

## 地域特産野菜「ウコギ」の皮膚保護作用探索（第一報）

Effects of *Eleutherococcus sieboldianus* extracts  
on UVB-induced apoptosis in HaCaT cells

仁科淳良<sup>1)</sup>・加藤守匡<sup>1)</sup>・寺島康正<sup>1)</sup>・森田幸雄<sup>2)</sup>・木村博一<sup>3)</sup>  
Atsuyoshi Nishina, Morimasa Kato, Yasumasa Terashima,  
Yukio Morita and Hirokazu Kimura

<sup>1)</sup>米沢女子短期大学健康栄養学科、<sup>2)</sup>東京家政大、<sup>3)</sup>国立感染症研究所

### 1. はじめに

ウコギ（ヒメウコギ：*Eleutherococcus sieboldianus*）は、ウコギ科の植物で、中国原産の落葉低木である。これまで機能性素材として用いられてきたエゾウコギ（*Eleutherococcus senticosus* f. *inermis*）とは区別される。ウコギは昔、全国各地で栽培されており、特に戦国時代は、とげのあるウコギの垣根が敵の侵入を防ぐという重要な用途を担っていた。現在、ウコギは地域特産の野菜で、米沢周辺では家庭用食材である。調理法としては、天ぷら、おひたし、きり合せ、ウコギご飯などがある。第九代米沢藩主上杉鷹山が垣根や旬の食材として奨励したことから、米沢では古くから暮らしの中にあり、郷土料理としても伝統が受け継がれてきた。地産地消の範囲を超えて、全国的にウコギを販売しようとする動きがみられるが、未だに生産量は年間1.2t（山形県農業振興課資料）に留まっている。

これまで、ウコギに含まれている成分が人間に有用であるとして様々な研究が行われてきた。ウコギにはビタミンA、C、カルシウム、食物繊維のほか、近年ではサポニン類、クロロゲン酸やルチンなどのポリフェノール類が見いだされている。山田らは、ウコギ葉に食後の血糖値上昇を抑制する働きがあることを報告し、ラットを用いた実験結果からウコギにはマルターゼ阻害作用があると述べた。また、マルターゼ阻害作用はポリフェノール類、特にサポニン類とクロロゲン酸に由来すると推定した。さらに、山田らの研究結果を利用し、新規の抗糖尿病食品としてウコギ茶の開発も行われている<sup>1)</sup>。一方、ウコギ葉乾燥粉末から煮出した抽出液を用いた実験では、大腸菌、ブドウ球菌、バチルス菌、サルモネラ菌に対して抗菌性があることが報告されている<sup>2)</sup>。既往の文献をPubMedで検索した結果、エゾウコギの機能性に関して多数の報告が存在するのに対しヒメウコギに関する報告は見いだせなかった。ウコギの用途を拡大するためには機能性研究の面で新たな検討が必要であると考えた。

現在、世界的に見て皮膚がん患者が増加傾向にある。特に被害が拡大しているオーストラリアでの年間死亡者数は1000人以上となっている。日本では毎年3000人以上が皮膚がんを発症している。皮膚がん増加の一因はオゾンホール拡大による紫外線の増加にあるといわれている<sup>3-6)</sup>。このオゾンホールは1970年代から出現し年々拡大傾向にあり、オゾンが1%減少すると、地上に達する紫外線が2%増加し、結果、皮膚がん患者が4%増加するといわれている。

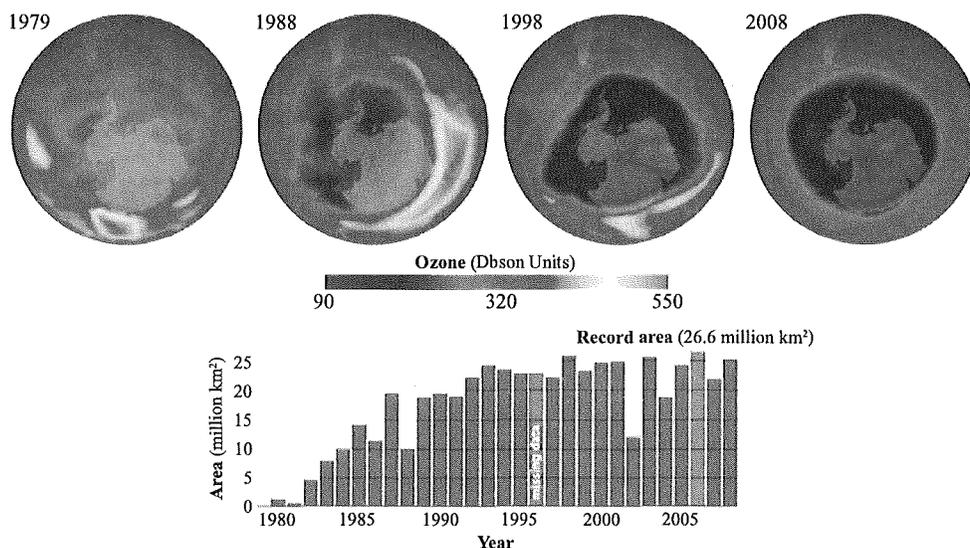


図 1 オゾンホールの拡大 (NASAのホームページより転載)

紫外線は、UVA (315-400nm), UVB (280-315nm), UVC (280nm以下) の3種類に分けられる。波長が短いものほど人体に有害であるが、最も波長の短いUVCは地表には届かない。UVBは地表まで届き皮膚がんを引き起こす。UVBによる皮膚がんの発生に関しては、hinokitiolがUVBによる皮膚がんのリスクを減らす<sup>(7)</sup>、ルテオリンがUVB皮膚がんを抑制する<sup>(8)</sup>、マクロファージ遊走化抑制因子 (MIF) がUVB皮膚がんの治療効果を示す<sup>(9)</sup>、UVB照射がラットのがんを誘発する<sup>(10)</sup>、UVBと癌の発症リスクの低減に関する研究 (William B. Grant earned a Ph.D. in physics from the University of California, Berkeley in 1971.)、紫外線とメラノーマ (皮膚ガン) との関係 (AMERICAN JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY)、紫外線の増加が人の健康に及ぼす影響に関する研究 (YAMAMOTO Kiichi; Department of Virology I National Institute of Health.) などの研究がなされている。

UVBによる皮膚細胞死抑制作用を検討する方法としてや、実験動物を用いる方法と培養細胞を使用する方法が知られている。皮膚に関する実験には、培養細胞としてHaCaT細胞が用いられる<sup>(11,12)</sup>。HaCaT細胞は人から不死化した細胞を採取したものである。上皮細胞のがん化の解析や、紫外線や化学物質などのストレスによる細胞死や修復の実験に用いられる。

今回、我々はHaCaT細胞を用いて、山形県の特産物、特にウコギ中の皮膚保護成分について検討することとした。具体的検討項目は①ウコギからエキス成分を抽出②エキス成分の活性測定③活性成分の生成④皮膚保護メカニズムの推定とした。

## 2. 実験方法

### 2. 1 実験材料

山形県置賜総合支庁産業経済部所轄の産地研究室場 (南陽市宮内) から発育が同等なウコギを購入した。

## 2. 2 試薬

3-(4,5-dimethylthiazol-2-y)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) はシグマ社の製品をそのまま用いた。ヘキサソ、クロロホルム、そしてメタノールは半井科学の製品（特級）をそのまま使用した。その他の試薬は和光純薬の製品を、購入した状態で使用した。

## 2. 3 HaCaT細胞

HaCaT細胞は、国立感染症研究所の木村博一博士のご好意により寄与されたものを用いた。ダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM) に牛胎児血清 (FBS) を10%添加し、37℃、CO<sub>2</sub> 5%の環境で培養した。

## 2. 4 細胞の播種法

HaCaT細胞がコンフルエントになるまで培養したカルチャーフラスコの培地を捨て、PBS 5 mlで洗浄後、再びPBS 5 ml、トリプシン 1 mlを加えチルティングにより混合した。37℃で10分間インキュベートし、FCSを 1 ml入れてピペッティングで均一化して、遠心管に移し4℃1000rpmで5分間遠心分離した。上清を捨て、沈殿した細胞を分散し、培地 (10%FCSを添加したDMEM) に入れてピペッティングした。96穴プレートに100 μlずつ分注し、皮膚保護作用の測定に用いた。残り細胞混濁液をカルチャーフラスコに入れ、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。

## 2. 5 HaCaT細胞の生存測定法

生存率測定法にはMTT法

[3-(4,5-dimethylthiazol-2-y)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromideを用いた、細胞の生死判定法]を用いた。すなわち、96穴プレートにあらかじめHaCaT細胞を充分発育させ、MTT (5 mg/1 ml) を培地の5%量添加し、2時間後に分光光度計 (650nm) で生存率を測定した。

## 2. 6 細胞毒性測定

96穴ウェルにコンフルエントになるまでHaCaT細胞を生育させた。培地に100 μg/mlまたは500 μg/mlの被験物を添加し、一晚37℃でインキュベートした。その後MTT法で細胞の生存率を測定した。

## 2. 7 皮膚保護作用測定

96穴ウェルにコンフルエントになるまでHaCaT細胞を生育させた。培地に100 μg/mlまたは500 μg/mlの被験物を添加し、一晚37℃でインキュベートした。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 100 μl で2回洗浄し、FBSを1%添加したDMEM (アッセイ用培地) に交換した。UVBを400mJ/cm<sup>2</sup>照射し、0, 12, 24, 36時間後にMTT法で生存率を測定した。

## 2. 8 エキスの調製

ウコギを真空乾燥して乾燥ウコギとした。ミキサーで乾燥ウコギを粉碎し、抽出原料とした。抽出原料に5倍量のヘキサソを入れ、一晚静置した後濾過し、ロータリーエバポレーターで乾燥して、ヘキサソ抽出物を得た。次に抽出残渣にヘキサソと同量のクロロホルムを入れ、ヘキサソ抽出物と同じ操作によりクロロホルム抽出物を得た。同様の方法でメタノール抽出物を得た。

## 2. 9 粗分画（オープンカラム精製）

充填剤としてシリカゲル（ワコーゲルC-200）を用いたオープンカラムトグラフィー（内径52mm）で皮膚保護作用を示したクロロホルム抽出物を5つのフラクションに粗分画した。移動相はヘキサン：酢酸エチル＝100:0、90:10、80:20、70:30、60:40（いずれも容積比）を用いた。

## 2. 10 活性フラクションの薄層クロマトグラフィーによる分析

オープンカラム分画物のうち活性が認められたクロロホルム70%画分（C70%画分）を薄層クロマトグラフィーによって分析した。

薄層プレートはシリカゲルF<sub>254</sub>（メルク社）を、展開溶媒はヘキサン：イソプレピルアルコール＝100:0、90:10、80:20、70:30、60:40、50:50（いずれも容積比）を用いた。展開後に風乾し、リン酸硫酸銅液（硫酸銅3gを15%リン酸水溶液100mlに溶かした）を用いて105℃で30分間加熱することにより発色させた。

## 2. 11 活性フラクションの分取高速液体クロマトグラフィーによる分画

C70%画分の再精製は次の方法で行った。カラムはDevelosil 60-10（内径200mm×長さ250mm：野村化学製）、移動相はヘキサン：イソプロピルアルコール＝97:3（容積比）流速5ml/min、検出には紫外可視検出器（254nm）を用いた。

## 2. 12 蛍光顕微鏡によるアポトーシスの判定

HaCaT細胞の培地にHoechst33342を5mg/ml添加し30分後に蛍光顕微鏡（MT-2：オリンパス製、励起波長350nm蛍光波長461nm）で核の状態を比較した。

## 2. 13 細胞の形態観察

倒立顕微鏡IX70（オリンパス製）を用い、×100で細胞の形態観察を行った。撮像にはデジタルカメラ（QV-8000：カシオ製）を用いた。

## 2. 14 ウェスタンブロット法

DMEM培地にFCS10%を添加した溶液にHaCaT細胞を $2 \times 10^6$ 個/ml濃度で混濁し、コーゲンコートした6穴マイクロプレートに播種し37℃、空気95%、二酸化炭素5%のもとで2日間前培養した。培地を除去してPBSで洗浄後、被験サンプルの所定量を活性試験用培地に分散または溶解し、37℃、30分間HaCaT細胞を被験サンプルで刺激した。

次に氷上でマイクロプレートを3mlの2mMTBS(0.33M NaCl and 6.25M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>含有)で洗い、Ripaバッファー(150mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Nonidet P-40(w/v), 1 % sodium deoxycholate(w/v), 0.1% SDS(w/v), 50mM NaF, 0.1% aprotinin(w/v), 0.1% leupeptin(w/v), 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and 1mM PMSF pH8.0)で細胞を溶かした。溶解した細胞をセルスクレーパーで集めて、1.5mlのマイクロチューブに移し、4℃ 15000gで30分間遠心分離した。上清を別のマイクロチューブに移すとともにタンパク含量をBCAタンパク定量キット（ピアス社）で測定した。20 μgのタンパク質を含む上清をSDSサンプルバッファー（インビトロジェン社）と混合し、80℃で5分間反応した。タンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離し、PVDFメンブランにエレクトロブロットにより転写した。PVDFメンブランは（ハイボンドP；GEヘルスケア社）を用いた。イムブロット分析は一次抗体としてリン酸化p44/42ERKモノクローナル抗体（セルシグナルテクノロジー社）、二次抗体としてアルカ

ノロジー社）、二次抗体としてアルカリホスファターゼの抗ウサギIgG（サンタクルズ社）を用いた。発色はAPバッファー（0.1M Tris-HCl NaCl 0.58%, MgCl<sub>2</sub> 0.1% pH9.5）10mℓに7.5% nitro blue tetrazolium (NBT) を45μℓと5% 5-bromo-4-chloro-3-inducryl phosphate-p-touidine (BCIP) を35μℓ混合した溶液中で行った。

### 3. 結果と考察

#### 3. 1 粗分画物の収量と細胞毒性

粗分画の結果、乾燥ウコギ100gからヘキサン抽出物が2.3g、クロロホルム抽出物が1.5g、メタノール抽出物が12.3g得られた（図2）。各抽出物の細胞毒性を図3に示した。無添加と比較して、ヘキサン抽出物、クロロホルム抽出物を添加すると細胞数が減少したが、統計的な有意差は認められなかった。

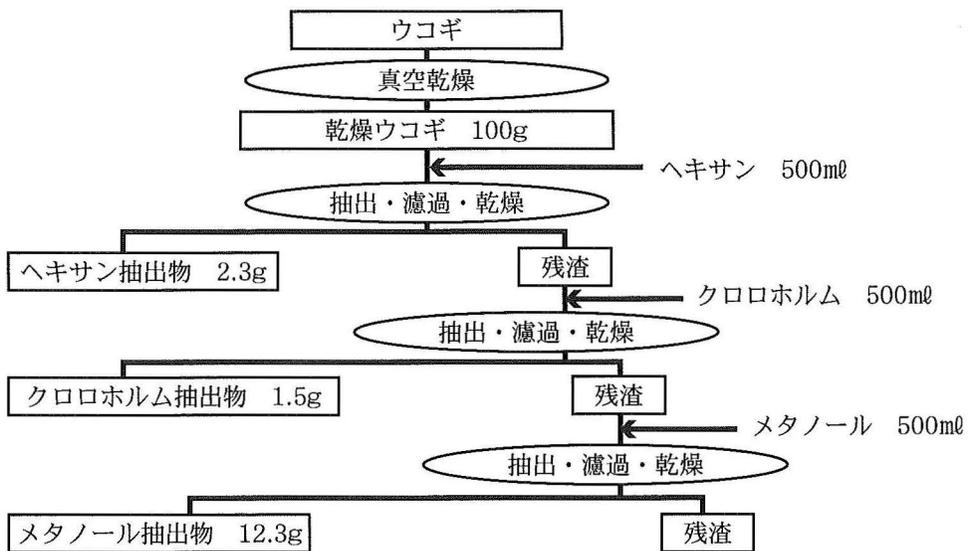


図2 粗分画法と各抽出物の収量

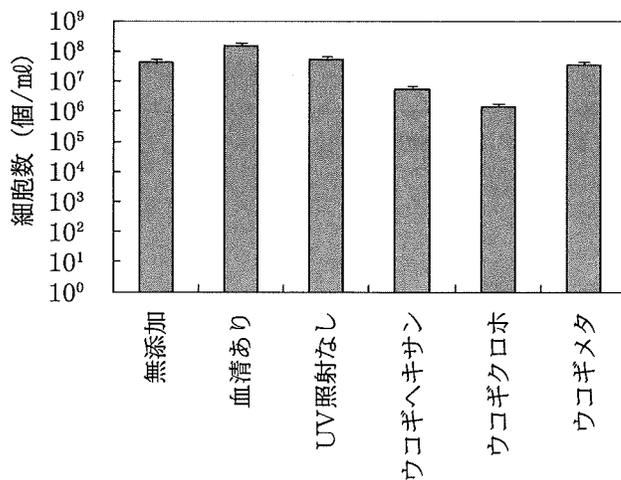


図 3 各抽出物の細胞毒性

### 3. 2 粗分画物の皮膚保護作用

粗分画物の皮膚保護作用を図 4 に示した。画分物無添加区に比べ、クロロホルム抽出物を 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加することにより有意な皮膚保護作用が認められた。ヘキササン抽出物、メタノール抽出物には皮膚保護作用が皆無であった。以上の結果からウコギのクロロホルム抽出物から活性成分の精製を行うこととした。

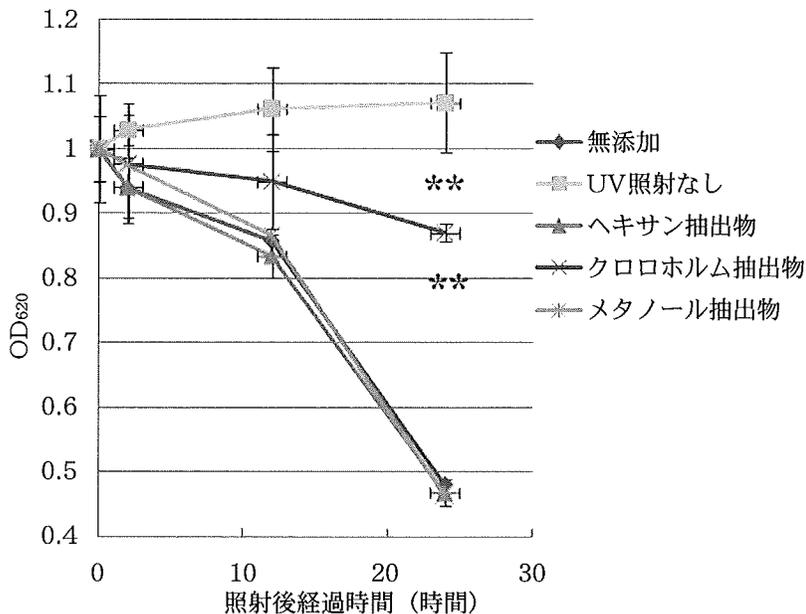


図 4 各抽出物の皮膚保護効果

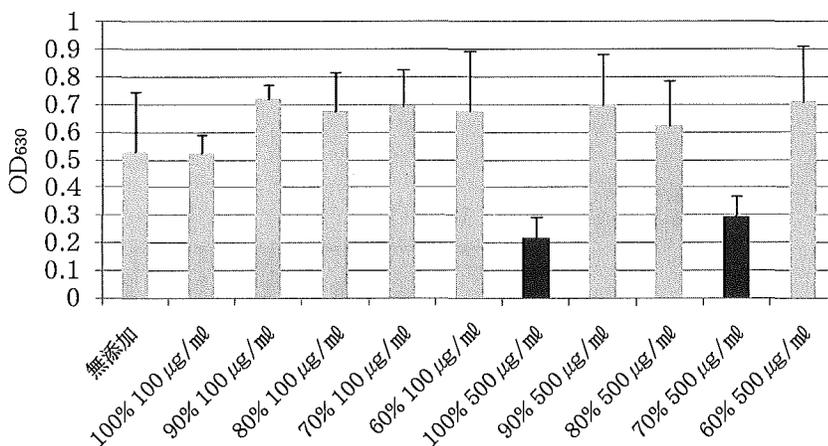
### 3. 3 オープンカラムクロマトグラフィーによるクロロホルム抽出物の分画

活性が認められたクロロホルム抽出物をオープンカラムクロマトグラフィーで分画し、5種類の分画物、すなわちヘキササン100%画分、ヘキササン90%画分、ヘキササン80%画分、ヘキササン70%画分、ヘキササン60%画分を得た。クロロホルム抽出物を3g用いたときの各画分の収量を表1に示した。それぞれの画分の細胞毒性を図5に、皮膚保護活性を図6に示した。無添加と比較してヘキササン100%画分または70%画分を添加することにより、有意な皮膚保護作用が認められた。

表1 オープンカラム精製時の収量

ヘキササン含量 (%)	収量/3g
100	0.32
90	0.42
80	1.95
70	0.11
60	0.2

図5 分画物の細胞毒性



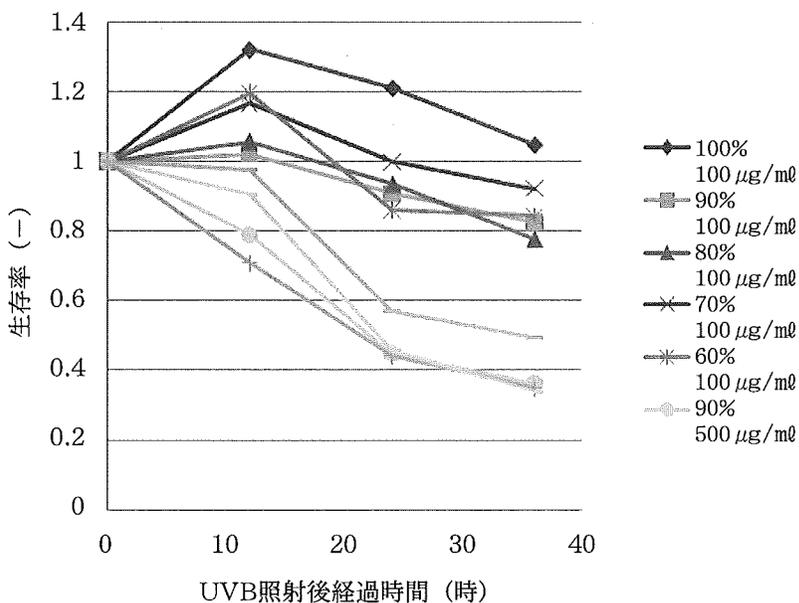


図 6 分画物の皮膚保護効果

### 3. 4 薄層クロマトグラフィーによる分析

薄層クロマトグラフィーによるヘキサン100%画分または70%画分の分析結果を図 7 に示した。ヘキサンとイソプロピルアルコールの混合液で展開することにより良好な分離が認められた。よって、精製にはカラムとしてシリカゲル、移動相としてヘキサンとイソプロピルアルコールの混合液を用いることとした。また、移動相の極性が低いほど、高極性の夾雑物が少なく、精製が容易であるので、ヘキサン100%画分を精製することとした。

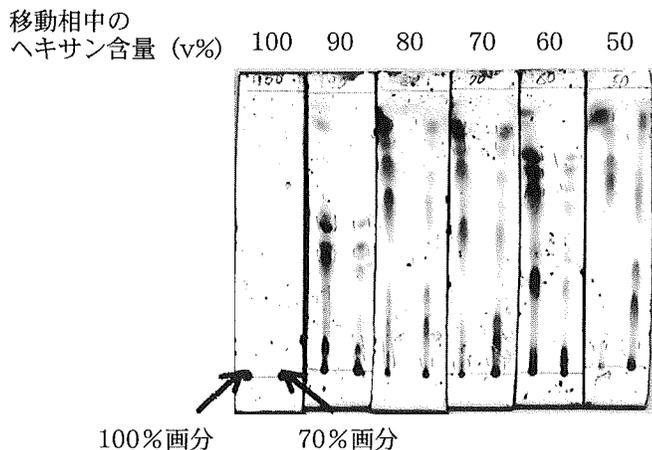


図 7 薄層クロマトグラフィーによる粗分画物の分析

### 3. 5 分取液体クロマトグラフィーによる精製

予備的に分析用液体クロマトグラフィーでヘキサン100%画分を分析した結果を図8に示した。移動相組成に関しては3. 4の薄層クロマトグラフィーの結果を参考にした。結果、移動相としてヘキサン：イソプロピルアルコール=97：3（容積比）を用いることにより精製に適した分離が得られると判断した。移動相としてヘキサン：イソプロピルアルコール=97：3（容積比）を用いてヘキサン100%画分をフラクションNo.1~8に分画した（図9）。各フラクションの皮膚保護作用を図10に示した。図10よりフラクション1の皮膚保護作用が最も強いことが分かった。図9よりフラクション1は多種の物質の混合物と推定された。活性成分を単離するためにはフラクション1の再精製が必要である。

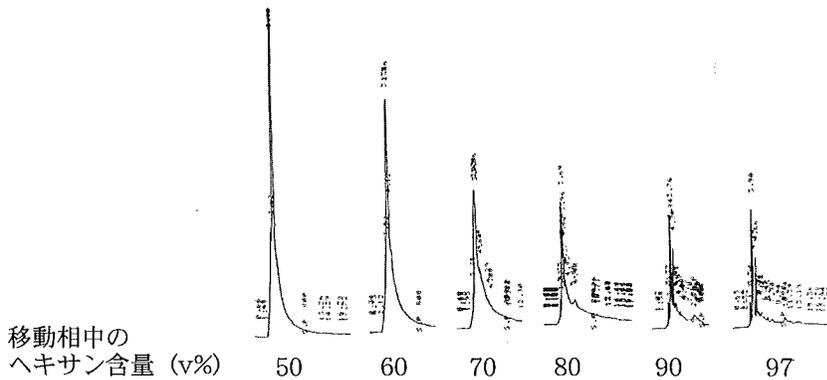


図8 分析用カラムによる予備検討

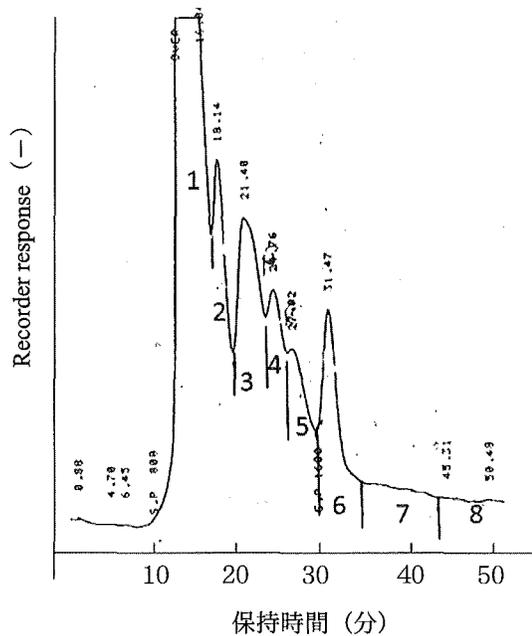


図9 分取高速液体クロマトグラフィーによる分画

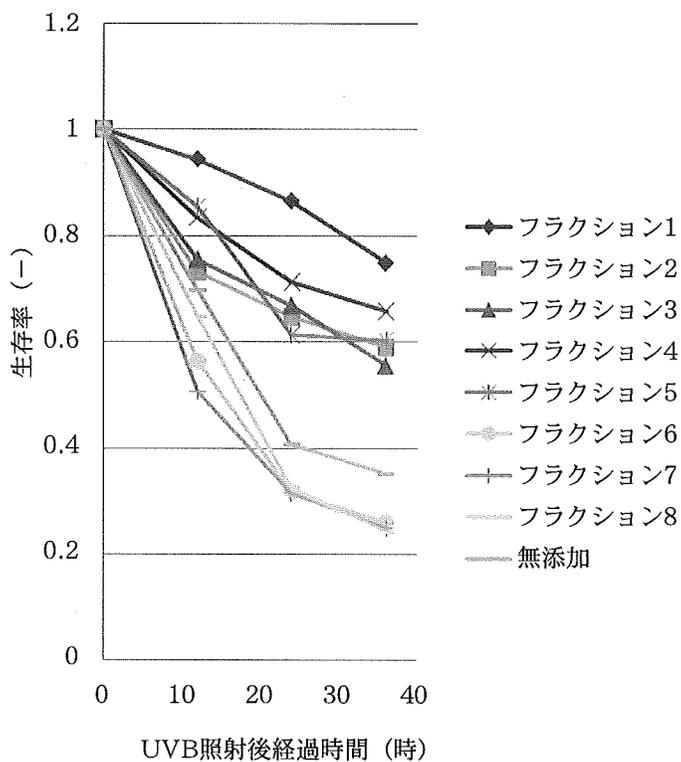


図10 分取高速液体クロマトグラフィーによって得られた各フラクシオンの皮膚保護作用

### 3. 6 UVB照射によるHaCaT細胞死滅様式の推定

既往の研究ではUVB照射によりHaCaT細胞がアポトーシスを起こすことが報告されている。細胞死の様式の推定を目的として、UVB照射によるHaCaT細胞の形態変化を観察した。結果を図11に示した。UVB未照射の透過像(A)とUVB照射24時間後の透過像の比較により、UVB照射による細胞の剥離、小胞化が観察された。核のヘキスト染色像からUVB照射24時間で核が断片化して矮小化することがわかった(C、D)。既往の研究結果でUVB照射により、HaCaT細胞がアポトーシスを起こすことが報告されており、我々の実験系でUVB照射によりアポトーシスの特徴である細胞の小胞化、核の断片化が認められたことから、我々が用いた実験系ではUVB照射によりHaCaT細胞がアポトーシスを起こすものと判断した。

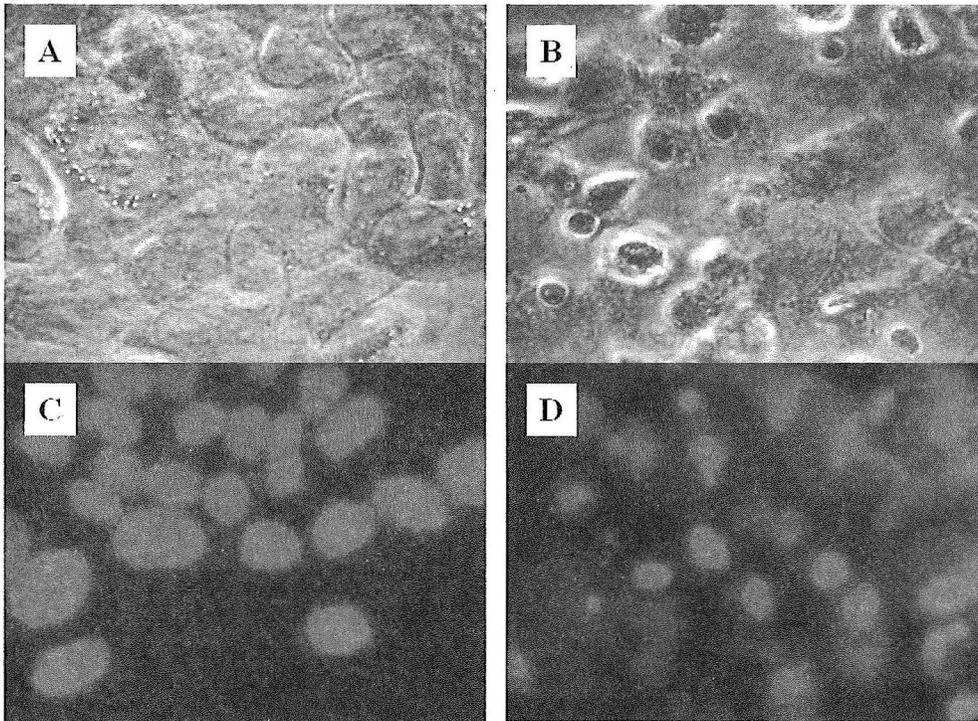


図11 UVB照射後の細胞および核の形態変化

A：UVB未照射透過像、B：UVB照射24時間後透過像、  
C：UVB未照射蛍光像、D：UVB照射24時間後蛍光像、

### 3. 7 ウコギ成分が皮膚保護作用を示すメカニズムの推定

既往の研究におけるアポトーシスの亢進、抑制に関する細胞内情報経路を図12～14にまとめた（画像データは、セルシグナルテクノロジー社から提供された）。



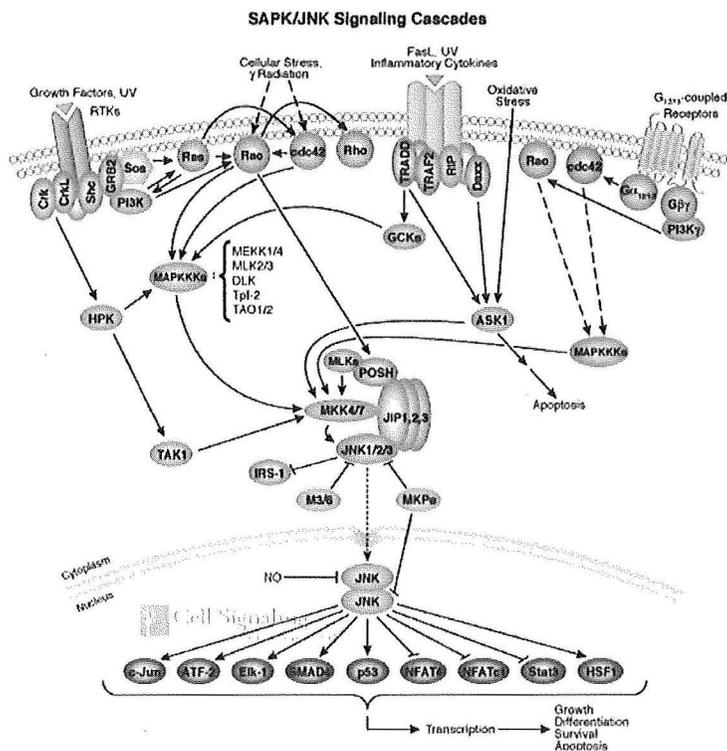


図14 JNKカスケード

アポトーシス抑制が起こる場合に、図12～14に示した経路が活性化、または阻害されている可能性がある。

ウコギ中の成分がHaCaT細胞上の受容体を刺激し、MAPK/ERK経路、PKB/Akt経路、JNKカスケードにいずれかまたは複数を経路を活性化し、最終的にアポトーシスが抑制されると仮定すると、各経路のチェックポイントである。ERK1/2、Akt、JNK、p38-MAPKのいずれかまたは複数が活性化されるはずである。

次のステップとして、ウコギ抽出物による刺激と、各キナーゼ活性化の関係を測定した。HaCaT細胞の培地中にフラクシオン1または陽性対照である上皮活性化因子（EGF）を添加し、30分後の各キナーゼのリン酸化を測定した。p38-MAPKはEGFまたはウコギ抽出物を添加してもリン酸化されなかった。JNKはEGF添加区でリン酸化が促進されたが、フラクシオン1は無作用であった。一方、フラクシオン1を添加することによりERK1/2とAktのリン酸化が有意に亢進された。フラクシオン1の作用の強さは陽性対照のEGFに及ばなかった。

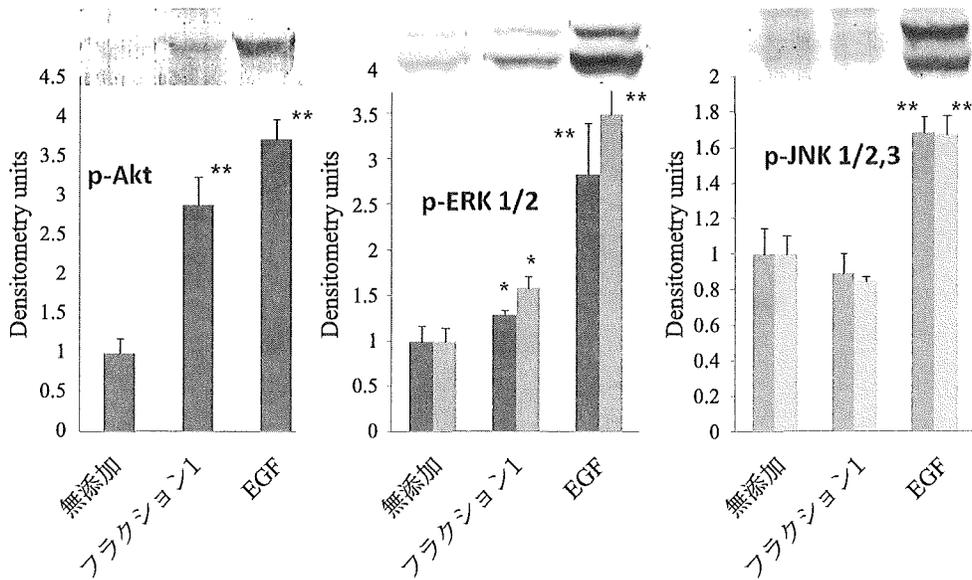


図15 フラクシオン1またはEGFにより活性化されるキナーゼ

以上の結果から、フラクシオン1の中の成分によりPKB/Akt経路または古典的MAPK経路のいずれかまたは両方を活性化され、UVB照射によるHaCaT細胞のアポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

#### 4. まとめ

フロンガスによるオゾンホール拡大により地上に到達するUVBが増加するとともに皮膚がん患者が増える傾向にある。我々は人皮膚ケラチノサイト (HaCaT細胞) を使用して、山形県特産の農産物の皮膚保護作用を探索した結果、ウコギ抽出物が比較的強力な皮膚保護作用を示すことを見いだした。次にウコギクロロホルム抽出物をオープンカラムクロマトグラフィーと分取高速液体クロマトグラフィーを用いて精製し、活性の高いフラクシオンを得た。今後、ウコギ中の皮膚保護成分の単離と同定及び、実験動物を用いたウコギの皮膚保護作用の測定を行うことにより、ウコギの新たな機能成分として実用化したいと考えている。また、ウコギを経口的に摂取したときの効果を検証することにより、美容食品としての実用化が可能となる。

ウコギの知名度は比較的高いと考えているが、生産量の増加が今後の課題となっている。今後ウコギの新たな機能性を明らかにすることによりウコギの生産量増加の一助となれば幸いである。

#### 5. 謝辞

卒業研究を通して本研究を遂行した穀野知美氏、佐藤真美氏に感謝いたします。

## 参考文献

1. 本三保子, 田村朝子, and 山田則子, ヒメウコギ葉茶のラットおよびヒトにおける食後血糖上昇抑制作用. 日本栄養・食糧学会誌 **61** (2008) 111-117.
2. 田村朝子, 田淵三保子, and 山田則子, ウコギの抗菌性およびカット野菜に対する効果. 日本家政学会誌 **56** (2005) 451-456.
3. M.P. Correa, P. Dubuisson, and A. Plana-Fattori, An overview of the ultraviolet index and the skin cancer cases in Brazil. *Photochem Photobiol* **78** (2003) 49-54.
4. J.F. Abarca, and C.C. Casiccia, Skin cancer and ultraviolet-B radiation under the Antarctic ozone hole: southern Chile, 1987-2000. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **18** (2002) 294-302.
5. J. Sinclair, The effects of the hole in the ozone layer on health. *Nurs Stand* **14** (1999) 42-3.
6. R. Marks, Skin cancer and the ozone hole. When is not enough likely to be too much? *Med J Aust* **163** (1995) 578-9.
7. S. Chilampalli, X. Zhang, H. Fahmy, R.S. Kaushik, D. Zeman, M.B. Hildreth, and C. Dwivedi, Chemopreventive effects of honokiol on UVB-induced skin cancer development. *Anticancer Res* **30** (2010) 777-83.
8. S. Byun, K.W. Lee, S.K. Jung, E.J. Lee, M.K. Hwang, S.H. Lim, A.M. Bode, H.J. Lee, and Z. Dong, Luteolin inhibits protein kinase C(epsilon) and c-Src activities and UVB-induced skin cancer. *Cancer Res* **70** (2010) 2415-23.
9. J. Martin, F.J. Duncan, T. Keiser, S. Shin, D.F. Kusewitt, T. Oberyszyn, A.R. Satoskar, and A.M. VanBuskirk, Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a critical role in pathogenesis of ultraviolet-B (UVB) -induced nonmelanoma skin cancer (NMSC). *FASEB J* **23** (2009) 720-30.
10. G.T. van der Horst, L. Meira, T.G. Gorgels, J. de Wit, S. Velasco-Miguel, J.A. Richardson, Y. Kamp, M.P. Vreeswijk, B. Smit, D. Bootsma, J.H. Hoeijmakers, and E.C. Friedberg, UVB radiation-induced cancer predisposition in Cockayne syndrome group A (Csa) mutant mice. *DNA Repair (Amst)* **1** (2002) 143-57.
11. M. Seo, and Y.S. Juhn, Gq protein mediates UVB-induced cyclooxygenase-2 expression by stimulating HB-EGF secretion from HaCaT human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **393** (2010) 190-5.
12. J. Kang, W. Chen, J. Xia, Y. Li, B. Yang, B. Chen, W. Sun, X. Song, W. Xiang, X. Wang, F. Wang, Z. Bi, and Y. Wan, Extracellular matrix secreted by senescent fibroblasts induced by UVB promotes cell proliferation in HaCaT cells through PI3K/AKT and ERK signaling pathways. *Int J Mol Med* **21** (2008) 777-84.

## 要旨

地域振興を目的として、山形県特産物の皮膚保護作用を予備的に測定した結果、ウコギのクロロホルム抽出物に比較的強い皮膚保護作用が認められた。そこで、ウコギのクロロホルム抽出物の皮膚保護作用に関する詳細な検討を行った。

まず、人皮膚ケラチノサイト (HaCaT細胞) にUVBを照射すると、アポトーシスが起ることを顕微鏡像で確認した。ウコギのクロロホルム抽出物をオープンカラムクロマトグラフィーと分取高速液体クロマトグラフィーを用いて精製し、活性の高いフラクション (フラクションF) を得た。フラクションFをHaCaT細胞の培地に添加することにより、AktとERK1/2のリン酸化が有意に亢進することが分かった。また、阻害剤により、フラクションFによるAktとERK1/2のリン酸化を阻害すると、皮膚保護作用も消失したことから、フラクションFはAktとERK1/2を活性化してHaCaT細胞のUVBによるアポトーシスを抑制していると判断した。

### Summary

For the purpose of regional promotion, skin protective effects of special products of Yamagata prefecture were studied. From the result of preliminary measurements, it was confirmed that skin protective effect of *Eleutherococcus sieboldianus* extract was comparatively strong compare with another botanical extracts. Then, advanced study about the skin protective effects of *Eleutherococcus sieboldianus* chloroform extract was performed.

First, it was confirmed that apoptosis was promoted in human keratinocyte (HaCaT cells) by UVB irradiation from morphological observation by fluorescence microscope. The chloroform extract of *Eleutherococcus sieboldianus* was refined using open column chromatography and preparative HPLC, and markedly active fraction (fraction F) was obtained. Phosphorylation of Akt and ERK1/2 were promoted by addition of fraction F to the culture medium of HaCaT cells. Because anti-apoptotic effects were inhibited by down regulation of Akt or ERK1/2 phosphorylation, it was presumed that fraction F inhibited UVB-induced apoptosis in HaCaT cells vie activation of Akt and/or ERK1/2.