

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32692
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22500724
 研究課題名（和文） 弾力性低下を引き起こす紫外線の作用波長の研究と紫外線遮蔽効果の新評価法の開発
 研究課題名（英文） Action spectrum of the decrease of collagen flexibility caused by UV rays, and development of the new evaluation method of sunscreen
 研究代表者
 前田 憲寿（MAEDA KAZUHISA）
 東京工科大学 応用生物学部・教授
 研究者番号：50454137

研究成果の概要（和文）：コラーゲン線維モデルに UVA を照射すると弾力性が低下し、硬くなることを見出した。作用波長を検討した結果、320nm 付近に硬度・弾力性に変化がみられた。また、コラーゲングルに 320nm 付近の UVB+UVA2 を照射してから線維芽細胞を培養すると、細胞生存率が低下することを見出した。この作用は UVA1 を照射することやカタラーゼを培地に添加することによって抑制された。UVA1 を照射することによって細胞内のカタラーゼ活性が増加することが、UVA1 が UVB+UVA2 を照射したコラーゲングルでの細胞生存の低下を抑制する機序の一つと考えられた。これらの結果は *in vivo* に UVB+UVA2 を照射し続けたときに引き起こされる皮膚の光老化メカニズムの一端を説明していると考えられ、紫外線防止製品の新評価法として利用できる。

研究成果の概要（英文）：We found that the collagen gel is exposed to UVA resulting in less elasticity. Investigations on the action spectrum of the collagen elasticity decline caused by UV rays revealed that the UV rays near 320 nm decline elasticity. Moreover, after irradiating the collagen gel with UVB+UVA2, when the fibroblast was cultured, cell survival decreased. This decrease in cell survival was rescued by irradiating the fibroblast with UVA1, and by adding catalase to the culture medium. The increase in intracellular catalase activity was considered to be one of the mechanisms in which UVA1 irradiation rescues the decrease of the cell survival on UVB+UVA2 irradiated collagen gel. It is thought that these results explain a part of the photoaging mechanism of skin caused by irradiating of UVB+UVA2 *in vivo* and is available as a new evaluation method of the sunscreen product.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・生活科学一般

キーワード：生活素材・生活財、紫外線遮蔽

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚は体のなかでは最も大きな器官である。そのなかで真皮は表皮の内側にある 1.0～3.0mm の層で、コラーゲン線維とエラスチン線維、プロテオグリカン（ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸など）などの細胞外マトリックスでできており、皮膚に弾力性と強さを与えている。真皮の乾燥重量の約 70% のコラーゲン線維と 1～2% を占めるエラスチン線維による三次元ネットワーク構造により皮膚の弾力性が保たれている。日光を長期間浴びると、UVA の作用によって真皮のコラーゲン線維が変性し、皮膚の弾力性が低下し、しわが生じる原因になる。研究代表者らは、UVA の皮膚への影響についてヘアレスマウスを用いて研究した結果、日常的に浴びる UVA 量を 2 か月間ヘアレスマウスに照射すると、皮膚の弾力性が半永久的に低下することを明らかにした（① Maeda K.: Photoaging in epidermis. In: Recent Res. Devel. Photochem. Photobiol. Vol.6, pp35-47, Transworld Research Network, India, 2002. ② Maeda K., Kouno Y.: Delayed photoaging model. Proceeding of Japanese Photomedicine and Photobiology 73-75, 1999. ③ Maeda K., Naganuma M., Fukuda M.: Effect of chronic exposure ultraviolet-A including 2% ultraviolet-B on free radical reduction systems in hairless mice. Photochem. Photobiol. 54: 737-740, 1991.）。このように、UVA による皮膚の弾力性の低下には、長期間の日光曝露が必要なため、製品の紫外線防止効果の *in vivo* での評価は困難である。そこで、コラーゲン線維モデルの弾力性を用いて UVA 防止効果を測定することを考えた。

(2) 現在、国内外の UVA 防止効果の測定法としては、照射 2 時間後以降に皮膚の即時黒化を求める方法 (*in vivo* 法)、テープに塗布した試料の吸収曲線から求める方法 (*in vitro* 法) があるが、UVA によって引き起こされる主要な傷害である皮膚の弾力性低下の防止効果を評価できる UVA 防止効果評価法はないのが現状である。また、紫外線がコラーゲン線維の構造や機能に与える影響と弾力性との間にどのような関連性があるかを直接証明した研究もないのが現状である。したがって、従来の培養細胞やコラーゲン希釈溶液を用いた実験方法や考え方では日光による弾力

性低下のメカニズムを説明することが不可能であり、UVA による弾力性低下に関する真のメカニズムを発見するためには、新たな方法が必要である。

(3) 研究代表者らは、過去に UVA の皮膚に対する傷害とその防止効果について研究を行ってきた { ① Maeda K., Hatao M.: Involvement of photo-oxidation of melanogenic precursors in prolonged pigmentation induced by UVA. J. Invest. Dermatol. 122: 503-509, 2004, ② Fukuda M., Naganuma M., Maeda K.: Protection against cutaneous aging induced by repeated sun exposure. In: Cutaneous Aging, pp589-605, Eds. Kligman A. M, Takase Y., University of Tokyo Press, 1989, ③ 長沼雅子, 前田憲寿, 福田實: UVA 防止効果の評価法 (第 2 報) 健康人の即時型黒化を指標にして. 日本皮膚科学会, 1988, ④ 長沼雅子, 前田憲寿, 福田實: 長期紫外線曝露による実験的光加齢変化の研究 (第 2 報) - 紫外線波長域の皮膚変化に及ぼす影響 -. 日本皮膚科学会, 1988, ⑤ 福田實, 長沼雅子, 前田憲寿: 日本人における一次黒化作用波長曲線に関する研究. 日本皮膚科学会, 東京, 1987 等}. そのなかで、UVA による即時黒化は 330nm をピークにして、長波長側の 380nm では急速に低下することを明らかにした { 前田憲寿, 井上東彦, 西川洋史, 三木聡子, 渋谷修, 三木徳太郎, 畑尾正人: 長波長紫外線 (UVA) 曝露による皮膚の即時型色素沈着におけるメラニンモノマーの関与とビタミン C エチルの有効性. 日本化粧品科学会誌 27: 257-268, 2003. }. しかしながら、コラーゲンに傷害を与える波長が、即時黒化を引き起こす波長と同じかどうかはわからない。このような現状では、現在用いられている皮膚の即時黒化を指標にした UVA 防止効果評価方法 (*in vivo* 法) で開発された紫外線防止製品が皮膚の弾力性低下をどの程度防止する効果があるかはわからない。これらのことから、コラーゲン線維の弾力性を低下させる波長スペクトルの研究は学術的に重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、紫外線をコラーゲン線維モデルに照射して弾力性を評価する実験系を用

いて、(1)弾力性評価方法の検討、(2)弾力性低下を引き起こす作用スペクトルの解析研究、(3)弾力性低下メカニズムの生化学的研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 豚皮膚の硬さと弾力性の測定

豚の皮膚を1×1 cmにカットした。ドイツに豚の皮膚を置き、PBSを真皮が浸るぐらいまで入れた。DERMARAY200でUVAを49 J/cm²、147 J/cm²照射した。UVBも同様に3.2 J/cm²、9.6 J/cm²照射した。Cutometer MPA580、RHEO TEX SD-700、モデラスにより真皮の硬さと弾力性を測定した。

(2) コラーゲンゲルの硬さと弾力性の測定

35mmドイツにコラーゲンゲルを作成した。DERMARAY200でUVAを49 J/cm²、98 J/cm²、147 J/cm²照射した。UVBも同様に3.2 J/cm²、6.4 J/cm²、9.6 J/cm²照射した。Cutometer MPA580、RHEO TEX SD-700、モデラスによりコラーゲンゲルの硬さと弾力性を測定した。

(3) 豚皮膚とコラーゲンゲルの硬さ・弾力性の照射波長による変化

光源としてキセノンランプを用い、10nmバンドパスフィルター(300nm、310nm、320nm、330nm、340nm、350nm、360nm、370nm、380nm)を通して、10nm毎の紫外線を、豚皮膚とコラーゲンゲルに、4.19J/cm²、8.38J/cm²照射した。Cutometer MPA580、RHEO TEX SD-700、モデラスを用いて豚皮膚とコラーゲンゲルの硬さと弾力性を測定した。

(4) コラーゲンゲル中のチロシンダイマーの測定

UVAを照射(147 J/cm²)したコラーゲンゲルと未照射のコラーゲンゲルを、6Mの塩酸で加水分解(110℃、24 h)した。0.01mg/mlのチロシン水溶液にUVAを照射(147 J/cm²)した。ジチロシンは、チロシンにホースラディッシュペルオキシダーゼと過酸化水素水を反応させて合成した。ジチロシン溶液とUVAを照射したチロシン溶液、UVAを照射したコラーゲンゲルの塩酸加水分解物、UVA未照射のコラーゲンゲルの塩酸加水分解物のジチロシン量を高速液体クロマトグラフィーで測定した。

(5) UVAを照射したコラーゲンゲルの酢酸可溶性と酢酸不溶性の測定

UVAを照射(147 J/cm²)したコラーゲンゲルと未照射のコラーゲンゲルに0.5M酢酸を

入れ、酢酸可溶性コラーゲンと酢酸不溶性コラーゲンに分け、遠心型濃縮機で水分を除去後、6M塩酸で加水分解した。UVAを照射したコラーゲンゲルの酢酸不溶性分画の塩酸加水分解物、UVAを照射したコラーゲンゲルの酢酸可溶性分画の塩酸加水分解物、未照射のコラーゲンゲルの酢酸可溶性分画の塩酸加水分解物を高速液体クロマトグラフィーで測定した。

(6) UVB+UVA2を照射したコラーゲンゲルの細胞障害性に対するUVA1、カタラーゼの防御作用

コラーゲンゲルにUVB+UVA2を照射した後に細胞を播種して、UVA1を照射した時の細胞数を未照射のものとは比べた。さらに、コラーゲンゲルにUVB+UVA2を照射した時の細胞数減少が、カタラーゼによって抑制されるかを調べた。

4. 研究成果

(1) コラーゲン弾力性低下の紫外線の作用波長の解析

コラーゲン弾力性低下の作用波長を解析した結果、弾力性低下を引き起こす作用波長は320nm付近の紫外線であり、300nm、350nm以上の紫外線には弾力性低下の作用はほとんどなかった。

(2) コラーゲン弾力性低下の紫外線の作用メカニズムの解析

また、コラーゲンゲルに紫外線を照射すると酢酸不溶性コラーゲンが増加し、不溶性コラーゲンにチロシンの架橋物であるジチロシンが増加していた。ヘアレスマウスに長期間紫外線を照射した光老化皮膚でも、不溶性コラーゲンが増加していた。

(3) コラーゲンは代謝回転が遅いタンパク質なので、長期間の日光曝露によってコラーゲンに障害が蓄積して、弾力性が低下すると考えられる。320nm付近の紫外線によってコラーゲン中にチロシンの架橋物であるジチロシンが形成されることによって、コラーゲンの弾力性が低下し、光老化皮膚に特徴的な弾力性低下が引き起こされると考えられた。

(4) コラーゲンゲルにUVB+UVA2を照射してから線維芽細胞を培養すると、細胞生存率が低下することを見出した。この作用はUVA1を照射することやカタラーゼを培地に添加することによって抑制された。UVB+UVA2を照射したコラーゲンゲルで細胞が生育できないのは、UVB+UVA2が暴露されることによって、過酸化水素が生成したためと考えられた。さらに、UVA1照射によ

る細胞内カタラーゼ活性の増加は、UVA1 が UVB+UVA2 を照射したコラーゲングルで細胞生存の低下を抑制する機序の一つと考えられた。

(5) また、日本の紫外線防止化粧品に表示されている PA(Protection Grade of UVA)は持続型即時黒化を指標にした UVA 防止効果 PFA(Protection Factor of UVA) に基づいて設定されているが、紫外線が引き起こすコラーゲン弾力性低下スペクトルと持続型即時黒化スペクトルは異なるので、持続型即時黒化を指標にした PA 表示では、紫外線が引き起こす皮膚のコラーゲンへの悪影響に対する防御効果を推察することができないと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 野々口拓人、前田憲寿、UVB曝露した培養ヒト線維芽細胞の細胞外マトリックスに対するUVA1 の再構築促進効果、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、北海道大学高等教育推進機構(札幌市)
- ② 前田憲寿、秋山裕昭、飯伏慶子、濱野奈々子紫外線によるコラーゲン弾力性低下の作用波長の解析とそのメカニズム、第 11 回日本抗加齢医学会 2011 年 5 月 28 日、国立京都国際会館(京都市)
- ③ 飯伏慶子、秋山裕昭、濱野奈々子、前田憲寿、紫外線に引き起こされるコラーゲン弾力性低下の作用波長の解析、日本農芸化学会 2011 年度大会 2011 年 3 月 27 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 憲寿 (MAEDA KAZUHISA)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：50454137