

## 地域資源を活用した機能性食品および素材開発（第3報）

### ー皮膚機能に及ぼすレンコンポリフェノールの影響ー

食品工業部

柘植圭介 岩元彬 吉村臣史 鶴田裕美

レンコンポリフェノール (LP) は、抗肥満作用等の食品機能に加えて抗菌活性を有しており、化粧品向け防腐剤の代替成分として活用し得る素材である。本報では、化粧品向け素材としての LP のさらなる用途を拓くべく、紫外線により誘導される皮膚炎症マーカーの産生に及ぼす LP の効果を検証した。ヒト3次元培養表皮を用い、UVA 照射により誘導される炎症性サイトカイン IL-1 $\alpha$ およびコラゲナーゼ MMP-1 産生に及ぼす LP の影響を評価した。その結果、UVA 照射により誘導された IL-1 $\alpha$ および MMP-1 の遺伝子発現が、培養表皮側からの LP 添加により抑えられた。また、培養液中の IL-1 $\alpha$ および MMP-1 濃度も、遺伝子発現抑制を反映して低下した。以上の結果から、LP が化粧品の防腐剤代替成分のみならず、皮膚の紫外線によるダメージを緩和する機能性素材として利用展開できる可能性が示唆された。

### 1. はじめに

佐賀県では、「中小企業による地域産業資源を活用した事業活動の促進に関する法律（平成19年施行、令和2年10月1日廃止）」に基づき、「みかん」や「佐賀のり」をはじめとする農林水産物95件を地域資源として指定してきた（令和2年度）<sup>1)</sup>。レンコンは、本県の地域資源に指定されている農産物の一つであり、その生産量は全国2位、九州1位を誇る（令和2年度）。

我々は、これまでに、未利用な規格外品のレンコンを新たな機能性食品素材として利用することを目的に研究を行ってきた。そのなかで、レンコンに含まれるポリフェノール（レンコンポリフェノール；LP）は、主にカテキンおよびガロカテキンを構成成分とした重合型のプロアントシアニジンであり（図1）、肥満モデルマウスにおける脂肪肝改善効果や線虫の寿命延長効果を認めている<sup>2-6)</sup>。また、レンコンポリフェノールは、可食部に比べて、皮や節などの未利用部位に多く存在することも認めている<sup>7)</sup>。

また、佐賀県では「さがフード&コスメラボ」や「唐津コスメティック構想」など、県内の農林水産資源を活用したコスメティック素材の開発支援の取り組みが活発に行われている。当センターでも、これまでに佐賀県産未利用素材の化粧品・健康食品への活用を目指し、LPの化粧品向けの防腐効果に関する検証を行ってきた。その結果、LPを0.1%配合したモデル化粧水が、細菌である大腸菌、黄色ブドウ球菌および緑膿菌数を顕著に減少させることを明らかにしている<sup>8)</sup>。

このような結果は、化粧品向け天然抗菌成分として

の LP の活用を示唆するものであるが、さらに、LP の皮膚への生理機能を明示し、肌の状態を良好に保つ効果を実証すれば、LP が美容効果と抗菌性を併せ持つハイブリット型の化粧品原料となり得ると考えられる。

近年の化粧品市場では、紫外線などの外的要因や加齢などの内的要因で起こる皮膚ダメージやトラブルの改善・解消効果を訴求した高機能化粧品が市場を急成長させている。また、このような化粧品の開発では、動物実験を行わずに3次元培養表皮等を用いる代替法による試験が世界中で強く求められている。

以上の背景から、本研究では紫外線による皮膚ダメージに及ぼす LP の影響について3次元培養表皮を用いて検証した。その結果、LP が皮膚の炎症やシワ形成等の原因となる炎症マーカーの産生を抑制することを初めて明らかにしたので報告する。

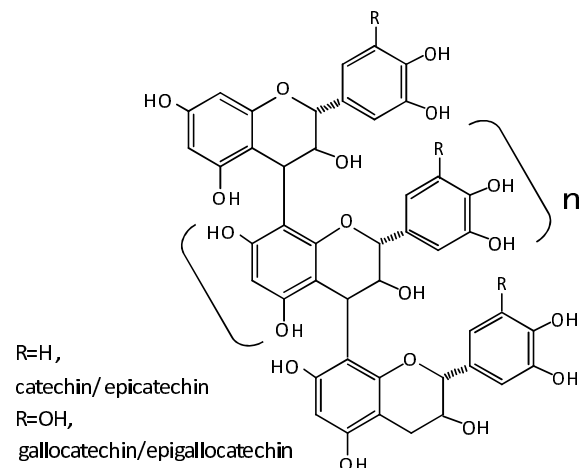


図1 レンコンポリフェノールの推定構造

## 2. 実験方法

### 2.1 試薬類

本研究における試薬は以下のものを用いた。細胞機能評価用試薬：ウシ胎児血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific), TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Thermo Fisher Scientific), Prime Script<sup>™</sup> RT Master Mix, TB Green Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Takara Bio), 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT; 同仁化学研究所), 抗ヒト MMP-1 マウス抗体 (Santa Cruz Biotechnology), HRP 結合-抗マウス IgG 抗体 (Bethyl Laboratories), 抗ヒト IL-1 $\alpha$ 抗体およびビオチン結合-抗ヒト IL-1 $\alpha$ 抗体 (Peprotech), HRP 結合ストレプトアビジンおよび 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) for ELISA (Thermo Fisher Scientific), 試料精製用試薬：疎水性吸着樹脂 (Diaion HP-20; 三菱化学)。

有機溶媒, 酸・アルカリ溶媒および緩衝液は, 特に記載しない限り富士フィルム和光純薬製の特級または LC-MS 用試薬を用いた。

### 2.2 LP の調製

県内の食品工場からレンコンの皮 (図2) を収集し, 露点制御型熱風乾燥機 (木原製作所, SM10S-EH-DPC) を用いて 70°C にて乾燥させた。これをハンマークラッシャー (三庄インダストリー, メッシュ孔径 0.3 mm) で粉碎し, LP 抽出原料とした。

原料 300 g に 3 L の 50%エタノールを加え, 常温で 5 時間攪拌抽出し, プフナー漏斗 (粘稠ろ紙使用) で吸引ろ過した。残渣に 2.4 L の 50%エタノールを加え, 同一の操作で再抽出し, ろ液を得た。混合ろ液の減圧濃縮物を水で再溶解し, 疎水性吸着樹脂 (Diaion HP-20) に吸着させた。樹脂を水洗浄後に 90%エタノールで溶出させ, 濃縮乾固物 (収量 9.95 g) を LP 試料とした。



図2 乾燥前のレンコン皮

### 2.3 3次元細胞培養

ヒト表皮角化細胞を用いて作製された 3 次元培養表皮 (LabCyte EPI-MODEL24, J-TEC) を用いて, UVA (波長 320-400 nm) 照射後の培養表皮のタンパク質/遺伝子発現に及ぼす LP の影響を検討した。LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験は経済協力開発機構 (OECD) テストガイドライン 439 に記載されており, LabCyte EPI-MODEL24 は皮膚刺激性の評価に適した培養表皮モデルとされている。

まず, LabCyte EPI-MODEL24 の培養カップを 500  $\mu$ L のアッセイ培地を分注したアッセイプレートに移し, CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。18 時間の前培養後, UVA (320-400 nm, ランプ: Toshiba SH1002MA, フィルター: Asahi spectra SH0325+LU0325) を 30 J/cm<sup>2</sup> の強度で照射した。照射後に培養カップに PBS または所定濃度の LP を含む PBS を添加し, CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 6 時間培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄した後にアッセイ培地で 18 時間培養した。培養カップに PBS または LP を含む PBS を再添加し, 6 時間培養後細胞を洗浄し, アッセイ培地で 18 時間培養した。照射から 48 時間培養した後に細胞を回収し, mRNA およびタンパク質の発現の解析に供した。

### 2.4 生細胞率の測定

3 次元培養表皮の生細胞率は MTT アッセイにより評価した。まず, 24 ウェル培養プレートにアッセイ培地で 0.5 mg/mL に調製した MTT を 500  $\mu$ L ずつ分注し, CO<sub>2</sub> インキュベーター内で加温した。これを培養カップに移し, CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置した。4 時間反応後, 培養カップから培養表皮を回収し, 0.04 mol/L の塩酸を含むイソプロピルアルコールに浸漬させ, 室温で 16 時間静置して色素を抽出した。その後, 抽出液を 96 ウェルマイクロプレートに移し, 570-650 nm の吸光度を測定することにより, 生細胞率を算出した。

### 2.5 遺伝子発現解析

3 次元培養表皮における IL-1 $\alpha$  およびコラゲナーゼ (Matrix metalloproteinase-1, MMP-1) の mRNA 発現量の変化を調べるため, バイオマッシャー II を用いて培養表皮を破碎後 TRIZOL<sup>®</sup> Reagent を用いて総 RNA を抽出し, PrimeScript<sup>™</sup> RT Master Mix により cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として, TB Green<sup>®</sup> Premix EX Taq<sup>™</sup> (Takara) を用いてリアルタイム PCR を行うことにより, 遺伝子発現量を比較した。得られたデータは, BIO-RAD CFX Manager version 3.1 を用いて Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部標準として比較 CT 法により解析した。これらの操作は製造プロトコールに従って行った。

## 2.6 タンパク質発現解析

培養48時間後の培養液に蓄積したIL-1 $\alpha$ 濃度を、IL-1 $\alpha$  human uncoated ELISA kit (Invitrogen) を用いて酵素抗体法により測定した。まず、イムノプレートに Anti-human IL-1 $\alpha$  antibody を固定し、ブロッキング剤によりブロックコートした。これに培養液を加え、Biotin-conjugated anti-human IL-1 $\alpha$  antibody と Avidin-HRP により検出した。その際、基質には TMB を用い、450-570 nm の吸光度を測定することにより、培養液中の IL-1 $\alpha$  濃度を算出した。

また、培養48時間後の培養液に蓄積した MMP-1 を、ウエスタンブロッティングにより検出した。まず、ポリアクリルアミドゲル (Bio-rad) を用いて培養液を電気泳動に供し、ニトロセルロースメンブレン (Bio-rad) に転写した。これを PVDF blocking reagent for can get signal (Toyobo) でブロックコートした後、anti-human MMP-1 antibody および HRP-conjugated anti-mouse IgG を加え、反応させた。基質には Clarity Western ECL substrate (Bio-rad) を用い、Chemidoc XRS plus (Bio-rad) により化学発光を検出し、Image lab software (Bio-rad) で解析した。

## 2.7 統計処理

得られたデータは、Statcel4 (OMS Publishing Inc.) を用い、Turkey-kramer 法で解析した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 細胞生存率

3次元培養表皮におけるLP添加48時間後の細胞生存率を図3に示した。その結果、UVA照射によって有意に低下した細胞の生存率が、濃度1 $\mu$ g/mLのLPの添加によりUVA未照射と同程度にまで向上することが明らかとなった。

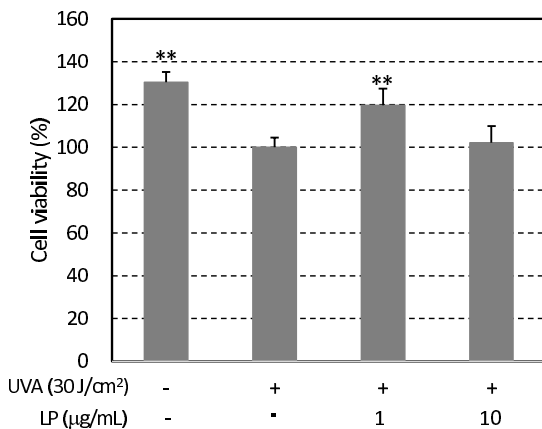


図3 細胞生存率に及ぼすLPの影響

測定値は4-5連の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。  
\*\*p<0.01 vs UVA(+), LP(-)を示す。

### 3.2 IL-1 $\alpha$ 産生に及ぼすLPの影響

3次元培養表皮におけるIL-1 $\alpha$ のmRNA発現量および培養液中の濃度をそれぞれ図4および5に示す。UVA照射によって誘導されたIL-1 $\alpha$ の遺伝子発現が、LPを1 $\mu$ g/mLの濃度で添加することにより低下する傾向が認められた(図4)。同様に、表皮にUVAを照射するとIL-1 $\alpha$ の培養液中の濃度が顕著に増加する一方で、LPを10 $\mu$ g/mLの培地に加えたものではその濃度が有意に低下した(図5)。

IL-1 $\alpha$ は炎症や組織損傷、免疫応答における強力なメディエーターとして機能する炎症性サイトカインである。IL-1 $\alpha$ は表皮角化細胞など、皮膚を構成する細胞においても高発現しており、特に紫外線等の外部刺激により亢進し、皮膚の炎症反応の一因と考えられている。本研究において、3次元培養表皮の系においてもUVA照射によるIL-1 $\alpha$ の産生が亢進することが確認され、さらにはLP添加により産生が抑制されることが明らか

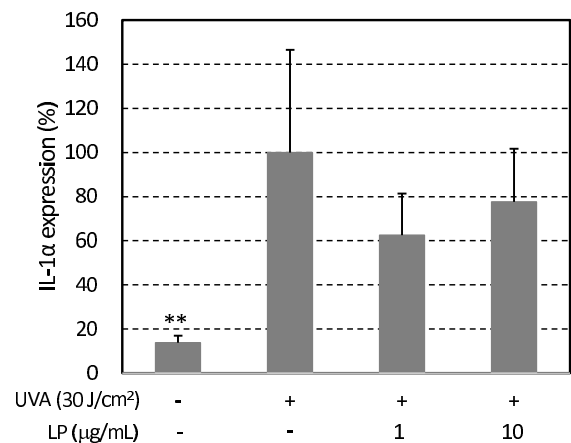


図4 IL-1 $\alpha$ 遺伝子発現に及ぼすLPの影響

測定値は4-5連の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

\*\*p<0.01 vs UVA(+), LP(-)を示す

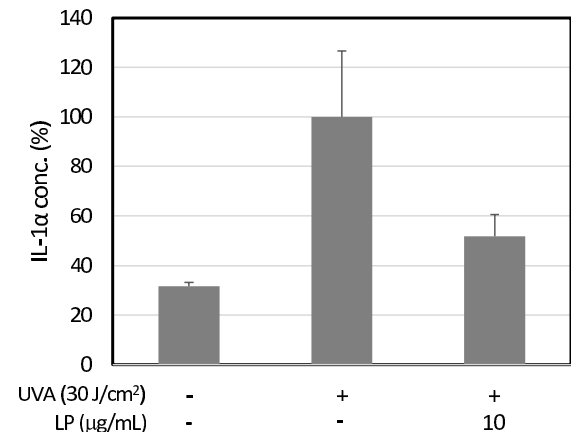


図5 IL-1 $\alpha$ 産生に及ぼすLPの影響

測定値は4-5連の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

となった。このことは、LPがIL-1 $\alpha$ 産生の抑制を介して紫外線による表皮の炎症を緩和し、ダメージ低減にはたらく可能性を示唆していた。

### 3.3 MMP-1産生に及ぼすLPの影響

コラーゲンは生体タンパク質の1/4~1/3を占めるタンパク質であり、加齢や外的ストレスにより減少することが知られている。コラーゲンの減少により起こる症状としては、皮膚のシワの形成やハリ低下、関節炎などがある。そのため、コラーゲンの分解や産生量の低下を抑制することは、美容や健康機能の恒常性維持に繋がる。

そこで、本研究ではコラーゲン分解酵素であるMMP-1産生に対するLPの影響を調べた。その結果、図6に示すようにUVAを照射した細胞の培養液ではMMP-1のmRNA発現量が上昇する傾向があったのに対し、1 $\mu$ g/mLの濃度でLPを添加した細胞では上昇が抑えられる傾向にあった。同様に、表皮にUVAを照射するとMMP-1の培養液中の相対含量が顕著に増加する一方で、10 $\mu$ g/mLの濃度でLPを培地に加えたものではその量が低下する傾向にあった(図7)。即ち、UVAの照射により3次元培養表皮のMMP-1産生は促進されたが、LPを添加したものではその産生が抑制されたことが示された。このことは、LPがMMP-1の産生抑制を介して紫外線による皮膚のコラーゲン分解を抑え、シワ形成やハリ低下を緩和する可能性を示唆していた。

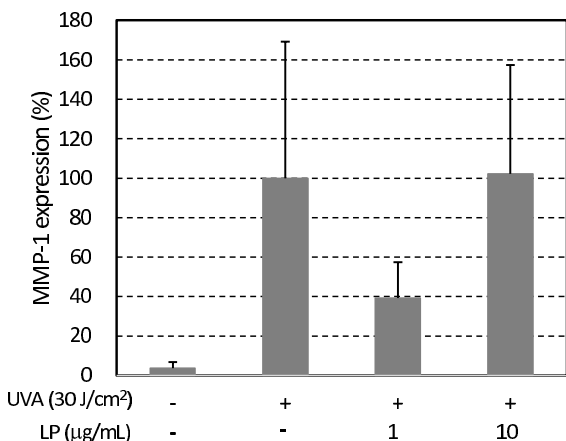


図6 MMP-1 遺伝子発現に及ぼすLPの影響

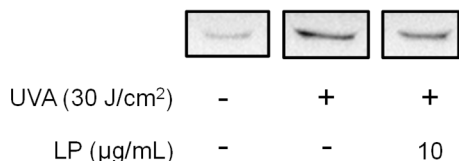


図7 MMP-1産生に及ぼすLPの影響

### 4. おわりに

本研究ではこれまで、LPが機能性食品素材のみならず、天然由来の安全性の高い化粧品防腐剤の代替成分として利用できるかの可能性について検討し、その効果を実証している。モデル化粧水を用いた保存効力試験を行った結果、LPを1mg/mL配合した化粧水は、細菌である大腸菌、黄色ブドウ球菌および緑膿菌数を顕著に減少させた<sup>8)</sup>。また、防腐剤として1,3-ブチレングリコールを5%併用したモデル化粧水では、LP 100 $\mu$ g/mLの低濃度配合においても、緑膿菌に対する強い防腐効果が認められ、防腐剤との併用により化粧品の防腐剤代替成分として利用展開できる可能性が示唆されている。

今回、化粧品用防腐剤としてのLPの効果に加え、さらに紫外線が誘導するIL-1 $\alpha$ /MMP-1産生抑制効果をヒト3次元培養表皮の系で明らかにした。本系におけるLPの有効濃度は1 $\mu$ g/mLであり、また、表皮上部側からのLP添加によって産生抑制効果を示していた。3次元培養表皮は、ヒトの実際の皮膚を模した多層構造を成しており、単層培養された角化細胞や線維芽細胞に比べるとバリア性が高いのが特徴である。このような系においてLPのIL-1 $\alpha$ /MMP-1産生抑制効果が示されたことは、LPが実際のヒトの皮膚においても紫外線ダメージの緩和にはたらく可能性を強く示唆している。

併せて、LPは、これまでに、ヒトパッチテストおよびヒトアレルギーテストを実施しており、その安全性が証明されている(データ示さず)。

以上の結果を踏まえ、佐賀県産の規格外レンコン、特にその皮に多く含まれるLPの化粧品素材としての新たな用途の創出が望まれる。これらの達成が、ひいてはサステナブルな未利用資源の有効活用や新産業創出に結実することを強く期待するものである。

なお、研究を実施するにあたって使用した紫外線照射装置およびリアルタイムPCR装置は、電源立地地域対策交付金で導入した。

### 参考文献

- 1) 佐賀県庁 HP : <https://www.pref.saga.lg.jp/kiji00327303/index.html>
- 2) 鶴田裕美, 柘植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義, 柳田晃良, 永尾晃治: 佐賀県工業技術センター研究報告書, **16**, 51-53 (2007)
- 3) 鶴田裕美, 柘植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義, 柳田晃良, 永尾晃治: 佐賀県工業技術センター研究報告書, **18**, 41-47 (2009)
- 4) Tsuruta Y, Nagao K, Shirouchi B, Nomura S, Tsuge K,

- Koganemaru K, Yanagita T. : Effects of Lotus root (the edible rhizome of *Nelumbo nucifera*) on the development of non-alcoholic fatty liver disease in obese diabetic db/db mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* **76** (3), 462-466 (2012)
- 5) Tsuruta Y, Nagao K, Kai S, Tsuge K, Yoshimura T, Koganemaru K, Yanagita T. : Polyphenolic extract of lotus root (edible rhizome of *Nelumbo nucifera*) alleviates hepatic steatosis in obese diabetic db/db mice. *Lipids Health Dis.* **10**, 202 (2011)
- 6) 鶴田裕美, 吉村臣史, 澤田和敬 : 佐賀県工業技術センター研究報告書, **23**, 57-62 (2014)
- 7) 鶴田裕美, 吉村臣史, 澤田和敬, 柘植圭介 : 佐賀県工業技術センター研究報告書, **24**, 45-49 (2015)
- 8) 鶴田裕美, 吉村臣史, 澤田和敬, 柘植圭介 : 佐賀県工業技術センター研究報告書, **29**, 25-29 (2021)