

ごあいさつ

本年はコスメトロジー研究振興財団が1991年3月に第1回目の研究助成表彰を行ってから10回目という節目の年ということになります。この間、設立者の小林孝三郎氏から私が理事長を引き継ぎましたが、バブル崩壊という経済変動で財団運営の主体である金利が下がり、健全運営に苦労を強いられる環境へとシフトしてきています。このような中で当財団では安定した研究助成活動を継続、維持してきています。これはひとえに関係各の皆様方のご協力、ご支援があればこそその結と感謝している次第です。

最近の話題として“ライフスタイルドラッグ”がマスコミにも取り上げられていますが、これは皆様もご存じのバイアグラや育毛剤「リアップ」(主剤ミノキシジル)、禁煙助成のニコチンシールや肥満治療薬等が対象とされ、生活の質を上げる目的で使用される薬とのことだそうですが、この領域の薬がブームとなっているようです。これは微弱的な疾患でも生活に苦痛なものは取り去って快適な生活を目指そうというものであり、化粧品が目指す目的価値と類似し、時代の流れの方向を感じます。

又、最近あるテレビ番組で21世紀の予測を世界の科学者にアンケート調査した中で、カリフォルニア工科大学のA.リードヘッド博士が“人は100歳でも活動的であり、女性はもっと長い間奇麗でいられるようになっているだろう”と予測していましたが、この予測を実現出来るようにコスメトロジーとしては“肌の環境”整備に関する学術的な追求を目指し、基礎から応用まで幅広い研究に対する助成を続けて行きたいと考えております。

今後とも旧来に増して皆様方のご協力・ご支援をお願いしてやまない次第です。

平成11年8月

財団法人 コスメトロジー研究振興財団
理事長 小林 禮次郎

ごあいさつ

■ 研究報告

I. 素材、物性に関する分野

- ・ 単分散無機顔料粒子のモルフォロジー制御とそのキャラクタリゼーション 2
大阪教育大学教育学部 神 鳥 和彦
- ・ 合成糖脂質の超分子集合体に関する研究11
早稲田大学理工学部 武 岡 真司
- ・ 高分子経皮吸収促進剤：糖残基を有するシロキサン化合物の合成と促進作用17
（財）相模中央化学研究所 長 瀬 裕
- ・ トランスグルタミナーゼに対する細胞接着28
東京工業大学生命理工学部 斉 藤 佑尚
- ・ 植物由来環状ペプチド類のチロシナーゼ阻害活性に関する研究36
東京薬科大学薬学部 竹 谷 孝一

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・ X線照射とマイトマイシンの併用によって起こる
皮膚障害に対するイチョウ葉エキスの効果44
星薬科大学 太 田 節子
- ・ 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53
近畿大学薬学部 小木曾 太郎
- ・ HGF による皮膚の再生促進と老化防止の基礎的研究61
大阪大学医学部 松 本 邦夫
- ・ ケラチノサイトの発現するエラスチンと皮膚の老化との関連について70
防衛医科大学校皮膚科 多 島 新吾
- ・ ヒト毛乳頭細胞における androgen receptor, 5 α -reductase,
17 β -hydroxysteroid dehydrogenase の発現76
大阪大学医学部 板 見 智
- ・ 生体計測工学に基づいた非侵襲的な皮膚の性状の測定法の開発：
皮膚を指で触った感覚の定的測定83
東北大学大学院医学系研究科 田 上 八 朗
- ・ 接触過敏症の皮膚浸潤細胞に特異的に発現している遺伝子の解析95
東邦大学理学部 小 林 芳郎
- ・ ノックアウトマウスによる cell envelope のバリアー機能解析100
京都府立医科大学皮膚科学教室 山 西 清文

- ・ 眼粘膜への障害を指標とした化粧品素材の安全性評価のための基礎的検討
——眼内動態の定量的評価法の確立104
長崎大学薬学部 中 村 純三
- ・ 紫外線誘発 DNA 損傷および修復酵素の細胞内分布状態の三次元的表示116
奈良県立医科大学ラジオアイソトープ実験施設 森 俊雄
- ・ 皮膚器官培養系を用いた化学物質の刺激性、抗原性の検討123
東京医科歯科大学医学部 横 関 博雄

II. 精神、文化に関する分野

- ・ 化粧品の香り表現に関する研究130
明星大学人文学部 神 宮 英夫
- ・ 高齢女性における化粧を用いた情動活性化療法：
心理的リハビリテーション・プログラムの枠組みづくりへ向けて138
文京女子大学人間学部 伊 波 和恵

■記念講演

- 平成 10 年度記念講演 『香りと味の分子認識と生理的な役割』149
北海道大学大学院薬学研究科 栗 原 堅三

■コスメトロジー研究雑感161

■ 付 録

- 平成 10 年度事業報告181
- 役員一覧188
- 研究助成課題一覧189



研究報告

-
- I . 素材、物性に関する分野
- II . 生体作用、安全性に関する分野
- III . 精神、文化に関する分野
-

I． 素材、物性に関する分野

単分散無機顔料粒子のモルフォロジー制御と そのキャラクターゼーション

大阪教育大学 教育学部

神 鳥 和 彦

The morphology and texture of hematite particles producing from a forced hydrolysis reaction of $\text{FeCl}_3\text{-HCl}$ solution were controlled by dimethylformamide (DMF) and dioxane (DX). The morphology of synthetic hematite particles was concentration dependent; they changed from large sphere with diameter of ca. 600 nm to diamond-like shape with increasing DMF concentration in the aging solution accompanying a reduction of their size to 80 nm without incorporation of DMF in the particles. This fact was explained by an acceleration of phase transformation from β - FeOOH to hematite with an elevation of the solution pH owing to dimethylamine produced from a hydrolysis of DMF at an elevated temperature. TEM and XRD suggested that the diamond-like hematite particles formed above 6 ~ 10 vol% DMF possess a single crystal nature. TG and FTIR indicated that the hematite particles produced with DMF contained small amounts of OH^- ions in the lattice though they provided a single crystal nature. On the other hand, the spherical shape of haematite particles produced below the DX concentration of 10 vol% (diameters: 600 ~ 1000 nm) was changed to cubic one after producing the particles at more than 12 vol% DX (mean edge lengths: 900 ~ 1200 nm). The rod-like β - FeOOH particles were precipitated to be cubic ones at the DX concentration ≥ 28 vol%. TEM and XRD suggested that the haematite particles formed in the presence of DX are polycrystalline with an enlarged c dimension in a unit cell. TG and FTIR indicated that the haematite particles produced with DX are hydrohaematite possessing OH^- ions in the lattice as well as the particles produced with DMF. The results obtained in the present study revealed that variation of the polarity of the medium with addition of DX is a determining factor of the particle size and shape rather than the interfacial tension of the medium and the particles. In the case of aluminum phosphate particles, the size of spherical particles was controlled by using urea and isopropylamine (IPA) and their texture was investigated by various means. The mean particle diameter (D_p) of the particles decreased with increase in the concentration of urea by accelerating the precipitation reaction from decomposition of urea at elevated temperature. The D_p decreased by addition of IPA up to 6 mol% to Al ions under a constant urea concentration, while D_p increased above the concentration because IPA produced electrolytes by reacting with HNO_3 ; the electrolytes may reduce the range of coulombic repulsion between charged primary particles. All the particles adsorbed selectively H_2O molecules. IPA does not act as a template but operates as an effective additive for controlling the particle size without altering the inner texture of spherical aluminum phosphate particles. It was revealed from the results that both the hematite and aluminum phosphate particles are produced from the aggregation of small primary particles.

1 緒 言

形態と大きさの均一ないわゆる単分散コロイド無機顔料粒子は、分散安定性や光散乱の基礎的研究のモデル物質としてだけではなく、その色調・色彩・光物性あるいは吸着物性からコスメトロジー分野への広い応用が期待できる新素材である。このような単分散無機顔料粒子調製に関する研究は、これまでかなり経験的に試行錯誤の上に行わ

れてきた。最近、我々は多くの単分散粒子を調製し、このような単分散コロイド粒子は、一般に非常に微細なクラスター粒子が集合して生成する、いわゆる凝集機構によることを明らかにしてきた^{1)~5)}。そこで、このように微細な一次粒子の凝集速度をコントロール出来れば、得られる粒子の形態と大きさを任意にコントロールすることが出来るものと期待される。さらに、凝集の程度までコントロール出来れば、一次粒子間の間隙に形成する細孔の大きさを変えることが可能となり、ウルトラマイクロポアからマイクロポアまで様々な吸着特性を有する新しい単分散無機顔料粒子が得られよう。本研究は「単分散コロイド粒子」として、ヘマタイト ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ならびに金属リン酸塩の1つであるリン酸アルミニウムを選び、こ



Morphology control of monodispersed inorganic pigment particles and their characterization.

Kazuhiko kandori

School of Chemistry Osaka University of Education 4-698-1, Asahigaoka, Kashiwara, Osaka, 582-8582 Japan

これらの表面や内部の細孔構造に関するキャラクタリゼーションを自動気体吸着装置、XRD、DTA-TG、SEM、TEM、XPS 等で行った。

今回ヘマタイト粒子の大きさや形態等を精密にコントロールする方法として、低表面張力・高沸点を有し、水と任意の割合で混合するジメチルホルムアミド (DMF) ならびにジオキサン (DX) を用い、水-DMF あるいは水-DX 混合溶媒で FeCl_3 -HCl 溶液の加熱加水分解を行うことによって単分散ヘマタイト粒子の調製を行い、得られた粒子の構造と性質について調べた。一方、リン酸アルミニウム粒子については均一沈殿剤である尿素、ならびに多孔性材料を調製する際にテンプレート剤として広く利用されているイソプロピルアミン (IPA) の影響について検討した。

2 実験

単分散ヘマタイト粒子は、 FeCl_3 ($3.16 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$)、HCl ($3.16 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) の混合水溶液に、所定量の DMF (あるいは DX) を 30mL テフロンキャップ付き耐熱スクリュウビンに入れ、 100°C 、7 日間熟成して調製した。DMF ならびに DX の濃度は、全溶液に対して 0 ~ 80 vol% と変化させた。一方、球状リン酸アルミニウム粒子の調製は、 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ($3.98 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$)、 Na_2HPO_4 ($3.98 \times 10^{-2} \text{ mol/dm}^3$)、 HNO_3 (0.035 mol/dm^3)、尿素 (0 ~ 1 mol/dm^3) ならびに IPA (Al^{3+} イオンに対して 0 ~ 10 mol%) の混合溶液を 20 cm^2 のテフロン栓付き試験管に入れ、 100°C で 19 時間熟成した。得られた粒子はミリポアフィルターで濾過後充分洗浄し、 25°C で 16 時間減圧乾燥した。得られた沈殿はいずれも濾過し、蒸留水で十分洗浄した後、室温で 16 時間真空乾燥した。これらの粒子のキャラクタリゼーションは、TEM、XRD、TG-DTA、FTIR、 N_2 ならびに H_2O の吸着測定、格子定数測定及び CHN 元素分析から行った。なお、*in-situ* FTIR、 N_2 ならびに H_2O の吸着測定における粒子の前処理は、 10^{-5} Torr 下 2 時間所定温度で行なった。

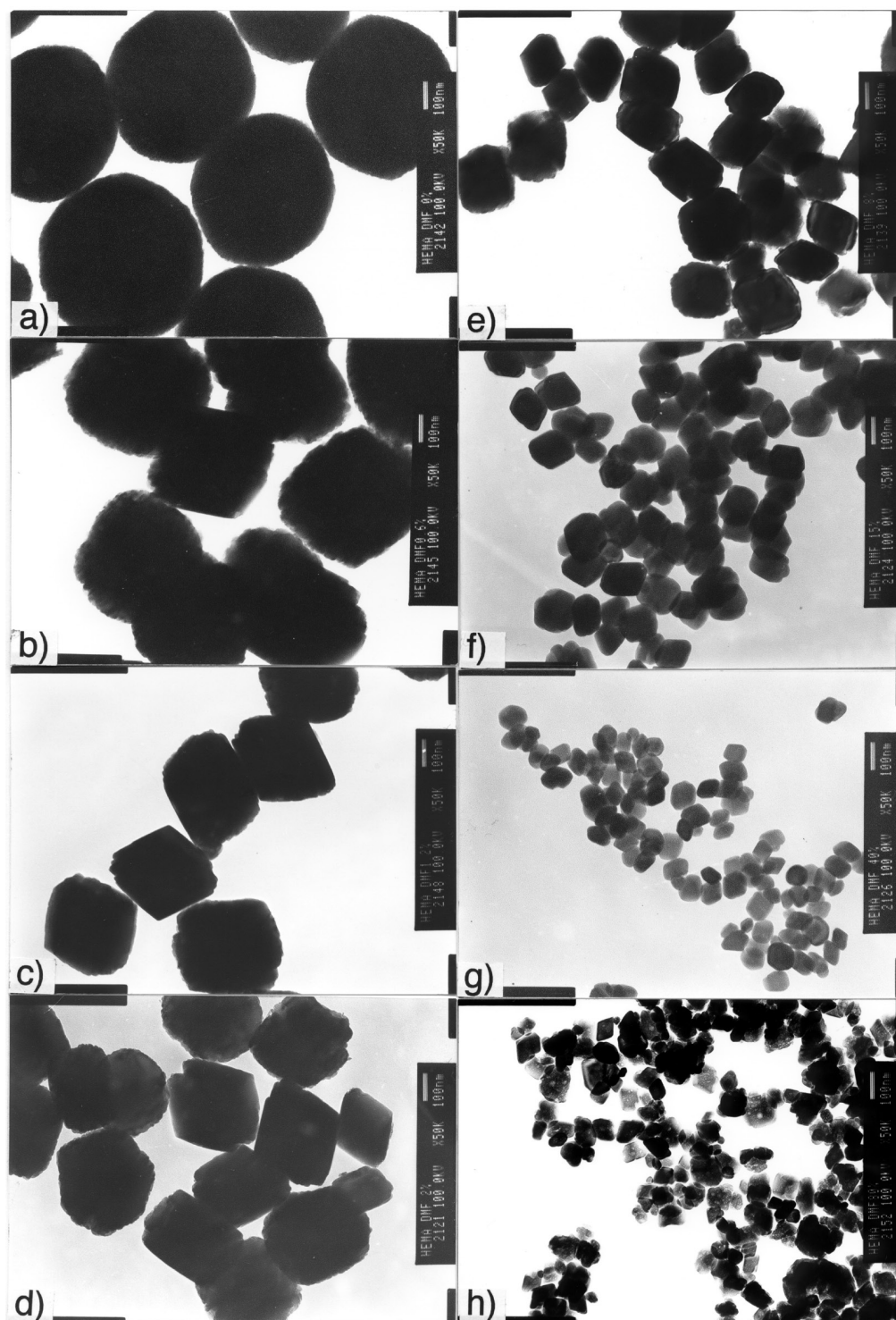
3 結果と考察

3.1 単分散ヘマタイト粒子系

3.1.1 粒子形態に及ぼす DMF の影響と得られたヘマタイト粒子の性質

粒子はいずれも、ヘマタイト特有の XRD パターンを示した。Fig. 1 の TEM 写真に見られるように、粒子形態は DMF 濃度の増加にともない、球状からダイヤモンド型へ変化するとともに、Fig. 2 に示すように平均長軸径 (L_p) が約 600nm から約 80nm へと小さくなることが分かった。TEM 観察と FTIR スペクトルの経時変化から、これらのヘマタイト粒子は、 β - FeOOH から結晶転移することによって生成することが分かった。また、この結晶転移の速度は、DMF 濃度の増加とともに速くなることが分かった。これは、DMF が高温で加水分解 $[(\text{CH}_3)_2\text{N}-\text{CHO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HO}(\text{CHO}) + (\text{CH}_3)_2\text{NH}]$ して生成するジメチルアミンによって溶液の pH が上昇し、 β - FeOOH の生成速度が速くなったためと考えられる。すなわち、速い速度で生成した β - FeOOH 粒子は小さいためより速く溶解し、ヘマタイト粒子の生成速度が促進され、 L_p が低下したと考えられる。このように、DMF は表面張力の低下という作用以外に、尿素やアミド等のように昇温とともに均一に溶液の pH を上昇させる、いわゆる均一沈殿剤として作用していることが分かった。

DMF 添加系で得られた粒子の XRD パターンの (104) と (110) 面の半値幅から求めた結晶子径を計算したところ、Fig. 2 に示すように DMF 濃度が 6 ~ 10 vol% 以下では L_p は結晶子径よりかなり大きく粒子は多結晶体であることが示唆されたが、6 ~ 10 vol% 以上では両者は一致し単結晶粒子が生成していることが分かった。XRD 測定から粒子の格子定数を測定したところ、Fig. 3 に示すように a 軸は変化しないものの c 軸は DMF 低濃度領域で大きく、多結晶体では結晶格子に歪みが生じていることが分かった。また、TG 曲線にはいずれの粒子にも室温から 400°C までに吸着水の



200nm

Fig.1 Typical TEM micrographs of hematite particles produced at various DMF concentrations.
DMF concentration : (a) 0, (b) 0.6, (c) 1, (d) 2, (e) 8, (f) 15, (g) 40, (h) 80 vol% .

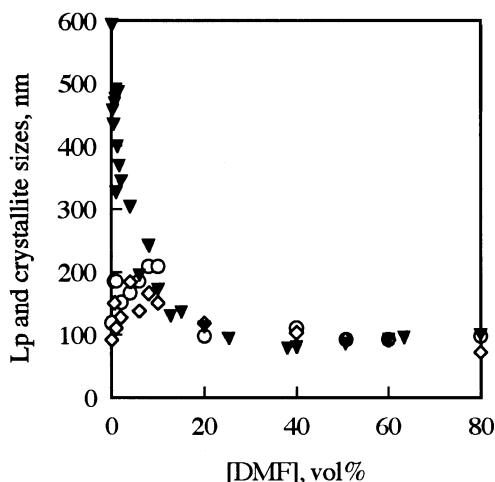


Fig.2 Changes of mean long axis length (Lp) and crystallite sizes from (104) and (110) planes, D_{104} and D_{110} , with DMF concentration.

(▼) Lp, (◇) D_{104} , (○) D_{110}

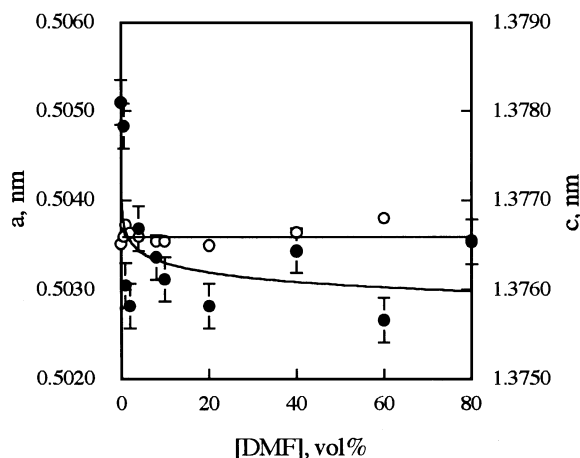


Fig.3 Changes of unit cell dimensions with DMF concentration.

(○) a-axis, (●) c-axis.

脱離あるいは表面からの脱水酸基によるものと考えられる重量減と、わずかではあるが 700°C から 1000°C までに粒子内部に取り込まれた OH^- イオンの脱離と考えられる重量減が見られた。さらにこの内部 OH^- イオンの存在は、Fig. 4 に示した粒子の *in situ* FTIR スペクトルにおいて 3400cm^{-1} 付近の吸収が観測されることから確かめられた。このように粒子は組成式 $\alpha\text{-Fe}_{2-x/3}(\text{OH})_x\text{O}_{3-x}$ で与えられるハイドロヘマタイトであることが分

かった。このことは、内部 OH^- イオンの存在によって結晶格子が拡張するという Wolska ら⁷⁾ の報告とも一致する。粒子の結晶性の違いを明らかにする目的で、 N_2 ならびに H_2O の吸着測定を行ない、 N_2 比表面積 (S_{N_2}) と N_2 比表面積当りの H_2O の単分子吸着容量 (n_w) を測定し Fig. 5 に示した。このように DMF 0.6 vol% 以下で生成したヘマタイト粒子は 200°C 以下では S_{N_2} と n_w とともに大きな値を示し、粒子内に水を選択的に吸着するウルトラマイクロポアが生成することが分かった。一方、DMF が 1 vol% 以上で生成したヘマタイト粒子の S_{N_2} と n_w は処理温度に対してほぼ一定で、粒子の結晶性の高いことが示唆された。これらの結果は先の XRD と TG の結果と良く一致した。

3.1.2 粒子形態に及ぼす DX の影響と得られたヘマタイト粒子の性質

TEM 観察から、粒子形態は DX 濃度の増加に伴い 10 vol% までは球状であり、 $12 < [\text{DX}] < 26$ vol% では立方状へと変化した、いずれもヘマタイト特有の XRD パターンを示した。28 vol% 以上では立方状粒子の他に $\beta\text{-FeOOH}$ が一緒に生成した。TEM 観察と FTIR スペクトルの経時変化から、これらのヘマタイト粒子は、前項の DMF-水系と同様 $\beta\text{-FeOOH}$ から結晶転移することによって生成することが分かった。また、この結晶転移の速度は、DX 濃度の増加とともに 4 vol% までは遅くなるものの 6 vol% 以上では速くなった。これは Fig. 6 に示すように粒子の平均径 (Lp) が 6 vol% まで 400 nm から 1000 nm まで増大し、それ以上では反対に 1000 nm から 800 nm までわずかに減少するという傾向と良く一致した。表面張力の低い DX の添加は、粒子表面の固-液界面自由エネルギーを低下させ、粒子の大きさを小さくするものと期待されたが、結果は反対であった。このことから、生成する粒子の大きさと形態を支配する因子は、溶媒の界面張力ではなく極性であることが分かった。

粒子の結晶子径を計算したところ、すべての

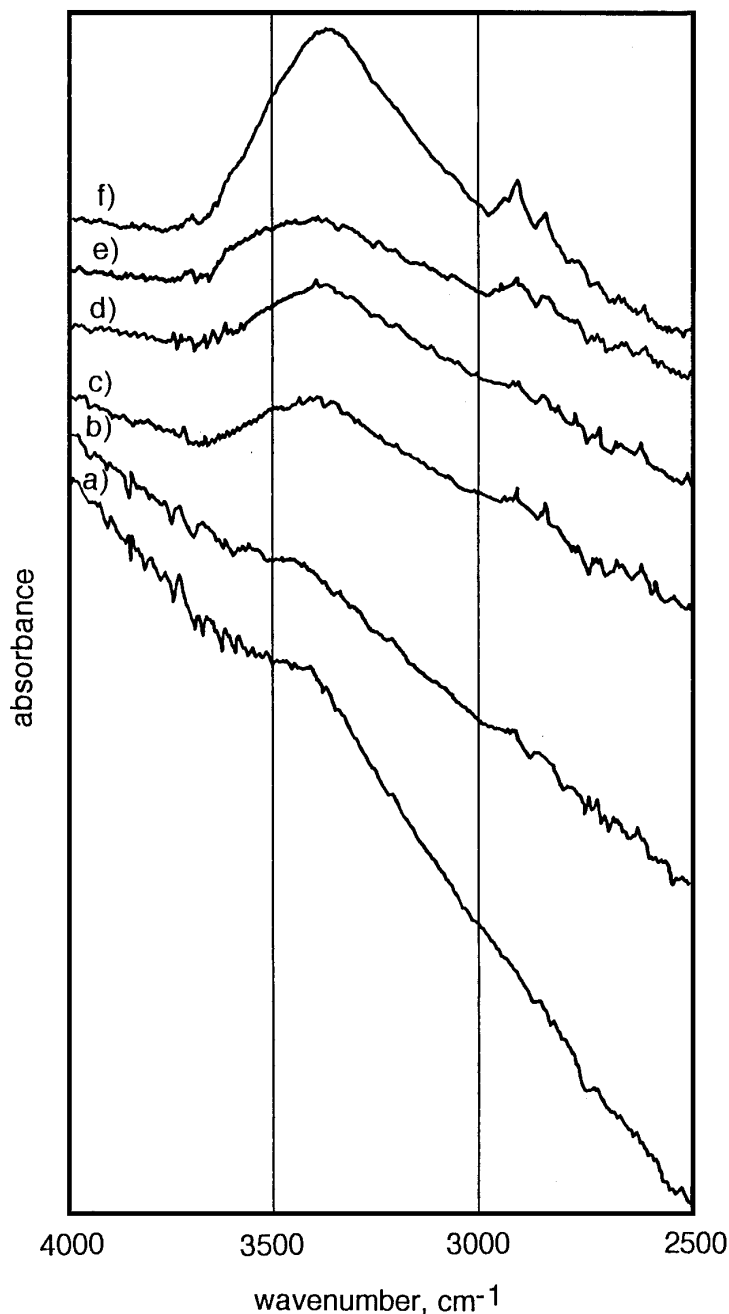


Fig.4 In-situ IR spectra of hematite particles produced at various DMF concentrations.
DMF concentration : (a) 0, (b) 1, (c) 4, (d) 10, (e) 40, (f) 80 vol% .

DX 濃度で L_p は結晶子径よりかなり大きく、粒子は多結晶体であることが示唆された (図6)。XRD 測定から粒子の格子定数を測定したところ、Fig.

7に示すように DMF - 水系と同様 a 軸は変化しないものの c 軸はすべての DX 濃度領域で単結晶粒子について報告されている文献値よりも大きく、得られた粒子の結晶格子は c 軸方向に拡張していることが分かった。また、TG 曲線にはいずれの粒子にも室温から 400℃ までに吸着水の脱離あるいは表面からの脱水酸基によるものと考えられる重量減と、わずかではあるが 700℃ から 1000℃ までに粒子内部に取り込まれた OH^- イオンの脱離と考えられる重量減が見られた。さらにこの内部 OH^- イオンの存在は、粒子の *in situ* FTIR スペクトルにおいて 3400cm^{-1} 付近の吸収が観測されることから確かめられた。このように粒子は DMF - 水系と同様ハイドロヘマタイトであることが分かった。粒子の結晶性の違いを明らかにする目的で、 N_2 ならびに H_2O の吸着測定を行い、比表面積 (S_N と S_w) を測定し Fig. 8 に示した。DX 濃度が 6 ならびに 10 vol% で生成したヘマタイト粒子では前処理温度の上昇と共に S_w / S_N 比が増加するのに対して、その他の粒子では減少した。 S_w / S_N 比は、水を選択的に吸着するウルトラマイクロポアの割合を表す一つの尺度であるから、この結果は前者の試料の高い熱的安定性を示唆するものである。また、これらの粒子には他の試料よりも内部 OH^- イオンが多く存在することが *in situ* FTIR 測定によって確認されたことから、

ウルトラマイクロポアは内部 OH^- イオンの脱水によって生成することが明かとなった。

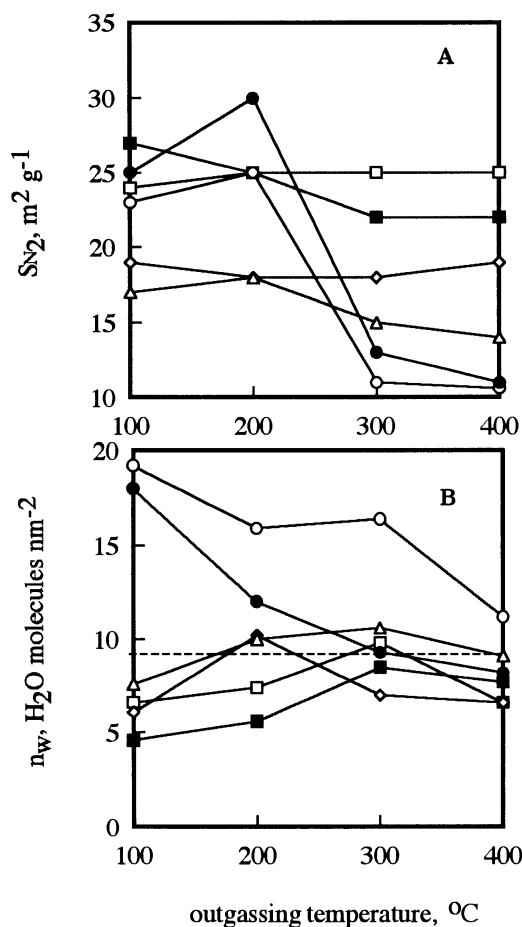


Fig. 5 Changes of (A) specific surface areas and (B) number of adsorbed H_2O molecules (n_w) on hematite particles produced at various DMF concentrations as a function of outgassing temperature.
DMF concentration : (●) 0, (○) 0.6, (△) 10, (◇) 10, (■) 40, (□) 80 vol%.

3. 2 単分散リン酸アルミニウム ($AlPO_4$) 系

3. 2. 1 尿素ならびに IPA の影響

いずれの系においても球状粒子が得られた。Fig. 9 に得られた粒子の平均粒子径 (D_p) の尿素濃度による変化を示した。このように、 D_p は尿素濃度が 1 mol/dm^3 まで増加するにつれて 478 から 36nm まで連続的に低下した。この際、尿素的加水分解によって生成したアンモニウムイオンによって、熟成溶液の pH は上昇した。粒子のモノマー形成はプロトン生成反応であるため、 D_p の

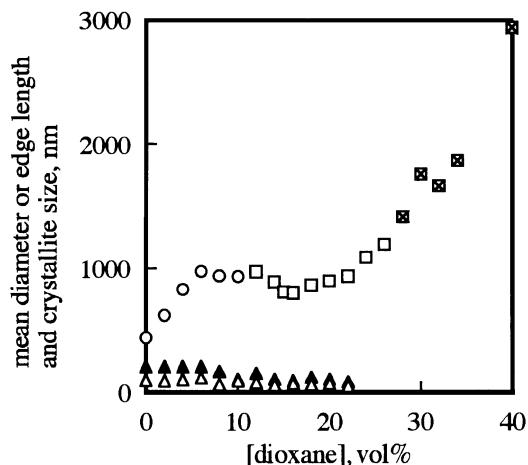


Fig. 6 Changes of mean diameter or length (L_p) and crystallite sizes from (104) and (110) planes, D_{104} and D_{110} , with DX concentration.
 L_p : (○) spherical, (□) cubic, (◇) cubic with rod-like β -FeOOH particles. (△) : D_{104} , (▲) : D_{110} .

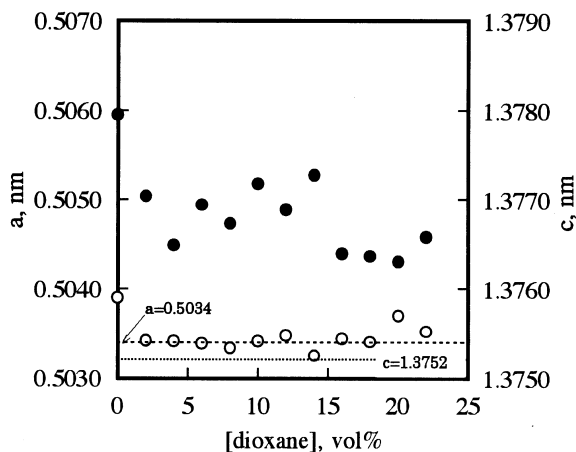


Fig. 7 Changes of unit cell dimensions of hematite particles with DX concentration.
(○) a-axis, (●) c-axis..

低下は pH 上昇によってモノマー形成反応が促進され、より多くの結晶核が生じたためと考えられる。

Fig. 10 に D_p の IPA 濃度依存性を示した。尿素無添加の場合には、 D_p は 478 から 173nm へと低下し、粒子成長に対する阻害効果が見られる。一方、尿素添加系では、特徴的な結果が見られる。すなわち、いずれの尿素濃度においても IPA が 6

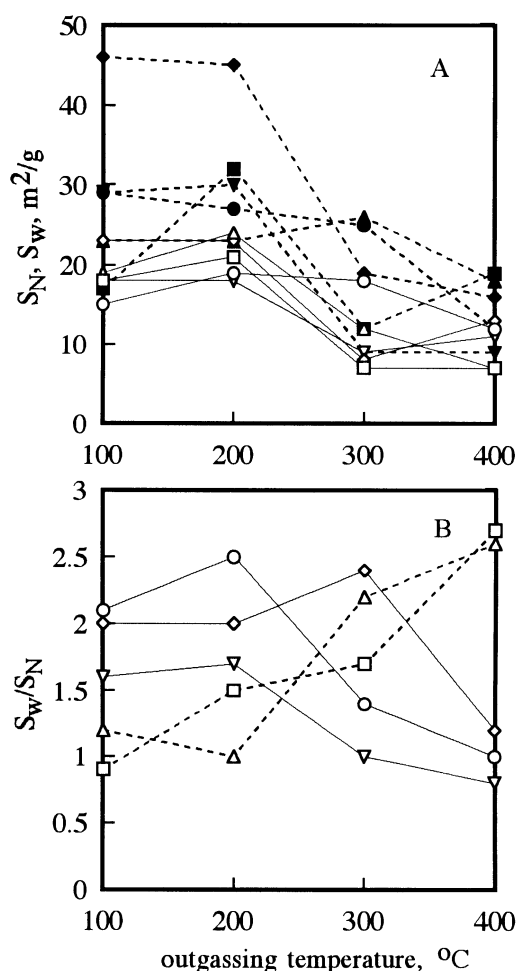


Fig. 8 (A) Changes of specific surface areas from nitrogen (SN: open symbols with solid line) and water (Sw: full symbols with break line) adsorption experiments as a function of outgassing temperature. (B) Changes of S_W/S_N ratio as a function of outgassing temperature. DX concentration (vol%): (○) 0, (□) 6, (△) 10, (◇) 16, (▽) 20.

mol%まで D_p は低下するものの、それ以上では再び増加する。IPA の pK_a は 10.53 であるので、溶液中 IPA は硝酸と反応して硝酸塩 $[(CH_3)CHNH_3^+ \cdot NO_3^-]$ を形成する。したがって、この形成した硝酸塩が無関係電解質として作用し、凝集する一次粒子間の静電的斥力を弱めることによって凝集が促進され、 D_p が増加したものと考えられる。

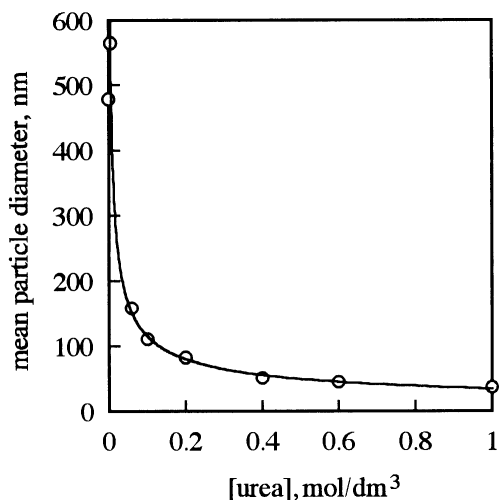


Fig. 9 Changes of mean particle diameter of spherical aluminum phosphates urea concentration.

3.2.2 粒子のキャラクタリゼイション

尿素濃度 0, 0.2, 0.6, 1 mol/dm³ならびに 1 mol/dm³の尿素に 10mol%の IPA を添加した系で得られた粒子について検討した。試料の TG 曲線は、室温から 200 $^{\circ}C$ までに急激な重量減が生じ、それ以上では 1000 $^{\circ}C$ までゆっくりと僅かな減量が見られたが、試料による違いは見られなかった。前者の重量減は吸熱ピークを伴っていることから、吸着水と Al^{3+} イオンに配位した水の脱離によるものと考えられる。25 $^{\circ}C$ から 1000 $^{\circ}C$ までの全重量減はいずれも 21.5 ~ 26.5%であり、ICP 測定から決定された Al/P の原子比は 0.96 ~ 1.15 であった。これらの結果から、得られた粒子の組成は $AlPO_4 \cdot nH_2O$ ($n=1.9 \sim 2.4$) と推定された。吸着水と配位水の存在は、さらに真空中における粒子の FTIR 測定によっても確認された。生成粒子はアモルファスであり、空气中 600 ~ 800 $^{\circ}C$ 以上で 2 時間熱処理することによって $AlPO_4$ に結晶化した。

3.2.3 粒子の水分子選択吸着性

前報で我々はリン酸アルミニウム粒子が高い水分子選択吸着性を有することを報告した⁶⁾。そこで、今回調製したいろいろな大きさを有する粒子

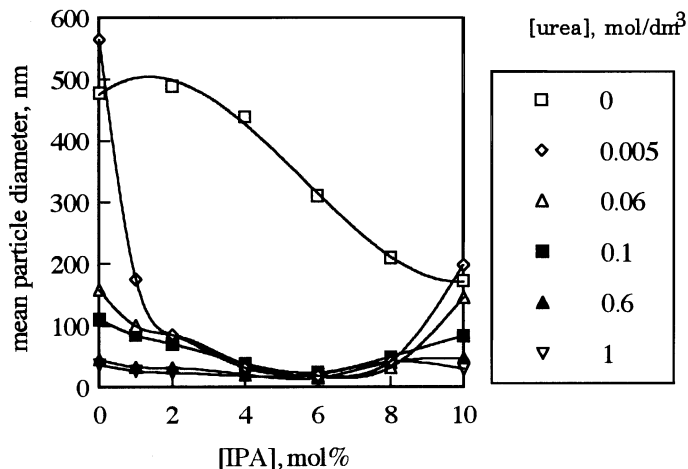


Fig. 10 Effect of IPA on mean particle diameter of spherical aluminum phosphates at various concentration of urea.

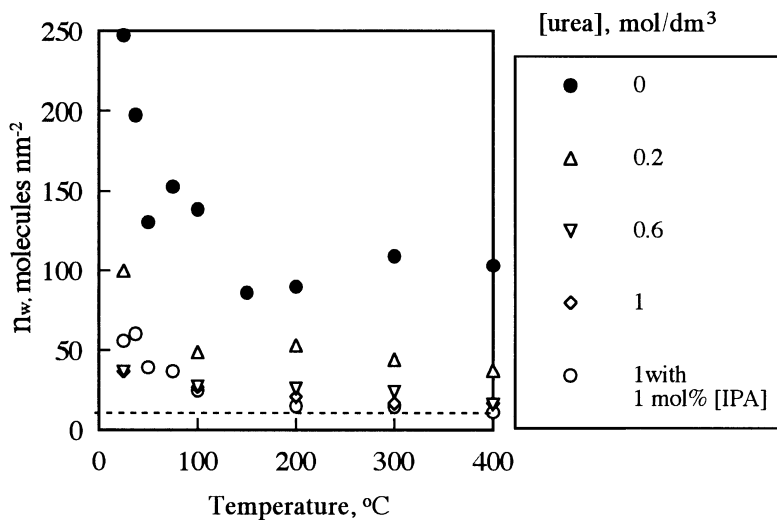


Fig. 11 Plots of n_w as a function of pretreatment temperature for spherical aluminum produced at various urea and IPA concentrations.

がどのような水分子選択吸着性を示すかを調べるために、 N_2 と H_2O の吸着実験を行った。その結果いずれもⅡ型の等温線が得られた。 N_2 の吸着等温線からD-H法により細孔径分布を解析したところ、ポアサイズはいずれも2～30nmに分布しており、一次粒子間ならびに二次粒子間の間隙に形成されたメソポアの存在が確認され、凝集による粒子の生成機構を支持する結果が得られた。水の選択吸着性を比較するためにFig. 11に H_2O 分子の N_2 表面積を基準とした単分子吸着容量(n_w)を処理温度に対して示した。この図にはさらに H_2O 分

子占有面積(0.106nm^2)から計算される n_w の理論値9.3分子/ nm^2 を波線で示した。この値と比較すると n_w 値は 100°C 以下でかなり大きい。このことは、粒子が高い水分子選択吸着性を有している事を意味している。しかし、選択吸着性は尿素濃度の増加、すなわち D_p の低下とともに低下した。これは、 D_p の低下によって粒子の外部比表面積が大きくなったためである。しかしながら、IPA添加による n_w の違いは見られない。以上の結果より、IPAはテンプレート剤として働くのではなく、粒子の大きさを制御する効果のあることが分かった。

4 総 括

以上、本研究では単分散ヘマタイトならびにリン酸アルミニウム粒子の合成に成功し、それらの粒子の特性を調べた。その結果、いずれの粒子の形成も微細なクラスター粒子の凝集機構によるものであり、その凝集の程度をコントロールすることによって生成するマイクロポアのサイズを任意に変えることが示唆された。このような方法を用いた、均一なマイクロポアを有する他の様々な粒子の調製はこれからの課題である。

文 献

- 1) Kandori, K., Kawashima, Y. and Ishikawa, T., : Characterization of Monodispersed Hematite Particles by Gas Adsorption and FTIR Spectroscopy, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 87, 2241-2246 (1991).
- 2) Kandori, K., Toshioka, M., Nakashima, H. et al: Pore Structure of Uniform Spherical Cobalt Phosphate Particles, Langmuir, 9, 1031-1035 (1993) .
- 3) Kandori, K., Nakashima, H. and Ishikawa, T. :Inner Structure of Uniform Spherical Metal Phosphate Particles II . nickel phosphate, J. Colloid Interface Sci., 160, 499-501 (1993) .
- 4) Kandori, K., Tamura, S. and Ishikawa, T. :Inner Structure and Properties of diamond-shaped and spherical α -Fe₂O₃ Particles, Colloids Polym. Sci., 272, 812-819 (1994).
- 5) Kandori, K., Matsuda, E., Yasukawa, A. and Ishikawa, T. :Size Control of Uniform Spherical Cobalt Phosphate Particles and Their Adsorptive Properties, Shikizai, 68, 75-82 (1995) .
- 6) Kandori, K., Imazato, T., Yasukawa, Y. et al. :Textures of Spherical Aluminum Phosphate Particles, Colloid Polym. Sci., 274, 290-294 (1996).
- 7) Wolska E. and Schwertmann, U. : Nonstoichiometric structures during dehydroxylation of goethite, Z. fur Kristallogra., 189, 223-23 (1989).

合成糖脂質の超分子集合体に関する研究

早稲田大学 理工学部

武 岡 真 司

Amidic glycolipids, 1,5-bis-O-alkyl-N-maltooligonoyl-L-glutamate (**1**), having various lengths of two hydrocarbon chains (carbon number, *m*: 14, 16, 18) and maltooligoside (glucose unit, *n*: 3, 5, 7) and N-glycosidic lipid, 1,5-bis-O-octadecyl-N-maltopentaonosyl-L-glutamate **2** were synthesized. The assembling structures were analyzed by microscopic observation such as negatively stained TEM, cryo-TEM, and AFM. The glycolipid **1a** (*m,n*: 14,5) showed a fiber-like structure, while **1b** (16,5) showed a fiber-like structure when the hydrating temperature was above the gel-to-liquid crystalline phase transition temperature (T_c) and a large disk-like structure when incubated below the T_c . The glycolipid **1c** (18,5) took a large disk-like structure by hydrating the powder above the T_c . The glycolipids **1d** (18,3) and **1e** (18,7) showed the mixture of large disks and large vesicles and the mixture of small disks and micelles, respectively. While, N-glycoside lipid **2** made vesicular structure only.

Preparation procedure using high shear stress such as extrusion or sonication converted the large disk of **1c** to the smaller assemblies such as small disk, cone, and granule-like assemblies, having low molecular packing states. The glycolipid molecules in the plane part of the disk were packed so tight that the segmental mobility was very low even above the T_c ; and the reactivity of the saccharide chain against Concanavalin A (ConA) was also very low. These data indicate that high reactivity should come from the loose packing of saccharide chains around the edge part of the assemblies.

The disks make a unique supramolecular assembling structure by complex formation with ConA. The stacking of several disks forms a rouleaux-like structure, and the structures further assemble to construct hyperbranched three-dimensional aggregates. This supramolecular assembly would be a model of an extracellular matrix, an effective matrix to keep bound water, or a material which releases hydrophilic or hydrophobic substances with controllable rates.

1 緒 言

細胞表面に局在する糖鎖は、生体系において情報の担持と伝達の役割を担っている。例えば、抗原抗体反応、細胞間認識（接着と融合、接触阻害）、細胞の分化などにおいて、その情報伝達機能が分子レベルで明らかにされてきている。本研究では分子構造と分子認識からその生理活性を追及する糖鎖工学的手法に対して、糖脂質自体の物理化学的な性質に焦点を当て、単純構造の合成糖脂質が形成する分子集合形態に関する基礎知見を得ることを目的としている。既に、オリゴ糖の還元末端に疎水基を導入して構造の明確な糖脂質の簡便合成法を確立し、構造（糖鎖の長さや結合様式、疎

水部のアルキル鎖長や糖鎖との結合）の異なる一連の糖脂質を合成、これがリン脂質小胞体の分散安定度の向上や凍結融解操作に対する安定度向上に寄与することを報告している¹⁻³⁾。更に糖脂質集合体をレセプター蛋白質 (ConA) と複合させて超分子集合体を形成させることができた⁴⁾。これは細胞外マトリックスや新しい薬物保持・徐放材料の構築に対して工学的な手法を与えることが期待される。

2 実 験

2.1 試 料

実験に用いた2種類の糖脂質構造を Figure 1 に示す⁵⁾。ここで、アルキル鎖がグルタミン酸のカルボン酸基とエステル結合した中間体が糖鎖末端とアミド結合した amidic glycolipid 系を **1**、アミノ結合した N-glycosidic lipid 系を **2** とした (Figure 1)。1 に関してグルコース単位数 3, 5, 7, アルキル鎖炭素数 14, 16, 18 を組み合わせた糖脂質を合成した。



Research on Supramolecular Assemblies of Synthetic Glycolipids

Shinji Takeoka

School of Science and Engineering,
Waseda University

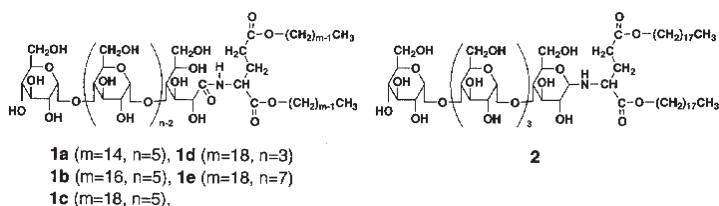


Figure 1 Structure of synthetic glycolipids.

2.2 分子集合形態の観察

透過型電子顕微鏡 (TEM, JEOL JEM-100CX), Cryo-TEM (Philips, CM12), 原子間力顕微鏡 (AFM, Digital Instruments Nanoscope II) について各々の常法に従って試料を作成し, 集合体形態を観察した. 透過型電子顕微鏡観察ではリンタンゲステン酸あるいはモリブデンアンモニウムをネガティブ染色剤とした.

2.3 ^1H -NMR 測定による分子充填状態の解析

D_2O に糖脂質を分散させて集合体 (2mM) を形成, DMSO を糖脂質に対し 2mol% を外部参照として添加し, ^1H -NMR (JEOL JNM-LA500) にて 25°C から 70°C までの各温度にて測定した.

2.4 等温型滴定熱量分析による ConA との結合解析

等温型滴定熱 分析には Microcal 社の MCS ITC を用いた. *Concanavalin A* (ConA) (0.812mM) 溶液を糖脂質分散液 (0.8mM) に滴下した際の熱から会合定数 (K), エンタルピー変化 (ΔH), 結合数 (n) を計算した.

3 結 と 考 察

3.1 糖脂質分子構造と集合形態

アミド結合糖脂質 1 の粉末に純水を添加してゲル-液晶相転移温度 T_c 以上で静置すると, 自発的に分散し集合体を形成する. 1a は静置温度に関係なく繊維状集合

体を形成する (Figure 2 (a)) が, 1b では静置温度が T_c 以上の場合に繊維状 (幅 8.4nm, 厚さ 10nm) の集合体を形成し, T_c 以下の場合には大きな円盤型 (直径約 180nm) の集合体 (Figure 2 (b)) となる. AFM 観察によると膜厚は 9nm であり, 糖脂質の

二分子長 (10nm) とほぼ一致し, これが二分子膜であることを確認した. 1c では T_c 以上で分散させると静置温度に関係なく大きな円盤型二分子膜を形成した. また, 1d と 1e は各々, 大きな円盤型二分子膜と大きな二分子膜小胞体の混合系, 小さな円盤型二分子膜と球状ミセルの混合系であった. この様に集合形態はアルキル鎖長の伸長に伴い繊維状→円盤型二分子膜へと変化し, 糖鎖長の伸長に伴い小胞体→大きな円盤型二分子膜→小さな円盤型二分子膜, ミセルへと変化する傾向が認められた (Table 1). これは, 糖脂質の糖鎖部の割合が相対的に大きくなるに従って, 曲率の小さな円盤や小胞体から曲率の大きな集合形態 (小さな円盤, 繊維, ミセルなど) へ変化するを示している. 他方, N-glycoside lipid 2 では二分子膜小胞体構造のみが確認された.

更に調製方法 (分散エネルギーの大きさ) によってとり得る集合形態が異なることを見出した. 例えば, 糖脂質 1c では (i) T_c 以上での分散静置にて大きな円盤状二分子膜 (平均直径 400nm)

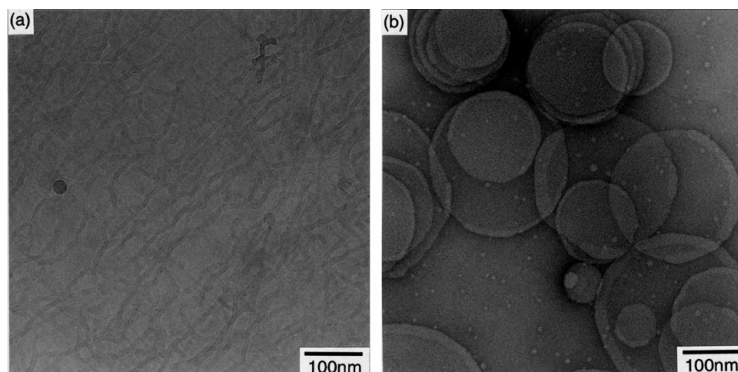


Figure 2 Microscopic observation of glycolipid assemblies. (a) Cryo-TEM of fiber-like assemblies (1a), (b) TEM of large disk-like assemblies (1b) below T_c .

Table 1 The areas per molecule, collapse pressures of glycolipids, and physical properties of the glycolipid assemblies.

glycolipids	molecular area at 30mN/m ¹⁾ (Å ²)	collapse pressure ¹⁾ (mN/m)	CMC ¹⁾ (mM)	T _c (°C)	ΔH (kcal/mol)	assembling structures
1a	56.0	44.0	0.72	non	—	fiber
1b	59.0	51.1	0.47	45	4.8	large disk (<T _c), fiber (>T _c)
1c	51.5	52.3	0.0083	58	8.1	large disk, small disk, grain, and cone
1d	47.5	51.8	0.015	57	6.6	vesicle and large disk
1e	soluble	soluble	0.82	non	—	spherical micelle and short fiber
2	52.0	50.0	<10 ⁻²	54 66	1.3 10.6	vesicle

¹⁾ 25°C in pure water

A を形成, (ii) これを均一孔径のメンブランフィルター (孔径 0.1 μm) に強制的に透過させると小さな円盤状二分子膜 (平均直径 50 nm) B, あるいは楕円状, 棒状形態が観測されるが, 同一視野の傾斜観察から楕円状, 棒状体は小さな円盤状集合体の縁部であることが明らかになった (Figure 3 (a)). (iii) B に超音波照射を行なうと顆粒状 (長径 18 nm, 短径 9 nm) のミセル C が得られた (Figure 3 (b)).

3.2 分子動力学計算による集合形態の考察

分子力学計算 (Discover 97.0, msi 社) による 1 の分子構造は, 螺旋状オリゴ糖鎖がアルキル鎖からみた分子軸に対して大きく屈曲した構造が最も安定であった (Figure 4 (a) - (i)). アルキル

鎖軸にほぼ沿った構造 (Figure 4 (a) - (ii)) が 6.9 kcal/mol のわずかな差でこれに続いた. これは疎水部に結合している糖が開環しており糖鎖配向の自由度が大きいためである. 他方, 閉環構造の 2 はほぼアルキル鎖軸に沿った構造 (Figure 4 (a) - (iii)) をとった. 次に 1 の屈曲構造分子 (i) を 40 分子水中に分散させて動力学計算を行ったところ, 曲率の高い楕円ミセル様集合構造を形成した (Figure 4 (b)). また, 伸長構造 (ii) では二分子膜を形成した. 従って, 1 では屈曲構造の分子の集合が二分子膜縁部の安定化に寄与できるために, 円盤状の集合形態 A, B が可能であり, 更にこれを高エネルギーにて分散させると全ての分子が屈曲構造となり顆粒状ミセル C として安定化する機構が考察される. また, 円盤状集合体に水素結合を切断する尿素を添加するとミセル状に

形態変化することから, この円盤形態の安定化には糖鎖間の水素結合も寄与していることが示唆された.

3.3 ¹H-NMR による分子セグメント運動の測定

1c の 3 種類の集合体について, ¹H-NMR のピーク強度 (半幅値) の測定から各集合体における糖脂質分子各部の運動状態 (これは分子充填状態に関係する) を検

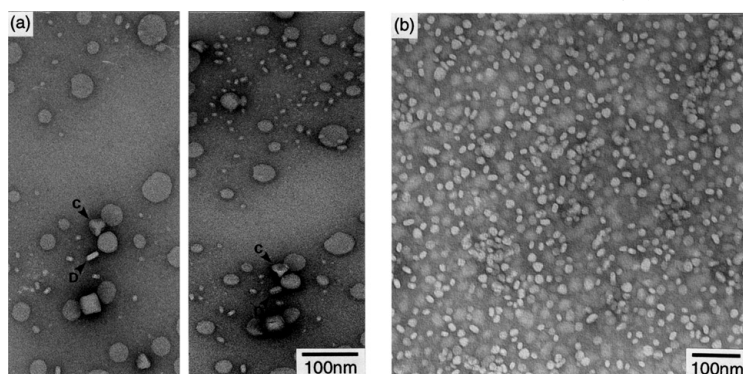


Figure 3 Microscopic observation of glycolipid assemblies (1c). (a) Two TEMs of small disk-like assemblies changing the observation angle with 45 degree. Arrows C and D in the pictures indicate cone- and disk-like assemblies, respectively. (b) TEM of granule-like assemblies.

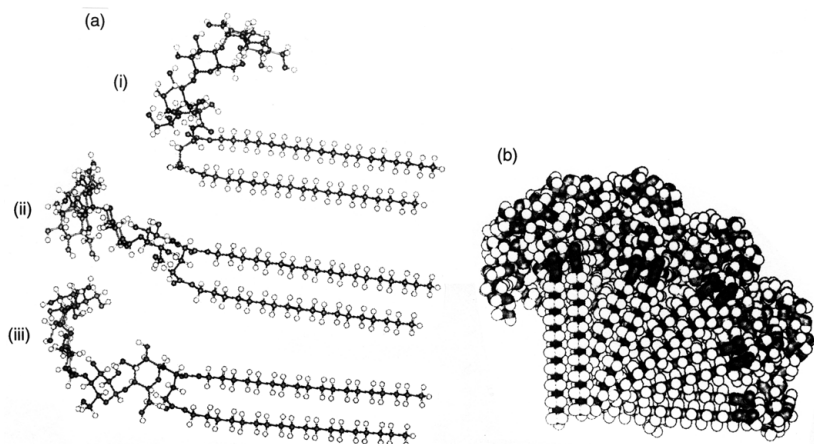


Figure 4 Simulation of glycolipid structure and its molecular assembly. (a) Structure of (i) 1c bending, (ii) 1c stretching, (iii) 2. (b) A part of granule-like assembly of 1c with the bending structure.

討した (Figure 5). A では相転移温度 (58°C) 以下では糖鎖 (3.2 ~ 4.0ppm), アルキル鎖 (0.8, 1.2ppm) プロトンのピークは観測されず, 相転移温度以上でアルキル鎖プロトンのピークが僅かに観測されたのみであった (Figure 5 (a)). これは分子充填状態が高くセグメント運動が著しく抑制されていることを示している. B では相転移温度以下でも糖鎖, アルキル鎖の幅広いピークが観測

され, 温度上昇に伴いピーク強度は増大, 縁部の乱れが中心部まで及んでいることが示唆された (Figure 5 (b)). C では低温域でも糖鎖, アルキル鎖のピーク強度は大きく, 温度上昇に伴いアルキル鎖のピーク強度が大きく増大した (Figure 5 (c)). 従って, 分子充填状態は大きな円盤状二分子膜 → 小さな円盤状二分子膜 → 楕円球状ミセルの順に低下し, 高エネルギーで分散

3. 4 等温滴定型微小熱量分析による糖鎖認識の解析

分子充填状態の異なる糖脂質集合体 A, B, C について, 分子内に 4 つ糖認識部位を持つ蛋白質

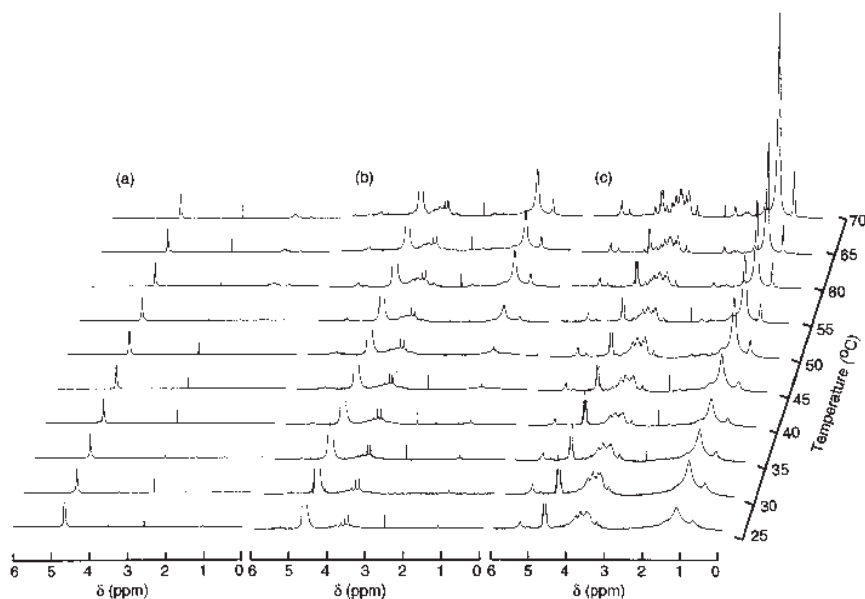


Figure 5 Temperature dependence of segmental motion in glycolipid assemblies obtained from ^1H -NMR spectra of their D_2O dispersions. (a) Large disk-like assembly A, (b) small disk-like assembly B, (c) granule-like assembly C.

Table 2 Thermodynamic parameters of the binding of Con A to various glycolipid assemblies at 25°C.

preparations	main assembling structure	binding ratio (glycolipid/Con A)	binding constant K (M^{-1})	ΔH (kcal/mol)
(i)	large disk	ca. 303	$(6.1 \pm 1.6) \times 10^4$	-22.4 ± 40.6
(ii)	small disk	43.5 ± 0.9	$(2.6 \pm 0.4) \times 10^4$	-16.2 ± 3.8
(iii)	grain	25.9 ± 2.0	$(5.8 \pm 0.9) \times 10^4$	-25.9 ± 2.5

(ConA) に対する複合体形成能を等温滴定型微小熱量分析を用いて解析した (Table 2). 各集合体分散溶液と ConA 水溶液を混合すると直ちにしているが、濁度上昇度は C>B>A の順で大きかった。結合定数と ΔH は A と C でほぼ等しい値を示したが、A への ConA の結合量は C と比較して 9% 程度に過ぎなかった。一方、B では結合定数、 ΔH は A や C に比較して小さな値であったが、ConA の結合量は A、C の中間値であった (C の 60% 程度)。

以上の結果から、分子充填状態の最も低い C では集合体全体に ConA が結合できるが、A ではその大部分を占める分子充填状態の高い平板部には ConA は結合できず、C と類似の分子充填状態を持つ縁部に限定されると推測される。B では縁部の乱れが中心部まで及んでおり、縁部だけでなく平板部にも ConA が結合するが、その結合定数、結合量は縁部ほど高くないと考えられる。

3.5 円盤型集合体と ConA からなる超分子集合体

小さな円盤型集合体 B に対して、構成糖脂質と当モル量の ConA を加えると白濁し沈殿物を形成する。これを TEM 観測すると Figure 6 に示した様に 3~5 個の円盤が連なった連鎖構造を単位として主に側面-平面結合を主とする多分岐状の超分子集合体が観測された。円盤の間隔は 8 nm

であり、ConA 一分子に相当する。また、円形構造は紙面に対して垂直に伸びた連鎖構造体と推測され、これが 3 次元構造物であることを示唆している。側面を結合サイトとする集合体は、前述したように縁部に ConA が多く結合しており、これが架橋構造を取り易い自由度を持っているためと考察される。もし、平面部に ConA が結合し易い充填構造をとるのであれば、カラム状の超分子集合体が得られるであろう。

4 総括

単純ではあるが、従来にない親疎水結合構造を持つ一連の糖脂質を合成し、分子構造と分子集合形態との間の相関について検討した。親水部が大きく自由度の高い構造の分子では、曲率の大き

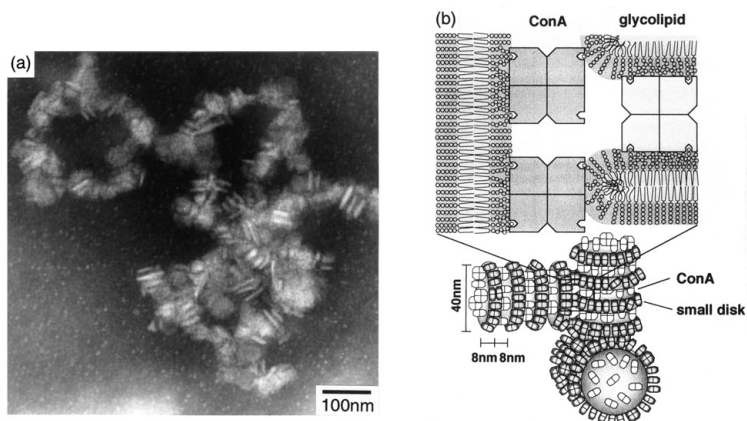


Figure 6 Rouleaux-like structure prepared by the addition of a Con A aqueous solution to the dispersion of disk-like assemblies of 1c. (a) TEM photograph, and (b) estimated illustration. The structure would be constructed by crosslinking between the plane sides or between the plane sides and edge parts of the disk by four binding sites of ConA for the glycosyl group of 1c.

な集合形態と充填状態の高い平板状形態の両極端が可能となるため、円盤型集合体を得られ、これを分子動力学的にシミュレーションできた。調製時のエネルギーが高くなるほど、より分子充填状態の低い集合形態へと変化し、*ConA* との結合性が高くなった。また、*ConA* と円盤型集合体を複合させることにより3次元多分岐状超分子集合体を得られた。これは細胞外マトリックスモデルあるいは結合水を有効保持できる新しいマトリックス、水溶性・疎水性薬剤の徐放材料などの応用が期待できる。

引用文献

- 1) Takeoka S, Sakai H, Takisada M, et al., :Inhibition of intervesicular aggregation of phospholipid vesicles by incorporation of dialkyl oligosaccharide glycerol, Chem. Lett., 1992, 1877-1880.
- 2) Takeoka S, Sakai H, Ohno H, et al., :Inhibition effect of aggregation of phospholipid vesicles by incorporation of glycolipids, J. Colloid Interface Sci., 152, 351-358, 1992.
- 3) Sakai H, Takisada M, Takeoka S, et al., :Cryoprotection of synthetic glycolipids for phospholipid vesicles, Chem. Lett., 1993, 1891-1894.
- 4) Takeoka S, Sou K, Ohgushi T, Tsuchida E, :Disk-like assemblies of a synthetic glycolipid and their association with Concanavalin A, Supramol. Sci., 5, 159-162, 1998.
- 5) Takeoka S, Sou K, Boettcher C, Fuhrhop J-H, Tsuchida E, :Physical properties and packing states of molecular assemblies of synthetic glycolipids in aqueous dispersions, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 94, 2151-2158, 1998.

高分子経皮吸収促進剤： 糖残基を有するシロキサン化合物の合成と促進作用

(財)相模中央化学研究所

長 瀬 裕、秋 元 倫 子

Polydimethylsiloxanes containing a β -D-glucopiranosyl group at one chain end (Glc-PSn) with various molecular weights were prepared to develop a silicone-based polymeric transdermal penetration enhancer. Glc-PSn was prepared by hydrosilylation of hydrosilyl-terminated polydimethylsiloxane (PDMS) with 1-allyl- β -D-glucose tetraacetate in the presence of bis(benzonitrile)platinum dichloride as the catalyst, followed by hydrolysis of the acetyl groups with sodium methoxide. The enhancing activity in the drug penetration was evaluated by in vitro experiments using a two-chamber diffusion cell. Antipyrine was used as a model drug, and the amount of drug permeated through the rat abdominal skin with or without Glc-PSn was determined by HPLC. These compounds were effective for the penetration of antipyrine. The enhancing activities were influenced by the chain length of PDMS component and by the concentration of Glc-PSn coexisted. The enhancing activity was also observed by the pretreatment of the skin with Glc-PSn before the drug permeation. It was also found that the enhancing activity was due to an increase of the partition coefficient of a drug into the stratum corneum, from the determination of kinetic parameters in the drug permeation. On the other hand, 1-(3- β -D-glucopiranosylpropyl)-3-alkyl-1,1,3,3-tetramethyldisiloxane (Glc-SiCn, alkyl = octyl, decyl or dodecyl) was prepared according to the similar method, which exhibited the excellent enhancing activity for the drug penetration through the skin. In addition, no or slight irritation to the skin was confirmed for these siloxane compounds by Draize test.

1 緒 言

全身作用を目的とした薬物投与方法として、薬物を皮膚からの浸透吸収によって投与する経皮吸収治療システムが従来法に代わる新しい薬物投与方法として注目されている。経皮投与の場合、薬物の肝臓での代謝（初回通過効果）が回避できる、薬物血中濃度の維持が容易である、患者のコンプライアンスを改善できる、何らかの不都合が起きた場合投与の中断が容易であるなどといった利点を有している。しかし、皮膚表面の最外層に位置する角質層は物質の透過に対してバリアー性があるために、良好な透過性を示す一部の薬物を除いて、治療に必要な薬物血中濃度を得るのが困難なことが多い。そこで、経皮吸収型製剤の実現のためには何らかの薬物の皮膚透過促進手段が必要

となり、中でも簡便な方法である経皮吸収促進剤の利用が広く検討されている¹⁾。ジメチルスルホキシド、N-メチル-2-ピロリドンなどの非プロトン性極性溶媒²⁾、アルコール類³⁾、脂肪酸⁴⁾、エステル類⁵⁾、界面活性剤⁶⁾、テルペン類⁷⁾など既存の化合物の促進剤としての効果が検討され、また、さまざまな構造を有する新規の経皮吸収促進剤 (Azone⁸⁾等)が開発されている。しかしながら、これらの促進剤は比較的分子量が小さいためにそれ自身が皮膚内に浸透し、刺激性や毒性を発現してしまう可能性を有している。

筆者らは、経皮吸収促進剤の刺激性や毒性を低減させることを目的として、吸収促進作用を有する高分子化合物の探索研究を行ってきた。Flynnらは経皮吸収型製剤に適する薬物の条件として分子量が400以下であるとしている⁹⁾。裏返せばそれ以上に分子量が大きいと皮膚透過が困難であるということである。そこで促進剤の分子量が大きくなればそれ自身の浸透は抑えられ、皮膚に対する刺激性や毒性が低減できると考えられる。筆者らは以前に、界面活性剤としての性質を有する塩化ベンザルコニウムと類似したモノマーおよびポ



Polymeric Transdermal Drug Penetration Enhancer: Preparation and Enhancing Property of Siloxane Compounds Containing a Sugar Moiety

Yu Nagase, Tomoko Akimoto
Sagami Chemical Research Center

一方、筆者らは片末端に極性基を有するポリジメチルシロキサン (PDMS) を各種合成し^{12)~18)}、抗炎症薬インドメタシンあるいはアンチピリンの経皮吸収に対する促進効果を主に検討した。ポリマーの構造式を Fig. 1 に示す。これらのポリマーは非極性基として PDMS 鎖を有しているために、いわば分子サイズの大きい界面活性剤と見なすことができる。いずれの場合も薬物の経皮吸収を促進し、その効果は分子量に大きく依存することが判った。中でも、カチオン残基を末端に有する PDMS (**1**、**2**、**3** および **7**) は分子量が 1,000 ~ 2,000 の範囲で優れた促進効果を示した^{12)、14)、15)}。また、**1** ~ **3** は疎水性薬物であるインドメタシンの透過促進に有効であるのに対して、ポリエチレングリコール (PEG) 鎖を導入した **7** は親水性のアンチピリンの皮膚透過を効果的に促進した¹⁸⁾。ところが、このようなカチオン系促進剤をアニオン解離するような薬物と併用した場合、薬物とカチ

オン末端とのイオン性相互作用により促進効果が著しく減少することも明らかとなった。

本研究では、ポリシロキサン系促進剤が適用できる薬物の幅を広げる目的で、非イオン型の極性基として糖残基をPDMS末端に導入することを新たに検討した。非イオン性極性基としてはこれまでもリン酸アミドやピロリドン環をそれぞれ末端に有するPDMS 4および6を検討してきたが、これらはいずれも低分子量体の方が高分子量体と比べ促進効果が高い傾向を示した^{13), 17)}。このような結果から、ポリシロキサン系促進剤の促進効果の発現には末端極性基と疎水性のシロキサン鎖との適度な極性のバランスが重要であると思われる。そこで、多くの水酸基を有し極性が高い糖残基を導入すれば比較的長いシロキサン鎖と結合させることにより促進作用を示す高分子化合物が得られるものと考えた。また、疎水性部位としてシロキサン鎖の代わりに比較的長いアルキル差を導入することで促進作用が発現するかについても検討した。ここでは、グルコピラノシル末端を有するPDMS化合物およびグルコピラノシル基とアルキル基を有するジシロキサン化合物の合成を行い、それらの経皮吸収促進作用について検討した結果を報告する。

2 実験

2.1 グルコピラノシル末端を有するポリジメチルシロキサン (Glc-PSn) の合成

Scheme 1 に示す反応に従い、目的とするポリシロキサン化合物 Glc-PS_n を合成した。典型的な

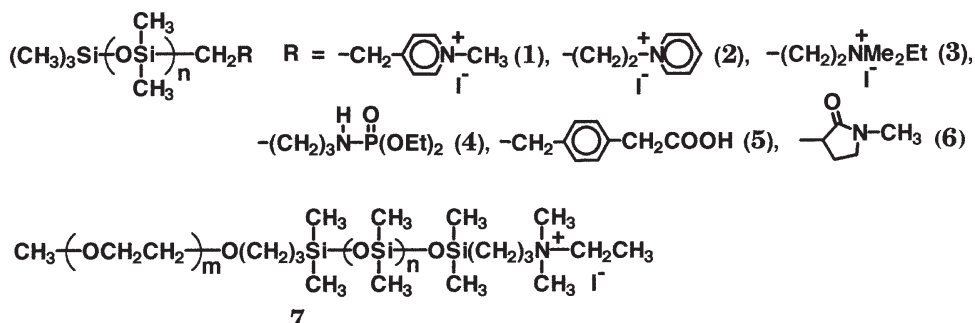
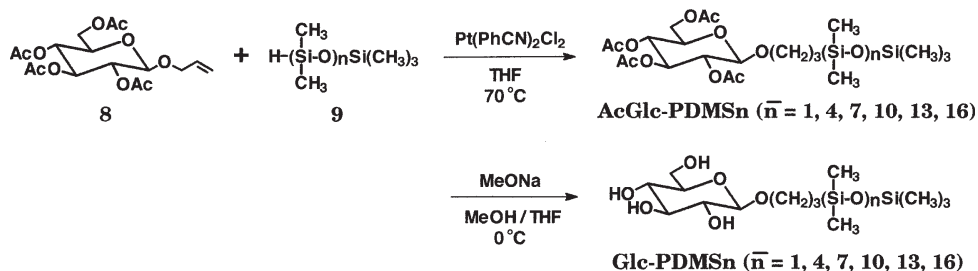


Fig. 1 Polydimethylsiloxanes containing a polar end group.



Scheme 1 Synthetic procedure of Glc-PSn.

合成手順を以下に示す。ここで、原料となる 1-アリル-β-D-グルコース (8)¹⁹⁾ およびヒドロシリル末端を有するポリジメチルシロキサン (9)²⁰⁾ はそれぞれ文献記載の方法により合成した。

AcGlc-PS10

アルゴン雰囲気下、8 (2.40g, 6.19mmol) およびビスベンゾニトリルプラチナムジクロリド (3.1mg, 6.5μmol) を THF 60mL に溶解した。この溶液に、あらかじめ真空中にて 2 時間脱気処理を行った 9 (n = 10, 5.36g, 6.18mmol) を加え、70℃にて 2 時間撹拌した。溶媒を留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル = 10/1-10/2vol.) にて精製したところ、5.79g の AcGlc-PS10 を淡黄色粘性体として得た。(収率：75.4%)

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃, δ/ppm) : 0.08 ((6n+9) H, s), 0.50 (2H, m), 1.59 (2H, m), 2.00 (3H, s), 2.02 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.08 (3H, s), 3.43, 3.83 (2H, ddt), 3.69 (1H, ddd), 4.13 (1H, dd), 4.27 (1H, dd), 4.50 (1H, d), 4.99 (1H, dd), 5.09 (1H, t), 5.20 (1H, t).

IR (KBr, ν/cm⁻¹) : 2850, 1760, 1410, 1360, 1260 (Si-C), 1220, 1100-1010 (SiOSi), 810, 700.

Glc-PS10

AcGlc-PS10 (5.69g, 4.58mmol) を THF 30mL/メタノール 30mL の混合溶媒に溶解し、ナトリウムメトキシド溶液 (1.0mol/L, 0.9mL) を加え、0℃にて 1 時間半撹拌した。次に、この溶液を希塩酸で中和し溶媒を留去後、シリカゲルカラムクロ

マトグラフィー (展開溶媒：ジクロロメタン/メタノール = 20/1vol.) にて精製したところ、4.08g の Glc-PS10 を白色のワックス状固体として得た。(収率：84.7%)

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃, δ/ppm) : 0.07 ((6n+9)H, s), 0.53 (2H, m), 1.65 (2H, m), 2.17 (1H, bs), 2.64 (1H, bs), 2.94 (1H, bs), 3.01 (1H, bs), 3.36 (1H, t), 3.38 (1H, m), 3.50, 3.84 (2H, ddt), 3.57 (1H, t), 3.59 (1H, t), 3.80-3.94 (2H, bs), 4.30 (1H, d).

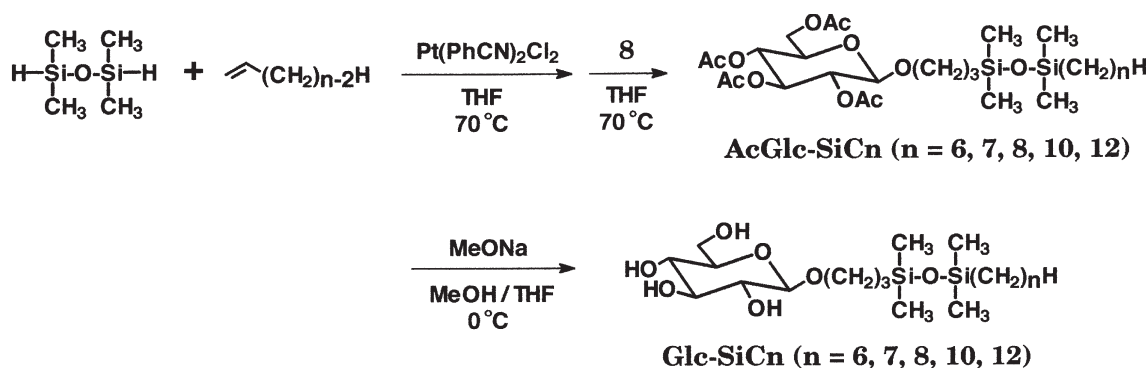
IR (KBr, ν/cm⁻¹) : 3400 (O-H), 2950, 1730, 1640, 1410, 1360, 1260 (Si-C), 1100-1010 (SiOSi), 800, 710, 670.

2.2 グルコピラノシル基とアルキル基を有するジシロキサン化合物 (Glc-SiCn) の合成

Scheme 2 に示す反応に従い、目的とするジシロキサン化合物 Glc-SiCn を合成した。典型的な合成手順を以下に示す。

AcGlc-SiC12

アルゴン雰囲気下、テトラメチルジシロキサン 3.60mL (20.3mmol) および 1-ドデセン 0.45mL (2.03mmol) を混合し、ジ(シアノフェニル)プラチナムジクロリド 0.96mg を加え 70℃にて 2 時間撹拌した。減圧下にて過剰量のテトラメチルジシロキサンを留去した後系内をアルゴン置換し、8 (0.79g, 2.03mmol) をテトラヒドロフラン 5mL に溶解した溶液を加え再び 70℃にて 2 時間撹拌した。溶媒を留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (流出溶媒：ヘキサン/酢酸エチル =



Scheme 2 Synthetic procedure of Glc-SiCn.

5/1 vol.) にて精製したところ、0.88 g の AcGlc-SiC12 を無色油状物として得た。(収率：62.7%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 0.02 (12H, s), 0.47 (4H, m), 0.86 (3H, t), 1.23 (20H, s), 1.58 (2H, m), 1.98 (3H, s), 2.00 (3H, s), 2.01 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.08 (3H, s), 2.12 (3H, s), 3.40, 3.82 (2H, ddt), 3.67 (1H, ddd), 4.13 (1H, dd), 4.27 (1H, dd), 4.48 (1H, d), 4.97 (1H, dd), 5.07 (1H, t), 5.19 (1H, t).

IR (KBr, ν/cm^{-1}): 2960, 2850, 1750 (C=O), 1550, 1450, 1410, 1360, 1260 (Si-C), 1220, 1160, 1100-1020 (SiOSi), 900, 830.

Mass (m/e, SIMS): 691 ($\text{M}^+ + 1$), 631, 575, 521, 345, 331.

Glc-SiC12

AcGlc-SiC12 (0.87 g, 1.25 mmol) をテトラヒドロフラン 4 mL およびメタノール 4 mL の混合溶媒に溶解した。この溶液に、ナトリウムメトキシドのメタノール溶液 (1 mol/L) を 0.13 mL 加え、0℃ にて 1.5 時間攪拌した。次に希塩酸を加えて中和し溶媒を留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (流出溶媒：酢酸エチル) にて精製したところ、0.61 g の Glc-SiC12 を無色ワックス状固体として得た。(収率：93.3%)

\$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ /ppm): 0.02 (12H, s), 0.47 (4H, m), 0.82 (3H, t), 1.20 (20H, s), 1.58

(2H, m), 1.93 (1H, t), 2.35 (1H, m), 2.50 (1H, m), 2.61 (1H, m), 3.33 (2H, m), 3.40, 3.82 (2H, m), 3.55 (2H, m), 3.80 (2H, m), 4.28 (1H, d).

IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3500 (O-H), 3000, 2950, 1480, 1400, 1270 (Si-C), 1100-1020 (SiOSi), 860, 810.

Mass (m/e, SIMS, 3-NBA+NaCl): 545 ($\text{M}^+ + 23$), 454, 301, 267, 219.

2.3 薬物の皮膚透過実験

Fig. 2 に示すウォータージャケット付 2 室型拡散セル (断面積 0.95cm^2 、容積それぞれ 2.0mL) にラット (Crj: CD (SD)、雄性、6 週齢、日本チャールス・リバー) の腹部剥離皮膚を挟み、ドナー部 (角質層側) に所定濃度の促進剤 (Glc-PSn または Glc-SiCn) およびアンチピリン 2 w/v% を含むエタノール 50 w/w% 水溶液を、レセプター部 (皮膚内部側) に pH7.4 に調製した 0.25 M リン酸緩衝液をそれぞれ入れた。ウォータージャケ

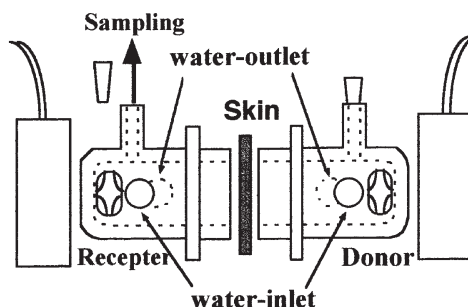


Fig. 2 2-Chamber diffusion cell.

ット内に、37℃の恒温水を循環させてセル全体を一定温度に保った。2時間おきにレセプター部より50μLずつサンプリングし、皮膚を透過したアンチピリンの量をHPLC（ポンプ：CCPE、カラム：TSK_{gel} ODS-80_{TM}、検出器：UV-8011、いずれも東ソー(株)製）にて定量した。なお、サンプリング後は、薬物を含まない同量のリン酸緩衝液をレセプター部に加えレセプター部の量を一定に保った。移動相は、5.0mmol/Lの硫酸水素テトラブチルアンモニウムを含むアセトニトリル/0.1wt.%リン酸水溶液（3/7w/w）混合液を用い、254nmで検出し定量した。

2.4 皮膚一次刺激性試験

本試験は(財)食品農医薬品安全性評価センターに委託して行った。促進剤化合物のウサギに対する皮膚一次刺激性試験を、一匹のKbs:NZW種雌性ウサギを用い実施した。0.5gの被験物質を水0.4mLに分散させ、6cm²のフランネルパッチに塗布した。得られたパッチをウサギの背部に4時間張り付け、パッチ除去後の皮膚の様子を72時間まで観察した。ここで、それぞれの経過時間における紅斑（erythema）および浮腫（edema）の発生の度合いをそれぞれ0～4ポイントの5段階で評価した。

3 結果および考察

3.1 合成結果

Scheme 1の反応で原料として用いたポリシロキサン化合物9の合成²⁰⁾において、開始剤となるリチウムトリメチルシラノレート（TMSLi）とモノマーとなるヘキサメチルシクロトリシロキサン（D₃）とのモル比を調製することにより異なる重合度の9を得た。それらを用いることで、それぞれに重合度が異なるAcGlc-PSnおよびGlc-PSn（添字のnはシロキサン鎖の平均重合度を表す。）を合成した。また、中間体のAcGlc-PSnからGlc-PSnを導

く加水分解反応においては、ナトリウムメトキシドを塩基として用いることによりシロキサン鎖の切断を併発することなくグルコース残基の脱保護のみを行うことができた。得られたGlc-PSnの平均重合度およびGPC測定から求めた平均分子量の値を表1に示す。表1中のサンプルコードGlc-PSnの添字nはそれぞれのシロキサン鎖の平均重合度を表す。また、表中のGlc-PS1はScheme 1に示す反応において8とペンタメチルジシロキサンを用いて同様に合成したものである。

一方、このような糖残基を有するシロキサン化合物の類縁体として、グルコピラノシル基とアルキル基を有するジシロキサン化合物Glc-SiCn（添字のnはアルキル基の炭素数を表す。）の合成を行った。Scheme 2に示すように、テトラメチルジシロキサンを原料とした2段階のヒドロシリル化反応を経て、上記と同様な加水分解反応を行うことにより収率良く目的物を得ることができた。

3.2 Glc-PSnの経皮吸収促進作用

ラット腹部剥離皮膚を用いてアンチピリンを薬物とした薬物透過実験を行い、得られたポリシロキサン化合物Glc-PSnの経皮吸収促進効果を検討した。促進剤の添加量を1.0w/v%としてシロキサン成分の重合度が異なるGlc-PSnをそれぞれ添加した場合の薬物（アンチピリン）透過量の時間変化をFig. 3に示す。また、Fig. 4はFig. 3の定常状態における傾きから求めた薬物の透過速度（Flux）の重合度依存性を表したものである。こ

Table 1 Results of preparations of Glc-PSn.

Code	D ₃ /TMSLi ^{a)} (mole ratio)	$\bar{n}$		Mnx10 ^{-3c)}	Mw / Mn ^{c)}
		theo.	obs. ^{b)}		
Glc-PS1	0	1	1	--	--
Glc-PS4	1	4.0	4.7	0.76	1.03
Glc-PS7	2	7.0	7.4	1.04	1.07
Glc-PS10	3	10.0	10.2	1.16	1.08
Glc-PS13	4	13.0	13.7	1.47	1.09
Glc-PS16	5	16.0	15.6	1.50	1.08

a) Mole ratio of the monomer and the initiator in the synthesis of 9.

b) Observed degree of polymerization was determined by ¹H-NMR.

c) Mn: number-average molecular weight, Mw: weight-average molecular weight, determined by gel permeation chromatography (THF eluent).

これらの図から明らかなように、 n が4以上のGlc-PS n を添加するといずれも無添加系に比べFluxが向上しており、これらの化合物は薬物の皮膚透過を有意に促進することが明らかとなった。さらに、この範囲で最も高いFluxを与えたのはGlc-PS4の場合であった。それ以上の重合度においても十分な促進効果を示すことから、この化合物はある程度の分子量範囲で親水性薬物の吸収促進剤として機能することが判った。ここで、 $n = 1$ である化合物Glc-PS1に促進効果がまったく見られないことは注目に値する。すなわち、分子量分布をもつ重合体中の低分子量体が効果を発現しているのではなく、促進効果の発現にはある程度の重合度が必要であることが明らかである。

さらに、Glc-PS n の添加濃度を0.05～2.0w/v%の範囲で変化させて同様な薬物の皮膚透過実験を行い、それぞれの化合物について促進効果の添加濃度依存性を検討した。Glc-PS4およびGlc-PS13を添加した場合の添加濃度に対する薬物のFluxの関係をFig. 5(A)および(B)にそれぞれ示す。図から判るように、これらの化合物は更に低濃度(0.1～0.2w/v%)においてより高い促進効果を

示し、またそれぞれの重合度において最適な添加濃度が存在することが明らかとなった。すなわち、Glc-PS4およびGlc-PS13を添加した場合、添加濃度としては0.25w/v%および0.1w/v%がそれぞれ最も効果的であった。これらの化合物が皮膚表面にある程度吸着することで薬物の皮膚表面への分配を高め吸収促進効果を発現しているとする、このようにある濃度範囲以上で薬物の透過速度が低下してくるのは吸着層が厚くなる結果逆に薬物の透過を抑制する効果が働くためと考えられる。

一方、これらのポリシロキサン化合物が薬物との共存下でドナー溶液の性質を変化させて促進効果を発現しているのではなく、皮膚に直接作用して薬物の経皮吸収を高めていることを確認するため以下の前処理実験を行った。すなわち、Glc-PS10の1.0w/v%溶液をドナー部に入れて皮膚表面を12時間前処理し、次に薬物のみの溶液に入れ替えて薬物透過実験を行った。その結果、上記の併用系の場合と同様な高い促進効果が観測された。(Fig. 6)なお、図中のcontrolは基剤である50%エタノール水溶液で皮膚表面を同様に12時

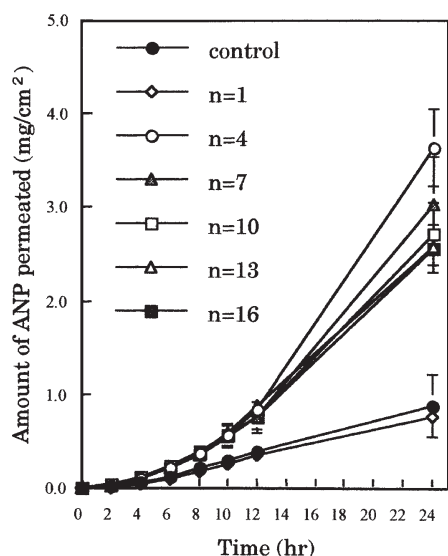


Fig. 3 Permeation profiles of antipyrine (ANP) through rat abdominal skin with Glc-PS n (1.0w/v%) or without enhancer (control).

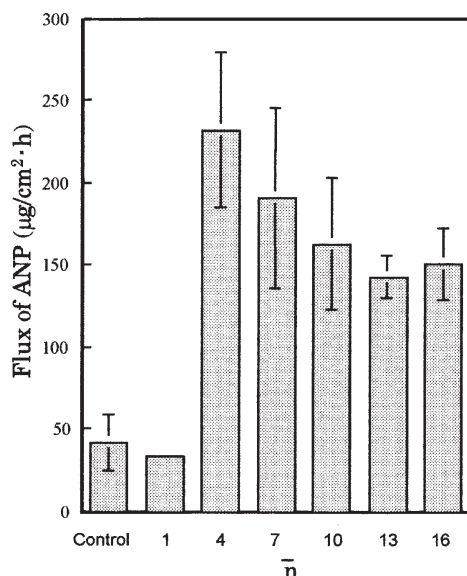


Fig. 4 Effect of degree of polymerization (n) of Glc-PS n on the flux of antipyrine (ANP) permeated through rat abdominal skin.

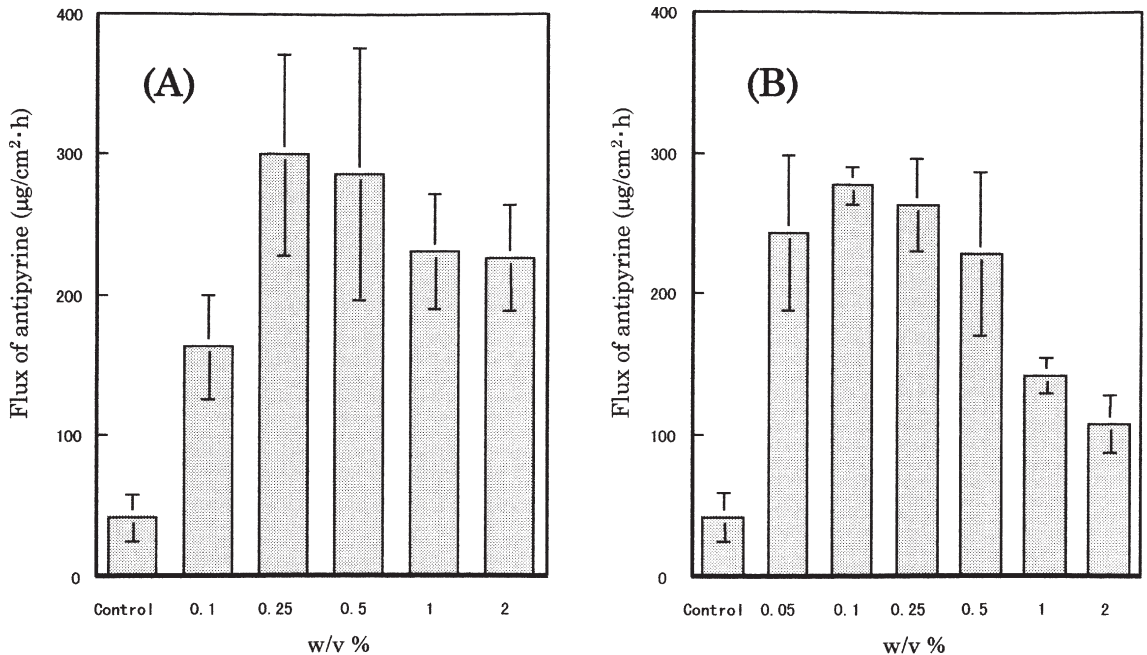


Fig. 5 Effect of concentration of Glc-PS4 (A) and Glc-PS13 (B) on the flux of antipyrine permeated through rat abdominal skin.

間前処理した後、アンチピリン溶液を注入して透過実験を行った結果である。このグラフから Flux を算出すると、Glc-PS10 および基剤で処理した場合の Flux はそれぞれ 141 および $40.8 \mu\text{g h}^{-1} \text{cm}^{-2}$ であった。この値を Fig. 4 に示した結果と比べ

ると、促進剤で前処理した後薬物のみの溶液を透過させても促進剤併用系と同等の高い促進効果を発現することが判る。したがって、このようなポリシロキサン系促進剤は皮膚表面に吸着するか、あるいは角質のごく表面近傍に入り込み促進作用を発現しているものと思われる。また、Fig. 5 に示したように促進剤の添加濃度に最適値が存在するのは、ある濃度以上になると皮膚表面の促進剤の量が増え逆にバリアーとして働くためと考えられる。

薬物の経皮吸収を物理化学的に取り扱う場合、皮膚を均一な膜であると仮定できた時にのみ成り立つが、Fick の式などを適用することによって得られる情報は多い。定常状態における薬物の皮膚透過速度 dQ/dt は Fick の式より、

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{KC_vDA}{L} \quad (1)$$

で表される²¹⁾。ここで K は薬物の基剤から皮膚バリアー (角質層) への分配係数、 C_v はドナー中の薬物濃度、D は皮膚バリアー中の薬物の拡散係数、A は皮膚透過における有効面積、L は皮膚バリア

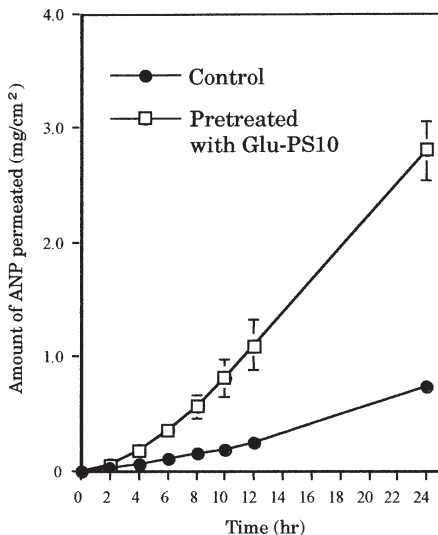


Fig. 6 The permeation profiles of ANP through the rat skin, pretreated with Glc-PS10 (1.0%) or vehicle (Control) for 12h before the drug permeation.

一の厚さを表す。(1)式において $P (= KD/L)$ は透過係数と定義され、 t と Q の関係のグラフの定常状態における傾きより算出される。さらに、定常状態までに達する時間を考慮すれば、薬物の透過量 Q は(2)式で表される²²⁾。

$$Q = \frac{KCvDA}{L} \left(t - \frac{L^2}{6D} \right) - \frac{2KCvLA}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{L^2}\right) \quad (2)$$

各シンボルは(1)式と同じである。ここで、薬物の透過実験から得られた透過曲線を上記(2)式における時間 t と Q の関係としてカーブフィッティングを行い²³⁾、分配パラメータ $P_1 (= LK)$ および拡散パラメータ $P_2 (= D/L^2)$ をそれぞれ算出した。薬物の皮膚透過における各段階のパラメータを評価することによって促進剤がどの過程に作用しているか推定できると思われる。Glc-PS10を併用系および前処理系に用いた場合の薬物透過実験結果から、それぞれのパラメータ P 、 P_1 および P_2 を求めた。結果を表3に示す。いずれの場合も無添加系に比べ薬物透過係数 P が増大しており、それは主に P_1 の増大、すなわち分配係数の増大に起因していることが判る。一方、拡散パラメータ P_2 は無添加系とほぼ同等の値を示している。つまり、このポリマーの経皮吸収促進効果は薬物の基剤から皮膚への分配を特異的に高めることにより発現し、皮膚内部の薬物の拡散性には影響しないことが明らかとなった。これまで我々が開発してきたポリシロキサン系促進剤 (Fig. 1) においても薬物透過の熱力学的パラメータの値は同様な傾向を示しており^{12) ~ 15), 18)}、また低分子の促

進剤 (例えば、オレイン酸) では拡散係数を大幅に増大させることも明らかにしている¹⁵⁾。

3.3 Glc-SiCnの経皮吸収促進作用

一方、このような糖残基を有するポリシロキサン化合物の類縁体として、グルコピラノシル基とアルキル基を有するジシロキサン化合物 Glc-SiCn の合成を行った。ここで、Glc-SiCn のアルキル鎖長 n が促進効果に及ぼす影響を調べるため、種々のアルキル基 ($n = 6, 7, 8, 10, 12$) を導入した化合物をそれぞれ合成し、前述と同様なアンチピリンのラット皮膚透過実験を行った。Fig. 7 および8に示すように、その促進効果はアルキル基の長さに大きく依存しており、特に、Glc-SiC8 および Glc-SiC10 は今回評価した化合物の中で最も高い経皮吸収促進効果を示している。よって、このような構造の化合物ではある程度長いアルキル基が促進効果に有効に働くと考えられる。また、比較のためジシロキサン結合を持たない1-ドデシル- β -D-グルコース (Glc-C12) についても同様な実験を行ったが促進効果は見られず、この化合物においてはジシロキサン成分が促進効果の発現に寄与しているものと思われる。さらに、オレイン酸についても比較検討したところ Fig. 7 に示すように Glc-SiC8 および Glc-SiC10 と同程度の

Table 2 The kinetic parameters of the drug permeation.

Code	P (cm h ⁻¹)	$P_1 \times 10^2$ (cm)	$P_2 \times 10^2$ (h ⁻¹)
Control	1.51	4.68	3.17
Glc-PDMS10	6.35	12.1	4.86
Control-Pre ^{a)}	2.04	3.20	5.36
Glc-PDMS10-Pre ^{a)}	7.07	16.8	4.15

^{a)} The skin was pretreated with vehicle or 1.0% of Glc-PS10 for 12h before the drug permeation.

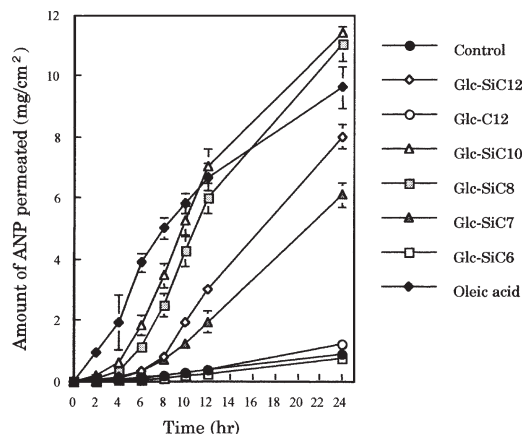


Fig. 7 Permeation profiles of antipyrene (ANP) through rat abdominal skin with Glc-SiCn and other compounds (1.0w/v%).

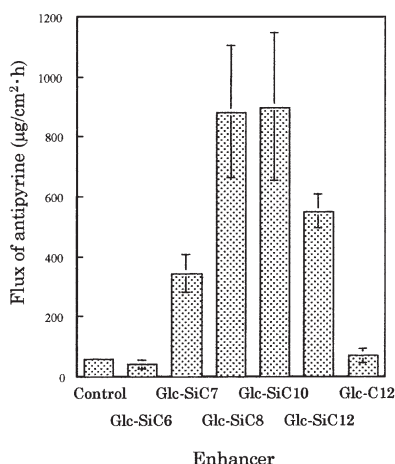


Fig. 8 Effect of alkyl chain length of Glc-C12 on the flux of antipyrine (ANP) through rat abdominal skin.

高い促進効果が観測された。また、Glc-SiC10 について添加濃度依存性を検討したところ 1.0w/v % 以下では促進効果が低下し、濃度依存性に関しては Glc-PSn とは逆の傾向が見られた。Glc-SiCn 系の化合物は角質内部に浸透して効果を発現していることが予想される（後述）ので、今後促進剤

の皮膚透過性を調べるなどの実験を行い促進メカニズムについて考察を加える予定である。

3. 4 皮膚一次刺激性試験

これらのシロキサン化合物 Glc-PSn および Glc-SiCn の一部について Draize 法による皮膚一次刺激性を評価した。ここでは比較のため Glc-C12 およびオレイン酸についても同様な評価を行った。結果を Table 3 に示す。表中の評点から判るように、ポリシロキサン化合物 Glc-PS4 および Glc-PS13 においてはそれぞれの経過時間において皮膚刺激はまったく観測されず、平均評点 PII 値が 0 ポイントとなり皮膚刺激性はないものと判断された。また、ジシロキサン化合物 Glc-SiC10 および Glc-SiC12 では、多少刺激性が見られたものの PII 値は低い値であり弱い刺激性があるものと評価された。しかしながら、これらのジシロキサン化合物が Glc-C12 やオレイン酸と同様にある程度の刺激性を発現することから、これらはポリシロキサン化合物とは異なり皮膚内部に浸透し角質層

Table 3 Primary skin irritation on rabbit dorsal skin after treating with 0.5g of these enhancers dispersed in 0.4mL of water in 6cm² patch for 4h.

Code	Type of response	Time after removal of dressing					PII ^{a)}
		1h	24h	48h	72h	6d	
Glc-PDMS4	Erythema	0	0	0	0	--	0.0
	Edema	0	0	0	0	--	
Glc-PDMS13	Erythema	0	0	0	0	--	0.0
	Edema	0	0	0	0	--	
Glc-SiC10	Erythema	1	2	2	2	--	1.5
	Edema	0	2	0	0	--	
Glc-SiC12	Erythema	1	1	1	0	--	1.0
	Edema	0	0	0	0	--	
Glc-C12	Erythema	1	2	2	2	0	1.5
	Edema	0	0	0	0	0	
Oleic acid	Erythema	1	1	0	0	--	0.5
	Edema	0	0	0	0	--	

^{a)} PII (primary irritation index) is calculated by averaging the erythema values and averaging the edema values at 1 and 48 h then combining the averages. (maximum PII = 8)

に何らかの影響を与え促進作用を発現していることが考えられる。

4 総 括

以上述べたように、我々が開発してきた高分子促進剤は皮膚表面に作用し、皮膚バリアー中の拡散性には影響を及ぼさずに特徴的に基剤から皮膚への薬物の分配のみを高めていることから、既存の低分子量の促進剤とは作用機序が根本的に異なることが予想される。すなわち、高分子量なるがゆえに皮膚内部に浸透せず内部の脂質構造に影響しないため、皮膚刺激性がなく薬物のみを吸収促進させる理想的な経皮吸収促進剤になるものと期待される。また、本研究で得られた糖末端を有するポリシロキサン化合物 (Glc-PSn) はある程度の高分子量体において経皮吸収促進効果を発現しており、その効果はカチオン末端を有するポリシロキサン化合物とほぼ同等であった。一方、糖残基と長鎖アルキル基を有するジシロキサン化合物 (Glc-SiCn) は Glc-PSn に比べさらに高い促進効果を示すことを見出したが、皮膚内部に浸透するため弱いながらも皮膚刺激性を発現することが判った。今後はこれらの知見を基に、実際の経皮吸収製剤に応用できる皮膚に優しく効果の高い経皮吸収促進剤の開発を行っていきたいと思う。

本研究を進めるに当たり、東京女子医大の青柳隆夫博士には多くの貴重な御助言をいただいており、この場を借りて同氏に感謝の意を表したい。

参考文献

- 1) Ed. by Smith, E. W. and Maibach, H. I., Percutaneous Penetration Enhancer, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1995.
- 2) J. Hadgraft, : Penetration enhancers in percutaneous absorption. Pharm. Int., **5** 252-254, 1984.
- 3) Tsuzuki, N., Wong, O., and Higuchi, T., : Effect of primary alcohols on percutaneous absorption. Int. J. Pharm., **46**, 19-23, 1988.
- 4) Cooper, E. R., Increased skin permeability for lipophilic molecules. J. Pharm. Sci., **73**, 1153-1156, 1984. ; Aungst, B. J., : Structure/effect studies on fatty acid isomers as skin penetration enhancers and skin irritants. Pharm. Res., **6**, 244-247, 1989.
- 5) Friend, D., Catz, P., Heller, J., Reid, J., and Baker, R., : Simple alkyl esters as skin permeation enhancers. J. Controlled Release, **9**, 33-41, 1989.
- 6) Chowhan, Z. T. and Pritchard, R., : Effect of surfactants on the percutaneous absorption of naproxen. I. Comparison of rabbit rat and human excised skin. J. Pharm. Sci., **67**, 1272-1274, 1978.
- 7) Williams, A. C. and Barry, B. W., : Terpenes and the lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. Pharm. Res., **8**, 17-24, 1991.
- 8) Stoughton, R. B., and McClure, W. O., : AZONE® : A new non-toxic enhancer of percutaneous penetration. Drug Develop. Ind. Pharm., **9**, 725-744, 1983.
- 9) Flynn, G. L., and B. Stewart, B., : Percutaneous drug penetration: Choosing candidates for transdermal development. Drug Dev. Res., **13**, 169-185, 1988.
- 10) Aoyagi, T., Terashima, O., Suzuki, N., Matsui, K., and Nagase, Y., : Polymerization of benzalkonium chloride-type monomer and application to percutaneous drug absorption enhancer. J. Controlled Release, **13**, 63-71, 1990.
- 11) Aoyagi, T., Terashima, O., Nagase, Y., and Matsui, K., : Preparation of a polymer containing hexadecylpyridinium bromide groups and its utilization as a transdermal drug penetration enhancer. Polymer, **32**, 2106-2111, 1991.
- 12) Aoyagi, T., Takamura, Y., Nakamura, T., Yabuchi, Y., and Nagase, Y., : Novel silicones for transdermal therapeutic system, 1. Synthesis of 1-methyl-4-pyridinio-terminated polydimethylsiloxane and evaluation as a

- transdermal penetration enhancer. *Polymer*, **33**, 2203-2207, 1992.
- 13) Aoyagi, T., Nakamura, T., and Nagase, Y., : Novel silicones for transdermal therapeutic system, 2. Preparation of oligodimethylsiloxanes containing diethylphosphoramidate group at the chain end and the evaluation as transdermal penetration enhancers. *Polym. J.*, **24**, 375-381, 1992.
- 14) Aoyagi, T., Nakamura, T., Yabuchi, Y., and Nagase, Y., : Novel silicones for transdermal therapeutic system, 3. Preparation of pyridinio or ammonio-terminated polydimethylsiloxanes and the evaluation as transdermal penetration enhancers. *Polym. J.*, **24**, 545-553, 1992.
- 15) 青柳隆夫, 中村倫子, 長瀬 裕 : カチオンまたはアニオン基を片末端に有するポリジメチルシロキサンの合成と経皮吸収促進作用. *高分子論文集*, **49**, 839-845, 1992.
- 16) Nagase, Y., Aoyagi, T., Akimoto, T., and Fuchikami, T., : Novel silicones for transdermal therapeutic system, 5. A novel method of carboxyl-terminated polydimethylsiloxane and its enhancing effect on transdermal drug penetration. *Macromol. Chem. Rapid Commun.*, **13**, 441-446, 1992.
- 17) Aoyagi, T., Tadenuma, R., and Nagase, Y., : Novel silicones for transdermal therapeutic system, 6. Preparation of oligodimethylsiloxane containing 2-pyrrolidone moiety as a terminal group and its enhancing effect on transdermal drug penetration. *Macromol. Chem. Phys.*, **197**, 677-686, 1996.
- 18) Akimoto, T., Aoyagi, T., Minoshima, J., and Nagase, Y., : Polymeric percutaneous drug penetration enhancer: Synthesis and enhancing property of PEG/PDMS block copolymer with a cationic end group. *J. Controlled Release*, **49**, 229-242, 1997.
- 19) Takano, T., Nakatsubo, F., and Murakami, K., : A Facile allyl b-glycosylation in the presence of benzyl protecting group, using boron trifluoride etherate. *Carbohydr. Res.*, **203**, 341-342, 1990.
- 20) Nagase, Y., Naruse, A., and Matsui, K., : Chemical Modification of Polysulphone: 1. Synthesis of Polysulphone/Polydimethylsiloxane Graft Copolymer. *Polymer*, **30**, 1931-1937, 1989.
- 21) Higuchi, T., : Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *J. Soc. Cosmetic Chemists*, **11**, 85-97, 1960.
- 22) Scheuplein, R. J., Mechanism of percutaneous absorption II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. *J. Invest. Derm.*, **48**, 79-88, 1967.
- 23) Calpena, A., Lauroba, J., Suriol, M., Obach, R., and Domenech, J., Effect of D-limonene on the transdermal permeation of nifedipine and domperidone. *Int. J. Pharm.*, **103**, 179-186, 1994.

トランスグルタミナーゼに対する細胞接着

東京工業大学 生命理工学部

齊 藤 佑 尚

Transglutaminases (TGases) are enzymes which catalyze cross-link formation between specific glutamine residues and lysine residues in substrate proteins. We report here that two of the TGases, blood coagulation factor XIIIa (FXIIIa) and tissue-type TGase (TGc), are capable of mediating adhesion of various cells through different mechanisms. When coated on plastic surfaces, they promoted adhesion and spreading of various cells of both normal and tumor origin, in a concentration-dependent manner. The adhesion was not inhibited by antibodies against possible contaminants in the enzyme preparation such as fibronectin and vitronectin, but was completely inhibited by a polyclonal antibody against the enzymes. It is obvious, therefore, that contaminants, if there were any, cannot account for the observed cell adhesion to the enzymes. Furthermore, phosphorylations of tyrosine residues in 120 kDa- and 70 kDa-proteins were very clearly shown in human fibroblasts adhered to the enzyme. Formation of actin stress fibers was also quite unambiguously observed in the adhered cells. These biochemical reactions, which are also observed when cells adhered to a typical cell adhesion protein fibronectin, are believed to be of importance in the process of cell adhesion. Although the adhesion to FXIIIa is dependent on its TGase activity, the TGc-mediated cell adhesion is independent of its TGase activity: 1) The modification of the active center cysteine with iodoacetamide blocked the enzyme activity without any effect on the cell adhesion. 2) The addition of Mg^{2+} did not induce the enzyme activity, but it was as effective as Ca^{2+} for the cell adhesion. 3) The addition of NH_4^+ inhibited the enzyme activity, yet it did not affect the adhesion significantly. The integrins involved in these cell adhesions are quite different. In the case of F XIIIa, $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$ integrins are involved and consequently the RGD peptide substantially inhibited the adhesion. On the other hand, the cell adhesion to TGc is mediated by $\alpha 4 \beta 1$ integrin, and the RGD peptide was without effects. It is possible that these two molecules may mediate cell adhesions under different physiological or pathological situations.

1 緒 言

血中に存在する血球細胞を除けば、殆ど全ての細胞は単独にまた孤独な状態にあるのではなく、いわゆる細胞外マトリックス或いは他の細胞に接着してある種の細胞社会を形成しないと生存出来ないと言っても過言ではない。さらに秩序だって異なる細胞が寄り集まって多種類の器官や臓器を形成する。このように考えると、細胞接着反応は細胞ひいては生体にとってかなり根元的に重要な事であると考えられる。細胞外マトリックスを形成する分子には多種類のタンパク質が知られている。代表的な物として、コラーゲン、ファイブ

ロネクチンやヴィトロネクチンが挙げられよう。ところでこれら多種類のタンパク質がいわゆる巨大な超分子とも考えられるマトリックスを形成するには、タンパク質分子同士が結合せねばならない。このタンパク質の架橋結合の形成を担うのが酵素トランスグルタミナーゼである。本酵素は、一つのタンパク質中の特異的なグルタミン残基と他のタンパク質中のリジン残基を、アンモニアを放出することによって形成する“イソペプチド結合”により結合する¹⁾。上述の3種類の細胞外マトリックスタンパク質、特にファイブロネクチンへの細胞接着反応は、近年多くの研究者の注目を集め、細胞生物学、分子生物学、また最新の生物化学的な手法を駆使しここ数年極めて詳細に研究されている。私たちの研究室では、血小板と血管内皮細胞によって特異的に合成される或るタンパク質が、代表的な細胞外マトリックス中のタンパク質成分とトランスグルタミナーゼの作用によって結合することを発見した²⁾。さらに、このタンパク質が



Cell Adhesion to Transglutaminases
Yuji Saito
Faculty of Bioscience and
Biotechnology, Tokyo Institute of
Technology

新規な細胞接着性のタンパク質であることも明らかにした³⁾。

そこで私たちがさらに考えた事は、細胞外マトリックスを形成するための酵素であるトランスグルタミナーゼそのものにも細胞が接着しないかという可能性である。トランスグルタミナーゼにもいくつかの種類が存在するが、血液凝固第 XIII 因子 (FXIII) と組織型トランスグルタミナーゼ (TGc) の二種は他の物と異なり、細胞外にも存在することが知られている。今回私たちはこれら二種類のトランスグルタミナーゼに対する細胞接着反応を検討したので、ここに報告する。

2 実験

FXIII は日本ヘキストマリオナルセル社より頂いた物を、さらにアフィニティークロマトグラフィー⁴⁾やイオン交換クロマトグラフィーによって精製し、ほぼ完全に純品になった物を使用した。TGc は宝酒造より購入し、不純物が殆ど混入されていないことを確かめて利用した。細胞接着の検討に用いた細胞は、大体は財団法人がん研究振興財団より入手した物である。各種インテグリンに対するモノクロナル抗体は、市販の物および国内外の研究者から供与して頂いた物を用いた。

細胞接着反応は次のようにして検討した：まずトランスグルタミナーゼなどのタンパク質を 6 mm 四方のプラスチック小片に 4℃ で 16 時間結合させ、次いでタンパク質などで覆われずに残っているかも知れないプラスチックの表面を大過剰のアルブミンで覆い尽くす。そこに培養皿から剥離した細胞を加え、37℃ で 90 分間静置して接着させ、接着しなかった細胞を良く洗ってプラスチック表面から除き、染色後に顕微鏡下で接着した細胞を観察しながら計数する。

3 結果

細胞がファイブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質に接着する際には、細胞は単にタンパク質に結合するだけではなく、一般的には細胞表面のインテグリンと呼ばれる接着受容体を介して細胞外部から内部にその情報が伝えられ、また逆に内部から外部にも情報が伝達されと考えられている⁵⁾。その結果の代表的な現象として細胞接着に伴う細胞骨格タンパク質アクチンの配向がある。Fig. 1 は、線維芽細胞がファイブロネクチンと活性化 FXIII とに細胞が接着した際のアクチン繊維の配向を調べたものである。図の A では各々の基質タンパク質に接着した細胞の形態を位相差顕微鏡で観察したものであるが、いずれの

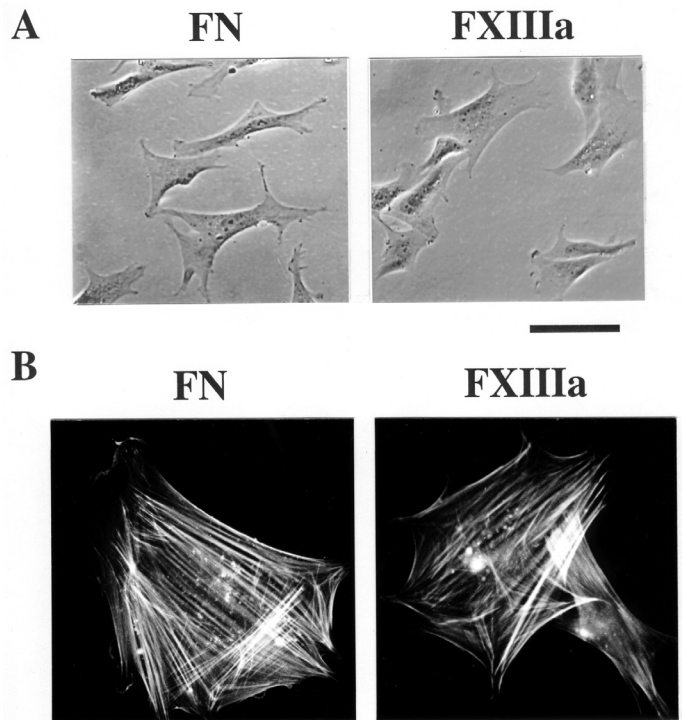


Fig. 1. The cell adhesion to FXIIIa. A, Human fibroblast TIG-1 cells were plated on plastic chips coated with 20 μg/mL fibronectin (FN) or 30 μg/mL FXIIIa and viewed under a phase contrast microscope. Bar, 100 μm, magnification, × 100. B, TIG-1 cells adhered to FN or FXIIIa were fixed, permeabilized and actin fibers were stained with rhodamine-phalloidin conjugate for fluorescence microscopy. Bar, 50 μm, magnification, × 400.

場合も細胞が接着して良く伸展しているのが明らかである。図のBでは、アクチンに特異的に結合するファロイディンという物質に蛍光物質を結合させ、アクチン繊維を蛍光顕微鏡で観察したものであるが、いずれの場合にも繊維が一定方向に配向しているのが明らかである。

ところでここで重要な点は、FXIII への接着はファイブロネクチンの際とは異なり、FXIII がタ

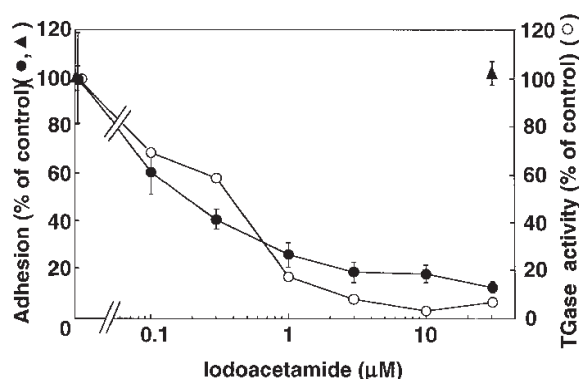


Fig. 2. Effects of the treatment of FXIIIa with iodoacetamide (IAA) on TGase and the cell adhesion activity. FXIIIa (30 μ g/mL) or FN (20 μ g/mL) was incubated with varying concentrations of IAA at 37°C for 90 minutes and was subjected to the cell adhesion assay using TIG-1 cells or TGase assay. More than 90% of the cells subjected to the cell adhesion assay did adhere to FXIIIa in control experiments. The data of cell adhesion assay are mean $\pm$ s.e.m. of a representative experiment in which triplicate determinations were made: TGase activity, open circles; the cell adhesion to FXIIIa closed circles; the cell adhesion to FN, closed triangles.

ンパク質分解酵素トロンピンによる限定分解とカルシウムイオンによる活性化を予め受けていなければならない点である。従ってトランスグルタミナーゼの酵素活性を必要とする極めて異色の細胞接着反応ということになる。この点は、Fig. 2に示したように本酵素の活性中心のシステインをヨードアセトアミドによりアルキル化すると酵素活性の減少にほぼ平行して細胞接着活性も減少することによって先ず証明された。この現象が本試薬の添加による非特異的な効果ではないことは、用いた最高濃度においてもファイブロネクチンへの接着にはなんら影響が無いことによって示されている。さらにその特異的な効果は、Fig. 3に示されているように他の多数の接着基質タンパク質への接着においては全く認められなかった。さらには本酵素反応はアンモニアを産生するので、逆に反応系にアンモニアを加えると、反応の平衡をずらし酵素活性を阻害する事が出来る⁶⁾。その際に細胞接着活性が如何に変化するかを検討したのがFig. 4である。ここでも明らかに酵素活性と細胞接着活性はほぼ平行して加えたアンモニアの濃度に依存して阻害されている。さらにアンモニアの影響は特異的で、例えばファイブロネクチンへの接着に対してはこの濃度範囲では何等影響しないことも示されている。しかしこれとは対照的にTGcに対する細胞接着においてはその酵素活性は

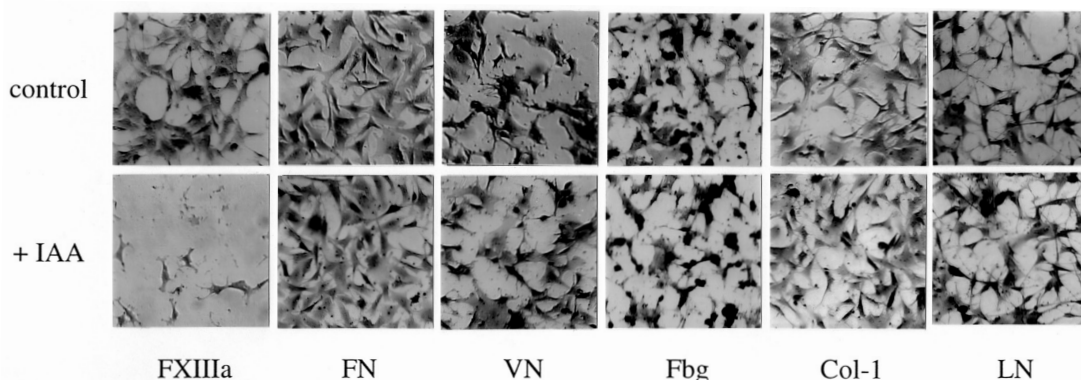


Fig. 3. Thirty μ g/mL FXIIIa, 10 μ g/mL FN, 3 μ g/mL vitronectin (VN), 10 μ g/mL fibrinogen (Fbg), 3 μ g/mL type-1 collagen (Col), and 10 μ g/mL laminin (LN) were treated with 30 M IAA, then were subjected to the cell adhesion assay using TIG-1 cells. Note that the cell adhesion to neither FN, VN, Fbg, type-1 Col nor LN was affected but the cell adhesion to FXIIIa was completely inhibited by the treatment with IAA. Magnification, $\times 100$.

全く必要ないことが判明した。Fig. 5に示した様に、FXIIIとは対照的にTGcにおいてはヨードアセトアミドによって確かにその酵素活性は激減するが、細胞接着活性は殆ど変化しない。またアンモニアの影響も殆ど認められなかった。さらにはイオンの影響を調べたところ興味深い結果が得られた。通常インテグリンが関与する細胞接着反応には2価の金属イオンが必要であると考えられている。ところでトランスグルタミナーゼの活性発現にはカルシウムイオンが極めて特異的に要求されることも良く知られている。そこで2種類のトランスグルタミナーゼに対する細胞接着反応におけるイオンの要求性を比較した。Fig. 6に示したように、FXIIIにおいてはカルシウムイオンは酵素活性の発現のみならず細胞接着反応にもほぼ同様の濃度で有効であるが、マグネシウムイオンは酵素活性を予想通りに賦活化することが出来ず、細胞接着反応も全く認められなかった。一方TGcにおいては、確かにカルシウムイオンを添加すると酵素活性を発現し細胞接着も顕著であるが、酵素活性を些かも賦活化しないマグネシウムイオンがカルシウムイオンと同程度に細胞接着活性を促進することを明らかにした。この事はTGcに対する細胞接着反応には酵素活性が不必要であるという事をさらに裏づけることになる。

ところでこれほど細胞接着の機構が異なるとすれば、関与する細胞側の接着受容体も異なる可能性がある。そこで各種のインテグリンに対するモノクロナル抗体の影響を調べることによって、各々の反応に関与する特異的なインテグリンを決定する実験を行った。先ずFXIIIの場合だが、Fig. 7に示したように、線維芽細胞を用いた際には何れのモノクロナル抗体でも単独で

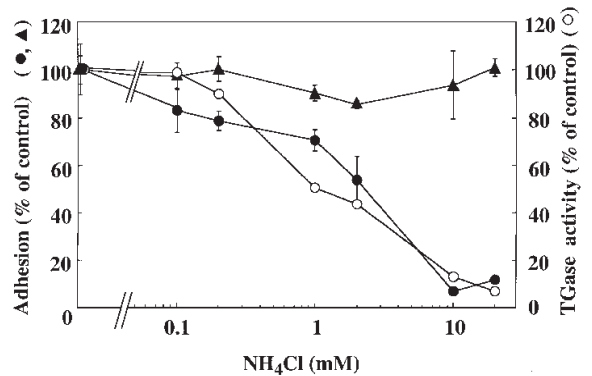


Fig. 4. Effects of ammonium ion on TGase and the cell adhesion activity. TGase and the cell adhesion of TIG-1 cells were determined in the presence of varying concentrations of ammonium chloride. In the case of the cell adhesion assays, the reagent was added to the cell suspension. TGase and the cell adhesion activities were expressed as percent of control values obtained in the absence of ammonium chloride. More than 90% of the cells subjected to the cell adhesion assay did adhere to FXIIIa in control experiments. The data of cell adhesion assay are mean $\pm$ s.e.m. of a representative experiment in which triplicate determinations were made: TGase activity, open circles; the cell adhesion to FXIIIa, closed circles; the cell adhesion to FN, closed triangles.

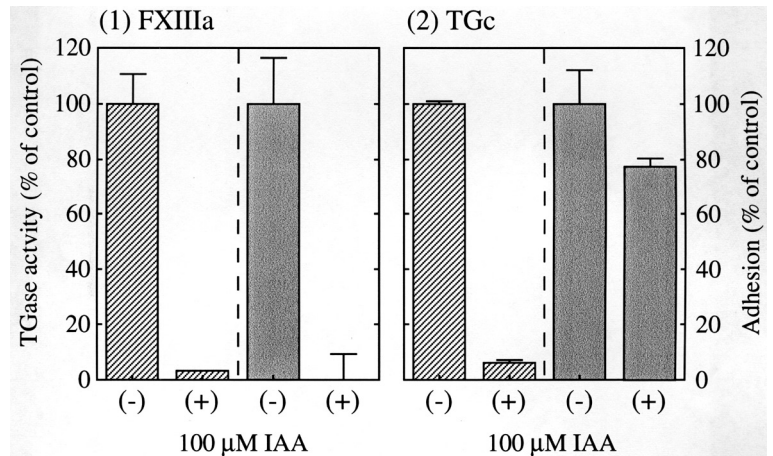


Fig. 5. The cell adhesion to TGc is not affected by the modification by IAA. The determinations of TGase activity (hatched columns) and cell adhesion of TIG-1 cells (closed columns) were performed using FXIIIa (1) or TGc (2) with (+) or without (-) modification of enzymes with IAA. The modification of TGc (10 μ g/mL) or FXIIIa (30 μ g/mL) with 100 μ M IAA was carried out at 37°C for 30 minutes. The cell adhesion assay data are mean $\pm$ s.d. of a representative experiment in which quintuplicate determinations were made. Values are expressed as relative to the control values.

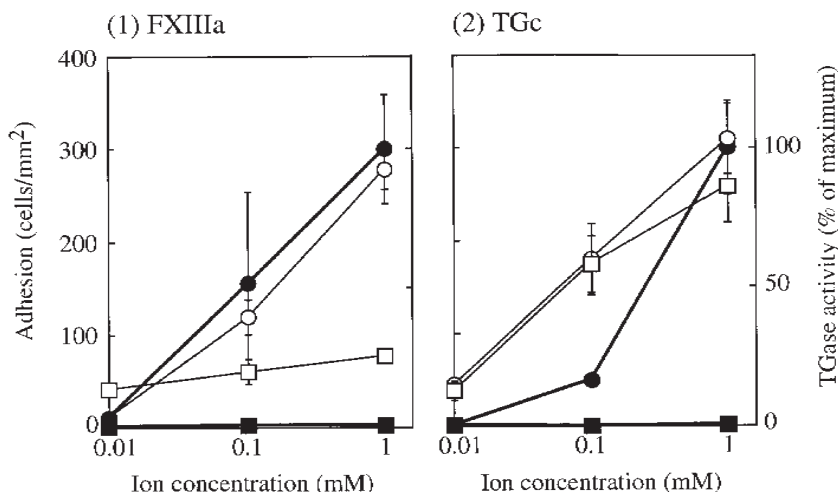


Fig. 6. Dependence of the TGc-mediated cell adhesion on Ca²⁺ or Mg²⁺. TIG-1 cells were incubated with 5mM EDTA at 37°C for 10 minutes, and washed two times with HEPES-Tyrod buffer. Cells were then suspended in the same buffer containing either Ca²⁺ (open circles) or Mg²⁺ (open squares) at varied concentrations, and subjected to the cell adhesion to FXIIIa (1) or to TGc (2). TGase activity of FIIIa (1) and TGc (2) was also determined in the presence of varied concentrations of Ca²⁺ (closed circles) or Mg²⁺ (closed squares).

顕著に阻害するものは無く、単独のインテグリンが関与するとは考えられなかった。そこで複数種類のモノクローナル抗体を組み合わせで加えたところ、この図で明かな様に $\alpha\text{v}\beta 3$ および $\beta 1$ インテグリンに対する抗体を加えた際に接着はほぼ完全に阻害された。さらにその接着する細胞の特異性などから、少なくとも $\alpha\text{v}\beta 3$ および多分 $\alpha 5 \beta 1$ が共に接着反応に携わっていると考えられる。一方 TGc への細胞接着だが FXIII の場合とは全く異なり、Fig. 8 に明らかに示されているように α サブユニットに対する抗体のなかで単独で細胞接着を阻害するものは認められなかったが、 $\beta 1$ インテグリンに対する抗体によって単独でほぼ完全に接着が阻害された。従って TGc に対する細胞接着においては $\beta 1$ を含むインテグリンのみが関与し、 $\beta 3$ を含むインテグリンは全く関与しない事が明らかとなった。さらに白血病細胞

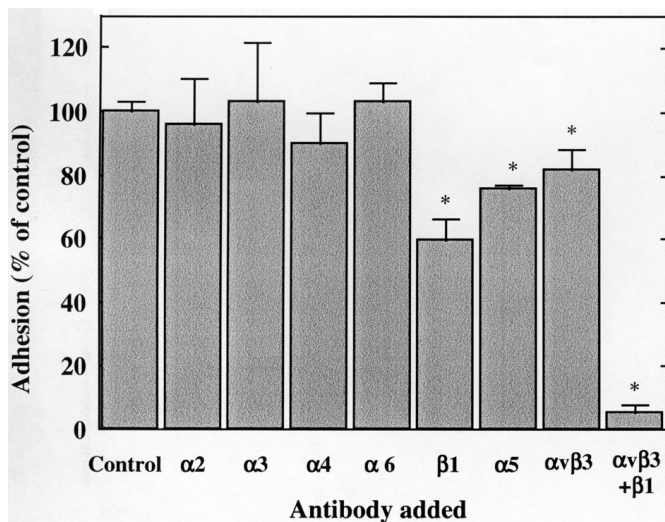


Fig. 7. The effect of antibodies against various integrins on the cell adhesion to FXIIIa. TIG-1 cells were preincubated with antibodies against various integrins at room temperature for 30 minutes and the adhesion to FXIIIa was measured. It was expressed as relative to the control value obtained in the experiment carried out in the presence of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ preimmune rabbit IgG and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ control mouse IgG. The following concentrations of antibodies were used: $\alpha 2$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti- $\alpha 2$ mAb (6F1); $\alpha 3$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti- $\alpha 3$ mAb (P1B5); $\alpha 4$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti- $\alpha 4$ mAb (SG/73); $\alpha 6$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti- $\alpha 6$ mAb (GoH3); $\beta 1$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti- $\beta 1$ mAb (4B4); $\alpha 5$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti- $\alpha 5$ mAb (BIIIG2); $\alpha\text{v}\beta 3$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-VN receptor polyclonal antibody. The lowest possible concentrations to give the maximum effect were chosen if the effects of antibodies were positive. The highest possible concentrations were chosen, on the other hand, if the effects of antibodies were negative. More than 90% of the cells subjected to the cell adhesion assay did adhere to FXIIIa in control experiments. The data are mean $\pm$ s.e.m. of triplicate determinations from a representative out of three experiments. The * on the bars means that $p < 0.05$. The p values for the experiments without * were more than 0.1 ($p > 0.1$).

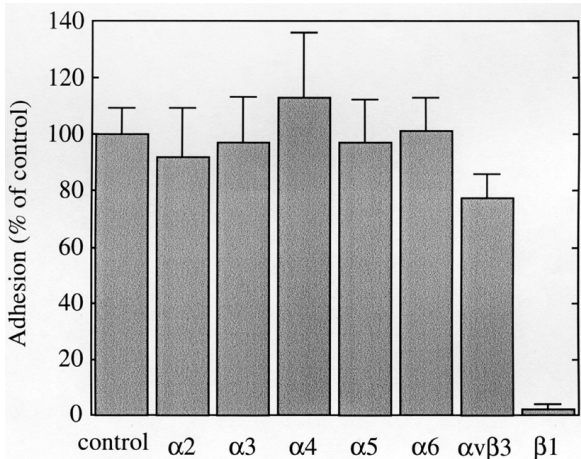


Fig. 8. Effects of anti-integrin antibodies with function-blocking activity on the cell adhesion to TGc. TIG-1 cells were preincubated with function-blocking antibodies against various integrins at room temperature for 30 minutes and the adhesion to TGc was measured. It was expressed as relative to the control value obtained in the experiment carried out in the presence of 100 μ g/mL preimmune rabbit IgG and 10 μ g/mL control mouse IgG. The following concentrations of antibodies were used: α 2, 10 μ g/mL anti- α 2 mAb (6F1); α 3, 10 μ g/mL anti- α 3 mAb (P1B5); α 4, 10 μ g/mL anti- α 4 mAb (HP2/1); α 5, 10 μ g/mL anti- α 5 mAb (BIIG2); α 6, 10 μ g/mL anti- α 6 mAb (G0H3); β 1, 5 μ g/mL anti- β 1 mAb (4B4); α v β 3, 100 μ g/mL anti-VN receptor polyclonal antibody. It was confirmed that these concentrations of antibodies were high enough to inhibit the cell adhesions to well known adhesion proteins used as each positive control. The data are mean $\pm$ s.d. of a representative experiment in which quintuplicate determinations were made.

を用いて検討したところ、Fig. 9に示したように、 β 1 インテグリンを特異的に活性化するモノクローナル抗体の存在下でのみ細胞接着し、しかもこの細胞接着が α 4 インテグリンに対するモノクローナル抗体によって完全に阻害される事より、この細胞接着においては α 4 β 1 が関与するインテグリンであることを解明した。さらにこの関与するインテグリンの種類の相違を裏づけるために合成ペプチドの細胞接着への影響を検討した。ファイブロネクチンの細胞接着ドメインを探索した研究から明らかとなった事だが⁷⁾、ある種のインテグリン例えば α v β 3 や α 5 β 1 が関与する細胞接着反応では分子中の ARG-GLY-ASP を含むドメインが関与するためにこれらを含む合成ペプ

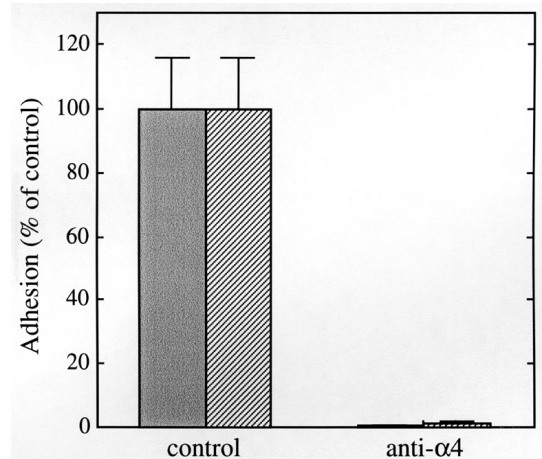


Fig. 9. Effect of anti- α 4 integrin antibody on the cell adhesion to TGc. MOLT-3 cells (human lymphoma cell line) were preincubated with 20 μ g/mL anti- α 4 function-blocking antibody (HP2/1) at room temperature for 30 minutes in the presence of 5 μ g/mL β 1 integrin-activating mAb (TS2/16) and 0.25 mM Mn^{2+} and the adhesions to TGc (closed columns) and FN(hatched columns) were measured. It was expressed as relative to the control value obtained in the experiment carried out in the presence of 10 μ g/mL control mouse IgG. The data are mean $\pm$ s.d. of a representative experiment in which quintuplicate determinations were made.

チド (RGD) によって接着が阻害されるが、 α 4 β 1 インテグリンが関与する細胞接着の際には全く異なるドメインが担当するためにこれらのペプチドを加えても接着は殆ど阻害されないとされる。そこで RGD ペプチドおよびそのネガティブコントロールとして ASP の代わりに GLU を含むペプチド (RGE) を加える実験を行った。Fig.10に示したように、FXIII およびファイブロネクチンに対する細胞接着反応は RGD ペプチドによってかなりの阻害を受けたが、TGc に対する接着においては殆ど阻害が認められなかった。勿論ネガティブコントロールとして用いた RGE ペプチドは何れの細胞接着においても何等阻害効果を示さなかった。この結果は、Fig. 8 および Fig. 9 で得られた結果

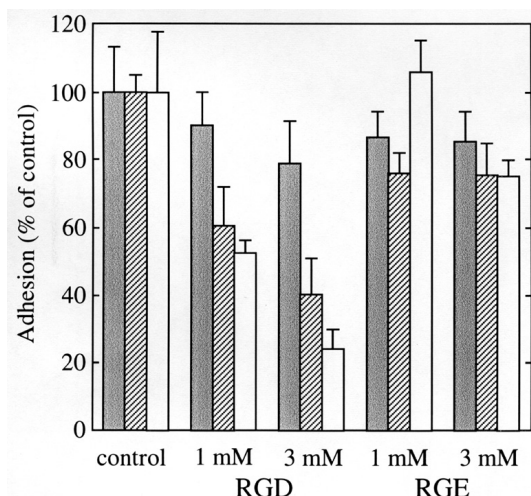


Fig. 10. The cell adhesion to TGc is not inhibited by a RGD peptide. TIG-1 cells were mixed with either a synthetic peptide GRGDSP or GRGESp at indicated concentrations, and the cell adhesions to following proteins were measured: 10 μ g/mL TGc (closed columns), 30 μ g/mL FXIIIa (hatched columns), or 3 μ g/mL FN (open columns). The data are mean $\pm$ s.d. of a representative experiment in which quintuplicate determinations were made.

をさらに支持するものである。

4 考 察

上述のようにトランスグルタミナーゼという酵素に細胞が接着することを発見した。さらに全く異なる機構によって細胞が2種類のトランスグルタミナーゼに接着する事を明らかにした。ところでFXIIIの場合その酵素活性は細胞接着反応に如何に関与するのであろうか。これまでに細胞接着反応に酵素活性が関与するという報告は全くない。一つのヒントが次の実験から得られた。先ず活性化されたFXIIIに細胞を接着させ、その細胞を接着面から剥離し、再びFXIIIに対して接着させてみたのである。このような実験をした理由は、インテグリンは通常は不活性な状態にあり、何らかの機構によって活性化され初めて細胞接着に参加する事が出来ると考えられているからである。例えば、フォルボルエステルなどがその代表的な物質である。即ちトランスグルタミナーゼによって

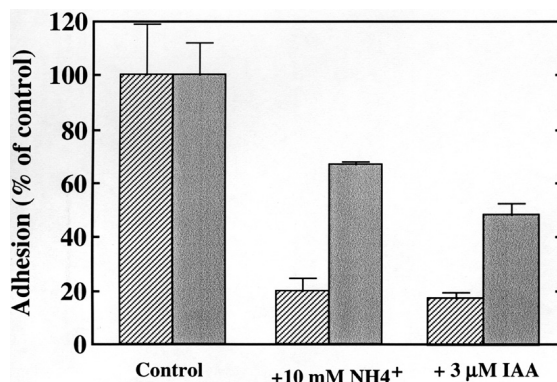


Fig. 11. Dual functions of FXIIIa for the cell adhesion. The TIG-1 cells once attached to FXIIIa (30 μ g/mL) (solid bars) or FN (20 μ g/mL) (hatched bars) were detached by incubation with EDTA, washed 2 times with the medium MEM, and were subjected to the second cell adhesion assay to another FXIIIa (30 μ g/mL)-coated surface to investigate the effects of IAA or ammonium ion. Values were expressed as relative to the control values. More than 90% of the cells subjected to the cell adhesion assay did adhere to FXIIIa in control experiments; the cells detached from both substrata adhered similarly well in the second adhesion assay to FXIIIa. The data are mean $\pm$ s.e.m. of triplicate determinations from a representative experiment.

インテグリンの活性化が起こるのではないかと考えたのである。その結果はFig.11に示した通りである。ここで明らかな通り、一度FXIIIに接着した細胞を再度FXIIIに接着させる際には、あたかも酵素活性を要しないかの如く、アンモニアイオンやヨードアセタミドの添加によって阻害が受けにくくなっていた。これはFXIIIに一度接着した面のインテグリンは既に活性化されているために再度の活性化の必要が無いからであると解釈できる。ところでこれらの試薬が二度目の接着の際に全く阻害しないのではなく、ある程度は阻害する理由は、細胞が最初にFXIIIに接着する際には接着しない表面に存在するインテグリン分子は活性化されていないからであろうと考えられる。一方一度ファイブロネクチンに接着した後に剥離した細胞をFXIIIに接着させた場合には、明らかにこれらの処理によって接着が大きく阻害された。すなわちFXIIIに対する細胞接着においては、二段階で反応が進行し、一段目ではインテグリンが

活性化されるのであろうと考えられる。実際に、FXIIIに一度接着させ再度FXIIIに接着させた際にはFXIIIは必ずしも活性化されている必要が無いことも分かった。私たちはそれでは具体的に如何なるタンパク質がトランスグルタミナーゼ活性によって架橋されているのかを検討したが、現在までのところ明確な答えは未だ得られていない。これまでの結果を総合すると、FXIIIではその酵素活性によってインテグリンを活性化し、その後はファイブロネクチンなどと同様に活性化されたインテグリンに結合してシグナルを与え、アクチンの配向などを伴う変化を細胞内部に引き起こし細胞接着を完了するものと考えられる。ところがTGcの場合は酵素活性によってインテグリンを活性化することが無いので、他の物質によって活性化されたインテグリンを用いるしかない。従ってこれまでに見つかったファイブロネクチンやコラーゲンという細胞接着タンパク質と同様に考えることが出来る。ここで興味あることの第一点は、TGcが $\alpha 4\beta 1$ というインテグリンを接着に用いる点である。現在までにこの種類のインテグリンを接着受容体に用いるタンパク質はファイブロネクチン、VCAM-1および私たちが以前報告したフォンビルブランド因子のプロポリペプチドとその種類が限られていることである。この点に関しては、今後その細胞接着に関与するドメインを可能な限り限定し、これまでに得られているものと比較したいと考えている。ところでTGcに対する細胞接着において、 $\alpha 4$ インテグリンに対する抗体が白血病細胞においては完全に阻害したのとは対照的に線維芽細胞を用いた際には全く無効であったのは、後者においては $\beta 1$ インテグリンと結合している全く異なる α サブユニットを有するインテグリンが関与しているからであると考えられる。実際にこの線維芽細胞には $\alpha 4\beta 1$ インテグリンは存在しないことが知られている。そうだとすると、異なるドメインが各々異なるインテグリンへの接着に関与している可能性がある。第二点は、線維芽細胞に関してはインテグ

リンを活性化すること無しにTGcに良く接着することである。またこの二種類のトランスグルタミナーゼに接着する細胞の種類が異なるのは、関与するインテグリンが異なることによって理解されるが、これらが細胞接着反応に関与する際の生理的局面的差を示唆しているのかも知れず興味深い。将来可能であれば、より生理的な条件下での細胞接着に関して検討していきたいと考える。

引用文献

- 1) Aeschlimann, D. and Paulsson, M.: Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids, *Thromb. Haemost.*, 71, 402-415, 1994.
- 2) Usui, T., Takagi, J. and Saito, Y.: Propolypeptide of von Willebrand Factor serves as a substrate for Factor XIIIa and is cross-linked to laminin, *J. Biol. Chem.*, 268, 12311-12316, 1993.
- 3) Isobe, T., Hisaoka, T., Shimizu, A., Okuno, M., Aimoto, S., Takada, Y., Saito, Y. and Takagi, J.: Propolypeptide of von Willebrand factor is a novel ligand for very late antigen-4 integrin, *J. Biol. Chem.*, 272, 8447-8453, 1997.
- 4) McDonagh, R. P.: Affinity chromatography of human plasma and platelet factor XIII on organomercurial agarose, *Biochim. Biophys. Acta*, 446, 345-357, 1976.
- 5) Hynes, R. O.: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell*, 69, 11-25, 1992.
- 6) Takagi, J., Saito, Y., Kikuchi, T. and Inada, Y.: Modification of transglutaminase assay: Use of ammonium sulfate to stop the reaction, *Analyt. Biochem.*, 153, 295-298, 1986.
- 7) Ruoslahti, E.: Fibronectin and its receptors, *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 375-413, 1988.

植物由来環状ペプチド類のチロシナーゼ阻害活性に関する研究

東京薬科大学 薬学部

竹 谷 孝 一

We have focused our attention on various naturally occurring cyclic peptides with unique structures and biological activities, especially tyrosinase inhibitors, from higher plants. As a part of our continuing studies in search of new bioactive cyclic peptides from higher plants, we have isolated 26 novel cyclic peptides, named pseudostellarins A - H from the roots of *Pseudostellaria heterophylla*, dichotomins A - I from the roots of *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata*, yunnanins A - F from the roots of *Stellaria yunnanensis*, and delavayin from the roots of *Stellaria delavayi*, all of them belonging to Caryophyllaceae family. Some of them showed tyrosinase inhibitory and cell growth inhibitory activities. These structures were elucidated by extensive 2D NMR such as COSY, HOHAHA, HMBC, HMQC, phase sensitive NOESY and ROESY spectra, chemical degradation and ESI MS / MS methods. Also, in order to determine the importance of the specific functional groups for the overall conformation of cyclic heptapeptides, and in an attempt to understand the relationships between chemical composition and three-dimensional structure, conformational analyses of cyclic peptides, pseudostellarin D (**4**), yunnanins A (**18**) and C (**20**) using X-ray crystallography, high field NMR and MD calculations were undertaken. The dominant solution conformations of **4**, **18** and **20** analyzed by high field NMR and MD calculations employing distance constraints were homologous to those observed in the solid state.

1 緒 言

環状ペプチドは抗腫瘍活性、抗菌活性、免疫抑制活性などの多様な生理活性作用が報告されており、医薬品開発の重要な化合物群の一群を築きつつある。これら環状ペプチド類は海洋生物・菌類の二次代謝産物の生理活性物質として単離、構造決定されていることが多いのに対して、高等植物由来環状ペプチド類の報告例が希であったので、高等植物由来の環状ペプチド類に的を絞り、活性物質の単離・構造決定を行ってきた^{1, 2)}。この研究過程において、ナデシコ科の漢方生薬である太子参 (*Pseudostellaria heterophylla* の根) よりチロシナーゼ阻害活性作用を有する環状ペプチド pseudostellarin 類を単離・構造決定することができた。このチロシナーゼ阻害活性は、メラニンの生成を抑制して皮膚の美白を保持するので、本活

性を有するアルブチン、コウジ酸などが化粧品などに利用されている。しかしながら、従来知られているチロシナーゼ阻害剤の作用は、十分に満足されるのではなく、新規構造のチロシナーゼ阻害剤が求められているにもかかわらず、その新素材に関する研究は、国内外を問わず非常に少ないのが現状で、我々は太子参^{3~7)}を含め、銀柴胡 *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata*^{8~11)}、千針万線草 *Stellaria yunnanensis*^{12~15)} および *Stellaria delavayi*¹⁶⁾ 中の環状ペプチド類の探索研究を行い、それぞれより新規環状ペプチドを単離・構造決定し、pseudostellarins A - H (**1** - **8**)、dichotomins A - I (**9** - **17**)、yunnanins A - F (**18** - **23**) および delavayin A - C (**24** - **26**) と命名した。これらの構造は 1, 2 次元 NMR および ESI MS/MS により決定した。また、これらのコンホメーション解析および生理活性についても検討した。

2 実験・結果

太子参 (10kg) を 90% メタノールで加温抽出し、得られた抽出物を n-ブタノール/水で分配した。次いで n-ブタノール画分 (167.3g) をドラーゲンドルフ試薬、硫酸試薬を指標に分離・精製



Studies on the tyrosinase inhibitors of cyclic compounds from higher plants

Koichi Takeya

School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy & Life Science

を行った。まず、n-ブタノール可溶画分を Diaion HP-20 を用い、溶媒系として水-メタノールのグラジエント系で分離し、引き続き 80%, 100% メタノール画分をシリカゲルカラムクロマト、ODS カラムを用いた逆相 HPLC で順次、分離・精製した結果、8 種類の環状ペプチド pseudostellarins A-H (1-8) を単離した。銀柴胡 (8.5kg)、千針万線草 (7.0kg) および *Stellaria delavayi* (10kg) についても同様の分離・精製手法を用い、メタノール抽出物を順次、分離・精製することにより、それぞれ dichotomins A-I (9-17), yunnanins A-F (18-23) および delavayins A-C (24-26) と命名した環状ペプチドを得た。

単離された 26 種の化合物は、赤外吸収スペクトルにおけるアミドカルボニルの吸収や pyridine- d_5 , DMSO- d_6 による ^1H , ^{13}C NMR の測定から得られたスペクトルデータより、ペプチド性化合物であることが示唆されたため、まず各サンプルを常法に従い 6N HCl, 110°C で加水分解した後、アミノ酸分析を行い、含有アミノ酸の組成を決定した。次いで 2 次元 NMR を用いて各アミノ酸の ^1H , ^{13}C NMR シグナルを帰属した後、HMBC スペクトルによるロングレンジ相関および NOESY, ROESY スペクトルによる NOE 相関を解析することにより 1 次構造を決定した。また、各アミノ酸の絶対立体配置の決定には、Marfey 法¹⁷⁾を適用して分析したところ、2 種類の異常アミノ酸 (γ -hydroxy Ile, δ -hydroxy Ile) を除いて、pseudostellarin 類, dichotomin 類, yunnanin 類, delavayin 類の構成アミノ酸のいずれも L 体であることが判明した。また、この際アミド結合 (CO-NH) との HMBC スペクトルにおけるロングレンジ相関、あるいは連続した異種アミノ酸間における NOE, ROE 相関の観察、高分解能 FABMS から決定された分子式などから、同じアミノ酸組成の直鎖ペプチドに比べ、 H_2O が 1 分子少ないことなどから、すべて環状ペプチドであると決定した。なお、Table 1 に *P. heterophylla*, *S. dichotoma* var *lanceolata*, *S. yunnanensis*, *S. delavayi* から得られた

環状ペプチドの全構造を示し、その構造決定の代表的なものとして, dichotomin A (9), Yunnanin B (19), Pseudostellarin E (5) について説明する。

Dichotomin A (9) は無色針状晶 (mp 179 ~ 180°C) として得られ、高分解能 FABMS (m/z 681.3652 ($\text{M} + \text{H}^+$)) により、分子式は $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_8$ と決定した。Pyridine- d_5 中における ^1H NMR において、6 個のアミドプロトン (δ : 8.35, 8.60, 8.79, 9.07, 9.21, 9.97) が、また ^{13}C NMR において、6 個のアミドカルボニル (δ : 170.69, 171.29, 172.33, 172.39, 172.72 $\times$ 2) 由来のシグナルが観測されたこと、さらに HMBC スペクトルにおいて、すべてのアミド結合に $^2\text{J}_{\text{H-C}}$ カップリングが観測されたことより、9 は Fig. 1 に示すような環状ペプチドであることが判明し、ROESY によりその構造を確認した。

Yunnanin B (19) は白色粉末として得られ、高分解能 FABMS (m/z 639.3114 ($\text{M} + \text{H}^+$)) により、分子式は $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_8$ と決定した。Pyridine- d_5 中における ^1H NMR において、6 個のアミドプロトン (δ : 8.51, 9.04, 9.11, 9.32, 9.34, 9.95) が、また ^{13}C NMR において、6 個のアミドカルボニル (δ : 170.28, 171.44, 171.60, 172.21, 172.75, 173.80) 由来のシグナルが観測されたこと、さらに HMBC スペクトルにおいて、すべてのアミド結合に $^2\text{J}_{\text{H-C}}$ カップリングが観測されたことより、19 は Fig. 1 に示すような環状ヘキサペプチドであることが判明した。しかしアミノ酸分析の結果、Gly, Ala, Ser, Phe $\times$ 2 の 5 個のアミノ酸の存在しか確認されなかったため、残る 1 残基は異常アミノ酸であることが示唆された。残る 1 残基の構造は H-H COSY により、NH (δ : 9.04, 1H, d) / αH (δ : 4.81, 1H, dd) / βH (δ : 2.60, 1H, m) のカップリングシークエンスが観測され、さらに βH は、メチルプロトン γH (δ : 0.91, 3H, d) と 2 組の連続したメチレンプロトン γH (δ : 1.49, 1.95, each 1H, m), δH (δ : 3.80, 3.87, each 1H, m) とカップリングしていることが明らかとなった。また、 δH が 3.80, 3.87 ppm で共鳴

Table 1 Structure of Cyclic Peptides from *P. heterophylla*, *S. dichotoma* var *lanceolata*, *S. yunnanensis*, and *S. delavayi*

compound	structures	yield (mg)
pseudostellarin A (1)	cyclo (-Gly-Pro-Tyr-Leu-Ala-)	250
pseudostellarin B (2)	cyclo (-Gly-Ile-Gly-Gly-Gly-Pro-Pro-Phe-)	600
pseudostellarin C (3)	cyclo (-Gly-Thr-Pro-Ser-Pro-Leu-Phe-Leu-)	450
pseudostellarin D (4)	cyclo (-Gly-Thr-Gly-Pro-Leu-Ile-Leu-)	400
pseudostellarin E (5)	cyclo (-Gly-Pro-Pro-Leu-Gly-Pro-Val-Ile-Phe-)	850
pseudostellarin F (6)	cyclo (-Gly-Gly-Thr-Leu-Pro-Pro-Leu-Ser-)	125
pseudostellarin G (7)	cyclo (-Gly-Pro-Leu-Ala-Pro-Phe-Ser-Phe-)	150
pseudostellarin H (8)	cyclo (-Gly-Thr-Pro-Thr-Pro-Leu-Phe-Phe-)	8
dichotomin A (9)	cyclo (-Gly-Thr-Phe-Leu-Tyr-Val-)	595
dichotomin B (10)	cyclo (-Gly- Thr-Phe-Leu-Tyr-Thr-)	34
dichotomin C (11)	cyclo (-Gly- Thr-Phe-Leu-Tyr-Ala-)	255
dichotomin D (12)	cyclo (-Gly-Val-Gly-Phe-Tyr-Ile-)	102
dichotomin E (13)	cyclo (-Gly-Tyr-Ala-Phe-Ala-)	17
dichotomin F (14)	cyclo (-Val-Leu-Pro-Ser-Val-Tyr-Pro-Tyr-Phe-)	26
dichotomin G (15)	cyclo (-Ser-Pro-Leu-Pro-Ile-Pro-Pro-Phe-Tyr-)	51
dichotomin H (16)	cyclo (-Ala-Pro-Thr-Phe-Tyr-Pro-Leu-Ile-)	85
dichotomin I (17)	cyclo (-Val-Pro-Thr-Phe-Tyr-Pro-Leu-Ile-)	43
yunnanin A (18)	cyclo (-Gly-Tyr-Gly-Gly-Pro-Phe-Pro-)	400
yunnanin B (19)	cyclo (-Gly-Ser- δ -hydroxy Ile-Phe-Phe-Ala-)	210
yunnanin C (20)	cyclo (-Gly-Ile-Gly-Phe-Tyr-Ser-Pro-)	30
yunnanin D (21)	cyclo (-Gly-Ile-Ser-Phe-Arg-Phe-Pro-)	470
yunnanin E (22)	cyclo (-Gly-Ser- δ -hydroxy Ile-Phe-Phe-Ser-)	160
yunnanin F (23)	cyclo (-Gly-Val-Thr-Trp-Tyr-Pro-Ser-Ser-)	16
delavayin A (24)	cyclo (-Gly-Ser- γ -hydroxy Ile-Phe-Phe-Ala-)	11
delavayin B (25)	cyclo (-Gly-Ser-Ile-Phe-Phe-Ala-)	35
delavayin C (26)	cyclo (-Gly-Tyr-Tyr-Tyr-Pro-Val-Pro-)	4

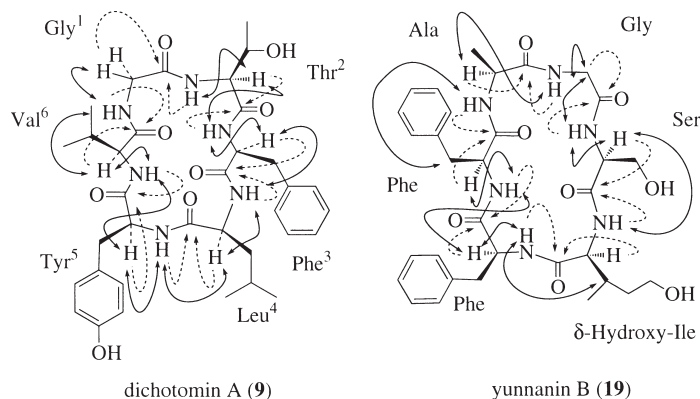


Fig. 1 Structures of Dichotomin A and Yunnanin B. Dashed arrows show HMBC correlations and arrows show NOE relationship in pyridine-d₅.

していること, FABMS より得られた分子式より, 残る 1 残基の構造は, Ile の δ 位に水酸基が置換した δ -hydroxy Ile であることが判明した (Fig. 1)。最終的には HMBC, ROESY より各アミノ酸のシーケンスを決定し, **19** の構造は cyclo (Gly-Ser- δ -hydroxy Ile-Phe-Phe-Ala) であることが明らかとなった。

Pseudostellarin E (**5**) (白色粉末, m/z 878.5154 ($M+H$)⁺, C₄₅H₆₇N₉O₉) はアミノ酸分析の結果, Gly $\times$ 2, Val, Ile, Leu, Phe, Pro $\times$ 3 の存在が確認され, 引き続き ¹H NMR を測定したが, CDCl₃, Pyridine-d₅, DMSO-d₆, CD₃OD のいずれの溶媒においてもブロードシグナルを与えたため, 構造決定にはイオン化法として ESI を用いたタンデムマススペクトロメトリー法を適用した。まず, Pseudostellarin E を α -キモトリプシンで酵素分解し, そのリニア体とした後, ESI MS/MS を行い, 得られたフラグメントピークを詳細に検討することにより, その構造を cyclo (Gly-Pro-Pro-Leu-

Gly-Pro-Val-Ile-Phe) と決定した (Fig. 2)。

MS/MS を用いた環状ペプチドの構造決定では, これまでイオン化法として FAB が一般的に用いられてきたが, 環状ペプチドをリニア体に変換することにより, より緩和なイオン化法である ESI も構造決定に利用できることが示され, その有用性が認められた。

続いて環状ペプチド Pseudostellarin D (**4**), Yunnanin A (**18**), Yunnanin C (**20**) のコンホメーション解析について述べるが, 天然物および合成品由来の環状ペプチド類の中で, ペンタ, ヘキサ, オクタペプチドなどの例は多数知られているが, 環状ヘプタペプチドの存在は, Ilamycin B1, Evolidine, Hymenamide 類, Phakellistatin 類, Axinastatin 類, Rhizonin A などの十数例しか知られておらず, 詳細なコンホメーションに関する知見も十分とはいえない。そこで我々は, 単離された 3 種類の環状ヘプタペプチド **4**, **18**, **20** について X 線結晶構造解析, NMR および分子動力学

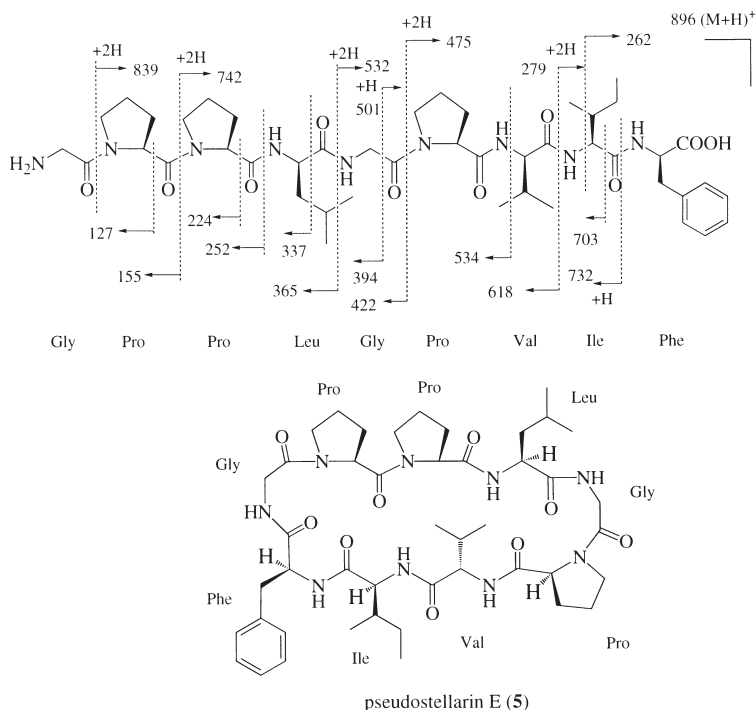


Fig. 2 ESI MS/MS fragmentation of m/z 896($M+H$)⁺ ion of linear peptide from pseudostellarin E

(MD) 法, モンテカルロ (MC) 法などの計算化学的手法を用いたコンホメーション解析を行った。

まず, 化合物 **4**, **18**, **20** の単結晶を用いて X 線結晶解析を行った (Fig. 3)。その結果, X-Pro ペプチド結合を含め, すべてのペプチド結合が trans ジオメトリーであり, これまでにない特徴的なコンホメーションを有していることが判明した。また, Table 2, 3 に示すように, 分子中に 2 カ所の β -turn 構造と分子内水素結合の存在が示された。また, **4**, **18** にはそれぞれ Tyr²-Gly¹ 位に β -bulge 構造が存在することが明らかとなり, コンホメーションの類似性が示された (Fig. 3)。

また, 溶液中のコンホメーションは, NMR (in DMSO-d₆) における ROESY 測定, アミドプロトンの温度依存性実験 (300 – 330 K), ³J_{NH α ビシナルカップリング定数による二面角 ϕ の計算など}

により解析し, さらに得られた ROE を制限項として MD, MC 計算を行った。その結果, **4** および **18** では β -turn 構造のサブタイプや β -bulge 構造の存在など, 結晶中のコンホメーションと類似性が示された (Fig. 4)。これに対し, **20** は結晶構造において観測された Tyr⁵NH-Ile²C=O の分子内水素結合および Gly³-Phe⁴ 位の Type II' β -turn の存在は示されず, Phe⁴-Tyr⁵ 位に Type I β -turn の存在が示唆されるなど, 溶液中のコンホメーションは結晶中と大きく異なることが推測された。

Pseudostellarin 類にはチロシナーゼ阻害活性が観測され, それぞれの IC₅₀ (mM) 値は, pseudostellarins A (**1**: 131), B (**2**: 187), C (**3**: 63), D (**4**: 100), E (**5**: 175), F (**6**: 50), G (**7**: 75) というものであった。また, その他の活性

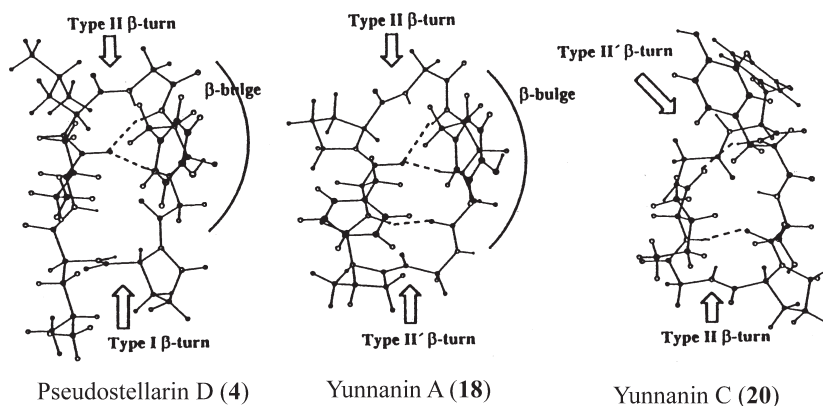


Fig. 3 Computer-generated Crystal Structures of **4**, **18** and **20**
Dashed lines show intramolecular hydrogen bonds.

Table 2 β -Turn Forms of **4**, **18**, **20**

compound	residues	β -turn form
4	Pro ⁴ -Leu ⁵	Type I
	Leu ⁷ -Gly ¹	Type II
18	Gly ⁴ -Pro ⁵	Type II'
	Pro ⁷ -Gly ¹	Type II
20	Gly ³ -Phe ⁴	Type II'
	Pro ⁷ -Gly ¹	Type II

Table 3 Hydrogen Bonds & Intermolecular Very Short Contacts of **4**, **18**, **20**

compound	distance (Å)	angle (°)
4	O3-N6 3.40	O3-N6H 162
	O6-N2 2.93	O6-N2H 103
	O6-N3 3.03	O6-N3H 150
18	O3-N6 3.01	O3-N6H 159
	O6-N2 3.19	O6-N2H 141
	O6-N3 3.02	O6-N3H 165
20	O6-N2 2.77	O6-N2H 151
	O2-N5 2.99	O2-N5H 143
	O2-N6 3.69	O2-N6H 144

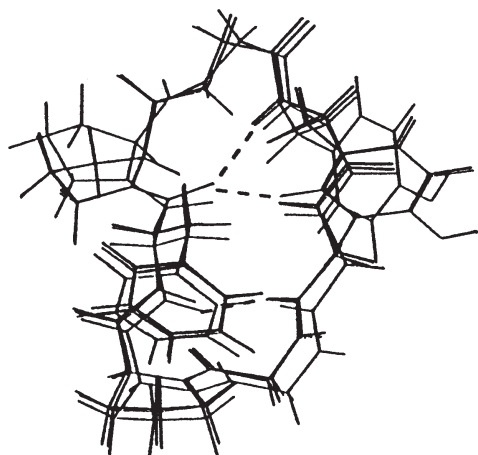


Fig. 4 Superimposed Structures of Crystal State of 14 and Its Energetically Stable Conformers by MD/MM and MC/MM Simulations

として、P388 培養細胞に対する細胞増殖阻害活性を検討したところ、それぞれの IC_{50} (mg/mL) 値は、dichotomins A (**9**: 2.5), B (**10**: 3.5), C (**11**: 5.0), E (**13**: 3.0), yunnanin C (**20**: 2.2) であり、dichotomin D (**12**) にはシクロオキシゲナーゼ阻害活性が認められた。

3 考 察

高等植物より単離・構造決定した環状ペプチドにチロシナーゼ阻害活性を見出し、漢方生薬の太子参 (*Pseudostellaria heterophylla* の根) の環状ペプチド pseudostellarin A-G にチロシナーゼ阻害活性を認めた。近縁植物である銀柴胡 *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata*, 千針万線草 *Stellaria yunnanensis* および *Stellaria delavayi* 中にも環状ペプチド類を見出し、同様のチロシナーゼ阻害活性を期待している。また、これら環状ペプチド類の構造とコンホメーションとチロシナーゼ阻害活性との関連研究を進めているが、結論を得ていないのが現実であるが、環状ペプチド類は、新規タイプのチロシナーゼ阻害活性物質であり、リード化合物として今後、期待される化合物であると考えらる。

謝 辞

本研究をご支援いただきましたコスメトロロジー研究振興財団に対しまして、厚く御礼申し上げますとともに、本研究を遂行するにあたり、ご助力をいただきました森田博史博士、代田修博士、栢下隆氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) Itokawa, H. and Takeya, K., Antitumor Substances from Higher Plants, *Heterocycles* 35, 1467 - 1501 (1993).
- 2) Itokawa, H., Takeya, K., Hitotsuyanagi, Y. and Morita, H., Macrocyclic Peptide Alkaloids from Plants, *The Alkaloids* 49, 301 - 387 (1997).
- 3) Morita, H., Kayashita, T., Kobata, H., Gonda, A., Takeya, K. and Itokawa, H., Pseudostellarins D - F, New Tyrosinase Inhibitory Cyclic Peptides from *Pseudostellaria heterophylla*, *Tetrahedron* 50, 9975-9982 (1994).
- 4) Morita, H., Kayashita, T., Kobata, H., Gonda, A., Takeya, K. and Itokawa, H., Pseudostellarins A - C, New Tyrosinase Inhibitory Cyclic Peptides from *Pseudostellaria heterophylla*, *Tetrahedron* 50, 6797-6804 (1994).
- 5) Morita, H., Kayashita, T., Takeya, K. and Itokawa, H., Conformational Analysis of a Tyrosinase Inhibitory Cyclic Pentapeptide, Pseudostellarin A, from *Pseudostellaria heterophylla*, *Tetrahedron* 50, 12599-12608 (1994).
- 6) Morita, H., Kobata, H., Takeya, K. and Itokawa, H., Pseudostellarin G, A New Tyrosinase Inhibitory Cyclic Octapeptide from *Pseudostellaria heterophylla*, *Tetrahedron Lett.* 35, 3563-3564 (1994).
- 7) Morita, H., Kayashita, T., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic Peptides from Higher Plants, Part 15. Pseudostellarin H, A New Cyclic Octapeptide from *Pseudostellaria heterophylla*, *J. Nat. Prod.* 58, 943 - 947 (1995).

- 8) Morita, H., Kayashita, T., Shishido, A., Takeya, K., Itokawa, H. and Shiro, M., Dichotomin A, A New Cyclic Hexapeptide from *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bge., *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 5, 2353 - 2356 (1995).
- 9) Morita, H., Kayashita, T., Shishido, A., Takeya, K., Itokawa, H. and Shiro, M., Dichotomins A - E, New Cyclic Peptides from *Stellaria dichotoma* L. var. *lanceolata* Bge., *Tetrahedron* 52, 1165-1176 (1996) .
- 10) Morita, H., Shishido, A., Kayashita, T., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic peptides from higher plants. 39. Dichotomins F and G, cyclic peptides from *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata*, *J. Nat. Prod.* 60, 404 - 407 (1997) .
- 11) Morita, H., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic Octapeptides from *Stellaria dichotoma* var. *lanceolata*, *Phytochemistry* 45, 841 - 845 (1997).
- 12) Morita, H., Shishido, A., Kayashita, T., Shimomura, M., Takeya, K. and Itokawa, H., Two Novel Cyclic Peptides, Yunnanins A and B from *Stellaria yunnanensis*, *Chem.Lett.* 2415-2418 (1994).
- 13) Morita, H., Kayashita, T., Shimomura, M., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic Peptides from Higher Plants. Part30. Three Novel Cyclic Peptides, Yunnanins D, E and F from *Stellaria yunnanensis*, *Heterocycles* 43, 1279-1286(1996).
- 14) Morita, H., Kayashita, T., Shimomura, M., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic Peptides from Higher Plants. Part 30. Three Novel Cyclic Peptides, Yunnanins D, E and F from *Stellaria yunnanensis*, *Heterocycles* 43, 1279-1286(1996).
- 15) Morita, H., Kayashita, T., Shimomura, M., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic Peptides from Higher Plants. 24. Yunnanin C, a Novel Cyclic Heptapeptide from *Stellaria yunnanensis*, *J. Nat. Prod.* 59, 280-282 (1996).
- 16) Morita, H., Kayashita, T., Uchida, A., Takeya, K. and Itokawa, H., Cyclic peptides from higher plants. 33. Delavayins A-C, three new cyclic peptides from *Stellaria delavayi*, *J. Nat. Prod.* 60, 212 - 215 (1997) .

Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

X線照射とマイトマイシンの併用によって起こる 皮膚障害に対するイチョウ葉エキスの効果

星薬科大学

太 田 節 子

One treatment for cancer is the combination of radiotherapy and chemotherapy. Either radiotherapy or chemotherapy has side effects, such as skin injury. In particular, skin injury in combination therapy is more serious compared with it in either radiotherapy or chemotherapy. We already established the method to estimate protective effects for skin injury by X-ray irradiation, and we found protective effects in many crude drugs. Previous report showed that extracts of *Ginkgo Biloba L.* have various pharmacological effects. However, other effects of extracts of *Ginkgo Biloba L.* have not been known. In this study, we examined protective effects of extracts of *Ginkgo Biloba L.* for skin injury induced by X-ray irradiation combined with mitomycin in mice.

1 緒 言

癌治療において手術、放射線照射、制癌剤投与は3本の柱で、癌の種類、病巣の位置、進行度で各々が使い分けられ、また併用されている。放射線照射と制癌剤投与の共通の副作用として、白血球減少と皮膚障害がある。白血球数の急減は免疫力の低下の危険性から、治療計画の中断にもかわる重要課題とされ、G-CSFなどの治療薬が用いられている。一方体外から照射された放射線は必ず皮膚を通過して体内に入るため、照射部位の皮膚は湿性のただれや潰瘍を発生し、患者は日常生活の中で常に痛みさらされている。また、制癌剤や被爆による全身の脱毛は大部分の患者に生じるにもかかわらず、生命の危険がなく、将来的には再生することから殆ど留意されていない。しかし再生までの長期間、療養中の患者は四六時中、癌の恐怖を意識づけられていることになり、多大なストレスは回復効果にも影響する。そこでこれらの制癌剤や放射線被曝による皮膚障害に対する

予防薬の開発を目的とする研究を行った。

著者らは30kVpの軟X線を用いることにより、一般のX線(200kVp)の場合と類似した皮膚障害モデルを作製し、この独自の方法によれば透過力の弱いX線が皮膚の表面に集中するため、消化管障害や造血機能障害を併発せず皮膚障害を観察できる利点があることを認めた。また障害の程度をスコア表を用いることにより計量化し、予防薬開発のための放射線皮膚障害防護効力試験法を確立した¹⁾。その結果、含イオウ化合物²⁾、フェルラ酸関連化合物³⁾生薬エキス⁴⁾核酸構成物質⁵⁾漢方方剤⁶⁾川キュウ分画物⁷⁾キダチアロエ⁸⁾など多数の薬物に有効性を認めた。この中に最近健康食品として人気のあるイチョウ葉エキスの分画物がある。

イチョウ(*Ginkgo Biloba L.*)は地質を問わずよく繁茂するために、街路樹あるいは神社、寺の境内などで植栽されている馴染みの深い植物である。種子のギンナンは嗜好性の食品として、また鎮咳、去痰作用のある生薬として広く愛用されている。葉は防虫、しもやけなど民間薬として用いられていたが、1965年にドイツで緑葉エキスを動脈の血液循環を促進し、毛細血管の血流もスムーズにする働きが強力であることが認められてからは、血行障害や老人性痴呆症の治療薬として広く使われている。しかし、薬効本体の解明が充分で



Protective Effects of Extract from Leaves of *Ginkgo Biloba L.* on Skin Injury Induced by X-ray Irradiation Combined with Mitomycin in Mice

Setsuko Ohta

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Hoshi University

ない状況から、日本では健康食品として扱われている。

イチヨウの緑葉抽出物に含まれるケルセチン、ケンフェロール等のフラボノイドやピロバリド、ギンゴリド等のテルペノイドは黄葉になる直前の8月頃に最も含有量が高いことも知られており、原料の緑葉はこの時期に収穫されている。

また、イチヨウ緑葉エキスの末梢血行改善効果に着目してC3H系マウスを用いた育毛効果の報告もあるが、我々はICR系マウスを用いた放射線誘発皮膚障害防護効果を検討してきた。そこでイチヨウ緑葉より抽出した分画物の効力試験を行った結果、放射線によって生じる脱毛、潰瘍などの障害を90%以上抑制する画分を得た。これらの有効画分について制ガン剤投与によって発症する脱毛に対する、抑制効果の有無を測定し、制ガン剤副作用抑制への応用の可否を検討した。

2 実験

実験材料および試料の調整法：イチヨウ緑葉は星薬科大学構内のイチヨウ樹（雌株、樹高10 m、

幹回り1.4 m）の葉を8月初旬に採取し、加熱乾燥した後、メタノールで抽出してメタノールエキスを作製し、図1に示すように分画した。

分画物は注射用蒸留水を加えた後超音波処理し、溶解または懸濁させ、必要に応じて0.4N-NaOHを用いてpH7-8に調整した。この処理法で不溶物が多い画分は遠心分離した後上清のみを用いた。これらの試料は投与液量がマウスの体重30g当り0.3mLになるように調整した。

8種類の制ガン剤は臨床で用いられている市販品を入手し、注射用蒸留水に溶解させた。

8種類の制ガン剤

塩酸ニムスチン
シクロホスファミド
ドキソルビシン
ビンクリスチン
ブレオマイシン
フルオロウラシル
マイトマイシン (MMC)

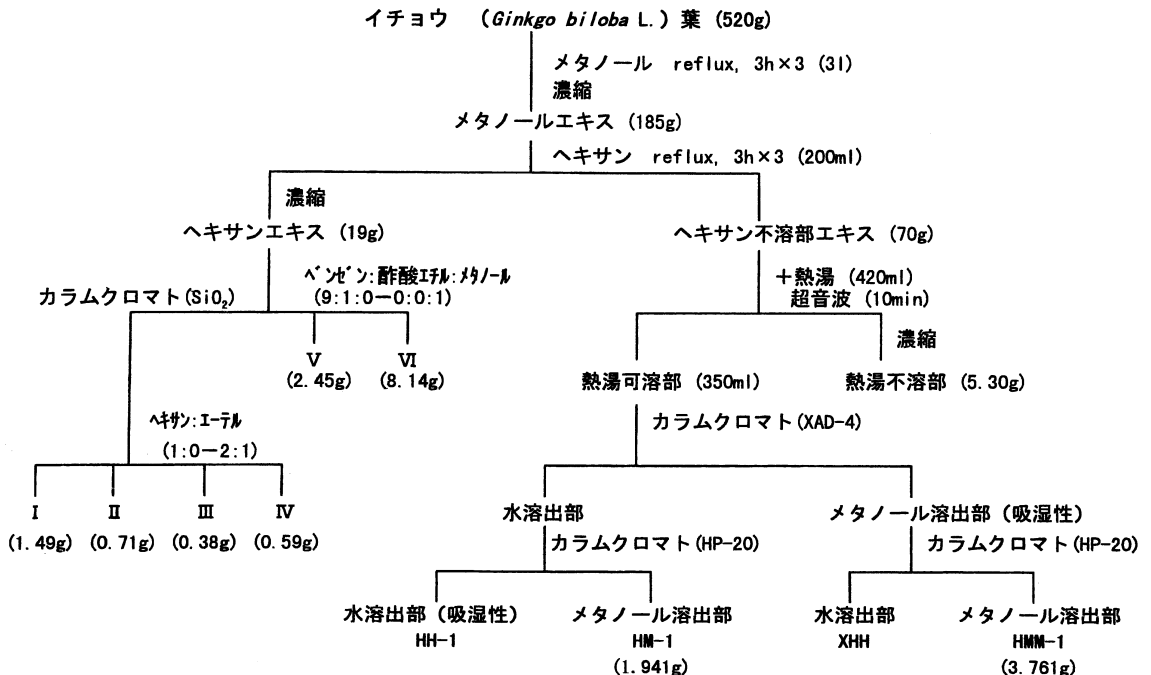


図1 イチヨウ葉の分布図

エトポシド

実験動物

日本生物材料センターより購入した生後5週令のICR系雄マウスを1週間予備飼育した後、実験に使用した。マウスは1群8匹とし、4匹ずつ1ケージに入れ、繁殖用固型飼料を与え、飲料水は自動給水装置により自由に摂取させた。

X線照射法

ソフテックス製CMBW特型軟X線発生装置を用い、30kVp、10mA、フィルターは使用せず、照射距離40cm、線量率200R/min（線量計：ビクトリン500型 プローブ：30-330型で測定）の条件で除毛を全くしていないマウスの背部より1200Rを全身照射した。

試料の投与方法

MMCは腹腔内注射又は皮下注射し、イチョウ分画物は腹腔内注射、皮下注射又は経口投与を行った。

皮膚障害効力試験法

照射後20日頃より、マウスの頭部および背部に見られる皮膚障害を照射後40日間、週2回、定時に観察した。これを症状と障害面積を考慮して定量的に評価したスコア表（表1）に基づき、頭部と背部に発生した皮膚障害のスコアを計測した。皮膚障害防護効力は頭部、背部又は頭部と背部併せたスコアを1群毎に合計し、対照群と薬物投与群について同一観察日あるいは観察期間中に最悪の症状を示した時のスコアを次式に代入して求めた。

$$\text{皮膚障害防護効力(\%)} = \frac{\text{対照群のスコア} - \text{薬物投与群のスコア}}{\text{対照群のスコア}} \times 100$$

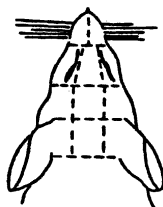
血清中の硝酸イオンの測定

マウスをエーテル麻酔下で開腹し、腹部下行大静脈から0.8～1.0mL採血し、血清を得た。次に0.3NのNaOHと5%の硫酸亜鉛で除蛋白し、上清を硝酸イオン測定検体とした。この検体を用いてGriess法にて硝酸イオン濃度を算出した。

表1 放射線皮膚障害スコア表

1) 頭部皮膚障害

Reaction of head	(頭部の反応)	Score
No visible effect	(無影響)	0
Slight epilation	(軽微脱毛)	1
Severe epilation	(重症脱毛)	3
Complete epilation	(完全脱毛)	6
Epilation of eyelid	(まぶたの脱毛)	3
Slightly fused eyelid	(軽微なまぶたの癒合)	5
Severely fused eyelid	(重症のまぶたの癒合)	10
Vasodilatation of auricle	(耳介の血管拡張)	6
Slight atrophy of auricle	(耳介の軽微萎縮)	9
Severe atrophy of auricle	(耳介の重症萎縮)	12



頭部皮膚障害のスコアは図のように耳のつけ根の後を結んだ線より前が頭部と仮定し、ほぼ等面積の11ブロックごとに、1)のスコアをあてはめ、11カ所のスコアの合計を一匹のスコアとして数値処理をした。

2) 背部皮膚障害

Reaction of dorsum	(背部の反応)	Score													
		Injury area ($\times 10^3 \text{ mm}^2$) (障害面積)													
		0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11	11-12	12-	
No visible effect	(無影響)	0													
Slight epilation	(軽微脱毛)	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	
Severe epilation	(重症脱毛)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Fairly complete epilation	(準完全脱毛)	4	5.5	7	8.5	10	11.5	13	14.5	16	17.5	19	20.5	22	
Complete epilation	(完全脱毛)	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	
Complete epilation and moist exudation	(完全脱毛と湿潤性渗出)	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	
Ulceration	(潰瘍形成)	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	49	52	

背部皮膚障害のスコアは、2)の7段階の症状と障害面積より該当スコアを求め、症状の異なる部位すべてを合計し、それを一匹のスコアとして数値処理をした。

3 結果および考察

3.1 イチヨウ葉抽出物の放射線皮膚障害に対する防護効果

図1に示す分画法によって得られたヘキサンエキスとヘキサンエキスの分画物について放射線照

射で誘発された皮膚障害に対する防護効果を表2、3に示した。ヘキサン可溶部分画物はヘキサンエキスをシリカゲルによるクロマトグラフィーを行い、ヘキサンとTHFの混液で溶出させて、5つの画分(S1～S5)に分画したものをを用いた。軟X線を全身に照射されたマウスの頭部および背

表2 イチヨウ葉ヘキサンエキスの放射線皮膚障害防護効力

試料	投与量 (mg/kg)	投与時期 (min)	投与方法	皮膚障害防護効力 (%)					
				頭部			背部		
				23日目	27日目	最悪時	23日目	27日目	最悪時
Hexane ext. 1000	前120	i.p.	95.7 ⁺⁺	91.9 ⁺⁺⁺	92.6 ⁺⁺⁺	89.2 ⁺⁺⁺	82.7 ⁺⁺⁺	76.3 ⁺⁺⁺	
	前 60	i.p.	82.6 ⁺	97.3 ⁺⁺⁺	89.1 ⁺⁺⁺	82.5 ⁺⁺⁺	80.0 ⁺⁺⁺	78.0 ⁺⁺⁺	
	前 60	p.o.	-13.0	-32.4	-40.0	-23.3	-44.0	-36.6	
Hexane ext. 1000			29日目	31日目	最悪時	29日目	31日目	最悪時	
	前 60	i.p.	87.8 ⁺⁺	91.9 ⁺	91.9 ⁺	93.2 ⁺⁺⁺	89.4 ⁺⁺⁺	89.7 ⁺⁺	
	1000	前 5	i.p.	20.7	35.0	32.5	41.6	32.1	33.9
	200	前 60	i.p.	47.6 ⁺	47.2 ⁺	40.7	35.6	31.2	31.3

1) 最悪時：観察期間（照射後40日）中で照射群と薬物投与＋照射群の各々の障害が最も悪化した時の平均スコアの比より算出した場合を示す。

2) 有意差検定：照射群と薬物＋照射群の各々のスコア間の有意差

+++; p<0.001 ++; p<0.01 +; p<0.05

表3 ヘキサン可溶部の分画物 (s-1～5)

試料	投与量 (mg/kg)	投与時期 (min)	投与方法	皮膚障害防護効力 (%)					
				頭部			背部		
				32日目	35日目	最悪時	32日目	35日目	最悪時
S-1	400	前 60	i.p.	-52.0	-80.9	-58.8	-14.2	11.5	2.7
	100	前 60	i.p.	-52.0	-60.7	-52.0	-4.0	14.9	9.6
S-2	400	前 60	i.p.	81.4 ⁺⁺⁺	74.2 ⁺⁺	77.5 ⁺⁺⁺	82.9 ⁺⁺⁺	87.4 ⁺⁺⁺	83.9 ⁺⁺⁺
	100	前 60	i.p.	34.3	-60.0	-39.2	21.8	31.0	23.4
S-3	400	前 60	i.p.	3.9	4.5	3.9	42.2 ⁺	57.9 ⁺⁺⁺	50.6 ⁺⁺
	100	前 60	i.p.	18.6	16.9	18.6	33.9	43.3 ⁺	43.3 ⁺
S-4	100	前 60	i.p.	0	-24.7	-13.7	14.4	24.5	22.6
S-5	400	前 60	i.p.	-20.6	-36.0	-30.4	12.4	35.2 ⁺	25.3
	100	前 60	i.p.	-21.6	-19.1	-21.6	34.6 ⁺	32.6	32.6

部には照射後 20 日目頃より脱毛、湿性剥離、潰瘍などの皮膚障害が認められ、経時的に悪化していくが、40 日目頃には細く短い毛の再生が認められ、回復が始まった。これに対し、ヘキサノエキスを 1000mg/kg を腹腔内投与した群のマウスの大部分は観察期間中を通して障害が全く認められず、平均皮膚障害防護効力は約 90%であった。

また、ヘキサノの分画物では画分 S-2 に特に強い防護効力が認められ、ヘキサノエキス中の有効成分の大部分は S-2 に移行していることを認めた。

3.2 制ガン剤と放射線の併用によって誘発される皮膚障害モデルの作製

臨床上、副作用として脱毛が問題になっている制ガン剤 8 種について、マウスを用いて、LD50 を考慮した投与量、投与方法、投与回数などと皮膚障害の関係を検討した。制ガン剤としてニムスチン、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ブレオマイシン、フルオロウラシル、マイトマイシン (MMC)、エトポシドの 8 種を選び、腹腔内投与、皮下投与又は経口投与により 1 回又は 5 回連続投与を行った。しかし制ガン剤の単独投与では 5 日連続投与においても脱毛が認められなかった。そこで、制ガン剤投与 2 日後に軟 X 線を照射した。照射線量はあらかじめ 400R から 1600R までの 6 種の線量を比較した結果、1200R 以下では照射による皮膚障害が全く生じないことから、1200R を照射して、制ガン剤と軟 X 線の併用による皮膚障害を観察した。その結果、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ブレオマイシンは約 50%のマウスに脱毛が認められ、ニムスチンとドキソルビシンは約 20～40%のマウスに脱

毛が認められた。これに対し、MMC の腹腔内投与は、約 80～100%のマウスに脱毛および湿性剥離などの皮膚障害が認められた。また MMC の皮下投与は背部全体に脱毛が認められない例もあったが、投与部位の重度の脱毛および潰瘍は、すべてのマウスで認められた。この様に投与部位に限られた場合は、表 1 に示したスコア表以外に新たなスコア表の設定が必要となるため、以後の実験は腹腔内投与で行った。

以上の結果より、MMC 6mg/kg を 1 回腹腔内投与した 2 日後に軟 X 線 1200R を照射し、照射後 40 日間、皮膚障害を観察した。また、この条件では MMC 単独又は放射線照射単独では殆ど皮膚障害が発現せず、両者を併用すると照射後 35 日目まで障害が悪化していく傾向が認められた (図 2)。

汎用されている 8 種類の制癌剤のうち、ドキソルビシンとブレオマイシンとエトポシドは臨床で重篤な副作用として脱毛が挙げられ、シクロホスファミド、ビンクリスチン、フルオロウラシルも「現れることがある」。MMC、ニムスチンは「ときにみられる」と確率が下がるが明記されている。しかしマウスでは MMC に最も広汎な脱毛が認め

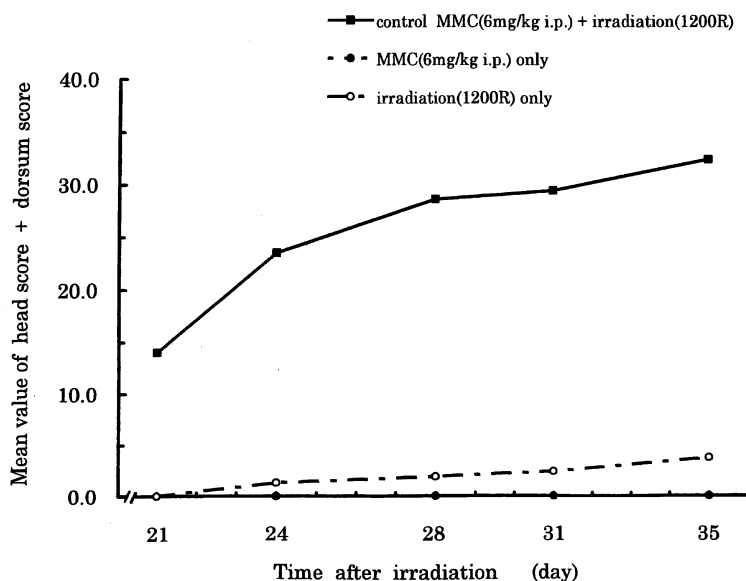


図2 制ガン剤と X 線照射の併用による皮膚障害

られ、エトポシドは毒性傾向が認められても脱毛は軽度であった。この結果よりヒトの頭部の脱毛とマウスの背部の脱毛の再生サイクルの違いが示唆された。

3.3 MMCと放射線の併用による皮膚障害に対するイチヨウ葉分画物の効力

図1に示したように分画して得られた画分をマウスに投与した後、MMCを投与し、2日後にX線1200Rを照射した。40日間観察し、MMC投与後照射した対照群とMMC投与前に分画物を投与し、MMC投与2日後X線照射した群を比較するとヘキサノエキ스는皮下投与で有効であった(図3)。

ヘキサノエキ스는腹腔内投与でも有効であったので(図はない)、図1に示したヘキサノエキスの分画物(Ⅱ～Ⅵ)を腹腔内投与した結果、ⅣとⅥに弱い効力が認められ(図4)、ⅡⅢⅤは無効であった。このⅣは放射線照射単独で起こる皮膚障害に有効であった表3のS-2画分に相当すると考えられるが、この実験条件ではS-2のような強い効力は認められなかった。今後、投与方法を検討することにより、より高い効力を期待できる。

また、図3に示したGb ext.はイチヨウ葉エキスとして市販されている製品の原料エキスである。これはフラボン配糖体が全体の1/4を占める程多いと言われていることから図1のヘキサノ不溶部の熱湯可溶部を分画して得られると考えられ、図1に示した。HM-1又はHMM-1

に相当することを薄層クロマトグラフィーで認めた(図5)。

特に原点が薄くなっていることからHMMがGbエキスに最も近いと考えられていたHHはGbエキスと全く異なることも認めた。これらHH、HM、HMMについて250、500、1000mg/kgの投与量で腹腔内投与、経口投与の条件でMMCとX線照射の併用実験による脱毛に対する予防効を

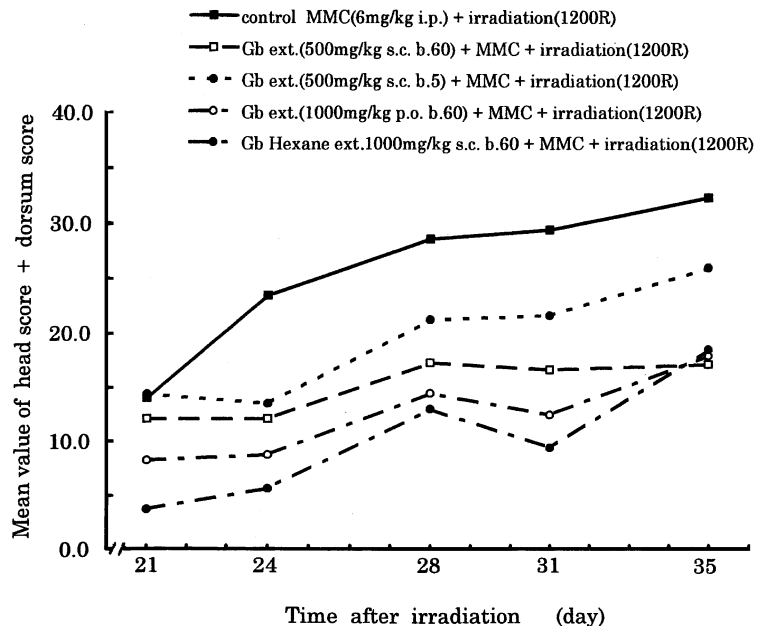


図3 制ガン剤とX線照射の併用によって起こる皮膚障害に対するヘキサノエキ스와 Gbext.の効

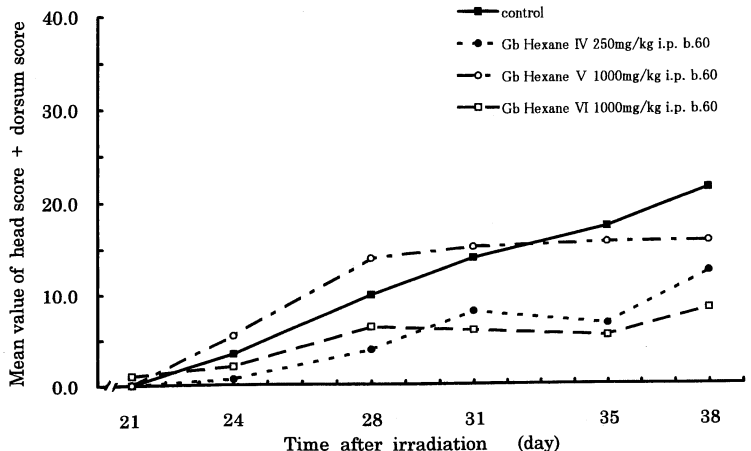


図4 制ガン剤とX線照射の併用によって起こる皮膚障害に対するヘキサノエキスの分画物の効

クロロホルム：メタノール：水（65：35：10）の下層

ブタノール：酢酸：水（3：1：1）

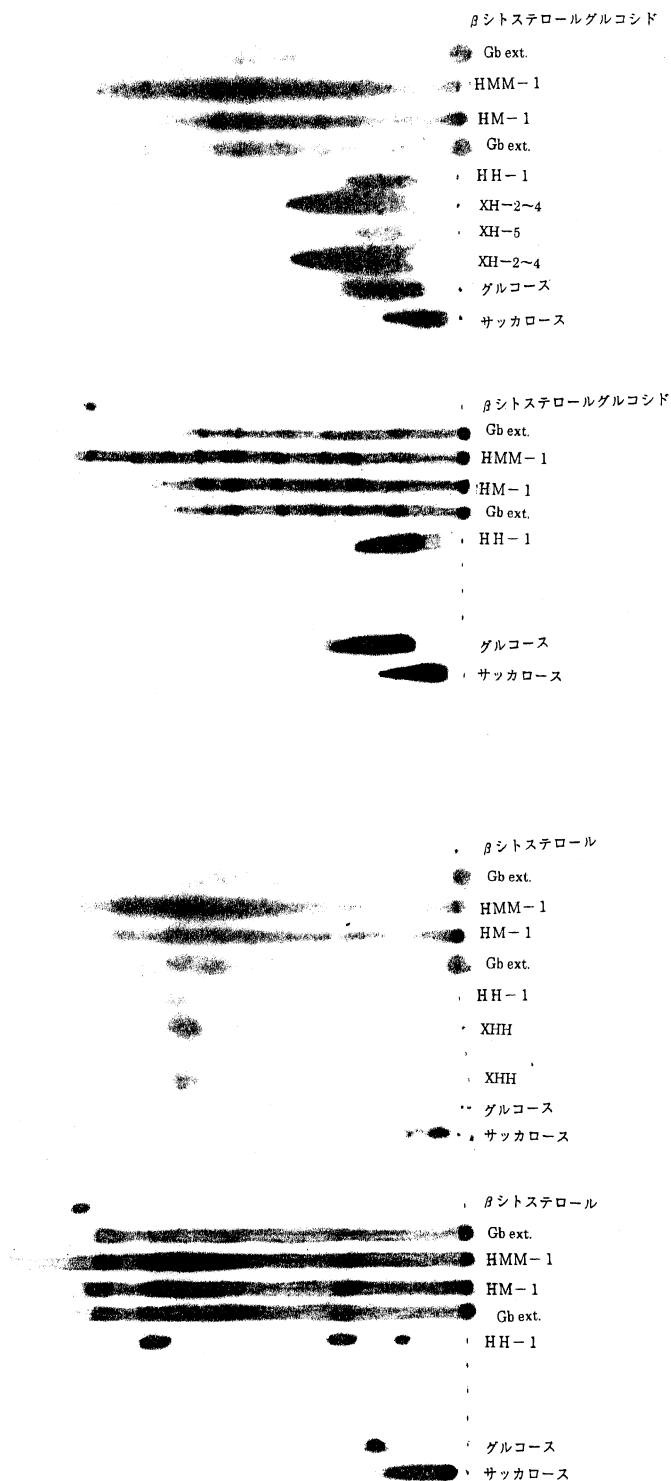


図5 ヘキサン不溶・熱湯可溶部分画物の薄層クロマトグラフィー

検討した結果、バラツキが大きく、有意な効が認められなかった。

3.4 イチョウ葉分画物の作用機序

放射線照射と MMC のような制癌剤のガン細胞に対する効果は共にガン細胞内の DNA の二重鎖切断とその不完全な損傷修復によって、ガン細胞にアポトーシスを起こすため、と考えられている。同時に副作用として発生する脱毛も毛母細胞が正常な機能を果たせない結果生じるとされている。そこで *in vitro* の実験でアガロースゲル電気泳動を用いて DNA ラダーを比較してみると、MMC により発生するラダーは Gb エキス添加により見られなくなりアポトーシスを抑制しているが、HH、HM、HMM はラダーが認められ、アポトーシスを抑制しなかった。しかし、フローサイトメトリーを用いる方法では MMC によってアポトーシスを起こし、細分化した細胞のピークと HH だけが一致した傾向を示したが Gb エキスと HM は正常群と類似したピークを示し、MMC を添加しない正常群よりわずかに左にずれた小さい細胞のピークを示した。このことは Gb エキスと HM がアポトーシスをほぼ抑制しているが、MMC より数は少ないがアポトーシスを起こしている細胞もあることを示している。HMM は Gb エキス、HM よりも完全にアポトーシスを抑制し、正常群と一致したピークを示した。また、ヘキサン不溶、水可溶部の粗エキスを全く同じ傾向を示したことから、この粗エキスを

中にはGbエキス以上にMMCによるアポトーシスを完全に抑制する成分が含まれており、精製法を変えることにより、有効性の高い画分が得られることが示唆された。

また、DNA鎖切断は照射により発生した遊離基によることから、活性酸素が関与していると言われている。そこで照射したマウスの血清中の一酸化窒素ラジカル($\cdot\text{NO}$)の変動を測定し、障害の原因となる $\cdot\text{NO}$ 合成酵素(NOS)を阻害する効果をHH、HMM照射前投与で比較した(表4、図6)。その結果、照射によって増加する血清中の $\cdot\text{NO}$ 量をHH、HMM投与群は低下させる効果はなく、HH、HMM単独投与の場合も有意な差はなかったが図6よりHMM分画の精製の改良によってはNOS抑制効果も期待できる。

表4 イチヨウ抽出分画投与マウス血清硝酸イオン

	硝酸イオン(μM)
対 照	51.79 $\pm$ 33.49
HH分画	85.23 $\pm$ 42.38
HH分画/照射	111.93 $\pm$ 32.92
HMM分画	73.26 $\pm$ 63.42
HMM分画/照射	139.07 $\pm$ 68.02
照射/37分	109.63 $\pm$ 43.37

各群間に有意差はANOVA分析で“ある”とは言えない

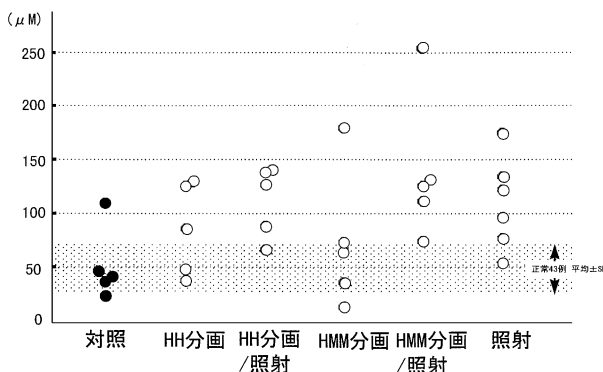


図6 照射後マウスの血清硝酸イオン に対するHH、HMM分画の効

4 総 括

本研究では、ガン治療時に併発される脱毛を予防する薬物を検索し、将来において最近やっと重要視されはじめた患者のクオリティー オブ ライフ(QOL)の一助になることを目的とした。しかし、放射線皮膚障害防護効力試験法を用いイチヨウ葉画分中に著しく強い有効画分を認めていることから、制癌剤による脱毛に対する効果の検討を期待したが、8種のうち特に臨床的に脱毛が激しい制癌剤にも投与部位のわずか周辺5mm直径くらいの重度の脱毛が認められただけであった。MMCは最も脱毛が広汎に生じたが、バラツキもあることから、本法では脱毛の発生しない低線量のX線と脱毛の発生しない量のMMCを腹腔内投与し、その併用による相乗作用により生じた脱毛についてイチヨウ葉エキスの効果を検討した。その結果、有効成分を確認するまでには至らなかった。しかし、アポトーシス抑制効果も認められたことから、分画精製をさらに繰り返すことにより不純物によるマイナスの影響を除けばより高い予防効果も期待できることを認めた。

謝 辞

本研究を行うにあたりご援助をいただいた財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

引用文献

- 1) 篠田雅人、太田節子、早瀬幸俊、放射線障害防護薬剤に関する研究(第21報)軟X線によるマウスの皮膚障害を指標とする放射線障害防護薬剤の効力試験法の検討、薬誌、99、551-555、1979.
- 2) 太田節子、篠田雅人、放射線障害防護薬剤に関する研究(第22報)放射線皮膚障害に対する各種含イオウ化合物の防護効果について、薬誌、102、774-780、1982.
- 3) 太田節子、古川真知子、篠田雅人、放射線障

- 害防護薬剤に関する研究 (第 23 報) フェルラ酸
関連化合物の放射線防護効力、薬誌、104, 793-
797, 1984.
- 4) 佐藤祐之、太田節子、桜井信子、篠田雅人、
放射線障害防護薬剤に関する研究 (第 26 報) 放
射線皮膚障害に対する各種生薬の防護効果、薬
誌、109, 113-118, 1989.
- 5) 佐藤祐之、太田節子、篠田雅人、放射線障害
防護薬剤に関する研究 (第 28 報) 放射線障害に
対する核酸構成物質の防護効果、110, 210-217,
1990.
- 6) 王誠明、太田節子、篠田雅人、放射線障害防
護薬剤に関する研究 (第 29 報) 放射線皮膚障害
に対する各種漢方方剤メタノールエキスの防護
効果、110, 218-224, 1990.
- 7) 太田節子、桜井信子、佐藤祐之、井上隆夫、
篠田雅人、放射線障害防護薬剤に関する研究 (第
30 報) 川キウ中の放射線障害防護物質、110,
746-754, 1990.
- 8) 佐藤祐之、太田節子、篠田雅人、放射線障害
防護薬剤に関する研究 (第 31 報) 放射線皮膚
障害に対するキダチアロエの防護効果、薬誌、
110, 876-884, 1990.

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。

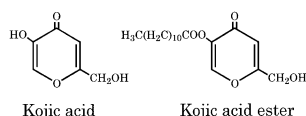


Fig. 1 Structures of kojic acid and kojic acid ester

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, ^{13}C -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 容含有）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チ拡散セル（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後に皮膚をフランチセルより取り外し、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

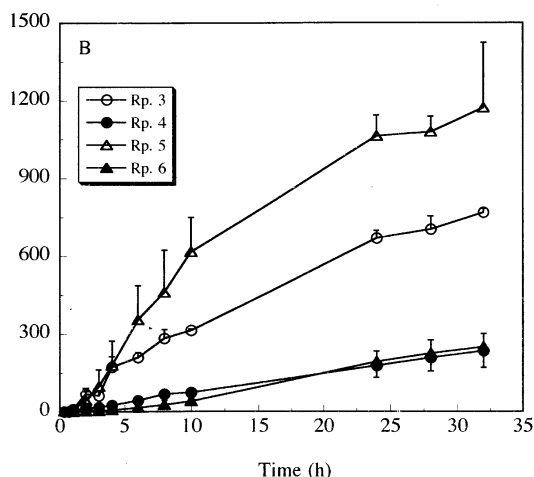
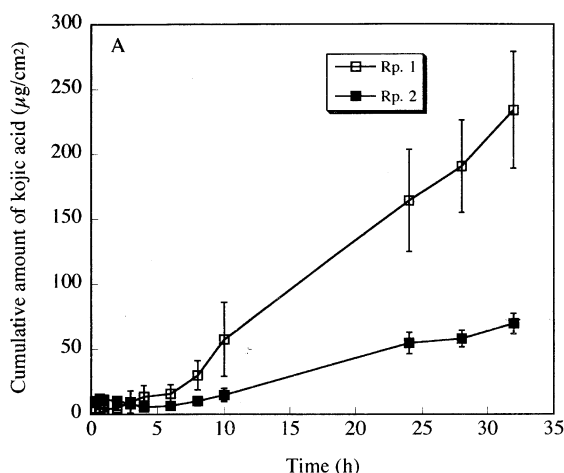


Fig. 2 Penetration profiles of kojic acid through hairless rat skin
Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3-4). A 0.25g/2.01 cm² of gel ointment was applied.

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.

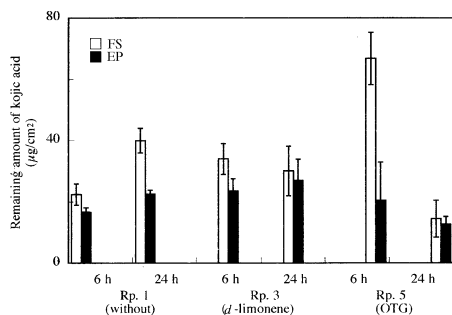


Fig. 3 Comparison of amount remaining in stratum corneum with that in full-thickness of skin
Application : Kojic acid ointment (n=4-6). FS, Full-thickness skin ; epidermis.

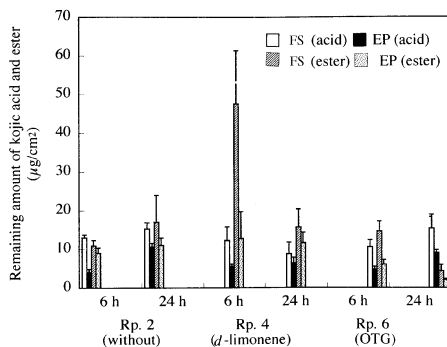


Fig. 4 Comparison of amount remaining in stratum corneum with that in full-thickness of skin
Application : Kojic acid ester ointment (n=3-4).

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

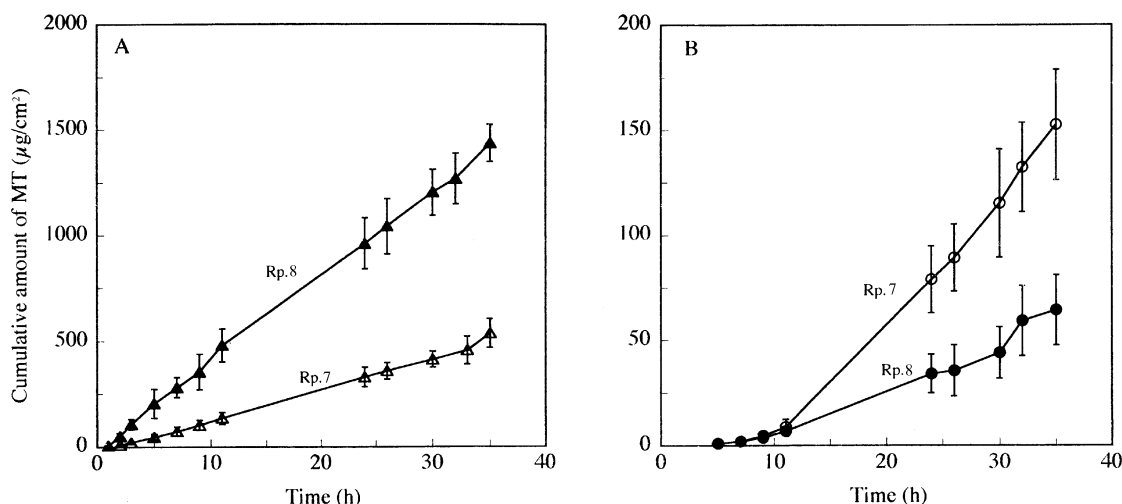


Fig. 5 Penetration profiles of melatonin through Wistar rat (A) and human skins (B)
Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3-4). A 0.1 g/0.785 cm² of gel ointment was applied.

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

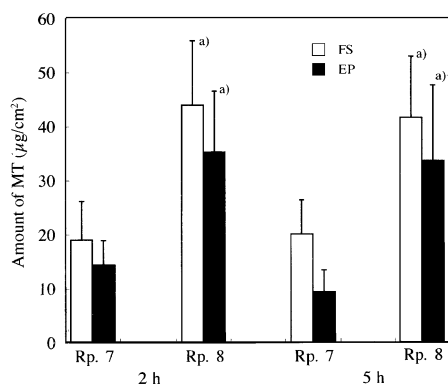


Fig. 6 Amount of melatonin remaining in rat skin
Each bar represents the mean $\pm$ S.D. (n=4).
a) $p < 0.05$ compared with Rp. 7.

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.

HGF による皮膚の再生促進と老化防止の基礎的研究

大阪大学医学部 バイオメディカル教育研究センター 腫瘍生化学研究部

松 本 邦 夫

Hepatocyte growth factor (HGF), originally discovered and identified as a powerful mitogen for hepatocytes, has mitogenic, motogenic, and anti-apoptotic activities for a variety of cells. HGF has organotrophic roles for regeneration of the liver, kidney, lung, etc. In skin tissues, we previously showed that HGF has mitogenic and motogenic activities for normal human epidermal keratinocytes and melanocytes. We here studied a mechanism of epidermal wound healing by HGF. HGF is produced by normal human skin fibroblasts and HGF production is up-regulated by interleukin-1, platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- α , and prostaglandins. Using in vitro epidermal wound healing model, we found that HGF but not PDGF stimulated healing of cultured keratinocyte sheet. Importantly, addition of the conditioned medium of PDGF-treated fibroblasts but not non-treated fibroblasts stimulated in vitro epidermal wound healing, indicating that PDGF-treated fibroblasts produce a soluble factor(s) which stimulates epidermal wound healing. The fibroblast-derived soluble factor was identified as HGF. Since PDGF is secreted from activated platelets in wounded skin tissues, the results implicate the presence of a paracrine cascade for epidermal wound healing: PDGF secreted from platelets activates HGF gene expression in dermal fibroblasts, while fibroblast-derived HGF stimulates both migration and cell growth in epidermal keratinocytes, leading to rapid wound healing after skin injury. In addition, HGF can induce growth and migration of dermal endothelial cells, which are essentially involved in wound healing as well. We recently found that HGF potently prevents apoptotic cell death in many types of cells and has therapeutic effects on various fibrotic diseases such as liver cirrhosis, renal fibrosis, and lung fibrosis. Taken together, HGF may well become therapeutic tool for treatment of skin injury and fibrotic skin diseases.

1 緒 言

再生現象は古くから多くの発生物学者の関心を集めてきた。ヒトを含め哺乳類においても組織・臓器は活発な再生能を有しており、とりわけ肝臓は旺盛な再生力をもつことが古くから知られている。例えば生体肝移植によって移植された 400g の肝臓は 1 カ月後には約 1kg にまで再生する。HGF はわれわれによって 1984 年に初代培養肝細胞に対する増殖因子として発見され、1989 年分子クローニングにより全構造が解明された。HGF は長らく実体の不明であった肝再生因子の本体であり、さらに現在では、HGF はさまざまな細胞を標的とし、多様な生理活性を有する代表的な増殖因

子の 1 つとなった^{1, 2)}。HGF のもつ増殖促進、細胞運動性促進、形態形成促進活性はいずれも機能的な細胞社会の構築には必須の生物活性であり、今や HGF は器官再生や器官形成過程において組織化を担う実行分子であることが明らかになった。一方、われわれはリコンビナント HGF を実験動物に投与する実験から、HGF が肝臓のみならず腎臓や肺の再生を強力に促進することを明らかにし、HGF の臨床応用への可能性を示した。さらに最近では根本的治療法の確立されていない難治性臓器疾患に対し、HGF がその発症を防止するのみならず、積極的に組織の再構築を促し機能改善をもたらすことを見出した。

ところで私達は HGF がヒト正常皮膚組織より分離した正常ケラチノサイトやメラノサイトに対する強力な増殖促進因子であること、また HGF が正常ケラチノサイトの遊走を促進することを報告した^{3, 4)}。この結果は HGF が皮膚組織においても創傷治癒促進、再生促進機能を担う重要な因子である可能性を示唆している。また HGF は脂



Roles of HGF in Wound Healing and Prevention of Skin Aging

Kunio Matsumoto

Division of Biochemistry,
Biomedical Research Center,
Osaka University Medical School

質代謝を改善する作用や育毛促進作用を有している。本研究においては HGF による皮膚の再生促進、発毛促進、老化防止を目指し、皮膚組織を標的とした in vivo、in vitro における HGF の生理活性を解明することを目的としている。

2 実験

2.1 ヒト正常皮膚由来ケラチノサイト、線維芽細胞ならびに血管内皮細胞の培養

ヒト正常皮膚よりデイスパーゼ処理によって表皮を分離し、さらにトリプシン処理によってケラチノサイトを分散させた。高アミノ酸 MCDB153 培地にてケラチノサイトを培養し、初代培養後 2 回継代培養したものを実験に用いた^{5, 6)}。一方、皮膚組織を 10% FCS を含む DMEM 培地にて組織培養し、組織片より増殖する線維芽細胞を継代培養した。皮膚微小血管内皮細胞は岩城硝子社より購入、付属プロトコールに従って培養した。

2.2 ヒト正常線維芽細胞における HGF 発現の解析

線維芽細胞を 48 well plate にて 24 時間培養後、1% FCS を含む DMEM 培地に交換し、増殖因子、サイトカインを添加後 24 時間培養した。培養上清 (conditioned medium) を回収し、培養上清中の HGF 量を酵素抗体法 (ELISA) によって定量した⁷⁾。また、線維芽細胞における HGF の発現を Western blotting ならびに Northern blotting 法によっても解析した。

2.3 ケラチノサイトの in vitro 創傷治癒解析

ケラチノサイトを 12well plate にコンフルエントになるまで培養後 10% FCS を含む DMEM 培地に交換し 24 時間培養した。直径 7mm の角膜移植用の円形メスを用いて培養ケラチノサイトシートに創傷処理を施した。ケラチノサイトを 48 時間培養し、創傷位置からの修復された長さを指標にして創傷治癒を評価した。

2.4 HGF の血管内皮細胞に対する増殖・運動能促進効果の検討

皮膚微小血管内皮細胞を 24well plate 上、またはコラーゲンゲル・チャンパーにて 24 時間培養後、1% FCS を含む DMEM 培地に交換し、増殖因子を添加して 72 時間後の細胞数ならびに遊走細胞数を測定した。

2.5 表皮で HGF を高産生するトランスジェニックマウスの作製とその表現型の解析

ケラチン・プロモーター下に HGF cDNA を繋いだ construct をマウス受精卵に顕微注入し、表皮特異的に HGF を高産生するトランスジェニック (Tg) マウスを作

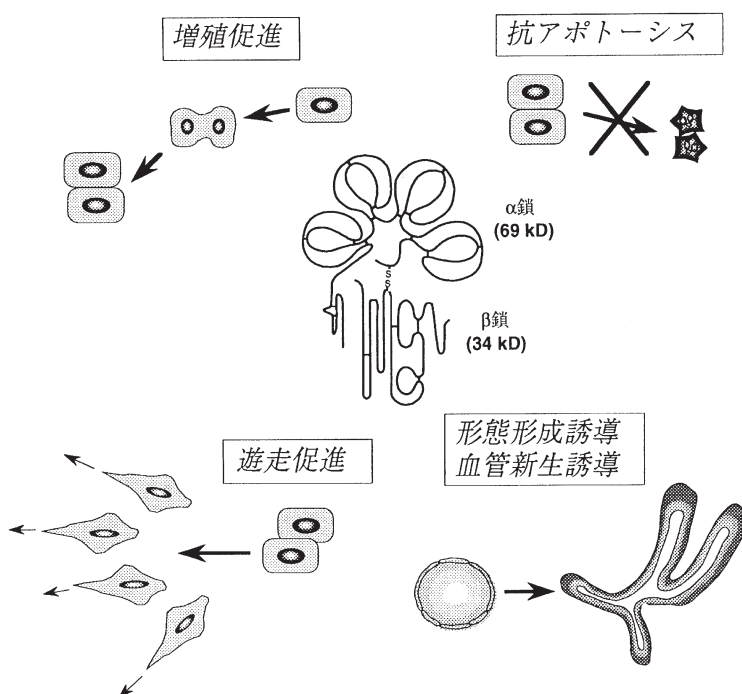


図1 HGFの構造と代表的な生活活性。

製し、その皮膚組織を組織学的に調べた。

3 結果

3.1 ヒト正常線維芽細胞における HGF 産生

ヒト線維芽細胞における HGF の発現調節因子を調べるため、線維芽細胞の培養系に各種因子を添加し、24 時間後の HGF 産生量を ELISA により定量した (図 2)。その結果、IL-1 α (interleukin-1 α)、IL-1 β 、PDGF (platelet-derived growth factor)、bFGF (basic fibroblast growth factor)、TGF- α (transforming growth factor- α)、PGE₁ (prostaglandin E₁)、PGE₂ など複数の因子が HGF の産生を促進する positive regulator であることが明らかになった^{7~9)}。これら複数の因子の中で、とりわけ PDGF は血小板中に存在し、皮膚の創傷治癒に関与することが予想された。そこで、今回 PDGF による皮膚線維芽細胞の HGF 発現誘導に注目し解析を進めた。

3.2 PDGF による HGF 発現誘導

皮膚線維芽細胞の培養系に PDGF (PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB) を添加すると濃度依存的に HGF 産生を強く促進した (図 2)。PDGF-

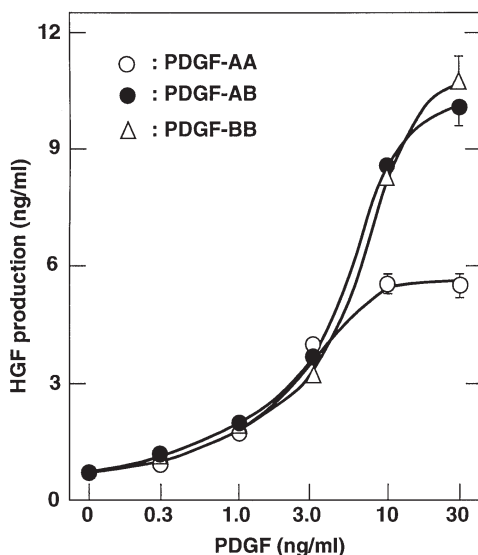


図2 PDGF によるヒト皮膚線維芽細胞の HGF 産生促進作用。

AB ならびに PDGF-BB はほぼ同等の HGF 産生促進活性を有し、30ng/mL の濃度で HGF 産生を約 10 倍促進した。また皮膚線維芽細胞の培養上清を回収し、Western blotting 法によって HGF 蛋白質の発現を調べたところ (図 3)、線維芽細胞は 85kDa の native type HGF を産生・分泌しており、PDGF ならびに IL-1 β は native type HGF の産生を著しく誘導することが明らかになった。さらに、PDGF による HGF 産生誘導が HGF 遺伝子の発現誘導を介したものであるか調べるため、線維芽細胞より RNA を調製し、Northern hybridization によって HGF mRNA の発現を調べた (図 4)。その結果、PDGF-AA、PDGF-BB、ならびに IL-1 β は HGF mRNA の発現を強く誘導し、HGF 蛋白質の産生促進活性と同様に、PDGF-BB は PDGF-AA よりも強い HGF 発現誘導活性をもっていた。したがって、PDGF は HGF 遺伝子の転写レベルでの活性化を介して HGF の産生・分泌を促進しているものと考えられる。

3.3 TGF- β 1 ならびにグルココルチコイドによる HGF 産生抑制

上記のように PDGF を含む複数の因子が HGF

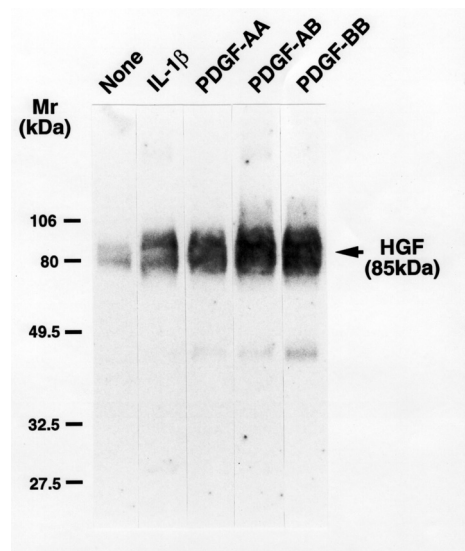


図3 PDGF によるヒト皮膚線維芽細胞の HGF 産生促進の Western blotting による解析。

の positive regulator として作用するのに対して、TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) なら

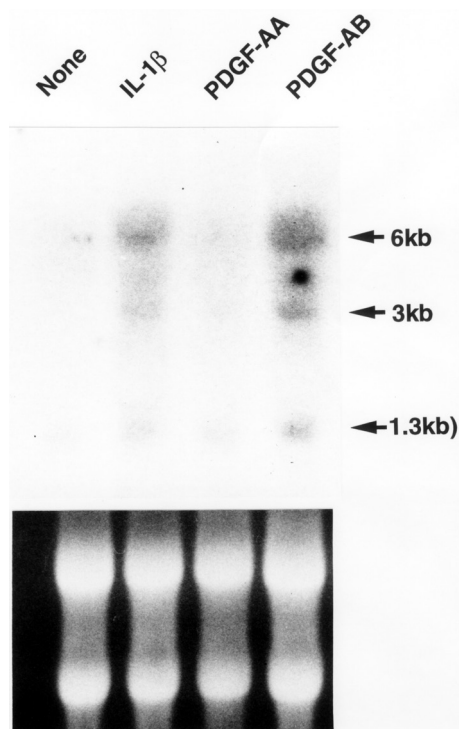


図4 PDGF ならびに IL-1 β によるヒト皮膚線維芽細胞における HGF mRNA 発現誘導。

びにグルコルチコイドは HGF の産生を抑制する negative regulator であることがわかった¹⁰⁾。皮膚線維芽細胞の培養系に PDGF を添加すると HGF 産生は促進されるが、このとき PDGF 存在下に TGF- β 1 あるいはグルコルチコイドと同様の活性をもつ dexamethasone を添加したところ、TGF- β 1 ならびに dexamethasone は PDGF によって促進される HGF 産生を濃度依存的に抑制した(図5)。とりわけ TGF- β 1 の抑制活性は強く、5ng/mL の濃度において PDGF の HGF 産生促進活性を約 90% 阻害した。したがって TGF- β 1 ならびにグルコルチコイドは HGF 産生に対する negative regulator といえる。

3.4 PDGF による HGF 産生誘導を介した in vitro 創傷治癒促進

PDGF は血小板中に存在し、創傷に伴い血小板から分泌され治癒過程に関与すると予想される。そこで培養ケラチノサイトのシートに創傷処理を施し、その治癒に対する HGF ならびに PDGF の作用を調べた(図6)。培養ケラチノサイトシートに創傷処理を施した後 48 時間培養すると、創傷

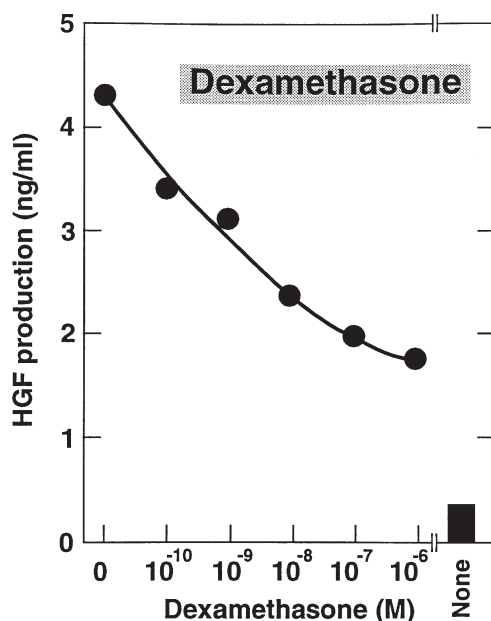
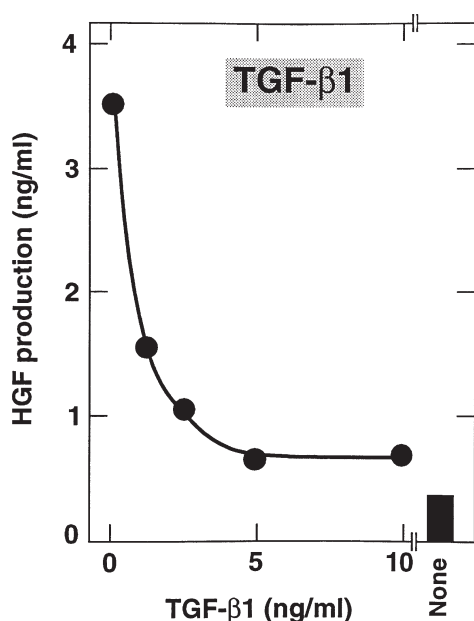


図5 ヒト皮膚線維芽細胞の HGF 産生に対する TGF- β 1 ならびに dexamethasone の濃度依存的抑制作用。

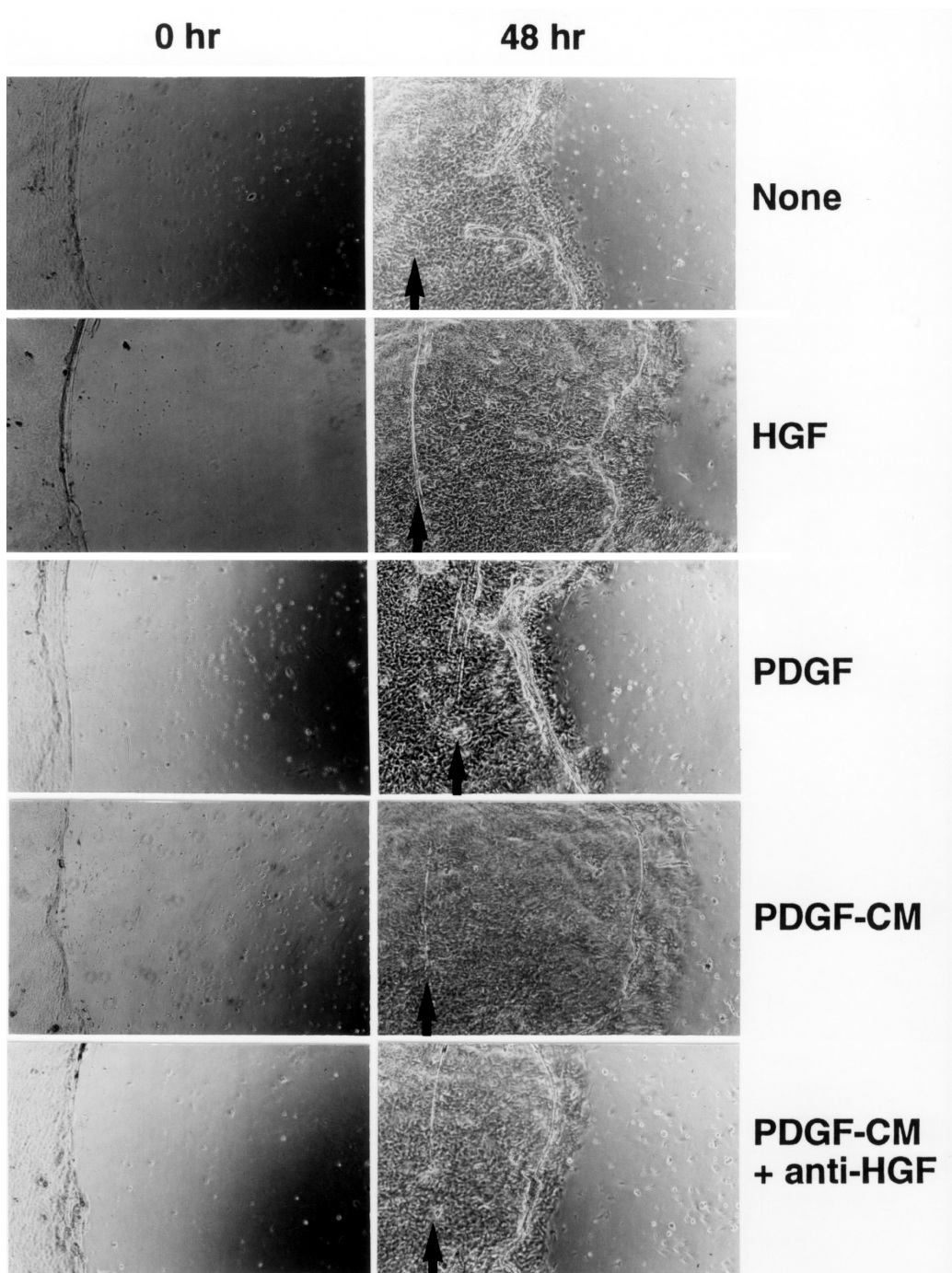


図6 ヒト正常皮膚ケラチノサイトの in vitro 創傷治癒に対する HGF、PDGF、ならびにヒト皮膚線維芽細胞由来培養上清 (CM) の作用。HGF ならびに PDGF で処理した線維芽細胞由来培養上清 (PDGF-CM) は培養ケラチノサイトの治癒を促進する。また、PDGF で処理した線維芽細胞由来培養上清 (PDGF-CM) の創傷治癒促進活性は抗 HGF によって中和された。

部先端よりケラチノサイトシートの伸展が認められる。一方、HGF 存在下に同様の処理を行い培養したところ、HGF は創傷部の修復を強く促進した。これに対して、PDGF は培養ケラチノサイトの修復には無効であった。PDGF は主に線維芽細胞や血管平滑筋細胞など間質細胞に作用し、上皮系細胞に対して生物活性を示さないことが知られており、ケラチノサイトは PDGF レセプターを発現していないものと考えられる。一方、私達は既に HGF がケラチノサイトの増殖ならびに遊走を強く促進することを報告しており、HGF はケラチノサイトの増殖ならびに遊走を促進することによって培養ケラチノサイトの修復を促進したものと考えられる。

ところで PDGF はケラチノサイトに対し直接生物活性を示さないものの間質線維芽細胞に対して強力な HGF 産生誘導因子として作用することから、PDGF は線維芽細胞における HGF 産生誘導を介して表皮の創傷治癒に関与する可能性が示唆された。そこで、次に皮膚線維芽細胞を PDGF の存在下ならびに非存在下で 24 時間培養し、その培養上清をケラチノサイトシートの培養系に添加し、修復に対する影響を調べた。その結果、無処理の線維芽細胞の培養上清はケラチノサイトシートの修復をわずかに促進した程度であったが、PDGF 処理を行った線維芽細胞の培養上清を添加したところ、ケラチノサイトシートの修復は強く促進された。この結果は PDGF 存在下で培養した皮膚線維芽細胞は表皮の創傷治癒を促進する液性因子を産生・分泌していることを示唆している。そこで、線維芽細胞由来の表皮創傷治癒促進因子が HGF ではないかと推定し、HGF に対する抗体存在下にて PDGF 処理線維芽細胞由来培養上清の作用を調べたところ、培養上清の表皮創傷治癒促進活性は HGF に対する抗体によってほぼ完全に阻害された。この結果は PDGF によって刺激された皮膚線維芽細胞が産生する表皮修復因子の実体は HGF であることを示している。

3.5 HGF による皮膚微小血管内皮細胞の増殖・遊走能促進効果

上述の様に HGF はケラチノサイトに対して強力にその増殖能や遊走性を亢進させるが、皮膚組織において HGF のレセプターである c-Met は血管内皮細胞でも発現が認められ、HGF の標的細胞となることが考えられる。そこで皮膚微小血管より単離した内皮細胞を用いて HGF の効果を検討した。まず増殖に及ぼす影響を調べたところ、HGF は著しい促進活性を示し、その効果は血管内皮細胞の強力な増殖因子である bFGF に勝るとも劣らず、VEGF (vascular endothelial growth factor) より有意に強かった (図 7 A)。またコラーゲンゲルへの浸潤能を指標に検討したところ、HGF は血管内皮細胞の遊走性を bFGF や VEGF よりも顕著に促進した (図 7 B)。

3.6 HGF の過剰発現が皮膚組織の発生・形成に及ぼす影響

ケラチノサイトに対する HGF の増殖促進因子ならびに創傷治癒促進因子としての機能を in vivo において確認するため、表皮特異的に HGF を高産生する Tg マウスを作製し、その皮膚組織構築に及ぼす影響を検討した。3 系統の Tg マウスを得ることに成功したが、これらのマウスの表皮は正常に形成され、過剰増殖等の組織秩序の乱れは全く認められなかった。しかし興味深いことにこれらの Tg マウスでは全身性に (耳や唇、鼻、尾

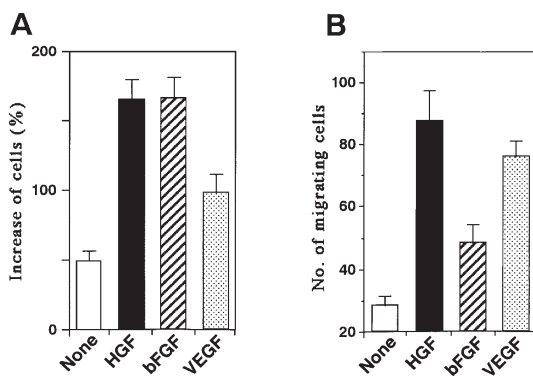


図7 HGF の皮膚微小血管内皮細胞に対する増殖 (A) ならびに (B) 促進効果。

などにも) 著しい色素の沈着が認められ(図8)、組織学的には異所的かつ過剰なメラノサイトの存在が観察された。このことは表皮で産生されたHGFが過剰なメラノサイトの増殖または移動・遊走をもたらした結果と考えられる。

4 考 察

4.1 PDGF-HGF ループを介した皮膚創傷治癒機構

PDGF ならびに HGF などの増殖因子は細胞増



図8 表皮特異的に HGF を高産生するマウスの作出とその表現形質。1 番左が野生型で他の3匹は HGF トランスジェニックマウスである。

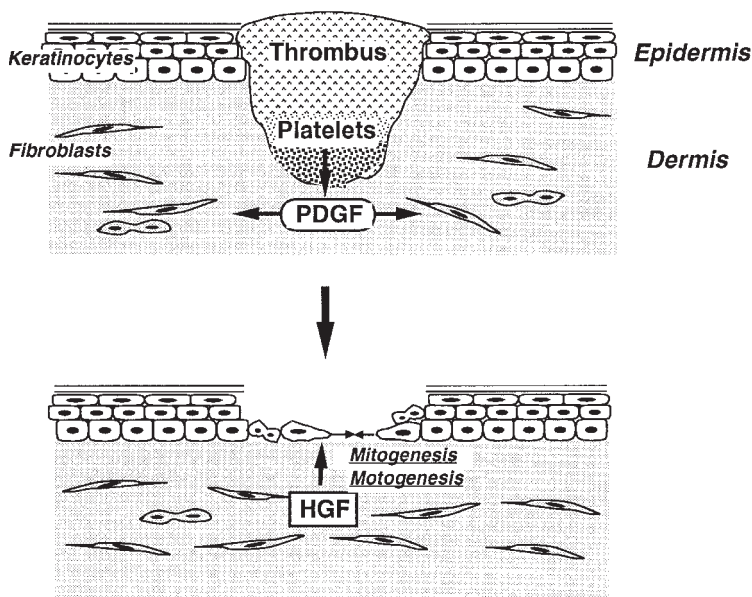


図9 HGF-PDGF ループ機構を介した皮膚創傷治癒機構。血小板由来するPDGFは間質線維芽細胞の増殖や促進を促し、真皮組織の修復を促す一方、間質線維芽細胞におけるHGFの産生を誘導する。このHGFは表皮ケラチノサイトの遊走ならびに増殖を促し、その結果、表皮の修復を促進している。

殖促進、細胞遊走促進活性を介して皮膚の創傷治癒促進に関与することが予想される。今回の研究から明らかになったPDGF-HGFループを介した皮膚創傷治癒機構を図9に示す。皮膚の創傷に伴い血小板が活性化され、血小板からは創傷部における血餅の形成を促すプロテアーゼに加えPDGFが分泌される。血小板由来するPDGFは表皮ケラチノサイトには無効であるが、間質線維芽細胞の増殖や遊走を促し、真皮組織の修復を促すと同時に間質におけるHGFの発現を強力に促す。一方、間質線維芽細胞由来するHGFは表皮ケラチノサイトに作用し、ケラチノサイトの遊走ならびに増殖を促し、その結果表皮の修復を促進していると考えられる。すなわち、PDGF-HGFループは皮膚の創傷治癒促進を支える重要な細胞間ネットワークとして機能しているものと思われる。

4.2 上皮-間葉(間質)相互作用と組織再生

腎臓、肺、肝臓、消化器官などを含む多くの臓器・組織の形成は上皮-間葉相互作用と呼ばれる組織間相互作用に依存することが知られている。HGF

は発生過程においては間葉に由来する因子として肝臓、腎臓、肺、消化管など様々な臓器における上皮系細胞(肝細胞、腎尿細管細胞、肺気管支上皮細胞、胃粘膜上皮細胞など)の増殖、遊走形態形成(例えば管腔形成など)を促進し、これら臓器の形成を担っている^{1), 2), 11)}。一方、成体においても様々な臓器の傷害にともない、HGFの発現は間葉系細胞(間質細胞)で高まり、上皮組織の再生を駆動している。皮膚はその発生学的起源からケラチノサイトやメラノサイトなど上皮系細胞によって構成される表皮と線維芽細胞や血管系細胞などによって構成される真皮からなる。今回の実験結果よりHGF

は皮膚微小血管の新生を促す因子であることが示唆され、表皮組織の再生に加え、皮膚血管新生促進を介して皮膚の創傷治癒を促していることが予想される。さらに HGF は毛根の発育をも促進することが知られている。皮膚組織における表皮-真皮相互作用は皮膚組織の再生・形成を支える重要な相互作用であり、HGF は主に真皮に由来する因子として皮膚組織の再生・維持を支える因子である。

4.3 HGF の抗線維化、抗アポトーシス作用

最近、私達は HGF が *in vivo* において肝硬変、慢性腎不全、肺線維症といった繊維性疾患に対して発症防止、治癒改善作用を有することを報告した¹²⁻¹⁴⁾。HGF は組織の線維化を引き起こす TGF- β 1 の発現を抑制するとともに繊維性組織の融解、上皮組織の再構築を促す結果、これら繊維性疾患に対して強力な治癒改善作用を有している。これら慢性繊維性疾患はいずれも難治性疾患として知られ、現在でも根本的治療法は確立されておらず、HGF は根本的治療を可能にする有効な薬剤となろう。さらに、私達は HGF が劇症肝炎に代表される大量肝細胞死をほぼ完全にブロックすることも報告している¹⁵⁾。また HGF の抗アポトーシス作用は肝細胞に限らず、尿細管上皮細胞、血管内皮細胞、神経細胞にも及んでいる^{13, 16, 17)}。

皮膚疾患においても創傷後の斑痕、慢性皮膚疾患に伴う線維化に対して有効な治療法は確立されていない。皮膚組織の線維化も他の組織と同様に TGF- β 1 の過剰発現によって引き起こされることが知られており、HGF は皮膚の線維化をブロックする薬剤となることが予想される。また、紫外線・薬剤により表皮ケラチノサイト、メラノサイトなどのアポトーシスが引き起こされるが、HGF は表皮においても抗アポトーシス作用を発揮することが期待される。すなわち、HGF は皮膚においても皮膚の創傷治癒促進剤としての作用はもとより抗線維化、抗アポトーシス活性、毛根の発育促進、など複数の生理活性を介して皮膚の恒常性維

持、老化防止に機能することが期待される。

引用論文

- 1) K. Matsumoto and T. Nakamura (1997) Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 639-644.
- 2) K. Matsumoto and T. Nakamura (1997) HGF: its organotrophic role and therapeutic potential. "Plasminogen-Related Growth Factors" (ed. E. Gherardi), Jhon Wiley & Sons, pp. 198-214.
- 3) K. Matsumoto, K. Hashimoto, K. Yoshikawa, and T. Nakamura (1991) Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor. *Exp. Cell Res.*, 196, 114-120.
- 4) K. Matsumoto, H. Tajima, and T. Nakamura (1991) Hepatocyte growth factor is a potent stimulator of human melanocyte DNA synthesis and growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176, 45-51.
- 5) K. Matsumoto, K. Hashimoto, M. Hashiro, H. Yoshimasa, and K. Yoshikawa (1990) Modulation of growth and differentiation in normal human keratinocytes by transforming growth factor- β . *J. Cell. Physiol.* 145, 95-101.
- 6) K. Matsumoto, Y. Azuma, M. Kiyoki, H. Okumura, K. Hashimoto, and K. Yoshikawa (1991) Involvement of endogenously produced 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the growth and differentiation of human keratinocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1092, 311-318.
- 7) T. Nakamura, K. Matsumoto, A. Kiritoshi, Y. Tano and T. Nakamura (1997) Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: In vitro analysis of tumor-stromal interaction. *Cancer Res.* 57, 3305-3313
- 8) K. Matsumoto, H. Okazaki, and T. Nakamura

- (1992) Up-regulation of hepatocyte growth factor mRNA by interleukin-1 in human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 188, 235-243.
- 9) K. Matsumoto, H. Okazaki, and T. Nakamura. (1995) Novel function of prostaglandins as inducers of gene expression of HGF and putative mediators of tissue regeneration. *J. Biochem.*, 117, 458-464.
- 10) K. Matsumoto, H. Tajima, H. Okazaki, and T. Nakamura (1992) Negative regulation of hepatocyte growth factor gene expression in human lung fibroblasts and leukemic cells by transforming growth factor- β 1 and glucocorticoids. *J. Biol. Chem.*, 267, 24917-24920.
- 11) H. Ohmichi, U. Koshimizu, K. Matsumoto and T. Nakamura (1998) Hepatocyte growth factor (HGF) acts as a mesenchymal- derived morphogenic factor during fetal lung development. *Development*, 125, 1315-1324.
- 12) Y. Matsuda, K. Matsumoto, A. Yamada, T. Ichida, H. Asakura, Y. Komoriyama, E. Nishiyama and T. Nakamura (1997) Prevential and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology*, 26, 81-89
- 13) S. Mizuno, T. Kurosawa, K. Matsumoto, M. Okamoto, M. Naiki, and T. Nakamura (1998) Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in mouse model of chronic renal disease. *J. Clin. Invest.*, 101, 1827-1834.
- 14) M. Yaekashiwa, S. Nakayama, K. Ohnuma, T. Sakai, T. Abe, K. Satoh, T. Nakamura, T. Takahashi and T. Nukiwa (1997) Both simultaneous and delayed administration of hepatocyte growth factor (HGF) repress the fibrotic changes in murine lung injury induced by bleomycin. *Am. J. Resp. & Crit. Care Med.* 156, 1937-1944.
- 15) K. Kosai, K. Matsumoto, S. Nagata, Y. Tsujimoto and T. Nakamura (1998) Hepatocyte growth factor abrogates Fas-induced lethal liver apoptosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 244, 683-690.
- 16) R. Morishita, S. Nakamura, Y. Nakamura, M. Aoki, A. Moriguchi, I. Kida, Y. Yo, K. Matsumoto, T. Nakamura and T. Ogihara (1997) Potential role of endothelium-specific growth factor hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes mellitus. *Diabetes*, 46, 138-142
- 17) T. Miyazawa, K. Matsumoto, H. Ohmichi, T. Yamashima, H. Chigasaki and T. Nakamura (1998) Protection of hippocampal neurons from ischemia-induced delayed neuronal death by hepatocyte growth factor: A novel neurotrophic factor. *J. Cerebral Blood Flow Metabolism.*, 18, 345-348.

ケラチノサイトの発現するエラスチンと皮膚の老化との関連について

防衛医科大学校 皮膚科

多 島 新 吾

Tropoelastin polypeptide and mRNA were detected in cultured normal human keratinocytes (NHKs) by RNase protection and Western blot assays. The expression of elastin by NHKs was found to reach a maximum level at the quiescent phase of keratinocyte growth. When NHKs were cultured on tropoelastin-coated dishes, their growth potential was greatly suppressed compared with other matrix protein-coated dishes. These results suggest that cultured NHKs can actively synthesize elastin and that keratinocyte tropoelastin may act as a growth-regulator for keratinocyte.

1 緒 言

エラスチンは血管、靱帯、皮膚、肺など、ほぼ全身の臓器、組織に分布されている。心臓、消化器、眼球、生殖器、泌尿器、耳鼻咽喉、乳腺、胸腺、リンパ節などの臓器の基本的機能である弾性の保持に関与していると思われる。

皮膚は表皮、真皮の2層から構成される。皮膚真皮では弾力線維を認め主に皮膚線維芽細胞において産生されていることが知られていることが分かっている。

表皮は外胚葉に由来する重層扁平上皮で、この上皮細胞は角化するのを特徴とする。表皮角化細胞は type IV、type V、type VII コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン等の様々なマトリックスタンパクを産生していることが既に報告されている。そこで、表皮角化細胞においてエラスチンの前駆体のトロポエラスチンの発現と表皮角化細胞の増殖との関連について研究した。

2 実 験

2.1 細胞培養法

ヒト表皮角化細胞 (NHKs) は無血清、低カルシウム (0.03mM)、表皮成長因子 (EGF)、インスリン、脳下垂体抽出液、ハイドロコルチゾンを含む培地 (K110type II) で、37℃、5 % CO₂、95 % air の条件下で培養した。プレコンフレント (80 % of confluent) になったら 1 : 3 の割合で継体し、3 代目、4 代目の細胞を本実験で使用した。

ヒト皮膚線維芽細胞は 10 % 子牛血清を含む DMEM で培養した。

静止期を得るための浮遊培養は Dike と Farmer の方法に準じて行った⁽¹⁾。プレコンフルエント (80 % of confluent) になったヒト表皮角化細胞を 0.02 % EDTA を含む 0.25 % トリプシンで 37℃、5 分間インキュベートし、細胞を剥離し 1 mL 当たり 1.5×10^5 cells の密度で 1.3 % メチルセルロースを含む K110type II 培地中に浮遊させ 37℃ で 2 時間培養した (suspension-arrested)。また、ヒト表皮角化細胞を 2×10^5 cells の密度で 35mm シャーレに播き 37℃ で 6 時間、24 時間、72 時間 K110type II 培地中で培養した。6 時間後に細胞は petri dish の底にほとんど接着し (接着期)⁽²⁾、24 時間後には細胞は増殖していた (増殖期)。また、72 時間後には細胞はコンフレントになり分化 (角化) が始



Relation between epidermal elastin and skin aging

Shingo Tajima

Department of Dermatology,
National Defense Medical College

まっていた (density - arrested) ⁽³⁾。

細胞増殖に対する固相トロポエラスチンの影響を見るためにヒト表皮角化細胞を 4.0×10^4 cells の密度で、予め type I コラーゲン、type IV コラーゲン、ラミニン、フィブロメクチン、トロポエラスチンをそれぞれコートしておいた 35mm シャーレに播き ⁽⁴⁾、37℃、5 % CO₂、95 % air の条件下で K110 type II 中で培養した。そして、3 日目、5 日目に細胞数を測定した。細胞数の測定は次のようにして行った。シャーレ内の培地を除去し、PBS で 2 回洗浄した。シャーレ内に 0.02 % EDTA を含む 0.25 % トリプシンを加え 37℃、5 分間インキュベートし、位相差倒立顕微鏡で細胞が剥離しているのを確認した後、コールターカウンターで細胞数を測定した。

2. 2 Northern blot assay

2. 1 の方法で培養した NHKs から全 RNA を Chomczynski と Sacchi の方法 ⁽⁵⁾ に準じてグアニジンチオシアネートを用いて抽出し $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度に調製して使用するまで - 80℃ で保存した。10 μg の RNA を 1 M グリオキサールを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) で 50℃、1 時間処理して変性させた後、1 % アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写した。このフィルターを 50 % ホルムアミド、0.1 % filcoll 400、0.1 % polyvinylpyrrolidone、0.1 % bovine serum albumin、0.1 % SDS、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tRNA、5 $\times$ SSC を含む溶液で 42℃、24 時間プレハイブリダイズした後、32p で標識したプローブで 42℃、24 時間ハイブリダイズした。フィルターを 2 $\times$ SSC/0.1 % SDS を含む溶液で 15 分間室温で洗浄した後、0.1 $\times$ SSC/0.1 % SDS を含む溶液で 15 分間室温で洗浄した。mRNA の変動は、オートラジオグラフィーにより観察し、オートラジオグラムをデンストメーターにより定量化した。尚プローブは GAPDH (glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase) ⁽⁶⁾ 合成オリゴヌクレオチドを 5 末端ラベル法を用いて [γ - ³²P] dATP で標識したものをを用いた。

2. 3 Ribonuclease protection assay (RNase protection assay)

2. 1 の方法で培養した NHKs から全 RNA を Chomczynski と Sacchi の方法に準じてグアニジンチオシアネートを用いて抽出し $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ の濃度になるように調製して使用するまで - 80℃ で保存した。エラスチンの N 末端領域を含むヒトのエラスチン cDNA (EcoR I / Sac I 424 bp) ⁽⁷⁾ を pGEM32Zf (-) vector に組み込み、T7 RNA polymerase を用いて鋳型の配列から anti-senseRNA プローブを転写し、このプローブを [α - ³²P] UTP (16 TBq/mmol) で標識した。そして、50 μg の RNA とこのプローブを 80 % ホルムアミド、40 mM Piperrazinediethanesulphonic acid (pH 6.4)、400 mM 酢酸ナトリウム (pH 6.4)、1 mM EDTA を含む溶液で 42℃、24 時間ハイブリダイズした後、RNase A (10 units/mL)、RNase A (10 units/mL)、RNase T1 (200 units/mL) を用いて 37℃、30 分間酵素消化した。そして酵素消化されなかった RNA は 8 M 尿素を含む 6 % アクリルアミドゲルで電気泳動した後、X 線フィルムに転写後 24 時間から 48 時間、- 80℃ に放置 ⁽⁸⁾ し、オートラジオグラフィーにより観察し、デシトメーターにより定量化した。

2. 4 Western blot assay

ヒト表皮角化細胞がコンフレントになったときの培地を 200 mL プールした。この培地をタンパク分解酵素阻害剤 (1 mM EDTA、1 mM NEM、1 mM PMSF) 存在下、硫酸アンモニウム (176 mg/mL) を加え 4℃ で攪拌しながら、1 晩放置し、タンパクを塩析した ⁽⁹⁾。その後、4℃、10,000 r.p.m 20 分間遠心し上清を除去し、沈殿物を 2 M グアニジン塩酸を含む、50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液に溶解し、4℃、10,000 r.p.m 20 分間遠心し上清を、2 M グアニジン塩酸を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液で予め平衡化しておいた 4 % アガロースカラムを用いてゲルろ過を行った ⁽¹⁰⁾。そして各フラクションを 3 本 1 組にしてまとめ、上記の

タンパク分解酵素阻害剤を含む0.1%酢酸で4℃、3日間透析した透析内液を凍結乾燥後、sample buffer (10mM Tris-HCl pH7.4, 1% SDS, 5% Glycerol, 0.01% BPB, 1mM DTT) に溶解し、各試料を100℃、2分間煮沸した後、SDS-PAGE グラデエントゲル (2~15%) で電気泳動し、ニトロセルロースフィルターに転写した⁽¹¹⁾。抗エラスチン抗体による発色は、ECLTM-ウエスタンブロッティング検出システムを用いて以下に行った。フィルターをT-TBS (50mM Tris-HCl pH8.0, 0.9% NaCl, 0.05% Tween20) 中で5分間洗浄後、5%スキムミルクを含むT-TBSで1時間ブロッキングした。T-TBS中で30分間洗浄後、5,000倍希釈のモノクローナル抗エラスチン抗体⁽¹²⁾で1時間反応させた。T-TBS中で30分間洗浄後、5,000倍希釈の抗マウスIgG抗体で1時間反応させた。T-TBS中で1時間洗浄後、ECL発光試薬と反応させ、X線フィルムにて観察した。

2.5 免疫染色

ヒト表皮角化細胞と皮膚線維芽細胞をガラスチ

ャンバースライドを用いて培養し、コンフルエントの状態になった後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、T-TBSで洗浄後、0.01%サポニンを含むT-TBSで5分間反応させた。1%ウシ血清アルブミンでブロッキング後、500倍希釈のモノクローナル抗エラスチン抗体で4℃で24時間反応させた。T-TBSで60分間洗浄後、500倍希釈のビオチン標識された抗マウスIgG抗体で30分間反応させた。T-TBSで洗浄後、ABC/AP kitを用いて反応させた後、倒立顕微鏡下で観察した。

3 結果

3.1 培養ヒト表皮角化細胞におけるトロポエラスチン遺伝子の発現

培養ヒト表皮角化細胞においてトロポエラスチン mRNA はノーザンブロット法では、含有量が少ないためか検出できなかった。しかし、RNase protection assay では、プローブに特異的なフラグメント (424bp) を、培養ヒト皮膚線維芽細胞に限らず、培養ヒト表皮角化細胞においても確認することができた (Fig. 1)。424bp のバンドをデシ

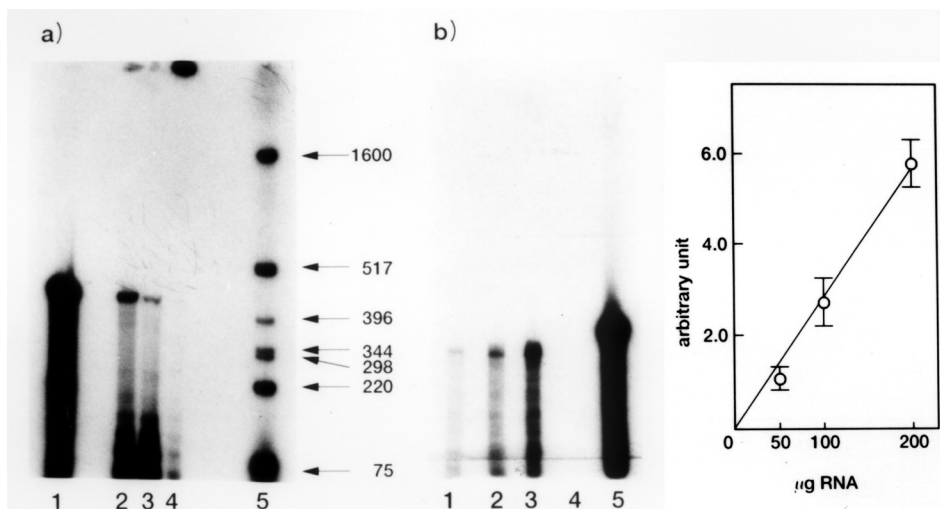


Figure 1 Tropoelastin mRNA is detected in cultured keratinocytes by RNase protection assays with a linear correlation between input sample RNA, and protected anti-sense probe.

Total RNA was isolated from cultured human keratinocytes of dermal fibroblasts. (a) RNase protection assays were performed without (lane 1) or with (lanes 2-4) RNase digestion, using dermal fibroblast RNA (1 µg per lane) (lane 2), keratinocyte RNA (50 µg per lane) (lane 1 and 3), or no sample RNA (lane 4). Molecular markers were Hinf I fragments of pBR322 DNA. (b) For quantitative assays, RNase protection assays were performed with a range of keratinocytes RNA (0-100 µg). Values are mean ± range from duplicate assays.

トメーターによって測定したところ培養ヒト表皮角化細胞のトロポエラスチン mRNA レベルは培養ヒト皮膚線維芽細胞のトロポエラスチン mRNA レベルの約 1/20 の量であった。また、予備実験としてヒト表皮角化細胞 RNA の量を 0～100 μ g の範囲で変化させたときプローブに特異的なフラグメントのデンシティーは RNA の量に比例して増加した。よってこれからの実験で使用する RNA の量を 50 μ g と決定した。

3.2 培養ヒト表皮角化細胞におけるエラスチンポリペプチドの発現

培養ヒト表皮角化細胞培養中のタンパクをゲルマトグラフィーで分画した。No.45～47 のフラクションに 68kDa の位置に抗エラスチン抗体に特異

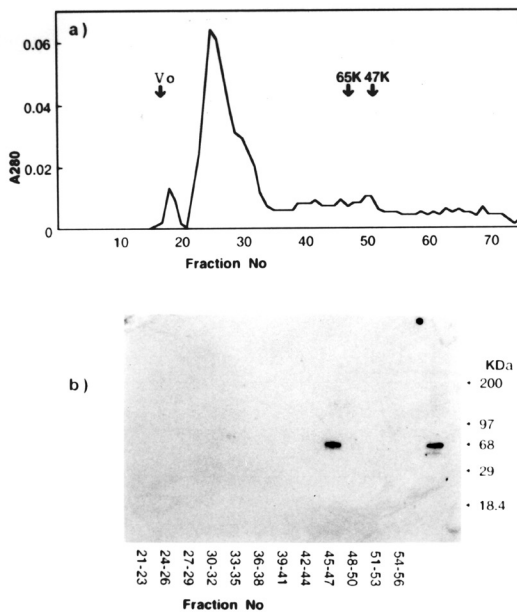


Figure 2 Tropoelastin polypeptide is detected in the medium of cultured keratinocytes.

(a) Conditioning media of cultured keratinocytes were pooled and the proteins were fractionated by gel chromatography equilibrated with 50mM Tris-HCl (pH7.5) containing 4M guanidine-HCl.

(b) Every three fractions were mixed and subjected to SDS-PAGE. Tropoelastin polypeptide was detected by western blot analysis using antibody. The right lane indicates tropoelastin secreted in the medium by cultured smooth muscle cells.

的なバンドを検出した。また他のフラクションではなにも検出されなかった (Fig. 2)。

また免疫染色において、ヒト皮膚線維芽細胞と同様にヒト表皮角化細胞において抗エラスチン抗体に対する陽性所見が得られた (Fig. 3)。

3.3 ヒト表皮角化細胞の細胞増殖とトロポエラスチンとの関連

50 μ g の RNA を使用した結果、プローブに特異的なフラグメントの発現は接着期、増殖期に比べて、細胞の分化誘導期のほうが発現量は多かった (Fig. 4)。

ヒト表皮角化細胞の増殖に対する固相エラスチ

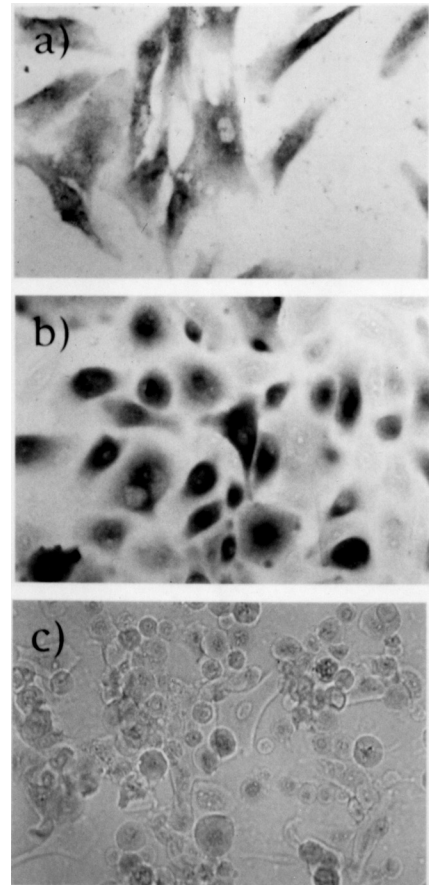


Figure 3 Cultured keratinocytes are immunostained with anti-elastin antibody.

Cultured skin fibroblasts (a) and NHKs (b and c) were fixed and stained with (a and b) or without (c) anti-elastin antibody at a 1 : 500 dilution. Scale bars, 40 μ m.

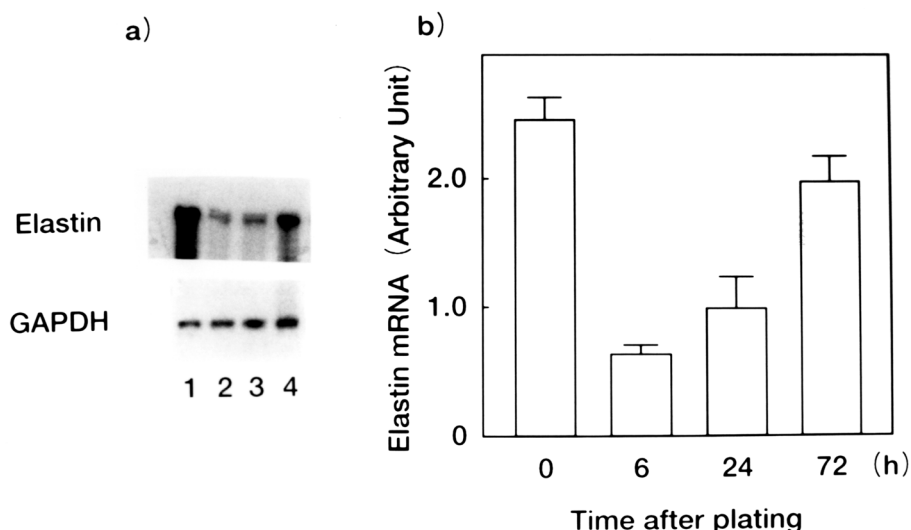


Figure 4 Tropoelastin expression is modulated during different phases of keratinocyte growth.

(a) Cells were trypsinized and suspended for 6h in 1.3% methylcellulose (designated as 0h) (lane 1; suspension-arrested phase) or plated at a density of 2×10^5 cells per 35mm-diameter petri dish and cultured for 6h (lane 2; adhesion phase) or (lane 3: proliferating phase) or 72h (lane 4; growth-arrested phase) in K110Type II. RNA was extracted from the cells at the end of the culture, then tropoelastin mRNA content was assayed by means of RNase protection analysis. GAPDH mRNA level was determined by northern blot analysis. (b) The level of tropoelastin mRNA was determined by scanning the autoradiograms, and normalized by GAPDH mRNA level. Values indicate densitometric percentage relative to the mRNA level at 0h and mean $\pm$ range from duplicate experiments.

の影響において、type I コラーゲン、type II コラーゲン、ラミニン、ファイブロネクチンをそれぞれコートしたシャーレにおいては3日目、5日目ともに、以前の報告通りコントロールのシャーレより細胞増殖を促進した。トロポエラスチンをコートしたシャーレにおいては前者のコートしたシャーレ及びコントロールのシャーレと比較して3日目、5日目ともに細胞増殖は抑えられていた (Fig. 5)。

4 考 察

今回の実験の結果で培養ヒト表皮角化細胞においてトロポエラスチンがmRNA、タンパク両レベルで発現されていることが分かった。表皮角化細胞ではコラーゲン、ラミニン、プロテオグリカン、フィブロネクチンといった多くのマトリックスタンパクを発現していることが既に報告されているので、このことはそれほど不自然なことではない。

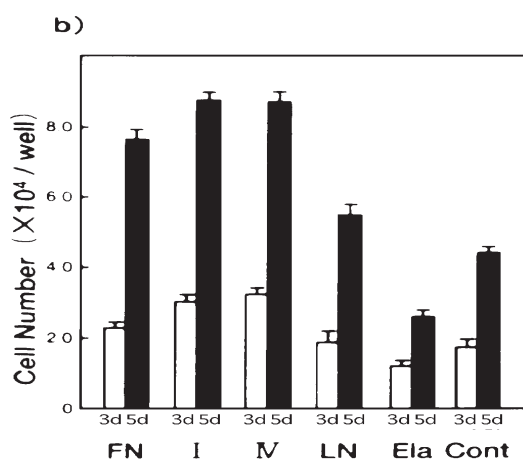


Figure 5 Effect of solid phase of tropoelastin on human keratinocytes proliferation.

NHKs were plated at a density of 4×10^4 cells per 35mm-diameter petri dish on fibronectin coated (FN), laminin-coated (LN), type I collagen-coated (I), type IV collagen-coated (IV), of tropoelastin-coated (Ela), or plane (Cont) dishes. Cells were grown in K110Type II for 3, 5 days. At the termination of culture, cell number was counted. Values are mean $\pm$ SD from triplicate experiments.

培養ヒト表皮角化細胞のトロポエラスチン mRNA レベルは培養ヒト皮膚線維芽細胞のトロポエラスチン mRNA レベルの 1/20 の量であった。今まで培養ヒト表皮角化細胞においてエラスチンが同定されなかったのは発現量があまりにも少なかったためだと考える。また、トロポエラスチンの発現は細胞増殖の状態に依存していて、固相トロポエラスチンが、ヒト表皮角化細胞の細胞増殖を調節していることが分かった。以上のことよりヒト表皮角化細胞のトロポエラスチンは細胞増殖に関連したいくつかの機能を持っていることが分かった。また、ヒト表皮角化細胞におけるトロポエラスチン発現は、静止期（分化期）において最も多くなった。このことは血管平滑筋細胞においてエラスチンは G₀ 期で発現されている⁽¹³⁾ という報告に一致しているように思える。よってヒト表皮角化細胞のトロポエラスチンの発現はヒト表皮角化細胞の分化（角化）に関係していることが推測された。

引用文献

- 1) Dike LE and Farmer SR: Cell adhesion induces expression of growth-associated genes in suspension-arrested fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6792-6796, 1988.
- 2) Woodley DT, Kimberly S, Wynn BA et al: Type IV collagen and fibronectin enhance human keratinocyte thymidine incorporation and spreading in the absence of soluble growth factor. *J. Invest. Dermatol.* 94, 139-143, 1990.
- 3) Tajima S and Tokimitu I: Regulation of BPAG2 (180 kDa) gene expression in spontaneously transformed murine keratinocytes. *J. Biochem. (Tokyo)* 118, 734-737, 1995.
- 4) Kubo N, Kan M, Isemura M et al: Effect of extracellular matrices on human keratinocyte adhesion and growth and on its secretion and deposition of fibronectin in culture. *J. Invest. Dermatol.* 88, 594-601, 1987.
- 5) Chomczynski P and Sacchi N: Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159, 1987.
- 6) Fort P, Marty L, Piechaczyk M et al: Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase mutigenic family. *Nucleic. Acids. Res.* 13, 1431-1442, 1985.
- 7) Azuma N, Izumi T, Tajima S et al: Expression type II collagen at the middle stages of chick embryonic and human fetal skin development. *J. Invest. Dermatol.* 102, 958-962, 1993.
- 8) Hayashi A, Suzuki T, Wachi et al: Minoxidil stimulate elastin expression in aortic smooth muscle cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 315, 137-141, 1994.
- 9) Tajima S and Pinnell SR: Collagen synthesis by human skin fibroblasts in culture. Studies of fibroblast explanted from papillary and reticular dermis. *J. Invest. Dermatol.* 77, 410-412, 1981.
- 10) Towbin H, Staechelin T and Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354, 1979.
- 11) Hayashi A, Wachi H and Tajima S: Presence of elastin-related 45-kDa fragment in culture medium: Specific cleavage product of tropoelastin in vascular smooth muscle cell culture. *Biochim. Biophys. Acta* 1244, 325-330, 1995.
- 12) Yamane Y, Yaoita H and Couchman JR: Basement membrane proteoglycans are of epithelial origin in rodent skin. *J. Invest. Dermatol.* 106, 531-537, 1996.
- 13) Wachi H, Seyama Y, Yamashita S et al: Cell cycle-dependent regulation of elastin gene in cultured chick vascular smooth muscle cell. *Biochem. J.* 309, 575-579, 1995.

ヒト毛乳頭細胞における androgen receptor, 5 α -reductase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase の発現

大阪大学 医学部皮膚科学教室

板 見 智

In order to know whether adrenal and gonadal weak androgens are utilized to form active androgens in human hair, we studied the expression of androgen receptor (AR), 5 α -reductase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) in cultured dermal papilla cells(DPCs) from various body sites. AR was expressed with the order being male axillary hair $\approx$ female axillary hair>Beard> occipital scalp hair. The expression of Type I 5 α -reductase is a ubiquitous property of DPCs. In DPCs from beard, a high level mRNA of type II 5 α -reductase was observed, which is in contrast to the undetectable level in DPCs from occipital scalp hair and axillary hair. Type II 17 β -HSD mRNA was strongly expressed in outer root sheath cells (ORSCs). DPCs except for male axillary hair, expressed no type II 17 β -HSD. On the other hand, type III 17 β -HSD mRNA was strongly expressed in beard and axillary DPCs, and was equally expressed in axillary DPCs from both sexes. ORSCs showed low level of the expression. mRNA Expression of type III 17 β -HSD in DPCs was not regulated by androgen in axillary DPCs. These results suggest that the sensitivity of hairs to androgen is partially controlled by the cell-site specific expression of AR, 5 α -reductase, and 17 β -HSD in DPCs.

1 緒 言

ヒトの毛組織は、主に外胚葉由来の上皮系毛包と中胚葉に由来する結合織性毛包により構成されている。毛包の下部では基底膜を境に未分化な毛母細胞と間葉系の毛乳頭細胞が合い接して存在しこれらの細胞間の相互作用により毛の発育分化がなされる。ヒトの毛の発育が男性ホルモンに影響を受けることはよく知られているが、その反応性は部位によって異なり、髭毛、胸毛は通常思春期以後の男性においてのみ軟毛より終毛への変化を認めるが、腋毛、恥毛では両性に認められるようになる。また、遺伝的に決められた特定の男性においては、男性型脱毛の発症にも関与する。これらの毛周期の変化が男性ホルモンが毛乳頭細胞に作用して生じることが明らかとなってきた¹⁻⁶⁾。これまでに髭、腋毛の毛乳頭細胞では後頭部の毛乳頭細胞に比べ男性ホルモン受容体は豊富に存在

しており、髭の毛乳頭細胞は後頭部の毛乳頭細胞に比べ5 α -reductaseの活性が数倍高く^{1, 5, 7)}、至適pHよりⅡ型の5 α -reductaseであり⁵⁾、男性の腋毛の毛乳頭細胞における5 α -reductaseは活性の低いⅠ型の5 α -reductaseであることが明らかになっている^{7, 8)}。

一方、女性においては思春期発来の数年前より恥毛や腋毛が成長してくる⁹⁾。副腎由来の男性ホルモンであるdehydroepiandrosterone (DHEA)、dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S)、androstenedione (Δ^4 -A)は思春期の数年前からすでに増加し始めている^{10, 11)}。これらのことは副腎由来の男性ホルモンが末梢組織において強力な男性ホルモンに変換されることを示唆している。弱い性ステロイドホルモンと強力な性ステロイドホルモンの相互変換作用を有する17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD)は、性ステロイドホルモンが働くための鍵となる酵素である¹²⁾。Ⅱ型の17 β -HSDはテストステロン(T)を Δ^4 -Aに不活化し、Ⅲ型の17 β -HSDは Δ^4 -AをTに活性化する¹³⁻¹⁵⁾。

そこでわれわれは、ヒト毛乳頭細胞における男性ホルモン作用メカニズムの性差や部位間差を知るために、男性ホルモン受容体、Ⅰ型、Ⅱ型の5



Expression of androgen receptor, 5 α -reductase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human dermal papilla cells

Satoshi Itami

Department of Dermatology,
Osaka University Medical School

α -reductase および II 型、III 型の 17 β -HSD の発現について比較した。

2 実験

2.1 毛乳頭細胞培養

毛乳頭細胞の採取と細胞培養はこれまでに記載されている方法で行った^{1, 16)}。皮膚標本は形成外科的に入手し、毛乳頭細胞は男性 17 歳から 47 歳、女性 18 歳から 40 歳の皮膚標本から単離した。髭、腋毛、後頭部毛の各々 5 サンプルを用いた。これらはダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に 10 % 子牛血清 (FCS) を加えた培地で 95 % O₂、5 % CO₂、37°C の条件下で培養した。サブコンフルエントになった時点で 2 % FCS を加えた DMEM 培地で 48 時間培養し全 RNA を抽出した。すべて 3 代から 6 代まで継代した細胞を用いた。外毛根梢細胞は髭の抜去毛包を用い、以前に記載されている方法で培養した^{4, 7)}。培養外毛根梢細胞の培地は MCDB153 に 0.4 μ g/mL hydrocortisone、5 μ g/mL insulin、50 μ g/mL ampicilin、6.1 μ g/mL

ethanolamine、14.1 μ g/mL phosphoethanolamine、5 ng/mL の表皮細胞成長因子 (EGF) と 0.1mM Ca²⁺を加えた KGM 培地で培養した。

2.2 RT-PCR 法

回収した細胞より全 RNA を acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform 法で抽出した。それぞれの総 RNA の 1 μ g を用いて 2.5 M random hexamer、5mM MgCl₂、50mM KCl、10mM Tris - HCl、pH8.3、1 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP)、1.0U/ μ L RNase inhibitor (Takara, Tokyo, Japan) と 2.5U/ μ L M-MLV reverse transcriptase (Gibco-BRL, MD) の条件で逆転写反応を行った。PCR は得られた cDNA 100 μ g を用い 0.5 μ M プライマー、2mM MgCl₂、50mM KCl、10mM Tris-HCl、pH8.3、0.025U/ μ L recombinant Taq DNA polymerase (Takara, Tokyo, Japan) の条件で行った。PCR のオリゴヌクレオチドプライマーは公表されている cDNA シークエンスに基づいたも

表1 オリゴヌクレオチド プライマー

		プライマー	位置	サイズ(bp)
I 5 α -R	Sense	5'-TTACCCGTTTCTGATGCGAG	333 -352	1024
	Anti-sense	5'-GTTCTCCACTTACACACAGC	1337 -1356	
II 5 α -R	Sense	5'-GGCCTCTTCTGCGTACATTA	280 -299	803
	Anti-sense	5'-CTAAGAAGCAACTGTCGCCA	1063 -1082	
AR	Sense	5'-GGTAAGGGAAGTAGGTGGAA	324 -343	998
	Anti-sense	5'-CCTTCTAGCCCTTTGGTGTA	1302 -1321	
II 17 β -HSD	Sense	5'-CAAATGGACATCACGAAGCCAGTGC	489-513	827
	Anti-sense	5'-CCGAGTTTCCCAGTTTCCCTTTCAT	1291-1315	
III 17 β -HSD	Sense	5'-TTCTGGGATAGCCCTGTTTCCTTGG	600-624	459
	Anti-sense	5'-TGGTCTGCTCCTCTGGTCCTCTTCA	1034-1058	
G3PDH	Sense	5'-CCCATCACCATCTTCCAG	250 -267	577
	Anti-sense	5'-CCTGCTTCACCACCTTCT	809 -826	

I 5 α -R, I型 5 α -reductase ; II 5 α -R, II型 5 α -reductase ; AR, 男性ホルモン受容体 ; II 17 β -HSD, II 型 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase ; III 17 β -HSD, III型 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase ; G3PDH, glyceralde-3-phosphate dehydrogenase

のを使用し、それを表1にまとめた。I型の5 α -reductaseは30サイクルで、II型の5 α -reductase及び男性ホルモン受容体は35サイクルで、II型、III型の17 β -HSDは38サイクルでPCRを行った。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)を内部コントロールとした。これらの増幅産物を2%アガロースゲル電気泳動で分析した。

3 結果

3.1 PCR増幅産物の同定

RT-PCR法で得られた男性ホルモン受容体、5

α -reductase、17 β -HSDのそれぞれの産物を特異的な制限酵素の切断パターンで確認した。図1に示すように切断されたサンプルはアガロースゲル電気泳動法により予測されるサイズと一致した。

3.2 男性ホルモン受容体、5 α -reductaseの発現

髭、後頭部毛、男女の腋毛の培養毛乳頭細胞で5 α -reductaseと男性ホルモン受容体のmRNA発現を比較した(図2)。男性ホルモン受容体は、男性腋毛=女性腋毛>髭>後頭部毛の毛乳頭細胞の

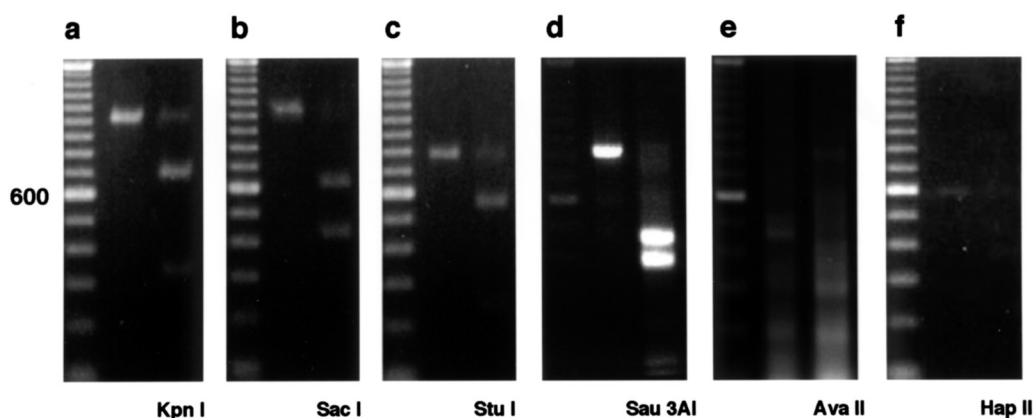


図1 PCR産物の制限酵素による同定

(a) 型5 α -reductase、(b) 型5 α -reductase、(c) 男性ホルモン受容体、(d) 型17 β -HSD、
(e) 型17 β -HSD、(f) G3PDH

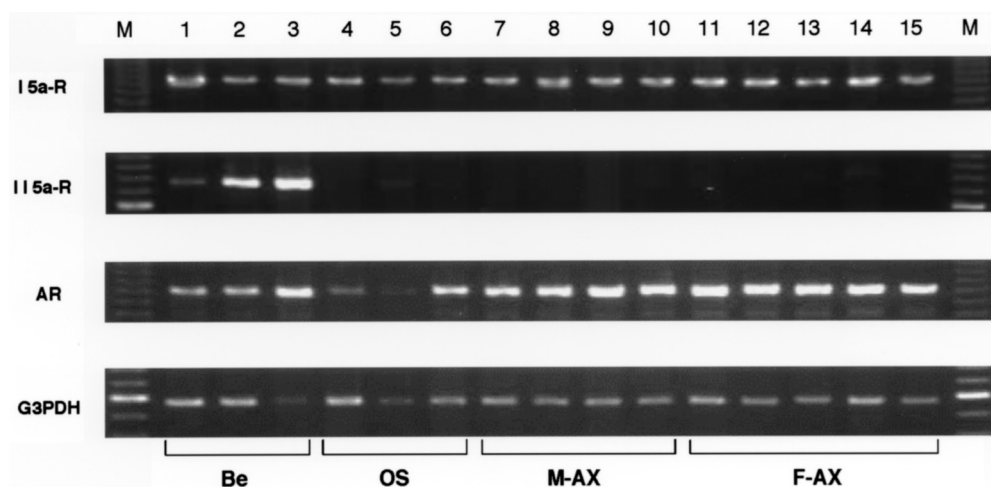


図2 身体各部の毛乳頭細胞における型5 α -reductase、型5 α -reductase、男性ホルモン受容体の発現
Be、髭； OS、後頭部毛； M-A、男性腋毛； F-AX、女性腋毛

順に強く発現していた。I型の5 α -reductaseはすべての毛乳頭細胞で発現を認めた。II型の5 α -reductaseは髭の毛乳頭細胞で強く発現していたが、腋毛と後頭部毛では発現していなかった。

3.3 17 β -HSDの発現

毛乳頭細胞や髭の外毛根鞘細胞における17 β -HSDの発現についても検討した。II型の17 β -HSDは外毛根鞘細胞で強く発現しており、毛乳頭細胞においては男性腋毛の一部で発現を認めたのみであった(図3)。一方、III型の17 β -HSDは髭及び男女の腋毛で強く発現しており、その発現に性差を認めなかった(図4)。III型の17 β -HSD

の発現は外毛根鞘細胞では弱く、身体各部位における外毛根鞘細胞でも発現に違いは認めなかった。III型の17 β -HSDの発現に対する男性ホルモンの影響についても検討した。細胞は10⁻⁹Mの合成男性ホルモンである methyltrienolone (R1881)とそれに抗男性ホルモン剤である10⁻⁶Mの cyproterone acetateを加えた培地で48時間培養し全RNAを抽出した。これらの処理によってもIII型の17 β -HSDのmRNAの発現は特に影響を受けなかった(図5)。

4 考 察

われわれは、髭、男女の腋毛、後頭部毛の培

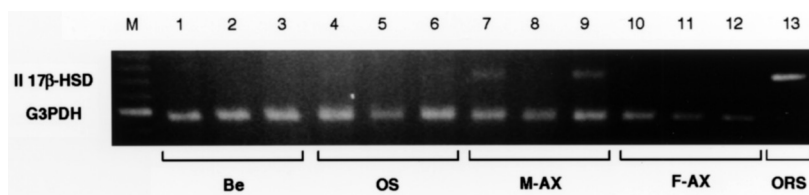


図3 身体各部の毛乳頭細胞と髭の外毛根鞘細胞における型17 β -HSDの発現
Be、髭； OS、後頭部毛； M-AX、男性腋毛； F-AX、女性腋毛； ORS、外毛根鞘細胞

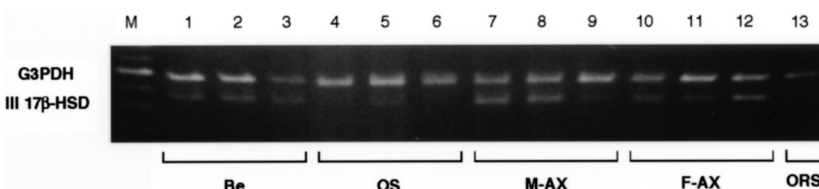


図4 身体各部の毛乳頭細胞と髭の外毛根鞘細胞における型17 β -HSDの発現
Be、髭； OS、後頭部毛； M-AX、男性腋毛； F-AX、女性腋毛； ORS、外毛根鞘細胞

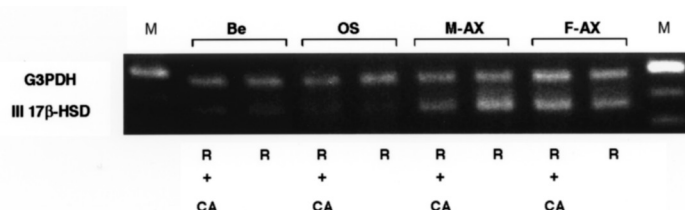


図5 身体各部の毛乳頭細胞における型17 β -HSDの発現に対する男性ホルモンの影響
Be、髭； OS、後頭部毛； M-AX、男性腋毛； F-AX、女性腋毛； R、10⁻⁹MR1881； R+CA、10⁻⁹MのR1881及び10⁻⁶Mのcyproterone acetate。

養毛乳頭細胞における男性ホルモン受容体、5 α -reductase、17 β -HSD mRNA の発現を検討した。髭の毛乳頭細胞は男性ホルモン受容体、5 α -reductase mRNA を発現しており、特にⅡ型の5 α -reductase の発現を強く認めた。これらの結果は我々がこれまで報告してきた髭の毛乳頭細胞における男性ホルモン受容体蛋白の発現や5 α -reductase 活性の結果と一致した^{1~7)}。また、腋毛の毛乳頭細胞ではⅡ型の5 α -reductase の発現は強くないが、男性ホルモン受容体の発現は強く認めた。Ⅰ型の5 α -reductase はすべての毛乳頭細胞で発現を認めた。Ⅱ型の5 α -reductase 欠損症では思春期に腋毛は正常に認めざ瘡も発症するが、髭の発育は認めず男性型脱毛も発症しない¹⁷⁾。髭や男性型脱毛のような強い男性化徴候の発来には男性ホルモン受容体とⅡ型の5 α -reductase の両方が必要だが、腋毛やざ瘡の発症にはT自体が男性ホルモン受容体に結合して作用するのか⁸⁾、もしくは脂腺や外陰部の線維芽細胞のようにⅠ型の5 α -reductase を利用してTをDHTに変換して働くものと考えられる^{18, 19)}。

これまでに4タイプの17 β -HSDが確認されている^{12, 20, 21)}。Ⅰ型の17 β -HSDはヒトの胎盤や卵巣、乳房で発現しており、estroneを生物活性の強いestradiolに変換する^{22, 23)}。Ⅱ型の17 β -HSDは前立腺、胎盤、肝臓、腸管、子宮内膜、腎臓、脾臓、結腸で発現しており、estoradiolをestroneへ、Tを Δ^4 -Aへ不活化させる^{13, 14)}。精巣のみで認められるⅢ型の17 β -HSDは、 Δ^4 -AをTへ活性化させる¹⁵⁾。最近同定されたⅣ型の17 β -HSDはestrogenを活性化するのに重要な働きをする¹²⁾。またⅤ型の17 β -HSDも発見されたが、その作用は確定されていない²⁴⁾。

われわれは、毛乳頭細胞と外毛根梢細胞における男性ホルモン代謝酵素であるⅡ型の17 β -HSDとⅢ型の17 β -HSDのmRNAを検討した。Ⅱ型の17 β -HSDのmRNAは外毛根梢細胞で強く発現しており、毛乳頭細胞においては男性腋毛の一部で発現を認めたのみでその他は認めなかった。

これらの結果は、表皮細胞や髭の培養外毛根梢細胞ではTは主に Δ^4 -Aに変換されるという結果と一致する²⁵⁾。おそらく皮膚の上皮系の細胞は男性ホルモンを不活性化することでホメオスタシスを保つ作用があると推測される。一方、Ⅲ型の17 β -HSDのmRNAは髭及び男女の腋毛で強く発現しており、その発現は性差を認めなかった。Ⅲ型の17 β -HSD発現を精巣以外の組織で認めたのはこれが初めてである。思春期数年以前の副腎の男性ホルモンが急激に増加する時期はadrenarcheと呼ばれ、思春期発来に先だって腋毛や恥毛の発育を認める^{10, 11)}。これは副腎由来の男性ホルモンが末梢組織において Δ^4 -Aに代謝され、さらに腋毛や恥毛の毛乳頭細胞内でⅢ型の17 β -HSDによりTへ変換されることにより活性の高い男性ホルモンとして作用するものと考えられる。

以上、毛乳頭細胞における男性ホルモン感受性は男性ホルモン受容体、5 α -reductase、17 β -HSDの発現によっても制御されていることが示唆された。

参考文献

- 1) Itami S, Kurata S, Takayasu S. 5 α -reductase activity in cultured human dermal papilla cells from beard compared with reticular dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1990; 94: 150-2.
- 2) Randall VA, Thornton MJ, Messenger AG. Cultured dermal papilla cells from androgen-dependent human hair follicles (e.g. beard) contain more androgen receptors than those from non-balding areas of scalp. *J Endocrinol* 1992; 133: 141-7.
- 3) Choudhry R, Hodgins MB, Van der Kwast TH et al. Localization of androgen receptors in human skin by immunohistochemistry: implications for the hormonal regulation of hair growth, sebaceous glands and sweat glands. *J Endocrinol* 1992; 133: 467-75.
- 4) Itami S, Kurata S, Sonoda T et al. Interaction

- between dermal papilla cells and follicular epithelial cells in vitro: effect of androgen. *Br J Dermatol* 1995; 132: 527-32.
- 5) Itami S, Kurata S, Sonoda T et al. Characterization of 5 α -reductase in cultured human dermal papilla cells from beard and occipital scalp hair. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 57-60.
 - 6) Hibberts NA, Howell AE, Randall VA. Balding hair follicle dermal papilla cells contain higher levels of androgen receptors than those from non-balding scalp. *J Endocrinol* 1998; 156: 59-65.
 - 7) Itami S, Kurata S, Sonoda T et al. Mechanism of action of androgen in dermal papilla cells. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 642: 385-95.
 - 8) Hamada K, Thornton MJ, Laing I et al. The metabolism of testosterone by dermal papilla cells cultured from human pubic and axillary hair follicles concurs with hair growth in 5 α -reductase deficiency. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 1017-22.
 - 9) Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969; 44: 291-303.
 - 10) Prader A. Growth and development. In: *Clinical Endocrinology Theory and Practice* (Labhart A, ed), 3rd edn., Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1978; 1013-53.
 - 11) Odell WD. Endocrinology of sexual maturation. In: *Endocrinology* (DeGroot LJ, Besser M, Burger HG et al., eds), 3rd edn., Vol. 2., Philadelphia: Saunders, 1995; 1938-52.
 - 12) Labrie F, Luu The V, Lin SX et al. The key role of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* 1997; 62: 148-58.
 - 13) Wu L, Einstein M, Geissler WM et al. Expression cloning and characterization of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 1993; 268: 12964-9.
 - 14) Casey ML, MacDonald PC, Andersson S. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progestin regulation of gene expression in human endometrium. *J Clin invest* 1994; 94: 2135-41.
 - 15) Geissler WM, Davis DL, Wu L et al. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet* 1994; 7: 34-9.
 - 16) Messenger AG. The culture of dermal papilla cells from human hair follicles. *Br J Dermatol* 1984; 110: 685-9.
 - 17) Wilson JD. Syndromes of androgen resistance. *Biol Reprod* 1992; 46: 168-73.
 - 18) Thiboutot D, Harris G, Iles V et al. Activity of the type 1 5 α -reductase exhibits regional differences in isolated sebaceous glands and whole skin. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 209-14.
 - 19) Mestayer C, Berthaut I, Portois MC et al. Predominant expression of 5 α -reductase type 1 in pubic skin from normal subjects and hirsute patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1989-93.
 - 20) Adamski J, Leenders F, Carstensen JF et al. Steroids, fatty acyl-CoA, and sterols are substrates of 80-kDa multifunctional protein. *Steroids* 1997; 62: 159-63.
 - 21) Andersson S, Moghrabi N. Physiology and molecular genetics of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids* 1997; 62: 143-7.
 - 22) Peltoketo H, Isomaa V, Maentausta O et al. Complete amino acid sequence of human placental 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA. *FEBS Lett* 1988; 239: 73-7.
 - 23) Martel C, Rheaume E, Takahashi M et al. Distribution of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and activity in

- rat and human tissues. J Steroid Biochem Mol Biol 1992; 41: 597-603.
- 24) Zang Y, Dufort I, Soucy P et al. Cloning and expression of human type V 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. 77th Annual Meeting of the Endocrine Society 1995; 622 (P3-614). Abstract.
- 25) Sonoda T, Itami S, Kurata S et al. Testosterone metabolism by cultured human beard outer root sheath cells in comparison with epidermal keratinocytes. J Dermatol Sci 1993; 6: 214-8.

生体計測工学に基づいた非侵襲的な皮膚の性状の測定法の開発 皮膚を指で触った感覚の定量的測定

東北大学大学院医学系研究科 内科病態学講座皮膚科学分野

田 上 八 朗、笹 井 収

Various attempts have been made to measure mechanical properties of the skin quantitatively and noninvasively. However, no attempt has been made to measure a tactile sense of our finger that palpates the skin; when we palpate the skin to search for any change, we at first rub the skin surface softly with a finger tip to detect a surface change and then press the finger against the skin to perceive any alteration in consistency. The problem here is how to record such tactile sense quantitatively, because the palpating examination for smoothness or softness of the skin totally depends on a subjective perception. Since a new tactile sensor that evolved from robot technology is equipped with a fingertip-like sensing probe oscillating at a resonance frequency of 60 kHz which is capable of clearly sensing small differences in hardness of solid substances from a change in the oscillating frequency and a displacement sensor that detects depressability of the skin, we have tried to introduce this new measuring system to evaluate the hardness and elasticity of the skin.

We constructed a probe with two independent sensors, i. e., a newly developed tactile vibration sensor and displacement sensor. To determine its usefulness we use at first an in vitro skin model and subsequently normal and lesional skin such as neutrophilic erythema, keloid, hypertrophic scar, and scleroderma.

Parameters obtained with our probe consisted of two, i.e., the one that reflected superficial firmness of the skin, which mainly correlated with the hydration state of the stratum corneum, and the other that reflected firmness of deeper tissue.

Our results showed that this probe is useful to evaluate the physical properties of skin lesions accompanying changes in skin firmness.

1 緒 言

皮膚科医が臨床の場で診察し皮疹の経過を追う場合に、病変の硬さがどのように変化したかは、これまでは、あくまで「固い、柔らかい」という主観的表現でされてきた。臨床の場で触診したときの状態を正確に記録に残すことは、残念ながら現時点ではできないため、前回の受診時と比較してどのように変化したかを客観的に評価することはできない。ましてや別の医師が診察した場合との比較はなお難しい。そのようなことを背景に、皮膚科領域では皮膚の力学的特性を生体計測工学的に評価しようとする研究がこれまでも種々なされてきた^{1~6)}。それらは皮膚を弾性体としてその力学的特性を測定するものであったが、

われわれ医師が皮膚を指で触れて診察する状況をシミュレートできるような方法ではなかった。

さらに生体の外層に位置する皮膚は、表皮、真皮、皮下脂肪組織というそれぞれ異なる成分からなる層状の臓器である。とくに皮表を覆う角層はその部位によっても厚さが異なり、10 ミクロンから 90 ミクロンという非常に薄い膜様組織としてみられる。角層は外界の環境に応じてその水分含有量が変化するため、その性状は絶えず変化し、乾燥した角層では指先でかすかに触れたとしても硬く感じる。したがって皮膚の硬さを測定する場合、角層の影響を全く無視することはできない。過去に生体内における角層の力学的性質と皮表水分含有量とを比較、検討した報告には電流力計によるもの⁷⁾、吸引法によるもの^{8~10)}、摩擦回転法¹¹⁾によるものがある。しかしこれらの方法は現在のところ広くおこなわれるまでに到っていない。

最近、尾股らにより、人間の手指のもつ硬さの知覚特性によく対応した触覚センサが開発された¹²⁾。このセンサは、圧電セラミック素子である振



Development of non-invasive assay system of the skin :

Quantitative measurement of a tactile sensation of the palpating finger

Hachiro Tagami and Shu Sasai

Department of Dermatology, Tohoku University School of Medicine

動子と振動を検出する検出器からなるセンサ部と、検出器から得られる出力を増幅して再び振動子に帰還する強制帰還回路から構成されている。この回路で増幅度を増すと、この系は振動子の機械的共振周波数で発振状態になる。この状態でセンサを物質に接触させると、その物質のもつ固有音響インピーダンスの影響でセンサの発振周波数が変化する。そこでその周波数の変化量を測定することによって、接触させた物質の特性を調べることができる。本センサを用いて皮膚の硬さを測定すると、ヒトが指で触れて硬いあるいは軟らかいと判断することをセンサの計測値として数値化できる。しかしこれまでに病変部皮膚での測定はおこなわれておらず、また角層水分量との関係についてもデータはなかった。

そこで、本研究ではこの触覚センサと、バネの弾性力を応用した変位センサの両方を用いた皮膚症状観察用プローブを製作し、このプローブの基本的な特性を確認するとともに、臨床の場で皮膚病変部の硬さを実際に計測することによって、皮膚での測定の実用性を検討した。

2 実験

2.1 皮膚症状観察用プローブ (図1)

指で物体の硬さを知るときには、ヒトは非常に弱い力ながらその物体を押している。そこで10g前後の力で振動子が皮膚面に接触するようにセンサ部をバネと連結し、プローブに内蔵した。触覚センサの先端が皮表面に接したとき、皮表から受ける応力により内蔵のバネが縮められるので、バネの押し込まれた長さを変位センサにより検出して記録した。それによって本プローブでは、接触させた物質の特性と関係する周波数の変化量 (DF1 値) と、変位センサによるバネの縮んだ長さに対応する値 (DF 2 値) の2つの測定値を得られる。すなわち DF1 値と DF2 値という2種類のパラメータを非侵襲的に検出することによって皮膚の硬さを計測する。DF1 値と DF2 値として変化量が安定する接触後3秒経過したと

きの値を記録した。

2.2 測定対象

2.2.1 皮膚モデルによる基礎実験

皮膚のモデルとして、シリコン (商品名シリコン KE-116、(株)信越化学工業、東京) とその硬化剤の混合比率を変えることにより、硬さの異なるシリコンラバーをつくった。シリコンの濃度が40%のものをSOFT、60%のものをMODERATE、80%のものをHARDとした。また角層という生きた細胞とは異なる非常に薄い構造物をシミュレートするため、ポリウレタンシート (商品名テガダーム、(株)スリーエムヘルスケア、東京) をシリコンラバーに貼付してDF1 値、DF2 値を測定した。

さらに角層の水分含有量とプローブの測定値の関係を検討するため、ラバーに角層シートをのせ、室内で24時間放置して乾燥させることによってラバーに密着させた状態を作った。そして蒸留水を100 μ Lのせて角層に水を吸わせ、その水負荷の量の違いによるDF1 値、DF2 値への影響を検討した。なお角層シートは、リンパ節廓清術

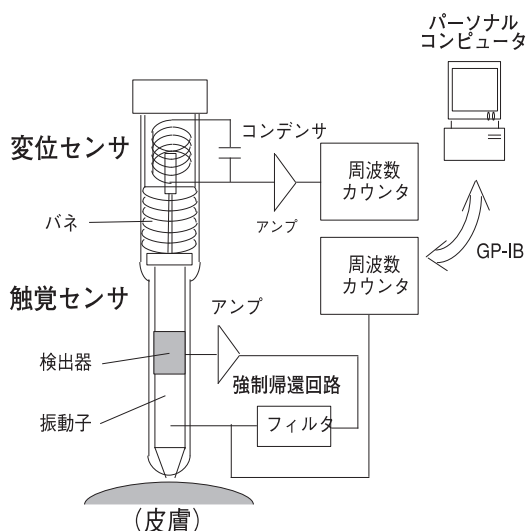


図1 触覚センサの模式図

触覚センサの接触時、非接触時の共振周波数の差をカウンタボードのインターフェースを介してコンピュータで処理する。またプローブ内には変位センサも内蔵しており、センサの移動も合わせて記録する。

施行時に切除した大腿前面の健常皮膚の一部から得た皮膚切片を Kligman ら¹³⁾の方法で処理して作製した。

2.2.2 正常皮膚での測定

前腕屈側面と前胸部の正常皮膚における DF1 値、DF2 値と高周波伝導度を測定し、部位間や被験者間に違いがみられるかを検討した。また外用剤塗布による DF1 値、DF2 値と高周波伝導度の関係を調べた。健常成人男性 5 人 (27 ~ 31 歳、平均 30 歳) の左右前腕屈側面に 4 × 4 cm の被験部位を 4 カ所設定し、そこへ試料を 1.25 μL/cm² になるように塗布した。試料として油脂性の基剤である白色ワセリン (日本薬局方)、親水性基剤で多量の水分を含む親水軟膏 (日本薬局方)、保湿剤として尿素を含有する軟膏 (商品名ウレパール軟膏、(株)大塚製薬、東京) の計 3 種類の外用剤を用い、残り 1 カ所には対照として何も塗布しなかった。そして塗布前と塗布 1 時間後の測定値の関係を検討した。

2.2.3 病変部皮膚での測定

真皮の浅層に浮腫、炎症をみる浮腫性紅斑と、真皮の浅層から深層にかけ線維化による硬化を認めるケロイドや肥厚性瘢痕、強皮症を対象疾患として選択した。

(1) 浮腫性紅斑

50 歳、女性。Sweet 病で通院中。左手背に生じた径 3 cm 大の境界明瞭な紅斑と、右手背の正常皮膚とを比較した。

(2) ケロイド、肥厚性瘢痕、強皮症

20 歳、男性。尋常性ざ瘡の皮疹出現後に生じたケロイドに対して内服薬 (トラニラスト、商品名リザベン) を内服中。

30 歳、男性。前胸部のケロイドに対してステロイド (トリアムシノロンアセトニド、商品名ケナコルト A) 局所注射療法を施行した。

10 歳、女兒。右前腕屈側面の表皮母斑を切除、単純縫縮術施行後に肥厚性瘢痕を生じた。

18 歳、女性。手指、手背から前腕にかけ両側性、対称性に遠位側から近位側に向かって皮膚の硬化の進行がみられた。

2.3 角層水分量測定

3.5 MHz 交流電流に対する伝導度測定装置 (商品名 Skicon - 200、(株) IBS、浜松市) と付属のプロープを用いた。

2.4 測定環境

以上の測定はすべて温度 18 ~ 22℃、相対湿度 18 ~ 45% に調節した測定室内でおこなった。

2.5 測定値と統計処理

本プロープによる測定値 DF 1 値と DF 2 値、皮表高周波伝導度は 1 回の測定で同じ地点を 5 回測定して、その平均値を代表値とした。なお DF 1 値は変化した周波数 Hz に対応する。またバネが 1 mm 縮むと DF 2 値は 1153.94 (a.u.) 変化した。高周波伝導度は μS で記録した。2 群間の相関係数は Pearson の積率相関係数を求め、回帰直線は最小 2 乗法により求めた。群間比較は、対応のある 2 群間を Wilcoxon signed-rank 検定、対応のない 2 群間を Wilcoxon rank-sum 検定を用いておこない、p < 0.05 のとき有意差があると判断した。

3 結 果

3.1 皮膚モデルによる基礎実験

3.1.1 シリコンラバーとポリウレタンシートの影響 (図 2)

皮膚をシミュレートして作った硬さの異なる 3 種類のシリコンラバーを用いて測定したところ、DF1 値は SOFT、MODERATE、HARD とシリコンラバーが硬くなるにつれて有意に小さくなった。DF 2 値はシリコンラバーが硬くなるにつれて有意に大きくなった。またシリコンラバーの表面に、シリコンラバーとは異なる成分からなるポリウレタンシートを密着させて貼付す

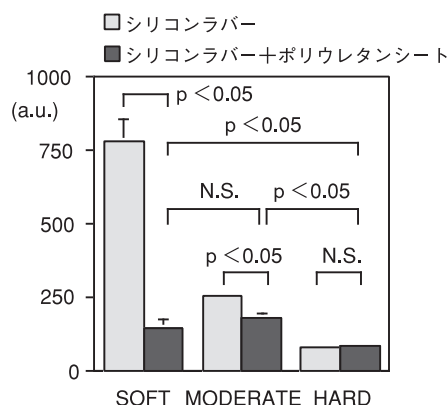
ると、SOFTとMODERATEのDF1値に有意差はみられなかったが、HARDとそれら2種のあいだには有意な差がみとめられた。DF2値はシリコン濃度がMODERATEとHARDとでは、シートをのせたものとのせないものとのあいだ

で有意差はみられなかったが、SOFTではシートをのせることにより値が有意に上昇した。

3.1.2 シリコンラバーと角層シートの水分量の影響

MODERATEラバーを角層シートで覆った状態では水を吸わせる前と比較して、水負荷10秒後、5分後いずれもDF1値が上昇しており、角層水分量が多いほどDF1値が上昇していた。しかしDF2値には有意な差をもった変化はみられなかった(図3)。HARDラバーでもMODERATEラバーと同様の結果が得られた。

(1) DF1



(2) DF2

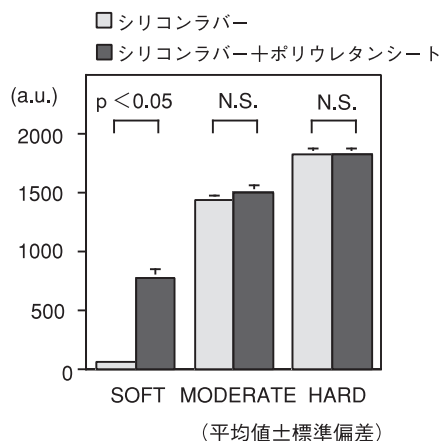
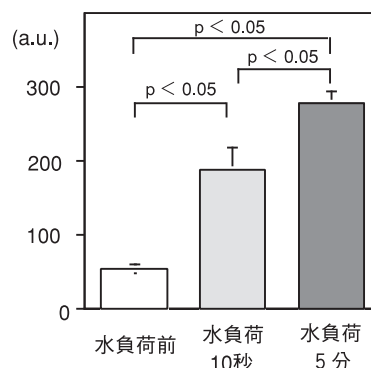


図2 シリコンラバーの硬さの違いによるDF1値とDF2値の差

- (1)シリコンラバーが硬いほどDF1値は低値を示した。ポリウレタンシートを貼付すると、SOFTとMODERATEでは貼付前と比較して有意に低くなったが、HARDではほぼ等しい値を示した。シート貼付後のSOFTとMODERATEのDF1値の間に有意な差を認めないが、HARDではそれらよりも有意に低い値を示した。
- (2)シリコンラバーが硬いほどDF2値は高値を示した。ポリウレタンシートを貼付すると、SOFTではシートの貼付前と比較して有意に高くなったが、MODERATEとHARDでは貼付前とほぼ等しい値を示した。

(1) DF1



(2) DF2

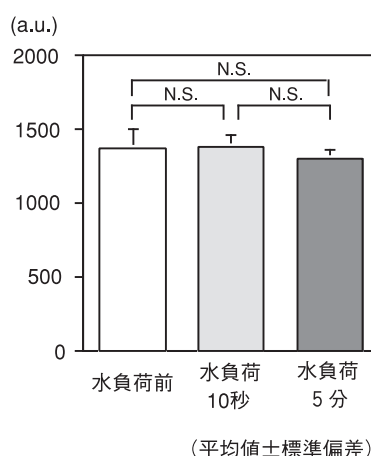


図3 水負荷とDF1値とDF2値

MODERATEラバーでの結果を示す。DF1値は水負荷が増えるとともに上昇したが、DF2値に有意な差を示す変化はみられない。

3.2 正常皮膚の DF1 値、DF2 値と高周波伝導度

3.2.1 正常皮膚での関係

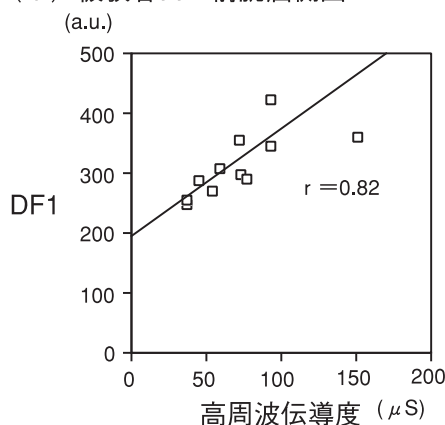
1年にわたり、ほぼ定期的に同一人の同一部位の DF1 値と DF2 値を測定した。被験者 A (30 歳、男性) の前腕屈側面の高周波伝導度が高い湿った角層では DF1 値は高く、高周波伝導度が低い乾燥した角層では DF1 値も低い値をとる正の相関関係がみられた (図 4 - (1))。しかし DF1 値と高周波伝導度の関係は個人個人により異なっていた。別の被験者 B (30 歳、男性) の皮膚でも高

周波伝導度と DF1 値との間に正の相関関係を認めたが、被験者 A と B の回帰直線の傾きには有意な差が認められた ($p < 0.05$)。

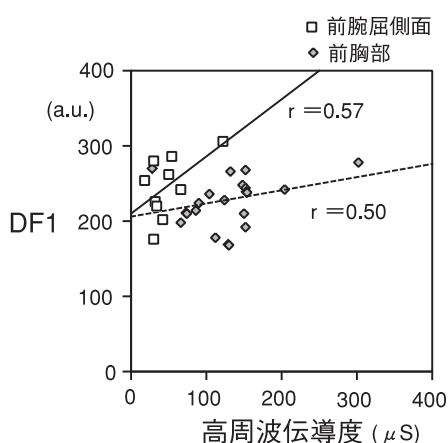
また被験者 B の前腕屈側面と前胸部を比較したところ、前胸部でも高周波伝導度と DF1 値の間には正の相関関係があった。また回帰直線の傾きには、前腕屈側面と前胸部の間に有意な差が認められた ($p < 0.05$) (図 4 - (2))。

一方 DF2 値は高周波伝導度とは関係がなく、ある一定範囲の値を示した (図 4 - (3))。

(1) 被験者 A 前腕屈側面

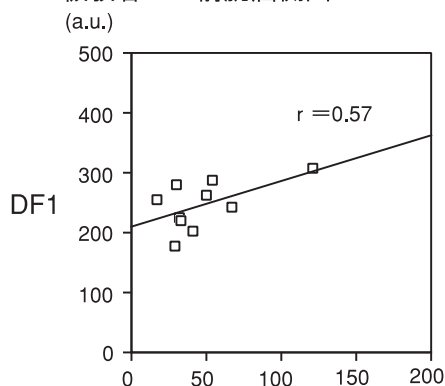


(2) 被験者 B 前腕屈側面と前胸部



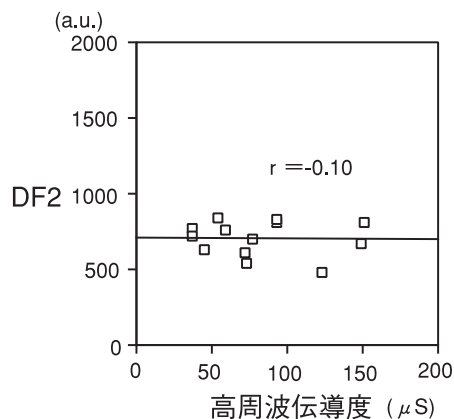
DF1 値と高周波伝導度の関係は同一被験者であっても測定部の違いにより異なった。

被験者 B 前腕屈側面



高周波伝導度が高い皮膚では DF1 値も高く、正の相関関係が認められた。DF1 値と高周波伝導度の関係は被験者により異なった。

(3) 被験者 A 前腕屈側面



DF2 値は高周波伝導度とほとんど関係がなかった。

図 4 正常皮膚における DF1 値と DF2 値と高周波伝導度の関係

3.2.2 外用剤の影響

3種類の外用剤の塗布前と塗布後1時間で測定値を比較した。DF2値はどの部位でも変化しなかったが、DF1値は有意に高くなった。高周波伝導度は白色ワセリン塗布部位で有意に上昇したが、親水軟膏と尿素軟膏塗布部位では有意な差をもった変化が認められなかった(図5)。

3.3 病変部皮膚のDF1値、DF2値と高周波伝導度

3.3.1 浮腫性紅斑(図6)

真皮上層に浮腫の強い浮腫性紅斑では対照と比較して皮表高周波伝導度に有意な差はなかったが、DF1値が有意に上昇していた。

3.3.2 肥厚性癬痕・ケロイド

真皮の線維化により、病変では深部が硬くなるこれらの病変で、肥厚性癬痕のDF2値は、正常皮膚のDF2値よりも有意に高かった(図7)。癬痕1と2の間でDF2値に有意な差はみられなかったが、皮表高周波伝導度の高い癬痕1では

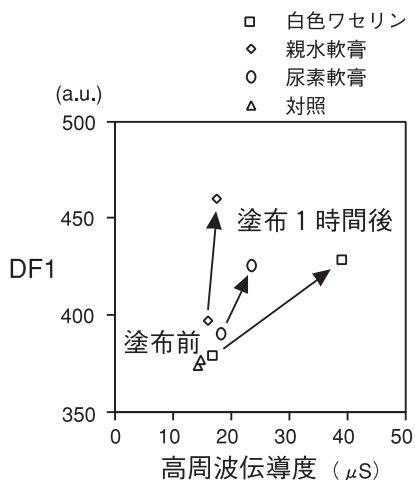
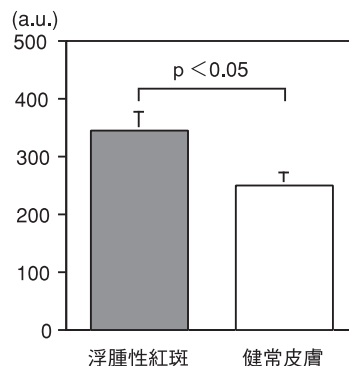


図5 外用剤塗布前後のDF1値と高周波伝導度の関係

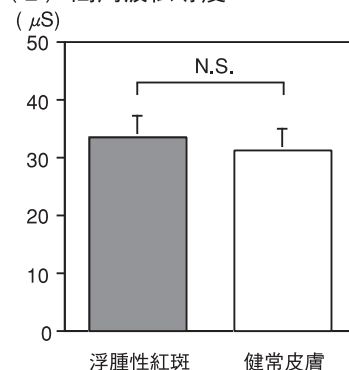
3種の外用剤塗布後に、DF1値はいずれの部でも上昇していた。高周波伝導度は、白色ワセリン塗布部では有意に上昇した($p < 0.05$)が、他の2剤では有意な差をもった変化を認めなかった。塗布前と塗布1時間後との間で、対照部の測定値には有意な差がみられなかった。

DF1値が有意に高かった。ケロイドのDF1値は皮表高周波伝導度とほぼ並行して変動した(図

(1) DF1



(2) 高周波伝導度



(3) DF2

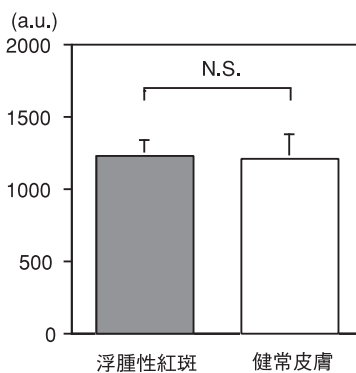


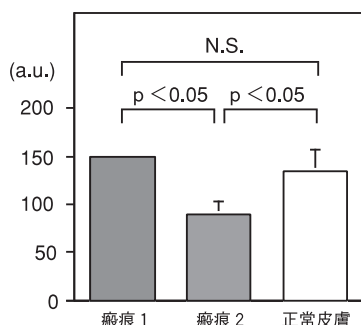
図6 浮腫性紅斑

浮腫性紅斑と対側の健常皮膚を比較した。高周波伝導度に差はみられなかったが、DF1値は有意に高い値をとった。

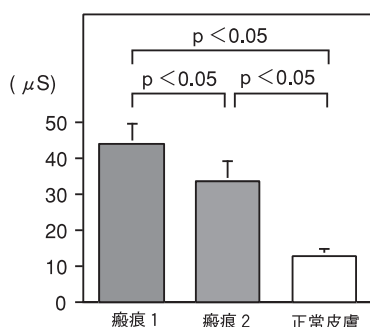
8)。ケロイドにステロイド(トリアムシノロンアセトニド10mg)を局注した後にDF2値が局注後に有意に低下した。DF1値も低下したが、

このときには皮表高周波伝導度も低下していた(図9)。

(1) DF1



(2) 高周波伝導度



(3) DF2

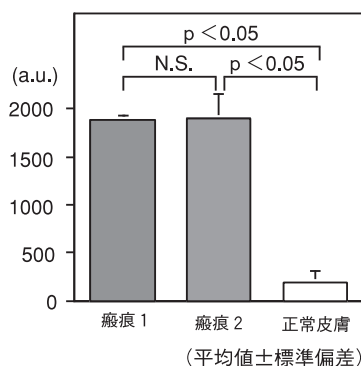


図7 肥厚性瘢痕のDF1値、DF2値と高周波伝導度

瘢痕1と瘢痕2はDF2値に有意な差を認めなかったが、DF1値には差を認めた。そしてこれらの高周波伝導度には有意な差がみられた。瘢痕1と正常皮膚を比較すると、DF1値に有意な差はみられなかったが、DF2値に有意な差を認めた。

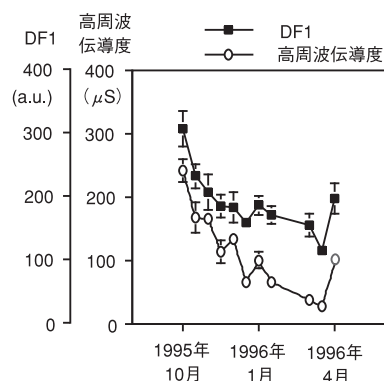
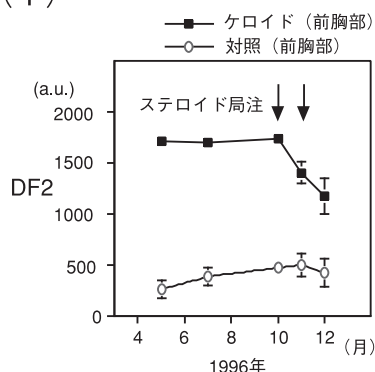


図8 ケロイドの経過

DF1値と高周波伝導度とは並行して変動した。

(1)



(2)

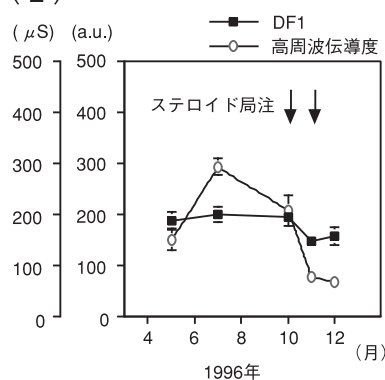


図9 ケロイドのステロイド局所注射療法による変化

(1) ステロイド局所注射療法によりDF2値は低下した。

(2) DF1値も低下したが、このときには高周波伝導度も低下していた。

3.3.3 全身性強皮症 (図 10-1、2)

真皮の線維化で硬化の徐々に進行するこの疾患では、前腕屈側面において、臨床的に硬く触れすでに硬化していると考えられた部位 (手関節から 10cm の点) と、まだ完全に硬化していないと考えられた部位 (手関節から 15cm の点) を測定した。DF1 値はすでに硬化した部位、まだ完全に硬化していない部位ともに高周波伝導度の動きと並行して変動していた。すでに硬化した部位では DF1 値、DF2 値は大きく変動しなかった。まだ完全に硬化していない部位では、とくに高温多湿の夏 (1996 年 8 月) に、左右前腕がともに近位側の DF1 値の上昇、DF2 値の低下が明らかで、

正常皮膚での季節的な変動と同様な傾向がみられた。またすでに硬化した部位では完全に硬化していない部位と比較して DF1 値が小さく、DF2 値は大きかった。

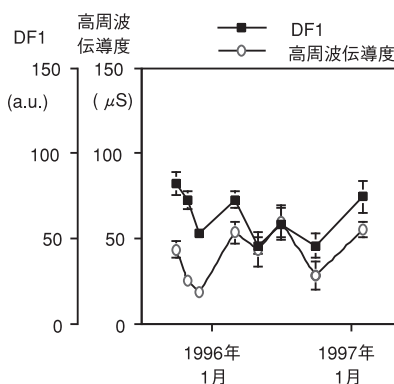
4 考 察

本研究では、触覚センサとバネの弾性力を利用した変位センサによる測定値が、正常皮膚あるいは皮膚病変において臨床症状を反映しているかどうかを検討した。

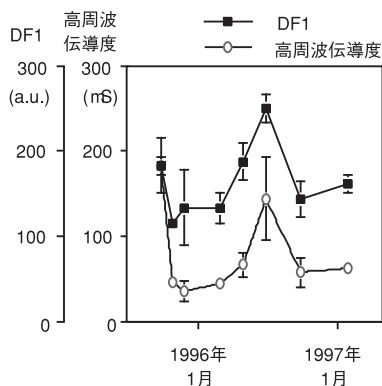
まず 3 種の異なる硬さのシリコンラバーを測定したところ、硬いもののほど DF1 値は有意に低値を、DF2 値は有意に高値を示した。そして薄い膜様物を表層に有する 2 層の構造物 (シリコンラバーにポリウレタンシートをのせたもの) を測定したところ、DF1 値は深部組織がある程度軟らかいときには接触面の影響を受けるが、深部が硬いときには接触面の影響をほとんど受けなかった。それに対して DF2 値は深部組織が軟らかいときには接触面の影響を受けるものの、通常はその影響を受けにくいことがわかった。

ヒトの皮膚の表面の角層は、表面の水分含有量の違いによりその性状が大きく変化する。実際の診療において、皮表が乾燥すると表面がカサカサとして硬く感じることはよく経験する。そこで角

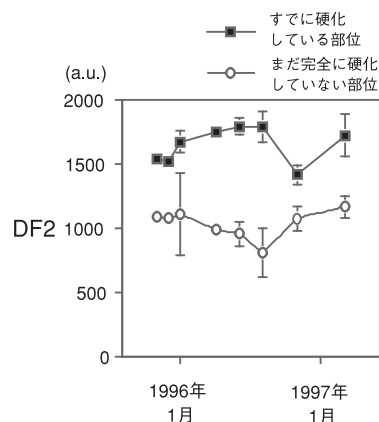
(1) すでに硬化している部位



(2) まだ完全に硬化していない部位



すでに硬化した部、まだ完全に硬化していない部 どちらであっても DF1 値と高周波伝導度は並行して変動した。すでに硬化した部の方が低値をとった。



DF2 値はすでに硬化した部の方が高値をとった。

図 10 全身性強皮症における DF1 値、DF2 値と高周波伝導度

層における皮表水分含有量が DF1 値、DF2 値に与える影響について、シリコンラバーに角層シートをのせ密着させて固定し、生体の皮膚により近い状態を再現したモデルを作ってさらに検討した。角層へ水を吸わせると DF1 値は有意に上昇し、しかも吸わせた水の量が多いほど高値を示した。しかし DF2 値は角層が水を含んでも有意な差をもった変化を示さなかった。したがって DF1 値は、角層の性状の影響を受けるが、DF2 値は角層の影響をほぼ無視できることが確認できた。上腕の正常皮膚での測定から皮表高周波伝導度が高い角層では DF1 値が高くなることを意味する結果が過去の報告¹⁵⁾にもみられるが、今回の測定によってそれが生体内、生体外どちらでも成り立つことがさらに明らかとなった。ただし DF1 値を決定するのは角層の水分量だけではない。油脂性の外用剤である白色ワセリンあるいは水溶性の外用剤である親水軟膏を皮表に塗布することで角層の水や脂性成分を変えると、DF1 値は異なる変化を示した。これは健常人の前腕と脂漏部位である前胸部とで高周波伝導度と DF1 値の関係が異なることの確実な証明ではないとしても、その理由の 1 つと考えられる。

ケロイド、肥厚性癬痕の DF1 値も基本的には高周波伝導度と並行して変動し、角層の水分含有量がその値に大きく影響していることが示唆された。そしてケロイドにステロイド局所注射（局注）療法を行った後の硬さの変化を調べたところ、DF2 値が臨床上的患者の自覚症状や触診による他覚所見の傾向と一致していた。またこのときには DF1 値は低下していた。シリコンラバーの測定結果から、DF1 値は硬いケロイドでは小さく、軟らかいケロイドでは大きくなると推測されたが、それとは異なる測定結果であった。ケロイド、肥厚性癬痕では正常の角層と比較して角層水分含有量が高値であること、肥厚性癬痕では少しずつ沈静化するにたがって角層水分含有量が低下することを私たちはこれまでに観察している¹⁶⁾。今回の結果でも局注後には皮表高周波伝導度が低

下していた。したがってステロイドの効果によりケロイドが見かけ状沈静化した癬痕の状態へ移行したため、DF1 値の低下は皮表高周波伝導度の低下、すなわち角層水分含有量の減少を反映した変化であると判断した。

また全身性強皮症患者の前腕屈側面の測定結果では、すでに硬化期であると判断できる部位と、浮腫期から硬化期へ移行しつつある部位とのあいだで、DF1 値、DF2 値の変動の大きさに違いが見られた。そしてこのときも DF1 値は皮表高周波伝導度と並行して変動した。一方 DF2 値は臨床上的患者の自覚症状や触診による他覚症状の傾向とも一致していた。したがって強皮症の硬化部位でもケロイドや癬痕部の皮膚と同様に、DF1 値は皮膚の浅層とくに皮表の硬さ、DF2 値は皮膚の深層までを含んだ硬さを反映しており、本プローブにより皮膚の硬化の進行を客観的に評価できる可能性が示唆された。

一方浮腫性、滲出性紅斑では、皮表高周波伝導度と DF2 値に対照とした対側の健常皮膚の有意な差を認めなかったのに対し、DF1 値は有意に高い値を示した。病変部と健常皮膚の角層の水分含有状態がほぼ等しいならば角層の硬さもほぼ同じと推測されるので、ここでみられた差は真皮の上層にある浮腫の影響であると考えた。

これまでも皮膚の硬さ、粘弾性、伸展性といった物理的性質を研究対象とした計測法は、皮膚科の臨床の場合だけでなく、化粧品業界でも数多く開発されおこなわれてきた^{3~6)}。しかしそれらの方法の中で完全に確立されたものはない。また単に触診と言ってもつまむ、つまみあげる、引き伸ばす、押しこむ、表面に軽く触れるなどさまざまな動作を含んでいる。したがってそれらの動作の中で、どの動作が検討しようとする皮膚の状態を反映するのかをよく調べる必要がある。ヒトはある物質の表面の性状を知ろうとするときにはごくわずかな力で表面を撫でるようにし、また硬さや弾力性を判断するときにはそれよりも強く、しかも対象物が可塑性であるならば、それがわず

かに変化する程度の強さで押して調べる。今回使用したプローブは、その表面に軽く触れる、押しこむという2つの動作に着目して製作したものである。

本研究で使用したプローブは、皮膚にあてて皮表を押し込む力にバネの弾性力を利用している。これはヒトの皮膚の硬さ、弾性力を感知するために皮膚を押す指の力の大きさに近づけるため、設計上10g前後の荷重が必要であったことによる。皮膚に一定荷重をかけたときの皮表のへこみ量を検討した過去の報告では、強皮症¹⁷⁾や静脈還流異常に伴う皮膚の硬化病変¹⁸⁾の測定がある。これらは皮膚の柔らかさよりも硬さの指標として使われてきた。しかし、ゼンマイの弾性力により65gの荷重をかけ、身体各部位の皮膚の硬さの性別、年齢層による違いをみた報告^{1, 2)}もある。今回の計測法では、これらの報告例で用いられたものと比較して負荷する荷重が小さい。硬い病変だけでなく正常皮膚の測定にも使用することができる荷重の大きさについては、今後も検討が必要である。

過去にケロイドや熱傷後に生じた肥厚性瘢痕に対し、皮表に平行に張力をかけて組織の伸展性を調べた報告^{19~25)}もいくつかある。しかしそれらは対象としてすべて前腕に生じた熱傷後の肥厚性瘢痕のみをあつかっている。そしてこれらの報告を検討すると、その測定器の構造上の問題点として、他の部位に生じたものを測定しにくいこと、そして病変がある程度以上の大きさを有するものでないと測定できないことがわかった。今回使用したプローブは理論的にはセンサの先端にある半球部分の半径の3倍の大きさがあればよく、すなわち直径が12mmあればよい。そのため測定部位をとくに制限することはなく、前胸部に生じた小さなケロイドの経過観察にも使用できる。過去に、ステロイド局所注射療法をおこなったケロイドの治療効果を判定するため、皮膚に陰圧をかけて皮表を持ち上げ、皮膚の伸びやすさをみた報告²⁶⁾がある。この報告では最大径

2cmから5cmのケロイドに対し直径2mmの範囲に陰圧をかけている。今回の測定時に陰圧法による測定をおこなっていないのでどちらの方法が優っているかは断定できないが、小さい病変でも測定可能という点では本法が明らかに優れている。

また強皮症ではその皮膚症状の客観性のある指標として吸引法による皮膚の垂直方向の伸展性^{27~32)}をはじめとして、皮膚の水平方向の伸展性³³⁾、皮表のねじれ力による伸展性³⁴⁾、押し込み法による計測^{17, 35)}、血流量^{34, 35)}、超音波エコーによる皮膚の厚さ^{34, 36)}、経皮的酸素分圧³⁴⁾などさまざまな方法が考えられてきた。今回作製したプローブによる測定方法は全く新しいものである。他の方法と併用することで難治性疾患であり注意深い経過観察を必要とする本症の診察時に有用であろう。

今回の測定に用いたプローブでDF2値は前述のとおりバネの縮んだ長さを反映しているが、センサの先端が皮膚内への入り込んだ深さを示しているわけではない。今回作製したプローブでは設計上不可能であったが、今後は皮膚表面からの変位量や、センサにかかる応力を正確に測定できる機器を併用して測定する必要がある。また皮膚は、性状が異なり非常に薄い何層もの層状構造を有する臓器であり、その力学的特性を反映させた皮膚モデルを製作するのは非常に難しい。そのためにも病理組織学的な変化を有するさまざまな皮膚疾患の病変部を測定することが必要である。その結果として、測定値にそれら各層や病理学的変化の及ぼす影響を解析できるのではないかと考える。

5 総括

これらの研究結果より、本プローブの2種類の測定値は、それぞれ異なる硬さを示していることが明らかとなった。すなわちDF1値は皮表の浅いところの硬さ、特に角層の水分含有量の増減に伴う性状の変化や真皮上層の変化を反映したも

のであり、DF2 値はより深いところまでの硬さを示していた。そして本プローブでの測定は患者の臨床症状の経過を追い、客観的に評価するために有用であると考えられた。

引用文献

- 1) 荒川忠良, 瀬河幸枝. (1958) 皮膚の硬さ測定への1つの試み—特に学童皮膚の部位的、性的差異について—. 四国医誌, 13, 41-9.
- 2) 宮本陸夫. (1961) 健康者の皮膚の硬さ—特に部位的、性的年齢差について—皮膚の硬さに関する研究 (第2報). 四国医誌, 16, 666-82
- 3) Pierard G. (1989) A critical approach to in vivo mechanical testing of the skin. In : Cutaneous investigation in health and disease. (Leveque, J.L., ed.), Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, pp215-240.
- 4) Marks R. (1991) Mechanical properties of the skin. In : Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin. (Goldsmith, L.A., ed.), 2nd ed., Oxford University Press, Inc., New York, pp602-21.
- 5) Vogel H.G. (1994) Mechanical measurements of skin. Acta. Dermato-Venereologica. Suppl., 185, 39-43.
- 6) Edwards C., Marks R. (1995) Evaluation of biomechanical properties of human skin. Clin. Dermatol., 13, 375-80.
- 7) Christensen M.S., Hargens C.W.d., Nacht S., et al. (1977) Viscoelastic properties of intact human skin: instrumentation, hydration effects, and the contribution of the stratum corneum. J. Invest. Dermatol., 69, 282-6.
- 8) Jemec G.B. and Serup J. (1990) Epidermal hydration and skin mechanics. The relationship between electrical capacitance and the mechanical properties of human skin in vivo. Acta Dermato-Venereol., 70, 245-7.
- 9) Murray B.C. and Wickett R.R. (1996) Sensitivity of cutometer data to stratum corneum hydration level. A preliminary study. Skin. Res. Technol., 2, 167-72.
- 10) Murray B.C. and Wickett R.R. (1997) Correlation between Dermal Torque Meter, Cutometer and Dermal Phase Meter measurements of human skin. Skin. Res. Technol., 3, 101-6.
- 11) de Rigal J. and Leveque J.L. (1985) In vivo measurement of the stratum corneum elasticity. Bioeng. Skin., 1, 13-23.
- 12) Omata S. and Terunuma Y. (1992) New tactile sensor like the human hand and its applications. Sensors Actuators, 35, 9-15.
- 13) Kligman A.M. and Christophers E. (1963) Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. Arch. Dermatol., 88, 702-705.
- 14) Tagami H., Ohi M., Iwatsuki K., et al. (1980) Evaluation of the skin surface hydration in vivo by electrical measurement. J. Invest. Dermatol., 75, 500-7.
- 15) 浅野新, 尾股定夫, 鈴木正. (1995) 硬さ測定用触覚センサによる皮膚の力学的特性の計測. 粧技誌, 28, 336-43.
- 16) Suetake T., Sasai S., Zhen Y.X., et al. (1996) Functional analyses of the stratum corneum in scars. Sequential studies after injury and comparison among keloids, hypertrophic scars, and atrophic scars. Arch. Dermatol., 132, 1453-8.
- 17) Falanga V. and Bucalo B. (1993) Use of a durometer to assess skin hardness. J. Am. Acad. Dermatol., 29, 47-51.
- 18) Romanelli M. and Falanga V. (1995) Use of a durometer to measure the degree of skin induration in lipodermatosclerosis. J. Am. Acad. Dermatol., 32, 188-91.
- 19) Chu B.M. and Brody G. (1975) Nondestructive

- measurements of the properties of healing burn scars. *Med Instrument*, 9, 139-42.
- 20) Leung K.S., Cheng J.C.Y., Leung Y.K., et al. (1984) In vivo study of the mechanical property of postburn hypertrophic scar tissues. *J Burn Care Rehabil*, 5, 458-62.
 - 21) Clark J.A., Cheng J.C., Leung K.S., et al. (1987) Mechanical characterisation of human postburn hypertrophic skin during pressure therapy. *J. Biomechanics*, 20, 397-406.
 - 22) Bartell T.H., Monafo W.W., Mustoe T.A. (1988) A new instrument for serial measurements of elasticity in hypertrophic scar. *J. Burn Care Rehabil*, 9, 657-60.
 - 23) Ahn S.T., Monafo W.W., Mustoe T.A. (1989) Topical silicone gel: a new treatment for hypertrophic scars. *Surgery*, 106, 781-6; discussion 6-7.
 - 24) Ahn S.T., Monafo W.W., Mustoe T.A. (1991) Topical silicone gel for the prevention and treatment of hypertrophic scar. *Arch. Surgery*, 126, 499-504.
 - 25) Clark J.A., Cheng J.C., Leung K.S. (1996) Mechanical properties of normal skin and hypertrophic scars. *Burns*, 22, 443-6.
 - 26) Krusche T. and Worret W.I. (1995) Mechanical properties of keloids in vivo during treatment with intralesional triamcinolone acetonide. *Arch. Dermatol. Res.*, 287, 289-93.
 - 27) Serup J. and Northeved A. (1985) Skin elasticity in localized scleroderma (morphoea). Introduction of a biaxial in vivo method for measurement of tensile distensibility, hysteresis, and resilient distension of diseased and normal skin. *J. Dermatol.*, 12, 52-62.
 - 28) Bjerring P. (1985) Skin elasticity measured by dynamic admittance. A new technique for mechanical measurements in patients with scleroderma. *Acta Dermato-Venereol. Suppl.*, 120, 83-7.
 - 29) Jemec G.B., Jemec B., Jemec B.I., et al. (1990) The effect of superficial hydration on the mechanical properties of human skin in vivo: implications for plastic surgery. *Plast. Reconstr. Surg.*, 85, 100-3.
 - 30) 西村正広, 辻卓夫. (1992) ニュータイプの皮膚弾力測定器による人皮膚弾力性の測定—加齢、男女、部位による差及び病的皮膚との比較—. *日皮会誌*, 102, 1111-7.
 - 31) 傳實憲一, 佐々木哲雄, 中嶋弘. (1994) 全身性強皮症における皮膚硬化症の評価—皮膚粘弾性測定器の有用性—. *日皮会誌*, 104, 881-4.
 - 32) Enomoto D.N., Mekkes J.R., Bossuyt P.M., et al. (1996) Quantification of cutaneous sclerosis with a skin elasticity meter in patients with generalized scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 35, 381-7.
 - 33) Ballou S.P., Mackiewicz A., Lysikiewicz A., et al. (1990) Direct quantitation of skin elasticity in systemic sclerosis. *J. Rheumatol.*, 17, 790-4.
 - 34) Kalis B., De Riga J., Leonard F., et al. (1990) In vivo study of scleroderma by non-invasive techniques. *Br. J. Dermatol.*, 122, 785-91.
 - 35) Aghassi D., Monoson T., Braverman I. (1995) Reproducible measurements to quantify cutaneous involvement in scleroderma. *Arch. Dermatol.*, 131, 1160-6.
 - 36) Myers S.L., Cohen J.S., Sheets P.W., et al. (1986) B-mode ultrasound evaluation of skin thickness in progressive systemic sclerosis. *J. Rheumatol.*, 13, 577-80.

接触過敏症の皮膚浸潤細胞に特異的に発現している遺伝子の解析

東邦大学 理学部

小林 芳 郎

Although the cellular and molecular mechanisms underlying the delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction have been intensively investigated, the functions of infiltrating leukocytes and skin resident cells in the elicitation phase of the DTH reaction are not completely understood. To gain more insight into the role of these cells in the DTH reaction, we performed differential display analysis aiming at identification of the genes showing elevated expression during the DNCB-induced guinea pig skin DTH reaction. About 250 cDNA fragments, each corresponding to the 3' end of a RNA species, were obtained through differential display analysis. Characterization of 50 of them led to the identification of 28 genes whose expression was elevated in the DNCB-induced DTH reactive tissue. Sequencing of the 28 cDNA fragments and homology search analysis demonstrated that 10 of them represented known genes, some of which, in particular elafin (an elastase inhibitor) and ferritin, are considered to play roles in the DTH reaction. The other 18 cDNA fragments are probably derived from unknown genes. Northern blot hybridization with the 18 cDNA fragments as probes revealed that the expression of these genes during the DTH reaction changed with different kinetics. Cloning of the cDNAs of two of these genes indicated that one is that for guinea pig tryptophanyl-tRNA synthetase, a protein recently found to be induced by IFN- γ and upregulated during the late stages of mononuclear phagocyte maturation in vitro. Strong induction of the gene for tryptophanyl-tRNA synthetase during the DTH reaction suggests its involvement in the in vivo immune response.

1 緒 言

遅延型過敏症 (DTH) はいわゆる細胞性免疫の一種で、白血球の浸潤、フィブリンの沈着、血管透過性の昂進などを特徴とする¹⁾。これには、ツベルクリン反応、ハプテンで惹起される接触過敏症などが含まれ、いずれもランゲルハンス細胞が抗原提示に重要な役割を演じている。すなわち1回目の抗原投与時(感作)、活性化されたランゲルハンス細胞は所属リンパ節に移動して特異的T細胞に抗原を提示してこれを活性化する。次いで2回目の抗原投与(惹起)を行うと、抗原特異的記憶T細胞と単球などが活性化されて浸潤し、サイトカインなどの様々な因子を放出して、炎症反応を増幅させる。このとき、これら浸潤細胞だけでなく常在性細胞や神経末端からも様々な物

質が放出され、炎症反応に関わっている。

このDTH反応には様々なサイトカイン、ケモカイン、接着分子などが関係している。たとえば抗体やノックアウトマウスを用いた研究から、ICAM-1、LFA-1、E-セ렉チン、L-セ렉チン、CD4、IL-1、IL-8、IL-12、IFN- γ が必須であること、IL-10、IL-1ra (IL-1レセプターアンタゴニスト)が反応を沈静化することなどが明らかになっている。これらのほかにもMIP-1 α 、MCP-1、TNF、IL-6など多様なサイトカイン、ケモカインが関わっているとの報告がある(たとえば文献²⁾や³⁾など)。さらに我々自身もモルモットDTH反応にTNFや低分子量マクロファージ走化性因子が関わっていることを報告した^{4、5)}。

DTH反応の大きな特徴は白血球の浸潤である。モルモットDTH反応部位では約40%が単球/マクロファージであった⁵⁾。ゼラチンスポンジモデルで調べた報告によると最初に好中球が浸潤し、ついでリンパ球、単球が浸潤した。

DTH反応について以上のように分子および細胞レベルで研究が進められているものの、従来は



Identification and Cloning of Genes Associated with the Guinea Pig Skin Delayed-type Hypersensitivity Reaction

Yoshiro Kobayashi

Faculty of Science, Toho University

他の研究から推定されたものについて検討するという方向が主であった。そこで今回我々は、惹起過程の解析が特に臨床上重要な意味を持っていることも考慮して、differential display 法を用いて DTH 反応の惹起時に発現が上昇している遺伝子を網羅的に取得することとし、動物としてモルモットを選んだ。これはその DTH 皮膚反応が嚙歯類のなかで最もヒトに類似しているからである。

2 実験

- **DTH 反応の誘導**：ジニトロクロロベンゼン (DNCB) 100 μ g をフロイント完全アジュバントと混合し、モルモット (Hartley albino ♀、6～7 週齢) 足裏に注射した。2 週間後、毛刈りした背部皮膚に DNCB エタノール溶液を塗布、様々な時間の後皮膚を切除して以後の実験に用いた。
- **皮膚浸潤細胞と常在細胞の単離**：既報⁴⁾に準じて単離した。
- **RNA の単離と精製**：細胞からの粗 RNA は QIAshredders を用いて単離した。これはさらに DNase I で処理した後 RNeasy Total RNA Kit で精製した。皮膚組織からの全 RNA はグアニジン中でポリトロンでホモジナイズ後、定法により抽出した。
- **Differential display 法**：既法^{6, 7)}に従い、EcoRI 部位を付加した 26 種類の 10mer のプライマーと HindIII 部位を付加した 3 種類の 1 塩基アンカーオリゴ dT を用いて、RT-PCR を行い、6 % アクリルアミド 8 M 尿素ゲルで分離し、目的のバンドを回収した。これをプラスミドに回収して塩基配列を決定し、FASTA と BLAST を用いてホモロジー検索を行った。
- **ノザンプロットハイブリダイゼーション**：全 RNA を 1 % アガロースホルムアルデヒドゲルで分離、ニトロセルロースに転写、定法に従い、様々な cDNA プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。対照としてはモルモット

β -アクチン cDNA プローブを用いた。結果は BAS1000 バイオイメージアナライザで分析した。

- **cDNA ライブラリーとクローニング**：ConA 刺激モルモット脾臓細胞由来 mRNA を用いて、ラムダ ZAPII にライブラリーを構築し、定法によりクローニングを行った。陽性のクローン由来の cDNA 断片はファージミドとして回収した。

3 結果

3.1 DTH 反応で発現が昂進する cDNA 断片の特徴

Differential display 法で約 250 種類の cDNA 断片が DTH 反応で発現が昂進する遺伝子の候補として得られた。そこでその中から 50 種類を無作為に選び、惹起後 24 時間後の皮膚組織と同じ動物で惹起していない皮膚組織とから RNA を単離し、ノザンプロットハイブリダイゼーションを行ったところ、28 種類については確かに DTH 反応で発現が昂進していた。これらを DEG (differentially expressed gene) と名付け、その塩基配列を決定し、ホモロジー検索を行った。その結果、18 種類がおそらくこれまでに報告されていないもので、残りの 10 種類は既知の遺伝子であろうと推定された (Table 1)。これらの中には、エラフィン、フェリチン重鎖、Hox-1.7、ミトコンドリアアチトクロム b、リボソーム RNA、リボソーム L34 蛋白質などが含まれていた。

3.2 18 種類の DEG の DTH 反応における発現の経時変化

これら 18 種類の DEG の DTH 反応における役割を知るためにまず、発現の経時変化を調べた。その結果およそ 3 つのグループに分類できることが明らかになった (Fig. 1)。

- (1) DEG 4、6、7、13 はその発現が 12 時間目にピークとなった。
- (2) EG10、12、14 はその発現が時間とともにゆっ

Table 1 The identified genes differentially expressed during the DTH reaction

Name	Size	Identity	Name	Size	Identity
DEG# 1	167 bp	unique	DEG 16	312 bp	unique, 90% homology with AC0015*
DEG 2	129 bp	unique	DEG 17	194 bp	unique
DEG 3	141 bp	elafin	DEG 18	127 bp	ribosomal L34 protein
DEG 4	124 bp	unique, 90% homology with D31886*	DEG 19	184 bp	unique, 60% homology with H11836*
DEG 5	149 bp	mitochondrion cytochrome b	DEG 20	246 bp	unique, 80% homology with N53996*
DEG 6	162 bp	unique	DEG 21	275 bp	unique
DEG 7	201 bp	unique	DEG 22	213 bp	unique, 80% homology with AA211693*
DEG 8	156 bp	ribosomal RNA	DEG 23	160 bp	unique
DEG 9	90 bp	MHC class II antigen	DEG 24	110 bp	unique
DEG 10	73 bp	unique	DEG 25	124 bp	unique
DEG 11	515 bp	ferritin heavy chain	DEG 26	287 bp	B cell activation gene
DEG 12	253 bp	unique, 70% homology with AA323500*	DEG 27	326 bp	α chain of MHC class II antigen
DEG 13	231 bp	unique	DEG 28	170 bp	T cell receptor
DEG 14	358 bp	unique, 65% homology with AA261572* & T67068*			
DEG 15	159 bp	Hox-1.7 protein			

#DEG: differentially expressed gene fragments.

* accession number of EST, STS, GSS, or HTGS sequence data.

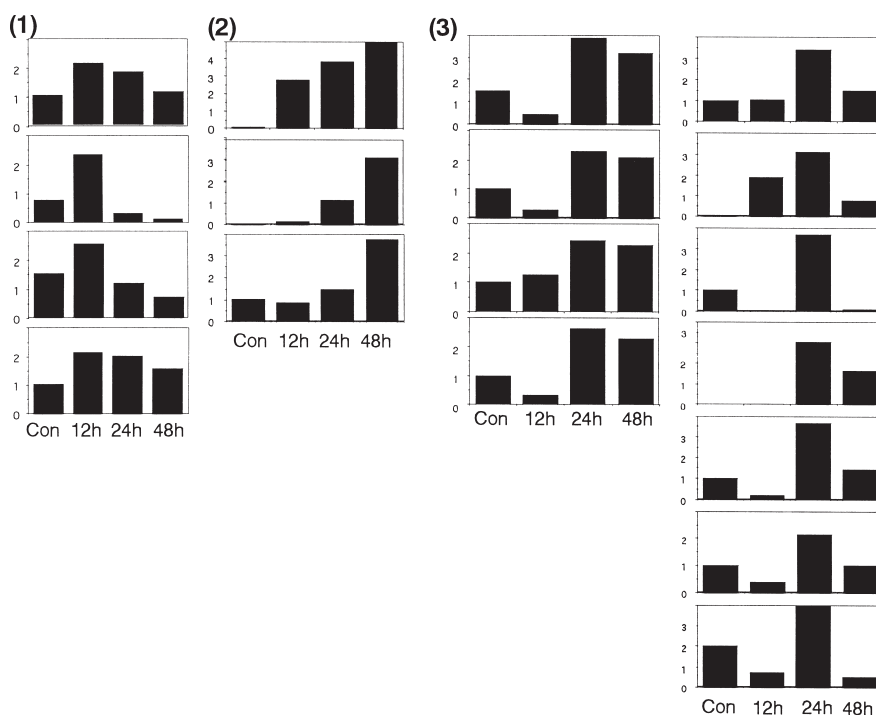


Fig. 1

くり増大した。

(3)残りの DEG はその発現が 24 時間目で最高となった。そのうち、DEG16、17、20、22 は 48 時間でも発現がまだ高いのに対し、残りの 7 種類は 48 時間目にはほとんど対照レベルまで低下した。

3. 3 DEG21 cDNA のクローニング

DEG21 cDNA をクローニングしたところ、1896 塩基の挿入配列をもつクローンが得られた。これは 305 残基のアミノ酸からなる蛋白質をコードでき、この部分はマウストリプトファン tRNA 合成酵素 (WRS) のカルボキシル末端側と 94% の相同性がみられた。従って、DEG21 はモルモット WRS であると結論された。

4 考 察

これまで DTH の研究は、サイトカイン、ケモカイン、接着分子など、他の研究から DTH での役割が想定されたものについて調べるという方向でなされてきた。今回我々は differential display 法により DTH 反応局所で昂進している遺伝子を直接単離するという従来とは別の方法を試みた。多くの生体内の反応がそうであるように DTH 反応も高度に複雑な反応であるから、我々のアプローチからまったく新しい知見が得られる可能性が高いと考えられたためである。その結果、250 種類の cDNA 断片が候補として得られ、無作為に 50 種類について調べたところ 28 種類が DTH 反応で発現が昂進していた。この結果は DTH 反応が多くの遺伝子の関係した高度に複雑な反応であるということと一致する。

28 種類の DEG 断片の中で 10 種類はすでに報告されている遺伝子であった (Table 1)。これらのうち、MHC や TCR の発現の増大は免疫応答におけるこれらの役割を反映しているのであろう。またリボソーム RNA や蛋白質、ミトコンドリアチトクロム b の発現の増大は、DTH 反応局所に浸潤した細胞の活発な代謝や蛋白合成を

反映しているのであろう。一方フェリチンは鉄イオンの無毒化、貯蔵に重要であり、特にマクロファージ内のフェリチンは細菌感染防御における鉄イオン代謝で重要な役割を果たしている⁸⁾。したがって DTH において、活性化されたマクロファージの鉄代謝が感染防御以外の未知の役割を演じている可能性があろう。またエラフィン⁹⁾はエラスターゼ特異的阻害剤で、上皮細胞で主に産生されるが好中球でも少量産生され、血管新生を制御しているといわれているから⁹⁾、DTH 反応で血管新生が関係している可能性があろう。最後に Hox-1.7 はホメオボックス遺伝子の一つで、本来は発生過程でパターン形成に関わる遺伝子とされてきたが、最近 T 細胞や NK 細胞の増殖と関連しているとの報告もある¹⁰⁾。しかし現在のところこの遺伝子が生体内の免疫反応に関わっているかどうかは不明である。

残りの 18 種類の DEG 断片はこれまでに報告されていない遺伝子ではないかと想定された。これらの遺伝子の発現の DTH 反応に伴う経時変化はおおよそ 3 種類に分類された。この発現のパターンが特定の細胞集団の数の増減を反映している可能性もあるが、浸潤細胞で発現が実際に昂進していて DTH 反応を制御している可能性もある。

DEG21 は新規遺伝子と想定された DEG 断片の一つであったがクローニングの結果モルモット WRS 遺伝子であることが明らかとなった。WRS 遺伝子はハウスキーピング遺伝子であるがマクロファージで IFN- γ によって強く誘導されること^{11, 12)}や、マクロファージの成熟化に伴い増加すること¹³⁾が報告されている。IFN- γ によって誘導される免疫関連分子にトリプトファンを取り込むのに必要なのではないかとの説¹⁴⁾もあるが、誘導される意義は現在のところ不明である。今回 DTH 反応でこの遺伝子の発現が昂進したことは WRS の重要な働きを示唆しているのではないかと考えている。

今後残りの遺伝子のクローニングを初め、それらのコードする蛋白質の DTH 反応における役割

を解明していかなければいけないと考える。

引用文献

- 1) Turk, J. L. : Delayed type hypersensitivity, 2nd edn. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1980.
- 2) Larsen, C. G., Thomsen, M. K., Gesser, B., et al. : The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8: Inhibition of a tuberculin skin reaction by anti-IL-8 antibody. *J. Immunol.* 155, 2151-2157, 1995.
- 3) Saulnier, M., Huang, S., Aguet, M., et al. : Role of interferon-gamma in contact hypersensitivity assessed in interferon-gamma receptor-deficient mice. *Toxicology* 102, 301-312, 1995.
- 4) Higashi, N., Yoshizuka, N., Ohuchi, A., et al. : Involvement of inflammatory cytokines in a delayed-type hypersensitivity reaction. *Cell. Immunol.* 161, 288-294, 1995.
- 5) Higashi, N., Yoshizuka, N. & Kobayashi, Y. : Phenotypic properties and cytokine production of skin-infiltrating cells obtained from guinea pig delayed-type hypersensitivity reaction sites. *Cell. Immunol.* 164, 28-35, 1995.
- 6) Bauer, D., Muller, H., Reich, J., et al. : Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* 21, 4272-4280, 1993.
- 7) Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., et al. : Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res.* 22, 5763-5764, 1994.
- 8) Harrison, P. M. & Arosio, P. : The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 479-514, 1996.
- 9) Webster, J., Jones, P.L., Sallenave, J.M., et al. : Elastase-specific inhibitor elafin and endogenous vascular elastase (EVE) in vascular development. *FASEB J.* 11, A224, 1997.
- 10) Caré A., Testa, U., Bassani, A., et al. : Coordinate expression and proliferative role of HOX B genes in activated adult T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4872-4877, 1994.
- 11) Fleckner, J., Rasmussen, H. H. & Justesen, J. : Human interferon gamma potently induces the synthesis of a 55-kDa protein (gamma 2) highly homologous to rabbit peptide chain release factor and bovine tryptophanyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 11520-11524, 1991.
- 12) Fleckner, J., Martensen, P. M., Tolstrup, A. B., et al. : Differential regulation of the human interferon inducible tryptophanyl-tRNA synthetase by various cytokines in cell lines. *Cytokine* 7, 70-77, 1995.
- 13) Krause, S. W., Rehli, M., Kreutz, M., et al. : Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation. *J. Leukoc. Biol.* 60, 540-545, 1996.
- 14) Xue, H. & Wong, T. F. : Interferon induction of human tryptophanyl-tRNA synthetase safeguards the synthesis of tryptophan-rich immune-system proteins: a hypothesis. *Gene* 165, 335-339, 1995.

ノックアウトマウスによる cell envelope のバリアー機能解析

京都府立医科大学 皮膚科学教室

山西 清 文

At the cell periphery of the stratum corneum is the cell envelope, a highly insoluble membranous structure composed of proteins polymerized via ϵ -(γ -glutamyl) lysine cross-linking. We generated mice with defective cell envelope by gene targeting for transglutaminase 1. The skin barrier function of TGase 1^{-/-} neonates, assessed by measurement of TEWL, by in vitro diffusion of mannitol, and by in vivo transdermal absorption of lucifer yellow, was markedly impaired, and these mice died within 4-5 h after birth. This knock-out study has clearly demonstrated that the cell envelope formation by TGase 1 gene is essential for maintenance of the skin barrier function.

1 緒 言

細胞は形質膜によって外界から隔てられた環境を維持し、生命活動を可能にしているが、われわれの生体を外部環境から保護し、内部環境を保つ生物学的なシステムとして、体表面に角質が産生される。角質は皮膚の表層を構成する表皮細胞（角化細胞）が終末分化（角化）の結果、細胞そのものが特異な変化をとげて作り出される構造である¹⁾。形態的には、細胞内には、細胞骨格を構成するケラチン中間径線維がフィラグリンとともに凝集して充満し、細胞の周囲には15から20nmに肥厚した電子密度の高い膜様構造が形成される。この構造はcell envelope（電顕的にはmarginal band）とよばれ、不溶性で化学的な抵抗性を有する ϵ -(γ -glutamyl) lysine結合で架橋された蛋白から成り、機械的あるいは化学的侵襲に対する障壁として機能すると考えられている。また、cell envelopeを構成する蛋白として、ロリクリン、インボルクリン、コーニフィンなどの構造蛋白以外に、プロテアーゼインヒビターであ

るエラフィン、シスタチン- α も見出され、微生物のプロテアーゼに対して抵抗性であることから、微生物に対する生体防御にも関わることが示唆される。 ϵ -(γ -glutamyl) lysine結合を触媒する酵素として、transglutaminases (TGases) (E 2.3.2.13)の存在が知られているが、TGase 2 (tissue TGase) は各組織に広く発現するのに対し、表皮角化細胞では、TGase 1 (keratinocyte TGase) とTGase 3 (epidermal TGase) が特異的に発現すること²⁻⁵⁾、さらに、遺伝性皮膚疾患である常染色体劣性葉状魚鱗癬 (MIM242300) の家系においてTGase 1の突然変異が見出され^{6, 7)}、葉状魚鱗癬の一部の患者においてcell envelopeの形成不全が見られることから、TGase 1がcell envelopeの形成に関与する可能性が推測される。本研究では、TGase 1のジーンターゲティングによりTGase 1遺伝子破壊マウスを作製し⁸⁾、cell envelopeの形成におけるTGase 1の役割を明確にし、cell envelopeの障害にともなう皮膚バリアー機能の変化を解析した。

2 実 験

pPNT および ES 細胞 R1 は、それぞれ、Dr. R. Mulligan、Dr. A. Nagy より供与された。mouse TGase1 genomic DNA は 129/SVJ genomic library (Stratagene) をスクリーニングして得られ、その5'上流5.5kbとexon 3より3'側



Analysis of cell envelope for skin barrier function in Knockout mice

Kiyofumi Yamanishi

Department of Dermatology, Kyoto Prefectural University of Medicine

の2.5kbの領域を pPNT の Xba I-Kpn I および Xho I-Not I site に挿入し、pPNTmtg 1 を構築した。 1×10^7 個の ES 細胞に直鎖化した pPNTmtg 1 (25 μ g) を electroporation で導入後、G418 (150 μ g/mL) と gancyclovir (0.51 μ g/mL) で選択を行い、ES 細胞コロニーを PCR (primers: P1、P2) と Southern hybridization (probe1、2) で解析し、相同組み換えを起こした ES クローンを単離した。ES クローン由来 F₂ マウスの遺伝子型は、PCR (primers: P 3、P 4、P 5) と Southern hybridization (probe 1、2) で解析した。Northern hybridization には Oligotex dT30 (TAKARA) で部分精製した5 μ g の poly (A)⁺ RNA を用い、各 TGase cDNA に対応する RT-PCR 産物をプローブにした。Hematoxylin-eosin 染色および *in situ* hybridization には4 μ m パラフィン組織切片を用いた。*In situ* hybridization は digoxigenin ラベルマウス TGase 1 および keratin14 antisense cRNA probe を用いて行った。蛍光抗体法によるロリクリンの観察には、抗マウス・ロリクリン抗体 (BA bCo) を用いた。透過電顕による観察は、常法に従って実施した。

経皮水分蒸散 (TEWL) の測定には Courage and Khazaka Tewameter TM210 を用いた。*In vitro* における経皮吸収の測定は、新生仔マウス背部皮膚を採取し、拡散セル (有効表面積: 0.126 cm²) に挟んで 37°C Ringer 液 (pH7.4) に平衡化したのちに、表皮側に [³H] mannitol (NEN) (10 μ Ci/mL) を添加後、500 μ L の溶液を真皮側から採取し、その直後に等の Ringer 液を添加する操作を経時的に行った。*In vivo* における蛍光色素の経皮吸収は、新生仔マウスをベトリ皿に固定し背部を 1 mM lucifer yellow を含む Ringer 液 (pH7.4) に 1 時間浸したのちに、背腹方向に 5 μ m の凍結切片を作製し、propidium iodide (5 μ g/mL) で対比染色後、蛍光顕微鏡で観察した。

3 結果

TGase 1 のジーンターゲッティングは、129SVJ

マウスゲノムライブラリーからクローニングした TGase 1 ゲノム DNA を用いて、pPNT をもとに、exon 1 から 3 が Neo によって破壊されるようにデザインしたターゲティングベクターを構築し⁸⁾、ES 細胞株 R 1 に導入後、G418 と gancyclovir による positive-negative selection を行い、TGase 1 遺伝子の一方の allele に相同組換えをおこした ES クローンを単離した。ES クローン #27 と #32 を C57BL/6 マウスの胚盤胞にマイクロインジェクションし、偽妊娠マウスに移植した。その結果、#27 よりキメラマウスが得られ、キメラマウスと B6 を交配しヘテロマウス (TGase 1^{+/+}) を得、さらにヘテロマウス同士を交配して TGase 1 欠損マウス (TGase 1^{-/-}) を作製した。TGase 1^{-/-}における TGase ファミリーの mRNA を Northern blotting で解析したところ、TGase 1 mRNA は、TGase 1^{+/+}では TGase 1^{+/+}の 1/2 であったが、TGase 1^{-/-}では検出されなかった。また、TGase 2、TGase 3 mRNA には変化が認められなかった。

TGase 1^{-/-}新生仔マウスは、やや体格が小さく、皮膚は緊張して皺壁が少なく、紅皮症状態を呈した (図1)。TGase 1^{-/-}は生後全くほ乳せず、4-5 時間のうちに死亡した。なかには、葉状魚

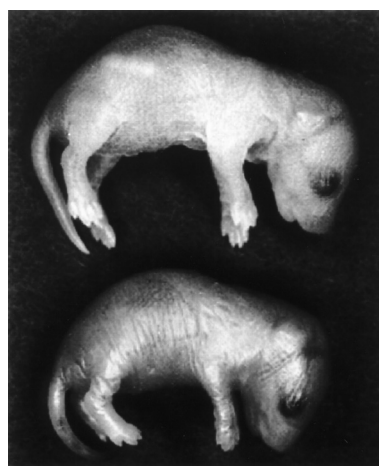


図1 TGase 1 欠損マウスの肉眼的所見
正常新生仔マウス (上) に比較して、TGase 1 欠損マウスは (下) は体格が小さく、皮膚は緊張し、皺壁が粗く、紅皮症状態である。

鱗癬の新生児でみられる collodion baby を思わせるような、透過性のうすい膜で包まれている新生仔も認められた。

新生仔マウス皮膚の HE 染色像では、TGase 1^{-/-}の表皮は伸展し、角層は、正常マウスでみられる明確な層状構造とは異なり、均質で、下層から中層にかけて扁平なケラトヒアリン顆粒の残存が認められた。In situ hybridization では、正常マウス表皮において TGase1 mRNA は有棘層上層から顆粒層にかけて発現するが、TGase 1^{-/-}ではその発現は認められず、対照として、ケラチン 14mRNA の発現は、正常と同様に、基底層から有棘層数層にかけて認められた。Cell envelope の主要な構成蛋白であるロリクリンの局在は TGase 1^{-/-}の角層において低下し、TGase 1^{-/-}では、ロリクリン局在化の障害が示唆された。

18.5 日胎仔表皮の電顕的観察では、TGase 1^{-/-}マウスでは、正常のコンパクトな角質の構造とは異なり、角質細胞は膨化し、ケラトヒアリン F 顆粒の残存が認められた。marginal band (cell envelope) は消失し、その代わり、細胞膜にそって電子密度の高い顆粒が認められた (図 2)。これらの所見から、TGase 1^{-/-}では、ケラトヒアリン F 顆粒の分解の遅滞と cell envelope 形成の

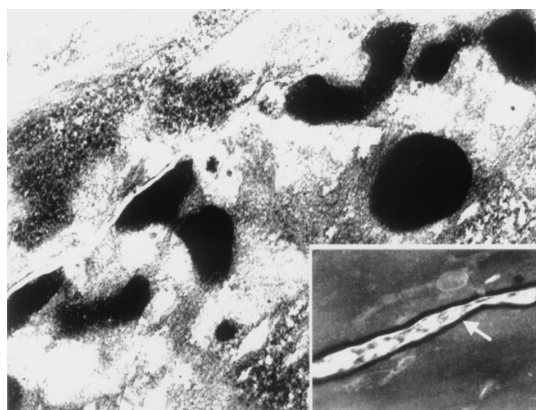


図2 TGase 1 欠損マウス角質の電顕所見

正常マウス (胎生 18.5 日) では、角質細胞辺縁は肥厚した cell envelope がみられるが (囲み内矢印)、TGase 1 欠損マウスでは cell envelope は欠落し、細胞膜に沿って、あるいはその近傍の細胞質内に高電子密度顆粒がみられる。

障害が示唆された。

皮膚の生理学的な指標として、皮膚のバリア機能を解析するために、まず、エバポリメーターを用いて経皮水分蒸散 TEWL の測定を行った。その結果、TGase 1^{+/+}や TGase 1^{+/-}に比し、TGase 1^{-/-}の TEWL は 100 倍以上亢進していることが明らかになった (図 3)。また、新生仔皮膚をもちいて mannitol の透過性を測定したところ、TGase 1^{-/-}皮膚における mannitol の透過速度は対照の 1000 倍以上と著明な亢進を示し (図 4)、さらに lucifer yellow の経皮吸収実験では、lucifer yellow を 1 時間新生仔背部皮膚に接

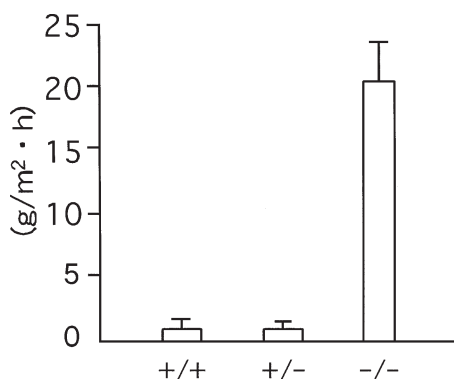


図3 TGase 1 欠損マウスの経表皮水分蒸散 (TEWL)

野生型 (+/+), ヘテロ変異新生仔マウス (+/-) に比較して、TGase 1 欠損マウス (-/-) では TEWL は 100 倍以上に増加している。

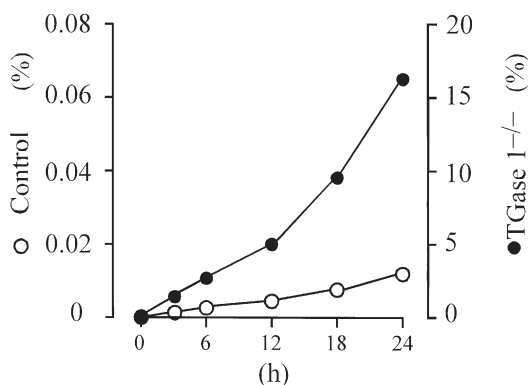


図4 TGase 1 欠損マウスにおける mannitol の経皮吸収

新生仔マウス剥離皮膚をもちいて mannitol 透過速度を測定した結、正常マウス (○) に比較して、TGase 1 欠損マウス (●) では 1000 倍以上の増加が観察される。

触させた場合、対照では lucifer yellow は角層に止まるが、TGase 1^{-/-}では真皮にまで到達することが確認された。これらの結果から、TGase 1^{-/-}では皮膚のバリアー機能が著しく障害されていると考えられた。

4 考 察

TGase 1 遺伝子欠損マウスの解析から、TGase 1 遺伝子は角質の発生と成熟、とくに cell envelope の形成に必須であり、生後の外部環境への適応と個体の生存のために極めて重要な遺伝子であることが示唆された。TGase 1^{-/-}における皮膚のバリアー機能の著しい障害は、cell envelope の欠損に起因すると考えられるが、cell envelope を構成する前駆蛋白の重合不全、あるいは、cell envelope を覆う lipid envelope の何れが主要な役割を担っているのか、今後の研究課題である。

引用文献

- 1) Roop DR: Defects in the barrier. *Science*, 267, 474-475, 1995.
- 2) Yamanishi K, Inazawa J, Liew F-M, *et al.*: Structure of the gene for human transglutaminase 1. *J. Biol. Chem.*, 267, 17858-17863, 1992.
- 3) Ueda E, Ohno S, Kuroki T, *et al.* The ϵ isoform of protein kinase C mediates transcriptional activation of the human transglutaminase 1 gene. *J. Biol. Chem.*, 271, 9790-9794, 1996.
- 4) Yamada K, Matsuki M, Morishima Y *et al.*: Activation of the human transglutaminase 1 promoter in transgenic mice: Terminal differentiation-specific expression of the TGM1-lacZ transgene in keratinized stratified squamous epithelia. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 2223-2231, 1997.
- 5) Kim I-G, Lee S-C, Lee J-H, *et al.*: Structure and organization of the human transglutaminase 3 gene: evolutionary relationship to the transglutaminase family. *J. Invest. Dermatol.*, 103, 137-142, 1994.
- 6) Huber M, Rettler I, Bernasconi K, *et al.*: Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science*, 267, 525-528, 1995.
- 7) Russell LJ, DiGiovanna JJ, Rogers GR, *et al.*: Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive lamellar ichthyosis. *Nature Genet.*, 9, 279-283, 1995.
- 8) Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, *et al.*: Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 1044-1049, 1998./

眼粘膜への障害を指標とした化粧品素材の安全性評価のための基礎的検討 ——眼内動態の定 的評価法の確立

長崎大学 薬学部

中 村 純 三

The eye contains several different structures with specific physiological functions. The eye also has protective mechanisms for serving its primary function of ensuring proper vision which are responsible for cleaning the outside and inside of the eye and for eliminating foreign matter. These protective mechanisms include solution drainage, lacrimation, drug absorption via the vascularized conjunctiva, corneal barrier, melanin binding, aqueous humor flow, and the blood-eye barrier. Although protective, these mechanisms also disturb the ocular delivery and decrease the bioavailability of ophthalmic drugs. The availability and pharmacokinetics of instilled drugs in the eye is mainly controlled by three factors : (1) disposition of drugs in precorneal area, (2) the permeability of cornea, and (3) elimination of drugs from the eye.

Generally, topical application of drugs is the method of choice under most circumstances because of its convenience and safety for ophthalmic chemotherapy. However, upon instillation of an ophthalmic drug, most of it is rapidly eliminated from the precorneal area due to drainage by the naso-lacrimal duct and dilution by tear turnover ; this is readily absorbed into the systemic circulation. To be effective, most of the drug also should penetrate the tight barrier of the corneal epithelium into the inside of the eye. Such behaviour can result in poor bioavailability and increased severity in a systemic adverse effects from topically applied drugs.

The purpose of this study was to develop the quantitative assessment of drug behaviour in the eye for the safety assessment of the cosmetic compound as an index of the damage of ocular membrane. Therefore, the penetration of drugs was measured across the isolated corneal and conjunctival membranes of the albino rabbit using a two-chamber glass diffusion cell. In summary, the conjunctival and cornea of the rabbit eye are sufficiently different in permeation character to control the extent and pathway for ocular absorption of drugs.

1 緒 言

眼粘膜への障害を指標とした化粧品素材の安全性を評価するためには、眼局所の解剖学的および生理学的な特徴を考慮した上で、眼粘膜の薬物透過性や、眼局所における薬物動態を正確に把握し、薬物動態を評価・予測できる方法論を確立することが重要である。しかし、これらに関する系統的な研究は少ないのが現状である。

著者は、このような背景を踏まえ、眼粘膜の薬物透過性および眼局所における薬物動態を系統的に解析し、その機構や影響を及ぼす要因を検討した^{1~6)}。これらの知見を基にして、眼粘膜の薬物透過性および眼局所における薬物動態を考慮した

速度論的モデルを構築した。

2 実 験

2.1 試薬および薬液の調製

Befunolol および carteolol は、それぞれ科研製薬株式会社および大塚製薬株式会社より供与されたものを用いた。Timolol および tilisolol は、それぞれ萬有製薬株式会社および日清製粉株式会社より供与されたものを用いた。Thyrotropin-releasing hormone(TRH) および luteinizing hormone-releasing hormone(LHRH) は、田辺製薬株式会社より供与されたものを用いた。p-Nitrophenyl β -cellopentaoside (PNP) は、生化学工業株式会社より購入したものをを用いた。Atenolol, methylparaben および fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) (平均分子量 4,400 : FD-4、平均分子量 9,400 : FD-10) は、Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より購入したものをを用いた。Salicylic acid, pindolol および o-ethoxybenzamide は、ナカライテスク株式会社



Studies on the safety assessment of the cosmetic compound as an index of the damage of ocular membrane : development of quantitative assessment of drug behaviour in the eye

Junzo Nakamura

School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University

より購入した。その他の合成試薬は市販特級品を用いた。Salicyl methionine は、当研究室で合成したものを用いた。Phosphate-buffered saline (PBS; pH7.4) は、等張リン酸緩衝液 (NaH_2PO_4 および Na_2HPO_4) と生理食塩水を 1 : 1 (v/v) で攪拌し調製した。

2.2 In vitro 眼粘膜透過実験

日本白色種雄性家兎 (体重 2.0 ~ 3.0kg) を sodium pentobarbital の過量投与により屠殺後、角膜と結膜を摘出し、拡散チャンバーに装着した。Donor 側に薬物 (5mM; β 遮断薬、0.2mM; PNP、0.5mM; TRH および LHRH、0.05mM; FITC-dextran) を含む glutathione bicarbonated Ringer's solution (GBR) を 4mL、receiver 側に GBR を 4mL 添加し、 O_2/CO_2 (95 : 5%) の混合ガスを通じながら、角膜を $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、結膜を $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ でインキュベートした。経時的に receiver 側の GBR を採取した。また、角膜の上皮層をメスで剥離した上皮層剥離角膜 (scraped cornea) を用いた透過実験も同様に行った。採取試料の定量は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法または蛍光光度法により行った。

2.3 分配実験

水相に 50mM phosphate buffer (pH7.4)、有機相に 1-octanol を用いた。予め水相および有機相を、それぞれ 1-octanol および pH7.4 phosphate buffer で飽和させた後、水相に β 遮断薬を 0.2mM の濃度で溶解した。水相と有機相を 1 : 1 (v/v) で混合し、5min ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) 攪拌した。みかけの分配係数 (PC) 値は、有機相添加前と添加後の水相中の薬物濃度を HPLC で測定し算出した。

2.4 代謝実験

拡散チャンバーに角膜または結膜を装着後、donor 側および receiver 側に薬物 (0.5mM; TRH および LHRH) を含む GBR を 4mL 添加した。 O_2/CO_2 (95 : 5%) の混合ガスを通じながら、角膜

を $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、結膜を $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ でインキュベートし、経時的に donor 側および receiver 側の GBR を採取した。試料の定量は、HPLC 法により行った。

2.5 データ解析

膜透過パラメータは、薬物透過曲線の当てはめ計算から算出した。高速ラプラス逆変換アルゴリズムを用いた非線形最小二乗法プログラム MULTI (FILT) で膜透過パラメータを算出した。MULTI (FILT) は、京都大学大学院薬学研究科山岡清助教授より供与されたものを用いた。当てはめ計算には、パーソナルコンピュータ (PC-9821 V10 NEC) を用いた。

2.6 薬物の定量

β 遮断薬は試料溶液 (50 μL) に、0.1M HCl (50 μL) および内部標準物質 (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ salicylic acid; atenolol, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ salicyl methionine; befunolol, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pindolol; carteolol, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o-ethoxybenzamide; tilisolol, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ methyl paraben; timolol) の methanol 溶液 (100 μL) を加えて、微量遠心機 (M15-3 : 佐久間製作所) により、12,000xg、10min 遠心した後、得られた上澄 50 μL を HPLC (ポンプ: LC-6A (島津製作所)、検出器: RF-535 または SPD-10A (島津製作所)、オートインジェクター: AS-8010 (東ソー)、レコーダー: CR-3A (島津製作所)) により測定した。

TRH、PNP および LHRH は、試料溶液 (200 μL) に内部標準物質 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ protocathechuic acid (TRH)、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o-ethoxybenzamide (LHRH、PNP)) の methanol 溶液 (50 μL) を加えて、微量遠心機 (M15-3 : 佐久間製作所) により、12,000xg、10min 遠心した後、得られた上澄 (80 μL) を β 遮断薬と同様の HPLC システムで測定した。

FITC-dextran は、試料溶液 (100 μL) に、PBS (4mL) を添加し、分光蛍光光度計 (RF-1500 : 島津製作所) で測定した (蛍光測定波長 : Ex.489nm、Em.515 nm)。

3 結果

眼は、様々な生理学的機能をもった細胞や粘膜などで構成され、その構造は非常に複雑である。Fig. 1 は、眼の正面図および断面図を示している。眼局所は眼球以外に、涙腺や涙小管および鼻涙管等の付属器官から構成されている。眼球の外側は、角膜および強膜などの粘膜で構成され、強膜表面および眼瞼の裏側は結膜組織で覆われている。

角膜は前眼部を構成する組織で体表面側より、角膜上皮、ボウマン膜、角膜実質、デスメ膜、および角膜内皮の5層からなる時計皿状の透明組織である。角膜上皮は5～6層からなる細胞層で、輪部で結膜上皮に移行しており再生能力が強い。角膜実質は厚さの90%を占め、コラーゲン繊維と線維芽細胞が豊富である。内皮は単層の細胞層で再生能力はない。角膜の組成は約80%が水分で、その他はコラーゲン繊維と酸性ムコ多糖の多いことが特徴である。

結膜は上皮層と結合組織である固有層からなり、血流に富んだ薄い粘膜である。眼瞼と眼球の間に入り込み結膜嚢を形成し、眼球および眼瞼の運動と形態維持に重要な働きをしている。また、結膜上皮には杯細胞が存在し、ムチンなどの粘液成分を分泌している³⁾。

一般に、薬物の眼粘膜透過は単純拡散であり、薬物の物理化学的性質が膜透過に影響を及ぼすこ

とが知られている。点眼した薬物の一部分は、角膜や結膜などの眼粘膜組織に移行した後、眼内または全身循環に吸収されるため、薬物の眼粘膜透過性を把握することは、眼内または全身循環への薬物移行性を評価する上で重要であると考えられる。

3.1 β 遮断薬の眼粘膜透過性

眼粘膜透過性を支配する薬物側の要因として、主に脂溶性および分子量の二つがあり、前者は眼粘膜に対する分配過程を決定し、後者は眼粘膜中の拡散過程を決定づけると考えられる。そこで、 β 遮断薬の眼粘膜透過性を調べ、薬物の脂溶性が眼粘膜透過性に及ぼす影響を検討した¹⁾。Table 1 に示した5種類の β 遮断薬を用いて、in vitro 眼粘膜透過実験を行った。Befunolol, carteolol および timolol は、国内で緑内障治療に用いられている薬物である。Tilisolol は非選択的 β 遮断薬であり、家兎の眼圧を低下させることが報告されている。ここに示した5種類の薬物は分子量がほぼ同じであるが、1-octanol と緩衝液間の分配係数(PC) 間の対数値は、-1.5 から -0.009 の間で変化しており、脂溶性が異なることが認められた。

3.1.1 β 遮断薬の眼粘膜透過性

In vitro 眼粘膜透過実験は、Fig. 2 に示すガラス製の拡散チャンバーを用いた。In vitro 膜透過実験は in vivo の実験系と異なり、涙液や眼房水の影響、鼻涙管への薬物排出などの影響を受けずに、一定した条件で薬物の膜透過性を評価することが可能である。家兎から摘出した眼粘膜を拡散チャンバーの中央部分に装着し、donor 側に薬物を溶解した緩衝液(4 mL)を、receiver 側に緩衝液(4 mL)のみを添加し、receiver 側の緩衝液を

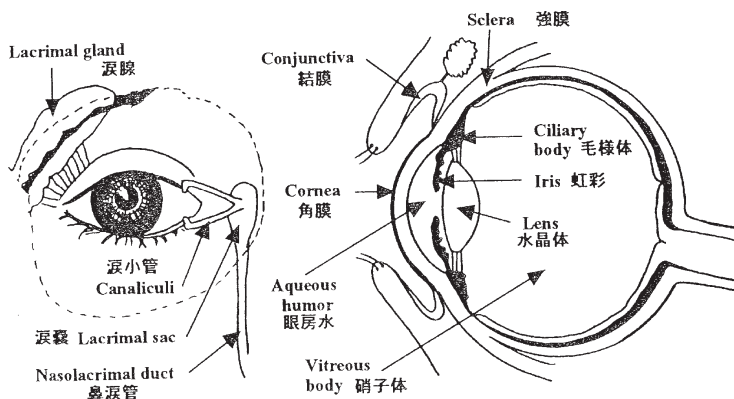
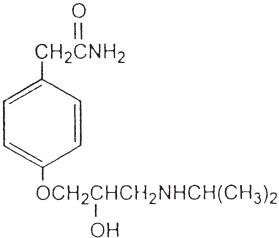
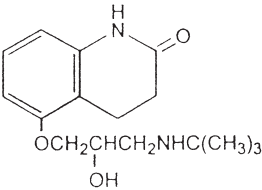
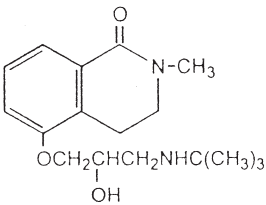
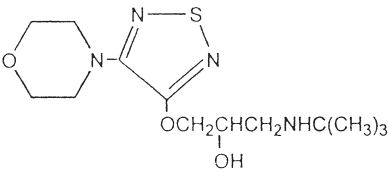
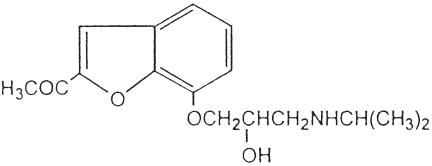


Fig. 1 Structure of eye

経時的に採取した。また、角膜では上皮層とそれ以外の層のバリアー特性を明らかにするため、上皮層を剥離した角膜についても透過実験を行った。緩衝液には、GBR を使用した。

Fig. 3 は β 遮断薬の累積薬物透過量－時間曲線を示したものである。薬物適用後、累積透過曲線は一定の lag time を示した後、右上がりの直線を示した。実験開始後 240min での角膜の累積薬物

Table 1 Chemical structures and physicochemical properties of β -blockers used in vitro penetration experiment.

Drug	Structure	Molecular weight	Log PC
Atenolol		266.3	-1.5
Carteolol		292.4	-0.81
Tilisolol		304.4	-0.24
Timolol		316.4	-0.16
Befunolol		291.4	-0.009

PC: apparent partition coefficient between 1-octanol and pH 7.4 buffer at 22 °C.

透過量は、他の眼粘膜と比較して少なかった (Fig. 3 A)。上皮層を剥離した場合では、正常な角膜と

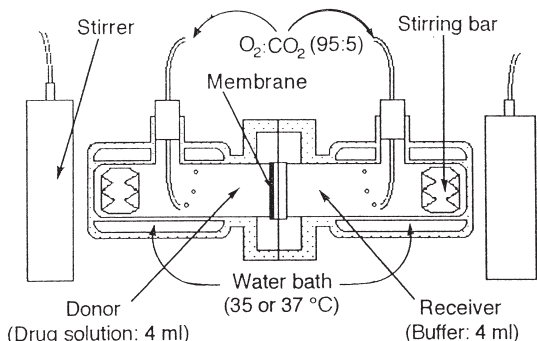


Fig. 2 Diffusion chamber for in vitro penetration experiment.

比較して、累積薬物透過量が増大する結果を示した (Fig. 3 B)。結膜の累積薬物透過量は、角膜と比較して大きな値を示した (Fig. 3 C)。

3. 1. 2 In vitro 拡散モデルと眼粘膜透過パラメータの算出

薬物の眼粘膜透過性を解析するため、Fig. 4 に示す donor 中薬物濃度を一定、receiver 側を sink condition とし、眼粘膜を一枚膜とした in vitro 拡散モデルを構築した。薬物の膜透過を拡散過程として捉えるモデルは、実際に即したモデルと考

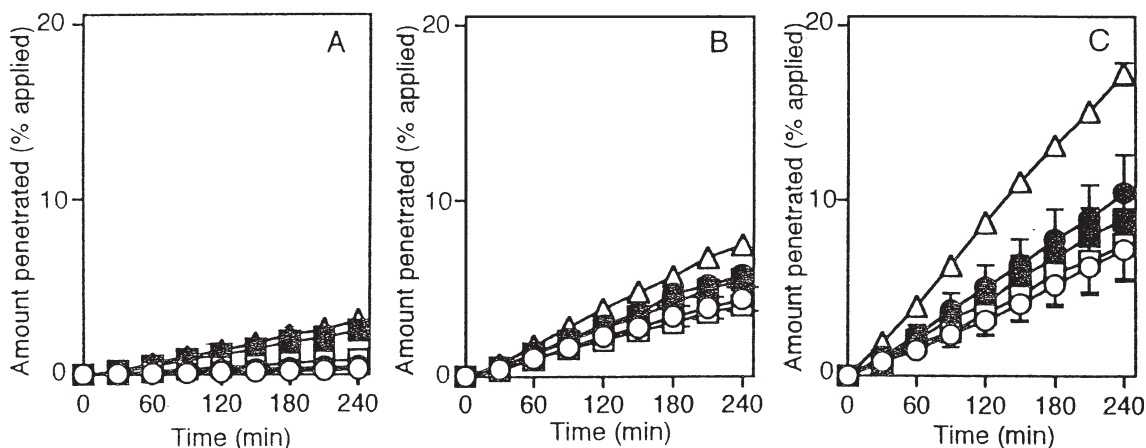


Fig. 3 Penetration profiles of β -blockers through coenea (A), scraped cornea (B) and conjunctiva (C) in albino rabbits.

(○) Atenolol, (●) carteolol, (□) tilisolol, (■) timolol, (△) befunolol. Each point represents the average of at least three experiments $\pm$ S.E.

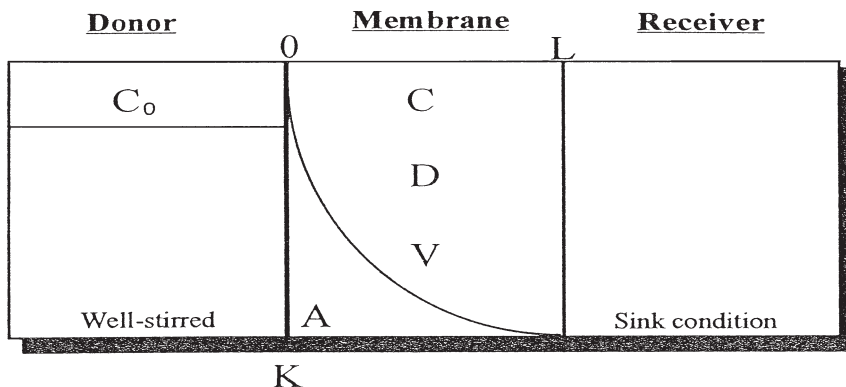


Fig. 4 In vitro diffusion model for drug penetration through ocular membrane in albino rabbits.

Abbreviation: C_0 , the initial concentration in the donor cell; C , the drug concentration in the membrane; V , the membrane volume; D , the diffusion coefficient of drug in the membrane; K , the partition coefficient of drug between the membrane and donor solution; A , the effective diffusion area; L , the effective diffusion length in the membrane.

えられ、主に経皮吸収の分野で広く使われている。このモデルを用いた解析法によって、薬液から膜への薬物分配係数および膜中の薬物拡散係数などの物理化学的パラメータを求めることができる。Receiver 側に出現する累積薬物量 (Q_{receiver}) を表すラプラス次元式を誘導すると以下ようになる。

$$Q_{\text{receiver}} = C_0 Z / s / \sinh d \quad (1)$$

$$d = L(s/D)^{0.5}$$

$$Z = KV/d$$

(1) 式中の s はラプラス演算子、 C_0 は donor 中薬物初濃度、 L は膜の厚さ、 D は拡散定数、 K は分配係数、 V は膜の容積を表す。なお、膜の中での薬物拡散距離および膜の容積を正確に求めることが困難なため、拡散パラメータ D' (D/L^2)、そして分配パラメータ K' (KV) という複合パラメータを定義した。膜透過実験で得られた累積薬物透過量 - 時間曲線を (1) 式に当てはめ、薬物が膜の

中を移動する過程を示す拡散パラメータ、および薬物が donor 側から膜に移行する過程を示す分配パラメータを、高速ラプラス逆変換を利用した非線形最小二乗法プログラム MULTI (FILT) により算出した。

Table 2 は、当てはめ計算によって得られた膜透過パラメータをまとめたものである。また、得られた拡散パラメータおよび分配パラメータから、膜透過定数 K_p ($K'D'/A$ (膜の表面積))、lag time ($1/6/D'$) を算出した (Table 2)。さらに、上皮層剥離処置による膜透過性増加の指標として、角膜に対する上皮層を剥離した角膜の膜透過定数の比 (SCCR/CR)、角膜および結膜に対する薬物移行性の指標として、結膜に対する角膜の膜透過定数の比 (CR/CJ) をそれぞれ算出した (Table 2)。角膜の lag time は、0.18hr から 0.31hr までの値を示したのに対し、上皮層を剥離した角膜ではおよそ

Table 2 Penetration parameters of β -blockers through cornea, scraped cornea and conjunctiva using in vitro diffusion model.

β -Blocker	N	Lag time (hr)	D' (hr^{-1})	$K' \times 10^2$ (cm^3)	$K_p \times 10^2$ (cm/hr)	Ratio
Cornea						
Atenolol	6	0.21	0.78	0.37	0.33	
Carteolol	6	0.31	0.53	1.0	0.61	
Tilisolol	6	0.18	0.91	0.98	1.0	
Timolol	6	0.23	0.74	3.5	3.0	
Befunolol	4	0.25	0.66	4.9	3.7	
Scraped cornea						SCCR/CR ^{a)}
Atenolol	3	0.09	1.8	2.5	5.3	16
Carteolol	6	0.10	1.7	3.6	7.0	11
Tilisolol	3	0.08	2.0	2.1	4.8	4.8
Timolol	6	0.11	1.5	3.9	6.6	2.2
Befunolol	3	0.09	1.8	4.4	9.0	2.4
Conjunctiva						CR/CJ ^{b)}
Atenolol	5	0.22	0.76	9.9	9.5	0.035
Carteolol	5	0.12	1.4	7.9	14	0.044
Tilisolol	6	0.15	1.1	6.9	10	0.10
Timolol	6	0.14	1.2	7.7	12	0.25
Befunolol	4	0.07	2.5	7.1	23	0.16

Abbreviation: N, the number of experiment; D' (D/L^2), diffusion parameter; K' (KV); partition parameter; K_p ($D' K'/A$ (surface area of ocular membrane)), permeability coefficient. ^{a)}The ratio of permeability coefficient of scraped cornea (SCCR) to that of cornea (CR). ^{b)} The ratio of permeability coefficient of cornea (CR) to that of conjunctiva (CJ).

0.1hr となり、lag time の減少が認められた。一方、上皮層を剥離することによって、ほとんどの β 遮断薬で、拡散パラメータ、分配パラメータおよび膜透過定数は増加した。SCCR/CR は、全ての β 遮断薬で 1.0 以上の値を示したが、最も水溶性の高い atenolol で 16、最も脂溶性の高い befunolol で 2.4 となり、水溶性の高いものほど大きな値を示した。

結膜の lag time は角膜の場合と同じ、若しくは小さい値を示した。結膜の拡散パラメータは atenolol の場合を除き、他の β 遮断薬では角膜よりも大きい値を示した。分配パラメータおよび膜透過定数は、全ての β 遮断薬で角膜よりも大きい値を示した。CR/CJ は薬物脂溶性が増大するに伴い、増加する傾向が認められた。

3.1.3 β 遮断薬の眼粘膜透過に及ぼす薬物脂溶性の影響

膜透過に対する薬物脂溶性の影響を解明するために、 β 遮断薬の脂溶性と、眼粘膜の膜透過定数、拡散パラメータおよび分配パラメータとの関係を示した (Fig. 5)。角膜の薬物透過定数は、 β 遮断薬の脂溶性に依存して増加する有意な相関を示した (Fig. 5A)。一方、上皮層を剥離した角膜

および結膜の薬物透過性は、角膜の場合ほど顕著な増加は認められなかった。全ての眼粘膜において、拡散パラメータは薬物脂溶性に影響を受けず、ほぼ一定の値を示した (Fig. 5B)。このことから、薬物の脂溶性は、拡散パラメータに影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、分配パラメータと薬物脂溶性の関係において、上皮層を剥離した角膜と結膜では、薬物脂溶性の影響はほとんど認められなかったのに対し、角膜の分配パラメータは、薬物の脂溶性に依存して増加した (Fig. 5C)。以上の結果から、脂溶性は主に角膜表面への分配過程に影響を及ぼすことが明らかになった。

3.2 水溶性薬物の眼粘膜透過性

一般に、ペプチド医薬品のような水溶性で比較的分子量の大きい薬物は、眼粘膜透過性が低いことが知られているものの、水溶性薬物の眼粘膜透過機構に関する情報は極めて少ない。そこで、ペプチド医薬品等のモデルとして、Table 3 に示す分子量の異なる 4 種類の水溶性薬物を使用し、眼粘膜の薬物透過性に及ぼす分子量の影響を調べた⁶⁾。今回使用した薬物の 1-octanol と緩衝液間の分配係数は 0.005 以下を示し、いずれの薬物も極めて高い水溶性を示した。

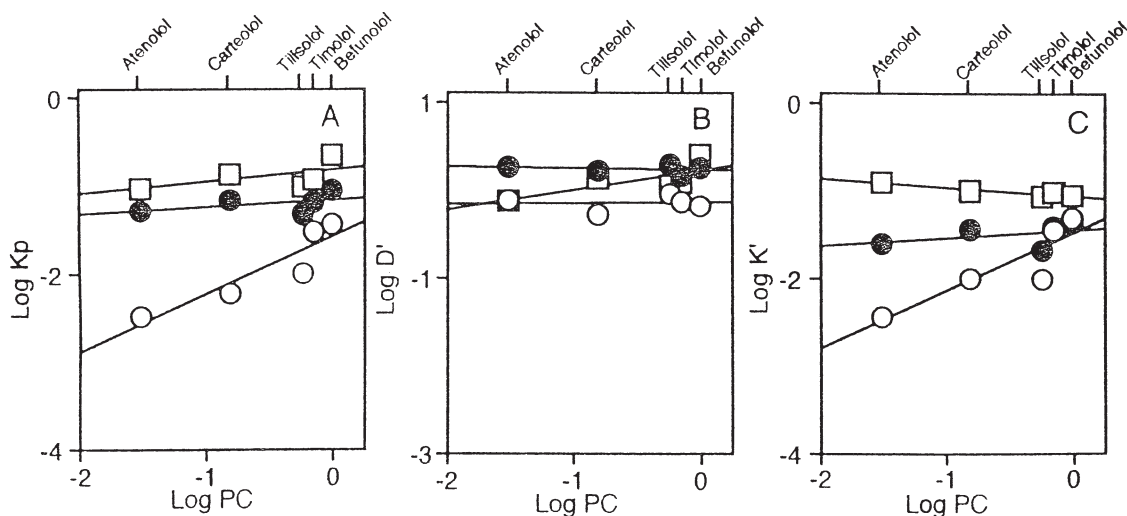


Fig. 5 Relationship between logarithmic values of apparent partition coefficient (PC) between 1-octanol and pH7.4 buffer and permeability coefficient (K_p ; A), diffusion parameter (D' ; B) or partition parameter (K' ; C) in ocular membrane. (○) Cornea, (●) scraped cornea, (□) conjunctiva.

3.2.1 水溶性薬物の眼粘膜透過性

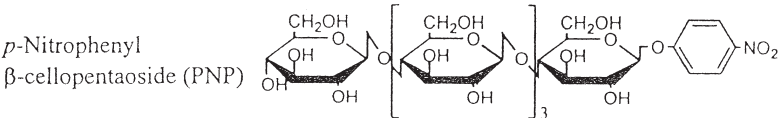
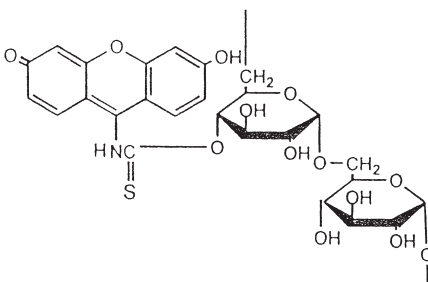
水溶性薬物の眼粘膜透過性は、Fig. 2の拡散チャーターを用いて評価した。Fig. 6には、水溶性薬物の累積薬物透過量-時間曲線を示した。実験開始後240minの角膜の累積薬物透過量は、他の眼粘膜と比較して極めて少なかった。また、上皮層を剥離することによって、角膜における薬物透過量は顕著に増大した。全ての薬物において結膜の累積透過量は角膜よりも高い値を示した。水溶性薬物の眼粘膜組織による代謝実験を行った結果、角膜組織中でLHRHが代謝による分解を若干受けた以外は、実験開始後240minまで有意な薬物の

分解は認められなかった。

3.2.2 水溶性薬物の膜透過パラメータの算出

薬物の膜透過機構を解明するために、in vitro拡散モデルに基づく解析を行い、膜透過に関するパラメータを算出した (Table 4)。角膜のlag timeは、0.15hrから0.39hrまでの値を示したのに対し、上皮層を剥離した角膜では0.09hrから0.58hrまでの値を示した。分配パラメータおよび膜透過定数は、上皮層を剥離することにより著しく増加した。また、角膜の膜透過定数は他の粘膜と比較し

Table 3 Chemical structures and physicochemical properties of hydrophilic drugs used in vitro penetration experiment.

Drug	Structure	Molecular weight
Thyrotropin-releasing hormone (TRH)	PyroGlu-His-ProNH ₂	362.4
<i>p</i> -Nitrophenyl β-cellopentaoside (PNP)		949.8
Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)	PyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr H ₂ NGly-Pro-Arg-Leu-Gly	1182.3
Fluorescein isothiocyanate-dextran		4,400 (FD-4) 9,400 (FD-10)

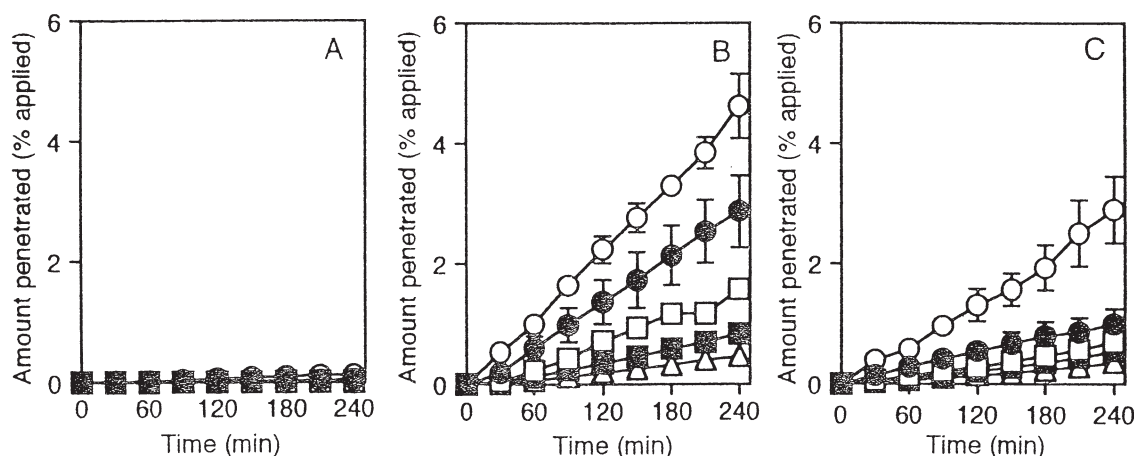


Fig. 6 Penetration profiles of hydrophilic drugs through cornea (A) , scraped cornea (B) and conjunctiva (C) in albino rabbits. (○) TRH, (●) PNP, (□) LHRH, (■) FD-4, (△) FD-10. Each point represents the average of at least three experiments $\pm$ S.E.

Table 4 Penetration parameters of hydrophilic drugs through cornea, scraped cornea and conjunctiva using in vitro diffusion model.

Hydrophilic drug	N	Lag time (hr)	D' (hr ⁻¹)	K' x 10 ² (cm ³)	Kp x 10 ² (cm/hr)	Ratio
Cornea						
TRH	5	0.16	1.0	0.13	0.15	
PNP	6	0.15	1.1	0.04	0.06	
LHRH	7	0.39	0.43	0.03	0.02	
FD-4	5	0.33	0.51	0.03	0.02	
FD-10	4	0.26	0.65	0.02	0.01	
Scraped cornea						SCCR/CR ^{a)}
TRH	3	0.09	1.9	2.3	5.1	34
PNP	4	0.23	0.73	4.2	3.5	58
LHRH	4	0.44	0.38	4.5	2.0	100
FD-4	4	0.49	0.34	3.2	1.1	55
FD-10		0.58	0.29	2.2	0.63	63
Conjunctiva						CR/CJ ^{b)}
TRH	4	0.14	1.2	2.4	3.7	0.041
PNP	6	0.14	1.2	0.66	1.0	0.060
LHRH	6	0.19	0.88	0.84	0.94	0.021
FD-4	5	0.28	0.60	1.2	0.70	0.029
FD-10	6	0.32	0.53	0.88	0.46	0.022

Abbreviation: N, the number of experiment; D' (D/L²), diffusion parameter; K' (KV); partition parameter; Kp (D' K'/A(surface area of ocular membrane)), permeability coefficient. ^{a)}The ratio of permeability coefficient of scraped cornea (SCCR) to that of cornea (CR). ^{b)} The ratio of permeability coefficient of cornea (CR) to that of conjunctiva (CJ).

て極めて低い値を示した。SCCR/CR は、全ての薬物で高い値を示し、上皮層を剥離することにより膜透過性が顕著に増大することが明らかになった。さらに、SCCR/CR は β 遮断薬の場合と比較した結果、より大きな値になることが示された。CR/CJ は、 β 遮断薬の atenolol および carteolol と同等もしくはそれ以下の値を示した。これらのことから、角膜では、上皮層が水溶性の薬物や分子量の大きい薬物の透過に対して、強固なバリアー機能を有することが明らかになった。

結膜の拡散パラメータは、FD-10 の場合を除く他の薬物では、角膜とほぼ同様の値を示した。分配パラメータおよび膜透過定数は、全ての薬物で角膜よりも大きい値を示した。

3. 2. 3 水溶性薬物の眼粘膜透過に及ぼす薬物分子量の影響

膜透過に及ぼす分子量の影響を調べるために、薬物の分子量と膜透過定数、拡散パラメータおよび分配パラメータとの関係を示した (Fig. 7)。全ての眼粘膜で膜透過定数は、分子量の増大に伴い減少し、これらの間には有意な相関が認められた。

(Fig. 7 A)。拡散パラメータは、全ての眼粘膜で分子量の増加に伴い減少する傾向を示し、結膜では有意な相関を示した (Fig. 7 B)。分配パラメータも拡散パラメータと同様、分子量の増加に伴い減少する傾向を示し、角膜において分子量と有意な相関が認められた (Fig. 7 C)。

4 考 察

得られた結果を基にして、眼粘膜透過の模式図を Fig. 8 にまとめた。角膜の構造を薬物透過性の観点から分類した場合、上皮層、実質層および内皮層の3層が薬物透過のバリアーとして機能している。上皮層は電気的膜抵抗値が高く tight な細胞層であるが、結膜の上皮層は、apical 側の細胞にしか tight junction が存在していないため、角膜に比べ leaky な粘膜であることが知られている。眼粘膜の種類による透過性の違いは、このような組織学的な差違に起因していると考えられる。

生体膜を透過する薬物の透過経路は、細胞膜に分配し細胞内を通過する経路 (transcellular route) と、細胞間隙 (paracellular route) や細胞表面の孔 (pore) を通過する水溶性の経路 (aqueous route)

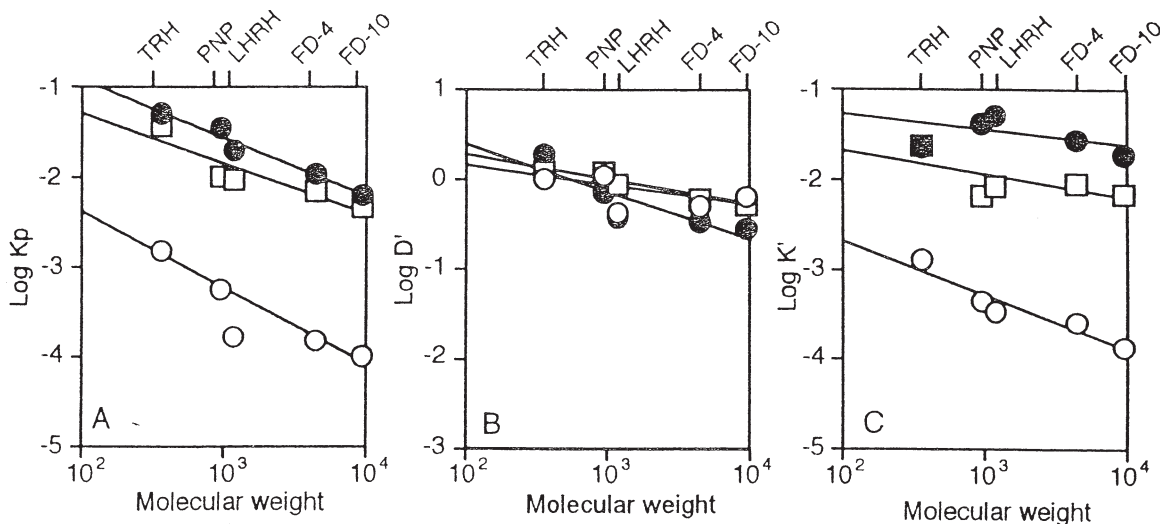


Fig. 7 Relationship between molecular weight and permeability coefficient (Kp; A), diffusion parameter (D'; B) or partition parameter (K'; C) in ocular membrane.

(○) Cornea, (●) scraped cornea, (□) conjunctiva.

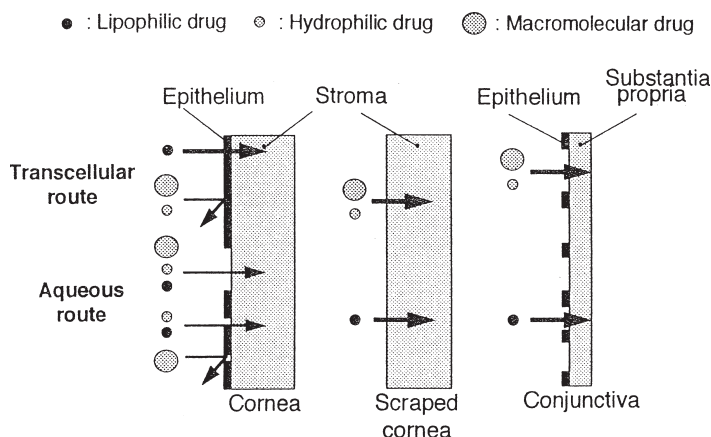


Fig. 8 Schematic representation of drug penetration mechanism through cornea, scraped cornea and conjunctiva.

が存在する。一般に、脂溶性の高い薬物は脂質成分で構成される細胞膜に分配し、transcellular routeを透過することが可能である。一方、水溶性の高い薬物は細胞膜に分配せず、主にaqueous routeを透過すると考えられる。このことから、transcellular routeおよびaqueous routeを透過できる β 遮断薬の方が、aqueous routeしか透過できない水溶性薬物よりも膜透過性が高いと考えられる。

β 遮断薬の角膜透過性は拡散過程ではなく、分配過程に依存することが明らかとなった。これは、角膜表面のほとんどが上皮細胞で覆われているため、脂溶性の変化が分配過程へ及ぼす影響が大きいと考えられる。また、より広範囲な薬物脂溶性を有する薬物を用いた研究結果より、眼粘膜透過性と薬物脂溶性との関係には、parabolicな相関を有することが報告されている。

分配パラメータは分配係数に膜の容積、すなわち膜表面積と膜の厚さを組み込んだ複合パラメータである。また、水溶性薬物は細胞膜にほとんど分配しないことから、水溶性薬物の分配パラメータは、細胞膜に対する薬物の分配ではなく、透過できるaqueous routeの有効表面積を反映した値と考えられる。よって、拡散パラメータはaqueous route内での拡散性を反映するものと考えられる。家兎の角膜および結膜におけるaqueous routeの

pore半径は、それぞれ2.0nmおよび4.9nm、細胞間隙の面積は角膜表面積1.0cm²あたり0.019×10⁻³mm²、結膜表面積1.0cm²あたり0.46×10⁻³mm²と報告されていることから、角膜でのaqueous routeの占める面積は、結膜よりも極めて狭いことが明かである。このことは、水溶性薬物の角膜の分配パラメータが、結膜と比較して小さな値を示した結果と一致している。一方、結膜は、上皮層の構造が角膜と異なり、細胞同士の接着が緩やかで、水溶性薬物の透過できる有効表面積、つまりaqueous routeの占める表面積が角膜より広いと、分配パラメータが大きい値を示したと考えられる。

上皮層を剥離することによって β 遮断薬の角膜透過性は増大し、特に水溶性薬物では顕著な増加を示した。これは、薬物透過バリアーである上皮層がなくなり、水およびcollagenで構成されている実質層への分配性が上昇したためと考えられる。また、分子量が大きい水溶性薬物では、lag timeの増加および角膜中の薬物拡散性が減少した。これは、外から膜中へ水分が流入することにより角膜実質が膨潤し、薬物の拡散距離が長くなるためと考えられる。

これらの結果は、眼粘膜の薬物透過性に加えて、眼内動態の定量的評価法を確立するための基礎的知見になりうるものと考えている。

引用文献

- 1) Sasaki H., Igarashi Y., Nagano T., et al : Penetration of β -blockers through ocular membranes in albino rabbits, J.Pharm. Pharmacol, 47, 17-21, 1995.
- 2) Sasaki H., Yamamura K., Tei C., et al : Ocular permeability of FITC-dextran with absorption promoter for ocular delivery of peptide drug, J. Drug Targeting, 3, 129-135, 1995.
- 3) Sasaki H., Nagano T., Yamamura K., et al : Ophthalmic preservatives as absorption promoters for ocular drug delivery, J. Pharm. Pharmacol, 47, 703-707, 1995.
- 4) Sasaki H., Yamamura K., Nishida K., et al : Delivery of drugs to the eye by topical application, Progress in Retinal and Eye Res, 15, 583-620, 1996.
- 5) Sasaki H., Ichikawa M., Kawakami S., et al : In-situ ocular absorption of ophthalmic β -blockers through ocular membranes in albino rabbits, J. Pharm. Pharmacol, 49, 140-144, 1997.
- 6) Sasaki H., Ichikawa M., Yamamura K., et al : Ocular membrane permeability of hydrophilic drugs for ocular peptide delivery J. Pharm. Pharmacol, 49, 135-139, 1997.

紫外線誘発 DNA 損傷および修復酵素の 細胞内分布状態の三次元的表示

奈良県立医科大学 ラジオアイソトープ実験施設

森 俊 雄

Two major DNA damage produced by 254-nm UV light are cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) and (6-4) photoproduct (6-4PP). Both photolesions are repaired in normal human cells by nucleotide excision repair (NER). However, little is known about where CPDs are repaired or where 6-4PPs are repaired in relation to the various sub-nuclear structures. The present study was performed to aim at three-dimensional demonstration of UV-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei. We first investigated the repair kinetics of CPD and 6-4PP using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with damage-specific monoclonal antibodies in normal human and xeroderma pigmentosum complementation group C (XP-C) cells. We also examined the kinetics of repair DNA synthesis (unscheduled DNA synthesis, UDS) using a quantitative immunofluorescence method with anti-5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. We confirmed the normal repair in normal human cells and the impaired repair in XP-C cells. Then, using laser scanning confocal microscopy, we succeeded in three-dimensional visualization of the nuclear localization of CPDs, 6-4PPs and UDS in individual human cells. The typical three-dimensional images of photolesions or UDS at various repair times reflected well the repair kinetics obtained by ELISA or immunofluorescence. The important finding is that the punctate, not diffusely spread, nuclear localization of unrepaired 6-4PPs was found at 2 h after irradiation. Similarly, the focal nuclear localization of UDS was observed both during the first and the second 3h-repair periods. The present results suggest that both 6-4PPs and CPDs are non-randomly repaired from nuclei in normal human cells.

1 緒 言

太陽光に含まれる紫外線 (特に、B 紫外線) は細胞 DNA 中にシクロブタン型ダイマー (CPD) や (6-4) 型ダイマー (6-4PP) といった DNA 損傷を誘起し、皮膚がんを発生させる¹⁾。ヒトにおいては、これらの DNA 損傷はヌクレオチド除去修復機構 (NER) によって修復され、修復機構に欠陥を持つ常染色体劣性遺伝病、色素性乾皮症 (XP) 患者では太陽光被ばく部位の皮膚がん発生頻度は著しく高くなる²⁾。近年、DNA 修復研究は驚くべき速度で進展し、E を除いて 7 種類の相補性群 (A-G) からなる XP の原因遺伝子全てがクローニングされるに至った。また、精製修復蛋白を用いることにより、修復反応を試験管内で再構築することが可能となり、NER は約 30 種類の

蛋白が順序よく関与する反応であることが明らかとなってきた^{3, 4)}。こうした中、修復蛋白の一つである XPG は細胞核内でドット状に分布し、修復に伴い再分布することが報告された⁵⁾。この結果は、試験管内修復実験に加えて、DNA 損傷や修復酵素を実際の修復反応の場である細胞核内で観察することの必要性和学問的おもしろさを示唆するものである。そこで本実験では、主要な 2 種類の紫外線誘発 DNA 損傷の生成および修復について、我々が樹立した損傷特異モノクローナル抗体を共焦点レーザー顕微鏡に応用することにより個々の細胞レベルで三次元的に可視化することを試みた。

2 実 験

2.1 細胞

正常ヒト皮膚由来 (MSU-1、MSU-2)、および相補性群 C に属する XP 患者皮膚由来 (XP1 CTA) の線維芽細胞を実験に用いた。細胞はダルベッコ変法 MEM 培地に 10% の牛胎児血清を加えた培養液中で培養した。



Three-dimensional visualization of ultraviolet-induced DNA damage and its repair in human cell nuclei

Toshio Mori, Ph.D.

Radioisotope Research Center
Nara Medical University

2.2 CPD および 6-4PP の修復動態の解析

細胞に紫外線（主として 254nm）を照射した直後および各時間修復後に DNA を抽出し、損傷特異モノクローナル抗体（CPD に対する TDM-2 抗体、6-4PP に対する 64M-2 抗体）を利用した ELISA 法（酵素標識免疫法）により各サンプル DNA 中の損傷を定量した⁶⁾。

2.3 紫外線照射後の修復過程における細胞内 DNA 損傷の三次元的可視化

細胞に紫外線を照射した直後および各時間修復後に細胞を固定し、細胞 DNA を変性した後、損傷特異モノクローナル抗体、Biotin 標識 2 次抗体、さらに Streptavidin-FITC により DNA 損傷を蛍光染色した。同時に、細胞核 DNA を propidium iodide (PI) で蛍光染色した。共焦点レーザー顕微鏡 (InSIGHTplus-IQ、Meridian Instruments 社製) を用いて蛍光画像を作成し、各サンプル当たり 0.2μm 間隔の約 25 枚の連続平面画像を付属したソフトで立体化し三次元画像を構築した⁷⁾。

2.4 紫外線照射後の修復 DNA 合成（不定期 DNA 合成）動態の解析

紫外線照射後、細胞を fluorodeoxyuridine および bromodeoxyuridine (BrdU) 存在下で種々の時間修復培養した。細胞を固定し DNA を変性させた後、抗 BrdU モノクローナル抗体、Biotin 標識 2 次抗体、さらに Streptavidin-FITC により修復 DNA 合成部位を蛍光染色した。同時に、細胞核 DNA を PI で蛍光染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、1 サンプル当たり約 100 細胞について、単個細胞当たりの FITC および PI の蛍光量を定量し、修復 DNA 合成量を FITC/PI として計算した。なお、サンプル中に一部混入する定期 DNA 合成細胞は極めて強力な FITC 蛍光を示し、修復 DNA 合成の計算から除外した。

2.5 紫外線照射後の細胞内修復 DNA 合成の三次元的可視化

2.4 と同様の処理をした細胞において、共焦点レーザー顕微鏡を用い、修復 DNA 合成および細胞核 DNA を示す FITC および PI の蛍光画像を作成し、0.2μm 間隔の約 25 枚の連続平面画像からなる三次元蛍光画像を構築した⁷⁾。

3 結果

3.1 ヒト細胞における CPD および 6-4PP の修復動態の定量

図 1 に、30J/m² の紫外線を照射された正常および XP-C 細胞における CPD および 6-4PP の修復動態の ELISA 法による定量の結果を示す。二つの正常細胞はほぼ同様の修復動態を示した。つまり、6-4PP の 90% 以上を 3 時間以内に修復し、また、CPD の 40% および 50% をそれぞれ照射後 10 および 24 時間に修復除去した。一方、XP-C 細胞は照射後 24 時間以内に両損傷をほとんど修復できなかった。

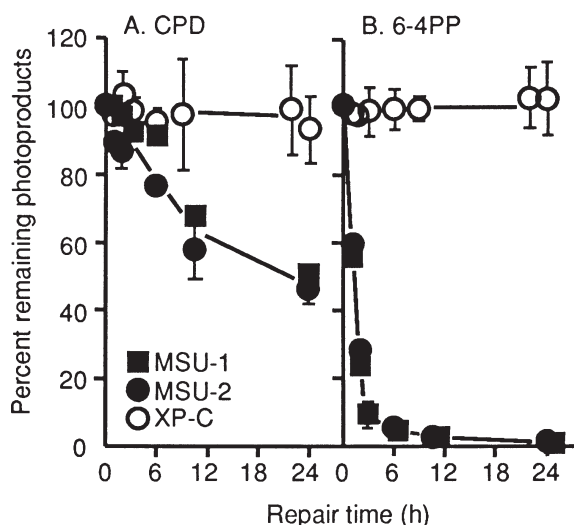


図1 30J/m²の紫外線を照射された正常およびXP-C細胞におけるCPDおよび6-4PPの修復動態のELISA法による定

3. 2 紫外線照射後の修復過程における細胞内 DNA 損傷の三次元的可視化

図 2 に、 $30\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線照射直後および修復過程の正常細胞 (MSU-2) における 6-4PP および細胞核 DNA の三次元蛍光画像を示す。画像は細胞核の下側半分のみを表示しており、細胞核内部の観察を可能とした。また、損傷の画像を大きく示し、対応する細胞核 DNA を右下に小さく表示した。未照射の細胞には 6-4PP を示す蛍光画像はほとんど見られなかった (図 2 A)。しかし、照射直後には強い画像が得られた (図 2 B)。損傷と DNA の三次元蛍光画像が重なり合うことから、6-4PP が細胞核内一面に誘発されていることがわかる。6-4PP の蛍光画像は照射後の修復時間に依存して次第に弱まった (図 2 C ~ F)。興味あることに、修復 2 時間後に修復されずに残った 6-4PP の画像は細胞核内でドット状に見られた。

図 3 に、XP-C 細胞の各修復過程での 6-4PP および細胞核 DNA の三次元蛍光画像を示す。MSU-2 細胞の場合と同様に、未照射の細胞には 6-4PP の蛍光画像はほとんど見られないが (図 3 A)、照射直後には DNA 画像と重なり合う明るい蛍光画像が得られた (図 3 B)。しかしながら、6-4PP の明るい蛍光画像は照射後 6 時間修復させても何ら変化しなかった (図 3 C ~ F)。

図 4 に、正常細胞 (MSU-2) の各修復過程での CPD および細胞核 DNA の三次元蛍光画像を示す。未照射の細胞には CPD の蛍光画像はほとんど見られないが (図 4 A)、照射直後には明るい蛍光画像が得られた (図 4 B)。照射 6 時間後でも、CPD の明るい蛍光画像に大きな変化が見られなかった。これは高々 20% しか修復されないとする ELISA の結果 (図 1) とつじつまが合う。

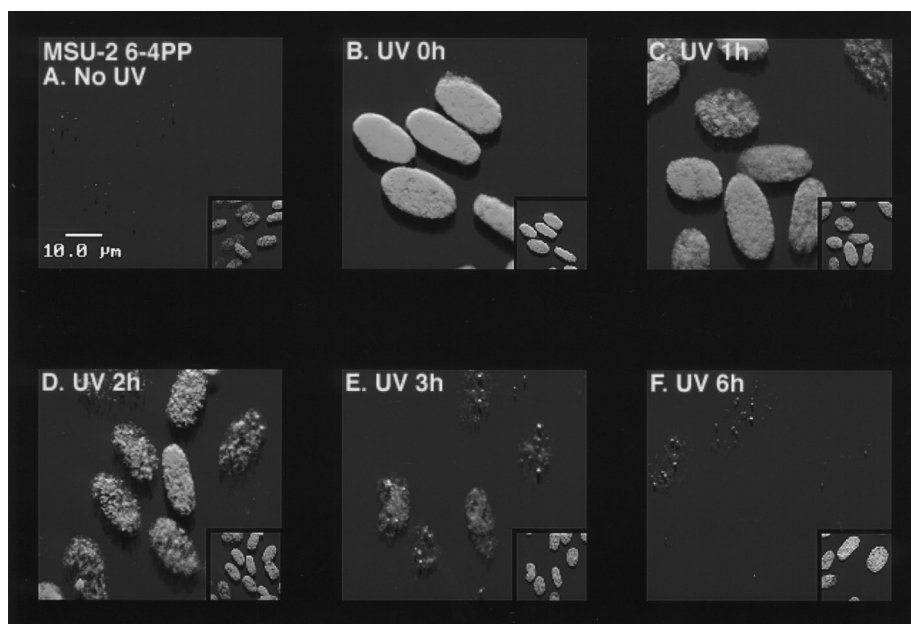


図 2 $30\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線照射直後および修復過程の正常細胞 (MSU-2) における 6-4PP および細胞核 DNA の三次元蛍光画像

画像は細胞核の下側半分のみを表示しており、細胞核内部の観察を可能とした。また、損傷の画像を大きく示し、対応する細胞核 DNA を右下に小さく表示した。A) 未照射、B) 照射直後、C) 1 時間修復、D) 2 時間修復、E) 3 時間修復、F) 6 時間修復。

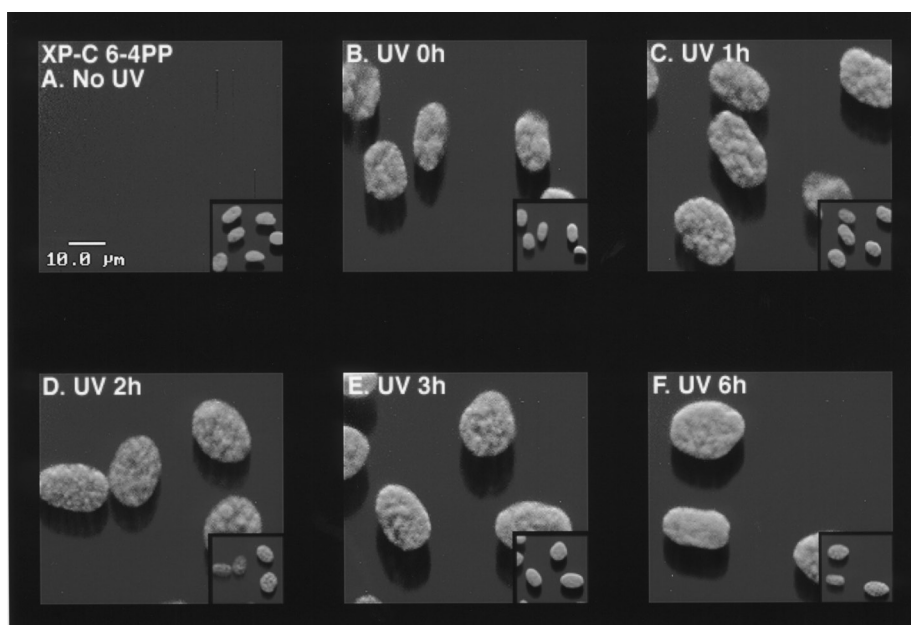


図3 30J/m²の紫外線照射直後および修復過程のXP-C細胞における6-4PPおよび細胞核DNAの三次元蛍光画像

A) 未照射、B) 照射直後、C) 1時間修復、D) 2時間修復、E) 3時間修復、F) 6時間修復。

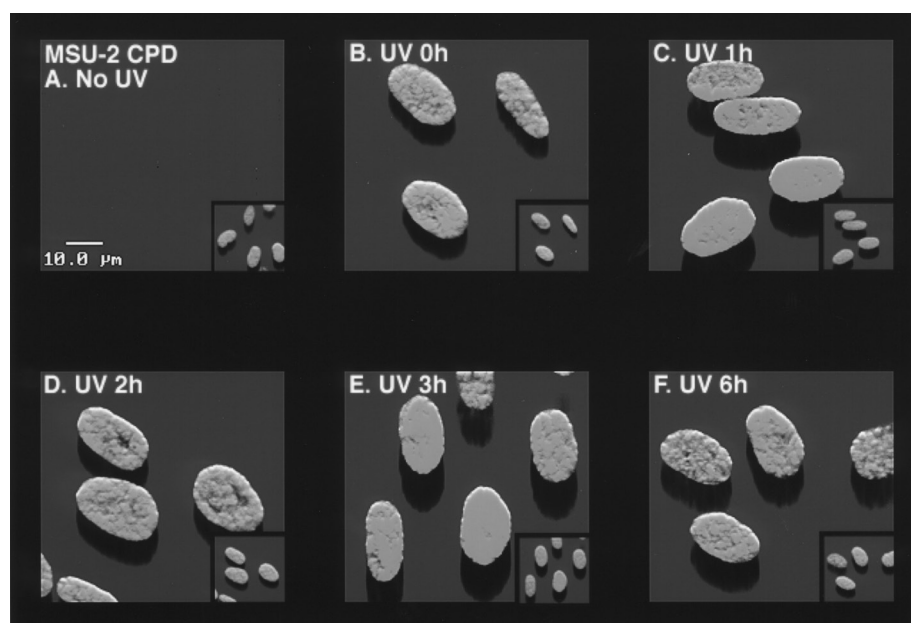


図4 30J/m²の紫外線照射直後および修復過程の正常細胞(MSU-2)におけるCPDおよび細胞核DNAの三次元蛍光画像

A) 未照射、B) 照射直後、C) 1時間修復、D) 2時間修復、E) 3時間修復、F) 6時間修復。

3.3 紫外線照射後の修復 DNA 合成 (不定期 DNA 合成) 動態の定量

図 5 に、 $30\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線を照射後の正常および XP-C 細胞における修復 DNA 合成動態の定

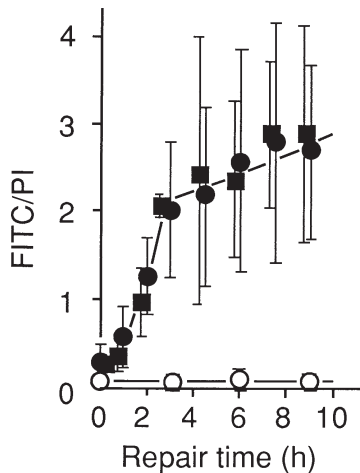


図 5 $30\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線を照射後の正常および XP-C 細胞における修復 DNA 合成動態の定量
シンボルは図 1 と同様。

量の結果を示す。二つの正常細胞はほぼ同様の修復 DNA 合成動態を示した。照射後 3 時間までは極めて効率が良かったが、それ以降は効率が低下した。一方、XP-C 細胞は照射後 9 時間の間全く修復 DNA 合成を示さなかった。

3.4 紫外線照射後の細胞内修復 DNA 合成の三次元的可視化

図 6 に、 $30\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線照射後の正常細胞 (MSU-2) における修復 DNA 合成および細胞核 DNA の三次元蛍光画像を示す。修復が始まっていない照射直後には修復 DNA 合成を示す蛍光画像が全く見られないが (図 6 A)、その後修復時間に依存して次第に画像は明るくなった (図 6 B ~ E)。修復 3 時間で、修復 DNA 合成蛍光画像が細胞核内でドット状を示すのが興味深い。

図 7 に、XP-C 細胞の修復 DNA 合成および細胞核 DNA の三次元蛍光画像を示す。照射後 6 時間まで、全く修復 DNA 合成が行われていないこ

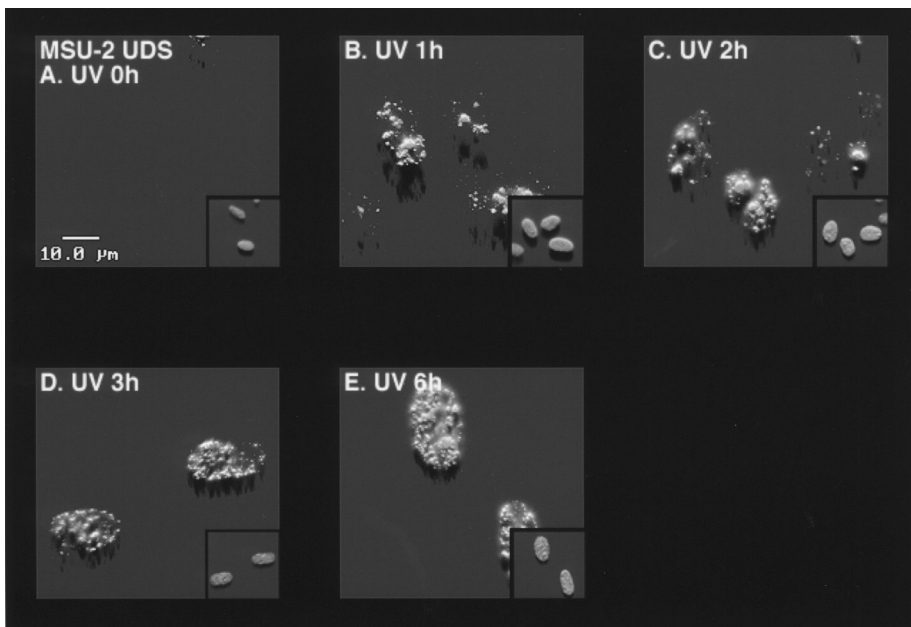


図 6 $30\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線照射後の正常細胞 (MSU-2) における修復 DNA 合成および細胞核 DNA の三次元蛍光画像

画像は細胞核の下側半分のみを表示しており、細胞核内部の観察を可能とした。また、修復 DNA 合成の画像を大きくし、対応する細胞核 DNA を右下に小さく表示した。A) 照射直後、B) 1 時間修復、C) 2 時間修復、D) 3 時間修復、E) 6 時間修復。

とがわかる。

また、図 8 に、紫外線照射直後からの 3 時間、および 3 時間目から 6 時間目にかけての 3 時間における正常細胞 (MSU-2) の修復 DNA 合成および細胞核 DNA の三次元蛍光画像を示す。どちらの場合も修復 DNA 合成蛍光画像が細胞核内でドット状を示した。

4 考 察

254nm 紫外線はヒト細胞 DNA 中に主に CPD と 6-4PP を誘起する。さらに、CPD と 6-4PP は共通して NER で修復され、損傷を含む約 30 ヌクレオチドが DNA から修復除去された後、生じたギャップは修復 DNA 合成によってうめられ

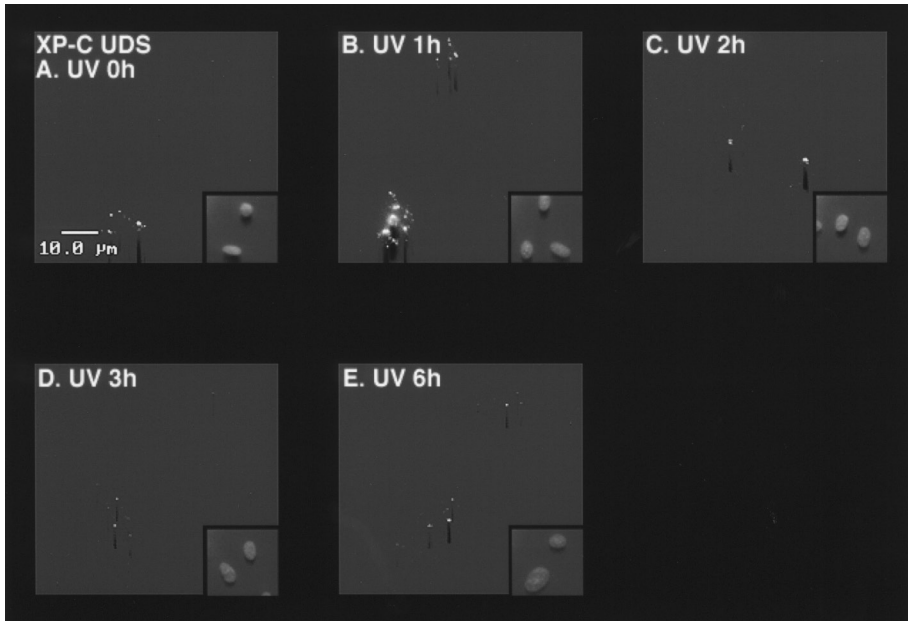


図 7 30J/m² の紫外線照射後の XP-C 細胞における修復 DNA 合成および細胞核 DNA の三次元蛍光画像

A) 照射直後、B) 1 時間修復、C) 2 時間修復、D) 3 時間修復、E) 6 時間修復。

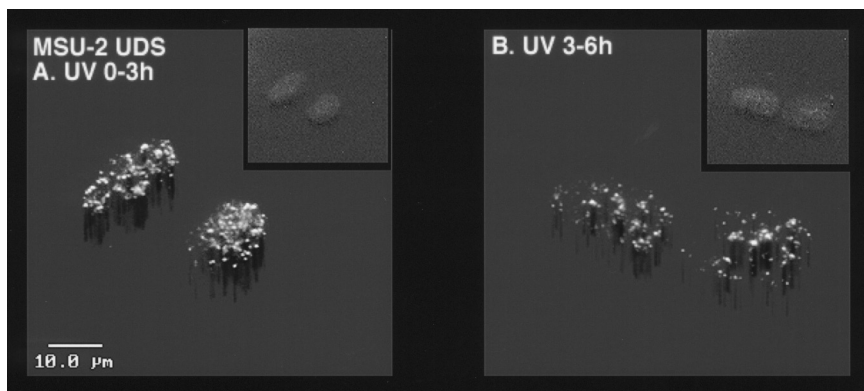


図 8 30J/m² の紫外線照射直後からの 3 時間、および 3 時間目から 6 時間目にかけての 3 時間における正常細胞 (MSU-2) の修復 DNA 合成および細胞核 DNA の三次元蛍光画像

A) 照射直後からの 3 時間の修復 DNA 合成、B) 照射後 3 時間目から 6 時間目にかけての 3 時間の修復 DNA 合成。

る。それ故、図1と図5の結果を比較することで、
各々の損傷の生成割合などが計算できる。計算の
結果、6-4PPのCPDに対する生成割合は0.34
となった。また、照射後3時間までの修復DNA
合成は、75%の6-4PPと25%のCPDが関与す
ること、さらに、3時間以降の修復DNA合成は、
ほぼ100%CPDが関与するすることが明らかと
なった。

紫外線照射直後および修復過程のヒト細胞に
おいて、私達は世界で初めてCPD、6-4PPおよ
び修復DNA合成の三次元的表示に成功した。得
られた蛍光画像は各損傷や修復DNA合成に極め
て特異的であることが確認され、さらに、修復に
伴う画像変化は、ELISA法や免疫染色法による
定量的結果を見事に反映することもわかった。こ
れらの結果は3次元蛍光画像が極めて信頼性の
高いものであることを示している。この新技術の
開発がもたらした最大の発見は、6-4PPの修復
が細胞核内で均一ではないことを示唆したこと
である(図2D)。この結果は、修復DNA合成さ
れる部位も細胞核内で均一ではないという図6D
により支持された。さらに、6-4PPが主に関与
する照射後3時間の修復DNA合成も、CPDが
ほぼ全面的に関与する3時間目以降の修復DNA
合成も共に細胞核内で不均一に起こることが明
らかとなった(図8)。以上の結果は、CPDも6
-4PPも共に細胞核内で不均一に修復されること
を示すものとなった。

DNA損傷の修復過程の三次元表示に成功した
ことから、続いてNERに関係する修復蛋白の画
像作成を試みた。不幸なことには、損傷検出に用
いた細胞固定法は修復蛋白のエピトープを破壊
することが判明した。現在、修復蛋白の染色に成
功した新固定法を損傷検出に応用する実験を進
めている。

5 謝 辞

本研究は奈良県立医科大学皮膚科学研究室と
の共同研究であり、関係する諸先生に心より感謝

いたします。また、本研究の遂行を可能にしたコ
スメトロジー研究振興財団研究助成に対し深く
感謝いたします。

引用文献

- 1) Clingen PH, Arlett CF, Cole J et al: Correlation of
UVC and UVB cytotoxicity with the induction
of specific photoproducts in T-lymphocytes
and fibroblasts from normal human donors,
Photochem. Photobiol., 61, 163-170, 1995.
- 2) Cleaver JE, Kraemer KH: Xeroderma
pigmentosum and Cockayne syndrome, In:
Scriber CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D
(eds.): The Metabolic and Molecular Bases
of Inherited Disease, McGraw-Hill, New York,
1995, 4393-4419.
- 3) Sancar A: Mechanisms of DNA excision
repair, Science 266, 1954-1956, 1994.
- 4) Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MKK
et al: Mammalian DNA nucleotide excision
repair reconstituted with purified protein
components, Cell, 80, 859-868, 1995.
- 5) Park MS, Knauf JA, Pendergrass SH et al:
Ultraviolet- induced movement of the human
DNA repair protein, Xeroderma pigmentosum
type G, in the nucleus, Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 93, 8368-8373, 1996.
- 6) Mori T, Nakane M, Hattori T et al: Simultaneous establishment of monoclonal
antibodies specific for either cyclobutane
pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct from
the same mouse immunized with ultraviolet-
irradiated DNA, Photochem. Photobiol., 54,
225-232, 1991.
- 7) Nakagawa A, Kobayashi N, Muramatsu T
et al., : Three- dimensional visualization of
ultraviolet-induced DNA damage and its repair
in human cell nuclei, J. Invest. Dermatol., 110,
143-148, 1998.

皮膚器官培養系を用いた化学物質の刺激性、抗原性の検討

東京医科歯科大学 医学部皮膚科

横 関 博 雄

In order to predict the contact allergens or irritants in various chemicals, we analyzed mRNA of cytokines expressed in epidermis by stimulation of various chemicals in a human skin organ culture systems. After painting haptens, primary irritants or vehicle control on human skin specimens sliced to 1 mm thickness and cut into approximately 5×5 mm blocks, the pieces were cultured in serum-free medium. After separating epidermis from dermis, total mRNA was extracted and mRNA of cytokines was assessed by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Only haptens but not irritants induced IL-1 β mRNA at 1-3 hours. TNF- α mRNA was induced 9 hours after application of haptens and 1 hour after application of primary irritants. IL-1 α mRNA was not induced by either haptens or primary irritants. Thus, cytokine mRNA expression induced by haptens in epidermis from that induced by primary irritants.

These results indicate that analysis of the epidermal cytokines mRNA expression induced by chemicals in a human skin organ culture system is useful methods to predict haptens or primary irritants from various chemicals.

1 緒 言

接触皮膚炎 (contact dermatitis, CD) は、湿疹性疾患群の代表的な疾患であり皮膚科の外来患者数では最も多い疾患である。現代の進歩した化学産業は新たに多くのアレルゲンを生みだし、そのアレルゲンによる接触アレルギーが増加してきた。また戦後、生活様式が大きく異なり、シャンプー、石鹸などを多量に使用することによる刺激性皮膚炎も増加してきた。現在、このように接触皮膚炎が増加することは生体環境上大きな社会問題となっている。

化粧品や医薬部外品はその使用に関し、医師の指導を必要とせず使用方法に関しては野放し状態であるため、特に安全性を高くする必要がある。現在では9種類の安全性試験を施行するよう法的に義務づけられている¹⁾。特に接触アレルギーを起こしやすいかどうかを判定する感作性試験は、接触アレルギーの予防上最も大切な試験である。

しかし、in vitro での感作性試験はまだ十分に検討されていない。1986年にKimberらはハプテンで経皮感作したのちのリンパ節細胞を調整し、リンパ節細胞の³H-thymidineの取り込み量を測定すること(LLNA)によりそのハプテンの抗原性を定量し得ることを報告した²⁾。一方、私たちの教室でも化学物質を結合させた表皮細胞と脾細胞を混合培養することにより化学物質の感作性を定量することに成功した^{3、4)}。しかし、これらのin vitro試験はマウスを用いた系で一部ヒトにおける抗原性とは異なる結果が認められた。一方、皮膚にハプテンもしくは一時刺激物質を塗布することによりIL-1 β 、TNF- α など種々のサイトカインが誘導されることが明らかにされた^{5、6)}。そこで今回、ヒトの皮膚を用いて器官培養することによりハプテンと一時刺激物質ではサイトカインのmRNAの発現パターンが異なる結果が見られたのでここに報告する^{7、8)}。

2 実験方法

2.1 皮膚器官培養

厚さ1mmの正常分層植皮片を5×5mmに細切した後、種々の化学物質を表皮側に塗布、表皮側を上にしてパラフィンで被ったレンズペーパーの上に乗せ無血清培地(セルグロッサーH)で



Analysis of Cytokine mRNA Expression Induced by haptens or irritants in human organ culture system

Hiroo Yokozeki, M.D.

Department of Dermatology,
School of Medicine, Tokyo Medical
and Dental University

24時間培養し経時的に皮膚を回収した^{5, 6)}。

2.2 化学物質による刺激

皮膚器官培養時に表皮に0.1mM DNCB (ジニトロクロロベンゼン)、2.5% PPD (パラフェニレンジアミン)、 10^{-6} M レチノイン酸、1%メチルサリチレート、1 μ g/mL superantigen (SEB) を塗布する。

2.3 RNA抽出とcDNA作成

回収した皮膚は0.5mM ammonium thiocyanateを用いて表皮と真皮を分離する。得られた表皮シートはPBSで洗浄後、RNAzolでRNAを抽出する。RNAよりRAV reverse transcriptase (Takara Co. Ltd) を用いてcDNAを作成する。

2.4 Polymerase chain reaction (PCR) 解析

RT-PCRはIL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、 β -actin、ICAM-1、VCAM-1のprimerを用いて表皮シートより抽出し作成したcDNAにて施行後半定量を行い比較検討した。

3 結果

RT-PCR法が半定量性があることを明らかにするためにRT-PCRのcycles数とその結果得られたバンドの強さをデンスイーターで測定した。その結果、図1に見られるように各種のサイトカインのRT-PCRのcycle数とODとの間に比例関係が認められた。次にRT-PCRを施行したcDNAの量とその結果得られたバンドのODに比例関係が見られることを図2に示している。以上、今回のRT-PCR法で半定量性があることが明らかにされた。

3.1 IL-1 α 発現レベルの比較検討

各種の化学物質を塗布後24時間培養した後のIL-1 α の発現レベルを図3に示した。縦軸にIL-1 α と β -actinの発現の比率を表示している。

IL-1 α は化学物質による刺激のない状態で発現しており各種の化学物質の刺激後1時間後に強く発現している。しかし、化学物質による刺激後のIL-1 α の発現レベルとコントロールの間では差が認められなかった⁸⁾。

3.2 IL-1 β の mRNA 発現レベルの比較検討

各種の化学物質を塗布後24時間培養した後のIL-1 β の発現レベルを図4に示した。縦軸にIL-1 β と β -actinのRNAの発現の比率を表示している。IL-1 β のmRNA発現量はDNCBで刺激した時は3時間後に、PPDで刺激した時は1時間後にピークがみられる。しかし、MS、RAなどの刺激因子では特に発現のピークは認められなかった⁸⁾。

3.3 TNF- α の mRNA 発現レベルの比較検討

各種の化学物質を塗布後24時間培養した後のTNF- α のRNA発現レベルを図5に示した。DNCB、PPDなどのハプテンでは培養後9時間後にピークが見られMS、RAなどの刺激因子では培養後1時間後にピークが認められた。この結果は刺激因子が直接表皮に作用しTNF- α を誘導するという報告に一致する。また、ハプテンを塗布後9時間してTNF- α が発現する結果は、ハプテンによりIL-1 β 発現が誘導されIL-1 β により間接的にTNF- α が誘導されたと考えられた⁸⁾。

3.4 superantigen (SEB) 刺激によるサイトカインの動態

皮膚器官培養時に1 μ g/mL SEBを加え経時的に皮膚を回収してその表皮シートよりRNAを抽出しIL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、ICAM-1、VCAM-1のmRNA発現レベルをRT-PCR法で解析した。その結果図6に示されるようにIL-1 α は3~6時間後にピークがみられIL-1 β は3時間後にmRNAの発現が見られた後持続的に発現していた。TNF- α は1時間後より持続的

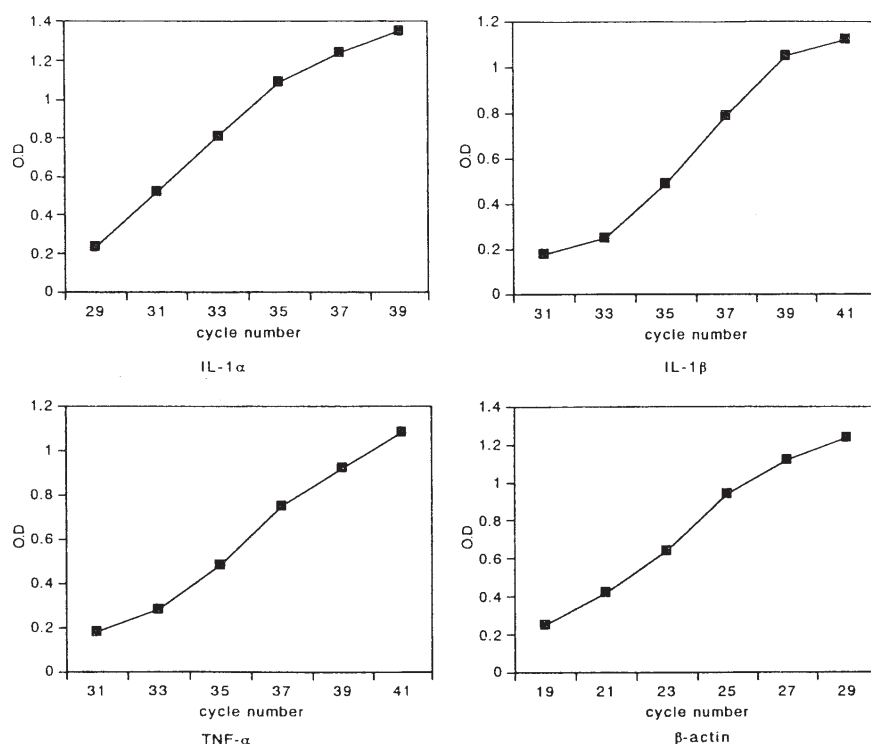


図1 RT-PCR法を施行した cycle 数と得られたバンドの OD の関連性

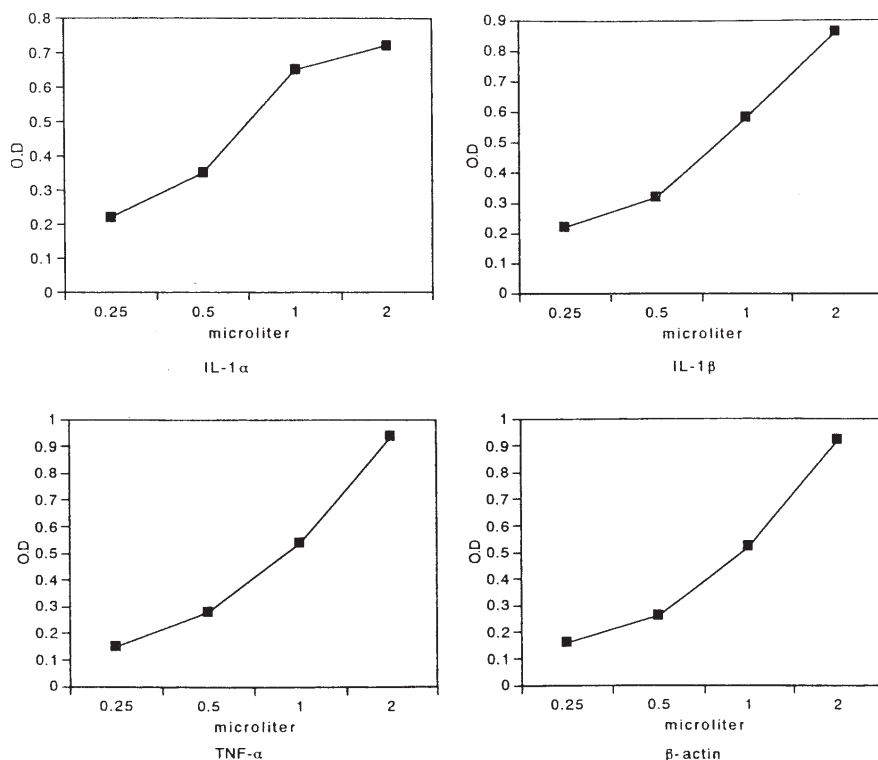


図2 RT-PCR法を施行した cDNA のと得られたバンドの OD の関連性

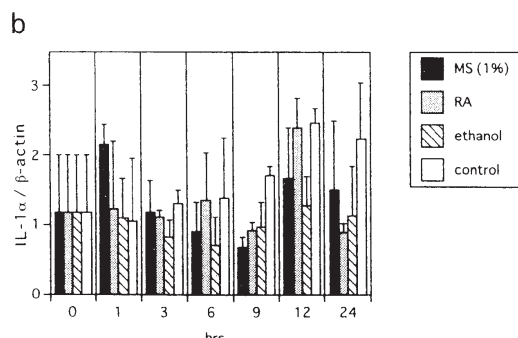
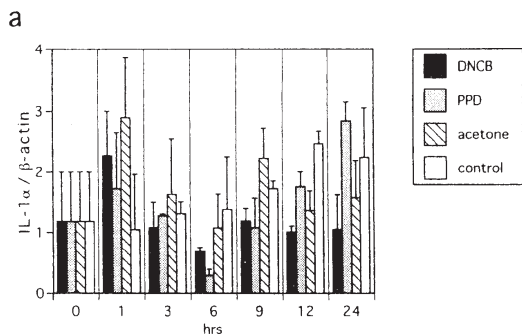


図3 各種の化学物質の存在下での表皮における IL-1 α の mRNA の発現

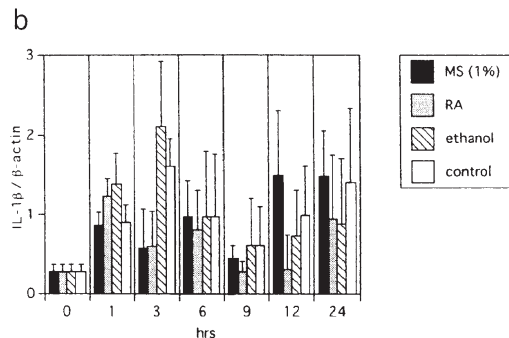
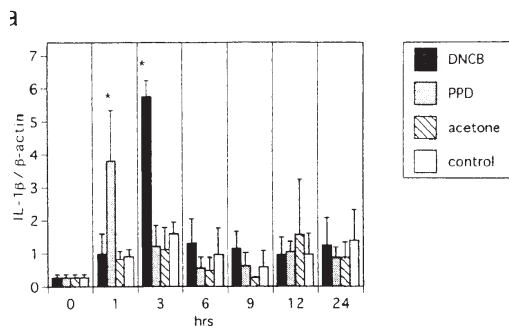


図4 各種の化学物質の存在下での表皮における IL-1 β の mRNA の発現

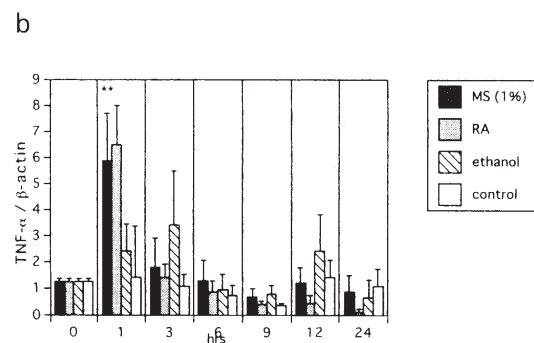
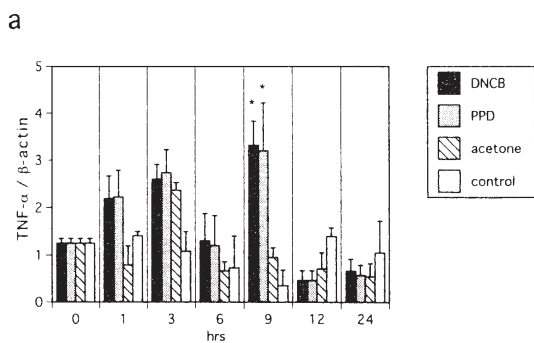


図5 各種の化学物質の存在下での表皮における TNF- α の mRNA の発現

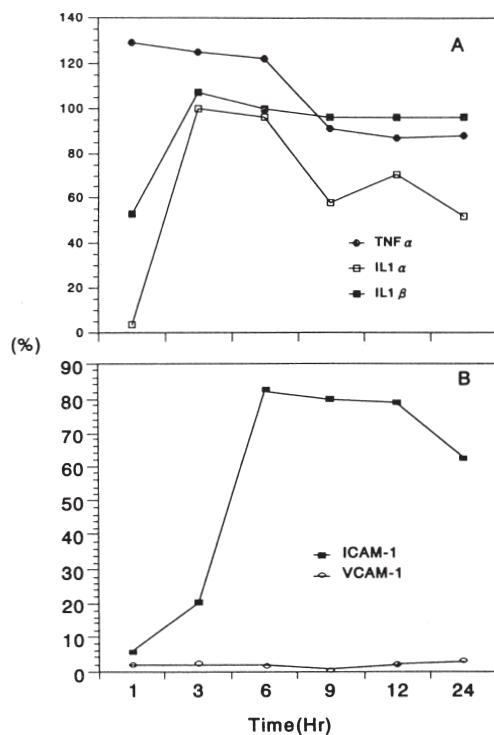


図6 スーパー抗原 (SEB) 存在下での IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、ICAM-1、VCAM-1 の mRNA の発現レベル

に発現している。また、接着因子である ICAM-1 は 6～12 時間後にピークが見られた。この結果ブドウ球菌由来のスーパー抗原により IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α などのサイトカインが産生されその相互作用により ICAM-1 の発現が誘導されることが明らかにされた⁷⁾。

4 総括

化学物質の抗原性、刺激性を In vitro での試験法で判定することは非常に困難なことである。Kimber らはマウスの耳介に化学物質を塗布後そのリンパ節細胞の増殖能により抗原性を判定する LLNA 法を開発したが一時刺激物質の SDS とハプテンとの鑑別が不可能であった。また、私たちの教室で開発した化学物質を結合した表皮細胞と T リンパ球をマクロファージの存在下で培養し抗原特異的 T 細胞が誘導できるかどうかで抗原性を判定する In vitro sensitization test でもニッケルなどの抗原が判定できない^{3, 4)} などまだ抗原性試験として用いるには感度が不十分であると考えられた。今回、ヒトの皮膚を用いた器官培養法では表皮より DNCB, PPD などのハプテンでは 1～3 時間後の早期に IL-1 β の mRNA が発現し 9 時間後に TNF- α の mRNA が発現した。一方、一時刺激性物質では表皮から IL-1 β の mRNA の発現はみられず 1 時間後に TNF- α の mRNA 発現が見られた。スーパー抗原では早期よりすべてのサイトカインの mRNA の発現が見られた。このように塗布した物質がハプテンか刺激物質かにより表皮細胞内のサイトカインの mRNA 発現時期が異なることが明らかになった。この特性を利用して各物質の抗原性、刺激性を評価できる可能性が示唆された。しかし、2 種類のハプテンと一時刺激物質しか検討しておらずニッケル、コバルト、クロム、ホルマリン、ウルシなどの典型的な接触アレルゲンを検出でき

るか、刺激物質、抗原性の低い物質をアレルゲンと鑑別しうるかさらに検討する必要がある。

なお以上の業績は J Dermatol : 25, 421-428 : 1998 で報告した。

文 献

- 1) 昭和 62 年 6 月 18 日付、厚生省薬務局審査第 2 課、事務連絡。
- 2) Kimber I, Weisenberger C : A murine local lymph nodes assay for the identification of contact allergens. Assay development and results of an initial validation study, Arch Toxicol. 63 : 274-282, 1989
- 3) Yokozeki H, Katayama I, Nishioka K : Experimental study for the development of an in vitro test for contact allergens I, Int Arch Allergy Immunol, 106 : 394-400, 1995
- 4) Arimura M, Yokozeki H, Katayama I et al. : Experimental study for the development of an in vitro test for contact allergens II, Int Arch Allergy Immunol, 115 : 228-234, 1998
- 5) Enk AE, Katz SI : Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity, Proc Natl Acad Sci, 89 : 1398-1402, 1992
- 6) Barker JNWN, Sarma V, Dixit V et al. : Keratinocytes as initiators of inflammation, J Invest Dermatol, 105 : 211-214, 1991
- 7) Matsunaga T, Katayama I, Yokozeki H et al. : Superantigen-induced cytokine expression in organ-cultured human skin, J Dermatol Sci, 11 : 104-110, 1996
- 8) Matsunaga T, Katayama I, Yokozeki H et al. : Epidermal cytokine mRNA expression induced by hapten differ from that induced by primary irritant in human skin organ culture system, J Dermatol, 25 : 421-428, 1998

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

化粧品の香り表現に関する研究

明星大学 人文学部

神 宮 英 夫

The relationship between olfactory and other four sensations was examined by expressing a perfume material and a lotion. The results of a verbal expression through synaesthesia and a color-matching test demonstrated that the words expressive of four sensations except for olfactory was affected by visual and haptic expressions and especially the relation between olfactory and haptic sensation was strong. The same effects of haptic sensation were obtained by the judgements on multiple expressions of fragrance. It was possible to evaluate a fragrance using a verbal expression through synaesthesia.

1 緒 言

香りの表現に際して、通常使われているのは、特性的用語と香料用語と感覚用語とである。特性的用語は「石鹸のような」などの表現であり、香料用語は「フローラルグリーン」などの表現である。これらは、香りの専門家の間で用いられることが多く、非専門家と比較すると語彙も多様であり、一般的にはわかりにくい。香りと言語との間とを結ぶ何らかの経験がなければ、これらの用語を使うことができないためである。一方、感覚用語については、共通の感覚的経験があり、非専門家でも理解しやすい。

そして、香りを嗅覚に関する感覚用語で表現するだけではなく、他の感覚に関する用語でも表現することができる。例えば、「甘い香り」などである。このような表現は、共感覚的表現と呼ばれている。

共感覚 (synaesthesia) は、1 種類の刺激によって感覚様相の異なる 2 つの感覚経験が生起する現象である。よく知られた例として、色聴 (chromesthesia) がある。これは、ある音を聞いて色が見えるもの

であり、低音には暗い色、高音には明るい色が現れる傾向がある。また、C 音に対する赤色のような特定の対応性も報告されている。その他、音の大きさや音色についても、いくつかの研究がある。

ところが、従来の研究では、ほとんどの場合、海外でも日本でも、共感覚保持者を被験者としたものであった。しかし、共感覚保持者は非常に少なく、色聴でも、10% 前後といわれている。このことが、共感覚研究を困難にしている最大の問題点である。しかし、共感覚的表現を研究することで、共感覚研究の問題点を克服することが可能となる。

共感覚的表現の研究は、感覚の相互関係を明らかにして、なぜ共感覚が存在するのかを明らかにする手がかりを与えてくれる。このことによって、われわれの五感の相互関係がどのようになっているのかを知ることができる。五感の関係を考えることは、人はなぜ複数の感覚を持っているのかを明らかにするために必要である。このような点に、共感覚研究の意義がある。

そこで、本研究では、香りを刺激として、嗅覚と他の感覚との関係を明らかにすることを目的とした。また、応用的には、非専門家でもわかりやすい香りの表現はどうあるべきかということ、提案できる可能性がある。



Studies on Verbal Expression of
Fragrance in Cosmetic

Hideo Jingu

Department of Psychology, Meisei
University

2 実験1：単品香料の表現

(櫻井・神宮, 1997a・b)

2.1 方法

ムスク・レモン・ローズの3種類の市販されているエッセンシャルオイルを使って、実験を行った。被験者に各香料をかいでもらった後で、32個の表現用語 (Table 1) を呈示して、その香りを表現するのに適切なものを選んでもらった。これらの表現用語は、視覚・聴覚・触覚・味覚に関する形容詞・形容動詞で、各8個である。

また、この実験の後に、12の色名 (紫・青・水色・緑・黄・茶・オレンジ・赤・ピンク・白・灰色・黒) を呈示して、その香りに見合った色名を1つ選択してもらった。該当しない場合には、「その他」とした。そして、彩度についても、「たいへんあざやか」から「まったくあざやかでない」までの5段階評価を求めた。

Table 1 4感覚での表現用語 (32語)

視覚語	聴覚語	触覚語	味覚語
明るい	ぎしぎしする	さらりとした	こてりとした
艶のある	こもっている	ふんわりとした	味気ない
不透明な	高い	かたい	甘い
ぼやけた	静かな	ざらざらした	すっぱい
暗い	ゆるやかな	べとべとした	味わい深い
色あせた	響きのある	うすっぺらな	あっさりした
あざやかな	低い	やわらかい	にがい
透明な	うるさい	なめらかな	しぶい

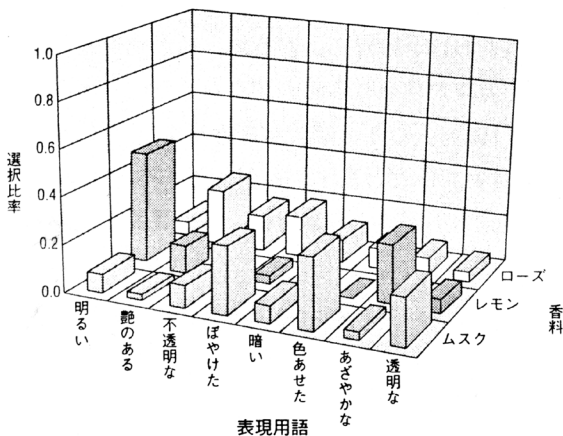


Fig. 1 各香料での視覚語の選択比率

2.2 結果と考察

2.2.1 共感覚的表現

共感覚的表現に関しては、各感覚用語での選択比率を各香料で分析すると、選択される用語の傾向がある程度一致していた (Fig. 1、2、3、4)。そして、各香料で、触覚語に関して、共通した用語が選択されやすかった。また、各香料での数量化Ⅲ類による分析では、それぞれ特徴的な傾向が見られたが、どの香料でも、表現用語群がまとまる際に、必ず触覚語が関係していた (Fig. 5、6、7)。

これらの結果から、嗅覚と触覚との密接な関係の存在が推測できる。このことから、触覚語を考慮することで、香料の表現が、よりわかりやすく適切なものになる可能性が指摘できる。

2.2.2 色彩との関連性

色名については、各香料で異なっており、ムスクで紫・灰色、レモンでオレンジ・黄色、ローズで白・ピンクが、選択頻度が高かった (Fig. 8)。また、彩度については、5段階評価を-2から+2で得点化して分散分析を行ったところ、香料間で有意差が認められ、レモンが最もあざやかであり、ローズ・ムスクという順であった。なお、個人間での有意差は認められな

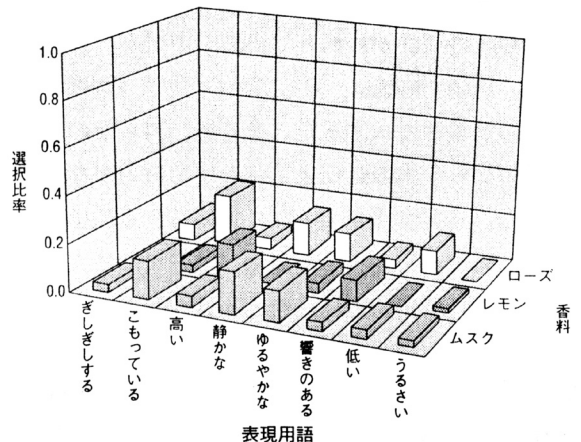


Fig. 2 各香料での聴覚語の選択比率

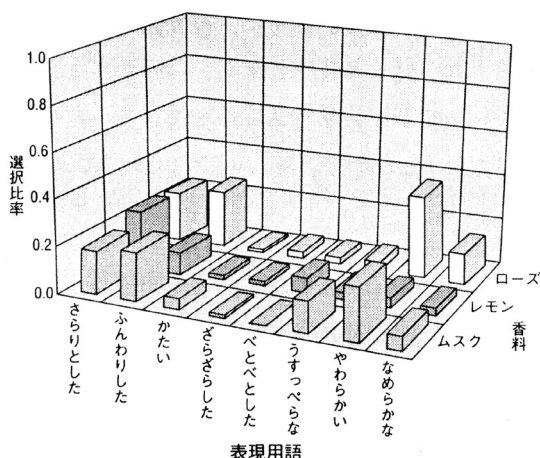


Fig. 3 各香料での触覚語の選択比率

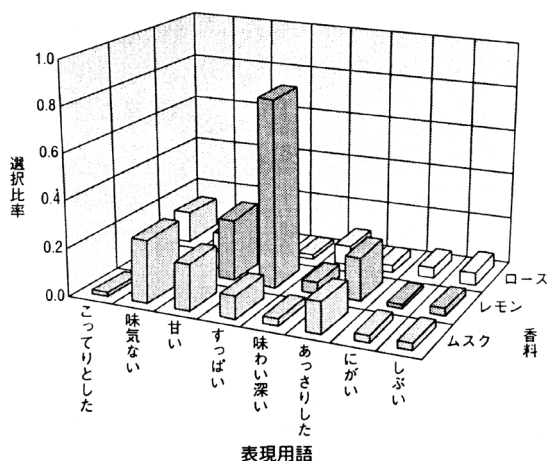


Fig. 4 各香料での味覚語の選択比率

った。

これらの結果から、香りとは色とのそれぞれの象徴性が判断を規定しており、彩度の評価でもそのことが影響を与えていると考えられる。このような象徴性は、文化の中で共通性を持っており、経験の共有が存在するために生起するのであろう。したがって、単品の香料では、その香りに対する象徴的なイメージが、その表現に影響していると考えられる。

3 実験2：化粧水の表現

(櫻井・神宮、1997 c；岩田・神宮、1997)

実験1のように、単品の香料を刺激として用いた場合、その香りに対する象徴的なイメージが影

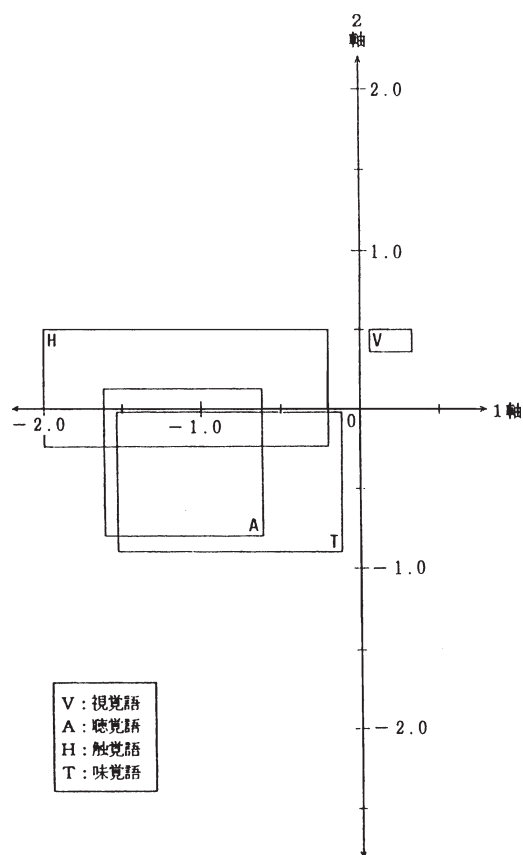


Fig. 5 ムスクに対する数量化Ⅲ類のスコアの95%信頼区間

響したり、香料によってはレモンのように、その香りから具体的対象が想起されて、表現を規定してしまう可能性がある。そこで、本実験では、これらの対応を避けるため、複数の香料で合成され、必ずしもその香りそのものが主体ではない、微香性の化粧水を刺激として用いた。

3.1 方法

同一メーカーの4種類の化粧水(A:32円/mL; B:28.13円/mL; C:29.17円/mL; D:46.67円/mL)を刺激として用いた。

手続きは、ほぼ実験1と同様であるが、以下の3点が異なっていた。まず、用いた表現用語は、実験1の結果と評定方法とを考慮して、各感覚用語からそれぞれ2つを削除して、合計24語とし

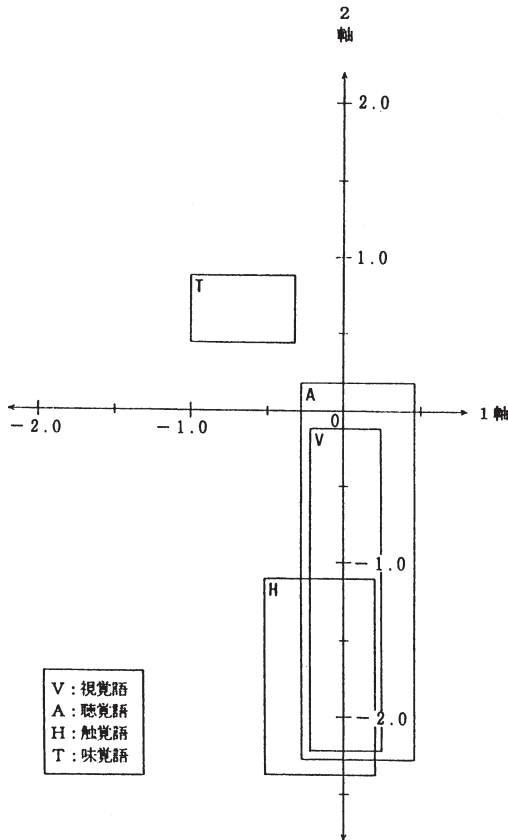


Fig. 6 レモンに対する数量化Ⅲ類のスコアの95%信頼区間

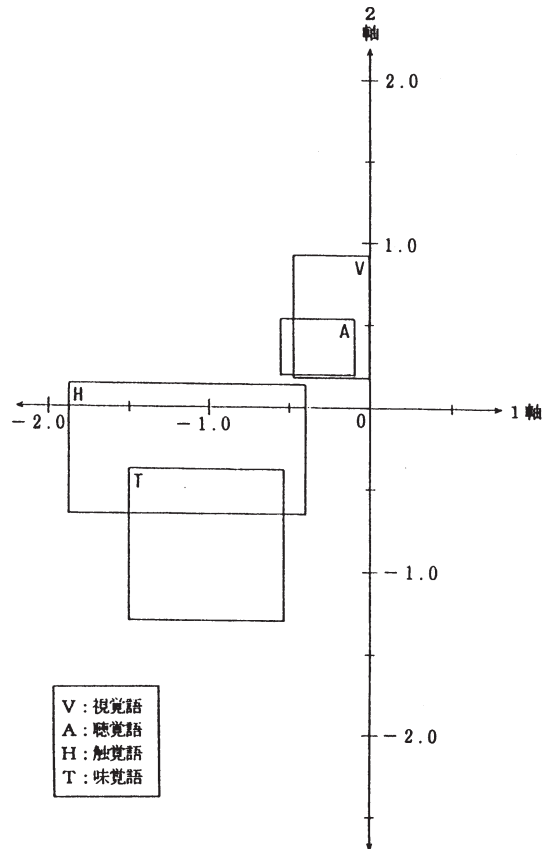


Fig. 7 ローズに対する数量化Ⅲ類のスコアの95%信頼区間

た (Table 2)。また、判断方法は、「感じる」から「感じない」までの4段階評定とした。さらに、「心地よさ」と「高級感」とについても、4段階評定を求めた。これらの評定は、感覚用語の評定の後に行った。

3.2 結果と考察

3.2.1 共感覚的表現

これらの共感覚的表現による4段階の評価を1点から4点まで得点化し、59名の結果を、4種類で縦にならべてデータ行列として、主成分分析を行った。

その結果、固有値が1.0以上のものが5主成分得られた。これらの累積寄与率は60.44%であっ

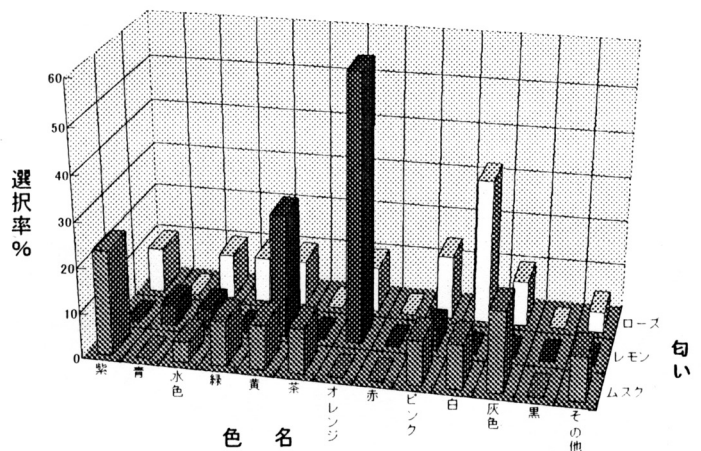


Fig. 8 各香料の匂いに対する色名の選択率

た。次に、各主成分で負荷量の二乗和を求め、感覚用語群ごとにその比率を求めたところ、主成分の固有値の大小によって、感覚用語群の比率が異

Table 2 4感覚での表現用語 (24 語)

視覚語	聴覚語	触覚語	味覚語
明るい	ぎしぎしする	さらりとした	こてりとした
艶のある	こもっている	ふんわりとした	味気ない
ぼやけた	静かな	かたい	甘い
色あせた	ゆるやかな	べとべとした	すっぱい
あざやかな	響きのある	やわらかい	味わい深い
透明な	うるさい	なめらかな	あっさりした

Table 3 感覚用語群の平均比率

	第1、第2主成分	第4、第5主成分
視覚語	0.137	0.546
聴覚語	0.250	0.097
触覚語	0.376	0.040
味覚語	0.237	0.317

なっていた (Fig. 9)。そこで感覚用語群ごとに、第1主成分と第2主成分での平均比率と、第4主成分と第5主成分での平均比率とを比較した (Table 3)。第1・第2主成分においては触覚語がもっとも優位であり、次いで聴覚語・味覚語・視覚語の順であった。第4・第5主成分においては視覚語がもっとも優位であり、次いで味覚語・聴覚語・触覚語の順であった。このことは、香りの表現にとって、触覚語が重要な役割を果たしていることを示唆している。また、触覚語の中でも、その負荷量から、表現内容は各主成分において一定のまとまりを持っていた。

これらのことから、化粧水の香りを共感的に表現することは可能であり、特に、触覚語の重要性を指摘することができ、嗅覚と触覚との強い結びつきが示唆された。

3.2.2 総合評価と共感的表現との関連性

各化粧水において、感覚用語群ごとでの6語の評定結果の合計値を求め、これら4つの感覚用語群の結果を独立変数として、「心地よさ」と「高級感」の各評定値をそれぞれ従属変数として、重回帰分析を行った (Fig.10、11、12、13)。どの化粧水においても、「心地よさ」は視覚語や触覚語によって規定されていた。しかし、「高級感」は、Bで視覚語、Dで触覚語の規定を受けているだけであった。

総合評価としての「心地よさ」は、共感的表現を個別評価として考えることが可能であり、視覚語と触覚語が重要な役割を果たしているといえる。しかし、「高級感」は、共感的表現は適切な個別評価の側面ではないといえる。このような結果は、「心地よさ」が情緒的な側面を持った

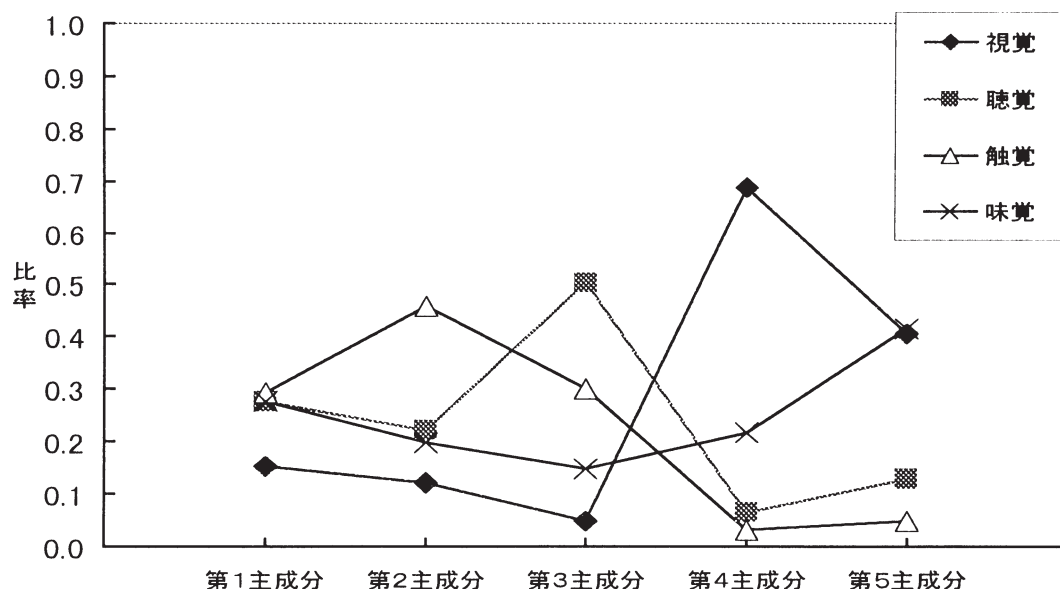


Fig. 9 各主成分における感覚用語群の比率

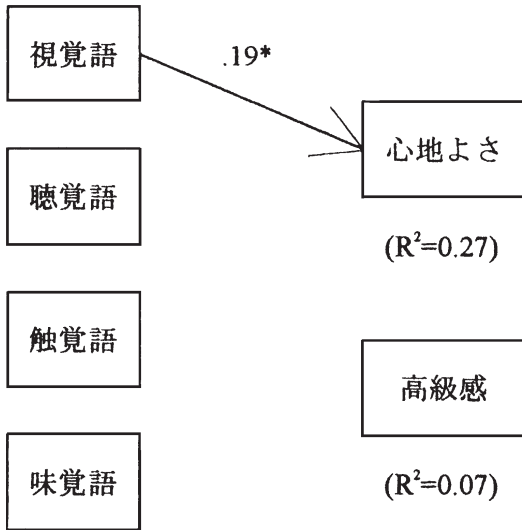


Fig. 10 化粧水 A におけるパス図

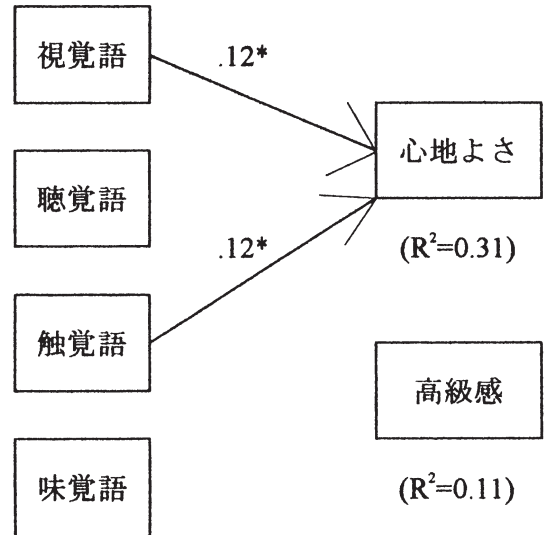


Fig. 12 化粧水 C におけるパス図

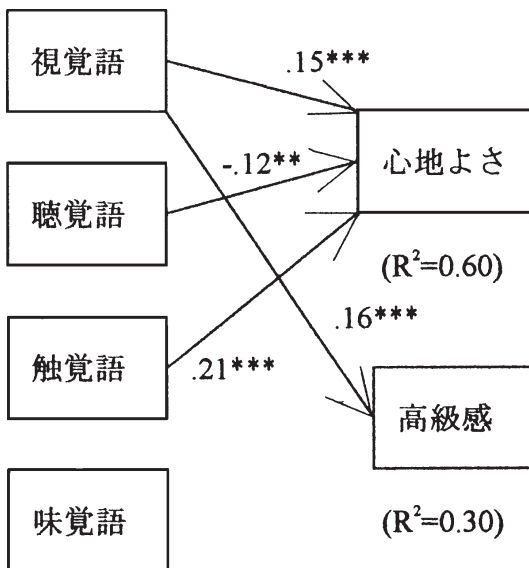


Fig. 11 化粧水 B におけるパス図

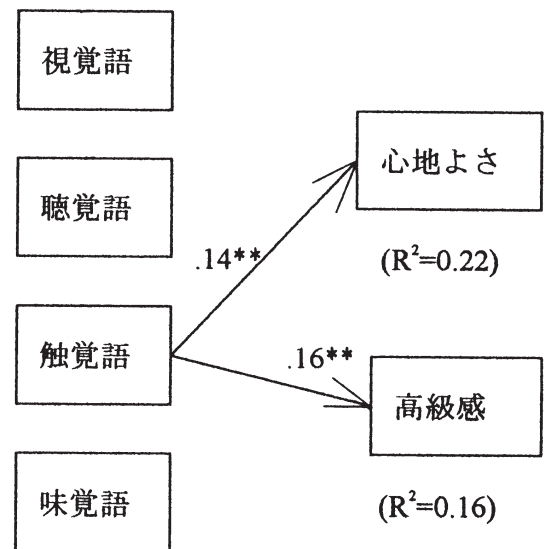


Fig. 13 化粧水 D におけるパス図

総合評価であり、「高級感」は価値的な側面を持った総合評価であることが関係していると考えられる。したがって、共感覚的表現は、情緒性を表わす際に効果的な表現方法であると考えられる。

4 実 験 3：共感覚的表現の複合性

(櫻井・神宮、1998a・b)

実験1と2とは、基本的に、1つの香り刺激に対して、それぞれの表現用語を対応させることで、被験者に判断を要求してきた。しかし、実際上は、1つの香りに対して、複数の表現が同時に使われている。例えば、「さらりとした甘い香り」

のような表現用語の組み合わせである。そこで、香りの共感覚的表現における用語の組み合わせの可能性について、実験を行った。

4.1 方法

実験2で使用した24語を使い、感覚間で用語を組み合わせ、複合表現を構成した。4つの感覚のうちいずれか1つについて、その用語を第1語として、他の3感覚でのそれぞれを第2語とした。例えば、視覚用語の「明るい」を第1語とすると、他の3感覚の18語が第2語となる。

4種類の調査用紙で、各用紙は、6個の第1語に対して各々18個の第2語が続き、計108の複合表現項目から成り立っていた。

手続きとしては、各複合表現が、香りの表現用語として適切かどうかを、「適切」から「不適切」まで4段階で評価してもらった。被験者は、第1語が視覚語の場合69名、聴覚語で75名、触覚語で73名、味覚語で73名であった。

4.2 結果と考察

4段階評価を1点から4点まで得点化して、以下の2種類の分析を行った。

4.2.1 主成分分析

第1語の感覚別に主成分分析を行った。18個の第2語に対して、6個の第1語の被験者分の結果を縦につなげてデータ行列とした。例えば、視覚語の場合は18×414 (6×69) となる。

固有値が1.0以上のものを主成分とすると、それぞれで第4主成分まで得られた。バリマックス回転後の累積寄与率は、視覚語で54.3%、聴覚語で67.44%、触覚語で59.37%、味覚語で62.98%であった。そして、各主成分毎で、負荷量の二乗和を求め、感覚用語群ごとに各々の比率を求めた。Fig.14は第1語が視覚語の場合である。最も固有値の大きな第1主成分に関する結果は、

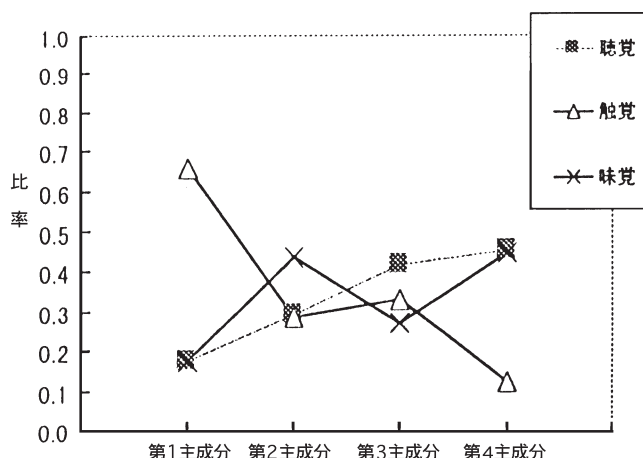


Fig. 14 視覚語が第1語での主成分負荷に関する感覚用語群の比率

Table 4 第1主成分での比率
第1語

第2語	第1語			
	視覚語	聴覚語	触覚語	味覚語
視覚語		0.256	0.172	0.286
聴覚語	0.173		0.560	0.258
触覚語	0.654	0.528		0.456
味覚語	0.173	0.215	0.268	

Table 4である。

第1語が視覚語でも聴覚語でも味覚語でも、常に、第2語における触覚語が高い比率を示していた。このことは、香りを表現する用語として、触覚語が重要な役割を果たしていることを示唆している。

4.2.2 クラスター分析

各感覚で、第1語の場合と第2語の場合とで、香りの表現に際しての役割が異なっていれば、クラスター分析の結果は異なることが考えられる。そこで、第1語と第2語とで、ワード法によって分析を行った。例えば、触覚語が第1語である場合、18語の第2語に関して分析を行った。一方、触覚語が第2語である場合には、18語の第1語に関して分析を行った。

クラスター間距離を10として、それぞれでクラスターを求めた。視覚語では、第1語でも第2語でも、クラスターは2であった。聴覚語と触覚

Table 5 クラスタ間での表現用語の一致度 (%)

第1語での各クラスターの用語数													
第2語での各クラスターの用語数	視覚			聴覚			触覚			味覚			
		10	8		12	6		8	10		6	7	5
	10	100	0	11	91.67	0	5	37.5	20	8	16.67	100	0
	8	0	100	3	8.33	33.33	9	12.5	80	3	0	0	60
				4	0	66.67	4	50	0	3	50	0	0
										4	33.33	0	40

語では、第1語で2、第2語で3であった。味覚語では、第1語で3、第2語で4であった。このように、第1語と第2語との間で、ほぼ同じクラスター数が得られたが、それぞれのクラスターを構成している用語が異なることが考えられる。そこで、各感覚用語ごとに、各クラスターに属する表現用語の一致度を求めた。結果は、Table 5である。第1語と第2語との間で比較的一致度が高かったのは、視覚語・聴覚語・味覚語であった。触覚語では、一致度は必ずしも高いとはいえず、第1語の場合と第2語の場合とで、香りの表現に際しての役割が異なっていることを示唆している。

5 全体的考察

共感覚がなぜ生起するのかということに関して、従来多くの考え方が提案されてきた。大別すると、神経活動が未分化なためという考え方、連想などの認知過程によるという考え方、感情が仲介となっているという考え方、そして、アリストテレス以来の共通感覚の考え方などである。

共感覚が存在するということは、入力刺激と反応としての出力とに関する2つの感覚様相をつなぐ何らかの働きを考えざるをえない。この仲介役として、感情を考えたり、共通感覚では五感を統合する“司令塔”のようなものと考えてきた。

香りの表現について、嗅覚に関する一連の研究を行った。これらの研究から、触覚の果たす役割

が重要であることが明らかとなった。そして、このことは、共通感覚での“司令塔”が触覚である可能性を示唆している。

また、香りの表現にとっては、触覚に関わる言葉に特に注目する必要がある。このような言葉を使うことによって、香りについて、実際の刺激がなくても、他者に的確に伝えることが可能になると考えられる。

引用文献

- 1) 岩田幸子・神宮英夫：香りの共感覚的表現による化粧品の特徴分析、第27回官能評価シンポジウム発表報文集、pp.131 - 134、1997
- 2) 櫻井広幸・神宮英夫：香料の共感覚的表現 日本官能評価学会誌、第1巻 第2号、pp.41 - 45、1997 a
- 3) 櫻井広幸・神宮英夫：匂いの共感覚的表現—色彩との関連性—、日本心理学会第61回大会発表論文集、pp.492、1997 b
- 4) 櫻井広幸・神宮英夫：化粧品の香り表現—共感覚と官能評価との関係—、日本官能評価学会1997年度大会発表論文集、1997 c
- 5) 櫻井広幸・神宮英夫：香りの共感覚的表現—感覚間の関連性—、日本心理学会大62回大会発表論文集、pp.578、1998 a
- 6) 櫻井広幸・神宮英夫：香りの共感覚的表現—複合表現における触覚語の役割—、日本官能評価学会1998年度大会発表論文集、1998 b

高齢女性における化粧を用いた情動活性化療法¹⁾： 心理的リハビリテーション・プログラムの枠組みづくりへ向けて

文京女子大学 人間学部

伊 波 和 恵

This series of studies aim at demonstrating the effectiveness of the use of cosmetics methods as mental rehabilitation on elderly women. Our hypothesis is that make-up application might heighten their self-esteem, and we attend to frame a cosmetical program for mental rehabilitation.

The participants were elderly women who stayed at the health care facilities for the aged in Kyoto City. Preliminarily, we research about their interests in cosmetics and beauty treatments at the past and the present on 60 elderly women. The findings of the pre-research was that 88% had been in the habit of making up at the past, and at the present, 35% had positive interests in some cosmetic treatments.

On the study¹, we compared the Continuous group (C group, N=6), who received more than 8 sessions of our cosmetic application, with the Discontinuous group (D group, N=7) about attitudes for cosmetic treatments and of participation in our sessions. Effects of cosmetic program were measured by several nonverbal indices. The following results were obtained: 1) The C group showed the tendency of arousal by our sessions and it was more interested in cosmetic treatments than the D group. 2) The D group was sensitive at the mirror. 3) Taking results of pre-research into consideration, their cosmetical habits at the past was useful as an index of positive, continuous participation in the programs at the present.

On the study², we compared two women as the case studies. One was an resident at the facility, and the other was an client of the day-care service there. These cases suggest that the client needs to the cosmetical program as the former, we needs to exmine the variety of methods furthermore.

1 緒 言

近年、老人福祉の領域において、QOL (Quality of Life) を高める目的で「お化粧」を園内レクリエーション活動に採用しているとの報告が、福祉介護誌などの媒体を通じて一般に広く紹介されている (例えば、『お達者で』1998 年秋号)。高齢者福祉・看護・保健領域の職員を対象とした自治体の介護講座において、回想法、あるいは音楽や絵画を用いた芸術療法と並んで、講習テーマに加えられていることもある (例えば、岐阜県ならびに青森県・介護実習普及センター主催の介護講座)。高齢者福祉の現場において、化粧をすることの心理的な効用については一般的な期待が寄せられ続け、福祉サービスの一環として、様々なかたち

で高齢女性に提供されているようである。

このような背景としては、福祉サービスの利用者層が多様化し、特定の精神的老年性疾患のない高齢者の数が増すにつれ、従来の医療的・看護的・介護的サポート以外のサポート形態へのニーズが高まってきたと考えられる。また、老年期における精神的諸障害についても、医学的な、とりわけ薬理的なアプローチが確立しているとは言い難い現在、非薬物的アプローチの見直しと整備とが急務であることも指摘されており (須貝・竹中, 1995)、福祉現場においてもそのような現状に 대응べく、手探りの実践がそれぞれに進められているものと思われる。しかし、「化粧療法」、すなわち心理療法の一手法として化粧を適用するには、まだ至らない段階であるのも確かである。例えば、化粧へのニーズの把握、他者化粧の場合は施術者のスキルの検討と教育、効果測定法、さらに効果を得るための介入手法についての吟味などについては未だに不十分なままであり、ただ日常的な実感にもとづいた実践のみが散発的に試みられているのが現状であろう。



An Applicational Study of Emotional Activation Using Cosmetics Methods for Elderly Women at the Nursing Home: Toward Framing a Psychological Rehabilitation Program for Elderly

Kazue Inami
Bunkyo Women's University

この10年間にわたって、浜らは情動の活性化に関する一連の研究を通じ、臨床場面においては化粧と情動活性との関連に重点をおいて、その効果を検討することに取り組んでいる(浜・日比野・藤田, 1990 など)。この情動活性化療法とは、鬱病などの感情障害、老人性痴呆症といった心理臨床的に問題を抱える者に対して、彼らの情動に働きかけるような刺激(例えば、香り、映像、音楽)を用いることで、情動状態あるいは社会性における改善を図ることを目的とする療法的試みである(浜・日比野・藤田, 1990; 浅井・浜, 1992; 浅井・余語・浜, 1992; 浜・浅井, 1993)。これらの情動活性化療法において、化粧を刺激として用いる利点には、次の事柄が挙げられる: 1) 女性の多くにとっては、プログラム導入にあたって、刺激が新奇すぎないので、心理的な違和感や抵抗感が比較的少ない、2) 参加者の視覚、触覚、嗅覚など五官に訴える情動価が高く、かつ基本的には快刺激であると考えられる(伊波・浜, 1994)、3) 道具の入手および実施が比較的簡便であり、参加者、実施者双方への作業負担が軽い、4) 実施した際、参加者本人にも周囲の者にも実施前後あるいは過程における変化が視覚的に明らかなので、フィードバックを得やすく、また、やりとりも生じやすくなる(伊波・浜, 1994)、5) プログラム終了後、参加者にとって、自発的、日常的かつ習慣的に化粧を取り入れやすい(伊波・浜, 1993)、6) 研究者にとっては、直接効果(例えば、覚醒・自信・主観的満足感の上昇(余語・津田・浜・鈴木・互, 1990; 浜・浅井・余語, 1991))および間接効果(例えば、社会性・積極性の促進(伊波・浜, 1995))に関する操作性・観察性が高い。

このような一連の流れを汲み、老人保健施設における心理的リハビリテーション・プログラムとしての化粧の有用性を検討することを目的として(伊波・浜, 1996; 伊波・浜, 1997; 伊波・浜・西野, 1998)、本研究は、『化粧を用いた情動活性化療法(以下、化粧プログラムとする)』のプログラムおよびガイドラインを作成をめざしている

(伊波, 1996)。すなわち、入所者に対してはレクリエーションとして、通所者に対してはディケアのメニューのひとつとして、あるいは参加者のセルフケアを援助する精神的リハビリテーションの一手法として、提供可能な化粧プログラムの枠組みの作成を試みるものである。

そこで我々は、化粧を含む整容行動に関する高齢女性のニーズおよび施設内での化粧プログラムへの参加状況について調査を行った。まず、言語的やりとりがある程度可能な高齢女性を対象に、継続的な化粧プログラム開始に先立ち、整容行動とその習慣に関する聞き取り調査を行った(予備調査)。第2に、化粧プログラムに継続して参加した者と初回で中断した者との差異に注目し、化粧場面において観察された行動上の特徴がみられるか否かを比較した。同時に、調査における化粧への印象、過去および現在での化粧習慣における差異と、実際の参加状況との関連について群間で比較した(研究1)。このように継続者群、非継続者群との差異を明らかにすることは、化粧を用いた情動活性化を施設の実情および入所者のニーズにより即した実際的な化粧プログラムを、提案し実施するうえで有意義であると考えられる(なお、予備調査および研究1の詳細については、中間報告および伊波・浜・西田(1998)において、すでに報告済みである)。最後に、老人保健施設における通所・入所それぞれの生活環境の差異をめぐって、事例的に概観し(研究2)、化粧行動の個別性について考察した。

2 予備調査

2.1 目的

老人保健施設において、高齢女性の化粧行動に関するニーズと実状を把握する目的で、化粧行動および習慣に関する調査を行った。

2.2 方法

2.2.1 対象者

京都市内の老人保健施設・博寿苑を利用中の高

齢女性 109 名を対象とした（65～93 歳、平均年齢 82.3 歳）。

2.2.2 調査実施

質問項目は、1) 過去の化粧習慣、2) 現在の化粧習慣・態度、3) 整容に関するニーズ・イメージの 3 カテゴリーに分かれており、各カテゴリーにはそれぞれ 3 項目の質問が含まれていた（Table 1）。調査は、施設内において、化粧プログラム実施者の女性 4 名がそれぞれ個別に聞き取りを行った。

対象者の心身の健康状態は、ともに健常な者からどちらも良好とはいえない者までと様々であった。質問の意図について対象者が了解不能であった場合や、自分の名前を呼ばれたときに応えることができないなどの著しい認知障害が認められた場合は、本調査の対象から除外した。その結果、さらに回答が不十分であった者をも除いて、

分析の対象者は 60 名となった。

2.2.3 結果

過去および現在における化粧習慣の有無と、現在の化粧への関心について、対象者を入所・通所と施設の利用形態に分けて比較した結果を Table 2 に示した。

全体の 95% の者に過去に何らかの化粧経験があり、80% において化粧習慣が過去にあったことが報告された。現在の化粧習慣については 58% に減少した。

入所者においては、入所中と在宅時・帰宅時とを比較した場合、有意な差ではないものの、在宅時の方がより化粧をすることが報告された（それぞれ、61%、72%）。これは、42% が自宅にいるときに化粧習慣があるとし、通所時には 50% が化粧をするという通所者とは、一致しない傾向を示した。

Table 1 予備調査質問項目（概略）

過去の化粧（習慣）	
1-1	これまでに、化粧をしたことがありますか？
1-2	化粧は、日常的にしていたか？
1-3	化粧を止めたきっかけはありましたか？
現在の化粧（習慣）	
2-1	現在、何か顔のお手入れはしていますか？
2-2	自宅にいるときには、どうですか？
2-3	自分の鏡（台）をもっていますか？ それを見ることはありますか？ 鏡を見たときに、何か思うようなことはありますか？
化粧に関するニーズとイメージ	
3-1	化粧や顔のお手入れをしたいと思うことはありますか？
3-2	化粧や顔のお手入れをしてもらいたいと思うことはありますか？
3-3	化粧（をする）というと、どんな印象をもちますか？

Table 2 過去・現在の化粧習慣の有無と、現在の化粧への関心

		入所者		通所者		計	
回答人数（人） 平均年齢（歳）		36 81.5		24 80.9		60 81.20	
過去	化粧経験有	35	97%	21	88%	57	95%
	化粧習慣無	30	83%	17	71%	48	80%
現在	化粧習慣有	22	61%	12	50%	35	58%
	化粧習慣有（在宅）	26	72%	10	42%	37	61%
関心	化粧への関心	10	28%	11	46%	21	35%
	消極的な関心	6	17%	8	33%	14	24%

さらに、整容および化粧への関心について、自分で化粧をしたいと望む場合を積極的な関心があるとし、人にしてもらいたいとならしたいと望む場合を消極的な関心があるとみなすと、全体の35%にあたる21人が化粧への積極的な関心を示した。とりわけ、通所者において、化粧および整容への興味について言及する者が46%、消極的ながら関心があるとする者が33%と、より関心を寄せる傾向がみられた。

2.2.4 考 察

過去および現在における化粧習慣の有無と、現在の化粧への関心に関する予備調査において、対象者の80%に、かつては化粧習慣があったことが確認された。しかし、過去のある時点において化粧を止め、今では化粧習慣はないと報告する者は多く、現在でも化粧習慣はあるとしながらも使用品目としては基礎化粧のみの者が多くを占めていた。

また、施設内では化粧習慣がないとしながらも、自宅では化粧をするという者がわずかながら多いことは、入所者において特徴的であった。通所者では逆の傾向が示されたことは興味深いが、これは、入所者にとって施設内において目立つまいとする意識が化粧行動を抑制している可能性が示唆された。同時に、通所者にとっては、施設へ通うことはすなわち余所へ行くことにはかならないので、あえて装いに気を配るという行動に繋がっている可能性があった。これは、施設をウチとみなすかヨソとみなすかという点において、入所者と通所者の間では施設という場の捉え方が逆転しているとも考えられた。

さらに、化粧への関心については、3人に1人が積極的な関心を寄せていることが明らかとなった。とりわけ、通所者においては化粧品ブランドへの関心、整髪への希望など、多岐にわたる整容行動への言及が認められた。これらの、通所者の化粧行動への意欲の高さが示されたことは、彼女らの方が比較的、化粧や整容に関する情報を得や

すい生活環境にあることと関連しているのかもしれない。

このように、過去と現在の化粧習慣およびニーズが示されたとともに、施設利用形態の違いによって、化粧への態度および関心が変わりうることも示唆された。

3 研究1

3.1 目 的

老人保健施設・博寿苑で実施した化粧プログラムにおいて、継続して参加した者と、継続して参加しなかった者との差異に注目した。さらに、予備調査に示された化粧習慣性と実際の参加状況との関連について、両群を比較した。

3.2 方 法

3.2.1 参加者

予備調査対象者において分析の対象となった60名のうち、完全回答が得られ、かつ通所日、入所期間などの外的条件が整っていると認められた33名に対してプログラムへの参加呼びかけを行ったところ、20名から参加への意思が認められた(65～92歳、81.3歳)。このうち、1回のみの参加者は8名であり、2～7回参加者は5名、8回以上継続した参加者は7名であった。そこで、本研究においては、1回のみの参加者を非継続群とし、8回以上参加した者を継続群とした。両群から、欠損値の多い者を1名ずつ除外して、非継続群7名、継続群6名を群間比較の対象とした。

3.2.2 実験室および装置

実験室は化粧室とモニター室の2室で構成されていた。化粧室内では、ワンサイドミラーである三面鏡の裏のVTRカメラを写して、入室時から退室時までの参加者の行動を常時モニターした。口紅立ては鏡台の上に、布製の覆いをかけ、口紅選択場面までは参加者の目に触れないような状態で置いた。呈示する口紅(deuxseize,

KOSE) は 39 色用意した。

3.2.3 手続き

実験は週 1 回の頻度で行なわれた。1 回毎の所要時間は 15 分程度で、そのうち化粧に要した時間は約 10 分であった。化粧プログラムは、次のような手順で進められた。

化粧水、乳液、化粧下地を順に用いて基礎化粧(段階 1)を施した後、必要に応じてコンシーラーを用い、続いてファンデーション、フェイスパウダー、眉墨を付けた(段階 2)。さらに、布覆いを外して口紅立てを呈示するとともに、付けてみたい色を選ぶように教示し(口紅選択場面)、最後に頬紅をつけて化粧を仕上げたのち(段階 3)、参加者に手鏡を手渡しして見せた。

化粧前後には音声を録音するために「あいうえお」と書いた紙を呈示し、それを読むように教示した。また、化粧前後に 30 秒間、参加者を 1 人にする時間を設け、実験者がいない状況での行動をも観察した(実験者不在場面)。

3.2.4 測 度

実験室内での行動測度としては、次の 7 項目を用いた。

リラックス(脱活性)および快感情の指標として(1)閉眼時間、(2)微笑時間、覚醒および興味の指標として(3)1 分あたりの瞬目回数、自意識の指標として(4)鏡注視時間、(5)整容行為時間、(6)選択された口紅の色の種類、社会性の指標として(7)発話時間および(2)。

3.3 結 果

3.3.1 予備調査と群間比較

予備調査における質問項目と群間を、U テストを用いて比較した結果、『過去の化粧習慣』の項目で有意差が認められた($U = 9.00$, $df = 6$, 7 , $p < .05$)。すなわち、継続群では全員が、かつては日常的な化粧習慣があったとする一方で、非継続群では、化粧が習慣化していた経験はないとい

う者も含まれていた。

3.3.2 化粧場面(初回時)における行動上の群間比較

1 分あたりの瞬目回数を化粧過程別にみたとき、Wilcoxon の T テストの結果、継続群では化粧段階 1・2 より段階 3 において瞬目が増える傾向がみられた($T = 4.00$, $df = 6$, $p < .10$)。また、化粧前後 30 秒間の瞬目回数について、継続群においては化粧後に増加した($T = 0.00$, $df = 6$, $p < .05$)。

化粧前後 30 秒間の鏡注視時間については、化粧前後ともに非継続群の方が鏡注視時間は長かった($U = 9.00$, $df = 6$, 7 , $p < .05$; $U = 11.50$, $df = 6$, 7 , $p < .10$)。整容行為時間についての化粧前後 30 秒間における比較では、化粧前では非継続群の方が長かったが、化粧後では継続群の方が長い傾向がみられた($U = 9.00$, $df = 6$, 7 , $p < .05$; $U = 11.50$, $df = 6$, 7 , $p < .10$)。

口紅選択場面において、継続群では全員が口紅を選択して用いたが、一方、非継続群では口紅施術を拒否する者もいた(57.1%が選択)。

3.4 考 察

第 1 に、予備調査との関連から、『過去の化粧習慣』が化粧プログラムへの参加継続性と関連することが示唆された。第 2 に、継続群および非継続群間の初回時の行動を比較して、継続群は非継続群に対して、化粧中、後半における瞬目の増加、化粧後の瞬目の増加が認められることが示唆された。このことは、継続群において、化粧をすることで覚醒感が高まる可能性が示されたものと考えられた。一方、非継続群では、化粧前後での鏡注視時間が長いことや化粧前に整容行為時間が長いことから、非継続群の方が鏡に対して「過敏である」可能性が示唆された。しかし、ネガティブな反応が顕著であったかどうかについては未検討であり、行動の質にまで踏み込んで見極める必要があると考えられる。また継続群では、口

紅選択場面において拒否する者が皆無であったこと、化粧後に整容行為時間が延長したことから、継続して参加する者は、化粧による自分自身の容姿の変化に関して、より関心が高いという可能性が示唆された。

これらのことから、化粧プログラムに先だって予備調査を行う際には、現在のニーズを把握するだけでなく、過去の化粧習慣をもあわせて問うことによって、プログラムへの向き不向きがより明確に予測しうると考えられた。また、プログラム導入後も、化粧品(とくに口紅)への抵抗の有無は、参加の継続性を予測する目安となると思われる。

過去の化粧習慣および現在のニーズを踏まえて化粧プログラムを適用することは、参加者に対して無理強いをしないという意味でも、参加へのモチベーションを高めるであろう。同時に、参加にまつわる負担感を軽減することで、参加者たちの満足および自信をより増すことができるとも期待しう。

4 研究2

4.1 目的

老人保健施設における通所・入所それぞれの生活環境の差異をめぐって、化粧行動の個性について検討した。

4.2 方法

4.2.1 対象者

老人保健施設における化粧プログラム参加者のうち、10回以上継続した者から、通所・入所それぞれ1名ずつを本報告の対象とした。

4.2.2 装置・手続きおよび測度

研究1(3.2.2~4)と同様であった。

4.2.3 事例

①入所者I

92歳の女性で、老年性痴呆と診断されていた。おもに短期記憶面での問題が認められており、ま

た独立歩行には杖を要したが、ADL面においては自立していた。施設内では、色鉛筆を用いた描画や手芸を好み、1人で穏やかに過ごしていることが多いようであった。参加中の生活上の変化としては、中盤、第12セッションの前に2人部屋から4人部屋へと部屋替えがあり、化粧セッションも2週間あけて再開した。プログラムへの参加前、化粧への関心は高かった。長年、「身だしなみ」としての化粧が習慣化されていたものの、入所を機にメーキャップを中断していた。

微笑時間・発話時間 いずれの指標においても1セッション目で最長であり、12、13セッションで最低値をとった。セッションを通じてほぼ同一の増減傾向を示した(Fig. 1)。発話内容としては、セッション前半においては、日常的な手入れができるように化粧品を購入したいという訴えや、そのことについて家人が応えてくれないという不満が述べられた。

口紅選択場面 口紅の色の選好は色味の薄いピンク系のものが中心であり、一定していた。選択時間も4セッションまでは20秒以上要していたものが、5セッション以降は短時間で決定された。化粧後、30秒間1人で化粧室に残される場面では、口紅を指で拭い、つけた色を若干落とす行動がしばしば認められた。13セッション目においては、口紅および頬紅を強く拒否した。

②通所者N

83歳の女性で、軽度の老年性痴呆と診断され

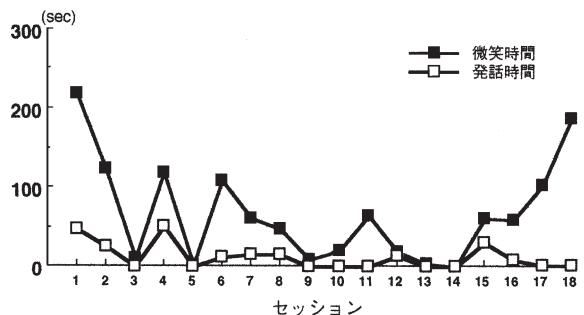


Fig. 1 入所者Iの微笑時間および発話時間

ていた。身体的には健康で、ADLは正常であった。日常会話上の支障はないが、その内容は乏しく、知的面では介助を要するとみなされていた。明朗快活な人柄であり、誰とでも親しげに打ち解けて話すことはできるのであるが、社交的なやりとりを終始する傾向にあった。施設においては、社会的孤立感の軽減を目的として、週1回ディケア・サービスを利用中であった。化粧への関心は高く、自宅から化粧をして来ることがあった。

鏡注視時間 セッションが進むにつれ、鏡を注視する時間が増加しており (Fig. 2)、またセッション中、化粧が進行するにつれて長くなった。

身体接触時間 セッションを重ねるほどに自分に触れる時間が長くなった (Fig. 2)。行動内容としては、髪を直す、衣服を整える、という頻出する行為ばかりでなく、化粧道具を手にとり自ら化粧をするものが含まれた。これらは、口紅を上から塗りなおす、アイシャドウをいれる、口紅を耳たぶに塗ってみる、などの「色を付ける」行為であった。

口紅選択場面 決定までの時間にはばらつきがあり、一定の傾向は認められなかった。選好された色はピンク系が中心であり、ローズ系も含まれていた。しかし、自分で1色選ぶのを避けようとする態度がみられ、化粧施術者に決定を委ねることが多かったため、彼女の本来の選好が反映されていたかどうかは疑わしかった。

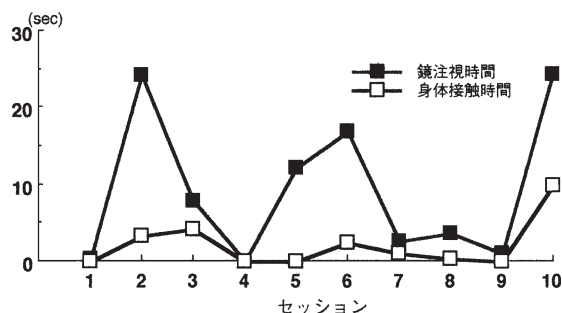


Fig. 2 所者Nの鏡注視時間および身体接触時間

4.4 考察

研究2においては、老人保健施設のサービス利用形態によって、化粧プログラムへの参加態度が異なるのか否かについて事例的に検討した。その結果、情動活性や自意識の改善という点においては、入所者よりもむしろ通所者についてより顕著な効果が認められることが判った。従来、施設入所者に対するサービスとしてのみ行われてきた化粧プログラムではあるが、通所者に対してもより積極的に提供されてしかるべきであると考えられた。ただし、通所者Nに認められたような、口紅を頬のうえにつけるなど、必ずしも社会的に適当でない街奇的な化粧行為への対処については、今後、議論の余地があると思われる。それは社会的適応性の文脈から離れる一方で、化粧の別の機能的側面、変身願望の充足および祝祭性の表現を意味すると考えられるからである。

一方で、通所者の反応の顕著さに対して、施設入所者の刺激への反応性の鈍さが懸念される結果ともなった。一般に施設入所者は、通所者よりも高齢であり、また身体的機能、知的機能面における衰えが認められる者も少なくない。結果には、環境の特徴というよりもむしろ、このような状態的特徴がそのまま反映されたということも考えられた。しかし入所者については、施設内の生活にあってさらに感情鈍麻を進行させないための「情動面でのリハビリテーション」を意識したプログラム作成も必要であることが示唆された。

化粧が、女性の精神状態を把握するための適当な外的指標であることは、精神科医も指摘している。経験と観察にもとづいて、気分の浮き沈みの指標であるとともに、化粧の再開や開始を、一般的に積極的で好ましいセルフイメージを支持する行為であるとみなすなど (小西, 1991)、女性患者の病状回復の目安としている医師も少なくはない。

緒言において論じたように、心理的リハビリテーションの手法として、化粧および整容を積極的に活用するにあたっては、それぞれの心理的な意

味づけについて、いまだ議論不足な点があることも否めない。療法的アプリケーションを意図する際、例えば行動療法のように、プログラムの実施によって特定の効果が得られるように操作するなど、一定の方向性を定めることも大切である。また、すでに枠組みが定まりつつある心理的リハビリテーションの手法（例えば、回想法；野村（1998））を踏まえて、手法的な検討を進める一方で、再度、基礎的な資料をみなおし、心理的な理論的整備を図る必要もあると考えられる。

今後の展望としては、施設や家庭において、介護者の負担なく、化粧および整容に関するプログラムを日常的かつ効果的に取り入れる方法について、さらに検討を進める必要があると考えられる。また、個人のみならず集団への適用も視野に入れるなど、サービス形態の多様化に 대응できるよう、枠組みに柔軟性をもたせていくことも必要となるであろう。

謝 辞

化粧プログラムの実施にあたっては、医療法人行陵会 老人保健施設・博寿苑の苑長、遠山光郎先生をはじめとする、施設職員および病院所属の作業療法士の方々に多大なるご尽力をいただいたほか、参加者の方々には、プログラムへご協力いただいたうえ、貴重なご意見とデータとを頂戴した。また、同志社大学文学部心理学専攻卒業生の北田育子氏、花岡恭子氏、長江美奈氏ならびに西田真弓氏とはデータを共有した。諸氏のご理解とお力添えに、心より感謝申しあげる。

なお、研究に用いた化粧品のうち口紅一式（deuxseize, KOSE）は、1993年に（財）コスメトロジー研究振興財団よりご寄贈いただいたものである。関係諸氏、とりわけ、宮川安正氏のお力添えとご厚意に深く感謝申しあげる。

1) 本研究は、筆者の共同研究者であり指導教官である浜 治世（文京女子大学教授；同志社大学名誉教授）が中心となって進めている、情動活性化療法の試みの一部である。

引用文献

- 1) 浅井 泉・浜 治世 1992 老人性痴呆の情動活性化の試み：化粧を一つ的手段として 日本健康心理学会第5回大会発表論文集, 40-41.
- 2) 浅井 泉・余語 優美・浜 治世 1992 老人性痴呆の情動活性化の試み 日本心理学会第56回大会発表論文集, 662.
- 3) 浜 治世・浅井 泉 1993 メーキャップの臨床心理学への適用 資生堂ビューティーサイエンス研究所(編) 化粧心理学 フレグランスジャーナル社 Pp. 346-358.
- 4) 浜 治世・浅井 泉・余語真夫 1991 化粧による情動活性の試み 日本健康心理学会第4回大会発表論文集, 84-85.
- 5) 浜 治世・日比野英子・藤田祐子 1990 化粧による情動活性化の試み 日本心理学会第54回大会発表論文集, 714.
- 6) 保健同人社 1998 きれいになって、心も体もイキイキしませんか お達者で 秋号, 3.
- 7) 伊波和恵・浜 治世 1993 老年期痴呆症者における情動活性化の試み 健康心理学研究, 6, 29-38.
- 8) 伊波和恵・浜 治世 1994 化粧を用いた情動活性化の試み 日本感情心理学会第2回大会発表要旨, 36.
- 9) 伊波和恵・浜 治世 1995 化粧を用いた情動活性化の試み(2) 日本感情心理学会第3回大会発表要旨, 35.
- 10) 伊波和恵・浜 治世 1996 化粧を用いた情動活性化の試み(3) 日本感情心理学会第4回大会発表要旨, 31.
- 11) 伊波和恵 1996 化粧と社会的適応 高木 修(監修) 大坊郁夫・神山 進(編) 被服と化粧の社会心理学 Pp. 178-196.
- 12) 伊波和恵・浜 治世 1997 化粧を用いた情動活性化の試み(4) 日本感情心理学会第5回大会発表要旨.
- 13) 伊波和恵・浜 治世・西田真弓 1998 高齢女性における化粧を用いた情動活性化の試み：

- 過去の化粧習慣と化粧プログラムにみられる
参加継続性との関連 文京女子大学紀要(人間
学部), 2, 81-92.
- 14) 伊波和恵・浜 治世・西野泰広 1998 化粧
を用いた情動活性化の試み(5) 日本感情心
理学会第6回大会発表要旨, (印刷中).
- 15) 小西聖子 1991 黄色いアイシャドウ imago,
2(4), 95-101.
- 16) 野村豊子 1998 回想法とライフレビュー:
その理論と技法 中央法規出版.
- 17) 須貝佑一・竹中星郎 1995 痴呆症精神疾患
の非薬物的アプローチの臨床的意義と適応
老年精神医学雑誌, 6(12), 1471-1475.
- 18) 余語真夫・津田兼六・浜 治世・鈴木ゆかり・
互 恵子 1990 女性の精神的健康に与える化
粧の効用 健康心理学研究, 3, 28-32.

記念講演

●
平成 10 年度記念講演 栗 原 堅 三
●

香りと味の分子認識と生理的な役割

北海道大学大学院 薬学研究科

栗原 堅三

場所 日本薬学会会長記念ホール

日時 平成10年11月17日(火)

はじめに

最近、味と匂いの分子機構に関する研究が急速に進展しています。ここでは、まず、匂いの受容体と情報変換機構を紹介します。ついで、この研究を基礎に発展してきた、匂いの人工センサーについて紹介します。フェロモンも一種の匂い物質ですが、通常の匂い物質とは異なった機構で受容されます。最近では、哺乳動物のフェロモンの研究が注目されています。そこで、ここでは、ラットのフェロモン受容機構を紹介します。

つぎに、味の話をしてします。匂いの場合と同じく、最初に受容体と情報変換の話をしてします。つぎに、食品の味、とくに日本人にはなじみ深いうま味の話をしていたします。さらに、薬の苦味を抑える阻害剤の話をしてします。

最後に、味と匂いの生理学的な意義について述べます。また、われわれが食物を食べるとき、食物のいろいろな情報が脳内でどのように伝達され情報処理されるかを紹介します。

1 匂いの受容機構

匂いを受けとる嗅覚の細胞の先端には、10本ばかりの線毛がはえています。匂い分子がこの線毛のところにある受容体に結合すると、その情報

が電気信号に変換されます。この受容体や電気信号に変換される機構を話す前に、GTP結合タンパク質(Gタンパク質)の話をしていただきます。

ホルモンや神経伝達物質がGタンパク質と共役している受容体に結合すると、Gタンパク質が活性化され、これとカップルしている酵素活性を変化させます(図1)。これにより、サイクリックAMP(cAMP)やイノシトール3-リン酸(IP₃)やサイクリックGMP(cGMP)のような二次メッセンジャーの濃度が変化します。最近では視細胞での光の受容も同じようなメカニズムで行われることがわかってきています。視細胞の場合は、ロドプシンがGタンパク質共役型受容体です。一般に、Gタンパク質共役型受容体は、細胞膜を7回貫通する構造をもっています。このように、以

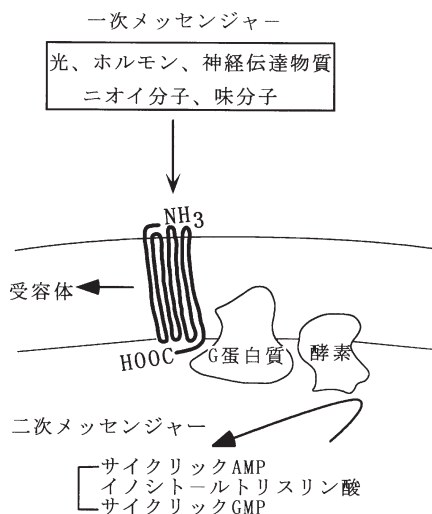
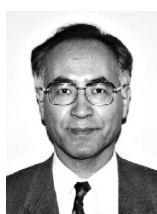


図1 刺激受容の共通のしくみ



Molecular Recognition of Oder
and Taste and Their Physiological
Roles

Kenzo Kurihara

Graduate School of Pharmaceutical
Sciences, Hokkaido University

前は全然違う機構が働いていると思われていた系が、統一的に説明できるようになりました。これからお話しします匂いや味の場合も、類似の機構が関与しています。

後ほどお話ししますが、アメリカのバックは、1991年に、嗅覚受容体に関する論文を発表しました。彼女はそれまで免疫の仕事をしていましたが、どうも嗅細胞の情報変換にはcAMPが関与しているらしいという文献を読んで、それなら7回膜貫通型の受容体がある筈だと考え、遺伝子をクローニングしました。嗅細胞には、およそ1000種類ぐらいの構造がよく似た受容体があることがわかったわけです。ただ、本当のことをいうと未だにこの受容体が匂いの受容体かどうか、確固たるデータはありません。今は、機能がわからなくても、遺伝子のクローニングは出来る時代ですから、遺伝子が先に登場してきたわけです。

歴史的なことを申しますと、実は嗅覚あるいは味覚の受容にcAMPが関与しているだろうということは、1972年に、私が最初に提唱しました。当時、私は嗅細胞あるいは味細胞の膜標品が、cAMPを合成する酵素であるアデニル酸シクラーゼの非常に強い活性をもっていることを見つけました。他の細胞膜標品より、はるかに強い活性をもっていました。ですから、嗅細胞や味細胞で、cAMPが二次メッセンジャーとして働いているかもしれないという論文を書いたわけです。

この当時、嗅細胞の膜標品に匂い物質を加えて、アデニル酸シクラーゼの活性が上昇するかどうかを一生懸命調べましたが、上昇は見られませんでした。いまから考えると当然でありまして、Gタンパク質が介在している場合は、GTPを添加しないと活性は上がらないわけです。ただ、当時はGタンパク質の性質もまだよく分かっておりませんし、GTPを添加することは思いもよらなかったわけです。それから十数年経ってから、イスラエルのランセットが、GTPを共存させたら、アデニル酸シクラーゼが活性化したという論文を発表しました。ここで、嗅覚におけるcAMP

説が大きく進展しました。途中の経過は省略しますが、1991年になりまして、先ほどお話ししたバックが、嗅細胞にGタンパク質と共役している7回膜貫通型の受容体があるということを発表しました。

バックは、インサイチュウハイブリダイゼーションという方法で、一つの嗅細胞に何種類ぐらいの受容体が存在するかを調べました。結論は非常に単純でありまして、一つの嗅細胞には一種類の受容体しか存在しないという結果でした。そうすると匂いの識別は非常に単純だろうということで、つぎのような考えを提唱しました。たとえばスカトールという匂いを与えたとします。そうすると、このスカトールと結合できる受容体をもっている細胞だけが興奮して、受容体をもっていない細胞は興奮しない。別の匂いを与えればその受容体をもっている細胞だけが興奮して、他は興奮しないという、いわば1対1の関係のメカニズムを提唱したわけです。この考えは非常に単純明解で、現在、多くの分子生物学者はこの説を信じています。ただし、実際には、そんなに話は簡単ではありません。

私どもの共同研究者である柏柳助教授は、つぎのような実験をやりました。先に述べたように、嗅細胞の先端には線毛が生えています。この1本の線毛は、顕微鏡でもかすかに見えるような小さなものですが、それを毛細管電極の中に吸い込みます。こうすると、1本の線毛から電気的な応答を記録できます。嗅上皮にいろんな匂いを与えたところ、バックの予想とはまったく違って、いろいろな種類の、それも構造が大きく違った匂い分子が、ことごとく応答をひき起こしました。ということは、嗅覚の細胞はそんなに特異的ではないということです。別の角度から今の結果を説明します。今、ある匂いを与えますと、よく応答する細胞、中くらいに応答する細胞、少ししか応答しない細胞というように、細胞はいろいろな大きさの応答を示します(図2)。

それでは、そんなに特異性が高なくて、どう

匂い物質 嗅細胞 膜電位変化 神経インパルス 応答パターン

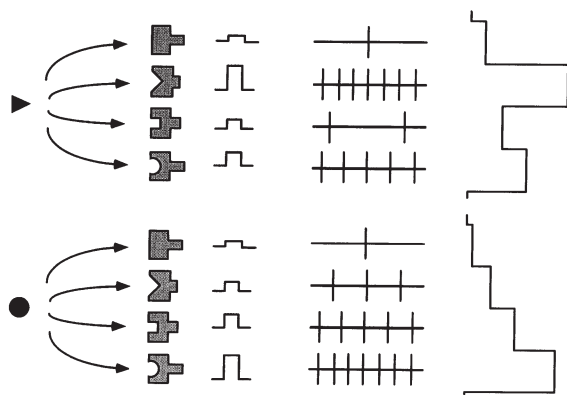


図2 匂いの識別に関するアクロスファイバーパターン説

して匂いが識別されるのかという疑問が湧いてきます。図2の右側には、嗅細胞の応答の大きさを表示しています。それぞれの匂いにより特徴的なパターンが書けます。こうした応答のパターンを脳が認識して、いろいろな匂いを識別しているものと、私たちは考えています。一個一個の細胞があまり特異性が高くないてもいろいろな匂いを識別できるという考えは、あとから話します人工膜の匂いセンサーの匂い識別に応用されています。

今、一個の嗅細胞はあまり特異性が高くないといいましたが、その一つの理由はつぎのようなことと考えています。匂い物質を与えますと、cAMPを介して応答をひき起こしますが、それがあつ一つの匂い物質の応答の全部を占めているわけではありません。たとえばシトラールという匂いを与えたときに、この経路で発生する応答は全体の応答を100%としますと大体40%ぐらいで、残りの60%は実は二次メッセンジャーを介していない経路で現れます。詳しいデータは省略しますが、匂い物質はもともと非常に油に溶けやすいので、細胞の脂質膜に直接溶けて応答をひき起こします。この機構で生じる応答が、先ほどの二次メッセンジャーを介さない経路で発現する応答に対応していると考えています。こういう経路で発現する応答も混じっていますから、全体としては嗅細胞

の匂い特異性が低くなるものと考えています。

2 匂いの人工膜センサー

タンパク質を含まない脂質だけで人工膜を作り、これに匂いを与えますと、かなり敏感に応答します。たとえば、リポソームという脂質2分子膜からなる小胞をつくり、これに匂い物質を与えると、膜電位変化が起こります。ホスファチジルコリンという種類の脂質から作ったリポソームは、アミルアセテートという匂い分子に 10^{-5} モルぐ

らいから応答しますが、これに別の脂質、たとえばホスファチジルセリンという脂質を少し加えていきますと、 10^{-10} モルぐらいから応答ははじめます。つまり5桁ぐらい感度がよくなります。私どもが実験に使っているカメとかカエルの嗅覚器は、これよりはるかに感度が悪いので、人工膜の方が感度が良いということになります。ただし、イヌの嗅覚器の感度には到底及びませんが、いずれにしても、脂質膜は人工膜センサーとして使えるということになりました。

人工膜で匂いを識別するときには、いろいろな組成の膜を用意しておきます。先ほどの嗅細胞に対応させますと、嗅上皮にいろいろな特性をもつた嗅細胞が存在することに相当します。人工膜の場合は、それほどたくさんの膜を用意できませんので、8つぐらいしか用意しません。ある膜は、ある匂いによく応答する、別の膜は別の匂いによく応答するといった特性があります。ただし、一つの膜がある匂いだけに応答するといった特異性の高い膜はありません。それぞれの膜がどの程度の応答性を示すかといったパターンは、匂いごとに違います。したがって、8つの膜全体の応答パターンの違いで、いろいろな匂いの識別ができます。

匂いセンサーに関し私どもがこういう基礎的な研究をやつて以来、工学分野でたくさんの人が

この研究をどんどん発展させてきました。現在は、匂いセンサーは市販もされています。その原理は私どもの系のそれと同じです。東京工大の森泉教授らは、匂いの人工膜センサーを使って面白い実験をやっています。まず、同じサントリー社製のいろいろな銘柄のウイスキーを人工膜に与えます。それぞれの応答パターンをコンピュータに覚えさせ、その次に各銘柄のウイスキーを与えます。90～100%の確率で、正しい銘柄を当てます。

3 フェロモンの受容機構

今度はフェロモンの受容器の話をしていきます。以前は、フェロモンといえば、昆虫のフェロモンをすぐに思い浮かべたものですが、最近では哺乳動物のフェロモンが注目されています。1998年のNature誌には、人にもフェロモンが存在するという論文が掲載されました。

ここでは、ラットのフェロモンの話をします。ラットのフェロモンは、尿中に含まれています。オスの尿にはメスの性的な成熟を促進するフェロモンが含まれていますし、メスの尿にはメスの性的な成熟を抑制するフェロモンが含まれています。

フェロモンは、鼻腔のなかにある鋤鼻器という器官で感知されます。鋤鼻器細胞のフェロモンに対する応答を測定するためには、細胞をバラバラにして微小電極を挿入すればいいわけですが、そうすると細胞のフェロモン応答機能が消失してしまいます。このため、世界中のどのグループも鋤鼻器細胞から応答を記録できなかったのですが、柏柳助教授のグループは鋤鼻器のスライスを作ると応答がとれることを見つめました。実験には、ウイスターという種類のラットのメスの鋤鼻器スライスを使いました。この結果、鋤鼻器細胞は非常に特異性が高いことがわかりました。つまり、ある細胞はオスの尿にだけ応答し、別の細胞はメスの尿にだけ応答します。一つの細胞が、オスの尿にもメスの尿にも応答するということはありません。先に述べました嗅細胞は匂いに対す

る特異性はむしろ非常に低かったのですが、これとは対照的にフェロモン受容細胞は非常に高い特異性をもっています。

鋤鼻器細胞のお腹の方からcAMPを注入してみました。cAMPを非常に濃い濃度にしても応答が現れません。ところがIP₃を注入しますと、非常に大きな応答が現れました。ラットの尿を鋤鼻器に与えますと応答しますが、尿にIP₃の阻害剤を共存させますと、応答なくなります。このような結果から、IP₃がフェロモン受容の二次メッセンジャーであると結論しました。

4 味の受容機構

つぎに、味の話をします。味細胞の先端に味物質が結合すると、情報変換が起こって神経にインパルスが発生します。嗅細胞と違って、味細胞の場合はシナプスという繋ぎ目を介して、神経に情報が伝わります。以前、この伝達物質が何かということをやいぶん一生懸命調べて、ノルエピネフリンであるということを証明しました。最近の興味は、味細胞の細胞膜にある受容体がどのようなものであるか、あるいは情報変換がどうなっているかということです。

嗅細胞の場合と同じような手法で、受容体のクローニングを行いました。その結果、嗅細胞と同じように、味細胞にも7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体があることがわかりました。嗅覚でクローニングされたものと構造が非常によく似ています。面白いことに、これによく似た受容体が腎臓にも非常にたくさんあります。味覚の7回貫通型受容体が、甘味の受容体なのか苦味の受容体なのかということは、現在まだよくわかりません。ちなみに、匂いの場合も、どの受容体がどのような匂いを受容するか依然わからない状況です。

5 基本味としてのうま味

話をちょっと変えて、うま味の話をします。味というのは、塩辛い味、すっぱい味、甘い味、

苦い味と、いわゆる4基本味に分類されます。日本では、これにうま味を追加しますが、欧米では4つが基本味だということになっていました。うま味物質には、昆布のうま味成分であるグルタミン酸ナトリウム、シイタケのうま味成分のグアニル酸ナトリウム、カツオブシの成分であるイノシン酸ナトリウムの3種類があります。うま味には相乗作用という特性があります。たとえば、昆布だけでは大したうま味は出ません。昆布とカツオブシとか、昆布とシイタケを混ぜないと味が出ません。湯豆腐に昆布を入れても、昆布だけでは大した味がでない。豆腐を食べるときにカツオブシの入った醤油につけますが、ここで昆布とカツオブシが混ざるから味が出るわけです。シイタケのうま味成分であるグアニル酸も、単品ではほとんど味がしません。ご経験済みでしょうが、ダシをとるときに、昆布とカツオブシ、シイタケ、煮干しなどを一緒に使うからいい味が出るわけで、単独では大した味はでません。こういう現象を味の相乗作用といいますが、ヤマサの国中さんという人が見つけた現象です。

うま味が基本味かどうかは、動物を使って生理学的に証明する必要がありますので、いろいろな人がラットを使って実験をやってきました。ラットを使うのが味覚の実験には常道でしたからやむを得ませんが、今から思うとラットを使ったことが不幸でした。ラットはうま味に対して非常に鈍感でありまして、はっきりとしたうま味の応答がとれません。後で述べますが、ラットでは、うま味物質に対する応答がうま味の応答なのか、うま味物質に含まれているナトリウムの応答なのか区別できません。そのうえ、うま味の相乗作用は、ラットでは非常に小さい。結局、ラットを用いた実験では、うま味が他の基本味とは独立の味であるという結果は得られませんでしたので、うま味が基本味であるという考えには生理学者は否定的な見解をもっていました。

私どもはイヌを使っていろいろな実験をやっていました。イヌの味覚は、ヒトに大変よく似て

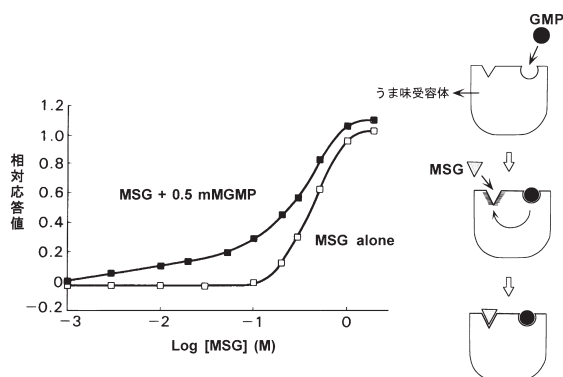


図3 グルタミン酸ナトリウム (MSG) とグアニル酸ナトリウム (GMP) との相乗作用

います。うま味に対しても非常に敏感に反応しますし、大きな相乗作用が現れます。図3の横軸は、昆布のうま味成分であるグルタミン酸ナトリウムの濃度、縦軸には味神経の応答を示します。ここに、0.5mM という非常に低濃度のシイタケのうま味成分を共存させます。それ自身では何も応答が出ないぐらいの低い濃度です。グルタミン酸単独でも、かなり濃度を高くしないと応答ができませんが、両方を混ぜると、非常に大きな応答が現れます。これは、まさに人間が舌で味わっているのと同じような大きな相乗作用です。イヌの味覚器が人の味を再現してくれたと、大喜びしたわけです。

昆布の成分にどういう成分を加えると相乗作用が出るかと言いますと、シイタケの成分とカツオブシの成分です。アデニル酸とかサイクリックAMPとかいったヌクレオチドには効果がないことも、ヒトと同じです。

うま味の受容体の実体はまだわかっていませんが、図3の右側に、相乗作用を説明する模式図を挿入してあります。受容体には、グルタミン酸ナトリウムとヌクレオチドが結合する2つのサイトがあると仮定しています。アロステリック効果により、片方のサイトにリガンドが結合すると、他方の親和性が大きくなるというようなメカニズムで、相乗作用が説明できると考えています。

ところで、うま味物質は、いずれも塩です。た

たとえば、グルタミン酸は酸ですから、中性の状態では塩の形をとります。普通は、ナトリウム塩です。イノシン酸でもグアニル酸でも、使うのはナトリウム塩です。先に述べたように、ラットの味覚器にうま味物質を与えて味神経に現れる応答は、うま味の応答なのかナトリウムの応答なのか区別できませんでした。

そこで、イヌでつぎのような実験をしました。アミロライドという薬物は、塩化ナトリウムの応答を阻害します。イヌの舌に塩化ナトリウムを与えたときの応答は、アミロライドで完全に阻害されます。ところが、グルタミン酸ナトリウムとグアニル酸ナトリウムの相乗作用により生じた大きなうま味応答は、アミロライドに全然影響を受けません。ですから、このうま味の応答は、ナトリウムの応答ではなくて、うま味という独特な味の応答ということになります。明らかに、うま味はいわゆる4基本味とは独立の味です。その他のいろいろな理由から、うま味は5番目の基本味であることを、私どもは提案しました。英語にはうま味という概念の言葉がありませんので、umami をそのまま国際語にしました。

うま味に関する国際シンポジウムを何回かオーガナイズしました。たとえば、1997年の夏にサンディエゴで味覚と嗅覚の国際会議があったときに、私とアメリカのモネル化学感覚研究所の所長とで、うま味シンポジウムをオーガナイズしました。そのシンポジウムは大変好評で、うま味は第5番目の味という標題で、アメリカの各新聞にかなり大きく取り上げられました。実は、アメリカでは、グルタミン酸ナトリウムはあまり評判がよくありません。以前、中華料理を食べすぎると頭が痛くなることを訴えた人がいて、これはグルタミン酸を摂りすぎたためだと新聞に取り上げられたことがあります。それ以来、アメリカのマスコミでは、グルタミン酸ナトリウムは評判が悪くなりました。実は、この話はその後アメリカの政府の研究機関で大々的に調べられました。そういう症状を訴える人を集めて、いわゆる二重盲

検法で調べたところ、科学的な根拠がなかったというのが結論でした。それでも、一般の人はそういうことを知りませんから、グルタミン酸ナトリウムは相変わらず評判が悪かったわけです。そういう意味では、うま味シンポジウムに対するアメリカの新聞の論調は、めずらしく好意的でした。

6 食物の味

自然界に存在するほとんどの食物の味は、うま味物質とアミノ酸と塩だけで決まっています。味の世界は、思ったより単純だという話をさせていただきます。

表1には、東京大学の鴻巣先生のグループの結果を示しています。私も共同研究をさせて頂いたので、その結果を紹介いたします。グリシン、アラニン、アルギニンというアミノ酸とうま味物質、それに塩を表1のような割合で混ぜると、カニの味がします。私も味わってみました。下手なカニよりよっぽどおいしい味がします。同じ成分で、各アミノ酸の比率を変えるとホタテの味になったり、これにメチオニンを加えるとウニの味になったりします。

もう一つ重要なのは、食塩です。実は食塩がないと、味が弱くて、カニの味ができません。以前、鴻巣先生から食塩にどういう効果があるのか調べてくれと頼まれまして、ラットを使って調べましたが、さっぱり効果がありません。ところが、それから何年かしてイヌで調べてみたら、食塩の効果がわかりました。グリシンやアラニンに食塩を加えますと、イヌの味神経応答は大きく増大し

表1 カニ味を再現するための必須成分

必須成分	組成 (mg/100mL)
グリシン	600
アラニン	200
アルギニン	600
グルタミン酸ナトリウム	30
イノシン酸ナトリウム	20
食塩	500
第二リン酸カリウム	400

(鴻巣ら、1986)

ました。食塩の濃度は、0.1M から 0.2M ぐらいの低濃度で十分増強効果が現れます。それ以上濃度を高くすると、逆に増強効果はなくなります。グリシンやアラニンだけではなくて、ほとんどのアミノ酸の味は、食塩により増強されます。

皆さんもご経験と思いますが、砂糖の味も食塩で強くなります。たとえば、汁粉に食塩を入れると甘くなるとか、スイカに塩をふると甘味が増すとかということをご経験だと思っています。イヌを使うと、甘味に対する味神経応答も、食塩により大きく増大することがわかりました。

食塩だけではなく、いろいろな塩が、アミノ酸や糖の応答を増強します。塩の陽イオンと陰イオンが味受容膜に結合すると、膜の構造が変化し、受容膜上に存在する受容体にアミノ酸や糖が結合しやすくなると考えています。

7 苦味阻害剤

実は、私は薬剤学講座の教授ですから、少しは薬剤学にふさわしい研究をしたいと思っており、以前から非常に大きな研究テーマでした。当然私もいろいろな試みをしましたが、さっぱりいい阻害剤は見つかりません。数年前に花王の桂木さんという研究員が、味覚の基礎研究をやるために私どもの研究室に留学にきました。大豆の中にあるホスファチジン酸というリン脂質と牛乳の中にある β -ラクトグロブリンというタンパク質を混ぜて凍結乾燥すると、非共有結合で互にくっついたリボ蛋白ができます。これが苦味だけを特異的に抑えるということ、まったく偶然に見つけました。

苦味阻害効果を、まずカエルで調べました。カエルは苦味に非常に敏感に応答します。キニーネはものすごく苦いアルカロイドですが、舌にリポタンパク質を与えておきますと、苦味に対する味神経応答はほとんどでなくなります。舌を洗うとまたすぐもとにもどります。パパベリンという薬の苦味もなくなりますし、ロイシンという苦いア

ミノ酸の応答もなくなってしまいます。これに対して、食塩、酢酸、糖、甘いアミノ酸（グリシンなど）に対する応答は、ほとんど影響を受けません。

苦味の阻害剤の濃度を増やしますと、苦味応答は全てほとんど同じように完全に抑制されます。これに対して、食塩とか糖とか酸の応答は、全然影響を受けないので、このリポタンパク質は、理想的な阻害剤と言えます。阻害のメカニズムは非常に単純です。阻害剤が苦味物質が結合する受容サイトを塞いでしまうので、苦味物質が結合できなくなるため、苦味応答が現れなくなると考えています（図4）。

ヒトの場合も、カエルの場合と同じような結果が得られました。苦味阻害剤は、食塩とか糖の応答は全然抑制しませんが、苦味応答だけを選択的に抑制することがわかりました。

苦味阻害剤を実用化する場合に、タンパク質が入っていると安定性が悪いとか、コストが高くなるといった問題があります。いっそのこと、ホスファチジン酸だけで使えないかを調べてみました。効果は多少落ちますが、ホスファチジン酸だけでも濃度を上げれば結構よく苦味を阻害しま

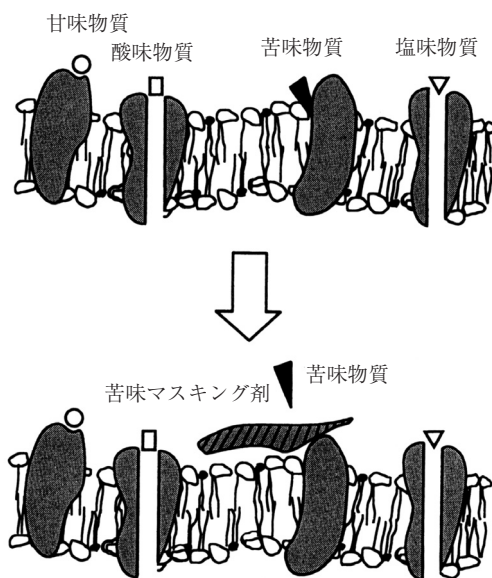


図4 苦味マスキング剤の作用機構

した。現在では、大豆のレシチンからホスファチジン酸を高含量含む分画が、薬や食品の苦味の阻害剤として実用化されています。ポリフェノールは、活性酸素の働きを抑える作用があるので注目されていますが、非常に強い渋味と苦味をもっています。ホスファチジン酸はポリフェノールの嫌な味を抑えますので、チョコレート中のポリフェノールの味を抑制するのに使われています。

8 味と匂いの生理学的な意義

それぞれの基本味には、生理学的な意義があります。甘味を呈する代表的な物質は糖ですから、甘味は糖のシグナルと言えます。うま味を呈する代表的な物質は、グルタミン酸です。グルタミン酸は、タンパク質の中にもっとも多く含まれているアミノ酸です。タンパク質自身には味がありませんが、タンパク質のあるところには遊離のアミノ酸が存在します。したがって、グルタミン酸は、タンパク質のシグナルと言うことができます。塩味を呈する代表的な物質は食塩です。塩味は、ミネラルのシグナルと言えます。糖、タンパク質、食塩は大切な栄養源です。甘味、うま味、塩味は、動物にとっては好ましい味ですから、こういう味のするものを動物は好んで摂取します。一方、酸味は腐敗物のシグナルです。多くの毒物は苦味をもっていますので、苦味は毒物のシグナルです。動物は、有害物質から身を守るために、酸味や苦味のするものを食べません。このように、味覚は栄養物を摂取しやすくし、有害物質から身を守る役割を果たしています。

生まれたての赤ちゃんは、動物と同じように、甘味、うま味、塩味を好み、酸味、苦味を嫌います。このように、味の好き嫌いは生得的なものです。大人は、腐敗物はすっぱいが、酸そのものにはむしろ食欲を増進する好ましい作用があることを知っています。毒物が苦くても、苦いものでも体に害がないものがたくさんあることも知っています。したがって、大人は酢の物のようなすっぱいものや、ビールやコーヒーのような苦いもの

のを好んで摂取します。こうした嗜好は学習効果のたまもので、ヒトの文化の産物と言えます。

それでは、匂いはどういう生理的な意義があるのでしょうか。多くの動物にとって、フェロモンは生殖行動や社会行動において重要な役割を果たしています。ある種の匂いは、外敵や餌の在りかを知るためにも重要な役目を果たしています。それでは、ヒトの場合には、匂いはどういう役割を果たしているのでしょうか。学習経験のない赤ちゃんは、糞臭をとくに嫌わないし、花の香りに特別な関心を示しません。大人が糞臭を嫌うのは、糞臭と汚いというイメージが重なっているからであり、花の香りが好きなのは美しい花が連想されるからです。ヒトの場合は、匂いの好き嫌いはほとんどの場合、学習効果であると言えます。

匂いの好き嫌いは学習で決まるといっても、ある種の匂いをかぐと気が休まりストレスが解消されるという効果は、客観的に評価できます。精神状態に対する匂いの効果は、いろいろな方法で測定されていますが、ここでは瞳の縮小率を計る方法を紹介します。目に光を当てますと、瞬間的に瞳が縮小しますが、疲れてくると瞳の縮小反応が鈍くなります。ストレスが貯まるハードな作業を長時間行わせると、瞳の縮小反応が鈍くなりますが、ハーブの香りを室内に流しておくで縮小反応がそれほど鈍化しないというデータも報告されています。つまり、ハーブの香りをかぐと、ストレスが解消されることが客観的に示されています。

9 脳内における食物情報の流れ

味覚器で受容された味の情報は、神経を介して、まず、延髄に伝えられます。すっぱいものを食べると、唾液が出たり、しかめっ面をするような反射的な活動は、延髄内で行われます。味覚情報は、延髄から視床を経て、大脳皮質の味覚野（第一次味覚野）に伝えられます（図5）。

食物には、味の他に、辛味、渋味（これらは厳密な意味では味ではない）、ニオイ、形、色、温度、

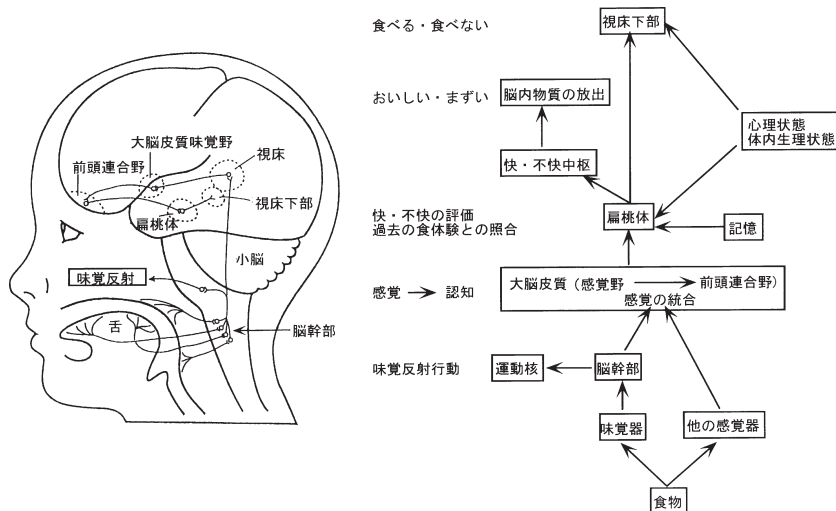


図5 脳内における食物情報の流れ

菌ごたえといった情報が含まれています。これらの情報は別々の感覚器で感知され、大脳皮質のそれぞれの感覚野に送られます。各感覚野に送られた情報は、前頭葉の連合野（第二次味覚野）で統合されます。ここでは、いちごを食べたときに、赤い、いいニオイがする、甘い、噛むとぶつぶつした感じがするといった情報が統合され、いちごという食べ物の全体的な評価が行われます。

連合野の情報はさらに扁桃体に伝えられます。動物の扁桃体を破壊すると、食べ物と非食べ物の区別がつかなくなり、何でも口にもってゆくようになります。普通、ラットは初めて食べるものに対しては非常に警戒（新奇恐怖）しますが、扁桃体を破壊すると新奇恐怖がなくなります。ラットは、普通、干しブドウやキノコはあまり食べませんが、扁桃体が破壊されると、こうしたものも食べるようになります。小さい頃から食べつけている食物には、安心して食べてよいという判断が下されるが、今まで食べたことがないようなものは警戒感を生じさせます。

こうした扁桃体からの情報は、視床下部に伝えられます。快感をもたらすものは摂食中枢を刺激し、摂食を開始させ、不快感をもたらすものは、満腹中枢を刺激し、摂食が中止されます。扁桃体からの情報は、海馬（記憶が形成される中心的な

部位）や大脳皮質連合野にも運ばれ、その食物の風味、食事の際の雰囲気、快・不快感などに関する記憶が形成されます。富山医薬大の小野らは、サルにスイカを食べさせて味を覚えさせると、サルの扁桃体にスイカを見せたときだけに応答する神経が現れることを見いだしました。この神経は、スイカ以外の果物を見せても応答しないし、いろいろな昆虫を見せても応答しない。スイカに塩をべったり塗ってサルに与えると、サルはスイカを食べなくなるが、こうなるとスイカを見て応答する神経は見られなくなってしまいます。つまり、この神経細胞は、「スイカの形や色をみるとスイカの味が連想されるという記憶」を担っている細胞です。

10 食習慣と味覚機能

小さいときに甘いものを食べさせると、その子は大人になっても甘いものが好きになるのだろうか。この質問に答えるため、ラットを使った実験を紹介します。哺乳期のラットに味覚経験をさせなかった群（胃の中に管を通じて栄養物を与えた群）、ショ糖の味だけを経験させた群、正常飼育をさせた群について、成熟後に味覚嗜好テストが行われました。三群の間では嗜好性に差がなかったというのが、実験の結論です。

もっと極端な例を紹介します。母ラットに極端に食塩を減らした餌を与え、同じ餌を生まれた子ラットにも与え続けてみました。子ラットの食塩に対する味神経応答は、正常食で育てたラットよりも減少していました。ただし、このような食塩に対する神経応答の減少は、子ラットに食塩を含んだ餌を与えると回復します。こうした極端な条件下でも、成熟後に不可逆的に残るような味覚機能の変化は起こりませんでした。

以上のことは、幼児期の食習慣が、味覚機能そのものには影響しないことを意味しています。塩辛いものが好きな人、甘いものが好きな人の間でも、味覚器の機能にはあまり差がありません。うま味物質が豊富に入っている食物を小さいときから食べている日本人と、欧米人のうま味に対する感度を比較してみても、とくに差は認められません。塩辛いものを食べつけている人と、薄味

のものを食べつけている人の間にも、食塩に対する味覚感度にはあまり差がありません。長い間の食習慣の違いがあっても、味覚器のセンサー機能にはあまり差がないということになります。

おわりに

嗅覚や味覚の受容体と情報変換機構の研究は、現在もっとも活発に研究が行われています。現在、受容体の候補がクローニングされているが、その機能は依然として不明です。また、どのような情報変換機構が生理的に機能しているかも確定していない部分があります。ただし、数年のうちには、受容体の実体や情報変換機構が解明されるものと思われます。味や匂いの情報が脳内でどのように情報処理されているかは、まだまだ未知のことが多いのですが、今後大きく発展する夢の多い分野です。



(平成8年度)

コスメトロジー雑感

神鳥 和彦

この度、“単分散無機顔料粒子のモルフォロジー制御とそのキャラクタリゼーション”という研究課題で研究助成金を頂き大変有難うございました。

本研究の目的は今までコロイド分野で形態と大きさの均一性にのみ注目されてきた単分散コロイド無機顔料粒子を、その特異な色調・色彩・光物性あるいは吸着物性からコスメトロジー分野の新素材として応用できるかどうかを検討することでありました。その結果、様々な単分散無機顔料粒子（本研究で取り扱ったのは単分散ヘマタイトならびにリン酸アルミニウム粒子）は、非常に微細なクラスター粒子が集合して生成する、いわゆる凝集機構によることが明らかになりました。さらに、その凝集の程度によって生成する粒子の大きさやマイクロポアのサイズがコントロールできることが示唆されました。この発見はコスメトロジー分野で注目すべき点であると思われます。なぜなら、化粧品として使用する際の消費者の肌への

使用感を大きく左右する粒子の形態と大きさを任意にコントロールできるからです。また、現在までの化粧品で使用される無機顔料は、概ねその色調と紫外線吸収性に重点が置かれてきた感があり、必ずしも満足できるものではなかったと考えられます。ところが、今回の結果ではその粒子の持つマイクロポアのサイズもコントロールできることが明らかとなり、汗などの身体から発生する水分量もコントロールできる、高い付加価値を有する粒子が製造出来るという点でも注目出来るからです。

最後に、私は今までコロイドという一分野から単分散無機顔料粒子の合成とキャラクタリゼーションを行ってきましたが、今回コスメトロジー分野という新しい観点から研究を見直す大変良い機会を与えていただきました。これからも、この経験を生かして、研究を発展させていこうと心新たにしているところです。（大阪教育大学教育学部）

(平成8年度)

私のコスメトロジー雑感

武岡 真司

6年ほど前中国青海省に出掛ける機会に恵まれた。海拔3000メートル以上の高地に遊牧民が暮らしており、エメラルドグリーン of 巨大な青海湖のほとりでその夜民族舞踊でもてなしてくれた。こちらは息も絶え絶えで鑑賞する余裕などなかったが、面白いことに気がついた。ヒロイン役の美女は抜けるような白い肌をしているのに、回りで踊っている女性は遊牧民特有の日に焼けたかさか

さの肌をしていた。そこで、ヒロインは低地に住む漢民族の別品さんを特別にリクルートしてきたのか、と現地のガイドに聞いてみた。ガイドは偉くプライドが傷付けられたのか憤慨して応えた。とんでもない！彼女は当然我々の民族の出身、小さい頃から日にあたらないう様に大事大事に育てられた自慢の美女である、と。

やはり、お肌の大敵は紫外線なのである。それ

では、女性は日に当たらない生活をしていれば、生まれ授かった美貌は自然に保てることになる。事実、洋の東西を問わず、一昔前の貴族の女性は皆働かずに家の奥で生活をしていたのである。

現代の活動的な女性は美貌を保つためにその様な日陰の生活を選択するであろうか、当然否でありそのために化粧品があるのだと主張するであろう。しかし、日焼けが健康美であるような間違っただイメージと一緒に化粧品を広告することは避けなければいけないと考える。肌が小麦色に見える色素が入った化粧品を用いれば事足りるはずである。これは煙草に対して世の中全体が神経質になっているのと同様、皮膚において日焼けはもっと神経質になるべきである。

私は現在、活性酸素と生体成分の関わりをテー

マの一つにしているが、日焼けなどによる皮膚の劣化には活性酸素が深く関与している。しかし、その対処方法において、活性酸素の発生箇所(細胞の内外)、寿命(活性酸素の種類によって大きく異なる)、その消去法(間違えば過酸化水素を溜め込むことになる)、微量金属イオンの存在、還元剤や抗酸化剤の効能と副作用(かえって活性酸素の発生源となる)を考慮しないと全く効果がないばかりか、逆に悪影響を与える結果になることを良く経験している。そのためには、一つ一つを解きほぐすような息の長い研究と、従来研究の真偽を見極める学問的バックグラウンドが必要である。是非、コスメトロジーがこの分野の学問体系の構築に牽引的役割を果たすことを願う次第である。

(早稲田大学 理工学部)

(平成8年度)

コスメトロジー研究との出会い

長瀬 裕

様々な薬物を皮膚からの浸透吸収、すなわち経皮吸収によって投与することができればその波及効果は計り知れない。医薬品のみならずコスメトロジーの分野でも広く利用されるであろう。しかしながら、そもそも皮膚は外界からの物質の進入を阻むための防御組織であり、あえてそのバリア機能を低減させて薬物を浸透させるには無理が生じる。皮膚刺激の発現はその無理に対する皮膚からの警告である。私たちは薬物の経皮吸収を助け、皮膚に優しい化合物の研究を約10年前から行っている。高分子化学が専門の私が、このような研究に携わった経緯を述べてみたい。

学生時代にシリコン化合物の特異な物性に興味を惹かれた私は、以来1983年に相模中研へ入所した後もポリシロキサン化合物の特性を活かした機能性高分子材料の開発研究を行ってきた。入所した当時始めたテーマは分離膜素材の開発であっ

た。ポリシロキサンの高い気体透過性に着目して、シロキサン鎖を側鎖に有する種々のグラフト共重合体の合成を中心に行い気体分離膜やパーバレーション膜に応用可能な分離膜素材の開発研究を行った。また一方では、シロキサン結合の柔軟性を利用した高分子液晶の合成研究なども手がけた。

シロキサン化合物を利用できるユニークな応用分野を模索していた私が経皮吸収促進剤に巡り会ったのは、現東京女子医大講師の青柳隆夫氏との出会いがきっかけであった。彼は相模中研の研究員として1987年に入所し、その時経皮吸収製剤に用いる助剤(経皮吸収促進剤)として高分子化合物を利用してみたいという斬新なアイデアを持っていた。薬物の経皮吸収促進効果を有する高分子化合物が得られれば皮膚への刺激が低い実用的な助剤となる、というのが彼のコンセプトであった。

それを聞いた私はコスメトロジーの分野で広く用いられているシリコン化合物を利用できないかと考えた。その数年後、彼と共同でシロキサン化合物を用いた経皮吸収促進剤の開発研究を行うこととなった。当時入所した秋元倫子さんと3人での共同作業が始まった。はじめに試したのは、ポリジニウム塩を末端に有するポリシロキサン化合物である。ある程度の高分子量体が優れた促進効果を示した結果を見たときには大変興奮した。以来、研究報告で述べたように様々な極性基を有するポリシロキサン化合物を合成し、その促進作用を検討してきた。皮膚刺激性の低減のためには促進剤の高分子量化が極めて有効であった。私に大

きなテーマの種を与え、また長い間精力的に仕事を進めてくれた青柳氏には深く感謝している。

多くの製薬会社や化粧品会社の方々にも興味を示していただき、様々な薬物へ適用してその促進効果を検討するための評価を快く引き受けていただいた。その結果、我々の高分子促進剤は薬物や基剤の違いにより促進効果が大幅に異なることが判ってきた。また、新規物質であるため認可を受ける必要があるなど、実用化のためには越えなければならないハードルが多い。一つ一つ乗り越えて、様々な経皮製剤や化粧品の中で使われる高分子助剤を創り上げたい。(財相模中央化学研究所)

(平成9年度)

コスメトロジーとの出会い

齊藤 佑尚

貴財団の助成金を頂きながらこういう事を言うのは不謹慎かも知れませんが、正直申しまして私にはこれまで“COSMETOLOGY”という単語に馴染みがありませんでした。“COSMETIC”という単語が「化粧品」を意味することは知っていましたので、多分これと関係があるのではないかとこの予測はつきました。さらに末尾に-OLOGYと来るので、何か学問体系を指している事も何となく考えられました。そうなるこの単語は「化粧品学」を意味するのではと思い、英和辞典を引いてみました。そこには二つの訳が掲載されており、それらは、一つは予想した「化粧品学」で、もう一つは「美容術」でした。さて今度はこの内のどちらがこの場合により適切な日本語訳かということですが、多分研究助成をするからには前者の「化粧品学」であろうと思いました。男性化粧品さえも全く使用したことが無いという私が「美容術」に関して助成金を頂ける訳がないので、勝手にそう決めてしまいました。しかしそれでは一体「化粧品学」と

はどういう学問なのだろうかと考えてしまいました。大学で体系的にこういう学問体系を研究しているところが有るかは存じ上げませんが、少なくとも「化粧品学科」と言うのは聞いたことが無いような気がします。しかし助成金を申請する段になって、過去の研究課題を見て何となくそのイメージがつかめましたと同時に、何と広範な学問分野であるのかと驚きました。考えてみれば、人間は太古の時代から不老長寿を夢見る薬の研究と同じ位に、安全に美しくなりたいという願望を叶えるための研究をしてきたのかも知れません。今回の私の研究が少しでも“COSMETOLOGY”に近づければ幸いです。

ところで“COSMETIC”という単語は「表面的」というあまり良くない意味の形容詞としても多用されます。私のこれからの研究を「表面的」ではなく、本当の意味での“COSMETOLOGY”のように広範囲で奥が深いものに少しでもしたいものだとつくづく思いました。(東京工業大学生命理工学部)

コスメトロジーとホメオパシー

竹谷 孝一

ホメオパシーという言葉に日本では馴染みが薄い人が多いと思いますが、ヨーロッパではこの言葉は日常的であり、日本で日常使われる漢方がヨーロッパではあまり馴染みがないのと同じようなものであります。ヨーロッパの医療体系は、紀元前四世紀のヒポクラテスの時代より生薬を用いた生物療法なるものが植物療法という名称になって現在まで続いており、ケシからモルヒネ、トコンよりエメチン、キナ皮よりキニーネなど、薬効主要成分が単離され、近代医薬品の基礎が築かれていきました。一方、モルヒネ発見とほぼ同じ頃にドイツの医師ハーネマンによって、ホメオパシー療法なるものがライプツヒで創立され、現在、ヨーロッパには植物療法、ホメオパシー、単一薬効成分を主体とする近代医薬品の3者が病の治療体系として重みの差はあれ共存している。

ここで、対症療法としての近代医薬品と植物療法は我々の常識の範囲で理解できる治療法であるが、ホメオパシーは、同種療法あるいは類似療法とも言われ、かなり希釈した濃度の動物、鉱物、植物などを使用して治療するため、薬効は薬物の投与量に比例して効果が現れるものと思っている

ものには理解しがたい治療法である。ホメオパシー Homeopathy とは、ギリシャ語のホモイオス (同じような) とパトス (病苦) に起源を発するもので、同じような病苦を引き起こすという意味であり、これに対してアロパシー Allopathy は、アロス (他の) パトス (病苦)、すなわち治療すべき病苦と反対の症状を起こさせるように、薬剤を投与する治療法である。すなわち、前者を類似療法あるいは同種療法、後者を対症療法と訳しているが、現在、日本で行なわれている治療法のほとんどは、対症療法である。長々とコスメトロジーと関係ないようなホメオパシーについて述べてきましたが、 10^{-22} 濃度の化合物で本当に薬効を現すのですかと、とにかく思いがちですが、生物における各種ホルモン、フェロモンなどの作用濃度がまさにこのような世界であり、あまり効用などについて論じられることのない極少濃度世界の化粧品香料の効用についても、もっともっと研究され、論じられるとともに、ホメオパシー療法、アロマセラピー世界に化粧品開発の思わぬ開発ヒントがあるのではないかと思っている今日この頃です。

(東京薬科大学薬学部)

(平成7年度)

私のコスメトロジー観

太田 節子

「遺伝子治療開始」、「脳死からの臓器移植成功」茶の間のニュースに世界の最先端を行く日本の医療技術の高さが誇らしげに伝えられている。それを聞いて感心しながらも複雑な心境になってしまう。成功でも免疫抑制剤を一生離せない生活はどういうものなのか、この恩恵に与った数人は宝くじに当たった位の幸運な人であって、喜ばしいが、連日紙面を大々的に占めた術後の詳しい容態よりも、身近な医療の現状と山積みされた問題に関心を持って欲しい、と思った。インフォームド・コンセント、カルテの開示、患者のクオリティ・オブ・ライフの向上等々。

この半年間、私は自分が癌になった様な深刻な悩みを抱えていた。家族同様の親友が卵巣腫瘍で手術をした結果、早期ながら悪性度の高い種類の癌とわかった。親友は長年薬剤師として勤務中の大病院で手術したので、「身内待遇」、羨ましい程のインフォームド・コンセントで若い主治医はありったけの知識を並べて友人の鋭い質問に答えているように見えた。それでもダメ押しの3サイクルの化学療法、転移チェックとリンパ節切除を目的とした2回目の手術については卵巣癌では教科書的な専門書には必ず載っているのに、「私としてはやっておきたい」程度の医師の意見、化学療法が終わって総て終わったと思っていたら2回目の手術予定を告げられたりもして、患者自身は疑心暗鬼になっていった。インフォームド・コンセント、充分な情報を得た上での患者の選択、拒否、同意といわれ、患者の権利として当然で大切なことだと思っていたが、素人が急に勉強しても無理で、難しい。患者は化学療法の副作用は大部分の人に生じると言われていても良い方にとってしまいがちだ。2サイクル目が終わって自宅療養中に突然バラバラと髪が抜けだし、ブラシにゴ

ソッと抜けた毛を見て友人は悲鳴を上げて私に電話をしてきた。完治を目指して果敢に癌と取り組んでいた友人が「化学療法、やるんじゃないかった。」と言った。尼さんみたいになっても1,2年すれば元に戻るし、命に別状はないし、カツラもあるし…私はそう思っていたし、医師もそうだろう。しかし、当人は起きている間中、髪がないことを感じ、部屋中のガラスに写る自分を見て、寸暇でも忘れたい癌を意識するのだ。完治すると言われても転移・再発の恐怖がつきまってしまう癌、死を結びつけてしまう癌、それを四六時中意識させるのだ。他人に癌だったと知られたくないと言った。春からの職場復帰にも気にしている。見えない臓器の喪失感も大きな心理的ショックを与えるが、脱毛も回復意欲を左右するような大きなストレスを与えることが想像以上であることがわかった。

コスメトロジー＝美容術＝化粧品、私も30年来お世話になって、香料・使い心地・特にファンデーションののびの良さ・カバー力・きめの細かさ・UV効果など格段の技術の進歩に拍手を送りながら、化粧品のポスターのような美容の追求のことを思っていた。

これからのコスメトロジーは同時に医療に顔を向けて欲しいと思っている。今までの医療になかった患者主体の心地よい加療生活を果たす際にコスメトロジーの役割は絶大だと思う。クオリティ・オブ・ライフの向上にもコスメトロジーの力が必要だと思う。例えば、病気でフーフー言っているとき以外は、メイクをした後の鏡の中の自分の変身を見て一瞬でも晴れやかな明るい気分になるのも女性の本能ではなくてコスメトロジーの持つ魔力の一つだと思っているから。

(星薬科大学)

(平成8年度)

私とコスメトロジー

小木曾 太郎

20年程前まで化粧品科学の講義をしていましたので化粧品には興味がありましたが、その後は主に薬の体内動態、吸収排泄、使用方法などの研究に移りましたので、長い間コスメトロジーには大きな関心を払ってこなかったのが事実です。しかし皮膚からの薬物の吸収の研究を始めてから、皮膚の荒れ、着色、皮膚障害などにも多少興味を持ち始めました。その意味で5年前からシミの脱色、皮膚の老化防止に関心をいただき、その研究を始めました。勿論、私共の研究の主体は、薬の吸収(皮膚吸収を含め)、代謝、排泄ですので、その片手間に行っていると云っても過言ではありませんが。手始めに、コウジ酸のエステルを合成して、そのシミの脱色を行い(直接私と学生の人体実験でした)、それに成功しましたので、ラットでのこのエステルの皮膚透過、皮膚内貯留性、チロシナーゼ活性の阻害をコウジ酸と比較しました。また、フリーラジカルを消去するメラトニンにも興味を持ちましたので、それについても皮膚透過な

どを調べています。コスメトロジーの研究の途中でいろいろな失敗、苦労がありました。例えば、ヘアレスマウスでの紅斑抑制をみる実験(初めての実験)ではマウスの全身にUVBを照射しましたところ、3—4回の照射でマウスが眼をやられ飼料がとれず全匹死んでしまったり、ヒトの皮膚は高価で、その入手に大変苦労(入手ルートなども含め)しました。この研究は、初めての実験が多く、実験機器の不足などの関係で、十分の成果が得られたとは云えませんので、引き続いて研究を行う予定です。これからもコスメトロジーの発展のために多少でも役立ちたいと考えています。

本研究を遂行するうえで、多大な御支援を頂きましたコスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。
(近畿大学薬学部)

(平成8年度)

再生医学研究とコスメトロジー

松本 邦夫

私の研究対象である HGF (Hepatocyte growth factor) は元々、肝臓の再生因子として見つけられた増殖因子であるが、近年、肝臓のみならず腎臓や肺など様々な臓器においても「器官再生因子」として働くことが明らかになっている。私たちは HGF のもつこの様な器官再生能を実際の臨床場で応用すること、すなわち各種疾病に対する治療薬として用いることを将来的な目標としている。その際、「皮膚」は(詳細な科学的根拠は割愛

するが) 最も実現性の高い組織であると考えられ、またその有用性もきわめて大きい。皮膚科学は異常をきたした皮膚組織をどのようにして元の状態に戻すかを研究する学問であり、さらにコスメトロジーはその知見を基に皮膚をより美しく、かつ健康的に保つことを目的としており、両者はともに皮膚の組織恒常性を維持することが根幹であると言っても言い過ぎではあるまい。そのためには皮膚組織が元々もっている「自己修復能」を上手

に引き出してやる必要があるであり、それ故、生物体がその目的のために生来的に用いている HGFこそ最もその適任であると思われる。近い将来、切り傷・擦り傷に「HGF 軟膏」、肌のお手入れに

「HGF 配合クリーム」が使われることも夢ではないのではなからうか？

(大阪大学医学部)

(平成 9 年度)

コスメトロジー雑感

板見 智

近年女性では四肢の多毛、男性では男性型脱毛に対する社会的な関心が高まって来ており、種々の治療法が試みられている。多毛症とは、正常な女性では終毛がみられない顔面、胸部、大腿などに太い終毛が生じる疾患であるが、過剰に男性ホルモンを産生する臓器によって、卵巣性、副腎性、特発性の三種類に分類される。卵巣性、副腎性の場合には原疾患の治療により軽快するが、特発性は局所毛包での男性ホルモン感受性の亢進が推測されているものの不明の点が多い。いずれにしても女性の多毛症は疾患とみなされ医療の対象となる。一方、男性型脱毛はその病名に「症」がないように医療の対象とはみなされていない。もっとも保険診療の対象にしようものならあまりに患者が多く財政を圧迫してしまうのでこのままでよいと

は思うが。よってコスメトロジーの対象として扱うこととなる。男性型脱毛の発症に遺伝とともに男性ホルモンの関与していることは、すでに 50 年前に明らかにされているが、いまだそのメカニズムは不明である。これまでの我々の実験結果より男性型脱毛の発症においても、間葉系細胞である毛乳頭細胞が主役をなすことが推測される。これらの発症メカニズムを明らかにすることはコスメトロジーの観点からも重要である。欧米ではミノキシジルやプロペシアなどが容易に使えるようになって来ているが、日本ではプロペシアは当分使えそうにない。「ハゲ」に悩む世の男性諸氏のためにニコチンガムのような認可はできないのだろうか。

(大阪大学医学部)

(平成 9 年度)

コスメトロジーと皮膚科医

田上 八朗

私が皮膚科医になった 30 数年前、皮膚科医は一種の職人、あるいは芸術家の感覚で皮膚疾患を捉え、診療しているように見えた。直接、病変が目につく臓器である皮膚の病気が対象であってみれば、それが可能である。一瞬にして診断をつけ、見事に治療効果をあげる名人芸ともいえる能力に

魅せられ、ぜひとも、そのような名医になれるよう腕を磨こうという思いに励まされて、一生懸命に勉強したものである。

しかし、人間の感覚は、一、二週間ぐらい前の所見であれば覚えているにしても、それより先の状態となると心許ない。まして、その病変の程度

が軽度で、変化も微妙であると、よほど、感覚の鋭い医師以外には、間隔をおいての所見の比較など、おぼつかない。ましてや、ほかの医師が診察した場合、記載された所見との比較となると不可能である。皮膚所見は見えるからよい、さわれるからよいとしている限り、科学としての進歩は望めない。

偶然のことから、私は皮膚の表層角層の水分含有量の測定機器を開発する機会に恵まれた。そこで、人間の感覚では捉え得ない機器測定の鋭敏さと、皮膚所見ではあっても、数量的評価が重要であることを強く認識させられた。

皮膚科医は、はっきりした皮膚病変を、おおよそ周囲の正常の皮膚に近くまで、良くできれば事足りたといえる。ところが、この正常がくせ者である。正常皮膚というスタンダードが成り立たないのである。同じ年齢の同性であっても、大きな巾の違いがある。正常人でも環境により、大きく

変わる。

ここで、コスメトロジー、すなわち化粧品科学の研究者の仕事の難しさがよくわかる。正常皮膚として、医師のように十把一絡げにはできないという、つらさがあるからである。人間の欲望には限りがないので、それぞれの皮膚の個性にしたがって、その正常の皮膚の状態を把握し、それをさらに、どれだけ良いものまでもっていくかということが使命の学問である。

この正常の人の皮膚の違いを細かく捉えるには、科学である限り、客観性をもつ生体計測工学の助けが当然必要である。皮膚科学とコスメトロジー。両者が皮膚を対象とする科学である限り、そこに境はもはや存在しない。お互いによりひろく、より頻繁に情報交換をしつつ進んでゆく場が、盛んになることを切に願うものである。

(東北大学大学院医学系研究科)

(平成9年度)

本研究のコスメトロジーにおよぼす影響

小林 芳郎

報告書にも記したように我々はモルモット接触過敏症の惹起時に増大する遺伝子断片を数多く取得した。28種類調べた中で、未知の遺伝子であろうと予想されたものが18種類もあったのは、用いた方法ではおもに3'側が取れてくるので相同性が低く出る可能性もあるものの、驚きであった。それらの発現は大きく3パターンに分類され、抗原投与後12、24、48時間目の発現が(1)12時間でピークとなるもの、(2)徐々に増大するもの、(3)24時間でピークとなり、48時間で元に戻るか、48時間でも十分発現しているもの、のいずれかであった。今回クローニングしてトリプトファンtRNA合成酵素(WRS)であると判明したものは(3)に属していた。

さて、コスメトロジーの大きな課題の一つは膨大な化合物の安全性の評価系の構築にある。これは従来モルモットの皮膚反応を用いて評価されてきたが、定量的に判定するには多数の動物が必要である。その点、取得された遺伝子の中にはその発現が初期に大きく増大するものもあるので、今後これらを用いて感度よく比較的短時間で評価できる系が構築できる可能性がある。時間の短縮には、惹起後ごく初期の皮膚組織を用いて今回と同様のアプローチをすれば有用なプローブが取得できるであろう。コスメトロジーのもうひとつの課題は惹起時の皮膚反応の制御にある。これには惹起時の反応の解析が是非とも必要であるが、ヒトでは研究がどうしても限られるので、従来他の動

物特にマウスでよく研究されてきた。皮膚反応がヒトに類似しているのはモルモットであるから、モルモットで解析できる道具を揃えていくことはすこぶる重要であろう。今回得られた遺伝子のうち WRS もフェリチンもいずれも活性化マクロフ

ページの産物であることは DTH がマクロファージを主体とする反応であることと一致する。今後これらの蛋白質の役割の解明が重要であろう。

(東邦大学理学部)

(平成9年度)

コスメトロジー雑感 “No magic in smoking”

山西 清文

タバコのCMがテレビで放映されなくなって1年ばかりたちました。喫煙の害としては、心疾患、ガンなどの、およそ生活習慣病と呼ばれる疾患は公に認知されるようになり、喫煙の悪影響について以前よりは頻繁に啓蒙されているようです。しかし、意外にも、喫煙の容貌への影響に関してはほとんど知られていません。1971年になって、喫煙は老徴の促進、顔面の皺、とくに深い皺の増加を引き起こすことが、ようやく、報告されるようになりました。1985年に Model は、British Medical Journal に “Smoker's face” の基準を著しています。(1) prominent lines or wrinkles (顕著な皺襞) (2) a gauntness of facial features with prominence of the underlying bony contours (骨格外形が目立つ痩せ衰えた顔貌) (3) an atrophic, slightly pigmented gray appearance of the skin (萎縮し、やや色素沈着をともなう灰色調外観の皮

膚) (4) a plethoric, slightly orange, purple, and red complexion (多血ぎみの、やや橙調、紫調、紅色調の顔色)。最近、若い年代層の女性の喫煙率が急速に増加していることが指摘されています。実際に、女性の歩行中の喫煙、自転車に乗りながらの喫煙なども、しばしば、見かけるようになりました。ダイオキシンなどの内分泌攪乱物質で大騒ぎするなかで、これほど人体に直接的な影響をもたらし、容貌までに影響を及ぼす、個人の習慣というにはあまりにも依存性の強い喫煙について、マスコミも学会も、ほとんど無関心であるのは極めて不可解に思えてなりません。彼女たちの衰えゆく顔貌を少しでも補おうとするのがコスメトロジーの役割かもしれませんが、むしろ、容貌に及ぼす喫煙の影響を早く知らせ啓蒙するのも、コスメトロジーの重要な使命ではないでしょうか。

(京都府立医科大学)

私のコスメトロジー雑感

中村 純三

私が皮膚のことで困り、そして同時に興味を感じるようになったのは、小学生の時でした。子供の頃から、食事の準備と食器を洗うなどの後片付けを手伝っていたおかげで、冬には、手の皮膚にあかぎれが絶えなかったことを覚えています。その時に、ハンドクリームを手に塗り込んで寝ると、翌朝、なんともいえないいい手になっていて、子供心に嬉しかったこととどうして治るんだろうという素朴な疑問を感じました。また、当時竹の子を食べると皮膚に発しんが現れました。アトピー性皮膚炎と食物アレルギーだったのかもしれませんが。三つ子の魂百までではないでしょうが、薬学部に入學し、研究者の道を歩むことになりました。

現在、私は薬学部医療薬剤学講座薬剤学研究室に所属しています。薬理学、生化学、衛生化学、物理化学等に比べて、薬剤学は正確にイメージされにくい分野ではないかと思っています。幅広い分野を包含する薬剤学の中で、私は主に薬物の体内動態と毒性の評価法に関する研究を長年行ってきました。コスメトロジー研究振興財団の研究助成金については、以前から知っていたのですが、薬剤学との間に少し距離があると感じていました。何か接点を見つけられないかと思案し、「眼粘膜への障害を指標とした化粧品素材の安全性評

価のための基礎的検討－眼内動態の定量的評価法の確立」の研究課題で応募させていただきました。最近、科学の研究分野は、細分化されているように感じていましたが、逆に言えば、ボーダレスの時代に入ってきたのかもしれません。ある分野の研究成果が、全く異なるように見える他の分野の研究に影響を及ぼす時代になっています。薬剤学とコスメトロジーとの接点を今後も追いかけていきたいと思います。

貴財団の「コスメトロジー研究」の対象課題分野は、素材、物性に関する分野、生体作用、安全性に関する分野、精神、文化に関する分野があります。薬剤学との接点を考えてみると、薬物の経皮吸収用基材、乳剤、懸濁剤等の言葉が直ぐに思い浮かびます。しかしながら、精神、文化に関する分野との接点となると、悩んでしまいます。医学、理工学、薬学関連の多くの研究助成金の制度がありますが、貴財団は、「精神、文化に関する分野」を含まれている点で非常にユニークであり、エールを送りたいと思います。薬剤学は、薬という化学物質を中心に研究されてきましたが、今後は、精神、文化に関する分野にも影響を及ぼすような研究課題を見つけることを夢見ています。

(長崎大学薬学部)

(平成9年度)

細胞内 DNA 損傷の三次元表示とコスメトロジー

森 俊雄

10年以上をかけて、紫外線で誘発される DNA 損傷を特異的に認識するモノクローナル抗体の樹立、抗体を ELISA 法に応用した鋭敏な損傷検出系の確立、および抗体を共焦点レーザー顕微鏡法に応用した損傷の三次元的表示技術の確立を何とか成し遂げることができた。特に後者の損傷の三次元的表示技術の確立は、コスメトロジー研究振興財団の研究助成によりはじめて可能になったことを強調しておきたい。加えて、同期間中に金沢大学から転勤した奈良県立医科大学において、皮膚科学研究室の多くの情熱あふれる医師との共同研究および共焦点レーザー顕微鏡購入の幸運に支えられたものである。深く感謝したい。

ゴルフ、テニス、水泳、ハイキングといった太陽の下での活動は人間にとって幸せを実感できる必要不可欠なものである。しかし、太陽光はあたりすぎると人体に容赦なく紫外線影響をもたらす。日焼けに始まり、しみ、そばかすを増加させ、長期的には、しわ、たるみなどの皮膚老化の促進、

あるいは皮膚の腫瘍やがんを引き起こす。これらの多くはコスメトロジーの対象となるものであるが、同時にこれらの生物学的現象が表皮細胞中に生成する紫外線 DNA 損傷に深く関与していることは疑いようがない。

本実験では、紫外線誘発 DNA 損傷がどのように形成され、どのように治っていくかを培養ヒト細胞を用いて三次元的にわかりやすく表示できた。今回の報告には含めなかったが、この技術は器官培養したヒト皮膚においても応用可能であったことから、サンスクリーン剤の効果判定や上述したコスメトロジー分野での学術的研究に極めて有用であると考えられる。また、ヒト表皮細胞中に生成した DNA 損傷を大胆に表示することにより、太陽光にあたりすぎることの危険性の啓蒙に大いに役立つのではと考えられる。長い年月をかけて、世界に先駆けて得られた技術である。多くの人に有効に利用していただけたらと願っている。
(奈良県立医科大学)

(平成9年度)

本研究のコスメトロジーに及ぼす影響

横関 博雄

私がコスメトロジーを考えるようになったのは大学院に入学後研究テーマが「接触皮膚炎の発症機序の解析」になってからである。

私が大学院に入学したのは昭和 57 年 (1982 年) で皮膚免疫学が開花した時期である。1979 年頃 Wien 大学の Stingl らがランゲルハンス細胞が接触皮膚炎の誘導に必要な抗原提示細胞であることを発見して以来続々とサイトカイン、Thy1DEC

など皮膚免疫に重要な役割を果たす細胞や蛋白が発見され非常に興奮したことを思い出す。その当時はまだ皮膚免疫学に興味が集出し、臨床的な接触皮膚炎にはまだ興味が湧かなかった。その後、重症のウルシかぶれ、毛染めによるかぶれなどの症例を経験していくうちに次第に接触皮膚炎の予防に関心が移ってきた。

化粧品、外用剤などの成分の感作性試験を調べ

るといまだにモルモットによる Maximization test が主な検査法であることに驚き、もっと簡単な in vitro の検査法を開発することになった。最初は化学物質を皮膚細胞に結合させてマクロファージの存在下でTリンパ球を感作しうるかどうかを調べた。この方法で種々の化学物質の抗原性を測定したが感度に問題がありニッケルで感作することが非常に困難であった。そこで、今回ヒトの皮膚を用いて化学物質の刺激による表皮内のサイトカインの動きを RT - PCR 法で半定量したところハプ

テンと刺激物質の間でサイトカインの動態が異なることがわかった。この実験法を用いて In vitro の感作性検査が簡単にできるようになるとより安全な化粧品を簡単に開発することができ、そのことはコスメトロジーの進歩にもつながると信じている。

最後に本研究に助成していただいたコスメトロジー研究振興財団に心より深謝致します。

(東京医科歯科大学医学部)

(平成8年度)

私のコスメトロジー観

神宮 英夫

最近の化粧品のテレビCMを見ていると、製品の効能を強調するものが多くなっているように思います。以前は、きれいな映像と音楽とで単に雰囲気を出しているだけで、実体のないCMが多かったように思います。単なる雰囲気だけでは、化粧品そのものがぼやけてしまい、ものづくりにたずさわる人たちにとっては不満だったのではないのでしょうか。しかし、だからといって、効能だけでは、薬品と変わらなくなってしまいます。化粧品を使う人は、薬と同じようには考えていないと思います。おそらく、効能と雰囲気の微妙なバランスが、化粧品には求められているのではないのでしょうか。

作り手にとっては、商品のことをお客様にきちんと伝えることが必要です。もちろん、商品の何をどこまで伝えるかが問題なのです。この内容について、普通、商品そのもののことを考えてしまいます。いわゆる品質に関わる問題です。しかし、お客様は、伝えられた品質内容だけで、その商品を

選択しているわけではありません。品質構成を仲立ちとして、作り手の商品に対する思いを感じ取り、その思いに共感することで、購買行動へとつなげていっているのではないかと考えています。作り手の思いを品質構成に託して、どれだけ正確にお客様に伝えられるかが問題なのです。

私の研究テーマは、「化粧品の香り表現に関する研究」でした。商品のことをお客様に伝える際に、最も頻繁に使われるのは言葉です。単なる品質内容ではなく、作り手の思いを伝えられる表現はどのようなものなのかを常に意識して、この研究に取り組みました。今回注目したのは、共感覚です。これは、共通感覚とも関係があり、この英語は「common sense」で、常識とも関係してきます。もちろん、共感との関係も指摘されています。

今回は香りでしたが、他の官能の側面、例えば触感に関わる問題なども、今後研究していきたいと考えています。

(明星大学人文学部)

(平成8年度)

コスメトロジー雑感：今日、明日

伊波 和恵

ここ数年にわたり、私は老人保健施設に通い続けてきた。週に1日、化粧プログラムの提供者として、毎回10名程のお婆さまを相手に「お化粧」をしていたのである。場所は施設の一角で、アカデミックな雰囲気とはかけ離れたフィールドではあったが、鏡の前や待合い席でのおしゃべりで、部屋はいつも活気で満ちていた。

化粧プログラムへ参加する方々には、常連さんいれば、一見さんもらっしやった。気が向いたときだけにふらっと立ち寄られる方もいた。皆さんが仰るには、その「化粧部屋」は、町のパーマ屋さんのような存在であつたらしい。ただし、整髪技術スタッフはひとりもないので、「あとは、髪にパーマ、あてたいねんけどな」と、参加者の嘆きを耳にしても、そのニーズに応えられないのが残念であつた。施設での全体アンケートによると、化粧を好んでいるという人は3人に1人であつたが、整髪へのニーズも高かつたので、いずれ化粧プログラムでも取り組むべき課題であるかもしれない。

化粧場面といえば、通所の方々が流行色や自分に似合う色を自由に選択しているのに対して、入所の方の間では、ナチュラルメイクが好まれていたのが印象に残っている。「目立たん、地味なのがええわ」と、他の入所者の目を気にしての選択であるようにお見受けした。入所通所を問わず、どなたにも人気があつたのは、アイブ로우(眉墨)とコンシーラー(シミ隠し)であり、それに口紅を加えて、化粧室の三種の神器であつた。研究成果もさることながら、施設に通っている間に、私が与えていただいたものは大きかつた。今ここで、目の前にいる人と楽しみを分かち合っているとい

う共有感、プログラムの実施者冥利に尽きるものであり、参加者の方々にはつねに励まされ、支えられてきた。出会った方すべてに、今でも心から感謝している。

ところで、大学院在学中に助成を頂いてまもなく、私は女子大学に勤務しはじめた。日々、女子大学生たちを眺めれば、ここしばらくは、臉や爪はキラキラ、唇はツヤツヤさせるメイクが巷で流行っているらしい。その前は、唇、爪、臉を血豆のような色でマツトに染めるメイクが全盛であつた。そのような化粧、ヘアスタイル、ファッションで身を固めた彼女たちが、流行という名の制服を好んで身につけていることについて、ちゃんと自覚しているのかどうか定かではない。ただ、半世紀余りを経ても(それはおそらく、彼女たちにとって、想像を超えた長い時であろう)、彼女たちは好んで化粧をしているような気がする。人目に気にしつつ、臉の辺りにキラキラを散らしたりしているかもしれない。いずれにせよ、アイブ로우とコンシーラーだけは、いつでもポーチに忍ばせて歩くお婆さまたちになっているのではないかと思う。彼女たちのニーズに応えるようにして、その頃には、高齢者向け住居内での美容サービスなども、ずっと多様化していることだろう。

つくづく思えば思うほど、高齢女性と美容をめぐる研究は、まだまだ萌芽的な段階にあり、当分は興味が尽きそうにない。そしてやがては私自身もそのサービスの享受者となる筈なので、はなはだ身勝手ながら、脆弱で野暮なプログラムは作りたくないものだとも思っている。

(文京女子大学人間学部)

化粧品雑感

五島 綾子

30年も昔の話であるが、結婚する前はデパートのセールスレディにいわれるままに化粧品を購入し、レシピ通り何層も塗りたくっていたことを記憶する。しかし結婚後、子育てと仕事の両立で、美しいライフスタイルなど無縁の生活を過ごしてしまった。しかも私のテーマはコロイド界面化学、中でも界面活性剤の物性が中心となり、高級な化粧品は機能性の高い高価な界面活性剤を含んでおり、おそらく肌に悪いであろうと、コスメトロジー財団で奨励金をいただきながら不届き千万であるが、殆ど化粧品は生協の安いもので済ませていた。

しかし娘が年ごろになり、なにやら高級のブランドの化粧品を使っているではないか。娘に薦められて使ってみると、今の化粧品はなるほど肌が瑞々しくなった気が確かにするのである。子育ても終了し、精神的ゆとりができたことに加え、思いがけずスイスに留学する機会を得た時の体験からであろうか、もしかして高級(?)化粧品を試してみたら、肌を少しは蘇らせることができるのではないかと期待する気持ちになったのである。ヨーロッパでは若い娘たちはいわゆるすっぴんである。美しい髪をなびかせ、ジーンズをはき、それがなんとも美しい。しかし夜のレストランでは中年の女性同志や夫婦が実に楽しそうにお食事をしているが、その化粧が上品で美しいのである。

私はやはり化粧とはゆとりと関係すると思う。これから化粧品のシェアを広げるには、やはり50代以上の女性に照準を合わせることが肝要であ

ろう。彼女たちは若い世代より裕福でゆとりがあるからである。化粧品売り場にぐっと肌が変貌する50代以降の女性のコーナーを設けて、上品な薄化粧の化粧法を実演し、テレビのコマーシャルにも50代以上の女性を登場させれば、どれほど変わるのか。そしてそれを支えるのは50代以上の男性である。日本の男性は若い女の子にだけ興味を示さないで、成熟した女性にもう少し関心を持つことである。そうすれば50代以上の女性は一層心強くなるであろう。

私の友人でベルギーに在住するクロムランク・吉田悦子さんがいる。彼女が80歳の実母を入院させたときの体験を綴った「福祉のひろば」が1988年の1月6日の天声人語でも取り上げられたことがある。「入院したら『素顔で寝間着姿』は日本の常識のようだが、ベルギーでは入院とあってあわてて寝間着を買い込んだ私は、病院から『できるだけ明るい色の洋服と靴、そして化粧品道具とオーデコロンをもってきてください。』と言われました。毎朝看護婦さんがきれいに化粧してくれて、長い髪も結い上げてくれます。病气以前よりずっと若々しいです。」と紹介された。そんな彼女も母上を見送り、今もベルギーで実に洗練された美しい60代を迎えている。

化粧は若さを保つ事にのみに執着しないで、上品に老いていけるメソドロジーをめざせば、50代以上の女性はどうなにか心豊かな生活を楽しめるのか。成熟した社会は化粧品の変革から生まれるかもしれない。(静岡県立大学経営情報学部)

(平成9年度 外国人招聘助成)

活性酸素及びセラミドに制御される免疫及び炎症反応の解析とそれを標的とした薬剤化合物の開発

招聘研究者：米国ソーク研究所ポスドク研究員 Daniel J Van Antwerp

受入責任者：東京大学医科学研究所 助教授 井上 純一郎

Van Antwerp 博士は、US-Japan Joint Symposium on Chemistry Biology Interface (生物化学インターフェイス日米合同シンポジウム) の演者及び座長として来日し、平成9年8月5日、"Transcription Factors as Drug Targets : The NF κ B/Rel/I κ B Paradigm" の演題で講演された。本シンポジウムは通常あまり交流することが少ない生物学者と化学者が一堂に会し医薬品開発における新しいアプローチを見出すことを目的に企画された。今回が第一回であり、テーマとして Intracellular Signal Transduction (細胞内シグナル伝達) を掲げ活発な討論が行われた。

NF κ B の制御機構を解明し、それを標的とした薬剤化合物の開発は、種々の細胞外刺激 (紫外線、活性酸素、セラミド、サイトカイン) により数分で活性化され、免疫及び炎症反応を制御する。したがって、NF κ B の制御機構を解明し、それを標的とした薬剤化合物の開発を目指す研究の成果は紫外線や活性酸素等の関連から化粧品等の開発に際して、不可欠な情報を提供すると考えられる。また NF κ B が白血病発症とも関わりがあることから医薬品開発の標的として注目されている。この様な現状をふまえ本シンポジウムでは NF κ B の制御機構の研究に関して世界的な業績を有する研究者を5名招待した。その中でも Van Antwerp 博士は受入責任者である井上と「NF κ B 制御機構の解明及びそれを標的とした薬剤化合物の開発」

をテーマに共同研究を進行させており、今回その成果を中心に講演された。NF κ B は転写因子でありながら不活性化時には抑制因子 I κ B と複合体を形成して細胞質に存在している。腫瘍壊死因子 (TNF- α) による刺激により I κ B が数分でリン酸化された後プロテアソームにより分解され、I κ B から解放された NF κ B が核に移行する。これにより短時間の内に新たな蛋白質合成を介することなしに標的遺伝子が発現誘導される。今回の講演では NF κ B の制御機構に関する最新の知見を紹介した後、「NF κ B の活性化がアポトーシスを抑制する」という細胞の増殖分化を考える上で不可欠な結果を発表した。この講演は本シンポジウムの目的に沿った的確なものであり本シンポジウムの成功に大いに貢献した。

本シンポジウムは8月4日、5日の2日間に渡って開催され、日米合わせて18名の演者による発表、聴衆約100名の参加により活発な討論と友好的な雰囲気の中に終了した。また、今回の成功が評価され2年後に米国において第2回シンポジウムが開催されることが決定された。今後とも生物学者と化学者との共同研究の発展の中心となるシンポジウムとして継続して行くつもりである。

最後に、この度の Van Antwerp 博士の招聘にご援助をいただいた(財)コスメトロジー研究振興財団に深謝する次第である。

カナダ・ケベック州におけるフランス文化の現状と将来

早稲田大学政治経済学部 教授 原 章二

来る21世紀は、多言語・多文化主義の時代となると思われる。

インターネットによりますます、英語が唯一の国際的な共通語として地歩を固めるというのは、やや浅い見方であろう。英語が一般的に求められれば求められるほど、各民族のそれぞれの言葉は血・出自・伝統・アイデンティティーを保証するものとして、重みを増す。このことは実際に、多文化主義の国を現在訪れれば実感できる。わたしの滞在したカナダ・ケベック州モントリオールは、この意味で非常に興味深い都市だった。

単にアメリカ的な人種の坩堝というかたちが、多文化主義の唯一のあり方ではない。カナダの場合はサラダボールの中での混合という比喩がよく使われるが、そこでは単に英語だけが公用語ではなく、フランス語とせめぎ合っているということだけでも、多文化・多言語主義の将来を考える上でカナダの実験はたいへん参考となる。

ふり返って、単一民族の国家として存在しているように見える日本も、単にこれから在留外国人が少しずつ増えていくということだけではなく、自らより積極的に、とりわけ近隣諸国（韓国・北朝鮮、中国・台湾、ロシア、フィリピン等々）と表面的でない文化交流を深めていかなければ、すなわち日本の内部にそれら諸文化を生きた形で取り入れてゆかなければ、日本語と日本文化の伝統すらも死文字となるであろう。

コスメトロロジーということでは、それは決して平均的・一般的な人間像との関わり合いの中で考えられていていいはずはない。多言語・多文化主義の時代の中で今後のコスメトロロジーをより積極的に追究してゆく必要があるだろう。

なお、今回のわたしの海外交流に関するレポートは、『みすず』（みすず書房）と『ふらんす』（白水社）に、それぞれ1998年5月号と6月号より連載中なので、ご覧いただければ幸いである。

(平成 10 年度 外国人招聘助成)

化粧品に関わる各種界面活性物質分子集合体の 電子顕微鏡的研究

招聘研究者：タイ国チェンマイ大学薬学系 助教授 Ladda Wongpayapkul

受入責任者：東京理科大学理工学部 教授 阿部 正彦

貴財団の平成 10 年度外国人招聘助成により、タイ国・チェンマイ大学薬学部のラダ・ウワンパヤプクル (Ladda Wongpayapkul) 助教授を、平成 11 年 3 月 16 日から同年 5 月 9 日までの 55 日間、「化粧品に関わる各種界面活性物質分子集合体の電子顕微鏡的研究」の共同研究遂行のため招聘して頂いた。ラダ先生を招聘することにしたのは、数年前にもこの助成により薬理作用のみならず生体の生理機能や代謝機能にも精通している同大学同学科の別の助教授 (アラニヤ・マノスロイ博士) を招聘して頂いたところ、かなりの成果を上げられた。今回もまた、我々が研究を進めているコスメトロジーに深く関与するコロイド次元分子集合体の構造機能的研究にかなり貢献して頂けるものと、さらに研究機会の拡大の観点から別の先生をお呼びすべきと判断したからである。事実、薬物の担体であるベシクルやリボソームの性質を、我々が一貫して行ってきた物理化学的以外の観点

からも捉えることができ、得られた成果は大きいものである。また、滞在中には日本におけるコスメトロジーの現状を学んで頂くとともに、フリーズレプリカ法を用いた透過型電子顕微鏡や微分干渉装置によるコロイド次元分子集合体 (マイクロエマルション、マクロエマルション、リボソーム) の観察や原子間力顕微鏡 (AFM) 観察によるリン脂質とセラミドとの単分子膜の観察などには特に熱心に取り組んでおられ、かなりの情報や技術の習得もされ満足されておられた様であります。

今回の助成は、当方の研究遂行のみならず、少なくともこの分野では発展途上国であるタイ国のレベル・アップにも貢献できたものと確信しております。

末文ながら、このような実り多い機会を与えて下さったことにラダ先生ともどもお礼申し上げますとともに、貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。

付 録

●
事業報告書(平成10年度)
役 員
研究助成課題一覧
●

事業報告書

(自平成 10 年 4 月 1 日 至平成 11 年 3 月 31 日)

I. 平成 10 年度 (第 9 回) 事業

昨年に引き続き以下のような事業を計画し、実行しました。

自然科学や社会科学の各分野にわたり、ひろくかかわりをもつ化粧品を総合的に体系化することを目的として

- ①化粧品学の調査・研究に関して顕著な成績をあげた研究者や機関に対して功労金をもってこれを表彰する。(1 件あたり 100 万円)
- ②皮膚の生理機能や老化機構の解明、美容に役立つ素材の研究等化粧品学に関連した生命科学、その他の分野の調査・研究に対する助成を行う。
(1 件あたり 200 万円、100 万円、又は 50 万円)
- ③化粧品学の調査・研究にたずさわる研究者の海外派遣や招聘に対して資金援助を行う。(1 件あたり 50 万円まで)

II. 募集及び選考の経過

本年度の各事業につきましては平成 10 年 5 月 6 日より募集を開始し同 10 年 7 月 10 日をもって締切りました。

研究助成事業は本年度も一般公募を原則とし全国 217 ヶ所の大学・病院・研究機関等にダイレクトメールで推薦書を送付するほか、関係学術雑誌 8 誌にも広告し、その結果多数の応募をいただきました。応募者の研究分野が多岐にわたった為、選考委員会の中に 3 分科会を設け、それぞれにおいて予備選考を行い平成 10 年 9 月 24 日 (木) ルビーホールにおいて本選考委員会を開催して受賞候補者を決定し、11 月 17 日の理事会及び評議員会の議決を経て、受賞者を最終決定しました。

III. 第 9 回功労賞・研究助成等の結果

以下のとおり合計 22 件が決定され研究助成金 2,500 万円、国際交流援助金 100 万円が交付されました。

功労表彰 (小林 孝三郎賞)	0 件
研究助成	20 件
国際交流援助	2 件

Ⅳ． 会議等

第1回 常理事会

開催日時 平成10年6月18日(木) 午後2時

開催場所 東京都千代田区大手町1-5-1 大手町ファーストスクエア 23階 宴「銀河」

理事総数 13名 本人出席 11名 委任状出席 1名(賛成) 欠席 1名

監事 2名 出席 2名

審議事項

第一号議案 事業報告ならびに収支決算報告を承認する件

配付された資料に基づき、平成9年度の事業内容が事務局より詳細に説明され、続いて収支計算、財産内容などが詳しく報告された。次いで小田倉監事より、上記内容が適正適法である旨の監査報告がなされた。

慎重審議の結果、本議案は書面表決者を含め全員一致で可決承認された。

第二号議案 評議員の選任に関する件

当財団第4期(平成8年4月～平成10年3月)の評議員の任期満了及び期中に市原久照評議員が逝去されたことに伴い、第5期(平成10年4月～平成12年3月)の評議員候補として、再任13名、新任1名の提案がなされ、満場一致で可決承認された。ついで、被選任者は即時、就任を承諾した。

理事長及び専務理事互選の件

(評議員会で第5期理事・監事の選任の可決、承認を受け新理事会として審議)

専務理事より議長代行を行うことのできることを求める提案があり、これが了承された後、小林禮次郎氏を理事長に、宮澤香氏を専務理事とする提案がなされ、新理事の全員一致で可決承認された。

第三号議案 選考委員の選任に関する件

当財団第4期の選考委員の任期満了及び期中に中尾美津男選考委員が逝去されたことに伴い、第5期の選考委員候補として、再任13名、新任1名の提案がなされ、満場一致で可決承認された。

報告事項

平成10年度の研究助成事業について

研究助成事業、国際交流援助事業、功労表彰の実施計画及び事業経過の概要について説明がなされ、了承された。

その他

本年9月中にコスメトロジー研究報告第6号(収載論文14編)を発行

予定であること、また助成金贈呈式を平成 10 年 11 月 17 日に開催予定であることが報告され、いずれも了承された。

第 1 回 常評議員会

開催日時・場所は第 1 回 常理事会に同じ。

評議員総数 13 名 本人出席 8 名 委任状出席 5 名（賛成）

審議事項

第一号議案 事業報告ならびに収支決算報告を承認する件

配付された資料に基づき、平成 9 年度の事業内容が事務局より詳細に説明され、続いて収支計算、財産内容などが詳しく報告された。次いで小田倉監事より、上記内容が適正適法である旨の監査報告がなされた。

慎重審議の結果、本議案は書面表決者を含め全員一致で可決承認された。

第二号議案 理事及び監事の選任に関する件

当財団第 4 期の理事・監事の任期満了及び高山富士雄理事の退任に伴い、第 5 期の理事候補として、再任 12 名、新任 1 名、監事候補として、再任 2 名の提案がなされ、満場一致で可決承認された。ついで、被選任者は即時、就任を承諾した。

報告事項

平成 10 年度の研究助成事業について

研究助成事業、国際交流援助事業、功労表彰の実施計画及び事業経過の概要について説明がなされ、了承された。

その他

本年 9 月中にコスメトロジー研究報告第 6 号（収載論文 14 編）を発行予定であること、また助成金贈呈式を平成 10 年 11 月 17 日に開催予定であることが報告され、いずれも了承された。

第2回 常理事会

開催日時 平成 10 年 11 月 17 日 (火) 午後 2 時 30 分

開催場所 東京都渋谷区渋谷 2 - 12 - 15 日本薬学会長井記念館会議室

理事総数 13 名 本人出席 13 名

監事 2 名 出席 2 名

審議事項

第一号議案 平成 10 年度（第 9 回）研究助成者等を承認する件

配付された資料に基づき、平成 10 年度の研究助成課題（20 題）及び、国際交流援助課題（2 題）の選定経緯に関する説明がなされた。

慎重審議の結果、本議案は書面表決者を含め全員一致で可決承認された。

第二号議案 平成 11 年度事業計画及び予算案を承認する件

配付された資料に基づき、平成 11 年度の事業計画及び、平成 11 年度予算案について詳細説明がなされた。

慎重審議の結果、事業計画は応募・推薦状況により事業総額を目安に多少弾力的な運用を行うことを含めて、本議案は書面表決者を含め全員一致で可決承認された。

第2回 常評議員会

開催日時・場所は第 2 回 常理事会に同じ。

評議員総数 14 名 本人出席 8 名 委任状出席 3 名（賛成） 欠席 3 名

上記理事会の決議を全員一致で確認した。

選考委員会

分科会Ⅰ

開催日時 平成 10 年 9 月 2 日 (水) 午後 6 時

開催場所 東京都千代田区大手町 1-5-1 トップオブザスクエア会議室

審議事項 素材、物性に関する分野の選考

分科会Ⅱ

開催日時 平成 10 年 9 月 4 日 (金) 午後 6 時

開催場所 東京都千代田区大手町 1-5-1 トップオブザスクエア会議室

審議事項 生体作用、安全性に関する分野の選考

分科会Ⅲ

開催日時 平成 10 年 9 月 3 日 (木) 午後 6 時

開催場所 東京都千代田区大手町 1-5-1 トップオブザスクエア会議室

審議事項 精神、文化に関する分野の選考

本選考委員会

開催日時 平成 10 年 9 月 24 日 (木) 午後 5 時 30 分

開催場所 東京都千代田区丸の内 1-9-1 ルビーホール会議室

審議事項 各分科会の結果を総合的に判断して助成候補者が決定された。

表彰贈呈式

開催日時 平成 10 年 11 月 17 日 (火) 午後 4 時

開催場所 東京都渋谷区渋谷 2-12-15 日本薬学会会長井記念ホール

以上

第9回 研究助成等を受けられたかたがた

(JA, JB: 一 研究助成 H: 国際交流援助)

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
JA-98-01	紫外線ならびに放射線により皮膚で惹起されるラジカル反応の無侵襲測定と皮膚障害予防を目的とした抗酸化剤評価への応用	生体物理化学	放射線医学総合研究所総合研究官 小 沢 俊 彦
JA-98-02	ヒト角層細胞のcell envelopeの発生とその機能障害を来す病態の解析	皮膚科学	慶應義塾大学医学部助手 秋 山 真 志
JA-98-03	古細菌由来のエーテル型リン脂質の物性と機能に関する基礎的な研究	生物有機化学	東京工業大学大学院 理工学研究科助教授 江 口 正
JA-98-04	微小透析法を用いた皮膚内の化粧品素材動態および生体成分動態の系統的解析法の確立	臨床薬剤学	長崎大学医学部附属病院助教授 佐 々 木 均
JA-98-05	森林生物資源からの育毛活性化成分の探索	森林生物化学 天然物化学	九州大学農学部助教授 近 藤 隆 一 郎
JB-98-01	動的光散乱法を用いた合成および天然高分子のゲル化機構の多面的解析	高分子物性 化学物理	京都工芸繊維大学繊維学部教授 柴 山 充 弘
JB-98-02	接触性皮膚炎の研究：皮膚刺激とマクロファージ「細胞交通」の関与	免疫学 アレルギー学	静岡県立大学薬学部教授 今 井 康 之
JB-98-03	老化抑制遺伝子klothoの結合細胞老化における病態生理学的意義の解明と治療法開発への応用	老化学	群馬大学医学部教授 永 井 良 三
JB-98-04	サンスクリーンの皮膚悪性黒色腫発症予防効果の解析	免疫学 皮膚科学	名古屋大学医学部助手 加 藤 昌 志
JB-98-05	アスコルビン酸膜透過促進キャリアーの開発と機構探求	薬品物理化学 生物有機化学	東北大学薬学部講師 鈴 木 巖
JB-98-06	表皮有棘細胞に特異的な遺伝子組み替えを用いた、ダメージスキンの修復機序の研究	皮膚科学 分子生物学 細胞生物学	京都大学大学院医学研究科助手 高 橋 健 造

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
JB-98-07	化粧品による皮膚かぶれを防ぐ菌類成分の探索	薬理活性天然物化学	千葉大学薬学部助教授 藤 本 治 宏
JB-98-08	太陽光紫外線変異原性の作用スペクトラムとサンスクリーンの効果	変異機構学	岡山大学薬学部助教授 根 岸 友 恵
JB-98-09	ヒト毛細胞特異的ペプチジルアルギニンデイミナーゼのcDNAクローニングと毛髪新生における生理機能の解析	皮膚科学 生化学 分子生物学	帝京大学医学部附属市原病院助教授 川 田 暁
JB-98-10	化粧とよそおいにおける非対称性 ーアシンメトリー流行の可能性ー	造形心理学 社会心理学	神戸松蔭女子学院大学文学部教授 藤 本 浩 一
JB-98-11	遺伝子の増殖を制御する人工の脂質膜の開発	生物化学 脂質化学 界面化学	九州大学有機化学 基礎研究センター助教授 石 川 雄 一
JB-98-12	美白剤の紫外線色素沈着抑制機構とその安全性に関する研究	皮膚科学	神戸大学医学部附属病院講師 船 坂 陽 子
JB-98-13	発光、電子分光スペクトルによる酸化亜鉛中の表面・欠陥の状態解析と発光特性制御	酸化物半導体物性 (粉体の光学的性質)	東京工業大学工学部助手 大 橋 直 樹
JB-98-14	含フッ素非対称置換トレハロース誘導体の合成と皮膚に対する保湿性と親和性の検討	糖質生化学 有機合成化学	北里大学看護学部助教授 森 島 直 彦
JB-98-15	空間演出における環境芳香の与える心理的影響に関する研究	人間工学	早稲田大学人間科学部助手 河 合 隆 史
H-98-01	膠原病発症における自己抗体の役割に関する研究 ー美容的にも苦しめる女性顔面の蝶形紅斑などの発症機構についてー	自己免疫疾患	名古屋大学大学院医学研究科大学院生 杉 浦 一 充 米国サンディエゴ The Scripps Research Institute
H-98-02	化粧品に関わる各種界面活性物質分子集合体の電子顕微鏡的研究	コスメトロジー	タイチェンマイ大学薬学系助教授 Ladda Wongpayapkul 受入責任者 東京理科大学理工学部 阿 部 正 彦

(敬称略 受付順)

役 員

理事長	小林禮次郎	(株)コーセー 代表取締役会長
専務理事	宮澤 香	
理 事	有本 亨	日本化粧品工業連合会 専務理事
理 事	磯邊 律男	(株)博報堂 代表取締役会長
理 事	宇佐美昭次	早稲田大学理工学部 教授
理 事	内山 充	(財)日本薬剤師研修センター 理事長
理 事	小林 保清	(株)コーセー 代表取締役社長
理 事	菅原 正文	高砂香料工業(株) 代表取締役会長
理 事	高橋 久	帝京大学 名誉教授
理 事	立川 雅美	安田信託銀行(株) 取締役相談役
理 事	西川 武二	慶應義塾大学医学部 教授
理 事	花輪 隆昭	社会福祉法人 福利厚生センター 理事長
理 事	廣部 雅昭	東京大学 名誉教授
監 事	小田倉正典	公認会計士
監 事	黒田 節哉	弁護士
評議員	秋吉 信夫	(株)コーセー 常務取締役
評議員	上野 芳夫	東京理科大学薬学部 教授
評議員	緒方 宏泰	明治薬科大学 教授
評議員	北原 文雄	東京理科大学 名誉教授
評議員	近藤 保	東京理科大学 名誉教授
評議員	齊藤 勲	(社)東京医薬品工業協会 理事長
評議員	長野 哲雄	東京大学薬学部 教授
評議員	西岡 清	東京医科歯科大学医学部 教授
評議員	野呂 影勇	早稲田大学人間科学部 教授
評議員	福内 靖男	慶應義塾大学医学部 教授
評議員	溝口 昌子	聖マリアンナ医科大学 教授
評議員	宮崎 榮三	東京工業大学 名誉教授
評議員	山崎 幹夫	千葉大学 名誉教授
評議員	渡辺 徹	日本薬剤師会 専務理事

素材、物性に関する分野

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 90-03	リン脂質膜の表面修飾と分子集合体としての機能発現に関する研究	界面物理化学	筑波大学化学系助教授 古澤 邦夫
J 90-06	ヒアルロン酸で表面を修飾したりボソームからの内容物の温度による放出制御	薬品物理化学	東京理科大学薬学部助手 牧野 公子
J 90-07	皮膚DDSとしての高分子脂質リボソームの基礎研究	高分子合成	早稲田大学理工学部教授 西出 宏之
J 90-15	皮膚への作用性を有する各種糖脂質の合成	有機合成化学	千葉大学薬学部助教授 中川 昌子
J 90-16	新製剤法及び新素材を用いた化粧品の品質確保に関する研究	衛生化学	国立衛生試験所 環境衛生化学部長 武田 明治
J 91-02	生体適合性逆型ベシクルの生成、安定化と応用に関する研究	溶液論 界面化学	横浜国立大学工学部助教授 国枝 博信
J 91-05	新しいDDS剤型としての高分子ミセルの設計と機能開発	高分子合成 DDS	東京理科大学 生命科学研究所助教授 片岡 一則
J 91-06	化粧品素材としての利用が可能な乳酸菌の新規育種技術の開発	応用生物化学	早稲田大学理工学部専任講師 桐村 光太郎
J 91-08	化粧品素材としての竹節人參並びに甘草の組織培養による物質生産並びに大量増殖に関する研究	生薬 薬用生物学	広島大学医学部助教授 神田 博史
J 91-10	界面活性剤を含む溶液混合系の相挙動と濡れの挙動に関する研究	界面化学 物理化学	九州大学理学部助教授 荒 殿 誠
J 91-11	超微粒子分散系の構造と物性及び自己制御コロイド系の開発	高分子物性 コロイド物性	京都大学工学部助手 松本 孝芳
J 91-20	各種界面活性物質によるマクロ及びマイクロエマルジョンの調製並びに物性に関する物理化学的研究	応用界面化学	東京理科大学理工学部講師 阿部 正彦

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
J 92-01	ヒトリゾチームタンパク質を高分泌する酵母突然変異体を用いた素材生産の効率化研究	分子生物学 遺伝学	広島大学理学部助手 鈴 木 克 周
J 92-03	化粧品の紫外線照射による光酸化メカニズムの研究	物理化学 界面化学	明星大学理工学部教授 日 高 久 夫
J 92-04	水素添加大豆リン脂質を用いた油性ゲル及び水性ゲルの保湿作用に関する研究	薬剤学	昭和薬科大学薬学部講師 藤 井 ま き 子
JA-93-05	細胞膜の脂質の物性と機能の基礎的な研究 ーリン脂質物性のコスモロジーへの応用ー	生体物性学 細胞生物物理学	東北大学理学部教授 大 木 和 夫
JA-93-06	化粧品基本素材金属酸化物の酸性大気汚染物質との相互作用	物理化学 固体界面化学	千葉大学理学部教授 金 子 克 美
JA-93-08	新規な構造を有するヒアルロン酸類似多糖の開発	糖鎖工学 高分子化学	東京工業大学生命理工学部助教授 畑 中 研 一
JB-93-01	ペプチドシナージストによるビタミンEの抗酸化能の向上ーヒト血清アルブミン由来のペプチドシナージストの開発ー	脂質生化学 食品化学	水産大学校講師 幡 手 英 雄
JB-93-02	層状鉱物を用いたホストーゲスト反応による有機色素のカプセル化	無機材料化学 粘土科学	早稲田大学理工学部助教授 菅 原 義 之
JA-94-01	ハーダー腺の分泌するアルキルジアシルグリセロールの物性解明とその素材としての応用開発	生化学 脂質生化学	東京大学医学部教授 脊 山 洋 右
JA-94-02	植物組織培養法を用いたクチナシ植物からの橙黄色色素Crocinn及び青色色素イリドイド配糖体の生成に関する研究	植物細胞工学	東京理科大学総合研究所助教授 生 田 安 喜 良
JA-94-04	植物培養細胞・組織による化粧品素材としての活性成分の生産と育種に関する研究	生薬学 植物細胞・組織培養	九州大学薬学部教授 正 山 征 洋
JA-94-07	遺伝子工学的手法を用いた必須脂肪酸 γ -リノレン酸の高等植物における多量生産	植物生理学 植物細胞工学	九州大学理学部助教授 射 場 厚

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
JA-94-10	遠赤外線の水の構造と物性に及ぼす影響及び遠赤水の保湿効果に関する研究	物理化学 (薬学・医学系)	静岡県立大学薬学部助教授 片 山 誠 二
JB-94-05	弾性線維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の構造、物性、機能に関する研究	物理化学 生体物性学	九州大学理学部助手 甲 斐 原 梢
JB-94-06	バイオシグナル分子を固定化した細胞成長促進タンパク質ハイブリッド材料の合成	生体材料化学 高分子化学	京都大学工学部助手 伊 藤 嘉 浩
JA-95-01	材料表面－生体分子間相互作用の直接解析に基づく生体適合性の発現機構の解明	高分子化学	九州大学工学部助教授 高 原 淳
JA-95-06	生体膜構造をもつ高分子中の水の構造解析と生体反応の解明に関する研究	高分子化学 生体材料学	東京医科歯科大学 医用器材研究所助教授 石 原 一 彦
JA-95-07	オリゴ糖による皮膚の耐乾燥保護の分子メカニズムに関する基礎的研究	生体分子工学	東京工業大学生命理工学部教授 井 上 義 夫
JA-95-10	両親媒性分子が構築する超分子の構造と機能性に関する研究	超分子物性化学 高分子物性	名古屋大学理学部助教授 今 栄 東 洋 子
JB-95-02	光学活性化化合物合成を目的とする新規不斉触媒及び新規不斉触媒サイクルの開発研究	有機合成化学	早稲田大学理工学部助教授 中 田 雅 久
JA-96-02	単分散無機顔料粒子のモルフォロジー制御とそのキャラクタリゼーション	コロイド化学 界面化学	大阪教育大学教育学部助教授 神 鳥 和 彦
JA-96-05	合成糖脂質の超分子集合体に関する研究	高分子化学 高分子物性	早稲田大学理工学部助教授 武 岡 真 司
JA-96-07	高分子経皮吸収促進剤の開発と応用研究	高分子化学 製剤学	相模中央化学研究所主任研究員 長 瀬 裕
JA-96-08	新発見の糊代を持ったタンパク質の基礎と応用 (タンパク質接着能を有する化粧品素材の開発)	生物化学	東京工業大学生命理工学部教授 広 瀬 茂 久

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
JB-96-02	食用乳酸菌による化粧品素材としての機能性多糖の生産とその改質	生物材料化学 応用生物化学	新潟大学工学部教授 谷 口 正 之
JB-96-03	メラニン生合成阻害作用を示す海洋天然物の探索	生薬学 天然物化学	北海道大学薬学部教授 小 林 淳 一
JA-97-01	微粒子酸化チタン上に形成された多鎖型界面活性剤吸着層への紫外線吸収剤の吸着可溶化	コロイド 界面化学	東京理科大学理学部教授 江 角 邦 男
JA-97-02	新規な機能を有するコラーゲンの創製	生物化学 分子生物学 バイオテクノロジー	東京工業大学生命理工学部助教授 斉 藤 佑 尚
JA-97-03	脂質エマルション表面単分子膜とリポソーム表面2分子膜の示す顕著なバイオ機能の差異	界面化学 製剤物理化学	京都大学大学院薬学研究科教授 半 田 哲 郎
JB-97-03	植物由来環状ペプチド類のチロシナーゼ阻害活性に関する研究	生薬 天然物化学	東京薬科大学薬学部助教授 竹 谷 孝 一
JB-97-07	逆ミセルを用いた水の構造化とその機能性に関する研究	コロイド界面化学	静岡県立大学経営情報学部助教授 五 島 綾 子
JA-98-03	古細菌由来のエーテル型リン脂質の物性と機能に関する基礎的な研究	生物有機化学	東京工業大学大学院 理工学研究科助教授 江 口 正
JA-98-05	森林生物資源からの育毛活性化成分の探索	森林生物化学 天然物化学	九州大学農学部助教授 近 藤 隆 一 郎
JB-98-01	動的光散乱法を用いた合成および天然高分子のゲル化機構の多面的解析	高分子物性 化学物理	京都工芸繊維大学繊維学部教授 柴 山 充 弘
JB-98-07	化粧品による皮膚かぶれを防ぐ菌類成分の探索	薬理活性天然物化学	千葉大学薬学部助教授 藤 本 治 宏
JB-98-11	遺伝子の増殖を制御する人工の脂質膜の開発	生物化学 脂質化学 界面化学	九州大学有機化学 基礎研究センター助教授 石 川 雄 一

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
JB-98-13	発光、電子分光スペクトルによる酸化亜鉛中の表面・欠陥の状態解析と発光特性制御	酸化物半導体物性 (粉体の光学的性質)	東京工業大学工学部助手 大 橋 直 樹
JB-98-14	含フッ素非対称置換トレハロース誘導体の合成と皮膚に対する保湿性と親和性の検討	糖質生化学 有機合成化学	北里大学看護学部助教授 森 島 直 彦

生体作用、安全性に関する分野

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
J 90-01	染毛剤成分の代謝に関する研究	薬物代謝	食品薬品安全センター秦野研究所 中 尾 美 津 男
J 90-02	ドレイズ試験代替法の開発ーヒト細胞、昆虫細胞を用いた高感度迅速試験法の開発研究ー	組織培養学	理化学研究所副主任研究員 大 野 忠 夫
J 90-05	胆汁酸生合成のメカニズムに関する研究	生物有機化学	東京工業大学理学部助教授 藤 本 善 徳
J 90-08	皮膚の老化に伴うエラスチン遺伝子発現の動態	皮膚科学	慶應義塾大学医学部講師 多 島 新 吾
J 90-09	Werner症候群患者皮膚由来培養線維芽細胞のサイトカイン細胞成長因子に対する応答性	皮膚科学	横浜市立大学医学部助手 佐 々 木 哲 雄
J 90-10	光化学反応によるフリーラジカルの産生と表皮培養細胞に対する影響	医科学 生化学	東京大学医科学研究所教授 金 ケ 士 朗
J 90-11	色素性皮膚病変に対するレーザー療法の研究	皮膚科学	帝京大学医学部助教授 渡 辺 晋 一
J 90-12	表皮糖脂質の生化学的、形態学的並びに臨床的研究（エピデルモシド）	皮膚科学 生化学	山口労災病院皮膚科部長 浜 中 す み 子
J 90-13	生体の酸化的障害に対する防御機構の生化学的研究ービタミンEの活性発現機構の解析ー	生化学	東京大学薬学部助手 新 井 洋 由
J 90-14	皮膚生理機能賦活物質の経皮吸収に対する評価解析理論の確立	薬剤学	京都大学薬学部教授 瀬 仁
J 91-01	培養表皮細胞及び線維芽細胞におけるグリコサミノグリカン及びコラーゲンの代謝	生化学	東京薬科大学教授 森 陽
J 91-03	活性酸素、フリーラジカルによる生体膜障害の防止に関する研究	有機生化学	東京大学 先端科学技術研究センター教授 二 木 鋭 雄

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
J 91-04	パッチテスト結果のコンピューター処理システムの開発	皮膚科学 接触皮膚炎	名古屋大学 医学部附属病院分院皮膚科長 早 川 律 子
J 91-07	皮膚過敏症に対するマスト細胞の役割—マスト細胞欠損動物を用いた検定法の開発—	実験病理学	大阪大学医学部教授 北 村 幸 彦
J 91-09	マウス悪性黒色腫を用いたチロシナーゼ抑制因子の精製と応用	皮膚科学 メラニン色素	北里大学医学部講師 亀 山 孝 一 郎
J 91-12	接触光過敏症のマウスモデルを用いた化粧品による光アレルギーのスクリーニング及びサンスクリーンの効果の評価	光生物学 皮膚免疫	浜松医科大学教授 滝 川 雅 浩
J 91-14	メラニン生合成の調節	分子生物学	東北大学医学部教授 柴 原 茂 樹
J 91-16	ビタミンCと上皮成長因子によるヒト皮膚線維芽細胞の増殖とコラーゲン代謝調節機構の分子細胞生物学的研究	分子細胞生物学 医化学	東京医科歯科大学助手 畑 隆 一 郎
J 91-17	人工皮膚を用いた皮膚の形成機構及び皮膚の反応性試験に関する研究	細胞生物学	広島大学理学部教授 吉 里 勝 利
J 91-18	サンスクリーンの紫外線性表皮障害に対する防御作用の免疫生物学的研究	皮膚科学	京都大学医学部講師 古 川 福 実
J 91-19	ダイレクトスキンセンサーを用いて測定した皮溝と加齢の関係	老年病学 動脈硬化	慶應義塾大学医学部助手 本 間 聡 起
J 91-22	フリーラジカルとポルフィリン代謝に関連する皮膚の老化機構解明に関する研究	環境科学 毒性学	国立公衆衛生院 労働衛生学部室長 市 川 勇
J 92-02	光熱変換分光法による薬物の組織及び細胞への非侵襲吸収計測法の開発	分析化学	東京大学工学部教授 澤 田 嗣 郎
J 92-05	アスパラギン酸プロテアーゼ類の蛋白工学的機能改変によるケラチナーゼの開発	蛋白工学 生化学	東京大学理学部助手 井 上 英 史

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
J 92-06	神経ペプチドによる皮膚炎症反応の成立機序とその特異的制御	内科学 アレルギー学	千葉大学医学部助手 岩 本 逸 夫
J 92-07	皮膚の機能と脂質代謝に関する基礎的研究	生化学	新潟大学医学部教授 小 野 輝 夫
J 92-08	転移因子を用いたアントシアニン色素生成遺伝子とその発現調節因子遺伝子の解析	分子遺伝学 分子生物学	東京理科大学基礎工学部教授 飯 田 滋
J 92-09	モノクローナル抗体を用いた紫外線誘発DNA損傷の定量とメラニン色素のサンスクリーン効果の実験的証明	皮膚科学	奈良県立医科大学大学院生 小 林 信 彦
J 92-10	皮膚の老化における染色体構造の変化と遺伝子修復機構に関する研究	細胞生理学	理化学研究所主任研究員 花 岡 文 雄
J 92-11	アスコルビン酸 2-グルコシドの生物学的有用性研究ー経皮吸収によるビタミン C 活性発現の評価ー	免疫薬理学	岡山大学薬学部教授 山 本 格
JA-93-01	還元型ネオプテリン (NPH-4) の紫外線照射皮膚障害に対する効果	放射化学 薬理学 生化学	東京理科大学 生命科学研究科講師 小 島 周 二
JA-93-02	化粧品による光老化の抗酸化制御に関する細胞生物学的及び生化学的研究	皮膚科学 紫外線生物学	群馬大学医学部教授 宮 地 良 樹
JA-93-03	太陽光紫外線でヒトDNA中に誘発される損傷とその修復に関する研究	放射線生物学 細胞生物学	金沢大学薬学部教授 二 階 堂 修
JA-93-07	色素化合物の光照射下での反応の解析	生物物理化学 光化学治療 光増感化学	東京工業大学生命理工学部教授 大 倉 一 郎
JA-93-09	いわゆる“しみ”（肝斑など）の発症機構とその増悪因子に関する研究	皮膚科学	東北大学医学部講師 富 田 靖
JB-93-04	尋常性痤瘡の発症機序の解明のための皮膚の保湿機能と脂質代謝に関する研究	皮膚科学	新潟大学医学部助教授 山 本 綾 子

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
JB-93-05	哺乳類皮膚細胞のアポトーシスと細胞接着をつかさどるセラミドの研究	糖生物学 発生生物学 生化学	九州大学理学部助教授 野 村 一 也
JB-93-06	不飽和脂肪酸とその過酸化生成物の皮膚角質層への作用に関する研究	製剤学	大阪薬科大学薬学部助教授 森 本 一 洋
JA-94-03	表皮ケラチノサイトにおけるヒト細胞老化因子の研究	皮膚科学	大阪大学医学部助教授 橋 本 公 二
JA-94-06	皮膚生理機能賦活物質の合理的吸収促進法の開発	薬剤学	京都大学薬学部教授 橋 田 充
JA-94-08	リポソーム封入薬剤の皮膚吸収過程の解析と皮膚内ラジカル消去への応用	生体物理化学 生体医用化学	九州大学薬学部教授 内 海 英 雄
JA-94-09	表皮細胞の細胞接着と角化制御に関するシグナル伝達	皮膚科学 細胞生物学	岐阜大学医学部教授 北 島 康 雄
JA-94-11	微生物に由来する多糖分解酵素のコスメトロジーへの応用	遺伝子工学 生化学	東京工業大学 生命理工学部助教授 中 村 聡
JB-94-01	皮膚発現型レチノイン酸受容体のドミナントネガティブ・トランスジェニックマウスを用いた皮膚の成熟過程の検討	皮膚科学 遺伝子工学	京都大学医学部助手 田 中 俊 宏
JB-94-02	化粧品が高温環境下の発汗反応及び選択的脳冷却機構に及ぼす影響	環境生理学 温熱生理学	金沢大学医学部助手 田 辺 実
JB-94-03	サンスクリーン剤の光ハブテンとしての性格	皮膚科学	浜松医科大学医学部講師 戸 倉 新 樹
JA-95-02	脂質皮膚モデルを利用した化粧品及び水の浸透と安全性に関する基礎的研究	生物物理化学 高分子物性	東京工業大学工学部助教授 谷 岡 明 彦
JA-95-03	小分子化学物質によるアトピー性皮膚炎の発症と予防についての基礎研究	免疫薬理学	岐阜薬科大学教授 永 井 博 弐

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
JA-95-04	ヒト皮膚移植SCIDマウスを用いた新しいコスメトロジー研究	実験病理学	大阪大学医学部教授 野 村 大 成
JA-95-08	接触皮膚炎におけるマスト細胞活性化反応の解析	生化学	昭和大学薬学部教授 工 藤 一 郎
JA-95-09	放射線照射あるいは制癌剤投与による脱毛の抑制	生化学 放射線生物学	星薬科大学講師 太 田 節 子
JB-95-01	皮膚表皮細胞におけるリピドバイオフィクターの機能発現機構	生化学 分子生物学	新潟大学医学部助教授 藤 井 博
JB-95-03	炎症後色素沈着におけるエイコサノイドによるメラノサイト活性化機構の解明	皮膚科学 生化学	京都大学医学部助教授 井 階 幸 一
JB-95-04	細胞内小器官ペルオキシソーム：エーテルリン脂質の生合成と酸素ラジカルスカベンジャー機能及び欠損症	細胞生化学 分子生物学	九州大学理学部教授 藤 木 幸 夫
JB-95-06	多成分油性皮膚浸透促進システムの有効性及び作用機構に関する研究	製剤学	城西大学薬学部助教授 杉 林 堅 次
JA-96-01	化粧品用生理活性物質の皮膚透過と皮内貯留性及びヒト皮膚と動物並びに培養皮膚との比較	生物薬剤学 皮膚科学	近畿大学薬学部教授 小 木 曾 太 郎
JA-96-03	酸化ストレスにより生体膜に生成する酸化型リン脂質の代謝機構の解明	生化学 薬学	北里大学薬学部教授 中 川 靖 一
JA-96-06	HGFによる皮膚の再生促進と老化防止の基礎的研究	生化学 細胞生物学	大阪大学医学部助教授 松 本 邦 夫
JA-96-09	in vitroヒト樹状細胞培養系を用いた化学物質の感作性試験の可能性についての基礎的検討	皮膚科学 皮膚免疫	東北大学医学部講師 相 場 節 也
JA-96-10	ケラチノサイトの発現するエラスチンと皮膚老化の関連について	皮膚科学 生化学 分子生物学	防衛医科大学校助教授 多 島 新 吾

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
JB-96-05	免疫不全マウス再構成皮膚における培養毛乳頭細胞による毛包形成の誘導と関連因子の検討	皮膚科学	聖マリアンナ医科大学助教授 窪 田 泰 夫
JB-96-06	細胞増殖因子および接着分子による皮膚硬化制御に関する分子生物学的研究	皮膚科学 膠原病学	獨協医科大学助教授 山 蔭 明 生
JA-97-04	男性ホルモンによる毛の発育制御機序の解析	皮膚科学 内分泌学	大阪大学医学部助教授 板 見 智
JA-97-05	新規蛍光プローブを用いた一酸化窒素（NO）の皮膚における作用解析	有機化学 分析化学 細胞生物学	東京大学大学院薬学系研究科助手 菊 地 和 也
JA-97-06	生体計測工学に基づいた非侵襲的な皮膚の性状の測定法の開発	皮膚科学 化粧品科学 生体工学 医用工学	東北大学医学部教授 田 上 八 朗
JA-97-07	老化による皮膚色素沈着の画像定量自動解析システム確立のための基礎研究	皮膚科学	慶應義塾大学医学部専任講師 田 中 勝
JB-97-01	接触過敏症の皮膚浸潤細胞に特異的に発現している遺伝子の解析	免疫学 分子生物学	東邦大学理学部教授 小 林 芳 郎
JB-97-02	ノックアウトマウスをもちいたcell envelopeのバリアー機能解析	分子生物学 発生工学 遺伝子工学 皮膚科学	京都府立医科大学医学部講師 山 西 清 文
JB-97-04	紫外線吸収効果をもつ酸化チタンの光触媒作用と生体適合性	生体材料	東京理科大学基礎工学部助教授 鈴 木 高 広
JB-97-05	日光老化について一とくに日光弾性線維症の発症機構ならびにUV ^B 症候群の病態に関する研究一	皮膚科学 生化学 分子生物学	熊本大学医学部教授 小 野 友 道
JB-97-06	眼粘膜への障害を指標とした化粧品素材の安全性評価のための基礎的検討ー眼内動態の定量的評価法の確立	薬剤学	長崎大学薬学部教授 中 村 純 三
JB-97-08	紫外線誘発DNA損傷および修復酵素の細胞内分布状態の三次元的表示	放射線生物学	奈良県立医科大学助教授 森 俊 雄

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
JB-97-10	皮膚器官培養系を用いた化学物質の刺激性、抗原性の検討	免疫学 アレルギー 分子生物学	東京医科歯科大学医学部助教授 横 関 博 雄
JB-97-11	皮膚の老化に伴うテロメア短縮化とフリーラジカル障害に対する、細胞内アスコルビン酸のエンリッチング化による防御効果	皮膚生化学 細胞薬理学	広島県立大学大学院 生物生産システム研究科教授 三 羽 信比古
JA-98-01	紫外線ならびに放射線により皮膚で惹起されるラジカル反応の無侵襲測定と皮膚障害予防を目的とした抗酸化剤評価への応用	生体物理化学	放射線医学総合研究所総合研究官 小 沢 俊 彦
JA-98-02	ヒト角層細胞のcell envelopeの発生とその機能障害を来す病態の解析	皮膚科学	慶應義塾大学医学部助手 秋 山 真 志
JA-98-04	微小透析法を用いた皮膚内の化粧品素材動態および生体成分動態の系統的解析法の確立	臨床薬剤学	長崎大学医学部附属病院助教授 佐々木 均
JB-98-02	接触性皮膚炎の研究：皮膚刺激とマクロファージ「細胞交通」の関与	免疫学 アレルギー学	静岡県立大学薬学部教授 今 井 康 之
JB-98-03	老化抑制遺伝子klothoの結合細胞老化における病態生理学的意義の解明と治療法開発への応用	老化学	群馬大学医学部教授 永 井 良 三
JB-98-04	サンスクリーンの皮膚悪性黒色腫発症予防効果の解析	免疫学 皮膚科学	名古屋大学医学部助手 加 藤 昌 志
JB-98-05	アスコルビン酸膜透過促進キャリアーの開発と機構探求	薬品物理化学 生物有機化学	東北大学薬学部講師 鈴 木 巖
JB-98-06	表皮有棘細胞に特異的な遺伝子組み替えを用いた、ダメージスキンの修復機序の研究	皮膚科学 分子生物学 細胞生物学	京都大学大学院医学研究科助手 高 橋 健 造
JB-98-08	太陽光紫外線変異原性の作用スペクトラムとサンスクリーンの効果	変異機構学	岡山大学薬学部助教授 根 岸 友 恵
JB-98-09	ヒト毛細胞特異的ペプチジルアルギニンデイミナーゼのcDNAクローニングと毛髪新生における生理機能の解析	皮膚科学 生化学 分子生物学	帝京大学医学部市原病院助教授 川 田 暁

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
JB-98-12	美白剤の紫外線色素沈着抑制機構とその安全性に関する研究	皮膚科学	神戸大学医学部附属病院講師 船 坂 陽 子

精神、文化に関する分野

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
J 90-04	化粧が意識性に及ぼす効果の研究	心理学	早稲田大学人間科学部教授 春 木 豊
J 91-13	香料に関する定量的解析	感覚生理学	北海道大学薬学部教授 栗 原 堅 三
J 91-15	アルツハイマー型老年痴呆症者と、いわゆる“ぼけ” 症状を呈する人々への化粧による情動活性化の研究	感情心理学 臨床心理学	同志社大学文学部教授 浜 治 世 子
J 91-21	「色白」の嗜好構造に関する一考察	心理学 色彩心理学 造形心理学	早稲田大学 人間総合研究センター 齋 藤 美 穂
Js-92-01	病院看護における化粧に関する研究	基礎看護学	埼玉県立衛生短期大学教授 大河原 千鶴子
Js-92-02	高齢者のおしゃれ行動とその評価に関する研究	人間行動科学	北海道教育大学教育学部助教授 藤 森 立 男
JA-93-04	色彩の心理学的意味空間の研究	計量心理学 認知心理学 行動計量学	金沢大学文学部助教授 岡 本 安 晴
JB-93-03	化粧の個人的効果と対人的効果に関する実証的研究	社会心理学	福島大学教育学部助教授 飛 田 操
JA-94-05	化粧と痴呆老人に関する基礎的研究	脳神経外科学 心理学	産業医科大学名誉教授 松 岡 成 明
JB-94-04	対人魅力の形成にかかわる顔の構造的特徴と化粧行 動の影響の研究	社会心理学 対人魅力	北星学園大学文学部教授 大 坊 郁 夫
JA-95-05	化粧皿を通じた古代ヘレニズム世界における化粧文 化の研究	装飾文化 デザイン	神戸芸術工科大学助教授 服 部 等 作
JB-95-05	化粧品の表示に関する研究－ことに警告表現につい て－	社会心理学	筑波大学社会工学系講師 吉 川 肇 子

管理番号	研 究 課 題	分 野	代 表 研 究 者
JA-96-04	化粧品香り表現に関する研究	心理学 官能評価	東京学芸大学教育学部助教授 神 宮 英 夫
JB-96-04	高齢女性における情動活性化の試み：リハビリテーション・プログラムへの適用可能性の検討	情動心理学 発達心理学	同志社大学 文学部学生（博士課程） 伊 波 和 恵
JB-97-09	高齢者の被服行動の変容が、高齢者の自尊感情及び日常生活行動に与える影響	行動学 老年心理学 臨床心理学	京都大学教育学部助教授 吉 川 左紀子
JB-97-12	健康な笑いづくりの方法について	感情心理学 健康心理学	福岡大学人文学部教授 高 下 保 幸
JB-98-10	化粧とよそおいにおける非対称性 ーアシンメトリー流行の可能性ー	造形心理学 社会心理学	神戸松蔭女子学院大学文学部教授 藤 本 浩 一
JB-98-15	空間演出における環境芳香の与える心理的影響に関する研究	人間工学	早稲田大学人間科学部助手 河 合 隆 史

*本財団についてのお問い合わせは下記に
お願いいたします。

財団法人 コスメトロジー研究振興財団

〒104-0061 東京都中央区銀座三丁目5番12号
電 話 東京 03(3564)6731

コスメトロジー研究報告 Vol. 7 / '99

非売品

1999年9月1日発行

編集責任者 宮澤 香

発 行 財団法人 コスメトロジー研究振興財団
〒104-0061 東京都中央区銀座三丁目5番12号
電 話 東京 03 (3564) 6731

製 作 エイエム企画
〒170-0013 東京都豊島区東池袋三丁目15番2号
電 話 東京 03 (3590) 5375

印 刷 宮崎印刷