

ハーブ抽出物のヒアルロニダーゼ活性阻害効果の評価

生物資源科学部 生物生産科学科
2年 阿部 くるみ
2年 川口 美優

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、日本では健康の維持・増進への関心が高まるとともに、美容関連への関心も高まっている。肌荒れの改善、抗酸化作用などの効果を持つハーブがある。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の阻害物質の活性と抗酸化活性を確認する。また、その成分の特定を行う。

昨年度の自主研究で、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。その結果、ほとんどの抽出物はヒアルロニダーゼ阻害活性の値が負となった。今回の研究では、測定方法を変更してヒアルロニダーゼ阻害活性を評価した。

【材料および方法】

ヒアルロニダーゼ阻害活性測定方法は以下の通りである。

- 1) 1.5 mL チューブに Hyaluronidase (from bovine tests, 750-3000 unit/mg, Sigma, 400 NF/mL final concentration)) 50 μ L とエキス 100 μ L を入れ、37°Cで 20 分間反応させた。
- 2) 酵素を活性化させるために Compound 48/80 を 100 μ L を入れ、37°Cで 20 分間反応させた。
- 3) 基質である Hyaluronic acid を 250 μ L 入れ、37°Cで 40 分間反応させた。
- 4) 0.4 N NaOH を 100 μ L 入れ、95 °Cで 3 分間加熱し、室温まで温度を下げた後、氷上にチューブを置いた (表 1) 。
- 5) 96 穴プレートのウェルにそれぞれ反応液 20 μ L (試薬組成 A) を入れた後、Hyaluronic acid の分解産物 (GlcNAc) と反応する p-DAD 試薬 (p-dimethylaminobenzaldehyde) を 200 μ L 加え (試薬組成 B)、37°Cで 20 分間反応させた (表 2) 。
- 6) マイクロプレートリーダーで 585 nm の吸光度を測定し、以下の式に従って酵素活性を求めた。

$$\text{Enzyme activity (\%)} = \{(\text{sample Abs. 585 nm} - \text{sample blank Abs. 585 nm}) / (\text{control Abs. 585 nm} - \text{control blank Abs. 585 nm})\} \times 100$$

Blank は Hyaluronidase 試薬の代わりにバッファーを入れた。

表 1 試薬組成(A)

Sample or Rosmarinic acid	20 μ L
Hyaluronidase	10 μ L
Compound 48/80	20 μ L
Hyaluronic acid	50 μ L
NaOH	20 μ L
Total	120 μ L

表 2 試薬組成 (B)

Reaction mixture A	20 μ L
p-DAD reagent	200 μ L
Total	220 μ L

TLC 分析の方法は以下の通りである。

- 1) それぞれの抽出物 1 mg を 1 mL のメタノールに溶解した。
- 2) 酢酸エチル：トルエン：ギ酸=5：4：1 の展開溶媒を用いて分離した。
- 3) 254 nm の UV 照射によって検出した後、1 枚は DPPH を噴霧し、もう 1 枚は硝酸を噴霧して加熱して、スポットを確認した。

【結果】

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酵素活性を比較した。その結果、エルダーフラワーは 7.4 %、レモンバームは 0.9 %、ラベンダーは 77 %、セントジョーンズワートは 1.4 %の酵素活性が見られた。よって、最も強い阻害活性を示したのは、レモンバームであり、次いでセントジョーンズワート、エルダーフラワーの順に高い活性を示した。ラベンダーは活性を示さなかった。

表 3 ヒアルロニダーゼ酵素活性

サンプル	ヒアルロニダーゼ酵素活性(%)
ロスマリン酸	-1.9
エルダーフラワー	7.4
レモンバーム	0.9
ラベンダー	77.0
セントジョーンズワート	1.4

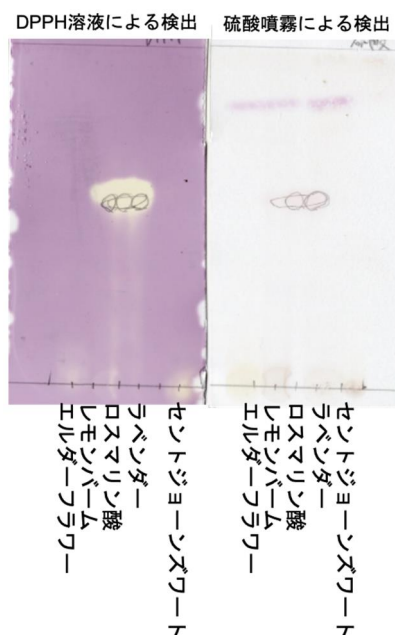


図 1 DPPH を噴霧した TLC(左)と硝酸を噴霧し加熱した TLC(右)

ヒアルロニダーゼ阻害活性を有する物質の多くは抗酸化活性も有することが報告されている。実際ロスマリン酸は両方の活性を有する標準物質である。よって、抗酸化物質を分離、検出が可能な DPPH-TLC 法で分析することで、ヒアルロニダーゼ阻害活性を示す物質を見出すことができると考え、分析した。

その結果、DPPH 溶液を噴霧した TLC シートを観察すると、ロスマリン酸をスポットしたときに検出された黄色のスポットと同じ Rf 値に、レモンバームとラベンダーも黄色のスポットが検出された。このことから、レモンバームとラベンダーにはロスマリン酸が含まれていることが確認できる。また、エルダーフラワーとセントジョーンズワートは、原点にスポットが見られた。硝酸を噴霧し加熱した TLC シートを確認すると、ロスマリン酸以外の物質には上部に紫色のスポットが見られた。

【考察】

図 1 より、エルダーフラワーとセントジョーンズワートは、ロスマリン酸以外の活性物質を含んでいると考えた。また、ロスマリン酸以外の物質には上部の同じ位置に紫色のスポットが見られたことから、4 つの試料に共通して含まれている物質であるタンニンが検出されたと推測した。表 3 より、ラベンダー抽出物がほとんど阻害活性を示さなかった要因は、ロスマリン酸以外の物質が、ロスマリン酸のヒアルロニダーゼ阻害活性を抑制したためと考えた。今後、抽出物を分離した後に活性測定することで、阻害物質の他にヒアルロン酸の分解を促進するような物質も見出されるかもしれない。

【参考文献】

メディカルハーブ ハンドブック, リエコ・大島・バークレー著, 株式会社説話社
アロマセラピーの教科書, 和田文緒著, 株式会社新星出版社