

# ミャンマー産ハーブの美白効果の検証と美白成分の解析

富山大学和漢医薬学総合研究所

森田 洋行

The bark and wood of *Hesperethusa crenulata* Roem., *Naringi crenulate* (Roxb.) Nicols., *Limonia acidissima* Linn. belonging to Rutaceae, as well as *Premna integrifolia* Linn. (Verbenaceae) have been used to produce traditional cosmetics, also known as “Thanaka” cream, for over 2000 years in Myanmar. Applying the paste to the skin of the face, arms, and legs have been believed to make it smooth, clear, and cool, and also increases the production of collagen and elastin to prevent wrinkles and skin aging, excessive facial oil, serious acne, pimples, blackheads, and whiteheads. Among the plants used as “Thanaka”, the most popular ones among customers are the former three, whereas the last one is especially popular in the Tanintharyi Region, in the southern part of Myanmar. However, *P. integrifolia* has not been investigated in a scientific, evidence-based manner. Hence, we evaluated *in vitro* melanin deposition regulatory, anti-inflammatory, antibacterial, and antifungal activities of the water, methanol, and chloroform extracts of *P. integrifolia*, and found that all extracts showed the above mentioned activities. In particular, the chloroform extract showed the highest potency in the anti-melanin deposition and anti-inflammatory activities, suggesting the cosmetic effectiveness of this plant. In order to further clarify the cosmetic effectiveness of this plants from the chemical component point of view, we carried out the isolation of the compounds from the chloroform extract, and obtained 21 compounds including six new lignans. Interestingly, ten compounds exhibited strong or moderate anti-melanin deposition activities, providing new insight into the effectiveness of this plant as a cosmetic ingredient. Additionally, five compounds showed weak melanogenesis enhancing activities. The present results also suggest that the cosmetic anti-melanin deposition efficacy of the *P. serratifolia* wood should be discussed with consideration of the melanogenesis enhancing activities of the chemical constituents in this plant.

## 1. 緒言

ミャンマーでは、ミカン科植物 *Hesperethusa crenulata* Roem の枝木・樹皮・根のペーストが“タナカ”という名で伝統的に天然美肌化粧品として用いられている。現地では、この化粧品には、毛穴収縮作用と皮脂の過剰分泌阻害作用による肌の保湿効果、抗酸化作用による肌荒れの軽減効果、さらには皮膚病予防の効果があると言われている。また、日焼止めとして、肌の老化防止効果を目的に使用されている。一方、ミャンマー南部のバイやダウェイでは、クマツヅラ科植物 *Premna integrifolia* L. (異名：*Premna serratifolia*) がタナカとして利用されている。この植物は、インドでは美肌化粧品には利用していないが、解熱、解毒、貧血改善、皮膚障害治療、健胃薬、抗炎症、肝障害改善、便秘、強心薬などの多岐に亘る症状に有効なアーユルヴェーダ生薬の一つとして、頻繁に利用されている<sup>1)</sup>。既に、タイ産 *H. crenulata* については、水や有機溶媒抽出液が強い抗炎症・抗酸化作用、比較的強いチロシナーゼ阻害活性、及び、弱いながらも抗菌活性を示すことが明らか

かになった<sup>2)</sup>。また、同時に、細胞毒性の極めて弱いことが報告されるに至り、*H. crenulata* の美肌化粧品素材としての有効性が間接的に示唆されている。産地は不明であるが、同植物に含まれるクマリン誘導体が抗菌活性や抗酸化作用を示すことも報告されている<sup>3)</sup>。*P. integrifolia* については、アルカロイドやポリフェノールなどの単離が報告されている<sup>4-13)</sup>。しかし、化粧品素材として検証した例は極めて少ない<sup>4, 10-12)</sup>。伝統的に使用されてきた天然資源の中には、経験的に効果が認識されて長年用いられているものが数多くあり、その科学的検証により医薬品及び化粧品の開発に繋がっているものが多々ある。また、同一の植物であったとしても、天然資源の化学成分は気候風土によって左右され、他の地域のものとは異なった効能を示すことがあることから、ミャンマー産の *P. integrifolia* には、新たな美肌化粧品天然素材としての可能性が大いに期待される。本研究では、ミャンマー産の *H. crenulata* と *P. integrifolia* の化粧品素材としての機能性を比較することで、*P. integrifolia* に新たな美肌化粧品素材としての科学的根拠を与えることを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. 化合物抽出液の調整

バイとヤンゴンで購入したミャンマー産の *P. integrifolia* 及び *H. crenulata* の木部・樹皮・根を破砕機を用いて粉末化し、水、メタノール、クロロホルムに各々一晩浸すことで化合物の粗抽出液を調整した。



Verification of whitening effect of Myanmar herb and analysis of whitening component

Hiroyuki Morita

Institute of Natural Medicine, University of Toyama

## 2. 2. 抽出液の生物活性評価と単離した化合物のメラニン産生調節活性評価

メラニン産生調節活性は、細井らの方法に準じ<sup>14)</sup>、100  $\mu$ Mの $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン( $\alpha$ -MSH)と0.25  $\mu$ Mの3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX)にてメラニン色素の産生を誘導したB16-F10 マウス黒色細胞の培養液に抽出液を加え、1N NaOHで細胞融解後に360nmの吸光度を測定することにより、メラニン色素産生に及ぼす影響を評価した。メラニン産生調節活性には、アルブチンをコントロールとして用いた。単離した化合物のメラニン産生調節活性評価についても同様に行った。抗炎症作用は、予め抽出液を作用させたマウスマクロファージ様細胞RAW264.7細胞にリポ多糖(LPS)で炎症を誘起した場合と、LPSで炎症を誘起したRAW264.7細胞に抽出液を作用させた場合の一酸化酸素産生抑制能を測定した<sup>15)</sup>。抗菌作用は、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌、セレウス菌、大腸菌、及び肺炎桿菌、抗真菌作用はカンジダの培養液に抽出液を加え、これらの増殖阻害を測定することにより評価した<sup>16,17)</sup>。

## 2. 3. 化合物の単離・構造決定

クロロホルム抽出液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供して分画した後、さらに、カラムクロマトにおいて分画操作を繰り返すことにより、化合物を単離・精製した。得られた化合物の化学構造は、NMR、HR-ESIMS等の各種スペクトル分析、化学変換、及び計算化学を用いて決定した。

## 2. 4. 化合物 14 と 21 のチロシナーゼ阻害活性評価

2.5mMのL-3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン(L-DOPA) と化合物 14 または 21 (終濃度 6.25、2.5、

25、50、100、及び200  $\mu$ M) を、Sigma社から購入した80units/mLのマッシュルーム由来チロシナーゼに作用させ、37 $^{\circ}$ Cの条件下で、492nmの吸光度を3分毎に30分間測定することでチロシナーゼ阻害活性を評価した。

## 2. 5. 化合物 14 と 21 のcAMP 伝達経路阻害活性評価

100  $\mu$ Mの $\alpha$ -メラノサイト刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) と0.25  $\mu$ Mの3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX)にてメラニン色素の産生を誘導したB16-F10 マウス黒色細胞の培養液に、100  $\mu$ Mの化合物 14 または 21 を加え、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養後、mRNAを抽出した。次いで、抽出したmRNAを鋳型として逆転写反応を行い、得られた1本鎖DNAを鋳型として、色素細胞の分化増殖制御因子(MITF)、チロシナーゼ(TYR)、チロシナーゼ関連タンパク質1 (TRP-1)、チロシナーゼ関連タンパク質2 (TRP-2) 遺伝子に特異的なプライマーを用いて各遺伝子を増幅し、その発現量を精査した。3リン酸デヒドロゲナーゼ(GADPH)のmRNAの発現をコントロールとした。

## 3. 結果

### 3. 1. *P. integrifolia* と *H. crenulata* 粗抽出液の生物活性評価

*P. integrifolia* と *H. crenulata* の木部・樹皮・根に係る水、メタノール、及び、クロロホルム粗抽出液について、メラニン産生調節活性、抗炎症活性、抗菌活性、抗真菌活性を測定した。その結果、いずれの粗抽出液においても、弱い抗炎症作用と抗菌活性が認められた。それらの中でも、クロロホルム粗抽出液については抗炎症作用が最も強かった。さらに、興味深いことに、*P. integrifolia* 木部のクロロホルム粗抽出液が、81.3  $\mu$ g/mLの穏やかなメラニン産生

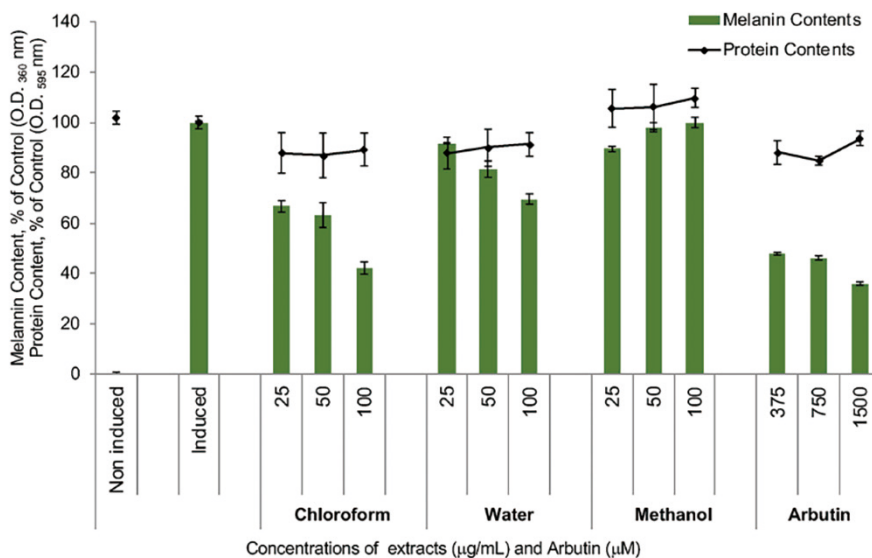


Fig. 1 Anti-melanin deposition activities of chloroform, water, and methanol extracts of the *P. integrifolia* wood against  $\alpha$ -MSH and IBMX-induced melanogenesis and protein contents in B16-F10 cell line.

抑制活性を示すことが明らかになった (Fig. 1)。これまで、*P. integrifolia* の化粧品素材としての検証が行われていないが、本結果は *P. integrifolia* の化粧品としての効果を示唆するものである。

### 3. 2. *P. integrifolia* 木部由来クロロホルム粗抽出液の化学成分の単離と化学構造決定

そこで、*P. integrifolia* の木部 3kg から得たクロロホルム粗抽出液を各種クロマトグラフィーを用いて化合物の精製を繰り返し、10 種の精製化合物を得た<sup>18)</sup> (Fig. 2)。これらについて、各種スペクトル分析を用いて化学構造を決定した結果、2 種の新規テトラヒドロフラン型リグナン taungtangyiols A (**1**; 20mg) と B (**2**; 4mg)、及び 8 種の既知フロフラン型リグナン asarinin (**3**; 10mg)、sesamin (**4**; 55mg)、paulownin (**5**; 20mg)、4 $\alpha$ -hydroxysesamin (**6**; 50 mg)、4 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -dihydroxysesamin (**7**; 2.5mg)、xanthoxyol (**8**; 10mg)、1 $\alpha$ -hydroxy-6-epipinoresinol (**9**; 15mg)、1 $\alpha$ -hydroxypinoresinol (**10**; 7mg) であることが判明した。セサミンやその類縁体には、強い抗酸化作用や抗炎症作用、メラニン産生調節活性が報告されている。

一方、この精製課程において、本クロロホルム粗抽出液には、単離した量が少なかったため化学構造を決定するまでには至らなかったものの、セサミン類縁体が含まれている可能性が<sup>1</sup>H NMR による解析により示された。

さらに、他の含有成分について検討するため、4.5kg の *P. integrifolia* 木部から新たに得たクロロホルム粗抽出液について、再度、化合物の単離・精製を進めた。その結果、上記の化合物に加え、10 種のリグナン premnan A (**11**; 1.7mg)、premnan B (**12**; 1.6mg)、tauntangyiol C (**13**; 3.0mg)、7,9-dihydroxydolichanthin B (**14**; 8.1mg)、premnan C (**15**; 2.1mg)、(3*R*, 4*S*)-4-(1,3-benzodioxol-5-ylcarbonyl)-3-[(*R*)-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-hydroxymethyl]tetrahydro-2-furanone (**16**; 1.6mg)、(-)-aptsimon (**17**; 3.4mg)、(-)-diasesamin-di- $\gamma$ -lactone (**18**; 17.1mg)、(+)-epi-sesaminone (**19**; 4.0mg) を、2 種の既知トリテルペン oleanonic acid (**20**; 4.2mg) と (2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ )-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid (**21**; 3.3mg) とともに得ることができた<sup>19,20)</sup> (Fig. 2)。新たに得たリグナンのうち、**11-14** は新規リグナンであった。また、**16** につい

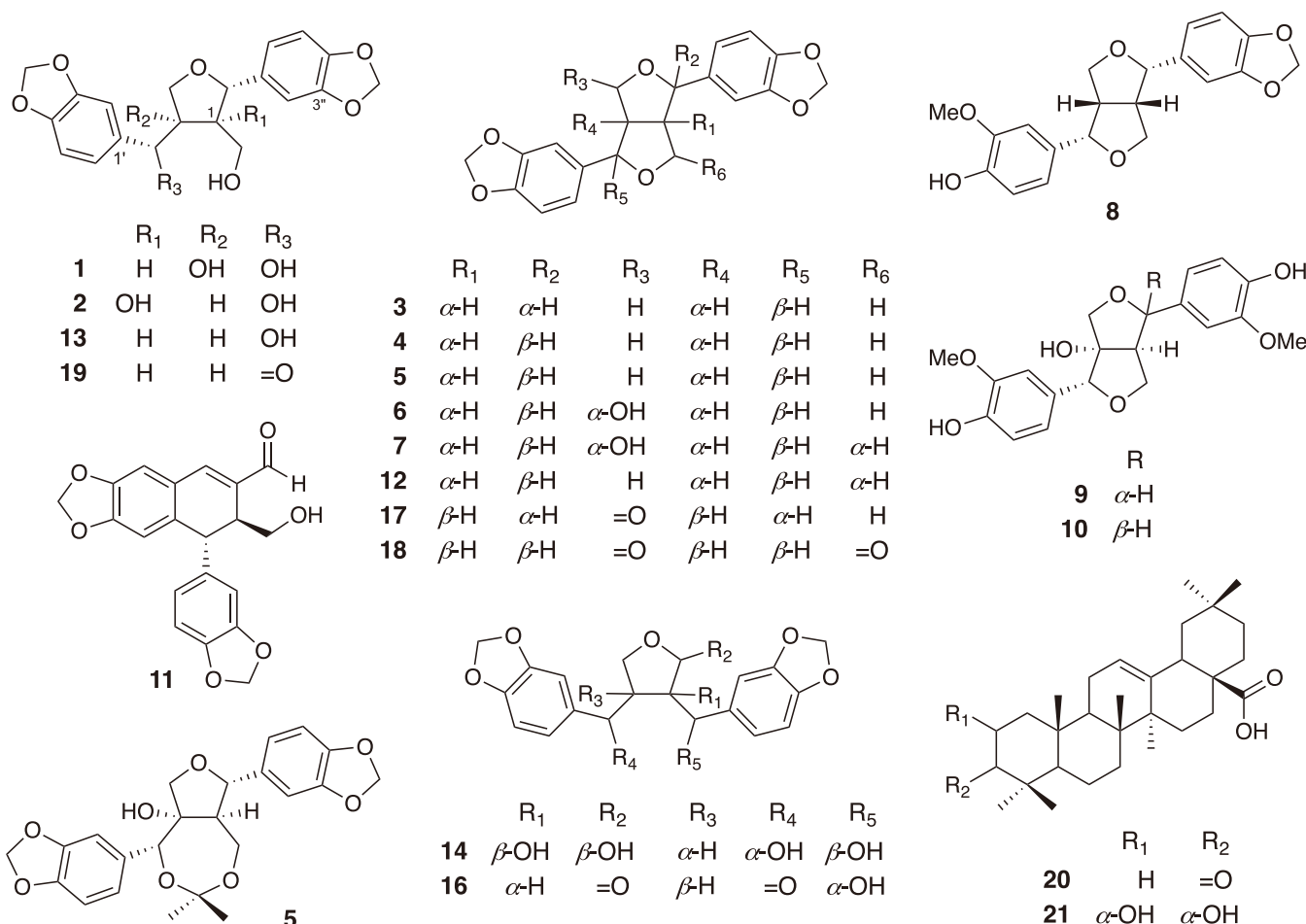


Fig. 2 Structures of isolated compounds from chloroform extracts of the *P. integrifolia* wood.

ては、合成品として既に報告されていたが、天然資源から得られたのは今回が初めてである。一方、**15**は、抽出液のHPLC分析においては存在を検出できなかった。このことから、**5**は、抽出・精製課程において生じた人工物であると推測される。

### 3.2. *P. integrifolia* 木部から得た化合物のメラニン産生調節活性評価

まず、単離した**1-10**について、メラニン産生調節活性を測定した<sup>18)</sup>。その結果、既知フロフラン型リグナン**4-8**が10μM以下のIC<sub>50</sub>値でB16-F10マウス黒色細胞のメラニン産生を強く抑制すること、及び、新規テトラヒドロフラン型リグナン**1**と**2**がIC<sub>50</sub>値で50.7μMと40.9μM

の穏和なメラニン産生抑制活性を示すことが明らかになった(Table 1)。

次に、化合物**11-21**について、メラニン産生調節活性を評価した結果、新規テトラヒドロフランリグナン**14**及び既知トリテルペン**21**が各々18.4μMと11.2μMのIC<sub>50</sub>値で、B16-F10マウス黒色細胞に細胞毒性を示さずにメラニン産生を抑制できることが判明した(Fig. 3)。また、既知トリテルペン**20**は、50μMの濃度ではB16-F10マウス黒色細胞に細胞毒性を示すものの、それ以下の濃度においては、B16-F10マウス黒色細胞のメラニン産生を17.7μMのIC<sub>50</sub>値で抑制することが示された(Fig. 4)。

一方、これらの化合物とは逆に、新規フェニルナフタレン型リグナン**11**、新規フロフラン型リグナン**12**、新規テトラヒドロフラン型リグナン**13**と**14**、及び既知フロフラン型リグナン**16**が、弱いながらもメラニン産生増強活性を示すことが明らかになった(Fig. 3)<sup>19)</sup>。

Table 1 Antimelanin deposition activities of **1-10**.

Compound	IC <sub>50</sub> (μM)	Compound	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>1</b>	50.7	<b>6</b>	< 10
<b>2</b>	40.9	<b>7</b>	< 10
<b>3</b>	<10	<b>8</b>	< 10
<b>4</b>	<10	<b>9</b>	> 100
<b>5</b>	<10	<b>10</b>	> 100
Arbutina <sup>a</sup>	364.4		

<sup>a</sup>apositional control.

### 3.3. 化合物**14**と**21**のチロシナーゼ阻害活性評価

メラニン産生抑制活性を示した化合物のうち、新規テトラヒドロフランリグナン**14**と既知トリテルペン**21**について、チロシナーゼ阻害活性を評価した。しかし、いずれの化合物もチロシナーゼ阻害活性を示さなかった(Fig. 5)。

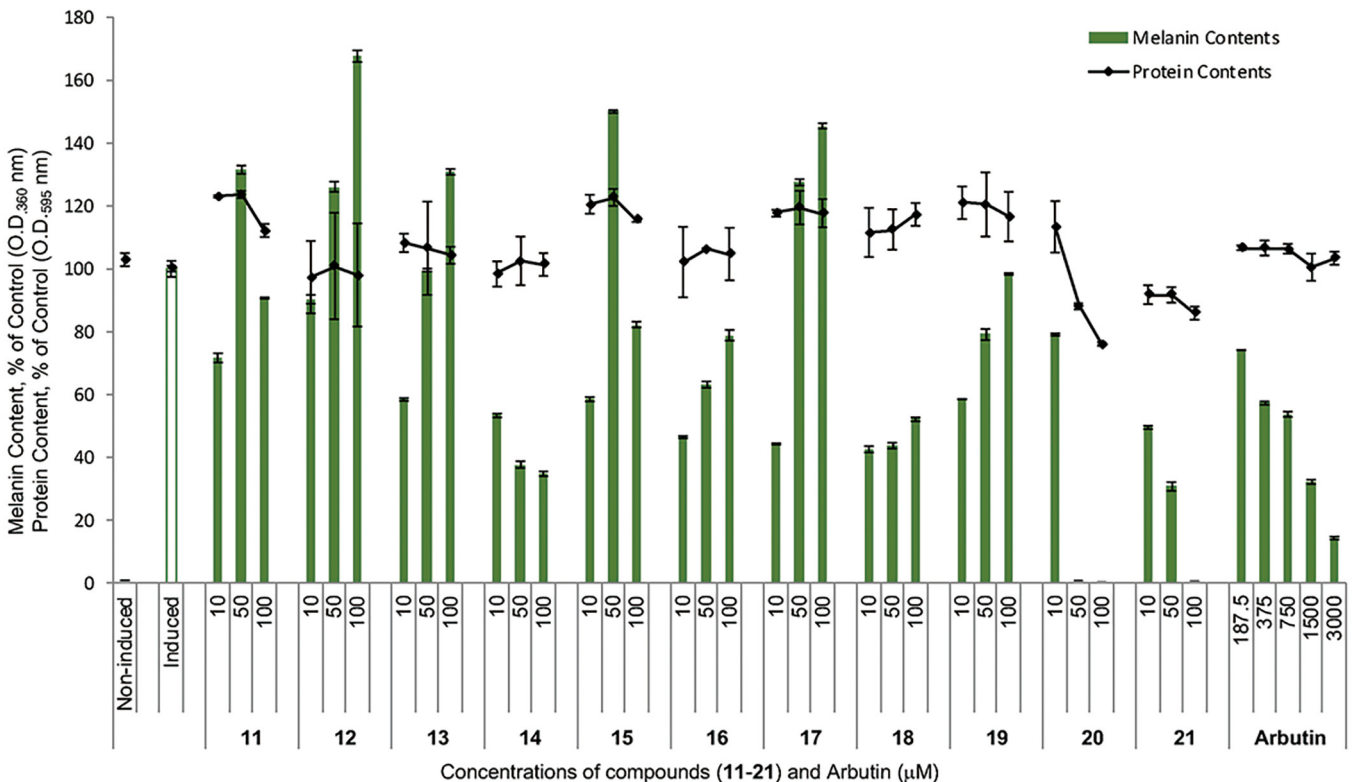


Fig. 3 Melanin deposition regulatory activities of **11-21** against α-MSH and IBMX-induced melanogenesis and protein contents in B16-F10 cell line.

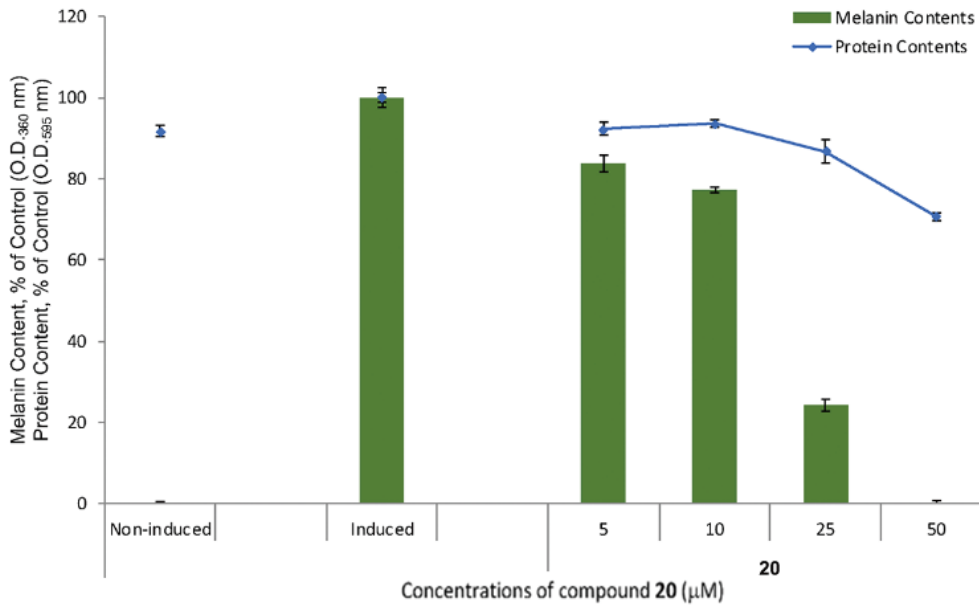


Fig. 4 Anti-melanin deposition activity of **20** against  $\alpha$ -MSH and IBMX-induced melanogenesis and protein contents in B16-F10 cell line.

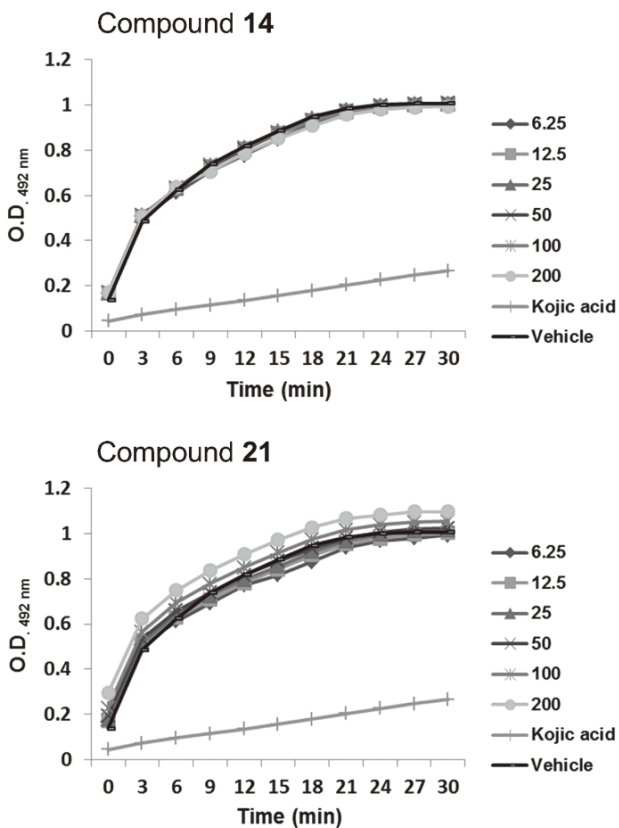


Fig. 5 Tyrosinase inhibitory activities of **14** and **21**

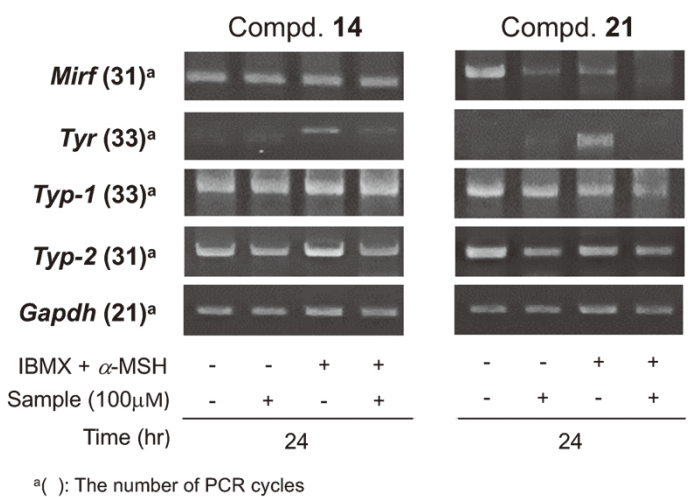


Fig. 6 Effects of **14** and **21** on the expression of key melanogenesis mRNAs.

### 3. 4. 化合物 14 と 21 の cAMP 伝達経路制御機構の解析

化合物 14 と 21 のメラニン産生抑制活性のより詳細な機構の解明を目指し、メラニン合成経路の一つである cAMP 伝達経路に及ぼす影響を、MITF、TYR、TRP-1、及び TRP-2 の mRNA の発現量を精査することで評価した。その結果、化合物 14 が TYR mRNA の発現を抑制することにより、メラニン産生抑制活性を示していることが示された。一方、化合物 21 は、その上流にある MITF mRNA の発現に影響を及ぼすことにより、メラニン産生抑制活性を制御していることが明らかになった (Fig. 6)。

## 4. 考察

本研究において、*P. integrifolia* 木部のクロロホルム粗抽出液が、その樹皮や根の水及びメタノール抽出液よりも強い抗炎症作用を示すことに加え、穏和なメラニン産生抑制活性をも示すことが明らかになった。ミャンマーでは、伝統化粧品であるタナカは、その木部をペースト状にし、顔などに塗布するやり方で用いられている。ペーストとしての利用は、脂溶性化合物の効果も期待できる使用方法である。本研究における結果は、*P. integrifolia* の化粧品としての効果を示唆するだけでなく、そのペーストとしての利用方法についても科学的根拠を与えたものと考えられる。

さらに、本研究においては、*P. integrifolia* 木部のクロロホルム粗抽出液から化合物の単離・精製を行うことにより、*P. integrifolia* に含まれるセサミンなどのリグナン類がそのメラニン産生抑制活性を示すことで、化粧品としての効果をもたらしている可能性が示された。しかし、本研究において、単離した化合物の中には、弱いながらもメラニン産生増強活性を示すものが見い出されている。クロロホルム抽出液ではメラニン産生抑制活性が示されていることから、*P. integrifolia* の化粧品としての効果は示唆されるが、そのメラニン産生抑制活性においては、本植物に含まれるメラニン産生抑制活性化合物と増強活性化合物の総和的效果によって、適度に化粧品としての効果を発揮しているものと推定される。また、化合物 14 と 21 において、メラニン産生抑制の制御機構に違いが見られる。メラニン合成は、Wnt シグナル伝達経路によっても制御されるため、他のメラニン産生抑制活性を示した化合物についても含め、cAMP 伝達経路のみならず、Wnt シグナル経路についても詳細に検討し、その総和的效果を解明していくことが必要である。

一方、*P. integrifolia* の木部 *H. crenulata* の主成分及び化粧品としての活性本体については、クマリン誘導体の可能性が指摘されており、成分の違いによる *H. crenulata* と *P. integrifolia* の化粧品としての効果の違いに興味を持たれる。また、ミャンマーにおいては、*H. crenulata* と

*P. integrifolia* 以外にも、他のミカン科植物である *Naringi crenulate* と *Limonia acidissima* の木部などもタナカの名で伝統的化粧品として利用されている。*H. crenulata* はミカン科に属することから、これらの植物中にもクマリン誘導体が含まれ、化粧品としての効果を発揮している可能性はあるが、これらの植物の化学成分と化粧品としての相関関係についても興味を持たれるところである。

## 5. 総括

本研究においては、*P. integrifolia* が、*H. crenulata* とは異なった含有成分により、伝統的化粧品としての効果を発揮している可能性が示された。しかし、本研究は、*P. integrifolia* のメラニン産生調節活性について検討しているが、抗酸化作用や抗炎症などの効果について詳細に検討するには至っていない。今後、精製した化合物の抗炎症作用や抗菌活性の評価を進めるとともに、*P. integrifolia* と *H. crenulata* の各抽出液、及び単離・精製した化合物のジフェニルピクリルヒドラジラジカル (DPPH) 消去活性を指標とした抗酸化作用や抗炎症作用などについて、他の化粧品としての効果についても詳細に検討する必要がある。

## 謝辞

計算科学を用いて化合物の絶対配置を決定するにあたり、ご支援賜りました東京大学大学院薬学系研究科教授 阿部郁朗先生及び大学院生 星野翔太郎氏に心より感謝申し上げます。

本研究を助成対象課題として採択いただきました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に心から御礼申し上げます。

## (引用文献)

- 1) Mali P.Y. *Premna integrifolia* L.: A review of its biodiversity, traditional uses and phytochemistry. *Anci. Scie. Life*, 35, 4-11 (2015).
- 2) Wangthong S., Palaga T., Rengpipat S., Wanichwecharungruang S.P., Chanchaisak P., Heinrich M. Biological activities and safety of Thanaka (*Hesperethusa crenulata*) stem bark. *J. Ethnopharmacol.*, 132, 466-472 (2010).
- 3) Nayar M.N.S., Bhan M.K. Coumarins and other constituents of *Hesperethusa crenulata*. *Phytochemistry*, 11, 3331-3333 (1972).
- 4) Rathore R.S., Prakash A., Singh P.P. *Premna integrifolia* Linn, a preliminary study of anti-inflammatory and anti-arthritis activity. *Rheumatism*, 12, 130-134 (1977).
- 5) Gopal R.H., Purushothaman K.K. Effect of plant

- isolates on coagulation of blood: an in vitro study. *Bull. Medico. Ethno. Botanical Res.*, 5, 171-177 (1984).
- 6) Dash G.K., Patroim C.P., Maiti A.K. A study on the anti-hyperglycaemic effect of roots of *Premna corymbosa*. *Rottl. J. Nat. Remedies*, 5, 31-34 (2005).
  - 7) Jothi E.T., Suryalakshmi P.K.P.V., Srinivasababu P. Gastroprotective potential of *Premna serratifolia* Linn. leaves against aspirin induced ulcer in albino rats. *Pharmacologyonline*, 3, 189-198 (2010).
  - 8) Karthikeyan M., Deepa M.K. Anti-inflammatory activity of *Premna corymbosa* (Burm.f.) Rottl. & Wild. leaves extracts in Wistar albino rats. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 4, 510-513 (2011).
  - 9) Karthikeyan M., Deepa M.K. Antinociceptive activity of *Premna corymbosa* (Burm.f.) Rottl. & Wild. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 21, 347-356 (2010).
  - 10) Rajendran R., Basha N.S. Antimicrobial activity of crude extracts and fractions of *Premna serratifolia* Linn. root. *Medicinal Plants*, 2, 33-38 (2010).
  - 11) Yadav D., Masood N., Luqman N., Brindha P., Gupta M.M. Antioxidant furofuran lignans from *Premna integrifolia*. *Industrial Crops and Products*, 41, 397-402 (2013).
  - 12) Habtemarian S., Varghese G.K. A novel diterpene skeleton: Identification of a highly aromatic, cytotoxic and antioxidant 5-methyl-10-demethyl-abietane type diterpene from *Premna serratifolia*. *Phytother. Res.*, 29, 80-85 (2015).
  - 13) Biradi M., Hullatti K. Bioactivity guided isolation of cytotoxic terpenoids and steroids from *Premna serratifolia*. *Pharm. Biol.*, 55, 1375-1379 (2017).
  - 14) Hosoi J., Abe E., Suda T., Kuroki T., Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid, *Cancer Res.*, 45 1474-1478 (1985).
  - 15) Morita H., Nishino H., Nakajima Y., Kakubari Y., Nakata A., Deguchi J., Nugroho A.E., Hirasawa Y., Kaneda T., Kawasaki Y., Goda Y. Oxomollugin, a potential inhibitor of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production including nuclear factor kappa B signals. *J. Nat. Med.*, 69, 608-11 (2015).
  - 16) Nguyen H.M., Ito T., Kurimoto S., Ogawa M., Win N.N., Hung V.Q., Nguyen H.T., Kubota T., Kobayashi J., Morita H. New merosesquiterpenes from a Vietnamese marine sponge of *Spongia* sp. and their biological activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27, 3043-3047 (2017).
  - 17) Woo S., Win N.N., Wong C.P., Ito T., Hoshino S., Ngwe H., Aye A.A., Han N.M., Zhang H., Hayashi F., Abe I., Morita H. Two new pyrrolo-2-aminoimidazoles from a Myanmarese marine sponge, *Clathria prolifera*. *J. Nat. Med.*, 72, 803-807 (2018).
  - 18) Win N.N., Woo S., Ngwe H., Prema, Wong C.P., Ito T., Okamoto Y., Tanaka M., Imagawa H., Asakawa Y., Abe I., Morita H. Tetrahydrofuran lignans: Melanogenesis inhibitors from *Premna integrifolia* wood collected in Myanmar. *Fitoterapia*, 127, 308-313 (2018).
  - 19) Woo S., Hoshino S., Wong C.P., Win N.N., Awoufack M.D., Prema, Ngwe H., Zhang H., Hayashi F., Abe I., Morita H. Lignans with melanogenesis effects from *Premna serratifolia* wood. *Fitoterapia*, 133, 35-42 (2019).
  - 20) Woo S., Wong C.P., Win N.N., Hoshino S., Prema, Ngwe H., Abe I., Morita H. A new tetrahydrofuran type lignan from *Premna integrifolia* wood. *Nat. Prod. Commun.*, 14, 113-116 (2019).