

奈良県産生薬における抗老化作用



株式会社クラブコスメティクス ²奈良県薬事研究センター

○伊藤真太郎¹ 武田悠¹ 豊田有希¹ 石田喬裕¹ 抜井啓二² 前川友香² 植山高光² 坂口育代¹

目的

皮膚の老化は、加齢による自然老化と紫外線による光老化の大きく2つに分けることができる。皮膚が老化すると肌のハリやうるおいが低下する等、肌の状態を悪化させることが知られている。

我々は、奈良県産生薬に着目し、シャクヤク、トウキ、オウバク、ジオウについて肌に対する自然老化への有効性を評価する為、真皮線維芽細胞増殖、コラーゲン産生、コラーゲナーゼ活性阻害、プロフィラグリン遺伝子発現、エストロゲン様活性、SOD様活性、抗糖化の7つの作用について検討を行った。

材料

奈良県内で収集した芍薬(シャクヤク, *Paeonia lactiflora*)、当帰(トウキ, *Angelica actinoides*)、黄柏(オウバク, *Phellodendron amurense*)、地黄(ジオウ, *Rehmanniae Radix*)を使用した。

方法

生薬エキスの抽出

シャクヤク、トウキ、オウバク、ジオウを1:3-BG / 精製水=1:1 溶液により50℃で5hr加温抽出を行い、濾過して各生薬からエキスを得た。

真皮線維芽細胞増殖作用

細胞は、ヒト正常線維芽細胞(NHDF, 倉敷紡績)を用いた。NHDFを96well plateに播種し、37℃、5%CO₂インキュベーターで24hr培養した後、生薬エキスを含有培地を添加し、さらに72hr培養した。培養後、MTT還元法により細胞の増殖活性を測定した。結果はcontrolを100とした相対値で示した。

1型コラーゲン産生

NHDFを96well plateに播種し、37℃、5%CO₂インキュベーターで24hr培養した後、生薬エキスを含有培地を添加し、さらに72hr培養した。培養後、培養上清を回収して培養上清中に存在するプロコラーゲン及びトロポコラーゲンを、ペプシン処理によりアテロコラーゲンに変換した。その後、96well plateに一晩コーティングし、ELISA法によって1型コラーゲン量を測定した。結果はcontrolを100とした相対値で示した。

コラーゲナーゼ活性

コラーゲナーゼ(ヒト線維芽細胞由来、ライフ研究所)と、FITC標識1型コラーゲン(コラーゲン技術研究会)、トリス塩酸緩衝液の混合液に生薬エキスを加え、37℃でインキュベートした。そこにフェナントリン/エタノール溶液を加え、さらに37℃でインキュベートした。エタノール/トリス塩酸緩衝液混合液を加え混合し、遠心後、上清の蛍光強度(Ex=495, Em=520)を測定した。結果はcontrolを阻害率0とした相対値で示した。

プロフィラグリン遺伝子発現

細胞はヒト正常上皮角化細胞(NHEK, 倉敷紡績)を用いた。NHEKは48well plateに播種し、24hr培養した後、生薬エキスを添加してさらに6hr、24hr培養した。培養後、細胞内から全RNAを抽出し、リアルタイムRT-PCR法により発現解析してプロフィラグリンmRNAを定量化した。結果は Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の発現量を補正し、control を発現量1とした相対値で示した。

エストロゲン様活性

細胞は、乳腺上皮がん細胞(MCF-7, 大日本製薬)を用いた。MCF-7を96well plateに播種し、37℃、5%CO₂インキュベーターで24hr培養した後、生薬エキスを含有培地を添加してさらに6days培養した。培養後、MTT還元法により細胞の増殖活性を測定した。結果はcontrolを100とした相対値で示した。

スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)様活性

キサンチン溶液、トリス塩酸緩衝液、EDTA溶液、ニトロプル-テトラゾリウム(NBT)溶液、生薬エキスの混合液に、キサンチンオキシダーゼ溶液を添加して37℃でインキュベートした。吸光度(550nm)を測定し還元されたNBT量を測定した。結果はcontrolをSOD様活性0とした相対値で示した。

抗糖化作用

タンパク(ヒト血清アルブミン, SIGMA)と糖(グルコース水溶液)、リン酸水素ナトリウム水溶液、生薬エキスを混合し60℃で反応させた。蛍光強度(Ex=360nm, Em=460nm)を測定し蛍光糖化最終産物(AGEs)の一つ、2-(2-フロイル)-1(5)-(2-フランイル)-1H-イミダゾールの量を測定した。結果はcontrolを抗糖化作用0とした相対値で示した。

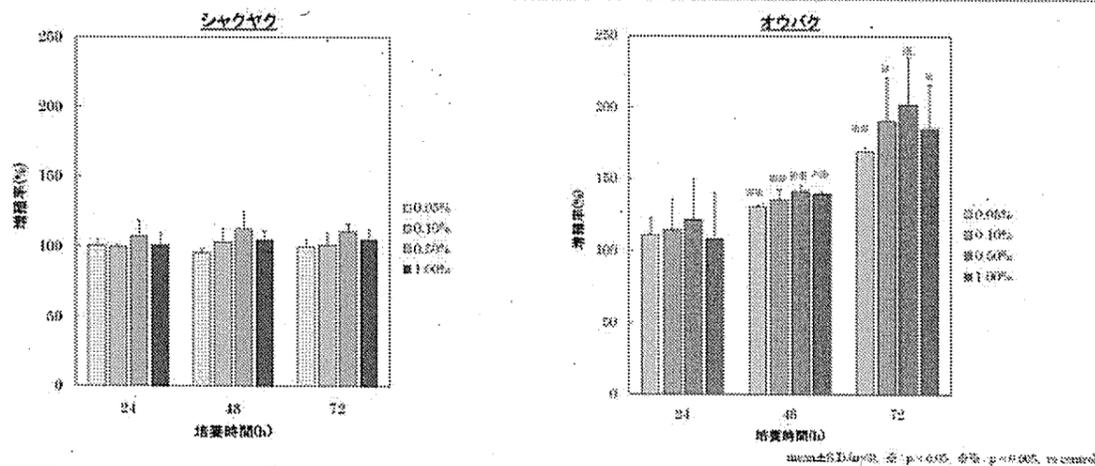
まとめ

奈良県内で収集したシャクヤク、トウキ、オウバク、ジオウを用いて有効性評価を行った。その結果、シャクヤクは線維芽細胞増殖を促進、1型コラーゲン産生を促進する傾向を示し、プロフィラグリン遺伝子発現促進、コラーゲナーゼ活性阻害作用を示した。オウバクは線維芽細胞増殖促進、1型コラーゲン産生促進、抗糖化、抗酸化作用、女性ホルモン様作用を示した。ジオウは抗糖化作用を示し、トウキは本検討項目では、有効性を確認できなかった。

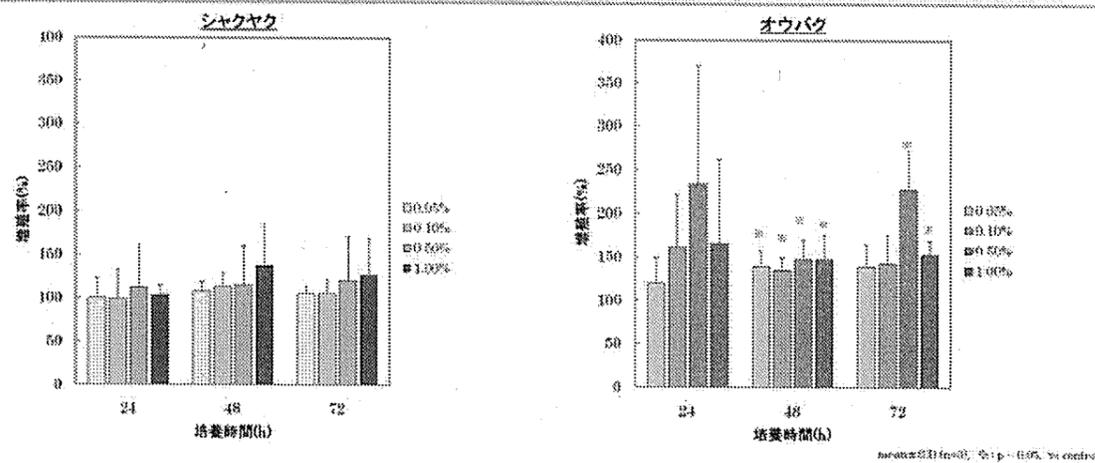
以上のことより、シャクヤク、オウバクは自然老化における抗老化素材であると考えられた。今後、有効成分の同定、作用メカニズムについて検討を行う予定である。

結果

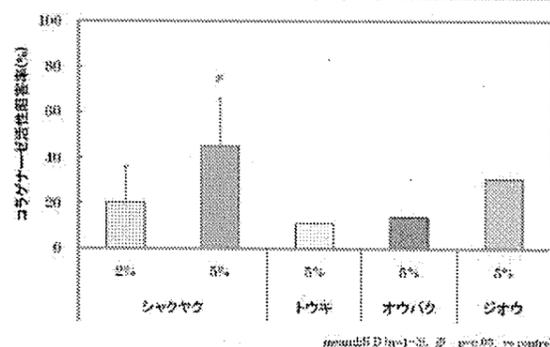
線維芽細胞増殖作用



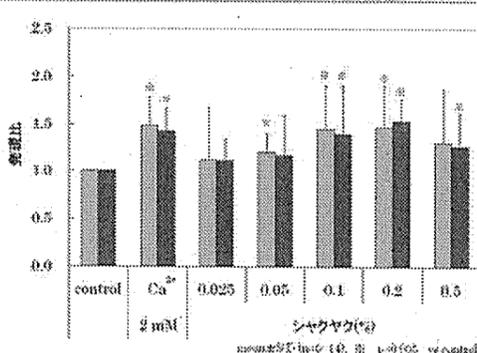
1型コラーゲン産生促進作用



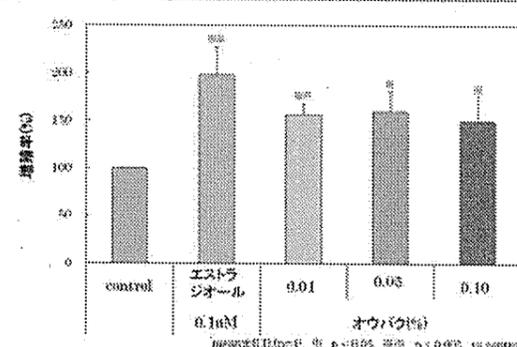
1型コラーゲナーゼ活性抑制作用



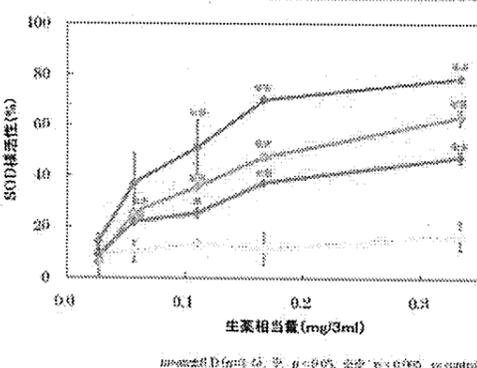
プロフィラグリン遺伝子発現促進作用



エストロゲン様活性



SOD様活性



抗糖化作用

