

サラシア属植物 (*Salacia reticulata*) のメラニン形成抑制作用

芳野恭士*¹、小關元気¹、鈴木 百¹、善養寺優香¹、芳野文香¹、古賀邦正²、金高 隆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東海大学 開発工学部 (〒410-0395 沼津市西野 317)

³株式会社盛光 (〒411-0931 静岡県駿東郡長泉町東野 50-6)

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

Preventive Effect of *Salacia reticulata* on Formation of Melanin

Kyoji YOSHINO¹, Genki KOSEKI¹, Momo Suzuki¹, Yuka ZEN-YOJI¹,

Ayaka YOSHINO¹, Kunimasa KOGA², Takashi KANETAKA³

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

²Tokai University (317 Nishino, Numazu, Shizuoka 410-0395, Japan)

³Seiko Co., Ltd (50-6 Higashino, Nagaizumi, Shizuoka 411-0931, Japan)

(Received September 14, 2018; Accepted October 26, 2018)

Abstract

The inhibitory effects of a *Salacia* plant, *Salacia reticulata*, on the production of melanin in the skin were investigated using in vitro and in vivo evaluation systems. Aqueous extracts prepared from the leaves and stems of *S. reticulata* inhibited the activities of tyrosinase in vitro, and the actions were stronger than that of the extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). The inhibitory effect of *Salacia* leaf and stem extracts on tyrosinase activity would be of an uncompetitive type. Several known polyphenolic components in *Salacia* leaf and stem extracts could not contribute sufficiently to their actions. In in vivo study, the ingestion of solutions of *Salacia* leaf and stem extracts and/or administration of the ointment including *Salacia* leaf extract to mice irradiated with ultraviolet B (UVB) tended to suppress elevations of melanin-like pigments and oxidative stress in their skin tissues. These results suggest that *Salacia* leaf and stem extracts are expected to suppress brownish pigmentation of the skin due to increased melanin pigment.

Keywords: *Salacia reticulata*, Melanin, Tyrosinase, Mouse, Skin, Oxidative stress

1. 緒言

サラシア属の植物は、Hippocrateaceae 科のつる性の植物で、東南アジアや南米等の熱帯から亜熱帯地域に広く分布している。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タに記載されている植物で、*Salacia reticulata* や *S. oblonga*,

S. chinensis など多くの種が知られている。このうち、*S. reticulata* の根皮には種々の細菌やカビに対する抗菌作用が認められており [1]、その葉にはリウマチ性関節炎抑制作用 [2] が、また、*S. oblonga* の根にはカラゲニン誘発ラット踵浮腫等に対する抑制作用 [3] があることが知られている。我々も

これまでに、*S. reticulata* の葉や幹にオキサゾロン誘発マウス耳介接触皮膚炎[4]やアラキドン酸誘発マウス耳介皮膚炎[5]に対する抑制作用があることを報告してきた。*S. reticulata* の葉や幹が示す抗炎症作用の機序の一つには、その抗酸化作用が考えられる[6,7]。このようなサラシア属植物の作用は、皮膚における炎症性障害の抑制に寄与する可能性がある。

紫外線による暴露は、皮膚に対して炎症を含む様々な障害を引き起こす[8]。そのうち、メラニン色素の形成と蓄積は、皮膚老化症状の一つである表皮の褐色化に関与する。平成 26 年の総務省の統計によると、日本の総人口の 25.9%を 65 歳以上の高齢者が占めている。高齢化が進む中、皮膚を含む老化症状を抑制し老後の健康を維持することは、生活の質を向上させる上で重要な課題である。そこで本研究では、*S. reticulata* の葉や幹の水抽出エキスの皮膚の褐色化を阻害する効果として、メラニン色素の形成抑制作用を検討した。

2. 実験

2. 1 サラシア葉および幹エキスの調製

サラシア属植物の葉または幹の微粉碎物に 9 倍量の水を加え、50°C、1 時間振盪抽出した。抽出物を 10°C、4000rpm、20 分間遠心分離した後、その上清を凍結乾燥させてエキスを得た。収量は葉で約 17%、幹では約 6%であった。サラシア属植物の試料については、(株)盛光より供与されたスリランカ産 *S. reticulata* のものを用いた。同様の方法で、ローズマリー (*Rosmarinus officinalis*) の葉および緑茶 (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) のエキスも調製した。それぞれの収量は、約 11%と約 18%であった。

2. 2 チロシナーゼ活性阻害作用の測定 [9]

0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.5) 5.0 mL、2.5 mM L-ドーパ水溶液 2.0 mL、ジメチルスルホキシド (DMSO) 0.25 mL、被験試料溶液 1.0 mL を混合

し、25°Cで 25 分間保温した後、シグマ社製マッシュルーム由来チロシナーゼ酵素溶液 (134 unit/0.25 mL) 0.25 mL を加えて振盪した。5 分後に生成したドパクロムの量を 475 nm における吸光度として測定した。被験試料はサラシア葉および幹エキス、比較対照としてローズマリー葉エキス、緑茶エキス、和光純薬工業社製ヒドロキノン、同社製(-)-エピガロカテキンガレート (EGCG) を用いた。チロシナーゼ活性に対する阻害率は、下式を用いて算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{OD}_{\text{試料有}} - \text{OD}_{\text{試料有酵素無}}}{\text{OD}_{\text{試料無}} - \text{OD}_{\text{試料無酵素無}}} \right)$$

OD: Optical Density (吸光度)

得られた阻害率と使用した試料の濃度の関係から、それぞれの試料について 50%阻害濃度 (IC₅₀ 値) を算出した。また、サラシア葉および幹エキス、EGCG について、基質である L-ドーパの濃度を変化させ、ラインウェーバー・バークプロット [10]を作成し酵素反応速度論的パラメータの変化を観察することで、それぞれの試料のチロシナーゼ活性に対する阻害形式を検討した。

別に、反応液中の終濃度でサラシア葉エキス 0.563 mg/mL、シグマ社製マンギフェリン 0.0732 μg/mL、和光純薬工業社製(-)-エピカテキン (EC) 0.642 μg/mL、同社製(-)-エピガロカテキン (EGC) 0.873 μg/mL、これらの濃度でのマンギフェリン、EC、EGC の混合物、サラシア幹エキス 3.362 mg/mL、マンギフェリン 0.0336 mg/mL のそれぞれの試料について、その阻害率を測定した。

これら *in vitro* における実験のデータは、それぞれ 3 回の実験における平均値あるいは平均値 ± 標準偏差で表した。

2. 3 マウス背部皮膚への紫外線照射実験

6 週齢の雄性 ddY 系マウスを用い、12 時間間隔で消灯、点灯する部屋で飼育し、飼育中は水道水または試料溶液を自由に摂取させた。実験動物の扱いは、「沼津工業高等専門学校における動物実

験に関する指針」に従った。

ペントバルビタール麻酔下で、マウスの背部を1辺が約3cmの四角となるように剃毛した。浜松ホトニクス社製紫外線 (UV) スポット光源 LC-5 を用いて、マウス剃毛部の皮膚に UVB 波 (UVB) を $0.8 \text{ mW/cm}^2 \times 8$ 分間 (0.384 J/cm^2) 照射した。マウスへの紫外線照射は、実験 1, 3, 5 日目に行い、その後 18 日目まで飼育した。別に、UV を照射しないマウス、UV を照射し試料を投与したマウスも用意した。1 群のマウス数は 3 とした。マウスをペントバルビタール麻酔下で屠殺し、背部の皮膚を採取した。マウスにおける UVB 照射による背部皮膚色素沈着実験の条件は、Ito ら[11]の方法に従った。

試料の投与と皮膚の分析は、以下のように行った。

実験 1：サラシア葉および幹エキスの飲用

サラシア葉または幹エキスの 0.01% 水溶液を調製し、18 日間の飼育期間中、水道水の代わりにマウスに自由に摂取させた。別に、水道水を自由摂取させたマウスも用意した。採取したマウスの皮膚に 25mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH7.6) を 4 倍容加え、アズワン社製 AHG-160A 型ホモジナイザーでホモジナイズした。10000rpm で 10 分間遠心分離して、その上清を採取した。この上清 600 μL に水 200 μL を加えて、37°C で 3 時間インキュベートした後、405 nm および 490 nm における吸光度を測定することでメラニン様色素レベルを評価した。また、上清中の過酸化脂質レベルをチオバルビツール酸法で測定し、マロンジアルデヒド相当量として算出した[12]。

実験 2：サラシア葉エキス含有軟膏の塗布

サラシア葉エキスの 20.8 mg を含有する軟膏を調製し、3 回の UV 照射の直前にマウスの背部皮膚に塗布した。別に、軟膏基剤 (流動パラフィンと白色ワセリンを 5:7 で混合したもの) のみを塗布したマウスも用意した。採取したマウスの皮膚

は、ディスパーゼで処理して表皮を採取し[13]、これに 25mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH7.6) を 4 倍容加えてホモジナイズした。得られた表皮ホモジネートについて、実験 1 と同様の方法でメラニン様色素レベルと過酸化脂質レベルを測定した。また、表皮の最終糖化産物 (AGEs) レベルを、セリスタ社製ラット/マウス用 Glycerinaldehyde 由来 AGE ELISA キットを用いて測定した。

マウスを用いた実験のデータは、平均値±標準偏差で表した。実験群間の差については、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) で解析し、次いで Tukey の多重比較法を用いて検定した。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 サラシア葉および幹エキスのチロシナーゼ活性阻害作用

表皮中のメラニン色素は、メラニン細胞においてチロシンやドーパを基質として酸化酵素チロシナーゼにより生成され、表皮細胞間に蓄積する。メラニンは UV の細胞毒性を抑制する一方で、シミやソバカスの原因となることが知られている。そのため、チロシナーゼの活性を阻害することで、皮膚におけるシミやソバカスの形成が抑制される可能性がある。チロシナーゼ活性阻害作用を有する素材としては、ローズマリー葉エキス[14]やヒドロキノン[15]、緑茶の EGCG をはじめとするカテキン類やポリフェノール画分 [16]等が知られており、化粧品の材料として利用されることがある。サラシアの葉や幹には、ポリフェノール成分としてマンギフェリン、EC、EGC、4'-メチル EGC、プロアントシアニジンオリゴマー等が含まれているため[17,18]、チロシナーゼ活性阻害作用があることが期待される。

本研究で、サラシア葉および幹エキスはチロシナーゼ活性に対して阻害作用を示すことを確認した。それぞれの IC₅₀ 値を表 1 に示す。陽性対照

表 1 サラシア葉および幹エキスの in vitro における
チロシナーゼ活性阻害作用

| 試料 | IC ₅₀ 値 (mg/mL) |
|------------|----------------------------|
| サラシア葉エキス | 0.563 ± 0.00467 |
| サラシア幹エキス | 3.362 ± 0.290 |
| ローズマリー葉エキス | 6.046 ± 0.513 |
| 緑茶エキス | 0.0780 ± 0.00344 |
| ヒドロキノン | 0.107 ± 0.000170 |
| EGCG | 0.0379 ± 0.00383 |

IC₅₀ 値 : 50%阻害濃度.

EGCG : (-)-エピガロカテキンガレート.

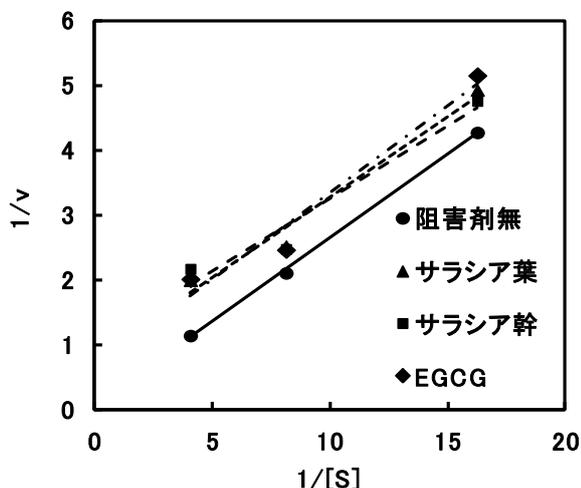


図 1 サラシア葉および幹エキスのチロシナーゼ活
性阻害反応におけるラインウェーバー・パークブ
ロット

EGCG : (-)-エピガロカテキンガレート.

[S]: L-ドーパの濃度 (mg/mL)

v: 反応速度 (ΔOD)

として用いたヒドロキノンと EGCG は、強いチロシナーゼ活性阻害作用を示した。サラシア葉および幹エキスの同作用は、緑茶エキスに比較して弱かったが、ローズマリー葉エキスよりは強かった。サラシアの試料間の比較では、葉エキスの方が幹エキスより強い作用が見られた。サラシア葉および幹エキスと EGCG について、チロシナーゼ活性阻害作用の形式を、ラインウェーバー・パークの

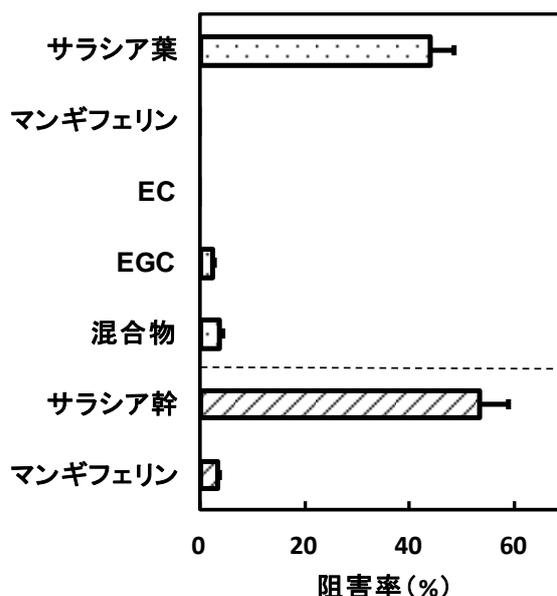


図 2 サラシア葉および幹エキスの既知ポリフェ
ノール成分のチロシナーゼ活性阻害作用

EC : (-)-エピカテキン.

EGC : (-)-エピガロカテキン.

プロットを作成して検討した。図 1 に示すように、いずれも非競争阻害であるものと考えられる。これまでの報告では、カテキン類のチロシナーゼ活性阻害作用の形式としては、(-)-ガロカテキンガレートが競争阻害を[16]、(+)-カテキン- α -グリコシドが非競争阻害を示す[19,20]という報告がある。

チロシナーゼ活性に対するサラシア葉および幹エキスの IC₅₀ 値である 0.563 mg/mL と 3.362 mg/mL 中に含まれる量のマンギフェリンや EC、EGC を用いて、その同作用を測定した結果を図 2 に示す。サラシア葉エキスには、マンギフェリン 0.013%、EC 0.114%、EGC 0.155%が、また、幹エキスにはマンギフェリン 1.0%がそれぞれ含まれることがわかっている[21]。マンギフェリン、EC、EGC あるいはこれらの混合物のチロシナーゼ活性阻害作用は、サラシアの葉および幹エキスの同作用に比較して弱かった。そのためサラシア葉エキス中の EGC とサラシア幹エキス中のマンギフ

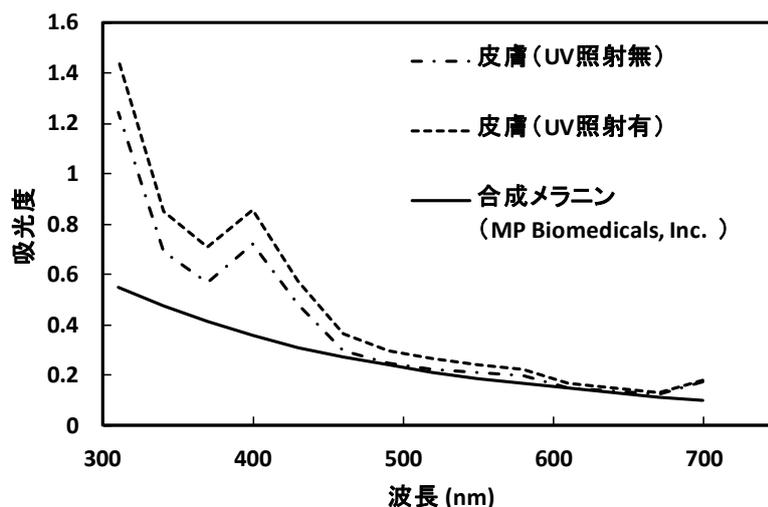


図3 合成メラニンおよびマウス皮膚ホモジネート上清の吸光スペクトル

エリンは、それぞれのエキスの同作用の一部に寄与する成分とは考えられるが、それ以外の有効成分の存在が予想される。

3. 2 サラシア葉および幹エキス投与の UV 暴露マウスの皮膚に対する影響

メラニンの吸光スペクトルは、300 nm から 700 nm の範囲では極大吸収は見られず、長波長になるほど低下する傾向を示すことが報告されている[22]。我々も、MP Biomedicals 社製の合成メラニンを用いて、図3に示すように同様の結果を得た。一方、マウスの皮膚ホモジネートの上清について吸光スペクトルを測定すると、全体としては長波長になるほど低下するが、それに加えて 405 nm 付近に極大吸収が見られる。この 405 nm における吸収は、血液に含まれるヘモグロビンに由来するものと考えられ[23]、短波長領域でのメラニンの吸光度測定を妨害する可能性がある。そのため、本研究ではメラニン様色素レベルを評価するために、ヘモグロビンの影響を受ける可能性のある 405 nm とその影響を受けない 490 nm の2つの波長における吸光度の測定を行うこととした。なお、我々が用いた市販メラニンでは、1 g/100 mL における比吸光係数は、405 nm では 1.2×10^3 、490 nm では 8.4×10^2 であった。

まず、サラシア葉および幹エキスの 0.01% 水溶

液を自由に摂取させた場合の、UV 照射マウスの皮膚のメラニン様色素レベルについて測定した実験1の結果を図4に示す。UV 非照射マウスと比較して、UV 照射マウスの皮膚メラニン様色素レベルは、測定波長 405 nm と 490 nm のいずれにおいても上昇した。特に、405 nm における測定結果では有意な上昇が見られた。サラシア葉および幹エキス溶液を飼育期間中自由に摂取させた場合には、いずれの場合も UV 照射によるマウス皮膚メラニン様色素レベルの上昇が抑制される傾向が見られた。

次に、*in vitro* においてチロシナーゼ活性阻害作用がより強かったサラシア葉エキスについて、その 20.8 mg を含有する軟膏を塗布した場合の、UV 照射マウスの表皮のメラニン様色素レベルについて測定した実験2の結果を図5に示す。本実験では、UV 非照射マウスと UV 照射マウス間に有意な差が見られた 405 nm を、測定波長として用いた。UV 非照射マウスと比較して、UV 照射マウスおよび軟膏基剤を塗布した UV 照射マウスの表皮では、メラニン様色素レベルが有意に上昇した。サラシア葉エキス含有軟膏を塗布した UV 照射マウスの表皮のメラニン様色素レベルは、UV 照射マウスおよび軟膏基剤を塗布した UV 照射マウスと比較して有意に低下した。この作用の機序の1

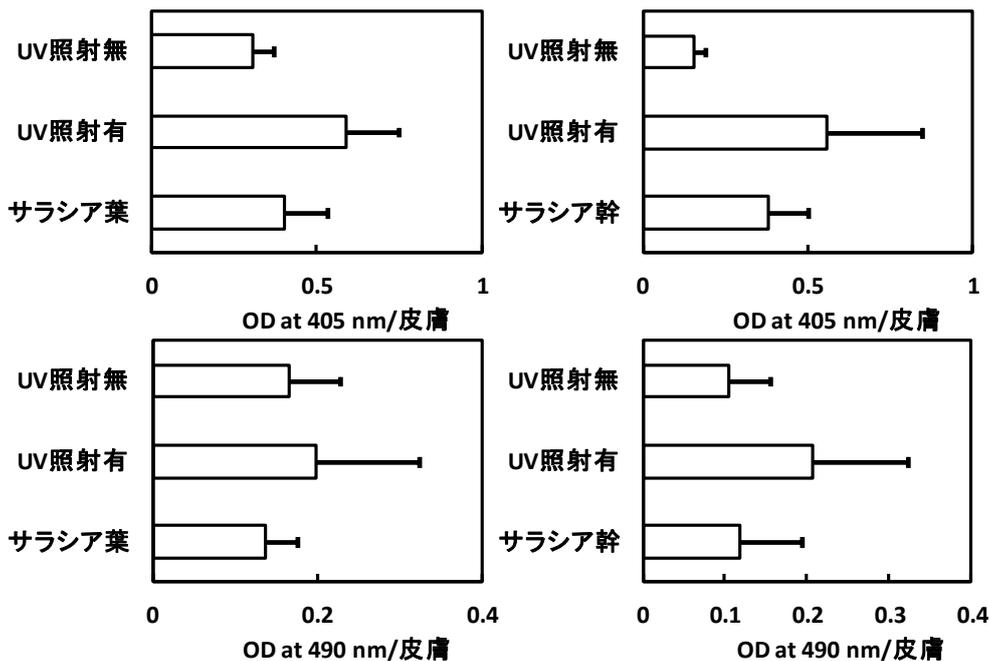


図4 紫外線照射マウス皮膚のメラニン様色素レベルに対するサラシア葉および幹エキスの飲用の影響

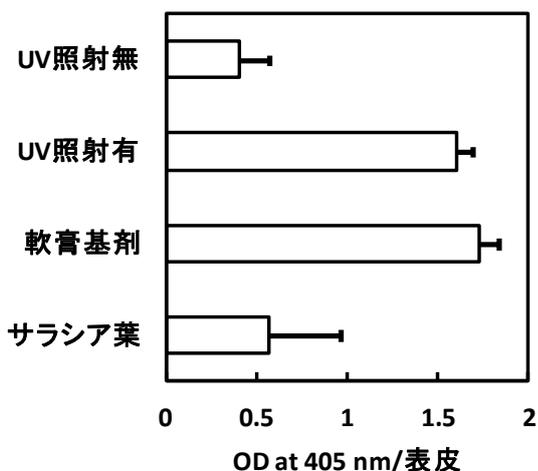


図5 紫外線照射マウス皮膚のメラニン様色素レベルに対するサラシア葉エキス含有軟膏の塗布の影響

つとして、サラシア葉エキスのチロシナーゼ活性阻害作用が予想されるが、今回の実験では測定感度の不足のため、マウス皮膚中のチロシナーゼ活性の変化を確認することはできなかった。

ところで、表皮が UVB に暴露されると、チロシナーゼ活性が上昇しメラニン色素の形成が促

進されるだけでなく、スーパーオキシドアニオンラジカル等の活性酸素の生成も高まることが知られている[24]。活性酸素は、生体中の脂質、糖、タンパク質、核酸といった様々な成分を酸化し、その機能に影響を与える。そこで、実験1と実験2のマウス皮膚における酸化ストレスの状態を評価するため、その過酸化脂質レベルを測定した結果を図6に示す。UV照射マウスの皮膚の過酸化脂質レベルは、UV非照射マウスに比較して上昇する傾向を示し、UVBへの暴露で皮膚の酸化ストレスが高まったものと考えられる。サラシア葉および幹エキスの飲用およびサラシア葉含有軟膏の塗布により、UV照射マウス皮膚の過酸化脂質レベルの上昇が抑制される傾向が見られた。

また、実験2については、さらにマウス表皮のAGEsレベルを測定したので、その結果を図7に示す。AGEsは、老化とともに体内のタンパク質が糖と反応して生成、蓄積するカルボキシメチルリジンやペントシジン、ピラリンといった物質を指すもので、その生成過程にラジカルが関与するとされている。UV非照射マウスに比較して、UV

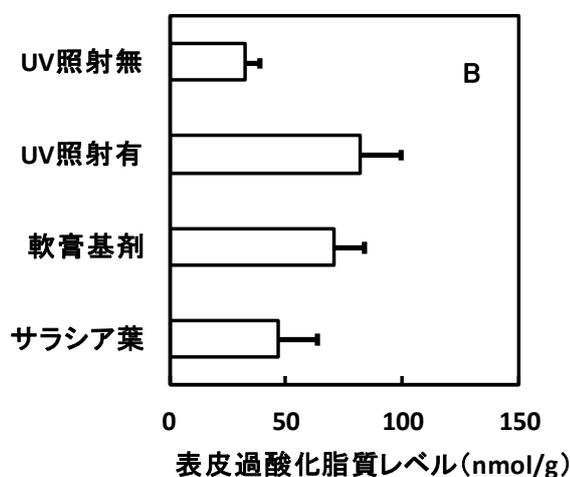
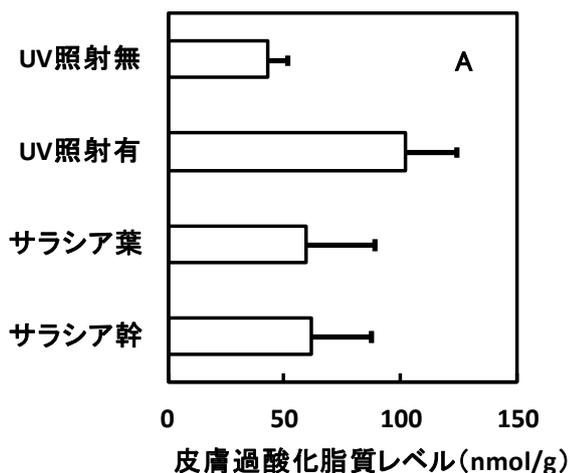


図6 紫外線照射マウス皮膚の過酸化脂質レベルに対するサラシア葉および幹エキスの影響
 A: サラシア葉および幹エキスの飲用.
 B: サラシア葉エキス含有软膏の塗布.

照射マウスの表皮では AGEs レベルの上昇傾向が見られた。软膏基剤あるいはサラシア葉エキス含有软膏を塗布した UV 照射マウスの表皮では、UV 照射マウスに比較して、そのレベルが低下する傾向が見られた。特に、サラシア葉エキス含有软膏を塗布した場合に、その低下が顕著であった。これらの結果から、サラシア葉または幹のエキスには、UVB 照射による皮膚の酸化ストレスの上昇を抑制する効果があるものと期待できる。

4. まとめ

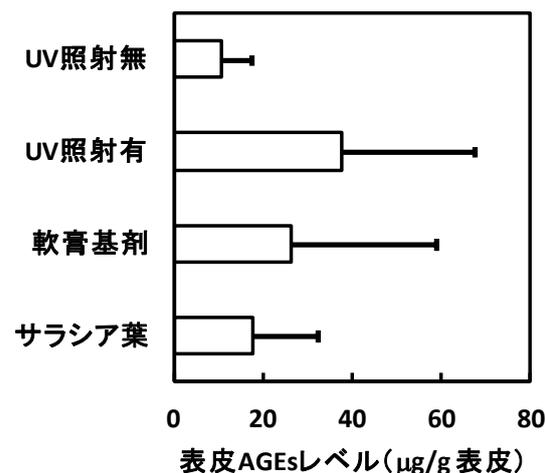


図7 紫外線照射マウス皮膚の最終糖化産物 (AGEs) レベルに対するサラシア葉エキス含有软膏の塗布の影響

サラシアの葉および幹の水抽出エキスを用いて、その皮膚メラニン形成抑制作用について、in vitro および in vivo の系を用いて検討を行った。

まず、メラニン生合成酵素の1つであるチロシナーゼの活性に対する阻害作用を in vitro で測定したところ、サラシア葉および幹エキスともにローズマリーエキスよりも強い効果が見られた。その阻害形式は、不競争阻害であると考えられた。また、この作用への既知ポリフェノール成分の寄与は高くなく、今後その有効成分について検討する必要がある。

次に、UVB をマウスの皮膚に照射する実験系を用いて in vivo におけるメラニン生成抑制作用を検討したところ、サラシア葉および幹エキスの溶液を自由摂取させた場合とサラシア葉エキス含有软膏を UVB 照射前に塗布した場合のいずれにおいても、UVB 照射によるマウス皮膚のメラニン様色素レベルの上昇が抑えられる傾向が見られた。さらに、これらのサラシアエキスの投与は、UVB 照射によるマウス皮膚の酸化ストレスの上昇も抑制する傾向が見られた。以上の結果から、サラシアの葉および幹のエキスには、皮膚メラニ

ンの増加による褐色化を抑制する効果があることが期待される。

参考文献

- 1) G. P. Choudhary, M. S. Vijay Kanth, Antimicrobial activity of root bark of *Salacia reticulata*, *Anc. Sci. Life*, vol.25, pp.4-7 (2005).
- 2) Y. Sekiguchi, H. Mano, S. Nakatani, J. Shimizu, M. Wada (2010), Effects of the Sri Lankan medicinal plant, *Salacia reticulata*, in rheumatoid arthritis, *Genes Nutr.*, vol.5, pp.89-96 (2010).
- 3) T. S. Ismail, S. Gopalakrishnan, V. H. Begum, V. Elango, Anti-inflammatory activity of *Salacia oblonga* Wall. and *Azima tetracantha* Lam., *J. Ethnopharmacol.*, vol.56, pp.145-152 (1997).
- 4) 芳野恭士, 宮本潤基, 間部涼祐, 近藤郁美子, 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).
- 5) 芳野恭士, 近藤郁美子, 金高 隆, 古賀邦正, サラシア (*Salacia reticulata*) のマウス耳介皮膚における抗炎症作用, 技術・教育研究論文誌, vol.21, pp.45-51 (2014).
- 6) 芳野恭士, 金高 隆, 古賀邦正, サラシア属植物 (*Salacia reticulata*) の抗酸化作用, 食品衛生学雑誌, vol.56, pp.144-150 (2015).
- 7) 芳野恭士, 勝亦雄太, 筒井千尋, 志賀早祥, 芳野文香, 片平俊志, 山崎 純, 一杉卓矢, 金高 隆, 古賀邦正, サラシア属植物 *Salacia reticulata* のスーパーオキシドアニオンラジカル捕捉作用, 技術・教育研究論文誌, vol.22, pp.35-40 (2015).
- 8) 正木 仁, 太陽光線に対する皮膚生理反応について, 日本化粧品技術者会誌, vol.47, pp.197-201 (2013).
- 9) 増田勝己, 多田千明, 食用植物及び香辛料の褐変阻害について, 仁愛女子短期大学研究紀要, vol.42, pp.57-64 (2010).
- 10) H. Lineweaver, D. Burk, The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.*, vol.56, pp.658-666 (1934).
- 11) K. Itoh, N. Hirata, M. Masuda, S. Naruto, K. Murata, K. Wakabayashi, H. Matsuda, Inhibitory effects of *Citrus hassaku* extract and its flavanone glycosides on melanogenesis, *Biol. Pharm. Bull.*, vol.32, pp.410-415 (2009).
- 12) S. Komura, K. Yoshino, K. Kondo, K. Yagi, Lipid peroxide levels in the skin of the senescence-accelerated mouse, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol.5, pp.255-260 (1988).
- 13) 小谷久也, 小林身哉, 光藤健司, 渡部真法, 藤内 祝, 上田 実, 星野 洸, 粘膜上皮の成熟とランゲルハンス細胞の動態, 日本口腔科学会雑誌, vol.44, pp.77-82 (1995).
- 14) 増田勝己, 多田千明, 食用植物及び香辛料の褐変阻害について, 仁愛女子短期大学研究紀要, vol.42, pp.57-64 (2010).
- 15) 船坂陽子, 美白剤の作用機序と治療, 日本皮膚科学会雑誌, vol.119, pp.2784-2788 (2009).
- 16) J. K. No, D. Y. Soung, Y. J. Kim, K. H. Shim, Y. S. Jun, S. H. Rhee, T. Yokozawa, H. Y. Chung, Inhibition of tyrosinase by green tea components, *Life Sci.*, vol.65, pp.PL241-246 (1999).
- 17) 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).
- 18) K. Koga, M. Hisamura, T. Kanetaka, K. Yoshino, Y. Matsuo, T. Tanaka, Proanthocyanidin oligomer isolated from *Salacia reticulata* leaves potently inhibit pancreatic lipase activity. *J. Food Sci.*, vol.78, pp.H105-H111 (2013).

- 19) M. Funayama, T. Nishino, A. Hirota, S. Murao, S. Takenishi, H. Nakano, Enzymatic synthesis of (+)catechin- α -glucoside and its effect on tyrosinase activity, *Biosci. Biotech. Biochem.*, vol.57, pp.1666-1669 (1993).
- 20) S. Kitao, T. Ariga, T. Matsudo, H. Sekine, The syntheses of catechin-glucosides by trans-glycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase, *Biosci. Biotech. Biochem.*, vol.57, pp.2010-2015 (1993).
- 21) 芳野恭士, 岸 由紀乃, 金高 隆, 古賀邦正, *Salacia reticulata* の卵アルブミン誘発I型アレルギー反応におけるマウス腹壁血管透過性亢進抑制作用, 日本栄養・食糧学会誌, vol.65, pp.221-227 (2012).
- 22) J. M. Gallas, G. W. Zajac, T. Sarna, P. L. Stotter, Structural differences in unbleached and mildly-bleached synthetic tyrosine-derived melanins identified by scanning probe microscopies, *Pigment Cell Res.*, vol.13, pp.99-108 (2000).
- 23) 野村美沙登, 小野裕輝, 佐藤亜樹, 長南幸安, 教材化を指向したポルフィリン錯体合成, 弘前大学教育学部紀要, No.101, pp.61-64 (2009).
- 24) 小林静子, 紫外線B波照射による皮膚障害とその予防・治療 - γ -Tocopherol 誘導体塗布の効果 -, *Yakugaku Zasshi*, vol.126, pp.677-693 (2006).