

毛包器官培養法を用いた育毛促進作用を持つ天然成分の探索

秋田大学大学院医学系研究科分子機能学・代謝機能学講座

杉山 俊博

The *Glechoma hederacea* subsp. *grandis* (*G. grandis*) is used as a herbal medicine and is supposed that the extract at the time of the bloom shade-drying is effective against a child's convulsion. Moreover, it may be considered as reduction of blood sugar level. In this study, the clinical test of the hair growth facilitatory effect of the *G. grandis* extract in people during one to three years was found remarkable improvement and a little improvement by evaluation at 95% (41 persons among 43 persons). In a mouse, the sex difference was seen. With the mouse, the tendency for hair growth was promoted compared with a control (physiological saline). Furthermore, we used the hair follicle organ culture system for the hair growth promoting substance from *G. grandis* extract. As a result, *G. grandis* in the growth phase after the bloom was remarkable growth effect, and found out having the remarkable hair growth effect in a fraction of aqueous phase from the extract especially. This aims at the establishment of the hair regenerative technology which utilizes the natural plant, *G. grandis*. It is possible to apply to the baldness and the alopecia caused by various causes, and the depilation prevention action, trichogenous, and the hair restoration action improve synergistic and it is effective as the external application medicine for the head with high safety compared with the scalp.

1. 緒言

カキドオシとは、シソ科カキドオシ属の植物であって、別名カントリソウ、生薬名連銭草とも呼ばれている。本研究の原料となるカキドオシは古くから生薬・薬草として利用され、開花時に採取したものを日陰干しにして、それを煎じて飲むことで生薬・薬草の効果をj得ていた。本研究は、ツルの成長が著しくなる開花後の成長期にあたるカキドオシを原料とするエキスから著しい発毛効果を持つことを見出した。

発毛等を促進する頭髪用剤としては、各種のものが知られている。国内での育毛剤・発毛剤の状況は次のようにまとめられる。

- 1) 花王・ポーラ・資生堂・住友電工などでは毛をつくる細胞を直接刺激する物質を使う新タイプの育毛剤の開発をねらっている。エピモルフィン・FGF-5S・DHA・IL-1・TGF- β ・ β カテニンやリポ酸などが知られている。
- 2) 武田薬品と藤沢薬品は、加齢による肥満・脱毛・性的不全向けの生活改善薬を共同開発している。市場規模1千億円といわれる第二の「バイアグラ」「リアップ」をねらったものである。
- 3) 協和発酵はリングに含まれるポリフェノールの一種「プロアントシアニジン」は毛母細胞を増殖させて活性化す

る働きを持つことを発見した。

- 4) 育毛剤として、循環改善剤(ミノキシジル)・飲むタイプ育毛剤「プロペシア(フィナステリド)」ホルモン・DHA、IL-1・ハーブエキスなど合成化合物から天然抽出物まで種々である。大手3社が国内出荷総額350億円の3分の2以上を占めている。

本研究では、天然由来のカキドオシから得られたカキドオシ・エキスが非常に優れた発毛作用があることが判明した。本研究は、ツルの成長が著しくなる開花後の成長期にあたるカキドオシを原料とするエキスから有機相と水相に分画し、なかでも水相画分の分子量3 kDa未満に著しい発毛効果を持つことを見出した。

2. 実験

2.1 カキドオシ・エキスの製法

自宅で栽培しているカキドオシを開花後の成長期に、その茎葉を刈り取り、軽く水洗いし、包丁等で約5cmの長さに切り揃え、その切断したカキドオシの茎葉の約300gを市販のジューサーミキサーに入れ、そこに30mlの蒸留水を加えてカキドオシの形が見分けられなくなり、どろどろした液状になるまでカキドオシの粉碎及びカキドオシ・エキスの抽出を行う。その後、どろどろした液体からカキドオシ・エキスをガーゼ4枚でピーカーに濾し取る。最後に、遠心機を用い8,600×gで30分間の遠心分離を行った。遠心分離後の上清を天然成分のカキドオシ・エキスとして使用に供した。

2.2 カキドオシ・エキス成分の分離調整法

脂溶性成分は、カキドオシ・エキスを、水飽和酢酸エチルで2回抽出し、抽出した酢酸エチル相を減圧下で除去し、



Search of a natural substance with the hair growth using a hair follicle organ culture Department of Biochemistry-Metabolic Science

Toshihiro Sugiyama

Akita University Graduate School of Medicine

得られた固体を、少量のメタノール、エタノールで溶解した。さらに水を加えて、抽出に使用したカキドオシ・エキスと同量に調整した。

水溶性成分は、水飽和酢酸エチル抽出後の水相画分を凍結乾燥させて水を除き、もう一度カキドオシ・エキスと同量の水に溶解させた。

2.3 ヒトにおけるカキドオシ・エキスの発毛促進効果の臨床試験

ヒト頭髪塗布治験については、「秋田大学研究倫理規定」に基づいた申請をし、許可を得て行った。被験者はボランティア43名で行った。

実施方法：脱毛症に悩む被験者に、カキドオシ・エキスを朝、晩のいずれか一日1回、頭頂部の脱毛部をお湯に浸したタオルで軽くふき取った後にカキドオシ・エキスを軽く地肌にしり込むようにして塗布した。1ヶ月につき約1瓶(150ml)を使用した。そして、1ヶ月ごとに発毛状態を経過観察した。この試験は平成16年3月から平成19年2月にかけて行い、それぞれの被験者の実施期間は約1～2年間であった。

発毛の有用性を判定するために検査項目として①「自覚症状」、②「他覚症状」、および③「頭髪撮影」を行った。治験終了後、効果についてアンケートを実施した。

2.4 毛包器官培養系での発毛促進効果試験

2.4.1 マウス頬髭毛包の採取

C3H/HeNマウスの頬部分の皮膚を切り取り、頬髭の根元から上部を切り除き、皮膚の裏側から毛包を周囲の組織

を付着させたまま切り離し採取する。図1に毛包器官培養の実例を示す。

2.4.2 毛包の器官培養

6well plateにMillicell-HA培養プレートインサートをセットし、メンブレンを下面から2mlの培地で湿潤させた。PBSに浸した毛包を、各群髭毛包20本を無作為に選び、ピンセットを用いてメンブレン上に移した。乾燥を避けるため、毛包組織が薄い液体皮膜で被われている事を確認し、37°C、5%CO₂インキュベータ内で培養した。培養開始後、定期的に実体顕微鏡で写真を撮影した。それぞれの頬髭伸長度に対する伸長本数の割合を示した。

3. 結果

3.1 ヒトにおけるカキドオシ・エキスの発毛促進効果の臨床試験

アンケートの結果を図2に示した。被験者の約3分の2の被験者が「塗布前に比較して髪の毛が太くなった。抜け毛が少なくなった。」という実感をもった(図2)。全員が何らかの効果が見られ、そのうち2人は1年間の使用で約40%回復した。安全性上の問題は全く見られなかった。

3.2 毛包器官培養系でのカキドオシ・エキスの発毛促進効果試験

3.2.1 カキドオシの収穫時期の違いによる毛包伸長度
髭が1.0mm以上伸長した毛包の数は成長期のカキドオシ・エキスの方は13本に対して開花期のそれは5本で、2.6倍多くなった。この結果、開花期よりは成長期のカキ

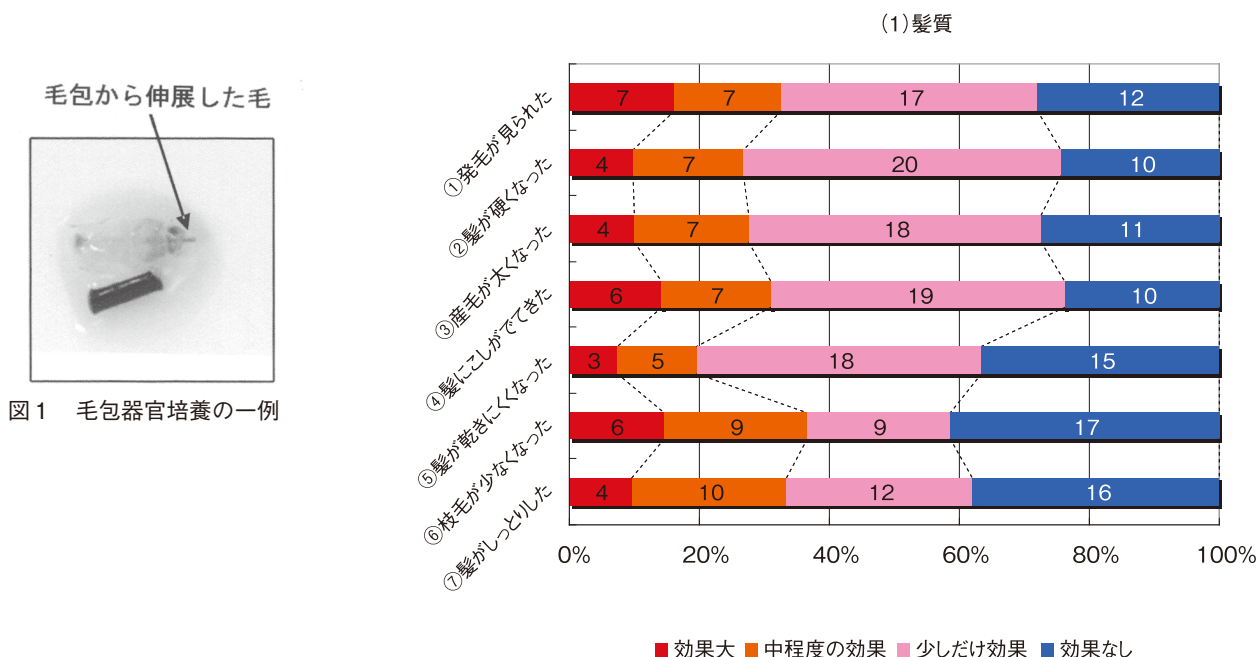


図2 ヒトでのカキドオシ・エキス塗布による髪質の変化

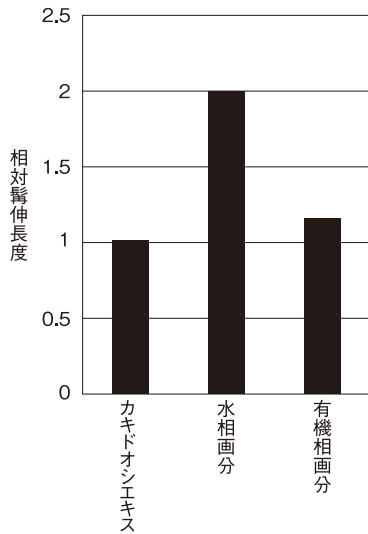


図3 有機相画分と水相画分におけるマウス発毛効果

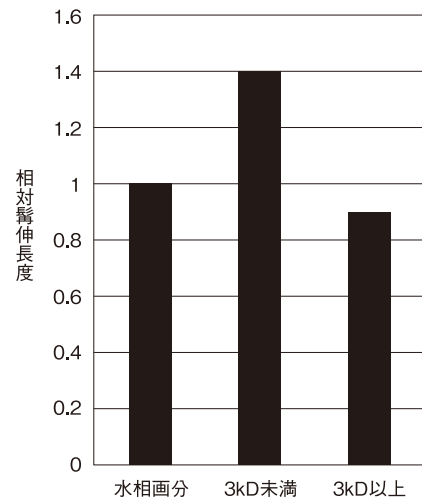


図4 水相画分における有効成分の分子量検定

ドオシ・エキスの方が強い発毛効果があることが分かった。

3.2.2 有機相画分と水相画分における発毛効果

髭が1.0mm以上伸長した毛包の数は有機相画分6本(14%)に対して、水相画分10本(25%)であった。水相画分は、カキドオシ・エキス又は有機相画分に対して約2倍の伸長効果が観察された。この結果、発毛促進成分は水相画分に多く存在することが判明した。髭を1mm以上伸長させる効果については、カキドオシ・エキスを1とした時、水溶性成分は2倍の効果があつた(図3)。

3.2.3 水相画分における有効成分の分子量検定

先に見いだした水相画分をさらに限外濾過法により有効成分を分析した。スピンカラムにより分子量3kDa以上と3kDa未満の2画分を得た。マウス頬髯器官培養法を用いて、分子量3kDa以上と3kDa未満の2画分の毛包伸長度を測定した。髭が1.0mm以上伸長した毛包の数は分子量3kDa未満の画分では14本に対して分子量3kDa以上の画分のそれは9本で、1.6倍多くなった。この結果、発毛促進成分は分子量3kDa未満の水溶性画分に多く存在することが判明した(図4)。

さらに、水抽出かつ3kDa以上の分子量のカキドオシ成分はカキドオシ・エキスに対して0.9倍に減少していたが、3kDa以下のカキドオシ成分には1.4倍の効果があつた。カキドオシの3kDa以上の画分には、髭伸長作用を抑制することから有害な副作用成分が含まれている可能性がある。従来知られている発毛効果のある化合物は、非極性のものが多く、カキドオシの有効成分は異なる物質である可能性がある。

4. 考察

有効成分に関する研究に関して、メタノールにて溶出される分画をさらにシリカゲルクロマトグラフィー、HPLCにて精製した発表^{1,2)}や、カキドオシ(連銭草)全草から水製エキス、メタノールエキス及びカキドオシ全草メタノールエキスから抽出成分を分析し新規な配糖体を同定した^{3,4)}発表があつた。いずれの報告も最初の抽出にメタノールを使用していることから、本研究の水相からの3kDaの有効成分とは明らかに異なる。また、これらの発表は、糖尿病に有効な成分であり、育毛効果については記載がない。さらに、連銭草はカキドオシの花期の全草を乾燥したもので、成長期の生のカキドオシとは全く異なるものである。本研究では、開花した後に落花し、ツルが伸びて繁茂し始めるときから葉が枯れ始める成長期に育毛効果が最も高いことを明らかにし、特許を取得した⁵⁾。

カキドオシによるメラニン合成抑制効果について著者らは、カキドオシ・エキスおよび分子量3kDa画分にはメラノーマのメラニン合成を阻害することを明らかにし、特許出願と論文発表を行った^{6,7)}。すなわち、メラニン合成量はカキドオシ・エキスの濃度依存的に細胞内で抑制された。カキドオシはビチリゴマウスの白髪防止効果(メラニン量の増加)があると主張する文献⁸⁾の内容とは反対の結果となった。

カキドオシの作用因子に関する研究はこれまで多数報告されている。カキドオシの効能に関する研究は、23種の植物について、それぞれ、毛包内で発現が知られている増殖因子に対する個別の影響を検討した結果、白髪予防改善剤に含有される植物成分の中の1つにカキドオシが述べられている⁸⁾。カキドオシの抽出物(エキスに該当)が毛乳

頭の増殖因子の発現を増加させる作用を奏することが記載されている。23種の植物について、それぞれ、毛包内で発現が知られている増殖因子に対する個別の影響が検討されている。解析に供した23種の植物のうち、カキドオシに着目すると、SCF (Stem cell factor) にのみ影響し、その他の因子には影響していない。23種の植物が列挙されている中の1つとして、カキドオシが記載されているにすぎず、さらに、in vitroでの解析の対象となっている増殖因子のうち、SCFのみに影響していることが示されているだけである。

毛乳頭が、上皮細胞との相互作用により、発毛を促進させることが文献9-10に記載されている。ほ乳類の皮膚においては、毛囊の上皮系の細胞群が毛乳頭との相互作用を介して増殖、分化し最終的に毛を形成する¹⁰⁾。また、休止期の毛包における毛芽を、毛乳頭との相互作用による活発な分裂増殖により毛母細胞に分化させ、新しい毛髪を生む段階に至らせる作用が認められることになる¹¹⁾と記載しているが、実験例では当該薬剤をマウスに塗布して皮膚の黒化により発毛効果を観察したもので、決して細胞培養系で細胞間の相互作用を証明したものではない。これはあくまで仮説であって科学的に証明されたものではない。毛根由来細胞にカツラの抽出物を添加して毛根由来細胞の増殖を促進したという結果に過ぎず、決して発毛形成を証明していない。

著者らは、カキドオシから得たエキスが、優れた発毛効果を有することを初めて見出した。さらに、カキドオシの抽出物が、有機溶媒により分離後水相画分に含まれる分子量3 kDa未満の抽出物であることを明らかにした。

これまでの知見から毛幹細胞は単独では毛髪形成を行うことが出来ず、真皮系細胞である毛乳頭細胞と協調的に働くことで毛髪の発生・再生を行う事が明らかとなっている。我々は、毛髪再生のためには毛幹細胞分離培養技術の確立と同時に、毛髪誘導活性を持った毛乳頭細胞株の樹立が重要であると考え、同細胞株の樹立を行ってきた(平成11～12年度中小企業創造基盤技術研究事業)。その成果として、毛包細胞に対する特異的モノクローナル抗体の作製に成功した¹²⁾。また、毛組織には毛幹細胞が存在することを証明した¹³⁾。

毛髪の発生・成長・再生をコントロールしている因子については長い間不明であったが、ニワトリの羽毛形成過程や遺伝子改変マウスの解析から、Shh・Wnt・骨形成因子 (bone morphogenetic protein ; BMP) ・上皮増殖因子 (epidermal growth factor ; EGF)、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor ; FGF) など多くの細胞成長因子群が関与することが明らかとなってきた¹⁴⁾。これらの因子を介した表皮と間充織の相互作用が毛髪の発生や毛周期の進行を制御していると考えられる。カキドオシ・エ

キスの3 kDaの分子量を持つ有効成分がこれらのシグナル伝達系のいずれかの部位に關与している可能性は高い。一方、これらの因子を用いた毛髪再生の試みも報告されてきた^{15,16)}。今後は毛幹細胞・毛乳頭細胞、細胞成長因子などを組み合わせた毛髪再生医工学の発展が期待される。

5. 総括

成長期のカキドオシの葉、茎、根から得たエキスが、優れた発毛効果を有することを初めて見出した。人におけるカキドオシ・エキスの発毛促進効果の臨床試験において、1～3年間に以内に顕著改善～やや改善が95% (35人中33人)、つまり外観での評価に改善が見られた。さらに、ネズミ髭の毛包の器官培養系を用いてカキドオシの発毛促進効果について、カキドオシの抽出物が、有機溶媒により分離後の水相画分に含まれる分子量3 kDa未満の抽出物であることを明らかにした。以上示した通り、本研究のカキドオシ・エキスを含有する発毛剤は、このように、極めて優れた発毛効果を示した。本研究によれば、カキドオシ・エキス水相画分が毛根細胞ないし毛母細胞に作用してそれらを活性化するため、優れた発毛効果を得ることができる。男性型脱毛症の他、種々の原因により生じる薄毛や脱毛症に適用可能で、脱毛防止作用及び発毛、育毛作用が相乗的に向上し、且つ頭皮に対し安全性の高い頭部外用剤を提供することができる。

(参考文献)

- 1) 山崎 律 他：連銭草の成分研究①. 日本生薬学会年会講演要旨集. 55, 71, 2008.
- 2) 野原 穂弘 他：連銭草の成分研究②. 日本生薬学会年会講演要旨集. 55, 72, 2008.
- 3) 角田 利枝 他：カキドオシの化学成分 (第3報) フェノール配糖体の化学構造について. 日本薬学今年会要旨集 128 (N0.2), 97, 2008.
- 4) Yamauchi H, Kakuda R, Yaoita Y, Machida K, Kikuti M :Two new glycosides from the whole plants of *Glechoma hederacea* L. *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 346-347, 2007.
- 5) 出願者：杉山俊博、発明者：杉山俊博、永井繁春、夏井美幸「カキドオシを主原料とする頭髪用剤」特願2011-56753、特許登録：2012年11月6日、特許第5146789号
- 6) Qiao Z, Koizumi Y, Zhang M, Natsui M, Flores JM, Gao L, Yusa K, Koyota S, Sugiyama T :Anti-melanogenesis effect of *Glechoma hederacea* L. extract on B16 murine melanoma cells. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **76**, 1877-1883, 2012.
- 7) 出願人：秋田大学、株式会社ドウシシャ、発明者：杉山俊博、小泉幸央、夏井美幸、佐野之康「メラニン生成

- 抑制剤及びこれを含有する皮膚外用剤」特願2012-121636、出願日：2012年5月29日
- 8) 出願人：ライオン株式会社、発明者：栗田 啓、西戸真紀「白髪予防改善剤及び毛髪有効成分のスクリーニング方法」特開2003-171240号、出願日：2003年6月17日
- 9) Hachiya A, Sriwiriyant P, Kobayashi T, Nagasawa A, Yoshida H, Ohuchi A, Kitahara T, Visscher MO, Takema Y, Tsuboi R, Boissy RE :Stem cell factor-KIT signalling plays a pivotal role in regulating pigmentation in mammalian hair. *J. Pathol.*, **21**, 30-39, 2009.
- 10) Randall VA, Jenner TJ, Hibberts NA, De Oliveira IO, Vafae T, Stem cell factor/c-Kit signalling in normal and androgenetic alopecia hair follicles. *J. Endocrinol.*, **197**,11-23, 2008.
- 11) 出願人：株式会社資生堂、発明者：森 浩、鈴木良治、金山敏司「毛髪の成長期誘導効果の検出方法」特開2003-149230号、出願日：2001年11月7日
- 12) Hatakeyama, S., Ma, Y.-Z., Miura, N., Abe, S., Kameda, T., Sakamoto, K., and Sugiyama, T. (2003) Production of monoclonal antibodies recognizing human hair follicle keratinocytes. *Hybrid Hybridomics*, **22**, 127-130.
- 13) Kameda T, Hatakeyama S, Ma YZ, Kawarada Y, Kawamata M, Terada K Sugiyama T, :Targeted elimination of the follicular label-retaining cells by photo-induced cell killing caused a defect on follicular renewal on mice. *Genes Cells*, **7**, 923-931, 2002.
- 14) Paus R, Cotsarelis G, :The biology of hair follicles. *N Engl J Med.*, **341**,491-497, 1999.
- 15) Sato N, Leopold PL Crystal RG, :Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic hedgehog. *Clin. Invest.*, **104**,855-864, 1999.
- 16) Kishimoto J, Burgeson RE, Morgan BA, :Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes Dev.*, **14**, 1181-1185, 2000.