

# フィトンチッドの化学成分と その抗酸化作用

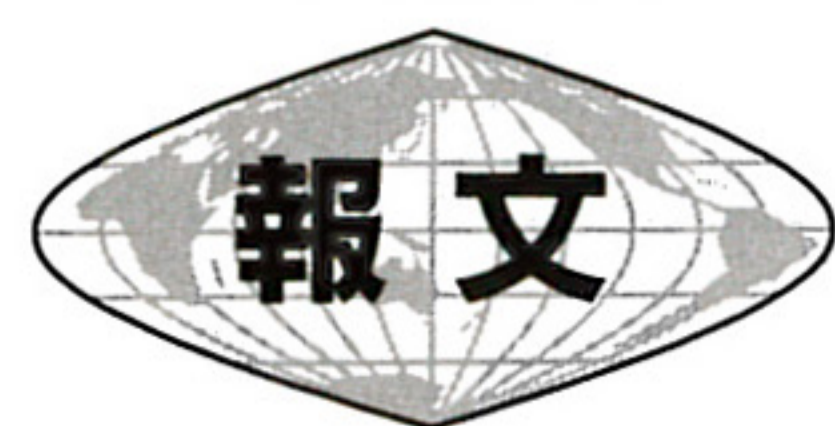
阿部 智<sup>1)</sup> 野村 正人<sup>2)</sup>

近畿大学大学院システム工学研究科システム工学専攻<sup>1)</sup>

近畿大学工学部生物化学工学科<sup>2)</sup>



フレグランスジャーナル社



# フィトンチッドの化学成分と その抗酸化作用

阿部 智<sup>1)</sup> 野村 正人<sup>2)</sup>

近畿大学大学院システム工学研究科システム工学専攻<sup>1)</sup>  
近畿大学工学部生物化学工学科<sup>2)</sup>

## Abstract

In modern advanced information society, many people feel stressed and become exhausted both mentally and physically. As a result, a significant number of people develop life-style related diseases. Treatment options for such illness include conventional medical therapies provided within the framework of urban living, and the forest therapy that utilizes natural forest. In forest, aromatic chemical substances, called phytoncides (phyto means “plant” and cide means “kill”), are radiated by plants. Phytoncides are suggested to have antibacterial, insect deterrent, odor eliminating, deodorization, and refreshing effects. Furthermore, the role of antioxidants has become increasingly important, as excessive cannot be deal with by our biological defense mechanism only.

In the present study, we focused on the antioxidant defense effect of phytoncides with the aim of effectively using the secondary metabolites of plants. Specifically, four types of phytoncide liquid were prepared using a wide variety of plant extract, and the antioxidant effects of the liquids were examined based on their DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) - radical elimination action. The highest radical elimination action was observed against a compound where hydroxyl and methoxy groups are bonded to the benzene ring in ortho (1,2-) position. It was therefore suggested that the alove phytoncide liquid, which consists of many types of plant extracts, have marked antioxidant effect.

**Key words** : phytoncide, forest therapy, antioxidant effect, DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) - radical

## はじめに

近年、著しく高度情報化された都市環境下において、ストレス状態にある現代人が増加し、その健康障害が問題になっている<sup>1,2)</sup>。ストレスにより高度の負荷がかかると生体内の平衡状態が保てなくなり、心身にさまざまなトラブルが起こってくるのが知られている。最近の生活習慣病（成人病）といわれている高血圧、心筋梗塞、糖尿病、胃潰瘍等の80%はストレスによるものだといわれている<sup>3,4)</sup>。このような中で人々が求めるものは、精神的な安らぎであり、自然の

香りでストレスを解消（アロマテラピー）したいと思う人が年々増加している。林野庁が“森林浴”という言葉を出して24年が経過し、森林浴は生活の中のリクリエーションや健康法のひとつとして注目されている。森林浴とは森林の自然を利用した大気浴の一種で、森林から分泌発散するフィトンチッド（Phytoncide）という揮発性の物質により人体が活性化され、健康的効果が得られるというものである<sup>5,6)</sup>。また、肉体的な効果だけでなく、その静けさが心を落ち着かせ穏やかな木々の緑や森の自然が精神的な安ら

## Chemical constituents of phytoncides and their antioxidative activities.

ABE Tomo<sup>1)</sup> and NOMURA Masato<sup>2)</sup>

Cluster of Biotechnology and Chemistry Systems, Program in Systems Engineering, Graduate School of Systems Engineering, Kinki University<sup>1)</sup>

Department of Biotechnology and Chemistry, School of Engineering, Kinki University<sup>2)</sup>

Accepted Oct. 5 2005

ぎを与えている<sup>7,8)</sup>。

著者らがこれまでに行ったフィトンチッド液に関する生理学的研究<sup>9,10)</sup>では、ラットはストレスに対して敏感であり、フィトンチッドの噴霧により高血圧発症ラットの血圧上昇を抑制し、正常血圧ラットの血圧を低下させる傾向があることを明らかにした。また、水浸拘束ストレス実験においては、対照群のラットの胃には著しい出血や損傷が認められたが、フィトンチッド噴霧下群のラットには僅かな損傷しか認められなかったことを報告<sup>11)</sup>した。

ところで最近、疾病や健康が話題になるたびにフリーラジカルや活性酸素という用語がよく用いられている。フリーラジカルとは最外殻軌道に不対電子をもつ原子や分子のことであり、活性酸素とは私たちが空気中から取り入れている酸素が体内で変質したもので、一般的にはスーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、過酸化水素、一重項酸素の4種類から成り立っている。活性酸素・フリーラジカルは生体にタンパク質変性、脂質過酸化、酵素失活、DNA切断等の傷害を与え、これにより生体膜や遺伝子等の損傷が生じ、老化をはじめ、動脈硬化、糖尿病やがん等の疾病を引き起こす要因となっている<sup>12,13)</sup>。生体内で生成したフリーラジカル・活性酸素は生体内に存在するSOD (Superoxide dismutase) 等の抗酸化酵素によって消去されるが、過剰な酸化ストレスが生じると生体防御機構では対応できなくなるので、抗酸化物質の役割が重要となってくる<sup>14,15)</sup>。

そこで著者らは、多種多様の樹木および植物から放出される揮散性物質を濃縮調製した4種類のフィトンチッド液に注目し、森林浴効果との関連性もふまえて、DPPHラジカル消去効果試験および活性酸素阻害(SOD)試験を行い、抗酸化能効果について検討したので、これらの結果について紹介する。

## 1. 実験

### 1-1. 試料の調製

入手((有)フィトンチッド118)し実験に用いた4種類のフィトンチッド(図1)は、Aタイプ(樹木系の植物エキス)、ABタイプ(殺菌力の強い植物エキス)、CYタイプ(アレルギー反応を起こさない植物エキス)およびDタイプ(草花系の植物エキス)で、それぞれ118種の植物から得られたエキスを混合したものである。

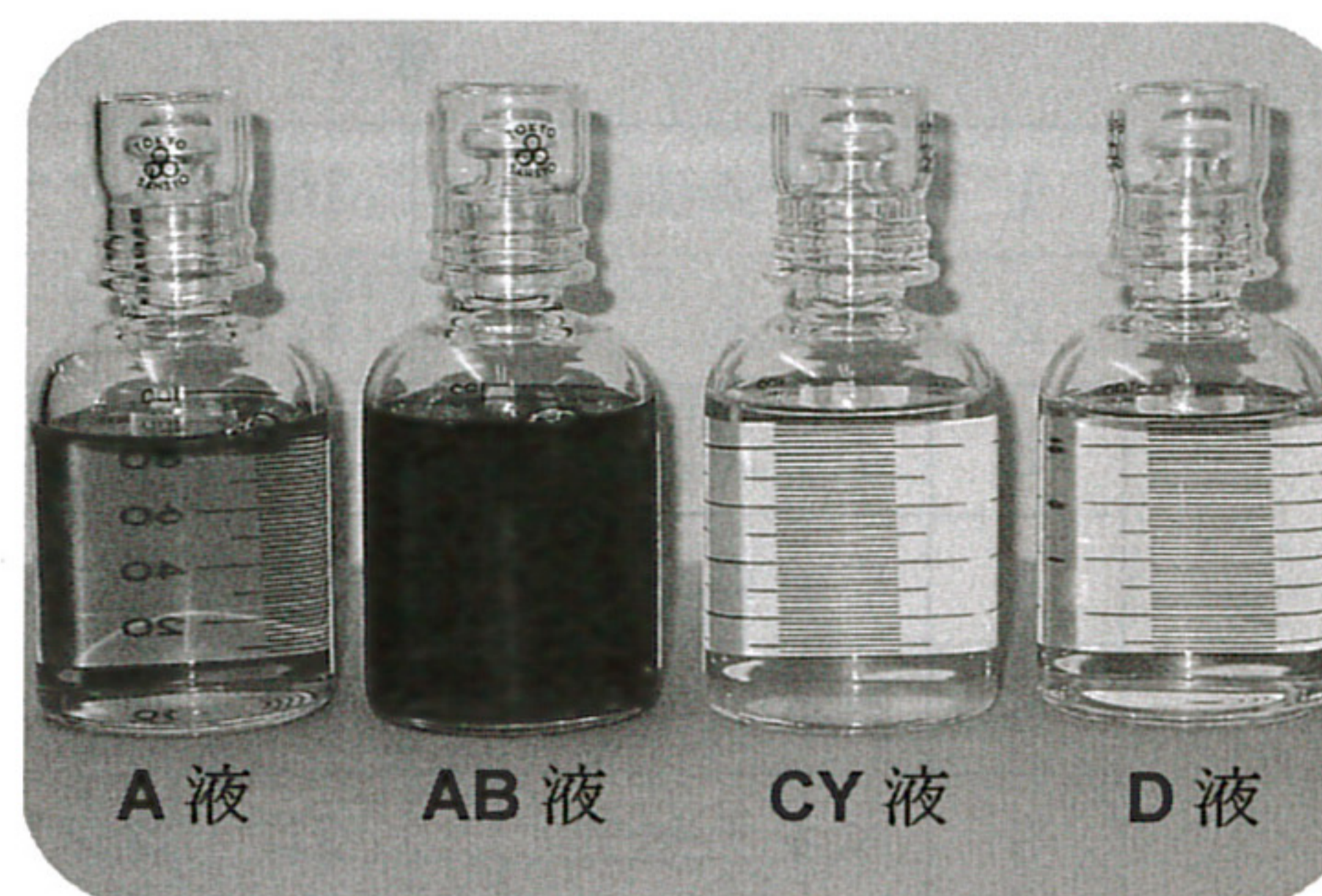


図1 各種フィトンチッド液の種類

### 1-2. 分析方法

4種類のフィトンチッド液は溶媒であるヘキサン、ベンゼン、エーテルおよび酢酸エチルの順で用いて抽出した。各フィトンチッド液から抽出した油分については、GC-MS分析(Hewlett Packerd HP 6890 GC, Hewlett Packerd HP 5973 MSD, column: TC-WAX, 60m×0.25mm, 70°C [5 min hold] ~ 240°C [3°C/min] injection: 240°C, ライブラリー: NIST (National Institute of Standards and Technology) WebBook)を行った。

### 1-3. DPPHラジカル消去効果試験<sup>16)</sup>

それぞれのフィトンチッド液の1mg/mLエタノール溶液を作成し、これらを希釈することにより、8濃度の希釈系列を2系統調整した。これに100μLのエタノールを加え、ついで0.2mMのDPPHエタノール溶液50μLを加え、攪拌し、室温で30分静置した後、マイクロプレートリーダーを用いて517nmの吸光度Aを測定した。ブランク試験としては、フィトンチッド液の代わりにエタノールを用いて同様の操作を行い、吸光度Bを測定した。また、測定試料に色が付いている場合には、色対照試験としてDPPHエタノール溶液の代わりにエタノールを用いて同様の操作を行い、吸光度Cを測定した。なお、DPPHラジカル消去率は次式に示した算出方法により求めた。

$$\text{DPPHラジカル消去率 (\%)} = \left(1 - \frac{A-C}{B}\right) \times 100$$

これらの消去率に基づいて、単位濃度1.0に対する50%消去濃度SC<sub>50</sub> (50% Scavenging concentration)についても算出した。

### 1-4. 活性酸素消去効果(SOD)試験<sup>17)</sup>

それぞれのフィトンチッド液10μLに発色試薬(0.1Mリン酸緩衝液pH8.0, キサンチン0.4mmol/L, ニトロブルーテトラゾリウム(NO<sub>2</sub>-TB) 0.24mmol/L) 100μLを加え、これらを本試験および色対照試

験とした。また、ブランク試験としてフィトンチッド液の代わりにDMSO液を用いて、同様の操作を行った。これらをプレートミキサーで1分間攪拌した後、本試験とブランク試験では酵素液（キサンチンオキシダーゼ、0.1Mリン酸緩衝液pH8.0）を、色対照試験ではブランク液（0.1Mリン酸緩衝液pH8.0）をそれぞれ100  $\mu$ L加え、プレートミキサーで1分間攪拌後、37°Cで28分間加温した。その後、反応停止液（ドデチル硫酸ナトリウム）20  $\mu$ L添加後、プレートミキサーで5分間攪拌した後、560nmの吸光度を測定し、得られた吸光度に基づき、SOD活性値を次式に示した算出方法により求めた。

$$\text{SOD 活性値(阻害率\%)} = \frac{(E_{BI} - E_{BI-BI}) - (E_S - E_{S-BI})}{(E_{BI} - E_{BI-BI})} \times 100$$

$E_S$  : 本試験                       $E_{BI}$  : 本試験のブランク

$E_{S-BI}$  : 色対照試験     $E_{BI-BI}$  : 色対照試験のブランク

## 2. 結果および考察

フィトンチッドは植物が作り出す成分で、比較的低分子の有機化合物であり、その揮発成分としての主なテルペノイドはd-リモネン、フェンコン、カンファー、リナロール、フェンチルアルコール、 $\beta$ -セドレン、 $\alpha$ -セドレン、テルピネオール、 $\alpha$ -ピネン、 $\beta$ -ピネン、シトロネロール、およびアネトールなどであることを確認している。今回用いたフィトンチッ

ドは表1に示した主な植物の組み合わせにより抽出したエキスをAタイプ、ABタイプ、CYタイプおよびDタイプとしたものを使用した。まず最初に、4種類のフィトンチッド原液について、DPPHラジカル消去効果試験を行ったところ、いずれのフィトンチッド液も比較物質として用いた $\alpha$ -Tocopherolの値（95.0%）よりも高く、いずれも97%以上のラジカル消去率を示した（表2）。その中でも、草花系の植物を主体としたDタイプのフィトンチッドが最も高いラジカル消去率（100%）を示すことが分かった。また、50%-ラジカル消去濃度（SC<sub>50</sub>）についても検討したところ、Dタイプのフィトンチッド液は $\alpha$ -Tocopherolと同等の値を示し、良好なラジカル消去効果があることを明らかにした。

一方、活性酸素消去効果試験では、緑色植物中に存在し、酸化防止効果として細胞膜を形成するリン脂質中の不飽和脂肪酸の酸化を抑え、生体膜の保持やフリーラジカルの消去などの特性を持ち、現在、最も有効な抗酸化剤として広範囲にわたって用いられている $\alpha$ -Tocopherolには存在しない活性酸素消去効果が、殺菌力が強い植物を主体としたABタイプのフィトンチッド液に著者らが期待した効果（60.7%）が認められた。また、AタイプおよびCYタイプのフィトンチッドにも50%前後の活性酸素消去効果が存在することが分かった（表2）。

表2 Antioxidative activities

Type of Phytoncide	DPPH radical scavenging effect		Superoxide dismutase activities effect
	Scavenging effect (%) <sup>a)</sup>	SC <sub>50</sub> <sup>b)</sup>	Scavenging effect (%) <sup>c)</sup>
Type-A	97.1	23	49.9
Type-AB	97.1	24	60.7
Type-CY	98.7	24	51.2
Type-D	100.0	6	30.1
$\alpha$ -Tocopherol	95.0	6	-

a) Corrected concentration 0.2 mg/mL

b) 50% Scavenging concentration ( $\mu$ g/mL)

c) SOD active value (%)

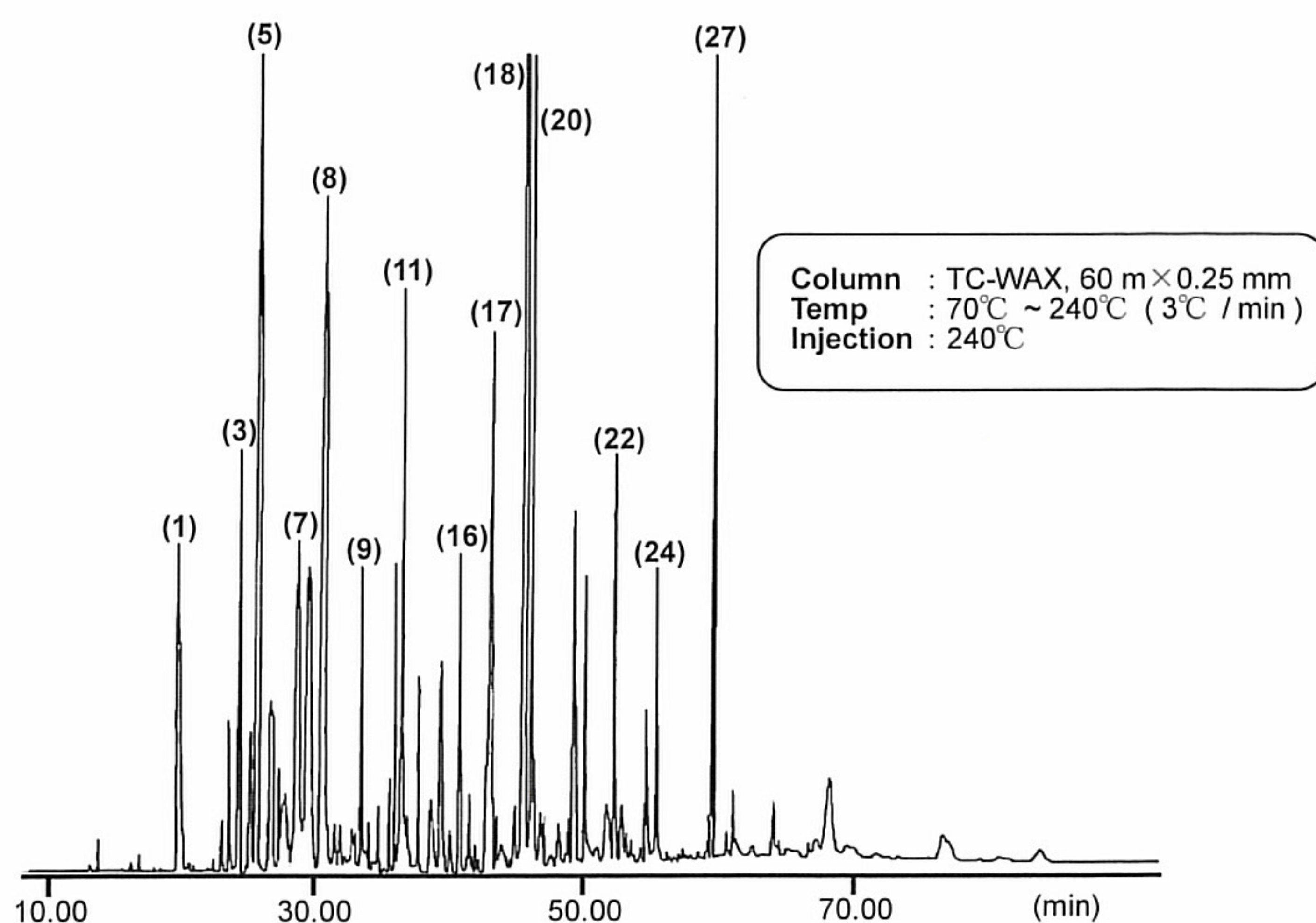


図2 GC-MS Chromatogram of D type

これらの結果から、DPPHラジカル消去効果試験において、最も高い値を示したDタイプのフィトンチッド液中に含まれる化学成分の検索を行った。すなわち、Dタイプのフィトンチッド原液を直接エーテル抽出し、エーテルを除去して得られた油分 (Ether extracts) についてGC-MS分析を行ったところ、図2に示した主なピーク (1) ~ (27) を含むチャートが得られ、それぞれのピークについての化学成分を解析したところ、表3に示したような化合物を明らかにすることができた。この油分をヘキサン抽出部と水層部に分画した後、再度それぞれの分画部について、DPPHラジカル消去効果試験を行った。その結果を表4に示す。ヘキサン抽出部および水層部のいずれも高いDPPHラジカル消去率を示したが、とくに水層部により高いラジカル消去能が発現することが分かった。そこで、ラジカル消去能を発現する化合物について、種々検討した結果、水層部中に存在するフェニルプロパノイド系化合物の挙動に着目した。まず、水層部に

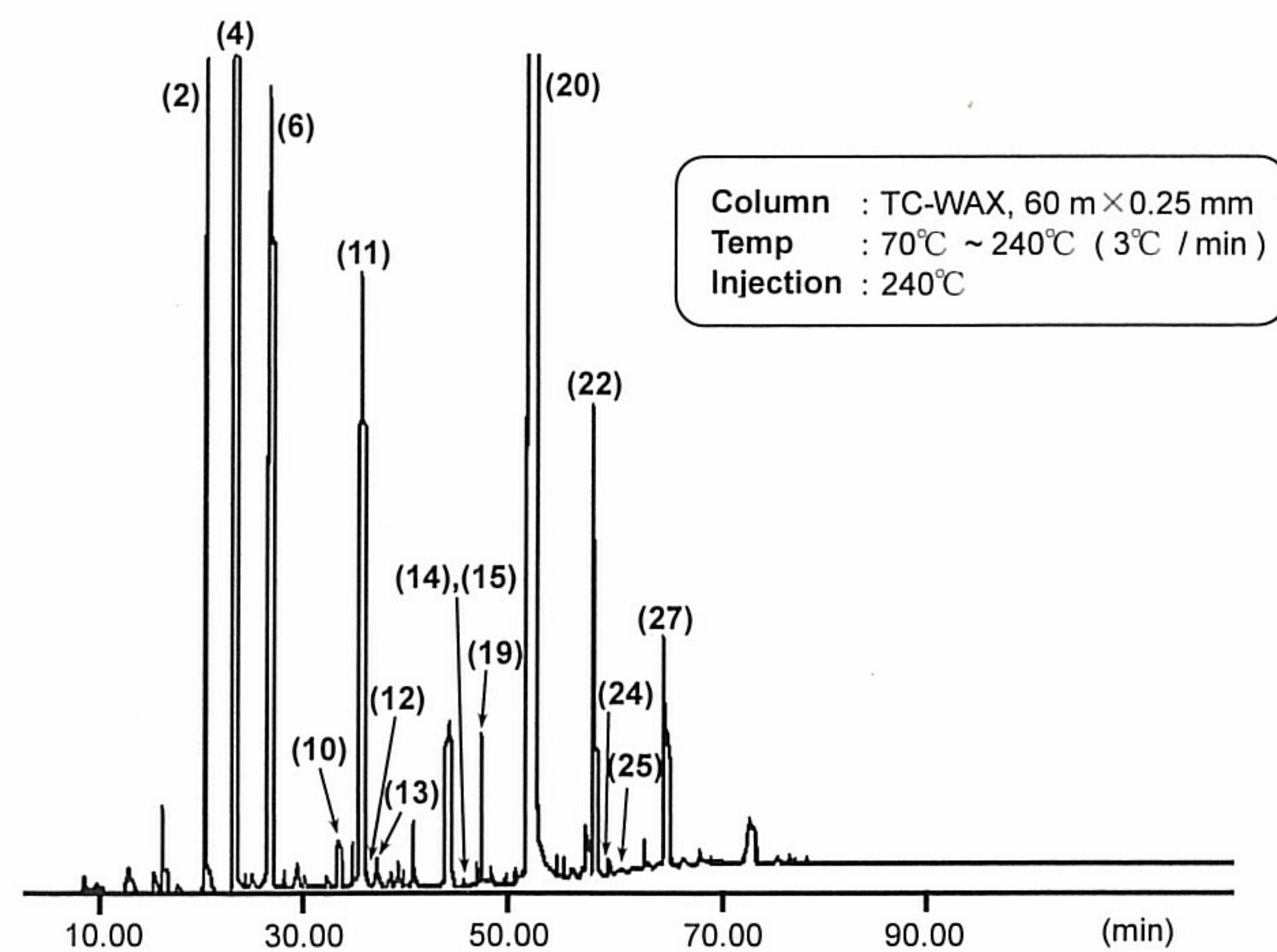


図3 GC-MS Chromatogram of water layer.

ついてGC-MS分析 (図3) を行い、出現した主な15のピークについて、標品 (MSライブラリーデータ) との同定により構造確認を行ったところ、図4に示したそれぞれの化合物の構造を明らかにすることができた。ついで、Dタイプのフィトンチッド液中に存在するフェニルプロパノイド系化合物の構造が明らかになったので、その化合物の中でも、今回、水層部から分画し、構造を明らかにした8種類の化合物についてのDPPHラジカル消去効果を検討した。

その結果、化合物の中でも2-Methoxyphenol (10), 2-Methoxy-5-methylphenol (14), 2-Methoxy-4-methylphenol (15), Eugenol (19) および4-Allyl-2,6-dimethoxy phenol (24) は、いずれも90%以上のラジカル消去率を示し、比較物質である $\alpha$ -Tocopherolよりも高い値を示した (表5)。また、50%-ラジカル消去濃度 (SC<sub>50</sub>) についても検討したところ、いずれの化合物も1~4の数値を示し、これらの化合物には高いラジカル消去能があることを明らかにした。つぎに、これら化合物の構造と活性発現の

表3 Identified compounds in Type D

Peak No.	R. T <sup>a)</sup>	Compounds	Composition (%)		Peak No.	R. T <sup>a)</sup>	Compounds	Composition (%)	
			Ether extracts	Water extracts				Ether extracts	Water extracts
(1)	21.72	Thujone	3.453	—	(16)	42.97	Phenol	1.755	0.251
(2)	24.96	Benzyl chloride	trace	8.115	(17)	45.02	Iso-amyl salicylate	3.964	—
(3)	26.45	Linalool	2.191	0.008	(18)	47.80	Cedrol	12.208	0.223
(4)	27.57	Diethyl glycol monomethyl ether	trace	15.113	(19)	48.21	Eugenol	2.143	0.019
(5)	27.93	2-(2-Methoxyethoxy) ethanol	7.247	—	(20)	52.31	Glycerin	6.549	35.576
(6)	30.32	N,N-Dimethyl dodecyl amine	trace	13.871	(21)	54.64	$\alpha$ -Hexyl cinnamaldehyde	1.704	—
(7)	30.77	p-tert-Buthylcyclohexyl acetate	4.123	—	(22)	57.17	N-Benzyl-N-methyl-dodecyl amine	trace	5.234
(8)	32.52	$\alpha$ -Terpineol	8.463	—	(23)	57.63	Dodecanoic acid	1.382	—
(9)	35.49	2-Methyl-2-butenic acid	1.680	—	(24)	58.54	4-Allyl-2,6-dimethoxyphenol	trace	0.051
(10)	37.60	2-Methoxyphenol	trace	0.155	(25)	59.03	Vanillin	trace	0.037
(11)	38.66	Benzyl alcohol	2.880	—	(26)	61.81	Benzyl benzoate	5.783	0.131
(12)	38.76	2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-one	0.178	0.042	(27)	63.11	N-Benzyl-N-methyl-tetradecyl amine	trace	2.771
(13)	39.58	Phenethyl alcohol	0.644	—					
(14)/(15)	41.03	2-Methoxy-5-methylphenol or 2-Methoxy-4-methylphenol	trace	0.131			...etc		

a) Retention time (min)

表4 DPPH radical scavenging effect

Type-D	Scavenging effect (%) <sup>a)</sup>	SC <sub>50</sub> <sup>b)</sup>
Water layer	100.0	7
Hexane layer	95.5	9

a) Corrected concentration 0.2 mg/mL

b) 50% Scavenging concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )

表5 DPPH radical scavenging effect of compound in water layer

Compounds	DPPH radical Scavenging effect (%) <sup>a)</sup>	SC <sub>50</sub> <sup>b)</sup>
2-Methoxyphenol (10)	93.8	3
2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-one (12)	82.2	50
Phenethyl alcohol (13)	15.3	>400
2-Methoxy-5-methyl phenol (14)	97.7	1
2-Methoxy-4-methyl phenol (15)	99.7	4
Eugenol (19)	96.9	1
4-Allyl-2,6-dimethoxyphenol (24)	98.7	2
Vanillin (25)	46.4	286

a) Corrected concentration 0.2 mg/mL

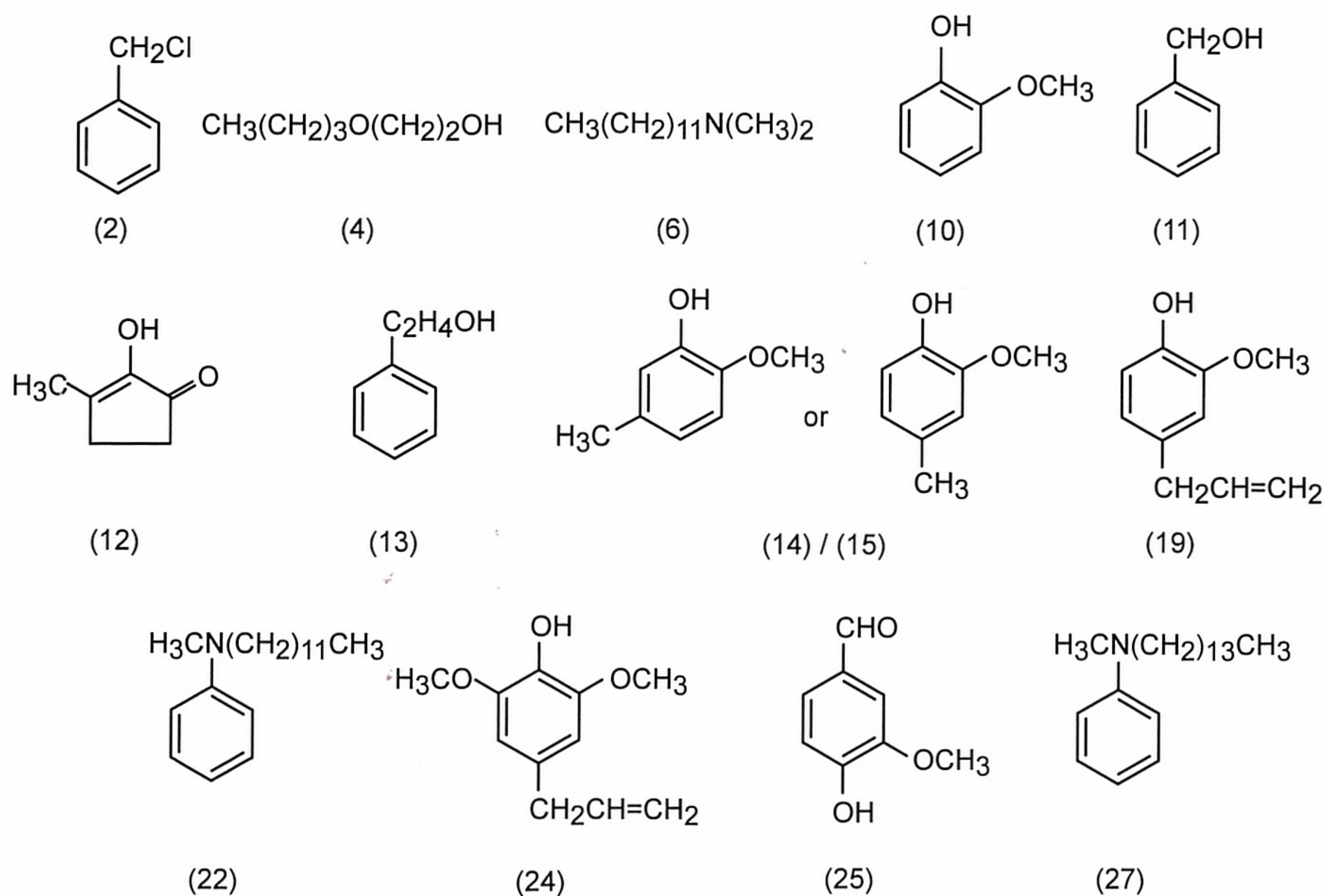
b) 50% Scavenging concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )

図4 Chemical structure of main compounds in water layer

相関性について考察したところ、いずれの化合物もベンゼン環を母格とし、ヒドロキシル基 (-OH) とメトキシ基 (-OCH<sub>3</sub>) がo-配向を形成していることから、これら2つの官能基の存在が活性発現の要因になっているものと思われる。また、ベンゼン環にヒドロキシル基とメトキシ基が存在する (10) よりも、第3の置換基としてメチル基やアリル基等の置換基が存在する化合物に、より高いラジカル消去率が認めら

れることも明らかになった。一方、(14) および (15) においては、わずかながら活性の強弱に違いが認められたことから、ヒドロキシル基に対してメチル基がp-位に配位している方よりもm-位に配位している方がラジカル消去効果を高くしている要因の一つではないかと考察した。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、フィトンチッド液を恵与して戴いた(有)フィトン・タオ118に深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) 宮崎良文：森林浴はなぜ体にいいか，文藝春秋，p10 (2003)
- 2) 土屋徹，細井純一：Fragrance Journal，24 (11)，26 (1996)
- 3) 野村総一郎，内藤宏：ストレス科学，8 (3)，11 (1994)
- 4) 西風脩，古屋悦子：JUOEH，20 (4)，273 (1998)
- 5) Strobel G. A.：Annu. Rev. Plant Physiol.，25，541 (1974)
- 6) 中川正，永井元：Fragrance Journal，19 (11)，44 (1991)
- 7) 谷田貝光克：森林の不思議，現代書林，p66 (1995)
- 8) 只田良也，吉良竜夫：ヒトと森林，共立出版，p250 (2002)
- 9) Kawakami K, Kawamoto M, Otani H and Nomura M：Clinical and Experimental Hypertension，27，442 (2005)
- 10) Kawakami K, Kawamoto M, Nomura M, Otani H et al.：Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology，31，27 (2004)
- 11) 川上浩平，河本舞，堀江哲史，野村正人，他：第39回日本実験動物技術者協会講演要旨集，(金沢) p96 (2005)
- 12) 吉川敏一：抗酸化物質のすべて，先端医学社，p16 (1998)
- 13) 吉川敏一：抗酸化物質のすべて，先端医学社，p26 (1998)
- 14) 藤本大三郎：老化のメカニズムと制御，アイピシー，p412 (1993)

- 15) 大澤俊彦：血中抗酸化物，現代医療，25，77 (1993)
- 16) Tominaga H, Kobayashi M, Goto T, Kasemura K and Nomura M：YAKUGAKU ZASSHI，125，371 (2005)
- 17) Toda T, Nomura M, Shimomura K and Fujihara Y：Biosci. Biotech. Biochem.，60，1421 (1996)

## 略歴

## \*1 阿部 智 (あべ とも)

\*1

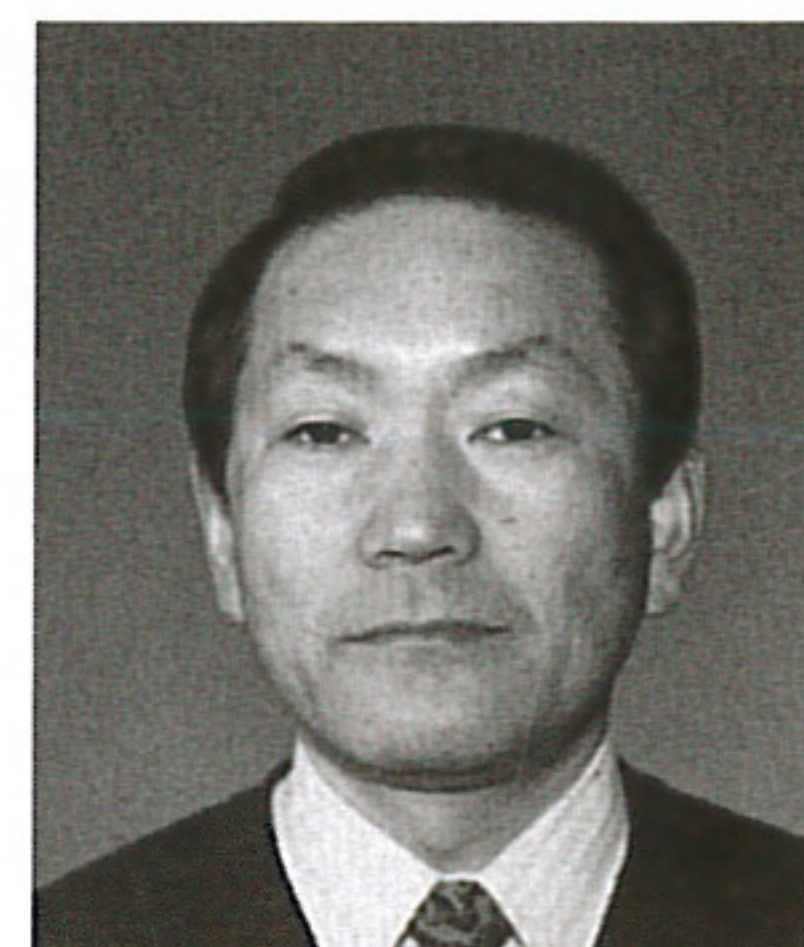
2005年 近畿大学工学部化学環境工学科卒業  
同年 近畿大学工学院システム工学研究科入学，現在に至る



## \*2 野村正人 (のむら まさと)

\*2

1976年 近畿大学大学院工学研究科修士課程修了  
1977年 近畿大学工学部助手  
1983年 同学部講師  
1987年 同学部助教授  
1988年 カリフォルニア大バークリー校博士研究員  
1997年 近畿大学工学部教授，現在に至る 工学博士



連絡先：〒739-2116 広島県東広島市高屋うめの辺1番  
近畿大学工学部 天然物機能化学研究室  
e-mail：hd053001@hiro.kindai.ac.jp