

メラニン生合成阻害作用を有する環状ジアリルヘプタノイド類の 美白効果に関する研究

星薬科大学薬学部

森 田 博 史

Cyclic diarylheptanoids with a biphenyl ether linkage such as a series of acerogenins have been isolated from the bark of *Acer nikoense* (Aceraceae), a Japanese folk medicine for hepatic disorders and eye diseases. A series of acerogenins exhibited a range of biological activities such as anti-inflammatory, antihepatotoxic, antibacterial, and inhibitory activity on nitric oxide production. There are well-known natural biphenyl ethers such as glycopeptide vancomycin, cyclic peptides from *Rubia cordifolia*, and macrocyclic bisether marchantin A from the liverwort *Marchantia* species. These structurally interesting cyclic diarylheptanoids continue to be of interest from biological points of view as well as providing challenging targets for total synthesis.

Our interest has been focused on inhibition of tyrosinase enzyme by a series of cyclic diarylheptanoids, acerogenins and the other biological activities. Fractions and acerogenins prepared from *Acer nikoense* showed inhibition of tyrosinase enzyme and melanin biosynthesis, and also showed vasorelaxant activity on rat aorta.

1. 緒 言

我々は植物をはじめとする生物資源の調査と同時に、化粧品素材の原点となる有用物質を未利用植物資源に求めてきた。植物成分のなかでもアルブチン、コウジ酸のようなフェノール性化合物のなかにはメラニン生合成阻害活性を示す化合物群が知られている。一方、既存のタイプにとらわれることなく、新たな骨格をもつ天然有機化合物は、しばしば重要な医薬品発見の糸口となるばかりでなく、新たな化粧品素材としての可能性も期待される。このような観点から、メラニンの過剰生成による色素沈着（シミなど）の予防および抑制効果を有する化粧品の開発を目的とし、さまざまな薬用植物および未利用植物などの天然資源からメラニン生成抑制物質のスクリーニングを行ってきた。その結果、これまでに和漢薬などに含まれる環状ペプチド類が、B16 マウスメラノーマ細胞培養系でメラニン生成を抑制することを報告してきた。

チロシナーゼは色素細胞に特異的に発現している酵素でメラニン産生において最初の反応を触媒する働きを持っている。一方、過剰な紫外線刺激による人皮膚の黒色化やシミ・ソバカスなどの生成は、一般に人皮膚細胞中の色素細胞（メラノサイト）内のメラノソームで、酵素チロシナーゼが、アミノ酸の一種であるチロシンあるいはドーパを酸化して生成した黒色のメラニンによることが知られている。さらに人皮膚の美白用皮膚外用剤としてハイドロキノン、

コウジ酸、アルブチンあるいはビタミンCなどのチロシナーゼ活性阻害剤がよく知られている。しかし、これらのチロシナーゼ活性阻害剤においては、それぞれ安定性、安全性、効果等において一長一短が指摘されており、依然改良の余地が残されている。

今回、薬用植物および未利用植物などの天然資源から得られた抽出エキスに対して、チロシナーゼ阻害活性のスクリーニングを行った結果、カエデ科メグスリノキ由来の抽出エキスに本酵素の阻害活性を見出したので、チロシナーゼ阻害活性を指標として分離精製を各種カラムクロマトグラフィーを用いて行い活性物質の単離および分画フラクションの諸性質に関する検討を試みた。

一方、我々は、美白効果、抗酸化効果、発がん予防効果、血管平滑筋弛緩作用等の複数の機能を同時に合わせ持つ新しい化粧品素材の開発をも狙っており、今回、メグスリノキの抽出エキスより分画した各種フラクションおよびアセロゲニンを用いて血管平滑筋に対する作用も検討した。

2. 実 験

2.1 カエデ科メグスリノキ (*Acer nikoense*)

メグスリノキは、一名チョウジャノキともいうが、宮城県以南の本州、四国、九州の山地に自生する落葉高木であり、三出複数をもち、若枝、葉柄、葉の下面に密に灰白色の開出粗毛が存在することを特徴とする。民間では、その樹皮を煎じて洗眼に用いたことから、目薬の木という名がついたと言われている。メグスリノキの成分としては、現在までに環状ジアリルヘプタノイドの他、トリテルペノイド、フラボノイド、クマリンなどが単離されている¹⁾。今回、群馬県で採集し風乾した樹皮を研究材料として用いた。

2.2 メグスリノキ (*Acer nikoense*) の抽出および分画

永井らの方法に従い¹⁾、メグスリノキの樹皮を粉砕後、

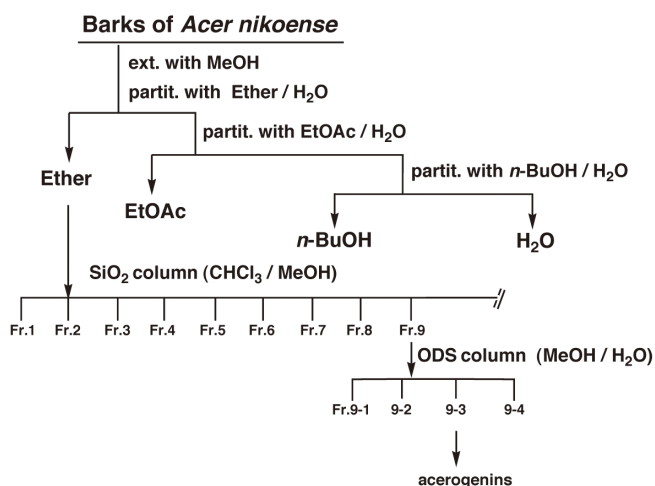


Inhibition of Melanin Biosynthesis of
Cyclic Diarylheptanoids from *Acer*
nikoense

Hiroshi Morita

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Hoshi University

メタノールで抽出し、濃縮して得たエキスをチャートに示すようにエーテル、酢酸エチルで順次、分配して、それぞれの可溶性画分を調製した。次に、チロシナーゼ阻害活性のみられたエーテル抽出画分をシリカゲルカラムマトクラフィーおよび ODS カラムマトクラフィーに付し、数種の活性フラクションを得た。



2.3 チロシナーゼ阻害活性の測定法

文献記載の方法に従い、mushroom tyrosinase を用いたドーパクロム法で測定した。試料は、全てエタノールに溶解 (2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) し、不溶物はメンブランフィルターでろ過して除去した。

2.4 メラニン生成抑制活性

B16 マウスメラノーマ細胞を、10% FCS、ペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシン B、炭酸水素ナトリウムを添加した D-MEM で 37℃、5 % CO₂ 条件下で培養した。24 時間後にサンプルの DMSO 溶液を含む培地に交換し、3 日間培養した。メラニン生成抑制活性は、細胞中のメラニン量と培地中のメラニン量（吸光度より算出）から求めた。また、細胞に対する毒性は、細胞溶解液のタンパク量から評価した。

2.5 血管平滑筋に対する作用³⁾

Wistar 系雄性ラットより胸部大動脈を摘出しリング標本を作成し、その張力変化を等尺性に記録した。この張力変化はオルガンバス中に懸垂した血管標本を張力トランジューサーに接続して測定した。分画フラクシオンの作用は、標本のノルエピネフリン収縮に対する弛緩作用を指標にスクリーニングを行った。ついで血管内皮の有無の影響、KCl、endothelin 等の収縮薬や各種リガンド存在下の血管収縮を観測し、作用機序の推定を行った。

3. 結果

3.1 メグスリノキの粗抽出物の有機溶媒可溶性画分のチロシナーゼ阻害活性およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画

メグスリノキのメタノール抽出物およびエーテル可溶性画分にチロシナーゼ阻害活性が認められた (Fig. 1)。また、エーテル可溶性画分のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画 ($\text{CHCl}_3 \sim \text{MeOH}$) によって得られた Fraction 9 の画分には、より強いチロシナーゼ阻害活性が認められた。

3.2 活性画分の ODS カラムクロマトグラフィーによる分画

シリカゲルカラムで分離した後に強い活性が認められた画分を ODS カラムクロマトグラフィー (H₂O ~ MeOH) でさらに分画し、得られた各画分の活性を測定したところ、チロシナーゼ阻害活性を有するフラクション (Fr.9-3) を得られ、アセロゲニン類が含有されることが分かった。これらの画分の活性には、コウジ酸、アルブチンと同様に、用量依存性が確認された (Fig. 2)。

3.3 メラニン生成抑制活性と細胞毒性

アセロゲニンのB16マウスメラノーマ細胞培養系での細胞毒性とメラニン生成抑制活性を検討した結果、アセロゲニンは0.5mM以下で増殖を阻害せず、1mMでわずかに増殖を阻害し、0.5mMで有意にメラニン生成を抑制した。このとき、アルブチンは、0.1mM以下で増殖を阻害せず、0.5mM以上で増殖を阻害し、0.1mMで有意にメラニン生成を抑制した。

3.4 活性画分の血管平滑筋弛緩作用

各抽出画分をラットより摘出したリング標本を用いて、ノルエビネフリン収縮に対する弛緩作用をその張力変化で測定した。その結果、各画分に血管平滑筋弛緩作用が観察された (Fig. 3)。

3.5 アセロゲニンの血管平滑筋弛緩作用

活性画分より単離したアセロゲニンをラットより摘出したリング標本を用いて、ノルエピネフリン収縮に対する弛緩作用をその張力変化で測定した。その結果、アセロゲニンは、ラット胸部大動脈由来の血管平滑筋のノルエピネフリンの収縮に対して内皮非依存性の弛緩作用を示した (Fig. 4)。また、アセロゲニンは、高濃度カリウムによる脱分極の収縮を阻害した (Fig. 5)。このことから、アセロゲニンの弛緩作用は、主に電位依存性カルシウムチャネルによる細胞外カルシウムの流入の阻害によるものと考えられた。

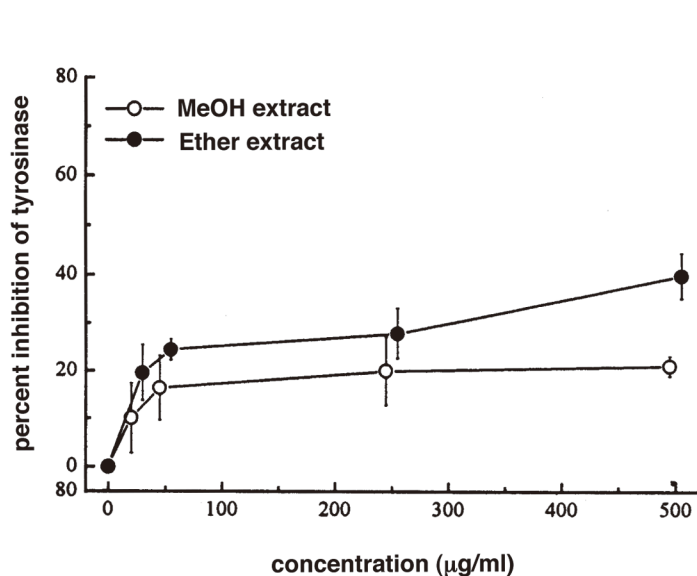


Figure 1 Inhibition of Tyrosinase by MeOH and Ether Extracts

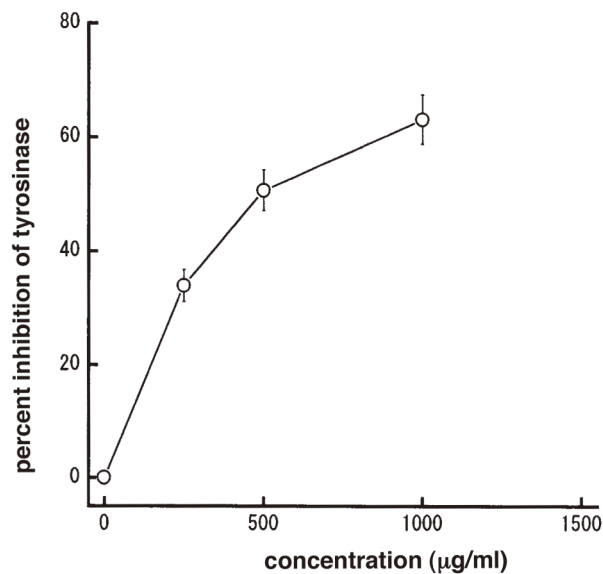


Figure 2 Inhibition of Tyrosinase by Acerogenins

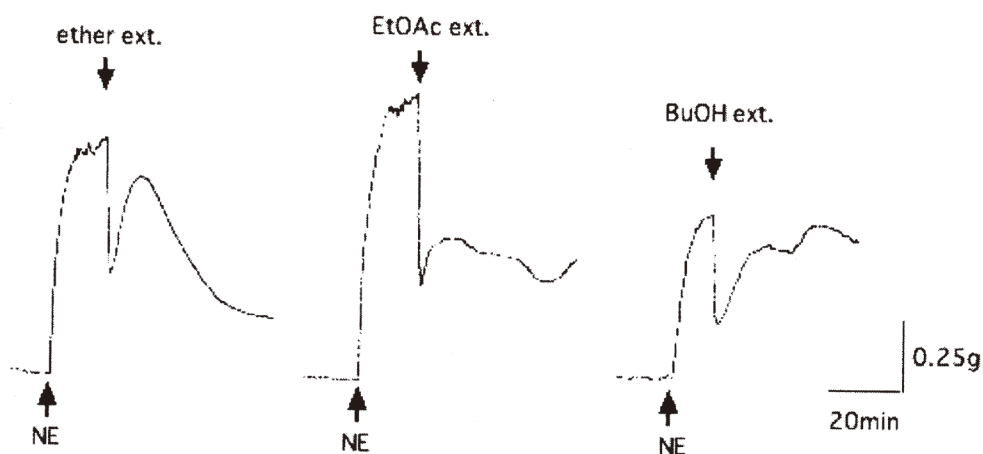


Figure 3 Typical Effects of Each Extract on the Aortic Rings Precontracted with 3×10^{-7} M Norepinephrine (NE).

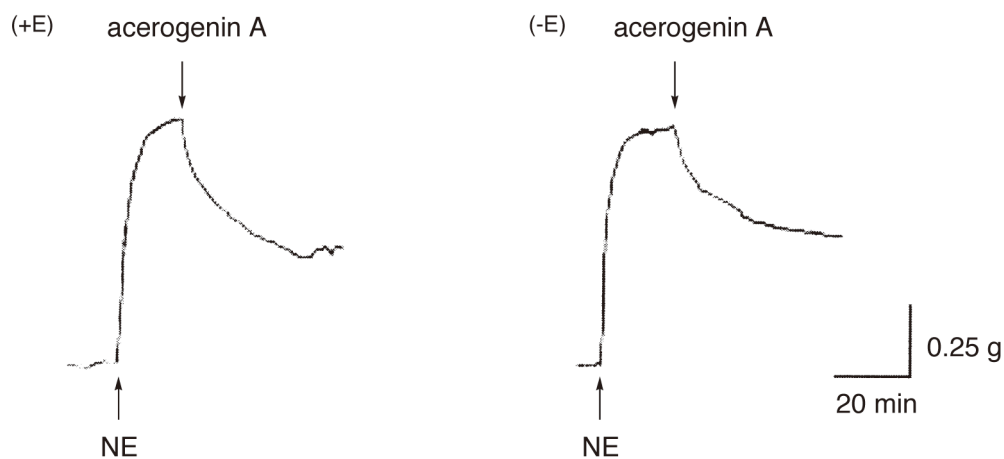


Figure 4 Relaxation responses induced by acerogenin A (3×10^{-7} M) on aortic rings with endothelium (+E) and without endothelium (-E) precontracted with 3×10^{-7} M norepinephrine (NE).

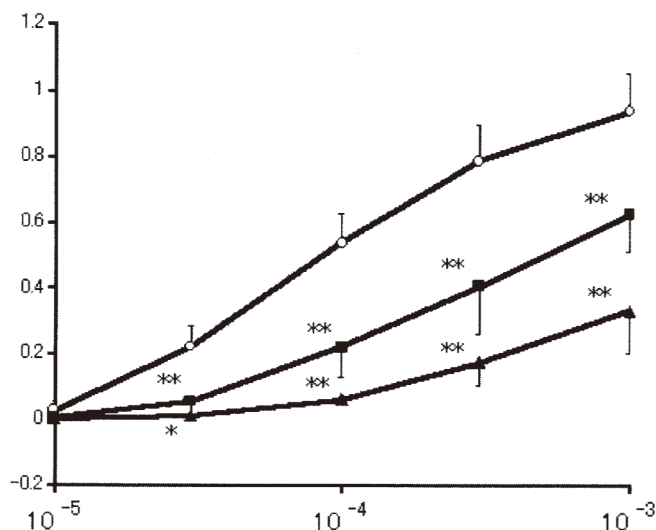


Figure 5 Concentration-Response Relationship for Contractile Responses of the Aortic Rings to Ca^{2+} in a Ca^{2+} -Free Medium Preincubated with High Potassium (60mM) ; Symbols : - ○ - control, - ■ - : acerogenin A (10^{-5}M), - ▲ - : acerogenin A ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) , Values are the mean $\pm$ S.E. (n = 4) . * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4. 考 察

メグスリノキは、カエデ科の *Acer nikoense* の樹皮を乾燥したもので、日本で民間薬として強壮あるいは目に有効な薬として服用されている。永井らにより、メグスリノキの樹皮より、特異な環状ジアリルヘプタノイド類をはじめとする様々な成分が明らかにされている¹⁾。また、近年、これらに環状ジアリルヘプタノイド類に、抗炎症、発ガンプロモータ抑制活性、NO 産生抑制活性などのさまざまな生物活性が報告されている²⁾。

今回、メグスリノキ由来のメタノール抽出物のエーテル可溶性画分およびこの画分のシリカゲルおよび ODS カラムクロマトグラフィーによる分画で得られた数種の画分にチロシナーゼ阻害活性が認められた。今回測定した画分のなかで最も活性が高かった画分は、アルブチンと同程度の活性を有することが分かった。これらの画分の TLC には、複数のスポットが検出され、アセロゲニン類が含有されることが分かった。

単離したアセロゲニンは、チロシナーゼ阻害活性を示し、アルブチンと同様に用量依存性が確認された。アセロゲニンの B16 マウスメラノーマ細胞培養系での細胞毒性とメラニン生成抑制活性を検討した結果、アセロゲニンはアルブチンより弱いながらメラニン生成を抑制した。また、このとき細胞毒性は示さなかった。

さらに、アセロゲニンの血管平滑筋弛緩作用をラットよ

り摘出したリング標本を用いて測定した。その結果、アセロゲニンは、ラット胸部大動脈由来の血管平滑筋のノルエピネフリンの収縮に対して内皮非依存性の弛緩作用を示した。

今後、高い活性が認められた画分よりアセロゲニンをはじめとする関連化合物の単離、同定を行い、得られた活性物質の構造を解明していく予定である。また、得られた活性物質の物性および各種誘導体を作成し、構造とチロシナーゼ阻害活性、血管平滑筋弛緩作用との関係についても検討していきたい。一方、メグスリノキの粗抽出エキスの細胞培養系での効果、安全性、安定性などを調べ、化粧品の素材としての可能性と応用性についても検討していく予定である。

(引用文献)

- 1) Nagai, M.; Kubo, M.; Fujita, M.; Inoue, T.; Matsuo, M. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1976**, 338-339; Inoue, T.; Ishidate, Y.; Fujita, M.; Kubo, M.; Fukushima, M.; Nagai, M. *Yakugaku Zasshi* **1978**, *98*, 41-46; Kubo, M.; Inoue, T.; Nagai, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 1300-1303.
- 2) Morikawa, T.; Tao, J.; Toguchida, I.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 86-91.
- 3) Nagai, M.; Noguchi, M.; Iizuka, T.; Otani, K.; Kamata, K. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 228-232.