

敏感肌に対するグリチルリチン酸ジカリウムの有効性*

屋敷 圭子, 大戸 信明, 川嶋 善仁, 中原 達雄

丸善製薬株式会社 総合研究所**

近年、紫外線や大気汚染などの環境因子、食生活の変化やストレス等によって敏感肌を訴える人は増加している。われわれは、すでに敏感肌向け化粧品に多く配合されているグリチルリチン酸ジカリウム (DPG) の有効性について検討した。DPG は、神経ペプチドであるサブスタンス P による神経成長因子の遺伝子発現上昇を抑制したことにより、敏感肌の特徴的状態である知覚過敏反応を抑制できる可能性が示された。また、敏感肌を対象にした臨床試験では、0.2% DPG 配合製剤は乳酸によって誘導されるかゆみに対する違和感に対して改善傾向が認められた。これらの結果から、DPG は、種々の敏感肌の人に対して改善作用を有する可能性が示唆された。

1. 緒 言

近年、自らを「敏感肌」とであると認識している女性は増加している。敏感肌とは、皮膚に明らかな病変がないにもかかわらず、外界からの要因に対して、皮膚に不利、有害な反応が起こりやすい皮膚のタイプ¹⁾と考えられているが、「敏感肌と診断するに足る科学的基準にはいまだ一定の見解がない²⁾」と沼上らが述べているように判断基準がはっきりしていない。敏感肌と自覚している女性は、その理由として、「化粧品使用時にむずむずする」、「ヒリヒリしみる」、「アレルギー体質」、「にきび・吹き出物が出やすい」など感覚的要因を挙げている。横田は、このような人の肌状態を詳細に調査し、化学物質の透過性亢進、表皮バリア機能低下、外的刺激の感受性が高まっているなど多くの特徴を有することをつきとめ、敏感肌は一つの肌状態を示すのではなく、異なる肌状態を有する3つの特徴的なタイプに分類されることを明らかにした³⁾。すなわち、Ⅰ. 表皮バリアが崩壊したタイプ、Ⅱ. 炎症タイプ、Ⅲ. みかけ上健康肌である知覚過敏タイプである。これら敏感肌のすべてのタイプにおいて、テープストリッピングにより剥離した角層細胞中の神経成長因子 (NGF) 量が有意に増加し、また、ス

テイングスコアも高いという報告がなされていることから、敏感肌では神経線維が関与する知覚過敏反応を呈している可能性が考えられる。

われわれは、すでに抗炎症作用成分として敏感肌向け化粧品に多く配合されているグリチルリチン酸ジカリウム (DPG) が敏感肌の上述の3つの特徴的なタイプに対して有用であるかについて検討した。さらに、臨床試験による刺激感緩和作用についての検討を行った。

2. 実 験

2.1. 試 料

DPG は丸善製薬社の製品を使用した。DPG の構造式を Fig.-1 に示す。サブスタンス P (SP) は、和光純薬社の製品を使用した。

2.2. 細胞培養

正常ヒト新生児表皮角化細胞 (NHEK, クラボウ) は増殖添加剤を含む HuMedia-KG2 培地 (KGM, クラボウ) を用いて 37℃, 5% CO₂ 条件下で培養した。

2.3. バリア機能に対する評価

2.3.1. インボルクリン産生促進の評価

NHEK を 48 穴プレートに播種し、サブコンフルエントになるまで培養したのち、培地を KGM で溶解した DPG に交換し、48 時間培養した。培養終了後、冷アセトンエタノールで細胞を固定し、細胞表面に発現しているインボルクリン量をモノクローナル抗ヒトインボルクリン抗体 (Sigma-Aldrich) を用いた ELISA 法により測

* 2016.3.3 受付, 2016.7.7 採用

** 〒729-3102 福山市新市町相方 1089-8 : 1089-8, Sagata, Shin-ichi-cho, Fukuyama 729-3102, Japan

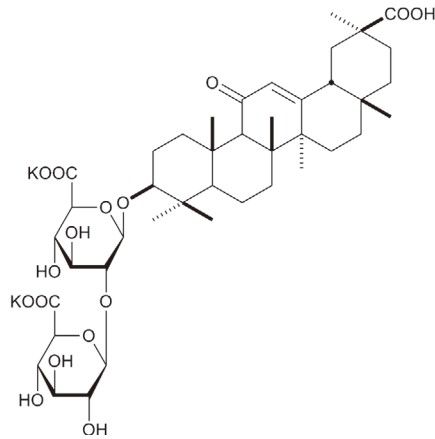


Fig.-1 Structure of dipotassium glycyrrhizate.

定した。

2.3.2. トランスグルタミナーゼ-1 産生促進の評価

NHEK を 96 穴プレートに播種し、サブコンフルエントになるまで培養したのち、培地を KGM で溶解した DPG に交換し、24 時間培養した。培養終了後、冷アセトンエタノールで細胞を固定し、細胞表面に発現しているトランスグルタミナーゼ-1 量をモノクローナル抗ヒトトランスグルタミナーゼ-1 抗体 (Biomedical Technologies) を用いた ELISA 法により測定した。

2.4. 抗炎症の評価

2.4.1. ヒアルロニダーゼ活性阻害の評価

所定濃度の DPG を溶解した 0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 3.5) 0.2 mL にヒアルロニダーゼ溶液 Type IV-S (Sigma-Aldrich) 0.1 mL を加え、37°C で 20 分間反応した。さらに、活性化剤として 2.5 mmol/L 塩化カルシウム (和光純薬) 0.2 mL を加え、37°C で 20 分間反応した。これに 0.8 mg/mL ヒアルロン酸ナトリウム溶液 (from rooster comb) (和光純薬) 0.5 mL を加え、37°C で 40 分間反応した。その後、0.4 mol/L 水酸化ナトリウム (和光純薬) 0.2 mL を加えて反応を止め冷却したのち、各反応溶液にホウ酸溶液 (和光純薬) 0.2 mL を加え、3 分間煮沸した。氷冷後、p-DABA 溶液 6 mL を加え、37°C で 20 分間反応した。その後、波長 585 nm における吸光度を測定した。

2.4.2. プロスタグランジン E₂ (PGE₂) の評価

NHEK を 48 穴プレートに播種し、サブコンフルエントになるまで培養したのち、培地を増殖添加剤を含まない正常ヒト表皮角化細胞基礎培地 (KBM, クラボウ) に交換し、さらに 1 日培養した。培地を Hank's 液へ交換し、50 mJ/cm² の UVB を照射したのち、KBM で溶解した DPG に交換し、24 時間培養した。培養上清中の PGE₂ 量を PGE₂ EIA Kit (Cayman Chemical) を用いて定

量した。

2.5. NGF の遺伝子発現の評価

NHEK を 35 mm シャーレに播種し、サブコンフルエントになるまで培養したのち、培地を KBM に交換し、さらに 1 日培養した。KBM で溶解した DPG または SP を各シャーレに添加し 24 時間培養した。その後、以下に示す方法で mRNA 発現量を測定した。

細胞から、ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いて総 RNA を抽出し、分光光度計を用いて 260 nm における吸光度により、総 RNA 量を求めた。総 RNA を基に、リアルタイム RT-PCR 法により、mRNA 発現量の測定を行った。すなわち、500 ng の総 RNA を PrimeScript™ RT Master Mix (タカラバイオ) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、NGF および内部標準である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現量を測定した。使用したプライマー (タカラバイオ) 配列を以下に示す。検出はリアルタイム PCR 装置 Smart Cycler® (Cepheid), SYBR® Premix Ex Taq™ (タカラバイオ) を用いた。その操作は定められた方法に従い、NGF mRNA の発現量を内部標準である GAPDH mRNA の発現量に対する割合として求めた。

NGF: 5'-AGCGTCCGGACCCAATAACA-3'

5'-CCTGCAGGGACATTGCTCTC-3'

GAPDH: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'

5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'

2.6. 肌の刺激感緩和作用の評価

肌の刺激感緩和作用の評価として、ステインギング試験を用いた。化粧品使用時に「びりびり」・「ちくちく」といった感覚的な違和感を示す女性の中から、事前に 2 日間に渡り 5% 乳酸配合製剤に対して違和感を示した再現性の良好な女性 (6 名, 平均 42.2 歳) を選び、対象とした。なお、本試験の被験者には試験参加についてあらかじめ内容を説明し、文書による同意を取得した上で実施した。Table-1 に示す処方製剤を調製し、試験を実施した。

被験者 6 名を 2 グループに分け、洗顔後、20 分間恒温恒湿室 (22°C, 湿度 50%) で待機し、一方のグループは 5% 乳酸, 0.2% DPG 配合製剤を顔面 (額, 鼻下, 下顎) に塗布し、塗布後、1 分, 2.5 分, 5 分後の違和感の強さを評価した。違和感に対する評価指標は Table-2 に示す。ついで、再度洗顔後、20 分間恒温恒湿室で待機し、5% 乳酸配合製剤 (DPG 無配合) を塗布し、同様に評価した。また、もう一方のグループは配合製剤の塗布の順番を入れ替え、同様に評価した。

Table-1 Formulae of emulsion creams (W/W%).

Ingredient	0.2% DPG	Without DPG
Polyglyceryl-10-pentastearate/ Sodium stearoyl lactylate/ 1-Docosanol	2.5	2.5
Glyceryl monostearate	1.5	1.5
Ethoxylated hydrogenated castor oil	0.5	0.5
1-Docosanol	1.5	1.5
Macadamia nut oil	2.0	2.0
3, 6-Dichloropyridazine	3.0	3.0
Ethylhexyl palmitate	3.0	3.0
Squalane	3.0	3.0
Polydimethylsiloxane	4.0	4.0
DPG	0.2	—
Butylene glycol	4.0	4.0
Glycerine	4.0	4.0
2% Xanthan gum solution	15.0	15.0
Methylparaben	0.2	0.2
Water	To 95.0	To 95.0
Lactic acid	5.0	5.0

Table-2 Parameters of discomfort sensation scale for severity assessment.

(a) Parameters of Discomfort	
Itching (feel a desire to scratch)	
Pain (prickling, stinging, burning, tingling)	
Crawling (feels like a worm is moving under the skin)	
(b) Discomfort Scale: Severity	
0.0	No sensation
0.5	Slight discomfort, barely detectable
1.0	Mild discomfort
1.5	Mild to moderate discomfort
2.0	Moderate discomfort
2.5	Moderate to severe discomfort
3.0	Severe discomfort, intense unpleasant feeling

2.7. 統計学的検定

値は平均値±標準誤差で表した。統計学的有意差検定は一元配置分散分析により水準間の差を認めたのち、Dunnett法を用いて多重比較検定をし、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判断した。2品間における違和感の強さについては、Wilcoxonの符号付順位和検定を用いて検定した。

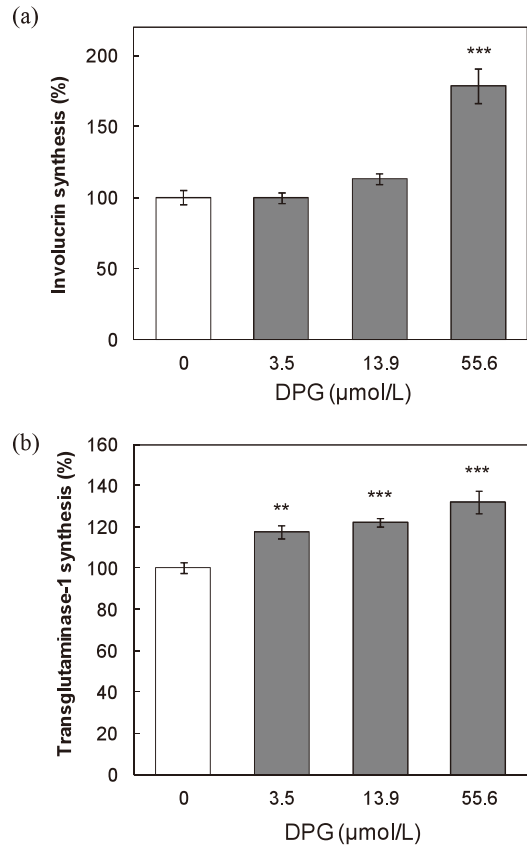


Fig.-2 Promotion effects on involucrin and transglutaminase-1 synthesis.

NHEKs were incubated with DPG. The amount of involucrin (a) and transglutaminase-1 (b) protein was quantitatively evaluated by ELISA. Values are the Mean ± SEM, $n = 6$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, compared with the 0 μmol/L.

3. 結 果

3.1. バリア機能に対する評価

インボルクリンおよびトランスグルタミナーゼ-1を産生するNHEKを用いてDPGの作用を検討したところ、いずれのタンパク質についても産生を促進した (Fig.-2)。

3.2. 抗炎症に対する評価

ヒアルロニダーゼの活性を阻害することでヒスタミンの放出を抑えることができ、アレルギー反応に伴う痒みや痛みを緩和することができる。DPGはFig.-3に示すとおり、ヒアルロニダーゼ活性を阻害した。また、紫外線による皮膚の炎症に対する作用検討のために、炎症性メディエーターとしてPGE₂に着目し、NHEKを用いてUVB照射によるPGE₂産生に対するDPGの効果を検討した。その結果、Fig.-4のように抑制作用を示した。

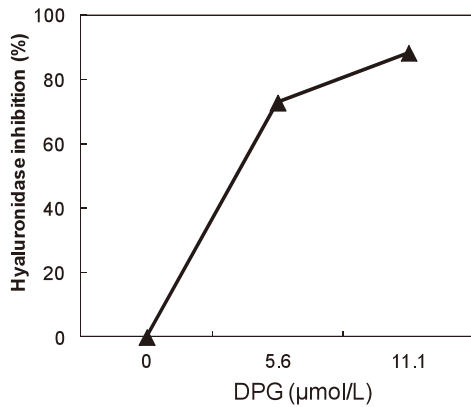


Fig.-3 Inhibition effect on hyaluronidase activity.

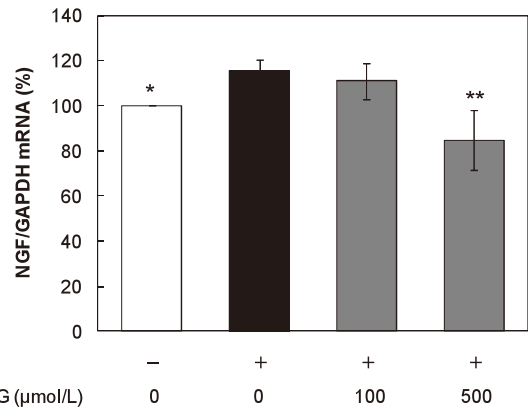


Fig.-5 Effects of DPG on NGF gene expressions. NHEKs were incubated with DPG and SP for 3 h. The mRNA level of NGF was evaluated by real-time RT-PCR analysis. Values are the Mean \pm SEM, $n=4$, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, compared with the SP (+), DPG 0 $\mu\text{mol/L}$.

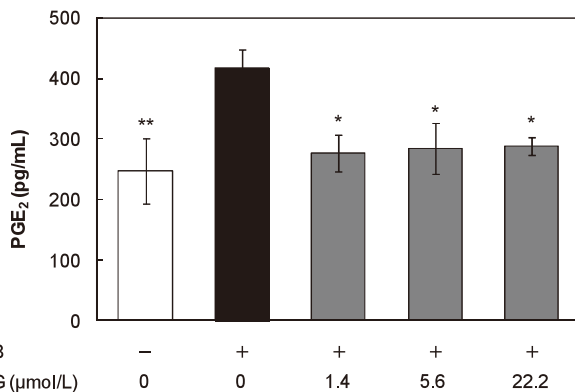


Fig.-4 Inhibition effect on UVB-induced PGE₂ production. NHEKs were incubated with DPG for 24 h after UV irradiation. The amount of PGE₂ in supernatant was quantitatively evaluated by ELISA. Values are the Mean \pm SEM, $n=6$, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, compared with the UVB (+), DPG 0 $\mu\text{mol/L}$.

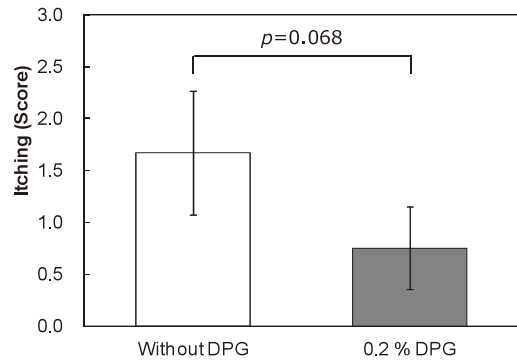


Fig.-6 Suppression effect of DPG on the stinging sensations induced by lactic acid on the human face. Values are the Mean \pm SEM, $n=6$.

3.3. NGF の遺伝子発現の評価

NHEK に 10 nmol/L の SP を処理することにより、NGF mRNA 発現が亢進した。このとき、DPG を同時に処理することで、SP によって亢進する NGF mRNA 発現が有意に抑制された (Fig.-5)。

3.4. 肌の刺激感緩和作用の評価

肌の刺激感緩和作用の評価について、6名の被験者の結果について解析した。「かゆみ」に対する違和感の解析結果を Fig.-6 に示した。5%乳酸と 0.2% DPG 配合製剤は、対照である 5%乳酸配合製剤 (DPG 無配合) と比較し、かゆみに対する違和感のスコアが低値を示す傾向であった。

4. 考 察

敏感肌向け化粧品に多く配合されている成分である DPG について、その配合根拠となる作用メカニズムについて解明することを目的とし、横田によって分類された敏感肌の 3 つのタイプ³⁾(I. 表皮バリアが崩壊したタイプ、II. 炎症タイプ、III. みかけ上健康肌である知覚過敏タイプ) に対する有用性を検討した。

肌のバリア機能を高めるには、肌の表層部である角層を成熟させる必要があり、この角層を成熟化させるにはコーニファイドエンベロープ (CE) の成熟が重要となる⁴⁾。CE とは、角質細胞を覆う強固な膜であり、CE のおかげで肌の水分保持、皮膚のバリア機能が維持される。CE の主な構成成分は、材料であるインボルクリン、そしてインボルクリン同士を繋ぎ合わせる酵素トラ

ンスグルタミナーゼ-1である。肌の内側にある角層細胞が分化するとともにインボルクリンが産生され、トランスグルタミナーゼ-1により繋ぎ合わせられる。このようにして肌の表面ではCEが作られるが、CEが十分に成熟しなければ肌の構造は弱くなり、バリア機能が低下する。そこで、インボルクリンおよびトランスグルタミナーゼ-1を増やすことにより、CEを成熟化させ、肌のバリア機能を高めることが可能と考えられる。DPGは、インボルクリンおよびトランスグルタミナーゼ-1の産生を促進したことから、CEの成熟化が期待できる。つまり、表皮バリアが崩壊したタイプの敏感肌への有用性が示唆された。

DPGは、細胞膜リン脂質に結合しているアラキドン酸の遊離を促進する酵素の活性阻害や、遊離したアラキドン酸の代謝酵素の活性阻害作用により、炎症応答の発生を抑制することがすでに知られている⁵⁾。今回はDPGの抗アレルギー作用を検討するために、ヒアルロニダーゼ活性阻害作用を評価した。DPGはヒアルロニダーゼの活性を阻害したことから、ヒスタミン顆粒の放出を抑え、アレルギー反応に伴う痒みや痛みを緩和することができると考えられる。また、紫外線による皮膚の炎症に対する作用検討のために、炎症性メディエーターとしてPGE₂に着目し、NHEKを用いてUVB照射によるPGE₂産生に対するDPGの効果を検討した。その結果、DPGにUVB照射によるPGE₂産生抑制作用が認められた。これまでも抗炎症剤、抗アレルギー剤として臨床治療に使用されてきたDPGが炎症タイプの敏感肌に対しても有用であることが示唆された。

前述した敏感肌の3つのすべてのタイプにおいて、テープストリッピングにより剥離した角層細胞中のNGF量が有意に増加し、また、ステインギングスコアも高いという報告がなされている³⁾。特に、タイプⅢでは、健康な人の皮膚の状態と同じであり、問題ないように見えるにもかかわらず、刺激に関して非常に敏感である。これらのことから神経線維が関与する知覚過敏反応を呈している可能性が極めて高いと考えられる。

神経線維は、正常皮膚では表皮真皮境界部に終焉しているが、ドライスキンでは表皮内、特に角層直下まで侵入、増殖していることが報告されている⁶⁾。神経線維の表皮内侵入には、神経軸索ガイダンス分子であるNGF、Semaphorin 3A (Sema3A)が関与している^{7),8)}。角層細胞は、神経伸長因子のNGFと神経反発因子のSema3Aを発現しており、正常皮膚ではSema3AがNGFよりも優位になっている。そのため神経線維は表皮真皮境界部に終焉しているが、ドライスキンなどでは

Sema3Aの発現が低下し、NGFの発現が亢進した結果、NGF優位になり、神経線維の表皮内への侵入が惹起されている。つまり、ケラチノサイトのNGF産生を低下させることにより、NGF誘導性の表皮内神経線維数を減少させることが敏感肌にも重要であると考え、ケラチノサイトにおけるNGF遺伝子発現抑制作用を評価した。

培養細胞を用いた実験において、NGFの産生を誘導するために神経ペプチドであるSPを用いた。SPは、11個のアミノ酸からなる神経ペプチドであり、主として痛覚情報伝達物質として知られている。SPはケラチノサイトから遊離され⁹⁾、さらにSPがケラチノサイトにおいてNGFの産生を誘導することが知られている¹⁰⁾ことから、まず、SPによるNGF遺伝子発現の誘導について評価した。NHEKにSPを処理すると、100 nmol/LではNGF mRNA発現は減少したが、10 nmol/LではNGF mRNA発現の亢進が認められ、SPの最適条件が確認できた(データ未表示)。次に、10 nmol/LのSPとDPGを同時に処理した際のNGF遺伝子発現について評価した。その結果、DPGはSPによるNGF mRNA発現の上昇を抑制することが確認された。また、SP処理を行わない場合のDPGのNGF遺伝子発現についても評価したところ、DPG単独ではNGF mRNA発現量に変化は認められなかった(データ未表示)。このことから、DPGはSPを介したNGF遺伝子発現上昇を抑制し、NGF産生を低下させることにより、NGF誘導性の表皮内神経線維数を減少させる可能性が示唆された。

最後に、ステインギング試験の刺激物質の一つである乳酸による感覚刺激を用い、敏感肌に対するDPGの有用性について評価を行った。その結果、DPG配合製剤によって違和感の改善傾向が確認された。しかしながら、DPGによる違和感の改善作用については、バリア機能改善作用によるものか、抗炎症作用によるものか、NGF誘導性の表皮内神経線維数を減少させているのか、もしくはその他のメカニズムも関与しているのか明確な知見は得られていない。これらの作用メカニズムの解明を含め、更なる検討の実施が今後の課題である。

5. 結 論

敏感肌向け化粧品に多く配合されているDPGは、培養細胞を用いた試験において、角層バリア機能を向上させる可能性を示した。また、ヒアルロニダーゼ活性阻害作用やUVB照射によって誘導されるPGE₂のような炎症要因の産生を抑制する作用も認められた。神経ペプチドであるSPによるNGFの遺伝子発現上昇をDPGが抑制したことにより、敏感肌に特徴的な知覚過敏反応を抑

制できる可能性が示された。臨床試験では、0.2% DPG 配合製剤はかゆみに対する違和感を改善した。以上の結果から、DPG は敏感肌の3つのタイプである、Ⅰ. 表皮バリアが崩壊したタイプ、Ⅱ. 炎症タイプ、Ⅲ. みかけ上健康肌である知覚過敏タイプのいずれに対しても改善作用を有する可能性が示された。

引用文献

- 1) E. Berardesca, H. I. Maibach, *Dermatol. Clin.*, 9 (1), 89-92 (1991)
- 2) 沼上克子, 田上八郎, *臨皮*, 54 (5 増), 188-189 (2000)
- 3) 横田朋宏, *香粧会誌*, 29, 44-49 (2005)
- 4) 平尾哲二, *香粧会誌*, 27, 167-170 (2003)
- 5) 河田則文, 長谷川格, 坂上吉秀, 溝口靖紘, 小林絢三, 近藤洋子, 森澤成司, 門奈丈之, 山本祐夫, *炎症*, 9 (1), 29-32 (1989)
- 6) M. Tominaga, S. Ozawa, S. Tengara, H. Ogawa, K. Takamori, *J. Dermatol. Sci.*, 48, 103-111 (2007)
- 7) M. Tominaga, H. Ogawa, K. Takamori, *Br. J. Dermatol.*, 158, 842-844 (2008)
- 8) M. Tominaga, A. Kamo, S. Tengara, H. Ogawa, K. Takamori, *Br. J. Dermatol.*, 161, 1028-1037 (2009)
- 9) S. Bae, Y. Matsunaga, Y. Tanaka, I. Katayama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 263 (2), 327-333 (1999)
- 10) G. J. Burbach, K. H. Kim, A. S. Zivony, A. Kim, J. Aranda, S. Wright, S. M. Naik, S. W. Caughman, J. C. Ansel, C. A. Armstrong, *J. Invest. Dermatol.*, 117 (5), 1075-1082 (2001)

The Effect of Dipotassium Glycyrrhiza on Sensitive Skin Care*

Keiko Yashiki, Nobuaki Ohto, Yoshihito Kawashima, Tatsuo Nakahara

Research Center, Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd. **

Market volume of sensitive skin care products has continuously increased along with the increase in people's concern about sensitive skin due to more stressful lifestyles and environmental degradation. We investigated whether dipotassium glycyrrhizate (DPG), the active ingredient which is most frequently utilized in sensitive skin care products in Japan, is able to reduce the expression of nerve growth factor (NGF), which upregulates hyperesthesia in the skin, a characteristic condition of sensitive skin, with an *in vitro* study. Furthermore, suppression effects in some parameters of sensory discomfort were found in a human stinging test using a formulation containing 5% lactic acid and with/without 0.2% DPG. In this study, DPG suggested the possibility of improvement for persons with various kinds of sensitive skin.

Key words : dipotassium glycyrrhizate, sensitive skin, nerve growth factor, Substance P, barrier function, inflammation, hypersensitivity, stinging test, pain, discomfort