

修 士 論 文

平成 18 年度

論文内容の要旨

フィトンチッド液の生理活性と
その利用について

近畿大学大学院
システム工学研究科
システム工学専攻
生物化学システムクラスター
05309001 阿部 智



要旨

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。最近の生活習慣病（成人病）と呼ばれる高血圧、心筋梗塞、糖尿病および胃潰瘍などの80%はストレスによるものだといわれ、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（アロマセラピー）したいと思う人が年々増加している。古くから日常生活の中で森林浴あるいはアロマセラピーを利用した癒しにより、心身の改善を行ってきており、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)という揮発性物質により心身の安らぎが得られるというものである。古くからフィトンチッドの主成分であるテルペン類には、殺菌・抗ウイルス作用、消毒・抗菌作用などの効果があることが知られている。また、テルペン類の吸入が、ストレスのない人の血圧や心拍数の低下ならびに前頭前野の活動を鎮静させる効果があり、リラックス状態をもたらすなどの報告がある。ところが、自然の植物から抽出されたフィトンチッドの効果に関する報告は少ない。

そこで今回、著者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の効能について注目した。すなわち、現代の生活習慣の中で、生体内に過剰に発生する活性酸素が関与している様々な障害（老化の促進、アレルギー、多発性硬化症およびパーキンソン病など）に対する生体防御機構が明らかにされつつあることに着目し、フィトンチッド液の効果が、その改善策と成り得るか否かについての研究を行った。また、近年の傾向とし

て、自然界に広範囲に分布している植物の中に含まれている優れた抗酸化発現する成分を求める動きが強くなっており、その有効性はもちろん、伝統やイメージから消費者に良い印象を与えており、化粧品においても植物由来の化粧品原料として積極的に利用されている。身近にある植物から得られたエキスを化粧品に配合することは、人にも環境にもやさしい化粧品を作り上げていくための大切な要素になってきている。そこで抗菌・消臭効果をともなうフィトンチッド液配合の化粧品を含む香粧品への利用に対しての検討も行った。

実験に用いた4種類のフィトンチッド液はA(樹木系の植物エキス)、AB(殺菌力の強い植物エキス)、CY(アレルギー反応を起こさない植物エキス)およびD(草花系の植物エキス)である。これらフィトンチッド液に対して抗酸化評価を行ったところ、ベンゼン環を母格とし、ヒドロキシル基(-OH)およびメトキシ基(-OCH₃)が、*o*-配向を形成している化合物に高い抗酸化能が認められた。また、これら化合物の類縁化合物についても生理活性についての比較を行った。

これらの結果を踏まえて、抗菌効果および消臭・脱臭効果について検討を行った。まず、高い抗酸化能が認められたフィトンチッドD液およびAB液に対して抗菌・抗黴試験を行った。細菌には、*Staphylococcus aureus subsp. Aureus* (NBRC13276)、*Bacillus subtilis subsp. subitilis* (NBRC3134)、*Escherichia coli* (NBRC3972)および*Pseudomonas aeruginosa* (NBRC132759)の4株を用い、黴には*Aspergillus niger* (NBRC6341)、酵母には*Candida albicans*(NBRC1594)を用いた。フィトンチッドAB液およびD液において、細菌、黴および酵母に対して急激な減少、消滅効果をもたらすことが確認でき、化粧品に1.0%濃度で配合しても十分な防腐力が得られると考えられた。

また、フィトンチッド AB 液および D 液はいずれも 1.0%濃度でのチロシナーゼ活性阻害率はいずれも良好な値を示し、化粧品美白剤として使用可能であることがわかった。

次に消臭・脱臭効果を確認するため、フィトンチッド AB 液を 1.0%配合した液体石けんを試作し、手洗い後の菌数を水洗いおよび石けん洗いと比較した。フィトンチッド液で洗浄した場合、短桿菌が水洗い、石けん洗いに比べて著しく減少し、菌の総数が少なくなることが確認できた。また、手洗い後の匂いについて、10名のボランティアによる匂い評価を行ったところ、水洗い、石けん洗いに比べて短い手洗い時間で消臭効果がみられた。よって、抗酸化および抗菌・消臭効果をもたうフィトンチッド液配合の化粧品への応用が考えられた。

目 次

1.	緒言	1
2.	結果および考察	3
2-1.	フィトンチッド液の組成	3
2-2.	フィトンチッド液の抗酸化能	7
2-3.	フィトンチッド液の抗菌効果	13
2-4.	フィトンチッド液の除菌・消臭効果	17
2-5.	類縁化合物の生理活性	22
3.	実験	26
3-1.	実験材料	26
3-2.	機器分析	26
3-3.	合成方法	27
3-4.	生理活性試験	30
3-4-1.	DPPH ラジカル消去効果試験	30
3-4-2.	活性酸素阻害効果 (SOD) 試験	30
3-4-3.	チロシナーゼ活性阻害試験	31
3-4-4.	抗菌および抗黴試験	32
3-4-5.	除菌効果試験	33
3-4-6.	消臭効果試験	33
4.	参考文献	33
5.	謝辞	38

1. 緒言

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^{1,2)}。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引き起こされることが知られている³⁾。最近の生活習慣病（成人病）と呼ばれる高血圧、心筋梗塞、糖尿病および胃潰瘍などの80%はストレスによるものだといわれ^{4,5)}、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。古くから日常生活の中で森林浴あるいはアロマテラピーを利用した癒しにより、心身の改善を行ってきており、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⁶⁾。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心身ともにリフレッシュ効が得られるというものである^{7,8)}。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ぎを与えている^{9,10)}。古くからフィトンチッドの主成分であるテルペン類には、殺菌・抗ウイルス作用、消毒・抗菌作用などの効果があることが知られている^{11,12)}。古代ローマ、ギリシャにおいては、すでに医療用に精油類が応用されたといわれ、天然に存在する植物成分は、経験的にも抗菌物質として使われていた¹³⁾。また、テルペン類の吸入が、血圧や心拍数の低下ならびに前頭前野の活動を鎮静させる効果があり、リラックス状態をもたらすなどの報告がある^{14,15)}。ところが、自然の植物から抽出されたフィトンチッドの効果に関する報告例は少ない。

今回、著者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の効能について注目した。私が所属する研究室がこれまでにに行ったフィトンチッド液に関わる生理学的研究では、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ている¹⁶⁾。また、水浸拘束ストレス実験において、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ず、ストレス低減にフィトンチッドが大きく関与していることも報告している¹⁷⁾。

一方、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る。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あり、一般的にはスーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、過酸化水素および一重項酸素の4種類から成り立っている¹⁸⁾。活性酸素・フリーラジカルはタンパク質変性、脂質過酸化、酵素失活および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^{19,20)}。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ため、抗酸化物質の役割が重要となってくる^{21,22)}。そこで今回、著者は現代の生活習慣の中で、生体内に過剰に発生する活性酸素が関与している様々な障害（老化の促進、アレルギー、多発性硬化症およびパーキ

ンソン病など)の生体防御機構が明らかにされつつあることに着目し、フィトンチッド液の効果がその改善策と成り得るか否かについての研究を行った。また、近年の傾向として、植物に含まれている優れた抗酸化能を発現する成分を求める動きが強くなっており、その有効性はもちろん、健康志向の消費者に良い印象を与えており²³⁾、化粧品においても、植物由来の化粧品原料として積極的に利用されている。身近にある植物から得られたエキスを化粧品に配合することは、人にも環境にもやさしい化粧品を作り上げていくための大切な要素になってきている²⁴⁾。そこで、著者は抗菌・消臭効果をともなうフィトンチッド液配合の化粧品を含む香粧品への利用についても検討を行った。

2. 結果および考察

2-1. フィトンチッド液の組成

森林浴とは生体を積極的に鎮静化させ、リラックス状態を作ることを目的としている。森林浴効果の主たる要因であると考えられているフィトンチッドは樹木から発散され、他の生物に何らかの影響を持つ植物由来の物質と考えることができ、森林浴中にそれを吸入すると快適感が増進する。

今回、入手した4種類のフィトンチッド液(A, AB, CY および D)は、118種類の自然植物から抽出したものであり、いずれも植物のエキスが主成分となっている(Table 1)。

Table 1 Main Component Plants of Phytoncide Solutions

1	Green laver	11	Tree ear	21	Dandelion	31	Sunflower
2	Aloe	12	Cucumber	22	Citrus Unshiu Peel	32	Blueberry
3	Fig	13	Burdock	23	Eucommia Bark	33	Hop
4	Oolong tea	14	Keip	24	Nandina Fruit	34	Majoram
5	Udo	15	Sage	25	Garlic	35	Mushroom
6	Echinacea	16	Shiitake	26	Basil	36	Mitsuba
7	Plantago Harb	17	Cinnamon	27	Parsley	37	Artémisia
8	Oregano	18	Water dropwort	28	Bell pepper	38	Lettuce
9	Pumpkin	19	Radish	29	Hinoki	39	Rosemary
10	Chinese quince	20	Bamboo	30	Hiba	40	Wakei

4 種類のフィトンチッド液について、エーテル抽出を行った後、GC-MS 分析による成分検索を行った (Fig.1-4)。その結果、未確認成分も含めて、フィトンチッド A 液では 139 の成分を、AB 液では 132 の成分を、CY 液では 95 の成分を、D 液では 104 の成分を確認することができた。その主な成分としては、酢酸、ツヨン、リナロール、酢酸ボルニル、ブタン酸、ギ酸ボルニル、 α -テルピネオール、グアイアコール、ベンジルアルコール、 β -フェネチルアルコール、セドロールおよびヘキサデカン酸であり、モノおよびセスキテルペンであることを確認すると同時に、フェノール類や炭化水素類から成り立っていることを確認した。

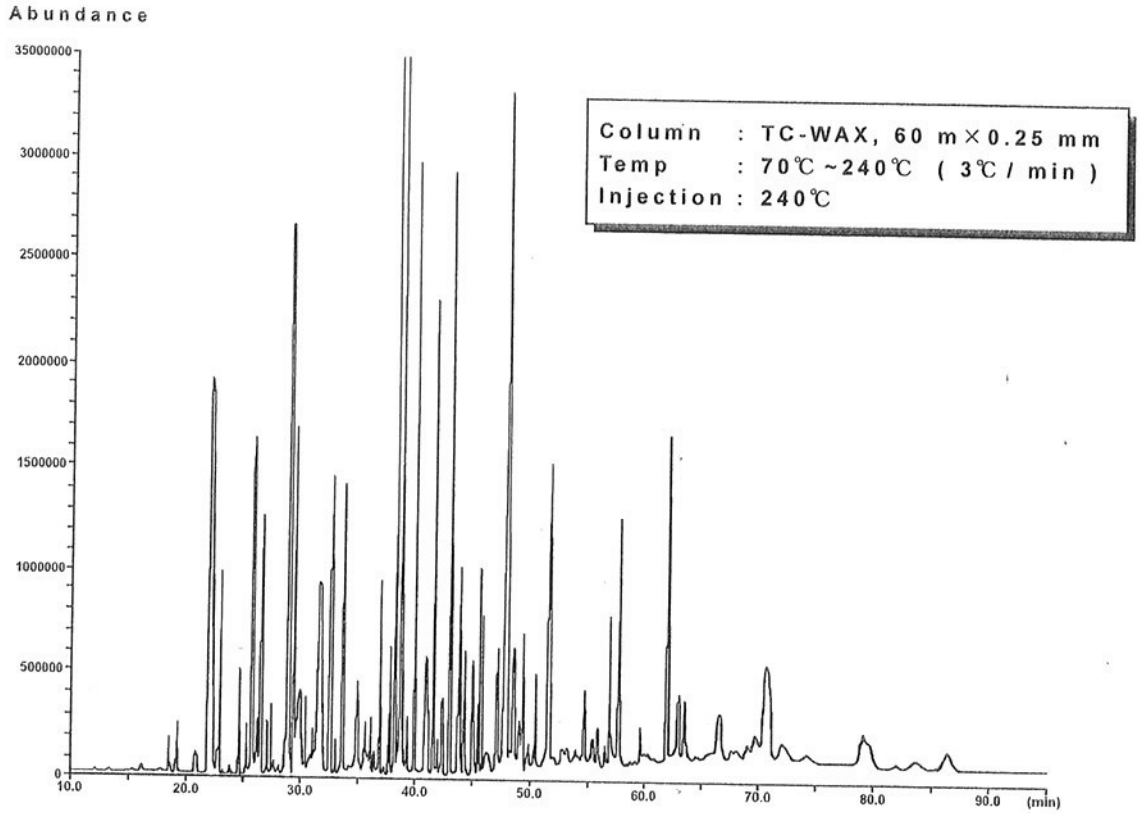


Fig.1 GC-MS Chromatogram of A-Type.

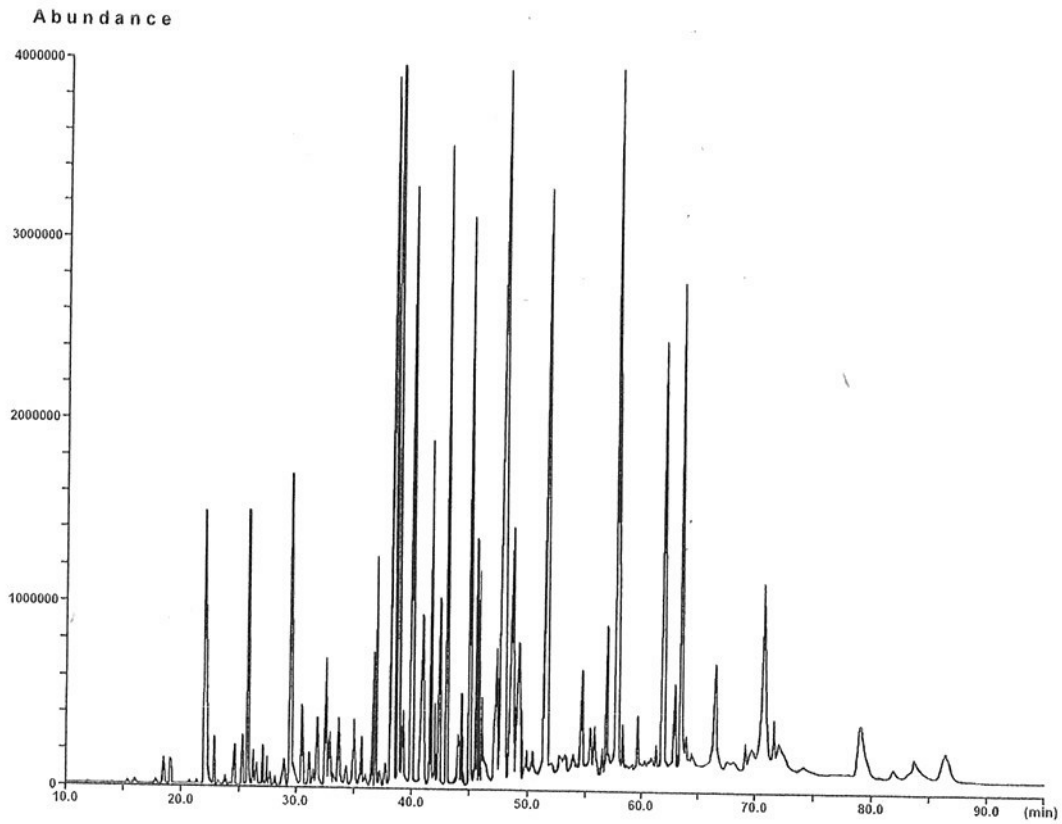


Fig.2 GC-MS Chromatogram of AB-Type.

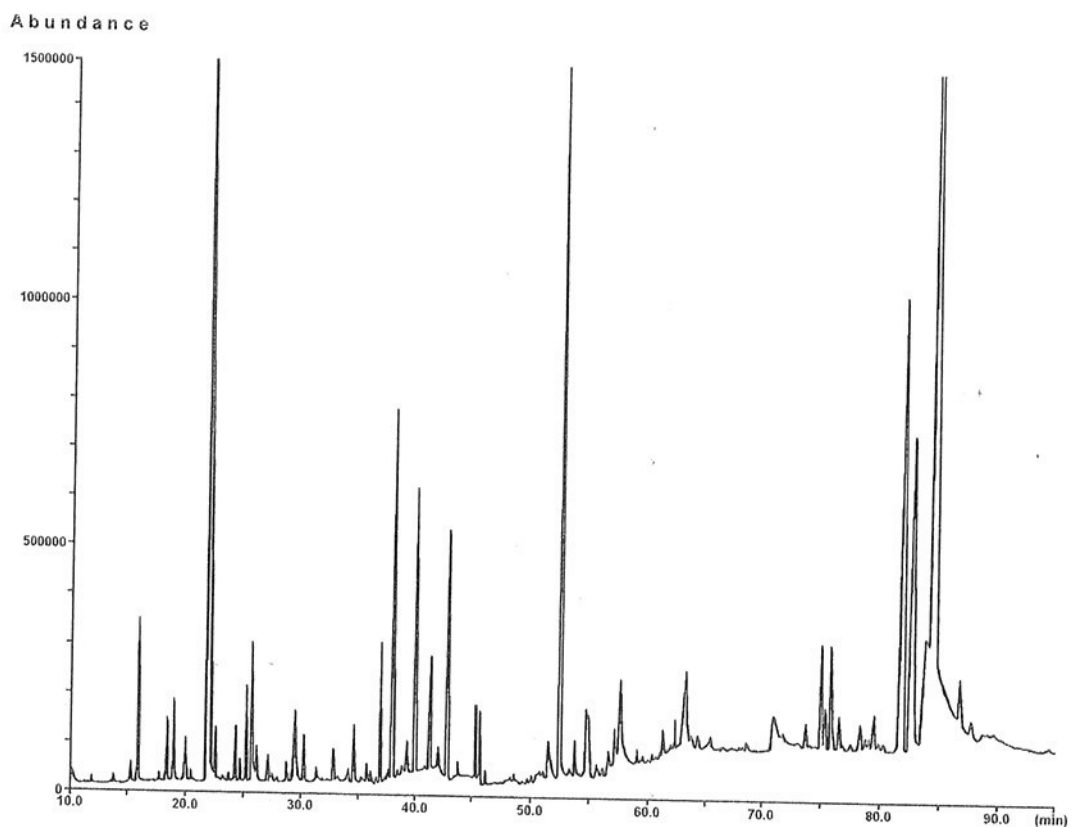


Fig.3 GC-MS Chromatogram of CY-Type.

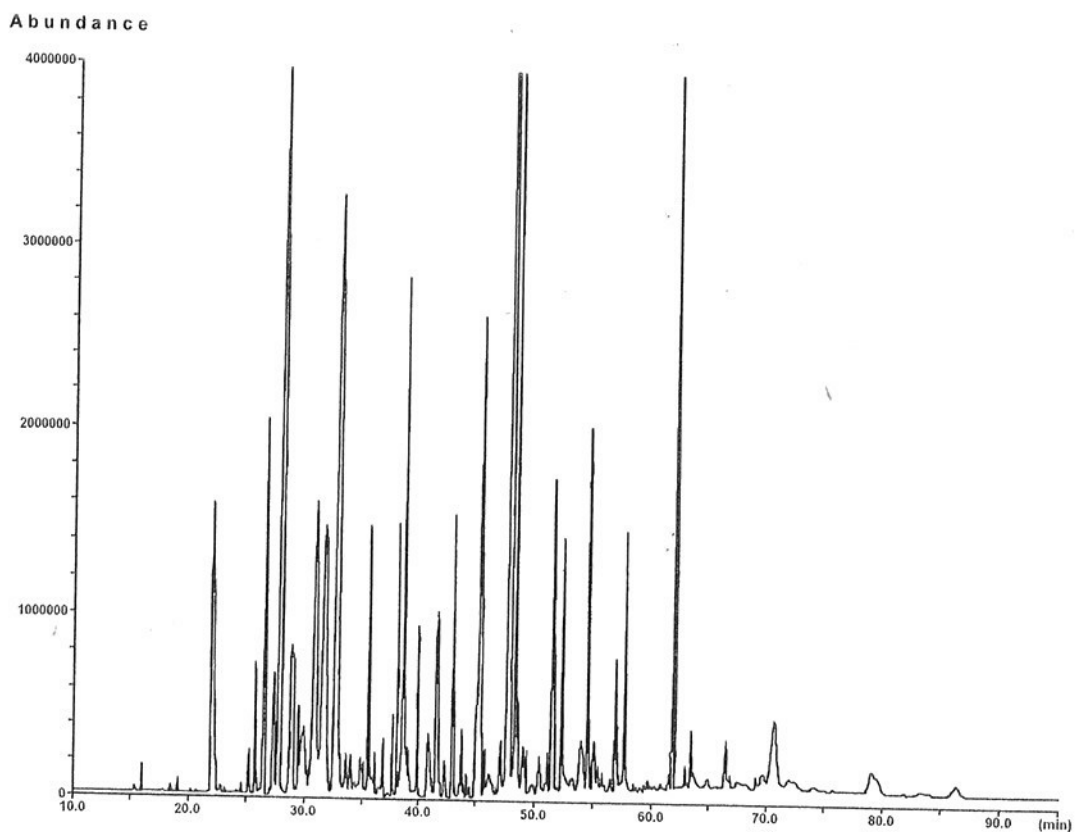


Fig.4 GC-MS Chromatogram of D-Type.

2-2. フィトンチッド液の抗酸化能

今回、フィトンチッド液の新たな生理活性の機能性として、抗酸化能についての検討を行った。すなわち、4種類のフィトンチッド液について、抗酸化能評価試験として DPPH ラジカル消去効果試験および活性酸素阻害(SOD)試験を行った(Table 2)。

Table 2 Anti-oxidative Activity

Type of Phytoncide	DPPH radical scavenging effect		Superoxide dismutase activity effect
	Scavenging effect (%) ^{a)}	SC ₅₀ ^{b)}	Inhibition effect (%) ^{c)}
A-Type	97.1	23	49.9
AB-Type	97.1	24	60.7
CY-Type	98.7	24	51.2
D-Type	100.0	6	30.1
α -Tocopherol	95.0	6	4.0
Ascorbic acid	—	—	24.5

a) Corrected concentration 0.2mg/mL

b) 50% Scavenging concentration (μ g/mL)

c) SOD active value (%)

DPPH ラジカル消去効果試験では、いずれのフィトンチッド液も比較物質として用いた α -トコフェロールの値(95.0%)よりも高い抗酸化能を示した。また、SC₅₀(50% Scavenging Concentration)についても検討したところ、草花系の植物を主体とした D 液が α -トコフェロールと同等の値を示し、良好なラジカル消去効果があることを明らかにした。活性酸素阻害(SOD)試験では、殺菌力が強い植物を主体とした AB 液に期待した活性酸素阻害効果が発現することを認めた。

DPPH ラジカル消去効果試験において、最も高いラジカル消去効果を示したフィトンチッド D 液に含まれる化学成分を検索した。フィトンチッド D 液をエーテル抽出し、留去し、得られた油分をヘキサン抽出部と水層部に分画した後、再度 DPPH ラジカル消去効果試験を行った。ヘキサン抽出部および水層部のいずれも高い DPPH ラジカル消去能を示したが、特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、水層部に対して GC-MS 分析を行い、フィトンチッド D 液との成分の相違を確認した (Fig.5,6)。出現した主なピークについて、標品 (MS ライブラリーデータ) とリテンションタイム (min) の同定により構造確認を行ったところ、主成分として、ジエチルグリコールモノメチルエーテル (4)、*N,N*-ジメチルドデシルアミン (6)、グリセリン (20)、*N*-ベンジル-*N*-メチルドデシルアミン (22)、および *N*-ベンジル-*N*-メチル-テトラデシルアミン (27) の化合物の構造を明らかにするとともに、Table 3 に示した化合物の割合 (%) を求めることができた。

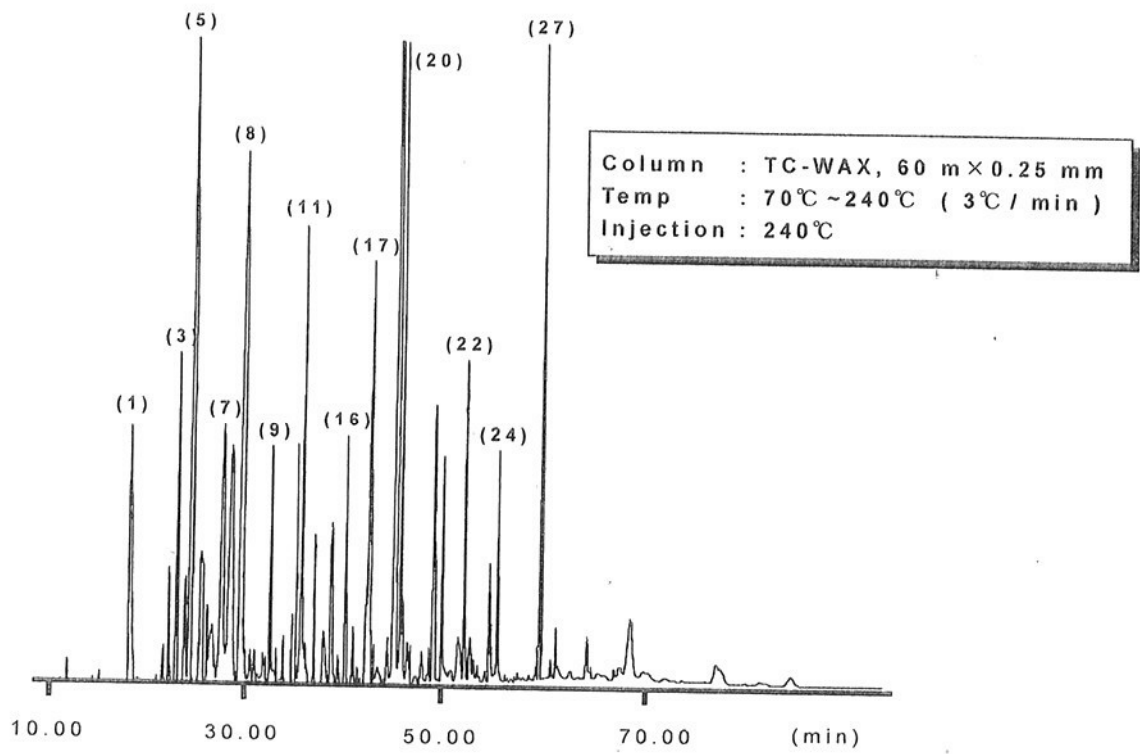


Fig.5 GC-MS Chromatogram of D-Type.

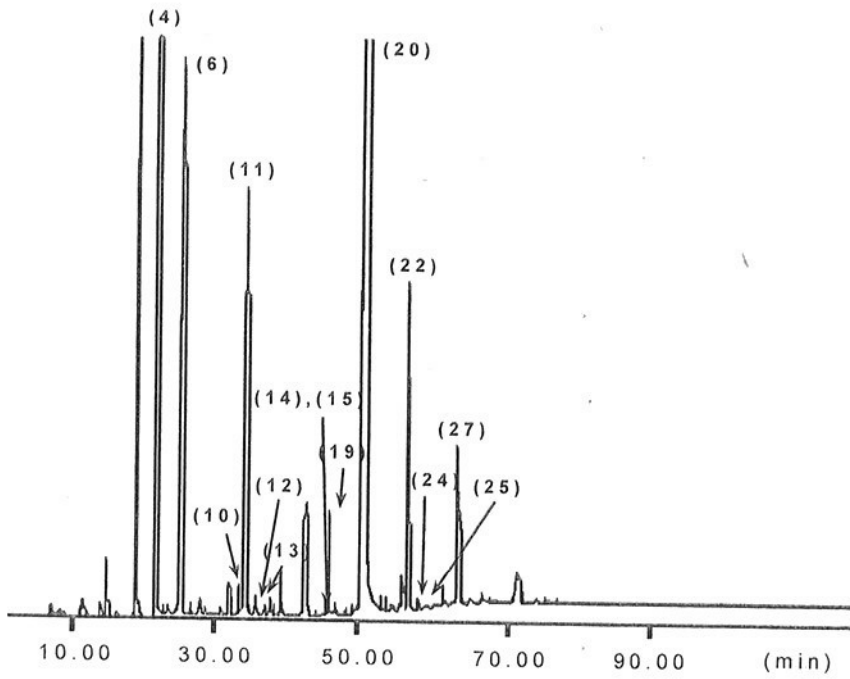
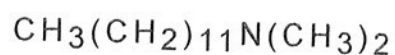
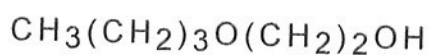


Fig.6 GC-MS Chromatogram of Water layer.

Table 3 Identified Compounds in D-Type

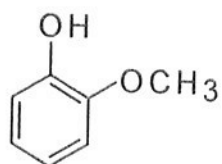
Peak No.	R. T ^{a)}	Compounds	Peak area (%)		Peak No.	R. T ^{a)}	Compounds	Peak area (%)	
			Ether extracts	Water extracts				Ether extracts	Water extracts
(1)	21.72	Thujone	3.453	—	(16)	42.97	Phenol	1.755	0.251
(2)	24.96	Benzyl chloride	trace	8.115	(17)	45.02	Iso-amyl salicylate	3.964	—
(3)	26.45	Linalool	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	α -Hexyl cinnamaldehyde	1.704	—
(7)	30.77	p-tert-Butylcyclohexyl- acetate	4.123	—	(22)	57.17	N-Benzyl-N-methyl-dodecyl amine	trace	5.234
(8)	32.52	α -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	Guaiacol	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)	41.03	2-Methoxy-5-methylphenol	trace	0.131					
(15)		2-Methoxy-4-methylphenol							
							...etc		

a) Retention time (min)

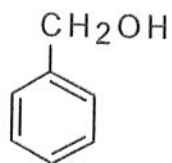


(4)

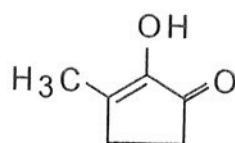
(6)



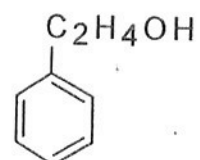
(10)



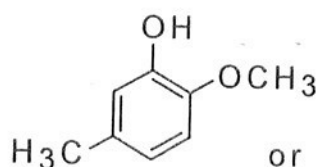
(11)



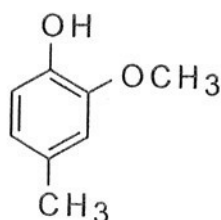
(12)



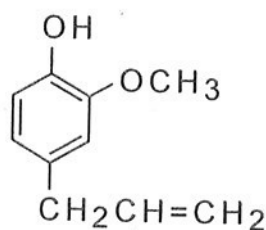
(13)



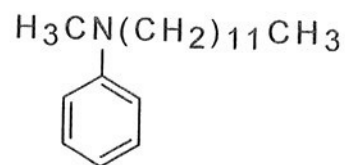
or



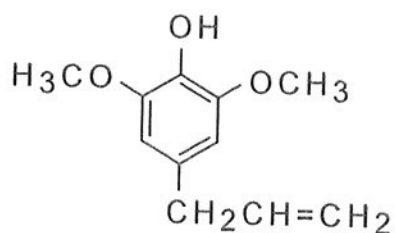
(14) / (15)



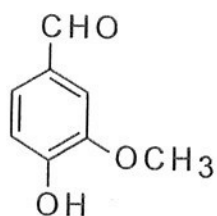
(19)



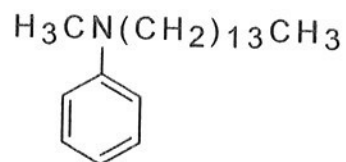
(22)



(24)



(25)



(27)

Fig.7 Chemical Structure of Main Compounds in Water layer.

今回、水層部から抽出し、構造を明らかにした8種類の化合物グアイアコール(10)、2-ヒドロキシ-3-メチル-2-シクロペンテン-1-オン(12)、フェネチルアルコール(13)、2-メトキシ-5-メチルフェノール(14)、2-メトキシ-4-メチルフェノール(15)、オイゲノール(19)、4-アリル-2,6-ジメトキシフェノール(24)およびバニリン(25)について、DPPHラジカル

消去効果を検討した (Table 4)。その結果、化合物の中でも (10), (14), (15), (19) および (24) は、いずれも 90% 以上のラジカル消去率を示し、高いラジカル消去能があることを明らかにすることができた。これら化合物と活性発現の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) およびメトキシ基 (-OCH₃) 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考えた。その理由として、*o*-配向に存在するヒドロキシル基 (-OH) とメトキシ基 (-OCH₃) が水素結合を形成し、水素が外れやすくなっているためであると考えた。また、ベンゼン環にヒドロキシル基 (-OH) とメトキシ基 (-OCH₃) のみが存在する (10) よりも、アリル基 (-CH₂CH=CH₂) 等の第 3 の置換基が *p*-位に存在する電子的に安定な化合物に、より高い消去効果を発現する傾向があることを明らかにすることができた。

Table 4 DPPH Radical Scavenging Effect of Compounds in Water layer

Compounds	Scavenging rate (%) ^{a)}	SC ₅₀ ^{b)}
Guaiacol (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-methylphenol (14)	97.7	1
2-Methoxy-4-methylphenol (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 0.2mg/mL

b) 50% Scavenging concentration (μg/mL)

このことから、今回用いた阻害試験結果から森林浴効果を演出しているフィトンチッド液には、活性酸素の発生を最小限に抑えたり、消去したりして酸化を防ぐ作用(抗酸化)があることを確認することができた。このことは、従来からいわれている副交感神経を刺激しストレスを和らげ、心身をリラックスさせる効果以外にも、細胞の損傷を防ぐ働きがあるものと考えられる。

2-3. フィトンチッド液の抗菌効果

つぎに、これらの結果を踏まえて、高付加価値のある製品づくりへの応用の一つとして、室内環境の改善あるいは抗菌・消臭効果をともなう化粧品への応用を目的として、抗菌効果をともなうフィトンチッドを配合した化粧品への利用について検討を行った。まず、高い抗酸化能を発現した2種類のフィトンチッド AB 液および D 液の抗菌・抗黴効果を検討した(Table 5)。2種類のグラム陰性菌(*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*)と2種類のグラム陽性菌(*Staphylococcus aureus subsp. Aureus*, *Bacillus subtilis subsp. subtilis*)を等量混和した菌液に対するフィトンチッド AB 液は、いずれの濃度(0.1~1.0%)に対しても3日間ないし7日間の培養期間において、いずれの菌も増殖した様子は認められず、逆に著しい殺菌効果が発現することを確認することができた。また、フィトンチッド D 液は低濃度領域(0.1%)において、わずかながら菌の増殖が認められたが、高濃度領域(0.5~1.0%)では、フィトンチッド AB 液と同様、著しい殺菌効果を発現することが確かめられた。

次に、抗黴効果については、*Aspergillus niger* を用いて1週間~2週間にわたって行ったところ、フィトンチッド AB 液および D 液も黴の培養期間の延長と濃度(0.1→1.0%)を変化させることにより、黴の増

殖傾向を押さえられることができた。

一方、酵母である *Candida albicans* に対しては、黴の培養と同様の培養期間で行ったところ、フィトンチッド AB 液および D 液 0.1% の濃度で、1 週間培養したところ、わずかながら酵母が増殖する傾向が認められた。しかし、フィトンチッド液の濃度を高くした条件 (0.5%, 1.0%) では、いずれも著しい殺菌効果を発現し、酵母の増殖はまったく確認することはできなかった。

Table 5 Antimicrobial Activity of Phytoncide

Phytoncide	Conc. (%)	Bacteria		Mold		Yeast	
		3Days	7Days	1Week	2Weeks	1Week	2Weeks
AB-Type	0.1	0	0	1.0×10^3	1.5×10^3	2.5×10^1	0
	0.5	0	0	1.0×10^1	2.0×10^1	0	0
	1.0	0	0	3.0×10^1	0	0	0
D-Type	0.1	1.5×10^1	1.5×10^3	6.0×10^3	4.0×10^3	3.0×10^1	0
	0.5	0	0	1.6×10^2	1.3×10^2	0	0
	1.0	0	0	1.2×10^2	4.5×10^1	0	0

a) Fungs (cfu/g)

以上の結果から、著しい抗酸化機能を持ったフィトンチッド AB 液および D 液は、1.0% の濃度で十分な抗菌力が確認されたことから、化粧品への配合が十分可能であり、従来、使用されているパラベンの代替品としての使用が可能であると考えられる。

次に、フィトンチッド AB 液および D 液の活性酸素阻害試験およびチロシナーゼ活性阻害試験を行い、化粧品美白剤への利用を検討した (Table 6)。

Table 6 Physiological Activity Effect of Phytoncide

Phytoncide	Conc.	Superoxide disumtase activity effect(%)	Anti-tyrosinase activity	
			L-tyrosine	L-DOPA
AB-Type	100.0%	60.7	85.8	93.4
	10.0%	32.2	27.3	83.7
	1.0%	20.0	—	34.5
	0.5%	12.7	—	19.2
	0.1%	—	—	4.5
D-Type	100.0%	30.1	89.1	85.2
	10.0%	10.7	—	47.9
	1.0%	—	—	10.0
	0.5%	—	—	5.3
	0.1%	—	—	—
α -Tocopherol ^{a)}		4.0	—	4.7
Ascorbic acid ^{b)}		24.5	0.3	21.1
Arbutin ^{c)}		—	56.7	10.9

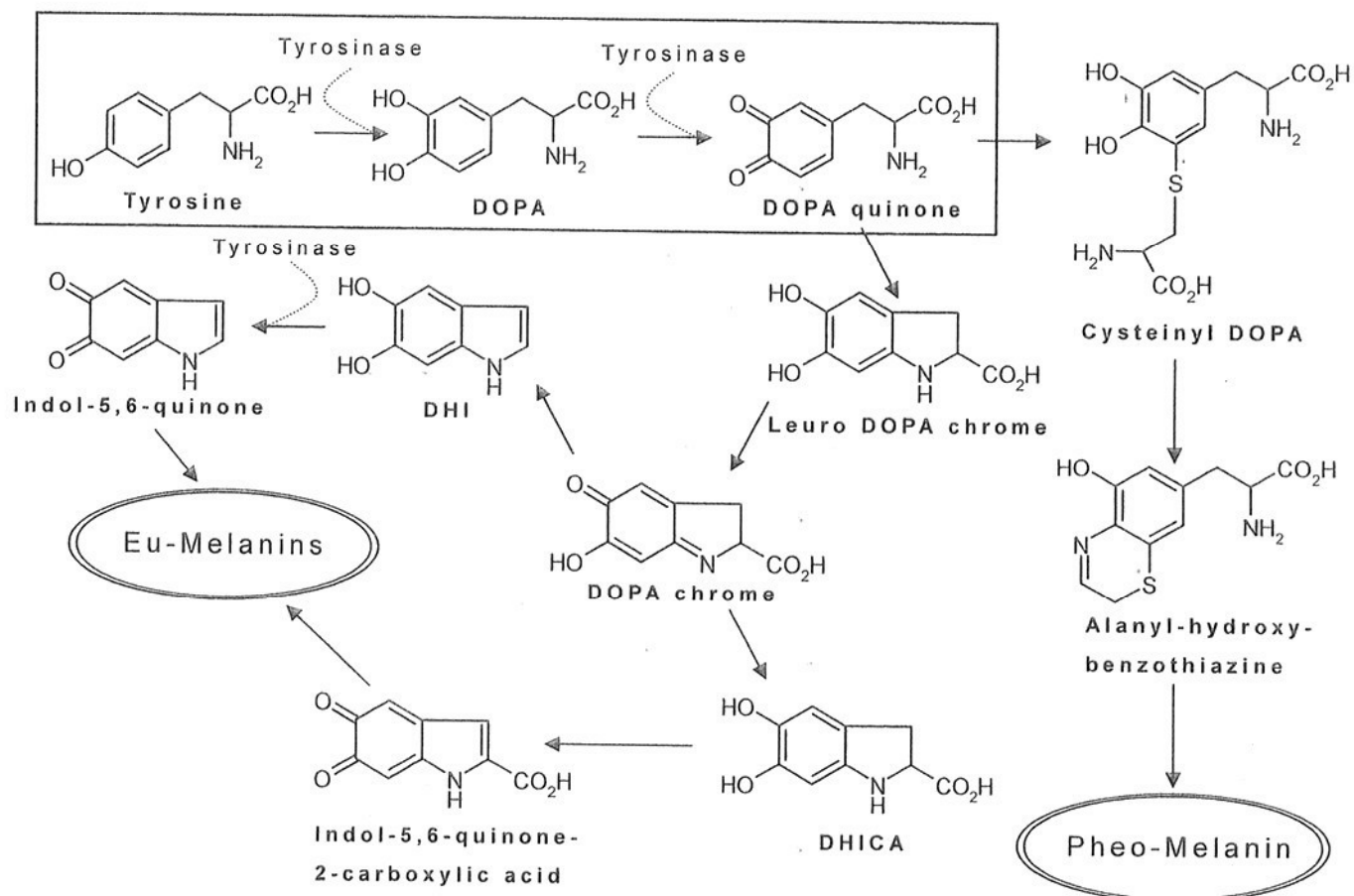
a) Concentration : 1mM

b) Concentration : 1mM

c) Concentration : 1.0%

紫外線が皮膚に照射されると皮膚内で活性酸素が発生し、メラニン産生に関与していることが多くの研究^{25,26)}から明らかにされており、活性酸素阻害活性を有する化合物(アスコルビン酸やビタミン E およびその誘導体)がメラニン産生を抑制する作用があることが報告されている^{27,28)}。生体内でのメラニンの生成過程は、チロシンがポリフェノールオキシターゼの一種であるチロシナーゼにより酸化され、チロシン→ドーパ→ドーパキノン→ドーパクローム→5,6-ジヒドロキシインドール→インドール-5,6-キノンとなり、さらに、インドール-5,6-キノンが重合してメラニンを生成するとされている(Scheme 1)。その中で、チロシンの酸化によるドーパの生成(Tyrosinehydroxylase 活性)、ドーパの脱プロトンによるドーパキノンの生成(DOPA oxidase 活性)、

5,6-ジヒドロキシインドールの脱プロトンによるインドール-5,6-キノンの生成には律速酵素であるチロシナーゼが関与し、それ以外は自動酸化の寄与が大きいとされている²⁹⁾。



Scheme 1 Mechanism of Melanogenesis.

今回の実験では、*L*-チロシンおよび *L*-ドーパにマッシュルーム由来のチロシナーゼを反応させ、生成するドーパキノンの量を測定した。フィトンチッド液を添加することで、チロシナーゼの活性阻害が起これば、ドーパキノンの生成量は減少するので、フィトンチッドエキスのメラニン生成抑制効果を確認することができる。

フィトンチッド AB 液および D 液の活性酸素阻害およびチロシナー

ゼ活性阻害を比較すると、フィトンチッド AB 液により高い活性が確認できた。フィトンチッド液における抗菌試験で十分な防腐力が確認されたフィトンチッド AB 液の濃度 1.0%では、1mM に調製したアスコルビン酸(比較物質)とほぼ同等の活性が発現することを確かめた。また、チロシナーゼ活性阻害試験については、現在、美白剤として広く用いられているアルブチン(1.0%濃度に調製)と比較したところ、L-ドーパを基質とした場合、約 3 倍強のチロシナーゼ活性阻害を発現したことを確認することができた。このことから、活性酸素阻害とチロシナーゼ阻害の関連性を検討したところ、一般的にドーパはカテコールアミン(アドレナリン、ノルアドレナリン)生合成の前駆体であるため、活性阻害値が低いとパーキンソン症などの病態を発症させることが見受けられる³⁰⁾。したがって、L-チロシンを水酸化し、L-ドーパに変化させるチロシナーゼにはほとんど作用せず、L-ドーパを酸化し、ドーパキノンへ変化させるチロシナーゼの活性を阻害することから、優れたメラニン生成抑制効果をもつものであると考えられる。今回用いたフィトンチッド AB 液の濃度 1.0%においても、これらの効果が、十分に発現し、抗酸化およびチロシナーゼ活性阻害を維持していることが示唆された。

2-4. フィトンチッド液の除菌・消臭効果

つぎに、抗菌活性が認められたフィトンチッド液の消臭・脱臭効果を確認するため、フィトンチッド AB 液を用いて 1.0%配合した液体石けんを試作し、手洗い後の菌数を検討した。Table 7 に今回試作したフィトンチッド液配合の石けん(液体)の配合量を示す。

Table 7 Prescription of Liquid soap

Ingredient name	Compounding ratio(%) (v/v)
Lauric acid	10.0
Myristic acid	3.0
Palmitic acid	1.0
Potassium hydroxide	7.0
EDTA	0.1
Potassium chloride	1.0
Lauric diethanolamide	3.0
Glycoldistearate	2.0
Antiseptic	trace
AB type of phytoncide solution	1.0
Water	trace
Total	100.0

試作したフィトンチッド液配合の石けんに対して「JIS K 3304 石けん試験方法」に基づいて分析を行った (Table 8)。純石けん分とは、脂肪酸と苛性カリ (水酸化カリウム) がケン化して作られる脂肪酸カリウムの量である。石油エーテル可溶部は石けんの中に残っている未反応の油などである。遊離アルカリとは、石けん中に残っている苛性カリ (水酸化カリウム) の値である。エタノール不溶部とはアルコール (エタノール) に溶けない無機物である塩、炭酸塩、ケイ酸塩等のことである。フィトンチッド液配合の石けんは、市販の液体石けんと比較して純石けん分が低く、石油エーテル可溶部が高い値を示した。純石けん分は 20~30% が理想であり、純石けん分が低いと泡立ち、洗浄力の効果が低下すると考えられる。また、石油エーテル可溶部が高い値を示したことから、フィトンチッド液の精油成分が水酸化カリウムと反応できずに残ってしまっているためだと考えた。また、pH の値が少し低くなっているのは、フィトンチッド液自体が酸性であるためであ

ると示唆された。

Table 8 Qualitative Test of Phutoncide Soap

Item	Analytical value (%)	
	Phytoncide soap	Commercial soap
Water value in product	77.50	62.80
Pure soap value	16.30	27.70
Ether soluble matter	1.28	0.00
Free alkali	0.00	0.00
Ethanol insoluble matter	0.00	0.00
pH	8.83 (20°C)	10.58% (20°C)

手洗いのみに比べ、市販の石けん(シャボン玉石けん株式会社製)およびフィトンチッド液配合の石けんを用いて洗浄すると、殺菌効果に大きな相違が確認された。フィトンチッド液配合の石けんで洗浄すると、水洗いに比べ皮膚に常に付着している常在菌であるビロード状コロニーである長桿菌に対し、高い除菌効果が認められた(Fig.8)。また、フィトンチッド液配合の石けんで洗浄すると、短桿菌の数が水洗いおよび市販の石けん洗いに比べて著しく減少し、4種類の菌の総数が最も少ない結果が得られた(Table 9)。

Table 9 Fungus After Washing hand

General germ	Washing water	Commercial soap	Phytoncide soap	Colony
Short bacterium	78	97	50	White colony (S)
Long bacterium	19	1	8	Velvet-shaped colony
Coccus	3	2	4	Milk-white colony (L)
Staphylococcus	11	9	7	Yellow colony
Total	111	109	69	

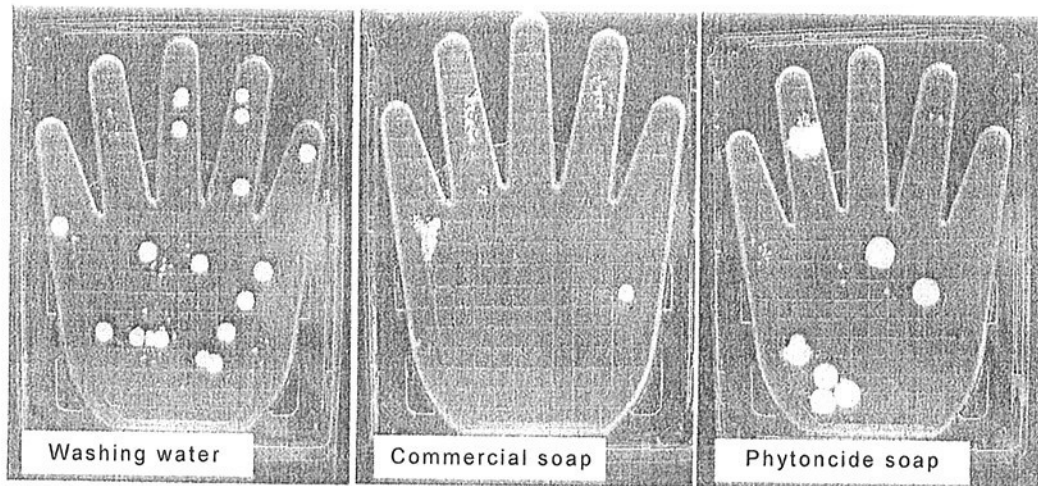


Fig.8 Fungus After Washing hand.

つぎに、手洗い後の匂いについて、10名のボランティアによる匂い評価を Table 10 に示した官能評価基準に従って実施し、その消臭効果を判断した。その結果を Table 10 に示す。

Table 10 Deodorant Evaluation

Mark	Evaluation Degree
5	Pungent smell
4	Worse smell
3	Normal smell
2	Slightly smell
1	Feeble smell
0	No difference

流水洗いに比べて、市販の石けんおよびフィトンチッド液配合の石けんで洗浄すると、いずれも消臭効果が得られるが、とくに、フィトンチッド液配合の石けんを用いると、短い手洗い時間で消臭効果が認められた。フィトンチッド液配合の石けんを用いて 40 秒以上手洗いを行うと、評価基準がほぼ 1 以下となり、良好な消臭効果を発揮する

ことがわかった (Table 11)。今回の除菌・消臭試験により、フィトンチッド AB 液には除菌効果および消臭効果があることを確認することができた。

Table 11 The Deodorant Evaluation of Panelist

Panelist	Washing water				Commercial soap				Soap included phytoncide			
	20 ^{a)}	30	40	60	20	30	40	60	20	30	40	60
A	5	5	4	4	4	3	3	2	4	2	1	0
B	5	4	4	4	4	4	3	2	3	2	1	0
C	5	4	4	3	4	3	2	2	3	2	1	1
D	5	5	4	3	4	3	2	1	3	2	1	0
E	5	5	5	4	4	4	3	2	3	1	1	1
F	4	4	4	3	4	3	2	2	3	2	1	1
G	5	5	4	4	4	3	2	1	3	1	1	1
H	5	4	4	3	4	4	3	2	3	2	2	1
I	4	4	4	4	4	3	2	1	4	2	1	1
J	5	5	4	3	4	3	2	2	3	1	1	1
Average	5	4.5	4	3.5	4	3.3	2.4	1.7	3.2	1.7	1.1	0.7

a) Washing time (sec)

このことから、フィトンチッドの主な機能であるリフレッシュ効果、抗菌・防虫効果および消臭・脱臭効果に対する試験を今回行ったが、4種類のフィトンチッド液を目的に応じて使用することにより、化粧品への応用が可能であることがわかった。

2-5. 類縁化合物の生理活性

フィトンチッド液に含まれる抗酸化活性の向上に寄与している化合物はベンゼン環を母格とし、ヒドロキシル基(-OH)とメトキシ基(-OCH₃)が *o*-配向を形成していることが確認された。さらに、アリル基(-CH₂CH=CH₂)等の第3の置換基が *p*-位に存在する化合物に、より高い消去効果が発現することを認めた。そこで、*p*-位の官能基の相違による抗酸化能の相違を確認するため、ベンゼン環を母格とし、ヒドロキシル基(-OH)およびメトキシ基(-OCH₃)が、*o*-配位を形成する Guaiacol(a)を基準として、ヒドロキシル基に対して *p*-位に置換基を有する化合物を合成し、抗酸化試験およびチロシナーゼ活性阻害試験を行った。すなわち、*p*-位にメチル基(-CH₃)、エチル基(-C₂H₅)、プロピル基(-C₃H₇)、アルデヒド基(-CHO)、ビニル基(-CH=CH₂)、アリル基(-CH₂-CH=CH₂)、およびプロペニル基(-CH=CH-CH₃)を有する化合物を合成し、試料として用いた。また、*o*-配位に存在するヒドロキシル基(-OH)とメトキシ基(-OCH₃)が抗酸化への影響を及ぼしているか否かを確認するため、*p*-位にメチル基を固定し、*o*-配位にヒドロキシル基(-OH)が存在する 4-メチルカテコール(i)、*o*-配位にメトキシ基(-OCH₃)が存在する 3,4-ジメトキシトルエン(j)、メトキシ基(-OCH₃)が *p*-位に存在する 2-メトキシ-5-メチルフェノール(k)を用いた。2-メトキシ-4-プロピルフェノール(d)については、オイゲノール(g)から水素添加反応により合成したものを用いた。2-メトキシ-4-ビニルフェノール(f)についてはバニリン(e)から Wittig 反応によりアルデヒド基をビニル基に合成したものを用いた。3,4-ジメトキシトルエン(j)については 4-メチルカテコール(i)をジメチル硫酸によりメトキシ化したものを用いた。

Table 12 Physiological Activity of Analogous Compounds

Compounds	DPPH radical scavenging effect		Superoxide dismutase activity effect		Anti-tyrosinase activity effect	
	Scavenging rate ¹⁾	SC50 ²⁾	Inhibition rate(%)	L-Tyrosine	L-DOPA	
Guaiacol (a)	97.0	11	11.9	—	—	
2-Methoxy-4-methylphenol (b)	99.4	2	9.1	0.4	—	
2-Methoxy-4-ethylphenol (c)	96.1	3	—	1.3	—	
2-Methoxy-4-propylphenol (d)	98.6	5	—	4.5	—	
Vanillin (e)	15.2	>400	1.2	—	—	
2-Methoxy-4-vinylphenol (f)	98.9	3	13.3	6.6	23.7	
Eugenol (g)	99.4	4	15.1	2.2	16.1	
Isoeugenol (h)	100.0	11	23.7	—	—	
4-Methylcatechol (i)	98.7	1	—	—	—	
3,4-Dimethoxytoluene (j)	57.8	>400	—	—	—	
2-Methoxy-5-methylphenol (k)	98.5	5	6.3	8.3	—	
α -Tocopherol ³⁾	95.0	6	4.0	—	4.7	
Ascorbic Acid ⁴⁾	—	—	24.5	0.3	21.1	
Arbutin ⁵⁾	—	—	—	5.2	4.0	

1) Corrected concentration 0.2mg / mL

2) 50% Scavenging concentration (ug/mL)

3) Concentration : 1mM

4) Concentration : 1mM

5) Concentration : 3mM

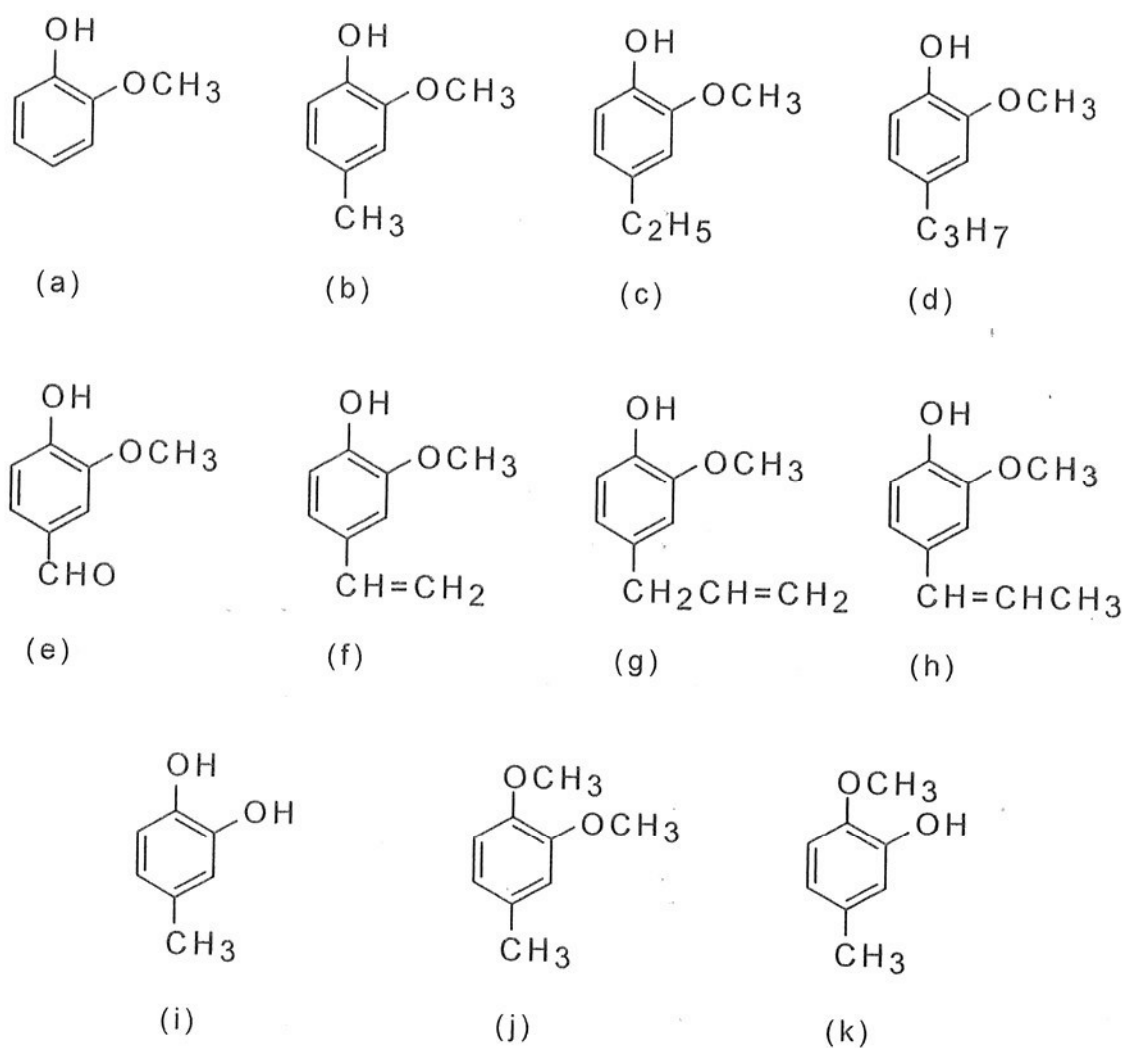


Fig.10 Chemical Structure of Analogous Compounds.

このように調製した化合物(a)~(k)について、DPPHラジカル消去効果試験を行った。ベンゼン環にヒドロキシル基(-OH)とメトキシ基(-OCH₃)が *o*-配向に存在しながらも、バニリン(e)にラジカル消去効果が認められなかった理由として、アルデヒド基(-CHO)が電子求引性であるため、ベンゼン環内の電子が不足し、反応性が低くなるためだと考えた。つぎに、*p*-位にアルキル基を有する化合物を比較すると、アルキル基が長くなるにつれて抗酸化能が低くなる傾向が認められた

(Table 12)。これら 3 種の化合物(b,c,d)の酸解離定数を比較すると、アルキル基が長くなるにつれて酸性度が高くなり、ヒドロキシル基(-OH)の水素が H⁺として外れてしまうため、ラジカル消去には関わっていないのではないかと考察した。また、オイゲノール(g)およびイソオイゲノール(h)を比較すると、同様の傾向を確認することができた。これら化合物の中でも、*o*-配位にヒドロキシル基(-OH)を有する 4-メチルカテコール(i)に高いラジカル消去効果が認められたことから、ヒドロキシル基をより多くもつ化合物に高いラジカル消去能を発現することが示唆された。

また、化粧品配合剤としての美白効果についてもチロシナーゼ活性阻害試験を行い、検討を行った。化合物はすべて 1mM に調製を行った。*p*-位にアルキル基を有する化合物を比較すると、アルキル基が長くなるにつれて、チロシナーゼ活性阻害率が高くなる傾向が認められた。その理由として、アルキル基が長くなるにつれて電子供与性が高くなり、反応性が高くなるためだと考えた。また、オイゲノール(g)に高いチロシナーゼ活性阻害効果が高く認められた理由として、アリル基(-CH₂-CH=CH₂)は立体障害が小さく、反応性が高いためであると考察した。さらに、2-メトキシ-4-ビニルフェノール(f)に高いチロシナーゼ活性阻害効果が認められたことから、置換基の末端に二重結合をもつ化合物に高いチロシナーゼ活性阻害能を発現することが示唆された。

3. 実験

3-1. 実験材料

実験に用いた4種類のフィトンチッドはA液(樹木系の植物エキス), AB液(殺菌力の強い植物エキス), CY液(アレルギー反応を起こさない植物エキス)およびD液(草花系の植物エキス)であり, それぞれ118種類の植物から調製し, 得られたエキスを混合したものであり, (有)フィトンタオ118から入手したものをを用いた。

また, 比較物質として, グアイアコール(GC 98%), 2-メトキシ-4-エチルフェノール(GC 97%), イソオイゲノール(GC 97%), 4-メチルカテコール(GC 98%)および2-メトキシ-5-メチルフェノール(GC 98%)は市販品(東京化成工業(株)製)を用いた。また, 2-メトキシ-4-メチルフェノール(GC 98%)はメルク(株)製を, バニリン(GC 98%)は和光純薬工業(株)製を, オイゲノール(GC 98%)は関東化学(株)製を用いた。

3-2. 機器分析

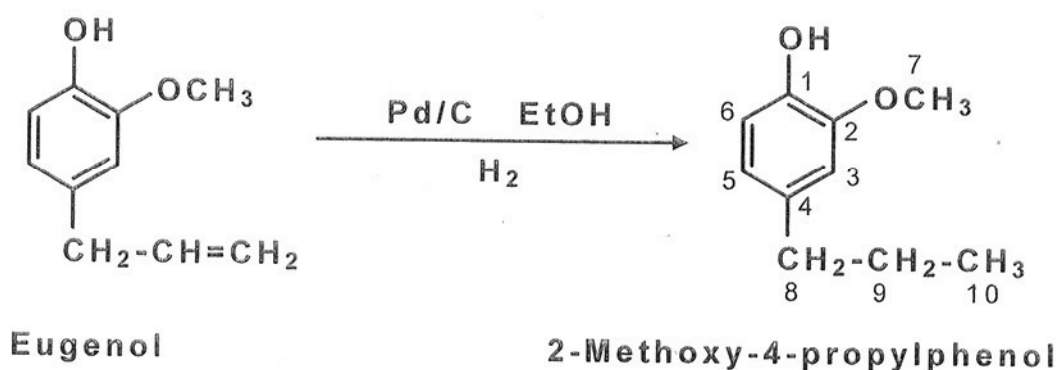
合成反応による生成物の構造は, ^1H -および ^{13}C -NMR(日本電子社製, JAM-EX400WB型FT), 純度測定にはGC(島津製作所製, GC-14B)を用いて, カラムDB-5($\phi 0.25\text{mm} \times 30\text{m}$), カラム温度 180°C , インジェクション温度 240°C およびデテクション温度 250°C で測定を行った。

GC-MSスペクトルはHP 6890GC; HP 5973 MSDを用いて, カラムTC-WAX($0.25\text{mm} \times 60\text{m}$), カラム温度 70°C (5min hold) ~ 240°C ($3^\circ\text{C}/\text{min}$), インジェクション温度 240°C)で測定を行った。

3-3. 合成方法

1) 2-メトキシ-4-プロピルフェノール(d)の合成

50mL のナスフラスコにオイゲノール(g)0.164g(1.1×10^{-3} mmol)とパラジウム炭素 50mg を取り, エタノール 10mL を加えた。激しく攪拌しながら水素をナスフラスコ内に充填させ, 48 時間室温で攪拌した。反応終了後, 溶媒留去し, 薄層シリカゲルクロマトグラフィー(展開溶媒: ヘキサン: エーテル=1:1)を用いて分離・精製を行い, 目的化合物である 2-メトキシ-4-プロピルフェノール(d)を 0.131g(収率 74.6%)得た。



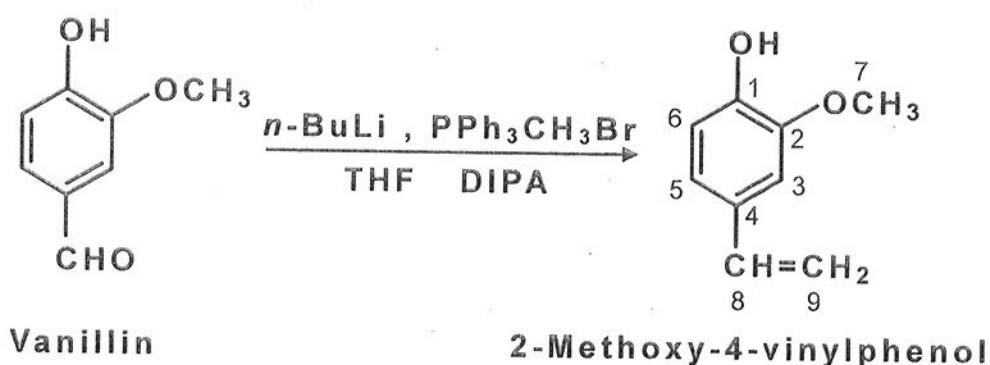
Scheme 2 Synthesis of 2-Methoxy-4-propylphenol from Eugenol.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 6.82(1H, d, $J=7.57\text{Hz}$, H-6), 6.68(1H, s, H-3),
6.65(1H, br, -OH), 5.52(1H, s, H-7), 2.53-2.49
(2H, d, $J=7.57\text{Hz}$, H-8), 1.65-1.56(2H, sext, $J=$
7.57Hz, H-9), 0.95-0.91(3H, t, $J=7.32\text{Hz}$, H-10).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : C-2(146.01), C-1(143.23), C-4(134.48), C-5
(120.76), C-6(113.91), C-3(110.83), C-7(55.81),
C-8(37.81), C-9(24.98), C-10(13.94).

2) 2-メトキシ-4-ビニルフェノール(f)の合成

アルゴンを充填させた 50mL の二口丸底フラスコにテトラヒドロフラン 15mL とジイソプロピルアミン 1.7mL を取り、ドライアイス下 (0°C) にて攪拌した。その後、*n*-ブチルリチウム 3.7mL を加え、ついで、 $\text{PPh}_3\text{CH}_3\text{Br}$ 1.96g を加え室温で攪拌した。反応油が黄色から橙色に変わった時点でバニリン(e) 0.80g (5.27mmol) を加え、1 時間攪拌した。反応終了後、2*N*-塩酸水溶液を加えた後、エーテルで 2 回抽出し、ついで、飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒留去後、得られた油分は薄層シリカゲルクロマトグラフィー(展開溶媒：ヘキサン：エーテル=3:1)を用いて分離・精製を行い、2-メトキシ-4-ビニルフェノール(f)を 0.31g(収率 39.2%)得た。



Scheme 3 Synthesis of 2-Methoxy-4-vinylphenol from Vanillin.

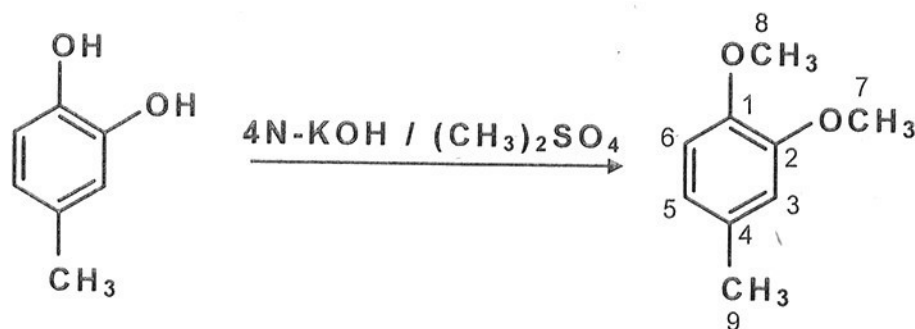
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 6.92(1H, d, $J=12.94\text{Hz}$, H-5), 6.89(1H, s, H-3), 6.84(1H, d, $J=10.50\text{Hz}$, H-6), 6.70-6.63 (1H, dd, $J=10.74, 17.58\text{Hz}$, H-8), 6.64(1H, br, -OH), 5.63(1H, dd, $J=0.98, 17.58\text{Hz}$, H-9), 5.12 (1H, dd, $J=0.98, 10.86\text{Hz}$, H-9), 3.81(3H, s, H-7).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : C-8(159.14), C-2(148.08), C-1

(136.41), C-4(119.92), C-5(114.18), C-6
(111.36), C-3(104.9), C-9(100.47), C-7
(57.43).

3) 3,4-ジメトキシトルエン(j)の合成

50mL のナスフラスコに 4-メチルカテコール(i)1.39g(11.2mmol)と 4*N*-水酸化カリウム水溶液 5mL を取り, 約 15 分間攪拌した。その後, ジメチル硫酸 2.33mL をゆっくり加え, 約 2 時間加熱還流を行った。反応終了後, エーテルで 3 回抽出し, エーテル層を 1*N*-水酸化ナトリウム水溶液で 2 回抽出し, 次いで飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。無水硫酸マグネシウムで乾燥し, 溶媒留去後, カラムクロマトグラフィー(展開溶媒:ヘキサン:酢酸エチル=7:3)を用いて分離・精製を行い, 目的化合物である 3,4-ジメトキシトルエン(j)を 1.59g(収率 93.5%)で得た。



4-Methylcatechol

3,4-Dimethoxytoluene

Scheme 4 Synthesis of 3,4-Dimethoxytoluene from 4-Methylcatechol.

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 6.77(1H, d, $J=8.55\text{Hz}$, H-6), 6.71(1H, s, H-3),
6.69(1H, d, $J=1.71\text{Hz}$, H-5), 3.86(3H, s, H-7or8),
3.84(3H, s, H-7or8), 2.30(3H, s, H-9).

$^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : C-2(148.32), C-1(146.47), C-4(130.07), C-5
(120.48), C-3(112.11), C-6(110.92), C-7or8
(55.82), C-7or8(55.63), C-9(21.00).

3-4. 生理活性試験

3-4-1. DPPH ラジカル消去効果試験³¹⁾

それぞれのフィトンチッド液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100 μL のエタノールを加え，ついで0.2mMのDPPHエタノール溶液50 μL 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(CORONA MTP-300)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_{50} についても算出した。

3-4-2. 活性酸素阻害効果 (SOD) 試験³²⁾

それぞれのフィトンチッド液10 μL に発色試薬(0.1Mリン酸緩衝液pH8.0，キサントシン0.4mmol/L，ニトロブルーテトラゾリウム

(NO₂-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 100μL 加え， プレートミキサーで 1 分間攪拌後， 37℃で 28 分間加温した。その後， 反応停止液 (ドデシル硫酸ナトリウム) 20μL 添加後， プレートミキサーで 5 分間攪拌した後， マイクロプレートリーダー (CORONA MTP-300) を用いて 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。

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

Es : 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

3-4-3. チロシナーゼ活性阻害試験³³⁾

試験管に 30mM リン酸ナトリウム緩衝液 1.8mL に L-チロシン (0.3g/L) 溶液 1.0mL， 調製試料 (3mM) DMSO 溶液 0.1mL を加えた。37℃ の恒温槽で 5 分間予備加温を行った。次いで， マッシュルームチロシナーゼ溶液 0.1mL を加え， すばやく攪拌した後に恒温槽にて 37℃で 10 分間加温した。UV 分光光度計 (JASCO V-530) を用いて 475nm における吸光度測定し (A)， 以下の式に従ってチロシナーゼ活性阻害率を算出した。なお， 対照として試料液の代わりに DMSO を加え同様に測定したものをブランクとした (B)。また， L-ドーパを基質とした場合，

L-チロシン溶液の代わりに L-ドーパ溶液を加え，恒温槽にて 25℃で加温した。

$$\text{チロシナーゼ活性阻害率 (\%)} = \left(\frac{A-B}{A} \right) \times 100$$

3-4-4. 抗菌および抗かび試験³⁴⁾

使用菌株は細菌，*Staphylococcus aureus subsp. Aureus* (NBRC13276)，*Bacillus subtilis subsp. subtilis* (NBRC3134)，*Escherichia coli* (NBRC3972)および*Pseudomonas aeruginosa* (NBRC132759)の4株を用いた。一方，黴は*Aspergillus niger* (NBRC6341)，酵母は*Candida albicans*(NBRC1594)を用いた(NBRC:生物遺伝資源部門)。

実験方法は，細菌は培地として Tryptone Soya Agar を用い，それぞれの菌濃度が 10^8 cfu/mL(*Bacillus subtilis subsp. subtilis* は 10^7 cfu/mL)になるように培養し，等量混和した液を用いた。また，黴・酵母は，培地としてサブローデキストロース寒天培地 (抗生物質クロラムフェニコール 50mg/L 含有)を用いて，濃度が 10^7 cfu/mLになるように培養したものを用いた。ついで，これら菌液 250 μ Lをそれぞれ 30g のフイトンチッド AB 液および D 液に加え，リン酸緩衝食塩水を用いて濃度を 0.1%，0.5%および 1.0%に調製した。細菌は 30℃，3日間ないし7日間，黴・酵母は 25℃で7日間ないし14日間インキュベーターにて培養を行った。培養後，各菌液 1mL を培地に加え，細菌については 30℃で4日間，黴・酵母については 25℃で5日間培養後，コロニー数をカウントし，増殖状態を観察した。

3-4-5. 除菌効果試験³⁵⁾

フィトンチッド液配合の石けんの除菌効果を確認するため、石けんで30秒間水洗いした後の菌数をカウントすることにより、フィトンチッド液配合の石けんの除菌効果の有無を検討した。手洗いとその後の水洗いの方法としては、30秒間の手洗いを①水洗い(流水洗い30秒間)、②市販の石けん洗い(石けん15秒間+流水洗い15秒間)、③フィトンチッド液配合石けん洗い(フィトンチッド液配合石けん15秒間+流水洗い15秒間)を行った。30秒の手洗い後、Fig.9に示したような寒天培地に手をおしつけて、37℃で24時間培養し、コロニーの形状により、それぞれの菌名、短桿菌(孢子無・グラム陽性)、長桿菌(孢子無・グラム陽性)、球菌(グラム陰性)およびブドウ球菌(グラム陰性)を判別し、その数をカウントした。

3-4-6. 消臭効果試験³⁶⁾

手洗い後の匂いについて、10名のボランティアによる匂い評価を官能評価基準に従って実施し、その消臭効果を判断した。

4. 参考文献

- 1) Toru TSUCHIYA, Junichi HOSOI : Psychoneuroendocrinological and psychoneuroimmunological effects of stress on skin functions, *Fragrance Journal*, 24, No.11, p26-34(1996).
- 2) Masashi NAKAGAWA, Hajime NAGAI : Evaluation for relieving effects to stress with odoriferous compounds, *Fragrance Journal*, 19, No.11, p44-50(1991).

- 3) Halliwell B., Gutteridge J. : Free radicals, other reactive species and disease, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., Oxford, p617-623(1999).
- 4) 野村総一郎, 内藤宏 : 過密環境ストレスモデル, *ストレス科学*, 8 No.3, p11-15(1994).
- 5) Toshiko ATSUMI, Keiichi TONOSAKI : Enhancement effect of aromatherapy on free radical scavenging activity and stress, *AROMA RESEARCH*, 25, Vol.7, No.1, p.44-51(2006).
- 6) Kintish L. : The Ancient Art of Aromatherapy, *Soap Cosmeics Chem. Art of Aromatherapy*, 73, No.10, p34-38(1997).
- 7) Hisanobu SUGANO, Hidetoshi TOMINAGA : Fragrances and organism, *Fragrance Journal*, 77, p21-25(1986).
- 8) Akihiri ISHIKAWA, Kazunori SHIMAGAMI : Efficacy of fragrance in mental sanitation, *Fragrance Journal*, 64, p32-35(1984).
- 9) Yoshinori OHTSUKA, Noriyuki YABUNAKA, Shigeru TAKAYAMA : Shinrin-yoku(forest-air bathing and walking) effectively decreases blood glucose levels in diabetic oatients, *Int J Biometeorol.*, 41, p125-127(1998).
- 10) Keizo KAMIYAMA : Ecology of forest and exhalating materials effect, *Fragrance Journal*, 65, p7-11(1984).
- 11) Yatagai.M. : Recent Research and development in phytoncides, *Fragrance Journal*, 6, p247-252(1986).
- 12) H.Isacoff, : Aromatics as bactericides, *Cosmetics and Toiletries*, 96, p.69-76(1981).
- 13) L.B.Bullerman, F.Y.Lieu and S.A.Seier, : INHIBITION OF

- GROWTH AND AFLATOXIN PRODUCTION BY CINNAMON AND CLOVE OILS. CINNAMIC ALDEHYDE AND EUGENOL, *J. Food Sci.*, **42**, p1107-1116 (1977).
- 14) 恒次祐子, 森川岳, 宮崎良文 : 木材の香りによるリラクゼーション効果, *木材工学*, **60**, p598-602(2005).
- 15) S.YAMAOKA : Abstracts of the twenty-sixth annual meeting of the Japanese Society of Biometeorology, *Int. J. Biometeorol.*, **32**, p217-229(1988).
- 16) Kawakami K., Kawamoto M., Otani H., and Nomura M. : Clinical and Experimental Hypertension, *Clinical and Experimental Hypertension*, **27**, p442(2005).
- 17) Kawakami K., Kawamoto M., Nomura M., Otani H., and et al : EFFECTS OF PHYTONCIDES ON BLOOD PRESSURE UNDER RESTRAINT STRESS IN SHRSP, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **31**, p27-28(2004).
- 18) Yin Lei et al. : Skin aging induced by ultraviolet exposed and tobacco smoking, evidence from epidemiological and molecular studies, *Photodermatol Photoimmunol Photomed.*, **17**, p178-183(2001).
- 19) Halliwell B., Gutteridge J.M.C. and Cross C.E. : Free radicals, antioxidants, and human disease:Where are we now?, *J. Lab. Clin. Med.*, **119**, p598-620(1992).
- 20) Kelvin J.A. Davies : Oxidative stress: the paradox of aerobic life, *Biochem.Soc.Symp.*, **61**, p1-31(1995).
- 21) Rebrin I., Kamzalov S. : EFFECT OF AGE AND CALORIC RESTRICTION ON GLUTATHIONE REDOX STATE IN MICE, *Free*

- Radical Biol. Med.*, **35**, NO.6, p626-635(2003).
- 22) Mote P.L., Grizzle J.M., Walford R.L., Spindler S.R. : AGE-RELATED DOWN REGULATION OF HEPATIC CYTOCHROME P₁-450,P₃-450, CATALASE AND CuZn-SUPEROXIDE DISMUTASE RNA, *Mechanisms of Ageing Development*, **53**, p101-110(1990).
- 23) Yoshiyuki OHMORI : Anti-aging effects of *Coleus scutellarioides Benth.* In the skin, *Fragrance Journal*, **8**, p31-35(2004).
- 24) Minoru SASAKI : Latest trends in development of plant extract for cosmetics use, *Fragrance Journal*, **8**, p13-16(2006).
- 25) Kunio KOSAKA, Toshitsugu MIYAZAKI : Accumulation of intracellular glutathione and inhibition of melanogenesis by carnosic acid, *Fragrance Journal*, **18**, p97-102(2003).
- 26) Schallreuter K.U. : A REVIEW OF RECENT ADVANCES ON REGULATION OF PIGMENTATION IN THE HUMAN EPIDERMIS, *Cellular and Molecular Biology*, **45**, No.7, p943-949(1999).
- 27) Hitoshi MASAKI , Yasunobu OCHIAI : A new approach for development of whitening agents – A role of active oxygen species on melanogenesis, *Fragrance Journal*, **28**, No.9, p16-23(2000).
- 28) Karg E., Odh G., Wittbjer A., Rosengren E., Rorsman H. : Hydrogen Peroxide as an Inducer of Elevated Tyrosinase Level in Melanoma Cells, *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 209S-213S(1993).
- 29) Hideo NAKANISHI : Melanin-Inhibitory activities of perfume, *Fragrance Journal*, **18**, p113-119(2003).
- 30) Atsushi KATO, Junko FUKUTAKE, Haruhisa KIZU : Inhibitory effects of Senkyu-chacho-san and Cnidii Rhizoma on catechol-*o*-methyltrans

- ferase, *Medical and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU*, **21**, p34-38(2004).
- 31) Hitoshi TOMINAGA, Yuka KOBAYASHI, Takashi GOTO, Kazuo KASEMURA, Masato NOMURA : DPPH Radical-scavenging Effect of Several Phenylpropanoid Compounds and Their Glycoside Derivatives, *YAKUGAKU ZASSHI*, **125**, No.4, p371-375(2005).
- 32) Takahiro TADA, Masato NOMURA, Kenji SHIMOMURA, Yoshihito FUJIHARA : Synthesis of Karahanaenone Derivatives and Their Inhibition Properties toward Tyrosinase and Superoxide Scavenging Activity, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, No.9, p1421-1424(1996).
- 33) Shinichi TANIMOTO, Hitoshi TOMINAGA, Yoshiharu OKADA, Masato NOMURA : Synthesis and Cosmetic Whitening Effect of Glycosides Derived from Several Phenylpropanoids, *YAKUGAKU ZASSHI*, **126**, No.3, p173-177(2006).
- 34) Shinobu GOCHO : Antimicrobial activity of phyto-ingredients, *Fragrance Journal*, **66**, p.39-42(1984).
- 35) Kyoko YAMAMOTO : 医療施設での手洗いの現状と課題, *Bokin Bobai*, **34**, No.4, p211-217(2006).
- 36) Keiichiro ISHIDA : Measurement methods for deodorant efficacy, *Fragrance Journal*, **13**, p.177-183(1994).

5. 謝辞

本研究に際し，終始ご指導，ご鞭撻を賜りました野村正人教授ならびに岡田芳治助教授に心より深謝いたします。また，フィトンチッドエキスを恵与していただきました(有)フィトンタオ 118 に感謝します。抗菌試験および試作石けんを作成するにあたり，ご指導いただきました東洋ビューティ株式会社およびシャボン玉石けん株式会社に深謝します。

Physiological Activities and Utilization of Phytoncide Solutions

By Tomo ABE

In modern advanced information society, any people feel stress and are fatigued both mentally and physically with living. And many people have resulted in illness such as lifestyle-related diseases. In contrast with general medical treatment provided in urban living, the forest therapy utilizing a natural forest was called attention. In the forest, aromatic chemical substances called phytoncide are radiated from plants. Phytoncide is of phyto and cide. The former means "plant" and the later means "kill". Phytoncide have been considered to possess antibacterial, deodorization, and refreshment effect.

Herein, I report the physiological activities and utilization of four types of phytoncide solutions A, AB, CY, and D, which were prepared from a wide variety of plant extract. On the other hand, a living body has been elucidating bio-defense system against various disorders, which superabundant active oxygen occurring in our living has influenced. The contribution of phytoncide to improvement of such disorders was also studied. Recently, natural occurring ingredient from plants have been taken notice of and used vigorously for cosmetics. Thus I report also the application of phytoncide to cosmetics that possessed physiological activities such as antibacterial and deodorization effect.

To investigate properties of phytoncide solutions, four types of phytoncide solutions were analyzed by GC-MS (HP 6890GC; HP 5973 MSD; column: TC-WAX, 0.25mm x 60m; column temperature: 70°C (5min hold) ~ 240°C (3°C/min); injection temperature: 240°C) (Fig.1,2). Each solution were consisted of same chemical substances with different proportion. The major compounds

were monoterpenoides and sesquiterpenoides, and phenols and hydrocarbons were also confirmed (Table 1).

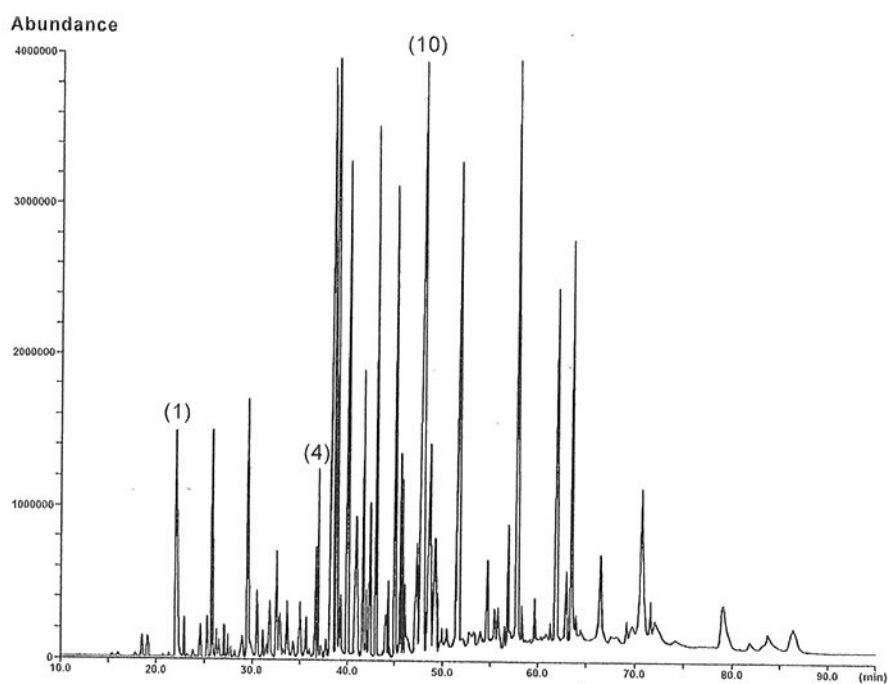


Fig.1 GC-MS Chromatogram of AB-Type.

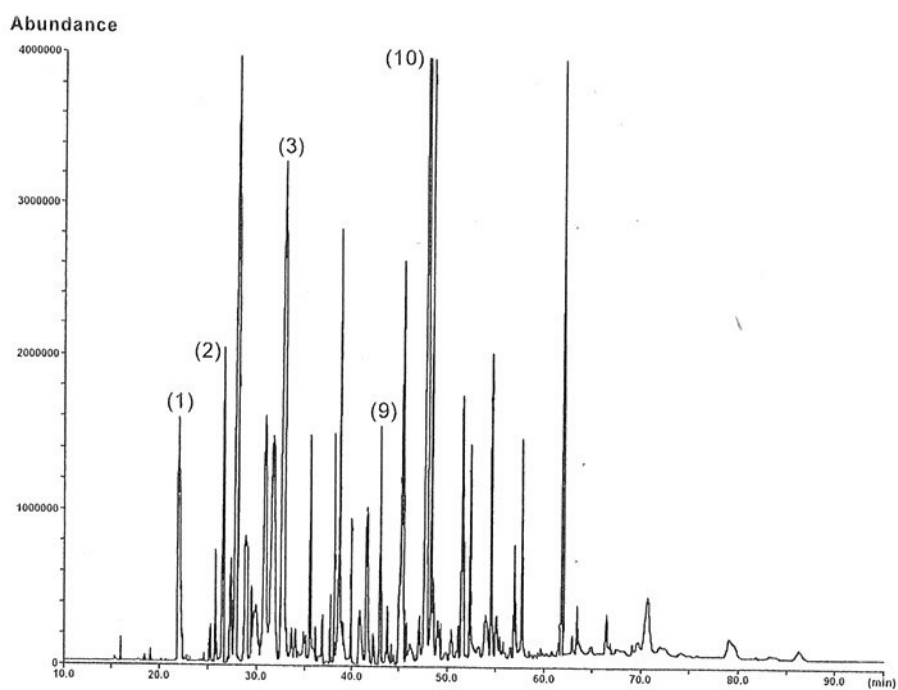


Fig.2 GC-MS Chromatogram of D-Type.

Table 1 Identified Compounds in Phytoncide Solutions

Peak No.	R.T. ^{a)}	Compounds	GC Area (%)			
			A	AB	CY	D
(1)	21.72	Thujone	7.258	3.943	11.610	3.453
(2)	26.45	Linalool	1.662	0.171	—	2.191
(3)	32.52	α -Terpineol	2.341	0.346	—	8.463
(4)	37.60	Guaiacol	4.179	3.177	1.867	trace
(5)	38.76	2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-one	0.280	0.061	0.171	0.178
(6)	39.58	Phenethyl alcohol	2.329	2.654	—	0.644
(7) / (8)	41.03	2-Methoxy-5-methylphenol or 2-Methoxy-4-methylphenol	1.710	1.433	0.576	trace
(9)	42.97	Phenol	2.437	2.850	1.575	1.755
(10)	47.80	Cedrol	8.128	9.623	—	12.208
(11)	48.21	Eugenol	0.282	—	—	2.143
(12)	58.54	4-Allyl-2,6-dimethoxyphenol	0.028	—	—	trace
(13)	59.03	Vanillin	0.239	0.214	—	trace

a) Retention time (min)

Next, the antioxidant effects of the solutions were assessed on the basis of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assay and active oxygen inhibition assay. On the DPPH-radical scavenging assay, antioxidant effect of each phytoncide solutions was comparable to that of the standard compounds α -Tocopherol in 95.0% scavenging rate. In addition, on the basis of calculation of SC_{50} value, which was substrate concentration scavenging a half of DPPH radical, it was found that A and D type of phytoncide solutions have especially comparable antioxidant effect to that of α -Tocopherol (SC_{50} 6 μ g/mL). On the active oxygen inhibition assay, antioxidant effect of AB type of phytoncide solution was highest of the four solutions in more than 60% inhibition rate. Next, attempt to characterize antioxidant compounds in Table 1 was carried out. As shown in Table 2, compounds of higher DPPH-radical scavenging effect were

phytoncide solution concentration from 0.1% to 1.0%. Although slight proliferation of the bacteria was confirmed in lower concentration (0.1%), D type of phytoncide solution was found to be antibacterial effect in higher concentration from 0.5% to 1.0%. The prevention against mold was confirmed with extending at culture period from one week to two weeks and increasing phytoncide solution concentration from 0.1% to 1.0%. Although slight proliferation of yeast was confirmed in 0.1% concentration of the two phytoncide solutions, significant antibacterial effect and no proliferation of yeast were shown in higher concentration. Therefore, these results demonstrated that the phytoncide solution was expected to be useful as new type of antiseptics for cosmetics mixing in only 1.0% concentration.

In addition, to investigate deodorization effect of phytoncide solutions, a soap included AB type of phytoncide solution in 1.0% concentration was produced. Total number of bacteria after washing hands with the soap was significantly decreased in comparison with water and a commercial soap. On the assessment of deodorization effect against a smell after washing hands for the shorter time, ten volunteers sustained using the soap in comparison with water and commercial soap.

In conclusion, it was found that phytoncide solutions had antioxidant, antibacterial, antifungal and deodorization effects. These results were suggested that phytoncide solutions were expected to utilize to a new type of cosmetics that possessed physiological activities such as antioxidant, antibacterial, and deodorization effects.