

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	住友 和弘
<p>学位論文題目</p> <p>Conifer-Derived Monoterpenes and Forest Walking (森林浴における針葉樹由来モノテルペン類の生理作用)</p> <p>共著者名：阿久津弘明、福山秀青、蓑島暁帆、久木田新、山村祐司、佐藤孔亮、 早坂太希、長内忍、船越洋、長谷部直幸、中村正雄</p> <p>Mass Spectrometry 4巻A0042 平成27年</p> <p>研究目的</p> <p>我々は地域の住民を対象に6年間にわたり定期的に森林ウォーキングを実施してきた。その結果、収縮期血圧改善、交感神経活性抑制、認知機能改善効果などが認められ身近な針葉樹林を活用した生活習慣病、認知症対策の可能性を提唱してきた。これらの生理反応の1因として少なくとも針葉樹由来モノテルペン類が関与していると報告してきた。しかし、モノテルペン類が森林大気中から生体内へどの程度移行するのか分かっていなかった。モノテルペン類の生理作用を明らかにする上でモノテルペン類の定量法の確立は不可欠であり、我々は、質量分析装置を用いた森林大気中、生体組織、体液中のモノテルペン類定量法の確立に取り組み、本研究では森林大気中から体内への移行を定量的に明らかにした。</p> <p>材料・方法</p> <p>森林大気中生物由来揮発性有機化合物 (BVOC) の吸着材としてSPMEファイバー (SUPELCO社製) を使い、晴天無風の日を選び地表から1mの高さに1時間静置してBVOCを吸着させた。SPMEファイバーには、揮発性有機化合物の吸着性に優れるジメチルシロキサンが使われ、食品、香料中の成分分析に使われている。</p> <p>質量分析器 (GC/MS) は、日本電子JMS T100GCvを用いた。分析には、J &amp; W DB-5MS 30m×0.25mm×0.25<math>\mu</math>mのフューズシリカキャピラリカラム (Agilent Technologies社) を使い、GCオープン温度は最初の3分間は32<math>^{\circ}</math>C、その後5<math>^{\circ}</math>C/分の割合で100<math>^{\circ}</math>Cまで昇温、さらに80<math>^{\circ}</math>C/分で300<math>^{\circ}</math>Cまで昇温し2分間保持した。GC注入口温度は280<math>^{\circ}</math>Cにした。キャリアガスにヘリウムガスを用い流速1.5 ml /分で送気し</p>			

(1)

※用紙の大きさは、A4判とし23×17cmの枠内におさめ、パソコン等で印字すること。

※用紙は、各自で作成すること。

た。イオン化法として電子イオン化法を用い、イオン化電圧は70eV、イオン化電流は300 $\mu$ Aとした。測定質量範囲は10-500 Da。BVOCを吸着させたSPMEファイバーは、GC注入口に2分間挿入しBVOCを脱着させ解析を行った。市販の $\alpha$ -Pinene、 $\beta$ -Pinene、phellandrene、limonene、bornyl acetateのクロマトグラフィー保持時間及び質量スペクトルが、試料の対応するピークの保持時間と一致するかGC/MSライブラリーを利用して分子種を同定した。

血中のBVOCの主要成分である $\alpha$ -Pinene濃度を決定するために検量線を作成した。 $\alpha$ -PineneをDMSOに溶解し1.0mM溶液を調製した。これを500 pM、5.0、50、500 nMに超純水で希釈し、各々のピーク面積を求め検量線を作成した。検量線が直線であることを確認し、試料の $\alpha$ -Pineneに相当するピーク面積から濃度を決定した。

質量分析測定条件決定のために4人の被験者から1時間の森林ウォーキング前後での静脈血10mLを採血し、採血した静脈血は専用の容器に入れ測定するまで4 $^{\circ}$ Cで保存した。試料の入ったバイアルを55 $^{\circ}$ C 20分間加温し、試料中から容器の上部空間に揮発したBVOCをSPMEファイバーに20分間吸着させ質量分析を行った。森林大気中と血中のモノテルペン類を比較するために植生の異なる道北地域（針葉樹）と島根県（広葉樹）でもサンプリングを行い分析した。血液中モノテルペン類検出の再現性を確認するためにインフォームドコンセントを行い同意の得られた被験者24人からもサンプリングを行った。

森林ウォーキング前後での被験者の血液中 $\alpha$ -ピネン濃度の変化は、Studentのt検定を用いて検定を行った。

## 成 績

森林大気中のBVOCの主要成分はモノテルペン類であり、その濃度は0.001~1ppmであった。夏季間の針葉樹由来モノテルペン類の主要成分は $\alpha$ および $\beta$ -Pineneであった。これら環内外に二重結合を有する化合物は、酸化ストレスから植物を保護するために活性酸素種と反応する。我々は、SPMEファイバーを使用した質量分析法にて初めて森林大気中と血中のモノテルペン類の検出に成功した。森林大気中の主なモノテルペン類は、クロマトグラムの検出時間順に $\alpha$ -pinene、camphene、 $\alpha$ -phellandrene、 $\beta$ -pinene、3-carene、 $\beta$ -phellandrene、limonene、camphor、bornyl acetateであった。Camphorやbornyl acetateなどの酸素を含んだモノテルペン類と3-careneの濃度はそれほど高くなかった。さらに針葉樹林では $\alpha$ -pineneと $\beta$ -pineneが相対的に多く、広葉樹林では $\alpha$ -phellandreneが相対的に多いという違いがあった。これらの結果からPineneは、針葉樹由来のモノテルペン類の主要成分であることが分かる。

4名の被験者に1時間の森林ウォーキングを実施したところ森林ウォーキング前では $\beta$ -phellandreneとlimoneneが多く、他のモノテルペン類は低濃度であった。また、被験者によっては食品由来と思われるallyl isothiocyanateやmenthol、limoneneなどが他のモノテルペン類よりも多く検出された。このことは $\beta$ -phellandreneやlimoneneが日常生活の中で食品や芳香剤などの成分として日常的に摂取していることを示す。4名の被験者の森林ウォーキング前後での $\alpha$ -Pinene濃度は、ウォーキング前 $2.6 \pm 1.7$ nMからウォーキング後 $19.4 \pm 2.1$ nM (mean $\pm$ S.E)に明瞭に増加していた。注目すべきは、森林大気中と血中のクロマトパターンが類似していることで

ある。

$\alpha$ -PineneとLimoneneは組織移行性が早いと報告されている。 $\alpha$ -Pineneは、生体内で代謝されverbenolを経由してverbenoneに変換される。Verbenolは抗炎症作用や虚血耐性獲得作用が報告されている。しかし、今回verbenolやverbenoneは検出されなかった。

## 考 案

モノテルペン類は、疎水性の性質を有し、水にはほとんど溶解しない。そのため検出に当たり気化させる必要があった。森林大気中のモノテルペン類は、SPME法で直接捕捉し質量分析器で解析ができた。また、血液中のモノテルペン類は、55°C20分間の加熱を加えた後、SPMEファイバーで直接捕捉し質量分析器で解析できた。本研究でモノテルペン類の検出にSPMEファイバーが適していることが明らかになった。

我々は、さまざまな地域で森林ウォーキングを行い、森林大気中とそこを歩いた歩行者の血液からモノテルペン類の検出に成功している。モノテルペン類は呼吸によって体内に取り込まれ血中に濃縮され数 $\mu$ Mのオーダーに達する。血中に移行したモノテルペン類が標的臓器に作用して交感神経活性抑制、降圧作用、抗ストレス作用、抗体産生調節、認知機能改善をもたらしていると考えている。

例えば、我々の研究では、モノテルペン類はアセチルコリンエステラーゼ活性阻害作用を有し、血液脳関門を透過する。脂質に富んだ脳組織へのモノテルペン類の移行性は高いと推測される。実際3か月間森林ウォーキングを行った14名の長谷川式認知症スコアは屋内運動群と比べ有意に改善していた。認知症進展予防の可能性が示唆される。

これまで地域の健康づくりに血圧改善効果や交感神経活性抑制効果を期待して森林ウォーキングを行って来たが、血中モノテルペン濃度の測定が可能になったことで血中濃度と降圧、交感神経活性の関係性が明らかになってきた（本論文ではデータ未提示）。血中モノテルペン濃度に依存して降圧や交感神経活性抑制がもたらされる。また、モノテルペン類の抗酸化作用についてスピントラップ法を用いて検討を行ったところ活性酸素種に対し消去能を確認できた。最新の高血圧発生機序として脳内酸化ストレス亢進が腎交感神経活性をもたらす血圧上昇に転じると考えられている。モノテルペン類がBBBを越えて脳に移行し自律神経中枢で抗酸化作用を発揮、交感神経活性を抑制し降圧をもたらす可能性が考えられる。モノテルペン類定量法の確立は、中枢の酸化ストレスを介した血圧調節機序や認知機能への作用を細胞分子レベルで解明する足掛かりとなり、今後の研究に広がりが出るものと期待される。

## 結 論

SPMEファイバーと質量分析器を用いて森林大気中と森林ウォーキング後の被験者の血液からモノテルペン類の検出に成功した。 $\alpha$ -Pineneは、針葉樹由来揮発性物質の主要な成分であり、森林ウォーキング後モノテルペン類は、血液中に濃縮される。森林大気中のモノテルペン類は容易に大気中から被験者の血中に移行することが明らかになった。

引 用 文 献

引用論文 1

1. Mechanisms of acute inhalation effect of (+) and (-)  $\alpha$ -Pinene in BALB/c mice. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 96: 420-428, 2005.
2. Physiological effects of shinrin-yoku (taking in the atmosphere of the forest) in an old-growth broad leaf forest in Yamagata prefecture, Japan. J. Physiol. Anthropol. 26: 135-142, 2007.
3. Comparison of different extraction methods for the determination of Essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. Anal. Bioanal. Chem. 387: 2207 - 2217, 2007.

参 考 論 文

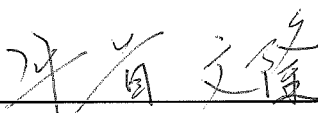

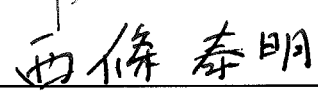

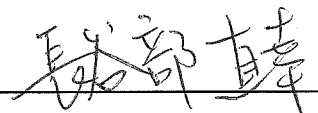

参考論文 1

1. 題 目 針葉樹林の香りは容易にヒトへ移行する  
中村正雄ほか8名と共著
2. 掲載の方法  
及び時期 AROMA RESEARCH 15巻3号 252頁～257頁 平成26年

参考論文 2

1. 題 目 森林療法は高血圧治療代替療法となりうるか  
長谷部直幸ほか5名と共著
2. 掲載の方法  
及び時期 森林科学 48巻 21頁～25頁 平成18年

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	佐友 和弘
<p>審査委員長  </p> <p>審査委員  </p> <p>審査委員  </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Conifer-derived monoterpenes and forest walking</b>  (森林浴における針葉樹由来モノテルペン類の生理作用)</p>			
<p>森林ウォーキングには、血圧の改善、交感神経系の抑制、認知機能の改善などの効果が認められ、生活習慣病・認知症対策での可能性が提唱されている。これらの効果には、針葉樹由来モノテルペン類の関与が報告されている。しかし、モノテルペン類の森林大気中から生体内への移行の程度やその生理作用を解明する上で、モノテルペン類の定量法の確立は不可欠である。本研究は、質量分析装置を用いた森林大気中、生体組織、体液中のモノテルペン類定量法の確立に取り組み、その森林大気中から体内への移行を定量的に解明することを目的としている。</p> <p>森林大気中生物由来揮発性有機化合物 (BVOC) の主要モノテルペン類は <math>\alpha</math>-pinene であった。被験者の森林ウォーキング前後での <math>\alpha</math>-pinene 濃度は、<math>2.6 \pm 1.7</math> nM から <math>19.4 \pm 2.1</math> nM へと有意に増加していた。一方、<math>\alpha</math>-pinene の代謝物質である verbenol や verbenone は検出されなかった。</p>			

本研究で明らかにされた血中移行したモノテルペン類は、標的臓器に作用して交感神経活性抑制、降圧作用、抗ストレス作用、抗体産生調節、認知機能改善をもたらすと考えられる。実際、森林ウォーキングによる血中モノテルペン濃度と降圧、交感神経活性の関係性が明らかとなってきた。α-pinene など環内外に二重結合を有する化合物は、活性酸素種と反応して抗酸化作用を発揮する。本研究によるモノテルペン類定量法の確立は、中枢の酸化ストレスを介した血圧調節機序や認知機能への効果を解明する足掛かりとなり得るものであり、当該分野の研究発展に資することが期待される。

なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。

以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。