

論文内容の要旨

氏名	かわ だ しゅん いち 河 田 純 一
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	工第175号
学位授与の日付	平成21年3月21日
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当
学位論文題目	Study on Cyclooxygenase-2 Inhibitory Effects of Aroma Compounds in Traditional Crude Drugs (生薬香気物質のシクロオキシゲナーゼ-2阻害 活性に関する研究)
論文審査委員(主査)	教授 宮 澤 三 雄
(副主査)	教授 松 原 凱 男
(副主査)	教授 武 隈 真 一

本研究は、抗炎症作用を示す和漢生薬の揮発性物質の探索を行うとともに、それらの香気特性の検討及び化粧品への実用化に向けた応用検討を中心に、以下の二章からなる研究を行っている。第一章では、抗炎症試験に向けて11種の和漢生薬揮発性油の構成成分を明らかにし、数種については香気特性の検討を行っている。第二章では、シコン揮発性油を中心とした和漢生薬及び15種類のp-メンタン骨格を有するモノテルペンによるCOX阻害活性を明らかにし、それらの化粧品への応用研究について検討している。

その結果、第一章ではムラサキ科のムラサキ(*Lithospermum erythrorhizon*)の根を乾燥させたシコン(紫根)から連続水蒸気蒸留によって得た揮発性油の構成物質の解析を行い、主成分がチーズ様の腐敗臭を示す枝分れ低級脂肪酸である2-methyl及び3-methyl butanoic acidであることを明らかにしている。アカミノアカネ(*Rubia cordifolia*)の根を乾燥させたセンソウ(茜草)からは、甘いフローラル系の香気を有す揮発性油を得、その主要成分はmollugin及びfuro-molluginであることを明らかにしている。これら2種のナフトヒドロキノン系は本研究において精油、揮発成分として初めて検出したものであった。ネムロコウホネ(*Nuphar pumilum*)の根を2縦割して乾燥したセンコツ(川骨)はロシア産の二種のケモタイプ(Type A: 高砂薬業、Type B: 山田薬研)を用い成分比較を行なっている。その結果、cyclo-S<sub>8</sub>を多く含むType A、paeonolが主要成分であるType Bの2通りの存在を確認している。また、Type Bの揮発性油についてGC-O測定を行い、センコツの香気寄与物質がnonanal及びmentholである事も明らかにしている。*Isatis tinctoria*の根を乾燥させたバンランコン(板藍根)及びシロガラシ(*Brassica hirta*)の種子を乾燥させたハクガイシ(白芥子)の揮発性油構成成分の検討の結果、バンランコンの主要構成成分は4-pentenitrileであり、ハクガイシ揮発性油の主成分は4-hydroxyphenylacetone nitrile及びpalmitic acidであることを明らかにしている。どちらもアブラナ科に特異的に見られる含窒素化合物が主成分であり、バンランコンではこれらが生薬の香気に強く関与していることをGC-O測定により証明している。一方、ハクガイシではheptanal、phenylethylalcohol等が香気に関与していることを同操作により明らかにしている。アケビ(*Akebia quinata*)を基源植物としたヨチシ(預知子)及びモクツウ(木通)の検討では、種子部の乾燥品であるヨチシ揮発性油の主成分は、limoneneであり、揮発性油中の35.5%を占めていたのに対し、木質の基部を乾燥したモクツウ揮発性油の主要な構成物質はcaproic acidを中心としたC<sub>5</sub>~C<sub>18</sub>の脂肪酸であることを明らかにしている。チガヤ(*Imperata cylindrica*)及びヨシ(*Phragmites communis*)の根をそれぞれ乾燥させた生薬であるポウコン(茅根)及びロコン(蘆根)の検討の結果、ポウコン揮発性油の主成分はpalmitic acid及びpaeonolであること、ロコン揮発性油の主成分はpalmitic acid及び(3Z)-hexenolであることをそれぞれ明らかにしている。また、ポウコン及びロコンの香気特性については、どちらも芳香族化合物、β-ionone等のC<sub>13</sub>化合物及びモノテルペンが比較的強く寄与していることをGC-MS/O測定により明らかにしている。

第二章では、第一章で揮発性物質を明らかにした和漢生薬のなかで、脂肪酸組成比率の高い5種の生薬(シコン・ヨチシ・モクツウ・ポウコン・ロコン)揮発性油のCOX-1及びCOX-2の阻害活性について検討を行っている。

そのため、次に、香りの面での改善を目指し、マスキング剤として*p*-メンタン骨格を有すモノテルペンに着目している。*p*-メンタン骨格を有すモノテルペンはミント系オイルの多くに含有されている精油成分であり、清涼感を与える目的で化粧品などにも広く活用されている。本研究では、マスキングと同時に、抗炎症活性の有無についても、15種の*p*-メンタン骨格を有すモノテルペンCOX阻害スクリーニング試験を行うことにより検討を加えている。その結果、 $\gamma$ -terpinene、 $\alpha$ -terpineol、 $\alpha$ -carveol、menthone及びpulegoneがCOX-2選択阻害活性を示したことを明らかにしている。構造活性相関については、顕著な相関は見出せなかったが、飽和*p*-メンタン骨格を有すモノテルペンであるmenthol及びmenthoneで比較すると、ケトン体であるmenthoneが強い阻害活性を示し、2重結合を2つ含有するlimonene、 $\alpha$ -carveol及びcarvoneと比較するとアルコール体である $\alpha$ -carveolに強い阻害活性を確認している。さらに、阻害活性の高かった5種類のモノテルペンについて、比較標準物質であるアスピリンと共に再度阻害試験を行い、COX-1及びCOX-2のIC50値の比較を行っている。その結果、 $\alpha$ -terpineol (IC<sub>50</sub>: COX-1= 5.14 mM, COX-2= 0.64 mM)及びmenthone (IC<sub>50</sub>: COX-1= >10 mM, COX-2= 1.74 mM)が特に高い選択性及び活性を示すことを明らかにしている。また、 $\alpha$ -terpineol及びmenthoneの阻害形式を明らかにする目的で、Lineweaver-Burkプロット法による阻害形式の検討を行い、 $\alpha$ -terpineolは基質と酵素の結合体のみ結合する拮抗阻害、menthoneは基質と同様の活性部位に可逆的に結合する拮抗阻害をそれぞれ示し、同じ*p*-メンタン骨格を有すモノテルペンでも異なる阻害形式を有していることを明らかにしている。最後に、 $\alpha$ -terpineol及びmenthoneを配合した香料を用いて、ムラサキ根油0.1%配合クリームのマスキングを行い再度評価を行っている。その結果、マスキングしたクリームでは、良好な評価が得られていた。

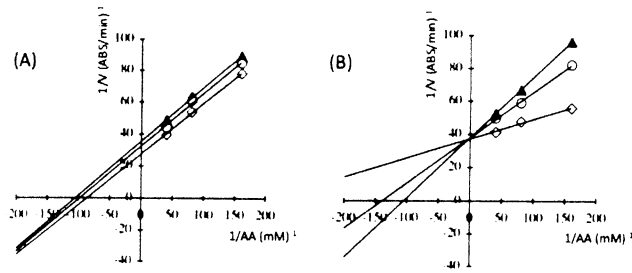


図.  $\alpha$ -terpineol 及びmenthoneのLineweaver-Burkプロット  
 (▲) 0.75, (○) 1.50 and (◇) 3.00 mM.  
 (A)  $\alpha$ -terpineol (B) menthone

その結果、シコン、ヨチシ及びモクツウ揮発性油はCOX阻害活性を示し、特にシコン揮発性油はCOX-1に比べCOX-2を選択的に阻害していることを明らかにしている。また、シコン揮発性油は、一般的に抗炎症剤として用いられるアスピリン及びシコン色素成分で抗炎症効果の報告があるshikoninと比較して強いCOX-2阻害活性を示すことを明らかにしている。このことから、シコン揮発性油は胃腸障害等の副作用を示さない抗炎症剤として化粧品などに応用できるものと考えられた。次に、シコン揮発性油の阻害活性物質及び作用機序を明らかにする目的で、揮発性油主成分でありCOX阻害活性物質と考えられた枝分れ低級脂肪酸のひとつである3-methyl butanoic acidのCOX-2阻害試験及びLineweaver-Burkプロット法による阻害形式の検討を行い、3-methyl butanoic acidはアスピリンと同程度のCOX阻害活性を示し、その阻害形式は基質であるアラキドン酸と同様に酵素の活性部位に可逆的に結合する拮抗阻害であることを明らかにしている。この結果より、シコン揮発性油中の主成分であった3-methyl butanoic acid等の枝分れ低級脂肪酸のカルボキシラートアニオンが酵素活性部位のArg-120とイオン結合又は、Ser-530及びTyr-385残基と水素結合し、アラキドン酸の酵素への取り込みを防ぐことにより、プロスタグランジンの産生を阻害していることを推測している。この研究成果を基に、新規抗炎症剤としてシコン揮発性油を化粧品へ応用できるように、国際化粧品機構(CIITA)及び日本化粧品工業会(JCIA)に新規原料として「INCI名: Lithospermum Erythrorhizon Roots Oil; 日本表示名: ムラサキ根油」を登録し、さらに、この「ムラサキ根油」を配合したクリームの開発を行い評価している。その結果、ムラサキ根油0.1%配合クリームは、感触や保湿の面では高い評価は得られたものの、香りの面では非常に低い評価しか得られない結果となった。

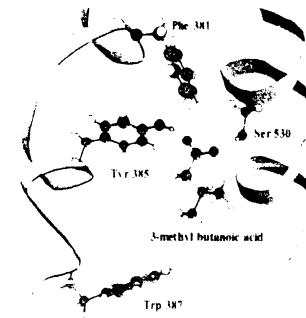


図. 3-methyl butanoic acidとCOX-2の結合予想図

## 論文審査結果の要旨

本研究は、抗炎症作用を示す和漢生薬の揮発性物質の探索を行うとともに、それらの香気特性の検討及び化粧品への実用化に向けた応用検討を中心に、以下の二章からなる研究を行っている。第一章では、抗炎症試験に向けて11種の和漢生薬揮発性油の構成成分を明らかにし、数種については香気特性の検討を行っている。第二章では、シコン揮発性油を中心とした和漢生薬及び15種類のp-メンタン骨格を有するモノテルペンによるCOX阻害活性を明らかにし、それらの化粧品への応用研究について検討している。

その結果、第一章では、シコン揮発性油の構成物質の解析を行い、主成分がチーズ様の腐敗臭を示す枝分れ低級脂肪酸である2-methyl及び3-methyl butanoic acidであることを、センソウ(茜草)揮発性油の主要成分はmollugin及びfuromolluginであることを明らかにしている。センコツ(川骨)はロシア産の二種のケモタイプ(Type A: 高砂薬業, Type B: 山田薬研)を用い成分比較を行い、cyclo-S8を多く含むType A、paeonolが主要成分であるType Bの2通りの存在を確認し、また、Type Bの揮発性油についてGC-0測定を行い、センコツの香気寄与物質がnonanal及びmentholである事も明らかにしている。パンランコン(板藍根)及びハクガイシ(白芥子)の揮発性油構成成分の検討の結果、パンランコンの主要構成成分は4-pentenitrileであり、ハクガイシ揮発性油の主成分は4-hydroxyphenylacetone nitrile及びpalmitic acidであることを明らかにしている。また、両生薬ともアブラナ科に特異的に見られる含窒素化合物が主成分であり、パンランコンではこれらが生薬の香気に強く関与していることを、一方、ハクガイシではheptanal、phenylethyl alcohol等が香気に関与していることをGC-0測定により明らかにしている。ヨチシ(預知子)及びモクツウ(木通)の検討では、種子部の乾燥品であるヨチシ揮発性油の主成分は、limoneneであり、揮発性油中の35.5%を占めていたのに対し、木質の茎部を乾燥したモクツウ揮発性油の主要な構成物質はcaproic acidを中心としたC<sub>5</sub>~C<sub>18</sub>の脂肪酸であることを明らかにしている。ポウコン(茅根)及びロコン(蘆根)の検討の結果、ポウコン揮発性油の主成分はpalmitic acid及びpaeonolであること、ロコン揮発性油の主成分はpalmitic acid及び3Z-hexenolであることをそれぞれ明らかにしている。また、ポウコン及びロコンの香気特性については、どちらも芳香族化合物、3-ionone等のC<sub>10</sub>化合物及びモノテルペンが比較的強く寄与していることをGC-MS 0測定により明らかにしている。

第二章では、第一章で揮発性物質を明らかにした和漢生薬のなかで、脂肪酸組成比率の高い生薬シコン・ヨチシ・モクツウ・ポウコン・ロコン)揮発性油のCOX-1及びCOX-2阻害活性について検討を行っている。その結果、シコン、ヨチシ及びモクツウ揮発性油はCOX阻害活性を示し、特にシコン揮発性油はCOX-1に比べCOX-2を選択的に阻害していることを明らかにしている。また、シコン揮発性油は、一般的に抗炎症薬として用いられるアスピリン及びシコン色素成分で抗炎症効果の報告があるshikoninと比較して強いCOX-2阻害活性を示すことを明らかにしている。このことから、シコン揮発性油は胃腸障害等の副作用を示さな、抗炎症薬として化粧品などに応用できるものと考えられた。

次に、シコン揮発性油の阻害活性物質及び作用機序を明らかにする目的で、揮発性油主成分でありCOX阻害活性物質と考えられた枝分れ低級脂肪酸のひとつである3-methyl butanoic acidのCOX-2阻害試験及びLineweaver-Burkプロット法による阻害形式の検討を行い、3-methyl butanoic acidはアスピリンと同程度のCOX阻害活性を示し、その阻害形式は基質であるアラキドン酸と同様に酵素の活性部位に可逆的に結合する拮抗阻害であることを明らかにしている。この結果より、シコン揮発性油中の主成分であった3-methyl butanoic acid等の枝分れ低級脂肪酸のカルボキシラートアニオンが酵素活性部位のArg-120とイオン結合又は、Ser-530及びTyr-385残基と水素結合し、アラキドン酸の酵素への取り込みを防ぐことにより、プロスタグランジンの産生を阻害していることを推測している。この研究成果を基に、新規抗炎症剤としてシコン揮発性油を化粧品へ応用できるように、国際化粧品機構(CTFA)及び日本化粧品工業会(JCIA)に新規原料として「INCI名: Lithospermum Erythrorhizon Roots Oil; 日本表示名: ムラサキ根油」を登録し、さらに、この“ムラサキ根油”を配合したクリームの開発を行い評価している。その結果、ムラサキ根油0.1%配合クリームは、感触や保湿の面では高い評価は得られたものの、香りの面では非常に低い評価しか得られない結果となった。そのため、香りの面での改善を目指し、マスキング剤としてp-メンタン骨格を有するモノテルペンに着目している。本研究では、マスキングと同時に、抗炎症活性の有無についても、15種のp-メンタン骨格を有するモノテルペンCOX阻害スクリーニング試験を行うことにより検討を加えている。その結果、 $\gamma$ -terpinene、 $\alpha$ -terpineol、 $\alpha$ -carveol、menthone及びpulegoneがCOX-2選択阻害活性を示したことを明らかにしている。さらに、阻害活性の高かった5種類のモノテルペンについて、比較標準物質であるアスピリンと共に再度阻害試験を行い、COX-1及びCOX-2のIC<sub>50</sub>値の比較を行っている。その結果、 $\alpha$ -terpineol及びmenthoneが特に高い選択性及び活性を示すことを明らかにしている。また、 $\alpha$ -terpineol及びmenthoneの阻害形式を明らかにする目的で、Lineweaver-Burkプロット法による阻害形式の検討を行い、 $\alpha$ -terpineolは基質と酵素の結合体のみには結合する拮抗阻害、menthoneは基質と同様の活性部位に可逆的に結合する拮抗阻害をそれぞれ示し、同じp-メンタン骨格を有するモノテルペンでも異なる阻害形式を有していることを明らかにしている。最後に、 $\alpha$ -terpineol及びmenthoneを配合した香料を用いて、ムラサキ根油0.1%配合クリームのマスキングを行い再度評価を行っている。その結果、マスキングしたクリームでは、良好な評価が得られていた。尚、これらの研究成果は、化粧品への実用化が容易であると考えられた。

以上、本論文で述べられた知見は、多数の独創性と優れた結果を含み、学術的、工業的、実用的にも重要であり、博士(工学)を授与するのに十分価値あるものと判断した。