

原 著

## 三重県産天然物を用いた薬湯開発における ゼブラフィッシュ生体安全性評価

中山寛子<sup>1)2)</sup>, 相馬明弘<sup>3)</sup>, 坂上 実<sup>4)</sup>, Nguyen Thanh Thao<sup>3)</sup>,  
松岡いづみ<sup>1)</sup>, 西村訓弘<sup>1)2)</sup>, 島田康人<sup>2)5)6)\*</sup>

(令和4年8月11日受付, 令和4年10月14日受理)

## Safety evaluation using zebrafish embryos in the development of medicinal baths using natural products from Mie Prefecture

Hiroko NAKAYAMA<sup>1)2)</sup>, Akihiro SOUMA<sup>3)</sup>, Minoru SAKAGAMI<sup>4)</sup>,  
Nguyen Thanh Thao<sup>3)</sup>, Izumi MATSUOKA<sup>1)</sup>, Norihiro NISHIMURA<sup>1)2)</sup>  
and Yasuhito SHIMADA<sup>2)5)6)\*</sup>

### Abstract

Addition of various natural products or extracts to hot springs or bath water so that the fragrance may have a relaxing effect or beautify the skin is becoming widely common. However, the functionality and safety of these so-called “medicinal baths” are mostly based on empirical evidence and have been scientifically proven only for a few products. In this study, as part of the development of new medicinal baths for use in an upcoming resort complex in Mie Prefecture, we conducted a biological safety evaluation, using zebrafish embryos.

Zebrafish is a common model animal for *in vivo* safety evaluation and has been used to investigate various chemical substances and medicines in accordance with OECD guidelines. We evaluated the safety of medicinal baths, a combination of several extracts of natural products from Mie Prefecture, using an OECD-compliant method (TG236) with some modifications. The test baths were exposed from the blastula stage, (5 hours after fertilization) for

<sup>1)</sup>三重大学大学院地域イノベーション学研究所 〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577. <sup>1)</sup>Mie University Graduate School of Regional Innovation Studies.

<sup>2)</sup>三重大学次世代創薬ゼブラフィッシュスクリーニングセンター 〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577. <sup>2)</sup>Mie University Zebrafish Drug Screening Center. \*Corresponding author: E-mail shimada.yasuhito@mie-u.ac.jp

<sup>3)</sup>ロート製薬株式会社 〒544-0012 大阪市生野区巽西 1-8-1. <sup>3)</sup>Rohto Pharmaceutical Co., Ltd.

<sup>4)</sup>株式会社モクジ 〒519-2176 三重県多気郡多気町長谷 64. <sup>4)</sup>Mokuji.

<sup>5)</sup>三重大学大学院医学系研究科統合薬理学分野 〒514-8507 三重県津市江戸橋 2 丁目 174. <sup>5)</sup>Department of Integrative Pharmacology, Mie University Graduate School of Medicine.

<sup>6)</sup>三重大学先端科学研究支援センターバイオインフォマティクス部門 〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577. <sup>6)</sup>Department of Bioinformatics, Mie University Advanced Science Research Promotion Center.

72 hours, and the effects on viability, teratogenicity, and growth (development) were analyzed. As a result, out of 98 kinds of medicinal water (hot water extracts of natural products) and three kinds of aromatic distilled water, 91 (90%) showed no toxicities. However, some of the aromatic distilled waters were found to be toxic in their undiluted state, indicating that a dilution of more than 1/100 is necessary to ensure safety. Interestingly, 5% of the medicinal baths, especially those containing seaweed extracts, showed pigmentation inhibiting effects, suggesting they may have whitening effects.

Key words : natural products, herbal bath, mist, regional vitalization

## 要 旨

様々な天然物あるいはそれらの抽出物を温泉や風呂水に添加し、香りによるリラックス作用や美肌などを期待することが日常的となっている。しかし、これらのいわゆる「薬湯（季節風呂など）」の機能性や安全性については経験則に基づくものがほとんどであり、科学的に証明されたものは少ない。今回私たちは三重県内に新規開設する複合リゾートの温浴施設に用いる新たな薬湯開発の一環として、ゼブラフィッシュ受精卵を用いた生体安全性評価を行なったので報告する。

ゼブラフィッシュは生体 (*in vivo*) 安全性評価の主要なモデル動物であり、OECD ガイドライン化され、様々な化学物質や医薬品の安全性評価に用いられている。今回、三重県産天然物の抽出物を複数組み合わせた薬湯の安全性評価を、OECD 法 (TG236) を一部改変した方法を用いて行なった。受精 5 時間後の胞胚期から試験薬湯を 72 時間曝露し、生存率・催奇性・成長 (発生) への影響について解析した。その結果、98 種類の薬湯 (天然物の温水抽出液) および 3 種類の芳香蒸留水のうち、91 種類 (90%) には異常を認めなかった。しかし、一部の芳香蒸留水には未希釈の状態では毒性が認められ、安全性を担保するためには 100 倍以上の希釈が必要であることが明らかとなった。また興味深いことに、5% の薬湯、特に海藻類の抽出物を含む薬湯には色素沈着阻害作用が認められ、美白作用の存在が示唆された。

キーワード：天然物、ハーブ湯、ミスト、地域活性化

発表した学会名：日本温泉科学会第75回大会、2022年9月8日/第28回日本未病学会、2021年11月20日

## 1. 緒 言

日本では古来より様々な疾患の治療や健康促進を期待し、入浴の際浴槽に温泉成分や薬草などを入れる習慣がある。近年では温浴施設等において薬湯浴剤を入れることが日常化している。しかし、いわゆる薬湯として利用できる天然物は薬機法「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」および原材料区分 (厚生労働省例示通知) の定めによる「専ら医薬品を除くもの」でなければならない。また、昌蒲や柚子のように古くから親しまれてきたもの以外にも各地域特有の天然物が入浴時に用いられている。

私たちは現在、三重県に新規開設する複合リゾート施設 (2021 年予定, VISON, 三重県多気町) の温浴施設で用いる新規薬湯の開発を行っている。三重大学とロート製薬株式会社が連携し、薬草畑や身近に採取できる薬草を活用し、季節ごとに様々な三重県産の天然物を組み合わせた薬湯レシピを考案し、利用者のストレス軽減・健康増進を期待している。しかし、これまでにない組み合わせを行うことにより潜在的な副作用が顕在化する可能性がある。これらの新規薬湯の安全性評価には、マウスなど齧歯類動物を用いた方法が理想的ではあるが、コスト・試験期間・動物愛護の面から現実的ではなく、代替法としての培養細胞を用いた試験系もその検出力に限界がある。

この解決策として、今回ゼブラフィッシュを用いた生体安全性評価試験 (Zebrafish Embryo

Acute Toxicity Test ; ZFET) を提案した。ZFET はマウスなど哺乳類動物あるいはその受精卵を用いた安全性試験と同等以上の感度が担保されており, 初期は医薬品やそのシード化合物の安全性評価に用いられていた (Nishimura ら, 2015, Inoue ら, 2016)。OECD ガイドライン (TG236) 化後 (Busquet ら, 2014) は, 環境学 (Golovko ら, 2021) や食品科学 (Egloff ら, 2018), 繊維学 (Kawada ら, 2019) など幅広い分野にて用いられている。ゼブラフィッシュを用いることにより, コスト・時間の短縮・動物愛護の順守に加え, マウス・ラットでは不可能な規模のサンプル数を検討することができる。今回, 私たちは大量の薬湯候補の安全性を検討する必要性から, 薬湯評価に特化した改訂型 ZFET を施行したので報告する。

## 2. 方 法

### 2.1 試料調製

実際の浴槽に, 試験天然物を添加した際に抽出される成分をイメージして, 試験天然物 (0.04-5 g) を不織布袋に詰め 40 度の温水 (2L) にて振盪はせず に 5 時間抽出し, 試験薬湯とした。試験天然物の量は抽出後試料 (薬湯) の色・香りを参考に決定した。香り付けに使用予定の芳香蒸留水サンプルは該当する植物の枝葉から水蒸気蒸留法で抽出したもの (宮川森林組合, 三重県多気郡大台町) を使用し, 薬湯に対し 10% 濃度で添加した。抽出したサンプルは 0.22  $\mu\text{m}$  フィルター (Millex) で濾過滅菌し 4°C 保存 (短期) あるいは -80°C 保存 (長期) した。

### 2.2 ゼブラフィッシュ飼育および採卵

野生型 (AB 系統; Zebrafish International Resource Center, Eugene, OR, USA より入手) を用いた。ゼブラフィッシュは, 標準的な運用ガイドラインに従って当施設で飼育された。すべての動物実験は, 日本の動物福祉法 (環境省) および国際的なガイドラインに準拠して行った。

### 2.3 安全性試験

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) の Test Guideline 236 : Fish Embryo Acute Toxicity Test (Busquet ら, 2014) を一部変更した試験を施行した。胞胚期 (受精後 5 時間) 20 個 (TG236 記載) を選別し各薬湯内にて 72 時間飼育, 表現型を観察し顕微鏡画像撮影を行った。この際, コントロールは一般的なゼブラフィッシュ受精卵の飼育水である 0.3  $\times$  Danieau's solution (17.4 mM NaCl, 0.21 mM KCl, 0.18 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.12 mM MgSO<sub>4</sub>, and 1.5 mM HEPES buffer, pH 7.6) および天然物抽出に用いた水にて飼育し, 両者とも全く異常が認められないことを確認した。

### 2.4 顕微鏡撮影

蛍光顕微鏡 BZ-X700 (キーエンス社) あるいは HD Lite 1080P (Tucsen Photonics) を搭載した実体顕微鏡 SMZ 745T (ニコン社) で撮影した。

## 3. 結 果

### 3.1 安全性評価について

通常の ZFET 試験では毒性の判断基準が「生死」であるが, これはあくまで化学物質を対象とした基準であり, 今回の試験薬湯のような安全性が高いと予想されるサンプル評価にはより詳細な

判断基準が必要と考えた。そこで 101 種類の試料に対し、「①正常」, 「①形態異常はないが孵化遅延など発生の遅れが認められた (30% 以上の個体に認められた場合)」, 「②明らかな形態異常 (催奇性) を示した (30% 以上の個体に認められた場合)」, 「③発生が進まず初期で死亡した (試験個体の生存率が 50% 以下)」の 4 カテゴリーを設定し, 試験を行った。試験結果を Table 1 に示す。これらの典型的な画像を Fig. 1 に示す。異常を認めた①~③の合計は 11 種類 (約 10%) であり, このうち深刻な問題のある②③は 3 種類 (3%), 残り 91 種類には大きな問題は認められなかった。異常を認めた試料の内訳を Table 2 に示す。

異常を認めた薬湯の半分近く (5/11) に芳香蒸留水が添加されていた。芳香蒸留水はミストなどによく用いられる水溶性抽出物である。そこで芳香蒸留水原料の安全性を決定するために, Table 2 で使用した 3 種類の芳香蒸留水に対して ZFET 試験を行った。その結果, 100~1000 倍希釈が必須であることが明らかとなった (Fig. 2)。芳香蒸留水は温水抽出ではなく水蒸気抽出を行っており抽出力が高い。従来薬湯として用いられているヒノキやクロモジでも過剰な抽出により, 安全性に問題が生じる可能性が指摘された。

### 3.2 色素沈着阻害作用を認めた試料

今回の試験では予想されていなかった結果の 1 つとして, 一部 (5 種) の薬湯に色素沈着抑制作用を認めた。典型例および該当する薬湯を Fig. 3 に示す。5 種のうち 1 つ (コメヌカ+ヒノキ芳香蒸留水) は発生障害を起こしたが, 残り 4 つはゼブラフィッシュに特徴的な縞模様 (稚魚の段階では黒点) の数が少ないのみで, その他の安全性に関連する異常は認められなかった。

## 4. 考 察

新設する複合リゾートの温浴施設では三重県産のさまざまな天然物を組み合わせた 72 種類の薬湯を 5 日毎に変更し提供することを予定しており, 今回それらの母数として合計 101 種類の安全性試験を行った。その結果, 90% の組み合わせには問題がなかったが, 残りの 10% には何らかの異常を認める結果となった。特に芳香蒸留水は通常のみストとしての利用に加え, 薬湯への応用を期待していたが, そのまま使うのではなく 100 倍以上の希釈が必要となったことが明らかとなった。以下に毒性を示した薬湯成分についての考察を述べる。

### 4.1 「③発生が進まずに初期で死亡した」試料

最も安全性に問題がある試料と考えられた。今回試験した範囲では「コメヌカ+ヒノキ玉+ヒノキ芳香蒸留水」の組み合わせだけであった。今回試験した類似の組み合わせ「コメヌカ+ヒノキ芳香蒸留水」は「①孵化したが発生が遅れ」に, 「コメヌカ+菊の花+ヒノキ芳香蒸留水」では異常を認めなかったことから, 「ヒノキ玉+ヒノキ芳香蒸留水」の過剰なヒノキ抽出物の負荷により毒性が強くなったと考えられた。ヒノキにはヒノキチオール・ヒノキオール・ $\alpha$  カジノール・ $\alpha$  ピネンなどのヒノキ特有の香り成分が含まれており, 香りによるリラックス気分を期待して薬湯に用いられている。その一方,  $\alpha$  ピネンはシックハウス症候群の原因物質の 1 つとされており, 今回の試験結果の原因である可能性が考えられた。ヒノキチオールおよびヒノキオールは強力な抗菌・抗真菌作用が有名だが, この作用機序は主に細胞膜の代謝障害であり (Morita ら, 2007), ゼブラフィッシュの発生にも悪影響を及ぼしたと考えられる。ヒトではヒノキ玉およびヒノキ抽出物による毒性報告は非常に少ない (細野ら, 1997) が, 「適量」が存在する可能性が示唆された。

Table 1 Results of zebrafish embryo acute toxicity test.

	生存率(匹数)	孵化遅れ(匹数)	奇形(匹数)
ヤマトタチバナ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ヤマトタチバナ+ヒノキ玉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
モモの葉(乾燥)	100% (20)	15% (3)	0% (0)
モモの葉+マイヤーレモン	100% (20)	0% (0)	0% (0)
モモの葉+白酒	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ワカメ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ワカメ+タンポポ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ワカメ+ヨモギ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ヤマザクラ+ボンカン	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ヤマザクラの樹皮+ソメイヨシノの樹皮	100% (20)	0% (0)	0% (0)
スギナ	85% (17)	85% (17)	0% (0)
ヤマザクラの葉+スギナ	100% (20)	50% (10)	0% (0)
チャの葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
チャ(乾)+チャ(生)	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ショウブの根+ショウブの生葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ショウブの葉+ヨモギ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ショウブの根+ハッカ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ショウブの葉+ハッカ	100% (20)	0% (0)	100% (20)
カキの葉+ツユクサの葉	85% (17)	0% (0)	0% (0)
シヤクヤク+ヒノキ玉+ヒノキ芳香蒸留水	85% (17)	85% (17)	0% (0)
カミツレ+ビワの葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
カミツレ+ベニバナ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
モモの生葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
モモの生葉+ウツボグサ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
モモの生葉+ハッサク皮	100% (20)	0% (0)	0% (0)
潮湯	100% (20)	0% (0)	0% (0)
塩+ゲンノショウコ	85% (17)	0% (0)	0% (0)
アカメガシワ+キンミズヒキ	100% (20)	0% (0)	0% (0)

Table 1 Results of zebrafish embryo acute toxicity test.

	生存率(匹数)	孵化遅れ(匹数)	奇形(匹数)
アカメガシワ葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
アカメガシワ+ハスの葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
アカメガシワ+スイレンの葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
和紅茶	100% (20)	0% (0)	0% (0)
和紅茶+カボス	100% (20)	0% (0)	0% (0)
スダチ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
スダチ+ハギ	70% (14)	0% (0)	0% (0)
キンモクセイ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
キンモクセイ+ワレモコウ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
コメヌカ+ヒノキ芳香蒸留水	85% (17)	85% (17)	0% (0)
コメヌカ(1/5)+キクの花+ヒノキ芳香蒸留水	100% (20)	35% (7)	0% (0)
コメヌカ(1/10)+キクの花+ヒノキ芳香蒸留水	100% (20)	0% (0)	0% (0)
コメヌカ+ヒノキ玉+ヒノキ芳香蒸留水	0% (0)	0% (0)	0% (0)
ダイダイ	65% (13)	35% (7)	30% (6)
ダイダイ+ウコン	100% (20)	15% (3)	0% (0)
ダイダイ+ウコン(原液)	100% (20)	0% (0)	0% (0)
キクの花	100% (20)	0% (0)	0% (0)
キクの花+ショウガ	100% (20)	15% (3)	0% (0)
キクの花+ツワブキの葉	100% (20)	50% (10)	0% (0)
ヒノキ玉+クロモジ芳香蒸留水	100% (20)	65% (13)	0% (0)
センキュウ+クロモジ芳香蒸留水	100% (20)	15% (3)	0% (0)
センキュウの葉+クロモジ芳香蒸留水	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ウンシュウミカン+ダイコン干葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ウンシュウミカン+ヒノキ玉	100% (20)	15% (3)	0% (0)
ウンシュウミカン(皮)	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ユズ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ユズ+マツの葉	100% (20)	15% (3)	15% (3)
セリ	100% (20)	50% (10)	0% (0)

Table 1 Results of zebrafish embryo acute toxicity test.

	生存率(匹数)	孵化遅れ(匹数)	奇形(匹数)
アシタバ	100% (20)	15% (3)	0% (0)
トウガラシ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
キンカン	100% (20)	0% (0)	0% (0)
キンカン+トウキの葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
キンカン+コンブ+ヨモギ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ヤマザクラの樹皮	85% (17)	0% (0)	0% (0)
カミツレ	85% (17)	0% (0)	0% (0)
カキの葉	70% (14)	0% (0)	0% (0)
シャクヤクの花	85% (17)	0% (0)	0% (0)
シソ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
イチジクの葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ミル	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ハッカ+ショウブ(生)	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ハッカ+ヨモギ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ハッカ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
シソ+ハッサク	100% (20)	0% (0)	0% (0)
シソ+モモの葉	85% (17)	0% (0)	0% (0)
ショウガ	100% (20)	0% (0)	15% (3)
シオ+アラメ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
和紅茶+ハッサク	100% (20)	15% (3)	15% (3)
ショウガ+ダイコン干菜	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ウンシュウミカン+キンカン	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ボンカン+アラメ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ボンカン	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ドクダミ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ドクダミ+ハスの葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ドクダミ+アカメガシワ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
モモの葉+マイヤーレモン+椿油	100% (20)	0% (0)	0% (0)

Table 1 Results of zebrafish embryo acute toxicity test.

	生存率(匹数)	孵化遅れ(匹数)	奇形(匹数)
スダチ+サンショウ実・葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ダイコン干菜+ヒメコマツ精油	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ダイコン干菜+ヒノキ玉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ヒメコマツ精油	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ウンシュウミカン+コンブ+ヨモギ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
カキの葉+バラ精油	100% (20)	0% (0)	0% (0)
シャクヤクの花+ダイダイ	100% (20)	0% (0)	0% (0)
塩+テングサ	85% (17)	0% (0)	0% (0)
ショウガ+ヒノキ玉+白酒	100% (20)	15% (3)	0% (0)
モモの葉+にごり酒	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ショウガ+ヒノキ玉+にごり酒	100% (20)	25% (5)	0% (0)
ダイコン干菜	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ヨモギ+ウンシュウミカン+ビワの葉	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ヨモギ+ウンシュウミカン	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ヒノキ(芳香蒸留水)1/10	50% (10)	0% (0)	0% (0)
ヒノキ(芳香蒸留水)1/100	50% (10)	0% (0)	0% (0)
ヒノキ(芳香蒸留水)1/1000	100% (20)	0% (0)	15% (3)
ヒノキ(芳香蒸留水)1/10000	100% (20)	0% (0)	0% (0)
クロモジ(芳香蒸留水)1/10	0% (0)	0% (0)	0% (0)
クロモジ(芳香蒸留水)1/100	100% (20)	0% (0)	0% (0)
クロモジ(芳香蒸留水)1/1000	100% (20)	0% (0)	15% (3)
クロモジ(芳香蒸留水)1/10000	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ウメの花、枝(芳香蒸留水)1/10	85% (17)	85% (17)	0% (0)
ウメの花、枝(芳香蒸留水)1/100	100% (20)	100% (20)	35% (7)
ウメの花、枝(芳香蒸留水)1/1000	100% (20)	0% (0)	0% (0)
ウメの花、枝(芳香蒸留水)1/10000	100% (20)	0% (0)	0% (0)



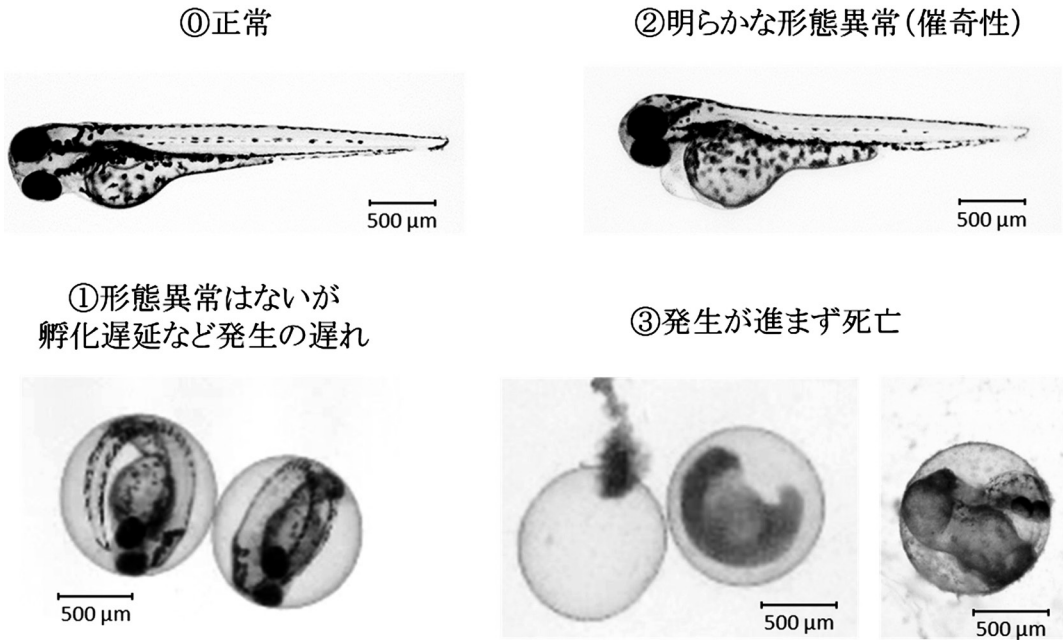


Fig. 1 Representative phenotypes of abnormal larvae.

Table 2 List of samples with abnormal phenotypes.

薬湯成分	評価	分類番号
スギナ	孵化遅れ	①
ヤマザクラの葉+スギナ	孵化遅れ	①
コメヌカ(1/5)+キクの花+ヒノキ芳香蒸留水	孵化遅れ	①
キクの花+ツワブキの葉	孵化遅れ	①
ヒノキ玉+クロモジ芳香蒸留水	孵化遅れ	①
セリ	孵化遅れ	①
シャクヤク+ヒノキ玉+ヒノキ芳香蒸留水	未孵化	①
コメヌカ+ヒノキ芳香蒸留水	未孵化・色素沈着抑制	①
ショウブの葉+ハッカ	奇形(心臓周囲浮腫)	②
ダイダイ	奇形(体軸形成異常)	②
コメヌカ+ヒノキ玉+ヒノキ芳香蒸留水	死亡	③

#### 4.2 「②形態異常を示した」試料

前項よりも毒性は低かったが、正常な発生ができなかった点では決して無視できない結果である。2種類の試験薬湯が該当したが、このうち「ショウブの葉+ハッカ」については、今回試験した「ショウブの葉+ヨモギ」「ショウブの根+ハッカ」では異常を認めなかったことから、ショウブ・ハッカ単体ではなく両者の組み合わせが毒性を示したと考えられた。ショウブの葉にはアサロンが含まれており、ゼブラフィッシュにおいて心臓発生障害・不整脈が報告されている(Shangら, 2020)。ハッカにはメントールを主に、ピネン, カンフェン, リモネンなどの精油成分が含まれて

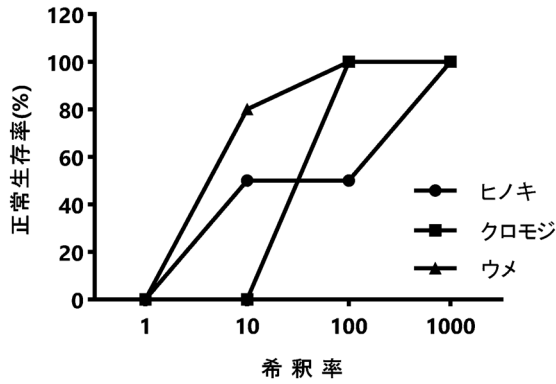


Fig. 2 Zebrafish embryo acute toxicity test (ZFET) for diluted aromatic distilled water samples.

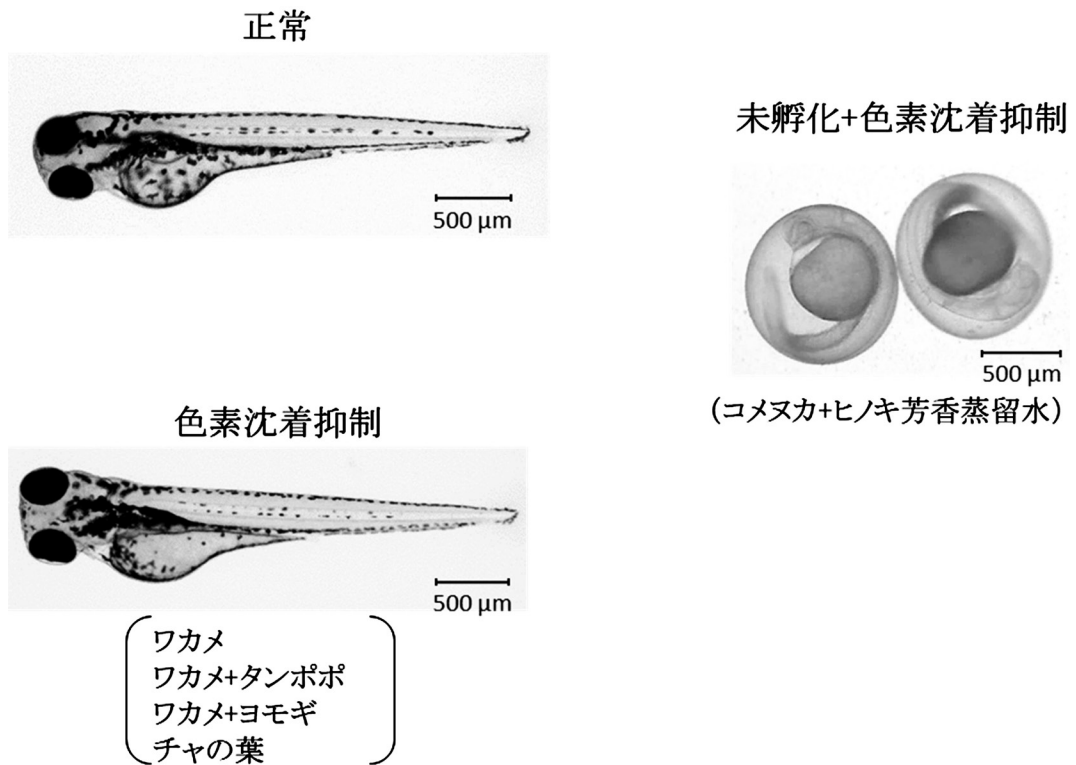


Fig. 3 Samples with reduced pigmentation.

おり、これらの相乗あるいは相加効果が問題だと考えられた。

ダイダイには、果皮にフロクマリン類、酸味成分のクエン酸、d-リモネン、ベルガプテン、β-カリオフィレン、ヘスペリジン、シネフリン等、数多くの化合物を含んでいる。これらのうち、シネフリンは生薬の麻黄（エフェドラ）に含まれる成分（エフェドリン）と類似の構造をもっており、交感神経・副交感神経混合型興奮作用を有している。この成分を加工したものが「シトラス」とい

う名称でアメリカではダイエット用の健康食品として使用されているが、エフェドラと同様の作用を示すことから、血管新生を阻害する副作用報告 (Kimら, 2015) も出ている。また、フロクマリンおよびリモネンは皮膚刺激および光毒性が報告されており (Raquetら, 2014, Kimら, 2013), 実験の飼育環境において、概日リズムと同じようにインキュベーター内飼育でライトを点けていたためどちらかの作用が出た可能性も考えられた。

そこで、薬湯に使用予定の柑橘類中のクマリン類 (ソラレン, ベルガプテン, キサントトキシシ, イソピムピネリンの4成分) 量を分析した (Table 3)。International Fragrance Associationの基準を参考にすれば15ppm以下であれば光毒性は問題ないとされている。どのサンプルも<15ppmもしくは不検出という結果となり、当初危惧されていたクマリン類による毒性発現の可能性は否定された。

Table 3 Amount of coumarone extracted (ppm) when 1 g of sample is suspended in 1 L of water.

		水 1L に対し試料約 1g を使用したときのフマリン類の含 量 (ppm)				サンプル量	Kg/20000	参考
No.	サンプル名	ソラレン	キサントキシ ン	ベルガブ テン	イソピムピネリ ン	(g)	L <sup>1)</sup>	(Kg/20000L) <sup>2)</sup>
Sample 1	ヤマトダイバ ナ	nd	nd	0.0399	0.2059	1.0150	1479	>70
Sample 2	マイヤーレ モン	nd	nd	0.0324	0.0597	1.0273	5163	>70
Sample 3	ボンカン	nd	nd	nd	0.0417	1.0131	7293	>70
Sample 5	ハッサク	nd	nd	nd	nd	1.0318	10036	>70
Sample 6	カボス	nd	nd	nd	nd	1.0227	9947	>70
Sample 7	ダイダイ	nd	nd	0.1822	nd	1.0262	1689	>70
Sample 8	温州ミカン	nd	nd	nd	nd	1.0624	10333	>70
Sample 9	ユズ	nd	nd	nd	nd	1.0688	10396	>70
Sample 11	スダチ	nd	nd	nd	nd	1.0646	10355	>70
Sample 12	アマナツ	nd	nd	nd	nd	1.0276	9995	>70

1) 薬湯の水量を 20,000 L (20t) と仮定した場合の光毒性の懸念がある試料量

2) 安全係数として今回使用した柑橘類より 20 倍の濃いクマリン類が付着した柑橘類を使用して煎じた場合の光毒性の懸念がある試料量

#### 4.3 「①形態異常はないが孵化遅延など発生の遅れが認められた」試料

約 7% がこの結果となった。これらのうち、前述のヒノキに関連するものが複数認められた。ヒノキは古来より慣習的に薬湯として用いられているが、「4-1. 【③発生が進まずに初期で死亡】した試料」でも考察したように、「過ぎたるは及ばざるが如し」、やはり適量が存在する可能性が示唆された。

このほかにも、「スギナ」および「ヤマザクラ葉+スギナ」については、共通するスギナが毒性発現に関与していると考えられた。スギナにはアルカロイドのエキセチンとニコチン・サポニンの 1 種であるエキセトニン、フラボノイドのイソクエルシトリン、グルテオリン、エキセトロンが含まれている。特にエキセチンには強い抗真菌作用や家畜への中毒作用が報告されており、ゼブラフィッシュにおいても毒性を有した報告がある (Liu ら, 2018)。

「キクの花+ツブブキの葉」では、キクの花に含まれるルテオニンが、不整脈や心室性期外収縮といった副作用報告 (Milosević-Djordjević ら, 2011) もあることからこの成分が発生を遅らせたものと考えられる。「セリ」は春の七草として食用に、また薬湯料として用いられており脂溶性成分が湯に溶け出して血液循環をよくして、リウマチ、神経痛、血圧降下の効果があるとされている。ゼブラフィッシュの皮膚には人間のような角質層がなく、稚魚期には鱗の形成も未熟であるため、脂溶性成分による刺激が強いのではないかと考えられた。

#### 4.4 色素沈着阻害を示した試料

今回の試験系では安全性を評価するのが主目的であったが、予想外の展開として、5% の試料で色素沈着阻害作用を確認した (Fig. 3)。ゼブラフィッシュ受精卵は受精後 48 時間から色素沈着が開始する。評価時期である受精後 100 時間の段階では、卵黄嚢を中心に、黒色色素細胞が増加し、Fig. 3 (正常) に示すような黒点が発生する。すでに様々な研究者がこのゼブラフィッシュの色素沈着を利用して、チロシナーゼ阻害薬などいわゆる美白研究を行っており (Belleri ら, 2018)、著者らのグループもセラミドの色素沈着阻害作用に関する報告をしている (Kagotani ら, 2020)。色素沈着阻害作用を認めた薬湯にはワカメ、チャ (茶) の抽出物が含まれており、過去の研究からワカメに含まれるフコキサンチン (Shimoda ら, 2010) やフコイダン (Wang ら, 2017)、茶のカテキン (Kim ら, 2015) が作用を発揮していると考えられた。また「コメヌカ+ヒノキ芳香蒸留水」にも色素沈着抑制がみられ、他のヒノキ芳香蒸留水を使った組み合わせではその傾向が見られないことから、コメヌカが作用していると考えられた。コメヌカは古来より肌に良いとされているが、培養細胞系などでメラニン合成を阻害することが報告されており (Chung ら, 2009)、本試験でも同様のメカニズムが存在すると考えられた。

## 5. 結 語

我々は新たな薬湯開発の一環として、様々な天然物または天然物を組み合わせた試料について、ゼブラフィッシュを用いた生体安全性試験 (ZFET) を行った。その結果、大半の試料は安全であったが、一部体によいものとして知られる天然物も組み合わせ次第で毒性を呈することが明らかとなった。今後、毒性を示した全ての試料に対してより低濃度の試験を行い 50% 致死濃度 ( $LC_{50}$ ) を算出することを計画している。試験対象が天然物であるため、サンプリング時期・抽出時期・混合時期などにより、化学成分の含有量が異なる可能性や、ZFET の試験期間が 72 時間と通常の入浴では考えられないレベルで長く、またマウス胎児試験に相当する非常に感度の良い試験系であるため (Inoue ら, 2016)、毒性を過大評価している可能性は高い。しかし入浴施設、特にリゾート

施設の入浴施設での利用者数・バラエティの多さを考えると、感度が高すぎる試験を実施し安全性を担保した薬湯を提供することは決して行き過ぎた対策ではないと考える。もちろん、魚類と人間の間のギャップは常に頭に入れておく必要があり、今後、実際の運営上での利用者（ヒト）における異常反応、特に皮膚症状のモニタリングを行っていく計画である。

また、ゼブラフィッシュ試験系は複数成分の組み合わせ時の安全性評価ツールとして利用できる。本技術は薬湯評価のみならず、複数の機能性食品を組み合わせたサプリメント・調理法開発、複数の医薬品を組み合わせた合剤開発における最初の安全性評価に適用できると考えている。

## 引用文献

- Belleri, M., Paganini, G., Coltrini, D., Ronca, R., Zizioli, D., Corsini, M., Barbieri, A., Grillo, E., Calza, S., Bresciani, R., *et al.* (2020) :  $\beta$ -Galactosylceramidase Promotes Melanoma Growth via Modulation of Ceramide Metabolism, *Cancer Res.* **80**, 5011-5023.
- Busquet, F., Strecker, R., Rawlings, JM., Belanger, SE., Braunbeck, T., Carr, GJ., Ceniijn, P., Fochtman, P., Gourmelon, A., Hübler, N., *et al.* (2014) : OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing, *Regul Toxicol Pharmacol.*, **69**, 496-511.
- Chung, SY., Seo, YK., Park, JM., Seo, MJ., Park, JK., Kim, JM., Park, CS. (2009) : Fermented Rice Bran Downregulates MITF Expression and Leads to Inhibition of alpha-MSH-Induced Melanogenesis in B16F1 Melanoma, *Biosci Biotechnol Biochem.*, **73**, 1704-1710.
- Egloff, S., Pietsch, C. (2018) : Ethoxyquin : a feed additive that poses a risk for aquatic life, *Dis Aquat Organ.*, **131**, 39-48.
- Golovko, O., Orn, S., Sorengard, M., Frieberg, K., Nassazzi, W., Lai, FY., Ahrens, L. (2021) : Occurrence and removal of chemicals of emerging concern in wastewater treatment plants and their impact on receiving water systems, *Sci Total Environ.*, **754**, 9.
- Inoue, A., Nishimura, Y., Matsumoto, N., Umemoto, N., Shimada, Y., Maruyama, T., Kayasuga, K., Morihara, M., Katagi, J., Shiroya, T., *et al.* (2016) : Comparative study of the zebrafish embryonic toxicity test and mouse embryonic stem cell test to screen developmental toxicity of human pharmaceutical drugs, *Fundam Toxicol Sci.*, **3**, 79-87.
- Kagotani, K., Nakayama, H., Zang, L., Fujimoto, Y., Hayashi, A., Sono, R., Nishimura, N., Shimada Y. (2020) : Lecithin-Based Dermal Drug Delivery for Anti-Pigmentation Maize Ceramide, *Molecules.*, **25**, 1585.
- Kawada, T., Kuroyanagi, J., Okazaki, F., Taniguchi, M., Nakayama, H., Suda, N., Abiko, S., Kaneco, S., Nishimura, N., Shimada, Y. (2019) : An Integrative Evaluation Method for the Biological Safety of Down and Feather Materials, *Int J Mol Sci.*, **20**, 1434.
- Kim, NH., Pham, NB., Quinn, RJ., Shim, JS., Cho, H., Cho, SM., Park, AW., Kim, JH., Seok, SH., Oh, JW., *et al.* (2015) : The Small Molecule R(-)- $\beta$ -O-Methylsynephrine Binds to Nucleoporin 153 kDa and Inhibits Angiogenesis, *Int J Biol Sci.*, **11**, 1088-1099.
- Kim, YC., Choi, SY., Park, EY. (2015) : Anti-melanogenic effects of black, green, and white tea extracts on immortalized melanocytes, *J Vet Sci.*, **16**, 135-143.
- Kim, YW., Kim, MJ., Chung, BY., Bang du, Y., Lim, SK., Choi, SM., Lim, DS., Cho, MC., Yoon, K., Kim, HS., *et al.* (2013) : Safety evaluation and risk assessment of d-Limonene, *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.*, **16**, 17-38.

- Liu, SZ., Yan, X., Tang, XX., Lin, GJ., Qiu, YK. (2018) : New Bis-Alkenoic Acid Derivatives from a Marine-Derived Fungus *Fusarium solani* H915, *Mar Drugs.*, **16**, 483.
- Milosević-Djordjević, O., Grujčić, D., Joksić, G., Marinković, D. (2011) : In vitro evaluation of the genotoxicity of ritodrine and verapamil in human lymphocytes., *Hum Exp Toxicol.*, **30**, 398-405.
- Morita, Y., Sakagami, Y., Okabe, T., Ohe, T., Inamori, Y., Ishida, N. (2007) : The mechanism of the bactericidal activity of hinokitiol, *Biocontrol Sci.*, **12**, 101-110.
- Nishimura, Y., Murakami, S., Ashikawa, Y., Sasagawa, S., Umemoto, N., Shimada, Y., Tanaka, T. (2015) : Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing, *Congenit Anom (Kyoto).*, **55**, 1-16.
- Raquet, N., Schrenk, D. (2014) : Application of the equivalency factor concept to the phototoxicity and -genotoxicity of furocoumarin mixtures. *Food Chem Toxicol.*, **68**, 257-266.
- Shang, X., Ji, X., Dang, J., Wang, L., Sun, C., Liu, K., Sik, A., Jin, M. (2020) :  $\alpha$ -asarone induces cardiac defects and QT prolongation through mitochondrial apoptosis pathway in zebrafish, *Toxicol Lett.*, **324**, 1-11.
- Shimoda, H., Tanaka, J., Shan, SJ., Maoka, T. (2010) : Anti-pigmentary activity of fucoxanthin and its influence on skin mRNA expression of melanogenic molecules, *J Pharm Pharmacol.*, **62**, 1137-1145.
- Wang, ZJ., Xu, W., Liang, JW., Wang, CS., Kang, Y. (2017) : Effect of fucoidan on B16 murine melanoma cell melanin formation and apoptosis, *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, **14**, 149-155.
- 細野久美子, 脇田素子 (1997) : 育毛剤中のヒノキチオールとパントテニルエチルエーテルによる接触皮膚炎の2例, *皮膚*, **39**, 1, 42-47