

## 技術論文

## ヒト皮膚状態評価のための角質のカテプシン L 活性分析法

田原 祐助<sup>1</sup>, 伊 達 朗<sup>2</sup>, 牧野 輝彦<sup>3</sup>, 清水 忠道<sup>3</sup>, 山口 昌樹<sup>®1</sup>

著者らは、ヒト皮膚の角質中に含まれるカテプシン L (Cat L) をバイオマーカーとした皮膚評価手法の研究を進めている。本論文では、微量な角質 Cat L の簡便な活性分析法の確立を目的とし、角質採取テープを用いた角質の採取、角質サンプルの濃縮、阻害剤と蛍光基質による感度の向上を図った。本分析による Cat L 活性は 0.003～0.04 U/L の範囲内において  $R^2 = 0.98$  という良好な結果が得られた。本分析方法を用いてヒトでの生体評価を行ったところ、角質 Cat L 活性は 0.005～0.028 U/L の範囲に分布し、本測定法が十分な測定範囲を有していることが示された。このとき、角質 Cat L 活性と総タンパク量の相関係数は 0.09 と低い値を示し、角質 Cat L 活性を皮膚状態の指標として用いるには、単位総タンパク量当たりの角質 Cat L 活性を求める必要があると考えられた。すなわち、本分析方法を用いることで、角質 Cat L 活性を高感度、簡便に分析可能であることが示された。

## 1 緒 言

皮膚状態の評価は、専門医による臨床的診断だけでなく、水分<sup>1)</sup>、油脂成分<sup>2)</sup>、メラニン量<sup>3)</sup>などの物理量を計測した結果が利用されており、専用の計測機器も開発されている<sup>4)</sup>。しかし、これらの物理量の個人差が激しく、また皮膚の洗浄状態の影響も大きい<sup>5)</sup>、物理量と皮膚状態の相関はそれほど高くない。

一方で、皮膚の一部を採取して、それに含まれる酵素などのバイオマーカーを分析する方法も研究されている<sup>6)</sup>。皮膚の加齢のフリーラジカル説<sup>7)</sup>が注目されているように、バイオマーカーを解析することは、皮膚の機序を直接的に考察するために重要である。ヒトの表皮は、上層から順に、角質層、顆粒層、有棘層、基底層と呼ばれている。また、角質は基底層で分裂した角質細胞が、ターンオーバーによって皮膚の最も上層（角質層）に代謝された死細胞の層である。

カテプシンファミリーは、皮膚細胞の代謝酵素の一種であり、カテプシン D (EC 3.4.23.5) (enzyme commission, EC) や、システインプロテアーゼであるカテプシン B (EC 3.4.22.1), H (EC 3.4.22.16), L (EC 3.4.22.15) などがある<sup>8)9)</sup>。中でも、カテプシン L (Cat L, EC 3.4.22.15) は、細胞内小器官のリソソームから分泌され<sup>10)</sup>、コラーゲン、アゾカゼイン等を強力に加水分解することから、皮膚のシミやシ

ワといった皮膚トラブルと関連性が高いことが確認されている<sup>9)11)</sup>。皮膚が紫外線に暴露されると、細胞の損傷を防ぐためにメラノサイトからのメラニンの分泌量が増加する。メラニンの過剰産生、又は角質の代謝不全によって刺激を受けることで、皮膚細胞中の Cat L の分泌量が増加し、最終的にアポトーシスにつながると考えられている<sup>12)13)</sup>。

Cat L 活性の分析には、皮膚組織を採取し、蛍光基質と蛍光顕微鏡を用いて *in situ* で観察及び定量する分析キット (cathepsin L detection kit, Kamiya Biomedical company, USA) や、細胞ライセートをサンプルとし、酵素免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) を利用した定量用分析キット (cathepsin L Elisa kit, Alexis co., USA) がある。しかし、生化学分析の経験がなければ、これらの分析方法を扱うのは難しく、また結果を得るまでに半日から 1 日が必要である。一方、肝臓や脾臓に含まれる Cat L 活性の分析には、アゾカゼインを基質とした比色法<sup>14)</sup>がある。比色法は、操作が簡便である一方、測定感度が低い。その他、高感度分析手法としては、蛍光分析法<sup>15)</sup>が検討されている。

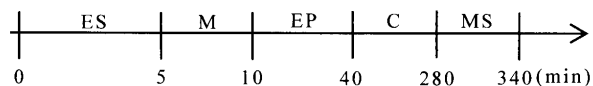
著者らは、皮膚状態を把握するためのバイオマーカーとして、角質中に含まれる微量の Cat L (以下、角質 Cat L) 活性に注目している。本論文では、微量な角質 Cat L の簡便な活性分析法の確立を目的とし、角質採取テープを用いた角質の採取、角質サンプルの濃縮、阻害剤と蛍光基質による感度の向上を図った分析方法を提案する。

角質の採取には、角質採取テープを用い、非侵襲的に誰にでも簡便に採取することができるテープストリッピングを行った (以下、テープストリッピング法)。微量な角質 Cat L 活性を分析するために、角質サンプルの濃縮を行っ

<sup>1</sup> 岩手大学大学院工学研究科生産開発工学専攻: 020-8551 岩手県盛岡市上田 4-3-5

<sup>2</sup> プロクター・アンド・ギャンブル・ジャパン株式会社: 658-0032 兵庫県神戸市東灘区向洋町中 1-17

<sup>3</sup> 富山大学大学院医学薬学研究部: 930-0194 富山県富山市杉谷 2630



**Fig. 1** Analysis protocol for Cat L of the stratum corneum

ES: Extraction of stratum corneum; M: Mixture with sample solution; EP: Extraction of protein; C: Concentration of sample solution; MS: Measuring Cat L activity and protein

た。角質 Cat L 活性を特異的に分析するために、カテプシン B の阻害剤を用いた。また、合成ペプチドである Z-Phe-Arg-AMC<sup>(16)</sup> を基質として用いた蛍光分析を行い、角質 Cat L 活性の高感度分析を行った。

## 2 実 験

### 2.1 試薬と溶液

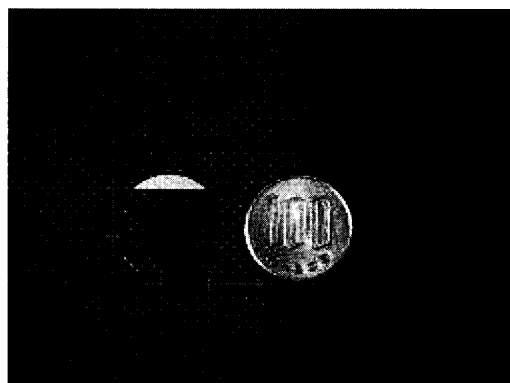
角質の採取には、円形状（直径 22 mm）のアクリル樹脂性粘着テープである CuDerm 製（USA）の角質採取テープ（D-Squame Standard Sampling Discs）を用いた。Cat L の基質には、ペプチド研究所製の Z-Phe-Arg-AMC を用いた。カテプシン B の阻害剤には、Biomol international L.P. 製（UK）の *N*-[L-3-trans-(propylcarbamoyl)-oxirane-2-carbinyl]-L-isoleucyl-L-proline を用いた。Cat L の検量線に用いたヒト肝臓由来 Cat L は、メルク製（GER）を用いた。本研究では、2 種類の緩衝液を用いた。阻害剤溶液の調製に、0.2M L-Cys 塩酸塩、1 mM ジチオスレイトール（DTT）、1 mM グルタチオン（GSH）、1 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）を含む EDTA 緩衝液を用いた。Cat L の基質溶液の調製に、0.13 M ジメチルスルホキシド（DMSO）、4 mM 酢酸を含む酢酸緩衝液（pH 5）を用いた。使用した溶液はすべて蒸留水で調製し、4℃ で保管した。

### 2.2 Cat L 活性

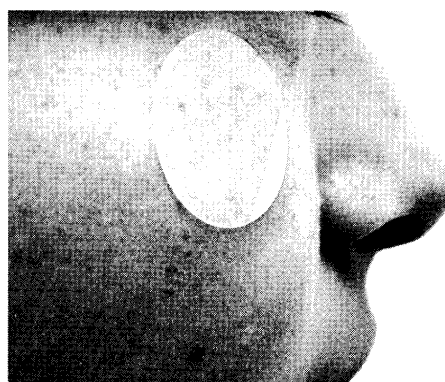
Cat L は、Z-Phe-Arg-AMC を基質として特異的に分解し、蛍光基質である 4-methyl-coumaryl-7-amide（AMC）<sup>(17)</sup> を遊離させる。その反応式を式（1）に示す。



蛍光マイクロプレートリーダー（ARVO MX, Perkin Elmer Inc., USA）を用い、AMC の蛍光強度を検出した（37℃）。Z-Phe-Arg-AMC は、カテプシン B の基質でもあるため、カテプシン B を特異的に阻害する *N*-[L-3-trans-(propylcarbamoyl)-oxirane-2-carbinyl]-L-isoleucyl-L-proline<sup>(18)</sup> を反応液に混合することで、Cat L 活性を特異的に測定した。採取した角質サンプルと標準 Cat L 溶液を用い



(a) The stratum corneum collection device manufactured



(b) Upper cheek

**Fig. 2** Collection the stratum corneum samples

て Cat L 活性の添加回収試験を行った。この統計解析には SPSS（14.0J, SPSS Inc., Japan）を用いた。

### 2.3 角質サンプルの採取

本研究で提案する角質 Cat L の分析手順を Fig. 1 に示した。皮膚疾患の認められない成人男性 5 名（22.8 ± 1.5 歳、mean ± SD）の角質 Cat L を採取するために、角質採取テープを用いて角質を採取した [Fig. 2 (a)]。本検査のプロトコルは、富山大学倫理委員会の承認を受けた。被検者には、検査の趣旨を口頭と書面の双方で十分に説明し、理解させ書面で同意を得た。皮膚表面の汗や皮脂等が角質サンプルに与える影響を防ぐために、採取 20 分前に被検者自身で水と洗顔剤で洗顔した後、タオルで水分を拭き取った。洗顔後、ローションなどを用いた肌の保湿は行わなかった。角質採取は、角質採取テープを頬上 [Fig. 2 (b)] に 30 秒間貼付してから剥離する操作を、角質採取テープを交換しつつ、同一か所で 5 回連続して行った。

角質採取テープに付着するタンパクの抽出を行うために、角質採取テープを 1 枚ずつ 1.5 mL のエッペンチューブに入れ、Triton X-100 を 0.1% 含有する 4 mM の酢酸緩衝液（pH 5）を 750 μL 加えた。超音波洗浄器（2210DTH,

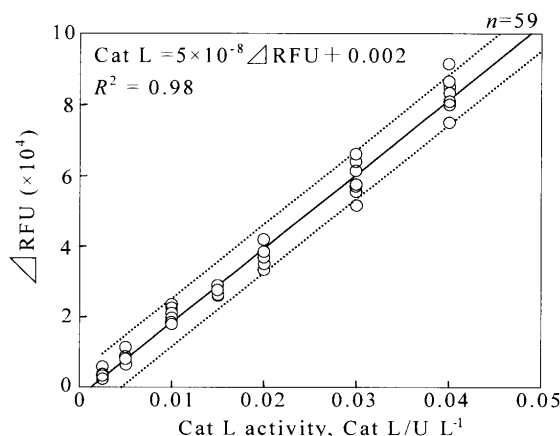


Fig. 3 Calibration curve of the Cat L activity  
 ..... : Confidence interval

Branson Ultrasonics Co., USA) を用いて, 37°C で 30 分間超音波処理を行った。角質 Cat L は微量であるため, 遠心エバポレータ (CE1, 日立工機製) を用いて, 37°C で 4 時間処理し 5 倍に濃縮することで角質サンプル液を得た。採取した総タンパク量を分析するために, 界面活性剤の影響を受けにくい Lowry 法<sup>19)</sup> を用い, タンパク質定量キット (DC プロテインアッセイ, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) を用いた。また, 採取した皮膚サンプルとタンパク質定量に用いた標準タンパク質溶液 (ウシ血清アルブミン) を用いて, 添加回収試験を行った。

#### 2.4 Cat L 活性測定

蛍光測定用の 96 ウェルプレートに, 阻害剤溶液 (10  $\mu$ M CA074, 0.2 M L-Cys 塩酸塩, 1 mM DTT, 1 mM GSH, 1 mM EDTA) 50  $\mu$ L と角質サンプル液を 50  $\mu$ L 加え, 25°C で穏やかに振とうしながら 15 分間インキュベーションを行った。更に, 基質溶液 {0.1 mM Z-Phe-Arg-AMC in 4 mM 酢酸緩衝液 (pH 5)} 50  $\mu$ L を加え, 37°C で穏やかに振とうしながら 60 分間インキュベーションした。蛍光マイクロプレートリーダーを用い, 励起波長 360 nm, 測定波長 460 nm で蛍光強度を検出した。各濃度の蛍光強度 RFU (relative fluorescence units) の値と空試験 (酢酸緩衝液) の蛍光強度の差分  $\Delta$ RFU を求め, 検量線により Cat L 活性 (U/L) を算出した。また, 本分析に用いたヒト肝臓由来 Cat L 溶液の Cat L 活性は, 25°C, 1 分で 1  $\mu$ mol の Z-Phe-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (Z-FR-AFC) を加水分解する酵素量を 1 U と定義している。

### 3 結果と考察

#### 3.1 検量線

Cat L 活性と  $\Delta$ RFU の直線性を確認するために, ヒト肝臓由来 Cat L を用いて検量線を作成した。0.003 ~ 0.04 U/L

の範囲で求めた 1 次近似直線は, Cat L 活性 =  $5 \times 10^{-8} \Delta$ RFU + 0.002,  $R^2 = 0.98$ , 変動係数 (CV) = 14.6% であった (Fig. 3)。検出限界を, 空試験に偶然誤差 ( $S_{y/x}$ ) の 3 倍を加えた信号強度に相当する Cat L 活性値と定義すると, 本法の検出限界は 0.003 U/L であった。また, 添加回収試験を行った結果, 期待値による測定値の回収率 99.0%, CV = 7.3% であり, 良好な結果が得られた。アゾカゼイン法では, 酵素活性の検出感度が報告されていない。蛍光基質とカテプシン B の阻害剤を用いることで, 0.003 ~ 0.04 U/L の Cat L を特異的に分析可能であることが示された。

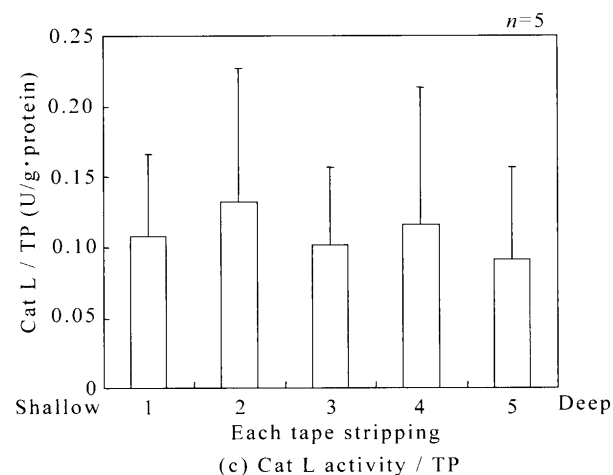
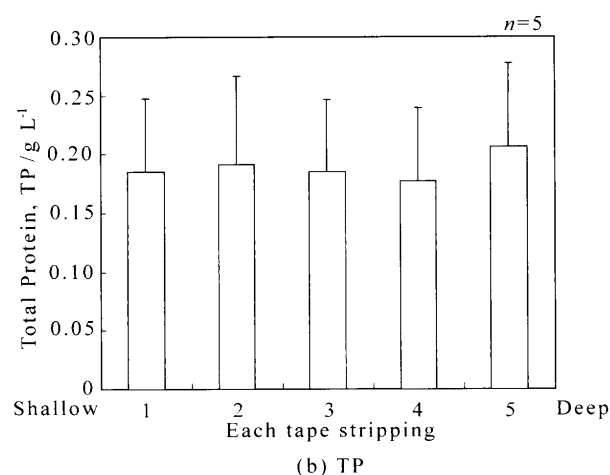
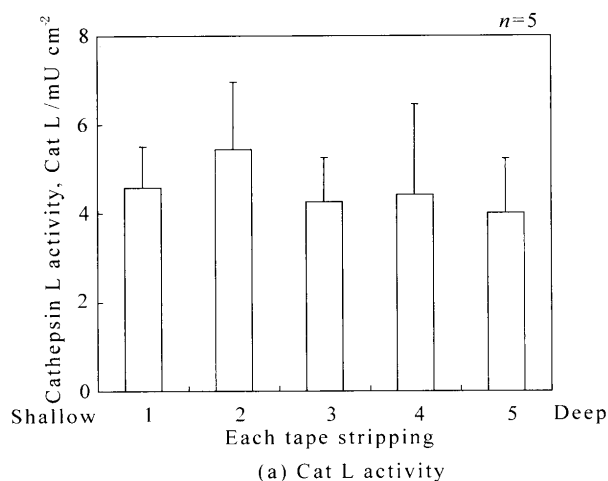
#### 3.2 角質サンプルの分析

頬上から採取した角質サンプルを濃縮し, 蛍光基質を用いることで角質 Cat L 活性を分析した。1 枚目から 5 枚目の角質採取テープの角質 Cat L 活性は, それぞれ  $4.6 \pm 0.9$ ,  $5.4 \pm 1.5$ ,  $4.3 \pm 1.0$ ,  $4.4 \pm 2.0$ ,  $4.0 \pm 1.2$  mU/cm<sup>2</sup> であり, 平均で  $4.5 \pm 1.3$  mU/cm<sup>2</sup> であった {Fig. 4 (a)}。最も高値の角質 Cat L 活性を示したのは, 2 枚目であったが, 全体で  $\pm 34\%$  の範囲にあり, SD と比べて顕著な差異は認められなかった。角質 Cat L は, 角質サンプルの濃縮と蛍光基質を用いることで, その活性を分析可能であることが示された。

濃縮した角質サンプル液を用い, Lowry 法を用いて総タンパク定量を行った。1 枚目から 5 枚目の角質採取テープの総タンパク量は, それぞれ  $0.185 \pm 0.06$ ,  $0.191 \pm 0.08$ ,  $0.185 \pm 0.06$ ,  $0.177 \pm 0.06$ ,  $0.206 \pm 0.07$  g/L であった {Fig. 4 (b)}。つまり, 角質テープから抽出した総タンパク量は, 1 枚当たり  $32 \pm 7$  ng であった。また, 角質テープで採取した単位総タンパク量当たりの 1 枚目から 5 枚目の角質 Cat L 活性/total protein (TP) 比は, それぞれ  $0.108 \pm 0.06$ ,  $0.132 \pm 0.09$ ,  $0.101 \pm 0.06$ ,  $0.116 \pm 0.10$ ,  $0.091 \pm 0.07$  U/g·protein であった {Fig. 4 (c)}。添加回収試験を行った結果, 期待値による測定値の回収率 103.4%, CV = 5.7% であり, 良好な結果が得られた。表皮は, 角化による成熟段階が異なる細胞が古い細胞を押し上げるように重層され, その最も上層にある層が角質層である。また, 角質層には, 10 ~ 20% の水分があり, この水分量を保つ働きがある。採取された総タンパク量にばらつきが観察されたのは, 角質の深さによって水分量の違いがあるためカサツキ度合いが異なることや, 角質テープを貼付する圧力のばらつきが影響していると考えられる。

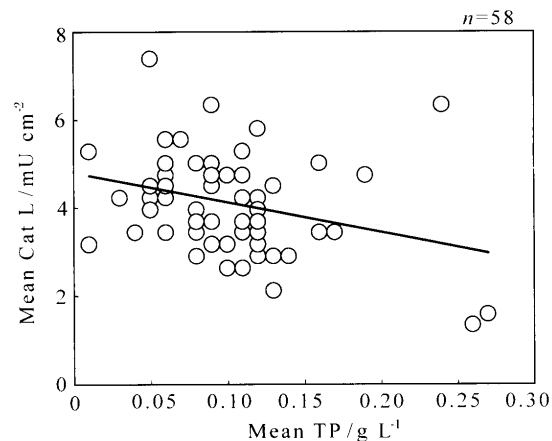
#### 3.3 生体評価

角質 Cat L 活性と総タンパク量の関係性を評価するために, 皮膚疾患の認められない成人女性 29 名 ( $20.9 \pm 1.0$  歳, mean  $\pm$  SD) から, 頬上, 頬下の計 2 か所の角質サン



**Fig. 4** Comparison of Cat L activity and TP of the upper cheek in each tape stripping

プルを採取した。各角質採取テープの角質 Cat L 活性には顕著な差異が認められなかったため、すべての濃縮した角質サンプル液を 1 つに混合することで、平均活性（以下、Mean Cat L）を求めた。Mean Cat L 活性と Mean TP は、 $1.3 \sim 7.4 \text{ mU/cm}^2$ 、 $0.01 \sim 0.27 \text{ g/L}$  の範囲（Min. – Max.）に分布した。頬上の Mean Cat L 活性と平均総タンパク量



**Fig. 5** Correlation between Mean Cat L activity and Mean TP

（以下、Mean TP）は、 $4.0 \pm 1.0 \text{ mU/cm}^2$ 、 $0.117 \pm 0.054 \text{ g/L}$  であった。頬下の Mean Cat L 活性と Mean TP は、 $4.2 \pm 1.3 \text{ mU/cm}^2$ 、 $0.090 \pm 0.046 \text{ g/L}$  であった（Fig. 5）。全サンプルの Mean Cat L 活性と Mean TP の平均値は、 $7.4 \pm 1.3 \text{ mU/cm}^2$ 、 $0.103 \pm 0.052 \text{ g/L}$  であった。

Mean Cat L 活性と Mean TP の決定係数は  $R^2 = 0.09$  であり、低い相関が示された。もし、角質 Cat L 活性が採取方法だけによって一義的に決まるのであれば、Mean Cat L 活性と Mean TP は強い正の相関を示すはずである。実際には、角質 Cat L 活性は、皮膚への環境刺激や乾燥度等の皮膚状態により影響を受けると考えられ、個人差の影響を無視できない。すなわち、角質 Cat L 活性を皮膚状態の指標として用いるには、単位総タンパク量当たりの角質 Cat L 活性 [Cat L/TP 比 ( $\text{U/g} \cdot \text{protein}$ )] を求める必要があることが本研究により示された。

#### 4 結 言

著者らは、テープストリッピング法で非侵襲的に角質サンプルを採取し、角質 Cat L 活性の分析を行った。カテプシン B の阻害剤と蛍光基質を用いることで、Cat L 活性と蛍光強度は  $0.003 \sim 0.04 \text{ U/L}$  の濃度範囲において良好な直線関係を示し、本方法により Cat L 活性の高感度分析が可能であることが示された。

本分析方法を用いてヒトでの生体評価を行ったところ、角質 Cat L 活性は  $0.005 \sim 0.028 \text{ U/L}$  の範囲に分布し、本測定法が十分に測定可能な測定範囲を有していることが示された。このとき、角質 Cat L 活性と総タンパク量は低い相関を示し、角質 Cat L 活性を皮膚状態の指標として用いるには、単位総タンパク量当たりの角質 Cat L 活性 [Cat L/TP 比 ( $\text{U/g} \cdot \text{protein}$ )] を求める必要があると考えられた。

以上のことから、本分析方法を用いることで、角質 Cat L

活性を高感度, 簡便かつ分析可能であることが示された。

## 文 献

- 1) SE. Dal'Belo, LR. Gaspar, PM. Maia Campos : *Skin Res Technol.*, **12**, 241 (2006).
- 2) D. L. Sprecher, S. G. Goodman, P. Kannampuzha, GL. Pearce, A. Lamger : *Atherosclerosis.*, **171**, 255 (2003).
- 3) JF. Hermanns, L. Petit, T. Hermanns-Lê, GE. Piérard : *Skin Res Technol.*, **7**, 168 (2001).
- 4) ES. Park, JI. Na, SO. Kim, CH. Huh, SW. Youn, KC. Park : *Skin Res Technol.*, **12**, 298 (2006).
- 5) 高薄一弘 : “皮膚の測定・評価マニュアル集”, 第1版, p. 151 (2003), (技術情報協会化学同人).
- 6) S. Higaki, M. Nakamura, T. Kitagawa, M. Morohashi, T. Yamagishi : *Drugs Exp Clin Res.*, **27**, 161 (2001).
- 7) D. Ichman : *Mutat Res.*, **275**, 257 (1992).
- 8) M. Ichihashi, M. Ueda, A. Budiyo, T. Bito, M. Oka, M. Fukunaga, K. Tsutu, T. Horikawa : *Toxicology*, **189**, 21 (2003).
- 9) AJ. Barrett, H. Kirschke : *Methods Enzymol.*, **80**, 535 (1981).
- 10) N. Katunuma, T. Towatari, E. Kominami, S. Hashida, K. Takio, K. Titani : *Acta Biol Med Ger.*, **40**, 1419 (1981).
- 11) H. Kirschke, J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge, P. Bohley : *Eur. J Biochem.*, **74**, 293 (1977).
- 12) C. A. Bivik, P. K. Larsson, K. M. Kagedal, I. K. Rosdahl, K. M. O. Llinger : *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1119 (2006).
- 13) G. Imre, Z. Dunai, I. Petak, R. Mihalik : *Biochimica et Biophysica Acta*, **1773**, 1546 (2007).
- 14) H. Kirschke, J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge, P. Bohley : *Euro. J. Biochem.*, **74**, 293 (1977).
- 15) T. Cheng, K. Hitomi, I. M. J. J. Van Vlijmen-Willems, G. J. DE Jongh, K. Yamamoto, K. Nishi, C. Watts, T. Reinheckel, J. Schalkwijk, P. L. J. M. Zeeuwen : *J. Biolo. Chem.*, **281**, 15893 (2006).
- 16) T. Horikoshi, S. Igarashi, H. Uchiwa, H. Brysk, MM. Brysk : *Br J Dermatol.*, **141**, 453 (1999).
- 17) T. Morita, H. Kato, S. Iwanaga, K. Takada, T. Kimura, S. Sakakibara : *J. Biochem.*, **82**, 1495 (1977).
- 18) T. Yasuma, S. Oi, N. Chon, T. Nomura, N. Furuyama, A. Nishimura, Y. Fujisawa, T. Sohda : *J. Med. Chem.*, **41**, 4301 (1998).
- 19) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. FAarr R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

## Cathepsin L Activity Analysis Method for Evaluation of Skin Conditions of Human

Yusuke TAHARA<sup>1</sup>, Akira DATE<sup>2</sup>, Teruhiko MAKINO<sup>3</sup>, Tadamichi SHIMIZU<sup>3</sup> and Masaki YAMAGUCHI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Engineering, Iwate University, 4-3-5, Ueda, Morioka-shi, Iwate 020-8551

<sup>2</sup> Procter & Gamble Japan K.K., 1-17, Koyo-cho Naka, Higashinada-ku, Kobe-shi, Hyogo 658-0032

<sup>3</sup> Graduate School of Medicine and Pharmaceutical sciences, University of Toyama, 2630, Sugitani, Toyama-shi, Toyama 930-0194

(Received 1 August 2008, Accepted 13 November 2008)

In order to develop an analysis method of skin conditions for humans, we have been investigating cathepsin L (Cat L) activity derived from stratum corneum as a biomarker. In the present work, an analysis method for a low amount of Cat L activity was demonstrated that was made possible by collecting stratum corneum using a tape stripping, concentrating stratum corneum sample solution and using an inhibitor and a fluorescent substrate of Cat L. Within the range of Cat L activity between 0.003 and 0.04 U/L, the calibration curve for this method showed coefficient with  $R^2 = 0.98$ . The Cat L activity ranged between 0.005 and 0.028 U/L in all of the stratum corneum samples in the subjective evaluation. It was indicated that this analysis method had a sufficient range for the analysis of human Cat L activity. The determined coefficient between the Cat L activity and the total protein showed 0.09, which was a comparatively low level. Therefore, it was considered that the Cat L/total protein ratio might be a useful index of the skin condition for humans. Thus, it was indicated that this analysis method might be suitable for an easy analysis of Cat L activity.

**Keywords** : cathepsin L ; stratum corneum ; tape stripping ; fluorescent substrate ; total protein.