

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：83807

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12312

研究課題名(和文) ヒトの嗅覚アッセイによる温度感受性TRPチャネル活性化成分の探索

研究課題名(英文) Searching for agonists of thermo-sensitive TRP channels with human olfactory response assay

研究代表者

山下 里恵 (YAMASHITA, Rie)

静岡県工業技術研究所・工芸科・上席研究員

研究者番号：80505636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：匂い嗅ぎ-ガスクロマトグラフ質量分析法を用いて、冷涼感のある香りを持つ柑橘ダイダイの香気成分中の冷覚作用成分を探索した。更に、冷温感受性TRPチャネルを発現させた細胞試験及びヒト試験による検証を行った。

ダイダイ果皮油は、TRPA1を活性化したが、高濃度で TRPM8活性を阻害した。一方、ダイダイ果皮油の主成分 Limonene及び冷覚作用の候補成分Carvoneは、TRPM8 活性を阻害せずにTRPA1を活性化した。ヒト試験において、ダイダイ果皮油による冷覚作用への阻害は認められず、その香りを嗅ぐことで嗜好性の向上やリラックスする傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：Cool/cold sensation components of the odor components of citrus Daidai were explored with gas chromatograph-mass spectrometry/olfactometry. Furthermore, the investigations on responses of cells expressing cool/cold TRP channels and subjective/physiological responses of humans were carried out.

Daidai peel oil activated TRPA1 but inhibited TRPM8 activity at high concentrations. On the other hand, limonene, main component of Daidai peel oil, and carvone, cold sensation candidate component, activated TRPA1 without inhibiting TRPM8 activity. Inhibition of cold sensation by Daidai peel oil was not observed, and there was a tendency to improve palatability or to become feeling relaxed by sniffing the scent with human analyses.

研究分野：環境・室内空気質、香り、臭気測定・制御

キーワード：冷涼感 ダイダイ果皮油 TRPチャネル 匂い嗅ぎGC/MS ヒト試験 生理応答 主観評価

1. 研究開始当初の背景

スパイスやハーブ等の植物の香りは、香味料として風味の向上や食欲の増進に、また芳香剤(香料)として生活製品や住環境に用いられることで快適性の向上に活用されてきた。更に近年では、*l*-Menthol をはじめ、様々な香気成分が清涼化剤として見出され、食品、化粧品、雑貨、繊維にまで活用されている。

この香りによる清涼感、感覚神経系に発現する温度感受性 Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルのうち TRPM8 の活性化によることが知られている。更に、熱や冷感に關与する TRPV1 や TRPA1 の活性化成分としては、トウガラシの Capsaicin、ワサビの Allyl isothiocyanate、シナモンの Cinnamaldehyde 等のスパイスの特徴的な辛味・香気成分が同定されている。特に TRPV1 や TRPA1 は活性化により、熱や冷感等の体性感覚の他にも、エネルギー代謝、アレルギーの脱感作にも關与することが報告され、現在も、新たな TRP チャンネル活性化成分の探索と生理作用に關する研究が盛んに進められている。

一方、香りは、鼻腔内の嗅覚細胞に発現する G タンパク質共役型受容体(嗅覚受容体)によって受容され、ニオイとして認知される。特に、分子内にカルボニル基等の官能基と不飽和結合部を近接して持つ成分は、極微量で強い香りを呈する(=特異的にヒトの嗅覚受容体を活性化することが知られている)。

温度感受性 TRP チャンネルのうち、TRPA1 活性化成分の多くが、特有の香りを持つハーブやスパイス等の成分であり、これら成分は、分子内にカルボニル基等の官能基と不飽和結合部を持つことから、ヒトの嗅覚応答が強い香気成分と共通している。

そこで、これら活性化成分の特徴的な香りに対して、微量でも特異的に感知可能なヒトの嗅覚特性に着目し、香りの分析的手法を用いた嗅覚応答アッセイを行うことにより、植物の多様な香気成分の中から TRP チャンネルを活性化する新たな成分を検出できると考えた。

2. 研究の目的

TRP チャンネル活性化成分が有する特徴的な香りと微量な成分でも特異的に感知するヒトの嗅覚特性に着目して、香りの分析的手法を用いたヒトの嗅覚アッセイにより、植物の多様な香気成分の中からヒトの冷覚に作用する TRP チャンネルを活性化する成分を探索する。

更に、細胞試験による冷温感受性の TRP チャンネルの活性化(in vitro)、及びヒトの体性感覚や主観的印象における冷覚への影響(in vivo)を検証する。

3. 研究の方法

(1) 嗅覚アッセイによる冷覚作用成分の探索

匂い嗅ぎ-ガスクログラフ質量分析法による嗅覚アッセイ

清涼感のある香りを呈する香酸柑橘類のダイダイ(*Citrus aurantium* L.)の果皮油を対象として、匂い嗅ぎ-ガスクログラフ質量分析法(Gas chromatograph-mass spectrometry/Olfactometry; GC-MS/O)により香気成分の分離、各成分の嗅覚アッセイ及び成分同定を行った。

冷覚刺激の分析的検証

ダイダイ果皮油の香気中に知覚される清涼感のある香り刺激を、60 °Cでの加熱酸化及び「試香紙」での選択的保持により、人為的に増幅・再現し、その香りを GC-MS/O により分析・検証した。

また、以上の嗅覚アッセイで見出された有望な候補成分を主成分として含有し、食経験のあるスパイスから採取される植物精油を、ヒト試験による冷覚作用の検証に用いる試料とした。

(2) 細胞試験による冷温感受性 TRP チャンネルの活性化の検証

TRPA1 及び TRPM8 活性の測定

カルシウムイメージング法(細胞に Ca^{2+} 感受性蛍光試薬を取り込ませ、チャンネルの活性化に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に応じた蛍光量の測定)により、TRP チャンネルの活性化を評価した。

TRP 活性は、試料投与によって上昇する蛍光量の、その後の 5 μ M Ionomycin 投与による最大蛍光量に対する相対値(%)として算出した。

試験細胞には、ヒト TRPA1 (hTRPA1) 及びヒト TRPM8 (hTRPM8) を発現させた HEK 細胞を用いた。

TRPM8 活性の阻害作用の評価

(2) と同様に、カルシウムイメージング法により、既知アゴニスト(*l*-Menthol)の hTRPM8 活性化に対する、試料による阻害作用を観察した。

TRPM8 活性は、試料投与後、5 mM の *l*-Menthol 投与によって上昇する蛍光量の、その後の 5 μ M Ionomycin 投与による最大蛍光量に対する相対値(%)として算出した。

(3) ヒトの体性感覚、主観評価及び生理応答による冷覚作用の検証

ヒト試験における倫理的配慮

20 歳 ~ 24 歳の女子学生 18 名を対象に以下 ~ のヒト試験を実施した。

ヒト試験の実施にあたり、研究参加者に対して、研究の目的、内容、方法を説明した。

参加者の理解を確認したうえで、中途放棄の自由、プライバシーの保護等を明記した同

意書への署名を得た。

体性感覚（冷覚閾値測定）

既知の冷涼化剤（*l*-Menthol）及びダイダイ果皮油を添加したジェル基材を腕に塗布後、体温付近から 25 程度までの冷覚の自覚温度（ ）及び自覚熱流量（ w/m^2 ）を繰り返し 5 回測定し、冷覚作用を検証した。

また、嗅覚アッセイ系で見出された候補成分を主成分とするキャラウェイ精油についても、同様の試験を行った。

主観評価（香りの印象）

既知の冷涼化剤（*l*-Menthol）及びダイダイ果皮油を添加したジェル基材の香りを 1 分間嗅いだ後、以下の主観評価を 7 段階の尺度法により行った。

【主観評価項目】

- | | |
|-------|-----|
| ・温かい | 冷涼な |
| ・まったり | 刺激的 |
| ・不快 | 快適 |
| ・嫌い | 好き |

生理的応答（自律神経機能のバランスの評価）

既知の冷涼化剤（*l*-Menthol）及びダイダイ果皮油を添加したジェル基材の香りを嗅いだ時の 1 分間の指尖加速度脈波を測定した。その a-a 間隔の変動周波数解析（MEM 法）で得られる低周波（low frequency; LF）領域（0.15 Hz 未満）と高周波（high frequency; HF）領域（0.15Hz 以上）のパワー比（LF/HF）を自律神経機能のバランスの指標（LF/HF の値が低いほど、副交感神経が優位）として評価した。

4. 研究成果

(1) 嗅覚アッセイによる冷覚作用成分の探索

ダイダイ果皮油の GC-MS/0 を用いたヒトの嗅覚アッセイにより、冷覚作用成分の候補として Carvone を見出した。

ダイダイ果皮油に 60 熱処理を 3 週間施したところ Carvone の生成が確認され、主成分である Limonene の酸化によって生成することが示唆された。また、ダイダイ果皮油を滴下した「紙香紙」に知覚される冷涼な刺激の残香についても、分析の結果、Carvone が主成分であることが分かった。

そこで、ダイダイ果皮油の主成分である Limonene 及び Carvone の 2 つを主成分として含有するキャラウェイ精油を、細胞試験及びヒト試験での検証に用いた。

(2) 細胞試験による冷温感受性 TRP チャネルの活性化の検証

TRPA1 及び TRPM8 活性

細胞試験（in vitro）によって、ダイダ

イ果皮油及び含酸素成分すなわちダイダイの香り濃縮試料に、冷感刺激に関わる hTRPA1 への作用活性を見出した。一方、hTRPM8 への活性は認められなかった。

また、冷覚作用が見込まれた 10 数種の成分についても、hTRPA1 への活性が認められた。このうち、Limonene、Osthole、Citral は、 EC_{50} 値が 100 μ M 未満と、強い hTRPA1 活性化作用を示した。一方、hTRPM8 については、Geranyl Acetate、Citral に弱い活性化作用が認められた。

TRPM8 活性の阻害作用

ダイダイ果皮油による hTRPM8 の阻害が示され、この作用には Osthole と Geranyl Propionate が寄与することが示された。

すなわち、ダイダイ果皮油は全体として hTRPA1 活性化作用、hTRPM8 活性阻害作用を示した。

(3) ヒトの体性感覚、主観評価及び生理応答による冷覚作用の検証

既存の冷涼化剤として用いられ hTRPM8 のアゴニストである *l*-Menthol と共に、ダイダイ果皮油またはキャラウェイ精油を、化粧品用ジェルに添加した試料について、ヒト試験を行い以下 ~ の知見を得た。

冷覚閾値への影響

l-Menthol（1%）のみの場合及びこれにダイダイ果皮油（5%）を添加した試料は、いずれも冷覚の自覚温度がおよそ 1 上昇し、自覚熱流束が $300W/m^2$ 減少した。

l-Menthol（0.1%）のみの場合及びこれにキャラウェイ精油（0.01%）を添加した試料においても、いずれも冷覚の自覚温度が上昇し、自覚熱流束が減少した。しかし、繰り返し測定 5 回目では、キャラウェイ精油添加試料の方が、対照との差が大きくなる傾向にあった。

すなわち、*l*-Menthol 濃度が比較的低い（0.1%）場合に、低濃度（0.01%）のキャラウェイ精油の添加によって、冷覚作用を増強することが示唆された。

ダイダイ果皮油においても、低濃度（例えば 0.1% 以下）の *l*-Menthol と組み合わせた場合の冷覚作用の検証が、今後必要であると思われる。

香りの印象

ダイダイ果皮油の添加によって、*l*-Menthol の冷涼感や刺激が減少し（より穏やかになり）、嗜好性の顕著な向上（より快適で好まれる）が認められた。

自律神経機能のバランスへの影響

心拍変動の揺らぎの解析から、自律神経活動の状態の指標 LF/HF 値を得た。

LF/HF 値は、個人間差が著しく、分散も正

規分布を示さないことから、メジアン値を比較に用いた。

LF/HF 値は、[対照試料] > [ℓ-Menthol のみ添加した試料] > [ℓ-Menthol 及びダイダイ果皮油を添加した試料]の傾向にあった。

すなわち、香りの無い対照試料に比較して、ℓ-Menthol、更にダイダイ果皮油を添加した試料の香りを嗅ぐことによって、より副交感神経活動優位となり、リラックスする傾向が認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計1件)

柑橘の香り中の冷涼感作用成分の探索

山下里恵，井原望，伊藤圭祐，渡辺達夫，

石橋佳奈，上野千恵

2018.3 平成 29 年度静岡県工業技術研究所
研究発表会 静岡

[その他]

研究成果事例集(平成29年度分)

2018 静岡県工業技術研究所

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下里恵 (YAMASHITA, Rie)

静岡県工業技術研究所・工芸科

・上席研究員

研究者番号：80505636

(2)研究分担者

渡辺達夫 (WATANABE, Tatsuo)

静岡県立大学・食品栄養科学部

・客員共同研究員

研究者番号：10210915

(3)連携研究者

櫻川智史 (SAKURAGAWA, Satoshi)

静岡県工業技術研究所・企画調整部長

研究者番号：10505639