

地中海アロマ植物からの白髪予防生理活性物質の探索 およびその機能探索

筑波大学大学院生命環境科学研究科

磯田 博子

Recently, people are experiencing more stress and some have problems regarding hair growth as a part of the aging process. Resolving this hair growth problem is important for the aging society in the future. This is because not only bodily health but also mental health is important for a healthy life. Thus, we attempted to find plants having hair growth regulation activity. We collected plant extracts from Tunisia for bioprospecting purposes. Among them, we investigated the *Erica multiflora* extract to evaluate the hair growth promotion activity. MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay and cell cycle assay on human dermal papilla cells in vitro and administration assay on mouse dorsal skin in vivo were performed. As a result, the *Erica multiflora* extract promote the dermal papilla cell growth and cell cycle, and induced hair growth in vivo. We show that the *Erica multiflora* extract has a high activity for promotion of hair growth cycle, or induction of anagen phase from telogen phase.

1. 緒言

毛の成長周期の制御に関する研究は、現在世界中で盛んに行われており、年々分子生物学的手法を取り入れたものが数多く見られるようになってきた。しかしながら、ごく最近までは医学系の研究者が主に研究を行っていた背景もあり、分子生物学的コントロール下のデータは少ない。また逆に分子生物学者が行っているデータを眺めると、皮膚科学としてのコントロールが正確になされていないものも少なくない。したがって、現在までに報告されているもののうち、分子生物学的・皮膚科学的信頼性の高いものはごく限られた研究室から出た報告に限定されると言わざるを得ない。

また、白髪の改善にも注目した毛成長周期制御に関する研究についてはほとんど進んでおらず、本研究課題が皮膚科学分野へ与える影響は大きいと言える。これまでは、実際に皮膚に発現している分子をターゲットとして研究が行われてきており、毛成長に関与するもの、白髪の抑制に関与するものを分けて考えざるを得ず、白髪を抑制し尚且つ発毛も促進するようなものへの期待が高いことが明らかであったにも関わらず、その実験系の構築までは至っていない¹⁾。

本研究では、北アフリカ乾燥地域原産生物資源をターゲットし毛成長促進・メラニン合成促進を探索する。その後、正常皮膚の色素沈着へ貢献しないものをさらにスクリーニング、毛成長促進作用とメラニン合成促進作用とのシナジ



Hair growth regulation by the extract of aromatic plant *Erica multiflora*

Hiroko Isoda

Alliance for Research on North Africa (ARENA), Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,

ー効果を評価するという三段階に分かれた評価系の構築を目指した。

2. 実験

2.1 地中海アロマ植物

本研究において実験に使用したサンプルとして、環地中海半乾燥地域に生育するアロマ植物である、*Erica multiflora*、*Thymelaea hirsuta*、*Pistacia lentiscus*、*Lycium europeum*、*Thapsia garganica* の5種を用いた²⁾⁻⁴⁾。チュニジアにおいて、これらの植物の乾燥重量10gを100mlの70%エタノールに7-10日間浸して抽出したもの、また植物の乾燥体は生物多様性条約に基づいて、北アフリカ研究センターを通じて入手した。その抽出液を0.22 μ mフィルター (Millipore, USA) で濾過したものをサンプルとした。

2.2 *E. multiflora* の分配・分離

葉の乾燥体 (100g) を100%メタノール (500ml及び800ml) に浸して暗所で1週間静置した。この抽出液を吸引濾過後、濾液をロータリーエバポレーターにて減圧下30℃で濃縮・乾固し、メタノール抽出物 (22.68g) を得た。

得られたメタノール抽出物を、酢酸エチル (400ml \times 3) と水 (400ml \times 3) で2層分配し、酢酸エチル層・水層を得た。酢酸エチル層をロータリーエバポレーターで濃縮・乾固し酢酸エチル層 (EMEA) を得た。その後水層を *n*-ブタノール (500ml \times 3) で2層分配し、ブタノール層・水層を得た。それぞれをロータリーエバポレーターで濃縮・乾固させ、ブタノール層 (EMBU)・水層 (EMWA) を得た。

酢酸エチル層をシリカゲルクロマトグラフィー (ϕ 2.2 \times 30cm、*n*-hexane : EtOAc = 5 : 1 \rightarrow 3 : 1 \rightarrow 1 : 2 \rightarrow CHCl₃ : MeOH = 8 : 2 \rightarrow 5 : 5 \rightarrow 2 : 8 \rightarrow 0 : 10) で分離を行い、酢酸エチル層を15画分 (EMEA1~15) に分離した (図1)。

2.3 毛乳頭細胞増殖率測定実験

ヒト毛乳頭細胞 (human dermal papilla cell) を播種し、37℃、5% CO₂ インキュベーターで一晩培養した後、サンプルを含む培地と交換し、96時間培養した。そのあと、細胞生存率を調べるため、MTT 手法を用いて測定した。

2.4 細胞周期測定

Erica multiflora で処理した細胞に Cell Cycle Reagent (Millipore, USA) を加える。フローサイトメトリー (Guava PCA; Millipore, USA) を用いて、細胞周期測定用ソフトウェア Guava CellCycle により、細胞周期を測定した。

2.5 メラニン産生量測定実験

B16 メラノーマ細胞を播種し、37℃、5% CO₂ インキュベーターで一晩培養した後、サンプルを含む培地と交換し、72時間培養し、メラニン産生量を測定した。培地を除去した後、トリプシン処理により細胞を採取した。0.1% Triton X-100 を用いて細胞の膜タンパク質を可溶化し、10% トリクロロ酢酸を用いて産生されたメラニンを沈殿させ精製を行った。その後 8N 水酸化ナトリウムを添加し、80℃ 設定のヒートブロック中で2時間処理することでメラニンを溶解させ、410nm の波長で吸光度を測定した。産生されたメラニンの量は濃度既知のメラニンで作製した検量線を用いて算出し、さらに細胞数で除法することで1細胞あたりのメラニン産生量とした⁵⁾。

2.6 動物実験

C3H / He マウス (16 週齢、雄) の背部を剃毛し、1日に1回、500 μg / ml の *Erica multiflora* 抽出物を含む PBS 溶液、PBS をそれぞれ 0.1 ml ずつ、21 日間皮下注射した。

3. 結果と考察

3.1 毛乳頭細胞増殖率測定実験

毛乳頭細胞を用いて、アロマ植物 *Erica multiflora*、*Thymelaea hirsuta*、*Pistacia lentiscus*、*Lycium europeum*、*Thapsia garganica* の毛乳頭細胞増殖率に及ぼす影響を調べた。その結果、*Erica multiflora* に最も毛乳頭細胞増殖活性が見られた (表1)。

3.2 毛乳頭細胞周期測定実験

Erica multiflora で 12、24、36、48 時間処理した毛乳頭細胞の細胞周期を調べた。その結果、24、36、48 時間処理において弱いが細胞周期進行の停止が見られたが、12 時間処理においては細胞周期促進が見られた (表2)。以上のことは *Erica multiflora* の成分が毛乳頭細胞の細胞周期を制御することを示唆する。

3.3 マウスの毛髪成長促進効果

C3H / He マウスにおける *Erica multiflora* の毛髪成長促進効果を調べた。*Erica multiflora* を毎日皮下注射して3週間後マウスの毛を剃った皮膚から毛の成長が確認でき、血管拡張も確認した (図2)。*Erica multiflora* によるマウス毛髪成長促進効果は血管拡張効果による毛根までの血流が増加したことによると思われる。

3.4 *E. multiflora* メタノール抽出物分配成分が B16 メラノーマ細胞のメラニン産生量に与える影響

B16 メラノーマ細胞に、*E. multiflora* メタノール抽出物、またメタノール抽出物を分配して得られた酢酸エチル層、ブタノール層、水層を 1 μg / ml の濃度で添加し72時間後のメラニン産生量を測定した結果、酢酸エチル層においてメ

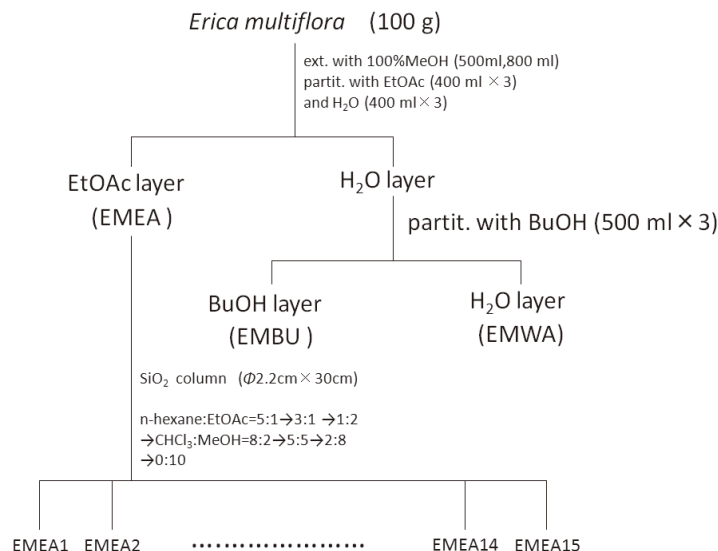


Figure 1. *E. multiflora* の分離スキーム

ラニン産生を促進する活性が示された (図3)。酢酸エチル層にて処理した細胞ではコントロールと比較して138.5%とメラニン産生が促進された。

3.5 *E. multiflora* メタノール抽出物酢酸エチル層の分離成分が B16 メラノーマ細胞に与える影響

E. multiflora のメタノール抽出物分配画分である酢酸エチル層にメラニン産生促進活性があることが明らかとなったので、この画分をさらに15の画分に分離し、同様の方法で、メラニン産生に与える影響を評価した。その結果、画分2において最も強いメラニン産生促進活性を示した (図4A)。図3より *E. multiflora* 酢酸エチル層画分2はメラニン産生促進活性を示したので、同様の実験を3回行い、結果を平均値±SDにて表した (図5A)。その結果 *E. multiflora* 酢酸エチル層画分2にて処理した細胞ではコントロールと比較して172.7%と有意にメラニン産生

が促進された。またメラニン産生量測定時と同条件で *E. multiflora* の分離・分配成分による細胞生存率を評価した (図4B、5B)。その結果、*E. multiflora* の分離・分配成分による処理はB16メラノーマ細胞の生存率に影響を与えないことが明らかとなった。

4. 総括

北アフリカのチュニジアのアロマ植物から、発毛制御活性がある植物の探索を試みた。その植物抽出物の中から、発毛促進活動を評価するためにアロマ植物を選び、*in vitro*系ではヒト毛乳頭細胞 (human dermal papilla cell) を用いてMTTアッセイ及び細胞周期分析を、*in vivo*系ではマウスの背側の皮膚における発毛促進実験を行った。その結果、*Erica multiflora* 抽出物はヒト毛乳頭細胞において細胞増殖促進効果と細胞周期促進効果が、マウスにおいては発毛促進効果が見られた。このような結果から、

Table 1. Growth promotion activity of the *Erica multiflora* extract on human follicular dermal papilla cells (HFDPCs). Symbols represent means±SD of n=4 samples. Asterisks (* and **) indicate statistically significant difference (p<0.05 and p<0.01, respectively) between the extract-treated and control cells.

Plant name	Growth promotion activity (% of control)			
	Concentration (µg/ml)			
	5	50	500	5000
<i>Erica multiflora</i>	103±18	106±11	109±8*	144±9**
<i>Thymelaea hirsta</i>	81±16	90±17	88±13	105±9
<i>Pistacia lentiscus</i>	92±22	98±7	97±15	112±6*
<i>Lycium europeum</i>	97±11	102±9	101±13	93±18
<i>Thapsia garganica</i>	78±3	81±9	78±10	83±5
<i>Gloria alypum</i>	96±17	93±15	85±11	91±13

Table 2. Human dermal papilla cell cycle promotion activity of the *Erica multiflora* extract. Human follicular dermal papilla cells (HFDPCs) were subcultured at density of 4 x 10⁵ cells in collagen type I-coated 100 mm dish. After overnight culture, HFDPCs were starved for 48 h, and then the cells were treated with the *Erica multiflora* (500 µg/ml) for 12, 24, 36 and 48 h. The treated cells were harvested and washed with PBS, and then fixed in 75% Ethanol. The fixed cells were evaluated about cell cycle status using Guava cell cycle system according to the manufacture's instructions. Cont. means control.

		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
12h	Cont.	72.6%	4.9%	8.2%
	Extract	68.5%	4.8%	10.0%
24h	Cont.	69.2%	6.8%	7.8%
	Extract	77.7%	3.1%	7.2%
36h	Cont.	74.4%	6.0%	6.0%
	Extract	76.2%	4.7%	7.3%
48h	Cont.	75.6%	4.4%	8.9%
	Extract	79.7%	4.3%	5.4%

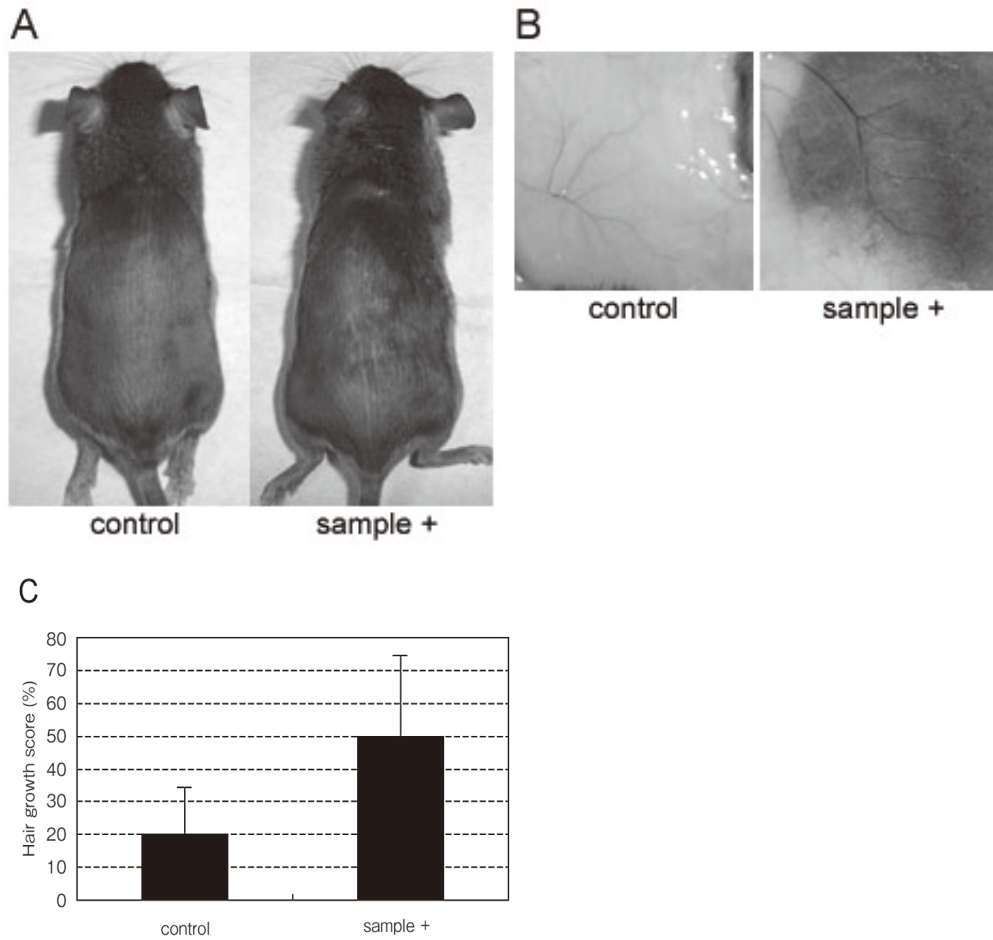


Figure 2. Hair growth effect of the *Erica multiflora* extract. A, Skin surface hair growth was detected on the dorsal skin of mice injected with the *Erica multiflora* extract. Seven-week-old male C3H/He mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital and dorsal hair shafts were trimmed to maintain the telogen phase. *Erica multiflora* extract (+sample) or PBS (control) was injected subcutaneously into the trimmed telogen phase skin (n=5 in each group). B, On the reverse side of the skin. After gray color skin was detected, their skin was isolated and the reverse side was photographed to evaluate anagen induction. C, Hair growth score. The hair growth was evaluated by the skin reverse side gray or black colored area (%).

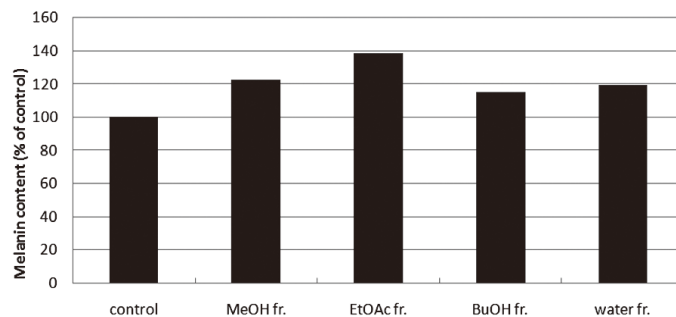


Figure 3. *E. multiflora* の画分成分が B16 メラノーマ細胞のメラニン産生量に与える影響

B16 メラノーマ細胞を 100-mm ディッシュに 5.0×10^5 cells/dish の濃度で播種し、一晚培養後、*E. multiflora* メタノール抽出物を酢酸エチル層、ブタノール層また水層に分配したサンプルを $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度で添加し、72 時間後のメラニン産生量を測定した。

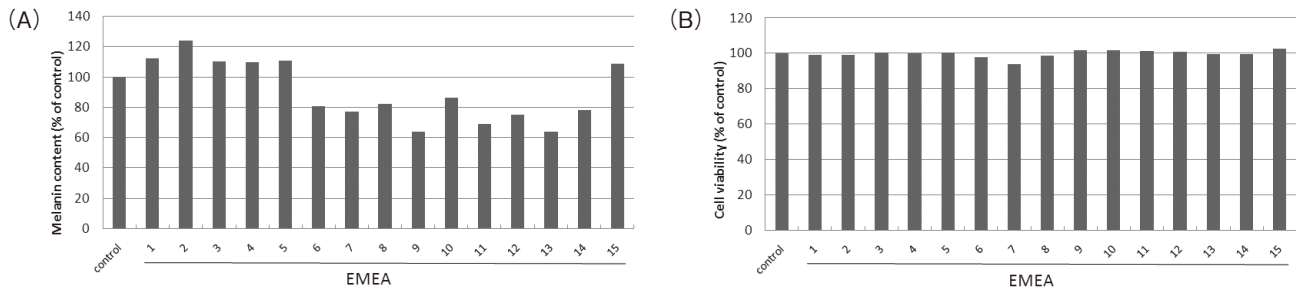


Figure 4. *E. multiflora* の分離成分が B16 メラノーマ細胞のメラニン産生量に与える影響

(A) メラニン産生量 (B) 細胞生存率

B16 メラノーマ細胞を 100-mm ディッシュに 5.0×10^5 cells/dish の濃度で播種し、一晚培養後、*E. multiflora* メタノール抽出物の酢酸エチル層を分離した 15 画分をそれぞれ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加し、72 時間後のメラニン産生量及び細胞生存率を測定した。

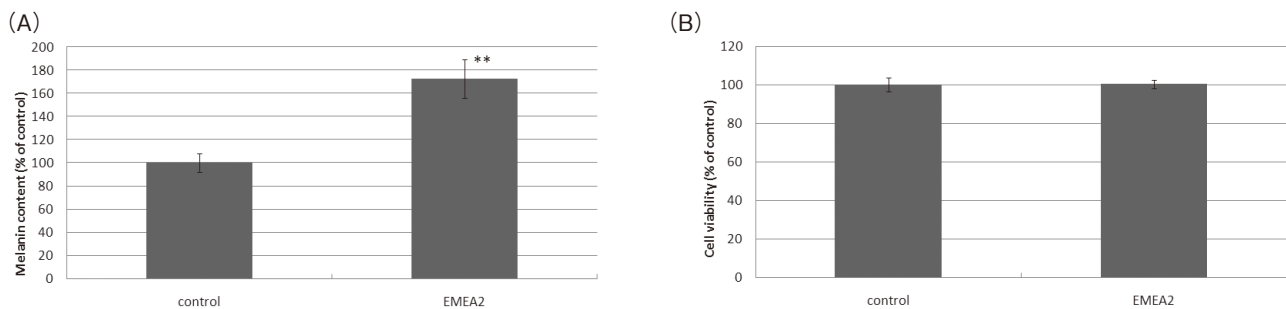


Figure 5. *E. multiflora* メタノール抽出物の酢酸エチル層分離画分 2 が B16 メラノーマ細胞のメラニン産生量に与える影響

(A) メラニン産生量 (B) 細胞生存率

B16 メラノーマ細胞を 100-mm ディッシュに 5.0×10^5 cells/dish の濃度で播種し、一晚培養後、*E. multiflora* メタノール抽出物を酢酸エチル層、ブタノール層また水層に分配したサンプルを $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加し、72 時間後のメラニン産生量を測定した。n=3, **P < 0.01 vs control

Erica multiflora 抽出物による発毛促進効果は発毛周期の促進、或いは発毛周期の休止期 (telogen phase) から成長期 (anagen phase) への誘導によるものと思われる。

E. multiflora はメラニン産生促進物質を含むと示唆されたことから、その活性物質を同定するために *E. multiflora* をメタノールにて抽出、さらに分配・分離して得られた画分についてメラニン産生促進活性を評価した。その結果、活性物質は *E. multiflora* メタノール抽出物の酢酸エチル層から分離された画分にあることが明らかとなった。この画分による細胞生存率への影響は見られなかった。従って、この画分にメラニン産生を顕著に促進する活性物質が含まれると示唆された。

(参考文献)

1) Kawano M, Imamura T, Isoda H: Methods for searching and evaluating effective hair growth regulation factors from Tunisian samples. Journal of Arid Land Studies 15: 443-446, 2006

2) Sassi AB, Harzallah-Skhiri F, Bourguignon N, et al.: Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against Herpes simplex virus type 1. Nat Prod Res., 22 (1): 53-65, 2008

3) Harnafi H, Bouanani Nel H AM, Serghini CH, et al.: The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: a comparison with fenofibrate. J. Ethnopharmacol., 109 (1): 150-160, 2007

4) Bnouham M, Merhfour FZ, Legssyer A, et al.: Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsute*, Pharmazie., 62 (8): 630-632, 2007

5) Ohguchi K, Akao Y, Nozawa Y: Stimulation of melanogenesis by the citrus flavonoid naringenin in mouse B16 melanoma cells. Biosci. Biotechnol. Biochem., 70 (6): 1499-1501, 2006