

スクアレンモノヒドロペルオキシドの皮膚毒性と
その特性

2002 年
千葉勝由

目 次	Page
目次	1
略号	5
はじめに	6
I. スクアレンモノヒドロペルオキシドの生成と分解	
緒言	10
1. 紫外線照射されたヒト皮表脂質中でのスクアレンモノヒドロペルオキシドの生成	
1. 実験材料および方法	11
2. 結果	13
3. 考察	16
2. スクアレンモノヒドロペルオキシドの調製法と構造解析	
1. 実験材料および方法	18
2. 結果	20
3. 考察	26
3. スクアレンモノヒドロペルオキシドの分解性	
1. 実験材料および方法	29
2. 結果	31
3. 考察	34
4. 小括	37
II. スクアレンモノヒドロペルオキシドの皮膚毒性作用	
緒言	39
1. 皮膚刺激性	
1. 実験材料および方法	39

2. 結果	41
3. 考察	44
2. コメド形成作用	
1. 実験材料および方法	46
2. 結果	48
3. 考察	51
3. 培養皮膚に対する細胞毒性	
1. 実験材料および方法	52
2. 結果	54
3. 考察	55
4. 小括	56
III. スクアレンモノヒドロペルオキシド累積塗布によるシワ形成作用	
緒言	58
1. スクアレンモノヒドロペルオキシド累積塗布による皮膚変化について	
1. 実験材料および方法	58
2. 結果	61
3. 考察	70
2. スクアレンモノヒドロペルオキシド長期塗布と紫外線照射によるシワ皮膚の比較	
1. 実験材料および方法	72
2. 結果	77
3. 考察	93

3. 小括	97
IV. スクアレンモノヒドロペルオキシドの皮膚グルタチオンへの作用	
緒言	98
1. 皮膚内グルタチオンへの作用	
1. 実験材料および方法	98
2. 結果	100
3. 考察	103
2. 細胞内グルタチオンへの作用	
1. 実験材料および方法	104
2. 結果	105
3. 考察	106
3. グルタチオン枯渇による毒性増強作用	
1. 実験材料および方法	109
2. 結果	110
3. 考察	112
4. グルタチオン関連皮膚酵素への作用	
1. 実験材料および方法	113
2. 結果	114
3. 考察	115
5. 小括	117
V. 総括	119

VI. 謝辭	123
VII. 参考文献	124
VIII. 論文目錄	135
審查委員一覽	137

略号

Sq : squalene

Sq-OOH : squalene monohydroperoxide

Sq-OH: Squalene monohydroxide

BHP : *tert*-butyl hydroperoxide

CHP : cumene hydroperoxide

HSL : human skin surface lipid

CL-HPLC : chemiluminescence-high performance liquid chromatography

GSH : reduced glutathione

GSSG : oxidized glutathione

BSO : DL-buthionine-S, R-sulfoximine

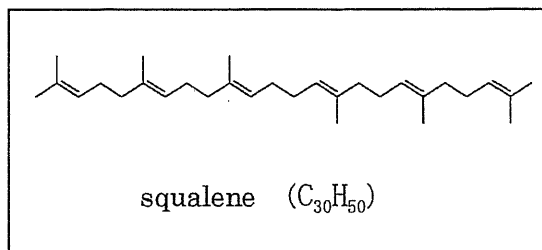
DEM : diethylmaleate

GAG : glycosaminoglycan

HP : hydroxyproline

はじめに

ヒト皮膚表面は不飽和結合を有する皮脂に覆われており、外的な環境因子である紫外線や大気汚染物質の暴露あるいは種々の薬剤塗布等により、容易に過酸化脂



質が生成されやすい場所である。ヒト皮表脂質の組成は Downing らの分析によると、トリグリセライドが 41%、ワックスエステルが 25%、脂肪酸が 16.4%、スクアレン squalene (C₃₀H₅₀, 以下 Sq と略す) が 12%、コレステロール、およびコレステロールエステルが 3~5%を占めていることが報告されている¹⁾。このうち、紫外線照射で酸化を受ける不飽和二重結合を持っているものは、オレイン酸のような脂肪酸、スクアレン、コレステロールがあげられる。とりわけ、Sq は 1 分子中に 6 箇所の不飽和二重結合を有しており、酸化されやすい構造になっている²⁾。

Sq は皮脂の主成分として皮膚からの水分蒸散を防ぎ皮膚に滑らかさを与え、化粧品原料としても使用されているが、Sq 自らが酸化されて皮膚表面の酸化を防御する抗酸化剂的な働きがある物質でもある。しかし、我々は新鮮でない Sq 原料には皮膚刺激性があり細胞毒性を発現することを確認しており³⁾、酸化された Sq (Sq 過酸化物) は皮膚に対して何らかの生理的・毒性的な作用を有していることが推察された。

近年、ヒト皮膚への紫外線照射時に、皮脂中の TBA 陽性物質 (チオバルビツール酸反応物質) の主な起源物質は、Sq 過酸化物に由来するということが明らかにされている^{4~6)}。皮膚表面の過酸化脂質は、皮膚の老化とともに総脂質量

に対する過酸化脂質量が増加すること⁷⁾、また女子顔面黒皮症、肝斑、アトピー性皮膚炎等の皮膚疾患患者中の皮脂でも増加していることが報告されていることから^{8, 9)}、これら過酸化脂質の多くが Sq 過酸化物由来だとすると、皮膚の老化兆候や様々な皮膚疾患（アトピー性皮膚炎、肝斑、ニキビ、脂漏性皮膚炎等）に Sq 過酸化物が関与している可能性が推察されてくる。

Sq 過酸化物の皮膚への作用に関しては、皮膚刺激性¹⁰⁾、皮膚培養細胞毒性^{10, 11)}、comedo の誘発^{12, 13)}、日焼け誘発¹⁴⁾、皮膚粗癬疹への関与¹⁵⁾、光毒性薬剤の皮膚毒性作用への関与^{16, 17)}、あるいは表皮内 ATP 陽性細胞の減少に伴う接触感作性の減弱作用¹⁸⁾といった様々な皮膚生理活性を持つ物質群であることが報告されている。更に、Sq 過酸化物の皮膚への作用点は皮膚表面にとどまらず、長期的な暴露では皮膚内部への量的質的变化をも引き起こし、皮膚の加齢変化に関与している可能性も推察される。

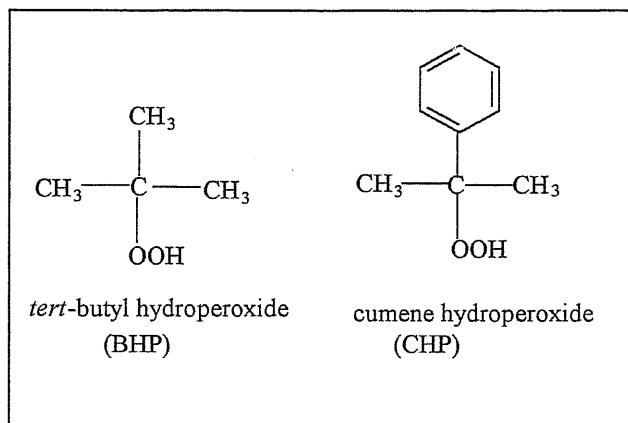
このように Sq 過酸化物がヒト皮膚にとって非常に身近な過酸化脂質であり、容易にヒト皮膚に酸化ストレスを与えつづける物質でありながら、実際の皮膚への詳細な影響について十分に把握されているとは言い難い。その理由として、従来の報告例は、Sq 過酸化物を TBA 陽性物質として大雑把に捉え、しかも Sq 過酸化物の調製法が非現実的な条件下で調製され、様々な物質群からなる過酸化物の混合試料を用いて評価している例が多く、作用物質レベルでの解析が不十分であったことが上げられる。

Sq 過酸化物の分析法に関して、最近、河野らは化学発光-液体クロマトグラフィー（CL-HPLC）法を開発し、ヒト皮表脂質中の過酸化の第一ターゲットは Sq であり、初期生成物のスクアレンモノヒドロペルオキシド（Squalene

monohydroperoxide、以下 Sq-OOH と略す) が過酸化物の主要生成物質の一つであることを明らかにした¹⁹⁾。この Sq-OOH は、皮膚上で日常レベルでの紫外線照射で容易に形成され、皮脂中の過酸化脂質である TBA 陽性物質として皮膚に何らかの影響を与えていることが推察された。また、Sq を酸化させるものは紫外線のみならず、8-methoxypsoralen¹⁶⁾、chlorpromazine¹⁷⁾、といった光増感作用のある薬剤や、皮膚常在菌でニキビ菌と言われているある *Propionibacterium acnes* が産生するコプロポルフィリンといった光増感物質による過酸化反応^{20, 21)}、あるいは頭皮常在菌 *Pityrosporum orbiculare* による酸化反応でも Sq 過酸化物生成が報告されており¹⁵⁾、Sq-OOH 生成と皮膚への作用との関連性に興味が持たれている。最近では、タバコの煙といった環境汚染物質で Sq-OOH が皮膚上で生成されること²²⁾、あるいは加齢臭の原因物質の一つと言われている n-ノネナールが、皮表脂質パルミトオレイン酸と Sq-OOH との反応により生成されることが報告されている²³⁾。その他、ヒトの皮膚年齢との関係や皮膚疾患（アトピー皮膚炎、乳児脂漏性皮膚炎等）との関係で、Sq-OOH 分析が行われており、皮膚の抗酸化機能や防御機構に Sq-OOH が関与していることが推察されている²⁴⁾。

このように、Sq 過酸化物、とりわけ Sq-OOH は、ヒト皮膚に対して様々な現象に関与し、皮膚に絶えず酸化ストレスを与え続けている身近な物質であるにもかかわらず、Sq-OOH 自身の皮膚への作用についての報告例はほとんど見当たらないのが現状であった。そこで、日常生活紫外線レベルで形成される Sq-OOH を効率よく分取する方法を構築し、得られた Sq-OOH が monohydroperoxy 体であることを確認するとともに、その主要成分について構造解析を行った。そして、Sq-OOH の皮膚への毒性作用を、皮膚刺激性、培養細胞毒性、コメド形成、および皮膚表面形態変化について検証を行った。また、Sq-OOH により誘発される皮膚変化の機能的・形態的な特性を明確にするために、Sq-OOH と同様な有機

monohydroperoxide である *tert*-butyl hydroperoxide (BHP と略) や cumene hydroperoxide (CHP と略) との比較、および皮膚に酸化ストレスを与えシワ形成作用が知られている紫外線照射による皮膚変化について Sq-OOH との比較を行った。更に、Sq-OOH の局所塗布は皮膚内部への酸化的ストレスを与えていることから、皮膚内在性抗酸化物質のグルタチオンに着目し、細胞・組織レベルでのグルタチオン量の変動やグルタチオン関連酵素への影響についても検討したのでここに報告する。



I. スクアレンモノヒドロペルオキシドの生成と分解

緒言

Sq は非常に酸化されやすく、紫外線照射や酸素暴露で容易に酸化され、実験条件の違いにより多種多様な過酸化物や副産物を生成する。Sq の紫外線照射で生成する初期生成物である squalene monohydroperoxide (Sq-OOH) の皮膚への影響を調べる為には、Sq-OOH を未反応の Sq や副産物から分離しながら調製する必要がある。従来、Sq の過酸化物を生成させるには、酸素暴露^{25~27)}、中波紫外線 UVB 照射^{14, 28)}、長波紫外線 UVA 照射^{29, 30)}、光増感剤^{31, 32)}、活性酸素発生剤³³⁾を用いた方法等が報告されている。これらの中で、Sq-OOH の大量調製方法としては、Sq を有機溶媒に溶かしメチレンブルーを用いた光増感酸化反応で調製し、HPLC で分離精製する方法が多くの論文で採用されている^{31, 34)}。

しかしながら、調製条件として光増感剤（一重項酸素発生剤）を使用すると、mono 体のみならず、通常の皮膚にはほとんど存在していない di-、tri-体が生成される強力な過酸化条件下であり、多数の分解物を含む Sq 過酸化物が得られてくる³⁴⁾。そこで、皮表脂質や Sq に日常生活レベルの長波長紫外線照射した時、初期の生成物をメタノール移動相で ODS カラムを用いて HPLC 分析した。また、より現実に近い環境で生成される Sq-OOH を作製するには、Sq に直接紫外線を生活紫外線レベルで短時間照射し、生成する過酸化物を溶媒で完全に抽出する方法が適していると考えた。

そこで、はじめに光源としては長波長紫外線 UV-A 照射を採用し、日常生活レベルの紫外線照射量 (UV-A 光源で照射強度 $5000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 1 時間照射) で生成してくる Sq 過酸化物のピーク物質 (Sq-OOH 分画物、Sq-OOH fraction) の生成を高速クロマトグラフィー (HPLC) で確認した。また、化学発光—高速クロマトグ

ラフイー (CL-HPLC) を用いて Sq-OOH を分析し Sq から紫外線照射で hydroperoxide 体が生成していることを確認するとともに、紫外線照射した後の皮膚表面に生成する Sq-OOH 量をヒト前腕内側部皮膚にて測定した。また、大量の Sq-OOH を調製するために、紫外線照射 Sq から効率的に Sq-OOH を分取する方法を検討し、分離された Sq-OOH の構造解析を mass 分析と NMR で分析した。また、Sq-OOH は生成とともに分解も同時に起きているので、Sq-OOH の分解性について *in vitro* で検討し種々の分解活性物質について検証した。

1. 紫外線照射されたヒト皮表脂質中でのスクアレンヒドロペルオキシドの生成

ヒト皮膚表面にある皮脂をカップ法で分取し、Pyrex 試験管に一定量をコートしてから、長波長紫外線 (UV-A) を経時的に照射し、得られた皮脂をメタノールで抽出したものを HPLC で分析した。また、実際のヒト皮膚上での Sq-OOH の存在量を CL-HPLC で定量した。

1-1. 実験材料および方法

・ヒト皮表脂質への紫外線照射

Sq は Sigma 社製、ヒト皮表脂質 (HSL) は、前腕内側部よりアセトン溶媒を用いたカップ法にて分取したものをを用いた。10 mL のスクリュウキャップ付き Pyrex ガラス試験管の内側に、アセトン溶媒を窒素ガスで留去させた約 3.2mg 重量相当の Sq あるいは HSL を薄く試験管にコートしてから紫外線を照射した。光照射条件は、長波長紫外線 (東芝 FL-20BLB ランプ) 5 本を室温下で、 $5000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の照射強度で 0~45 分間照射した。

・過酸化脂質 (LPO) 測定

デタミナーLPOキット (協和メディクス製) を用いた³⁵⁾。被験溶液の 0.1 mL に前処理溶液を 1 mL 添加し、30℃で 5 分間放置後、発色反応液を 2 mL 添加し、更に 10 分間インキュベートする。675 nm の吸光度を測定し、標準液 (50 nmole/mL のクメンヒドロペルオキシド溶液) から LPO 値を算出した。

・UV-HPLC による分析

紫外線照射された Sq あるいは HSL のコートされた試験管に 0.5 mL のメタノールを入れて 10 分間振とう後、3000 rpm で遠心した上清を HPLC に注入した。装置は Hitachi655 型 HPLC システムを用い、使用カラムは Shodex-ODS カラム (F-411, サイズ 4.6 x 150 mm, 昭和電工)、移動相は 6 % ミリ Q/メタノールで流速 1.2 mL、検出は 210 nm で分析した。

・CL-HPLC を用いた Sq-OOH 定量

Sq-OOH は、宮澤らの開発した CL-HPLC 装置で定量した³⁶⁾。測定波長は 210 nm の吸収で ODS 系 C-18 カラム (Inertsil ODS-80A, サイズ 4.6 x 250 mm, GL サイエンス) を用いて分析した。移動相は 100%メタノール、流速は 1.1 mL/min とし、化学発光用試薬は 50 mM のホウ酸バッファー (pH 9.3) に 10 μ g/mL のチトクローム C と 1 μ g/mL のルミノールを溶かしたものを流速 1.0 mL/min で流した。CL 検出器 (825-CL, JASCO) の感度は ATT8 で測定した。

・ヒト皮膚上の Sq-OOH 濃度の測定

皮膚表面を石鹸で洗浄後、紫外線 (UV-A) を 15 分間と 60 分間 2500 μ W/cm² 照射した。そして、皮膚の一定面積についてアセトンに湿らした脱脂綿棒で清拭し、付着した皮表脂質を n-butanol に可溶化し、河野らの方法に準じて Sq-OOH を CL-HPLC で分析した³⁴⁾。また、皮膚表面上の Sq 量を一定にする為に、皮膚洗浄後 Sq を 40 μ g/cm² 皮膚となるように塗布してから、紫外線を 1 時間照射し、同様に CL-HPLC 分析した。

1-2. 結果

- ・ 紫外線を照射した HSL 中の Sq 過酸化物の生成

Fig.1 は、紫外線を照射した HSL の HPLC チャートである。UV-A 照射時間とともに保持時間 10 分付近に、210 nm の吸収ピークが増加し、一方、32 分前後の Sq ピークが減少していることが認められた。

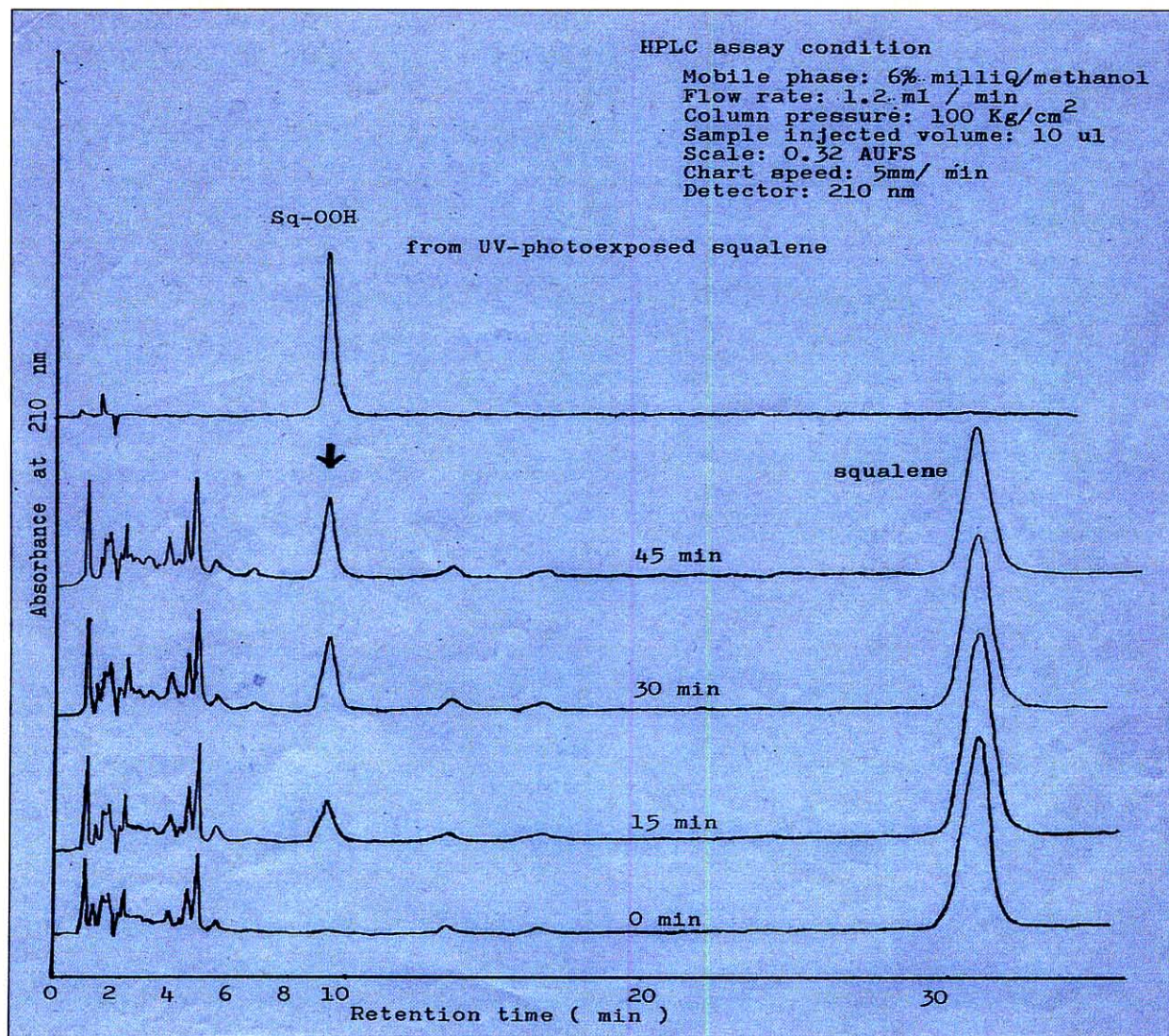
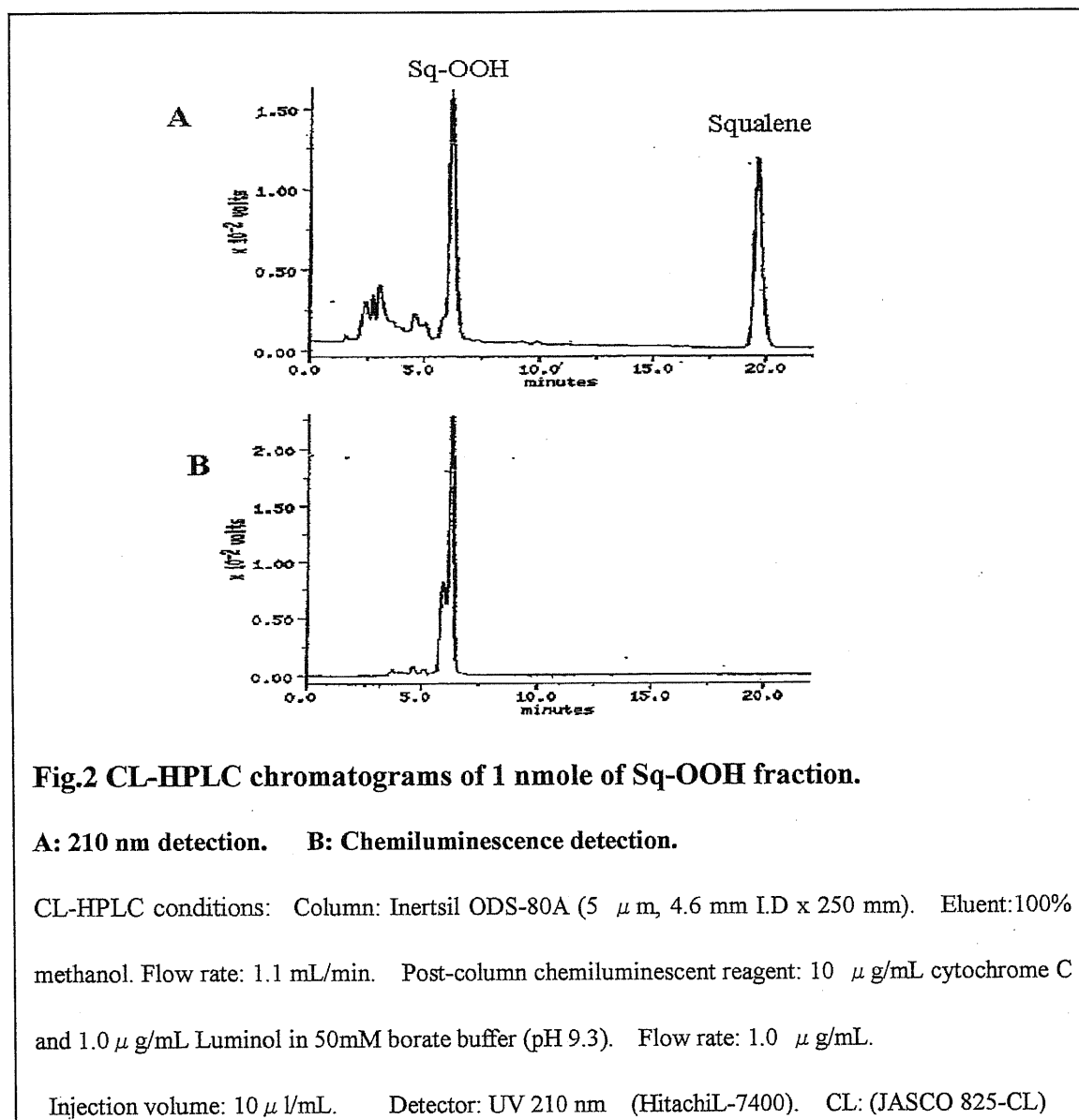


Fig.1 Changes in chromatograms of methanol extracts from HSL irradiated with UV-A for 0, 15, 30 , and 45 minutes.

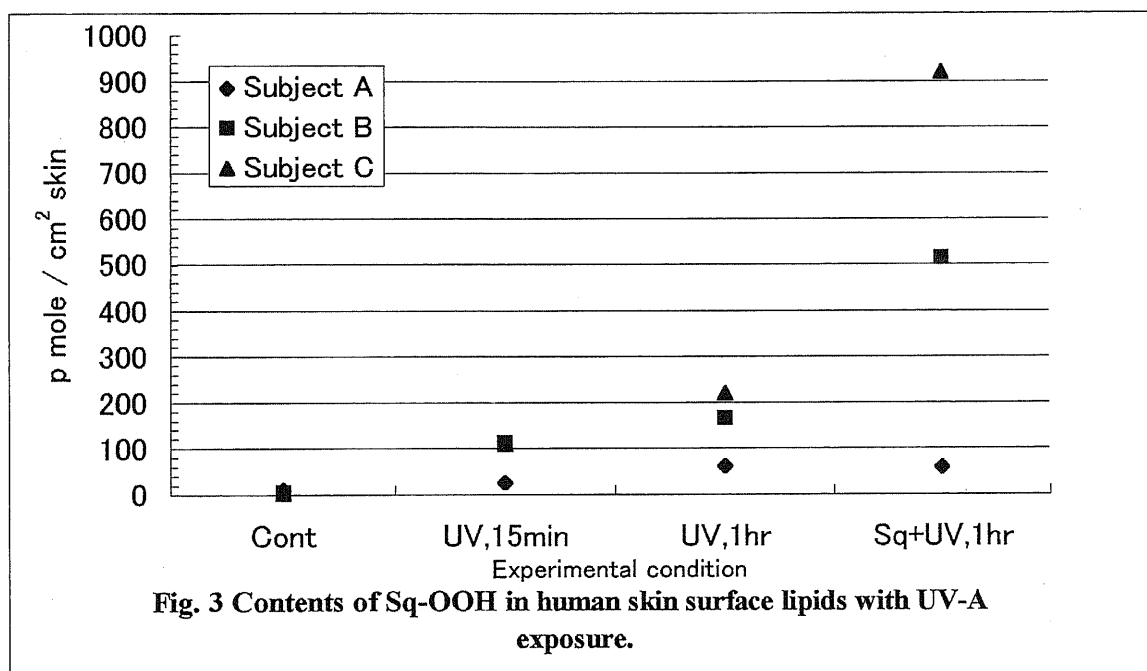
このピーク物質は、高いLPO値を有し、またSqから調製されたSq-OOHとほぼ同じ保持時間を有していることから、HSL中のSqがUV-A照射により生成したSq-OOH分画物であることが示された。Sqに同様な照射条件でHPLC分析した場合でも、保持時間10分前後にHSLで見られたものと同様のピークが検出された。

・ヒト皮膚上でのスクアレンペルオキシドの生成

CL-HPLC法は、Sq-OOHを特異的に検出できる分析法であり、pmoleオーダーでの分析が可能であった。Fig.2は1 nmoleのSq-OOH分画の分析結果である。



この機器条件下で、対象者 3 名で実際のヒト皮膚前腕内側部からアセトンで採取した皮脂中の Sq-OOH を様々な条件下で測定し、Sq-OOH 濃度は皮膚単位面積あたりの Sq-OOH 濃度で表した。その結果、洗浄直後は平均 6.3 pmole/cm²であったが、紫外線 UV-A の 2500 μ W/cm² を 15 分間照射するだけで 82 pmole/cm² となり、1 時間照射では 150 pmole/cm² となった (Fig. 3)。また、皮膚洗浄後に、通常の皮膚 Sq 濃度である 40 μ g/cm² となるように予め Sq を塗布してから、紫外線 UV-A の 2500 μ W/cm² を 1 時間照射した結果、平均 498 pmole/cm²、最も高い被検者 C では、921 pmole/cm² の値を示した。



1-3. 考察

紫外線照射された HSL の最も大きな変化は、Sq-00H と思われるピーク（保持時間 10 分前後）の物質群の生成である。この物質は Sq 由来の過酸化物であり、ヒト皮膚上にも通常数 10 から数 100 pmole/皮膚面積 cm^2 ぐらい存在していることが確かめられた。

今回のヒトのデータ結果が示すように、ヒト皮表脂質中の Sq-00H 量は、非常に個人差が大きいことが分かる。もともと、ヒト皮脂量は個人差が大きく、年齢、季節、性差等の変動要因は多いので、実際は皮膚単位面積あたりの Sq-00H 量ではなく、分取された Sq に対する Sq-00H の割合（Sq-00H 変換率）で表す論文も多い^{19), 22), 24), 34)}。前腕内側部の Sq-00H のばらつきに関して、最近、フランスの D. Maes らは、健康人前腕皮膚上の Sq-00H/Sq について季節変動と日内変動を 14 名のボランティアを用いて検討した³⁷⁾。その結果、10 月に比べ 7 月では約 5 倍高い値が観察され、また、一日の中では朝 8 時が最も低く、日光を浴びた後の午後 8 時では、朝の 3 倍以上の Sq-00H 濃度が観察された。このように、Sq-00H の量的変化は、個人差は勿論のこと、日内変動や季節変動もあり、皮脂の採取法、抽出溶媒（抗酸化剤の有無）、測定部位、等の多くの変動因子もあるため、評価試験系として使用する場合は、これらのことを考慮に入れる必要があるだろう。

ヒト皮膚上での Sq-00H の定量に関して、正確な Sq-00H 濃度は現在のところ得られていないし、文献上でも絶対値を発表している報告は少ない。しかし、Sq-00H 変換率では、加齢による変化について TBA 値と同様に、20 歳代が最も低く、乳児で高い傾向を示すことが報告されており²⁴⁾、皮膚の酸化に対する防御作用、抗酸化作用が 20 歳代で完成し、その後は衰えていくことが推察された。また、皮膚疾患については、アトピー性皮膚炎では正常人の 10 倍以上の高い変

換率を示す報告例もあった²⁴⁾。これらの報告内容から、健常皮膚の Sq-OOH/Sq 比は通常 1~5 % ぐらいであり、病的な皮膚の場合には 20% ぐらいに上昇する可能性が示されていた。

Sq 量は額部の洗顔 12 時間後で約 $30\sim40\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ とした時、屋外では Sq の 100 分子あたり 1 分子の割合で過酸化が認められることが報告されている¹⁹⁾。したがって、過酸化物濃度は、理論的には最高で約 $1\ \text{nmole}/\text{cm}^2$ と計算された。今回のデータから、CL-HPLC 分析でヒト前腕上での Sq-OOH 分析の結果、通常は皮脂洗浄後は $10\ \text{pmole}$ 前後であるが、紫外線照射により Sq-OOH 生成量が上昇し、特に Sq 塗布皮膚では、最高で $921\ \text{pmole}/\text{cm}^2$ 濃度の Sq-OOH が検出されたことから、健常ヒト皮膚上での Sq-OOH 濃度は最高で約 $1\ \text{nmole}/\text{cm}^2$ 前後は到達可能であると推測した。従って、健常ヒト皮膚では約 $1\ \text{nmole}/\text{cm}^2$ 、紫外線に長期暴露された場合や、病的な皮膚ではその 10~20 倍の存在量にもなる可能性が考えられた。

2. スクアレンモノペルオキシドの調製法と構造解析

Sq の紫外線照射により、Sq-00H を含む分画物を調製し、Sq-00H の簡略な分取方法について検討した。また、分取された Sq-00H が monohydroperoxide 体であることの確認と、更に精製された Sq-00H の主要な物質の構造解析について mass 分析と NMR 分析を行った。

2-1 実験材料および方法

Sq は Sigma 製 (純度 99 %) を用いた。抽出溶媒はすべて和光純薬製を用いた。2-thiobarbituric acid (TBA) 試薬は、Merck 社製を用いた。

・ 紫外線を照射したスクアレン中の TBA 反応物質の抽出

Sq 1 g を Pyrex 製 15 mL の試験管に入れ、紫外線 UV-A を $5000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ で 1 時間照射したもの、および照射 Sq にメタノール 1 mL を添加し振とう抽出した残りの Sq について、TBA 値を求めた。方法は、検体 0.1 g に 8.1 % の sodium lauryl sulfate (SLS) 0.1 mL、20 % 酢酸バッファ (pH 3.5) 1.5 mL、0.8 % TBA 試薬 1.5 mL をそれぞれ加え、95°C 水浴槽で 1 時間加熱後、冷却してから n-butanol を 5 mL 添加し、生成されるマロンジアルデヒド (MDA) を抽出し 532 nm の吸光度で測定した。標準品としてテトラエトキシプロパンを置き、各 Sq の TBA 値を MDA nmole/0.1g Sq で表した。

・ スクアレンモノペルオキシドの調製法

直径 6 cm のシャーレーに Sq を 10 g 入れ、UV-A ランプ (Toshiba BLB ランプ) の 5 本並列したものを光源とし、 $5000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ のエネルギー量で 1 時間照射した。そして、15 mL のメタノールで 2 回抽出してから、-20°C で一昼夜静置し、析出した沈渣 (Sq) を除いた上清液を窒素ガス噴射でメタノールを留去し

て濃縮したものを Sq-OOH 抽出物 (Sq-OOH 分画物) とした (Fig. 2 の分析チャート参照)。更に精製する必要がある場合には、分析チャートで保持時間 8 分～9 分の主ピーク物質を分取用の逆相 ODS カラム (Capcellpak C-18, 10 mm ϕ $\times$ 250 mm、資生堂、移動相は 100 %メタノール) を用いて集め、濃縮したものを Sq-OOH とした。

更に、NMR 分析用に Sq-OOH を精製するためには、Sq-OOH を NaBH_4 で還元した Sq-OH について順相系のシリカカラム (Lichrosorb Si60, 250 $\times$ 10 mm, Merck) を用いてメタノール：ヘキサン (1:99) 流速 2 mL で流し、保持時間 20 分付近の最大ピーク分画を分取した精製 Sq-OH を分析に供した。

・ LC-MS、DI-MS 分析

Sq-OOH をそのまま LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry) で分析した。装置は Waters616 HPLC に接続したサーモクエスト社製の TSQ7000 トリプル QUADRUPOLE MS を使用し、イオンモード ESI (positive) 4.5 KV、キャピラリー温度 250 $^{\circ}\text{C}$ で測定した。カラムは、Shodex ODSF-411A (4.6 mm id $\times$ 150 mm) で移動相はメタノール：水：TFA (90:10:0.01)、流速 1 mL/min、210 nm 検出で分析を行った。Sq-OH 体は、定法に従って TMS 化し、DI-MS (direct inlet-mass) 分析を実施した。装置は M-80B (日立)、EI (70eV)、温度 100–300 $^{\circ}\text{C}$ で分析した。

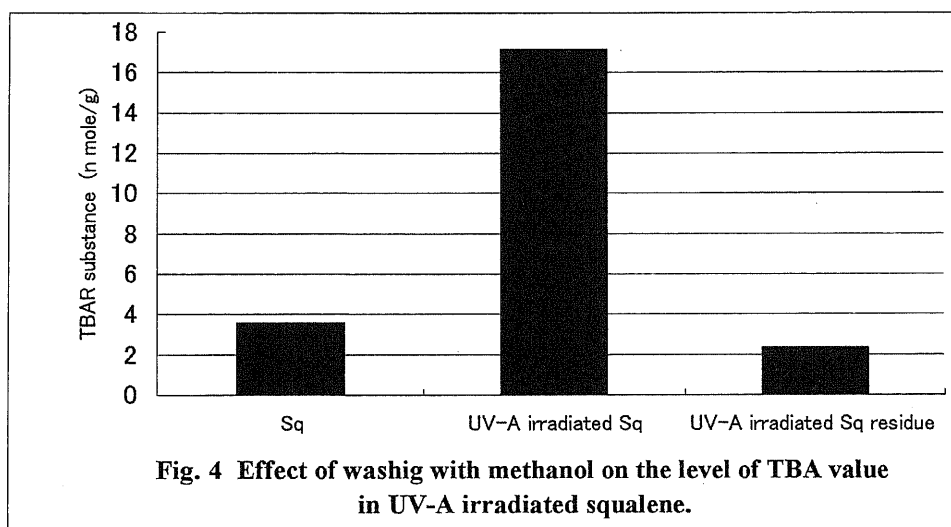
・ NMR 分析

Sq-OOH を NaBH_4 で還元した Sq-OH について定法に従って TMS 化し ^{13}C NMR にて解析した。Sq-OH は重クロロホルム (Aldrich 製) に溶かし、プロトン完全デカップリング法にて測定した。使用 NMR 機器は、JEOL GX-400 型の 100 MHz で測定した。

1-2. 結果

・ 紫外線を照射したスクアレン中の TBA 反応物質の抽出

紫外線照射にて過酸化された Sq は多数の TBA 反応物質を含み、この物質が過酸化物量の指標として評価されている。そこで、この TBA 反応物質を紫外線を照射 Sq から抽出できる溶媒を種々検討した。その結果、メタノール溶媒で抽出したところ、1 時間 UV-A 照射された Sq 中の TBA 反応物質が完全に抽出されることが示された (Fig. 4)。この抽出物を CL-HPLC 分析すると Fig. 2 に示されたように、主に Sq-OOH と Sq を含む分画物であった。



一方、エタノール、ブタノールのような溶媒を用いると、Sq-OOH は抽出されるが、同時に Sq も溶解してしまうので、Sq-OOH との分離が難しく、抽出溶媒としては不適當であった。

・ 紫外線照射スクアレンからスクアレンペルオキシド分画物 (Sq-OOH fraction) の分取法の検討

メタノール溶媒で抽出することにより、紫外線照射 Sq から Sq-OOH を効率よく

分取することができることがわかったので、紫外線に1時間照射した Sq を用いて大量に Sq-OOH の抽出を試みた。この時、紫外線照射時間は1時間が最も適当であり、2時間以上当てると Sq-OOH の分解反応も同時に起こるため副産物が多数生成され、純度良く Sq-OOH を分取できなかった。また、メタノールで抽出した濾液は低温（通常は -20°C 以下）で一昼夜以上静置することで、抽出されたメタノール中の過飽和な Sq が沈殿してくるので、その上清を集めることで、比較的 Sq 含量の少ない Sq-OOH 分画を分取することが可能となった。また、最後はアルゴンガスあるいは窒素ガスでメタノールを留去しながら濃縮することで、Sq が残渣として沈殿するので、上清を分取することでより高濃度の Sq-OOH 分画物を調製することが可能であった。

・ スクアレンペルオキシド分画物からスクアレンペルオキシドの精製と構造解析

紫外線照射 Sq からメタノールで抽出された Sq-OOH 分画物は Sq-OOH と Sq が混在した分画物 (Fig. 2) なので、Sq-OOH のみを分取するために、更に移動相 100%メタノールで分取用 ODS カラムを用いた HPLC で Sq-OOH となる単一ピーク物質を分取した。そして、分取された Sq-OOH の分子量を推定するために LC-MS 分析を実施した。

その結果、LC-MS のカラム分離条件では、プロトン付加の $[\text{MH}^+]: m/z$ は 443、その脱水ピーク $[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]: m/z$ は 425、更に $[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}_2]: m/z$ は 409 となった (Fig. 5)。これらのチャート値から、Sq-OOH の分子量は $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ に対応する 442 となり、Sq に $-\text{OOH}$ 基が一つ挿入した monohydroperoxy 体であることが考えられた。

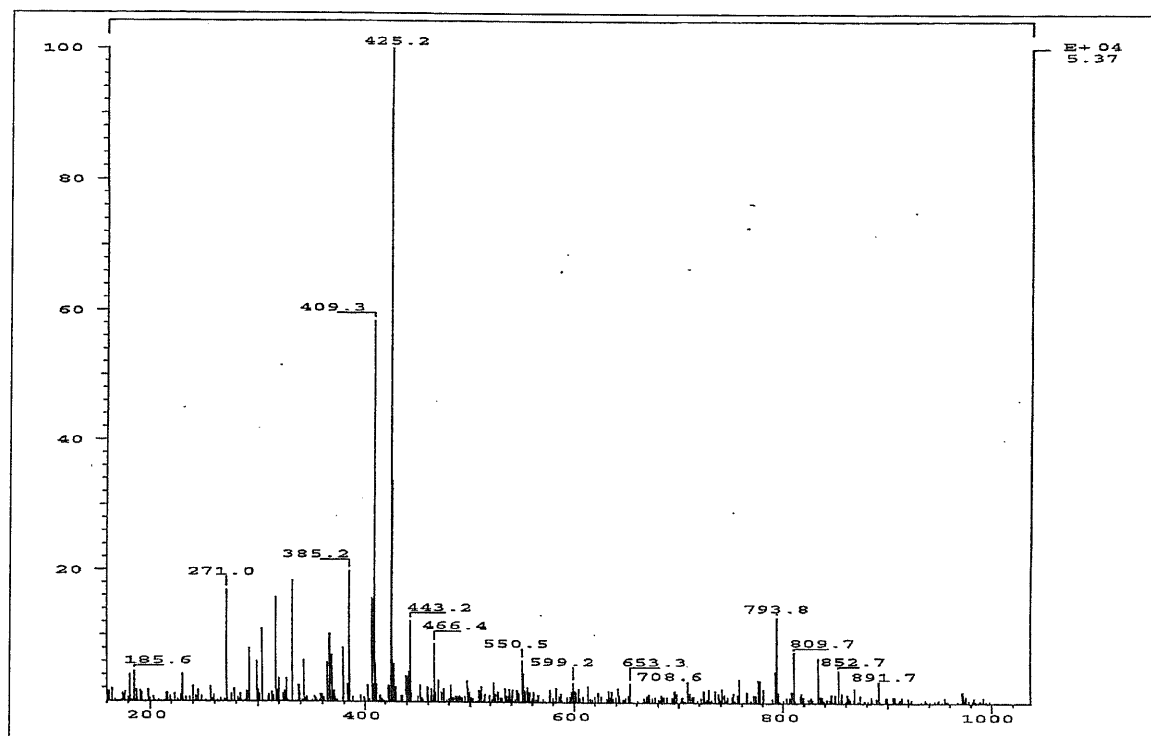


Fig. 5 LC-MS Chart of Sq-OOH.

更に、この Sq-OOH は単一物質ではなく、squalene の 6 個の二重結合に-OOH 基が一箇所導入された squalene monohydroperoxide 異性体の集まりであることが推察された。そこで、Sq-OOH の中から主要な構成物質を構造解析するために、100 %メタノールを移動相として逆相系で単一なピークとなった Sq-OOH を安定化するために、 NaBH_4 で還元した Sq-OH を調製し、更にシリカ順相系カラムを用いてそれぞれ分離し、その主要物質の分取を試みた。その結果、Fig. 6 に示したように最もピーク面積の大きい⑧Sq-OH を分離することができたので、この物質について C-13NMR 分析を行った。Sq-OH のシリカ順相系での分析では、Fig. 6 で示されたように 10 本以上のピークが分離可能であった。この内①～⑩までを分取して DI-MS 分析した結果、いずれの物質も分子イオンピーク (MH^+) は 426 で、脱水された MH-18 の 408 が高い強度として検出された。このことから分子

Fig. 7は最も高いピークを示したFig. 6⑧のDI-MSのチャートを示した。

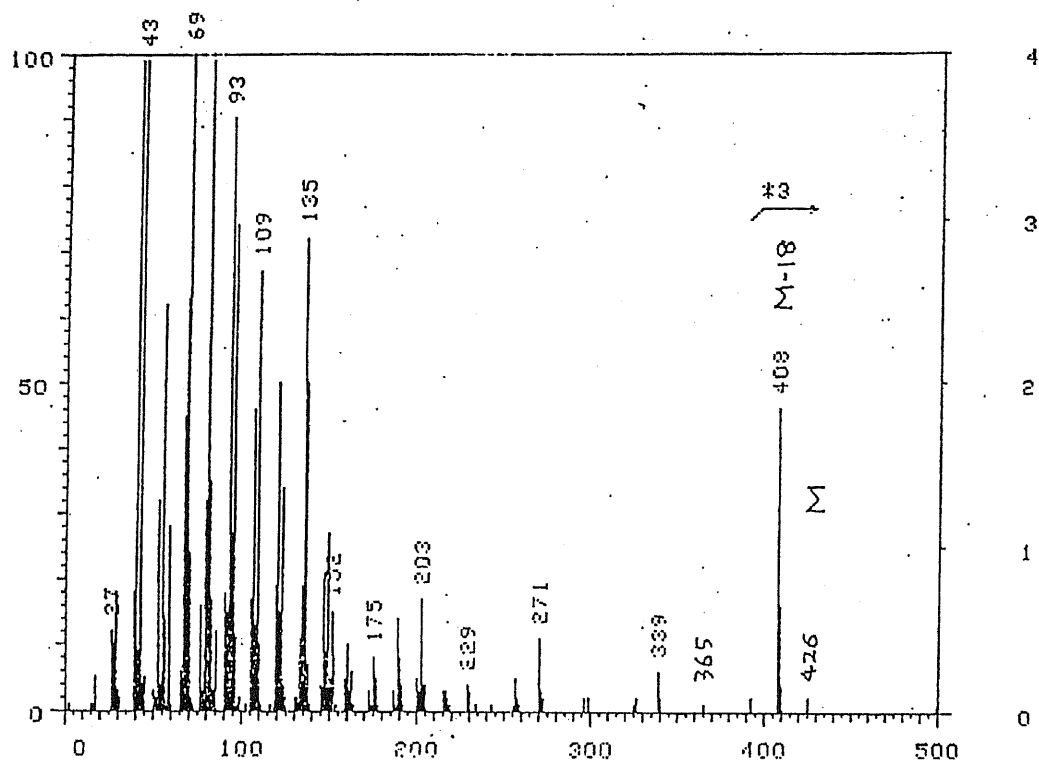


Fig.7 DI-MS spectrum of Squalene monohydroxide (Sq-OH, Peak No ⑧ in Fig.6)

更にこの⑧の Sq-OH を C-13NMR で分析したところ末端炭素 C-1, C-25 のケミカルシフトアサイメントが 29.9 ppm, C-2 が 70.6, C-3 が 139.3 ppm, C-4 が 125.48 ppm, C-5 が 42.4 ppm を示した (Fig. 8 の下図)。これらの値は Sam らが報告³⁸⁾している squalene-2-hydroxy 体の文献値と合致していた (Fig. 8 上図)。

量 426 であり, squalene に水酸基が一つ付加した Sq-OH 構造体である可能性が考えられた。

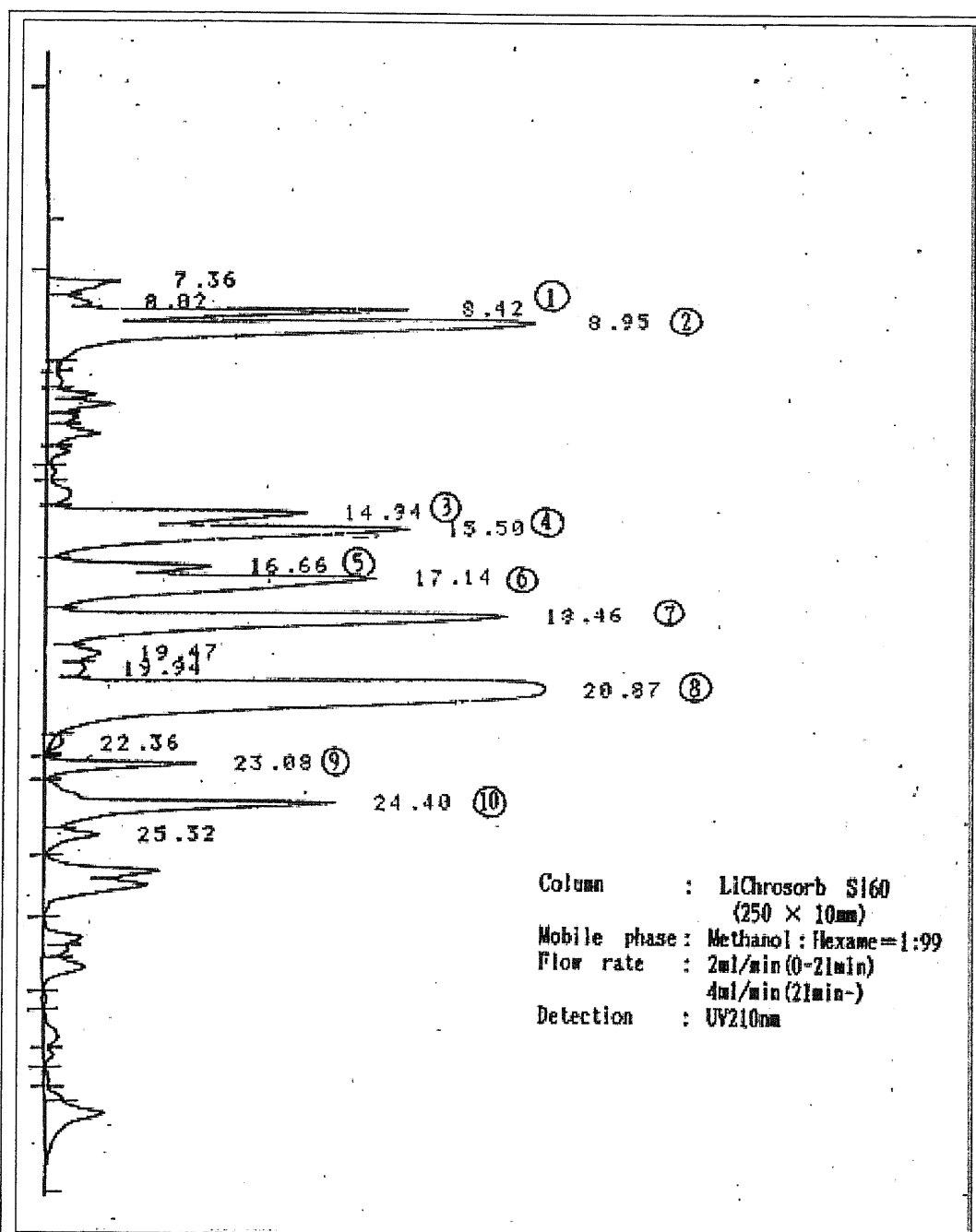
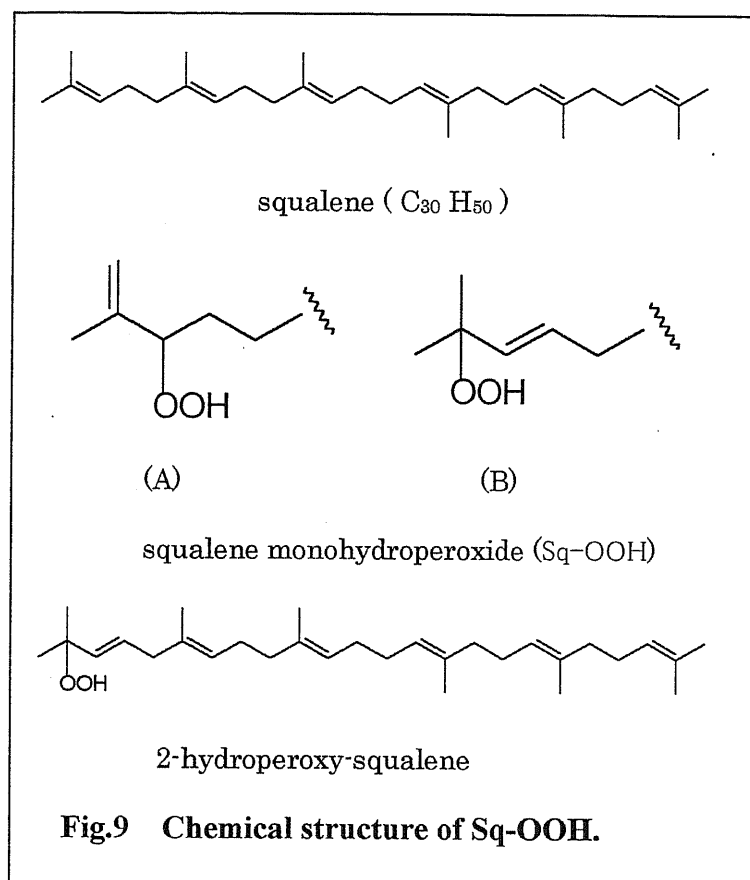


Fig.6 Preparative chromatogram of Sq-OH.

以上の分析結果より、Sq-OOH の主要成分は Sq に -OOH 基が一箇所導入された構

造（例えば Fig. 9 の (A) や (B)）を有しており、更に、文献値から推測して、2 位の炭素に -OOH 基が導入した 2-hydroperoxy squalene である可能性が示唆された (Fig. 9)。



2-3. 考察

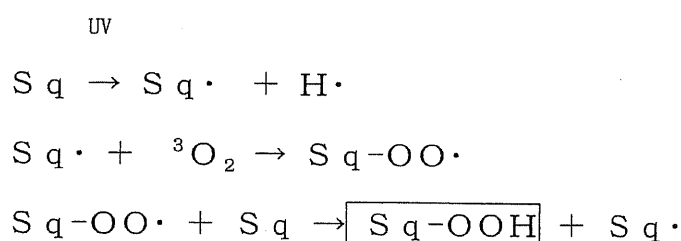
今回の結果から、①紫外線照射されたヒト皮脂中で、経時的に 210nm 紫外部吸収の物質群が増加すること、②この物質群が Sq 過酸化物に由来するものであること、③今回のような弱い照射条件では、その生成物のほとんどが Sq-OOH であること、が判明した。これらの知見は、河野らが報告している皮脂の過酸化物の初期生成物が Sq に由来する Sq-OOH であること¹⁹⁾、と一致した結果であった。しかし、構造に関しては、河野らは Sq の二重結合 6 箇のそれぞれ 1 2 箇所に等価に活性酸素付加が起こることを報告しているが³⁴⁾、今回の結果からは Sq-OOH は等価ではなく、Sam らが提唱しているように、最も反応しやすい末端

二重結合への酸素付加が優先され、2-hydroperoxy 体が選択的に生成されていることが示唆された。立体構造的に見て、Sq の分子構造は比較的中心部はバルキークな形を取っているために、末端の二重結合から水素の引き抜きが起こり、 $^1\text{O}_2$ により酸化されている様式のほうが起こりやすいと考えられた。Sq-OOH の調製方法において、今回は弱い酸化状態で Sq-OOH を調製したが、河野らが用いた色素増感法は、強力な酸素付加が起きて、反応部位に選択性がなくなり多くの付加体がほぼ等価に生成した結果であると考えられた。

Sq-OOH の生成様式に関しては、以下のように分類される。

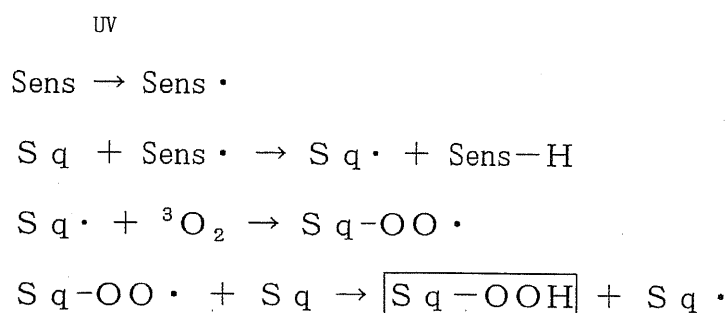
直接光酸化

Sq 自身が光を吸収しラジカル励起分子となり、 $^3\text{O}_2$ と反応する。



光増感酸化

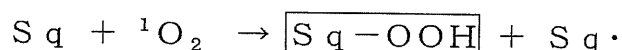
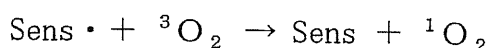
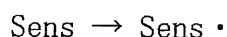
Type I 励起した光増感剤 (Sens) が Sq から H を引き抜き、ラジカルを生じ、連鎖反応で Sq-OOH を生成する。



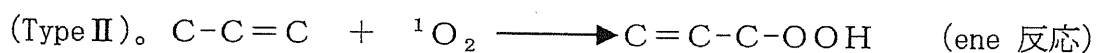
Type II 励起した光増感剤 (Sens) が $^3\text{O}_2$ から $^1\text{O}_2$ (一重項酸素) を形成し、

Sq に付加する ene 反応で生成する。

UV



Sq-OOH の生成に関しては、Sq は 6 個の二重結合を有しているが、ビスアリル水素を持たないためにフリーラジカル連鎖の酸化反応（直接光酸化や光増感酸化 Type I）は、Type II に比べて起こりにくいかもしれない。主反応は一重項酸素によるエン反応で Sq ヒドロオキシドが皮脂中で生成したとも考えられる



実際の皮膚上で光増感作用物質として働き、Sq を酸化するものとしては、微生物が産生するポルフィリン化合物²¹⁾や種々の活性酸素を発生させる薬剤 (8-methoxypsoralen¹⁶⁾, chlorpromazine¹⁷⁾, ある種のサイアザイド系利尿薬³⁹⁾) があり、Sq-OOH の形成に関係していることが示唆された。他にも、様々な皮膚光毒性物質の作用機作に Sq-OOH が関与している可能性があり、皮膚上で紫外線照射を受ける物質で一重項酸素発生能がある化粧品、皮膚外用剤等の皮膚への作用を考察する上で、Sq-OOH の生成は重要であると考えられた。

3. スクアレンモノヒドロペルオキシドの分解性

Sq 過酸化物は、皮膚上で生成されると同時に分解も起きていると考えられており、Sq-OOH の場合、皮膚表面では紫外線照射により更に低分子・高極性の物質群へとシフトしていくことが紫外線照射分解物の TLC・HPLC 分析で観察されている¹¹⁾。また、皮膚内部においてはグルタチオン (GSH) やアスコルビン酸を始めとする皮膚内在性抗酸化物質や抗酸化酵素群による Sq-OOH の修飾も可能性として考えられ、Sq-OOH の分解様式を理解することは、Sq-OOH の皮膚への生理・毒性作用を把握する上で有益な情報となる。

可能性として、Sq-OOH が他の脂質 hydroperoxide と同様に、分解されていく過程で脂質ラジカルや活性酸素 (一重項酸素、スーパーオキシドアニオン等) が発生し、ラジカル伝播により皮膚内の蛋白・脂質成分を修飾し、様々な生体反応を引き起こしていることが推察された。そこで、*in vitro* で様々な物質による Sq-OOH の分解性を検討した。また、Sq-OOH が分解して発生する活性酸素種を調べるために、典型的な分解例として hematin 分解系⁴⁰⁾を検討し、発生する活性酸素種をウミホタル・ルシフェリン誘導体 MCLA-chemiluminescence 法⁴¹⁾にて同定することを試みた。

3-1. 実験材料および方法

In vitro での Sq-OOH の分解物質

- ・ CL-HPLC を用いた Sq-OOH 分解活性測定法 (前述した宮澤らの方法に準じた³⁶⁾。)

反応系は、200 μ M の Sq-OOH メタノール溶液 0.1 mL + 被験物質溶液 / 精製水 0.2 mL + pH 5.8 の MES Buffer (0.01 % Tween-80) 0.1 mL の総量 0.4 mL とし、37°C、30 分間インキュベーション後クロロホルム 1 mL で Sq-OOH を抽出した。そして、窒素ガスでクロロホルムを留去してから 0.1 mL のメタノールに再溶解

させ、ガードカラムを通した溶液の 10 μ L を注入した。結果は、被験物質未添加の対照を 100 とした時のチャート面積比から Sq-00H の分解性を評価した。

・ GSH-peroxidase を用いた Sq-00H の分解活性

酵素を用いた Sq-00H の分解例として、GSH-peroxidase の基質として作用させた時の分解性について、BHP、CHP との比較を行った。

反応系は、分光光度計の 1 cm 角の石英セル中に①1 mM Tris-HCl/5 mM EDTA (pH 8.0) を 100 μ L、②0.1 M の GSH 溶液を 20 μ L、③GSH-reductase (10 unit/mL) を 100 μ L、④2 mM の NADPH 液を 100 μ L、酵素液 (ウサギ耳介皮膚のホモジュネート液) 10 μ L、⑤水 660 μ L を全て入れてから、37°C で 2 分間プレインキュベーションしてから、基質として Sq-00H、BHP、CHP の 7.5 mM を素早く入れて攪拌し、経時的な 340 nm の吸光度を測定スキャンしてスロープを求め、別途に測定した酵素液の蛋白定量値を用いて、nmole NADPH oxidized/min/mg protein 値を求めた。分解反応性は、それぞれの過酸化物を基質とした時の酵素の比活性で評価した。

・ MCLA-chemiluminescence 法を用いた活性酸素種の同定⁴¹⁾

試薬は、化学発光プローブのウミホタル・ルシフェリン誘導体 2-methyl-6 [p-methoxyphenyl] 3,7-dihydroimidazo[1,2-a] pyrazin-3-one, MCLA (東京化成工業)、hematin (bovine blood 由来、Sigma)、SOD (bovine erythrocyte, Sigma)、sodium azide (NaN₃, 和光純薬) を使用した。chemiluminescence 測定装置は、ML3000 Microtiter Plate Luminometer (Dynatech Laboratories, VA, USA) を用いた。

方法 1 (一重項酸素発生の検出)

96 ウェルの Microlite™ 1Flat Bottom Microtiter Plate (Dynatech

Laboratories, VA, USA)を用い、1 ウェルに 0.2 M 酢酸バッファー (pH 4.5) 50 μ L、20 μ M の Hematin を 20 μ L、精製水を 50 μ L、そして 0.01~100 mM の NaN_3 を 20 μ L を入れ、Luminometer にセットする。そして、Sq-OOH の 617 nm を 50 μ L と 200 μ M の MCLA を 10 μ L を攪拌しながら各ウェルに添加し、直ちに Luminometer で 4 分間の総発光量(Δ RLU, relative light unit)を測定した。

方法 2 (スーパーオキシドアニオンの検出)

96 ウェルの Microlite™ 1Flat Bottom Microtiter Plate (Dynatech Laboratories, VA, USA)を用い、1 ウェルに 0.2 M 酢酸バッファー (pH 4.5) 50 μ L、精製水を 50 μ L、20 μ M の hematin を 20 μ L、そして SOD の各ユニットあるいは対照として精製水 20 μ L を入れ、Luminometer にセットする。そして、Sq-OOH の 617 nm を 50 μ L と 200 μ M の MCLA を 10 μ L を攪拌しながら各ウェルに添加し、直ちに Luminometer で 4 分間の総発光量(Δ RLU)を測定した。

3-2. 結果

・ Sq-OOH の分解活性

CL-HPLC を用いた *in vitro* 系での探索では、Sq-OOH の化学発光強度は、SH 化合物 (cysteine)、vitamine C、還元剤 (NaBH_4 、triphenylphosphine)、金属塩 (Fe^{2+})、hemoglobin、hematin、等で減弱した。尚、210 nm の吸収ピークも同時に減弱したが、今回の HPLC 分析条件では、Sq-OOH の吸収と Sq-OOH が還元された Sq-OH の吸収との保持時間が重なるため、Sq-OOH の定量的な分解活性値としては使用できなかった。

Fig. 10 は、例として、cysteine (Cys)と tryptophan (Trp) を結合させた L-cysteinyl-tryptophan (Cys-Trp)を合成し⁴²⁾、Sq-OOH 分解作用を CL-HPLC チャートで表した。

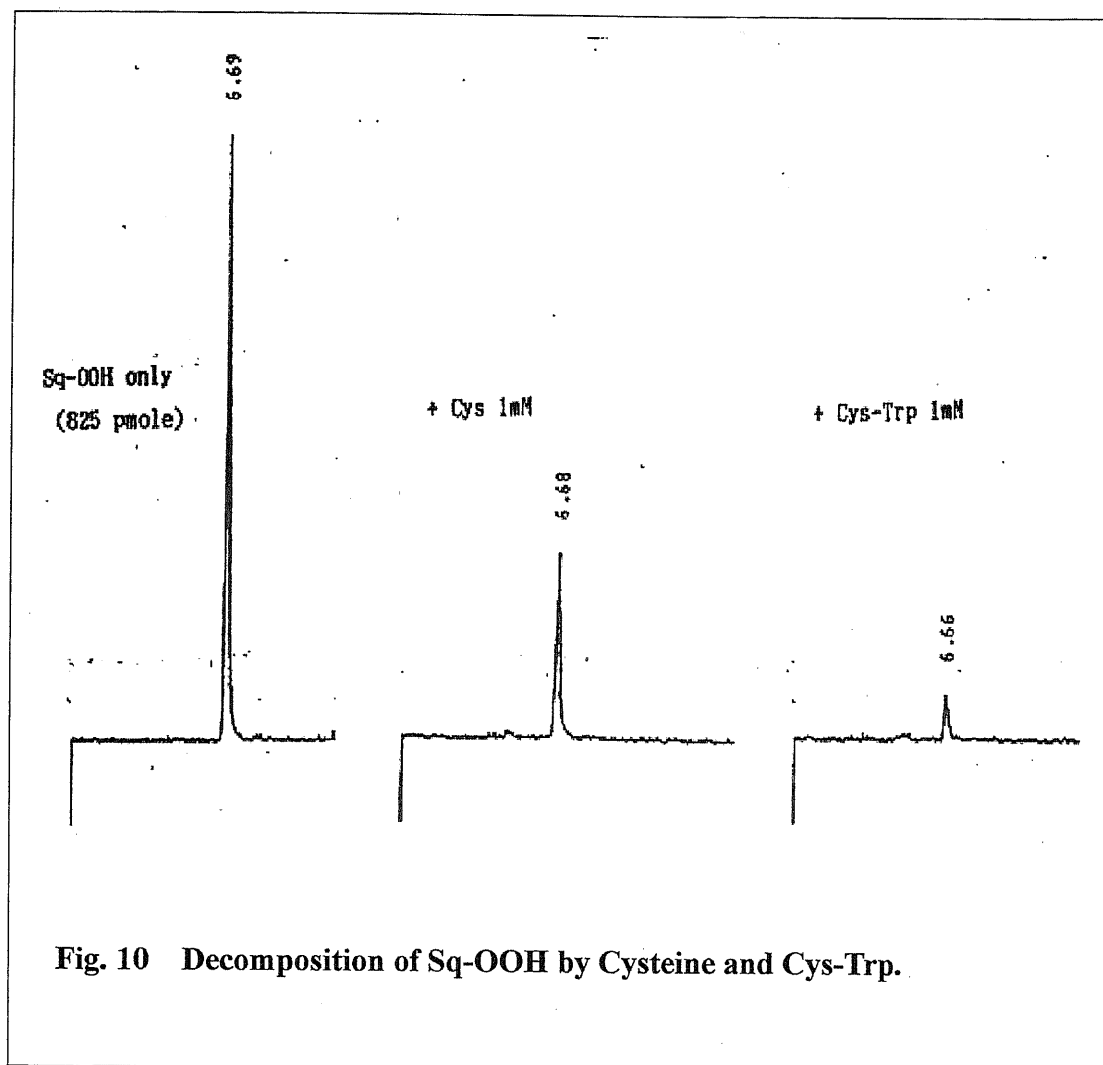


Fig. 10 Decomposition of Sq-OOH by Cysteine and Cys-Trp.

分解様式は、還元による Sq-OH 生成のパターンと、更に分解して高極性物質へと移行するパターンの二種類があり、還元性の化合物は前者の Sq-OH 生成となり、金属や hematin の場合は高極性への分解が主であった。

また、皮膚酵素による分解も考えられたので、皮膚組織の GSH-peroxidase の反応系で評価した。その結果、Sq-OOH を基質とした場合の活性は 10.7 ユニット (pmole NADPH oxidized/min/ mg protein)を示し、明らかに分解活性が認め

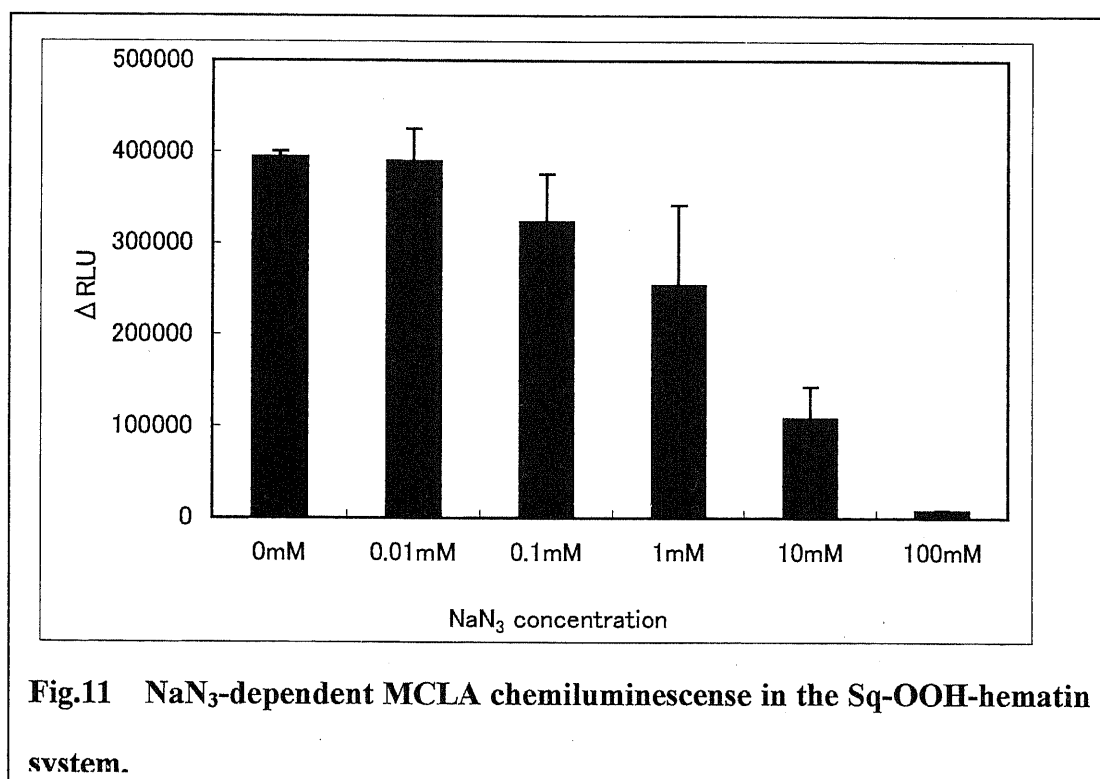
られた。一方、BHP を基質とした場合は 15.4 ユニットを示し、Sq-OOH より高い活性値を示したが、CHP を基質とした場合の活性 10.1 ユニットと Sq-OOH とは、ほぼ同等であった。

これらの結果から、Sq-OOH は様々の物質により還元・分解を受ける物質であることが示された。また、生体内の抗酸化酵素である GSH-peroxidase の基質となりうることも示された。

・hematin 分解による Sq-OOH からの活性酸素種の同定

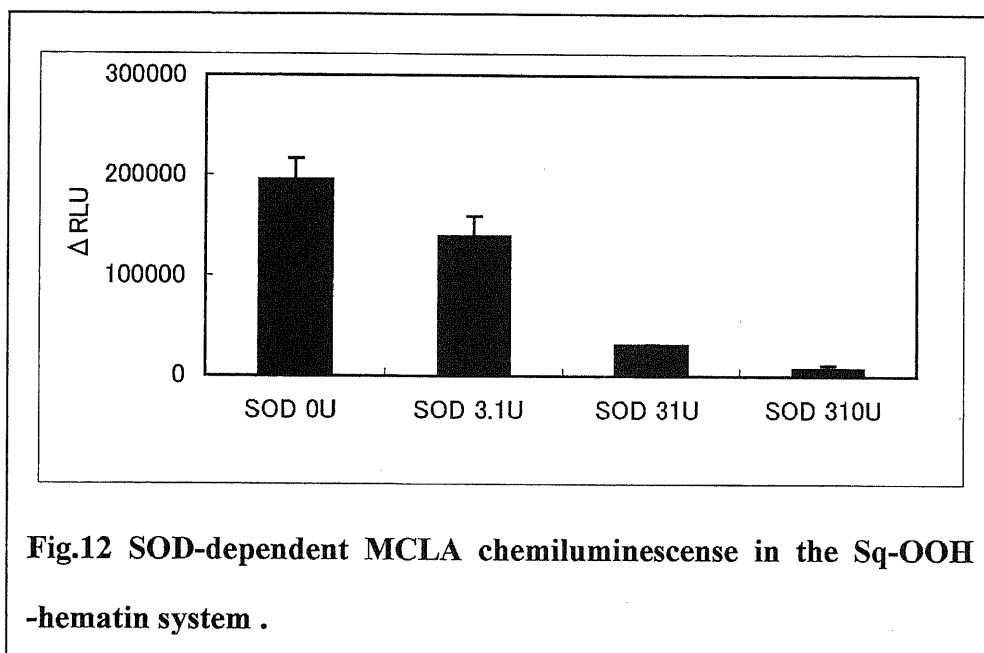
Sq-OOH は hematin 処理で急激な分解を受ける。そこで、MCLA-chemiluminescence 法を用いて、Sq-OOH 分解から発生する活性酸素種（一重項酸素、スーパーオキシドアニオン）を同定することを試みた。

Fig. 11 は一重項酸素のクエンチング作用を観察した結果であるが、アジ化ソーダの添加濃度に依存した化学発光強度の低下が観察された。



通常、一重項酸素が発生した場合、重水 (D_2O) 中での寿命延長により、発光強度がより増強することが知られている。そこで、Fig. 11 の系で反応系中の水を重水に置き換えて化学発光強度を測定した。その結果、化学発光強度の増加が認められなかったことから、この MCLA 法では、Sq-OOH から一重項酸素の発生は証明できなかった。

一方、Fig. 12 は SOD 添加の影響を調べたものであるが、SOD の添加量に依存した化学発光強度の低下が認められ、Sq-OOH の分解時にスーパーオキシドアニオンの発生が起きている可能性が示唆された。



3-3. 考察

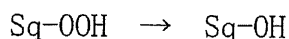
Sq-OOH は、メタノール（エタノール）中では極めて安定であり、低温 ($-20^{\circ}C$) 保存下で長期保存が可能であった。しかし、Sq-OOH は、皮膚上では他の脂質を酸化させ（例、palmitoleic acid との反応で加齢臭 nonenal を生成²³⁾）、皮膚の中へはラジカル伝播が起きて、皮膚内の様々な成分と相互作用を持っていることが推察されている。

in vitro 反応系では、還元性物質や金属により容易に Sq-OOH が分解される

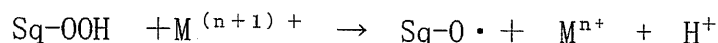
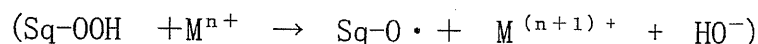
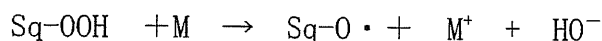
ことが判明した。また、抗酸化酵素で有機 hydroperoxide の代謝に関与している GSH-peroxidase の基質にもなり得ることから、生体内では Sq-OOH は様々な形で代謝・分解され、Sq ラジカル、あるいは活性酸素の発生が起きていることも予想された。

想定できる Sq-OOH の分解様式としては、以下のことが考えられた。

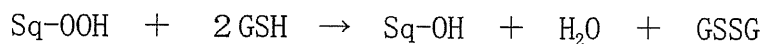
① 還元分解 (NaBH₄, cysteine, vitamin. C)



② 金属接触分解 (遷移金属イオンによる redox 分解、Fe²⁺)

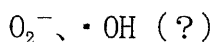
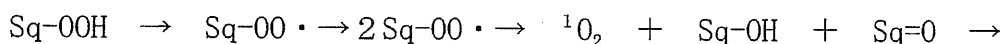


③ 酵素 (GSH-peroxidase, GSH-transferase)

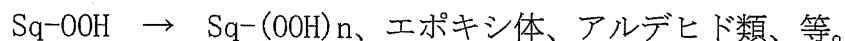


④ ヘム分解 (hemoglobin, cytochrome C, myoglobin)

hematin 分解



⑤ その他 (光、熱分解)



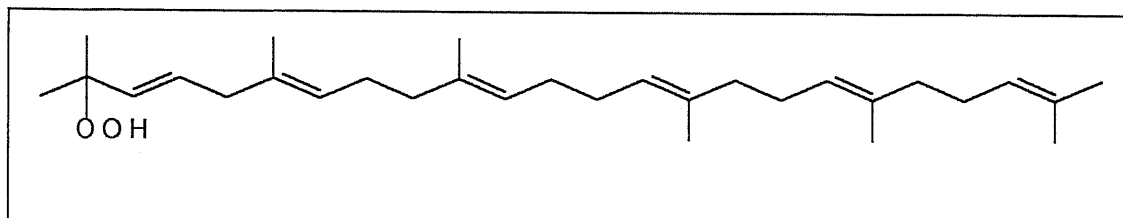
今回実施した Sq-OOH の分解には hematin を使用し、Sq-OOH 分析の CL-HPLC には hemoglobin を使用している。これらは、④のような分解様式により各種のラジカルや活性酸素が発生し、MCLA との化学発光、CL-HPLC 分析時のルミノールと化学発光が引き起こされていると考えられるが、詳細な分解様式は不明であ

った。但し、この反応 (Russell 反応) は、第一および第二ペルオキシドで起こり、CHP のような第三ペルオキシドでは $^1\text{O}_2$ が発生しないことが、化学発光検出法で確認されており⁴³⁾、Sq-OOH が CHP と同様な第三ペルオキシドであり、重水中での反応増強も観察されなかったことから、Sq-OOH からの $^1\text{O}_2$ 発生の可能性は低いことが考察された。

実際の皮膚上では、①②⑤が起きる可能性がある。皮膚中では、Sq-OOH が代謝分解され、①～④の様式で分解が起きている可能性が考えられた。皮膚内では、様々な抗酸化物質あるいは抗酸化酵素の作用により、Sq-OOH の無毒化・クエンチング化が起きているのかもしれない。生成された Sq-OOH の多くは他の皮脂成分とともに洗浄除去されたり古い角質 (垢) とともに皮膚から脱落していくと思われる。しかし、皮膚上に残存した Sq-OOH や皮膚内で処理しきれない Sq-OOH は、皮膚の蛋白・脂質に直接作用して、皮膚に様々な作用を及ぼしていることが推察された。

5. 小括

- ・ ヒト皮表脂質あるいはその組成物である Sq を *in vitro* で日常レベルの長波長紫外線 (UV-A) 照射して得られる過酸化物は TBA 陽性物質であり、メタノール溶媒を用いることで全て抽出することが可能であった。
- ・ この抽出物を HPLC で経時的にモニターすると、Sq-OOH ピークの急激な増加が観察された。逆相系 HPLC カラムでは単一のピークとして検出されるこの Sq-OOH は、更に順相系カラムで分離すると 10 本以上のピーク物質からなり、これらは Sq 1 分子に -OOH 基が 1 個導入された squalenemonohydroperoxide (Sq-OOH) であることが Mass 分析で明らかとなった。
- ・ 通常の生活紫外線量で UV-A 照射された Sq からメタノール溶媒抽出とセミ分取 HPLC を組み合わせることにより、簡易に Sq-OOH を調製する方法を構築した。得られた Sq-OOH は、LC-MS で分析し、monohydroperoxide 体であることが確認された。
- ・ Sq-OOH の化学構造としては、MS や NMR の結果や Sq-OOH 関連の文献データから、その主要な生成物の一つとして Sq の末端二重結合の一箇所に -OOH 基が 1 個導入された 2-hydroperoxy squalene であることが推察された。



・実際のヒト皮膚上では、Sq-00H 生成は日常生活の紫外線量UV-A照射で起こり、個体差が大きいものの、皮膚1 cm²当たり数 10 pmole から最高で約 1 nmole 程度存在していることが確認された。

・Sq-00H の分解は、光照射のほか熱や金属触媒、あるいは還元物質により容易に起きることが *in vitro* で確認された。hematin 分解によりスーパーオキシドアニオンのような活性酸素種も検出されている可能性があり、これら活性酸素が Sq-00H により皮膚内外で発生し、様々な皮膚生理（毒性）作用を引き起こしていることが推察された。そして、後述する皮表角化の亢進によるコメド形成、皮膚表面形態変化、皮膚内酸化ストレスの発生、また真皮ではコラーゲンの減少とシワの発生等の様々な皮膚への作用に、Sq-00H 由来の活性酸素が関与している可能性が示唆された。

II. スクアレンモノヒドロペルオキシドの皮膚毒性作用

緒言

Sq は酸化されやすく、化粧品原料の Sq は新鮮なロット原料に比べ時間の経ったロットの Sq にはウサギ皮膚一次刺激性があり、細胞毒性も出現してくることを見出した³⁾。Sq 過酸化物は、健常皮膚上に存在する過酸化物であるが、紫外線暴露により過剰に存在した場合、あるいは慢性的な暴露による累積的な酸化ストレスにより、皮膚に対しても何らかの作用を示すことが推察されるが、明確なデータは得られていない。そこで、Sq-00H の皮膚に対する毒性ポテンシャルを調べる為に、動物皮膚に対する皮膚一次刺激性と累積刺激性およびcomed誘発性について検討した。また、累積塗布により皮膚表面にシワ形成が観察されたので、皮膚表面形態観察を角層テープストリッピング法により評価した。また細胞レベルでの毒性評価を調べる為に、皮膚培養細胞を用いた細胞毒性についても検討した。

1. 皮膚刺激性

Sq-00H の皮膚への刺激性評価をウサギ皮膚一次刺激性、モルモット皮膚累積刺激性試験、並びにヘアレスマウス累積塗布試験を実施し、Sq-00H の皮膚刺激性を評価した。

1-1. 実験材料および方法

・検体

精製 Sq (シグマ社製) 10 g をシャーレーに入れ、紫外線蛍光灯ランプ (BLB-20、東芝) 5 本を光源とし、エネルギー強度 $5000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ で 1 時間照射した。酸化 Sq は、メタノール 15 mL で 2 回抽出後、窒素ガスで濃縮してから溶媒をエタ

ノールに置換したものを Sq 過酸化物 (Sq-OOH) とした (1 章 1-1 参照)。BHP, CHP は、市販の Sigma 社製試薬をそのままエタノールで希釈して用いた。

・ウサギ皮膚一次刺激性

日本白色種ウサギ (J.W、雄) を用いた皮膚一次刺激性試験を実施した。各濃度に調製された Sq-OOH (メタノール溶媒) を毛刈りされた健常皮膚 (塗布面積 2.25cm^2) に 0.1 mL 開放塗布した。判定は塗布後 24, 48, 72 時間目に肉眼判定した。判定基準はドレイズ法⁴⁴⁾に従って判定し点数化し、皮膚刺激指数 Primary Irritation Index (P.I.I) で表した。

・累積刺激性

Hartley♀モルモット腹側部 (塗布面積 1cm^2) に検体 0.1 mL を連日開放塗布し、翌日肉眼判定しスコア化した。判定基準は、反応なし…0 点、わずかな紅斑…0.5 点、明らかな紅斑…1 点、紅斑+浮腫…2 点で、点数を算出した。

ヘアレスマウスを用いた累積試験では、3 週間連続塗布した場合の皮膚変化を肉眼判定した。ヘアレスマウスの背部皮膚全面 (約 20cm^2) に検体を 0.2 mL (正中線をはさんで、左右に 0.1 mL ずつ) の開放塗布を行った。塗布は、1 日 1 回塗布で 3 週間連続塗布した。溶媒対照群としては、エタノールのみを同様に塗布した。判定は、シワの程度を 0 (無し) ~3 点 (深いシワ) の 4 段階でスコア化し、Cumulative Skin Irritation を算出した。

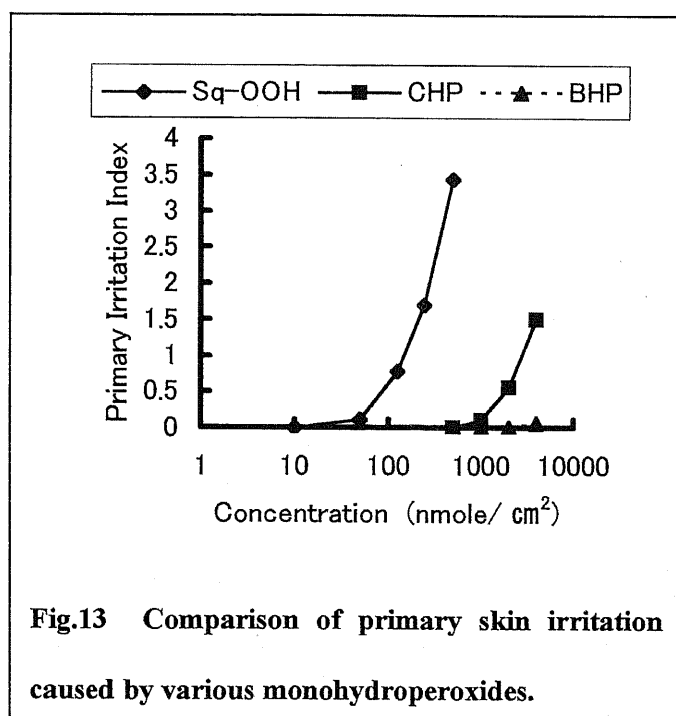
・角層テープストリッピング法による皮膚表面形態観察⁴⁵⁾

Sq-OOH の各濃度 (1 ~30 mM) をヘアレスマウス皮膚に 3 週間開放塗布し (累積塗布の動物を使用)、セロハン粘着テープ (ニチバン、幅 18 mm) で角質細胞をテープストリッピング法で採取し、染色して顕微鏡観察により判定した。被

検部位に粘着テープを圧着し、皮膚表面細胞を採取する。このテープをスライドガラス上に圧着して角質細胞を転写する。そして、キシレンに一昼夜浸漬させた後、キシレンを乾燥させてから、ブリリアントグリーン 0.5%-ゲンチアナバイオレット 1%の混合液で 10 分間染色し、乾燥させてから顕微鏡観察を行った。判定基準は、配列不規則性 (irregularity), 重層剥離 (thick abrasion), 核ゴースト (nuclear ghost) 有核細胞 (nucleated corneocyte) について 0 点 (ほとんど正常) ~3 点 (変化が大きい) までの 4 点スコア法で算出し、動物群の平均で表した (檀淵らの規準⁴⁶⁾ に準拠)。1 標本あたり 50 個の細胞を無作為に選び判定基準に従ってスコア化した。

1-2. 結果

・皮膚一次刺激性

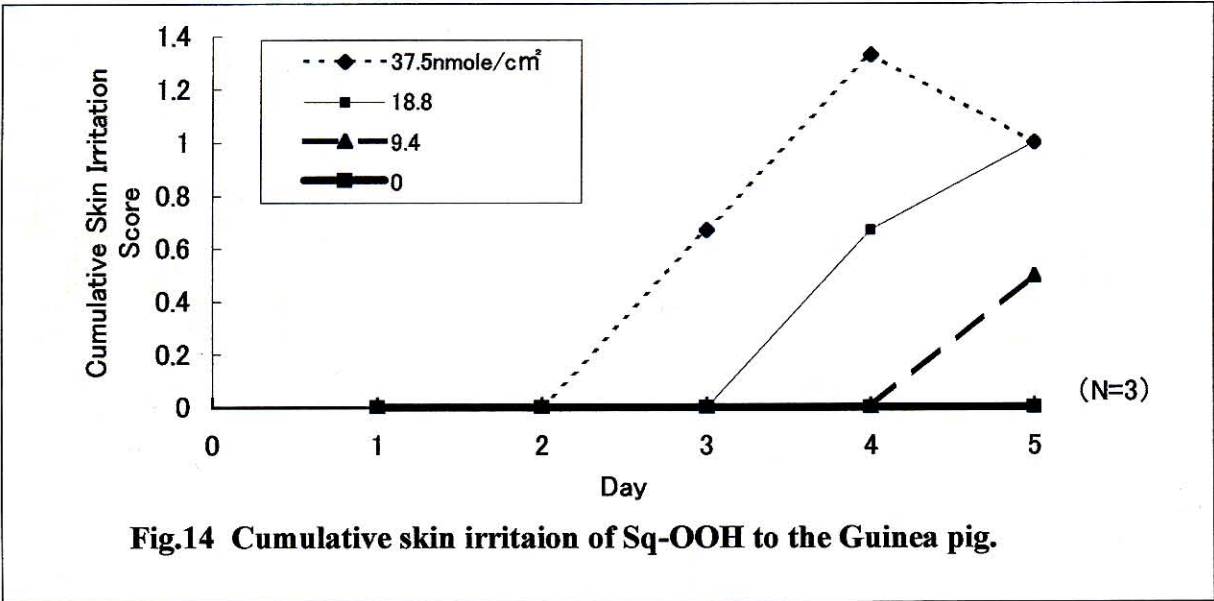


ウサギ皮膚では Sq-OOH の場合、100 nmole ぐらいから一次刺激性が出現しはじめ、300 nmole 付近では浮腫を伴った血管透過性の亢進が認められた (Fig. 13)。これに対し、CHP や BHP は Sq-OOH よりも明らかに低い皮膚一次刺激性を示した。

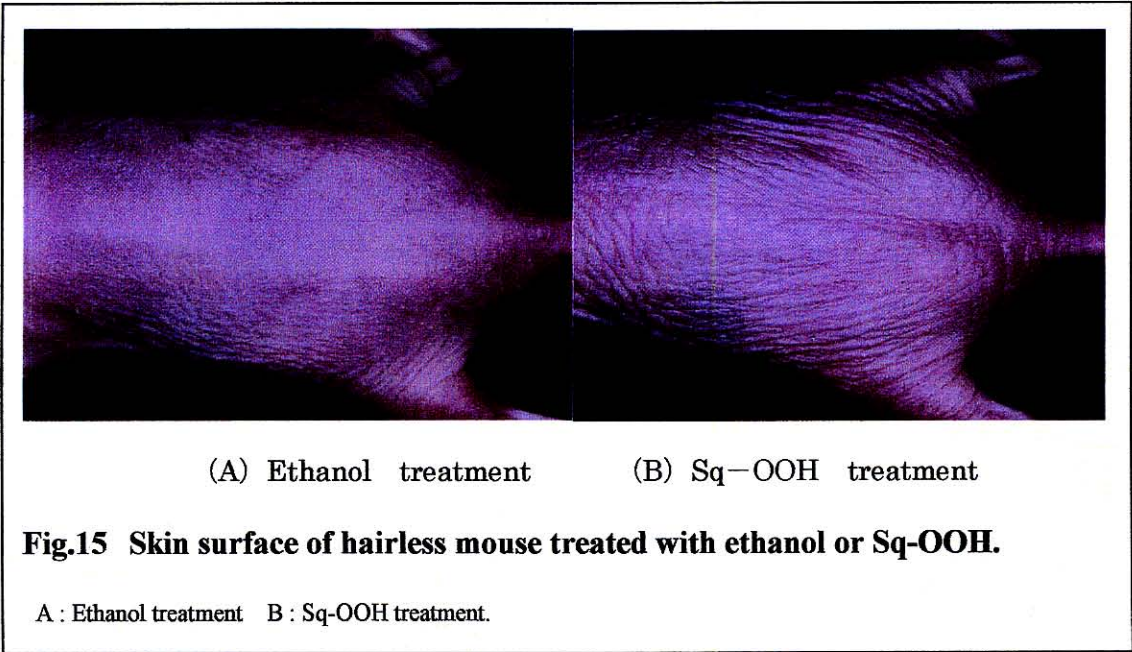
・累積刺激性

モルモット皮膚に対し Sq-OOH の 100 nmole 以下の濃度で累積刺激性を検討し

た。その結果、37.5 nmole で塗布 2 日目からわずかな紅斑が出現し始め、低濃度 9.4 nmole 塗布でも、繰り返し塗布することで刺激性が出現し (Fig. 14)、累積刺激性を有していることが明らかとなった。



累積に関しては、ヘアレスマウスを用いた累積試験も実施し、紅斑以下の濃度 (Sub-erythema-dose) である 10 mM の Sq-OOH を 3 週間塗布した結果、皮膚表面形態が明らかに変化し、シワ様の皮膚が観察された (Fig. 15)。



・ ヘアレスマウスの皮膚における累積刺激性

Sq-OOH をヘアレスマウスに 3 週間、1、3、10、および 30 mM 濃度で連続塗布した時の累積刺激性を経時的に肉眼判定した。その結果、濃度 10 mM、30 mM で、塗布開始 5 日目からシワ形成が認められた (Fig. 16)。溶媒としてメタノールを用いた場合、エタノールとほぼ同等の作用であった。3mM では 10 日目からシワ形成が認められ、1 mM では肉眼的なシワ誘発は観察されなかった。

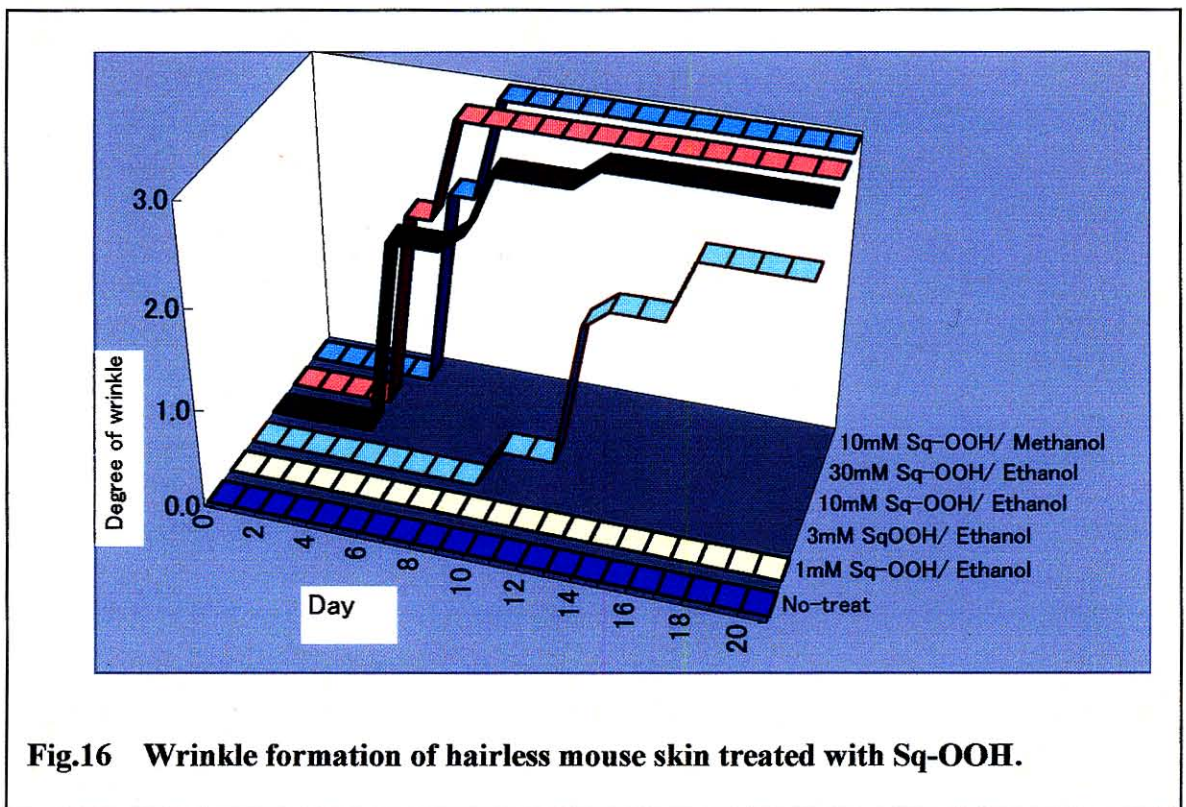


Fig.16 Wrinkle formation of hairless mouse skin treated with Sq-OOH.

・ Sq-OOH 塗布皮膚のテープストリッピング法による皮膚表面形態観察

肌荒れ時には角層のターンオーバーが亢進し、不全角化が起こり核が残存する有核細胞が角層中に認められ、配列の乱れと重層剥離も観察される。そこで、テープストリッピング法による皮膚表面形態観察を行い以下の結果を得た。

Table.1 Effect of Sq-OOH application for 3 weeks on exfoliative cytology in hairless mouse corneocyte.

Sample		Irregularity	Thick abrasion	Ghost	Nucleated
No-treat		0.6 ± 0.5	1.0 ± 0.7	1.6 ± 0.9	0.0 ± 0.0
Control		0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.7	1.2 ± 0.8	0.0 ± 0.0
Sq-OOH	1 mM	0.8 ± 0.4	1.6 ± 0.5	2.0 ± 1.0	0.0 ± 0.0
	3 mM	1.8 ± 0.4	2.8 ± 0.4	1.8 ± 0.8	0.6 ± 0.9
	10 mM	2.6 ± 0.5	3.0 ± 0.0	1.4 ± 0.5	1.6 ± 0.5
	30 mM	3.0 ± 0.0	2.8 ± 0.4	1.2 ± 0.4	1.6 ± 0.5

Mean ± S. D. (N = 5) Control : Ethanol

その結果、Table.1 で示したように 3 週間の Sq-OOH 連続塗布で配列不規則性と有核細胞の増加が Sq-OOH の塗布濃度依存的に認められ、重層剥離の程度も対照となるエタノール塗布部位に比べて有意に多く観察された。この結果から、Sq-OOH 塗布は表皮層の肥厚化と過角化を生じさせるとともに turn over 速度を速め、表皮細胞の核が完全に消失しない内に角質層へ押し上げられる不全角化が起きていることが明らかとなった。

1-3. 考察

Sq 過酸化物の皮膚刺激性については、ヒト¹⁰⁾ やウサギ³⁾ の報告があり、ウサギの場合、新鮮な Sq は皮膚刺激指数 (P. I. I) が 0.83 であるのに対し、酸化した Sq の P. I. I は 2.89 を示し、Sq は明らかに酸化による刺激性亢進が観察された。今回、再度 Sq-OOH で検討した結果、同様に明らかな刺激性が認められた。

動物実験の場合、Sq-OOH が単位皮膚 cm² 当たり数 10 nmole 量で、動物皮膚に何らかの作用を示すことが示された。特に累積されることで、低濃度でも何らかの皮膚所見が観察された。実際のヒト皮膚上での Sq-OOH 最大存在濃度が約 1

nmole 前後とすると、その 10 倍濃度から皮膚に対して刺激性が出現することが明らかになった。動物皮膚はヒト皮膚に比べて感受性が高いので、実際の皮膚上どの程度の Sq 過酸化物が存在すると、皮膚に影響を与えているか判断するのは、今回のデータだけから判断するのは難しい。しかし、ヒト皮膚上で常時生成されていることを考えると、Sq-OOH が皮膚に何らかの作用を与えている可能性は十分に推測することが考えられた。

皮膚上では、生成された Sq 過酸化物のうち、あるものは洗浄除去され、汗や他の皮膚上の油とともに除かれてしまうであろう⁴⁶⁾。しかし、河野らは残った Sq-OOH が他の脂質クラスに連鎖的反應でラジカルを伝播している可能性を報告した⁴⁷⁾。しかしながら、Sq-OOH の他の脂質との反応性を考えると、直接的な反應は起こりにくく、むしろ Sq-OOH そのままの形で経皮吸収されて、代謝されて分解し毒性が発現している可能性も考えられた。Sq-OOH の作用に比べ、還元された Sq-OH には全く刺激性が認められないことを考えると、—OOH 基を有する過酸化脂質由来のラジカルに起因した（酵素蛋白・核酸の変性による）皮膚刺激性の可能性が考えられた。

Sq-OOH が皮膚に累積塗布されると、明らかな表皮肥厚が病理所見で得られる（第Ⅲ章の 1 参照）と同時に、皮膚 turnover への影響も考えられた。中山らは、正常人の腹部皮膚に Sq-OOH を、実際の見たい目では紅斑や浮腫のような炎症反應が観察されない濃度で塗布し、turnover 速度（表皮細胞が角質細胞として剥離する速度）を測定した結果、対照部位のアルコール塗布部位に比べて有意に速くなっていることを報告した⁴⁸⁾。Sq-OOH 塗布での皮膚 turnover の亢進作用は、ヘアレスマウス皮膚でも明らかとなり、実際のヒト皮膚と同様な現象が起きていると考えられた。

2. コメド形成作用

コメド (comedo) とは、ニキビ発症初期時に形成される面皰のことであり、ウサギの耳介内側皮膚に連続して被験物質を塗布することで、面皰形成能を容易に検出することができる。今までに、多種類の化学薬品^{49, 50)}や化粧品原料⁵¹⁾でコメド誘発物質が認められ、最近では皮膚ガン誘発物質に強力なコメド誘発性があることから、皮膚ガン物質の短期スクリーニング系としてコメド誘発性が注目されている⁵²⁾。また、ヒト皮脂の連続塗布でも、コメドが形成することが知られており⁵³⁾、含有するトリグリセライドからの遊離脂肪酸であるオレイン酸やラウリン酸による表皮の過形成によるもの⁴⁹⁾、あるいは分子内に不飽和二重結合を有するSqやオレイン酸の過酸化物によるもの⁵⁴⁾等が報告されている。しかしながら、Sq 過酸化物の報告例では、過剰の紫外線照射により現実の皮膚上では存在し得ない濃度でコメド形成が評価されていた⁵⁴⁾。そこで、ここではSqの紫外線照射物を日常レベルのUV-B照射操作で調製してコメド形成を評価し、更に、初期生成物であるSq-OOHについて同様にコメド形成について評価した⁵⁵⁾。

2-1. 実験材料および方法

・検体

精製Sq(シグマ社製) 10 gをシャーレーに入れ、紫外線蛍光灯ランプ(BLB-20、東芝) 5本を光源とし、エネルギー強度 $5000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ で1~3時間照射した。過酸化Sqは、更にメタノール 15 mLで2回抽出後、窒素ガスで濃縮してから溶媒をエタノールに置換したものをSq過酸化物(Sq-OOH)とした(1章1-1参照)。また、別途に最高50 mM濃度のLPO値を有する過酸化Sqのメタノール抽出液を調製し、コメド試験に供した。Sq-OHは、 NaBH_4 を用いて冷メタノール中でSq-OOH

を還元し、蒸留水を添加後クロロホルムで抽出したものを用いた。還元体の確認は CL-HPLC 分析を用いた。BHP, CHP は、市販の Sigma 社製試薬をそのままメタノールで希釈して用いた。

・comedogenicity

著者らが開発した Derma scope を用いる計測法⁵⁶⁾にて、形成されたcomedoの直径を求め、comedogenicityを評価した。

方法は、ウサギ耳介内側皮膚中央部に、1.5 cm 角の窓を開けたパッチテスト用絆創膏テープ（リバーテープ製薬製）を Fig. 17 のように貼付し、検体を検体 0.1 mL を開放塗布し、週 3 回で 2 週間（計 6 回）開放塗布する。判定は塗布 2 週間後に形成された毛包開口部の皮疹を、フレキシブルマイクロスコープ（Derma scope YDS-90、（株）ヤヨイ）を接続したテレビモニター上で 200 倍に拡大し、1箇所塗布部位あたり 10 個のcomedoを選び、その直径をデジタルノギス（ミットヨ製）で計測し、平均値を求めた。

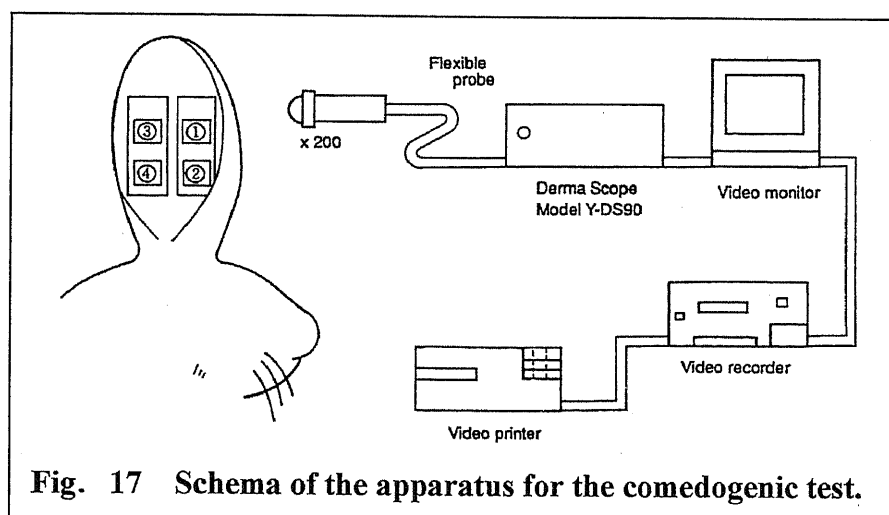
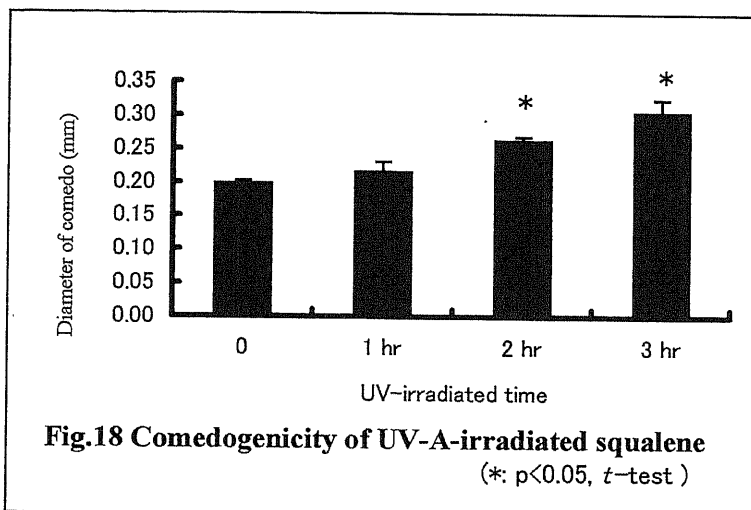


Fig. 17 Schema of the apparatus for the comedogenic test.

2-2. 結果

・紫外線照射 Sq のcomedogenicity

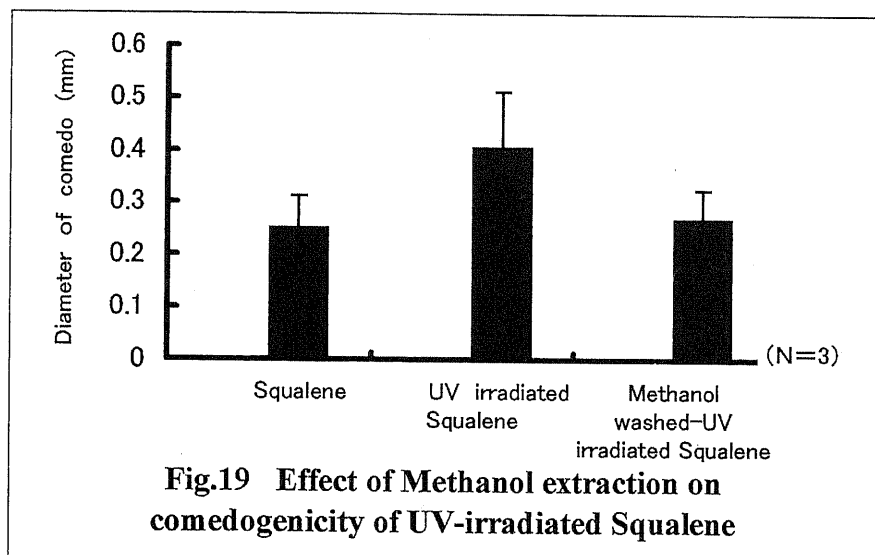


過酸化 Sq そのもののcomedogenicityを検討したところ、UV-B 照射時間に依存して、Sq にcomedogenicityの上昇が認められた。特に、2時間、3時間で有意にcomedogenicityの増加が観察された

(Fig.18)。

・メタノールによるcomedogenicityの抽出

過酸化された Sq から極性物質を抽出する為に、メタノール溶媒で抽出した Sq についてcomedogenicityを調べた。その結果、メタノールで抽出洗浄された残渣の

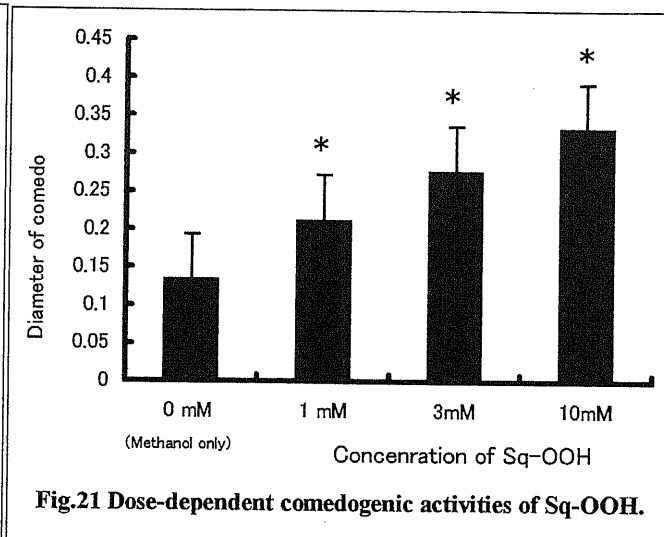
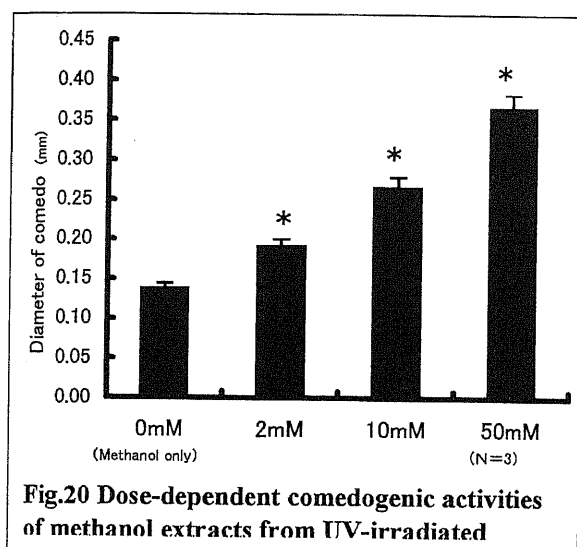


Sq には、comedogenicityは認められず、comedogenicity物質のほとんどはメタノール溶液にて抽出されたことが示された (Fig.19)。

・過酸化 Sq からメタノール抽出液および Sq-OOH のcomedo誘発活性

過酸化 Sq からメタノール抽出し LPO 値が 2, 10, および 50 mM 濃度の溶液を調製し comedo 活性を測定した結果、濃度依存的な活性増加が観察された (Fig. 20)。

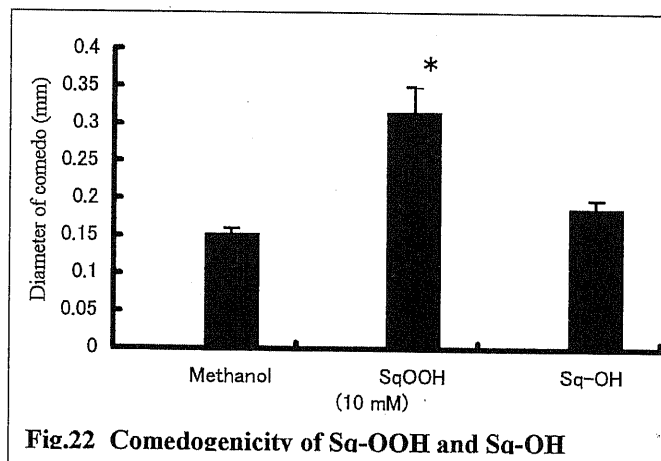
また、このメタノール溶液から HPLC で分離精製した Sq-OOH の 1, 3, および 10 mM



の検体について comedo 活性を計測した結果、1 mM 濃度でも有意な comedo 活性が観察された (Fig. 21)。

・Sq-OOH 還元剤処理による影響

Sq-OOH を NaBH_4 で還元した squalene-monohydroxide (Sq-OH) について comedo 誘発活性を測定した。その結果、10 mM の Sq-OOH に比べて、明らかに comedo 誘発活性が消失している結果が得られた (Fig. 22)。



・Sq-OOH と他の過酸化物との比較

Sq-OOH と同様な monohydroperoxide である BHP と CHP について、コメド誘発活性を比較した。その結果、BHP や CHP は Sq-OOH が明らかにコメド誘発性を示す 10 mM 濃度では、全くコメド誘発活性が認められなかった (Fig. 23)。

・コメドの病理写真

Sq-OOH の 10 mM を 2 週間塗布しウサギ耳介内側皮膚の病理標本写真を Fig. 24 に示した。

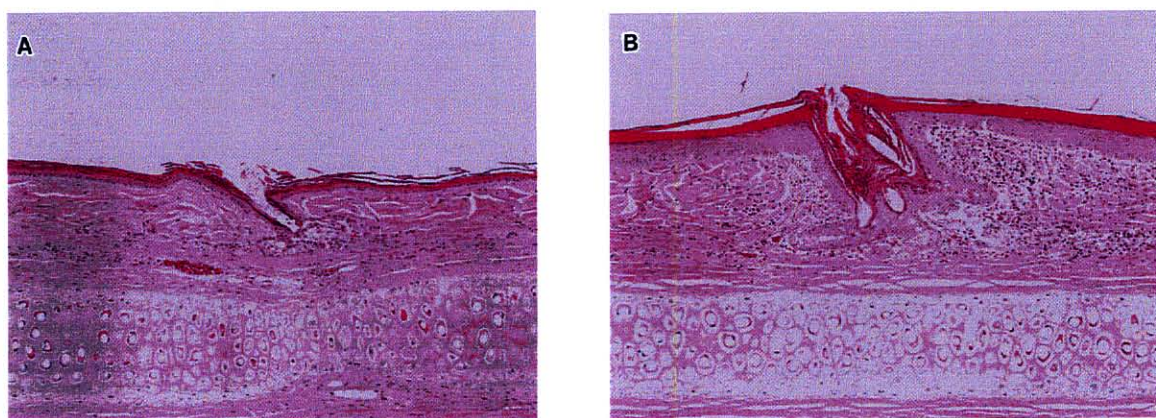
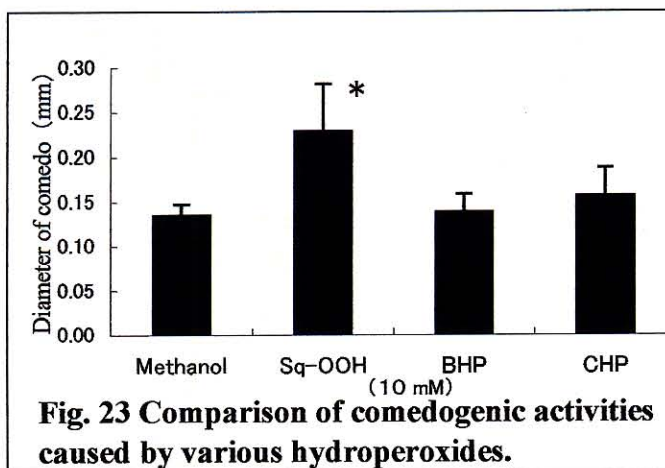


Fig.24 Histological finding of the rabbit ear skin treated with 10mM Sq-OOH.

A : Methanol (Vehicle control) B: 10mM Sq-OOH treatment. (×98). The photo B showed marked hyperplasia and hyperkeratosis of epithelium in the follicular infundibulum, and moderate infiltration of inflammatory cells in the dermis.

対照部位 (A) に比べて (B) は、毛包部周囲の表皮の過形成と過角化が顕著であり、真皮では中程度の炎症性細胞の浸潤が観察された。

2-3. 考察

紫外線照射された Sq にcomedogenic 誘発活性が知られているが⁵⁴⁾、実験に用いた Sq 過酸化物は過剰な紫外線照射により調製されているため、Sq-OOH 以外にアルデヒド類、epoxide 等の低分子化合物や、Sq の di-、tri-OOH 体が混合した Sq 過酸化物で検討したものであった。その為、ヒト皮膚上で実際に存在する Sq 過酸化物での comedogenic 誘発作用については報告されておらず、また、Sq の紫外線照射により生成される初期生成物 Sq-OOH の活性についても全く知られていなかった。

そこで、日常生活下でも被照射可能なエネルギー量で生成される物質について検討するため、 $5000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ のエネルギー量で 1~3 時間照射した Sq 過酸化物について、その comedogenic 誘発活性成分を調べた。その結果、Sq-OOH に強い活性が認められ、その作用は OO H 基が還元された OH 基では発現しないことから、Sq-OOH の分解されたラジカル、あるいは活性酸素による作用であることが推察された。また、同様な OO H 基を有する BHP や CHP には 10 mM 濃度では誘発活性が認められなかったことから、Sq-OOH に特異的な作用であることも考えられた。経皮吸収性や分解様式、皮膚刺激性や累積性等の違いがこれらの差異となっているのかもしれない。

Saint-Leger らは⁵⁷⁾、ニキビ患者の皮膚comedo から取り出された高極性脂質 (Compound D) が Sq の過酸化物質であり、comedogenic 誘発物質であることを報告しているが、TLC 分析の Rf 値から類推してこの物質群は Sq-OOH である可能性が高く、今回の結果を支持するものであった。実際のヒト皮膚上での comedo 形成に Sq-OOH が深く関わっている可能性が示唆された。

今回の結果から、Sq-OOH が最低 1 mM 濃度でも 2 週間塗布すれば comedo が誘発することが明らかとなった。実際の皮膚単位面積あたりの濃度に換算すると約 $40 \mu\text{mole}/\text{cm}^2$ であり、皮脂中の Sq 濃度 (約 $40 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) から考えてかなり高濃である。しかし、Sq-OOH の累積作用を考慮すると、長期間の局所的な Sq-OOH によ

る酸化ストレスは、病理所見で見られるような表皮肥厚や皮脂腺の拡大を引き起こし、結果的に皮膚にcomedoを形成すると考えられた。

ウサギ耳介皮膚のcomedo形成の病理学的特長は、表皮の肥厚と角化亢進、それに好塩基性細胞・リンパ球を主とする細胞浸潤を伴う炎症性の反応が主であり、毛孔はヘマトキシエオジンに好染色の角栓が充満している組織像を呈していた。Sq-00Hの酸化ストレスにより、表皮からは炎症性サイトカインが遊離され、角化が亢進しturnoverの進んだ状態で角化物が毛孔に栓塞していることが類推された。皮脂腺への作用は比較的緩和であり、ヘアレスマウスへの10 mMの累積塗布による作用のほうが、皮脂腺の拡大作用に関しては大きかった。

以上のことから、Sq-00Hは紫外線照射Sqのcomedo誘発物質の一つであり、実際のヒト皮膚上に存在する物質による作用であることを考えると、ヒト皮膚への影響の一つとしてSq-00Hの作用を考察していく上で重要であると考えられた。

3. 培養皮膚に対する細胞毒性

Sq-00Hの毒性パラメータの一つとして、細胞レベルでの毒性ポテンシャルを検討する為に、培養細胞を用いたSq-00Hの*in vitro*細胞毒性試験を実施した。

3-1. 実験材料および方法

・ウサギ皮膚線維芽細胞の調製

細胞はExplant culture法に従ってウサギ耳介皮膚から初代培養の皮膚線維芽細胞を調製した。すなわち、ネンブタール過剰麻酔下でウサギ耳介皮膚中央部を切除し、70 %エタノールで消毒後、ピンセットで軟骨上の真皮上部皮膚を剥離する。再度、70 %エタノールで消毒後、直径6 mmのパンチで円形に打ち

抜く。これを洗浄溶媒（100 unit のペニシリンとストレプトマイシン、0.25 μ g/mL のファンギゾン入りの Eagle MEM 培養液）にて良く洗浄してから、コラーゲンコートした培養 dish（Collagen Cellmatrix Type I-P、新田ゼラチン）にこの皮膚片を載せ、15 %牛胎児血清（FCS）含有 Eagle MEM 培地を満たし、95 %炭酸ガスインキュベーター内で培養し、2 週間後に皮膚組織から遊走している線維芽細胞を 0.25 %トリプシンで剥離して集めた。そして、セルカウントして -80°C 凍結保存し、使用時に融解して大量に培養してから使用した。

・ 毒性試験法

96 ウェルのマイクロプレートを使用し、1 ウェルあたり 10^4 細胞/0.1 mL を 10 %FCS 含有 Eagle 培地で播種し 48 時間後に DMSO、あるいはメタノールで各種濃度に調製した Sq-00H, BHP, CHP / 培地を細胞に接触させ、更に 24 時間培養後、細胞毒性を NR（neutral red 色素）法にて評価した。最終の DMSO メタノール濃度は、それぞれ 1 %に調整した。細胞シートは Phosphate buffer saline (PBS(-)) で洗浄後、50 μ g/mL の NR を含む Eagle 培地を 0.1 mL 添加し 3 時間 37°C の炭酸ガスフラン器内で培養してから、培養上清を除き細胞に取り込まれた NR を測定した。すなわち、固定液（1 %フォルマリン-1 %塩化カルシウム）で細胞シートを洗浄し、1 %の酢酸を含む 50%エタノール溶液を 0.1 mL 添加して室温に 15 分間放置後プレートミキサーで攪拌する。そして、抽出された NR 溶液をマイクロプレートリーダーの波長 540 nm で吸光度測定し、対照ウェル（培地接触のみ）を 100 %としたときの割合（% of control）を算出し、毒性の指標とした。

3-2. 結果

Fig. 25 は Sq-OOH の皮膚線維芽細胞への毒性作用を DMSO 溶媒で調べた結果である。

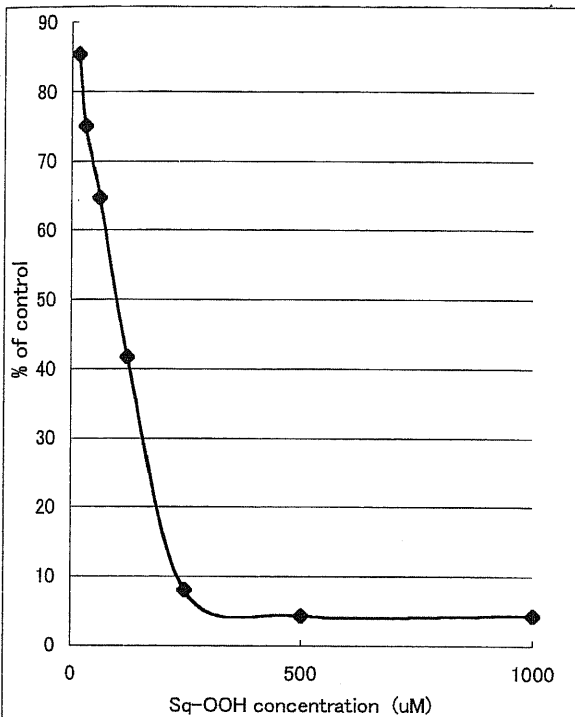


Fig. 25 Cytotoxicity of Sq-OOH to the primary rabbit skin fibroblasts.

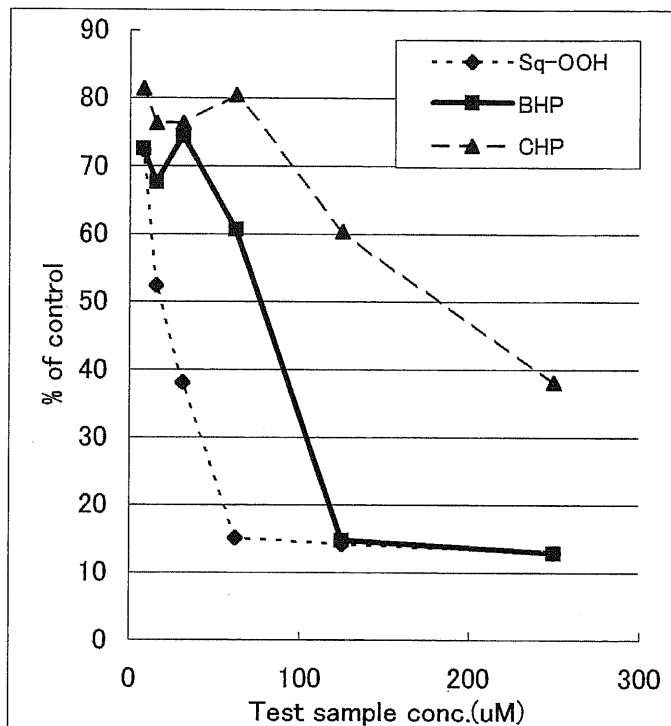


Fig. 26 Comparision of cytotoxicity among various organicmonohydroperoxides

500 μ M 以上では完全に toxic であり、この試験系での IC_{50} 値 (NR の取り込み量が対照ウェルの 50%となる試験濃度) は 103 μ M であった。

一方、Fig. 26 は Sq-OOH, BHP, CHP の三つの monohydroperoxide を比較した結果を示した。毒性は、皮膚一次刺激性と同様に Sq-OOH が最も毒性が強く、以下 BHP、CHP の順で毒性が減弱していった。

3-3. 考察

今回の結果から、Sq-00H には皮膚一次刺激性と培養細胞毒性の発現が nmole レベルのオーダーで認められた。皮膚一次刺激性に関しては、実際の皮膚上で生成量との関係について考察していく必要がある。皮膚中には、Sq-00H を分解する物質や酵素系（例えば GSH-peroxidase 等）が存在するので、過酸化物質自身の皮膚一次刺激性は予想していたよりは、低いものであった。また、Sq-00H が皮膚上で絶えず生成されつづけるとすると、長期的な皮膚累積刺激性についても検討を要するかもしれない。

細胞毒性については、培地中に含まれる血清の影響が大きく、Sq-00H の無毒化へ作用している可能性があり、絶対値的に見た場合、中程度の細胞毒性しか示さなかった。無血清培地での細胞毒性、あるいは検体接触時に血清を含まない状態でインキュベートすれば、毒性検出感度は上昇するかもしれない。また、過酸化物質の溶剤として DMSO とメタノールを使用した時では、Sq-00H の EC_{50} 値が異なり、メタノールを使用した時のほうが毒性は高く発現していた。このことから、培地中での溶解性・分散性によっても毒性結果は左右される結果であった。

4. 小括

・Sq 過酸化物の皮膚への刺激性（毒性）を調べる為に、Sq-OOH のウサギおよびモルモット皮膚一次刺激性、モルモット皮膚累積刺激性を検討した。Sq 過酸化物は皮膚上で生成され、皮膚に何らかの作用を及ぼしていることが考えられる。紫外線を照射 Sq については、皮膚一次刺激性、培養細胞毒性、コメド誘発性等が報告されている。しかし、これらの検体は過剰の紫外線照射した過酸化物が更に二次的に分解し生成した多数の低分子・揮発性物質を含む混合物であり、実際の皮膚上では生成していない物質での毒性評価であった。皮膚上では、むしろ穏やかな条件で生成される Sq-OOH が形成され、更に分解して二次的な分解終末物質に変わり、これらの混合物により様々な毒性を呈している可能性が考えられた。

・そこで、日常生活レベルで暴露される $5000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の照射量で紫外線照射し、生成された Sq-OOH の生体への影響を考える為に、ウサギ皮膚一次刺激性及び培養細胞毒性を検証した。その結果、単位面積 (cm^2) 当たりの LP0 濃度 (nmole) で比較すると、ウサギでは 100 nmole ぐらいから一次刺激性が出現し、モルモット皮膚累積刺激性では、約 10 nmole の低濃度でも、繰り返し塗布することで刺激性が出現した。以上の結果から、数 10 nmole オーダーで動物皮膚に何らかの作用を示すことが示された。また、Sq-OOH の皮膚一次刺激性や培養細胞毒性は、類似した monohydroperoxy 体である BHP や CHP よりも強かった。

・コメド誘発性においては、Sq 過酸化物に活性が認められ、その活性はメタノールで抽出され、活性本体が Sq-OOH であることが Derma scope を用いたコメド誘発試験で明らかとなった。一方、BHP や CHP にはコメド誘発性は認められず、Sq-OOH に特異的な反応であった。

・ヘアレスマウス皮膚への連続塗布では、Sq-00H が肌荒れ（皮膚表面形態の悪化）、皮膚水分低下作用、および縮緬シワ（crinkle）形成作用を有していることを見出した（詳細はⅢ章を参照）。これらの作用も、同様な monohydroperoxy 体である BHP や CHP では認められず、また還元体の Sq-OH でも全く認められず、Sq-00H に特徴的な作用であることが判明した。

Ⅲ. スクアレンモノペルオキシド累積塗布によるシワ形成作用

緒言

Ⅱ章 1 で示されたように、Sq-00H のヘアレスマウス皮膚への累積塗布試験で明瞭なシワ様皮膚が出現する結果が得られた。そこで、この現象を更に詳細に検討する為に、Sq-00H を 3 週間累積塗布した皮膚の形態変化（肌荒れ、シワ形成）を画像解析法により定量化し、肌荒れシワ様皮膚の程度を BHP、CHP、あるいは皮膚一次刺激性物質を累積塗布させた場合の皮膚と比較した。また、繰り返しの紫外線照射は、シワ皮膚を誘発させることが知られているので、Sq-00H 誘発のシワ皮膚と形態的・病理組織的变化について比較し、Sq-00H 誘発シワの特性について検討した。また、シワ形成の誘因として皮膚真皮マトリックス成分の変化、とりわけコラーゲンと酸性ムコ多糖の量的変化と皮膚表皮細胞から分泌されるサイトカインに着目し、Sq-00H 塗布と紫外線照射によるシワ発生メカニズムの違いについて考察してみた。

1. スクアレンモノペルオキシド累積塗布による皮膚変化について

Sq-00H の皮膚累積塗布による肌荒れやシワ様皮膚について、画像解析装置を用いて定量し、Sq-00H の皮膚表面形態への作用について検討した。更に、角層水分含量の測定と病理検査を実施し、Sq-00H の皮膚累積刺激性について詳細に検討した。

1-1. 実験材料および方法

・使用動物

ヘアレスマウス（Hos : hr-1）雌性を日本エスエルシー（株）より 7 週令で入

荷し、2週間の予備飼育後、9週令から検体塗布を開始した。動物数は一群5匹とし、無処置群、溶媒対照群（エタノール単独群）を設置した。

・塗布検体

精製 Sq（シグマ社製）10 g をシャーレーに入れ、紫外線蛍光灯ランプ（BLB-20、東芝）5 本を光源とし、エネルギー強度 $5000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ で1時間照射した。酸化 Sq は、メタノール 15 mL で2回抽出後、窒素ガスで濃縮してから溶媒をエタノールに置換したものを Sq-OOH 分画物とした（1章2参照）。更に HPLC で精製した Sq-OOH についても一部の実験で使用した。過酸化物質濃度は、LPO キット（協和メディクス）で測定して $30 \mu\text{mole}/\text{mL}$ エタノール濃度の検体を調製した。検体の希釈はエタノールを用いて 1, 3, $10 \mu\text{mole}/\text{mL}$ に調製した。

BHP, CHP は、市販の Sigma 社製試薬をそのままエタノールで希釈して用いた。還元体 Sq-OH は、エタノール中で等モルの triphenylphosphine を添加して作製した。皮膚一次刺激性物質としては sodium lauryl sulfate (SLS)、および Sq-OOH と同様に comedogenic な作用物質 (comedogen) である n-tetradecane について 0.5 %濃度で実施した。

・検体塗布法

ヘアレスマウスの背部皮膚全面（約 20 cm^2 ）に検体を 0.2 mL（正中線をはさんで、左右に 0.1 mL ずつ）の開放塗布を行った。塗布は、1日1回塗布の3週間連続で塗布した。溶媒対照群としては、エタノールのみを同様に塗布した。

・皮膚表面形態計測

肌荒れの各種パラメータ（皮溝・皮丘数、水平距離、及び不規則性）を計測した。皮膚のレプリカ作製は、即乾性のシリコンゴム（SILFLO、Flexico Developments）を用い、ネガティブレプリカをヘアレスマウスの右側腹部皮膚から検体塗布直前と屠殺直前に採取した。スンプ台紙に貼付されたレプリカは、画像解析装置により上記の各種パラメータを計測した。

方法は、曾根らが開発した画像解析法⁶⁹⁾に準拠し、皮膚表面立体画像システム 3D Skin Scanner（一丸ファルコス）と ASPECT ソフトウェア（三谷商事）を使用した。すなわち、採取されたレプリカを照明装置（LGW-100、オリンパス）に 30 度の照射角度で光線を照射し、その凹凸に応じた陰影を実体顕微鏡（SZ6045Trpt、オリンパス）に接続した CCD カメラ（TI-23A, NEC）で撮影後、画像を白黒反転してから画像解析装置（IMM256 V8、三谷商事）に入力した。そして、得られたデータを 1 cm²あたり 256 分割された領域中で X（縦）-Y（横）-Z（グレイレベル）にデジタル化し、3D Skin Scanner にて皮溝・皮丘数、水平距離、及び不規則性の各パラメータを算出した。

・角層水分含量測定

高周波伝導度測定装置（SKICON-200、IBS）を用いて皮表角層のコンダクタンス値を測定し、*in vivo*での角層水分含量とした。測定値は、同一部位を最低 5 回計測し、その平均値とした。

・病理検査

Sq-00H 分画物を 3 週間塗布したヘアレスマウス皮膚片を 10 %緩衝ホルマリソ（pH7.1）にて固定し、定法に従ってパラフィン包埋してから 6~10 μ m の厚さに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン（H.E）染色後に顕微鏡観察を行っ

た。

1-2. 結果

・肉眼観察所見

Sq-00H 分画物の最高濃度である 30 $\mu\text{mole/mL}$ 濃度では、塗布直後から皮膚炎症反応が出現し、5 日目頃より鱗屑も認められ、明らかな皮膚刺激性が観察された。また、同時に皮膚表面形態変化（とりわけ皮溝・皮丘）が顕著となり、3 週間継続塗布した場合、強い皮膚表面の荒れとシワの形成が明瞭であった。10 $\mu\text{mole/mL}$ 濃度でも、塗布後 4 日間は僅かに紅斑様反応が出現したが、それ以降は減弱し、代わりに塗布 5 日目頃より、明瞭な皮膚表面形態の変化とともに、シワの形成が観察されはじめ、3 週間では明瞭であった (Fig. 27)。10 μmole 群の肌荒れ・シワの形成は、3 週間目では 30 μmole 群と変わらない程に強い作用が認められた。尚、溶媒の比較のために、エタノール溶媒とともに 10 μmole 群ではメタノール溶媒についても実施した。その結果、メタノール溶媒群のほうがやや皮膚所見では全般的にエタノール溶媒群に比べて強い皮膚反応が出現していた。

一方、低濃度群の 1 及び 3 μmole 群では、3 週間の塗布期間を通じて全く紅斑は認められ無かった。しかし、3 μmole 群では皮膚表面形態の変化が 2 週間目頃から目立ち始め、また、10 日目ごろよりシワの形成も認められ、10, 30 μmole 群よりは弱いものの、明らかな肌荒れ亢進が観察された。尚、全動物とも塗布期間中での体重変動はほとんど無く、検体塗布による体重への影響は認められなかった。

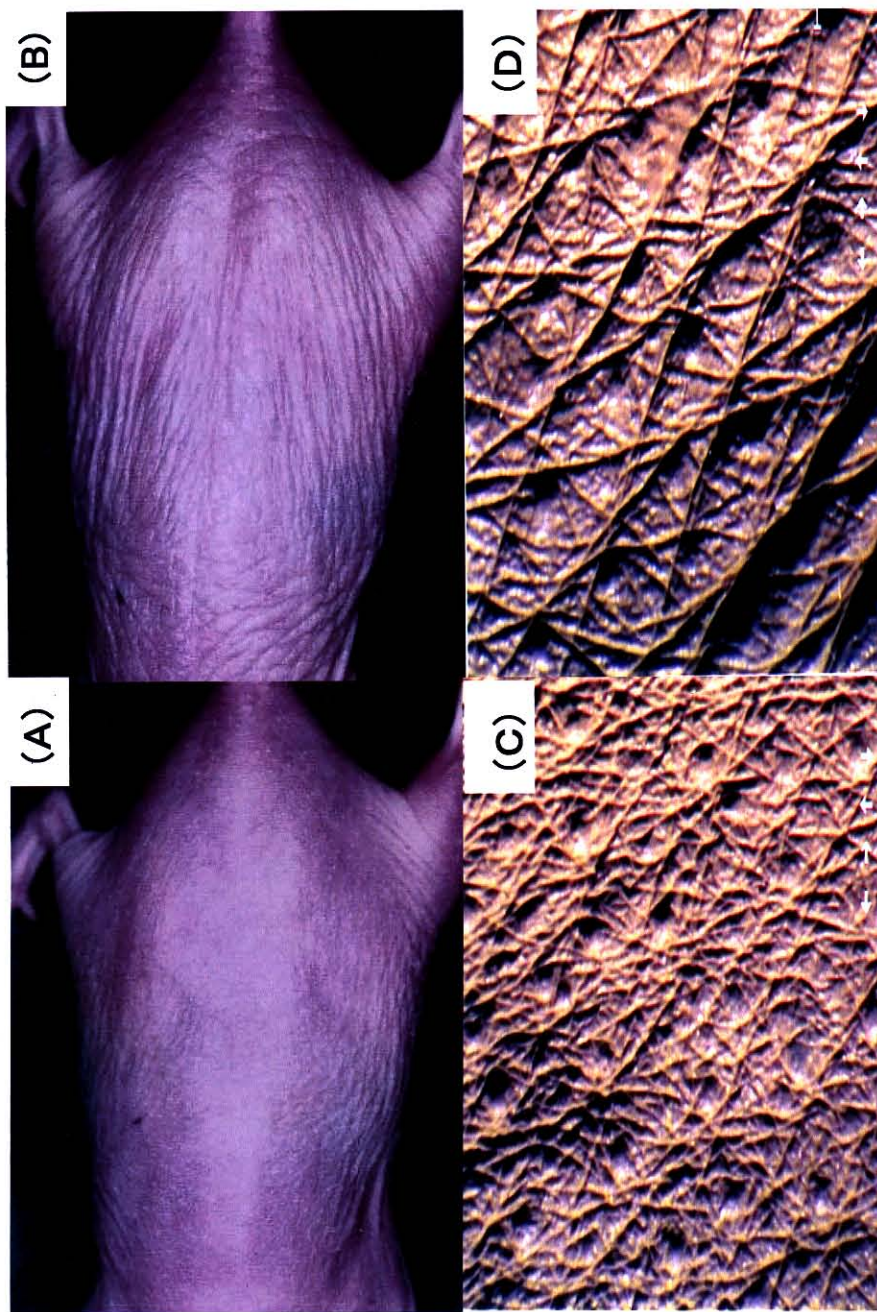


Fig.27 Skin surface of hairless mouse treated with ethanol or Sq-OOH.
A and C: Ethanol treatment B and D: Sq-OOH treatment.
10 mM of Sq-OOH fraction or vehicle (Ethanol) was topically applied for 3 weeks.
Skin surface impressions (Cand D) were photographed with an Olympus SZH 10 stereo-microscope.

・皮膚表面の形態変化、特に肌荒れパラメータ変化

3週間目の肌荒れのパラメータとして、皮膚レプリカの画像解析により、皮溝・皮丘の数、ピーク間の水平距離（間隔）、及び不規則性（間隔の標準偏差）を測定した結果を Fig. 28 に示した。塗布前後における各動物のパラメータについて対応のある *t* 検定を実施したところ、3~30 μ mole 群で検体塗布により塗布前に比べて皮溝・皮丘の数の減少、ピーク間の水平距離の延長、及び不規則性の増加が有意に観察された。1 μ mole 群でも統計的には有意差は認められないものの、傾向は他の高濃度群と同様であった。これらのことから、Sq-00H の累積塗布により、ヘアレスマウス皮膚上で肌荒れ現象が濃度依存的に発現していることが明らかになった。

・Sq 過酸化物の特異性

同様な試験系で、精製された Sq-00H についても検討した。その結果、Sq-00H 分画物よりやや強い傾向を示したが、同様な皮膚表面形態パラメーターの変動が観察された (Fig. 29)。また、還元した Sq-0H についても同様に検討した結果、全く皮膚表面形態に塗布前後での差は認められなかった。

そこで、類似した有機 hydroperoxide である BHP と CHP について 10 μ mole / mL の濃度で検討した。その結果、Sq-00H に比べ、これら hydroperoxide 体はほとんど皮膚表面形態の変化が認められなかった (Fig. 30)。また、皮膚一次刺激物質として使用される界面活性剤の SLS と強力な comedogen である *n*-tetradecane について、表中の塗布濃度で検討した場合は、Sq-00H と同様に累積塗布したが、皮膚表面形態パラメータの変動は認められなかった。

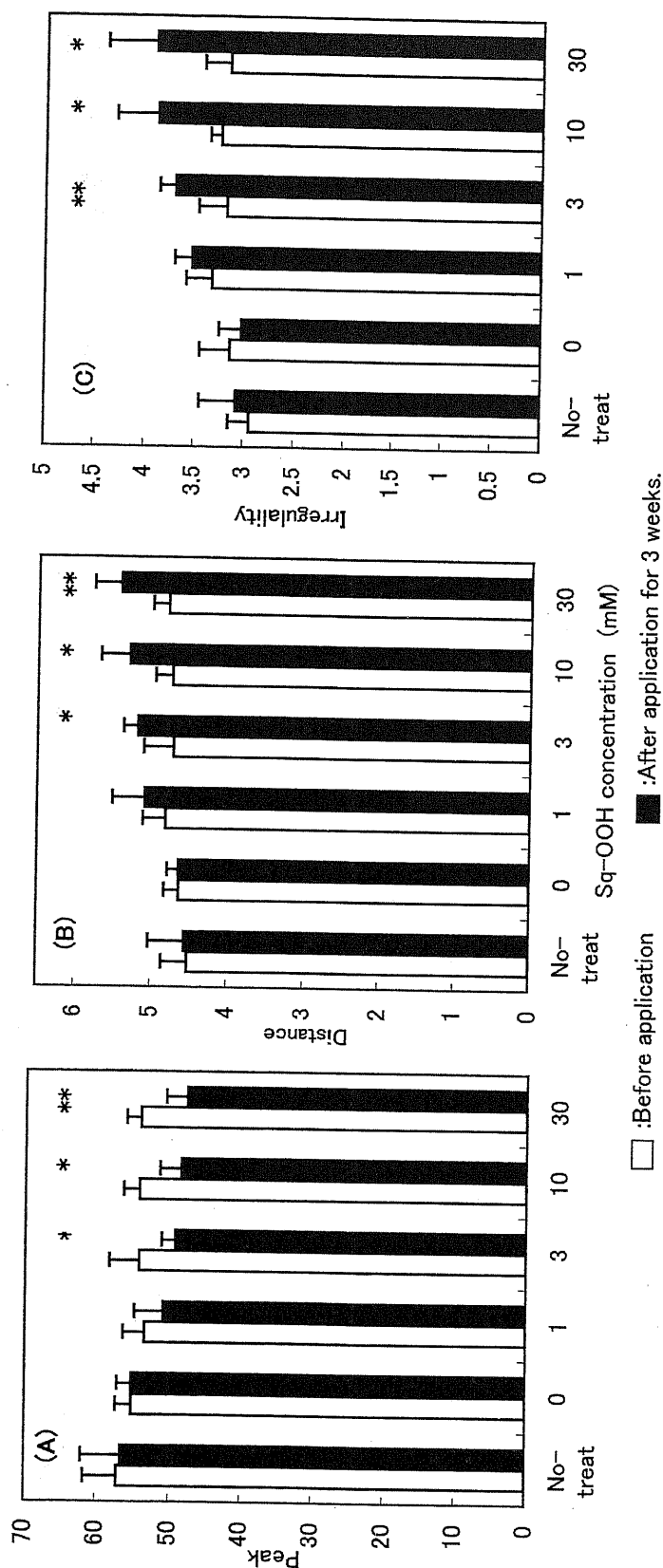


Fig.28 Dose-related of skin roughness parameters induced by Sq-OOH.

1~30mM Sq-OOH fraction or ethanol (vehicle) was topically applied daily for 3 weeks. No-treat:Age-matched control group.
 0: Vehicle control (ethanol) 1~30.1,3,10 or 30 mM Sq-OOH fraction was applied for 3 weeks. The degree of skin roughness was represented as following parameters; (A):number of furrow-crest, (B): distance between a furrow and the next crest, (c) irregularity (standard deviation of distance) Each value expressed as mean $\pm$ SD of 5 animals/group. Student *t* test paired data were used to calculate significance. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ as compared to the before application.

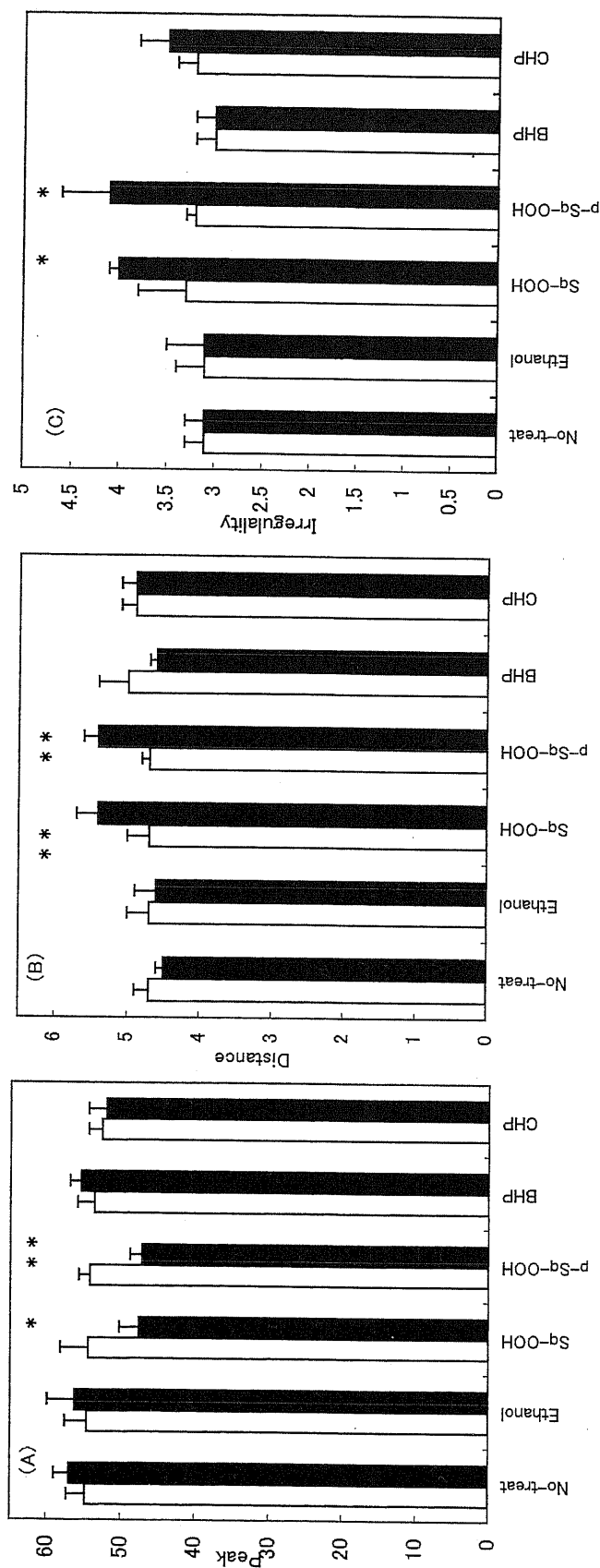


Fig.29 Comparison of skin roughness parameters caused by various hydroperoxides.

Each test sample 10 mM was topically applied daily for 3 weeks. Degree of skin roughness was represented by:

(A) Peak (number of furrows and crests), (B) Distance (distance between furrow and next crest), (C) Irregularity (standard deviation of distance)

Each value was expressed as mean $\pm$ SD of 5 animals/ group.

Student paired *t* test was used to evaluate significant differences, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with those before application.

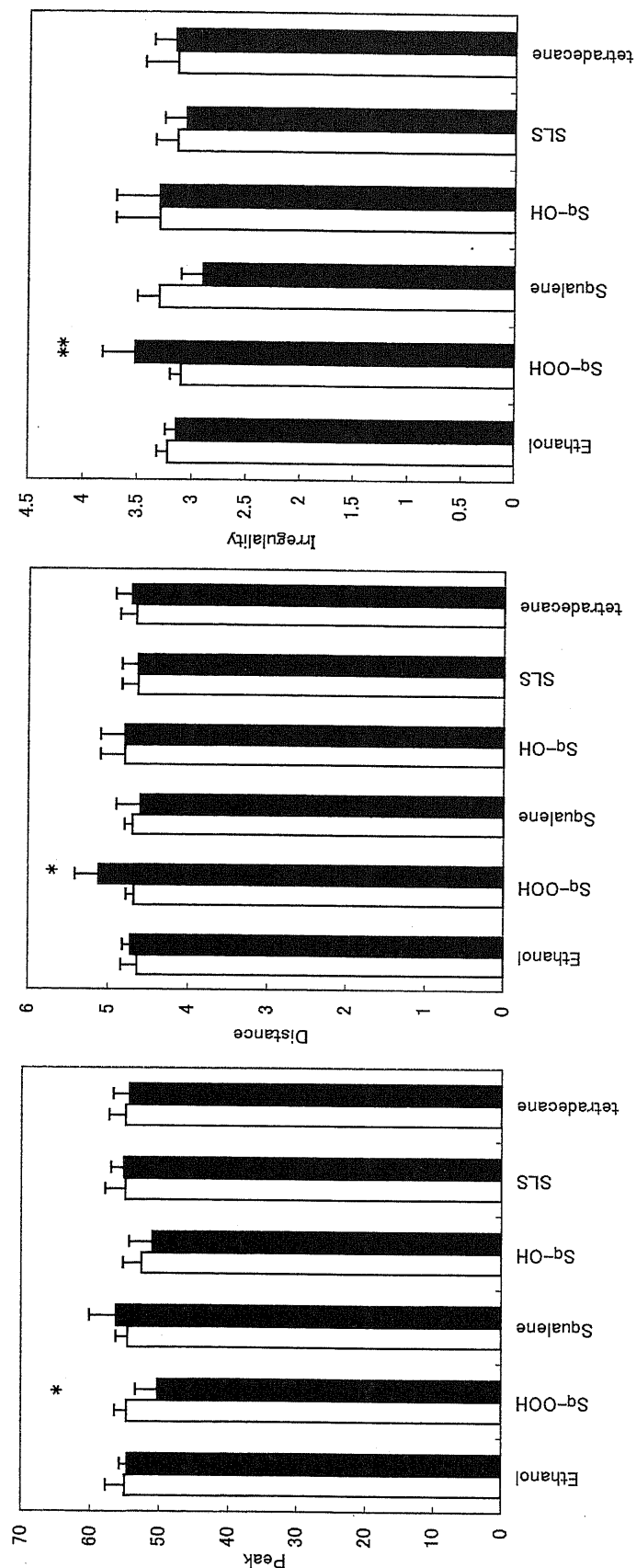


Fig.30 Comparison of skin roughness parameters caused by various chemicals.

Each test sample was topically applied daily for 3 weeks. Degree of skin roughness was represented by:

(A) Peak (number of furrows and crests), (B) Distance (distance between furrow and next crest), (C) Irregularity (standard deviation of distance)

□ :Before application ■ :After application for 3 weeks. Each value was expressed as mean $\pm$ SD of 5 animals/ group.

Test sample concentration : Ethanol (vehicle control):100%, Sq-OOH, Squalene and Sq-OH: 10 mM, SLS and n-tetradecane: 5%

Student paired t test was used to evaluate significant differences. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with those before application.

次に、皮膚角層水分含量でそれぞれの比較をした結果、Sq-00H は塗布濃度 10 m M と 30 m M で、5 日間塗布で明らかな角層水分含量の低下が認められ、角層バリアーの損傷が起きていた (Fig. 31 (A)) 。

一方、SLS のような一次刺激性物質は Sq-00H と同様に角層水分含量を低下させ、n-tetradecane も低下傾向を示したが、Sq-00H の還元体 Sq-OH や BHP には、角層水分含量の低下作用は認められなかった (Fig. 31 (B)) 。

角層水分含量を低下させ、角層バリアー機能を破壊することが知られている SLS には、Sq-00H のようなシワ形成作用が無いことから、一次刺激性物質が必ずしもシワ形成能がある、とは言えないことが明らかとなった。

・ 病理所見

Fig. 32 は、A がヘアレスマウス皮膚に溶媒のエタノールを 3 週間塗布したもの、B が Sq-00H 分画物を 3 週間塗布したものである。明らかな差としては、A に比べて B で表皮の肥厚と皮脂腺の肥大傾向が認められたが、その他の部位では、大きな差異は観察されなかった。

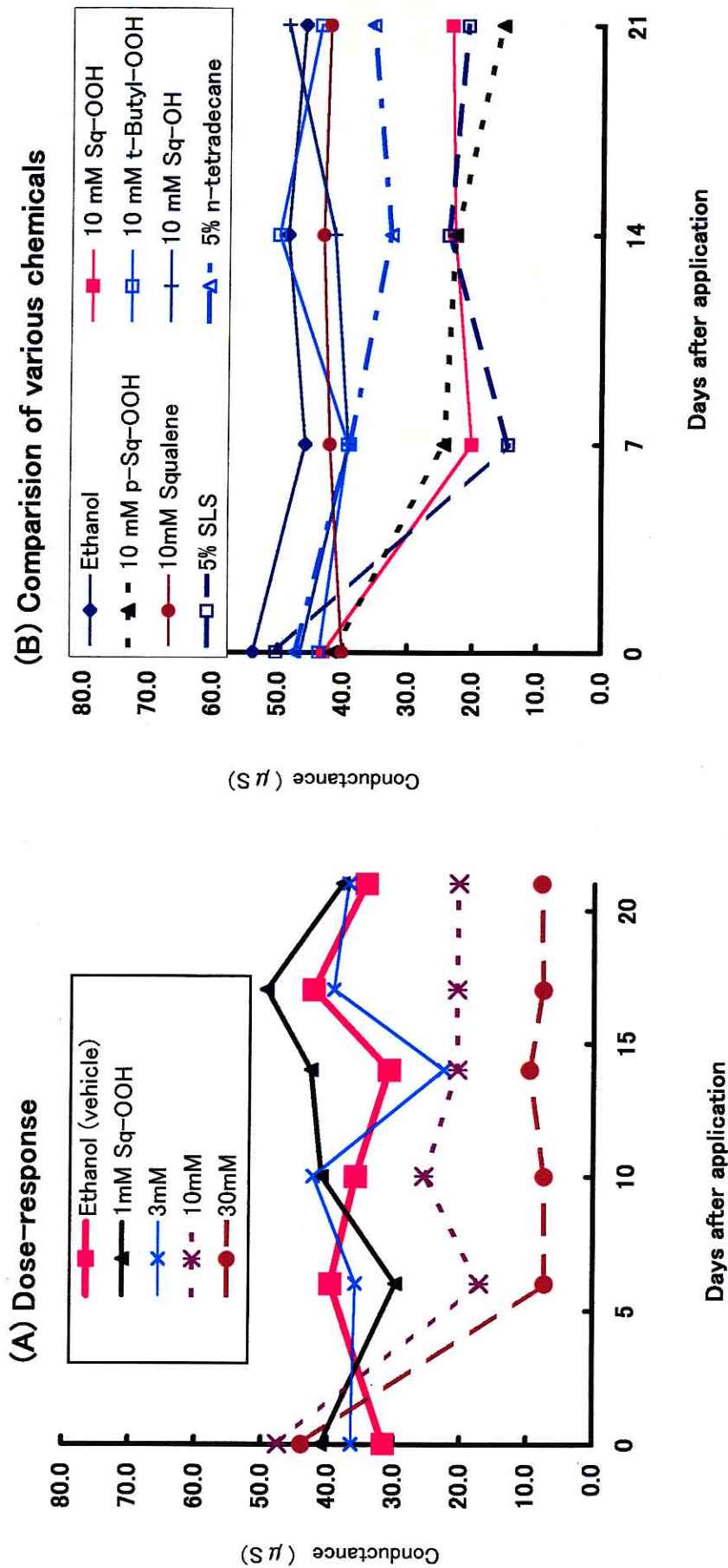
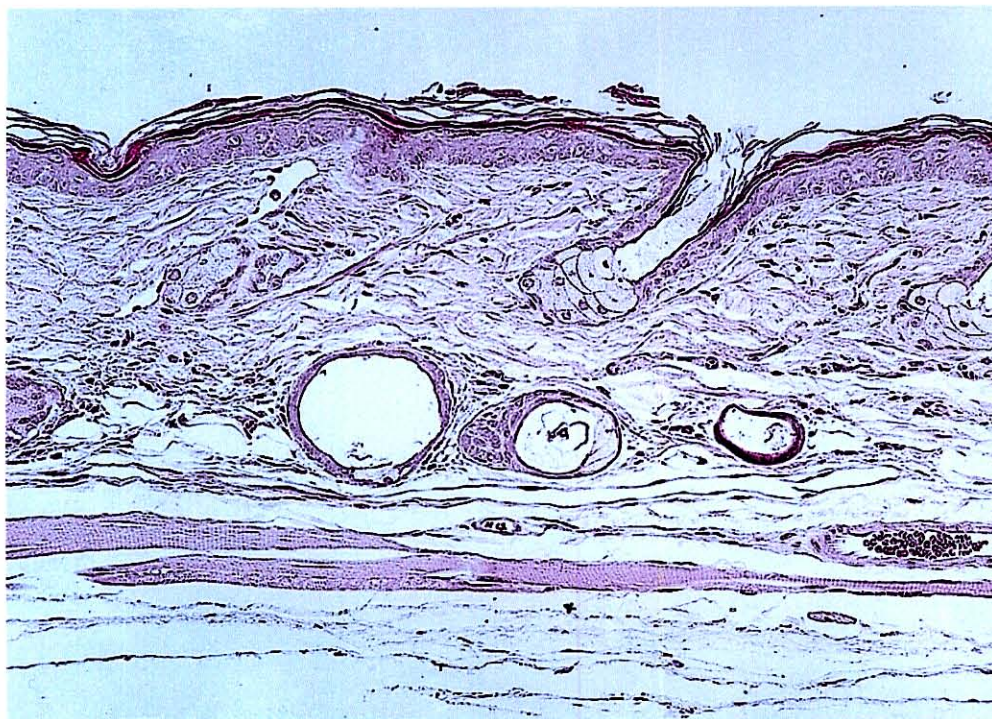


Fig.31 Changes in conductance of skin treated with various chemicals.
 After topical application for 3 weeks, the conductance was measured in the dorsal skin using a skin conductance meter. Each point represents the value for 5 animals.

A: Ethanol



B: 10 mM Sq-OOH

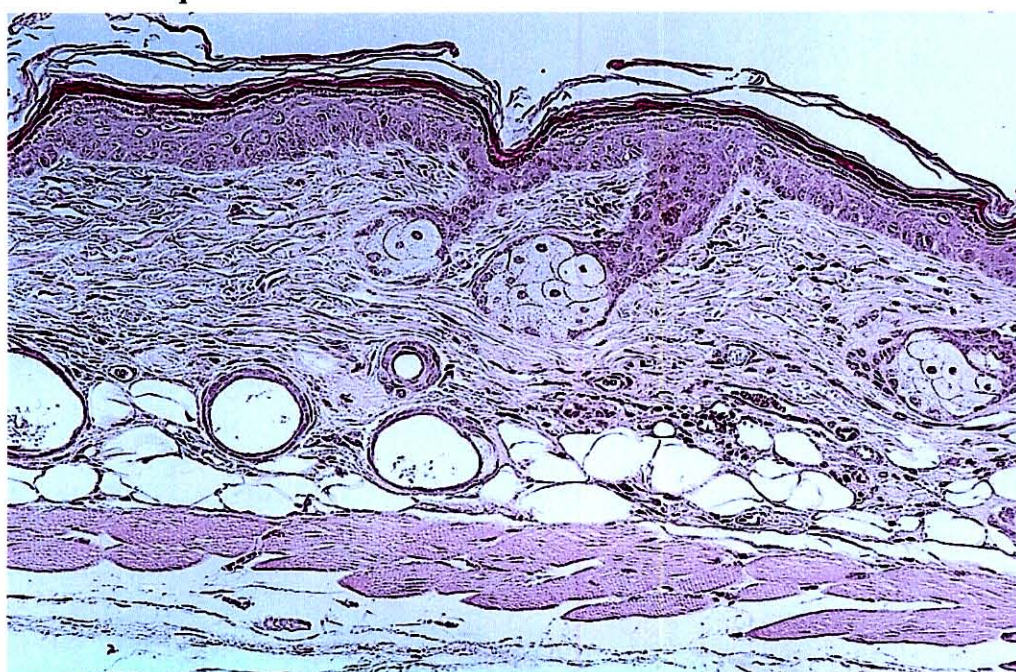


Fig.32 Histological finding of dorsal skin of hairless mouse treated with Sq-OOH.

A: Ethanol (vehicle control) **B:** 10 mM Sq-OOH treatment

Hyperkeratosis, epidermal thickening, and hyperplasia of sebaceous glands were observed in skin treated with Sq-OOH.

1-3. 考察

Sq 過酸化物の皮膚への刺激作用として、これまで皮膚一次刺激性やコメド誘発性を調べてきたが、実際の皮膚上で絶え間なく生成され暴露されていることを考えると、むしろ累積塗布された場合の皮膚への作用が重要であると言える。

健常ヒト皮膚上での Sq-00H 濃度が 1 nmole/mL とすると（第 I 章 1 参照），ヘアレスマウスの塗布面積を 20cm² とした場合、1 μmole 群ではヒト皮膚上の約 10 倍の濃度に相当し、シワの形成が出現しはじめた 3 μmole 群では、ヒト皮膚上の約 30 倍の濃度に相当した。これらの Sq-00H 量は過剰に紫外線が照射された皮膚や病的な皮膚の上に存在することが可能な濃度であった。今回の結果から、Sq-00H が正常の数 10 倍の濃度存在すれば、皮膚に何らかの作用

（肌荒れ・シワ形成）のポテンシャルを有していることが示され、健康な皮膚を維持するスキンケアを考えていく上で Sq-00H の排除・分解の重要性が認識されるデータとなった。

皮膚表面形態変化については、明らかに 3 μmole 群で有意な肌荒れの亢進が観察され、1 μmole 群でもその傾向が認められた。このことから、Sq-00H の皮膚上での蓄積は、皮膚の正常なターンオーバーを乱し、高濃度では角層のバリアーを破壊して水分を減少させる作用のあることが推測された。しかも、皮膚表面のみならず、Sq-00H 由来のラジカルが発生し、近縁の脂質を過酸化するとともに皮膚内部にラジカルが伝播して、皮膚真皮層への作用が今回のシワ形成反応の誘発として捉えられたのかもしれない。

一般に、有機 monohydroperoxide (BHP や CHP) は表皮細胞により代謝を受けて alkyl 体や alkoxy 体のラジカルが生成されることが、Taffe ら⁶⁰⁾、

Timmins ら⁶¹⁾により報告されている。Sq-00H が皮膚中でこれらの有機ラジカルを形成しているか否かは不明であるが、活性酸素や有機ラジカルの発生がシワ形成に関与している可能性が推察された。この実験結果は、従来の紫外線照射法ではなく過酸化脂質の累積塗布というラジカル形成の手段を用いることで皮膚表面変化が活性酸素・フリーラジカルの作用と密接に関係していることを検証するものであり、この現象が過酸化物に特異的な作用であるか否かについて更に検討していく必要があった。そこで、Sq-00H の還元体 Sq-0H で検討してみたが、全く皮膚表面変化が認められず、今回の作用が-00H 基に依存した反応であることが示唆された。Sq-00H の皮膚での作用は、発生するラジカルや活性酸素に起因する可能性が高いので、発生するラジカル種、活性酸素の同定や皮膚成分との相互作用を解析していくことが、これら皮膚表面形態変化と結びつくことが考えられた。

以上の結果、Sq-00H の皮膚への作用として、皮膚角質バリアーの損傷と皮膚表面形態の変化（肌荒れやシワの形成）が新たな作用として認められた。しかしながら、病理所見でも分かるように、大きな Sq-00H による皮膚内部への作用は表皮の肥厚と皮脂腺の拡大傾向があるのみで、Sq-00H 誘発の皮膚表面のシワは、表皮性の小ジワであることが考えられた。皮膚内部への作用については、さらに長期間の Sq-00H 塗布が必要であると考えた。

2. スクアレンモノヒドロペルオキシド長期塗布と紫外線照射によるシワ皮膚の比較

Sq-00H がヘアレスマウス皮膚に紅斑刺激以下の濃度で3週間累積塗布した結果、①皮膚表面形態変化（肌荒れの誘発、シワ形成）②皮膚水分含量の著明な低下（角層バリアーの損傷）③病理組織学的変化（表皮肥厚、皮脂腺の肥大）を引き起こし、肌荒れや皮膚シワ形成の新たな試験系モデルとなる可能性が示唆された⁵⁸⁾。そこで、Sq-00H の皮膚への累積作用の特徴を更に明確にする為に、15 週間の長期塗布実験を Sq-00H、および対照品として BHP や CHP について実施すると共に、同様なシワ誘発法である紫外線照射法によるシワ形成試験との比較について検討した⁶²⁾。

また、Sq-00H のシワ形成の特性を調べるために、ヘアレスマウス皮膚における Sq-00H 塗布と紫外線照射との反応性の違いについて、病理組織検査（コラーゲンの染色とムコ多糖染色）、および真皮成分であるコラーゲンとムコ多糖（Glycosaminoglycan (GAG)）の量をそれぞれ HP とウロン酸の量で表した⁶²⁾。また、酸化ストレスによるシグナル伝達により、様々な酵素誘導をはじめ遺伝子発現、サイトカインの分泌促進が誘発されることが知られている。とりわけ、皮膚においては表皮細胞から分泌されるサイトカインである IL-1 α 、IL-6、および TNF- α は、紫外線照射された酸化ストレス状態の時に表皮細胞から分泌され、真皮マトリクスへの作用としてコラーゲンの合成と分解に関与していることが知られている⁶³⁾。そこで、Sq-00H と紫外線 UV-B 照射による真皮コラーゲン量への差異が、これらサイトカインの分泌量の違いに起因している可能性が考えられたので、正常ヒト表皮角化細胞を用いて、紫外線照射および Sq-00H 接触した時の細胞からのサイトカインの分泌の違いについて検討した。

2-1. 実験材料および方法

・使用動物

ヘアレスマウス (Hos : hr-1) 雌性を日本エスエルシー (株) より 7 週令で入荷し、2 週間の予備飼育後、9 週令から検体塗布を開始した。動物数は通常一群 5 匹とし、無処置群、溶媒対照群 (エタノール単独群) を必要に応じて設置した。

・塗布検体

3 章 1 に記載した方法に準じ、Sq-00H はメタノール抽出物を使用した。

・検体塗布法

ヘアレスマウスの背部皮膚全面 (約 20 cm²) に検体を 0.2 mL (正中線をはさんで、左右に 0.1 mL ずつ) の開放塗布を行った。塗布は、1 日 1 回塗布で土日を除く週 5 回の割合で 15 週間まで塗布した。

・紫外線照射法 (Kiss らの方法⁶⁴⁾)

光源は Toshiba FL-20 S E ランプ^o を 5 本並列にしたものを使用し、照射距離は約 20cm (エネルギー量は 0.53 mW/cm²) とした。予め、この照射条件でマウス皮膚の MED (最小紅斑量) を測定した結果は 40 秒であった (約 21.5 mJ/cm²)。そこで、1 週目は 1 MED、2 週目が 2 MED、3 週目が 3 MED、4 週目以降が 4 MED で計 15 週間照射した。照射は、週 3 回 (月、水、金) とした。総照射エネルギー量は 3.48 J/cm²であった。

・皮膚表面肉眼判定スコア

無処置対照群皮膚、あるいは溶媒対照 (エタノール単独) 群の皮膚と比較観

察し、以下の判定基準で点数化した。

0 点：全く対照群皮膚と同等。 1 点：何らかの変化を認める。

2 点：僅かなシワ形成を認める。3 点：明らかな深いシワ形成が認められる。

・皮膚肥厚度計測

マウス背中の中央部を指で摘み上げ、ダイヤルゲージ付きのノギス (PEACOCK 製) で計測した。

・皮膚表面形態計測

肌荒れパラメータ (皮溝・皮丘数、水平距離、及び不規則性) は、第Ⅲ章の 1-1 と同様にして求めた。シワ形成のパラメータ (シワ面積比率、Ratio of Wrinkled Area , RWA) は、以下の手順で計測した⁶⁵⁾。

皮膚のレプリカ作製は、即乾性のシリコンゴム (商品名 SILFLO、Flexico Developments) を用い、ネガティブレプリカをヘアレスマウスの右側腹部皮膚から検体塗布直前と屠殺直前に採取した。スンプ台紙に貼付されたレプリカは、画像解析装置により RWA パラメータを計測した。方法は、曾根らが開発した画像解析法に準拠し、皮膚表面立体画像システム 3D Skin Scanner (一丸ファルコス) と ASPECT ソフトウェア (三谷商事) を使用した。すなわち、レプリカに照明装置 (LGW-100、オリンパス) により 30 度の照射角度で光線を照射し、その凹凸に応じた陰影を実体顕微鏡 (SZ6045Trpt、オリンパス) に接続した CCD カメラ (TI-23A, NEC) で撮影後、画像を白黒反転してから画像解析装置 (IMM256 V8、三谷商事) に入力した。そして、得られたデータを 1 cm²あたり 256 分割された領域中で X (縦) -Y (横) -Z (グレイレベル) にデジタル化し、シワ形成の指標となる RWA を、ASPECT ソフトウェアを用いて二値化し、得られたデータから陰影領域を抽出してシワの量を 1.33 cm²あたりの%値で表した。

・病理組織学的検査

処置された皮膚は、10 %緩衝ホルマリンにて固定しパラフィン包埋後、H. E 染色並びにコラーゲン線維を調べる為にワンギーソン染色を、ムコ多糖を調べる為にコロイド鉄染色 (Müller-Mowry 法) を実施し、光顕にて観察した。

・ H P 含量測定

パンチ (6 mm ϕ) で打ち抜いた背部皮膚切片を試験管にいれ、6 N塩酸 1 mL 添加後 110 °C で 48 時間加熱し加水分解する。それから、窒素ガスで溶液を蒸発乾固させてから 0.5 mL の蒸留水に再溶解させ、適宜希釈 (通常は 200 倍) してから、ヒドロキシプロリンの含量を Kivirikko らの方法⁶⁶⁾ に準じて定量した。すなわち、ネジ付き遠心管に試験溶液 2 mL を入れ結晶 KCl を添加して飽和状態とし、10 %のアラニン溶液と pH 8.7 のホウ酸緩衝液を加え室温で 30 分間放置する。そして、クロラミン T 溶液を 0.5 mL を添加し 25 分間放置後 3.6 Mチオ硫酸ナトリウム溶液 1.5 mL とトルエン 2.5 mL を添加し、密栓して 5 分間振とう後 1500rpm で 5 分間遠心しトルエン層を除去する。再び密栓してから 100°C の 30 分間ウォーターバスで加熱してから、流水で冷却後トルエンを更に 2.5 mL 添加し密栓して 5 分間振とうしてから 1500 rpm で 5 分間遠心する。このトルエン層を 1 mL 正確に小試験管に分取し、p-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 0.4 mL を加え室温 30 分後に測定波長 560 nm で吸光度を測定した。検量線用に H P 標準溶液 (1.25~10 μ g/mL) を検体溶液として同時に測定した。

・ ウロン酸含量測定

実際の皮膚中の GAG 量は、その構成糖であるウロン酸換算で算出できる。そこで、皮膚中のウロン酸を Schwartz の方法⁶⁷⁾ に準じて定量した。

1.5×1.5 cmの皮膚を切り取り、脂肪を取り除いてから皮膚を細かく切り刻みアセトン：エーテル（1:1）で1時間脱脂し、乾燥させる。そして、0.005 MのEDTA+0.005 MのCysteine 塩酸塩含有の0.1 Mのリン酸緩衝液（pH 6.5）1 mLで懸濁液を超音波ホモゲナイザーで30秒間で調製する。そして、パパン（2.4 IU/mL、和光純薬）を含む5 mL消化液で24時間65℃で分解させる。蒸留水で40 mLにメスアップし、12000 rpmで2時間遠心（4℃）後、その上清に1%濃度のcetyl pyridinium chloride（CPC）溶液を沈殿が生じるまで少しずつ添加し、4℃で一昼夜放置する。そして12000 rpmで1時間遠心（4℃）して得られた沈殿物を300 μLのn-プロパノールと75 μLの1%CPC溶液に溶解する。さらに5 mLの蒸留エタノールと飽和酢酸ソーダ溶液（80 μL）を加えて沈殿させ、沈殿物を0.5 mL蒸留エタノールと0.5 mLエーテルで洗浄し、風乾後1 mLの蒸留水で溶解し検体とする。そして、溶液中のウロン酸をカルバゾール法⁶⁸⁾にて定量した。

・正常ヒト表皮角化細胞を用いたサイトカインの遊離について

細胞は市販の正常ヒト表皮角化細胞（NHEK細胞、クラボウ製）を用い、無血清合成培地（HuMedia-KG2、クラボウ製）で培養し、継代3代目の細胞を本実験に供した。

・検体

Sq-00Hは定法に従って調製し、溶媒をジメチルスルフォキシド（DMSO）に置換ものを実験に用いた。

・サイトカイン測定

細胞に Sq-00H を 24 時間接触後、あるいは紫外線照射 24 時間後に培養上清を分取し、それぞれの ELISA 系 (BIOTRAK、Amersham Pharmacia Biotech 製) を用いて定量した。なお、IL-6 と TNF- α は高感度用の ELISA キットを使用した。

3.6×10^4 細胞を 12 穴のマルチプレートに播種し、4 日間の前培養を行い、サブコンフルエントな状態である 5 日目に $50 \mu\text{M} \sim 1000 \mu\text{M}$ の Sq-00H を接触し、24 時間後に培養液を分取し、ELISA 用検体とした。紫外線照射の場合は、4 日間の前培養後、培地を PBS (－) に置き換え、紫外線照射装置 312nm UV ランプ (VILBER LOURMAT 社製) を使用し、約 10 秒間照射した。この時の UV-B エネルギー量は $90 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ であった。そして無血清培地で更に 24 時間培養し、上清を ELISA 用検体とした。実験は N=3 で 2 回繰り返し、その平均値で表した。

2-2. 結果

・肉眼所見の比較

Sq-00H は塗布開始 1 週間目から変化が認められたのに対し、紫外線照射では 3 週目から変化が認められ、12 週間目で Sq-00H とほぼ同等の程度となった (Fig. 33)。全般的には、Sq-00H のほうが早期に皮膚変化が観察され、しかも常に紫外線よりも高いスコアを示す傾向であった。

Fig. 34 は、Sq-00H あるいは紫外線照射を 15 週間処置後の皮膚表面形態のシワ形成について背中側、側腹部、およびそのレプリカ像の写真である。シワの特徴は、紫外線照射皮膚が正中線に直角な方向で背部から腹部に向かって太いシワが縦走しているのに対し、Sq-00H 塗布では全方位的な様々な太さ (比較的小さいものが多い) の三角、菱形状のシワが網状に観察された。Sq-00H が比較的小ジワ誘発であるのに対し、紫外線では大ジワを誘発している傾向を示した。

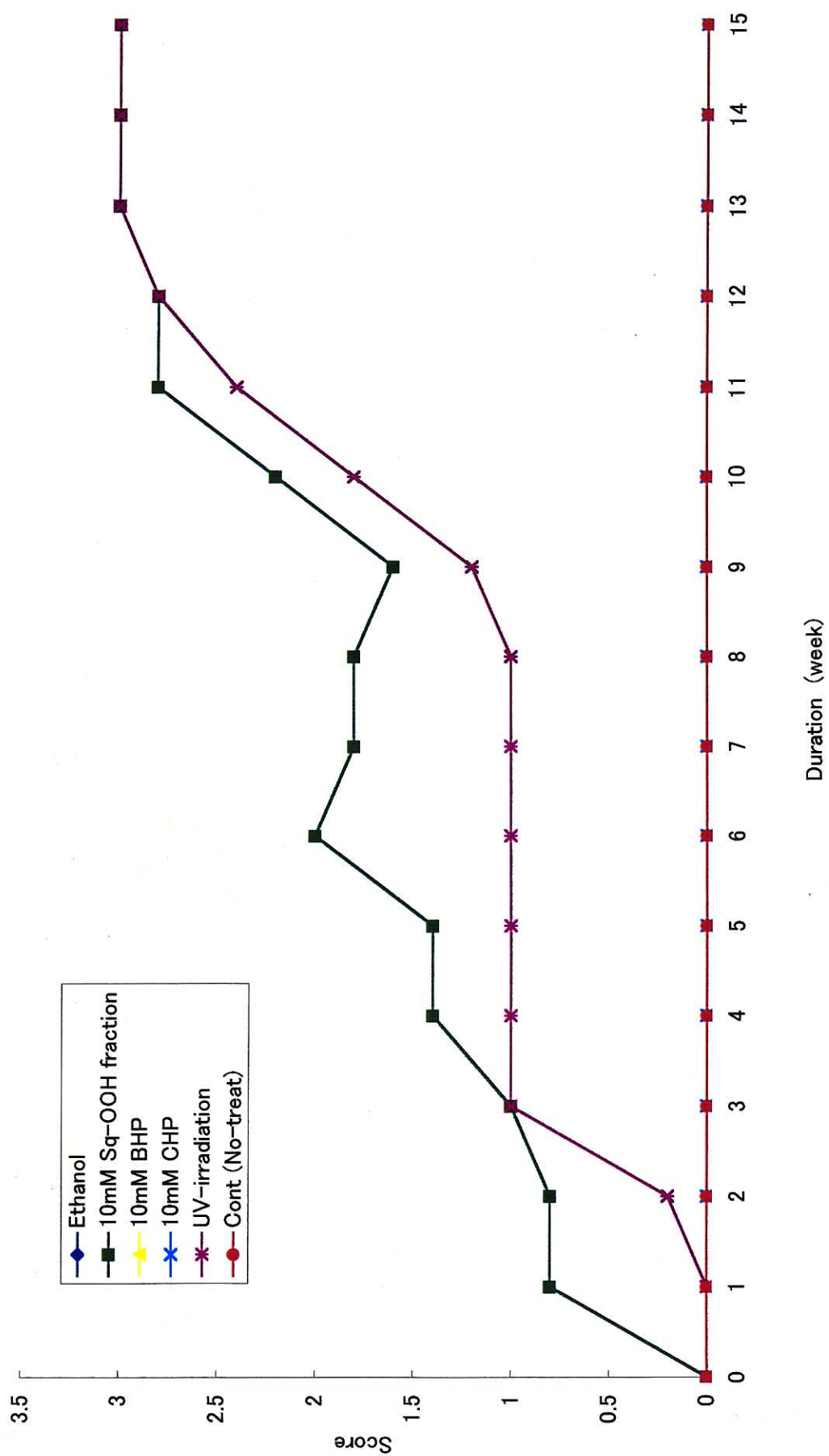


Fig.33 Changes of wrinkle score in the hairless mouse skin treated with various peroxides and UV.

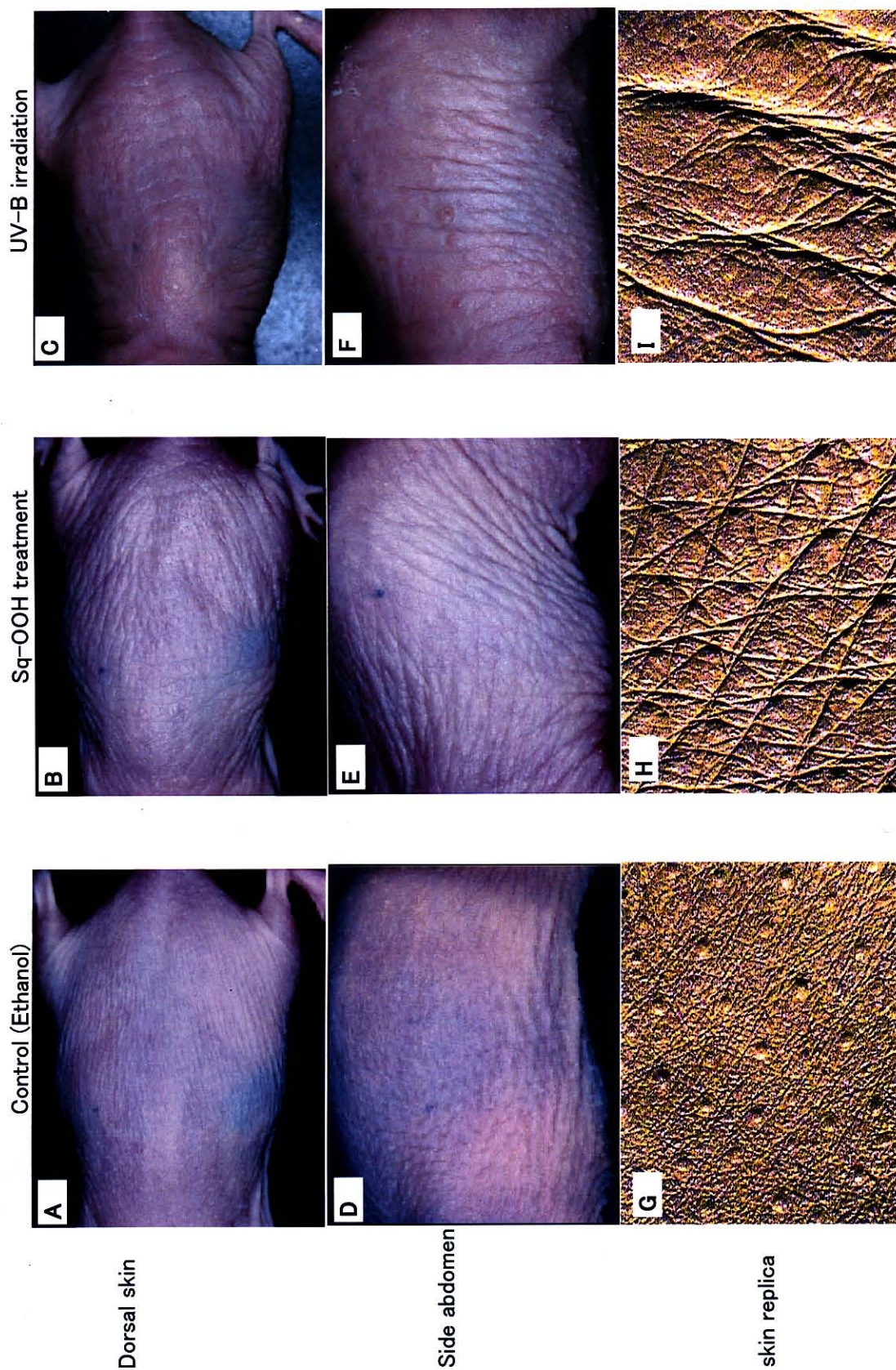


Fig. 34. Photographs of skin surface and replica impression of hairless mouse skin treated with Sq-OOH application or UV-B irradiation .

また、Sq-00H の場合、発生部位は頸部皮膚や腰部皮膚でもシワ形成が顕著であった。

紫外線照射皮膚では皮膚全体が肥厚気味であり、背部皮膚の厚さを皮膚を摘んでノギスで計測した結果、明らかに肥厚が見られた (Fig. 35)。

Sq-00H 塗布皮膚も僅かに肥厚していたが紫外線法ほど顕著では無く、他の有機 hydroperoxide では全く肥厚が認められなかった (Fig. 35)。

・皮膚シワ変化の比較

Sq-00H 塗布の場合は、皮溝・皮丘数、水平距離、および不規則度について検討した結果、前述の 3 週間塗布 (第 3 章 1-2) と同様にこれら肌荒れパラメータの悪化が、塗布期間に応じて進行していた (Fig. 36)。

一方、紫外線照射群は 15 週間目においては、Sq-00H 塗布群と同等の肌荒れパラメータ変化であった (Fig. 37)。他の有機 monohydroperoxide である BHP や CHP には、15 週間塗布しても 10 mM 濃度では全く肌荒れパラメータの変化は認められなかった。

次に、シワ形成のパラメータとして、シワ面積比率 (RWA) を画像処理法で計測し、それぞれの皮膚表面のシワを定量化した。その結果を Fig. 38 に示した様に、0 週と比較して Sq-00H 群と紫外線照射群のみに有意な RWA の上昇が観察され、ほぼ同程度の値を示した。一方、BHP や CHP には 15 週間塗布しても RWA の変化は認められなかった。

以上の結果、シワの程度を画像解析による数値化で見ると、Sq-00H と紫外線ではほぼ同程度のシワ誘発作用であった。しかしながら、形態的には大きく異なり、Sq-00H 塗布により特徴的な皮膚表面形態を呈することが示された。

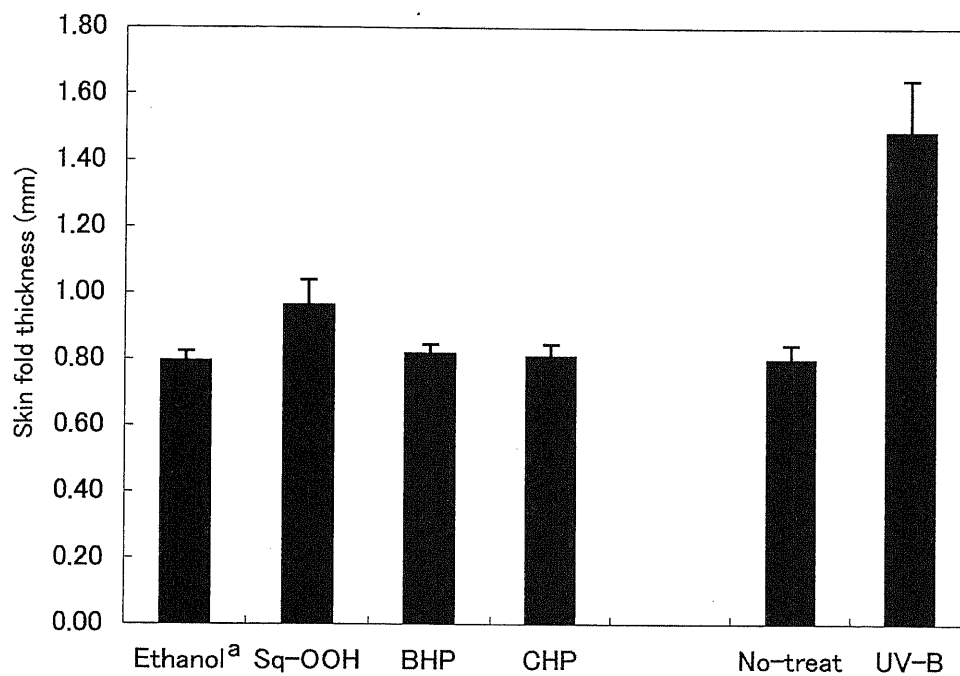


Fig.35 Skin fold thickness of hairless mouse treated with Sq-OOH, BHP, or CHP application, or UV-B irradiation for 15 weeks.

a: vehicle control, Each value expressed as mean SD of 5 animals/group.

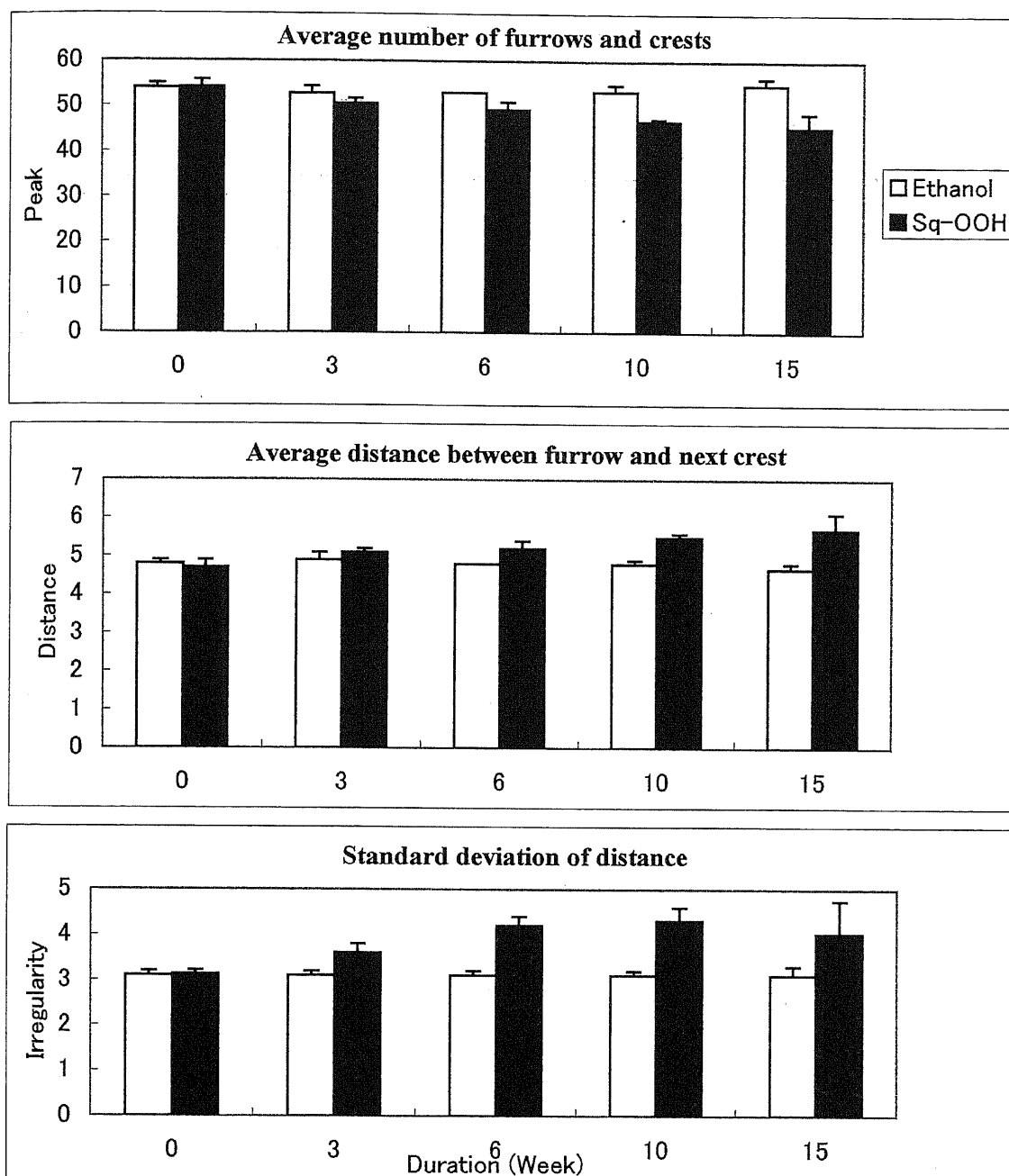


Fig. 36 Changes in skin roughness parameters induced by Sq-OOH fraction.

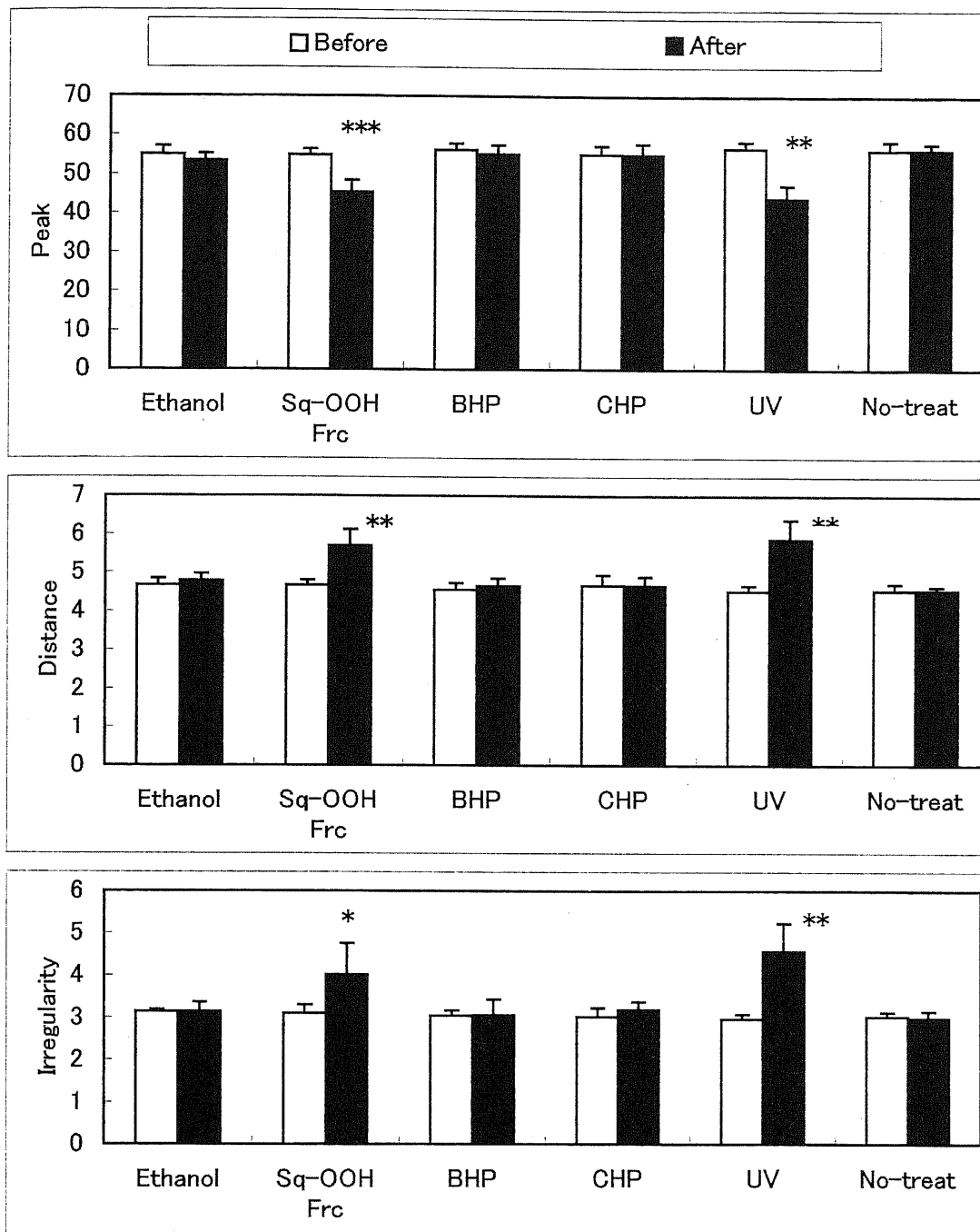


Fig. 37 Comparison of skin roughness parameters among the various hydroperoxides.

Each test sample was applied for 15 weeks, or UV-irradiation for 15 weeks.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$ (paired t test)

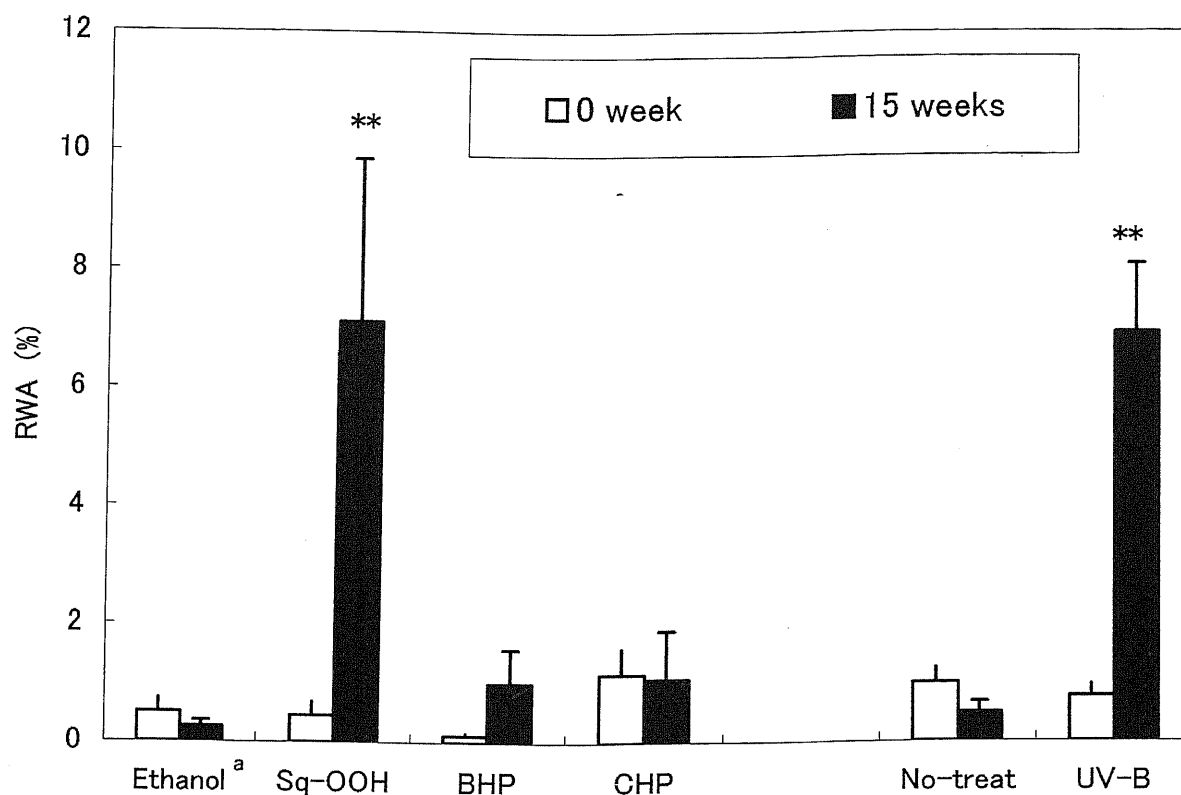


Fig.38 Comparison of wrinkle parameter of hairless mouse skin treated with Sq-OOH, BHP, or CHP application, or UV-B irradiation for 15 weeks.

a: vehicle control Each value expressed as mean $\pm$ SD of 5 animals / group.

Student paired t-test used to calculate significant differences.

** : $p < 0.01$ compared to before application (0 week).

・病理組織学的変化

Sq-00H の 3 週間連続塗布では、表皮肥厚が認められたが真皮への作用は全く認められなかった（第Ⅲ章 1）。そこで、今回は 15 週間塗布した時の皮膚病理組織への作用について検討した。その結果、表皮への肥厚は 3 週間塗布と同様に 15 週間塗布でも顕著な肥厚が認められた。真皮の肥厚に関しては、Sq-00H 塗布は対照のエタノール塗布のみに比べてほとんど違いが認められなかった。一方、紫外線照射皮膚では、Sq-00H よりも強い表皮肥厚が観察され、真皮の肥厚も顕著であった。

皮膚表面のシワに関しては、皮膚真皮層への変化が大きいと考え、コラーゲンとムコ多糖類への作用を中心に病理検査を行った。Fig. 39 は、Sq-00H 塗布と紫外線照射皮膚のコラーゲンへの影響をワンギーソン染色で調べた病理写真である。各群について、真皮コラーゲンの走行性および染色性について所見をとると、以下の①～④ように評価された。

① コラーゲン線維の走行性の乱れ（－：無，±：僅かに，＋：明瞭）

エタノール群では（－：4/5、±：1/5）、無処置群では（－：5/5）で陰性であった。紫外線照射群では（＋：5/5）、Sq-00H 群では陽性（＋：4/5）が認められた。明らかに、紫外線照射群のほうが真皮上層にかけて走行性の乱れが顕著であった。

② コラーゲン線維の染色性の低下（－：無，±：僅かに，＋：明瞭，++：強度）

エタノール群では（－：5/5）、無処置群では（－：5/5）で陰性であった。紫外線照射群は真皮上層部の広い範囲で（++：5/5）陽性であった。Sq-00H 群は真皮上層部、表皮直下及び皮脂腺周囲で（＋：3/5）顕著に認められた。

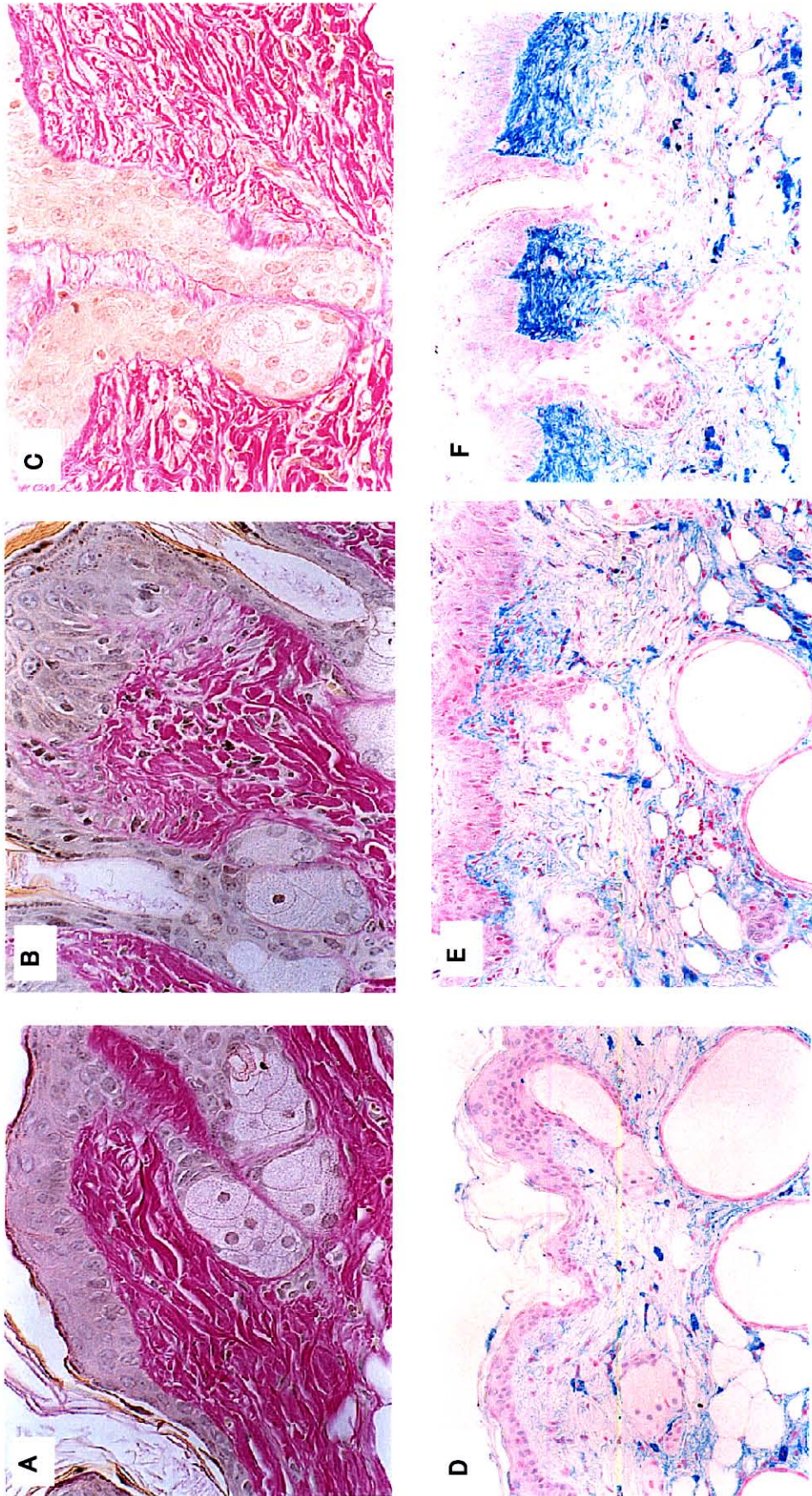


Fig.39 Histological findings of mouse skin treated with Sq-OOH application or UV-B irradiation.

(A) (D): Control, (B) (E): Sq-OOH treatment, (C) (F): UV-B irradiation,

(A) (B) (C) : Van Gieson stain for collagen (x 394) , (D) (E) (F) : Müller-Mowry's colloidal iron stain for GAGs (x 197)

③真皮上層でのコロイド鉄染色（－：無, ±：僅かに, +：明瞭, ++：強度）

真皮ムコ多糖の局在性については、コロイド鉄染色での病理所見を調べた。

真皮上層：エタノール群では（－：4/5、±：1/5）、無処置群では（－：5/5）で陰性であった。紫外線照射群では（++：5/5）。Sq-00H 群では細胞間に陽性（+：3/5）が認められた。

④表皮内でのコロイド鉄染色（－：無, ±：僅かに, +：明瞭, ++：強度）

表皮内では、エタノール群では（－：4/5）、無処置群では（－：5/5）で陰性であった。紫外線照射群は広い範囲で（+：2/5、++3/5）陽性であった。一方、Sq-00H 群は（+：3/5）に認められた。

これらの結果をまとめると、コラーゲン変性は Sq-00H と紫外線照射の両群で認められるが、変性の程度は紫外線照射のほうが強かった。ムコ多糖の染色性でも、紫外線照射群では染色性が高く、表皮内でも染色していたが、Sq-00H 群では染色性は高まるものの、程度は弱かった。

・皮膚中の hydroxyproline (HP) 含量

病理所見にてコラーゲン線維への作用が確認されたので、実際の皮膚中のコラーゲン含量を測定した。その結果、塗布 6 週目と 15 週目において皮膚単位面積あたり、重量あたりのいずれの分母においても、HP 含量は Sq-00H 塗布により対照の溶媒（エタノール塗布）群と比べて有意に低下していた（Fig. 40）。一方、紫外線照射群では重量比あたりの HP は減少していたが、単位面積あたりでは有意な差は認められなかった。また、BHP や CHP 塗布でも、HP 含量の増減は観察されなかった。

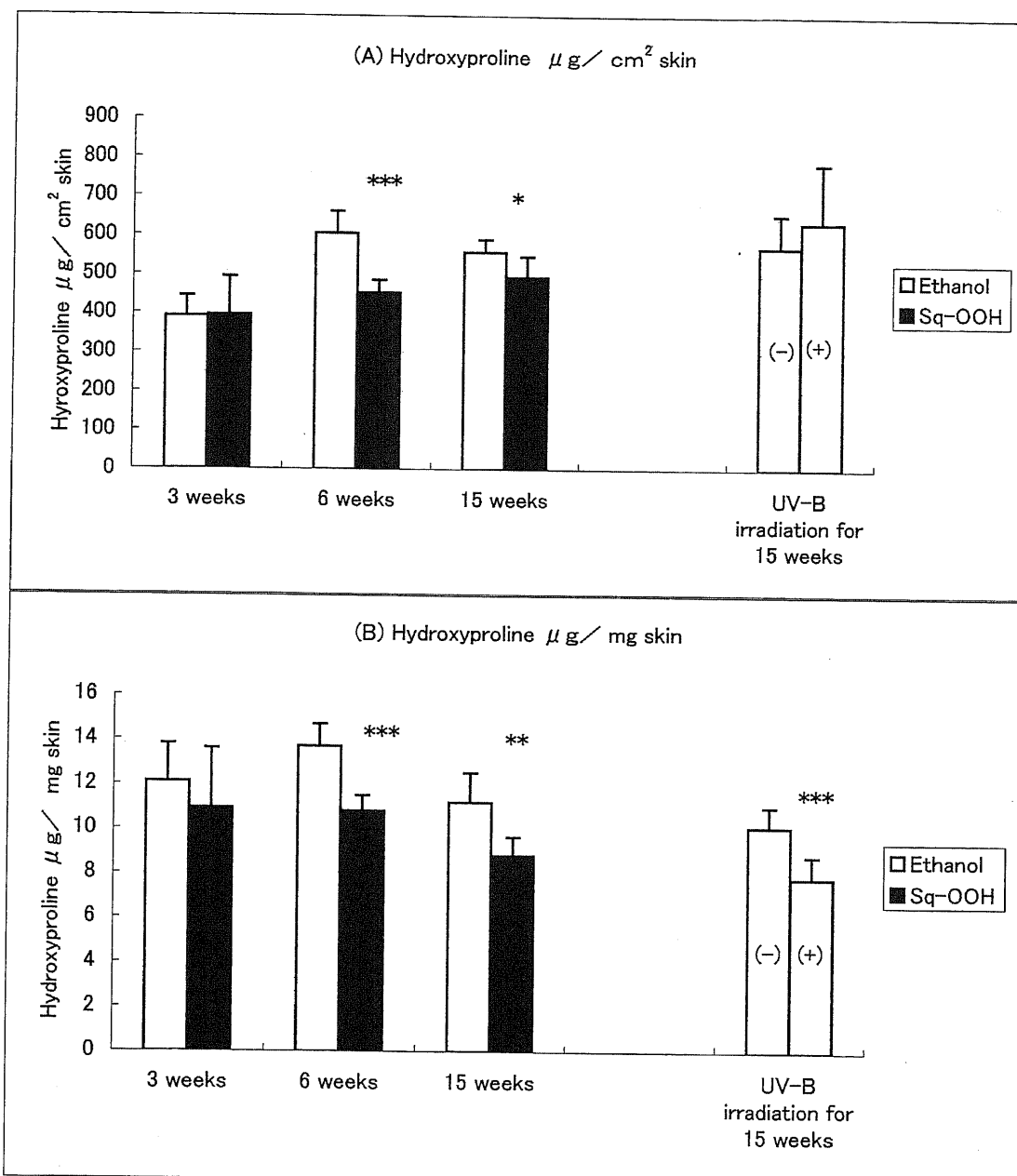


Fig.40 Changes in hydroxyproline contents in hairless mouse skin treated with repeated application of Sq-OOH or UV-B irradiation.

(A):Unit per area, (B): Unit per wet weight.

(-): Non-UV irradiation, age-matched control.

(+): UV-B irradiation for 15 weeks.

Each value was expressed as mean $\pm$ SD of 5 animals/ group. *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.005

・皮膚中のウロン酸含有量

病理所見において、紫外線照射群では非常に顕著な沈着が観察され、ウロン酸定量においても、重量あたり面積あたりの何れの単位でも有意なウロン酸量の増加が認められ、病理所見と一致した結果が得られた (Fig. 41)。

これに対し、Sq-00H 塗布群では 15 週間目において単位面積あたりのウロン酸量が有意に増加していたが、増加の程度は顕著ではなく病理所見で得られた結果と一致していた。BHP や CHP 塗布では、ウロン酸含量の増減は観察されなかった。

・表皮培養細胞からのサイトカイン遊離

Sq-00H 接触後あるいは紫外線照射後の NHEK 細胞からの IL-1 α 、IL-6、および TNF- α の遊離を ELISA 法にて測定した結果を Fig. 42 に示した。

その結果、Sq-00H 接触した細胞では IL-1 α が、紫外線照射では IL-6 と TNF- α が対照に比べて顕著に遊離していることが確認された。なお、Sq-00H は 200 μ M 以上でニュートラルレッド (NR) の取り込み阻害が観察されたが、形態的には正常であった。また、紫外線量は sub-lethal な照射量であり、細胞への形態的な影響は見られなかった。

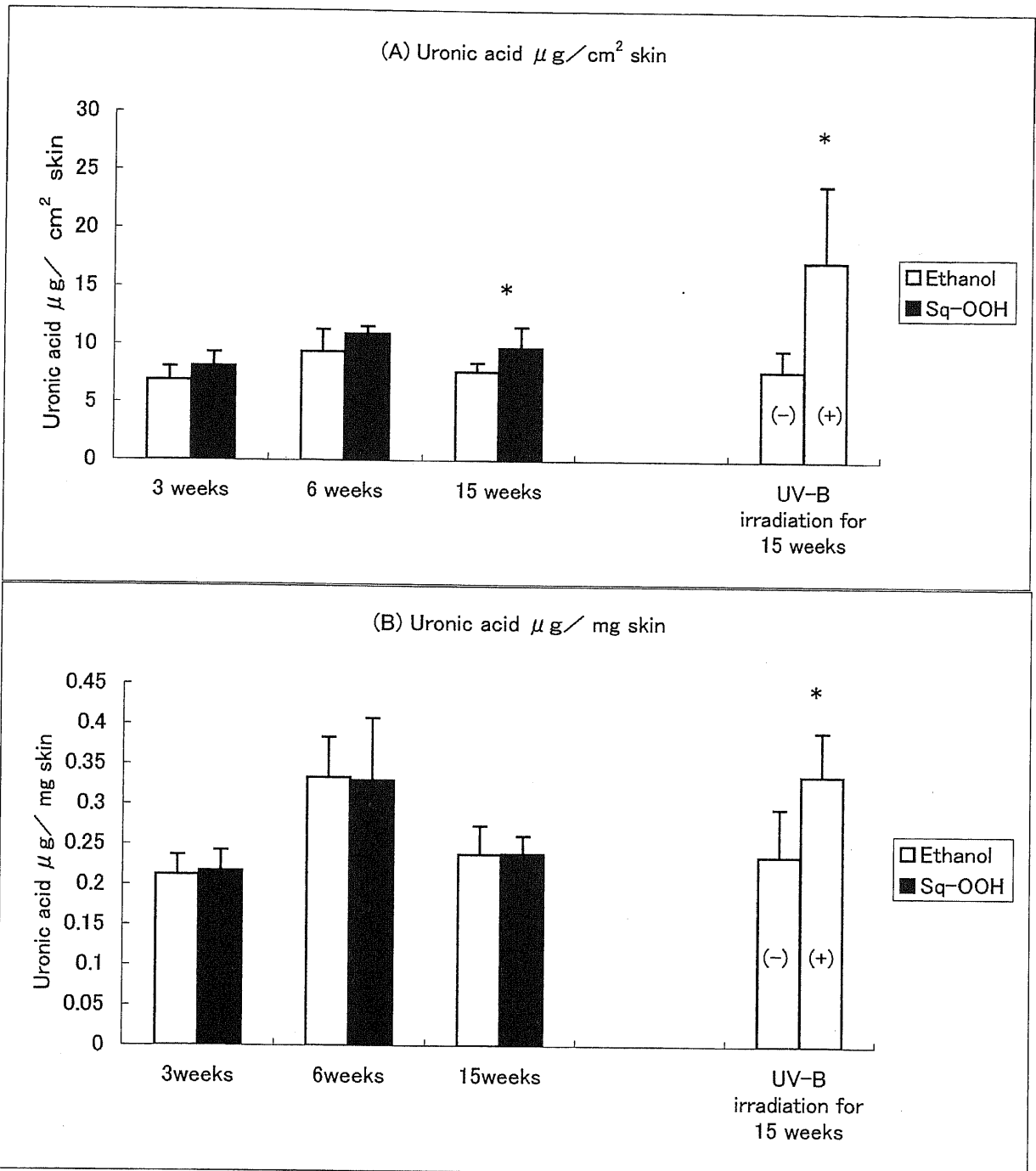


Fig.41. Changes in uronic acid contents in hairless mouse skin treated with repeated application of Sq-OOH or UV-B irradiation.

(A): Unit per area, (B): Unit per weight.

(-): Non-UV irradiation, age-matched control

(+): UV-B irradiation for 15 weeks. Each value was expressed as mean $\pm$ SD of 5 animals/ group. *:p<0.05,

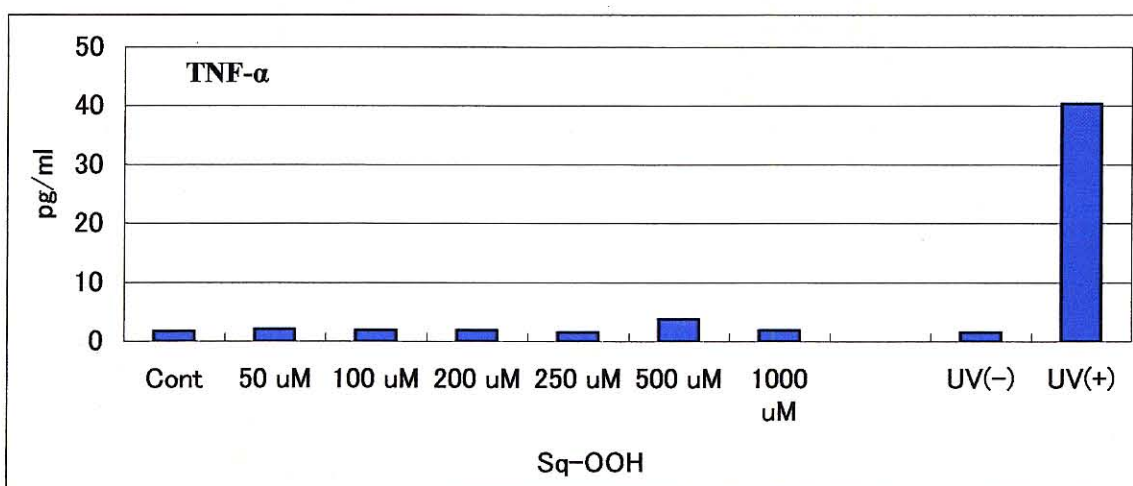
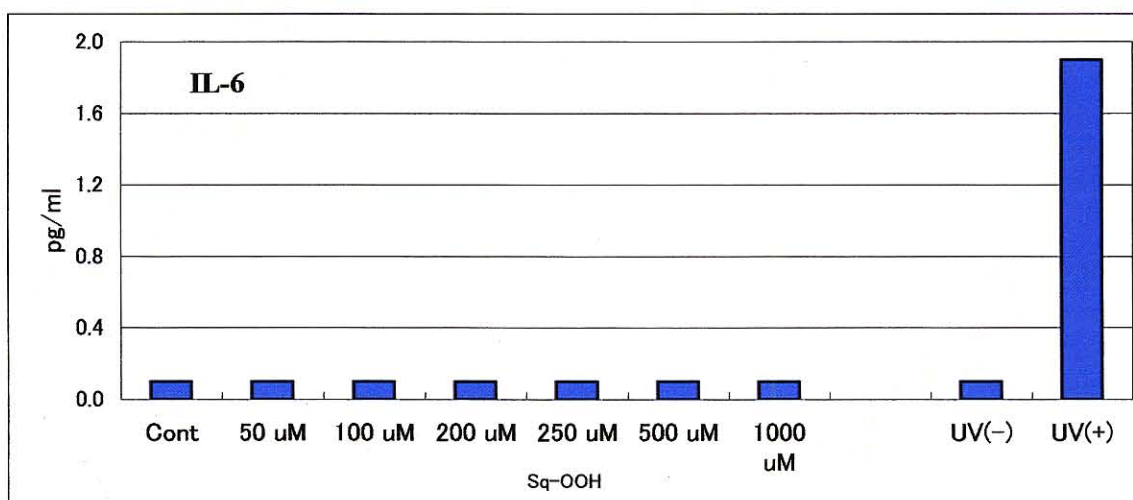
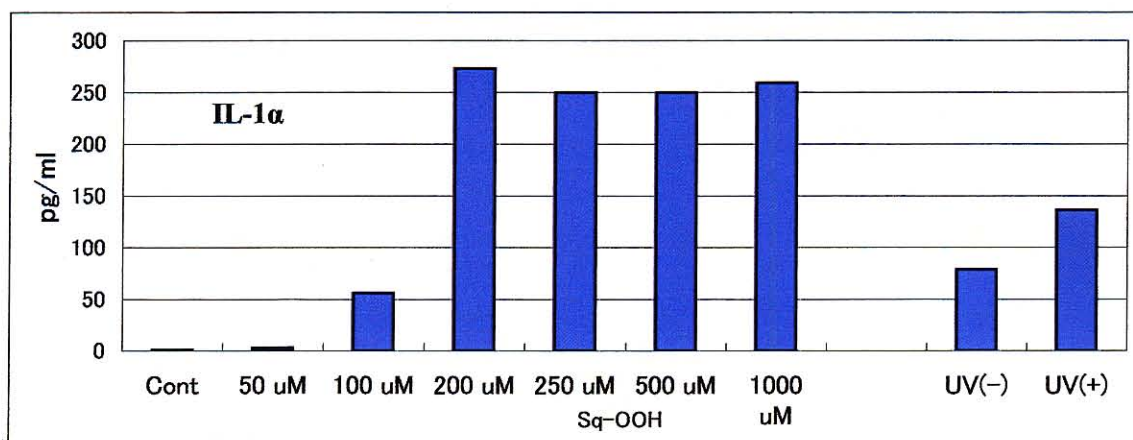


Fig. 42 Changes in levels of IL-1 α , IL-6, and TNF- α release from NHEK cells treated with Sq-OOH or UV-B irradiation.

Sq-00H と紫外線照射誘発シワの肉眼的・生化学的・病理組織的違い

マウスにおける Sq-00H 長期塗布皮膚と紫外線照射皮膚との違いについてまとめたものを、下記 **Table. 2** に示した。

Table. 2 Sq-00H長期塗布皮膚と紫外線照射皮膚との比較			
		Sq-00H長期塗布	紫外線照射皮膚
肌荒れパラメータ変化		顕著な肌荒れ	顕著な肌荒れ
シワ様皮膚の形成		明瞭なシワ	明瞭なシワ
	形態上の分類	縮緬シワ	線状・図形シワ
	シワ方向性	全方位性	正中線に対し直角方向
	シワ太さ	様々	太いものが多い
	シワ局在性	比較的均一	背中から腹部に集中
皮膚肥厚度		肥厚（表皮）	強度の肥厚（表皮真皮）
水分含量		低下	低下
病理所見	表皮肥厚	肥厚	強度の肥厚
	真皮肥厚	やや肥厚	強度の肥厚
	コラーゲン像	走行性の乱れ	走行性の乱れ、線維間隙の増大
	GAGの局在	真皮上層に散見	表皮内と真皮に多量
成分分析	コラーゲン量	減少	減少(重量比)
	GAG量	増加（面積比）	顕著に増加

これらの結果から、Sq-00H 塗布皮膚が従来の紫外線照射シワモデルとは異なり、より生理的老化に近似した新たなシワ発生モデルとして利用可能であることが示された。

2-3. 考察

Sq-00H 分画物の累積塗布では、3 週間よりも 6, 10, 15 週間とより長期に塗布するほど皮膚表面形態は変化し、肌荒れパラメータが悪化していた。また、3 週間塗布では表皮の肥厚は認められたが、真皮への作用はほとんど見られず、形成されたシワ皮膚も塗布を中止すると回復する可逆的なものであった。しかしながら、15 週間塗布すると形成されたシワは固定化され、真皮成分への影響も十分に推測された。シワ形成においては、真皮マトリックスの変化が重要な因子になっている。紫外線照射皮膚部位の真皮マトリックス変化としては、①コラーゲン（膠原線維）量、②エラスチン（弾力線維）量、そして③プロテオグリカン（デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸）、グリコサミノグリカン（ヒアルロン酸）の量について報告されている。

①のコラーゲン量については、ヒト光加齢皮膚では減少することが Kligman により報告⁶⁹⁾されているが、ヘアレスマウス皮膚については、紫外線照射により不変^{70, 71)}の結果と、減少^{72, 73)}の結果が報告されている。今回の紫外線照射実験では、15 週間では HP 含量（単位面積あたり）は不変であった。一方、Sq-00H 塗布は HP 含量の有意な減少を示し、紫外線皮膚とは異なる傾向を示した。紫外線は照射すると皮膚が大幅に肥厚している為、単位面積当たりでは上昇するが皮膚重量単位では減少することがあり⁷⁴⁾、データ解釈には慎重さが必要である。Sq-00H 塗布では、紫外線照射のような真皮成分の大きな増加は認められない為、皮膚重量単位と単位面積の両方で解析が可能であった。

②のエラスチンについては、今回の 15 週照射実験でも、特にエラスチンへの大きな作用は認められなかった（データ未発表）。シワとの関連では、皮膚表面形態にとって、エラスチンの変性は大きな因子となるが、病理組織変化で

はその質的な変化を捉えるには限界があり、更に検出感度の高い成分分析が必要であろう。

③のグルコサミノグリカン（ムコ多糖、例えばヒアルロン酸）の量については、紫外線照射皮膚部位では病理検査やウロン酸の分析から、著明に増加していることが報告されている^{75,76)}。今回の15週間の紫外線照射でも病理所見では著明なGAG沈着が真皮上層のみならず表皮内にも散見された。一方、Sq-00H塗布部位でも同様なGAGの存在が対照部位に比べて明らかに多く、紫外線照射ほどの強度ではないが、真皮マトリックス中での多糖合成にSq-00Hが影響を及ぼしていることが推察された。そこで、Sq-00H塗布皮膚においてウロン酸の定量を試み、単位面積あたりのウロン酸含量がSq-00H塗布で上昇していることを確認したが、その程度は紫外線照射皮膚に比べると低いものであった。

第I章3に記述したように、Sq-00Hの分解において、活性酸素（スーパーオキシドアニオン、 O_2^- ）を発生する可能性が示唆された。田中らは線維芽細胞を用いた *in vitro* 実験で、 O_2^- が真皮マトリックス系への影響として、コラーゲン産生の低下とGAG合成の亢進を認めており⁷⁷⁾、今回の15週間Sq-00H塗布した場合と同様な結果を表していた。実際の皮膚において、Sq-00Hの分解と発生してくる活性酸素種は不明であるが、Sq-00Hを用いた *in vivo* 系でも同様な活性酸素による真皮マトリックスへの影響が起きている可能性が示唆された。

病理所見では、対照群とくらべSq-00H塗布群では真皮層の肥厚が認められるものの軽微であった。コラーゲン走行性は多方向に褶曲した形態を取っていた。染色性については正常な染色性を呈している繊維は比較的多いが、表皮直下、特に皮脂腺周囲に染色性の低下が顕著であった。このことから、真皮にお

いて収縮および歪み等の正常とは異なる繊維の緊張状態が生じていることが明らかであり、皮膚表面形態の変化（菱形のシワ様構造）はこのコラーゲン変性が影響している可能性が示唆された。また、このようなコラーゲン繊維の変化は真皮層の炎症症状にともなう変化というよりはむしろ表皮側から浸透してきた Sq-00H またはその代謝分解物による影響の可能性が考えられた。一方、紫外線照射群では真皮上層部の広範囲にわたって繊維自体の染色性の低下とともに、コラーゲン繊維が細く繊維間にすき間が生じ縞状の形態を示した。また、真皮層の肥厚が顕著であり、皮膚の弾力性、柔軟性に乏しい状態であった。真皮の組織変化はコラーゲン繊維に注目した場合、Sq-00H 群と紫外線照射群では明らかな形態的違いが生じ、これらの結果が皮膚表面でのシワの発生の差異に影響していることが考えられた。

コラーゲン量は合成量と分解酵素（コラゲナーゼ）およびそれに対するインヒビターのバランスによって調節されている。そして、皮膚の真皮マトリックス代謝については、サイトカインネットワークによって制御されていることは周知のことである。皮膚細胞に紫外線を照射すると、表皮細胞や線維芽細胞からは IL-1 α 、IL-6、TNF- α 等の炎症性サイトカインが分泌されることが知られている。具体的には、IL-1 α 、TNF- α はコラーゲン生成量を増加させる一方で、collagenase を活性化させ⁷⁸⁾、IL-6 は GAG の合成を促進すること⁶³⁾が知られている。Sq-00H 暴露された表皮細胞では、細胞毒性レベルでも TNF- α や IL-6 の分泌が認められなかった点は、紫外線によるサイトカイン分泌パターンと異なる点であった。Sq-00H 処置による真皮コラーゲン量の減少は、この IL-1 α と TNF- α の量的な差が紫外線照射皮膚と異なることに起因しているのかもしれない。UV-A 紫外線照射の場合、一重項酸素を介した IL-1 α や IL-6 の mRNA 活性化が起こり、collagenase が活性化されることが *in vitro* で報告されて

いるが⁷⁹⁾、Sq-00H の場合は一重項酸素よりもむしろスーパーオキシドが発生している可能性が高いこと（第 I 章 3 参照）から、活性酸素種の違いがサイトカイン産生の差異となっている可能性も考えられた。

このように、Sq-00H 処置によるヘアレスマウス皮膚中の HP 減少の理由として、IL-1 α のような炎症性サイトカインの産生量が関与していることが考えられた。一方、紫外線照射は TNF- α とともに IL-6 を分泌させることで GAG 合成促進し、ウロン酸の増加や GAG の沈着増強がより強く認められたと考えられた。

実際の皮膚上においては、Sq-00H の作用と紫外線による作用とが混在した状態で、活性酸素が発生し、種々のサイトカインが遊離され、結果的に皮膚表面形態への変化や真皮マトリックスへの作用が発現しているものと推察された。

3. 小括

・Sq 過酸化物の皮膚への長期的暴露による影響を検討する為に、ヘアレスマウス皮膚に 21 日間の累積塗布を実施した。その結果、用量依存的に皮膚表面形態の変化（皮溝・皮丘数の減少、水平距離の延長、不規則性の増加）や皮膚水分低下作用が認められ、肉眼的観察では、不規則の高い明瞭な縮緬シワ

(crinkle) が認められた。これらの変化は、Sq-00H に特異的な作用であり、還元体の Sq-0H や他の hydroperoxide (BHP, CHP) では観察されなかった。

・更に長期間の Sq-00H 分画物の連続塗布を実施し、シワ形成と真皮への作用、および紫外線照射によるシワ皮膚と、形態的变化とシワ形成能について比較した。その結果、皮膚表面形態の変化・表皮肥厚とともに、Sq-00H 連続塗布では真皮コラーゲン量の指標となる HP の減少が認められた。同様なシワ発生系の動物モデルである紫外線照射法によるシワ皮膚との形態的・生化学的・病理的な特徴の差異について比較検討し、Sq-00H 塗布皮膚が従来の紫外線照射シワモデルとは異なった新たなシワ発生モデルとして利用可能であることが示された。

・シワ皮膚の作用メカニズムとしては、皮膚上で生成した Sq-00H が皮膚上あるいは内部で分解され、活性酸素（例えばスーパーオキシド, O_2^- ）や Sq ラジカル発生による酸化的ストレス作用と、これらに随伴する各種のサイトカイン遊離により、表皮増殖性の亢進と表皮肥厚化が無秩序に起きると考えられた。その結果、表皮角化が亢進、皮膚表面では縮緬シワが形成され、真皮ではコラーゲン量低下と酸性ムコ多糖の増加に伴う変性により、皮膚表面で特徴的なシワ形成が起きたと考えられた。

IV. スクアレンモノヒドロペルオキシドの皮膚グルタチオンへの作用

緒言

グルタチオンはほとんどの哺乳動物細胞に認められるトリペプチドの抗酸化物質であり、毒性物質の代謝に寄与し、また活性酸素からの酸化ストレスに対して細胞を保護する抗酸化的な作用が知られている。そこで、Sq-OOH により酸化ストレスを受けた時の皮膚中のグルタチオン（還元型と酸化型）の量的な変化について、ウサギ耳介皮膚および培養皮膚細胞を用いて検討した⁸⁰⁾。また、グルタチオンと Sq-OOH との相互作用を明確にするために、GSH 枯渇剤（DL-buthionine-S, R- sulfoximine 以下 BSO と略、diethylmaleate 以下 DEM と略）で前処置した場合の Sq-OOH の作用を、コメド誘発性と培養細胞毒性への影響の面から検証した⁸⁰⁾。更に、Sq-OOH の皮膚 GSH 関連酵素系への影響を調べるために、抗酸化酵素系である GSH-peroxidase、catalase、抱合解毒酵素系の GSH-S-transferase、そして GSSG から GSH へ還元する GSH-reductase の各酵素活性に及ぼす Sq-OOH の影響についてウサギ耳介皮膚を用いて検討した。

1. 皮膚内グルタチオンへの作用

Sq-OOH 塗布による GSH の質的量的変化についてウサギ耳介皮膚を用いて検証するために、皮膚内の GSH と GSSG を同時に計測可能な HPLC 法⁸¹⁾を用いて、Sq-OOH の皮膚への酸化ストレスによるグルタチオンの変動について検討した。

1-1. 実験材料および方法

・試薬

GSH, GSSG は Sigma 製を使用し、4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole

(ABD-F)と 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate (SBD-F)は同仁化学から購入した。

・スクアレン過酸化物の調製

I 章 2 の調製法に準じ、UV-A 照射法によりスクアレン過酸化物を作製し、HPLC で精製分離後に LPO 値をデタミナー-LPO キット（協和メディクス製）で測定し、メタノールで各濃度（1, 3, 10 mM）の Sq-00H を調製した。

・動物

日本白色ウサギ（JW、体重 2～3 Kg、北山ラベス）のヘルシーグレードを使用し、餌は市販の RC4（オリエンタル酵母製）を与えた。

・検体塗布法および皮膚切片分取

各動物の片耳内側に検体 1 mL（対照はメタノール）を耳介皮膚に均一に開放塗布し、最終塗布 24 時間後に pentobarbital-Na 塩を耳静脈に過剰投与する。安楽死させてから、耳介内側の中央部を手術用メスで切り取り、ピンセットを用いて表皮側を軟骨部分から剥離し、氷上で冷却しながら余分な皮下脂肪を除去し、重量測定後-80 °Cのフリーザーに使用直前まで冷凍保存した。

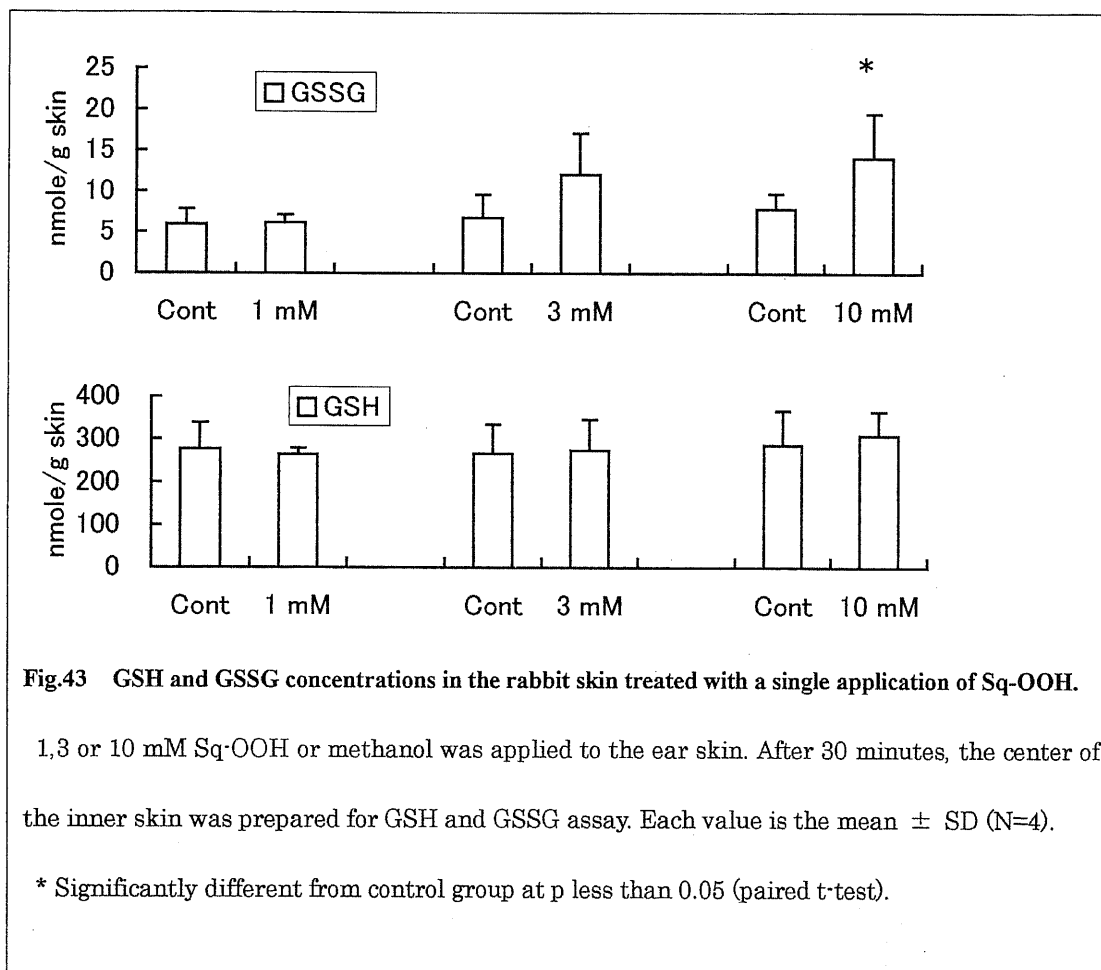
・GSH と GSSG の測定

皮膚組織は、3.3 %の 5-スルフォサリチル酸-EDTA 溶液でホモジネートし、その 0.3 mL に 2 M のクエン酸液 0.2 mL 加え、GSH 測定溶液とした。測定は Toyooka らの開発した GSH と GSSG が同時定量できる蛍光-HPLC 法（ABD-F と SBD-F 試薬法）に準じた⁸¹⁾。すなわち、組織ホモジュネート液に 1 mM の EDTA 含有ホウ酸緩衝液（pH 9.3）を溶媒とした ABD-F 溶液で 60°C 水浴中で 5 分間加熱し、冷却後未反応の ABD-F を酢酸エチルで洗浄する。水層を分取し

Tri-n-butylphosphine 存在下 SBD-F 溶液添加で 60 °C、20 分間加熱し、冷却後その水相溶液を逆相カラム-蛍光検出器 (Ex. 380 nm、Em. 510 nm) の HPLC で分析し、GSH と GSSG を同時定量した。

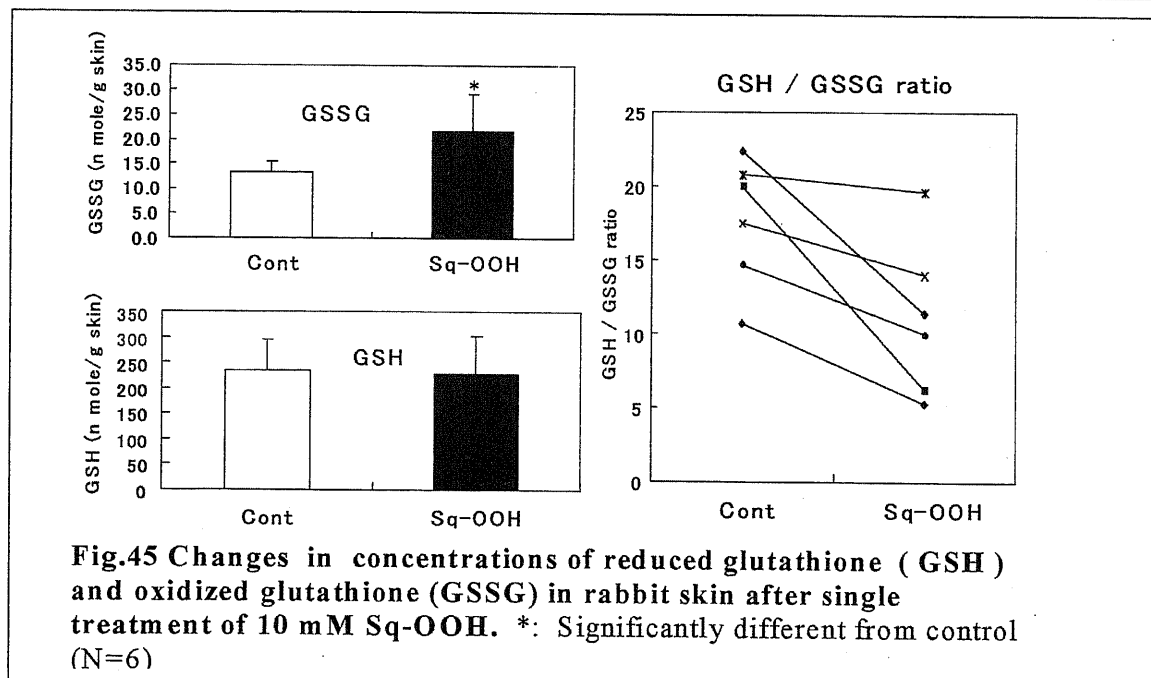
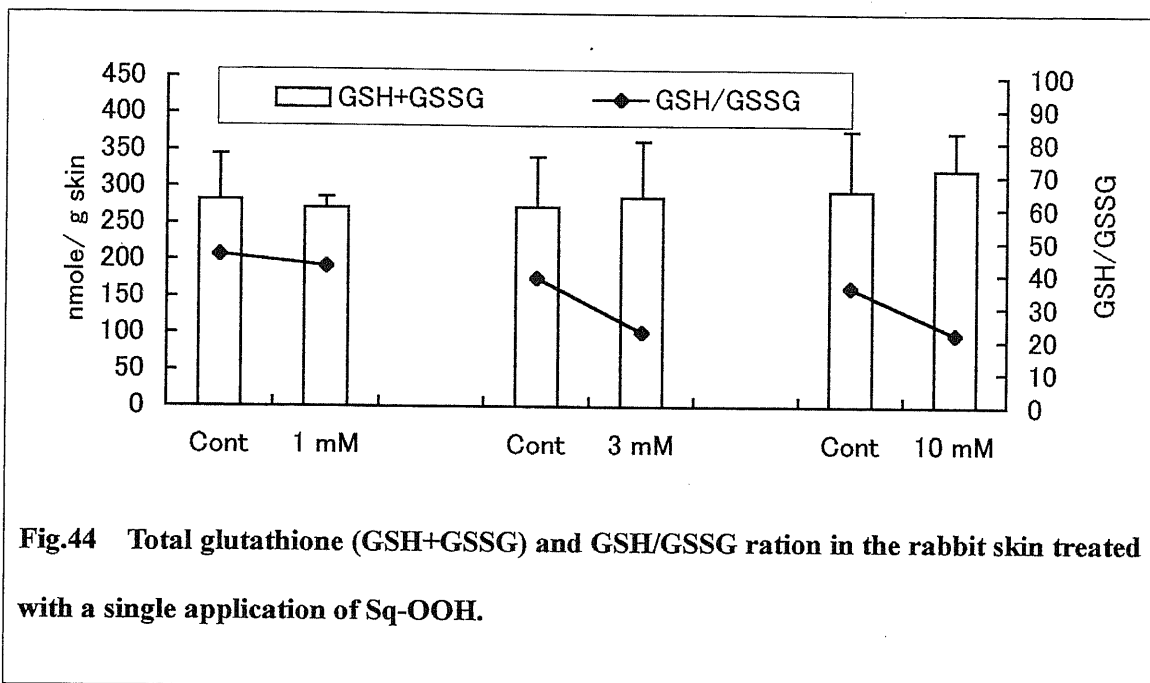
1-2. 結果

Fig. 43 は、1, 3, 10 mM の Sq-OOH を塗布し 30 後の皮膚内 GSH と GSSG 量を表したものである。



1 mM の Sq-OOH では GSH, GSSG とともに差は無いが、GSSG 濃度に関しては 3 mM から増加傾向を示し、10 mM では有意な増加が観察された。GSH 濃度は、

10 mM の Sq-OOH 塗布でも変化無かった。これらの結果を GSH/GSSG の比で表すと以下 Fig.44 のように表され、3 mM と 10 mM の Sq-OOH で明らかに低下しており、酸化ストレスが皮膚中で起きていることが示された。



GSH/GSSG 比を更に各個体ごとに比較しても、全例で低下していた (Fig. 45)。

この変化は、しかし持続的な作用ではなく 10 mM 濃度で単回塗布後 3 時間目、

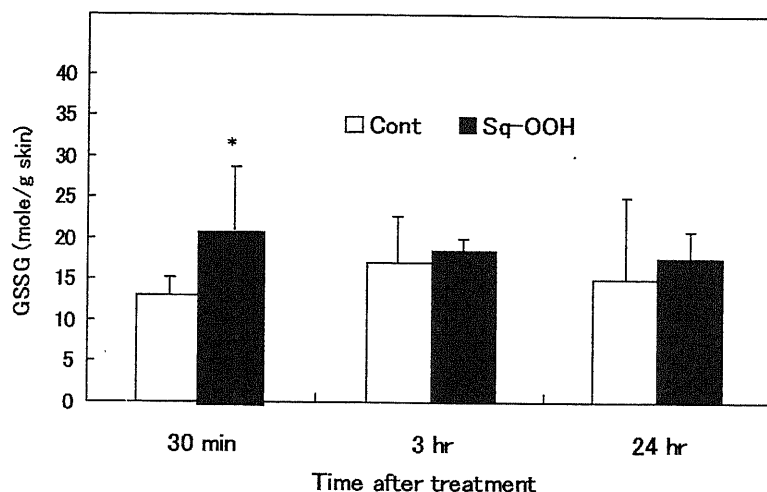


Fig.46 Changes in levels of oxidized glutathione (GSSG) in the skin after treatment of 10 mM Sq-OOH.

(Significantly different from the control value at * $p < 0.05$)

24時間目ではGSSG量の増加が見られなくなり、Sq-OOH塗布によるGSSGの増加は一過性の作用であることが示された (Fig.46)。

一方、1～10 mM濃度でSq-OOHを週3回の割合で2週間塗布した場合では、わずか1 mM濃度のSq-OOHでも有意なGSSG量の増加が観察された (Fig.47)。

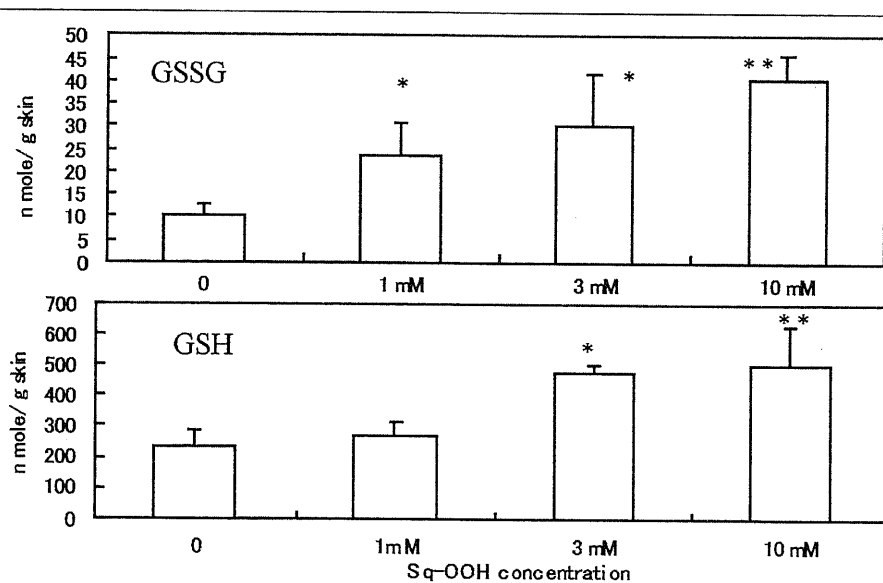


Fig.47 Changes in levels of GSH and GSSG in the skin treated with various concentration of Sq-OOH topically 3 times per week for 2 weeks. (Significantly different from control value at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=3$)

間塗布した場合は、わずか1 mM濃度のSq-OOHでも有意なGSSG量の増加が観察された (Fig.47)。この時、GSH/GSSG比でみると、対照群 23.4 であるのに対し、Sq-OOH塗布では12.4～18.2を示し、

明らかにGSHよりもGSSGが増加しているデータが得られた。

尚、BHPについても同様に検討したが、Sq-OOHのような作用は、ウサギ耳介皮膚では認められなかった。

1-3. 考察

実際の *in vivo* 皮膚酸化ストレスで GSH 量が変動する例としては、紫外線単回照射^{82,83} や PUVA (8-MOP と UV-A 照射)⁸⁴⁾ での作用が報告されているが、いずれも一過性であり、皮膚では急激な回復作用が認められており、酸化ストレスに対する防御的な生体恒常性が皮膚には備わっていることがわかる。今回の結果でも、1 回塗布では 30 分後に GSSG の増加は認められたものの、3 時間目では回復していた。しかしながら、6 回塗布では僅か 1 mM 濃度の Sq-00H で GSSG が増加し GSH/GSSG も低下したことから、たとえ低濃度の累積的な Sq-00H 暴露でも、恒常的な酸化ストレス状態が皮膚局所で発生している可能性が推察された。長期的な過酸化物の暴露により慢性的な GSH の低減した皮膚では、種々の酸化ストレス (例えば紫外線による損傷) に対する抵抗力が低下していることが考えられ、皮膚真皮でのコラーゲンの重合化やメラニン生成、あるいは光老化にも影響することが推察された。

一般に、細胞質内 GSH プールの代謝回転は速く、一過性の GSH の減少では皮膚への視覚的な作用はほとんど認められないのかもしれない。しかし、皮膚中の還元型 GSH から酸化型の GSSG への変換が起きることで、酸化ストレスに起因したシグナル伝達が生体内の抗酸化系やタンパク質誘導、遺伝子発現にまで関係してくる可能性があると考えられた。

長期的かつ持続的な酸化ストレス作用は、皮膚の抗酸化能にも影響することが考えられる。河野らは、Sq-00H/Sq 比が 20 才代の皮膚抗酸化能が完成している時期がもっとも低く、乳児のような調節機構の未熟な場合や加齢とともに皮膚の酸化防止能力が低下した場合に、Sq-00H/Sq 比が高くなる傾向を示した²⁴⁾。このことは、Sq-00H の酸化ストレスに対する防御的な生体恒常性は年齢と共に変化し、皮膚の抗酸化能としての GSH 濃度や GSH-peroxidase のような抗酸化酵

素と Sq-00H の皮膚への感受性が密接に関係していることを示しているのかもしれない (IV 章 4 参照)。

2. 細胞内グルタチオンへの作用

Sq-00H の酸化ストレス作用を培養細胞レベルで検証するために、ウサギ耳介皮膚から調製した線維芽細胞を用いて、細胞内 GSH, GSSG レベルの変動を検討した。

2-1. 実験材料および方法

・ 培養細胞の調製

II 章 3 で記述したウサギ耳介内側皮膚の Explant 培養法⁸⁵⁾により、遊走してくる線維芽細胞を集め、初代培養 3 代目を本実験に供した。すなわち、ネンブタール過剰麻酔下でウサギ耳介皮膚中央部を切除し、70 %エタノールで消毒後、ピンセットで軟骨上の真皮上部皮膚を剥離する。再度、70 %エタノールで消毒後、直径 6 mm のパンチで円形に打ち抜く。これを洗浄溶媒 (100 unit のペニシリンとストレプトマイシン、0.25 μ g/ml のファンギゾン入りの Eagle MEM 培養液) にて良く洗浄してから、コラーゲンコートした培養 dish (Collagen Cellmatrix Type I -P、新田ゼラチン) にこの皮膚片を載せ、15 %牛胎児血清 (FCS) 含有 Eagle MEM 培地を満たし、95 %炭酸ガスインキュベーター内で培養し、2 週間後に皮膚組織から遊走している線維芽細胞を 0.25 %トリプシンで剥離して集めた。そして、セルカウントして -80 °C 凍結保存し、使用時に融解して大量に培養してから使用した。

・ GSH と GSSG の測定

細胞は、ラバーポリースマンでかき集め、3.3 %の 5 - スルフォサリチル酸

- EDTA 溶液でホモジネートし、その 0.3 mL に 2 M のクエン酸液 0.2 mL 加え、GSH 測定溶液とした⁸²⁾。測定は Toyooka らの開発した GSH と GSSG が同時定量できる蛍光-HPLC 法 (ABD-F と SBD-F 試薬法) に準じた⁸¹⁾。単位は、シャーレー当たりの細胞数をカウントし、細胞 100 万個あたりの GSH、GSSG 濃度で表した。

・ Sq-00H の接触

直径 6 cm の培養シャーレーに 40000 個の細胞を播種し、4 mL の 10%FCS 含有 Eagle MEM 培地で 4 日間の前培養を行い、コンフルエントな状態になったところで、Sq-00H を接触させた。培地を除いてから、Hanks 緩衝液に Sq-00H を DMSO にて可溶化させたものを接触させた (DMSO の最終濃度は 0.5 % 以下)。

30 分間、炭酸ガスインキュベーターの中で培養してから、検体を除き Hanks 緩衝液で洗浄してからラバーポリースマンでかき集め、遠心操作 (1000 回転 5 分間) 後、細胞ペレットを 3.3 % の 5 - スルフォサリチル酸 - EDTA 溶液でホモジネートし、グルタチオン分析を行った。

2-2. 結果

Sq-00H の濃度は、今回の接触条件では細胞毒性が全く出ない濃度 0.5 mM と sub-toxic dose である 2.5 mM の 2 濃度で接触させた。その結果、GSH は濃度と共に減少し、GSSG は増加する傾向を示し、典型的な細胞内 GSH-depletion (枯渇作用) が観察された (Fig.48)。

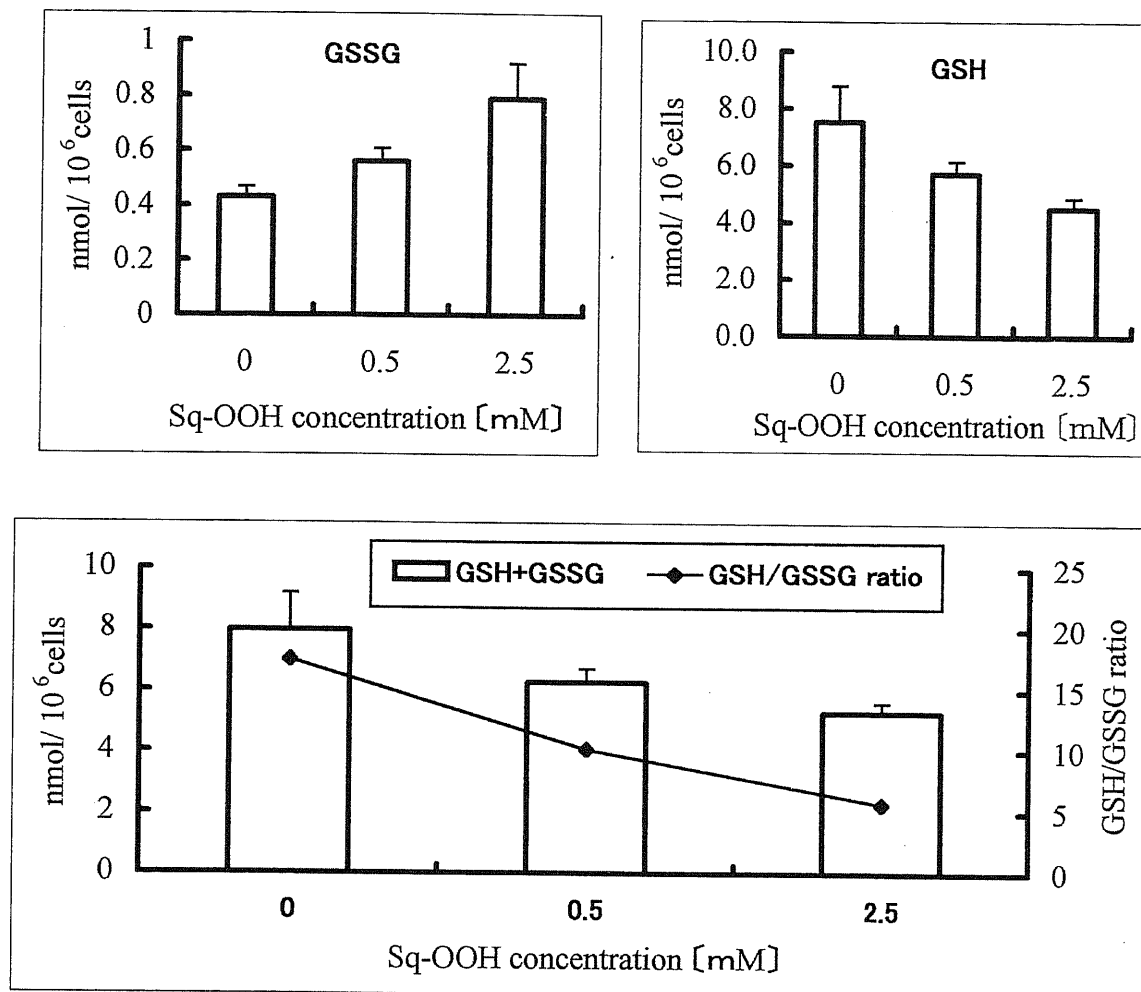


Fig.48 Changes in levels of cellular glutathione in skin fibroblasts treated with 0.5 or 2.5 mM Sq-OOH. Fibroblasts were cultured for four days to a confluent state, and then cells were exposed to 0.5 or 2.5 mM Sq-OOH for 30 minutes. The values are the mean values $\pm$ SD of three experiments.

2-3. 考察

細胞レベルで Sq-OOH 暴露後の GSH/GSSG を検討した結果、実際の皮膚の結果とは異なり、GSSG の増加と共に GSH と総グルタチオン量の減少が認められ、明瞭なグルタチオン枯渇作用が観察された。皮膚では、局所の GSH 減少が起こる

と、周りの組織からグルタチオンが動員されるとともに GSH 合成酵素の活性化がおこり、GSH-reductase による GSSG から GSH への還元再生反応が急速に起こる。同様な現象はヒト線維芽細胞に対する CHP の暴露でも観察され⁸⁷⁾、短期暴露ではグルタチオン量が減少するが長期暴露では回復し、この反応はペントースリン酸経路を介した NADPH の消費を伴う反応であることが報告されており、Sq-00H の場合も同様な機作が考えられた。また、GSH/GSSG の変動は、細胞毒性が誘発される以下の濃度でも認められ、レドックス状態が大きく変化し細胞内抗酸化能が急激に低下することで、様々なシグナル伝達（タンパク誘導、酵素活性化、サイトカイン分泌、転写調節因子 NF- κ B の活性化等）が起きていることが予想された。

GSH 枯渇作用のある物質としては、以下の種類が知られている⁸⁶⁾。

- ①GSH-transferase の基質となるもの (DEM や phorone のような α 、 β 不飽和カルボニル体で弱い親電子化合物で GSH と結合するもの、あるいは 1-chloro-2,4-dinitrobenzene のような芳香族ハロゲン化合物、2-chloroethanol のようなアルカハゲン体、styrene oxide のようなエポキシサイド体)
- ②チトクローム P-450 依存の Monooxygenase 活性にて形成される親電子化合物 (Phenobarbital, 3-methylcholanthrene のような誘導剤、acetoaminophene のような代謝されてできるもの)
- ③チオール酸化物質 (diamide のような酸化剤、CHP や BHP のような GSH-peroxidase の基質となる有機 hydroperoxide)
- ④その他 (aminopyrin のような酸化的な demethylation を受ける化合物、HCHO、aspirin、glycylglycine、maleate)
- ⑤GSH 合成阻害 (BSO のような γ -glutamylcysteine 合成酵素阻害剤)

Sq-OOH は、③の有機 hydroperoxide として GSH-peroxidase の基質となり GSH の低下を誘発するか (第 I 章 3 参照)、あるいは、Sq-OOH 分解物との直接的な作用で、GSH の還元が起きている可能性が考えられた (例、 $\text{GSH} + \text{SqOO}\cdot \rightarrow \text{GS}\cdot + \text{Sq-OOH}$, $\text{GS}\cdot + \text{GS}\cdot \rightarrow \text{GSSG}$)

また、Sq 過酸化物中には紫外線照射分解物として 6-Methyl-5-hepten-2-one を介した α 、 β 不飽和カルボニル体が生成することが報告されており²⁸⁾、①のメカニズムにより、皮膚中の GSH に影響する可能性も考えられた。しかしながら、HPLC 分析の結果、日常生活レベルでの紫外線照射では Sq 過酸化物から 6-Methyl-5-hepten-2-one は生成していなかったため、この可能性は否定された。

GSH は生体内抗酸化物質として、生体内にかなり高濃度で広く分布し、細胞の還元ポテンシャルの維持や多くの GSH 関連酵素の補酵素として極めて重要な役割を果たしている。また、脂質 hydroperoxide の解毒作用に関与していることが知られており、GSH-peroxidase を介する抗酸化系、GSH-transferase の抱合解毒作用、あるいは直接的な活性酸素の消去系に関与していると考えられる。その為、Sq-OOH のような有機 hydroperoxide についても CHP や BHP と同様に、GSH による解毒が起こりうることが予測され、GSH/GSSG や GSH 関連酵素の変動が起こる可能性が考えられた。例えば、皮膚ケラチノサイトに有機過酸化物 (CHP や BHP) を接触させると有意な GSH-peroxidase の減少が観察され⁸⁸⁾、総 GSH 量の枯渇作用や GSH/GSSG 比の減少も報告されている⁸⁹⁾。有機 hydroperoxide (CHP、BHP、ethyl hydroperoxide) はマウス角化細胞中で分解されて、各種のラジカルが生成されることが *in vitro* 系で報告されている⁶⁰⁾。Sq-OOH も、皮膚中で同様な代謝分解が起これば Sq-OO $\cdot$ や Sq $\cdot$ が発生し、それらが更に逐次的に分解して種々の活性酸素種が生成し、皮膚中の GSH と相互作用を有することも考えられた。

3. グルタチオン枯渇による毒性増強作用

Sq-00H の皮膚への作用の一つとしてグルタチオンへの関与が認められた。そこで、この現象を明確にするために GSH 枯渇剤を用いて皮膚組織あるいは細胞内の GSH 濃度を低減させてから、Sq-00H の皮膚への作用であるコメド形成作用と皮膚細胞毒性を実施し、GSH 量と Sq-00H の作用との関係について考察した。

3-1. 実験材料および方法

・ 試薬

GSH 枯渇剤としては、皮膚組織用には diethylmaleate (DEM, 東京化成)、培養細胞用には DL-buthionine-S, R-sulfoximine (BSO, Sigma)を使用した。

Sq-00H は、定法に従って調製し HPLC で精製したものを使用した。

・ コメド誘発性

コメド誘発性試験系は、ウサギ耳介内側皮膚を用い、週 3 回検体を開放塗布し 2 週間後に Derma scope で形成されたコメドの直径を計測する方法を採用した。片方の耳皮膚の中央部に DEM の 1 μ M 溶液／アセトン溶液 0.5mL を広く塗布し、30 分後にスクアレン過酸化物を 2×2cm の範囲に 0.1mL 開放塗布した。反対側の耳は、アセトン 0.5mL のみ塗布し 30 分後、同様に Sq-00H を塗布した。この操作を週 3 回で 6 回塗布し、塗布開始 2 週間後に Drma scope でコメドの直径を測定した。

・ 細胞毒性試験

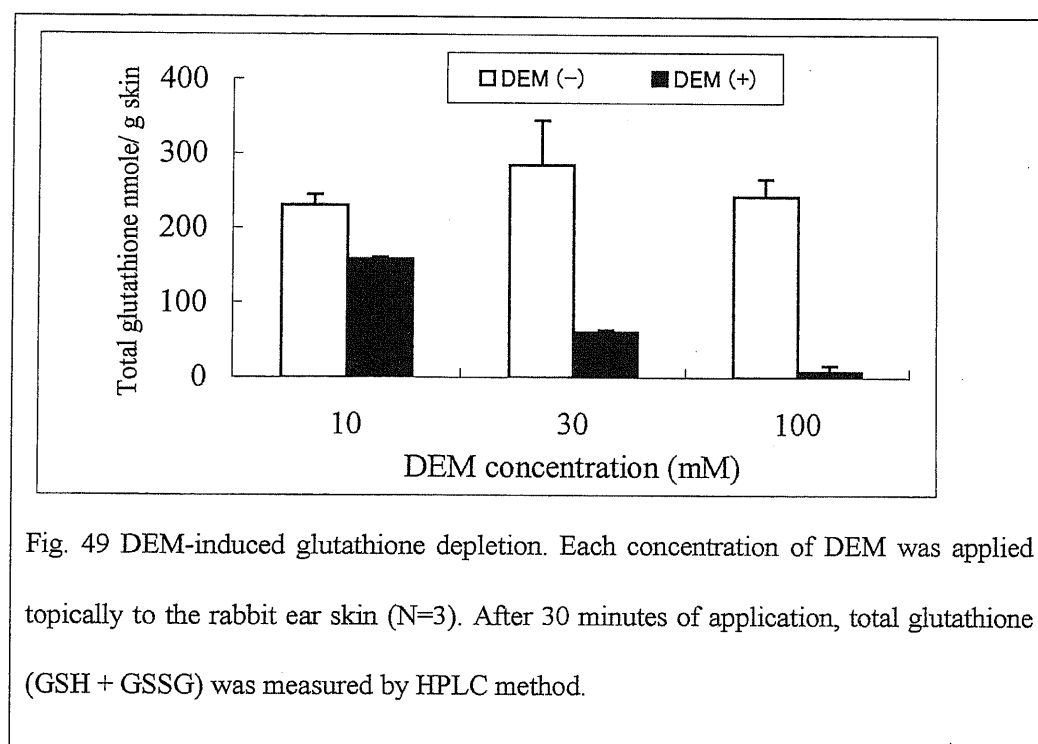
用いた細胞は、ウサギ耳介皮膚をメスで切り取り、ピンセットで軟骨から皮膚スライスを剥離し、コラーゲンコートしたシャーレーに Explant-culture 法にて培養し、遊走してくる繊維芽細胞を Trypsin 処理して集め、凍結した細胞

を用いた(Ⅱ章 3 参照)。96 ウエルマルチプレートを使用し、1 ウエル当たり 2×10^4 個の細胞を播種し、24 時間前培養してから各濃度の Sq-OOH を 48 時間接触させた。溶剤としては、ジメチルスルフォオキシド (DMSO) を使用し、培地中最高で 1% 以下になるように添加した。BSO は、前培養時に $100 \mu\text{M}$ 濃度に調製したものを接触させた。細胞毒性の評価は、ニュートラルレッドの取り込み法 (NR 法) により cell viability を求め、% of control として表した。

3-2. 結果

・ DEM 処置によるウサギ皮膚内 GSH 枯渇について

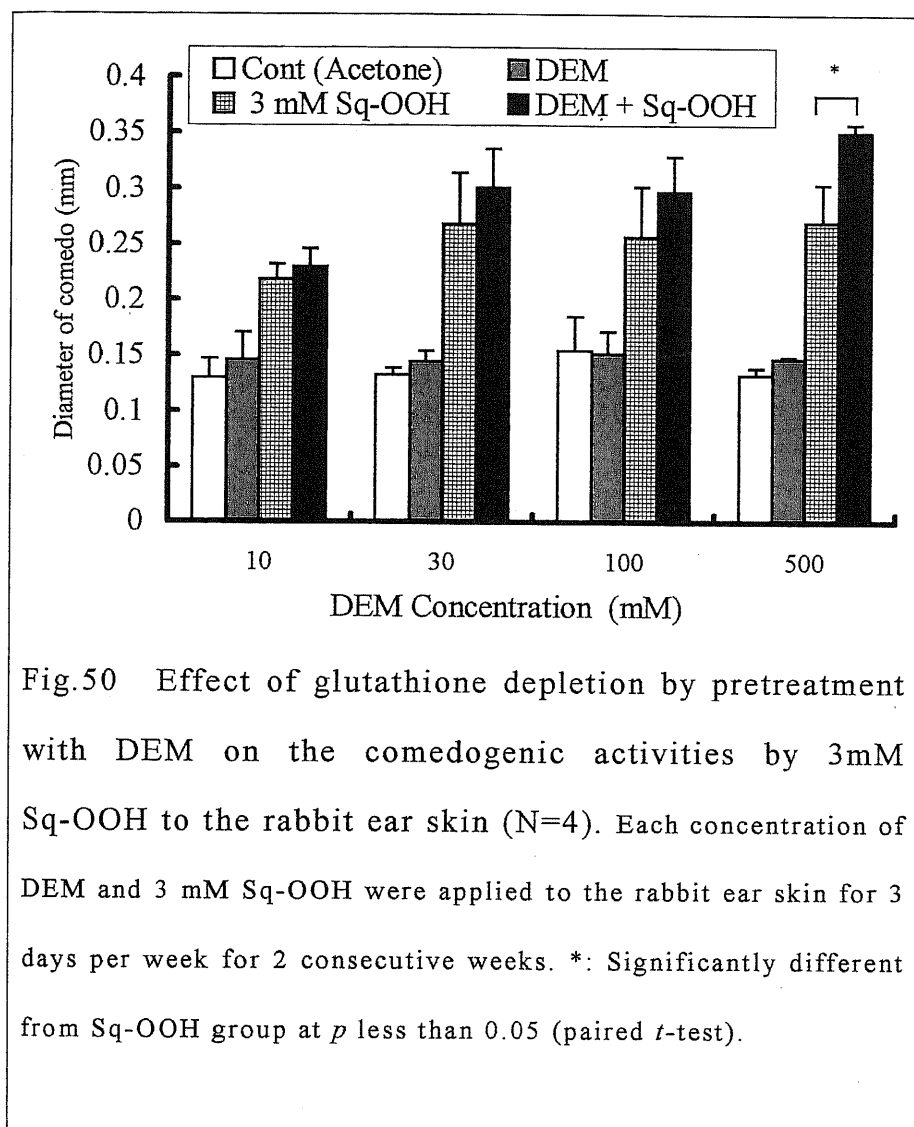
各濃度 (10~100 mM) の DEM を開放塗布 30 分後、皮膚中の総グルタチオン量を測定すると、急激な GSH 枯渇作用が認められた (Fig.49)。



・ Sq-OOH 誘発コメド形成に対する DEM 前処置の影響

10~500 mM 濃度の DEM 前処置した皮膚に Sq-OOH を塗布し、コメド形成への影響について検討した。

Fig.50 は 3 mM の Sq-OOH を塗布した試験系に、前処置として 30 分前に DEM を



塗布した影響をコメドの直径で計測したものである。塗布 2 週間後では 3 mM 濃度の Sq-OOH 塗布で明らかなコメドが形成された。そして、DEM を前処置した場合、30 mM 以上の濃度で Sq-OOH のコメド形成が増加傾向にあり、500 mM 濃度では、Sq-OOH 群と Sq-OOH + DEM 群間で有意なコメド形成の亢進が認められた。なお、DEM 塗布のみではコメド反応は観察されなかった。

・ Sq-OOH の細胞毒性に対する GSH 枯渇剤 BSO 処置の影響

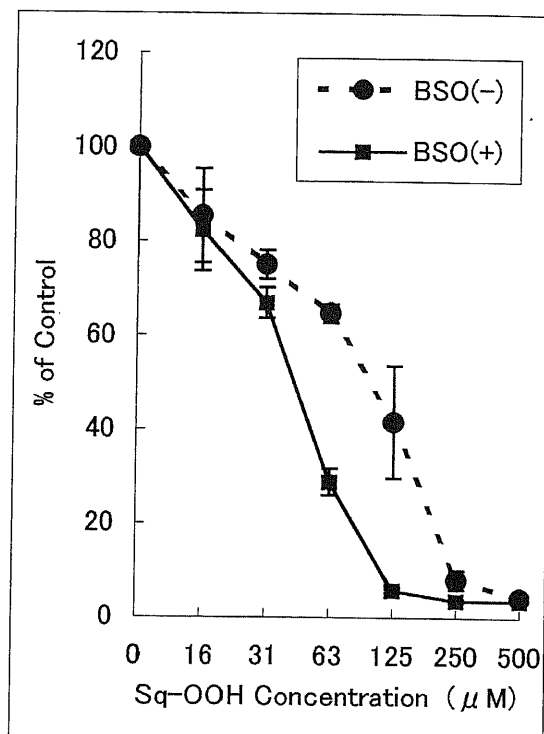


Fig.51 は BSO 処置によるグルタチオン枯渇細胞に対する Sq-OOH の毒性の増強をみたものである。毒性評価を IC_{50} 値で表すと、Sq-OOH では $103 \mu M$ であるのに対し、BSO 処置細胞では $45 \mu M$ となり、約 2 倍の毒性増強が観察された。

Fig.51 Effect of glutathione depletion using BSO treatment on cytotoxicity of Sq-OOH in skin fibroblasts. Fibroblasts pretreated with $100 \mu M$ BSO were exposed to various concentrations of Sq-OOH for 24 hours. The cell viability was estimated by NR assay.

3-3. 考察

BSO 処置された GSH 枯渇状態な皮膚線維芽細胞で、Sq-OOH の細胞毒性が増強していることが明らかとなった。また、DEM 処置で、Sq-OOH のコメド形成が促進されていることも判明した。これらの結果から、Sq-OOH は毒性が発現しない（肉眼的な皮膚への影響が少ない）状態でも、皮膚中の GSH 量を変動させるポテンシャルを有しており、長期間の累積塗布により肌荒れ・ニキビの増悪や種々の Sq-OOH/Sq 変換率の高い皮膚疾患に影響を及ぼしている可能性が推察された。皮膚は GSH 枯渇状態になると、紫外線照射にて発生する活性酸素（スーパーオキシドアニオン）によりマウス表皮内 sunburn cell 数が増加すること⁹⁰⁾、更に、

ヒトメラノーマ細胞の Tyrosinase 活性が GSH 枯渇で上昇すること⁹¹⁾が報告されていることから、紫外線による皮膚感受性やシミの発生増強についても、Sq-00H の関与が推察された。

一方、皮膚グルタチオンはヒト皮膚への Sq-00H による毒性作用を保護し、あるいは毒性の低減化に寄与している可能性が考えられた。最近、江川らは、タバコの煙による Sq-00H 生成が、GSH 処置により強力に抑制されることを報告しており²²⁾、皮膚内の SH 化合物、とりわけ抗酸化成分としてのグルタチオンが、Sq-00H の作用を低減していく上で重要な役割を示していることが推察された。

4. グルタチオン関連皮膚酵素への作用

Sq-00H が皮膚に酸化ストレスを与え、細胞内 GSH 枯渇作用、皮膚内 GSSG 量の増加が観察されたことから、GSH 関連の抗酸化酵素である GSH-peroxidase、catalase、抱合解毒酵素系の GSH-S-transferase、そして GSSG から GSH へ還元する GSH-reductase の各酵素活性に及ぼす Sq-00H の影響についてウサギ耳介皮膚を用いた塗布試験系で検討した。

4-1. 実験材料および方法

・スクアレン過酸化物の調製

第 I 章 2 の調製法に準じ、UV-A 照射法によりスクアレン過酸化物を作製し、10mM 濃度の Sq-00H メタノール溶液を調製した。

・動物

日本白色ウサギ (JW、体重 2~3 Kg、北山ラベス) のヘルシーグレードを使用し、餌は市販の RC 4 (オリエンタル酵母製) を与えた。

・ Sq-00H の塗布と皮膚採取

塗布方法は、コメド形成試験と同様に実施した（第Ⅱ章 2 参照）。すなわち、ウサギ耳介内側皮膚を用い、一日おきに 2 回、3 回、6 回の割合で片方の耳に 3 mM 濃度の Sq-00H を耳介皮膚の中央部 2×2 cm の範囲に 0.1 ml 開放塗布し、反対側は対照として溶媒であるメタノールを 0.1 ml 塗布した。そして最終塗布 24 時間後に皮膚片を採取し、軟骨から皮膚を剥離し秤量後、測定日まで -80 °C のフリーザーにて保存した。酵素液は、それぞれの指定された反応系のバッファーでホモジュネート液を超音波（Astrason ultrasonic processor, level. 3 で 30 秒）で調製し、3000 rpm の遠心後の上清を酵素液とした。

・ 酵素測定法

細胞工学別冊 1994 年版「活性酸素実験プロトコール」（谷口直之監修、秀潤社）に記載の酵素活性法に準拠して測定した。

GSH-peroxidase は、BHP を基質とし、NADPH の吸収（340 nm）の減少から活性を求めた。catalase は、過酸化水素 H_2O_2 の紫外吸収 240 nm の傾きから活性を求めた。GSH-S-transferase は、1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) を基質とし、340 nm の吸収から活性を求めた。GSH-reductase は NADPH の吸収（340 nm）の減少から活性を求めた。反応は全て分光光度計 UV-160A（島津製作所）の保温セルホルダーで time scan mode で測定した。蛋白量は、bio-rad 社の BCA protein Assay キットで測定した。

4-2. 結果

ウサギ耳介皮膚に Sq-00H を単回塗布して 30 分後、24 時間後の各種酵素活性は、対照の溶媒塗布部位と活性に差が認められなかった。しかし、Fig.52 に示したように、Sq-00H 塗布 2、3、および 6 回塗布した後 24 時間目の皮膚について酵素

活性を検討した結果、catalase と GSH-peroxidase で対照部位に比べて有意な活性上昇が観察された。

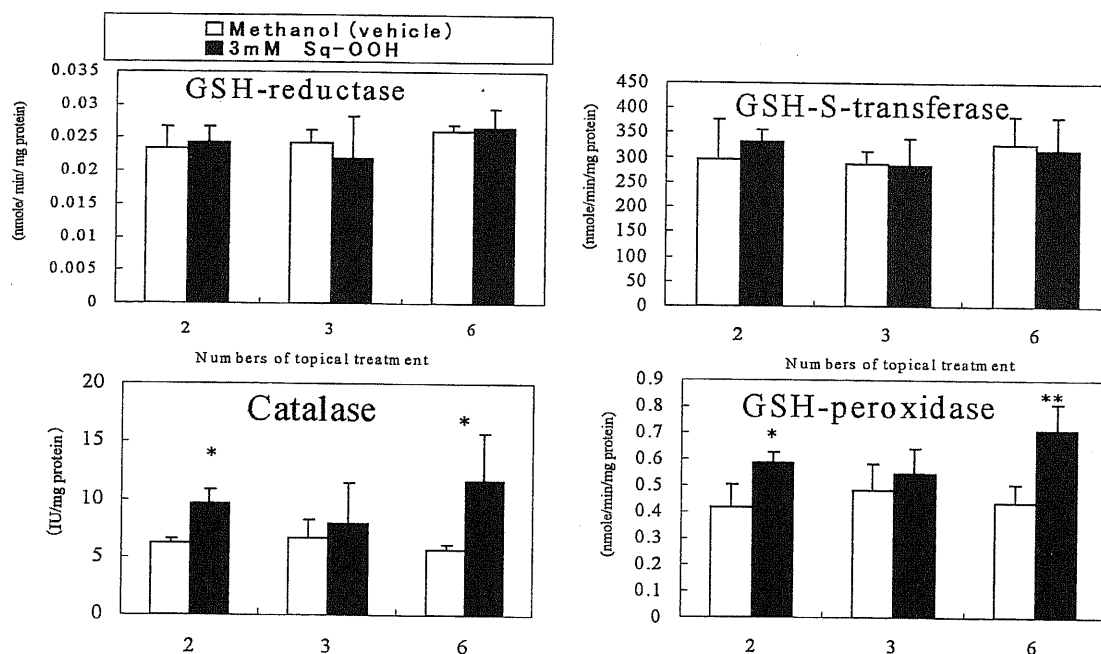


Fig.52 Changes in levels of GSH related- enzymatic activities in the skin treated with 3 mM of Sq-OOH. (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)

4-3. 考察

Sq-OOHのような有機 hydroperoxide は GSH 関連酵素の GSH peroxidase の基質として働くことが可能であり、皮膚内での Sq-OOH の代謝分解に関与している可能性が考えられた (第 I 章 3)。また、UV-B 紫外線照射のような酸化ストレスに対しても、皮膚の GSH peroxidase や GSH reductase は、照射直後には活性低下が起こるが、その後活性が増加することが報告されている⁸²⁾。

そこで、3 mM の Sq-OOH 連続塗布の試験系で、各 GSH 関連酵素の活性を検討した。その結果、catalase と GSH peroxidase で有意な酵素活性の上昇が認められた。これらの酵素は直接、あるいは間接的に Sq-OOH の代謝に関係している可

能性があり、Sq-OOH の皮膚への塗布が GSH の量的変化をもたらすとともに、これら抗酸化酵素の活性にも影響を与えていることが示された。今回の酵素活性への影響は、Sq-OOH の皮膚内での代謝分解によりラジカルや活性酸素により、皮膚内の抗酸化成分であるグルタチオンが消費され、酵素活性に影響したためと考えられた。しかしながら、酵素活性の変動は刺激の程度や刺激後の時間によっても異なることがあり、今回はあくまでも 3 mM 濃度（顕著にコメドが形成されない濃度）の為、酵素活性と酸化ストレスとの関係を明確にするには、更に種々の塗布濃度で詳細な経時的変動を調べていく必要があるのかもしれない。

5.小括

- ・通常、酸化ストレスに対する生体の防御作用としては、抗酸化物質による防御と抗酸化酵素系による防御作用が知られている。そこで、今回は生体中の重要な抗酸化物質であるとともに、過酸化物質の解毒代謝に大きく関与しているグルタチオンについて、Sq-OOH をウサギ皮膚に塗布した場合の皮膚への作用を検討した。

- ・その結果、皮膚単回塗布 30 分後では、総 GSH 量に大きな変動は認められなかったが、GSH の還元型と酸化型の比 (GSH/GSSG) が有意に低下し、酸化ストレスが短時間で皮膚局所に発生していた。しかしながら、その反応は一過性であり、酸化ストレスに対し GSH を介した防御的な生体恒常性が皮膚には備わっていること示していた。このような作用は、同様な monohydroperoxide である BHP では観察することができず、Sq-OOH に特異的な作用であることも判明した。

- ・また、Sq-OOH を 2 週間で 6 回塗布した場合では、GSH と GSSG の量が塗布濃度依存的に上昇していたが、GSH/GSSG ではやはり低下していた。そこで、皮膚中の GSH を DEM 塗布で 90% 以上枯渇させた酸化ストレス状態で、Sq-OOH の毒性をcomedo形成能で検討したところ、DEM 前処置で明らかなcomedo形成の増強作用が認められた。

- ・ウサギ耳介内側皮膚由来の正常繊維芽細胞を用いた *in vitro* の細胞毒性でも、BSO 処置による GSH 枯渇状態で Sq-OOH の細胞毒性が増強していることが確認された。

- ・そこで、皮膚中の GSH 関連抗酸化酵素について Sq-OOH 塗布の影響を調べた結

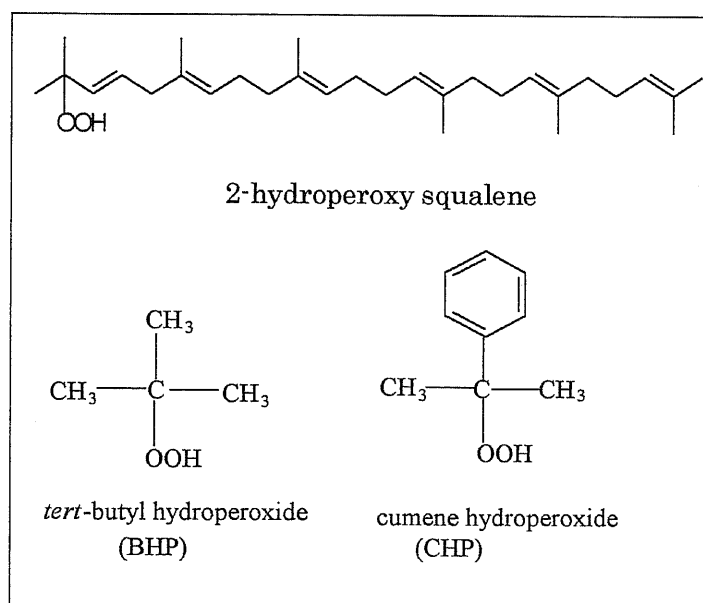
果、catalase と GSH peroxidase において、Sq-00H 塗布による酵素活性の上昇が認められた。

・以上の結果から、Sq-00H は皮膚局所に塗布することで酸化型 GSH の増加（酸化的ストレス）を与えるとともに、その毒性は GSH 枯渇状態による酸化ストレス状態で増強することが明瞭となり、細胞内抗酸化成分であるグルタチオン類のような抗酸化成分の存在が Sq-00H の毒性を抑制する因子として働いていることが示唆され、また Sq-00H による酸化ストレスが GSH 関連の抗酸化酵素活性にも影響を与えていることが明らかとなった。

V. 総括

・ヒトの皮表脂質に長波長紫外線 UV-A を照射すると、Sq 過酸化物が顕著に生成され、日常生活照射レベルの紫外線で生成される Sq 過酸化物は、メタノール溶媒で完全に抽出された。そこで、メタノール溶媒抽出と分取 HPLC を組み合わせることにより、簡易に Sq-OOH を調製する方法を構築した。

・多くの構造異性体を含む Sq-OOH は、メタノールを移動相とする逆相カラム HPLC 分析では mono hydroperoxy 体の単一ピークとして捉えられるが、更に順相カラムで HPLC 分析すると 10 本以上のピーク物質として分離可能であった。そこで、それぞれのピーク物質を分析した結果、mono hydroperoxide の存在



が確認され、その内の主要なピーク物質を分析した結果、Sq の末端二重結合に -OOH 基が導入した 2-hydroperoxy squalene であることが判明した。

そこで、この Sq-OOH の皮膚への酸化ストレス作用を類似した mono hydroperoxide

体であり、酸化ストレスのモデル物質として使用される BHP と CHP との比較、あるいは、紫外線照射による作用との比較を行い、Sq-OOH の皮膚への作用の特性について検討した。

・Sq-OOH の皮膚への刺激作用として、皮膚一次刺激性や累積刺激性を確認した。皮膚一次刺激性は、類似した mono hydroperoxy 体である BHP や CHP よりも強

かった。また、細胞毒性をウサギ耳介皮膚由来の線維芽細胞で評価した結果 CHP や BHP よりも Sq-00H に強い細胞毒性が認められた。コメド誘発性においては、Sq 過酸化物に活性が認められ、その活性はメタノールで抽出され、活性本体が Sq-00H であることが Derma scope を用いたコメド誘発試験で明らかとなった。BHP や CHP にはコメド誘発性は認められなかった。

- ・ヘアレスマウス皮膚への連続塗布により、Sq-00H が肌荒れ（皮膚表面形態の悪化）、皮膚水分低下作用、および縮緬シワ（crinkle）形成作用を有していることを見出した。これらの作用は BHP や CHP、また還元体の Sq-0H でも全く認められず、Sq-00H に特徴的な作用であることが判明した。

- ・ヘアレスマウス皮膚への長期間 Sq-00H 皮膚塗布で、皮膚表面形態の変化・表皮肥厚とともに、真皮コラーゲン量の指標となる HP の減少が認められた。同様なシワ発生系の動物モデルである紫外線照射法によるシワ皮膚との形態的・生化学的・病理的な特徴の差異について比較検討し、Sq-00H 塗布皮膚が従来の紫外線照射シワモデルとは異なった新たな特徴を持ったシワ発生モデルであることが示された。

- ・シワ皮膚の作用メカニズムとしては、皮膚上で生成した Sq-00H が皮膚上あるいは内部で分解され、活性酸素（例えば O_2^- ）や Sq ラジカル発生による酸化ストレス作用と、これらに随伴する各種 cytokine 遊離（例えば $IL1-\alpha$ ）により、表皮増殖性の亢進と表皮肥厚化が起こり無秩序な増殖が起きると考えられた。その結果、表皮角化亢進と皮脂腺の拡大によりコメドが形成され、皮膚表面では縮緬シワを形成し、真皮ではコラーゲン量低下と酸性ムコ多糖の増加に伴う変性により、皮膚表面で特徴的な深いシワ形成が起きたと考え

られた。

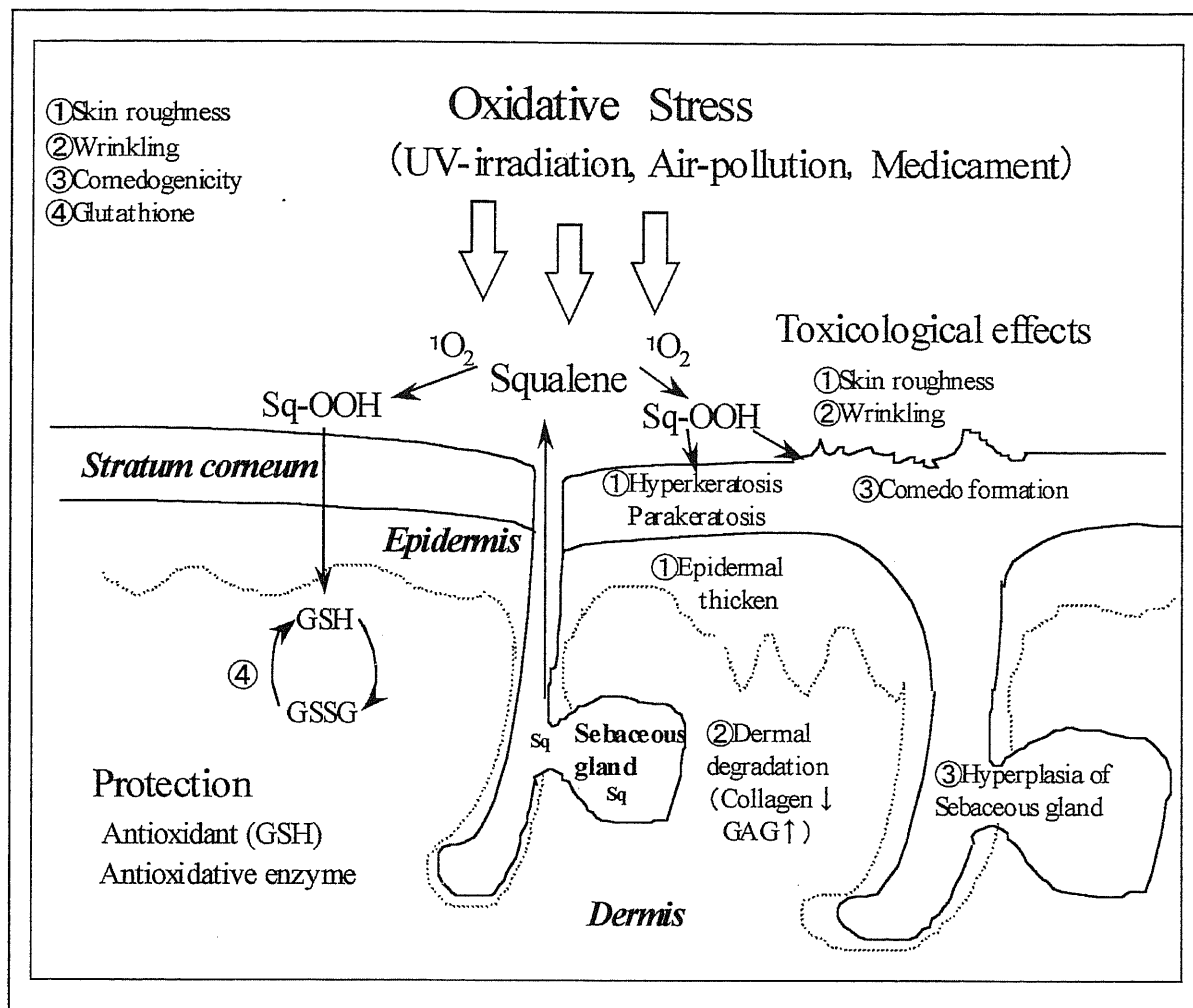
・Sq-00H の皮膚への酸化ストレスの結果として、ウサギ耳介皮膚を用いた一過性の皮膚内 GSH/GSSG の低下、*in vitro* では培養線維芽細胞内 GSH の枯渇作用が確認された。BHP にはウサギ皮膚での GSH/GSSG 低下作用は認められなかった。また、Sq-00H はウサギ耳介皮膚への塗布で GSH 関連の抗酸化酵素 (catalase、GSH-peroxidase) への影響も示唆され、Sq-00H 誘発の酸化ストレス作用に対して、皮膚内の抗酸化物質であるグルタチオンが皮膚細胞レベルでの酸化ストレスに対して保護的に働き、細胞毒性やコメド形成を抑制していることを見出した。皮膚内 GSH への作用も Sq ラジカル伝播による急激な GSH の消費が皮膚局所での酸化ストレス状態を引き起こし、GSH 関連抗酸化酵素への活性にも影響を与えている、と推察された。

皮膚各部位での Sq-00H の作用についてまとめると、以下のようになった。

皮膚表面 皮膚紅斑形成、皮膚表面形態 (皮溝・皮丘) 変化、シワ形成、
皮膚内部 炎症の惹起、抗酸化能低下 (GSSH/GSH↑)、GSH 関連酵素の変動、

Sq-00H の分解とラジカル・活性酸素の発生

角層	バリア損傷、不全角化、水分量の低下	⇒ 肌荒れ誘発
	過形成、角栓形成	⇒ コメド形成
表皮	肥厚・角化亢進、サイトカインの分泌	⇒ 肌荒れ誘発
皮脂腺	拡大 (機能亢進)	⇒ コメド形成
真皮	コラーゲン変性 (染色性↓、HP 量の低下)、 GAG の増加 (ウロン酸の増加)	⇒ シワ形成



このように、ヒト皮膚表面で生成される Sq-OOH は、BHP・CHP や紫外線照射には見られない様々な特徴的な作用を有していることが判明した。これらの作用は、相互に関連を持ちながら皮膚の生理機能（表皮細胞の角化調節機能、抗酸化機構等）に影響を与え、皮膚に過剰に働いた場合、肌荒れ（乾燥、炎症、皮膚表面変化）やニキビ（コメド形成）の誘発要因になると考えられた。更に Sq-OOH の長期的かつ持続的な酸化ストレスは、シワ形成の誘発においても重要な役割を演じていると考えられた。

VI. 謝辞

本研究をまとめるにあたり、多大なる御助言を頂いた千葉大学大学院薬学
研究院衛生化学教室の鈴木和夫教授に心から感謝するとともに、研究発表の
機会を与えていただいたヤクルト本社中央研究所所長 横倉輝夫博士、および
研究所顧問 大澤利昭博士に深謝いたします。また、ヤクルト本社中央研究所
にて研究を指導して頂いた安全性試験研究センター長の尾上正治主席研究員、
中央分析研究室の牧野孝副主席研究員、木村一雅主任研究員、また実験に関
して協力して頂いた曾根俊郎博士、川上幸治指導研究員、吉澤和彦氏、牧野
育代氏、花水智子氏、および飯塚量子氏に感謝いたします。

VII. 参考文献

1. D. Downing, J. Strauss and P. Pochi: Variability in the chemical composition of human skin surface lipids. J. Invest. Dermatol. 53, 322-327 (1969)
2. 吉野和廣: 皮表脂質中の過酸化脂質, 皮表過酸化脂質の定量法ならびに UVA 照射時における生成促進因子について. 日皮会誌 90, 1081-1087 (1980)
3. 千葉勝由, 遠山清: 培養細胞系を用いた化粧品油性原料の安全性評価. 香粧誌. 13, 194-202 (1989)
4. T. Kwon and H. Olcott: Thiobarbituric acid reactive substances from autoxidized or ultraviolet irradiated unsaturated fatty esters and squalene. J. Food Sci. 31, 552-557 (1966)
5. K. Dennis and T. Shibamoto: Production of malondialdehyde from squalene, a major skin surface lipid, during uv-irradiation. Photochem. & Photobiol. 49, 711-716 (1989).
6. 西拔和喜夫, 熊井則夫, 三浦隆, 清寺眞: UVB 照射によるリノレン酸, スクアレン過酸化物からの超微弱発光と発光スペクトル分析. 日皮会誌. 92, 29-33, (1982)
7. 早川律子: 皮脂の過酸化. 香粧誌. 2, 6-12 (1978)
8. 上田宏他: アトピー性皮膚炎における皮膚過酸化脂質の意義. 日皮会誌. 81, 736-737 (1971)
9. 早川律子: 皮脂中の過酸化脂質と皮膚疾患. 臨床皮膚 29, 181-192 (1975)
10. 清水美津子, 設楽篤幸, 長井透, 宮入宏之, 猪股成美, 佐藤良夫: スクアレン過酸化物の皮膚刺激性に関する研究. 日皮会誌. 90, 194 (1980)
11. 千葉勝由, 遠山清: Squalene 過酸化物の生成と毒性. 日皮会誌. 101, 669 (1991)

12. O. Mills, M. Porte and A. Kligman: Enhancement of comedogenic substances by ultraviolet radiation. *Brit. J. Dermatol.* 98, 145-150 (1978).
13. K. Motoyoshi: Enhanced comedo formation in rabbit ear skin by squalene and oleic acid peroxides. *Brit. J. Dermatol.* 109, 191- 198 (1983)
14. K. Ohsawa, T. Watanabe, R. Matsukawa, Y. Yoshimura and K. Imaeda: The possible role of squalene and its peroxide of the sebum in the occurrence of sunburn and protection from the damage caused by UV irradiation. *J. Toxicol. Sci.* 9, 151-159 (1984)
15. M. Nazzaro-porro, S. Passi, M. Picard, R. Mercantini and A. Breathnach: Lipoxygenase activity of pityrosporum in vitro and in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 87, 108-112, (1986)
16. K. Yoshino and I. Matsuo: Squalene peroxide formation by UVA irradiation with or without 8-MOP. *Jpn. J. Dermatol.* 91, 55-57 (1981)
17. H. Fujita, I. Matsuo, M. Okazaki, K. Yoshino and M. Ohkido: Chlorpromazine-sensitized photooxidation of squalene. *Arch. Dermatol. Res.* 278, 224-227 (1986)
18. M. Picardo, C. Zompetta, C. De Luca, A. Amantea, A. Faggioni, M. Nazzaro-porro and S. Passi: Squalene peroxides may contribute to ultraviolet light-induced immunological effects. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 8, 105-110 (1991)
19. 河野善行, 阪本興彦, 富田健一, 堀井和泉, 宮澤陽夫: 化学発光検出器を用いたHPLCによるヒト表皮における過酸化脂の定量. *油化学.* 40, 715-718 (1991)
20. D. Saint-Leger, A. Baque, E. Cohen and M. Chivo: A possible role for squalene in the pathogenesis of acne II. *Brit. J. Dermtol.* 114, 535-552

(1986)

21. 笠明美, 荒金久美, 林千賀子, 増永卓司, 新本浩一, 長野哲雄, 廣部雅昭, 益子信郎 Propioniumbacterium acnes 由来ポルフィリンによる一重項酸素の產生と皮表脂質の過酸化. 香粧会誌. 19, 1-6 (1995)
22. M. Egawa, Y. Kohno and Y. Kumano: Oxidative effects of cigarette smoke on the human skin: Int. J. Cosmet. Sci. 21, 83-98 (1999)
23. 合津陽子, 土師信一郎, 中村祥二, 河野善行, 福井寛, 熊野可丸, 沢野清仁, 大田英明, 山崎一雄: 加齢臭発生機序に基づく対処商品の開発. J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn. 32, 379-386 (2000)
24. 河野善行, 高橋元次: 皮膚における過酸化反応とその制御. 油化学. 44, 248-255 (1995)
25. T. Witas and J. Wedzinska: The determination method of malonal generation degree of oxidized squalene. Die Nahrung. 23, 589-595 (1979)
26. R. Robert and J. Mead: Small hydrocarbons formed by the peroxidation of saualene. Chemistry and Physics of Lipids 46, 117-120 (1988)
27. 河野恵宣, 塩盛弘一郎, 芝原敦, 孫偉, 馬場由成, 三谷博明, 幡手泰雄: スクアレン酸化劣化挙動. 油化学 46, 1361-1367 (1997)
28. H. C. H. Yeo and T. Shibamoto: Formation of formaldehyde and malonaldehyde by photooxidation of squalene. Lipids 27, 50-53 (1992)
29. 吉野和廣: 皮表脂質中の過酸化脂質, 皮表過酸化脂質の定量法ならびに UVA 照射時における生成促進因子について. 日皮会誌 90, 1081-1087 (1980)
30. I. Matsuo, K. Yoshino and M. Ohkido: Mechanism of skin surface lipid peroxidation. Curr. Probl. Dermatol. 11, 135-143 (1983)
31. 福沢健治, 寺尾純二: 脂質過酸化反応実験法, 広川書店 p33 (1990)
32. 吉野和廣, 松尾聿朗: UVA 単独照射および 8-MOP+UVA 照射によるスクアレ

ン過酸化物の生成. 日皮会誌 91, 53-57 (1981)

33. M. Nakano, Y. Kambayashi, H. Tatsuzawa, T. Komiyama and K. Fujimori: Useful $^1\text{O}_2$ generator, 3 - (4' - methyl- 11' -naphthyl) - propionic acid, 1', 4' -endoperoxide (NEPO), for dioxygenation of squalene (a skin surface lipid) in an organic solvent and bacterial killing in aqueous medium. FEBS Lett. 432, 9-12 (1998)
34. 河野善行, 阪本興彦, 中村哲治, 宮澤陽夫: 化学発光検出器を用いた HPLC によるヒト皮表脂質過酸化物の定量(第2報). 油化学 42, 204-209 (1993)
35. N. Ohishi, H. Ohkawa, A. Miike, T. Tatano and K. Yagi: A new assay method for lipid peroxides using a methylene blue derivative. Biochem. Int. 10, 205-211 (1985)
36. T. Miyazawa, K. Yasuda and K. Fujimoto : Chemiluminescence-high performance liquid chromatography of phosphatidylcholine hydroperoxide. Anal. Lett. 20, 915-925 (1987).
37. D. Maes, T. Mammone, M. A. McKeever, E. Pelle, C. Fthenakis, L. Declerco, P. U. Giacomoni and K. Marenus: Noninvasive techniques for measuring oxidation products on the surface of human skin. Meth. Enzymol. 319, 612-622 (2000)
38. T. W. Sam and E. T. Guan: Polyene oxidation. Part II. Mono-alcohols from the squalene-singlet oxygen reaction. J. Nat. Rubb. Res. 3, 81-89 (1988)
39. I. Matsuo, H. Fujita, K. Hayakawa and M. Ohkido: Lipid peroxidative potency of photosensitized thiazide diuretics. J. Invest. Dermatol. 37, 637-641 (1986)
40. S. Koga, M. Nakano and K. Uehara: Mechanism for the generation of superoxide anion and singlet oxygen during heme compound-catalyzed

- linoleic acid hydroperoxide decomposition. Arch. Biochem. Biophys. 289, 223-229 (1991)
41. M. Nakano: Detection of superoxide radical and singlet oxygen based on chemiluminescence of luciferin analogs. Meth. Enzymol. (L. Packer and A.N. Glazer. Eds) 186, 585-591 (1990)
 42. 千葉勝由, 池邨治夫, 宮崎幸司: ジペプチド及びこれを含有する化粧品. 特開平 6-345797.
 43. 中野稔: 活性酸素の化学発光による検出. 蛋白質 核酸 酵素 臨時増刊. 33, 2699-2707 (1988)
 44. J. H. Draize: Dermal toxicology. In Appraisal of the Safety of Chemical in Food, Drug and Cosmetics. Edited by the association of food and drug officials of the United States, Austin, TX. P46. (1959)
 45. 檀淵暢夫: 皮膚の形態学的評価の為の改良された剥離角質細胞診断法. J. Soc. Cosmet. Chem. Jap. 23, 143-154 (1989)
 46. 遠藤正行, 鷺谷広道, 真知田宏: 角層中における過酸化脂質及び皮表脂質の分布と洗浄による除去. 油化学 40, 422-426 (1991)
 47. 河野善行, 萩野滋延, 森眞輝, 阪本興彦, 中村 哲治, 高橋 元次: ヒト表皮における脂質過酸化反応. J. Soc. Cosmet. Chem, Japan 27, 33-40 (1993)
 48. 中山靖久: 環境影響の制御に果たすスキンケアの役割. 皮膚の健康科学, 石橋康正, J. A. Parrish 監修. 南山堂, 134-144 (1994)
 49. P. Kanaar: Follicular-keratogenic properties of fatty acids in the external ear canal of the rabbit. Dermatologica 142, 14-22 (1971)
 50. K. Motoyoshi: The correlation between surface microscopy and dermal histology in tetradecane-induced comedones in rabbit ear skin. Brit. J. Dermatol. 108, 573-579 (1983)

51. J. E. Fulton: Comedogenicity and irritancy of commonly used ingredients in skin care products. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 40, 321-333 (1989)
52. A. M. Kligman and L. H. Kligman: Carcinogens show comedogenic activity. A potential animal screen for tumorigenic substances. *Cancer lett.* 87, 171-178 (1994)
53. A. M. Kligman: Pathogenesis of acne vulgaris. II. Histopathology of comedones induced in the rabbit ears by human sebum. *Archs Dermatol.* 98, 56-66 (1986)
54. K. Motoyoshi: Enhanced comedo formation in rabbit ear skin by squalene and oleic acid peroxides. *Brit. J. Dermatol.* 109, 191-198 (1983)
55. K. Chiba, K. Yoshizawa, I. Makino, K. Kawakami and M. Onoue: Comedogenicity of squalene monohydroperoxide in the skin after topical application. *J. Toxicol. Sci.* 25, 77-83 (2000)
56. 千葉勝由, 吉澤和彦, 牧野育代, 角将一, 尾上正治, 遠山清: ウサギ耳介皮膚を用いたコメド誘発性試験の改良法. *香粧誌* 17, 65-72 (1993)
57. D. Saint-leger, A. Bague, E. Cohen and M. Chivot: A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. I. In vitro study of squalene oxidation. *Brit. J. Dermatol.* 114, 535-542 (1986)
58. K. Chiba, T. Sone, K. Kawakami and M. Onoue: Skin roughness and wrinkle formation induced by repeated application of squalene monohydroperoxide to the hairless mouse. *Exp. Dermatol.* 8, 471-479 (1999)
59. T. Sone, M. Ichioka and T. Yokokura: A study of seasonal changes in skin surface configuration and rough skin by image analysis. *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.* 15, 60-65 (1991)

60. B. G. Taffe, N. Takahashi, T. W. Kensler and R. P. Mason: Generation of free radicals from organic hydroperoxide tumor promoters in isolated mouse keratinocytes. Formation of alkyl and alkoxyl radicals from *tert*-butyl hydroperoxide and cumene hydroperoxide. J. Biol. Chem. 262, 12143-12149 (1987)
61. G. S. Timmins and M. J. Davies: Free radical formation in isolated murine keratinocytes treated with organic peroxides and its modulation by antioxidants. Carcinogenesis 14, 1615-1620 (1993)
62. K. Chiba, K. Kawakami, T. Sone and M. Onoue: Characteristics of skin wrinkling and dermal changes induced by repeated application of squalene monohydroperoxide to hairless mouse skin. Skin. Pharmacol. Appl. Skin. Physiol. Submitted
63. 正木仁: 光老化皮膚の形成メカニズムとそれに対応する抗シワ用有用性原料開発について. Fragrance J. 4, 18-26 (1998)
64. I. Kiss, S. Chen and K. M. Tramposch: The effect of high and low ultraviolet-B dose exposure on the degree of hairless mouse skin wrinkling. Photochem. Photobiol. 53, 109-112 (1991)
65. S. Hayashi, T. Matsuki, K. Matsue, S. Arai, Y. Fukuda and T. Yoneya: Changes of facial wrinkles by aging, sunlight exposure and application of cosmetics. J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn. 27, 355-373 (1993)
66. K. I. Kivirikko, O. Laitinen and D. J. Prockop: Modification of a specific assay for hydroxyproline in urine. Anal. Biochem. 19, 249-255 (1967).
67. E. Schwartz, J. A. Mezick, G. J. Gendimenico and L. H. Kligman: In vivo prevention of corticosteroid-induced skin atrophy by tretinoin in the

- hairless mouse is accompanied by modulation of collagen glycosaminoglycans and fibronectin. *J. Invest. Dermatol.* 102, 241-246 (1994)
68. T. Bitter and H. M. Muir: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* 4, 330-334 (1962)
69. L. H. Kligman, M. Gebre, R. Alper and A. Kefalides: Collagen metabolism in ultraviolet irradiated hairless mouse skin and its correlation to histochemical observations. *J. Invest. Dermatol.* 93, 210-214 (1989)
70. K. J. Johnston, A. I. Oikarinen, N. J. Lowe, J. G. Clark and J. Uitto: Ultraviolet radiation-induced connective tissue changes in the skin of hairless mouse. *J. Invest. Dermatol.* 82, 587-590 (1984)
71. S. J. Moloney, S.H. Edmonds, L. D. Giddens and D. B. Learn: The hairless mouse model of photoaging model: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles. *Photochem. Photobiol.* 56, 505-511 (1992)
72. B. Boyer, A. Fourtanier, P. Kern and J. Labat-Robert: UVA- and UVB-induced changes in collagen and fibronectin biosynthesis in the skin of hairless mice. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 14, 247-259 (1992)
73. D. L. Bissett, P. Hannon and T. V. Orr: An animal model of solar-aged skin: Histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem. Photobiol.* 46, 367-378 (1987).
74. R. Chatterjee, M. J. Benzinger, J. L. Ritter and D. L. Bissett: Chronic ultraviolet B radiation-induced biochemical changes in the skin of hairless mice. *Photochem. Photobiol.* 51, 91-97 (1990)

75. E. Schwartz: Connective tissue alterations in the skin of ultraviolet irradiated hairless mice. *J. Invest. Dermatol.* 91, 158-161 (1988)
76. E. Schwartz and L. H. Kligman: Topical tretinoin increase the topoe elastin and fibronectin content of photoaged hairless mouse skin. *J. Invest. Dermatol.* 104, 518-522 (1995)
77. H. Tanaka, T. Okada, H. Konishi and T. Tsuji: The effect of reactive oxygen species on the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycans in cultured human dermal fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.* 285, 352-353 (1993)
78. M. R. Duncan and B. Berman: Differential regulation of collagen, glycosamknoglycan, fibronectin, and collagenase activity production in cultured human adult dermal fibroblasts by interleukin 1-alpha and beta and tumor necrosis factor-alpha and beta. *J. Invest. Dermatol.* 92, 699-706 (1989)
79. M. Wlaschek, J. Wenk, P. Brenneisen, K. Briviba, A. Schwarz, H. Sies and K. Scharffetter-Kochanek: Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro. *FEBS Letters* 413, 239-242 (1997)
80. K. Chiba, K. Yoshizawa, I. Makino, K. Kawakami and M. Onoue: Changes in the levels of Glutathione after cellular and cutaneous damage induced by Squalene-monohydroperoxide. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 150-158 (2001)
81. T. Toyooka, S. Uchiyama and Y. Saito: Simultaneous determination of thiol and disulfides by high-performance liquid chromatography with

- fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta.* 205, 29-41 (1988)
82. Y. Shindo, E. Witt, D. Han, B. Tzeng, T. Aziz, L. Nguyen and L. Packer: Recovery of antioxidants and reduction in lipid hydroperoxides in murine epidermis and dermis after acute ultraviolet radiation exposure. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 10, 183-191 (1994)
83. M. J. Connor and L. A. Wheeler: Depletion of cutaneous glutathione by ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol.* 46, 239-245 (1987)
84. L. A. Wheeler, A. Aswad, M. J. Connor and N. Lowe: Depletion of cutaneous glutathione and the induction of inflammation by 8-methoxypsoralen. *J. Invest. Dermatol.* 87, 658-662 (1986)
85. R. G. Ham: Dermal fibroblasts. In *Methods in Cell Biology*, C. Harris, B. Trump, and G. Stoner, eds (Academic Press Inc, New York). 21, 255-275 (1980)
86. J. L. Plummer, B. R. Smith, H. Sies and J. R. Brend: Chemical depletion of glutathione in vivo. In *Method IN Enzymology*, W. B. Jakoby, eds (Academic Press Inc, New York). 77, 50-59 (1981)
87. M. Poot, A. Verkerk, J. Koster, H. Esterbauer and J. Jongkind: Influence of cumene hydroperoxide and 4-hydroxynonenal on the glutathione metabolism during in vitro ageing of human skin fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 162, 287-91 (1987)
88. D. Vessey and K. Lee: Inactivation of enzymes of glutathione antioxidant system by treatment of cultured human keratinocytes with peroxides. *J. Invest. Dermatol.* 100, 829-833 (1993)
89. D. Vessey, K. Lee and K. Blacker: Characterization of the oxidative stress initiated in cultured human keratinocytes by treatment with

- peroxides. J. Invest. Dermatol. 99, 859-863 (1992)
90. K. Hanada, R. W. Gange and M. J. Connor: Effect of glutathione depletion on sunburn cell formation in the hairless mouse. J. Invest. Dermatol. 96, 838-840 (1991)
91. V.D.Marmol, F.Solano, A.Sels, G. Huez, A.Libert, F.Lejeune and G. Ghanem: Glutathine depletion increases tyrosinase activity in human melanoma cells. J. Invest. Dermatol. 101, 871-874 (1993)

VII. 論文目録

主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. 千葉勝由, 遠山清: 培養細胞系を用いた化粧品油性原料の安全性評価. 化粧品誌 13, 194-202 (1989)
2. 千葉勝由, 吉澤和彦, 牧野育代, 角将一, 尾上正治, 遠山清: ウサギ耳介皮膚を用いたcomedogenicity試験の改良法. 化粧品誌 17, 65-72 (1993)
3. K. Chiba, T. Sone, K. Kawakami and M. Onoue: Skin roughness and wrinkle formation induced by repeated application of squalene monohydroperoxide to the hairless mouse. Exp. Dermatol. 8, 471-479 (1999)
4. K. Chiba, K. Yoshizawa, I. Makino, K. Kawakami and M. Onoue: Comedogenicity of squalenemonohydroperoxide in the skin after topical application. J. Toxicol. Sci. 25, 77-83 (2000)
5. K. Chiba, K. Yoshizawa, I. Makino, K. Kawakami and M. Onoue: Changes in the levels of glutathione after cellular and cutaneous damage induced by squalene-monohydroperoxide. J. Biochem. Mol. Toxicol. 15, 150-158 (2001)

参考論文

1. K. Chiba, K. Kawakami, K. Tohyama: Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol. In Vitro*, 12, 251-258 (1998)
2. K. Chiba, I. Makino, J. Ohuchi, Y. Kasai, H. Kakishima, K. Tsukumo, T. Uchiyama, J. Miyai, Y. Okamoto, H. Kojima, H. Okumura, Y. Tsurumi, M. Usami, K. Katou, S. Sugiura, A. Kurishita, M. Sunouchi, A. Miyajima, M. Hayashi, Y. Ohno: Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients (9). Evaluation of cytotoxicity test on HeLa cells. *Toxicol. In Vitro*. 13, 189-198 (1999)

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学教授（薬学研究院）薬学博士 鈴木和夫

副査 千葉大学教授（薬学研究院）薬学博士 今成登志男

副査 千葉大学教授（薬学研究院）薬学博士 上野光一

副査 千葉大学教授（薬学研究院）薬学博士 堀江利治

副査 千葉大学教授（薬学研究院）薬学博士 矢野眞吾