



Studies on the utilization of plant materials as active ingredients for cosmetics

Kusakari, Ken

(Degree)

博士（農学）

(Date of Degree)

2014-09-25

(Date of Publication)

2015-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6226号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006226>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

論文内容・要旨

氏 名 草薙 健

専攻・講座 生命機能科学専攻・応用生命化学講座

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Studies on the utilization of plant materials as active ingredients for cosmetics

(植物素材の化粧品用薬剤としての利用に関する研究)

指導教員 杉本 幸裕

本学位論文は、化粧品用薬剤2素材の実用化に際して実施した、ミシマサイコ (*Bupleurum falcatum* L.) 培養根によるサイコサポニンの大量生産に関する組織培養学研究とリンドウ科植物 *Gentiana urnula* Harry Sm. の花由来の抗酸化成分に関する天然物化学研究をまとめたものである。本学位論文は以下の5つの部分からなる。

【Preface】

緒言として、化粧品用原料の中における化粧品用薬剤の位置付けや薬事上の制限等について述べた後、ミシマサイコおよび *G. urnula* が研究対象として選ばれた理由等について記述した。

ミシマサイコは局方に収載される漢方の要薬であり、サイコサポニン a (SSa)、サイコサポニン d (SSd)等のトリテルペノイド系サポニンやフィステロール類を含む。SSa と SSd からそれぞれ得られるサイコサポニン b₁ とサイコサポニン b₂ は皮膚線維芽細胞単層培養系において優れた増殖促進作用を示す他、真皮モデルと位置付けられる収縮コラーゲンゲル内において Cell-Matrix Contact Inhibition により引き起こされる線維芽細胞増殖抑制を緩和することも知られている。そこで抗老化剤への活用を目指して、サイコサポニンの大量生産に取り組んだ。

もう一つの素材である *G. urnula* はチベット医学で風邪などの治療に用いられる植物で、抗酸化剤の幅広いスクリーニングの中で選ばれたものである。

【Chapter 1】

本研究で確立したサイコサポニン大量生産法の根幹を成す、培地中の糖濃度の制御について記述した。糖は光合成能を持たない培養根の生育に必須の炭素源であるが、一般の植物組織培養用培地に最も多量に配合される成分でもあり、その影響は浸透圧をはじめ多岐にわたると考えられる。そこで糖濃度の影響を詳細に検討した。

培養開始時のショ糖濃度について IBA 4 mg/L を含む B5 基本培地を用いて検討したところ、通常用いられる濃度域 (2~3%) においてもミシマサイコ培養根の側根形成が濃度依存的に強く抑制され、初期の生育はショ糖 1%付近で最も良好であった。しかしショ糖 1%では側根形成した2週目以降に糖が不足し、培養8週目の最終的なサポニン生産量はショ糖 4%で最も高い結果となった (SSa と SSd の合計で約 200 mg/L)。

次に、培養開始時にショ糖 4%を添加する条件をコントロールとして、種々の添加方法を検討した。ショ糖濃度 1%で培養を開始して側根が形成された2週目に残りのショ糖 3%分を一度に添加するとサポニン生産量は約2倍となった。さらに培養2週目に添加するショ

糖の濃度を 6%まで高めたところ、高いサポニン含量を維持しながら根の収量が増大し、サポニン生産量はコントロールに比べ、約 4 倍に上昇した (SSa と SSd の合計で約 800 mg/L)。

以上のように、糖濃度を 2 段階に制御することにより、サイコサポニンの蓄積部位である側根の形成を効率化させ、最終的なサポニン生産量を飛躍的に増やすことができた。この内容は Plant Cell Reports, 19, 1115–1120, 2000 に掲載されている。

【Chapter 2】

本章では、前章に記載した成果を実用化するために実施したミシマサイコ培養根の大量培養に関する研究について記述した。植物懸濁培養細胞に比べて培養根は一般に互いに絡みあって大きな集塊を形成しやすく、通気や攪拌によるせん断ストレスを受けやすい。このような根の形態上の特徴はリアクター内で不均一な環境を生み、培養スケールアップを阻む一因になると考えられる。そこで根の培養に特有の問題を解決するために、培養全般に広く用いられる通気攪拌型リアクター、バブルカラムリアクター、エアリフトリアクター (10~200 L) の内部構造を改変することにより、ミシマサイコ培養根の大量培養とサイコサポニン生産の最適化を試みた。

攪拌羽根と培養スペースがステンレスメッシュで隔てられた改変通気攪拌型リアクター (10 L) では、発泡による培地の流出を避けるために通気攪拌条件は攪拌回転数 50 rpm、通気量 0.1 vvm と低い値に制限された。その結果、サイコサポニン生産量はフラスコ培養の場合の半分程度であった。一方、20 L バブルカラムリアクター培養の結果、微細な気泡を発生するセラミックスパージャーを用いることにより、攪拌羽根なしで良好な生育と高いサポニン生産量が得られた。しかし 200 L にスケールアップした場合、根は上部に浮上して円盤状の集塊を形成し通気攪拌が困難な状態となり、サポニン生産量は著しく低下した。根の浮上を避けるために通気部と培養部をメッシュ状のドラフトチューブと多孔板により仕切った改変エアリフトリアクターをデザインした。その結果、200 L スケールにおいて培養 8 週間で培地 1 L あたりサイコサポニン生産量 500~600 mg と高い生産性が達成された。

20 L のモデル装置を用い、培養根集塊の上下部間での差圧を測定したところ、通気量 0.5 vvm 時に約 0.5 kPa であった。この差圧は培地循環の推進力となるが、小さな差圧を効率よく利用する観点からも、根の局在化やバイパスの発生を防ぐことは極めて重要と考えられた。この内容は Journal of Bioscience and Bioengineering, 113, 99–105, 2012 に掲載されている。

【Chapter 3】

本章では、リンドウ科 *G. urnula* Harry Sm. の花由来の抗酸化成分に関する研究について記載した。*G. urnula* Harry Sm. (以下、本植物と云う) は中国西部からヒマラヤの高地に分布し、その花はチベット医学で伝統的に生薬「Gang-ga Chung」として用いられている。高山帯に自生する多くの植物をスクリーニングした結果、本植物の花に優れた抗酸化活性が認められた。本植物に含まれる成分に関して、Liu らによるイリドイド配糖体に関する報告 (1994) があるが、活性に関する研究はこれまでなされていない。そこで本植物に含まれる抗酸化成分の構造を明らかにすることを目的として研究を行なった。

本植物の花から得られたメタノールエキスを出発原料とし、DPPH 法による抗酸化活性を指標に分画した。はじめに溶媒分画法により粗分画した後、このうち活性が最も高かったブタノール画分を中圧 LC および分取 HPLC により精製し、3 種の単一化合物を得た。NMR および HR-MS 測定の結果、3 種ともに既知のイリドイド (Gentiournoside A、Gentiournoside E、Depressoside) でいずれもビタミン C に匹敵する高い抗酸化活性を示した。このうち、Depressoside は近縁種である *G. depressa* の全草から Chulia と Kaoudaji (1985) により単離・構造決定された化合物であるが、既報の構造に誤りがあることを見出し、構造訂正した。本化合物はスーパーオキシドラジカルを消去する SOD 様活性評価において、他の 2 化合物に比べて著しく高い活性を示した。構造を比較した結果、Depressoside の高い SOD 様活性にはピロガロール部分が寄与しているものと考えられた。

【Conclusion】

本章では本学位論文のまとめとして、得られた研究成果の意義等について記載した。サイコサポニンの大量生産に関する研究においては、ミシマサイコ培養根の増殖とサイコサポニンの蓄積に重要な側根の形成が糖濃度により強く阻害されることを見出し、糖濃度を 2 段階に制御した独自の培養法により、従来にない高いサイコサポニン生産量を達成した。この培養法については、一度の糖添加で簡単に実施可能な点、およびショ糖を用いた安全性の高い方法である点も特筆される。またバブルカラムリアクターを改変することにより根の局在化を抑制し、200 L スケールでのサイコ培養根の培養を可能にした。本技術を活用したエキ스는、サイコエキス BS として医薬部外品添加剤承認を受け、化粧品および医薬部外品 (主にスキンケア製品) に広く用いられている。中国化粧品既存原料リストにも収載されていることから、今後も幅広い活用が期待される。

一方、*G. urnula* の花由来の抗酸化成分の研究においては、主な抗酸化活性成分として既知のイリドイドを 3 種を単離した。NMR データを詳細に検討した結果、3 種の中で最も高い SOD 様活性を示した Depressoside の構造訂正に繋がった。このような基礎研究から

(氏名： 草苺 健 NO. 4)

得られる情報は、科学的根拠に基づいた情報が化粧品においてもより強く望まれる状況の中、今後より重要になると考えられる。

氏名	草苺 健		
論文 題目	Studies on the utilization of plant materials as active ingredients for cosmetics (植物素材の化粧品用薬剤としての利用に関する研究)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	杉 本 幸 裕
	副 査	教 授	滝 川 浩 郷
	副 査	准教授	水 谷 正 治
	副 査		
	副 査		

印

印

要 旨

化粧品は一般に油分・水・保湿剤・増粘剤・界面活性剤・香料・薬剤など数多くの原料で構成されるが、とりわけ薬剤は最終製品やそのブランドを特徴付ける重要な位置を占める。一方、「人体に対する作用が緩和なもの」と定義される化粧品の成分や訴求に関して、「医薬品成分の配合禁止」や「医薬品の訴求の禁止」など厳しい規制がある。このような制限の中、化粧品開発では魅力および特徴ある製品作りのために、皮膚科学研究や処方研究にとどまらない様々な方面から薬剤研究が積極的に行われている。学位申請者の草苺健は、2種の化粧品用オリジナル薬剤である *Buleurum falcatum* root extract 及び *Gentiana urnula* flower extract の開発に際して行った3つの研究を本論文にまとめている。Prefaceで化粧品原料における化粧品薬剤の位置づけ、薬剤開発上の課題、研究背景について説明した後、植物組織培養技術を用いたサイコサポニン大量生産研究について Chapter 1 と Chapter 2 に、*Gentiana urnula* の花由来の抗酸化成分研究について Chapter 3 に論述している。Conclusion では Chapter 1~3 を総括し、研究成果とその応用展開について論じている。

Chapter 1 にはサイコサポニン大量生産法の根幹を成す、培地中の糖濃度の制御によるサイコサポニンの高生産について論じている。*B. falcatum* (ミシマサイコ) の根は「サイコ」として局方に収載される漢方の要薬であり、saikosaponin-a (SSa)、saikosaponin-d (SSd) 等のサイコサポニン類やフィトステロール類を含む。SSa と SSd から弱い酸性処理等によりそれぞれ得られる saikosaponin-b₁ (SSb₁) と saikosaponin-b₂ (SSb₂) は皮膚線維芽細胞単層培養系において優れた増殖促進作用を示す他、真皮モデルと位置付けられる収縮コラーゲンゲル内において Cell-Matrix Contact Inhibition により引き起こされる線維芽細胞増殖抑制を緩和することも知られている。これらは SSa や SSd には無い、SSb₁ と SSb₂ に特有の効果であり、これらの効果から SSb₁ と SSb₂ の抗老化剤への活用が期待されている。一方、天然植物根中のサイコサポニン含量は個体差や地域差により大きくばらつくことが知られており、より安定で効率よい生産方法の確立が望まれていた。ミシマサイコ培養根を用いたサポニン生産については、培地中の窒素源の影響を検討した報告はあるが、生産量は約 100 mg/L と実生産には不十分と考えられた。一方、光合成能を持たない培養根の生育に必須の炭素源である糖の影響についてはミシマサイコに関する報告はなかった。そこで一般の植物組織培養用培地に最も多量に配合される成分である糖に着目し、培養条件の最適化に取り組んだ。

IBA 4 mg/L を含む B5 基本培地を用いて培養開始時のシヨ糖濃度について検討した結果、通常用いられる濃度域 (2~3%) においてもミシマサイコ培養根の側根形成が濃度依存的に強く抑制されることを見出した。初期の生育はシヨ糖 1% 付近で最も良好であったが、シヨ糖 1% では側根形成した 2 週目以降に糖が不足し、培養 8 週目の最終的なサポニン生産量はシヨ糖 4% で最も高い結果となった (SSa と SSd の合計で約 200 mg/L)。

次に、培養開始時にシヨ糖 4% を添加する条件をコントロールとして、種々の添加方法を検討した。シヨ糖 1% で培養を開始して側根が形成された 2 週目に残りのシヨ糖 3% 分を一度に添加すると、サポニン生産量は約 2 倍となった。さらに培養 2 週目に添加する糖濃度を 6% まで高めたところ、高いサポニン含量を維持しながら根の収量が増大し、サポニン生産量はコントロールに比べ、約 4 倍に上昇した (SSa と SSd の合計で約 800 mg/L)。以上のように、糖濃度を 2 段階に制御することにより、サイコサポニンの蓄積部位である側根の形成を早め、最終的なサポニン生産量を飛躍的に増やすことに成功した。

氏名	草苺 健
----	------

Chapter 2 では、Chapter 1 にて確立された糖濃度を 2 段階に制御する培養方法をベースにして、培養のスケールアップ研究、すなわち改変エアリフトリアクターによるサイコサポニンの大量生産について論じている。培養根は植物懸濁培養細胞に比べて互いに絡みあって大きな集塊を形成しやすく、通気や攪拌によるせん断ストレスを受けやすい。このような根の形態上の特徴はリアクター内で不均一な環境を生み、培養スケールアップを阻む一因になると考えられる。このような根の培養に特有の問題を解決するために、培養全般に広く用いられる通気攪拌型リアクター、バブルカラムリアクター、エアリフトリアクター (10~200 L) を使い、その内部構造改変の効果を検討した。

攪拌羽根と培養スペースがステンレスメッシュで隔てられた改変通気攪拌型リアクター (10 L) では、発泡による培地の流出が起こりやすく、通気攪拌条件は攪拌回転数 50 rpm、通気量 0.1 vvm と低い値に制限された。その結果、サイコサポニン生産量はフラスコ培養の場合の半分程度に留まった。一方、20 L バブルカラムリアクター培養の結果、微細な気泡を発生するセラミックスパージャーを用いることにより、攪拌羽根なしで良好な生育と高いサポニン生産量が得られた。しかし 200 L にスケールアップした場合、根は上部に浮上して円盤状の集塊を形成し通気攪拌が困難な状態となり、サポニン生産量は著しく低下した。根の浮上を避けるために通気部と培養部をメッシュ状のドラフトチューブと多孔板により仕切った改変エアリフトリアクターをデザインした。その結果、200 L スケールにおいて培養 8 週間で培地 1 L あたりサイコサポニン生産量 500~600 mg と高い生産性を達成した。

これに加えて、20 L のモデル装置を用いて、培養根集塊の上下部間での差圧や培地の流速について推定している。その結果、通気量 0.5 vvm 時に差圧は約 0.45 kPa で、下方への線流速は約 5.3 cm/min であった。この差圧は培地循環の推進力となるが、小さな差圧を効率よく利用する観点からも、根の局在化やバイパスの発生を防ぐことが極めて重要と考察している。

Chapter 3 ではリンドウ科 *G. urnula* Harry Sm. の花由来の抗酸化成分探索について論じている。*G. urnula* Harry Sm. は中国西部からヒマラヤの高地に分布し、その全草はチベット医学で伝統的に生薬「*Gang-ga Chung*」として風邪などの治療に用いられる。高山帯に自生する多くの植物をスクリーニングした結果、本植物の花に優れた抗酸化活性が認められたことから化粧品薬剤としての活用検討に着手した。本植物に含まれる成分に関して、イリドイド配糖体に関する報告はあったが、活性に関する研究はなかった。そこで薬剤の追加情報取得の一環として本植物に含まれる抗酸化成分を明らかにすることを目的として研究を行なった。

本植物の花から得られたメタノールエキスを出発原料とし、DPPH法による抗酸化活性を指標に分画した。溶媒分画法により粗分画した後、このうち活性が最も高かったブタノール画分を中圧LCおよび分取HPLCにより精製し、単一化合物3品を得た。NMRおよびHR-MS測定の結果、3品ともに既知のイリドイド

(gentiournoside A, gentiournoside E, depressoside) で、いずれもアスכולビン酸に匹敵する高いDPPHラジカル消去活性を示した。このうち、depressosideは*G. urnula*の近縁種である*G. depressa*の全草から単離・構造決定された化合物であるが、既報において各部分の構造は正しいものの、イリダン骨格の7位周辺の構造決定の誤りに起因する結合の誤りを見出した。その結果、depressosideの構造を6-β-(2,3-dihydroxyphenyl)-D-glucosyl 7-O-(2,3-dihydroxybenzoyl)-loganateと訂正した。Depressosideはスーパーオキシドラジカルを消去するSOD様活性評価において、他の2化合物に比べて著しく高い活性を示した。構造を比較した結果、depressosideの高いSOD様活性は2,3-dihydroxyphenyl基部分の寄与によるものと考えられた。

本研究で確立された糖の2段階制御によるサイコサポニンの高生産法は、ミシマサイコ培養根の生育過程において糖の至適濃度が著しく異なることを上手く利用した方法であり、優れた効果と実用性が高く評価できる。また、200 Lスケールでの培養を可能とする過程で得た培養槽の効果に関する知見は他の根の培養にも有用と考えられる。*G. urnula* の抗酸化成分探索については、depressosideの真の構造を解明した点が評価される。以上のように、本研究の成果は植物二次代謝産物について、基礎と産業上の活用の両面において重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって学位申請者の草苺健は、博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。