

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

ヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)はヒノキ科ヒノキ属の常緑針葉樹であり、日本では古くから建材として使用されてきた身近な植物である。ヒノキ材は抗菌作用や湿気に強いことから浴槽材などに利用されてきた。また独特の香りを有しており心を落ち着かせる作用があるといわれている。

香りの効果や嗅覚に対するメカニズムに関しては不明な点が多いものの、2004年にノーベル医学生理学賞を受賞した Buck と Axel の研究以降、様々な研究が行われている。その中で香りを医療に応用すべく芳香植物療法(アロマセラピー)が医療機関において扱われ始めている。

アロマセラピーでは植物から抽出された精油を使用する。植物精油は医薬品ではないため、化学成分に関する研究や吸入による効果など、科学的なデータに関する報告は少ない。科学的な観点から植物精油の効果を明らかにすることは将来的に精神疾患における新たな治療法として、安全かつ有効な利用につながると考える。

そこで、本研究ではヒノキ精油を用いて吸入投与による情動に与える影響を明らかにすることを目的として研究を行った。実験には、2010年10月に長野県木曾郡にて採取されたヒノキの枝を水蒸気蒸留にて抽出された精油を使用した。

1. ヒノキ精油の化学成分分析

数十～数百もの化学成分から成る精油は、採取された時期や場所によっても異なる。そのため、本実験で使用するヒノキ精油を構成する化学成分を明らかにするために、GC/MS及びGC/FIDを用いて詳細な成分分析を行った。結果、GC分析によってヒノキ精油から59種類の化学成分を同定した。含有量としては δ -Cadinene(43)[152.9 g/L]が最も多く、次いで α -Pinene(3)[134.0 g/L]、 γ -Cadinene(42)[90.8 g/L]、 α -Muurolene(41)[59.8 g/L]の順に多く含まれていた。このうちセスキテルペン類が全成分量の6割を占めていることが明らかとなった。[Fig. 1]

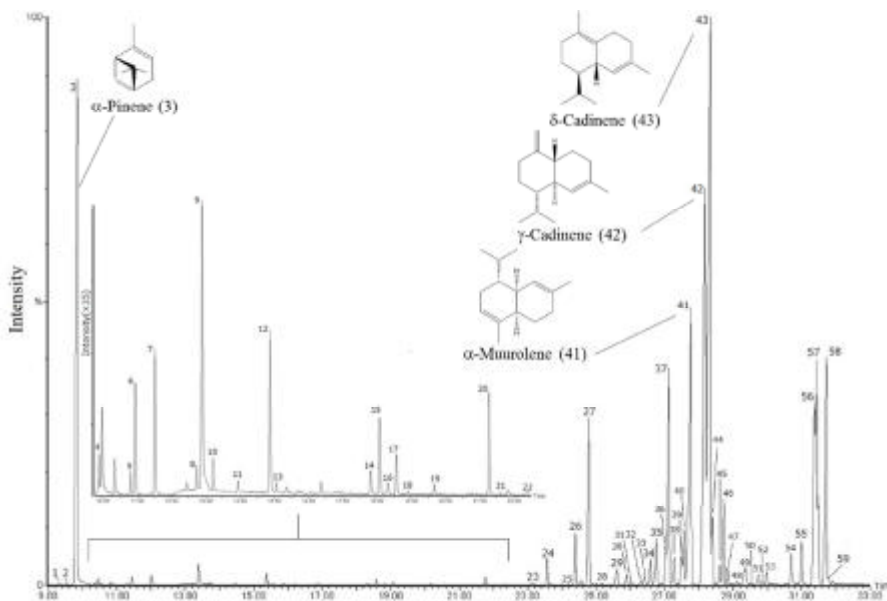


Fig. 1 ヒノキ精油の TIC および化学成分 (一部抜粋)

Chen らはヒノキの葉から得られた精油について分析を行っており、主成分は Sabinene であると報告している。一方で Shien らはヒノキ材から得られた精油について、主成分は γ -Cadinene や δ -Cadinene であると報告している。本研究では枝から抽出された精油を用い、主成分は δ -Cadinene であった。すなわち同じ植物を用いた精油であっても抽出部位の違いにより化学成分に差異が生じる。このような成分の違いが吸入による作用に影響を及ぼす可能性が考えられる。

2. ヒノキ精油吸入による抗不安様作用

不安とは日常生活において誰もが感じることであり、強い不安からパニック障害など様々な症状が引き起こされる場合がある。治療として薬物療法が用いられるが、副作用に悩まされる患者も少なくはないことから新たな治療方法が望まれる。そこで今回はヒノキ精油の有効性を明らかにするために不安に対する作用について検討を行った。対象には雄マウスを用い、ヒノキ精油 (20, 40, 60 μ L) を 90 分間吸入させた後試験を行った。試験には不安水準の評価系である高架式十字迷路試験(EPM)を用いた。EPM に曝露された動物は、壁のない恐怖から open arm への滞在時間や進入回数が減少する。そこで測定指標は open arm の滞在時間及び進入率とした。結果、ヒノキ精油 40 μ L において、control (蒸留水) と比べ open arm の滞在時間並びに進入率に有意な増加が認められた [Fig. 2A, B]。すなわち、ヒノキ精油吸入による抗不安様作用が認められた¹⁾。しかしながらヒノキ精油 60 μ L においては control と比べ有意な増加が認められなかった [Fig. 2A,B]。すなわち 60 μ L 以上の濃度では濃度依存性は見られないことから、ヒノキ精油吸入による抗不安様作用には適した濃度が存在することが考えられる。

3. ヒノキ精油吸入による抗ストレス作用

不安と同様にストレスもまた日常生活において常に感じるものである。そこでヒノキ精油吸入による抗不安様作用がストレスに対しても影響を及ぼすのか明らかにするため、ストレスの有無により発現量が変動する 2 つの脳内遺伝子を対象として検討を行った。EPM 終了後に脳を摘出し、神経成長因子受容体(*NGFR*)及び活動依存性細胞骨格関連蛋白質(*Arc*)の変動を RT-PCR 法を用いて測定した。*NGFR* 及び *Arc* 共にストレスが加わることでその発現量が減少することが増尾らより報告されている。結果、EPM 後の脳内遺伝子の変動について、ヒノキ精油(40 μ L)において *NGFR* 並びに *Arc* 遺伝子において有意な増加が認められた [Fig. 2C, D]。すなわち、ヒノキ精油吸入による抗ストレス作用が認められた¹⁾。*NGFR* は酸化ストレスに対して抵抗性を持つ神経成長因子(*NGF*)の受容体遺伝子として知られていることから、ヒノキ精油吸入による酸化ストレスに対する作用の可能性も示唆される。一方 *Arc* はシナプス可塑性に関与している最初期遺伝子の一種で、長期記憶の強化に重要な役割を果たすといわれている。ゆえに、認知症治療薬関連の分野への応用も期待されると考える。

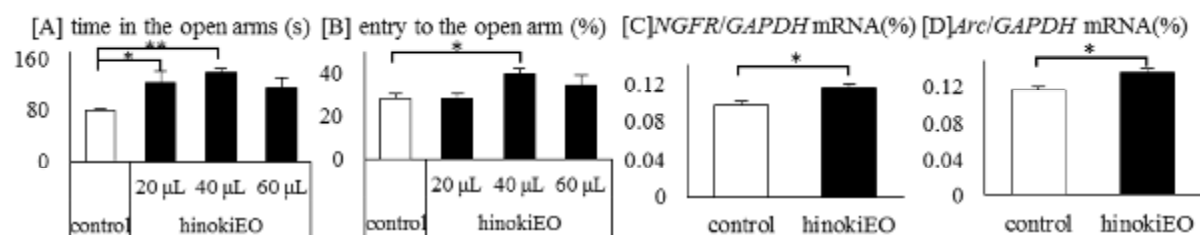


Fig. 2 ヒノキ精油吸入後の EPM 試験[A, B]及び脳内遺伝子発現量[C, D] (mean \pm SE, $n = 5$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)
control : 蒸留水, hinokiEO : ヒノキ精油 (C,D については 40 μ L 使用) *GAPDH* : ハウスキーピング遺伝子

4. ヒノキ精油吸入時に揮発する化学成分分析

ヒノキ精油吸入が情動に与える影響を検討する上で、ヒノキ精油から揮発している化学成分を明らかにする必要がある。そこでヒノキ精油吸入中に揮発している化学成分について GC 分析を行った。揮発している化学成分に対してはシリカゲルを素材とした MonoTrap[®] を使用してサンプリングを行った。またヒノキ精油吸入後に脳を摘出し、脳内に移行した成分についても測定した。結果、MonoTrap[®]によりヒノキ精油(40 μ L)吸入中に揮発している成分として、 α -Pinene(3)[124.4 μ g/5 Lair]が最も多く含有されていた。さらにキラルカラムを用いて測定を行ったところヒノキ精油に含まれる α -Pinene(3)はすべてが(+)-体であった。また、脳内からも同成分が主成分として検出された。すなわち、ヒノキ精油吸入による抗不安様作用並びに抗ストレス作用には体内に移行した(+)- α -Pinene の影響が示唆される。さらに(+)- α -Pinene は混合物の状態では揮発されやすいという特徴があることから⁴⁾、主成分として検出されたと考えられる。ゆえにヒノキ精油に含まれる化学成分と吸入時に揮発する化学成分は大きく異なること、そしてこのような違いが作用に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

5. 吸入時間及び吸入時の温度変化と情動行動

植物精油を使用するにあたり、適した時間や温度に関する研究報告はほとんど存在しない。一方で精油の使用方法は多様化している。そこで実験 4 より得られた(+)- α -Pinene(50 μ L)を用いて、吸入時間や吸入時の温度変化が情動に与える影響について検討を行った。結果、吸入時間を 60 分・90 分の 2 群で EPM 試験を行ったところ、90 分間吸入させた群において control と比べ open arm の滞在時間並びに進入率において有意な増加が認められた[Fig. 3B,C]。すなわち(+)- α -Pinene 吸入による抗不安様作用が認められた^{2,3)}。一方 60 分間吸入させた群では自発運動量が有意に増加した[Fig. 3A]。(+)- α -Pinene において、90 分間吸入させたところ抗不安様作用を示したが、吸入時間を 60 分間にするだけで健著な興奮様作用を示した[Fig. 3A]。そこで (+)- α -Pinene 吸入後の中脳におけるチロシン水酸化酵素(*TH*)の遺伝子発現量を測定したところ、control と比べ有意な増加が認められた[Fig. 4A]。すなわち、(+)- α -Pinene 吸入により中脳におけるドパミン神経系の賦活化が起き、結果として自発運動量が増加したと考えられる。さらに不安やうつに関係があるとされる海馬における脳由来神経栄養因子(*BDNF*)の遺伝子発現量を測定したところ、control と比べ有意な増加が認められた[Fig. 4B]。うつ病モデルマウスでは海馬における *BDNF* 発現量の低下が見られることから、ドパミン神経性の賦活化に伴い発現量が増加したと考えられる。一方で、90 分間吸入した群においては中脳における *TH* 遺伝子並びに海馬における *BDNF* 遺伝子に変化は見られなかった。しかしながら嗅球における *BDNF* 遺伝子発現量が有意に増加した[Fig. 4C]。ゆえに(+)- α -Pinene 吸入による抗不安様作用には、嗅球における *BDNF* 遺伝子発現量の増加が関係していると考えられる。

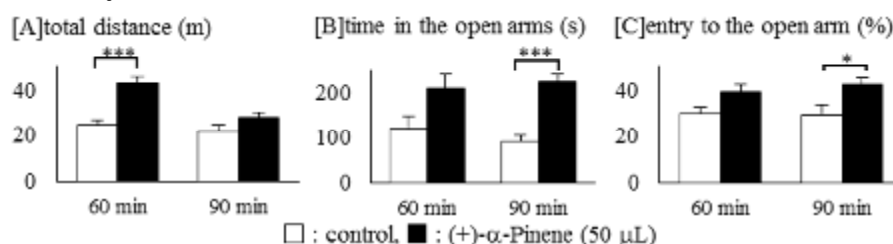


Fig. 3 (+)- α -Pinene 吸入後の EPM 試験 (mean \pm SE, $n = 5$, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)

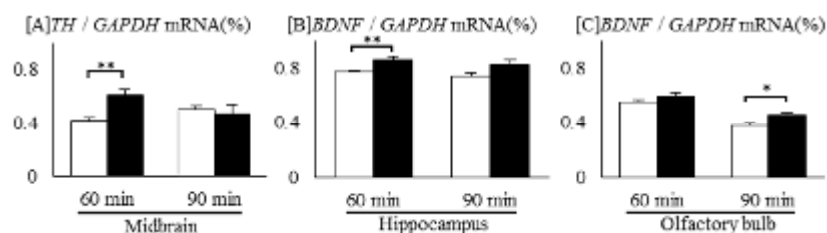


Fig. 4 各部位における(+)- α -Pinene 吸入後の遺伝子発現量 (mean \pm SE, $n = 5$), □: control, ■: (+)- α -Pinene (50 μ L)

吸入時の温度の影響を調べるために、(+)- α -Pinene を含ませたる紙を加温させた状態で 90 分間吸入させた。その後 EPM 試験を行ったところ open arm の滞在時間において有意な増加が認められたが、進入率においては有意な増加が認められなかった [Fig. 5A,B]。すなわち加温条件下における (+)- α -Pinene の吸入は室温条件下と比べ顕著な抗不安様作用が認められなかった。そこでヒノキ精油(40 μ L)を使用して同実験を行ったところ、加温条件下においても抗不安様作用が認められた [Fig. 5C, D]。また加温条件下における揮発成分について測定を行ったところ、主成分である (+)- α -Pinene に加え、 δ -Cadinene(43)[35.7 μ g/5 Lair]を中心としたセスキテルペン類の増加が認められた。すなわち、加温条件下におけるヒノキ精油の抗不安様作用は、(+)- α -Pinene(3)だけではなく、 δ -Cadinene(43)などのほかの成分との相乗効果によるものであると示唆される。

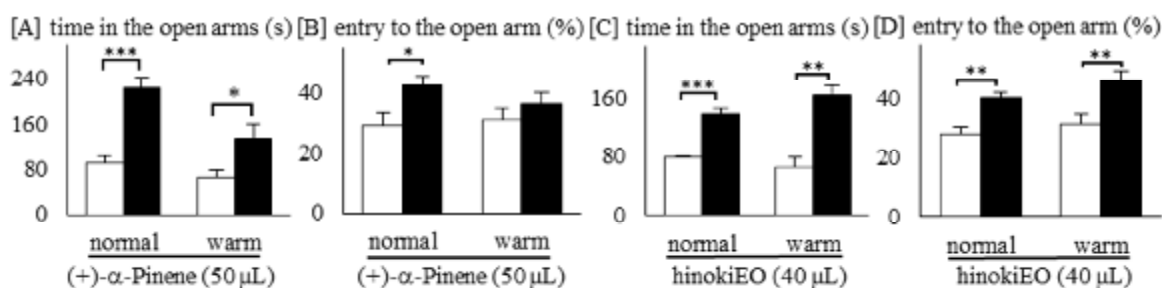


Fig. 5 室温時(normal)並びに加温時(warm)における EPM 試験(mean \pm SE, $n = 5$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) □: control, ■: (+)- α -Pinene (50 μ L)[A,B], hinokiEO (40 μ L)[C,D]

6. 結語

本研究により、ヒノキ精油は δ -Cadinene を主成分とする 59 種の化学成分から構成され、吸入することにより抗不安様作用並びに抗ストレス作用を有することを明らかとした。さらに吸入時においては(+)- α -Pinene を主成分としており、吸入時間や温度によっても作用が異なることを明らかにした。以上の結果から、ヒノキの香りがもつ心を落ち着かせる作用には(+)- α -Pinene を中心とした化学成分が関与しており、またヒノキ材を利用したヒノキ風呂の良さには「香り」が深く影響していることが明確となった。よってヒノキ精油をはじめとした植物精油の吸入は精神疾患などに対する新たな治療方法として、医療に貢献できるものと考えられる。

[対象論文] 1) H. Kasuya, E. Hata, T. Satou, M. Yoshikawa, S. Hayashi, Y. Masuo, K. Koike. *Natural Product Communications*, **8**(4), 515-518, 2013 2) H. Kasuya, N. Okada, M. Kubohara, T. Satou, Y. Masuo, K. Koike. *Phytotherapy Research*, (Article first published online: 17 SEP 2014)

[参考論文] 3) T. Satou, H. Kasuya, K. Maeda and K. Koike. *Phytotherapy Research*, **28**(9), pp1284-1287, 2014 4) T. Satou, M. Takahashi, H. Kasuya, S. Murakami, S. Hayashi, K. Sadamoto, K. Koike. *Phytotherapy Research*, **27** (2), pp306-311, 2013

平成 27 年 2 月 25 日

学位論文審査講評

東邦大学薬学部生薬学教室

小池一男

氏 名： 粕谷 ひかる

論文題目： 日本産ヒノキ精油の科学的特性の解明

講 評：

世界各地では古くから植物からの芳香物質が薫香や浸剤として宗教儀式、伝承医学や伝統医学における病気の治療、美容などに使用されてきた。日本においても平安時代から現代に至る千数百年という歴史とアジア各国との交流を通して、日本の精神文化とともに育まれてきた香道があり、そこで使用される香りの原料である香木は日本ではほとんど産出がない。

19 世紀にはいと近代医学の発展に伴い、ハーブや植物精油の利用は少なくなっていったが、イギリスやフランスでは独自の発展により、現代においても病気の治療に積極的に使用されている。そしてイギリスやフランスを中心に広まったアロマセラピーが 1990 年代頃に日本へ導入されたが、日本でのアロマセラピーは、リラクゼーションというイメージが優先されている。

近年、医療分野でアロマセラピーが用いられるケースが増えるのに伴い、当然ではあるがハーブや精油においても EBM の重要性が指摘され、科学的な効果の解明が求められるようになってきている。しかしながら、アロマセラピーで使用される精油も香木と同様に日本では、一部を除いて産出がない。

粕谷ひかる氏は日本に生育する精油原料植物の有用性の解明を目的に、なかでも古来から日本人の文化や生活に利用されてきたヒノキに着目した。

本論において、ヒノキは家屋や神社などの建材として知られているが、その香りについての研究はほとんどないことから、ヒノキの香り効果を明らかにすることを目的とした。これまで多くの精油に関する研究が腹腔内投与による作用の検証であったのに対して、精油が揮発物質であるという特性を活かした吸入投与による作用については、科学的なデータが乏しい。

粕谷氏は、ヒノキ精油の吸入投与による不安作用などの情動に与える影響を明らかにすることを目的として、化学的成分分析、吸入によるマウスに対する情動に及ぼす影響、さらに吸入条件の違いによる情動に及ぼす影響について検討を行ったので、それらについて講評する。

ヒノキの水蒸気蒸留法により得られた精油の化学成分を単に分析するのは、品質評価である。しかしながら植物精油を医療現場で使用することを前提した場合、精油から揮発する化学成分について検証することは意義のあるこ

とである。

すなわち、精神に影響を及ぼすストレスや不安のような見えない病気の原因を、精油から揮発した見えない物質で症状の改善を検討するには、揮発した化学成分を明らかにする必要がある。この揮発した化学成分を吸着剤によりトラップして分析するという方法は、これまで研究されていそうで、実はなかった新しい着眼点である。ヒノキ精油では、精油の主成分である δ -**cadinene** などのセスキテルペン類が全量の 6 割を占めていたのに対して、ヒノキ精油を一定量のガラスコンテナ内で揮発させトラップした成分を分析すると、 α -**pinene** が約 6 割と多く、モノテルペン類で占められており、水蒸気蒸留法で調製した精油と揮発した精油での成分の違いを明らかにした。

精油の作用経路は、嗅覚器から直接脳に作用する経路と、様々な部位から体内に取り込まれ作用する経路に大別される。これまでの精油の多くは、現代医薬品の評価と同じく腹腔内投与が中心であった。粕谷氏は精油の特性を活かした吸入による嗅覚器から直接脳に作用する経路の検証を行った。マウスの情動を不安として定義し、抗不安作用や抗ストレス作用をいかに示すかを、吸入投与によるマウスの行動薬理実験の高架式十字路迷路試験により検討し、ヒノキ精油の抗不安作用とその活性本体が α -**pinene** であることを明らかにした。ついで、最近注目され始めた新しいストレスの評価方法である脳内の遺伝子発現量を用いて評価を行い、ヒノキ精油が脳内の遺伝子 **NGFR** と **Arc** の発現量を有意に増加させストレス負荷を軽減していること明らかにした。ついで、嗅覚器から直接脳に作用する経路を考慮して、ヒノキ精油の吸入による脳内への活性成分の移行量を分析し、マウスの脳内から α -**pinene** を検出した。さらに同成分の単独投与でも抗不安作用を示すことを明らかにした。

最後に、ヒノキ精油の臨床での使用を考慮して、吸入時間と温度条件の違いがマウスの情動行動に及ぼす影響を検討し、吸入時間により作用や脳内遺伝子発現量の増減に差異が明確に生じること、ならびにヒノキ精油は高温で加熱することにより、室温では認められなかった δ -**cadinene** などのセスキテルペン類にも抗不安作用の関与が認められると結論している。

以上述べたように、日本で使用される精油は、そのほとんどが輸入に頼っているが、粕谷氏は日本の風土が育んだ日本産ヒノキ精油の科学特性を、揮発成分を考慮した化学成分分析とマウスに対する抗不安作用と抗ストレス作用の行動薬理的な考察、あわせて脳内遺伝子発現量という新たなストレス評価法を含めて明らかにした。

粕谷氏のヒノキ精油に関する研究が端緒となり、日本固有の植物精油の科学的特性やエビデンスが蓄積されることにより、有用資源の開発と臨床応用へ貢献するものと信ずる。

本論にかかわる内容は、国際的な学術論文に既に公表しており、博士（薬学）として学位を授与するに値するものと判断する。