

炎症後色素沈着におけるエイコサノイドによる メラノサイト活性化機構の解明

京都大学大学院 医学研究科臨床器官病態学講座皮膚病態学分野

井 階 幸 一

Skin pigmentation after inflammation is a well recognized phenomenon, but its mechanisms have been unknown yet. A number of substances are considered to contribute to post-inflammatory pigmentation, and eicosanoids are one of the most important mediators. Eicosanoids, prostaglandins (PGs) or leukotrienes (LTs), show a potent pharmacological activity in various tissues, and actively synthesized and degraded in the skin, and contribute to the pathogenesis of a number of skin diseases such as UV-dermatitis, atopic dermatitis, urticaria and psoriasis. We examined the synthesis of leukotrienes in human melanoma cells in order to assess the function of leukotrienes in human melanocytes. The enzyme activity of LTA_4 hydrolase, which catalyzes the conversion of LTA_4 to LTB_4 , was detected in the supernatant of cultured human melanoma cells (MeWo cells) and melanoma cells obtained from patients. Immunoblotting analysis using an anti-human LTA_4 hydrolase antibody demonstrated LTA_4 hydrolase as a 70-kDa protein in both MeWo and melanoma cells. Considerable enzyme activity of LTC_4 synthase, which catalyzes the conversion of LTA_4 to LTC_4 , was detected in the microsomal fraction of both MeWo and melanoma cells. The HPLC profile of the LTC_4 synthase reaction products revealed that LTC_4 was the main product. LTD_4 was not detected under these conditions, indicating that the microsomal fraction of human melanoma cells lacks the membrane-bound γ -glutamyl transferase that converts LTC_4 to LTD_4 . LTC_4 synthase activity was inhibited by the addition of MK886, and was not altered by treatment with N-ethylmaleimide (NEM) or 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). These results indicate that the enzyme responsible for the conversion of LTA_4 to LTC_4 in human melanoma cells is LTC_4 synthase rather than a nonspecific or microsomal glutathione-S-transferase. These results also suggest that human melanoma cells can generate LTB_4 and LTC_4 from LTA_4 , and that this process is catalyzed by two enzymes: LTA_4 hydrolase and LTC_4 synthase.

1 緒 言

私達の皮膚に紫外線があたると発赤などの急性の炎症症状 (Sunburn) が生じ、3~4日後から黒褐色の色素沈着 (Suntan) を認めることはよく知られている。また、湿疹やアトピー性皮膚炎をはじめさまざまな炎症性皮膚疾患はあとに色素沈着をきたす。これらの炎症時の局所皮膚において、プロスタグランジン (PG) やロイコトリエン (LT) などのエイコサノイドが増加することから、これら脂質メディエーターが皮膚の色素沈着に関与していると考えられている⁽¹⁻⁵⁾。さらに、皮膚の炎症時には好中球、好酸球が局所に浸潤

し、組織障害性に働く諸酵素、サイトカイン、成長因子、接着分子およびエイコサノイドなどが遊離し、これらが、表皮基底層のメラノサイトに生物学的作用を与えることは十分に考えられる。さらに、肥満細胞がヒスタミンやエイコサノイドを遊離したり、あるいは局所に浸潤したマクロファージがエイコサノイドを産生する可能性もある。

さて、このエイコサノイドはアラキドン酸由来の脂質メディエーターであり、炎症状態にある細胞が何らかの刺激や障害を受けて、細胞内のホスホリパーゼ A_2 がカルシウム依存性に活性化され、リン脂質よりアラキドン酸が遊離する。このアラキドン酸は速やかに代謝されて Cyclooxygenase 経路によりプロスタグランジン、トロンボキサンが、Lipoxygenase 経路によりロイコトリエンなどのエイコサノイドが生成する。生成したエイコサノイドは速やかに細胞外へ放出され、細胞表面に存在する特異的な受容体を介し



Study of the Role of Eicosanoids in Melanocyte-stimulation in Post-inflammatory Pigmentation

Kouichi Ikai

て、臓器や組織に多彩な生理活性を發揮し、種々の生理現象や各種疾患の病態に影響を与える。エイコサノイドは一般に生体内できわめて不安定であるが、ごく微量、通常、 $\text{pM} \sim \text{nM}$ のオーダーで、オータコイドとして種々の臓器にきわめて強力な薬理作用を發揮する⁽⁶⁻⁹⁾。遊離されたロイコトリエンのうち、 LTB_4 は白血球の局所への浸潤・脱顆粒を促進させ、さらに多量のロイコトリエンが炎症巣に産生・放出される。さらに直接的に、 LTB_4 はメラノサイトを活性化し、 LTC_4 と LTD_4 はメラノサイトの増殖誘導能を持つ。ロイコトリエンはオータコイドとして作用するので、メラノサイト自身もロイコトリエンを産生し、周囲の表皮細胞、メラノサイト、真皮の、好中球、リンパ球、マクロファージ、肥満細胞、線維芽細胞などの浸潤細胞にも影響を与えられ⁽¹⁰⁻¹⁶⁾。

今回、私達は炎症後の色素沈着の機構を解明するために、オータコイドとしてのロイコトリエンのメラノサイトへの影響ならびにメラノサイト自体のロイコトリエン産生能を検討してみた。

2 実験

2.1 材料

LTB_4 、 PGB_2 および LTA_4 メチルエステルはCayman Chemical (Ann Arbor, MI) より、1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) は東京化成より、N-ethylmaleimide (NEM) とグルタチオンは和光純薬より購入した。MK-886はMerck Frosst社 (Claire-Dorval, Quebec, Canada) より提供を受けた。抗 LTA_4 水解酵素抗体⁽¹⁷⁾は東京大学医学部第2生化学教室の清水孝雄教授より提供を受けた。BALB/c-nu/nuヌードマウスは清水実験材料より購入した。

2.2 ヒト正常メラノサイトの培養

ヒト正常メラノサイトはクラボウより購入した“Melanocell”⁽¹⁸⁾を用いた。培養は添付のマニュアルに従い、HMGS添加Medium154Sの培地中、

37°Cで培養し、80%コンフルエントになった時点で、ロイコトリエンを添加し、48時間後、位相差顕微鏡で観察した。

2.3 ヒトメラノーマ細胞株の培養およびヌードマウスへの移植

ヒトメラノーマ細胞株としてMeWo cell^(19,20)を用いた。培養は10% fetal calf serum (FCS) を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY) 培地中、37°Cで培養した。5 × 10⁶のMeWo cellsをヌードマウスの背に移植し、2週後、腫瘍の重量が平均1.4 gのところまで摘出した。

2.4 患者材料よりのヒトメラノーマ細胞および色素性母斑の採取

皮膚科手術時に患者の同意のもとにヒトメラノーマ細胞および色素性母斑細胞を入手した。

2.5 エイコサノイド合成諸酵素の活性測定

皮膚科手術時に得られたヒトメラノーマ細胞、色素性母斑細胞およびヌードマウス移植ヒトメラノーマをホモゲナイズ後、細胞分画法にてCytosol分画、Microsome分画に分離し、それらを材料として、以下のエイコサノイドの合成に關する諸酵素の活性ならびに局在を検索した。

2.5.1 LTA_4 水解酵素

LTA_4 水解酵素活性の測定は、上記のメラノーマの分画に、50mM Tris-HCl (pH7.8)、1mg/ml ウシ血清アルブミンを含む反応液 (50 μl) を37°C、1分間プレインキュベーションし、 LTA_4 エタノール溶液 (終濃度70 μM) を加えて、反応を開始した。37°C、3分間の反応の後、反応停止液 (アセトニトリル/メタノール/酢酸、150/50/3) 100 μl を加え、12,000回転、5分間で遠心し、除蛋白をした。遠心血清120 μl に20 μl の0.35% EDTA (pH9.8) を加えて混和し、そのうち50 μl をHPLCに注入した。HPLCにはODSカラム

(Tosoh OFDS 80TM) を用い、溶媒としてアセトニトリル/メタノール/水/酢酸、31/3/0.006を用いた。HPLCの流速は1 ml/分とし、紫外光270 nmで生成したLTB₄の量を、PGB₂を内部標準として測定した^(17,21,22)。

2.5.2 LTC₄合成酵素

LTC₄合成酵素活性の測定はLTA₄水解酵素活性測定とほぼ同一であり、反応系に10mMのグルタチオンを加え、pH8.0で反応させ、生成したLTC₄の量を紫外光280 nmで測定した⁽²³⁾。

2.5.3 5-リポキシゲナーゼ

5-リポキシゲナーゼ活性測定は25 μM [1-¹⁴C]アラキドン酸(50,000cpm, 5nmol, 5 μl エタノール溶液)と酵素を、2 mM CaCl₂、2 mM ATPを含む50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.4)の反応液(総量200 μl)中で30℃で2分間反応を行った。0.3 mlの反応停止液[ジエチルエーテル/メタノール/0.2Mクエン酸(30:40:1)]を添加後、反応生成物を有機層に抽出し、200 μlの有機層をシリカゲルのTLCプレートに帯状にスポットした。石油エーテル/ジエチルエーテル/酢酸(15:85:0.1)の展開溶媒で-10℃で50分間TLCを行い、アラキドン酸と生成物を分離した。オートラジオグラフィーで放射能の分布を調べ、アラキドン酸から5-HPETEあるいはそれに由来する生成物への変換量を求めて酵素活性とした⁽²⁴⁾。

2.6 ウエスタンブロットイング法

上記のメラノーマのCytosol画分を0.2 mlの20%トリクロロ酢酸にて蛋白を沈殿させ、0.1 mlの1 N NaOHに溶解した後、蛋白10 mgを12%-SDS-ポリアクリルアミドにLaemmliの方法で展開後⁽²⁵⁾、ニトロセルロース紙に転写し、抗LTA₄水解酵素抗体にてウエスタンブロットイング法を行った⁽²⁶⁾。蛋白量はLowry法⁽²⁷⁾で定量した。

3 結果

3.1 ロイコトリエンの培養ヒト正常メラノサイトへの影響

“Melanocell”をHMGS添加Medium154Sの培地中、37℃で培養し、80%コンフルエントになった時点で、5 mMのLTB₄、LTC₄、PGE₂、PGD₂を添加し、48時間後、位相差顕微鏡で観察した。図1に5 mMのLTB₄添加時の所見を示した。メラノサイトは大型化し、樹枝状突起の数も増加していた。LTC₄、PGE₂、PGD₂添加でも程度の差はあっても同様の所見が得られた

3.2 LTA₄水解酵素活性

LTA₄水解酵素活性は、皮膚科手術時に採取したヒトメラノーマ細胞およびヌードマウス移植MeWo細胞のCytosol画分(100,000×g, 1 hr)に局在した(表1)。MeWo細胞(0.72 ±

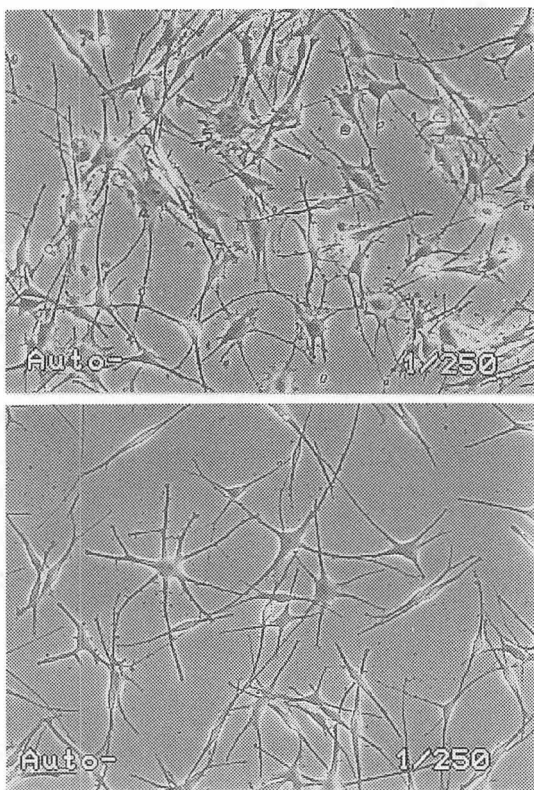


図1 Normal human melanocytes were incubated with 5mM LTB₄ (upper) or control (lower) .

0.04nmol/min/mg protein) はモルモット肺 (0.81 ± 0.21nmol/min/mg protein) や小腸 (0.85 ± 0.23nmol/min/mg protein) に比較できる程の酵素活性を示した。

3.3 LTA₄ 水解酵素のウエスタンブロッティング法

ウエスタンブロッティング法による解析では、LTA₄ 水解酵素はモルモット肺 (図

2、lane 1)、MeWo細胞 (lane 2)、手術時に採取したヒトメラノーマ細胞 (lane 3)、色素性母斑細胞 (lane 4) において70-kDaの蛋白バンドとして認められた。

3.4 LTC₄ 合成酵素活性

LTC₄ 合成酵素活性は、皮膚科手術時に採取したヒトメラノーマ細胞およびヌードマウス移植ヒトメラノーマ細胞において、大部分はの Microsome 分画 (100,000 × g pellet, 1 hr) に局在したが、一部は10,000 × g pellet の分画にも局在した (表2)。MeWo細胞の Microsome 分画と LTA₄ による反応産物を逆相 HPLC で解析すると、Microsome 分画の量の増加とともに LTC₄ も

表1 Subcellular Localization of LTA₄ Hydrolase in Human Melanoma Cells

	MeWo cells	Melanoma cells (from surgical specimen)
Specific activity (nmol/min/mg protein)		
Homogenate	0.20 ± 0.01	0.04 ± 0.01
800 x g pellet	N.D.	N.D.
10,000 x g pellet	N.D.	N.D.
100,000 x g pellet	N.D.	N.D.
100,000 x g supernatant	0.72 ± 0.04	0.23 ± 0.01

Cultured cells (MeWo) and tumor cells were homogenized, and the subcellular fractions were examined for LTA₄ hydrolase activity. Values represent the mean ± SE of 3 experiments. N.D.= not detected.

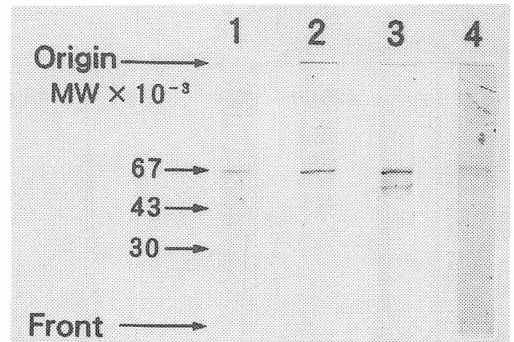


図2 Immunoblot analysis using an anti-LTA₄ hydrolase antibody. The supernatants (100,000 × g, 1 h; 10 μg protein in each lane) from guinea pig lung (lane 1), human melanoma cell line (MeWo cell) (lane 2), malignant melanoma cells (lane 3) and nevus pigmentosus cells (lane 4) were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. The proteins were then immunostained using an anti-LTA₄ hydrolase antibody.

表2 Subcellular Localization of LTC₄ Synthase in Human Melanoma Cells

	MeWo cells	Melanoma cells (from surgical specimen)
Specific activity (nmol/min/mg protein)		
Homogenate	N.D.	0.42 ± 0.03
800 x g pellet	N.D.	0.26 ± 0.08
10,000 x g pellet	0.65 ± 0.03	0.19 ± 0.02
100,000 x g pellet	1.88 ± 0.32	1.62 ± 0.06
100,000 x g supernatant	N.D.	N.D.

Cultured cells (MeWo) and tumor cells were homogenized, and the subcellular fractions were examined for LTC₄ synthase activity. Specific activity values represent the mean ± SE of 3 experiments. N.D.= not detected.

増加した(図3)。LTD₄は認められなかった。一方、モルモット肺のMicrosome分画とLTA₄による反応産物にはLTC₄とLTD₄の両方が認めら

れた。このことは、LTC₄をLTD₄に変換する酵素である膜結合型γ-グルタミルトランスフェラーゼがモルモット肺には存在しても、ヒトメラ

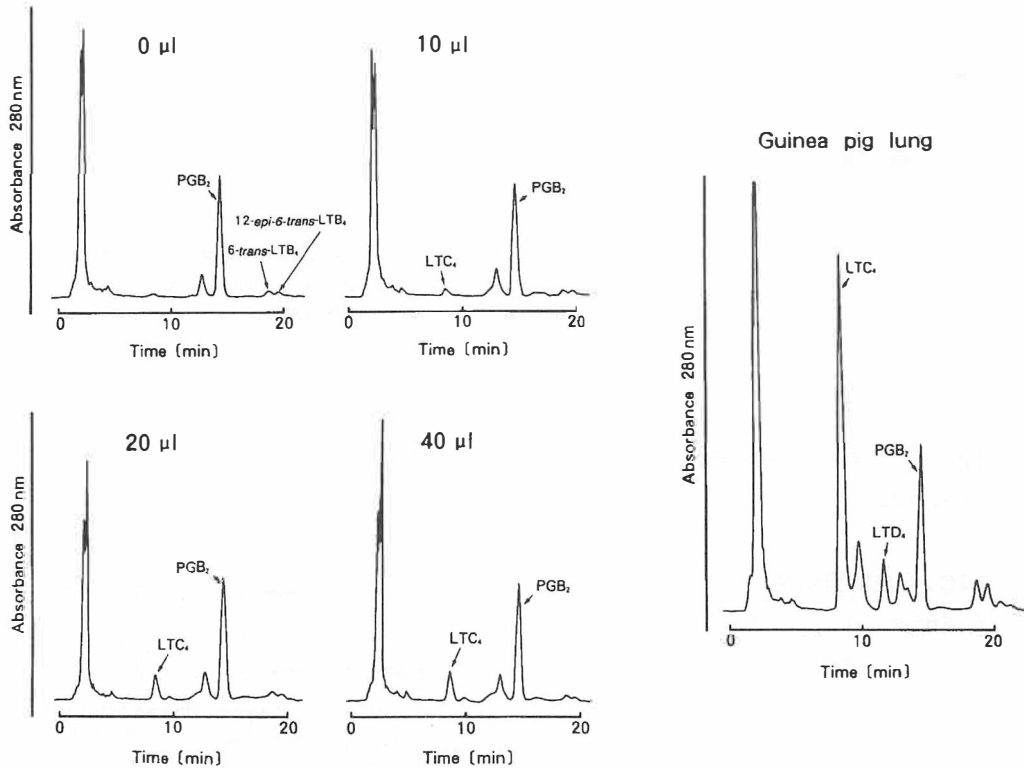


図3 Reverse phase HPLC profiles of products formed from the incubation of the microsomal fraction (100,000 x g pellet) of cultured melanoma cells (MeWo cells) incubated with LTA₄. LTC₄ is produced in a dose-dependent manner. LTD₄ was not detected. In contrast, both LTC₄ and LTD₄ are produced by the microsomal fraction of guinea pig lung, indicating that the microsomal fraction of MeWo cells lacks the membrane-bound g-glutamyl transferase that converts LTC₄ to LTD₄.

表3. Effects of Various Compounds on LTC₄ Synthase Activity in MeWo cells

Compound	LTC ₄ synthase activity (nmol/min/mg protein)
None	1.62 ± 0.06
CDNB (10 mM)	1.59 ± 0.06
NEM (10 mM)	1.61 ± 0.03
MK-886 (0.01 mM)	1.15 ± 0.00
MK-886 (0.1 mM)	0.66 ± 0.01
MK-886 (1 mM)	0.20 ± 0.01
MK-886 (10 mM)	N.D.

Effects on LTC₄ synthase activity in the microsomal fraction (100,000 x g pellet 1h) of MeWo cells by various compounds. LTC₄ synthase activity, which was assayed as described in Materials and Methods, was inhibited by increasing concentrations of MK-886. In contrast, 10 mM of CDNB and NEM had no effect on the production of LTC₄. Values are expressed as the mean ± SE of three experiments. N.D.= not detected.

ノーマ細胞には欠如していることを意味する⁽²³⁾。このMeWo細胞のMicrosome分画に局在するLTC₄合成酵素の性質を調べると、酵素活性はMK-886で濃度依存性に阻害されたが、10mM N-ethylmaleimideや10mM CDNB、過剰のグルタチオンの添加には影響を受けなかった(表3)。

4 考察

LTA₄は濃度依存性に培養新生児ヒトメラノサイトを活性化し^(12, 14)、LTC₄とLTD₄は培養新生児ヒトメラノサイトの細胞分裂を促進すると報告されている^(11, 13, 15)。従って、これらのロイコトリエンは種々の皮膚疾患における炎症後色素沈着の重要なメディエーターであるかもしれない^(10, 14, 16)。さらにメラノサイト自体によって産生されたロイコトリエンは表皮のケラチノサイト、他のメラノサイト、真皮の好中球、リンパ球、マクロファージ、肥満細胞、線維芽細胞、内皮細胞にも作用すると考えられる。このことから、メラノサイト自体のロイコトリエン産生を詳しく研究することは重要であろう。Abdel-Malekら⁽²⁸⁾の若干の報告があるものの、ヒトメラノサイトのロイコトリエン合成についての研究は乏しい。それで、今回、私達はロイコトリエンのメラノサイトへの影響ならびにメラノサイト自体のロイコトリエン産生能を検討してみた。ヒト正常メラノサイトを大量に調整するのは困難なので、私達は代わりにヒトメラノーマ細胞株としてMeWo cellを用いた。

LTA₄水解酵素活性は、皮膚科手術時に採取したヒトメラノーマ細胞およびヌードマウス移植ヒトメラノーマ細胞のCytosol分画に局在した(表1)。これは抗LTA₄水解酵素抗体を用いた免疫組織化学(data not shown)、ウエスタンブロッティング法においても確認できた(図2)。これらの結果は、従来のLTA₄水解酵素はモルモットのほぼ全ての細胞、組織に認められるという報告と一致する^(17, 21)。

一方、LTC₄合成酵素活性は、皮膚科手術時に

採取したヒトメラノーマ細胞およびヌードマウス移植ヒトメラノーマ細胞において、大部分はMicrosome分画(100,000×g pellet, 1 hr)に局在した(表2)。MeWo細胞のMicrosome分画とLTA₄による反応産物を逆相HPLCで解析すると、Microsome分画の量の増加とともにLTC₄の産生量は増加したが(図3)、LTD₄の産生は認められなかった。一方、モルモット肺のMicrosome分画とLTA₄による反応産物にはLTC₄とLTD₄の両方が認められた。このことは、LTC₄をLTD₄に変換する酵素である膜結合型γ-グルタミルトランスフェラーゼがモルモット肺には存在しても、ヒトメラノーマ細胞には欠如していることを意味する⁽²³⁾。このMeWo細胞のMicrosome分画に局在するLTC₄合成酵素の性質を調べると、酵素活性はMK-886で濃度依存性に阻害されたが、10mM N-ethylmaleimideや10mM CDNB、過剰のグルタチオンの添加には影響を受けなかった(表3)。MK-886はロイコトリエン合成の阻害剤⁽²⁹⁾であり、かつLTC₄合成酵素活性をも阻害する⁽³⁰⁾。N-ethylmaleimideはMicrosome分画に局在するグルタチオン-s-トランスフェラーゼを活性化する⁽³¹⁾、そしてCDNBはMicrosome分画に局在するグルタチオン-s-トランスフェラーゼの拮抗阻害剤である⁽³²⁾。この結果から、ヒトメラノーマ細胞において、LTA₄からLTC₄への変換に関与する主たる酵素はMicrosome分画に局在するグルタチオン-s-トランスフェラーゼや非特異的なグルタチオン-s-トランスフェラーゼではなく、LTC₄合成酵素であると考えられる。これについては、LTC₄合成酵素に対する特異抗体を用いた研究を継続中である⁽³⁰⁾。

さて、LTA₄水解酵素とLTC₄合成酵素の基質であるLTA₄はどのように合成されるかという問題が残っている。私達の予備的な実験結果では、アラキドン酸からLTA₄への変換に関与する酵素である5-リポキシナーゼ活性はヒト末梢白血球では認められたものの、MeWo細胞では認められなかった。これは抗5-リポキシナーゼ抗体を

用いた免疫組織化学、Western Blotting 法、さらに、5-リポキシゲナーゼ遺伝子をコードする cDNA の塩基配列に基づいて合成した適切なプライマーを用いた RT-PCR 法によっても確認できた。最近、ケラチノサイトに 5-リポキシナーゼ活性が存在するかどうかについては種々の論議がある。もし、メラノサイトやケラチノサイトに 5-リポキシナーゼ活性が存在しないということであれば、好中球などのような 5-リポキシナーゼ活性が存在する細胞から LTA₄ がメラノサイトやケラチノサイトに何らかの機構で移動し、LTA₄ 水解酵素や LTC₄ 合成酵素により LTB₄ や LTC₄ が生成すると仮定されている^(33, 34, 35)。このところの機構は興味深い、不明な点も多い。今回の研究結果はほんの第一歩であり、私達はメラノサイトとエイコサノイド、アラキドン酸カスケードに関係する酵素、エイコサノイド受容体の機能、細胞分布を明らかにし、これに基づいて各種炎症性皮膚疾患の炎症後色素沈着の機構を解明し、治療に結び付けていきたいと考えている。

5 追記

抗 LTA₄ 水解酵素抗体を提供していただいた東京大学医学部第 2 生化学教室の清水孝雄教授に感謝の意を表す。また、上記の結果は下記の論文で発表した。

Okano-Mitani H, Ikai K, Imamura S: Human melanoma cells generate leukotriene B₄ and C₄ from leukotriene A₄. Arch Dermatol Res 290:in press, 1997.

引用文献

- Ikai K, Danno K, Horio T, Narumiya S: Effect of ultraviolet irradiation on mast cell deficient W/W^v mice. J Invest Dermatol 85: 82-84, 1985
- Ikai K, Danno K, Horio T, Narumiya S: Ear swelling in response to UVB irradiation. Arch Dermatol Res 278: 455-448, 1986
- Ruzicka T, Simmet T, Peskar BA, Ring J: Skin levels of arachidonic acid-derived inflammatory mediators and histamine in atopic dermatitis and psoriasis. J Invest Dermatol 86: 105-108, 1986
- Ruzicka T: The physiology and pathophysiology of eicosanoids in the skin. Eicosanoids 1: 59-72, 1988
- Ikai K, Imamura S: Role of eicosanoids in the pathogenesis of atopic dermatitis. Pros Leuko Ess Fatty Acids 48: 409-416, 1993
- Samuelsson B: Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. Science 220:568-575, 1983
- Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ: Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. New Eng J Med 323: 645-655, 1990
- Janssen TU, Tomic I, Specht E, Beilecke U, Habenicht AJ: The arachidonic acid cascade, eicosanoids, and signal transduction. Ann NY Acad Sci 733: 325-334, 1994
- Henderson WR: The role of leukotrienes in inflammation. Ann Intern Med 121: 684-697, 1994
- Tomita Y, Maeda K, Tagami H: Leukotrienes and thromboxane B₂ stimulate normal human melanocytes in vitro: possible inducers of postinflammatory pigmentation. Tohoku J Exp Med 156: 303-304, 1988
- Morelli JG, Yohn JJ, Lyons MB, Murphy RC, Norris DA: Leukotriene C₄ and D₄ as potent mitogens for cultured human neonatal melanocytes. J Invest Dermatol 93: 719-722, 1989
- Morelli JG, Hake SS, Murphy RC, Norris DA: Leukotriene B₄-induced human melanocyte pigmentation and leukotriene C₄-induced human melanocyte growth are inhibited by different isoquinolinesulfonamides. J Invest Dermatol 98: 55-58, 1992
- Morelli JG, Kincannon J, Yohn JJ, Zekman T, Weston WL, Norris DA: Leukotriene C₄ and

- TGF- α are stimulators of human melanocyte migration in vitro. *J Invest Dermatol* 98: 290-295, 1992
14. Tomita Y, Maeda K, Tagami H: Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: Possible role in postinflammatory pigmentation. *Pigment Cell Res* 5: 357-361, 1992
 15. Medrano EE, Farooqui JZ, Boissy RE, Boissy YL, Akadiri B, Nordlund JJ: Chronic growth stimulation of human adult melanocytes by inflammatory mediators in vitro: Implication for nevus formation and initial steps in melanocyte oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1790-1794, 1993
 16. Morelli JG, Norris DA: Influence of inflammatory mediators and cytokines on human melanocyte function. *J Invest Dermatol* 100: 191s-195s, 1993
 17. Ohishi N, Minami M, Kobayashi J, Seyama Y, Hata J, Yotsumoto H, Takaku F, Shimizu T: Immunological quantification and immunohistochemical localization of leukotriene A4 hydrolase in guinea pig tissues. *J Biol Chem* 265: 7520-7525, 1990
 18. メラノセル (Melanocell) 取扱説明書 (クラブウ)
 19. Carey TE, Takahashi T, Resnick LA, Oettgen HF, Old LJ: Cell surface antigens of human malignant melanoma: Mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 3278-3282, 1976
 20. Fogh J, Wright WC, Loveless JD: Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58: 209-214, 1977
 21. Izumi T, Shimizu T, Seyama Y, Ohishi N, Takaku F: Tissue distribution of leukotriene A4 hydrolase activity in guinea pig. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 139-145, 1986
 22. Ikai K, Okano H, Horiguchi Y, Sakamoto Y: Leukotriene A4 hydrolase in human skin. *J Invest Dermatol* 102: 253-257, 1994
 23. Izumi T, Honda Z, Ohishi N, Kitamura S, Tsuchida S, Sato K, Shimizu T, Seyama Y: Solubilization and partial purification of leukotriene C4 synthase from guinea-pig lung: a microsomal enzyme with high specificity towards 5,6-epoxide leukotriene A4. *Biochim Biophys Acta* 959: 305-315, 1988
 24. Furukawa M, Yoshimoto T, Ochi K, Yamamoto S: Studies on arachidonate 5-lipoxygenase of rat basophilic leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 795: 458-465, 1984
 25. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 256: 495-497, 1975
 26. Towbin H, Staehlin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 980-984, 1980
 27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
 28. Abdel-Malek Z, Swope V, Doupnik C, Leikauf G, Nordlund JJ: Responsiveness of malignant and normal melanocytes to autocrine eicosanoids. *J Invest Dermatol* 92: 393, 1989
 29. Gillard J, Ford-Hutchinson AW, Chan C, Charleson S, Foster A, Fortin R, Leger S, McFarlane CS, Morton H, Piechuta H, Riendeau D, Rouzer CA, Rokach J, Young R, MacIntyre E, Eirmann G, Hopple S, Hupe L, Meurer R, Opas E, Pacholok S: L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-t-butyl-thio-5-isopropylindol-2-yl]-2,2-dimethylpropanoic acid), a novel, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can J*

- Physiol Pharmacol 67:456-464, 1989
30. Welsh DJ, Creely DP, Hauser SD, Mathis KL, Krivi GG, Isakson PC: Molecular cloning and expression of human leukotriene-C4 synthase. Proc Natl Acad Sci USA 91: 9745-9749, 1994
31. Metters KM, Sawyer N, Nicholson DW: Microsomal glutathione s-transferase is the predominant leukotriene C4 binding site in cellular membranes. J Biol Chem 269: 12816-12823, 1994
32. Agarwal R, Raza H, Allyn DL, Bickers DR, Mukhtar H: Glutathione s-transferase-dependent conjugation of leukotriene A4-methyl ester to leukotriene C4-methyl ester in mammalian skin. Biochem Pharmacol 44: 2047-2053, 1992
33. Medina JF, Odlander B, Funk CD, Fu JY, Claesson HE, Ramark O: B-lymphocytic cell line Raji expresses the leukotriene A4 hydrolase gene but not the 5-lipoxygenase gene. Biochem Biophys Res Commun 161: 740-745, 1989
34. Jakobsson PJ, Odlander B, Claesson HE: Effects of monocyte-lymphocyte interaction on the synthesis of leukotriene B4. Eur J Biochem 196:395-400, 1991
35. Breton J, Woolf D, Young P, Chabot-Fletcher: Human keratinocytes lack the components to produce leukotriene B4. J Invest Dermatol 106: 162-167, 1996