

試験報告書

ゆず種子抽出物・果皮抽出物の有用性評価
(メラニン生成抑制作用・細胞賦活作用および
コラーゲン産生に対する作用)

試験番号：

14-CHMRM-0707

14-B16RM-0707

14-HDFRM-0707

2014年10月21日



株式会社バイオリサーチ

試験実施概要

1. 試験の名称

メラニン生成抑制作用・細胞賦活作用およびコラーゲン産生に対する
ゆず種子抽出物・ゆず果皮抽出物の有用性評価

2. 試験内容

- (1) ゆず種子抽出物・ゆず果皮抽出物の後期メラニン生成化学溶液系によるメラニン生成抑制作用評価試験
- (2) ゆず種子抽出物・ゆず果皮抽出物の B16 メラノーマ細胞系を用いてのメラニン生成抑制作用評価試験
- (3) ゆず種子抽出物・ゆず果皮抽出物のヒト真皮繊維芽細胞を用いての細胞賦活化作用評価試験
- (4) ゆず種子抽出物・ゆず果皮抽出物のヒト真皮繊維芽細胞を用いてのコラーゲン産生促進作用評価試験

3. 試験番号

14-CHMRM-0707 (化学溶液系によるメラニン生成抑制評価試験)

14-B16RM-0707 (B16 メラノーマ細胞を用いたメラニン生成抑制評価試験)

14-HDFRM-0707 (繊維芽細胞を用いた細胞賦活化・コラーゲン産生評価試験)

4. 試験目的

以下の試験系を用いて、ゆず種子抽出物・果皮抽出物の美白・美肌作用を示すことを目的とする。

- (1) 美白作用：化学溶液系・培養細胞系を用いた試験系により、ゆず種子抽出物・果皮抽出物のメラニン生成抑制作用を示す。
- (2) 美肌作用：培養細胞系を用いた試験系により、ゆず種子抽出物・果皮抽出物の細胞賦活化作用・コラーゲン産生促進作用を示す。

試験結果概要

1. 試験結果

(1) ゆず種子・果皮抽出物の後期メラニン生成過程に対する抑制作用評価（試験管内化学溶液系）（別添資料 1 参照）

【ゆず果皮物の後期メラニン生成抑制作用】

DOPAchrome からの後期メラニン生成に対するゆず種子抽出物の作用を化学溶液系で検討した。生成したメラニンをメンブランフィルターにトラップし、その生成量を比較した。

ゆず種子抽出物は、陰性対照に比してメラニン生成量が明確に減少し、最終濃度 5% と 10% を比較すると、最終濃度 5% の方が強くメラニン生成を抑制した。

【ゆず果皮抽出物後期メラニン生成抑制作用】

DOPAchrome からの後期メラニン生成に対するゆず果皮抽出物の作用を化学溶液系で検討した。生成したメラニンをメンブランフィルターにトラップし、その生成量を比較した。

ゆず果皮抽出物は、ゆず種子抽出物とは異なり、5%、10% の濃度では、後期メラニン生成抑制作用は見られなかった。

以上の評価試験結果より、以下の結論が導かれた。

【結論】

化学溶液系を用いた後期メラニン生成過程に対する作用試験より、

- ・ゆず種子抽出物は、5%以上の濃度で後期メラニン生成過程を抑制する。
- ・ゆず果皮抽出物は、後期メラニン生成過程を抑制しない。

(2) B16 細胞を用いたメラニン生成抑制作用評価(ゆず種子エキス、ゆず果皮エキス) (別添資料 2 参照)

【メラノーマ細胞増殖への作用】

ゆず種子エキスは、濃度依存的にメラノーマ細胞の増殖を抑制した。
ゆず果皮エキスは、弱い細胞抑制作用が見られたが明確な濃度依存性は見られなかった。

これらの結果より、ゆず種子エキス・果皮エキスには B16 メラノーマ細胞に対して弱い細胞増殖抑制作用があり、種子エキスの方が果皮エキスより細胞増殖抑制作用は強いことが示された。

【メラニン産生に対する作用】

ゆず種子エキスは、ほぼ濃度依存的にメラニン産生を弱く抑制する作用が見られた。また、2.0%添加した場合、約 46%に抑制し、2.0mMコウジ酸添加に匹敵するメラニン生成抑制作用が見られた。

ゆず果皮エキスにおいては、メラニン産生を弱く抑制する作用が見られたが明確な濃度依存性は見られなかった。種子エキスと同様に 2.0%添加した場合、約 49%に抑制し、2.0mMコウジ酸添加に匹敵するメラニン生成抑制作用が見られた。

【結論】

- ・ **ゆず種子エキス・ゆず果皮エキス**ともメラノーマ細胞に対して、弱い細胞増殖抑制作用があるものの**明確なメラニン生成抑制作用を有する**。
- ・ 高濃度添加の場合、**コウジ酸に匹敵するメラニン生成抑制作用を有する可能性が示唆**された。

(3) ヒト繊維芽細胞を用いた細胞賦活・コラーゲン産生に対する
作用評価試験（ゆず種子エキス、ゆず果皮エキス）
(別添資料3参照)

【繊維芽細胞の増殖への作用】

ゆず種子エキスにおいては、0.5%・1.0%含有の場合において、約20%程度の弱い増殖促進作用が見られた。2.0%含有においても増殖抑制作用はみられなかった。

ゆず果皮エキスにおいても、0.5%・1.0%・2.0%含有の場合において、約30%程度の増殖促進作用が見られた。0.2%含有の場合においても増殖抑制作用は見られなかった。

これらの結果からゆず種子エキス・ゆず果皮エキスには、ヒト繊維芽細胞の増殖を促進する作用を有すると考えられる。

【細胞内呼吸酵素活性に対する細胞賦活作用】

本試験ではWST-1アッセイと細胞数定量を組み合わせることにより、細胞あたりの細胞内呼吸酵素活性を比較することにより評価した。

WST-1アッセイは細胞内呼吸酵素の活性を定量する手法で、細胞1個あたりのWST-1活性（呼吸酵素活性）の増大が細胞賦活化の本態であるという考えもあり、その理論に沿って本試験では1細胞当たりの酵素活性を細胞賦活化活性値として評価した。

ゆず種子エキスにおいては、濃度依存的に、約10%～20%程度の呼吸活性低下が見られ、ゆず果皮エキスにおいても約10%～30%程度の呼吸活性低下が見られ細胞賦活作用は見られなかった。

これらの結果より、今回の評価試験で採用した、細胞内呼吸活性を亢進させるタイプの細胞賦活作用は、ゆず種子エキス・ゆず果皮エキスにはないことが考えられた。一方で、細胞増殖の促進作用を有することから細胞内呼吸酵素の亢進作用以外のタイプの細胞賦活作用を有する可能性は否定できない。

【コラーゲン産生への作用】

ゆず種子エキスにおいては、0.2%~1.0%の濃度範囲において、0.5%含有の場合に約70%の産生促進を頂点として、山形の濃度依存性のコラーゲン産生促進作用が見られた。0.5%・1.0%含有エキスにおいても約30%~45%の産生促進がみられた。2.0%含有エキスにおいては、逆に約40%程度の産生抑制作用がみられた。

ゆず果皮エキスにおいては、0.5%~2.0%含有の場合において、約30~45%程度のコラーゲン産生抑制作用が濃度依存的にみられた。

これらの結果より、ゆず種子エキスは明確にコラーゲン産生促進作用を有すると考えられた。ゆず果皮エキスは、産生促進作用は有さないことが示された。

【結論】

- ・ ゆず種子エキス・ゆず果皮エキスともに、**ヒト繊維芽細胞に対しては増殖促進作用**を有する。
- ・ ゆず種子エキス・ゆず果皮エキスともに細胞内呼吸活性を亢進させるタイプの細胞賦活作用は有さない。細胞増殖促進作用を有することから、他のタイプの細胞賦活作用を有する可能性がある。
- ・ **ゆず種子エキスは明確にコラーゲン産生促進作用**を有する。ゆず果皮エキスには産生促進作用は無いものと考えられる。

2. 考察と総合結論

ゆず種子エキス・ゆず果皮エキスの美白・美肌に関する有用性に関し、美白作用に関しては、化学溶液系・メラノーマ細胞系を用いて評価し、美肌作用に関してはヒト真皮繊維芽細胞を用いて評価した。

(1) 考察

【美白作用】

DOPAchrome 以降の後期メラニン生成過程に対し、化学溶液系で、ゆず種子エキスが抑制作用を示した。

一方、メラノーマ細胞系での評価試験において、ゆず種子エキス・ゆず果皮エキスともに**メラニン産生抑制作用**を示し、特に**高濃度添加の場合は、コウジ酸に匹敵するメラニン産生抑制作用**を示した。

化学溶液系・色素細胞系の試験結果から考察すると、色素細胞系における**ゆず種子エキスのメラニン産生抑制作用は、主として後期メラニン生成抑制作用**によるものと考えられる。

一方でゆず果皮エキスのメラニン産生抑制作用は、それ以外のメカニズムによるものと考えられる。

ゆず種子エキス・ゆず果皮エキスとも、美白に関し有用性を有すると考えられ、そのメラニン産生抑制作用が異なることが想定されるため、これらエキス配合を配合する美白化粧品においては、種々の美白シナリオに基づく配合設計が可能と考えられる。

【美肌作用】

ゆず種子エキス・ゆず果皮エキスともに、**ヒト繊維芽細胞に対しては増殖促進作用**を有する。

一方で、細胞内呼吸活性を亢進させるタイプの細胞賦活作用は示さなかったが、細胞増殖促進作用を有することから、他のタイプの細胞賦活作用を有する可能

性がある。

さらに、**ゆず種子エキスは明確にコラーゲン産生促進作用を有する。**

これらの知見により、**ゆず種子エキスは、美肌作用に関し明確な有用性を持つ**と考えられる。ゆず果皮エキスはコラーゲン産生促進作用等の効果は有さないが、繊維芽細胞の増殖促進活性は有しており、本エキスの美白作用と組み合わせての多様な配合設計が可能であると考えられる。

(2) 総合結論

以上の試験結果と考察を総合すると、以下の結論が導かれる。

【総合結論】

- ・ **ゆず種子エキスは、美白作用・美肌作用の双方に有用**である。
- ・ **ゆず果皮エキスは、美肌作用に関し有用性を有し、多様な配合設計に利用できる。**

以上