

ハーブ培養物から美容成分を見つけよう

生物資源科学部 生物生産科学科

1年 阿部 くるみ

1年 石井 月

指導教員 生物資源科学部 生物生産科学科

助教 川上 寛子

【背景および目的】

近年、日本では男女問わず健康の維持・増進への関心が高まるとともに、アンチエイジングなどの美容関連の分野への関心も高まっている。美容におけるアンチエイジングとは主に、しわやたるみを抑制することである。ヒアルロン酸が不足するとしわやたるみの原因となる。そのヒアルロン酸を分解する酵素ヒアルロニダーゼの活性を抑制させる成分を発見できれば、化粧品への応用が期待できる。

アロマオイルに用いられるハーブの中には、肌荒れの改善、抗酸化作用などの効果を持つものがある。本研究では、エルダーフラワー、レモンバーム、ラベンダー、セントジョーンズワートを用いた。これらのハーブの抽出物のヒアルロニダーゼ阻害物質の活性と抗酸化活性を測定した。

【材料および方法】

A) エキスの抽出

B) 抗ヒアルロニダーゼ活性測定

① 20本のマイクロチューブに、0.3 M リン酸バッファー (pH 7) を 370 μ l ずつ分注した。

エキス 9 種×酵素あり=9 本

エキス 9 種×酵素なし=9 本

エタノール×酵素あり=1 本

エタノール×酵素なし=1 本

② 各エキスまたはエタノールを 20 μ l ずつ加え、混合した。

③ ありの試験区に 80 U/ μ l の酵素を 10 ml ずつ加え、酵素なしの試験区にはリン酸バッファーを 10 μ l ずつ加え、泡立てないように混合した。

④ 室温で 30 分放置し、エキスと酵素をあらかじめなじませた (計 400 μ l)。

⑤ 調整したアガロースを 95°C で温めながらすべて溶解させた後、1.0 ml (アガロース液の 1/10 量) のヒアルロン酸を加え、96 穴プレートに 100 μ l ずつ分注した。

⑥ エキス・HAse 混合液を 100 μ l ずつ、試験区ごとに 3 か所ずつ分注した。(全部で 54)

⑦ 反応中に乾燥しないようにシールをして、37°C で 3 時間反応させた。

⑧ その後、反応液を除いた後、10% CPC を 100 μ l ずつ加え、30 分間室温で反応させた。

⑨ 30 分後、プレートリーダーで 595 nm の吸光度 (A) を測定した。

⑩ 分解されなかった未反応のヒアルロン酸は CPC により白濁するので、透過率($T=10^{-A}$)に換算した。エキスを加えた試験区の透過率を T とし、エタノールを加えた対照区を C、酵素無しの対照区を Cblank とし、阻害率 (%) を以下の式で求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 \times [1 - \{(T - T_{\text{blank}}) / (C - C_{\text{blank}})\}]$$

C) 抗酸化活性試験 (ORAC (oxygen radical absorbance capacity) 法)

① あらかじめ、プレートリーダーの電源を入れ、励起波長・蛍光波長・温度などの測定条件を設定しておいた。

カイネティクス測定条件

- 5分ごと、90分測定、37度
- 励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm
- 最初の測定前に混合 (10秒)

② 分注用プレートに以下の図に従って試薬を入れた。緑はブランク (溶媒)、青は Trolox(濃度が濃い順に青色が濃い)、オレンジはサンプル (濃度が濃い順にオレンジ色が濃い)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		BL	EW	EM	EE	RW	RM	RE	BL			
C		TL	EW	EM	EE	RW	RM	RE				
D			LW	LM	LE	SW	SM	SE				
E			LW	LM	LE	SW	SM	SE				
F									TL			
G		BL							BL			
H												

図1 測定用プレート (ブラック) 上の配置

- 測定用プレートへ FL 溶液 50 ul ずつ、すべてのウェルへ分注した。
- 分注用プレートから 50 ul ずつ測定用プレートへ混合し、ミキサーで良く混ぜた。
- あらかじめ 37 °C にしておいたインキュベータ内で 15 分間保温した。
- 各ウェルに 50 ul の AAPH 溶液を速やかに加えた。
- 10 秒混合させた後、37 °C、励起波長 490 nm、蛍光波長 520nm で測定した。
- 90 分間 5 分ごとに測定した。

【結果】

A) 抗ヒアルロニダーゼ活性測定

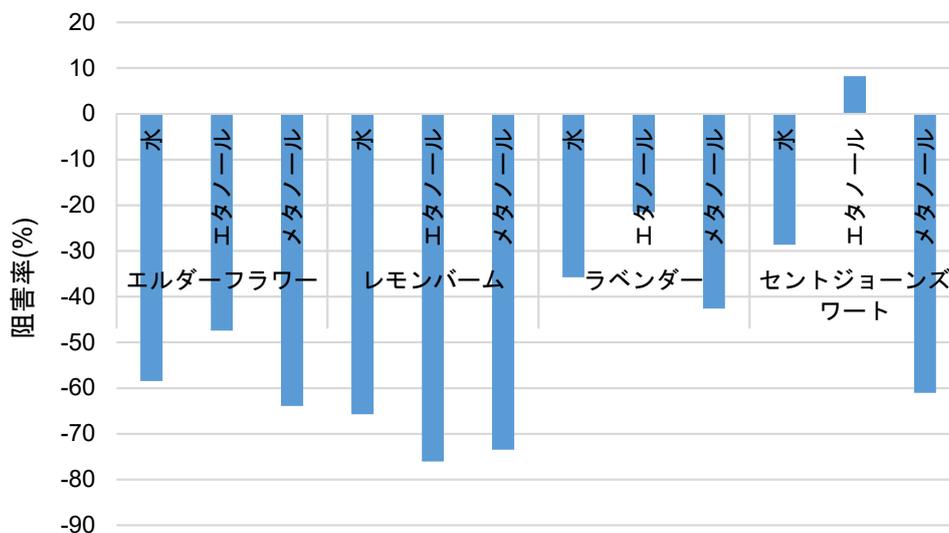


図2 各ハーブ由来抽出物のヒアルロニダーゼ阻害活性の比較

エルダーフラワー、レモンバーム、ラベンダー、セントジョーンズワートの抽出物のヒアルロニダーゼの阻害活性を比較した（図2）。その結果、セントジョーンズワートのエタノール抽出物では8%のヒアルロニダーゼ阻害活性が見られた一方、その他の抽出物はヒアルロニダーゼ阻害活性の値が負となり、ヒアルロニダーゼの活性を促進した。今回抽出した材料にはヒアルロニダーゼの働きを阻害する物質は含まれないことがわかった。

B) 抗酸化活性試験

エルダーフラワー、レモンバーム、ラベンダー、セントジョーンズワートの抽出物の抗酸化活性を比較した（図3）。全体的に高い活性を示したが、レモンバームの抽出物は比較的活性が弱く、特に、メタノールとエタノールを溶媒とした抽出物は弱い抗酸化活性を示した。

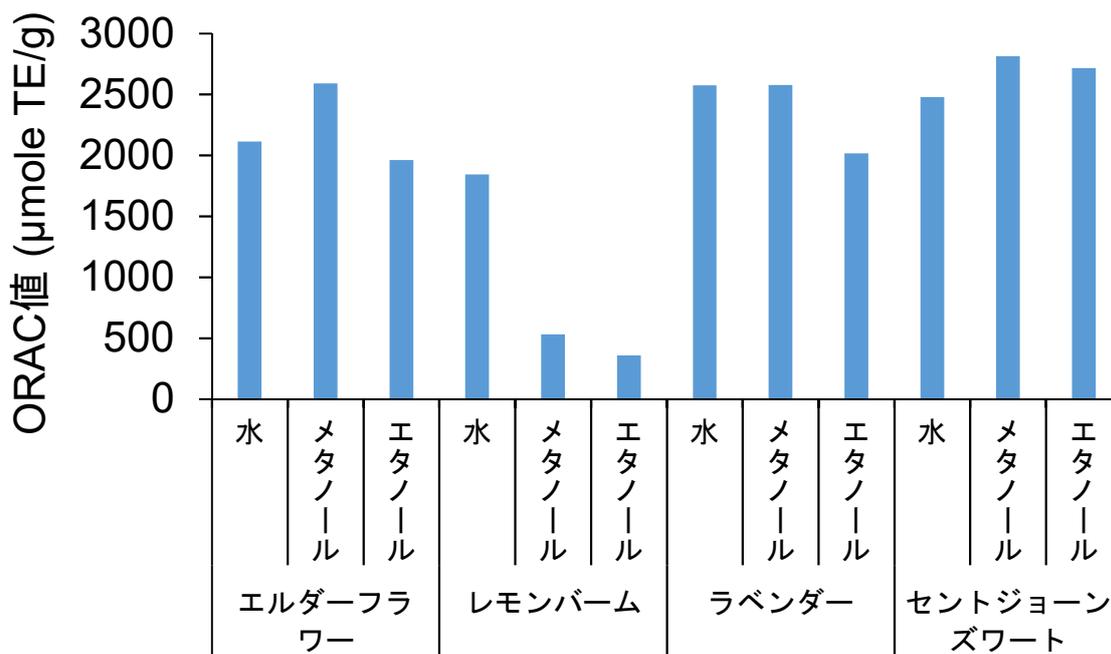


図3 各ハーブ由来抽出物の抗酸化活性の比較

【考察】

全ての抽出物について、ヒアルロニダーゼの活性はほとんど見られなかったが、抗酸化活性は強く見られたことから、この2つの活性に相関は見られないと思われた。

エルダーフラワーは、グリコシド、有機酸、タンニン群などの成分が含まれていることが知られている。抗酸化活性試験の結果より、エルダーフラワーは水を溶媒としたエキスよりも、メタノールを溶媒としたエキスの活性の方が高かった。ラベンダーとセントジョーンズワートは、3つの溶媒ですべて同程度に強い活性を示した。以上より、これらの材料においては3つの溶媒に共通して多く溶解する物質を探索することで活性成分の特定につながると考えられる。レモンバームは、シトラール、シトロネラール、ロスマリン酸、カフェ酸、タンニン群などの成分が含まれていることが知られている。抗酸化活性試験の結果より、レモンバームは水を溶媒としたエキスの活性が最も強かった。このことから、このエキスには水溶性かつ抗酸化作用を持つタンニンに分類される成分が多く溶解していると推測する。

【参考文献】

ジェニー・ハーディング.ハーブ図鑑.ペーパーバック 出版