

東邦大学審査学位論文（博士）

ヒノキ精油吸入による抗不安様作用及び抗ストレス作用について

東邦大学大学院

薬学研究科 医療薬学専攻

生薬学講座 3012002 粕谷 ひかる

目次

序論	2
本論	11
第 1 章 ヒノキ精油の化学成分及び揮発成分	11
第 1 節 ヒノキ精油の化学成分	11
第 2 節 ヒノキ精油の揮発成分	20
小括	23
第 2 章 ヒノキ精油吸入によるマウスに対する情動に及ぼす影響	24
第 1 節 行動薬理試験を用いた抗不安様作用の評価	24
第 2 節 脳内遺伝子発現量を指標としたストレスに対する評価	28
第 3 節 化学成分の脳内への移行性	31
第 4 節 (+)- α -pinene 吸入による抗不安様作用	33
小括	35
第 3 章 吸入条件の違いがマウスに対する情動に及ぼす影響	36
第 1 節 吸入時間の違いが情動に及ぼす影響	36
第 2 節 温度条件の違いが情動に及ぼす影響	41
小括	45
総括	47
実験の部	53
謝辞	61
参考文献	63

序論

1990年代初頭、心臓・脳血管疾患、癌、高血圧症、糖尿病などの生活習慣病や慢性疾患、また現代病と言われているアトピー性皮膚炎、機能性胃腸症、花粉症、精神疾患などの増加から、現代西洋医学の効果に限界を感じ始めた患者や医療従事者が現れた。加えて、急速な少子高齢化社会による社会保障制度の圧迫、そして、病院における治療を中心とした医療だけでは医療費が増大することもあり、予防医療やセルフケアにより医療費を抑えることも必要になってきた。そこで、統合医療という考え方が広まり始めた。

統合医療とは、現代西洋医学の力の及ばないところを相補（補完）・代替医療（CAM：Complementary and Alternative Medicine）で補っていく患者中心の医療であり、さらに、疾病の治療だけではなく、予防医療、終末期におけるケア、健康増進や健康維持などを含んだ統合的な医療のことである。統合医療により、全人的かつQOL（Quality of Life）やADL（Activities of Daily Living）を考慮した理想的な医療が行われると考えられている。

相補（補完）・代替医療に含まれるアロマセラピー（芳香療法）は、精油を薬剤として用いた医療と定義されている¹。アロマセラピーという言葉は、1930年代にフランス人化学者のルネ＝モーリス・ガットフォセが、自身の火傷に誤ってラベンダー精油を塗布したことからその有効性に着目し、植物精油の医療方面での活用を研究し始め、「疾病治療効果を有する精油は多くの芳香を有する」ことからこの用語を作成したと言われている²。

アロマセラピーでは植物から抽出された植物精油を使用する。植物精油は植物の花、葉、果皮、樹皮、根、種子、樹脂などから抽出した天然物であり、数十から数百もの化学成分を含んだ有機化合物の複合体である。植物精油の多くは水蒸気蒸留法又は直接蒸留法によって得られるが、圧搾法、溶剤抽出法、油脂吸着法（冷浸法/温浸法）、超臨界抽出法によって得られたものも広義の植物精油に含まれる。アロマセラピーは植物より得られる抽出物を使用する点から、現代西洋医学の薬の概念に非常に近く、医療従事者に受け入れられやすいと考えられる。

ヨーロッパを中心に発展してきたアロマセラピーは、大きく二つの流れに分類できる。一つは、フランス式と呼ばれるメディカルアロマセラピーである。フランスでは、専門の医師の処方箋に基づき植物精油が処方されており、時には内服も行われている。そして、もう一つがイギリス式と呼ばれるエステティックアロマセラピーである。主に美容やリラクセス等を目的としており、吸入投与やマッサージを中心に行われている。日本のアロマセラピーはエステティックアロマセラピーとしての概念が強く、本来の芳香療法としての意味合いが薄れている。そのため、医療従事者を含めた多くの人々は、アロマセラピーを美容法やファッションの一部として捉えている。そのような中、メディカルアロマセラピーの有効性に着目した医療従事者も存在している。

東邦大学医療センター大橋病院では、心身を健康にすることを目的とし、女性専用外来においてメディカルアロマセラピーが取り入れられている。また、ラベンダー精油の吸入投与が老年症候群（転倒・失禁・せん妄など）を改善する報告³や、認知症やアルツハイマー病の分野に対し、各種精油を組み合わせたものを吸入投与することで、緩和、改善することも報告されている⁴。しかしながら、日本においてメディカルアロマセラピーを取り入れている医療機関は少ないのが現状である。その要因として、植物精油が医薬品ではなく雑貨として扱われていること、アロマセラピストに公的資格制度がないこと、そして、メディカルアロマセラピーの西洋医学的な解明が遅れていることが挙げられる。そのため、医療従事者にメディカルアロマセラピーの有効性が認識されていないことが考えられる。すなわち、メディカルアロマセラピーに対する科学的根拠の解明が進むことで医療従事者への理解に繋がり、そして医療の幅を広げることが可能であると考察される。そのためには、メディカルアロマセラピーで使用される植物精油の科学特性を明らかにする必要があると考えられる。

植物精油は、種類はもちろんのこと、品質を含めると数多く存在している。中には日本産の植物精油も存在するが、その他の多くは輸入品である。主に雑貨として取り扱われているほか、食品・一部化粧品における食品添加物として使用されている。

食品添加物に対しては国際機関であるアメリカの RIFM (Research Institute for Fragrance Materials Inc.) とベルギーの IFRA (The International Fragrance Association) が規制と安全性の確保に関与している。しかし、これらの国際機関が提供しているのは主に植物精油の毒性に関する情報である。一方、植物精油の品質と規格に関しては、国際的にアメリカの FCC (Food Chemicals Codex) とフランスの AFNOR (Association française de normalization) が主に関与しており、これらの機関が提供する情報としては、植物精油の製造方法に加え、物理データや、主要成分を中心とした最低限の化学成分分析に関するデータである。ゆえに、各機関共に植物精油の効果については報告されていない⁵。

現在、メディカルアロマセラピーの有効性に着目し、植物精油を対象とした研究が世界各地で進められている。植物精油はエステティックアロマセラピーのように香りを楽しむことから、メディカルアロマセラピーのような医療分野での病気の治療や症状の緩和まで幅広く使用されていることから、研究分野は多岐にわたる。

近年の分析技術の進歩により、データベース化されたライブラリとの比較から微量成分の同定が可能となっている。ゆえに、多成分系からなる植物精油の化学成分分析に関する総論も報告されている⁶⁻⁸。化学成分分析は基礎的かつ重要な研究分野である。しかし、植物精油の原料となる植物の生育場所や使用部位によって化学成分の組成が異なり、さらに同じ植物精油中に含まれる化学成分であっても分子量や官能基の違いによって揮発のしやすさに差異が生じることが考えられる。そのため、植物精油に含まれる化学成分の含有量が直接的に作用に関係しているとは言いがたい部分もある。ゆえに、メディカルアロマセラピーとしての効果と化学成分との関係性については不十分な点が残る。また混合物として使用される植物精油の場合、主要成分が目的とする作用を示すとは限らないと考えられる。そのため、目的とする作用を考慮した植物精油成分の規格化が重要であると考えられる。

メディカルアロマセラピーは医療現場で使用されていることから、ヒトを対象とした臨床試験が報告されており、主に脳波⁹や fMRI (functional magnetic resonance imaging)¹⁰、心拍動の測定¹¹からリラックス作用やストレス軽減作用を明らかにしている。このような研究報告は、ヒトに対する植物精油の効果が明確であることから、多くのアロマセラピストにとってデータを参考にしやすいという利点がある。しかしながらヒトを対象とした場合、香りを吸入投与することで過去の記憶や感情といった、いわゆる心理作用が試験結果に影響を及ぼす可能性が考えられる。さらに、香りのプラセボを設定することは非常に困難であることから、メディカルアロマセラピーの効果を曖昧なものにしている¹²。ゆえに、ヒトを対象とした臨床試験により得られた効果が植物精油本来の効果であるのか判断することが難しいと考察される。

同時に、心理作用の影響を受けない実験動物を対象とした植物精油の薬理作用に関する研究も進められている。主な評価方法としては行動を基盤とした行動評価法であり目的に応じた様々な試験方法が存在している¹³。そして、植物精油の投与方法として用いられている多くが腹腔内投与であり、植物精油に含まれる化学成分が血中を介して脳に作用すると考える非常にストレートな研究である¹⁴⁻¹⁶。しかしながら、植物精油の主要な投与方法の一つである吸入投与を考慮すると、この研究結果に対応しない部分も存在すると考えられる。なぜならば、Fig. 1 に示すように、吸入投与における植物精油の作用経路には、肺胞や鼻腔から血液を介して脳あるいは各臓器へと作用する薬物学的伝達経路がある一方で、嗅神経や嗅球を介して脳へと作用する神経学的伝達経路も存在するからである。すなわち、植物精油の吸入投与による薬理作用には化学成分の体内動態と嗅覚刺激の双方が関わっていると考察されるが、作用機序は明らかにされていないのが現状である。さらに、日本において植物精油は医薬品ではないことから、各植物精油に対し適した使用時間については記載も無く皆一様に扱われている。加えて植物精油は揮発しやすい特徴を有していることから、使用時の温度環境が化学成分並びに作用に影響を与えていることが示唆される。そのため、吸入投与の場合は様々な条件を考慮した研究が必要である。

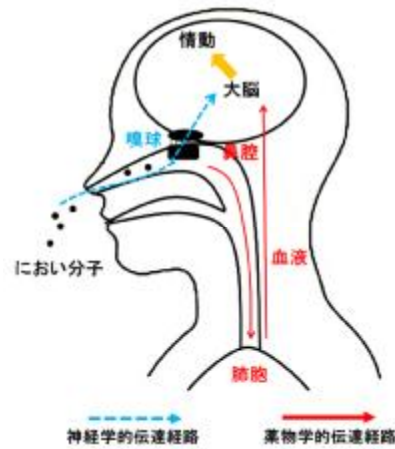


Fig. 1 植物精油の吸入投与による作用経路

このように植物精油に関する研究は各方面から進められており、メディカルアロマセラピーは科学的に解明されているように思われる。しかし、これまで行われてきた全ての研究をつなぎ合わせるためには、重要な部分である嗅覚の解明が取り残されていた。

嗅覚は五感の中の一つであり、特に意識することなく日常的に香りを感じる事が出来る。そして、前述の通り心理作用にも影響を及ぼす。そのため、嗅覚について定義することは難しく、そのメカニズムに関してはほとんど明らかにされてこなかった。すなわち、他の感覚器官と比較して「嗅覚」に関する研究は非常に遅れていた分野であった。そのような中、Richard Axel 博士と Linda B. Buck 博士は PCR 法の技術を駆使し、1991年に匂い受容体をコードしていると思われる遺伝子ファミリーを発見した¹⁷。その後、オーファン嗅覚受容体のひとつのリガンドが決定され¹⁸、そして単一の嗅神経細胞レベルで匂いリガンドと受容体遺伝子の対応が明らかにされた¹⁹ことで、両博士が発見した匂い受容体の存在を裏付けることとなり、嗅覚神経系のメカニズムの解明へと発展を遂げる。そして、「匂いの受容体遺伝子の発見と嗅覚感覚の分子メカニズムの解明」が認められ、両博士は2004年にノーベル医学生理学賞を受賞した。現在では、嗅覚受容体に関する研究は日本がリードしており、嗅覚から情動反応へと至る神経機構の解析において、「快い香り」や「不快な匂い」に

対する神経機構の一部が明らかにされている²⁰⁻²³。情動とは、広義の感情の中で感覚刺激によって生じる喜びや悲しみなどの感情群であると定義されている。

メディカルアロマセラピーに直結する嗅覚と情動との関係性についてはまだほとんど明らかにされてはいない。これらの関係性について科学的に解明されることで、これまで研究されてきた各分野が繋がり、メディカルアロマセラピーの西洋医学的な解明に近づくことができると考えられる。

メディカルアロマセラピーの医療分野への応用として、精神疾患への有用性が考えられている。前述の通り精神疾患の患者数は年々増加しており、今もなお向精神薬の探索と研究開発は続けられている。厚生労働省によれば精神疾患患者の中で最も患者数が多いのはうつ病、統合失調症、そして不安障害である。このうち不安障害は、他の疾患と併発している割合が高く、また比較的軽微な症状も含まれるため潜在的な患者数も多いと推測される。

不安障害はパニック障害や社会性不安障害、強迫性障害などに別けられるが、全般的に GABA_A 受容体作動薬や選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI: Selective Serotonin Reuptake Inhibitors) などが使用されている²⁴。これらの薬剤は抗不安薬として非常に有効であるが、問題点として GABA_A 受容体作動薬の場合には依存性、眠気、記憶障害、SSRI の場合には痙攣、せん妄、錯乱のような副作用があり、さらには薬剤を中止した際に離脱症状を引き起こす可能性も存在する。そのため、抗不安薬を含めた新たな向精神薬の開発は急務である。一方で開発を進めるにあたり、向精神薬において既存の薬のターゲットを指標とした場合、これまでと同様の問題が生じる恐れがある。ゆえに、新たな作用部位をターゲットとする向精神薬の開発が望まれている。

不安障害の患者数が多い要因の一つとして、現代の人々が様々なストレスにさらされていることが挙げられる。ストレスとは、外部からの圧力によって生じた歪んだ状態であり、心や身体に対し外部からの刺激 (ストレッサー) に適応するために生じる応答がストレス反応である。ストレッサーによって引き起こされる、心理面、身体面、行動面でのストレス反応は精神疾患だけではなく、生活習慣病などの様々な疾患の引き金になることが考えられている。ストレスに関する研究の主流はストレスマーカーの発見である。これまでカテコールアミンやコルチゾールなどによる生化学的評価方法²⁵ や心拍変動などによる生体信号による評価方法²⁶ そして問診による評価方法¹⁰ が存在する。実際には

これらのデータを総合的に評価することで、ストレスの状態や精神疲労を判断している。不安障害やその要因となるストレスに対しては、早期発見、早期治療が有効である。そのためには初期の段階で測定できる精度の高いストレス評価方法が望まれる。

近年、注目されている評価方法の一つに遺伝子発現量の測定がある²⁷。ストレス負荷後の遺伝子発現量及びタンパク質発現量について網羅的に解析を行うことで、ストレス負荷により発現量変動する遺伝子群の存在が示された。さらに興味深いことに Masuo ら²⁸はラットに対し、ストレス負荷と共にコーヒーの香りを吸入投与することで、ストレス負荷により減少していた遺伝子発現量が回復したことを明らかにしている。しかしながら、ストレス負荷と遺伝子発現量に関する研究は非常に新しい研究分野であるためメカニズムの解明等はまだ行われていない。基礎研究が進められることで将来新たなストレスマーカーとして確立されることが期待されている。

以上のことから、早期治療の段階でメディカルアロマセラピーを行うことは、不安障害やその要因の一つであるストレスに対し、有用性があると考えられる。

当研究室ではメディカルアロマセラピーとして医療従事者に信頼してもらえ科学的根拠を提示するために、日本産植物精油の科学特性を明らかにすることを目的に研究を行っている。

その背景には、その土地の産物はその土地の人に適するという「身土不二」の考え方や、トレーサビリティによる植物原料の安全性の確認が可能であること、また日本に多く保有されている植物原料の有効活用という点がある。これまで、沖縄県産のゲットウ (*Alpinia zerumbet*) 精油²⁹・北海道産トドマツ (*Abies sachalinensis*) 精油³⁰・高知県産ユズ (*Citrus junos*) 精油³¹の科学特性について研究し、マウスに対する吸入投与による抗不安様作用を報告してきた。

その一環として、今回私はヒノキ (*Chamaecyparis obtuse* (Siebold et Zucc.) Endl.) 精油に着目した。ヒノキはヒノキ科ヒノキ属の常緑針葉樹であり、福島県、新潟県の南部から鹿児島、屋久島まで分布している。ヒノキは独特の香りを有しており、なおかつ抗菌作用、耐久性に優れることから、古くから神社仏閣の建築材料や浴槽材に使用されている³²。そのため、ヒノキ精油を用いた研究の多くが抗菌作用³³⁻³⁵や抗真菌作用³⁶に関したものである。そのような

中、人を対象とした臨床試験においてヒノキ精油の吸入投与によるリラックス作用が明らかとなっている^{10, 11}。さらに近年では、アミロイド β を投与したラットに対し、ヒノキ精油を吸入投与することで認知機能障害を改善したことも報告されている³⁷。ゆえに、ヒノキ精油は非常に有用な植物精油であると考えられる。また、ヒノキは日本人に馴染みの深い植物であり、初めてメディカルアロマセラピーを行う人でも身近な香りであるという点から治療に入り易いというメリットがあると考えられる。

よって、本研究はメディカルアロマセラピーとして医療従事者に信頼してもらえる科学的根拠を提示するために、日本産ヒノキ精油の科学特性を明らかにすることを目的とした。

メディカルアロマセラピーをより多くの医療従事者に使用してもらうために、以下の研究戦略を立案する。

医療従事者がメディカルアロマセラピーを使用しにくい状況にあるのは、メディカルアロマセラピーの科学的な効果が明確化されていないことが挙げられる。ゆえに植物精油が医薬品ではなく雑貨として扱われていることにも起因する。よって一つ目は、メディカルアロマセラピーによる効果が個人の心理作用によるものではなく、植物精油による薬理作用であることを明確にすることである。二つ目は、植物精油の薬理作用を明確にするためには、作用の再現性の確保が重要であり、そのためには植物精油の品質の規格基準を明確にすることである。

この二点が明らかとなることによって、植物精油に対し医薬品と同等の効果の保障と品質の保証が認められ、そして医療従事者にとって植物精油が使いやすいものとなり、メディカルアロマセラピーがより多くの医療従事者に使用されるようになると思われる。そこで本研究では三つの観点から日本産ヒノキ精油の科学特性を解明した。

植物精油の化学成分に関する報告は、植物精油を有機溶剤で希釈し直接分析したものがほとんどである。植物精油をメディカルアロマセラピーで使用することを想定した場合、マッサージなどの経皮投与においては分析結果を参考にすることは可能である。しかし、吸入投与においては同じ植物精油であっても分子量や官能基の違いによって揮発のしやすさに差異が生じることが考えられ

る。よって第1章では、ガスクロマトグラフを用いたヒノキ精油の化学成分分析に加え揮発成分についても分析を行うことで、双方の観点から化学成分の明確化を行った。

メディカルアロマセラピーの医療分野への応用として、精神疾患への有用性が考えられている。そこで第2章では、心理作用の影響の少ないマウスを対象に情動に及ぼす影響について検討した。特に未病の段階において患者数の多い不安障害を対象としたため、本研究では情動を不安として定義する。さらにその要因の一つと考えられるストレスに対する研究と共に考察することで、ヒノキ精油の不安障害への有用性とその要因の一つであるストレスに対する作用が明らかになると考える。さらに、ヒノキ精油の作用が単に心理作用によるものではないことを裏付けるために、脳内に移行した精油成分について分析を行った。また、脳内から検出された成分を使用して情動に与える影響を検討することで、ヒノキ精油の作用について主要な要因となる化学成分が明確にできると考える。

メディカルアロマセラピーで使用される植物精油は、塗布による経皮投与時も含めて、短時間、長時間、室温、加温など様々な条件下で吸入投与が行われている。植物精油の作用について科学的に解明するためには、各種吸入条件による情動に及ぼす影響の検討が必要である。そこで第3章では、メディカルアロマセラピーにおける使用条件を考慮し、使用時間や温度条件を変化させた際の情動に与える影響についてマウスを対象に検討を行った。これにより、ヒノキ精油の吸入条件と作用の関係性が明確になると考える。

本論

第 1 章 ヒノキ精油の化学成分及び揮発成分

植物精油をメディカルアロマセラピーで使用することを想定した場合、植物精油自体の化学成分はマッサージなどで使用される経皮投与の条件に合うものの、吸入投与の場合には植物精油から揮発する化学成分が一様では無いことから、植物精油自体の化学成分だけでは当てはまらないと考えられる。よって本章では、ヒノキ精油の化学成分に加えて揮発成分についても明確にすることを目的とした。

第 1 節 ヒノキ精油の化学成分

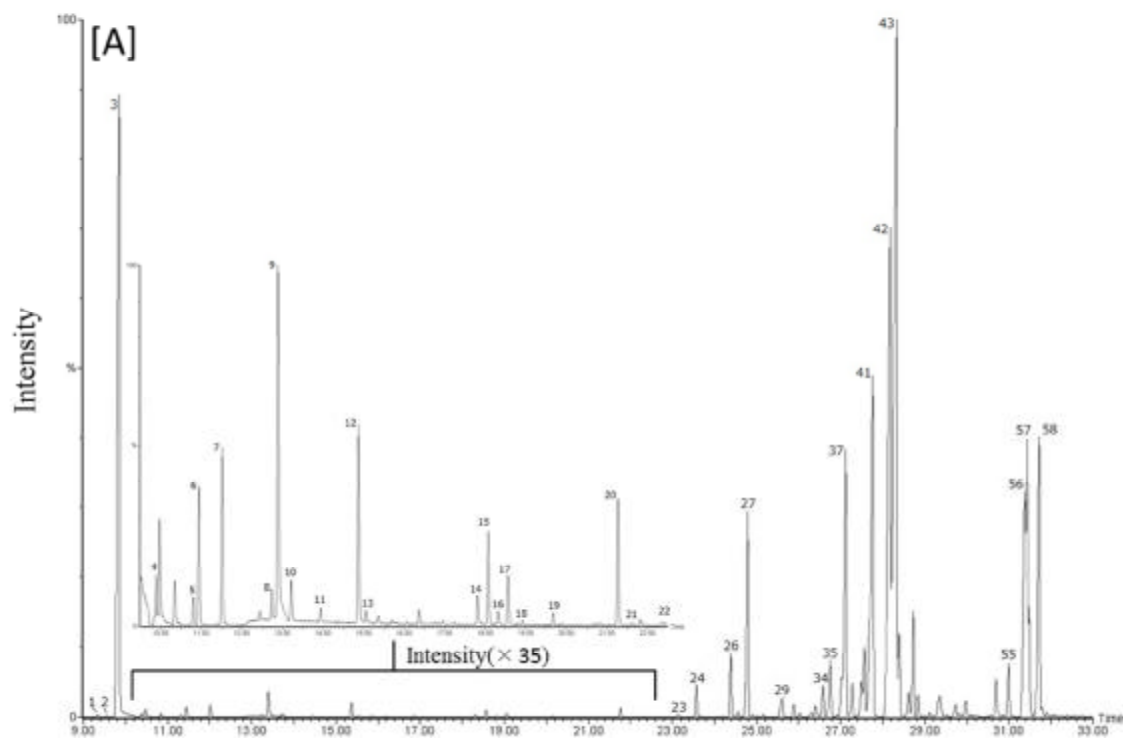
本実験に使用したヒノキ精油は 2010 年 10 月に長野県木曾郡王滝村国有林内で採取されたヒノキの枝を、水蒸気蒸留法を用いて抽出したものを入手した。Fig. 2 は長野県木曾郡上松町にある赤沢自然休養林内の木曾ヒノキである。



Fig. 2 長野県木曾郡の赤沢自然休養林の木曾ヒノキ

ヒノキ精油を構成している化学成分を明確にすることを目的とし、ガスクロマトグラフィー (GC: Gas Chromatography) による化学成分分析を行った。*n*-hexane に希釈した 1 μ L のヒノキ精油を試料とし、定性分析には質量分析法 (MS: Mass Spectrometry) を、定量分析の検出器には水素炎イオン検出器 (FID: Flame Ionization Detector) を使用した。初めに、ヒノキ精油を構成している化学成分について、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) を用

いて定性分析を行った。カラムは非極性キャピラリーカラム DB-5ms を使用した。



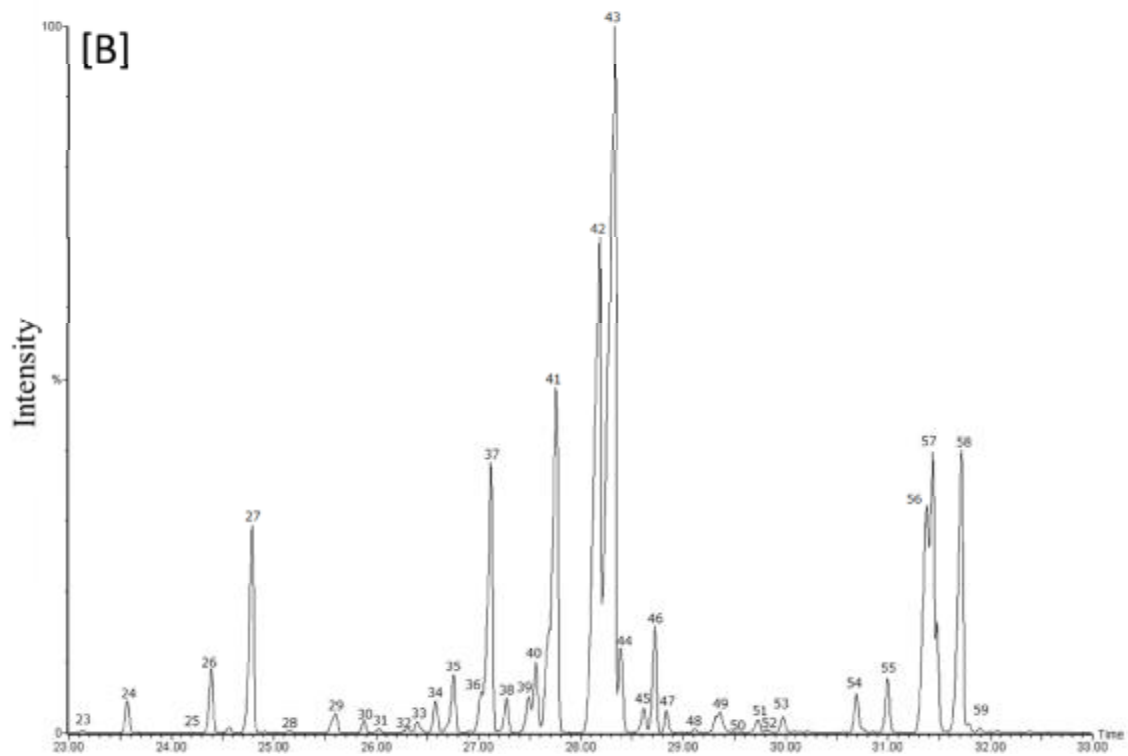


Fig. 3 GC/MS で得られたヒノキ精油（2010年10月に抽出）の TIC
 [A]は全体の TIC を示し、[B]は 23 分以降を拡大したものとなっている

モノテルペン類

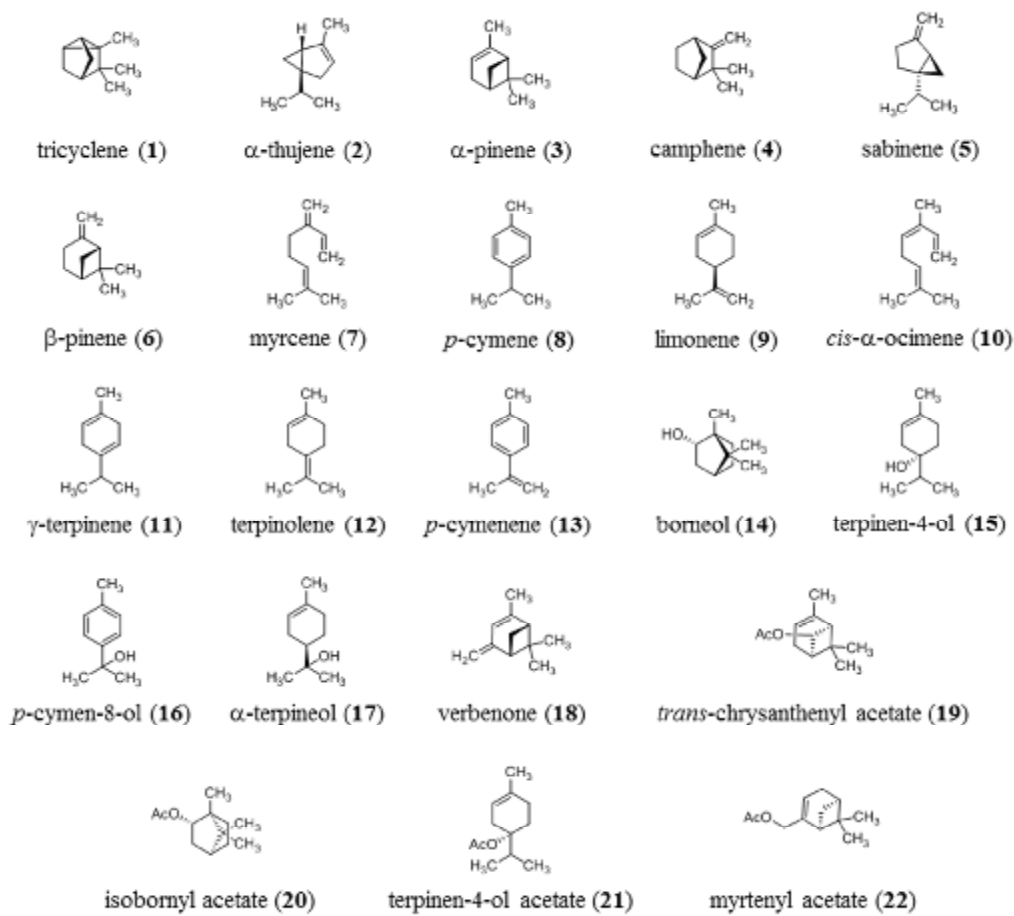


Fig. 4 ヒノキ精油の化学成分 I (TIC ピーク番号)

セスキテルペン類

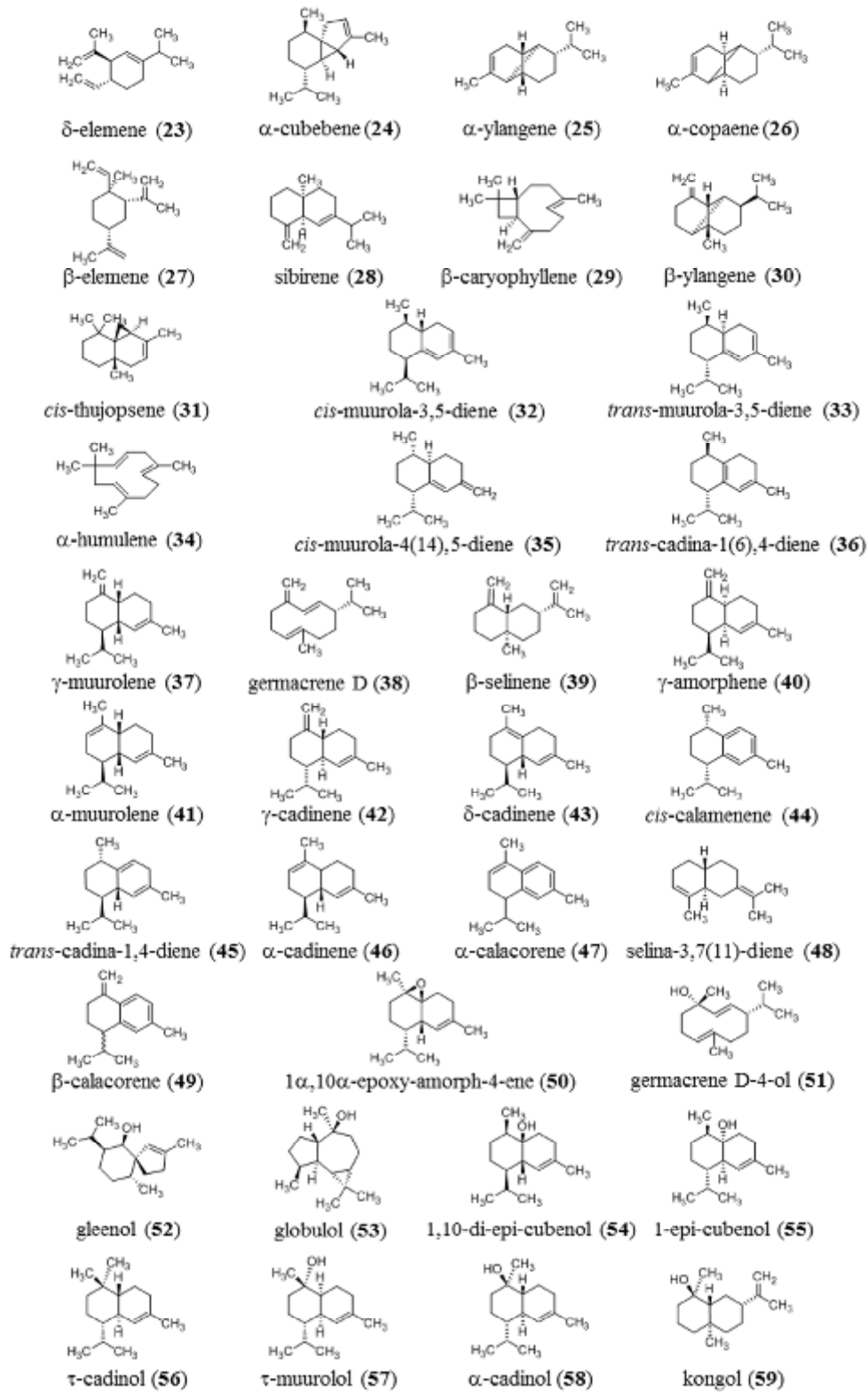


Fig. 5 ヒノキ精油の化学成分Ⅱ (TIC ピーク番号)

その結果、Fig. 3 に示すように、GC/MS 分析において 59 本のピークが観察された。それぞれのピークについて、70eV で開裂したそれぞれのピークのフラグメントパターンを MS のライブラリである NIST MS Search Version 1.7 による MS スペクトルの比較、Adams ら³⁸ により提供されている LRI(Linear Retention Index)との比較、さらに標準品との直接比較を行ったところ、Fig. 4 及び Fig. 5 に示すように、モノテルペン類 22 種、セスキテルペン類 37 種の計 59 種の化学成分を同定した。モノテルペン類の中には、アルコールが 4 種、ケトンが 1 種、アセテートが 4 種、そしてセスキテルペン類の中には、エポキシが 1 種、アルコールが 9 種含まれていることが明らかとなった。

ヒノキには優れた殺菌力や抗菌力を有する hinokitiol の存在が知られているが、hinokitiol はタイワンヒノキ *Chamaecyparis obtusa* (Siebold et Zucc.) Endl. var. *formosana* (Hayata) Hayata の精油成分から単離された化学成分であり³⁹、今回使用した日本産ヒノキ精油からは検出されなかった。同じヒノキ科であるアスナロ属のヒノキアスナロ（別名青森ヒバ）*Thujopsis dolabrata* (L.f.) Siebold et Zucc. var. *hondae* Makino、クロベ属のクロベ（別名ネズコ）*Thuja standishii* (Gordon) Carrière には hinokitiol が含まれている^{40, 41}。澁谷は⁴²木材の抽出成分に対する生物活性について総説を報告しており、ヒノキは、 α -cadinol、 τ -muurolol を初めとするセスキテルペンアルコールが腐朽菌に対する菌糸成長抑制活性を示していることから、これらが耐久性の原因物質であるとしている。さらにセスキテルペンアルコールはシロアリに対しても抵抗性を示すことも報告している。本実験においても、 τ -muurolol(57)、 α -cadinol(58)を含む 9 種類のセスキテルペンアルコールが検出されたことから、木曾ヒノキが古くから神社仏閣等の建築で使用⁴³される背景には、これらの成分が関係していると考えられる。

次に GC/MS は化学構造の異なる化合物間では定量性に欠けるため、検出器に水素炎イオン化検出器 (FID) を用いた GC/FID を使用して各化学成分について定量分析を行った。カラムは非極性キャピラリーカラム DB-5ms を使用した。各化学成分に対し、標準品である undecane を用いた絶対検量線法より定量を行った。検出限界は S/N=3 となる濃度で算出し 0.75 g/L、定量限界は

S/N=10 となる濃度で算出し 3.0 g/L とした。検量線を用いてヒノキ精油中の各化学成分のピーク面積から濃度を算出し含有量を計算した。

Table 1 ヒノキ精油に含まれる化学成分の含有量(g/L)及びヒノキ精油成分中の含有率(%)

Peak No.	Compound	Identification	Reference LRI	Measurement LRI	Quantitative data	
					g/L	%
1	tricyclene	MS, LRI	917	926	3.1	0.4
2	α -thujene	MS, LRI	923	930	trace	trace
3	α -pinene	MS, LRI, STD	931	939	134.0	15.3
4	camphene	MS, LRI, STD	945	954	3.2	0.4
5	sabinene	MS, LRI	969	975	3.1	0.3
6	β -pinene	MS, LRI, STD	973	979	4.0	0.5
7	myrcene	MS, LRI, STD	988	990	4.5	0.5
8	<i>p</i> -cymene	MS, LRI, STD	1021	1024	3.0	0.3
9	limonene	MS, LRI, STD	1026	1029	5.5	0.6
10	<i>cis</i> - α -ocimene	MS, LRI	1035	1037	3.0	0.3
11	γ -terpinene	MS, LRI, STD	1056	1059	trace	trace
12	terpinolene	MS, LRI, STD	1082	1088	4.3	0.5
13	<i>p</i> -cymenene	MS, LRI	1087	1091	trace	trace
14	borneol	MS, LRI, STD	1171	1169	3.1	0.4
15	terpinen-4-ol	MS, LRI, STD	1179	1177	3.5	0.4
16	<i>p</i> -cymen-8-ol	MS, LRI	1186	1182	trace	trace
17	α -terpineol	MS, LRI, STD	1194	1188	3.5	0.4
18	verbenone	MS, LRI	1205	1205	trace	trace
19	<i>trans</i> -chrysanthenyl acetate	MS, LRI	1230	1238	3.0	0.3
20	isobornyl acetate	MS, LRI, STD	1282	1285	3.6	0.4
21	terpinen-4-ol acetate	MS, LRI	1293	1299	trace	trace
22	myrtenyl acetate	MS, LRI	1320	1326	trace	trace
23	δ -elemene	MS, LRI	1329	1338	3.1	0.4
24	α -cubebene	MS, LRI	1344	1351	6.4	0.7
25	α -ylangene	MS, LRI	1366	1375	trace	trace
26	α -copaene	MS, LRI	1373	1376	9.1	1.0
27	β -elemene	MS, LRI	1387	1390	10.6	1.2
28	sibirene	MS, LRI	1399	1400	18.3	2.1
29	β -caryophyllene	MS, LRI, STD	1416	1419	5.4	0.6
30	β -ylangene	MS, LRI	1427	1420	3.9	0.4
31	<i>cis</i> -thujopsene	MS, LRI	1432	1431	3.2	0.4
32	<i>cis</i> -muurolo-3,5-diene	MS, LRI	1443	1450	3.4	0.4
33	<i>trans</i> -muurolo-3,5-diene	MS, LRI	1446	1453	4.2	0.5
34	α -humulene	MS, LRI	1453	1454	6.3	0.7
35	<i>cis</i> -muurolo-4(14),5-diene	MS, LRI	1460	1466	9.5	1.1
36	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-diene	MS, LRI	1470	1476	6.1	0.7
37	γ -muuroloene	MS, LRI	1473	1479	36.1	4.1
38	germacrene D	MS, LRI	1479	1481	8.1	0.9
39	β -selinene	MS, LRI	1487	1490	6.4	0.7
40	γ -amorphene	MS, LRI	1490	1495	10.6	1.2
41	α -muuroloene	MS, LRI	1497	1500	59.8	6.8
42	γ -cadinene	MS, LRI	1514	1513	90.8	10.4
43	δ -cadinene	MS, LRI	1520	1523	152.9	17.5
44	<i>cis</i> -calamenene	MS, LRI	1522	1529	14.7	1.7
45	<i>trans</i> -cadina-1,4-diene	MS, LRI	1531	1534	5.1	0.6
46	α -cadinene	MS, LRI	1535	1538	12.6	1.4
47	α -calacorene	MS, LRI	1540	1545	4.8	0.6
48	selina-3,7(11)-diene	MS, LRI	1551	1546	3.1	0.4
49	β -calacorene	MS, LRI	1560	1565	6.8	0.8
50	1 α ,10 α -epoxy-amorph-4-ene	MS, LRI	1567	1572	3.1	0.4
51	germacrene D-4-ol	MS, LRI	1575	1575	4.5	0.5
52	gleenol	MS, LRI	1579	1587	3.5	0.4
53	globulol	MS, LRI	1585	1590	4.5	0.5
54	1,10-di-epi-cubenol	MS, LRI	1614	1619	7.1	0.8
55	1-epi-cubenol	MS, LRI	1626	1628	8.2	0.9
56	τ -cadinol	MS, LRI	1642	1640	17.6	2.0
57	τ -muurotolol	MS, LRI	1645	1642	52.6	6.0
58	α -cadinol	MS, LRI	1657	1654	40.5	4.6
59	kongol	MS, LRI	1660	1659	4.2	0.5

MS : MS スペクトルの比較、LRI : LRI の比較、STD : 標準品との直接比較(trace < 3.0 g/L、0.3 %)

その結果、Table 1に記載するように、ヒノキ精油を構成している 59 種類の化学成分のうち、セスキテルペン類の δ -cadinene が 17.5%と最も多く、次いでモノテルペン類の α -pinene、セスキテルペン類の γ -cadinene、 α -muurolene、 τ -muurolol の順に多く含まれていることが明らかとなった。

日本産ヒノキ精油の化学成分に関する研究は、これまでにいくつか報告されている^{33, 44, 45}。その中で、奈良県の吉野ヒノキの木材から抽出されたヒノキ精油の化学成分分析においては、20.5%の α -cadinol をはじめとし、 τ -muurolol、 γ -cadinene、 δ -cadinene であった。一方で α -pinene に関しては 0.4%と非常に低い値を示していた⁴⁴。本実験で得られた結果は、化学成分の組成に関しては同様であるものの、各成分の割合に対しては相違が認められた。このことは、同じ種の植物、同じ国の産地、同じ抽出部位であっても化学成分に違いが生じる可能性があることを示しており、植物精油の品質保持の難しさを表している。さらに、原料となる植物の生育条件や気候変動により精油成分の割合も異なるため⁴⁶、植物精油を同一品質に保つことは理論上困難である。よって、植物精油をメディカルアロマセラピーに応用するためには品質にある程度の幅を設ける必要があると考えられる。その幅を決定するのは、植物精油から得られる作用の度合いであると考えられる。そのためには、植物精油の化学成分分析と共に作用についても明確にする必要性があると考察する。

第 2 節 ヒノキ精油の揮発成分

ヒノキ精油の揮発成分を明らかにするため、Fig. 6 に示すように、マウスのいない状態で、40 μL のヒノキ精油を 5L のガラス製コンテナ内上蓋の濾紙に染み込ませた。コンテナの中にエアープンプ (0.5 L / min) を設置し、エアープンプの先にシリカゲルを素材とする MonoTrap[®] を取り付け揮発成分の捕集を試みた。90 分後に 2 mL の *n*-hexane を用いて超音波にて 5 分間抽出操作を行い、得られた溶液をサンプルとし GC / FID にて成分分析を行った。

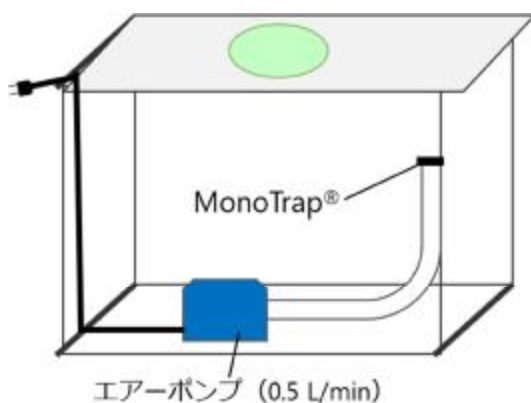


Fig. 6 5L のガラス製コンテナ内におけるヒノキ精油の揮発成分の捕集方法

その結果、Table 2 に示すように、コンテナ内に揮発している化学成分は、モノテルペン類である α -pinene が 58.6% と最も多く、次いで limonene、myrcene、terpinolene、 β -pinene の順に多く含有されていた。一方で、ヒノキ精油の主成分である δ -cadinene を含むセスキテルペン類は、今回の条件下ではほとんど揮発していないことが明らかとなった。さらに、キラルカラムの CYCLOSIL-B を用いた分析により、ヒノキ精油に含まれる α -pinene は全て (+) 体であり、(-) 体はほとんど含まれていないことも明らかとなった。当研究室により、ヘッドスペース法を用いた揮発成分分析において、(+)- α -pinene は単一成分よりも *p*-cymene、1,8-cineole、(+)-limonene と共に混合物として使用することで揮発されやすいという特徴を有していることを報告している⁴⁷。ゆえに、本実験で行った捕集方法においても主要な揮発成分として (+)- α -pinene が検出されたと考える。

Table 2 ヒノキ精油の化学成分及び揮発成分

Peak No.	Compound	Essential oil ^{a)}		Volatilization ^{b)}		Comparison among %
		g/L	%	mg/L air	%	
1	tricyclene	3.1	0.4	trace	trace	down
2	α -thujene	trace	trace	trace	trace	
3	(+)- α -pinene	134.0	15.3	24.9	58.6	UP
4	camphene	3.2	0.4	1.2	2.8	UP
5	sabinene	3.1	0.3	1.2	2.8	UP
6	β -pinene	4.0	0.5	1.5	3.4	UP
7	myrcene	4.5	0.5	2.3	5.3	UP
8	<i>p</i> -cymene	3.0	0.3	1.2	2.9	UP
9	limonene	5.5	0.6	2.4	5.7	UP
10	<i>cis</i> - α -ocimene	3.0	0.3	trace	trace	down
11	γ -terpinene	trace	trace	trace	trace	
12	terpinolene	4.3	0.5	1.5	3.5	UP
13	<i>p</i> -cymenene	trace	trace	trace	trace	
14	borneol	3.1	0.4	-	-	
15	terpinen-4-ol	3.5	0.4	-	-	
16	<i>p</i> -cymen-8-ol	trace	trace	-	-	
17	α -terpineol	3.5	0.4	-	-	
18	verbenone	trace	trace	-	-	
19	<i>trans</i> -chrysanthenyl acetate	3.0	0.3	-	-	
20	isobornyl acetate	3.6	0.4	-	-	
21	terpinen-4-ol acetate	trace	trace	-	-	
22	myrtenyl acetate	trace	trace	trace	trace	
23	δ -elemene	3.1	0.4	-	-	
24	α -cubebene	6.4	0.7	-	-	
25	α -ylangene	trace	trace	-	-	
26	α -copaene	9.1	1.0	trace	trace	down
27	β -elemene	10.6	1.2	1.3	3.1	UP
28	sibirene	18.3	2.1	-	-	
29	β -caryophyllene	5.4	0.6	-	-	
30	β -ylangene	3.9	0.4	-	-	
31	<i>cis</i> -thujopsene	3.2	0.4	-	-	
32	<i>cis</i> -muurolo-3,5-diene	3.4	0.4	-	-	
33	<i>trans</i> -muurolo-3,5-diene	4.2	0.5	-	-	
34	α -humulene	6.3	0.7	-	-	
35	<i>cis</i> -muurolo-4(14),5-diene	9.5	1.1	trace	trace	down
36	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-diene	6.1	0.7	-	-	
37	γ -muurolene	36.1	4.1	trace	trace	down
38	germacrene D	8.1	0.9	trace	trace	down
39	β -selinene	6.4	0.7	-	-	
40	γ -amorphene	10.6	1.2	trace	trace	down
41	α -muurolene	59.8	6.8	1.3	3.0	down
42	γ -cadinene	90.8	10.4	1.2	2.9	down
43	δ -cadinene	152.9	17.5	1.3	3.2	down
44	<i>cis</i> -calamenene	14.7	1.7	1.2	2.8	UP
45	<i>trans</i> -cadina-1,4-diene	5.1	0.6	-	-	
46	α -cadinene	12.6	1.4	-	-	
47	α -calacorene	4.8	0.6	-	-	
48	selina-3,7(11)-diene	3.1	0.4	-	-	
49	β -calacorene	6.8	0.8	-	-	
50	1 α ,10 α -epoxy-amorph-4-ene	3.1	0.4	-	-	
51	germacrene D-4-ol	4.5	0.5	-	-	
52	gleenol	3.5	0.4	-	-	
53	globulol	4.5	0.5	-	-	
54	1,10-di-epi-cubenol	7.1	0.8	trace	trace	down
55	1-epi-cubenol	8.2	0.9	-	-	
56	τ -cadinol	17.6	2.0	-	-	
57	τ -muurolol	52.6	6.0	-	-	
58	α -cadinol	40.5	4.6	-	-	
59	kongol	4.2	0.5	-	-	

a) trace < 3.0 g/L、0.3 %、b) trace < 1.0 μ g/L air、2.0 %、- : 検出限界未満、ヒノキ精油中の含有率と比べ割合が増加した化学成分を UP、割合が減少した化学成分を down と記した

α -Pinene は、自然界において最も豊富に存在するテルペン類の一つである⁸。
(+)- α -pinene と (-)- α -pinene の含有率に関しては、韓国産ヒノキ精油に含まれる
 α -pinene は全て(-)体であると報告されている³⁴。しかしながら本実験により、
日本産ヒノキ精油に含まれる α -pinene は全て(+)体であることが明らかとなっ
たことから、植物精油の揮発成分分析に加えキラリティーを検討することで、
より詳細な植物精油の分類が可能になるのではないかと考える。

本章第1節で得られたヒノキ精油成分とコンテナ内における揮発成分の比較
を行ったところ、Table 2 に示すように、ヒノキ精油の主要な化学成分であつ
た δ -cadinene、(+)- α -pinene、 γ -cadinene、 α -muurolene、 τ -muurolol のうち、揮
発成分では(+)- α -pinene の割合だけが増加し、それ以外の δ -cadinene、 γ -
cadinene、 α -muurolene、 τ -muurolol に減少が認められた。一方、ヒノキ精油の
化学成分において割合の少なかった liminene、myrcene、terpinolene、 β -pinene
は、揮発成分では増加が認められた。この違いは揮発のしやすさ、すなわち、
分子量の大きさの違いに依存していると考えられる。そのため、 δ -cadinene など
の比較的分子量の大きいセスキテルペン類は揮発されにくく、揮発条件下で
は含有量が減少したと考えられる。反対に、(+)- α -pinene などの比較的分子量
の小さいモノテルペン類は揮発されやすく、揮発条件下では含有量が増加した
と考察される。

多成分から構成される植物精油の作用の場合、植物精油に含まれる割合の多
い化学成分がその作用を示すとは限らず、微量成分であっても作用が強ければ
その主要因であることが考えられる。しかし、植物精油の科学特性を明らかに
する上で、まずは主要な化学成分の作用から検討すべきであると考ええる。本実
験で使用したヒノキ精油の場合には、(+)- α -pinene が揮発成分として 6 割を占
めていたことから、ヒノキ精油の吸入投与による作用には(+)- α -pinene が強く
影響していると推測される。

小括

植物精油は多成分から構成されている。メディカルアロマセラピーにおいて植物精油を使用することを想定した場合、吸入投与においては同じ植物精油であっても分子量や官能基の違いによって揮発のしやすさに差異が生じることが考えられる。そのため、本章ではヒノキ精油の化学成分及び揮発成分の双方の観点から化学成分の明確化を行った。

その結果、ヒノキ精油の化学成分は 17.5%の δ -cadinene をはじめとする α -pinene、 γ -cadinene、 α -muurolene、 τ -muurolol を主要成分としていた。一方、揮発成分は 58.6%の α -pinene をはじめとする limonene、myrcene、terpinolene、 β -pinene を主要成分としていた。すなわち、ヒノキ精油の化学成分において主要な成分であった δ -cadinene、 γ -cadinene などのセスキテルペン類の含有量が揮発条件下では減少していた。反対に、 α -pinene、limonene などのモノテルペン類の含有量が揮発条件下では増加していた。特に α -pinene の割合が 6 割を占める形となり、またキラル分析により (+)- α -pinene であることを明らかにした。

当研究室により、(+)- α -pinene は単一成分よりも混合物として使用することで揮発されやすいという特徴を有していることを報告している⁴⁷。ヒノキ精油の場合には(+)- α -pinene が元々多く含まれていることもあり、結果として(+)- α -pinene が主要な揮発成分になったと考察する。以上の結果から、後に実験を行うヒノキ精油吸入による情動に及ぼす影響には(+)- α -pinene が関与している可能性が推測される。

現在、植物精油の含有成分に関する表記には、植物精油をそのまま GC で分析した結果が記載されている。植物精油の使用方法は、主に吸入投与とマッサージによる塗布が考えられる。塗布の場合にはこれまでと同様に植物精油に対する成分分析のデータが重要であると考えられる。しかし、吸入投与の場合には上記のデータだけでは補えない部分があり、また全てが揮発するわけではないことが本章より明らかにされた。ゆえに、植物精油の化学成分分析に加え揮発成分分析、そしてキラリティーに関しても検討を行うことで、植物精油の化学成分について正確な情報提供が可能となるが、植物精油を同一品質に保つことは理論上困難であるため、植物精油をメディカルアロマセラピーに応用するため

には品質にある程度の幅を設ける必要があると考えられる。その幅を決定するのは、植物精油から得られる作用の度合いであると考ええる。

第2章 ヒノキ精油吸入によるマウスに対する情動に及ぼす影響

メディカルアロマセラピーの科学的な解明のためには、情動との関係を示す基礎データの蓄積が重要である。よって本章では、ヒノキ精油吸入による情動に及ぼす影響について明らかにすることを目的とし、心理作用の影響の少ないマウスを用いて検討を行った。

第1節 行動薬理試験を用いた抗不安様作用の評価

実験動物の不安関連行動の評価方法には、Geller-Seifter 型コンフリクト試験や Vogel 型コンフリクト試験などの条件付け行動による評価と、オープンフィールド試験や高架式十字迷路試験などの生得的・潜在的な行動による評価に大別できる¹³。コンフリクト試験は、ベンゾジアゼピン系抗不安薬などの多くの薬物に対して信頼性の高い評価が可能であるとされている。しかし、今回の研究では、植物精油の作用を幅広く検出するため、比較的操作が簡便かつ作用の有無を評価し易い高架式十字迷路試験（EPM test: Elevated Plus Maze test）を採用した。

高架式十字迷路試験は、1985年に Pellow ら⁴⁸によって考案された不安水準の評価系の一つである。Fig. 7 に示すように、十字型に交差した open arm、close arm で構成された装置を高所に設置したものである。高架式十字迷路に曝露された動物は高所で壁がないという恐怖から、壁のない open arm の滞在時間や侵入回数が減少する⁴⁹。ゆえに評価方法としては対照である control と比較し open arm の滞在時間及び侵入率が有意に増加し、さらに装置上における総移動距離が control と比較して有意な変化がないことから、抗不安様作用があると評価した。

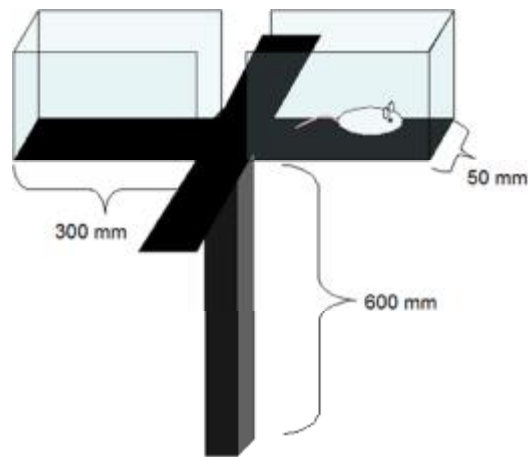


Fig. 7 高架式十字迷路試験（EPM test : Elevated Plus Maze test）

本実験では、ICR系5週齢の雄マウスを1週間単独飼育し、5 Lのガラス製コンテナにマウスを入れて30分間慣れさせた後、20 μL ・40 μL ・60 μL のヒノキ精油をコンテナ内上蓋の濾紙に染み込ませ室温にて揮発させた。全てのヒノキ精油が揮発したとすると、コンテナ内のヒノキ精油の濃度は4 $\mu\text{L}/\text{L air}$ 、8 $\mu\text{L}/\text{L air}$ 、12 $\mu\text{L}/\text{L air}$ となる。controlは1 $\mu\text{L}/\text{L air}$ の蒸留水を使用した。コンテナにて90分間吸入させた後、10分間の高架式十字迷路試験を行った。各試験はウェブカメラで撮影し、行動解析ソフト ANY-maze を使用してマウスの行動の解析を行った。

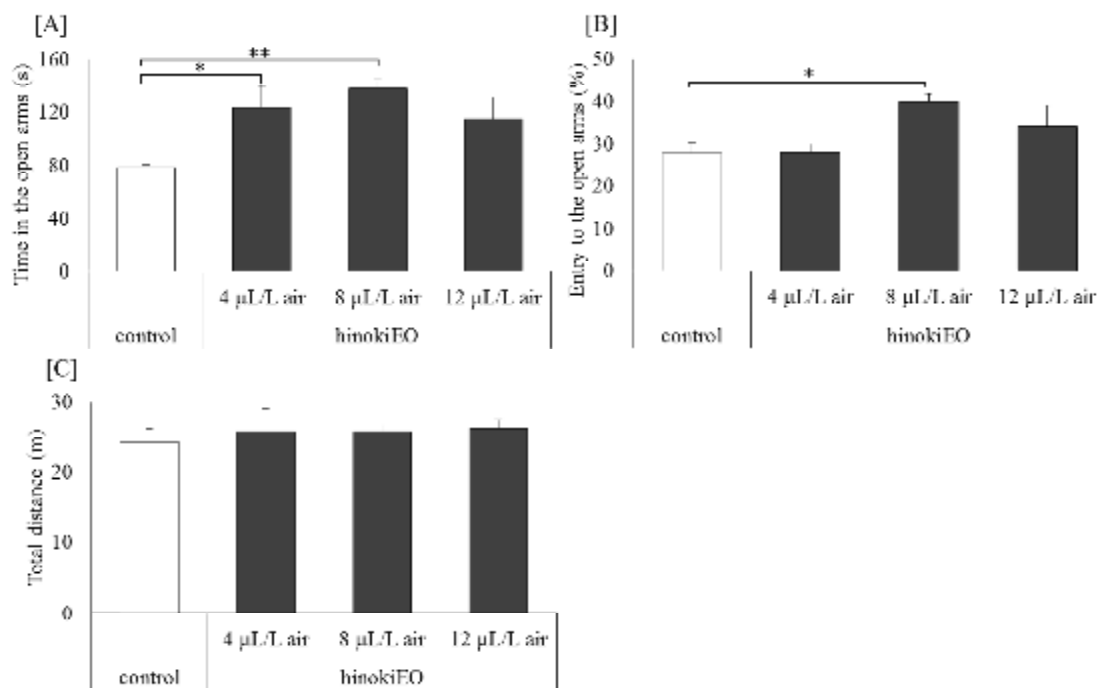


Fig. 8 マウスに対するヒノキ精油の吸入投与後の高架式十字迷路試験
 [A]open arm の滞在時間(s)、[B]open arm への侵入率(%)、[C]総移動距離(m)
 □control : 蒸留水(1 μL/L air)、■hinokiEO : ヒノキ精油 (4、8、12μL/L air)
 mean ± SE、 n = 5、 *p < 0.05、 **p < 0.01 (Dunnett)

その結果、Fig. 8に示すように、マウスに対する4 μL/L airのヒノキ精油の吸入投与は、controlと比較してopen armの滞在時間に有意な増加($p < 0.05$)を示したが、open armへの侵入率については有意な増加は認められなかった。しかし、マウスに対する8 μL/L airのヒノキ精油の吸入投与は、controlと比較してopen armの滞在時間に有意な増加($p < 0.01$)を示し、open armへの侵入率においても有意な増加($p < 0.05$)が認められた。このとき、装置上の総移動距離はcontrolと比較して有意な変化を示さなかったことから、鎮静作用も興奮作用も示していないと評価でき、8 μL/L airのヒノキ精油の吸入投与はマウスに対して抗不安様作用を示したと結論付けた。さらに、12 μL/L airのヒノキ精油の吸入投与はcontrolと比べopen armの滞在時間や侵入率において有意な増加を示さなかったことは、ヒノキ精油の吸入投与において抗不安様作用を示すためには最適な濃度が存在することが考えられる。

マウスを対象とした吸入投与における抗不安様作用について、先行研究によれば、ゲットウ精油²⁹では 10 $\mu\text{L}/\text{L air}$ 、トドマツ精油³⁰では 4 $\mu\text{L}/\text{L air}$ 、ユズ精油³¹では 8 $\mu\text{L}/\text{L air}$ などのように、抗不安様作用を示すための最適な濃度が存在することを報告している。今回の結果も抗不安様作用の発現には最適な濃度が存在することを示しており、さらに、植物精油の作用が単なる心理作用によるものではないことを裏付ける結果であると考ええる。また、抗不安様作用において最適な濃度が存在することは、メディカルアロマセラピーにおける植物精油の品質の規格化が、抗不安様作用を測定することにより可能であることが考えられる。しかし、前述の通り植物精油は多数の成分から構成されていることから、単に植物精油の濃度だけで品質を規格化することは不可能である。そのため、活性成分の同定が必要になると考える。

第 2 節 脳内遺伝子発現量を指標としたストレスに対する評価

序論に述べたように、近年、注目されているストレスに対する評価方法の一つに遺伝子発現量の測定がある²⁷。さらに Masuo ら²⁸は神経成長因子(*NGF*)における受容体遺伝子である *NGFR* (Nerve Growth Factor Receptor)、最初期遺伝子の一種で空間学習や恐怖条件などの記憶形成や保持に携わる *Arc* (Activity Regulated Cytoskeletal-associated Protein) の二つの脳内遺伝子の有用性を報告している。そこで本実験では、*NGFR* と *Arc* 遺伝子発現量の変化と共に、本章第 1 節で行った行動薬理試験の結果とあわせて総合的にストレスに対する評価を行った。

本実験では、先述の抗不安様作用と同様の条件で実験を行い、高架式十字迷路試験を行った直後に速やかに全脳を採取した。採取した全脳を使用して RT-PCR 法により *NGFR* 及び *Arc* 遺伝子発現量を測定した。

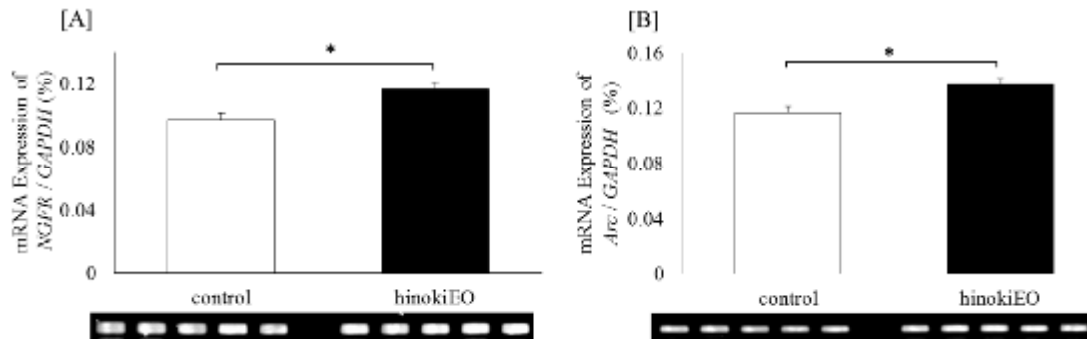


Fig. 9 高架式十字迷路試験後の脳内遺伝子発現量及びゲル電気泳動
 [A] *NGFR* における mRNA 発現率(%) [B] *Arc* における mRNA 発現率(%)
 □ control: 蒸留水(1 $\mu\text{L/L}$ air)、 ■ hinokiEO: ヒノキ精油 (8 $\mu\text{L/L}$ air)
GAPDH:ハウスキーピング遺伝子、 mean \pm SE、 $n = 5$ 、 * $p < 0.05$ (t -test)

その結果、Fig. 9に示すように、*NGFR* と *Arc* 遺伝子発現量は、8 $\mu\text{L/L}$ air のヒノキ精油の吸入投与によって有意に増加($p < 0.05$)した。先行研究²⁸により *NGFR* と *Arc* 遺伝子発現量はストレス負荷により減少することが知られており、なおかつコーヒーの香りを吸入投与することによりストレス負荷による減少を抑えることが明らかとなっている。ここで興味深いことは、ストレス負荷を伴わずにコーヒーの香りだけを吸入投与した場合は、二つの遺伝子発現量がストレス負荷時と同様に減少することが報告されていることである。また、試験を行う前の単独飼育並びに吸入投与時と行動薬理試験における新奇環境は、マウスにとってストレス負荷となることが明らかにされている^{50, 51}。すなわち本実験の場合、これらのストレス負荷に加えヒノキ精油を吸入投与した結果、二つの遺伝子発現量が有意に増加したと考察した。さらに、Fig. 8に示すように、直前において認められたヒノキ精油の吸入投与による抗不安様作用と合わせて評価することにより、8 $\mu\text{L/L}$ air のヒノキ精油の吸入投与はマウスに対する抗ストレス作用を示したと結論付けた。

ストレスなどの環境要因により、脳内の遺伝子発現調節機構に変動が起きる。すると、細胞における生理機能に変化をもたらす脳の高次機能に悪影響を及ぼす。脳内における遺伝子発現調節機構はシナプス可塑性にとって重要な役割を担っており、うつ病等の疾患において自然緩解することがあることから推測される。この機構にはヒストン・アセチル化や DNA メチル化などのエピジェネティックな遺伝子発現調節機構が、病態の一端を説明できる可能性があると考えられている^{52, 53}。すなわち、植物精油の吸入投与は比較的脳に作用しやすいことから、これらのエピジェネティックな遺伝子発現調節機構に関与している可能性も考えられる。本実験では *NGFR* と *Arc* 遺伝子発現量の変化を行動薬理試験と合わせて考察した。上記の遺伝子とストレスとの関係を明確なものにするためには、強制水泳試験や社会性敗北ストレス負荷試験等の他のストレス負荷試験を組み合わせた試験方法や現在使用されている向精神薬との関係性などを明らかにする必要があると考える。

本実験の結果はマウスに対する実験結果である。ヒトに対してもヒノキ精油は抗不安様作用を有する可能性はあるものの、明確に対応させるためにはヒノキ精油の抗ストレス作用に対する臨床研究が必要である。しかし、臨床研究においてヒノキ精油を含めた植物精油のプラセボ効果を排除することは非常に困難である¹²。そのため、他の植物精油との比較や複数の臨床試験（脳波や fMRI、心拍動など）を組み合わせた総合的な評価が必要になると考える。また、本試験ではマウスに対する脳内遺伝子を指標としたが、あくまでも基礎研究の段階であり、ヒトに適用するためには脳内ではなく血中などの試料採取の容易な部位からの検出が必要とされる。そのため現在では、血中などからの同様の遺伝子発現量の変化について研究が進められている。今回得られたヒノキ精油の抗ストレス作用の結果も、ヒトへの応用の足掛かりになることを期待する。

第3節 化学成分の脳内への移行性

植物精油の吸入投与は、化学成分の鼻腔粘膜や肺胞からの血液循環を経由した脳内への移行、並びに嗅覚受容体を介した嗅覚神経による作用の二つを兼ね備えていると考えられている。そのため本実験では、ヒノキ精油の吸入投与により脳内に移行した化学成分を明らかにすることを目的とした。

試料として 8 $\mu\text{L/L}$ air のヒノキ精油を使用した。実験条件は前述の抗不安様作用の条件と同様に行い、コンテナ内での吸入投与後に速やか全脳を採取した。採取した全脳は、*n*-hexane 抽出を行い、GC/FID により定量分析を行った。

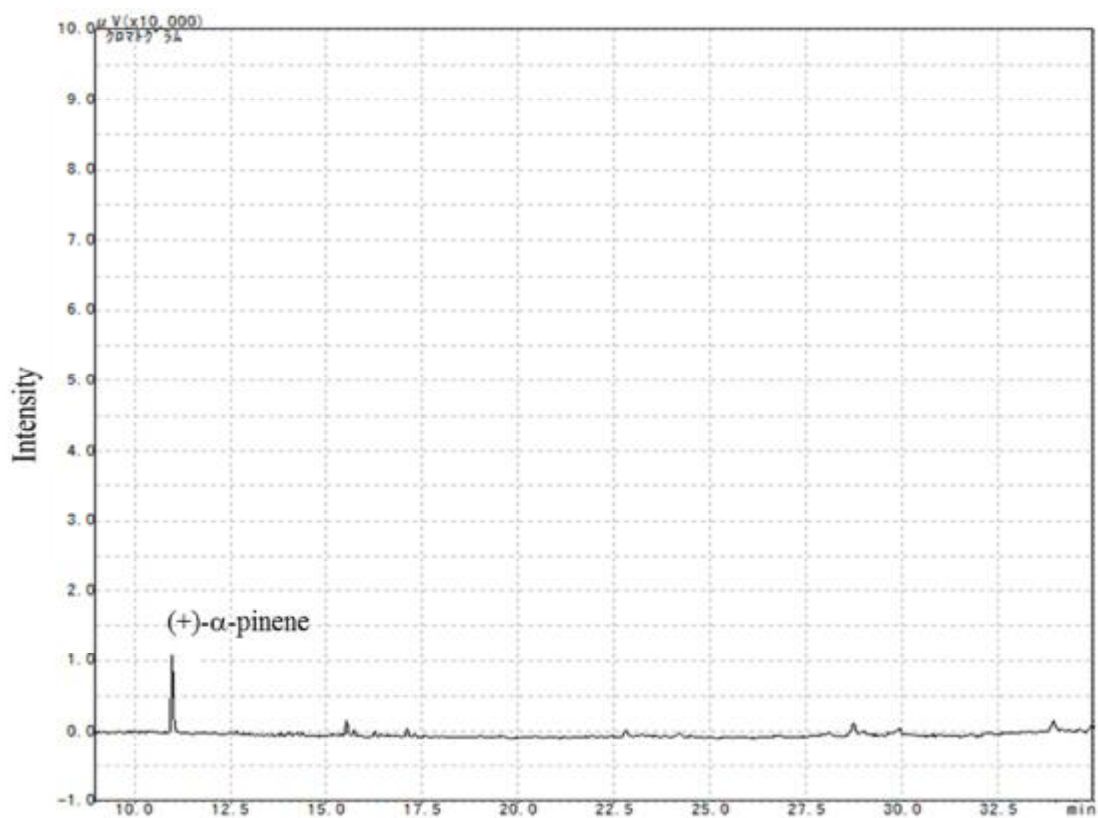


Fig. 10 GC/FID により得られたヒノキ精油 (8 $\mu\text{L/L}$ air) の吸入投与により脳内に移行した化学成分のクロマトグラム

その結果、Fig. 10 に示すように、8 $\mu\text{L/L air}$ のヒノキ精油の吸入投与後のマウスの脳内から(+)- α -pinene が検出され、その濃度は $57.6 \pm 2.7 \mu\text{g/g tissue}$ ($n = 3$) であった。(+) - α -pinene 以外のヒノキ精油の化学成分は検出限界未満であった。この結果は、ヒノキ精油の揮発成分として 58.6%の(+)- α -pinene が検出されていることに起因し、ヒノキ精油自体の成分分析における割合とは大きくかけ離れていることを意味している。また、(+)- α -pinene は単一成分よりも混合物としてマウスに吸入させたることで、脳内や肝臓内から検出される(+)- α -pinene の量が 2 倍近く増加することを報告していることから⁴⁷、ヒノキ精油の吸入投与において(+)- α -pinene が情動に影響を及ぼしている可能性が示唆される。

植物精油の吸入投与における脳内に移行する化学成分について、関係する研究報告のほとんどは当研究室からである。報告によると 10 $\mu\text{L/L air}$ のゲットウ精油²⁹ の吸入投与によって脳内から $0.7 \mu\text{g/g tissue}$ の α -pinene、10 $\mu\text{L/L air}$ のトドマツ精油³⁰ の吸入投与によって脳内から $19.7 \mu\text{g/g tissue}$ の α -pinene、 $20.7 \mu\text{g/g tissue}$ の camphene、 $8.9 \mu\text{g/g tissue}$ の β -pinene、そして 8 $\mu\text{L/L air}$ のユズ精油³¹ の吸入投与によって脳内から $40 \mu\text{g/g tissue}$ の limonene が検出されている。さらに、今回使用したヒノキ精油を対象に脳以外の臓器においても同様に測定を行ったところ、血中からは $10.8 \mu\text{g/g tissue}$ 、肝臓からは $12.4 \mu\text{g/g tissue}$ 、腎臓からは $45.0 \mu\text{g/g tissue}$ の(+)- α -pinene が検出された。以上のことから、植物精油の吸入投与により脳内に移行し易い化学成分は、揮発性の高いモノテルペン類であり、その多くが特異な官能基を持たないモノテルペン炭化水素であることを明らかにした。 α -pinene や limonene などは自然界に比較的多く存在するため、人々は何度もさらされる機会があったと思われる。しかしながら、吸入投与による化学成分の体内動態や作用機序は明らかにされていない。今後は揮発成分の脳内への移行性と作用との関係性が明確にされることで、抗不安作用や抗ストレス作用だけでなく、その他の脳に関連する疾患に対する新たな治療方法として植物精油を使用するメディカルアロマセラピーが有用になりうる可能性が考えられる。

第 4 節 (+)- α -pinene 吸入による抗不安様作用

ヒノキ精油の主要な揮発成分は(+)- α -pinene であり、さらに吸入投与により脳内に移行した化学成分も(+)- α -pinene であることを明らかとした。次に、(+)- α -pinene と情動との関係性を明らかにするために、マウスを使用して(+)- α -pinene 吸入による抗不安様作用を検討した。

試料は 10 μ L/L air (+)- α -pinene を用い、前述の抗不安様作用と同様の条件で実験を行った。

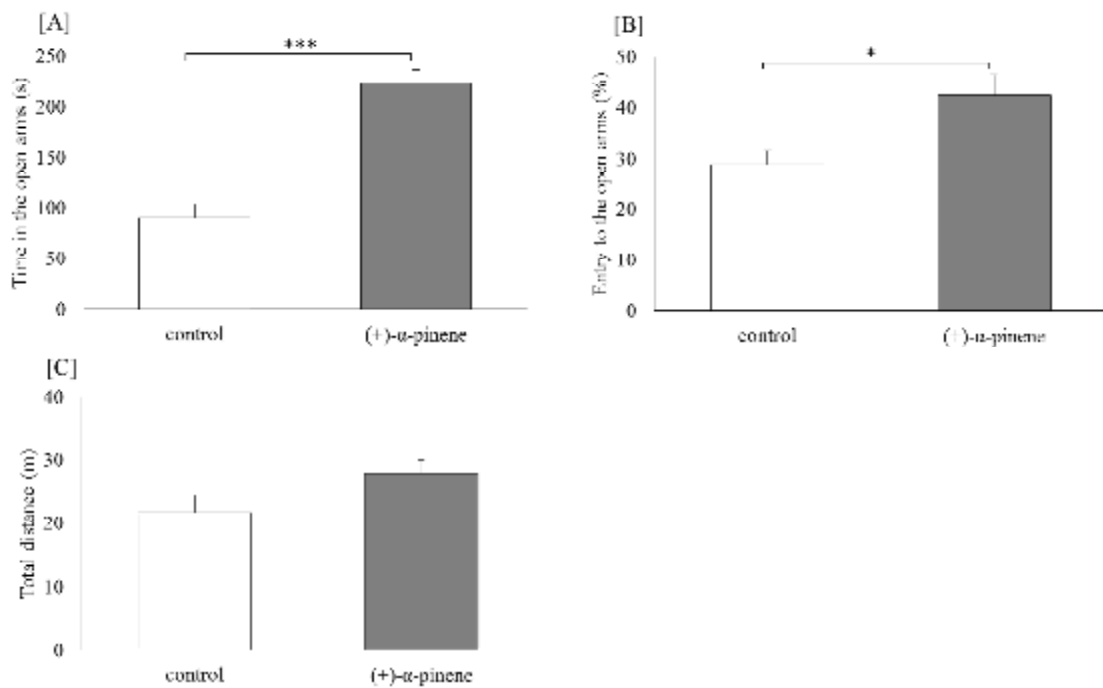


Fig. 11 マウスに対する(+)- α -pinene の吸入投与後の高架式十字迷路試験 [A]open arm の滞在時間(s)、[B]open arm への侵入率(%)、[C]総移動距離(m)

□ control : 蒸留水(10 μ L/L air)、 ■ (+)- α -pinene (10 μ L/L air)

mean \pm SE、 $n = 5$ 、 * $p < 0.05$ 、 *** $p < 0.001$ (t -test)

その結果、Fig. 11 に示すように、マウスに対する 10 $\mu\text{L/L}$ air の(+)- α -pinene の吸入投与は、control と比べ open arm の滞在時間並びに侵入率に有意な増加 ($p < 0.001$, $p < 0.05$)が認められた。さらに、装置上における総移動距離においても有意な変化が認められなかったことから、10 $\mu\text{L/L}$ air の(+)- α -pinene の吸入投与はマウスに対し抗不安様作用を有することが明らかとなった。

本実験で使用したの吸入投与とは異なり、腹腔内投与における α -pinene の抗不安様作用を検討した研究が梅津らにより行われている¹⁴。報告によると、 α -pinene の投与量が 1600 mg/kg (*i.p.*) においても抗コンフリクト作用を示さないことから、抗不安様作用は認められないとしている。しかし、本実験により(+)- α -pinene の吸入投与はマウスに対し抗不安様作用を示したことが明らかにされた。この相違は評価方法ではなく投与方法の違いが影響していると考えられる。すなわち、(+)- α -pinene の場合には吸入投与を行うことで抗不安様作用を発現しやすいと考察される。その要因の一つとして、(+)- α -pinene は吸入投与を行うことで脳内に移行されやすいことが挙げられる⁴⁷。一方、吸入投与は嗅覚受容体を介した嗅覚神経を伴う唯一の投与方法でもあるため、もう一つの要因として嗅覚刺激の関与も考えられる。ゆえに吸入投与は血中を介する薬物学的伝達経路及び嗅覚刺激による神経学的伝達経路の双方が関係しており、現時点では明確な作用機序は明らかとされていない。

10 $\mu\text{L/L}$ air の(+)- α -pinene の吸入投与がマウスに対し抗不安様作用を示したことは、他の植物精油においても(+)- α -pinene が一定量含まれることで、抗不安様作用を示す可能性を表している。本実験を元に抗不安様作用に対してメディカルアロマセラピーで使用する植物精油の規格化が可能であると考えられる。しかし、今回の結果はマウスに対する評価であることから、ヒトに応用するためには、ヒトに合わせた濃度の設定や他の化学成分との比較など多方面からの総合的な臨床研究が必要である。

小括

日本産ヒノキ精油の科学特性を明らかにするため、マウスを対象に情動に及ぼす影響について検討を行った。その結果、高架式十字迷路試験において、8 $\mu\text{L/L}$ air のヒノキ精油の吸入投与は、open arm の滞在時間並びに侵入率を有意に増加させた。すなわち、ヒノキ精油の吸入投与はマウスに対して抗不安様作用を示すことを明らかにした。さらにストレス負荷による減少が報告されている²⁸、*NGFR* と *Arc* の二つの遺伝子発現量は、8 $\mu\text{L/L}$ air のヒノキ精油の吸入投与により有意な増加が認められた。さらに同時に行った行動薬理試験において抗不安様作用を示したことから、ヒノキ精油は抗ストレス作用を有すると結論付けた。また、ヒノキ精油の吸入投与によりマウスの脳内から比較的多量の (+)- α -pinene が検出された。そして 10 $\mu\text{L/L}$ air の (+)- α -pinene の吸入投与はマウスに対して抗不安様作用を示すことを明らかにした。

本実験を含め、植物精油の吸入投与が抗不安様作用を示すには最適な濃度が存在することが報告されている²⁹⁻³¹。これは、植物精油の作用が単なる心理作用によるものではないことを裏付ける結果であると考えられる。また、抗不安様作用において最適な濃度が存在することは、メディカルアロマセラピーにおける植物精油の品質の規格化が、抗不安様作用を測定することにより可能であることが考えられる。よって、マウスの抗不安様作用を対象とした場合、ヒノキ精油だけではなく他の植物精油においても (+)- α -pinene が一定量含まれるという規格化が可能であると考察される。また、本試験ではストレスに対する評価として脳内遺伝子を指標としたが、あくまでも基礎研究の段階であり、ヒトに適用するためには脳内ではなく血中などの試料採取の容易な部位からの検出が必要とされる。そのため現在では、血中などからの同様の遺伝子発現量の変化について研究が進められている。今回得られたヒノキ精油の抗ストレス作用の結果も、ヒトへの応用の足掛かりになることを期待する。

本章より、ヒノキ精油吸入により (+)- α -pinene が脳内に移行することが明らかとなった。植物精油の吸入投与による化学成分の体内動態や作用機序は明らかにされてはいないが、今後、揮発成分の脳内への移行性と作用との関係性が明確にされることで、抗不安作用や抗ストレス作用だけではなく、その他の脳に関連する疾患に対する新たな治療方法として植物精油を使用するメディカルアロマセラピーが有用になりうる可能性が考えられる。

第3章 吸入条件の違いがマウスに対する情動に及ぼす影響

メディカルアロマセラピーで使用される植物精油は、時間や温度など様々な条件の元で使用されている。関連の書籍等において植物精油の大まかな吸入方法は記載されているものの、時間や温度などの詳細な使用条件の記載は無く、これまでも研究報告はほとんど存在しない。植物精油の情動に及ぼす影響について再現性の良いものとするためには、時間や温度など様々な条件の元で作用を検討し明確にする必要があると考える。そこで本章では、吸入条件の違いが情動に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

第1節 吸入時間の違いが情動に及ぼす影響

第1項 抗不安様作用を指標とした吸入時間の影響

植物精油吸入によるマウスに対する抗不安様作用の研究においては、これまで、Komiya ら⁵⁴の研究報告をはじめとする90分間の吸入投与で行われていた。その背景には、マウスに対する90分間の吸入投与はcontrol値を低く抑えるからである。すなわち吸入投与時の新奇環境に慣れるためには90分間を要すると考察される。しかし、実際に植物精油を吸入投与する際には、気分が落ち着いているときもあれば、気分が高揚しているときもあるなど様々である。植物精油吸入による情動に及ぼす影響について明確にするためには、吸入条件を考慮する必要があると考える。そこで、本実験では90分間よりも短い60分間の吸入投与におけるヒノキ精油の影響を明らかにするために、ヒノキ精油の抗不安様作用の主要因として考えられる(+)- α -pineneを使用した。吸入時間を30分間繰り上げることで、新奇環境に慣れずにまだ少し興奮状態にあるマウスに対し、(+)- α -pineneを吸入投与した際の影響について検討した。

試料として10 μ L/L airの(+)- α -pineneを用い、測定条件は60分間と90分間の吸入時間の違い以外は前述の抗不安様作用の測定方法と同様に行った。

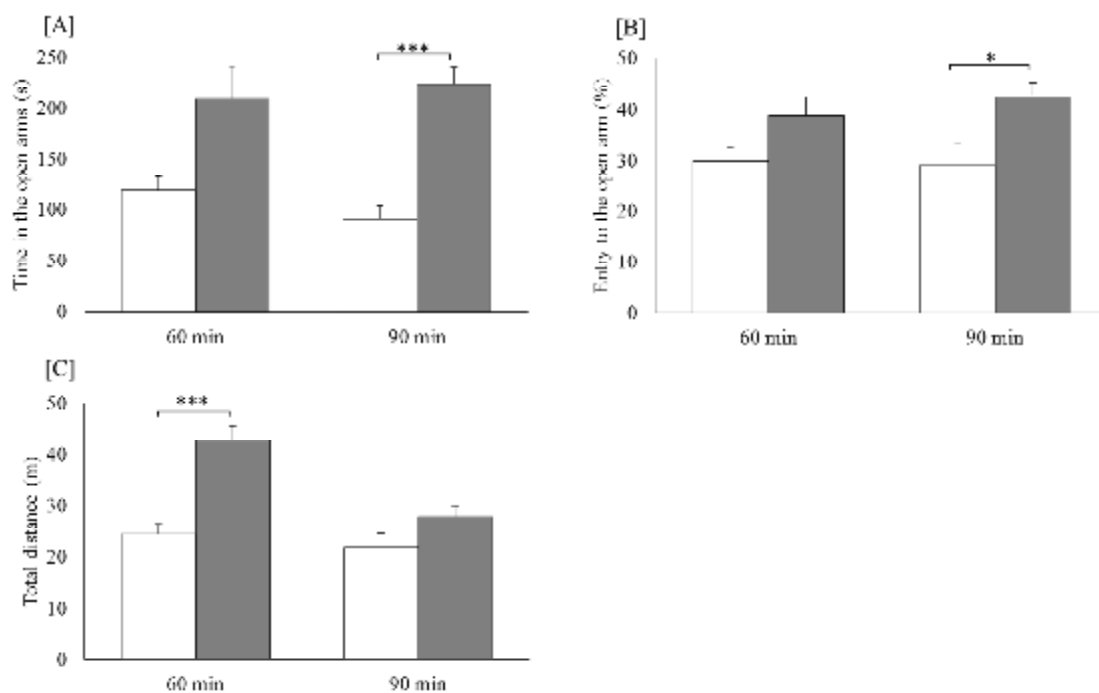


Fig. 12 マウスに対する(+)- α -pinene の吸入投与後の高架式十字迷路試験
 [A]open arm の滞在時間(s)、[B]open arm への侵入率(%)、[C]総移動距離(m) □
 control : 蒸留水(10 μ L/L air)、■ (+)- α -pinene (10 μ L/L air)
 mean \pm SE、 $n = 5$ 、* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ (t -test)

その結果、Fig. 12 に示すように、前述と同様に (+)- α -pinene の 90 分間の吸入投与においては、装置上の総移動距離に影響を及ぼさずに control と比較して open arm の滞在時間と侵入率に有意な増加が認められた ($p < 0.001$, $p < 0.05$)。すなわち 90 分間において 10 μ L/L air の(+)- α -pinene の吸入投与はマウスに対して抗不安様作用を表している。一方で、(+)- α -pinene の 60 分間の吸入投与においては control と比較して open arm の滞在時間と侵入率に有意な変化を示さないことから、60 分間における 10 μ L/L air の(+)- α -pinene の吸入投与はマウスに対して抗不安様作用は認められなかった。さらに、60 分間の吸入投与における装置上の総移動距離は control と比較して有意な増加 ($p < 0.001$) が認められた。すなわち、90 分間の吸入投与においてマウスに対し抗不安様作用を示す(+)- α -pinene も、60 分間では興奮状態を示すことを明らかにした。ゆえに、ヒノキ精油を含めた植物精油の吸入投与による作用は、吸入時間が異なればその作用も全く異なることが考えられる。すなわち、植物精油の効果に記載するには、吸入時間とその効果を明記する必要があることを示している。さらに、

本実験の結果は、60 分間並びに 90 分間と非常に限定した条件である。実際にヒトに適用する際には、吸入時の周囲の環境に対する影響も考慮する必要があると考える。

第 2 項 脳内遺伝子発現量を指標とした吸入時間の影響

前項において、10 $\mu\text{L/L}$ air の(+)- α -pinene の 90 分間の吸入投与では抗不安様作用を、60 分間の吸入投与では興奮様作用を示すこと明らかにした。次に、これらの情動行動の違いについて要因を明らかにするために、情動に深く関与する脳内の遺伝子発現量の測定を行った。脳内における遺伝子発現量に相違が生じれば、そこから生合成されるタンパク質量に影響を及ぼし、結果としてモノアミンなどの神経伝達機構に影響を及ぼすことが考えられる。

前述の抗ストレス作用に関する研究においては *NGFR* と *Arc* 遺伝子を研究対象としたが、本実験では、不安障害と密接な関係にあるうつ症のマーカー遺伝子である脳由来神経栄養因子 (*BDNF*: Brain-derived neurotrophic factor)、自発運動量など運動機能の調節や喜怒哀楽などの情動に関係しているドパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (*TH*: tyrosine hydroxylase) を研究対象とした。なお、*BDNF* 遺伝子発現量は、記憶や不安障害との関わりの深い海馬と吸入投与の影響を明確にするために嗅球を用いて測定を行った。*TH* 遺伝子発現量は、ドパミン神経の投射の元である中脳を用いて測定を行った。

試料は 10 $\mu\text{L/L}$ air の(+)- α -pinene を用い、実験は前述の 60 分間と 90 分間の吸入投与の条件で行い、吸入投与後に速やかに全脳を採取した。採取した全脳は冷却した台の上で分割を行い、中脳、海馬、嗅球を得た[Fig. 13]。得られた各部位について、RT-PCR 法によりそれぞれ *BDNF*、*TH* 遺伝子発現量を測定した。



Fig. 13 マウスの脳の矢状断面図
右側が前方部、左側が後方部となる。本実験で使用した部位を黄色く示す。

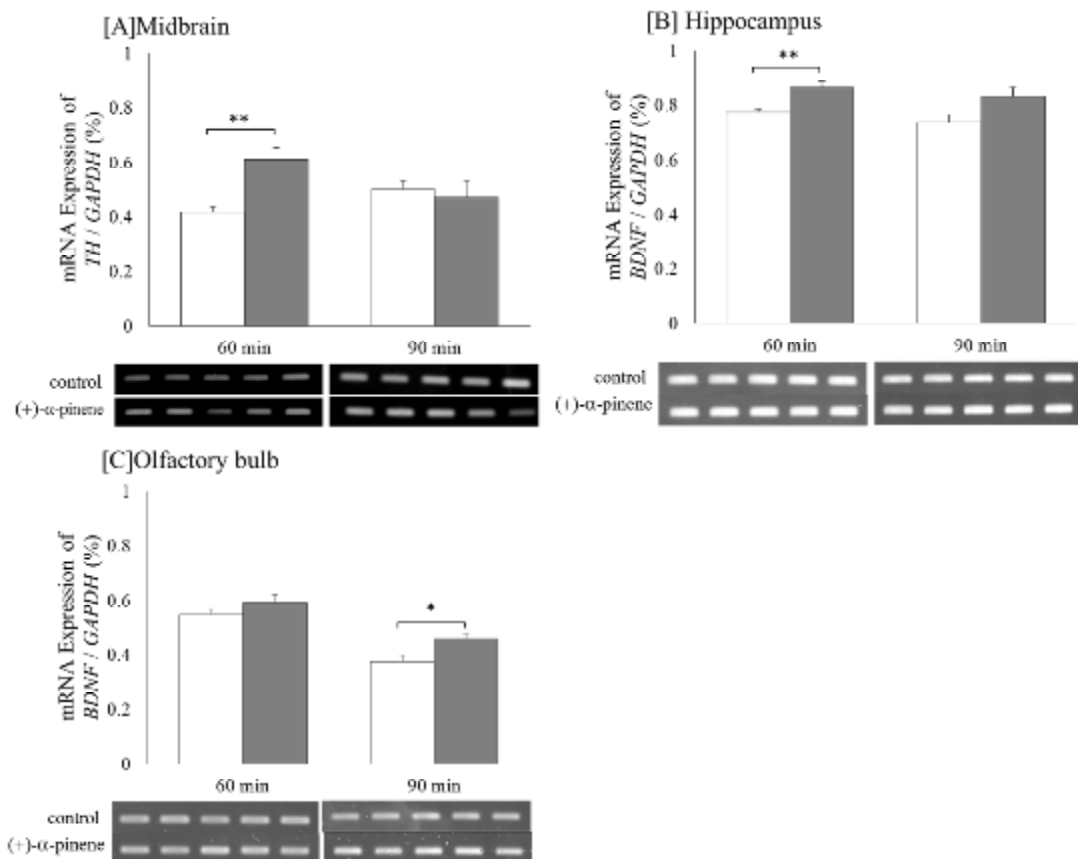


Fig. 14 (+)- α -pinene 吸入投与後の脳内遺伝子発現量及びゲル電気泳動
 [A]中脳における *TH* 遺伝子発現量(%), [B]海馬における *BDNF* 遺伝子発現量(%)
 [C]嗅球における *BDNF* 遺伝子発現量(%), □control: 蒸留水(10 μ L/L air)
 ■ (+)- α -pinene (10 μ L/L air), mean \pm SE, $n = 5$, ** $p < 0.01$ (t -test)

その結果、Fig. 14 に示すように、行動薬理試験において抗不安様作用の認められた 90 分間の 10 μ L/L air の (+)- α -pinene の吸入投与では、control と比較して中脳における *TH* 遺伝子発現量 に有意な変化は認められなかった。ゆえに、吸入投与後の行動薬理試験において自発運動量に影響を及ぼさなかったと考察される。また、海馬における *BDNF* 遺伝子発現量は control と比較して増加傾向を示した。海馬における遺伝子発現量はうつ病との関連性が深いことが知られている⁵⁵。そのため、本実験のような不安を対象とした場合には有意な変化が認められなかったと考える。嗅球における *BDNF* 遺伝子発現量は control と比較して優位な増加が認められた ($p < 0.05$)。嗅覚における *BDNF* 遺伝子発現量は幼児期のおい学習 (においの判別や好き嫌い) に関わる重要な

遺伝子であるとされる⁵⁶、ゆえに(+)- α -pinene の吸入投与による抗不安様作用には、嗅覚受容体を介した嗅覚神経系の関与も十分に考慮される。

一方、行動薬理試験において興奮様作用の認められた 60 分間の 10 μ L/L air の(+)- α -pinene の吸入投与では、control と比較して中脳における *TH* 遺伝子発現量に有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。中脳には、ドパミンを線条体に投射する黒質緻密部と辺縁系や大脳皮質に投射する腹側被蓋野が存在する⁵⁷。すなわち、(+)- α -pinene の吸入投与は脳内のドパミン量を増加させたことで、自発運動量の増加、すなわち興奮様作用につながったと考えられる。また、海馬における *BDNF* 遺伝子発現量は control と比較して優位な増加が認められた ($p < 0.01$)。これはドパミン量の増加に伴う変動であると考えられる。嗅球における *BDNF* 遺伝子発現量は control と比較して優位な変化は認められなかった。

以上のことから、行動薬理試験における自発運動量と中脳における *TH* 遺伝子発現量との間に明確な関連が認められた。ゆえに、(+)- α -pinene を含む植物精油の作用は単に心理的なものだけではなく、脳内遺伝子発現量に変化を生じさせ、情動に影響を及ぼす作用を有する可能性があることを示している。今後は、タンパク質やモノアミンをターゲットとした測定を行うことで、吸入投与における作用機序の一部が明らかになると考える。また、うつ様モデルマウスや異なるストレス負荷試験などを組み合わせることで、海馬における *BDNF* 遺伝子との関係性が明確となり、不安だけでなくうつ病やその他情動に与える影響との関連性も見出すことが可能になる。さらに、においの学習に重要であるとされる嗅覚の *BDNF* 遺伝子との関係性において、抗不安様作用が明らかとなっている植物精油を用いることで、情動行動と嗅覚神経系の関与も明確にできると推測する。

第2節 温度条件の違いが情動に及ぼす影響

第1項 抗不安様作用を指標とした温度条件の影響

植物精油吸入によるマウスに対する抗不安様作用の研究において、植物精油を室温で揮発させる条件⁵⁴や、ライト上などで加温する条件⁵⁸などが報告されている。そして、その作用について議論する場合、両者を混同して取り扱われている。しかし実際には室温条件と加温条件では植物精油の香りの感じ方も異なり、それによりもたらされる作用にも差異が生じることが考えられる。そこで本実験では、温度条件の違いが情動に及ぼす影響を明らかにするために、ヒノキ精油とその抗不安様作用の主要因と考えられる(+)- α -pineneの影響について検討した。

試料としては、8 $\mu\text{L/L}$ airのヒノキ精油と10 $\mu\text{L/L}$ airの(+)- α -pineneを用いた。測定条件は室温条件に加え、植物精油の添加部分(濾紙)をはんだごとと交流変圧器を用いて加温を行うことで、人為的に加温条件を作成した。それ以外の条件は前述の抗不安様作用の測定と同様の方法で行った。

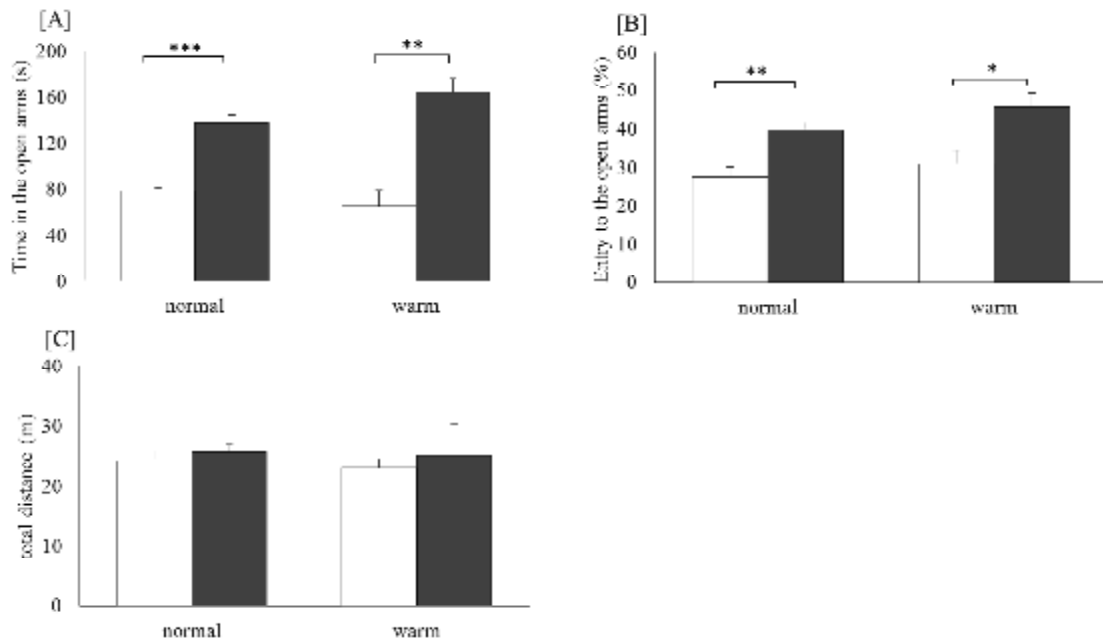


Fig. 15 マウスに対するヒノキ精油の吸入投与後の高架式十字迷路試験
[A]open armの滞在時間(s)、 [B]open armへの侵入率(%)、 [C]総移動距離(m)
normal: 室温条件下、 warm: 加温条件下

□:蒸留水 (1 $\mu\text{L/L}$ air)、 ■:ヒノキ精油 (8 $\mu\text{L/L}$ air)

mean \pm SE、 $n = 5$ 、 * $p < 0.05$ 、 ** $p < 0.01$ 、 *** $p < 0.001$ (t -test)

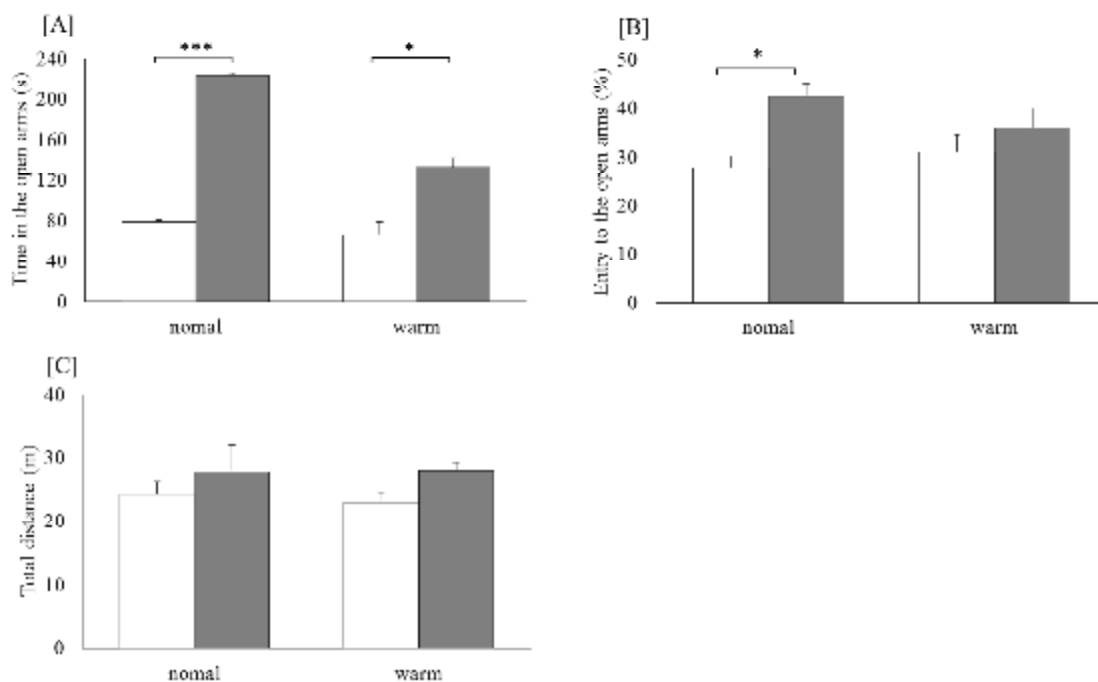


Fig. 16 マウスに対する(+)- α -pinene の吸入投与後の高架式十字迷路試験
 [A]open arm の滞在時間(s)、[B]open arm への侵入率(%)、[C]総移動距離(m)
 normal (室温条件下)、warm (加温条件下)
 □:control (10 μ L/L air)、■: (+)- α -pinene(10 μ L/L air)
 mean \pm SE、 $n = 5$ 、* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ (t -test)

その結果、Fig. 15 に示すように、8 μ L/L air のヒノキ精油の吸入投与は、室温条件下、加温条件下共に総移動距離に有意な増加を示さずに、open arm の滞在時間と侵入率を有意に増加させた。今回の温度条件の相違では、8 μ L/L air のヒノキ精油の吸入投与はマウスに対し抗不安様作用に影響を及ぼさないことを明らかとした。一方、Fig. 16 に示すように、10 μ L/L air の(+)- α -pinene の吸入投与は、室温条件下、加温条件下共に総移動距離に有意な増加を示さずに、open arm の滞在時間と侵入率を増加させたが、加温条件下では有意な増加は認められなかった。

通常、室温条件下よりも加温条件下の方が、より多くの化学成分が揮発するためには作用は強くなることが予想される。ヒノキ精油の場合には予想通りの結果であったが、(+)- α -pinene の場合には加温条件下における作用に低下が認められた。すなわち、(+)- α -pinene において加温条件下では抗不安様作用を示す最適な濃度を越えてしまった、あるいはヒノキ精油と比べ単一化合物であることから揮発分量が予想に反して少なかったことが推察される。

第 2 項 温度条件におけるヒノキ精油の揮発成分

温度条件の違いによるマウスに対する抗不安様作用と揮発成分の関係を明らかにするために、前項と同様の二つの温度条件におけるコンテナ内の揮発成分分析を行った。ヒノキ精油の揮発成分の捕集には MonoTrap[®] を使用し GC/MS、GC/FID により分析を行った。

その結果、ヒノキ精油に関しては Table 3 に示すように、室温条件下において含有率の多い(+)- α -pinene、limonene、myrcene などの分子量の比較的小さいモノテルペン類は、加温条件下において割合が減少した。一方で、室温条件下において含有率の少なかった δ -cadinene、 α -muurolene、 γ -muurolene などの分子量の比較的大きいセスキテルペン類は、加温条件下において割合が増加した。すなわち、加温条件下では(+)- α -pinene の割合が減少しているにも関わらず行動薬理試験において抗不安様作用を示したことは、 δ -cadinene などのセスキテルペン類が抗不安様作用の要因として加わったためではないかと考える。

(+)- α -pinene に関しては、室温条件下では 58.6%であったが、加温条件下では 29.0%と割合が減少した。この背景には加温することでコンテナ内の空気が膨張し、(+)- α -pinene を含んだ空気がコンテナ内から漏れ出たことが考えられる。ゆえに、行動薬理試験において抗不安様作用を低下させたものと考えられる。

以上のことより、ヒノキ精油は室温条件下、加温条件下共に抗不安様作用が認められるが、室温条件下では(+)- α -pinene が、加温条件下では(+)- α -pinene に加えて δ -cadinene などのセスキテルペン類が要因であると考えられる。一方、(+)- α -pinene の場合には、空気の膨張が影響し、予想される作用を得られない場合があると考えられる。すなわち、ヒノキ精油における(+)- α -pinene は揮発し易い反面、温度が高くなると容易に拡散してしまい、吸入投与にが難しいと考える。さらに、本実験の結果をヒトに対して置き換えた場合、密閉した空間においては(+)- α -pinene のような揮発性の高い成分の作用が強く現れるが、開放的な空間においては(+)- α -pinene のような揮発性の高い化学成分と共に δ -cadinene などのセスキテルペン類の作用に強く影響する可能性が考えられる。

Table 3 室温条件下と加温条件下におけるヒノキ精油の揮発成分

Peak No.	Compound	normal		warm		Comparison among %
		mg/L air	%	mg/L air	%	
1	tricyclene	trace	trace	trace	trace	
2	α -thujene	trace	trace	trace	trace	
3	(+)- α -pinene	24.9	58.6	15.9	29.0	down
4	camphene	1.2	2.8	1.2	2.3	down
5	sabinene	1.2	2.8	trace	trace	down
6	β -pinene	1.5	3.4	1.3	2.4	down
7	myrcene	2.3	5.3	1.9	3.5	down
8	<i>p</i> -cymene	1.2	2.9	1.3	2.3	down
9	limonene	2.4	5.7	2.0	3.7	down
10	<i>cis</i> - α -ocimene	trace	trace	trace	trace	
11	γ -terpinene	trace	trace	1.2	2.3	UP
12	terpinolene	1.5	3.5	1.4	2.5	down
13	<i>p</i> -cymenene	trace	trace	trace	trace	
14	borneol	-	-	-	-	
15	terpinen-4-ol	-	-	-	-	
16	<i>p</i> -cymen-8-ol	-	-	-	-	
17	α -terpineol	-	-	-	-	
18	verbenone	-	-	-	-	
19	<i>trans</i> -chrysanthenyl acetate	-	-	-	-	
20	isobornyl acetate	-	-	trace	trace	UP
21	terpinen-4-ol acetate	-	-	trace	trace	UP
22	myrtenyl acetate	trace	trace	trace	trace	
23	δ -elemene	-	-	trace	trace	UP
24	α -cubebene	-	-	trace	trace	UP
25	α -ylangene	-	-	-	-	
26	α -copaene	trace	trace	1.5	2.8	UP
27	β -elemene	1.3	3.1	2.3	4.2	UP
28	sibirene	-	-	-	-	
29	β -caryophyllene	-	-	-	-	
30	β -ylangene	-	-	trace	trace	UP
31	<i>cis</i> -thujopsene	-	-	trace	trace	UP
32	<i>cis</i> -muurola-3,5-diene	-	-	trace	trace	UP
33	<i>trans</i> -muurola-3,5-diene	-	-	trace	trace	UP
34	α -humulene	-	-	-	-	
35	<i>cis</i> -muurola-4(14),5-diene	trace	trace	1.3	2.4	UP
36	<i>trans</i> -cadina-1(6),4-diene	-	-	-	-	
37	γ -muurolene	trace	trace	2.3	4.2	UP
38	germacrene D	trace	trace	-	-	down
39	β -selinene	-	-	1.5	2.7	UP
40	γ -amorphene	trace	trace	1.4	2.6	UP
41	α -muurolene	1.3	3.0	2.9	5.2	UP
42	γ -cadinene	1.2	2.9	2.2	4.0	UP
43	δ -cadinene	1.3	3.2	7.1	13.1	UP
44	<i>cis</i> -calamenene	1.2	2.8	-	-	down
45	<i>trans</i> -cadina-1,4-diene	-	-	-	-	
46	α -cadinene	-	-	-	-	
47	α -calacorene	-	-	1.4	2.6	UP
48	selina-3,7(11)-diene	-	-	-	-	
49	β -calacorene	-	-	-	-	
50	1 α ,10 α -epoxy-amorph-4-ene	-	-	-	-	
51	germacrene D-4-ol	-	-	-	-	
52	gleenol	-	-	-	-	
53	globulol	-	-	trace	trace	UP
54	1,10-di-epi-cubenol	trace	trace	trace	trace	
55	1-epi-cubenol	-	-	1.2	2.2	UP
56	τ -cadinol	-	-	trace	trace	UP
57	τ -muurolol	-	-	trace	trace	UP
58	α -cadinol	-	-	2.0	3.6	UP
59	kongol	-	-	1.5	2.8	UP

trace < 1.0 μ g/L air、 2.0 %、 - : 検出限界未満、 normal : 室温条件下、 warm : 加温条件下

室温条件下における揮発成分の含有率と比べ割合が増加した化学成分を UP

室温条件下における揮発成分の含有率と比べ割合が減少した化学成分を **down** と記す

小括

植物精油の使用方法は様々であるが、中でも吸入投与は、吸入する条件によって揮発する成分が異なり、そこから得られる作用についても違いが生じる可能性が考えられる。そこで本章では、異なる吸入条件における化学成分や情動に及ぼす影響を明らかにするために、ヒノキ精油あるいは(+)- α -pinene を使用し、吸入条件の違いによるマウスに対する情動に与える影響について検討を行った。

(+)- α -Pinene の吸入時間を 60 分間と 90 分間で比較したところ、60 分間吸入投与した群では自発運動量が有意に増加したことから興奮様作用を示すことが明らかになった。このときの脳内の遺伝子発現量について測定した結果、中脳における *TH* 遺伝子発現量に有意な増加が認められた。また海馬における *BDNF* 遺伝子発現量においても有意な増加が認められたことから、中脳におけるドパミン神経系の賦活化により自発運動量が増加したと考えられる。一方、90 分間吸入投与した群では抗不安様作用を示すことが明らかとなり、そして嗅球における *BDNF* 遺伝子発現量において有意な増加が認められた。ゆえに嗅球における *BDNF* 遺伝子発現量の増加が抗不安様作用に関係していると考えられる。

さらに吸入時の温度条件について、室温で揮発させた場合と人為的に加温することで揮発させた場合とを比較したところ、(+)- α -pinene においては加温することで抗不安様作用は認められなかった。しかしながらヒノキ精油においては加温することでも健著な抗不安様作用が認められた。このときの揮発成分について分析を行ったところ、室温で揮発させた場合に比べ(+)- α -pinene の割合が減少したことに対し δ -cadinene などのセスキテルペン類の割合が増加していた。

以上の結果から、吸入時間の違いはマウスに対して興奮様作用と抗不安様作用という全く異なる情動を示すことを明らかにした。そしてヒノキ精油のような多成分系の場合には、異なる温度条件下において揮発成分に差異が生じても見かけ上同様の抗不安様作用を示すことを明らかにした。

医療従事者に信頼されるエビデンスとして、ヒノキ精油や主要因と考えられる(+)- α -pinene の情動に及ぼす影響を提示する際には、60 分間の 10 μ L/L air

の(+)- α -pinene の吸入投与はマウスに対してドパミン神経系の賦活化により興奮様作用を示すこと。90 分間の 10 μ L/L air の(+)- α -pinene の吸入投与はマウスに対して嗅球における *BDNF* 遺伝子発現量の増加の関与により抗不安様作用を示すこと。そして室温条件下における 90 分間の 8 μ L/L air のヒノキ精油の吸入投与はマウスに対して(+)- α -pinene の影響により抗不安様作用を示すこと。加温条件下における 90 分間の 8 μ L/L air のヒノキ精油の吸入投与はマウスに対して(+)- α -pinene を含む δ -cadinene などのセスキテルペン類の影響により抗不安様作用を示すことと記載できる。これらのことは、ヒノキ精油だけに当てはまることではなく、他の植物精油においても同様に実験を行うことで条件付きの効果の表示が可能になると考える。

総括

本研究では、相補（補完）・代替医療の一つであるメディカルアロマセラピーについて、医療従事者に信頼してもらえ科学的根拠を提示するために、日本産ヒノキ精油の科学特性を明らかにすることを目的に研究を行った。そのため、揮発成分を含めたヒノキ精油の化学成分分析、マウスを対象とした吸入投与による情動の一つである不安並びにその要因であるストレスに対する評価、そしてメディカルアロマセラピーにおける使用条件を考慮した吸入時間や温度条件の要素もあわせて検討した。

第 1 章では、ヒノキ精油の化学成分および揮発成分の分析を行った。木曾ヒノキの枝から水蒸気蒸留により得られたヒノキ精油を使用し、GC/MS による定性分析及び GC/FID による定量分析を行った。その結果、17.5%の δ -cadinene をはじめとする α -pinene、 γ -cadinene、 α -muurolene、 τ -muurolol を主要成分とする 59 種の化学成分を同定した。次に、5L のガラス製コンテナ内における揮発成分をシリカゲル素材の MonoTrap[®] を使用して捕集し化学成分分析を行った。その結果、58.6%の α -pinene をはじめとする limonene、myrcene、terpinolene、 β -pinene を主要成分とする 25 種の化学成分を同定した。さらに、ヒノキ精油の主要な揮発成分として検出された α -pinene についてキラル分析を行ったところ、99%以上の割合で(+)- α -pinene であった。ヒノキ精油の化学成分と揮発成分の比較を行ったところ、揮発成分においてモノテルペン類の(+)- α -pinene、limonene、myrcene、terpinolene、 β -pinene の割合が増加した一方で、ヒノキ精油成分に含まれていたセスキテルペン類の δ -cadinene、 γ -cadinene、 α -muurolene、 τ -muurolol の割合が減少していた。以上のことから、ヒノキ精油の揮発成分は (+)- α -pinene をはじめとするモノテルペン類が大部分を占めることが明らかとなった。

植物精油の化学成分の記載には、通常、植物精油を直接成分分析した結果が記載されている。植物精油の使用方法は主に吸入投与とマッサージなどによる塗布が考えられ、塗布の場合には、これまでの植物精油自体の成分分析のデータが重要な意味を持っている。しかし、吸入投与の場合には本研究の結果にもあるように、全ての化学成分が均一に揮発されないことから、植物精油自体の成分分析の結果が実際に当てはまらない可能性がある。ゆえに、植物精油を使

用する側はその点を注意すると共に、製造・販売側は揮発成分やキラリティーを考慮した詳細なデータの提供が必要になると考える。また植物精油を同一品質に保つことは理論上困難であることから、植物精油をメディカルアロマセラピーに応用するためには品質にある程度の幅を設ける必要があると考えられる。その幅を決定するのは、植物精油から得られる作用の度合いであることから、植物精油の化学成分分析と共に作用についても明確にする必要性があると考察する。

第2章ではヒノキ精油吸入による情動に及ぼす影響について、心理作用の影響の少ないマウスを使用した動物実験により検討を行った。

情動には様々な種類が存在するが、精神疾患の中で潜在的な患者数の多いと考えられる不安障害を対象としたため、本研究では情動を不安と定義した。評価方法としては不安関連行動評価である高架式十字迷路試験を使用した。ICR系5週齢の雄マウスを1週間の単独飼育の後、5Lのガラスコンテナ内で90分間ヒノキ精油を吸入させ、10分間の高架式十字迷路試験を行った。測定指標はopen armの滞在時間並びに侵入率とした。その結果、8 $\mu\text{L/L}$ airのヒノキ精油の吸入投与はcontrolである蒸留水と比較して、open armの滞在時間及び侵入率に有意な増加が認められた。ゆえに、ヒノキ精油の吸入投与はマウスに対して抗不安様作用を示すことが明らかとなった。

続いて、不安とその要因の一つであるストレスに対する評価を行った。今回、ストレスの度合いの測定方法としてストレスを感じる初期の現象を捉えることが可能である脳内の遺伝子発現量の変化²⁷に着目した。Masuoら²⁸によってストレス負荷の状態のラットがコーヒーの香りを嗅ぐことによりストレスが軽減したとする報告を参考に、*NGFR*と*Arc*遺伝子を対象とした。実験の流れは抗不安様作用の測定時と同様の方法で行った。行動薬理試験の直後に全脳を採取し、液体窒素を用いて全脳をパウダー化した後、RNAの抽出を行い、RT-PCR法によって遺伝子発現量を測定した。その結果、ヒノキ精油の吸入投与による*NGFR*と*Arc*の遺伝子発現量は、controlである蒸留水と比較して共に有意な増加が認められた。さらに、直前に行った高架式十字迷路試験においてヒノキ精油の吸入投与はcontrolである蒸留水と比較して有意な増加が認められていることから考察し、ヒノキ精油の吸入投与はマウスに対して抗ストレス作用を示すと結論付けた。

吸入投与における作用経路には、鼻腔や肺胞から化学成分が血液中に取り込まれ、脳内に移行し中枢に作用する経路（薬物学的伝達経路）と鼻腔の奥上部にある嗅覚器に作用し、嗅信号として中枢に作用する経路（神経学的伝達経路）の二つが組み合わさっていると考えられる。そこで、植物精油の科学特性を明らかにするためにも、ヒノキ精油吸入により脳内に移行した化学成分について検討を行った。実験方法としては、8 $\mu\text{L/L}$ air のヒノキ精油の吸入投与後に全脳を採取し、*n*-hexane 抽出の後、化学成分分析を行った。その結果、8 $\mu\text{L/L}$ air のヒノキ精油の吸入投与によって、マウスの脳内からは (+)- α -pinene が検出された。その濃度は $57.6 \pm 2.7 \mu\text{g/g tissue}$ であった。この結果は、ヒノキ精油の揮発成分分析における 58.6% の (+)- α -pinene の結果を裏付けるものでもある。

次に、ヒノキ精油の揮発成分の大部分を占め、そしてヒノキ精油を吸入投与させたマウスの脳内から検出された成分である (+)- α -pinene の抗不安様作用について検討を行った。実験方法は、これまでと同様に単独飼育の後、90 分間の吸入投与後、行動薬理試験を行った。その結果、10 $\mu\text{L/L}$ air の (+)- α -pinene の吸入投与は open arm の滞在時間及び侵入率において有意な増加を示したことから、(+)- α -pinene の吸入投与はマウスに対して抗不安様作用を示すことが明らかとなった。すなわち、マウスに対するヒノキ精油の抗不安様作用には、他の微量成分の関与も否定は出来ないが、主要な揮発成分である (+)- α -pinene が影響していると結論付けることができた。

よって、ヒノキ精油の吸入投与はマウスに対して抗不安様作用及び抗ストレス作用を示すことが明らかとなり、これらの作用には、ヒノキ精油の主要な揮発成分である (+)- α -pinene が主に影響していると結論付けた。ゆえに、マウスの抗不安様作用を対象とした場合、ヒノキ精油だけではなく他の植物精油においても (+)- α -pinene が一定量含まれるという規格化が可能であると考察される。

植物精油には独特の香りが存在する。そのため香りの認識としての効果、すなわち神経学的伝達経路が情動に深く関与していると考えられている。しかしながら、植物精油の作用を明確にするためには、心理作用を排除して考える必要がある。今回ヒノキ精油の吸入投与によって、マウス脳内から比較的多量の (+)- α -pinene を検出することができた。このことは、ヒノキ精油の吸入投与が、神経学的伝達経路以外の薬物学的伝達による経路の影響を強く受けている可能

性を示すものであり、ヒノキ精油の吸入投与によるマウスの抗不安様作用と抗ストレス作用は、心理作用ではなく薬理作用によるものと考えられる。

第3章では、メディカルアロマセラピーにおける植物精油の使用方法を考慮して、吸入時間及び温度条件の違いがマウスの情動に及ぼす影響について検討を行った。

吸入時間については、これまで行ってきた90分間の吸入投与に加えて、それよりも短い60分間の吸入投与の2群について検討を行った。実験には90分間の吸入投与において抗不安様作用の明確となった(+)- α -pineneを使用し、実験方法はこれまでと同様に、マウスを1週間単独飼育後、60分間あるいは90分間の吸入投与を行い、高架式十字迷路試験において評価を行った。その結果、90分間の吸入投与において認められていた抗不安様作用は、60分間の吸入投与においては認められなかった。しかし、controlである蒸留水と比較して自発運動量の有意な増加が認められたことから、興奮様作用があることが明らかになった。この相違は、脳内における遺伝子発現量が影響していると考え、うつ病と関連のある神経栄養因子であるBDNF遺伝子と、自発運動量の増加はドパミンの増加による興奮作用が影響していると考えられるため、ドパミン合成の律速酵素であるTH遺伝子を対象とし測定した。遺伝子発現量の測定部位は、嗅覚の関与と情動への影響が強い嗅球を含め、海馬及び中脳を対象とした。(+) - α -pineneの吸入投与直後の各脳部位において遺伝子発現量の測定を行ったところ、90分間の吸入投与では嗅球におけるBDNF遺伝子発現量がcontrolと比較して有意に増加していた。ゆえに(+)- α -pinene吸入投与による抗不安様作用には、薬物学的伝達経路に加えて神経学的伝達経路の関与が示唆された。60分間の吸入投与では海馬におけるBDNF遺伝子発現量がcontrolと比較して有意に増加すると共に、中脳におけるTH遺伝子発現量がcontrolと比較して有意な増加が認められた。このことは、60分間の(+)- α -pineneの吸入投与で生じる興奮様作用には、ドパミン神経の賦活化が関与していると示唆される。さらに、各時間において吸入投与後の脳内に移行した(+)- α -pineneについて分析を行ったところ、60分間吸入投与を行った群において $91.9 \pm 12.1 \mu\text{g/g tissue}$ と大量に脳内に移行していることを明らかにした。ゆえに嗅覚刺激よりも脳内へ移行した成分の違いが興奮様作用をもたらしたと考えられる。

次に、温度条件の違いが情動に及ぼす影響についても検討を行った。一つはこれまで通りの室温条件、もう一つは揮発性の物質を人為的に加熱して揮発を

早めた状態（加温条件）においてマウスの情動に及ぼす影響を検討した。実験条件は、単独飼育の後、90 分間の吸入投与、10 分間の高架式十字迷路試験により評価を行った。その結果、10 $\mu\text{L/L}$ air の(+)- α -pinene の吸入投与は、マウスに対し室温条件において有意な抗不安様作用を示したものの、加温条件下では有意な抗不安様作用を示さなかった。次に 8 $\mu\text{L/L}$ air のヒノキ精油の吸入投与を行ったところ、マウスに対し双方の条件下においても共に有意な抗不安様作用を示した。そこで、加温条件下におけるコンテナ内の揮発成分について測定を行ったところ、室温条件と比較して(+)- α -pinene の割合が半減していた。それと同時に室温条件では割合の低かった δ -cadinene などのセスキテルペン類の割合の増加が認められた。ヒノキ精油の加温条件における抗不安様作用は、(+)- α -pinene に加えて δ -cadinene などのセスキテルペン類が関与していると考えられる。

以上の結果から、単一の成分である(+)- α -pinene は、吸入時間が変わることによって情動に及ぼす影響も異なることを明らかにした。一方、ヒノキ精油は揮発温度が異なっても、他の化学成分との相互作用により、見かけ上の情動に及ぼす影響については変化を及ぼさないことを明らかにした。すなわち、植物精油の作用は、主要な成分に依存している反面、それだけではなく複数の化学成分が組み合わせたり作用を発揮する部分もある。揮発成分を含めた詳細な化学成分分析がその解明に必要であることを本研究により示された。

今回、日本産ヒノキ精油の科学特性について、揮発成分を考慮した化学成分とマウスに対する抗不安様作用と抗ストレス作用の点から明らかにすることができた。また、ヒノキ精油の吸入投与によって、マウスの脳内から比較的多量の(+)- α -pinene を検出することができた。そして、ヒノキ精油の吸入投与による抗不安様作用や抗ストレス作用などの情動に対する作用は明確な薬理作用であると考えられる。さらに、10 $\mu\text{L/L}$ air の(+)- α -Pinene の吸入投与で抗不安様作用を示したことは、ヒノキ精油を含めた植物精油のうち、(+)- α -Pinene が一定量含まれている場合に抗不安様作用を示すことを表しており、これを元に抗不安様作用に対する植物精油の規格化が可能であると考えられる。その一方で、マウスの結果をヒトに直接応用することは困難であることから、植物精油の臨床研究も引き続き行う必要がある。

植物精油の種類は多い。今後は、本研究により行った日本産ヒノキ精油の研究を基に、他の植物精油に対する科学特性の解明に繋がり、植物精油を使用するメディカルアロマセラピーの基礎研究がさらに発展すると考えられる。その結果、メディカルアロマセラピーの基礎研究のエビデンスが蓄積され、医療従事者へのメディカルアロマセラピーの理解や医療分野におけるメディカルアロマセラピーの使用が広がり、最終的には患者の健康へ貢献できることを期待する。

実験の部

第 1 章 ヒノキ精油の化学成分及び揮発成分

本研究では、2010 年 10 月に長野県木曾郡王滝村国有林内で採取されたヒノキ (*Chamaecyparis obtuse* (Siebold et Zucc.) Endl.) の枝を原料とし、水蒸気蒸留法にて抽出された精油をひのき精香株式会社より入手した。

第 1 節 ヒノキ精油の化学成分

試料の作成

n-hexane (和光純薬工業株式会社) 1 mL に希釈した 1 μ L のヒノキ精油を試料とした。

分析条件 I

Claus 500 GC/Claus 500 MS(PerIn Elmer Inc.)にて、非極性キャピラリーカラム DB-5ms (30 m \times 0.25 mm ID, 0.25 μ m, Supelco Inc.) を用いて分析を行った。キャリアガスは Helium を使用し、流量は 1.33 mL/min とした。注入口温度は 250 $^{\circ}$ C で注入モードはスプリットレスモードである。注入量は 1 μ L、昇温条件は 40 $^{\circ}$ C (5 min) \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 280 $^{\circ}$ C (20 min) とした。定性分析には質量分析法 (MS : Mass Spectrometry) を用い、イオン源温度は 230 $^{\circ}$ C、フルスキャンモード (m/z 40-300) で測定した。

同定は EI 法において 70eV で開裂したそれぞれのピークのフラグメントパターンを MS のライブラリである NIST MS Search Version 1.7 (NIST / EPA / NIH Mass Spectral Library) による MS スペクトルの比較、Adams ら³⁸ により提供されている LRI (Linear Retention Index) と実測値から以下の式により求めた LRI との比較、そして標準品との直接比較により行った。RT(Retention Time)は保持時間を表す。

$$\text{LRI} = 100z + 100 \left[\frac{\text{RT}(x) - \text{RT}(z)}{\text{RT}(z+1) - \text{RT}(z)} \right]$$

RT(z) (炭素数 z の直鎖アルカンの保持時間) \leq RT(x) (未知成分 x の保持時間) \leq RT(z+1) (炭素数 z + 1 の直鎖アルカンの保持時間) とする。

使用した標準物質

(+)- α -Pinene、(-)- α -pinene、(+/-)-camphene、 β -pinene、myrcene、*p*-cymene、(+)-limonene、(-)-limonene、 γ -terpinene、terpinolene、borneol、terpinen-4-ol、 α -terpineol、isobornyl acetate、 β -caryophyllene、octane、nonane、decane、undecane、dodecane、tridecane、tetradecane、pentadecane、hexadecane、heptadecane、octadecane、nonadecane、icosane は東京化成工業株式会社より購入した。

分析条件 II

GC-2010 Plus (株式会社島津製作所) にて、非極性キャピラリーカラム DB-5ms (30 m \times 0.25 mm ID, 0.25 μ m, Supelco Inc.) を用いて分析を行った。キャリアガスは helium を使用し、流量は 1.33 mL/min とした。注入口温度は 250 $^{\circ}$ C で注入モードはスプリットレスモードである。注入量は 1 μ L、昇温条件は 40 $^{\circ}$ C (5 min) \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 230 $^{\circ}$ C (20 min) とした。検出器は FID を使用した。検出器の温度は 230 $^{\circ}$ C である。

定量法は絶対検量線法を採用した。標準物質として undecane (東京化成工業株式会社) を使用して検量線を作製した。検出限界は S/N=3 となる濃度で算出し 0.75 g/L、定量限界は S/N=10 となる濃度で算出し 3.0 g/L とした。 $R^2=0.9999$ であることから良好な直線性を示しており、この検量線を用いてヒノキ精油の化学成分の定量を行った。

第 2 節 ヒノキ精油の揮発成分

試料の作成

マウスのいない状態で、5 L のガラス製コンテナに 40 μ L のヒノキ精油をコンテナ内上蓋の濾紙に染み込ませた。コンテナの中にエアープンプ (0.5 L / min ジェックス株式会社製 e~AIR-1000SB) を設置した。エアープンプの先にシリカゲルを素材とする MonoTrap[®] を設置し、90 分後に *n*-hexane (和光純薬工業株式会社) 2 mL で超音波 (本多電子株式会社製 W-170ST) にて 5 分間抽出操作後、遠心機 (株式会社佐久間製作所) により遠心分離 (1500 rpm, 30 分間) を行い、上澄みを試料とした。

分析条件

GC-2010 Plus (株式会社島津製作所) にて、非極性キャピラリーカラム DB-5ms (30 m × 0.25 mm ID, 0.25 μm, Supelco Inc.) を用いて分析を行った。昇温条件等は本章第 1 節と同様である。

キラルカラムを用いた GC/MS による光学異性体の同定

試料の作成

n-hexane (和光純薬工業株式会社) に希釈した 0.1 μL のヒノキ精油もしくは標準品である (+)-α-pinene、(-)-α-pinene を試料とした。

分析条件

ガスクロマトグラフ質量分析計 Clarus 500 GC/Clarus 500 MS (PerkinElmer Inc.) にて、キラルカラム CYCLOSIL-B (30m×0.25mmID, 0.25μm, Agilent Technologies, Inc.) を用いて分析を行った。キャリアガスは Helium を使用し、流量は 1.33 mL/min とした。注入口温度は 230 °C で注入モードはスプリットレスモードである。注入量は 1 μL、昇温条件は 40 °C (5 min) → 5 °C/min → 230 °C (20 min) とした。定性分析には質量分析法 (MS : Mass Spectrometry) を用い、イオン源温度は 230 °C、フルスキャンモード (m/z 40-300) で測定した。

得られた TIC を Fig. 17 に示す。光学異性体の存在比率はピーク面積値より算出した。

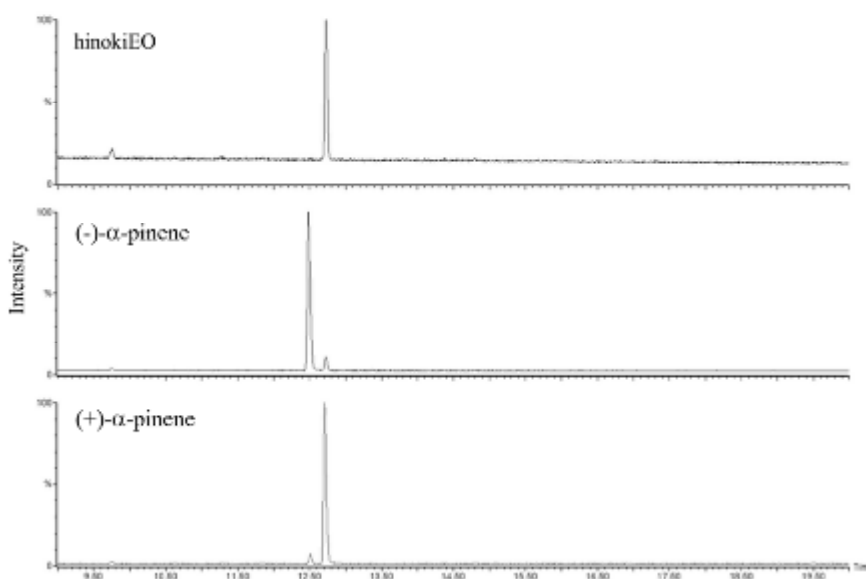


Fig. 17 キラルカラムを用いたヒノキ精油 (hinokiEO)、(-)-α-pinene、(+)-α-pinene の TIC

第2章 ヒノキ精油吸入によるマウスに対する情動に及ぼす影響

第1節 行動薬理試験を用いた抗不安様作用の評価

実験動物

温度 ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、明暗 (明 12 時間 08:00 - 20:00、暗 12 時間 20:00 - 08:00)、摂食飲水自由の条件下で飼育された ICR 系雄マウス (日本クレア株式会社) を実験に使用した。実験は、東邦大学動物実験委員会による動物実験取扱規程に準じて行った。

蒸留水並びにヒノキ精油の吸入方法

直径 55 mm の円形濾紙 (ワットマンジャパン株式会社) を 5 L のガラス製コンテナ (L100 × W250 × H200 mm) の上蓋内側に貼付設置した。マウスをコンテナ内へ投入して上蓋を閉め、30 分間馴らした後、蒸留水 5 μL もしくはヒノキ精油 20 μL 、40 μL 、60 μL を濾紙に染み込ませて 90 分間精油曝露下に置き吸入させた。照度は 200 Lx とした。全ての精油が揮発したとすると、コンテナ内のヒノキ精油濃度は 4 $\mu\text{L}/\text{L air}$ 、8 $\mu\text{L}/\text{L air}$ 、12 $\mu\text{L}/\text{L air}$ となる。

高架式十字迷路試験 (EPM test: Elevated Plus Maze test)

高架式十字迷路は 1985 年に Pellow ら⁴⁸ によって考案された不安水準の評価系である。壁のある二つの close arm と壁のない二つの open arm とが中央部分で交互に交差した迷路を高所に設置した構造をもつ。close arm (200 × 300 × 50 mm) と open arm (300 × 50 mm) からなる迷路をアクリル、close arm の壁を polyethylene terephthalate (PET) を材料として製作し、床から 600 mm の高さに設置した。各アームの照度は 200 Lx とした。マウスが中央の交差部分に置かれ、リリースされることで試験が開始し、その後 10 分間のマウスの行動をウェブカメラ (CMS-V26SETSV/V26SETBK, サンワサプライ株式会社) で記録した。各マウスについて、open arm の滞在時間及び侵入率を行動解析ソフト ANY-maze (Stoelting Co.) を用いて計測した。

第 2 節 脳内遺伝子発現量を指標としたストレスに対する評価

試料として 8 $\mu\text{L/L}$ air のヒノキ精油を使用した。実験条件は、前述の行動薬理試験の方法と同様の方法で行い、その直後に速やかに全脳を採取し試料とした。なお、1 週間の単独飼育と 90 分間の吸入投与と 10 分間の行動薬理試験をマウスにとってのストレス負荷とした。

RT-PCR 法

RNA の抽出

液体窒素を用いて全脳をパウダー状になるまで磨り潰し、マイクロチューブに移した (54-70 mg)。以下の RNA の抽出は RNeasy® Mini kit (QIAGEN Inc.) により行った。1 サンプルにつき QIAzol® Lysis Reagent (QIAGEN Inc.) を 1000 μL 加え 30 秒間ボルテックス (M&S Industries Inc. 製 Vortex Genie-2) を行い、室温で 5 分間インキュベートした。Chloroform (和光純薬工業株式会社) を 200 μL 加え同様にインキュベート後遠心を行った (15000 rpm, 10°C, 15 分間, 株式会社トミー精工製 MRX-150)。上澄み 500 μL を別のチューブに移し、70% Ethanol (和光純薬工業株式会社) を同量加え洗浄後、上澄みをカラムへ移し遠心した (5 秒間, フナコシ株式会社製回転くん Jr.)。さらに RW1 buffer (QIAGEN Inc.) を 350 μL 加え遠心した (14000 rpm, 10°C, 1 分間)。続いて 1 サンプルにつき DNase I (タカラバイオ株式会社) を 10 μL と RDD (QIAGEN Inc.) を 70 μL 混合したものをカラムのメンブレン上へのせ、叩いてしみこませた後室温で 15 分間インキュベートした。再度 RW1 buffer を 350 μL 加え遠心し (14000 rpm, 10°C, 1 分間)、RPE buffer (QIAGEN Inc.) を 500 μL 加え遠心を 2 回行った (13000 rpm, 10°C, 1 回目は 15 秒間, 2 回目は 1 分間)。カラムの上部を別のチューブに移して再度遠心 (15000 rpm, 10°C, 2 分間) を行い、さらにフタのついている別のチューブに移し、RNase free water (タカラバイオ株式会社) を 50 μL それぞれ加えた。その後室温で 1 分間インキュベートし遠心を行った (13000 rpm, 10°C, 1 分間)。

RNA の純度

抽出した RNA は Nano Drop 2000c (Thermo Scientific Inc.) で濃度測定をし、ホルムアルデヒド・アガロース・ゲル電気泳動 (ADVANCE Inc. 製 Mupid-ACE) により RNA の純度を確認した後、-80°C で保存した。

cDNA 合成

Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies Inc.) により以下の操作を行った。1 サンプルにつき Master mix 10 μ L、Oligo(dT) Primer 3 μ L、Affinity Script Black 1 μ L を入れ、RNA と RNA free water は計 6 μ L 中の RNA 量が 1000 ng になるようにした。Applied Biosystems[®] Gene Amp[®] PCR System 9700 (Life Technologies Inc.) にかけた。設定は 25 $^{\circ}$ C (5 分間) \rightarrow 42 $^{\circ}$ C (5 分間) \rightarrow 55 $^{\circ}$ C (40 分間) \rightarrow 95 $^{\circ}$ C (5 分間) \rightarrow 4 $^{\circ}$ C である。その後、滅菌蒸留水 (SDW) を 30 μ L 加えて 50 μ L とした。

遺伝子の増幅

1 サンプルにつき、各サンプルの cDNA 1 μ L、プライマー各 1 μ L、SDW 7 μ L、Emerald Amp[®] PCR Master Mix (タカラバイオ株式会社) を 10 μ L 加え、Applied Biosystems[®] Gene Amp[®] PCR System 9700 にかけた。初期変性 97 $^{\circ}$ C (5 分間) 後、95 $^{\circ}$ C (45 秒間) \rightarrow 55 $^{\circ}$ C (45 秒間) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C (1 分間) のサイクルを *GADPH* (28 回)、*NGFR* (35 回)、*Arc* (28 回) 繰り返した後、72 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた。PCR 後、1.6% アガロース・ゲルと TAE buffer (和光純薬工業株式会社) を用いて 1 レーンに 3 μ L ずつ注入し電気泳動した (100 V、18 分間、ADVANCE Inc. 製 Mupid-2X)。臭化エチジウム (ナカライテスク株式会社) 染色の後、バンドは ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Inc.) で可視化し定量した。尚、各遺伝子のプライマーは Primer3 を用いてデザインした後、OPERON 社製を使用した。

GADPH Forward: 5'-GCTACACTGAGGACCAGGTTGT-3'

Reverse: 5'-CTCCTGTTATTATGGGGGTCTG-3'

NGFR Forward: 5'-GCAAATAAACAAGGAGCCAAC-3'

Reverse: 5'-AGTCTATATGCTCCGGCTGGTA-3'

Arc Forward: 5'-TGATCCTGCAGATTGGTAAGTG-3'

Reverse: 5'-TCTCCAGACGGTAGAAGACCTC-3'

第 3 節 化学成分の脳内への移行性

試料として 8 $\mu\text{L/L}$ air のヒノキ精油を使用した。実験条件は、前述の行動薬理試験の方法と同様の方法で行い、その直後に全脳を速やかに採取し試料とした。試料について *n*-hexane により抽出を行い、GC/MS、GC/FID により化学成分分析を行った。

第 4 節 (+)- α -pinene 吸入による抗不安様作用

試料として 10 $\mu\text{L/L}$ air の(+)- α -Pinene（東京化成工業）を使用した。実験条件は、前述の行動薬理試験と同様の方法で行った。

第 3 章 吸入条件の違いがマウスに対する情動に及ぼす影響

第 1 節 吸入時間の違いが情動に及ぼす影響

第 1 項 抗不安様作用を指標とした吸入時間の影響

試料として 10 $\mu\text{L/L}$ air の(+)- α -pinene（東京化成工業）を使用した。実験条件は、前述の行動薬理試験と同様の方法で行った。

第 2 項 脳内遺伝子発現量を指標とした吸入時間の影響

試料として 10 $\mu\text{L/L}$ air の(+)- α -pinene（東京化成工業）を使用した。実験条件は、前述の行動薬理試験の方法と同様で、その直後に速やかに全脳を採取し、さらにその全脳を冷却した台の上で、嗅球、前頭皮質、大脳皮質、線条体、中隔、海馬、視床、視床下部、中脳、小脳、延髄の 11 に分画した、試料としては、その中の嗅球、海馬、中脳を使用し、遺伝子発現量の測定を前述と同様の RT-PCR 法で行った。なお、使用したプライマーは以下の通りであり、Thermal Cycler におけるサイクル数は *GADPH* が 25 回、*TH* が 24 回、*BDNF* が嗅球で 25 回、海馬で 26 回行った。

GADPH Forward: 5'-GCTACACTGAGGACCAGGTTGT-3'
Reverse: 5'-CTCCTGTTATTATGGGGGTCTG-3'
TH Forward: 5'-AAGCCAAAATCCACCACTTAGA-3'
Reverse: 5'-GCTTGTATTGGAAGGCAATCTC-3'
BDNF Forward: 5'-AGCTGAGCGTGTGTGACAGTAT-3'
Reverse: 5'-CTTCCCCTTTTAATGGTCAGTG-3'

第 2 節 温度条件の違いが情動に及ぼす影響

第 1 項 抗不安様作用を指標とした温度条件の影響

ヒノキ精油と(+)- α -pinene を人為的に加熱し揮発させる方法として、はんだごとと交流変圧器（株式会社東京理工舎）を使用した。はんだごとてに巻いたろ紙の表面温度は 100 °C となるように設定することで、コンテナ内を加温条件とした。実験条件は、前述の行動薬理試験と同様の方法で行った。

第 2 項 温度条件におけるヒノキ精油の揮発成分

加温条件下におけるコンテナ内の揮発成分分析については、前述の加温条件下と同様に MonoTrap[®]を使用した方法で化学成分を捕集し、GC/MS、GC/FID により化学成分分析を行った。

統計処理

全ての結果は平均値±標準誤差で表した。control を含む 3 群以上の比較は、one-way ANOVA 及び、Dunnett の検定により行った。control を含む 2 群の比較は F 検定の後、Student の *t* 検定により行った。これらの解析は統計ソフト R version 2.15.2 (<http://www.r-project.org/>) を使用して行った。

謝辞

本研究の機会を与えてくださり、終始温かくご指導してくださいました東邦大学薬学部生薬学教室 小池一男教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、終始熱く、直接ご指導頂き、数多くの有益なご助言をくださいました東邦大学薬学部生薬学教室 佐藤忠章講師に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数多くの有益なご助言をくださいました東邦大学薬学部生薬学教室 李巍准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、脳内遺伝子発現量の研究においてご指導いただきました終始熱く、直接ご指導頂き、数多くの有益なご助言をくださいました東邦大学理学部神経科学教室 増尾好則教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、貴重な精油を提供してくださり、芳香療法について数多くの有益なご助言をくださいましたひのき精香株式会社 吉川正樹氏、グリーンフラスコ代表、東邦大学客員講師 林真一郎氏に厚く御礼申し上げます。

実験動物であるマウスを管理、飼育してくださいました東邦大学薬学部動物センターのみなさまに御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多大なご協力をいただきました、東邦大学薬学部生薬学教室 田中まち子博士、宮川三千世修士、佐々木佳苗氏・浅沼千尋氏・山中綾子氏・小牟禮円香氏・舘野満梨奈氏・星 知美氏・御園亜津子氏・進藤宏昭氏・石橋歩弥氏・黒田奈帆氏・田澤理恵氏・前田和美氏・早坂裕美氏・茂呂有紗氏・行宗千裕氏・渡邊公絵氏・稲見健太氏・小野久留美氏・川崎水南氏・日下部芽衣氏・小林彩香氏・大森あゆみ氏・飯田紗由香氏・小川優子氏・加藤陽世氏・坂井百合恵氏・日吉美紗稀氏・宮崎徹氏・八神佳美氏、東邦大学薬学部臨床病態学教室 高橋瑞穂講師、東邦大学理学部神経科学教室 秦絵里香氏・岡田成美氏・久保原美佳氏に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] 日本アロマセラピー学会 編. (2008) 『アロマセラピー標準テキスト基礎編』丸善出版 pp2-11.
- [2] ルネ= モーリス・ガットフォセ 著、ロバート・ティスランド 編著 (前田久仁子 訳) (2006) 『ガットフォセのアロマセラピー』フレグランスジャーナル社 pp3-12.
- [3] 海老原 覚. アロマによる高齢者医療への挑戦—誤嚥・転倒予防. (2013) *Aroma research*. 54(14) 168-171.
- [4] 木村 有希、綱分 信二、谷口 美也子、斎藤 潤、北浦 美貴、細田 理恵子、米原 あき、長谷川 順子、児山 憲恵、清水 百合子、森本 靖子、頼田 孝男、小嶋 良平、浦上 克哉. (2005) アルツハイマー病患者に対するアロマセラピーの有用性. *Demectia Japan*, 19(1) 77-85.
- [5] 三上 杏平 著. (2012) 『エッセンシャルオイル総覧 第2版』フレグランスジャーナル社 pp26-34.
- [6] Mark B, Werner RB. (1998) *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Thieme Medical Pub.
- [7] Marriot PJ, Shellie R, Cornwell C. (2001) Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A*. 936(1-2) 1-22.
- [8] Baser KHC, Buchbauer. G. (2009) *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC press. pp677-729.
- [9] 外池 光雄 著. (2011) 『匂いとヒトの脳』フレグランスジャーナル社 pp34-54. pp55-97.
- [10] 趙 炫珠、李 宙營、藤井 英二郎. (2007) 「オリエンタルハーブの香りの生理・心理的効果の脳血液動態及び SD 法による解析」『環境情報科学論文集』 21 207-212
- [11] 八木 俊衣、田島 幸信、廣濱 秀次、肥田 不二夫、小林 郁夫、川嶋 賢一、新里 昭保、吉岡 利忠. (2008) 「香りが心拍動リズムの動揺に与える影響」『宇宙航空環境医学』 45(1) 11-16
- [12] マリア・リス・バルチン 著 (田邊和子、松村康生 監訳) (2011) 『アロマセラピーサイエンス』フレグランスジャーナル社 pp1-8.
- [13] 日本薬理学会 編. (2010) 『実践行動薬理学』金芳堂 pp11-19, pp43-52

- [14] Umezu T, Nagano K, Ito H, Kosakai K, Sakaniwa M, Morita M. (2006) Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 85(4) 713-721.
- [15] 梅津 豊司.(2009) 「精油の中樞薬理作用の研究と最新動向」『アロマセラピー学雑誌』 9(3) 1-20.
- [16] Umezu T. (2012) Evaluation of the Effects of Plant-derived Essential Oils on Central Nervous System Function Using Discrete Shuttle-type Conditioned Avoidance Response in Mice. *Phytotherapy Research*. 26(6) 884-891.
- [17] Buck L, Axel R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*. 65(1)175-187.
- [18] Zhao H, Ivic L, Otaki JM, Hashimoto M, Mikoshiba K, Firestein S. (1998) Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science*. 279(5348) 237-242.
- [19] Bulger M, van Doorninck JH, Saitoh N, Telling A, Farrell C, Bender MA, Felsenfeld G, Axel R, Groudine M.(1999) Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human beta-globin loci: the beta-globin genes are embedded within an array of odorant receptor genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(9) 5129-5134.
- [20] Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusui T, Mori K, Sakano H. (2007) Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature*. 450(7169) 503-508.
- [21] Yamaguchi M, Mori K. (2005) Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(27) 9697-9702.
- [22] Mori K, Takahashi YK, Igarashi KM, Yamaguchi M. (2006) Maps of odorant molecular features in the Mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev*. 86(2) 409-433.
- [23] Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R. (2011) Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(20) 8479-8484.
- [24] 井上 猛. (2012) 「不安障害の薬物療法」『精神神経学雑誌』 114(9) 1085-1092.

- [25] 秦 多恵子、伊藤 栄次、西川 裕之. (2000) 「ストレスと不安と脳内物質」
『日本薬理学雑誌』 115(1) 13-20.
- [26] Lim SJ, Kim C. (2014) Effects of autogenic training on stress response and heart rate variability in nursing students. *Asian Nursing Research (Korean Society of Nursing Science)*. 8(4) 286-292.
- [27] Hirano M, Shibato J, Rakwal R, Kouyama N, Katayama Y, Hayashi M, Masuo Y. (2009) Transcriptomic analysis of rat brain tissue following gamma knife surgery: Early and distinct bilateral effects in the un-irradiated striatum. *Molecules and Cells*. 27(2) 263-268.
- [28] Seo HS, Hirano M, Shibato J, Rakwal R, Hwang IK, Masuo Y. (2008) Effects of coffee bean aroma on the rat brain stressed by sleep deprivation: A selected transcript- and 2D gel-based proteome analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(12) 4665-4673.
- [29] Murakami S, Matsuura M, Satou T, Hayashi S, Koike K. (2009) Effects of the Essential Oil from Leaves of *Alpinia zerumbet* on Behavioral Alterations in Mice. *Natural Product Communications*. 4(1) 129-132.
- [30] Satou T, Matsuura M, Takahashi M, Umezu T, Hayashi S, Sadamoto K, Koike K. (2011) Anxiolytic-like effect of essential oil extracted from *Abies sachalinensis*. *Flavour and Fragrance Journal*. 26(6) 416-420.
- [31] Satou T, Miyahara N, Murakami S, Hayashi S, Koike K. (2012) Differences in the effects of essential oil from *Citrus junos* and (+)-limonene on emotional behavior in mice. *Journal of Essential Oil Research*. 24(5) 493-500.
- [32] 谷田貝 光克 著. (2011) 『文化を育んできた木の香り』フレグランスジャーナル社 pp58-72.
- [33] Hong EJ, Na KJ, Choi IG, Choi KC, Jeung EB. (2004) Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27(6) 863-866.
- [34] Lee JH, Lee BK, Kim JH, Lee SH, Hong SK. (2009) Comparison of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from three: conifer trees; *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, and *Chamaecyparis obtusa*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19(4) 391-396.

- [35] Yang JK, Choi MS, Seo WT, Rinker DL, Han SW, Cheong GW. (2007) Chemical composition and antimicrobial activity of *Chamaecyparis obtusa* leaf essential oil. *Fitoterapia*. 78(2) 149-152.
- [36] Takao Y, Kuriyama I, Yamada T, Mizoguchi H, Yoshida H, Mizushima Y. (2012) Antifungal properties of Japanese cedar essential oil from waste wood chips made from used sake barrels. *Molecular Medicine Reports*. 5(5) 1163-1168.
- [37] Bae D, Seol H, Yoon HG, Na JR, Oh K, Choi CY, Lee DW, Jun W, Youl Lee K, Lee J, Hwang K, Lee YH, Kim S. (2012) Inhaled essential oil from *Chamaecyparis obtusa* ameliorates the impairments of cognitive function induced by injection of beta-amyloid in rats. *Pharmaceutical Biology*. 50(7) 900-910.
- [38] Adams RP. (2007) *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. (4th ed.). Allured. Carol Stream, IL.
- [39] Nozoe, T. (1936) Dye of the wood of the "Hinoki" tree. I. Hinokitin and hinokitiol. Preliminary note. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 11(3) 295-298
- [40] Inamori Y, Morita Y, Sakagami Y, Okabe T, Ishida N. (2006) The excellence of Aomori Hiba (*Hinokiasunaro*) in its use as building materials of Buddhist temples and Shinto shrines. *Biocontrol Science*. 11(2) 49-54.
- [41] Nakatsuka T. (1953) The occurrence of hinokitiol in the wood of *Thuja Standishii* CARR. *Journal of the Japanese Forestry Society*. 35(9) 291-292.
- [42] 澁谷 栄. (2008) 「抽出成分による木材の生物劣化抵抗性」『木材保存』 34(2) 48-54.
- [43] 今森 光彦. (2008) 『神さまの森、伊勢』小学館 pp2-32.
- [44] Shieh B, Iizuka Y, Matsubara Y. (1981) Monoterpenoid and sesquiterpenoid constituents of the essential oil of hinoki (*Chamaecyparis obtusa* (Sieb. et Zucc.) Endl.). *Agricultural and Biological Chemistry*. 45(6) 1497-1499.
- [45] Chen YJ, Lin CY, Cheng SS, Chang ST. (2011) Phylogenetic Relationships of the Genus *Chamaecyparis* Inferred from Leaf Essential Oil. *Chemistry & Biodiversity*. 8(6) 1083-1097.
- [46] Murakami S, Li W, Matsuura M, Satou T, Hayashi S, Koike K. (2009) Composition and seasonal variation of essential oil in *Alpinia zerumbet* from Okinawa Island. *Journal of Natural Medicines*. 63(2) 204-208.

- [47] Satou T, Takahashi M, Kasuya H, Murakami S, Hayashi S, Sadamoto K, Koike K.(2013) Organ accumulation in mice after inhalation of single or mixed essential oil compounds. *Phytotherapy Research*. 27(2) 306-11.
- [48] Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 14(3) 149-167.
- [49] 山口 拓、富樫 広子、松本 真知子、吉岡 充弘. (2005) 「高架式十字迷路試験を用いた不安水準の評価とその応用」『日本薬理学雑誌』126(2) 99-105.
- [50] 鬼頭 裕子、林 明美、岩田 四郎. (1980) 「マウスの尿中成分について」『金城学院大学論文集』19 1-7.
- [51] 加藤 克紀. (2006) 「マウスのオープンフィールド行動に対する社会的隔離の影響」『動物心理学研究』56(1) 11-18.
- [52] 森信 繁. (2013) 「エピジェネティクスからみたうつ病の病態」『精神神経学雑誌』115(11) 1101-1112.
- [53] 森信 繁、淵上 学、山脇 洋輔、山本 茂人、倉田 明子、山脇 成人. (2010) 「うつ病の新たなメカニズム-エピジェネティクス」『精神神経学雑誌』112(10) 986-991.
- [54] Komiya M, Takeuchi T, Harada E.(2006) Lemon oil vapor causes an anti-stress effect via modulating the 5-HT and DA activities in mice. *Behavioural Brain Research*. 172(2)240-249.
- [55] 吉村 玲児、杉田 篤子、堀 輝、中野 和歌子、林 健司、香月 あすか、上田 展久、中村 純. (2010) 「神経栄養因子 BDNF 仮説の検証」『精神神経学雑誌』112(10) 982-985.
- [56] 奥谷 文乃、張 敬姫、椛 秀人. (2002) 「嗅球内 BDNF 注入はにの学習を促進する」『日本味と匂学会誌』9(3) 655-658.
- [57] 有田 秀穂著. (2006) 『脳内物質のシステム神経生理学』中外医学社 pp96-129.
- [58] Takemoto H, Omameuda Y, Ito M, Fukuda T, Kaneko S, Akaike A, Kobayashi Y. (2014) Inhalation administration of valerena-4,7(11)-diene from *Nardostachys chinensis* roots ameliorates restraint stress-induced changes in murine behavior and stress-related factors. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 37(6) 1050-1055.