

東京農業大学

博士論文

ヤチヤナギの芳香成分に関する研究

Studies on the aroma components in *Myrica gale* var. *tomentosa*.

生物産業学研究科 生物産業学専攻

中田真悠子

## 目次

序論	1
----	---

## 第1章 ヤチヤナギの芳香成分の解析

### 第1節 試料および実験方法

1. 試料・試薬	4
2. 直接蒸留	4
3. Likens-nickerson 装置を用いた連続蒸留抽出	4
4. Solvent-assisted flavor evaporation (SAFE) 装置を用いた 高真空蒸留抽出	5
5. AEDA 法による主要成分中の特徴香気の決定	5

### 第2節 結果および考察

1. ヤチヤナギ芳香成分の網羅的解析	6
2. AEDA 法による主要成分中の特徴香気の決定	13

## 第2章 ヤチヤナギの芳香特性の解析

### 第1節 試料および実験方法

1. 試料・試薬	17
2. 精油の分画と分析	
2.1 シリカゲルカラム分画および GC-MS 分析	17
2.2 各フラクションの官能評価	18
3. 混合香気下による分析	19

### 第2節 結果および考察

1. 精油の分画と香調の解析	20
2. ヤチヤナギ香における各香気成分の役割	
2.1 AROMATCH の最適条件の検討	23
2.2 香気成分の変調および出現	23

### 第3章 ヤチヤナギのリラクゼーション効果

#### 第1節 試料および実験方法

1. 試料・試薬・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31
2. 試料の調整・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31
3. POMS を用いた心理的効果の検証・・・・・・・・・・・・ 32
4. 唾液アミラーゼ測定によるストレス値計測・・・・・・・・ 32
5. 脳血流測定によるリラクゼーション効果の検討・・・・ 33

#### 第2節 結果および考察

1. POMS によるヤチヤナギ芳香の心理的効果の検証・・・・ 35
2. 唾液アミラーゼ測定によるストレス値計測・・・・・・・・ 37
3. NIRS を用いた脳血流測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 38
4. リラクゼーション効果に関与する化合物の解析・・・・ 40

### 第4章 ヤチヤナギの抗菌作用

#### 第1節 試料および実験方法

1. 試料・試薬・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43
2. シリカゲルカラムによる精油分画  
2.1 GC-MS による芳香成分の分析・・・・・・・・・・・・ 44
3. 精油中の抗菌物質の特定  
3.1 ペーパーディスク法による抗菌作用試験・・・・ 44  
3.2 最小発育阻害濃度（MIC）の測定・・・・・・・・・・ 45
4. 精油中の抗菌物質の特定  
4.1 菌体への化合物処理・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45  
4.2 菌体脂肪酸メチルエステル化・・・・・・・・・・・・ 45  
4.3 GC による分析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 46  
4.4 走査型電子顕微鏡（SEM）による観察・・・・・・・・ 46  
4.5 アルカリフォスファターゼ活性測定・・・・・・・・ 46  
4.6 導電率測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 46  
4.7 核酸の測定・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 46

#### 第2節 結果および考察

1. 精油中の抗菌作用に関与する成分の特定・・・・・・・・ 47

2. *Sta. aureus* に対する精油の抗菌作用機作 . . . . . 50

総括 . . . . . 57

要約 . . . . . 60

参考文献 . . . . . 66

謝辞 . . . . . 71

## 序論

香りをもつ物質は香料と呼ばれ、化粧品や食品類に付香され日常生活に用いられている。人間と香料のかかわりは非常に古く、古代社会においても宗教的な儀式に用いられていた。生活が豊かになるにつれて化粧品や食品などの分野に用途が広がり、一般大衆にも利用されるようになった。最近では香りの隠された機能や効用が見直され、それを利用した各種の製品が市場で見られるようになった。

古来よりヨーロッパではアロマセラピー（芳香療法）が行われており、植物精油の生理的薬理的効果が伝承的経験的に認められ、病気の治療に用いられている。近年では、香りの生理的効果について科学的研究が行われ、ある種の精油は免疫系を活性化することが認められている。さらに人間の快、不快、好みなどの嗜好性の問題や香りの内分泌系や免疫系に対する効果などいっそうの研究の進展が待たれる<sup>1)</sup>。

ヤチヤナギ (*Myrica gale* var. *tomentosa*) はヤマモモ科の落葉小低木で、ヨーロッパおよび北東アジアから北米の寒冷湿地に分布している。植物体の形態的な特徴は、枝が黒褐色でやや光沢があり、葉は小さく狭倒卵型—長楕円状倒披針型で先に少数の鋸歯がある。ほとんど無柄で、両面に軟毛があり、淡黄色の小腺点がある。雄雌は異株で、4月頃が開花期となる。果実は広卵型で小さく、表面に脂状の物質を分泌し、基部には3個の小苞が合着して翼状になる<sup>2,3)</sup>。セイヨウヤチヤナギ (*Myrica gale* var. *gale*) は、古くからヨーロッパでハーブとして用いられており、料理やお酒の香り付けなどに利用されてきた歴史がある。しかし現在では、資源保護のため利用が制限されている。我が国では、北海道の釧路湿原やサロベツ原野等、多くの湿地に自生しており、化粧品成分として配合している商品もある。また、その自生地ほとんどが国立公園やラムサール条約登録地等の保護区に指定されており、湿原の減少とともにその個体数も減少傾向にあることから、多量の材料を得るのが困難である。しかしながら最近、北海道立林業試験場の脇田らが組織培養法によるヤチヤナギの安定的な大量増殖に成功したことにより<sup>4)</sup>、新たな道産資源としての有効利用が期待されている。

しかし、自然とは異なる方法で植物を増殖させる方法では香りが増えるという懸念もあるため、GC-MS に自生葉と組織培養由来葉より抽出した精油を供

し、成分比較を行った結果、主要成分は一致し、自生葉と組織培養由来葉の芳香成分は同じものを有している可能性が高いことが示唆された。これらヤチヤナギ葉芳香成分の時期変動を明らかにするため、SPME法により成分比較を行ったところ、生育時期による成分変化は認められず、香りについても同様の結果となった。このことからヤチヤナギは生育時期に関係なく、利用可能であると考えられた。さらに、これらの機能性を探るために種々の実験をしたところ、プロパンジオール、ブチレングリコール抽出物に強いヒドロキシラジカル、スーパーオキシドアニオンラジカルに対する捕捉能、食用油に対する抗酸化活性が認められた<sup>5)</sup>。外国産ヤチヤナギの機能性については、SylvestereやPopviciなどの報告があり、抗がん作用、抗菌作用があることが報告されている<sup>6,7)</sup>。

そこで本研究では、組織培養由来の栽培株の芳香成分に注目し、抽出方法による精油中の芳香成分の変化およびヤチヤナギ香を特徴付ける芳香成分を特定するとともに、その安静効果、抗菌作用などの機能性について検討した。

## 第1章 ヤチヤナギの芳香成分の解析

ヤチヤナギは強い芳香を有し、ハーブや芳香剤などの原料として期待できる。これまでの研究で、自生株および組織培養由来葉の精油は、主要成分は概ね一致しており、芳香成分に大きな相違はないこと、さらに、収穫時期による芳香成分の変動も極めて小さいことが示唆された。一方、これまでに成分研究された精油は、全て常圧蒸留で調製されたものに限っている。現在の技術では、1つの方法で植物の芳香成分全てを効率よく全て抽出できる方法はないことから、芳香成分を網羅的に解析するにはいくつかの抽出方法で得られた成分について解析することが望ましい。

直接蒸留法 (Hydro distillation) は、原料を水中に浸し、それを直火あるいは蒸気で加熱して沸騰させると、蒸気とともに揮発性精油成分が揮発することを利用した蒸留法である。蒸気を冷却することで、水と精油を容易に分離・捕集することができる。最も経済的で簡便な方法であるが、蒸留に時間がかかる。連続蒸留抽出法 (SDE : Simultaneous Distillation Extraction) は、水蒸気蒸留と溶媒抽出を同時に行い、香氣成分を連続的に抽出する方法である。

Likens-Nickerson の装置を用いるこの方法は、抽出効率が高いことから、精油含量の少ない植物からの香氣成分の抽出に適している。常圧下では、水蒸気蒸留法と同様に高温加熱されることから、成分変化を軽減するために減圧状態で行われる場合もある。高真空蒸留法 (SAFE : Solvent Assisted Flavor Evaporation) は、高沸点の香氣成分を効率よく捕集できるもので、あらかじめ試料を有機溶媒に浸漬して香氣成分を抽出しておき、この抽出物を装置を用いて高真空下で香氣成分のみを捕集するものである。有機溶媒抽出では、溶媒に溶解するものはすべて抽出されてしまうが、この装置を用いることで芳香に寄与しない植物のロウ成分のような極高沸点成分を分溜することができる<sup>8)</sup>。

本章では、様々な抽出方法で精油を抽出し、ヤチヤナギ精油の詳細な芳香成分の解析を行うと共に、ヤチヤナギ香を特徴付ける成分の特定を試みた。

## 第 1 節 試料および実験方法

### 1. 試料・試薬

北海道立林業試験場より恵与されたヤチヤナギの乾燥葉を 1 cm<sup>2</sup> 程度に砕いて用い、芳香成分の網羅的解析を行った。メタノール（特級）、ヘキサン（特級）、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、1-オクタノールおよび Silica Gel 60 は関東化学株式会社のものを用いた。

### 2. 直接蒸留

100 g の細かく砕いたヤチヤナギ乾燥葉をフラスコにとり、2000 ml の純水を加えて蒸留した。2 時間蒸留した後、フラスコ内の乾燥葉を取り出し、新たに同量のヤチヤナギの乾燥葉を入れ蒸留する操作を 2 回繰り返した。精油は精油定量器で定量した。なお、精油の下層に貯まるアロマウォーター（AW）も精油と同時に採集した。得られた精油をヘキサンで 50 倍希釈し、ガスクロマトグラフ-マススペクトロメーター（GC-MS, Agilent Technologies 7890 A）を用い分析した。カラムには DB-WAX (0.25 mm i.d. × 30 m, 液相厚 0.25 μm) を用い、注入量は 1 μl、注入口温度は 250°C、カラム温度は 60°C から 220°C まで 3°C/min で 50 分間昇温した。スプリット比 10:1、流量は 20 ml/min とした。芳香成分の同定については、RI (GC の相対保持時間)<sup>9)</sup> およびアロマオフィス 2D を用いた検索によって行った。なお、同定された成分の量は、すべてのピーク面積の和に対する面積百分率%で算出した。標品がある成分については GC-MS により定量を行った。

### 3. Likens-nickerson 装置を用いた連続蒸留抽出

40 g の細かく砕いたヤチヤナギの乾燥葉をフラスコにとり、700 ml の純水を加え、Likens-nickerson 装置（桐山製作所製）を用いて蒸留した。1 時間蒸留した後、フラスコ内の乾燥葉を取り出し、新たに同量のヤチヤナギの乾燥葉を入れ蒸留する操作を繰り返した。得られた精油は 1.1 と同様の条件で GC-MS による分析を行った。



#### 4. Solvent-Assisted Flavor Evaporation (SAFE) 装置を用いた

##### 高真空蒸留抽出

乾燥葉 10 g を 100 ml のジクロロメタンに浸漬させた。内部標準として 1-オクタノールの 10 µg/ml ジクロロメタン溶液を 2 ml 添加し、一晩静置後、ろ紙にて葉を取り除き、ジクロロメタン溶液を分離した。この溶液を、SAFE 装置（桐山製作所製）を用いて蒸留し（真空度：約  $1 \times 10^{-3}$  Pa, 湯浴温度 35°C）、揮発成分を液体窒素で冷却したフラスコ内に回収した。得られた香気成分はエバポレーターで濃縮し、1.1 と同様の条件で GC-MS による分析を行った

#### 5. AEDA (aroma extract dilution analysis) 法による主要成分中の特徴香気の設定

##### ガスクロマトグラフィー・オルファクトメトリー

（Gaschromatography-olfactometry : GC-O）による分析を行い、AEDA 法により栽培株から抽出した精油のにおい強度の測定を行った。精油をヘキサンで 2 倍希釈した溶液を調製し、これを倍々希釈して 128 倍希釈溶液まで調製した。希釈率の低いものから 2~3 人のパネラーでにおい嗅ぎを行った。においを感じなくなった希釈回数を希釈割合に乗じたものを FD(flavor dilution)値として示した。なお、FD 値は下に示す式により求めた。GC-MS 条件は 1.1 と同様に行った。

$$\text{FD 値} = 2^{n-1} \text{ (n: 希釈回数)}$$

## 第2節 結果および考察

### 1. ヤチヤナギ芳香成分の網羅的解析

ヤチヤナギ葉から3種類の方法で精油を抽出した結果、直接蒸留では乾燥葉300 gから精油0.989 g (収率0.33%)、連続蒸留では、乾燥葉40 gから0.169 g (収率0.42%)、SAFE高真空蒸留は乾燥葉10 gから0.131 g (収率1.3%)をそれぞれ得ることができた。

各抽出法で得られた精油中の芳香成分をGC-MSで分析し、そのクロマトグラムを図1.1、1.2および1.3に、同定された成分は表1.1にまとめた。分量はすべてのピーク面積の和に対する面積百分率%で算出した。なお、直接蒸留により得られた精油に関しては標品のある成分を定量した(表1.2)。各抽出法により総計で55成分を検出することができた。

抽出法の違いによる精油の成分を比較すると、直接蒸留ではlimonene、cymene、germacroneが主要成分で、その他 $\alpha$ -terpinolene、caryophyllene、 $\delta$ -cadinene、selina-3,7(11)-dien、geraniolおよびnerolidolが同定された。テルペン類の比率はモノテルペンが39.84%、セスキテルペンが23.81%となり、モノテルペン中ではlimonene、cymene、 $\alpha$ -pineneが大きな割合を占めた。連続蒸留法では、直接蒸留では得られなかった $\beta$ -myrceneが検出され、germacroneは直接蒸留よりも多く検出することができた。テルペン類の割合は直接蒸留と同程度であったが、モノテルペン中の割合は大きく異なり、1,8-cineoleが16.8%と最も多くを占め、次いで $\beta$ -myrcene 8.64%、limonene 7.18%であった。従って、連続蒸留法は、試料の量が少ない場合でも高い収量で精油を得られ、成分組成も直接蒸留と大きな差はないものの、成分比が異なることがわかった。高真空蒸留では、 $\beta$ -pineneが約25%と、直接蒸留の約5倍の含有量となった他、limoneneや1,8-cineoleの割合が他の抽出法よりも高く、モノテルペンが91%となり、精油の大部分を占めることがわかった。モノテルペン中の比率は $\beta$ -pinene (24.65%)、1,8-cineole (22.71%)、limonene (17.74%)、cymene (11.06%)の順に高く、他の抽出法で得られた精油とは $\beta$ -pineneの比率が大きくなることとなった。従って、低沸点成分の捕集を目的とする場合には高真空蒸留が有効であることがわかった。

これらの成分割合を外国産ヤチヤナギと比較してみると、 $\beta$ -pineneとcymeneは外国産ヤチヤナギにはそれぞれ0.1-2.5%、1-6%であるのに対し、北海道産ヤ

チヤナギにはそれぞれ 0.3-24.6%、5.6-13.1%と、多量に含有されていた。また、直接蒸留と連続蒸留で 10%以上の割合を占めた *germacrone* は、外国産では微量の検出のみであったことから、北海道産のヤチヤナギの特徴香気と言える<sup>10-15)</sup>。一方で、 $\alpha$ -*phellandrene*、 $\beta$ -*elemene*、*caryophyllene* は外国産ヤチヤナギに多く含まれ、*ocimene*、 $\beta$ -*phellandrene* は北海道産では検出されなかった。また、外国産ヤチヤナギでも、スコットランド産、フィンランド産およびオランダ産は全体的に類似した成分であるのに対し、スペイン産は他の国よりも低沸点物質が多くなっており、気候や温度などの環境的な要因によって違いが現れることが報告されている<sup>10)</sup>。これらのことから、北海道産ヤチヤナギの香調は、外国産ヤチヤナギとは類似していないものと考えられる。

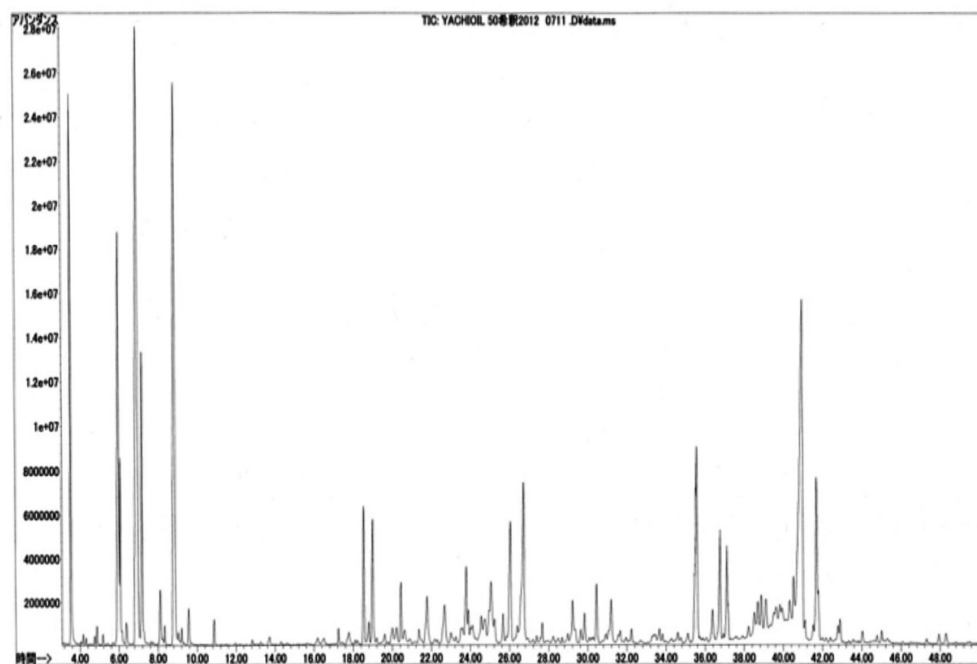


図 1.1 直接蒸留で得られた精油のクロマトグラム

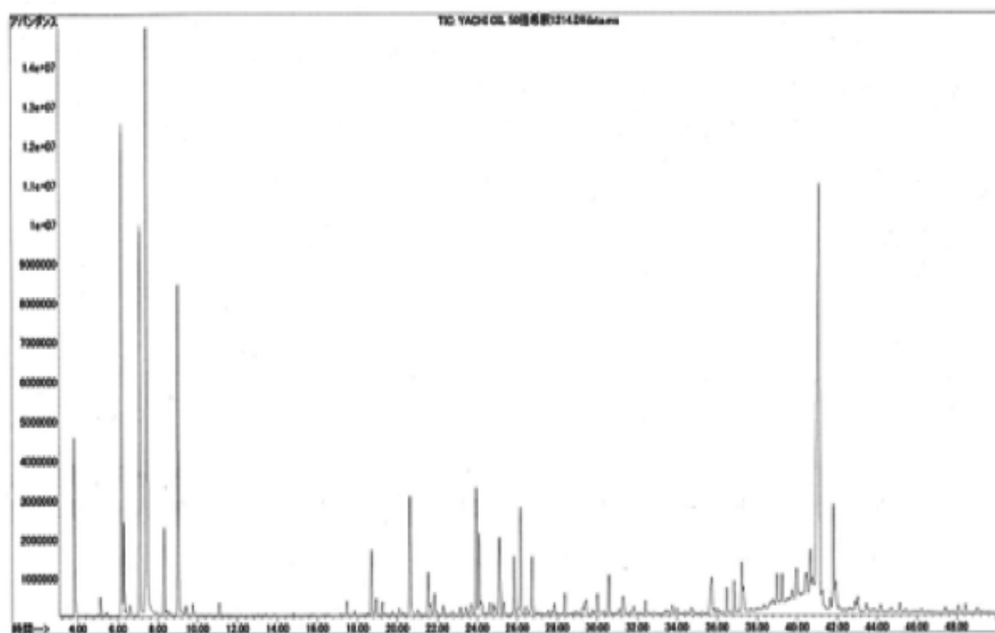


図 1.2 連続蒸留で得られた精油のクロマトグラム

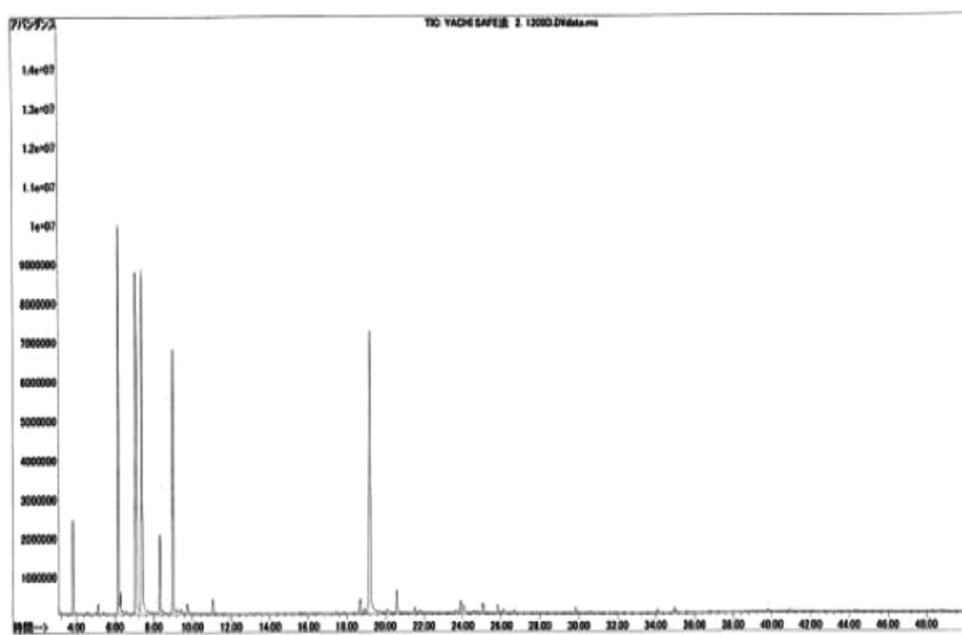


図 1.3 高真空蒸留で得られた精油のクロマトグラム

表 1.1 各抽出法により得られた精油の芳香成分 (%)

Constituent	直接蒸留	連続蒸留	高真空蒸留
$\alpha$ -pinene	4.28	2.88	3.54
$\beta$ -pinene	-	0.32	24.65
$\beta$ -myrcene	-	8.64	2.18
norbornane	0.02	-	-
camphene	0.08	-	-
$\alpha$ -phellandrene	1.29	0.99	-
3-carene	0.04	-	-
$\alpha$ -terpinolene	0.41	-	-
$\alpha$ -terpinene	-	0.16	-
limonene	11.41	7.18	17.74
1,8-cineole	3.12	16.08	22.71
$\beta$ -ocimene	0.03	-	-
$\gamma$ -terpinene	0.61	1.26	4.21
styrene	0.16	-	-
cymene	8.93	5.61	11.06
4-carene	-	0.13	-
isoamyl isovalerate	0.36	0.19	-
<i>cis</i> -2-(2-phenylenyl)furan	0.01	-	-
methyl heptenone	0.23	-	-
copaene	0.15	-	-
benzaldehyde	0.16	0.30	-
$\beta$ -vatiene	0.27	-	-
linalool	1.54	1.19	1.53
linalyl anthranilate	0.32	-	-
<i>trans</i> - <i>p</i> -2-menthen-1-ol	-	0.23	-
isobornyl acetate	0.14	-	-
2-norborneol	0.02	-	-
$\beta$ -elemene	0.31	0.17	-
caryophyllene	0.33	-	-

				continued
terpinen-4-ol	0.71	2.51	2.14	
isolekene	0.30	-	-	
$\gamma$ -elemene	0.94	0.50	1.25	
ipsdienol	-	0.17	-	
$\delta$ -cadinene	0.91	-	-	
$\alpha$ -terpinyl acetate	-	2.71	-	
$\alpha$ -terpineole	-	1.64	1.21	
$\beta$ -selinene	-	0.22	-	-
$\alpha$ -selinene	-	1.38	-	
<i>cis</i> - $\alpha$ -bergamotene	-	1.83	2.95	
carvotan acetone	0.26	-	-	
2-carene	1.17	-	-	
$\gamma$ -selinene	0.62	-	-	
geranyl acetate	2.15	-	-	
$\alpha$ -gurjunene	0.27	-	-	
selina-3,7(11)-dien	3.43	-	-	
geraniol	0.75	-	-	
benzyl pentanoate	0.78	0.82	-	
dehydroaromadendrene	tr	-	-	
$\beta$ -ionone	0.11	-	-	
nerolidol	3.37	-	-	
$\beta$ -elemenone	1.51	0.67	1.17	
germacrone	10.71	18.22	tr	
cinnamyl 3-methylbutyrate	0.06	-	-	
farnesol	0.08	-	-	
Unidentified	36.07	23.51	2.10	
<b>Total</b>	<b>98.42</b>	<b>99.51</b>	<b>98.44</b>	
Monoterpenoids	37.14	49.18	90.97	
Sesquiterpenoids	23.20	22.99	5.37	
Others	2.01	3.83	0	

表 1.2 GC-MS による精油成分の定量 (直接蒸留法)

Components	(mg/g)
$\alpha$ -pinene	0.48
$\beta$ -pinene	0.04
limonene	1.33
1,8-cineole	0.42
cymene	1.63
isoamyl isovalerate	0.85
linalool	0.73
terpinen-4-ol	3.60
nerolidol	0.90



## 2. AEDA 法による主要成分中の特徴香気の決定

ヤチヤナギ葉の芳香成分を特定するために GC-O による分析を行い、AEDA 法によって「におい強度」を求めた (図 1.4)。保持時間 ( $t_R$ ) 12 分でレモン、ミントのようなすっきりした香り、 $t_R$  26 分で甘いフローラル調の香り、 $t_R$  32 分前後で薬草のような香りを特に感じた。GC-MS のクロマトグラムから、 $\beta$ -pinene (FD 値 2、以下同じ)、limonene (64)、1,8-cineole (64)、cymene (2)、linalool (128)、terpinene-4-ol (4)、 $\beta$ -selinene (16) および  $\beta$ -elemenone (16) が検出された (表 1.3)。FD 値は linalool が最も高く、次いで limonene、1,8-cineole が高かった。 $\beta$ -pinene は cut grass、limonene は green や citrus、1,8-cineole は eucalyptus、linalool は flowery などの香りを感じることが出来た。以上より、ヤチヤナギの芳香は linalool のフローラル、limonene のシトラス、1,8-cineole のユーカリ様香気によって特徴付けられていることが示唆された

そこで、これら 8 成分を GC-MS による分析により得られた成分割合の比で混合したところ、ヤチヤナギ香とはならなかった。すなわち、ヤチヤナギ香においては化合物のニオイ寄与度を測定しただけでは特徴香を明らかにすることは出来ないことが示唆された。

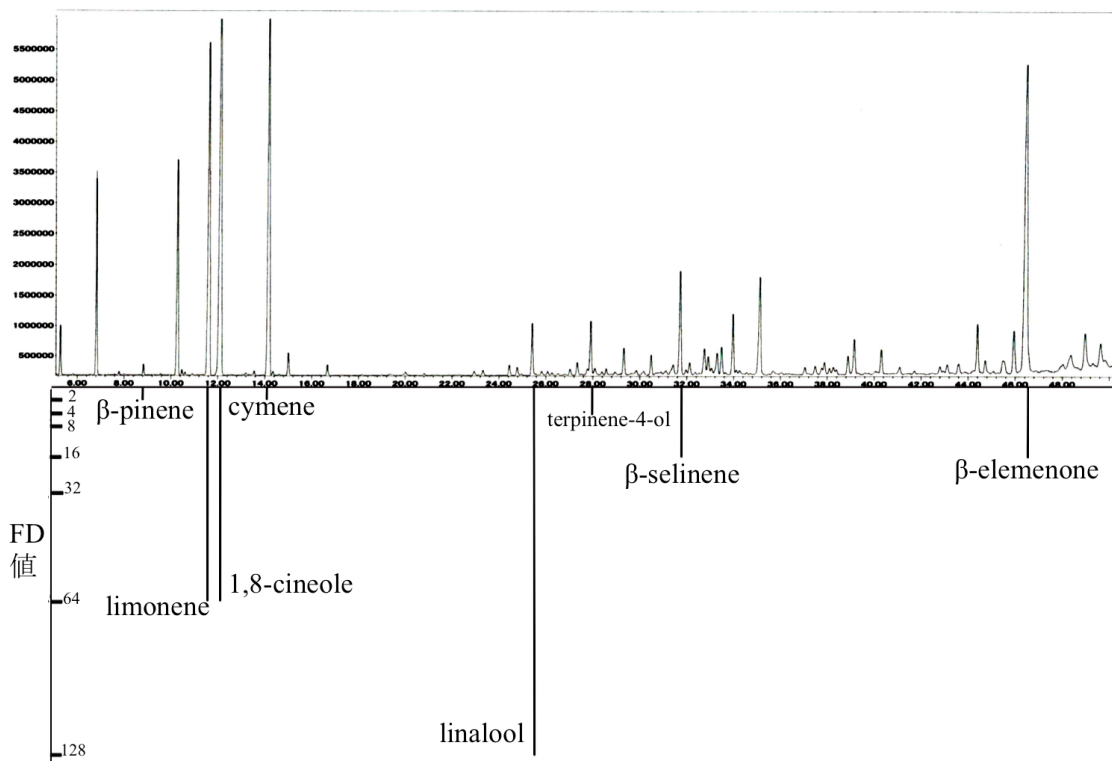


図 1.4 精油のクロマトグラムと AEDA 法の結果

表 1.3 AEDA 法で感知された成分

No.	t <sub>R</sub>	Compound	Odor description	FD factors
2	8.8	β-pinene	green	2
6	11.6	limonene	citrus	64
7	12.1	1,8-cineole	eucalyptus	64
9	14.2	cymene	citrus	2
13	25.4	linalool	floral	128
17	27.9	terpinene-4-ol	floral	4
23	32.5	β-selinene	cut green glass	16
32	46.4	β-elemenone	medicine-like	16

## まとめ

ヤチヤナギの葉から直接蒸留、連続蒸留およびSAFE法により精油を抽出し、芳香成分を網羅的に解析した。その結果、直接蒸留で得られた精油では、limonene、cymene、germacroneが主要成分で、その他 $\alpha$ -terpinolene、caryophyllene、 $\delta$ -cadinene、selina-3,7(11)-dien、geraniolおよびnerolidolが同定された。一方、連続蒸留法由来の精油では、直接蒸留の精油には検出できなかった $\beta$ -myrceneや $\alpha$ -terpinylacetateを抽出することができた。さらに、SAFE法による精油では、 $\beta$ -pineneが約25%と、直接蒸留の約5倍の含有量となった他、limoneneや1,8-cineoleの割合が他の抽出法よりも高く、モノテルペン類を効率よく捕集することができた。これらの結果を外国産のヤチヤナギ精油と比較すると、北海道で栽培されたヤチヤナギはlimonene、cymeneおよびgermacroneの含有率が高かったことから、地域によって精油の香調は異なることが示唆された。また、AEDA法によって、 $\beta$ -pinene、linalool、limonene、1,8-cineole、cymene、terpinene-4-ol、 $\beta$ -selineneおよび $\beta$ -elemenoneの8成分によってヤチヤナギの香りの骨格が形成されていることが示唆された。

## 第 2 章 ヤチヤナギの芳香特性の解析

前章において、ヤチヤナギの芳香成分を種々の方法で抽出し、網羅的に解析した。一方、植物の芳香は、単一の化合物の強弱により決定されるものではなく、多様な化合物による調和によって形成される。そこで、本章ではヤチヤナギ香の香調に対して、個々の成分がどのような関与をするのかを明らかにすることを目的とした。現在その関係性を検証する手法の一つとして AROMATCH が用いられている<sup>16)</sup>。

AROMATCH とは、GC-O で匂いを確認する際に、スニッフィングポートに試料を入れたフラスコを繋ぎ、GC で分離された成分とヤチヤナギ香を混合することで混合香気を形成させる。そして、その匂いをヤチヤナギ香気単独の場合と比較し、増強効果および香気変調を評価する方法である。

そこで、本章ではヤチヤナギ精油を分画し、官能的な解析と共に、各香気成分を精油の芳香と混合させることで、ヤチヤナギ香の香調に寄与する成分を明らかにすることを目的とした。

### 第 1 節 試料および実験方法

#### 1. 試料・試薬

株式会社レクシアより恵与されたヤチヤナギ乾燥葉を用いた。精油は直接蒸留法により抽出し、ヘキサンで 50 倍希釈した溶液を GC-MS で分析した。分析条件および成分の同定方法は、第 1 章と同様に行った。試薬は第 1 章と同様のものを用いた。

#### 2. 精油の分画と分析

##### 2.1 シリカゲルカラム分画および GC-MS 分析

内径 1.5 cm 長さ 30 cm コック付きカラムクロマト管に 50 g のシリカゲル(メッシュ 63~210  $\mu\text{m}$ ) をヘキサンで懸濁して充填した。ヘキサン 500 ml でカラムを 2 回洗浄して、平衡化を行った。これに精油 1.0022 g をヘキサン 5 ml に溶解したものをマウントした。溶離液はヘキサン、ジエチルエーテルおよびメタノールを表 2.1 の割合で調製した。これらをカラムに通液し、得られたフラク

クションをエバポレーターおよび窒素ガス気流下で濃縮した。濃縮物はそれぞれヘキサンで25倍に希釈し、GC-MSに供した。

## 2.2. 各フラクションの官能評価

シリカゲルカラム分画により得たフラクション1~8の官能評価を、20代前半の男女（男性10名、女性10名）をパネルとして行った。パネルに試料を嗅がせ、5点評点法でヤチヤナギ精油との類似度を評価した。なお、匂いに対するコメントも明記させた。

表 2.1 各フラクションの溶離液の割合

フラクション	1	2	3	4	5	6	7	8
ヘキサン (ml)	100	98	95	90	80	50	0	メタノール 100 (ml)
ジエチルエーテル (ml)	0	2	5	10	20	50	100	

### 3. 混合香気下による分析

ヘキサンで 10 倍、25 倍および 50 倍に希釈したヤチヤナギ精油各 1  $\mu$ l を GC 注入試料とした。フラスコ内にはヤチヤナギ乾燥葉 10 g またはヤチヤナギ精油をヘキサンで 10 倍、25 倍、50 倍に希釈した溶液を各 1 滴用いた。GC 注入試料とフラスコ内試料の希釈倍率の組み合わせを表 2.2 に示した。また、ヤチヤナギ精油をヘキサンで 10 倍、25 倍、50 倍に希釈した溶液で、GC でスニッフィングをし、混合香気下で行った実験と比較した。使用したカラムは Inert Cap Pure (WAX) で、長さ・直径は 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m、注入口温度は 250 $^{\circ}$ C、カラム温度は 60 $^{\circ}$ C $\sim$ 220 $^{\circ}$ C (3 $^{\circ}$ C/min)、スプリット比は 10:1、流量は 20 ml/min とした。

表 2.2 混合香気の組み合わせ

GC フラスコ	10 倍希釈	25 倍希釈	50 倍希釈
10 倍希釈	○	— *	— *
25 倍希釈	○	○	— *
50 倍希釈	○	○	○

— \* : フラスコ内の精油濃度が濃く、GC からの香気が確認出来なかった組み合わせ

## 第 2 節 結果および考察

### 1. 精油の分画と香調の解析

精油中の香気成分を分画し、ヤチヤナギ香における各香気成分の役割を検討した。シリカゲルカラム分画により得た各濃縮物の重量および主な香気成分を表 2.3 に示した。重量はフラクション 4 が 360.8 mg と最も多く、次いでフラクション 5 が 249 mg であった。

各フラクションの香調を官能的に解析したところ、フラクション 1 は金属香が強調された森林香、2 はレモンピール感のある皮臭、3 は発酵臭、4 はフローラルな薬草様、5 は薬草様、6 はフローラルグリーン、7 は紅茶様であった。各フラクションとヤチヤナギ精油の匂いを比較し、精油との類似度を 5 段階評価した結果を図 2.1 に示した。匂いのコメントで「薬草様」と挙げられたフラクション 5 が最も類似度が高かった。次いで、「フローラルグリーン」のフラクション 6、「フローラルな薬草様」および「紅茶様」のフラクション 4 と 7 の順に高かった。この結果より、ヤチヤナギ香は薬草様の香調をベースとして、グリーンなフローラル感に紅茶様の香りが構成要素となっていることが分かった。

そこで、各フラクションを構成する化合物を GC-MS で分析し、香調の関係を解析した。その結果、ヤチヤナギ香のベースとなるフラクション 5 では、FD ファクターが高く、香調がヤチヤナギに近いと考えられた  $\beta$ -elemenone と germacrone の他に、1,8-cineole、 $\beta$ -ionone、cinnamyl acetate 等により構成され、フラクション 6 では linalool や terpinene-4-ol、nerolidol、フラクション 7 では citronellol、geraniol で構成されていた (表 2.3)。一方、ヤチヤナギ香にはよだれを連想させる香調も感じられるが、本実験で得られたフラクションにこれを感じることはできなかった。



表 2.3 シリカゲルカラム分画より得た濃縮物の重量および  
主な香気成分

Fr.	ヘキサン： ジエチルエーテル	重量 (mg)	主な香気成分
1	100 : 1	121.7	$\alpha$ -pinene limonene $\alpha$ -phellandrene $\alpha$ -terpinolene $\gamma$ -terpinene selina-3,7(11)-diene
2	98 : 2	75.1	$\beta$ -myrcene limonene cymene $\gamma$ -elemene $\alpha$ -farnesene selina-3,7(11)-diene
3	95 : 5	27.6	$\gamma$ -elemene elixene cadaline
4	90 : 10	360.8	1,8-cineole terpinyl acetate geranyl acetate benzyl isovalerate $\beta$ -elemenone germacrone
5	80 : 20	249.0	1,8-cineole carvotanacetone $\beta$ -ionone cinnamyl acetate

continued			
5	80 : 20		$\beta$ -elemenone germacrone
6	50 : 50	126.0	linalool terpinene-4-ol sabinyl acetate nerolidol farnesol juniper camphor
7	0 : 100	111.8	$\alpha$ -terpineol citronellol geraniol
8	メタノール	15.3	—

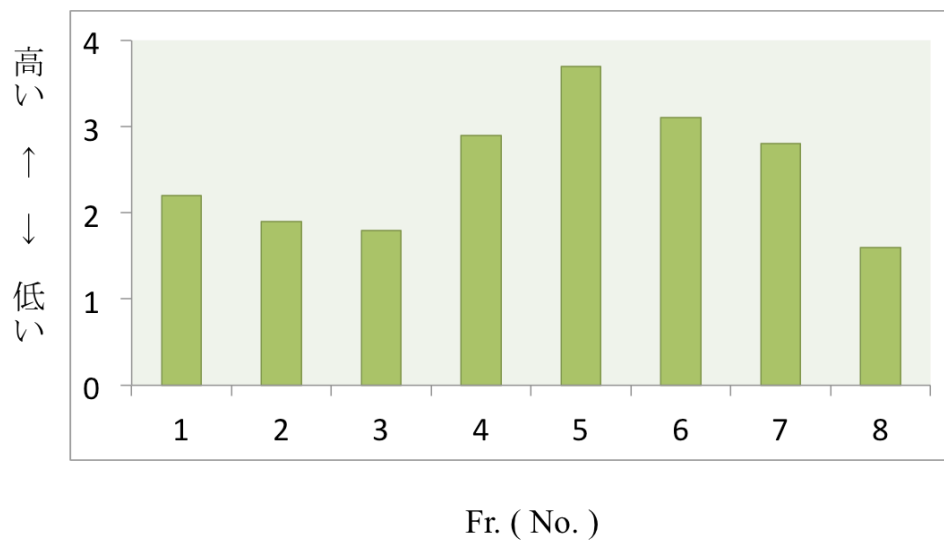


図 2.1 各フラクションにおけるヤチヤナギ精油への類似度

## 2. ヤチヤナギ香における各香気成分の役割

### 2.1 AROMATCH の最適条件の検討

各香気成分の混合香気における特性を調査するために、まず分析条件を検討した。その結果、GC 注入試料が 10 倍希釈のときに検出成分が最も多かった (表 2.4)。一方、25 倍および 50 倍希釈の試料は、カラムで分離された香気は微量であることから、混合香気下においてその特徴を検知することはできなかった。また、ヤチヤナギ香気を発生するフラスコ内の試料濃度は、50 倍希釈で最も多くコメントが得られた。以上により、混合香気のお最適条件として、GC 注入試料を 10 倍希釈の精油、フラスコ内には 50 倍希釈の精油を入れて以下の実験を行った。

### 2.2 香気成分の変調および出現

精油の 10 倍希釈溶液をスニッフィングし、その結果と 2.1 で最適とされた組み合わせで AROMATCH を行った時のコメントを比較した (表 2.5)。59 成分が感知され、そのうち 19 成分が混合により変調するか、新たに感知された。tr 3.8 分の norbornane は、混合香気になると匂いが確認でき、その香りはニラ様であった。tr 10.0 分の成分は混合香気になると、マスキング効果による消臭が認められた。しかし、同成分はクロマトグラム上でピークが確認できず、成分の特定には至っていない。tr 14.3 分の linalool oxide は、混合香気になると泥水や雨水の匂いとなった。強い足裏臭の tr 21.4 分の cadinene は、混合香気になるとよだれ様やパン生地が発酵した匂いに変調した。また、tr 36.2 分の cis-stilbene のシナモン様の匂いも、よだれ様に変調した。この匂いはヤチヤナギ乾燥葉の匂いと類似しており、ヤチヤナギの葉が乾燥した際に、強く感じられる香気成分と考えられた。ウッディな香りを有する tr 31.8 分の dehydroaromadendrene は、混合香気下において、ウッディ感の増強効果を示した。従来までの研究において、ヤチヤナギ香の key 化合物と示唆された tr 35.0 分の  $\beta$ -elemenone は、混合香気になると塩素様の匂いとなった。一方、tr 40.1 分の germacrone は、分離後の匂いがウッディ様であったが、混合香気下ではウッディ感のある菓草様へと変調した。

以上の結果から、ヤチヤナギ香は香気成分の混合だけでなく、成分の変調・増強効果により構成されていることが認められた。また、前項の結果と合わせ

て考えると、ヤチヤナギ香のベースとなる「薬草様」の香調は *germacrone* と *dehydroaromadendrene* によるところが大きく、*linalool* や *geraniol* によるフローラル感や紅茶感、*α-pinene* によるグリーン感が強調されることが考えられた。さらに、分画物では感じられなかった「よだれ様」は、*cadinene* および *cis-stilbene* による変調効果によることが明らかとなった。

表 2.4 GC 注入試料が 10 倍希釈溶液の混合香気下コメント

t <sub>R</sub>	Compound	GC 10/	GC 10/	GC 10/
		フラスコ 10	フラスコ 25	フラスコ 50
3.0	$\alpha$ -pinene	森林様	森林様	ウッディ様 森林様
3.8	norbornane	ニラ様	ニラ様	ニラ様
5.2	$\beta$ -pinene	土様・鉄臭	土様・鉄臭	鉄様
6.0	limonene	ハッカ様	ハッカ様	ハッカ様
8.9	isoamyl isovalerate		コーン様	米様
10.0	<i>cis</i> -2-pentenyl-furan	消臭		消臭
10.8	unidentified			土様
12.6	nonanal			ビニール臭
14.3	linalool oxide			泥水臭
15.6	benzaldehyde	カメムシ臭		カメムシ臭
16.4	ylangene	朱肉様	朱肉様	朱肉様
17.1	linalool	フローラル様	シトラス+ フローラル様	シトラス+ フローラル様
18.2	bornyl acetate	キュウリ様	キュウリ様	キュウリ様
19.0	terpinene-4-ol	土様	土様	土様
20.3	$\gamma$ -elemene	腐敗臭	アニマリック	アニマリック
21.4	cadinene	よだれ様	よだれ様	発酵臭
22.4	(+)-2-carene		豆腐様	豆腐様
22.7	$\alpha$ -selinene		ビニール臭	強いビニール臭
23.0	(+)-carvone		新品の 電化製品臭	新品の 電化製品臭
24.3	eremophilene			ミョウガ様
26.2	$\alpha$ -gurjunene	豆腐様	豆腐様	豆腐様
26.3	$\beta$ -damascenone	リンゴ煮様	リンゴ煮様	リンゴ煮様
26.9	elixene	ソース様	メントール様	メントール様
27.7	geraniol		フローラル様	フローラル様
28.2	unidentified		マツタケ様	マツタケ様

continued

28.3	1-octen-3-ol		マツタケ様	
29.0	benzyl isovalerate	動物臭		酸臭
30.3	$\beta$ -ionone	甘いワカメ様	甘いワカメ様	フローラル様 甘いワカメ様
31.8	dehydro aromadendrene	ウッディ調香水	ウッディ調 香水	強いウッディ調の香 水
34.0	nerolidol	雑巾臭		雑巾臭・汗臭
35.0	$\beta$ -elemenone	塩素臭	塩素臭	電化製品臭
36.2	<i>cis</i> -stilbene	よだれ様	よだれ様	よだれ様・ ウコン様
36.5	unidentified	ウコン様	ウコン様	ビニール臭
36.9	unidentified	ウコン様	やや香水様 ビニール臭	やや香水様 ビニール臭
37.5	(+)-calaren	ウコン様	ウコン様	ソース様
38.0	unidentified	ウコン様	ウコン様	
38.1	2-methoxy-4-vinylphenol	強いウコン様	ウコン様	ウコン様・ 薬品臭
38.5	unidentified			ウッディ様
39.1	methyl hexadecanoate	森林様	鉛筆様	鉛筆様
40.1	germacrone	ウッディ様	ウッディ様	ウッディ様薬草様
41.8	unidentified	麻様		麻様
42.5	$\gamma$ -selinene			リンゴ煮様
44.0	2,3-dihydrobenzofuran			ウコン様
47.3	unidentified	マツタケ様	吸い物様	
48.1	unidentified	バニラ	バニラ	バニラ
48.2	unidentified	焦げ臭 樹液様	樹液様	樹液様
48.9	unidentified	強いウコン様	ウコン様	ウコン様

表 2.5 最適条件下での混合香気の結果

$t_R$	Compound	GC 10 倍 (スニッフィング)	GC10 倍 / フラスコ 50 倍 (AROMATCH)
3.0	$\alpha$ -pinene	ヒノキ様	森林様
3.8	norbornane		ニラ様
4.5	$\alpha$ -phellandrene	土様	
5.2	$\beta$ -pinene	土様・鉄臭	鉄様
6.0	limonene	シトラス+ 松様・ハッカ様	ハッカ様
6.5	1,8-cineole	腐葉土臭	
8.9	isoamyl isovalerate	土様・コーン様	米様
10.0	<i>cis</i> -2-pentenyl-furan	土様	土様
10.8	unidentified		消臭
12.6	nonanal	土+葉様 ビニール臭	ビニール臭
13.5	styrene	腐葉土臭 アニマリック	
14.3	linalool oxide		雨水様
15.6	benzaldehyde	枯葉様・ カメムシ臭	カメムシ臭
16.4	ylangene	朱肉様	朱肉様
17.1	linalool	シトラス+ フローラル様	シトラス+ フローラル様
18.2	bornyl acetate	キュウリ様	キュウリ様
19.0	terpinene-4-ol	土様	土様
19.8	tricyclene	フローラル様	
20.3	$\gamma$ -elemene		アニマリック
21.4	cadinene	足裏様	よだれ様・発酵臭
22.4	(+)-2-carene		豆腐様
22.7	$\alpha$ -selinene	葉草様・ビニール臭	強いビニール臭

continued			
23.0	(+)-carvone	塩素様 ビニール臭	電化製品臭
24.3	eremophilene		ミョウガ様
26.2	$\alpha$ -gurjunene	豆腐様	豆腐様
26.3	$\beta$ -damascenone	リンゴ煮様	リンゴ煮様
26.9	elixene	グリーン メントール様	メントール様
27.7	geraniol	フローラル様	フローラル様
27.8	unidentified	男性用香水	
28.2	unidentified	マツタケ様	マツタケ様
28.3	1-octen-3-ol	マツタケ様	
29.0	benzyl isovalerate	足裏臭	酸臭
30.3	$\beta$ -ionone	フローラル様 甘いワカメ様	フローラル様 甘いワカメ様
31.8	dehydroaromadendrene	ウッディ調香水	ウッディ調香水
34.0	nerolidol	糞便臭	雑巾臭・汗臭
35.0	$\beta$ -elemenone	薬草様	塩素臭
36.2	<i>cis</i> -stilbene	シナモン様	ウコン様 よだれ様
36.5	unidentified	ビニール臭	ビニール臭
36.9	unidentified	シトラス調香水 ビニール臭	香水 ビニール臭
37.5	(+)-calaren	グリーン香	ソース様
38.1	2-methoxy-4-vinylphenol	ウコン様 薬品様	ウコン様 薬品様
38.5	unidentified	薬品様・ゴム臭	ウッディ様
39.1	methyl hexadecanoate	ウコン様 鉛筆様	鉛筆様
40.1	germacrone	ミツバ様・ウッディ様	薬草様・ウッディ様



contunued			
41.0	juniper camphor	ハーブ様・ビニール臭	
41.8	unidentified	麻様	麻様
42.5	$\gamma$ -selinene	ハーブ様	甘いリンゴ様
44.0	2,3-dihydrobenzofuran	セリ様・ウッディ様	ウコン様
45.7	benzophenone	磯臭	
48.1	unidentified	バニラ様	バニラ様
48.2	unidentified	アニマリック	樹液様
48.9	unidentified	強いウコン様	ウコン様

## まとめ

ヤチヤナギ精油をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、各フラクションの香調と構成する化合物を分析し、ヤチヤナギの芳香特性を解析した。官能評価によってヤチヤナギ香気との類似度を測定したところ、「ウッディ感のある薬草様」香気を持つフラクションで最も高く、その香調は  $\beta$ -elemenone、germacrone および 1,8-cineole 等に由来すると推察された。次いで、「フローラルグリーン」や「紅茶様」の香調を有するフラクションで精油香気との類似度が高く、linalool、terpinene-4-ol、nerolidol、geraniol 等が寄与成分と考えられた。

一方、精油で感じられる「よだれ様」の香りはどのフラクションにも感じるができなかった。そこで、各香気成分の詳細な役割を調べるために、ヤチヤナギ香気中に GC で分離された香気成分を混合してそれぞれの香調を解析した。その結果、「ウッディ感のある薬草様」の香調は germacrone に由来し dehydroaromadendrene により増強され、linalool や geraniol によってフローラル感や紅茶感、 $\alpha$ -pinene によりグリーン感の強調されることが明らかとなった。さらに、フラクションでは感じられなかったよだれ感は、cadinene および cis-stilbene の変調により発生していることが明らかとなった。

### 第 3 章 ヤチヤナギのリラクゼーション効果

ヤチヤナギは、従来の研究において抗がん作用や抗菌作用があると報告されている。一方、ハーブとしての利用もあり、化粧品や食品などにリラクゼーションを目的として使用されていた。

香りの効用はその作用メカニズムから、香りの成分が直接生体に作用して生じる薬理効果と、香りが嗅覚を介して脳を刺激することで生じる心理・生理効果の二つに分けて考えることができる。リラクゼーション効果の検証方法としては、心理面に与える影響を見るためのアンケート調査や、自律神経系への影響を見る心拍や血圧の測定、生理的效果を検証するための唾液アミラーゼやコルチゾール測定、神経生理学的変化を検討するための脳血流量測定や脳波測定などが挙げられる。

本研究ではヤチヤナギ精油の心理・生理効果を、Profile of Mood States (POMS) によるアンケート調査、唾液アミラーゼ測定および Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) による脳血流量の測定方法を用い、一般的にリラクゼーション効果を有するといわれているラベンダーなどと比較することで検討した。

#### 第 1 節 試料および実験

##### 1. 試料および試薬

株式会社レクシアより恵与されたヤチヤナギ乾燥葉を用いた。ラベンダー精油およびローズマリー精油は曾田香料のものを用い、イソ吉草酸、クエン酸トリエチルは関東化学株式会社のものを用いた。他の試薬は第 1 章と同様のものを用いた。

##### 2. 試料の調製

精油は直接蒸留法により抽出し、内径 4 cm 長さ 30 cm コック付きカラムクロマト管に 100 g のシリカゲル (メッシュ 63~210  $\mu\text{m}$ ) をヘキサンで懸濁して充填した。ヘキサン 500 ml でカラムを 2 回洗浄して、平衡化を行った。これに精油 2.0 g をヘキサン 5 ml に溶解したものをマウントした。溶離液はヘキサン、ジエチルエーテルおよびメタノールを表の割合で混合して調製し、順に 100 ml

ずつで溶出し、フラクション1~16を得た(表3.1)。得られたフラクションをエバポレーターおよび窒素ガス気流下で濃縮した。濃縮物はそれぞれヘキサンで希釈し、GC-MSで分析した。分析条件は第1章と同様とした。これらの中から、官能評価でヤチヤナギ香が感じられたフラクション4、9、11、13を実験試料として用いた。

表 3.1 各フラクションの溶離液の割合 (%)

Fr.	1・2	3・4	5・6	7・8	9・10	11・12	13・14	15・16
ヘキサン	100	98	95	90	80	50	0	メタ ノール
ジエチル エーテル	0	2	5	10	20	50	100	100

### 3. POMS を用いた心理的効果の検証

POMS は日本語版 No.850 (金子書房) の質問紙を使用した。調査では、65 項目の質問について「今の気分」による回答を 5 件法 (0 = まったくなかった、1 = 少しあった、2 = まあまああった、3 = かなりあった、4 = 非常に多くあった) 自己記入式により求めた。各項目の回答は、POMS の得点集計法に基づき 6 尺度ごとの粗得点にまとめ、換算表により T 得点 (全国平均を 50 点としたときに対して標準化された得点) に換算した。サンプルはラベンダー精油 (1% 溶液)、イソ吉草酸 (1% 溶液)、ヤチヤナギ精油 (原液・10% 溶液・2% 溶液) を用いた。香りを何も嗅がない状態と、香りが付香された試香紙を 30 秒間嗅いだ後に質問用紙に回答してもらった。

### 4. 唾液アミラーゼ測定によるストレス値計測

唾液アミラーゼによるストレスの判定は、ニプロ株式会社の酵素分析装置「唾液アミラーゼモニター」で測定した。これは、唾液中のアミラーゼが試験紙に含まれている  $\alpha$ -2-クロロ-4-ニトロフェニル-ガラクトピラノシルマルトサイドを加水分解し、生成すると 2-クロロ-4-ニトロフェノールの発色 (黄色) を光化学ユニット (波長 470 nm の light-emitting diode (LED) と受光素子)

で 20 秒間測定し、その反射率の変化を酵素活性値に変換することを原理として、唾液中のアミラーゼ活性を定量化する。まず専用チップを舌下に挿入し唾液を浸み込ませ、このチップをすみやかに本体に挿入して、約 60 秒後に表示される唾液中のアミラーゼ活性 (KU/l) を読み取る。測定結果の判定は、0-30 KU/l がストレスなし、31-45 KU/l はストレスややあり、46-60 KU/l はストレスあり、61 KU/l 以上はストレスがかなりある、となり、200 KU/l まで測定可能である。

サンプルは、ポジティブ対照としてラベンダー精油（原液および 1% 溶液）、ローズマリー精油（原液および 1% 溶液）、ネガティブ対照として、0.1% イソ吉草酸溶液を使用した。ヤチヤナギ精油は 原液および 10%、5%、2% 溶液を用意した。また、ヤチヤナギ精油画分 Fr.4、9、11、13 を 10 倍希釈したものを用いた。

香りを何も嗅がない状態と、香りが付香された試香紙を 30 秒間嗅いだ後に唾液アミラーゼ測定を実施した。

## 5. 脳血流測定によるリラクゼーション効果の検討

脳血流測定には携帯型近赤外線組織酸素モニタ装置（株式会社 Dynasense 社製）を用いた近赤外線スペクトロスコーピー（NIRS）法を用いた。測定部位は VLPFC（腹外側前頭前野）とした。国際 10-20 法により VLPFC を探りだし、脳活動の変化を血中の酸素化ヘモグロビン量の変化  $\Delta$  [oxy-Hb] としてモニターした。20 代前半の男女各 5~7 名を被験者とした。携帯型近赤外線組織酸素モニタ装置は、近赤外光を照射し、照射部位から 3 cm 離れた部位で検出された光を解析することにより、酸素化ヘモグロビン及び脱酸素化ヘモグロビンの変化を追跡する装置である。脳が香りという刺激を受けることで、酸素化ヘモグロビンの量の増減にどのような変化が現れるかを調べた。また、近赤外線スペクトロスコーピー（NIRS）は局所脳活動の増加はその領域の酸素消費と血流増加を伴い、酸素化ヘモグロビンは血流の変化を反映するとされる<sup>17,18)</sup>。測定深度は、照射-受光間距離が 3 cm の場合、頭皮上から約 25 mm 程度とされる。fMRI は脱酸素化ヘモグロビンを反映しているとされるが、NIRS は酸素化ヘモグロビンを測定することが出来る。NIRS 信号では、血流変化を見るのに酸素化ヘモグロビンの方がより鋭敏である。また、VLPFC を探り出す国際 10-20 法について以下に記載した。

- ① 眉間から頭の最上部位を通り後頭部のくぼみまでの長さを計測

- ② ①の 50%の位置に印を付ける
- ③ ①の測定時に眉間から上部 10%に印を付ける
- ④ 聴宮から②を通り反対の聴宮まで計測
- ⑤ 計測した両聴宮から上部 10%に印を付ける
- ⑥ 左⑤→③→右⑤を通るよう計測し、内側 20%に印を付ける

サンプルは4. と同様のものを用いた他、希釈溶液として使用したクエン酸トリエチルを用いた。実験は、安静 (rest) を30 秒間、その後サンプルを30 秒間嗅がせた。複数のサンプルを連続で嗅がせる場合は、サンプル間に60 秒の安静時間を設けた。実験は静かで匂いのこもらない部屋で行い、被験者はソファに座り安静を保ち、測定中は香りが付香された試香紙を受け取り嗅ぐこととした。なお、ポジティブ対照であるラベンダーおよびローズマリーの香りを苦手とする被験者は除外した。

## 第 2 節 結果および考察

### 1. POMS によるヤチヤナギ芳香の心理的効果の検証

POMS は心理的効果を探るため、様々な試験で活用され、効果が報告されている<sup>19-21)</sup>。なお、POMS の 6 尺度は、以下のことを表すとされている。緊張・不安尺度 (T-A) は、「気がはりつめる」、「不安だ」などの項目からなり、緊張および不安感を表す。抑うつ・落ち込み尺度 (D) は、「ゆううつだ」などの項目からなり、自信喪失感を伴う抑うつ感を表す。怒り・敵意尺度 (A-H) は、「怒る」、「すぐ喧嘩したくなる」などの項目からなり、怒りと他者への敵意を表す。活気尺度 (V) は、「生き生きする」などの項目からなり、元気さ、躍動感、活力を表し、他の五つの尺度との間に負の相関が認められる。疲労尺度 (F) は、「ぐったりする」などの項目からなり、意欲減退、活力低下を表し、活気尺度との間に負の相関がある。混乱尺度 (C) は、「頭が混乱する」などの項目からなり、当惑、思考力低下を表す。「活気」以外の項目については、値が低いほど気分・感情が良好な状態にあることを示す。回答は T 得点に換算後、測定前の数値を引くことで、香りを嗅ぐことによる各尺度の変化量を求め、その結果を図 3.1 に示した。本実験では、リラクゼーション効果を有するラベンダーをポジティブコントロールとし<sup>22-28)</sup>、ネガティブコントロールには悪臭成分であるイソ吉草酸を用いた。ラベンダーの結果を見ると、「不安や怒り、抑うつ、怒り」といったストレスの尺度はイソ吉草酸に比較すると低かった。一方、「活気」の尺度は高かったことから、ラベンダーオイルを嗅ぐことで気分や感情が良好になったことを示している。ヤチヤナギ精油についてみると、「抑うつ」を除いてラベンダーと同様の傾向を示した。「抑うつ」について高くなったことから、ヤチヤナギ香を嗅ぐことで、気分・感情が落ち着くと考えられ、活気をもたらすラベンダーとは安静効果の影響の仕方が異なると考えられた。また、その効果は精油の濃度によって異なっており、10%溶液では、活気以外の項目でラベンダーよりも低値であった。

次に、総合的な気分・感情を示す指標として、「活気」以外の 5 尺度を合計し、この合計から「活気」尺度得点を引いた値である Total Mood Disturbance (TMD) も算出した (表 3.2)。この値は、低いほど気分・感情が良好なことを示す<sup>29,30)</sup>。この結果から、ヤチヤナギ精油の 10%溶液はラベンダーに次いで気分・感情の良好を示していることが認められた。

以上より、ヤチヤナギの芳香には人の気分や感情をリラックスさせる効果があることが明らかとなり、その程度は精油の濃度によって異なることが示唆された。

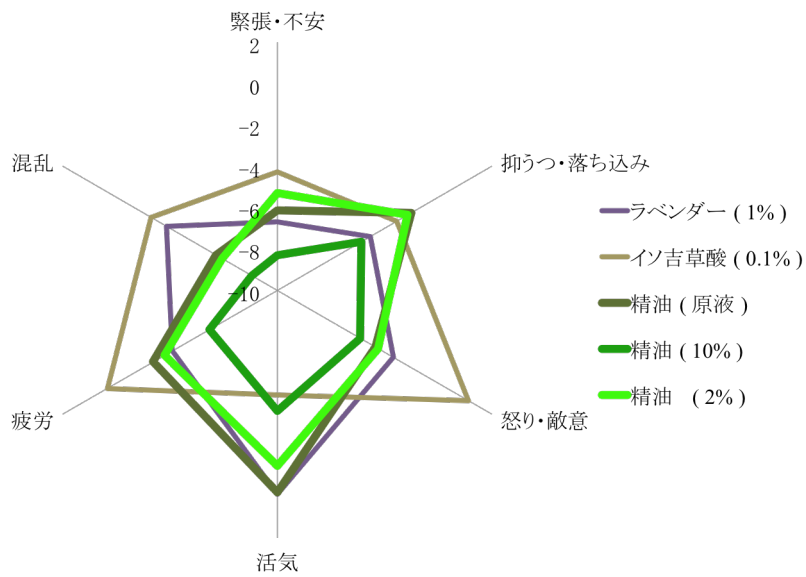


図 3.1 各サンプルの気分尺度変化量

表 3.2 各サンプルの TMD および香り吸引後の変化量

	TMD	測定前からの変化量
測定前	230.9	-
ラベンダー	165.0	-65.9
精油原液	197.5	-33.7
精油 10%溶液	189.1	-41.8
精油 2%溶液	197.9	-33.0
イソ吉草酸	192.5	-38.4



## 2. 唾液アミラーゼ測定によるストレス値計測

本研究では、香りを嗅ぐ前後の唾液アミラーゼ活性値を計測することにより、ストレス値の軽減効果の有無を検討した。唾液アミラーゼの反応は30秒から1分程度で生じ、簡易的に測定できることから、ストレスマーカーとして多様な試験に用いられている方法である<sup>31-35</sup>。香りを嗅いだ後の計測値から香りを嗅ぐ前（通常時）の計測値を引くことで変化量を求め、その差をストレス値として算出し、図3.2に示した。ラベンダーとローズマリーの原液および1%溶液、ヤチヤナギ精油の原液、10%溶液、5%溶液でストレス値はマイナスとなった。一方、ヤチヤナギ精油の2%溶液ではストレス値が高く、イソ吉草酸と同程度であった。前項の実験において、ヤチヤナギの芳香によって人の気分や感情がリラックスすることを示したが、その効果は、内分泌系、交感神経系のストレスマーカーである唾液アミラーゼの量からも明らかとなった。

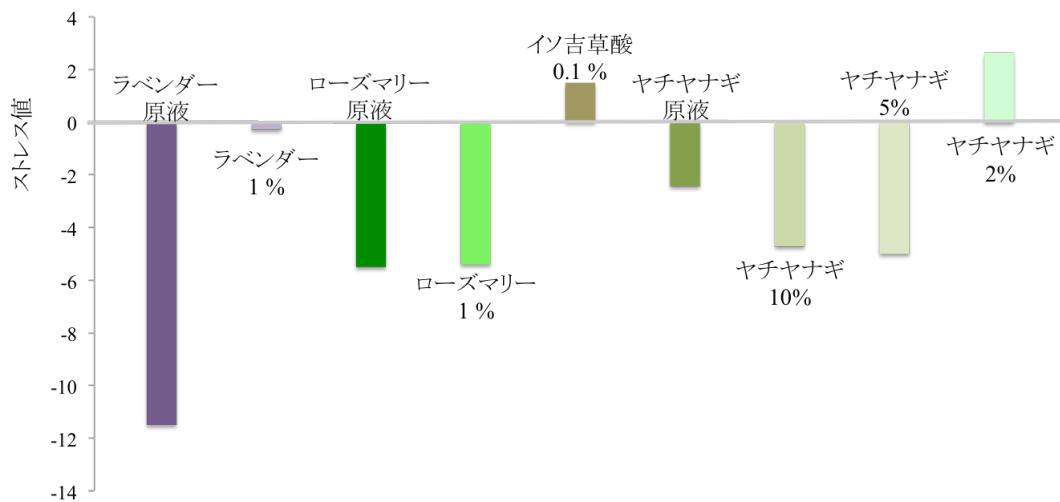


図 3.2 唾液アミラーゼ検査から算出した各サンプルがもたらすストレス値

### 3. NIRS を用いた脳血流測定

これまでに香りの脳血流変化に及ぼす影響はあまり調べられていない。そこで、まずは快い香りとしてされているラベンダーおよびローズマリーをポジティブ対象、足裏臭と表現される不快臭を放つイソ吉草酸をネガティブ対象として測定を行った。

その結果、図 3.3 に示したように、ラベンダーおよびローズマリーの 1%溶液はヘモグロビン相対濃度の変化  $\Delta[\text{oxy-Hb}]$  がマイナスとなり安静効果が確認された。一方で、ラベンダー、ローズマリーの原液およびイソ吉草酸はプラスの数値となったことから覚醒または興奮作用が見られた。ラベンダーの主要成分である linalool およびローズマリーの主要成分である 1,8-cineole は覚醒作用を持つとの報告もあるが<sup>36-38)</sup>、原液のような濃い濃度で試験を行うことで今回のように覚醒作用を示すものと考えられる。

このように、安静作用や覚醒作用は濃度によって変化することが示唆された。快、不快な香りで脳血流量が変化することが確認できたため、ヤチヤナギ精油を 4 段階の濃度に調製し測定したところ、全ての濃度において安静効果が見られた(図 3.4)。原液が最も安静効果を示し、続いて 5%溶液、10%溶液、2%溶液の順となった。これらの匂いの強さは、原液で「ニオイが濃いと感ずる濃度」、5%溶液は「良いニオイと感ずる濃度」、10%溶液は「ヤチヤナギの香りと認識できる濃度」、2%溶液は「ニオイが薄いと感ずる濃度」であった。

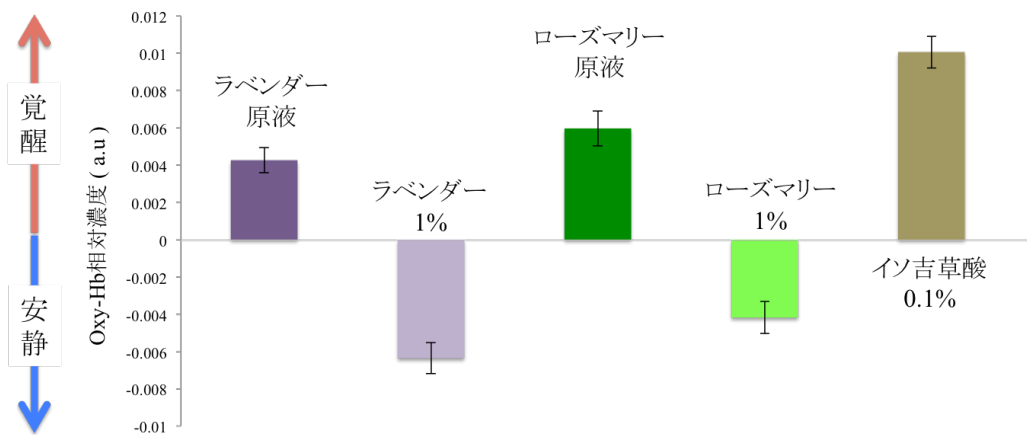


図 3.3 快（ラベンダー・ローズマリー）、不快（イソ吉草酸）な香りの影響

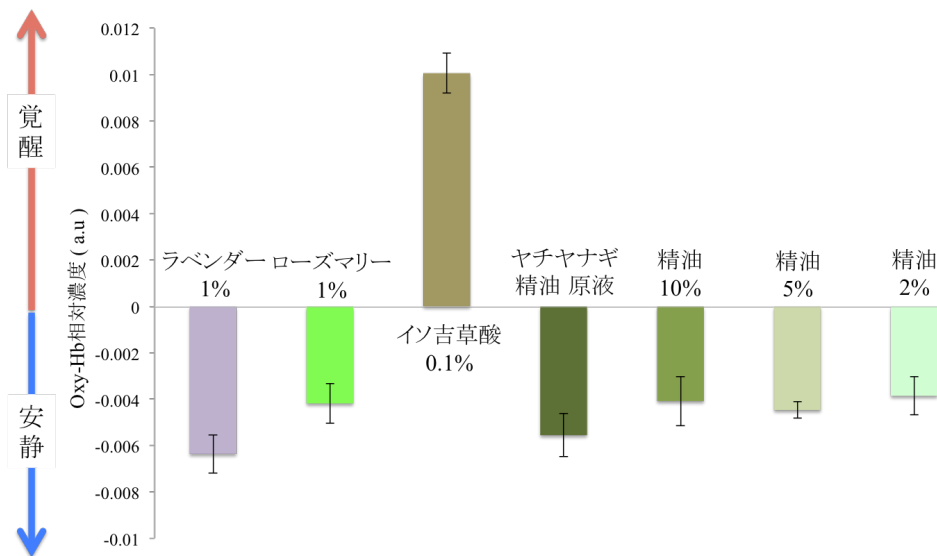


図 3.4 快、不快な香りとヤチヤナギ精油の各濃度における効果を比較

#### 4. リラクゼーション効果に関与する化合物の解析

ヤチヤナギ精油のリラクゼーション効果を解明するため、POMS、唾液アミラーゼ測定、NIRSによる脳血流量測定を行ったところ、精油および精油の各希釈溶液に安静効果が認められた。そこで、安静効果に寄与する成分を特定するため、精油を分画し、その中から、官能評価でヤチヤナギ香が感じられた Fr. 4、9、11、13 を用いて安静効果を検討した。各 Fr. を嗅ぎやすい 10%溶液に調製し、被験者に嗅がせたところ、唾液アミラーゼ測定では Fr. 4、9、11 においてストレス値がマイナスとなり、NIRS では全てのフラクションにおいてヘモグロビン相対濃度の変化  $\Delta[\text{oxy-Hb}]$  がマイナスとなった (図 3.5, 3.6)。中でも、Fr.4 および 9 に高い安静効果が見られたため、この 2 つのフラクションについてニオイ寄与度の測定を行ったところ、Fr.4 では limonene (シトラス様: FD 値 4)、 $\gamma$ -elemene (薬草様: 16) の 2 成分、Fr.9 では germacrone (ハッカ様: 64)、 $\beta$ -elemenone (ハッカ様: 8)、isoamyl isovalerate (鉄臭: 16) の 3 成分が主要香気成分として特定された。よって、ヤチヤナギ芳香の安静効果にはこれらの成分が関与している可能性が示唆された。

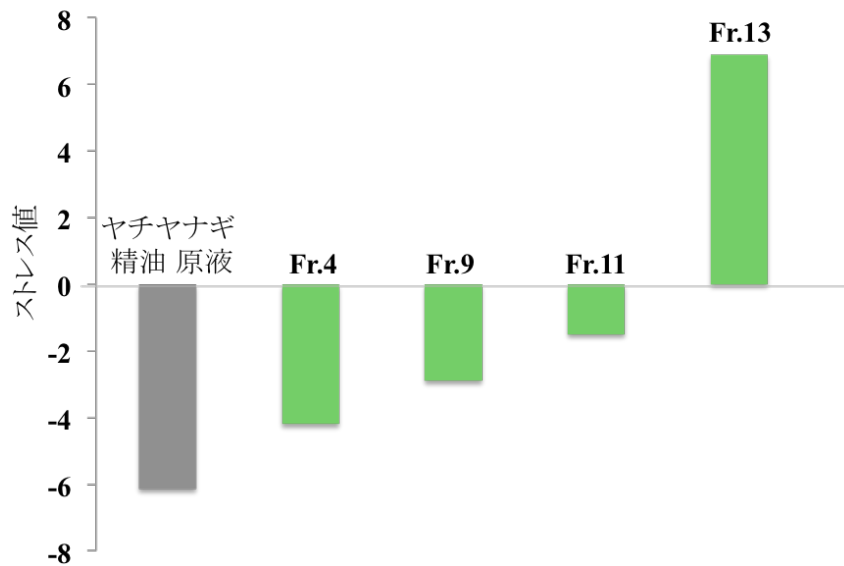


図 3.5 精油（原液）と各フラクションの唾液アミラーゼ測定によるストレス値

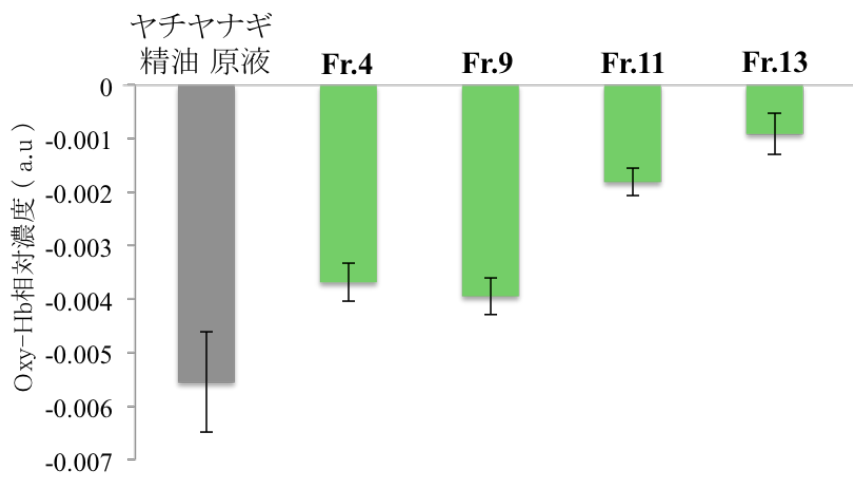


図 3.6 精油（原液）と各フラクションのヘモグロビン相対濃度

## まとめ

ヤチヤナギの芳香が有するリラクゼーション効果について、心理的效果を POMS 評価で、生理効果を唾液アミラーゼと近赤外線分光鏡 (NIRS) による脳血流中の酸素化ヘモグロビン相対濃度変化の測定により解析した。POMS 評価により、ヤチヤナギの芳香は人の感情に対して安静効果を示すことが認められ、その効果はラベンダーの活気を与えるような安静効果とは異なり、気分を落ち着かせる効果を与えられた。次に、ストレスマーカーである唾液アミラーゼと測定したところ、原液、10%、5%溶液のヤチヤナギ精油を嗅ぐことで、アミラーゼの分泌量は減少した。同様の現象は脳血流においてもみられ、ヤチヤナギ精油により安静状態となった。

以上の結果から、ヤチヤナギの香りにはリラクゼーション効果のあることが明らかとなったため、この効果に寄与するヤチヤナギの香気成分を探索した。その結果、limonene、 $\gamma$ -elemene を主要香気する Fr.4 および  $\beta$ -elemenone、germacrone、isoamyl isovalerate を主要香気とする Fr.9 が、他のフラクションよりもヘモグロビン相対濃度が減少したことから、ヤチヤナギ芳香の安静効果にはこれらの成分が関与している可能性が考えられた。

## 第4章 ヤチヤナギの抗菌作用

我々の生活では、腐敗につながる細菌は何らかの方法で静菌あるいは殺菌される。食品であれば加熱により製品を滅菌し、防腐剤により消費期限をできる限り延長する方法が採られ、化粧品では防腐剤としてパラベン（パラオキシ安息香酸エステル）が汎用される。しかし、近年の健康志向に伴い、消費者は消費期限の長さよりも安全性の担保を重視する傾向にあり、天然由来の防腐剤が求められている。

前章までに、ヤチヤナギ精油の芳香特性を解明し、その機能性としてリラクゼーション効果について検証してきた。一方、ヤチヤナギは従来の研究によって抗酸化や抗菌作用のあることが明らかにされている。とくに、抗菌活性は精油で効果が高く、4種のグラム陽性菌に対する作用が報告された。グラム陰性菌に効果はないものの、使用する条件を整えば、天然由来の防腐剤として利用できる可能性を有している。

そこで本章では、ヤチヤナギ精油の抗菌活性について寄与成分を特定し、さらに作用機作について考察した。

### 第1節 試料および実験方法

#### 1. 試料・試薬

ヤチヤナギ乾燥葉を用い、直接蒸留によって得られた精油、を試料とした。ポジティブコントロールには、100 µg/ml カナマイシン（和光純薬工業株式会社）、3.0 mg/ml オーレオワシジン A（タカラバイオ株式会社）を用いた。Sabouraud Dextrose Broth 培地は Becton, Dickinson のもの、DMSO および Mueller-Hinton Broth 培地は関東化学株式会社のものを用いた。limonene、thymol、 $\alpha$ -terpineol、geraniol および nerolidol は和光純薬工業株式会社のものを用いた。菌株は *Staphylococcus aureus* (NRIC 1135) を使用した。他の試薬は第1章と同様のものを使用した。

## 2.シリカゲルカラムによる精油分画

内径 1.5 cm 長さ 30 cm コック付きカラムクロマト管に Silica Gel 60 (spherical 63-210  $\mu\text{m}$ ) 15 g をヘキサンで懸濁して充填した。これに精油 0.5 g をヘキサン 5 ml に溶解したものをマウントした。溶離液はヘキサン、ジエチルエーテルおよびメタノール系を表 4.1 の割合で調製した。

### 2.1 GC-MS による芳香成分の分析

抗菌作用が認められた画分に含有される抗菌物質を調べるために、GC-MS による分析を行った。分析条件は第 1 章と同様とした。

表 4.1 溶離液の組成

Fr. (No.)	溶離液	ヘキサン (ml)	ジエチルエーテル (ml)	メタノール (ml)
1	100 %ヘキサン	100	0	0
2	98 %ヘキサン	98	2	0
3	95 %ヘキサン	95	5	0
4	90 %ヘキサン	90	10	0
5	50 %ヘキサン	50	50	0
6	100 %ジエチル エーテル	0	100	0
7	100 %メタノール	0	0	100

## 3.精油および抽出物の抗菌作用

### 3.1 ペーパーディスク法による抗菌作用試験

各菌株を一白金耳取り、*Sta. aureus* を YPD 液体培地にて前培養した。菌株の培養液を 1 ml エッペンチューブに取った。これを遠心分離 (15,000 rpm、2 分) し、上澄みを捨て、生理食塩水を 1 ml 加えて再び遠心分離 (15,000 rpm、2 分) した。この操作を 2 回繰り返した後、沈殿物に 500  $\mu\text{l}$  の食塩水を加えて混合し洗浄菌体を得た。これを 100  $\mu\text{l}$  取り、YT 培地プレート上に塗布した。ペーパーディスク (FILTER PAPER、6 mm 直径、ADVANTEC 社) にポジティブコン



トロールおよびサンプルを 20  $\mu$ l ずつ含ませた。これを菌株が塗布された寒天培地上に置き、37°C、1 日間培養した後、ペーパーディスクの周りにできた阻止円の大きさを計測した。

### 3.2 最小生育阻止濃度 (MIC) の測定

2.1.の通りに前培養した各菌株の培養液を 1 ml エッペンチューブに取った。これを遠心分離 (15,000 rpm、2 分) して、上澄みを捨て、生理食塩水を 1 ml 加えて、再び遠心分離 (15,000 rpm、2 分) した。この操作を 2 回繰り返した後、菌液の濁度をマクファーランド濁度標準液番号 0.5 (1.0%塩化バリウム 0.05 ml と 1.0%硫酸 9.95 ml を混合したもの) と、マクファーランド濁度標準液番号 1 (1.0%塩化バリウム 0.1 ml と 1.0%硫酸 9.9 ml 混合したもの) の 660 nm における吸光度の数値の間の値になるように生理食塩水を用いて調製した。マイクロプレートのウェルに Mueller-Hinton Broth 培地 150  $\mu$ l とサンプル 50  $\mu$ l を加えた。それを 2 倍ずつ順次希釈し、そこへ菌液を 5  $\mu$ l ずつ加え各菌の培養温度で 16-20 時間培養した。サンプルの濃度は 125,000 ppm から 61 ppm の 12 段階とし、菌体が増殖する最小生育阻止濃度 (MIC) を求めた。なお、サンプルの精油は 50% DMSO で 50 倍希釈したものをを用いた。溶媒の抗菌活性の有無を測定するため 50% DMSO の MIC も測定した。

## 4. 精油中の抗菌物質の特定

### 4.1 菌体への化合物処理

150 mg の湿菌体に 0.02 M リン酸緩衝生理食塩水 4.2 ml と、limonene、thymol、 $\alpha$ -terpineol、geraniol および nerolidol の 1 M メタノール溶液 (終濃度 0.2 M 化合物 20% メタノール溶液) を 4.2 ml 加え混合し、振とう培養 (30°C, 2 h) した。control にはメタノールを加えた。

### 4.2 菌体脂肪酸メチルエステル化

Ichihara らの方法に準じて行った<sup>39)</sup>。すなわち、培養液を遠心分離 (2,500 rpm, 10 min) し、化合物処理菌体を得た。それに 2.5 ml ヘキサンと 0.35 ml 1 M 水酸化カリウム/メタノールを加え 2 分間激しく混合した。これに酢酸を 37.5  $\mu$ l 加え、遠心分離 (3,000 rpm, 5 min) した。ヘキサン層を 1.0 ml の純水で洗浄し、脂肪酸エステルを得た。

#### 4.3 GC による分析

菌体脂肪酸メチルエステルを GC (Agilent 7890 A) で分析した。条件としてカラムは DB-23 (0.25 mm×60 m, 膜厚 0.15  $\mu$ m) を用い、注入口温度は 250°C、カラム温度は 50°C で 1 分間保持し、175°C まで 25°C/min で昇温し、230°C まで 4°C/min で昇温して 14 分間保持した。スプリットレスで、流量は 1 ml/min とした。脂肪酸の同定は FAME 標準品を用いた。なお、同定された成分は面積百分率によって面積 (%) を算出した。

#### 4.4 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

3.1 と同様に湿菌体を得た。その後集菌するために 4.1 と同様に菌体を処理した。化合物は nerolidol と geraniol を用いた。また、化合物溶液の代わりにメタノールを control に用いた。これらの菌体は、金蒸着を行い SEM による観察を行った。

#### 4.5 アルカリフォスファターゼ活性測定

4.1.2.1 で得られた菌液をサンプルとした。遠心分離 (1,500 rpm, 5 min) を行い、上澄みをシリンジフィルター (starlab scientific) により濾過した。ラボアッセイ TM ALP (和光純薬工業株式会社) を用いて活性の測定を行った。96 穴マイクロプレート (イワキ株式会社) に菌液 20  $\mu$ l に基質緩衝液 100  $\mu$ l を加え、37°C、15 分間インキュベートし、反応停止液 80  $\mu$ l を加えた。測定はマイクロプレートリーダーを用いた。細胞膜が損傷した時に細胞から出現する酵素であるアルカリフォスファターゼ活性を測定した。

#### 4.6 導電率測定

化合物処理した菌体上澄み液の導電率は LAQUA twin (株式会社堀場製作所) を用いて測定した。同様の菌体濃度のサンプルを bead beater によって 5 min×10 回 (4,600 rpm) 破碎し、導電率を測定した。

#### 4.7 核酸の測定

96 穴 UV マイクロタイタプレート（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）に化合物処理上澄み液 200  $\mu$ l ずつ分注し、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。同様の菌体濃度のサンプルを bead beater によって 5 min $\times$ 5 回および 5 min $\times$ 10 回（4,600 rpm）破砕し、導電率を測定した。

## 第 2 節 結果および考察

### 1. 精油中の抗菌作用に関与する成分の特定

ヤチヤナギの葉より精油を抽出し、*Sta. aureus* に対する抗菌作用を確認してからシリカゲルカラムで分画した。分画後の収量は 0.3 g、収率 65%であった。得られた 7 つのフラクションを用いて *Sta. aureus* に対する抗菌試験を行った。その結果、Fr.2、4、5 および 6 で抗菌作用が現れ、とくに Fr.5 と Fr.6 の活性が強かった（表 4.2）。そこで、抗菌活性を有する Fr.を GC-MS に供し、構成する化合物を分析し、その結果を表 4.3 にまとめた。なお、種々の研究によりすでに抗菌作用の報告されている limonene、1,8-cineole、thymol、geranyl acetate、linalool、terpinene-4-ol および  $\alpha$ -terpineole などの 12 成分を赤字で示し<sup>40-47</sup>、標品のあるものについて抗菌試験を行ったところ、7 成分に作用が認められた（表 4.4）。

Dorman & Deans は幅広い抗菌スペクトルを検討することで、植物に含まれている揮発性成分の抗菌性について言及しており<sup>48</sup>、thymol、 $\alpha$ -terpineol、terpinene-4-ol などのモノテルペンの *Sta. aureus* に対する効果を報告している。なかでも thymol および  $\alpha$ -terpineol が強い抗菌活性を示すという報告もあり<sup>49,50</sup>、ヤチヤナギの *Sta. aureus* に対する抗菌性はこの 2 成分が大きく関与していると考えられた。

そこで、抗菌作用の高いと報告されている limonene、thymol、geraniol、nerolidol および  $\alpha$ -terpineol の 5 成分の標準品を用いて MIC を測定した（表 4.4）。その結果、 $\alpha$ -terpineol の MIC が < 0.0156 mg/ml と最も低く、次いで 0.35 mg/ml の thymol、0.5 mg/ml の geraniol、1.0 mg/ml の nerolidol、1.68 mg/ml の limonene の順であった。

表 4.2 各フラクションの収量、収率および抗菌試験結果

Fr.	収量 (mg)	収率 (%)	帯幅 (mm)
1	5.0	0.9	-
2	34.0	6.8	1
3	3.0	0.5	-
4	54.0	10.8	1
5	100.0	20.0	3
6	47.0	9.3	3
7	84.0	16.7	-

表 4.3 各フラクションの GC-MS 分析結果

Fr.2	Area %	Fr.4	Area %	Fr.5	Area %	Fr.6	Area %
limonene	23.46	germacrone	40.75	germacrone	26.49	nerolidol	9.41
cymene	19.38	1,8-cineole	7.57	nerolidol	6.91	linalool	6.53
$\beta$ -myrcene	11.78	terpinyl acetate	6.36	1,8-cineole	5.35	terpinene-4-ol	2.32
selina-3,7(11)-dien	11.42	geranyl acetate	6.24	geranyl acetate	3.02	$\alpha$ -terpineol	2.25
$\alpha$ -pherandrene	2.94	benzyl isovalerate	3.92	$\beta$ -elemenone	1.84	geraniol	2.08
$\gamma$ -elemene	2.82	$\beta$ -elemenone	3.90	linalool	1.37	agarospirol	1.96
$\beta$ -panasinsene	2.35	octadecane	3.19	carvacrol	1.33	hedycaryol	0.78
$\beta$ -cadinene	1.31	isopenthyl-isovalerate	2.04	terpinene-4-ol	1.13	borneol	0.71
$\gamma$ -terpinene	1.22	$\beta$ -elemene	1.80	terpinyl acetate	0.88	$\beta$ -guaiene	0.50
$\gamma$ -cadinene	1.21	$\beta$ -panasinsene	1.55	benzyl isovalerate	0.51	(+)-4-calarene	0.45
$\beta$ -elemene	0.97	isobornyl acetate	1.15	benzaldehyde	0.41	farnesol	0.42
$\beta$ -guaiene	0.94	bornyl acetate	0.56	$\beta$ -ionone	0.34	thymol	0.20
caryophyllene	0.93						
$\alpha$ -terpinene	0.57						
$\beta$ -pherandrene	0.47						

※赤字は抗菌作用が報告されている成分

表 4.4 *Sta. aureus* に対する芳香成分の抗菌作用

Compound	阻止帯半径 (mm)	MIC (mg/ml)	Compound	阻止帯半径 (mm)	MIC (mg/ml)
thymol	> 10	0.35	geraniol	8	0.50
$\beta$ -pinene	×	–	$\alpha$ -terpineol	1	< 0.02
nerolidol	4	1.00	$\alpha$ -terpinene	×	–
1,8-cineole	×	–	terpinolene	×	–
terpinyl acetate	×	–	terpinene-4-ol	< 1	–
limonene	< 1	1.68	linalool	< 1	–

– : 未検定

カナマイシン : MIC 1.25 ppm

## 2. *St. aureus* に対する精油の抗菌作用機作

植物精油の微生物に対する抗菌のメカニズムは明らかにされていないことから、本項ではいくつかの実験を通して作用機作の解明を試みた。

まず、抗菌作用を示す過程において *St. aureus* が実際にどのような影響を受けているのかを確認するため、SEM によって菌体の表面を観察した。geraniol および nerolidol を反応させた画像を図 4.1 と 4.2 に示すが、菌体の形状に大きな損傷あるいは変形は認められなかった。そこで、菌体細胞膜の損傷のマーカーとなるアルカリフォスファターゼ活性を測定したところ、培養時間が経過しても変化は見られなかった（図 4.3）。導電率においても有意な差が認められなかったことから（結果省略）、精油に含有するテルペン類は、*St. aureus* の形態には大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。

Di Pasqua らは、精油に含有されるテルペン類やフェノール類が菌体の細胞膜に対して作用し、脂肪酸組成を変化させると報告している<sup>49-55</sup>。そこで、*St. aureus* に前項で抗菌活性を示した化合物を作用させて 0、4、8 時間後の脂肪酸組成を測定した。全ての処理区において、培養時間の経過と共に飽和脂肪酸の割合が増加したが、control と処理区の間には明確な差は認められなかった（表 4.5）。Burt らは、精油成分が脂溶性であるため細胞膜へ作用しやすく、不飽和脂肪酸の割合に影響を及ぼすと報告しているが<sup>51,52</sup>、我々の実験結果ではテルペンやフェノール類の作用による脂肪酸の変化は認められなかった。

次に、同様の試料における 260 nm における吸光度測定を行い、化合物を作用させた直後および 4 時間後の拡散量の推移を図 5 に示した。この結果、全ての化合物を作用させることで核酸量の上昇が認められた。これは、核酸が菌体外に漏出していることを意味している。Helander らは、テルペン類の化合物を作用させることで細胞膜の透過性が上昇すると報告している<sup>56-59</sup>。したがって、limonene、geraniol、nerolidol および  $\alpha$ -terpineol は *St. aureus* の細胞膜に作用し、透過性を上昇させて核酸の流出を誘発することで抗菌性を示すと推察された。

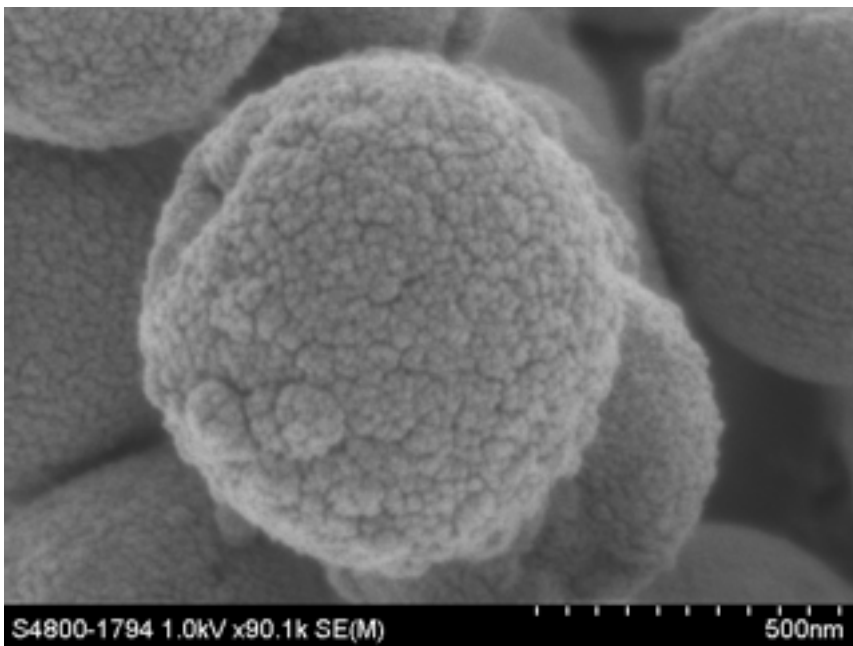


図 4.1 *Sta. aureus* に geraniol を 4 時間作用させた後の  
全体（上）および損傷部分（下）の SEM 画像

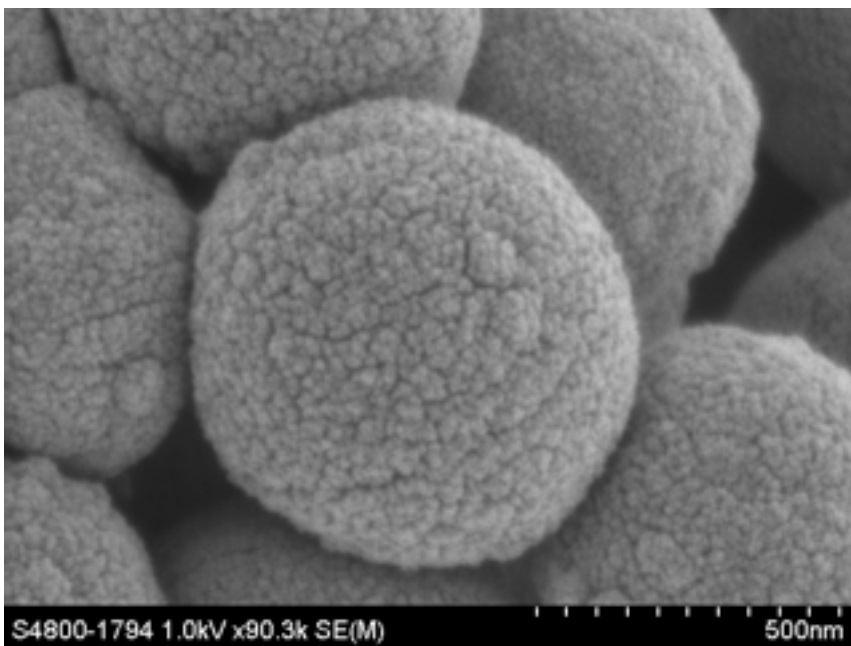
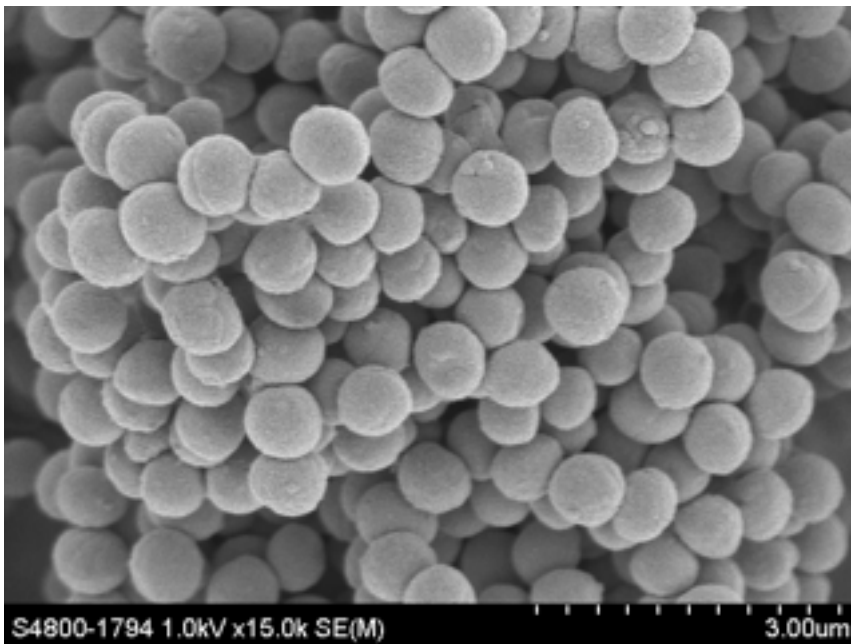


図 4.2 *Sta. aureus* に nerolidol を 4 時間作用させた後の  
全体（上） および損傷部分（下）



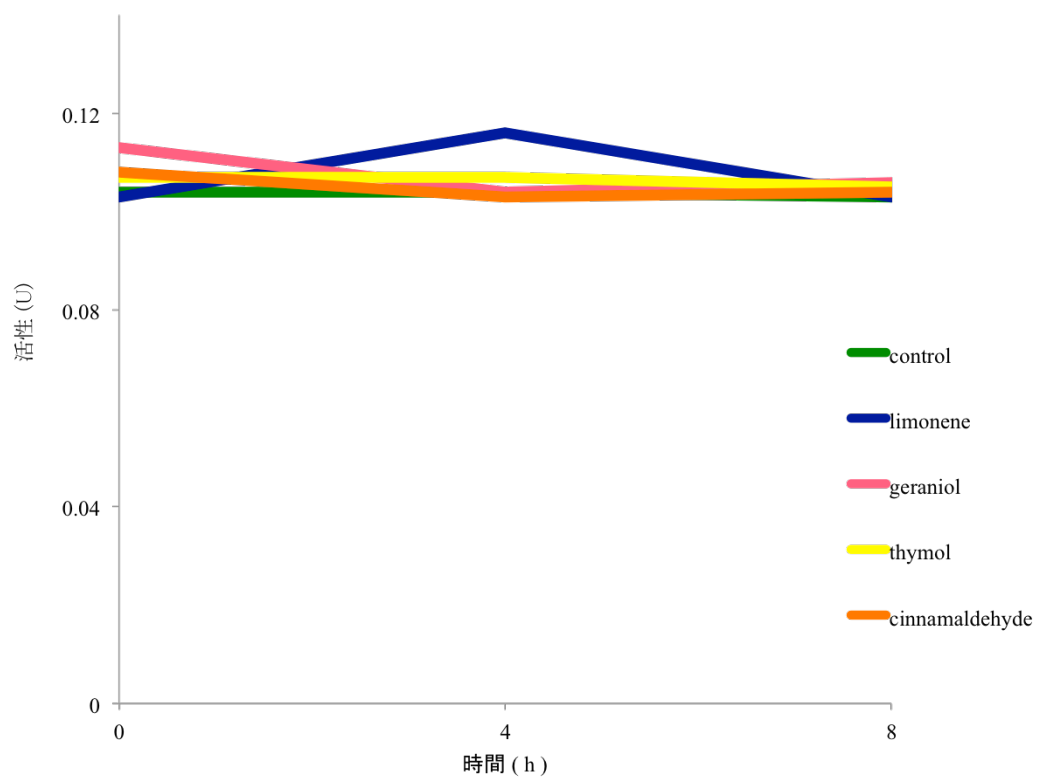


図 4.3 各化合物作用時のアルカリフォスファターゼ活性の経時変化

表 4.5 化合物処理菌体の脂肪酸組成の経時的変化

	時間 (h)	0	4	8
control	飽和 (%)	30.7	32.7	58.6
	不飽和 (%)	69.3	67.3	41.4
limonene	飽和 (%)	38.1	38.9	47.2
	不飽和 (%)	61.9	61.1	52.8
geraniol	飽和 (%)	34.4	38.9	47.2
	不飽和 (%)	65.6	61.1	56.8
nerolidol	飽和 (%)	33.9	39.5	34.5
	不飽和 (%)	66.1	60.5	65.5
$\alpha$ -terpineol	飽和 (%)	32.2	37.9	29.8
	不飽和 (%)	67.8	62.1	70.2

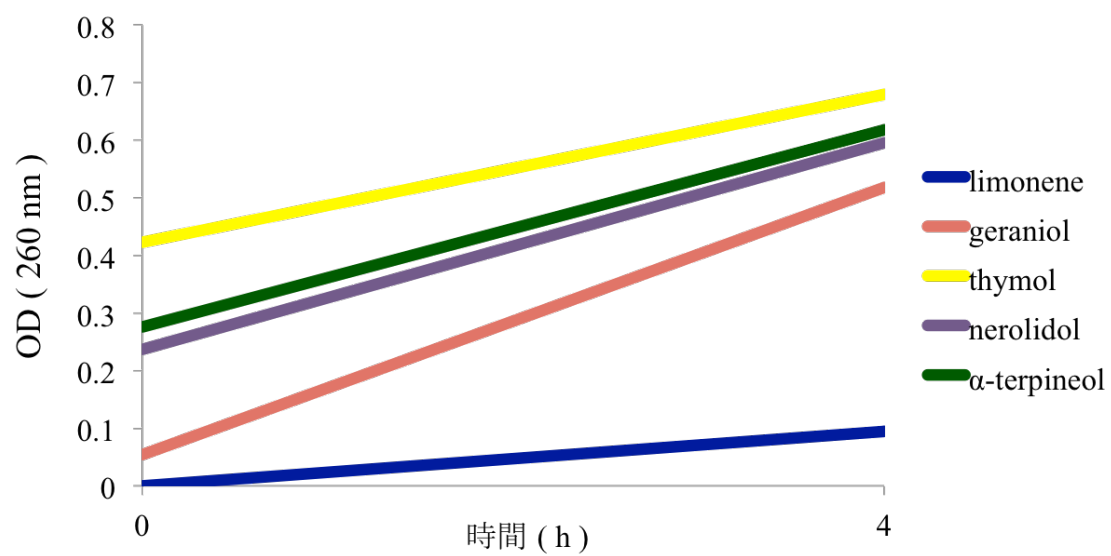


図 4.4 各化合物作用時の核酸量の経時変化

## まとめ

ヤチヤナギの機能性を明らかにするため、抗菌試験を行ったところ、精油に4種類 (*Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis*、*Saccharomyces cerevisiae* および *Candida albicans*) の菌に対して抗菌作用が認められた。そこで、抗菌作用をもたらす成分を特定するためシリカゲル分画し、試験したところ、limonene、geraniol、linalool を含む7成分が特定された。このような芳香成分が抗菌作用を示す場合、菌体の細胞膜中の脂肪酸組成を変動させると報告があったため、*Sta. aureus* に limonene、thymol、geraniol、nerolidol、 $\alpha$ -terpineol を作用させ、脂肪酸組成の分析を行った。飽和脂肪酸の増加が認められたものの、SEMによる観察では大きな損傷が見られなかった。別の視点から菌体の損傷を検証するために行った導電率測定では、thymol が5%の導電率上昇を示し、核酸量の測定では5成分すべてに増加が認められた。これらの結果から、ヤチヤナギの抗菌作用は精油中の芳香成分によるものであり、それはSEMで観察されるような大きな損傷ではなく、核酸を漏出させるような微視的な損傷を与えている可能性が考えられた。

## 総括

香りをもつ物質は香料と呼ばれ、化粧品や食品類に付香され日常生活に用いられている。生活が豊かになるにつれて化粧品や食品などの分野に用途が広がり、一般大衆にも利用されるようになった。最近では香りの隠された機能や効用が見直され、それを利用した各種の製品が市場で見られるようになった。また、香りの生理的効果についての科学的研究も行われ、ある種の精油は免疫系を活性化することが認められている。さらに人間の快、不快、好みなどの嗜好性の問題や香りの内分泌系や免疫系に対する効果などいっそうの研究の進展が待たれる。

本研究では、未利用資源であるヤチヤナギの芳香作用に注目した。この植物は、元来ヨーロッパにおいてハーブやビールの香り付けとして用いられた記録があるものの、現代では利用に制限がある。しかし、わが国では北海道で自生し、さらに北海道立林業試験場により安定的に大量増殖できる技術が開発されたことから、新たな道産資源として期待されている。そこで本研究では、組織培養由来の栽培株の芳香成分に注目し、精油中の芳香成分の網羅的解析とともにヤチヤナギ香を特徴付ける芳香成分を特定した。まずはヤチヤナギの芳香成分を解析するため、ヤチヤナギ葉から水蒸気蒸留、連続蒸留およびSAFE法により精油を抽出し、芳香成分を網羅的に解析した。その結果、水蒸気蒸留で得られた精油では、limonene、cymene、germacroneが主要成分であった。連続蒸留法由来の精油では、水蒸気蒸留のそれで得られなかった $\beta$ -myrceneや $\alpha$ -terpinylacetateを抽出することができた。一方で、SAFE法よる精油では、 $\beta$ -pineneが約25%と、水蒸気蒸留の約5倍の含有量となった他、limoneneや1,8-cineoleの割合が他の抽出法よりも高く、モノテルペン類を効率よく捕集することができた。これらの結果は外国産のヤチヤナギ精油とは異なり、地域によって精油の香調は異なることが示唆された。また、AEDA法によってヤチヤナギの特有の香りを構成する主要な成分を求めたところ、 $\beta$ -pinene、linalool、limonene、1,8-cineole、cymene、terpinene-4-ol、 $\beta$ -selineneおよび $\beta$ -elemenoneの8成分が特定された。

そこで、ヤチヤナギ芳香特性の解析を行うため、ヤチヤナギ精油をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し、各フラクションの香調と構成する化合物を分析した。まずは、官能評価によってヤチヤナギ香気との類似度を測

定したところ、「ウッディ感のある薬草様」香気を持つフラクションで最も類似度が高く、その香調は  $\beta$ -elemenone、germacrone および 1,8-cineole 等に由来すると推察された。次いで、「フローラルグリーン」や「紅茶様」の香調を有するフラクションで精油香気との類似度が高く、linalool、terpinene-4-ol、nerolidol、geraniol 等が寄与成分と考えられた。一方、精油で感じられる「よだれ様」の香りはどのフラクションにも感じる事ができなかった。そこで、各香気成分の詳細な役割を調べるために、ヤチヤナギ香気中に GC で分離された香気成分を混合してそれぞれの香調を解析した。その結果、「ウッディ感のある薬草様」の香調は germacrone が基となって dehydroaromadendrene により増強され、linalool や geraniol によってフローラル感や紅茶感、 $\alpha$ -pinene によりグリーン感の強調されることが明らかとなった。さらに、フラクションでは感じられなかったよだれ感は、cadinene および cis-stilbene の変調により発生していることが明らかとなった。

これまでの研究で、ヤチヤナギ香を構成する成分を明らかにした。さらに、香りの持つ機能性として、安静効果、抗菌作用についての効果をそれぞれ調べた。まず、ヤチヤナギの芳香が有するリラクゼーション効果について、心理的効果を POMS 評価で、生理効果を唾液アミラーゼと近赤外線分光鏡 (NIRS) による脳血流中の酸素化ヘモグロビン相対濃度の測定により解析した。POMS 評価により、ヤチヤナギの芳香は人の感情に対して安静効果を示すことが認められ、その効果はポジティブコントロールのラベンダーと類似していた。次に、ストレスマーカーである唾液アミラーゼと測定したところ、ヤチヤナギ精油を嗅ぐことで、アミラーゼの分泌量は減少した。同様の現象は脳血流においてもみられ、ヤチヤナギ精油により安静状態となった。以上の結果から、ヤチヤナギの香りにはリラクゼーション効果のあることが明らかとなった。そこで、この効果に寄与するヤチヤナギの香気成分を探索した。その結果、ヤチヤナギ特徴香であるシトラス香を有する limonene や、薬草様の香りを示す  $\beta$ -elemenone と germacrone を含有するフラクションにヘモグロビン相対濃度の減少が認められたことから、ヤチヤナギ芳香の安静効果はこれらの成分が関与している可能性が考えられた。

もう一つの機能性試験として抗菌試験を行ったところ、精油に *Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis*、*Saccharomyces cerevisiae* および *Candida albicans* に対して抗菌作用が認められた。そこで、抗菌作用をもたらす成分を特定するためシ

リカゲル分画し、試験したところ、limonene、geraniol、linalool を含む7成分が特定された。このような芳香成分が抗菌作用を示す場合、菌体の細胞膜中の脂肪酸組成を変動させると報告があったため、*Sta. aureus* に limonene、thymol、geraniol、nerolidol、 $\alpha$ -terpineol を作用させ、脂肪酸組成の分析を行った。両菌体において飽和脂肪酸の増加が認められたものの、SEMによる観察では大きな損傷が見られなかった。別の視点から菌体の損傷を検証するために行った導電率測定では、*Sta. aureus* に対して thymol が導電率上昇を示し、核酸量の測定では5成分すべてに増加が認められた。これらの結果から、ヤチヤナギの抗菌作用は精油中の芳香成分によるものであり、それはSEMで観察されるような大きな損傷ではなく、核酸を漏出させるような微視的な損傷を与えている可能性が考えられた。

本研究の結果より、ヤチヤナギの芳香は「ウッディな薬草様」香気を基調として、香氣成分の混合効果によってフローラル、グリーン、紅茶様さらにはよだれ様の香調が加わることで形成されることを明らかにした。さらに、ヤチヤナギ香氣は心理、生理的なリラクゼーション効果や抗菌作用を有するため、今後、化粧品の素材や食品への添加物として広く応用できることが示唆された。

## 要約

ヤチヤナギは、北海道の湿地に広く分布する落葉小低木である。強い芳香成分を有し、ハーブや芳香剤などの原料として期待できることから、本研究では、組織培養由来の栽培株の芳香成分に注目し、精油中の芳香成分の網羅的解析とともにヤチヤナギ香を特徴付ける芳香成分を特定した。さらに、香りの持つ機能性として、安静効果、抗菌作用についての効果をそれぞれ明らかにした。主な結果は以下の通りである。

・ヤチヤナギの葉から水蒸気蒸留、連続蒸留および SAFE 法により精油を抽出し、芳香成分を網羅的に解析した。その結果、水蒸気蒸留で得られた精油では、limonene、cymene、germacrone が主要成分として同定された。一方、連続蒸留法由来の精油では、水蒸気蒸留のそれで得られなかった  $\beta$ -myrcene や  $\alpha$ -terpinylacetate を抽出することができた。SAFE 法よる精油では、 $\beta$ -pinene が約 25%と、水蒸気蒸留の約 5 倍の含有量となった他、limonene や 1,8-cineole の割合が他の抽出法よりも高く、モノテルペン類を効率よく捕集することができた。これらの結果を外国産のヤチヤナギ精油と比較すると、地域によって精油の香調は異なることが示唆された。また、AEDA 法によってヤチヤナギの特有の香りを構成する主要な成分を求めたところ、 $\beta$ -pinene、linalool、limonene、1,8-cineole、cymene、terpinene-4-ol、 $\beta$ -selinene および  $\beta$ -elemenone の 8 成分が特定された。

・ヤチヤナギ精油を分画し、各フラクションの香調と構成する化合物を分析し、ヤチヤナギの芳香特性を解析した。官能評価によってヤチヤナギ香気との類似度を測定したところ、「ウッディ感のある薬草様」香気を持つフラクションで最も高く、その香調は  $\beta$ -elemenone、germacrone および 1,8-cineole 等に由来すると推察された。次いで、「フローラルグリーン」や「紅茶様」の香調を有するフラクションで精油香気との類似度が高く、linalool、terpinene-4-ol、nerolidol、geraniol 等が寄与成分と考えられた。一方、精油で感じられる「よだれ様」の香りはどのフラクションにも感じるができなかった。そこで、各香気成分の詳細な役割を調べるために、ヤチヤナギ香気中に GC で分離された香気成分を混合してそれぞれの香調を解析したところ「ウッディ感のある薬草様」の香調は germacrone が基となって dehydroaromadendrene により増強され、linalool や geraniol によってフローラル感や紅茶感、 $\alpha$ -pinene によりグリーン感の強調され



ることが明らかとなった。さらに、フラクシオンでは感じられなかったよだれ感は、*cadinene* および *cis-stilbene* の変調により発生していることが明らかとなった。

・ヤチヤナギの芳香が有するリラクゼーション効果について、心理的効果を POMS 評価で、生理効果を唾液アミラーゼと近赤外線スペクトロスコピー (NIRS) による脳血流中の酸素化ヘモグロビン相対濃度の測定により解析した。POMS 評価により、ヤチヤナギの芳香は人の感情に対して安静効果を示すことが認められ、その効果はポジティブコントロールのラベンダーとは多少異なり、気分を落ち着かせるような効果であった。次に、ストレスマーカーである唾液アミラーゼと測定したところ、精油の 10%、5% 溶液を嗅ぐことで、アミラーゼの分泌量は減少した。同様の現象は脳血流においてもみられ、ヤチヤナギ精油により安静状態となった。この効果に寄与するヤチヤナギの香気成分を探索したところ、ヤチヤナギ特徴香であるシトラス香を有する *limonene* や、薬草様の香り示す  $\beta$ -*elemenone* と *germacrone* を含有するフラクシオンにヘモグロビン相対濃度の減少が認められたことから、ヤチヤナギ芳香の安静効果はこれらの成分が関与している可能性が考えられた。

・ヤチヤナギの機能性を明らかにするため、抗菌試験を行ったところ、精油に 4 種類の菌に対して抗菌作用が認められ、*limonene*、*geraniol*、*linalool* を含む 7 成分によるものと明らかになった。また、*Sta. aureus* に化合物を作用させると、脂肪酸組成の変化、導電率、核酸量の増加が確認された。

本研究の結果より、ヤチヤナギの芳香は *germacrone* と *dehydroaromadendrene* による「ウッディな薬草様」香気を基調として、香気成分の混合効果によってフローラル、グリーン、紅茶様さらにはよだれ様の香調が加わることで形成されることを明らかにした。さらに、ヤチヤナギ香気を持つリラクゼーション効果に、香調の主要成分である *germacrone* の関与することを明らかにしたのは、本研究が初めてである。精油の持つ抗菌作用を活用しながら、今後、ヤチヤナギの芳香成分は化粧品の素材や食品への添加物として広く応用できることが示唆された。

## Summary

### Studies on aroma constituents in *Myrica gale* var. *tomentosa*

The relationship between mankind and flavor and fragrance has been kept important from ancient time when flavor and fragrance played important roles in religious ceremony. According to the development of human society, the importance of the relation spread widely in our daily life, such as food and cosmetics. In modern society, many people suffer from stress caused by business and strain in daily life. Many goods and services for relaxation to heal stress and strain are widely spread in developed countries. Lavender oil and other essential oils known as relaxing effecters are utilized in popular cosmetics and foods. In Europe, aromatherapy has been applied for medical purpose, and many herbal oils have been used and their physiological and pharmacological effects were recognized traditionally and experientially. Recently, many studies on effects of flavor and fragrance on physiology of human were reported such as activation of immunological or endocrine system. And further investigations on the psychology and physiology and relation between flavor (or fragrance) and excitation and relaxation of human must be needed.

*Myrica gale* and other members of the Myricaceae plant family are aromatic shrubs, and were used in traditional medicine in Northern Europe and North America. The dried leaves of *M. gale* var. *gale* are also used as a flavoring agent for beer, and a perfuming agent for linen. Moreover, dried leaves and fruits are used as a spice for soups and stews. However, the commercial applications of *Myrica gale* var. *gale* have not spread to Northern Europe and America, because of the lack of available resources. In Asia, *M. gale* var. *tomentosa* grows in the wild, in the marshes in Japan, especially in Hokkaido, the northern island of Japan. Commercial use of *M. gale* var. *tomentosa* in Japan has also not been available. Recently, our research collaborators developed a mass propagation system of *M. gale* var. *tomentosa* by using a shoot tip culture technique. This tissue culture system is ideal for propagating plants with genetic homogeneity. Using our method, 2 hundred million seedlings can be obtained from one seedling in one year. Therefore, *M. gale* var. *tomentosa* is expected to become a new resource owing to its aromatic and medicinal characteristics.

### **1. Aroma characteristics of *M. gale* var. *tomentosa***

The essential oil of *M. gale* var. *tomentosa* was prepared by hydrodistillation (HD), continues distillation (CD) and high solvent assisted flavor evaporation (SAFE) from dried leaves, and were analyzed by Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) for comprehension aroma constituents in *M. gale* var. *tomentosa* exhaustively. The yields by HD and SAFE were 0.32% (0.989g/300g dried leaves) and 0.42% (0.169g/40g), respectively. In the essential oil prepared by HD, limonene, cymene and germacrone were identified as major constituents. In the essential oil prepared by CD,  $\beta$ -myrcen and  $\alpha$ -terpineyl acetate, which were not detected in the SD oil, were identified. In the essential oil prepared by SAFE,  $\beta$ -pinene content was about 5 times more than HD oil, and the contents of limonene and 1,8-cineole were higher than those in the oil of HD and CD. SAFE method was shown to extract monoterpenes effectively. Comparison of the aroma constituents in the oil of *M. gale* var. *tomentosa* and the oils of foreign *Myrica gale* and related plants, the constituents and their compositions were different each others, and there must be regional difference in the flavors of oils obtained from these plants.

### **2. Aroma characteristics of *M. gale* var. *tomentosa* by mixed aroma experiment**

The fractions of the oil of were obtained by chromatography on silica gel, and the aroma characteristic of *M. gale* var. *tomentosa* was clarified by the sensory analysis to determined the notes of the fractions and by GC-MS analysis. The similarity of the note of each fraction to that of the essential oil was tested by the sensory analysis, and the fraction having "woody and medicine like" note showed the highest similarity to the essential oil. The note of the fraction was assumed to be due to  $\beta$ -elemenone, germacrone and 1,8-cineole. The fraction having "floral green and brown red tea like" flavor also showed high similarity, and linalool, terpinene-4-ol, nerolidol and geraniol were assumed to be responsible to for the flavor. However, there was no fraction having "saliva like" note that was experienced in the essential oil of *M. gale* var. *tomentosa*.

Then, mixed aroma experiments (AROMATCH) were performed to investigate precise roles of aroma constituents. The olfactometric analysis of the constituents in the presence of the flavor of essential oil revealed that "woody and medicine like" flavor was based on germacrone and was enhanced by dehydroaromadendrene. The flavor of

"floral and green" was based on linalool and geraniol, and the flavor of "green" was shown to be enhanced by  $\alpha$ -pinene. The flavor of "saliva like" was detected by modulation of cadinene and *cis*-stilbene with other constituents.

### **3. Relaxation effects of the essential oil of *M. gale* var. *tomentosa***

The effects of the essential oil of *M. gale* var. *tomentosa* were tested by psychological and physiological experiments using lavender oil as relaxation standard, rosemary oil as wakefulness standard and isovaleric acid as food malodor. The experiments were composed of near-infrared spectroscopy (NIRS) monitoring the change of the amounts of oxygenated hemoglobin in brain, measuring the activities of saliva  $\alpha$ -amylase and profile of mood status (POMS) test that represents psychological status. The essential oil of *M. gale* var. *tomentosa* exhibited relaxation effects in these three tests, and the fractions containing characteristic aroma constituents also exhibited the effects. In NIRS tests, the fraction containing  $\beta$ -elemenone and germacrone exhibited remarkable relaxation effects among fractions, these compound must be responsible for the relaxation effects of *M. gale* var. *tomentosa*. The ten times diluted oil exhibited notable relaxation effect in Saliva  $\alpha$ -amylase test and POMS test that are known to response quickly by aroma.

### **4. Antimicrobial activities of the essential oil of *M. gale* var. *tomentosa***

Antimicrobial activities of the essential oil of *M. gale* var. *tomentosa* were demonstrated against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. Chromatographic fractionation of the oil on silica gel resulted in the identification of limonen, geraniol, linalool and other 9 constituents were identified as responsible constituents in the oil. Then, the effects of limonene, thymol, geraniol, nerolidol, and  $\alpha$ -terpineol on the ratio of fatty acids were tested. The increases of saturated fatty acids were observed, but apparent damages of cell membrane were not observed by SEM. The increase of electron conductivities of culture medium of *Sta. aureus* was observed by addition of thymol, and the increases of the amounts nucleic acid were detected by addition of all 5 aroma constituents. The aroma constituents in the essential oil of *M. gale* var. *tomentosa* must be responsible for antimicrobial activities. The effects were assumed to be due to under microscopic damage on cell membrane such as leakage of nucleic acids, but not heavy damage observed by microscope.

In conclusion, the keynote of the aroma of *M. gale* var. *tomentosa* is "woody and medicine like" due to germacrone and dehydroanromadendren, and the aroma is also composed of additional notes of "floral green", "red tea like" and "saliva like". The relaxation effects of the essential oil were revealed for the first time by three different experiments, POMS, saliva amylase test and NIRS spectroscopy. The fraction containing germacrone was shown to be responsible to the relaxation effects. These characteristics of the essential oil of *M. gale* var. *tomentosa* must be beneficial for the development of cosmetics, food additives and other applications.

## 参考文献

- 1) 印藤元一 ; 増補改訂版 合成香料 化学と商品知識, **1**, (2005).
- 2) 堀田満、緒方健、新田あや、星川清親、山崎耕宇 ; 世界有用植物辞典, 700 (1989).
- 3) 北村四郎、村田源 原色日本植物図鑑・木本編, 350, (1979).
- 4) Wakita, Y., Sato, T., Tanahashi, I., Ishii, H., and Sato, T., Development of the micropropagation technology and inspection of the relaxation effect in the *Myrica gale* var. *tomentosa*., *Bor. For. Res.*, **60**, 85-87 (2010).
- 5) Nakata, M., Myoda, T., Wakita, Y., Sato, T., Tanahashi, I., Toeda, K., Fujimori, T., and Nishizawa, M., Volatile components of essential oil from cultivated *Myrica gale* var. *tomentosa* and its antioxidant and antimicrobial activities., *J. Oleo Sci.*, **62**, 755-762 (2013).
- 6) Sylvestere, M., Legault, J., Dufour, D., and Pichette, A., Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L., *Phytomedicine.*, **12**, 299-304 (2005).
- 7) Popvici, J., Bertrand, C., Bagnarol, E., and Comte, G., Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L. and antifungal activity., *Nat. Prod. Res.*, **22**, 1024-1032 (2008).
- 8) 藤森嶺 編著 ; 香りが見える理由, (2012).
- 9) Kovats, E., Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system., *Adv. Chromatogr.*, **1**, 229 (1965).
- 10) Malterub, K.E., and Faergi, A., Bacteriostatic and fungistatic activity of C-methylated dihydrochalcones from the fruits of *Myrica gale* L., *Acta Pharm. Suec.*, **19**, 43-46 (1982).
- 11) Svoboda, K.P., Inglis, A., Hampson, J., Galambosi, B., and Asakawa, Y., Biomass production, essential oil yield and composition of *Myrica gale* L. harvested from wild populations in Scotland and Finland., *Flavour Fragr. J.*, **13**, 367-372 (1998).
- 12) Carlton, R.R., Waterman, P.G., Gray, A.I., and Deans, S.G., Variation of leaf gland volatile oil within a population of sweet gale (*Myrica gale*) (*Myricaceae*)., *Chemoecology.*, **3**, 45-54 (1992).
- 13) Halim, A.F., and Collins, R.P., Essential oil analysis of the Myricaceae of the Eastern United State., *Phytochemistry.*, **12**, 1077-1083 (1973).

- 14) Jeanson, T.G.T., Palsson, K., and Borg-Karlson, A.K., Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden., *Med. Vet. Entomol.*, **19**, 345-352 (2005).
- 15) Lawrence, B.M., and Weaver, K.M., Essential oil and their constituents., *Planta Medica.*, **25**, 385-388 (1974).
- 16) Hattori, S., Takagi, H., and Fujimori, T., Evaluation of Japanese green tea extract using GC-O with original aroma simultaneously input to suniffing port method (OASIS)., *Food Sc. Technol. Res.*, **9**, 350-352 (2003).
- 17) Goto, K., Hoshi, Y., Kawahara, M., Takahashi, M., and Murohashi, H., Role of the prefrontal cortex in the cognitive control of reaching movements : near-infrared spectroscopy study., *J. Biomed. Opt.*, **16**, 1-8 (2011).
- 18) Hoshi, Y., Kobayashi, N., and Tamura, M., Interpretation of near-infrared spectroscopy signals : a study with a newly developed perfused rat brain model., *J. Appl. Physiol.*, **90**, 1657-1662 (2001).
- 19) Hatayama, T., Kitamura, S., and Ohnuki, K., The facial massage reduced anxiety and negative mood status, and increased sympathetic nervous activity., *Biomed. Res.*, **29**, 317-320 (2008).
- 20) 大石康彦、金濱聖子、比屋根哲、田口春孝 ; 森林空間が人に与えるイメージと気分の比較 -POMS および SD 法を用いた森林環境評価-, *J. Jpn. For. Soc.*, **85**, 70-77 (2003).
- 21) 松村成司、近藤健吾、岸恵美、広田悠子、齋藤初恵 ; POMS テストからみた大学生の朝の心理特性と生活習慣との関連性について, *千葉教育大学 教育学部 研究紀要*, **50**, 503-515 (2002).
- 22) Xudong, D., Tashiro, M., Yambe, T., and Itoh, M., Autonomic nervous function and localization of cerebral activity during lavender aromatic immersion., *Technol. Health Care.*, **15**, 69-78 (2007).
- 23) Winai, S., and Vorastith, S., The effects of lavender oil inhalation on emotional state, autonomic nervous system, and brain electrical activity., *J. Med. Assoc. Thai.*, **95**, (2012).
- 24) 宮島成江、小田史郎、森谷繫、阿岸祐幸 ; 脳波からみたラベンダー湯入浴のリラクゼーション効果, *北海道大学 教育学部 紀要*, **8**, 139-147.
- 25) Morinushi, T., Masumoto, Y., and Takigawa, M., Effect on electroencephalogram of chewing flavored gum., *Psychiat. Clin. Neurosciences.*, **54**, 645-651 (2000).
- 26) Yamaguchi, M., Tahara, Y., and Kosaka, S., Influence of concentration of

- fragrance on salivary  $\alpha$ -amylase., *Int. J. Cosmetic Sci.*, **31**, 391-395 (2009).
- 27) Masumoto, T., Asakura, H., and Hayashi, T., Does lavender aromatherapy alleviate premenstrual emotional symptoms ? : a randomized crossover trial., *BioPsychoSocial Medicine.*, **7**, (2013).
  - 28) 由留木裕子、鈴木俊明 ; ラベンダーの香りと神経機能に関する文献的研究, *関西医療大学 紀要*, **6**, 109-115 (2012).
  - 29) Kyle, R.D., and Andrew, A.S., The relationship between mood state and plasma methadone concentration in maintenance patients., *J. clin. psychopharmacol.*, **21**, 78-84 (2001).
  - 30) 石崎太一、黒田素央、杉田正明 ; 鱈だし継続摂取が気分・感情状態、特に疲労感に及ぼす影響, *日本食品科学工学会 (note)*, **53**, 225-228 (2006).
  - 31) 長野裕一郎 ; スピーチ課題が唾液アミラーゼ活性に与える効果, *文京学院大学 人間学部 研究紀要*, **10**, 221-228 (2008).
  - 32) 山口昌樹 ; 唾液マーカーでストレスを測る, *Folia pharmacol. Jpn.*, **129**, 80-84 (2007).
  - 33) 山口勝機 ; 唾液アミラーゼ活性に対するレモンの香りの効果, *志學館大学 人間関係学部 研究紀要*, **30**, 19-26 (2009).
  - 34) 三島隆章 ; 奥入瀬溪流での散策が唾液アミラーゼ活性に及ぼす影響について, *八戸大学 紀要*, **44**, 35-42.
  - 35) Nakano, A., and Yamaguchi, M., Evaluation of human stress using salivary amylase., *J. Soc. Biofeedback Res.*, **38**, 3-9 (2011).
  - 36) Winai, S., and Vorasith, S., Effects of inhaled rosemary oil on subjective feelings and activities of the nervous system., *Sci. Pharm.*, **81**, 531-542 (2013).
  - 37) Rodrigo, S., and Saad, L., Linalool-rich rosewood oil induces Vago-vagal bradycardic and depressor reflex in rats., *Phytother. Res.*, **28**, 42-48 (2014).
  - 38) 芳賀三紀子、小口江美子、浅野和仁 ; 異なる香りによる脳内酸化ヘモグロビン濃度および気分への影響, *昭和大学 保険医療学雑誌*, **11**, (2013).
  - 39) Ichihara, K., and Tani, A., Simple procedure for fatty acid analysis of glycerophospholipids in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*., *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 472-475 (2012).
  - 40) Dejan, S., Marina, S., Jasmina, G., Ana, D., Ana, C., Mihailo, R., and Dragoljub, G., Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils., *Food Chem.*, **128**, 1017-1022 (2011).



- 41) Mangena, T., and Muyima, N.Y.O., Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisa afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains., *Lett. Appl. Microbiol.*, **28**, 291-296 (1999).
- 42) Kivrak, I., Duru, M. E., Öztürk, M., Mercan, N., Harmsndar, M., and Topçu, G., Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*., *Food Chem.*, **116**, 470-479 (2009).
- 43) Di Pasqua, R., De Feo, V., Villani, F., and Mauriello, G., In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean *Apiaceae*, *Verbenaceae* and *Lamiaceae* against pathogens and spoilage bacteria., *Ann. Microbiol.*, **55**, 139-143 (2005).
- 44) Sikkema, J., de Bont, J.A.M., and Poolman, B., Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons., *Microbiol. Rev.*, **59**, 201-222 (1995).
- 45) Gill, A.O., and Holley, R.A., Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*., *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5750-5755 (2004).
- 46) Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., and Debevere, J., Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. Flexneri*., *Food Microbiol.*, **21**, 33-42 (2004).
- 47) Varel, V.H., and Miller, D.L., Eugenol stimulates lactate accumulation yet inhibits volatile fatty acid production and eliminates coliform bacteria in cattle and swine waste., *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 1001-1005 (2004).
- 48) Dorman, H.J.D., and Deans, S.G., Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils., *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 308-316 (2000).
- 49) Rosangla, D.P., Gail, B., Nikki, H., Mink, E., Danilo, E., and Gialuigi, M. Mebrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oil., *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 4863-4870 (2007).
- 50) Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., and Mauriello, G., Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde and eugenol in the growing media., *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 2745-2749 (2006).
- 51) Burt, S., Essential oils : Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review., *Int. J. Food Microbiol.*, **94**, 223-253 (2002).
- 52) Burt, S.A., and Reinders, R.D., Antibacterial activity of selected plant essential oils

- against *Escherichia coli* O157:H7., *Lett. Appl. Microbiol.*, **36**, 162-167 (2003).
- 53) Hearth, R.J., and Rock, C.O., Fatty acid biosynthesis as a target for novel antibacterials., *Curr. Opin. Invest. Drugs.*, **5**, 146-153 (2004).
- 54) Hearth, R.J., White, S.W., and Rock, C.O., Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents., *Prog. Lipid Res.*, **40**, 467-497 (2001).
- 55) Campbell, J.W., and Cronan, J.E., Bacterial fatty acids biosynthesis: Targets for antibacterial drug discovery., *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**, 305-332 (2001).
- 56) Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., and Von, W.A., Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria., *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3590-3595 (1998).
- 57) Ultee, A., Bennink, M.H.J., and Moezelaar, R., The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*., *Appl. Environ. Microbiol.*, **94**, 223-253 (2002).
- 58) Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., Uecker, J., Bolis, A., and Narbad, A., Mode of action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus Plantarum* and *Listeria innocua*., *J. Appl. Microbiol.*, **97**, 104-113 (2004).
- 59) Shao, X., Cheng, S., Wang, H., Yu, D., and Mungai, C., The possible mechanism of antifungal action of tea tree oil on *Botrytis cinerea*., *J. Appl. Microbiol.*, 1-8 (2013).

## 謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり終始多大なるご助言、ご指導を賜りました東京農業大学 生物産業学部食品香粧学科 香りの化学研究室 西澤信教授、特に抗菌試験において終始多大なるご助言、ご指導を賜りました戸枝一喜教授、香りという未知の分野に関し終始多大なるご助言、ご指導を賜りました藤森嶺教授、久保田紀久枝教授に深く感謝の意を表したいと思います。時に応じて、厳しくご指導いただいたこと、またやさしく励ましてくださったことを通して、私自身の至らなさを実感することができたことは今後の努力の糧になるものであります。

そして、不慣れな実験と化学用語に途方に暮れる私に、長期に渡って的確な助言と激励を下された妙田貴生准教授には、感謝の念が絶えません。

東京農業大学 生物産業学部食品香粧学科 生物化学研究室 丹羽光一教授には、本研究の遂行および本論文の作成にあたり多大なるご助言を賜りました。厚く御礼申し上げます。

共同研究者として長年、試料を提供していただいた株式会社レクシア、北海道立総合研究機構 林業試験場 脇田陽一氏に深謝いたします。

生物産業学部食品香粧学科 後藤広太郎助教には、脳血流量測定にあたり、機器の使用だけではなく、多岐に渡りご指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。

北見工業大学 工学部電気電子工学科 橋本泰成准教授には、脳波測定および脳活動について、多大なるご助言、ご指導を賜りました。厚く御礼申し上げます。

SEMによる形態観察を引き受けて頂きました東京農業大学世田谷キャンパス 地域環境科学部の電子顕微鏡室の本橋慶一教授、抗菌試験においてご指導賜りました元食品微生物学研究室 藤村朱喜助教に深謝いたします。

金嶋泰氏、加藤由麻氏には、同期として多くの刺激や助言を頂いたほか、精神的に支えて頂きました。心より感謝しています。

食品科学科 遠藤菜実子氏、関根ゆきな氏、斉藤吉太郎氏、食品香粧科学科 小野塚麻里亜氏、艸香やえ氏、瀬木岳央氏、花田雄太氏、金澤美里氏、友松和音氏、そしてリラクゼーション効果検討の際に快く協力してくださった香りの化

学研究室員の皆さん、食品微生物学研究室員の皆さん、本当に有り難うございました。

最後に、温かく見守りそして支援して下さった家族に対しては深い感謝の意を表して謝辞と致します。

2015年3月17日