

음양곽 추출물의 멜라닌 생성 촉진 효과

이 응 지[†] · 배 성 윤 · 이 용 화

정산생명공학(주) 중앙연구소
(2009년 10월 14일 접수, 2009년 11월 30일 수정, 2009년 12월 2일 채택)

The Stimulatory Effects of *Epimedium koreanum* Nakai Extract on Melanogenesis

Eung Ji Lee[†], Seong Yun Bae, and Yong Hwa Lee

R&D Center, Jung San Biotechnology, 61, Dukjeul-ri, Jeongnam-myun, Whasoung-si, Kyunggi-do 445-964, Korea
(Received October 14, 2009; Revised November 30, 2009; Accepted December 2, 2009)

요약: 멜라닌 생합성을 활성화하여 자연스러운 모발의 흑화를 촉진할 수 있는 소재를 개발하기 위하여 음양곽 메탄올 추출물의 멜라닌 생성에 연관된 생리 활성을 분석하였다. 음양곽 추출물은 100 µg/mL 이하에서 세포 독성이 없는 것으로 확인 되었으며 50 µg/mL 농도에서 B16 melanoma 세포 내 멜라닌 생합성을 104 % 증가시켰고 tyrosinase의 활성을 95 % 촉진하는 것으로 나타났다. Western blot을 이용한 실험에서는 음양곽 추출물이 농도 의존적으로 TRP-2의 발현을 증가시키는 경향을 관찰할 수 있었다. 또한 C3H/HeJ 마우스를 이용한 동물 실험에서 음양곽 추출물을 도포한 등 부위 털의 멜라닌 생합성이 5 % (w/v) 도포 시 25 % 증가되는 경향을 관찰할 수 있었다. 위의 결과를 통해 음양곽 메탄올 추출물이 멜라닌 생합성 기전에 관여하는 것으로 알려진 tyrosinase의 활성 촉진, 멜라닌 생합성 기전과 melanocyte 생존에 관여하는 것으로 알려진 TRP-2의 발현 증가를 통해 멜라닌 합성 촉진을 유도하는 것으로 추측해 볼 수 있었다. 이러한 음양곽 추출물의 효능을 이용해 모발의 흑화 촉진 효과를 나타내는 화장품 소재 개발이 가능할 것으로 보인다.

Abstract: To develop a natural stimulating agent for hair melanogenesis, we investigated the stimulatory effects of *Epimedium koreanum* Nakai extract (EKNE) on melanogenesis. EKNE both increased melanin content in B16 melanoma cells up to about 104 % and intracellular tyrosinase activity up to about 95 % at a concentration of 50 µg/mL without cell cytotoxicity (below 100 µg/mL). From the result of western blot, we could find that EKNE dose-dependently induce the expression of TRP-2. Also, EKNE increased melanogenesis up to about 25 % at a concentration of 5 % (w/v) in back hair of C3H/HeJ mouse. These results suggest that EKNE has an effect to stimulate melanin formation through the induction of tyrosinase activity and TRP-2 expression which are involved in melanin synthesis in melanocyte. Therefore, we suggest that EKNE could be used as a useful melanogenesis stimulator for development of natural hair cosmetics.

Keywords: melanogenesis, *Epimedium koreanum* Nakai, hair, tyrosinase, TRP-2

1. 서 론

피부색과 마찬가지로 모발색은 멜라닌 세포에서 만들어진 멜라닌에 의해 결정된다. 모발 성장 주기 중 성장기 (anagen phase) 동안 왕성하게 이루어지는 멜라닌 생성

은 멜라닌세포(melanocyte) 내의 melanosome에서 단계적인 여러 효소의 작용을 통해 이루어진다[1,2]. Tyrosinase에 의해 tyrosine 으로부터 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), DOPA quinone으로 변환되고 dopachrome을 거쳐 멜라닌이 생성되는데, 이 과정에서 TRP1 (DHICAoxidase), TRP2 (dopachrome tautomerase) 효소의 작용을 거친다[3]. 멜라닌은 흑, 갈색의 eu-

[†] 주 저자 (e-mail: witch83@jungsanbio.co.kr)

melanin과 적, 노랑색의 pheomelanin이 있는데, tyrosinase는 이들 두 가지 타입의 멜라닌 합성에 필요하며, TRP-1과 TRP-2는 eumelanin의 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다[4]. 생성된 멜라닌은 케라틴 세포(keratinocyte)에 전달되는 과정을 거친 후 색을 드러내게 되는데, 이 때 분포하는 멜라닌 색소의 종류와 농도에 따라 개인의 모발색이 결정 된다[2,5].

음양곽(*Epimedium koreanum* Nakai)은 매자나무과에 속하는 다년생초본식물인 삼지구엽초의 지상부를 건조한 것으로 주성분은 flavonoid인 icariin, epimedo side A 등이 알려져 있다. 한방에서는 강장, 거풍강정, 이노 및 신경성 강장제로 사용되고 있으며, 주성분인 icariin의 고혈압에 대한 효과와 간독성 억제 효과가 보고된 바 있다[6-8].

모발의 백화 현상은 모낭 내부의 멜라닌 세포의 활성화와 그 수가 점진적, 선별적으로 감소하여 나타나는데, 최근에 백모와 유색 모발의 차이가 TRP-2 효소의 유무에 있음이 보고된 바 있다. 즉, TRP-2가 멜라닌 생성에 관여하는 역할보다 모낭 내의 멜라닌 세포 생존에 더 많이 기여한다는 것이다[9-12].

본 연구에서는 음양곽 메탄올 추출물의 멜라닌 생성 촉진 효과 및 TRP-2 효소발현 증가 효과를 평가하여 모발 흑화 촉진 소재 개발 가능성을 제시하고자 한다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 기기

본 실험에 사용된 음양곽(*Epimedium koreanum* Nakai)은 국내 약초시장이던 경동시장에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약은 Sigma (USA) 제품을 사용하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10 % fetal bovine serum (FBS), penicillin streptomycin은 Lonza (Switzerland) 제품을 사용하였다. TRP-2, β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan), microplate reader (Bio-Rad, Japan), freeze dry system (OPERON, Korea)를 사용하였다.

2.2. 시료 추출물의 제조

음건 세절한 음양곽 1 kg을 methanol 5 L에 넣어 70 °C로 4 h 씩 3회에 걸쳐 가온하고 filter paper (ADVA-

NTEC, USA)로 여과하였다. 여과된 추출물을 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)를 이용해 농축한 후 freeze dry system (OPERON, Korea)으로 진공 건조하여, 메탄올을 완전히 제거한 약 120 g의 추출물을 얻었다.

2.3. 멜라닌 생성 효과 평가

2.3.1. 세포배양

Mouse melanoma cell line B16/F10 melanoma 세포와 Human keratinocyte HaCaT세포는 ATCC (USA)에서 구입하여 사용하였으며, 세포 배양에 사용된 DMEM 배지는 10 % FBS, 1 % penicillin streptomycin을 혼합하여 사용하였고, 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2.3.2. 세포 생존율 측정

세포 실험에 대한 시료의 적정 처리농도를 결정하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, USA) assay를 Mosmann의 방법을 변형하여 실시하였다[13]. 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT를 진청색의 비수용성 포마잔으로 변환시키는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법이다. 생성된 포마잔의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다.

HaCaT 세포를 5×10^3 cells/well로 96-well plate에 분주한 세포에 농도별로 시료를 처리하여 5 % CO₂ 배양기에 37 °C 조건하에서 72 h 동안 배양하였다. MTT 용액(5 mg/mL) 20 μ L을 첨가하고 4 h 동안 배양한 후 상등액을 제거하고 200 μ L dimethyl sulfoxide (DMSO, sigma, USA)을 첨가하여 microplate reader로 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대조군은 시료를 처리하지 않은 배양액으로 설정한 후 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존능력은 다음의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.3.3. 멜라닌 생성 촉진 효과 측정

멜라닌 함량 측정은 Yasunobu 방법을 변형하여 사용하였다[14]. B16 melanoma 세포를 24-well plate에 4×10^4 cell/well로 분주하여 배양한 후 시료를 농도별로 처리하고 72 h 동안 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다. Trypsinization으로 얻은 pellet에 10 % DMSO + 1

N NaOH 용액으로 멜라닌을 용해시키고, microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{증가율(\%)} = (\text{시료 첨가군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도} \times 100$$

2.3.4. 세포 내 Tyrosinase 활성 측정

세포 내 tyrosinase 활성 측정법은 Pawelek와 Pomerantz 방법을 변형하여 사용하였다[15,16]. 세포 내 tyrosinase 활성 분석은 세포 내에 존재하는 tyrosinase의 작용결과 생성되는 DOPAquinone의 비색법에 의해 측정하였다. B16 melanoma 세포를 6-well plate에 5×10^5 cells/well로 세포를 분주하고 5 h 동안 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 배양한 후 시료를 농도별로 처리하였다. 72 h 동안 배양 후 trypsinization으로 얻은 pellet을 Triton X-100이 포함된 PBS 용액으로 용해시켰다. 동량의 단백질 각각에 10 mM L-DOPA가 첨가된 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8)을 혼합한 후, 37 °C 항온기에서 20 min 동안 배양시키고, microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{증가율(\%)} = (\text{시료 첨가군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도} \times 100$$

2.3.5. Western Blot

시료를 72 h 동안 처리한 B16 melanoma 세포를 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100)로 용해하고 원심 분리하였다. 여기서 얻은 상층액을 7.5 % SDS-PAGE를 이용해 전기영동하고 이를 PVDF membrane으로 이전 시켰다. 5 % skim milk가 함유된 tris 완충용액에서 1 h blocking 과정을 거친 후, TRP-2 (sc-10452), β -actin (sc-47778) 항체와 각각 반응시켰다. Horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 항체를 가하고 enhanced chemiluminescent (ECL, Amersham, Sweden) kit을 사용하여 1 ~ 3 min 동안 반응시킨 후 X-ray 필름으로 현상하였다.

2.3.6. 마우스 모색 측정

마우스 모색 측정은 Furuichi 방법을 변형하여 사용하였다[17]. 4주령 암컷 C3H/HeJ 마우스(SLC, Japan)를 구입하여 1주일 동안 적응기를 거쳤다. Ketamin (Huons, Korea)과 Rompun (Bayer, Germany)을 7 : 3으로 섞어 주사해 마취시킨 후 등 부위의 털을 wax hair removal

kit (Reckitt Benckiser, England)로 제거하였다. 시료를 vehicle (AOO, acetone : olive oil = 4 : 1)에 1, 5 %로 녹여 준비한 후 12주 동안 등 부위에 도포하였다. 도포 완료 후 등 부위의 털을 채취하여 10 % DMSO + 1 N NaOH 용액으로 멜라닌을 용해시키고, microplate reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{증가율(\%)} = (\text{시료 도포군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도} \times 100$$

2.4. 피부안전성 시험

음양곽 추출물에 대한 피부 안전성, 즉 피부 반응의 관찰을 통해서 자극 혹은 알레르기성 반응의 발생 여부를 알아보기 위하여 인체 첩포 시험을 실시하였다.

평소 피부 질환 및 알러지가 없는 10명의 피험자를 대상으로 실시하였으며, 연령분포는 22 ~ 35세, 평균 27세였다. 우선, 첩포 부위인 전박을 70 % 에탄올로 세척한 후, 시험물질이 적용된 finn chamber를 시험부위에 첩포하였다. 첩포는 48 h 동안 도포하며, 첩포를 제거한 후에는 피부 marker로 시험부위를 표시하고 30 min, 24 h, 48 h에 자극 발생 유무를 평가하였다. 평가기준은 The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association (CTFA) 가이드라인에서 제시한 판정기준에 따랐으며, 피부반응도의 평가는 다음 계산식으로부터 계산된 평균값으로 하였다.

$$\text{피부반응도(\%)} = \frac{\sum (\text{가중치} \times \text{반응인원수})}{4(\text{최대가중치}) \times n (\text{전체인원수})} \times 100 \times 0.5$$

2.5. 자료분석 및 통계처리

모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 멜라닌 생성에 대한 효과 평가

3.1.1. 음양곽 추출물의 세포 생존에 미치는 영향

음양곽 추출물의 세포 독성 측정과 더불어 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. HaCaT 세포에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 100 μ g/mL 이하의 농도로 처리 시 음양곽 추출물은 세포 생

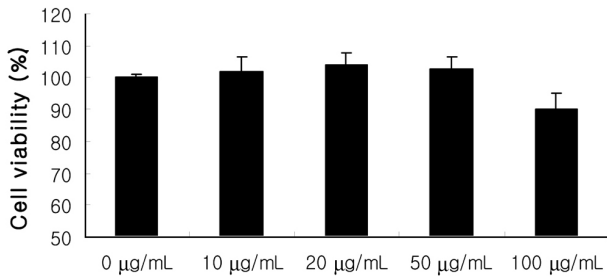


Figure 1. Cell viability of *Epimedium koreanum* Nakai extract (EKNE) on HaCaT cells by MTT assay. The cells were treated with various concentrations of samples for 72 h. The results were expressed as the average of triplicate samples.

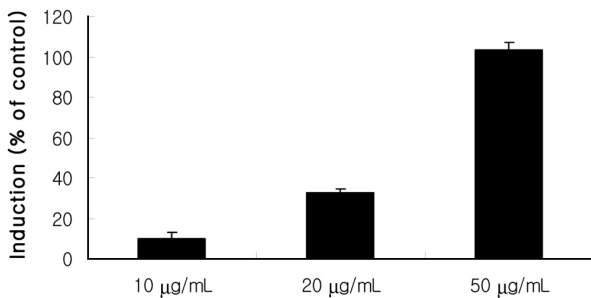


Figure 2. Stimulatory effect of *Epimedium koreanum* Nakai extract (EKNE) on melanin production in B16/F10 melanoma cells. After the treatment of samples for 72 h, melanin contents were measured at 405 nm. The results were expressed as the average of triplicate samples. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with control.

존율이 90 % 이상으로 나타났다(Figure 1).

3.1.2. 음양곽 추출물의 멜라닌 생성 촉진 효과

음양곽 추출물의 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 양을 측정하였다. 음양곽 추출물을 0, 10, 20, 50 µg/mL의 농도로 처리한 세포를 수집하여 멜라닌 양을 측정한 결과, 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 증가되어 50 µg/mL 농도로 처리 시 104 %의 증가율을 보였다(Figure 2).

3.1.3. 음양곽 추출물의 세포 내 tyrosinase 활성 촉진 효과

Tyrosinase는 멜라닌 합성 과정의 주요한 효소이다. 음양곽 추출물의 멜라닌 생성 촉진 효과가 tyrosinase 활성 촉진에 의한 영향인지 알아보기 위하여 cellular tyrosinase assay를 수행하였다. 음양곽 추출물을 0, 10, 20, 50 µg/mL의 농도로 처리한 세포를 수집하여 tyrosinase 활성을 측정한 결과, 농도 의존적으로 세포 내 tyrosinase

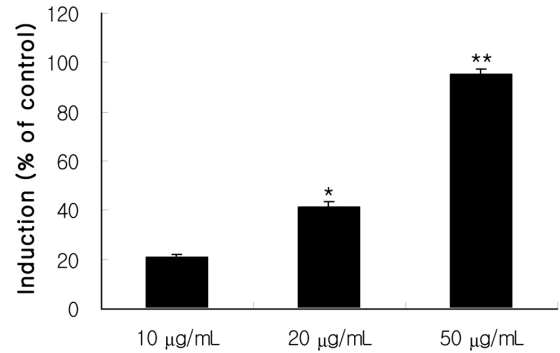


Figure 3. Stimulatory effect of *Epimedium koreanum* Nakai extract (EKNE) on tyrosinase activity in B16/F10 melanoma cells. After the treatment of samples for 72 h, lysates of the cells containing tyrosinase were incubated with DOPA for 30 min. The results were expressed as the average of triplicate samples. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with control.

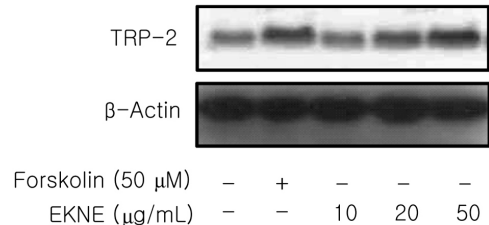


Figure 4. The effect of *Epimedium koreanum* Nakai extract (EKNE) on TRP-2 protein expression in B16 melanoma cells. The cells were treated with various concentrations of sample (10, 20, 50 µg/mL) for 72 h.

의 활성이 증가되어 50 µg/mL 농도로 처리 시 95 %의 증가율을 보였다(Figure 3).

3.1.4. 음양곽 추출물의 TRP-2 단백질 발현 촉진 효과

모양의 멜라닌 세포 생존에 관여하는 것으로 알려진 TRP-2의 발현에 음양곽 추출물이 영향을 주는지 알아보기 위하여 TRP-2에 대한 Western blot을 수행하였다. 10, 20, 50 µg/mL의 농도별로 시료를 처리한 세포를 이용해 실험을 수행한 결과 TRP-2의 발현량이 농도의존적으로 증가되고 있음을 관찰할 수 있었다(Figure 4).

3.1.5. 음양곽 추출물의 모발 내 멜라닌 생성 촉진 효과

음양곽 추출물이 실제 모발의 멜라닌 생성에도 촉진 효과를 나타내는지 알아보기 위하여 C3H/HeJ mouse를 이용한 동물 실험을 진행하였다. 1 %, 5 % 농도의 시료를 12주 동안 도포한 결과 농도에 따라 모발의 색이 진해지는 것을 육안상으로 관찰할 수 있었고 모발을 용해하여

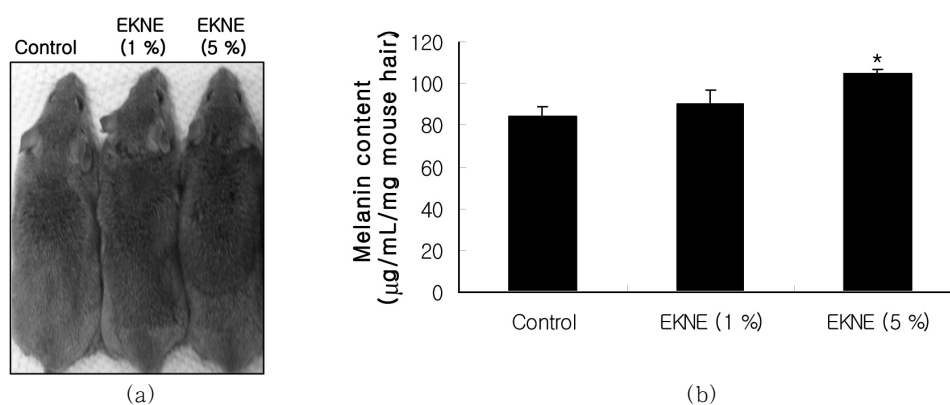


Figure 5. The effect of *Epimedium koreanum* Nakai extract (EKNE) on hair melanogenesis of C3H/HeJ mice. C3H/HeJ mice were treated with 1, 5 % (w/v) of EKNE for 12 weeks. The shaved back hair was lysed and the absorbance at 405 nm was measured. The results were expressed as the average of triplicate samples. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with control. (A) Pigmentation of C3H/HeJ mouse. (B) Melanin content of back hair.

멜라닌 양을 측정한 결과에서도 5 % 시료군에서 25 %의 멜라닌 생성 촉진을 확인할 수 있었다(Figure 5).

3.2. 피부자극 평가

피험자 10명에 대하여 실시한 인체 첩포 시험의 검사 결과에 근거하여 48 h 및 72 h 평균 반응도를 비교하였으며, 이를 기준으로 하여 그 결과를 판정한 결과, 음양곽 추출물 1 %에 대한 피부반응도(Means)는 0으로 대조군과 마찬가지로 무자극으로 판정되었다. 이는 세포독성과 같이 종합해 볼 때, 독성이 거의 존재하지 않는 안정한 소재임을 알 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 음양곽 메탄올 추출물의 모발 흑화 촉진 효과에 대한 화장품 원료로서의 가능성을 알아보았다. 음양곽 추출물은 100 µg/mL 내의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았으며 B16 melanoma 세포 내 멜라닌 생성과 tyrosinase의 활성화에 대해서는 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타냈다. 또한, 멜라닌 생성 및 세포의 생존과 연관되어 있는 것으로 알려진 TRP-2의 단백질 발현량을 Western blot을 이용하여 측정한 결과 단백질 발현량이 농도 의존적으로 증가되는 양상을 확인할 수 있었다. 따라서 음양곽 추출물이 멜라닌 생합성의 초기에 주요한 역할을 하는 tyrosinase의 활성화와 TRP-2의 발현을 증가시킴에 따라 멜라닌의 생성을 촉진한다고 판단할 수 있었다. 또한, TRP-2 발현을 증가시킴으로 인해 멜라닌 세포의 생존도 유지시켜 모발 색 변화 억제 효과

도 나타낼 것으로 추측해 볼 수 있었다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 음양곽 추출물은 모발 흑화 촉진 효과를 갖는 기능성 원료로서 이용 가치가 있을 것으로 보인다. 향후 이 소재에 대한 추가적인 임상 실험을 진행하여 피부 안정성 검증과 효능 평가를 진행할 예정이다.

이와 같은 천연 소재를 사용한 모발용 화장품이 개발된다면, 화학 성분의 기존 염모제 사용에 따른 부작용 염려 없이 흑화 효과를 기대할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 추가적으로 효능을 극대화할 수 있는 다양한 천연 소재를 발굴할 필요가 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. D. J. Tobin, Human hair pigmentation-biological aspects, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **30**(4), 233 (2008).
2. R. Cui, H. R. Widlund, E. Feige, J. Y. Lin, D. L. Wilensky, V. E. Igras, J. D'Orazio, C. Y. Fung, C. F. Schanbacher, S. R. Granter, and D. E. Fisher, Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation, *Cell*, **128**(5), 853 (2007).
3. K. Cheng, F. Hsu, S. Chen, P. Hsieh, H. Huang, C. Lee, and M. Lee, New constituent from *podocarpus macrophyllus* var. *macrophyllus* shows antityrosinase effect and regulates tyrosinase-related proteins and mRNA in human epidermal melanocytes, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**(5), 757 (2007).

4. T. Kobayashi, K. Urabe, A. Winder, C. Jimenez-Cervantes, G. Imokawa, T. Brewington, F. Solano, J. C. Garcia-Borrón, and V. J. Hearing, Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis, *EMBO J.*, **13**(24), 5818 (1994).
5. S. Briganti, E. Camera, and M. Picardo, Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment. Cell. Res.*, **16**(2), 101 (2003).
6. Y. G. Lee, H. O. Sohn, D. W. Lee, and H. B. Lim, The effect of water-extract of *Epimedium koreanum* Nakai on age-related changes of the xenobiotic metabolizing enzyme system in the liver of rats, *Kor. J. Med. Crop. Sci.*, **10**(1), 29 (2002).
7. S. J. Kim and D. H. Oh, Free radical scavenging effect and extraction condition of ethanol extracts of *Epimedium koreanum* Nakai containing different icariin quantity, *J. Fd Hyg. Safety*, **22**(4), 359 (2007).
8. B. J. Ha, H. J. Kim, S. H. Lee, J. M. Ha, S. H. Lee, J. H. Lee, D. G. Lee, E. K. Park, and C. S. Nam, The hepatoprotective effects of *Epimedium herba* through the antioxidation, *J. Life Sci.*, **15**(4), 572 (2005).
9. D. J. Tobin and R. Paus, Graying: gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit, *Exp. Gerontol.*, **36**(1), 29 (2001).
10. E. K. Nishimura, S. R. Granter, and D. E. Fisher, Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche, *Science*, **307**(5710), 720 (2005).
11. E. Steingrimsdóttir, N. G. Copeland, and N. A. Jenkins, Melanocyte stem cell maintenance and hair graying, *Cell*, **121**(1), 9 (2005).
12. S. Commo, O. Gaillard, S. Thibaut, and B. A. Bernard, Absence of TRP-2 in melanogenic melanocytes of human hair, *Pigment. Cell. Res.*, **17**(5), 488 (2004).
13. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay, *J. Immun. Methods* (1-2), **65**, (1983).
14. O. Yasunobu, K. Tomoko, O. Yuri, M. Hitoshi, K. Yoshiko, F. Yoko, I. Masamitsu, Y. Ytaka, K. Yoshitane, and S. Hiromu, Development of a novel zinc complex as whitening agent in a new concept, *ASCS*, **6**, 69 (2003).
15. J. Pawelk, Melanoma cells in culture, *Methods Enzymol.*, **58**, 564 (1978).
16. S. H. Pomerantz, Separation, purification, and properties of two tyrosinases from hamster melanoma, *J. Biol. Chem.*, **238**, 2351 (1963).
17. T. Itoh and Y. Furuichi, Hot-water extracts from adzuki beans (*Vigna angularis*) stimulate not only melanogenesis in cultured mouse B16 melanoma cells but also pigmentation of hair color in C3H mice, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**(5), 873 (2005).