

報告書

抗酸化能検討セット SHAMPOO BAR H2原料「水素化Mg」の

SOD様活性作用
OHラジカル消去能
過酸化脂質生成抑制
in vitro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6号 長谷萬ビル3F

TEL 03-6695-0144

【無断転載禁止】

試験依頼社	株式会社SBMplus 〒101-0031 東京都千代田区東神田1-3-6 マサヤビル2F 鈴木光代
試験受託社	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	OS20103001
被験品	SHAMPOO BAR H2原料「水素化Mg」
試験項目	抗酸化検討セット <ul style="list-style-type: none"> ・ SOD様活性作用評価 ・ OHラジカル消去能評価 ・ 過酸化脂質生成抑制評価
資料保存場所	株式会社きれいテストラボ
試験実施日	2020年11月30日
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 被験品調製
 - 4-2 試験操作
 - 4-2-1 SOD様活性作用評価
 - 4-2-2 OHラジカル消去能評価
 - 4-2-3 過酸化脂質生成抑制評価
- 5 有意差検定
- 6 試験結果
 - 6-1 SOD様活性作用評価
 - 6-2 OHラジカル消去能評価
 - 6-3 過酸化脂質生成抑制評価
- 7 参考文献

1 要約

SHAMPOO BAR H2原料「水素化Mg」は、

- ・ 対照と比較し、SOD様活性率を有意に増加させた。
- ・ 対照と比較し、OHラジカル消去率を有意に増加させた。
- ・ 対照と比較し、過酸化脂質生成抑制率を有意に増加させた。

上記よりSHAMPOO BAR H2原料「水素化Mg」は、有用な抗酸化能をもつ被験品であると考えられた。

2 試験目的

被験品の、SOD様活性・OHラジカル消去能・過酸化脂質生成抑制作用を評価し、被験品の抗酸化能を検討する。

3 試験概要

シミ、シワ、ハリ・弾力の低下、くすみや肌荒れなど、皮膚にまつわる様々な現象が活性酸素種を介していることが知られている。そのためこれら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。

本試験では、紫外線による炎症や代謝などで初期に生成されるスーパーオキシドアニオン(O_2^-)、反応性が極めて高い活性酸素と言われるヒドロキシラジカル($\cdot OH$)に対する被験品の消去作用、そして皮脂などが酸化して発生する過酸化脂質(LOOH)の生成を抑制する作用、これら3種の活性酸素に対する被験品の消去能や生成抑制作用を評価した。これにより被験品の抗酸化能を広範に評価した。

4 材料と試験方法

4-1 被験品調製

超純水(CAS No.7732-18-5, Wako, Japan)によって公比10で連続希釈して計7濃度(0.00001%, 0.0001%, 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1%, 10%)を用時調製した。調製後、1時間室温で静置させて水素を発生させた。その後、12000×g, 3分間遠心し、上澄みを1.5 mLチューブに300 μ L回収し、試験に使用した。対照には超純水を用いた。

4-2 試験操作

4-2-1 In vitroにおけるSOD様活性作用評価¹⁻³⁾

スーパーオキシドアニオン (O_2^-) 消去能をスーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide dismutase, SOD) 様活性として測定する。 O_2^- 消去能の測定はSOD Assay Kit-WST (Cat No. S311, Dojindo, Japan) を用いた。

- 1) 1.5 mLチューブ (Cat No. 0030125150, Eppendorf, Germany) に90 μ Lの被験品または対照、900 μ LのWST working solution、および90 μ LのEnzyme working solutionを加えた。また、ブランクにはEnzyme working solutionの代替としてDilution bufferを用いた。
- 2) ボルテックスミキサーを用いて溶液を混合し、37°Cで20分間インキュベートした。
- 3) 3,000 rpmで3分間遠心し、上清を96ウェルプレート (Lot. 9107, Corning, USA) に240 μ Lずつ分注し、マイクロプレートリーダー (SPARK®10M, TECAN, Switzerland) を用いて450 nmの吸光度(OD_{450})を測定した。
- 4) 被験品、対照の OD_{450} から被験品の O_2^- 残存率および O_2^- 消去率を次式により算出し、 O_2^- 消去率を被験品のSOD様活性率とした。

$$O_2^- \text{残存率}(\%) = (S - SB) / (C - CB) \times 100$$

$$O_2^- \text{消去率}(\%) = \{(C - CB) - (S - SB)\} / (C - CB) \times 100 = \text{SOD様活性率}(\%)$$

C : 対照の OD_{450}

CB : 対照のブランク OD_{450}

S : 被験品の OD_{450}

SB : 被験品のブランク OD_{450}

4-2-2 In vitroにおけるOHラジカル消去能評価^{4, 5)}

過酸化水素から生成する $\cdot OH$ に対する被験品のラジカル消去作用を測定する。

- 1) 1.5 mLチューブに100 μ Lの被験物質または対照、100 μ Lの100 μ M 過酸化水素(H_2O_2 , CAS No. 7722-84-1, Wako, Japan)を加えた。また、ブランクには100 μ M H_2O_2 の代替として精製水を用いた。
- 2) ボルテックスミキサーを用いて溶液を混合し、37°Cで20分間インキュベートした。
- 3) インキュベートした1.5 mLチューブを3,000 rpmで3分間遠心し、上清を96ウェルプレートに50 μ Lずつ入れた。
- 4) 100 μ mol/L DA-64 (CAS No. 115871-19-7, Wako, Japan)、2000 mU/mL ペルオキシダーゼ (ACS No. 9003-99-0, Wako, Japan)および0.5 % Triton X-100 (CAS No. 9002-93-1, Sigma, USA) を含有する100 mmol/L PIPES (CAS No. 5625-37-6, Dojindo, Japan) 緩衝液を150 μ L 加え、37°Cで5分間インキュベートした。
- 5) マイクロプレートリーダーを用いて727 nmの吸光度 (OD_{727}) を測定した。

- 6) 被験品、対照のOD₇₂₇から被験品のOHラジカル残存率およびOHラジカル消去率を次式により算出した。

$$\text{OHラジカル残存率(\%)} = (S - SB) / (C - CB) \times 100$$

$$\text{OHラジカル消去率(\%)} = \{ (C - CB) - (S - SB) \} / (C - CB) \times 100$$

C : 対照のOD₇₂₇

CB : 対照のブランクOD₇₂₇

S : 被験品のOD₇₂₇

SB : 被験品のブランクOD₇₂₇

4-2-3 In vitroにおける過酸化脂質生成抑制評価^{6, 7)}

不飽和脂肪酸の1つであるリノール酸が酸化して生成される共役ジエンを測定する。

- 1) 1.5 mLチューブに1,400 μLの0.26 mM リノール酸 (CAS No. 60-33-3, Wako, Japan) 含有10 mM Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, CAS No. 151-21-3, Sigma, USA) 溶液、20 μLの被験物質および対照を加え、ソニケーションにより溶液を混合した。
- 2) 1.5 mLチューブに10 μLの0.2% 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) Dihydrochloride (AAPH, CAS No. 2997-92-4, Wako, Japan) 溶液を加え、ソニケーションとボルテックスミキサーにより溶液を混合し、3,000 rpmで3分間遠心した。
- 3) 上清を紫外線透過型96ウェルプレート (Cat No. 8404, Thermo Fisher, USA) に100 μLずつ分注し、マイクロプレートリーダーを用いて、233 nmの吸光度 (OD₂₃₃) を測定した。
- 4) その後、1.5 mLチューブを50 °Cで60分間インキュベートした。
- 5) インキュベート後の1.5 mLチューブの溶液を3,000 rpmで3分間遠心し、上清を紫外線透過型96ウェルプレートに100 μLずつ分注し、マイクロプレートリーダーを用いて233nmの吸光度 (OD₂₃₃) を測定した。
- 6) 被験品、対照のOD₂₃₃から被験品の過酸化脂質生成率および過酸化脂質生成抑制率を次式により算出した。

$$\text{過酸化脂質生成率(\%)} = (S - SB) / (C - CB) \times 100$$

$$\text{過酸化脂質生成抑制率(\%)} = \{ (C - CB) - (S - SB) \} / (C - CB) \times 100$$

C : 対照のOD₂₃₃

CB : 対照のブランクOD₂₃₃

S : 被験品のOD₂₃₃

SB : 被験品のブランクOD₂₃₃

5 有意差検定

試験ごとに、対照と被験品添加群を対応のない検定で有意差検定を実施した。検定はいずれも両側で有意水準を5%未満とした。

6 試験結果

6-1 SOD様活性作用評価

対照の O_2^- 残存率を100%として、被験品の O_2^- 残存率を表1および図1に示した。また、被験品の O_2^- 消去率すなわちSOD様活性率を表1に示した。

6-2 OHラジカル消去能評価

対照のOHラジカル残存率を100%として、被験品のOHラジカル残存率を表2および図2に示した。また、被験品のOHラジカル消去率を表2に示した。

6-3 過酸化脂質生成抑制評価

対照の過酸化脂質生成率を100%として、被験品の過酸化脂質生成率を表3および図3に示した。また、被験品の過酸化脂質生成抑制率を表3に示した。

7 参考文献

- 1) H. Ukeda., et al., *Anal. Sci.*, 15, 353, 1999.
- 2) H. Ukeda., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 485, 1999.
- 3) H. Ukeda., et al., *Anal. Sci.*, 18, 1151, 2002.
- 4) K. Miyata., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(9), 2138-2144, 2006.
- 5) M. Miyashita., et al., *J. Agric. Food Chem.*, 55(3), 806-811, 2007.
- 6) C. Liegeois., et al., *J. Agric. Food Chem.*, 48(4), 1129-1134, 2000
- 7) LG. Nagler., et al., *Biochemistry Mosc.*, 68(2), 203-208, 2003.

表1 被験品のO₂⁻残存率およびO₂⁻消去率(SOD様活性率)

	濃度 (%)	O ₂ ⁻ 残存率(%)					O ₂ ⁻ 消去率(SOD様活性率)(%)					P値
		1	2	3	mean	± s.d.	1	2	3	mean	± s.d.	
対照	-	98.9	100.9	100.2	100.0 ± 1.0	1.1	-0.9	-0.2	0.0 ± 1.0	-		
被験品	0.00001	98.8	98.2	98.9	98.6 ± 0.4	1.2	1.8	1.1	1.4 ± 0.4	<i>P</i> < 0.1		
	0.0001	99.0	99.0	98.4	98.8 ± 0.4	1.0	1.0	1.6	1.2 ± 0.4	-		
	0.001	97.8	97.3	97.5	97.5 ± 0.3	2.2	2.7	2.5	2.5 ± 0.3	<i>P</i> < 0.05		
	0.01	98.6	98.0	98.6	98.4 ± 0.4	1.4	2.0	1.4	1.6 ± 0.4	<i>P</i> < 0.1		
	0.1	97.7	99.2	99.0	98.6 ± 0.8	2.3	0.8	1.0	1.4 ± 0.8	-		
	1	98.3	99.8	100.3	99.5 ± 1.0	1.7	0.2	-0.3	0.5 ± 1.0	-		
	10	85.3	84.8	84.5	84.9 ± 0.4	14.7	15.2	15.5	15.1 ± 0.4	<i>P</i> < 0.001		

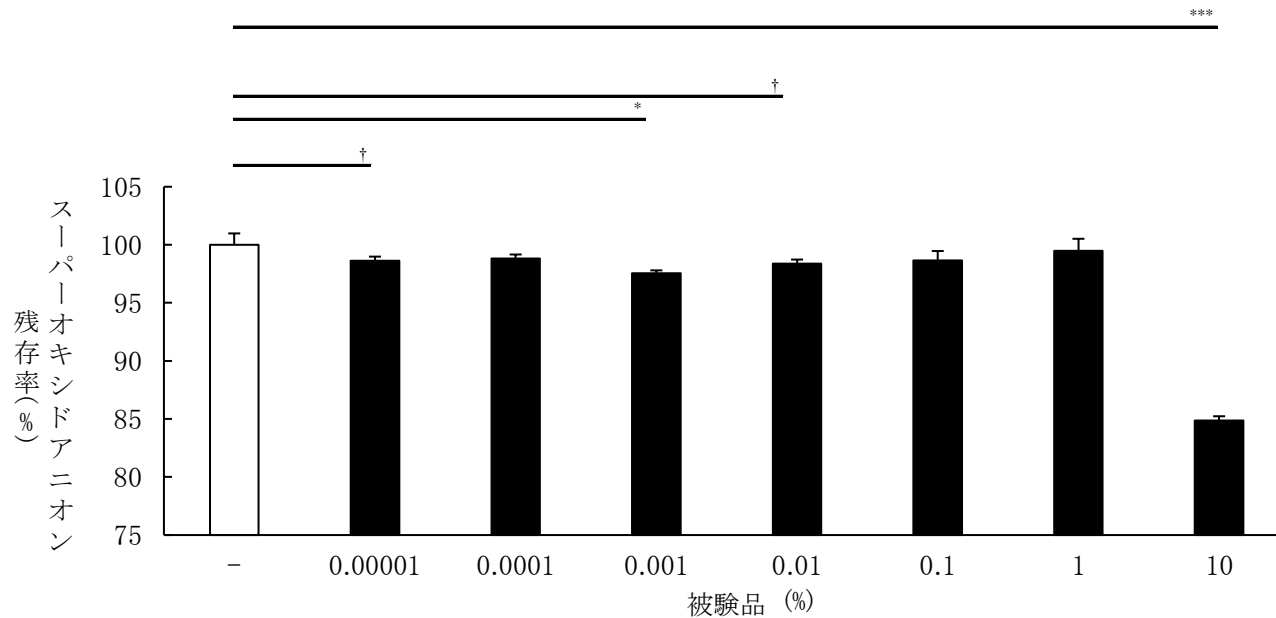


図1 被験品のO₂⁻残存率

n = 3, mean ± s.d., unpaired *t*-test, †*P* < 0.1, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001
s.d.: standard deviation

表2 被験品のOHラジカル残存率およびOHラジカル消去率

	濃度 (%)	・OH残存率(%)						・OH消去率(%)						P値
		1	2	3	mean	±	s.d.	1	2	3	mean	±	s.d.	
対照	-	97.5	100.9	101.6	100.0	±	2.2	2.5	-0.9	-1.6	0.0	±	2.2	-
	0.00001	99.4	101.6	102.3	101.1	±	1.5	0.6	-1.6	-2.3	-1.1	±	1.5	-
	0.0001	100.9	101.0	100.8	100.9	±	0.1	-0.9	-1.0	-0.8	-0.9	±	0.1	-
	0.001	98.8	101.1	100.7	100.2	±	1.3	1.2	-1.1	-0.7	-0.2	±	1.3	-
被験品	0.01	99.2	101.0	100.9	100.3	±	1.0	0.8	-1.0	-0.9	-0.3	±	1.0	-
	0.1	98.7	100.4	101.3	100.1	±	1.3	1.3	-0.4	-1.3	-0.1	±	1.3	-
	1	98.9	100.6	101.5	100.4	±	1.3	1.1	-0.6	-1.5	-0.4	±	1.3	-
	10	91.4	92.5	92.2	92.0	±	0.6	8.6	7.5	7.8	8.0	±	0.6	$P < 0.01$

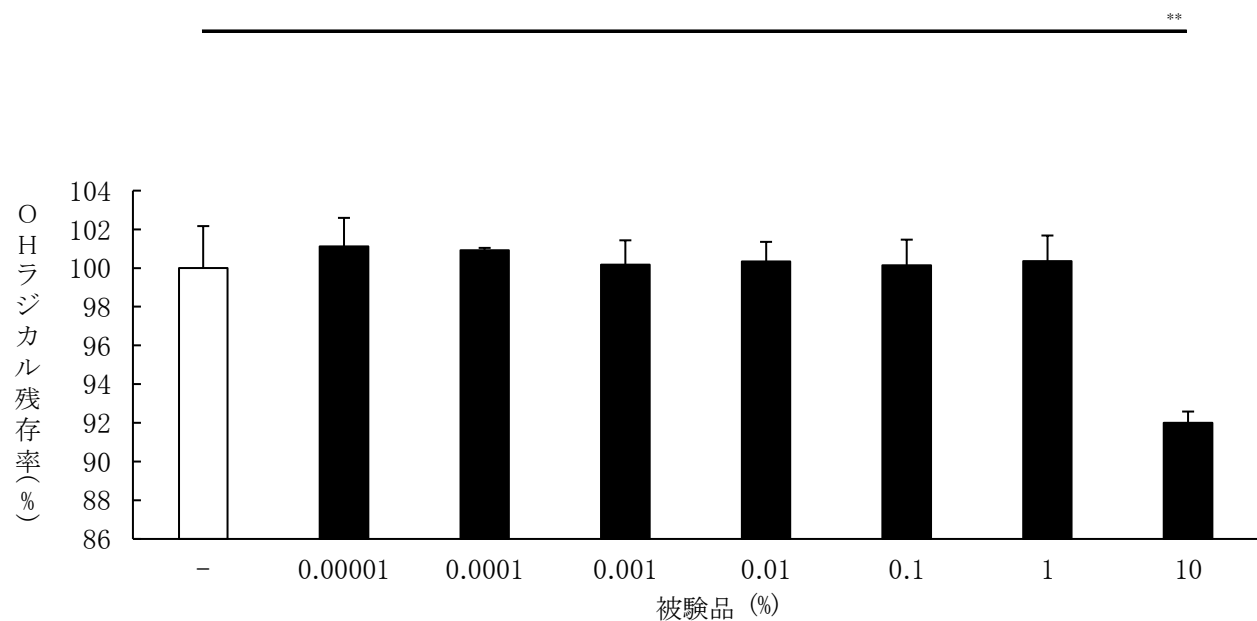


図2 被験品のOHラジカル残存率

$n = 3$, mean \pm s.d., unpaired t -test, $^{\dagger}P < 0.1$, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$
s.d.: standard deviation

表3 被験品の過酸化脂質生成率および生成抑制率

	濃度 (%)	過酸化脂質生成率(%)						過酸化脂質生成抑制率(%)						P値
		1	2	3	mean	±	s.d.	1	2	3	mean	±	s.d.	
対照	-	103.5	99.8	96.7	100.0	±	3.4	-3.5	0.2	3.3	0.0	±	3.4	-
	0.00001	72.9	80.8	80.3	78.0	±	4.4	27.1	19.2	19.7	22.0	±	4.4	$P < 0.01$
	0.0001	82.4	83.5	84.5	83.5	±	1.1	17.6	16.5	15.5	16.5	±	1.1	$P < 0.01$
	0.001	86.6	79.8	79.8	82.0	±	4.0	13.4	20.2	20.2	18.0	±	4.0	$P < 0.01$
被験品	0.01	76.6	86.6	79.8	81.0	±	5.1	23.4	13.4	20.2	19.0	±	5.1	$P < 0.01$
	0.1	84.0	78.7	83.5	82.0	±	2.9	16.0	21.3	16.5	18.0	±	2.9	$P < 0.01$
	1	51.8	55.5	55.5	54.2	±	2.1	48.2	44.5	44.5	45.8	±	2.1	$P < 0.001$
	10	11.6	2.6	5.8	6.7	±	4.6	88.4	97.4	94.2	93.3	±	4.6	$P < 0.001$

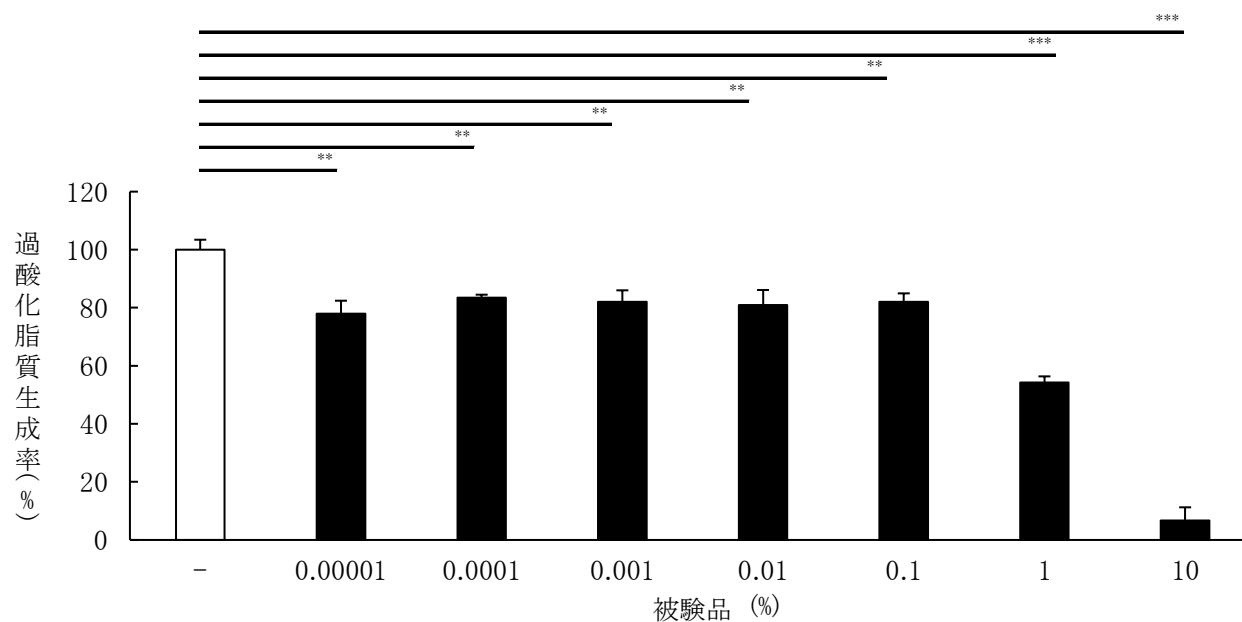


図3 被験品の過酸化脂質生成率

$n = 3$, mean \pm s.d., unpaired t -test, $^{\dagger}P < 0.1$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$
s.d.: standard deviation