

学 位 論 文 題 名

Studies on a hair growth stimulant, procyanidin B-2

（育毛活性物質プロシアニジン B - 2 に関する研究）

学位論文内容の要旨

古来さまざまな物質が育毛剤として用いられてきたが、真に有効な育毛剤は見出されていない。ミノキシジル製剤は、米国FDAにより認可された唯一の外用育毛剤であるが、効果を発現する薬剤濃度が高いこと、有効率・副作用などの面で課題が残されており、必ずしも理想的な薬剤とは言えないのが現状である。

本研究の目的は、安全で有効な育毛活性物質を見出し、実用化することである。

1. 天然物からの育毛活性物質の探索

毛包組織へ直接作用し、育毛活性を発現する物質を見出すことを目標に、マウス背部皮膚からの毛包上皮細胞の単離・培養系を構築した。1000種以上の植物抽出物を対象に、毛包上皮細胞への増殖促進活性を指標とする一次スクリーニングを実施した。その結果、ブドウ種子抽出物に顕著な増殖促進活性を見出し、活性物質としてプロアントシアニジン（Procyanidin）を単離・同定した。活性物質として単離したブドウ種子プロアントシアニジンは、無添加対照区に対し、約230%の毛包上皮細胞増殖促進活性を示した。さらに、ブドウ種子プロアントシアニジンは、C3Hマウスを用いた *in vivo* 育毛評価系で、成長期毛包誘導活性を示すことが明らかとなった。チオール分解並びにタンナーゼ加水分解により、プロアントシアニジンの構造を解析した。その結果、活性物質として単離したプロアントシアニジンは、カテキン並びにエピカテキンを構成単量体とする、平均重合度が3.5、没食子酸付加率が構成単量体に対するモル比で25%のプロアントシアニジンであることが明らかとなった。

2. プロシアニジンオリゴマーの育毛活性

プロシアニジンの重合度並びに構成単量体組成と育毛活性との関係を明らかにする目的で、単一のプロシアニジン分子種としてプロシアニジンB-1 [エピカテキン-(4 β →8)-カテキン]、プロシアニジンB-2 [エピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン]、プロシアニジンC-1 [エピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン] をリングから単離、プロシアニジンB-3 [カテキン-(4 α →8)-カテキン] を大麦種子から単離し、育毛活性を調べた。その結果、エピカテキン、プロシアニジンB-2（エピカテキンの2量体）、プロシアニジンC-1（エピカテキンの3量体）間の重合度別比較では、エピカテキンの2量体であるプロシアニジンB-2の毛包上皮細胞増殖促進活性が最も高く、5日間培養後のプロシアニジンB-2の増殖促進活性は、30 μ M濃度で無添加対照区に対し約300%の値を示した。構成単量体であるエピカテキンは、プロシアニジンB-2、プロシアニジンC-1に比べ低い活性であった。一方、構成単量体の違いによる比較、すなわちプロシアニ

ジンB-1（エピカテキンとカテキンの2量体）、プロシアニンジンB-2（エピカテキンの2量体）、プロシアニンジンB-3（カテキンの2量体）間の比較では、有意な増殖促進活性の差は認められなかった。1%濃度のこれらプロシアニンジンオリゴマーを休止期C3Hマウスに塗布したときの発毛面積率は、無添加対照群が41.7%±16.3%（平均±標準偏差）であったのに対し、プロシアニンジンB-2塗布群で69.6%±21.8%、プロシアニンジンB-3塗布群で80.9%±13.0%、プロシアニンジンC-1塗布群で78.3%±7.6%であり、プロシアニンジンオリゴマー塗布群いずれも、1%ミノキシジル塗布群（81.2%±10.5%）同様、高い発毛面積率を示すことが明らかとなった。

プロシアニンジンオリゴマーの育毛作用メカニズムを探る目的で、皮膚構成細胞、すなわち表皮細胞、真皮繊維芽細胞、毛乳頭細胞に対し、これらプロシアニンジンが増殖促進作用を示すか否かを調べた。その結果、プロシアニンジンオリゴマーは、毛包上皮細胞に加え、同じく上皮系細胞に属する表皮細胞に対しても増殖促進活性を示すことが明らかとなった。一方、間葉系細胞である真皮繊維芽細胞・毛乳頭細胞に対しては、増殖活性を示さなかった。以上より、プロシアニンジンオリゴマーによる細胞増殖促進作用は、上皮系細胞特異的であることが示唆された。

3. プロシアニンジンB-2外用を目的とした安全性試験

工業スケールでリングから取得したプロシアニンジンB-2について、ヒトへの外用の安全性を確認する目的で、変異原性試験（原体）、急性皮下毒性試験（原体）、皮膚一次刺激性試験（製剤）、皮膚感作性試験（原体）、眼粘膜一次刺激性試験（製剤）を実施した。微生物を用いた変異原性試験、CHL細胞染色体構造異常誘発性、マウス小核試験において、プロシアニンジンB-2は陰性であった。ラット急性皮下毒性試験から、プロシアニンジンB-2のLD₅₀値は2000 mg/kg以上と推察され、ウサギ皮膚一次刺激性試験、モルモット皮膚感作性試験（maximization test）では、プロシアニンジンB-2はいずれも陰性であった。ウサギ眼粘膜一次刺激性試験では、基剤に含まれるエチルアルコールに由来するものと思われるわずかな刺激性のみが認められた。これら、一連の安全性試験の結果、プロシアニンジンB-2の外用は、十分に安全であると判断した。

4. 外用プロシアニンジンB-2の臨床育毛評価試験

プロシアニンジンB-2のヒトでの有効性を確認する目的で、プラセボ群を配置した二重盲検の育毛ボランティア評価試験（1%プロシアニンジンB-2、20人；プラセボ、10人）を実施した。4ヶ月後の評価結果において、プロシアニンジンB-2群の78.9%の被験者の毛髪平均直径が増加したが、プラセボ群の増加者の割合は30.0%であった（フィッシャー直接確率計算法により、 $p < 0.02$ で有意）。また、直径40 μm以上の毛髪（非軟毛）の全毛髪に対する割合の増加率を解析した結果、4ヶ月間プロシアニンジンB-2外用群の値（8.04%±13.75%；平均±標準偏差）は、プラセボ群（-4.32%±18.31%）に比べ有意に高い値であった（ $p < 0.05$ ，二標本 t 検定）。頭皮の一定箇所（一定面積（0.25 cm²））中の毛髪の増加本数は、4ヶ月間プロシアニンジンB-2外用群（3.67±4.09（平均±標準偏差）/0.25 cm²）で、プラセボ群（-2.54±4.00/0.25 cm²）に対し有意に高い値であった（ $p < 0.001$ ，二標本 t 検定）。以上のように、プロシアニンジンB-2の外用により、毛髪直径、非軟毛率、並びに毛髪密度の評価において、プラセボ群に対し有意に増加する傾向を認めた。なお、副作用はいずれの試験区の被験者にも確認されなかった。今回の臨床試験から、プロシアニンジンB-2の外用は、安全であり、かつ男性型脱毛症の治療に有効であることが示された。

今回の研究は、毛包上皮細胞の増殖を顕著に促進し、かつ*in vivo* で育毛活性を発現するプロシアニジンB-2の新たな生理活性を初めて明らかにした。特に、無添加対照区に対し300%以上の毛包上皮細胞増殖促進活性を示す物質は、本研究で示すプロシアニジンB-2以外には報告がなく、本物質は極めてユニークな存在と考えられる。プロシアニジンB-2の育毛活性の発見・実用化は、化粧品・医薬品業界に大きなインパクトを与えられ、また、本研究は、毛周期メカニズムの解明にも貢献するものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	富 田 房 男
副 査	教 授	横 田 篤
副 査	教 授	松 井 博 和
副 査	助教授	浅 野 行 蔵

学 位 論 文 題 名

Studies on a hair growth stimulant, procyanidin B-2

(育毛活性物質プロシアニジン B - 2 に関する研究)

本論文は、4章からなり、図14、表12、文献105を含む総頁102の英文論文である。別に、参考論文16編が付されている。

古来さまざまな物質が育毛剤として用いられてきたが、真に有効な育毛剤は見出されていない。ミノキシジル製剤は、米国FDAにより認可された唯一の外用育毛剤であるが、効果を発現する薬剤濃度が高いこと、有効率・副作用などの面で課題が残されており、必ずしも理想的な薬剤とは言えない。

本研究の目的は、安全で有効な育毛活性物質を見出し、実用化することである。

1. 天然物からの育毛活性物質の探索

毛包組織へ直接作用し、育毛活性を発現する物質を見出すことを目標に、毛包上皮細胞の単離・培養系を構築した。1000種以上の植物抽出物を対象に、マウス毛包上皮細胞への増殖促進活性を指標とするスクリーニングを実施した結果、ブドウ種子抽出物に顕著な活性を見出し、活性物質としてプロアントシアニジン単離・同定した。単離プロアントシアニジンは、無添加対照区に対し約230%の毛包上皮細胞増殖促進活性を示し、さらに、C3Hマウス*in vivo* 育毛評価系で、成長期毛包誘導活性を示した。構造解析の結果、単離プロアントシアニジンは、カテキン並びにエピカテキンを構成単量体とする平均重合度3.5のプロアントシアニジンであることが明らかとなった。

2. プロシアニジンオリゴマーの育毛活性

プロシアニジンの重合度並びに構成単量体組成と育毛活性との関係を明らかにする目的で、単一のプロシアニジン分子種としてプロシアニジン B - 1 [エピカテキン-(4 β →8)-

カテキン]、プロシアニジンB-2 [エピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン]、プロシアニジンC-1 [エピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン-(4 β →8)-エピカテキン] をリンゴから単離、プロシアニジンB-3 [カテキン-(4 α →8)-カテキン] を大麦種子から単離し、育毛活性を調べた。その結果、毛包上皮細胞への増殖促進活性は、2量体>3量体>単量体の順であり、構成単量体の種類による活性の違いは認められなかった。リンゴより単離したプロシアニジンB-2の毛包上皮細胞増殖促進活性は、30 μ M濃度で無添加対照区に対し300%以上の値を示した。1%濃度のプロシアニジンオリゴマーを休止期C3Hマウスに塗布したときの発毛面積率は、無添加対照群が41.7% $\pm$ 16.3% (平均 $\pm$ 標準偏差)であったのに対し、プロシアニジンB-2群で69.6% $\pm$ 21.8%、プロシアニジンB-3群で80.9% $\pm$ 13.0%、プロシアニジンC-1群で78.3% $\pm$ 7.6%であり、1%ミノキシジル群(81.2% $\pm$ 10.5%)同様、高い発毛面積率を示した。

3. プロシアニジンB-2外用を目的とした安全性試験

工業スケールでリンゴより分取したプロシアニジンB-2の安全性を確認する目的で、変異原性試験(原体)、急性皮下毒性試験(原体)、皮膚一次刺激性試験(製剤)、皮膚感作性試験(原体)、眼粘膜一次刺激性試験(製剤)を実施、外用剤として問題がないことを確認した。

4. 外用プロシアニジンB-2の臨床育毛評価試験

プロシアニジンB-2のヒトでの有効性を確認する目的で、二重盲検の育毛ボランティア試験(1%プロシアニジンB-2、20人; プラセボ、10人)を実施した。4ヶ月後の評価において、プロシアニジンB-2群の78.9%の被験者の毛髪平均直径が増加したが、プラセボ群の増加者の割合は30.0%であった($p < 0.02$, フィッシャー直接確率計算法)。直径40 μ m以上の毛髪(非軟毛)の増加率の解析では、プロシアニジンB-2群の値(8.04% $\pm$ 13.75%; 平均 $\pm$ 標準偏差)はプラセボ群(-4.32% $\pm$ 18.31%)に比べ有意に高値であった($p < 0.05$, 二標本 t 検定)。プロシアニジンB-2群の毛髪密度の増加(3.67 $\pm$ 4.09 (平均 $\pm$ 標準偏差) / 0.25 cm²)はプラセボ群(-2.54 $\pm$ 4.00 / 0.25 cm²)に対し有意に高値であった($p < 0.001$, 二標本 t 検定)。以上より、プロシアニジンB-2の男性型脱毛症への有効性を確認した。

今回の申請者の研究は、毛包上皮細胞の増殖を顕著に促進し、かつ*in vivo*で育毛活性を発現するプロシアニジンB-2の新たな生理活性を初めて明らかにした。特に、無添加対照区に対し300%以上の毛包上皮細胞増殖促進活性を示す物質は、本研究で示すプロシアニジン以外には報告がなく、本物質は極めてユニークな存在と考えられる。プロシアニジンB-2の育毛活性の発見・実用化は、化粧品・医薬品業界に大きなインパクトを与えられ、と考えられる。また、本研究は、毛周期メカニズムの解明にも貢献するものと考えられ

る。

よって、審査員一同は、高橋知也が博士（農学）の学位を受けるのに、十分な資格を有するものと認めた。