報告書

美容3領域簡易検討セット<美白・抗老化・抗酸化>

Regen　H2　トリートメントの

チロシナーゼ阻害活性
エラスターゼ阻害活性
活性酸素(DPPH)消去能
評価

試験施設

株式会社きれいテストラボ

〒135-0047　東京都江東区富岡二丁目11番18号

TEL 03-6695-0144

【無断転載禁止】

試験見積番号	181130-1
試験依頼社	AmazingJWorld株式会社 〒151-0053 東京都渋谷区代々木1-55-2大和ビル2F 井上めぐみ
試験委託社	株式会社きれいテストラボ 〒135-0047 東京都江東区富岡2-11-18
試験実施機関	株式会社きれいテストラボ 試験センター 〒135-0047 東京都江東区富岡2-11-6 長谷萬ビル3F
試験番号	CBS19011102
被験物質	Regen H2 トリートメント
試験項目	美容3領域簡易検討セット<美白・抗老化・抗酸化> ・チロシナーゼ阻害活性 ・エラスターゼ阻害活性 ・活性酸素（DPPH）消去
資料保存場所	株式会社きれいテストラボ
保存期間	試験終了後5年間

報告書をwebなどへ転載を希望する場合、必ず事前に株式会社きれいテストラボにご相談ください。

報告書構成

1　要約
2　試験目的
3　試験概要
4　材料と試験方法
　4－1　被験物質
　4－2　試験操作
　　4－2－1　チロシナーゼ阻害活性
　　4－2－2　エラスターゼ阻害活性
　　4－2－3　活性酸素（DPPH）消去
5　試験結果
　5－1　チロシナーゼ阻害活性
　5－2　エラスターゼ阻害活性
　5－3　活性酸素（DPPH）消去
6　参考文献

1　要約

Regen　H2　トリートメントを添加すると、

・　対照と比較して、活性酸素種(DPPH)消去率が有意に増加した。

上記より、Regen　H2　トリートメントは抗酸化を視野に入れた原料として可能性をもつと考えられた。

2　試験目的

被験物質の、チロシナーゼ阻害活性・エラスターゼ阻害活性・活性酸素種（DPPH）消去能を評価し、美白・抗老化・抗酸化3領域における被験物質の性質を検証する。

3　試験概要

加齢した人の皮膚では、しみやしわやたるみなどの老徴が観察される。しみ、すなわち表皮におけるメラニンの蓄積にはメラノサイトにおける**チロシナーゼ活性**が重要な役割を果たしている。また、しわやたるみの一因である皮膚弾力（ハリ）の低下には、真皮線維芽細胞が産生する弾力線維（エラスチン）を分解する**エラスターゼ活性**が関与していると考えられている。加えて、しわやたるみの原因の約80%は長期紫外線曝露による光老化であると言われている一方、紫外線が皮膚に惹起する様々な現象は、活性酸素種を介していることが知られている。このため、光老化対策を考える上で**活性酸素種の消去**は重要な位置づけにあると言える。そこで本試験では、被験物質の、チロシナーゼ阻害活性・エラスターゼ阻害活性・活性酸素種（DPPH）消去能を評価し、被験物質のアンチエイジング化粧料への活用の可能性を検討した。

4　材料と試験方法

4－1　被験物質調製

超純水（CAS No.7732-18-5, Wako, Japan）によって被験物質を公比10で連続希釈して計3濃度（1%, 10%, 100%）を調製した。

４－２　試験操作

４－２－１　チロシナーゼ阻害活性[1-3)]

Dihydroxyphenylalanine（DOPA）を基質としたチロシナーゼ活性に及ぼす被験物質の効果を評価する。

1) 1.5mLマイクロチューブ（Lot. 0030 125 150, Eppendorf, Germany）に9 μLの被験物質または対照、50 μLの56 units/mLチロシナーゼ（CAS No. 9002-10-2, Sigma-Aldrich, USA）溶液および191 μLの100 mMリン酸buffer（pH6.8）を加え、37℃で10分間インキュベートした。対照は超純水（CAS No. 7732-18-5, Wako, Japan）を用いた。ブランクはチロシナーゼ溶液の代替として100 mMリン酸bufferを用いた。
2) 10分後に50 μLの1 mM 3,4-L-Dihydroxyphenylalanine（L-DOPA, CAS No. 59-92-7, Wako, Japan）溶液を添加し、37℃で5分間インキュベートした。
3) 1.5mLマイクロチューブをボルテックスミキサー(VORTEX-GENIE2 Mixer, Scientific Undustries, USA)で10秒間振とうし、12,000×g、室温で2分間遠心した。
4) 遠心後、96ウェルプレート（Lot. 9107, Corning, USA）に上清を300 μL分注し、マイクロプレートリーダー（SPARK®10M, TECAN, Switzerland）を用いて475 nmの吸光度（OD_{475}）を測定した。
5) 被験物質、対照のOD_{475}から被験物質のチロシナーゼ活性率およびチロシナーゼ活性阻害率を次式により算出した。

　　チロシナーゼ活性率(%) = (S −SB) / (C −CB) ×100

　　チロシナーゼ活性阻害率(%) = {(C− CB)−(S −SB)}/(C −CB) ×100

　　　C: 対照のOD_{475}　CB：対照のブランクOD_{475}

　　　S：被験物質のOD_{475}　SB：被験物質のブランクOD_{475}

４－２－２　エラスターゼ阻害活性[4, 5)]

N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilideを基質としたエラスターゼ活性に及ぼす被験物質の効果を評価する。

1) 1.5mLマイクロチューブに50 μLの被験物質または対照、50 μLの1.25 μg/mL エラスターゼ酵素（CAS No. 39445-21-1, Sigma-Aldrich, USA）溶液、100 μLのN-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-Nitroanilide（CAS No. 52299-14-6, Sigma-Aldrich, USA）溶液を加え、ボルテックスミキサーで30秒間振とうした後、37℃で15分間インキュベートした。対照には超純水を用いた。ブランクはエラスターゼ酵素の代替として0.05 M Tris-HCl bufferを用いた。
2) 1.5mLマイクロチューブをボルテックスミキサーで10秒間振とうし、12,000×g、室温で2分間遠心した。
3) 遠心後、96ウェルプレートに上清を200 μL分注し、マイクロプレートリーダー を用いて415 nmの吸光度（OD_{415}）を測定した。
4) 被験物質、対照のOD_{415}から被験物質のエラスターゼ活性率およびエラスターゼ活性阻害率を次式により算出した。

　　エラスターゼ活性率(%) = (S −SB) / (C −CB) ×100

　　エラスターゼ活性阻害率(%) = {(C− CB)−(S −SB)}/(C −CB) ×100

　　　C: 対照のOD_{415}　CB：対照のブランクO_{D415}

　　　S：被験物質のOD_{415}　SB：被験物質のブランクOD_{415}

４－２－３　活性酸素（DPPH）消去能評価[6-8)]

DPPHラジカルに対する被験物質のラジカル消去能を評価する。

1)　1.5mLマイクロチューブに20 μLの被験物質または対照、60 μLのエタノール（CAS No. 64-17-5, Japan Alcohol, Japan）、80 μLの0.25 M酢酸buffer（pH5.5）を加え、37℃で5分間インキュベートした。対照には超純水を用いた。ブランクはDPPHの代替としてエタノールを用いた。
2)　5分後に40 μLの7.8 μM 2,2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl（DPPH, CAS No. 1898-66-4, Sigma-Aldrich, USA）溶液を添加した。
3)　ボルテックスミキサーで30秒間振とうした後、37℃で30分間インキュベートした。
4)　1.5mLマイクロチューブを10秒間振とうし、12,000×g、室温で2分間遠心した。
5)　遠心後、96ウェルプレートに上清を200 µL分注し、マイクロプレートリーダー を用いて517 nmの吸光度（OD_{517}）を測定した。
6)　被験物質、対照のOD_{517}から被験物質のDPPH残存率およびDPPH消去率を次式により算出した。

活性酸素残存率(%) = (S −SB) / (C −CB) ×100

活性酸素消去率(%) = {(C− CB)−(S −SB)}/(C −CB) ×100

C: 対照のOD_{517}　　CB：対照のブランクOD_{517}

S：被験物質のOD_{517}　　SB：被験物質のブランクOD_{517}

５　試験結果

測定結果の平均および標準偏差、結果を棒グラフにした図を別紙に記載した。

５－１　　チロシナーゼ活性阻害評価

対照のチロシナーゼ活性率を100%とした被験物質のチロシナーゼ活性率、チロシナーゼ活性阻害率の平均および標準偏差を表1、チロシナーゼ活性率を棒グラフにした図を図1に示した。

５－２　　エラスターゼ活性阻害評価

対照のエラスターゼ活性率を100%とした被験物質のエラスターゼ活性率、エラスターゼ性阻害率の平均および標準偏差を表2、エラスターゼ活性率を棒グラフにした図を図2に示した。

５－３　　活性酸素（DPPH）消去能評価

対照のDPPH残存率を100%とした被験物質のDPPH残存率、DPPH消去率の平均および標準偏差を表3、DPPH残存率を棒グラフにした図を図3に示した。

６　参考文献

1) T. S. Chang., *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 2440-2475, 2009.

2) H. S. Mason., *J. Biol. Chem.*, 172, 83-99, 1948.

3) 芋川玄爾監修. 機能性化粧品素材開発のための実験法. シーエムシー出版. 2007. P354.

4) 本好捷宏ほか. 粧技誌. 31 (2), 190-200, 1997.

5) 正木仁・岩渕徳郎・平尾哲二監修. 化粧品技術者のための素材開発実験プロトコール集. シーエムシー出版. 2105. P347.

6) Om P. Sharma and Tej K. Bhat., *Food Chem.*, 113, 4, 1202-1205, 2009.

7) S. Mark and M. Alger., *Polymer science dictionary. Springer.*, P152, 1997.

8) 芋川玄爾監修. 機能性化粧品素材開発のための実験法. シーエムシー出版. 2007. P354.

表1 Regen H2 トリートメントのチロシナーゼ活性率および活性阻害率

	濃度(%)	チロシナーゼ活性率(%)						チロシナーゼ活性阻害率(%)					
		1	2	3	mean	±	s.d.	1	2	3	mean	±	s.d.
対照	−	99.5	100.3	100.3	100.0	±	0.5	0.5	−0.3	−0.3	0.0	±	0.5
被験物質	1	119.8	122.8	119.8	120.8	±	1.8	−19.8	−22.8	−19.8	−20.8	±	1.8
	10	140.0	140.0	139.5	139.8	±	0.3	−40.0	−40.0	−39.5	−39.8	±	0.3
	100	133.9	133.8	130.2	132.6	±	2.1	−33.9	−33.8	−30.2	−32.6	±	2.1

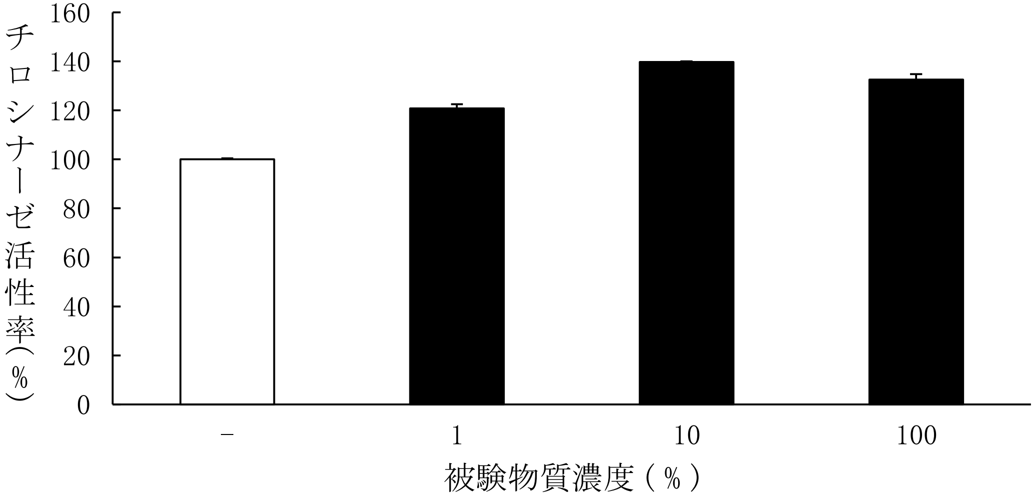

図1 チロシナーゼ活性率

n = 3, mean ± s.d., unpaired t-test, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001
s.d.: standard deviation

表2　Regen　H2　トリートメントのエラスターゼ活性率および活性阻害率

	濃度(%)	エラスターゼ活性率(%)						エラスターゼ活性阻害率(%)					
		1	2	3	mean	±	s.d.	1	2	3	mean	±	s.d.
対照	−	101.1	97.8	101.1	100.0	±	1.9	−1.1	2.2	−1.1	0.0	±	1.9
被験物質	1	136.6	137.9	140.2	138.3	±	1.8	−36.6	−37.9	−40.2	−38.3	±	1.8
	10	151.6	147.7	142.2	147.2	±	4.8	−51.6	−47.7	−42.2	−47.2	±	4.8
	100	112.5	125.5	115.1	117.7	±	6.9	−12.5	−25.5	−15.1	−17.7	±	6.9

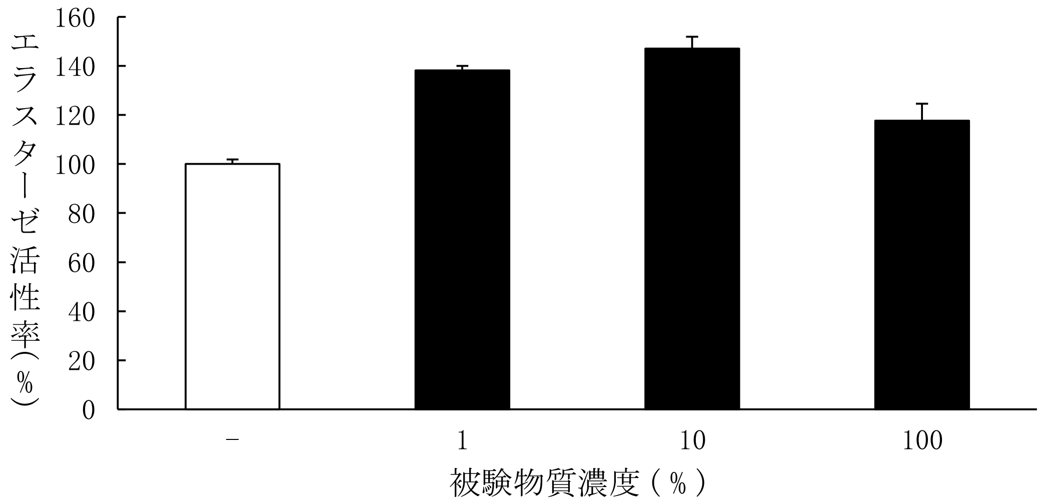

図2　エラスターゼ活性率

n = 3, mean ± s.d., unpaired t-test, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001
s.d.: standard deviation

表3　Regen　H2　トリートメントのDPPH残存率および消去率

濃度(%)		DPPH残存率(%)						DPPH消去率率(%)					
		1	2	3	mean	±	s.d.	1	2	3	mean	±	s.d.
対照	−	99.6	100.2	100.2	100.0	±	0.3	0.4	−0.2	−0.2	0.0	±	0.3
被験物質	1	95.5	99.0	96.1	96.9	±	1.9	4.5	1.0	3.9	3.1	±	1.9
	10	113.8	103.1	110.8	109.2	±	5.5	−13.8	−3.1	−10.8	−9.2	±	5.5
	100	79.6	84.3	87.2	83.7	±	3.9	20.4	15.7	12.8	16.3	±	3.9

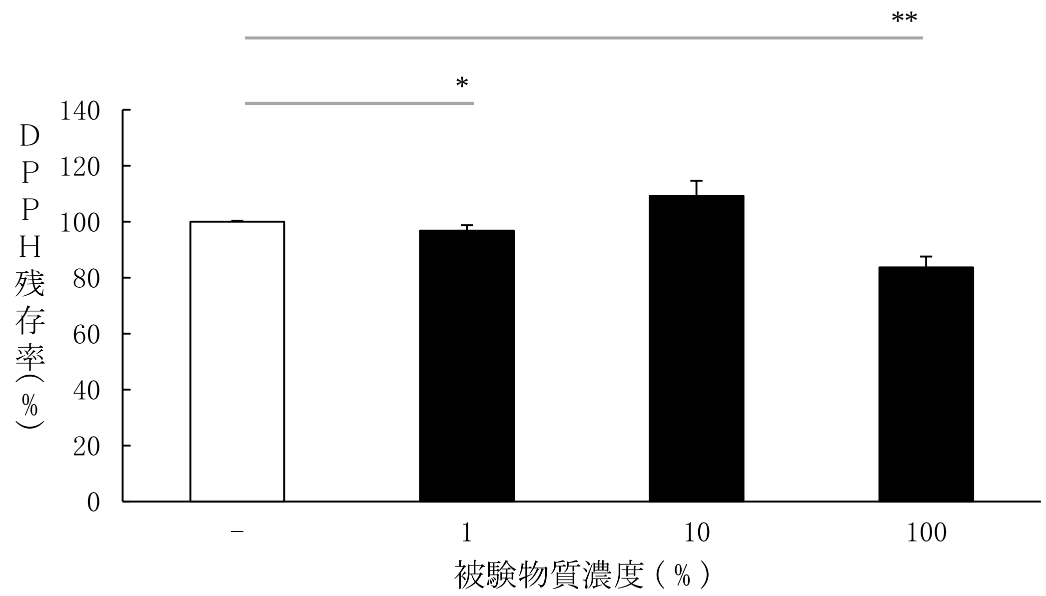

図3　DPPH残存率

n = 3, mean ± s.d., unpaired t-test, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001
s.d.: standard deviation