

美白剤の紫外線色素沈着制御機構とその安全性に関する研究

神戸大学 医学部皮膚科学教室

船坂 陽子

α -Tocopheryl ferulate (α -TF) is a compound of α -tocopherol (α -T) and ferulic acid connected by an ester bond; ferulic acid is also an antioxidant, and could scavenge free radicals induced by ultraviolet (UV) radiation, and thus maintain the long-lasting antioxidative effect of α -T. α -TF inhibited melanogenesis in human melanoma cells by inhibiting tyrosinase activity. The strong inhibitory effect of α -TF on UVB-induced melanogenesis and erythema formation was observed in guinea pigs. α -TF inhibited the formation of not CPD or 6-4 photoproducts but 8OHdG. Taken together, α -TF could be a good candidate for the whitening agent which suppresses UV-induced melanogenesis with sparing DNA damages induced by oxidative stress.

1 緒 言

顔面の色素沈着を引き起こす最も大きな要因の一つとして紫外線があげられる¹⁾。紫外線の色素沈着誘導機序としては、表皮メラノサイトへの直接作用と他の皮膚細胞、特に紫外線照射を受けた周囲ケラチノサイトから分泌される因子の paracrine による間接的な作用のあることが明らかにされている¹⁾。美白剤の開発は、主としてメラノサイトへ直接働いて、メラニン生成における律速酵素 tyrosinase を抑制する化合物のスクリーニングにより検討されてきた²⁾。最近では、後者の paracrine 機序に注目して、紫外線照射を受けたケラチノサイトから分泌される endothelin-1 (ET-1) が中波長紫外線 (ultraviolet B, UVB) による色素沈着に大きく作用することより、この ET-1 に対するメラノサイト上の受容体の活性化を抑制するカミツレエキスの開発が注目を集めている³⁾。しかしながらメラニン、特に黒いメラニンである eu-melanin は紫外線に対する一種の SOS 反応の産物であり、紫外線による DNA 損傷からの防御を担うことが明らかにされている⁴⁾。従って美白剤により melanin 産生を抑制した場合に、紫外線による DNA 損傷が増強するかどうかの検討が、安全性の点から重要である⁵⁾。

抗酸化剤であるビタミン E (α -トコフェロール) の経口摂取が、顔面の色素沈着の治療に有効であること、特に、ビタミン C 内服との併用療法にて、より効果的であることが報告されてきた^{6, 7)}。ビタミン E には α -、 β -、 γ -、 δ -トコフェロールおよびトコトリエノールの 8 種の同族体があるが、 α -トコフェロールが最も生物活性が強い⁸⁾。細胞膜の脂質層に入って、クロマン環とフェノールの OH 基

を通じて抗酸化作用を示す。この構造的特徴より α -トコフェロールはトコフェロキシラジカルを形成し、脂質の過酸化を防ぐ⁹⁾。トコフェロキシラジカルはビタミン C、還元型グルタチオン、セレンウムなどの酸化還元物質との共役反応により還元されて、再度フリーの α -トコフェロールが再生される⁹⁾。

そこで、我々は紫外線吸収作用と抗酸化作用を有するフェルラ酸と、ビタミン E をエステル結合させたビタミン E フェルラ酸エステル (d,l- α -tocopheryl ferulate, 以下 TF) (図 1) の、美白剤としての効能を培養ヒトメラノサイトを用いて検討した。さらに、TF が効率のよい抗酸化作用を有することより、UVB により誘導される色素沈着・紅斑形成あるいは DNA 損傷への抑制効果を、既に多くの施設で研究が進められている α -トコフェロール (α -tocopherol, T) と比較検討したので以下に述べる。

2 実 験

2.1 培養ヒトメラノサイトにおけるメラニン生成抑制実験 (メラニン量、tyrosinase 活性、DOPACHrome tautomerase 活性、DHICA polymerase 活性)

TF は脂溶性であるので、0.5% (w/v) レシチンに 0.1

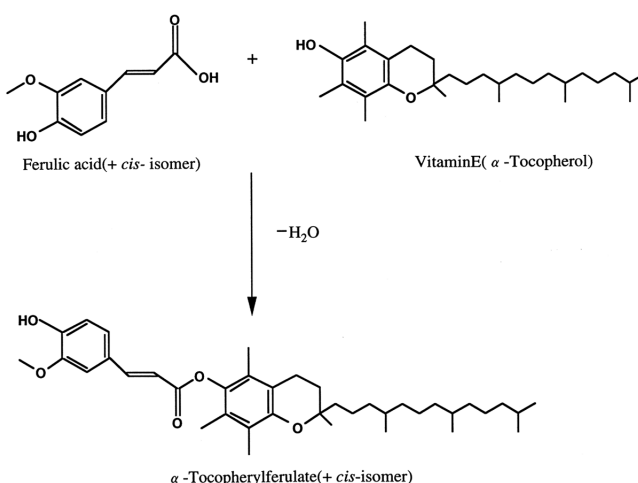
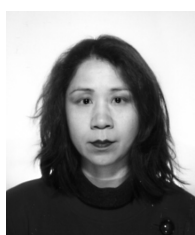


図 1 ビタミン E フェルラ酸エステルの構造



The inhibitory effect of α -tocopherylferulate on UVB-induced melanogenesis accompanied with protective effect of DNA damages

Yoko Funasaka

Department of Dermatology Kobe University School of Medicine

% (w/v) となるよう TF を混合 (即ち、レシチンは TF の 5 倍濃度、以下レシチン可溶 TF を TFL と呼ぶ) し、これをストック液とした。TF の溶媒コントロールとして、レシチン (以下 L と略す) 添加による影響も検討した。また、TF の、T やフェルラ酸 (ferulic acid, F) との比較のため、これらをエタノールに溶解したものとの比較実験も施行した。メラノテックなヒト黒色腫細胞 (HM3KO) に対して、細胞毒性を示さない濃度 (30 ないしは 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 5 日間培養した後、細胞をアルカリ処理し、メラニン可溶化してメラニン量を、また蛋白を抽出し、以下の如く酵素活性を測定した。Tyrosinase 活性は、トリチウム標識チロシンを用い、tyrosinase の働きで、チロシンがドーパになる際に生成されるトリチウム標識水量を測定することにより評価した。DOPAchrome tautomerase (TRP-2) 活性は DHICA の消失率を分光光度計で測定して評価した。DHICA polymerase 活性は、DHICA メラニンの生成量を 400nm の吸光度で測定して評価した。

2.2 UVB による色素沈着及び紅斑・DNA 損傷誘導に対する防御効果 (in vivo)

茶色モルモット背部に、1% 濃度のエタノールに溶解した T、TF および TFL を UVB 照射前後に外用し、1J/cm² の UVB を 1 週間に 2 回、連続 2 週間照射し、第 3 週めに色素沈着度を、色差計を用いて測定した。

白色モルモット背部に、1% 濃度のエタノールに溶解した T、TF、F および TFL、L を外用し、同様に 1.5-3J/cm² の UVB を照射して、4 時間および 24 時間後の紅斑

反応について観察した。

UVB による DNA 損傷は、照射 30 分、1 時間、3 時間、24 時間後に皮膚を採取し、チミン 2 量体、6-4 光産物、8-OHdG を認識する特異抗体で染色して評価した。

3 結果

3.1 培養細胞におけるメラニン生成抑制能

T、TF、TFL、L においてメラニン抑制効果を認め、これは tyrosinase 活性と DHICA polymerase 活性の抑制能と相関していたが、DOPAchrome tautomerase (TRP-2) 活性は、これらの処理にてほとんど影響を受けなかった (図 2)。

3.2 TF は in vivo における UVB による色素沈着及び紅斑・DNA 損傷誘導に対する防御効果を示す

図 3 に示すように、TF において明らかに色素沈着の形成抑制が認められた。

T と F 外用では、紅斑の抑制がみられるモルモットとみられないモルモットがそれぞれ約半数ずつ観察されたが、TF 外用では、検討した 10 匹のモルモット全てにおいて、著明な紅斑抑制がみられた。

TF 外用にて 8-OHdG 形成の明らかな抑制がみられたが、チミン 2 量体および 6-4 光産物の生成、および消退スピードにおいてはコントロールとの比較において TF、T、F い

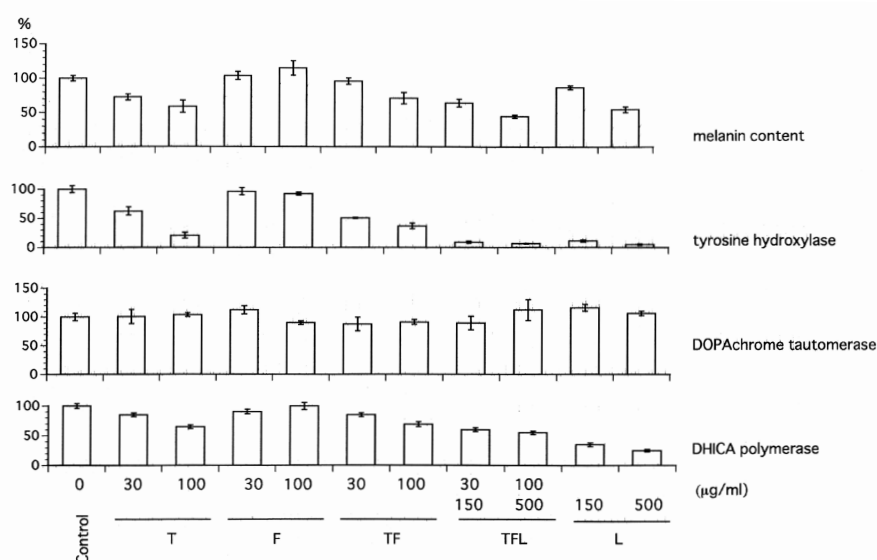


図2 α -トコフェロール、フェルラ酸、ビタミンEフェルラ酸、ビタミンEフェルラ酸レシチン、レシチンのメラニン生成抑制効果 (文献 10) を改変) ヒト黒色腫細胞 HM3KO を各種化合物の存在下に 5 日間培養した。Control: 無処理、T: α -トコフェロール、F: フェルラ酸、TF: ビタミンEフェルラ酸、TFL: ビタミンEフェルラ酸をレシチンに可溶化、L: レシチン。図中バーは標準誤差 (n=3)。

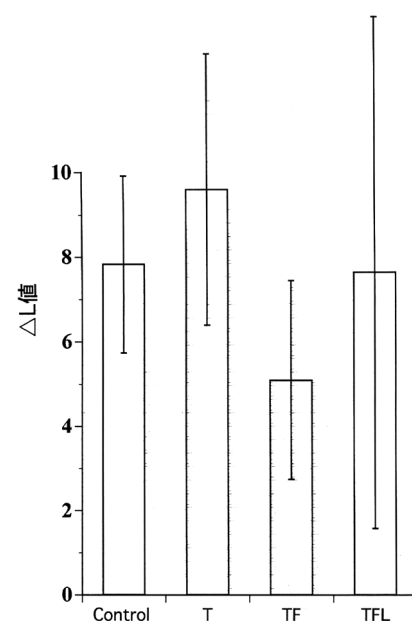


図3 茶色モルモット背部皮膚に形成された紫外線誘発色素沈着の L 値におよぼす各種抗酸化剤塗布の影響

Control: 無処理、T: α -トコフェロール、TF: ビタミンEフェルラ酸、TFL: ビタミンEフェルラ酸をレシチンに可溶化。図中バーは標準誤差 (n=4)。

ずれにおいても明らかな差は認められなかった。

4 考 察

UVB 照射ヘアレスマウス皮膚での T の作用についてはすでに多くの施設で検討が進められてきた。UVB 照射後皮膚の T 濃度が 50% に減弱することが知られており¹¹⁾、これを補充することも兼ねて、外用による UVB の急性反応の抑制について検討された結果、紅斑反応やサンバーン細胞の形成抑制が認められた¹²⁾。UVB の慢性効果としては、皮膚のしわ、膠原線維の損傷、そして腫瘍形成について検討され、T 外用によりこれらがいずれも減弱することが報告されている¹³⁾。腫瘍形成抑制の機序としては、UVB による細胞増殖、DNA 損傷を T が抑制する可能性が考えられるが、McVean らはマウス皮膚に UVB を照射する実験系で、T を紫外線照射前に塗るとチミン二量体の形成が抑制されることを示した¹⁴⁾。Berton らは紫外線照射後に T を外用し、1 MED の UVB 照射後のチミン二量体および 6-4 光産物の修復が T により増強すると報告している¹⁵⁾。しかし、細胞周期調節因子である cyclinD1 や P21 の発現パターンが変化するにもかかわらず、DNA 合成能には影響を及ぼさなかった。UVB による腫瘍形成発現時期を遅らせ、また腫瘍部のテロメラーゼ活性が T 外用群では低いことを見い出している¹⁶⁾。T はその吸収極大は 295nm であり、UVB を直接吸収して分解する。従って、McVean らの結果は一種のサンスクリーン効果により少量 UVB 照射により誘導されるチミン二量体の形成を抑制したと考えられる。我々の系で、チミン二量体および 6-4 光産物の形成抑制作用が認められなかったのは、照射量が多いためにサンスクリーンとしての効果を発揮できなかったものと思われる。実際、コントロールとして用いたサンスクリーン剤外用群では、これら DNA 損傷の形成は全て抑制された。Berton らが観察したチミン二量体および 6-4 光産物の修復が T により増強したという点は、興味深いものの、この修復増強効果の機序については全く不明である。8-OHdG は酸化ストレス即ち、ヒドロキシラジカルや一重項酸素を介して形成されるとされているが、水溶性のビタミン E にて、この DNA 損傷が抑制されることが報告されている¹⁶⁾。我々の系で、チミン二量体および 6-4 光産物のような UVB の直接作用による DNA 損傷ではなく、この 8-OHdG が選択的に抑制されたのは、TF がその抗酸化作用を効率よく発揮したためと考えられる。さらに、TF が UVB による色素沈着、紅斑、8-OHdG 形成抑制に α -トコフェロールよりも強力にその作用を発揮した理由として、エステル結合したフェルラ酸が α -トコフェロールの近傍に存在することより、抗酸化剤としてその効果を示した可能性が考えられる。しかしながら、TF により抑制されたこれら UVB による色素沈着、紅斑、DNA

損傷が一つの共通の機点に基づくものであるのか否かは不明である。

培養ヒト色素細胞を用いた in vitro の結果より、TF は強力にメラニン合成を抑制して、美白へと導くことを明らかにした。メラニンが少なくなると、ケラチノサイトの紫外線による DNA 損傷がより高度になり、紫外線発癌につながる危険性が増すと考えられている¹⁷⁾。しかしながら、TF は美白を保ちながらも、その抗酸化作用により紫外線による皮膚の損傷 (DNA 損傷および紅斑反応として認められる炎症反応) をも同時に防御しようと考えられる。今後、TF の生物効果をより詳細に分子生物学的に明らかにしていくことは、紫外線に曝露される顔面皮膚の光老化の防御や治療剤を開発していく上で重要と思われる。

(参考文献)

- 1) 船坂陽子、：メラノサイトと増殖因子、皮膚臨床、35、1371-1379、1993
- 2) 船坂陽子、市橋正光、：色素沈着の外用療法、臨皮、51、144-147、1997
- 3) Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M et al.; The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis, Pigment Cell Res, 10,218-228, 1997
- 4) Eller M, Ostrom K, Gilchrest BA.; DNA damage enhances melanogenesis, Proc Natl Acad Sci, USA, 93, 1087-1092, 1996
- 5) Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M.; Depigmenting effect of α -tocopheryl ferulate on normal human melanocytes, Pigment Cell Res, in press, 2000
- 6) ビタミン E, C 配合剤臨床研究班、：顔面色素沈着症にたいするビタミン E とビタミン C の配合剤および単味剤の治療効果、西日皮膚、42、1024-1034、1980
- 7) YEC-1 研究班、：女子顔面色素沈着症に対する YEC-1 (ユンケル (r) E C) の使用経験、基礎と臨床、25、312-323、1991
- 8) 赤田陽児、：ビタミン E と化粧品、フレグランス ジャーナル、19、68-76、1976
- 9) 古瀬一磨、：ビタミン E と過酸化脂質、フレグランス ジャーナル、14、53-56、1986
- 10) Funasaka Y, Chakraborty AK, Komoto M, et al.; Depigmenting effect of α -tocopheryl ferulate on human melanocytes, Br J Dermatol, 141, 20-29, 1999
- 11) Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM et al.; Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation, J Invest Dermatol, 93, 769-773, 1989
- 12) Trevithick JR, Xiong H, Lee S, et al.; Topical tocopherol acetate reduces post-UVB, sunburn-

- associated erythema, edema, and skin sensitivity in hairless mice, Arch Biochem Biophys, 296, 575-582, 1992
- 13) Bissett DL, Chatterjee R, Hannon DP,: Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse, Photodermatol Photoimmunol Photomed, 7, 56-62, 1990
- 14) McVean M, Liebler DC,: Inhibition of UVB induced DNA photodamage in mouse epidermis by topically applied α -tocopherol, Carcinogenesis, 18, 1617-1622, 1997
- 15) Berton T., Conti CJ, Mitchell DL, et al,: The effect of vitamin E acetate on ultraviolet-induced mouse skin carcinogenesis, Mol Carcinog, 23, 175-184, 1998
- 16) Stewart MS, Cameron GS, Pence BC,: Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture, J Invest Dermatol, 106, 1086-1089, 1996
- 17) Kobayashi N, Muramatsu T, Yamashina Y, et al,: Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells, J Invest Dermatol, 101, 685-689, 1993