

黒茶熱水抽出物の育毛促進作用に関する研究

Studies on the hair growth-promoting effect of Chinese black tea extract

平成 25 (2013) 年度

侯 依静

(I-Ching Hou)

要 旨

緑茶成分の epigallocatechin gallate (EGCG) は経口投与により育毛促進作用を示すことが知られているが、経皮投与により育毛促進作用を示す茶成分はこれまで報告されていない。今回、背部剃毛した6週齢の雄性 C3H/He マウスの背部に 150 μ L の試料溶液を塗布する系を用いて、中国の伝統的な発酵茶の一種である黒茶の熱水抽出物 (Chinese black tea extract, CBTE 3.5%) が有意な育毛促進作用を示すことを見出した。CBTE は EGCG を含有しない一方、緑茶よりもはるかに強力なエストロゲン受容体 (ER) 親和性を示した。CBTE は2種類の ER のうち、ER α よりも ER β に対して8倍強い親和性を示した。コアクチベーターレセプターアッセイの結果、CBTE に含まれる成分は ER α および ER β に対するアンタゴニストであることがわかった。

CBTE の育毛促進作用は意外にも ER α 選択的アンタゴニスト MPP によりブロックされる一方、ER β 選択的アンタゴニスト PHTPP により促進された。また、PHTPP はそれ自身が育毛促進作用を示すことを新たに見出した。CBTE および PHTPP の育毛促進作用は ER β 選択的アゴニスト DPN より有意に阻害された。ER β アンタゴニストである CBTE および PHTPP は内因性エストロゲンの ER α 作用を増強することによって育毛促進作用を示すと考えられる。育毛に関与することが知られている成長因子に対する中和抗血清を用いた実験から、CBTE および PHTPP の育毛促進作用には ER α の下流で血管内皮増殖因子 (VEGF)、線維芽細胞増殖因子 7 (FGF-7)、およびインスリン様成長因子 1 (IGF-1) が関与することが示唆された。

Abstract

It has been reported that green tea including active components (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), promote hair growth after oral administration, but rarely been reported by topical application.

In this study, hair growth-promoting effect of Chinese black tea extract (CBTE), a kind of Chinese traditional fermented tea, in shaved 6-week-old male C3H/He mice by topical administration has been investigated. CBTE was containing almost no EGCG, however it showed significant hair growth-promoting effect after topical administration with 150 μ L of 3.5% sample solution and showed a higher affinity for estrogen receptor (ER) than green tea. Furthermore, CBTE displayed 8 times higher affinity for the ER β than the ER α , and inhibited estrogen binding reaction as antagonists of ER α and ER β in co-activator assay.

Hair growth-promoting effect of CBTE was also blocked by ER α selective antagonist MPP unexpectedly, while this effect was promoted by ER β selective antagonist PHTPP. Moreover, PHTPP itself also showed hair growth-promoting effect. ER β selective agonist DPN inhibited the hair growth-promoting effect of not only CBTE but also PHTPP significantly. These results suggest that the hair growth-promoting effect of CBTE and PHTPP, as ER β antagonist, might enhance the endogenous estrogen effect for ER α . The hair growth-promoting effect of CBTE and PHTPP was blocked by antibodies of vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor 7 and insulin-like growth factor 1, suggesting this effect might stimulate these growth factors via ER α .

略語一覽

CBTE	Chinese black tea extract
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
DPN	2,3- <i>bis</i> (4-Hydroxyphenyl)-propionitrile
E2	Estradiol
EGCG	(-)-Epigallocatechin gallate
ER	Estrogen receptor
FGF-7	Fibroblast growth factor-7
Fulvestrant	7 α ,17 β -[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IgG	Immunoglobulin G
MPP dihydrochloride	1,3- <i>Bis</i> (4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinylethoxy)phenol-1- <i>H</i> pyrazole dihydrochloride
PTT	4,4',4''-(4-Propyl-[1 <i>H</i>]-pyrazole-1,3,5-triyl) <i>tris</i> phenol
PHTPP	4-[2-Phenyl-5,7- <i>bis</i> (trifluoromethyl)pyrazolo[1,5- <i>a</i>]pyrimidin-3-yl]phenol
SRC1	Steroid receptor coactivator 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

目次

序論	1
第一章 黒茶熱水抽出物による育毛促進作用の解明	6
第一節 黒茶熱水抽出物の経皮塗布による育毛作用	6
1. 緒言	
2. 実験方法	
3. 結果と考察	
第二節 黒茶熱水抽出物の示す育毛作用メカニズムの解明.....	15
1. 緒言	
2. 実験方法	
3. 結果	
4. 考察	
図表	
第二章 エストロゲン受容体 $ER\beta$ 選択的アンタゴニスト PHTPP による育毛 促進作用.....	31
1. 緒言	

2. 実験方法
3. 結果
4. 考察

図表

第三章 ERβ アンタゴニストである黒茶熱水抽出物、および PHTPP の関与 する育毛成長因子について.....40

1. 緒言
2. 実験方法
3. 結果
4. 考察

図表

総括	47
展望	51
引用文献	52
謝辞	53

序 論

毛包は、主に上皮系細胞、および間葉系細胞で構成されており [1]、その組織の成長の開始から終止までの循環はヘアサイクルと呼ばれ、下記の3期に分かれている(Figure 1) [2]。すなわち、①成長期 (anagen) : 細胞分裂が活発化し、毛髪の太さ、長さが増加する、②退行期 (catagen) : 下部毛包組織が委縮し、成長が停止する、そして③休止期(telogen) : 毛包が最も短くなり、古い毛髪が抜けて次の成長期への準備するため細胞活動が一旦休止する。

その周期は成長刺激物質、例えばインスリン様成長因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) [3,4] と、成長抑制物質 dihydrotestosterone [5] とのバランスで調節されていることが知られている。明確な作用機構は未だ不明だが、加齢、ホルモンバランス、生活習慣、精神的なストレスや、薬物治療などの原因によって、毛包数量の減少、または成長期の短縮が引き起こされ、最終的に脱毛症に至る (Figure 2) [6-8]。

このような、脱毛による外見への影響は人々の悩みとなり、その問題を抱える人数は年々増加していることから、育毛剤の開発が望まれている。市販されている代表的な医薬品としては、毛髪成長期を延長する有効成分としたミノキシジルを含むリアップや、ロゲインがあるが [9]、その売り上げは2012年の矢野経済研究所およびメディアの調査によると、約285.6億円と推算されている。一方、このような医薬品の場合にはその効果の反面、低血圧などの副作用も報告されており、その有効性と安全性を両立できる物質の開発が望まれている。そこで、我々はそのような育毛促進作用のある物質の探索を、食品由来の物質を基に検討することとした。

食品成分としては、緑茶のエピガロカテキンガレート (epigallocatechin gallate, EGCG) は経口投与によって毛髪成長促進作用を示すことが知られているが [10,11], 経皮投与による育毛促進作用を明確に示す茶成分はこれまで報告されていない。一方、経皮投与は経口投与とは異なり、育毛をさせたい局所でのみ効果を期待できるため、より直接的な育毛剤の開発が可能と考えられた。そこで、我々は経皮投与での検討を行うこととした。

黒茶 (Chinese black tea) は、中国の伝統的な茶の一種で、プーアル茶としてよく知られている。その製造工程において、麹菌 *Aspergillus* sp. による発酵を特徴とし、緑茶、ウーロン茶や紅茶とは全く異なるお茶である (Figure 3) [12,13]. 本研究では、黒茶の熱水抽出物 (Chinese black tea extract, CBTE) の経皮投与による育毛促進作用について検討し、さらにその作用機序を解明することを目的とした。

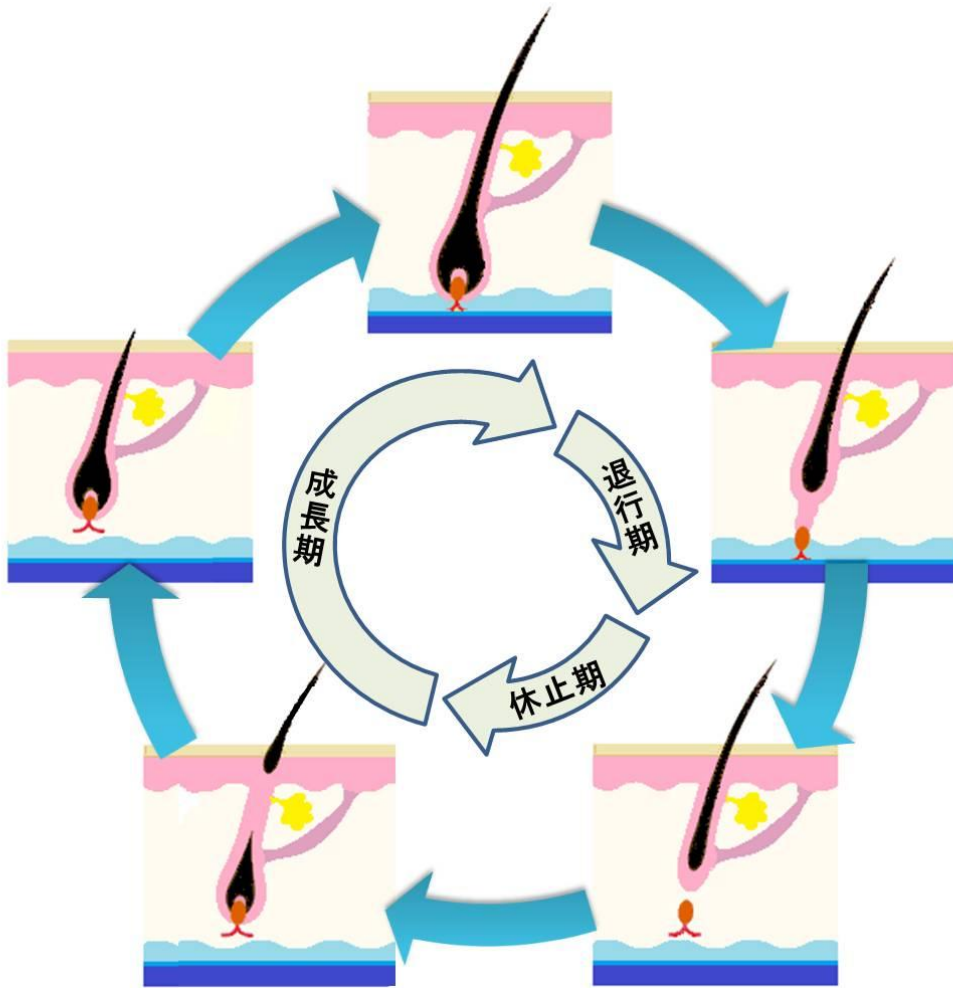


Figure 1. Hair cycle

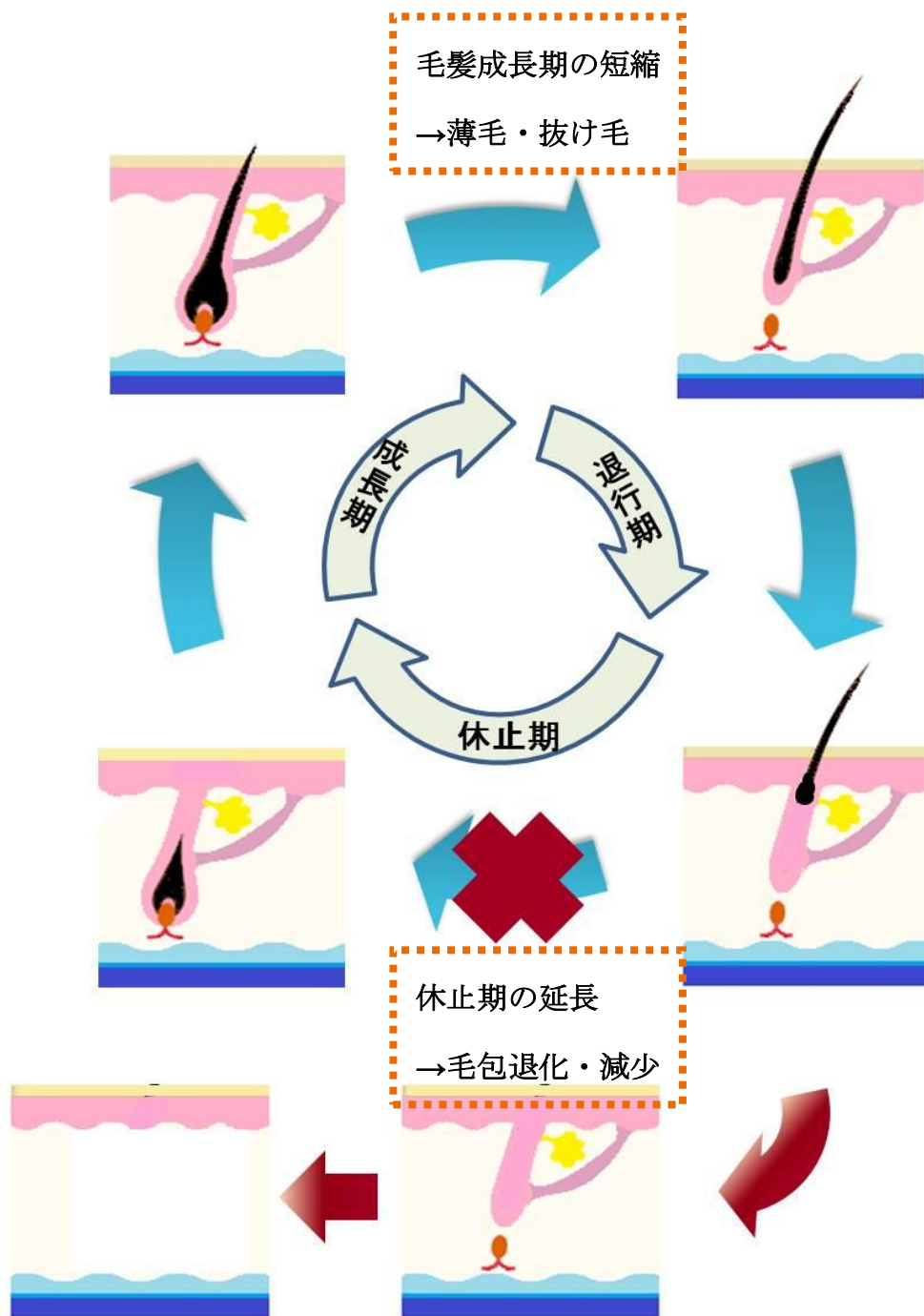


Figure 2. Hair cycle abnormalities (alopecia)

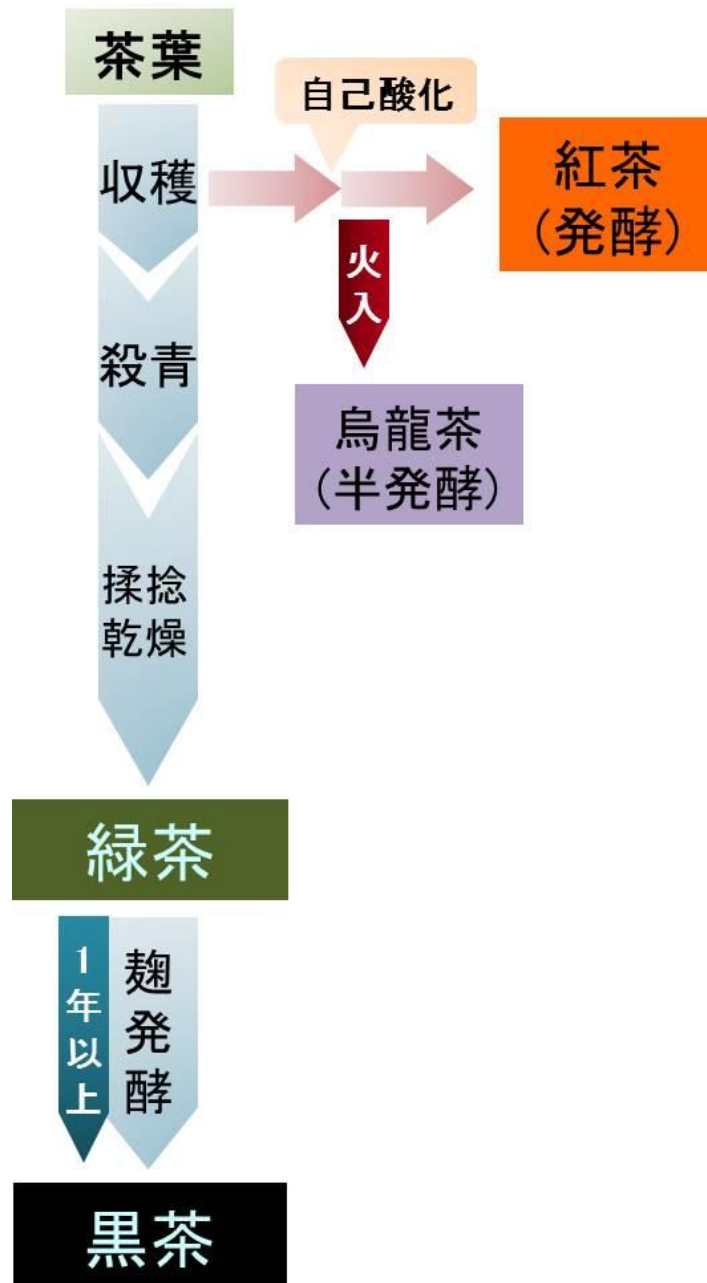


Fig. 3. Manufacturing processes of teas

第一章

黒茶熱水抽出物による育毛促進作用の解明

第 1 節 黒茶熱水抽出物の経皮塗布による育毛作用

緒言

緑茶成分の EGCG は経口投与により育毛促進作用を示すことが知られているが、経皮塗布により育毛促進作用を示す茶成分はこれまでに報告はない。一方、黒茶（プーアル茶）は緑茶を麴菌により発酵する過程を経て製造されることから、緑茶、紅茶とは全く異なっている。そこで、この黒茶に着目し、CBTE の経皮塗布による育毛作用について検討した。

一方、食品成分としては、大豆イソフラボン経口投与により、育毛促進作用を示すことが報告されている [14]。その促進作用はエストロゲン受容体に対し、アゴニスト作用を示すことを介すると考えられている [14]。さらに、その育毛促進作用に対しては、唐辛子成分であるカプサイシン (capsaicin) を添加することにより増強され、このカプサイシンは知覚神経を刺激し、末端からカルシトニン遺伝子関連ペプチド (Calcitonin gene-related peptide, CGRP) を放出させ、インスリン様成長因子 1 (IGF-1) の放出を促進すると考えられている [15]。

そこで、本節ではまず経皮塗布による CBTE の育毛促進作用について検討し、さらにその作用に対するカプサイシンの添加効果について検討した。

実験方法

1. 試薬

唐辛子チンキ (capsicum tincture) は東洋製薬化成株式会社より購入し、それは 0.039 mg/mL カプサイシン含有エタノール溶液である。チオペンタール (thiopental sodium) は和光純薬工業から購入した。

2. 実験方法

2-1. CBTE の調製法

中国雲南省で製造した黒茶を粉砕し、100 g の茶葉に対して 900 mL の水を加えて、100°C、60 分間加熱後、遠心分離を行った (2,050 × g, 30 分, 室温)。その後濾過 (No.5C ろ紙, 東洋濾紙株式会社)、その上清を濃縮後、噴霧乾燥し、黒茶熱水抽出物 (CBTE) を得た。

2-2. 実験動物

動物の飼育、保管および実験については、「京都学園大学大学院バイオ環境研究科・バイオ環境学部における動物実験に関する指針」に従って実施した。

6 週齢雄性 C3H/He マウス (清水実験材料) を 23 ± 1°C, 湿度 50 ± 10%, 12 時間明暗サイクル (明期 : 9:00-21:00) に設定された部屋で 3 日以上予備飼育し (4 匹/ケージ), 実験に使用した。飼育期間中、動物に固形飼料 MF (日本クレア), および水を自由摂取させた。

2-3. 育毛促進試験

毛の成長に対するサンプルの影響を正しく評価するため、ヘアサイクルが全て終止期に揃った 6 週齢の雄性 C3H/He マウス（体重約 25 g）を用いて実験を行った。

マウスはチオペンタール（60 mg/kg BW）にて麻酔し、動物専用電動バリカン、およびシェーバーを用い、背部を剃毛処置した。その後 3 日間の回復期間を設け、サンプルの塗布を行った。

サンプル溶液の調製には、基礎溶媒として（プロピレングリコール：エタノール：蒸留水 = 5:3:2）を使用した。CBTE を塗布する際には、CBTE を 20% (w/w) になるように溶解し、遠心した (9,800 × g, 10 分)。この上清を基礎溶媒で最終濃度になるように希釈し、塗布用のサンプル溶液を調製した。なお、塗布には無麻酔無拘束状態で柔らかい筆を用い、マウスの毛剃りした背部に 1 匹あたり 150 μL を塗布した。

カプサイシンは最終濃度 0.05% になるように CBTE 塗布液に加えて、動物の背部に塗布した。

2-4. 評価・統計解析

サンプルの塗布期間は コントロール群が背部の約 10 ~ 40% の毛髪成長範囲が確認できた時点で終了した (14 ~ 21 日間)。所定の育毛作用が確認できた時点で、1 匹あたりチオペンタール 0.1 mL (180 mg/kg BW) で安楽死後、目視評価、および写真撮影を行った (Figure 4)。撮影した写真は、画像解析ソフト Image J により定量化し、各サンプルの育毛促進作用を検討した。育毛部分と非育毛部分の判定は、肉眼によって観察できる毛の濃さと毛の生えている面積

を基に、Image J を用いて一定の閾値を設け、マウス背部全体に占める、毛の生えている部分の割合 (haired area/shaved area) を定量化することにより行った。有意差の検定は Student's t-test で行い、 $P < 0.05$ で有意差ありとした。

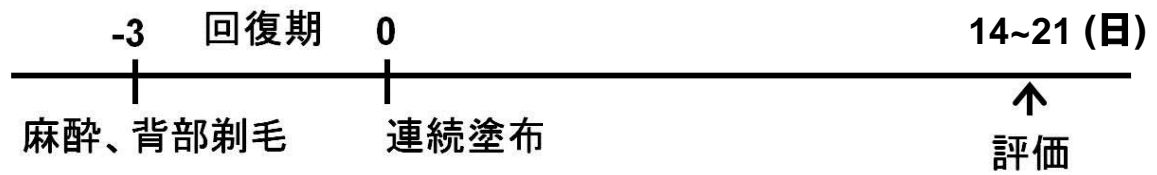


Figure 4. 実験スケジュール

結果と考察

C3H/He マウスに対し、2%、および 3.5% の濃度の CBTE を塗布し、育毛作用を検討した結果、CBTE は用量依存的に発毛面積 (% hair area) の割合を増加させ、コントロール群 (10.02 ± 13.5%) と比べて、3.5% の経皮塗布より、有意な育毛促進作用を示した (39.69 ± 29.14 %, $P < 0.05$, Figure 5).

これまでに、経皮塗布により有効な茶成分の報告はなく、CBTE が育毛促進作用を示すということを見出した。黒茶は、緑茶を麹菌 *Aspergillus sp.* 等により長時間発酵させることで製造するという特徴を持っている [12,13]。この発酵工程により、様々な化学反応が引き起こされ [16]、育毛に有効な成分が生成されると考えられた。なお、その有効成分の同定は今後の課題である。

さらに、CBTE (3.5%) に対してカプサイシンの添加効果について検討したところ、カプサイシン (0.05%) それ自身の塗布では、体毛成長への影響は認められなかったにも関わらず (コントロール : 21.97 ± 21.17%, カプサイシン単独塗布群 : 22.27 ± 17.49%), CBTE と同時塗布することにより、CBTE の示す育毛促進作用 (CBTE : 54.16 ± 20.52%, $P < 0.05$ vs. コントロール) が増強されることが明らかとなった (CBTE + カプサイシン : 69.61 ± 15.63%, $P < 0.01$ vs. コントロール, Figure 6).

これまでの報告では、細胞実験において、カプサイシンはヒトの毛幹組織の伸長を逆に抑制することが示されている [17]。一方、動物においてカプサイシン単独では作用を示さないものの、大豆イソフラボンとともに経口投与することにより、大豆イソフラボンによる育毛促進作用を増強することが知られている [14,15]。本実験において、カプサイシンは経皮塗布しても、毛の成長に対す

る抑制効果は観察されなかった。このようなカプサイシンによる効果は、用いた濃度による影響も考えられるが、*in vivo* 実験では他の神経系、およびホルモン分泌の影響もあることから、*in vitro* とは異なる結果になったと考えられた。

本実験により、CBTE の育毛促進作用はエストロゲン受容体アゴニストであるイソフラボンの促進作用と同じく、カプサイシンによって増強されることがわかった。一方、エストロゲン受容体は毛髪の成長を調節していることが知られていることから [18-20]、CBTE の育毛促進作用はエストロゲン受容体に関与していると考えられた。そこで、第 2 節ではそれらの関係の解明について検討することとした。

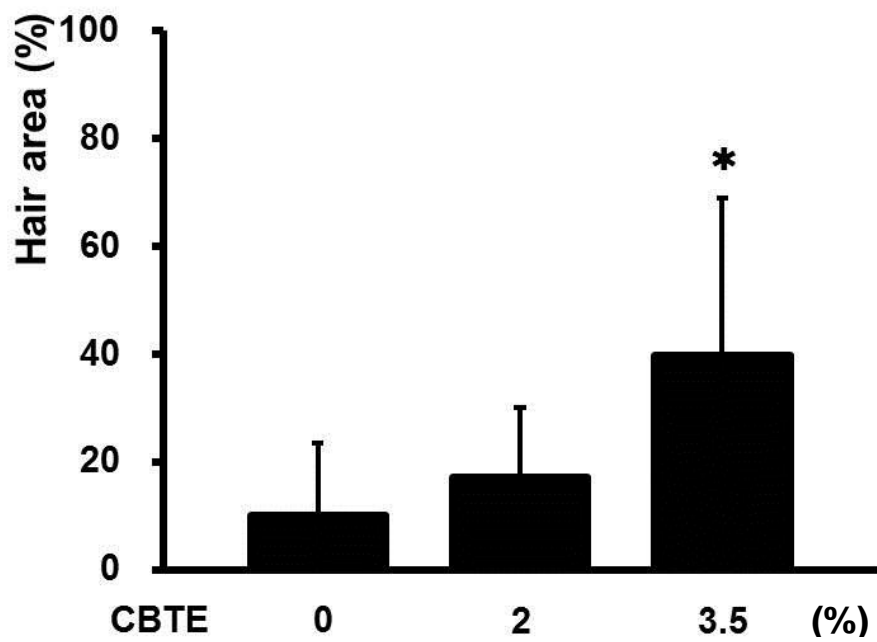


Figure 5. CBTE promoted hair growth in a dose-dependent manner. Mice were treated with 0, 2, and 3.5% CBTE for 18 days. Data are expressed as the mean \pm SD. (n=8). * $P < 0.05$ vs. Control.

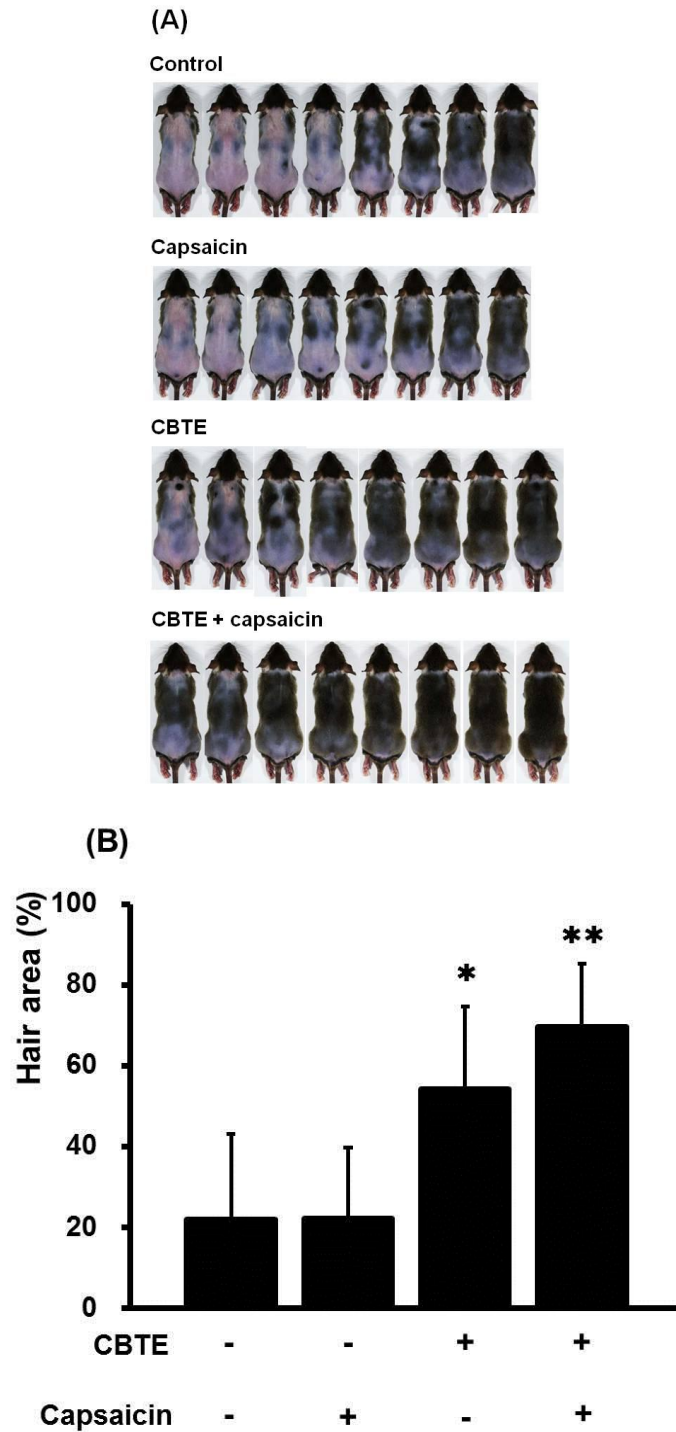


Figure 6. The effect of CBTE and capsaicin on hair growth. (A) Photography. (B) The ratio of the hair growth area. Mice were treated with 3.5% CBTE and 0.05% capsaicin for 14 days. Data are expressed as the mean \pm SD. (n=8). * $P < 0.05$ vs. Control. ** $P < 0.01$ vs. Control.

第 2 節 黒茶熱水抽出物の示す育毛作用メカニズムの解明

緒言

CBTE の育毛促進作用は、エストロゲン受容体アゴニストである大豆イソフラボンと同様に、カプサイシンによって増強されることがわかった。また、エストロゲン受容体は毛髪の成長に関与していることから [18-20], CBTE の促進作用はこの受容体を介していることが示唆された。

エストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER) には、2 種類の受容体サブタイプ ER α と ER β のあることが知られているが、これらの受容体と育毛作用との関係についてはよく分かっていない [21,22]。そこで、まず、CBTE の受容体への結合能やその結合様式について検討した。さらに、動物における CBTE の育毛促進作用に対する ER α 、および ER β それぞれの選択的アゴニスト、アンタゴニストを用いて検討を行うこととした。

実験方法

1. 試薬

Enbio RCAS キットは藤倉化成株式会社から購入した。ER α 選択的アゴニストである PTT (4,4',4''-(4-Propyl-[1*H*]-pyrazole-1,3,5-triyl) *tris*phenol), ER α 選択的アンタゴニストである MPP dihydrochloride (MPP, 1,3-*Bis*(4-hydroxy phenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinyloxy)phenol-1*H*pyrazoledihydrochloride), ER β 選択的アゴニストである DPN (2,3-*bis*(4-Hydroxy phenyl)-propionitrile), および ER β 選択的アンタゴニストである PHTPP (4-[2-Phenyl-5,7-*bis*(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl]phenol) は Tocris 社より購入した。

2. 実験方法

2-1. エストロゲン受容体結合実験

CBTE のエストロゲン受容体 2 種類のサブタイプ ER α , および ER β への結合実験は, 昆虫 Sf9 細胞でそれぞれ発現させたヒト ER α , ER β , および 0.5 nM [³H]-estradiol を用いた放射リガンドアッセイで行った。

非特異結合は 1 μ M diethylsilbestrol の存在下で測定を行った [23]。IC₅₀ 値は MathIQ (ID Business Solutions Ltd.) を用いて, 非線形最小二乗回帰分析によって決定した。阻害定数 (K_i) の値は参考文献 [24] に述べた方程式および化合物の IC₅₀ 値で計算した。

2-2. エストロゲン受容体に対する黒茶のリガンド作用評価

受容体に対するアゴニスト，あるいはアンタゴニスト作用の評価には，核内受容体・コファクター アッセイシステム (Nuclear Receptor Cofactor Assay System, EnBio RCAS キット, 藤倉化成株式会社) を用い，受容体，リガンド，コファクター (Steroid receptor coactivator 1, SRC1)，抗体 4 種類物質の結合による発色により検討した (コアクチベーター法：アゴニストであれば濃度依存的に発色が増加し，アンタゴニストであれば，内因性アゴニスト E2 による発色を濃度依存的に抑制する)。

CBTE は dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いて，各実験に必要な最終濃度になるように希釈し，サンプルを作成した。

結合能の評価は，下記のリガンド相対活性値 (B/Bmax) から算出した。

$$B/B_{\max} = (C - B) / (A - B) \%$$

- A： (ポジティブコントロールの SRC1 (+) の OD450)
 - (ポジティブコントロールの SRC1 (-) の OD450)
- B： (ネガティブコントロールの SRC1 (+) の OD450)
 - (ネガティブコントロールの SRC1 (-) の OD450)
- C： (サンプルの SRC1 (+) の OD450)
 - (サンプルの SRC1 (-) の OD450)

2-3. 動物への塗布試験

実験動物，育毛促進試験，および評価方法は第 1 節の通りである．なお，各種アゴニスト，アンタゴニストは最終濃度になるように塗布液に加えて，CBTE と同時に動物の背部に塗布した．また，作用機構に関する実験は，全て 0.05% になるようにカプサイシンを添加して検討を行った．

結果

1. エストロゲン受容体に対する結合性

2 種類のエストロゲン受容体サブタイプ ER α , ER β について, CBTE のそれぞれの結合実験を行った. その結果, CBTE は ER α , ER β に対してともに親和性を示したが (K_i 値 ER α : 21.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ER β : 2.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Table 1). CBTE は ER α より, ER β に対して約 8 倍強い選択的結合能を示すことが分かった.

2. エストロゲン受容体への応答性

ER α , ER β に対し結合能を示したことから, 各受容体に対する応答性について検討した. その結果, Figure 7 に示した通り, CBTE は ER α , ER β のいずれに対してもアゴニスト活性を示さなかった. 一方, CBTE の ER α , ER β に対するアンタゴニスト活性について検討した結果, ER β に選択的なアンタゴニスト活性を示すことが明らかとなった (IC₅₀ 750.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Figure 8).

3. 動物における育毛作用機構の解明 (CBTE の育毛促進作用に対する ER α , ER β 選択的アゴニスト, およびアンタゴニストの影響)

CBTE は ER β に対し選択的なアンタゴニスト活性を示したが, ER α にもアンタゴニスト活性を示したため, まず, それぞれの受容体に対する選択的なアゴニストを使用して, その影響について検討した. その結果, CBTE (3.5%) の

育毛促進作用は ER α 選択的アゴニスト PPT (0.1 mg/kg BW) によって阻害されなかったが (CBTE : 87.91 \pm 6.77%, CBTE + PPT : 72.32 \pm 23.39%, Figure 9), ER β 選択的アゴニスト DPN (0.25 mg/kg BW) より有意に阻害されたことから (CBTE : 82.32 \pm 12.22%, CBTE + DPN : 53.34 \pm 25.41%, $P < 0.05$, Figure 10), CBTE は ER β アンタゴニストとして育毛を促進することが分かった. なお, この時 DPN 単独塗布では育毛促進作用にほとんど影響を与えなかったが(コントロール : 41.27 \pm 20.43%, DPN : 39.89 \pm 22.87%), PPT 単独塗布により育毛を促進する傾向が認められた (コントロール : 44.43 \pm 19.85%, PPT : 65.29 \pm 28.05%, Figure 9).

次に, ER α , ER β 選択的アンタゴニストによる作用について検討した. ER α 選択的アンタゴニストとして MPP, および ER β 選択的アンタゴニストとして PHTPP を用いて検討した. その結果, CBTE の育毛促進作用は ER α 選択的アンタゴニスト MPP (0.2 mg/kg BW) により阻害される傾向を示した (CBTE : 62.09 \pm 20.74%, CBTE + MPP : 33.93 \pm 19.72%, $P = 0.05$, Figure 11). 一方, PHTPP により CBTE の育毛促進作用を逆に増強する傾向が認められた (CBTE : 62.09 \pm 20.74%, CBTE + PHTPP : 72.26 \pm 16.45%, Figure 12). ここで, 興味深いことに, PHTPP (0.2 mg/kg BW) そのものも育毛促進作用を示すことが明らかとなった (コントロール : 27.93 \pm 15.03%, PHTPP : 44.69 \pm 11.23%, $P < 0.05$, Figure 12).

考察

大豆イソフラボンによる育毛促進作用はエストロゲン受容体を介して生じるが、カプサイシンを添加することで、知覚神経を刺激し、末端から分泌した CGRP を放出させて IGF-1 の放出を促進することにより増強されたとの報告がある [14,15]. CBTE による育毛促進作用もカプサイシンにより増強されたことから、CBTE もエストロゲン受容体に対し関与すると考え、この受容体に対する影響を検討した. 受容体結合実験から、CBTE はエストロゲン受容体に強力に結合し、また、興味深いことに、ER β 選択的アンタゴニストであることが分かった. 実際に動物育毛実験により、ER β 選択的アゴニスト DPN によって CBTE の育毛促進作用が消失したことから明確になった.

一方、CBTE の育毛促進作用メカニズムについて、その他の可能性を検討するため、育毛に関連すると考えられる各種受容体（アデノシン受容体、アルドステロン受容体）に対する CBTE の結合能や、ステロイド 5 α -還元酵素 (Steroid 5 α -Reductase) 阻害活性についても検討した [25,26]. その結果、CBTE はこれらについて有効と考えられる結合能や阻害活性は認められなかった（データ未掲載）. 以上のことから、CBTE はエストロゲン受容体、特に ER β のみを介して育毛を促進すると考えられた.

エストロゲン受容体と育毛促進作用には何らかの関係を示唆する報告はいくつかあるが、まだ明確にはなっていない [21,22]. エストロゲン非選択的アンタゴニスト fulvestrant は経皮塗布により育毛促進作用が報告されているが [27,28], 一方で、非選択的アゴニストの経皮塗布によっても育毛が促進されたとの報告もある [29]. 今回の実験において、ER β 選択的アゴニスト DPN は育

毛抑制作用を示さなかったが、エストロゲン受容体 $ER\beta$ 選択的アンタゴニスト PHTPP は有意な育毛促進作用を示すことが明らかとなった。以上の結果と CBTE を用いた結果を考え合わせると、育毛促進作用には $ER\beta$ のアンタゴニスト活性が重要であると考えられた。

今回、エストロゲン受容体の選択的アゴニストを用いた実験により、 $ER\alpha$ 選択的アゴニストである PPT は、有意差は得られなかったが、育毛促進作用のあることが分かった。このことから、エストロゲン受容体のうち、 $ER\alpha$ のみを刺激することにより、育毛促進作用を示すと考えられた。それに加えて、CBTE の育毛促進作用は意外にも $ER\alpha$ 選択的アンタゴニストである MPP に抑制される傾向が認められた ($P = 0.05$)。以上の結果を踏まえて、著者は以下のようなエストロゲン受容体を介する育毛促進作用の仮説を立てた (Figure 13)。すなわち、1. $ER\alpha$ 受容体は育毛促進作用に関与していて、また、2. $ER\beta$ 受容体は育毛を抑制 (休止) する作用に関与している。従って、CBTE は、 $ER\beta$ 受容体への内因性のエストロゲンの結合を阻害することにより、育毛の抑制作用を解除することによって育毛促進作用を示すと考えられた。一方、なぜ CBTE が $ER\alpha$ アンタゴニストによりその作用が抑制されたかについては現段階では明確ではない。そこで、さらに $ER\alpha$ 受容体、 $ER\beta$ 受容体と育毛作用との関係について明確するため、次章では合成化学物質である $ER\beta$ 選択的アンタゴニスト PHTPP を用いて検討を行うこととした。

Table 1. Affinities of CBTE to the estrogen receptors

receptor subtypes	Ki value ($\mu\text{g/mL}$)
Estrogen ERα	21.4
Estrogen ERβ	2.66

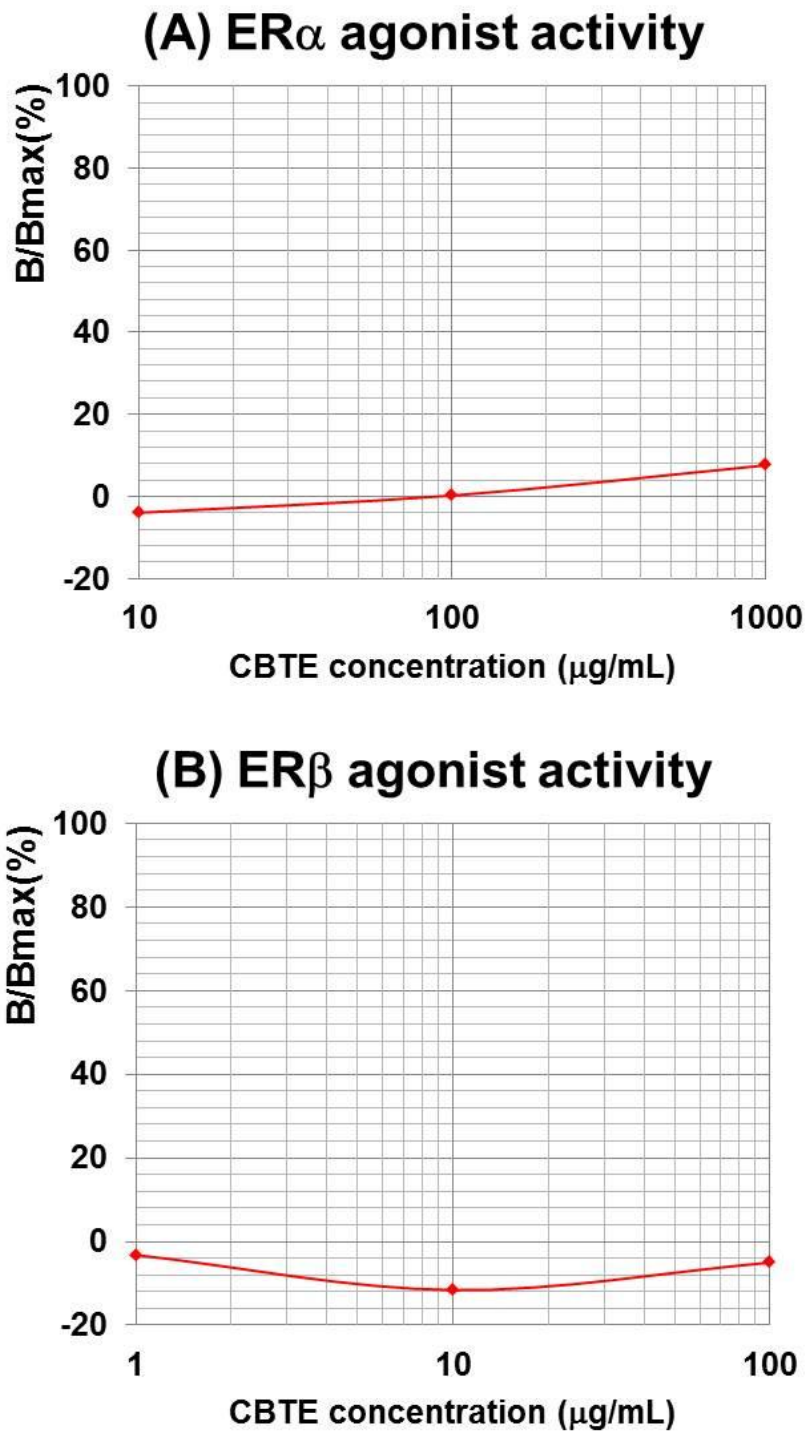


Figure 7. Agonist activities to estrogen receptors, ER α (A) and ER β (B).

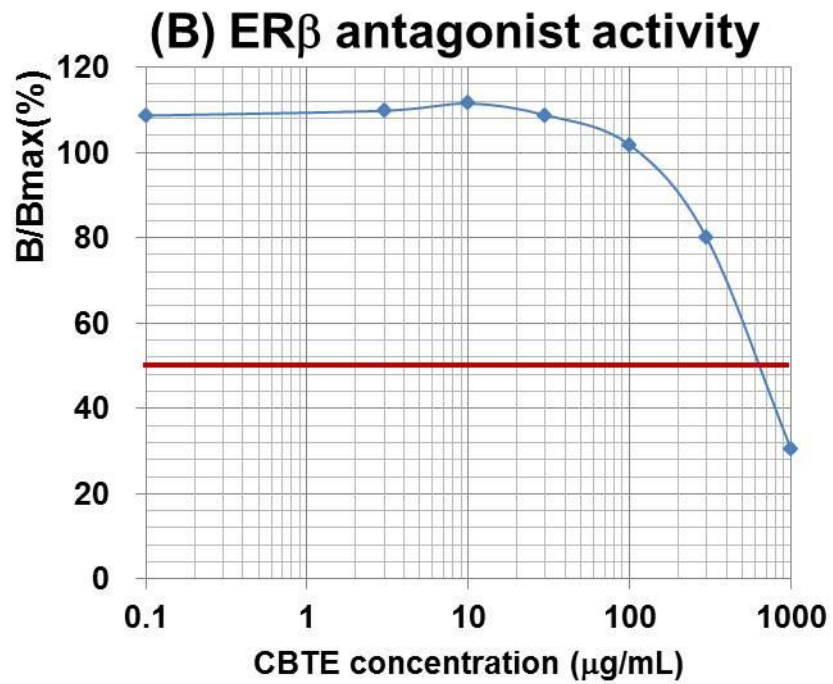
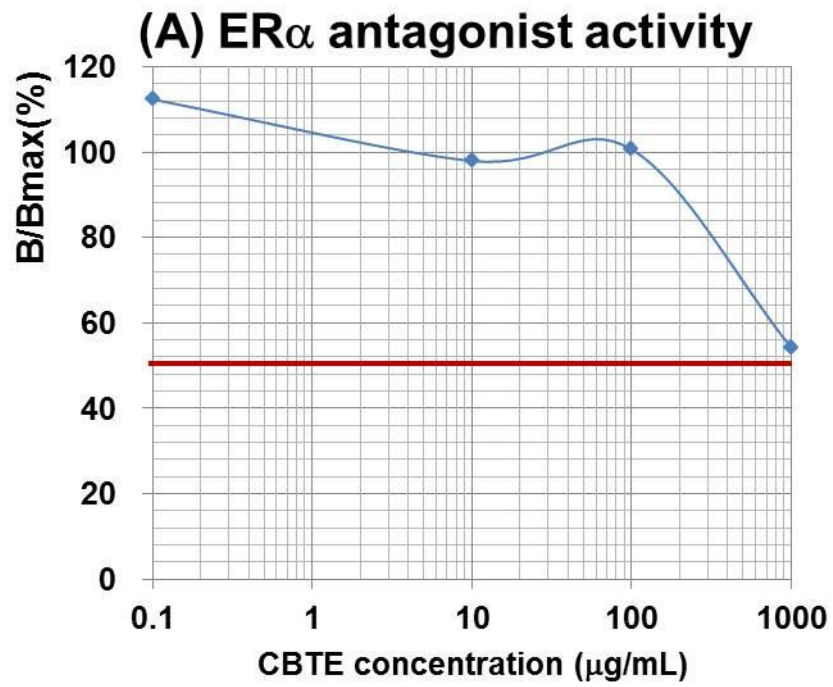


Figure 8. Antagonist activities to estrogen receptors, ER α (A) and ER β (B).

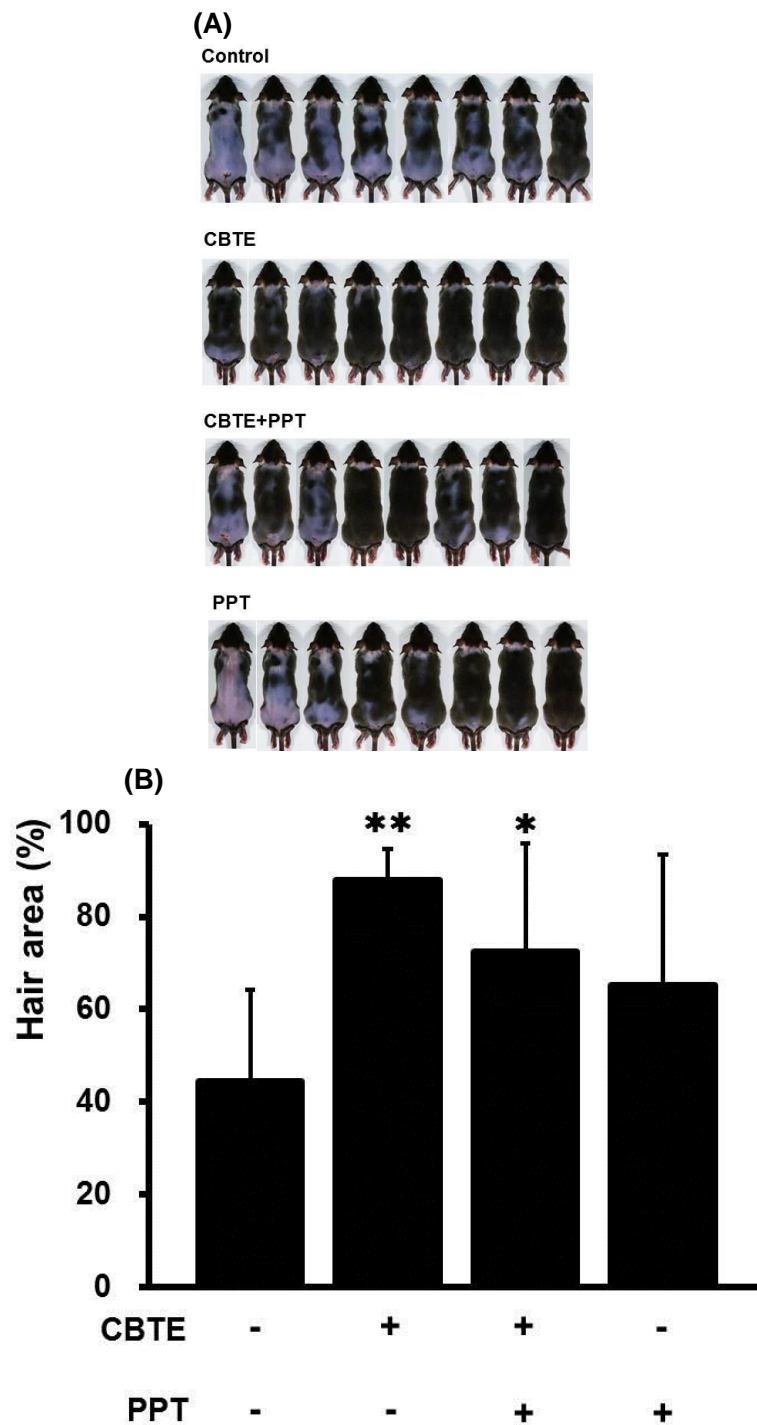


Figure 9. Effect of ER α selective agonist PPT on hair growth-promoting effect of CBTE in C3H/He mice. (A) Photography. (B) The ratio of the hair growth area. Mice were treated with 3.5% CBTE and 0.1 mg/kg BW PPT for 14 days. All groups contained 0.05% capsaicin. Data are expressed as the mean \pm SD. (n=8). * P < 0.05 vs. Control. ** P < 0.01 vs. Control.

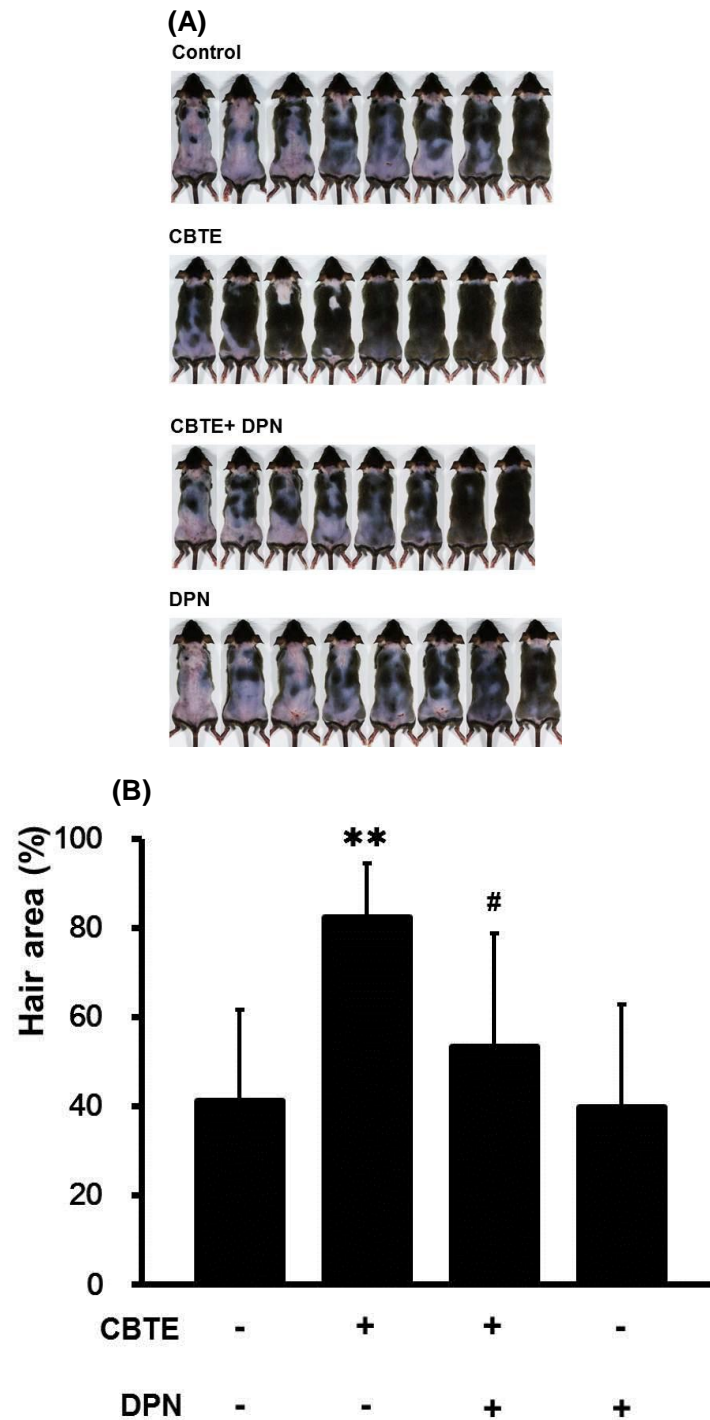


Figure 10. Effect of ER β selective agonist DPN on hair growth-promoting effect of CBTE in C3H/He mice. (A) Photography. (B) The ratio of the hair growth area. Mice were treated with 3.5% CBTE and 0.25 mg/kg BW DPN for 14 days. All groups contained 0.05% capsaicin. Data are expressed as the mean \pm SD. (n=8). * P < 0.05 vs. Control. # P < 0.05 vs. CBTE.

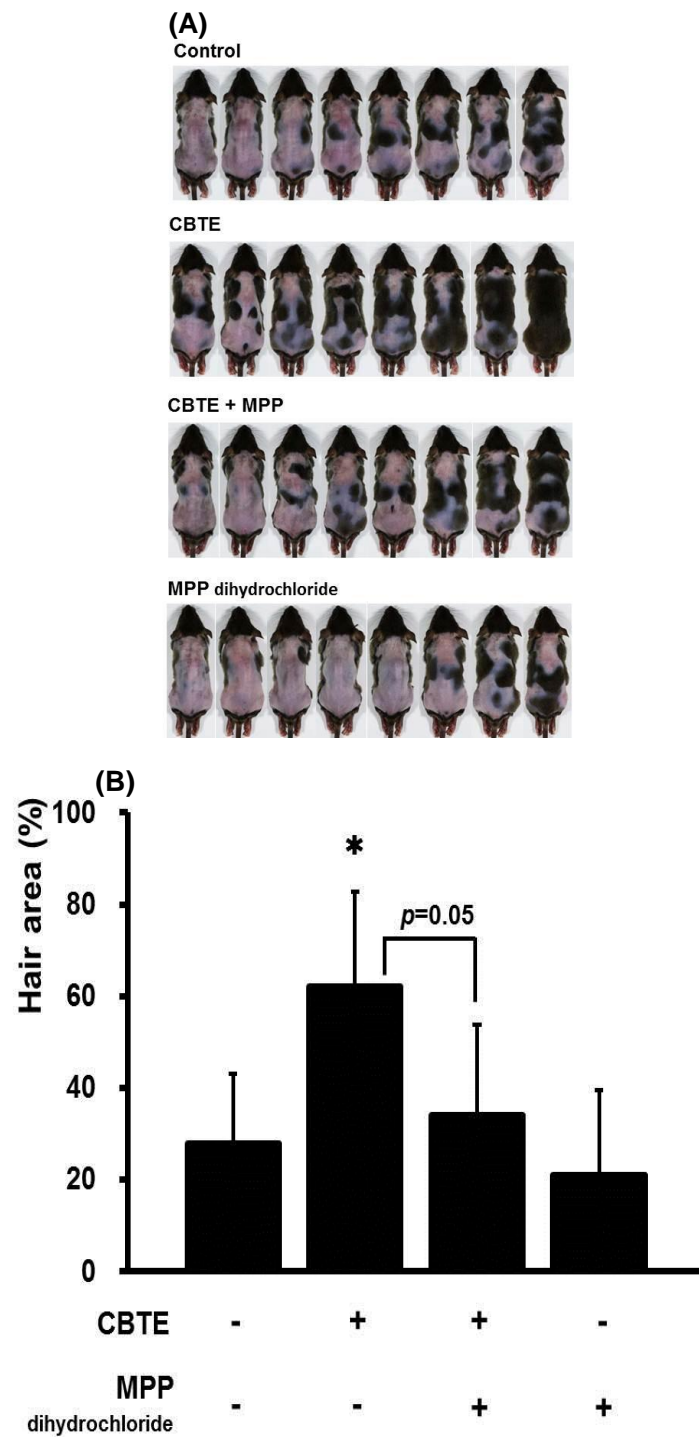


Figure 11. Effect of ER α selective antagonist MPP dihydrochloride on hair growth-promoting effect of CBTE in C3H/He mice. (A) Photography. (B) The ratio of the hair growth area. Mice were treated with 3.5% CBTE and 0.2 mg/kg BW MPP for 16 days. All groups contained 0.05% capsaicin. Data are expressed as the mean \pm SD. (n=8). * $P < 0.05$ vs. Control.

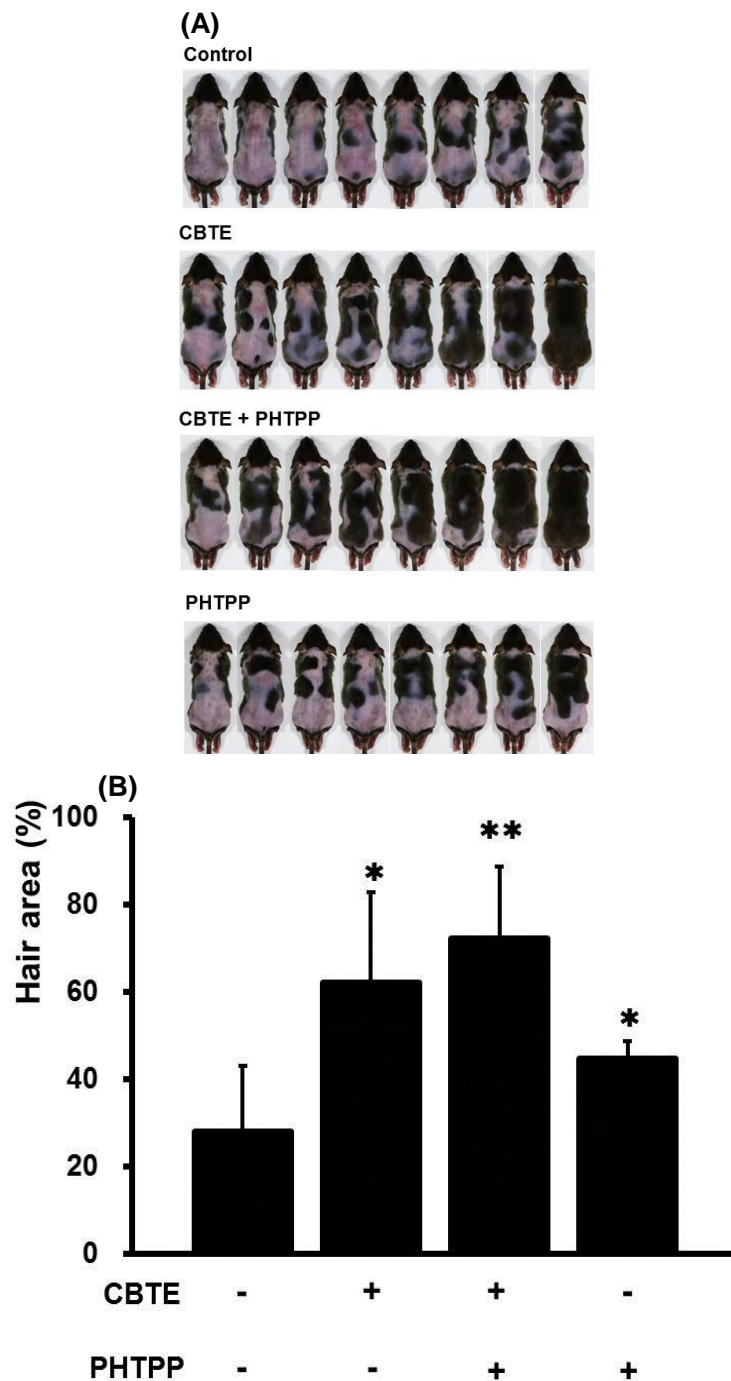


Figure 12. Effect of ER β selective antagonist PHTPP on hair growth-promoting effect of CBTE in C3H/He mice. (A) Photography. (B) The ratio of the hair growth area. Mice were treated with 3.5% CBTE and 0.2 mg/kg BW PHTPP for 16 days. All groups contained 0.05% capsaicin. Data are expressed as the mean \pm SD. (n=8). * P < 0.05 vs. Control. ** P < 0.01 vs. Control.

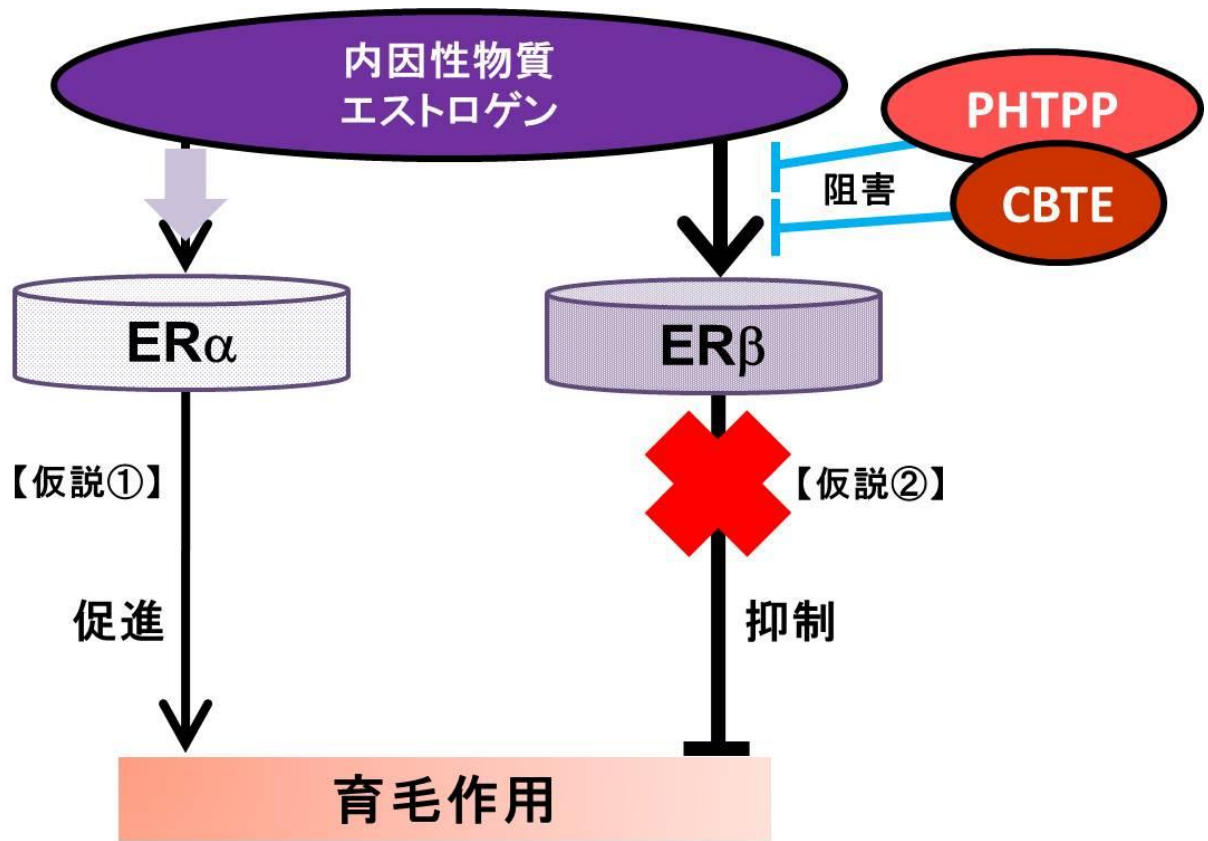


Figure 13. A hypothesis for the hair growth-promoting effect of CBTE and PHTPP.

第二章

エストロゲン受容体 $ER\beta$ 選択的アンタゴニスト PHTPP による育毛促進作用

緒言

第一章第2節で述べたように、CBTEの育毛促進作用について、その作用メカニズムを検討した結果、 $ER\beta$ アンタゴニスト活性を介したものと考えられた。この作用メカニズムについて検討する中で、 $ER\beta$ 選択的アンタゴニストPHTPPも育毛促進作用を有することが確認された。一方、CBTEは天然物質の黒茶を熱水抽出して得たもので、多くの成分を含む混合物である。従って、 $ER\beta$ 受容体アンタゴニストの育毛促進作用について検討するには、より選択性が高く、純度の高い物質による検証が必要と考えた。

そこで、本章では $ER\beta$ 選択的アンタゴニストのPHTPPを用い、エストロゲン受容体に対する各種選択的アゴニスト/アンタゴニストを使用して、育毛促進作用に対する影響について検討した。

実験方法

1. 試薬

ER 非選択的アンタゴニストである fulvestrant は Sigma-Aldrich から購入した。他の試薬は第一章と同様である。

2. 実験動物

第一章に記載している通りである。

3. 育毛促進試験

毛の成長に対するサンプルの影響を正しく評価するため、ヘアサイクルが全て終止期に揃った 6 週齢の雄性 C3H/He マウス（体重約 25 g）を用いて実験を行った。

マウスはチオペンタール（60 mg/kg BW）にて麻酔し、動物専用電動バリカン、およびシェーバーを用い、背部を剃毛処置した。その後 3 日間の回復期間を設け、サンプルの塗布を行った。サンプル溶液の調製には、基礎溶媒として（プロピレングリコール：エタノール：蒸留水 = 5:3:2）で最終濃度になるように調製した。なお、塗布には無麻酔無拘束状態で柔らかい筆を用い、マウスの毛剃りした背部に 1 匹当たり 150 μ L を塗布した。

カプサイシンは最終濃度 0.05% になるように各塗布液に加えて、動物の背部に塗布した。なお、各種アゴニスト、アンタゴニストは最終濃度になるように塗布液に加えて検討した。

結果

1. 動物における各種エストロゲン受容体アンタゴニストの育毛作用に与える影響

ER β 選択的アンタゴニスト PHTPP, ER α 選択的アンタゴニスト MPP, および ER 非選択的アンタゴニスト fulvestrant を C3H/He マウスに対し, 同一用量 (0.2 mg/kg BW) を塗布した. その結果, コントロール (37.57 \pm 22.40%) と比べて, MPP による育毛促進作用は認められなかったが (47.87 \pm 26.43%), PHTPP (65.10 \pm 16.40%, $P < 0.05$), および fulvestrant (61.98 \pm 19.45%, $P < 0.05$) は有意な育毛促進作用を示した (Figure 14). 更に, PHTPP の育毛促進作用を検討するため, 0.02, 0.2 mg/kg BW で塗布した結果, コントロール群 (21.97 \pm 21.17%) と比べて, PHTPP は用量依存的にかつ有意に育毛促進作用を示すことが認められた (PHTPP 0.02 : 41.18 \pm 16.10%, PHTPP 0.2 : 50.61 \pm 20.37%, それぞれ $P < 0.05$, Figure 15).

2. PHTPP の育毛促進作用に対する ER β 選択的アゴニスト, および ER α 選択的アンタゴニストの影響

PHTPP の育毛促進作用について検討するため, ER β 選択的アゴニスト DPN (0.25 mg/kg BW), および ER α 選択的アンタゴニスト MPP (0.2 mg/kg BW) を用いて検討した. その結果, PHTPP の育毛促進作用は DPN によって有意に抑制された (PHTPP: 72.97 \pm 26.89%, PHTPP + DPN: 20.75 \pm 10.58%, $P < 0.05$, Figure 16). さらに, その育毛促進作用は MPP によっても有意に阻

害された (PHTPP : $72.97 \pm 26.89\%$, PHTPP + MPP : $17.17 \pm 14.26\%$, $P < 0.01$, Figure 17). なお, これらの実験で, DPN 単独塗布 (コントロール : $21.40 \pm 23.20\%$, DPN : $20.75 \pm 10.85\%$, Figure 16), あるいは MPP 単独塗布 (コントロール : $21.40 \pm 23.20\%$, MPP : $17.17 \pm 14.26\%$, Figure 17) では育毛作用に対する変化は認められなかった.

考察

今まで、エストロゲン受容体は育毛に何らかの作用を示すことが知られていたが、これまでのそのアゴニストまたはアンタゴニストを用いた検討では、育毛に対して促進作用、あるいは逆に抑制作用を示すことが報告されている [27-29]. 本章では、ER β 選択的アンタゴニストである PHTPP が用量依存的に育毛促進作用を示すことを初めて見出した.

PHTPP の育毛促進作用が ER β アゴニスト DPN によりその作用が消失したことから、ER β への内因性エストロゲン刺激をブロックすることが、育毛促進作用を示すことに重要と考えられた. 一方、ER α アンタゴニスト MPP により、PHTPP の育毛促進作用が抑制されたことは、PHTPP の育毛促進作用は間接的に ER α を刺激していることを示唆している. このことは、第一章で示した仮説、すなわち、ER β 受容体は育毛に対して抑制的な作用を示していること、さらには、ER β アンタゴニストは、内因性の ER α および ER β 受容体のリガンドであるエストロゲンの結合量を ER α 側にシフトさせ、育毛促進作用を示す、という著者の仮説を支持するものと考えられた. このことは、ER α および ER β 受容体の非選択的アンタゴニストである fulvestrant の示した育毛促進作用は、主には ER β 受容体の育毛に対する抑制系を解除したためか、あるいは ER α と ER β の結合能の差によるものかもしれない.

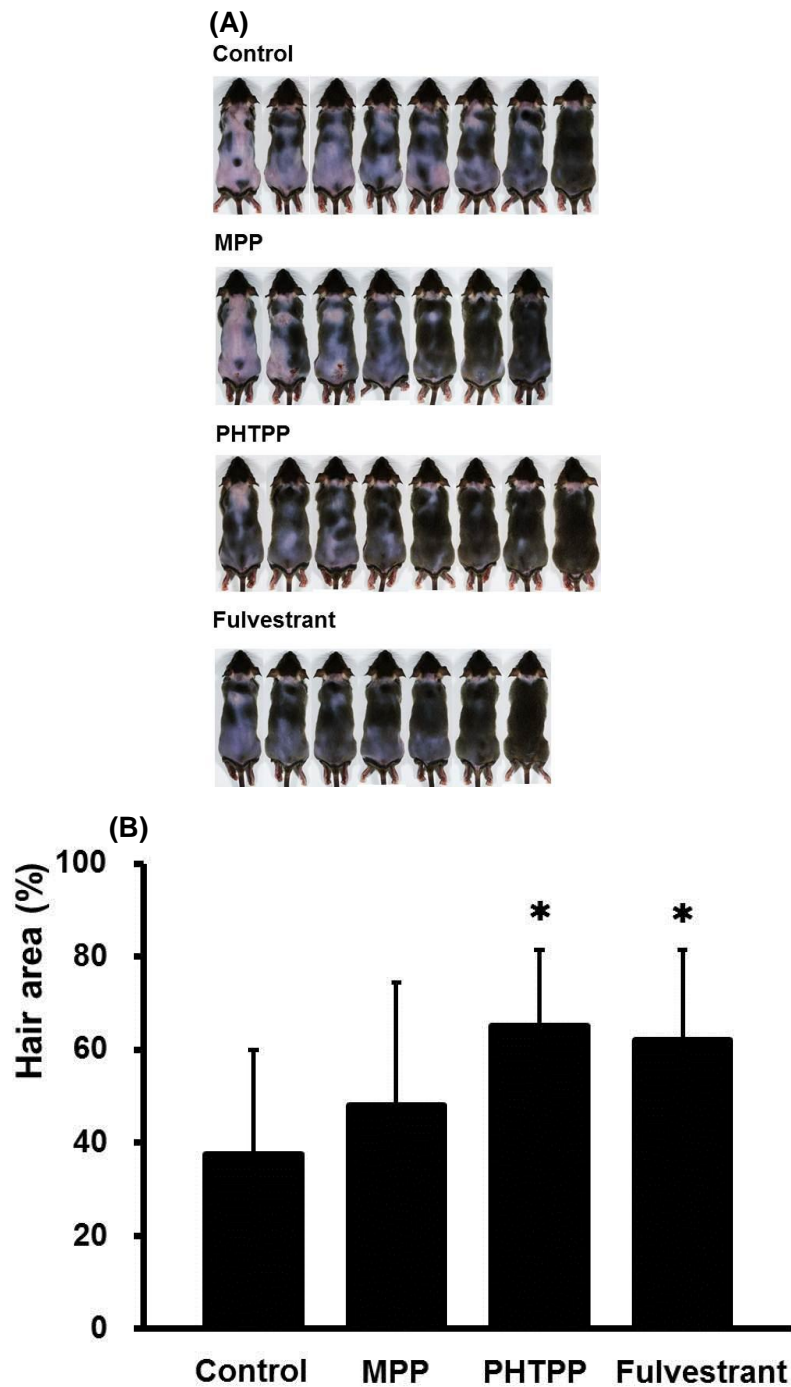


Figure 14. The effects of estrogen receptor antagonists on hair growth. (A) Photography. (B) The ratio of the hair growth area. Mice were treated with 0.2 mg/kg BW MPP ($ER\alpha$ -selective antagonist), 0.2 mg/kg BW PHTPP ($ER\beta$ -selective antagonist) and 0.2 mg/kg BW fulvestrant (ER non-selective antagonist). All groups contained 0.05% capsaicin. Data are expressed as the mean \pm SD. (n=7-8). * $P < 0.05$ vs. Control.

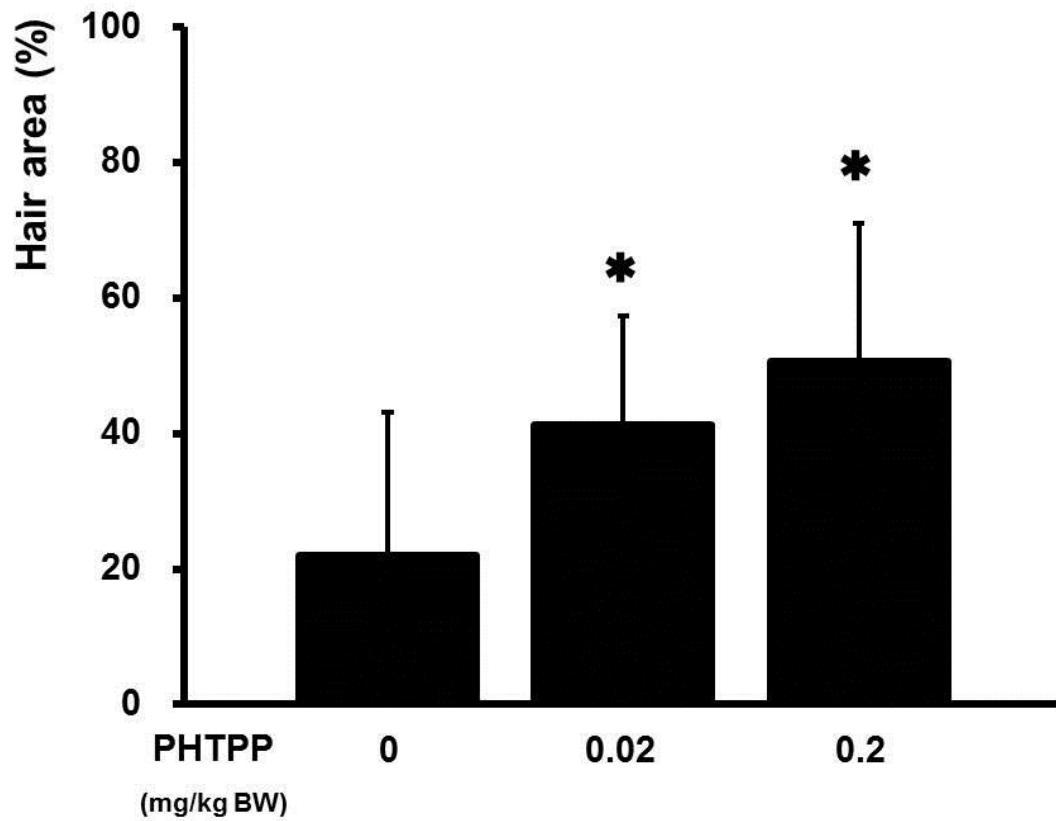


Figure 15. PHTPP promoted hair growth in a dose-dependent manner. Mice were treated with 0, 0.02, and 0.2 mg/kg BW PHTPP for 16 days. Data are expressed as the mean \pm SD. (n=8). * $P < 0.05$ vs. Control.

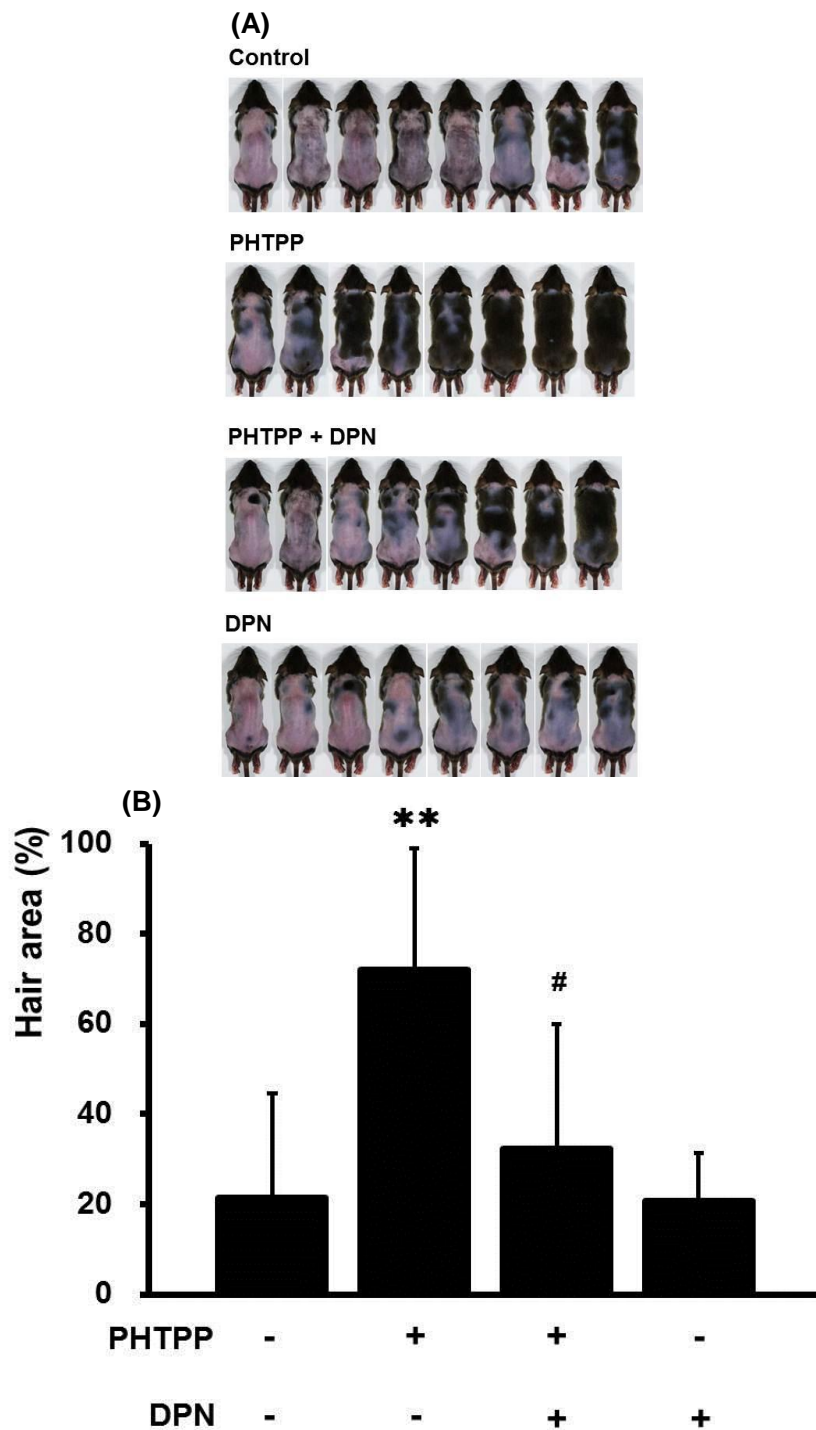


Figure 16. Effect of ER β selective agonist DPN on hair growth-promoting effect of PHTPP in C3H/He mice. (A) Photography. (B) The ratio of the hair growth area. Mice were treated with 0.2 mg/kg BW PHTPP and 0.25 mg/kg BW DPN for 14 days. All groups contained 0.05% capsaicin. Data are expressed as the mean \pm SD. (n=8). ** P < 0.01 vs. Control. # P < 0.05 vs. PHTPP.

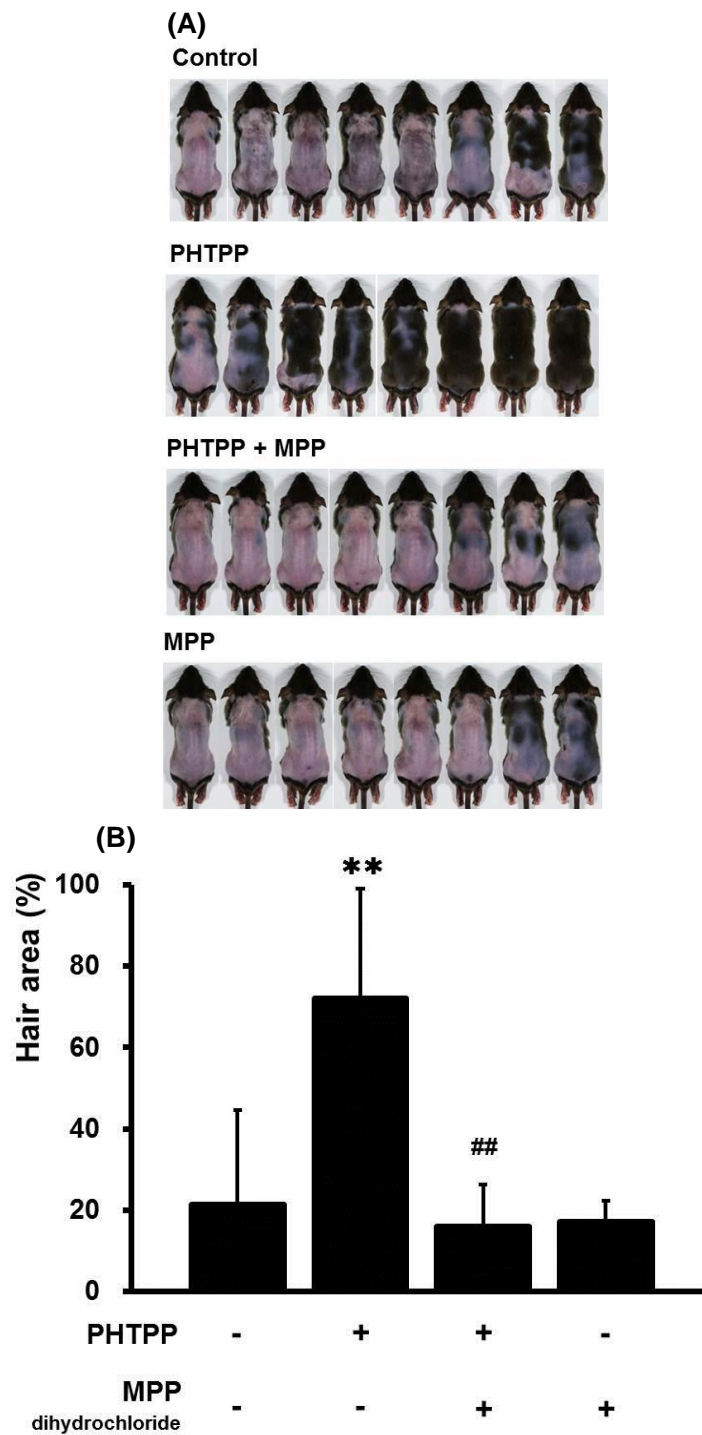


Figure 17. Effect of ER α selective antagonist MPP dihydrochloride on hair growth-promoting effect of PHTPP in C3H/He mice. (A) Photography. (B) The ratio of the hair growth area. Mice were treated with 0.2 mg/kg BW PHTPP and 0.2 mg/kg BW MPP for 14 days. All groups contained 0.05% capsaicin. Data are expressed as the mean \pm SD. (n=8). ** P < 0.01 vs. Control. ## P < 0.01 vs. PHTPP.

第三章

ER β アンタゴニストである黒茶熱水抽出物, および PHTPP の関与する育毛成長因子について

緒言

第二章において, ER β 選択的アンタゴニストである CBTE, および PHTPP は育毛促進作用を示すことを明らかにしたが, これにはどのような成長因子が関わっているか不明である. 細胞増殖因子として, 多くの物質が同定されているが, 特に育毛に関与している物質としては, IGF-1 [3,4], 血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor, VEGF) [30,31], 線維芽細胞増殖因子 7 (Fibroblast growth factor 7, FGF-7) [32] などが知られている. 特に, 大豆イソフラボンによるエストロゲン受容体を介した育毛作用については, IGF-1 が関与しているという報告もある [14,15]. これらの成長因子は, 独立に, あるいは協調して休止状態の毛乳頭細胞を活性化し, 更に毛乳頭細胞自身もオートクラインに毛髪成長因子を放出し, 新たな毛髪を形成すると考えられる.

そこで, 本章においては, ER β アンタゴニストを塗布した際のこれらの成長因子とその育毛促進作用の関連性を検討するため, これら成長因子に対する中和抗体を用いて検討を行った.

実験方法

1. 試薬

血管内皮増殖因子中和抗体 (Vascular endothelial growth factor antibody, VEGF antibody), 線維芽細胞増殖因子 7 中和抗体 (Fibroblast growth factor-7 antibody, FGF-7 antibody), インスリン様成長因子 1 中和抗体 (Insulin-like growth factor-1 antibody, IGF-1 antibody), およびウサギ免疫グロブリン G (Immunoglobulin G, IgG) は Santa Cruz Biotech 社より購入した. 他の試薬は第一, 二章と同様である.

2. 実験動物

第一章に記載している通りである.

3. 育毛促進試験

CBTE, および PHTPP 塗布液の調製方法は第一, 二章に記載している通りである. さらに, 中和抗体, およびウサギ IgG (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW) を生理食塩水で希釈し, マウス 1 匹当たり 0.1 mL を 3 日おきに腹腔内投与した. また, コントロール群, および CBTE, PHTPP 単独塗布群も同様に 0.1 mL 生理食塩水のみを腹腔内投与した. なお, 使用した抗体のうち, IGF-1 中和抗体のみウサギ由来であったため, 異なる動物系由来の血清生成タンパクによる影響を確認する目的で, ウサギ IgG 投与群も設定した.

結果

CBTE ($53.10 \pm 20.74\%$) の育毛促進作用は VEGF 中和抗体により顕著に抑制された ($22.59 \pm 13.85\%$, $P < 0.01$). さらに, FGF-7 中和抗体($31.76 \pm 14.11\%$, $P < 0.05$), および IGF-1 中和抗体($33.99 \pm 22.56\%$, $P < 0.05$) の腹腔内投与より有意に阻害されることが分かった (Figure 19). 一方, ER β アンタゴニスト PHTPP ($72.12 \pm 26.89\%$) の育毛促進作用への影響を検討したところ, CBTE と同様, VEGF ($13.26 \pm 8.98\%$, $P < 0.01$), および FGF-7 ($39.90 \pm 28.75\%$, $P < 0.05$) 中和抗体の腹腔内投与より阻害された (Figure 20).

なお, IGF-1 中和抗体のみウサギ由来の抗体であり, 種間による影響を確認するため, ウサギ IgG を同様に投与したが, 育毛作用に大きな影響を与えなかった($42.75 \pm 20.67\%$, Figure 19).

考察

これまでに、VEGF, あるいは FGF-7 のような成長因子が, 育毛促進作用に関与しているという報告はあるが [30, 31], エストロゲン受容体との関連性については不明であった. 本実験により, ER β アンタゴニスト活性を持つ CBTE, および PHTPP による育毛促進作用が, これらの中和抗体により抑制されたことから, エストロゲン刺激との関連性を初めて明らかにした.

一方, 岡嶋らによると [14,15], 大豆イソフラボンによる育毛促進作用は, エストロゲン受容体を介し, IGF-1 を放出させることにより, その作用を示すと報告されている. 今回, CBTE の実験において, IGF-1 中和抗体により, 育毛促進作用が阻害されたことから, エストロゲン受容体の関連性を示すデータとなった.

第二章では, ER β アンタゴニストが内因性のアゴニストであるエストロゲン刺激を ER α へシフトさせ, 育毛促進作用を示すのではないかとの仮説を立てた. 今後, 直接的に ER α 受容体を刺激することで, 実際にこれらの成長因子が放出させるかについて, 確認する必要がある. また, その他の成長因子の関与についても検討が必要と考えている. さらに, ER β 受容体を刺激することによる育毛阻害作用は, どのような情報伝達経路を介しているかについても興味深く, さらなる検討が必要と考えている.

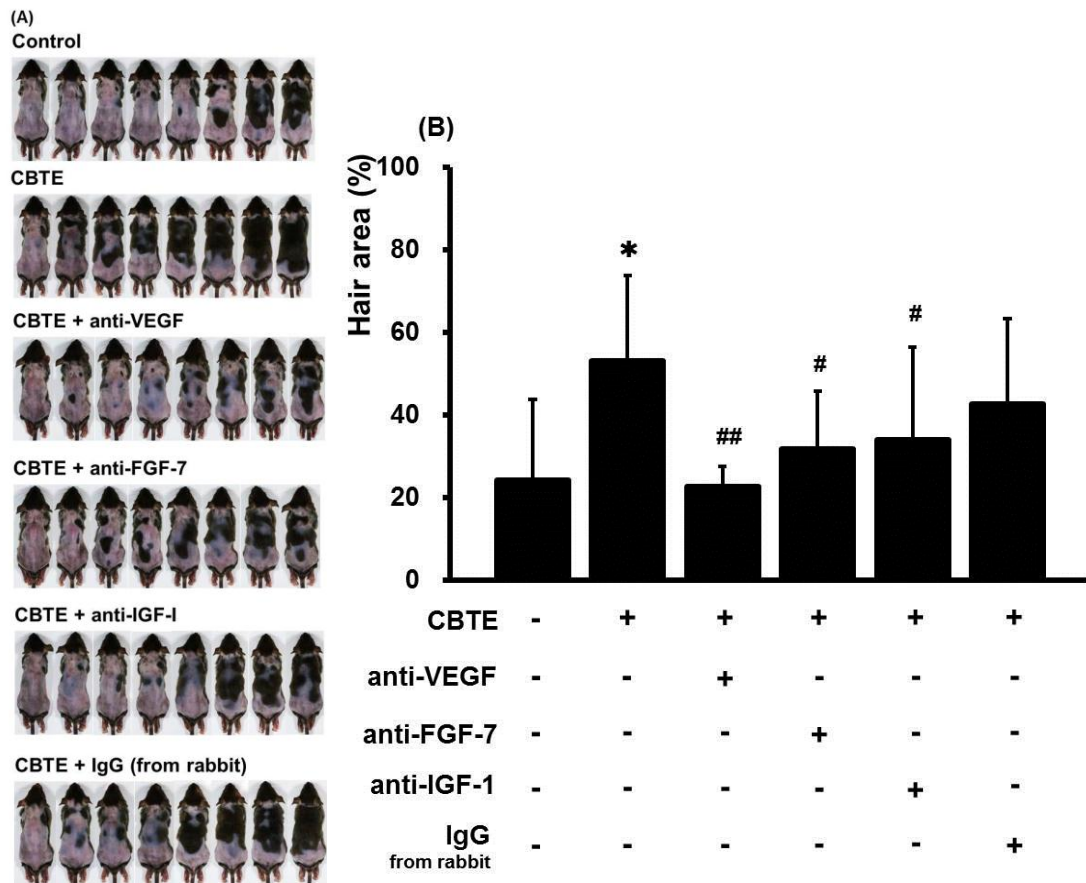


Figure 19. Effect of anti-growth factors (antibodies) on hair growth-promoting effect of CBTE in C3H/He mice. (A) Photography. (B) The ratio of the hair growth area. Mice were treated with 3.5% CBTE and 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW antibodies or IgG for 16 days. All groups contained 0.05% capsaicin. Data are expressed as the mean \pm SD. (n=8). * $P < 0.05$ vs. Control. # $P < 0.05$ vs. CBTE. ## $P < 0.01$ vs. CBTE.

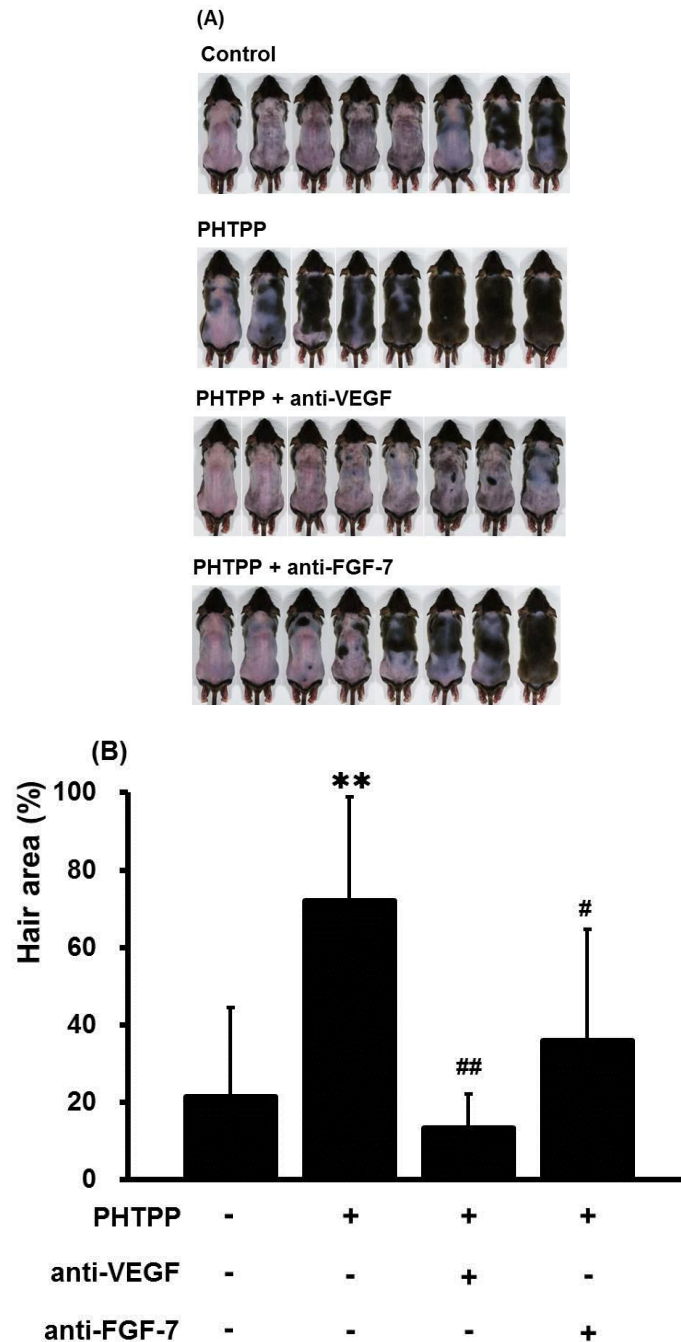


Figure 20. Effect of anti-growth factors (antibodies) on hair growth-promoting effect of PHTPP in C3H/He mice. (A) Photography. (B) The ratio of the hair growth area. Mice were treated with 3.5% CBTE and 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW antibodies for 14 days. All groups contained 0.05% capsaicin. Data are expressed as the mean \pm SD. (n=8). * $P < 0.05$ vs. Control. # $P < 0.05$ vs. PHTPP. ## $P < 0.01$ vs. PHTPP.

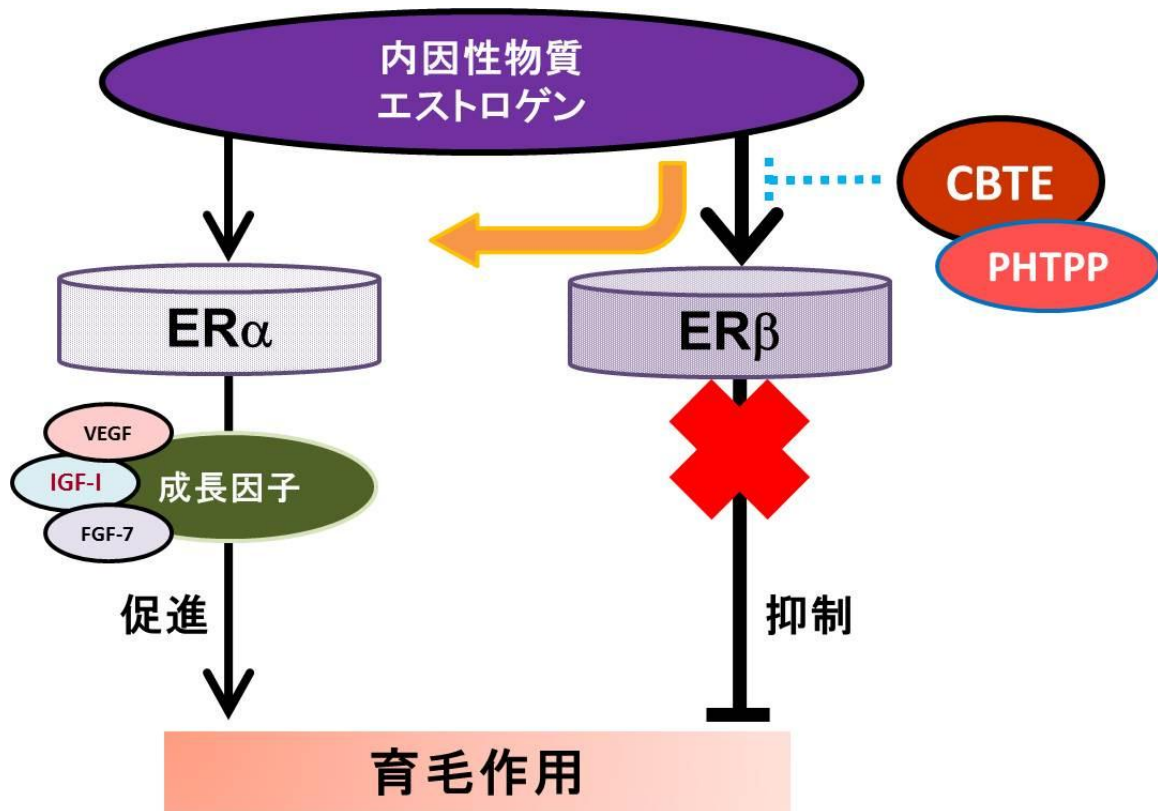


Figure 21. A hypothesis for the hair growth-promoting effect of CBTE. And PHTPP

総 括

本研究では、黒茶の熱水抽出物 (CBTE) が強力な育毛促進作用を示すことを見出し、さらに、今までにはない育毛メカニズムの、エストロゲン受容体 ER β アンタゴニストとして作用することを明らかにした。また、選択的 ER β アンタゴニスト PHTPP もまた育毛促進作用を示し、エストロゲンの ER β への刺激をブロックすることが最も重要であるという新たな育毛促進作用メカニズムを見出した。さらに、この育毛促進作用には、ER α にも間接的に関与していることが分かった。以下、本研究の結果を各章ごとに記述する。

中国の伝統的な茶の一種で、*Aspergillus sp.* による発酵を特徴とする黒茶の熱水抽出物 (CBTE) を用いて、C3H/He マウスに対する育毛作用を検討した。その結果、CBTE の経皮塗布により、用量依存的な育毛促進作用を示すことを見出した。また、その作用は、カプサイシンを添加することによってさらに増強された (第一章第 1 節)。

CBTE の育毛促進作用機構について受容体アッセイにより検討したところ、CBTE はエストロゲン受容体 (ER) に結合し、さらに ER β 受容体に特異なアンタゴニストであることが確認された。実際に、エストロゲン受容体に対する各種アゴニスト、アンタゴニストを用いた動物実験によっても、ER β アンタゴニストであることが認められた。CBTE と同様、エストロゲン受容体 ER β アンタゴニストの PHTPP もまた育毛促進作用を示し、このことから育毛促進作用には ER β のアンタゴニスト活性が重要と考えられた。一方、ER α アゴニストである PPT は有意ではないが、育毛促進作用を示した。このことから、ER α を刺激することにより、育毛促進作用を示すと考えられた。また、CBTE の育

毛促進作用は ER α アンタゴニスト MPP によっても抑制されたことから、著者は ER α , ER β 受容体の育毛に対し異なる作用を示すのではないかという仮説を立てた。すなわち、1. ER α 受容体は育毛促進作用に関与していて、また、2. ER β 受容体は育毛を抑制（休止）する作用に関与している（第一章第 2 節）。

ER β アンタゴニスト PHTPP の育毛作用について検討した。PHTPP は、用量依存的な育毛促進作用を示し、ER β アゴニスト DPN により阻害された。さらに興味深いことに、ER α アンタゴニスト MPP によっても阻害された。PHTPP が ER β の育毛阻害作用をブロックするとともに、内因性エストロゲンの ER β への刺激を遮断することで、ER α を間接的に刺激し、それによっても育毛促進作用を示すものと考えられた。以上の結果は、第一章で立てた著者の仮説を支持するものであった（第二章）。

ER β アンタゴニストである CBTE, および PHTPP に関与する育毛成長因子について検討した。CBTE の育毛促進作用は成長因子として知られている VEGF, FGF-7, および IGF-1 に対する中和抗体で阻害された。これまでに、VEGF や FGF-7 とエストロゲン受容体との関連性を示した報告はなく、初めて明らかにした。このことは、PHTPP の育毛促進作用に対する VEGF, FGF-7 の中和抗体による実験からも明確となった（第三章）。

展 望

本研究では、CBTE が経皮塗布により育毛促進作用を持つことを初めて見出した。また、ER β 選択的アンタゴニストである PHTPP もまた育毛促進作用を示したことから、CBTE の育毛促進作用は ER β アンタゴニスト活性に基づくものと考えられた。そして、毛髪成長過程に重要な分子である成長因子（VEGF、FGF-7、および IGF-I）が関与していることも推察された。今後、このような新しいメカニズムで、副作用の少ない医薬品、部外品の育毛剤の開発が期待される。

引用文献

1. Paus R, Müller-Röver S, Van Der Veen C, *et al.* A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 523-32.
2. Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 2001; 81: 449-94.
3. Su HY, Hickford JG, Bickerstaffe R, Palmer BR. Insulin-like growth factor 1 and hair growth. *Dermatol Online J* 1995; 5: 1.
4. Weger N, Schlake T. Igf-I signalling controls the hair growth cycle and the differentiation of hair shafts. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 873-82
5. Hoffmann R. Male androgenetic alopecia. *Clin Exp Dermatol* 2002; 27: 373-82.
6. Mahé YF, Buan B, Billoni N, *et al.* Pro-inflammatory cytokine cascade in human plucked hair. *Skin Pharmacol* 1996; 135: 366-75.
7. Kaufman KD, Olsen EA, Whiting D, *et al.* Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39: 578-89.
8. Ellis JA, Sinclair R, Harrap SB. Androgenetic alopecia: pathogenesis and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2002; 4: 1-11.
9. Messenger AG, Rundegren J. Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. *Br J Dermatol* 2004; 150: 186-94.
10. Esfandiari A, Kelly AP. The effects of tea polyphenolic compounds on hair loss among rodents. *J Natl Med Assoc* 2005; 97: 1165-9.
11. Kwon OS, Han JH, Yoo HG, *et al.* Human hair growth enhancement in vitro by green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Phytomedicine* 2007; 14: 551-5.
12. Fujita H, Yamagami T. Extract of black tea (pu-ehr) inhibits postprandial rise in serum cholesterol in mice, and with long term use reduces serum cholesterol and low density lipoprotein levels and renal fat weight in rats.

- Phytother Res* 2008; 22: 1275-81.
13. Oi Y, Hou IC, Fujita H, Yazawa K. Antiobesity effects of Chinese black tea (Pu-erh tea) extract and gallic acid. *Phytother Res* 2012; 26: 475-81.
 14. Zhao J, Harada N, Kurihara H, Nakagata N, Okajima K. Dietary isoflavone increases insulin-like growth factor-I production, thereby promoting hair growth in mice. *J Nutr Biochem* 2011; 22: 227-33.
 15. Harada N, Okajima K, Arai M, Kurihara H, Nakagata N. Administration of capsaicin and isoflavone promotes hair growth by increasing insulin-like growth factor-I production in mice and in humans with alopecia. *Growth Horm IGF Res* 2007; 17: 408-15.
 16. Yanagimoto K, Ochi H, Lee KG, Shibamoto T. Antioxidative activities of volatile extracts from green tea, oolong tea, and black tea. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 7396-401.
 17. Bódo E, Bíró T, Telek A, Criger Z, *et al.* A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am. J. Pathol* 2005; 166: 985-98.
 18. Oh HS, Smart RC. An estrogen receptor pathway regulates the telogen-anagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation. *Proc Natl Acad sci USA* 1996; 93: 12525-30.
 19. Hale PA, Ebling FJ. The effect of epilation and hormones on the activity of rat hair follicles. *J Exp Zool* 1975; 191: 49-62.
 20. Thornton, MJ. The biological actions of estrogens on skin. *Exp Dermatol* 2002; 11: 487-502.
 21. Movérare S, Lindberg MK, Faergemann J, Gustafsson JA, Ohlsson C. Estrogen receptor alpha, but not estrogen receptor beta, is involved in the regulation of the hair follicle cycling as well as the thickness of epidermis in male mice. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 1053-8.
 22. Ohnemus U, Unalan M, Conrad F, *et al.* Hair cycle control by estrogens: catagen induction via estrogen receptor (ER)- α is checked by ER β signaling. *Endocrinology* 2005; 146: 1214-25.

23. Obourn JD, Koszewski NJ, Notides AC. Hormone- and DNA-binding mechanisms of the recombinant human estrogen receptor. *Biochemistry* 1993; 32: 6229-36.
24. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973; 22: 3099-108.
25. Li M, Marubayashi A, Nakaya Y, Fukui K, Arase S. Minoxidil-induced hair growth is mediated by adenosine in cultured dermal papilla cells: possible involvement of sulfonylurea receptor 2B as a target of minoxidil. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1594-600.
26. Iorizzo M, Vincenzi C, Voudouris S, Piraccini BM, Tosti A. Finasteride treatment of female pattern hair loss. *Arch Dermatol* 2006; 142: 298-302.
27. Smart RC, Oh HS, Chanda S, Robinette CL. Effects of 17- β -estradiol and ICI 182780 on hair growth in various strains of mice. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999; 4: 285-9.
28. Chanda S, Robinette CL, Couse JF, Smart RC. 17 β -estradiol and ICI 182780 regulate the hair follicle cycle in mice through an estrogen receptor- α pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E202-10.
29. Ohnemus U, Unalan M, Handjiski B, Paus R. Topical estrogen accelerates hair regrowth in mice after chemotherapy-induced alopecia by favoring the dystrophic catagen response pathway to damage. *J Invest Dermatol* 2004; 122: 7-13.
30. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-39.
31. Ozeki M, Tabata Y. In vivo promoted growth of mice hair follicles by the controlled release of growth factors. *Biomaterials* 2003; 13: 2387-94.
32. Danilenko DM. Preclinical and early clinical development of keratinocyte growth factor, an epithelial-specific tissue growth factor. *Toxicol Pathol* 1999; 27: 64-71.

謝 辞

本研究を行うにあたり、懇切なるご指導、ご助言を賜りました京都学園大学バイオ環境研究科の深見治一教授、矢野善久教授に心より御礼申し上げます。

本実験に関するご指導、ご助言を頂きました生産開発科学研究所の吉川正明教授に深く感謝いたします。

また、常に暖かく励ましとご助言を頂きました藤田裕之部長、稲垣洋介研究員、大井康之研究員、島田実幸研究員ならびに日本サプリメント株式会社、およびキューサイ株式会社の皆様に深く感謝いたします。

最後に、本研究のため犠牲とした多くの動物たちに深く感謝し、心からご冥福を祈ります。

2014年1月24日

侯 依静