

サラシア (*Salacia reticulata*) のマウス耳介皮膚における抗炎症作用

芳野恭士*¹、近藤郁美子¹、金高 隆²、古賀邦正³

¹ 沼津工業高等専門学校 物質工学科 (〒410-8501 沼津市大岡 3600)

² 株式会社盛光 (〒411-0931 静岡県駿東郡長泉町東野 50-6)

³ 東海大学 開発工学部 (〒410-0395 沼津市西野 317)

*k-yoshino@numazu-ct.ac.jp

Anti-inflammatory Effect of *Salacia reticulata* on Mouse Ear Skin

Kyoji YOSHINO, Fumiko KONDOH, Takashi KANETAKA, Kunimasa KOGA

¹ Numazu College of Technology (3600 Ooka, Numazu, Shizuoka 410-8501, Japan)

² Seiko Co., Ltd (50-6 Higashino, Nagaizumi, Shizuoka 411-0931, Japan)

³ Tokai University (317 Nishino, Numazu, Shizuoka 410-0395, Japan)

(Received May 23, 2014; Accepted July 8, 2014)

Abstract

In this study, the inhibitory effects of water extracts prepared from the leaves and stems of *Salacia reticulata* on dermatitis were investigated by using a simple dermatitis model of arachidonic acid-induced mouse ear edema. Percutaneous administration of the extracts of leaves and stems at a dose of 0.2 mg/ear prevented the inflammation of mouse ear skin. Phenolic components in these extracts, mangiferin, (-)-epicatechin, and (-)-epigallocatechin, tended to inhibit mouse ear edema. Some antioxidants, iron chelators, lipoxygenase inhibitors, cyclooxygenase inhibitors, superoxide anion radical scavengers, and/or polyphenols having these functions also prevented mouse ear edema. Therefore, the phenolic components could contribute to the effects of the extracts prepared from the leaves and stems of *S. reticulata*. These results suggest that water extracts prepared from *S. reticulata* are natural components of cosmetics that are effective for preventing skin inflammation.

Keywords: *Salacia reticulata*, Skin inflammation, Mouse, Antioxidant

1. 緒言

サラシア属植物は、東南アジアやブラジル等の熱帯から亜熱帯地域に分布するデチンムル科のつる性の植物であり、*Salacia reticulata* や *S. oblonga* など多くの種が知られている。インドやスリランカでは、伝統医学を伝えるアーユルベーダで紹介されているハーブの一つであり、古くからその根あるいは幹が、主に糖尿病の初期治療等に使用されてきた[1]。また、スリランカでは *S.*

reticulata の根などが、民間薬として淋病や皮膚病に用いられてきた[2]。これらの疾病や糖尿病の合併症に共通する症状に炎症があり、サラシア属植物には抗炎症作用があることが期待される。実際、*S. reticulata* の葉や幹、*S. oblonga* の根に、接触皮膚炎抑制作用[3]、リウマチ性関節炎抑制作用[4] およびカラゲニン誘発ラット踵浮腫等に対する抑制作用[5]があることが明らかになっている。

本研究では、*S. reticulata* の葉および幹水抽出物

の化粧品への利用を目指し、アラキドン酸を起炎物質としたマウスの耳介皮膚炎モデルにおけるそれらの抗炎症作用を検討した。また、種々の抗酸化剤について、本皮膚炎モデルに対する効果を検討した。

2. 実験

2.1 試料およびその調製

試料は、スリランカ産 *S. reticulata* の葉と幹の乾燥物を、フードミルを使って微粉碎したものをを用いた。これに9倍量の水を加え、50°C、1時間振盪抽出した後、10°C、1,800×gで20分間遠心分離を行い、その上清を凍結乾燥することでそれぞれの水抽出物を得た。

2.2 実験動物

本実験には、日本 SLC 社より購入した6週齢の雄性 ICR 系マウスを用いた。マウスは、12時間間隔で照明が点灯・消灯する25°Cの部屋で飼育し、実験中は水道水と実験動物用標準飼料を自由に摂取させた。実験の全期間を通じて、実験動物の取り扱いは、「沼津工業高等専門学校における動物実験に関する指針」の規定に従った。

2.3 マウス耳介皮膚炎に対する *S. reticulata* の抑制作用の測定

耳介皮膚炎の誘発試薬として、20%(w/v)アラキドン酸/アセトン溶液を用いた[6]。この溶液を、マウス右耳介の表裏に各10 μL、計20 μL塗布した。塗布から1時間後に、マウスの両耳介を直径5.0 mmの円形にパンチで打ち抜き、右耳介と左耳介の重量(それぞれWR、WLとする)を測定して次式より耳介肥厚率を算出した。

$$\text{耳介肥厚率 (\%)} = \frac{\{(WR_{\text{試料}} - WL_{\text{試料}}) / WL_{\text{試料}}\}}{\{(WR_{\text{炎症}} - WL_{\text{炎症}}) / WL_{\text{炎症}}\}} \times 100.$$

また、心臓採血により調製した血漿について、前炎症性サイトカインであるインターリューキン

-12 (IL-12) およびインターフェロン-γ (IFN-γ) のレベルを、ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) 法により測定した。

試料を経皮投与する場合は、*S. reticulata* の葉および幹水抽出物では0.05、0.1、0.2または0.4 mg/耳介の投与量を、マンギフェリンでは0.05または4.0 μg/耳介の投与量を、(-)-エピカテキン (EC) と(-)-エピガロカテキン (EGC) ではそれぞれ0.46または0.62 μg/耳介の投与量を用いた。各試料は、それぞれの投与量となるようにアラキドン酸溶液に溶解し、マウス耳介に塗布した。各群のマウスは6匹とした。

2.4 マウス耳介皮膚炎に対する各種抗酸化剤の抑制作用の測定

前項と同様の方法により、14種類の抗酸化剤のマウス耳介皮膚炎に対する抑制作用を検討した。抗酸化剤は0.13 mg/耳介の投与量で経皮投与した。抗酸化剤としては、バソフェナントロリンスルホン酸、デフェロキサミンメシレート、(-)-エピガロカテキンガレート (EGCG)、ケンフェロール、プロトカテキン酸、エルゴステロール、ハイドロコーチゾン、イブプロフェン、フェニドン、L-ヒスチジン、β-カロテン、安息香酸ナトリウム、チオ尿素、トロロックスを用いた。また、酸化促進剤として塩化第二鉄を用いた。各群のマウスは5匹とした。

2.5 統計処理

実験データは、平均値±標準誤差で表した。各群間の平均値の差の検定には、一元配置分散分析法とTukeyの多重比較法を用い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

3. 結果および考察

3.1 マウス耳介皮膚炎に対する *S. reticulata* 水抽出物の経皮投与による抑制作用

動物の体内で炎症が起こる際、傷ついた細胞の細胞膜由来のアラキドン酸を基質として、シクロ

オキシゲナーゼ (COX) やリポキシゲナーゼ (LOX) 等の酵素による酸化反応でプロスタグランジン類やロイコトリエン類が生成する。これらの化合物はマクロファージや単球などの免疫細胞を遊走するため、激しい炎症が誘発されることになる。アラキドン酸をマウスの耳介などに塗布した場合にも、同様に炎症が誘発され[7]、この炎症モデルではプロスタグランジンの関与が大きいため COX 活性阻害剤でより効果的な抑制作用が見られるとされている[8]。

まず、アラキドン酸誘発のマウス耳介皮膚炎に対する、*S. reticulata* の葉および幹水抽出物の経皮投与による抑制作用を検討した。アラキドン酸を塗布しなかった群ではマウスの耳介に浮腫は認められなかったが、アラキドン酸を塗布したコントロール群では強い浮腫が発症した。図1に示すように、*S. reticulata* の葉および幹水抽出物を経皮投与したところ、マウス耳介皮膚炎を投与量依存的に抑制する傾向が見られた。特に、葉および幹の水抽出物ともに、0.2 mg/耳介の投与量で有意な効果が認められた。

マウス血漿中の前炎症性サイトカインのレベルを測定した結果を、図2および図3に示す。マ

ウス血漿中の IL-12 レベルは、健常群と比較してコントロール群での上昇は見られなかった。接触皮膚炎によるマウス耳介浮腫モデルの場合には、その血清中の IL-12 レベルは上昇する[3]。従って、アラキドン酸による耳介皮膚炎は、1型ヘルパーT細胞 (Th1 細胞) の活性化を介さないものであることが確認できた。*S. reticulata* の葉の水抽出物の経皮投与では、マウス血漿中の IL-12 レベルに有意な変動は見られなかったが、幹の水抽出物では 0.1 mg/耳介および 0.2 mg/耳介の投与量で有意な低下が見られた。一方、アラキドン酸誘発皮膚炎を発症したコントロール群のマウスの血漿中 IFN- γ レベルは、健常群よりも有意に上昇した。これは、活性化されたマクロファージ等による分泌が原因と推測される。*S. reticulata* の葉および幹の水抽出物の経皮投与では、マウス血漿の IFN- γ レベルの低下作用が見られたが、その効果に投与量に対する明確な依存性は認められなかった。

S. reticulata の葉や幹には、抗酸化作用を持つフラボノイド類のマンギフェリン、カテキン類の EC や EGC が含まれていることが知られている[9]。また、これらの成分は、接触皮膚炎によるマウス耳介浮腫に対する *S. reticulata* の葉および幹の水

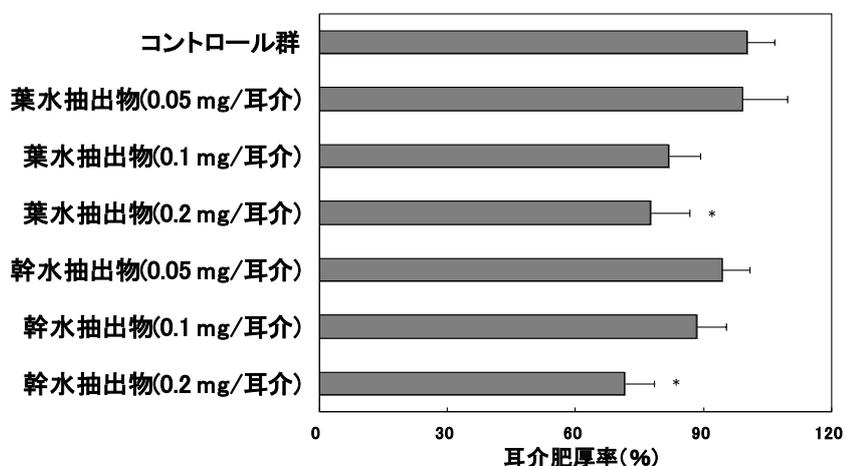


図1 *S. reticulata* の葉および幹水抽出物の経皮投与によるマウス耳介皮膚炎抑制作用
コントロール群との有意差; * $P < 0.05$.

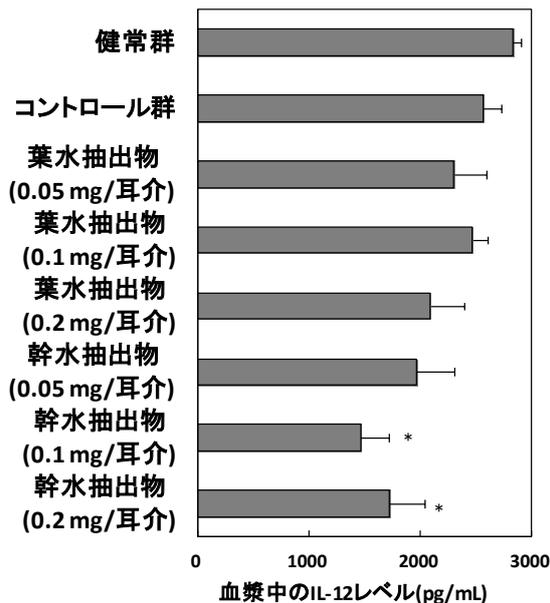


図2 *S. reticulata*の葉および幹水抽出物を投与した耳介皮膚炎マウスの血漿中のIL-12レベルコントロール群との有意差;*P<0.05.

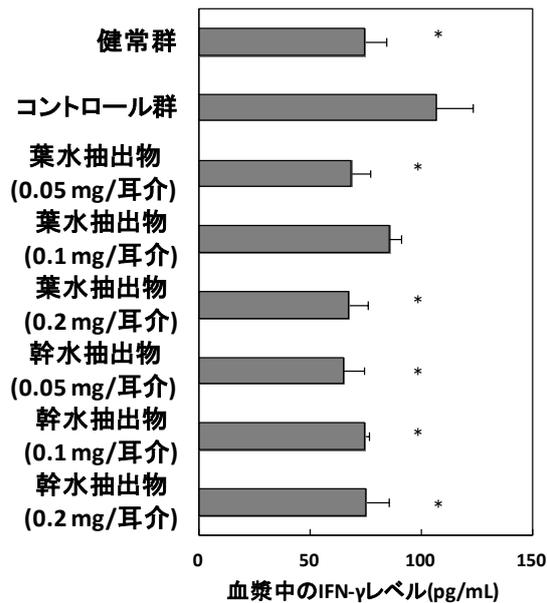


図3 *S. reticulata*の葉および幹水抽出物を投与した耳介皮膚炎マウスの血漿中のIFN-γレベルコントロール群との有意差;*P<0.05.

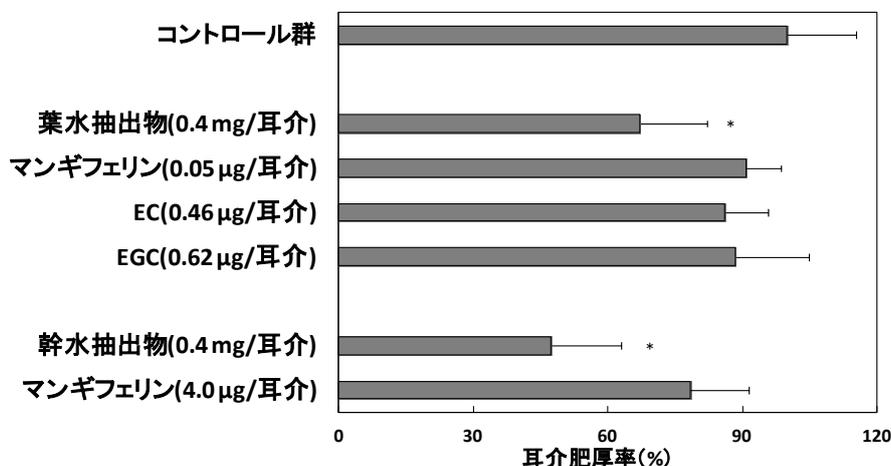


図4 *S. reticulata*の葉および幹水抽出物含有ポリフェノール成分の経皮投与によるマウス耳介皮膚炎抑制作用コントロール群との有意差;*P<0.05.

抽出物の抑制作用に、一部関与しているものと考えられる[3]。そこで、マンギフェリン、EC、EGCを葉および幹水抽出物 0.4 mg/耳介の投与量に含まれる量で経皮投与し、マウス耳介皮膚炎に対する抑制作用を検討した。*S. reticulata*の葉および幹水抽出物についても、0.4 mg/耳介の投与量で経皮投与した。その結果を図4に示す。*S. reticulata*の葉および幹水抽出物のいずれにおいても、0.4 mg/

耳介の投与量で有意な耳介皮膚炎の抑制作用を示した。葉水抽出物においては、3種のポリフェノール成分が示す抑制率の合計は葉水抽出物 0.4 mg/耳介が示す抑制率とほぼ同程度であった。今後、これらの成分の相加効果について検証する必要がある。幹水抽出物においては、マンギフェリンの示す抑制率は抽出物の41.1%に相当した。

以上の結果より、*S. reticulata*の葉や幹の水抽出

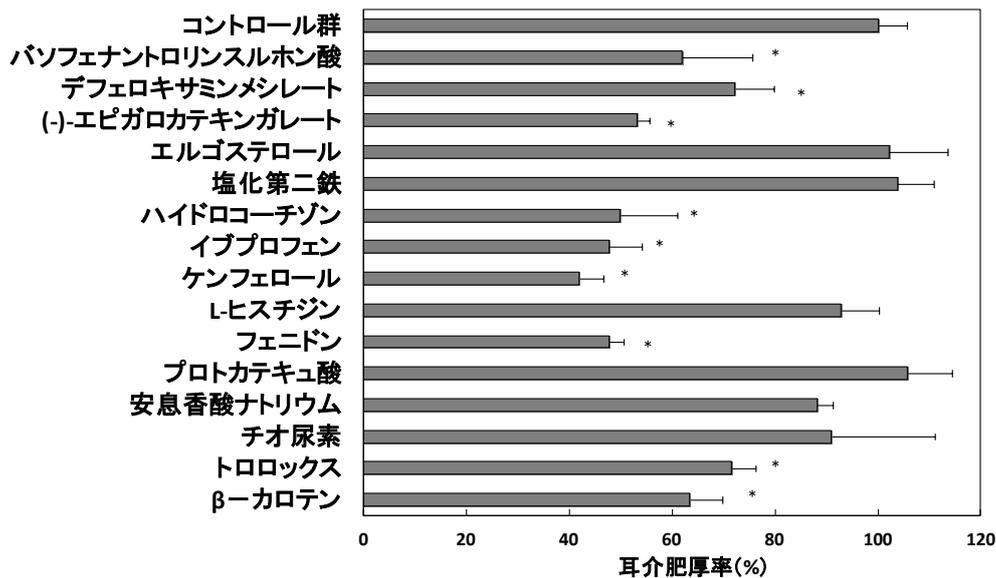


図5 各種抗酸化剤の経皮投与によるマウス耳介皮膚炎抑制作用
コントロール群との有意差; *P<0.05.

物が示すマウス耳介皮膚炎抑制作用の一部には、そのポリフェノール成分が関与していることが示唆された。ポリフェノール類には、マクロファージ等の免疫細胞による前炎症性サイトカイン類の産生、分泌に対する抑制作用があることも知られている[10]。

3.2 マウス耳介皮膚炎に対する各種抗酸化剤の経皮投与による抑制作用

使用した 14 種類の抗酸化剤を大まかにその作用あるいは化学構造ごとに分類すると、以下のようなになる。鉄キレート作用を示すものとして、パントテン酸とデフェロキサミンメシレートを用いた。ポリフェノール構造を有するものとして、EGCG、ケンフェロール、プロトカテキュ酸を用いた。ステロール構造を有するものとして、エルゴステロールを用いた。LOX 活性阻害作用を示すものとして、ハイドロコチゾンを用いた。COX 活性阻害作用を示すものとして、イブプロフェンを用いた。LOX 活性と COX 活性の両方を阻害するものとして、フェニドンを用いた。スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉作用を示すものとして、

L-ヒスチジンとβ-カロテンを用いた。ヒドロキシラジカル捕捉作用を示すものとして、安息香酸ナトリウムとチオ尿素を用いた。一般的なラジカル捕捉剤としてトロロックスを用いた。

これらの抗酸化剤について、マウス耳介皮膚炎に対する抑制作用を検討した。結果を図 5 に示す。コントロール群に対して有意な耳介皮膚炎抑制効果を示したのは、鉄キレート作用を示すパントテン酸とデフェロキサミンメシレート、ポリフェノール構造を有する EGCG とケンフェロール、COX 活性阻害作用を示すハイドロコチゾン、LOX 活性阻害作用を示すイブプロフェン、LOX 活性と COX 活性の両方を阻害するフェニドン、スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉作用を示すβ-カロテン、一般的な水溶性ラジカル捕捉剤であるトロロックスであった。ポリフェノール構造を有する EGCG やケンフェロールには、鉄キレート作用[11]、LOX 活性や COX 活性の阻害作用[12]、スーパーオキシドアニオンラジカル捕捉作用[11]等が報告されており、効果を示した他の抗酸化剤と同様の作用を持つ。従って、本マウス耳

介皮膚炎モデルには、これらの作用を持つ抗酸化剤が有効であり、*S. reticulata* の葉および幹水抽出物中のポリフェノール成分についても、その抗炎症作用にこれらの抗酸化作用が関与していることが考えられる。これらの抗酸化剤の多くには、マウスの接触皮膚炎を抑制する効果も認められている[3]。なお、本実験では酸化促進剤として用いた塩化第二鉄の投与では、著しい炎症の促進は認められなかった。

4. まとめ

本研究では、スリランカ産 *S. reticulata* の葉および幹の水抽出物について、アラキドン酸誘発のマウス耳介皮膚炎に対する抑制作用を検討し、それぞれ0.2 mg/耳介の経皮投与で有意な効果を認めた。従って、*S. reticulata* の葉および幹水抽出物は、化粧水等の化粧品に添加することで皮膚の炎症を抑制するのに有効な天然素材であることが期待できる。また、これらの抽出物のポリフェノール成分であるマンギフェリン、EC、EGC を、それぞれの抽出物 0.4 mg/耳介の投与量に含まれる量で経皮投与したところ、耳介皮膚炎が抑制される傾向が見られた。従って、これらポリフェノール成分が *S. reticulata* の葉および幹水抽出物の皮膚炎抑制作用の一部に寄与しているものと考えられる。

参考文献

- 1) 吉川雅之, 薬用植物の糖尿病予防成分 医食同源の観点から. 化学と生物, vol.40, pp.172-178 (2002).
- 2) 吉川雅之, *Salacia* 属植物の生物活性成分. 第1回サラシア属植物シンポジウム講演要旨集, pp.2-9 (2008).
- 3) 芳野 恭士, 宮本潤基, 間部涼祐, 近藤郁美, 善養寺優香, 金高 隆, 古賀邦正, *Salacia reticulata* のマウス接触皮膚炎抑制作用. 技術・教育研究論文誌, vol.19, pp.51-61 (2012).
- 4) Y. Sekiguchi, H. Mano, S. Nakatani, J. Shimizu, M. Wada, Effects of the Sri Lankan medicinal plant, *Salacia reticulata*, in rheumatoid arthritis. *Genes Nutr.*, vol.5, pp.89-96 (2010).
- 5) T.S. Ismail, S. Gopalakrishnan, V.H. Begum, V. Elango, Anti-inflammatory activity of *Salacia oblonga* Wall. and *Azima tetraacantha* Lam., *J. Ethnopharmacol.*, vol.56, pp.145-152 (1997).
- 6) K. Yoshino, T. Kawaguchi, K. Yamazaki, M. Sano, Preventive effects of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate on mouse type IV allergy induced by oxazolone and its antiinflammatory activities. *J. Technology and Education*, vol.17, pp.57-65 (2010).
- 7) J.M. Young, D.A. Spires, C.J. Bedord, B. Wagner, S.J. Ballaron, L.M. De Young, The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.*, vol.82, pp.367-371 (1984).
- 8) E.E. Opas, R.J. Bonney, J.L. Humes, Prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse ears inflamed by arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.*, vol.84, pp.253-256 (1985).
- 9) 吉川雅之, 西田典永, 下田博司, 高田美紀, 河原有三, 松田久司, *Salacia* 属植物のポリフェノール成分: α -グルコシダーゼ及びアルドースレダクターゼ阻害活性成分, Mangiferin, の定量分析. 薬学雑誌, vol.121, pp.371-378 (2001).
- 10) B. Powell, S. Crouvezier, D. Keir, P. Yaqoob, The effects of phenolic compounds of tea on the production of inflammatory cytokines in human whole blood cultures. *Proc. Nutr. Soc.*, vol.60, p.36A (2001).
- 11) 芳野恭士, 杉浦由佳, 篠原千恵, 廣田雅恵, フェノール化合物の抗酸化作用の測定と定量

法に関する研究. 技術・教育研究論文誌,
Vol.11, No.2, pp.59-70 (2004).

- 12) J. Hong, T.J. Smith, C.T. Ho, D.A. August, C.S. Yang, Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and

lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochem Pharmacol.*, vol.62, pp.1175-1183 (2001).