

ハーブ培養物から美容成分を見つけよう II

生物資源科学部 生物生産科学科

1年 阿部 愛笑

1年 阿部 杏樹

1年 加登 茜梨

1年 松渕 優子

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】

北アフリカ、ヨーロッパ、西アジアに分布するエルダーフラワー (*Sambucus nigra* L.) は各地で栽培されている落葉低木である。葉にはエムルシン、ショ糖、ウルソール酸、 β -シトステロールなどが含まれ、花にはカルシウム塩、粘液質、精油、コリン、吉草酸、ルチンなどが含まれる。また、葉と花に青酸配糖体のサンプニグリンがある。薬効と薬理としては、諸出血の消炎、止血あるいは活血の作用があり、利尿・鎮痛作用も強い。このため、筋骨の損傷や水腫、腎炎、関節リウマチ、通風などの諸痛、諸出血などに有効である。また、花には発汗・解熱作用がある。

このエルダーフラワーを組織培養することによって、有用成分を効率的に得ることができると考え、抗酸化活性とどのような物質が含まれているか調査することを目的とした。

【材料及び方法】

A) 組織培養

- ① ビーカーに蒸留水を 800 mL 入れ、スターラーで攪拌し、ムラシゲスクーグ (MS) 基本培地を 4.4 g、sucrose を 30 g Plant Preservative Mixture (PPM™) を 0.5 mL を測り入れ、溶解させた。
- ② 寒天を 1 g 測り、100 mL 三角フラスコに入れ、これを 9 つ用意した。
- ③ MS と sucrose が溶解したら、1000 mL にメスアップした。
- ④ ②の三角フラスコに 100 mL ずつ培地を移し替え、スターラーで攪拌した。
- ⑤ 2,4-D、カイネチン (KIN) をマイクロピペットで 1 mL を量り取り、④の三角フラスコに表 1 の組み合わせに従って加えた。これを攪拌し、pH を 5.7 ~ 5.8 の間に調整した。

表 1 植物ホルモンの種類と濃度の組み合わせ

植物ホルモンの種類及び濃度		2,4-D (M)		
		10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
KIN (M)	10 ⁻⁵	D5K5	D6K5	D7K5
	10 ⁻⁶	D5K6	D6K6	D7K6
	10 ⁻⁷	D5K7	D6K7	D7K7

- ⑥ 10 mL ずつ試験管ミホイルで蓋した後、

に分注し、3重のアル
120 °Cで20分間オー

- ⑦ 実験台にシャーレを置き、試験管立てを傾けて置くことで斜面培地にした。一晩ほど静置して培地を固めた。

- ⑧ 70 % エタノールに1分、10 % 次亜塩素酸に15分、エルダーフラワーの葉と茎を浸漬し、その後3度滅菌水で洗浄した。
- ⑨ 茎は5 mm くらいの間隔にして切り、培地のある試験管に入れた。葉は葉脈に対して垂直に5 mm にして切り、培地に植え付けた。

B) 抗酸化活性試験 (Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC法)

- ① 培養物を回収し、1.5 ml チューブに入れた後、17時間凍結乾燥した。凍結乾燥後のサンプルに 500 ul メタノールを加え、振盪し、2時間室温で抽出した。
- ② 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)

- ③ 分注用プレート (Microplate 96 well, 655001, greiner bio-one) に以下の図1に従って試薬を入れた。緑はブランク (メタノール)、青はTrolox (TE, 0.1 mM から3段階1/10希釈)、オレンジはサンプル (SP, 濃度が濃い順に濃いオレンジ色で表記)。数字は量 (ul) を示す。

	180	180	180	180	200	200	180	180	180	180	
	180	180	180	180	180	200	200	200	200	200	
	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	
	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180	
	200	200	200	200	200	180	180	180	180	180	
	180	180	180	180	200	200	180	180	180	180	

表2 反応液組成

FL	50 ul
TL or Sample	50 ul
AAPH	50 ul
1 well	150 ul

図1 分注用プレート (透明) 上の配置

- ④ 測定用プレート (図2, Nunc F96 MicroWell 黒ポリスチレン製プレート, 237105, Thermo Fisher) へ 78 uM Fluorescein sodium salt 溶液 (FL) を50ulずつ、すべてのウェルへ分注した。
- ⑤ 分注用プレートから50ulずつ測定用プレートへ混合し、ミキサーで良く混合した。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	BL	TL								TL	BL	
C	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7	SP8	SP9	SP10		
D												
E												
F												
G	BL	TL								TL	BL	
H												

図2 測定用プレート (ブラック) 上の配置

- ⑥ 測定用プレートに蓋をし、37 °Cのインキュベータ内で15分間保温する。
- ⑦ 各ウェルに50 μLの 132 μM 2,2-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) 溶液を速やかに加えた。

C) 薄層クロマトグラフィーによる成分分析

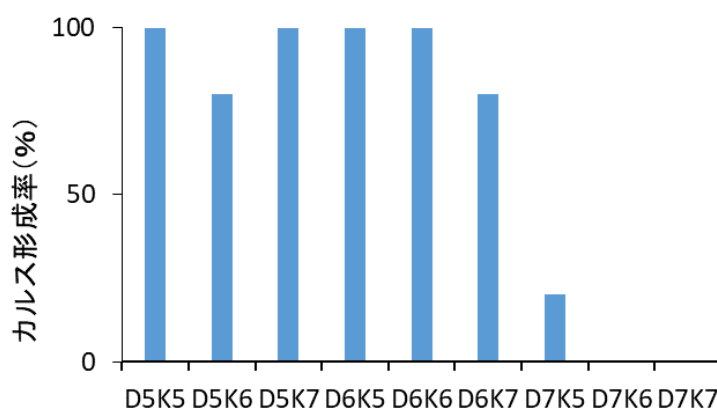
展開液の組成は以下の2種類、クロロホルム：メタノール=19：1、クロロホルム：メタノール=4：1を用いた。抗酸化成分を検出するために、展開後のTLCシートに0.2 % 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 溶液を噴霧した。

- ① 縦10 cmのTLC (Slica gel 60RP-18 F254 s, 1.05559.0001, メルク・ジャパン株式会社) の薄層表面上から5 mm、下から15 mmのところを線を引き、エキスをスポットした。
- ② 展開槽に溶媒を5 mmの高さまで入れ、展開槽に溶媒蒸気が充満するまで待った。
- ③ サンプルをスポットしたTLCシートを展開槽に入れ、TLC上部の線まで展開させた。
- ④ TLCシートを取り出し、乾燥させた後UVランプでサンプルのスポットを確認した。
- ⑤ 抗酸化成分を検出するために 0.2 % DPPHを噴霧した。

【結果】

A) 組織培養

葉、茎ともにコンタミしなかった。葉はカルスを形成しなかった。茎を材料に用いた場合に植物ホルモンの濃度の組み合わせがカルス形成率に与える影響について図3に示した。カルス形成率はKIN濃度には影響されず、2,4-D濃度が 10^{-6} M以上で高いカルス形成率を示した。一方、 10^{-7} M 2,4-Dの試験区ではカルスを形成しにくいことがわかった。

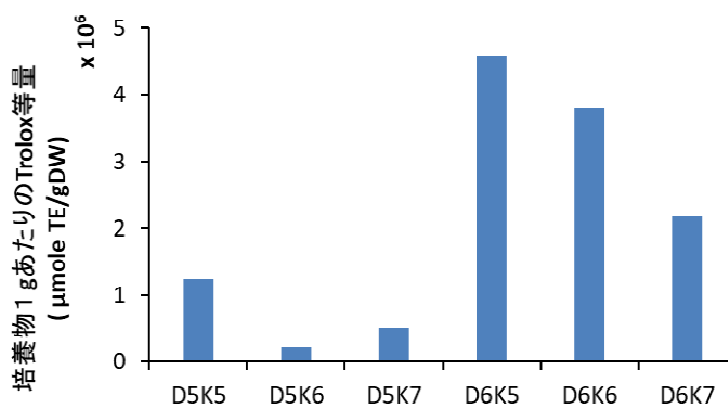


植物ホルモン及び濃度の組み合わせ

図3 茎のカルス誘導率

B) 抗酸化活性試験

茎由来の2,4-DとKINを用いた培養物において、 10^{-6} M 2,4-Dを用いた培養物の方が 10^{-5} M 2,4-Dを用いた培養物に比べて、非常に高い抗酸化活性が見られた。また、 10^{-6} M 2,4-Dを用いた試験区ではKINの濃度が高くなると抗酸化活性が減少した (図4)。



植物ホルモン及び濃度の組み合わせ

図4 茎の培養物 1 gあたりのTrolox等量の比較

C) 薄層クロマトグラフィー

培養物由来の抽出物をTLCによって成分分析した結果を図5に示す。TLC分析の結果、原点にスポットが濃く残っていた。またDPPHを噴霧した検出結果から、抗酸化成分が原点に多く含まれている他、Rf値0.33のスポットは 10^{-6} M 2,4-Dを用いた培養物に多く見られた。

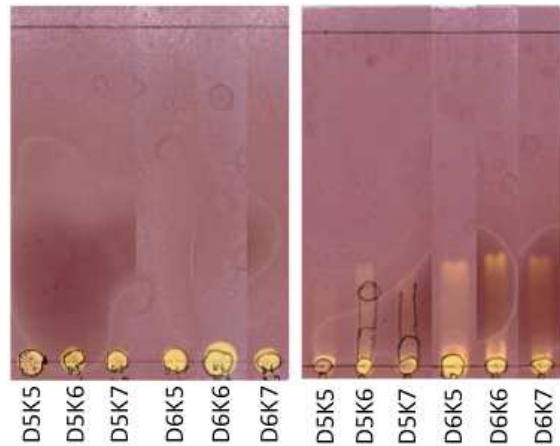


図5 クロロホルム：メタノール= 19：1でのTLC分析結果（左）と
クロロホルム：メタノール= 4：1でのTLC分析結果（右）

【考察】

エルダーフラワーの組織培養の材料には茎が適切であり、2,4-D濃度を 10^{-6} M以上にすることが必要であることがわかった。

また、ORAC試験の結果より、2,4-Dの濃度が高くなると抗酸化活性が減少した。このことから、2,4-Dは抗酸化成分の生成を阻害していると考えられる。一方、KINの濃度が高くなると抗酸化活性が増加したことから、KINは抗酸化活性成分の生成を促進していると考えられる。

TLCとDPPHによる検出結果から、展開溶媒にクロロホルム：メタノール= 4：1を用いた条件で抗酸化成分が分離された。また、どちらの展開溶媒で展開しても原点に強い抗酸化がみられた。このことから抽出物には、極性が高い水溶性成分が多く含まれていることが分かった。水溶性成分は化粧品などの有効成分として使用する際には、エタノールなどの水溶性の基剤によく溶解するので利用しやすいと考えられる。

最後にエルダーフラワーの培養物から得た抽出物を使って化粧水を試作した（図 6, 7）。化粧水の作成方法および組成を以下に示す。

- ① エタノールで溶解した抽出物を0.1 mL加え、市販の天然オイルを0.5 mL加えた。
- ② 蒸留水を9.4 mL加えた。



図6 化粧水の試作品



図7 ケースに入れた完成品

【参考文献】

牧野和漢薬草大図録, 監修：岡田 稔、発行：福田 久子、株式会社 北隆館、東京都