

Original article

Antiglycative effect of plant extract complex

Masayuki Yagi¹⁾, Chieko Sakiyama¹⁾, Kyoko Mori²⁾, Masato Ohta²⁾,
Kiyoshi Amami²⁾, Yoshikazu Yonei¹⁾

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

Glycative Stress Research 2023; 10 (1): 6-15

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

植物抽出液コンプレックスの抗糖化作用

八木雅之¹⁾、崎山智恵子¹⁾、森 京子²⁾、太田正人²⁾、天海 潔²⁾、米井嘉一¹⁾

1) 同志社大学生命医科学部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

2) Cocochicosme 株式会社

抄録

糖化ストレスによる皮膚組織での終末糖化産物 (advanced glycation end products; AGEs) の蓄積は弾力性低下、肌理の喪失など皮膚老化を進展させる要因の一つとなる。糖化ストレスの抑制は抗糖化または糖化ケアと呼ばれる。皮膚の抗糖化には食品等による体の内側からの対策とスキンケア製剤等による体の外側からのアプローチがある。さらに抗糖化には食後高血糖の抑制、糖化反応の抑制、AGEsの分解排泄などがある。さまざまな植物素材には抗糖化作用が認められている。しかしAGEsの生成に至る生体内の糖化反応は複雑多経路なため多成分による対策が有用と考えられている。本研究はスキンケア製剤に使用可能な5種類 (沙棘 (sea buckthorn) 果実、甜茶 (chinese blackberry tea)、チャノキ (tea plants) 葉、ビワ (loquat) 葉、ローズマリー (rosemary) 葉) の植物抽出液コンプレックス (plant extract complex: PEC) の皮膚に対する抗糖化作用の評価を目的に、糖化反応抑制作用、AGEs架橋切断作用、糖化蛋白架橋形成抑制作用、糖化蛋白架橋切断作用、抗酸化作用を検証した。

PECはヒト血清アルブミン (human serum albumins: HSA)、コラーゲン、ケラチンの蛋白糖化反応モデルにおいて蛍光性AGEsの生成を抑制した。またPECはケラチン-グルコース糖化反応モデルにおいてペントシジン、N^ε-(carboxymethyl) lysine (CML)、3-deoxyglucosone (3DG)、glyoxal (GO) の生成を抑制した。さらにPECはAGEs架橋切断作用を有し、リゾチーム-グルコース糖化架橋モデルにおいて糖化による蛋白の架橋形成を抑制するとともに、糖化によって2量体化した蛋白を分解した。PECは皮膚蛋白中のAGEs蓄積を抑制し、糖化蛋白架橋形成による機能低下を防ぐことで皮膚の糖化予防に有用となる可能性がある。

連絡先：教授 八木雅之
同志社大学生命医科学部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
〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷1-3
TEL&FAX: 0774-65-6394 e-mail: myagi@mail.doshisha.ac.jp
共著者：崎山智恵子 csakiyam@mail.doshisha.ac.jp;
森 京子 kyoko.mori@cocochicosme.com; 太田正人 masato.ohta@cocochicosme.com;
天海 潔 yj@cocochi.cn; 米井嘉一 yonei@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2023; 10 (1): 6-15
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

KEY WORDS: 糖化反応抑制、蛋白架橋分解、植物抽出液コンプレックス、皮膚老化

はじめに

糖化ストレスによる皮膚組織での終末糖化産物 (advanced glycation end products; AGEs) の蓄積は弾力性低下、肌理の喪失など皮膚老化を進展させる要因の一つとなる。さらに酸化は糖化ストレスの促進要因となる¹⁾。糖化ストレスの抑制は抗糖化または糖化ケアと呼ばれる。皮膚の糖化ケアには食品等による体の内側からの対策とスキンケア製剤等による体の外側からの対策がある。

抗糖化には食後高血糖の抑制、糖化反応の抑制、AGEsの分解排泄などがある²⁾。食後高血糖の抑制は食事とともに糖質分解酵素阻害作用素材を摂取することや食事法の改善などがある³⁾。糖化反応抑制作用を有する物質にはアミノグアニジン (aminoguanidine; AG) が知られている^{4,5)}。しかし AG の摂取は肝機能の低下やビタミン B6 欠乏症などの副作用を有することなどから食品、化粧品等に配合することができない。一方、天然物においては茶⁶⁾、野菜・ハーブ⁷⁾、フルーツ⁸⁾ など多数の植物素材の糖化反応抑制作用が報告されている。

また糖化による AGEs 架橋切断作用を有する物質には *N*-フェナシルチアゾリウムブロミド (*N*-phenacylthiazolium bromide; PTB) が知られている⁹⁾。PTB は糖化蛋白の架橋構造の一種である α ジケトン を切断する¹⁰⁾。PTB と同様の作用を有する天然物にはザクロ (*Punica granatum*)¹¹⁾、トウビシ (*Trapa bicornis*)¹²⁾、フェネル (*Trigonella foenum-graecum*)、フェヌグリーク (*Foeniculum vulgare*)、ハイビスカス (*Hibiscus sabdariffa*)¹³⁾ などの抽出物がある。これらの AGEs 架橋切断作用素材は AGEs の分解排泄に関与する可能性がある。また食用紫菊花 (edible *Chrysanthemum morifolium*) 抽出液は AGEs 架橋切断作用とともに、糖化蛋白架橋形成抑制作用、糖化蛋白架橋切断作用が認められている¹⁴⁾。糖化ストレス抑制作用を有する植物にはフラボノイド (flavonoid)¹⁵⁾、タンニン類 (tannin)¹⁶⁾ などが含まれる。これらの成分は抗酸化作用を有する。

AGEs の生成に至る生体内の糖化反応は複雑多経路である¹⁷⁾。このため生成経路が異なる AGEs の生成抑制には多成分による抑制が有用と考えられている¹⁸⁾。4 種類の混合ハーブエキ스는 *in vitro* 試験においてさまざまな AGEs の生成抑制作用を有する¹⁹⁾。さらに混合ハーブエキスの摂取試験では血中、皮膚中の AGEs 蓄積抑制²⁰⁻²²⁾、皮膚老化指標の改善が認められている²³⁾。AGEs 架橋切断作用を有するヨモギ (*mugwort*; *Artemisia indica*) エキスを配合したスキンケア製剤は皮膚弾力を改善することが臨床試験で検証されている^{24, 25)}。このように *in vitro* 抗糖化試験におい

て AGEs 生成抑制、AGEs 架橋構造分解作用を有する素材は、食品やスキンケア化粧品としてヒトの糖化ストレスによる影響を軽減する可能性がある。

本研究ではスキンケア製剤に使用可能な 5 種類の植物抽出液コンプレックス (plant extract complex: PEC) の抗糖化に関する有用性評価を目的に、糖化反応抑制作用、AGEs 架橋切断作用、糖化蛋白架橋形成抑制作用、糖化蛋白架橋切断作用、抗酸化作用を検証した。

材料と方法

1) 試薬

使用した試薬は以下のメーカーから購入して使用した。ヒト血清アルブミン (human serum albumin; HSA, lyophilized powder, $\geq 96\%$, agarose gel electrophoresis)、メチルグリオキサル (methylglyoxal solution, 40 % in H₂O; MGO)、*N*-フェナシルチアゾリウムブロミド (*N*-phenacylthiazolium bromide; PTB) は Sigma-Aldrich Japan (東京都目黒区)。牛皮由来コラーゲン Type I (Collagen Type I、牛皮、Pepsin 分解) は ニッピ (東京都足立区)。羊毛由来ケラチン (keratin, partially sulfonated, 5 % in water) は東京化成工業 (東京都中央区)。アミノグアニジン (aminoguanidine hydrochloride; AG)、グリオキサル (40 % glyoxal solution; GO)、2, 3-ジアミノナフタレン (2, 3-diaminonaphthalene; DAN)、1-フェニル-1, 2-プロパンジオン (1-phenyl-1, 2-propanedione; PPD)、安息香酸 (benzoic acid)、リゾチーム塩酸塩 (卵白由来) (lysozyme, from Egg White)、トロロックス (($\pm$)-6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; trolox) は富士フィルム和光純薬工業 (大阪府大阪市)。3-デオキシグルコソン (3-deoxyglucosone; 3DG) は同仁化学研究所 (熊本県上益城郡)。CircuLex CML/*N*^e- (carboxymethyl) lysine ELISA Kit は MBL (愛知県名古屋市)。ペントシジン (pentosidine-TFA salt) はペプチド研究所 (大阪府茨木市)。1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) は Cayman CHEMICAL (Ann Arbor, Michigan, USA)。その他の試薬は特級または HPLC グレードのものを富士フィルム和光純薬工業またはナカライテスク (京都府京都市) から購入して使用した。

2) 試料

試料は沙棘 (sea buckthorn) (*Hippophae rhamnoides*) 果実、甜茶 (chinese blackberry tea) (*Rubus suavissimus*)、チャノキ (tea plants) (*Camellia sinensis*) 葉、ビワ (loquat)

(*Eriobotrya japonica*) 葉、ローズマリー (rosemary) (*Salvia rosmarinus*) 葉の1,3ブチレングリコール (BG) 抽出液を混合した植物抽出液コンプレックス (plant extract complex: PEC) とした。ヨモギ葉のBG抽出液は既報^{24, 25)}の抗糖化作用成分の作用対照液 (RF) として比較した。PEC、RFは適宜BG水溶液 (試料溶解液) で希釈し、試料溶液として使用した。試料濃度は各試料原液の抽出液濃度を100%とした。これらの試料は株式会社コスモビューティー (Cosmo beauty Co., Ltd: 大阪府大阪市) から提供を受けた。

3) 蛋白-グルコース糖化反応モデル

糖化反応抑制作用の検証は既報²⁶⁾を参考に蛋白-グルコース糖化反応モデルを使用した。反応液の組成は蛋白とグルコースを含む0.1 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中に試料溶液を1/10量添加して作成した。蛋白とグルコース濃度はHSA 8mg/mLとグルコース0.2 mol/L、コラーゲン1.2 mg/mLとグルコース0.4 mol/L、ケラチン5 mg/mLとグルコース0.2 mol/Lの組成とした。

糖化反応はリン酸緩衝液、蛋白溶液、グルコース溶液、試料溶液の全てを添加した溶液 (A)、Aのグルコース溶液の代わりに精製水を添加した溶液 (B)、Aの試料溶液の代わりに試料溶解液を添加した溶液 (C)、Cのグルコース溶液の代わりに精製水を添加した溶液 (D) を作成し60℃でインキュベートした。インキュベート時間はHSAの場合40時間、コラーゲンとケラチンの場合10日間とした。

4) AGEsの測定

蛍光性AGEs (F-AGEs) は既報²⁶⁾に従い、インキュベート後の糖化反応液200 µLを黒色のマイクロプレートに入れ、AGEs由来蛍光 (励起波長370 nm/蛍光波長440 nm) を測定した。ペントシジンは既報²⁷⁾に従い、糖化反応液50 µLと6 N塩酸を混合して110℃で18時間加水分解後、HPLCにより測定した。CMLは糖化反応液を適宜希釈し、CircuLex CML / N^e-(Carboxymethyl) lysine ELISA Kitを使用して測定した。

5) 糖化反応中間体の測定

糖化反応中間体は3DG、GO、MGOを既報^{28, 29)}に従い、糖化反応液100 µLを過塩素酸で除蛋白後、アルカリ条件下でDANを添加してラベル化後、HPLCで測定した。

6) 糖化反応抑制作用の算出

糖化反応抑制作用は既報²⁶⁾に従い、AGEsおよび糖化反応中間体の生成阻害率 (%) を次式によって算出した。糖化反応抑制作用の陽性対照はAGとした。

$$\text{生成阻害率 (\%)} = \{1 - (A - B) / (C - D)\} \times 100$$

さらに試料3濃度の生成阻害率から50%生成阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration; IC₅₀; mg/mL) を

算出した^{26, 30)}。IC₅₀は値が小さいほど糖化反応抑制作用が強いことを示している。

7) AGEs架橋切断作用の測定

AGEs架橋切断作用 (cleavage of AGE cross-link) の測定は既報³¹⁻³³⁾に従い、PPDをAGEs架橋モデル物質とし、試料によるPPDのαジケトン切断率を測定した。試料溶液、PPD、リン酸緩衝液 (pH 7.4) を混合した反応液を37℃で8時間反応させ、塩酸を添加して反応停止後、PPDのαジケトンが試料によって切断され、遊離した安息香酸量を既報³²⁾と同様のHPLC条件で測定した。AGEs架橋切断作用の陽性対照物質はPTBを使用した。AGEs架橋切断率はPPD分子のαジケトンが切断されると、1 molのPPDから1 molの安息香酸が生成することから、以下に示した式で算出した。

$$\text{AGEs 架橋切断率 (\%)} = \{(A - B - R) / C\} \times 100$$

A; 反応液中の安息香酸量

B; 試料中の安息香酸量

R; 試料溶解液のみを添加した時の反応液中の安息香酸量

C; 反応に供したPPD量

8) 糖化蛋白架橋形成抑制作用の測定

糖化蛋白架橋形成抑制作用は既報^{14, 34, 35)}に従い、リゾチーム-グルコース糖化蛋白架橋モデルを使用した。反応液はリゾチームとグルコースを含む0.1 mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中に試料溶液を添加して作成した。反応液はリン酸緩衝液、リゾチーム溶液、グルコース溶液、試料溶液の全てを添加した溶液 (A)、Aのグルコース溶液の代わりに精製水を添加した溶液 (B)、Aの試料溶液の代わりに試料溶解液を添加した溶液 (C)、Cのグルコース溶液の代わりに精製水を添加した溶液 (D) を作成し、60℃で40時間インキュベートした。

反応終了後の反応液は遠心分離を行い、上清を4-20% SDS-PAGEに供した。泳動後のゲルはCBB Stain Oneで染色し、泳動像を画像化後、リゾチームのdimer (28.6kDa)、trimer (42.9kDa) のバンドの強度をImage Jで解析した。糖化蛋白架橋形成抑制作用の陽性対照物質はAGを使用した。糖化蛋白架橋形成抑制率は以下の式に基づいて算出した。

糖化蛋白糖化架橋形成抑制率 (%)

$$= \{1 - (A - B) / (C - D)\} \times 100$$

A-D; 各反応液 SDS-PAGE ゲル染色像のリゾチーム

dimer または trimer のバンド強度

9) 糖化蛋白架橋切断作用の測定

糖化蛋白架橋切断作用 (cleavage of glycated-protein cross-link: CGPC) の測定は既報を参考に^{14, 33)}、糖化リゾチームを作成し、試料によるリゾチームdimerの分解率を測定した。糖化リゾチームはリゾチームとグルコースを含

む 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 60 °C、40 時間反応させた後、限外ろ過により低分子物質を除去して作成した。反応液は糖化リゾチームを含む 0.05 mol/L リン酸緩衝液中に試料溶液を添加した溶液; (S)、S の試料溶液の代わりに試料溶解液を添加した溶液; (R) を作成し、37 °C で 16 時間インキュベートして反応させた。その後、反応液を遠心分離し、上清を 4-20 % SDS-PAGE に供した。泳動後のゲルは CBB Stain One (ナカライテスク) で染色し、スキャナー GT-X830 (EPSON 社) で画像化した後、リゾチームの単量体 (M)、二量体 (D) のバンドの強度を Image J で解析した。CGPC のポジティブコントロール物質は PTB を使用した。糖化蛋白架橋切断率は以下の式に基づいて算出した。

$$\text{糖化蛋白架橋切断率 (\%)} = [1 - \{(D_S/M_S)/(D_R/M_R)\}] \times 100$$

S ; 試料添加時のリゾチームのバンド強度

R ; 試料溶解液のみを添加した時のリゾチームのバンド強度

M; リゾチームの単量体バンド

D; リゾチームの二量体バンド

10) 抗酸化作用の測定

抗酸化作用は既報^{36,37)}を参考に、trolox で作成した回帰直線の傾きを用いて試料溶液に相当する DPPH ラジカル消去活性を測定した。DPPH ラジカル消去活性の測定は試料抽出液、MES 緩衝液 (pH 6.0)、DPPH 溶液、50 % エタノール水溶液をマイクロプレートのウェルに添加混合し、室温で 20 分間反応後、520 nm の吸光度を測定した。

その後、試料抽出液添加量と吸光度との一次回帰直線の傾きを求めた。DPPH ラジカル消去活性値は、試料と同時に反応させた Trolox (ビタミン E の水溶性アナログ物質) 溶液の反応液から得られた吸光度の一次回帰直線の傾きを試料抽出液の回帰直線の傾きで除し、試料抽出液の Trolox 当量 (trolox equivalent: TE) として算出した。

統計解析

測定値は平均値 ± 標準偏差 (standard deviation: SD) で示した。測定値の比較にはテューキーの多重比較検定 (Tukey's test) または t 検定を用いた。統計解析結果は危険率 5% 未満を有意とした。

結果

蛋白-グルコース糖化反応モデルにおける蛍光性 AGEs 生成抑制作用

PEC と RF の F-AGEs 生成抑制率は HSA、コラーゲン、ケラチンをモデル蛋白とした 3 種類全ての反応モデル

において試料濃度とともに高値になった (Fig. 1)。PEC の F-AGEs 生成抑制作用の IC₅₀ はコラーゲンが最も低値 (0.175 %) で、次いで HSA (0.290 %)、ケラチン (2.92 %) の順に高値であった (Table 1)。同様に RF の IC₅₀ は HSA が最も低値 (0.826 %) で、次いでコラーゲン (1.557 %)、ケラチン (2.0 % より大) の順に高値であった。PEC の F-AGEs 生成抑制作用の IC₅₀ は RF に対して HSA で 0.4 倍、コラーゲンで 0.1 倍、ケラチンで 0.4 倍未満の値であった。PEC の IC₅₀ 値は RF と比べていずれのモデル蛋白においても低値であった。

ケラチン-グルコース糖化反応モデルにおける対する AGEs および糖化反応中間体生成抑制作用

PEC と RF のペントシジン、CML、3DG、GO、MGO 生成抑制作用の検証にはケラチン-グルコース糖化反応モデルを使用した (Table 2)。PEC の IC₅₀ は CML と GO が最も低値 (ともに 1 % 未満) で、MGO (1.9 %)、3DG (4.7 %)、Pentosidine (9.6 %) の順に高値であった。同様に RF の IC₅₀ は CML が最も低値 (0.9 %) で、GO (1.2 %)、MGO (4.1 %)、ペントシジン (8.8 %) の順に高値であった。IC₅₀ 値は PEC が MGO、RF が 3DG で生成抑制率が小さく、算出できなかった。AG の IC₅₀ 値は GO (0.1 %) を除いて作用が小さく算出できなかった。

AGEs 架橋切断作用

PEC と RF の AGEs 架橋切断率は試料の濃度とともに高値となった。試料濃度 1.5 % 時の AGEs 架橋切断率は PEC (16.3 ± 0.4 %) が RF (2.1 ± 0.2 %) よりも 7.8 倍高値であった (p < 0.05) (Fig. 2)。

糖化蛋白架橋形成抑制作用

PEC、RF および AG のリゾチーム 3 量体 (trimer)、2 量体 (dimer) 生成抑制率は試料の濃度とともに高値となった (Table 3)。糖化蛋白架橋生成抑制作用の IC₅₀ 値は 2 量体と 3 量体ともに AG が最も低値で、次いで PEC、RF の順に高値であった。試料濃度 0.3 % の 2 量体形成抑制率は PEC (54.9 ± 3.5 %) が RF (19.7 ± 4.3 %) よりも 2.8 倍高値であった (p < 0.05)。

糖化蛋白架橋切断作用

糖化蛋白架橋切断率は試料の濃度とともに高値となった。しかし RF の糖化蛋白架橋切断率は試料濃度 0.2 ~ 2 % において差異が認められなかった (Fig 3, 4)。0.5 % PEC の糖化蛋白架橋切断率は 30.9 ± 7.8 % で 0.5 % RF (18.6 ± 3.5 %) よりも 1.7 倍高値であった (p < 0.05)。

抗酸化作用

DPPH ラジカル活性は PEC (26.0 ± 3.8 mmol-TE/L) が RF (2.0 ± 0.3 mmol-TE/L) よりも 13.0 倍高値であった (p < 0.05) (Table 4)。

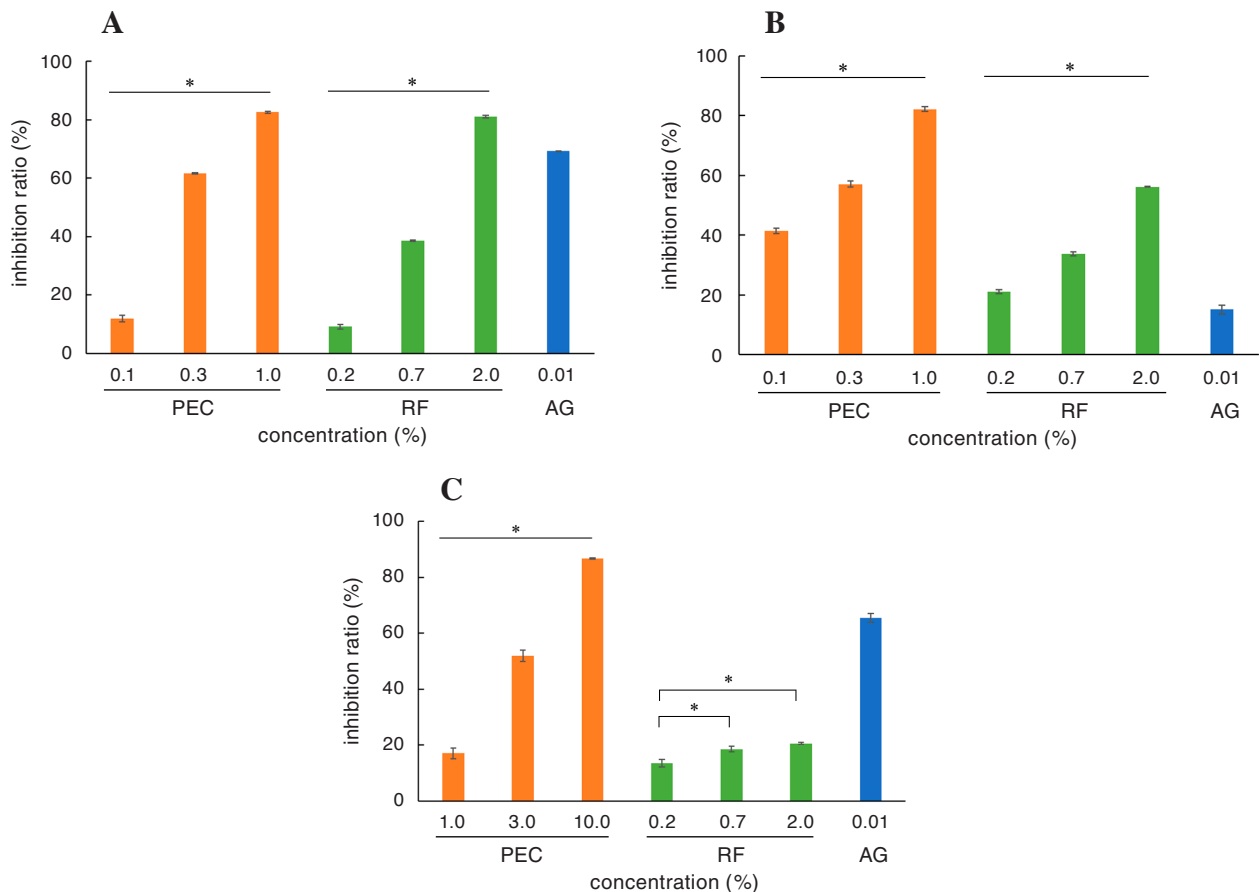


Fig.1. Inhibitory activity of F-AGE formation.

A, HSA-glucose model; **B**, collagen-glucose model; **C**, keratin-glucose model. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$, * $p < 0.05$ vs different concentration samples by Tukey's test; PEC, plant extract complex; RF, *Artemisia indica* Willd. var. *maximowiczii* leaf extract, AG, aminoguanidine; F-AGE, fluorescent advanced glycation end product; HSA, human serum albumin.

Table 1. Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) on the protein-glucose glycation model.

Model protein	PEC ¹⁾ (%)	RF ²⁾ (%)	AG ³⁾ (%)
HSA	0.290	0.826	0.006
collagen	0.175	1.557	0.049
keratin	2.92	2.0 <	0.007

1) plant extract complex, 2) *Artemisia indica* Willd. var. *maximowiczii* leaf extract, 3) aminoguanidine; positive control of glycation inhibitor. HSA, human serum albumin.

Table 2. Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) on the keratin-glucose glycation model.

AGE compound	PEC ¹⁾ (%)	RF ²⁾ (%)	AG ³⁾ (%)
pentosidine	9.6	8.8	NC ⁸⁾
CML ⁴⁾	1.0 >	0.9	NC
3DG ⁵⁾	4.7	NC	NC
GO ⁶⁾	1.0 >	1.2	0.1
MGO ⁷⁾	1.9	4.1	NC

1) plant extract complex, 2) *Artemisia indica* Willd. var. *maximowiczii* leaf extract, 3) aminoguanidine; positive control of glycation inhibitor, 4) N^{ϵ} -carboxymethyl lysine, 5) 3-deoxyglucosone, 6) glyoxal, 7) methylglyoxal, 8) can't calculation.

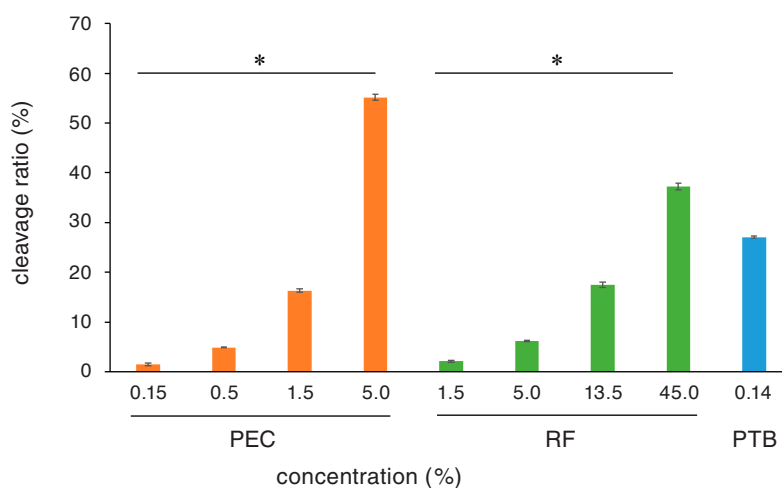


Fig. 2. AGE cross-link cleavage activity.

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$; * $p < 0.05$ vs different concentration samples by Tukey's test; PEC, plant extract complex; AGE, advanced glycation end product; RF, *Artemisia indica Willd. var. maximowiczii* leaf extract, PTB, N-phenacylthiazolium bromide.

Table 3. Inhibitory effect of PEC, RF and aminoguanidine on cross-linking formation in the lysozyme-glucose reaction model.

sample	conc. (%)	dimer		trimer	
		inhibition ratio (%)	IC ₅₀ (%)	inhibition ratio (%)	IC ₅₀ (%)
PEC ¹⁾	0.1	43.3 $\pm$ 4.1	0.19	88.9 $\pm$ 0.8	0.1 >
	0.3	54.9 $\pm$ 3.5		89.2 $\pm$ 3.3	
	1.0	68.7 $\pm$ 2.0		86.3 $\pm$ 1.1	
RF ²⁾	0.1	-1.6 $\pm$ 3.7	1.6	19.5 $\pm$ 2.8	0.24
	0.3	19.7 $\pm$ 4.3		66.8 $\pm$ 3.1	
	1.0	41.2 $\pm$ 3.7		84.6 $\pm$ 4.0	
AG ³⁾	0.01	25.7 $\pm$ 6.8	0.053	79.5 $\pm$ 3.8	0.01 >
	0.03	42.4 $\pm$ 3.8		92.9 $\pm$ 1.4	
	0.1	58.9 $\pm$ 8.3		98.6 $\pm$ 1.2	

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$; * $p < 0.05$ vs different concentration samples by Tukey's test; IC₅₀, half maximal inhibitory concentration. 1) plant extract complex, 2) *Artemisia indica Willd. var. maximowiczii* leaf extract, 3) aminoguanidine; positive control of glycation inhibitor. IC₅₀, half maximal inhibitory concentration.

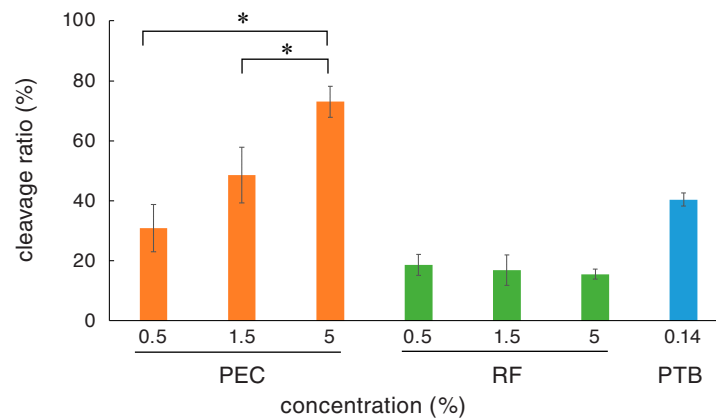


Fig. 3. Cleavage of glycated-protein cross-link activity.

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$; * $p < 0.05$ vs different concentration samples by Tukey's test; PEC, plant extract complex; RF, *Artemisia indica* Willd. var. *maximowiczii* leaf extract, PTB, *N*-phenacylthiazolium bromide.

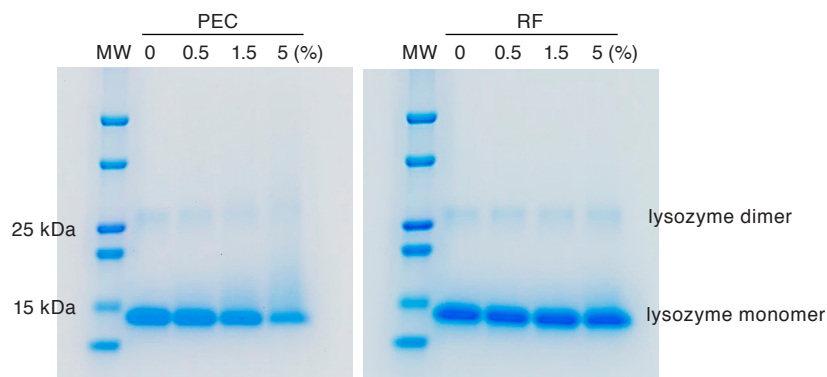


Fig. 4. CGPC of PEC and RF on lysozyme dimer in the glycated lysozyme.

Sample and 0.5 mg/mL glycated lysozyme were incubated at 37°C for 16 hours; SDS-PAGE was conducted using 2-40% acrylamide gels. Stained with CBB stain one; CGPC, cleavage of glycated-protein cross-linking; MW, molecular weight markers; BG, butylene glycol; PEC, plant extract complex; RF, *Artemisia indica* Willd. var. *maximowiczii* leaf extract; 0%, incubation without sample (with 2.5% BG).

Table 4. Antioxidative activity of PEC and RF.

sample	DPPH radical scavenging activity (mmol-TE/L)
PEC ¹⁾	26.0 $\pm$ 3.8
RF ²⁾	2.0 $\pm$ 0.3

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$; * $p < 0.05$ by t test; IC₅₀, half maximal inhibitory concentration. 1) plant extract complex, 2) *Artemisia indica* Willd. var. *maximowiczii* leaf extract. DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

考察

糖化反応抑制作用と蛋白架橋形成抑制作用

PEC、RF、AGには糖化反応抑制作用が認められた。PECは沙棘果実、甜茶、チャノキ葉、ビワ葉、ローズマリー葉の植物抽出液複合体（コンプレックス）である。沙棘の葉および果実の70%エタノール抽出液は牛血清アルブミン（BSA）-フルクトース糖化反応モデルにおいてAGEs生成抑制作用を有する³⁸⁾。また沙棘の果実にはカロテノイド、トコフェロール、フラボノイド、タンニンなどが含まれ強い抗酸化作用を有する³⁹⁾。

甜茶の熱水抽出液はコラーゲン-グルコース糖化反応モデルにいてAGEs生成抑制作用を有する⁴⁰⁾。さらに甜茶にはエタジタンニンが含まれ⁴¹⁾、抗アレルギー作用⁴²⁾、抗菌作用⁴³⁾を有する。チャノキの葉にはカテキン類が含まれる⁴⁵⁾。カテキン類には抗酸化作用⁴⁴⁾、糖化反応抑制作用^{40,46)}が認められている。ビワ葉には糖化反応抑制作用が認められている⁴⁰⁾。さらにビワ葉に含まれるコロソリン酸（corosolic acid）は抗酸化作用⁴⁷⁾、抗炎症作用⁴⁸⁾を有する。ローズマリーにはロスマリン酸が含まれ、抗酸化作用⁴⁹⁾、抗炎症作用⁵⁰⁾を有する。PECは複合体であるため各植物成分の作用が総合的に作用する可能性がある。またPECを構成するエキス植物の分類学的な科（family）は沙棘がグミ科（Elaeagnaceae）、甜茶とビワがバラ科（Rosaceae）、チャノキがツバキ科（Theaceae）、ローズマリーがシソ科（Lamiaceae）に属し多岐に渡る。植物においてはそれぞれの科の特徴成分が含まれる⁵¹⁾。

従ってPEC中は単一植物では含まれない多種類の植物成分が含まれる可能性がある。AGEsの生成に至る糖化反応系は複雑多経路である¹⁷⁾。このため生成経路の異なるAGEsの生成抑制には多成分による抑制が有用と考えられる¹⁸⁾。本研究ではケラチン-グルコース糖化反応モデルにおいてPECのAGEs生成抑制作用が単一植物由来のRFと比較して蛍光性AGEs（Table 2）、CML、3DG、GO、MGO（Table 3）で強い作用を示した。

PEC、RF、AGには全て蛋白架橋形成抑制作用が認められた。AGEsには架橋性を有するペントシジン（pentosidine）、クロスリン（crossline）、グルコspan（glucosepane）などがある。これらが蛋白中に蓄積すると蛋白の架橋重合体を形成する。一方、AGEsには蛍光性を有するペントシジン⁵²⁾、クロスリン⁵³⁾、ピロピリジン（pyrrolydine）⁵⁴⁾などがある。AGEsの蛍光性と架橋性は独立した特徴であり、AGEsごとに両方または一方の有無がある。本研究ではリゾチーム-グルコース糖化反応モデルにおける試料の2量体、3量体の生成抑制作用を検証した。PECの蛋白架橋形成抑制作用はRFよりも強かった。一方、架橋性AGEsの一種であるペントシジンのIC₅₀値はPECがRFよりも1.1倍で同レベルであった。また2量体形成抑制率はPECがRFよりも2.8倍強い作用を示した。PECとRFの作用の違いはPECがペントシジン以外の架橋性AGEsの生成を抑制した可能性を示している。

抗糖化作用成分の対照（RF）として使用したヨモギはキク科（Asteraceae）の植物である。ヨモギの80%エタノール抽出液にはコラーゲンゲル中に生成したAGEsの除去作用とヨモギエキスを配合した製剤の塗布試験による皮膚弾力改善作用が報告されている²⁵⁾。本研究における抗糖化作用の評価は*in vitro*試験のみであるが、PECは総じてRFよりも強い作用を示した。ドクダミ（*Dokudami: Houttuynia cordata*）地上部、セイヨウサンザシ（*Hawthorn: Crataegus laevigata*）実、ローマンカモミール（*Roman chamomile: Chamaemelum nobile*）花、ブドウ（*Grape: Vitis vinifera*）葉からなる混合ハーブエキスの抗糖化作用は*in vitro*と臨床試験の両方から検証されている¹⁹⁾。混合ハーブエキスの摂取試験では血中AGEsの蓄積抑制²⁰⁾、皮膚弾力性の改善²¹⁾、角層AGEsの蓄積抑制²²⁾、くすみ改善作用²³⁾などが認められている。混合ハーブエキスは分類学的に異なる4種類の植物が複数のAGEs生成経路を抑制し、さまざまなAGEsの生成を抑制すると考えられている¹⁹⁾。PECのコンプレックスは混合ハーブエキスと同様の観点で混合されており、ヒトを対象とした臨床試験での検証においても同様の作用を有する可能性がある。

AGEs架橋切断作用と蛋白架橋切断作用

PEC、RFにはAGEs架橋切断作用と蛋白架橋切断作用が認められた。但しRFの蛋白架橋切断作用は試料濃度0.5～5%の範囲において20%未満の切断率を示し、切断率が試料濃度に関係しなかった。AGEs架橋切断作用は糖化による蛋白架橋のうちαジケトンの切断作用を示している¹⁰⁾。一方、蛋白架橋切断作用のメカニズムは未解明である。糖化に伴う蛋白架橋形成にはαジケトン以外にグルコspan、lysine-dihydropyridinium-lysineの関与が報告されている¹⁰⁾。ハーブ等に含まれる12物質のAGEs架橋切断作用と蛋白架橋切断作用を検証した結果では両作用に相関性が認められなかった³³⁾。またAGEs架橋切断作用を有するフラボノイド3物質には蛋白架橋切断作用が認められなかった³³⁾。この結果は糖化によって架橋重合した蛋白分子内の架橋構造は単一でないことを示している。また架橋切断に関与する物質が単一の場合には糖化蛋白架橋を十分に切断できない可能性を示している。これらの結果からPECとRFの作用の違いはコンプレックスであるPECに含まれる多成分がαジケトン以外にも作用したと推定した。AGEs架橋切断作用を有する植物成分はフラボノイドやタンニン分子に付いたガレート基の数と分子内の位置に関与し、特にエラジタンニンの骨格となるトリヒドロキシベンゼン（trihydroxybenzene）構造を有する物質のAGEs架橋切断作用は強い³²⁾。

本研究において糖化蛋白架橋切断作用はリゾチーム-グルコース糖化反応モデルによって作成した糖化リゾチームを使用した。糖化させたリゾチームの2量体生成率は約12%（結果は未掲載）であったが、その架橋構造の種類や数は不明であった。糖化蛋白架橋切断作用のメカニズム解明には糖化させた蛋白中の架橋構造の同定と架橋切断作用

を有する物質に共通する分子構造等の検証が必要である。

皮膚老化予防への可能性

生体中の蛋白は細胞のエネルギー源として存在するグルコースに常に晒された状態にあるため糖化のリスクがある¹⁾。また糖化反応の進行やグルコースの酸化に伴う3DG、GO、MGOなどのアルデヒドの生成によりAGEsの生成が進む⁵⁵⁾。さらに皮膚組織は日光に含まれる紫外線によってラジカル生成や皮膚に接触する物質による酸化の影響を受ける。酸化は糖化によるAGEs生成の促進因子となる。このため皮膚組織の糖化反応抑制、AGEs架橋の分解および酸化の抑制はAGEsの蓄積を防ぐ上で重要となる。皮膚組織中のAGEs蓄積は真皮⁵⁶⁾、表皮^{57,58)}、角層⁵⁹⁾で認められている。真皮的糖化はコラーゲン、エラスチンに架橋構造を形成し、皮膚弾力を低下させる⁵⁸⁾。角層の糖化は肌理を乱し、見た目の老化を促進させる⁶⁰⁾。角層の主な蛋白はケラチンである。本研究においてPECはケラチンの糖化に対する各種AGEs生成抑制作用、AGEs架橋形成抑制作用が認められた。これらの作用はPECの塗布による皮膚老化抑制の可能性を示している。またPECのAGEs架橋分解作用、糖化蛋白架橋分解作用は皮膚組織の弾力低下を予防、改善に関与する可能性を示している。さらに抗酸化作用は糖化反応の進行を抑制する。これらの結果からPECを含むスキンケア製剤の皮膚へ使用は皮膚組織の老化予防や機能性の改善に作用する可能性がある。

研究限界

PECを構成する植物エキ스는既に化粧品原料として使用されており皮膚に対する安全性の高い素材と考えられる。

一方、本研究で得られたPECの作用は*in vitro*試験での作用検証結果である。PECの皮膚組織に対する老化予防への有用性はヒトに対する臨床試験等で検証する必要がある。

結語

沙棘果実、甜茶、チャノキ葉、ビワ葉、ローズマリー葉の植物抽出液コンプレックス (PEC) はHSA、コラーゲン、ケラチンの蛋白糖化モデルにおいて蛍光性AGEsの生成を抑制した。またPECはケラチン-グルコース糖化モデルにおいてペントシジン、CML、3DG、GO、MGOの生成を抑制した。さらにPECは糖化蛋白架橋抑制作用、AGEs架橋切断作用、糖化蛋白架橋切断作用が認められた。PECは皮膚蛋白中のAGEs蓄積を抑制し、糖化による蛋白架橋を防ぐことで皮膚の老化予防に有用となる可能性がある。

利益相反申告

本研究の実施にあたりCocochicosme株式会社より研究費の支援、株式会社コスモビューティーから試料の提供を受けた。

謝辞

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#21008) より支援を受けた。

参考文献

- 1) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo-aging in skin. *Anti-Aging Med.* 2011; 8: 23-29.
- 2) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 1. What is glycative stress? *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 152-155.
- 3) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 13. Regulation of glycative stress. 1. Postprandial blood glucose regulation. *Glycative Stress Res.* 2019; 6: 175-180.
- 4) Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science.* 1986; 232: 1629-1632.
- 5) Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, et al. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol.* 2004; 24: 32-40.
- 6) Hori M, Yagi Y, 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.
- 7) Ishioka Y, Yagi M, Ogura M, et al. Antiglycation effect of various vegetables: Inhibition of advanced glycation end product formation in glucose and human serum albumin reaction system. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 22-34.
- 8) Parengkuan L, Yagi M, Matsushima M, et al. Anti-glycation activity of various fruits. *Anti-Aging Med.* 2013; 10: 70-76.
- 9) Vasan S, Zhang X, Zhang X, et al. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. *Nature.* 1996; 382: 275-278.
- 10) Furber JD. Extracellular glycation crosslinks: prospects for removal. *Rejuvenation Res.* 2006; 9: 274-278.
- 11) Yagi M, Mitsuhashi R, Watanabe A, et al. Cleaving effect of pomegranate (*Punica granatum*) extract on crosslink derived from advanced glycation endproducts. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 58-66.
- 12) Takeshita S, Yagi M, Uemura T, et al. Peel extract of water chestnut (*Trapa bispinosa* Roxb.) inhibits glycation, degrades α -dicarbonyl compound, and breaks advanced glycation end product crosslinks. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 72-79.

- 13) Kawai H, Matsuo N, Yuasa E, et al. Investigation of herbal extracts that have both OPH activity enhancing action and AGE crosslink cleaving activity. *Glycative Stress Res.* 2021; 8: 39-44.
- 14) Yagi M, Hara H, Mifuru R, et al. Suppression of glycated protein cross-linking formation and cross-linking cleavage reaction of edible purple Chrysanthemum flower extract. *Glycative Stress Res.* 2021; 9: 7-14
- 15) Takabe W, Mitsunashi R, Parengkuan L, et al. Cleaving effect of melatonin on crosslinks in advanced glycation end products. *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 38-43.
- 16) Yagi M, Mitsunashi R, Watanabe A, et al. Cleaving effect of pomegranate (*Punica granatum*) extract on crosslink derived from advanced glycation endproducts. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 58-66.
- 17) Takeuchi M, Yamagishi S. Involvement of toxic AGEs (TAGE) in the pathogenesis of diabetic vascular complications and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009; 16: 845-858.
- 18) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 14. Regulation of Glycative stress. 2. Inhibition of the AGE production and accumulation. *Glycative Stress Res.* 2019; 6: 212-218.
- 19) Yonei Y, Yagi M, Hibino S, et al. Herbal extracts inhibit Maillard reaction, and reduce chronic diabetic complications risk in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anti-Aging Med.* 2008;5: 93-98.
- 20) Yonei Y, Miyazaki R, Takahashi Y, et al. Anti-Glycation effect of mixed herbal extract in individuals with pre-diabetes mellitus: A double-blind, placebo-controlled, parallel group study. *Anti-Aging Med.* 2010; 7(5): 26-35.
- 21) Kubo M, Yagi M, Kawai H, et al. Anti-glycation effects of mixed-herb-extracts in diabetes and pre-diabetes. *J Clin Biochem Nutr.* 2008; 43(suppl. 1): 66-69.
- 22) Yagi M, Shimode A, Hamada U, et al. Evaluation of the anti-glycation effect and the safety of a vinegar beverage containing indigestible dextrin and a mixed herbal extract. A placebo-controlled, double-blind study. *Glycative Stress Res.* 2014; 1: 14-24.
- 23) Kawai H, Shoshihara M, Kawakami H, et al. Anti-glycation and skin beautification properties from ingestion of mixed herb extract: A placebo-controlled, double-blind, randomized, parallel-group study. *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 236-245.
- 24) 多田明弘. 抗糖化化粧品に関する天然成分の評価と素材選定. コスメティックステーション. 2011; 5: 33-38.
- 25) Ohshima H, Tada A, Kanamaru A, et al. Relevance of the directionality of skin elasticity to aging and sagging of the face. *Skin Research and Tech.* 2011; 17: 101-107.
- 26) 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.
- 27) Yagi M, Isshiki K, Takabe W, et al. Measurement of pentosidine in human plasma by the high performance liquid chromatography. *Glycative Stress Res.* 2018; 5: 119-128.
- 28) Kusunoki H, Miyata S, Ohara T, et al. Relation between serum 3-deoxyglucosone and development of diabetic microangiopathy. *Diabetes Care.* 2003; 26: 1889-1894.
- 29) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 2. The Evaluation of glycative stress: Measurement of blood glucose, glycated proteins and intermediates. *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 205-209.
- 30) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging. 4: The evaluation of glycative Stress: Evaluation for anti-glycative effect. *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 87-92.
- 31) Vasan S, Zhang X, Zhang X. et al. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. 1996; *Nature.* 382: 275-278.
- 32) Yagi M, Mitsunashi R, Watanabe A, et al. Cleaving effect of pomegranate (*Punica granatum*) extract on crosslink derived from advanced glycation endproducts. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 58-66.
- 33) Kim Y, Yokota S, Yagi M, et al. Cleavage of glycated protein cross-linking and cleavage of AGEs cross-linking of substances contained in vegetables and herbs. *Glycative Stress Res.* 2022; 9: 106-111.
- 34) Perera HKI, Ranasinghe HASK. A simple method to detect plant based inhibitors of glycation induced protein cross-linking. *Asian J Med Sci.* 2015; 6: 28-33.
- 35) Perera HKI, Handuwalage CS. Analysis of glycation induced protein cross-linking inhibitory effects of some antidiabetic plants and spices. *BMC Complement Altern Med.* 2015; 15, 175.
- 36) Oki T, Osame M, Masuda M, et al. Simple and rapid spectrophotometric method for selecting purple-fleshed sweet potato cultivars with a high radical-scavenging activity. *Breed Sci.* 2003; 53:101-107.
- 37) Okuda F, Yagi M, Takabe W, et al. Anti-glycative stress effect of yogurt whey. *Glycative Stress Res.* 2019; 6: 230-240.
- 38) Lee HHL, Lee CJ, Choi SY, et al. Inhibitory effect of sea buckthorn extracts on advanced glycation endproduct formation. *Food Chemistry.* 2022; 373: 131364.
- 39) Ciesarovaa Z, Murkovic M, Cejpek K, et al. Why is sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) so exceptional? *Food Research Int.* 2020; 133: 109170.
- 40) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Inhibition of advanced glycation end product formation by herbal teas and its relation to anti-akin aging. *Anti-Aging Med.* 2012; 9: 135-148.
- 41) Tanaka T, Hong ZHANG, Jiang ZZ, Kouno I, et al. Relationship between hydrophobicity and structure of hydrolyzable tannins, and association of tannins with crude drug constituents in aqueous solution. *Chem Pharm Bull.* 1997; 45: 1891-1897.
- 42) Tanaka, T., Nonaka, G., Nishioka, I., Tannins and related compounds. Part 28. Revision of the structures of sanguins H-6, H-2, and H-3, and isolation and characterization of sanguin H-11, a novel tetrameric hydrolysable tannin and seven related tannins from *Sanguisorba officinalis*. *J Chem Research (S).* 1985, 176-177.
- 43) Aguilera-Correa JJ, Fernández-López S, Cuñas-Figueroa ID, et al. Sanguin H-6 fractionated from cloudberry (*Rubus chamaemorus*) seeds can prevent the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm development during wound infection. *Antibiotics.* 2021; 10: 1481.
- 44) Rietveld A, Wiseman S. Antioxidant Effects of tea: Evidence from human clinical trials. *J Nutr.* 2003; 133: 3285S-3292S.
- 45) Tanaka T, Kouno I. Oxidation of tea catechins: Chemical structures and reaction mechanism. *Food Sci Technol Res.* 2003; 9: 128-133.
- 46) 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.

- 47) Li BB, Pang K, Hao L, et al. Corosolic acid improves erectile function in metabolic syndrome rats by reducing reactive oxygen species generation and increasing nitric oxide bioavailability. *Food Sci Technol*. 2022; 42: e108821.
- 48) Zhao J, Zhou H, An Y, et al. Biological effects of corosolic acid as an anti-inflammatory, anti-metabolic syndrome and anti-neoplastic natural compound. *Oncology Lett*. 2021; 21: 84.
- 49) Etter SC. *Rosmarinus officinalis* as an antioxidant. *J Herbs Spices Med Plants*. 2005; 11: 121-159.
- 50) Yua MH, Choia JH, Chae IG, et al. Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chemistry*. 2013; 136: 1047-1054.
- 51) Robards K, Antolovich M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyt*. 1997; 122: 11R-34R.
- 52) Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix: Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem*. 1989; 264: 21597-21602.
- 53) Obayashi H, Nakano K, Shigeta H, et al. Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation end product *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 226: 37-41.
- 54) Hayase F. Recent development of 3-deoxyosone related Maillard reaction products. *Food Science and Technology Res*. 2000; 6: 79-86.
- 55) Yagi M, Takabe W, Wickramasinghe U, et al. Effect of heat-moisture-treated high-amylose corn starch-containing food on postprandial blood glucose. *Glycative Stress Res*. 2018; 5: 151-162.
- 56) 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 Invest Dermatol*. 1997; 108: 797-802.
- 57) Jeanmaire C, Danoux L, Pauly G, et al. Glycation during human dermal intrinsic and actinic ageing: an *in vivo* and *in vitro* model study. *Br J Dermatol*. 2001; 145: 10-18.
- 58) 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.
- 59) Yokota M, Tokudome Y. Permeation of hydrophilic molecules across glycated skin is differentially regulated by the stratum corneum and epidermis-dermis. *Biol Pharm Bull*. 2015; 38: 1383-1388.
- 60) 五味貴優. 角層のAGEs 評価法とその応用. バイオインダストリー. 2011; 28: 20-26.