

天然由来カキドオシ・エキスの発毛促進効果

夏井 美幸¹⁾・川越 政美^{1,2)}・永井 繁春³⁾・喬 志偉¹⁾
 佐藤 喜暁¹⁾・フローレス マリア ジョリナル¹⁾・小泉 幸央¹⁾・小代田宗一¹⁾
 杉山 俊博¹⁾

¹⁾秋田大学大学院医学系研究科病態制御学系 分子機能学・代謝機能学講座,

²⁾秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター動物実験部門, ³⁾SKK 総合研究所

(received 11 January 2013, accepted 1 February 2013)

Sitimulation of the hair growth by a natural origin *Glechoma hederacea* extract

Miyuki Natsui¹⁾, Masami Kawagoe^{1,2)}, Shigeharu Nagai³⁾, Zhiwei Qiao¹⁾,
 Yoshiaki Sato¹⁾, Maria Jolina Flores¹⁾, Yukio Koizumi¹⁾, Souichi Koyota¹⁾
 and Toshihiro Sugiyama¹⁾

¹⁾Department of Biochemistry-Metabolic Science, Division of Bioregulatory Medicine, Akita University Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine, Akita 010-8543, Japan

²⁾Animal Research Laboratory, Bioscience Education-Research Center, Akita University, Akita 010-8543, Japan

³⁾SKK Research Institute, Arayamachi, Akita, Japan

Abstract

The *glechoma hederacea* subsp. *grandis* (*G. grandis*) is used as an 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 human during one to three years showed remarkable improvement or a little improvement by evaluation at 95% (41 persons among 43 persons). With the mice, 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 had 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 factors, and preventive effect for the depilation, 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.

Key words : *Glechoma hederacea* extract, hair growth, SCF, hair follicle organ culture

I. 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前記の生薬・薬草の効果を得ていた。本研究は、ツルの成長が著しくな

Correspondence : Toshihiro Sugiyama
 Department of Biochemistry-Metabolic Science, Division of Bioregulatory Medicine, Akita University Graduate School of Medicine and Faculty of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
 Tel : 81-18-884-6074
 Fax : 81-18-884-6443
 E-mail : sugiyama@med.akita-u.ac.jp

(2)

天然由来カキドオシ・エキスの発毛促進効果

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) 協和発酵はリンゴ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見出した。

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「プロベシア(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(大正製薬、花王、資生堂)が国内出荷額総額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。

II. 実験方法

(1) 実験材料、実験動物および飼育条件

1) 実験材料

1. カキドオシ・エキスの調整

開花期は春(4~5月)高さが15~30 cm程になり花は葉腋から出て、薄い紫~紅紫で斑点がある。成長期は、開花した後に落花し、ツルが伸びて葉が繁茂し始めるときから葉が枯れ始めるときまでをいう。茎がつる状に伸びて長さが1 m程にもなる。

① 朝早く水分の多い内にカキドオシを採取する。
② カキドオシと雑草を1本づつより分け、根に付着している、土、砂をあらかじめ取り除く。③ カキドオシを水洗いする。さらに土、砂を完全に取り除く、

その後4,5回洗い、枯葉、土、塵を取り除き洗い流す。カキドオシを2 cm程度の長さに細かくきざみ、水をスプーン7杯(約30 ml)に、きざんだカキドオシをミキサー(2 L用)の回転出来る範囲で数回に分けて入れ攪拌(約1分)し、液を取り出す。液と残渣に分けて残渣を捨てる。④ 1晩静置して気泡が上に浮く翌朝まで待ち、気泡を静かに掻き混ぜ、気泡を少なくする。⑤ 翌日より6日間毎日掻き混ぜて、その後適温にて上澄みと沈殿物への分離を待つ(約1週間位、16度前後)。⑥ 分離後、上澄みを取り出しサラシ袋で濾過する。⑦ 更に底の沈殿物を取り除くため再度濾過する。⑧ 日数がたつに連れ上澄みの濁りが無くなる。⑨ 5,000 × g 10分間遠心分離後、冷蔵庫にて保管する。この状態の溶液をカキドオシ・エキスと称する。その上清を凍結保存した。使用時に凍結したものを溶解させて使用した。

2. カキドオシ・エキス成分の分離調整法

有機相画分は、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、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。

水相画分は、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) 動物および飼育条件

動物の飼育および実験は、すべて秋田大学バイオサイエンス教育・研究センター動物実験部門において行われた。また、本動物実験は「国立大学法人秋田大学動物実験規程」を遵守し、秋田大学動物実験委員会の許可を受けて行った。

雌性および雄性8週齢のC3H/HeNマウスを(株)日本チャールズ・リバーより購入し、実験に用いた。1週間の予備飼育後、発毛効果を検討する実験として、通常の長期飼育用固型飼料(日本クレア製CE-7)で飼育した。

3) 脱毛マウスを用いた発毛実験

雌性C3H/HeNマウス8匹を用い、各個体の背部をmy care[®](カネボウ化粧品、東京)で除毛し、除毛した部分に1%カキドオシ・エキスまたは生理食塩水を毎日1回14日間塗布した。対照群(生理食塩水)とカキドオシ群の育毛作用を写真で比較評価した。

脱毛マウスの再生毛面積の測定は、検査対象マウスを麻酔して伏臥位に固定してからデジタルカメラを検

査対象マウスの背部から一定の焦点距離になる様に固定して撮影した。そのデジタル画像をパソコンでTIFF形式ファイルに変換してから、「画像解析ソフトNIH-Image」を使って最初に、画像から選択した範囲(脱毛した範囲)の面積のカウントを測定する。次にその画像を二値化変換して得た画像から発毛面積を選択して発毛面積をカウントする。測定した脱毛面積カウントおよび発毛面積カウントから発毛比率を算出した。

(2) 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

ヒト頭髮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：脱毛症に悩む被検者に、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・エキス約5mlを軽く地肌にす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「頭髮撮影」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。

(3) 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

1) 試薬および実験動物

雌性C3H/HeNマウス5~6週齢を用いた。マウスの毛包を採取し、Millicell-HA培養プレートインサート(Millipore PIHA03050)6well plate内で毛包を器官培養用培地:DMEM(Sigma D5796)/5%牛胎児血清、ペニシリン(100U/ml)、ストレプトマイシン(100μg/ml)、アンフォテリシンB(0.25μg)を添加した培地で器官培養した。

2) マウス頬髭毛包の採取

雌性C57BL/6Jマウスの頬部分の皮膚を麻酔下で切り取り、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した。乾燥を避けるため、全サンプルが得られるまでリン酸緩衝液中で維持した。

3) 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の培地で湿润させた。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(図1)。培養は1週間行い、毛の伸長を実体顕微鏡下で観察し、写真を撮影した。観察する点は、毛根部黒色組織の始点から毛切断部までの全体の長さ、および、皮膚表面から毛切断部までの毛露出部の長さの変化とした。また、毛根部黒色組織(メラノサイト、毛母細胞および毛乳頭細胞を含むと考えられる)の形態変化(大きさ、位置)、および、皮膚表面組織の変形(収縮、陥没など)が、組織の破壊の進行に伴ってみられることを考慮して、培養実験中にこのような現象が起きていないか注意した。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。

実験群は以下の通りであった。

- ① コントロール群: 器官培養用培地: DMEM/5%牛胎児血清, ペニシリン, ストレプトマイシン, アンフォテリシンB 6サンプル/6well
- ② 試料添加群: それぞれ試料を①に以下を添加6サンプル/6well
 - ・カキドオシ・エキス
 - ・SCF(stem cell factor), EGF, HGF(いずれもSigma-Aldrich Japanより購入)
- ③ 6well plate/Millicell-HAメンブレン上で培養
- ④ Wellごとにスケール標準として、短く切った黒色ナイロン糸(3号)を置いた。

III. 結 果

(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

ボランティア43名によってカキドオシ使用による発毛効果の臨床試験を行った。ボランティアの被験者は全て、完全な脱毛状態の部位を頭部に持つ男性であった。成長期のカキドオシ・エキスを、毎日1回、約5mlずつを頭部に塗布した。

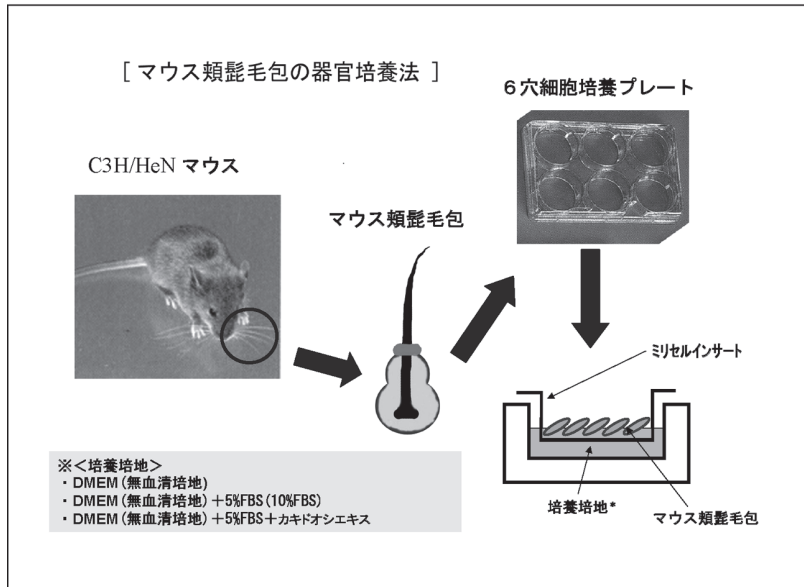
結果: 1~3年以内に顕著な改善~やや改善が95%(43人中41人)となり、外観での評価に改善が見られた。発毛効果のあった例を図2に示した。

アンケートの結果を図3と表1に示しているが、被

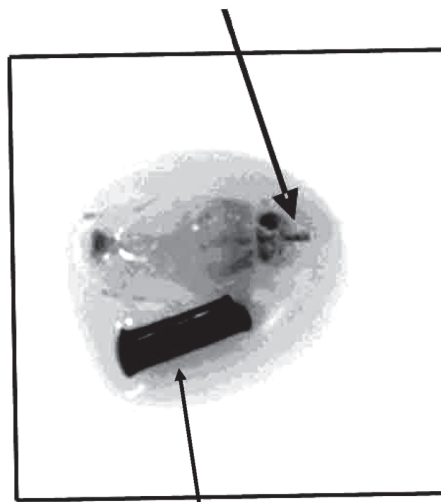
(4)

天然由来カキドオシ・エキスの発毛促進効果

A



B 毛包から伸展した毛



黒色ナイロン糸

図1. マウス毛包器官培養法.

A: 6 well 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 2 ml の培地で湿润させた。PBS に浸した毛包を、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膚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。B: マウス毛包器官培養法の実施例。

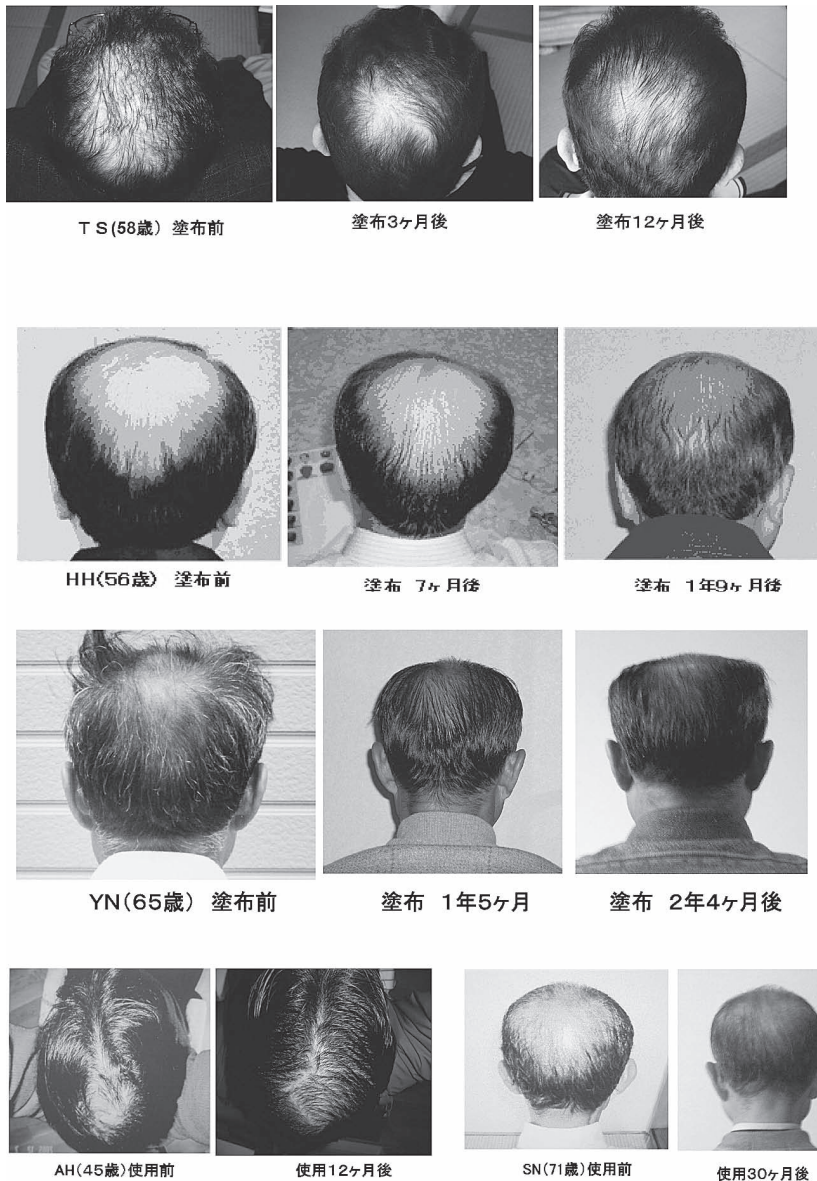


図2. 人におけるカキドオシ・エキスの発毛効果例。
カキドオシ・エキスを毎日1回、5mlずつ頭部に塗布した。塗布前及および7ヶ月使用後の毛髪部写真。

験者の約3分の2が「塗布前に比較して髪の毛が太くなった。枝毛が少なくなった。」という実感をもった(図3)。43人中41人が何らかの効果が見られ(表1)、表には示さなかったが、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。

(2) マウスにおけるカキドオシ・エキスの発毛促進効果

背部を脱毛したC3H雌マウス8匹を用いて、各個体の脱毛部に1%カキドオシ・エキスを、または対照として生理食塩水を毎日1回14日間塗布した。塗布

(6)

天然由来カキドオシ・エキスの発毛促進効果

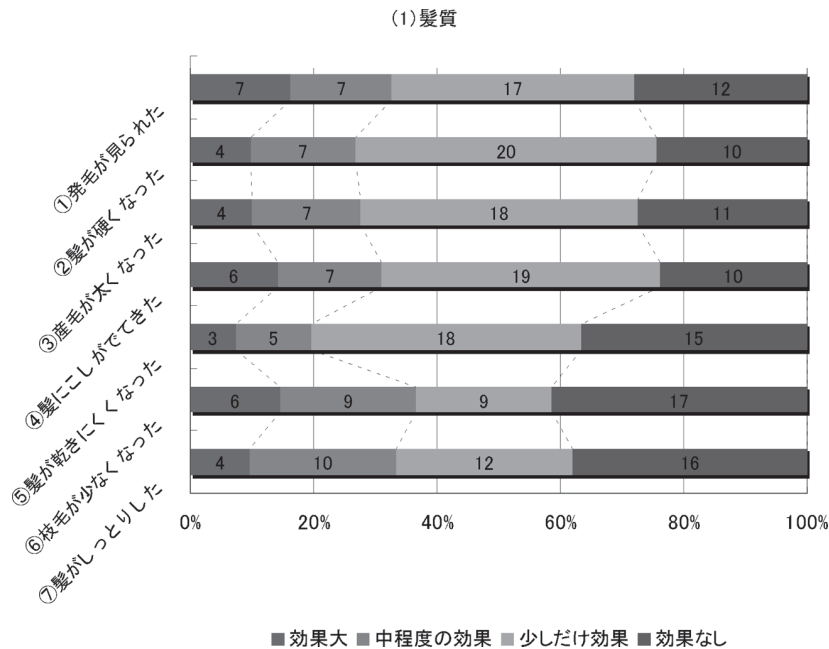


図3. ヒトでのカキドオシ・エキス塗布による髪質の変化。

脱毛症に悩むボランティア43名に対してカキドオシ・エキスを朝、晩のいずれか一日1回塗布した。それぞれの被験者の実施期間は約1~2年間であった。塗布終了後、発毛の有用性を判定するためにアンケートを実施した。

表1. ヒトでのカキドオシ・エキス塗布による頭髪改善効果

顕著改善 (15%)	中程度改善 (45%)	軽度改善 (20%)	やや改善 (15%)	改善無し, 中止 (5%)
------------	-------------	------------	------------	---------------

8日目では生理食塩水塗布群も、カキドオシ・エキス塗布群もほとんどのマウスで発毛は観察されなかった。14日目では、カキドオシ・エキス塗布群が生理食塩水塗布群より発毛促進効果が認められた(図4A)。各群における再生毛面積率はカキドオシ・エキスを塗布した実験群の方が生理食塩水を塗布したコントロール群より3倍ほど有意に高かった(図4B)。以上のことから、カキドオシ・エキスはマウスの発毛促進効果が見られたが、各群とくに、生理食塩水塗布群において個体間である程度のバラツキが見られた。このことからC3Hマウスを使つてのカキドオシ・エキス発毛促進効果について、試験方法に課題が残った。

(3) 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

1) カキドオシの収穫時期の違いによる毛包伸張度
マウス毛包器官培養系にカキドオシ・エキスを添加

して、4日目の頬髯の伸張を測定した。コントロールは、培地のみ、開花期は、開花期カキドオシ・エキス1%と培地、成長期は、成長期カキドオシ・エキス1%と培地からなる。髭が1.0mm以上伸張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(図5)。

2) 有機相画分と水相画分における発毛効果

髭が1.0mm以上伸張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、分画する前のカキドオシ・エキスまたは有機相画分に対して約2倍の伸張効果が観察された。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。(図6A)。髭を1mm以上伸張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倍の効果があった(図6B)。

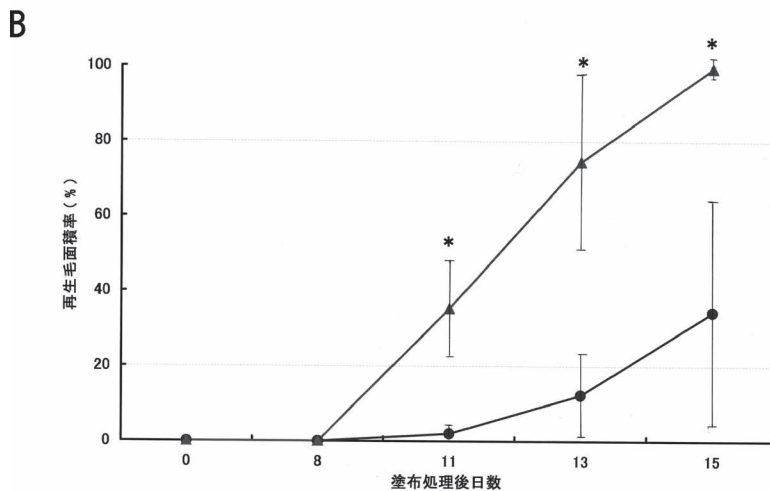
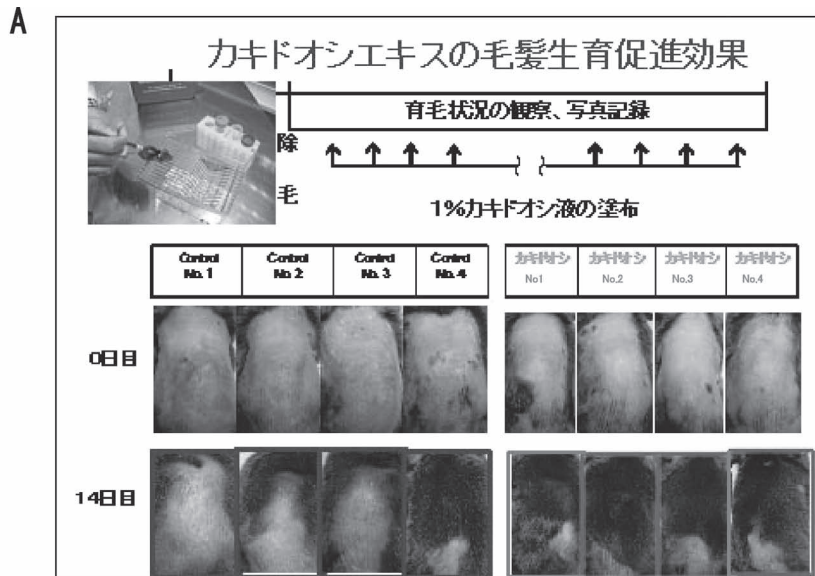


図4. 脱毛マウスを用いた発毛実験。

雌性 C3H マウス 8 匹, 各個体の背部に 1% カキドオシ・エキスを, 一方対照として背部に生理食塩水を毎日 1 回 14 日間塗布した. A: 塗布前, 塗布後 14 日におけるマウス背部の毛髪生育促進効果例. B: カキドオシ塗布処理後の再生毛面積率の時間変化. ▲; カキドオシ塗布群, ●; コントロール (生食) 群, *, $P < 0.05$ (Student's t-test).

3) 水相画分における有効成分の分子量検定

先に見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 3 kDa 以上と 3 kDa 未満の 2 分画を得た. マウス頬髯器官培養法を用いて, 分子量 3 kDa 以上と 3 kDa 未満の 2 分画の毛包伸張度を測定した. 髯が 1.0 mm 以上伸

張した毛包の数は分子量 3 kDa 未満の画分では 14 本に対して分子量 3 kDa 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 3 kDa 未満の水溶性画分に多く存在することが判明した (図 7A). さらに, 水抽出かつ 3 kDa 以上の分子量のカキドオシ成分は分画しないカキドオシ・エキスに対

(8)

天然由来カキドオシ・エキスの発毛促進効果

して 0.9 倍に減少していたが、3 kDa 以下のカキドオシ成分には 1.4 倍の効果があった (図 7B)。

4) Stem cell factor (SCF) のマウスでの発毛作用
50 ngSCF 添加群では髭伸張度は 1 mm 伸張した髭

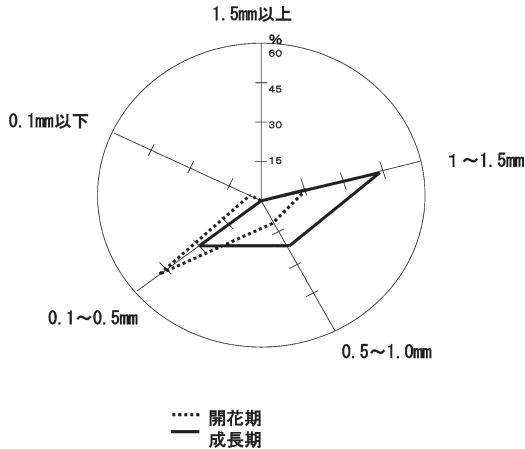


図 5. 開花期および成長期のカキドオシの頬髭伸張度。

各群髭毛包 20 本を無作為に選び、毛包器官培養系にカキドオシ・エキスを添加して 4 日目の頬髭の伸張を測定した。開花期は、開花期カキドオシ水抽出成分 1% と培地、成長期は、成長期カキドオシ水抽出成分 1% と培地からなる。それぞれの頬髭伸張度に対する伸長本数の割合を示した。

の数はコントロール (DMEM) 8 本に対して 7 本で、明らかに伸張効果は観察されなかった。かえって SCF は髭の伸張を抑制していることが判明した (図 8)。また、図には示さなかったが 50 ng の EGF または HGF 添加でも発毛作用はなかった。

IV. 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、メタノールエキスおよ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)}発表があった。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 3 kDa 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⁾。

カキドオシの 3 kDa 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

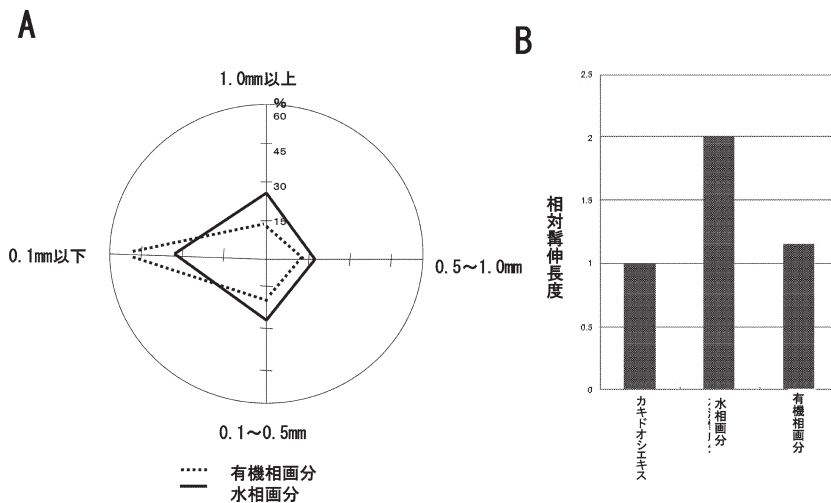


図 6. 有機相画分と水相画分における発毛効果。

各群髭毛包 20 本を無作為に選び、毛包器官培養系に 1% カキドオシ・エキス、1% カキドオシ水相画分、および 1% 有機相画分を添加した。A: 有機相画分または水相画分添加後の頬髭伸長本数の割合。B: 有機相画分または水相画分添加後の相対頬髭伸張度。

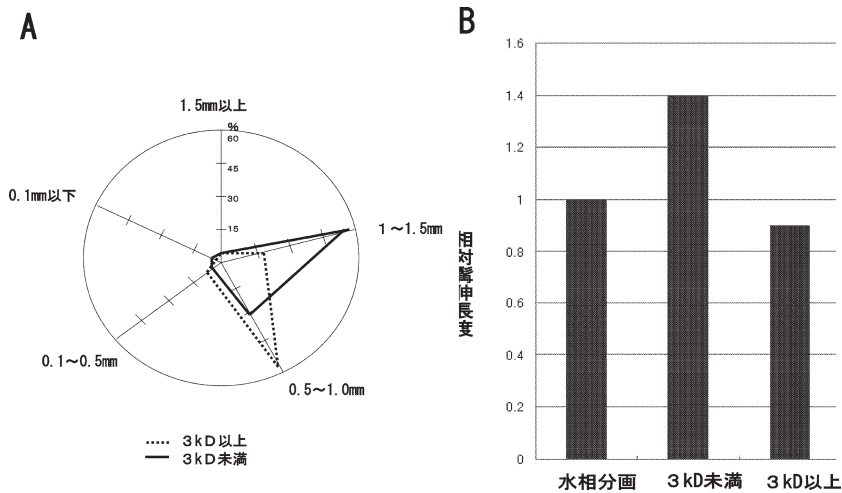


図7. 水相画分における有効成分の分子量検定.

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3 kDa以上と3 kDa未満の2画分を得た。マウス頬髯器官培養法を用いて、カキドオシ・エキス、分子量3 kDa以上と3 kDa未満の2画分の毛包伸長度を測定した（各群 $n=20$ ）。A: 分子量3 kDa以上または3 kDa未満の2画分を添加した後の頬髯伸長本数の割合。B: カキドオシ・エキス、分子量3 kDa以上または3 kDa未満の添加後の相対頬髯伸長度。

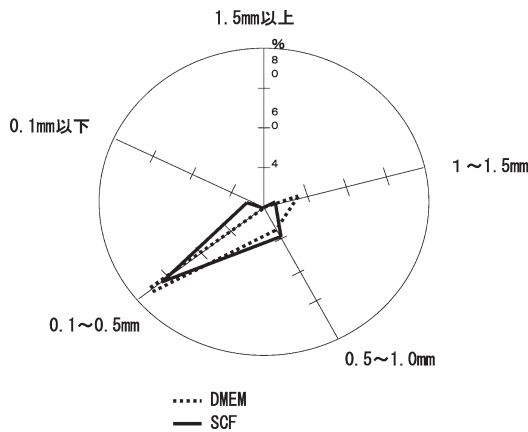


図8. SCFのマウスでの発毛作用.

雌性C3H/HeNマウスより摘出した各群髯毛包20本を無作為に選び、毛包器官培養実験に使用した。50 ng SCF/mlを毛包培養系に添加して、4日後、髯の伸長を計測し、頬髯伸長本数の割合を示した。

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。

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3 kDa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した^{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。他の植物には、複数の増殖因子に作用しているものもあり（サンザシ、ヘパリノイド、クコシ、ジュクジオウ、イラクサなど）、こ

れらと比較すると、SCFのみにしか作用していないカキドオシは、白髪防止に何らかの関連がある可能性があったとしても、特に優れたものとも見えず、わざわざこれらの中から単独に選択されるようなものではない。白髪予防改善剤に含有される植物成分の中の1つの選択として、カキドオシが記載されている。彼らの研究は白髪の予防効果を調べているのであり、メラノサイトの増殖に関する遺伝子を検討しているが、メラノサイトの増殖と毛髪の毛母細胞は調べていない。

彼らが記載しているSCFについて、これまで発表された論文をPubMedで「hair (毛), follicle (毛包)」で検索したところ、18件の発表があった。

1) SCFは、造血幹細胞の表面に発現しているc-kitレセプターのリガンドであり、造血細胞の増殖・分化を促す膜結合型の増殖因子として知られている。

2) 近年、ヒト組み替えSCFが生体内でヒトのマスト細胞と色素細胞の過形成と機能を亢進することを明らかにした。即時型アレルギーへの関与を始めとして、SCFの生体内作用に関する研究が進められている⁹⁻¹¹⁾。

3) 皮膚にのみSCFを発現させるトランスジェニックマウスにおいて、肥満細胞の誘導とメラノサイトの増殖により、メラニン合成が増強されることが判明した¹²⁾。

4) 抗KIT抗体を投与することによりMTTFやチロシナーゼの発現が消失して、その結果鬚菌類の再生毛髪やヒト毛髪器官培養系において可逆的な脱色素が起きた¹³⁾。

5) SCFとその受容体c-kitは色素細胞の生存維持に不可欠である¹⁴⁻¹⁸⁾。

これらの文献によると、SCF-KITシグナル系は、色素細胞の増殖および色素沈着に深く関与することが記載されている。しかし、SCFが毛包細胞の増殖に及ぼす作用は報告されていない。また、毛包細胞内でSCFの遺伝子増幅が認められるという論文はみられない。

Botchkareva, N.V.ら¹⁵⁾はPCRによるSCFの増殖活性を検討しているが、PCRによる検査は微量のDNA分画を数十倍に増幅して検査するものであり、偽陽性が出やすい傾向にある。また、PCRで陽性となっても細胞、生体でのタンパクとして発現が認められなければ、活性はない。このデータだけでは遺伝子レベルでのSCFのDNA合成は増幅しているが、タンパクの発現は示されていない。このことから遺伝子の発現だ

けで生体での活性は判断できないと思われる。

以上のように、SCFについては従来、造血幹細胞の表面に発現しているc-kitレセプターのリガンドであり、造血細胞の増殖・分化を促す膜結合型の増殖因子として知られている。近年、メラニンの生産にSCFが深く関与すると考えられていることなどは報告されている¹⁵⁾。このことは、白髪防止には合致している。従って、SCFについてのみ影響を与え得るカキドオシは、白髪防止という目的に結びつけられる可能性が否定はできないが、一方で、毛髪を増やすという証拠は不足している。Fig. 8に示したように、我々の研究ではSCFのマウス毛包器官培養系において頬髯伸張効果は観察されなかった。かえってSCFは髯の伸張を抑制していることが判明した。

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13-14に記載されている。ほ乳類の皮膚においては、毛嚢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¹⁴⁾。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¹⁹⁾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、カキドオシの有効成分が、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²¹⁾。また、毛組織には毛幹細胞が存在することを証明し

た²⁰⁾。

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)、繊維芽細胞増殖因子 (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²²⁾。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関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^{23,24)}。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学の発展が期待される。

V. 結 語

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年間以内に顕著改善~やや改善が95% (43人中41人)、つまり外観での評価に改善が見られた。マウスにおけるカキドオシ・エキスの発毛促進効果では、C3Hマウスでも性差によりカキドオシ・エキスの発毛促進効果に違いが見られた。つまり、雌マウスでは対照部位 (生理食塩水) に比べて発毛が促進される傾向が認められた。さらに、雌マウス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。ヒトを用いた臨床試験の結果を踏まえ、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。

VI. 謝 辞

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構 (JST) 「シーズ発掘試験」、東経連事業センター「産学マッチング助成事業」、および公益法人コスメトロジー研究振興財団よりご支援をいただきました。ここに深謝申し上げます。

VII. 参考文献

- 1) 山崎 律ら (2008) 連銭草の成分研究①. 日本生薬学会年会講演要旨集 **55**, 71.
- 2) 野原穂弘ら (2008) 連銭草の成分研究②. 日本生薬学会年会講演要旨集 **55**, 72.
- 3) 角田利枝ら (2008) 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** (No. 2), 97.
- 4) Yamauchi, H., Kakuda, R., Yaoita, Y., Machida, K. and Kikuti, M. (2007) Two new glycosides from the whole plants of *Glechoma hederacea* L. *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 346-347.
- 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髮用剤」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, J.M., Gao, L., Yusa, K., Koyota, S. and Sugiyama, T. (2012) Anti-melanogenesis effect of *Glechoma hederacea* L. extract on B16 murine melanoma cells. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **76**, 1877-1883.
- 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, 佐野の康「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) Costa, J.J., Demetri, G.D., Harnist, T.J., Dvorak, A.M., Hayes, D.F., Merica, E.A., Menchaca, D.M., Gringeri, A.J., Schwartz, L.B. and Galli, S.J. (1996) Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo. *J. Exp. Med.*, **183**, 2681-2686.
- 10) Galli, S.J., Tsai, M. and Wershil, B.K. (1993) The

(12)

天然由来カキドオシ・エキスの発毛促進効果

- c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am. J. Pathol.*, **142**, 965-974.
- 11) Kumamoto, T., Shalhevet, D., Matsue, H., Mummert, M.E., Ward, B.R., Jester, J.V. and Takashima, A. (2003) Hair follicles serve as local reservoirs of skin mast cell precursors. *Blood*, **102**, 1654-1660.
 - 12) Kunisada, T., Lu, S.Z., Yoshida, H., *et al.* (1998) Murine cutaneous mastocytosis and epidermal melanocytosis induced by keratinocyte expression of transgenic stem cell factor. *J. Exp. Med.*, **187**, 1565-1573.
 - 13) Hachiya, A., Sriwiriyanont, P., Kobayashi, T., *et al.* (2009) Stem cell factor-KIT signalling plays a pivotal role in regulating pigmentation in mammalian hair. *J. Pathol.*, **21**, 30-39.
 - 14) Randall, V.A., Jenner, T.J., Hibberts, N.A., De Oliveira, I.O. and Vafaei, T. (2008) Stem cell factor/c-Kit signalling in normal and androgenetic alopecia hair follicles. *J. Endocrinol.*, **197**, 11-23.
 - 15) Botchkareva, N.V., Khlgatian, M., Longley, B.J., Botchkarev, V.A. and Gilchrist, B.A. (2001) SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. *FASEB J.*, **15**, 645-658.
 - 16) Yoshida, H., Kunisada, T., Grimm, T., Nishimura, E.K., Nishioka, E. and Nishikawa, S.I. (2001) Melanocyte migration and survival controlled by SCF/c-kit expression. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, **6**, 1-5.
 - 17) Peters, E.M.J., Maurer, M., Botchkarev, V.A., Jensen, K.M., Welker, P., Glynis, A., Scott, G.A. and Paus, R. (2003) Kit is expressed by epithelial cells in vivo. *J. Invest. Dermatol.*, **121**, 976-984.
 - 18) Hibberts, N.A., Messenger, A.G. and Randall, V.A. (1996) Dermal papilla cells derived from beard hair follicles secrete more stem cell factor (SCF) in culture than scalp cells or dermal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **222**, 401-405.
 - 19) 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 of 成長期誘導効果の検出方法」特開 2003-149230 号，出願日：平成 13 (2001) 年 11 月 7 日。
 - 20) Kameda, T., Hatakeyama, S., Ma, Y.-Z., Kawarada, Y., Kawamata, M., Terada, K. and Sugiyama, T. (2002) 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.
 - 21) 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.
 - 22) Paus, R. and Cotsarelis, G. (1999) The biology of hair follicles. *N. Engl. J. Med.*, **341**, 491-497.
 - 23) Sato, N., Leopold, P.L. and Crystal, R.G. (1999) Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic Hedgehog. *Clin. Invest.*, **104**, 855-864.
 - 24) Kishimoto, J., Burgesson, R.E. and Morgan, B.A. (2000) Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes Dev.*, **14**, 1181-1185.