

氏 名	たい 平 良 じゅん せい 誠
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 乙 第 4 号
学位授与の日付	平成 4 年 11 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	紫外線照射で皮膚に発生する活性酸素の解析とその捕捉剤の探索
審 査 委 員	(主査) 教 授 牧 野 圭 祐 教 授 松 本 継 男 教 授 遠 藤 泰 久

論文内容の要旨

酸素分子は3重項酸素で安定であるが、吸入された酸素分子は還元され、スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル($\cdot OH$)の活性酸素を生成する。これら活性酸素は生体膜を攻撃し、膜脂質の過酸化を引き起こし過酸化脂質を生成させ、糖尿病、虚血障害等と関連することが臨床レベルで明らかにされている。皮膚は紫外線に直接被曝される組織であり、活性酸素の生成しやすい環境にあるため、紫外線による皮膚障害の要因に活性酸素が示唆されているが、明確にはされていない。本研究は、紫外線照射した皮膚で、活性酸素が発生していることを明らかにし、その防御物質を探索することを目的とした。

モルモット背部皮膚に紫外線(紫外線 B、 $4 J/cm^2$ 、 $280\sim 320 nm$)を照射し、その部分について過酸化脂質の挙動及び過酸化脂質消去酵素の一つであるグルタチオンリダクターゼの活性を測定し、活性酸素発生について考察した。照射後、3、18、42時間後の皮膚の表皮部分の過酸化脂質をTBA法で、グルタチオンリダクターゼ活性を酵素アッセイ法で測定した。過酸化脂質は紫外線照射3時間後に有意に増加しグルタチオンリダクターゼ活性は低下した。また過酸化脂質量の減少した18、42時間後には酵素活性が回復した。すなわちグルタチオンリダクターゼの酵素活性の低下が、過酸化脂質の増加の要因になったものと推察され、過酸化脂質及びそれを引き起こす活性酸素が、皮膚の紫外線障害の大きな原因になっていることが推察された。

紫外線照射時の皮膚で発生する活性酸素の検出は、未だ報告がない。本研究ではスピントラップ剤を用いて活性酸素を捕捉し、生成するスピンアダクトを電子スピン共鳴(ESR)法を用いて検出するスピントラッピング法を適用し、モルモット表皮から調製した細胞に紫外線を照射し、発生する活性酸素種を調べた。照射した細胞系で得られたESRスペクトルは、 $\cdot OH$ のスピンアダクトDMPO-OH由来であった。また、得られた $\cdot OH$ が生体由来の反応により生じていることを確かめるために、エタノールなどの $\cdot OH$ スカベンジャー共存下の競争反応を用い、DMPO-OHシグナルの減衰及びその結果生じるDMPO-CH(CH₃)₂シグナルを確認をした。エタノール添加によりDMPO-OHシグナル強度が半分に減衰し、紫外線照射により得られたDMPO-OHは細胞由来の $\cdot OH$ とDMPOが反応して生じたことが明らかになった。 $\cdot OH$ は他の活性酸素種にくらべて反応性が高く、また生体での特異的な防御機構がないことから、 $\cdot OH$ が紫外線による皮膚障害の原因の一つであると結論した。

次に、 $\cdot OH$ に対する消去剤の探索を目的とし、フェントン反応液を用いて、天然精油のクローブ油の成分について $\cdot OH$ 捕捉能を検討した。DMPOとの競争反応をもちいて $\cdot OH$ に対する捕捉能を検討した。結果、各種フェニプロパノイド誘導体が大きなヒドロキシラジカル捕捉効果を持つことを見出した($k_{DMPO+\cdot OH}=10^{12} M^{-1}s^{-1}$)。この値は、 $\cdot OH$ による膜損傷を防御するメタロチオネインと同程度の

・OH 捕捉速度である。フェニルプロパノイドが・OH によるミクロソーム膜の脂質過酸化やデオキシリボース分解の抑制効果を持つことも確認した。

一般にフェノール化合物は、皮膚刺激が強く安全性及び安定性に問題が多い。今回単離したビフェニル化合物は皮膚刺激が小さいので、数種のビフェニル化合物を合成してその・OH 捕捉能と安全性及び安定性を調べた。デハイドロジオイゲノール、デハイドロジジヒドロオイゲノール、デハイドロジクレオソール、デハイドロジバニリルアルコールを合成し、またマグノロールとホノキオールを購入し、前述のフェントン系にて評価をした。結果、ビフェニル化合物は、フェニルプロパノイド誘導体と同程度で、効率よく・OH を捕捉することがわかった。その中でもデハイドロジオイゲノール、デハイドロジクレオソールは皮膚刺激もなく安全性もよく安定性も優れており、今後皮膚の活性酸素消去剤としての応用化の可能性が十分に示唆された。

論文審査の結果の要旨

平良淳誠の博士論文について詳細な審査を行った。「紫外線による皮膚障害」がヒドロキシルラジカルによって誘発されていることを、生化学的ならびに物理化学的方法によって論理的に証明しており、さらにヒドロキシルラジカルの捕捉剤を化粧品粗原料であるクローブバッド油中に求め、数種のビフェニル化合物が極めて高い捕捉能を持っていることを証明した。この論文にに記載されている内容は最近の地球環境に関する最大の課題である“オゾンホールによる皮膚障害から身を守る”ために非常に有効な点が多く、極めて時代の要請に則した研究として評価する。以下に本論文の新しい知見を示す。紫外線照射によって皮膚にヒドロキシルラジカルが生じることを明らかにした研究では、モルモットの皮膚への照射でグルタチオンリダクターゼ活性が低下しスーパーオキシドデスミターゼ活性が増加することを見出し、活性酸素が生じて脂質過酸化反応が生じる条件が整うことを明らかにしている。またこのときマロンジアルデヒドが増加し、脂質過酸化反応が進行していることを確認している。またこの原因が極めて生体毒性の強いヒドロキシルラジカルの発生によるものであることを電子スピン共鳴法によって証明しており、生化学的方法と物理化学的方法が巧みに組み合わせられている点に創意工夫を見出す。後半の課題は、化粧品原料として用いることのできるヒドロキシルラジカル捕捉剤を見出す点にあるが、電子スピン共鳴法を巧みに用い、クローブバッド油中の成分中に効果的捕捉剤を見出し、さらには皮膚刺激の少ないビフェニル化合物を合成してその改良を行うなど、申請者の専門である化粧品化学に立脚した優れた研究であると評価する。

以上のように、本学位論文の内容は論理的に詳細にまとめられていると評価する。この内容は1編の国内学術雑誌と3編の国際的学術雑誌に報告されており、本学の学位(学術)を授与するに十分値する内容のものであると結論する。