【原 著】

リボフラビン溶液中への UVA 照射によるスーパーオキシド生成に対する各種精油（エッセンシャルオイル）の効果

Effects of Some Essential Oils on Superoxide Radical Formation in the Reaction Mixture of Riboflavin under UVA Irradiation

森 広子^{1,2,*}, 岩橋秀夫¹Hiroko MORI^{1,2,*}, Hideo IWAHASHI¹¹ 和歌山県立医科大学大学院医学研究科生体分子解析学² 森ノ宮医療学園専門学校

【要 旨】

目的：リボフラビン溶液への UVA (365 nm) 照射によるスーパーオキシド生成に対するティートリーオイル等各種精油の影響について検討した。

方法：15 μ M リボフラビン, 0.10 M DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide), 23 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 6.3 % (v/v) DMSO (dimethyl sulfoxide) を含む反応溶液（標準反応溶液）に UVA (365 nm) を照射し, ESR (electron spin resonance: 電子スピン共鳴) を測定した。

結果：標準反応溶液に各種精油を種々の濃度で添加すると, ESR ピーク高は濃度依存的に減少した。

結論：各種精油の抗酸化能は以下の順に大きくなった：ラベンダースーパーオイル<グレープフルーツオイル<ペパーミントオイル<ティートリーオイル<ウインターグリーンオイル。

【キーワード】

リボフラビン, スーパーオキシド, ティートリーオイル, 電子スピン共鳴

はじめに

アロマセラピーで用いられる精油中には、有機化合物が数十～数百種類含まれており、特有の香りと様々な薬理作用がある^{1,2)}。このようなことから、アロマセラピーは補完代替医療の一つとして研究が進められている³⁻⁵⁾。

紫外線により、一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、スーパーオキシド (O_2^-)、ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$)、過酸化水素 (H_2O_2) など各種活性酸素が生成される。精油の一重項酸素への影響については詳細な研究が進められており、各種精油の一重項酸素消去能あるいは一重項酸素生成促進作用が明らかとなっている⁶⁻⁸⁾。しかしながら、UVA (ultraviolet-A) 照射下でのスーパーオキシド生成に対する、精油の抗酸化能についての研究はほとんど行われていない。

リボフラビンは光増感剤として知られており、リボフラビンを含む反応溶液に UVA を照射すると、一重項酸素やスーパーオキシドが生成すると報告されている⁹⁻¹³⁾。今回我々は、精油のスーパーオキシドに対する影響について検討を行うために、リボフラビンを含む反応溶液中のスーパーオキシド生成に対しティートリーオイル等各種精油の抗酸化能について、ESR (electron spin resonance: 電子スピン共鳴) 装置を用いて検討を行った。

受理日：2009年5月13日

* 〒537-0022 大阪市東成区中本 4-1-8 森ノ宮医療学園専門学校教務部 Tel: 06-6976-6889 Fax: 06-6973-3133

E-mail: hiroko@morinomiya.ac.jp

材料と方法

1. 材料

抗炎症作用があると言われている精油の中で、特に使用頻度の高い、ラベンダースーパーオイル (*Lavandula burnatii Super*), グレープフルーツオイル (*Citrus paradisi*), ペパーミントオイル (*Mentha piperita*), ティートリーオイル (*Melaleuca alternifolia*), ウインターグリーンオイル (*Gaultheria procumbens*) の5種類 (PRANAROM 社, フランス) の精油を使用した。

反応水溶液への溶解性を上げるために、精油を DMSO (dimethyl sulfoxide, 和光純薬工業株式会社, 大阪府) に希釈し使用した。光増感剤としてリボフラビン (和光純薬株式会社, 大阪府), スピントラップ剤として DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide, 東京化成工業株式会社, 東京都) を使用した。反応における過酸化水素の関与を調べるためにカタラーゼ (Sigma-Aldrich 社, St Louis, Mo., USA) を, スーパーオキシドの関与を調べるために SOD (superoxide dismutase: Sigma-Aldrich 社, St Louis, Mo., USA) を使用した。

2. 方法

標準反応溶液として, 15 μ M リボフラビン, 0.10 M DMPO, 23 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4), 6.3% (v/v) DMSO を含む混合溶液を用いた。高圧水銀光源 REX-250 とバンドパスフィルター (朝日分光株式会社, 東京) を用いて 365 nm の UVA をこの標準反応溶液に 30 秒間照射した。UVA 照射エネルギーは 0.65 J/cm² であった。リボフラビン標準反応溶液に, 濃度 0.0015% (v/v) から 0.13% (v/v) のラベンダースーパーオイル, グレープフルーツオイル, ペパーミントオイル, ティートリーオイル, ウインターグリーンオイルをそれぞれ加え, 反応溶液の ESR シグナルを測定した。さらに, 強いスーパーオキシド生成阻害活性を認めたティートリーオイルとウインターグリーンオイル中の主成分である α -テルピネン, γ -テルピネン, テルピネン-4-オールおよびサリチル酸メチルをそれぞれ反応液へ添加して, ESR シグナルを測定した。ESR 測定には JES-FR 30 Free Radical Monitor (日本電子社, 東京都) を使用した。

結 果

1. リボフラビン標準反応溶液中のラジカル生成に対する SOD, カタラーゼおよびエタノール添加の影響

リボフラビン標準反応溶液に, 365 nm の UVA 照射を 30 秒間行くと DMPO/OH ラジカルアダクトの ESR スペ

クトルが検出された (図 1-A)。本標準反応溶液に SOD (0.93 U/ml, 9.3 U/ml, 93 U/ml) を添加すると, ESR ピーク高は濃度依存的に増加した (標準反応溶液に対し, 130%, 180%, 200%) (図 2)。一方, カタラーゼを 28 U/ μ l 添加しても DMPO/OH ラジカルアダクトの生成は減少しなかった [リボフラビン標準反応溶液に対し 93 $\pm$ 1% (n=3)] (表 1)。次に, ヒドロキシラジカルスカベンジャーであるエタノールを 10% (v/v) 添加しても, DMPO/OH ラジカルアダクトのピーク高はほとんど影響を受けなかつ

図 1 リボフラビン (Riboflavin) 標準反応溶液に UVA を照射した時の ESR スペクトル

反応および測定条件は本文に記載したとおりである。A; リボフラビン標準反応溶液に UVA を照射, B; UVA 照射なし, C; リボフラビンなし。

図 2 DMPO/OH ESR ピーク高に対する種々の濃度の SOD 添加の影響

反応および測定条件は本文に記載したとおりである。(各値は単一測定値)

た [リボフラビン標準反応溶液に対して $85 \pm 1\%$ ($n=3$)] (表 1).

2. リボフラビン標準反応溶液中のラジカル生成に対するティートリーオイルの影響

リボフラビン標準反応溶液にティートリーオイルを 0.031% (v/v) 添加した結果, ESR ピーク高は 44% に減少した (図 3-B).

3. リボフラビン標準反応溶液中のラジカル生成に対する各種精油の影響

リボフラビン標準反応溶液に, 種々の濃度のラベンダースーパーオイル, グレープフルーツオイル, ペパーミントオイル, ティートリーオイル, ウインターグリーンオイルを加え, ESR シグナルを測定するとそのピーク高は濃度依存的に減少した (図 4). その減少率は特にティートリーオイルやウインターグリーンオイルで大きかった (図 4).

表 1 DMPO/OH ESR ピーク高に対する SOD, カタラーゼ, エタノール添加の影響

添加物質	コントロール%
SOD (9.3 U/ml)	180
カタラーゼ (28 U/ μ l)	93 ± 1^a
エタノール (10% v/v)	85 ± 1^a

^a 数値は繰り返し 3 回の平均 $\pm$ 標準偏差

反応及び測定条件は本文に記載したとおりである.

図 3 リボフラビン標準反応溶液に UVA 照射により観測される ESR シグナルに対するティートリーオイル添加の影響

反応および測定条件は本文に記載したとおりである. A; リボフラビン標準反応溶液に UVA 照射, B; 0.031% (v/v) ティートリーオイルを添加したリボフラビン標準反応溶液に UVA 照射.

4. ティートリーオイルおよびウインターグリーンオイルの主成分のラジカル生成に対する効果

ティートリーオイルには 25 種類の成分が含まれている (表 2). これらの成分のうち, 特に含有量が多い α -テルピネン (9.57%), γ -テルピネン (21.76%), テルピネン-4-オール (39.89%) について, スーパーオキシド生成に対するそれぞれの成分の効果を調べた. 各成分を 0.031% (v/v) 添加すると, テルピネン-4-オールで ESR のピーク高が $110 \pm 11\%$ ($n=3$) に, γ -テルピネンで $49 \pm 5\%$ ($n=3$) に, α -テルピネンで $28 \pm 12\%$ ($n=3$) に変化し, γ -テルピネンと α -テルピネンに強い抗酸化能を認めた (図 5).

また, ウインターグリーンオイル中に 99.85% 含まれる

図 4 リボフラビン標準反応溶液に対する各種精油の添加の影響

反応および測定条件は本文に記載したとおりである. 標準反応溶液の ESR ピーク強度を 100% とし, 種々の濃度の各種精油の添加による ESR ピーク強度の影響を相対的に表している. (各値は単一測定値)

表 2 ティートリーオイル (*Melaleuca alternifolia*) の各成分の含量 (%)

α -ツヨネン	1.04	テルピネン-4-オール	39.89
α -ピネン	2.75	α -テルピネオール	2.90
サビネン	0.11	α -コパエン	0.08
β -ピネン	0.78	α -グルジュネン	0.26
ミルセン	0.97	β -カリフォレン	0.39
α -フェランドラン	0.37	α -ガイエン	0.91
α-テルピネン	9.57	β -セリネン	0.08
パラシメン	2.52	α -セリネン	0.20
リモネン	0.69	α -ミューロレン	0.45
β -フェランドラン	0.80	ビシクロゲルマクレン	0.72
γ-テルピネン	21.76	カジネン	0.88
テルピノレン	3.35	1,8-シネオール	5.65
ビリディフロロール	0.12

図5 ティートリーオイルの主成分のスーパーオキシド生成に対する影響

反応及び測定条件は本文に記載したとおりである。A; リボフラビン標準反応溶液, B; 0.031% (v/v) テルビネン-4-オール添加, C; 0.031% (v/v) γ -テルビネン添加, D; 0.031% (v/v) α -テルビネン添加。

サリチル酸メチルを 0.031% (v/v) 添加すると, ESR のピーク高が $12 \pm 1\%$ ($n=3$) に変化し, 強い抗酸化能を認めた。

考 察

リボフラビン光増感反応において, Krishna らは一重項酸素およびスーパーオキシドが生成すること, その量子収率がそれぞれ 0.49 および 0.009 であることを報告している¹²⁾。このことより本反応溶液中に一重項酸素が生成している可能性がある。

一方, 一重項酸素と DMPO との反応により DMPO/OH が生成することが明らかにされており, 一重項酸素の生成をヒドロキシラジカルの生成と誤解しないように注意しなければならないと指摘されている¹⁴⁻¹⁸⁾。しかし, 本標準反応溶液に SOD を添加すると, ESR ピーク高は濃度依存的に増加した (図 2)。このことより, 本実験において観測されている DMPO/OH は一重項酸素と DMPO の反応により生成されたものではないと考えられる。

一般にヒドロキシラジカルは, 過酸化水素と Fe^{2+} との反応 (フェントン反応) により生成する。

ところが今回の実験では, 過酸化水素を分解するカタラーゼを添加しても DMPO/OH ラジカルアダクトの生成は減少しなかった (表 1)。このことから, ここで検出された DMPO/OH ラジカルアダクトはフェントン反応

図6 リボフラビン光増感反応における DMPO/OH ラジカルアダクトの生成機構

によって生じたヒドロキシラジカルを DMPO が直接捕捉したものではないことが分かった。さらにヒドロキシラジカルスカベンジャーであるエタノールを添加しても, DMPO/OH ラジカルアダクトのピーク強度はほとんど影響を受けなかった (表 1)。このことから, ヒドロキシラジカルを DMPO が直接捕捉したものでもないことが分かった。

以上のことから DMPO はスーパーオキシドを捕捉した後, DMPO/ O_2^- ラジカルアダクトが DMPO/OH ラジカルアダクトに変化しものと思われる (図 6)。Finkelstein 等により DMPO/ O_2^- が容易に DMPO/OH に変換すると報告されている¹⁹⁾。リボフラビンの光増感反応においてスーパーオキシドが生成するとすでに報告されており^{12,20)}, 以上の考察はこのことから支持される。SOD を添加したとき, DMPO/OH ピーク高が増加したのは SOD が O_2^- を過酸化水素に変化させ, その過酸化水素からフェントン反応により $\cdot\text{OH}$ が生じたためと思われる (図 6)。

観測される DMPO/OH の ESR ピーク高は, 捕捉された DMPO/ O_2^- ラジカルアダクトの量に比例する。すなわち DMPO/OH を測定することによって, 反応溶液中に生成したスーパーオキシド生成を定量できる。

近年, 精油の抗酸化作用が注目されており, 様々な研究が進められている^{6-8,21,22)}。本研究においてティートリーオイルとウインターグリーンオイルに, 強い抗酸化作用を認めた (図 4)。また, それらの精油の主成分である γ -テルビネン, α -テルビネン, サリチル酸メチルに強い抗酸化能を認めた。

この抗酸化作用はスーパーオキシド生成阻害, スーパーオキシド消去, 光増感剤を消光する等を介しているものと考えられる。今後, どの阻害機構を介して抗酸化作用を発揮しているか検討する必要がある。

今回の研究ではリボフラビン光増感反応において生成

するスーパーオキシドに対する精油の効果を検討した。アロマセラピーと皮膚組織とは深い関連があるので、今後、皮膚組織への光照射に伴って生成するラジカルに対する精油の効果を検討したい。

今回検討した精油のうち少なくともティートリーオイルとウインターグリーンオイルに強い抗酸化能が存在することが明らかとなった。精油成分は皮膚や呼吸器を通して体内へ容易に吸収されるので、生体内で精油の抗酸化作用が効果的に発揮される可能性がある。今後、生体中での精油の抗酸化作用についても検討を行い、アロマセラピーの予防医学、補完代替医療への活用の可能性を科学的に検証していきたい。

参 考 文 献

- 1) 新島 旭. アロマセラピーの生理学基礎. 日本アロマセラピー学会誌. 2007; 6: 13-21.
- 2) 鳥居鎮夫. アロマセラピーの科学. 東京. 朝倉書店. 2004: 55-78.
- 3) 甲田雅一, 鮫島浩二, 本間請子ら. ティートリーの抗菌作用. 日本アロマセラピー学会誌. 2005; 4: 22-27.
- 4) 甲田雅一, 本間請子, 鮫島浩二ら. 腸管系病原菌に対するティートリー, マスカおよびマスカ蜂蜜の抗菌力. 日本アロマセラピー学会誌. 2004; 3: 38-44.
- 5) Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol* 2003; 95: 853-860.
- 6) 青 暢子, 佐藤和恵, 須藤絹子ら. 精油の抗酸化作用について——重項酸素消去能の検討. 日本アロマセラピー学会誌. 2007; 6: 55-61.
- 7) 青 暢子, 佐藤和恵, 清水 藍ら. 一重項酸素消去活性からみた精油の安全使用について. 日本アロマセラピー学会誌. 2008; 7: 36-42.
- 8) 佐藤和恵. アロマセラピーとフリーラジカル. 日本アロマセラピー学会誌. 2007; 6: 28-34.
- 9) Ahmad I, Fasihullah Q, Noor A, et al. Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. *Int J Pharm* 2004; 280: 199-208.
- 10) Chacon JN, McLearn J, Sinclair RS. Singlet oxygen yields and radical contributions in the dye-sensitized photo-oxidation in methanol of esters of polyunsaturated fatty acids (oleic, linoleic, linolenic and arachidonic). *Photochem Photobiol* 1988; 47: 647-656.
- 11) Heelis PF. The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazines). *Chem Soc Rev* 1982; 11: 15-39.
- 12) Krishna CM, Uppuluri S, Riesz P, et al. A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents. *Photochem Photobiol* 1991; 54: 51-58.
- 13) Pajares A, Gianotti J, Stettler G, et al. Modelling the natural photodegradation of water contaminants-A kinetic study on the light-induced aerobic interactions between riboflavin and 4-hydroxypyridine. *J Photochem Photobiol A* 2001; 139: 199-204.
- 14) Harbour JR, Issler SL, Hair ML. Singlet oxygen and spin trapping with nitrones. *J Am Chem Soc* 1980; 102: 7778-7779.
- 15) Feix JB, Kalyanaraman B. Production of singlet oxygen-derived hydroxyl radical adducts during merocyanine-540-mediated photosensitization: analysis by ESR-spin trapping and HPLC with electrochemical detection. *Arch Biochem Biophys* 1991; 291: 43-51.
- 16) Bilski P, Reszka K, Bilski M, et al. Oxidation of the spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide by singlet oxygen in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 1996; 118: 1330-1338.
- 17) Takeshita K, Olea-Azar CA, Mizuno M, et al. Singlet oxygen-dependent hydroxyl radical formation during uroporphyrin-mediated photosensitization in the presence of NADPH. *Antiox Redox Signal* 2000; 2: 355-362.
- 18) Nishizawa C, Takeshita K, Ueda J, et al. Hydroxyl radical generation caused by the reaction of singlet oxygen with a spin trap, DMPO, increases significantly in the presence of biological reductants. *Free Radic Res* 2004; 38: 385-392.
- 19) Finkelstein E, Rosen GM, Rauckman EJ. Production of hydroxyl radical by decomposition of superoxide spin-trapped adducts. *Mol Pharmacol* 1982; 21: 262-265.
- 20) Massad WA, Marioli JM, Garcia NA. Photoproducts and proposed degradation pathway in the riboflavin-sensitized photooxidation of isoproterenol. *Pharmazie* 2006; 61: 1019-1021.
- 21) Kim HJ, Chen F, Wu C, et al. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 2849-2854.
- 22) Brand C, Ferrante A, Prager RH, et al. The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide by human monocytes, but not neutrophils, activated in vitro. *Inflamm Res* 2001; 50: 213-219.

ABSTRACT

Effects of Some Essential Oils on Superoxide Radical Formation in the Reaction Mixture of Riboflavin under UVA Irradiation

Hiroko MORI^{1,2}, Hideo IWAHASHI¹

¹ *Department of Chemistry, Wakayama Medical University*

² *Morinomiya College of Medical Arts and Sciences*

Objective: The effects of essential oils on the formation of superoxide radicals during UVA (365 nm) irradiation were investigated.

Methods: ESR (electron spin resonance) spin-trapping experiments were performed on a reaction mixture containing 15 μ M riboflavin, 0.10 M DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide), 23 mM phosphate buffer (pH 7.4) and 6.3% (v/v) DMSO (dimethyl sulfoxide) (standard reaction mixture) during UVA (365 nm) irradiation.

Results: On addition of various concentrations of tea tree oil (*or* lavender super oil *or* grapefruit oil *or* peppermint oil *or* wintergreen oil) to the standard reaction mixture, the ESR peak height decreased dose-dependently.

Conclusion: This result shows that antioxidant activities increase as follows: lavender super oil < grapefruit oil < peppermint oil < tea tree oil < wintergreen oil.

Key words: Riboflavin, Superoxide radical, Tea tree oil, ESR (electron spin resonance)