

# 富山海洋深層水の正常ヒト表皮細胞に及ぼす影響

## Effects of Toyama Deep Ocean Water on Cultured Human Skin Keratinocytes

太田裕紀子<sup>1</sup>・植松 季栄<sup>1</sup>・井上紳太郎<sup>1</sup>  
Yukiko OTA, Rie UEMATSU and Shintaro INOUE

### Abstract

Deep ocean water has long been known for its stable characteristics of rich mineral ingredients, a low water temperature, and chemical and bacteriological purity, but the effects of deep ocean water on skin physiology remain obscure. In this study, we examined how cultured human skin keratinocytes responded to exposure to deep ocean water from the coastal waters of Toyama Prefecture. We found that these waters promoted not only keratinocyte proliferation, but also the formation of cornified envelope in the process of keratinocyte maturation (differentiation) into cornified cells. After reviewing the mineral ingredients in the seawater, we concluded that silicate promoted this envelope formation, and that coexisting calcium accelerated the effect of the silicate. As the homeostasis of skin depends heavily on a balanced skin turnover, with finely tuned coordination between proliferation and differentiation, this deep ocean water from Toyama is expected to be useful for skin care.

**Key Words:** keratinocytes, proliferation, differentiation, calcium, silicate

### 和文要旨

海洋深層水はミネラル成分が豊富に含まれていることが知られているが、皮膚に及ぼす作用については詳しく調べられていない。皮膚表層の健全な角層の形成にはミネラル成分が関与していると考えられているので、今回、富山海洋深層水の表皮細胞へ及ぼす作用を検討した。その結果、本深層水は細胞増殖および角化不溶性膜形成を用量依存的に促進し、また角層形成（角化）に重要なタンパク質であるインボルクリン産生の促進傾向を示したことから、細胞角化を増強することが明らかとなった。本深層水に高濃度に含有されるケイ酸は、濃度依存的に角化を促進し、その効果は共存するカルシウムによって相乗的に上昇した。これらの結果、本深層水の作用メカニズムの一つは同時に含有されるケイ酸とカルシウムの効果であることが示唆された。富山海洋深層水は表皮細胞の増殖能と角化能を同時増強することで、バランス良い角層の形成を促し（ターンオーバーの活性化）、スキンケアに有用と考えられる。

**キーワード：**表皮細胞、細胞増殖、細胞角化、カルシウム、ケイ酸

### 1. 緒論

私たちヒトの皮膚は主に皮下組織、真皮層、表皮層で構成されており、皮下組織はエネルギーの蓄積、真皮層は肌の弾力性や柔軟性に大きく関与している

と言われている。そして皮膚の最も外側に存在し、皮膚外部と直接接觸している表皮層は、さらに基底層、有棘層、顆粒層、角層の4層で構成されている（現代皮膚科学大系、1982）。

表皮層を形成する表皮細胞は基底層で分裂、増殖

<sup>1</sup>カネボウ株式会社基礎科学研究所 (〒250-0002 神奈川県小田原市寿町 5-3-28)

し、角化に伴い形を変化させながら上層へと移行し、表皮最外層の角層へと達する。角層の細胞（角質細胞）においては細胞膜が消失し、インボルクリンやロリクリン、システィン等のタンパク質で構成された角化不溶性膜で覆われる（Schaefer ら, 1996）。

角層のもつ役割の一つに、皮膚外部からのさまざまな刺激を防ぎ、皮膚内部からの水分の蒸散を防御する、バリアー機能という重要な働きがある。このバリアー機能によって、水分が皮膚内部に保たれ、滑らかで潤いのある皮膚、いわゆる美肌がかたちづくられている。

表皮細胞が分裂、増殖、角化、剥離を繰り返すことを表皮のターンオーバーと言い、このターンオーバーがバランス良くスムーズにはたらくことが美肌を維持するために重要であり、カルシウム等のミネラル成分が大きく関わっていること等が報告されている（Menon ら, 1994 ; Mauro ら, 1998 ; Resing ら, 1993 ; Schwarz, 1973 ; EXSYMBOL 社技術資料）。

また、このターンオーバーのバランスが崩れることが、皮膚機能の低下につながり、荒れ肌や乾燥肌、アトピー性皮膚炎の原因の一つになると考えられている。

一方、海洋深層水は一般に、ナトリウムやカルシウムなどのミネラル成分が豊富に含まれていること、水温が2度以下と低温であること、化学的にも細菌学的にも清浄であること、そしてこれらに季節変動が少ないと等が広く知られている（高橋正征, 2000）。しかし、これまで皮膚に対する作用を詳しく調べた報告はなく、皮膚科領域でのアトピー性皮膚炎に対する治療効果（野村ら, 1995；関ら, 2000）が報告されている程度であり、その作用機序などについても未だ不明な部分が多い。

今回の研究で、我々は細胞培養系を用いてミネラル成分が豊富に含まれている富山海洋深層水が表皮細胞へ及ぼす作用を調べた。

## 2. 実験材料および方法

### 2-1. 海洋深層水の処理

富山海洋深層水は細胞培養系に添加するために、過剰量の塩化ナトリウムを電気透析法により除去し

た、脱塩後の海洋深層水深層水を用いた。除去後のナトリウム及び塩素イオンはそれぞれ 400 mg/L, 117 mmol/L であった（表 1）。

### 2-2. 細胞培養

正常ヒト表皮細胞（NHEK）（クラボウ社：strain No.50409）を  $75 \text{ cm}^2$  コラーゲンコートプラスコ（ファルコン社）に播種し、MCDB153HAA 培地（和光純薬社）(6.7 g/L Hepes (SIGMA 社), 1.2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (関東化学社) 0.4% (v/v) 牛脳下垂体抽出物 (BPE) (クラボウ社), 5.0 mg/ml Insulin (和光純薬社), 10 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) (SIGMA 社), 180  $\mu\text{g}/\text{L}$  Hydrocortisone (SIGMA 社), 6.11 mg/L 2-Aminoethanol (ナカライテスク社), 14.11 mg/L o-Phosphorylethanolamine (東京化成社)) を加えて 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Air で培養した。

### 2-3. 細胞増殖能測定の方法

NHEK を 24 well プレートにウェル当たり  $1 \times 10^4$  個播種し 1 日間培養後、海洋深層水を含む MCDB153HAA 培地に置換し 3 日間培養した。細胞数の測定は Cell Count Reagent 試薬（ナカライテスク社）を用いた。

### 2-4. 角化不溶性膜形成能 (CE) の測定方法

CE の測定方法は以下に示すカルシウムイオノフォア法を用いた。

NHEK を 24 well プレートにウェル当たり  $1 \times 10^4$  個播種し、4 日間培養後、細胞がサブコンフルエントの状態で、富山海洋深層水を添加し 5 日間培養した。培養後の細胞は 0.025% Trypsin/0.01 % EDTA の Tripsin 処理によって回収後、カルシウムイオノフォア A23187 20  $\mu\text{g}$  を含む 0.5 ml のカルシウム濃度 1.25 mM の MCDB153HAA 培地に置換して 37°C で 2 時間、さらに培養をした。20 mM Dithiothreitol-1% ドデシル硫酸ナトリウムにより 100°C で 5 分間熱処理後、界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム耐性の細胞数を測定し、総細胞数に対する割合として評価した。

## 2-5. インボルクリン産生量測定の方法

NHEKを24 wellプレートにウェル当たり $1 \times 10^4$ 個播種し、4日間培養を行ない細胞がサブコンフルエントの状態で、富山海洋深層水を添加し24時間培養後、細胞中のインボルクリン量を測定した。インボルクリン産生量はINVOLUCRIN ELISA ASSAY KIT (Biomedical Technologies Inc.) を用いて測定した。

## 2-6. 検定方法

Dunnettの多重検定法を用い検定を行った (Dunnett, 1964)。

## 3. 結果および考察

### 3-1. 富山海洋深層水の表皮細胞増殖能に及ぼす作用

正常ヒト表皮細胞を用いて、富山海洋深層水を添加後3日目の細胞増殖能を調べた。その結果、富山海洋深層水の20%以上の添加によって有意な細胞増殖促進作用が認められ、40%添加においては、深層水無添加群と比較して、1.7倍の促進作用が認められた (図1)。

### 3-2. 富山海洋深層水の表皮インボルクリン産生に及ぼす作用

正常ヒト表皮細胞を用い、富山海洋深層水添加後24時間目に角化マーカーであるインボルクリン産

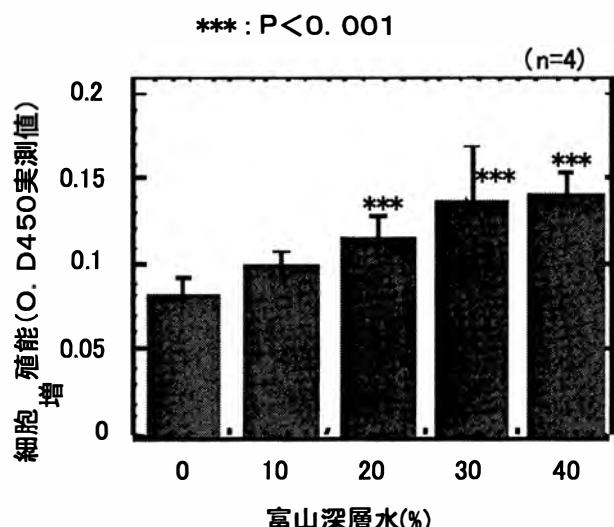


図1. 富山海洋深層水の細胞増殖能に及ぼす作用

生量を測定した。その結果、富山海洋深層水添加によって有意ではなかったが用量依存的にインボルクリン産生が促進する傾向が認められた (図2)。

### 3-3. 富山海洋深層水の表皮角化不溶性膜形成能に及ぼす作用

正常ヒト表皮細胞を用いて、富山海洋深層水添加後5日目の角化不溶性膜形成能をカルシウムイオノフォア法で測定した。その結果、富山海洋深層水添加により用量依存的に促進効果が認められ、30%以上で有意な角化不溶性膜形成促進作用が認められた。50%添加においては深層水無添加群と比べ、4倍以上の角化不溶性膜の形成が認められた (図3)。

以上の結果、富山海洋深層水は、インボルクリン産生と角化不溶性膜形成を促進したことから、細胞増殖能の促進と同じ濃度域で細胞角化能を促進することがわかった。

富山海洋深層水は表層水同様にミネラル成分が豊富に含まれているが、表層水と比較して、ケイ酸の含有量の高いことが特徴として挙げられる (表1)。また、ミネラル成分の一つであるカルシウムは表皮細胞の細胞角化に大きく関わり、角化を促すことが知られている (Resingら, 1993)。

そこで、富山海洋深層水の増殖促進、角化促進の作用メカニズムの一つとして、ケイ酸とカルシウムに着目し、角化不溶性膜形成について検討した。

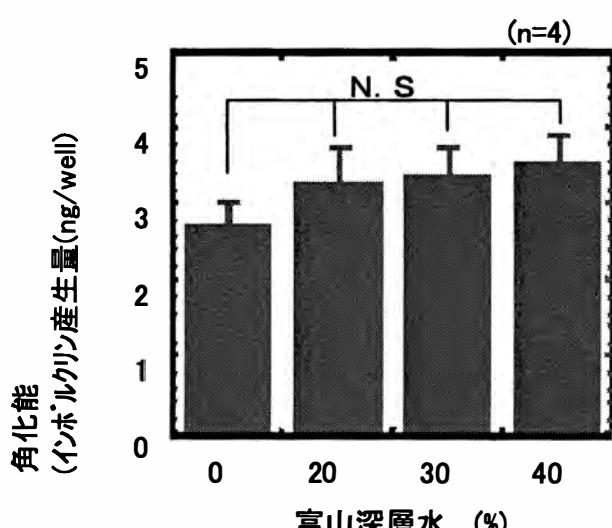


図2. 富山海洋深層水のインボルクリン産生量に及ぼす作用

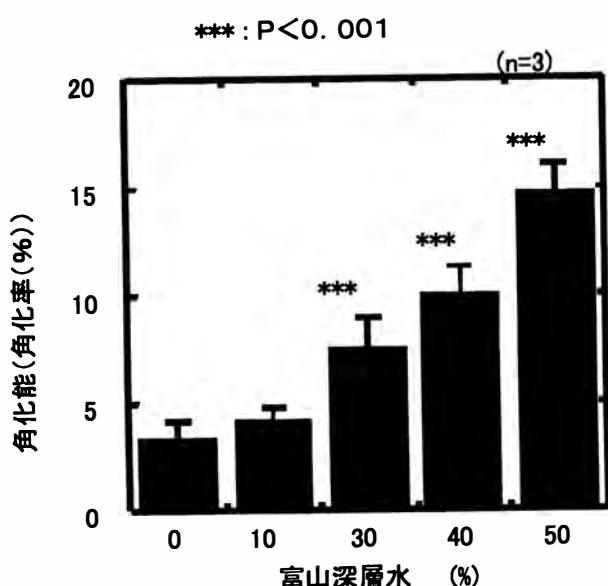


図3. 富山海洋深層水の角化不溶性膜形成能に及ぼす作用

表1. 富山深層水のミネラル成分特徴

	富山深層水	富山表層水	脱塩後の富山深層水*
Na	10200 mg/L	9300 mg/L	400 mg/L
Mg	1300 mg/L	1100 mg/L	2300 mg/L
Ca	446 mg/L	408 mg/L	645 mg/L
Si	1.01 mg/L	0.3 mg/L	2.3 mg/L

\*1: 富山海洋深層水を電気透析法により処理

### 3-4. ケイ酸とカルシウムの表皮角化不溶性膜形成能に及ぼす作用

まず、カルシウム濃度については、角化に与える影響が低い濃度として 0.03 mM、角化を促す濃度として 1.25 mM を用い検討した。カルシウム濃度 0.03 mM においてケイ酸を添加した結果、濃度依存的に角化促進が認められた。また、カルシウム濃度を 1.25 mM に上げることにより、0.03 mM に比べ角化は有意に促進されることが確認された。さらにカルシウムとケイ酸を同時に添加することにより、ケイ酸で認められた角化促進効果が相乗的に上昇することが見出された（図4）。

本実験を行ったケイ酸と、カルシウムの濃度は、それぞれ富山海洋深層水の添加試験で、効果の見られた含有量と同程度であることから促進効果の作用メカニズムの一つはケイ酸とカルシウムの効果であると考えられた。

美肌作用には健全な表皮ターンオーバーが重要で

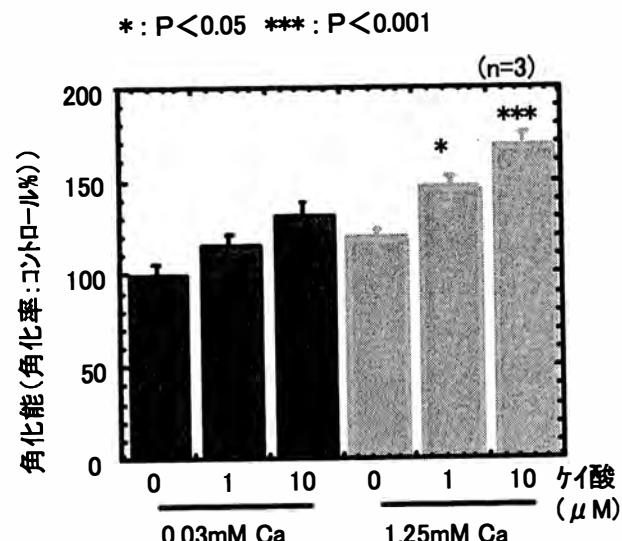


図4. ケイ酸とカルシウムの角化不溶性膜形成能に及ぼす作用

あるが、健全なターンオーバーとは増殖、角化、剥離がスムーズにバランス良くはたらくことである。老化に伴った荒れ肌では、このターンオーバーが低下していることが知られているが (Grove ら, 1983), 荒れ肌や乾燥肌の改善には表皮のターンオーバーを促進することが重要である。

以上のことより、富山海洋深層水は細胞増殖能と細胞角化能を同時に促進する表皮ターンオーバーを活性化することで、荒れ肌や乾燥肌の改善が期待される。

### 4. 謝辞

本研究において使用した富山海洋深層水を提供、並びに成分分析して頂いた五州薬品(株)に御礼申し上げます。

### 参考文献

- 関太輔、豊田雅彦、桧垣修一、諸橋正昭 (2000)：海洋深層水の皮膚疾患への治療効果。月刊海洋／号外 No. 22. 117-121.
- 高橋正征 (2000)：21世紀の資源としての海洋深層水。月刊海洋／号外 No. 22. 5-10.
- 野村伊知郎、森田秀雄、前田治子、倉繁隆信、田辺伸悟、山口光明、真村光政、川北浩久 (1995)：海洋深層水によるアトピー性皮膚炎の治療効果。小児科臨床, 48, 2251-2256.
- Dunnett CW. (1964): New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.

- Grove GL., Kligman AM (1983): Age-associated changes in human epidermal cell renewal. *J. Gerontol.*, **38**, 137-142.
- Hans Schaefer *et al.* (1996): Cornified envelope. 27-28pp. KARER. Switzerland.
- Mauro, T., Bench, G., Sidderas-Hadda, E., Feingold, K., Elias, P. and Cullander, C. (1998): Acute barrier perturbation abolishes the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^+$  gradients in murine epidermis : Quantitative measurement using PIXE. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 1198-1201.
- Menon, G. K., P. M. and Feingold, K.R. (1994): Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. *Br. J. Dermatol.* **130**, 139-147.
- Resing K. A., al-Alawi N., Blomquist C., Fleckman P., Dale BA. (1993): Independent regulation of two cytoplasmic processing stages of the intermediate filament-associated protein filaggrin and role of  $\text{Ca}^{2+}$  in the second stage. *J. Biol. Chem.*, **268**, 25139-45.
- Schwarz K. (1973): A bound form of silicon in glycosaminoglycans and polyuronides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1608-1612.
- EXSYMOL 社技術資料, Role of the SILANOLS on the regulation of collagen synthesis.
- 現代皮膚科学大系 (1982) : 表皮. ケラチノサイト. 微細構造からみた角化. 27-49 pp. 中山書店. 東京.

(2001. 12. 27 受付, 2002. 3. 10 受理)