

## 略 歴

九州大学大学院薬学研究科終了後、東北大学大学院医学研究科にて博士(医学)取得。株式会社資生堂を経て、2007年 東京工科大学バイオニクス学部教授、バイオ・情報メディア研究科教授に就任。  
2008年 同大応用生物学部、バイオ・情報メディア研究科教授。専門分野は、機能性化粧品学、美容皮膚科学など。

## 健康茶に含まれるヒアルロン酸促進成分に関する研究

### Study of hyaluronic acid promoting-compounds found in healthy tea

The dry peel of Satsuma mandarin (scientific name: *Citrus unshiu*) called Thinpi, has been utilized in Chinese medicine from ancient times, and has been used for food or cosmetics in recent years. We examined the effect of Satsuma mandarin on hyaluronan production in cultures because it is involved in skin firmness and moisture. First, the peel of the Satsuma mandarin was dried; it was immersed in hydrous ethanol for a week at room temperature, and two ethanolic extracts were produced at 50% and 95%. Then, human dermal fibroblasts were cultured for 3 days in a medium containing these extracts. The amount of hyaluronic acid in the cultured conditioned medium, with or without these extracts was quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a hyaluronan binding protein (HABP) and a biotin conjugated HABP. At the same time, the number of cells was counted and the amount of hyaluronic acid per cell was calculated based on concentration. As a result, it was shown that the Satsuma mandarin peel extract increases hyaluronic acid. In order to identify the active component in the Satsuma mandarin peel, the effect of hesperidin and limonene, which are commonly found in the peel of the Satsuma mandarin, was investigated. As a result, it was shown that hesperidin and limonene did promote hyaluronic acid production.

## はじめに

生活の質の向上や医療の発展により、女性の平均寿命は85歳を超え、高齢化社会を迎えている。高齢者の「美容と健康」に関する意識調査では、ほとんどの女性が、「美しく、若々しくありたい」と望み、心身ともに「健康」であることが「きれい」の土台として大切と考えている。外観の美しさだけでなく、内面から醸しだされる健康的な美しさを得るために、心身ともに充実した快適な生活と美容により食事が望まれている。ヒアルロン酸はコラーゲンとともに真皮を構成する重要な成分で、加

齢とともに減少することが報告されている<sup>1)</sup>。したがって、ヒアルロン酸の生成を促進する食品を毎日摂取するようにすれば、肌のしわやたるみといった老化を少しでも遅らせることができると期待できる。そこで今回、肌のハリや保湿に大きく関与しているヒアルロン酸に対する温州みかん（学名：*Citrus unshiu* Marc. 英名: satsuma mandarin orange)の効果について調べた。また、その主要な有効成分であるヘスペリジンとリモネンについてもヒアルロン酸生成促進効果を培養したヒト真皮線維芽細胞を用いて調べた。

温州みかんはムクロジ目ミカン科ミカン属の常緑低木で、果実を食用とする果物である。中国の温州にちなんでウンシュウミカンと命名されたが、温州原産ではなく日本の鹿児島県（不知火海沿岸）原産と推定される。温州みかんの乾燥果皮は陳皮（ちんぴ）と呼ばれ、古来、漢方薬として健胃・整腸、鎮咳に用いられ、健康茶としても利用されている。

温州みかんの機能性成分として、フラバノン配糖体（フラボノイド）であるヘスペリジン（Hesperidin、図1）が多く含まれ、果皮100g中にはヘスペリジンが4.63g含まれている<sup>2)</sup>。ヘスペリジンは陳皮の主成分でビタミンPと呼ばれるビタミン様物質である。ヘスペリジンは植物の防御に関与していると考えられ、ラット等の動物に投与すると、コレステロールや血圧を低下させる作用や毛細血管を強化し、血管透過性を抑える働き、抗アレルギー作用、発がん抑制作用を示す効果が報告されている<sup>3-7)</sup>。また、温州みかん果皮には香りを構成する物質の一つであるd-リモネン（Limonene、図1）も含まれている。d-リモネンはテルペン系炭化水素のひとつで、柑橘類の果皮に多く含まれ、香料や天然物由来の溶剤として利用されている。例えば、高濃度の場合は油汚れを落とすための洗浄剤や、ガム剥がし用の溶剤の成分として使用されるほか、発泡スチロールをよく溶かすため、発泡スチロールのリサイクルに利用される。脂肪を分解する働きや、頭皮皮脂中の酵素5 $\alpha$ リダクターゼの活性を妨げる作用があり、脱毛を防ぎ、毛母細胞を活性化して発毛を促す作用があることも報告されている<sup>8)</sup>。その他に温州みかんには、カロチノイド（ $\beta$ -クリプトキサンチン、 $\beta$ -カロチンなど）、クマリン（オーラプテンなど）、リモノイド（リモニンなど）、フラボノイド（タンゲレチン、ノビレチンなど）なども含まれている。

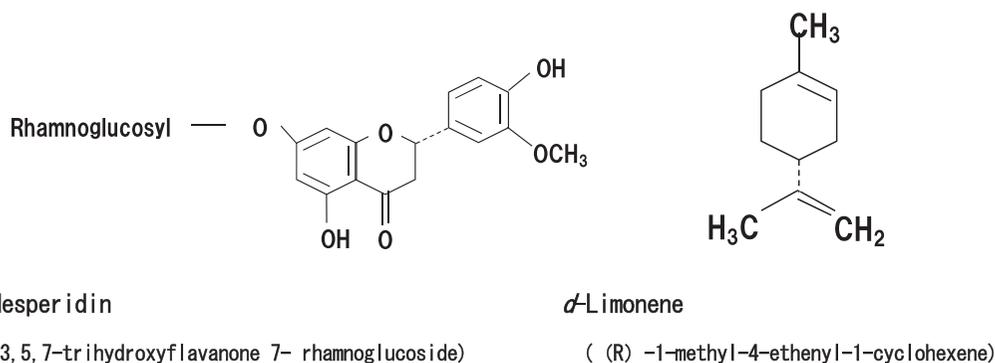


図1.ヘスペリジンとリモネンの構造

## 方 法

### 1. 温州みかん果皮の含水エタノール抽出物の作製

無農薬で栽培した温州みかんの果実より得られた果皮10gに含水エタノール(50%エタノール、95%エタノール)90gを加え、1週間室温暗所に静置した。抽出エキスをろ過後に回転型エバポレータで溶媒を溜去し、固形物を得た。20mg/mlになるようにジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解し、さらにDMSOで10mg/ml、5mg/mlに希釈した。

### 2. ヒト真皮線維芽細胞の培養

ヒト真皮線維芽細胞は75cm<sup>2</sup> フラスコに10%FBS-DMEMを用いて炭酸ガスインキュベーター内で培養し、増殖させた。96穴プレート1枚にヒト真皮線維芽細胞を3,000cells/wellずつ播種し、DMEM GlutaMAXに2%ウシ血清を含む培地(2%FBS-DMEM)で1日培養した。各濃度に調製した温州みかん果皮抽出物、ヘスペリジン、リモネンを1 $\mu$ lずつ添加し、炭酸ガスインキュベーターで3日間培養した後に、以下の方法でヒアルロン酸量、細胞数の測定を行った。

### 3. 培養上清中のヒアルロン酸量の測定

3日間培養した後に培養上清を採取して、培養上清中のヒアルロン酸をELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)法で測定した。炭酸緩衝液で200倍希釈したヒアルロン酸結合タンパク質(HABP、5 $\mu$ g/ml)溶液を高吸着96穴プレート(Immulon 4HBX)の各ウエルに100 $\mu$ lずつ入れて4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。300 $\mu$ lの洗浄液(0.05% Tween-20 / PBS)で各ウエルを2回洗浄後、風乾した。5% BSAを300 $\mu$ l添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。洗浄液で2回洗浄した。標準HA溶液(50、100、200、400、800ng/ml)およびサンプルをassay buffer(0.02% Tween-20、1% BSA / PBS)で20倍希釈し、ウエルに100 $\mu$ lずつ添加して室温で2時間静置した。washing bufferで4回洗浄した。1,000倍希釈したBiotin-HABP(250ng/ml)を100 $\mu$ lずつ添加し室温で30分静置した。洗浄液で4回洗浄後、純水で1回洗浄した。10,000倍希釈したstreptavidin-HRP(100ng/ml)を100 $\mu$ lずつ添加した。室温で30分静置後、洗浄液で4回洗浄し、純水で1回洗浄した。ABTS [2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt)]を100 $\mu$ lずつ添加し10～20分静置し、マイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を測定した。

### 4. ヘスペリジン、リモネンの細胞増殖促進効果の測定

Cell Counting kit-8(同仁化学株式会社)を用いた。Cell Counting kit 溶液を、各ウエルに10 $\mu$ lずつ添加した。炭酸ガスインキュベーター内に戻し、2時間呈色反応を行った。マイクロプレートリーダーで450nmの吸光度を測定し、検量線から細胞数を計算した。

### 5. 統計学的解析

EXCELの対応のないt-検定を用いて有意差検定を行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

## 結 果

温州みかん果皮抽出物のヒアルロン酸生成促進効果を、培養ヒト真皮線維芽細胞を用いて調べた結果、200 $\mu\text{g/ml}$ の温州みかん果皮の50%エタノール抽出物、95%エタノール抽出物によって、培養上清中のヒアルロン酸量が増加することがわかった(図2)。次に、温州みかんの果皮に含まれる代表的な成分であるリモネンとヘスペリジンのヒアルロン酸生成促進効果を、培養ヒト真皮線維芽細胞を用いて調べた結果、5~20 $\mu\text{g/ml}$ のリモネン、5 $\mu\text{g/ml}$ のヘスペリジンによって、培養上清中のヒアルロン酸量が増加することがわかった(図3)。また、細胞増殖への影響については、5~20 $\mu\text{g/ml}$ のリモネンによって濃度依存性に細胞増殖が抑制された(図4)。ヘスペリジンには、本濃度で細胞増殖への影響は認められなかった(図4)。したがって、細胞あたりのヒアルロン酸量を算出すると、5~20 $\mu\text{g/ml}$ のリモネンによって、細胞あたりのヒアルロン酸量が著しく増加することがわかった(図5)。特に、20 $\mu\text{g/ml}$ のリモネンによって、細胞あたりのヒアルロン酸量が約7倍増加することがわかった。5 $\mu\text{g/ml}$ のヘスペリジンによっても、細胞あたりのヒアルロン酸量が有意に増加することがわかった(図5)。

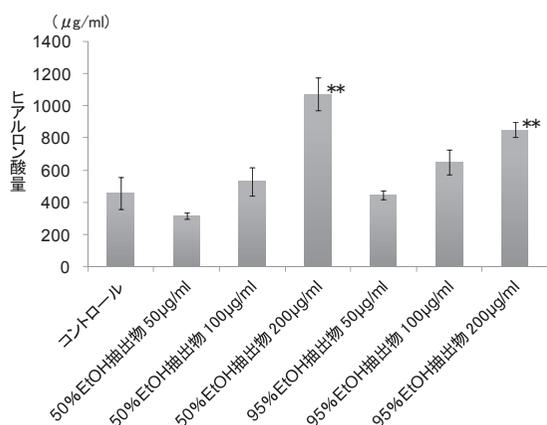


図2. 温州みかん果皮抽出物によるヒト真皮線維芽細胞の培養上清中のヒアルロン酸量

\*\*: $P<0.01$  vs. コントロール, バーは標準偏差

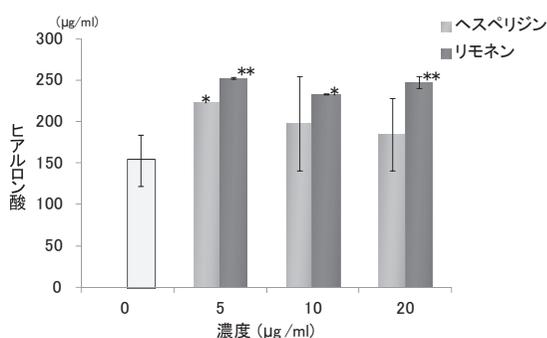


図3. ヘスペリジン、リモネンによるヒト真皮線維芽細胞の培養上清中のヒアルロン酸量

\*: $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$  vs. コントロール(0), バーは標準偏差

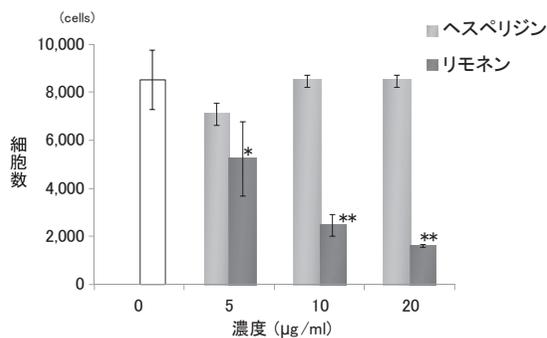


図4. ヘスペリジン、リモネンによるヒト真皮線維芽細胞の細胞増殖への影響

\*: $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$  vs. コントロール(0), バーは標準偏差

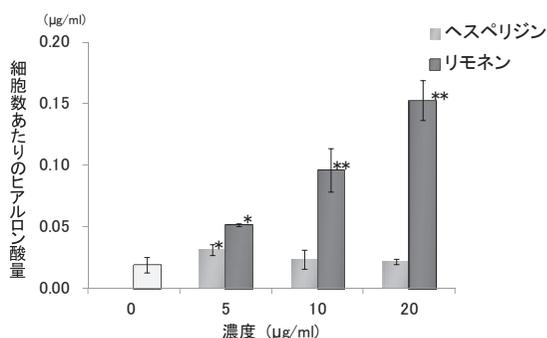


図5. ヘスペリジン、リモネンによるヒト真皮線維芽細胞の培養上清中の細胞数あたりのヒアルロン酸量

\*: $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$  vs. コントロール(0), バーは標準偏差

## 考 察

加齢とともに肌にしわやたるみ、しみが生じてくる。しわやたるみと関係の深い肌の弾力性を測定すると、年齢とともに肌の弾力性は低下し、伸びやすく戻りにくい古くなった輪ゴムようになる。肌の粘弾性は真皮に存在するコラーゲン繊維やエラスチン繊維といった繊維性タンパク質とヒアルロン酸などの高分子多糖によって構成された組織構築の完成度によって、その機能性が決められている。すなわち、これらの量が減少したり、質が低下したりすると、しわやたるみができやすくなるといっても過言ではない。皮膚の繊維性タンパク質が60代から減少する<sup>9)</sup>のに対し、ヒアルロン酸は40代後半から減少しはじめることが報告されている<sup>1)</sup>。したがって、40～60代はヒアルロン酸の生成を促進する食品を毎日摂取するにすれば、肌のしわやたるみといった老化を少しでも遅らせることができると期待できる。

ヒアルロン酸はグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンが交互に結合した高分子多糖で、分子量は数百万にもなり、水分を保持する能力が非常に高く、真皮に多量に存在しており、肌のみずみずしさ、ハリ、弾力性に深く関わっている。ヒアルロン酸はHAS (Hyaluronan synthase) 1やHAS2、HAS3などの3種類の合成酵素により合成され、真皮においては主にHAS2により高分子ヒアルロン酸が合成される<sup>10)</sup>。

温州みかん果皮抽出物を添加した培地でヒト真皮線維芽細胞を培養することによって培養上清中のヒアルロン酸が増加したことから、温州みかん果皮には肌のハリとうるおいを保つヒアルロン酸を増やす効果があると考えられた。

温州みかん果皮抽出物中のヒアルロン酸を促進する成分については明らかにされていないが、リモネンにはヒアルロン酸の生成を促進する作用があるので、温州みかん果皮抽出物中のヒアルロン酸の生成促進作用にリモネンが関与しているのかもしれない。

温州みかん果皮に代表される植物素材は健康茶に配合されている。例えば、「アサヒ 食事と一緒に十六茶」に配合されている植物素材としては、食物繊維（難消化性デキストリン）、ハトムギ、緑茶、大麦、玄米、ハブ茶、黒豆（大豆）、ウーロン茶、昆布、霊芝、熊笹、柿の葉、ゴマ、紅花、アシタバ、ミカンの皮、グアバ葉である。これら植物素材のエタノール抽出物が培養ヒト線維芽細胞のヒアルロン酸生成に与える影響を調べた結果、温州みかん果皮にヒアルロン酸合成促進作用が認められた。今後、温州みかん果皮抽出物の成分がどのようなメカニズムで効果を発現するかを調べ、温州みかん果皮等の柑橘果皮の抽出物の美容と健康に対する有用性を明らかにしていく。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、財団法人アサヒビール学術振興財団に助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Longas M.O., Russell C.S. and He X.Y. , Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging. *Carbohydr. Res.* 159 (1):127-136, 1987.
2. 伊藤三郎編, 果実の化学, 朝倉書店 p133-143, 1991.
3. Monforte M.T., Trovato A., Kirjavainen S., Forestieri A.M., Galati E.M., Lo Curto R.B. Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid. (note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco* 50 (9): 595-599, 1995.
4. Ohtsuki K., Abe A., Mitsuzumi H., Kondo M., Uemura K., Iwasaki Y., Kondo Y., Glucosyl hesperidin improves serum cholesterol composition and inhibits hypertrophy in vasculature, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 49 (6): 447-50, 2003.
5. Liu L., Xu D.M., Cheng Y.Y., Distinct effects of naringenin and hesperetin on nitric oxide production from endothelial cells. *J. Agric. Food. Chem.* 56 (3): 824-829, 2008.
6. Emim J.A., Oliveira A.B., Lapa A.J., Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (2): 118-122, 1994.
7. Miller E.G., Peacock J.J., Bourland T.C., Taylor S.E., Wright J.M., Patil B.S., Miller E.G., Inhibition of oral carcinogenesis by citrus flavonoids. *Nutr. Cancer* 60 (1): 69-74, 2008.
8. Miyauchi Y., Use of d-limonenes as testosterone-5-alpha-reductase inhibitor and as hair grower. European Patent Application EP0467660, 1992.
9. Shuster S., Black M.M. and McVitie E., The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. *Br. J. Dermatol.* 93 (6):639-643, 1975.
10. Sugiyama Y., Shimada A., Sayo T., Sakai S. and Inoue S., Putative hyaluronan synthase mRNA are expressed in mouse skin and TGF-beta upregulates their expression in cultured human skin cells. *J. Invest. Dermatol.* 110: 116-121, 1988.