

マウスにおけるデスモプレシン誘発水分貯留に対する香り成分の作用

森元康夫,* 柴田裕次郎

Effects of Various Fragrant Ingredients on Desmopressin-induced Fluid Retention in Mice

Yasuo MORIMOTO* and Yujiro SHIBATA

Kampo Research Laboratories, Kracie Pharma, Ltd., Kanebo-machi 3-1, Takaoka, Toyama 933-0856, Japan

(Received January 15, 2010; Accepted March 6, 2010)

Although fragrances are often used in aromatherapy for the treatment of edema, few studies on their diuretic and/or antiedematous activities have been performed. In this study, the effects of four types of fragrant ingredients (*d*-limonene, piperitone, α -pinene, and cinnamaldehyde) were examined in a mouse model of fluid retention. The mice were loaded with water after treatment with desmopressin (an antidiuretic hormone). In addition, zingerone, a pungent component of ginger which is considered to be effective in the treatment of edema, was examined. Moreover, their effects were compared with those of furosemide, a representative diuretic. Among the five types of fragrant ingredients examined, all except for cinnamaldehyde increased the urine volume in the fluid retention mouse model when administered at a dose of 100 mg/kg. In particular, *d*-limonene and zingerone significantly increased the urine volume. Thus the effects of these two ingredients were further examined at lower doses of 10 and 30 mg/kg. *d*-Limonene significantly increased the urine volume in a dose-dependent manner. Zingerone resulted in a significant increase in the urine volume only at a dose of 30 mg/kg. In normal mice, *d*-limonene did not affect the urine volume at the same doses. In contrast, zingerone significantly increased the urine volume in normal mice at a dose of 30 mg/kg. Furosemide significantly increased the urine volume in both the fluid-retentive and normal mice. These results indicate that both *d*-limonene and zingerone exhibit diuretic actions; however, the former fragrance only exerted an action in the fluid-retentive state. This different action suggests that *d*-limonene might be promising for the treatment of edema.

Key words—fragrance; desmopressin; fluid retention; limonene; zingerone

緒 言

人間の体の約60%は水分で占められている。体内水分は細胞内液と、血液や組織間液などの細胞外液として存在し、これらの比率はほぼ2:1とされている。むくみ（浮腫）とは、このうちの細胞外液が組織間に貯留した状態のことである。むくみの原因には、毛細血管からの水分の透過性亢進、毛細血管の血圧上昇、血中タンパク質濃度の低下などが考えられるが、これらはアレルギー、炎症、心機能低下、腎障害、肝硬変などの疾患に由来する場合のほか、妊娠により起きる場合もある。¹⁾

むくみは、一過性で自然に解消することもあれば、長期間持続する場合もある。後者の場合は、むくみが原因で前述のような原疾患が悪化したり、さらに別の疾患を誘発する可能性があるため、しばし

ば貯留した水分を薬物によって強制的に体外に排出させる治療を行う必要がある。この場合の薬物として代表的なものは利尿薬である。しかし、利尿薬は作用が強く、正常状態でも水分を排出させるため、投与の時期や用量が不適切であれば、貯留分以上に水分を過剰に排出させる恐れがある。したがって、むくみ治療においては水分が貯留した場合にのみ、それを体外に排出させるような薬物が理想的と考えられる。

香りの中には利尿作用を有するとされるものがあり、これらを吸入したり、塗布することによって、いわゆる「アロマセラピー」としてむくみ治療などに用いられている。例えば、アロマセラピーでむくみ治療や局所痩身などに用いられている香りとしては、グレープフルーツ (*Citrus paradisi*)、レモン (*Citrus limon*)、ユーカリ・ディベス (*Eucalyptus dives*)、サイプレス (*Cupressus sempervirens*)、ジュニパー・ベリー (*Juniperus communis*)、ケイヒ

クラシエ製薬株式会社漢方研究所

*e-mail: morimoto@phm.kracie.co.jp

(*Cinnamomum cassia*) などがある。^{2,3)} これらの香りについては、効果は穏やかであるが、副作用もほとんどないと予想されるため、それらを用いた治療には安全に長期間実施できるなどのメリットが期待される。しかし、これらの香りの利尿作用やむくみ改善作用については十分には確認されていない。そこで今回、グレープフルーツやレモンの香り成分である *d*-リモネン、ユーカリ・ディベスの香り成分のピペリトン、サイプレスやジュニパー・ベリーの香り成分の α -ピネン及びケイヒの香り成分のケイヒアルデヒドの4種類の成分を選び、マウスを用いて正常状態及び水分貯留状態での尿量に対する作用を検討した。なお、ショウガ (*Zingiber officinale*) はラットにおいて compound 48/80 やセロトニンによる足及び皮膚の浮腫を抑制することが報告されている。⁴⁾ そこで、ショウガの辛味成分であるジンゲロンの作用も併せて検討するとともに、これらの成分と利尿薬のフロセミドとの比較も行った。

方 法

1. 使用動物 ddY 系雄性マウス (日本 SLC, 浜松) を4週齢で購入し、1週間の予備飼育後実験に使用した。動物は温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、8時点灯、20時消灯の条件下で飼育した。なお、実験はクラシエ製薬漢方研究所動物実験委員会の承認のもと、同研究所の定める動物実験実施規程及び「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に則って実施された。

2. 使用薬物 酢酸デスマプレシンはデスマプレシン点鼻液 (協和発酵キリン, 東京) を生理食塩液で希釈して用いた。*d*-リモネン、ピペリトン、 α -ピネン、ケイヒアルデヒド (以上、高砂香料, 東京)、ジンゲロン (ジボダン・ジャパン, 東京) 及びフロセミド (和光純薬, 大阪) は、いずれも 0.5% Tween 80 水溶液に懸濁して調製した。

3. 水分貯留マウスに対する作用 水分貯留モデルは大西らの方法⁵⁾ に従い、マウスに抗利尿ホルモン (バソプレシン) のアナログであるデスマプレシン (1-デアミノ-8-D-アルギニン バソプレシン) を投与し、さらに水を負荷することで作製した。すなわち、水を自由に摂取できる条件下でマウスを2時間絶食させた後、酢酸デスマプレシン ($5 \mu\text{g}/10 \text{ ml/kg}$) を腹腔内投与した。その30分後に 90 ml/

kg の生理食塩液を腹腔内投与し、さらにその90分後に各種成分又はフロセミドを経口投与した (投与液量は 10 ml/kg)。その直後にマウスを採尿ケージ (KN-645, 夏目製作所, 東京) に移し、絶水条件下で1時間毎に4時間後まで尿量を測定した。薬物の用量は、各種成分については *d*-リモネン及びジンゲロンをマウス又はラットに投与している最近の報告^{6,7)} を参考にし、フロセミドについては大西らの報告⁵⁾ と同じとした。なお、大西らは尿量の測定を着色ろ紙法 (プロモクレゾールパープルで黄色に染色したろ紙をケージの下に敷き、これに尿がしみこんで紫色に変色した部分を切り取り、重量を測定する方法) で行っているが、今回は精度を高めるために採尿ケージを用いて尿量 (ml) を直接測定した。

4. 正常マウスに対する作用 水を自由に摂取できる条件下でマウスを2時間絶食させた後、各種成分又はフロセミドを経口投与した (投与液量は 10 ml/kg)。その直後にマウスを採尿ケージに移し、絶水条件下で1時間毎に4時間後まで尿量を測定した。

5. 統計処理 実験結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定は Student の *t* 検定法により行い、危険率が5%未満 ($p < 0.05$) の場合を有意差ありと判定した。

結 果

1. 水分貯留マウスに対する作用 まず、4種類の香り成分 (*d*-リモネン、ピペリトン、 α -ピネン、ケイヒアルデヒド) 及びジンゲロンを水分貯留マウスに各 100 mg/kg 投与したところ、ケイヒアルデヒド以外には対照群と比べて尿量増加が認められた。中でも *d*-リモネン及びジンゲロンは、それぞれ3時間後及び4時間後までの尿量を対照群と比べて有意に増加させた。なお、*d*-リモネン群の4時間後までの尿量 (1.08 ml) は対照群 (0.82 ml) の132%で、有意差はなかったが対照群よりも明らかに増加した (Fig. 1)。

そこで次に、*d*-リモネン及びジンゲロンについて各 10 及び 30 mg/kg で同様の検討を行った結果、*d*-リモネンは対照群と比べて用量依存的かつ有意に尿量を増加させた。一方、ジンゲロンは 10 mg/kg では作用を示さなかったが、 30 mg/kg では対照群と比べて有意に尿量を増加させた (Fig. 2)。なお、

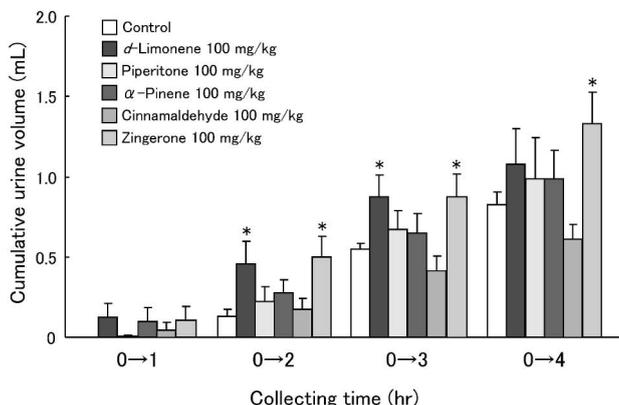


Fig. 1. Effects of Various Fragrant Ingredients on the Urine Volume in Mice Treated with Desmopressin
Each column and bar represents the mean \pm S.E.M., $n=5-7$. * $p<0.05$, compared with Control (t -test).

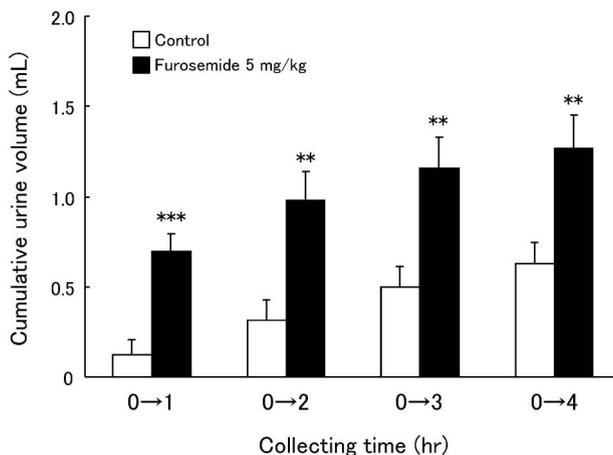


Fig. 3. Effects of Furosemide on the Urine Volume in Mice Treated with Desmopressin
Each column and bar represents the mean \pm S.E.M., $n=10$. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, compared with Control (t -test).

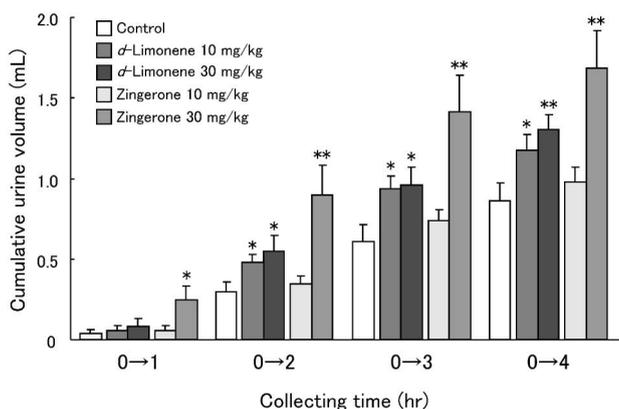


Fig. 2. Effects of d -Limonene and Zingerone on the Urine Volume in Mice Treated with Desmopressin
Each column and bar represents the mean \pm S.E.M., $n=11-12$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, compared with Control (t -test).

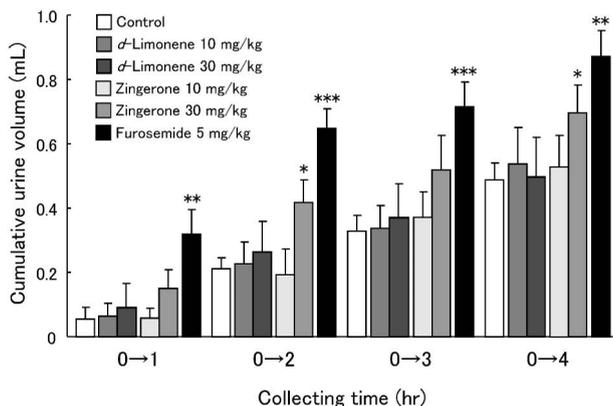


Fig. 4. Effects of d -Limonene, Zingerone and Furosemide on the Urine Volume in Normal Mice
Each column and bar represents the mean \pm S.E.M., $n=7-8$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, compared with Control (t -test).

フロセミドは 5 mg/kg で対照群と比べて有意に尿量を増加させた (Fig. 3)。

2. 正常マウスに対する作用 水分貯留マウスにおいて有意に尿量を増加させた d -リモネン及びジンゲロンを、同じ用量 (10 及び 30 mg/kg) で正常マウスに投与し、尿量に対する作用を調べた。その結果、 d -リモネンは尿量に対して明らかな作用を示さなかった。一方、ジンゲロンは 10 mg/kg では作用を示さなかったが、30 mg/kg では対照群と比べて有意に尿量を増加させた。なお、フロセミドは 5 mg/kg で対照群と比べて有意に尿量を増加させた (Fig. 4)。

考 察

今回、大西らが報告した抗利尿ホルモン投与によるマウスの水分貯留モデル⁵⁾を用いて、各種香り成分の尿量に対する作用を検討した。抗利尿ホルモン (バソプレシン) は、腎の集合管細胞のバソプレシン V_2 受容体に結合した後、水チャネルであるアクアポリン (AQP) を管腔側の細胞膜に移動させて水の再吸収を促進する。⁸⁾したがって、抗利尿ホルモン投与下でさらに水を負荷することで、体内に水分の貯留が起きる。本モデルもこのような原理に基づいており、全身性のむくみモデルと考えられる。

まず、本モデルに対する 4 種類の香り成分 (d -リモネン、ピペリトン、 α -ピネン、ケイヒアルデヒ

ド) 及びショウガの辛味成分であるジンゲロンの作用を調べたところ、ケイヒアルデヒドを除く3種類の香り成分に利尿作用が認められた。中でも、グレープフルーツやレモンの香り成分である *d*-リモネンには有意な利尿作用が認められた。また、ジンゲロンにも有意な利尿作用が認められた。次に、*d*-リモネンとジンゲロンについて同じ用量で正常マウスに対する作用を調べたところ、ジンゲロンは正常マウスにおいても有意な利尿作用を示したが、*d*-リモネンは尿量に対して作用を示さなかった。なお、利尿薬のプロセミドは大西らの結果⁹⁾と一致して、水分貯留マウス及び正常マウスのいずれにおいても尿量を増加させた。これらの結果から、*d*-リモネン及びジンゲロンはともに利尿作用を有することが確認されたが、このうちジンゲロンは利尿薬のプロセミドと同様に、正常状態及び水分貯留状態のいずれにおいても利尿作用を示すことが判明した。

ショウガはラットにおいて compound 48/80 やセロトニンによる足及び皮膚の浮腫を抑制し、その機序にはセロトニン受容体拮抗作用が一部関与することが示唆されている。⁴⁾ しかし、ショウガの利尿作用については、これまでに動物実験などで詳しい報告はない。今回の検討でジンゲロンが正常及び水分貯留マウスの両方においてプロセミドと類似した利尿作用を示したことから、ショウガの利尿作用には少なくともジンゲロンが関与し、またその機序の一部は例えば Henle 係蹄での $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ 共輸送系の阻害などプロセミドと共通している可能性が考えられる。

一方、*d*-リモネンはジンゲロンやプロセミドと異なり、水分貯留マウスにおいては利尿作用を示したが、正常マウスの尿量に対しては作用を示さなかった。東洋医学では、むくみのように水分が貯留した状態や、逆に枯渇した状態など、体内の水分バランスが異常になったときにそれを是正する薬物を「利尿薬」と呼んでいる。東洋医学の利尿薬の概念は、水分が貯留した状態ではそれを排出させる点で西洋医学の利尿薬と一部重なるが、水分バランスの是正を目的としていることから、正常状態や枯渇状態では水分を排出しないとされている。⁹⁾ 大西らは今回の水分貯留モデルに対する各種漢方薬の作用を検討し、その結果、五苓散や柴苓湯、猪苓湯、防己黄耆湯などいわゆる利尿薬とされる漢方薬が尿量を増加

して水分を排出させることを認めている。⁵⁾ また彼らは、絶水により水分が枯渇した状態のマウスにおいては、これらの利尿薬は尿量を増加させないことも確認している。⁵⁾ 前述のように、抗利尿ホルモンは腎の集合管細胞のパソプレシン V_2 受容体に結合した後、AQP を管腔側の細胞膜に移動させて水の再吸収を促進する。⁸⁾ 慢性心不全や肝硬変などの疾患や妊娠時にはむくみが起きることがあるが、このような状態では抗利尿ホルモンの分泌や AQP が増加することが知られている。^{1,10)} 一方、藤塚らはペントバルビタール投与によるラットのむくみモデルにおいて柴苓湯が利尿作用を示すことを認め、その機序として柴苓湯が V_2 受容体以降の細胞内情報伝達を抑制することを報告している。¹¹⁾ また、長井らは五苓散が *in vitro* において AQP の機能を抑制することを報告している。¹²⁾ これらのことから、むくみの原因には V_2 受容体や AQP が関与するが、いわゆる利尿薬はこれらの機能を抑制するため、むくみ状態においてのみ利尿作用を示すと推察される。今回の検討で香り成分である *d*-リモネンが利尿薬と類似した利尿作用を示したことは興味深いが、*d*-リモネンの V_2 受容体や AQP に対する作用についてはこれまでに報告はない。そこで今後は、このような *d*-リモネンの特徴的な利尿作用の機序を解明する手掛かりとして、 V_2 受容体や AQP への影響について調べる予定である。

今回の結果から、*d*-リモネンは利尿薬と異なり、体内に水分が貯留した状態においてのみ水分を排出させることが示唆された。*d*-リモネンのこのような作用は、むくみ治療において理想的と考えられる。なお、今回は単回投与での検討であったが、今後は持続的なむくみモデルに対する作用を長期投与でも検討したいと考えている。また、尿量とともに重要な尿中電解質への影響についても検討する予定である。さらに、*d*-リモネンをマウスに嗅がせた場合でも、同様にむくみ改善作用が認められるかどうか調べる予定である。

REFERENCES

- 1) Schrier R. W., Cadnapaphornchai M. A., Ohara M., *J. R. Soc. Med.*, **94**, 265–269 (2001).
- 2) Caddy R., “Aromatherapy: Essential Oils in Colour,” Fragrance Journal Ltd., Tokyo,

- 1999, pp. 34, 38, 46, 96, 104.
- 3) Toriizuka K., "Shoyaku no Yakuko•Yakuri (Monographs of Pharmacological Research on Traditional Herbal Medicines)," Ishiyaku Publishers, Inc., Tokyo, 2003, pp. 91–101.
 - 4) Penna S. C., Medeiros M. V., Aimbire F. S. C., Faria-Neto H. C. C., Sertie J. A. A., Lopes-Martins R. A. B., *Phytomedicine*, **10**, 381–385 (2003).
 - 5) Ohnishi N., Nagasawa K., Yokoyama T., *J. Trad. Med.*, **17**, 131–136 (2000).
 - 6) Amaral J. F., Silva M. I. G., Neto M. R. A., Neto P. F. T., Moura B. A., Melo C. T. V., Araújo F. L. O., Sousa D. P., Vasconcelos P. F., Vasconcelos S. M. M., Sousa F. C. F., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1217–1220 (2007).
 - 7) Han L.-K., Morimoto C., Zheng Y.-N., Li W., Asami E., Okuda H., Saito M., *Yakugaku Zasshi*, **128**, 1195–1201 (2008).
 - 8) Nielsen S., Chou C.-L., Marples D., Christensen E. I., Kishore B. K., Knepper M. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1013–1017 (1995).
 - 9) Kikutani T., Yakazu K., Imadaya A., Fukuda Y., Nomura A., Hosono H., *Jpn. J. Orient. Med.*, **43**, 349–386 (1993).
 - 10) Nielsen S., Frokiaer J., Marples D., Kwon T.-H., Agre P., Knepper M. A., *Physiol. Rev.*, **82**, 205–244 (2002).
 - 11) Fujitsuka N., Maruyama H., Kase Y., Takeda S., Aburada M., *J. Trad. Med.*, **21**, 271–274 (2004).
 - 12) Nagai K., Isohama Y., Ashizuka T., Toriizuka K., Ida Y., Miyata T., *J. Trad. Med.*, **21** (Suppl.), 83 (2004).