

平成 22 年 6 月 28 日

## 「海洋深層水及びβ-グルカンを基材に用いた化粧品の機能評価」

### 皮膚における機能性の研究

高知大学医学部看護学科臨床看護学教室  
渡部嘉哉、溝渕俊二

我々はこれまで『深層水』と『ソフィβ-グルカン (SBG)』の機能性をそれぞれ独立したテーマとして研究を行ってきた。しかし、これまでの両者の研究結果を鑑み、2つの物質を合わせることによって新たな機能性素材へと発展する可能性を見出し、本研究に着手した。

我々が行った深層水に関する研究では、アレルギー性炎症の病態を増悪すると考えられている白血球の好酸球に焦点を絞り解析を行ってきた。その結果、深層水によって好酸球の活性化、特に NADPH oxidase に由来する活性酸素の産生が阻害される傾向を見出した。また、本学の小児科のグループが行った臨床試験では、アトピー性皮膚炎の患者に深層水を塗布することによって症状を軽減するとの報告を行っている。また、過去の(株)シュウウエムラ化粧品の研究で、深層水原水を用いて低濃度では正常皮膚細胞の増殖を促進するとの結果が報告されている。これらの効果は、深層水が持つ清浄性が大きく寄与していると考えられているが、それ以外にも深層水中にはいまだ解明されていない、細胞の機能を調整する物質が含有されている可能性は否定できない。(株)シュウウエムラ化粧品の報告によると、深層水原水が高濃度になると細胞の増殖を阻害しており、その原因を深層水中に含まれる塩による浸透圧の上昇と結論づけていることから、今回は R0 水に NaCl を添加し、等張条件に調整した標品で試験を行った。

SBG は高知県仁淀川町に本社を有する(株)ソフィが製造しており、黒酵母が産生する水溶性β-1,3-1,6-グルカンを主成分としている。厚生労働省から『黒酵母培養液』として食品添加物の認可を受けており、また本学においても十分な毒性試験を行っているため、その安全性は担保されている。SBG の代表的な機能性は、免疫賦活効果にある。我々の研究過程で、特に細胞性免疫の賦活効果を見出し、積極的に学会等で発表してきた。また逆に、液性免疫は阻害するとのデータが得られていることから、アレルギー性疾患に対しては治療方向に機能する可能性が高い。

以上のように、深層水と SBG にはそれぞれ細胞に対して機能性を有する物質が含有されており、深層水と SBG のそれぞれの効果は、アレルギー性皮膚炎の治癒方向への効果が期待できるデータが得られている。また、その作用機序は深層水と SBG の物性・由来・組成・含有物の分子構造の違いから同一のものであるとは考え難い。そこで両者を混和することによって新たな効果が引き出せると考え本試験に着手した。また、単純に混和するだけでなく、本研究中に(株)ミューズの技術で SBG を低分子化し混和した試作品の開発に成功したので、その効果についても検討を行った。今回は特にアレルギー性皮膚炎への塗布剤を想定し、以下の3項目について解析を行った。

1. 標品（試作品）の皮膚細胞の増殖に関する効果についての評価  
題目：正常繊維芽細胞に対する増殖効果
2. 標品（試作品）の肥満細胞、好塩基性球の脱顆粒に与える影響の評価  
題目：肥満細胞系培養細胞のヒスタミン放出に与える効果
3. 標品（試作品）の抗酸化能に関する評価  
題目：抗酸化効果

## 1. 正常繊維芽細胞に対する増殖効果

アレルギー性皮膚炎では、皮膚の損傷が起こるため、病巣の修復・治癒には皮膚細胞の増殖が必須である。今回はヒト正常繊維芽細胞 (CCD-1056SK: Skin, fibroblast, normal control, human, 26 years, Female) に対する増殖効果を試験した。

CCD-1056SK細胞は 10% fetal bovine serum, 1.0 mM ピルビン酸、0.1 mM non-essential amino acids 添加 MEM-E 培地中で培養を行った。 $1 \times 10^6$  cell/ml に種々の標品で懸濁した細胞を 96 穴プレートで容量 100  $\mu$ l で培養を行った。細胞播種後、24 時間の前培養を行い、付着していない細胞を除去した後、種々の条件下で試験を行った。なお、培養は、5% CO<sub>2</sub>、37°C 条件下で行った。

### i) 単純混和物による試験

方法：深層水あるいはSBGをMEM-E培地で希釈し、CCD-1056SK細胞の増殖について試験を行った。なお、深層水あるいはSBGの浸透圧は1容のサンプルに対して9容の9%NaClを添加し等張に調整した。浸透圧調整後の検体を濃度100%と定義した。SBGの混和はグルカン分子を損傷しないようにピペティングで緩やかに行った。効果は、Cell Counting Kit（同人堂）を用いて比色によって評価した。

結果及び考察：深層水、SBGともに添加量3.12%、培養3日目で最も効果が認められた。（図1）この結果は、(株)シュウエムラ化粧品が深層水の添加量5%で繊維芽細胞の増殖効果が認められたと報告しており、その結果と非常に近い数値となった。よって、深層水の添加量には最適濃度が存在する可能性があり、この点は今後の検討が必要である。

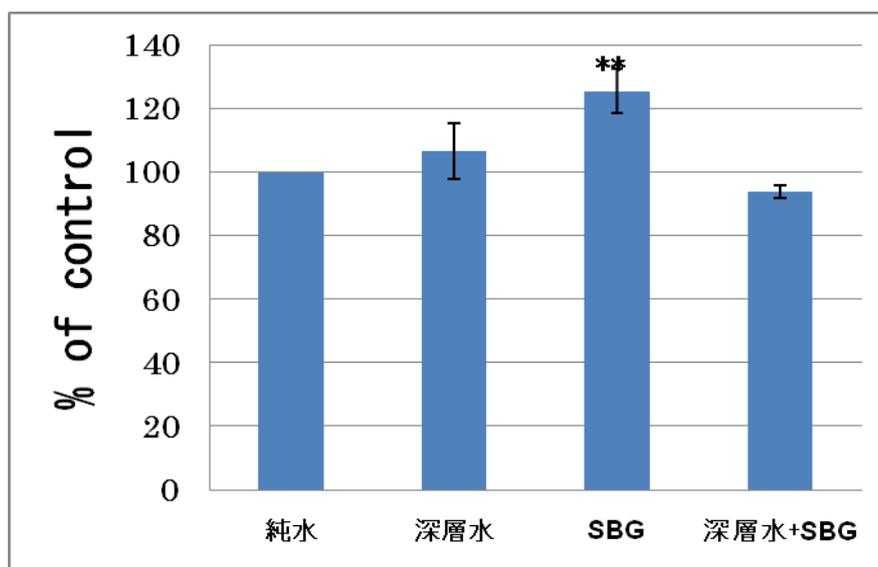


図1

対象群である純水の増殖を100%とした場合、深層水106.8±8.80%、SBG 125.5±6.92%、深層水+SBG 94.0±2.05%であった。深層水単独でも増殖促進傾向はあるものの統計的有意差は認められなかった。（p=0.215）SBG単独で最も優れた効果が認められ、統計的にも有意差が認められた。（p=0.002）しかしながら、両者を単純に混和すると、増殖効果は消滅した。（p=0.347）この現象は、SBGの凝集に起因すると考察した。つまり、SBGは2価イオン存在下で凝集する性質を有するため、深層水中のCa<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>のような2価イオンとSBGが反応した結果凝集が生じ、細胞に対する効果が喪失したと考えた。SBGが凝集しない条件、つまり相加効果が得られるための環境を作るため、(株)ミューズが有するノウハウによってSBGの低分子化を含めたサンプルの加工・調整を試みた。

## ii) 試作品による検討

方法: 培養方法、評価方法は単純混和試験に準じる。SBG の低分子化及び混和は、(株)ミューズ中島らの方法で行った。実験群は、対象群である純水、純水+低分子化 SBG、深層水単独群、試作品の 4 群とした。細胞を種々の条件下に置いた後、3 日間の細胞増殖に与える効果について検討した。

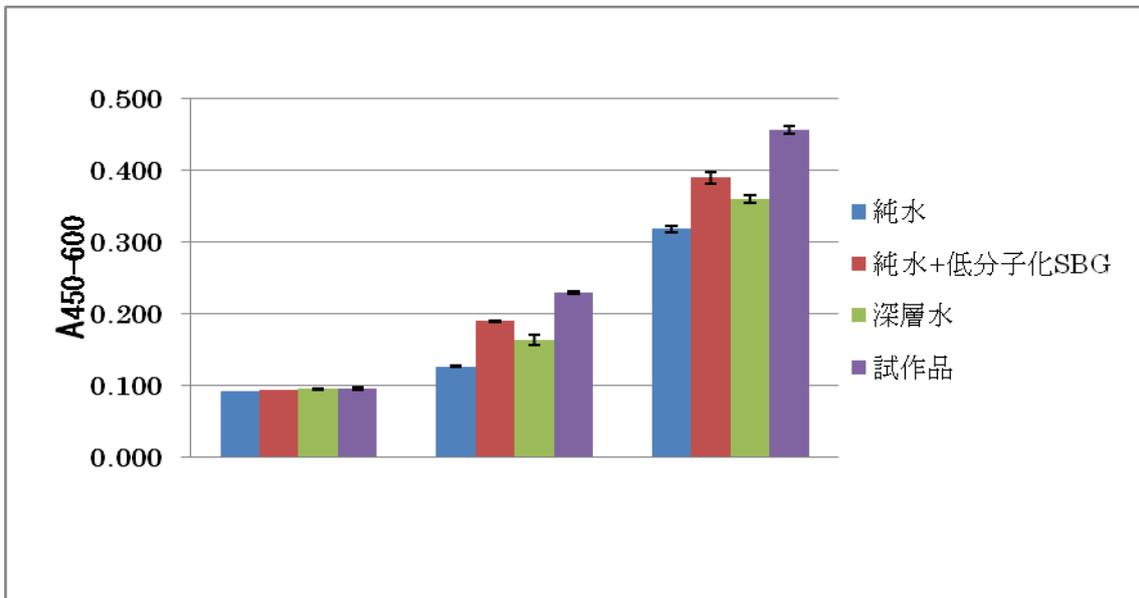


図 2

結果及び考察: 1 日目は 4 群間で全く差は認められなかった。2 日目以降、純水と比較して純水+低分子化 SBG、深層水、試作品すべての群で増殖促進効果が認められた。またこの差は統計学的にもすべての群間で有意であった ( $p < 0.01$ )。その効果は深層水 < 純水+低分子化 SBG < 試作品の順であった。(図 2)  
この結果と先の単純混和試験を比較すると非常に興味深い違いが認められた。つまり、単純混和試験では深層水、SBG それぞれ単独添加では細胞増殖効果が認められたが、混和することによりその効果が低下してしまった。しかしながら、(株)ミューズが開発した試作品では両者が共存する状態で、細胞増殖能が保たれており、さらにその効果は深層水と SBG それぞれの単独での効果より優れていた。つまり試作品は相加的効果が認められた。

## 2. 肥満細胞系培養細胞のヒスタミン放出に与える効果

アレルギー性皮膚炎では痒みが生じる。この痒みは、病巣部に浸潤した肥満細胞が脱顆粒で放出するヒスタミンによって誘起される。このヒスタミンの放出を抑制できれば痒みの軽減が期待できると考え本実験を計画した。本研究ではP815細胞（マウス肥満細胞：Mastocytoma, DBA/2 マウス由来）を用いて試験を行った。指標はカルシウムイオノフォア A23187 刺激に伴うヒスタミン放出量を用い、その評価はヒスタミン量をELISA法で測定した。

方法:P815細胞は10% fetal bovine serumを添加したDMEM培地中で培養を行った。深層水標品は(株)ミューズによる低分子化SBG添加物を用いた。実験群は、対象群である純水、純水+低分子化SBG、深層水単独群、試作品の4群とした。96穴プレートに細胞を終濃度  $1 \times 10^6$  cells/mlに種々の標品で懸濁し、5% CO<sub>2</sub>、37°Cで20分間の前培養を行った後、5mMのA23187で刺激を行った。A23187刺激を行う前に有濃度1mMのCaCl<sub>2</sub>を添加した。さらに5% CO<sub>2</sub>、37°Cで20分間の培養を行い、上澄に含まれるヒスタミン量を測定した。各々の群からA23187刺激を行っていない時のヒスタミン量を差し引き、対照群となる純水のヒスタミン量を100%とした相対放出量を表した。(図3)

結果及び考察：今回の試験ではすべての群でヒスタミンの放出阻害は認められなかった。純水を100%とした場合、それぞれの群のヒスタミン放出量と、純水と比較した場合のp値は、純水+低分子SBGで  $98.0 \pm 6.9\%$  ( $p=0.694$ )、深層水で  $97.7 \pm 4.8\%$  ( $p=0.808$ )、試作品では  $96.2 \pm 5.2\%$  ( $p=0.618$ ) で、統計的な差は無かった。

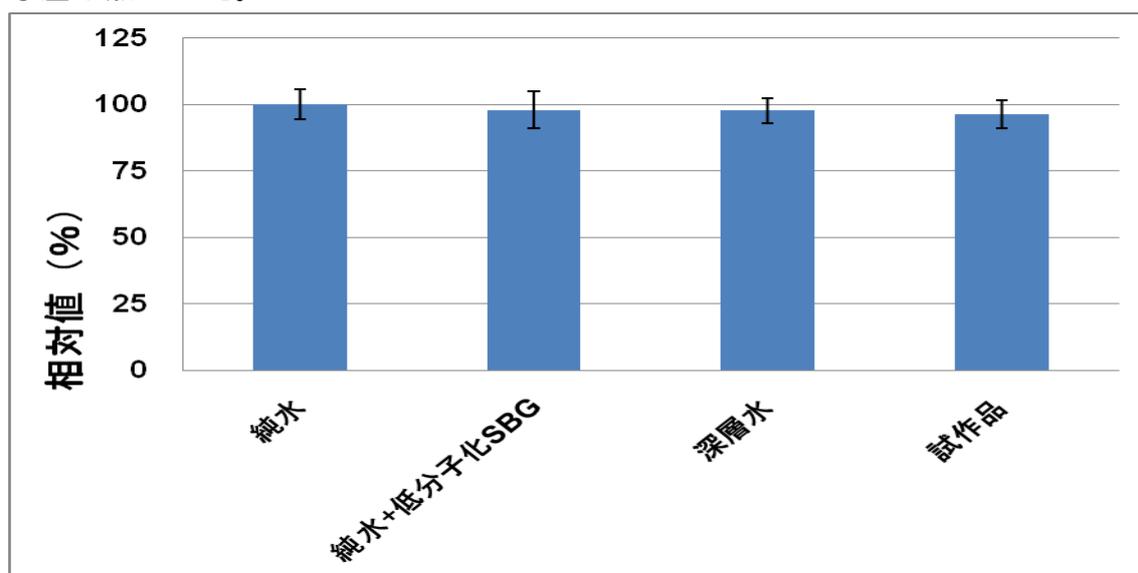


図3

しかしながら、深層水にはアトピー性皮膚炎患者への塗布によって痒みの軽減が報告されている。また SBG には細胞性免疫を活性化する働きがあるため、液性免疫が優位になっているアレルギー疾患では治癒傾向に働く可能性が高い。事実、我々はアトピー性皮膚炎モデルマウスである Nc/Nga マウスに SBG を経口投与することによって末梢血中 IgE の上昇を抑制するデータを得ている。本試験で効果が得られなかった原因の一つとして、細胞と物質が接している時間が短かったためと予想している。特に SBG による肥満細胞への効果は受容体を介した反応であるため、脱顆粒抑制を来すためには長期接触が必要である可能性が高い。今後は前培養段階から種々のサンプルを添加し、その効果を検討する予定である。あるいは、他の白血球からの肥満細胞への効果も予想される。つまり、深層水あるいは SBG によってリンパ球、あるいはマクロファージなどの白血球が活性化され IL-12, IFN- $\gamma$  のような細胞性免疫を誘起するサイトカインが産生される可能性がある。事実、SBG では経口投与によって抹消血中 IFN- $\gamma$  濃度が優位に上昇するとのデータを得ている。それらのサイトカインが肥満細胞に作用する可能性がある。以上のような生体内でのネットワークを介した系を解析するためマウスを用いた実験系も準備中である。

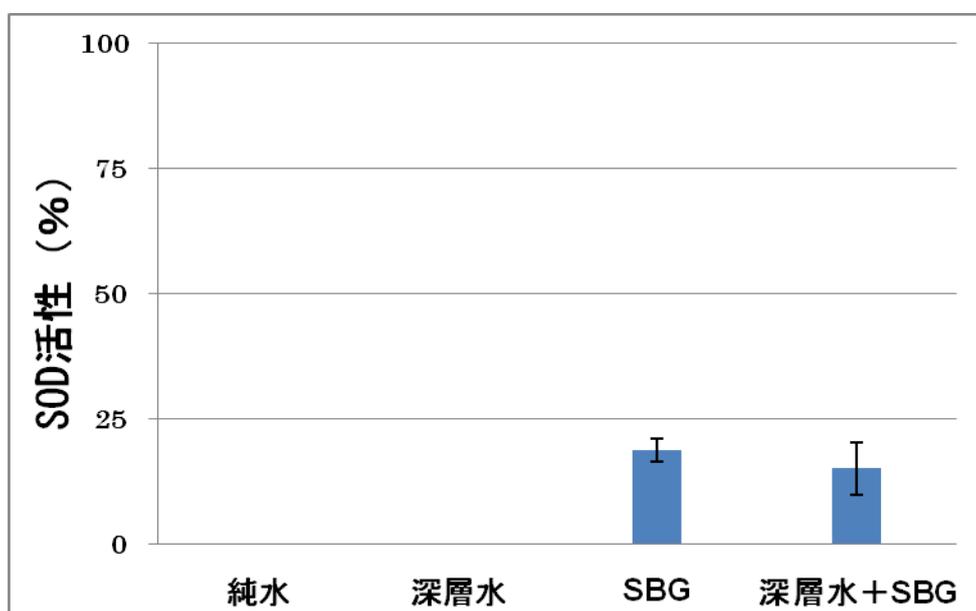
### 3. 抗酸化効果

アレルギー性皮膚炎では炎症を伴うことが多く、炎症を軽減させることで病態の緩和への寄与が期待できる。炎症を誘起する分子の一つとして活性酸素分子種の関与が考えられることから、本試験では深層水あるいは SBG による抗酸化能を試験した。

#### i) 単純混和物による試験

方法：種々のサンプルの抗酸化力は SOD 活性を指標とした。SOD 活性は SOD assay Kit-WST (同人科学研究所) を用いて測定した。SBG の添加量は反応系の最大添加量である 10% とした。グルカンの混和は細胞増殖試験と同様に、グルカン分子を損傷しないようにピペティングで緩やかに行った。

結果及び考察：深層水では SOD 活性は認められなかったものの、SBG では  $18.8 \pm 2.24\%$  の活性が認められた。(図 4) また、深層水と混和してもその効果は保持されており、その値は  $15.0 \pm 5.35\%$  であった。深層水と SBG を混和することによって若干の活性低下が認められたが両群間に統計的有意差は認められなかった。(p=0.273)



(図 4)

以上のように、SBG には SOD 活性、つまり抗酸化力が認められた。この効果を塗布剤に応用することで皮膚の炎症を緩和する素材へと発展する可能性が示唆された。

## ii) 試作品による検討

方法：評価方法は単純混和試験に準じる。SBG の低分子化及び混和は(株)ミューズ中島らの方法で行った。実験群は、対象群である純水、純水＋低分子化 SBG、深層水単独群、試作品の 4 群とした。

結果及び考察：加工により SBG による抗酸化力は喪失していた。効果喪失の原因として、現時点では仮説であるが、加工によるグルカン分子の低分子化に起因すると考えている。グルカンによる抗酸化力にはその分子中に存在するリン酸基が重要な役割をしていると予想されている。低分子化処理によってグルカンの分子構造が変化し、その結果リン酸基の存在形態に何らかの変化が起こったものとする。これは、今回の加工は細胞増殖を第一優先で行ったことも一因である。今後は細胞増殖力と抗酸化力の両方の機能を保持した加工方法の開発が期待される。あるいは、他の素材で抗酸化力を補う手法も検討に値すると考える。

## 【結 語】

以上のように、深層水、SBG とともに非常に大きな可能性を秘めた素材である。深層水については一時のブームが去り、過去のもののようには扱われがちであるが、その機能性の機序は明確になっておらず、さらに研究を進めることで新しい利用方法が発見される可能性を持っている。SBG も飲用による試験はヒト、マウスで広く行われているが、塗布による効果は全く未知数である。本研究は、時間的な制約もあったため深く踏み込んだ解析は行えなかった。しかしながら、今後の発展が期待できる多くのデータが得られた。本研究で得られた情報をもとに、アトピー性皮膚炎をはじめとする皮膚疾患に対して機能性を有する素材の開発を続けて行く計画である。