

## 57 種のビルマ伝統医薬抽出物のメラニン産生抑制作用

## Antimelanogenic effects of 57 spices of traditional Burmese medicines extracts in mouse B16 melanoma

蝦名宏大<sup>1</sup>, ○後藤正晴<sup>1</sup>, Nyunt Phay<sup>2</sup>, 仁科淳良<sup>1</sup>Kodai Ebina<sup>1</sup>, \*Masaharu Goto<sup>1</sup>, Nyunt Phay<sup>2</sup>, Atsuyoshi Nishina

Abstract: To date, many studies of natural materials on therapeutic effect of pigmentation disorders or skin stains by sunburn and freckles have been performed. In this study, antimelanogenic effects of newly prepared traditional Burmese medicines extracts were evaluated and it was tried to select utilizable materials. By comparison melanogenesis inhibition of 57 spices of traditional Burmese medicines extracts in mouse B16 melanoma, it was found that two spices of herbal medicine substantially inhibited melanogenesis with slight- or non-cytotoxicity. From now on, components from two spices that inhibit melanogenesis in mouse B16 melanoma will be identified and the mechanism of antimelanogenic effects by isolated components will be studied.

## 1. 目的

近年, 日焼けやシミ, ソバカスといった皮膚の色変化防止効果や色素異常症の治療効果を有する天然素材に関する多くの検討が行われている[1,2]. 一方, 表皮中のメラニンの生産および分散に起因する皮膚色素沈着は, 日照に対する主な生体防御機構でもある.

最近になって, われわれは, ミャンマーのパセイン大学と共同研究を開始し, ビルマ伝統医薬素材の入手が可能になった. 中国起源の漢方薬やインド起源のアーユルベータと比べて, ビルマ伝統医薬成分や効能の科学的な解明は進んでいない. 本研究では, 新規に入手したビルマ伝統医薬 57 種の抽出物のメラニン産生抑制作用を測定し, 有用な化合物を探索する対象となるターゲット生薬のリストアップを目的とした.

哺乳類のメラニン産生細胞 (メラノサイト) で, メラニンは, 小眼球症関連転写因子 (MITF) の発現と活性化によって調節される 3 つの主な色素酵素, チロシナーゼ, およびチロシナーゼ関連タンパク質 -1 (TRP-1), TRP-2 を含むメラノソーム内で合成される. また, メラニン産生は様々な細胞内シグナル伝達経路によって制御されることが明らかになっている. 本研究では, メラノサイトのモデルとして B16 メラノーマ細胞を用い,  $\alpha$ -MSH によりメラニンが産生される実験系にビルマ伝統医薬 57 種の抽出物を添加し, 各抽出物のメラニン産生抑制作用を比較した. また, 細胞毒性が低く, メラニン産生抑制作用が強い, すなわち実用化の可能性が認められた抽出物の MITF, チロシナーゼ, TRP-1, -2 に対する作用を測定して, 作用メカニズムの解明を行う予定である.

## 2. 実験材料と方法

- ・パセイン大学ニユン学長の好意により表 1 に示した 57 種のビルマ伝統医薬を入手した.
- ・生薬を裁断し, 粉碎後, 粉碎物 100g に対して 500ml のヘキサンを加えて, 一昼夜抽出した. 上澄と残渣をろ別し, 上澄はロータリーエバポレーターで乾燥して, ヘキサン抽出物とした.

Medicine	Part	Yield (%)		
		Hexane	ylaceta	Methano
English Name				
1 Annies lace	Roots	1.44	2.47	14.27
2 Bastard sandalwood	Stem	0.13	3.00	5.14
3 Bishop's weed lovage	Seeds	6.52	2.82	1.88
4 Black cumin	Seeds	22.59	3.78	8.19
5 Black hellebore	Roots	0.70	0.74	17.05
6 Black Pepper	Seeds	6.49	7.03	8.67
7 Chaulmoogra	Fruit	36.00	3.87	6.00
8 Cinnamon	Stem	1.29	1.68	13.92
9 Climbing lily	Roots	1.04	4.01	1.40
10 Cobra's saffron	Flower	6.52	5.45	10.18
11 Crab's claw ; Japan Wax	Fruit	0.21	7.66	53.52
12 Cumin	Seeds	5.07	1.81	3.28
13 Devils tree	Bark	3.09	0.22	3.62
14 Dill	Seeds	3.04	0.42	1.25
15 Dingy white	Solid	0.00	0.15	82.28
16 Drum stick	Bark	0.13	0.15	1.11
17 Emblic Myrobalan	Fruit	0.55	0.36	3.97
18 Fennel	Seeds	4.77	1.01	1.96
19 Physic nut	Seeds	11.34	0.38	2.28
20 Garden cress	Seeds	16.01	1.38	7.01
21 Ginger	Bulbs	2.78	2.90	4.87
22 Hara nut tree	Fruit	0.19	1.93	5.33
23 Heart Leaved moon	Stem	0.25	0.32	3.88
24 Heliotrope	Leaves	1.66	0.70	3.51
25 Gentiana kurroo Royle	Stem	6.77	2.57	5.71
26 Indian Birthwort	Leaves	0.39	0.54	3.51
27 Indian Cassia Lignea	Leaves , Bark	1.30	1.05	10.20
28 Indian Wild Pepper	Leaves	3.88	6.24	3.09
29 Jasmine	Flower	1.82	1.23	5.84
30 King of bitters	Stem,Leaves	0.66	1.58	6.22
31 Lesser galangal	Roots	0.68	1.02	3.42
32 Liquorice	Stem	0.30	2.61	13.93
33 Long Pepper	Stem	0.78	0.54	3.32
34 Musk root	Roots	6.17	3.23	5.83
35 Pagoda tree	Flower	1.92	4.33	8.50
36 Pricky Poppy	Flower	0.35	2.89	10.50
37 Purgative croton	Seeds	9.31	1.43	5.78
38 Red sandal wood	Stem	0.49	9.17	5.60
39 Lead Wort	Roots	0.22	2.86	11.88
40 Sandal wood	Stem	0.04	0.11	0.42
41 Small calthrops	Fruit	8.18	0.38	1.53
42 Star Flower	Flower	0.59	0.57	4.76
43 Three Leaved caper	Bark	0.30	0.39	0.65
44 Trumpet flower	Bark	0.09	2.00	3.78
45 Turmeric	Roots	5.00	6.64	9.38
46 Turmeric (Bitter)	Roots	3.97	2.59	2.42
47 Valerian	Bulbs	0.67	4.66	4.66
48 Wax Myrtle ; Bay Berry	Bark	0.16	2.15	27.14
49 Wax Myrtle ; Bay Berry	Bark	0.29	1.60	33.46
50 Ya-wo-mo	Stem	0.12	0.22	1.11
51 King of Bitters	leave	0.16	2.36	2.76
52 Gamon	bud	2.12	1.01	1.03
53 Indian Cork Tree	bark	0.09	0.94	1.15
54 Paramingnya Longispina	root	0.66	0.10	0.70
55 Hearte-leaved moon seed	bark	0.07	1.61	1.32
56 Long Pepper	fruit	1.97	1.24	1.49
57 Indian Pennywort Thyme	root	0.19	1.41	1.73

風乾した残渣に酢酸エチルを 500ml を加えて、ヘキサン抽出物と同様の方法で、酢酸エチル抽出物を調製した。同様の方法でメタノール抽出物を調製した。

- B16 細胞は DMEM (牛胎児血清 10%) を用いて、CO<sub>2</sub> 5%, 37 °C で培養した。
- 細胞毒性は MTT 法で細胞の生存率を測定して求めた。
- メラニン産生抑制作用の測定のため、24 穴マイクロプレートに B16 細胞を播種、培養し、終濃度 100 $\mu$ g/ml の生薬および  $\alpha$ -MSH(100 nM) を培地に添加し 96 時間培養した。培地を除去し、細胞を 10 % DMSO 2M NaOH 200  $\mu$ L で溶解した。メラニン産生量は、マイクロプレートリーダー (405nm) で吸光度を測定して算出した。
- メラニン産生関連タンパク質は、細胞ライセートを SDS ページで分離し、タンパク質を PVDF 膜にブロットした後、免疫染色により MITF, チロシナーゼ, TRP-1,2 そして  $\beta$ -actin を検出した。

### 3. 結果と考察

- 生薬抽出物の収量

各生薬のヘキサン, 酢酸エチル, メタノール抽出物の収量を Table 1 に示した。

- 生薬抽出物の細胞毒性とメラニン産生抑制作用

生薬抽出物の細胞毒性とメラニン産生抑制作用を Figure 1 に示した。57 種のビルマ伝統医薬のうち、No. 20 と 23 は細胞毒性が低く、参照化合物のアルブチン (100  $\mu$ g/ml のメラニン産生抑制率が 68.9%) よりもメラニン産生抑制作用が強いことがわかった。

以上の結果から、No. 20 または 23 中の含まれる物質を精製することにより、有望なメラニン産生抑制物質が得られる可能性が示唆された。一方、No. 20 と 23 は抽出物の状態で参照化合物のアルブチンよりも優れた作用が認められるので、未精製で実用化が可能であると判断できる。

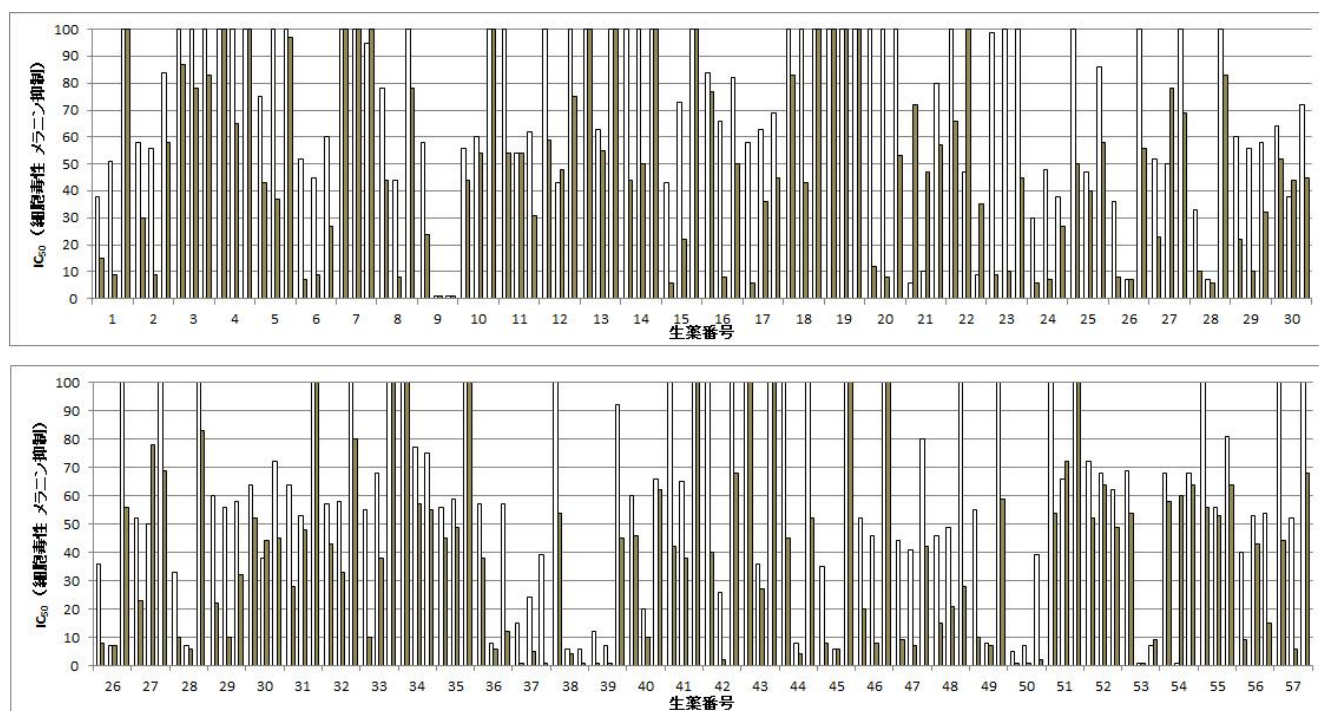


Figure 1. 57 種のビルマ伝統医薬抽出物のメラニン産生抑制作用 (黒棒) と細胞毒性 (白棒)

### 4. 参考文献

- [1] T. Morikawa, Y. Nakanishi, K. Ninomiya, H. Matsuda, S. Nakashima, H. Miki, Y. Miyashita, M. Yoshikawa, T. Hayakawa, O. Muraoka, Dimeric pyrrolidinoindoline-type alkaloids with melanogenesis inhibitory activity in flower buds of *Chimonanthus praecox*, *J Nat Med* 68 (2014) 539-549.
- [2] H.M. Chiang, Y.C. Chien, C.H. Wu, Y.H. Kuo, W.C. Wu, Y.Y. Pan, Y.H. Su, K.C. Wen, Hydroalcoholic extract of *Rhodiola rosea* L. (Crassulaceae) and its hydrolysate inhibit melanogenesis in B16F0 cells by regulating the CREB/MITF/tyrosinase pathway, *Food Chem Toxicol* 65 (2014) 129-139.