小山純一 森川良広 松本 勲

Studies on free amino acids in human
stratum corneum of epidermis

Jun-ichi Koyama, Yoshihiro Morikawa, Isao Matsumoto

There are many reports relating to the differences of free amino acids between abnormal skin and normal one, however their relations remain still unclear.

The behaviors of free amino acids in the stratum corneum of normal epidermis and abnormal one which was artificially induced by UV-irradiation and application of surfactant were examined.

Free amino acids in the stratum corneum of epidermis changed with region of body, seasons and ages. Especially citrulline and ornithine showed characteristic behaviors. It was suggested that citrulline and ornithine were related with each other.

By UV-irradiation and application of surfactant, the amounts and composition of free amino acids were changed. The behaviors of changes were the same in both cases; citrulline and ornithine were characteristic.

These phenomena suggested that free amino acids in the stratum corneum reflected the epidermal keratinization. By analysis of free amino acids extracted from the human skin, useful informations relating to skin conditions will be offered.

1. 緒 言

表皮には臓器、血中などに較べて多くの遊離アミノ酸が存在している。Spier¹⁾によると表皮の水溶性成分のうち約40%を遊離アミノ酸が占めているとされており、興味ある対象である。Spier 以後、多くの研究者により遊離アミノ酸の意義が研究され²⁻⁴⁾、表皮の遊離アミノ酸は単に表皮タンパクの分解によるものではなく、表皮自身のアミノ酸代謝を反映しているものであると報告されているが、遊離アミノ酸の由来、役割については未だ不明のままである。また、皮膚疾患と遊離アミノ酸との関連も調べられ、皮膚疾患により遊離アミノ酸が変動するという報告は多い。⁵⁻¹²⁾しかし、この種の研究はアミノ酸の採取法の違い、疾患部と比較するコントロー

ル部の選び方が曖昧であるとか分析法の違いなどにより統一的な見解は得られていない。著者らは、正常時の遊離アミノ酸の挙動を把握したのち、人工的に炎症を起こした部位の遊離アミノ酸の変化を調べ、角層中の遊離アミノ酸の変化がその部分の皮膚状態を知るための指標として利用できるかについて検討した。

2. 実 験

2・1 正常時の挙動

正常時の遊離アミノ酸の挙動を把握するため、部位差、季節差、年齢差をとり上げた。年齢差は女性41名(20~61才)の手甲を対象とし、季節差は10~2月および8月に採取して各種アミノ酸の挙動を調べた。

2・2 人工的に炎症を起こした場合の挙動

2・2・1 UV-照射の影響

UV-照射は40W、SE-ランプ(λ max=280nm)を用い、照射距離30cm、照射時間をそれぞれ2, 4, 6分に設定

㈱資生堂研究所; 横浜市港北区新羽町1050
Shiseido Laboratories; 1050, Nippa-cho, Kohoku,
ku, Yokohama-shi

し、照射した左上腕部と未照射の右上腕部の遊離アミノ酸の経時変化を検討した。

2・2・2 界面活性剤塗布の影響

ドデシルベンゼンスルホン酸ソーダ (LAS) 5%水溶液及び LAS を含んだ洗剤と含まない洗剤 (それぞれ10倍希釈) を直径2cmのガーゼに浸し左前腕で24時間閉塞パッチを行い、未塗布の右前腕と比較し、経時変化を調べた。

2・3 遊離アミノ酸の採取法

直径2cmのカップを皮膚上に置き、エチルエーテルで30秒間脱脂した後、蒸留水を2分および30秒の2回加え抽出した。

2・4 測定機器

アミノ酸分析は日立835型高速アミノ酸分析計と IBM システム-7を接続させたものを用いた。

3. 結果および考察

3・1 正常時の遊離アミノ酸の挙動

3・1・1 部位差

手の平から背部までの各部での遊離アミノ酸組成の一例を Fig.-1 に示した。いわゆる必須アミノ酸に属するアミノ酸 (Thr, Val, Ile, Leu, Phe, Lys) は含有量が少なく、非必須アミノ酸 (Pro, Asp, Ser, Cit, Glu, Gly, Ala, Tyr, Orn, His, Arg) に属する多くのものは含有量が多いことがわかる。

部位が違っていても含有量の少ないアミノ酸の割合にはそれほど大きな差はみられないが、含有量の多いアミノ酸には部位により差がみられる。特に Arg, Orn, Cit は手の先から体の中心部に向うにつれて Cit, Arg の割合は増加し、逆に Orn の割合は減少しており部位による

Fig.-1 Free amino acids composition in various areas of the body.

- 1) Palm of the hand 2) Back of the hand 3) Forearm
4) Upper arm 5) Dorsum

Table-1 Free amino acid composition in various areas of the body.
(Neighboring position and symmetrical position)

Amino acid	Neighboring position (forearm)				Symmetrical position			
	①	②	③	④	wrist		upper arm	
					Right	Left	Right	Left
Proline	1.06	1.05	1.02	1.05	1.01	1.24	0.66	0.62
Aspartic acid	2.86	3.76	2.77	3.40	2.77	2.55	2.32	2.20
Threonine	5.93	5.91	5.80	5.71	5.48	5.85	5.96	6.07
Serine	31.78	31.62	32.13	32.53	28.79	28.91	26.10	25.77
Citrulline	5.21	4.61	5.20	4.38	4.48	4.48	6.09	5.64
Glutamic acid	1.48	1.69	1.32	1.34	1.71	1.64	2.21	2.13
Glycine	17.80	18.06	17.91	18.48	14.90	15.94	14.00	13.95
Alanine	11.08	10.19	11.46	10.69	10.93	12.17	11.02	11.50
Valine	2.75	2.72	2.65	2.68	2.86	3.39	3.11	3.47
Isoleucine	1.50	1.48	1.42	1.40	1.61	2.00	2.01	2.39
Leucine	1.41	1.53	1.36	1.42	1.62	2.00	2.01	2.30
Tyrosine	1.43	1.39	1.42	1.37	1.53	1.60	1.63	1.77
Phenylalanine	1.01	1.01	0.97	0.95	1.11	1.09	1.11	1.32
Ornithine	3.76	3.99	4.26	4.60	4.05	4.06	2.78	3.14
Lysine	1.54	1.54	1.48	1.48	1.54	1.72	1.99	2.02
Histidine	4.56	4.91	4.84	4.75	4.62	4.16	5.19	4.78
Arginine	2.95	2.93	2.44	2.97	2.19	2.37	4.01	4.01

差が大きいことがわかる。

次に、Table-1 に近傍部及び体の左右でほぼ対称な部位での組成を示した。近傍部の組成を比較してみると先の離れた部位ほどの差はみられず、ほぼ同じような組成であることがわかる。また、左右で対称な部位の組成を手首と上腕についてみると、手首と上腕ではすでに部位差のため組成に差がみられるが、手首、上腕どうしの左右ではほぼ同じ位置の組成を較べれば大きな差はないことがわかる。このため皮膚の異常部の組成を検討する場合のコントロール部の選び方としては離れた部位を用いるのは不適當であり、近傍部か左右で対称な部位を選ぶ必要があることがわかった。

3・1・2 季節差

Fig.-2 に季節差の認められたアミノ酸の変化を示した。図では年代別に平均値で表わした。10月から2月にかけて Ala, Cit の割合が減少し、逆に Orn, Asp, His が増加している。それぞれのアミノ酸は約1年後の8月にはまた、10月と同じ割合になっていることがわかり季節によっても遊離アミノ酸の組成には差があることがわかった。

3・1・3 年令差

年令差による遊離アミノ酸組成の違いをみると、Orn, Cit に年令との相関が認められた。Fig.-3 に示すように年令の増加と共に Orn の割合は減少し、逆に Cit の割合が増加する傾向がみられた。それぞれの回帰式に対して相関係数は共に 0.73 であり有意と認められた。

以上のように正常時での遊離アミノ酸の挙動を調べると、いつも同じではなく部位、季節、年令の違いにより

その組成は変化していることがわかった。したがって異常部での変化を調べるためのコントロール部としては同一時期に近傍部か、左右で対称な部位を選ぶ必要があることがわかった。

また、遊離アミノ酸の挙動で特徴的なことは Orn と Cit が一方が減れば他方が増えるというように、互に関連した変化をすることである。Orn, Cit は尿素回路に関係したアミノ酸であるが、皮膚には Orn→Cit へ変える酵素が見い出されずこの回路は存在しないであろうとする報告¹³⁾がなされている。しかし、Fig.-4 に示す尿素回路が皮膚にも存在すると考えれば今までの現象を良く説明することができる。すなわち、Orn, Cit はタンパク構成のアミノ酸ではないため直接タンパクの分解により生じたものではない。また、表皮自体の遊離アミノ酸も反映していない¹⁴⁾ため角層中で他の物質から変化したものと考えられ、タンパクの分解により生じた Arg からこの回路に従い Orn が、続いて Cit が生成すると考えれば Orn, Cit の関連した変化も説明できる。また Fig.-5 から Orn, Cit の組成には相関があることがわかり、このことから尿素回路自体は存在しないとしても、少なくとも、Arg→Orn→Cit までの変化は進んでいると考えられる。しかし、尿素回路と関連づけて論ずるにはさらに酵素の存在などを証明する必要がある。

3・2 人工的に炎症を起した場合の変化

3・2・1 UV 照射による変化

肉眼的変化は各照射部とも3～4日後まで紅班がみられその後黒化が始まり、8～9日後に角層の剝離がみられた。反応の強さは6, 4, 2分の順であった。

Fig.-2 Seasonal variation of free amino acid composition in the four aged groups.

Fig.-3 Relationship between ages and composition of ornithine and citrulline(October)

Fig.-4 Urea Cycle

Fig.-5 Relationship between ornithine and citrulline.

Fig.-6 Effect of UV-irradiation on the quantities of free amino acid.

この状況で抽出されてくる遊離アミノ酸の変化をみると Fig-6 のように、照射1週間あたりまで一旦減少し、その後、抽出量は増加し照射前の2倍程度に達した後、元の抽出量に回復する現象がみられた。照射時間が長いほど、回復するまでに長時間を要することがわかる。この抽出量が増加するという現象は、

- 1) 実際に角層中の遊離アミノ酸が増加している。
- 2) 角層が荒れているため抽出効率が上がったため見かけ上増加した

という二つが考えられるが、皮膚に炎症を起させると角層中の遊離アミノ酸は減少するという報告^{12,13)}があり今回の現象は後者の理由によるものと考えられる。

Fig.-7 Effect of UV-irradiation on free amino acid composition.

Fig.-8 Effect of UV-irradiation on composition of ornithine, citrulline and arginine.

次に組成の変化をみると Fig.-7 に4分照射部の代表的なアミノ酸の変化を示したが、未照射部に比べ照射部では1~2週後に変化がみられた。必須アミノ酸類は図の Lys で代表されるようにわずかながら増加の傾向がみられた。必須アミノ酸類では Asp, Orn が増加し Ser, Cit, His が減少する傾向であった。正常時に大きな変化のみられた Arg, Orn, Cit はこの場合も大きな変化がみられ Cit は減少し, Orn は増加する傾向であったが, Arg には明確な傾向はみられなかった。3種のアミノ酸のみの組成割合の変化を示すと Fig.-8 のようであり、未照射部に比べ照射部ではやはり2週後に大きな変化がみられた。2分照射部では4週後ですでに影響はみられないが、4・6分照射部では6~8週後まで影響がみられた。

UV 照射をした場合には遊離アミノ酸組成の変化はそれほど大きなものではなかったが、Pratzel ら¹⁵⁾の報告(実験方法、遊離アミノ酸の採取法は異なるが)とはほぼ同じ傾向であった。また、抽出量、Arg・Orn・Cit の3種のアミノ酸の変化に大きな影響をみることができた。

3・2・2 活性剤塗布による変化

2・2・2 項の条件で皮膚に活性剤を塗布すると肉眼的には3~4日後まで紅斑がみられ、その後7~10日後あたりまで皮膚にザラつきがみられた。LASを含まない洗剤では紅斑が他の2つに比べて弱かった。

この場合も抽出されてくるアミノ酸量の変化は Fig.-9 に示したように UV 照射の場合と同じ変化がみ

られた。

組成変化は Fig.-10 にLAS を塗布した場合を示したが3日後にすでに変化がみられ、UV 照射した場合より影響が早くみられた。変化の様子は UV 照射した場合と同様に必須アミノ酸類は増加し、非必須アミノ酸類では Asp, Orn, Glu が増加し Ser, Cit, Gly, Ala, His が減少する傾向であった。変化の大きさも UV 照射した場合より大きかったが、回復は逆に早く4週後ですでに影響がみられなくなっていた。

Arg, Orn, Cit の3種のアミノ酸の割合の変化は Fig.-11 に示したように1週後に大きな変化がみられ、4週後にはすでに回復傾向にあることがわかる。LASの含まれている洗剤を塗布した場合の変化は LAS 溶液と同程度であるが、LAS の含まれていない洗剤の変化はより小さいことがわかる。

人工的に皮膚に炎症を起すと、遊離アミノ酸は量的、組成的に変化が認められ、必須アミノ酸類の増加、非必須アミノ酸類が減少(Asp, Glu, Orn は増加)し、特にArg, Orn, Cit の3種のアミノ酸が大きく変化することがわかった。

服部¹²⁾は炎症性角化増殖症について調べた結果、Ser, Gly, His 等の著明な減少と Val, Ile, Leu, Phe が増加するという今回と同様な結果を報告している。しかし、尿素回路については Crounse ら¹³⁾の皮膚には尿素回路は存在し難いという説をとり、Orn, Cit, Arg の変化については論じていない。遊離アミノ酸の減少につい

Fig.-9 Effect of application of surfactant on the quantities of free amino acid.

Fig.-10 Effect of application of surfactant on free amino acid composition.

Fig.-11 Effect of application of surfactant on free amino acid composition.

ては, Schwarz ら¹⁶⁾の正常の角化過程においては顆粒層から角層への移行過程において, 核を失うという急激な変化に際して, keratohyalin 顆粒が分解し, 多量の遊離アミノ酸を放出するのに比し, 不全角化過程におい

ては, keratohyalin 顆粒の少ないところから, その崩壊によるアミノ酸の放出が少ないのではないかと, また turn over time が正常の角化過程よりも速い不全角化過程では, 表皮細胞はその核を角層においてもまだ保有

しており、従って核由来のアミノ酸の放出が少ないのではないか、という推論を引用している。

今回の実験のように、人工的に炎症を起した場合にも遊離アミノ酸が変化することがわかった。これは炎症などにより、角化の過程に異常が起り、その結果、詳細は不明であるが、遊離アミノ酸の生成に変化が生ずる。そのため量的、組成的に変化が生じ、さらに生成した Arg を Orn, Cit に変える過程にも変化が起り Arg, Orn, Cit の割合が変わってくるものと考えられる。

4. 総括

皮膚上から角層中の遊離アミノ酸を抽出し分析することで以下の結果を得た。

- 1) 角層中の遊離アミノ酸はいつも同じではなく部位、季節、年齢により差があることがわかった。特に Orn, Cit の挙動が特徴的であり両者の関連が示唆された。
- 2) UV 照射、活性剤塗布により人工的に炎症を起した場合にも遊離アミノ酸は量的、組成的に変化がみられた。どちらの場合も変化の様子は同じであったが、UV 照射の方が変化は少ないが、影響が長く残る傾向であった。

これらの結果から角層中の遊離アミノ酸の変化は、皮膚の角化を反映していると考えられ、角層中の遊離アミノ酸を調べることは、皮膚の状態を知るための一助となり得ることがわかった。

文 献

- 1) Spier, H.W. und Pascher, G., Hautarzt, 7,

- 55 (1956)
- 2) Matoltsy, A.G. and Balsamo, C.A., J. Biphys, Biochem, Cytol., 1 339 (1955)
- 3) Roe, D.A., N.Y. Acad. Sci., 73, 977 (1958)
- 4) Wheatley, V.R. and Farber, E.M. ibid, 36 199 (1961)
- 5) Flesch, P. and Esode, E.C.J., ibid, 73, 989, (1958)
- 6) Cornish, H.H. et. al, J. Invest, Derm., 32, 43 (1959)
- 7) Rossmiller, J.D. and Hoekstra, W.G., ibid 47, 44 (1966)
- 8) Kirk, D.L. and Hoekstra, W.G., Fad, proc., 19, 336 (1960)
- 9) Badinand, A. et, al, Bull. Soc. Chim, Biol., 37, 619 (1955)
- 10) 原田儀一郎, 入交敏勝ら, お茶の水医誌, 10, 57 (1962)
- 11) 入交敏勝ら, お茶の水医誌, 10, 64 (1962)
- 12) 服部昌利, 日皮会誌, 79, 119 (1969)
- 13) Crouse, R.G. and Rothberg, S., J. Invest., Derm. 36, 287 (1961)
- 14) 堀井和泉ら, J, S, C, C, J., 14, 172 (1980)
- 15) H. Pratzel und P. Fries, Arch. Derm. Res., 259, 157 (1977)
- 16) Schwarz, E., Arch. Klin. Exp. Derm., 225, 299 (1966)

(昭和55年11月11日受理)