

南極における紫外線カット素材のコラーゲン人工皮膚への防御効果

島根大学教育学部 高橋哲也
島根大学生物資源科学部 山本達之
九州大学バイオアーキテクチャーセンター 笠井稚子・近藤哲男
(株)ニッピバイオマトリックス研究所 田中啓友・服部俊治・入江伸吉
国立極地研究所 工藤 栄・伊村 智・神田啓史

Protection Effect for Collagen Artificial Skin of UV-cut Materials in Antarctica

Tetsuya Takahashi^{*1}, *Tatsuyuki Yamamoto*^{*2}, *Wakako Kasai*^{*3}, *Tetsuo Kondo*^{*3}, *Keisuke Tanaka*^{*4},
Shunji Hattori^{*4}, *Shinkichi Irie*^{*4}, *Sakae Kudoh*^{*5}, *Satoshi Imura*^{*5}, and *Hiroshi Kanda*^{*5}

^{*1} Faculty of Education, Shimane University, 1060, Nishikawatsu-cho, Matsue, Shimane 690-8504, Japan

^{*2} Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, 1060, Nishikawatsu-cho, Matsue, Shimane 690-8504, Japan

^{*3} Bio-Architecture Center, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

^{*4} Nippi Research Institute of Biomatrix, 520-11, Kuwahara, Toride, Ibaragi 302-0017, Japan

^{*5} National Institute of Polar Research, 10-3, Midoricho, Tachikawa, Tokyo 190-8518, Japan

Abstract : In the Antarctica during mid-summer being appropriate for a severe environment of UV-rays, the authors surveyed the protective effect of UV-cut materials against UV-rays, using a collagen sheet (hereafter “collagen artificial skin”) that was covered with a UV-cut film and subjected to exposure outdoors. First, exposure of the laminated, collagen artificial skin not covered with any film to UV-rays caused the extracts from the 1st layer, i.e. the utmost outer-layer, of the collagen artificial skin to increase the terminal amino group concentration up to as high as 3.20 nmol/ml, since the collagen molecular chain was largely cut. On the other hand, for the 2nd and 3rd layers of the said sheet, the terminal amino group concentrations were found to have decreased in order, and for the 4th layer and onward, the concentrations were shown to have decreased down to 0.22 nmol/ml, which were nearly equal to the level before the exposure. Although the bands of three molecular chains of α -, β -, and γ -chains in all samples after exposure to UV-rays were disappeared, it was also shown that the more a layer was inside, the less the collagen molecular chain was not dissolved. In addition, when the collagen artificial skin covered with a UV-blocking, zinc oxide-added film was exposed to the sunlight, it was demonstrated that the more the addition of zinc oxide in the film increased, the lower the terminal amino group concentration in the extracts from the exposed, collagen artificial skin was observed. At the time when the added quantity of zinc oxide reached 0.40v%, the concentration was maintained almost at the same level as observed prior to the exposure. Also in comparison with UV-protecting agents, it was shown that the film added with an organic compound acting as a UV-absorbing agent reduced most the damages sustained by UV-rays. As described above, the evaluation method using a collagen artificial skin could be effectively employed in outdoor exposure for examining the protective effect of UV-cut materials to the skin against the UV-rays in the Antarctica.

(Received 23 June, 2009 ; Accepted 8 August, 2009)

1. 緒 言

南極の真夏は、長時間の日照、雪の照り返し、低湿度、空気中の浮遊粉塵量が少ないことなどの理由から、一日の積算紫外線量が赤道直下よりも多いことが知られている[1]。事実、日本南極地域観測隊ではサングラス、日焼け止めクリーム、紫外線カット剤配合リップクリームなどが隊員全員に支給され、夏作業にはそれらの使用は決

して欠かすことができない。

太陽光線の約6%は紫外線エネルギーであることが知られており、波長の短いものほどエネルギーが大きい。「しわ」、「しみ」といった皮膚障害や白内障の恐れもある[2,3]。美容的にも気になる皮膚の老化現象も、日光に含まれる紫外線による光老化が主な原因とされている[4]。紫外線は皮膚の遺伝子にも傷つけ、さらには免疫力も低下させる[5]。

著者らは皮膚モデルの成分としてコラーゲンに着目した。コラーゲンは細胞外マトリックスの主要タンパク質として各臓器に広く分布しており、皮膚ではI型コラーゲンを主成分とする線維性コラーゲンが乾燥重量の70~80%も占める。特に、真皮層においては線維成分の90%以上も存在する[6]。前報[7]では、スポンジ状のコラーゲンシート(以下、“コラーゲン人工皮膚”と記す)を紫外線カットフィルムで覆って、キセノンランプで人工的に照射した。そして、コラーゲン人工皮膚を用いることによって、紫外線カットフィルムの紫外線に対する防御効果について調べた。本報では、紫外線カットフィルムをコラーゲン人工皮膚に貼り合わせて、実際に苛酷な環境である真夏の南極にて屋外曝露を試みた。南極における紫外線カット素材の皮膚への防御効果について調べたので報告する。

2. 実験

2.1 試料

2.1.1 紫外線防御剤

紫外線防御剤として、紫外線散乱剤である粒径25nmの酸化亜鉛 ZnO(分子量 Mw: 81.39), 粒径が約30nmの酸化チタン TiO₂(分子量 Mw: 79.87), 紫外線吸収剤である有機系化合物 2-(2'-hydroxy-3'-tert-butyl-5'-(methyl-phenol))-5-chlorobenzotriazole, C₁₇H₁₈N₃O(分子量 Mw: 315.8)を用いた。なお、紫外線散乱剤とは、無機物の超微粒子による光に対する表面反射や散乱効果を利用し、紫外線を物理的に反射する粉末を指す[8]。紫外線吸収剤とは、紫外線を吸収して微小な熱エネルギーに変換して放出するものを指す[8,9]。なお、本実験に用いた有機系化合物は、紫外線エネルギーによって分子構造の一部の一重結合と二重結合が入れ替わるとともに、再び熱を放出して元の安定した状態に可逆的に戻る物質である。

2.1.2 紫外線カットフィルム

ポリプロピレン(分子量 Mw: 3.0×10⁵), ポリアミド6(分子量 Mw: 5.54×10⁵), 低密度ポリエチレン(分子量 Mw: 1.04×10⁵)の各ポリマーに対して、2.1.1項に示した紫外線防御剤を添加し、Tダイフィルム成形機を用いて厚み50±2μmのフィルムを作製した。なお、本実験でフィルム成形する際、酸化亜鉛の粒子は良好にポリマー中に分散していたのに対して、酸化チタン粒子は凝集が生じてフィルムが不透明となっていた。なお、添加量は全て体積分率(v%)で表記した。

2.1.3 コラーゲン人工皮膚

豚皮由来のコラーゲン線維を蒸留水に分散し、クエン酸にてpH3.5に調整した。ワーキングブレンダーを用いて均一に破碎した後、脱泡を行い、終濃度2.0wt%のコラーゲン分散液を調製した。FTS社製凍結乾燥機 DURA-DRYを用いてコラーゲン分散液を凍結乾燥し、得られたスポンジ状物を厚さ1.5mmにスライスした。そして、目付

29g/m²のコラーゲン人工皮膚を得た。コラーゲン人工皮膚の厚みは、測定圧0gf/cm²では1,500μm, 50gf/cm²では1,402μm, 240gf/cm²では1,193μmである。

2.2 曝露方法

南極リュツォ・ホルム湾沿岸部に位置する東オングル島・昭和基地の南方約50kmのスカルブスネスきざはし浜に曝露用架台を設置した(南緯69度28分, 東経39度40分)。図1に曝露地周辺の地図を示す。曝露サンプルは、高さ1.5mの曝露用架台に頭上方向(水平面)と真北方向(垂直面)に向けて設置した(図2)。その際、方位は磁方位ではなく、真方位とした。また、曝露用のサンプル(10×12cm)が重ならないように、間隔を空けて曝露用架台に取り付けた(図3)。

また、紫外線カットフィルムでコラーゲン人工皮膚を覆って曝露する場合には、2枚の紫外線カットフィルムでコラーゲン人工皮膚を挟んでヒートシールしてブラックボードに貼り付けることとした(図4)。なお、曝露期間は南極の真夏である2003年12月23日~2004年1月22日までの30日間とした。

2.3 コラーゲン人工皮膚からの抽出

コラーゲン人工皮膚の分析を行なうため、コラーゲンを抽出することにした。まず、曝露後のコラーゲン人工皮膚を3×3mm程度の大きさに細断して約0.1gを秤量瓶に入れ、その100倍量の50mM酢酸水溶液を加えて浸漬させた。秤量瓶の蓋をして、振盪器を用いて振盪速度120rpmで24時間振盪した。その後、上清のみを採取し、コラーゲンの抽出液を得た。



Fig. 1 The map of surrounding Skarvsnes area, East Antarctica.



Fig. 2 Sunlight exposure experiment of collagen artificial skins at the Kizahashi raised beach in Skarvsnes of Luetzow-Holm Bay region in mid-summer.



Fig. 3 Macrophotography of exposure samples at Skarvsnes, Antarctica.

2.4 測定方法

2.4.1 紫外線の照射強度

米国ウルトラバイオレット社製 デジタル式紫外線強度計 UVX 型を用いて、波長 254nm, 310nm, 365nm における頭上方向(水平面)と真北方向(垂直面)の紫外線強度を測定した。その際、温湿度計を用いて気温、湿度も測定した(表 1)。

2.4.2 ニンヒドリン反応

2.3 項で得られたコラーゲン抽出液 0.1ml を試験管に入れ、和光純薬工業(株)製ニンヒドリン溶液(プロピレングリコールモノメチルエーテル、ニンヒドリン)を 1ml、和光純薬工業(株)製 緩衝液(プロピレングリコールモノメチルエーテル、酢酸リチウム二水和物)を 1ml 加えた。攪拌した後、試験管の上にガラス球を置き、100℃ で 10 分間加熱した。その後、室温下で 3 時間程度放置した。株式会社島津製作所製 島津自記分光光度計 UV-3100 を用いて、波長 570nm での試料液の吸光度を測定した。また、コラーゲン分子鎖と同様に 1 分子中に 1 つの末端アミノ基を持

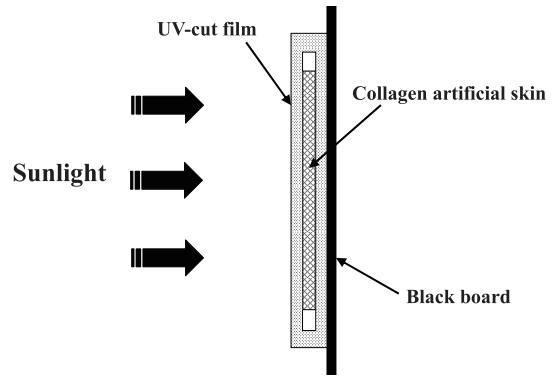


Fig. 4 Schematic representation of exposure samples.

つ牛血清アルブミンの異なる濃度の溶液も作製し、同様の処理をして吸光度を測定した。ニンヒドリンは末端アミノ基のみに反応すると仮定し、末端アミノ基濃度と吸光度の検量線を作成した。この検量線を用いて、試料液の吸光度より液中の末端アミノ基濃度を算出した。なお、測定は 5 回行ってその平均値を求めた。図には、エラーバーにて最小値と最大値を記した。

2.4.3 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社製ミニプロティアン 3 セルを用いて電気泳動を実施した。まず、コラーゲン抽出液 0.1ml を東京理化学株式会社製 凍結乾燥機 FD-1000 型を用いて凍結乾燥し、抽出液を濃縮した。次に、Laemmli の方法に準じ[10,11]、厚み 0.75mm の 5% 濃縮ゲル及び 15% 分離ゲルを調製した。Laemmli のサンプルバッファーに 2-Mercaptoethanol を 5% 加えた溶液を濃縮したコラーゲン抽出液に 15 μ l 加えて、95℃ で 5 分間の加熱処理を行った。この試料液をゲルのウェルに全量注入し、100V の定電圧で約 2 時間の泳動を行った。その後、クマシーブリリアントブルー R-250 でゲルを染色しバンドを検出した。その際、分子量マーカーとして Precision Plus Protein™ All Blue Standards もウェルに 10 μ l 注入した。また、ゲルの写真より、画像解析ソフト(Imege J)を用いてその濃度の数値化も試みた。

3. 結果と考察

3.1 積層したコラーゲン人工皮膚の屋外曝露

太陽光に対する皮膚のダメージを評価する方法として、前報[7]にて報告したコラーゲン人工皮膚を用いることにした。過酷な真夏の南極にて、コラーゲン人工皮膚を紫外線カットフィルムで覆って屋外曝露を行った。

コラーゲンは 3 本のポリペプチド鎖で構成され、その 1 本当たりの分子量は約 10 万である。3 本のポリペプチド鎖のうち 2 本は同じ α_1 鎖で、1 本は異なるアミノ酸配列順序を持った α_2 鎖である。コラーゲンは紫外線を浴びると、まず架橋が形成されて高分子化し、その後徐々に分解を受けて低分子化することが知られている[12]。ニン

Table 1 Meteorological data at Skarvsnes, Antarctica.

Date	Time	Weather	Temp. (°C)	Humi- dity (%)	Ultraviolet intensity ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)			
					Vertical direction		Horizontal direction	
					310nm	365nm	310nm	365nm
23-Dec-03	8:00	Thin cloud	3.2	59.0	950	1,170	508	615
	10:00	Thin cloud	5.7	27.3	1,648	1,665	1,429	1,756
	12:00	Fine	5.5	32.3	1,648	1,665	1,734	1,974
	14:00	Fine	7.6	38.7	1,773	1,842	1,489	1,753
	16:00	Fine	6.1	27.5	1,264	1,358	809	908
	18:00	Fine	6.7	29.3	55	657	344	435
	20:00	Clear	3.8	34.6	113	166	66	97
27-Dec-03	13:00	Clear	1.9	39.5	1,638	1,949	1,517	1,917
29-Dec-03	12:00	Fine	7.3	34.7	1,655	1,908	1,595	1,961
31-Dec-03	12:00	Cloud	3.3	63.9	972	1,163	465	548
1-Jan-04	8:00	Cloud	3.4	68.4	439	565	240	329
	12:00	Cloud	7.6	39.2	1,737	1,527	1,506	1,992
	14:00	Fine	8.0	33.6	1,502	1,747	1,454	1,817
	16:00	Thin cloud	10.5	29.0	1,203	1,353	916	1,102
	18:00	Thin cloud	10.6	28.1	712	847	376	457
3-Jan-04	12:00	Fine	6.3	46.4	1,613	1,875	1,597	1,990
6-Jan-04	12:00	Cloud	3.6	41.9	1,176	1,443	804	1,130
11-Jan-04	12:00	Clear	2.3	41.0	1,214	1,671	1,496	2,040
15-Jan-04	12:00	Cloud	3.2	43.7	587	732	321	392
18-Jan-04	Strong wind from Northwest and North							
20-Jan-04	8:00	Fine	1.3	62.7	769	1,055	447	636
	10:00	Fine	5.7	34.8	1,079	1,333	1,020	1,330
	12:00	Clear	5.1	28.3	1,308	1,565	1,506	2,040
	14:00	Fine	5.7	30.4	1,252	1,474	1,198	1,587
	16:00	Fine	6.5	29.9	961	1,162	717	953
	18:00	Clear	8.2	29.5	558	684	291	359
	22-Jan-04	12:00	Cloud	1.8	65.5	507	623	291

ヒドリン染色を行なうと、切断されたコラーゲンの分子鎖末端に生じた末端アミノ基のみが反応して青紫色に発色する。そのことから、発色濃度によりコラーゲン分子鎖の劣化度合いを調べることができる。そこで、紫外線によるコラーゲン人工皮膚の劣化度合いを調べる方法として、曝露後のコラーゲン人工皮膚からのコラーゲン抽出液を採取し、液中の末端アミノ基濃度を求めることにした。

まず、紫外線カットフィルムで覆わずにコラーゲン人工皮膚を5枚積層し、曝露用架台に頭上方向(水平面)と

真北方向(垂直面)に貼り付けて曝露を行った(図5)。その結果、積層したコラーゲン人工皮膚の最外層(1層目)からの抽出液では、コラーゲン分子鎖の大幅な切断によって末端アミノ基濃度が3.20 nmol/mlと高く現われていた。一方、最外層より2層目、3層目になると末端アミノ基濃度は順に小さくなり、4層目以降では末端アミノ基濃度は曝露前に比べてあまり差がなく、0.22 nmol/mlとなった。つまり、4層目以降ではコラーゲンの分解に先立ち、コラーゲン分子間に架橋が生じている可能性が示唆された。

また、頭上方向(水平面)の曝露は、真北方向(垂直面)

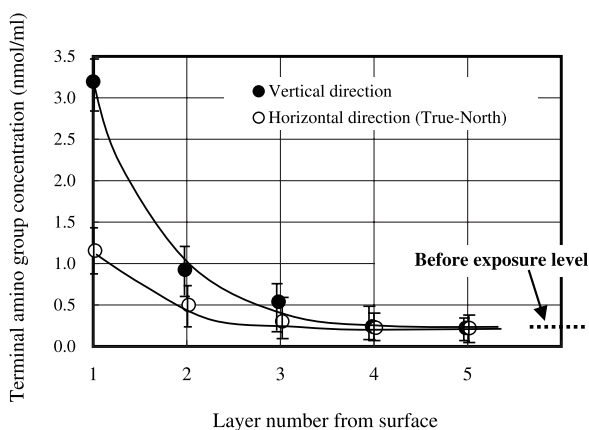


Fig. 5 Terminal amino group concentration of extracts from layered collagen artificial skins after sunlight exposure.

の曝露に比べて紫外線によるコラーゲン分子鎖の切断が多く発生し、末端アミノ基濃度が高く現われていた。つまり、頭上方向(水平面)の曝露は、真北方向(垂直面)に比べて紫外線によってより劣化していることが分かった。このことは、垂直面である真北方向の曝露では太陽が北側方向に位置する時のみ太陽光を浴びているのに対して、水平面である頭上方向の曝露では太陽光を1日中浴びているためと考えられた。

先述のように、コラーゲンに紫外線を浴びると架橋が形成されて高分子化し、その後徐々に分解を受けて低分子化する。そこで、コラーゲンに対する紫外線曝露の影響をより詳細に調べるため、15%ゲルを用いて電気泳動を行なった。図6(左)に、頭上方向(水平面)で曝露した場合の結果を示す。その結果、曝露前のコラーゲン人工皮膚には、ポリペプチドの3本の分子鎖(α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖)のバンドが見られていた。一方、紫外線曝露後の全ての試料にはコラーゲン分子鎖の切断が生じているとともに、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖のバンドは完全に消失している。また、

頭上方向(水平面)の曝露において、最外層である1層目では紫外線によって切断されたコラーゲン分子鎖の分解物が15 kDa付近に現れている。つまり、紫外線によって大幅に劣化されたと云える。また、最外層(1層目)より2層目、3層目へと進むのに従ってコラーゲン分子鎖の分解物は減少し、4層目以降では紫外線による分解が比較的少ないことも確認できた。

これらの傾向は、真北方向(垂直面)の曝露においても頭上方向(水平面)の結果と同様であった(図6(右))。但し、コラーゲン分子鎖の分解物の発生は頭上方向(水平面)に比べて少ないことがわかった。このような電気泳動の結果からも、頭上方向(水平面)の曝露の方が真北方向(垂直面)の曝露よりも紫外線の影響が大きいことが明確であった。なお、真北方向(垂直面)の曝露では最外層と2層目のコラーゲン人工皮膚が貼り付いていた部分が多かったため、あえて剥がさずに抽出した結果を示した。

また、分解物が現れている部分のSDS-PAGEの濃さを画像解析ソフトを用いて数値化を試みた。その結果、頭上方向(水平面)の曝露における1層目の濃度を100とすると、頭上方向(水平面)の2層目は98、3層目は92、4層目は32、5層目は11であった。一方、頭上方向(水平面)の曝露では、1層目と2層目は78、3層目は60、4層目は28、5層目は12であった。このようなSDS-PAGEの濃さの変化は高濃度では差が検出されにくい傾向があるものの、図5に示した末端アミノ基濃度の変化に対応していることがわかった。

3.2 酸化亜鉛を添加した紫外線カットフィルムの紫外線防御効果

南極の強い紫外線を防ぐには、紫外線カット素材で覆うことが有効であると考えられる。そこで、ポリプロピレンに対して酸化亜鉛を0.04、0.12、0.40v%添加したフィルムと、低密度ポリエチレンとポリアミド6に対して酸化亜鉛を各々0.40v%を添加したフィルムを作製した。比

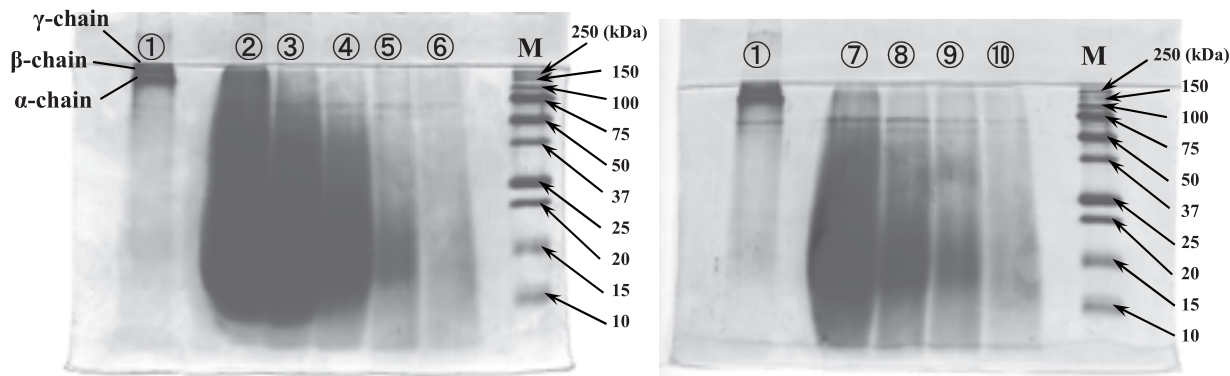


Fig. 6 SDS-PAGE of extracts from layered collagen artificial skins after sunlight exposure.
Right : Vertical exposure (Overhead direction), **Left** : Horizontal exposure (North direction)
 ① Before UV-irradiation, ② 1st layer, ③ 2nd layer, ④ 3rd layer, ⑤ 4th layer, ⑥ 5th layer,
 ⑦ 1st and 2nd layer, ⑧ 3rd layer, ⑨ 4th layer, ⑩ 5th layer, M : Molecular marker

較として、無添加のポリプロピレン、低密度ポリエチレン、ポリアミド6のフィルムも作製した。これらのフィルムでコラーゲン人工皮膚を覆い、頭上方向(水平面)と真北方向(垂直面)にて南極での屋外曝露を行った。そして、曝露後のコラーゲン人工皮膚より抽出液を採取した。その抽出液にニンヒドリン染色を行って570nmの吸光度を測定し、末端アミノ基濃度を算出した。図7には、頭上方向(水平面)の曝露におけるフィルム中の酸化亜鉛添加量と抽出液中の末端アミノ基濃度の関係を示す。図8には、真北方向(垂直面)の曝露におけるフィルム中の酸化亜鉛添加量と抽出液中の末端アミノ基濃度の関係を示す。

その結果、頭上方向(水平面)、真北方向(垂直面)の曝露とも、低密度ポリエチレンフィルムやポリプロピレンフィルムで覆った場合の方が、ポリアミド6フィルムで覆った場合に比べて末端アミノ基濃度は低いことがわかった(図7、図8)。つまり、低密度ポリエチレンやポリ

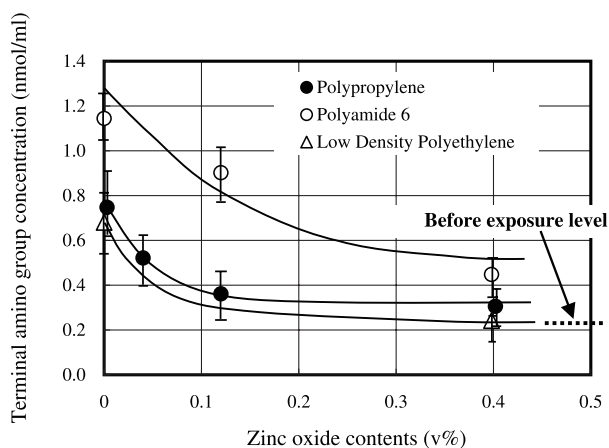


Fig. 7 Terminal amino group concentration of collagen artificial skins covered with different polymer films containing Zinc oxide after sunlight exposure in the vertical direction.

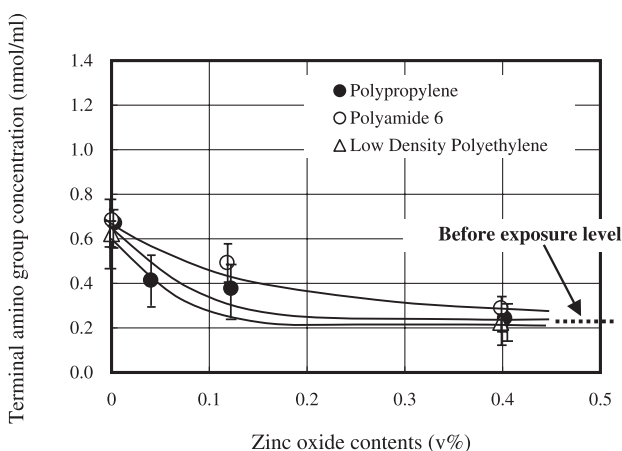


Fig. 8 Terminal amino group concentration of collagen artificial skins covered with different polymer films containing Zinc oxide after sunlight exposure in the horizontal direction (True-North).

プロピレンフィルムの方が、ポリアミド6フィルムよりも紫外線に対するコラーゲン人工皮膚のダメージを抑制できることがわかった。

また、ポリプロピレンフィルム中の酸化亜鉛添加量の増加に伴って末端アミノ基濃度は低くなり、添加量0.40v%になると曝露前とほぼ同程度の末端アミノ基濃度にまで低下した。また、頭上方向(水平面)の曝露は真北方向(垂直面)の曝露に比べて紫外線によるコラーゲン分子鎖の光劣化が大きく、末端アミノ基濃度が高く現れていた。つまり、紫外線カットフィルムで覆った場合であっても、紫外線の影響は頭上方向(水平面)の曝露の方が真北方向(垂直面)の曝露よりも高く現れることが確認された。

図9に、酸化亜鉛を添加したポリプロピレンフィルムや低密度ポリエチレンフィルムでコラーゲン人工皮膚を覆って頭上方向(水平面)にて曝露を行った場合の電気泳動の結果を示す。その結果、ポリプロピレンフィルムで覆った場合について見てみると、無添加フィルムの場合では紫外線によって切断されたコラーゲン分子鎖の分解物が15~20 kDa付近に最も現れている。つまり、紫外線により大幅に劣化されていると云える。しかし、酸化亜鉛の添加量の増加に伴って曝露後に発生するコラーゲン分子鎖の分解物は減少し、添加量が0.40v%になると紫外線によるコラーゲン分子鎖の構造に及ぼす影響は比較的小さくなることがわかった。但し、酸化亜鉛を0.40v%添加したポリプロピレンフィルムで覆った場合においても、ポリペプチドの α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖のバンドは消失していることもわかる。このことは、低密度ポリエチレンフィルムでコラーゲン人工皮膚を覆った場合においても、全く同様であった。つまり、いずれのフィルム素材においても酸化亜鉛の添加による紫外線防御効果が顕著に現れるものの、ポリペプチドの3本の分子鎖(α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖)のバンドは紫外線によって消失することもわかった。

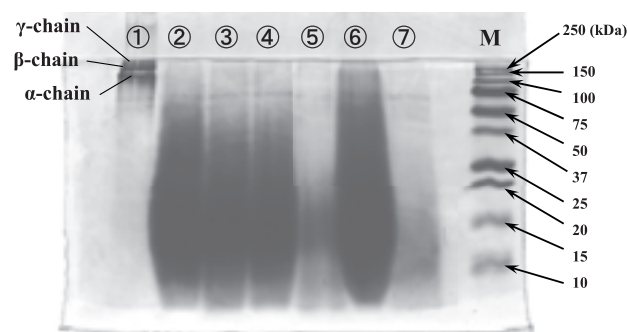


Fig. 9 SDS-PAGE of extracts from collagen artificial skins covered with different polymer films containing Zinc oxide after sunlight exposure in the vertical direction.

① Before UV-irradiation, ② PP : Additive-free, ③ PP : ZnO (0.04v%), ④ PP : ZnO (0.12v%), ⑤ PP : ZnO (0.04v%), ⑥ PE : (Additive-free), ⑦ PE : ZnO (0.40v%), M : Molecular marker

3.3 異なる紫外線防御剤を添加したポリアミド6フィルム の紫外線防御効果

紫外線防御剤として酸化亜鉛，酸化チタン，有機系化合物を各々0.40v%添加したポリアミド6フィルムでコラーゲン人工皮膚を覆い，頭上方向(水平面)と真北方向(垂直面)にて曝露を行った。比較として，紫外線防御剤を全く添加していないポリアミド6フィルムでも同様の曝露実験を行った。これら曝露後のコラーゲン人工皮膚からの抽出液を採取した，その抽出液にニンヒドリン染色を行って570nmの吸光度を測定し，末端アミノ基濃度を算出した(図10)。

その結果，紫外線防御剤を添加したポリアミド6フィルムで覆った場合には，紫外線防御剤を全く添加していないフィルムで覆った場合に比べて太陽光によるコラーゲン分子鎖の損傷が小さく，紫外線防御剤によってコラーゲン抽出液中の末端アミノ基濃度が2分の1以下となった。つまり，紫外線防御剤を添加することでフィルムの紫外線防御効果が大幅に増したと云える。また，紫外線吸収剤である有機系化合物を添加したフィルムでは，頭上方向(水平面)，真北方向(垂直面)の曝露とも末端アミノ基濃度は低く，曝露前とほとんど差が認められなかった。つまり，紫外線吸収剤である有機系化合物を添加したフィルムは，紫外線散乱剤である酸化チタンや酸化亜鉛を添加したフィルムに比べて紫外線防御効果は高いと云える。このことにより，有機系化合物の場合では紫外線による末端アミノ基濃度の上昇を有効に抑制できることがわかった。

次に，これらの曝露後のコラーゲン人工皮膚に対しても，電気泳動による分析を行なった(図11)。その結果，紫外線防御剤を全く添加していないポリアミド6フィルムで覆った場合では，紫外線によって切断されたコラーゲン分子鎖の分解物が15~20 kDa付近に多く現れていた。つまり，紫外線によってコラーゲン分子鎖が大幅に劣化されたと云える。また，紫外線防御剤の添加量の増加に伴ってコラーゲンの分解物は徐々に減少し，添加量が

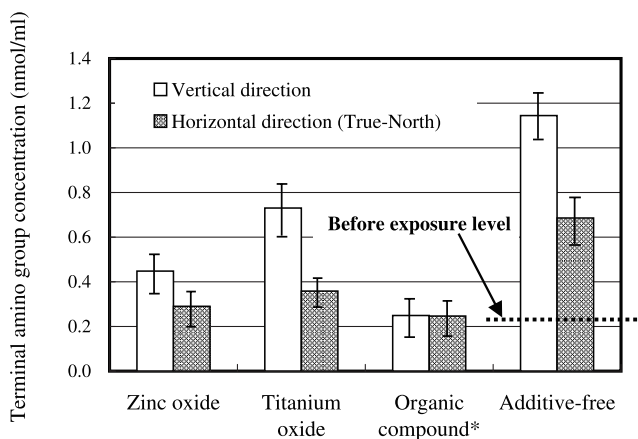


Fig. 10 Terminal amino group concentration of collagen artificial skins covered with polyamide 6 films containing different UV-protectors.

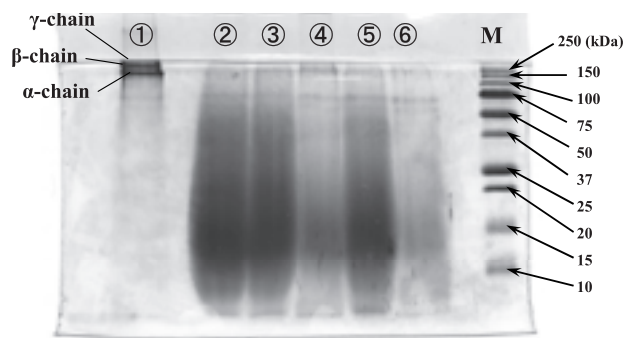


Fig. 11 SDS-PAGE of extracts from artificial skins covered with polyamide 6 films containing different UV-protectors after sunlight exposure in the vertical direction.

① Before UV-irradiation, ② Additive-free, ③ ZnO (0.12v%), ④ ZnO (0.40v%), ⑤ TiO (0.40v%), ⑥ Organic compound (0.40v%), M : Molecular marker

0.40v%になると紫外線によるコラーゲン分子鎖の分解は比較的少なくなった。このような電気泳動による分析からも，紫外線防御剤の添加が紫外線による光劣化の抑制に効果が高いことがわかった。但し，この有機系化合物には270nm付近に吸光度が低くなる波長領域があることがわかっている[7]。そのため，オゾンホールが拡大して低波長の紫外線が降り注ぐ季節になると，紫外線防御効果が逆に低下する可能性もある。

また，酸化チタンを0.40v%添加したポリアミド6フィルムでコラーゲン人工皮膚を覆って曝露したところ，コラーゲンの分解物が無添加フィルムの場合と同様に15kDa付近に現れた。つまり，紫外線によってコラーゲン人工皮膚が大幅に劣化されていることがわかった。なお，ここで紫外線散乱剤である酸化亜鉛と酸化チタンを添加したフィルムでの紫外線防御効果の相違は，フィルム中の散乱剤粒子の分散状態による影響であると考えられる。つまり，本実験に用いた酸化チタンを添加したフィルムはその分散状態が悪く，そのために紫外線の防御効果が低く現われたものと考えられる。

次に，画像解析ソフトを用いて，分解物が現れている部分のSDS-PAGEの濃さを数値化した。その結果，無添加の場合の濃度を100とすると，有機系化合物を0.4v%添加したものでは28であった。このようなSDS-PAGEの濃さの変化は，図10に示した末端アミノ基濃度の変化にほぼ対応していた。

以上のように，屋外曝露における紫外線カット素材の皮膚への防御効果を調べる方法として，コラーゲン人工皮膚を用いることは有効であった。既に，オゾンホール発生時である春季の南極においてもコラーゲン人工皮膚を用いた曝露実験も行っており，短波長の紫外線に対する皮膚への影響についても報告していく予定である。

4. 結 論

紫外線カットフィルムでコラーゲン人工皮膚を覆って、真夏の南極にて屋外曝露を行った。そして、紫外線カット素材による紫外線に対する皮膚への防御効果について調べた。

- (1) コラーゲン人工皮膚を積層して曝露したところ、最外層である1層目のコラーゲン人工皮膚からの抽出液には末端アミノ基濃度が3.20 nmol/mlと高く現われた。最外層より2層目、3層目へと進むのに従って末端アミノ基濃度は順に小さくなり、4層目以降は曝露前と同程度の0.22 nmol/mlにまで低下していた。
- (2) 種々のフィルム素材に酸化亜鉛を添加したフィルムでコラーゲン人工皮膚を覆って屋外曝露した。その結果、低密度ポリエチレンやポリプロピレンのフィルムで覆った場合には、ポリアミド6フィルムで覆った場合に比べてコラーゲンの損傷は小さかった。
- (3) フィルム中の酸化亜鉛添加量が増すほど、曝露後のコラーゲン人工皮膚からの抽出液中の末端アミノ基濃度は低下した。さらに添加量が0.40v%にまで達すると、曝露前とほぼ同程度の末端アミノ基濃度にまで低下することがわかった。
- (4) 異なる紫外線防御剤を添加したポリアミド6フィルムでコラーゲン人工皮膚を覆って曝露を行った。その結果、紫外線吸収剤である有機系化合物を添加したフィルムを用いるとコラーゲンの紫外線曝露に対する損傷は最も小さかった。また、電気泳動による分析でも、コラーゲン分子鎖の分解物の発生が比較的少ないこともわかった。
- (5) 曝露方向による紫外線の影響を調べたところ、コラーゲン人工皮膚を紫外線カットフィルムで覆った場合、覆わなかった場合のどちらであっても、頭上方向(水

平面)の曝露は真北方向(垂直面)に比べて紫外線による光劣化が大きかった。

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金(基盤研究(C)課題番号17510068[平成17-19年度])により行われた。

文 献

1. *Antarctic Meteorological Record*, Japan Meteorological Agency Ed., Japan Meteorological Business Support Center, CD-ROM.
2. T. D. Tenkate, *J. Environ. Health*, **61**, 2, 9-15 (1998).
3. A. J. Swerdlow, *Radiat. Prot. Dosim.*, **91**, 1/3, 19-23 (2000).
4. K. Matsunaga, *Radiation Biology Research Communications*, **33**, 3, 282-295 (1998).
5. A. Morita, A. Maeda, *Jpn. J. Dermatol.*, **118**, 9, 1683-1689 (2008).
6. S. Hattori, T. Ebihara, M. Amano, C. Sato, S. Irie, *Fragr. J.*, **29**, 11, 52-58 (2001).
7. T. Takahashi, K. Tanaka, S. Hattori, S. Irie, S. Kudoh, S. Imura, S. Kanda, *Sen'i Gakkaishi*, **65**, 344-358 (2009).
8. M. Naganuma, *J. Jan. Cosmetic Sci., Soc.*, **20**, 3, 187-191 (1996).
9. C. Mendrok-Edinger, K. Smith, A. Janssen, J. Vollhardt, *Cosmet. Toiletries*, **124**, 2, p.47-48, 50-52, 54 (2009).
10. U. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
11. T. Ebihara, K. Iijima, K. Sato, I. Someki, K. Kuwahara, S. Hattori, S. Irie, *Connective Tissue*, **31**, 17-23 (1999).
12. K. Watanabe, *Recent Res. Devel. Macromol. Res.*, **4**, 157-172 (1999).