

皮膚老化防止を目的とした
化粧品用素材の開発

2000年1月

鳥取大学大学院工学研究科
物質生産工学専攻

末次 一博

皮膚老化防止を目的とした化粧品用素材の開発

	ページ
研究の背景と目的	1- 7
第 I 部 安全性の高い紫外線防御剤の開発	8-26
第 1 章 シリカゲルへの紫外線吸収官能基の導入	8-21
第 2 章 シリカゲルをベースとした新規紫外線防御剤のモルモットを用いた安全性評価	22-26
第 II 部 植物成分を利用した活性酸素抑制素材及び抗シワ素材の開発	27-77
第 3 章 花弁中の活性酸素抑制物質の検索 ーモクレン花弁中の活性成分ー	27-40
第 4 章 活性酸素による DNA の損傷とルチン及びバラ抽出液の効果	41-50
第 5 章 イソクエルシトリンの配糖化による水溶性の向上	51-60
第 6 章 ハイビスカス花弁抽出物の抗シワ素材の開発	61-73
第 7 章 ハイビスカス抽出物の有効成分の同定	74-82
総括	83-84

研究の背景と目的

化粧品を開発する上で、消費者がどのようなものを欲しているかを的確につかむことが重要であることは言うまでもない。また、消費者が欲するような化粧品を開発して行く上で、化粧品原料の果たす役割は大きく、その化粧品の性能（使用感、機能性や効能効果）をだすためには、個々の原料の特性があって初めて可能となる。化粧品の歴史をひも解いて行くと、女性の美しくありたいという思いが自然にある鉱物や植物資源をうまく利用することによって、肌を美しく保ち、華やかに装ってきた。

先進国に到来しつつある高齢化への波は、社会問題として深刻である。21世紀初頭には国民の約4分の1が高齢者によって構成されることになると言われている。図1に総務庁統計局の調査による1930、1995、2050年の人口ピラミッドを示した。このような中で、すべてに人が健康に生きがいを持ち、安心して暮らせる社会環境をつくりあげることが重要なことである。加齢による皮膚や毛髪に対する変化は、視覚的にわかりやすく、自覚的にも他覚的にも老いを感じさせてしまう。特に女性に対して美しく年を重ねるため、外見的な加齢による変化を目立たなくする抗老化機能を化粧品に求められる役割が大きくなっていくことが明らかである。この目的を達成することができれば、精神的なゆとりも生まれ、積極的に社会参加も可能となり、充実した人生を送ることができるようになるものと期待される。

人は誕生し、成長し、成熟し、そして老化していく。老化はすべての人に訪れる避けることのできないプロセスである。人は老化とともに容姿や機能の衰えに直面し、その対応に複雑な心の動きをされるといわれている。容姿について20才を過ぎると実年齢より若く見られたいという思いが強くなり、逆に1才でも年齢より上に見られると不快に思うという傾向にある。

女性の肌の悩みに関する意識調査を年齢別に行った結果を図2に示した。ニキビへの悩みは20代に多く見られるが年齢と共に低下している。それに対して、シミに対する意識は40代前後がピークとなっている。シワやタルミに関する悩みは40代頃から年齢を重ねるとともに徐々に意識が高まっていくことがわかる。このような状況からも美白素材と同様に抗シワ素材の開発が必要となってきたことがうかがわれる。

次に抗老化化粧品の市場を見てみることにする¹⁾。抗老化化粧品は、美容液の動向とほぼ一致すると考えられるためその動向を解説する。図3に抗老化化粧品の1992年から1998年までの市場売上規模の変化を示した。化粧品全体の売上規模が停滞しているにもかかわらず、抗老化化粧品の売上規模は、

年々増加傾向を示しており今後も増加を続けるであろう。これは、消費者が化粧品に抗老化機能を求めていることを示している。

美容液は分類するとホワイトニング、アンチエイジング、保湿と角層機能向上やスリミングなどのその他に大きく分けることができる。図 4 に美容液に関して機能別の売上の構成比を 1997 年から本年 1999 年の見込みまでの 3 年間を示した。ホワイトニング、アンチエイジングと保湿で 90%以上を占めており、皮膚の老化に関連する機能に集中していることが明らかである。また、構成比に大きな変化は見られず、アンチエイジング(抗シワ)対応の化粧料は今後も重要な位置を占めることは言うまでもない。

一般に、皮膚の老化は、加齢に伴う内因性の老化と紫外線や乾燥などの外的環境の影響をうける外因性の老化の大きく分けることができ、外因性の老化の原因として、紫外線が代表的なものである。紫外線が皮膚に照射されると、直接紫外線のエネルギーによって生体成分である脂質、タンパク、糖質、核酸などに変化が見られるほか、紫外線が皮膚中の水分子に作用し、ヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)や過酸化水素(H_2O_2)が発生するといわれており、このような活性酸素種により、同様に生体成分はダメージを受けることになる。内因性の老化においても、生物は生きるために酸素を取り入れ、体内で燃焼させることによってエネルギーを得ているが、取り入れた酸素の 2~3%がスーパーオキシドラジカル(O_2^-)という活性酸素種になるといわれており、これらも生体成分に対して傷害を与えることとなる。

皮膚は、生体の最外層に位置するために生体内で発生する活性酸素だけでなく、紫外線を浴びるために最も活性酸素にさらされる器官である。このような状況におかれた皮膚を老化から守るためには、一つの因子を押さえるのではなく、多方向から押さえる必要がある。つまり、

- ① 皮膚表面に到達した紫外線から守る
- ② 皮膚表面の酸化から守る
- ③ 体内の活性酸素から守る

必要がある。更に、傷害を受けた皮膚を再生するような働きを持たせる必要がある。このような考えの基に安全性の高い紫外線防御素材の開発、天然物の中に活性酸素を抑える作用を有する素材を開発、紫外線によりダメージを受けた皮膚の再生作用を持つ素材の開発というように総合的な角度から検討を行い、化粧品材料として有用であることを確認した。

紫外線防御材としては、透明度が高く、かつ、安全性の面で優れた材料を作るべく、無機材料の中でも透明度の高い、シリカゲルを基材としてその表面に紫外線吸収を有する化合物を強固な結合で固定することによって、皮膚への吸収をなくすことで安全性の高いものとした。皮膚表面において、第一のバリア

一として紫外線防御材によりトラブルの原因となる紫外線から防御することは重要であるが、完全に紫外線の影響を除くことは不可能に近い。紫外線防御材で防ぎきれなかった紫外線や活性酸素から守る第二のバリアーとして、体内の抗酸化酵素を活性化させたり外部から抗酸化性物質を外用することが有効であると考えられる。本研究では、植物中に存在する抗酸化性物質を検討し、モクレン花卉中にクエルセチンを基本骨格としてもつ、ルチンが活性成分であることを確認した。本物質は、先に報告したバラ花卉中の活性成分であるイソクエルシトリン、クエルシトリンの類縁体である。

先のバラ花卉の研究で見出したクエルセチンの配糖体であるイソクエルシトリンやクエルシトリンは、水に対する溶解性が低いため、製剤化した場合に水中心の系では経時的に沈殿の生成が考えられる。その問題点を解決するために配糖化することによって、水溶性の向上を可能とした。

更に、ハイビスカス花卉（若いガク）中に線維芽細胞の増殖作用を持ち、シワに対して改善的に働く成分を見出した。

参考文献

- 1) 化粧品マーケティング要覧，富士経済(1999)

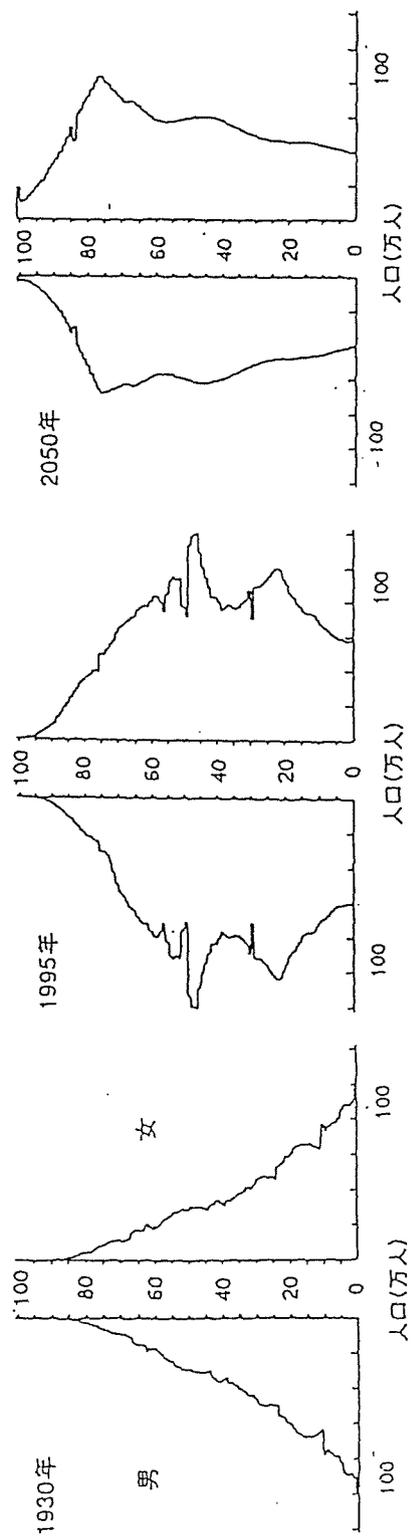


図1. 1930, 1995, 2050年の人口ピラミッド

(資料：総務庁統計局「国勢調査」及び国立社会保障・人口問題研究所「日本の将来推計人口

(平成7年1月)による。)

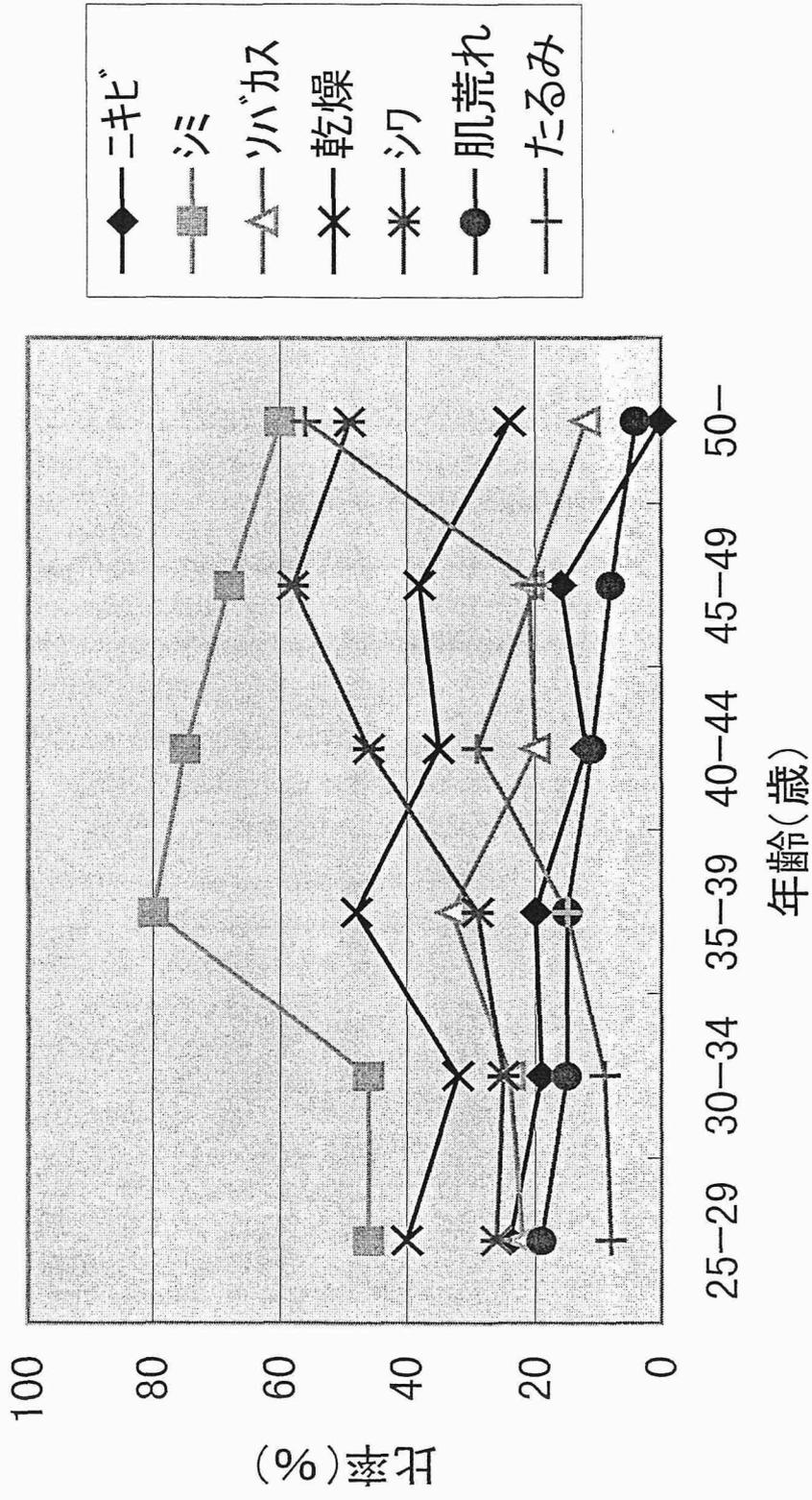


図2. 肌の悩みに関するアンケート調査結果(n=404)

(億円)

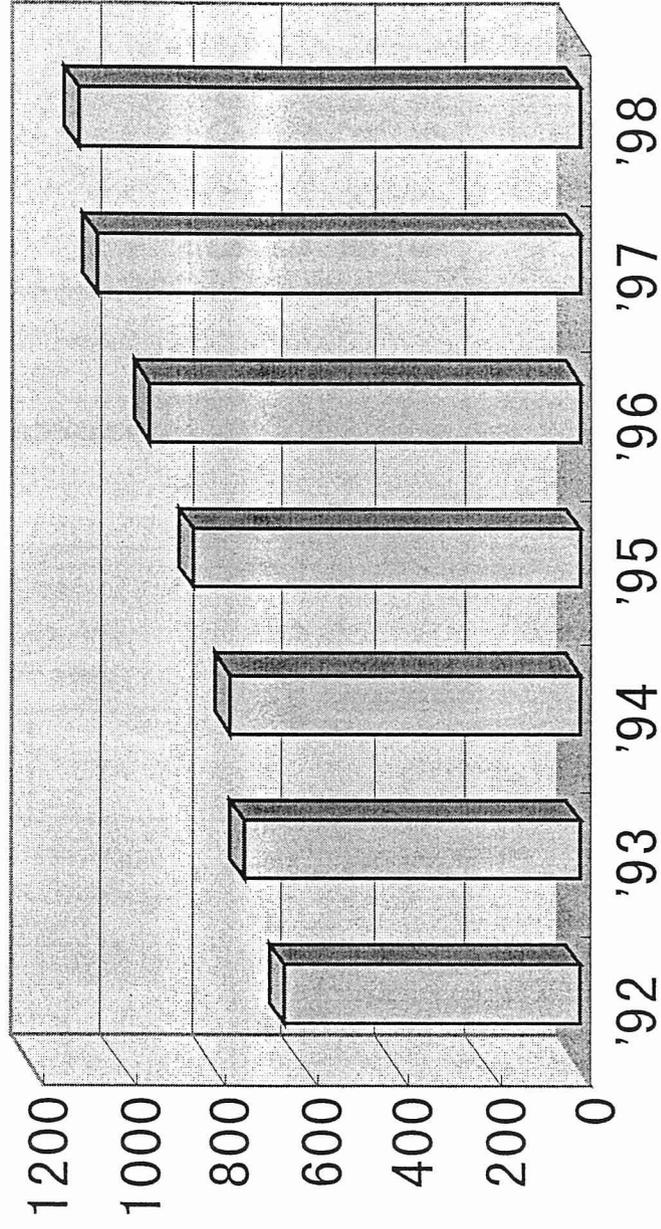


図3. 抗老化粧品市場の市場売上規模推計

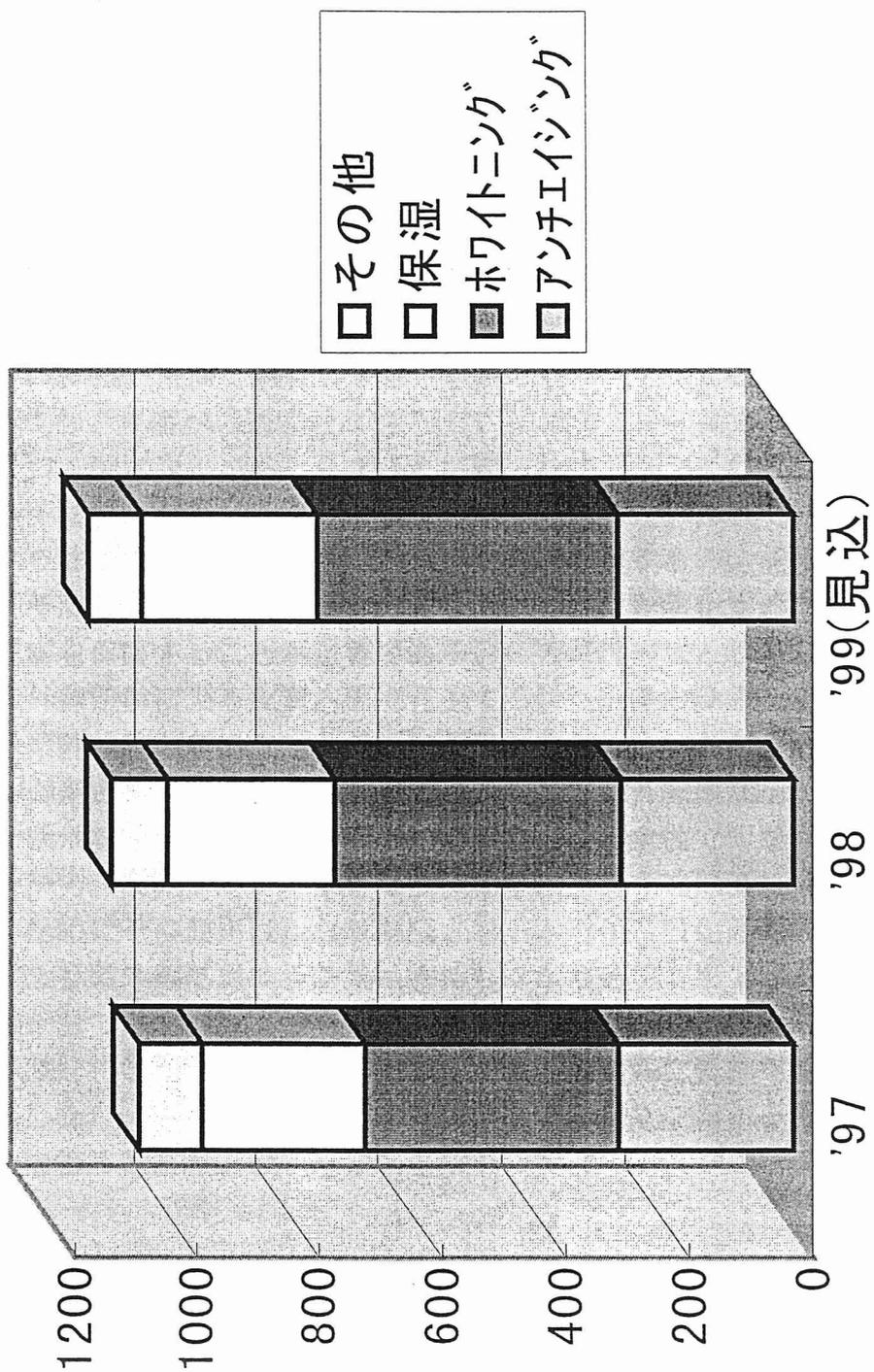


図4. 美容液の機能別売り上げ構成比の推移

第 I 部 安全性の高い紫外線防御剤の開発

序論

太陽光線に含まれる紫外線 (UV) は、その波長により区分され、短波長紫外線 (280nm 以下) を UV-C, 中波長紫外線 (320~280nm) を UV-B, 長波長紫外線 (400~320nm) を UV-A と呼んでいる。これらのなかで、UV-C は、そのほとんどが大気中のオゾンに吸収され地表に届くことはないが、より長波長部の紫外線は地表まで達して、人の皮膚に対して種々の影響を及ぼす。すなわち、UV-B は、皮膚に急性の炎症 (紅斑) (erythema) と火傷 (sunburn) を引き起こし、皮膚への透過性が高い UV-A は真皮中の弾力繊維、コラーゲンやヒアルロン酸に変化をもたらすことが知られており、これらの変化が皮膚の弾力の低下につながり、シワ・タルミの原因になるといわれている。また、紫外線はメラニンの産生を促進し、シミの沈着を促進する¹⁾。従って、皮膚の老化促進を予防し、しみ、そばかすの発生および悪化を防止するためには、紫外線から皮膚を保護することが重要である。この保護方法として紫外線防御剤の塗布、紫外線照射により皮膚内部で発生する活性酸素の除去などがあるが、今のところ紫外線防御剤の皮膚への塗布が最も有効であると考えられている²⁾。紫外線防御剤として有機紫外線吸収剤と無機物の紫外線散乱剤があるが、低分子の有機紫外線吸収剤は経皮吸収されるために、安全性で問題点が指摘されている³⁾。一方、酸化チタンのような無機粉体は、安全性は優れているが、透明度が低いためにその使用はかなり制限される。近年、酸化亜鉛の形状を検討することにより紫外線に対する効果は維持しながら透明度を上げる工夫がされている⁴⁾が十分ではない。本報告では、透明度の高いシリカゲルに紫外線吸収を持つ官能基を化学結合で固定することにより、透明性に優れた新規紫外線防御剤を調製した⁵⁾。そして、この紫外線防御剤の安全性に関する評価を行い、良好な結果を得ることができた。

第1章

1. 実験

1-1. 各種無機粉体をベースとした紫外線吸収官能基の導入

1-1-1. 試薬および材料

シリカゲル PA420B, BW127ZH, BW300, スーパーマイクロビーズシリカゲル (SMBS) C-30, SYLYSIA350, SYLYSIA550 は, 富士シリシア化学社製を, AEROSIL200 と比較試料の微粒子 Titanium Dioxide P25 は, 日本アエロジル社製を使用した。カオリン KF はフジライト工業社製, セリサイト GMS は東色ピグメント社製, タルク MS は日本タルク社製を用いた。3-アミノプロピルトリエトキシシランは, チッソ社製を使用した。その他の試薬は, 和光純薬社製をそのまま使用した。

1-1-2. 無機粉体の前処理

1-1-2-1. 無機粉体の前処理: 各種無機粉体 10 g に, 濃塩酸 (36 ml) を加え, 70 °C で 6 時間加熱した。洗液が中性を示すまで水洗し, 減圧下, 80 °C で乾燥した⁶⁾。

1-1-2-2. 無機粉体とトリアルコキシシラン誘導体の反応: 塩酸処理した各種シリカゲル 4.0 g にベンゼン 70 ml を加えて加熱還流し, 少量の水を共沸蒸留により除去した。これに, 3-アミノプロピルトリエトキシシラン 8 mmol を加え, 48 時間加熱還流した。反応させたシリカゲルは, ソックスレー抽出器を用いて熱ベンゼン可溶部を 24 時間抽出除去し, 減圧下 80 °C で乾燥した⁶⁾。

1-1-2-3. アミノプロピル化した無機粉体とケイ皮酸クロライドの反応: アミノプロピル化したシリカゲルを 1.0 g とり, これにベンゼン 40 ml を加え, 共沸蒸留により少量の水を除いた。さらに, ケイ皮酸クロライド 2 mmol およびトリエチルアミン 2 mmol を加え 24 時間還流した。反応物をソックスレー抽出器に入れ, 熱ベンゼン可溶部を 24 時間抽出除去したのち, さらにエタノールで同様に洗浄した。洗浄後, 減圧下で乾燥を行った。

1-1-3. 分析

1-1-3-1. 元素分析: 元素分析は, 元素分析計 CHN コーダー MT-3 (柳本製作所製) を用いて行なった。

1-1-3-2. 粒子サイズの測定: 平均粒子サイズは, 走査型電子顕微鏡 JSM2500LV (日本電子製) を用いて測定し, 表面積は簡易 BET 法によって測定した。

1-1-3-3. 赤外スペクトルの測定: 赤外スペクトルの測定は, 赤外吸光光度計 FT-720 (堀場製作所製) を用い, ヌジヨール法にて測定した。

1-2. 薄膜法による紫外線透過度の測定⁷⁾

各種シリカゲルを 5% 濃度になるようにヒマシ油で乳鉢を用いて均一に分散した。これを石英板上に 5 mg 取り, もう一枚の石英板でサンドイッチ状にし, 直径 16 mm の均一な薄膜とし, 分光光度計 UV-2100 (島津製作所製) を用いて 240-600 nm の透過度スペクトルを測定した。

1-3. 皮膚塗布による評価

調製した桂皮酸アミド化シリカゲルをヒマシ油に重量比5%を分散し、比較試料として紫外線領域の吸収が同程度になる微粒子 Titanium Dioxide P25 のヒマシ油に重量比1%を分散した試料を用いた。200mg の試料を4 cm² 皮膚に塗布し、透明度の比較を目視にて行なった。

2. 結果および考察

2-1. 各種無機粉体への紫外線吸収官能基の導入

アミノプロピルエトキシシランを導入した段階での元素分析結果を表 1-1 に示した。シリカゲル (SYLISIA350, 550, PA420B) への結合が認められるが、その他の無機物 (カオリン, タルク, セリサイト) には、ほとんどアミノプロピルエトキシシランの結合は見られなかった。本反応における差は、無機粉体表面にあるヒドロキシ基の有無によるものと思われる。引き続きケイ皮酸クロライドを用いて紫外線吸収を持つケイ皮酸の導入を行い元素分析を行った結果を表 1-2 に示した。アミノプロピルエトキシシランが導入されたシリカゲルには、ケイ皮酸の結合が認められた。その他の無機粉体にはほとんどケイ皮酸の結合は認められなかった。

今回使用した無機粉体は、化粧品材料として汎用されるものを使用したそれぞれの透明度を比較するとシリカゲルが最も透明性は高く、更に本実験から得られた結果に基づいて、ベース基材はシリカゲルに絞って検討を進めていくことにする。

2-2. シリカゲルをベースとした紫外線吸収官能基の導入

2-2-1. シリカゲルの化学修飾

本実験には、Table 1-3 に示す比表面積、ならびに平均粒径の異なる6種のシリカゲルを用いた。これらのシリカゲルを塩酸で処理して、表面シラノール密度を調整したのち、Scheme 1 にしたがって、3-アミノプロピルトリエトキシシランとの反応によりアミノプロピル基を結合させ、ついで桂皮酸クロリドを反応させて、桂皮酸アミド基を化学結合によりシリカゲル上に固定化した。これらの反応が進行していることを確認するために赤外スペクトルの測定を行なった。未処理のシリカゲル  1-1 と桂皮酸アミド化シリカゲルの  1-2 を比較すると 1698cm⁻¹ に新たなアミド結合と思われる吸収が発現しているためこれらの反応が定量的に進行していると仮定した。元素分析値による窒素分析値を基準として、シリカゲル表面上の官能基存在量を推定した。

元素分析値による窒素分析値を基準として、シリカゲル表面上の官能基存在量を推定した。Table 1-3 に、ベースとなる未修飾のシリカゲル 1 g 当たりの官能基導入量 (mmol/g-SiO₂) と、単位表面積当たりの官能基導入量 (μmol/m²) の計算値を示す。

アミノプロピル基の固定反応は、トリエトキシシリル基とシリカゲル表面のシラノール基との反応で進行する。したがって、アミノプロピル基の修飾量は、シリカゲルの表面積とシラノール基の密度に依存することとなる。本実験で用いたシリカゲルは、シラノール密度を一定にするために 1-1-2-2 に記載したように前処理を行った。したがって、比表面積が大きいほど単位重量当たりのアミノプロピル基の結合量 (mmol/SiO₂) が多いはずである。実際、表 3 に示すように、PA420B を除いて、この予測に従う結果が得られた。しかしながら、反応が完全に進行するとすれば、シリカゲルの単位表面積当たりの官能基導入量 (μmol/m²) はすべての場合に同一となるはずであるが、この値は、比表面積の大きいシリカゲルほど、結合量が少ないという結果になった。これは、内部に微細な細孔を持つタイプの比表面積の大きいシリカゲルでは、細孔内部での化学修飾反応が完全には進行しがたく、そのために、比表面積と単位表面積当たりの官能基導入量の間には正比例の関係が成立しないものと解釈される。アミノプロピル化シリカゲルとアミド化シリカゲルの官能基導入量を比較すると、いくつかの試料では、官能基導入量が減少している。これは、前者の反応で副生するアミノプロピルトリエトキシシラン由来のオリゴマーが水素結合でアミノ化シリカゲルに強く吸着しているために除去しにくいのに対し、アミド化することで水素結合による相互作用が減少し、ソックスレー洗浄で除去できた結果ではないかと推測される。

2-2-2. 紫外線透過の抑制効果の評価

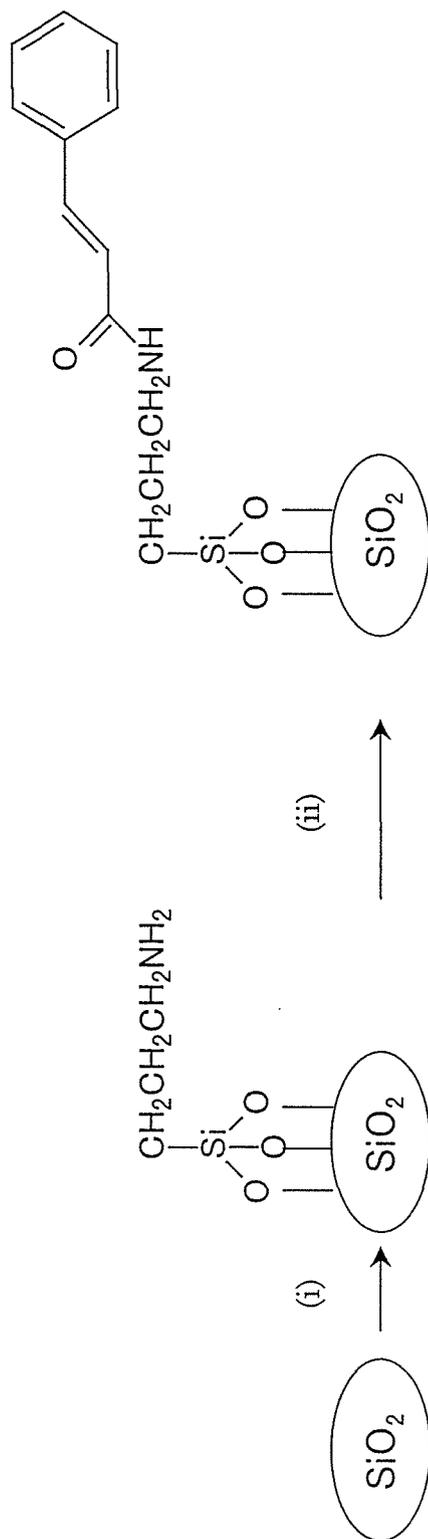
調製したシリカゲルをヒマシ油に重量比 5 % で分散し、これを試料として、可視および紫外領域の吸収スペクトルを測定した。比較試料には化粧品に紫外線散乱剤として汎用されている微粒子 Titanium Dioxide P-25 (比表面積 50m²/g, 平均粒子径 0.050 μm) を用いた。微粒子 Titanium Dioxide P-25 (重量比 1%) の透過度スペクトルを図 1-3 に示す。この図から、全領域にわたって透過率が低下し、透明性に弱点があることが明らかである。

未処理の AEROSIL 200 (図 1-4a) および桂皮酸アミド基を結合させた AEROSIL 200 (図 1-4b) の透過度スペクトルを図 1-4 に示す。いずれの場合も 350 nm 以上の領域では透過率が高く、可視光に対する透明性が優れている。さらに、この修飾シリカゲルでは、320 nm 以下の波長領域の紫外線に対する透過率が大きく低下しており、紫外線防御の機能をもつ素材であるといえる。また、SYLYSIA350 をベースとする修飾シリカゲルも AEROSIL 200 と同様な

透過度スペクトルを示した。このように可視光の透過性に優れ、紫外線を吸収、散乱する特性を有する修飾シリカゲルをAタイプと分類する。皮膚に塗付した場合も桂皮酸アミド化した AEROSIL 200 は、微粒子 Titanium Dioxide P-25 と比較して明らかに透明度に優れていることを確認した。

次に、BW300 と桂皮酸アミドで修飾した BW300 の透過度スペクトルを図 1-5 に示す。この修飾シリカゲル（図 1-5b）では、可視光領域の全領域にわたって透過率が減少した。一方、紫外領域の透過度について、未修飾のシリカゲルと修飾シリカゲルを比較すると、AEROSIL 200 に比べて単位重量当たりの官能基導入量が多いにもかかわらず、その透過度の減少率は小さいと判断される。このようなスペクトル特性は、PA420B, SMBSC-30, BW127ZH をベースとする修飾シリカゲルにおいても観察された。このような特性を有する修飾シリカゲルをBタイプと分類する。Table1-4 にシリカゲルの表面修飾前後における紫外線及び可視光領域の透過率（%）のデータを示す。

今回調製した修飾シリカゲルは、可視および紫外領域のスペクトル特性によって2種類に区別された。ベースとなるシリカゲルの特性で区別すると、粒径が微細で、内部細孔のないシリカゲルからはAタイプとなり、粒径、比表面積が大きく、内部細孔の多いシリカゲルからはBタイプとなるといえる。透過率の低下は、光線の散乱と吸収の2つの要因に帰することができるが、Aタイプのシリカゲルが可視光に対する透明性が高いことは、粒径が小さいために散乱が少ないことによると説明できる。また、桂皮酸アミド基が微粒子のシリカゲル表面に単分子膜状に分散して固定化されていると推定されるので、ヒマシ油中に均一に分散した状態で存在しているとみなすことができる。したがって、紫外線吸収剤が均一に溶解しているのと同様な結果となり、効率よく紫外線の吸収がおこるのではないかと判断される。一方、Bタイプのシリカゲルでは、比較的大きな粒径が可視光線を散乱する要因となっている。さらにこのタイプのシリカゲルでは、桂皮酸アミド基が細孔内に充填されたような状態で固定化され、その結果、微結晶の集合状態として存在しているとみなされる。このような状態の試料に光を照射した状況を考えると、吸収に関する有効断面積がきわめて小さくなり、ほとんどの光が紫外線吸収剤に遮られずそのまま通過する結果になるものと解釈される。



Scheme 1. Preparation of chemically-modified silica gels.

Reaction conditions; (i) 3-aminopropyltriethoxysilane / benzene reflux, 48hr.
 (ii) cinnamyl chloride, triethylamine / benzene, reflux, 24hr.

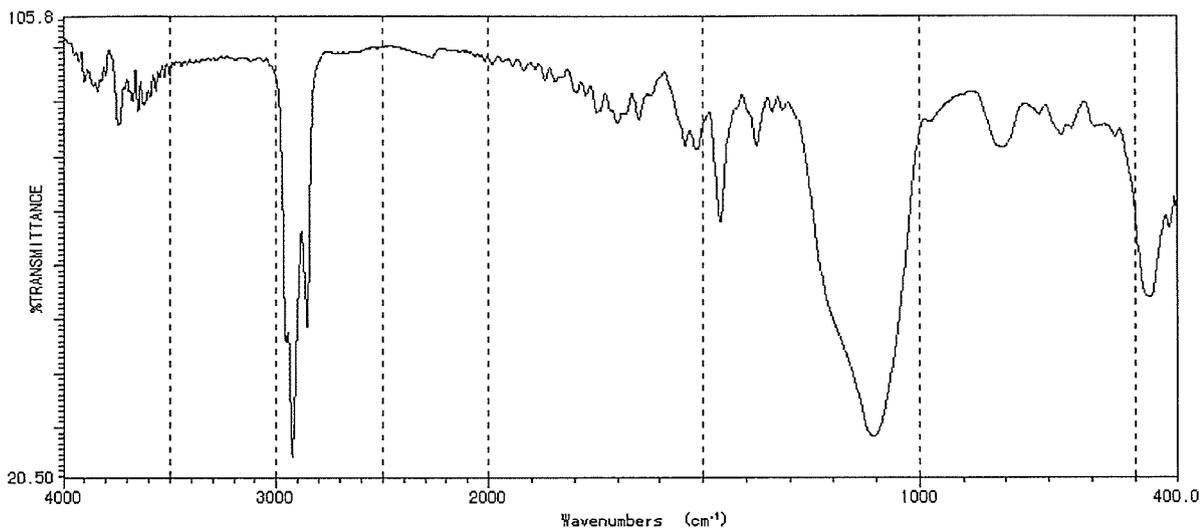


図 1-1. 未処理 AEROSIL-200 の IR スペクトル (ヌジヨール法)

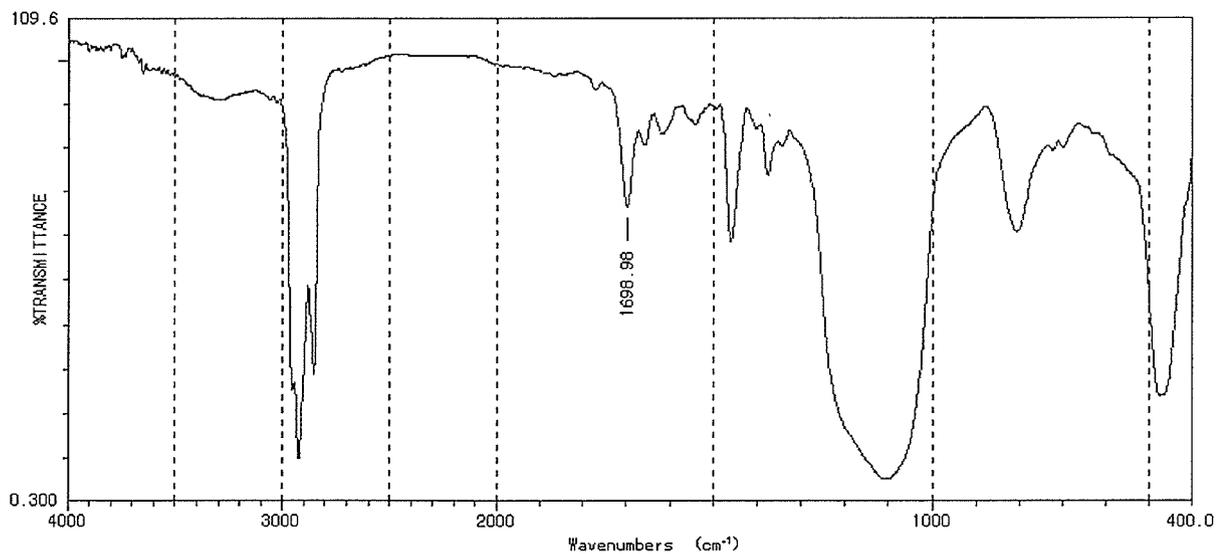


図 1-2. 桂皮酸アミド修飾 AEROSIL-200 の IR スペクトル
(ヌジヨール法)

表 1-1. 各種無機粉体へのアミノプロピルトリエトキシシランの導入による元素分析結果

	C%	H%	N%
SYLISIA350	4.44	1.46	1.57
SYLISIA550	5.53	1.70	1.86
PA420	5.26	1.67	1.71
カオリンKF	0.60	0.46	0.12
セリサイトGMS	0.41	0.82	0.08
タルクMS	0.29	0.55	0.02

表1-2. アミノプロピル化した各種無機紛体へのケイ皮酸の導入による元素分析結果

	C%	H%	N%
SYLISIA350	18.21	1.73	1.27
SYLISIA550	20.56	2.09	1.54
PA420	19.00	2.14	1.27
カオリンKF	1.01	0.50	0.09
セリサイトGMS	0.50	0.50	0.09
タルクMS	0.47	0.56	0.00

Table 1-3. Amount of anchored functional group of chemically modified silica gels

Original silica gel		Aminopropylated silica gel			Amidated silica gel							
Specific surface area	Particle diameter	Amount of amino group			Amount of amino group							
m ² /g	μm	C (%)	H (%)	N (%)	mmol/g-SiO ₂	μmol/m ₂	C (%)	H (%)	N (%)	mmol/g-SiO ₂	μmol/m ₂	
AEROSIL200	200	0.012	3.36	1.02	1.24	1.0	4.8	15.43	1.62	1.24	1.1	5.5
SYLYSIA350	300	1.8	4.44	1.46	1.57	1.2	4.1	18.21	1.73	1.27	1.1	3.8
BW300	450	60	5.86	1.47	1.78	1.4	3.2	19.72	2.14	1.49	1.4	3.1
BW127NH	450	125	5.92	1.77	1.92	1.6	3.5	16.98	1.87	1.46	1.4	3.0
SMBSC-30	500	10	7.13	1.87	2.29	1.9	3.8	15.19	1.88	1.45	1.3	2.7
PA420B	530	300	5.26	1.67	1.71	1.4	2.6	19.00	2.14	1.27	1.1	2.1

Table 1-4. The UV and visible light transmittance/% of suspension of silica gels or TiO₂ on castor oil.

The sample of 5mg was spread between two quartz plates in 16mm diameter and subjected to the measur

	Transmittance/%				
	280	300	350	400	500
Original silica gel group					
AEROSIL200	58.5	90.0	100.0	100.0	100.0
SYLYSIA350	56.2	85.7	98.7	99.0	99.0
BW300	52.7	82.4	98.0	99.2	99.3
BW127ZH	55.5	85.1	96.5	97.5	97.5
SMBSC-30	59.2	86.2	97.6	97.9	98.2
PA420B	62.8	85.8	92.7	95.6	96.0
Cinnamamide modified silica gel group					
AEROSIL200	22.5	45.2	92.5	98.0	98.5
SYLYSIA350	18.3	36.8	93.0	99.0	99.0
BW300	40.0	65.2	84.6	87.4	89.6
BW127ZH	49.0	74.5	90.5	94.0	94.5
SMBSC-30	42.5	69.5	86.9	91.0	91.5
PA420B	45.5	70.5	91.0	93.5	94.0

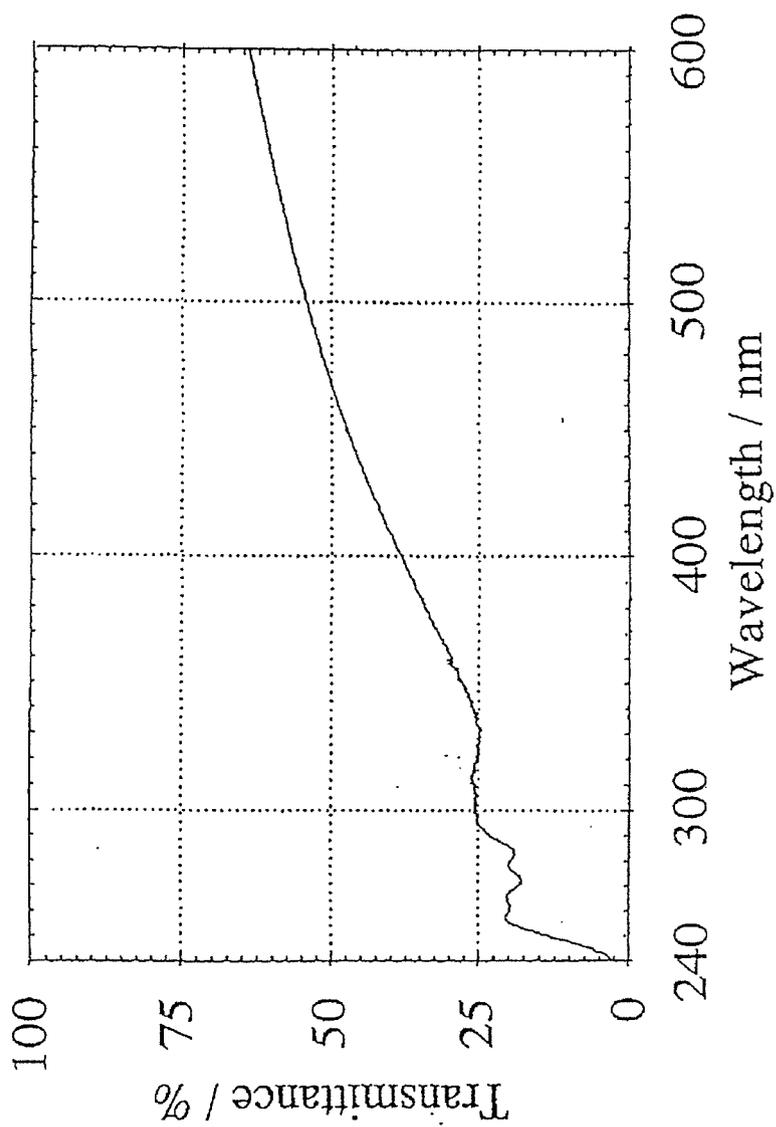


図1-3. 1%酸化チタン/ひまし油の紫外部・可視部スペクトル

5mgとり, 厚さ1mmの石英板2枚に挟み直径16mmの円になるまで圧迫後測定

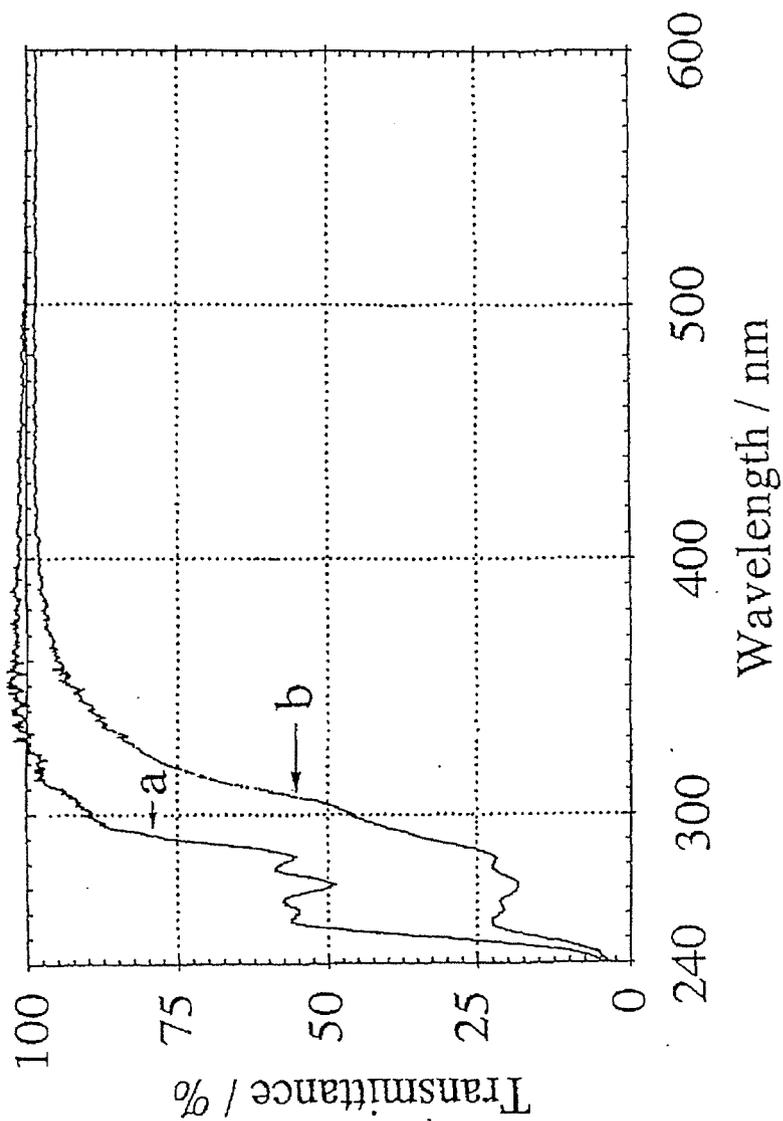


図1-4. 5%シリカゲル/ひまし油の紫外部・可視部スペクトル

5mgとり, 厚さ1mmの石英板2枚に挟み直径16mmの円になるまで圧迫後測定

(a)Aerosil-200, (b)桂皮酸アミド修飾Aerosil-200

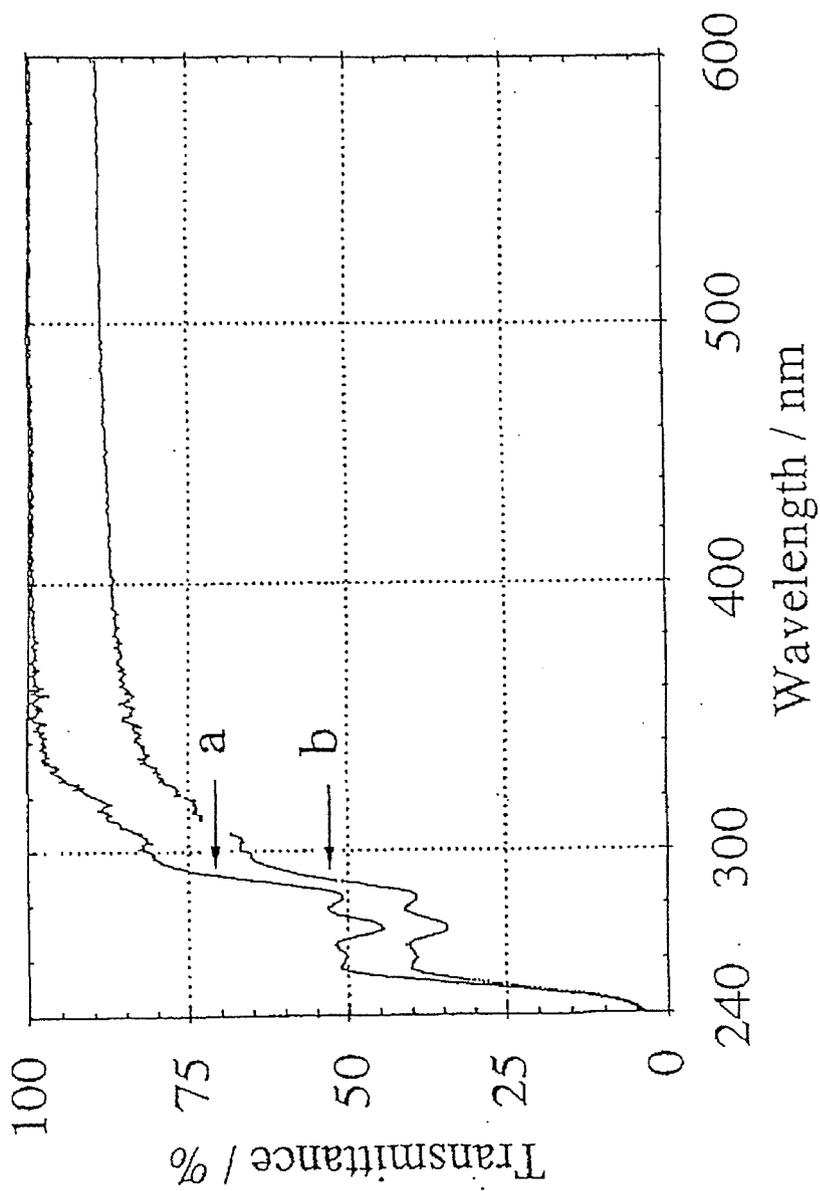


図1-5.5%シリカゲル/ひまし油の紫外部・可視部スペクトル

5mgとり、厚さ1mmの石英板2枚に挟み直径16mmの円になるまで圧迫後測定

(a)BW-300, (b)桂皮酸アミド修飾BW-300

第2章. シリカゲルをベースとした紫外線防御剤の安全性評価

1. 実験

4週齢のハートレー系雄性モルモットを1週間予備飼育し、一般状態の良好なものを試験に共した。1群の動物数は5匹とした。飼育条件は、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 10\%$ で行った。p-メトキシ桂皮酸アミド修飾シリカゲル、p-メトキシ桂皮酸オクチル（ネオヘリオパン AV（ハーマン&ライマー社製）、p-メトキシ桂皮酸（和光純薬社製）を白色ワセリン基剤とし、それぞれの被験物質の濃度をp-メトキシ桂皮酸を基準として0.3Mとなるように調整した。

皮膚一次刺激性試験は、側腹部を剃毛し、パッチテスト用絆創膏を用い、0.1gずつ24時間閉塞貼付した。皮膚累積刺激性試験は、側腹部を剃毛し、毎日1回4日連続して塗布し、毎塗布24時間後に皮膚反応の確認を行った。皮膚反応はDrazeの評価法⁸⁾により評価した。

皮膚反応の評価

紅斑(erythema)形成

紅斑無し	0
散在的に発赤を伴った皮疹	1
ごく軽度の紅斑	2
境界が明確な紅斑	3
中程度から強度の紅斑	4
強度の紅斑	5

浮腫(edema)形成

浮腫無し	0
ごく軽度の浮腫	1
軽度の浮腫	2
中等度の浮腫	3
強度の浮腫	4

2. 結果及び考察

モルモットを用いた皮膚一次刺激性試験の結果をTable 2-5に示した。比較対照として化粧品の紫外線吸収剤として使用されているp-メトキシ桂皮酸オクチルとp-メトキシ桂皮酸を用いた。この試験では、p-メトキシ桂皮酸オクチルとp-メトキシ桂皮酸は紅斑を生じ、特にp-メトキシ桂皮酸オクチルに関しては浮腫の生成までみられた。それに対して、今回作成したシリカ表面にアミノ基

を持ったシランカップリング剤を介して結合した p-メトキシ桂皮酸アミド修飾シリカは、皮膚にまったく刺激を与えなかった。

さらに連続塗布による皮膚刺激性に関しても Table 2-6 に示すように、p-メトキシ桂皮酸、p-メトキシ桂皮酸オクチルよりも、刺激性が極めて低い事が確認された。これらの2つの実験結果から、p-メトキシ桂皮酸や p-メトキシ桂皮酸オクチルに比べて、p-メトキシ桂皮酸アミド修飾シリカは安全性が極めて高いことが確認された。

これらの結果は、低分子の p-メトキシ桂皮酸や p-メトキシ桂皮酸オクチルが経皮吸収されるのに対して、p-メトキシ桂皮酸アミド修飾シリカは、高分子のシリカをベースとしているために経皮吸収が起らず、その結果、刺激性が低いものと解釈される。このような観点から、有機紫外線吸収剤の安全性の向上させるために、有機紫外線吸収剤を高分子などに内包させたカプセル化が行われている⁹⁾¹⁰⁾。しかし、カプセルに内包した有機紫外線吸収剤が皮膚上で漏出して問題となることが多い¹¹⁾。それに対して、今回作成した p-メトキシ桂皮酸アミド修飾シリカは紫外外部領域の吸収を持つ物質が強固な結合で固定されているため、安全性に優れていることになる。また、この修飾シリカゲルは可視光線に対する透明性に優れているため、紫外線防御を主目的とするサンスクリーン製品での白化現象を抑えることが可能である。近年、基礎化粧品やファンデーションにも紫外線から皮膚を守る機能が注目されており、透明度と安全性が高い本紫外線防御剤は有用な素材となることが期待される。

4. 引用文献

- 1) 宮地良樹, フレグランスジャーナル, 1993, 12.
- 2) 紅陽子, 末次一博, 田中 弘, 芝 篤志, 粧技誌, 27, 130 (1993).
- 3) S. Imayama, I. M. Braverman, *A. Record*, 222, 115 (1988).
- 4) A. Olkavinen, M. Kallioinen, *Photodermatology*, 6, 24, (1989).
- 5) 辻 卓夫, A. M. Kligman, 日皮会誌, 91, 43 (1981).
- 6) 小西久俊, 市橋裕司, 今井雅明, 岡野多門, 木地実夫, 日化, 1988, 1059.
- 7) 本好捷宏, フレグランスジャーナル, 1991, 55.
- 8) Draize. J : Dermal toxicity appraisal of the safety of chemicals in foods. The Association of Food and Drug. Officials of the United states, 1959, pp.46-59.
- 9) 菊池源, 高木真理, 近藤光雄, 引間俊男, 本田計一, 次田章, 徳永和信, 米谷融 : 粧技誌, 27 : 441-449(1993).
- 10) David Fairhust, Mark Mitchnick : *Cosmetics & Toiletries*, 110 : 46-50

(1995).

11) 松枝明：粧技誌，31：373-384（1997）.

Table 2-5. Primary irritant test of p-methoxycinnamide modified silica gels ,
 p-methoxycinnamic acid and octyl p-methoxycinnamate.

	Erythema			Edema		
	24h	48h	98h	24h	48h	98h
p-methoxycinnamide modified silica gel	0	0	0	0	0	0
p-methoxycinnamic acid	1.6	1.4	0.4	0	0	0
Octyl p-methoxycinnamate	0	1.8	2.0	0.8	0	0.4
Petrolatum	0	0	0	0	0	0

Table 2-6. Cumulative irritant test of p-methoxycinnamide modified silica gels ,
 p-methoxycinnamic acid and octyl p-methoxycinnamate.

	Erythe ma					Edema				
	1d	2d	3d	4d	5d	1d	2d	3d	4d	5d
p-methoxycinnamide modified silica gel	0	0	2.0	2.0	2.0	0	0	0	0	0
p-methoxycinnamic acid	0	0.2	2.6	2.6	2.8	0	0	0	0	0
Octyl p-methoxycinnamate	0	1.6	3.6	3.8	3.4	0	0	0.8	1.0	0.6
Petrolatum	0	0	2.4	2.0	2.0	0	0	0	0	0

第Ⅱ部 植物成分を利用した抗シワ素材の開発

序論

皮膚は、体内から起因する酸素ストレスだけではなく、空気と接していることや紫外線の照射を受けることから、最も活性酸素にさらされている器官である。皮膚表面では、活性酸素が皮脂を酸化し、皮膚表面状態の悪化の原因となっている^{1,2)}。また、真皮中では構成成分であるコラーゲン^{3,4)}やエラスチン⁵⁾が、架橋することにより弾力低下の原因となり、ヒアルロン酸は低分子化する^{6,7)}ことにより、保湿能の低下を引き起こすと言われている。このような真皮成分の変化が、シワの原因として提唱されている^{8,9)}。また、活性酸素は、シミの生成にも深く関与していると考えられ^{10,11)}、よって様々な皮膚の老化の主原因であると推測される。

一般に、皮膚の老化とは、加齢に伴う生理的（内因性）な老化と紫外線や乾燥などの外的環境などの影響を受ける外因性の老化に大きく分けることができ、外因性の老化として代表的なものとして光老化を挙げることができる。化粧品の役割として、日常生活の中で外用されるために、日常の外部環境からの刺激による皮膚に対する傷害をいかにして予防・改善できるかが重要となってきた。表Ⅱ-1に生理的(内因性)の老化と光老化(外因性)の老化との違いを示した¹²⁾。皮膚表面状態は、生理的老化は変化が少ないが、光老化は明瞭なシミやシワの形成に関与する。細胞外マトリックスは、それぞれ異なる挙動を示し生理的老化では、総コラーゲン、総エラスチン、総ムコ多糖(GAGs)ともに減少するが、光老化で、コラーゲンは量及び可溶性の割合が低下するが、総エラスチン、総GAGsは増加する傾向にあり、構造的な変性を受けている。血管に関しては、生理的老化による変化は少ないが、真皮上層部の毛細血管網の縮退が見られる。すべての現象において生理的老化は穏やかであるのに対して、光老化は過激な変化が認められる。この現象も活性酸素の関与で説明すると分かりやすい。生理的老化は、微量の消去されなかった活性酸素のダメージが蓄積され、徐々に生体機能が低下することによってマトリックス成分などの低下を引き起こしている。それに対して、紫外線を受け、生理的な反応よりも多くの活性酸素を生じ、急激な変化を与えるものと推測できる。

1. 表皮および角質層の乾燥に起因する小ジワ¹³⁾

加齢に伴い角層の水分量の低下は、皮膚の乾燥と柔軟性の低下につながり、小ジワの原因となるものと思われる。

さらに、表皮（特に角質層）は、皮膚の最外層に位置して、皮膚からの水分

の損失、紫外線に対する防御や病原菌・化学物質などからの防御する役割が多
大である。連続的な乾燥環境、紫外線や化学物質の露曝による皮膚の炎症によ
る角質層のダメージによって水分保持能が低下することも、皮膚表層部に乾燥
性の小ジワを形成する原因と考えられる。

2. 真皮マトリックス成分の変化に起因するシワ・タルミ¹³⁾

老化皮膚では、線維芽細胞の活性低下に伴い、真皮マトリックス成分である
コラーゲン線維・弾性線維・酸性ムコ多糖の質的・量的変化がシワやタルミの
原因となるといわれている。真皮マトリックス成分の変化は、単に生理的変化
によって促進されるだけでなく、質を異にするものとして光老化がある。光老
化の原因として紫外線照射により発生する活性酸素の関与が重要視されている。
活性酸素は線維芽細胞に傷害を与え機能低下や直接的に線維構造に対して分
解・断片化作用を促進する。また、活性酸素はメイラード反応を介してコラー
ゲン線維や弾性線維にいわゆる老化架橋の形成を促進する作用を有している。
コラーゲンの架橋は、分子内架橋と分子間架橋に大きく分けることができ、分
子内架橋は成長とともに必要なコラーゲンの機械的強度を獲得するが、分子間
架橋は必要以上の架橋が形成されるとコラーゲンの柔軟性が損なわれる結果と
なる。コラーゲンの分子間架橋の形成を図Ⅱ-1に示した¹⁴⁾。

さらに、UVA(長波長紫外線)暴露によって線維芽細胞のコラーゲン合成能が
減少し、分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼの mRNA 発現が促進
され、真皮マトリックス成分の産生と分解のバランスが崩れることも原因の一
つと考えられる。

また、光老化皮膚では毛細血管の微小循環も阻害されており、毛細血管基底
膜は肥厚し、多くは閉鎖性変化を示しているといわれる。

シワやたるみの形成の原因を述べたが、各々の原因に対して総合的に対応す
ることが必要である。表皮および角質層を乾燥から守るための保湿剤や紫外線
によるダメージから守るために紫外線防御剤の外用が有効であることは言うま
でもない。さらに、皮膚上で起こる老化作用を抑えるために皮膚内で発生する
活性酸素から皮膚を守ることも重要である。一方、加齢とともに衰える線維芽
細胞の機能低下は、真皮マトリックス成分の産生のバランスを狂わせるために
細胞機能の維持・向上も必要である。

紫外線や活性酸素は、遺伝子に傷をつけ発ガンの原因となるだけでなく、美
容面から考えると、皮膚の線維芽細胞の遺伝子に傷がつけば細胞の正常な働き
ができなくなるために、真皮マトリックス成分であるコラーゲン、ヒアルロン
酸やエラスチンの正常な代謝や生成ができなくなることによりシワやタルミの
原因になるばかりではなく、メラニン色素の遺伝子が傷つけば無秩序なメラニ
ン生成が色素沈着につながりシミの原因となる。このような紫外線や活性酸素

による遺伝子の損傷を防ぐことは、ガンや老化から守るために重要なこととなっている。

本実験では、DNA の損傷の確認を紫外線や活性酸素による DNA 鎖を in vitro での解析を閉鎖環状プラスミド DNA のコンフォメーションの変化を電気泳導的に調べることにより、容易にしかも鋭敏に測定が可能になり、その方法を用いてハクモクレンの抽出物から得られた活性酸素消去作用を持つルチンに関して紫外線・活性酸素ともに強い防御能を持つことを見出した。

以上のような考えのもとに、植物成分の中に抗シワ機能を持つ成分として、活性酸素防御素材として花卉抽出物の中に存在するクエルセチン配糖体が有効であること及び線維芽細胞の増殖作用と角質の改善作用をハイビスカス抽出物が見つかることを見出し化粧品素材として開発を行ったので説明をする。

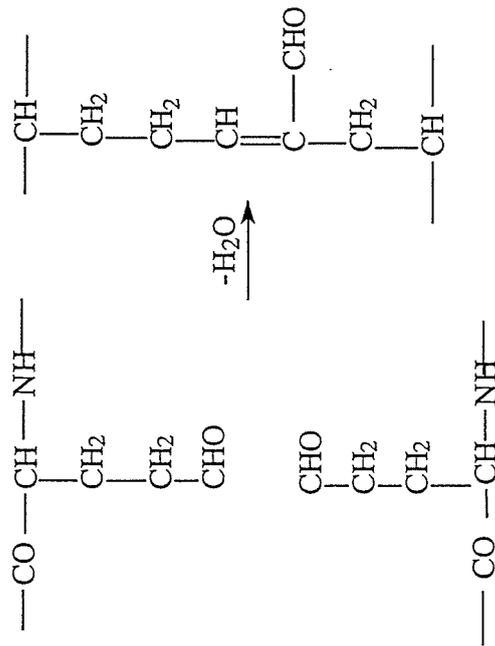
参考文献

- 1) 河野善行, 萩野滋延, 森真輝, 阪本興彦, 中村哲治, 高橋元次, 粧技誌, 27, 33 (1993)
- 3) 末次一博, 白石秀子, 泉愛子, 田中弘, 芝篤志, 粧技誌, 28, 44 (1994)
- 4) 川岸舜郎, 日本農芸化学会誌, 65, 1351 (1981)
- 5) 辻卓夫, 日皮会誌, 91, 543 (1981)
- 6) Shuhei Imayama, Irwin M.Braverman, Anatomical Record , 222 , 115 (1988)
- 7) Ikuo Sato , Jian Zu , Shiro Nisikawa , Naoki Kashimura, Biosci. Biotech, Biochem., 57, 2005(1993)
- 8) 紅陽子, 末次一博, 田中弘, 芝篤志, 粧技誌, 27, 130 (1993)
- 9) 佐田雅弘, フレグランスジャーナル, 1993 - 8, 39 (1993)
- 10) Ilaria Ghersetich, Torello Lotti, Int. J. Dermatol., 33, 119 (1994)
- 11) Donald A.Vessey, Kyung Hea Lee, Kerry L. Blacker, J.Invest.Dermatol., 99, 859 (1992)
- 12) Eszter Karg, Gerd Obh, Anna Wittbjær, Evald Rosengren, Hans Rorsmman, J.Invest.Dermatology, Vol.100 No.2 209s (1993)
- 13) 宮地良樹, *Fragrance Journal*, 25(4), 17-23 (1997)
- 14) 段野貴一郎, *Fragrance Journal*, 26(4), 11-17(1998)
- 15) 藤本大三郎, 日皮会誌, Vol. 89, No. 2, 51-59(1979)

表 II-1. 生理的(内因性)老化と光(外因性)老化の違い

	生理的老化皮膚	光老化皮膚
皮膚表面状態	表面形態の変化は少ない	明瞭なシワ形成、皮膚色変化
表皮・真皮組織	薄化	肥厚化、表皮・真皮接合面の平坦化
線維芽細胞	非活化	活性化
細胞外マトリックス		
コラーゲン	総・可溶性コラーゲンの減少	総・可溶性コラーゲンの減少
弾性線維	線維・線維束構造の変化は少 総エラスチン量の減少	線維・線維束構造の変性・崩壊 総エラスチン量の増加
GAGs	総GAGs量の減少	弾性線維構造の変性 総GAGs量の増加
血管	変化は少ない	真皮上層部の毛細血管網の縮退
炎症	炎症反応は見られない	微弱炎症状態

コラーゲン分子間架橋



シッフ塩基の形成

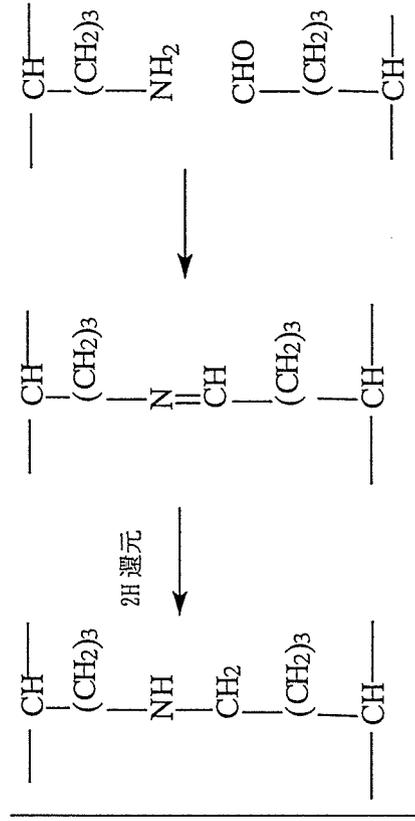


図 II-1. コラーゲンの老化(分子間)架橋の形成

第3章 モクレン花卉中の活性酸素消去物質

1. 緒言

活性酸素による傷害から皮膚を守る素材として、各種植物の研究がされている¹⁾が、特に花卉が注目されている²⁾。植物は長時間太陽光を受けても傷害を受けない。その理由として、幹は分厚い樹皮で覆われて光から守り、葉は光のエネルギーを光合成によって利用することにより、光から身を守っているといわれている³⁾。一方、花卉は葉緑素を持たないため光合成を行なうことができない。よって、それに代わるような防御物質を多く含有する可能性が高いと予想されるため、花卉の抽出物から活性酸素に対する防御能を有する物質を検索した。検索の評価法として、SOD 様活性とヒアルロン酸の断片化を抑制する能力の測定法を用いて行った。その結果、バラ科やモクレン科の植物に高い活性を確認した。バラ抽出物中の活性酸素によるヒアルロン酸の断片化抑制能を有する成分がイソクエルシトリンやクエルシトリンというクエルセチン配糖体であることが確認された⁴⁾。本報告では、バラよりもヒアルロン酸断片化抑制能の高かったモクレンの花弁から有効成分の単離精製及び構造解析を行なった。その結果、活性成分の一つはルチンであることを確認した。これまでの結果と合せ、クエルセチン配糖体の活性が高いことを確認した。

2. 実験

2-1. 試薬

キサンチンナトリウムはSigma社製、ヒアルロン酸ナトリウムは明治製菓製をその他の試薬は和光純薬製を用いた。

2-2. 材料

各種花卉を乾燥後、粉末とした。精製水で60℃、12時間3回抽出を行なった。抽出液を合せて減圧濃縮後、凍結乾燥し、花卉熱水抽出物を得た。

2-3. 花卉抽出物の活性酸素消去作用の測定

2-3-1. スーパーオキシド消去(SOD様)活性の測定⁷⁾

測定試料0.1mlに発色試液(0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)にキサンチンを0.04mmol/L、ニトロブルーテトラゾリウム(NO₂-TB)を0.024mmol/lとなるように溶解させる)1.0mlと酵素液(0.1Mリン酸緩衝液(pH8.0)にキサンチンオキシダーゼ(バターミルク由来)を0.049単位/mlとなるように溶解させる)

1.0ml とを加え、37℃で正確に 20 分間加温後、反応停止液（69mM ドデシル硫酸ナトリウム）2.0ml を加えて反応を停止した。反応停止後 560nm における吸光度(E_s)を測定した。また、測定試料の代わりに蒸留水 0.1ml を加えて同様の操作を行なって 560nm における吸光度(E_b)を測定した。

一方、測定試料 0.1ml に発色試液 1.0ml とブランク液（0.1M リン酸緩衝液 (pH8.0)）1.0ml とを加え、37℃で正確に 20 分間加温後反応停止液 2.0ml を加えて反応を停止させた後、560nm における吸光度(E_{sb})を測定した。また、測定試料の代わりに蒸留水 0.1ml を加えて同様の操作を行ない、560nm における吸光度(E_{bb})を測定した。そして、スーパーオキシドアニオンラジカル消去率(%)は次の式により算出して求めた。そして、その 50%抑制を示す濃度を ID_{50} (mg/ml)として比較した。

$$\text{スーパーオキシド消去率(\%)} = \frac{(E_b - E_{bb}) - (E_s - E_{sb})}{E_b - E_{bb}} \times 100$$

2-3-2. 活性酸素（過酸化水素－鉄系）によるヒアルロン酸の断片化に対する抑制作用の測定法⁵⁾

0.04%ヒアルロン酸ナトリウムを含む 0.3 Mリン酸緩衝液(pH5.3)0.45ml に各種濃度の測定試料 0.05ml、20mM過酸化水素 0.025ml ならびに 1mM塩化第 1 鉄 0.025ml を加え、37℃で 24 時間インキュベートした後、反応液を取り出し、0.1%アルブミンを含む酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液 (pH3.75) を加え、よく攪拌した。生成したヒアルロン酸とアルブミンの複合体の濁度 (OD600nm) を測定することにより、ヒアルロン酸量を求め、断片化抑制能を測定した。

2-4. モクレン熱水抽出物の分離精製及び構造解析

モクレン熱水抽出物 1.0g を精製水 10ml に溶かし、90ml のエタノールを加え、沈殿を除去後、溶媒を留去し、再度水に溶解した。

ODS（富士シリシア化学）カラム（ $\phi=20\text{mm}, h=250\text{mm}$ ）を用いて、モクレン熱水抽出物水溶液 5 ml を溶解し溶出した。溶出液は精製水のみから 10, 20, 30, 50%のエタノール水混液をそれぞれ 300ml ずつ流した。

ODS 30%エタノール溶出画分について再度 ODS カラムで分画した。溶出液を 25%, 30%と細かくし、フラクションコレクターを用いて 5ml ずつ分取した。各フラクションの 300nm における吸光度を測定し、4 つの分画に分けた。分画の状態は、薄層クロマトグラフィー及び液体クロマトグラフィーで行った。薄層クロマトグラフィーは、KISEGEL 60 F₂₅₄（メルク社製）を用い、メタノールに溶かした試料を塗布し、酢酸エチル／ブタノン／ギ酸／水

(5/3/1/1) 混液で展開した。発色は密閉容器内でヨウ素蒸気に接触させた。液体クロマトグラフィーは、UV-970 (日本分光製) で HIKARISIL C-18 (旭化成製) で移動相は、10m Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH2.6) / アセトニトリル (70:30), 室温で検出波長は 210nm で行なった。構造解析において UV スペクトルは、UV-2100 (島津製), IR スペクトルは、IR435 (島津製), ¹H-NMR は、JNM-EX-270 (日本電子製) で測定を行なった。

糖の部分の構造解析において、フラボノイドの解析で被検試料を 0.5N-塩酸中で 100℃, 1時間加水分解を行なった。加水分解で生成した沈殿を口別した。沈殿は、機器分析に供した。口液は、塩酸を減圧留去後、薄層クロマトで糖分析を行なった。KIESELGEL 60 F₂₅₄ (メルク社製) を用い、ベンゼン/酢酸/メタノール(1:1:3)を展開溶媒とし、20%硫酸:0.2%ナフトレゾルシン・エタノール(1:1)で発色した。糖結合位置の決定³⁾は、試料を無水メタノールに溶解し、無水塩化アルミニウム (AlCl₃) を加え、UV スペクトルを測定した。続いて、濃塩酸を1滴加え、UV スペクトルを測定した。

3. 結果及び考察

3-1. 花卉抽出物の化成酸素抑制作用

まず、花卉抽出物の活性酸素に対する作用として SOD 様活性とヒアルロン酸の低分子化抑制作用を表 3-1 に示した。バラ科 (Rosaceae) とモクレン科 (Magnoliaceae) の花卉抽出物に強い活性が認められ、フェントン反応系 (H₂O₂-Fe) によるヒアルロン酸断片化抑制能においてはモクレン科の花卉抽出物に高い活性が認められた。

3-2. ハクモクレンの分離精製とその活性酸素抑制作用

水抽出物にエタノールを添加して不溶分を除去後、ODSカラムを用いて Scheme 3-1 のように分画を行なった。エタノール濃度を 10% ずつ高くしていきそれぞれの分画物を得た。それぞれの分画物についてスーパーオキシドアニオンの消去能を SOD 様活性でフェントン反応により生じるヒドロキシラジカルによるヒアルロン酸断片化の抑制作用を測定した。その結果を表 3-2 に示した。SOD 様活性ではエタノール濃度 20、30 および 40% 溶出画分に強い活性が認められた。また、ヒアルロン酸断片化抑制活性はエタノール濃度 20 および 30% 溶出画分に強い活性が認められた。

続いて ODS オープンカラムを用いて再度細かく分画を行なった。20% エタ

ノール溶出分は、大きく2つの画分に分離することができた。しかし、その純度は両ピークとも65~80%と低く、さらに精製が必要と思われる。それに対して、30%溶出画分は、Fr-39~63の部分を集め再結晶をすることによって、純度95.3%の活性成分を得ることができた。

3-3. 活性成分の構造解析

3-3-1 スペクトル及び物性データ

淡黄色粉末、mp.189~194°C、IR $\nu_{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$; 3400(OH)、1658(C=O)、1602、1500 (arom., C=C)。 $^1\text{H-NMR}$; (DMSO) δ : 3.0~3.8、4.3~5.4 (21H, H-rutinoside)、6.19 (1H, d, J=1.3, H-6)、6.38 (1H, d, J=1.3, H-8)、6.84 (1H, d, J=9.2, H-6')、7.53 (1H, s, H-2')、7.55 (1H, d, J=9.2, H-5')、9.17、9.61、10.79、12.60 (each, 1H, s, ϕ -OH)、UV (MeOH) $\lambda_{\text{MAX}} \text{nm}$ ($\log \epsilon$); 256(4.31)、352 (4.13)、(MeOH-AlCl₃) $\lambda_{\text{MAX}} \text{nm}$; 276、(MeOH-AlCl₃-HCl) $\lambda_{\text{MAX}} \text{nm}$; 270。

塩酸により加水分解を行い、アグリコンの構成糖の分析を行った。アグリコン部はUV、IR スペクトルやHPLCによりクエルセチンであることを確認した。構成糖はTLC分析により、グルコースとラムノースであることを確認した。

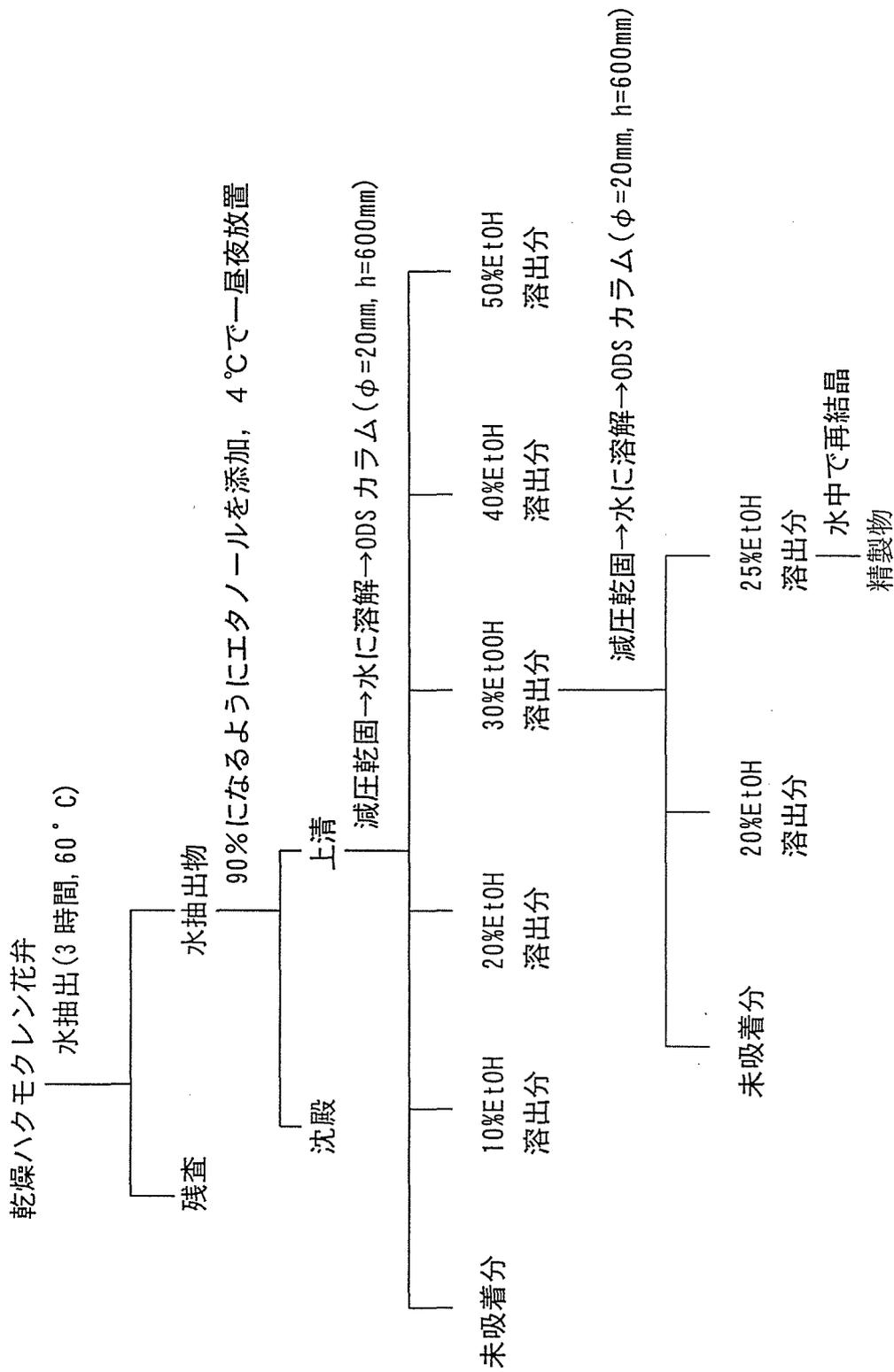
以上の結果より、この活性成分は、クエルセチンのグルコースとラムノースの配糖体であるルチン(queracetin-3-rutinoside)と同一した。ルチンの構造式は図3に示した。

今回の結果から、ハクモクレン中の活性成分もバラと同じくクエルセチンの配糖体であることが分かった。このように基本的にクエルセチンの骨格を有する配糖体は活性酸素によるヒアルロン酸の断片化を抑える作用を有しているものと思われる。

近年、植物由来の活性酸素消去物質が注目されており、その中でもフラボノイドは活性酸素消去能⁵⁾だけではなく抗炎症や抗アレルギー剤としても効果がある⁶⁾と報告されている。しかし、Hanasakiら⁷⁾によればルチンは活性酸素消去作用を示すが、クエルセチンはヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)の生成を高めると報告している。ルチンには従来血管強化作用などが知られているが、今回新たな作用が見いだされたことになる。これらをふまえて今後、フラボノイド配糖体の様々な有効性について明確にしていきたいと考えている。

4. 引用文献

- 1) 紅陽子, 末次一博, 田中弘, 芝篤志, 粧技誌, 27, 130 (1993)
- 2) 末次一博, 濱井かおり, 紅陽子, 田中弘, 河本昌彦, 粧技誌, 29, 113 (1995)
- 3) 浅田浩二, 日本農芸化学会誌, 67, 1255 (1993)
- 4) 林孝三編, 植物色素, 179 (1980)
- 5) Jadwiga Robak, Ryszard J. Gryglewski, *Biochem. Pharmac.*, 37, 837 (1988)
- 6) E. Bombardelli, P. Morazzoni, *フレグランスジャーナル*, 1994 - 1, 90 (1994)
- 7) Yukiko Hnasaki, Shunjiro Ogawa, Shozo Fukui, *Free Radical Biology & Medicine*, 16, 845 (1994)



Scheme3-1 . ハクモクレンの抽出と分離精製

表3-1. 各種花卉抽出物のSOD様活性とヒアルロン酸断片化抑制活性

Species	Scientific name	SOD like activity ²⁾	IHAD ¹⁾	
			H ₂ O ₂ -Fe ³⁾	AsA-Fe ⁴⁾
Rosaceae	<i>Rosa centifolia</i> (Red)	++	±	++
	<i>Rosa centifolia</i> (Pink)	++	±	++
	<i>Rosa hybrica</i> (White)	++	±	++
	<i>Rosa laevigata</i>	++	-	++
	<i>Prunus lannesiana</i>	±	+	±
	<i>Prunus persica</i>	+	±	±
	<i>Prunus ume</i>	±	-	±
	<i>Spiraea thunbergii</i>	+	±	++
Theaceae	<i>Camellia sasanqua</i> (Red)	+	-	+
	<i>Camellia sasanqua</i> (White)	+	-	++
	<i>Camellia japonica</i>	+	-	++
Ericaceae	<i>Rhododendron tokonatu</i>	+	±	±
	<i>Rhododendron pulchrum</i>	+	+	±
	<i>Rhododendron kaempferi</i>	±	±	±
Magnoliaceae	<i>Magnolia kobus</i>	+	++	±
	<i>Magnolia denudata</i>	+	+	-
Compositae	<i>Bellis perennis</i> L.	-	-	±
	<i>Taraxacum japonicum</i> Koidz	-	-	±
	<i>Helianthus annuus</i>	-	-	-
Leguminosae	<i>Wisteria floribunda</i>	-	-	±
	<i>Trifolium repens</i> L.	+	-	±
	<i>Astragalus sinicus</i> L.	-	-	±
Malvaceae	<i>Althaea rosae</i> (White)	-	-	±
	<i>Althaea rosae</i> (Red)	-	-	±
	<i>Malva sylvestris</i> L.	-	±	±
	<i>Hibiscus syriacus</i> L.	-	±	±
	<i>Hibiscus mutabilis</i>	-	±	++
Saxifragaceae	<i>Hydrangea macrophylla</i>	-	+	+
Liliaceae	<i>Lilium maculatum</i> Thunb.	-	±	-
Convolvulaceae	<i>Calystagia japonica</i>	±	±	++
	<i>Pharbitis congesta</i>	-	±	+
Lythraceae	<i>Lagerstroemia indica</i>	++	-	++
Crude Drug	<i>Geranium nepalense</i> Sweet	++	-	++
	<i>Syzygium aromaticum</i> L.	++	±	++
	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	++	-	+
	<i>Myrica rubra</i>	++	±	++

1) Inhibition of hyaluronic acid depolymerization

Concentration : 2)1.0mg/ml 3)0.1mg/ml 4)10.0mg/ml

Inhibition rate : ++: >70% +: 70-50% ±: 50-30% -: <30%

表 3-2. ハクモクレン分画物の SOD 様活性及びヒアルロン酸断片化抑制作用

Sample	SOD 様活性		IHAD* (H ₂ O ₂ -Fe) IC ₅₀ (mg/ml)
	IC ₅₀ (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/ml)	
ハクモクレン水抽出	0.92	0.22	
90%EtOH 沈殿	0.96	0.38	
ODS 未吸着分	13.87	4.99	
ODS10%EtOH 溶出分	2.52	0.028	
20%	0.57	0.008	
30%	0.46	0.007	
40%	0.87	0.054	
50%	3.08	0.032	

*IHAD:ヒアルロン酸断片化抑制作用

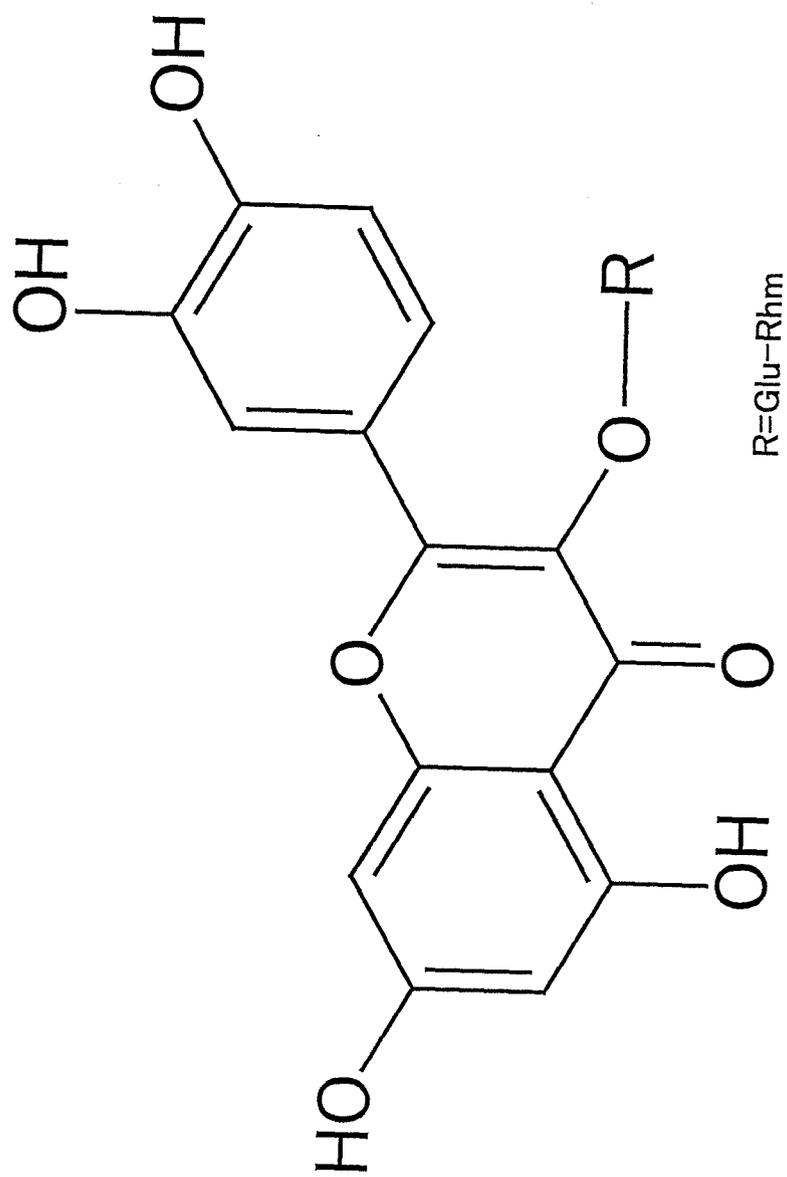


図3-1. モクレン花弁中の活性成分の構造式

第4章 活性酸素による DNA の損傷と抑制物質

1. 緒言

DNA (デオキシリボ核酸) とは、塩基-糖-リン酸の結合からなるヌクレオチドという単位物質が縮重合した高分子化合物の2本の鎖がらせん構造を形成したものである。この DNA には遺伝情報が詰め込まれており、生命現象に深く関わる重要な物質である。DNA に何らかの傷害が加わった場合、通常生体の修復機能が働くが、それを越した場合には細胞のあらゆる機能に影響することになる。例をあげれば、無秩序なメラニンの生成、コラーゲンや弾力線維などの細胞外マトリックス成分の産生と代謝のバランスのくずれなどが起こることになる。

本実験では、活性酸素抑制作用を有するモクレンから得られたルチンの有効性確認のために DNA に対する活性酸素の傷害を実験的に確認しその方法を用いて効果の確認を行うことを目的とした。DNA の損傷の確認を紫外線や活性酸素による DNA 鎖の切断を *in vitro* での解析を閉鎖環状プラスミド DNA のコンフォメーションの変化を電気泳動的に調べることにより、容易にしかも鋭敏に測定可能となった。その方法を用いてハクモクレンの抽出物から得られたルチンに関して紫外線・活性酸素共に強い防御作用を持つことを見いだしたので報告する。

2. 実験及び方法

2-1. pUC19 DNA の作成¹⁾

プラスミド pUC19 は、大腸菌 DH5 α で増幅し、アルカリ法、もしくは、QIAGEN Plasmid kit (フナコシ(株))を用いて抽出精製した。

2-2. DNA の切断反応の条件決定

2-2-1. 紫外線照射系²⁾

24 穴シャーレ (CORNING CELL WELLS) の1穴 ($\phi=16\text{mm}$) に 1M Tris-HCl Buffer (pH8.0)を $20\mu\text{l}$, $50\mu\text{g/ml}$ pUC19 DNAを $20\mu\text{l}$, 蒸留水を $160\mu\text{l}$ の総量 $200\mu\text{l}$ を添加した後、水分蒸発防止の目的で 2-エチ

ルヘキサン酸セトステアリルアルコールエステルを 300 μ l 重層した。37°Cのインキュベーター中で、UVA (デルマレイ FL20BLB、東芝医療用品 (株) 製) ランプ, または、UVB (デルマレイ FL20SE-30、東芝医療用品 (株) 製) ランプで照射した。紫外線の照射量は、UV-A (108, 216, 432, 648 J), UV-B (16, 32, 48, 128J) を照射した。光量の測定は、紫外線強度計 (UVR-306 / 365D(II)), 東芝医療用品 (株) 製) で測定した。

2-2-2. フェントン反応系

1.5ml エッペンドルフチューブに 1M Tris-HCl Buffer (pH8.0)を 5 μ l, 40 μ g/ml pUC19DNA を 12 μ l と FeCl₂ (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0mM), H₂O₂ (0, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 mM) の組み合わせで総量 50 μ l を添加した。37°Cのインキュベーター中において振とう (100rpm/min) しながら, 30 分間放置した。

2-3. 活性酸素による DNA の損傷と抑制物質の検索

2-3-1. 紫外線照射系

24well シャーレ (CORNING CELL WELLS) の 1 穴 (ϕ =16mm) に 1M Tris-HCl Buffer (pH8.0)を 20 μ l, 50 μ g/ml pUC19 DNA を 20 μ l, 蒸留水を 160 μ l, 試料溶液(濃度: 1000ppm)40 μ l を合わせた総量 200 μ l を添加した後, 水分蒸発防止の目的で 2-エチルヘキサン酸セトステアリルアルコールエステルを 300 μ l 重層した。37°Cのインキュベーター中で、UVA (デルマレイ FL20BLB、東芝医療用品 (株) 製) ランプ, または、UVB (デルマレイ FL20SE-30、東芝医療用品 (株) 製) ランプで照射した。紫外線の照射量は、UV-A (216, 432 J), UV-B (32, 48J) を照射した。光量の測定は、紫外線強度計 (UVR-306 / 365D(II)), 東芝医療用品 (株) 製) で測定した。ブランクとして試料を添加していない well として 50%1,3-ブチレングリコール水溶液のみを準備した。更に、紫外線非照射群としてシャーレ全体をアルミホイルで覆った。抑制活性の強さは電気泳動により生じたバンドの大きさを目視観察し評価した。

2-3-2. フェントン反応系

1.5ml エッペンドルフチューブに 1M Tris-HCl Buffer (pH8.0)を 5 μ l, 40 μ g/ml pUC19DNA を 12 μ l, 試料溶液(濃度: 1000ppm)を 10 μ l と 1mMFeCl₂ を 5 μ l, 100mMH₂O₂ を 10 μ l の組み合わせで総量 50 μ l を添加した。37°Cのインキュベーター中において振とう (100rpm/min) しながら, 30 分間放置した。ブランクとして試料を添加していない well として 50%1,3-ブチレングリコール水溶液のみを準備した。更に、FeCl₂ と H₂O₂ を添加しな

い群も準備した。抑制活性の強さは電気泳動により生じたバンドの大きさを目視観察し評価した。

2-4. DNA 切断の確認³⁾

上記反応後、直ちに試料溶液 (0.25% ブロモフェノールブルーを含む 5% グリセロール) をサンプル総量の $1/10$ (V/V) 量添加し、そのうち $10\mu\text{l}$ を 0.8% アガロースゲルで電気泳動を行った。

アガロースゲルの作成及び電気泳動用の緩衝液は、TAE Buffer を用いた。電気泳動は Mupid-2 (コスモバイオ社) を用いて、室温、100V で行なった。電気泳動後 DNA をエチジウムブロマイド (約 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 水溶液) で 15 分染色し、紫外線照射 (BIO INSTRUMENT アトー (株)) でゲルの蛍光バンドを観察し、ポラロイドフィルム (Polaroid 667) で写真撮影した。写真プリント上でバンドの濃さを肉眼で各レーンにおける I 型、II 型および III 型プラスミド DNA の相対量を確認した。

3. 結果及び考察

DNA の損傷に対して防御する作用を持つ効果測定系として様々な方法が検討されている。細菌 (変異株) を用いる方法として Ames 法⁴⁾ や repair test 法^{4, 5)} があり、直接 DNA を用いる方法として損傷した DNA のコンフォメーションを比較する方法³⁾ や DNA ポリメラーゼなどの修復に関与する酵素活性を測定する方法⁶⁾ がある。今回は DNA のコンフォメーションを比較する方法を用いて検討を進めた。

プラスミド pUC19 DNA の標品は、I 型 (閉鎖環状) が 80~90%、II 型 (開環状) が 10~20%、III 型 (線状) は存在しなかった。精製した pUC19 もほぼ同様の割合になっていることをあらかじめ確認した。I 型に一本鎖切断が生じると II 型になり、I 型および II 型に二本鎖切断が 1ヶ所起こると III 型になる。従って、I 型の減少と II 型の増加は一本鎖切断を示し、I 型または II 型の減少と III 型の増加は二本鎖切断を示し、さらに、III 型の減少はより高度な二本鎖切断を示す。I、II、III 型のそれぞれのエチジウムブロマイド染色による蛍光の増減はそれぞれの DNA 量の増減に比例していた。

長波長紫外線(UVA)の照射によるプラスミド DNA の変化は、照射量の増加と共に状態の変化は大きくなった(表 4-1)。同様に中波長紫外線(UVB)の照射によるプラスミド DNA の変化は、照射量の増加と共に状態の変化は、大きくなった(表 4-2)。

今回の結果を用いて、試料の DNA の活性酸素による損傷からの防御作用の強弱を調べるためには、プラスミドの切断が完全に生じている場合や著しい切断が生じ、DNA 鎖がバラバラになり、バンドが消失している条件は適していない。以上のことより、UVA は照射量が 216 又は 432 J、UVB は照射量が 32 又は 48 J 付近が適切であると判断し有効性確認の試験法の照射条件とした。

フェントン反応系とは、以下に示すように FeCl_2 と H_2O_2 が反応して、ヒドロキシラジカルが発生していると考えられている。 $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ 。この実験においては、ヒドロキシラジカルによってのみ DNA に損傷が生じる条件を検索する必要があった。しかし、 H_2O_2 、 FeCl_2 は、単独でも DNA に損傷を生じさせるおそれがあるために、おのおの単独では切断を生じないが、両者混合下では、充分切断が生じる条件を見つけ出すことが必要である。

実験結果を表 4-3 に示した。 FeCl_2 のみの結果において、 FeCl_2 の濃度を 0.4 mM 以上にすると DNA は強力に切断されることが明らかとなった。過酸化水素のみの場合は、0~20.0mM の間では、DNA は全く切断は生じないため過酸化水素のみでは DNA の障害は起こらないことが判明した。そこで、 FeCl_2 の濃度を FeCl_2 だけでは切断が起こらない 0.1mM に固定し、過酸化水素の濃度を変化させ検討した結果では、過酸化水素濃度が 0, 0.1mM では、DNA の切断は全く生じていないが、1.0, 5.0, 10.0mM では、I 型の切断が起こり III 型のみ検出できた。更に、過酸化水素水濃度を増加させ 20mM の場合には、完全にバラバラになっており、バンドは検出できなかつた。以上の結果より、ここで使用するフェントン反応系は FeCl_2 の系内濃度は 0.1mM、 H_2O_2 の系内濃度は 20mM の濃度条件が最適である。

3-2. ルチン及び各種植物抽出液の DNA 切断抑制活性

上記の結果から、紫外線の照射条件やフェントン反応の FeCl_2 - H_2O_2 濃度を決定し、ルチンや各種植物抽出液の効果の確認を行った。表 4-4 にその結果を示した。植物抽出液の中ではフェントン反応系において、バラ、チユ、ユーカリ、ハマメリスとラベンダーが強い活性を示した。これらの共通点は、どの試料もフェントン反応系で活性酸素を抑制する作用を持っている。紫外線照射系では、バラ、チユ、ユーカリ、ビワ葉などが効果を示した。これらは、抽出液の持つ紫外線吸収能が影響していると考えられる。

今回検討した試料の中でもっとも強い作用を示したのがルチンである。UVA 照射系においてルチンは 0.1%、1.0% 濃度ともに、強い活性が認められた。ルチンはフェントン反応系において強い活性を持つために今回の結果を得ること

ができたものと思われる。また、UVA・UVB照射系においても濃度1%において、ルチン活性が認められた。ルチンのようなクエルセチンを基本骨格とするフラボノイドはUVA領域に強い吸収を持つためその効果が現れたものと思われる。

図4-1にフェントン反応におけるルチンやその他植物抽出液の効果を示す電気泳動の代表例を示してみた。

今回の研究において、閉環状プラスミドのコンフォメーションの変化を電気泳動の手法を用いることによって容易に確認可能なことを利用して、DNA損傷の防御活性を確認するスクリーニング法を確立することが可能となった。その損傷の条件としては、紫外線(UVA, UVB)とフェントン反応を用いた。

更に、確立された方法を用いたスクリーニングの結果、いずれの試験系においてもルチンは共通して強い活性が認められた。これより、ルチンには、紫外線や活性酸素などによるDNA損傷を防御する活性が存在することが示唆された。

ここで、いずれの試験系においても最も強い活性を有していたルチンは、ハクモクレンの花弁から得られるフラボノイドであるために、ヒドロキシラジカルを補足できると考えられる。

また、今回、検討したのはDNA損傷への防御活性についてであったが、このような活性を有するルチンを配合した化粧品や従来のサンスクリーン剤などによって紫外線や活性酸素によるDNA損傷を防御することによって、我々の体を守ることが可能となる。しかし、その防御の力を越えたなんらかの攻撃によって、DNAが損傷してしまった事態を想定して‘DNA損傷の修復系’についても、今後検討を進める必要があると考える。

4. 引用文献

- 1) 松村正實編：ラボマニュアル遺伝子工学、丸善、p56 (1996)
- 2) 末次一博, 濱井かおり, 紅陽子, 田中弘, 河本昌彦, 粧技誌, 29, 113 (1995)
- 3) 張清敏, 池田正五, 小野琢三, 岡山理科大紀要, 26, 117 (1990)
- 4) 矢作多貴江, 蛋白核酸酵素, Vol.20, 13, 1178 (1975)
- 5) E.E.Slater, M.D.Anderson, H.S.Rosenkranz, Cancer Res, 31, 970 (1971)
- 6) 太田敏博, 並木満夫, 化学と生物, Vol.26, 3, 161 (1988)

表4-1. 長波長紫外線(UVA)照射による DNA 鎖の変化

照射量 (J)	プラスミドのコンフォメーションの状態
108	Ⅲ型が少し存在する
216	I 型とⅢ型の存在比がほぼ同等である
432	I 型よりⅢ型のほうが多い
648	ほとんどがⅢ型である

表4-2. 中波長紫外線(UVB)照射系による DNA 鎖の変化

照射量 (J)	プラスミドのコンフォメーションの状態
16	I 型のみ観察できる
32	Ⅲ型が少し存在する
48	I 型よりⅢ型のほうが多い
128	ほとんどがⅢ型である

表4-3. フェントン反応における DNA 鎖切断作用

H ₂ O ₂ (mM)	FeCl ₂ 濃度 (mM)					
	0	0.1	0.2	0.4	0.6	1.0
0	-	-	-	++	++	++
0.1	-	-				
1.0	-	+				
5.0	-	+				
10.0	-	+				
20.0	-	++				

- : 変化なし, + : III型のみ存在する, ++ : バンド消失
 空白 : 検討せず

表4-4. 紫外線及び活性酸素による DNA 損傷からの防御作用

試料名	フェントン反応系	UVA 照射系	UVB 照射系
バラ	++	++	++
チユ	++	+	+
ユーカリ	++	+	+
ハマメリス	++	-	-
ラベンダー	++	+	+
マロニエ	+	-	-
ビワ葉	-	+	-
西洋サンザシ	-	+	-
ウコン	-	-	+
ホップ	-	-	-
トウヒ	-	-	++
ヤグルマギク	-	-	+
カミツレ	-	-	-
麦門冬	-	-	-
ルチン	++	++	++

++：I型のみ，+：わずかにIII型が生成，-：ほとんどIII型に変化

レーン No. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

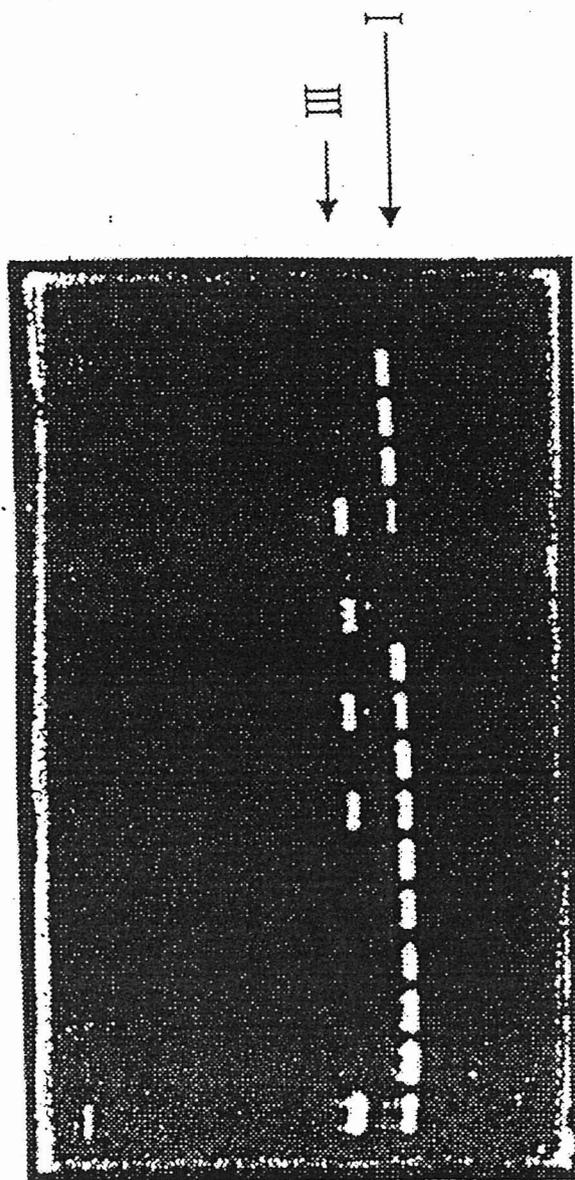


図4-1. フェントン反応によるプラスミド DNA(pUC19)のコンフォメーションにおける変化の

電気泳動パターンとルチンの効果

レーン No.1,3, 5,7,9,11,13,15: フェントン反応系(H₂O₂:20mM, FeCl₂ 210 μM, 30°C, 30min)

レーン No.2, 4,6,8,10,12,14,16: 試料のみ添加, レーン No.5,6: ルチン添加(0.1%aq)

レーン No.7,8: ラベンダー抽出物(0.1%aq), レーン No.9,10: マロニエ抽出物添加(0.1%aq)

レーン No.15,16: ハラ抽出物添加(0.1%aq)

第5章 イソクエルシトリンの酵素による配糖化

1. 緒言

近年、皮膚の老化の原因として活性酸素の関与が注目されている¹⁾。皮膚の老化予防の観点で活性酸素からの防御能を有する素材を花卉中から検索を行った²⁾。その結果、バラの花弁中の有効成分がイソクエルシトリン及びクエルシトリンであることを見いだした。これらの成分は、水に対する溶解性が悪く、化粧品に処方化したときの経時的な沈澱の生成などの問題点にも関与すると思われるため、溶解性の向上を検討した。近年、不安定な成分の安定化や水への溶解性の向上を目的としてアスコルビン酸の配糖化³⁾など盛んに行われている。イソクエルシトリンと類似したルチンの配糖化も研究され食品などに実用化されている⁴⁾。今回、イソクエルシトリンに対してデンプンやデキストリンを基質としてサイクロデキストリン合成酵素(CGTase)で配糖化を行うことが可能となった。その配糖化物の水に対する溶解性は100倍近く向上した。

2. 実験

2-1. 使用した材料及び酵素

イソクエルシトリンは、アルプス薬品製、デンプン、マルトース、デキストリンは、和光純薬製を用いた。

配糖化に使用した酵素は多岐にわたっているため一覧表を表5-1に示した。

2.2. 分析条件

2.2.1. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

Kieselgel 60 F 254 (メルク社製) を用い、酢酸エチル：ブタノン：ギ酸：水 (12 : 3 : 1 : 1) で展開した。

2.2.2. 液体クロマトグラフィー (HPLC)

ダイソーパックODSを用い、移動層を10mMリン酸緩衝液 (pH2.6) : アセトニトリル (8:2)、カラム温度を室温、検出はUV210nm、流速は1.0ml/minで行った。

2.3. 酵素の選択

イソクエルシトリン 20mg をエタノール2ml に加熱溶解し、糖源としてデンプン、デキストリン、マルトース2gを0.1mMリン酸緩衝液 (pH6.0) 18ml に加熱溶解し、両液を合せ基質液とした。基質液に上記酵素を1mgずつ添加

し、30℃で72時間インキュベートした。配糖体の生成はTLCにより判定した。

2.4. シクロデキストリン合成酵素(CGTase)を用いたイソクエルシトリン配糖化の条件の検討

2.3.の結果より、使用する酵素をCGTaseとし、酵素量、インキュベート温度、pH、基質（イソクエルシトリン、糖源）量、糖源の種類、有機溶媒（エタノール）量、インキュベート時間に関して、表5-2に示した条件で検討を行った。

2.6. 配糖化物の水に対する溶解性の検討

各種試料10mgに水10mlを加え、加熱し目視で溶解状態を確認し0時間の状態とした。その後、室温で24時間放置し、溶解状態を目視で確認した。

3. 結果及び考察

3.1. 配糖化物を生成する酵素の選択

糖源をマルトース、デキストリン、デンプンでインキュベート時間72時間インキュベートした。TLCで反応物をチェックし、糖源の種類を比較するとマルトースではイソクエルシトリンより水溶性が高い物は生成されておらず、デンプンとデキストリンでは α -アミラーゼ、セルラーゼ、CGTase、 β -アミラーゼ、 β -ガラクトシダーゼにおいて目的物が生成していると思われた。

3.2. 糖源の決定とエタノール濃度及び温度の検討

イソクエルシトリンの配糖化を行うためには基質の一つであるイソクエルシトリンを溶解する必要がある。イソクエルシトリン濃度が0.2%であれば溶解するためには10%以上のエタノール濃度が必要である。ここではpHを6.0、CGTaseを10 μ l/ml、反応は24時間行った。糖源の濃度を5%とし、糖源をマルトース、デンプン、デキストリンから選び、エタノール濃度は10、25、50%から選択した。温度は24、30、37、50℃から選択した。反応の進行度合いはTLCで確認した。

表5-3より、マルトースを基質とした場合、配糖体は生成せず、デンプン、デキストリンを糖源として生成することが明らかとなった。24℃や30℃の低い温度ではエタノール濃度は高い方が配糖体の生成が低いことが判った。また、エタノール濃度が50%であっても37℃以上になると配糖体の生成が認められた。

3.3. 糖及びイソクエルシトリン濃度の検討

0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8), 10%エタノール, CGTase (10 μ l/ml), 糖源をデンプンもしくはデキストリンとし, 濃度は5, 2, 1, 0.5 %, イソクエルシトリン濃度 0.4, 0.2, 0.1 %から選択し, 30 $^{\circ}$ Cで 48 時間及び 144 時間インキュベートした。反応終了後, アセトニトリルを 30%となるように加えて, 除酵素のために分子量 1 万の限外濾過膜を通し, 通過液を HPLC の移動層で 10 倍に希釈して, HPLC で分析した。

48 時間と 144 時間の比較からは, 配糖体の生成率には大差はみられず, 今回の条件では 48 時間までに反応は平衡に達していると思われる。糖源をデキストリンとした場合, 48 時間ではデキストリンの濃度が高いほど配糖体の生成率は高くなる傾向を示した。それが 144 時間になると 5.0 %では 60%前後と大きく変わらず, 0.5 %では時間とともに生成率は高くなった。この場合のイソクエルシトリン濃度の影響は 0.1, 0.2 %では大差はみられないが, 濃度が高い 0.4 %ではそれに対する生成率が低くなった。その理由として, この系では反応物に沈殿が見られたため, 基質となるイソクエルシトリンが沈殿することによって系内の基質濃度が低下したためと思われる。また, デンプンを基質とした場合時間での比較やイソクエルシトリン濃度での比較は同様な傾向を示した。大きく異なるのはデンプン濃度が 0.5 %の時にほとんど配糖体を生成しないところである。

以上のことより, 効率的にイソクエルシトリンの配糖体を作成するためには糖源濃度は 1 %以上必要であること反応液内にもう一方の基質であるイソクエルシトリンが高濃度で溶解していることが重要であると思われる。

3.4. エタノール量の検討

基質のイソクエルシトリンを反応液中に多く溶解する必要があることが考えられた。そのためにはエタノール濃度を高くする必要があるが, エタノール濃度を高くするともう一方の基質である糖は沈殿を起こす可能性がでてくるためその確認を行った。エタノール濃度の酵素の活性に与える影響は 3.1.の結果より大きく差はみられないと思われるが, 多少の低下はしかたないものと思われる。

デキストリンでは 40%濃度でも沈殿を起こさないが, デンプンは沈殿を生成した。実用上はエタノール濃度 40%では酵素の活性の低下が大きいためどちらにも影響の少ない 25%程度を利用していくこととした。

3.5. 糖濃度と温度の検討

Mリン酸緩衝液(pH7.0), イソクエルシトリン濃度 0.5 %, エタノール濃度 25%, CGTase 1 μ l / ml, インキュベート時間 48 時間で, 糖濃度 8.3, 4.1, 2.1 %, 温度 30, 50 $^{\circ}$ C で検討した。糖濃度を上げて, 配糖体の生成率が大きく向上するということはない。また, インキュベート温度は, 30 $^{\circ}$ C の方が生成率が高く, 熱による酵素の活性の低下が原因の一つではないかと考えられる。

3.6. 酵素量の検討

0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0)、糖源濃度 4 %, イソクエルシトリン濃度 0.5 %, エタノール濃度 25%, 30 $^{\circ}$ C, CGTase 2.0, 1.0, 0.5, 0.1, 0.05 μ l / ml で検討した。

配糖体の生成率は, 酵素濃度を増加させるとそれに従い増加する傾向を示した。当然ながら, 酵素濃度が高い方が反応は良く進んでいるが, 酵素濃度 0.5 μ l/ml 以上で 72 時間インキュベートすればそれほど大きな差はみられなかった。

3.8 イソクエルシトリン配糖体の水に対する溶解性

0.1%濃度で水に対する溶解性を検討した結果, イソクエルシトリンは配糖化することにより溶解性が向上し, 水沈殿で配糖化物の比率を上げると溶解性もさらに向上した。

今回, バラの花弁中の活性酸素消去能を有する有効成分であるイソクエルシトリンの水に対する溶解性を向上する目的で酵素による配糖化を行った。イソクエルシトリンは, サイクロデキストリン合成酵素 (CGTase) により, 配糖化が可能となり, その配糖化率は 60%に達した。配糖化物の生成は, 未反応イソクエルシトリンを水中で再沈殿することにより配糖化比率を 70%以上にすることができ水に対する溶解性は 100 倍近く向上することができた。

4. 引用文献

- 1) 宮地良樹, フレグランスジャーナル, 1993-11, 12 (1993)
- 2) 末次一博, 濱井かおり, 紅陽子, 田中弘, 河本昌彦, 粧技誌, 29, 113 (1995)
- 3) 鈴木幸雄, 三宅俊雄, 内田けい, 味野愛子, ビタミン, Vol.49, 259 (1973)
- 4) 尾高悦二, New Food Industry, Vol.32, 13 (1990)

表5-1. 配糖化に用いた酵素の一覧

酵 素 名	メーカー名
β -グルコシダーゼ	オリエンタル酵母、メルク、シグマ
リナラーゼ (β -D-グルコシダーゼ)	和光純薬
α -アミラーゼ	和光純薬、天野製薬
β -アミラーゼ	ナガセ、フナコシ、天野製薬(ヒ'サ'ム A,M5)
セルラーゼ	天野製薬、ナガセ
グルコチューム	ナガセ
コンチザイム (CGTase)	天野製薬
ナリンジナーゼ	田辺製薬
α -グルコシダーゼ (トランス'ル'タ'ナーゼ)	天野製薬
β -ガラクトシダーゼ (ラクターゼ)	天野製薬
グルコアミラーゼ	ナガセ
β -ガラクトシダーゼ	フナコシ
α -グルコシダーゼ	フナコシ

表5-2. 配糖化の条件

検討項目	条 件
酵素量(ml/ml)	0.05,0.1,0.5,1.0,2.0
イソクエルシトリン量 (%)	0.1,0.2,0.4,0.5
糖源の種類	デキストリン,デンプン,マルトース
糖源量 (%)	0.5,1.0,2.0,4.0,8.0
pH	7.0
インキュベート温度 (°C)	30,50
有機溶媒(EtOH)量	10,20,30,40
インキュベート時間 (hr)	24,48,72,144

表5-3. 基質の違いと反応温度

温度(°C)	EtOH 濃度(%)	デンプン	マルトース	デキストリン
24	50	—	—	—
	25	+	—	+
	10	+	—	+
30	50	—	—	—
	25	+	—	+
	10	+	—	+
37	50	+	—	+
	25	+	—	+
	10	+	—	+
50	50	+	—	+
	25	+	—	+
	10	+	—	+

配糖体の生成 + : 生成した — : 生成せず

表5-4. 48 時間後のイソクエルシトリン配糖体の生成量

イソクエルシトリン量	デキストリン量 (%)				デンプン量 (%)			
	5.0	2.0	1.0	0.5	5.0	2.0	1.0	0.5
0.4	53.3	40.1	30.2	22.8	49.9	50.9	36.7	0
0.2	59.0	52.9	47.5	40.9	63.5	54.6	51.3	0
0.1	58.1	52.5	47.6	40.1	53.4	52.7	49.4	0

表5-5. 144 時間後のイソクエルシトリン配糖体の生成量

イソクエルシトリン量	デキストリン量 (%)				デンプン量 (%)			
	5.0	2.0	1.0	0.5	5.0	2.0	1.0	0.5
0.4	56.2	56.8	44.4	36.3	54.8	61.6	46.9	3.5
0.2	64.8	53.1	59.6	45.3	64.3	61.7	54.7	4.6
0.1	66.1	59.2	54.2	46.3	71.8	62.6	57.6	6.4

表5-6. 配糖化に糖濃度と温度が与える影響

糖源	温度	糖 濃 度 (%)		
		8.3	4.1	2.1
デキストリン	30	48.6	41.1	40.6
	50	31.9	34.6	41.3
デンプン	30	57.1	55.5	64.7
	50	48.9	45.1	39.4

表5-7. 配糖化に対する CGTase 濃度と時間の影響

CGTase 濃度 (μ l/ml)	24 時間					72 時間				
	2.0	1.0	0.5	0.1	0.05	2.0	1.0	0.5	0.1	0.05
デキストリン	44.3	33.1	19.7	12.4	7.3	53.5	49.4	41.5	29.9	16.4
デンプン	53.8	45.6	32.8	18.0	8.8	55.7	55.1	51.1	41.5	29.8

表5-8. イソクエルシトリン配糖化物の溶解性

試料	0 hr	24hr
イソクエルシトリン	不溶	不溶
イソクエルシトリン配糖体	可溶	溶解

第6章 ハイビスカス花卉抽出物の抗シワ効果

1. 緒言

近年、健康で美しい肌を保つことが、老若男女を問わず、重大な関心事になっている。ところが、肌は加齢などの内的因子や紫外線や活性酸素などの外的因子によって、皮膚が本来維持している収縮性、柔軟性、保湿性などの機能が衰え、様々なトラブルを発生する。これらのトラブルのひとつであるシワは、真皮の細胞外マトリックスを産生する細胞数の減少、分裂速度の衰えなどの細胞機能の老化やコラーゲン線維の減少および変性、皮下脂肪組織の減少などにより、皮膚の弛緩および弾力性の損失が起こることが原因となって発生する。

従って、皮膚の老化を改善し、しかも皮膚に弊害がなく、安全に使用できる老化防止化粧料の開発が望まれている。ハイビスカス花卉抽出物が、皮膚線維芽細胞の細胞増殖を活性化し、細胞外マトリックスの産生を増加させることにより、皮膚のシワの改善に顕著な作用を示すことを見出した。

2. 実験

2-1. ハイビスカス抽出物の調製

原材料として、ハイビスカスの乾燥物を 300g 使用した。これにイオン交換水 450ml を加え、60℃で 3 時間加熱抽出した後 No.2 濾紙にて濾過した。全ての濾液を合わせ、HP-20（三菱化成社製：φ=50mm,h=500mm）カラムクロマトグラフィーに付し、HP-20 未吸着画分を減圧濃縮、凍結乾燥し、ハイビスカス抽出物 120g を得た（収量 40%）。

2-2. 皮膚線維芽細胞増殖試験

2.2.1 試験溶液調製

ハイビスカス抽出物を Ca_2^+ , Mg_2^+ 不含有 PBS (phosphate buffered saline。蒸留水 11 あたり, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g) に 0.1 (w/v) % になるように溶解後、0.2 μm メンブランフィルターにて濾過滅菌し、適宜希釈したものを試験溶液とした。

2-2-2. 細胞培養

正常ヒト 2 倍体線維芽細胞 HFSKF- II（理化学研究所製）を、Ham-F12（大

日本製薬社製)に 15 (v/v) %の牛胎児血清を添加したもので培養した。前記培地にて 1×10^5 cell/ml に調整した細胞を内径 16mm の滅菌プラスチック 24well プレートに 0.5ml ずつ接種し, 24 時間培養後, 試験溶液を 10 (v/v) % 含む培地に交換し, その後 48 時間培養した。

培養後、24well プレートの培地を捨て、 Ca_2^+ 、 Mg_2^+ 不含有 PBS で細胞を洗浄後、トリプシンを用いて細胞を剥離し、血球計算板を用いて細胞数を測定した。なお、ネガティブコントロールとしては Ca_2^+ 、 Mg_2^+ 不含有 PBS を用いた。ポジティブコントロールとしてアスコルビン酸リン酸マグネシウム塩 (AS-PM) を用いた。

2-3.皮膚線維芽細胞コラーゲン合成促進試験

2-3-1.試験溶液調製

ハイビスカス抽出物を Ca_2^+ 、 Mg_2^+ 不含有 PBS で希釈し、 $0.2 \mu m$ メンブランフィルターにて濾過滅菌したものを、試験溶液とした。

2-3-2.細胞培養

正常ヒト 2 倍体線維芽細胞 HFSKF-II を、Ham-F12 (大日本製薬社製)に 15 (v/v) %の牛胎児血清を添加したもので培養した。前記培地にて 1×10^5 cell/ml に調整した細胞を内径 32mm の滅菌プラスチック 12 穴プレートに 1.0ml ずつ接種し, 120 時間培養後, 試験溶液を 10 (v/v) %含む無血清線維芽細胞増殖培地 F-GM (クラボウ社製)に交換し, その後 48 時間培養を行った。

培養後、12 穴シャーレの培地を捨て、 Ca_2^+ 、 Mg_2^+ 不含有 PBS で細胞を洗浄し、トリプシンを用いて細胞を剥離し、細胞数を測定した。試験溶液のネガティブコントロールとしては Ca_2^+ 、 Mg_2^+ 不含有 PBS を使用した。ポジティブコントロールとしてアスコルビン酸リン酸マグネシウム塩 (AS-PM) を培地内に 0.05mM 添加した。

培地内コラーゲン量は、12 穴プレートの各ウェルの培地を採取し、 Ca_2^+ 、 Mg_2^+ 不含有 PBS により細胞を洗浄した液を加えた溶液中に存在するヒドロキシプロリンの含量を定量することにより測定した。ヒドロキシプロリン量は、以下の方法により測定した¹⁾。まず、培地に等容量の 12N-HCl を加え、 $110^\circ C$ 、24 時間加熱する。加水分解後、HCl はロータリーエバポレーターで除去する。蒸留水 2ml, KCl 1.5g, ホウ酸緩衝液 (蒸留水 1l 当たり, ホウ酸 61.84g, KCl 225g, pH8.7) 0.5ml を加え、室温で 20 分間静置する。クロラミン T 溶液 (p-トルエンスルホンクロロアミドナトリウム三水和物 1.41g を 2-メトキシエタノール 25ml に溶解) 0.5ml を加えて 25 分間振とうし、さらに 3.6M チオ硫酸ナトリウム溶液 1.5ml を加え、密栓し、 $100^\circ C$ で 30 分間加熱する。冷却した後、ト

ルエンを 2.5ml 加え 5 分間振とう後，トルエン層を採取し，無水硫酸ナトリウムのカラム（6mm2×30mm）を通過させる。流出液 1.0ml をとり，p-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 0.5ml（p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 120g をエタノール 200ml に溶解した液と濃硫酸 27.4ml をエタノール 200ml に溶解した液を氷冷下で混合）と混合し，室温で 30 分間放置後，560nm の吸光度を測定する。コラーゲン量を細胞数で割り，細胞数あたりの培地内コラーゲン量を算出する。試験溶液のネガティブコントロールとしては Ca_2^+ ， Mg_2^+ 不含有 PBS を使用した。コラーゲン合成促進率は次式を用い，ネガティブコントロールのコラーゲン量を 100% として計算を行った。

$$\text{培地内コラーゲン合成率(\%)} = (\text{Sx} / \text{Cx}) \times 100$$

Sx；試料溶液を添加したウェルにおける

細胞数あたりの培地内コラーゲン量

Cx； Ca_2^+ ， Mg_2^+ 不含有 PBS を添加したウェルにおける細胞数あたりの培地内コラーゲン量

これらの結果を表 3 に示す。なお，ネガティブコントロールとしては Ca_2^+ ， Mg_2^+ 不含有 PBS を用いた。

2-4. マウスを用いた皮膚コラーゲン量増加作用

2-4-1. 試料の調整

ハイビスカス抽出物を 5，10，20%（W/V%）となるように 10% エタノール水溶液に溶解した。ブランクとして 10% エタノール水溶液を用いた。

2-4-2. 動物実験

ICR 系リタイマウス(雌)を用いて行った。バリカンで剃毛した背部皮膚に試料を 1 日 1 回，0.2ml を週 5 回，4 週間連続塗布を行った。塗布終了後，直径 12mm の背部皮膚を採取した。採取皮膚は，湿重量を測定後，アセトンにて脱水・脱脂し，細切してコラーゲン量を測定した。

2-5. シワモデルマウスを用いたシワ改善効果

2-5-1. 試料の調整

ハイビスカス抽出物を 10%（W/V%）となるように 5% エタノール水溶液に溶解した。ブランクとして 5% エタノール水溶液を用いた。

2-5-2. 紫外線の照射

ヘアレスマウス (Skh/hr-1) 雌, 9 週齢を用い, 紫外線 (UVA:6mW/cm², UVB:0.3mW/cm², 東芝 FL20S/BLB ランプ) を 1 日 1 回 40 分間照射した。週 5 日間、12 週間背部に照射した。試験群は, 非照射群, 紫外線照射群, ハイビスカスエキス塗布-紫外線非照射群, 紫外線照射後ハイビスカスエキス塗布群, 紫外線照射後 5%エタノール塗布群の 5 群で行った。試料の塗布は, 紫外線照射 2 時間後, 背部に 0.2ml ずつ塗布した。

2-5-3.角層細胞の評価

マウス背部より, テープストリッピング法により角層細胞を採取し, 染色を行った。重層剥離率, 配列規則性, 有核率を檀淵らの方法²⁾に沿って評価を行った。

2-5-4.皮膚弾力性の測定

CutometerSEM474 (日本ユーロテック社製) を用いてマウス背部皮膚の弾力性を測定した。

2-5-5.シワ形成度の測定

シリコンゴム SILFLO (FLEXICO DDEVELOPMENTS LTD.製) を用いてマウス背部よりレプリカを採取し, 目視評価を行いシワスコアに置き換え評価を行った。

3. 結果および考察

ハイビスカス花卉から得られた抽出物を培養線維芽細胞に添加した時の, 線維芽細胞の増殖率を図 6-1 に培地内のコラーゲン産生促進作用を図 6-2 に示した。線維芽細胞の増殖率は低濃度ではあまり現れないが 100ppm 付近で増殖促進が認められた。その強さは, 陽性対照である AS-PM0.05mM と同程度であった。100ppm 以上に試料濃度を上げると増殖は低くなり, 細胞毒性がかかっていることが推測された。また, 培地内のコラーゲン量も同じような動きをし, ハイビスカス抽出物を線維芽細胞に添加すると, well 当たりの培地内のコラーゲン量は増加することが確認された。しかし, 培地内のコラーゲン量を細胞当たりに換算すると細胞当たりのコラーゲン産生量に増加はみられなかった。従って, 培地内のコラーゲン量の増加は線維芽細胞の増殖を促進することによって起こっているものと思われる。

培養細胞試験において細胞増殖を促進することにより, コラーゲンの産生能を促進させることを確認にしたことにより, in vivo 系としてマウス皮膚を用いて行った。ハイビスカスエキスを塗布し, 皮膚のコラーゲン量を測定したところ, 増加することが認められた(図 6-3)。更に, AHA は光老化に対して有効に働くといわれているためその確認を行った。ヘアレスマウスを用いる方法は,

桜岡らの報告³⁾でも外見的にシワに良く似た形状の生成が見られるため、同様な方法を用いてハイビスカスエキスの有効性の確認を行った。確認法には、外見所見だけでなく、皮膚の弾力性や角層細胞の状態の確認も同時に行った。その結果、無塗布に対して紫外線照射を行った群は、シワ形成及び角質状態の悪化や皮膚弾力性の低下が見られた。それに対して、ハイビスカス抽出物を紫外線照射後に塗布した群は、それらの変化を抑制していた。角質重層剥離の結果を図6-4に、有核率の変化を図6-5に、配列規則性の変化を図6-6に示した。更に、シワスコアに関して図6-7に、皮膚弾力回復に関しては図6-8に示した。

4. 引用文献

- 1) 藤本大三郎、永井裕(1985)、コラーゲン実験法、pp.51-56、講談社
- 2) 檀瀧暢夫、粧技誌、Vol.23, No.2, 143-154 (1989)
- 3) 桜岡浩一、日皮会誌、Vol.102, No.4, 425-431 (1992)

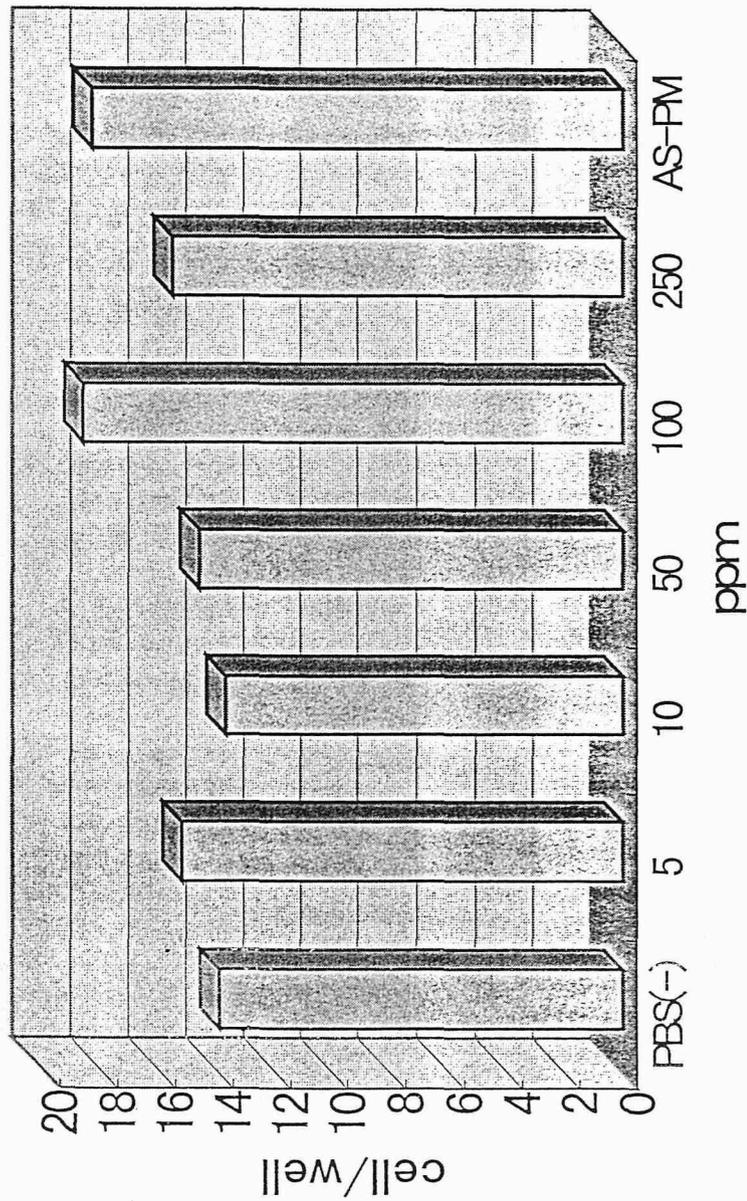


図6-1. ハイビスカス抽出液の線維芽細胞増殖試験

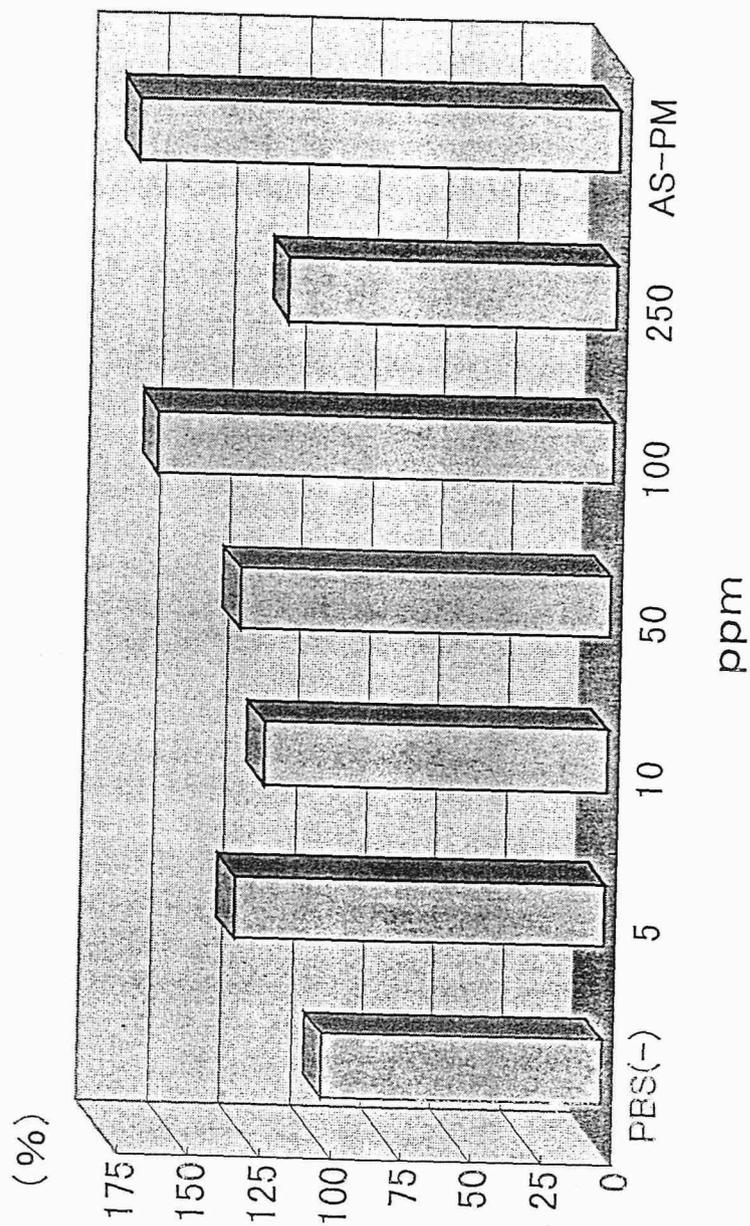


図6-2. ハイビスカス抽出液の培地内コラーゲン産生促進率

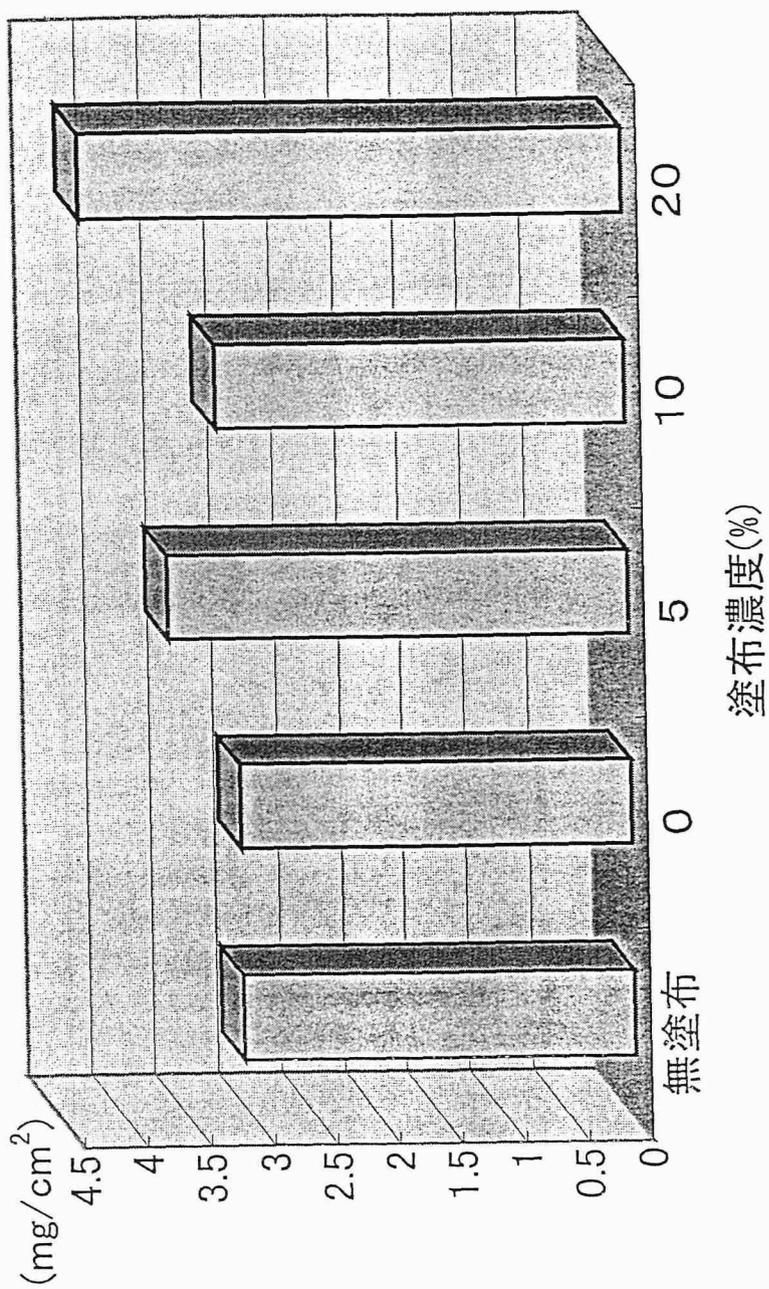


図6-3 ハイビスカス抽出物塗布によるマウス皮膚コラーゲン量の変化

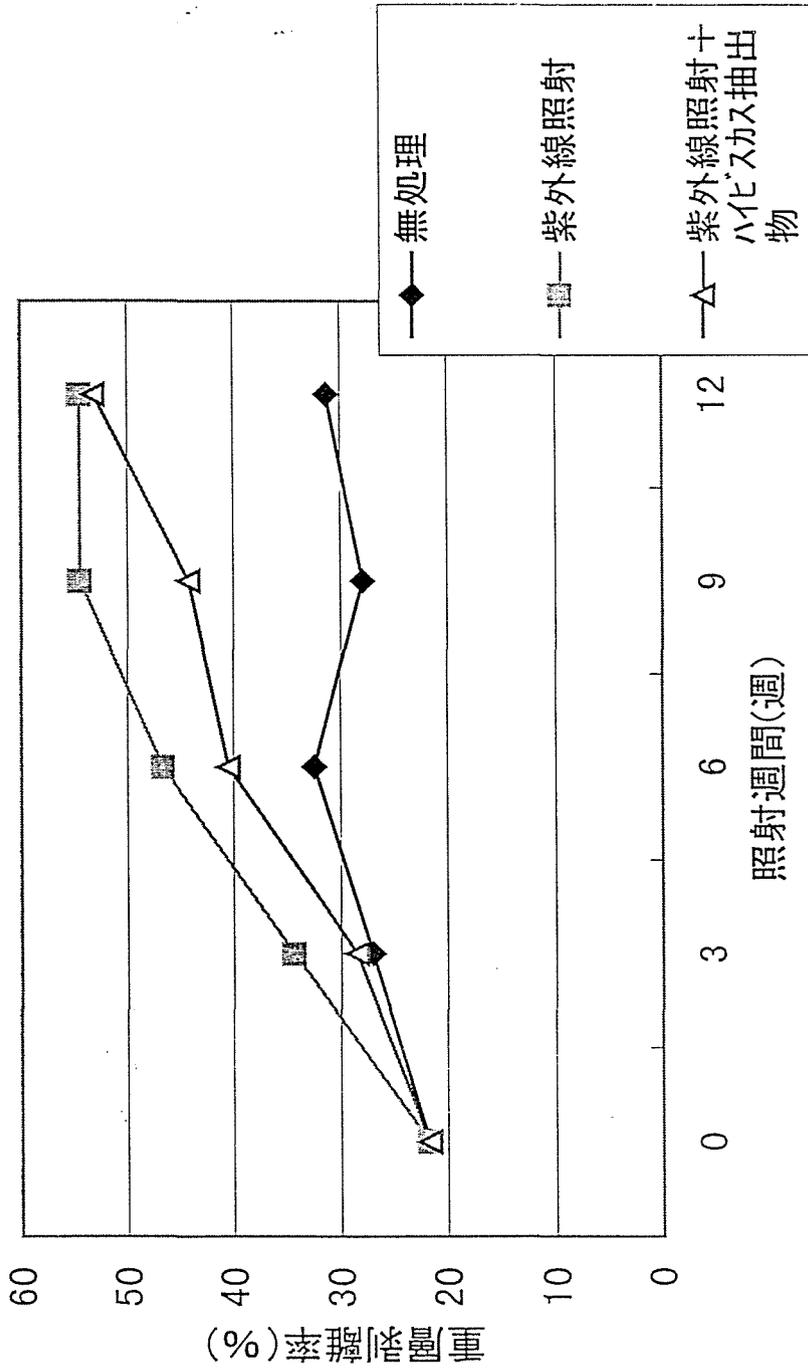


図6-4. ハイビスカス抽出物の紫外線照射ヘアレスマウスに対する角質重層剥離率
する改善効果

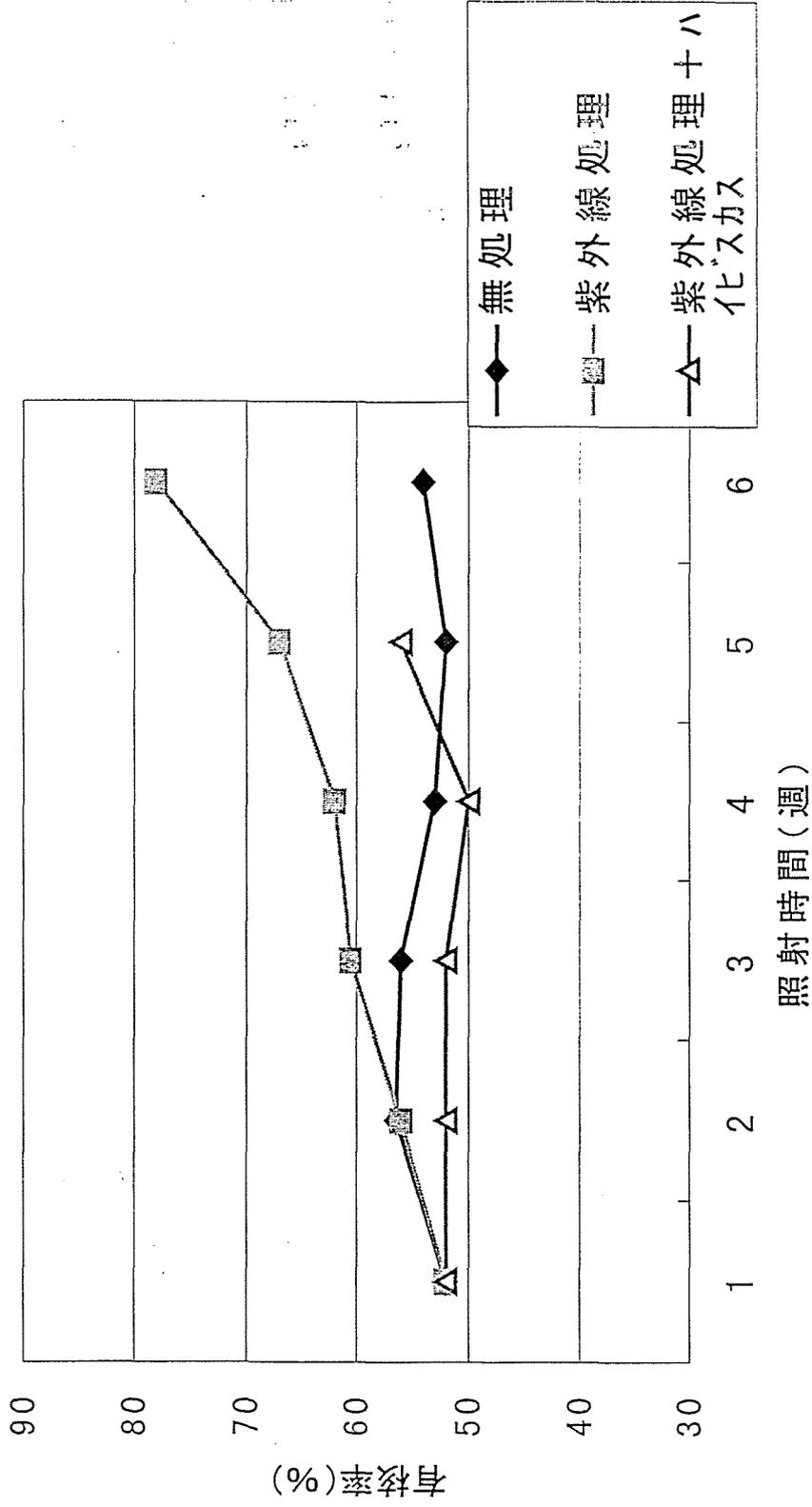


図6-5. ハイビスカス抽出物の紫外線照射ヘアレスマウスに対する角質有核率改善効果

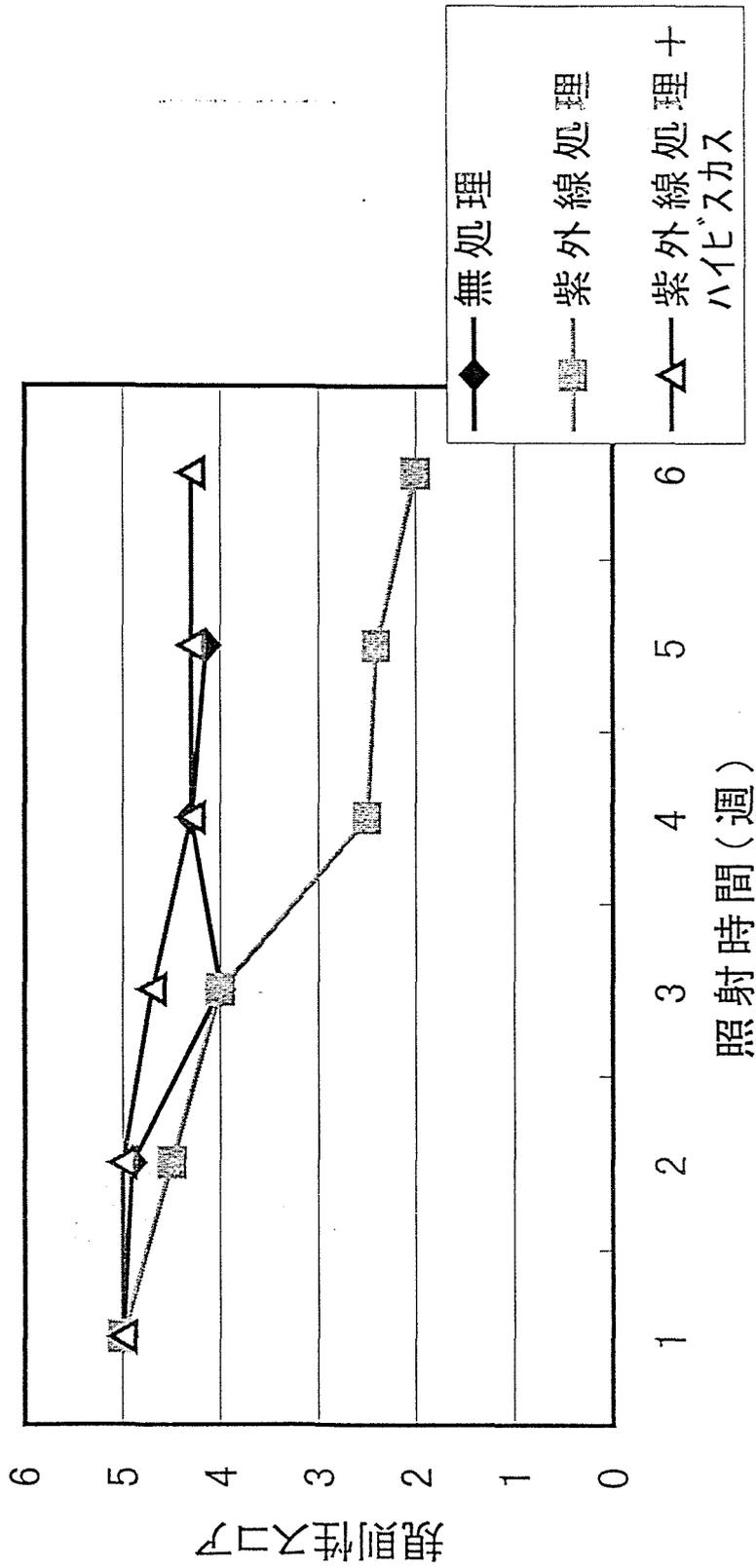


図6-6. ハイビスカス抽出物の紫外線照射ヘアレスマウスに対する角質規則性スコアに対する改善効果

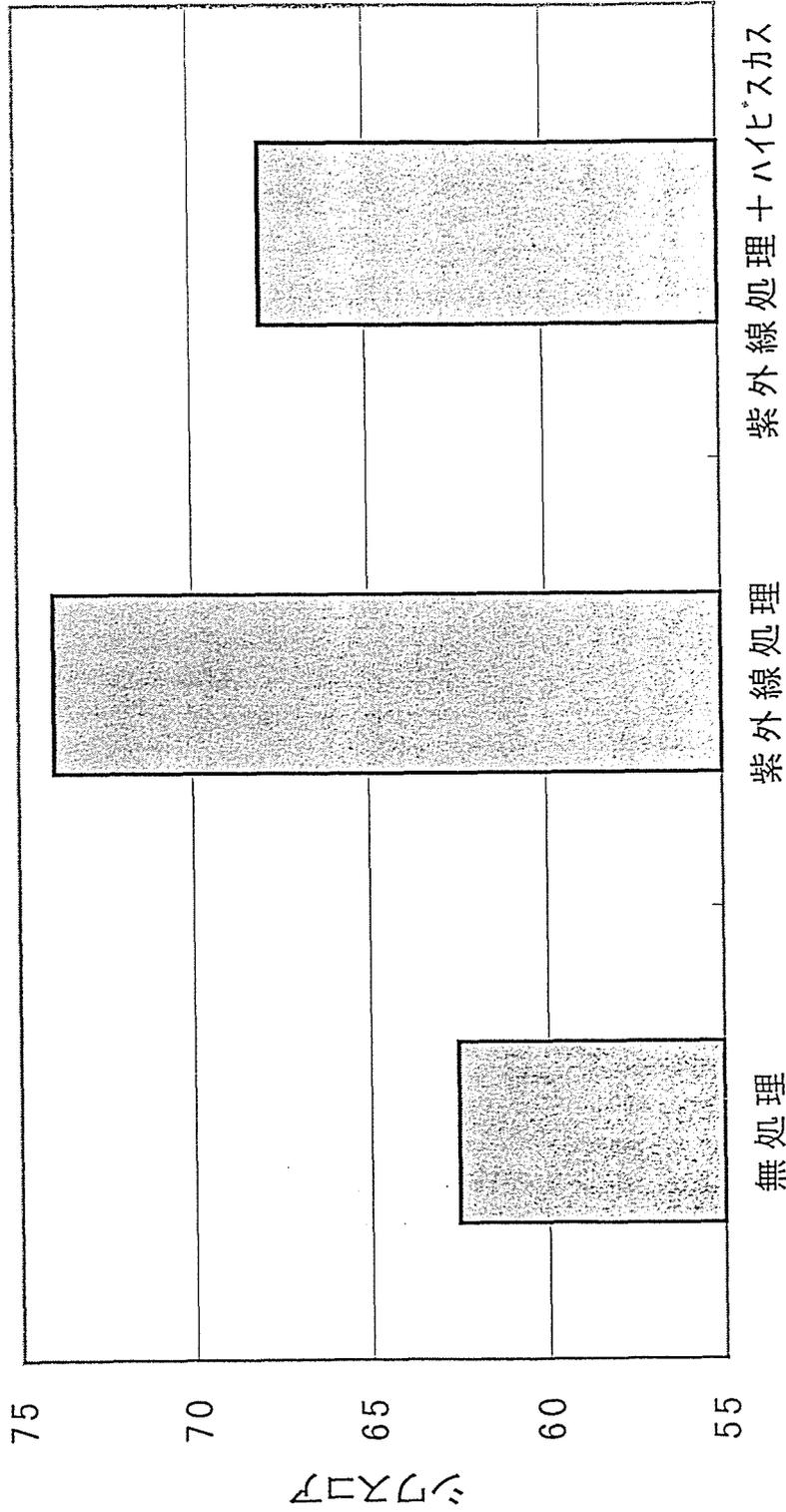


図 6-7. ハイビカスエキスのヘアレスマウスにおけるシワスコアに与える影響

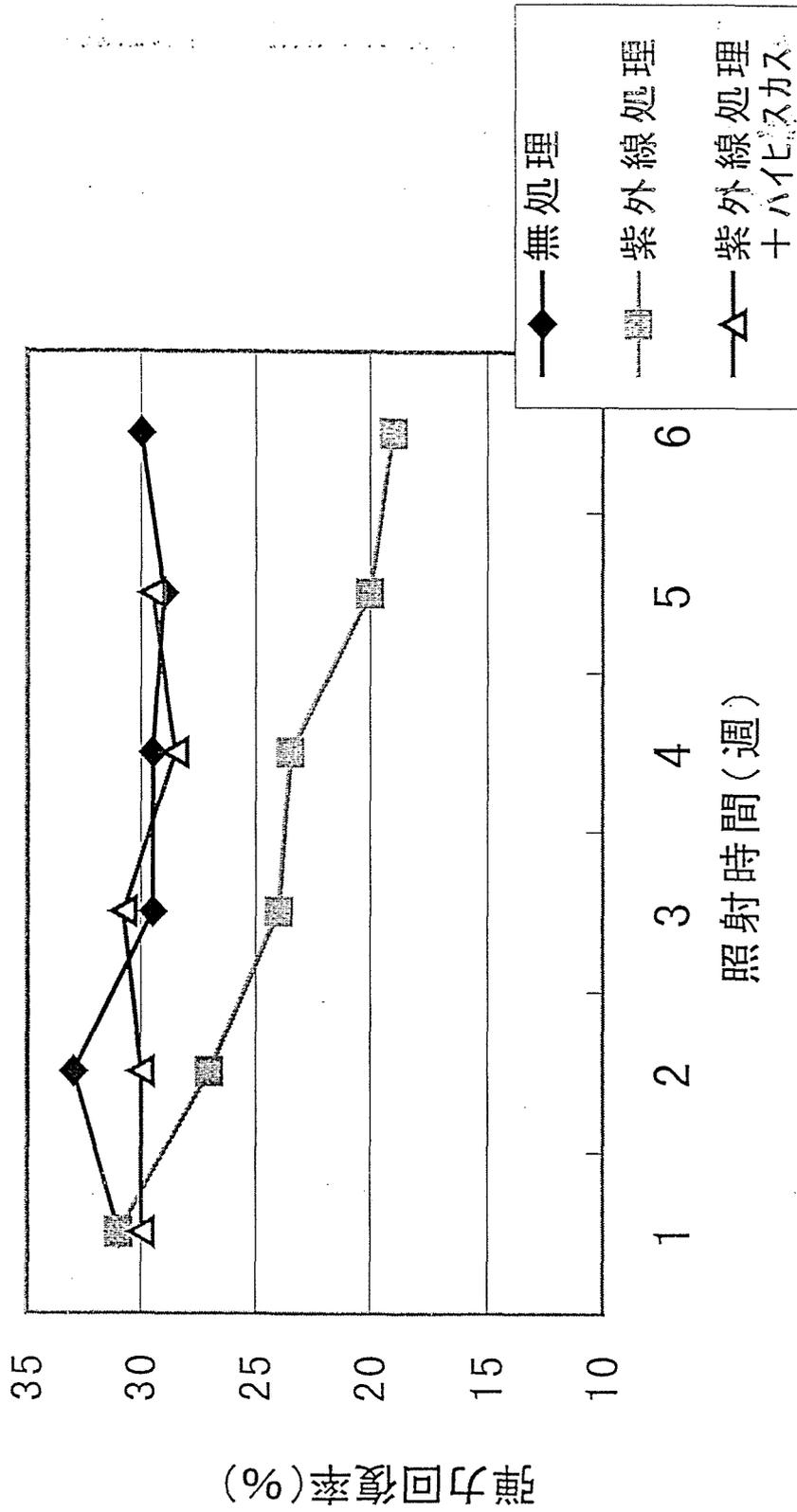


図6-8. ハイビスカスエキスへのアレスマウスの皮膚弾力回復率に与える影響

第7章 ハイビスカス抽出液中の線維芽細胞増殖活性成分の同定

1. 緒言

第6章においてハイビスカスから得た水抽出物は、グリコール酸と似たような効果を持ち、線維芽細胞の増殖に対して促進効果があり、そしてグリコール酸と比較して刺激性が少ないことを確認した。本章では、皮膚線維芽細胞増殖作用を指標として有効成分の分離精製を行い、活性成分を単離し構造決定した。

2. 実験

2-1. ハイビスカス水抽出物の作成

乾燥ハイビスカスつぼみ（若いガク）（鈴粉末製）800 gを精製水14 lで60℃、3時間抽出後、活性炭（白鷺KL（武田薬品製））600 gを加え、緩く攪拌しながら一夜、放置した。濾過後、減圧下、水を除去した。凍結乾燥後、ハイビスカス水抽出物249 gを得た。

2-2. ハイビスカス水抽出物の分離精製

2-2-1. 精製及び活性測定

2-2-1-1. 精製方法

ハイビスカス水抽出物をACIPLEX CARTRIDGE AC-110-10（旭化成製）を用い、脱塩装置（MICRO ACILYZER, 旭化成製）で、通過分を乾燥しFr. -1 1.10gを得た。

Fr. -1 0.2gをn-ブタノール20ml中に加え、硫酸0.9mlを加えて5時間還流した。反応中に生成した沈殿物を口別し、口液をn-ブタノール/水でブタノール抽出を行った。ブタノール層をは脱水後、溶媒を減圧下留去した。n-ブタノール層から得た混合物をシリカゲルカラムクロマト（ワコーゲルC-200、φ=10×210mm）を行い、溶出液を酢酸エチル、n-ブタノール、メタノールの順で分配クロマトを行った。酢酸エチルで溶出した画分を、シリカゲルカラムクロマト（ワコーゲルC-200、φ=20×420mm）で溶出液を酢酸エチル/ヘキサン=3/7として分画を行った。溶出液は、フラクションコレクターを用いて5mlずつ分取した。

2-2-1-2. 皮膚線維芽細胞増殖試験

前報の皮膚線維芽細胞増殖試験に従い、分離精製によって得られた画分の活性測定を行った。

2-3. 分析条件(純度及び構造解析)

2-3-1. HPLC条件

機種：日本分光ガリバーシリーズ

カラム：CEMCOSORB 7C8 (ケムコ製) 又は HIKARISIL C-18 (旭化成製)

溶出液：リン酸緩衝液(pH2.6)

流速：1ml/min

カラム温度：室温

検出波長：210nm 又は 190nm

2-3-2. TLC条件

プレート：KIESELGEL 60 F254 (MERCK製)

展開溶媒：酢酸エチル/ヘキサン=3/7

検出：ヨウ素蒸気

2-3-3. GC条件

機種：GC14A (島津製)

カラム：Silicone OV-1(1.5%)(0.5m) (和光純薬製)

カラム温度：100℃→330℃ (昇温10℃/min)

2-3-4. 元素分析

元素分析は、CHNコーダーMT-3 (柳本製作所製) により行った。

2-3-5. 構造解析

紫外スペクトル (UV-2100, 島津製), 赤外スペクトル (IR-435, 島津製), ¹H, ¹³C-NMR (JNM-EX-270, 日本電子製), MSスペクトル (JMS-DX303-HF, 日本電子製) によって解析を行った。

3. 結果及び考察

3-1. ハイビスカス水抽出物の作成

乾燥ハイビスカス花卉 (若いガク) 800gを粉砕することなく抽出を行った。乾燥体の半量近い抽出物414gを得た。抽出物は色素 (赤色) を有しているため、活性炭を使用することにより、色素の除去を行った。そして、最終的にハイビスカス水抽出物249gを得た。

3-2. ハイビスカス水抽出物の分離精製

ハイビスカス水抽出物を図 7-1 に従い分離精製を行った。最終的に脱塩装置で AC-110-10 という膜を用いることにより、電荷を有する低分子である Fr. -1 と Fr. -2 を得た。それぞれの画分を線維芽細胞の増殖試験に供し、Fr. -1 に活性成分が含まれていることを確認した。本成分は、HIKRISIL C-18、溶出液がリン酸緩衝液 (pH 2.6、1ml/min)、カラム温度を室温、検出波長を 210nm では、1 ピークであったため、有機物としては 1 成分と推測した。

Fr. -1 の IR スペクトルを測定し、その結果、塩化アンモニウムの IR スペクトルと酷似している成分を含んでいることを確認した。無機塩の検出を行うために検出波長を 210nm → 190nm にすることにより、塩化アンモニウムのような無機物でも検出できるようにし、分離能を上げるためにカラムの変更 (ODS → C-8) を行うことにより、不純物として含まれている塩化アンモニウムの存在の確認が行えるようにした。同時に、IR スペクトルもとることによって精製時の純度確認を行うことにした。

そこで、エステル化することにより、無機塩との分離を行った。エステル化は、炭素鎖の長い n-ブタノールでエステル化した。反応物中に白色の沈殿が生成したが、それは、塩化アンモニウムなどの無機物がブタノールに溶解せず分離されたものと思われる。抽出には、エーテルよりも極性の高い n-ブタノールを用いて行った。得られたエステル化物 (n-ブタノール層) は、シリカゲルクロマトによって分離を行った。まず、酢酸エチルのみ分配クロマトを行い粗い精製を行った。続いて、TLC の条件から得た酢酸エチル/ヘキサン (3/7) の溶出液を用いて分画を行った。

得られたフラクションを TLC によりチェックし、単一である画分を集めた。TLC 及び GC によって純度の確認を行い高純度であることを確認した。

ハイビスカスエキス Fr. -1 のブチルエステル化物の各種機器分析を行った。UV スペクトルは、紫外域特異的な吸収は持たない物質である。210nm 付近に吸収を持つため非共役の 2 重結合を有している可能性がある。IR スペクトルは、 1740cm^{-1} がカルボン酸エステルの $\text{C}=\text{O}$ の吸収、 1800cm^{-1} に後で解ったことであるがラクトンの $\text{C}=\text{O}$ の吸収が特長としてみられる。

MS スペクトルは、302 を示していた。この分子量は、予測していたハイビスカス酸のエステル化物であれば分子量は 376 となるため、302 で考えられるものを導き出した。ハイビスカス酸が脱水してラクトン構造をとることになれば、分子量は 302 となる。この構造であれば、IR での 1800cm^{-1} の吸収もラクトンの $\text{C}=\text{O}$ と考えれば説明が可能である。

NMR スペクトルの結果は、予測したハイビスカス抽出物 Fr. -1 ブチルエステルの NMR 帰属データを表 7-1 に示した。

以上の結果より、ハイビスカスエキスFr. -1をブチルエステル化して得た成分は、**図7-3**に示すような構造を持つものと思われる。これは、ハイビスカス酸の分子内での脱水物であり、エステル化反応中にこのような脱水が起こった可能性がある。しかし、ハイビスカスエキスFr. -1の反応前のIRスペクトルにも 1800cm^{-1} に吸収があるため、反応前もラクトンの $\text{C}=\text{O}$ を持っているものと判断した。よって、ハイビスカスエキス中の有効成分は**図7-4**に示した構造を持つものと思われる。氷見らの報告¹⁾ではハイビスカス花卉中には、マレイン酸、クエン酸、酒石酸やハイビスカス酸などの有機酸が含まれていることが知られている。なお、C. Griebel らの報告²⁾においてハイビスカス酸は組成式が $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$ であることが記載されており、それと同一の構造を持っていると思われる。

同定した3-hydroxy-3,4-dicarboxy-1,4-butanolideは、 α -ヒドロキシ酸の構造を有しており、 α -ヒドロキシ酸がシワに有効であり、線維芽細胞の増殖に促進的に働くといわれており、本成分も同様な働きを持っていることを確認したことになる。

また、Lanrent Sousselierは、ハイビスカス花卉中に含まれるピルビン酸が皮膚や毛髪に対して抗老化剤として有効であると報告しているが、我々は異なる成分に有効性を見出したことになる。

4.引用文献

- 1) 氷見三穂, 三浦和香, 香料, No. 176, 97-102(1992)
- 2) C. Griebel, Zeitschrift Untersuchung der Lebensmittel, Vol. 83, No. 6, p481 (1942)
- 3) Laurent Sousselier, Personal Care Ingredients Asia Conference Papers, Thursday 9. April, 1-9(1998)

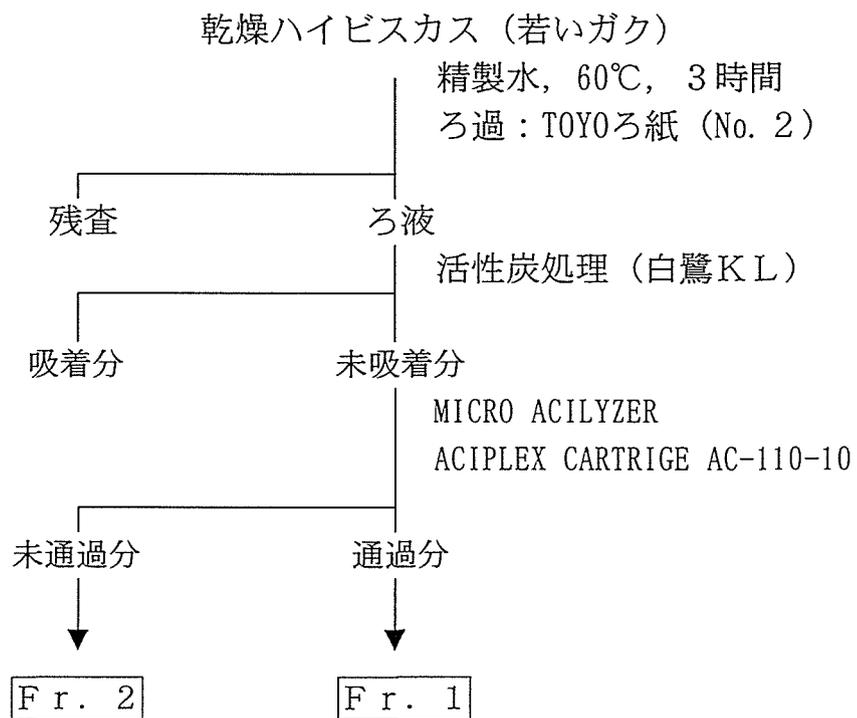


図7-1. ハイビスカス花卉抽出物の分離精製法

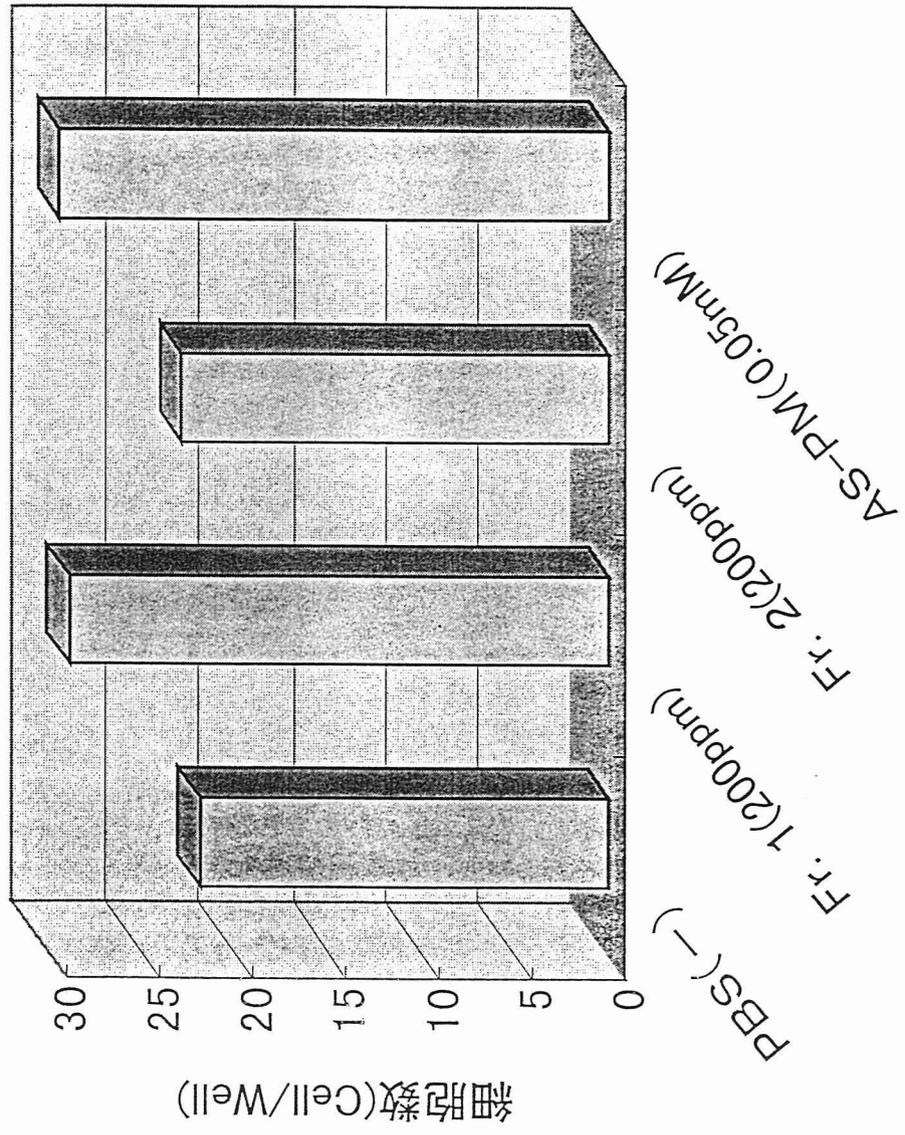


図7-2. ハイビスカス抽出物の分離画分の皮膚線維芽細胞増殖試験

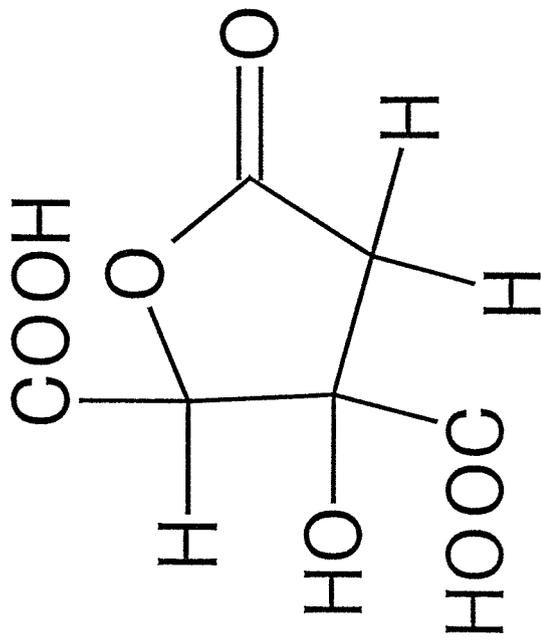


図7-4. ハイビスカス抽出物 Fr.-1 中の有効成分の構造式

表7-1. ハイビスカス抽出物Fr-1ブチルエステルのNMR帰属データ

	¹ HNMR	¹³ CNMR		¹ HNMR	¹³ CNMR
4', 4''	0.95 (6H, q, 7.3Hz)	13.5	1'	4.24 (2H, t, 7.0Hz)	66.0
3', 3''	1.39 (4H, m)	18.9	1''	4.32 (2H, m)	67.7
2', 2''	1.65 (4H, m)	30.4	4	5.08 (1H, s)	82.1
2(a, b)	2.86 (1H, d, 17.5Hz)	40.3	3	—	77.3
	3.05 (1H, d, 7.0Hz)		1	—	165.4
			5, 6	—	171.1, 171.5

総括

先進国に到来しつつある高齢化への波は、社会問題として深刻である。21世紀初頭には国民の約4分の1が高齢者によって構成されることになると言われていた。このような中で、すべてに人が健康に生きがいを持ち、安心して暮らせる社会環境をつくりあげることが重要なことである。加齢による皮膚や毛髪に対する変化は、視覚的にわかりやすく、自覚的にも他覚的にも老いを感じさせてしまう。特に女性に対して美しく年を重ねるため、外見的な加齢による変化を目立たなくする抗老化機能を化粧品に求められる役割が大きくなっていくことが明らかである。

皮膚の老化は、加齢に伴う内因性の老化と紫外線や乾燥などの外的環境の影響を受ける外因性の老化の大きく分けることができ、外因性の老化の原因として、紫外線が代表的なものである。内因性の老化においても、生物は生きるために取り入れる酸素の約2%がスーパーオキシドラジカル(O_2^-)というような活性酸素種になるといわれており、これらも生体成分に対して傷害を与えることとなる。

本研究では、安全性の高い紫外線防御素材の開発、天然物の中に活性酸素を抑える作用を有する素材を開発と紫外線によりダメージを受けた皮膚の再生作用を持つ素材の開発というように総合的な角度から化粧品材料の開発を行った。

(1) 皮膚刺激の少ない化粧品材料のための紫外線防御剤を開発することを目的として、シリカゲル表面に紫外線吸収能を有する桂皮酸アミド基を化学結合により固定化した表面修飾シリカゲルを作製した。可視および紫外光の透過率により評価を行ったところ、内部に細孔を持たない微粒子タイプのシリカゲルをベースとして調製した化学修飾シリカゲル(p-メトキシ桂皮酸アミド修飾シリカ)は、可視光に対して透明で、紫外線の透過を遮断する効果があることが認められた。また、これらの表面修飾シリカゲルを皮膚に塗布したところ、透明性が高く違和感がない特徴があった。本物質は、モルモットを用いた皮膚刺激性試験において刺激を認めなかった。

(2) 活性酸素による傷害から皮膚を守る素材として花卉に注目し検討を行なった。花卉の抽出物から活性酸素によるヒアルロン酸の断片化抑制能を指標として防御能を有する物質を検索した。その結果、バラ科やモクレン科の植物に高い活性を確認した。先の研究でバラ抽出物中のを有する成分がイソクエルシトリンやクエルシトリンというクエルセチン配糖体であることを確認した。本研

究では、花卉抽出物の中でヒアルロン酸断片化抑制能の最も高かったモクレンの花弁から有効成分の単離精製を行ない、構造解析を行った。その結果、活性成分の一つはルチンであることを確認した。前研究と合せてクエルセチン配糖体の活性が高いことを確認した。

これらのフラボノイドは水に対する溶解性が悪く、化粧品に配合した場合、経時的に沈澱の生成という問題点を生じる。この問題点を解決するために溶解性の向上の検討を行った。今回、イソクエルシトリンとデンプンを基質としてサイクロデキストリン合成酵素(CGTase)で配糖化を行った。その配糖化物の水に対する溶解性は、100 倍近く向上し化粧品への配合において経時的な沈澱からの回避が可能となった。

(3) 老化現象の一つであるシワは、真皮の細胞外マトリックスを産生する細胞数の減少、分裂速度の衰えなどの細胞機能の老化やコラーゲン線維の減少および変性などにより、皮膚の弛緩および弾力性の損失が起こることが原因となって発生する。

本研究では、ハイビスカス花卉抽出物が、皮膚線維芽細胞の細胞増殖を活性化し、細胞外マトリックスの産生を増加させることにより、皮膚のはり・しわの改善に顕著な作用を示すことを確認した。線維芽細胞の増殖作用を指標に活性成分の単離精製を行った結果、その活性成分は 3-hydroxy-3,4-dicarboxy-1,4-butanolide であることを確認した。

ハイビスカス抽出物の有効性は、ヘアレスマウスを用い、紫外線を照射することにより、外見的变化、角層剥離状態や皮膚弾力の測定を行った。無塗布に紫外線照射を行った群は、シワの形成及び角層剥離状態の悪化や皮膚弾力の低下が見られたが、ハイビスカス抽出物塗布群は、それらの変化を抑制していた。これらの結果から、ハイビスカス抽出物は真皮と表皮に作用し、シワの形成を抑える働きがあることが示唆された。

本研究によって得られた紫外線防御剤により、紫外線による傷害から皮膚を防御し、完全に防御できなかった紫外線により生じた皮膚上の活性酸素や体内から発生する活性酸素に対して、バラやモクレンから得られたクエルセチン配糖体により防御する。そして、それでも傷害を受けた皮膚に対してハイビスカスから得られた 3-hydroxy-3,4-dicarboxy-1,4-butanolide が皮膚の再生に役立つというわけである。このように総合的に老化から皮膚を守る素材を開発し、これらを配合した化粧品を使用することにより高齢化社会を迎えても美しく歳を重ねることができる日が来ることが期待される。

END