

グリセリン製剤中で生成するメチルグリオキサールの解析と、
メチルグリオキサールによる皮膚コラーゲンの糖化に関する研究

Analysis of Methylglyoxal in Glycerol Preparations and the Carbonylation of Skin Collagen Induced by Methylglyoxal

平成 29 年度入学 杉浦 江 (Sugiura, Ko)

メチルグリオキサール(MGO)は、糖代謝の副産物として知られている一方で、糖尿病合併症、神経変性疾患や統合失調症などの様々な疾患に関与することが指摘されている α -ジカルボニル化合物である。生体内で、MGO はメイラード反応によりタンパク質と反応して終末糖化産物(AGEs)を生じ、その蓄積が腎不全等のカルボニルストレス状態を引き起こす原因物質であると考えられている。

我々は、グリセリンを保湿剤として用いる限外濾過膜等のフィルター製品から、MGO が溶出することを偶発的に見出した。グリセリンを含む製剤あるいは製品は、通常室温で保管される。使用期限も長いことから、開封後、その成分変化が予想されるが、詳細について調べた報告は認められなかった。本研究では、85%グリセリン(日本薬局方収載品 第2類医薬品)と、頭蓋内浸透圧調節剤である10%グリセリン含有点滴静注薬(グリセオール)中における、MGOの検出を試みた。さらに、その保管状態による経時的変化や生成機序について検討した¹⁾。次いで、多くの保湿剤や化粧水に含まれるグリセリンの酸化によりMGOが生じることが明らかになったこと

から、演者は、グリセリン含有の化粧水や保湿剤中の MGO が日常的且つ非意図的に皮膚に塗布、浸漬される際に起こり得る生体影響として、MGO による皮膚タンパク質の糖化反応に着目した。本研究では、MGO をブタ皮膚由来 I 型コラーゲン及びブタ皮膚に処理することで、コラーゲンがカルボニル化されることを予想し、MGO との反応で特異的に生じる終末糖化産物 (AGEs) の構造について解析した²⁾。

1. グリセリン製剤中に存在する MGO 濃度の測定

MGO 濃度の測定は、当研究室で開発した蛍光ラベル化 HPLC 法を用いて行った。その結果、局方グリセリンにおいて、製薬メーカーによって差が見られるものの、開封直後の全ての製品に MGO が

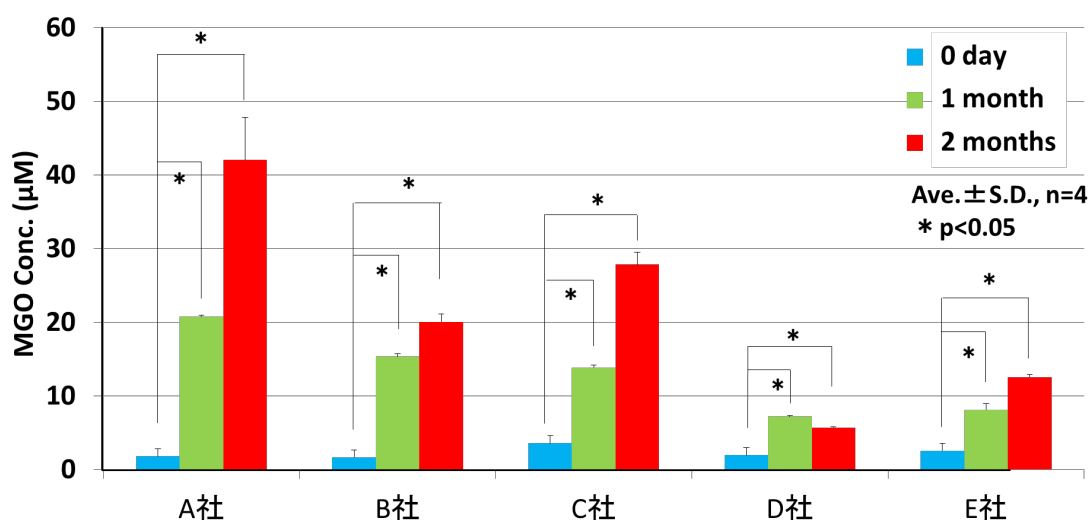


Fig. 1 局方グリセリンの 40°C 保管時における MGO 濃度の変化

含まれていることが判った (1.5~3.5µM)。そこで、局方グリセリンを、製剤安定性の加速試験で用いる 40°C 条件下で保管したところ、1 ヶ月及び 2 ヶ月間の保管で顕著な MGO 濃度の上昇が見られた (Fig.1)。次いで、頭蓋内浸透圧調整剤である 10%グリセリン含有点滴静注薬中の MGO を測定したところ、開封直後において 5 社すべての製品で MGO が含まれていることがわかった (4.0~6.5µM)。

同様に、点滴静注薬を加速試験で用いる 40℃ 条件下で保管した場合、Fig.2 に示すように、2 ヶ月間の保管で顕著な MGO 濃度の上昇が認められ、6 ヶ月後では開封直後の 15～45 倍の濃度に達した。

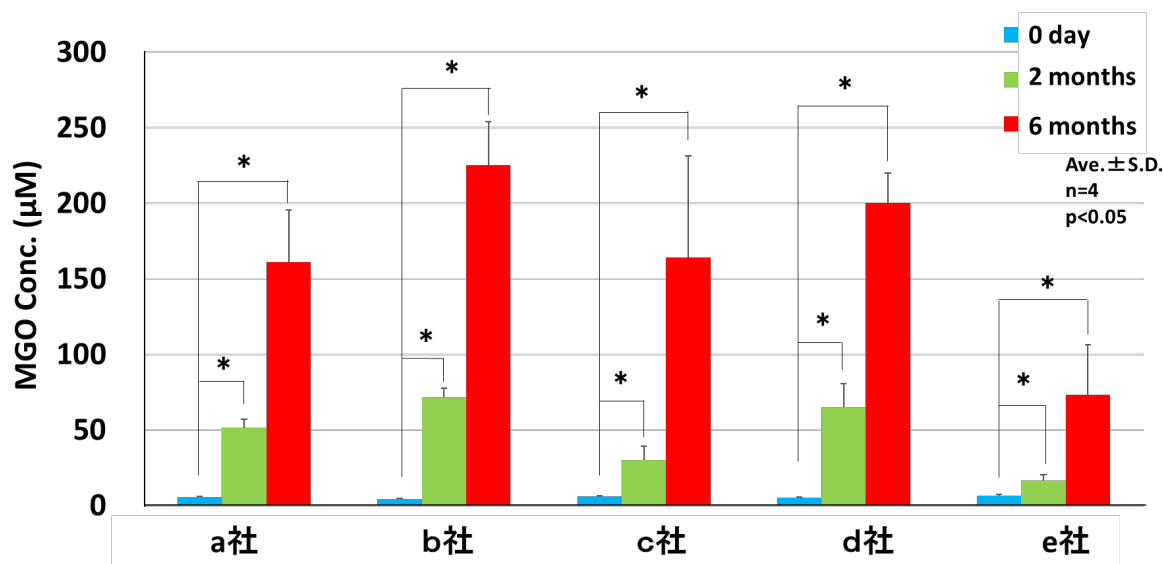


Fig. 2 頭蓋内浸透圧調整用点滴静注薬 40℃ 保管時の MGO 濃度変化

以上の結果から、グリセリン製剤中において、MGO 含量は、温度と時間に依存して増大することが示された。この原因として、グリセリンの自動酸化による生成を予想し、20%グリセリン溶液を用いて温度依存性を調べたところ、冷蔵保存(4℃)した場合 MGO 濃度に変化は認められなかったが、25℃の保管では開封後 1 か月間で有意な上昇が観られ、40℃での保管では MGO 濃度が急激に上昇した。

2. MGO 生成における溶存酸素の影響と抗酸化剤による抑制効果

Fig.3 に示すように、20%グリセリン溶液を超音波照射下で窒素ページして、初期の溶存酸素濃度を低下させた後、40℃で 1 か月間保管したところ、溶存酸素濃度がより低い条件下において、MGO の生成速度が有意に低下した。この結果から、開封後常温で保管した場合、グリセリン製剤内で MGO が徐々に生成し、温度と溶存酸素濃度に依存してその生成が加速することが明らかとなった。

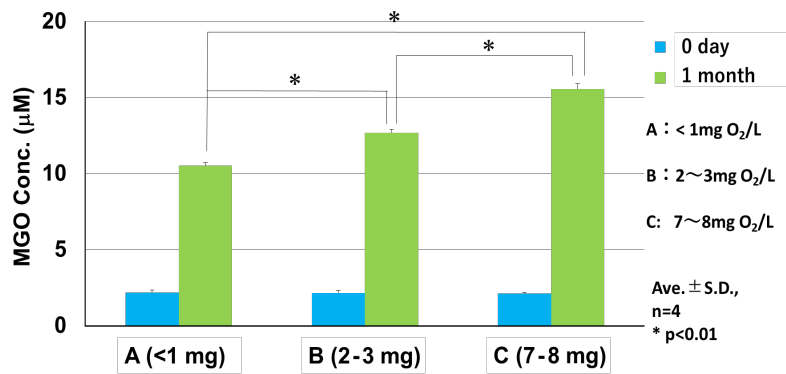


Fig. 3 MGO 生成における溶存酸素の影響

また、グリセリン 20% 溶液において、抗酸化剤としてピロ亜硫酸 Na を用いたところ、40℃、2ヶ月間の保管であっても、

MGO の生成は有意に抑制されたが、EDTA の添加による抑制効果は、繰り返し行なった実験において再現性が得られなかった。従って、グリセリンの酸化には、微量に混入する酸化性物質が、その促進に関与する可能性があることが示唆された。

3. 皮膚由来コラーゲンに対する MGO 処理によるカルボニル化の解析

ブタ皮膚由来 I 型コラーゲン(PBS 溶液)に 10~500μM MGO を添加後、37℃で 28 日間加温することで、カルボニル化タンパク質

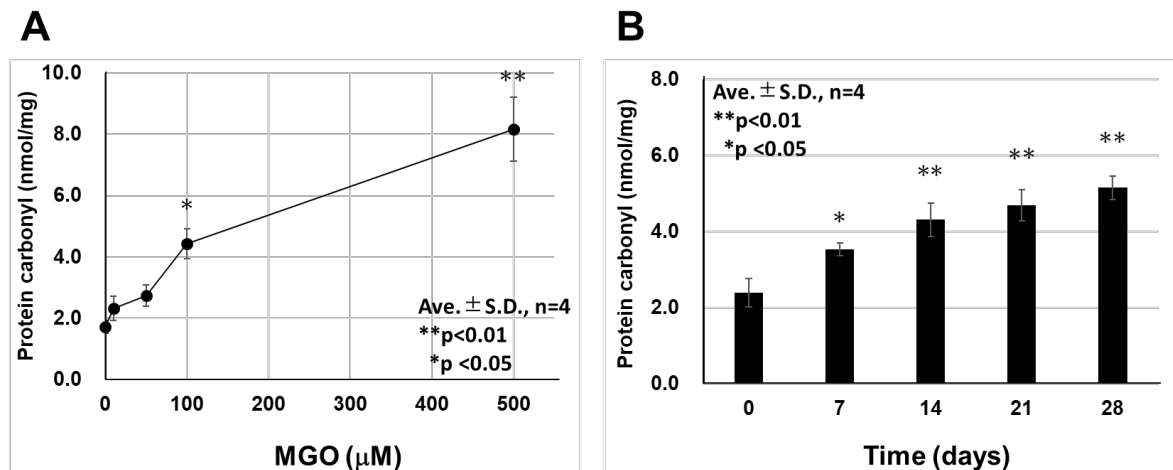


Fig. 4 MGO 処理による PCO 生成の濃度依存性 (A) と経時変化 (B)

(PCO) の生成を調べた。2,4-ジニロフェニルヒドラジン法により PCO を測定した結果、Fig.4A に示すように MGO 濃度依存的な PCO の増加が認められた。また、皮膚由来 I 型コラーゲンに 500μM の MGO を添加し、PCO 生成の経時的変化を調べたところ、7 日後

から有意な PCO の蓄積が認められた (Fig. 4B)。次いで、皮膚由来 I 型コラーゲンと MGO との反応による AGEs の生成について検討した。ウエスタンブロット法により、主に MGO より産生することが知られている AGEs であるメチルグリオキサールヒドロイミダゾロン (MG-H1)、カルボキシエチルリジン (CEL)、アルグピリミジン (APR) に加え代表的な AGEs であるカルボキシメチルリジン

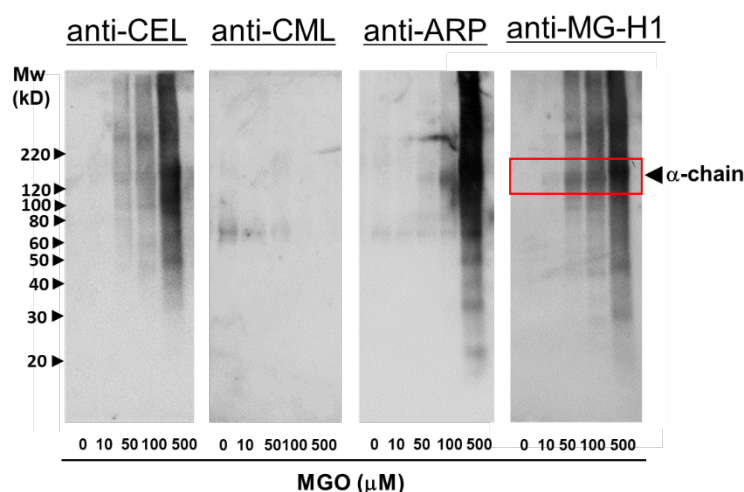


Fig. 5 各種 AGEs の MGO 濃度依存的な生成

(CML) の検出を行った。10 ~ 500 μM の MGO を添加し、37°C で 28 日間加温したとき、MG-H1, ARP, CEL の生成が認められた。特に、MG-H1 の生成は濃度依存的であり、低濃度 (50 μM) の MGO 処理でも有意な生成が認められた (Fig. 5)。そこで、MG-H1 に焦点を当て、MGO 処理による経時的な変化を調べたところ、処理後 7 日以降から MG-H1 化したコラーゲン α 鎖のバンド強度の有意な上昇が観察された。

4. ブタ皮膚への直接的な MGO 処理によるカルボニル化の解析

1.5 cm 角のブタ皮膚切片を 1000 μM MGO を含む PBS 溶液に浸漬し、37°C で加温することで、皮膚コラーゲンのカルボニル化を観察した結果、28 日後において有意な PCO の蓄積が認められた。次いで、ブタ皮膚切片と MGO との反応による AGEs の生成をウエスタンブロット法により調べた結果、MG-H1 化したタンパク質が検出された。2 つのバンド (130 kD, 250 kD) を切り出し、ゲル内消化した後抽出して LC-MS/MS による詳細な解析を行ったところ、い

れも I 型コラーゲン α -1 が同定され、そのアルギニン残基が MG-H1 修飾を受けていることが明らかとなった (Fig.6)。

5. 総括

本研究の結果から、製剤及び化粧品原料として用いられるグ

リセリンには微量の MGO が混入していると共に、常温における保管でもグリセリンから MGO が自動酸化によって生成し、その濃度は 100 μ M 以上にまで達することが明らかになった。更に、MGO は皮膚コラーゲンと直接反応し、結合型 AGEs の 1 つである MG-H1 化コラーゲンが生成し易いことが示された。従って、本研究で得られた知見から、グリセリン由来の MGO を含む製品を顔や手の皮膚に一定期間塗布することで、皮膚コラーゲンの MG-H1 化が起こることが危惧される。糖化コラーゲンの蓄積によって、繊維芽細胞がアポトーシスを起こし、皮膚弾力性の低下が亢進することが知られていることから、今後は、グリセリン製剤や市販の化粧水及び使用中の製品に、どの程度 MGO が含まれるのかを調査し、保管条件や使用期限の規制を促すと共に、MGO がヒト皮膚に与える影響を詳細化することが望まれる。

《参考文献》

- 1) Oxidative formation of methylglyoxal in glycerol preparations during storage. Sugiura K., Koike S., Suzuki T., Ogasawara Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **43**, 879-883 (2020).
- 2) Carbonylation of skin collagen induced by reaction with methylglyoxal. Sugiura K., Koike S., Suzuki T., Ogasawara Y., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **562**, 100-104 (2021).

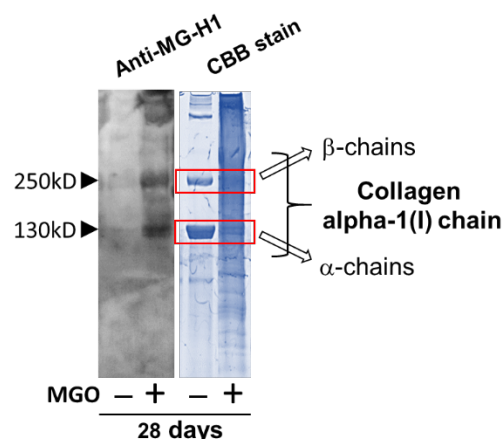


Fig. 6 ブタ皮膚中で MG-H1 化されたタンパク質の同定