取 HPLC を用いて CH₃CN : H₂O = 95 : 5 (流速 8.0 mL/min) の条件下で精製操作を行うことで valerena-4,7(11)-diene (純度 99%) を 43.0 mg 得た。各種スペクトルデータは前章と一致することを確認した。

Valerena-4,7(11)-diene; $[\alpha]_{\text{D}}^{25.0} -7.3^\circ$ (*c* 0.10, CHCl₃); ¹³C NMR (CDCl₃): δ 12.0, 13.3, 17.7, 24.5, 26.0, 26.5, 28.6, 33.5, 33.6, 37.5, 47.4, 126.3, 128.4, 129.8, 136.1. EIMS (GC-MS) 70 eV, *m/z* (rel. int.): 204 [M]⁺ (100), 189 [M-Me]⁺ (63), 161 (67), 147 (60).

[実験動物]

動物実験に関して「学校法人北里研究所及び北里大学が定める実験動物取扱安全衛生規定」を遵守して行った (許可番号: FR07-2)。4 週齢の ddY 系雄性マウス (体重 20 g) を日本エスエルシーより購入し、1 週間の順化飼育を行った後に試験に供した。飼育は、室温 23 $^\circ\text{C}$ 、湿度 50~60%、12 時間の明暗サイクルの下で行い、飼育期間中、マウスには飼料及び水道水を自由摂取させた。行動薬理学試験は 10 時 ~ 15 時の間に行った。

[吸入投与方法]

吸入投与方法は Kobayashi らの方法に従って行った⁶²⁾。行動薬理学試験は小型のホットプレート型ディフューザー (70 °C に加温) を上部側面に取り付けた円筒型ケージ (高さ 22 cm × 直径 25 cm) 内で行った。Valerena-4,7(11)-diene のトリエチルクエン酸溶液 30 µL を滴下したペーパーディスク (2.5 × 3.0 cm, 厚さ 1-mm) をディフューザーに装着した。ラップでケージを密封後、30 分間化合物を加熱拡散させた。Valerena-4,7(11)-diene の吸入投与量は 30、300 µg/cage とした。

[ストレス負荷方法]

マウスを 2 時間絶食処置した後に、ストレスケージ (夏目製作所) を用いて拘束ストレスを 15 分間負荷した。

[強制水泳試験]

強制水泳試験は Kobayashi らの方法を改良して行った⁶³⁾。実験は同一の円筒型ケージを用いて水槽 (深度 15 cm, 水温 25 °C) を作成し行った。試験 24 時間前にマウスを個別に水槽内に投入し、15 分間の水泳試験における不動時間から群分けを行った。試験当日、15 分間の拘束ストレスを負荷したマウスを水槽内に投入し、6 分間の水泳試験における不動時間の累積時間を測定した。拘束ストレス負荷による不動時間短縮作用をカフェイン投与による作用と比較するために、カフェインを 20 mg/kg の投与量でマウスに経口投与し、投与 30 分後に強制水泳試験を実施した。拘束ストレスを負荷したマウスに対する鎮静活性評価は、valerena-4,7(11)-diene が充滿する水槽内 (ラップで密封) で強制水泳試験を実施することで行い、またストレス負荷 15 分前にジアゼパムを経口投与 (5mg/kg) することで行った。不動時間の計測は赤外線センサー計測システム (SUPERMEX, 室町機械) 及び不動時間解析ソフト (CompACT FSS software, 室町機械) を用いて行った。

[ペントバルビタール睡眠試験]

15 分間の拘束ストレスを負荷したマウスにペントバルビタールを腹腔内投与 (30 mg/kg) し、投与直後にマウスを円筒型ケージに投入し睡眠試験を実施した。拘束ストレス負荷による睡眠時間短縮作用をカフェイン投与による作用と比較するために、カフェインを 20 mg/kg の投与量でマウスに経口投与し、投与 30 分後にペントバルビタール睡眠試験を実施した。拘束ストレスを負荷したマウスに対する鎮静活性評価は、valerena-4,7(11)-diene が充滿するケージ内 (ラップで密封) で睡眠試験を実施することで行い、またストレス負荷 15 分前にクロルプロマジンを経口投与 (5mg/kg) することで行った。

[血清中コルチコステロン量及び脳内モノアミン量の測定]

生体組織は拘束ストレス負荷の終了直後、及び解放 30 分後に回収した。マウスを未処置群、ストレス負荷群 (拘束ストレス負荷の終了直後)、vehicle 群 (解放後 30 分間トリエチルクエン酸を吸入)、valerena-4,7(11)-diene 投与群 (解放後 30 分間 valerena-4,7(11)-diene を吸入) の 4 群に分けた。ジエチルエーテル麻酔下で大腿動脈血を回収し、遠心分離 (1500 × g, 10 分, 4°C) 後に血清を得た。血清中コルチコステロン量は市販 ELISA キット (Assaypro LLC) を用いて測定した。

脱血致死させたマウスから視床下部及び線条体を摘出した。これら組織を 0.1 mM EDTA 及び内部標準としてイソプロテレノールを添加した 0.2 M 過塩素酸にてホモジナイズした。ホモジネートを遠心 (20000 × g, 15 分, 4°C) し、上清を 1 M 酢酸ナトリウムを用いて pH 2.9 に調整し、フィルター濾過した試料を HPLC-ECD 分析した。分析条件は以下である。カラム : C₁₈ 逆相系カラム (Inertsil® ODS-3, GL サイエンス)、検出器 : 電気化学検出器 (検出電圧 700 mV) (NANOSPACE®SI-2, 資生堂)、移動相 : 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 2.9) -5% アセトニトリル (0.7 mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム, 0.02 mM EDTA)。定量したモノアミンは、ノルエピネフリン (NE), ドパミン (DA), セロトニン (5-HT) 及びこれらの代謝物であるジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC), ホモバニリン酸 (HVA), 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) である。

[嗅覚鈍化マウスに対する吸入投与試験]

嗅覚鈍化マウスは Chuah らの方法を参考に行った⁶⁴⁾。ペントバルビタール麻酔下で 48.9 mg/mL の硫酸亜鉛水溶液を両鼻腔内に 5 µL ずつ点鼻し、この処置を 1 日 1 回、5 日間連続で行った。処置終了後 2 日間マウスを休息させた後に、嗅覚鈍化の確認を行った。酢酸 500 µL を浸した脱脂綿を円筒型ケージ底面の隅に配置し、ケージ底面を酢酸臭領域と無臭領域の 2 等分に区切った。嗅覚鈍化処置したマウスをケージ内に投入し、ケージ内での行動を 15 分間ビデオカメラにて撮影した。2 秒に 1 枚の画像として動画を切り出すことで (計 450 枚)、15 分間中に酢酸領域に侵入した回数を算出した。その結果、処置無しのマウスの酢酸領域への侵入回数は 19 回であったが、嗅覚鈍化処置したマウスの侵入回数は 137 回となり、嗅覚の鈍化を確認した。作成した嗅覚鈍化マウスに対する valerena-4,7(11)-diene の吸入投与試験を実施した。オープンフィールド試験におけるマウス自発運動量の計測は、赤外線センサー計測システム (SUPERMEX, 室町機械) 及び行動量解析ソフト (CompACT AMS software, 室町機械) を用いて行った⁶⁵⁾。

[血中及び脳内濃度の測定]

15, 30, 60 分間の valerena-4,7(11)-diene (300 µg/cage) の吸入投与後にジエチルエーテル麻酔下で頸静脈より採血し、さらに右心房より生理食塩水にて還流後に全脳を摘出した。全血及び全脳をジエチルエーテルと共に超音波破碎し、遠心 (20000 × g, 10 分, 4°C) 後の上清を減圧濃縮した。内部標準として *d*-limonene (6.2×10^{-4} mM) を添加したアセトンを用いて残渣を溶解し、ODS フラッシュカラムにてろ過した試料を GC-MS 分析した。*d*-Limonene は *m/z* 136, valerena-4,7(11)-diene は *m/z* 204 のマスクロマトグラムにおけるエリア面積を算出し、*d*-limonene のエリア面積に対する相対面積比として valerena-4,7(11)-diene の検量線を作成し、血中及び脳内濃度を算出した。

[GC-MS 分析]

GC-MS 装置は、GC-2010/GCMS-QP2010 Plus instrument (島津製作所) を使用した。測定条件は以下である。カラム : Rtx[®]-5MS (Restek Corporation), 30 m × 0.25 mm, 膜厚 0.25 µm ; 分析条件 : 60–180 °C (2 °C/min で昇温), 180–280 °C (10 °C/min で昇温), 280 °C で 15 分保持 ; 移動相 : ヘリウム (38.3 cm/s) ; 注入口温度 : 230 °C ; インターフェース : 250 °C ; イオン源 : 200 °C ; イオン化 (EI) 電圧 : 70 eV

[尾静脈投与試験]

Valerena-4,7(11)-diene を生理食塩水 (0.1% CMC-Na 含有) に懸濁した試料を、10, 100, 1000 µg/kg の投与量でマウスに尾静脈投与し、投与 15 分後にマウスを円筒型ケージ内に投入し 60 分間のオープンフィールド試験を行った。

[統計解析]

結果は平均±標準偏差で表した。2 群間の比較は Student's unpaired t 検定を行った。また多群間の比較は分散分析 ANOVA の後、Tukey の多重比較検定法で行った。統計学的に有意水準 $P < 0.05$ を有意差有りとした。

第4章

[実験材料]

本章で用いたトリエチルクエン酸、カフェイン、ジアゼパム、ペントバルビタールナトリウム塩は第3章と同一である。拮抗薬併用試験で用いたフルマゼニルは Sigma-Aldrich 社より購入した。カフェイン及びペントバルビタールは生理食塩水に溶解し、ジアゼパム及びフルマゼニルは DMSO : Tween-80 : 生理食塩水=1 : 1 : 8 の混合液に懸濁した。オープンカラムクロマトグラフィーでは順相系 60 N シリカゲル (40–50 μm , 関東化学株式会社) 及び逆相系 Cosmosil[®] 75C₁₈-PREP (ナカライテスク) を用いた。分取 HPLC で用いたカラム及び検出器は第3章と同一である。

[植物材料]

本章で用いた甘松香は前章までと同一である。

[精油画分の作成]

既報に従い⁶⁶⁾、cleverger 装置を用いて水蒸気蒸留を3時間行い、精油成分をヘキサン層に捕捉し、ヘキサンを留去することで精油画分を得た。

[GC-FID 及び GC-MS 分析]

定量解析 : GC-FID 分析には GC-2014 (島津製作所) を使用した。測定条件は以下である。カラム : Rtx[®]-5MS (Restek Corporation), 30 m \times 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm ; 分析条件 : 60–180 $^{\circ}\text{C}$ (2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温), 180–280 $^{\circ}\text{C}$ (10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で昇温), 280 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分保持 ; 移動相 : ヘリウム (39.2 cm/s) ; 注入口温度 : 230 $^{\circ}\text{C}$; 検出器温度 : 300 $^{\circ}\text{C}$; 注入量 : 1 μL
定性解析 : GC-MS 分析における機器及び条件は第3章と同一である。

[酸化型セスキテルペノイドの単離操作]

甘松香 150 g をアセトンにて室温で3回抽出した。得られたアセトンエキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (25 \times 5 cm) に付し、ヘキサン溶出画分として Fr. 1 ~ 5 を得、さらにヘキサン-酢酸エチルの混液にて比率 40 : 1 から 2 : 1 まで段階的に極性を上昇させながら Fr. 6 ~ 12 を得た。Fr. 7 (159.3 mg) に関して分取 HPLC を用いて CH₃CN : H₂O = 70 : 30 (流速 6.0 mL/min) の条件下で精製操作を行うことで β -ionone (5.66 mg) を得た。Fr. 8 (268.5 mg) に関して ODS カラムクロマトグラフィー (14 \times 2.6 cm) により CH₃CN : H₂O 混液 (6 : 4 から 10 : 0) にて溶出させることで Fr. 8-1 ~ 8-5 を得、さらに Fr. 8-3 (177.2 mg) を分取 HPLC (CH₃CN : H₂O = 82 : 18, 流速 6.0 mL/min) にて精製することで patchouli alcohol (154.3 mg) を得た。Fr. 10 (978.3 mg) を同一条件下で ODS カラムクロマトグラフィーに付し Fr. 10-1 ~ 10-7 を回収し、続く Fr. 10-2 (734.7 mg) の分取

HPLC を用いた精製操作 (CH₃CN : H₂O = 70 : 30, 流速 6.0 mL/min) から Fr. 10-2-1 とし て 1(10)-aristolen-2-one (62.8 mg) を得た。Fr. 10-2-2 をさらに分取 HPLC (CH₃CN : H₂O = 73 : 27, 流速 6.0 mL/min) により精製することで spathulenol (60.5 mg)、aristolen-1(10)-en-9-ol (244.3 mg)、maaliol (78.2 mg) を得た。構造決定は ¹³C, ¹H-NMR 及び HSQC, HMBC, ¹H-¹H-COSY スペクトル解析により行い、それぞれ ¹³C NMR のケミカルシフトの文献値 との一致を確認した^{54), 55), 56), 57), 58), 59)}。また精製化合物の純度は GC-FID により 98% 以上 であることを確認した。

β-Ionone. ¹³C NMR (CDCl₃): δ 18.8, 21.7, 27.1, 28.8, 33.5, 34.0, 39.7, 131.5, 135.9, 136.1, 143.2, and 198.8. EIMS (GC-MS) 70 eV, *m/z* (rel. int.): 192 [M]⁺ (5), 177 [M-Me]⁺ (100), 149 (8), and 135 (15)

Maaliol. ¹³C NMR (CDCl₃): δ 15.5, 15.5, 17.6, 18.8, 19.2, 19.8, 20.2, 23.0, 29.2, 33.0, 39.6, 41.3, 42.7, 49.7, and 72.9. EIMS (GC-MS) 70 eV, *m/z* (rel. int.): 222 [M]⁺ (1), 204 [M-H₂O]⁺ (69), and 189 [M-H₂O-Me]⁺ (100)

Spathulenol. ¹³C NMR (CDCl₃): δ 16.3, 20.2, 24.8, 26.0, 26.7, 27.4, 28.6, 29.9, 38.8, 41.7, 53.4, 54.3, 81.0, 106.2, and 153.4. EIMS (GC-MS) 70 eV, *m/z* (rel. int.): 220 [M]⁺ (7), 205 [M-Me]⁺ (93), 187 [M-Me-H₂O]⁺ (45), and 43 (100)

Patchouli alcohol. ¹³C NMR (CDCl₃): δ 18.6, 20.6, 24.3, 24.3, 24.6, 26.8, 28.1, 28.6, 28.8, 32.7, 37.6, 39.1, 40.1, 43.7, and 75.6. EIMS (GC-MS) 70 eV, *m/z* (rel. int.): 222 [M]⁺ (66), 207 [M-Me]⁺ (22), 189 [M-Me-H₂O]⁺ (13), and 138 (100)

Aristolen-1(10)-en-9-ol. ¹³C NMR (CDCl₃): δ 16.0, 16.5, 18.2, 18.6, 23.8, 25.3, 26.6, 29.6, 30.7, 32.7, 36.8, 38.6, 67.4, 116.2, and 145.7. EIMS (GC-MS) 70 eV, *m/z* (rel. int.): 220 [M]⁺ (8), 202 [M-H₂O]⁺ (23), 187 [M-H₂O-Me]⁺ (32), and 159 (100)

1(10)-Aristolen-2-one. ¹³C NMR (CDCl₃): δ 15.4, 17.2, 19.2, 19.3, 20.2, 21.7, 29.2, 30.6, 33.3, 36.4, 38.6, 42.5, 125.1, 174.1, and 199.0. EIMS (GC-MS) 70 eV, *m/z* (rel. int.): 218 [M]⁺ (23), 203 [M-Me]⁺ (44), 185 [M-Me-H₂O]⁺ (46), and 161 (100)

[実験動物]

使用動物、飼育条件、実験施設は第 3 章と同じである。

[吸入投与方法]

第 3 章と同一の装置及び条件下で試験を実施した。30 分間香気成分を加熱拡散させたケージ内にカフェイン及びペントバルビタールを投与したマウスを投入し、オープンフィールド試験及び睡眠試験を実施した。吸入投与量は 30, 300 μg/cage とした。

[オープンフィールド試験]

カフェイン投与 (20 mg/kg; p.o.) 30 分後に円筒型ケージ内にマウスを投入し、60 分間オープンフィールド試験を実施した。陽性対照としてカフェインを投与する 30 分前にジアゼパムを 0.2, 1, 5 mg/kg の投与量でマウスに経口投与した。

[ペントバルビタール睡眠試験]

ペントバルビタールを腹腔内投与 (30 mg/kg) したマウスを香気成分 (300 µg/cage) の充満する円筒型ケージ内に投入し、睡眠試験を実施した。陽性対照として、ペントバルビタールを投与する 30 分前にジアゼパムを 0.2, 1, 5 mg/kg の投与量でマウスに経口投与した。また拮抗薬併用試験では、GABA_A-ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬であるフルマゼニルを、ペントバルビタール処置を行う 60 分前に腹腔内投与 (3 mg/kg) した。

[ロータロッド試験]

ロータロッドトレッドミル (MK-600, 室町機械株式会社) を用いて試験した。試験前日に 1 時間毎に計 3 回、5 分間の走行訓練 (回転数 28 rpm) を行った。24 時間後、再度 5 分間の走行訓練を行い、完走したマウスを選抜した。Aristolen-1(10)-en-9-ol (300 µg/cage) の 60 分間の吸入投与後、またジアゼパムの経口投与 30 分後にロータロッド試験を行った。

[統計処理]

結果は平均±標準偏差で表した。2 群間の比較は Student's unpaired t 検定を行った。また多群間の比較は分散分析 ANOVA の後、Tukey の多重比較検定法で行った。統計学的に有意水準 $P < 0.05$ を有意差有りとした。

謝辞

本研究は、著者が京都大学大学院薬学研究科修士課程、博士課程在学中及び博士課程中退後、北里大学薬学部助教在職中に行った研究であります。

本研究を行う場を設けて頂き、大変興味深い研究テーマを与えて下さり御指導頂きました、姫路獨協大学学長 本多義昭教授に心より感謝致します。

本研究全般及び本学位論文作成を進めるにあたり、長年に渡る多大なる御指導と御鞭撻を頂きました京都大学大学院薬学研究科 伊藤美千穂准教授に謹んで感謝の意を表します。

北里大学薬学部在職中におきまして懇切丁寧な御指導、御助言および御協力を賜りました北里大学薬学部 小林義典教授、東京理科大学薬学部 浅田善久教授に心より感謝を申し上げます。

本学位論文の作成および提出にあたり、主査として懇切丁寧な御指導と御鞭撻を頂きました、京都大学大学院薬学研究科 金子周司教授に謹んで感謝を申し上げます。

本研究に際しまして、終始有益な御助言と御鞭撻を頂きました名古屋大学大学院創薬科学研究科 赤池昭紀教授、鈴鹿医療科学大学薬学部 近藤俊哉准教授、武田薬品工業株式会社 矢倉徹博士、北里大学薬学部 福田達男准教授に心より感謝致します。

共に研究生活を送り、お世話になりました京都大学大学院薬学研究科薬品資源学分野の皆様、北里大学薬学部生薬学教室の皆様に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、尊い命を犠牲にして頂いた実験動物に感謝するとともに、心から御冥福をお祈り申し上げます。

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 effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components.

Hiroaki Takemoto, Michiho Ito, Tomohiro Shiraki, Toru Yagura, Gisho Honda

Journal of Natural Medicines. **62**, 41-46 (2008)

2) Evaluation of volatile components from spikenard: valerena-4,7(11)-diene is a highly active sedative compound.

Hiroaki Takemoto, Toru Yagura, Michiho Ito

Journal of Natural Medicines. **63**, 380-385 (2009)

3) Inhalation Administration of Valerena-4,7(11)-diene from *Nardostachys chinensis* Roots Ameliorates Restraint Stress-Induced Changes in Murine Behavior and Stress-Related Factors.

Hiroaki Takemoto, Yuka Omameuda, Michiho Ito, Tatsuo Fukuda, Shuji Kaneko, Akinori Akaike, Yoshinori Kobayashi

Biological and Pharmaceutical Bulletin. **37**, 1050-1055 (2014)

4) Inhalation Administration of the Sesquiterpenoid Aristolen-1(10)-en-9-ol from *Nardostachys chinensis* has a Sedative Effect via the GABAergic System.

Hiroaki Takemoto, Michiho Ito, Yoshihisa Asada, Yoshinori Kobayashi

Planta Medica. **81**, 343-347 (2015)

引用文献

1. Post RM. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am J Psychiatry*. **149**, 999-1010 (1992)
2. 厚生労働省提供ホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/kokoro/speciality/data.html>)
3. Loeffler PM. Oral benzodiazepines and conscious sedation: a review. *J Oral Maxillofac Surg*. **50**, 989-997 (1992)
4. Licata SC, Platt DM, Cook JM, Van Linn ML, Rowlett JK. Contribution of α_1 subunit-containing γ -aminobutyric acid_A (GABA_A) receptors to motor-impairing effects of benzodiazepines in squirrel monkeys. *Psychopharmacology*. **203**, 539-546 (2009)
5. *NEW 薬理学 改訂第4版*, PP. 293
6. Fujita S, Ueki S, Miyoshi M, Watanabe T. Green odor inhalation by stressed rat dams reduces behavioral and neuroendocrine signs of prenatal stress in the offspring. *Horm Behav*. **58**, 264-272 (2010)
7. Nicolaidis NC, Kyratzi E, Lamprokostopoulou A, Chrousos GP, Charmandari E. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. **22**, 6-19 (2015)
8. McAuley MT, Kenny RA, Kirkwood TB, Wilkinson DJ, Jones JJ, Miller VM. A mathematical model of aging-related and cortisol induced hippocampal dysfunction. *BMC Neurosci*. **25**, 10-26 (2009)
9. Holsboer F, Ising M. Central CRH system in depression and anxiety-evidence from clinical studies with CRH₁ receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*. **583**, 350-357 (2008)
10. Tanaka Y, Wakida S. Frontiers of stress research in pharmaceutical fields. *Journal of Life Support Engineering*. **22**, 90-95 (2010)

11. Yukawa K, Ishikawa H, Yamazaki Y, Tsutani K, Kiuchi T. Relationship between health literacy and coping behavior towards the side effects of complementary and alternative medicine among patients with chronic diseases in Japan. *Japanese Journal of Health Education and Promotion*. **23**, 16-26 (2015)
12. Buchbauer G, Jirovetz L, Jager W, Dietrich H, Plank C. Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z Naturforsch C*. **46**, 1067-1072 (1991)
13. Sandeep, Paarakh PM. *Jasminum grandiflorum* Linn. (Chameli): ethnobotany, phytochemistry and pharmacology – a review. *Pharmacologyonline*. **2**, 586-595 (2009)
14. Rasch B, Büchel C, Gais S, Born J. Odor cues during slow-wave sleep prompt declarative memory consolidation. *Science*. **315**, 1426-1429 (2007)
15. Sinha D, Efron D. Complementary and alternative medicine use in children with attention deficit hyperactivity disorder. *J Paediatr Child Health*. **41**, 23-26 (2005)
16. Ota K. Incense and Japanese Culture. *Journal of Japan Association on Odor Environment*. **39**, 169-185 (2008)
17. 平泉貞吉, *香料*, **58**, 11 (1960)
18. Djerassi D, Connolly JD, Faulkner DJ, Mori K, Nakanishi K, Ourisson G, Raphael RA, Shamma M, Tamm CH. *Dictionary of Natural Products*. Chapman and Hall, London (1993)
19. Yang JS, Wang YL, Su YL, He DH, Zheng QT, Yang J. Studies on the chemical constituents of *Aquilaria sinensis* (Lour) Gilg. III. Elucidation of the structure of isobaimuxinol and isolation and identification of the constituents of lower boiling fraction of the volatile oil. *Yao Xue Xue Bao*. **24**, 264-268 (1989)
20. Okugawa H, Ueda R, Matsumoto K, Kawanishi K, Kato K. Effects of sesquiterpenoids from "Oriental incenses" on acetic acid-induced writhing and D₂ and 5-HT_{2A} receptors in rat brain. *Phytomedicine*. **7**, 417-422 (2000)
21. Zhang Y, Lu Y, Zhang L, Zheng QT, Xu LZ, Yang SL. Terpenoids from the roots and rhizomes of *Nardostachys chinensis*. *J Nat Prod*. **68**, 1131-1133 (2005)

22. Tanaka K, Komatsu K. Comparative study on volatile components of *Nardostachys* Rhizome. *J Nat Med.* **62**, 112-116 (2008)
23. Prabhu V, Karanth KS, Rao A. Effects of *Nardostachys jatamansi* on biogenic amines and inhibitory amino acids in the rat brain. *Planta Med.* **60**, 114-117 (1994)
24. Mori H, Kobayashi A, Kikkawa S, Yamashita H. Effects of Essential Oil Fragrances and Preferences thereof on Blood Pressure and Heart Rate in Healthy Human Subjects. *Japanese Journal of Complementary and Alternative Medicine.* **6**, 137-142 (2009)
25. Ali MS, Dash PR, Nasrin M. Study of sedative activity of different extracts of *Kaempferia galanga* in Swiss albino mice. *BMC Complement Altern Med.* **15**, doi:10.1186/s12906-015-0670-z (2015)
26. Buchbauer G, Jirovetz L, Jaeger W, Plank C, Dietrich H. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* **82**, 660-664 (1993)
27. 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 Agr.* **83**, 769-774 (2003)
28. Abraham WR, Kieslich K, Stumpf B, Ernst L. Microbial oxidation of tricyclic sesquiterpenoids containing a dimethylcyclopropane ring. *Phytochemistry.* **31**, 3749-3755 (1992)
29. Tort AB, Neto WP, Amaral OB, Kazlauckas V, Souza DO, Lara DR. A simple webcam-based approach for the measurement of rodent locomotion and other behavioural parameters. *J Neurosci Methods.* **157**, 91-97 (2006)
30. 実践行動薬理学 第一版, PP. 47
31. Sugawara Y, Hara C, Tamura K, Fujii T, Nakamura T, Aoki T. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. *Analytica Chimica Acta.* **365**, 293-299 (1998)

32. Screening information dataset for high volume chemicals. UNEP (2007). <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/oecd/sids/sidspub.html>
33. Teruhisa Komori, Takuya Matsumoto, Eishi Motomura, Takashi Shiroyama. The sleep-enhancing effect of valerian inhalation and sleep-shortening effect of lemon inhalation. *Chem Senses*. **31**, 731-737 (2006)
34. Liao JF, Huang SY, Jan YM, Yu LL, Chen CF. Central inhibitory effects of water extract of *Acori graminei* rhizoma in mice. *J Ethnopharmacol*. **61**, 185-193 (1998)
35. Buechi G, Greuter F, Tokoroyama T. Terpenes. XVII. Structure of calarene and stereochemistry of aristolene. *Tetrahedron Lett*. **3**, 827-833 (1962)
36. Matsuo A, Nozaki H, Kataoka H, Nakayama M, Hayashi S. (-)-Maalian-5-ol, a new enantiomeric sesquiterpenoid from the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. *Experimentia*. **35**, 1279-1280 (1979)
37. Paul C, König WA, Muhle H. Pacifigorgianes and tamariscene as constituents of *Frullania tamarisci* and *Valeriana officinalis*. *Phytochemistry*. **57**, 307-133 (2001)
38. Pyle BW, Tran HT, Pickel B, Haslam TM, Gao Z, MacNevin G, Vederas JC, Kim SU, Ro DK. Enzymatic synthesis of valerena-4,7(11)-diene by a unique sesquiterpene synthase from the valerian plant (*Valeriana officinalis*). *FEBS J*. **279**, 3136-3146 (2012)
39. *NEW 薬理学 改訂第4版*, PP. 316
40. Koo BS, Park KS, Ha JH, Park JH, Lim JC, Lee DU. Inhibitory effects of the fragrance inhalation of essential oil from *Acorus gramineus* on central nervous system. *Biol Pharm Bull*. **26**, 978-982 (2003)
41. Mora F, Segovia G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Res*. **1476**, 71-85 (2012)
42. Huang CJ, Webb HE, Zourdos MC, Acevedo EO. Cardiovascular reactivity, stress, and physical activity. *Front Physiol*. **4**, doi: 10.3389/fphys.2013.00314 (2013)

43. Anisman H, Gibb J, Hayley S. Influence of continuous infusion of interleukin-1 β on depression-related processes in mice: corticosterone, circulating cytokines, brain monoamines, and cytokine mRNA expression. *Psychopharmacology*. **199**, 231-244 (2008)
44. Sabban EL, Schilt N, Serova LI, Masineri SN, Stier CT Jr. Kinetics and persistence of cardiovascular and locomotor effects of immobilization stress and influence of ACTH treatment. *Neuroendocrinology*. **89**, 98-108 (2009)
45. Kagawa D, Jokura H, Ochiai R, Tokimitsu I, Tsubone H. The sedative effects and mechanism of action of cedrol inhalation with behavioral pharmacological evaluation. *Planta Med*. **69**, 637-641 (2003)
46. Satou T, Matsuura M, Takahashi M, Umezu T, Hayashi S, Sadatomo K, Koike K. Anxiolytic-like effect of essential oil extracted from *Abies sachalinensis*. *Flavour Fragr J*. **26**, 416-420 (2011)
47. Kitada Y, Miyauchi T, Satoh A, Satoh S. Effects of antidepressants in the rat forced swimming test. *Eur J Pharmacol*. **72**, 145-52 (1981)
48. Lim JE, Porteus CS, Bernier NJ. Serotonin directly stimulates cortisol secretion from the interrenals in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol*. **192**, 246-255 (2013)
49. Gesto M, Lopez-Patino MA, Hernandez J, Soengas JL, Miguez JM. The response of brain serotonergic and dopaminergic systems to an acute stressor in rainbow trout: a time course study. *J Exp Biol*. **216**, 4435-4442 (2013)
50. Dominic JA, Sinha AK, Barchas JD. Effect of benzodiazepine compounds on brain amine metabolism. *Eur J Pharmacol*. **32**, 124-127 (1975)
51. Calogero AE, Gallucci WT, Chrousos GP, Gold PW. Interaction between GABAergic neurotransmission and rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *Brain Res*. **463**, 28-36 (1988)
52. Watt MJ, Roberts CL, Scholl JL, Meyer DL, Miiller LC, Barr JL, Novick AM, Renner KJ, Forster GL. Decreased prefrontal cortex dopamine activity following adolescent social defeat in male rats: role of dopamine D₂ receptors. *Psychopharmacology*. **231**, 1627-1636 (2014)

53. Hayashi Y, Sogabe S, Hattori Y. Behavioral Analysis of the Stress-reducing Effects of Coffee Volatiles in Mice. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*. **64**, 323-327 (2011)
54. Sugiura M, Takao N, Ueji S. A new method for differentiating between solvent effect mechanisms on carbon-13 chemical shifts. *Org Magn Reson*. **18**, 128-133 (1982)
55. Nishiya K, Kimura T, Takeya K, Itokawa H. Sesquiterpenoids and iridoid glycosides from *Valeriana fauriei*. *Phytochemistry*. **31**, 3511-3514 (1992)
56. Ragasa CY, Ganzon J, Hofileña J, Tamboong B, Rideout LA. A new furanoid diterpene from *Caesalpinia pulcherrima*. *Chem Pharm Bull*. **51**, 1208-1210 (2003)
57. Furusawa M, Hashimoto T, Noma Y, Asakawa Y. Biotransformation of aristolane- and 2,3-secoaromadendrane-type sesquiterpenoids having a 1,1-dimethylcyclopropane ring by *Chlorella fusca* var. *vacuolata*, *mucor* species, and *Aspergillus niger*. *Chem Pharm Bull*. **54**, 861-868 (2006)
58. Su H, Shi DY, Li J, Guo SJ, Li LL, Yuan ZH, Zhu XB. Sesquiterpenes from *Laurencia similis*. *Molecules*. **14**, 1889-1897 (2009)
59. Faraldos JA, Wu S, Chappell J, Coates RM. Doubly deuterium-labeled patchouli alcohol from cyclization of singly labeled [2-²H₁]farnesyl diphosphate catalyzed by recombinant patchoulol synthase. *J Am Chem Soc*. **132**, 2998-3008 (2010)
60. Ito K, Ito M. The sedative effect of inhaled terpinolene in mice and its structure-activity relationships. *J Nat Med*. **67**, 833-837 (2013)
61. Sah SP, Mathela CS, Chopra K. Involvement of nitric oxide (NO) signaling pathway in the antidepressant activity of essential oil of *Valeriana wallichii* Patchouli alcohol chemotype. *Phytomedicine*. **18**, 1269-1275 (2011)
62. Kobayashi Y, Takemoto H, Sugata K, Fu Z, Asada Y. The sedative effect of volatilized essential oil from *Evodia* fruit. *Aroma Research*. **13**, 153-159 (2012)

63. Kobayashi Y, Takahashi R, Ogino F. Antipruritic effect of the single oral administration of German chamomile flower extract and its combined effect with antiallergic agents in ddY mice. *J Ethnopharmacol.* **101**, 308-312 (2005)
64. Chuah MI, Tennent R, Jacobs I. Response of olfactory Schwann cells to intranasal zinc sulfate irrigation. *J Neurosci Res.* **42**, 470-478 (1995)
65. Kobayashi Y, Bhatt ID. Antidepressant effect of the *Atractylodes japonica* essential oil in mice. *Aroma Research.* **6**, 356-361 (2005)
66. Ito K, Ito M. Sedative effects of vapor inhalation of the essential oil of *Microtoena patchoulii* and its related compounds. *J Nat Med.* **65**, 336-343 (2011)