

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7115778号  
(P7115778)

(45)発行日 令和4年8月9日(2022.8.9)

(24)登録日 令和4年8月1日(2022.8.1)

(51)国際特許分類 F I  
A 6 1 K 8/9789(2017.01) A 6 1 K 8/9789  
A 6 1 Q 19/02 (2006.01) A 6 1 Q 19/02

請求項の数 1 (全13頁)

(21)出願番号	特願2021-4343(P2021-4343)	(73)特許権者	505182454 学校法人四国大学 徳島県徳島市応神町古川字戎子野 1 2 3 - 1
(22)出願日	令和3年1月14日(2021.1.14)	(74)代理人	110000154 特許業務法人はるか国際特許事務所
(65)公開番号	特開2022-109030(P2022-109030 A)	(72)発明者	吉田 一郎 徳島県徳島市応神町古川字戎子野 1 2 3 - 1 四国大学短期大学部内
(43)公開日	令和4年7月27日(2022.7.27)	審査官	池田 周士郎
審査請求日	令和3年4月5日(2021.4.5)		
特許法第30条第2項適用	令和2年2月10日(月)		
令和元年度卒業実験要旨集、第3頁及び第15頁(四国大学短期大学部人間健康科食物栄養専攻)	令和2年2月10日(月)		
令和元年度卒業実験発表会、ポスター番号3(四国大学30周年記念館N209多目的室)			

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 メラニン生成抑制組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

阿波すず香の果皮抽出物を含有し、前記果皮抽出物の固形分換算の含有量が0.001重量%以上、0.03重量%以下である、メラニン生成抑制組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、メラニン生成抑制組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

柑橘類には、温州ミカン等の生食に適したものの以外に、レモンやユズ、スダチのように酸味が強く生食には向かないものの香りがよいため果汁や果皮を調味料等として用いる香酸柑橘類がある。

【0003】

阿波すず香は、スダチとユズの交配により徳島県が開発し、2017年に品種登録された新品種の香酸柑橘類である(登録番号26249)。阿波すず香は、種がほとんどなく、果汁が豊富であり、スダチとユズの間違った独特の香りを有し、糖度及びクエン酸含量はスダチより低くユズより高く、果皮はスダチのように硬く、店持ち及び貯蔵性がスダチやユズに比べて高いといった特徴を有する(非特許文献1, 2)。

【0004】

一方、特許文献1には、未成熟なユズ、ハッサク、グレープフルーツ及びバンペイユの果実の抽出物を細胞に添加した結果、メラニン合成抑制作用が確認されたことが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】特開2017-214349号公報

【非特許文献】

【0006】

【文献】徳島県立農林水産総合技術支援センターニュース、2015年8月、No.3、p 10  
6

徳島県立農林水産総合技術支援センター研究報告、2015年11月、No.2、p9-12

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の発明者は、独自に鋭意検討を重ねた結果、ユズ及びスダチの果皮抽出物は、細胞に添加された場合に細胞障害性を示すことがあることを見出した。

【0008】

本発明は、上記課題に鑑みて為されたものであり、安全性に優れ、且つ、細胞におけるメラニン生成を効果的に抑制するメラニン生成抑制組成物を提供することを目的とする。 20

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するための本発明の一実施形態に係るメラニン生成抑制組成物は、阿波すず香の果皮抽出物を含有する。本発明によれば、安全性に優れ、且つ、細胞におけるメラニン生成を効果的に抑制するメラニン生成抑制組成物を提供することができる。

【発明の効果】

【0010】

本発明によれば、安全性に優れ、且つ、細胞におけるメラニン生成を効果的に抑制するメラニン生成抑制組成物を提供することができる。 30

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】本発明の一実施形態に係る実施例1において、メラニン生成抑制効果を評価した結果を示す説明図である。

【図2】本発明の一実施形態に係る実施例1において、チロシナーゼ活性抑制効果を評価した結果を示す説明図である。

【図3】本発明の一実施形態に係る実施例2において、メラニン生成抑制効果を評価した結果を示す説明図である。

【図4】本発明の一実施形態に係る実施例2において、チロシナーゼ活性抑制効果を評価した結果を示す説明図である。 40

【図5】本発明の一実施形態に係る実施例3において、細胞生存率を評価した結果を示す説明図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下に、本発明の一実施形態に係るメラニン生成抑制組成物（以下、「本組成物」という。）について説明する。なお、本発明は本実施形態に限られるものではない。

【0013】

本組成物は、阿波すず香の果皮抽出物を含有するメラニン生成抑制組成物である。すなわち、本発明の発明者は、鋭意検討を重ねた結果、後述の実施例で実証されているように、ユズとスダチとの交配により生まれた阿波すず香の果皮抽出物が、意外にも、ユズの果 50

皮抽出物及びスダチの果皮抽出物のいずれに比べても細胞障害性が顕著に低く、したがって安全性に優れ、且つ、細胞におけるメラニン生成を効果的に抑制することを独自に見出し、本発明を完成するに至った。

**【0014】**

本組成物に含有される果皮抽出物は、抽出溶媒を用いて阿波すず香の果皮を抽出することにより得られる組成物である。抽出の対象とする阿波すず香の果皮は、本発明の効果が得られるものであれば特に限られず、阿波すず香の未熟な緑色の果皮であってもよいし、成熟した黄色の果皮であってもよいし、追熟した橙色の果皮であってもよい。また、阿波すず香の果皮は、乾燥させたものであってもよいし、乾燥させていないものであってもよいが、乾燥させた果皮が好ましく用いられる。

10

**【0015】**

阿波すず香の果実は、他の柑橘類と同様、果皮と、じょうのう（砂じょう及びこれを包むじょうのう膜から構成される）とを含むが、本発明に係る阿波すず香の果皮抽出物の調製には、当該じょうのうから分離された果皮（例えば、じょうのうから分離された後に乾燥させた果皮）が好ましく用いられる。すなわち、抽出の対象とする阿波すず香の果皮は、例えば、外果皮（フラベド）を含み、じょうのうを含まないことが好ましい。

**【0016】**

阿波すず香の果皮の抽出方法は、抽出溶媒を用いて当該果皮から果皮由来成分を抽出でき、本発明の効果が得られるものであれば特に限られないが、例えば、液体又は超臨界流体である抽出溶媒を用いる抽出方法（例えば、液体溶媒抽出法又は超臨界流体抽出法）が好ましく用いられる。

20

**【0017】**

抽出温度は、本発明の効果が得られる範囲であれば特に限られないが、例えば、0 超、100 以下であることが好ましく、1 以上、70 以下であることがより好ましく、1 以上、40 以下であることが特に好ましい。

**【0018】**

抽出時間は、本発明の効果が得られる範囲であれば特に限られないが、例えば、1時間以上であることが好ましく、12時間以上であることがより好ましく、24時間以上であることが特に好ましい。また、抽出時間は、例えば、12か月以下であることが好ましく、1か月以下であることがより好ましく、1週間以下であることが特に好ましい。抽出時間は、上述した下限値のいずれかと、上述した上限値のいずれかとを任意に組み合わせて特定されてもよい。

30

**【0019】**

抽出に用いる抽出溶媒の量は、本発明の効果が得られる範囲であれば特に限られないが、例えば、果皮1gに対して、1mL以上であることが好ましく、5mL以上であることが特に好ましい。また、抽出に用いる抽出溶媒の量は、例えば、果皮1gに対して、500mL以下であることが好ましく、100mL以下であることがより好ましく、20mL以下であることが特に好ましい。抽出に用いる抽出溶媒の量は、上述した下限値のいずれかと、上述した上限値のいずれかとを任意に組み合わせて特定されてもよい。

**【0020】**

阿波すず香の果皮の抽出に用いる抽出溶媒は、本発明の効果が得られるものであれば特に限られないが、例えば、有機系溶媒及び/又は超臨界流体が好ましく用いられる。有機系溶媒は、有機溶媒を含む溶媒であって本発明の効果が得られるものであれば特に限られない。

40

**【0021】**

有機溶媒は、本発明の効果が得られるものであれば特に限られないが、例えば、アルコール類、ケトン類（例えば、アセトン、メチルエチルケトン）、エーテル類（例えば、ジエチルエーテル）、エステル類（例えば、酢酸メチル、酢酸エチル）、アルカン類（例えば、ヘキサン）、及びシクロアルカン類（例えば、シクロヘキサン）からなる群より選択される1以上であってもよく、アルコール類であることが好ましい。

50

## 【0022】

アルコール類は、本発明の効果が得られるものであれば特に限られないが、例えば、低級1価アルコール、及び/又は、多価アルコールであることが好ましい。低級1価アルコールは、本発明の効果が得られるものであれば特に限られないが、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、及び2-ブタノールからなる群より選択される1以上であることが好ましく、エタノール、1-プロパノール、及びイソプロパノールからなる群より選択される1以上であることがより好ましく、エタノールであることが特に好ましい。多価アルコールは、本発明の効果が得られるものであれば特に限られないが、例えば、エチレングリコール、1,3-ブチレングリコール、プロピレングリコール、イソプレングリコール、グリセリン、及びジグリセリンからなる群より選択される1以上であることが好ましい。

10

## 【0023】

有機系溶媒は、有機溶媒のみから構成されるものであってもよいが、有機溶媒と水との混合溶媒であることが好ましい。有機系溶媒が有機溶媒と水との混合溶媒である場合、当該有機系溶媒は、例えば、20体積%以上、100体積%未満の有機溶媒と、0体積%超、80体積%以下の水とを含むこととしてもよく、30体積%以上、95体積%以下の有機溶媒と、5体積%以上、70体積%以下の水とを含むこととしてもよく、40体積%以上、95体積%以下の有機溶媒と、5体積%以上、60体積%以下の水とを含むこととしてもよい。

## 【0024】

さらに、有機系溶媒は、例えば、50体積%以上、95体積%以下の有機溶媒と、5体積%以上、50体積%以下の水とを含むことが好ましく、60体積%以上、95体積%以下の有機溶媒と、5体積%以上、40体積%以下の水とを含むことがより好ましく、70体積%以上、95体積%以下の有機溶媒と、5体積%以上、30体積%以下の水とを含むことがより一層好ましく、70体積%以上、90体積%以下の有機溶媒と、10体積%以上、30体積%以下の水とを含むことが特に好ましい。

20

## 【0025】

抽出溶媒としての超臨界流体は、本発明の効果が得られるものであれば特に限られないが、例えば、二酸化炭素が好ましく用いられる。

## 【0026】

上述した阿波すず香の果皮の抽出により、阿波すず香の果皮抽出物が得られる。果皮抽出物は、阿波すず香の果皮由来成分を含有する。より具体的に、果皮抽出物は、阿波すず香の果皮由来脂溶性成分を含有する。阿波すず香の果皮由来脂溶性成分を含有する果皮抽出物は、例えば、阿波すず香の果皮の有機系溶媒抽出物及び/又は超臨界抽出物であることとしてもよい。また、果皮抽出物の調製において、抽出の対象となった果皮の残渣をろ過等により除去した結果、最終的に得られる当該果皮抽出物（例えば、本組成物の製造において原料として用いられる果皮抽出物）は、当該果皮を含まないこととしてもよい。

30

## 【0027】

果皮抽出物は、抽出により調製された後そのまま本組成物の原料として用いられてもよいし、さらにろ過、濃縮、希釈、分画又は乾燥等の処理が施された後に本組成物の原料として用いられてもよい。

40

## 【0028】

すなわち、例えば、まず抽出により調製された果皮抽出物から抽出溶媒を除去し、乾燥させることにより固形状（例えば、乾燥粉末）の果皮抽出物を調製し、その後、当該固形状の果皮抽出物をそのまま、又は溶媒に溶解して液状の果皮組成物として、本組成物の原料として用いてもよい。

## 【0029】

本組成物は、上述のようにして調製される阿波すず香の果皮抽出物を、メラニン生成抑制の有効成分として含有する。すなわち、本組成物は、阿波すず香の果皮抽出物を、当該果皮抽出物を含有しない場合に比べてメラニン生成抑制効果が高められる範囲内の量で、

50

含有する。

【0030】

本組成物における果皮抽出物の含有量は、本発明の効果が得られる範囲内であれば特に限られないが、本組成物における果皮抽出物の固形分換算の含有量は、例えば、0.0005重量%以上であることとしてもよく、0.001重量%以上であることが好ましく、0.005重量%以上であることがより好ましく、0.01重量%以上であることが特に好ましい。

【0031】

本組成物における果皮抽出物の固形分換算の含有量の上限值は、本発明の効果が得られる範囲内であれば特に限られないが、例えば、20重量%以下であることとしてもよく、15重量%以下であることとしてもよく、10重量%以下であることとしてもよく、5重量%以下であることとしてもよく、1重量%以下であることとしてもよく、0.1重量%以下であることとしてもよく、0.05重量%以下であることとしてもよく、0.03重量%以下であることとしてもよい。本組成物における果皮抽出物の固形分換算の含有量は、上述した下限値のいずれかと、上述した上限値のいずれかとを任意に組み合わせて特定されてもよい。

10

【0032】

本組成物の形態は、本発明の効果が得られるものであれば特に限られず、液状（流動性を有する組成物）であってもよいし、固形状（流動性を有しない組成物）であってもよい。

【0033】

本組成物は、例えば、外用組成物であってもよく、具体的には、皮膚外用組成物であることが好ましい。すなわち、本組成物は、皮膚に塗布して使用される外用剤であってもよい。この場合、本組成物は、例えば、乳液、クリーム、ローション、軟膏、ジェル、フォーム、粉剤、スプレー剤、貼付剤、パック、又はマスクであってもよい。

20

【0034】

また、本組成物は、例えば、経口摂取用組成物であってもよい。すなわち、本組成物は、いわゆるサプリメント等の機能性飲食品であってもよい。この場合、本組成物は、例えば、液剤、シロップ剤、懸濁剤、乳剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、又はゼリー剤であってもよい。また、本組成物は、例えば、化粧品であってもよいし、医薬部外品であってもよいし、医薬品であってもよい。

30

【0035】

本組成物は、阿波すず香の果皮抽出物に加えて、他の成分を含有してもよい。他の成分は、通常の化粧品、外用剤、医薬部外品、医薬品等に使用し得る成分であれば特に限られない。

【0036】

具体的に、他の成分は、例えば、保湿剤、酸化防止剤、安定化剤、油性成分、乳化剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、紫外線吸収剤、溶剤、界面活性剤、アルコール類、水溶性高分子、殺菌剤、抗菌剤、ビタミン剤、pH調整剤、粘度調整剤、防腐剤、香料、及び色素からなる群より選択される1以上であってもよい。また、本組成物は、公知の美白成分（例えば、アルブチン、コウジ酸、アスコルビン酸及びその誘導体）をさらに含有してもよい。

40

【0037】

本組成物は、阿波すず香の果皮抽出物を含有することにより、生体の細胞におけるメラニンの生成を効果的に抑制する。すなわち、後述の実施例でも実証されているように、阿波すず香の果皮抽出物を細胞に接触させることにより、当該接触がなければ当該細胞におけるメラニンの過剰生成が誘導されるような場合においても、当該細胞におけるメラニンの生成を効果的に抑制することができる。

【0038】

したがって、本組成物を生体に適用することにより、当該生体の細胞におけるメラニンの生成を抑え、例えば、シミやソバカスを効果的に防ぐことができる。具体的に、本組成

50

物は、例えば、美白剤や、色素沈着症（例えば、肝斑、老人性色素斑、炎症後色素斑）改善剤として利用することができる。

【0039】

この点、阿波すず香の果皮に由来するメラニン生成抑制成分としては、当該果皮由来の脂溶性成分が特に有効である。このため、例えば、本組成物を皮膚外用組成物として皮膚に塗布した場合、当該脂溶性成分は汗などで流れにくいことから、本組成物は当該皮膚の細胞に効果的に作用して、メラニン生成を効果的に抑制することができる。

【0040】

また、阿波すず香の果皮は、従来 of 香酸柑橘に比べて苦味が少ないことから、本組成物は、美白や色素沈着症の改善のための機能性食品としても利用しやすい。また、阿波すず香の果皮としては、未熟なもの、成熟したもの、追熟したもののいずれも利用できることから、本組成物の製造は、阿波すず香の収穫時期や保存期間による制限を受けにくい。

【0041】

次に、本実施形態に係る具体的な実施例について説明する。

【実施例1】

【0042】

[果皮抽出物の調製] 未熟な阿波すず香の緑色の果皮（緑果皮）、成熟した阿波すず香の黄色の果皮（黄果皮）、及び追熟した阿波すず香の橙色の果皮（橙果皮）をそれぞれ50で2時間乾燥することにより、阿波すず香の乾燥緑果皮、乾燥黄果皮、及び乾燥橙果皮を調製した。

【0043】

次いで、各乾燥果皮の抽出物を調製した。抽出溶媒としては、80体積%のエタノールと20体積%の水を含むエタノール溶液を使用した。具体的に、乾燥果皮5.0gにエタノール溶液40mLを加え、ホモゲナイザーを用いて果皮を粉碎した。

【0044】

その後、粉碎された果皮を含むエタノール溶液を4で24時間静置することにより、抽出を行った。抽出後、3500rpmで10分遠心分離して果皮の残渣を沈殿させ、約40mLの上澄み液を果皮抽出物として得た。こうして、阿波すず香の乾燥緑果皮、乾燥黄果皮、及び乾燥橙果皮から、それぞれ阿波すず香の緑果皮抽出物、黄果皮抽出物、及び橙果皮抽出物を得た。

【0045】

なお、黄果皮抽出物（乾燥黄果皮5.0gをエタノール溶液40mLにて抽出し、遠心分離した後の上澄み液）10mLを乾燥させ、残った固形分の重量を測定すると、0.38gであった。すなわち、黄果皮抽出物の固形分含有量は、0.038g/mL（=0.38g÷10mL）（約3.8重量%）であった。

【0046】

[果皮抽出物の細胞添加試験] マウスB16メラノーマ細胞を市販の24ウェルプレート of 各ウェルに播種し（20000個/ウェル）、5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気中、37で一晚培養した。

【0047】

一方、上述のようにして得られた果皮抽出物1体積部を、細胞培養用の培地199体積部に添加することにより、体積比で200倍に希釈された当該果皮抽出物を含む果皮抽出物添加培地を調製した。

【0048】

そして、果皮抽出物添加培地を細胞が培養されている各ウェルに0.5mLずつ添加し、5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気中、37で30分培養した。なお、体積比で200倍に希釈された黄果皮抽出物を含む黄果皮抽出物添加培地における黄果皮抽出物の固形分換算の含有量は、0.00019g/mL（=0.038g/mL÷200）（約0.019重量%）であった。

【0049】

10

20

30

40

50

次いで、 $\alpha$ -MSH (Melanocyte-Stimulating Hormone) を水に溶解して  $\alpha$ -MSH 溶液を調製し、終濃度が  $1 \mu\text{M}$  となる量の当該  $\alpha$ -MSH 溶液を各ウェルに添加し、 $5\% \text{CO}_2 / 95\% \text{空気}$  雰囲気中、 $37^\circ\text{C}$  でさらに 72 時間培養した。なお、 $\alpha$ -MSH は、メラノサイトのメラニン生成を活性化する因子である。その後、各ウェルについて、後述するようにタンパク質含有量、メラニン含有量及びチロシナーゼ活性を評価した。

【0050】

[タンパク質含有量] 上述のようにして細胞を 72 時間培養した後の各ウェルにおけるタンパク質含有量を測定した。すなわち、まず各ウェルを PBS ( $0.5 \text{mL} / \text{ウェル}$ ) で 1 回洗浄後、各ウェルに  $0.1 \text{M}$  リン酸ナトリウム緩衝液 ( $1\% \text{Triton X-100}$ 、 $\text{protease inhibitor}$ 、 $\text{pH} 6.8$ )  $0.15 \text{mL}$  を添加し、細胞をスクレーパーで掻き取って回収した。

10

【0051】

次いで、回収した懸濁液を  $4^\circ\text{C}$  にて  $14000 \text{rpm}$  で 10 分遠心分離した。そして、遠心分離後の上澄み液  $4 \mu\text{L}$  を、市販のキット (Takara Bradford Protein Assay Kit) の  $0.2 \text{mL}$  の Bradford Dye Reagent に加え、室温で 5 分間反応後、波長  $595 \text{nm}$  における吸光度を測定した。

【0052】

[メラニン含有量] 上述のようにして細胞を 72 時間培養した後の各ウェルにおけるメラニン含有量を測定した。すなわち、まず各ウェルを PBS ( $0.5 \text{mL} / \text{ウェル}$ ) で 1 回洗浄後、各ウェルに  $1 \text{N}$  水酸化ナトリウム  $0.15 \text{mL}$  を添加し、細胞をスクレーパーで掻き取って回収した。

20

【0053】

次いで、回収した懸濁液を  $100^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させることによりメラニンを抽出し、その後、 $14000 \text{rpm}$  で 10 分遠心分離した。そして、遠心分離後の上澄み液の波長  $405 \text{nm}$  における吸光度を測定した。さらに、各ウェルについて、メラニン含有量測定で得られた吸光度 (波長  $405 \text{nm}$ ) を、タンパク質含有量測定で得られた吸光度 (波長  $595 \text{nm}$ ) で除して得られた値を、当該各ウェルにおけるタンパク質含有量あたりのメラニン含有量として用いた。

【0054】

[チロシナーゼ活性] 上述のようにして細胞を 72 時間培養した後の各ウェルにおけるチロシナーゼ活性を測定した。すなわち、まず各ウェルを PBS ( $0.5 \text{mL} / \text{ウェル}$ ) で 1 回洗浄後、各ウェルに  $0.1 \text{M}$  リン酸ナトリウム緩衝液 ( $1\% \text{Triton X-100}$ 、 $\text{protease inhibitor}$ 、 $\text{pH} 6.8$ )  $0.15 \text{mL}$  を添加し、細胞をスクレーパーで掻き取って回収した。

30

【0055】

次いで、回収した懸濁液を  $4^\circ\text{C}$  にて  $14000 \text{rpm}$  で 10 分遠心分離した。そして、遠心分離後の上澄み液を細胞内チロシナーゼ含有液とし、これに基質として  $2.5 \text{mM}$  の L-DOPA を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で 30 分間反応後、波長  $475 \text{nm}$  における吸光度を測定した。さらに、各ウェルについて、チロシナーゼ活性測定で得られた吸光度 (波長  $475 \text{nm}$ ) を、タンパク質含有量測定で得られた吸光度 (波長  $595 \text{nm}$ ) で除して得られた値を、当該各ウェルにおけるタンパク質含有量あたりのチロシナーゼ活性として用いた。

40

【0056】

[結果] 図 1 には、タンパク質含有量あたりのメラニン含有量を評価した結果を示す。図 1 の横軸において、「 $\alpha$ -MSH + 緑果皮」、「 $\alpha$ -MSH + 黄果皮」及び「 $\alpha$ -MSH + 橙果皮」は、それぞれ上述のように、阿波すず香の緑果皮抽出物、黄果皮抽出物、及び橙果皮抽出物を細胞に添加し、さらに  $\alpha$ -MSH を添加した群 (いずれも  $n = 3$ ) の結果を示す。

【0057】

一方、図 1 の横軸において、「対照」は、果皮抽出物に代えて抽出溶媒 (エタノール溶

50

液)を添加し、 $\beta$ -MSHは添加しなかった群( $n=3$ )、「緑果皮」、「黄果皮」及び「橙果皮」は、それぞれ緑果皮抽出物、黄果皮抽出物及び橙果皮抽出物を添加し、 $\beta$ -MSHは添加しなかった群(いずれも $n=3$ )、「 $\beta$ -MSH」は果皮抽出物に代えて抽出溶媒(エタノール溶液)を添加し、さらに $\beta$ -MSHを添加した群( $n=3$ )を示す。

【0058】

また、図1の縦軸は、「対照」におけるタンパク質含有量あたりのメラニン含有量を「1」とした場合の、各群におけるタンパク質含有量あたりのメラニン含有量の相対値を示す。

【0059】

図1に示すように、「緑果皮」、「黄果皮」及び「橙果皮」においては、「対照」に比べてメラニン含有量が顕著に低下した。すなわち、阿波すず香の成熟度に関わらず、阿波すず香の果皮抽出物を添加することにより、細胞におけるメラニンの生成が顕著に抑制された。

10

【0060】

また、「 $\beta$ -MSH」においては、「対照」に比べてメラニン含有量が顕著に増加した。すなわち、予め阿波すず香の果皮抽出物を添加することなく、 $\beta$ -MSHを添加した群では、細胞におけるメラニンの過剰生成が起こった。

【0061】

これに対し、「 $\beta$ -MSH+緑果皮」、「 $\beta$ -MSH+黄果皮」及び「 $\beta$ -MSH+橙果皮」におけるメラニン含有量は、「 $\beta$ -MSH」に比べて顕著に低減され、「対照」と同程度以下であった。

20

【0062】

すなわち、予め阿波すず香の果皮抽出物を添加することにより、その後に $\beta$ -MSHを添加した場合であっても(すなわち、メラニンの過剰生成が誘導されるような環境であっても)、阿波すず香の成熟度に関わらず、細胞におけるメラニンの過剰生成が顕著に抑制された。

【0063】

図2には、タンパク質含有量あたりのチロシナーゼ活性を評価した結果を示す。図2の横軸は図1と同様である。図2の縦軸は、「対照」におけるタンパク質含有量あたりのチロシナーゼ活性を「1」とした場合の、各群におけるタンパク質含有量あたりのチロシナーゼ活性の相対値を示す。

30

【0064】

図2に示すように、「緑果皮」及び「黄果皮」においては、「対照」に比べてチロシナーゼ活性が低下した。すなわち、阿波すず香の成熟度に関わらず、阿波すず香の果皮抽出物を添加することにより、細胞におけるチロシナーゼ活性が抑制された。

【0065】

また、「 $\beta$ -MSH」においては、「対照」に比べてチロシナーゼ活性が顕著に増加した。すなわち、予め阿波すず香の果皮抽出物を添加することなく、 $\beta$ -MSHを添加した群では、細胞におけるチロシナーゼの過剰な活性化が起こった。

【0066】

これに対し、「 $\beta$ -MSH+緑果皮」及び「 $\beta$ -MSH+黄果皮」におけるチロシナーゼ活性は、「 $\beta$ -MSH」に比べて顕著に低減された。すなわち、予め阿波すず香の果皮抽出物を添加することにより、その後に $\beta$ -MSHを添加した場合であっても、阿波すず香の成熟度に関わらず、細胞におけるチロシナーゼの過剰な活性化が顕著に抑制された。

40

【実施例2】

【0067】

[果皮抽出物の調製] 上述の実施例1と同様にして、成熟した阿波すず香の果皮抽出物(黄果皮抽出物)を調製した。

【0068】

[果皮抽出物の分画] まず上述のようにして調製された果皮抽出物500 $\mu$ Lからエバ

50



ポレーターを用いて溶媒を蒸発させた。次いで、水500 $\mu$ Lを加えて水溶性成分を溶解させた。さらに酢酸エチル500 $\mu$ Lを加え、vortexを用いて攪拌した。その後、15000rpmで5分遠心分離することで、互いに分離された酢酸エチル層と水層とを形成した。

【0069】

そして、酢酸エチル層（上層）400 $\mu$ Lを採取して乾燥固化し、得られた固形分をエタノール200 $\mu$ Lに溶解して、約200 $\mu$ Lの脂溶性画分を得た。一方、水層（下層）400 $\mu$ Lを採取し、フィルター滅菌し、エバポレーターで30分処理して、約200 $\mu$ Lの水溶性画分を得た。

【0070】

〔果皮抽出物の細胞添加試験〕果皮抽出物に代えて、脂溶性画分又は水溶性画分を用いたこと以外は上述の実施例1と同様にして、マウスB16メラノーマ細胞に当該脂溶性画分又は水溶性画分を添加し、タンパク質含有量、メラニン含有量及びチロシナーゼ活性を評価した。

【0071】

〔結果〕図3には、タンパク質含有量あたりのメラニン含有量を評価した結果を示す。図3の横軸において、「-MSH+脂溶性画分」及び「-MSH+水溶性画分」は、それぞれ阿波すず香の黄果皮抽出物の脂溶性画分及び水溶性画分を細胞に添加し、さらに-MSHを添加した群（いずれもn=3）の結果を示す。

【0072】

一方、図3の横軸において、「対照」は、脂溶性画分及び水溶性画分に代えて抽出溶媒（80体積%エタノール溶液）を添加し、-MSHは添加しなかった群（n=3）、「脂溶性画分」及び「水溶性画分」は、それぞれ脂溶性画分及び水溶性画分を添加し、-MSHは添加しなかった群（いずれもn=3）、「-MSH」は脂溶性画分及び水溶性画分に代えて抽出溶媒（80体積%エタノール溶液）を添加し、さらに-MSHを添加した群（n=3）を示す。

【0073】

また、図3の縦軸は、「対照」におけるタンパク質含有量あたりのメラニン含有量を「1」とした場合の、各群におけるタンパク質含有量あたりのメラニン含有量の相対値を示す。

【0074】

図3に示すように、「脂溶性画分」におけるメラニン含有量は、「対照」の6割程度に低下した。また、「水溶性画分」におけるメラニン含有量は、「対照」の7割程度に低下した。すなわち、阿波すず香の果皮抽出物の脂溶性画分は、当該果皮抽出物の水溶性画分よりも大きくメラニン含有量を低下させた。

【0075】

また、「-MSH」においては、「対照」に比べてメラニン含有量が顕著に増加した。すなわち、予め阿波すず香の果皮抽出物を添加することなく、-MSHを添加した群では、細胞におけるメラニンの過剰生成が起こった。

【0076】

これに対し、「-MSH+脂溶性画分」におけるメラニン含有量は、「-MSH」に比べて顕著に低減され、「対照」と同程度であった。すなわち、予め阿波すず香の果皮抽出物の脂溶性画分を添加することにより、その後に-MSHを添加した場合であっても（すなわち、メラニンの過剰生成が誘導されるような環境であっても）、細胞におけるメラニンの過剰生成が顕著に抑制された。

【0077】

一方、「-MSH+水溶性画分」におけるメラニン含有量は、「-MSH」と同程度であった。すなわち、阿波すず香の果皮抽出物に含有される果皮由来成分のうち、特に脂溶性画分に含まれる成分（果皮由来脂溶性成分）がメラニン生成を効果的に抑制していると考えられた。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 8 】

図 4 には、タンパク質含有量あたりのチロシナーゼ活性を評価した結果を示す。図 4 の横軸は図 3 と同様である。図 4 の縦軸は、「対照」におけるタンパク質含有量あたりのチロシナーゼ活性を「1」とした場合の、各群におけるタンパク質含有量あたりのチロシナーゼ活性の相対値を示す。

## 【 0 0 7 9 】

図 4 に示すように、「脂溶性画分」におけるチロシナーゼ活性は、「対照」の 2 割程度に低下した。また、「水溶性画分」におけるチロシナーゼ活性は、「対照」の 5 割程度に低下した。すなわち、阿波すず香の果皮抽出物の脂溶性画分は、当該果皮抽出物の水溶性画分よりも大きくチロシナーゼ活性を低下させた。

10

## 【 0 0 8 0 】

また、「 $\alpha$ -MSH」においては、「対照」に比べてチロシナーゼ活性が顕著に増加した。すなわち、予め阿波すず香の果皮抽出物を添加することなく、 $\alpha$ -MSH を添加した群では、細胞におけるチロシナーゼの過剰な活性化が起こった。

## 【 0 0 8 1 】

これに対し、「 $\alpha$ -MSH + 脂溶性画分」におけるチロシナーゼ活性は、「 $\alpha$ -MSH」に比べて顕著に低減された。すなわち、予め阿波すず香の果皮抽出物の脂溶性画分を添加することにより、その後 $\alpha$ -MSH を添加した場合であっても、細胞におけるチロシナーゼの過剰な活性化が顕著に抑制された。

## 【 0 0 8 2 】

一方、「 $\alpha$ -MSH + 水溶性画分」におけるチロシナーゼ活性は、「 $\alpha$ -MSH」と同程度であった。すなわち、阿波すず香の果皮抽出物に含まれる果皮由来成分のうち、特に脂溶性画分に含まれる成分（果皮由来脂溶性成分）がチロシナーゼ活性を効果的に抑制していると考えられた。

20

## 【 実施例 3 】

## 【 0 0 8 3 】

〔果皮抽出物の調製〕成熟した阿波すず香の果皮（黄果皮）、成熟したスダチの果皮、及び成熟したユズの果皮をそれぞれ 50 g で 2 時間乾燥することにより、阿波すず香の乾燥果皮、スダチの乾燥果皮、及びユズの乾燥果皮を調製した。

## 【 0 0 8 4 】

次いで、上述の実施例 1 と同様にして、阿波すず香の乾燥果皮、スダチの乾燥黄果皮、及びユズの乾燥果皮のエタノール溶液による抽出を行い、阿波すず香の果皮抽出物、スダチの果皮抽出物、及びユズの果皮抽出物を得た。

30

## 【 0 0 8 5 】

〔果皮抽出物の細胞添加試験〕マウス B 16 メラノーマ細胞を市販の 96 ウェルプレート（各ウェルに播種し（5000 個/ウェル）、5% CO<sub>2</sub> / 95% 空気雰囲気中、37℃ で一晩培養した。

## 【 0 0 8 6 】

一方、上述のようにして得られた果皮抽出物を、細胞培養用の培地に添加することにより、体積比で 100 倍、200 倍、300 倍、400 倍、500 倍、600 倍、700 倍、又は 800 倍に希釈された当該果皮抽出物を含む果皮抽出物添加培地を調製した。そして、果皮抽出物添加培地を細胞が培養されている各ウェルに 0.1 mL ずつ添加し、5% CO<sub>2</sub> / 95% 空気雰囲気中、37℃ で 72 時間培養した（各群 n = 3）。

40

## 【 0 0 8 7 】

〔細胞生存率〕上述のようにして 72 時間培養した後の各ウェルにおける細胞の生存率を MTT アッセイ法により評価した。すなわち、細胞が培養されているウェル内の培地に、終濃度が 0.5 mg/mL となる量の MTT（3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide）を添加し、5% CO<sub>2</sub> / 95% 空気雰囲気中、37℃ で 2 時間培養した。

## 【 0 0 8 8 】

50

次いで、ウェルから培地を除去するとともに、DMSOを添加し、さらに5%CO<sub>2</sub>/95%空気雰囲気中、37℃で1時間、細胞を培養した。その後、細胞及びDMSOをウェルから回収し、懸濁液の波長570nmにおける吸光度を測定した。

【0089】

[結果] 図5には、細胞生存率を評価した結果を示す。図5において、黒塗りの丸印は「阿波すず香」の果皮抽出物を添加した群、黒塗りの三角印は「スダチ」の果皮抽出物を添加した群、及び黒塗りの四角印は「ユズ」の果皮抽出物を添加した群の結果を示し、白抜きの丸印は、果皮抽出物に代えて抽出溶媒(80体積%エタノール溶液)を添加した群(「対照」)の結果を示す(各点n=3の平均値)。

【0090】

図5において、横軸は、培地への添加による果皮抽出物又は抽出溶媒の希釈倍率(体積比)を示し、縦軸は、抽出溶媒を体積比で800倍に希釈して培地に添加した「対照」の群の波長570nmにおける吸光度を細胞生存率100%とした場合における、他の群の相対的な細胞生存率(%)を示す。

【0091】

すなわち、例えば、「阿波すず香」の「x200」における細胞生存率は、体積比で200倍に希釈された阿波すず香の果皮抽出物を含む果皮抽出物添加培地を用いた群の波長570nmにおける吸光度を、体積比で800倍に希釈された抽出溶媒を含む抽出溶媒添加培地を用いた群の波長570nmにおける吸光度で除して、さらに「100」を乗じた値として算出した。

【0092】

図5に示すように、「スダチ」の果皮抽出物は、希釈率が700倍以下の場合には細胞生存率が10%程度以下であり、800倍に希釈して添加した場合においても細胞生存率は40%程度と非常に低かった。すなわち、「スダチ」の果皮抽出物は、希釈率が800倍以下の場合には、顕著な細胞障害性を示すことが確認された。

【0093】

また、「ユズ」の果皮抽出物は、500倍以上に希釈して添加した場合の細胞生存率は「対照」及び「阿波すず香」と同等であったが、希釈率が400倍以下の場合には細胞生存率が顕著に低下した。すなわち、「ユズ」の果皮抽出物は、希釈率が400倍以下の場合には、顕著な細胞障害性を示すことが確認された。

【0094】

これに対し、「阿波すず香」の果皮抽出物は、希釈率が100倍以下の場合には「スダチ」や「ユズ」と同様に細胞生存率が顕著に低下したが、200倍以上に希釈して添加した場合の細胞生存率は「対照」と同等であった。すなわち、「阿波すず香」の果皮抽出物は、少なくとも200倍以上に希釈すれば、細胞障害性を示さないことが確認された。

【0095】

このように、「阿波すず香」は「スダチ」と「ユズ」との交配により生まれたにもかかわらず、「阿波すず香」の果皮抽出物は、意外にも、「スダチ」の果皮抽出物及び「ユズ」の果皮抽出物のいずれに比べても細胞障害性が顕著に小さいことが確認された。

10

20

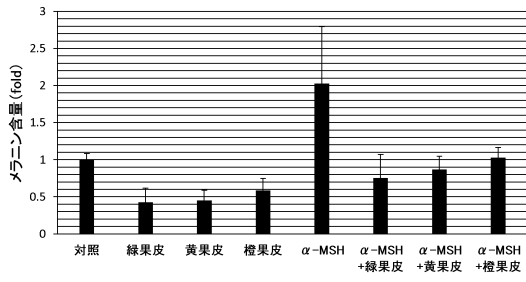
30

40

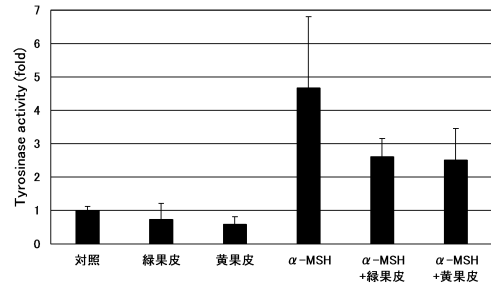
50

【 図 面 】

【 図 1 】

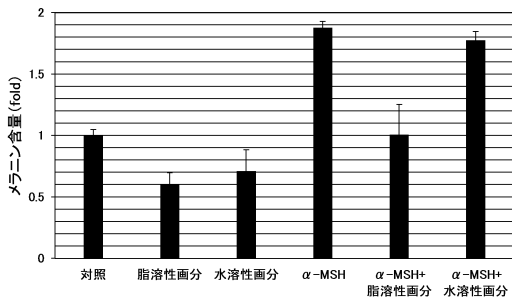


【 図 2 】

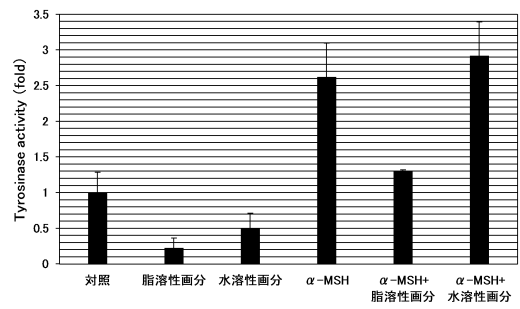


10

【 図 3 】

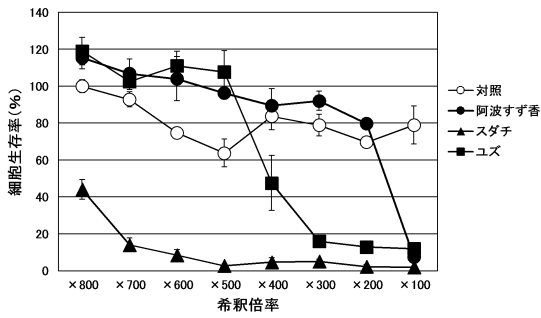


【 図 4 】



20

【 図 5 】



30

40

50

## フロントページの続き

- (56)参考文献 特開 2013 - 118887 (JP, A)  
 特開 2017 - 214349 (JP, A)  
 特開 2001 - 200237 (JP, A)  
 特開 2017 - 226612 (JP, A)  
 韓国公開特許第 10 - 2011 - 0029740 (KR, A)  
 新居佳考, 池田絵梨, 県産農産物の抗酸化活性とポリフェノール量, 徳島県立工業技術センター研究報告, 徳島県立工業技術センター企画情報課, 2020年03月, Vol.28, p.1-4  
 永田 武 Takeshi Nagata Takeshi Nagata, 新規ポリフェノール「テアデノール」の美白作用 Skin whitening activity of new polyphenol "Teadenol", フレグランスジャーナル 11月号, 第40巻, 宇野 浩一 フレグランス ジャーナル社  
 ポリフェノール食品・素材の開発と利用～新知見・新素材も続々、市場は形成期から成長期に突入～ Development and Utilization of Phytochemicals Containing "Polyphenols", 食品と開発 6月号, 第40巻, 牧野 順一 CMPジャパン株式会社  
 中島光廣, 外 6 名, 三倍体香酸カンキツ新品種 '阿波すず香' の育成, 徳島県立農林水産総合技術支援センター研究報告, 徳島県立農林水産総合技術支援センター, 2015年11月, No.2, p.9-12  
 [学会報告], フレグランスジャーナル FRAGRANCE JOURNAL, 第47巻, フレグランスジャーナル社 FRAGRANCE JOURNAL LTD. 宇野 浩一
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
 A 6 1 K 8 / 0 0 - 8 / 9 9  
 A 6 1 Q 1 / 0 0 - 9 0 / 0 0  
 M i n t e l G N P D  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )