Glycative Stress Research

Online edition : ISSN 2188-3610
Print edition : ISSN 2188-3602
Received : July 6, 2021
Accepted : August 25, 2021
Published online : September 30, 2021
doi:10.24659/gsr.8.3_148

Original article

Screening plant extracts for inhibition of hair glycation

Yasunori Okuma [1], Jiro Tanaka [1], Akimasa Mochizuki [1],
Masayuki Yagi [2], Yoshikazu Yonei [2]

1) Research Center, Arimino Co., Ltd, Saitama, Japan
2) Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center,
Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

Glycative Stress Research 2021; 8(3): 148-155
(c) Society for Glycative Stress Research

（原著論文：日本語翻訳版）

毛髪における抗糖化作用を有する植物抽出液の探索

大熊康範 [1]、田中二郎 [1]、望月章雅 [1]、八木雅之 [2]、米井嘉一 [2]

1) 株式会社アリミノ 研究開発部　総合研究所
2) 同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター・糖化ストレス研究センター

抄録

［目的］毛髪は根元から毛先にかけて、経時的に糖化し破断強度の低下といった物性変化を示す事が報告されている。一方で、毛髪における糖化を抑制する研究は数少ない。そこで、本研究では糖化による毛髪の物性変化を抑制する素材の探索を目的に、化粧品原料として使用可能な植物抽出液の抗糖化作用を検証した。。

［方法］試料は既に化粧品原料として使用されている植物抽出物26種を使用した。抗糖化作用は、羊毛由来ケラチン5.0 mg/mL、グルコース1.2 mol/L、各試料を含む0.1 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.4）を60 °Cで10日間反応させた後、反応液中に生成したAGEs量を蛍光法（励起波長370 nm/検出波長440 nm）で測定し、AGEs生成抑制率を算出した。

一次スクリーニングは、各試料を殺菌イオン交換水にて反応液中の終濃度が0.1 mg/mLになるよう調整し、AGEs生成抑制率の測定を行った。二次スクリーニングは、一次スクリーニングで得たAGEs生成抑制率75％以上の試料について、50％生成抑制濃度（IC_{50}）を算出し、評価を行った。次に、美容処理履歴のない30歳代健康女性に対して、書面にて毛髪サンプル提供の同意を得て、抗糖化作用の検証を行った。抗糖化作用の検証は、毛髪サンプルをグルコース1.2 mol/L、各試料0.1 mg/mLを添加した0.1 mol/Lリン酸緩衝液（pH 7.4）に浸漬し、50 °Cで10日間反応させた後、毛髪蛋白質を抽出し、蛍光性AGEs量を測定した。毛髪の物性値は引張り試験機を用いて、室温25 °C 湿度65％RHにて破断強度の測定を行った。

連絡先：大熊康範
株式会社アリミノ　研究開発部　総合研究所
〒355-0812 埼玉県比企郡滑川町大字都25-5
TEL：0493-57-0621　FAX：0493-57-0623　e-mail：y-ohkuma@arimino.co.jp
共著者：田中二郎 j-tanaka@arimino.co.jp；望月章雅 a-mochizuki@arimino.co.jp；
八木雅之 myagi@mail.doshisha.ac.jp；米井嘉一 yyonei@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2021; 8(3): 148-155
本論文を引用する際はこちらを引用してください。
(c) Society for Glycative Stress Research

[結果] 一次スクリーニングの結果、26種中9種の試料に75％以上のAGEs生成抑制作用が認められた。二次スクリーニングの結果、ルイボスエキスのIC_{50}はアミノグアニジンと比べて20倍以上の強い抗糖化作用を有した。毛髪を用いた試験では、ルイボスエキスが蛍光性AGEsの生成を抑制した（生成抑制率82.4％）。また、糖化処理を施した毛髪の破断強度は、未糖化処理毛髪と比較し20.8％低下したが、ルイボスエキスを添加することにより、糖化による破断強度低下を4.9％に抑制できた。
[結論] ルイボスエキスには、毛髪の蛋白質の蛍光性AGEs産生抑制作用が認められた。また、糖化による毛髪の破断強度の低下に対しても抑制作用を示した。これらの結果より、ルイボスエキスを頭髪化粧品に添加することで、毛髪の糖化による物性変化を抑制できる可能性が示された。

KEY WORDS: 毛髪、植物抽出物、ルイボス、糖化、糖化最終生成物（advanced glycation end products: AGEs）

はじめに

グルコースなどの還元糖と蛋白との非酵素的反応は糖化と呼ばれる。糖化は生体内でも起こり、糖化により組織中に糖化最終生成物（advanced glycation end products: AGEs）が生成し蓄積する。生体内でのAGEsの蓄積は物理的、生理的、見た目のダメージを引き起こすとされている[1)]。糖化は、循環器疾患[2)]、骨粗鬆症[3)]、認知症[4)]などの進展要因となり、老化危険因子の一つとされている。

皮膚においても、AGEsは表皮のケラチン[5)]、真皮のコラーゲン[6)]やエラスチン[7)]等の蛋白に蓄積する事が報告されている。角層AGEs蓄積量が多い皮膚は肌のキメが喪失し[8)]、真皮に形成されたAGEsは皮膚の黄変を引き起こし[9)]、また皮膚のハリ、弾力低下の原因になると考えられている。このように皮膚の糖化は見た目の老化に関与している事から、近年、糖化を抑制する「抗糖化」がエイジングケアの一つの重要な要素として注目を浴びている。

毛髪も皮膚同様に見た目の若々しさを保つための重要な要素の一つである。近年、毛髪においても、根元から毛先にかけて経時的に糖化し、破断強度の低下といった物性変化を示す事が報告されている[10)]。毛髪の破断強度が低下すると、切れ毛や枝毛といった髪質の低下につながり、見た目の老化を促進させる。しかし、毛髪における糖化を抑制する研究は、これまでのところほとんどない。

そこで、本研究では糖化による毛髪の物性変化を抑制する素材の探索を目的に、植物抽出液の抗糖化作用を検証した。

方法

(1) 試薬

糖化反応のモデル蛋白は、羊毛由来ケラチンをナカライテスク株式会社（京都）から購入して使用した。抗AGEs抗体（clone 6D12）は株式会社トランスジェニック（福岡）より購入した。Alexa546標識二次抗体はThermo Fisher Scientific（Waltham, MA, U.S.A.）より購入した。Can Get Signal immunostain Solutionは東洋紡株式会社（大阪）より購入した。その他の試薬は特級及び生化学用のものを富士フイルム和光純薬株式会社（大阪）から購入して使用した。

(2) 試料の調製

化粧品原料として販売されている26種類の植物抽出物を試料として用いた（*Table 1*）。糖化反応阻害作用の陽性対照としては糖化反応阻害剤の一種であるアミノグアニジン（AG）を使用した。

(3) 糖化反応抑制作用の検証

糖化反応抑制作用のスクリーニングにはケラチン-グルコース（Ker-Glucose）糖化反応モデルを使用した[11)]。糖化反応液は、0.1 mol/Lリン酸緩衝液（PB）（pH 7.4）、5.0 mol/Lグルコース、5.0 mg/mLケラチンを調製した後、それぞれ試料を添加した。その後、糖化反応液を60°Cで10日間反応させた後、マイクロプレートリーダーでAGEs由来蛍光（励起波長370 nm／検出波長440 nm）を測定した。対照（reference: ref）は、試料の代わりに等量の精製水を加え、同条件で反応させた。蛍光性AGEs生成抑制作用の陽性対照にはAG 1.0 mg/mLを試料と同量加えたものを使用した。蛍光値は5.0 μg/mL硫酸キニーネの蛍光値を1,000としたときの相対値として算出した。蛍光性AGEs生成抑制率は以下の式に基づいて算出した。

蛍光性AGEs生成抑制率(%)
= 100 – {(sample Glucose(+) – sample Glucose(–)) / (ref Glucose(+) – ref Glucose(–)) x 100}

Table 1. Sample profile.

ID	Sample Name	Scientific Name	Family Name	Japanese name	INCI	Extractants
1	Chinese blackberry	*Rubus Suavissimus*	Rosaceae	Ten-cha	Rubus Suavissimus (Raspberry) Leaf Extract	Water
2	Dokudami (BG)	*Houttuynia Cordata*	Saururaceae	Dokudami	Houttuynia Cordata Extract	Butylene Glycol
3	Dokudami (Alcohol)					Alcohol
4	Dokudami (Water)					Water
5	Kuma bamboo grass	*Sasa Veitchii*	Poaceae	Kuma-zasa	Sasa Veitchii Leaf Extract	Alcohol
6	Rooibos	*Aspalathus Linearis*	Fabaceae	Rooibos	Aspalathus Linearis Leaf Extract	Butylene Glycol
7	Evening primrose	*Oenothera biennis*	Onagraceae	Mematuyoigusa	Oenothera Biennis (Evening Primrose) Seed Extract	Water
8	Jiaogulan	*Gynostemma pentaphyllum*	Cucurbitaceae	Amatyaduru	Gynostemma Pentaphyllum Leaf Extract	Water
9	Lemon grass	*Cymbopogon citratus*	Poaceae	Lemon grass	Cymbopogon Schoenanthus Leaf/Stem Extract	Butylene Glycol
10	Mugwort	*Artemisia Princeps*	Asteraceae	Yomogi	Artemisia Princeps Leaf Extract	Alcohol
11	Field Horsetail	*Equisetum Arvense*	Equisetaceae	Sugina	Equisetum Arvense Extract	Alcohol
12	hatomugi	*Coix Lacryma-Jobi*	Poaceae	Hatomugi	Coix Lacryma-Jobi Ma-yuen Seed Extract	Butylene Glycol
13	Loquat (BG)	*Eriobotrya Japonica*	Rosaceae	Biwa	Eriobotrya Japonica Leaf Extract	Butylene Glycol
14	Loquat (Alcohol)					Alcohol
15	Japanese hawthorn	*Crataegus cuneata*	Rosaceae	Sanzasi	Crataegus Oxyacantha Fruit Extract	Alcohol
16	Rose hip	*Rosa canina*	Rosaceae	Rose Hip	Rosa Canina Fruit Extract	Alcohol
17	Chamomile	*Matricaria recutita*	Asteraceae	Kamiture	Chamomilla Recutita (Matricaria) Flower Extract	Alcohol
18	Aloe	*Aloe Arborescens*	Asphodelaceae	Aloe	Aloe Arborescens Leaf Extract	Butylene Glycol
19	Safflower	*Carthamus Tinctorius*	Asteraceae	Benibana	Carthamus Tinctorius (Safflower) Flower Extract	Alcohol
20	Ashitaba	*Angelica keiskei*	Apiaceae	Ashitaba	Angelica Keiskei Leaf/Stem Extract	Butylene Glycol
21	Ginger	*Zingiber Officinale*	Zingiberaceae	Shouga	Zingiber Officinale（Ginger） Rhizome Extract	Alcohol
22	Edible burdock	*Arctium lappa*	Asteraceae	Gobou	Arctium Lappa Root Extract	Alcohol
23	Asian Ginseng	*Panax Ginseng*	Araliaceae	Otane ninjin	Panax Ginseng Root Extract	Alcohol
24	Green tea	*Camellia Sinensis*	Theaceae	Ryoku-cha	Camellia Sinensis Leaf Extract	Alcohol
25	Black tea			Kou-cha		Alcohol
26	Oolong tea			Oolong-cha		Alcohol
Ref	Aminoguanidine	–	–	–	–	–

(4) 一次スクリーニング

各試料を終濃度0.1 mg/mLとなるように精製水で調整をした。上記の試験法にて蛍光性AGEs生成抑制率を算出した。

(5) 二次スクリーニング

二次スクリーニングは、一次スクリーニングで得た蛍光性AGEs生成抑制率75％以上の試料について、50％生成抑制濃度（IC_{50}）を算出し評価を行った。IC_{50}の算出は、各試料を終濃度で3濃度（0.1 mg/mL、0.01 mg/mL、0.001 mg/mL）となるように調整し、各濃度における蛍光性AGEs形成の阻害率を測定し、算出を行った。

(6) 毛髪の糖化処理

毛髪は美容処理履歴（ブリーチ、ヘアカラー、パーマネントウェーブ、縮毛矯正）のない30歳代健康女性に対して、書面にてサンプル提供の同意を得て、採取した。

毛髪をグルコース1.2 mol/L、および各試料を0.1 mg/mLを含む0.1 mol/L PB中で50 °C、10日間反応させる事により、*in vitro*で糖化させた。対照（reference: ref）は、試料の代わりに等量の精製水を加え、同条件で反応させた。

(7) 毛髪中AGEs測定

各毛髪サンプルを脱脂剤（クロロホルム／メタノール[MeOH] = 2/1）に室温で16時間浸漬した。脱脂剤から毛髪を回収し、室温で1時間以上乾燥させた後、5 mm以下の長さに切断した。各毛髪サンプル10 mgを、5 M尿素、2.6 Mチオ尿素、および25 mmol/L Tris-HCLバッファー、5％ 3-メルカプト-1, 2-プロパンジオールで構成される500 µLの抽出バッファー（pH 8.5）に浸漬した。その後、攪拌しながら50 °Cで1日間反応させた。

次に、サンプルを10,000 rpmで1分間、20 °Cで遠心分離し、得られた上清を蛋白質溶液として回収した。蛋白質溶液の蛍光性AGEsは、既出の方法(3)と同様に蛍光法にて測定した。蛋白質濃度はブラッドフォード法[12]にて測定した。蛍光性AGEs含有量は、蛋白質含有量1 mgあたりで計算した。グルコース添加群と未添加群の差を蛋白当たりのAGEs変化量とし評価を行った。

(8) 毛髪の破断強度測定

毛髪の物性値は引張り試験機（KES-G1-SH毛髪一本引張り試験機、カトーテック株式会社、京都）を用いて、室温25 °C、湿度65％RHにて破断荷重の測定を行った。毛髪断面積を毛髪直径測定器（SK2000 カトーテック株式会社）にて測定し、毛髪の破断強度を以下の式に基づいて算出した。

破断強度 = 破断荷重／毛髪断面積

(9) 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色法はモノクローナル抗体clone 6D12を用いたABC法にて行った[8]。

糖化処理を行った毛髪をミクロトーム（REM-710 ヤマト科学株式会社、東京）を用いて厚さ5 µmに切断し、切片をスライドガラス上に固定した。一次抗体をCan Get Signal immmunostai Solution Aに1/200で希釈し、毛髪と4 °Cにて一晩反応させた。その後、二次抗体を一次抗体と同様に希釈し、毛髪と室温にて一時間反応させた。PBにて洗浄後、蛍光顕微鏡（BZ-X810 株式会社キーエンス、大阪）を用いて観察を行った。露光時間は未糖化処理毛において自家蛍光が検出されない時間を設定した。

結果

(1) 一次スクリーニング結果

各試料の蛍光性AGEs生成抑制率を***Fig. 1***に示した。26種類すべての試料は蛍光性AGEsの生成を抑制した。また、26種中9種の試料に75％以上の蛍光性AGEs生成抑制作用が見られた。

(2) 二次スクリーニング結果

IC_{50}の結果を***Fig. 2***に示した。ルイボスエキス（Rooibos）に最も高い抗糖化作用が見られ、次いで緑茶エキス（Green tea）、カミツレエキス（Chamomile）に高い抗糖化作用が見られた。特に、ルイボスエキスは緑茶エキスと比較して2倍、またAGと比較し20倍以上と高い抗糖化作用を示した。 IC_{50}の結果のうち、上位のルイボスエキス、中位のテンチャエキス（Chinese blackberry）、下位のコウチャエキス（Black tea）を毛髪に対する抗糖化作用の検証に供した。

(3) 毛髪に対する抗糖化作用

毛髪に対する抗糖化作用の検証結果を***Fig. 3***に示した。糖化処理日数が増えるに従って、毛髪中のAGEsの蓄積量は増加した。ルイボスエキスが最も強く蛍光性AGEsの生成を抑制した（生成抑制率82.4％）。また、テンチャエキスやコウチャエキスもAGと比較し、高い生成抑制作用を示し、その効果の強弱はIC_{50}の値と同様の傾向を示した。

(4) 破断強度測定

糖化処理を施した毛髪の破断強度は、未糖化処理毛髪と比較し20.8％低下した。一方で、ルイボスエキスを添加することにより、糖化による破断強度低下を4.9％に抑制できた。

(5) 蛍光観察

糖化処理により毛髪内にAGEsが蓄積する様子が蛍光にて観察できた。特に毛髪内の蛍光性AGEsの蓄積は表面のキューティクルに留まらず、内部のメデュラやコルテックスにまで進行している様子も観察された。また、ルイボスエキスを添加することにより、毛髪全体でAGEs生成が抑制された事も確認できた。

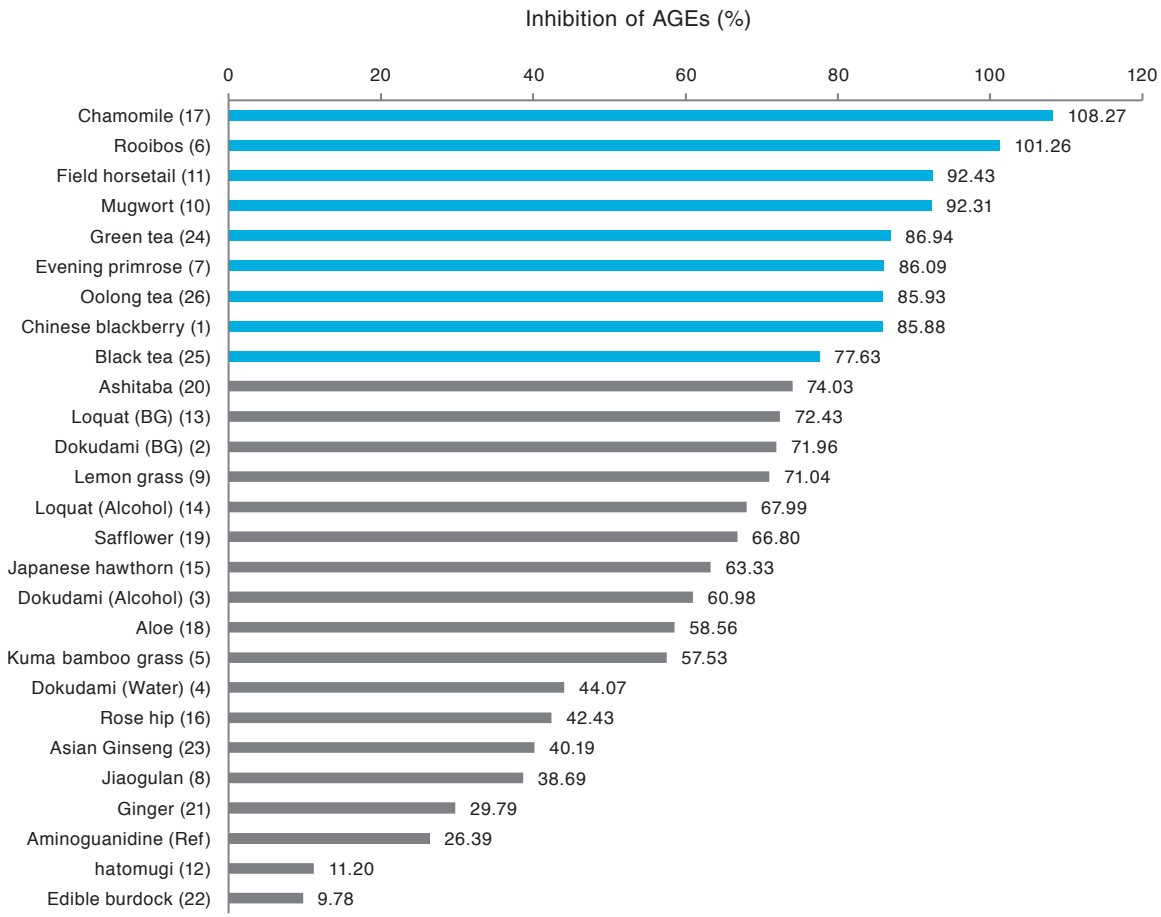

Fig. 1. **Inhibitory effect of plant extracts on AGEs in the Ker-Glucose reaction model.**

The results are expressed as means. 0.1 mg/mL plant extracts were introduced into glycation models containing 5.0 mg/mL Ker and 1.2 mol/L glucose (n = 3). After 10 days of incubation at 60°C, fluorescent AGEs were measured by excitation at 370 nm and emission at 440 nm. AGEs, advanced glycation end products; Ker, keratin.

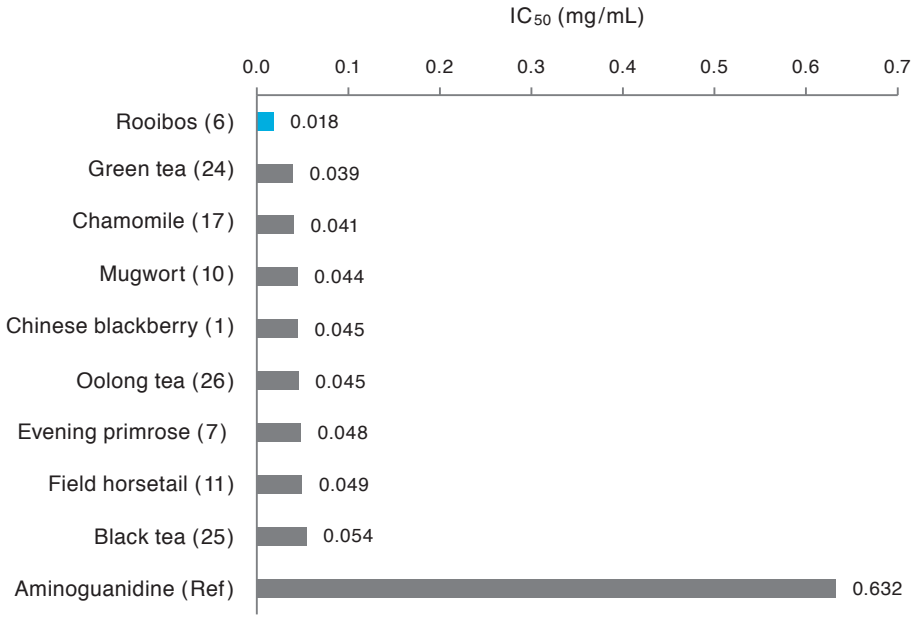

Fig. 2. **IC_{50} of plant extracts on AGEs in the Ker-Glucose reaction model.**

The results are expressed as means. 0.1 mg/mL, 0.01 mg/mL, and 0.001 mg/mL plant extracts were introduced into glycation models containing 5.0 mg/mL Ker and 1.2 mol/L glucose (n = 3). After 10 days of incubation at 60°C, fluorescent AGEs were measured by excitation at 370 nm and emission at 440 nm. IC_{50}, half maximal inhibitory concentration; AGEs, advanced glycation end products; Ker, keratin.

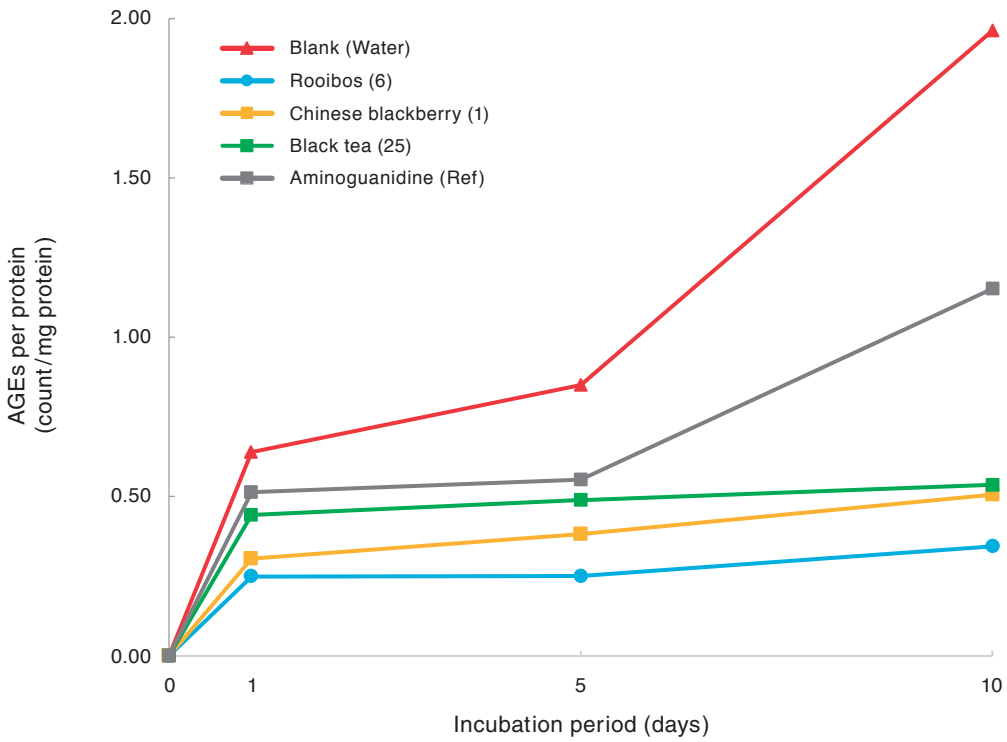

Fig. 3. **AGEs in hair protein.**

The results are expressed as means. Hair samples were introduced into PB containing 1.2 mol/L glucose and 0.1 mg/mL samples. After 10 days of incubation at 50 °C, fluorescent AGEs were measured by excitation at 370 nm and emission at 440 nm. The degree of AGE content was calculated per 1 mg of protein content. AGEs, advanced glycation end products; PB, phosphate buffer.

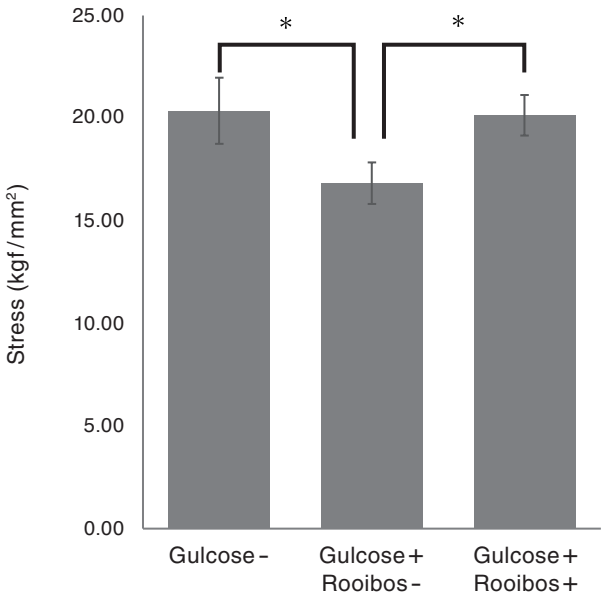

Fig. 4. **Tensile strength of hair.**

Results are expressed as mean ± SD. * $p < 0.05$, Tukey (Kramer test). Hair samples were introduced into PB containing 1.2 mol/L glucose and 0.1 mg/mL samples. After 10 days of incubation at 50 °C, the tensile strength was measured using a high-sensitivity hair rheology analyzer at breaking strength, when the hair was torn off. PB, phosphate buffer; SD, standard deviation.

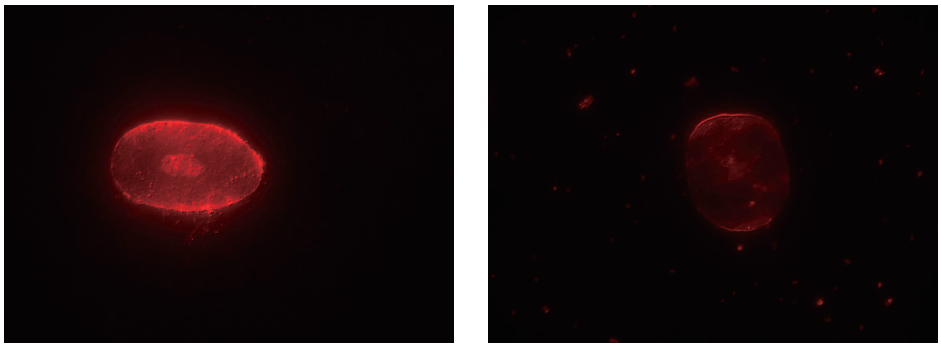

Fig. 5. **Immunofluorescent staining of hair.**

Hair samples were introduced into PB containing 1.2 mol/L glucose and 0.1 mg/mL samples. After 10 days of incubation at 50°C, AGEs were immunostained with an anti-AGE antibody. AGEs, advanced glycation end products; PB, phosphate buffer.

考察

ケラチン-グルコース糖化反応モデルを使用したスクリーニング方法

これまでに500種類以上の素材において、BSAやHSA等の蛋白質に対する抗糖化作用が報告されている[13-17]。一方で、蛋白質の種類によりAGEsの産生量に差異があり、抗糖化の効果はターゲットとなる蛋白質ごとに異なる事も報告されている[16]。

そこで、本研究ではまず毛髪を構成する蛋白質であるケラチンを用いてスクリーニングを行った。その後、スクリーニングによりケラチンにおける抗糖化作用の確認された植物抽出物について、実際に毛髪を用いて抗糖化作用の検証を行った。

その結果、ルイボスエキスは、ケラチンにおいても実際の毛髪においても蛍光性AGEsの生成を強力に抑制した。この結果は、ケラチン-グルコース糖化反応モデルが毛髪の抗糖化のスクリーニングに役立つ可能性があることを示した。

糖化と毛髪破断強度の関係性について

近年、糖化は還元糖のみならず、脂質やアルコールに由来する様々なアルデヒドが原因と考えられている[18]。これらのアルデヒドが蛋白と反応してAGEsやカルボルニ化蛋白を生成し、身体に様々な障害を引き起こすと考えられている。

毛髪に関する研究においても、これらアルデヒドの影響について、研究が行われている。まず、グリオキサールやグリオキシル酸は毛髪のケラチン構造に影響を及ぼし、その結果として破断強度を低下させる事が報告されている[19]。次に、ヤクの毛にグリオキシル酸処理を施した場合、ジスルフィド結合のコンフォメーション変化、セリン残基の減少、イミンの形成といった、ケラチンタンパクの二次構造分布の配列に影響を及ぼす事が報告されている[20]。これらグリオキサールとグリオキシル酸は、グルコース同様にアルデヒド基を有している。したがって、糖化反応においても上記の様に毛髪内のケラチンタンパクの構造に変化が生じている可能性が考えられる。

このように糖化が毛髪へ与える影響は、複雑かつ細部の構造にまで及んでおり、その結果として破断強度が低下するといった物性変化が起きると推測される。今後、詳細なメカニズムは検討する必要がある。

ルイボス抽出物の抗糖化作用

ルイボス（*Aspalathus Linearis*）は、南アフリカの西ケープ州の西海岸のごく一部にしか分布しない種である。収穫した葉を発酵させて作られるルイボスティーは健康飲料として、アフリカ、ヨーロッパをはじめ、日本でも広く親しまれている。ルイボスティーは便秘等の消化器疾患の緩和、ストレス緩和作用、アレルギー症状の緩和等、の生物学的作用が報告されている[21]。栄養素としてはカフェインを含まない事に加えて、カリウム、ナトリウム、マグネシウム等のミネラルを多く含んでいると言われている。更に、ルイボス特有のアスパラチンをはじめ、ルチン、ルテオリン、ケルセチンなど、さまざまなポリフェノールが含まれている[22]。

ルテオリンはフラボン類の一種であり、BSAに対する抗糖化作用が報告されている[23]。フラボノールであるケルセチンは、スルフォラファンのAGEs形成抑制作用を増強する事が報告されている[24]。このようにルイボス抽出物の糖化反応の阻害は、ポリフェノール類によるものと考えられる。

ルイボスエキスに含まれる様々な成分の中で、毛髪に対する抗糖化作用がどの成分に由来するのかは、今後更なる検証を必要とする。

結語

本研究ではルイボスエキスが毛髪の糖化を防ぐための新しい素材であることを見出した。ルイボスエキス配合の毛髪化粧品を使用することで、糖化を防ぎ、美しい髪を保つことができる事が示唆された。

利益相反申告

本研究を遂行するにあたり株式会社アリミノより支援を受けた。

謝辞

本研究の概略は第17回糖化ストレス研究会（2019年8月31日、京都）、IFSCC Mexico Conference 2021（2021年10月18-28日、web開催）にて発表した。本研究の発表にあたり一般財団法人 医食同源生薬研究推進財団（IDF#21007）より支援を受けた。

参考文献

1) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 1. What is glycative stress? *Glycative Stress Res*. 2016; 3: 152-155.
2) Ward MS, Fortheringham AK, Cooper ME, et al. Targeting advanced glycation endproducts and mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2013; 13: 654-661.
3) Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes. *Curr DrugTargets*. 2011; 12: 2096-2102.
4) Takeuchi M, Yamagishi S. Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2008; 14: 973-978.
5) Kawabata K, Yoshikawa H, Saruwatari K, et al. The presence of N(ε)-(carboxymethyl) lysine in the human epidermis. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1814: 1246-1252.
6) Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, et al. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest*. 1993; 91: 2463-2469.
7) Mizutani K, Ono T, Ikeda K, et al. Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine, one of the glycoxidation products of the Maillard reaction. *J Clin Invest*. 1997; 108: 797-802.
8) 五味貴優. 角層のAGEs評価法とその応用. *Bio Industry*. 2011; 28: 20-26.
9) Ohshima H, Oyobikawa M, Tada A, et al: Melanin and facial skin fluorescence as markers of yellowish discoloration with aging. *Skin Res Technol*. 2009; 15: 496-502.
10) Shimode A, Yagi M, Naito J, et al. Hair protein glycation reduces hair breaking strength. *Glycative Stress Res*. 2014; 1: 37-45.
11) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. *Anti-Aging Med*. 2012; 9: 125-134.
12) Bradford, M.M. Rapid and Sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.
13) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Inhibition of advanced glycation end product formation by herbal teas and its relation to anti-skin aging. *Anti-Aging Med*. 2012; 9: 135-148.
14) Parengkuan L, Yagi M, Matsushima M, et al. Anti-glycation activity of various fruits. *Anti-Aging Med*. 2013; 10: 70-76.
15) Ishioka Y, Yagi M, Ogura M, et al. Antiglycation effect of various vegetables: Inhibition of advancedglycation end product formation in glucose and human serum albumin reaction system. *Glycative Stress Res*. 2015; 2: 22-34.
16) Moniruzzaman M, Parengkuan L, Yagi M, et al. Effect of proteins, sugars and extraction methods on the antiglycation activity of spices. *Glycative Stress Res*. 2015; 2: 129-139.
17) Otake K, Yagi M, Takabe W, et al. Effect of tea (*Camellia sinensis*) and herbs on advanced glycation endproduct formation and the influence of post-fermentation. *Glycative Stress Res*. 2015; 2: 156-162.
18) 米井嘉一, 八木雅之, 髙部稚子, 他. 皮膚老化概論：酸化ストレスと糖化ストレス. *日本化粧品技術者会誌*. 2019; 53: 83-90.
19) Picon F, Albarici V, Terci D, et al. Spectroscopic analysis of microstructure and protein degradation of human hair caused by new hair straightening systems. *IFSCC Magazine*. 2014; 17: 5-8.
20) Boga C, Taddei P, Micheletti G, et al. Formaldehyde replacement with glyoxylic acid in semipermanent hair straightening: A new and multidisciplinary investigation. *Int J Cosmet Sci*. 2014; 36: 459-470.
21) Une S, Sugimoto I, Akiyama J, et al. Antioxidative activity and flavonoid composition of the acid precipitates from a rooibos tea extract. *J Home Econ Jpn*. 2010; 61: 717-723.
22) Rabe C, Steenkamp J.A, Joubert E, et al. Phenolic metabolites from rooibos (*Asphalatus linearis*). *Phytochemistry*. 1994; 35; 1559-1565.
23) Wu CH, Yen GC. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J Agric Food Chem*. 2005; 53: 3167-3173.
24) Yamagishi S, Matsui T, Ishibashi Y, et al. Phytochemicals against advanced glycation end products (AGEs) and the receptor system. *Curr Pharm Des*. 2017; 23: 1135-1141.