

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870419

研究課題名(和文)アロマテラピーへの活用を目指したユズ種子オイルの機能性評価

研究課題名(英文)Functional properties of yuzu seed oil for aromatherapy

研究代表者

吉金 優 (Yoshikane, Yu)

高知大学・地域連携推進センター・特任准教授

研究者番号：10530131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、ユズ種子オイルのキャリアオイルへの活用を目的として、理化学的特徴や皮膚への安全性、およびヒト皮膚の保湿効果等を明らかにしてきた。本研究では、ユズ種子オイルのさらなる安全性、付加価値を明らかにすることを目的として研究を行った。

まず、フクマリン類の新規分析法を確立し、ユズ種子オイルに光毒性をもつフクマリン類が存在しないことを明らかにした。次に、ユズ種子オイルがメラニン生成酵素であるチロシナーゼを阻害すること、また、マウスB16メラノーマ細胞のメラニン生成を阻害することを明らかにした。以上、本研究は、ユズ種子オイルの安全性と新しい機能的存在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to investigate the safety and functional properties of yuzu seed oil for aromatherapy. Furanocoumarins, which are present in some plants, are well known to cause cutaneous phototoxicity under ultraviolet radiation. Generally, the quantitative extraction of furanocoumarins from oils takes time and is labor intensive owing to the complexity of the process. We have developed a one-step extraction method that drastically reduces working time. In this first trial to determine furanocoumarin presence in oil samples, psoralen, xanthotoxin, bergapten, and isoimpinellin were not detected in yuzu seed oil. Biochemical studies were also performed, and yuzu seed oil sample showed inhibitory effects on mushroom tyrosinase activity. Further support for this inhibitory property is provided by the observation of melanogenesis in mouse B16 melanoma cells. These results promise to support the current research on the safety and skin-lightening potential of yuzu seed oil.

研究分野：食品科学

キーワード：アロマテラピー

## 1. 研究開始当初の背景

アロマセラピーがわが国に導入されて四半世紀以上たった今日、日本において着実に底辺の広がりをみせている。また、学术界でも医学、薬学、化学、生化学分野を中心にアロマセラピーに関する研究が活発に行われ、補完医療の一つとして地位を築きつつある。しかし、今日までアロマセラピーで使用される精油やキャリアオイルなどアロマセラピー資材のほとんどは外国産である。今後、さらに日本でアロマセラピーが広く浸透していくことを考えると、私たち、日本人に馴染みの深いアロマセラピー資材への関心が高まることが予測されると同時に、それらの基礎的研究が求められている。

ユズ(ミカン科、*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) は代表的和カンキツの一つとして、日本人に1,300年以上親しまれてきた。わが国ではユズの利用は、約1/3が青果として、残り2/3は搾汁・加工用として利用されている。ユズ果実は1個当り30個前後の種子を含み、その重量は果実重量あたり約2割を占める。カンキツ類の中でもこれほど種子の占有率の高いカンキツは希有である。生産量および精製率に基づき、日本における精製ユズ種子オイルの賦存量として、20~30トンであると推察している。しかしながら、これまでユズ種子に関しては特に有効な利用はなされておらず、ほとんどが廃棄されてきた。そこで、ユズ種子オイルに着目し、アロマセラピーにおける和製キャリアオイルとして利用できないか検討してきた。

## 2. 研究の目的

申請者らは、未利用資源であるユズ種子からオイルを調製し、このユズ種子オイルのキャリアオイル(マッサージトリートメントオイル)への応用を目的として、理化学的特徴や皮膚への安全性、およびヒトのメラニン生成抑制効果を明らかにしてきた<sup>1,2)</sup>。本研究で

は、ユズ種子オイルのさらなる優位性、付加価値、安全性を明らかにすることを目的とする。

本研究では、アロマセラピーにおけるキャリアオイルの安全性評価として、光毒性が知られるフロクマリン類の測定を、新規の分析法の設定を含めて行った。また、ユズ種子オイルの機能性評価として、抗酸化活性試験、マウスB16メラノーマ細胞を用いたメラニン産生抑制試験、ヒト繊維芽細胞増殖促進試験を行った。

沢村正義、熊谷千津、和田真理、岡田嘉仁、浅野公人、吉金 優、塚田裕行、アロマセラピーにおけるキャリアオイルとしてのユズシードオイルの基本特性、アロマセラピー学雑誌、Vol. 12、No. 1、2012、pp. 41-49

沢村正義、熊谷千津、馬場正樹、岡田嘉仁、吉金 優、浅野公人、東谷望史、塚田弘行、キャリアオイルとしてのユズシードオイルの芳香特性および美白作用、アロマセラピー学雑誌、Vol. 13、No. 1、2013、pp. 14-20

## 3. 研究の方法

### 1) フロクマリン類の分析方法

分析用試料はアセトニトリル抽出で行った。試料オイル2gに内標準物質として100ppm *p*-クロロベンゾフェノン(CBP)を含むアセトニトリルを2mL加えた。室温にて30分間攪拌し、1時間放置した。2層に分かれた上層をGCMS分析用試料とした。

フロクマリン類の分析はGCMSのSIMモードで行った。分析条件は以下の通りである。

GCMS: Shimadzu GCMS QP-2010Plus

オートインジェクター: Shimadzu AOC-20i

カラム: DB-1 (15m × 0.25mm, 膜厚0.2μm)

カラム温度: 120 4 /min 200

10 /min 300 (5 min)

スプリット比：50:1

注入試料量：1  $\mu$ L

測定質量と追跡成分は以下の通りである。  
 $m/z$  186 (ソラレン)、 $m/z$  201, 216 (CBP、  
キサントトキシン、ベルガプテン)、 $m/z$  246  
(イソピムピネリン)。

## 2) 試料オイルから DMSO 可溶性抽出液の調製

分析用試料は、DMSO 抽出で行った。100 mL  
容三角フラスコに試料オイル 50 g と DMSO 10  
mL を加えた。室温にて 60 分間強く撹拌した。  
一晩放置した 2 層に分かれた下層 (DMSO 層)  
を機能性評価のための分析用試料とした。

## 3) 抗酸化活性試験

スーパーオキシドアニオンおよび DPPH ラ  
ジカル消去活性は、それぞれ SOD Assay  
Kit-WST (Dojin) 定法 (島村智子ら、食品  
科学工学会雑誌、54, 482-487, 2007) によ  
り試験した。

## 4) チロシナーゼ阻害試験、マウス B16 メラ ノーマ細胞を用いたメラニン産生抑制試験

チロシナーゼ阻害試験は、マッシュルーム  
由来チロシナーゼを用いて行った。すなわち、  
0.83 mM L-DOPA、60 mM リン酸ナトリウム緩  
衝液 (pH 6.8)、30 mU マッシュルーム由来チ  
ロシナーゼおよび被検液もしくはコントロ  
ールとして DMSO を 0.1 mL 加え、全量を 1.5 mL  
とした。30°C、10 秒間における生成物ドーパ  
クロムの吸光度 (475 nm) の増加率を測定し  
た。

マウス B16 メラノーマ細胞 (B16 melanoma  
4A5、RCB0557、独立行政法人理化学研究所バ  
イオリソースセンター) の細胞密度を  $5 \times 10^4$   
cells/mL に調整し、24 穴プレートに 1 ウェルあ  
たり 500  $\mu$ L ずつ加え、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下で 24 時  
間前培養した。1 ウェルあたり 5  $\mu$ L の被検液も  
しくはコントロールとして DMSO を加え、さら  
に 2 日間培養した。増殖した細胞を 1 M 水酸化

ナトリウム水溶液で溶解し、可溶化したメラ  
ニンの 405 nm の吸光度を測定した。メラニン  
含量は生細胞数で補正し、コントロールに対  
する相対メラニン含量として示した。

## 5) ヒト繊維芽細胞増殖試験

正常ヒト新生児包皮繊維芽細胞 (02117、倉  
敷紡績) の細胞密度を  $5 \times 10^3$  cells/mL に調整  
し、24 穴プレートに 1 ウェルあたり 500  $\mu$ L づ  
つ加え、24 時間前培養した。20  $\mu$ L の被検液も  
しくはコントロールとして DMSO を加えた培地  
520  $\mu$ L を添加し、さらに 24 時間培養した。細  
胞数の測定は、Cell Counting Kit-8 (Dojin)  
を用いて行った。

## 4. 研究成果

### 1) ユズ種子オイルのフロクマリン類

本研究において、試料オイルのアセトニト  
リルによる簡易抽出法およびフロクマリン  
類の最適分析条件を構築した。

ユズ種子オイルには、光毒性をもつソラレ  
ン、キサントトキシン、ベルガプテン、イソ  
ピムピネリンのいずれのフロクマリン類も  
検出されなかった。このことは、光毒性の観  
点から、ユズ種子オイルの通常の使用は、安  
全であることを示すものである。

### 2) 抗酸化活性

ユズ種子オイルの抗酸化活性を調べたと  
ころ、試験条件下でスーパーオキシドアニ  
オンおよび DPPH ラジカル消去活性を示さな  
かった。

### 3) チロシナーゼ阻害作用、マウス B16 メラ ノーマ細胞を用いたメラニン産生抑制作用

最近、我々はユズ種子オイルが、ヒトの肌  
のメラニン量を有意に減少させる作用を明  
らかにした。本試験では、その阻害様式を明  
らかにすることを目的とした。

ユズ種子オイルのマッシュルーム由来チ

ロシナーゼに対する阻害活性を測定したところ、ユズ種子オイル DMSO 抽出液の添加量 (0, 0.07, 0.17, 0.33 g ユズ種子オイル相当量/mL) に依存して有意にチロシナーゼ活性が減少した。0.33 g 相当量/mL 添加時、50% チロシナーゼ活性を阻害した。また、アロマテラピーに汎用される他 16 種類のキャリアオイルのポリフェノール含量とチロシナーゼ活性阻害を測定したところ、その間に高い相関がみられた ( $R = 0.7224$ )。このことから、ユズ種子オイル (キャリアオイル) のチロシナーゼ阻害作用の一因として、ポリフェノール類が関与していることが示唆された。

ユズ種子オイルのマウス B16 メラノーマ細胞のメラニン産生に及ぼす影響を調べたところ、ユズ種子オイル 98 mg 相当量/mL 添加時、コントロールと比べメラニン含量を 27% 減少させた。本試験条件下において、有意な生細胞数の変化は見られなかった ( $P > 0.05$ )。また、アロマテラピーに汎用される他 16 種類のキャリアオイルのポリフェノール含量とメラニン産生抑制作用の間にも相関がみられた ( $R = 0.5903$ )。

以上のことから、ユズ種子オイルは、メラニン産生抑制効果を示し、その抑制メカニズムは細胞増殖抑制によるものではなく、チロシナーゼ活性の阻害が抑制機序の一因であると考えられた。

#### 4) ヒト繊維芽細胞増殖試験

ユズ種子オイルのヒト繊維芽細胞の増殖に及ぼす影響を調べたところ、試験条件下で増殖に影響を与えなかった。

以上、本研究は、ユズ種子オイルの安全性と新しい機能的存在を明らかにしただけでなく、今後のユズ種子オイル (キャリアオイル) の新しい側面を切り開くものと期待される。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. 吉金 優、熊谷千津、島上和則、手塚千史、野田信三、堀田龍志、村上志緒、山本芳邦、沢村正義、キャリアオイルのチロシナーゼ活性阻害およびメラニン産生抑制作用、アロマテラピー学雑誌、査読有、Vo. 15、No. 1、2015、pp. 54-62、<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020414771>
2. Andrew Njagi Mugo, Jun Kobayashi, Bunzo Mikami, Yu Yoshikane, Toshiharu Yagi, Kouhei Ohnishi, Crystal structure of 5-formyl-3-hydroxy-2-methylpyridine 4-carboxylic acid 5-dehydrogenase, an NAD<sup>+</sup>-dependent dismutase from *Mesorhizobium loti*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, Vol. 456, 2015, pp. 35-40, DOI:10.1016/j.bbrc.2014.11.028.
3. Jun Kobayashi, Yu Yoshikane, Toshiharu Yagi, Seiki Baba, Kimihiko Mizutani, Nobuyuki Takahashi, Bunzo Mikami, Structure of 4-pyridoxolactonase from *Mesorhizobium loti*, Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 査読有, Vol. 70, No. 4, 2014, pp. 424-432, DOI:10.1107/S2053230X14003926.

〔学会発表〕(計5件)

1. 平岡幸浩、大畑宏史、吉金 優、トマト新品種作出に有用なDNAマーカーの探索ならびにその活用、日本農芸化学会2016年度大会、2016年3月27-30日、札幌コンベンションセンター他(北海道札幌市)
2. 山本博志、吉金 優、中島悦子、栗田せりか、樋口慶郎、沢村正義、共振振動分析装置を用いたメロン‘アールスメロン’の食べ頃判定および予測、日本農芸化学会2015年度中四国・西日本支部合同大会、2015年9月17-18日、愛媛大学農学部(愛媛県松山市)
3. Andrew Mugo, Jun Kobayashi, Bunzo Mikami, Yu Yoshikane, Toshiharu Yagi, Kouhei Ohnishi, Crystal structure of 5-formyl-3-hydroxy-2-methylpyridine 4-carboxylic Acid 5-dehydrogenase, an NAD<sup>+</sup>-dependent dismutase from *Mesorhizobium loti*, 日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月26-29日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)
4. 西川きよ、吉金 優、中島悦子、樋口慶郎、沢村正義、グアバ葉のスキンケア化粧品素材としての機能性、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月26-29日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)
5. 西川きよ、吉金 優、中島悦子、片山智子、樋口慶郎、沢村正義、高知県産グアバ茶葉の -アミラーゼおよびチロシナーゼ活性阻害と抗酸化活性、日本農芸化学会中四国支部第39回講演会、2014年5月31日、福山大学宮地茂記念館(広島県福山市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉金 優 (YOSHIKANE, Yu)  
高知大学・地域連携推進センター・特任准教授  
研究者番号：10530131

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：