

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

（平成 25 年 5 月 24 日現在）

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380094

研究課題名（和文）サイプレス材精油の匂い刺激による代謝物質の網羅的解析と肥満抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文）Exhaustive analysis of metabolic substances by olfactory stimulus of cypress essential oil and anti-obese mechanism

研究代表者

光永 徹（MITSUNAGA TOHRU）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20219679

研究成果の概要（和文）： サイプレス材精油(CEO)を吸入した高脂肪食で飼育したマウスの肥満抑制効果が認められた。その作用機構を解明するために、CEO の匂い刺激を与えたラットの肩甲骨間褐色脂肪組織支配の交感神経活動(BSNA)を測定した。CEO は成分分画の結果、(-)-Citronellic acid (CA), guaiol, α , β -, γ -eudesmol 混合画分 (GE), guaiol (G) and β -eudesmol fraction (E)の各画分を得た。それらの BSNA を測定したところ、CA は全く活性に影響しなかったが、GE 画分および G は BSNA の活動を大きく亢進する事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Inhaling Cypress Essential Oil (CEO) showed anti-obese effect of mice breeding with high fat diet. In order to clarify the mechanism of CEO on anti-obesity of mouse we examined whether the olfactory stimulation with CEO excites sympathetic nerves innervating the interscapular brown adipose tissue in rats by using electrophysiological methods. (-)-Citronellic acid (CA), guaiol, α , β -, γ -eudesmol mixture fraction (GE), guaiol (G) and β -eudesmol fraction (E) were obtained by liquid-liquid partition, preparative HPLC and column chromatography from CEO. The sympathetic nerve activity on brown adipose tissue (BSNA) was measured in anesthetized rat. When olfactory stimulations with CEO, GE, G, E suspended in 100 volumes of water were performed, the BSNA significantly elevated respectively, but CA has no changes. These results show that olfactory stimulation with CEO enhances BSNA and the active ingredients were guaiol and β -eudesmol.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2011 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：抽出成分・微量成分

1. 研究開始当初の背景

植物は古来より、木材、燃料、紙、飲料、食品、煎じ薬、防腐剤、殺虫剤など、人々の

社会生活に密接に関わっていることは周知の事実である。植物の香り成分もその一つであり、古代エジプトのミイラの製造に欠かせ

ない^{もつやく}没薬や聖徳太子が好んだ香木など神事や神聖な時と場所において不可欠なものであるばかりでなく、伝統的な精神疾患の治療薬として世界の各地域で生まれ今なお発展し続けている。

現在ではハーブや果実から抽出した精油を嗅いだり、浴槽に入れたり、体に塗ったりすることで、リラクゼーションやストレスケア、美容、健康維持、疲労回復さらには疾病予防などアロマセラピーとして馴染み深い。その具体的な効能を挙げると、ラベンダーは鎮静・鎮痛効果、ペパーミントは胃腸機能改善・収斂効果、ローズはホルモン調節効果があるとされている。これらの効能は、体温、血圧、保水性などの体内環境恒常性を自動的に制御している自律神経系に作用して働くと考えられている。またグレープフルーツの主要成分であるリモネンの吸入が、麻酔下ラットにおいて視床下部を介して褐色脂肪組織の交感神経を活性化し、脂肪のエネルギーを熱として発散するため、肥満抑制効果につながると報告している。このように、様々な植物由来の成分に関する研究・探索が行われているが、それらの対象は主に果皮、果実、葉、花由来の精油に関するものが多い。一方、豊富なバイオマスを持つ高等植物の樹木およびその加工材料の木材に関しては、建築用材やパルプ用材などへの利用は確立されているものの、その精油の利用に関する実用化研究は多くない。しかしながら、近年の森林浴概念の定着とともに、木材の揮発成分が生体に及ぼす影響など、様々な実証的研究も散見されるようになってきた。

2. 研究の目的

最近、我々はマウスやラットを用いた実験において、ヒノキ科樹木の一つであるホワイトサイプレスの心材に含まれる精油（CEO）の香気成分雰囲気下で飼育したマウスの体重、血清中および肝臓中のトリグリセライドとトータルコレステロールがコントロール群に比べて減少することを見出し、この匂い成分に肥満抑制効果があると考察した。さらに、麻酔下ラットにCEOおよびその分画物を吸入させたときの肩甲骨間褐色脂肪組織の交感神経活動に及ぼす影響と肥満抑制効果に寄与する成分の特定を試みたところ、興

味深い新しい知見を得ることができた。

本報告書では、平成22年から24年の間に得られたCEOの吸入によるマウスおよびラットの肥満抑制効果に関する基礎知見について報告する。

3. 研究の方法

(1) 精油の蒸留分別・GCMS分析

オーストラリア森林研究所から入手した、サイプレス材熱トルエン抽出物から精油定量装置を用いて水熱蒸留により、初留(HVF)、中留(MVF)、後留(LVF)の留分を得る。これら精油の分析は研究室既存のGCMSで行った。

(2) 成分単離と構造解析

効果のあった留分は、主にシリカゲルカラムクロマトグラフィーで活性成分を分画し、逆相分取HPLCにて単離した後、岐阜大学分析センター保有のFAB-MSおよび高分解能NMRで構造解析した。

(3) 精油雰囲気下におけるマウスの飼育

通常Wistar系ddyマウスおよび肥満モデルマウスob/obマウスを25℃、12時間のライトサイクル(7:00-19:00)で飼育し、飼料および水は自由摂取とする。マウスの飼料は高脂肪食餌として、基礎飼料+コレステロール粉末+ラード+コール酸ナトリウムを調製する。対照飼料は高脂肪食餌のラードを除いて他はすべて同じにする。1週間の予備飼育の後、各留分の精油を水で1000倍希釈した精油溶液にポンプで空気を送り、そのヘッドスペースガスを飼育用ゲージに揮散し、4週間25℃下で本飼育する。飼育期間は、獣医学教育の備品である、摂食、飲水、行動量同時解析システムで各項目を測定した。

(4) 肥満抑制因子物質の定量

飼育終了後ただちに解剖し、心臓大動脈から採血する。血清は使用するまで凍結保存する。肝臓および精巣周辺の脂肪組織を摘出し、重量測定後使用するまで凍結保存する。血清中の総コレステロール(TC)、トリグリセライド(TG)をそれぞれの市販キットを用いて定量した。

(5) 交感神経活動の測定

体重約300gのWistar系雄ラットをウレタン麻酔下で開腹し、交感神経を露出する。活

動測定する交感神経は精巣周辺の白色脂肪支配のものと同様に肩胛骨周辺の褐色脂肪支配の2種類について行う。神経枝を切断し、中枢側から神経フィラメントを分離して電極にセットし、遠心性神経活動を磁気テープに記録した。さらにパワーラボシステムを用いて、5秒ごとのスパイク数を連続カウントし、経時変化を記録した。サイプレス材精油画分を100倍、1000倍、10000倍に蒸留水で希釈攪拌し、サスペンションとして使用し、サスペンションの入ったビーカーにラットの鼻を近づけ匂い刺激を10分間行った後の神経活動を計測した。

(6) 褐色脂肪組織の熱産生測定

サイプレス材精油の匂い刺激による褐色脂肪細胞からの熱産生を測定した。

4. 研究成果

(1) CEO の脂質代謝に与える影響

我々はホワイトサイプレスのチップ上または板材上で飼育したマウスの血清中のトリグリセライド(TG)がコントロール群に対し有意に減少することを見出した。そこで、その効果がサイプレス材の香り成分すなわち精油にあるのではないかと考え、精油を嗅がせたマウスおよびラットについて血中および肝臓中の脂質の代謝を調べた。

サイプレス材から木粉を調製し、水蒸気蒸留によって精油を得た。精油を界面活性剤と共にイオン水に加え、0.1%濃度の精油エマルジョンを調製した。精油エマルジョンはガラス製容器に入れ、ポンプでバブリングし、ヘッドスペースガスを飼育ゲージに送った。餌は基礎飼料(コントロール群)に対し豚脂20%含む高脂肪食(高脂肪食群)とし、25°Cで6週間飼育した後、血清の全コレステロール(TC)、TGを定量した。その結果6週間後のマウスの体重増加は、高脂肪食群がもっとも大きく精油群はそれより有意に少なかった。これは精巣周辺の白色脂肪組織重量の減少を伴った結果と考えられる。飼育期間を通して摂餌量にはほとんど差はなかったため、精油を嗅ぐことによる摂食障害はないと判断した。血清および肝臓中のTG量は、精油群は高脂肪食を与えているにもかかわらずTGが有意に減少していることが判る。加えて、

肝臓の色が高脂肪食群はかなり白色化したのに対し、精油群ではコントロール群とほぼ同様な赤みを呈していた。

(2) CEO 分画物の脂質代謝に及ぼす影響

SPMEにより吸着したCEOの揮発成分のGC-MS分析結果と主要化合物の構造を図1に示す。主要化合物として揮発性の高いモノテルペンである(-)-シトロネール酸、セスキテルペンアルコールのグアイオール、 α -、 β -、 γ -オイデスマールおよび比較的揮発性の低いジヒドロコルメラリン、コルメラリンなどの含酸素セスキテルペンを含む事がわかる。

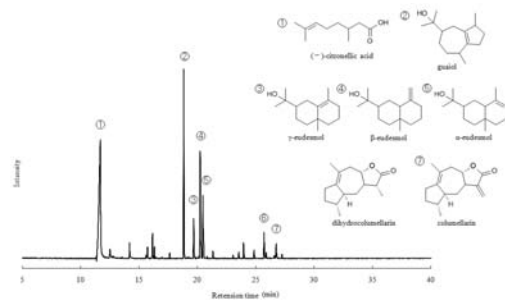


図1 CEO揮発成分のGCMS分析と構造

酸・塩基による液-液分配で、酸性画分に(-)-シトロネール酸(CA-2画分)を90%以上の純度で、中性・フェノール性画分はシリカゲルカラムにより、グアイオール、 α -、 β -、 γ -オイデスマール共存画分(GE画分)をそれぞれ得た。 β -eudesmolを多く含む生薬の蒼朮から精油を調製し、シリカゲルカラムにより β -eudesmolを85%以上含む画分(E画分)を得た。また、グアイオール(G画分)はCEOから結晶化によって直接得た。これらの各分画成分を用いて(E画分は試料量が少ないため除く)、3-2と同様な実験を行った。予備飼育一週間後に香りを嗅がせ、52日間飼育した。飼育終了後に摘出した肝臓を観察した。高脂肪食群(HFD)ではかなり白色化し、CA-2画分もほぼ同様な白色化を示した。一方、GE画分とG画分では白色化は認められず、特にGE画分は標準食を与えたコントロールの肝臓色と遜色なかった。また肝臓中のTG量は、GE群では他の群に比べ有意にTG量が減少した。血中でのTG量も同様の傾向を示したことをあわせて考察すると、CEOの揮発成分を吸入することで、食餌から得られる脂肪が分解され、その結果血中や肝臓中での中性

脂肪が減少し、体重増加や脂肪組織の増加を抑制することが示された。さらに脂肪を合成し血中に運搬する肝機能を正常に働かせる役割を演じていると推測される。特に CEO に含まれるグアイオールおよびオイデスマールにその効果が期待される。

(3) 麻酔下ラットの交感神経活動測定

上述の飼育実験で、脂肪組織中の脂肪分解を推定したが、脂肪分解は交感神経の活動が亢進することで活発になることが要因の一つである。特に褐色脂肪組織での脂肪分解は熱産生を伴うことが指摘されている。香りによる脂肪分解は、視床下部腹内側核→交感神経→ノルアドレナリン→ β 受容体→脂肪分解という流れによって、褐色脂肪細胞ミトコンドリアの脱共役タンパク質 UCP1 (uncoupling protein 1) が活性化されて起こると報告されている。このような予測を元に、CEO およびその分画物を吸入したラットの交感神経活動を測定することにした。

12 週齢のオス Wistar ラット (体重 260~280g) を温度 25°C, 12 時間のライトサイクル (7:30~19:30) で、標準飼料及び水は自由摂取として一週間飼育した後、腹腔内投与によるウレタン麻酔 (1000mg ウレタン溶液/kg 体重) を行った。ウレタン麻酔下ラットの肩甲骨の周辺を切開後、ズーム式実体顕微鏡を使用し、褐色脂肪組織に入る 4 本の交感神経の束を探した。束になった 4 本の神経を褐色脂肪組織からマイクロ剪刀で切断した。時計ピンセットで 4 本の交感神経の束を 1 本ずつに剥離し、その 1 本を 2 本の銀線電極にかけ、電極をマニピレーターに固定した (写真 4)。電極は、ラットの体に触れないように設置し、絶縁するために切開部にパラフィンワセリン混合液で満たした。

褐色脂肪組織の交感神経活動 (BSNA) 測定は、得られた神経活動を高感度生体電位増幅器で増幅し、オシロスコープでモニタリングした。神経活動は増幅器を通じて Power Lab システムでデータをコンピューターに収録し、データは解析システム (MLS062 Spike Histogram Module, AD Instruments) でスパイクヒストグラムとして得た。

匂い刺激試料を水で懸濁し、CEO は 10 倍希釈溶液、CA, GE 画分, G, E は 100 倍希釈溶液に調製した。深さ 5.5cm, 底面直径 4cm の紙コップの底に敷いたキムワイブに希釈溶液 1ml を滴下して湿らせ、紙コップをラットの鼻に近づけ匂い刺激を 10 分間行い、交感神経活動を測定した。コントロールは水を滴下して行った。

(4) 香気成分が交感神経活動に及ぼす影響

コントロール溶液を吸入させた場合、刺激前と刺激後のラットの交感神経活動を表すスパイクの頻度はほとんど変わらなかった。また 5 分間のトータルスパイク数の経時変化において、BSNA 値が 80~120% を推移し、生体実験のコントロールとしてふさわしいものと考えた。以上の結果より、コントロール溶液ではラットの交感神経活動に変化は見られず、紙コップで刺激を行うことによる交感神経活動への影響はないものと判断した。

一方、CEO の 10 倍希釈溶液を吸入させた場合の交感神経活動のスパイクヒストグラムから、刺激前と比較し刺激後では、スパイクの頻度が明らかに増加していると判断できる。また BSNA の経時変化をグラフにし、図 2 に示した。黒いバーは匂い刺激を与えている時間を示す。匂い刺激後はスパイク頻度が急激に増加し、最大時には刺激前の 8 倍に達した。コントロールの水蒸気を吸入した場合と比較するとスパイク頻度に有意な差がみられた。以上の結果より、CEO の匂い刺激はラットの褐色脂肪組織の交感神経活動を促進することが示された。

(5) CEO 成分の交感神経活動に及ぼす影響

CA-2, GE, G および E それぞれの 100 倍希釈溶液を吸入させた場合、CA-2 は刺激前と刺激後でスパイクの頻度はほとんど変わらなかったため、CA-2 の匂い刺激はラットの褐色脂肪組織の交感神経活動に影響を及ぼさないことが示された。

GE 画分の 100 倍希釈溶液を吸入させた場合では、刺激前後でスパイクの頻度が明らかに増加し、最も高いときでコントロールの約 3.5 倍神経活動が増加した。よって、GE 画分の匂い刺激はラットの褐色脂肪組織の交感

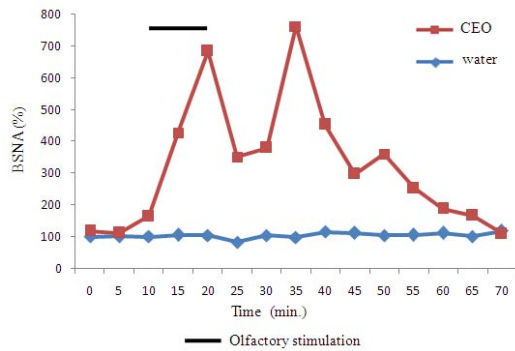


図2 CEO 匂い刺激による交感神経活動の経時変化

神経活動を促進することが示された。G および E の 100 倍希釈溶液を吸入させた場合の交感神経活動は、どちらの刺激も刺激前後でスパイクの頻度が明らかに増加し、交感神経活動を活性化した。しかしながら、GE 画分ほどの増加は認められず、単独の刺激成分になるとその効果が低下すると予想した。

以上示した匂い刺激の結果、CEO、GE 画分、G、E は交感神経活動を促進し、一方 CA-2 は交感神経活動に影響を及ぼさなかった。このことより、CEO の交感神経活動の促進は、guaiol、 β -eudesmol に主に起因することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Batubara I., Suparto I.H., Sadiyah S., Matsuoka R., Mitsunaga T., Effect of Zingiber zerumbet Essential oils and Zerumbone Inhalation on Body Weight of Sprague Dawley Rat, Pakistan Journal of Biological Science, 16(19), 1028-1033, 2013. 査読有
- ② 光永 徹: 麻酔下ラットの交感神経活動に及ぼすサイプレス材精油吸入の効果, AROMA RESEARCH, No. 51, Vol. 13, 209-213, 2012. 査読無
- ③ 光永 徹: サイプレス (豪州ヒノキ) 材精油の吸入が肥満抑制および交感神経活動に及ぼす効果, 香料, No. 256, 21-29, 2012. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

- ① 松岡竜之介, 光永徹: ホワイトサイプレス心材精油の吸入がラット褐色脂肪組織の交感神経活動を亢進する, 精油・

テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2012 年 10 月 29 日, 鹿児島.

- ② R. Matsuoka, T. Mitsunaga: Effects of olfactory stimulation with scent of cypress (*Callitris glaucophylla*) essential oil on brown adipose tissue sympathetic nerve activity of rat, 薬用植物国際学会 2011 年 5 月 26 日, ボゴール (インドネシア).
- ③ 松岡竜之介, 光永徹: ホワイトサイプレス (*Callitris glaucophylla*) 心材精油成分が褐色脂肪組織の交感神経活動に及ぼす影響, 日本木材学会, 2011 年 3 月 17 日, 京都.

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光永 徹 (MITSUNAGA TOHRU)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号: 20219679

(2) 研究分担者

志水 泰武 (SHIMIZU YASUTAKE)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号: 40243802

(3) 連携研究者

()

研究者番号: