

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23660037

研究課題名（和文） 黒酵母由来β-グルカンを用いた老人性乾皮症治療剤の開発

研究課題名（英文） The study of the senile xerodermic therapeutic agent using β-glucan derived from *Aureobasidium pullulans*

研究代表者

溝渕 俊二 (MIZOBUCHI SHUNJI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：00209785

研究成果の概要（和文）：我々は黒酵母由来β-1,3-1,6グルカン（黒酵母β-グルカン）と海洋深層水（DSW）の特性を利用した老人性乾皮症塗布剤の開発を行っている。本研究では、HOS-HRマウスにTNCBを塗布し皮膚炎を発症させ、このマウスに評価物を塗布し、皮膚スコアと耳介厚で評価を行った。その結果、黒酵母β-グルカンの濃度依存的に症状の軽減効果が認められたが、DSWとの相乗効果は認められなかった。作用機序を検証するため、好酸球系細胞株;Eo1-1の脱顆粒に及ぼす影響を解析した。その結果、黒酵母β-グルカンには、脱顆粒を阻害する効果が認められた。

研究成果の概要（英文）：We studied about the liniment of senile xeroderma using beta-1,3-1,6-glucan (β-glucan) derived from *Aureobasidium pullulans* and the deep-sea water (DSW). In this study, we showed the effect of β-glucan and DSW for senile xeroderma in HOS-HR dermatitis model mice induced by TNCB. As a result, β-glucan was effective for a palliation of symptom in senile xeroderma a dose-dependent manner. Furthermore, we made clear that β-glucan had an effect to inhibit eosinophilic degranulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：看護学・臨床看護学

キーワード：老人性乾皮症、海洋深層水、黒酵母β-グルカン、好酸球

1. 研究開始当初の背景

高齢者の痒みの原因として、最も頻度が高い老人性乾皮症の根本的治療法は開発されていないため、対症療法で対処しているのが現状である。この症状は、加齢に伴いアンドロゲンの分泌が低下し、その結果、皮脂腺の機能低下を引き起こすために起こると考えられている。老人性乾皮症発生部位の皮膚は搔痒閾値が低下しているため、かゆみを伴うことが多く、搔くことにより容易に湿疹性的変化を起こす。痒いから掻き、その結果、さ

らに痒みが増すといった悪循環に陥り、最終的には皮脂欠乏性皮膚炎に移行する。薬剤を用いた治療は、皮脂・水分の保持を目的として白色ワセリン軟膏や尿素軟膏が用いられ、症状が炎症性の湿疹へと進行した場合は、ステロイド外用薬が処方される。また、痒みの軽減を目的として、経口的に抗アレルギー薬や抗ヒスタミン剤が処方されることもある。以上のように、現状は対症療法が主流であり、抜本的な治療法がない。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、黒酵母水溶性β-グルカンと海洋深層水の特性を利用した高齢者乾皮症治療方法の開発であった。現在行われている対症療法には、薬剤による副作用も懸念されるため、副作用のない老人性乾皮症に対する抜本的解決策を示すことを研究の最終目的とした。

我々が開発を目指す治療法と従来の対症療法とは、以下の点で異なっている。

(1) 副作用が無い。

(2) 油性成分を用いないため、石鹸の過剰利用に伴う脱脂が防止できる。⇒悪循環の改善に寄与する。

(3) 症状の緩和によるQOLの改善。

(4) 1剤で複数の効果が期待され、介護者のケアに伴う労力が軽減する。

上記の着眼点から本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 炎症性皮膚炎モデルマウスでの検証

マウスの皮膚にトリニトロクロロベンゼン(TNCB)を塗布し、皮膚炎を発症させ、このマウスに黒酵母β-グルカンと海洋深層水(DSW)あるいはそれらの混合物を塗布し、その効果を検討した。動物を用いた研究は、高知大学動物実験委員会の審査・承認の上、動物実験に関する法律および高知大学の定める動物実験に関する指針を順守し行った。

日本SLC(株)から購入したHOS-HR系ヘアレスマウス、♀、実験開始時6週齢、(1群5匹)を用いた。7% TNCBアセトン溶液30μlを腹部に塗布し皮膚炎を誘発した。誘発から1週間後、隔日で頸背部に1% TNCBアセトン溶液30μlを塗布し続けることで、皮膚炎症状を維持した。1% TNCB塗布は、隔日で実験終了まで継続して行った。

皮膚炎モデルマウスに対し、TNCBによる皮膚炎の誘発と同時に、試験標品塗布を開始した。試験標品100μlを患部である耳介及び背部に毎日塗布した。試験標品の塗布期間は2週間とし、TNCB塗布後8時間以上の時間を空けて行った。

効果の評価には、皮膚スコアと患部である耳介の厚みを用いた。皮膚スコアは、皮膚炎症状についてそれぞれ、紅斑、浮腫・肥厚、出血・掻破痕、乾燥の4項目を設け、各項目について、無症状(0点)、軽度(1点)、中等度(2点)、重度(3点)の評価を行い、合計12点満点でスコア化した(表1.)。耳介厚は、定圧ノギス(マイクロメーター)を用いて測定した。

	無症状 (0点)	軽度 (1点)	中等度 (2点)	重度 (3点)
紅斑	認められない	血管に沿った線の発赤	血管線から広がった面の発赤	面積の半分以上を占める発赤
浮腫・肥厚	認められない	初期の肥厚	広範囲に広がった肥厚	面積の半分以上を占める肥厚
出血・掻破痕	認められない	一箇所面の出血・掻破痕	2箇所以上の出血・掻破痕	面積の1/3以上を占める出血・掻破痕
乾燥	認められない	初期の乾燥	広範囲に広がった乾燥	面積の半分以上を占める乾燥

表 1.

(2) 好酸球系細胞株 Eo1-1 細胞を用いた脱顆粒に対する効果の検証

炎症性細胞として働く好酸球に対する黒酵母β-グルカンの効果を *in vitro* で解析する目的で、本試験を行った。

好酸球は正常時には末梢血白血球中にわずか3%しか存在せず、その純度や収量に限界があり、加えて *in vitro* での寿命が短いため、機能性の解析には適さない点が多い。そこで、本研究では、ヒト由来好酸球系細胞株 Eo1-1 細胞を用いて黒酵母β-グルカンの好酸球の脱顆粒に対する影響を検証した。

Eo1-1 細胞株は Saito¹ らによって樹立された好酸性細胞株で、通常の培養条件下では骨髄芽球(myeloblast)様の形態を示し、好酸球の特徴である内部特殊顆粒を有する細胞の割合がきわめて低い。本研究では、Eo1-1 細胞をジメチルスルホキシド(DMSO)で刺激し、内部顆粒の成熟を促し、成熟後の細胞を実験に用いた。黒酵母β-グルカンの好酸球に対する効果は、脱顆粒を指標とし、脱顆粒量の指標には刺激後細胞外に放出された、Eosinophil peroxidase (EPO) の活性を用いた。

Eo1-1 細胞株の DMSO 刺激による成熟培養は、Saito¹ らの方法を一部改変して行った。つまり、10%ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地中に 5×10^5 /ml の growth phase の細胞を浮遊させ、ここに終濃度 1% (V/V) の DMSO を添加して、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を行った。細胞の成熟は、後述の細胞内EPO活性値を指標として用いた。成熟がほぼプラトーに達した DMSO 添加10日後の細胞を実験に供した。

EPO 活性の測定は Kroegel² らの方法を改変して行った。Eo1-1 細胞を、ハンクス平衡塩類(Hanks' Balanced Salt Solution; HBSS)で2度洗浄後、種々の濃度の黒酵母β-グルカンを添加した HBSS 中に終濃度 1×10^6 cells/200μl で再懸濁した。10 μMカルシウムイオノフォアA₂₃₁₈₇で刺激を行い、10分、30分、60分、120分それぞれの時間、37°C条件下で静置した。Eo1-1の成熟の指標となる細胞内

の総 EPO 活性を測定する場合は、この細胞懸濁液に対して300 μ l の *o*-フェニレンジアミン (*o*-Phenylenediamine ; OPD) 溶液 (0.1% (V/V) Triton X-100、1mM H₂O₂、0.05 M Tris-HCl (pH 8.0)) を添加した。

脱顆粒量を測定する場合は、個々の処理を行った後、400g、4°C、5分間遠心し、上澄を回収し、ここに300 μ l の OPD 溶液を添加した。OPD 溶液を添加したら十分な攪拌を行い、界面活性剤であるTriton X-100による細胞膜あるいは顆粒膜の破壊を十分に促し、EPO を反応液内へ遊離させた。反応液を、室温で30分間反応させた後、200 μ l の4M H₂SO₄ を添加し、反応を停止させ、ここから200 μ l を96穴プレートに分取し、マイクロプレートリーダーを用いて波長 492 nmの吸光度を測定した。

4. 研究成果

(1) 炎症性皮膚炎モデルマウスでの検証

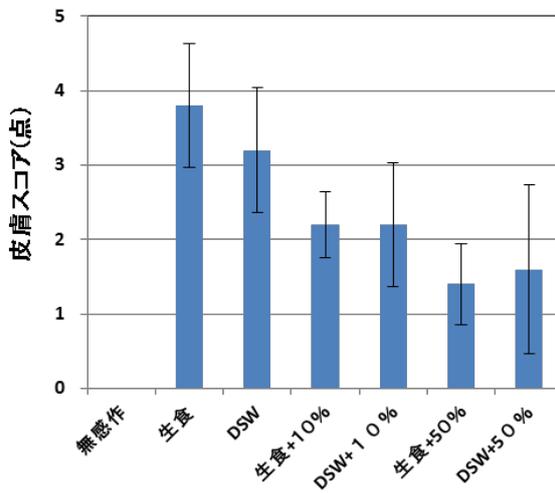


図 1.

無塗布群では無症状であったのに対し、TNCB の塗布により皮膚炎症状を呈した。ネガティブコントロールである生食群では 3.38 \pm 0.84 (\pm S.D.) 点、DSW 群は 3.20 \pm 0.84 点と、平均点では DSW 群が低値を示したが統計的には有意差は無かった。生食+10%グルカン群は 2.20 \pm 0.45 点、DSW+10%グルカン群は 2.20 \pm 0.84 点、生食+50%グルカン群は 1.40 \pm 0.55 点、DSW+50%グルカン群は 1.60 \pm 1.14 点であった。各群間で統計的処理を行ったところ (表 2.)、黒酵母 β -グルカンに関しては、皮膚症状の緩和効果が濃度依存的に認められた。しかし、DSW との相乗効果は認められなかった。

t 検定	p 値
生食 VS 生食+10%グルカン	0.0027
生食 VS 生食+50%グルカン	0.0003
生食+10% VS 生食+50%グルカン	0.0176
DSW VS DSW+10%グルカン	0.0477
DSW VS DSW+50%グルカン	0.0019
DSW10% VS DSW+50%グルカン	0.1853
生食 VS DSW	0.1448
生食+10% VS DSW+10%グルカン	0.5000
生食+50% VS DSW+50%グルカン	0.3664

表 2.

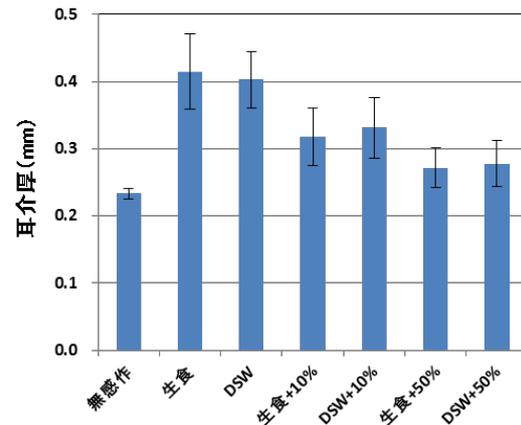


図 2.

図 2. には、塗布後の耳介厚を示した。無塗布群では 0.233 \pm 0.008 (\pm S.D.) であるのに対し、TNCB の塗布により耳介 (患部) の浮腫に伴う肥厚が認められた。ネガティブコントロールである生食群では 0.415 \pm 0.056 mm、DSW は 0.403 \pm 0.041 mm と、同程度の耳介厚であった。生食+10%グルカン群は 0.318 \pm 0.042 mm、DSW+10%グルカン群は 0.331 \pm 0.045 mm、生食+50%グルカン群は 0.271 \pm 0.029 mm、DSW+50%グルカン群は 0.278 \pm 0.035 mm であった。各群間で統計的処理を行ったところ (表 3.)、黒酵母 β -グルカンに関しては、皮膚炎緩和効果が濃度依存的に認められた。しかし、DSW との相乗効果は認められなかった。

t 検定	p 値
生食 VS 生食+10%グルカン	0.0002
生食 VS 生食+50%グルカン	0.0000
生食+10% VS 生食+50%グルカン	0.0052
DSW VS DSW+10%グルカン	0.0009
DSW VS DSW+50%グルカン	0.0000
DSW+10% VS DSW+50%グルカン	0.0163
生食 VS DSW	0.2922
生食+10% VS DSW+10%グルカン	0.2497
生食+50% VS DSW+50%グルカン	0.3308

表 3.

TNCB 誘導皮膚炎患部に黒酵母 β -グルカン を塗布することで、黒酵母 β -グルカンの濃度依存的に、皮膚炎症状の緩和効果が認められた。しかしながら、深層水との併用による相乗効果は認められなかった。その原因としては、深層水と比較して、黒酵母 β -グルカンの抗炎症緩和効果が著明であったため、深層水の効果がその背景となり、明確に見出されなかった可能性がある。

これらの結果より、以降は黒酵母 β -グルカンに焦点を絞り、作用機序の解明に向け検証を続けた。

(2) 好酸球系細胞株 Eo1-1 細胞を用いた脱顆粒に対する効果の検証

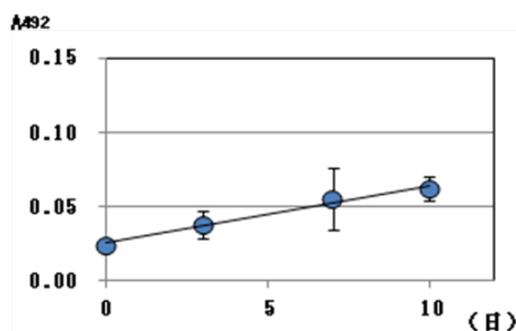


図 3.

図 3. には Eo1-1 細胞に対する DMSO 刺激に伴う細胞内部顆粒の成熟を、細胞内総 EPO 活性で示した。DMSO 添加に伴い、経時的に細胞内 EPO 活性が上昇することは、Eo1-1 細胞が成熟し、細胞内部顆粒が充実してきた事を示す。Eo1-1 細胞を DMSO 存在下で培養すると、内部顆粒が成熟する半面、細胞生存率が著しく低下するため、実験に必要な細胞数が十分に確保できる 10 日後を DMSO 刺激のエンドポイントとした。

図 4. に、好酸球系細胞株 Eo1-1 細胞をカルシウムイオノフォア A23187 で刺激をした際の脱顆粒に対する黒酵母 β -グルカンの効果を示した。黒酵母 β -グルカンには、Eo1-1 細胞の脱顆粒を阻害する効果が認められた。

最も効果が顕著であった培養 120 分後で、数値の比較を行った。未刺激の Eo1-1 細胞単独では A492 が 0.010 ± 0.013 (\pm S. D.) で、この数値が spontaneous な脱顆粒量を示す。Eo1-1 細胞に A23187 刺激を行うと、 0.064 ± 0.026 と A492 が著明に上昇し、脱顆粒が引き起こされたことが示唆された。この反応系に黒酵母 β -グルカンを添加すると、0.1% 添加では 0.027 ± 0.009 、0.05% 添加では 0.031 ± 0.006 と、好酸球系細胞株からの脱顆粒が阻害された。

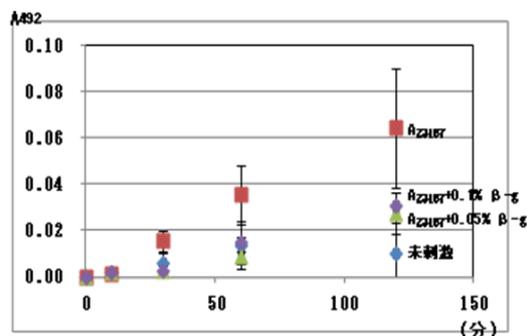


図 4.

A23187 刺激群とそれぞれの濃度のグルカン添加群とを統計的処理を行うと、0.1% 黒酵母 β -グルカン添加群、0.05% 黒酵母 β -グルカン添加群ともに、統計的有意差が認められた。0.1% 黒酵母 β -グルカン添加群と 0.05% 黒酵母 β -グルカン添加群とでは有意差が無かったことから、0.05% 以下の濃度でも十分に効果が発揮されることが示唆された。

t 検定	p 値
A_{23187} VS $A_{23187}+0.1\% \beta$ -g	0.039934
A_{23187} VS $A_{23187}+0.05\% \beta$ -g	0.046336
$A_{23187}+0.1\% \beta$ -g VS $A_{23187}+0.05\% \beta$ -g	0.306933

表 4.

【まとめ】

以上述べてきたとおり、TNCB 誘導皮膚炎患部に黒酵母 β -グルカンを塗布することで、黒酵母 β -グルカンの濃度依存的に、症状の緩和効果が認められた。しかしながら、深層水との併用による相乗効果は認められなかった。その原因は、深層水と比較して黒酵母 β -グルカンの効果が著明であったため、深層水の効果が明確に見出されなかった可能性がある。あるいは、用いた深層水の組成が、本研究には適していなかった可能性も残るため、今後もさらに検証を続けていく計画である。

黒酵母 β -グルカン塗布による抗炎症効果の作用機序の一つとして、好酸球の機能性を阻害する可能性に着目し、解析を行った。好酸球は炎症、特にアレルギー性炎症の中心的なエフェクター細胞として機能している。好酸球は NADPH oxidase に由来する活性酸素の産生や、細胞内特殊顆粒に内在するタンパク質によって組織損傷を引き起こす。本研究では、特に細胞内部特殊顆粒の放出に対する黒酵母 β -グルカンの影響を、*in vitro* の系で解析した。

好酸球の細胞内部特殊顆粒に内在するタンパク質は主に、major basic protein (MBP)、eosinophil peroxidase (EPO)、

eosinophil cationic protein (ECP)、eosinophil derived neurotoxin (EDN)の4種の塩基性タンパク質が挙げられる。電子顕微鏡で好酸球顆粒を観察すると、電子密度が高いコア部分と、微細顆粒状の皮質から形成されている。MBPはコア部分に、EPO、ECP、EDNは皮質部分に局在する。好酸球に刺激が加わると、脱顆粒が起こり、組織中にこのEPO、EDN、ECP、MBPが放出される。黒酵母β-グルカンに脱顆粒を阻害する効果があれば、結果的にこの4種の塩基性タンパク質による組織損傷を防ぐことができ、炎症の緩和につながると予想した。研究成果(2)で示した通り、黒酵母β-グルカンには、好酸球の脱顆粒を阻害する効果が認められ、この効果が皮膚炎症症状の緩和に寄与している可能性を見出した。

現在、黒酵母β-グルカンの好酸球に及ぼす効果を検証するため、次段階の研究準備を進めている。通常は末梢白血球中に3%前後しか存在しない好酸球を、IL-5遺伝子をトランスジェニックすることで50%以上に高めたマウスを用いての解析準備に入っている。このマウスを用いることで、今回用いたEo1-1細胞のようながん細胞とは異なり、正常好酸球に対する効果を検証する事が可能となる。さらに、試験管レベルから動物レベルでの解析を行う計画も進行中である。

我々が取り組んでいるテーマは、まだ途上ではあるものの、治療方法の確立していない老人性乾皮症の症状低減に寄与する可能性が高い素材であることを改めて示した。本期間中には海洋深層水の効果を明確にすることはできなかったが、本学で行った抗アトピー試験に関するヒト介入試験の結果や、我々が行った正常皮膚繊維芽細胞の増殖促進(傷の治癒促進)効果など、症状の改善に寄与する可能性は高い。今後も実用化に向けた検証を進めていく計画である。

【参考文献】

- 1) H. Saito, A. Bourinbaiar, et al.: Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line, *Blood*, **66**, 1233-1240 (1985)
- 2) C. Kroegel, T. Yukawa, et al.: Stimulation of degranulation from human eosinophils by platelet-activating factor, *immunol.* **142**, 3518-3526 (1989)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

- ① 北村亜希子、渡部嘉哉、中島洋、大島正人、溝渕俊二：黒酵母β-1,3-1,6グルカンの抗アレルギー塗布剤としての検討、第62回日本アレルギー学会秋期学術大会、平成24年11月29日、大阪国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝渕 俊二 (MIZOBUCHI SHUNJI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：00209785

(2) 研究協力者

渡部 嘉哉 (WATANABE YOSHIYA)
高知大学・医学部・特任助教
北村 亜希子 (KITAMURA AKIKO)
高知大学・黒潮圏・博士課程大学院生
中島 洋 (NAKAJIMA YOU)
(株)ミューズ・研究開発部長