

芳香性化合物の吸入投与が  
マウスの摂食行動に与える影響に関する研究

2015

小川 鶴洋

## <目次>

緒言	-----1
第一章 ベンジルアセトンの吸入投与による摂食促進作用について	-----3
第一節 ベンジルアセトンの吸入投与による摂食促進作用	-----3
1. ベンジルアセトンの吸入投与がマウスの POMC および NPY の mRNA の 発現に与える影響	
2. ベンジルアセトンの吸入投与による摂食促進作用	
第二節 ベンジルアセトンの摂食促進作用に対する投与時間、投与濃度の影響	-----9
1. 吸入投与時間と摂食促進作用	
2. 吸入投与濃度と摂食促進作用	
3. 吸入濃度と吸入時間の組合せが摂食促進作用に及ぼす影響	
4. 作用発現にいたるメカニズムの検討	
第三節 考察	-----13
第二章 ベンジルアセトンの吸入投与による体重増加について	-----17
第一節 芳香性化合物の吸入投与による体重増加とそれに寄与する作用の検討	--17
1. ベンジルアセトンの体重増加作用	
2. 体重増加に対する自発運動抑制作用の影響	
第二節 考察	-----21
第三章 香辛料精油による摂食促進作用	-----22
第一節 カレー粉精油の摂食促進作用と活性成分の検討	-----22
1. カレー粉精油の摂食促進作用の検討	
2. カレー粉精油中の活性化合物の探索	
3. 活性化合物の混合による摂食促進作用への影響	
第二節 考察	-----26

第四章 ハナショウガ ( <i>Zingiber zerumbet</i> ) 根茎由来環状セスキテルペンゼルンボン およびその誘導体の自発運動抑制活性 -----	28
第一節 研究の背景 ハナショウガ及びその精油成分について -----	28
第二節 ゼルンボン誘導体についての構造活性相関研究 -----	29
1. ゼルンボンのケトン基の有無と自発運動抑制活性	
2. ゼルンボンの二重結合の水素付加による自発運動抑制活性への影響	
3. 酸素含有官能基の種類の違いによる活性への影響	
4. ゼルンボンのジアステレオマー誘導体の幾何異性体が 自発運動抑制活性に与える影響	
第三節 考察 -----	32
総括および結語 -----	34
実験方法 -----	36
発表論文目録 -----	40
引用文献 -----	41
謝辞 -----	48

## 緒言

近年、欧米を中心とした先進諸国では漢方医学やインドのアーユルヴェーダなど生薬を用いた伝統医学が、補完代替医療の一つとして用いられている[1]。このような傾向は、西洋医学による治療では十分な効果が得られない疾患が存在していることを示唆している。日本では漢方薬は西洋薬と共に疾病の治療に用いられ、互いに補完し合うように使われており、歴史的な使用経験に加え、近代での使用経験により多くの知見が得られている。例えば、六君子湯は胃炎や食欲不振を対象とした漢方処方であるが、その服用による抗がん剤服用時の食欲不振の改善効果が注目されている[2]。

日本で生薬として用いられる天然物の過半数は植物由来である。これらには精油を多く含むものがあり、欧米では精油のにおいを利用して鬱病や不安症などの予防・治療をめざす芳香療法が補完代替医療としてしばしば利用される[3]。芳香療法では蒸散した精油のにおいに作用があると考えられており、ラベンダー精油が好んで用いられる。ラベンダー精油、およびその主成分であるリナロールは香料として様々な場面で用いられるほかに、薬理作用としては抗鬱・抗不安、鎮静やストレスを軽減する作用があるとされており[4-7]、セルフメディケーションに、また医療現場でも使われている[8, 9]。ラベンダー精油、リナロールの他に鎮静作用を有する化合物としては、沈香の加熱香気中に含まれるベンジルアセトンや白檀精油などが報告されており[10,11]、日本ではこれらの香りはリラクゼーションなどを目的に嗜好品として利用されている。

ラベンダー精油やリナロールは鎮静作用を示すが、これは  $GABA_A$  受容体の刺激に加え[12]、ストレスを緩和することにより作用を示していると予想されている[4]。ベンジルアセトンやチモールなども[4, 10]鎮静活性を有することが報告されているが、その作用機序に関する検討を加えた例は少ない。

これらの鎮静作用の評価においてはオープンフィールド法による方法が確立されており[13]、そこでは1時間の総自発運動量を鎮静作用の指標としている。さらに、これに加えて、遺伝子発現量や生体内分子濃度の変化をモニターする事で、鎮静活性の定量的評価が可能と考えられる。

鎮静作用を示すリナロールを多く含むゼラニウム精油[14]やキンモクセイ精油[15]を入投与させたラットの視床下部で、プロオピオメラノコルチン(POMC) mRNA と神経ペプチド Y (NPY) mRNA の発現量が、これらを吸入させていないラットでの遺伝子発現量と比較して有意な変化を示したことが報告されている[16, 17]。これらの試験で調査されたのは摂食減退作用であり、視床下部での POMC はプロセシングされ  $\alpha$ -メラニン細胞刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) となり摂食減退作用に、NPY は摂食促進作用に寄与する事が知られている[18]。さらに、視床下部での NPY は鎮静作用に寄与することも確認されている[19]。また、鎮静作用を評価する際の指標である自発運動量はストレス負荷により増加することが知られてお

り[20]、これに関連する因子として、副腎皮質から分泌される糖質コルチコイド(ヒトではコルチゾール、齧歯類ではコルチコステロン) [21]や、その放出ホルモンである副腎皮質刺激ホルモンがある[22]。副腎皮質刺激ホルモンは下垂体において POMC がプロセッシングを受けたペプチドであり、したがって下垂体での POMC mRNA 発現量がストレスの指標として利用できる可能性がある。それ故、POMC mRNA および NPY mRNA の視床下部および下垂体での発現量を測定すれば鎮静作用やその他薬理作用を評価することができる可能性がある。

本研究では、摂食行動や鎮静作用に関わるとされる視床下部や、ストレス反応に関与するとされる下垂体での POMC mRNA、ならびに NPY mRNA の発現量変化を用いて芳香性化合物の吸入投与による薬理作用を評価し、その作用メカニズムについて考察することを計画した。

## 第一章 ベンジルアセトンの吸入投与による摂食促進作用について

### 第一節 ベンジルアセトンの吸入投与による摂食促進作用

投与濃度  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L のベンジルアセトンなど芳香性化合物の吸入投与による鎮静作用およびその他の薬理作用の脳内遺伝子による評価法としてマウスが拘束を受けずに自由に動き回れる環境において 1 時間吸入投与を行い、その後脳内で様々な行動やストレス反応に関わる視床下部・下垂体混合組織からの total RNA 抽出を行った。total RNA を利用して逆転写を行い、cDNA を合成した。この cDNA を用いて視床下部・下垂体混合組織でのプロオピオメラノコルチン(POMC) mRNA、神経ペプチド Y (NPY) mRNA の発現量を  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法を用いたリアルタイム PCR で調査した[16]。投与濃度  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L のベンジルアセトンとその構造異性体である 1-フェニル-2-ブタノンを吸入投与した際の自発運動量を比較すると、ベンジルアセトン投与群ではコントロール群に比べ有意に自発運動量が低下しているが、1-フェニル-2-ブタノン投与群の自発運動量はコントロール群の自発運動量と差がなかったと報告されている[10]。

本研究において、芳香性化合物の吸入投与にはガラスケージ (奥行 30 cm, 幅 60 cm, 高さ 34 cm; 容積 61.2 L) を用いた。吸入投与方法として、ケージ上部にクエン酸トリエチルで溶解、希釈した芳香性化合物や精油を滴下したろ紙を貼付し、ガラス板で蓋をした後に自然拡散で 60 分間芳香性化合物の蒸気を充満させた。このケージ内にマウスを投入し芳香性化合物を 60 分間吸入投与させた[10]。60 分間の吸入投与後、速やかにマウスを断頭して視床下部・下垂体混合組織を摘出し、液体窒素を用いて粉碎した[16]。粉碎した組織から total RNA を抽出し、逆転写により cDNA を作成した。作成した cDNA を用いてリアルタイム PCR を実施し、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法で組織中の POMC mRNA および NPY mRNA 発現量をコントロール群に対して相対的に定量した。検討試料として、ベンジルアセトンおよび 1-フェニル-2-ブタノンをを用いて遺伝子発現の検討を行った。また、ベンジルアセトン、1-フェニル-2-ブタノン、シンナムアルデヒド、ブチルベンゼン、6-メチル-5-ヘプテン-2-オン、リナロール、ベンズアルデヒドおよび視床下部での POMC mRNA 発現促進作用があると報告されているゼラニウム精油[16]を用いて視床下部での POMC mRNA および NPY mRNA 発現量をコントロール群に対して相対的に定量し、これら芳香性化合物の摂食促進作用について検討した。本章で検討した化合物の化学構造は Figure 1 に示す。

摂食行動評価にスクリーニング法として本研究では摂食行動試験を実施した。摂食行動試験とは、絶食マウスにオープンフィールドでの 60 分間の吸入投与を行い、その後 4 時間での摂食行動の変化を予測する手法である。摂食行動試験において胃から分泌されるペプチドホルモン グレリン(0.3 nmol/mouse)をマウスに腹腔内投与すると、コントロール群と比較して 4 時間での摂食量が有意に増加することから[23]、グレリン投与時の摂食量を指標にして摂食促進作用を評価した。またグレリンは陽性対照としても用いた。

本研究では、摂食行動開始時に絶食開始後 24 時間となるようにし、計量した餌を与えた後 4 時間での消費量を摂食量とした[16]。以上のようにして遺伝子発現量の検討で用いた化合物を絶食マウスに吸入投与させた場合の摂食促進作用の発現検討を行った。

本章では、視床下部での POMC mRNA および NPY mRNA の発現量、芳香性化合物による摂食促進作用、またそれらに影響を与える因子および芳香性化合物の作用部位について報告する。

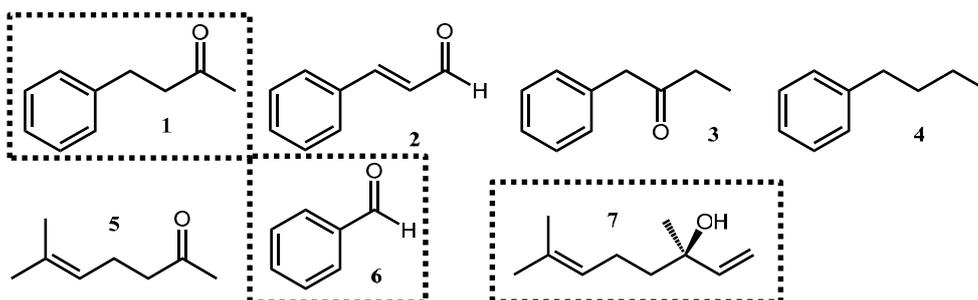


Figure 1. Compounds tested in Chapter 1.

1. benzylacetone 2. *trans*-cinnamaldehyde 3. 1-phenyl-2-butanone 4. butylbenzene  
5. 6-methyl-5-hepten-2-one 6. benzaldehyde 7. (*R*)-linalool.

Compounds and essential oil enclosed in dotted rectangles are showed locomotor-reducing (sedative) effects. Other compounds have no locomotor-reducing effects or are unknown.

#### 1. ベンジルアセトンの吸入投与がマウスの POMC および NPY の mRNA の発現に与える影響

鎮静活性に関連した脳内遺伝子発現量の変化について検討するため、投与濃度  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L で鎮静作用を示すベンジルアセトン、および鎮静作用を示さない 1-フェニル-2-ブタノン[10]をそれぞれ吸入投与させた場合のマウスの視床下部・下垂体混合組織での、ストレスホルモンである糖質コルチコイド分泌や摂食抑制作用に参与する POMC mRNA 発現量を、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法を用いたリアルタイム PCR で、コントロール群に対して相対的に定量評価した。

鎮静作用を示す  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L の投与濃度でベンジルアセトンを吸入投与したマウスの視床下部・下垂体混合組織での POMC mRNA 発現量は、無臭溶媒であるクエン酸トリエチルのみを滴下したコントロール群の 45%であった( $p < 0.05$ , Figure 2)。しかし、鎮静作用がないと報告のある  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L の投与濃度で 1-フェニル-2-ブタノン[10]を吸入投与したマウスの視床下部・下垂体混合組織での POMC mRNA 発現量は、コントロール群と比較してその 55%であった。( $p < 0.05$ , Figure 2)。この結果は、両化合物が鎮静作用の有無に関わらず、吸入投与により視床下部・下垂体混合組織での POMC mRNA 発現量を抑制したことを示唆し

ている。

この作用がストレスに関連した下垂体での発現量抑制か、摂食行動に関連した下垂体での発現抑制かを確認するため、下垂体の POMC mRNA 発現量に影響のあるストレスを拘束ケージを用いてマウスに負荷した後、吸入投与を実施して POMC mRNA 発現量に影響があるか調査した[24]。ストレス負荷後のコントロール群、ベンジルアセトン投与群、1-フェニル-2-ブタノン投与群での POMC mRNA の発現量は、拘束ストレスを負荷していないコントロールマウスでの発現量を基準として相対的定量を実施した。その結果、ストレス負荷コントロール群での POMC mRNA 発現量は非ストレス負荷コントロール群でのものと差がなかった。ストレスを負荷したベンジルアセトン投与群や 1-フェニル-2-ブタノン投与群でもストレスを負荷していないマウスと同等の POMC mRNA 発現量の低下が確認された(Figure 2)。ストレス負荷コントロール群とストレス非負荷コントロール群で POMC mRNA 発現量に差がなかったことから、ベンジルアセトンおよび 1-フェニル-2-ブタノンの吸入投与による POMC mRNA 発現量の低下は、下垂体ではなく視床下部におけるものであると推測される[24]。このことから、この POMC mRNA 発現量の低下はストレスに関連したものではなく、摂食行動に関連したものである可能性が高いと考えられた[16, 17]。

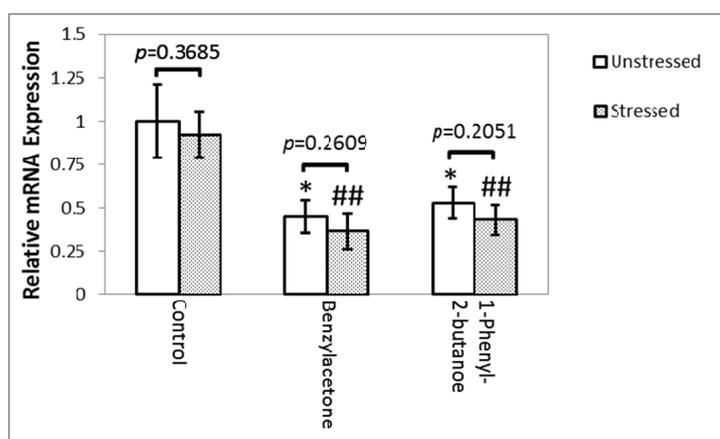


Figure 2. Relative mRNA expression after inhalation of benzylacetone and 1-phenyl-2-butanone in stressed/unstressed mice.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 5 mice. Blanc bars are the data of unstressed mice, dot bars are those of stressed mice. Benzylacetone and 1-phenly-2-butanone were diluted with triethyl citrate, and their concentration was  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L. The statistical analysis was performed using Student's *t*-test and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. \*  $p < 0.05$  vs. the unstressed control group, ##  $p < 0.01$  vs. the unstressed control group.

視床下部における POMC は、プロセッシングされた後  $\alpha$ -メラニン細胞刺激ホルモン( $\alpha$ -MSH)となり、摂食減退作用を示す[25]。 $\alpha$ -MSH の前駆体である POMC の mRNA の発現量

が減少しているため摂食行動が促進される可能性があるが、POMC の発現量のみでは摂食行動の促進が行われているかどうかを判断するのは難しい。そのため、視床下部で摂食行動を促進するペプチド NPY[26]の mRNA 発現量と合わせて調査することで、ベンジルアセトンなどの吸入投与により摂食行動が促進されるかを検討した。Figure 1 で示した芳香性化合物および精油のうち、鎮静活性のあるベンジルアセトン、ベンズアルデヒド、リナロール、ゼラニウム精油は鎮静作用のある濃度で、その他のベンジルアセトンに構造が類似したシンナムアルデヒド、1-フェニル-2-ブタノン、6-メチル-5-ヘプテン-2-オン(Figure 1)はベンジルアセトンと同じ  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L の投与濃度で吸入投与し、1時間の吸入投与後のマウスの視床下部を用いて POMC mRNA および NPY mRNA のコントロール群に対する相対発現量を調査した。

芳香性化合物を非絶食マウスに精油を吸入させた時の視床下部における NPY mRNA および POMC mRNA の発現量を Figure 3 に示した。ベンジルアセトン、1-フェニル-2-ブタノン、シンナムアルデヒド投与群で NPY mRNA の発現量が有意に増加した。一方、POMC mRNA はいずれの群でも減少傾向が見られるが有意な減少は見られなかった。ベンジルアセトンのカルボニル基が消失したブチルベンゼン(Figure 1, 化合物 4)やフェニル基がイソブテニル基に置換された 6-メチル-5-ヘプテン-2-オン(Figure 1, 化合物 5)を吸入したマウスの視床下部での POMC mRNA、NPY mRNA 発現量は、コントロール群での発現量と比較して有意な変化を示さなかった(Figure 3)、ベンジルアセトンや 1-フェニル-2-ブタノン、シンナムアルデヒド(Figure 1, 化合物 1-3)での NPY mRNA 発現量の増加にはこれらのフェニル基やカルボニル基が重要な官能基である可能性がある。また、リナロールやベンズアルデヒド(Figure 1, 化合物 6, 7)のような鎮静作用のある化合物は、鎮静作用を示す投与濃度で吸入投与を行った場合、視床下部での遺伝子発現量はコントロール群での発現量と比較して有意な変化を示さなかった(Figure 3)。さらに、Choi らによりゼラニウム精油は吸入投与後にラットの視床下部での POMC mRNA 発現量が増加すると報告されているが[16]、本研究でのゼラニウム精油吸入後のマウスの視床下部における POMC mRNA ならびに NPY mRNA 発現量はリナロールの場合と同様にコントロール群での遺伝子発現量と有意な変化を示さなかった(Figure 3)。

ゼラニウム精油の吸入投与による POMC mRNA 発現量の変化が Choi らの結果と本研究の結果で異なるのは、本研究は鎮静作用を示す投与濃度でマウスに吸入投与し、遺伝子発現を観察したのに対し、Choi らの研究では鎮静作用を示す濃度より 1000 倍濃い摂食抑制作用を示す投与濃度でラットに吸入投与し、遺伝子発現を観察しており[16]、投与濃度に差がある。このため、吸入投与後の POMC mRNA の発現量が異なった可能性がある。

ベンジルアセトン、1-フェニル-2-ブタノン、シンナムアルデヒドを吸入したマウスの視床下部における NPY mRNA 発現量が増加しており、POMC mRNA 発現量が減少傾向にあることから、これらの変化は摂食行動、特に摂食量の増加に関連があると推測した。

## 2. ベンジルアセトンの吸入投与による摂食促進作用

芳香性化合物、精油を絶食処置後のマウスに吸入させると、コントロール群と比較して NPY mRNA 発現量がコントロール群と比較して優位に増加したベンジルアセトン、1-フェニル-2-ブタノン、シナナムアルデヒド投与群では食餌量が有意に増加しており、コントロール群の凡そ 1.2 倍となった。(Figure 4)

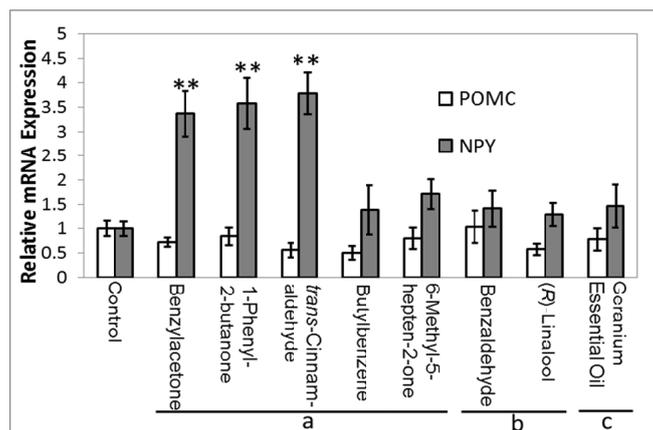


Figure 3. Gene expression by inhalation of fragrant compounds in unfasted mice. **a**  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L, **b**  $7.4 \times 10^{-7}$  mg/L, **c**  $7.4 \times 10^{-5}$  mg/L. Control: triethyl citrate inhalation. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 8 mice). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. \*\* $p < 0.01$  vs. control group.

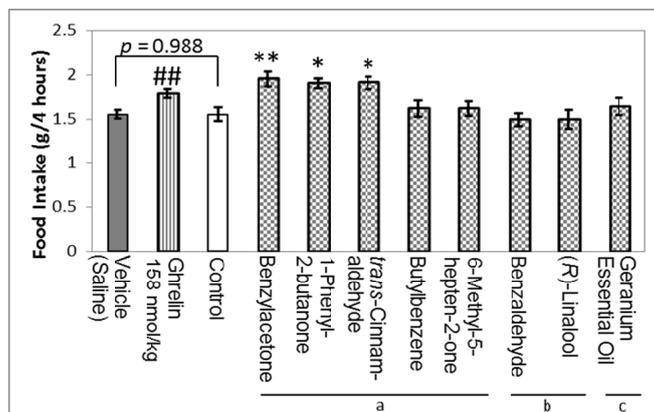


Figure 4. Appetite enhancement in fasted mice by inhalation of fragrant compounds. **a**  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L, **b**  $7.4 \times 10^{-7}$  mg/L, **c**  $7.4 \times 10^{-5}$  mg/L. Vehicle: saline injected *i. p.*; positive control: ghrelin; control: triethyl citrate inhalation. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 8 mice). Statistical analysis was performed using subsequent *t*-test with Bonferroni correction for multiple comparisons and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs. control group; ## $p < 0.01$  vs. vehicle group.

陽性対照群であるグレリン腹腔内投与群(158 nmol/kg)は生理食塩水腹腔内投与群と比較

して摂食量が有意に増加した。また、ベンジルアセトン、1-フェニル-2-ブタノン、シンナムアルデヒド吸入投与群の摂食量はグレリン腹腔内投与群の摂食量と比較してそれぞれ1.09倍、1.06倍、1.07倍であった(Figure 4)。

一方、芳香性化合物を吸入投与後のマウスの視床下部における NPY mRNA の発現量がコントロール群と比較して変化が示されなかった化合物では、摂食量もコントロールと比較して有意に増加していなかった(Figure 4)。これらのことから、芳香性化合物を吸入投与後のマウスの視床下部における NPY mRNA 発現量は、遺伝子発現を用いた摂食促進作用の評価に利用できると考えられる。

## 第二節 ベンジルアセトンの摂食促進作用に対する投与時間、投与濃度の影響

### 1. 吸入投与時間と摂食促進作用

ゲットウ(*Alpinia zerumbet*, ショウガ科)精油の吸入投与による抗不安作用は投与時間依存的に作用が増強すると報告されている[26]。ベンジルアセトンは吸入投与により摂食促進作用を示したので、ゲットウ精油の吸入投与による抗不安作用と同様に投与時間依存的な作用であることが予想される。そこで、ベンジルアセトンを  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L の投与濃度で吸入投与する際の投与時間を変化させ、その際に現れる摂食量への影響を調査した。

$7.4 \times 10^{-6}$  mg/L の投与濃度でベンジルアセトンを 15 分、30 分、60 分間吸入させたマウスではコントロール群と比較して有意な摂食量の増加が観察されたが、これを 5 分間吸入させたマウスでは摂食量の有意な増加は確認されなかった(Figure 5)。投与時間と摂食量の関係はそれぞれコントロール群の摂食量の 1.032 (5 分)、1.158 (15 分)、1.203 (30 分)、1.241 (60 分) 倍であり、吸入時間が長くなるにつれて摂食量が増加する傾向があることが確認された。

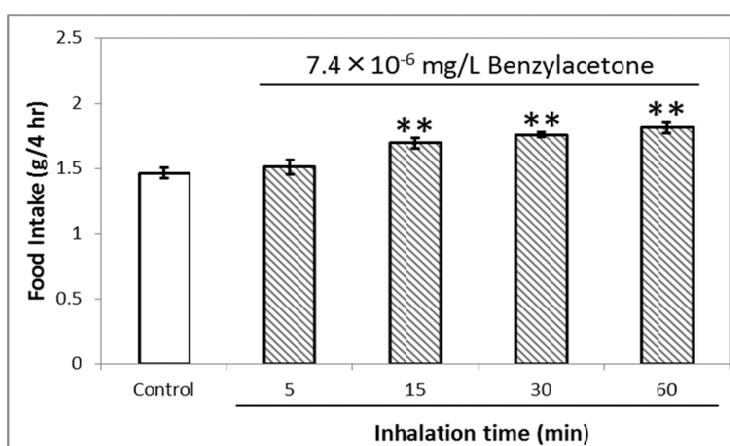


Figure 5. Appetite enhancement in mice treated with different duration of benzylacetone inhalation. Control: triethyl citrate inhalation.  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L of benzylacetone were inhaled by mice in treated groups. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 8 mice. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. \*\* $p < 0.01$  vs. the control group.

## 2. 吸入投与濃度と摂食促進作用

精油または芳香性化合物の吸入投与後の自発運動量は投与濃度の違いにより変化する事が報告されている[10, 11]。ベンジルアセトンの摂食促進作用も同様に吸入投与法によるものであるから、投与濃度の違いにより摂食量が増加する事が予想される。そこで、ベンジルアセトンの 60 分間吸入投与する際の投与濃度を変化させ、その際に摂食量に現れる影響を調査した。

ベンジルアセトンの投与濃度  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L から  $7.4 \times 10^{-4}$  mg/L の範囲で吸入させたマウスでは有意な摂食量の増加が確認された。一方、 $7.4 \times 10^{-2}$  mg/L、 $7.4 \times 10^{-3}$  mg/L、 $7.4 \times 10^{-7}$  mg/L、及び  $7.4 \times 10^{-8}$  mg/L のベンジルアセトンを吸入させたマウスでは有意な摂食量の増加は確認できなかった。投与濃度  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L での効果をピークとしてそれよりも高いもしくは低い投与濃度では濃度依存的な作用が確認され、高い濃度域では濃度依存的に摂食量が減少し、低い濃度では濃度依存的に摂食量が増加した(Figure 6)。

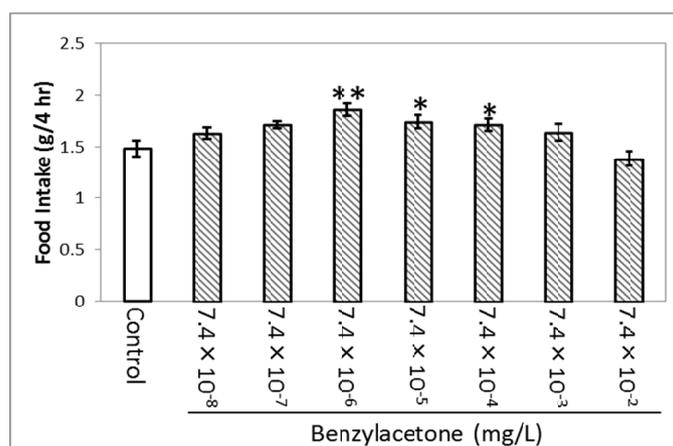


Figure 6. Appetite enhancement in mice treated with several applied amounts of benzylacetone.

Control: triethyl citrate inhalation. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 8 mice. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. the control group.

## 3. 吸入濃度と吸入時間の組合せが摂食促進作用に及ぼす影響

ゲットウ精油の吸入投与で吸入時間(分)が長くなると抗不安作用が減弱することが知られている[26]。本節 1. でベンジルアセトンの吸入投与では投与時間依存的な摂食量の増加のみが観察されたが、本節 2. での高濃度のベンジルアセトンを 60 分間吸入投与した場合、作用の減弱が観察されている。ゲットウ精油での長時間投与が抗不安作用を減弱させていることと本節 1., 2. の結果は、ベンジルアセトンの吸入投与において投与時間と投与濃度が互

いに類似したメカニズムを介して摂食促進作用を発現させている可能性を示唆している。そこで、投与時間と投与濃度の組合せにより作用が変化するかを検討した。

ベンジルアセトンの吸入投与において、本節 2. で作用のなかった  $7.4 \times 10^{-3}$  mg/L の投与濃度および本節 1. で作用のなかった 5 分間を組み合わせ、すなわち  $7.4 \times 10^{-3}$  mg/L のベンジルアセトンを 5 分間吸入したマウスの摂食量は  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L のベンジルアセトンを 60 分間吸入投与したマウスの摂食量と同等であった (Figure 7)。さらに、 $7.4 \times 10^{-4}$  mg/L の投与量でベンジルアセトンを 5 分間吸入させたときの摂食量は  $7.4 \times 10^{-3}$  mg/L の投与量で 5 分間吸入させたときのものより少なくなっていた。このことから、 $7.4 \times 10^{-3}$  mg/L のベンジルアセトンを 5 分間吸入させた場合、 $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L のベンジルアセトンを 60 分間吸入させた場合と同程度の化合物が作用部位に刺激を与えたと推測される。

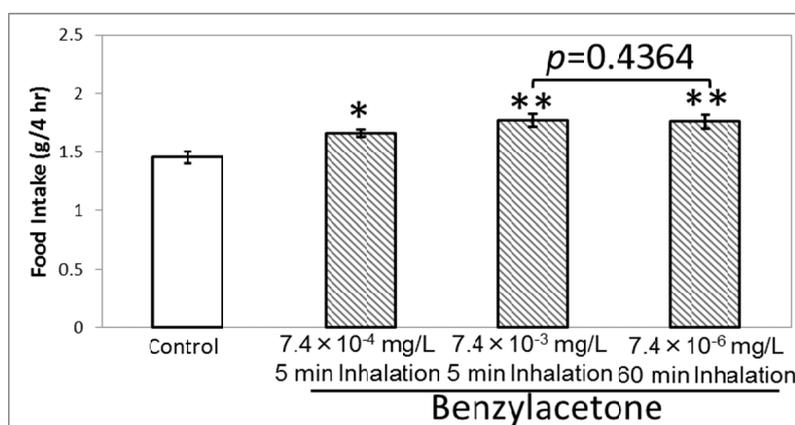


Figure 7. Appetite-enhancement in mice inhaled  $7.4 \times 10^{-3}$  mg/L of benzylacetone for 5 minutes.

Control: triethyl citrate inhalation. The statistical analysis was performed using Student's *t*-test and one-way ANOVA followed by Dunnett's test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. the control group.

#### 4. 作用発現にいたるメカニズムの検討

作用経路に関して芳香性化合物の行動に与える影響のメカニズム、例えば血中移行の後受容体等に作用するもの、または嗅受容体の刺激によるもの、が提唱されている[27, 16]。これらは嗅受容体の破壊により活性が失われたことも報告している。摂食促進作用の作用経路を検討するため、ベンジルアセトンを経口投与した結果いずれの投与量でもコーンオイル投与群と差がなかった(Figure 8)。この結果、摂食促進作用は血中移行した化合物の作用による可能性が低い事を示唆しており、嗅覚刺激により発現している可能性が高いと推測した。

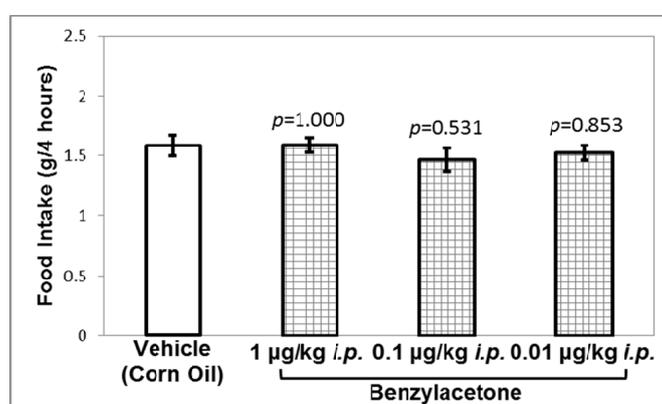


Figure 8. Appetite-enhancing effects of benzylacetone administered via intraperitoneal injection in fasted mice.

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 8 mice). Statistical analysis was performed using subsequent *t*-test with Bonferroni correction for multiple comparisons and one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

### 第三節 考察

Figure 4 で示した食餌摂取量変化と化合物の構造との比較から、摂食促進作用はフェニルプロパノイド構造を持つ化合物で発現したが、直鎖状モノテルペン化合物であるリナロール やシトロネロール、ゲラニオールなどを多く含むゼラニウム精油で発現しなかった。更に、摂食促進作用を示したベンジルアセトンに類似した構造を持つ化合物でもカルボニル基のないブチルベンゼンやカルボニル基とフェニル基が隣接するベンズアルデヒド、フェニル基がイソブチル基で置換された 6-メチル-5-ヘプテン-2-オンでは活性が消失した。カルボニル基の位置や脂肪族鎖長はベンジルアセトン、1-フェニル-2-ブタノン、アセトフェノンの鎮静作用[10]やオイゲノール、2-メトキシ-4-フェニルフェノールの嗅覚受容体の活性化[28]に影響を与えていることが報告されている。

Table 1. Compounds contained in geranium essential oil.

Compounds	Content ratio (%)	Retention Indices
<i>cis</i> -rose oxide	4.30	1376
<i>trans</i> -rose oxide	2.37	1393
<i>trans</i> -linalool oxide	5.41	1466
menthone	3.81	1503
isomenthone	5.66	1533
linalool	5.32	1550
$\beta$ -bourbonene	3.68	1559
citronellyl formate	6.29	1631
geranyl formate	3.05	1715
citronellol	26.31	1769
geraniol	13.55	1849
10- <i>epi</i> - $\gamma$ -eudesmol	2.63	2129
other compounds (less than 2% of content ratio)	17.62	-
total (34 compounds)	100.00	-

Figure 3 及び 4 で示した摂食量変化と視床下部での NPY mRNA および POMC mRNA の発現量の変化を比較すると、摂食量の変化は NPY mRNA の発現変化と正の相関性があり、Figure 9 で示した様に絶食の有無では摂食促進作用に差が無いと考えられるため Figure 3 と Figure 4 の比較は妥当性があると思われる。この摂食量と NPY の相関性はベンジルアセトン、1-フェニル-2-ブタノン、シンナムアルデヒドによる嗅覚刺激が NPY mRNA の発現量を有意に増加させる事を示唆している。更に、視床下部の NPY は摂食促進ペプチドとして知られており[26]、NPY がベンジルアセトン、1-フェニル-2-ブタノン、シンナムアルデヒドの摂食促進作用に関与していると推察した。NPY mRNA、POMC mRNA と摂食量についての報告のいくつかは摂食量が減少する際 NPY mRNA が減少すれば POMC mRNA が増加したことを示唆している[16, 17]。しかし、今回の結果は摂食量が増加する際に NPY mRNA が有意に増加し、POMC mRNA は減少傾向にあるが、POMC mRNA の発現量に有意な変化はな

いので、化合物投与による両遺伝子の発現量の変化は必ずしも相反する変化であるとは限らないと考えられる。これは過去の芳香性化合物の吸入による食事摂取量への影響に関する報告とも一致した[16]。更に、腹腔内投与での摂食行動試験の結果(Figure 8)からベンジルアセトンの摂食促進作用は鼻粘膜の受容体を介して NPY を増加させる働きを持つと推定した。

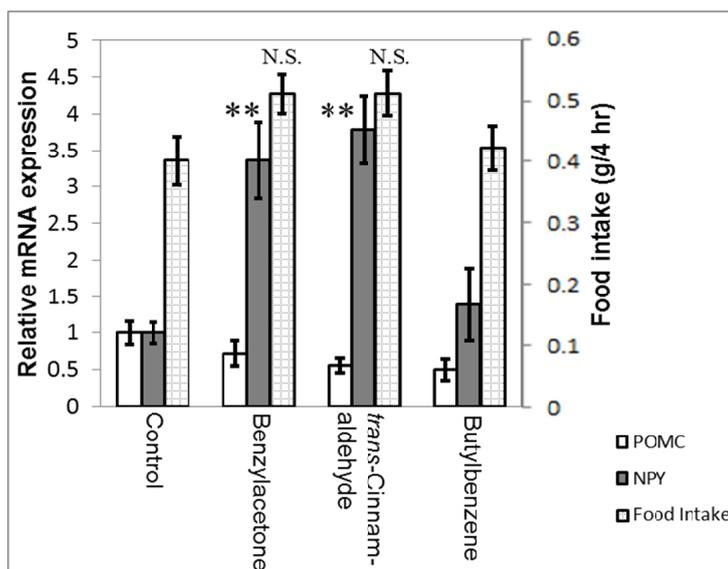


Figure 9. Gene expression and food intake in unfasted mice

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 8 for food intake, n = 5 for gene expression). Statistical analysis was performed using subsequent *t*-test with Bonferroni correction for multiple comparisons and one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

本研究で摂食促進活性が明らかになった化合物の他に、摂食促進作用を示した化合物として  $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール、ジアゼパム[29]、アナンダミド[30]、モルヒネ[31]、グレリン[32]が報告されている。しかし、 $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノール、ジアゼパム、モルヒネは依存性を始めとする問題があり、これらの化合物を摂食障害の治療に継続的に用いることは難しいと考えられる[33-36]。グレリンは静脈内投与されるが、精製されたグレリンの安定性に関する情報は示されていないものの、長期保存の際には低温度での保存、安定化剤やプロテアーゼ阻害剤の添加を行ってもグレリンの分解が阻止できないことが示唆されている[37]。そのため、インスリンや成長ホルモンなどのホルモン製剤のように日常的に投与できないという問題点がある。これらの化合物と比較すると、ベンジルアセトン、1-フェニル-2-ブタノン、シナムアルデヒドの吸入投与による摂食促進作用は非侵襲的である上に化合物の安定性や価格の面でも優れており、食欲不振または摂食障害を改善する新しい手法として期待できる。

近年、漢方薬の一つである六君子湯がシスプラチン投与ラットの血中グレリン濃度を上昇させ、食欲不振の改善を促進したと報告されている[2]。また、グレリンがラットの視床下部での NPY mRNA の発現量を増加させたという研究結果も報告されている[38]。ベンジルアセトンとグレリンはどちらも視床下部での NPY mRNA 発現量を増加させるので、ベンジルアセトンは六君子湯で治療される食欲不振のような症状の改善に利用できる可能性がある。

ベンジルアセトンの摂食促進作用は 60 分以下の吸入時間では時間との間に正の相関があり、(Figure 7)、Satou らによるゲットウ(*Alpinia zerumbet*)精油の吸入投与による抗不安作用の調査でも同様に抗不安作用と時間との間に正の相関が示されている。[26] 一方で Satou らは長時間の吸入投与では作用が減弱したことも報告している。

ベンジルアセトンの吸入投与による摂食促進作用は投与濃度と投与時間の影響を受けていることを本章第二節で示し、更にその作用は嗅覚を刺激した化合物の総物質に依存すると推定されている。これらの結果および本章第二節 4.の結果から投与時間が短くなるにつれ摂食量が減少したのは摂食行動に関連した鼻粘膜上の受容体と相互作用した化合物の総物質が減少したためであると推測する。ベンジルアセトン  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L 以下の投与量で投与量依存的に摂食量が減少したのもこれと同じ理由であると思われる。更に、有意差はつかなかったものの  $7.4 \times 10^{-2}$  mg/L の 60 分間吸入投与ではコントロール群より摂食量が 7%減少している事が明らかとなったことから、濃度の上昇とともに摂食行動を抑制する可能性があると考えられる(Figure 8)。この結果から異なった作用機序が高濃度投与時に働いている可能性がある。Hur らはフェネル精油を高濃度で吸入投与させた結果、摂食量、体重などが減少したと報告している[39]。精油の高濃度投与は Choi ら及び Yamamoto らも行っており、いずれも摂食量が減少していた [16, 17]。本研究では Choi らと同じゼラニウム精油を用いたアッセイを行った。第一章第一節 2.の Figure 3 で示した通り、ゼラニウム精油で鎮静作用のある  $7.4 \times 10^{-5}$  mg/L の投与濃度では POMC mRNA の発現量は増加しておらず、摂食量の減少も観察されていない。Choi らは金属製ラットケージ(31.28 L)に 2 mL のゼラニウム精油を滴下する投与を行っているので 610 mg/L と予想され、ケージ内化合物量は  $7.4 \times 10^{-5}$  mg/L の約 1 億倍と算出される。

以上の考察から、本研究においてベンジルアセトン  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L を投与した群より低濃度を吸入させたものは投与濃度が高くなるにつれ視床下部における NPY mRNA 発現量が増加するが、 $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L より高い投与濃度で投与すると NPY mRNA 発現量が減少し、POMC mRNA 発現量が増加していると予想される。

芳香性化合物の推定作用機序は大きく分けて二つある。一つは中枢神経系の受容体を血中移行した化合物が刺激するというもの、もう一つは直接嗅覚刺激により作用を発現するものである[12, 27, 28, 40]。これまでに硫酸亜鉛を溶かした生理食塩水やキシロカインを用

いた嗅覚破壊により作用機序が嗅覚を介したものであるということを確認した例がいくつか存在する[16, 27]。しかし、嗅覚破壊は処置中に窒息などにより動物が死亡することが多いため、倫理的観点から腹腔内投与で中枢への化合物の直接作用の有無を調査した。第二節 4.で示した通り、腹腔内投与ではいずれの投与濃度でも摂食量の増加は見られなかった。このことから、ベンジルアセトンの吸入投与による摂食促進作用は主として中枢にベンジルアセトンが直接作用したのではなく、主に嗅覚刺激によっておこるものと推定した。

## 第二章 ベンジルアセトンの吸入投与による体重増加について

### 第一節 芳香性化合物の吸入投与による体重増加とそれに寄与する作用の検討

#### 1. ベンジルアセトンの体重増加作用

Yamamoto らはキンモクセイ精油は単位時間当たりの摂食量を減少させるだけでなく、これを 18 日間繰り返し吸入投与したマウスはコントロール群のマウスに比べ体重増加が有意に抑制されたことを報告している[17]。食欲減退作用のある精油の繰り返し投与が体重増加を抑制するのであれば、摂食促進作用のある化合物の繰り返し投与は体重増加を促進する可能性があると予想し、第一章第一節 2. で摂食促進作用を示したベンジルアセトンとシンナムアルデヒドを 1 日 1 回、一時間吸入投与させ、これを 14 日間繰り返した場合の体重増加作用を検討した。

ベンジルアセトン投与群では優位な体重増加が観察され、シンナムアルデヒド投与群では体重増加傾向が観察された(Figure 10)。最初に化合物を吸入投与した日を 0 日目とし、それ以後 1 日ごとの体重変化を記録した結果 14 日目におけるマウスの体重はコントロール群に比べベンジルアセトン、シンナムアルデヒド投与群でそれぞれ 2.5 g, 1.5 g 程度増加していた。ベンジルアセトン投与群に関する two-way (Group × Day) ANOVA の統計処理の結果は Group [F(1,148)=7.0554,  $p < 0.01$ ] および Day [F(14,135)=96.818,  $p < 0.001$ ] が吸入投与後のマウスの体重増加に有意な影響を与えていることを示唆している。更に Group×Day [F(14,135)=2.5238,  $p < 0.01$ ] 相互作用も体重増加に有意な影響を与えていることを示した。事後検定の結果はベンジルアセトン投与群ではコントロール群と比較して有意に体重が増加していることを明らかにした(Day 5, 8, 11-12, 14 日目,  $p < 0.05$ ; 4, 6-7, 9-10, 13 日目,  $p < 0.01$ )。

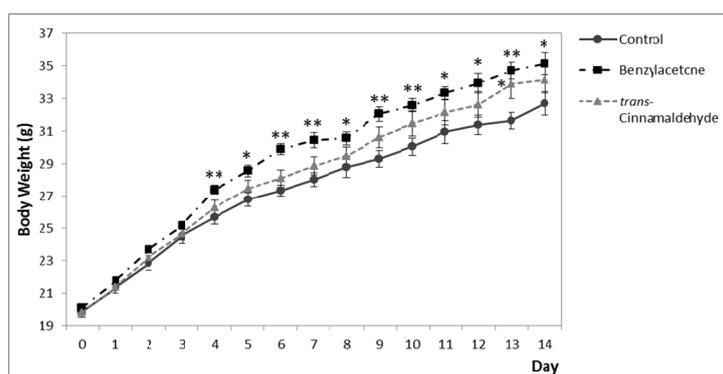


Figure 10. Body weights and food intake of mice treated daily with benzylacetone for 14 days.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 5 mice. The statistical analysis was performed using two-way ANOVA and one-way ANOVA followed by Dunnett's test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. the control group.

一方、シナムアルデヒド投与群に関する two-way ANOVA の統計処理の結果は Day [F(14, 135)=125.25,  $p < 0.001$ ]の影響のみが吸入投与によるマウスの体重増加に有意な作用であることを示唆しているが、Group×Day 相互作用は体重増加に有意な影響を与えなかった。事後検定の結果はシナムアルデヒド投与群ではコントロール群間と比較して 13 日目 ( $p < 0.05$ )のみで有意に体重が増加したことを示している。

## 2. 体重増加に対する自発運動抑制作用の影響

ベンジルアセトンには既に  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L の投与濃度で自発運動抑制作用があることが知られている [10]。精油組成の大半をシナムアルデヒドが占める桂皮精油は有意な自発運動抑制作用を示さなかった[11]。ヒトにおける体重増加の要因として運動不足と過食が挙げられている[41]。そこで体重増加に摂食促進作用と共に自発運動抑制作用が寄与しているかを検討するため、ベンジルアセトンおよびシナムアルデヒドの自発運動抑制作用をオープンフィールド法を用いて調査した。オープンフィールド試験とは、動物が制約を受けず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により動物の情動変化を観察する試験である。本研究ではケージ (奥行 30 cm, 幅 60 cm, 高さ 34 cm) をオープンフィールドとして使用し、実験を実施した。ケージ底面に 10 cm 間隔で線を引き、その線をマウスが 5 分ごとに横切った回数を y 軸、時間を x 軸としてグラフを描き、この曲線下面積(AUC)を自発運動量として扱った。またマウスの行動をビデオカメラにて撮影することで、跳躍、立ち上り等の異常行動等の発現の有無を確認した。吸入投与方法は遺伝子発現量調査の場合と同様にケージ上部にクエン酸トリエチルで溶解、希釈した芳香性化合物を滴下したしたろ紙を調布し、ガラス板で蓋をした後に自然拡散で 60 分間芳香性化合物を充満させた。このケージ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[10]。

ベンジルアセトンおよびシナムアルデヒドを用いて投与開始後 1 時間の自発運動量を観察した結果、ベンジルアセトン投与群では摂食促進作用と体重増加作用を示した  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L の投与濃度で自発運動量がコントロール群より 70%低下したが(Figure 11A)、シナムアルデヒド投与群では濃度が増加するにつれ自発運動量が減少する傾向があるものの、摂食促進作用が観察された  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L の投与濃度では有意な自発運動抑制作用は確認されなかった(Figure 11B)。この結果はベンジルアセトンの体重増加作用に自発運動抑制作用が寄与していることを示唆しているとともに、摂食促進作用と自発運動抑制作用はそれぞれ独立した作用であることを示した。Figure 11 で示した結果は 1 時間での自発運動量である。1 日ごとに体重を測定していた体重増加作用の結果に自発運動抑制作用が寄与していることを確かなものにするには 1 日当たりの自発運動量の測定が必要であると考えた。そこで、イグルーファストトラックケージシステムを用いてマウスの 1 日あたりの自発運動量を調

査した。

1日当たりの自発運動量は体重増加作用と同じ13 Lプラスチックケージの上方にろ紙を貼付し、そこにクエン酸トリエチルで溶解、希釈した芳香性化合物を滴下して1時間自然拡散でケージ内に充満させた。その後マウスを1匹ケージ内に投入し1時間吸入投与させた。吸入投与が終了したマウスはマウス用イグルーファスト・トラック回転ケージシステムを設置したマウス飼育用ケージに単独に入れ、マウス用イグルーファスト・トラック回転ケージシステムの円盤をマウスが回転させた数を自発運動量として扱った。

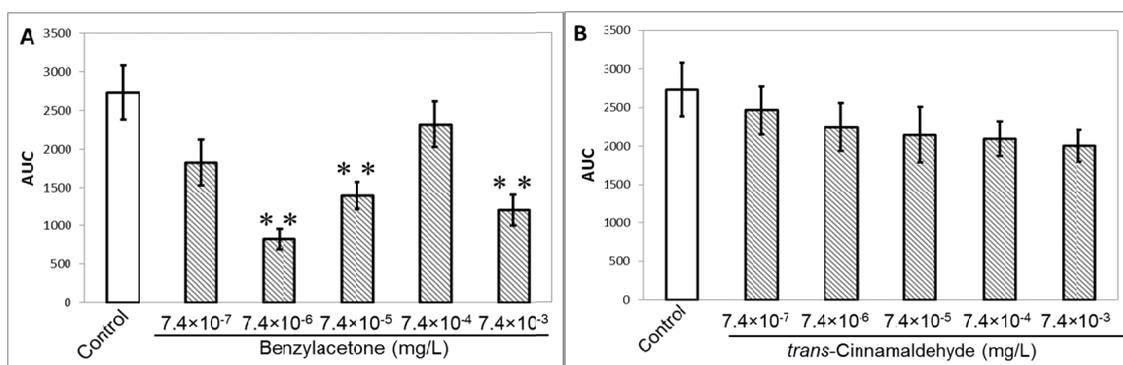


Figure 11. Spontaneous motor activity after an hour of mice treated with benzylacetone (A) and *trans*-cinnamaldehyde (B).

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 5 mice. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test.  $**p < 0.01$  vs. the control group.

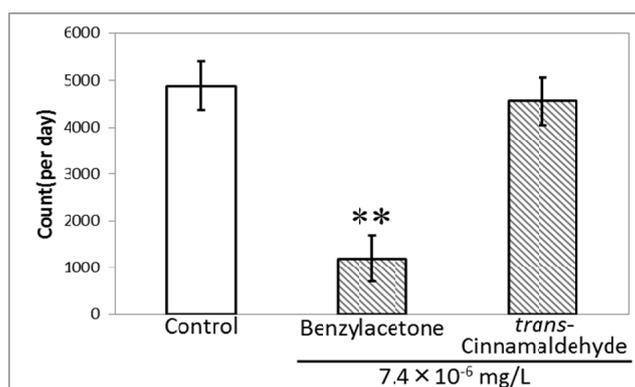


Figure 12. Spontaneous locomotor activity throughout the day after 1 h inhalation of fragrant compounds.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 5 mice. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test.  $**p < 0.01$  vs. the control group.

1日当たりの自発運動量は1時間での自発運動量と同様に投与濃度  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L のベンジルアセトン投与群でコントロール群の 30%に減少することが明らかとなった(Figure 12)。一方、シンナムアルデヒド投与群ではコントロールと有意差はなかった(Figure 12)。この結果はベンジルアセトンの体重増加作用は摂食促進作用だけでなく、自発運動抑制作用の影響も受けておりこれらの組み合わせによって有意な作用となっていることを示唆した。一方、シンナムアルデヒドでは摂食促進作用はあるが、自発運動抑制作用がないので体重増加傾向はあるが有意な作用でないと考えられる。

## 第二節 考察

14 日間ベンジルアセトンを繰り返し投与したマウスでは体重がコントロール群と比較して有意に増加しており、two-way ANOVA の結果からベンジルアセトンの吸入投与自体が体重増加作用に寄与している事が明らかとなった (Figure 10)。一方、14 日間シンナムアルデヒドを繰り返し投与したマウスの体重はコントロール群のものと比較して増加する傾向にはあるが有意な増加は確認できず、two-way ANOVA の結果もシンナムアルデヒドの吸入投与が体重増加作用に寄与しているとは言えない事を示した(Figure 11)。14 日間でマウスが消費したペレットの総量はコントロール群と比較してベンジルアセトンで 16.5 g、シンナムアルデヒドで 21.2 g 多かった。ベンジルアセトン投与群では吸入投与が体重増加に寄与しており、シンナムアルデヒドでは吸入投与が体重増加に寄与していないと two-way ANOVA の結果は示しているが、摂食量は体重増加に与える一要因であり[41]、今回の吸入投与でも 14 日間で両群とも摂食量は増加している。これは two-way ANOVA が示した吸入投与による作用がベンジルアセトンにはあるがシンナムアルデヒドにはない作用であって、摂食促進作用ではないものであることを示唆している。

そこで、ベンジルアセトンにはみられるが、シンナムアルデヒドが主成分である桂皮精油ではみとめられなかった自発運動抑制作用が寄与しているのではないかと予想した。

摂食促進作用と自発運動抑制作用は第一章第一節での芳香性化合物の摂食促進作用の結果と本章第一節 2.の結果からそれぞれ独立した作用を示している。ベンジルアセトンの有意な体重増加作用はtwo-way ANOVA の結果から考えると自発運動抑制作用が強く影響を及ぼしていることがうかがえる。また、ベンジルアセトンは摂食促進作用と自発運動抑制作用の両者を同一濃度で示す非常に面白い化合物である。

第一章第一節 2.で示した様に、ベンジルアセトンとシンナムアルデヒドの吸入投与による摂食促進作用および視床下部における NPY 発現量の変化はどちらもよく似ていると考えられる。一方、本章第一節で示したベンジルアセトンの自発運動量は  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L 前後の投与濃度で U 字カーブを描くが、シンナムアルデヒド吸入後の自発運動量はどの濃度でも投与濃度依存的に低下していくものであった。ベンジルアセトンの自発運動抑制活性は嗅覚破壊により減弱するが、それでも自発運動量の減少が観察されたことが報告されている [27]。この報告から、ベンジルアセトンの自発運動抑制作用は嗅覚刺激と血中移行した化合物の中枢における作用の両者に基づいていると考えられる。シンナムアルデヒドの自発運動への作用は 250 mg/kg (経口投与での生物学的利用脳は 20%未満とされているため[42]、最大で利用可能量は 50 mg/kg)での経口投与により観察されており、更にシンナムアルデヒド 250 mg/kg の腹腔内投与により運動失調作用も確認されている [43]。

### 第三章. 香辛料精油による摂食促進作用

#### 第一節 カレー粉精油の摂食促進作用と活性成分の検討

##### 1. カレー粉精油の摂食促進作用の検討

ヒトは経験的にカレー粉やそれを用いた料理の香気により食欲が促進される経験を感じることがある。これら香辛料や生薬は辛味成分や非揮発性成分の薬理学的調査は行われているものの、これらに含まれる芳香性化合物、即ち香気に関する薬理学的調査はほとんど検討されていない。カレー粉[44]やカレー粉の原料[44, 45]であるスパイス例えばシナモン[46]やクローブ[47]、フェンネル[48]には多くのフェニルプロパノイド化合物が含まれている。また、カレー粉やその原料であるシナモン、クローブ、フェンネルなど生薬としても用いられるスパイスは精油を含み特徴のある芳香を有する。また、これらの芳香を有する生薬は芳香性健胃薬と呼ばれ、食欲不振の改善する効果を持つとされる胃腸薬にも多く含まれる[49]。第一章第一節 2. でフェニルプロパノイド構造を有するシンナムアルデヒドやベンジルアセトンが摂食促進作用を示したので、クローブの精油の主成分オイゲノールやフェンネルの精油の主成分アネトールを含むカレー粉の精油も摂食促進作用を示すと予想される。そこで、混合香辛料であるカレー粉の精油をマウスに吸入投与させ、その摂食促進作用を第一章第一節 2. で実施した摂食行動試験で検討した。本章で検討した化合物は Figure 1 および Figure 4 に示す。

カレー粉精油を  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L の濃度で吸入投与した場合有意な摂食促進作用を示し、その摂食量は陽性対照として用いた同じ濃度のベンジルアセトンを吸入投与した場合と同等であった(Figure 13)。これにより、生薬としても用いられる香辛料の混合物であるカレー粉精油の吸入投与により香辛料や生薬の香気に摂食促進作用があることが見出された。

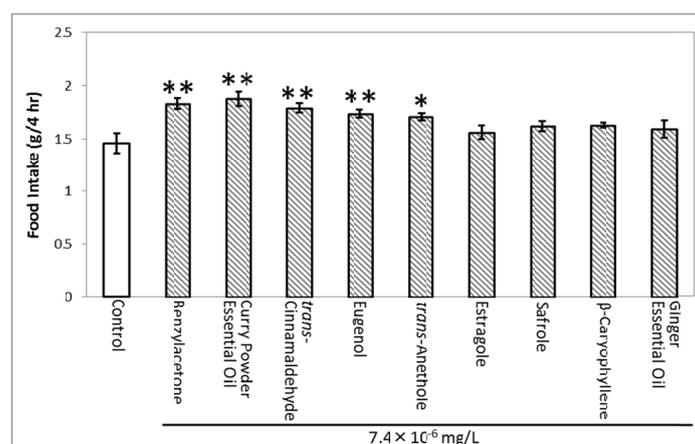


Figure 13. Appetite enhancement in mice treated with fragrances.

Control: triethyl citrate inhalation, benzylacetone: as a positive control via inhalation. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 8 mice. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. the control group.

## 2. カレー粉精油中の活性化化合物の探索

本節 1.で摂食促進作用を示したカレー粉精油の活性成分を同定するため、カレー粉精油の 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。Table 2 に示したとおり、カレー粉精油はシナナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールなどフェニルプロパノイドと、 $\beta$ -カリオフィレンや生姜精油に含まれるジンギベレンなどテルペノイドから成っていた。

Table 2. Main components of curry powder and ginger essential oil.

Components	Curry Powder Essential Oil		Ginger Essential Oil	
	Peak Area (%)	RI	Peak Area (%)	RI
$\beta$ -Phellandrene	-	-	5.46	1212
$\gamma$ -Terpinene	1.16	1246	-	-
$\delta$ -Elemene	1.02	1473	-	-
$\alpha$ -Copaene	1.71	1497	-	-
Linalool	3.13	1550	1.17	1550
Bornyl acetate	-	-	1.70	1584
2-Undecanone	-	-	1.31	1600
$\beta$ -Caryophyllene	4.64	1600	-	-
Terpinen-4-ol	-	-	1.41	1606
Myrtenal	-	-	1.13	1631
Neral	-	-	10.81	1684
$\alpha$ -Terpineol	-	-	1.83	1702
<i>endo</i> -Borneol	-	-	3.28	1708
Zingiberene	1.25	1724	8.59	1724
$\beta$ -Bisabolene	-	-	1.61	1730
Geranial	-	-	22.29	1734
$\alpha$ -Farnesene	-	-	1.92	1750
$\delta$ -Cadinene	1.87	1761	-	-
$\beta$ -Sesquiphellandrene	2.57	1772	3.04	1772
$\alpha$ -Curcumene	1.01	1775	1.41	1775
2-Methyl-3-phenylpropanal	11.46	1781	-	-
Methylenebornane	2.45	1793	-	-
<i>trans</i> -Anethole	15.18	1827	-	-
Geraniol	-	-	2.10	1852
<i>7-epi-cis</i> -Sesquisabinene hydrate	-	-	1.07	2004
<i>trans</i> -Cinnamaldehyde	2.70	2045	-	-
<i>cis</i> -Nerolidol	-	-	1.40	2051
<i>p</i> -Cimen-7-ol	1.82	2118	-	-
<i>7-epi-trans</i> -Sesquisabinene hydrate	-	-	1.95	2119
Zingiberenol	-	-	2.55	2129
Eugenol	6.97	2172	-	-
Turmerone	7.81	2185	-	-
$\beta$ -Eudesmol	-	-	1.00	2232
Curlone	6.31	2240	-	-
<i>ar</i> -Turmerone	10.32	2251	-	-
Unknowns	-	-	3.70	-
Main Component total	83.38	18 compounds	80.74	24 compounds
Other compounds	16.62	36 compounds	19.26	41 compounds

フェニルプロパノイドはカレー粉精油の 24.78%を占めていた。シンナムアルデヒド、オイゲノール、アネトール、 $\beta$ -カリオフィレンやカレー粉の原料の一つである生姜精油(Table 2)を  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L の濃度で吸入投与し摂食促進作用を測定したところ、フェニルプロパノイドであるシンナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールでは有意な摂食量の増加が観察されたが、 $\beta$ -カリオフィレンやテルペノイドのみからなる生姜精油(Table 2)では摂食量の増加が観察されなかった(Figure 13)。この結果からシンナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールはカレー粉精油の活性に寄与する化合物である可能性がある。オイゲノールやアネトールに構造の類似したフェニルプロパノイド、サフロールやエストラゴールを吸入したマウスでは摂食量の増加が観察されなかった(Figure 13)。

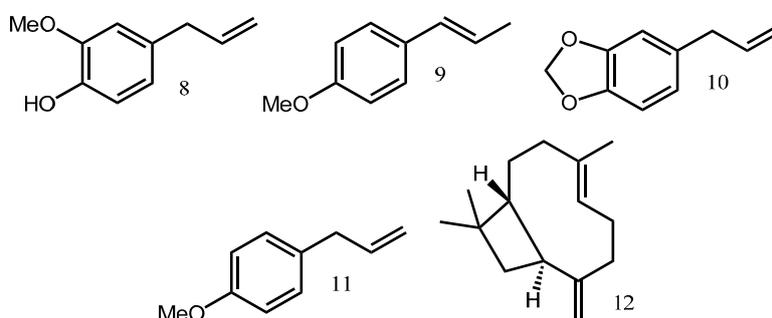


Fig. 14. Compounds tested in this study

8. eugenol 9. *trans*-anethole 10. safrole 11. estragole 12.  $\beta$ -caryophyllene

### 3. 活性化合物の混合による摂食促進作用への影響

自発運動抑制活性のある複数の精油を混ぜて吸入投与すると精油混合物では自発運動抑制作用が増強されたとの報告がある[11]。カレー粉精油の活性化合物と考えられるシンナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールは単独でも摂食促進作用を示した。カレー粉精油ではこれら 3 化合物は混ざり合っており、複数の精油の混合による自発運動抑制作用の変化と同様に、摂食促進作用も変化する可能性がある。そこでシンナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールをカレー粉精油中の割合(1 : 2.6 : 5.6)で混合したものの摂食促進作用を  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L を吸入投与して摂食行動試験で検討した。その結果、コントロール群と比較して有意に摂食量は増加しているものの、同一濃度で活性化合物と考えられる各化合物を投与した場合より摂食量は減少していた(Figure 15)。これを 10 倍希釈した場合、カレー粉精油を吸入投与した場合と同等の摂食量が観察された(Figure 15)。これを更に 10 倍希釈すると摂食量はコントロールとほぼ同等となった(Figure 15)。

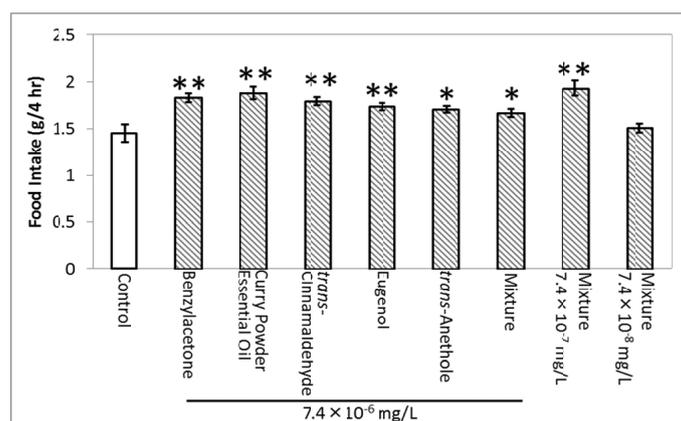


Figure 15. Appetite effect in mice inhaled mixture of active compounds in curry essential oil.

Control: triethyl citrate inhalation, benzylacetone: as a positive control via inhalation. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 8 mice. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. the control group.

## 第二節 考察

カレー粉精油を吸入したマウスはコントロール群と比較して優位に多い摂食量を示した。ポジティブコントロールである投与濃度  $7.4 \times 10^6$  mg/L のベンジルアセトン吸入させたマウスの摂食量はこれとほぼ同等であった。カレー粉精油に含まれるフェニルプロパノイド化合物 シンナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールには摂食促進作用があったが、 $\beta$ -カリオフィレンやジンギベレンなどのセスキテルペンを含む生姜精油は摂食促進作用を示さなかった(Figure 13)。第一章第一節 2.でもフェニルプロパノイドやその類縁体が摂食促進作用を示すことを述べたが、テルペノイドやテルペノイドを主成分としたゼラニウム精油は摂食促進作用を示さなかった。これらはテルペノイド化合物と比較してフェニルプロパノイド構造を有する化合物が摂食促進作用を示す可能性があることを示唆している。

一方で、フェニルプロパノイドの中でもサフロールやエストラゴールのように摂食促進作用を示さないものも存在している。第一章第二節 4.の結果から、芳香性化合物による摂食促進作用は主として嗅覚刺激によるものと推測するが、摂食促進作用を示すオイゲノールの作用する嗅覚受容体の一つにサフロールなどが作用しないことが明らかとなっている[28]。更にシンナムアルデヒド、アネトール、エストラゴールはオイゲノールやバニリン[28]と違うタイプの嗅覚受容体で高い親和性を示したこと報告されており[50]、サフロールやエストラゴールは摂食促進作用を示さない受容体と相互作用をしている可能性がある。

生薬として用いられる生姜や乾姜の第十六改正日本薬局方 (JPXVI)における指標物質はそれぞれ[6]-ギンゲロール[51], [6]-ショウガオール[52]であるが、本研究で得た生姜精油にはこれらは含まれていなかった。[6]-ギンゲロールや[6]-ショウガオールは生の生姜のメタノールエキスでは少なく、乾燥や蒸すなどの加熱処理をした生姜のメタノールエキスで増加する事が Cheng らの研究で明らかとなっている[53]。一方で、乾燥させた生姜でも精油には[6]-ギンゲロールが含まれないという報告があり[54]、その組成は本研究の結果と同様にモノテルペンやセスキテルペンを主体とした精油であった。[6]-ギンゲロールがイソオクタンや四塩化炭素に溶解しにくい事が Singh ら[55]の研究で明らかとなっているので、捕集溶媒として用いたヘキサンやヘキサンに溶けたテルペノイドの中には溶けにくい可能性がある。しかし、Singh らは[6]-ショウガオールがイソオクタンに非常に溶けやすいことも報告しているため少量であっても精油中に現れないというのは別の理由があるからであると考えられる。その一つに沸点の差が考えられる。生姜精油に含まれる  $\alpha$ -クルクメン、および *cis*-ネロリドールの沸点はそれぞれ 20Torr で 140-142°C (760Torr で約 260°C)[56]、および 0.1Torr で 70°C (760Torr で約 290°C)[57]と報告されており、多くの精油成分が 200-300°C の間での沸点を有する。しかし、[6]-ギンゲロールで沸点は 453°C[58]、[6]-ショウガオールでは 427.5°C[59]である。このように高沸点であるため水蒸気蒸留によって蒸留され難いことが[6]-ギンゲロールや[6]-ショウガオールが精油成分中に存在しない理由であると推測する。

カレー粉精油に含まれているシンナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールをカレー粉精油中の割合(1.00 : 2.58 : 5.62)で混合したものを  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L で投与するとカレー粉精油を投与した場合より作用が弱くなったばかりでなく活性化化合物と予想される化合物のみの投与の場合よりも作用が弱くなっていた。(Figure 15) カレー粉精油中でシンナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールが占める割合は 24.85% であり、生姜精油由来の化合物(ジンギベレン)や  $\beta$ -カリオフィレン、第一章第一節 2. で明らかにしたリナロールなどは摂食促進作用を示さないと考えられるので、カレー粉精油において作用を持たない溶媒としての役割を持ち、3 つの摂食促進作用を示す化合物を希釈している可能性が考えられる。シンナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールを混合したものを  $7.4 \times 10^{-7}$  mg/L ならびに  $7.4 \times 10^{-8}$  mg/L に希釈したところ  $7.4 \times 10^{-7}$  mg/L でカレー粉精油とほぼ同等の摂食促進作用が得られ、 $7.4 \times 10^{-8}$  mg/L では作用が消失していた。この結果は第一章第三節 2. の結果と同様に、濃度が高すぎても低すぎても活性が弱くなるということを示している。このためシンナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールを混合したものがテルペノイドを主体とする活性を持たないと考えられる精油成分により希釈されていたことでより高濃度である  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L でカレー粉精油の摂食促進作用が観察されたのだと推察する。また、 $7.4 \times 10^{-7}$  mg/L の活性化化合物と予想される化合物をカレー粉精油中の比率で混合したものはカレー粉精油より低濃度で強い摂食促進作用を示したことから相乗効果も存在する可能性がある。

カレー粉精油を吸入したマウスの摂食量はコントロール群と比較して有意に増加しており、これはベンジルアセトンの吸入投与での摂食量と同等であった。この結果は生薬や香辛料の香気に薬理作用があることを示した。また、カレー粉精油中に含まれるシンナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールがカレー粉精油の活性成分である可能性が示唆された。これらの化合物を主要成分として含むスパイス、例えばフェンネル(*Foeniculum vulgare* Mill., Apiaceae)、シナモン(*Cinnamomum zeylanicum* J.Presl, Lauraceae)、クローブ(*Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry, Myrtaceae) [44, 45]などの精油も摂食促進作用を示すことが推察される。Kariyone[60]によれば日本で売られている健胃薬に含まれる芳香性健胃薬、桂皮、丁子、アニスなどの香りはそれらの摂食促進作用の活性成分であると考えられてきた。本研究の結果は桂皮[46]、丁子[47]、アニス[61]の精油の 50%以上をそれぞれ占めるシンナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールがこれら芳香性健胃薬の主要活性成分である可能性を示唆している。

#### 第四章 ハナショウガ (*Zingiber zerumbet*) 根茎由来環状セスキテルペン ゼルンボンおよびその誘導体の自発運動抑制活性

##### 第一節 研究の背景 ハナショウガ及びその精油成分について

ハナショウガ *Zingiber zerumbet* Smith (Zingiberaceae)はインド原産で、インド・東南アジアからハワイ諸島に至る広い地域に分布する[62]。花茎が華やかなので欧米では園芸植物としての利用が主だが、東南アジアでは根茎を主に鎮痛作用を期待して民間で薬用にする[63]。実際、根茎由来の精油の主成分であるゼルンボンには抗侵害作用が認められたことが報告されている[64]。ゼルンボンには抗侵害作用の他にも抗ウイルス作用、抗炎症作用などが示されているが、化合物としては高い反応性を有するため、パクリタキセルをはじめとする医薬品等の合成原料として期待されている[65-70]。ゼルンボンは香りがある揮発性が高いセスキテルペンであり[67]、吸入投与により自発運動抑制活性などの生物活性があらわれる可能性があるとして期待される。そこで、Figure 16 に示したゼルンボン及びその誘導体を吸入投与した際のマウスの総自発運動量の変化を第二章第一節 2.と同様にオープンフィールド法で観察し、化合物の構造と活性との関係の調査を計画した。

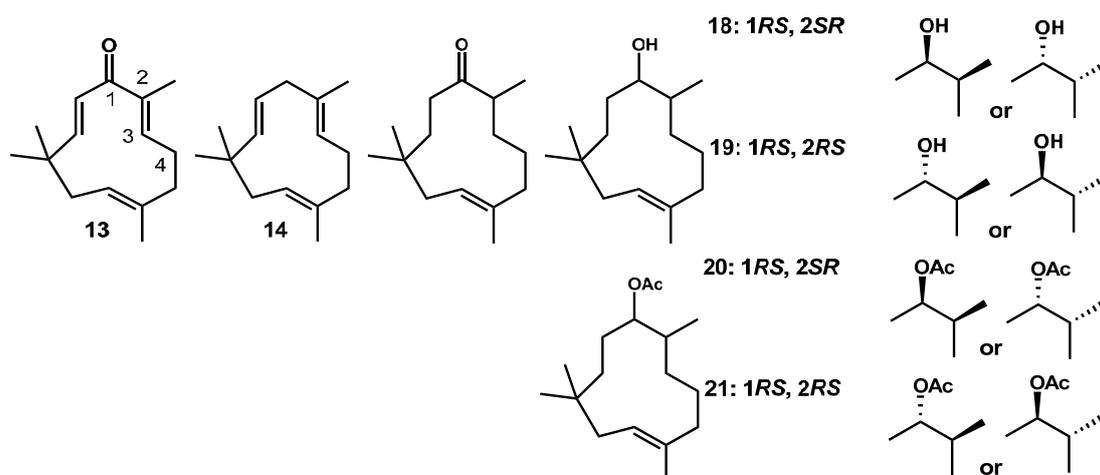


Figure 16. Structures of zerumbone and its derivatives examined in this study.

**13:** zerumbone; **14:**  $\alpha$ -humulene; **15:** (2*R*)-tetrahydrozerumbone (*R*-THZ); **16:** (2*S*)-tetrahydrozerumbone (*S*-THZ); **17:** (2*RS*)-tetrahydrozerumbone (*rac*-THZ); **18:** (1*RS*,2*SR*)-*cis*-tetrahydrozerumbol (*rac-cis*-THZol); **19:** (1*RS*,2*RS*)-*trans*-tetrahydrozerumbol (*rac-trans*-THZol); **20:** (1*RS*,2*SR*)-*cis*-tetrahydrozerumbol acetate (*rac-cis*-THZAc); **21:** (1*RS*,2*RS*)-*trans*-tetrahydrozerumbol acetate (*rac-trans*-THZAc).

## 第二節 ゼルンボン誘導体についての構造活性相関研究

### 1. ゼルンボンのケトン基の有無と自発運動抑制活性

ゼルンボン **13** と  $\alpha$ -フムレン **14** の鎮静活性を比較し、活性へのケトン基の関与を考察した。化合物 **13** を投与すると総自発運動量の低下が認められ、投与量  $7.4 \times 10^{-4}$  mg/L で有意な低下が確認された。(Fig. 17) 一方、構造中にケトン基のない化合物 **14** を投与すると総自発運動量の減少が認められるものの、どの濃度でも有意な活性は見られなかった。

この結果から、化合物 **13** の1位のケトン基の有無は有意な活性の有無に関与していると推定した。

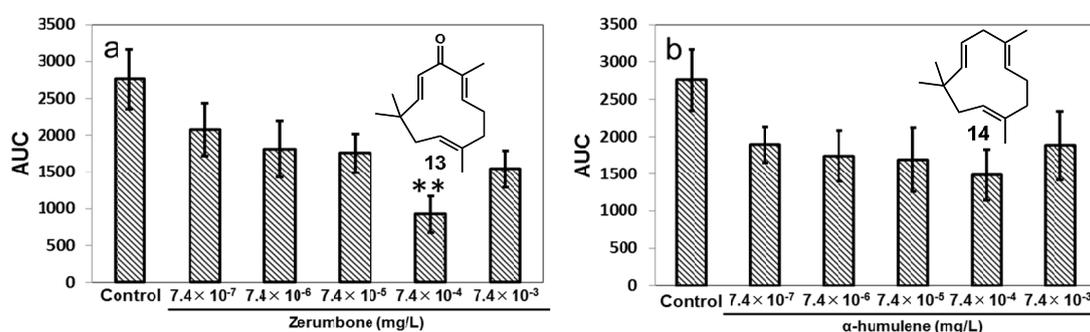


Figure 17. Spontaneous motor activity of mice treated with zerumbone **13** (a) and

$\alpha$ -humulene **14** (b).

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 5 mice. The statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs. the control group.

## 2. ゼルンボンの二重結合の水素付加による自発運動抑制活性への影響

(2*R*)-テトラヒドロゼルンボン(THZ) **15**、(2*S*)-THZ **16** 及び(2*R*)-THZ **15** と(2*S*)-THZ **16** の等モル混合物 **17** の投与により総自発運動量はいずれも投与量  $7.4 \times 10^{-6}$  mg/L で最も低下した。また、濃度の違いによる総自発運動量の減少は化合物 **15**, **16**, **17** のいずれでも類似しているため、ラセミ体でも鏡像異性体同様の作用が期待できることが示唆された。(Figure 18) 化合物 **15**, **16**, **17** は化合物 **13** の 1/100 の投与量で有意な活性を示した。(Fig. 17, 18)

この結果から、化合物 **13** のケトン基に隣接する二つの二重結合の消失は有意な活性の発現する濃度を低下させると推測した。

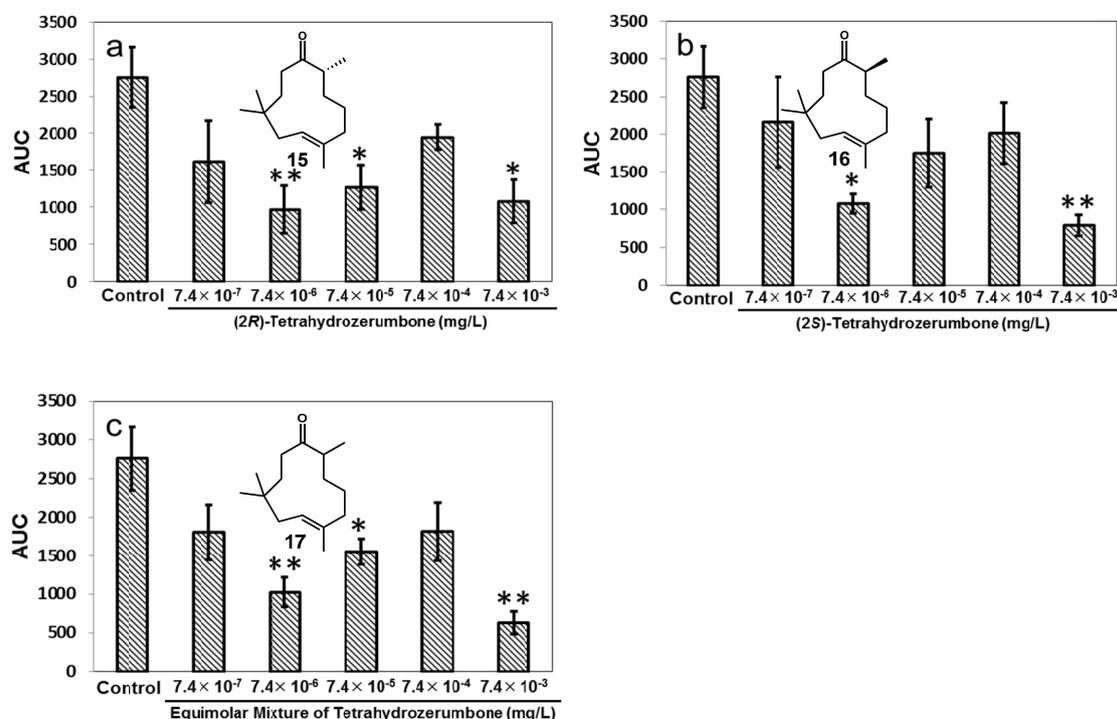


Figure 18. Total spontaneous motor activity of mice treated with (2*R*)-THZ **15** (a), (2*S*)-THZ **16** (b), and (2*RS*)-THZ **17** (c).

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 5 mice. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs. the control group.

## 3. 酸素含有官能基の種類の違いによる活性への影響

テトラヒドロゼルンボール(THZol)およびテトラヒドロゼルンビルアセテート(THZAc) **18-21** はいずれも有意な自発運動抑制活性を示した。化合物 **18**, **19** を比較すると、化合物 **19** 投与時の総自発運動量は化合物 **18** 投与時の 1/10 の量で最も低下した。同様に、化合物

20、21 を比較すると化合物 21 投与時の総自発運動量は化合物 20 投与時の 1/10 の投与量で最も低下した。これより、*rac-cis/trans*-THZol (化合物 18,19) 及び *rac-cis/trans*-THZAc (化合物 20,21) のいずれの場合も *trans* 体 (化合物 19,21) が *cis* 体 (化合物 18,20) より少ない投与量で同等の活性を有することが示された。

#### 4. ゼルンボンのジアステレオマー誘導体の幾何異性体が自発運動抑制活性に与える影響

THZol と THZAc の立体配置が同じ *cis-trans* 異性体間 (化合物 18,20 及び 19,21) を比較すると、どちらの *cis-trans* 異性体も THZol が THZAc 投与時の 1/10 の量で活性を示した (Figure 19)。THZol と THZAc では THZol がより少ない投与量で有意な活性を示したことから、THZol の 1 位のアセチル化は有意な活性を発現させるのに必要な投与量を増大させると推測した。

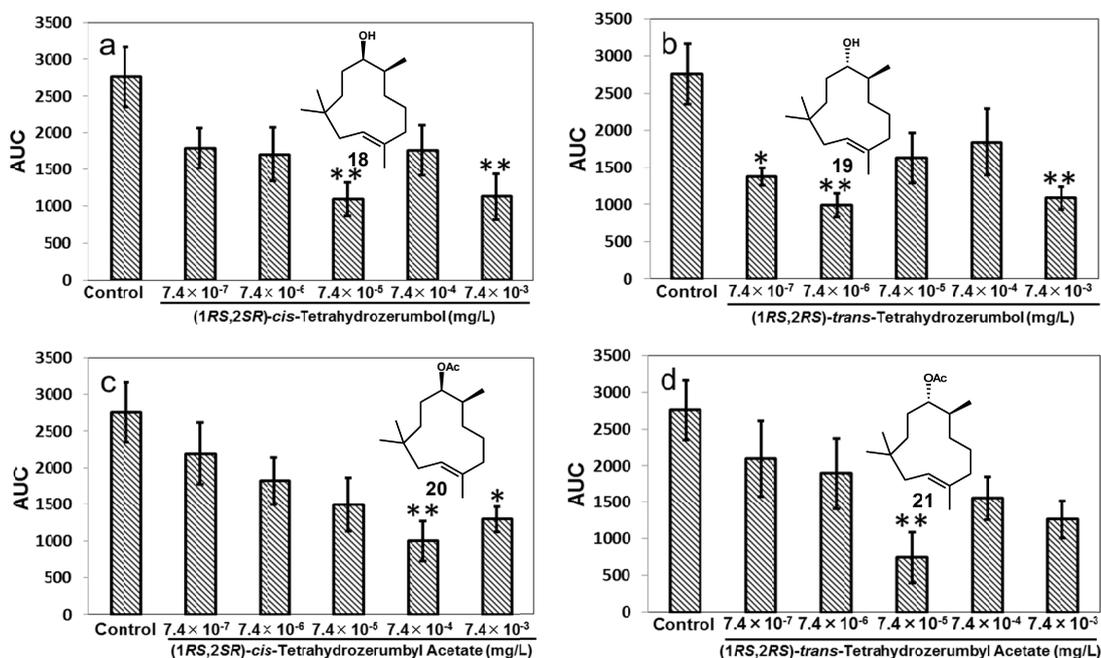


Figure 19. Total spontaneous motor activity of mice treated with *rac-cis*-THZol 18 (a), *rac-trans*-THZol 19 (b), *rac-cis*-THZAc 20 (c), and *rac-trans*-THZAc 21 (d).

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 5 mice. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs the control group.

### 第三節 考察

本研究の結果、 $\alpha$ -フムレン **14** は弱い自発運動抑制活性を有することが見出された。(Fig. 17) ゼルンボン **13** および化合物 **14** の間で活性曲線が異なっていたのは  $7.4 \times 10^{-4}$  mg/L の投与時のみであった。また、環構造と自発運動抑制活性の関連を考察するために過去に報告された化合物 **13** および **14** の X 線構造解析の結果を比較した結果、両化合物間でケトン基付近のねじれ角の大きさを除き環構造に大きな差はない事が示された[69, 70]。これらの結果から、化合物 **13** の 1 位にあるケトン基は有意な自発運動量の低下作用に寄与していると推測した。THZ **15-17** はゼルンボン **13** の 1/100 の投与量で最も強い自発運動抑制作用を示した。このため、ゼルンボン **13** の C2-C3 及び C10-C11 の二重結合の有無が有意な活性の発現に寄与していると推定した。THZ **15-17**, THZol **18-19**, THZAc **20-21** の結果(Figure 18, 19) から、いずれの化合物にも有意な自発運動抑制活があることが明らかになった。化合物 **14** と化合物 **13** および **15-21** の比較から、酸素含有官能基が有意な自発運動量の低下作用に寄与している可能性が示唆された。また、化合物 **18,19** と化合物 **20,21** の比較から水酸基のアセチル化は自発運動抑制活性を減弱させる可能性があることが示唆された。水酸基のアセチル化による活性の減弱はベンジルアセトン誘導體でも報告されている[10]。

既に報告された吸入投与による *cis-trans* 異性体環状化合物の生理活性の比較は Vernet-Maury らの報告のみである[71]。Vernet-Maury らによれば *cis-trans* 異性体環状化合物である 8-メルカプトメントンの異性体間でストレス誘発作用に差がない事を報告している。一方、本研究の結果では *cis-trans* 異性体間の有意な自発運動抑制活性の発現する化合物量に 10 倍の差があることが化合物 **18** と **19** の比較および化合物 **20** と **21** の比較から明らかとなった。また、THZ **15-17** では C2 位の絶対配置は自発運動抑制活性に影響を与えないことを示した。既に報告されている鏡像異性体間で活性に差のない化合物としては limonene がある[27]。

以上の考察における二重結合の有無や *cis-trans* 異性体間の活性の違いから、11 員環やそれに付属した官能基の立体配座が活性に強く影響を与えると考察した。

芳香性化合物の吸入投与による自発運動抑制作用機序として、いくつかの仮説が示されている。ひとつは中枢神経系での受容体制御であり[10, 12]、もうひとつは自律神経の制御である<sup>19)</sup>。ゼルンボン誘導體の作用部位を検討するため、混合物 **17** をコーンオイル (和光純薬工業) に溶解し、 $10^{-5}$  mg/kg の投与量で腹腔内投与した結果、対照群と比べて有意な自発行動の減少が認められた(Figure 20)。この結果から、本研究で用いた化合物の自発運動抑制活性は、嗅球の刺激のみではなく、肺もしくは鼻粘膜から化合物が吸収されるという経路による活性発現も関与していると推測した。

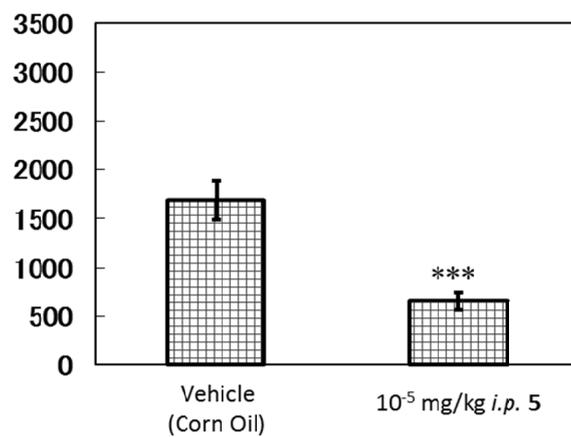


Figure 20. Effect of the equimolar mixture of tetrahydrozerumbone **17** by intraperitoneal injection.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM for 5 mice. The statistical analysis was performed by Student's *t*-test. \*\*\* $p < 0.005$  vs. the vehicle group.

## 総括および結語

本研究ではいくつかの芳香性化合物、特にフェニルプロパノイド構造を有する化合物の吸入投与による視床下部での遺伝子発現量調査を通してベンジルアセトンやシナムアルデヒドのようなフェニルプロパノイド構造を有する化合物の摂食促進作用の効果を科学的に立証するとともに、摂食促進作用を示す化合物としてベンジルアセトン、シナムアルデヒド、1-フェニル-2-ブタノン、オイゲノール、アネトールを同定したとともに、シナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールを含むカレー粉精油にもこの作用があることを明らかにした。以下に各章で明らかになった結論を示す。

### ベンジルアセトンの吸入投与による摂食促進作用について

ベンジルアセトン、1-フェニル-2-ブタノン、シナムアルデヒドは吸入投与により視床下部での神経ペプチド Y mRNA の発現量増加から、これらの化合物の香気がマウスに摂食促進作用を示したことを明らかにした。活性成分としてフェニルプロパノイド構造を有するベンジルアセトン、1-フェニル-2-ブタノン、シナムアルデヒドがあり、テルペノイドなどは摂食促進作用を示さなかった。ベンジルアセトンの吸入投与による摂食促進作用は投与濃度や投与時間の影響を受けたことから、この作用は作用点である嗅覚を刺激したその化合物量に依存した反応であると考えられる。

### ベンジルアセトンの吸入投与による体重増加作用について

ベンジルアセトンの吸入投与は有意な体重増加作用を示したが、シナムアルデヒドでは体重増加傾向はあるものの、優位な体重増加は観察されなかった。摂食量はほぼ同等であるこれらの化合物の1時間あたりおよび1日あたりの吸入投与を行ったマウスの自発運動量はベンジルアセトンを投与した場合はコントロール群と比較して優位に低下したものの、シナムアルデヒドを投与した場合はコントロール群と差がなかった。これらのことから、摂食促進作用と自発運動抑制作用は独立した作用であるが、これらを組み合わせることにより有意な体重増加作用が発現した。

### 香辛料精油の吸入投与による摂食促進作用

カレー粉精油の吸入投与によりベンジルアセトンと同等の摂食促進作用が得られた。また、カレー粉精油に含まれるシナムアルデヒド、オイゲノール、アネトールも摂食促進作用を示し、これらの混合物はカレー粉精油より低い濃度で強い摂食促進作用を示した。

これらの結果から、摂食促進作用を示す化合物はフェニルプロパノイド構造を持っており、テルペノイドなどはこれを示さないことが明らかとなった。また、カレー粉精油に活性があったことから、生薬や香辛料の匂いには薬理作用があることが明らかとなった。

#### ゼルンボンおよびその誘導体の吸入投与による自発運動抑制活性

ゼルンボンおよびその誘導体は  $\alpha$ -フムレンとの自発運動抑制活性との比較から、酸素含有官能基、すなわちカルボニル基、水酸基、アセトキシ基を有する事で有意な自発運動抑制活性を示している事が明らかとなった。更に、二重結合の消失やジアステレオマーなど環構造の違いにより作用濃度が変化する事から、環構造も自発運動抑制活性に強く寄与している。

以上、本研究では希薄な芳香性化合物の吸入投与、すなわち、においが摂食促進作用を示すことを、マウスを用いた動物実験により明らかにしたものである。これは吸入投与による医薬品の開発やにおいを利用したセルフメディケーションの考案など、芳香性化合物の新たな研究開発に有用な知見となると考えている。

## 実験方法

### [Materials]

Essential oils and compounds used in this study (Figure 1, 14, 16) were obtained as follows. *trans*-Cinnamaldehyde (purity 98%) and benzaldehyde (purity 98%) were purchased from Nacalai Tesque, benzylacetone (purity >95%), 1-phenyl-2-butanone (purity >95%), butylbenzene (purity 99%), 6-methyl-5-hepten-2-one (purity 98%), eugenol (purity 99%), *trans*-anethole (purity 98%), safrole (purity 96%) and  $\beta$ -caryophyllene (purity >90%) were purchased from Tokyo Chemical Industry. Geranium essential oil was purchased from Tisserand and (*R*)-linalool (purity >95%), *p*-allylanisole (estragole; purity 98%) and  $\alpha$ -humulene (purity >96%) were obtained from Sigma-Aldrich. All fragrant compounds used in this study were of the highest grade available. Zerumbone was extracted from *Zingiber zerumbet* rhizome, and the extract was refined. 2,3,10,11-Tetrahydrozerumbone (THZ) stereoisomers and tetrahydrozerumbone derivatives were synthesised from zerumbone. First, zerumbone was reduced with H<sub>2</sub> on Pd/C to give racemic THZ. Then, racemic THZ was reduced with LiAlH<sub>4</sub> to give racemic THZol, which were acetylated with acetic anhydride in pyridine solution to obtain *cis*- and *trans*-THZAc. Furthermore, racemic THZol were treated with lipase and isopropenyl acetate to obtain (*2S*)-tetrahydrozerumbol acetate and (*2R*)-tetrahydrozerumbol in order to resolve the racemic THZ into (*2R*)-THZ and (*2S*)-THZ by oxidation following deacylation. Zerumbone derivatives were refined to more than 99.9% purity, as evaluated by <sup>1</sup>H-NMR, and (*2R*)-THZ and (*2S*)-THZ were obtained with 97% and 95% e.e., respectively. The purity of *cis*-THZol was 85%. Triethyl citrate was purchased from Merck KGaA, and 2-mercaptoethanol and ethanol were from Nacalai Tesque. Ghrelin (rat) was purchased from Peptide Institute Inc. The materials for distillation of spices; curry powder and raw ginger (*Zingiber officinale* Roscoe, Zingiberaceae) were purchased from S&B Foods INC. and Sakata. The batch numbers of the purchased spices were as follows: 2017.7.17 (curry powder), H 2K (raw ginger).

### [Animals]

The animal studies were designed according to the recommendations of the Animal Research Committee of Kyoto University, Kyoto, Japan. Four-week-old male ddY mice (approximately 16 g at the time of purchase) were obtained from Japan SLC. The mice were housed in colony cages (six mice per cage) at an ambient temperature of 25 ± 2°C under a 12 h light-dark cycle. The mice used for the measurement of gene expression in the hypothalamus, locomotor activities and weight gain caused by fragrant compounds administration over 14 days (25 g at the time of experiments) were fed standard pellet chow and water *ad libitum*. The mice used in the feeding tests (19 g at the time of the experiments) were fasted for up to but not more than 24 h before starting the tests, but water was available *ad libitum*. All studies were conducted from 08:00 to 17:00.

[Evaluation of gene expression in mice hypothalamus]

The evaluation method for gene expression used in this study was modified from that described previously [12, 16]. The mice that were not fasted inhaled the fragrance in their cage for 60 min, then their brains were removed after cervical dislocation and decapitation. Hypothalamus was isolated from the brain and was ground up using liquid nitrogen. Total RNA was extracted from the hypothalamus using an RNeasy fibrous tissue mini kit (Qiagen). cDNA was synthesised using Revatra Ace (Toyobo) and oligo (dT)15 primer (Takara Bio Inc.) with extracted total RNA as a template, and the resultant cDNA was refined by NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL). Gene expression in the hypothalamus was measured using THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) on StepOnePlus™ (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed with a temperature programme starting at 95.0 °C for 20 s, followed by 40 cycles of 95.0 °C for 3 s, 45.0 °C for 30 s and 72.0 °C for 30 s. The primers used in this study are shown in Table 3. Calibration curves for each couple of primers were plotted using the results of real-time PCR. The calibration curves of  $\beta$ -actin, POMC and NPY and their correlation coefficients are shown in Table 3. The linearity of the calibration curves was evaluated with the correlation coefficients, and the appropriate values were set to > 0.98. The efficiency of the target amplification was calculated based on the slopes of the calibration curves, and the efficiency was confirmed to be 0.8-1.2 [73]. Quantitative evaluation of gene expression was analysed using the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method.

Table 3. Characteristics of primers and their amplicons.

	Primer sequence	T <sub>m</sub> value (°C)	Calibration curve	PCR efficiency	Amplicon size
$\beta$ -actin forward	5'-CTAAGGCCAACCGTAAAAAG-3'	48.0	$y = -3.868 \log(x) + 35.516$ ( $R^2 = 0.989$ )	0.814	104 bp
$\beta$ -actin reverse	5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'	50.0			
POMC forward	5'-CATTAGGCTTGGAGTAGGTC-3'	48.0	$y = -3.889 \log(x) + 40.782$ ( $R^2 = 0.997$ )	0.808	154 bp
POMC reverse	5'-TCTTGACGATGGCGTTCTTG-3'	48.0			
NPY forward	5'-GTGTGTTGGGCATTCTG-3'	44.2	$y = -3.815 \log(x) + 34.732$ ( $R^2 = 0.998$ )	0.829	112 bp
NPY reverse	5'-TTGATGTAGTGTGTCGAGAGC-3'	48.0			

[Stress Loading]

Mice were subjected to restraint stress for 15 min using a stress cage (Natsume Seisakusho Co., Ltd.) before starting inhalation.

[Feeding test]

Feeding tests were performed according to the previous studies of Choi *et al.* (2011) and Miyoshi *et al.* (2013) [10, 16]. Fragrant compounds and essential oils were dissolved in and diluted with triethyl citrate (400  $\mu$ L) and dropped onto four filter paper discs attached to the four corners of the glass cage (30 cm  $\times$  60 cm  $\times$  34 cm; 61.2 L). The cage was filled with vaporised solution by diffusion for 60 min. The fasted mice inhaled fragrances in the cage for 1 h before the end of the fast. At the end of fast, the mice were taken from the glass cage and placed in plastic cages and then given approximately 10 g of weighed standard pellet chow (Oriental Yeast). After 4 h of feeding, they were removed from the plastic cages and the remaining pellets were weighed to calculate the food intake. The control group inhaled air after placement of triethyl citrate in the cage. Ghrelin (rat), a hormone that has an appetite-enhancing effect, was dissolved in saline (Otsuka Pharmaceutical) and injected intraperitoneally (158 nmol/kg) [23] as a positive control 1 h before starting the feeding test and saline was injected as a vehicle. Food intake was tested at various applied dosages ( $7.4 \times 10^{-8}$ - $7.4 \times 10^{-2}$  mg/L) and periods of inhalation (5, 15, 30, and 60 min) of benzylacetone.

[Evaluation of weight gain caused by aroma compound administration over 14 days]

Daily administration was performed according to the study of Yamamoto *et al.* to investigate the weight gain caused by administration of the aroma compounds once a day over 14 days [17]. The triethyl citrate solution containing the aroma compounds (85  $\mu$ L) was dropped onto a filter paper disc attached to the upper wall of a plastic cage (13 L). Mice (n=5) were placed in the cage for 60 min after they and the pellet chow were weighed, and then returned to the colony cages. The first day of exposure to the compounds was regarded as day 0, and the body weights of the mice were recorded daily for 14 days.

[Evaluation of spontaneous motor activity]

In 1-hr test, each compound was dissolved in triethyl citrate (400  $\mu$ L) and dropped onto four filter paper disks attached to four corners of the glass cage (61.2 L). The vapour from the solution was allowed to fill the cage by natural diffusion for 60 min. A mouse was then placed in the center of the cage and monitored with a video camera for 60 min. The total spontaneous locomotor activity is the area under the curve (AUC) which is calculated from a graph with time (min) on the *x*-axis, and the *y*-axis was the number of times per 5 min the mouse crossed the lines drawn at 10 cm intervals on the bottom of the cage. Most of the effective compounds showed a two-phase effect and the effects at lower doses were considered as the true activity. This is because the mice displayed excited activities, such as jumping and rearing, at higher doses [4]. In 1-day test, compound was dissolved in triethyl citrate (85  $\mu$ L) dropped onto a filter paper disc were attached to the upper wall of the plastic cage (13 L). Mice were placed in the cages for 60 min, and subsequently moved to colony

cages containing Igloo Fast-Tracs running wheels with counters for mice (MK-713/CU01; Muromachi Kikai Co.). A single mouse was placed in each cage, and spontaneous locomotor activity was measured by rotations of the running wheel.

[Distillation of materials and GC-MS analysis]

Curry powder (37 g) and raw ginger (81.7 g) were hydrodistilled for 3 h using the clever-type apparatus designated in the Japanese Pharmacopoeia 16th edition, and the distilled oil was captured in hexane [74]. The essential oil was dried over anhydrous sodium sulphate and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  before analysis and animal experiments.

Qualitative analysis of the volatile components was performed by GC/MS (6850GC/5975MSD, Agilent Technologies) under the following operating conditions: fused silica capillary column, DB-Wax (Agilent Technologies),  $60\text{m} \times 0.25\text{ mm}$ , film thickness  $0.25\text{ }\mu\text{m}$ ; column temperature programme for geranium essential oil:  $60\text{--}210^{\circ}\text{C}$  increasing at  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , holding at  $210^{\circ}\text{C}$  for 30 min [22]; column temperature programme for other essential oils: starting at  $60^{\circ}\text{C}$ , holding at this temperature for 4 min, and then increasing  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $180^{\circ}\text{C}$ , followed by  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $200^{\circ}\text{C}$  and holding at this temperature for 30 min [75]; injector,  $100^{\circ}\text{C}$ ; carrier gas, helium,  $26\text{ cm}/\text{min}$ ; split ratio, 100:1; injection volume,  $1\text{ }\mu\text{L}$ ; ionisation energy,  $70\text{ eV}$ . Quantitative analysis of volatile components was performed by GC (G-5000, Hitachi) with an FID under the following operating conditions: fused silica capillary column, InertCap-Wax (GL Sciences),  $60\text{m} \times 0.25\text{ mm}$ , film thickness  $0.25\text{ }\mu\text{m}$ ; column temperature programme, same as for GC/MS; injector,  $100^{\circ}\text{C}$ ; detector for galangal,  $250^{\circ}\text{C}$ ; detector for other materials,  $220^{\circ}\text{C}$ ; carrier gas, helium,  $0.8\text{ cm}/\text{min}$ ; split ratio, 100:1; injection volume,  $1\text{ }\mu\text{L}$ . The retention indices of the components were calculated on the InertCap-Wax column using *n*-alkane standards. The compounds were identified by comparing the fragmentation pattern of the mass spectra with those available from the National Institute of Standards and Technology and flavors libraries. Quantitative analysis was achieved with an FID.

[Statistical analysis]

Results are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M). Statistical analyses were performed by Dunnett's test, two-way ANOVA and subsequent *t*-tests with Bonferroni testing for multiple comparisons using GraphPad InStat (GraphPad Software Inc.) and R (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing). A probability level of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 発表論文目録

### 1. Locomotor-Reducing Effects and Structural Characteristics of Inhaled Zerumbone and Tetrahydrozerumbone Derivatives.

(ゼルンボンおよびテトラヒドロゼルンボン誘導体の吸入投与による自発運動抑制活性と構造活性相関)

Kakuyou Ogawa, Takashi Miyoshi, Takashi Kitayama, Michiho Ito

平成 26 年 9 月発行 Biological and Pharmaceutical Bulletin 第 37 巻 9 号 1559 頁～1563 頁に掲載

### 2. Appetite-enhancing effects of *trans*-cinnamaldehyde, benzylacetone and 1-phenyl-2-butanone by inhalation.

(シンナムアルデヒド、ベンジルアセトンおよび 1-フェニル-2-ブタノンの吸入投与による摂食促進作用)

Kakuyou Ogawa, Michiho Ito

平成 28 年 1 月発行 Planta Medica 第 82 巻 1/2 号 16 年 84 頁～88 頁に掲載。

### 3. Appetite-enhancing effects: the influence of concentrations of benzylacetone and *trans*-cinnamaldehyde and inhalation time, as well as the effect of aroma on body weight in mice.

(ベンジルアセトンおよびシンナムアルデヒドの吸入濃度と吸入時間が摂食促進作用に与える影響とマウスの体重に与える影響)

Kakuyou Ogawa, Michiho Ito

投稿中

### 4. Appetite-enhancing effects of curry oil.

(カレー粉精油の摂食促進作用)

Kakuyou Ogawa, Michiho Ito

投稿準備中

## 引用文献

- [1] Suzuki N. Complementary and Alternative Medicine: a Japanese Perspective. *Evid Based Complement Alternat Med.* 1(2): 113-119. (2004)
- [2] Takeda H, Sadakane C, Hattori T, Katsurada T, Ohkawara T, Nagai K, Asaka M. Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonism. *Gastroenterology.* 134: 2004–2013. (2008)
- [3] Worwood VA. The Complete Book of Essential Oils & Aromatherapy. New World Library, Novato, CA 1991, pp. 86.
- [4] Tankam JM, Ito M. Inhalation of the Essential Oil of *Piper guineense* from ameroon Shows Sedative and Anxiolytic-Like Effects in Mice. *Biol Pharm Bull.* 36(10): 1608-1614. (2013)
- [5] Mirzaei F, Keshtgar S, Kaviani M, Rajaeifard AR. The Effect of Lavender Essence Smelling during Labor on Cortisol and Serotonin Plasma Levels and Anxiety Reduction in Nulliparous Women. *J Kerman Univ Med Sci.* 16: 245-254. (2009)
- [6] Buchbauer G, Jirovetz L, Jäger W. Aromatherapy: Evidence for Sedative Effects of the Essential Oil of Lavender after Inhalation. *Z Naturforsch.* 46c:1067-1072. (1991)
- [7] Linck VM, da Silva AL, Figueiró M, Caramão EB, Moreno PRH, Elisabetsky E. Effects of inhaled Linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. *Phytomedicine.* 17: 679-683. (2010)
- [8] Couic-Marinier F, Lobstein Annelise. Les huiles essentielles en pratique à l'officine. *Actual Pharm.* 52: 31-33. (2013).
- [9] Kumar V. Characterization of anxiolytic and neuropharmacological activities of Silexan. *Wien Med Wochenschr.* 163: 89-49. (2013).
- [10] Miyoshi T, Ito M, Kitayama T, Isomori S, Yamashita F. Sedative Effects of Inhaled Benzylacetone and Structural Features Contributing to Its Activity. *Biol Pharm Bull.* 36(9): 1474-1481. (2013)
- [11] Fujiwara Y, Ito M. Synergistic Effect of Fragrant Herbs in Japanese Scent Sachets. *Planta Med.* 81: 193-199. (2015)
- [12] Tasaka T, Aoshima H. Effect of monoterpene alcohols on the expression of GABA<sub>A</sub> receptor subunits in the brain of mice. *Aroma Research.* 11:345–351. (2010)

- [13] 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: 41-46. (2008)
- [14] Babu KGD, Kaul VK. Variation in essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) distilled by different distillation techniques. *Flavour Fragr J.* 20: 222-231. (2005)
- [15] Hu CD, Liang YZ, Li XR, Guo FQ, Zeng MM, Zhang LX, Li HD. Essential Oil Composition of *Osmanthus fragrans* Varieties by GC-MS and Heuristic Evolving Latent Projections. *Chromatographia.* 70: 1163-1169. (2009)
- [16] Choi SJ, Ye SB, Na HG, Kim GO, Bae CH, Song SY, Kim YW, Park SY, Kim YD. Effect of Geranium Essential Oil on Food Intake via Olfactory Stimulus. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg.* 54: 766-770. (2011)
- [17] Yamamoto T, Inui T, Tsuji T. The odor of *Osmanthus fragrans* attenuates food intake. *Sci Rep.* 3: 1518 doi: 10.1038. (2013)
- [18] Schwartz MW, Woods SC, Porte D. Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 404: 661-671. (2000)
- [19] Naveilhan P, Canals JM, Valjakka A, Vartiainen J, Arenas E, Ernfors P. Neuropeptide Y alters sedation through a hypothalamic Y<sub>1</sub>-mediated mechanism. *Eur J Neurosci.* 13: 2241-2246. (2001)
- [20] Grønli J, Murison R, Fiske E, Bjorvatn B, Sørensen E, Portas CM, Ursin R. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Physiol Behav.* 84: 571-577. (2005)
- [21] Harbuz MS, Lightman SL. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis : acute, chronic and immunological activation. *J Endocrinol.* 134: 327-339. (1992)
- [22] Dallman MF, Jones MT. Corticosteroid Feedback Control of ACTH Secretion: Effect of Stress Induced Corticosterone Secretion on Subsequent Stress Responses in the Rat. *Endocrinology.* 92: 1367-1375. (1973)
- [23] Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology.* 120: 337-345. (2001)
- [24] Harbuz MS, Lightman SL. Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat. *J Endocrinol.* 122: 705-711. (1989)

- [25] Wardlaw SL. Hypothalamic proopiomelanocortin processing and the regulation of energy balance. *Eur J Pharmacol.* 660: 213-219. (2011)
- [26] Satou T, Kasuya H, Takahashi M, Murakami S, Hayashi S, Sadamoto K, Koike K. Relationship between duration of exposure and anxiolytic-like effects of essential oil from *Alpinia zerumbet*. *Flavour Fragr J.* 26: 180-185. (2011)
- [27] Ito K, Ito M. The sedative effect of inhaled terpinolene in mice and its structure–activity relationships. *J Nat Med.* 67: 833-837. (2013)
- [28] Kajiya K, Inaki K, Tanaka M, Haga T, Kataoka H, Touhara K. Molecular bases of odor discrimination: reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *J Neurosci.* 21: 6018-6025. (2001)
- [29] Rahminiwati M, Nishimura M. Effects of  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol and diazepam on feeding behavior in mice. *J Vet Med Sci.* 61: 351-355. (1999)
- [30] Jamshidi N, Taylor DA. Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. *Br J Pharmacol.* 134: 1151–1154. (2001)
- [31] Majeed NH, Przewłocka B, Wedzony K, Przewłocki R. Stimulation of food intake following opioid microinjection into the nucleus accumbens septi in rats. *Peptides.* 7: 711-716. (1986)
- [32] Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Murayama T, Yokode M, Teramukai S, Seno H, Chiba T, Noma S, Nakai Y, Fukunaga M, Nakai Y, Kanagawa K; FD Clinical Study Team. Repeated administration of ghrelin to patients with functional dyspepsia: its effects on food intake and appetite. *Eur J Endocrinol.* 158: 491-498. (2008)
- [33] Fujiwara M. Characteristics of abnormal behavior induced by  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol in rats. *Folia Pharmacologica Japonica.* 117: 35-41. (2011)
- [34] Habara K. Drug abuse prevention strategy and national crisis management policy. *Journal of Policy Studies.* 1: 95–111. (2008)
- [35] Nestler EJ. Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 210–218. (2004)
- [36] Rickels K, Case WG, Downing RW, Winokur A. Long-term diazepam therapy and clinical outcome. *JAMA.* 250: 767–771. (1983)

- [37] Delhanty PJD, Huisman M, Julien M, Mouchain K, Brune P, Themmen APN, Aribat T, van der Lely AJ. The acylated (AG) to unacylated (UAG) ghrelin ratio in esterase inhibitor-treated blood is higher than previously described. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 82: 142–146. (2014)
- [38] Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*. 50: 227–232. (2001)
- [39] Hur MH, Kim C, Kim CH, Ahn HC, Ahn HY. The Effects of Inhalation of Essential Oils on the Body Weight, Food Efficiency Rate and Serum Leptin of Growing SD Rats. *J Korean Acad Nurs*. 36: 236-243. (2006)
- [40] Fleming MF, Mihic SJ, Harris RA. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of THERAPEUTICS eleventh edition Section III, Chap. 22, ed. by Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York NY 2006, pp. 600.
- [41] Kawada T. Obesity and life style-related disease. *Trace Nutrients Res*. 22: 1-5. (2002)
- [42] Yuan JH, Dieter MP, Bucher JR, Jameson CW. TOXICOKINETICS OF CINNAMALDEHYDE IN F344 RATS. *Food Chem Toxicol*. 30: 997-1004. (1992)
- [43] Harada M, Ozaki Y. Pharmacological Studies on Chinese Cinnamon. I. Central Effects of Cinnamaldehyde. *Yakugaku Zasshi*. 92: 135-140. (1972)
- [44] Kim HW, Huh KT, Choi CU. Studies on the Volatile Flavor Components of Spices in Curry. *Korean J Food Sci Thechnol*. 21: 127-135. (1989)
- [45] S&B Foods INC. The secret recipes using S&B Curry Powder presented by S&B staffs. Ikeda Shoten, Tokyo, 2013 pp. 46.
- [46] Dong Y, Lu N, Cole RB. Analysis of the volatile organic compounds in *Cinnamomum cassia* bark by direct sample introduction thermal desorption gas chromatography–mass spectrometry. *J Essent Oil Res*. 25: 458-463. (2013)
- [47] Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytother Res*. 21: 501-506. (2007)
- [48] Anwar F, Ali M, Hussain AI, Shahid M. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour Fragr J*. 24: 170-176. (2009)

- [49] Urabe A, Shimada K, Kawai S. Today's drug therapy in 2015. Nankodo, Tokyo, 2015: pp. 712.
- [40] Furudono Y, Sone Y, Takizawa K, Hirono J, Sato T. Relationship between Peripheral Receptor Code and Perceived Odor Quality. *Chem Senses*. 34: pp. 151-158. (2009)
- [51] Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science Society of Japan. The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition (JP XVI). Yakuji-Nippo, Tokyo, 2012 pp. 1521.
- [52] Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science Society of Japan. The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition (JP XVI). Yakuji-Nippo, Tokyo, 2012 pp. 1474.
- [53] Cheng XL, Liu Q, Peng YB, Qi LW, Li P. Steamed ginger (*Zingiber officinale*): Changed chemical profile and increased anticancer potential. *Food Chem*. 129: 1785-1792. (2011)
- [54] Onyenekwe PC, Hashimoto S. The composition of the essential oil of dried Nigerian ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Eur Food Res Technol*. 209: 407-410. (1999)
- [55] Singh G, Kapoor IPS., Singh P, de Heluani CS, de Lampasona MP, Catalan CAN. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food Chem Toxicol*. 46: 3295-3302. (2008)
- [56] Mahulikar, PP, Mane RB. Application of Meldrum's acid in natural product synthesis. Synthesis of ar-turmerone and  $\alpha$ -curcumene. *J Chem Res*. 7: 15-18. (2006)
- [57] Merck & Co., Ltd. The Merck Index Fourteenth Edition. Merck & Co., Ltd., Whitehouse Station, NJ, 2006 pp. 6481.
- [58] Royal Society of Chemistry. "(+)-[6]-Gingerol.": <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.391126.html>>, cited 24th November, 2015.
- [59] Royal Society of Chemistry. "Shogaol.": <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.444-5106.html>>, cited 24th November, 2015.
- [60] Kariyone T. Saishin Shouyakugaku, 6th ed. Hirokawa Publishing, Tokyo 1988, pp. 433-434.
- [61] Rodrigues VM, Rosa PTV, Marques MOM, Petenate AJ, Meireles MAA. Supercritical Extraction of Essential Oil from Aniseed (*Pimpinella anisum* L) Using CO<sub>2</sub>: Solubility, Kinetics, and Composition Data. *J Agric Food Chem*. 51: 1518-1523. (2013)
- [62] Ghosh S, Majumder PB, Mandi SS. Species-specific AFLP markers for identification of *Zingiber officinale*, *Z. montanum* and *Z. zerumbet* (Zingiberaceae). *Gen Mol Res*. 10: 218-229. (2011)

- [63] Perry LM. Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses. The MIT Press, Cambridge MA 1980, p.444.
- [64] Sulaiman MR, Tengku Mohamad AS, Shaik Mossadeq WM, Moin S, Yusof M, Mokhtar AF, Zakaria ZA, Israf DA, Lajis N. Antinociceptive Activity of the Essential Oil of *Zingiber zerumbet*. *Planta Med.* 76: 107-112. (2010)
- [65] Murakami A, Takahashi M, Jiawajinda S, Koshimizu K, Ohigashi H. Identification of Zerumbone in *Zingiber zerumbet* Smith as a Potent Inhibitor of 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr Virus Activation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 63: 1811–1812. (1999)
- [66] Chien TY, Chen LG, Lee CJ, Lee FY, Wang CC. Anti-inflammatory constituents of *Zingiber zerumbet*. *Food Chemistry.* 110: 584-589. (2008)
- [67] Sawada S, Yokoi T, Kitayama T. Woody fragrance made from a wild ginger : The chemistry of zerumbone. *Aroma Research.* 3: 34-39. (2002)
- [68] Kitayama T, Okamoto T, Kawai Y, Takahashi S, Yonemori S, Yamamoto Y, Ohe K, Uemura S, Sawada S. Chemistry of Zerumbone. 1. Simplified Isolation, Conjugate Addition Reactions, and a Unique Ring Contracting Transannular Reaction of Its Dibromide. *J Org Chem.* 64: 2667-2672. (1999)
- [69] McPhail AT, Sim GA. Sesquiterpenoids. Part IV. The Stereochemistry of Humulene: X-Ray Analysis of the Humulene-Silver Nitrate Adduct. *J Chem SOC B.* 112–120. (1966)
- [70] Hall SR, Nimgirawath S, Raston CL, Sittatrakul A, Thadaniti S, Thirasasana N, White AH. Crystal Structure of Zerumbone [(*E,E,E*)-2,6,9,9-Tetramethylcycloundeca-2,6,10-trien-1-one]. *Aust J Chem.* 34: 2243-2247. (1981)
- [71] Vernet-Maury E, Polak EH, Demael A. STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP OF STRESS-INDUCING ODORANTS IN THE RAT. *J Chem Ecol.* 10: 1007-1018 (1984).
- [72] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method. *Methods.* 25: 402-408. (2001)
- [73] Schlesinger J, Tönjes M, Schueler M, Zhang Q, Dunkel I, Sperling SR. Evaluation of the Light-Cycler® 1536 Instrument for high-throughput quantitative real-time PCR. *Methods.* 50: 19-22. (2010)
- [74] Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science Society of Japan. The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition (JP XVI). Yakuji-Nippo, Tokyo, pp. 120 (2012)

[75] Kawamura F, Kato K, Hatanaka T. Determination and Differences of the Aroma Components in Cooked Curry Powder. *Science of Cookery*. 20: 240-245. (1987)

## 謝辞

本研究を行うに際し、終始懇切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 伊藤 美千穂 准教授に謹んで感謝の意を表します。

終始温かく励ましてくださいました京都大学大学院 薬学研究科 薬品資源学分野の皆さま、特に三好 大 修士に心より御礼申し上げます。

また、第四章の実験サンプルを合成、提供してくださいました近畿大学 農学部バイオサイエンス学科 北山 隆 教授に感謝申し上げます。

最後に、いつも変わらず支えてくれた両親に感謝いたします。