

(様式5)

学 位 論 文 要 旨

平成 31 年 1 月 9 日

学位申請者

阿部 (土井) 萌子



学位論文題目

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

学位論文の要旨

〈背景〉

皮膚の構造とバリア機能

ヒトの体全体を覆う皮膚は、体内と外界の環境を隔て人体の恒常性を維持するための様々な機能を持つ最大の組織である。皮膚は表皮角化細胞により構成される表皮 (epidermis)、コラーゲン、エラスチンなどの細胞外マトリックス (ECM) とそれらを産生する線維芽細胞により構成される真皮 (dermis)、そして皮下組織 (subcutaneous tissue) からなっている。皮膚本来の役割である生体内部の保護 (皮膚バリア機能) 作用に重要な役割を果たしているのは表皮であり、その中でも最外層に位置する角層 (Stratum corneum : SC) である。皮膚は、生体の最も外側に位置している臓器のため様々な外部環境の変化に曝されている。このような環境変化に対して、皮膚の最外層に位置する角層は物理的、生理的に対応し皮膚の恒常性を維持するために対応している。しかしながら、このような環境変化への対応がストレスとなり皮膚の機能低下を誘導し、様々な皮膚トラブルを発現することが知られている。このような環境因子の影響から皮膚を保護し、皮膚トラブルの発現を避けるためにも皮膚バリア機能を維持する日常的なスキンケアが大切である。

皮膚バリア機能とは、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。日常的には、皮膚バリアは体外への水の漏出を抑え皮膚の乾燥を防ぐ大切な機能である。

皮膚バリア機能の発現には角層細胞間脂質、角層細胞の成熟構造と表皮顆粒層に存在するタイトジャンクションが大きく関わっている。

角層細胞間脂質は顆粒層に存在する層板顆粒 (Lamellar granule : LG) 由来の脂質であり、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。これらの脂質が細胞膜のような脂質二重膜 (シート状) 構造を形成し、この脂質二重膜が 10~20 層程度積み重なった層状構造体 (ラメラ構造体) が角層細胞間に形成され、角質細胞間に密に充填されることで水分蒸散に対する障壁として作用する。

また、角層細胞の成熟は、角層細胞が外側に向かって押し上げられる過程における角層細胞構造の変化のことを云う。この過程において、角層細胞から細胞小器官と核、細胞膜が消失し、細胞膜の代わりに角層細胞周辺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) が形成される。さらに CE の外部には ω -ヒドロキシセラミドが共有結合された脂質辺縁体 (lipid cell envelope) が形成され、脂質辺縁体を足場にしてラメラ構造が構築されると考えられている。

一方、タイトジャンクションは顆粒層の上から 2 層目に存在している細胞接着構造体である。タイトジャンクションの本来の役割は、カルシウム、マグネシウムなどの金属イオンの障壁として働き、近年、皮膚水分蒸散にも関与していることが報告されている。

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*) とは、日本固有の淡水生食用藍藻であり、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生育が確認されている。食用として用いられてきた歴史は古く、1600 年代 (江戸時代) には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食材として珍重されていたことが古文献により確認されている。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、熊本県と福岡県の一部において生育が確認されているのみであり、現在ではスイゼンジノリは絶滅危惧種に指定されている。

スイゼンジノリは、緑褐色ないし茶褐色の寒天質の塊であり、寒天質の中には多数の繭型単細胞が散在している。スイゼンジノリは、増殖時に細胞外に寒天質の粘性物質を分泌する。「サクラン」は、この寒天質から抽出された新規多糖類である。

サクランは、分子量 $1.6\sim 2.9\times 10^7$ 、分子鎖長 $10\mu\text{m}$ 以上の超巨大分子の硫酸化多糖である。構成単糖は、新規糖である硫酸化ムラミン酸を含め 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 $12\text{mol}\%$) などを含み、グリコサミノグリカンとも類似している。しかしながら、サクランの全構造のうち明らかにされているのは、構成糖と部分構造だけで、そのシーケンスや他の構成成分についての分析は終了しておらず未知の部分が多く残されている。実際には、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保水力の約 5 倍であることが確認されている。また水溶液は $100,000\text{cps}$ ($1\text{wt}\%$) もの高粘性と高いチキソトロピー性を示すことも観察されている。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す構造性があり、被膜形成能を有することも明らかになっている。

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。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レルギー免疫応答で亢進される肥満細胞の β -ヘキソダミダーゼの分泌を抑制する作用も報告されている。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の一環として今日位置づけられている化粧品やさらには医薬品の効果を増強させる機材としての応用が大いに期待されている。

目的

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る。また、高分子は、増粘効果、乳化効果、保湿効果、被膜形成効果などの機能を期待して化粧品に配合される。これまでの物性研究結果から、サクランは保湿増粘効果だけでなく乳化効果、ユニークな被膜形成効果を示すことも期待される。

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。

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。

〈方法と結果〉

第1章では、これまでの研究成果に基づき、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。その結果、皮膚表面水分（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の値を用いて規格化した値で評価を行うと、サクラン保湿液の使用による有意な保湿機能の改善を示した。この規格値は、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。また炎症パラメーターであるIL-1RA/IL-1 α やCEの成熟度などの角層パラメーターの有意な改善が確認された。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。

第2章では、サクランの皮膚への浸透性、および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証を行った。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内のサクランの局在を検証した。サクランは成熟した角層では表面に留まり、未成熟な角層では表皮生細胞層まで浸透することが確認された。

アニオン性界面活性剤のラウリル硫酸ナトリウム（SLS）は、皮膚一次刺激性を有することが報告されている。SLSは、株化ヒト皮膚角化細胞（HaCaT）の活性酸素生成を亢進することにより細胞内に酸化ストレスを惹起することも報告されている。そこで、SLSがHaCaT細胞に与える細胞傷害と酸化ストレスに対するサクランの緩和作用を化粧品に汎用される保湿剤のヒアルロン酸と比較評価した。サクランは、ヒアルロン酸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。

続いて第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を検証した。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、さらにそのトラップ作用により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。

第4章では、第3章までの結果から、サクランは皮膚表面に保護膜を形成し、外部刺激から皮膚を保護している可能性が考えられた。そこで、サクランの物理化学的性質の検証として、まず被膜形成能の評価を行った。サクランは被膜形成能を有し、その水溶液を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）」となることを見出した。さらに1, 3-ブチレングリコールを用いて調製した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。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、湿度計を用いたシステムを利用して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シートと比較してGSは水分透過を有意に抑制することが確認された。続いて皮膚外部からの化学物質の皮膚への侵入に対するGSの作用も明らかにするため、GSのカルセイン透過度を測定すると、水分蒸散と同じくGSの方が有意にカルセインの透過を抑制していた。つまりこの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。この事実は、サクラン-ポリオール複合体が乳化能をもつことを示唆した。そこでスクワラン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より安定な乳化性能を示すことが確認された。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発見である。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。サクランとポリオールと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。つまりサクランとポリオール類を混合させて製剤に配合するメリットを見出した。またサクランが増粘剤、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。

〈結論〉

サクランは外用すると表皮の分化を正常化し、角層細胞の成熟を補助することによりバリア機能の高い角層形成を誘導することが確認された。外来成分に対する表皮細胞の応答性を軽減する効果も確認された。サクランの物性については、水を含んだゲル状シートを形成し、そのシートは外来成分の浸透および水透過性を抑制することが確認された。また、その作用はポリオールと併用することにより高まることも確認された。さらに、サクランはポリオールと併用することにより乳化性能を発揮し、界面を用いない乳化製剤を提供することが可能であった。

以上の結果を総合的に考察すると以下のようなになる。サクランは皮膚表面において人工的なバリアとなる被膜を形成する。この形成能はポリオールが存在することにより強くなり、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。その結果、ヒト皮膚への使用は表皮分化を正常することにより高い機能を持つ角層形成を実現している。

驚くべきことにサクランの作用はヒアルロン酸より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、これまで人々に提要されてきた化粧品より高い効果を有する化粧品を提供できることを示唆している。

以上のことから、本研究の成果は人々が皮膚恒常性をより良く維持するために、サクランという新しい素材を用いたスキンケアの方向性を示したものである。

備 考

1. 要旨は4000字程度にまとめること。
2. 本様式により、ワープロで作成することを原則とする。
3. 用紙はA4版 上質紙を使用すること。

(様式6)

Summary

Applicant for degree:

Moeko Doi ABE

Title of thesis :

The study of “SACRAN”, extracellular polysaccharide of *Aphanothece Sacrum* on function for the skin care and its application to skin care products

Sacran which is a super-giant sulfated polysaccharide isolated from *Aphanothece Sacrum* (Suizenji-
nori), is expected to be as a functional material. The purpose of this study was to find out the potential
benefits of sacran on skin care. First, we evaluated skin care effects of the serum containing sacran
in human volunteers. The long-term application of the serum showed to improve skin conditions
at points of skin hydration and parameters of corneocytes. It was hypothesized that the skin care
effects base on the action of sacran as artificial barrier. Thus, to clarify the action mechanisms,
we examined protection effects of sacran against extracellular stimuli when assuming penetration
of sacran into epidermis and film forming on the skin surface. Sacran reduced cell damage and
elevation of intracellular reactive oxygen species which were stimulated by sodium lauryl sulfate
and IL-1 α . In addition, the film formed by sacran gave reduction of cytotoxicity and oxidative
stress caused by tobacco smoke due to trapping chemicals included in the tobacco smoke as one
of familiar air pollutants. The results indicated that sacran interfered actions of extracellular
substances by its trapping fashion. Finally, we examined a possibility for development of sacran
to cosmetics. Sacran showed an unique film forming property holding water in the matrix and an
emulsification property combined with polyols. Gathering these results, it was demonstrated that
sacran shows beneficial effects on human healthy skin by forming artificial barrier on the skin.
Author believes that the results of this study provide an effective tool for human being to be given
the higher quality of life due to protection of the skin by external stimuli.

備 考

1. 要旨は300語程度にまとめること。
2. 本様式により、ワープロで作成することを原則とする。
3. 用紙はA4版 上質紙を使用すること。