



サガラメエキスおよび マンダリンオレンジ果皮エキスを配合した 化粧品によるフィラグリン遺伝子の 発現促進効果の検証

神保希望¹⁾ / 植松史帆²⁾ / 木内めぐみ¹⁾ / 黒河正司¹⁾ / 岡沢唯香¹⁾ /
武藤友瑛¹⁾ / 竹田竜嗣³⁾

● 要旨

フィラグリンは、皮膚のバリア機能に重要な役割を果たす角層のタンパク質として知られている。本研究では、試験品のフィラグリン遺伝子の発現への影響を確認するため、3次元培養皮膚モデルを用いた、Real-Time PCR法による遺伝子発現試験を実施した。試験には、サガラメエキスおよびマンダリンオレンジ果皮エキスをを用い、各単品および組み合わせによるフィラグリン遺伝子への影響を確認した。また、ローションとクリームの製品にこれらの成分を配合し、両エキス非配合品との比較も実施した。その結果、各試験品添加24時間後のフィラグリン遺伝子の発現は、マンダリンオレンジ果皮エキス単品添加ではControlと比較して有意な増加は認められなかったが、サガラメエキス単品添加群において増加が認められた。サガラメエキスとマンダリンオレンジ果皮エキスの組み合わせによる混合物においてもサガラメエキスの効果に影響を与えることなく、フィラグリン遺伝子の発現は増加が見られた。また、製品を用いた評価においても、サガラメエキスおよびマンダリンオレンジ果皮エキスを配合した製品が有意にフィラグリン遺伝子の発現を増加させた。一方、両エキスを配合しない製品および既存市販品においてはフィラグリン遺伝子の発現には影響を与えなかった。これらの結果から、両エキスを配合した製品は、化粧品の効能効果で認められている肌に外側からうるおいを与える保湿効果だけでなく、フィラグリン遺伝子の発現を増加させ角層内から肌本来の機能を高めることで、保湿効果やバリア機能の維持に役立つことが示唆された。この効果によりアトピー性皮膚炎(AD)発症の抑制やアレルギーマーチの抑制が期待できると考えられる。今後、更なる研究が必要ではあるが両エキスを配合した製品は、乳幼児などバリア機能の未熟な方に効果的なスキンケア製品であることが期待される。

Key words : フィラグリン, バリア機能, サガラメエキス, マンダリンオレンジ果皮エキス, アレルギーマーチ

1) ピジョン株式会社 : 〒103-8480 東京都中央区日本橋久松町4-4

2) ピジョンホームプロダクツ株式会社 : 〒417-0826 静岡県富士市中里2608-31 富士市浮島工業団地

3) 関西福祉科学大学 健康福祉学部福祉栄養学科 : 〒582-0026 大阪府柏原市旭ヶ丘3-11-1

1. 緒 言

アトピー性皮膚炎(AD)は、慢性的なかゆみを伴う皮膚疾患である。遺伝的要因を背景に環境因子が加わり発症する多因子性疾患と考えられている¹⁾。これまで、免疫学的異常が背景として多くの研究が免疫学側面からなされてきたが、2006年にPalmerらが表皮組織のバリア機能関連タンパク質であるフィラグリンの遺伝子変異がAD発症の重要な因子であることを報告²⁾してから、表皮組織のバリア機能について着目するようになってきた。乃村らは、日本のAD患者におけるフィラグリンの遺伝子異常を解析した結果、30%程度が遺伝子異常を持つことを報告^{3)~6)}している。これらのことから、フィラグリンの異常はAD発症と関連性が深いと考えられる。また、近年アレルギーマーチという言葉がよく知られるようになった。アレルギーマーチとは、乳幼児期に発症したADに続いて食物アレルギー・気管支喘息・アレルギー性鼻炎と子供の成長に従い連鎖的に様々なアレルギー性疾患が出現してくることを指す。これらの原因については様々な観点での研究や考察が進んでいるが、皮膚バリア機能の障害に始まる皮膚へのアレルゲン曝露(経皮感作)が食物アレルギーやADの悪化につながることも示唆されており、ADが食物アレルゲンへの感作や食物アレルギーの発症に先行するとされるシステムティックレビューが公表⁷⁾されるなど、ADが成長期におけるアレルギー性疾患へ大きく関わっていることが示唆されている。また、Horimukaiらは、新生児期の経表皮水分蒸散量(TEWL)が高い、すなわち皮膚バリア機能が低下しているほど、フィラグリン遺伝子の異常に関わらず、ADやその後には生じるアレルギー性疾患と関連が高いことを報告⁸⁾している。これらの報告から、乳幼児期における皮膚バリア機能を高めることや保湿を行うことは、ADの発症抑制やその後のアレルギーマーチの抑制につながる事が期待されている。また、乳幼児期においては角層が大人の約半分の薄さであることや皮膚の形成が未熟であることから、皮膚の外的刺激に弱く、皮膚バリア機能は成人と比較しても低下しやすいと考えられる。

フィラグリンは、皮膚のバリア機能に重要な役割を果たす角層のタンパク質として知られている。角

層は、皮膚の最外層に位置し、約10層程度、脱核した細胞が重層化しており、フィラグリンはその重要な構成要素である⁹⁾。フィラグリンの役割としては、角層内における強度、柔軟性の維持、pHの調整を担っている。また、角層においては、カスパーゼ14によってフィラグリンはその一部が分解され、その後カルパイン、プレオマイシン分解酵素によって完全に分解され、天然保湿因子(NMF)として作用している。NMFは、角層において水分保持量を高め、pHを調整するバッファー作用を持つ。これらの作用により、細胞の正常分化を促進し、病原性細菌のコロニー形成を阻止する役割を持っている¹⁰⁾。フィラグリンは、生体内において、まずプロフィラグリンとして生成される。プロフィラグリンは、分子量が約400 kDa、10-12のフィラグリンリピート構造を有している。その後、角化細胞の最終分化に伴いプロフィラグリンは脱リン酸化され様々なアプローチを経て、分子量約37 kDaのフィラグリンへと分解される¹¹⁾。近年、フィラグリンの発現をコントロールすることでADの発症を抑制することができるかが検討されている。大塚らは、培養表皮細胞および3次元培養皮膚モデルを用いて約1200程度の化合物からフィラグリン遺伝子の発現を亢進する化合物をスクリーニングし、mRNAレベルだけでなく、タンパク質レベルでもフィラグリンの産生を亢進する化合物を確認¹²⁾している。また、この化合物がマウスADモデル(NC/Ngaマウス)においてAD症状の改善を示したことから、フィラグリン遺伝子の発現亢進によって、AD症状が改善することが示唆されている。

我々は、これらの背景から、化粧品原料として用いられ、フィラグリンの産生促進効果が示唆されるサガラメエキスとフィラグリンの分解促進効果が示唆されるマンダリンオレンジ果皮エキスに着目した。サガラメエキスは、海藻のサガラメ(*Eisenia arborea* Areschoug)から抽出されたエキスである。サガラメは、コンブ科アラメ属の褐藻類で御前崎から紀伊半島までの狭い地域で水揚げされるものを指す。鳥羽市内では、「あらめ巻き」などの伝統料理として食されている植物で、ヒト正常表皮細胞においてフィラグリンの産生効果が知られている¹³⁾。マンダリンオレンジ果皮エキスは、マンダリンオレンジ(*Citrus reticulata*)の果実の果皮から作られた

Table 1 Test Compounds and products

Extracts and cpnc.		
Sagarame extract 0.001%		
Sagarame extract 0.002%		
Sagarame extract 0.003%		
Mandarin orange peel extract 0.006%		
Mixture of Sagarame extract 0.002% and Mandarin orange peel extract 0.006%		
Mixture of Sagarame extract 0.002% and Mandarin orange peel extract 0.003%		
Products	Concentration of Extract	Addition volume
Baby Lotion (involved Extract)	Mixture of Sagarame extract 0.002% and Mandarin orange peel extract 0.003%	0.1 g
Baby Lotion (no Extract)	none	0.1 g
Baby Cream (involved Extract)	Mixture of Sagarame extract 0.002% and Mandarin orange peel extract 0.003%	0.1 g
Baby Cream (no Extract)	none	0.1 g
Other commercially available Baby Lotion	none	0.1 g
Other commercially available Baby Cream	none	0.1 g

エキスである。マンダリンオレンジは、ミカン属の常緑低木で白い花をつけ、秋から冬に食用となる果実をつける。果皮が薄く手でむくことができるのが特徴である。マンダリンオレンジ果皮エキスはヒト表皮角化細胞においてカスパーゼ14産生促進作用が知られている¹⁴⁾。カスパーゼ14産生促進により、カスパーゼ14がフィラグリンの分解することによるNMFの産生が示唆され、皮膚のバリア機能改善が見込まれる。今回使用した2つのエキスが配合された原料は、皮膚一次刺激性・皮膚感作性も認められておらず、いずれも安全性の高い原料である。

本研究では、フィラグリンの産生促進が乳幼児期におけるバリア機能の維持や保湿を高めることによってADの発症を抑制し、アレルギーマーチを緩和することができると考え、これらの仮説を検証するために、まずはこの2種のエキスを用いたフィラグリン遺伝子の発現への影響について検討を実施した。また、各エキス単独だけでなく、組み合わせについても検討し、エキス原料そのものだけでなく、これらのエキスを含む製剤の評価も実施を行いたい

と考え、3次元培養皮膚モデルによる実験を行った。

2. 実験

2-1. 試薬

サガラメエキスおよびマンダリンオレンジ果皮エキスは、一丸ファルコス社製のものを用いた。3次元培養皮膚モデルは、Mattek社(クラボウ)のEPI-200を用いた。NucleoSpin[®]RNA, PrimeScript[®] RT Master Mix, SYBR[®]Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2X)は、タカラバイオ社のものを用いた。フィラグリンおよびハウスキーピング遺伝子のcDNAは、タカラバイオ社のものを用いた。

製品評価には「ピジョン フィルベビー ベビーミルクローション」(発売元 ピジョン株式会社)と「ピジョン フィルベビー ベビークリーム」(発売元 ピジョン株式会社)を用いた。本剤は、サガラメエキス、マンダリンオレンジ果皮エキスに加えて保湿成分としてグリセリン、パルミチン酸エチルヘキシル、水添ナタネ油アルコール等を配合したO/W型製剤であり、皮膚の保湿効果を持続させるように工夫している。さらに、着色料や香料、エタノールを

含んでおらず、安全性にも配慮した製剤設計になっている。比較製品としてサガラメエキスおよびマンダリンオレンジ果皮エキスを配合しない同成分のローションとクリームも用いた。また、比較製品として一般的に市場で保湿効果が高いとされている既存市販品のローションとクリームを用いた。既存市販品は、保湿成分としてグリセリン、スクワラン、ベヘニルアルコール等を配合した O/W 型製剤であり、サガラメエキスおよびマンダリンオレンジ果皮エキスは配合されていない。

2-2. 3次元培養皮膚モデルの培養

ヒト3次元培養皮膚モデル (Mattek, EPI-200) は、添付の EPI-100-NMM 培地を用いて、37°C, CO₂ 5% 雰囲気下の CO₂ インキュベーターにて 18 時間前培養した。その後、Table 1 に示した濃度で調整した各試験品溶液をヒト3次元培養皮膚モデルの上部へ原料は 50 μ L, 製品は 0.1 g 添加し、24 時間培養した。また、Control として、試験品の代わりに PBS (-) 50 μ L を添加した。各試験区は、3 個の皮膚モデルを用いた。培養終了後、PBS (-) で皮膚モデル表面を十分洗浄した。ヒト3次元培養皮膚モデルを回収し、RNA の抽出操作を行うまで -80°C にて保存した。

2-3. ヒト3次元培養皮膚モデルからの RNA 抽出および Real-Time PCR による解析

ヒト3次元培養皮膚モデルは、カップから底面の培養組織部分を取り外し、NucleoSpin[®] RNA により RNA を抽出した。得られたサンプルの一部を 50 倍に希釈し、260 nm の吸光度を測定して Total RNA 量を測定した。(計算式: OD 260 nm \times 40 (factor) \times 50 (希釈率) = Total RNA 量 (ng/ μ L)。続いて、PrimeScript[®] RT Master Mix を用いて PCR による逆転写反応 (37°C 15 分, 85°C 5 秒) を行い、cDNA を作成した。その後、リアルタイム PCR 反応は、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II を用いた。SYBR[®] Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2X) 12.5 μ L, PCR Forward Primer (10 μ M) 1 μ L, PCR Reverse Primer (10 μ M) 1 μ L, cDNA を 1 μ L または 2 μ L 加え、RNase Free H₂O を用いて全量を 25 μ L にした。使用したプライマーの塩基配列は、Forward Primer: 5'-TCACGTGGCA GTCCTCACAG-3', Reverse Primer: 5'-AGTGTCTA AACCCGGATTACCATA-3' を用いた。リアルタ

イム PCR 反応は、95°C で 10 秒の初期変性の後、95°C で 5 秒, 60 ~ 65°C で 30 秒のサイクルを 45 回繰り返す。最後に 60 ~ 95°C で 0.2 deg/s の反応を 1 回行った。PCR 反応後、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH による補正を行い、 $\Delta\Delta$ Ct 法により Control と各試験区の mRNA 発現量を比較した。

2-4. 統計処理

遺伝子発現比は、平均値 \pm 標準偏差で表し、Control との比較を Dunnett 検定で実施した。統計計算は、JMP 13.0 (SAS 社製) を用いた。

3. 結 果

3-1. 原料を用いた評価

Fig. 1 に Control を基準としたフィラグリン遺伝子の発現比を示した。サガラメエキス単独では、0.001%, 0.002%, 0.003% すべての濃度において、フィラグリン遺伝子の発現が Control と比較して有意に増加した。マンダリンオレンジ果皮エキス単独では Control と比較して有意な差は認められなかった。組み合わせ試験区については、マンダリンオレンジ果皮エキスの影響はなくサガラメエキス単独の試験結果同様に Control と比較してフィラグリン遺伝子の発現が有意に増加した。

3-2. 製品を用いた評価

Fig. 2 に Control を基準としたフィラグリン遺伝子の発現比を示した。サガラメエキスおよびマンダリンオレンジ果皮エキスを配合したローション、クリームいずれの製品においても Control と比較して有意にフィラグリン遺伝子の発現が増加した。一方、サガラメエキスおよびマンダリンオレンジ果皮エキスを配合していないローションとクリームでは Control と比較して有意な差は認められなかった。同成分のローションとクリームでも両エキスの配合の有無でフィラグリン遺伝子の発現には差異が認められた。また、一般的に保湿力が高いとされている既存市販品のローションとクリームにおいても Control と比較して有意な差は認められなかった。

4. 考 察

フィラグリンは、皮膚のバリア機能に重要な役割を果たす角層のタンパク質として知られている。フィラグリンは、生合成されたのち、角層の外層部でさらに分解され、アミノ酸や天然保湿因子

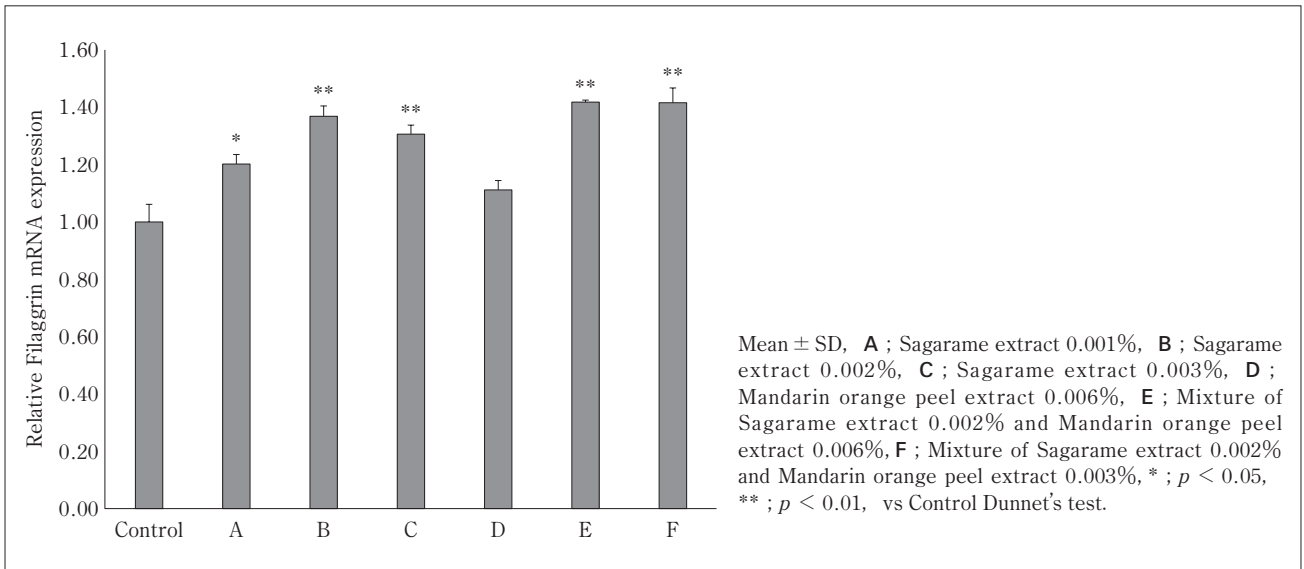


Fig. 1 Relative Filaggrin mRNA expression (Extract)

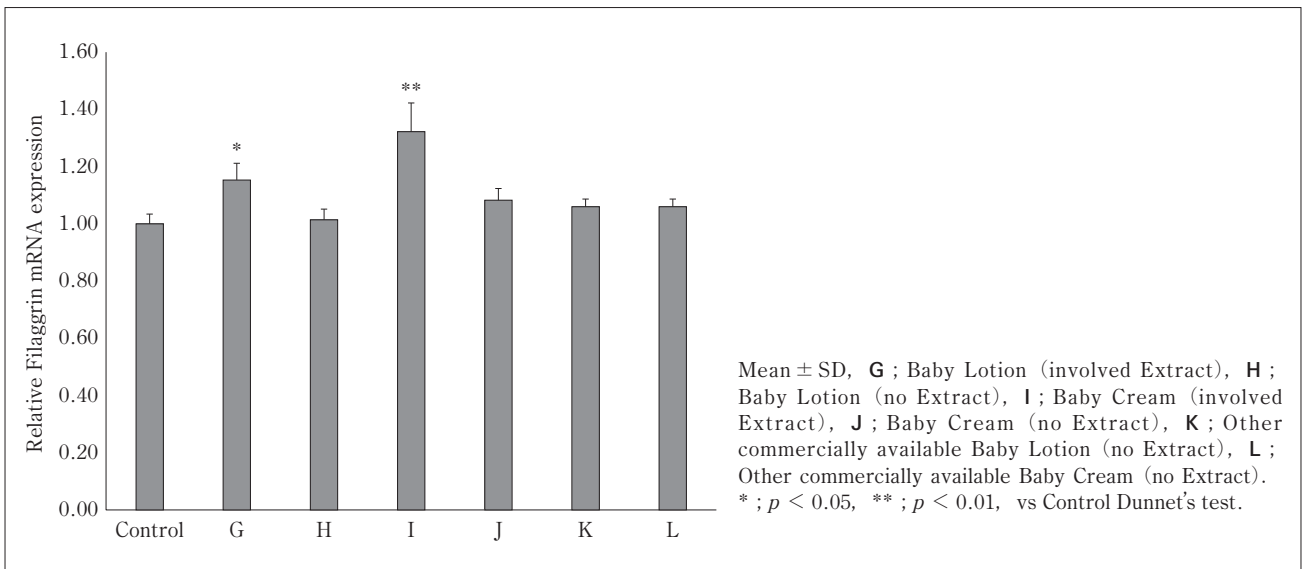


Fig. 2 Relative Filaggrin mRNA expression (Products)

(NMF)として存在している。これまでに実施されたAD¹⁵⁾や老人性乾皮症¹⁶⁾などのドライスキンの研究から、乾燥した肌では角層水分量とともに角層アミノ酸量が低下することが報告¹⁷⁾されている。これらのアミノ酸はNMFと関連が深いと考えられ、フィラグリンの分解により供給されたものである可能性が高い。以上よりフィラグリンの増加は、バリア機能の改善だけでなく、保湿への関与も高いと考えられる。本研究では、サガラメエキスに、フィラグリン遺伝子の発現促進効果が認められた。杉浦らの報告¹⁸⁾によると、サガラメのメタノール/クロ

ロホルム抽出画分において、アラキドン酸(AA)刺激によりマウスの耳介に浮腫を惹起した動物モデルで浮腫の抑制効果が認められており、これらの抗炎症作用に関しては、フェノール化合物であるフロロタンニンの効果である可能性について述べられている。その他にも、褐藻由来の抗炎症・抗アレルギー性の脂溶性成分として、フコキサンチンやフコステロールが報告¹⁹⁾²⁰⁾されている。本研究においても、フィラグリン遺伝子の発現を増加させた物質については今後さらなる研究が必要ではあるが、抗炎症・抗アレルギー性の物質である可能性が考えられ

る。マンダリンオレンジ果皮エキスについてはフィラグリン遺伝子の発現には影響を与えなかった。マンダリンオレンジ果皮エキスにはフィラグリン分解酵素であるカスパーゼ14産生促進作用が知られているが¹⁴⁾、今回の結果からフィラグリン遺伝子の発現には負の影響を与えず、サガラメエキスと組み合わせ合わせて配合してもサガラメエキスのフィラグリン遺伝子の発現促進効果に影響を与えないと考えられる。マンダリンオレンジ果皮エキスはフィラグリン遺伝子の発現促進には影響を与えないが、フィラグリンの分解を促進することでNMF産生には影響を与えると期待されるため、今後更なる研究が必要だと考える。また、サガラメエキスおよびマンダリンオレンジ果皮エキスを配合した製品においてもフィラグリン遺伝子の発現促進効果が認められ、エキスを配合していない製品においてはフィラグリン遺伝子の発現には影響を与えなかったことから、フィラグリン遺伝子の発現促進効果はエキス配合によるもので、エキスの効果は製品に配合しても効果が発揮すると考えられる。

ADは、様々な病態や重症度が異なる疾患である。また、乳幼児期におけるADの発症にはその後のアレルギー疾患の連鎖であるアレルギーマーチの発端になることが示唆されている。近年、ADの発症と皮膚の保湿やバリア機能において強い関連があることが示唆されており、Horimukaiらの研究では、AD高リスク乳児に毎日全身への保湿剤塗布を32週間実施した群でAD累積発症率が32%、有意に低下したことを報告²¹⁾している。また、Simpsonらによる研究においても、英国または米国で出生のAD高リスク児に生後3週間以内に1日1回以上の全身への保湿剤塗布、または介入なしの対照群で生後6カ月のAD発症リスクを比較した結果、保湿剤使用群で、対照群に比べAD累積発症率が50%、有意に低下していたことも報告²²⁾されている。これらの研究結果からも乳幼児期における保湿剤の使用によって、ADの発症リスクを低減させることが示されており、また、アレルギーマーチの抑制にも寄与することが示唆されている。

我々は、サガラメエキスおよびマンダリンオレンジ果皮エキスのフィラグリン遺伝子の発現への影響について検討した。本結果から、エキスの単独だけでなく、エキスの混合物でも効果に影響を与えるこ

となく、フィラグリン遺伝子の発現の増加が認められた。また、これらの両エキスを配合した製品についても、フィラグリン遺伝子の発現を増加させた。また、これらの原料の安全性についても皮膚一次刺激性・感作性試験などにより確認されており、乳幼児などバリア機能の未熟な方への使用も問題ないと考えられる。以上の結果から、両エキスを配合した製品は乳幼児などのバリア機能の未熟な方への保湿効果やバリア機能の維持についても期待でき、AD発症の抑制やアレルギーマーチの抑制につながる効果的なスキンケア製品である可能性が示唆された。化粧品の効能効果で認められている肌に外側からうるおいを与える保湿効果だけでなく、フィラグリン遺伝子の発現を促進させ角層内から肌本来の機能を高めることで、保湿効果やバリア機能の維持に役立つことが示唆された。しかしながら、今回の我々の研究ではタンパク質レベルでのフィラグリンの増加を確認しておらず、今後はタンパク質レベルでのフィラグリンの増加についても検討する予定である。今後これらの結果がさらに明らかになることでサガラメエキスおよびマンダリンオレンジ果皮エキスの機能についてより多くの知見が得られることが期待される。

5. 参考文献

- 1) 森実 真：アトピー性皮膚炎と表皮角化細胞産生カリクレイン関連ペプチダーゼ。岡山医学会雑誌 **131**：17-21, 2019.
- 2) Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH: Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature Genetics* volume **38**: 441-446, 2006.
- 3) Nomura T, Sandilands A, Akiyama M, et al: Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **119**: 434-440, 2007.
- 4) Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, et al: Specific filaggrin mutations cause ichthyosis vulgaris and significantly associated with atopic dermatitis in Japan. *J Invest Dermatol* **128**: 1436-1441, 2008.
- 5) Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, et al: Prevalent

- and rare mutations in the gene encoding filaggrin in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **129**: 1302-1305, 2009.
- 6) 乃村俊史：フィラグリンをターゲットにしたアトピー性皮膚炎の新規治療法の開発. *Cosmetology* **24** : 124-128, 2016.
 - 7) Tsakok T, Marrs T, Mohsin M, Baron S, du Toit G, Till S, Flohr C: Does atopic dermatitis cause food allergy? A systematic review. *J Allergy Clin Immunol* **137**: 1071-1078, 2016.
 - 8) Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kabashima S, Inoue E, Sasaki T, Niizeki H, Saito H, Matsumoto K, Ohya Y: Transepidermal water loss measurement during infancy can predict the subsequent development of atopic dermatitis regardless of filaggrin mutations. *Allergol Int* **65**: 103-108, 2016.
 - 9) 大塚篤司, 椛島健治：専門医のためのアレルギー学講座, 1. バリア機能と皮膚免疫. *アレルギー* **64** : 1189-1195, 2015.
 - 10) Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, Klopp N, Wagenpfeil S, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Palmer CN, Jenneck C, Maintz L, Hagemann T, Behrendt H, Ring J, Nothen MM, McLean WH, Novak N: Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol* **118**: 214-219, 2006.
 - 11) McKinley-Grant LJ, et al: Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4848-4852, 1989.
 - 12) Otsuka A, Doi H, Egawa G, Maekawa A, Fujita T, Nakamizo S, Nakashima C, Nakajima S, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Kabashima K: Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression. *J Allergy Clin Immunol* **133**: 139-146, 2014.
 - 13) 一丸ファルコス：新原料紹介. *フレグランスジャーナル* 2009 (3), 112.
 - 14) 榎谷昇明, カザール ボロン ビスワス, 小島弘之, 伊藤賢一：マンダリンオレンジエキスの表皮構造強化機能及び角質透明感改善作用. 第40回日本化粧品学会講演要旨集, p. 90, 2015.
 - 15) Tanaka M, Okada M, Zhen YX, Inamura N, Kitano T, Shirai S, Sakamoto K, Inamura T, Tagami H: Decreased hydration state of the stratum corneum and reduced amino acid content of the skin surface in patients with seasonal allergic rhinitis. *Br J Dermatol* **139**: 618-621, 1998.
 - 16) Horii I, Nakayama Y, Obata M, Tagami H: Stratum corneum hydration and amino acid content in xerotic skin. *Br J Dermatol* **121**: 587-592, 1989.
 - 17) 藤田宏志, 片桐千華, 太田直美, 和田元次, 大田正弘, 平尾哲二：乾燥によるフィラグリんとアミノ酸の減少を防ぐ Palo Azul. *J Soc Cosmet Chem Jpn* **37** : 84-91, 2003.
 - 18) 杉浦義正, 白井将勝, 宮田昌明：マウス耳介浮腫に対する褐藻サガラメ由来の脂溶性成分による抑制効果. *水産大学校研究報告* **65** : 245-250, 2017.
 - 19) Sugiura Y, Kinoshita Y, Usui M, Tanaka R, Matsushita T, Miyata M: The suppressive effect of a marine carotenoid, fucoxanthin, on mouse ear swelling through regulation of activities and mRNA expression of inflammation-associated enzymes. *Food Sci Technol Res* **22**: 227-234, 2016.
 - 20) Sun Z, Mohamed MAA, Park S-Y, Yi T-H: Fucosterol protects cobalt chloride induced inflammation by the inhibition of hypoxia-inducible factor through PI3K/Akt pathway. *Int Immunopharmacol* **29**: 642-647, 2015.
 - 21) Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y: Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* **134**: 824-830, 2014.
 - 22) Simpson EL, Chalmers JR, Hanifin JM, Thomas KS, Cork MJ, McLean WH, Brown SJ, Chen Z, Chen Y, Williams HC: Emollient enhancement of the skin barrier from birth offers effective atopic dermatitis prevention. *J Allergy Clin Immunol* **134**: 818-823, 2014.

Validation of the Effects of Cosmetics Containing Combination of Sagaramé (*Eisenia arborea*) Extract and Mandarin Orange (*Citrus reticulata*) Peel Extract on Filaggrin Gene Expression

Nozomi JIMBO¹⁾/Shiho UEMATSU²⁾/Megumi KIUCHI¹⁾/Masashi KUROKAWA¹⁾/
Yuka OKAZAWA¹⁾/Tomoe MUTO¹⁾/Ryuji TAKEDA³⁾

1) Pigeon Corporation: 4-4, Nihonbashi-Hisamatsucho, Chuo-ku, Tokyo 103-8480, Japan

2) Pigeon Home Products Corporation: Fuji City Ukishima Industrial District 2608-31 Nakazato Fuji-shi, Shizuoka-ken 417-0826, Japan

3) Kansai University of Welfare Sciences Department of Nutritional Sciences for Well-being, Faculty of Health Sciences for Welfare: Asahigaoka 3-11-1, Kashiwara-City, Osaka 582-0026, Japan

Abstract

Filaggrin is a stratum corneum protein which plays an important role in the skin barrier function. Herein, a gene expression study was conducted using real-time polymerase chain reaction and three-dimensional skin culture models to confirm the effects of each test article, i.e., Sagaramé and mandarin orange peel extracts, either alone or in combination, on filaggrin gene expression. These extracts were also added to lotion and cream products for comparison with extract-free products. Addition of Sagaramé extracts resulted in increase of filaggrin gene expression after 24h. Mandarin orange peel extract, on the other hand, did not show significant results. In addition, the effects of the combination of Sagaramé and mandarin orange peel extracts on filaggrin gene expression was studied, and addition of mandarin orange peel extracts did not affect the effects observed with Sagaramé extracts. Significant effects were also observed in the lotion and cream products containing the combination of both extracts. The lotion and cream products without neither extracts and other commercially available products had no significant difference compared to Control. Therefore, products containing the combination of both extracts not only exhibited external moisturizing effects but were also useful in maintaining the moisturizing effect and skin barrier function by increasing filaggrin gene expression and enhancing the original function of the stratum corneum. In addition, suppressing effects on the onset of atopic dermatitis and allergic march are expected. Although we need more research, products formulated with combined extracts are expected to be effective skin care products for infants with immature skin barrier function.

Keywords : filaggrin, barrier function, Sagaramé (*Eisenia arborea*) extract, mandarin orange (*Citrus reticulata*) peel extract, atopic march