

ハーブ精油の血小板凝集抑制能

茅原 紘・中川賢司・只左弘治・林 俊英*

米田公生*・武藤紀生*・中川博司*

信州大学農学部生物資源科学科生物制御化学講座

Effect of Herb Oils on Platelet Aggregation

Hiroshi KAYAHARA, Kenshi NAKAGAWA, Koji TADASA,

Toshihide HAYASHI*, Kimio YONEDA*,

Norio MUTOU* and Hiroshi NAKAGAWA*

Division of Bio-Organic Chemistry, Department of Bioscience and Biotechnology,
Faculty of Agriculture, Shinshu University

Summary

Essential oils and their constituents were investigated for their effect on the platelet aggregation. Among them, basil, geranium, jasmine, peppermint and rosewood oil showed remarkably suppressive effects on platelet aggregation induced by arachidonic acid.

Juniper and neroli oil have also fairly high effect. Further, among the constituents, carvacrol and eugenol had higher suppressive potencies than others.

(Jour. Fac. Agric. Shinshu Univ. 33: 1-8, 1996)

Key words: herb essential oil, inhibition of platelet aggregation, arachidonic acid, prostaglandin, thromboxane, aromatherapy

緒 言

生体内では、図 1¹⁾に示すように、アラキドン酸からプロスタグランジン (PG)、トロンボキサン (TX)、ロイコトリエン (LT) という 3 群の生体機能調節物質が生合成されるが、各臓器、血球などで特徴的に産生される物質が決まっている。血小板においては、12-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸 (12-HPETE) と TXA₂ が主に生合成される。特に TXA₂ は血漿中ではきわめて寿命の短い物質であるが、血小板凝集を強力に惹起する性質を持っていて、血栓症および動脈硬化症の進展の過程において重要な促進因子の一つと考えられており、それらの疾患を持つ患者においては、TXA₂ 生産が亢進している。また TXA₂ と

1996年4月30日 受理

* (株)イナ リサーチ, 長野県伊那市

INA Research, Co.Ltd., Ina Nagano

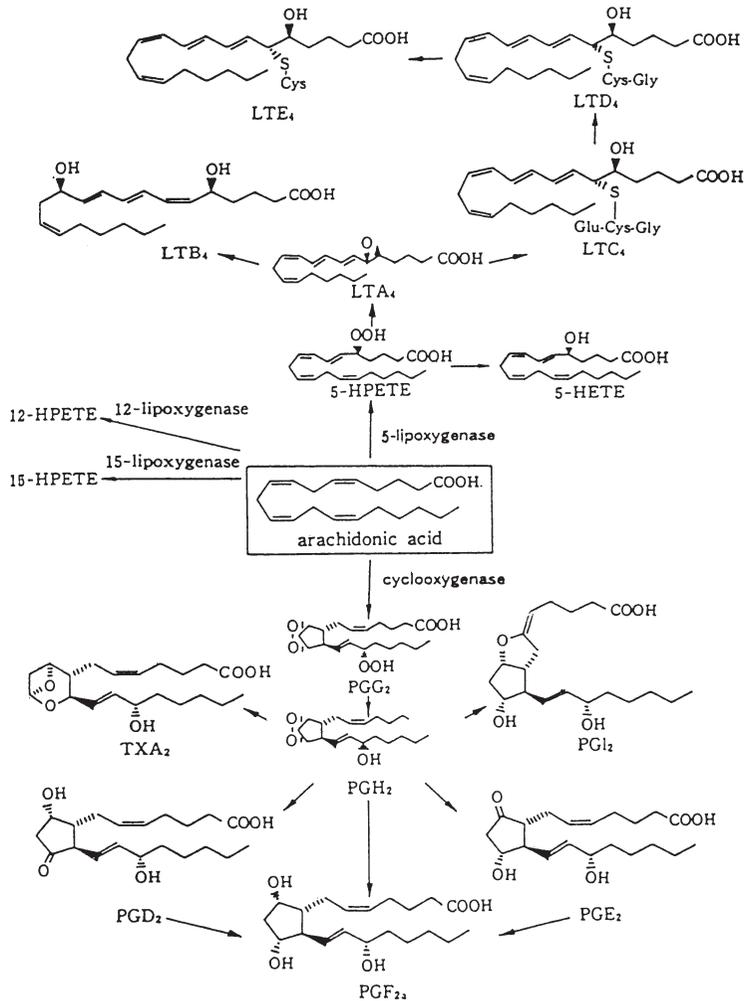


図1 アラキドン酸カスケード

まったく相反する生理作用を示す PGI₂ が血管の内皮細胞で生合成される。一方、リポキシゲナーゼ活性が高い血球や単球などにより、アラキドン酸はヒドロペルオキシ酸 (HPETE)、ヒドロキシ酸 (HETE)、LT に変換される。特に、LT は生体異物に対する防御機構の情報伝達、生理活性物質として働いているが、一度その制御を失うと例えばアレルギー、炎症、喘息などの重大な疾病を引き起こす。

手始めに本研究では血小板凝集阻害物質に絞って検索を行った。阻害活性試験としてアラキドン酸、プロスタグランジン G₂ (PGG₂)、TXA₂ それぞれによって惹起された兎血小板の凝集反応に対する被験物質の阻害能を測定した。

材料及び実験方法

1. 実験材料：市販されているハーブの中で血液および循環器系に対して何らかの効果があるとされているハーブ類を使用した。

2. 血小板凝集抑制能の測定方法：最初に多血小板血漿 (PRP) と乏血小板血漿 (PPP) を兔血液より以下の様に分離した。あらかじめシリンジに3.8%クエン酸ナトリウムを1ml入れ、続いて兔の耳 (耳介動脈) から9ml採血して混合した凝固阻止血を150Gで10分間遠心分離し、上澄液のPRPを分離した後、下層を2100Gで10分間さらに遠心分離し、その上澄液のPPPを分離した。PRPの血小板数を自動血球計数装置 (東亜 Sysmex CC-180A) を用いて計測し、PPPにて約 $30 \times 10^4 / \mu\text{l}$ となる様に調整した後、実験に用いた。

実際の測定は比濁法²⁾を応用して、以下のように行った。被験物質を5%エタノール水溶液中に懸濁させた後、30秒間超音波洗浄し、2本の専用キュベットに、それぞれ10 μl ずつ加え、一方にはPRPを、もう一方にはブランクとしてPPPをそれぞれ90 μl ずつ加え、血小板凝集計 (NBS HEMA TRACER 601) を用いて解析した。まずブランクの透光度を測定し、その値を血小板凝集率100%の時の値として設定した後、PRPを加えた被験物質の吸光度を凝集率0%の値として設定し、そこに惹起物質 (濃度は後記) 11 μl を加え、凝集率の変化を凝集曲線で観察した。そしてコントロールの凝集率との比較によって被験物質の血小板凝集抑制能を算出した。

血小板凝集抑制能の判定方法であるが、凝集曲線は一般に凝集率60から80%にピークがあり、やがて横這い状態となるが、被験物質が抑制能を有する場合、ピーク時の凝集抑制ばかりでなく、ピーク後の凝集の解離の増大が見られる場合がある。従って抑制能の判定として以下の3つの指標を設けた。

- 1) コントロールと被験物質とのピークの比較：被験物質添加時のピーク時における抑制率を I_{Max} 、コントロールにおけるピークの値を C_{Max} 、被験物質添加時におけるピークの値を S_{Max} として

$$I_{\text{Max}} = \frac{C_{\text{Max}} - S_{\text{Max}}}{C_{\text{Max}}} \times 100 (\%)$$

- 2) 凝集開始から5分時の凝集抑制率：被験物質添加後5分時における抑制率を $I_{5\text{min}}$ 、コントロールにおける5分時の値を $C_{5\text{min}}$ 、被験物質添加後5分時の値を $S_{5\text{min}}$ として

$$I_{5\text{min}} = \frac{C_{5\text{min}} - S_{5\text{min}}}{C_{5\text{min}}} \times 100 (\%)$$

- 3) ピークから5分時までの被験物質による凝集の解離率をコントロールと比較：被験物質添加時の凝集解離率を Dd として

$$Dd = \left\{ \frac{S_{\text{Max}} - S_{5\text{min}}}{S_{\text{Max}}} - \frac{C_{\text{Max}} - C_{5\text{min}}}{C_{\text{Max}}} \right\} \times 100 (\%)$$

また、被験物質の抑制能が非常に強く、5分時またはピーク時ともに凝集率が0%以下の場合、ピーク時の凝集率と5分時の凝集率のみ算出した。

表1 アラキドン酸によって惹起された血小板凝集に対する
ハーブ油の抑制能

Sample name	Inhibition at the point of 'maximum' (%)	Inhibition at the point of '5min' (%)	Degree of dissociation (%)
Angelica	0	0	0
Basil	93.6	102.7	—
Camphor	3.7	0	0
Eucaryptus	12.9	14.6	1.7
Geranium	106.4	109.6	—
Jasmine	109.7	111.3	—
Juniper	75.6	78.1	0
Lavender	0	0	1.4
Mandarin	0	0	0
Neroli	30.6	60.0	37.5
Peppermint	105.9	106.2	—
Rosemary	19.4	—	—
Rosewood	92.6	100.0	—

表2 アラキドン酸によって惹起された血小板凝集に対する
ハーブ精油成分の抑制能

Sample name	Inhibition at the point of 'maximum' (%)	Inhibition at the point of '5min' (%)	Degree of dissociation (%)
Carvacrol	105.6	118.5	—
Citral	0	0	0
Cuminaldehyde	3.2	0	0
Citroneral	0	0	0
Citronerol	9.3	54.8	22.2
Eugenol	102.6	102.7	—
Geraniol	0	6.8	6.6
Jasmone	47.1	75.4	49.7
Limonene	0	0	0
Linalool	7.7	6.8	0
Menthol	0	16.7	18.5
Menthone	0	0	0
Nerol	23.5	40.0	21.0
Nerolidol	15.4	17.8	0
Terpineol	0	0	0

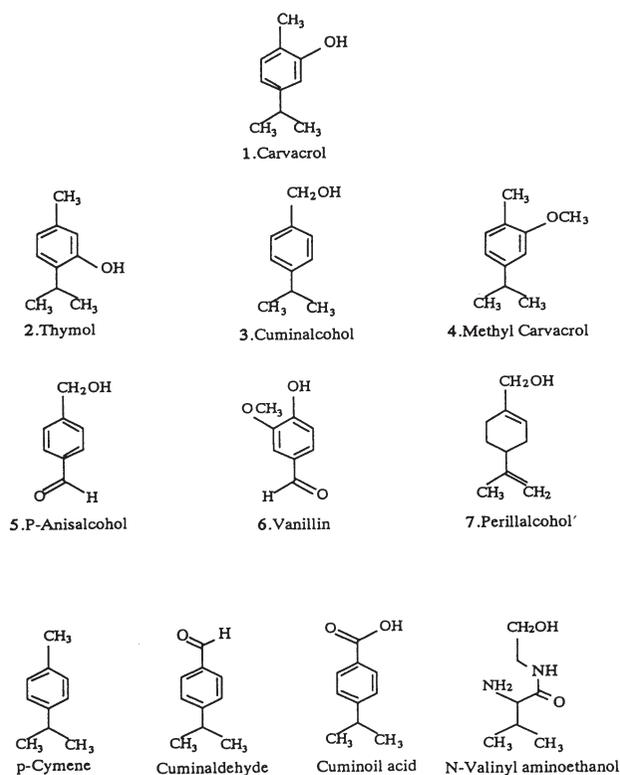


図2 カルバクロールとその類縁物質の構造

表3 アラキドン酸によって惹起された血小板凝集に対するカルバクロール類縁体の抑制能

Sample name	Inhibition at the point of 'maximum' (%)	Inhibition at the point of '5min' (%)	Degree of dissociation (%)	IC ₅₀ (μM)
Anis alcohol	51.9	75.6	51.4	
Cuminalcohol	101.3	112.3	—	79.0
Cuminic acid	6.5	0	0	
Cuminoyl-Gly-OH	4.8	0	0	
p-Cymene	8.3	0	0	
Gallic acid	8.3	0	0	
Methyl carvacrol	82.2	97.7	—	101.0
Perillic acid	6.2	7.2	0	
Perillaalcohol	30.6	52.7	28.2	
Perillaaldehyde	3.2	0	0	
Thymol	116.1	117.7	—	41.5
N-Valinyl aminoethanol	8.3	0	0	
Vanillin	49.3	75.6	44.0	

表4 プロスタグランジン G₂ によって惹起された血小板凝集に対するカルバクロールとその類縁体の抑制能

Sample name	Inhibition at the point of 'maximum' (%)	Inhibition at the point of '5min' (%)	Degree of dissociation (%)
Carvacrol	23.1	15.0	4.3
Cuminalcohol	0	25.0	0
Thymol	28.5	0	0

表5 トロンボキサン A₂ によって惹起された血小板凝集に対するカルバクロールとその類縁体の抑制能

Sample name	Inhibition at the point of 'maximum' (%)	Inhibition at the point of '5min' (%)	Degree of dissociation (%)
Carvacrol	0	0	0
Cuminalcohol	0	0	0
Thymol	0	0	0

結 果

1) アラキドン酸によって惹起された兎血小板の凝集反応に対するハーブ精油の抑制能：アラキドン酸の最終濃度（調整濃度の1/10）を750 μ M、ハーブ精油をすべて濃度200 μ g/mlとした時の抑制能を測定した結果を表1に示した。バジル、ゲラニウム、ジャスミン、ペパーミント及びローズウッドに顕著な抑制能が観察され、ジュニパー及びネロリもかなり高い抑制能を持っていることが判った。つぎに今回の実験で活性の高かった上記7種類のハーブ精油主成分の抑制能の測定結果を表2に示す。最終濃度についてはアラキドン酸を750 μ M、被験物質をオイゲノール（0.75 μ M）を除き、すべて750 μ Mとした。その結果、カルバクロール（バジル及びペパーミントの成分）、オイゲノール（ゲラニウム及びジャスミンの成分）及びジャスモン（ジャスミン、ネロリ及びペパーミントの成分）に顕著な抑制能が観察された。さらに構造と活性の相関関係を調べる目的でカルバクロール類縁体（図2）について同様に抑制能を測定して、表3の結果を得た。クミンアルコール、チモール、に顕著な抑制能が見られ、アニスアルコール、メチルカルバクロール、ペリラルアルコール、バニリンにもかなりの阻害能を観察した。

2) PGG₂及びTXA₂によって惹起された兎血小板の凝集反応に対するカルバクロール及び類縁物質の抑制能：PGG₂及びTXA₂の濃度を150 μ M、被験物質についても濃度を150 μ Mに固定して、抑制能を測定し表4、5の結果を得た。表5をみる限りにおいては、いずれの物質もTXA₂にはまったく作用していないことが判った。

考 察

ハーブ精油の代表的な用途の一つとして、最近、日本でも芳香療法（アロマセラピー）が注目される様になってきた。そしてハーブ類の生理作用のデータの報告も盛んに行われているが、本論文で扱った血小板凝集抑制能に関する報告はほとんど見当たらない。

今回取り扱ったハーブはほんの僅かであるが、血液及び循環器系に有効とされているハーブに絞って血小板凝集抑制能を測定した結果、バジル、ゲラニウム、ジャスミン、ペパーミントオイル等に顕著な抑制能が観察され、またジュニパーやネロリもかなりの抑制能を有することが判った。更にハーブ精油成分の中で、オイゲノール及びカルバクロールに強い抑制能が観察され、特にオイゲノールは $0.75\mu\text{M}$ の濃度で完全に抑制した。オイゲノールやカルバクロールなどのいわゆるフェノール系化合物は速やかに皮膚や粘膜表面から体内に吸収されることが知られており、血小板凝集抑制を期待したアロマセラピーのためのハーブの選択にも有効と考えられる。

次に、血小板凝集抑制活性と構造の相関関係を考察した結果、以下のような知見を得た。つまり、抑制能の発現には、化合物の構造中に

- 1) 水酸基が存在すること。
- 2) 水酸基はアルコール性よりも、フェノール性水酸基として存在するほうが有効。
- 3) イソプロピル基が存在すること。

最後に、アラキドン酸カスケードのどの段階を被験物質が作用している可能性があるかを考察した。表5を見る限り、 TXA_2 にはまったく作用しておらず、表4ではいずれも若干の活性は認められるものの、アラキドン酸に対する作用に比べあきらかに抑制能は減少している。以上の事から、被験物質は抗炎症剤として知られるアスピリンやインドメタシンの作用と同様にシクロオキシゲナーゼの活性を抑制しているか、またはアラキドン酸に直接作用している可能性もあるが、これらは今後の課題である。

要 約

アラキドン酸 (AA) のシクロオキシゲナーゼ系代謝産物の一つであるトロンボキサン A_2 (TXA_2) は、血栓症や動脈硬化症の発症に深く関与している事が知られており、近年、 TXA_2 生合成の選択的抑制についての研究が多くなされる様になって、天然物及び合成物から活性物質が見いだされてきた。しかしハーブ類に関するこの種の研究はほとんどなされていない。本実験では従来ハーブの中で血液及び循環器系に対して何らかの効果があるとされているハーブ13種類を選出し、主として AA によって惹起される血小板凝集の抑制能を調べた。その結果、バジル、ゲラニウム、ジャスミン、ペパーミント及びローズウッドに顕著な抑制能が観察され、ジュニパー及びネロリもかなり高い阻害能を有する事が判った。更に、ハーブ精油成分について抑制能を調べた結果、オイゲノール及びカルバクロールに強い抑制能が見られ、特にオイゲノールは $0.75\mu\text{M}$ の濃度で完全に抑制した。最後に、被験物質がアラキドン酸カスケードのどの段階に作用しているかを調べた結果、シクロオキシゲナーゼの

活性を抑制しているか、またはアラキドン酸に直接作用している可能性を示唆する結果を得た。

本研究は最近特に注目されだした芳香療法（アロマセラピー）の分野において、血栓症や動脈硬化症の予防および治療³⁾を目的としてハーブの種類を選択する際の指針を提供するものとする。

キーワード：ハーブ精油，血小板凝集抑制能，アラキドン酸，プロスタグランジン，トロンボキサン，芳香療法

参考文献

- 1) 森光康次郎・川岸舜郎. 1993. 食用植物中の抗血小板・抗炎症物質について. 食品工業：37—45.
- 2) 寺田秀夫. 血液凝固・線溶系検査——血小板凝集能. 1985. 日本臨床（増刊）：43巻，680—687.
- 3) 平井愛山. 1994. 和漢生薬の抗血栓・抗動脈硬化作用とその機序の解明——とくにアラキドン酸カスケードを中心に. 11巻，16—28.