

コウジ酸、コウジ酸エステル及びメラトニンの 皮膚透過と皮膚生理活性に及ぼす影響

近畿大学 薬学部

小木曾 太 郎

This study was designed to compare the in vitro skin penetration, skin distribution and physiological activities of kojic acid laurate (ester) with those of kojic acid. Kojic acid penetrated across the rat skin much faster than the ester, but the amount of ester distributed in the epidermis was relatively much compared with that of kojic acid. The ester inhibited tyrosinase activity to the same extent as kojic acid did. Enhancers enhanced the penetration of kojic acid much more than that of ester. In addition, the penetration of melatonin through rat and human skins and the effect of melatonin on lipid peroxidation and UVB-induced erythema were estimated. Melatonin facily penetrated across both skins. Melatonin, in concentrations of 5 and 10 mM, significantly reduced lipid peroxidation and enhanced the photoprotective effect.

1 緒 言

美白(化粧品)は女性の美しさへの願望を満たすテーマの一つである。種々の化合物が美白剤として開発されてきた。ビタミンC類^{1,2)}、胎盤エキス³⁾、コウジ酸⁴⁾、アルブチン⁵⁾、などが市場に登場した。コウジ酸は、3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)と dopaquinone を経てチロシンからメラニンの生成を触媒するチロシナーゼを阻害することが知られている^{4, 6)}。コウジ酸がチロシナーゼ阻害効果を発現するには、コウジ酸がメラニン生成部位である表皮基底層に長時間滞留することが必要である。皮膚内滞留性の増加を図るため、コウジ酸のエステル化を行った。そのチロシナーゼ阻害作用と、皮膚透過及び皮膚内分配性について、コウジ酸と比較評価した。一方、メラトニンは松果体においてセロトニンから2段階の酵素反応を経て合成されるホルモンである。セロトニン量が昼間は多く夜間減少するのに対し、メラトニンは夜間には日中の50～100倍になる。メラトニンは生理

的な睡眠を導入する化合物として注目を集めているが、メラトニンはまた免疫力を回復する⁷⁾、フリーラジカル消去作用を示し細胞の老化を抑える^{8, 9)}、著しい抗酸化作用を有すること¹⁰⁾も報告されている。皮膚に関しても、UVB照射で惹起された紅斑を抑制することが知られている¹¹⁾。メラトニンの皮膚生理機能に対する影響と、その皮膚透過について知るため、メラトニンの抗酸化作用、UVB照射ラット皮膚での紅斑の抑制及びラット、ヒト皮膚での透過性を調べた。

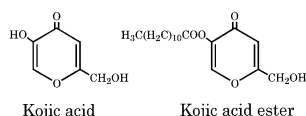


Fig. 1 Structures of kojic acid and kojic acid ester

2 実 験

2.1 コウジ酸のラウリン酸エステルの合成

コウジ酸 3g (21.11mmol) をピリジン 50mL に溶解後氷冷下にラウリン酸クロリド 5.37mL を滴下した。24h 反応後、反応液中のピリジンを減圧留去した。残渣をエーテル 100mL に溶解した後、吸引ろ過した。エーテル層を 5% HCl 10mL で 3 回洗浄後エーテル層を MgSO₄ で乾燥、ろ過した。エーテルを留去後残渣をクロロホルムに溶解させ、シリカゲルカラムに負荷した。展開溶媒に



Skin penetration of kojic acid, its ester and melatonin, and effect of them on physiological activities of skin

Taro Ogiso

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kinki University, Kowakae 3-4-1,
Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

はクロロホルム：エタノール（50：1）を用いた。過液を減圧留去した。得られた化合物をベンゼン：ヘキサン（2：3）で再結晶させた。エステル体の収率は1.52g（22.2%）であった。本品の生成はIR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR で確認した。

2.2 ゲル軟膏の調製

Hiviswako 104 を水で膨潤させ、これにジイソプロパノールアミンの水溶液を加え中和した。コウジ酸またはエステルはプロピレングリコールに溶解した。処方3と4の場合はd-limoneneをさらに溶解した。処方5と6ではOTGを水に溶解して基剤に加えた。残りのゲンタマイシン、水を加えた。処方7と8も同様に調製した。

2.3 皮膚の調製と *in vitro* 皮吸収実験

ヘアレスラットまたはWistar ラット皮膚を実験前日に除毛した。次の日腹部皮膚（3×3cm）を切除し、下部の脂肪組織等を取り除き、0.85% NaCl-10mM リン酸緩衝液（pH 7.4、ゲンタマイシン液を1/100 含有）で湿らせたろ紙上にのせ5℃で12h水和させた。水和した皮膚をフランツ拡散セル（透過面積2.01/cm²、リザーバー容積10.5mL）に装着した。皮膚上にゲル軟膏0.25gを均一に塗布した。アルミ箔で被い、37℃でインキュベートした。レシバー液を経時的に採取した。ヒト皮膚については水和せずに同様に実験し

た。メラトニンの透過実験ではゲル軟膏0.1gを0.785cm²に適用し、リザーバー液に0.5mMのNa₂S₂O₅を加えた。

2.4 皮膚内分配量の測定

In vitro 吸収実験と同様に行った。ゲル軟膏適用6hと24h後に皮膚をフランツセルより取り外し、皮膚表面の軟膏を拭き取った。適用部位の皮膚を切り取った。表皮の調製には、アルミ箔で包み60℃で2分間加熱後ミクロスパーテルで真皮を取り除いた。コウジ酸軟膏の場合は4mLの70%メタノール中で、エステル軟膏の場合は、70%アセトニトリル中でヒスコロンホモジナイザーを用い2分間ホモジナイズした。遠心分離後上清中のコウジ酸とそのエステルを定量した。メラトニンの皮膚内分配量は0.1M 過塩素酸（4mL）中でホモジナイズ後、遠心分離して得られた上清を使用した。

2.5 定 量

コウジ酸定量の内部標準物質 (is.) はヒドロキノン、コウジ酸エステルの is. にはアントラセンを用いた。HPLCのカラムはInertsil ODSを用い、測定条件は検出波長223nm、温度20℃、移動相は、コウジ酸の測定にはアセトニトリル：水：リン酸（2：97：1、v/v）、エステルではアセトニトリル：水（30：70、v/v）を用いた。メラトニンの定

Table 1 Composition of kojic acid, kojic acid ester, and melatonin gel ointments

Composition (g)	Rp. 1	Rp. 2	Rp. 3	Rp. 4	Rp. 5	Rp. 6	Rp. 7	Rp. 8
Hiviswako 104	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Propylene glycol	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Ethanol	-	-	-	-	-	-	15.0	15.0
Diisopropanolamine	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
d-Limonene	-	-	5.0	5.0	-	-	-	4.0
n-Octyl-β-D-thiogluco- side	-	-	-	-	1.5	1.5	-	-
Kojic acid	1.5	-	1.5	-	1.5	-	-	-
Kojic acid ester	-	3.4	-	3.4	-	3.4	-	-
Melatonin	-	-	-	-	-	-	3.0	3.0
Gentamicin sol.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

The gel formulations were prepared by adding dist. water to give a total weight of 100.0 g.

量には、Inertsil ODS C18 カラム、波長 278nm、移動相は 50mM 酢酸ナトリウム－100mM 酢酸－0.1mM EDTA：アセトニトリル (80：20、v/v)、is. は 5-methoxyindole-3-acetic acid を用いた。

2.6 チロシナーゼ活性の測定

マッシュルームチロシナーゼ 50U、基質として 0.05% L-DOPA を用い、37℃で 20 分反応後、475nm で吸光度を測定した。

2.7 脂質過酸化の測定

ヘアレスラット肝の 9000xg 上清画分または皮膚ホモジネートの 9000xg 上清画分 1.0mL に 300mM 硫酸第 1 鉄 0.1mL、20mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) またはメラトニン液 0.4mL を加え、37℃で 60 分インキュベートした後、0.5mL の 25% トリクロル酢酸を加え遠心分離した。上清 1.5mL に 0.67% チオバルビツール酸 1.5mL を加え 100℃で 10 分加熱、冷後 535nm で吸光度を測定した。

2.8 皮膚一次刺激性試験

前日に除毛した白色系雄性家兔 (体重、2kg) 背部に処方 1～6 のゲル軟膏 0.2g/3.14cm² を適用後、粘着テープで固定した。24h 後皮膚の反応を一次刺激性試験法¹³⁾ に準じ判定した。

2.9 紅斑抑制作用の測定

雄性ヘアレスラット (10 週令、体重 200～210g) の背部皮膚を除毛した。UVB はラットの背部より 45cm の距離 (0.298mW/cm²) から 30 分間照射した。この照射を週 3 日間、計 6 回行った。メラトニン処理群は 0.2% メラトニン軟膏 (0.75g/6cm²) を UVB 照射後 24h 塗布した。酢酸レチノール処理群は 0.2% 酢酸レチノール軟膏を同様に塗布した。最終処理後、皮膚の紅斑を判定基準 0 (紅斑を認めない)、1 (微弱あるいは境界不明瞭な紅斑)、2 (中等度の境界明瞭な紅斑)、3 (強度の境界明瞭な紅斑) に従い判定した。

2.10 データの解析

In vitro 透過パラメータは次式を用いて計算した。

$$D = \frac{\delta^2}{6\tau}$$

$$J_s = \frac{D K_m C_s}{\delta} = K_p C_s$$

D は皮膚内の拡散定数、 J_s は透過速度、 K_m は皮膚／軟膏分配係数、 K_p は透過係数である。有意差検定は Student t-test により行った。

3 結果と考察

3.1 コウジ酸とそのエステル

3.1.1 In vitro 皮膚透過

ゲル軟膏適用時のコウジ酸のヘアレスラット皮膚透過を Fig.2A に示した。コウジ酸の透過速度 (J_s) と透過係数 (K_p) は、エステル適用時のそれより 3～4 倍大きかった (Table 2)。なお、コウジ酸エステル適用時リザーバー液中にエステルは検出されず、全てがコウジ酸に加水分解されていた。lag time (τ) もコウジ酸は 1/2 であった。コウジ酸エステル適用時のコウジ酸の J_s が小さい理由は、脂溶性のエステルが角質層を透過後、親水性の生きた表皮を透過できにくいためと考えられる。

吸収促進剤の *d*-limonene と OTG を配合することにより、コウジ酸の透過は促進され J_s は Rp. 1 のそれぞれ 5 倍と 10 倍に増加した。一方、コウジ酸エステルの場合も透過は増大したが、促進の程度はコウジ酸の場合より小さく、3 倍と 3.5 倍の増加であった。これらのことから、コウジ酸はラット皮膚を比較的容易に透過するが、エステルの透過性は低いと判断される。またこのエステル結合は生きた表皮と真皮及びリザーバー液 (真皮から遊離した酵素が存在) 中で加水分解されると考えられる。

3.1.2 皮膚内分配

各ゲル軟膏適用 6h と 24h 後に、全皮膚 (FS) 及び表皮 (EP) 中のコウジ酸とエステル量を測定

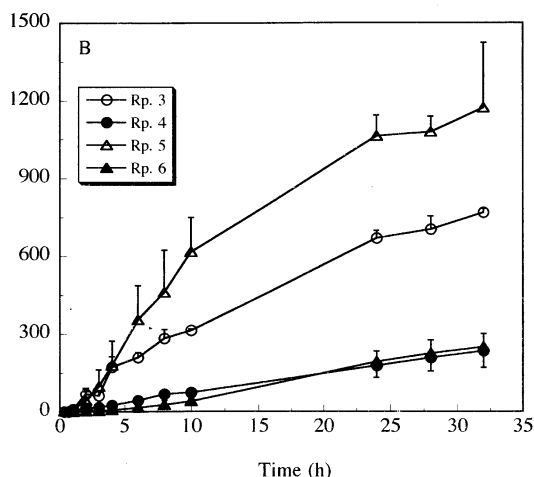
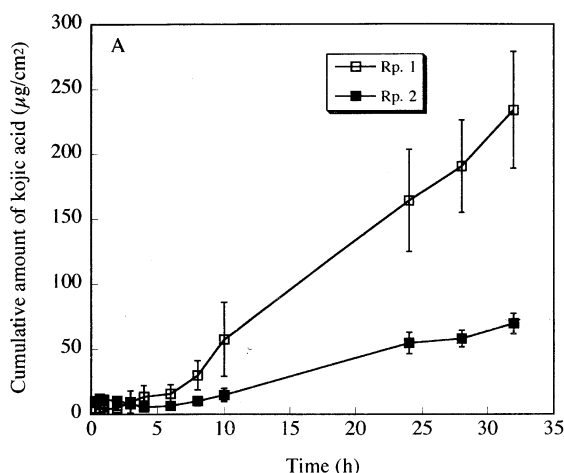


Fig. 2 Penetration profiles of kojic acid through hairless rat skin
Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3-4). A 0.25g/2.01 cm² of gel ointment was applied.

Table 2 In vitro percutaneous penetration parameters of kojic acid and its ester through rat skin

Parameter	Rp. 1	Rp. 2	Rp. 3	Rp. 4	Rp. 5	Rp. 6
J_s ($\mu\text{g}/\text{h}\cdot\text{cm}^2$)	7.36 $\pm$ 1.66	2.60 $\pm$ 0.25	34.70 $\pm$ 0.66 ^a	8.21 $\pm$ 3.10 ^a	72.70 $\pm$ 16.78 ^a	9.01 $\pm$ 1.11 ^a
K_p ($\times 10^{-3}\text{cm}/\text{h}$)	0.49 $\pm$ 0.11	0.17 $\pm$ 0.02	2.31 $\pm$ 0.44 ^a	0.55 $\pm$ 0.21 ^a	4.85 $\pm$ 1.12 ^a	0.60 $\pm$ 0.07 ^a
Lag time (h)	1.69 $\pm$ 0.67	3.66 $\pm$ 1.42	0.51 $\pm$ 0.14	0.97 $\pm$ 0.25 ^a	2.06 $\pm$ 0.55	5.54 $\pm$ 1.00
D ($\times 10^{-7}\text{cm}^2/\text{h}$)	4.51 $\pm$ 1.99	2.01 $\pm$ 0.66	13.90 $\pm$ 4.11 ^a	7.31 $\pm$ 2.12 ^a	3.41 $\pm$ 0.90	1.23 $\pm$ 0.25
K_m	2.46 $\pm$ 1.16	1.92 $\pm$ 0.86	3.52 $\pm$ 0.92	1.47 $\pm$ 0.15	29.10 $\pm$ 5.67 ^a	10.13 $\pm$ 2.89 ^a

J_s , penetration rate; K_p , permeability coefficient through skin; K_m , partition coefficient; D , diffusion constant within skin. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3-4). a) $p < 0.05$ compared with the Rp. 1 or Rp. 2.

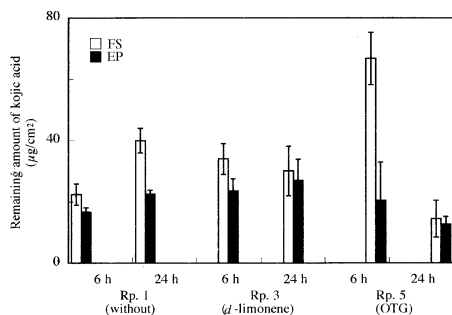


Fig. 3 Comparison of amount remaining in stratum corneum with that in full-thickness of skin
Application : Kojic acid ointment (n=4-6). FS, Full-thickness skin ; epidermis.

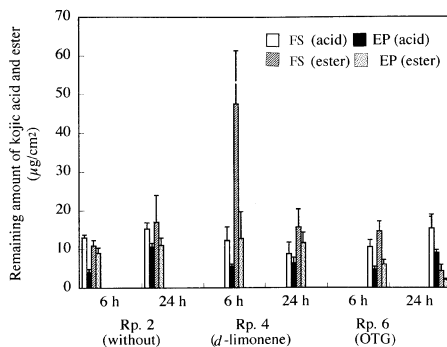


Fig. 4 Comparison of amount remaining in stratum corneum with that in full-thickness of skin
Application : Kojic acid ester ointment (n=3-4) .

した結果を Fig. 3 と 4 に示した。全皮膚中のコウジ酸量は、表皮中より多かったが、Rp. 5 (OTG 配合) を除いて、60%以上が表皮中に存在した。Rp. 1 の場合は 24h 後にも皮膚内量は増加していたが、促進剤を加えた Rp. 3 と 5 では 24h 後の皮膚内量は減少する傾向がみられた。特に Rp. 5 で

この傾向が顕著であった。これは、促進剤が皮膚透過を高めるため、24h 後には透過が殆ど終了し皮膚内量が少なくなるためと考えられる。OTG を配合すると真皮内 (FS 量 - EP 量 = 真皮内量) に多くなる理由は、既に報告したように¹⁴⁾、OTG が角質層の細胞間結合を離反させ、そのバリア機

能を殆ど消失させるので、プロピレングリコールに溶解したコウジ酸が容易に真皮に移行したためと思われる。

エステル配合ゲル軟膏の Rp. 2、4 と 6 を適用した場合、24h 後に表皮及び全皮膚中にエステルがかなり残存していた。*d*-limonene を配合した Rp. 4 では 6h 後に多量のエステルが全皮膚内に検出された (Fig. 4)。脂溶性のエステルの角質層透過が促進された結果、生きた表皮と真皮内に多く残留しているためと考えられる。

Rp. 2 ゲル軟膏適用時の表皮内エステル (コウジ酸量に換算) とコウジ酸の合計量は 6h 後で $7.9\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、24h 後で $15.4\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。この量はコウジ酸のゲル軟膏 (Rp. 1) 適用時の値、 16.6 と $22.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ と比較して少ないが、皮膚の透過量を考慮すると、エステル処方 of 皮膚内分配量は相対的に高くなった。事実 24h 後の [表皮分配量 / 24h での透過量] の比を求めると Rp. 1 で 0.137 、Rp. 2 で 0.282 となり、エステル処方が 2 倍以上高い値を示した。促進剤配合の Rp. 4 と 6 についても同様、この比はエステル処方が 2 ～

4 倍高い値となった。したがって基底層でのメラトニン生成の抑制には、表皮内分配性の高いコウジ酸エステルがコウジ酸より有効であると判断される。

3. 1. 3 チロシナーゼ活性の阻害

コウジ酸のエステル化によりチロシナーゼ活性が変化するか否かを検討した。その結果を Table 3 に示したが、エステル体自身にもチロシナーゼ活性阻害作用が認められた。また、その阻害作用はコウジ酸のそれに匹敵する強い阻害であった。なお、このエステルは非水溶性であるため、濃度の高い場合には阻害活性が測定できなかった。この結果、表皮基底層に達したエステルはその型でメラニン色素の生成を阻害できると考えられる。また経時的に加水分解されるので生成したコウジ酸と相まって阻害作用を発現すると判断される。

3. 1. 4 皮膚一次刺激性

エステル体の刺激性をコウジ酸と比較した。Table 4 に示すように、Rp. 1 と Rp. 2 (エステル

Table 3 Tyrosinase inhibitory activity of kojic acid and its ester

Compound	mM	Inhibition (%)
Kojic acid	0.02	61.8 ± 6.3
	0.05	70.4 ± 3.5
	0.2	77.6 ± 5.6
	0.5	85.1 ± 2.7
Kojic acid ester	0.02	61.3 ± 3.9
	0.05	$60.0 \pm 3.9^{\text{a}}$
	0.2	$_{-}^{\text{b}}$

a) The medium was slightly cloudy. b) Not determined, because the ester was not dissolved in the medium. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3-4).

Table 4 Evaluation of skin reaction by kojic acid and kojic acid ester gel ointments

	Score					
	Rp. 1	2	3	4	5	6
Erythema and eschar formation	1.0	1.3	1.7	1.3	0.7	0.7
Edema formation	0	0	0	0	0	0

Gel ointment ($0.2\text{ g}/3.14\text{ cm}^2$) were applied on the back skin of rabbits for 24h. Each value represents the mean (n=3).

配合)ゲル軟膏適用では明瞭な紅斑は認められなかったが、微弱な紅斑が観察された。しかし両者の間に明確な差異は認められなかった。この結果はエステルもコウジ酸と同じく若干の刺激作用を有することを示唆する。なお、*d*-limonene を配合すると刺激性は僅かに増加した。

3.2 メラトニン

3.2.1 In vitro 皮膚透過

メラトニンの皮膚透過を Wistar ラットとヒト皮膚について測定した。ラット皮膚の透過を Fig. 5A に示した。メラトニンはラット皮膚を促進剤なしでもかなり容易に透過した。*d*-limonene の配

合(Rp. 8)は J_s と K_p を3倍に増大した(Table 5)。メラトニンの容易な皮膚透過は、その高い脂溶性と低分子量のため、角質層の細胞間脂質を容易に浸透することによると考えられる。

ヒト皮膚の透過を Fig. 5B に示した。メラトニンはまたヒト皮膚を透過できるが、透過速度はラットに比較して若干小さく、Rp. 7ではラットの1/2であった。しかし lag time はラットより5倍大きかった。一方 *d*-limonene を配合すると透過速度は減少した。この理由は *d*-limonene に溶解したメラトニンの多くが親水性の生きた表皮を透過しにくいと思われる。

3.2.2 皮膚内分配

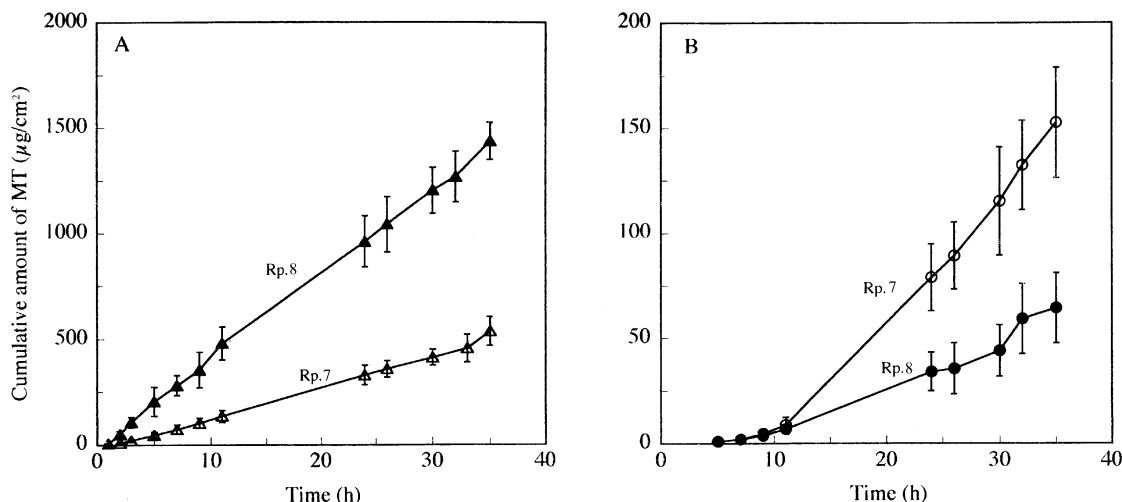


Fig. 5 Penetration profiles of melatonin through Wistar rat (A) and human skins (B)
Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3-4). A 0.1 g/0.785 cm^2 of gel ointment was applied.

Table 5 In vitro percutaneous penetration parameters of melatonin through rat and human skins

Parameter	Rat skin		Human skin	
	Rp. 7	Rp. 8	Rp. 7	Rp. 8
J_s ($\mu\text{g}/\text{h cm}^2$)	14.19 ± 2.85	45.56 ± 7.13^a	6.77 ± 1.07	2.98 ± 0.76^a
K_p ($\times 10^{-4}\text{cm}/\text{h}$)	4.73 ± 0.95	15.19 ± 2.38^a	2.26 ± 0.36	0.99 ± 0.25^a
Lag time (h)	1.70 ± 0.36	0.81 ± 0.25^a	12.71 ± 1.06	13.46 ± 1.47
D ($\times 10^{-7}\text{cm}^2/\text{h}$)	4.05 ± 0.75	8.98 ± 2.97	0.53 ± 0.05	0.50 ± 0.05
K_m	2.37 ± 0.43	3.54 ± 0.68	8.59 ± 1.40	4.01 ± 1.13^a

Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=4). a) $P < 0.05$ compared with Rp. 7.

メラトニンの皮膚内分配量の測定は、ラット皮膚のみで行い、ゲル軟膏適用後2と5hで測定した。メラトニンは両時間とも表皮に大部分検出された。おそらく角質層またはその下部の顆粒層、有棘層、基底層などに分布していると思われる (Fig. 6)。*d*-Limonene を配合すると (Rp. 8) 皮膚内分配量は2倍近くに増加した。その増加の大部分は表皮内分配量の増加であった。この増加は Fig. 4 に示すような皮膚透過の増大に関連していると思われる。なお、メラトニンは皮膚ホモジネート中で全く加水分解されなかったため、皮膚内で安定であると考えられる。

3. 2. 3 脂質過酸化の防止

Wistar ラット皮膚について脂質過酸化を測定したが、皮膚の脂質含量が少ないため、過酸化物は検出できなかった。そのため、肝 homogenate の

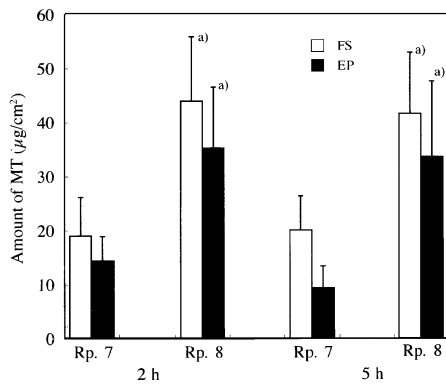


Fig. 6 Amount of melatonin remaining in rat skin
Each bar represents the mean $\pm$ S.D. (n=4).
a) $p < 0.05$ compared with Rp. 7.

Table 6 Protecting effect of melatonin on lipid peroxidation

Concentration (mM)	MDA (nmol/mg protein)	Inhibition (%)
0	0.450 $\pm$ 0.020	-
1	0.457 $\pm$ 0.020	0
1.5	0.386 $\pm$ 0.038	14.2
5	0.085 $\pm$ 0.015	73.0
10	0.065 $\pm$ 0.011	79.4

Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

9000xg 上清画分についてメラトニンの防止作用を測定した。その結果を Table 6 に示した。メラトニンは反応系濃度 5 及び 10mM で 70% 以上の過酸化防止作用を示した。この作用はすでに報告されているメラトニンの lipid peroxidation の抑制と一致する¹⁵⁾。皮膚については明確な結果が得られなかったが、皮膚でもメラトニンは脂質過酸化を防止して、free radical による損傷から皮膚の細胞を保護すると思われる。

3. 2. 4 紅斑抑制作用

UVB 照射による紅斑に対するメラトニンの抑制作用を酢酸レチノールのそれと比較した。UVB 照射により紅斑 (スコア 1.33 ± 0.58) が認められたが、メラトニンゲル軟膏の適用により紅斑は消失した (スコア 0)。この効果は酢酸レチノールのそれに (スコア 0.33 ± 0.58) に匹敵した。この実験では、ラットの例数が少なかった (n = 3) ので、多数のラットを用いて再確認する必要があるが、メラトニンは紅斑を抑制できると判断される。

4 総括

コウジ酸エステルの皮膚透過、皮膚内分配性及びチロシナーゼ阻害作用などをコウジ酸と比較した。コウジ酸のラット皮膚透過速度はエステル適用時よりも3倍大きかったが、適用6及び24h後の皮膚内分配量はエステル軟膏が相対的に増加し、[表皮内分配量/透過量]の比はエステル軟膏が2倍以上高くなった。コウジ酸エステル自体にチロシナーゼ活性阻害作用が認められた。これらのことから、コウジ酸エステルは皮膚透過が少なく、表皮内に比較的多く滞留するので、基底層でのメラニン色素の生成抑制に有用であると考えられる。吸収促進剤はコウジ酸及びエステル (皮膚透過時コウジ酸に加水分

解される) 両者の透過を高めたが、コウジ酸に対する透過促進が大きかった。

メラトニンはラット及びヒト皮膚を比較的容易に透過した。*d*-Limonene を配合するとラット皮膚の透過は上昇したが、ヒト皮膚ではむしろ減少した。メラトニンは脂質過酸化を 5 mM 以上の濃度で強く防止した。また、UVB 照射による紅斑を抑制し、その効果は酢酸レチノールのそれに匹敵した。

参考文献

- 1) 秋保 暁, 福田 實: 最近の美白剤の開発の動向, フレグランスジャーナル, 1992-6, 29-34, 1992.
- 2) 田中宣征: 皮膚美白剤の研究開発の現状と今後の問題点, フレグランスジャーナル, No.63, 23-27, 1983.
- 3) 伊東泰美: プラセンターエキストラクトの色素沈着抑制効果, フレグランスジャーナル, No. 63, 35-39, 1983.
- 4) 比嘉良喬: コウジ酸の melanin 生成抑制作用について, フレグランスジャーナル, No. 63, 40, 1983.
- 5) 秋保 暁, 鈴木裕美子, 浅原智久, 藤沼好守, 福田 實: アルブチンのメラニン生成抑制作用, B16 メラノーマ培養細胞による生化学的研究, 日本皮膚化学雑誌, 101, 609-613, 1991.
- 6) Saruno R., Kato F., Ikeno T.: Kojic acid, a tyrosinase inhibitor from *Aspergillus albus*, Agric. Biol. Chem., 43 (6), 1337-1338, 1979.
- 7) Maestroni G. J. M., Conti A., Pierpaoli W.: Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immuno-suppressive effect of corticosterone, J. Neuroimmunol, 13, 19-30, 1986.
- 8) Reiter R. J., Tan D. X., Poeggeler B., Menendez-Pelaez A.: Melatonin as a free radical scavenger: Implications for aging and age-related diseases, Ann. N. Y. Acad. Sci., 719, 1-12, 1993.
- 9) Reiter R. J., Regina C., Carneiro C., Oh C.-S.: Melatonin in relation to cellular antioxidative defence mechanism, Horm. Metab. Res., 29, 363-372, 1997.
- 10) Poeggeler B., Reiter R. J., Tan D. X., Chen L. D., Manchester L. C.: Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: A hypothesis, J. Pineal. Res., 14, 151-168, 1993.
- 11) Reiter R. J., Poeggeler B., Tan D. X., Chen L. D., Manchester L. C., Guerrero J. M.: Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor, Neuroendocrinol. Lett., 15, 103-116, 1993.
- 12) Bangha E., Elsner P., Kistler G. S.: Suppression of UV-induced erythema by topical treatment with melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine). A dose response study, Arch Dermatol. Res., 288, 522-526, 1996.
- 13) 白須泰彦, 松岡 理編: 新しい毒性試験と安全性の評価, 皮膚一次刺激性試験, ソフトサイエンス, 東京, 1981, 444-445.
- 14) Ogiso T., Paku T., Iwaki M., Tanino T.: Mechanism of the enhancement effect of *n*-octyl- β -D-thioglucoside on the transdermal penetration of fluorescein isothiocyanate-labeled dextrans and the molecular weight dependence of water-soluble penetrants through stripped skin, J. Pharm. Sci., 83, 1676-1681, 1994.
- 15) Carneiro R. C. G., Reiter R. J.: δ -Aminolevulinic acid-induced lipid peroxidation in rat kidney and liver is attenuated by melatonin: An in vitro and in vivo study, J. Pineal. Res., 24, 131-136, 1998.