Inhibition of frog sciatic nerve compound action potentials by aroma–oil compounds in a manner dependent on their chemical structures

Sena Ohtsubo, Tsugumi Fujita, Moe Miyahara, Akitomo Matsushita, Chang–Yu Jiang, Zhi–Hao Xu, and Eiichi Kumamoto

Department of Physiology, Saga Medical School

Abstract

Aroma–oil compounds derived from plants have a variety of clinical effects including local anesthesia. We have previously reported that various aroma–oil compounds reduce the peak amplitudes of fast–conducting and Na⁺–channel blocker tetrodotoxin–sensitive compound action potentials (CAPs) recorded from the frog sciatic nerve in a manner dependent on their chemical structures. The present study further examined this structure–activity relationship by applying the air–gap method to the frog sciatic nerve. Cyclic alcohols ((+)-borneol, (–)-borneol, α -terpineol), chain alcohols ((–)-linalool, citronellol, geraniol) and esters (bornyl acetate, geranyl acetate) reduced CAP peak amplitudes with the half–maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of 1.5 mM, 2.3 mM, 2.7 mM, 2.0 mM, 0.35 mM, 0.53 mM, 0.44 mM and 0.51 mM, respectively. This IC₅₀ value for (–)-linalool was similar to that for (±)-linalool (1.7 mM), a value as reported previously. On the other hand, hydrocarbon (*p*-cymene) at a high concentration such as 2 mM reduced CAP amplitude by only 20%. The efficacy sequence of the aroma–oil compounds was esters $\geq$ alcohols > hydrocarbons, and was thus consistent with one reported previously, i.e., phenols $\geq$ aldehydes $\geq$ esters > alcohols > ketones > oxides $\gg$ hydrocarbons. There was a variation in IC₅₀ value among the alcohols used; chain alcohols were more effective in inhibiting CAPs than cyclic ones. Similar IC₅₀ values of (–)-linalool and (±)-linalool and also of (+)-borneol and (–)-borneol indicate no difference in efficacy between the stereoisomers in inhibiting CAPs. There was no correlation between IC₅₀ value for CAP inhibition by aroma–oil compound and its octanol–water partition coefficient value. The present study confirmed that aroma–oil compounds inhibit nerve conduction in a manner specific to their chemical structures.

Keywords

Aroma–oil compound; Frog; Sciatic nerve; Conduction inhibition; Structure–activity relationship

Received: 1 December 2014

Accepted: 9 January 2015

アロマ精油成分による化学構造に依存した蛙坐骨神経の複合活動電位抑制

大坪 瀬奈／藤田 亜美／宮原 萌／松下 晋大／蔣 昌宇／徐 志昊／熊本 栄一

佐賀大学医学部 生体構造機能学講座（神経生理学分野）

はじめに

植物由来のアロマ精油を用いたアロマセラピーには、抗不安、抗炎症、鎮痛、局所麻酔などの様々な効能がある^{1,4)}。局所麻酔でよく知られているラベンダー (*Lavandula angustifolia*) 精油成分の作用は1次感覚ニューロンにおける活動電位の伝導抑制^{7,29)}、つまり、電位作動性Na⁺チャネルの抑制^{13,17)}によると考えられている。

我々は、最近、様々な植物由来成分が蛙坐骨神経から記録される電位作動性Na⁺チャネル阻害薬テトロドトキシン (TTX) 感受性の複合活動電位 (CAP) を抑制することを見出している。例えば、唐辛子成分カプサイシンやミント成分メントール、さらに、これらに関連した様々な生理活性物質のCAP抑制作用である^{9,25)}。また、ワサビ成分アリルイソチオシアネートやシナモン成分シンナムアルデヒドにも同様な作用があることを報告している¹⁵⁾。

さらに、薬物による蛙坐骨神経のCAP抑制は、その薬物の化学構造と密接な関係があることも明らかにしている。例えば、非麻薬性オピオイドのトラマドールとその代謝産物モノ-O-デメチルトラマドール⁸⁾、オピオイド類のモルヒネ、エチルモルヒネおよびコデイン¹⁶⁾、デクスメトミジンを含む様々なアドレナリン

受容体作動薬¹¹⁾、抗痙攣薬のカルバマゼピンとオクスカルバゼピン²⁶⁾のそれぞれの場合で、わずかな化学構造の違いがCAPの抑制の程度に大きく影響することを見出している。ごく最近、アロマ精油成分によるCAP抑制には構造活性連関があることも明らかにしている。つまり、アロマ精油成分がCAPを抑制する序列は、フェノール類 (カルバクロール、チモール、オイゲノール) ≥ アルデヒド類 (シトラール、シトロネラール) ≥ エステル類 (酢酸リナリル) > アルコール類 ((±)-リナロール、メントール) > ケトン類 (プレゴン、カルボン、メントン) > オキサイド類 (ローズオキシド、シネオール) ≫ 炭化水素類 (ミルセン、リモネン) であることを発見した¹⁸⁾。今回、さらに、この構造活性連関を検討するために、アルコール類 ((+)-ボルネオール, (-)-ボルネオール, α-テルピネオール, (-)-リナロール, シトロネロール, ゲラニオール), エステル類 (酢酸ボルニル, 酢酸ゲラニル) および炭化水素類 (*p*-シメン) が蛙坐骨神経のCAPにどのような作用を及ぼすか調べた。

方 法

本実験の計画は佐賀大学動物実験委員会によ

り承認されている。

1. 蛙坐骨神経標本の作製

蛙坐骨神経標本は以前と同様な方法^{9,12,15,18,25,26)}により作製した。すなわち、雌雄のトノサマガエルから坐骨神経を摘出して実体顕微鏡下でその表面の薄膜を注意深く剥がし、Luciteプレートに接着している5本の白金線に設置して神経の両端を糸で結んだ。そして、神経を吊したプレートをリンガー液が入っているビーカーに浸し、攪拌子により絶えず攪拌した。使用したリンガー液の組成(mM)は、NaCl, 115.5; KCl, 2.0; CaCl₂, 1.8; Na₂HPO₄, 1.3; NaH₂PO₄, 0.7 (pH = 7.0)であった。

2. 蛙坐骨神経からの複合活動電位の記録

以前と同様^{9,12,15,18,25,26)}、長さが約3 cmの蛙坐骨神経にair-gap法を適用してCAPを記録した。すなわち、神経の電気刺激は、2本の白金線を刺激電極とし、刺激装置を用いて1 Hzの頻度で0.1 msの持続時間を持つ矩形波パルスを与えることにより行った。一方、CAPの記録は、他の2本の白金線を記録電極とし、増幅器を用いて行った。このような刺激と記録は、坐骨神経を設置したLuciteプレートを、神経が浸らない程度の少量のリンガー液を入れて水分で飽和状態にあるビーカーに移動させて、神経が乾燥しないようにして空気中で行った。測定は30秒以内に終了させ、直ちに神経をリンガー液に戻した。このような測定を2分の時間間隔で繰り返し行った。活動電位の伝導速度(CV)の値は、5本の白金線のうちの残りの1本を使い刺激電極と記録電極の間の距離を変え、得られたCAP波形の刺激のアーチファクトからの潜時の変化と移動させた刺激電極の距離の比から求めた。CAPの振幅はベースラ

インからCAPの頂点までの長さから見積もった。

蛙の坐骨神経には、伝導速度の異なるいくつかの種類のア線維、また、それよりも約60倍遅いCVを持つC線維が含まれている¹⁰⁾。刺激電極と記録電極の間の距離を離すと、重なり合ったA線維のCAPが峰別れすることが期待されるが、使用した坐骨神経標本の長さが短いので分離したCAPに及ぼすアロマ精油成分の作用を調べられなかった¹⁰⁾。また、C線維のCAPの振幅はA線維のものより大変小さいので、C線維のCAPへの作用を検討しなかった。

3. 試薬

使用した試薬について、(+)-ボルネオール、(-)-ボルネオール、(-)-リナロール、 α -テルピネオール、シトロネロール、ゲラニオール、酢酸ゲラニルは、Sigma-Aldrich社、L-酢酸ボルニル(酢酸ボルニル)はフナコシ社、*p*-シメンは東京化成工業から購入した。すべての薬物は、まずDMSOに溶かし、その後にリンガー液に加えて使用した。DMSO自身がCAPに影響する可能性があるため、その濃度は1%以下になるようにした。1%のDMSOはCAPに影響しなかった。浸透圧変化がCAPに影響する可能性があるため、実験に使用した試薬の濃度は10 mMを最大とした。なお、試薬を溶かしたリンガー液のpHは1 N-NaOHを添加して7.0に調整した。

4. データ解析

試薬によるCAP振幅減少の濃度依存性は次のHillの式を用いて解析した。

$$\text{CAP 振幅 (コントロールの相対値)} = \frac{100}{1 + ([\text{試薬}]/\text{IC}_{50})^{\text{pH}}}$$

ここで、[試薬]は試薬の濃度、IC₅₀は試薬が

Fig.1 Cyclic alcohols, (+)-borneol and (-)-borneol, reduce the peak amplitude of compound action potential (CAP) recorded from frog sciatic nerve fibers in a concentration-dependent manner.

(A, D) The chemical structures of (+)-borneol and (-)-borneol. (B, E) (+)-Borneol and (-)-borneol (each 3 mM) reduce CAP peak amplitude. (Ba, Ea) Recordings of CAPs in the control (*left*), at 20 min after exposure to (+)-borneol or (-)-borneol (*middle*) and thereafter 50 min in the absence of (+)-borneol or (-)-borneol (*right*). (Bb, Eb) Average time course of changes in CAP peak amplitude following exposure to (+)-borneol or (-)-borneol for 20 min, relative to that before the soaking. In this and subsequent figures, each point with vertical bars represents the mean and S.E.M.; the S.E.M. of the values without a vertical bar was within the size of symbol. (C, F) CAP peak amplitude reductions produced by (+)-borneol or (-)-borneol at various concentrations. (Ca, Fa) Comparison in average time course among CAP peak amplitude reductions produced by (+)-borneol at 0.2 – 3 mM (obtained from 3 – 4 sciatic nerves at each concentration) or by (-)-borneol at 0.1 – 3 mM (3 – 4 nerves). Solid lines in (Ca) and (Fa) were arbitrarily drawn. (Cb, Fb) The peak amplitude of CAP recorded from sciatic nerve fibers treated with (+)-borneol or (-)-borneol at various concentrations for 20 min, relative to control, which was plotted against its concentration. Each of the data points was obtained from 3 – 4 sciatic nerves. These solid lines were drawn by the Hill plot [half-maximal inhibitory concentration, IC₅₀ (Hill coefficient, n_H): 1.5 mM (3.0) and 2.3 mM (2.9) in Cb and Fb, respectively].

CAP 振幅を半分減少させる濃度, n_H は Hill 係数である。データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (S.E.M.) で示し, 検定は Student の t -test により行い, $p < 0.05$ を有意と判断した。 n は調べた坐骨神経の数である。

結 果

蛙坐骨神経の CAP の振幅は電気刺激の強度の増加とともに増加し, その後一定値に達した。多くの坐骨神経から得られたこの CAP の振幅の平均値は 27.3 ± 0.6 mV ($n=122$) であった。また, それらの一部の坐骨神経で測定した CV の平均値は 28.8 ± 1.4 m/s ($n=91$) であり, これらの値は以前報告したもの^{8,9,11,15,16,18,25,26}) と同程度であった。今回, このような CAP に対するアロマ精油成分の作用を調べた。

1. 環状アルコール類の作用

環状アルコールの一つであるアロマ精油成分 (+)-ボルネオール (Fig.1-A) は, ローズマリー (*Rosmarinus officinalis*) などに多く含まれており抗菌作用を持っている²⁴)。坐骨神経を 3 mM の (+)-ボルネオールを含むリンガー液に浸すと, Fig.1-Ba に示すように, CAP の振幅は減少し, それを除去後, ほぼ完全な回復がみられた。Fig.1-Bb は, 4 本の坐骨神経から得たもので, 3 mM の (+)-ボルネオールによる CAP の振幅減少とその除去後の回復の平均値の経時変化を示している。(+) -ボルネオールに 20 分間浸した時, CAP の振幅はコントロールの $2 \pm 1\%$ ($n=4$; $p < 0.05$) まで減少した。Fig.1-Ca は 0.2~3 mM の濃度範囲の (+)-ボルネオールを含むリンガー液に浸した時の CAP 振幅の経時変

Table 1 Values of IC₅₀ for frog sciatic nerve CAP peak amplitude reduction by aroma-oil compounds and of the logarithm of their K_{ow}

Group	Compound	IC ₅₀ (mM)	log K _{ow}
Alcohols	(+)-Borneol	1.5 (3.0)	2.85
	(-)-Borneol	2.3 (2.9)	3.01
	α -Terpineol	2.7 (4.0)	2.98
	(-)-Linalool	2.0 (2.0)	–
	Citronellol	0.35 (3.1)	3.91
	Geraniol	0.53 (3.3)	3.56
Esters	($\pm$)-Linalool	1.7 (2.5)	2.97
	Bornyl acetate	0.44 (2.2)	3.86
	Geranyl acetate	0.51 (1.1)	4.04
	Linalyl acetate	0.49 (2.2)	3.93
Aldehydes	Citral	0.48 (0.73)	3.45
	Citronellal	0.50 (3.8)	3.53

Value in parentheses, next to IC₅₀, indicates n_H used to obtain the IC₅₀ value in the present work. Data of ($\pm$)-linalool, linalyl acetate, citral and citronellal were taken from Ohtsubo *et al.*¹⁸⁾.

化を示している。この振幅減少の速度は濃度の増加とともに大きくなった。Fig.1-Cb は多くの坐骨神経から得た結果をまとめたもので, 様々な濃度の (+)-ボルネオールを作用させて 20 分後の CAP 振幅の減少を示している。この減少の程度は濃度の増加とともに大きくなった。Hill プロットにより解析すると, (+)-ボルネオールの IC₅₀ 値は 1.5 mM であった (Table 1)。

(-) -ボルネオール (Fig.1-D) は, (+)-ボルネオールの光学異性体であり, (+)-ボルネオール

Fig.2 A cyclic alcohol α -terpineol and a chain alcohol $(-)$ -linalool reduce frog sciatic nerve CAP peak amplitudes in a concentration-dependent manner.

(A, D) The chemical structures of α -terpineol and $(-)$ -linalool. (B, E) α -terpineol and $(-)$ -linalool (each 2 mM) reduce CAP peak amplitude. (Ba, Ea) Recordings of CAPs in the control (*left*), at 20 min after exposure to α -terpineol or $(-)$ -linalool (*middle*) and thereafter 50 min in the absence of α -terpineol or $(-)$ -linalool (*right*). (Bb, Eb) Average time course of changes in CAP peak amplitude following exposure to α -terpineol or $(-)$ -linalool for 20 min, relative to that before the soaking. (C, F) Comparison in average time course among CAP peak amplitude reductions produced by α -terpineol at 0.2–5 mM (obtained from 3–4 sciatic nerves at each concentration) or by $(-)$ -linalool at 0.1–5 mM (3–4 nerves). Solid lines in (C) and (F) were arbitrarily drawn.

と同様にローズマリーなどに多く含まれている²⁴⁾。坐骨神経を 3 mM の $(-)$ -ボルネオールを含むリンガー液に浸すと、Fig.1-Ea に示すように、CAP の振幅は減少し、その除去後、コントロールの 9 割程度までの回復がみられた。Fig.1-Eb は、4 本の坐骨神経から得たもので、3 mM の $(-)$ -ボルネオールによる CAP

の振幅減少とその除去後の部分的回復の平均値の経時変化を示している。 $(-)$ -ボルネオールに 20 分間浸した時、CAP の振幅はコントロールの $2 \pm 2\%$ ($n=4$; $p<0.05$) まで減少した。Fig.1-Fa は 0.1–3 mM の濃度範囲の $(-)$ -ボルネオールを含むリンガー液に浸した時の CAP 振幅の経時変化を示している。この振幅減少の速度は

Fig.3 Chain alcohols, citronellol and geraniol, reduce frog sciatic nerve CAP peak amplitudes in a concentration-dependent manner.

(A, D) The chemical structures of citronellol and geraniol. (B, E) Citronellol and geraniol (each 1 mM) reduce CAP peak amplitude. (Ba, Ea) Recordings of CAPs in the control (*left*), at 20 min after exposure to citronellol or geraniol (*middle*) and thereafter 60 min in the absence of citronellol or geraniol (*right*). (Bb, Eb) Average time course of changes in CAP peak amplitude following exposure to citronellol or geraniol for 20 min, relative to that before the soaking. (C, F) Comparison in average time course among CAP peak amplitude reductions produced by citronellol at 0.05–1 mM (obtained from 3–4 sciatic nerves at each concentration) or by geraniol at 0.1–1 mM (3–6 nerves). Solid lines in (C) and (F) were arbitrarily drawn.

濃度の増加とともに大きくなった。Fig.1-Fb は多くの坐骨神経から得た結果をまとめたもので、様々な濃度の(–)-ボルネオールを作用させて20分後のCAP振幅の減少を示している。この減少の程度は濃度の増加とともに大きくなった。Hillプロットにより解析すると、(–)-ボルネオールのIC₅₀値は2.3 mMであった(Table 1)。

ユーカリ (*Eucalyptus globulus*) に含まれており鎮痛作用を持つ環状アルコールのα-テルピ

ネオール (2 mM; Fig.2-A)²²⁾ は可逆的にCAPの振幅を減少させた (Fig.2-Ba)。Fig.2-Bb は、4本の坐骨神経から得たもので、2 mMのα-テルピネオールによるCAPの振幅減少とその除去後の回復の平均値の経時変化を示している。α-テルピネオールに20分間浸した時、CAPの振幅はコントロールの79 ± 4% (n=4; p<0.05) まで減少した。Fig.2-Cは0.2~5 mMの濃度範囲のα-テルピネオールを含むリン

ガー液に浸した時の CAP 振幅の経時変化を示している。投与 20 分後の CAP 振幅の減少の大きさの濃度依存性を Hill プロットにより解析すると、 α -テルピネオール IC₅₀ 値は 2.7 mM であった (Table 1)。

2. 鎖状アルコール類の作用

以前、鎖状アルコールとして、(+)-リナロールと (-)-リナロールの混合物である (±)-リナロールの作用を調べたが¹⁸⁾、今回、入手できた (-)-リナロール (Fig.2-D) の作用を調べた。(±)-リナロールは、酢酸リナリルとともにラベンダー精油の主成分であり^{7,27)}、これらは抗炎症や鎮痛の作用を示す^{19,20)}。(-)-リナロール (2 mM) を含むリンガー液に坐骨神経を 20 分間浸すと、Fig.2-Ea に示すように、CAP の振幅は減少し、それを除去して 50 分後にはコントロールの 9 割程度までの回復がみられた。Fig.2-Eb は、4 本の坐骨神経から得たもので、2 mM の (-)-リナロールによる CAP の振幅減少とその除去後の部分的回復の平均値の経時変化を示している。(-)-リナロールに 20 分間浸した時、CAP の振幅はコントロールの $42 \pm 5\%$ ($n=4$; $p<0.05$) まで減少した。Fig.2-F は 0.1~5 mM の濃度範囲の (-)-リナロールを含むリンガー液に浸した時の CAP 振幅の経時変化を示している。投与 20 分後の CAP 振幅の減少の大きさの濃度依存性を Hill プロットにより解析すると、(-)-リナロールの IC₅₀ 値は 2.0 mM であった (Table 1)。

シトロネロールは、以前報告したシトロネラール¹⁸⁾の末端の -COH 基が -OH 基となっている鎖状アルコールである (Fig.3-A)。バラ (*Rosa*) などに多く含まれており腸管の収縮を抑制する²³⁾。シトロネロール (1 mM) を含むリンガー液に坐骨神経を 20 分間浸すと、Fig.3-

Ba に示すように、CAP は消失し、それを除去して 1 時間後にはコントロールの 7 割程度までの回復がみられた。Fig.3-Bb は、4 本の坐骨神経から得たもので、1 mM のシトロネロールによる CAP の振幅減少とその除去後の部分的回復の平均値の経時変化を示している。シトロネロールに 20 分間浸した時、CAP の振幅はコントロールの $6 \pm 2\%$ ($n=4$; $p<0.05$) まで減少した。Fig.3-C は 0.05~1 mM の濃度範囲のシトロネロールを含むリンガー液に浸した時の CAP 振幅の経時変化を示している。投与 20 分後の CAP 振幅の減少の大きさの濃度依存性を Hill プロットにより解析すると、シトロネロールの IC₅₀ 値は 0.35 mM であった (Table 1)。

ゲラニオールはシトロネロールの炭素の単結合の 1 つが二重結合になった構造を持っている鎖状アルコールである (Fig.3-D)。ゼラニウム (*Pelargonium graveolens*) やバラなどに多く含まれており腸管の収縮を抑制する^{2,23)}。ゲラニオール (1 mM) を含むリンガー液に坐骨神経を 20 分間浸すと、Fig.3-Ea に示すように、CAP は消失し、それを除去して 1 時間後にはほぼ完全な回復がみられた。Fig.3-Eb は、6 本の坐骨神経から得たもので、1 mM のゲラニオールによる CAP の振幅減少とその除去後の回復の平均値の経時変化を示している。ゲラニオールに 20 分間浸した時、CAP の振幅はコントロールの $5 \pm 3\%$ ($n=6$; $p<0.05$) まで減少した。Fig.3-F は 0.1~1 mM の濃度範囲のゲラニオールを含むリンガー液に浸した時の CAP 振幅の経時変化を示している。投与 20 分後の CAP 振幅の減少の大きさの濃度依存性を Hill プロットにより解析すると、ゲラニオールの IC₅₀ 値は 0.53 mM であった (Table 1)。

Fig.4 Esters, bornyl acetate and geranyl acetate, concentration-dependently reduce frog sciatic nerve CAP peak amplitudes in an irreversible manner.

(A, D) The chemical structures of bornyl acetate and geranyl acetate. (B, E) Bornyl acetate (1 mM) and geranyl acetate (0.5 mM) reduce CAP peak amplitude. (Ba, Ea) Recordings of CAPs in the control (*left*), at 20 min after exposure to bornyl acetate or geranyl acetate (*middle*) and thereafter 60 min in the absence of bornyl acetate or geranyl acetate (*right*). (Bb, Eb) Average time course of changes in CAP peak amplitude following exposure to bornyl acetate or geranyl acetate for 20 min, relative to that before the soaking. (C, F) Comparison in average time course among CAP peak amplitude reductions produced by bornyl acetate at 0.05 – 1 mM (obtained from 3 – 4 sciatic nerves at each concentration) or by geranyl acetate at 0.01 – 0.5 mM (3 – 4 nerves). The solid lines in (C) and (F) were arbitrarily drawn.

3. エステル類の作用

酢酸ボルニルはボルネオールの–OH基の部分が–OCOCH₃基となったエステル類である (Fig.4-A)。モミ (*Abies firma*) などに多く含まれており自律神経の働きを緩和させる^{14,28)}。酢酸ボルニル (1 mM) を含むリンガー液に坐骨神

経を20分間浸すと、Fig.4-Baに示すように、CAPの振幅は減少し、それを除去して1時間後にはコントロールの5割程度までの回復がみられた。Fig.4-Bbは、4本の坐骨神経から得たもので、1 mMの酢酸ボルニルによるCAPの振幅減少とその除去後の部分的回復の平均値の経時変化を示している。酢酸ボルニルに20

Fig.5 A hydrocarbon *p*-cymene concentration-dependently reduces frog sciatic nerve CAP peak amplitudes in an irreversible manner.

(A) The chemical structure of *p*-cymene. (B) Time course of a change in CAP peak amplitude following *p*-cymene (2 mM) treatment. (Ba) Recordings of CAPs in the control (left), at 20 min after exposure to *p*-cymene (middle) and thereafter 60 min in the absence of *p*-cymene (right). (Bb) Average time course of changes in CAP peak amplitude following exposure to *p*-cymene for 20 min, relative to that before the soaking. (C) Comparison in average time course among CAP peak amplitude reductions produced by *p*-cymene at 0.05 – 2 mM, obtained from 3 – 6 sciatic nerves at each concentration. (D) The peak amplitude of CAP recorded from sciatic nerve fibers treated with *p*-cymene at various concentrations for 20 min, relative to control, which was plotted against its concentration. Each of the data points was obtained from 3 – 6 sciatic nerves. The solid lines in (C) and (D) were arbitrarily drawn.

分間浸した時、CAPの振幅はコントロールの $36 \pm 1\%$ ($n=4$; $p<0.05$) まで減少した。Fig.4-Cは0.05~1 mMの濃度範囲の酢酸ボルニルを含むリンガー液に浸した時のCAP振幅の経時変化を示している。投与20分後のCAP振幅の減少の大きさの濃度依存性をHillプロットにより解析すると、酢酸ボルニルのIC₅₀値は0.44 mMであった (Table 1)。

酢酸ゲラニルはゲラニオールの-OH基が-OCOCH₃基となったエステル類である (Fig.4-D)。イランイラン (*Cananga odorata*) などに含まれており鎮痛作用を持っている^{3,21)}。酢酸ゲラニル (0.5 mM) を含むリンガー液に坐

骨神経を20分間浸すと、Fig.4-Eaに示すように、CAPの振幅は減少し、それを除去して1時間後にはコントロールの6割程度までの回復がみられた。Fig.4-Ebは、4本の坐骨神経から得たもので、0.5 mMの酢酸ゲラニルによるCAPの振幅減少とその除去後の部分的回復の平均値の経時変化を示している。酢酸ゲラニルに20分間浸した時、CAPの振幅はコントロールの $49 \pm 2\%$ ($n=4$; $p<0.05$) まで減少した。Fig.4-Fは0.01~0.5 mMの濃度範囲の酢酸ゲラニルを含むリンガー液に浸した時のCAP振幅の経時変化を示している。投与20分後のCAP振幅の減少の大きさの濃度依存性をHill

Fig.6 Relationship between the chemical structures of aroma-oil alcohols and their IC₅₀ values in inhibiting frog sciatic nerve CAPs.

(A, B) Chain alcohols having -OH group at the end of the structures (A: citronellol and geraniol) and at the other positions (B: (-)-linalool and (±)-linalool). (C) Cyclic alcohols ((+)-borneol, (-)-borneol and α-terpineol). Values in parentheses indicate IC₅₀ values. The value for (±)-linalool was taken from our previous study¹⁸⁾.

プロットにより解析すると、酢酸ゲラニルの IC₅₀ 値は 0.51 mM であった (Table 1)。

4. 炭化水素類の作用

我々は、以前、炭化水素類に属するアロマ精油成分のミルセンやリモネンは CAP にほとんど作用しないことを明らかにしている^{9,18)}。今回、クミン (*Cuminum cyminum*) やタイム (*Thymus vulgaris*) などのアロマ精油に含まれており、鎮痛作用を持つ炭化水素類 *p*-シメン (Fig.5-A)²¹⁾ が CAP に及ぼす作用を調べた。*p*-シメン (2 mM) を含むリンガー液に坐骨神経を 20 分間浸したところ CAP のわずかな抑制がみられ、その除去後、CAP 抑制からの部分的な回復がみられた (Fig.5-Ba)。Fig.5-Bb は、6 本の坐骨神経から得たもので、2 mM の *p*-シメンによる CAP の振幅減少とその除去後の部分的回復の平均値の経時変化を示している。*p*-シメンに 20 分間浸した時、CAP の振幅はコントロールの $78 \pm 2\%$ ($n=6$; $p<0.05$) まで減

少した。Fig.5-C, D は 0.05~2 mM の濃度範囲の *p*-シメンを含むリンガー液に浸した時の CAP 振幅の経時変化と 20 分後の CAP 振幅の減少の大きさを示している。

考 察

本研究は、アロマ精油成分による神経伝導抑制の構造活性連関を知るために、その様々な化学構造を持つものが蛙坐骨神経の A 線維に由来する CAP に及ぼす作用を調べた。その結果、環状アルコール類 ((+)-ボルネオール, (-)-ボルネオール, α-テルピネオール), 鎖状アルコール類 ((-)-リナロール, シトロネロール, ゲラニオール) およびエステル類 (酢酸ボルニル, 酢酸ゲラニル) が CAP 振幅を減少させ、それらの IC₅₀ 値は、それぞれ 1.5 mM, 2.3 mM, 2.7 mM, 2.0 mM, 0.35 mM, 0.53 mM, 0.44

mM, 0.51 mM であることがわかった。これらの抑制作用は、アロマ精油成分の種類により可逆的あるいは不可逆的であったが、これらの精油成分除去後の回復の程度の違いは蛙坐骨神経組織への精油成分の親和性の差によるのであろう。一方、炭化水素類 (*p*-シメン) は 2 mM の濃度で約 20% しか CAP の振幅を減少させなかった。以上より、CAP 抑制の序列は、エステル類 $\geq$ アルコール類 $>$ 炭化水素類であることが明らかになった。これは、以前報告した序列¹⁸⁾ であるフェノール類 $\geq$ アルデヒド類 $\geq$ エステル類 $>$ アルコール類 $>$ ケトン類 $>$ オキサイド類 $\gg$ 炭化水素類に含まれていた。つまり、CAP 抑制のためにはエステル基やヒドロキシル基 (アルコール類) が重要であることが確かめられた。

以上のアルコール類の IC₅₀ 値については、0.35~2.7 mM の範囲でバラツキが大きかった。このため、アルコール類の化学構造と CAP 抑制の IC₅₀ 値の間に関係があるかどうかを検討した。その結果、Fig.6 で示すように、環状アルコールよりも鎖状アルコールの方が、鎖状アルコールの中でも -OH 基がその構造の端に付いている方がそうでないものよりも IC₅₀ 値が小さい傾向があることが明らかになった。このことは、メントールの環が開き、かつ -OH 基がその構造の端に付いているテトラヒドロラバンズロールの方がメントールよりも大きな CAP 抑制を示す結果と一致している¹⁵⁾。アルコール類と異なり、エステル類では、その構造が鎖状であるか環状であるかは、CAP に及ぼす作用に影響しないようであった。すなわち、Fig.4 と Table 1 から気付かれるように、環状構造の酢酸ボルニルと鎖状構造の酢酸ゲラニルはほぼ同じ IC₅₀ 値を持っていた。

(-) -リナロールの IC₅₀ 値 (2.0 mM) は、以前

Fig.7 A relationship between the IC₅₀ for CAP inhibition produced by aroma-oil compound and the logarithm of its octanol-water partition coefficient (K_{ow}).

Here, are plotted data of aroma-oil compounds whose K_{ows} are available from ChemIDplus⁵⁾ (see Table 1). The straight line drawn through the data points is the least squares regression line (correlation coefficient: 0.67).

報告した (±) -リナロールの IC₅₀ 値 (1.7 mM)¹⁸⁾ に近く、また、(+) -ボルネオールと (-) -ボルネオールの IC₅₀ 値はそれほど異なっていなかった。つまり、リナロールとボルネオールのそれぞれで、光学異性体間で伝導抑制作用にそれほど差はみられなかった。

-OH 基が構造の端についた鎖状アルコール類やエステル類の CAP 抑制の IC₅₀ 値は、局所麻酔薬であるリドカイン、ロピバカイン、コカインおよびレボブピバカインのもの (それらの IC₅₀ 値は、それぞれ 0.74 mM, 0.34 mM, 0.80 mM, 0.23 mM)^{8,16,25,26)} にほぼ等しかった。すなわち、これらの値は、皮膚塗布により局所麻酔作用を示すことで知られているラベンダー精油の成分 (酢酸リナリルとリナロール) の値に匹敵していた^{7,29)}。つまり、鎖状アルコールやエステルの成分を含むアロマ精油はラベンダー精油と同程度の局所麻酔効果を持つ可能性が示唆される。

アロマ精油成分はいずれも脂溶性であることより、CAP の抑制は細胞膜の脂質層への作用

による可能性がある。この点を検討するために、Fig.7で示すように、アロマ精油成分によるCAP振幅の減少の大きさと、その成分の脂溶性の目安であるオクタノール-水分配係数の間の関係を調べた。その結果、両者の間に強い相関がみられないことがわかった。つまり、アロマ精油成分によるCAP抑制は、その脂溶性とは無関係であることが明らかになった。

蛙坐骨神経のCAPが電位作動性Na⁺チャンネルの活性化を介していることは、そのTTX感受性から明らかである^{8,16)}。リナロールをはじめとする多くのアロマ精油成分が電位作動性Na⁺チャンネルを抑制することから、その成分によるCAP抑制はNa⁺チャンネルの抑制によることが考えられる^{6,13,17)}。

結 語

アロマ精油成分によるCAP抑制にその特異的な化学構造が重要であることが確かめられた。その抑制の大きさとアロマ精油成分の脂溶性を比較したところ、それらの間で強い相関がなかった。アロマ精油による局所麻酔あるいは鎮痛の作用に活動電位の伝導抑制が寄与していると考えられるが、本研究で明らかになった結果は、より有効な作用を持つアロマ精油成分を知るのに役立つかもしれない。

文 献

- 1) Almeida, R.N., Navarro, D.S., Barbosa-Filho, J.M., Plants with central analgesic activity, *Phytomedicine*, 8 (2001) 310–322.
- 2) Banthorpe, D.V., Le Patourel, G.N.J., Francis, M.J.O., Biosynthesis of geraniol and nerol and their β -D-glucosides in *Pelargonium grave-*
- 3) olens and *Rosa dilecta*, *Biochem. J.*, 130 (1972) 1045–1054.
- 3) Brokl, M., Fauconnier, M.-L., Benini, C., Lognay, G., du Jardin, P., Focant, J.-F., Improvement of ylang-ylang essential oil characterization by GC $\times$ GC-TOFMS, *Molecules*, 18 (2013) 1783–1797.
- 4) Buchbauer, G., Jirovetz, L., Aromatherapy — use of fragrances and essential oils as medications, *Flavour Frag. J.*, 9 (1994) 217–222.
- 5) ChemIDplus [Internet] Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Available from: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>
- 6) de Araújo, D.A.M., Freitas, C., Cruz, J.S., Essential oils components as a new path to understand ion channel molecular pharmacology, *Life Sci.*, 89 (2011) 540–544.
- 7) Ghelardini, C., Galeotti, N., Salvatore, G., Mazzanti, G., Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*, *Planta Med.*, 65 (1999) 700–703.
- 8) Katsuki, R., Fujita, T., Koga, A., Liu, T., Nakatsuka, T., Nakashima, M., Kumamoto, E., Tramadol, but not its major metabolite (mono-O-demethyl tramadol) depresses compound action potentials in frog sciatic nerves, *Br. J. Pharmacol.*, 149 (2006) 319–327.
- 9) Kawasaki, H., Mizuta, K., Fujita, T., Kumamoto, E., Inhibition by menthol and its related chemicals of compound action potentials in frog sciatic nerves, *Life Sci.*, 92 (2013) 359–367.
- 10) Kobayashi, J., Ohta, M., Terada, Y., C fiber generates a slow Na⁺ spike in the frog sciatic nerve, *Neurosci. Lett.*, 162 (1993) 93–96.
- 11) Kosugi, T., Mizuta, K., Fujita, T., Nakashima, M., Kumamoto, E., High concentrations of dexmedetomidine inhibit compound action potentials in frog sciatic nerves without α_2 adrenoceptor activation, *Br. J. Pharmacol.*, 160 (2010) 1662–1676.
- 12) Kumamoto, E., Mizuta, K., Fujita, T., Peripheral nervous system in the frog as a tool to examine the regulation of the transmission of neuronal information. In: J.L. Murray (Ed.), *Frogs: Biology, Ecology and Uses*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2012, pp89–106.
- 13) Leal-Cardoso, J.H., da Silva-Alves, K.S., Ferreira-da-Silva, F.W., dos Santos-Nascimento, T., Joca, H.C., de Macedo, F.H.P., de Albuquerque-Neto, P.M., Magalhães, P.J.C., Lahlou, S., Cruz, J.S., Barbosa, R., Linalool blocks excitability in peripheral nerves and voltage-dependent Na⁺ current in dissociated

- dorsal root ganglia neurons, *Eur. J. Pharmacol.*, 645 (2010) 86–93.
- 14) Matsubara, E., Fukagawa, M., Okamoto, T., Ohnuki, K., Shimizu, K., Kondo, R., (–)-Bornyl acetate induces autonomic relaxation and reduces arousal level after visual display terminal work without any influences of task performance in low-dose condition, *Biomed. Res.*, 32 (2011) 151–157.
 - 15) Matsushita, A., Ohtsubo, S., Fujita, T., Kumamoto, E., Inhibition by TRPA1 agonists of compound action potentials in the frog sciatic nerve, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 434 (2013) 179–184.
 - 16) Mizuta, K., Fujita, T., Nakatsuka, T., Kumamoto, E., Inhibitory effects of opioids on compound action potentials in frog sciatic nerves and their chemical structures, *Life Sci.*, 83 (2008) 198–207.
 - 17) Narusuye, K., Kawai, F., Matsuzaki, K., Miyachi, E., Linalool suppresses voltage-gated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells, *J. Neural. Transm.*, 112 (2005) 193–203.
 - 18) Ohtsubo, S., Fujita, T., Matsushita, A., Jiang, C.-Y., Kumamoto, E., Inhibitory actions of aroma-oil chemicals on compound action potentials in the frog sciatic nerve, *Pain Res.*, 29 (2014) 17–30.
 - 19) Peana, A.T., D'Aquila, P.S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., Moretti, M.D.L., Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils, *Phytomedicine*, 9 (2002) 721–726.
 - 20) Peana, A.T., de Montis, M.G., Nieddu, E., Spano, M.T., D'Aquila, P.S., Pippia, P., Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (–)-linalool, *Eur. J. Pharmacol.*, 485 (2004) 165–174.
 - 21) Quintans-Júnior, L., Moreira, J.C.F., Pasquali, M.A.B., Rabie, S.M.S., Pires, A.S., Schröder, R., Rabelo, T.K., Santos, J.P.A., Lima, P.S.S., Cavalcanti, S.C.H., Araújo, A.A.S., Quintans, J.S.S., Gelain, D.P., Antinociceptive activity and redox profile of the monoterpenes (+)-camphene, *p*-cymene, and geranyl acetate in experimental models, *ISRN Toxicol.*, 2013 (2013) 459530.
 - 22) Quintans-Júnior, L.J., Oliveira, M.G.B., Santana, M.F., Santana, M.T., Guimarães, A.G., Siqueira, J.S., de Sousa, D.P., Almeida, R.N., α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice, *Pharm. Biol.*, 49 (2011) 583–586.
 - 23) Sadraei, H., Asghari, G., Emami, S., Inhibitory effect of *Rosa damascena* Mill flower essential oil, geraniol and citronellol on rat ileum contraction, *Res. Pharm. Sci.*, 8 (2013) 17–23.
 - 24) Tavassoli, S.K., Mousavi, S.M., Emam-Djomeh, Z., Razavi, S.H., Chemical composition and evaluation of antimicrobial properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil, *Afr. J. Biotechnol.*, 10 (2011) 13895–13899.
 - 25) Tomohiro, D., Mizuta, K., Fujita, T., Nishikubo, Y., Kumamoto, E., Inhibition by capsaicin and its related vanilloids of compound action potentials in frog sciatic nerves, *Life Sci.*, 92 (2013) 368–378.
 - 26) Uemura, Y., Fujita, T., Ohtsubo, S., Hirakawa, N., Sakaguchi, Y., Kumamoto, E., Effects of various antiepileptics used to alleviate neuropathic pain on compound action potential in frog sciatic nerves: comparison with those of local anesthetics, *Biomed. Res. Int.*, 2014 (2014) 540238.
 - 27) Umez, T., Nagano, K., Ito, H., Kosakai, K., Sakaniwa, M., Morita, M., Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 85 (2006) 713–721.
 - 28) Yatagai, M., Sato, T., Terpenes of leaf oils from conifers, *Biochem. Syst. Ecol.*, 14 (1986) 469–478.
 - 29) Zalachoras, I., Kagiava, A., Vokou, D., Theophilidis, G., Assessing the local anesthetic effect of five essential oil constituents, *Planta Med.*, 76 (2010) 1647–1653.

Address for correspondence: Eiichi Kumamoto
 Department of Physiology, Saga Medical School
 Nabeshima 5-1-1, Saga 849-8501, Japan
 Tel: 0952-34-2273 / Fax: 0952-34-2013
 E-mail: kumamote@cc.saga-u.ac.jp