

東京工科大学

博士學位論文

スイゼンジノリ細胞外多糖体「サクラン」のヒト皮膚保護

効果に関する研究

平成31年3月

阿部（土井） 萌子

目次

序論	1
第1章 サクラン保湿液のヒト皮膚への有用性	
-サクランの角層細胞のバリア機能改善効果-	8
1-1. 緒言	8
1-2. 実験方法	11
1-2-1. 試薬	11
1-2-2. ヒト皮膚連用試験	12
1-2-2-1. 被験者	12
1-2-2-2. 試験期間	12
1-2-2-3. 試験試料および塗布方法	12
1-2-3. 皮膚表皮水分量 (SWC) と経表皮水分蒸散量 (TEWL) の測定	13
1-2-4. 角層細胞の採取とスライドガラスへの転写	13
1-2-5. 角層細胞の BG 染色	13
1-2-6. 角層細胞中の SH/SS の蛍光ラベル	13
1-2-7. 角層細胞中のインボルクリンの免疫染色	14
1-2-8. 角層 IL-1 α ・IL-1RA の定量	14
1-2-9. 角層細胞中のカルボニルタンパク質 (CP) の蛍光ラベル	15
1-2-10. 統計処理	15
1-3. 結果	15
1-3-1. 皮膚の生理的パラメーターに及ぼすサクランの影響	15
1-3-2. 角層細胞の成熟に及ぼすサクランの影響	16
1-3-3. 表皮の紅斑性炎症に対するサクランの影響	17
1-3-4. 角層 (SC) タンパク質のカルボニル化に対するサクランの影響	19

1-4. 考察	20
第2章 外部刺激に対するサクランの角層保護効果とそのメカニズム	24
2-1. 緒言	24
2-2. 実験方法	25
2-2-1. 試薬	25
2-2-2. サクラン／ヒアルロン酸水溶液の調製	26
2-2-3. サクラン／ヒアルロン酸 (HA) のビオチン化	26
2-2-4. サクランと HA のヒト再生表皮モデル (RHEE) 中での局在の確認	27
2-2-5. 細胞培養	28
2-2-6. 細胞生存率の測定	28
2-2-7. 細胞内 ROS レベルの測定	28
2-2-8. 生体膜流動性の評価	29
2-2-9. 統計処理	29
2-3. 結果	30
2-3-1. ビオチン化多糖類の RHEE への浸透・局在	30
2-3-2. SLS による細胞傷害に対する多糖類の保護効果	31
2-3-3. SLS／IL-1 α によって誘導された ROS 生成に対する多糖類の抑制効果	32
2-3-4. SLS に誘導される細胞傷害に対するサクラン前処理の抑制効果	33
2-3-5. サクランと脂質二重膜との相互作用	34
2-4. 考察	34
第3章 サクラン被膜によるタバコの煙に含まれる有害物質のトラップ効果と酸化ストレス低減効果	39
3-1. 緒言	39
3-2. 実験方法	40

3-2-1. 試薬	40
3-2-2. サクラン水溶液／ヒアルロン酸水溶液の調製	41
3-2-3. タバコの煙	41
3-2-4. タバコの煙に対する多糖類フィルムの特ラップ効果	42
3-2-5. 細胞培養とタバコの煙への曝露	42
3-2-6. RT-qPCR	42
3-2-7. HaCaT 細胞に対するタバコの煙の悪影響	43
3-2-7-1. 細胞生存率の測定	43
3-2-7-2. 細胞内 ROS レベルの測定	43
3-2-7-3. CP レベルの測定	44
3-2-8. ex-vivo test	44
3-2-8-1. 角層細胞の採取とスライドガラスへの転写	44
3-2-8-2. 角層細胞の多糖類処理とタバコの煙への曝露	44
3-2-9. 統計処理	45
3-3. 結果	45
3-3-1. アルデヒド化合物 (AC) とベンゾピレン (BaP) 特ラップ効果	45
3-3-2. タバコの煙による CYP1A1 mRNA 発現誘導に対する多糖類の抑制効果	46
3-3-3. タバコの煙の有害作用に対する多糖類の改善効果	46
3-3-4. 多糖類の角層への吸着とタバコの煙に対するバリア効果	47
3-4. 考察	49
第4章 サクラン-ポリオール複合体の基礎化粧品への配合の可能性	
-化学的、物理的側面からのアプローチ-	52
4-1. 緒言	52
4-2. 実験方法	53

4-2-1. 試薬	53
4-2-2. サクラン水溶液の調製	54
4-2-3. サクランゲル状シート (GS) 形成試験	54
4-2-4. 外部からの化学物質侵入に対するサクランの効果	55
4-2-4-1. ケラチンフィルムの調製	55
4-2-4-2. 疑似角層モデルを使用したカルセイン透過度の評価	56
4-2-5. 皮膚内部からの水分蒸散に対するサクランの効果	56
4-2-6. サクランの乳化特性	57
4-2-7. 統計処理	57
4-3. 結果	57
4-3-1. サクランゲル状シート (GS) の形成特性	57
4-3-2. サクランゲル状シート (GS) の皮膚保護作用	59
4-3-3. サクラン-ポリオールとの乳化特性	60
4-4. 考察	62
第5章 総括	66
参考文献	72
謝辞	82

略語一覽

ACs: aldehyde compounds

AD: atopic dermatitis

AFM: atomic force microscope

AhR: aryl hydrocarbon receptor

BSA: bovine serum albumin

BaP: benzo[a]pyrene

BCA: bicinchoninic acid

CE: cornified cell envelope

CP: carbonylated proteins

CYP1A1: cytochrome P450-1A1

DACM: N-(7-dimethylamino-4-methyl-3-coumarinyl)maleimide

DMSO: dimethyl sulfoxide

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA: enzyme-linked immunoassay

ESR: electron spin resonance

FBS: fetal bovine serum

F.I.: fluorescence intensity

FLG: filaggrin

FTSC: fluorescein-5-thiosemicarbazide

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HA: hyaluronic acid

HBSS: hanks buffered saline solution

HaCaT: immortalized human keratinocytes

H₂DCFDA: 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

IL-1 α : interleukin-1 α

IL-1RA: interleukin-1 receptor antagonist

MeOH: methanol

MES: α -morpholinoethanesulfonic acid

NBD-H: 4-hydrazino-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole hydrazine

NMF: natural moisturizing factor

PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons

PBS: phosphate buffered saline

PBS-T: phosphate buffered saline-Tween 20

PM_{2.5}: particulate matter 2.5

RHEEs: reconstructed human epidermal equivalents

ROS: reactive oxygen species

RT-qPCR: real-time quantitative polymerase chain reaction

SACRAN: a sulfated polysaccharide isolated from *Aphanothece Sacrum* (Suizenji-nori)

SC: stratum corneum

SLS: sodium lauryl sulfate

SWC: skin surface water content

SS: disulfide

SH: thiol

TEM: transmission electron microscope

TEWL: transepidermal water loss

1,3-BG: 1,3-butyleneglycol

2-ME: 2-mercapto-ethanol

5-DSA: doxyl stearic acid

序論

皮膚の構造と機能

ヒトの体全体を覆う皮膚は成人で面積が 1.6m²、重量は体重の約 16%を占める人体で最大の器官であり、体内と外界の環境を隔て人体内部を保護し、人体の恒常性を維持するための様々な機能を持つ重要な組織である。その機能とは、①人体内部からの水分の喪失や透過の抑制、②微生物や物理化学的な刺激からの生体の保護、③体温の調節、④感覚器としての役割など必要不可欠なものである。この中で最も重要な保護機能はバリアとしての機能である。これを機能実現するために皮膚は複雑な構造を有している。皮膚は最外層から表皮 (epidermis)、真皮 (dermis)、皮下組織 (subcutaneous tissue) の 3 層構造を形成している。皮膚のバリアとしての機能は表皮において形成され、最も外側に位置する角層 (stratum corneum ; SC) がバリア機能発現において最も重要な役割を果たす。表皮の厚さは平均約 0.2 mm で、存在する細胞の 95%は角化細胞 (keratinocyte) で構成され、残り 5%は色素細胞 (melanocyte) やランゲルハンス細胞 (langerhans cell) などである。角化細胞は表皮の最下層の基底層 (stratum basale) においてのみ分裂し、成熟に伴い有棘層 (stratum spinosum)、顆粒層 (stratum granulosum)、そして最外層の角層へと分化していく。この分化のプロセス (角化) において生態保護のためのバリア機能を獲得する¹⁻³⁾。従って、外環境の変化に物理的にも生理的にも柔軟に対応しながら表皮は基底細胞が分裂して生まれた娘細胞が有棘細胞、顆粒細胞、角層細胞と分化し、表皮表面から脱落する過程 (ターンオーバー) を繰り返している。それ故、環境因子の変化に柔軟に対応し機能的にも美容的にも健康な状態を維持するために表皮バリア機能を補強、改善する日常的なスキンケアが大切である。

表皮バリア機能

バリア機能とは、外部からの刺激や異物の侵入に対する障壁として働く機能と、体内からの色々な物質の体外への漏出を防止する二つの機能を意味する。外部からの刺激や異物としては温度、湿度、圧力、紫外線、化学物質、細菌やウイルスなどの病原体や病原体由来の毒素などがある。体内から漏出する物質の最も大切なものは水である。バリア機能は、体外への水の漏出を抑え、且つ、適度な水分量を角層に維持することにより皮膚の柔軟性を保っている。

皮膚バリア機能は、角層細胞間脂質が形成するラメラ構造体が角層細胞間隙に充填されることで発揮される。約 50%を占めるセラミドとコレステロール、遊離脂肪酸などによって構成される角層細胞間脂質は、顆粒層に存在する層板顆粒 (Lamellar granule : LG) にセラミドはスフィンゴミエリンおよびグルコシドセラミドとして集積される⁴⁾。これらの脂質が細胞膜のような脂質二重膜 (シート状) を形成し、脂質二重膜が 10~20 層程度積み重なった層状構造体が角層細胞間隙に存在している⁵⁾。皮膚表層に向かって顆粒細胞が移行する過程において細胞は劇的な変化を遂げ角層細胞が生成される。角層細胞は、核および細胞内小器官が消失し、細胞膜の代わりに内部から裏打ちタンパク構造体であるコーニファイドセルエンベローブ (CE) が形成されている⁶⁾。CE の外部には、 ω -ヒドロキシセラミドが共有結合で角層細胞に結合した疎水性の脂質辺縁体が存在し、その脂質辺縁層を足場として細胞間脂質のラメラ構造が構築されると考えられている。バリア機能を発現する仕組みとして、もう一つよく知られているものにタイトジャンクション (TJ) がある⁷⁾。顆粒層は通常 3 層存在し、TJ は表層側から 2 層目の顆粒細胞の垂直な細胞膜に存在する。TJ は低分子化合物や Ca^{2+} や Mg^{2+} のような金属イオンの有棘層以下への侵入に対する障壁として働く。

一方、生理学的なバリア機能も存在し、生理的なバリア機能は物理的な障壁を乗り越えて皮膚内部へ侵入してきた物質や病原体に対応して生体を保護する機能である。この役割を担うものとしてランゲルハンス細胞と抗菌ペプチド (Antimicrobial peptides : AMPs) があ

げられる⁸⁾。このように、皮膚には外部環境からの刺激に対応するためのバリア機能が備わっており、私たちの体は守られている。

表皮バリア機能異常を引き起こす因子と皮膚障害

表皮バリア機能が低下する要因と結果は様々である。例えば、最も身近で日々使用する洗剤（界面活性剤：石鹼）も表皮バリア機能低下の要因の1つに挙げられる。

皮膚表面の pH が様々な要因によって弱酸性に保たれていることは、皮膚バリア機能構築・維持において非常に重要な意味を持つと考えられている。石鹼などの洗剤による過度の皮膚洗浄は、皮膚のアルカリ中和能を低下させ、角層表面の高い pH が長時間維持される。角層 pH が上昇すると、スフィンゴミエリンあるいはグルコシルセラミドからセラミドを生成する過程で働く酸性スフィンゴミエリナーゼや β -グルコセレブロシダーゼの活性を低下させ、角層細胞間脂質のラメラ構造体の形成が阻害されると考えられている⁹⁾。また、高い pH を至適 pH とするセリンプロテアーゼの活性化が生じ、酸性スフィンゴミエリナーゼや β -グルコセレブロシダーゼの分解促進、protease-activated receptor 2 (PAR-2)の活性化、角層細胞の接着に重要なコルネオデスモソームの分解促進、活性型 IL-1 α の産生亢進、抗菌ペプチドの分解促進などが生じる¹⁰⁾。また、角層 pH の上昇が、皮膚における黄色ブドウ球菌の増殖を促進することも知られている¹⁰⁾。このようにバリアが破壊されると、バリア修復に必要な因子であるインターロイキン (IL) -1 α 、TNF- α 、IL-6などのサイトカインが表皮より放出される。一方、バリア破壊の程度が高度である場合は、これらのサイトカインが過剰に産生、分泌され皮膚の炎症が生じ、さらにアレルゲンの皮膚内部への侵入が容易となりアトピー性皮膚炎 (AD) の増悪や接触アレルギー反応の惹起につながる。

以上のように、界面活性剤による表皮バリア機能の破壊は、皮膚の化学物質等の外来性物質に対する感受性を高め皮膚の健康を害することにつながる可能性を有している。一般的に、スキンケア化粧品に配合されている界面活性剤の皮膚への影響を懸念する声も多くな

っており、界面活性剤フリーのスキンケア製品の消費者への提供が皮膚の健康維持において望まれている。

スイゼンジノリから抽出されるサクラン

スイゼンジノリ (*Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada) とは、日本固有の淡水生食用藍藻であり、1872 (明治5) 年に、オランダの植物学者・スリンガーが水前寺・江津湖 (熊本市) において発見し、新属新種の藍藻として『日本藍藻図鑑』の中で世界に紹介したものである¹¹⁾。食用として用いられてきた歴史は学術的な発見よりもはるかに古く、1600 年代 (江戸時代) には細川藩 (熊本) では「清水苔」、秋月藩 (福岡) では「寿泉苔」の名称で幕府への献上品として大切に保護・育成され高級郷土料理の素材として珍重されてきた。

これまで、スイゼンジノリは阿蘇山の岩盤からの湧水が流れ込む河川がある地域に限定してその生育が確認されていた。しかしながら、近年の水質汚染によりその生育領域は狭まり、現在ではスイゼンジノリは熊本県と福岡県の一部でしか生育が確認されておらず絶滅危惧種に指定されている¹¹⁾。スイゼンジノリは、緑褐色ないし茶褐色の寒天質の塊 (Fig. 1a) であり、寒天質の中には多数の繭型細胞 (Fig. 1b) が散在し、二倍体分裂時に細胞外に粘性物質を分泌する。この寒天質の細胞外マトリックスから抽出された新規多糖類が「サクラン」であり (Fig. 1c)、2006 年に北陸先端科学技術大学院大学の岡島らの研究チームが発見、抽出に成功したものである^{11, 12)}。

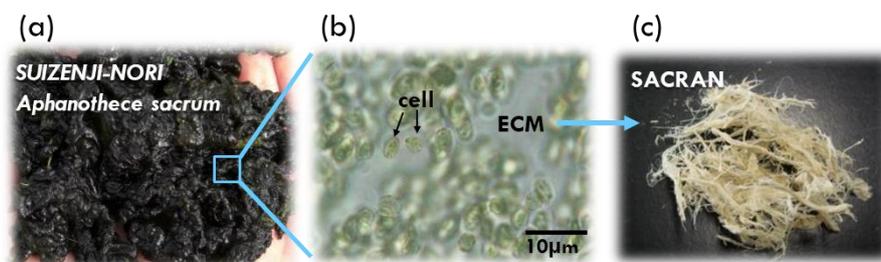


Fig. 1 スイゼンジノリとサクラン

サクランの性質

サクランの分子量は $1600\sim 2900\times 10^4$ 、分子鎖長 $10\ \mu\text{m}$ 以上の天然物からの抽出物としては史上最大級の超巨大分子である¹²⁾。抽出にアルカリを使用するため分子鎖が切れてしまうことが予想されるが、抽出後の大きさから比較的強固で化学的には容易に切断されにくい構造であることが考えられる。構成単糖は硫酸化ムラミン酸という新規糖を含め 11 種類と非常に多く、官能基もアミノ基、カルボキシ基、硫酸基（糖残基当たりの硫酸基は 12mol%）などを含むグリコサミノグリカンとも類似したアニオン性多糖である¹³⁾。また原子間力顕微鏡（AFM）と透過電子顕微鏡（TEM）の観察によりサクランはらせん構造を取る分子であることもわかっているが¹³⁾、その大きさ故に詳細な構成成分や構成糖の配列などのサクラン全構造は未だ解明されていない。それにも関わらず非常にユニークな物理的特性が分かっている。

サクランは自重の 6100 倍もの水を保持する高い保水性を示し、その保水力はヒアルロン酸の約 5 倍になる。また一般的に塩の添加によって水溶性高分子の保水力は低くなるが、サクランは各種塩の存在下においてもヒアルロン酸よりも高い保水力を維持しており、単純に分子量の大きさだけでなく分子構造あるいは分子間にて形成される組織体構造の作用など複雑な要因が考えられた。水溶液は 100,000 cps（1 wt%）もの高粘性と高いチキントロピー性を示し、塩を添加すると動的粘弾性や静的粘度が大きくなることも観察されている^{14, 15)}。これはサクラン分子内の会合状態が塩添加によって変化・促進された結果と思われる。さらにサクラン水溶液は 0.5%以下の低濃度でネマチック液晶を示し、被膜形成能を有することも明らかになっている^{15, 16)}。

また生理学的特性についても様々な研究が行われている。アトピー性皮膚炎患者に対するサクラン水溶液の臨床試験のアンケート調査では、サクラン水溶液使用により痒みや湿疹が軽減し、アトピー性皮膚炎の症状が改善したことが報告されている^{17, 18)}。また *in vitro* 実験において、発がん性物質刺激によるマクロファージの炎症性サイトカインの分泌とア

アレルギー免疫応答で亢進される肥満細胞の β -ヘキソサミンダーゼの分泌を抑制する作用も報告されている¹⁷⁾。これらの報告から、サクランには刺激物質に対する皮膚応答性を低減しアレルギー反応を抑制する可能性が期待される。以上のような様々な特性から、サクランは予防医療における化粧品や医薬品への様々な応用が期待される。

本研究の目的

本研究は、スイゼンジノリ細胞外多糖体サクランの皮膚に対する効果をヒト使用試験、さらには培養細胞を用いた研究において明らかにし、その物理化学的特性を検証することにより皮膚に対する作用メカニズムと化粧品製剤への応用の可能性を議論することを目的とした。また、本研究の成果は未だ全構造が解明されていないサクランの構造に対する情報提供にもつながり全構造解明の一助となることも期待している。

そこで第1章では、サクラン製剤のスキンケア効果（バリア機能改善効果）を検証し、アトピー性皮膚炎（AD）罹患歴のある健常人の皮膚機能改善効果を有することを確認した¹⁹⁾。第2章では、サクランは未成熟なSCでは表皮生細胞層まで浸透し、自身の分子マトリックス内に刺激物質をトラップすることで細胞保護作用を発揮している可能性を明らかにした²⁰⁾。続いて第3章では、サクランのトラップ効果をより実践的に検証するため、環境汚染物質の一例としてタバコの煙に対するサクラン被膜のトラップ効果とタバコの煙で引き起こされる様々な酸化ストレスへのサクランの緩和作用を評価した。その結果、サクランはタバコの煙に含まれる水溶性のアルデヒド化合物も油溶性のベンゾピレンも100%近くトラップすることでタバコの煙による細胞傷害性や酸化ストレスを低減することを明らかにした²¹⁾。最後に第4章では、サクランの物理化学的性質の検証として、サクランをポリオール類と組み合わせたときのユニークな被膜形成能と乳化能の検証を行った。サクランは保湿剤、増粘剤、被膜形成剤と乳化剤の4つの役割を果たし得る機能性素材であることを明らかにした²²⁾。

本論文は、スイゼンジノリ細胞外多糖体サクランの皮膚保護効果とそのメカニズムの解明、また天然水溶性高分子としての物理化学的特性の検証を介してスキンケア成分としての可能性を明らかにした。これを化粧品に利用することで、健常人の日々のスキンケアだけでなく、AD や敏感肌、乾燥肌のような皮膚障害に悩むすべての人々の QOL 向上につながることを期待する。

第 1 章

サクラン保湿液のヒト皮膚への有用性 -サクランの角層細胞のバリア機能改善効果-

1-1. 緒言

近年の不順な気候や、過剰な日光、刺激性化学物質、および大気汚染物質などの環境ストレス要因の皮膚への曝露が、ヒトの皮膚への悪影響を及ぼすことが懸念されている。皮膚バリア機能障害を持つ人々は、このような環境要因に対して過度に反応することから、近年では敏感肌やアトピー性皮膚炎（AD）を発症頻度が世界中で増加している²³⁾。人体の最外層である角層（SC）は、環境刺激に対する防御に重要な役割を果たしていることはよく知られている。すべての刺激物質やアレルゲンは、SCを通過して皮膚内部に浸透した結果、様々な症状を引き起こす。例えば、アレルギー性皮膚疾患であるADは、アレルゲンが表皮に浸透することによりランゲルハンス細胞の活性化を介して感作を成立させ炎症反応を惹起させる。これまで、フィラグリン（FLG）遺伝子の機能不全がADの素因となることが報告されている^{24,25)}。実験的にも、FLG mRNAの発現量減少がSCバリア機能の低下につながる実証されている^{26,27)}ことから、フィラグリン（FLG）遺伝子の機能不全がアトピー性皮膚炎の素因となることもうなずける。またSCバリア機能は体外からの外来性因子の侵入を防ぐのみならず、体内からの色々な物質の体外への漏出、特に水の蒸散を防止する役割を担っている。このことから、SCバリア機能の低下は皮膚を乾燥状態に誘導してしまう。

一般的に皮膚の保湿状態を表すパラメーターとして皮膚表面水分量（SWC）と経表皮水分蒸散量（TEWL）がある。SWCにはTEWLが大きく影響を及ぼすが、それ以外に角層内部に存在する天然保湿因子（NMF）による水分保持機能もSWCに関与している。また、角層の水分状態は、その下層に存在する表皮細胞の分化状態にも大きく影響を及ぼす²⁸⁾。一般的に表皮細胞の分化状態は角層細胞由来のパラメーターを用いて議論することができる。

角層細胞由来パラメーターには角層細胞の皮膚表面での滞留時間（ターンオーバー速度）や角層細胞成熟を反映する角層細胞面積、多重剥離度、遊離 SH 基とジスルフィド結合 (SS) の比 (SH/SS)、インボルクリンの染色とナイルレッドの染色の比、また炎症パラメーターである炎症性サイトカインであるインターロイキン 1 レセプターアンタゴニストとインターロイキン-1 α の比 (IL-1RA/IL-1 α)、酸化ストレスの指標となるカルボニルタンパク (CPs) などがある。

角層細胞面積は角層細胞が皮膚表面に滞留する時間を示すパラメーターであり、角層細胞面積は角層のターンオーバーの状態を表す指標と考えられている。一般に皮膚内部に微弱炎症反応が生じている場合は、角層ターンオーバー速度が速くなり、その結果、角層細胞面積は小さくなる。角層細胞面積から皮膚代謝および皮膚内部での微弱炎症を議論することができる²⁹⁾。

また、多重剥離は乾燥性皮膚でよく観察される乾燥と落屑異常の指標となる。乾燥性皮膚では角層細胞の剥離過程が均一ではなく、均一であればテープストリップによる角層採取時に角層細胞が一層ずつ剥離されてくるところが、多層に重なって剥離される。角層細胞はコルネオデスモソームにより接着されており、カリクレインやカテプシン D などのタンパク分解酵素がコルネオデスモソームを消化することにより角層の落屑が進行する^{30, 31)}。多重剥離が発生する詳細なメカニズムは解明されていないが、角層内水分の分布による角層下層部位でのタンパク分解酵素の不均一な活性化が原因となり部分的なコルネオデスモソームの消化が進行している可能性が指摘されている。

さらに、角層細胞の成熟度を表す指標として遊離 SH 基と SS 結合の比 (SH/SS) とコーニファイドセルエンベロップ (CE) の状態を反映するインボルクリンの染色とナイルレッドの染色の比³²⁾が用いられる。表面からの角層内深部から表面に向けて、SH/SS 比率が低下してくる。これは、角層細胞が表面に現れてくるに従い、タンパク質の遊離 SH 基がスルホヒドリルオキシダーゼにより SS 架橋されていくことによる³³⁾。一方、CE は種々の分化

関連タンパクがトランスグルタミナーゼ 1 (TGM-1) により架橋されて形成される。分化マーカータンパクの一つにインボルクリンがあり、インボルクリンが TGM-1 により完全に CE に組み込まれることによりインボルクリンの免疫染色性は消失する。CE には ω -ヒドロキシセラミドが共有結合されることにより形成される脂質辺縁層が存在する。このことから、CE の脂質辺縁層は油溶性の蛍光色素であるナイルレッドに染色される。このナイルレッドによる染色強度を用いてインボルクリンの染色強度を規格化した値がインボルクリンの染色とナイルレッドの染色の比となる。つまり、SH/SS 比率およびインボルクリンの染色とナイルレッドの染色の比の値が大きくなるに従い、角層細胞の CE が未成熟であることを示している。

皮膚内部で繰り返されている微弱炎症の指標となるのが角層細胞より抽出される炎症性サイトカインの一つである IL-1RA と IL-1 α の比 (IL-1RA/IL-1 α) である。この比は、UVB 曝露皮膚角層や乾燥性皮膚の角層において高くなることが知られている^{34, 35)}。加えて、カルボニルタンパク (CPs) は酸化ストレスを受けた角層細胞に高頻度で観察される脂質過酸化反応の最終生成物である。皮膚は常に、細胞内外において生成される活性酸素種 (ROS) などの酸化源に曝露されて構成成分が酸化される。これまでの疫学的調査では、角層内 CPs は皮膚保湿機能との関連性が報告されており³⁶⁾、角層内 CPs が多くなると皮膚表面水分量の低下と TEWL の上昇が生じる。よって、角層細胞由来各パラメーターを解析することで、SC バリア機能の状態および表皮細胞の分解状態を議論することができる。

2006 年に金子らにより発見され、抽出に成功したスイゼンジノリ (*Aphanothece Sacrum*) の細胞外マトリックスに含まれる Sacran (サクラン) は、構成単糖 11 種類からなる平均分子量 $1.6\sim 2.9\times 10^7$ 、分子鎖長 $10\mu\text{m}$ 以上の超高分子量の天然多糖体である¹²⁾。構成単糖には官能基として硫酸基、カルボキシル基、アミノ基を含んでいることから水に対する親和性が高く、ヒアルロン酸の保水力の 5 倍もの保水力をもつ新たなスキンケア成分 (保湿成分) として注目されている^{12, 13)}。これまでの研究で、AD 患者に対するサクラン水溶液の臨床試

験のアンケート調査では、サクラン水溶液使用により痒みや湿疹が軽減し、AD の症状が改善したことが報告されている¹⁷⁾。またサクラン水溶液の局所適用によって、AD 患者の Eczema Area and Severity Index (EASI) や Dermatology Life Quality Index (DLQI) のスコアが改善したという報告もある¹⁸⁾。これらの報告から、サクランは肌を保護し皮膚感作性を低減しアレルギーなどによる炎症などを抑えるバリアとして働くと考えられた。そこで本章では、バリア病とも呼ばれる AD の罹患歴のある健常人を対象に、健康な皮膚に対するサクランの作用を検証するためにサクラン製剤の 1 か月間連用試験を行った。アンケートや保湿パラメーターだけでなく実際に角層細胞を採取し、各種角層細胞由来パラメーターにどのような変化が生じるか検証した。

1-2. 実験方法

1-2-1. 試薬

サクラン保湿液／プラセボ製剤：サクラン (sacran)；大東化成工業株式会社 (大阪)、グリセリン (glycerin)；花王株式会社 (東京)、1,3-ブチレングリコール (1,3-butyleneglycol、1,3-BG)；KH ネオケム株式会社 (東京)、ペンチレングリコール (pentylenglycol)；Symrise (Holzminden, Germany)

角層転写：キシレン (xylene)；ナカライテスク株式会社 (京都)

細胞面積／多重剥離：ゲンチアナバイオレット (Gentian Violet R) , ブリリアントグリーン (Brilliant Green)；和光純薬工業株式会社 (大阪)

SH/SS 染色：エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 (EDTA), ジチオスレイトール (DTT)；ナカライテスク株式会社 (京都)、Dylight 633 maleimide；Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA) , N-(7-Dimethylamino-4-methyl-3-coumarinyl)maleimide (DACM)；コスモバイオ株式会社 (東京)

インボルクリン染色：抗インボルクリン抗体 (Novocastra Lyophilized Mouse Monoclonal

Antibody Invulocin)；ライカマイクロシステムズ株式会社（東京）、ビオチン結合抗マウス IgG-1 抗体 (Biotin-conjugated anti-mouse IgG1 antibody)；トミーデジタルバイオロジー株式会社（東京）、Dylight 405 結合ストレプトアビジン (Dylight 405-conjugated streptavidin)；フナコシ株式会社（東京）、ナイルレッド (Nile Red)；和光純薬工業株式会社（大阪）

IL-1 α /IL-1RA：DLA50 and DY280 ELISA kits；R&D Systems, Inc. (Minneapolis, USA)、ウシ血清アルブミン(BSA)；Sigma-Aldrich（東京）

カルボニルタンパク染色：4-Morpholineethanesulfonic acid, sodium salt (4-MES)；和光純薬工業株式会社（大阪）、Fluorescein-5-Thiosemicarbazide (FTSC)；Sigma Aldrich（東京）、Dimethyl Sulfoxide (DMSO)；ナカライテスク株式会社（京都）

1-2-2. ヒト皮膚連用試験

1-2-2-1. 被験者

アトピー性皮膚炎の履歴があり表皮バリア機能の低下している男性 5 名、女性 4 名（年齢：22～36 歳）の計 9 名を被験者とした。

1-2-2-2. 試験期間

2015 年 12 月 16 日から 2016 年 1 月 19 日に実施した。

1-2-2-3. 試験試料および塗布方法

試験試料は、0.04%のサクランと 15%のポリオール類（1,3-BG とグリセリン、ペンチレングリコール）を含んだ保湿液(サクラン保湿液)を用いた。プラセボ製剤として、サクランを除く、試験製剤と同様のポリオールを含む保湿液を用いた。試料塗付部位は二重盲検にて割り付けを行った。試験試料は、両前腕の屈側部位から手首までの範囲に全体的に朝と夜の 1 日 2 回塗布した。試験期間は、1 か月間とした。

1-2-3. 皮膚表面水分量 (SWC) と経表皮水分蒸散量 (TEWL) の測定

測定部位の右手の前腕屈側部位から手首までを所定の洗顔料で洗った後、 $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 15%~20%の環境に 15 分間馴化させた。その後、被験部位を 5 か所測定した。測定機器は Multi probe Adapter MPA システム (MPA Corneometer CM825 用皮膚水分測定プローブ、MPA Tewameter Triple TM300 用経皮水分蒸散量測定プローブ) を使用した。

1-2-4. 角層細胞の採取とスライドガラスへの転写

テープストリッピングしたテープを一度クラフト粘着テープ(紙製のガムテープ)の非粘着面に移した。(非粘着面は合成樹脂によってラミネート加工されているため、水や油を弾く性質がある。) その後、6 mm の穴あけパンチでガムテープごと角層付きテープを抜き取った。ピンセットを用いてスライドガラスに 6 mm に取った角層付きテープのみを貼り付けた。キシレンに一晩つけてセロハンテープの粘着剤のみを溶解し、その後風乾することでスライドガラスに角層細胞のみを転写した。

1-2-5. 角層細胞の BG 染色

0.5 g/ 100 mL のブリリアントグリーン、1 g/ 100 mL のゲンチアナバイオレットを含む水溶液を BG 染色液とした。スライドガラスに転写した角層細胞を BG 染色液に室温で 15 分間浸漬後、水道水の流水で染色した角層細胞以外の BG 染色液を洗浄した。風乾し、光学顕微鏡 (IMT-2 オリンパス) で画像を取り込み角層計測プログラム: 株式会社 CIEL) にて画像解析を行った。

1-2-6. 角層細胞中の SH/SS の蛍光ラベル

スライドガラスに転写した角層細胞中の遊離 SH 基を蛍光標識するために、 $2 \mu\text{g/mL}$ DyLight 633 マレイミドを含む 0.1 M TAS buffer (pH6.8) に 25°C の暗所下で 2 時間浸漬し

た。水ですすいだ後、角層細胞を 37°C で 10 分間、0.1 M TAS 緩衝液 (pH 6.8) 中の 40 mM DTT および 0.5 mM EDTA と反応させて、ジスルフィド (SS) 結合を減少させた。すすぎ後、25°C の暗所下で 3 分間、TAS 緩衝溶液 (pH 6.8) 中の 10 μ M DACM で角層細胞を標識した。蛍光顕微鏡 (Fluoid Cell Imaging Station、Life Technologies Corp.、NY、USA) を用いて、角層中の遊離 SH 基 (赤色) および SS 結合 (青色) を観察し蛍光画像を取得した。Corneocytometry を用いて蛍光画像を解析し、遊離 SH 対 SS の比を定量した。

1-2-7. 角層細胞中のインボルクリンの免疫染色

スライドガラスに転写した角層細胞を液体ブロッカーでマーキングした後、PBS (-) で 5 分間水和させた。Block Ace (Bio Rad Laboratories Ltd.、CA、USA) を用いて 1 時間ブロッキングした後、角層細胞を抗インボルクリン抗体 (1 : 100) と共に 1 時間インキュベートした後、ビオチン結合抗マウス IgG-1 抗体 (1 : 100) で 1 時間処理した。PBS-T で洗浄した後、角層細胞を Dylight 405 結合ストレプトアビジン (1 : 100) と共に 25 °C、1 時間暗所でインキュベートした。脂質辺縁体を 75%グリセロール中 3 μ g/mL を含むナイルレッド色素溶液で染色し、カバーガラスで囲んだ。インボルクリンおよび脂質辺縁体 (ナイルレッド) は、蛍光顕微鏡 (Fluoid Cell Imaging Station) を用いてそれぞれ青色および赤色蛍光として観察した。Corneocytometry を用いて得られた各蛍光画像の蛍光強度を測定し、インボルクリンの免疫染色性を、インボルクリン対ナイルレッドの比として表した。

1-2-8. 角層 IL-1 α ・IL-1RA の定量

テープ (1 cm \times 1.5 cm) に付着した状態の角層細胞を遠心管に入れ、氷上で 2 時間、300 μ L の 0.05% Triton X-PBS (-) 中で攪拌した。得られた溶液を、1000 rpm、4 °C で 10 分間の遠心分離し、分離後の IL-1 α 、IL-1RA、および角層細胞タンパク質の測定に使用した。IL-1 α および IL-1RA を、DLA50 および DY280 ELISA キットでそれぞれ定量した。

1-2-9. 角層細胞中のカルボニルタンパク質の蛍光ラベル

スライドガラスに転写した角層細胞を、 $20 \mu\text{M}$ FTSC を含む 0.1M MES-Na 溶液 (pH5.5) に、 25°C の暗所で 1 時間浸漬した。水ですすいだ後、蛍光顕微鏡 (Fluor Cell Imaging Station) を用いて画像を得た。Corneocytometry を用いて、各蛍光画像におけるカルボニル化タンパク質の蛍光強度をカルボニルタンパクレベルとして定量した。

1-2-10. 統計処理

全ての研究データを箱ひげ図で表した。Wilcoxon 符号付順位検定で p 値を決定し、0.05 未満の p 値を統計的に有意とみなした。

1-3. 結果

1-3-1. 皮膚の生理的パラメーターに及ぼすサクランの影響

4 週間のサクラン保湿液適用後の平均 SWC は、Wilcoxon 符号順位検定を用いて評価した結果、プラセボ群と有意な差は確認できなかったが、プラセボ群のベースライン平均

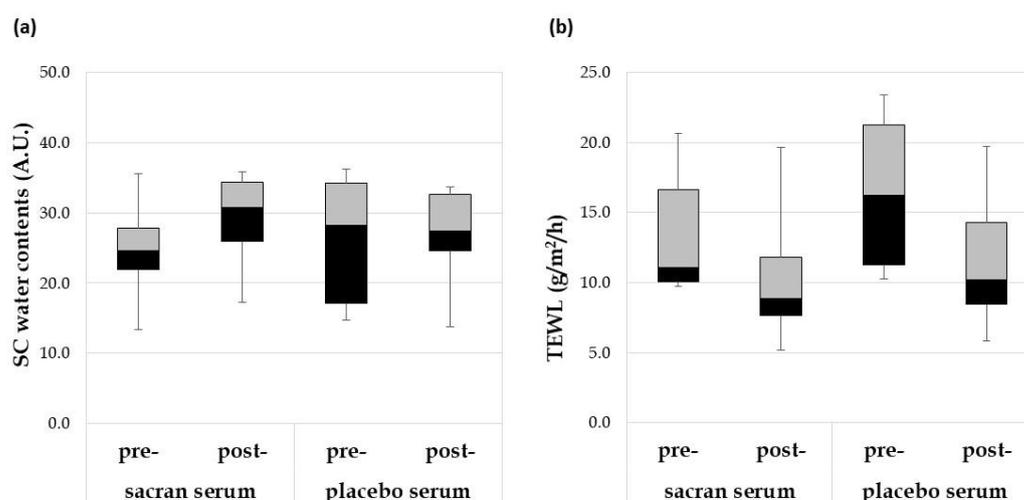


Figure 1-1. Effects of sacran-serum on skin surface water content (SSWC) and trans-epidermal water loss (TEWL). Changes in (a) SSWC and (b) TEWL in volunteers applying samples, serum and placebo for 4 weeks (pre: baseline of testing sites, post: after 4 weeks' application)

(25.0 ± 9.5 A.U)よりも高かった(32.7 ± 10.1 AU)。プラセボを適用した被験者の平均 SWC は、ベースライン値から変化しなかった (Fig. 1-1a)。4 週間のサクラン保湿液およびプラセボの両方の適用部位における平均 TEWL は、試験前のベースライン値と比較して低い値を示したが、サクラン保湿液とプラセボ群の間に有意差を確認できなかった (Fig. 1-1b)。

1-3-2. 角層細胞の成熟に及ぼすサクランの影響

角層細胞の成熟に及ぼすサクラン保湿液の効果を実証するために、角層細胞面積、角層多重剥離度、SH/SS の比およびインボルクリンの免疫染色性を解析した。プラセボ適用部位での角層細胞面積は変化しなかったが、サクラン保湿液適用部位における角層細胞の平均面積は、適用 4 週間後に $521.8 \pm 61.8 \mu\text{m}^2$ から $747.5 \pm 76.2 \mu\text{m}^2$ に有意に増加し (Fig. 1-2)、角層多重剥離度は、 $27.8 \pm 5.5\%$ から $9.8 \pm 2.4\%$ に有意に減少した (Fig. 1-3)。プラセボ適用部位では、角層多重剥離度に変化は見られなかった (Fig. 1-3)。SH/SS 比は、サクラン

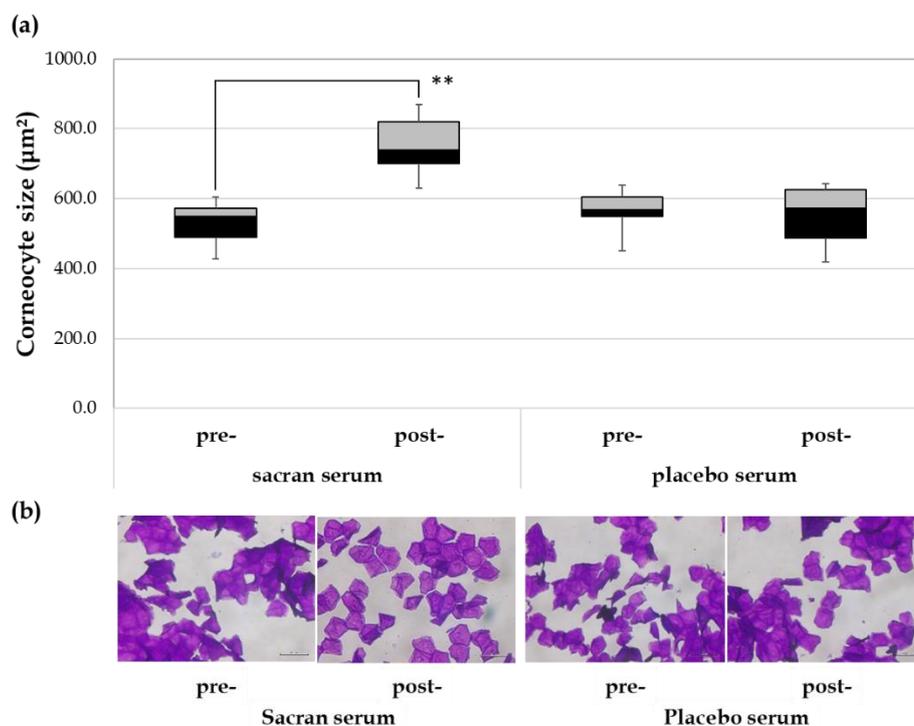


Figure 1-2. Effects of sacran-serum containing sacran on mean size of corneocytes. (a) Changes in mean size of corneocyte after 4 weeks' application of samples (pre: baseline of testing sites, post: after 4 weeks of sample application), Wilcoxon signed rank test, ** $p < 0.01$. (b) Representative images of corneocyte at baseline and after sample application. Scale bar was 100 μm

保湿液を適用すると、適用 4 週間後に 2.3 ± 0.5 から 0.7 ± 0.1 に有意に減少した ($p < 0.01$) が、プラセボ適用部位では変化は見られなかった (Fig. 1-4)。サクラン保湿液適用部位における CE の状態を反映するインボルクリンの免疫染色性、インボルクリン対ナイルレッドの比は、プラセボ適用部位と比較して 0.37 ± 0.06 から 0.61 ± 0.10 に有意に低下した ($p < 0.01$) (Fig. 1-5)。これらの結果を総合すると、サクラン保湿液は角層細胞の未成熟状態を改善することを示唆している。

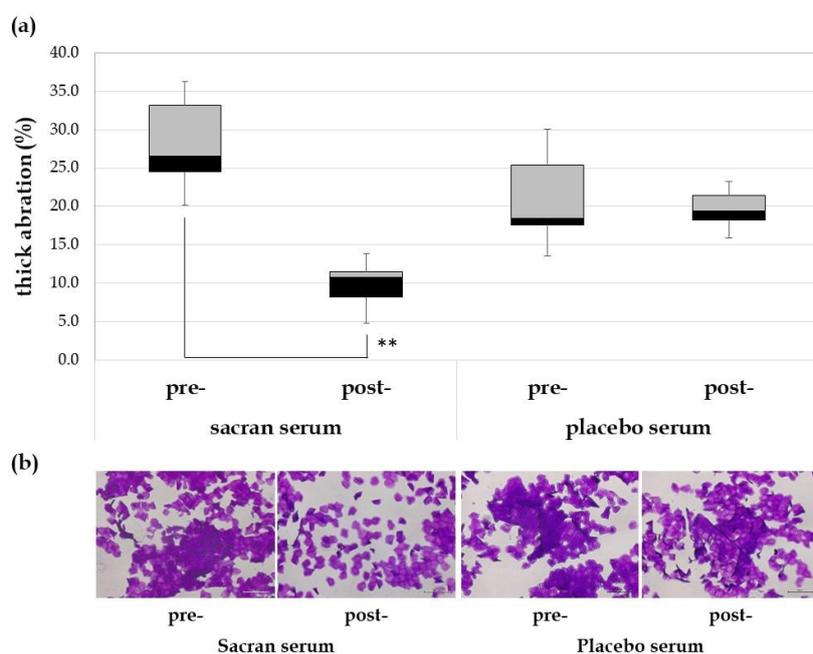


Figure 1-3. Effects of sacran-serum on percentage of thick abrasion. (a) Changes in percentage of thick abrasion of corneocytes after 4 weeks' application of samples (pre: baseline of testing sites, post: after 4 weeks of sample application), Wilcoxon signed rank test, ** $p < 0.01$. (b) Representative desquamation images of corneocyte at baseline and after sample application. Scale bar was 100 μm

1-3-3. 表皮の紅斑性炎症に対するサクランの影響

乾燥した皮膚や日光に曝された皮膚では、IL-1RA/IL-1 α の比率が高いことが良く知られている^{37, 38)}。角層細胞における IL-1RA/IL-1 α の比は、皮膚における炎症の程度を反映するパラメーターとして受け入れられている³⁹⁾。サクラン保湿液適用部位は、プラセボ適用部位と比較した場合、IL-1RA/IL-1 α の比が有意に低下していた (Fig. 1-6)。この結果は、

サクラン保湿液が表皮における炎症を抑制することを示している。

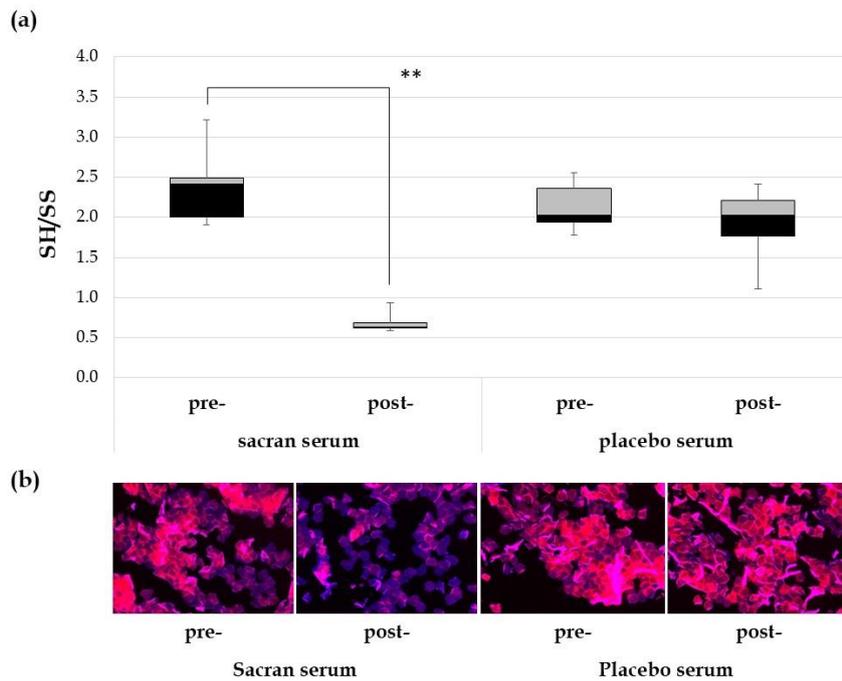


Figure 1-4. Effects of sacran-serum on SH to SS ratio. (a) Changes in ratio of SH to SS after 4 weeks' application of samples (pre: baseline of testing sites, post: after 4 weeks' sample application), Wilcoxon signed rank test, ** $p < 0.01$. (b) Representative merged images of SH (red) and SS (blue) in corneocytes at baseline and after sample application. Scale bar was 100 μm

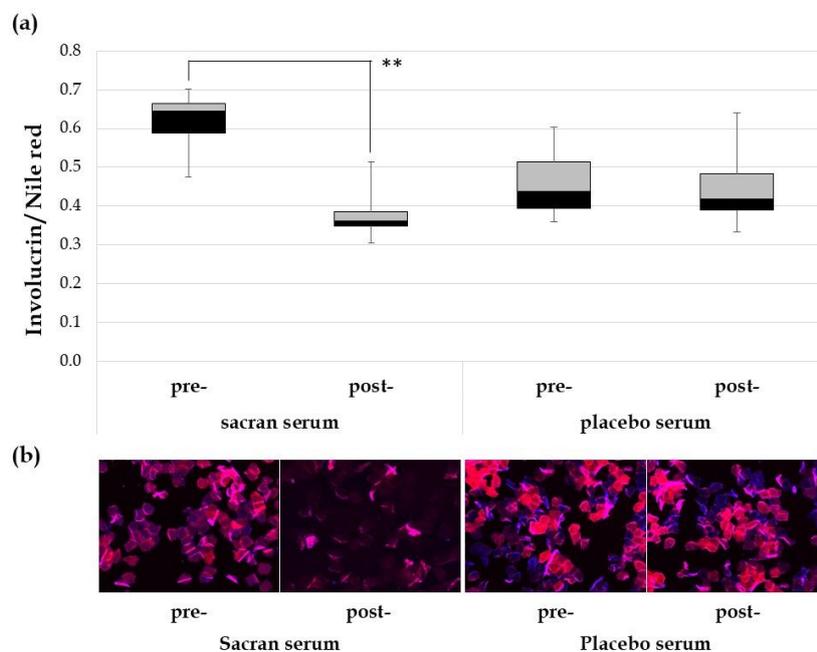


Figure 1-5. Effects of sacran-serum on immunostainability of involucrin. (a) Changes in immunostainability of involucrin normalized with Nile red fluorescence after 4 weeks' application of samples (pre: baseline of testing sites, post: after 4 weeks' sample application), Wilcoxon signed rank test, ** $p < 0.01$. (b) Representative merged images of involucrin (blue) and Nile red (red) in corneocytes at baseline and after sample application. Scale bar was 100 μm

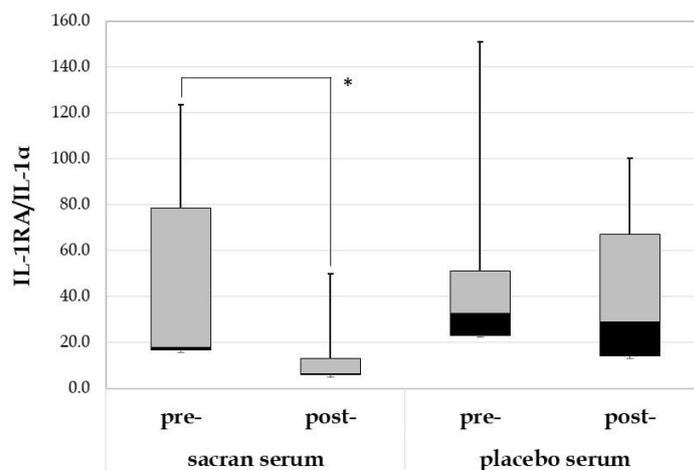


Figure 1-6. Effects of sacran-serum on ratio of IL-1RA to IL-1 α . Changes in ratio of IL-1RA to IL-1 α after 4 weeks' application of samples (pre: baseline of testing sites, post: after 4 weeks' sample application), Wilcoxon signed rank test, * $p < 0.05$.

1-3-4. 角層 (SC) タンパク質のカルボニル化に対するサクランの影響

SC 中のカルボニル化タンパク質 (CP) は、冬季の乾燥性皮膚で増加することが報告されている⁴⁰⁾ ため、角層細胞におけるカルボニル化タンパク質のレベルに対するサクラン保湿液およびプラセボの効果を測定した。サクラン保湿液の適用部位は、プラセボの適用部位の

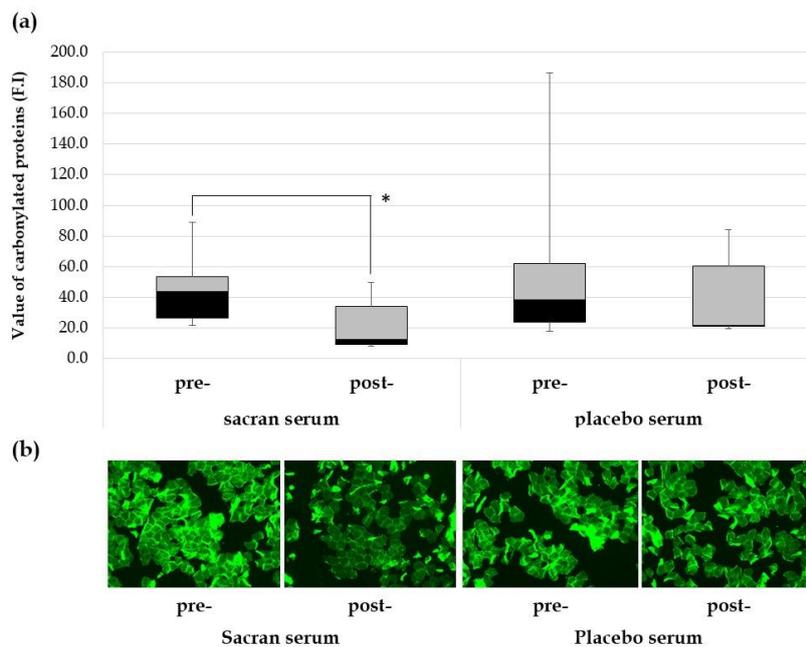


Figure 1-7. Effects of sacran-serum on protein carbonylation in corneocytes. (a) Changes in protein carbonylation in corneocytes after 4 weeks' application of samples (pre: baseline of testing sites, post: after 4 weeks' sample application), Wilcoxon signed rank test, * $p < 0.05$. (b) Representative images of carbonylated protein in corneocytes at baseline and after sample application. Scale bar was 100 μm .

平均 CP レベル (34.3 ± 21.8 F.I.) よりも有意に低い値となった (21.0 ± 17.1 F.I.)。CP は、活性酸素種 (ROS) によって始まる脂質過酸化の最終生成物である⁴¹⁾。この結果は、サクラン保湿液が表皮における酸化ストレスを減少させることを示している (Fig. 1-7)。

1-4. 考察

これまでの研究で、AD 患者に対する治験アンケート調査では、サクラン水溶液の塗布で AD 患者の皮膚のざらつきや顔面発疹が軽減されること、2,4,6-トリニトロクロロベンゼンによる感作後のアレルギー反応の発症が抑制されることが報告されている^{23, 42)}。また、サクランは被膜形成能があるにも関わらず、角層形成の未熟な再生表皮モデルでは表皮生細胞層まで浸透することも確認されている。これらの報告では、サクランが AD などのアレルギー疾患に罹患した皮膚に対して生理学的に有効に働き、皮膚アレルギー反応の発症を予防・抑制することが示されている。しかしながら、今まで健康な皮膚に対するサクランの効果は不明であった。従って、本章では正常な皮膚状態を有するボランティアではあるが、皮膚生理学的パラメーターおよび核細胞パラメーターに焦点をあてて過去に AD の病歴を有するボランティアにおけるサクランの影響を評価した。

連用試験では、まず SWC と TEWL を測定し、サクランが皮膚の水分に及ぼす影響を調べたが、ベースラインと比較して、これらの 2 つのパラメーターのいずれかにもサクランの納得のいく改善効果を見出すことができなかった。ただ興味深いことに、SWC の値を TEWL の値で除した値 (SWC/TEWL) では、サクラン保湿液の使用により有意な保湿機能の改善効果が確認された (Table 1-1, Fig. 1-8)⁴³⁾。これは被験者全体で SWC、TEWL の測定結果を考察するのではなく、被験者個人の結果のバラツキをなくして比較した結果である。各個人の結果として見ると、皮膚保湿機能も改善されることが確認できた。

ここで、SWC/TEWL の値も含めたサクラン保湿液とプラセボ保湿液それぞれの適用前後の群間比較の解析結果を Table 1 に示す。インボルクリン免疫染色性を除いて、試験前の

サクラン保湿液塗布部位とプラセボ保湿液塗布部位間に有意差はなく、試験後には有意差が認められた。各パラメーターの改善効果については以下で述べる。

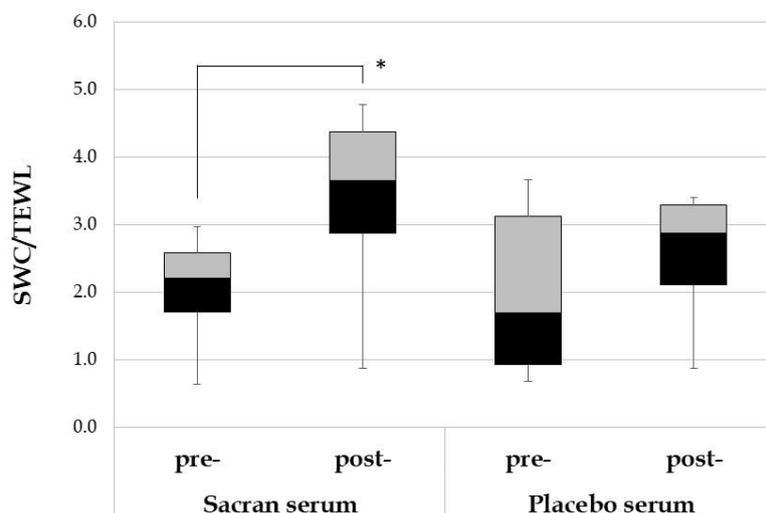


Figure 1-8. Effects of sacran-serum on ration of SWC to TEWL. Changes in SWC and TEWL in volunteers applying samples, serum and placebo for 4 weeks (pre: baseline of testing sites, post: after 4 weeks' application)

Table 1-1 : Summary results of use test

Parameters	pre/post	Sacran serum		Placebo serum		p2
		Mean ±SD	p1	Mean ±SD	p1	
SC water contents /TEWL	pre	2.15±1.16		2.05±1.30		NS
	post	4.67±3.50	*	2.65±1.63	NS	*
Corneocyte Size (μm ²)	pre	521.75±61.75		568.48±83.28		NS
	post	747.5±76.21	**	551.57±85.68	NS	**
Thick abrasion (%)	pre	27.83±5.46		21.15±6.47		NS
	post	9.82±2.40	**	19.01±3.64	NS	**
SCCP	pre	42.54±20.96		42.81±21.77		NS
	post	21.03±17.05	**	34.31±21.77	NS	**
SH/SS	pre	2.33±0.48		2.11±0.27		NS
	post	0.70±0.12	**	1.91±0.40	NS	**
Involucrin /nile red	pre	0.61±0.07		0.47±0.09		*
	post	0.37±0.06	**	0.44±0.09	NS	NS
IL-1RA/IL-1α	pre	110.10±219.8		51.22±45.81		NS
	post	13.48±15.54	†	42.40±37.18	NS	**

pre: baseline of testing sites, post: 4 weeks after sample application

p1: probability between pre and post, p2: probability between sacran and placebo

NS: no significance, †; 0.05<p<0.01, *, p<0.05, **, p<0.01, Wilcoxon signed-rank test

次に健康な皮膚に対するサクランの影響を正確に検証するために角層細胞由来のパラメーターの解析を行った。乾燥した皮膚や損傷した皮膚では、未熟な角層細胞が頻繁に観察さ

れる。角層細胞の大きさは表皮のターンオーバーに依存し、皮膚内部の微弱炎症によって小さくなる^{29,44)}。ADに見られるような炎症を起こした皮膚でも、健康な皮膚よりも皮膚表面でより小さい角層細胞面積を示すことが報告されている⁴⁵⁾。連用試験において、サクラン保湿液を適用するとプラセボに比べて細胞面積が有意に大きくなり、炎症パラメーターであるIL-1RA/IL-1 α の値も有意に低下することが確認されている (Table 1-1, Fig. 1-2, 6)。サクラン保湿液の連用で皮膚内部での炎症が軽減された結果、ターンオーバーが正常化した可能性が示唆される。また乾燥時に頻繁に観察される多重剥離だが、その原因にカリクレインおよびカテプシン D の作用によって調節される角層細胞の落屑に欠陥があることが示唆されている^{46,47)}。サクラン保湿液の適用は多重剥離の割合を減少・改善したことから (Table 1-1, Fig. 1-3)、落屑プロセスを正常化すると仮説が立てられる。

一般的に、成熟した角層細胞では小さくなるSH/SSの値とインボルクリンの免疫染色性が、今回のサクラン保湿液の連用試験でにおいて試験前およびプラセボと比較して有意に減少し、またSH/SSの値とSWCとの間に負の相関が認められた (データは示さない)。以上よりサクラン保湿液の適用は、プラセボ群と比較して有意な角層細胞面積の拡大、多重剥離の減少、SH/SS値およびインボルクリン/ナイルレッドの値の低下をもたらした (Table 1-1, Fig. 4, 5)。まとめると、サクランは角層細胞の成熟を促進し乾燥状態を改善することを示している。

乾燥した皮膚や日光に曝された皮膚では、IL-1RAに対するIL-1 α の比率が高いことが多い^{37,38)}。IL-1 α は促進型の炎症性サイトカインであり、IL-1RAはその受容体アンタゴニストである。損傷した皮膚におけるIL-1RAに対するIL-1 α の高い比率は、上昇したIL-1 α 合成に応答して増加するIL-1RAの発現に起因する。したがって、角層細胞において、IL-1RA/IL-1 α の値は、表皮における炎症を反映するパラメーターとして使用される。サクラン保湿液はプラセボ群と比較して、被験者のIL-1RA/IL-1 α 値を有意に減少させた (Table 1-1, Fig. 1-6)。これは、サクランが表皮における炎症を減少させる可能性を示した。

最後に、CPs は ROS によって開始され、乾燥した皮膚の角層細胞において頻繁に観察される脂質過酸化反応の最終生成物である^{41,48)}。IL-1 α は、IL-1 α 受容体との相互作用によって活性化されるインターロイキン-1 受容体関連キナーゼ-1 を含むシグナル伝達経路を介して ROS を生成することが報告されている⁴⁹⁾。この機構は、IL-1 α の増加がケラチノサイトにおいて高い酸化状態を誘発し、角層細胞中の CPs のレベルがより高くなることによって起こる。これらの結果は、サクランが IL-1 α の減少を通じて細胞内酸化を減少させること、SWC および TEWL によって測定される皮膚保湿機能と CPs との間に負の相関があることを示している (Table 1-1, Fig. 1-7)。つまり、サクラン保湿液の適用によって酸化ストレスが減少することで CPs が有意に低下、皮膚保湿機能の強化につながったと推測できる。

皮膚状態の解析結果を総合的に考察すると以下のようなになる。健康な皮膚では、サクランは角層細胞が成熟する環境を整え、酸化状態となる環境を改善していることが示唆された。この作用メカニズムとして、皮膚表面にサクランが被膜を形成することで物理的障壁として肌からの水分蒸散を抑制し、皮膚保湿機能を改善している可能性が考えられた。

第2章

外部刺激に対するサクランの角層保護効果とそのメカニズム

2-1. 緒言

肌荒れは、低い皮膚表面水分量 (SWC)、高い経表皮水分蒸散量 (TEWL) を特徴とし、時には角層の落屑の頻発による粉吹き状態が見られる。季節的には低温でかつ低湿度状態にある冬季に多く発生し、さらに洗剤などの過剰使用による外的要因、および皮膚の内的要因など、様々な要因が複雑に組み合わさることにより発生する。肌荒れは、アニオン性界面活性剤のラウリル硫酸ナトリウム (SLS) の局所適用によって実験的に再現することができる⁵⁰⁾。皮膚に SLS を繰り返し適用することにより、SWC の低下と TEWL の上昇、加えて皮膚の落屑が観察される^{51, 52)}。また角層細胞由来のパラメーターの変化として、SLS 誘導の肌荒れでは高いインターロイキン (IL) -1 α 受容体アンタゴニスト (IL-1RA) に対する IL-1 α の比率と IL-8 の高レベルでの発現が観察されている⁵³⁾。また、冬季の乾燥肌では、角層細胞にカルボニルタンパク質 (CP) が高い割合で存在することも明らかになっている。最近の研究では、SLS が表皮生細胞層まで容易に浸透し、SLS が細胞内の活性酸素種 (ROS) の生成亢進および IL-1 α の分泌を増加、さらには IL-1 α が株化ヒト皮膚角化細胞 (HaCaT 細胞) の ROS 生成を増加させることも明らかになっている⁵⁴⁾。

一方、アトピー性皮膚炎 (AD) はアレルギー性疾患ではあるが、AD 患者の生理学的皮膚パラメーターの示す特徴は、冬季の乾燥性の肌荒れと共通する表皮バリア機能の低下を示す^{24, 25)}。また、健康な皮膚においても、大気汚染物質など外部因子の影響を受けることにより、感覚刺激に対する高い感受性を示す敏感肌となるリスクが考えられている⁸⁾。敏感肌を自称するパネルの TEWL は高い状態にある^{55, 56)}。

以上のことから、外来性因子による肌荒れ発生に対する対応には表皮バリア機能の改善あるいは皮膚保護膜の形成が重要であることが強く示唆される。

本研究第1章において、サクランとポリオールを含む保湿液は、AD罹患歴のある健常人の皮膚状態を改善することが確認された¹⁹⁾。先行研究において、サクランがAD患者の炎症を含めた皮膚状態を改善することも報告されている^{17,18,42)}。これらの事実を総合すると、サクランは皮膚表面で人工バリアとして働くだけでなく生きた表皮細胞に浸透して皮膚の状態を改善すると考えられた。つまり、サクランが皮膚状態を維持または改善するために表皮内部でも何らかのバリアとして作用することができると仮定した。

従って本章では、サクランの皮膚への浸透性、および内部に浸透した場合の刺激物質からの皮膚保護効果とそのメカニズムについて検討を行った。サクランの皮膚への浸透性については、ビオチン化サクランを用いてヒト再生表皮モデル (RHEE) 内の局在について確認した。外来性刺激物質として SLS を用い、SLS 誘導肌荒れの改善作用を HaCaT 細胞に対する SLS 曝露および SLS 曝露によって誘導される IL-1 α の影響に対するサクランの効果を検証することにより評価した。また、この効果を化粧品に汎用される同じアニオン性多糖類であるヒアルロン酸ナトリウムとの比較も行い、サクランの作用の優劣についても評価した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 試薬

サクラン (sacran) ; 大東化成工業株式会社 (大阪)、ヒアルロン酸ナトリウム (Sodium hyaluronate ; HA) , トリプシン (from Hog panceas) , ラウリル硫酸ナトリウム (SLS) , トコフェロール (α -tocopherol) , 大豆レシチン (lecithin from soybeans) , コレステロール (cholesterol) ; ナカライテスク株式会社 (京都)、ダルベッコイーグル変性培地 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) , ハンクス平衡塩液 (Ca²⁺ and Mg²⁺含有Hanks' Balanced Salt solution, HBSS) ; 日水製薬株式会社 (東京)、ウシ胎児血清 (FBS) ; Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)、BCA Protein Assay Reagent kit ; Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA)、IL-

1 α and IL-1 α ELISA Quantikine kits, ストレプトアビジン (streptavidin-HRP) ; R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)、5-Doxyl stearic acid (5-DSA)、4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) ; Sigma (St Louis, MO, USA)、ヒト再生表皮モデル (LabCyte EPI-MODEL, reconstructed human epidermal equivalents, RHEEs) および培養培地 ; 株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (愛知)、6-[6-(Biotinylamino)hexanoylamino] hexanoylhydrazine (biotin-AC5-hydrazide) , Hoechst33342 solution ; 同仁化学研究所 (熊本)、DyLight650標識ストレプトアビジン (DyLight650-labeled streptavidin) ; Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt (ABTS) ; 和光純薬工業株式会社 (大阪)

2-2-2. サクラン／ヒアルロン酸水溶液の調製

サクラン : 2L ビーカーにサクラン 2.5 g を量り取り、イオン交換水を添加し 1000 g としたものをウォーターバスで 60°Cまで加温した。ウォーターバスで加温して 60 °Cを保ったままホモミキサー (MARK II 2.5 型、Primix 社製) で 10,000rpm の回転数で 1 時間攪拌溶解したものを密閉容器に移し、室温まで戻したものを実験に供した。ヒアルロン酸 : 200mL ビーカーに 99 g のイオン交換水を量り取りディスパーミキサーで攪拌しておく。別に計量しておいたヒアルロン酸ナトリウムを少量ずつ添加していき、全量添加後に 3,000 rpm まで回転数を上げ 30 分間攪拌溶解させた。

2-2-3. サクラン／ヒアルロン酸 (HA) のビオチン化

サクラン及び HA を 20 mg/ mL の 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride の存在下で、2 mg/ mL の biotin-AC5-hydrazide と反応させたピリジンで 5 時間処理した。ビオチン結合多糖を脱イオン水に対する透析により精製

した。

2-2-4. サクランとヒアルロン酸ナトリウム (HA) のヒト再生表皮モデル (RHEE) 中での局在の確認

0.05 w/v%のビオチン化多糖類水溶液 (サクランまたは HA) を RHEE の角層表面側に処理し、37 °Cで 24 時間培養した。24 時間培養後の各培地を回収し、RHEE を透過したビオチン化多糖類の定量を行った。一方、RHEE は 2 つに切断し、1 つは RHEE 内に留まっているビオチン化多糖類の定量を、もう 1 つは染色し組織学的解析を行った。RHEE 切片抽出液は以下の手順で調製した。500 μ L のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) に浸漬した RHEE 切片を μ T-12 ビーズクラッシャー (Taitec Corp., Saitama, Japan) を用いて 2,700 rpm で 10 分間ホモジナイズした。さらに 4 °C、15,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、その上清を RHEE 切片抽出液とした。

競合 ELISA 法を用いて、以下のようにビオチン化多糖類を定量した。各培地または切片抽出液を等量のストレプトアビジン-HRP (1 : 1,000) と混合し、37 °Cで 1 時間インキュベートした。得られた混合物をサンプルとして ELISA アッセイに使用した。ELISA プレートの各ウェルにビオチン化ウシ血清アルブミン (B-BSA) をコートするために、各ウェルに 150 μ L の B-BSA を入れた後、プレートを 37 °Cで 1 時間インキュベートした。200 μ L の PBS-T で 5 分間 3 回すすいだ後、プレートを 150 μ L のブロッキング溶液とともに 37 °Cで 1 時間インキュベートした。試料 (100 μ L) をウェルに入れ、37 °Cで 2 時間インキュベートした。100 μ L の着色溶液 (300 μ g/mL の ABTS、10 μ L の H₂O₂) を添加した後、プレートを 20 分間室温下の暗所で反応させた。マイクロプレートリーダー (Spectra Max Gemini, Molecular Devices, CA, USA) を用いて、得られた溶液の 405nm における吸光度を測定した。

組織学的解析としては、RHEE の凍結切片中のビオチン化多糖類を DyLight 650 標識ス

トレプトアビジンで染色することによって視覚化し、核を Hoechst33342 で同時に染色した。Floyd Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific) を用いて蛍光画像を撮影した。

2-2-5. 細胞培養

ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT) は 5% の FBS を含む DMEM を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。0.25% トリプシンおよび 0.02% EDTA を含有する PBS(-) を用いて細胞を剥離し、96 穴培養細胞用マイクロプレート (旭硝子株式会社) に 3.5×10^4 cells/well の密度で再播種して各実験に供した。

2-2-6. 細胞生存率の測定

HaCaT を様々な濃度の SLS (0、6.25、12.5、25、50、100 μ g/mL) を添加した培地で 24 時間培養した後の細胞傷害性は、Neutral Red 法を用いて細胞生存率として評価した。33 μ g/mL のニュートラルレッドを含む DMEM 中で細胞を 2 時間さらに培養し、PBS(-) で洗浄後、生細胞に取り込まれたニュートラルレッドを 30% メタノール水溶液で抽出した。得られた溶液の 550nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、コントロール (0% 処理) を生存率 100% として算出した。また 0.02 w/v% のサクランまたは HA、さらには代表的な抗酸化剤である 200 μ M の α -トコフェロールと SLS を混合した培地で 24 時間培養し、SLS の細胞傷害に対する緩和作用について評価した。

2-2-7. 細胞内 ROS レベルの測定

マイクロプレートに播種した HaCaT に HBSS(+) を用いて 20 μ M に調製した ROS 反応性蛍光プローブ H₂DCFDA を 30 分間処理し、細胞内に取り込ませた。HBSS(+) で細胞を洗浄後、5% FBS を含有する DMEM を用いて調製した 0-100 μ g/mL の SLS または 50ng/mL IL-1 α を添加し、24 時間培養後 PBS-T で細胞を溶解しマイクロプレートリーダー

ーによって蛍光強度を測定した（励起波長：485 nm、蛍光波長：560 nm）。その後、定法に従って BCA protein assay kit にてタンパク質量を測定し（測定波長：560 nm）、蛍光強度をタンパク質量で除して細胞内 ROS レベルを算出した。また 0.02 w/v%のサクランまたは HA を SLS または IL-1 α を混合して培養し、細胞内 ROS レベル上昇に対する抑制効果について評価した。

2-2-8. 生体膜流動性の評価

リポソーム膜および HaCaT の細胞膜流動性の変動は、ESR スピンラベル剤である 5-doxyl stearic acid (5-DSA) を用いた ESR スピンラベル法によって評価した^{57,58)}。リポソームはバンガム法に従い大豆レシチンとコレステロール比を 2:1 として調製した⁵⁹⁾。リポソームおよび HaCaT (1.0 \times 10⁶ cells) をそれぞれ 1 mM 5-DSA または 10mM 5-DSA 共存下でインキュベートすることにより、生体膜内にスピンラベル剤を取り込ませた。この時、リポソーム分散液、HaCaT に対して 0.02 w/v%のサクランを添加して、膜流動性にサクランが及ぼす影響を観察した。生体膜の流動性における SLS の作用は ESR スペクトルを元に次式（式 1）によって算出されるオーダーパラメーター（ S ）を用いて評価した。また ESR スペクトルは、ESR 測定装置（RFR-30 Electron Spin Resonance, Radical Research Inc.）を用い、37°Cにおいて Table 1 に示す設定条件で測定した。

$$S = (A_{//} - A_{\perp}) / [A_{zz} - 1/2(A_{xx} + A_{yy})] \quad (\text{式 1})$$

$$(A_{xx}: 0.63 \text{ mT } A_{yy}: 0.58 \text{ mT } A_{zz}: 3.36 \text{ mT})$$

2-2-9. 統計処理

測定値は平均値 \pm 標準偏差で表し、one way ANOVA の Dunnett's 検定によって有意差検定を行った。 p 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

Table 1 Conditions for ESR study

<i>Items</i>	<i>Value</i>
<i>Modulation frequency</i>	100 kHz
<i>Modulation amplitude width</i>	0.1 mT
<i>Scanning field</i>	338.1 ± 5 mT
<i>Receiver gain</i>	200
<i>Response time</i>	0.03
<i>Sweep time</i>	8 min
<i>Output powder</i>	4 mW

2-3. 結果

2-3-1. ビオチン化多糖類の RHEE への浸透・局在

未熟な角質層 (SC) または成熟 SC を有するモデルとして、6 日間および 12 日間培養した RHEE を用いて、多糖類 (サクラン、HA) が SC に浸透するか検証した。ビオチン化サクランまたは HA 由来の赤い蛍光は、12 日間培養した成熟モデルでは表面に局在しており (Fig. 2-1a)、ELISA 法での定量でも培地中には浸透しておらずほぼ 100%SC 内に留まっていた (Fig. 2-1b)。一方、6 日間培養の未成熟モデルでは、SC 内全体的に赤く染まっており、定量では約 5 割近くが SC 内を浸透して培地中へ移行していることが明らかになった (Fig. 2-1a, b)。この結果は、サクランや HA のような高分子化合物でもバリア機能が弱った SC には浸透する可能性を示している。

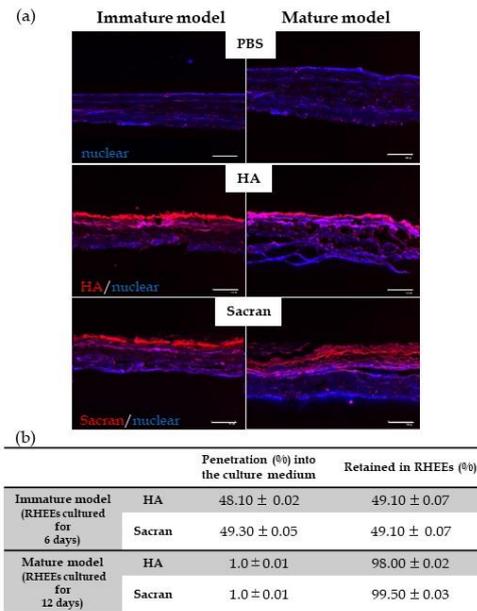


Figure 2-1. Penetration of biotin-conjugated sacran in RHEEs. RHEEs were treated topically with or without 0.05% biotin-conjugated polysaccharide aqueous solutions (sacran or HA) as noted and then were cultured for 24 h at 37°C. The culture media were collected to quantify biotin-conjugated polysaccharides that penetrated through the RHEEs. (a) The histology of biotin-conjugated polysaccharides is shown as representative images (scale bars, 100 μ m). PBS was used as a control. (b) The penetration or retention of biotin-conjugated polysaccharides in RHEEs is expressed as a percentage of the amount of biotin-conjugated polysaccharides applied. (n=4)

2-3-2. SLS による細胞傷害に対する多糖類の保護効果

SLS は代表的な刺激剤であり、肌荒れを引き起こすことがよく知られている。HaCaT を用いて、50, 100 μ g/mL の SLS によって誘導された細胞毒性に対するサクランおよび HA の緩和効果を調べた。サクランおよび HA の両方とも SLS に誘導される細胞損傷を緩和した (Fig. 2-2)。代表的な酸化防止剤である α -トコフェロールもまた、SLS による細胞損傷

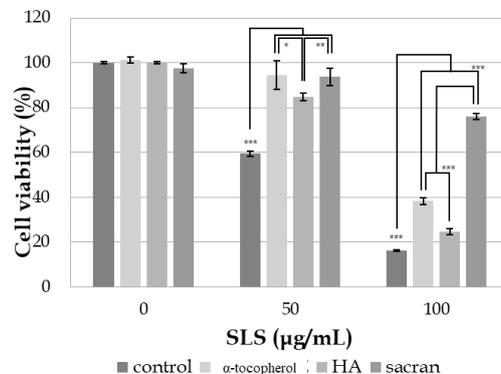


Figure 2-2. Protective effects of polysaccharides against cell damage of HaCaT keratinocytes induced by SLS. HaCaT keratinocytes were cultured with SLS at various concentrations in the presence or absence of 0.02% polysaccharides (sacran or HA) and 200 μ M α -tocopherol as noted for 24 h. Cell viability was measured using the neutral red assay and is expressed as a percentage against the sham-treated cells. Dunnett's test, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 (n=4).

を緩和した。サクランの保護効果は、HA よりも α -トコフェロールよりも優れていた。また HaCaT に対する SLS による細胞損傷と細胞内 ROS レベルとの関係を明らかにするために、様々な濃度の SLS を処理した。SLS によって誘導された細胞損傷は濃度依存的に高まり、細胞内 ROS レベルとの高い相関関係が見出された (Fig. 2-3)。つまり ROS が SLS によって誘発された細胞損傷の原因であると考えられる。

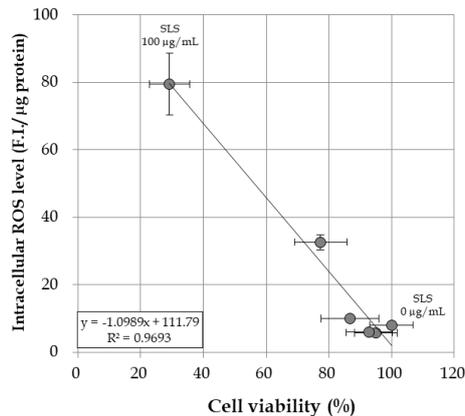


Figure 2-3. Relationship between cell damage and ROS generation in HaCaT keratinocytes induced by SLS. HaCaT keratinocytes were cultured with SLS at the concentrations noted (0, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h. Cell viability was then measured using the neutral red assay and is expressed as a percentage against the sham-treated cells. Intracellular ROS levels were measured using H_2DCFDA and are reported as F.I. per μg protein. (n=5).

2-3-3. SLS/ $\text{IL-1}\alpha$ によって誘導された ROS 生成に対する多糖類の抑制効果

HaCaT では、SLS によって ROS の生成と $\text{IL-1}\alpha$ の分泌が上昇すること、 $\text{IL-1}\alpha$ によって ROS の生成が誘導されることが明らかになっている。そこで SLS または $\text{IL-1}\alpha$ によって HaCaT で誘導される ROS 生成に対するサクランと HA の抑制効果を調べた。HaCaT は $50\mu\text{g}/\text{mL}$ SLS 処理によって細胞内 ROS のレベルが 4.04 ± 0.22 F.I./ μg protein から 17.92 ± 1.47 まで、また $50\text{ ng}/\text{mL}$ $\text{IL-1}\alpha$ 処理では 7.65 ± 0.95 F.I./ μg protein まで (コントロールと比較して 4 倍または 2 倍変化) 上昇した (Fig. 2-4)。この SLS および $\text{IL-1}\alpha$ による ROS レベル上昇に対して、サクランと HA の両方とも抑制効果を示すことが確認できた。またサクランは、HA に比べて優れた抑制効果を示した。

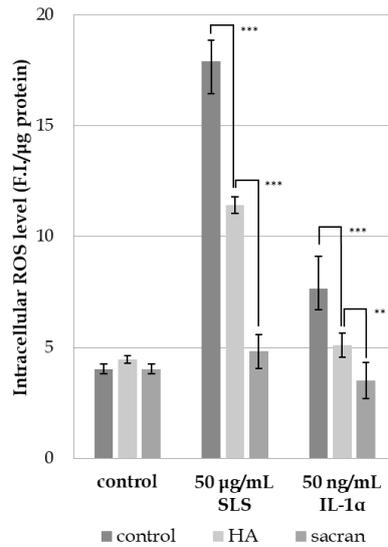


Figure 2-4. Suppressive effects of polysaccharides on ROS generation in HaCaT keratinocytes induced by SLS or IL-1 α . HaCaT keratinocytes were cultured with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SLS or 50 ng/ml IL-1 α in the presence or absence of polysaccharides (sacran or HA) as noted for 24 h. Intracellular ROS levels were measured using H₂DCFDA and are reported as F.I. per μg protein. Dunnett's test, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (n=7).

2-3-4. SLS に誘導される細胞傷害に対するサクラン前処理の抑制効果

サクランは、SLS によって誘導される細胞損傷に対してどのように HaCaT を保護しているのか、そのメカニズムを決定するために、SLS へ曝露の前に細胞をサクランで前処理する場合の保護効果を調べた。サクランによる前処理は、様々な濃度の SLS によって誘導された細胞損傷に対して保護効果を示さなかった (Fig. 2-5)。

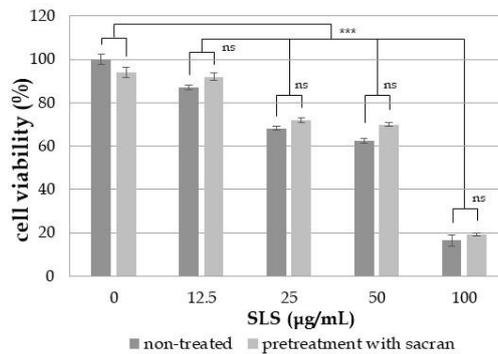


Figure 2-5. Protective effects of sacran against cell damage of HaCa keratinocytes induced by SLS. HaCaT keratinocytes were pretreated with or without 0.02% sacran for 24 h after which they were cultured with SLS at various concentrations as noted. Cell viability was measured using the neutral red assay, and is expressed as a percentage against sham-treated cells. Dunnett's test, ns; not significant, *** $p < 0.001$ (n=5).

2-3-5. サクランと脂質二重膜との相互作用

サクランと細胞膜が相互作用する可能性を探るために、大豆レシチンとコレステロールで調製したリポソーム膜、または HaCaT 細胞膜の膜流動性を ESR スピンラベリング法にて測定した (Fig.2-6)。まずサクランのみを混合した場合、リポソーム膜および HaCaT 細胞膜においてオーダーパラメーター (S) 値がほぼ同じ値を示していることから、サクランと脂質二重膜が相互作用しないことが明らかになった。相互作用する場合は、膜流動性に影響するため値も大きく変化する。一方 SLS のみを混合した場合は、リポソーム膜および HaCaT 細胞膜の両方において S の値が有意に低くなったので、脂質二重層構造との相互作用のために膜流動性を増加させたと考えられる。しかしサクランと SLS を混合した場合は、 S の低下を完全に回復していることから、サクランは SLS とリポソーム膜および HaCaT 細胞膜の脂質二重層との相互作用を妨害すると推測できた。つまりサクランは脂質二重膜よりも刺激物質である SLS と相互作用することが示唆された。

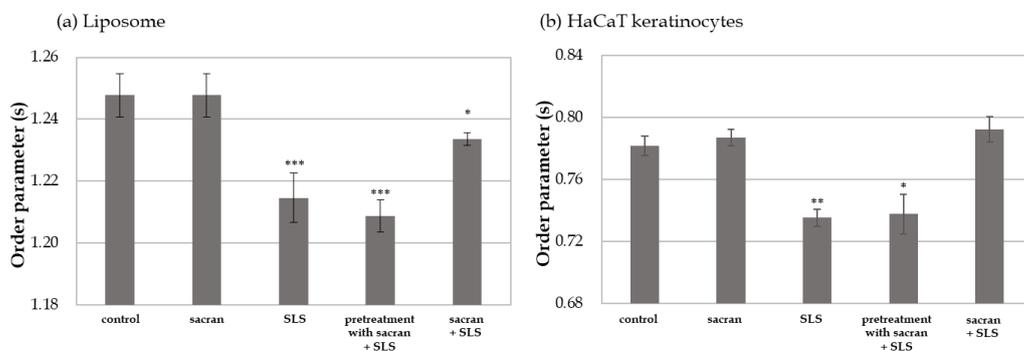


Figure 2-6. Changes of order parameters (S) of liposomes and HaCaT keratinocytes treated with SLS assessed using ESR spin-labeling. The membrane fluidity of (a) liposomes and (b) HaCaT keratinocytes was estimated using an ESR spin-labeling method with 5-DSA as an ESR spin-labeling agent. control (sham-treated liposomes and HaCaT keratinocytes), sacran (liposomes or HaCaT keratinocytes were treated with 0.02% sacran), SLS (liposomes or HaCaT keratinocytes were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SLS), pretreatment with sacran + SLS (liposomes or HaCaT keratinocytes pretreated with 0.02% sacran were exposed to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SLS), sacran + SLS (liposomes or HaCaT keratinocytes were exposed to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SLS and 0.02% sacran). Dunnett's test, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 (n =5).

2-4. 考察

第 1 章におけるヒト試験において、サクラン配合製剤を適用すると健常者の皮膚状態を

改善することが確認されている¹⁹⁾。サクランの分子量から考えると、この作用はサクランが皮膚表面における保護膜形成に由来している可能性が考えられた。一方、サクラン水溶液が AD 患者の炎症や痒みを改善することが明らかになっている⁴²⁾。これらの結果から、サクランが SC に浸透して効果を発揮することもまた考えられた。そこで、サクランが皮膚に浸透するかどうか、また浸透したときの皮膚状態改善メカニズムを議論するために以下の実験を行った。

角層未成熟（6 日培養）および角層成熟（12 日培養）の RHEE に対するサクランの浸透性を検証したところ、サクランは未成熟な角層にのみ浸透することが確認された。これは化粧品に汎用される代表的なアニオン性多糖類である HA も同様の浸透挙動を示した (Fig. 2-1)。サクランおよび HA 共に、バリア機能の低下した未成熟な SC を浸透することにより、SC において機能することを示唆している。また代表的な陰イオン界面活性剤で皮膚刺激を引き起こすことで知られている SLS を用いて、これらの多糖類が SLS によって誘導される細胞傷害の緩和効果を検証した。

初めに SLS によって誘導される細胞傷害に対する ROS の役割を明らかにするために、細胞生存率と細胞内 ROS レベルの関係、および α -トコフェロールの細胞傷害を緩和する効果を確認した。細胞内 ROS レベルは細胞生存率と高い相関を示し (Fig. 2-3)、抗酸化剤である α -トコフェロールも SLS 誘導性の細胞傷害に対して有意な緩和効果を示した。一方、サクランと HA 共に SLS による細胞傷害を抑制し、サクランは HA と α -トコフェロールと比較しても優れた細胞傷害抑制効果を示した (Fig. 2-2)。サクランも HA もいかなる抗酸化作用は持たないが、SLS による細胞傷害を緩和することから、ROS の除去以外の異なる機構で細胞傷害を抑制している可能性が考えられた。

これまでに SLS が Ca^{2+} 流入の刺激を通じて細胞内 ROS の生成を促進するという報告がある⁵⁴⁾。また、 $\text{IL-1}\alpha$ は IL-1R 関連キナーゼ-1 シグナル伝達による NADPH オキシダーゼの活性化を介して ROS を生成する⁶⁰⁾。また、肌荒れの初期段階である乾燥性皮膚の角層

パラメーターとして、IL-1RA に対する IL-1 α の高い比率と高いカルボニル化タンパク質 (CPs) レベルが報告されている⁶¹⁾。タンパク質のカルボニル化は、不飽和脂質および ROS の過酸化反応によって生成されたアルデヒド化合物によって開始される⁶²⁾。よって、SLS および IL-1 α によって誘導される ROS 生成に対する多糖類の抑制効果を調べた。サクラン および HA は、SLS と IL-1 α によって亢進される細胞内 ROS の生成抑制を示した。また、サクランは HA に比較してより高い細胞内 ROS の生成抑制効果を示した (Fig. 2-4)。

ここまでの結果をまとめると、多糖類は外部刺激によって惹起される悪影響を抑制することが確認された。また、その抑制作用は HA と比較するとサクランの方が優れた効果を示した。しかしながら、これまでの結果からサクランと HA の効果の違いを議論することは困難である。サクランと HA の違いは分子量とアニオン性官能基にある。本実験に供した HA の分子量は 1.0×10^6 Da であり、サクランの分子量は $1.6 \sim 2.9 \times 10^7$ Da と報告されている。また、アニオン性官能基は、HA はカルボキシル基のみであるがサクランにはカルボキシル基と硫酸基が存在する。効果の違いか分子量の違いか、あるいはアニオン性官能基の違いに起因するのかどうかについてはまだ明らかではない。この差異についてのメカニズムを解明するためには、保護効果と多糖類の分子量、官能基との関係に焦点を当ててさらなる研究が必要である。

これまでの知見により、多糖類が SLS により誘導される細胞傷害を緩和し、細胞内 ROS の亢進を抑制するメカニズムとして以下の 2 つの仮説を考えた。①多糖類は細胞膜へ吸着することにより SLS あるいは IL-1 α との細胞との接触を抑制する。②多糖類が形成するマトリックスが SLS あるいは IL-1 α を捕捉することによって細胞との相互作用を減少させる。①については、多糖類はレクチンを介して細胞膜と結合する可能性があるため、サクランが細胞表面へ結合・吸着することで、細胞膜と外部刺激の相互作用をバリアのように妨害すると考えた。②についてはこれまでの第 1 章での研究結果に基づいてマトリックス内への補足作用を考えた。これらの仮説を検証するために SLS を用いて以下の検討を行った。

まず①の仮説を検証するために、サクランを24時間前処理した HaCaT 細胞の SLS によって誘導される細胞傷害を検証した。しかしながら、サクラン前処理は SLS 誘導細胞傷害の緩和は確認されなかった (Fig. 2-5)。また、リン脂質にて調製したリポソームおよび HaCaT 細胞の膜流動性にサクランは影響を及ぼさなかったこと、さらにサクラン処理したリポソームおよび HaCaT 細胞への SLS 添加は無処理と同様に膜流動性が上昇したことから (Fig. 2-6)、サクランは細胞膜へ吸着しないことが考えられた。

さらに②の仮説を検証するため、サクランが刺激物質と相互作用する可能性を調べるために、サクランの存在下において SLS を処理したときの膜流動性の変化を検証した。その結果、サクランは、SLS に起因する膜流動性の上昇を共存することにより抑えることが確認された (Fig. 2-6)。

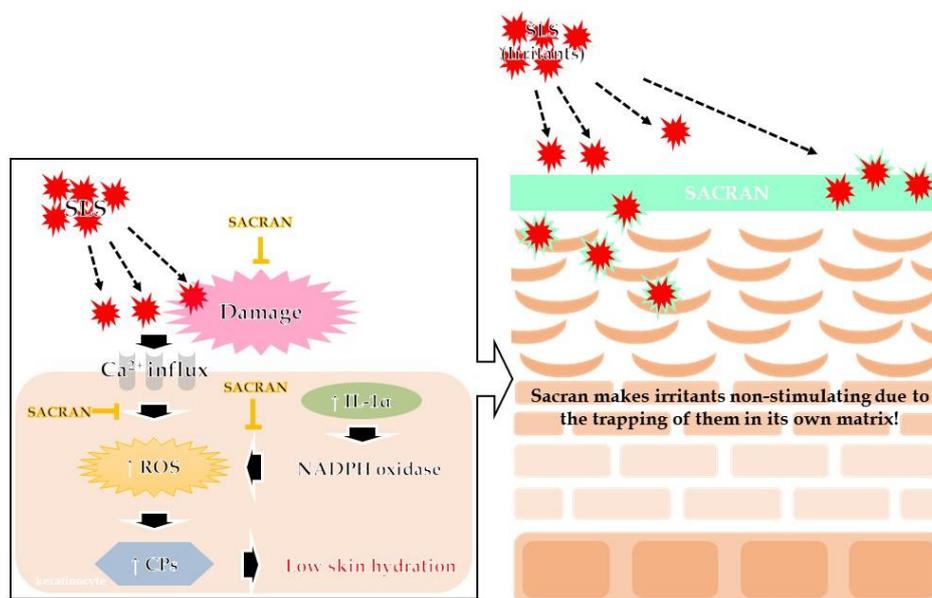


Figure 2-7. Possible mechanism based on the results of this study.

以上の結果から、サクランは SLS および IL-1 α をそのマトリックス内に捕捉することで、SLS による細胞傷害や IL-1 α による ROS 生成上昇を抑制したと考えられる (Fig. 2-7)。SLS は、典型的なアニオン性界面活性剤であり、カチオン性バイオポリマーであるキトサンと相

相互作用することが知られている⁶³⁾。これまで、解明されているサクランの保有官能基は硫酸基およびカルボキシル基のアニオン性官能基である。HA も同様にカルボキシル基を持つアニオン性多糖類である。アニオン性の SLS とサクラン、HA とは電荷反発からイオンの相互作用を補足メカニズムとして考えることは困難である。しかしながら、程度の差はあるがサクラン、HA とともに SLS の細胞への作用を抑制した。また、IL-1 α のような高分子物質の細胞への作用についても抑制作用を示した。現時点では、サクランのこれら分子に対する補足メカニズムの解明に関する知見はなく、補足メカニズムの解明には今後の研究が必要である。

第3章

サクラン被膜によるタバコの煙に含まれる有害物質のトラップ効果 と酸化ストレス低減効果

3-1. 緒言

近年、世界的に PM2.5 や揮発性有機化合物、窒素酸化物、多環式芳香化合物 (PAHs) などさまざまな大気汚染物質の人間の健康に対する悪影響について大いに懸念されている。特に、インド、中国、サウジアラビア、アフリカ諸国や東南アジアなどの地域では大気汚染の拡大が深刻化している⁶⁴⁾。呼吸器系からの大気汚染物質の体内への取込みによる影響は容易に想像できるが、常に大気汚染物質に曝されている皮膚および皮膚からの大気汚染物質の悪影響についても大いに関心を集めている。これまでの研究で、大気汚染物質が表皮細胞の DNA 損傷などを引き起こすこと、脂質の酸化や細胞内酸化ストレスを亢進することにより正常な細胞および皮膚機能を干渉していることが報告されている⁶⁵⁻⁷³⁾。大気汚染物質の恒常的曝露は、皮膚の老化、皮膚癌発症やアトピー性皮膚炎 (AD)、乾癬患者への重篤な影響をもたらす^{74, 75)}。一般に、ダイオキシン類や PAHs は、アリアル hidrocarbon 受容体 (AhR) シグナル伝達経路を活性化することによって炎症を誘導することが明らかにされている⁷⁵⁾。AhR は外因性の化学物質に応答し、有毒化学物質の解毒作用を持ついくつかの遺伝子の発現を誘導または抑制する化学受容体である⁷⁶⁾。AhR の活性化がシトクロム P450-1A1 (CYP1A1) の過剰発現を誘導し PAHs の代謝を行い、その過程において過剰な活性酸素種 (ROS) を生成することが明らかにされている⁷⁶⁻⁷⁸⁾。

日常生活では、身近な大気汚染物質の一種としてタバコの煙や排気ガスに皮膚が恒常的に曝されており、その影響の発現に対する懸念も以前からある⁷⁹⁻⁸¹⁾。これらタバコの煙や排気ガスには反応性の高いアルデヒド化合物 (AC)、ベンゾ[a]ピレン (BaP) および他の化学物質が多く含まれている^{82, 83)}。AC は皮膚のタンパク質のカルボニル化を引き起こし、カ

ルボニル化タンパク質 (CP) を生成する。CP は、青色光を吸収することによりタイプ I の光増感反応を行い、スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) を生成することが報告されている⁶¹⁾。 $\cdot\text{O}_2^-$ は脂質過酸化反応を介して AC を生成することから、AC は皮膚に CP を蓄積する酸化ループを開始することが示唆される。一方、工場などの燃焼過程で生成される代表的な PAHs である BaP は、AhR シグナルの活性化により誘導される過剰の ROS 生成を介して、ヒト表皮ケラチノサイトから炎症性サイトカインの分泌を亢進させる⁸⁴⁾。大気汚染物質、PAHs や AC などの皮膚への浸透を防止・抑制する効果的なアプローチを開発することは、皮膚の健康を維持するうえで非常に重要である。

本研究第 2 章において、サクランは成熟した角層 (SC) のモデルである 12 日培養のヒト再生表皮モデル (RHEE) では浸透せず表面に留まっていたことから、皮膚表面において人工的なバリアとなる可能性がより具体的に示唆された。第 1 章で明らかになったサクランの皮膚保護効果は、高分子化合物に期待される被膜形成により発現されたことが考えられる。これらの事実から、サクラン外用は環境因子により惹起される刺激に対するバリア効果を発揮することが期待された。そこで、本章では、環境因子として大気汚染物質を考え、大気汚染物質から皮膚を保護する作用の検証を試みた。本章では大気汚染物質としてタバコの煙を用いて、サクランのトラップ効果を中心に大気汚染物質に起因する皮膚損傷の軽減作用を酸化ストレスの観点から明らかにした。また前章に引き続き、ヒアルロン酸ナトリウム (HA) との効果の比較を行った。

3-2. 実験方法

3-2-1. 試薬

サクラン (sacran) ; 大東化成工業株式会社 (大阪)、ヒアルロン酸ナトリウム (Bio-sodium hyaluronate ; HA) ; SK Bioland (Chungam, South Korea)、トリプシン、DMSO ; ナカライテスク株式会社 (京都)、DMEM, HBSS(+); 日水製薬株式会社 (東京)、FBS ; Invitrogen

(Carlsbad, CA, USA)、BCA Protein Assay Reagent kit ; Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA)、アクロレイン (acrolein monomer) , NBD-hydrazine (4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan-hydrazine) , 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride ; 東京化成工業株式会社 (東京)、Fluorescein-5-thiosemicarbazide (FTSC), 2'.7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA), ベンゾピレン (BaP) ; Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)、4-Morpholineethanesulfonic acid, sodium salt (4-MES) ; 和光純薬工業株式会社 (大阪)、メルカプトエタノール (2-Mercapto-ethanol, 2-ME) , SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix for real-time PCR analysis ; Thermo Fisher Scientific (Kanagawa, Japan)、RLT buffer, RNeasy Mini Kit ; Qiagen (Hilden, Germany)

3-2-2. サクラン／ヒアルロン酸水溶液の調製

サクラン：2L ビーカーにサクラン 2.5 g を量り取り、イオン交換水を添加し 1000 g としたものをウォーターバスで 60 °Cまで加温した。ウォーターバスで加温して 60 °Cを保ったままホモキサー (MARK II 2.5 型、Primix 社製) で 10,000rpm の回転数で 1 時間攪拌溶解したものを密閉容器に移し、室温まで戻した。ヒアルロン酸：200mL ビーカーに 99 g のイオン交換水を量り取りディスペルミキサーで攪拌しておく。別に計量しておいたヒアルロン酸ナトリウムを少量ずつ添加していき、全量添加後に 3,000 rpm まで回転数を上げ 30 分間攪拌溶解させた。0.25 wt%サクラン水溶液と 1.0 wt%HA 水溶液から 0.05 wt%水溶液を調製し、実験に供した。

3-2-3. タバコの煙

タバコの煙源としてセブンスター (Seven Stars®; 14 mg, 1.2 mg, 日本たばこ産業株式会社) を用いた。

3-2-4. タバコの煙に対する多糖類フィルムのトラップ効果

多糖類のフィルムを通してタバコの煙を PBS(-)中に吹き込み、PBS(-)中に含まれる AC および BaP を蛍光法を用いて定量し、多糖類のタバコの煙に対するトラップ効果を検証した。1 mL の多糖類水溶液をメンブレンフィルター (10 μ mJH, Merck Millipore) に滴下し、50°Cで乾燥させて多糖類フィルムとした。この多糖類フィルムまたは未処理のフィルムに1本分のタバコの煙を通過させた後、スターラーで攪拌している 10 mL の PBS(-)に吹き込んだものをサンプルとした。各 PBS(-)サンプルを 0.05%トリフルオロ酢酸の存在下、暗所で 30 分間、25 μ M NBD-ヒドラジンと反応させて、マイクロプレートリーダー (Spectra Max Gemini, Molecular Devices, CA, USA) で蛍光強度 (Ex; 470 nm, EM; 550 nm) を測定し AC を検出した。AC の標準物質としてアクロレインを用いて作製した検量線を用いて、蛍光強度より AC を定量した。BaP は自身の蛍光強度 (Ex; 360nm, Em; 450nm) を測定し、検量線も作成して定量した。トラップ効果は、未処理フィルターの値に対する百分率として表した。

3-2-5. 細胞培養とタバコの煙への曝露

ヒト表皮角化細胞株 (HaCaT) は 5%の FBS を含む DMEM を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。0.25%トリプシンおよび 0.02%EDTA を含有する PBS(-)を用いて細胞を剥離し、96 穴培養細胞用マイクロプレート (旭硝子株式会社) に 3.5 \times 10⁴ cells/well の密度で再播種して各実験に供した。トラップ効果と同様の方法でタバコの煙を導入した PBS(-)サンプルを DMEM 培地に混合し、24 時間培養した。

3-2-6. RT-qPCR

タバコの煙を曝露した HaCaT における CYP1A1 mRNA の発現レベルを、リアルタイム PCR 分析を用いて評価した。ウェルから培地を除去し PBS(-)で洗浄後、3.5 μ L の 2-ME を

含む 350 μ L の RLT buffer を添加し細胞溶解液を得た。RNeasy Mini Kit を用いて細胞溶解液から total RNA を抽出した。続いて PrimeScript RT Master Mix を用いて反応液を調製し、T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories、CA、USA) を使用して、total RNA から一本鎖 cDNA を合成し前処理を終了した。リアルタイム PCR は、Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて各サンプルにつき 1 μ L の cDNA と 10 μ M のプライマーを用いて行った。SYBR Green Real-Time PCR Master Mix を用いて生成物を検出した。プライマーは、CYP1A1 とグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) (NM_002046.5, NR_045089.1 ; TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) を用いた。各試料中の cDNA の相対量を GAPDH で標準化し、融解曲線を用いて特異性を確認した。

3-2-7. HaCaT に対するタバコの煙の悪影響

タバコの煙の HaCaT に対する影響を細胞生存率、細胞内 ROS レベルと細胞内 CP レベルを用いて検証した。

3-2-7-1. 細胞生存率の測定

タバコの煙に曝露して 24 時間培養後の細胞を、ニュートラルレッドを 33 μ g/mL に調製した 5% FBS を含有する DMEM で 2 時間培養した。PBS(-)で洗浄後、生細胞に取り込まれたニュートラルレッドを 30%メタノール水溶液で抽出した。得られた溶液の 550 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、コントロール (0%処理) を生存率 100%として算出した。

3-2-7-2. 細胞内 ROS レベルの測定

マイクロプレートに播種した HaCaT に HBSS(+)を用いて 20 μ M に調製した ROS 反応性蛍光プローブ H₂DCFDA を 30 分間処理し、細胞内に取り込ませた。HBSS(+)で細胞を洗浄後、タバコの煙に曝露した。24 時間培養後 PBS-T で細胞を溶解し、マイクロプレー

トリーダーによって蛍光強度を測定した（励起波長：485 nm、蛍光波長：560 nm）。その後、定法に従って BCA protein assay kit にてタンパク質量を測定し（測定波長：560 nm）、蛍光強度をタンパク質量で除して細胞内 ROS レベルを算出した。

3-2-7-3. CP レベルの測定

FTSC を用いたアルデヒド基の蛍光標識により CP の細胞内レベルを決定した。培地を捨て冷 MeOH で 10 分間細胞を固定した後、20 μ M FTSC を含む 0.1 M MES-Na 溶液 (pH 5.5) に 25°C の暗所で 1 時間反応させた。蛍光顕微鏡 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて画像を取得し、Corneocytometry (CIEL, Tokyo, Japan) を用いて、各蛍光画像におけるカルボニル化タンパク質の蛍光強度をカルボニルタンパクレベルとして定量した。

3-2-8. ex-vivo test

多糖類の角層への吸着性とバリア機能を検証するため、多糖類を処理した角層細胞がタバコの煙に曝された後の CP レベルを測定した。

3-2-8-1. 角層細胞の採取とスライドガラスへの転写

テープストリッピングしたテープを一度クラフト粘着テープの非粘着面に移した。その後、6mm の穴あけパンチでガムテープごと角層付きテープを抜き取った。ピンセットを用いてスライドガラスに 6mm に取った角層付きテープのみを貼り付けた。キシレンに一晩つけてセロハンテープの粘着剤のみを溶解し、その後、風乾することでスライドガラスに角層細胞のみを転写した。

3-2-8-2. 角層細胞の多糖類処理とタバコの煙への曝露

スライドガラスに転写した角質細胞を室温で 10 μ L の多糖類水溶液を 10 分間処理した。流水で 5 分すぎ乾燥させた後、スライドガラスごと各層細胞をタバコ煙で満たされた箱の中に室温で 2 時間置いた。さらに 37°C で 24 時間インキュベートした後、FTSC を用い

たアルデヒド基の蛍光標識により角層細胞の CP の細胞内レベルを決定した。

3-2-9. 統計処理

測定値は平均値±標準偏差で表し、Wilcoxon 符号付順位検定で p 値を決定し、0.05 未満の p 値を統計的に有意とみなした。

3-3. 結果

3-3-1. アルデヒド化合物 (AC) とベンゾピレン (BaP) トラップ効果

多糖類フィルムのタバコの煙に対するトラップ効果を検証した。サクランフィルムを通過してから PBS(-)に導入された AC と BaP の比率を確認すると、PBS(-)中にはほとんど透過していなかった (Fig. 3-1)。サクランフィルムは AC および BaP の両方に対する優れたトラップ効果が確認された。一方、HA フィルムも未処理のフィルムと比較すると AC と BaP に対するトラップ効果を示し、特に BaP に対して強いトラップ効果が確認された。サクランも HA も AC および BaP に対するトラップ効果を有するが、サクランは HA に比べて優れた効果を示した。

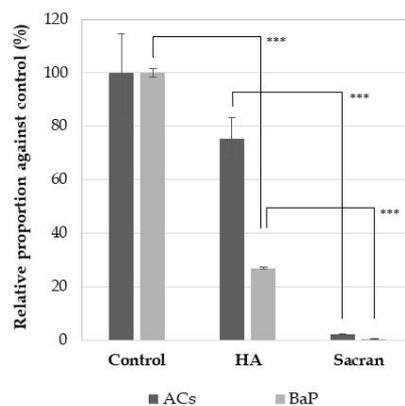


Figure 3-1. Trapping effects of polysaccharide-treated filters on ACs and BaP in tobacco smoke. ACs and BaP in PBS diffused with tobacco smoke passing through filters treated with or without polysaccharides were quantified as follows: ACs were estimated by fluorescence intensity (Ex; 470 nm, Em; 550 nm) with NBD-hydrazine in the presence of trifluoroacetic acid. BaP was quantified by fluorescence intensity (Ex; 360 nm, Em; 450 nm). Calibration curves were prepared and their concentrations were quantified. Each value represents the mean ± S.D. of 3 experiments. Wilcoxon rank sum test, ***p<0.001. Trapping efficiency is expressed as a percentage versus the value of the non-treated membrane filter (Control).

3-3-2. タバコの煙による CYP1A1 mRNA 発現誘導に対する多糖類の抑制効果

タバコの煙を未処理フィルターに通過させて処理した Control(+)では、タバコ未処理の Control(-)と比較して急激な CYP1A1 mRNA レベルの上昇が確認された。一方、サクランおよび HA フィルターを通過させてタバコの煙を処理した場合、タバコの煙による発現誘導が抑制されていた。サクランと HA を比較すると、サクランの方がより CYP1A1 mRNA 発現レベルの抑制に効果的であることが確認できた (Fig. 3-2)。

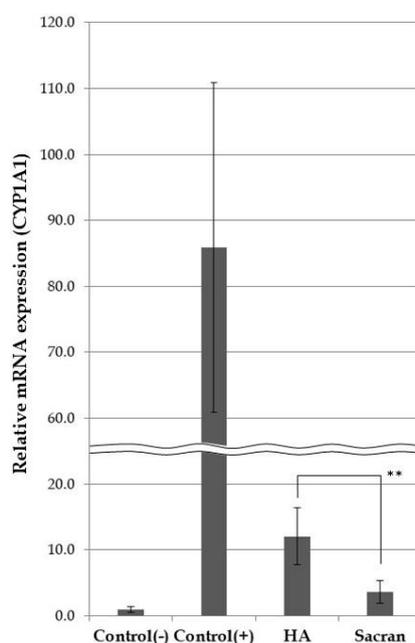


Figure 3-2. Suppressive effects of polysaccharides on CYP1A1 mRNA expression levels induced by tobacco. HaCaT keratinocytes were cultured in DMEM containing PBS diffused with tobacco smoke through filters treated with or without sacran or HA. After 24 h, total RNA was extracted and mRNA levels were determined by real-time PCR. Each value represents the mean \pm S.D. of 4 experiments. ** $p < 0.01$. Control(-) denotes sham-treated cells and Control(+) denotes cells treated with tobacco smoke through a non-treated filter.

3-3-3. タバコの煙の有害作用に対する多糖類の改善効果

タバコの煙の処理によって HaCaT 細胞の細胞生存率は低下し、細胞内 ROS レベルと CP レベルは上昇していた (Fig. 3-3~5) タバコの煙によって細胞傷害が起こり、ROS レベルの上昇による酸化ストレスで CP が増えるという結果となった。サクランおよび HA フィル

ターを通過させたタバコの煙では、HaCaT 細胞に対する毒性と酸化ストレスを有意に低下していた。細胞障害性の改善については、サクランは HA よりも有意に高い細胞障害性の低下効果を示した (Fig. 3-3)。サクランは細胞内 ROS レベルと CP レベルの上昇を有意に抑制したが、HA では細胞内 ROS レベルは低下させた一方、CP レベルを有意に抑制することができなかった (Fig. 3-4, 5)。

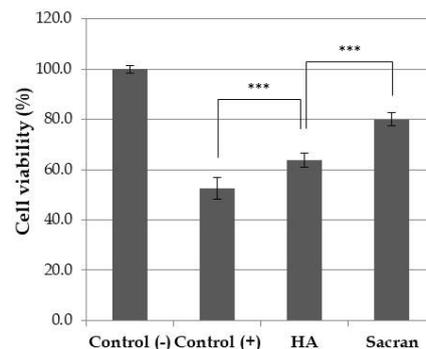


Figure 3-3. Amelioration of the cytotoxicity induced by tobacco smoke on HaCaT keratinocytes. HaCaT keratinocytes were cultured in DMEM containing PBS diffused with tobacco smoke through filters treated with or without sacran or HA for 24 h at 37°C. Cell viability was measured using the neutral red assay and is expressed as a percentage against sham-treated cells (Control(-)). Each value represents the mean \pm S.D. of 6 experiments. Wilcoxon rank sum test, *** p <0.001.

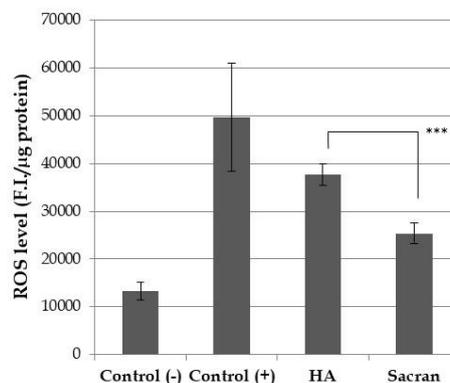


Figure 3-4. Amelioration of ROS generation induced by tobacco smoke on HaCaT keratinocytes. HaCaT keratinocytes were cultured in DMEM containing PBS diffused with tobacco smoke through filters treated with or without sacran or HA for 24 h at 37°C. Intracellular ROS levels were measured using H₂DCFDA. Each value represents the mean \pm S.D. of 6 experiments. Wilcoxon rank sum test, *** p <0.001. Control(-) denotes sham-treated cells and Control(+) denotes cells treated with tobacco through a non-treated filter.

3-3-4. 多糖類の角層への吸着とタバコの煙に対するバリア効果

テープストリッピングした角層に多糖類を処理して、タバコの煙に暴露する ex-vivo 試験を行った。タバコの煙に暴露した角層細胞では有意に CP レベルを上昇させた。サクランと

HA を処理した角層細胞は、タバコの煙に暴露後の CP レベルを有意に低下したが、サクランの方がより低い CP レベルを示した (Fig. 3-6)。

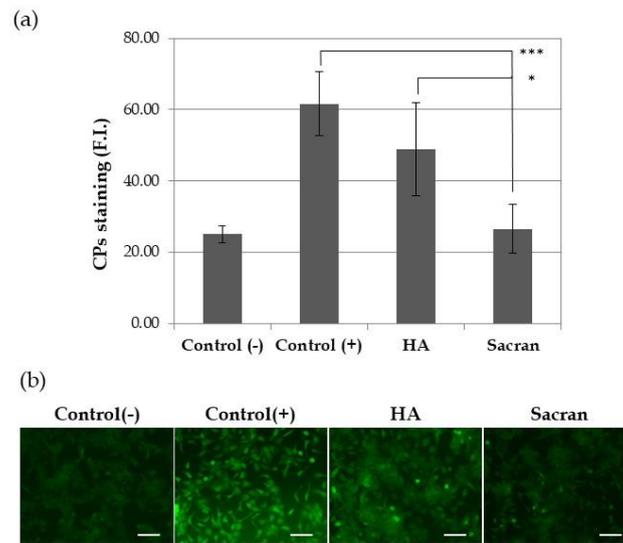


Figure 3-5. Amelioration of protein carbonylation induced by tobacco smoke on HaCaT keratinocytes. HaCaT keratinocytes were cultured in DMEM containing PBS diffused with tobacco smoke through filters treated with or without sacran or HA. After 24 h, intracellular CP levels were estimated by fluorescence intensity of FTSC labeling. (a) CP levels were quantified by image analysis, each value represents the mean \pm S.D. of 6 experiments. Wilcoxon rank sum test, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (b) Representative images of CPs in HaCaT keratinocytes after each treatment (scale bar, 100 μ m). Control(-) denotes sham-treated cells and Control(+) denotes cells treated with tobacco through a non-treated filter.

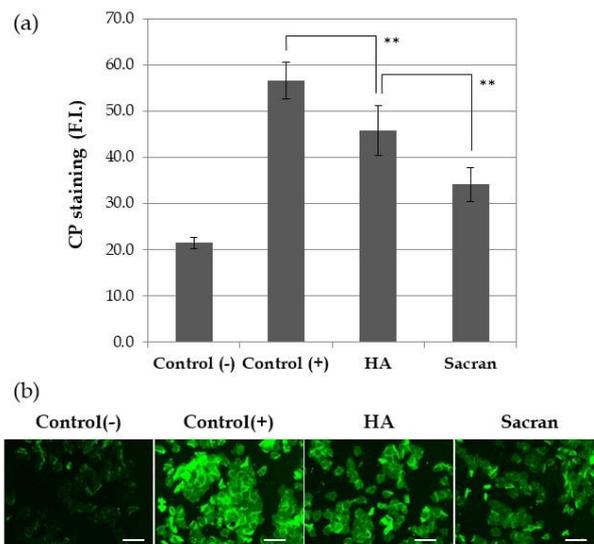


Figure 3-6. Interference with protein carbonylation in corneocytes exposed to tobacco smoke. Tape-stripped corneocytes were treated with sacran or HA, placed in a box filled with tobacco smoke for 2 h and then were incubated for 24 h at 37°C. The levels of CPs in corneocytes was quantified by image analysis. (a) Changes in protein carbonylation in corneocytes. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 experiments. Wilcoxon rank sum test, ** $p < 0.01$. (b) Representative images of CPs in corneocytes after each treatment (scale bar, 100 μ m). Control(-) denotes sham-treated corneocytes and Control(+) denotes corneocytes treated with tobacco smoke without polysaccharide treatment.

3-4. 考察

本研究第1、第2章では、サクランが皮膚上で人工的なバリアとなり得る可能性、外来成分の細胞への作用を緩和したことから外来成分のトラップ効果を有する可能性について明らかにした。これらの効果は、サクランのもつ物理化学的にユニークな特性に起因する外部刺激に対する皮膚の保護効果に基づくと考えられた。本章では、大気汚染物質としてタバコの煙を用いてサクランのアンチポリューション効果を検証することを目的とした。さらには RHEE を用いたサクランの SC での局在を検証した結果、サクランは成熟した SC では内部に浸透せずに表面に留まることが確認された²⁰⁾。したがって、サクランは大気汚染物質に対する保護効果も期待された。

まず、皮膚表面で被膜を形成したサクランが有害物質の外部からの浸透に対する障壁として機能するかどうかを調べるために、サクランまたは HA を処理したフィルターを通して、タバコの煙を吹き込んだ PBS(-)中の AC および BaP の量を比較した。サクランと HA は、共に PBS(-)中の AC と BaP の割合を低下させること、サクランフィルターの方が強いトラップ効果を持つことが明らかになった (Fig. 3-1)。また、テープストリッピングした角層細胞をタバコの煙への曝露による CP レベルの上昇を指標としてトラップ効果を評価した。サクランと HA は、角層細胞への吸着を含めてその効果を確認するため、処理後に流水で除去を行った。タバコの煙へ曝露した角層細胞は CP レベルの有意な上昇を示したが、曝露前にサクランあるいは HA を角層細胞へ処理すると、CP レベルの上昇を抑制することが確認された (Fig. 3-6)。この作用は、HA よりもサクランの方が強い効果を示した。これらの結果をまとめると、サクランは角層とより強く相互作用することで表面に留まりやすく、タバコの煙に含まれる AC や BaP などの有害物質をトラップすることで皮膚への悪影響を低減することができるものと考えられた (Fig. 3-7)。また、この効果が HA よりも強いことを示している。

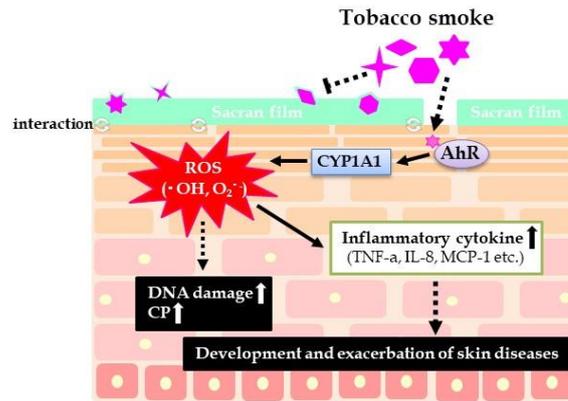


Figure 3-7. Possible mechanism based on the results of this study.

次に生物学的観点からサクランの影響を評価するために、HaCaT細胞に対するタバコの煙の影響を検証した。一般的に、BaPはAhRシグナル伝達の活性化を介してCYP1A1の転写を活性化することが知られている。CYP1A1は、BaPなどの多環式芳香化合物を解毒するためにヒドロキシル基を導入する。この過程において副生成物としてスーパーオキシドアニオンラジカルが合成されることが報告されている⁷⁵⁻⁷⁸⁾。従って、HaCaT細胞におけるCYP1A1 mRNA発現レベルと細胞内ROSレベルについて検証し、タバコ煙に対するバリアとしてのサクランの効果を評価した。サクランは、タバコの煙によって誘導されたCYP1A1のmRNA発現レベル上昇を抑制し(Fig. 3-2)、さらにタバコの煙の細胞毒性とタバコ煙によって亢進される細胞内ROS生成および細胞内CPの上昇を抑制した(Fig. 3-3~5)。HAも抑制効果を示したが、サクランの方がより強い抑制効果を示すことが確認された。以上の結果から、サクランの有害物質トラップ効果が生物学的にも有効であることが確認された。

サクランは、11%の硫酸基と22%のカルボキシ基を含む11種類の単糖類で構成されたユニークな藍藻由来の硫酸化多糖だが、詳細な構造は同定されていない^{11, 12)}。これまでの結果から、サクランとHAで程度に違いはあるが共通しているトラップ効果のメカニズムを考察すると、多糖類自身のマトリックスの中にBaPやACを捕捉することが考えられる。サクランとHAには硫酸基の有無という大きな違いがあるが、予備実験で行った硫酸化多

糖類であるカラギーナンはトラップ効果を示さなかったことから（データは示さない）、硫酸基の有無で BaP や AC に対するサクランと HA のトラップ効果の違いを説明するのは困難である。特に、BaP の極性は AC と比較して低いことから多糖体分子内の解離基の多寡で議論することはできないが、サクランの分子マトリックス中には非極性化学物質を保持する疎水性ドメインが存在する可能性が示唆される。BaP についてはその疎水性ドメインにトラップされた可能性が考えられる。しかしながら、AC のトラップ効率は HA に比較してサクランに強いことが確認されている。この結果を、疎水性ドメインや硫酸基の有無だけで説明することは困難である。サクランの BaP および AC のトラップメカニズムの解明には、分子量および形成される組織体構造を含めた詳細な研究が必要であると考えられる。

第 4 章

サクラン-ポリオール複合体の基礎化粧品への配合の可能性 -化学的、物理的側面からのアプローチ-

4-1. 緒言

高分子化学の進歩は、繊維、紙、容器、磁気フィルム、建築材料、農業関連製品や化粧品など幅広い分野で、新しい機能を有する多くの新素材を提供してきた。化粧品分野において、高分子化合物は、増粘、ゲル化、整髪、撥水、コンディショニング、乳化/分散、被膜形成、保湿、経皮吸収促進といった機能が期待され化粧品へ配合されている。さらに、さまざまな機能を求めて高分子自体を粉体化してメイクアップ製品へ使用されている。

近年の化粧品原料のトレンドは天然由来原料へ大きくシフトし、近い将来には化学合成原料の使用を抑えることを決定した欧米企業もある。このような状況下において環境にやさしく持続可能な「天然由来の」機能性化粧品原料の開発が求められている今、多くの天然機能性多糖類の化粧品原料への展開のための応用研究が盛んに行われている。

サクランは、構成単糖 11 種類からなる平均分子量 $1.6\sim 2.9\times 10^7$ 、分子鎖長 $10\mu\text{m}$ 以上の超高分子量の天然多糖体であり、ユニークな特性を持つ¹²⁾。まずサクラン水溶液は 100,000cps (1 wt%) もの高粘性と高いチキソトロピー性を有する^{14,15)}。一般的に高分子ゲル化剤は、化粧品製剤中で塩の影響を受け分子が収縮して粘度低下を起こすことがありしばしば製品安定性の観点から問題になるが^{85,86)}、サクランは塩の影響も受けにくく塩共存下においても粘度低下を示さないことから増粘・ゲル化剤としての機能においても大いに期待される。また水溶液を乾かすだけで被膜になる被膜形成能も確認されている。

皮膚は生体の最外層に位置し、物質浸透および漏出のバリアとして働いている。バリアとしての機能が損なわれた皮膚は、高濃度の乳化剤により調製された製剤の経皮浸透を容易にし、炎症性のサイトカイン分泌を誘導し皮膚刺激性を高頻度で発現することが知られて

いる⁸⁷⁾。このような皮膚刺激性を緩和あるいは防止するためには、物理的障壁として皮膚表面にフィルムを作ることは非常に効果的な手段である。

本研究の第1～3章において、サクランの皮膚保護効果と刺激物質のトラップ効果を明らかにした。サクランは被膜を形成することにより皮膚表面において人工バリアとして働くことが期待された。また、化粧品製剤調製時に配合される低分子乳化剤は皮膚一次刺激性を発現する可能性があることから低分子乳化剤の化粧品製剤への配合濃度は必要最小量となっている。サクランは硫酸基、カルボキシル基を有することによりアルコール、ポリオールの水酸基と水素結合を形成することによりサクランのマトリックス内に疎水性ドメインを提供できる可能性が考えられた。

そこで本章では、サクランの基礎化粧品への配合の可能性を明らかにするために、ポリオールと共存させたときのサクランの被膜形成能および乳化剤としての評価を行った。

4-2. 実験方法

4-2-1. 試薬

サクラン (sacran) ; 大東化成工業株式会社 (大阪)、羊毛由来ケラチン (keratin) ; 株式会社成和化成 (大阪)、カルセイン (Bis[*N,N*-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein) ; 同仁化学研究所

ポリオール類 : 1,2-プロパンジオール (1,2-propanediol) ; 株式会社 ADEKA (東京)、グリセリン (glycerin: 1,2,3-propanetriol) ; 花王株式会社 (東京)、1,2-ブタンジオール (1,2-butanediol) , 1,4-ブタンジオール (1,4-butanediol) , 1,2-ヘキサジオール (1,2-hexanediol) , 1,6-ヘキサジオール (1,6-hexanediol) , 1,2-オクタジオール (1,2-octanediol) ; 東京化成工業株式会社 (東京)、1,3-ブチレングリコール (1,3-butanediol ; 1,3-BG) ; KH ネオケム株式会社 (東京)、ペンチレングリコール (1,2-pentanediol) ; Symrise AG (Holzminden, Germany)

乳化試験に使用した油剤：スクワラン (Squalane)；Sophim (Provence, France)、流動パラフィン (mineral oil)；カネダ株式会社 (東京)、水添ポリブテン (hydrogenated polyisobutene), ベヘニルアルコール (behenyl alcohol)；日油株式会社 (東京)、イソステアリアルアルコール (Isostearyl alcohol)；高級アルコール工業株式会社 (千葉)、オクチルドデカノール (octyldodecanol)；花王株式会社 (東京)、トリ (カプリル酸/カプリン酸) グリセリル (Caprylic/Capric Triglyceride), リンゴ酸ジステアレート (diisosteryl malate), ヒドロキシステアリン酸エチルヘキシル (2-ethylhexyl hydroxystearate)；日清オイリオグループ株式会社 (東京), ワセリン (petrolatum)；日興理化株式会社 (東京)、ラノリン (lanolin)；クロダジャパン株式会社 (東京)、パラフィンワックス (paraffin wax), マイクロクリスタリンワックス (microcrystalline wax)；日本精蠟株式会社 (東京)、セチルアルコール (cetyl alcohol)；日光ケミカルズ株式会社 (東京)、ジメチコン (dimethicone; KF-96L-2cs), シクロメチコン (cyclopentasiloxane; KF-995)；信越化学工業株式会社 (東京)、ポリパーフルオロメチルイソプロピルエーテル (polyperfluoromethylisopropyl ether)；Solvey Solexis (Arizona, USA)

4-2-2. サクラン水溶液の調製

2L ビーカーにサクラン 2.5 g を量り取り、イオン交換水を添加し 1000 g としたものをウォーターバスで 60°C まで加温した。ウォーターバスで加温して 60 °C を保ったままホモミキサー (MARK II 2.5 型、Primix 社製) で 10,000rpm の回転数で 1 時間攪拌溶解したものを密閉容器に移し、室温まで戻した。これを 0.25 wt% サクラン水溶液として本章実験に用いた。

4-2-3. サクランゲル状シート (GS) 形成試験

0.25 wt% サクラン水溶液に Table 4-1 に記載したポリオール類を添加し、イオン交換水で

サクランの濃度を調整した。これを 1,000 rpm の回転数のディスペルミキサーで 1 分間攪拌し、サクランと 1,3-BG の混合水溶液とした。所定の濃度に調整したサクランと 1,3-BG の混合水溶液をバランスディッシュ (As One 製) に流し入れ、50 °Cで一晩乾燥させた。サクランの濃度は 0.05、0.1、0.15、0.2 wt%とし、ポリオール濃度は 0、1、3、5、7、9、10 wt%とした。サクランの GS 形成は、乾燥後のフィルムを再度水に浸漬した後にピンセットなどでフィルムの形状を保ったまま持ち上げられるかどうか、水への溶解性を確認することで判断した。また 1,2-オクタンジオールは油溶性のため使用しなかった。

Table 4-1. The list of oils and polyols for emulsification experiments

Oil	non-polar	polar	silicone & fluoline oil	Polyol
Liquid	Squalane	Isostearyl alcohol	Dimethicone	1, 2-propanediol
	Mineral oil	Octyldodecanol	Cyclopentasiloxane	glycerin
	Hydrogenated polyisobutene (low viscosity)	Glyceryl tricaprilate/tricaprate	Polyperfluoromethyl isopropyl ether	1, 2-butanediol
	Hydrogenated polyisobutene (high viscosity)	Diisostearyl malate		1, 3-butanediol
Paste	Petrolatum	2-Ethylhexyl hydroxystearate		1, 4-butanediol
		Lanolin		1, 2-pentanediol
Solid (wax)	Paraffin wax	Cetyl alcohol		1, 2-hexanediol
	Microcrystalline wax	Behenyl alcohol		1, 6-hexanediol
				1, 2-Octanediol

4-2-4. 外部からの化学物質の侵入に対するサクランの効果

4-2-4-1. ケラチンフィルムの調製

9 g のウール (ケラチン) を 8 M urea、0.26 M SDS、1.66 M 2-ME を含む水溶液 100 mL に浸漬し、振盪しながら 50 °Cにおいて 16 時間インキュベートした。透析の外液を予め調製し、4 °Cにて保管した。その溶液を 50mL の遠沈管に分注し、トップスピード (2,700rpm) で 10 分間遠心分離し、上澄みをステンレスメッシュ、もしくはナイロンフィルタで濾過し、不溶化物を濾別する。ろ液を透析膜に移し、3 L の脱気したイオン交換水 (d.H₂O) を透析外液とし、毎日交換しながら 3 日間透析を行った。透析内液を 4,000 rpm で 10 分間遠心して、上清を回収してオリを除去し、タンパク質量を定量した (4 °C保管可能)。タンパク質濃度 20 mg/mL となるように精製水で希釈したものを、3 cm×3 cm の非帯電バランスディッシュに流し込み、50 °Cで一晩乾燥させたものをケラチンフィルムとして用いた。

4-2-4-2. 疑似角層モデルを使用したカルセイン透過度の評価

高さ 2 cm、直径 5 mm のプラスチックの筒に調製したケラチンフィルムを接着剤（コニシ株式会社 ボンドクイック 30）で貼り付けた。ケラチンフィルムをヒトの疑似角層に見立て、0.5 wt% サクラン水溶液（SACRAN-05、大東化成工業(株)）、20 wt% の 1,3-BG を含む 0.5% サクラン水溶液（SACRAN-05BG、大東化成工業(株)）を 200 μ L 添加し、一晩 50 $^{\circ}$ C で乾燥させてケラチンフィルム上に GS を形成させた。サクランの GS ができたプラスチックの筒に 1 mM に d.H₂O で希釈したカルセイン水溶液を 300 μ L 添加した。その筒を PBS の入った 48 well プレートに設置し、カルセイン水溶液の透過度を蛍光強度（Ex/Em : 495/520 nm）の測定により評価した。測定は 10 分間隔で 60 分まで行った。この時 BG のみでは被膜が形成されないため、同様の効果がないと考えられコントロールは GS なしとした。

4-2-5. 皮膚内部からの水分蒸散に対するサクランの効果

サクラン GS の水分透過性は、湿度センサーを改良した湿度計を用いてセンサー環境内の湿度変化を指標として測定した（Fig. 4-1）。センサーは閉鎖型とした。サクラン GS はカルセインの透過試験と同様の濃度のサクラン単独と 1,3-BG との組み合わせのものを調製して用いた。穴の開いたプラスチックの板に GS をはさみ、d.H₂O を入れたビンの蓋にはめ込み、このビンをお湯の上に設置し、プラスチックの穴の部分からの水分の蒸散を湿度変化として測定した。この測定は湿度を一定にしたプラスチックの箱の中で行った。測定は 1 分間隔で 1 時間行った。コントロールはカルセインの透過の実験と同様に GS なしで行った。

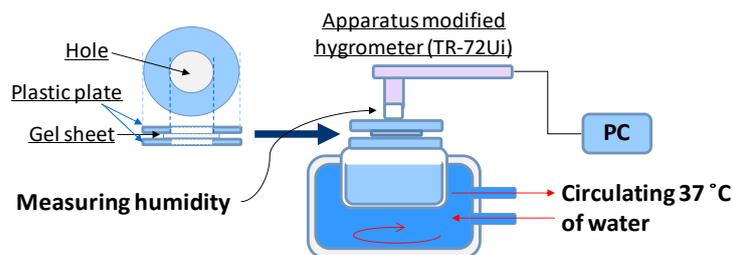


Figure 4-1. Method for measurement of water evaporation property

4-2-6. サクランの乳化特性

0.25 wt%に調製したサクラン水溶液とポリオール類 (Table 4-1) を dH₂O で所定の濃度に調製し、室温下でホモミキサー (HM-310、AS One 製) を用いて 8,000 rpm の回転数で 10 分間攪拌混合した。そこへ油剤を 3 wt% 添加し、ホモミキサー (8,000 rpm) で 15 分間乳化保持した。1,2-オクタジオールは油溶性のため、油に混合して乳化に用いた。乳化プロフィールを作成する際は、油はスクワランを使用し室温下で乳化保持を行った。様々な油に対する乳化能を検証する際は、80°C に加熱したサクラン-1,2-ペンタンジオール混合水溶液 (サクラン 0.2%、1,2-ペンタンジオール 10%) に 80°C に加熱した各種油剤を添加し、乳化保持を行った。15 分間の乳化保持後、水に乳化物を浸けながら攪拌棒で手攪拌しながら室温へ戻した。油剤は Table 4-1 に示したものをを使用した。

また様々な pH によるサクラン-ポリオール (ペンチレングリコール) の乳化性能を検証した。0.25 wt% に調製したサクラン水溶液を 1.5 wt% アルギニン水溶液と 1.5 wt% 酢酸水溶液を用いて pH4~11 に調整してから 1,2-ペンタンジオールを添加し、油剤にスクワランを用いて前述した方法と同様に乳化物を調製した。

乳化状態は、乳化直後、3 日後、7 日後の目視判定と粘度測定 (TVB 10M、東機産業株式会社製)、乳化滴の粒径測定 (Microtrac MT3300EX II、日機装株式会社製) により判断した。

4-2-7. 統計処理

測定値は平均値±標準偏差で表し、student の t 検定によって有意差検定を行った。p 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

4-3. 結果

4-3-1. サクランゲル状シート (GS) の形成特性

サクラン単独の水溶液は、どの濃度においても水を飛ばすだけで硬い被膜になったため、サクランは被膜形成能を持つことが確認された。サクランとポリオール類の混合水溶液を乾燥して得た被膜は、水に難溶でかつ含水し水を保持することができるためゲル状シート (GS) と名付けた。このサクラン-ポリオール混合水溶液からの GS の形成傾向は、組み合わせるポリオール分子中の炭素鎖の数および水酸基の置換位置とその混合比率によって異なっていた。GS 形成プロフィールを Fig. 4-2 に示した。Fig. 4-2 のプロフィールからわかるように 3 つ水酸基をもつグリセリンでは GS 形成が確認されず、2 つの水酸基を構造内に持つジオール類に GS 形成が確認された。ブタンジオールでは、2 つの水酸基の置換位置が 1 位と 2 位あるいは 1 位と 3 位ではほぼ同等の範囲で GS の形成は確認されたが、1 位と 4 位になると GS 形成は狭くなることが確認された。また、ジオールのアルキル鎖が 3 から 6 に増えるにしたがって GS 形成領域が広くなることが確認された。以上の結果から、今

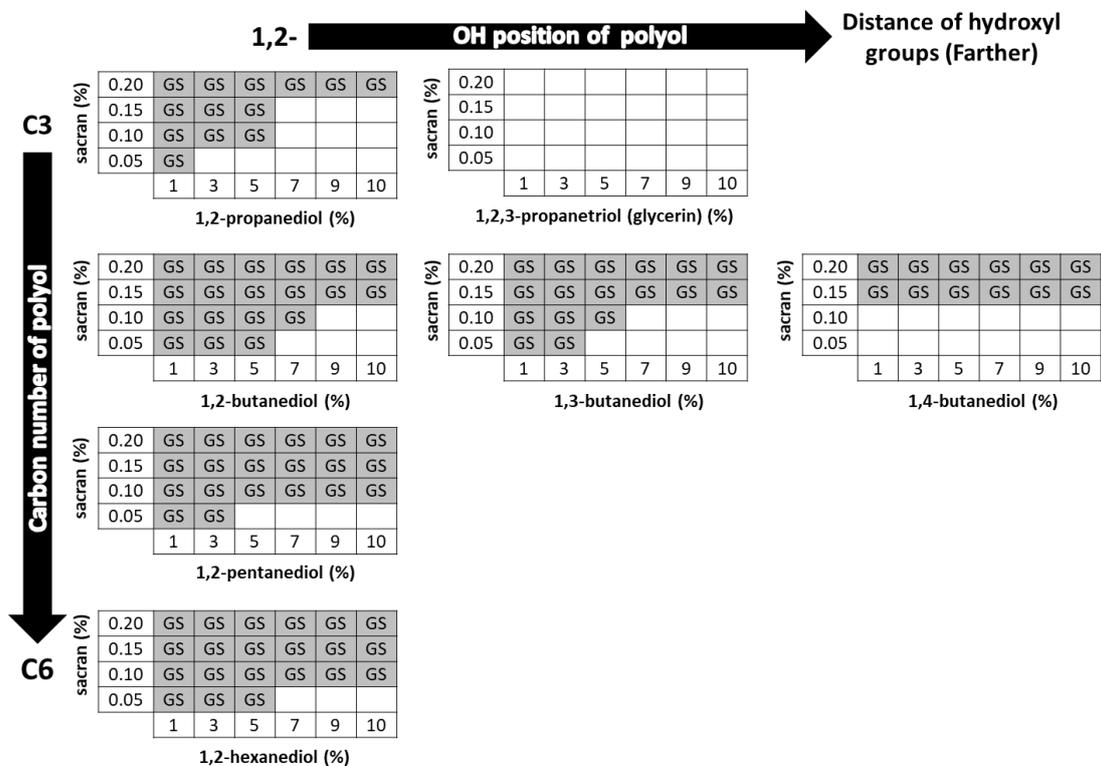


Figure 4-2. Profiles of sacran-polyol complexes the gel-sheets formations. This figure shows the composition map of sacran-polyol complexes which yielded the gel-sheet (GS) formation. The greater the carbon number of polyols, the larger the region of the GS formation composition ratio. In terms of the position of hydroxyl groups of polyols, 1,2 position is the best for GS formation. In case of tri-polyol (1,2,3-propanetriol), there is no region to form GS.

回実験に用いたポリオール類の中で GS 形成能を発揮するために必要な化学構造の特徴は、水酸基が 2 つ必要で、水酸基の結合位置はアルキル鎖の末端と隣接する 1 位と 2 位のジオール構造を有し、且つアルキル鎖長が長いことであった。

4-3-2. サクランゲル状シート (GS) の皮膚保護作用

GS 形成プロフィールの結果から、グリセリンに次いで化粧品に広く配合される 1,3-BG を用いて調製した GS の物理化学的性質について皮膚保護作用の観点から評価した。まず皮膚の外部からの化学物質の皮膚への浸透に対する GS の作用を明らかにするため、カルセインの透過性を検証した。皮膚の代替膜として羊毛のケラチンタンパクより再生したケラチンフィルムを用い、ケラチンフィルム上に GS を調製し、その上部よりカルセイン溶液を添加した。サクランと 1,3-BG を用いた GS のカルセイン透過は、サクランのみで調製した GS と比較して有意に低いことが確認された (Fig. 4-3)。

次に皮膚内部からの水分蒸散に対する作用を明らかにするため、Fig. 1 に示したシステムを用いて GS を透過する水分量を測定した。サクランのみで調製した GS と比較して、サクランと 1,3-BG を用いた GS は水分透過性を有意に抑制することが確認された (Table 4-2)。

これらの結果をまとめると、皮膚表面においてサクランとポリオールにより調製された GS が形成されることにより、皮膚内部からの水分蒸散と皮膚外部からの化学物質の皮膚内部

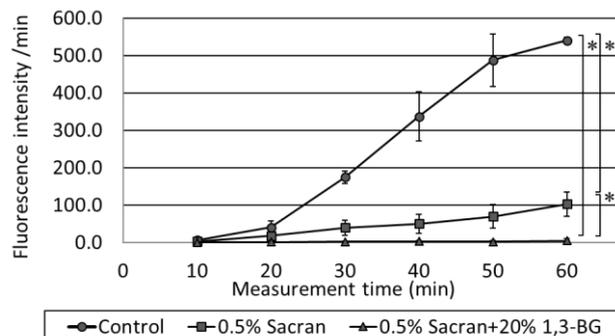


Figure 4-3. Permeability of a calcein through gel-sheets. The fluorescence intensity (Ex/Em: 495/520nm) of PBS was measured after each 10-minutes interval to 60. Data showed as an average of 5 independent examinations. Control showed calcein leakages (%) through keratin film without gel-sheet of sacran and sacran-1,3-BG complex. Student t-test. Significance; *p<0.05.

への侵入を抑制する効果が期待された。

Table 4-2. Water evaporation through gel-sheets at the initial state

	Water evaporation rate (%/min)	Significance	
		vs Control	vs 0.5 % Sacran
Control	1.24 ± 0.02		
0.5 % Sacran	1.04 ± 0.06	***	
0.5 % Sacran + 20 % 1,3-BG	0.17 ± 0.05	***	***

Water evaporation rates were measured with the modified hygrometer described in the materials and methods. A water evaporation rate was calculated as humidity changes per minute. Control showed water evaporation rate without gel-sheet of sacran and sacran-1,3-BG complex in the measurement condition. Measurements were carried out in triplicate, results were expressed mean ± standard deviation (S.D.). Student t-test. Significance: *** p<0.001.

4-3-3. サクラン-ポリオールとの乳化性能

サクランとポリオールの水に難溶な GS の形成から考え、サクランとポリオールは複合体を形成し、その内部に親水性ドメインと疎水性ドメインが存在する可能性が考えられた。疎水性ドメインが存在すると、その内部に油を保持できる乳化能を持つことが期待できた。そこで、サクランと各ポリオールの混合体の乳化能を油性成分としてスクワランを用いて検証した。結果を Fig. 4-4 に乳化状態プロフィールを示す。サクランは単独でもスクワランを保持し O/W エマルジョンを形成できたが、ポリオール類を添加することでより安定化した。サクランとポリオールの乳化性能は、GS 形成能と概ね一致し、サクランとの混合により安定な乳化性能を発揮する本実験で使用したポリオールは分子内に 2 つの水酸基を持つジオールであること、水酸基の結合位置はアルキル鎖の末端と隣接する 1 位と 2 位であり、アルキル鎖長が適度に長いことを特徴とした。

ここで GS 形成の結果を考慮すると、1,2-ペンタンジオールはサクランと最も優れた相互作用性を示し、親水-疎水バランスがサクランの分子に適していると考えられた。乳化粒子径を比較すると 1,2-ペンタンジオールの粒子径が一番小さく安定していた (Fig. 4-5a)。またサクラン-ポリオール複合体中の油を保持するために、1,2-ペンタンジオールのアルキル鎖の長さが最良の立体配座を与えることができると考えた。そこで 10% の 1,2-ペンタンジ

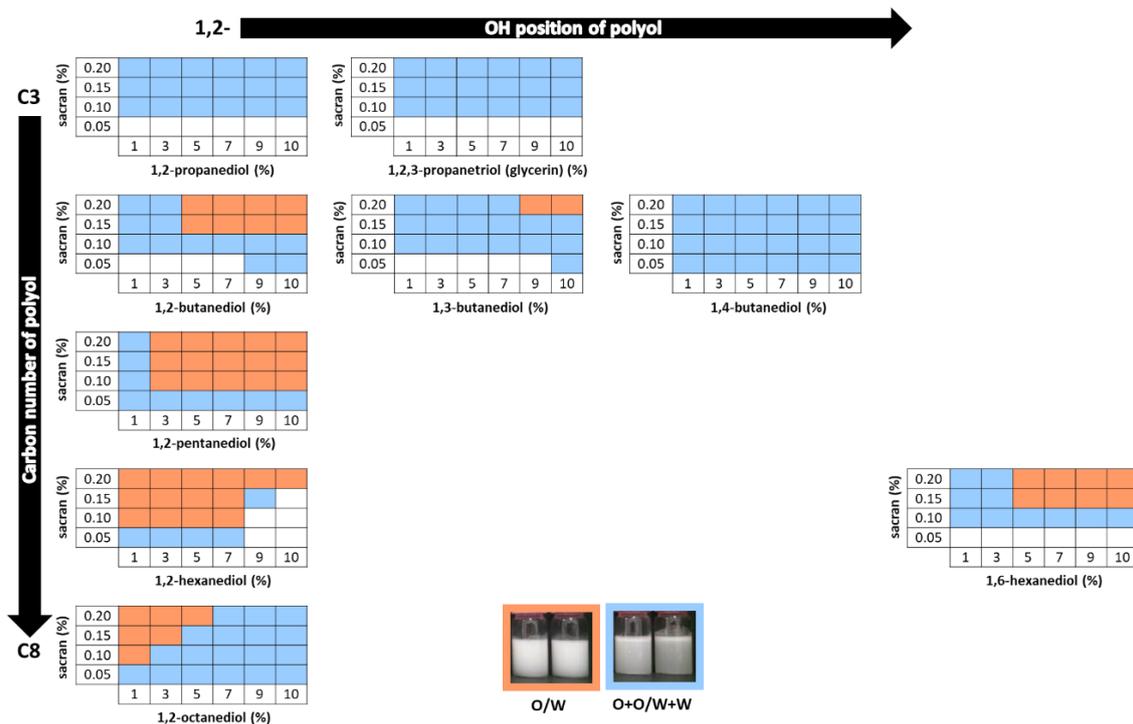


Figure 4-4. Formation diagram of emulsion using squalane (3%). Emulsification property of sacran-polyol complexes against 3% squalane are shown in the figure. The region for stable emulsification is shown in red. Blue regions indicate unstable emulsification. The stability of each emulsion was determined by appearance at 24 hours after preparation.

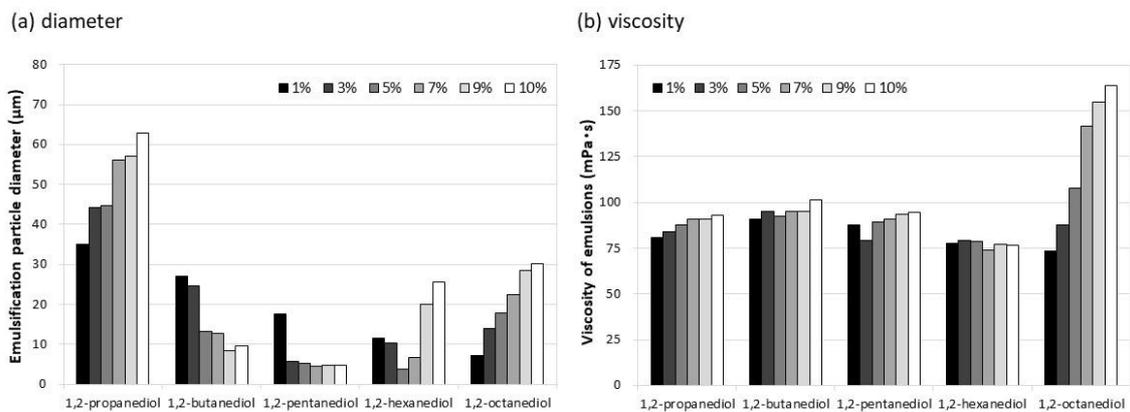


Figure 4-5. Particle diameters of squalane in the emulsions and viscosities of emulsion. This is the results of the diameter and viscosity of 3% squalane in the emulsion system with 0.2% sacran-polyol complexes (changing concentration of polyols). Effects of polyols on emulsification was determined by particle size at 72 hours after preparation. Viscosity was just reference value. The measurements of particle diameter was carried out with methods described in materials and method.

オールを添加した 0.2%サクラン水溶液を用いて、サクランの乳化性能を評価した。

まずスクワランを用いて乳化限界量について検証したところ、6 wt%まで安定に乳化することができた。次に油の極性の影響を調べた。油の極性は、サクラン-ポリオール (1,2-ペンタンジオール) の乳化に影響しないことが分かった。低極性で分子量の少し大きい油など一部乳化できない油も存在したが、幅広い種類の油を乳化できる乳化系であることが確認

できた (Table 4-3)。さらに pH の影響を検証した。乳化物の粘度はアルカリ性/酸性条件下でも低下したが、エマルジョンの粒子径は、酸性条件下で大きくなるという結果であった (Fig. 4-6)。この結果は、酸性条件下ではサクラン-ポリオールとのインタラクションが影響を受ける可能性を示した。

Table 4-3. Summary of the evaluation of the emulsion with each oil using sacran-polyol (1,2-pentanediol)
gray : emulsified, white: not emulsified

Oil	non-polar	polar	silicone & fluoline oil
Liquid	Squalane	Isostearyl alcohol	Dimethicone
	Mineral oil	Octyldodecanol	Cyclopentasiloxane
	Hydrogenated polyisobutene (low viscosity)	Glyceryl tricaprilate/tricaprate	Polyperfluoromethylisopropyl ether
	Hydrogenated polyisobutene (high viscosity)	Diisostearyl malate	
Paste	Petrolatum	2-Ethylhexyl hydroxystearate	
		Lanolin	
Solid (wax)	Paraffin wax	Cetyl alcohol	
	Microcrystalline wax	Behenyl alcohol	

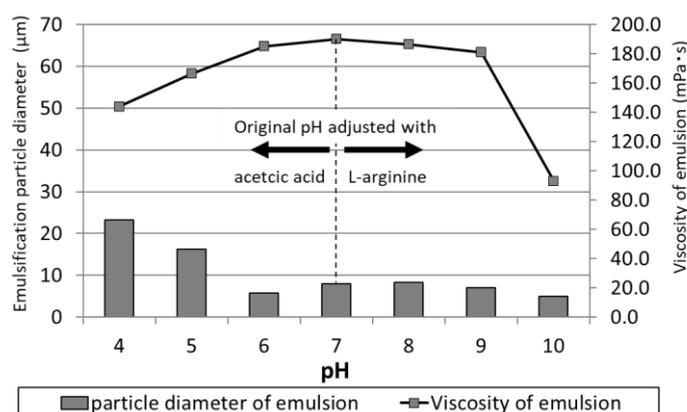


Figure 4-6. Effect of pH for sacran-polyol complex emulsion. Effects of pH on emulsification were determined by particle size and viscosity at 72 hours after preparation. The measurements of particle diameter and viscosity were carried out with methods described in materials and methods.

4-4. 考察

本検討では、サクランがポリオールの存在下で GS を形成すること、特に組み合わせるポリオールが 1, 2 位を水酸基置換されたジオールであると、サクランと優れた相互作用を示すことを見出した (Fig. 4-2)。また 1,3-BG を使用したサクラン GS は、サクランのみで調製した GS よりもカルセインの浸透と水分の蒸散を抑制した (Fig. 4-3、Table 4-2)。この結果からサクランとポリオールは相互作用することで複合体を形成すると考えられた。そしてサクラン-ポリオール複合体は油の極性に依存しない乳化能を持つことも示した (Fig. 4-

4, 5)。

これらの結果は、サクランとポリオールの複合体内に親水性ドメインと疎水性ドメインが存在していることを強く示唆し、疎水性ドメインの形成にはサクランの構成糖の持つ硫酸基およびカルボキシ基に対するポリオールの水酸基の水素結合の寄与が考えられた。

そこで、サクランとポリオールの混合体による乳化時の pH を変化させたところ、硫酸基およびカルボキシ基の解離が抑えられる酸性 pH 領域において、乳化滴が大きくなる乳化性の低下が確認された (Fig. 4-6)。また、サクラン-ポリオール複合体の乳化メカニズムを考察するため、他の多糖類の 0.2% の水溶液を調製し 10% の 1,2-ペンタンジオールを併用した乳化能について同様に検討した。硫酸基を持たないヒアルロン酸ナトリウムやアルギン酸についても 1,2-ペンタンジオールを添加することにより乳化能が確認された (データは示さない)。さらに硫酸基を持つフコイダンやカラギーナンについても乳化能は認められ、1,2-ペンタンジオールの添加により乳化の安定化が確認された (データは示さない)。1,2 位に水酸基を持つジオールと組み合わせることで、分子内にアニオン性官能基を有する多糖類では乳化能を發揮・安定化することが確認された。

これらの事実から、サクラン-ポリオール複合体内の疎水性ドメイン形成においてはサクランのアニオン性官能基とポリオール水酸基間の水素結合の寄与の可能性が非常に高く、Fig. 4-7 に示したようなサクラン-ポリオール複合体の乳化様式が考えられた。サクラン分子中に含まれるカルボキシ基を主としてポリオールの水酸基が水素結合することにより、ポリオールのアルキル鎖に由来する疎水性ドメインが形成され、その疎水性ドメイン内へ油滴を安定に保持することで乳化能を發揮している可能性が考えられた。

また、分子内の硫酸基は疎水性コンプレックスとは異なる機序で乳化を補助している可能性もあり、硫酸基の有無と分子量が、乳化物の安定性に寄与すると考えられた。さらに GS 形成におけるメカニズムも同様であると考えられる。油が存在しない場合、ポリオールのアルキル鎖は互いに疎水性相互作用によりラメラ構造のようになることでゲルシート構造の強

化、つまりバリア機能の強化をもたらす。

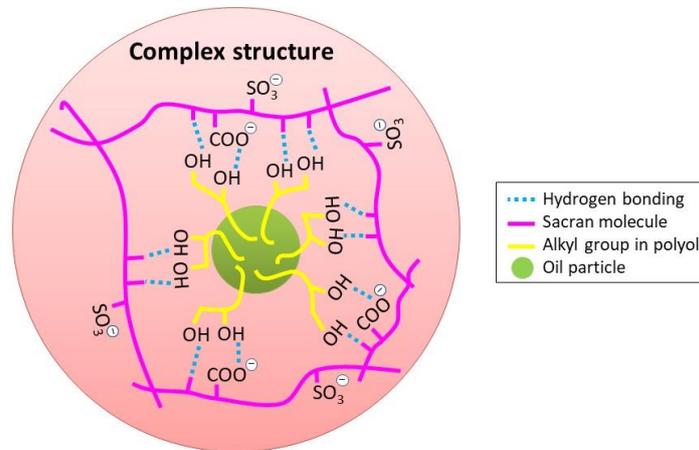


Figure 4-7. The expected mechanism of the emulsification using sacran-polyol complex aqueous solution

一方、このサクラン-ポリオール複合体による乳化は、活性剤なしに乳化物を調製できるものでもあった。一般的に、乳化に必要なラウリル硫酸ナトリウムなどの低分子界面活性剤はその乳化能に由来する両親媒性構造を持つことで、角層細胞間脂質のラメラ構造体に影響を及ぼし、皮膚一次刺激を惹起する可能性があることが知られている⁸⁸⁾。そして近年増加している大気汚染物質によって、皮膚感受性を増大してしまう可能性もある。様々な原因により皮膚バリア機能は損なわれてしまうが、さらに刺激してしまわないために界面活性剤を含まないスキンケア製品を使用することは良い治療法になる。つまりサクラン-ポリオール複合体を用いればより低分子界面活性剤を用いない乳化製剤の提供が可能であり、化粧品乳化製剤による刺激低減につながる可能性が大いに期待できる。また本実験ではポリオール類を2種類以上サクランと組み合わせたデータは載せていないが、1,3-BGと1,2-ペンタンジオール、グリセリンを混合して乳化物を調製した場合でも乳化能に影響がないことから、ポリオール類を混合してもサクラン-ポリオール複合体に影響しないことが考えられる。さらに1,2-オクタンジオールは、本研究で行った濃度領域(1~10%)以下で優れた乳化能を示すことが分かっている(データは示さない)など、サクラン-ポリオール複合体の基礎化粧品への配合の可能性が非常に高いことが示された。つまり本章では、サクラン

は増粘剤、保湿剤、被膜形成剤、乳化剤の4つの役割を果たし得る機能性素材であることを明らかにした。

第5章

総括

現代社会において、科学の発展は全く新しいものや技術を生み出し、人々の暮らしをより快適にしている。しかしながら、この技術の進歩が人の健康を害する原因となり得るケースもある。近年では、技術進歩の過程で生じた副生成物が種々の問題を発生させている。エネルギー発生時の燃焼に伴う CO₂ の増加が気温の上昇や気候の変化を、フロンガスによるオゾン層破壊が地上への放射紫外線量の増加を引き起こしている。また、工場廃棄物による大気汚染物質などが人々の平穏な暮らしを脅かしている。さらに、技術進歩により生成された物質が人体に対して悪影響を及ぼす刺激性化学物質となるケースも散見される。

これらの悪影響は、人体の最外層で生体保持を担い直接接触する皮膚において強く発現されることが予想される。具体例として、敏感肌やアトピー性皮膚炎（AD）を発症する人の数は世界中で増加している²³⁾。これらの症状の発症は、大きく環境が変化することに対する皮膚の順応性の低下、あるいはアレルゲンが増加することにより皮膚内部への侵入頻度が高くなることに由来しているものと考えられる。この要因のひとつとして皮膚バリア機能の低下が考えられる。事実、欧州および日本においても皮膚バリア機能に関連するフィラグリン遺伝子の機能不全が AD の発症素因となっていることが報告されている^{26,27)}。AD については 2000～2002 年度に実施された厚生労働科学研究による全国調査で、小学生以下の有病率が 10%以上であることが報告されており、成人でも増加の一途を辿っている⁸⁹⁾。AD などの皮膚疾患は、人の外観的印象に著しく影響を与え、掻痒を伴うことにより精神的にも苦痛が大きく QOL を損なう。これまでも医薬品や化粧品などさまざまな方法で皮膚バリア機能の改善が試みられてきているが十分ではなく、皮膚を健やかに保つための新たな方法を提案することが必要である。

これまでの研究結果から、サクランは外部刺激に対する皮膚応答性を緩和する作用を有

することが示唆されていた。また、サクランは保湿増粘効果や被膜形成能があり、化粧品に配合される高分子化合物に期待される乳化効果など、化粧品へ配合したときに有効な物理的・化学的特性を持つ可能性も示唆された。

そこで本研究は、スイゼンジノリ細胞外多糖体サクランの皮膚に対する効果をヒト使用試験、培養細胞を用いた研究において明らかにし、その物理化学的特性を検証することにより皮膚に対する作用メカニズムと化粧品製剤への応用の可能性を議論することを目的とした。さらに、本研究の成果は未だ全構造が解明されていないサクランの構造に対する情報提供にもつながり全構造解明の一助となることも期待される。

第 1 章では、サクラン-ポリオール複合体を用いた製剤のスキンケア効果（バリア機能改善効果）を検証するために、アトピー性皮膚炎罹患歴のある健常人に対して 0.04%のサクランと 15%のポリオール類を配合した保湿液の 1 か月間連用試験を行い、皮膚機能の改善に対する効果の評価を行った¹⁹⁾。その結果、皮膚表面水分量（SWC）および経皮水分蒸散量（TEWL）のそれぞれに対する有意な効果は確認されなかったが、SWC の値を TEWL の値で規格化した値（SWC/TEWL）では、サクラン保湿液の使用により有意な保湿機能の改善効果が確認された。SWC/TEWL 値は被験者の個人差を補正し、肌状態を反映する角層パラメーターと相関し、皮膚保湿機能を表現する有効なパラメーターであることが報告されている⁴³⁾。以上の結果から、サクラン保湿液は皮膚保湿機能を改善することが確認できた。またサクラン保湿液使用により角層成熟度を表す角層パラメーターの有意な改善が確認された。さらに、サクラン保湿液使用による炎症パラメーターである IL-1RA/IL-1 α や脂質過酸化の最終産物である角層カルボニルタンパク（CP）レベルの改善も確認された。乾燥性皮膚では角層 CP が高いレベルで存在すること⁴⁰⁾、また、再生表皮モデルの表皮表面を低湿度環境に曝露することにより表皮モデル内 CP の増加が確認されている⁹⁰⁾。この事実は、低湿度環境に曝された皮膚内部では高い活性酸素の産生を伴う酸化状態が亢進していることを示唆している。よって、サクラン保湿液の適用による CP の有意な低下は皮膚

保湿機能の改善により表皮内酸化ストレスが減少することに由来するものと考えられる。

以上の結果から、サクラン配合製剤には皮膚保湿機能を改善することにより角層細胞が成熟する環境を整えている可能性が示唆された。

これらの事実を総合すると、サクランは皮膚表面上の人工バリアとして働くだけでなく、生きた表皮細胞に浸透して皮膚の状態を改善すると考えられた。つまり、サクランが皮膚状態を維持または改善するために表皮内部でも何らかのバリアとして作用することが期待される。

そこで第 2 章では、サクランが皮膚に浸透するかどうか、また皮膚内部へ浸透したときの皮膚状態改善効果とそのメカニズムについて議論した²⁰⁾。サクランは成熟した角層(SC)では角層表面に留まり、未成熟な SC のみ浸透することが確認された。これは化粧品に汎用される代表的なアニオン性多糖類であるヒアルロン酸ナトリウム (HA) も同様の浸透挙動を示した。サクランおよび HA 共に、バリア機能の低下した未成熟な SC を浸透することにより、SC において機能することを示唆している。続いて代表的な陰イオン界面活性剤で皮膚刺激を引き起こすことで知られているラウリル硫酸ナトリウム (SLS)⁵⁰⁾ を用いて、これらの多糖類が SLS によって誘導される細胞傷害と酸化ストレスの緩和効果を検証した²⁰⁾。サクランは、HA と比較して細胞障害性や活性酸素種の生成を有意に抑制することが確認された。さらにこの作用は、HaCaT 細胞へサクランを前処理した場合は確認されず、サクランと SLS を混合して HaCaT 細胞に処理した場合においてのみ抑制効果が確認された。このことから、サクランは SLS をサクランの分子マトリックス内にトラップすることにより細胞保護作用を発揮している可能性が示唆された。一方、成熟した SC では内部に浸透せず表面に留まることも確認されたことから、皮膚表面において人工的なバリアとなることがより具体的に示唆された。したがって、サクランは大気汚染物質に対する保護効果も期待された。

第 3 章では、サクランのトラップ効果をより検証するため、最も身近な環境汚染物質の

ひとつであるタバコの煙に対して調製したサクラン被膜の保護作用について議論した²¹⁾。サクラン被膜は、タバコの煙に含まれる水溶性のアルデヒド化合物、および油溶性のベンゾピレンを被膜内にトラップすることが確認され、そのトラップ作用により HaCaT 細胞に対するタバコの煙による細胞傷害性や酸化ストレスを低減することを明らかにした。また、テープストリッピングした角層細胞のタバコの煙への曝露による CP レベルの上昇を指標としてさらにバリア効果を評価した。多糖類は、角層細胞への吸着を含めてその効果を確認するため、処理後に流水にて多糖類の除去を行った。曝露前に角層細胞へ行ったサクランの処理は CP レベルの上昇を抑制することが確認され、この作用は、HA よりもサクランの方が強い結果となった。これらの結果をまとめると、サクランは角層とより強く相互作用することで表面に留まりやすく、タバコの煙中の AC や BaP などの有害物質をトラップすることで皮膚への悪影響を低減するアンチポリューション効果をもつと考えられた。

第 4 章では、サクラン物理化学的性質の検証として、ポリオール類と組み合わせたときの被膜形成能と乳化能の評価を行った²²⁾。サクラン水溶液は乾燥させるだけで被膜を形成するが、この被膜形成過程に化粧品に汎用されるポリオール類を共存させることにより、水に対して難溶の含水性シート、「ゲル状シート (GS)」となることを確認した。さらに 1,3-BG を用いて調製した GS の物理化学的性質について皮膚保護作用の観点から評価した。GS は皮膚内部からの水分蒸散と皮膚外部からの化学物質の皮膚内部への侵入を抑制する作用が期待できることを明らかにした。本研究第 1 章のサクラン配合保湿液のスキンケア効果は、ポリオール類と組み合わせていることも有意な改善効果を得た一因であると考えられる。

このようにサクランとポリオールが共存すると水に難溶な GS を形成することから、サクランとポリオールの混合物は複合体を形成し、その複合体内に疎水性ドメインと親水性ドメインが存在する可能性があると考えられた。これは、サクラン-ポリオール複合体が乳化能も持つことを示唆した。そこでスクワランや様々な油を用いてサクランの乳化性能を検

証したところ、ポリオールが共存すると油の極性に左右されない安定な乳化性能を示すことが確認された²²⁾。これは、サクランとポリオールのみで乳化物を調製することができるという新たな知見であった。一般的に、乳化に必要な低分子界面活性剤は皮膚内部へ浸透し皮膚一次刺激を惹起する場合は報告されている⁵⁰⁾。サクランは、高分子化合物であることから皮膚内部への浸透性は低いことが考えられる。サクランとポリオールの混合物を用いることにより低分子界面活性剤を用いない乳化製剤の提供が可能であり、化粧品乳化製剤による刺激の低減につながる可能性が期待された。以上の結果は、サクランが増粘剤、保湿剤、被膜形成剤そして乳化剤の4つの役割を果たし得る機能性素材であることを明らかにした。

以上、本研究ではサクランの機能性素材としてのスキンケアへの配合の可能性をバリア機能改善効果と化学物質のトラップ効果、そしてポリオール類と組み合わせたときに発揮するユニークな被膜形成能と乳化能から検証し、ヒト皮膚保護効果とそのメカニズムを明らかにした。サクランは皮膚表面において被膜を形成し、SCと相互作用することで表面に留まり人工的なバリアとなる。このときポリオールが存在することによりその効果は強くなり、皮膚内部からの水分蒸散および環境からの色々な成分・因子の皮膚内部への侵入を抑えることができる。その結果、角層細胞の成熟を補助し表皮バリア機能を正常に発現できう

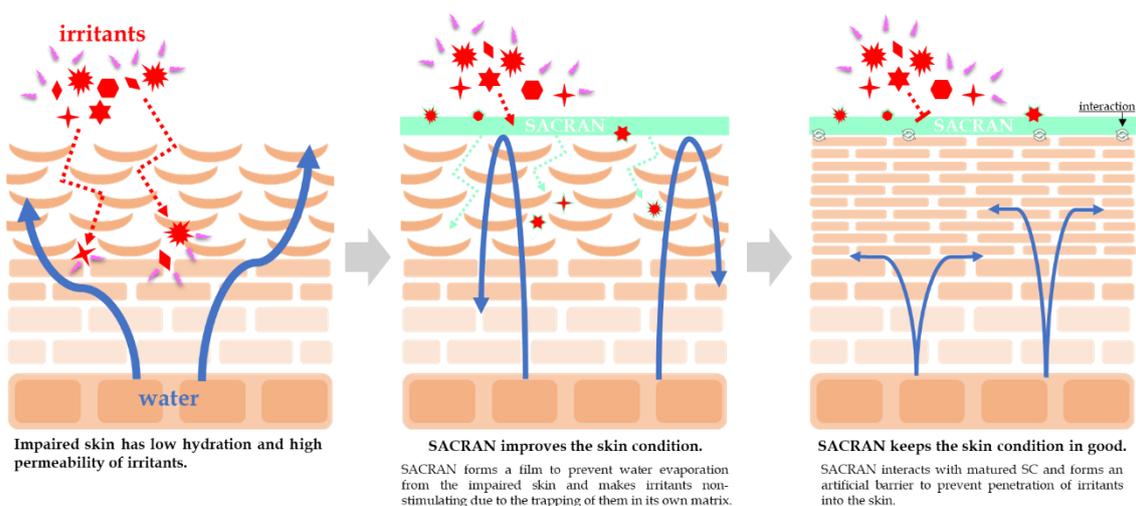


Figure 5-1. proposed scheme of sacran protects and improves the skin.

る状態を提供すると考えられた (Fig. 5-1)。またこの効果はこれまで保湿剤として汎用されてきた HA よりも高いことが確認された。この事実は、サクランを化粧品製剤へ配合することにより、これまで提供されていた化粧品よりも皮膚保護効果の高い化粧品を提供できることを示唆した。

本研究の成果は、皮膚恒常性をより良く維持するための新規な手段として、サクランという新しい素材を用いたスキンケアの効果を明らかにしたものであり、人々の生活に高い QOL を提供するものである。

参考文献

- 1) Proksch E., Brandner JM., Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* **17**: 1063-1072 (2008).
- 2) Choi MJ., Maibach HI. Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *Am. J. Clin. Dermatol.* **6**: 215-223 (2005).
- 3) Fluhr J.W., Kao J., Jain M., Ahn S.K., Feingold K.R., Elias P.M. Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J. Invest. Dermatol.* **117**: 44-51 (2001).
- 4) Odland GF., Holbrook K. The lamellar granules of epidermis. *Curr Probl Dermatol.* **9**: 29-49 (1981)
- 5) Hatta I., Ohta N., Inoue K., Yagi N. Coexistence of two domains in intercellular lipid matrix of stratum corneum. *Biochim Biophys Acta.* **1758**: 1830-1836 (2006).
- 6) Eckert RL., Yaffe MB., Crish JF., Murthy S., Rorke EA., Welter JF. Involcrin-structure and role in envelope assembly. *J Invest Dermatol.* **100**: 613-617 (1993).
- 7) Niessen CM. Tight junction/ adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* **127**: 2525-2532 (2007).
- 8) Lai Y., Cogen AL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* **30**: 131-141 (2009).
- 9) Wohlrab J., Gebert A., Neubert RHH. Lipids in the Skin and pH. *Curr Probl Dermatol.* **54**: 64-70 (2018).
- 10) Proksch E. pH in nature, humans and skin. *J Dermatol.* **45(9)**:1044-1052 (2018).
- 11) 椛田聖孝、金子達雄、新発見「サクラン」と伝統のスイゼンジノリ、ハート出版、ISBN 978-4-89295-802-1 C2177 (2009)

- 12) Okajima MK., Ono M., Kabata K., Kaneko T. Extraction of novel sulfated polysaccharides from *Aphanothece sacrum* (Sur.) Okada, and its spectroscopic characterization. *Pure Appl. Chem.* **79(11)**: 2039-2046 (2007).
- 13) Okajima MK., Bamba T., Kaneso Y., Hirata K., Fukusaki E., Kajiyama S., Kaneko T. Supergiant ampholytic sugar chains with imbalanced charge ratio form saline ultra-absorbent hydrogels. *Macromolecules*, **41**: 4061-4064 (2008).
- 14) Okajima MK., Kaneko D., Mitsumata T., Kaneko T., Watanabe J. Cyanobacteria that produce megamolecules with efficient self-orientations. *Macromolecules*, **42**: 3057-3062 (2009).
- 15) Okajima MK., Miyazato S., Kaneko T. Cyanobacterial megamolecule sacran efficiently forms LC gels with very heavy metal ions. *Langmuir*, **25**: 8526-8531 (2009).
- 16) Motoyama K, Tanida Y, Hata K, Hayashi T, Higashi T, Ishitsuka Y, Kondo Y, Irie T, Kaneko S, Arima H. Potential use of a megamolecular polysaccharide Sacran as a hydrogel-based sustained release system. *Biol. Pharm. Bull.* **62(7)**: 636-641 (2014).
- 17) Fukushima, S.; Motoyama, K., *et al.* *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications 2016*, **6**, 9-18
- 18) Ngatu NR, Hirota R, Okajima MK, Kaneko T, Malonga KF, Suganuma N. Sacran, a natural skin barrier enhancer, improves atopic and contact eczema: Case report. *Annals of Phytomedicine* **4(1)**: 111-113 (2015).
- 19) Doi M, Sagawa Y, Momose S., Tanaka T., Mizutani T., Okano Y., Masaki H. Topical treatment with sacran, a sulfated polysaccharide from *Aphanothece sacrum*, improves corneocyte-derived parameters. *J Dermatol* 2017; **44(12)**: 1360-1367.

- 20) Doi M., Sagawa Y., Tanaka T., Mizutani T., Okano Y., Masaki H. Defensive effects of a unique polysaccharide, Sacran, to protect keratinocytes against extracellular stimuli and its possible mechanism of action. *Biol. Pharm. Bull.* **41**, 1554-1560 (2018).
- 21) Doi M., Sagawa Y., Sasano K., Tanaka T., Mizutani T., Okano Y., Masaki H. Protective effects of sacran, a natural polysaccharide, against adverse effects on the skin induced by tobacco smoke. *SCC*.
- 22) Doi M, Sagawa Y, Mizutani T., Okano Y., Momose S., Tanaka T., Masaki H. Possibilities of sacran-polyol complexes in the skin care - Evaluations of chemical and physical aspects -. *J Soc Cosmet Chem Jpn* 2017; **51(2)**: 117-125.
- 23) Berardesca E, Farage M, Maibach H. Sensitive skin: an overview. *Int J Cosmet Sci* 2013 Feb; **35** (1): 2–8.
- 24) Boguniewicz M, Donald YM. Atopic dermatitis: A disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev* 2011; **242** (1): 233–246.
- 25) Imokawa G, Ishida K. Role of ceramide in the barrier function of the stratum corneum, implications for the pathogenesis of atopic dermatitis. *J Clin Exp Dermatol Res* 2014; **5**: 206.
- 26) Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2006; **38**: 441–446.
- 27) Howell MD, Kim BE, Gao P et al. Cytokine modulation of AD filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol* 2007; **120** (1): 150–155.
- 28) Choi H.K., Cho Y.H., Lee E.O., Kim J.W., Park C.S. Phytosphingosine enhances moisture level in human skin barrier through stimulation of the filaggrin biosynthesis and degradation leading to NMF formation. *Arch. Dermatol. Res.*, **309**, 795-803 (2017)

- 29) Hoath S.B., Leahy D.G. The Organization of Human Epidermis: Functional Epidermal Units and Phi Proportionality. *J. Invest. Dermatol.*, **121**, 1440–1446 (2003).
- 30) Caubet C., Jonca N., Brattsand M., Guerrin M., Bernard D., Schmidt R., Egelrud T., Simon M., Serre G. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 1235-1244 (2004).
- 31) Horikoshi T., Igarashi S., Uchiwa H., Brysk H., Brysk M.M. Epidermal Lamellar Granules Transport Different Cargoes as Distinct Aggregates. *Br. J. Dermatol.* **141**, 453-459 (1999).
- 32) Hirao T. Involvement of transglutaminase in ex vivo maturation of cornified envelopes in the stratum corneum. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **25**, 245-257 (2003).
- 33) Hashimoto Y., Suga Y., Matsuba S., Mizoguchi M., Takamori K., Seitz J., Ogawa H. Sulfhydryl oxidase (SO_X) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. *Arch. Dermatol. Res.*, **292**, 570-572 (2000).
- 34) Hirao T., Aoki H., Yoshida T., Sato Y., Kamoda H. Elevation of interleukin 1 receptor antagonist in the stratum corneum of sun-exposed and ultraviolet B-irradiated human skin. *J. Invest. Dermatol.*, **106**, 1102-1107 (1996).
- 35) Terui T., Hirao T., Sato Y., Uesugi T., Honda M., Iguchi M., Matsumura N., Kudoh K., Aiba S., Tagami H. An increased ratio of interleukin-1 receptor antagonist to interleukin-1 α in inflammatory skin diseases. *Exp. Dermatol.*, **7**, 327-334 (1998).
- 36) Fujita H., Hirao T., Takahashi M. A simple and non-invasive visualization for assessment of carbonylated protein in the stratum corneum. *Skin Res. Technol.*, **13**, 84-90 (2007).
- 37) Hiriya T, Hirao T, Yokoyama T, Ichikawa H. A study on IL-1 receptor antagonist/IL-1 α

- ratio in the stratum corneum of the so-called sensitive skin. *Skin Research* 2001; **43**: 10–18.
- 38) Terui T, Hirao T, Sato Y et al. An increased ratio interleukin-1 receptor antagonist to interleukin-1 α in inflammatory skin diseases. *Exp Dermatol* 1998; **7**: 327–334.
- 39) Kikuchi K, Kobayashi H, Hirao T, Ito A, Takahashi H, Tagami H. Improvement of mild inflammatory changes of the facial skin induced by winter environment with daily applications of a moisturizing cream. A half-side test of biophysical skin parameters, cytokine expression pattern and the formation of cornified envelope. *Dermatology* 2003; **207**: 269–275.
- 40) Kobayashi Y, Iwai I, Akutsu N, Hirao T. Increased carbonyl protein levels in the stratum corneum of the face during winter. *Int J Cosmet Sci* 2008; **30**: 35–40.
- 41) Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* 2008; **153**: 6–20.
- 42) Ngatu NR.; Okajima MK., Yokogawa M. et al. Anti-inflammatory effects of sacran, a novel polysaccharide from *Aphanothece sacrum*, on 2,4,6-trinitrochlorobenzene-induced allergic dermatitis in vivo. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **108**, 117-122 (2012). Kawakami, K. Ihara, T. Salt tolerance of an aqueous solution of a novel amphiphilic polysaccharide derivative. *Langmuir*, **22**, 3337-3343 (2006).
- 43) Masaki H., Yamashita Y., Kyotani D., Honda T., Takano K., Tamura T., Mizutani T., Okano Y., *J. Cosmet. Dermatol.*, doi: 10.1111/jocd.12502 (2018).
- 44) Hoath SB, Leahy DG. The organization of human epidermis: Functional epidermal units and phi proportionality. *J Invest Dermatol* 2003; **121**: 1440–1446.
- 45) Kikuchi K, Tagami H, Akaraphanth R, Aiba S. Functional analysis of the skin surface of

- the areola mammae: comparison between healthy adult male and female subjects and between healthy individuals and patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2011; **164** (1): 97–102.
- 46) Hashimoto Y, Suga Y, Matsuba S, Mizoguchi M, Takamori K, Seitz J, Ogawa H. Immunohistochemical localization of sulfhydryl oxidase correlates with disulfide crosslinking in the upper epidermis of rat skin. *Arch Dermatol Res* 2000; **292**(11): 570–572.
- 47) Matoltsy AG. Keratinization. *J Invest Dermatol* 1976; **67**(1): 20–25.
- 48) Jensen JM, Fölster-Holst R, Baranowsky A et al. Impaired sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *JAAD* 2004; **122**: 1423–1431.
- 49) Iwai I, Shimadzu K, Kabayashi Y, Hirao T, Etou T. Increased carbonyl protein level in the stratum corneum of inflammatory skin disorders: A non-invasive approach. *J Dermatol* 2010; **37**: 693–698.
- 50) Trommer H, Neubert RHH. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; **19**: 106-121.
- 51) Ponc M, Kempenaar J. Use of human skin recombinants as an in vitro model for testing the irritation potential of cutaneous irritants. *Skin Pharmacol* 1995; **8**(1-2): 49-59.
- 52) Fartasch M, Schnets E, Diepgen TL. Characterization of detergent-induced barrier alterations - effect of barrier cream on irritation. *J Invest Dermatol* 1998; **3**(2): 121-127.
- 53) Boxman IL, Ruwhof C, Boerman OC, Lowik CW, Ponc M. Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. *Arch Dermatol Res.* 1996; **288**(7): 391-398.
- 54) Mizutani T, Mori R, Hirayama M et al. Sodium lauryl sulfate stimulates the generation of reactive oxygen species through interactions with cell membranes. *J Oleo Sci* 2016; **65**:

- 993–1001.
- 55) Kamide R, Misery L, Perez-Cullell N, Sibaud V, Taïeb C. Sensitive skin evaluation in the Japanese population. *J Dermatol* 2013; **40(3)**: 177-181.
- 56) Renée JH, Richters DF, Natallia E. Uzunbajakava et al. Sensitive skin: assessment of the skin barrier using confocal Raman microspectroscopy. *Skin Pharmacol Physiol* 2017; **30(1)**: 1–12.
- 57) Hubbell WL, McConnell HM. Molecular motion in spin labeled phospholipids and membranes. *J Am Chem Soc* 1971; **93**: 314-326.
- 58) Kitagawa S, Kametani F, Tsuchiya K, Sakurai H. ESR analysis with long-chain alkyl spin labels in bovine blood platelets. Relationship between the increase in membrane fluidity by alcohols and phenolic compounds and their inhibitory effects on aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1027**: 123-129.
- 59) Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965; **13**: 238–252.
- 60) Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells* 2011; **32**: 491-509.
- 61) Mizutani T, Sumida H, Sagawa Y, Okano Y, Masaki H. Carbonylated proteins exposed to UVA and to blue light generate reactive oxygen species through a type I photosensitizing reaction. *J Dermatol Sci* 2016; **84**: 314–321.
- 62) Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; ID **360438**: 31 pages.
- 63) Thongngam M, McClements DJ. Characterization of interactions between chitosan and an anionic surfactant. *J Agric Food Chem.* 2004; **52(4)**: 987-991.

- 64) World Health Organization Publication. Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease (2016).
<http://www.who.int/iris/bitstream/10665/250141/1/9789241511353-eng.pdf?ua=1>
- 65) Adelman, R., Saul, R.L. and Ames, B.N. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 2706–2708 (1988).
- 66) Karten, B., Beisiegel, U., Gercken, G. and Konstusk, A. Mechanism of lipid peroxidation in human blood plasma (a kinetic approach). *Chem. Phys. Lipid*, **88**: 83–96 (1988).
- 67) Stadtman, E.R. Protein oxidation and aging. *Science* **257**: 1220–1224 (1992).
- 68) Gaboran, F., Moliere, P., Maquis, I., Moysa, A., Geze, M. and Dubertret, L. Membrane damage induced in cultured human skin fibroblasts by UVA irradiation. *Photochem. Photobiol.* **58**: 515–520 (1993).
- 69) Menzel, D.B. The toxicity of air pollution in experimental animals and humans: the role of oxidative stress. *Toxicol. Lett.* **72**: 269–277 (1994).
- 70) Ames, B.N., Gold, L.S. and Willett, W.C. The cause and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 5258–5265 (1995).
- 71) Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**: 44–84 (2006).
- 72) Kampa, M. and Castanas, E. Human health effects of air pollution. *Environ. Pollut.* **151**: 362–367 (2008).
- 73) Lodovici, M. and Bigagli, E. Oxidative stress and air pollution exposure. *J. Toxicol.* **2011**: ID 487074 (2011).
- 74) Kohen, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - new approaches for their evaluation. *Biomed. Pharmacother.* **53**: 181–192 (1999).

- 75) Baudouin, C., Charveron, M., Tarroux, R. and Gall, Y. Environmental pollutants and skin cancer. *Cell Biol. Toxicol.* **18(5)**: 341–348 (2002).
- 76) Denison, M.S., Soshilov, A.A., He, G., DeGroot, D.E. and Zhao, B. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicol. Sci.* **124(1)**: 1–22 (2011).
- 77) Ikuta, T., Namiki, T., Fujii-Kuriyama, Y. and Kawajiri, K. AhR protein trafficking and function in the skin. *Biochem. Pharmacol.* **77(4)**:588–596 (2009).
- 78) Furue, M., Takahara, M., Nakahara, T. and Uchi, H. Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch. Dermatol. Res.* **306**: 769-770 (2014).
- 79) Yang G., Ibuki Y. Cigarette sidestream smoke delays nucleotide excision repair: inhibited accumulation of repair proteins at DNA lesions. *Carcinogenesis.* **39(1)**: 56-65 (2018).
- 80) Rajagopalan P., Nanjappa V., Raja R., Jain AP., *et al.* How does chronic cigarette smoke exposure affect human skin? A global proteomics study in primary human keratinocytes. *OMICS.* **20(11)**: 615-626 (2016).
- 81) Laitinen J, Koponen H, Sippula O, Peak exposures to main components of ash and gaseous diesel exhausts in closed and open ash loading stations at biomass-fuelled power plants. *Chemosphere.* **185**:183-191 (2017).
- 82) 厚生労働省、平成11 – 12年度 たばこ煙の成分分析について（概要）
<https://www.mhlw.go.jp/topics/tobacco/houkoku/seibun.html>
- 83) 環境省委託業務結果報告書 平成12年度自動車排出ガス実測調査 – アルコール系燃料の排出ガス実態調査 – <https://www.env.go.jp/air/report/h12-01/h12-01.pdf>
- 84) Kim, E.K, Cho, D. and Park, J.H. Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. *Life Sci.* **152**: 126-134 (2016).

- 85) Kawakami, K. Ihara, T. Salt tolerance of an aqueous solution of a novel amphiphilic polysaccharide derivative. *Langmuir*, **22**, 3337-3343 (2006).
- 86) Akiyama, E. Yamamoto, T. Thickening properties and emulsification mechanisms of new derivatives of polysaccharide in aqueous solution 2. The effect of the substitution ratio of hydrophobic/hydrophilic moieties. *Journal of Colloid and Interface Science*. **311**. 438-446(2007).
- 87) Coqueutte, A., Berna, N., Vandenbosh, A., Rosdy, M., De Wever, B., Poumay, Y. Analysis of interleukin-1 alpha (IL-1alpha) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. *Toxicol. In Vitro*. **17**, 311-321 (2003)
- 88) Trommer H, Neubert RHH. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. *Skin Pharmacol Physiol*2006; **19**: 106-121.
- 89) 厚生労働省 アトピー性皮膚炎（小児）疫学調査の結果にもとづくわが国での発症・悪化因子の検討
<https://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/kenkou/ryumachi/dl/jouhou01-04.pdf>
- 90) Yokota M, Shimizu K, Kyotani D, Yahagi S, Hashimoto S, Masaki H. The possible involvement of skin dryness on alterations of the dermal matrix. *Exp Dermatol*. **23(1)**: 27-31 (2014).

謝辞

本研究の実施、また論文の作成にあたり終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました東京工科大学 応用生物学部 光老化研究室 正木仁教授に深謝申し上げます。また全ての実験に携わり、執筆にあたっても多大なるご協力を頂きました東京工科大学 光老化研究室の卒業生である佐川由葵様に厚く御礼申し上げます。第 3 章の実験に携わり、東京工科大学で実験を実施するにあたり様々のご協力を頂き、色々のご相談させて頂きました東京工科大学 光老化研究室の院生である笹野恭平様に心より御礼申し上げます。

東京工科大学における研究の機会を与えてくださいました脇祥哲代表取締役、田中巧常務取締役、長谷昇研究開発部統括を始め、大東化成工業株式会社に深く感謝いたします。また数々のご助言を賜りました各論文共著者の皆様、そして同じく社会人博士を志し沢山の刺激を頂いた皆様に御礼申し上げます。

最後に、大東化成工業株式会社顧問でいらっしゃった百瀬重禎様（故人）には、本研究を始め学位取得申請に至るきっかけと熱意を、また実験に関するさまざまなお助言と御指導を賜りました。この場を借りて心より感謝申し上げます。