

ごあいさつ

本年は20世紀最後の年であり、当財団としましては設立10周年という記念すべき年にあたります。この間に622件の応募があり、その内170件の研究課題に対し研究助成を行うことができました。バブル崩壊・低金利政策による財政上の試練もありました中で、このように多くの優れた研究を世に送り出せましたことは、ひとえに関係各位のご支援ご協力の賜と感謝を申し上げます。次第でございます。

最近では、ヒトゲノムの塩基配列は90%以上が解析されたといわれ、再生医療や臓器移植への期待が高いヒトES細胞の研究が倫理上の問題として論議されています。このように20世紀は機能性素材、電子情報工学の進歩と共にバイオテクノロジー進化の時代であったといえるのではないのでしょうか。そして21世紀は人の成分設計の解明からその作用機序や心・意志の本質解明へと踏み込む脳科学発展の時代になるであろうと予測されます。

化粧品学も従来は素材・薬剤の発展にともなう身体の美化・健康化とともに心の健康、満足を一貫して追求してきましたが、これから始まる21世紀は心へのアプローチに必要な科学的基盤が整備される時代となることが想定されます。そして、心の解明には自然科学だけではなく、人文・社会科学との文理融合的なアプローチが必要であろうと思われまます。このような時代の趨勢を念頭におきながら化粧品学の発展を目指して、幅広い研究課題への助成活動に向けてより一層の努力を続けていきたいと考えております。

今後とも、皆様方の益々のご協力とご支援をお願い申し上げます。

平成12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**

目次

■ ごあいさつ

■ 研究報告

I. 素材、物性に関する分野

- ・ 微粒子酸化チタン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 …… 2
東京理科大学理学部 江 角 邦男
- ・ 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
——血漿アポリポ蛋白質の認識について—— ……7
京都大学大学院薬学研究科 半 田 哲郎
- ・ 凝集性蛋白質溶液のゲル化現象の解明 ……13
京都工芸繊維大学繊維学部 柴 山 充弘
- ・ 化粧品による皮膚かぶれを防ぐ菌類成分の探索 ……17
千葉大学薬学部 藤 本 治宏
- ・ DNA複製開始タンパク質 (DnaA) の活性発現と相分離した混合二分子膜の関連性 ……24
九州大学有機化学基礎研究センター 石 川 雄一
- ・ 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 ……29
東京工業大学大学院理工学研究科 大 橋 直樹

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・ 新規蛍光プローブを用いた一酸化窒素 (NO) の生細胞における作用解析 ……36
東京大学大学院薬学系研究科 菊 地 和也
- ・ 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 ……43
慶應義塾大学医学部 田 中 勝
- ・ 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 ……48
東京理科大学基礎工学部 鈴 木 高広
- ・ 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 ……53
広島県立大学生物資源学部 三 羽 信比古
- ・ 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 ……59
東京大学医学部 永 井 良三
- ・ 紫外線による Ret チロシンキナーゼ活性化のメカニズム ……64
名古屋大学医学部 加 藤 昌志
- ・ 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 ……70
岡山大学薬学部 根 岸 友恵

目 次

・ 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	78
近畿大学医学部 川 田 暁	
・ 美白剤の紫外線色素沈着制御機構とその安全性に関する研究	82
神戸大学医学部 船 坂 陽子	
Ⅲ. 精神、文化に関する分野	
・ シルバーファッションショー出演者の被服に関する意識	88
京都大学大学院教育学研究科 西 尾 新	
・ 健康な笑いづくりの方法について	93
福岡大学人文学部 高 下 保幸	
・ 環境芳香の与える心理的影響に関する研究	98
早稲田大学国際情報通信研究センター 河 合 隆史	
■ 記念講演	
平成 11 年度記念講演 『紫外線とコスメトロジー』	107
京都大学大学院医学研究科 宮 地 良樹	
■ コスメトロジー研究雑感	117
■ 付 録	
平成 11 年度事業報告	131
役員一覧	137
研究助成課題一覧	138

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

微粒子酸化チタン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

東京理科大学 理学部

江 角 邦 男

When surfactants are adsorbed on particles, micelle-like surfactants are often formed on particles, which are called admicelles. Admicelles exhibit an incorporation of hydrophobic compounds as well as micelles. This incorporation has been referred to adsolubilization. The objective of this work was to investigate adsolubilization of 4-tertbutyl-4'-methoxydibenzoylmethan (Parsol) into surfactant adsorbed layer on titanium dioxide. The surfactants used were single-chained, double-chained, and gemini cationic surfactants. At first, since Parsol was not soluble in water, solubilization behavior of Parsol into cationic surfactants was characterized. It was found that the solubilized amount of Parsol increased with the surfactant concentration where the double-chained surfactants provided higher solubilized amount compared with the others.

Adsolubilization experiments were conducted as a function of feed concentration of Parsol under a constant surfactant concentration. The constant surfactant concentrations were above the cmcs of the respective surfactants. The adsolubilized amount of Parsol increased with increasing feed concentration of Parsol; the order of the adsolubilized amount by the surfactant was double-chained > single-chained > gemini surfactant. From the admicellar partitioning coefficients of Parsol it was found that Parsol was preferentially adsolubilized into the single-chained and double-chained surfactants compared to that of gemini surfactants. In addition, the surfactants having bromide as counter ion showed greater admicellar partitioning coefficients than those having chloride as counter ion.

1 緒 言

オゾン層の破壊にともない紫外線がますます人間に照射される機会が増し、特に人間の肌への害は近年深刻化している。もちろん肌への影響を防ぐために紫外線吸収剤や散乱剤などを含む化粧品が盛んに利用されている。一般に散乱剤として酸化チタン、酸化亜鉛などが用いられている。

われわれは以前から微粒子と界面活性剤の相互作用に関する研究を行ってきた。微粒子に界面活性剤を吸着させると二層吸着層がしばしば形成される。その吸着層の環境はプローブなどで測定すると疎水性を示す。その結果、水に溶けにくい化合物が界面活性剤の吸着層に取り込まれるようになる。この現象は吸着可溶化と呼ばれている¹⁾。今までに吸着可溶化の研究に用いられてきた化合物に芳香族化合物²⁾、モノマー³⁾、油性染料⁴⁾、アルコール⁵⁾、ステロイド⁶⁾などがある。

本研究では微粒子酸化チタン表面に多鎖型を含む界面活性剤の吸着層を構築し、かつその吸着層への紫外線吸収剤の吸着可溶化挙動を検討することを目的とした。このような基礎研究は安全かつ効率の良い紫外線吸収剤の開発のための知見を与えると考えられる。

2 実 験

2.1 試 料

実験に用いた界面活性剤は2種類の一鎖型、2種類のジェミニ型、2種類の二鎖型陽イオン性界面活性剤でそれらの構造を図1に示す。ジェミニ型の界面活性剤は合成したものであり⁷⁾、他の界面活性剤は市販品を用いた。

紫外線吸収剤としては日本ロシユ(株)製の4tertbutyl-4'-methoxydibenzoylmethan (Parsol 1789)を用いた。

微粒子酸化チタンは石原産業製のルチル型であり、比表面積は $53.3\text{m}^2\text{g}^{-1}$ であった。水はミリポアで精製したものを使った。他の薬品は特級のものを用いた。

2.2 方法と実験

まずParsolの界面活性剤溶液中への飽和可溶化量を測定した。界面活性剤水溶液10mLにParsolをスパチュラ1杯分程度加え、20分間超音波分散器で処理し、25℃で48時間振盪し、Parsolの可溶化平衡を得た。可溶化されないParsolをフィルターで濾過し、採取した溶液中のParsol濃度を360nmでの吸光度から求めた。吸光度の測定にはHewlett Packard社製8452A Diode Array分光計を用いた。

吸着可溶化実験は次のように行った。各界面活性剤溶液中での飽和可溶化量の知見から界面活性剤の濃度を固定しParsolの可溶化濃度の異なる溶液を調製する。この溶液10mLに酸化チタン0.1gを加え、25℃で24時間振盪し吸着可溶化平衡を得た。遠心分離後、フィルターで濾過し、得られた溶液中のParsol濃度を分光計より求めた。また、溶液中の界面活性剤の濃度は東ソー(株)製高速液体クロマ



Adsolubilization of an UV absorbent into Multi-chained Surfactant Adsorbed Layer on Titanium Dioxide

Kunio Esumi

Faculty of Science, Department of Applied Chemistry, Science University of Tokyo

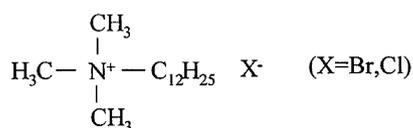
トグラフィーを用いて決定した。

Parsolの溶解性を高めるために水に10%のエタノールを加えた系についても上と同様な実験を行った。

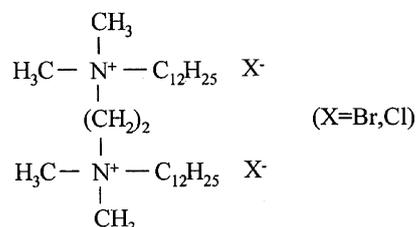
3 結果および考察

3.1 Parsolの可溶化挙動

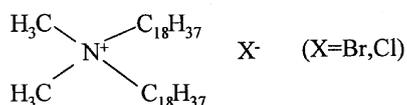
Parsolはほとんど水に溶けないので吸着可溶化実験の前に先ず種々の界面活性剤溶液中での可溶化挙動について調べた。それらの結果を図2～4に示す。Parsolの可溶化量は界面活性剤のある濃度から急激に増加していることがわかる。この濃度は臨界ミセル濃度に対応する。図2に示すDTABでの可溶化量はDTACに比べて大きくなっている。この傾向はエタノール添加系でより明確になっている。一般にイオン性界面活性剤のミセルの大きさならびに会合数は対イオンのミセルへの固定度に大きく依存しており、 Br^- は Cl^- に比べて固定されやすい。したがってDTABミセルの会合数はDTACに比べて大きくなり、その可溶化量も増えることになる。また、エタノール添加の効果は二つ考えられ、ひとつは界面活性剤ミセルとの混合ミセルの形成を促進させることである。もうひとつは界面活性剤の溶解性を高めるために界面活性剤ミセルの形成を妨げることである。図2からエタノール添加によりDTABミセルの可溶化は高められるがDTACミセルではほとんど影響ないことがわかる。図3、4においても同様な対イオンの効果がParsolの可溶化挙動にみられる。また、界面活性剤の可溶化能（界面活性剤一分子当たり可溶化される分子数）は図から二鎖型 > 一鎖型 > ジェミニ型とな



n-Dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB)
chloride (DTAC)



1,2-Bis(dodecyltrimethylammonium)ethane dibromide (2RenQ Br)
dichloride (2RenQ Cl)



Diocetadecyldimethylammonium bromide (DODAB)
chloride (DODAC)

Fig.1 Surfactant structures used in this study.

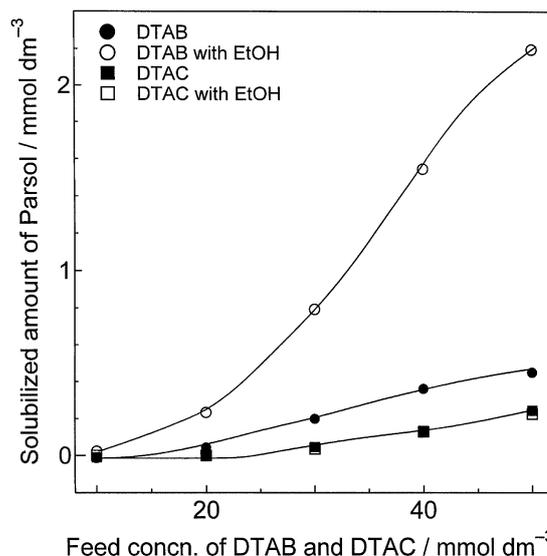


Fig.2 Solubilized amount of Parsol with DTAB and DTAC.

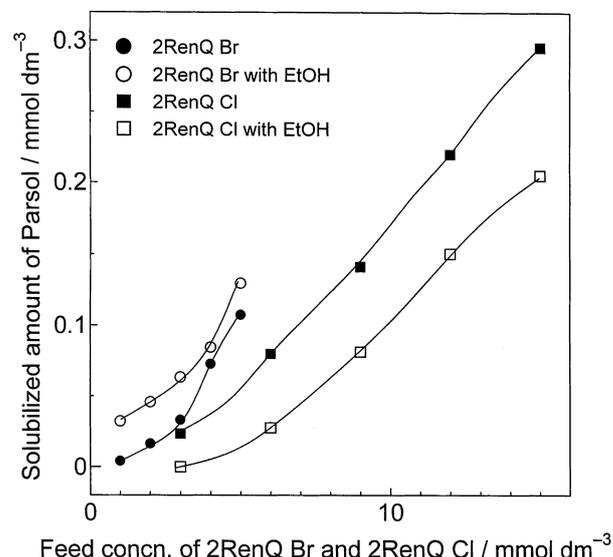


Fig.3 Solubilized amount of Parsol with 2RenQ Br and 2RenQ Cl.

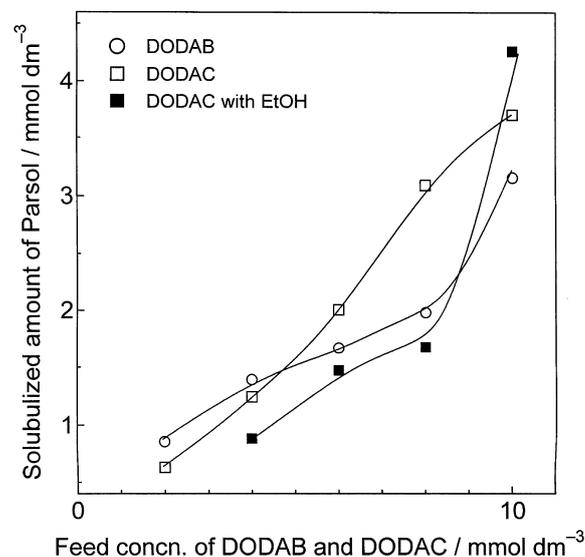


Fig.4 Solubilized amount of Parsol with DODAB and DODAC.

ることがわかる。特に、二鎖型界面活性剤の場合、それらの臨界ミセル濃度は非常に低く、水中ではベシクルとして存在していると考えられている。ベシクルは疎水性環境の占める割合が大きいため可溶化能も大きくなるのが当然示唆される。

3.2 界面活性剤の吸着等温式

まず、Parsolの吸着可溶化挙動を調べる前に用いた界面活性剤の二酸化チタンへの吸着等温線を作成した。その結果を図5～7に示す。どの吸着等温線でも界面活性剤濃度の増加に伴い吸着量も増え、高い濃度で飽和に達する。また、二鎖型やジェミニ型に比べ一鎖型の界面活性剤の吸着量が大きくなるのがわかる。これは分子の大きさに依存していることが考えられる。さらに、エタノールを添加すると界面活性剤の吸着量は増加する。これは界面活性剤吸着分子同士の反発を吸着するエタノール分子によって弱められてためと推定される。

3.3 Parsolの吸着可溶化

前に述べたようにParsolは難水溶性であるから吸着可溶化実験での平衡状態ではParsol分子は吸着可溶化される分子と可溶化される分子に分配される。したがって界面活性剤溶液の濃度は臨界ミセル濃度以上が必要となる。この実験においてDTAB (30mmoldm⁻³)、DTAC (40mmoldm⁻³)、2RenQBr (3mmoldm⁻³)、2RenQCl (9mmoldm⁻³)、DODAB (8mmoldm⁻³)、DODAC (6mmoldm⁻³)とした。図8～10に吸着可溶化の結果を示す。全ての吸着可溶化において仕込みのParsol濃度の増加にともない吸着可溶化量も増加している。図8のDTAB、DTACの場合、エタノール添加によりParsolの吸着可溶化量は増加する。一方、図9からジェミニ型ではエタノール添加による効果はあまりみられない。エタノールを含む系では酸化チタン表面で界面活性剤、エタノール、Parsol分子との複雑な相互作用が考えられる。二鎖型であるDODAB、DODACでは吸着可溶化量は他の界面活性剤に比べてかなり大きくなるがこれは仕込みのParsol濃度が高いためとも考えられる。

種々の界面活性剤を用いて吸着可溶化挙動を比較するために次のようなアドミセル分配係数 (K_{adm}) を定義する⁸⁾。

$$K_{adm} = X_{adm} / X_{aq}$$

$$X_{adm} = C_{adm} / (C_{adm} + S_{ads})$$

$$X_{aq} = C_{eq} / (C_{eq} + 55.55)$$

ここで C_{adm} と C_{eq} は難水溶性物の吸着可溶化量と平衡濃度である。 S_{ads} は界面活性剤の吸着量である。また、55.55 は1Lの水のモル数である。この分配係数を求めるために C_{adm} 、 C_{eq} 、 S_{ads} が必要となる。すでに C_{adm} と C_{eq} は既知であるが S_{ads} を決定しなければならない。界面活性剤濃度が

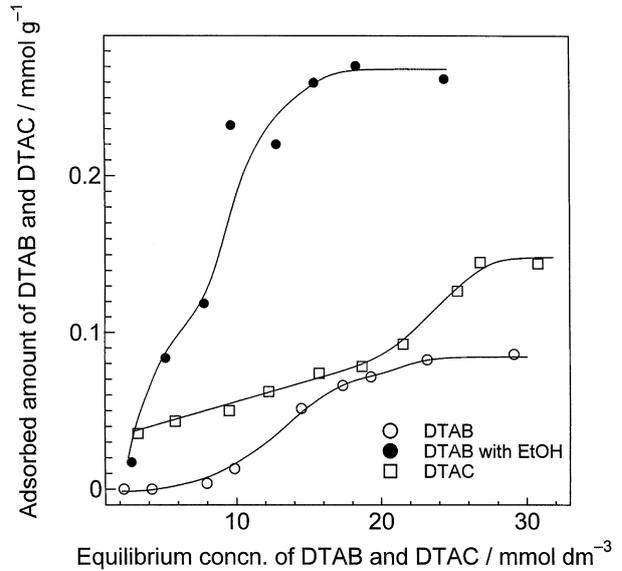


Fig.5 Adsorption isotherms of DTAB and DTAC on TiO₂.

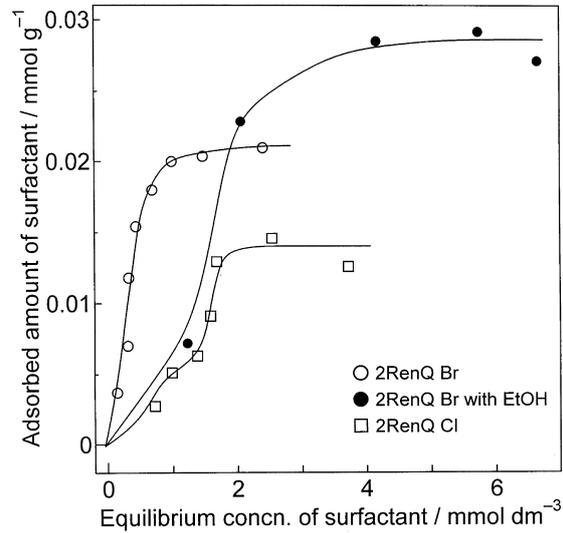


Fig.6 Adsorption isotherms of 2RenQ Cl on TiO₂.

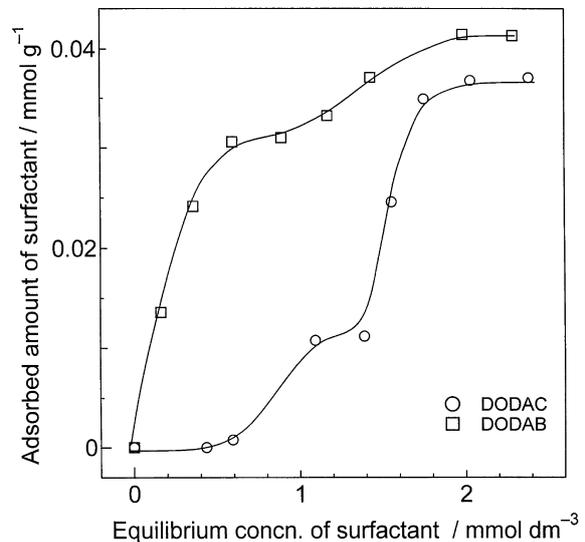


Fig.7 Adsorption isotherms of DODAB and DODAC on TiO₂.

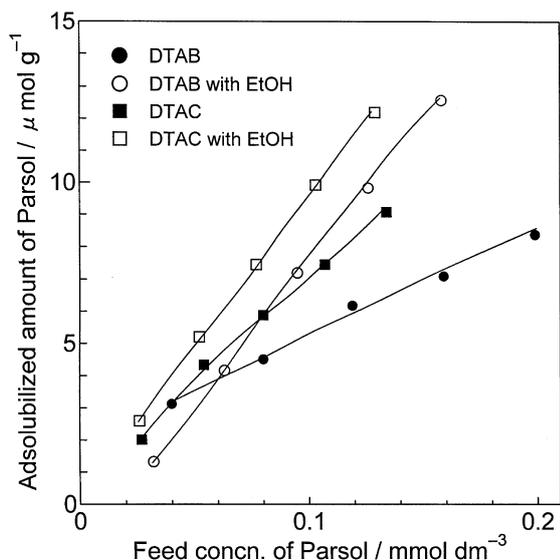


Fig.8 Adsorbed amount of Parsol with DTAB and DTAC on TiO_2 .

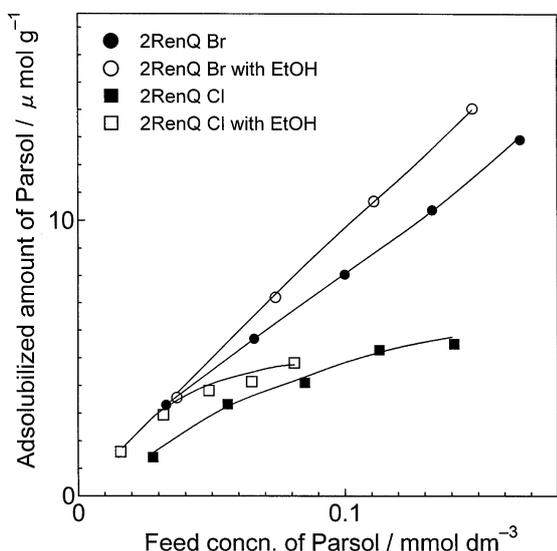


Fig.9 Adsorbed amount of Parsol with 2RenQ Br and 2RenQ Cl on TiO_2 .

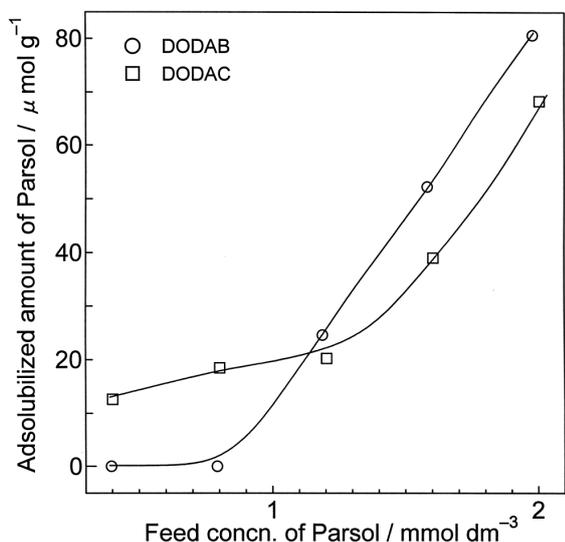


Fig.10 Adsorbed amount of Parsol with DODAB and DODAC on TiO_2 .

臨界ミセル濃度よりかなり高い場合の吸着量の測定に置いて吸着前後での界面活性剤濃度の差から求めることは非常に困難である。一般に臨界ミセル濃度以上では界面活性剤の吸着量は飽和になると考えられるので S_{ads} は臨界ミセル濃度前後での値を採用した。図 11 ~ 12 に DTAB、DTAC、2RenQBr、2RenQCl ならびに DODAB、DODAC による Parsol のアドミセル分配係数を仕込みの Parsol 濃度の関数として示す。図 11 から明らかなように Parsol 分子は酸化チタン粒子表面に形成された DTAC 吸着層よりも DTAB 吸着層の方に吸着可溶化されやすいことがわかる。また、ジェミニ型では一鎖型界面活性剤に比べてアド

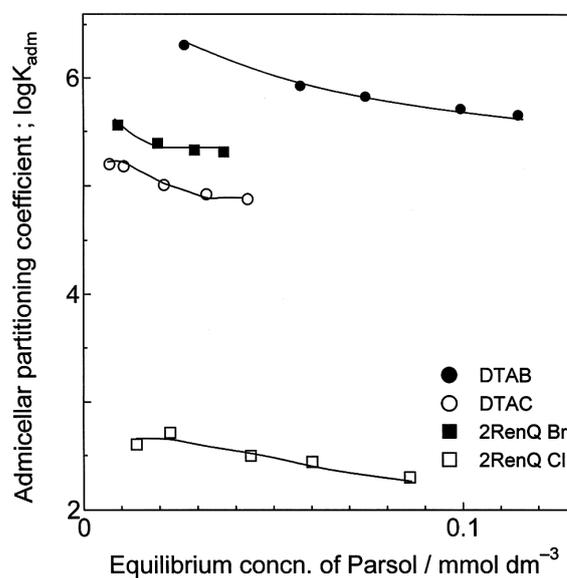


Fig.11 Admicellar partitioning coefficient of Parsol with DTAB, DTAC, 2RenQ Br and 2RenQ Cl.

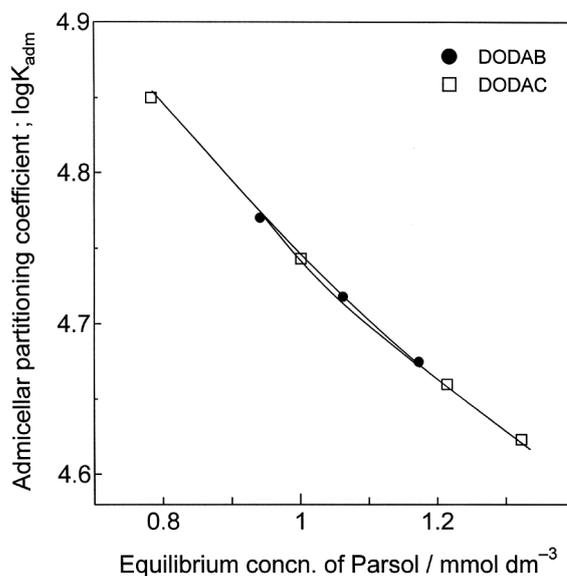


Fig.12 Admicellar partitioning coefficient of Parsol with DODAB and DODAC.

ミセル分配係数は小さい。図 12 の DODAB、DODAC でのアドミセル分配係数はあまり変わらないがその値は大きい。

4 総括

以上、本研究では紫外線散乱剤である酸化チタン粒子表面に形成される界面活性剤吸着層への Parsol の取り込み挙動（吸着可溶化）について検討した。その結果、Parsol の吸着可溶化は界面活性剤の構造に大きく影響することがあきらかになった。酸化チタンの表面に種々の官能基を付与できるので表面処理した後の吸着可溶化の研究は今後の課題となるであろう。

(参考文献)

- 1) 江角邦男: 微粒子表面に形成される界面活性剤の吸着層の特性とその利用, 色材, 70, 675-685 (1997).
- 2) K. Esumi, S. Uda, M. Gojino, K. Ishiduki, T. Suhara, H. Fukui, Y. Koide: Adsorption of Cationic Surfactants on Titanium Dioxide with a Hydrophobic Group Anchor and Their Adsolubilization Behaviors, Langmuir, 13, 2803-2807 (1997).
- 3) K. Meguro, T. Yabe, S. Ishioka, K. Kato, K. Esumi: Polymerization of Styrene Adsolubilized in a Surfactant-adsorbed Bilayer Formed on the Surface of Inorganic Pigments, Bull. Chem. Soc. Jpn., 59, 3019-3021 (1986).
- 4) K. Esumi, Y. Sakamoto, T. Nagahama, K. Meguro: Adsolubilization Behavior of Dyes Caused by Mixed Surfactant Bilayers Formed on Alumina, Bull. Chem. Soc. Jpn. 62, 2502-2506 (1989).
- 5) C. Lee, M. A. Yeskie, J. H. Harwell, E. A. O'Rear: Two-Site Adsolubilization Model of Incorporation of Alcohols into Adsorbed Surfactant Aggregates, Langmuir, 6, 1758-1762 (1990).
- 6) J. Jansen, C. Treiner, C. Vantion: Coadsorption of Steroids and Nonionic Surfactants on Polystyrene Latex Particles from Aqueous Solutions, J. Colloid Interface Sci. 179, 578-586 (1996).
- 7) K. Esumi, K. Taguma, Y. Koide: Aqueous Properties of Multichain Quaternary Cationic Surfactants, Langmuir, 12, 4039-4041 (1996).
- 8) K. Esumi, H. Toyoda, M. Gojino, T. Suhara, H. Fukui: Adsorption of Sodium Dodecyl Sulfate and 2-Naphthol Adsolubilization on Titanium Dioxide with Quaternary Ammonium Groups, Langmuir, 14, 199-203 (1998).

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——血漿アポリポ蛋白質の認識について——

京都大学大学院 薬学研究科

半田 哲郎

Triacylglyceride (TG)/phosphatidylcholine (PC) -emulsions and PC-vesicles are protein-free models for TG-rich plasma lipoproteins and biological membranes, respectively. Both have been utilized for drug delivery systems. We have found that PC monolayers of emulsion particles and PC bilayers of vesicles have different interfacial properties and metabolic fates in animal plasma. In this study, plasma apolipoprotein binding to emulsion and vesicle particles are studied in terms of interaction between amphiphilic helices of apolipoproteins and surface PC layers of the lipid particles, and the physiological relevance of the results is discussed. Binding amounts of apoC-2 and apoE to PC/TG-emulsions were about 10 times larger than those to PC-vesicles in plasma. Accordingly, the plasma-clearance of emulsions through apoE receptors was more rapid than vesicles in rat. The maximum binding amount of the isolated apoA-1 was 4 times larger for emulsions than vesicles. Apolipoproteins are thought to interact surface PC layers of lipid particles, with the amphiphilic helices nestled between the PC head groups. The different binding capacities between emulsions and vesicles are explained by the interaction of surface (PC) and core (TG) lipids. Although binding of apolipoproteins to surface PC layers may produce the packing defects, the penetration of TG into the surface monolayers of emulsions could fill the packing defects, resulting the increased binding capacity.

1 緒言

トリグリセライド-rich な血漿リポ蛋白質、カイロミクロン (Chylomicrons) や VLDL は脂質エマルションを基本構造としている。その代謝過程で種々の可溶性のアポリポ蛋白質の結合が変化し、これがトリグリセライドの分解 (リポリシス) やレセプターを経由した細胞取り込みを調製すると考えられる¹⁾。アポリポ蛋白質の脂質表面膜に対する親和性は、リポ蛋白質のみならず人工のエマルションの体内動態にも重要である。我々は、リポ蛋白質の代謝過程での脂質組成の変化が可溶性アポリポ蛋白質との親和性を変化させ、その代謝を制御すると位置づけている。実際、エマルションを利用して、一部これを証明してきた²⁻⁶⁾。2分子膜 (リポソーム or ベシクル vesicles) とレシチン単分子膜 (エマルション emulsions) は、それぞれ生体膜と動物血漿リポ蛋白質の蛋白質フリーモデルと考えられる (Fig. 1 参照)。単分子膜 (monolayers) と2分子膜 (bilayers) では、血漿アポリポ蛋白質 apoA-1、ApoC-II、および apoE の結合性に著しい差異があり、これに応じて動物血漿中での代謝が変化する。また、膜へのコレステロールの添加も、apoA-1 の結合に対し単分子膜と2分子膜では逆方向の効果を示す。これらの結果に、脂質粒子の表面膜とコアの物理化学的研究をあわせ、エマルションとベ

シクル粒子への血漿アポリポ蛋白質選択的結合のメカニズムを考察する。特に、脂質表面膜の両親媒性構造とアポリポ蛋白質のヘリックスの両親媒性構造の適合性、表面膜の水和など、アポリポ蛋白質の選択制や活性化に重要な因子について議論する。なお、本研究では、エマルションやベシクル粒子径を一定 (約 100nm) に保って比較した。

2 実験

エマルションとリポソームの調製 エマルションのコアを形成する中性脂質トリグリセライド (triolein, **TO** or **TG**)、またはコレステリルオレート (**CO**) を、エマルション表面単分子膜を構成する卵黄レシチン (**PC**)、あるいはこれとコレステロール (**Chol**) の混合物を (乳化剤として) 用い、粒子径約 100nm のエマルションを調製した (高压乳化機: 800 ~ 1300 気圧)。共存するリポソームは超遠心法で取り除いた²⁾。リポソームは、PC あるいは PC-Chol 混合物を水溶液に分散し、これを 100nm のポアを持つポリカーボネート膜に押し出して調製した (Extrusion method)²⁾。

膜流動性の評価 エマルションのコアは蛍光プローブ 1,6-diphenylhexatriene (DPH) で、表面 PC 膜はそのカチオン性誘導体 TMADPH あるいはリン脂質誘導体 DPH_pPC で、それぞれ標識し、蛍光異方性を測定して流動性を評価した。また、ナノ秒時間分割蛍光異方性の測定も行った^{2, 3)}。

膜中の Chol の位置 蛍光性の Chol アナログ dehydroergosterol (DHE) で Chol の一部を置き換え、水溶性の NaI で蛍光を消光し、これを解析して単分子膜と2分子膜中の Chol のロケーション (メチウムへの露出度) を評価した³⁾。

アポリポ蛋白質の結合性 ヒト serum 中の apoC-II と apoE のエマルションとリポソームに対する (飽和) 結合量を、1 次元免疫拡散法によるアポリポ蛋白質定プレート

Distinct Plasma Apolipoprotein-Interactions with Emulsion Monolayers and Vesicle Bilayers

Tetsuro Handa

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University



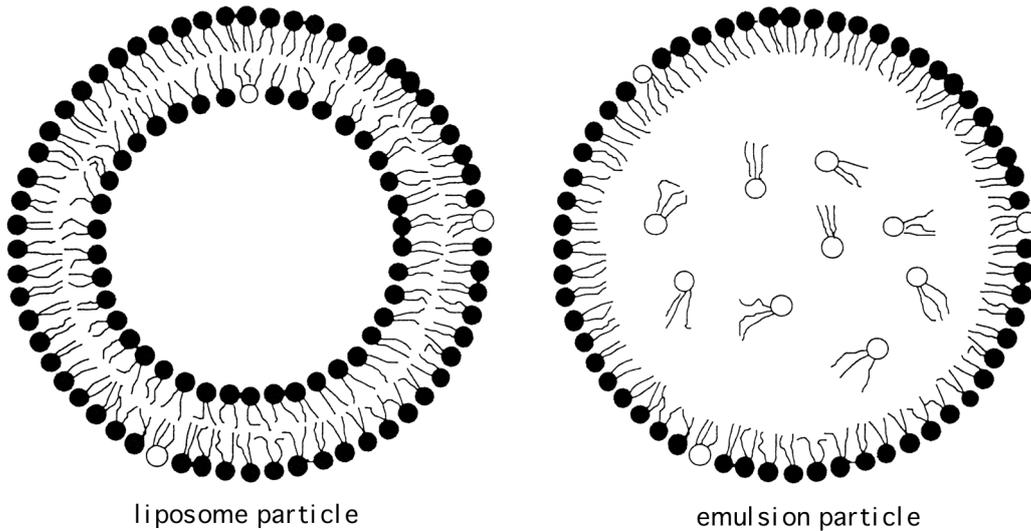


Fig. 1 TO-PC emulsions (PC monolayers) and PC liposomes (PC bilayers)

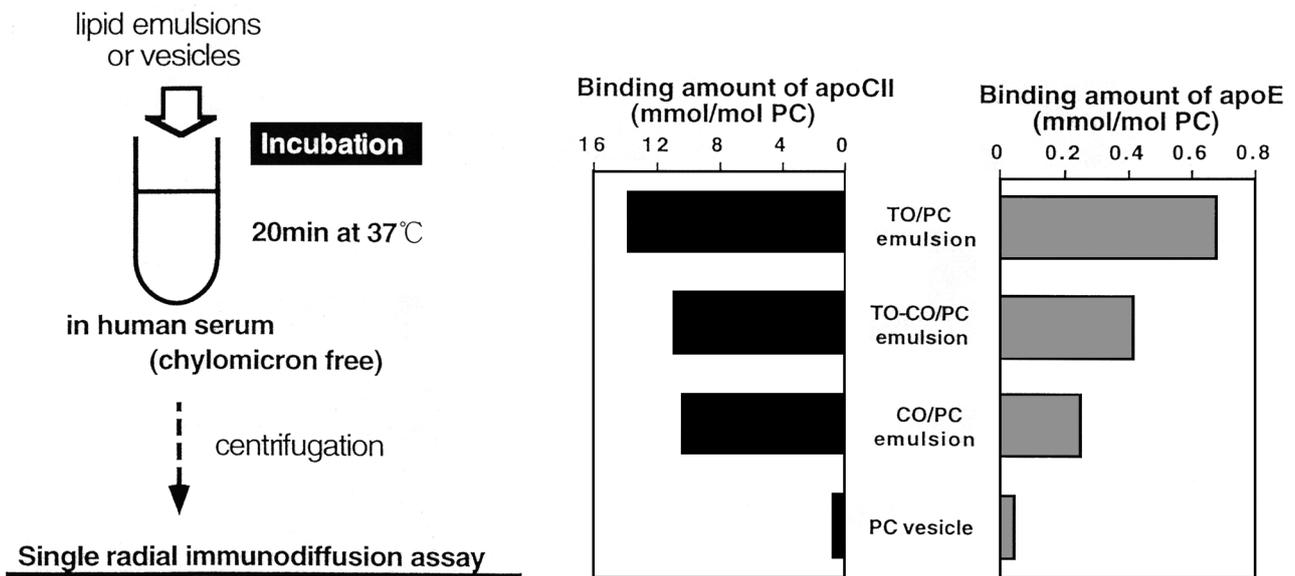


Fig. 2 apoC-II and apoE binding to emulsions and vesicles in human serum

を用いて測定した^{3, 4)}。単離した apoA-1 や apoE の結合等温線は、脂質粒子を分離する前後のメゾウム中のフリー蛋白質を蛍光 (tryptophan) 分析して求めた⁵⁾。

ウイスター系ラット血中からの (蛍光脂質 cholesteryl 1-pyrene decanoate で標識した) 脂質粒子の肝臓取り込みによる消失 (クリアランス) は、粒子投与後の血中の蛍光脂質を追跡して評価した^{4, 6)}。

3 結果と考察

Fig. 2 は、TO/PC-、CO/PC-、TO-CO/PC-emulsions と PC-liposomes (vesicles) に対する、apoC-II と apoE の serum 中での飽和結合量を示す。apoC-II と ApoE の結合量は、共にエマルション (PC 単分子膜) に比較してベシクル (PC 2 分子膜) では 10 分の 1 以下に低下している。また、エマルションのコアの脂質を液体の TO から液

晶の CO に置き換えると、apoC-II と ApoE の結合量が減少することも認められる。なお、ここで、apoC-II は血漿リポ蛋白質 (エマルション) コアの TG を加水分解する酵素 LPL の活性化因子 (ペプチド) であり、apoE は、肝臓実質細胞の LDL やレムナント (remnant) レセプターの特異的リガンド蛋白質である³⁾。

Fig. 3 は、ラット血中に投与されたエマルションとベシクルが肝臓の取り込みにより血漿中から消失される様子を示す。粒子径は 100nm と同じであるが、TO/PC-emulsions > TO-CO/PC-emulsions > CO/PC-emulsions > PC-vesicles の順に肝臓への移行が速い。この順序は、Fig. 2 で示された apoE の結合性の順序と一致する⁷⁾。

Fig. 4 は、エマルション表面 PC 単分子膜とコアの堅さを、蛍光異方性をより評価した結果である。TO を CO で置き換えるとコアの蛍光異方 (すなわち、堅さ) は高くな

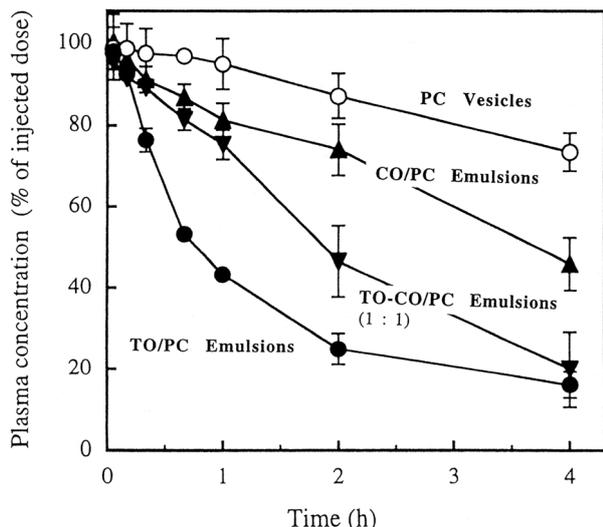


Fig. 3 Clearance of emulsions and vesicles in rat blood

るが、PC 表面単分子膜の堅さは一定である⁷⁾。それでは、コアの組成によりアポリポ蛋白質の表面膜結合性や (Fig. 2) 血中からの消失 (Fig. 3) が変化するのどのようなメカニズムによるのであろうか？ これを考察する前に、単離した apoA-1 のエマルションとベシクルへの結合性を見てみよう。

apoA-1 は、動物体内でコレステロールの代謝に重要な役割をはたしている。この蛋白質は Fig. 5 に示されるように、7~8本の両親媒性 α -ヘリックス (amphiphilic helices) から構成されており、水中ではこれらのヘリックスは球状蛋白質へと畳み込まれている。脂質粒子表面では、apoA-1 の高次構造はほどけ、両親媒性ヘリックスは PC

分子間に挿入されると考えられている。

Fig. 6 に示すように、単離した apoA-1 もエマルションの PC 単分子膜の方が圧倒的に高い結合量を示した (右図⁵⁾。また、コアを液体の TO から液晶の CO の置き換えると、アポリポ蛋白質の結合量が減少した (左図⁵⁾。アポリポ蛋白質の粒子への結合は、表面 PC 単分子膜上のイベントである。コア脂質はどのように関与するのであろうか？

Fig. 7 に、アポリポ蛋白質と PC 膜の相互作用の模式図を示す。アポリポ蛋白質の脂質結合部位は両親媒性の α -helix である。PC 分子の臨界充填パラメータは約 1、自発的曲率はほぼ 0 である⁸⁾。また、脂質粒子は 100nm なので、粒子表面は分子レベルでは平面と見なせる。血漿アポリポ蛋白質の両親媒性ヘリックスは、一般に、親水面が大きく親油面が小さい (親水性の高い) 構造を持つので⁹⁾、表面膜に結合して + の曲率 (positive curvature) あるいは + の曲げ (positive bending) をもたらす。この膜の曲げは、表面エネルギーを高め²⁾、蛋白質を脱着させる方向に

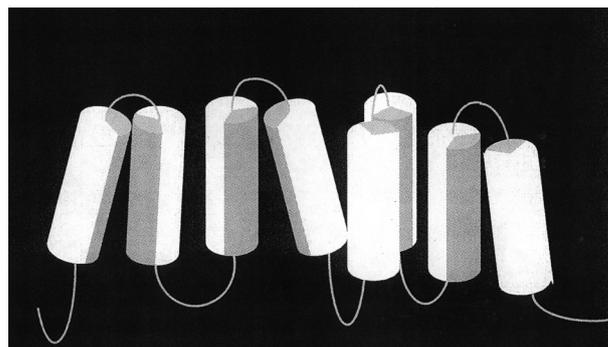
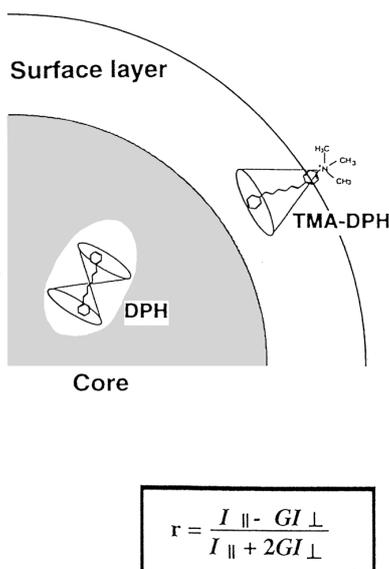
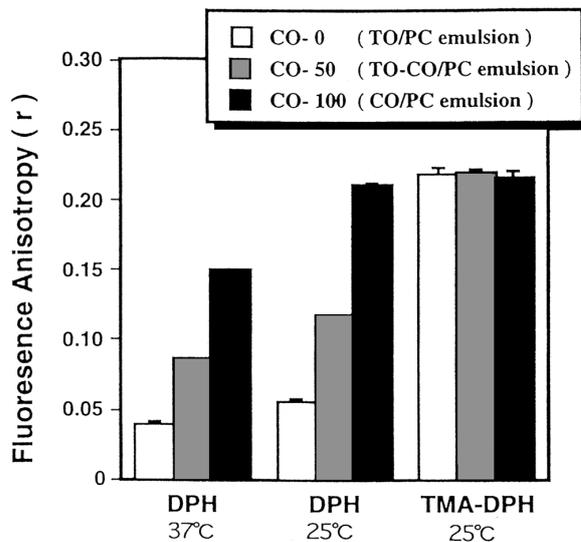


Fig. 5 Plasma apoA-1 in the unfolded state

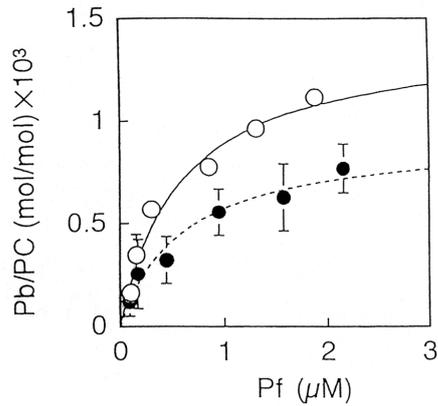


I_{\parallel} : parallel fluorescence components
 I_{\perp} : perpendicular fluorescence components

Fig. 4 Fluorescence anisotropy or rigidity of surface layer and core of emulsion particles

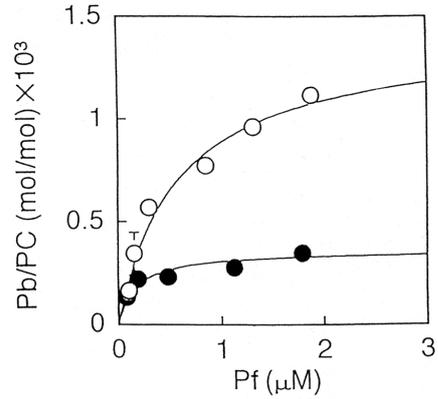


TG-PC and CO-PC emulsions



○ TG-PC emulsions
● CO-PC emulsions

Emulsions and LUV



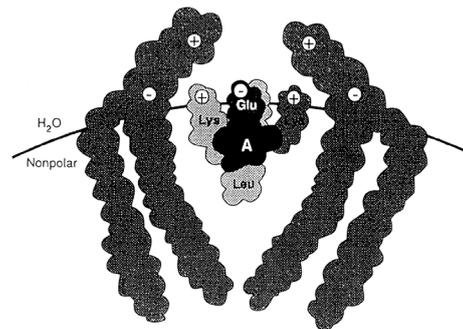
○ TG-PC emulsions
● PC LUV

Fig. 6 ApoA-1 binding to emulsion and vesicle particles

作用する。エマルション (PC 単分子膜) はコアに中性脂質 (親油性の TO) を有し、その表面膜への移動は-の曲げ (negative bending) を誘導し、蛋白結合による膜のフラストラクションを緩和する。

コアを持たないベシクル (PC 2 分子膜) では、このような曲げエネルギー低減効果は期待されない。また、エマルションのコアを液体の TO から液晶の CO に置き換えると、中性脂質の表面膜への移動が抑制され表面フラストラクションの緩和も減弱する。

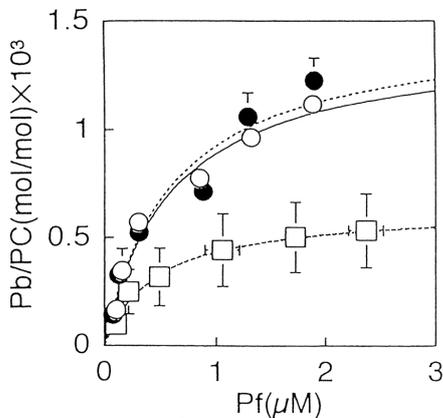
Fig. 8 では、エマルションとベシクルへの apoA-1 の結合に対する Chol の効果を示す。TG-PC エマルション表面の PC 単分子膜へ Chol を 20mol% 以上添加すると apoA-1 の結合は減少する⁵⁾。40mol% の Chol は蛋白結合量を半分



The long axis of the helix is perpendicular to the plane of the figure, from Segrest et al., 1994

Fig. 7 Interaction between amphiphilic helix of apolipoprotein and PC molecules at surface layer

TG-PC emulsions



○ Chol 0%
● Chol 20%
□ Chol 40%

PC-LUV

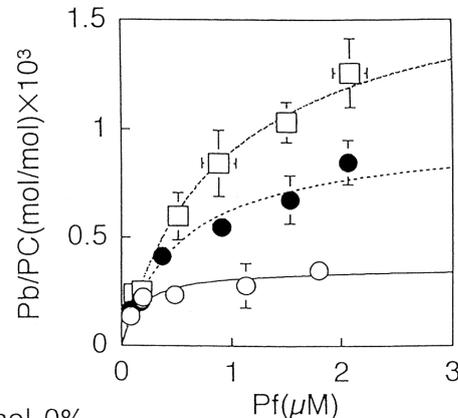


Fig. 8 Distinct effects of Chol on apoA-1 binding between emulsions and vesicles

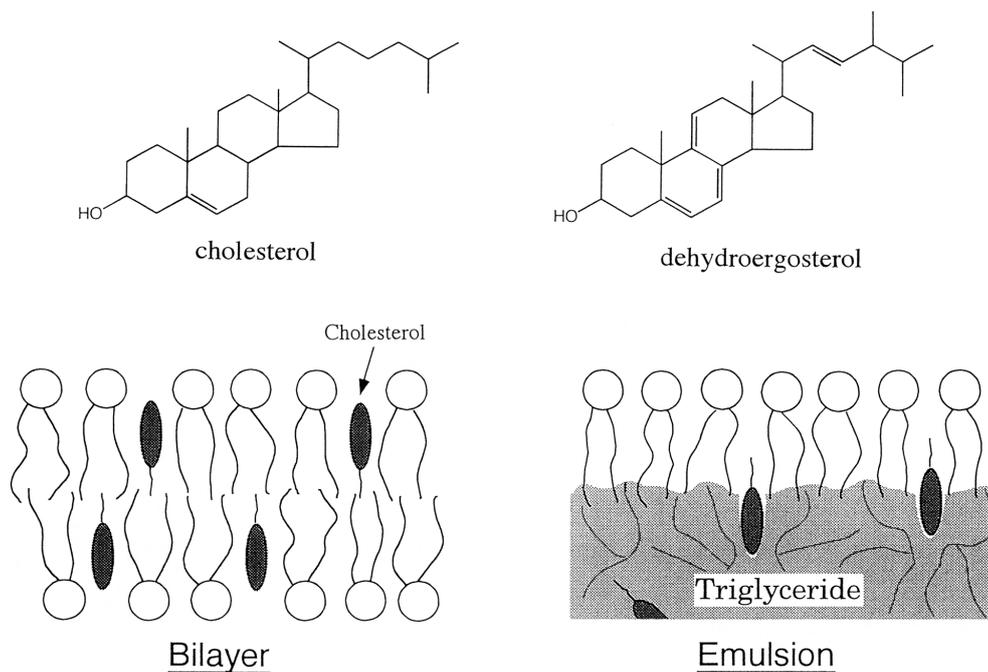


Fig. 9 Chol in PC bilayers and emulsion PC monolayers

に減少する。一方、PC ベシクル 2 分子膜への Chol の添加は apoA-1 結合量を急増させる⁵⁾。40mol% の Chol は結合量を 5 倍にまで上昇させる。このように、エマルションとベシクルでは Chol の効果は逆転する。

Fig. 9 で apoA-1 の結合に対する、エマルションとベシクルでの対照的な Chol の効果を考察しよう。エマルション表面の PC monolayers とベシクルの PC bilayers 中の Chol のごく一部を、蛍光性の Chol アナログ、dehydroergosterol (DHE) で置き換える。水溶性の蛍光消光剤 NaI による膜中の DHE の消光実験の結果、DHE (Chol) は PC bilayers では水溶液に接して存在するが (左下図)、PC monolayers では膜のより内側に取り込まれ、水溶性の消光剤に完全には曝されていない (右下図) ことがわかった³⁾。ベシクルの PC 2 分子膜はそれ自身のアポリポ蛋白質の結合容量は小さいが、自発的曲率が負の Chol は - の曲げを表面に誘導し、蛋白質による膜の + の曲げを相殺する。これにより、表面フラストレーションも緩和され、アポリポ蛋白質結合容量が増大すると考えられる。

Fig.10 は、apoA-1 により誘起される蛍光色素 calcein のベシクル 2 分子膜からの漏出を示す。apoA-1 が外水相にないとき、蛍光色素の漏れは認められない。動物血漿中のフリー濃度に相当する $4\mu\text{M}$ apoA-1 により、PC vesicle bilayers から急速に大量の蛍光色素が漏出する。PC bilayers に 40mo% の Chol を添加するとこの漏出は大幅に抑制される。一方、apoA-1 の結合量は、Chol 含有ベシクルのほうが PC のみのベシクルより 5 倍も大きい⁵⁾ (Fig. 8 参照)。この結果より、アポリポ蛋白質と脂質 2 分

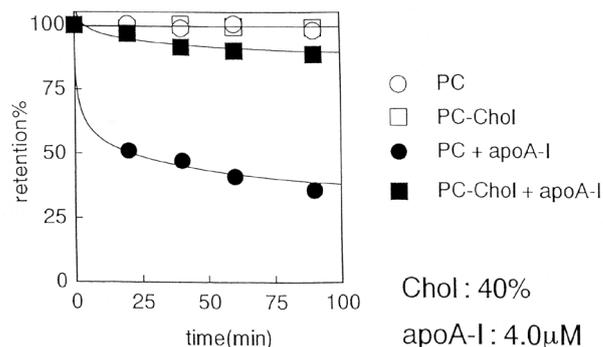


Fig.10 ApoA-1 induced leakage of calcein out of vesicles

子膜からなる超分子構造 (Fig. 7) の形成に Chol が重要な役割をもっていると推定され、血漿中の Chol 代謝とも関連して注目される。

4 総括

- 4.1 エマルション表面の PC 単分子膜は、ベシクル 2 分子膜に比べアポリポ蛋白質の結合容量が大きい。TO-PC エマルションは動物血中では PC ベシクルより速く (apoE レセプター経由で) 肝に取り込まれる。
- 4.2 エマルションコアの TO を CO に置き換えると、アポリポ蛋白質の結合容量が低下し、動物血中での肝取り込みも遅延する。
- 4.3 アポリポ蛋白質の PC 表面膜結合は膜に + の曲げをもたらす。TO-PC エマルションでは TO がコアから表面膜へ移行して、表面膜に - の曲げを誘起しこれを打ち消す。
- 4.4 Chol は、アポリポ蛋白質の結合に関して、エマル

ション表面の PC 単分子膜とベシクル 2 分子膜で逆の効果を示す。PC 2 分子膜では Chol は - の曲げを誘起して、アポリポ蛋白質の誘起する + の曲げを打ち消す。PC 単分子膜では Chol は膜とコアの境界に局在し、アポリポ蛋白質の結合容量を低下させる。

4.5 また、エマルション表面にスフィンゴリエリンを添加するとアポリポ蛋白質や TG を分解する LPL の結合性を低下し、その代謝に顕著に影響することも明らかになった¹⁰⁾。

(参考文献)

- 1) 例えば, A M. Gotto, Jr et al., **Method Enzymol.** **128**, 3-31 (1986)
- 2) H. Saito, K. Nishiwaki, S. Ito, T. Handa, K. Miyajima, **Langmuir** **11**, 3742-3747 (1995)
- 3) H. Saito, T. Minamida, I. Arimoto, T. Handa, K. Miyajima, **J. Biol. Chem.** **271**, 15515-15520 (1996)
- 4) I. Arimoto et al., **Lipid** **33**, 773-779 (1998); I. Arimoto, M. Fujita, H. Saito, T. Handa, K. Miyajima, **Colloid Polymer Sci.** **275**, 60-66 (1997)
- 5) H. Saito, Y. Miyako, T. Handa, K. Miyajima, **J. Lipid Res.** **38**, 287-294 (1997)
- 6) T. Handa, Y. Eguchi, K. Miyajima, **Pharm. Res.** **11**, 1283-1287 (1994)
- 7) Saito et al, **J. Lipid Res**, submitted.
- 8) A. Kabalnov et al., **Langmuir**, **12**, 276-292 (1996); **J. Colloid Interface Sci.** **184**, 227-235 (1996)
- 9) J. P. Segrest, D. W. Garber, C. G. Brouillette, S. C. Harver, G. M. Anantharamaiah, **Adv. Protein Chem.** **45**, 303-369 (1994)
- 10) I. Arimoto, H. Saito, Y. Kawashima, K. Miyajima, T. Handa, **J. Lipid Res.** **39**, 143-151 (1998)

凝集性蛋白質溶液のゲル化現象の解明

京都工芸繊維大学 繊維学部

柴山 充弘

The aggregation mechanism and aggregated structure of globular protein, β -lactoglobulin (β -LG), have been studied by dynamic light scattering (DLS) and small angle neutron scattering (SANS). DLS shows that time intensity correlation functions for β -LG solutions prepared at pH 2 and 7 indicated a power law behavior around gelation threshold. The critical exponent related to the relaxation time, n , was 0.5 at pH2 and 0.7 at 7, which can be explained by percolation theory without and with excluded volume effect, respectively. It is known that the value $n \cong 0.66$ suggests a highly branched percolated cluster. On the other hand, a lower value of n is expected for a chain-like structure where the excluded volume is screened. SANS results show that the scattered intensity for β -LG at pH 2 increased with heat-induced aggregation, while that at pH 7 exhibits a distinct maximum at the scattering vector, $q = 0.025\text{\AA}^{-1}$. This is due to microphase separation, which was well reproduced by the Borue-Erukhimovich theory of weakly charged polyelectrolyte solutions.

1. 緒言

高分子ゲルは、従来から食品工学や高分子加工において重要な位置を占めてきたが、最近ではその保湿性、薬剤保持性、形状安定性など、ゲル特有の機能を生かした化粧品や医薬品などが次々に開発されてきている。しかしながら、ゲル化のメカニズムや構造といったゲルの本質にかかわるような重要な問題の多くは未解明なままである。これまで我々は動的光散乱法 (DLS) によるゲルの多面的解析法を提唱し、その有用性を合成高分子を用いて検証してきた¹⁻⁵⁾。この手法をコスメトロジーにとって興味ある蛋白質のゲル化現象の研究に応用し、熱変性過程にある蛋白質の構造変化を実時間で観察することで、凝集およびゲル化機構の研究を行った。試料として用いた乳清蛋白質の主成分である β -ラクトグロブリン (β -LG) は pH 変化に対して可逆的な monomer-dimer 転移を示す球状タンパク質である。pH を変化させるとアミノ酸側鎖のイオン状態が変化し、電荷分布や水素結合性に影響するため、蛋白質の変性機構ならびに凝集機構に大きな影響を及ぼす。本研究では、異なる pH の β -LG 水溶液を加熱し、ゲル化するまでの構造変化ならびにダイナミクス変化を DLS によるゲル化点の決定やゲル化点近傍のフラクタル構造解析法⁶⁾を用いて解析した。また小角中性子散乱測定 (SANS) を行うことにより、ナノメートル領域の微視的構造変化についても検討した。

2. 実験

DLS 測定: SIGMA 社製の β -LG (L0130, Lot114H7055) 水溶液 (0.05, 0.1g/mL) を HCl を用いて pH2 及び pH7 に調整した。その各試料を約 75°C に温度制御されたサンプルホルダーの中に入れ、熱凝集する過程を動的散乱装置 (ALV 社製) を用いて測定した。光源には 22mW の He-Ne レーザー (波長 632.8nm) を用い、散乱角 90° で測定を行なった。

SANS 測定: DCI により pH2 及び pH7 に調整した β -LG 重水溶液 (0.09g/mL) を約 75°C で加熱し、その凝集過程を時系列的に測定した。測定には SANS-U (東大物性研究所; 茨城県東海村) を用い、波長 7 Å、散乱ベクトル $0.01 < q < 0.08 \text{\AA}^{-1}$ の条件で行った。

3. 結果と考察

まず動的散乱から得られた結果を Fig.1 に示す。上の段に pH2 および pH7 の時間に対する散乱強度の変化を示しており、下の段には相関関数の時間ゼロに対応する初期振幅 (σ_1^2) の変化を示したものである。

散乱強度は熱凝集が進むにつれて上昇し、やがて pH7、0.05g/mL の試料を除いて強度が急激に揺らぎ始める。この点がゲル化点であり、図中の矢印で示している。また下段を見てみるとゲル化点に対応する時間で初期振幅が減少し始めている。この現象はエルゴード性を保持する溶液から制限エルゴード性を示すゲルが形成したことを意味するものである。次に pH2 と pH7 の初期の凝集過程を比較してみると、pH2 は数時間かけて散乱強度が徐々に上昇しているに対して、pH7 は最初の数十分の間に急激に散乱強度が上昇するという結果が得られた。次にゲル化時間に注目すると、pH2 の 0.1g/mL 試料は約 2 時間後にゲル化し、0.05g/mL の試料は約 4 時間後にゲル化した。すなわち濃度が半減するとゲル化時間が倍となっている。pH7 の場



Study on the gelation process of aggregative protein solutions

Mitsuhiro Shibayama

Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology

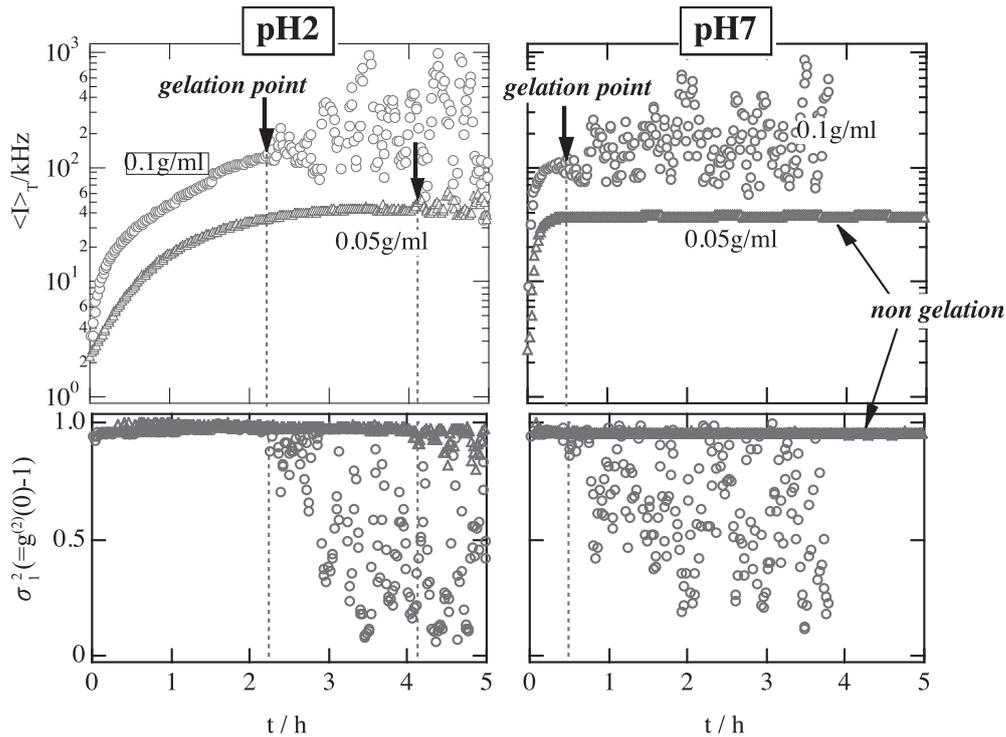


Fig.1 Variation of the scattered intensity, $\langle I \rangle_t$, and the initial amplitude of the intensity correlation function, σ_1^2 .

合、0.1g/mLの試料は約30分であり同濃度のpH2試料に比べて早くゲル化した。0.05g/mLの試料はゲル化せず、散乱強度はすぐに定常値になり、初期振幅にも変化は見られなかった。こういったことから、pH2とpH7では凝集機構が異なることが考えられる。これらの結果はシリカゲルの酸性触媒と塩基性触媒下での重合方法の違いで観察された散乱強度の挙動変化⁷⁾と大変よく合致しており、pH2の場合が酸性触媒系に、pH7の場合が塩基性触媒系に挙動に酷似している。

次にFig.2(a), (b)に強度相関関数の時間変化を示す。pH2及びpH7ともに凝集が進むにつれ相関関数は長時間側にシフトし、Fig.1のゲル化点に対応する時間で相関関数がPower law decayを示した。このPower law decayを示した相関関数を以下のMartinらによる式⁸⁾でフィッティングした結果をFig.3に示す。

$$g^{(2)}(q, \tau) - 1 = \sigma_1^2 [A \exp(-\Gamma \tau) + (1-A) (1 + \tau/\tau^*)^{-(n-1)/2}]^2$$

この臨界指数 n はゲル化点において粘弾性測定から得られる臨界指数 $|G'(\omega)| = G'(\omega) \propto \omega^n$ と等価なものである。pH2の臨界指数 n は二種類の濃度によらず約 $n \approx 0.5$ という値が得られた。この値はWinterら⁹⁾が粘弾性測定によって報告した値とほぼ一致しており、クラスターの成長過程において分岐が少ないものであることを示唆している。一方pH7で得られた約 $n \approx 0.7$ という値はパーコレーション理論から予測される値に大変近いものであり、クラスターの成長が多分岐であることを示唆する結果である。

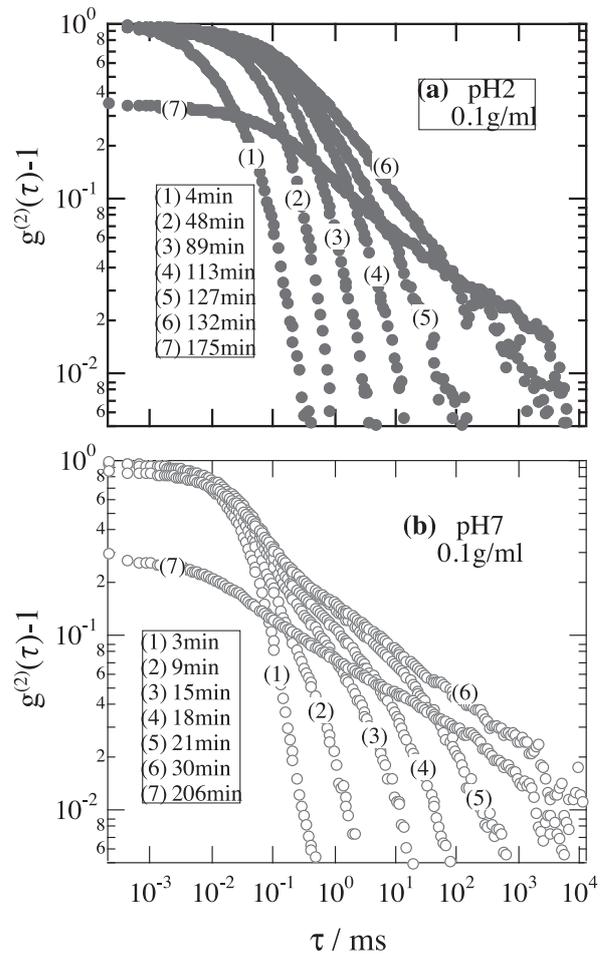


Fig.2 Intensity correlation function of β -LG during gelation. (a) pH2, (b) pH7.

このような pH2 及び pH7 での凝集構造の成長の違いは、変性温度 T_d とチオール基 (-SH) の反応性の違いが要因であると考えられる。pH2 の T_d は約 78°C¹⁰⁾、pH7 の T_d は約 67°C¹¹⁾ であるため、本測定温度 (75°C) では pH7 の方がより unfolding している。そのために pH7 では β -LG 分子に存在するフリーのチオール基 (-SH) とジスルフィド基 (R-SS-R') の交換反応などが生じやすくなり、さらにチオール基 (-SH) の反応性は弱アルカリ性側で高いことが要因であると考えられる。そのために pH7 の臨界指数 n が pH2 の場合より多分岐を示す値になると考えられる。

次に Fig.4 に SANS 測定から得られた pH2 および pH7 の β -LG の凝集機構の変化を示す。散乱関数を比較すると pH2 の場合、加熱時間が増すにつれて、散乱関数が小角側で徐々に立ち上がっているのがわかる。ところが

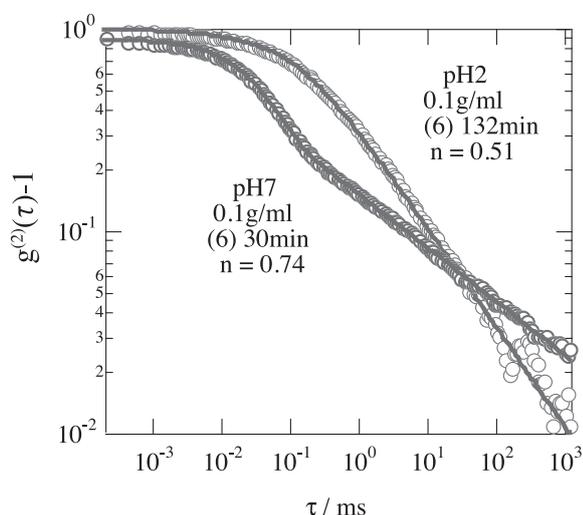


Fig.3 Power law analysis of intensity correlation function under pH2 and pH7.

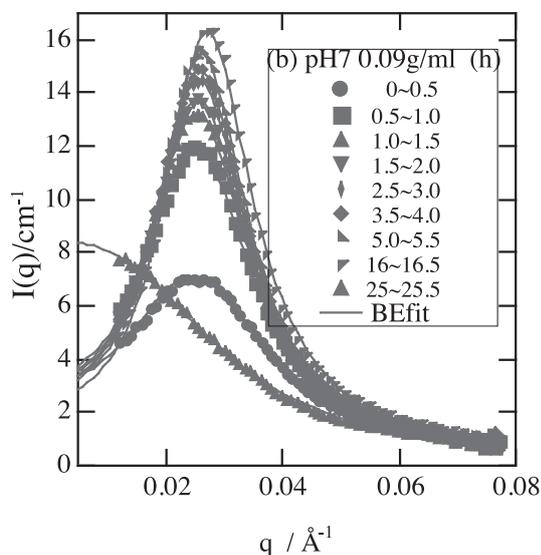
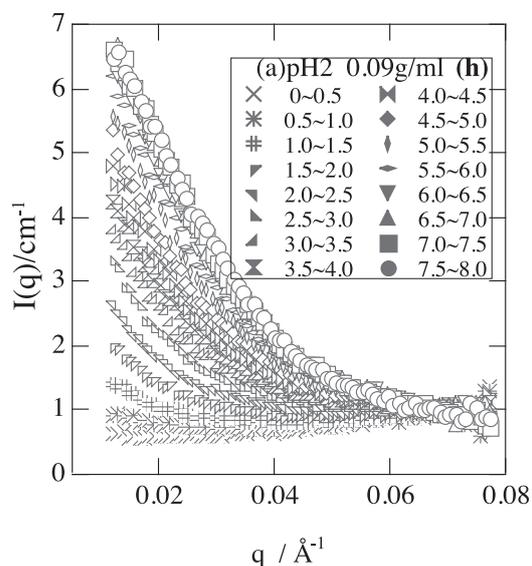


Fig.4 SANS results of β -LG of (a)pH2, (b)pH7

pH7 の場合、ゲル化後の試料 (\blacktriangle) を除いて散乱ベクトル約 0.025 \AA^{-1} 付近に顕著なピークが発現し、時間とともにピークが成長するという興味ある結果を得た。このピークは蛋白質が熱変性過程において荷電化 (三次構造が変化しイオン基を外に向ける形態変化) することを示すものであり、弱荷電系高分子が貧溶媒に置かれたときに発現するマイクロ相分離構造 (ナノメートルオーダーでの相分離) と同等と考えられる^{12,13)}。そこで貧溶媒中での高分子電解質の散乱関数 (構造因子) を平均場理論により導出した以下の式の様な Borue-Erukhimovich (BE) 散乱理論¹⁴⁾ を用いて解析を試みた。

$$S(x) = \frac{x+s}{(x^2+t)(x^2+s)+1}$$

ここで x 、 t 、 s 、はそれぞれ還元散乱ベクトル、還元温度、還元塩濃度である。

この BE 理論によると良溶媒系 (還元温度 $t > 0$) であれば還元塩濃度 s に依存せず散乱極大は出現しないが、貧溶媒 (還元温度 $t < 0$) でなおかつ還元塩濃度 ($0 < s < 1$) が低い場合に散乱極大が現れる。図のように pH7 の場合、後者の条件でうまく再現することができた。すなわち pH2 の場合は静電相互作用が溶媒中の電荷によって遮蔽されるが、pH7 の場合は遮蔽されないため静電反発力が作用し、凝集力と拮抗することによってマイクロ相分離構造が発現すると考えられる。

4. 総括

これまで我々が提唱してきた動的光散乱法によるゲル化点の決定法やフラクタル解析法などの多面的解析法が天然高分子である球状タンパク質のゲル化現象の測定においても有効であることがわかった。その結果、pH2 および

pH7 水溶液の凝集及びゲル化機構に違いがあることが明らかとなり、pH2 の場合は分岐が少ないクラスター成長であり、pH7 の場合はクラスターの成長が多分岐でありパーコレーション的であることがわかった。また小角中性子散乱測定においても pH2 と pH7 の凝集機構に顕著な違いが観察され、特に pH7 の試料では貧溶媒中における弱電解質系高分子のミクロ相分離構造と類似の構造を持つ凝集体が形成されることがわかった。本研究で明らかになったように、蛋白質の凝集およびゲル化現象において普遍的に見られる現象や球状タンパク質の凝集機構の特殊性の解明に、静的・動的散乱法が非常に有効であることが示された。今後、さらに温度、pH、塩濃度などの様々な因子と凝集機構の相関関係を明確にしていく予定である。

5. 総括

本研究をご支援いただきましたコスメト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。また、本研究を遂行するにあたり、ご助力をいただきました田中直毅博士、高田慎一氏に深謝いたします。

(参考文献)

- 1) M. Shibayama, S. Takata, and T. Norisuye, : Static inhomogeneities and dynamic fluctuations of temperature sensitive polymer gels : *Physica A* **249**, 245 (1998).
- 2) M. Shibayama, : Spatial inhomogeneity and dynamic fluctuations of polymer gels : *Macromol. Chem. Phys.* **199**, 1 (1998).
- 3) T. Norisuye, M. Shibayama, and R. Tamaki, et. al., : Time-resolved dynamic light scattering studies on gelation process of organic-inorganic polymer hybrid : *Macromolecules* **32**, 1528 (1999).
- 4) S. Takata, T. Norisuye, and M. Shibayama, : Preparation temperature dependence and effects of hydrolysis on static inhomogeneities of poly(acrylamide) gels : *Macromolecules* **32**, 3989 (1999).
- 5) F. Ikkai, and M. Shibayama, : Static Inhomogeneities in thermoreversible physical gels : *Phys. Rev. Lett.*, **82**, 4946 (1999)
- 6) 柴山充弘, : ゲルのフラクタル解析 : *高分子*, **48**, 78 (1999).
- 7) T. Norisuye, M. Inoue, M. Shibayama, et. al., : Dynamics of silica gels during gelation under acidic and basic conditions : *Macromolecules*, **33**, 900. (2000).
- 8) J. E. Martin, J. Wilcoxon, and J. Odinek, : Decay of density fluctuations in gels : *Phys. Rev. A*, **43**, 858 (1991).
- 9) H. H. Winter and F. Chambon, : Analysis of Linear Viscoelasticity of a Crosslinking Polymer at the Gel Point : *J. Rheology*, **30**, 367 (1986).
- 10) Y. V. Griko, and P. L. Privalov, : Calorimetric study of the heat and cold denaturation of β -lactoglobulin : *Biochemistry*, **31**, 8810, (1992)
- 11) W. G. Griffin, M. C. A. Griffin, and S. R. Martin, et. al., : Molecular Basis of thermal aggregation of bovine β -lactoglobulin A : *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **89**, 18 (1993)
- 12) F. Schosseler, F. Ilmain, and S. J. Candau, : Structure and properties of partially neutralized poly(acrylic acid) gels : *Macromolecules*, **24**, 225 (1991).
- 13) M. Shibayama, and T. Tanaka, : Small-angle neutron scattering study on weakly charged poly(N-isopropyl acrylamide-co-acrylic acid) copolymer solutions : *J. Chem. Phys.*, **102**, 9392 (1995)
- 14) V. Y. Borue, and I. Ya. Erukhimovich, : A statistical theory of weakly charged polyelectrolytes : fluctuations, equation of state, and microphase separation : *Macromolecules*, **21**, 3240 (1988).

化粧品による皮膚かぶれを防ぐ菌類成分の探索

千葉大学 薬学部

藤本 治 宏

In order to protect a person from allergic skin inflammation caused by some cosmetics, survey to discover new fungal immunosuppressive constituents which are helpful to induction of immunotolerance against such allergy, was executed in the use of more than 170 Ascomycetous fungi. On the survey, it was found out that *Gelasinospora multiforis*, *G.heterospora*, *G.longispora*, *G.kobi*, *Diplogelasinospora grovesii*, and *Microascus tardifaciens* produced appreciably immunosuppressive constituents. Solvent partition followed by repeated chromatographic fractionations of crude extracts obtained from the six fungi under the guidance of bioassay to test suppressive activity against proliferation of mouse splenic lymphocytes stimulated with mitogens afforded many immunosuppressive features. Namely, nine new 2-pyrones named multiforins A-I from *G.multiforis*, some of the multiforins together with a known metabolite sordarial from both *G.heterospora* and *G.longispora*, a novel bicyclic sesterterpene named kobiin and three new 2-furanones named kobifuranones A-C from *G.kobi*, two known metabolites macrophin and colletodiol together with a new stereoisomer of colletodiol named 10-epi-colletodiol from *D.grovesii*, and six known metabolites, questin, rubrocristin, cladosporin (asperentin), cladosporin 8-O-methylether, 5,7-dihydroxy-4-methylphthalide and asperflavin, together with two new 2,5-dioxopiperazines named tardioxopiperazines A and B from *M.tardifaciens*, were isolated as immunosuppressive features on this study. It was further examined whether interleukin-2 (IL-2) recovered proliferative suppressions of the lymphocytes caused by eight sample compounds, which were selected from these immunosuppressive constituents isolated this time from fungi, or not. It has been shown up to now that IL-2 has not recovered proliferative suppressions of the lymphocytes due to the eight compounds, indicating that they have not inhibited biosynthesis of IL-2.

1. 緒言

化粧品により皮膚かぶれ（皮膚の炎症）を起こす人が時に見られる。この様な皮膚かぶれは、多くの場合、化粧品中に存在する生体にとって異物の成分（抗原、アレルゲン）に対し、生体が過剰に免疫応答して起きたアレルギーである。化粧品による皮膚かぶれを防ぐ方法の一つとして、化粧品に対し免疫寛容を誘導することが考えられる。もし、化粧品中の特定のアレルゲンに対する免疫寛容を誘導できれば、皮膚かぶれを起こさずに化粧品を安全に使えることになる。免疫寛容の誘導には、免疫抑制剤を緩和に使用してアレルゲン特異的なIgE抗体の生産を低下させておきながら、生体を徐々にアレルゲンへ曝し、長時間かけて生体をアレルゲンへ馴化させて行く方法が考えられる。この際使われる免疫抑制剤には、個々の体質による適不適があるため、色々な体質の人向けに様々なタイプのもが準備されていることが望ましい。化粧品による皮膚かぶれに対する免疫寛容の誘導の様な目的に相応しい免疫抑制剤は、臓器移植や骨髄移植などに際して用いられる cyclosporin A や tacrolimus (FK506) の様な強力なものよりも、作用が比較的緩和なものの方が副作用も少なく長期間の使用も可能と

なって都合が良い。本研究では、この様な目的に合う新しい免疫抑制物質を天然素材から探索することを目指した。

探索対象の天然素材としては、既に、いくつかの免疫抑制成分が得られて実績がある菌類を考えたが、これまで得られたものの多くが不完全菌や放線菌から見出されたものであったため、今回は、新しいタイプのもを見出そうと、従来、比較的的成分研究例が少なかった子囊菌を選んだ。生体がアレルゲンの侵入に対し発動させる細胞性、体液性免疫の一連の免疫応答の開始過程であるアレルゲン刺激によるT、B細胞活性化の*in vitro*モデルとされるマイトゲン刺激によるT、B細胞幼若化（増殖）に対する抑制活性（LT活性）を指標として、これまでに170余種の子囊菌につき検索を行った。その結果、多数の新化合物を含む免疫抑制活性成分を見出した。しかしながら、LT活性には、一般的な細胞増殖抑制活性も含まれることがある。そこで、検体化合物が免疫担当細胞へ特異的な抑制活性を有するか否かを調べる方法の一つとして、今回、活性化T細胞から分泌されてT細胞の増殖、細胞障害性T細胞やB細胞の活性化などを誘導するリンホカインであるinterleukin 2 (IL-2)の存在が、検体によるリンパ細胞増殖抑制を取り止めさせるか否かを*in vitro*で試験する方法を採用し、本研究で得られた免疫抑制活性成分中の主なものへ適用してみた。これらの研究結果について、以前の関連研究における結果も含めて以下に述べる。

2. 実験

2.1 LT活性検索用子囊菌脱脂画分の作製

精白米培地 200gをいれたルー培養瓶を高圧滅菌し、子



Search for Fungal Constituents to Protect a Person from Allergic Skin Inflammation Caused by Cosmetics

Haruhiro Fujimoto

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

菌を接種して、25℃暗所で、時々振り混ぜながら、静置培養を、各菌の生育状態により 10-30days 行った。LT 活性検索には、各菌当り精白米培地 800g (ルー瓶 4 本) を用いて行ない、培養終了後、かび米へ AcOEt 1.2L を加え、室温振盪抽出 5hr を 2 回繰り返して行ない、抽出液を減圧溶媒留去して、AcOEt エキスを得た。次に、同エキスへ *n*-hexane 5-10mL を加え、超音波処理により *n*-hexane 可溶成分を溶解させて除去し、*n*-hexane 不溶性の脱脂画分を得て、この脱脂画分を LT 活性検索用検体とした。

2.2 LT 活性試験

マウス (BALB/C、雄、7-11 週齢) の脾臓由来リンパ細胞のマイトゲン刺激増殖に対する検体の抑制活性を試験した。マイトゲンとしては、T 細胞には concanavalin A (Con A) を、B 細胞には lipopolysaccharide (LPS) を用いた。活性の測定には、リンパ細胞をマイトゲン、検体と共にマイクロタイタープレートの well 内で、37℃、5% CO₂ 存在下、48hr 培養した後、[methyl-³H]thymidine を培地に添加し、更に 22hr 培養した際にリンパ細胞中に取り込まれる ³H 放射能から、細胞増殖抑制率を算出する ³H 標識法 (実験の詳細は既報¹⁾ 参照) か、又は、上記マイクロタイタープレートで培養を 72hr 行った後、MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] を培地に添加し、更に 4hr 培養した際に、リンパ生細胞の mitochondria 内膜中の呼吸鎖関与酵素により MTT が還元されて生成する MTT-formazan の量を 57nm で比色定量し (対照波長 630nm)、細胞増殖抑制率を算出する MTT 法 (実験の詳細は既報²⁾ 参照) か、いずれかの方法を用いた (³H 標識法での算出値と MTT 法での算出値はほとんど同じであった)。171 種の子嚢菌の一斉 LT 活性検索では、各検体は 50、10、2.0、0.4µg/mL の濃度においてそれぞれ triplicate で活性を測定した。

2.3 活性成分の単離

LT 活性検索で、濃度依存性を示す高い活性を示した菌の中で、活性成分が未解明と考えられた菌については、精白米培地 20-60kg (ルー瓶 100-300 本) を用い、2.1 と同様の条件で大量培養を行った。培養終了後、AcOEt 30-90L を用いて室温振盪抽出 5hr を 2 回繰り返して行ない、抽出液を減圧溶媒留去して、AcOEt エキスを得た。AcOEt 抽出エキスを *n*-hexane-AcOEt (1:1, v/v) を用いて *n*-hexane 可溶部と不溶部に分け、*n*-hexane 不溶部は、更に、AcOEt-H₂O (1:1) を用いて AcOEt 可溶部と H₂O 可溶部に分けた。*n*-hexane、AcOEt、H₂O 可溶部につき、LT 活性を試験したところ、AcOEt 可溶部に活性が集約したので、AcOEt 可溶部を、更に LT 活性を指標にしながら、順相の silica gel や逆相の octadecyl silica gel (ODS) を用いたオープンカラム、

中圧カラム、高速液体カラム、薄層などによるクロマトグラフィーを適宜用いて、分画精製を繰り返し行ない、更に再結晶等によって精製して、各菌の活性成分を単離した。

2.4 活性成分の構造解明

単離された各菌の活性成分については、mp、[α]_D、各種呈色反応、溶解性等の物性を測定し、如何なるタイプの化合物であるかを推定し、更に、¹H-NMR、¹³C-NMR、IR、UV、MS (低分解能の EI-MS、FAB-MS、高分解能の EI-MS、FAB-MS)、CD スペクトルを測定して検討した。特に NMR では、通常測定のほか、spin-decoupling ¹H-NMR、NOE ¹H-NMR、二次元の ¹H-¹H シフト相関 (COSY)、¹H-¹³C シフト相関 (HMQC)、¹H-¹³C 遠隔シフト相関 (HMBC) スペクトルを測定し検討した。その結果、活性成分が既知化合物と推定された場合は、その文献記載の各種物性やスペクトルデータとの比較を行って、標品が入手可能なら直接比較して同定した。活性成分が新化合物と推定された場合は、各種スペクトルデータの詳細な検討、誘導体の作製、或いは、X 線解析 (10-*epi*-colletodiol の場合) 等を適宜用い、化学構造を解明した。

2.5 免疫抑制活性が IL-2 の存在により拮抗されるか否かを調べる実験

リンパ細胞溶液は 2.2 の際と同様に作製し、マイトゲンとしては、Con A の代わりに ionomycin と phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を用いた。活性の測定は、リンパ細胞をマイトゲン、検体と共にマイクロタイタープレートの well 内で LT 試験に類似した方法で培養して進められるが、IL-2 生合成阻害の有無を調べるために、培地に IL-2 を添加して培養する実験と添加しないで培養する実験を常に平行させて行う。培養は 37℃、5% CO₂ 存在下、48hr 培養した後、MTT を培地に添加し、更に 4hr 培養した後、MTT が還元されて生成する MTT-formazan を比色定量し、IL-2 を添加した場合と添加しない場合のリンパ細胞増殖抑制活性を比較し、検体による細胞増殖抑制が、培地への IL-2 添加により拮抗されるか否かを試験した (実験の詳細は既報²⁾ 参照)。

3. 結果と考察

3.1 子嚢菌の LT 活性検索と LT 活性子嚢菌からの免疫抑制活性成分の単離

当研究室保存の子嚢菌中、不整子嚢菌綱 (Plectomycetes) に属する *Emericella* 属 13 種、*Eupenicillium* 属 16 種、*Eurotium* 属 16 種、*Hemicarpenales* 属 3 種、*Neosartorya* 属 5 種、*Talaromyces* 属 4 種など、並びに核菌綱 (Pyrenomycetes) に属する *Chaetomium* 属 5 種、*Gelasinospora* 属 20 種、*Microascus* 属 3 種、*Thielavia* 属 4 種などこれまでに合計 171 種につき、

リンパ球幼若化抑制活性 (LT 活性) の有無を検索した。その結果、濃度依存性の高い活性を示した菌は 38 種も見出されたが、それらの中で、新しい免疫抑制活性成分の単離を目的として、これまで系統立った成分研究が比較的行なわれていない属に分類される菌からの系統的な活性本体の解明を目指した。今回は、その様な菌の中から、核菌綱の *Gelasinospora multiforis*, *G. heterospora*, *G. longispora*, *G. kobei*, *Diplogelasinospora grovesii* および *Microascus tardifaciens* の 6 種の LT 活性菌について得られた結果につき述べる。

3.1.1 *Gelasinospora*, *Diplogelasinospora* 属菌の免疫抑制活性成分

LT 活性を示す菌が多数見出された *Gelasinospora*, *Diplogelasinospora* 属の菌については、従来系統立った成分研究があまり行なわれていなかったため、これらの属に分類される活性菌中、比較的高い活性が示された菌につき活性成分の単離を目指した。

まず、*G. multiforis* について、溶媒分画によって LT 活性の集約した AcOEt 可溶部から、主活性成分として単離された化合物は構造研究の結果、5-formyl-3-hydroxymethyl-4-methoxy-6-(1E-propenyl)-2-pyrone の構造を有する新 2-pyrone (*a*-pyrone) と判明し、multiforisin A (1) (Fig. 1) と命名された。同菌からは、更に同族体 5 種が単離され、それぞれ multiforisin B-F (2-6) と命名された。続いて、同属の *G. heterospora* より単離された活性成分 3 種も multiforisin 類と構造関連の新 2-pyrone であることが分か

り、multiforisin G-I (7-9) (Fig. 1) と命名された。なお、同菌からは、*Sordaria macrospora* から単離されていた sordarial (10) ³⁾ (Fig. 1) も活性成分として得られたが、側鎖の絶対配置が未定であったので、絶対配置を (3'R, 4'S) と決定した。なお、10 に免疫抑制活性が知られたのは今回が初めてである。7-9 については、その後 *G. multiforis* から得られた。*G. longispora* から 1, 7-9 並びに 10 が活性成分として単離された^{2, 4)}。

新しい免疫抑制活性成分として得られた multiforisin 類 1-9 中、活性が高いものは 1, 7, 8 である [リンパ球の Con A 誘導 (T 細胞)、LPS 誘導 (B 細胞) 増殖に対する 1 の IC₅₀ は 0.6, 0.6 μg/mL]。1 に比較し、1 の acetyl 体 [multiforisin B (2) に一致する] では活性は大きく低下し、1 の dihydro 体 (11) では活性はやや低下した。multiforisin 類とその誘導体の活性比較から、multiforisin 類では 3 に hydroxymethyl 基、5 に formyl 基が存在するか、3 と 5 のどちらか一方に hydroxymethyl 基、他方に acetoxymethyl 基が存在すると高い活性を示すが、3, 5 が共に acetoxymethyl 基である 8 の acetyl 体 (12) では活性がやや低下し、共に hydroxymethyl 基の 9 では活性が大きく低下する、2-pyrone 環と共役した 6 位側鎖中の二重結合は活性の増強に寄与することなどが判明した (Fig. 1, Table 1)。一方、10 は 1, 7, 8 等に比べ活性は低かった (Table 1)。Table 1 には、本研究で見出された LT 活性代謝産物についての Con A, LPS 誘導増殖に対する IC₅₀ の値を数種の positive control 化合物のそれと共に示す。

G. kobei からは LT 活性を示す成分として、15 員環と 5 員

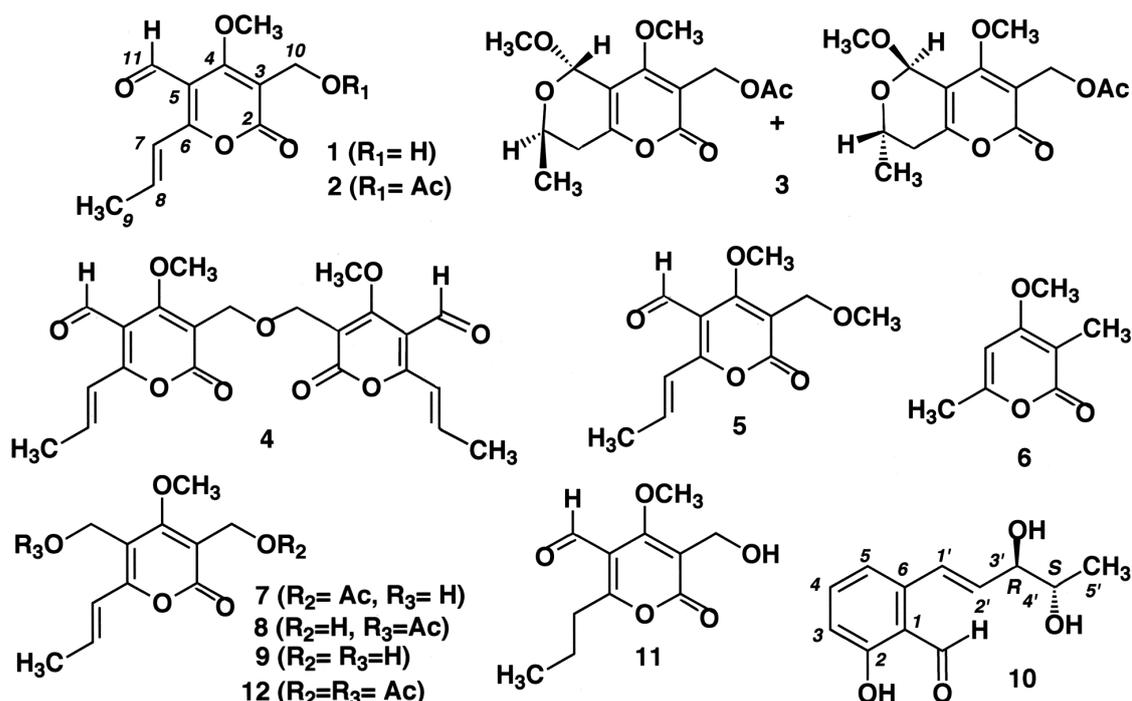


Fig. 1

環から成る新sesterterpenetriolが単離されてkobiin (13)と命名され絶対配置を含めて構造が決定されたほか、新2-furanoneが3種得られてkobifuranone A, B, C (14-16)と名付けられた (Fig. 2)⁵⁾。13の活性は中程度であるが (Table 1)、大環状のユニークな構造を有しており興味深い。14-16の活性は13のそれよりも低かった (Table 1)。

*D. grovesii*からは主活性成分として、*Macrophoma commelinae*から得られていたmacrophin (17)⁶⁾が単離されたほか、*Colletotricum capsici*や*Chaetomium funicola*から得られていた14員環を有する大環状化合物 colletodiol

(18)⁷⁻¹¹⁾及び18の10位立体異性体と判明した新化合物 10-epi-colletodiol (19)¹²⁾が得られた (Fig. 3)¹²⁾。なお、17、18に免疫抑制活性が知られたのは今回が初めてである。*D. grovesii*の主活性成分17がmultiforisin類と構造類似の2-pyrone化合物であったことは構造活性相関の意味から興味深く、その活性もmultiforisin類と同様に高かった (17のCon A, LPS誘導増殖に対するIC₅₀は0.4、0.3μg/mL) (Table 1)。一方、18、19の活性はやや低かった。

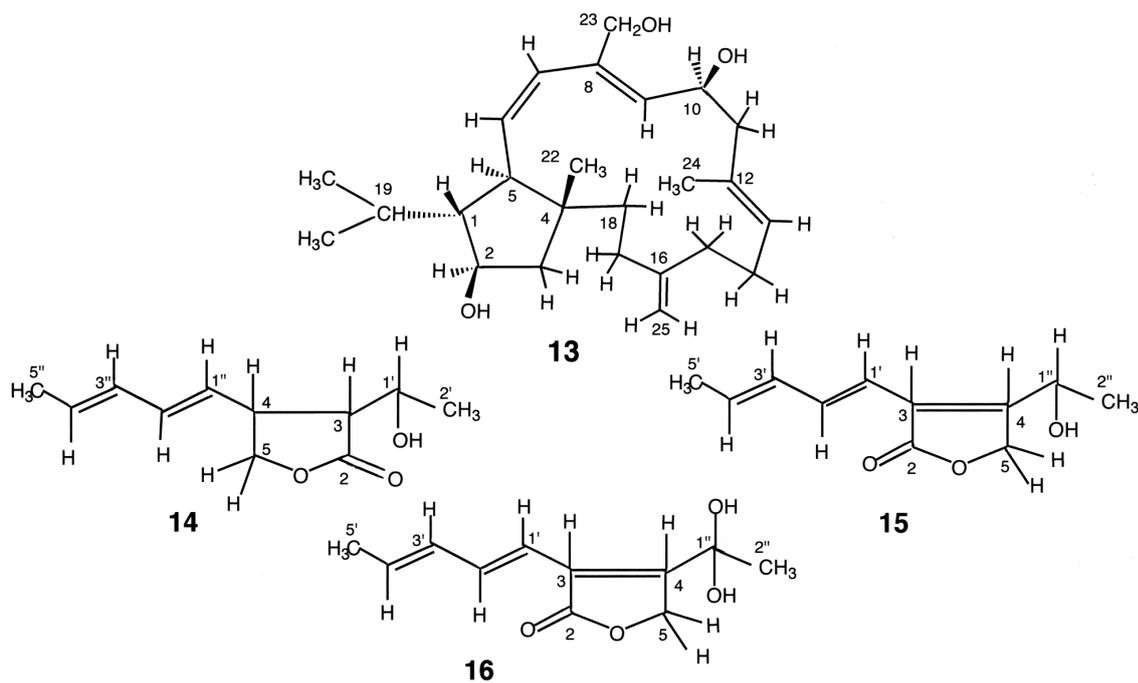


Fig. 2

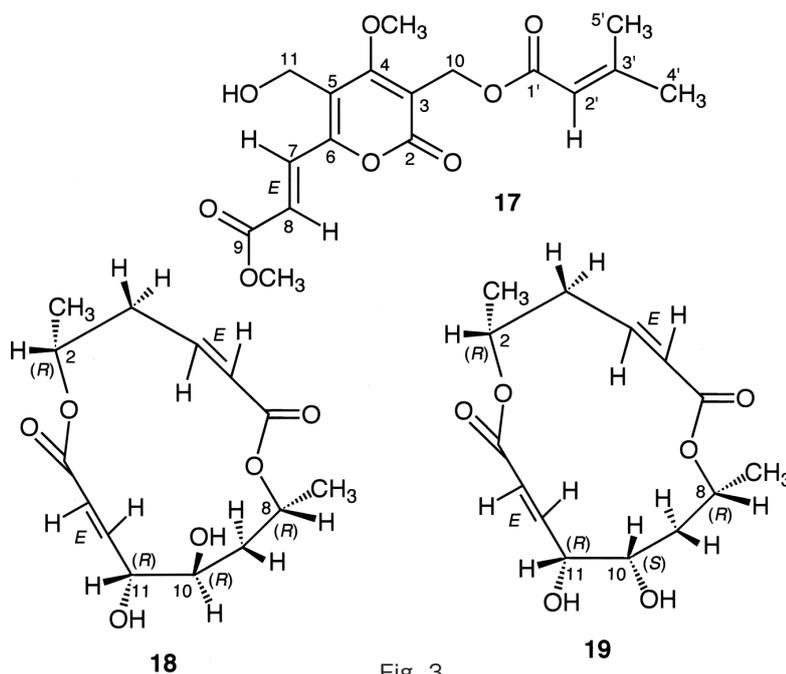


Fig. 3

3.1.2 *M.tardifaciens* の免疫抑制活性成分

*M.tardifaciens*からは、8種の活性成分が得られたが、それらの中の6種は既知菌類代謝産物に一致するものであった。即ち、それらは*Penicillium frequentans*等から得られていたquestin (20)¹³⁾と*Aspergillus cristatus*から得られていたrubrocristin (21)¹⁴⁾、*Cladosporium cladosporioides*や*Aspergillus flavus*から得られていたcladosporin (asperentin) (22)¹⁵⁻¹⁷⁾、*Aspergillus flavus*から得られていたcladosporin 8-O-methylether (23)¹⁶⁾、*Aspergillus flavus*から得られていた5,7-dihydroxy-4-methylphthalide (24)とasperflavin (25)¹⁸⁾であるが、これらのいずれについても免疫抑制活性が知られたのは、今回が初めてである。20-25はいずれも酢酸-マロン酸経路で生合成される代謝

産物であり、20、21はanthraquinone、22、23はoctaketideに属する。*M.tardifaciens*から新化合物として得られた2種のは、いずれも2,5-dioxopiperazineであることが判明し、tardioxopiperazine A (26)、B (27)と命名された (Fig. 4)¹⁹⁾。anthraquinone類の免疫抑制については、既にemodinでの例が知られているが²⁰⁾、今回、20、21にも活性が見出され、いずれも高い活性を示した (Con A、LPS誘導増殖に対するIC₅₀は20は0.3、0.3、21は0.8、0.1 μg/mL) (Table 1)。多数の関連するanthraquinone化合物との活性の比較から、β位に遊離のOH基を有するものが活性を示すものと考えられた。新化合物2種中では、26がやや高い活性を示した (Table 1)。その他の化合物の活性は低かった。

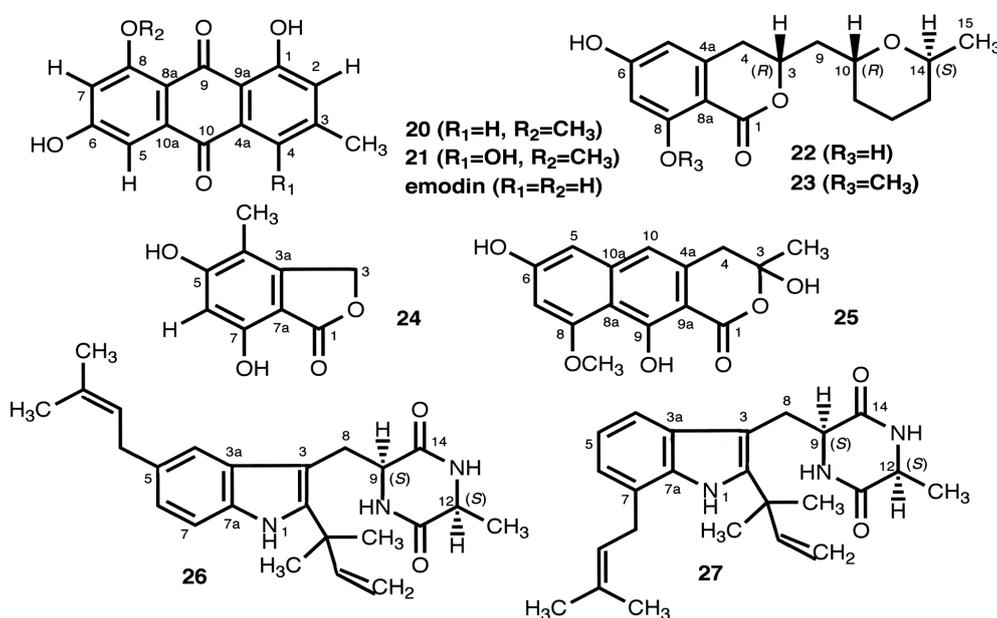


Fig. 4

Table 1 Suppressive Effects of Compounds 1 – 27, and Emodin, Azathioprine, CyclosporinA, and FK506 on ConA and LPS-Induced Proliferations of Mouse Splenic Lymphocytes [IC₅₀(μg/mL)]

Compound	Con A-induced	LPS-induced	Compound	Con A-induced	LPS-induced
1	0.6	0.6	17	0.4	0.3
2	24	22	18	12	5
3	44	27	19	5	3.8
4	>50	37	20	0.3	0.3
5	5	4	21	0.8	0.1
6	22	28	22	13	7.5
7	0.9	1.2	23	2.3	13
8	1.8	0.9	24	17	3
9	>25	19	25	16	3.6
10	6.5	5.1	26	4.5	0.7
11	13	9	27	>25	15
12	4.7	4.5	emodin	0.2	0.2
13	7	3.5	azathioprine	2.7	2.7
14	39	8	cyclosporin A	0.04	0.07
15	17.5	9	FK506	1.5x10 ⁻⁵	1.6x10 ⁻³
16	13	6			

The IC₅₀ value of each sample was calculated from the correlation curve between the sample concentration (horizontal axis) and the cell proliferation (vertical axis). The curve of each sample was drawn with 6 points, each of which represented the mean of 3 experiments on each correlation between 6 different concentrations and cell proliferations.

3.2 免疫抑制活性が IL-2 生合成阻害によるものか否かの検定

上述の 3.1 で得られた免疫抑制活性成分中、活性が比較的高く、量的にも実験が可能であった化合物につき、その免疫抑制活性が IL-2 の存在によって拮抗されるか否かを調べることによって、その免疫抑制活性が活性化 T 細胞における IL-2 生合成の阻害により起きているか否かを検定した。この検定に用いた検体は、2-pyrone 3 種 [multiforisin G (7), dihydromultiforisin A (11), macrophin (17)]、hexaketide と octaketide 各 1 種 [sordariol (10), cladospurin (22)]、大環状化合物 2 種 [kobiin (13), colletodiol (18)]、及び anthraquinone 1 種 [questin (20)] の合計 8 種の化合物である。これらのほかに positive control として、既にその作用発現機構が IL-2 生合成の阻害にあることが判明している FK506 を用いた。その結果、Fig. 5 に示す様に、FK506 では、IL-2 が培地中に存在しない場合はリンパ細胞増殖は強く抑制されるが、IL-2 が培地中に存在するとリンパ細胞増殖抑制は IL-2 により拮抗されるためわずかとなり、IL-2 が存在しない場合のリンパ細胞増殖抑制と、存在する場合のそれとの間に大きな差異が見られた。一方、検体である 8 種の化合物では、いずれにおいても、Fig. 5 に示す 7 と同様に、IL-2 が存在しない場合のリンパ細胞増殖抑制と、存在する場合のそれとの間に差異は見られなかった。それ故、これら 8 種の化合物による免疫抑制活性は IL-2 生合成阻害によるものではないと考えられた。免疫発現の機構は多数の段階から成る複雑なものであり、いずれかの段階が阻害されても、総体としての免疫阻害が起こる。今後、本研究で見出された多数の LT 活性天然成分が如何なる機構で活性を発現しているのかを解明し、化

粧品による皮膚かぶれを防ぐ目的を始め、色々な目的のために有効に利用できる道を探って行きたい。

(引用文献)

- 1) Fujimoto H., Nakayama Y., Yamazaki M.: Identification of immunosuppressive components of a mushroom, *Lactarius flavidulus*, *Chem.Pharm.Bull.*, 41, 654-658 (1993) .
- 2) Fujimoto H., Sumino M., Nagano J., Natori H., Okuyama E., Yamazaki M.: Immunomodulatory constituents from three ascomycetes, *Gelasinospora heterospora*, *G. multiforis*, and *G. longispora*, *Chem. Pharm.Bull.*, 47, 71-76 (1999) .
- 3) Bouillant M.L., Bernillon J., Favre-Bonvin J., Salin N.: New hexaketides related to sordariol in *Sordaria macrospora*, *Naturforsch.*, 44c, 719-723 (1989) .
- 4) Fujimoto H., Satoh Y., Nakayama M., Takayama T., Yamazaki M.: Isolation of some immunosuppressive components from an ascomycete, *Gelasinospora multiforis*, *Chem.Pharm.Bull.*, 43, 547-552 (1995) .
- 5) Fujimoto H., Satoh Y., Yamazaki M.: Four new immunosuppressive components, *kobiin* and *kobifuranones A, B, and C*, from an ascomycete, *Gelasinospora kobei*, *Chem.Pharm.Bull.*, 46, 211-216 (1998) .
- 6) Sakurai I., Shimizu S., Yamamoto Y.: Studies on metabolites of *Macrophoma commelinae*. III. isolation of new metabolites and biosynthesis of *macommelin* group, *Chem.Pharm.Bull.*, 36, 1328-1335 (1988) .

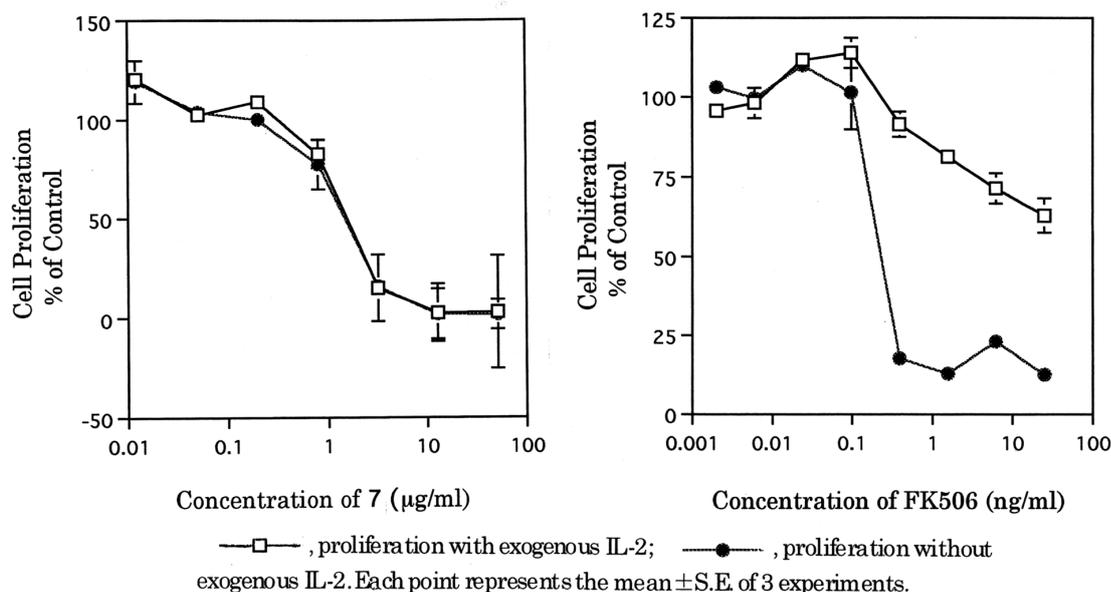


Fig 5 Effects of Multiforisin G(7) and FK506 (a Positive Control) on the Proliferation of Mouse Splenic Lymphocytes Stimulated with Ionomycin and PMA in Cultivation with and without Exogenous IL-2

- 7) Grove J.F., Speake R.N., Ward G.: Metabolic products of *Colletotrichum capsici*: isolation and characterisation of acetylcolletotrichin and colletodiol, *J.Chem.Soc. (C)*, 1966, 230-234.
- 8) Powell J.W., Whalley W.B.: The chemistry of fungi. part LVIII. structure of colletodiol, a metabolite of *Chaetomium funicola*, *J.Chem. Soc. (C)*, 1969, 911-912.
- 9) MacMillan J., Simpson T.J.: Fungal products. part V. the absolute stereochemistry of colletodiol and the structures of related metabolites of *Colletotrichum capsici*, *J.C.S.Perkin Trans. I*, 1973, 1487-1493.
- 10) MacMillan J., Pryce R.J.: The structure of colletodiol, a macrocyclic dilactone from *Colletotrichum capsici*, *Tetrahedron Lett.*, 1968, 5497-5500.
- 11) Amstutz R., Hungerbühler E., Seebach D.: Revidierte struktur des makrodiolids colletodiol, *Helv.Chim.Acta*, 64, 1796-1799 (1981).
- 12) Fujimoto H., Nagano J., Yamaguchi K., Yamazaki M.: Immunosuppressive components from an ascomycete, *Diplogelasinospora grovesii*, *Chem.Pharm. Bull.*, 46, 423-429 (1998).
- 13) Mahmoodian A., Stickings C.E.: Studies in the biochemistry of microorganisms. 115. metabolites of *Penicillium frequentans* Westling: isolation of sulochrin, asteric acid, (+) -bisdechlorogeodin and two new substituted anthraquinones, questin and questinol, *Biochem.J.*, 92, 369-378 (1964).
- 14) Anke H., Kolthoum I., Zahner H., Laatsch H.: Metabolic products of microorganisms. 185. the anthraquinones of the *Aspergillus glaucus* group. I. occurrence, isolation, identification and antimicrobial activity, *Arch.Microbiol.*, 126, 223-230 (1980).
- 15) Scott P.M., Walbeek W.V., MacLean W.M.: Cladosporin, a new antifungal metabolite from *Cladosporium cladosporioides*, *J. Antibiotics*, 24, 747-755 (1971).
- 16) Grove J.F.: New metabolic products of *Aspergillus flavus*. part I. asperentin, its methyl ethers, and 5^l-hydroxyasperentin, *J.C.S.Perkin Trans. I*, 1972, 2400-2406.
- 17) Springer J.P., Cutler H.G., Crumley F.G., Cox R.H., Davis E.E., Thean J.E.: Plant growth regulatory effects and stereochemistry of cladosporin, *J.Agric. Food Chem.*, 29, 853-855 (1981).
- 18) Grove J.F.: New metabolic products of *Aspergillus flavus*. part II. asperflavin, anhydroasperflavin, and 5,7-dihydroxy-4-methylphthalide, *J.C.S.Perkin Trans. I*, 1972, 2406-2411.
- 19) Fujimoto H., Fujimaki T., Okuyama E., Yamazaki M.: Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Microascus tardifaciens*, *Chem.Pharm. Bull.*, 47, 1426-1432 (1999).
- 20) Huang H.-C., Chang J.-H., Tung S.-F., Wu R.-T., Foegh M.L., Chu S.-H.: Immunosuppressive effect of emodin, a free radical generator, *European J. Pharmacol.*, 211, 359-364 (1992).

DNA 複製開始タンパク質 (DnaA) の活性発現と相分離した混合二分子膜の関連性

九州大学 有機化学基礎研究センター、大分大学 工学部応用化学科

石川 雄一

DnaA protein is the initiator of chromosomal DNA replication in *Escherichia coli*. We examined the influence of artificial mixed membrane composed of synthetic anionic (phosphate) lipid and cationic (ammonium) lipid on the affinity of DnaA protein for ATP. Two sets of anionic and cationic lipids with distinguishable numbers of hydrophobic alkyl chains were devised for regulating the cluster (phase separated) formation of anionic lipid around the cationic matrix. Anionic lipid, not cationic membranes, inhibited the ATP-binding and stimulated ATP-release from the ATP-DnaA active form. In the case of the mixed membrane, only anionic lipids forming cluster structures inhibit of ATP-binding and stimulate the ATP release. These results suggest that in mixed membrane a cluster formation (phase separated state) of anionic lipids seems to be an important factor to affect the affinity of DnaA protein for ATP.

1 緒言

細胞の自己増殖（複製）が考慮される時、多くの研究は、遺伝情報を担う DNA の親から娘への伝達の素過程に主眼を据えている。染色体 DNA の複製は、脂質膜の増殖と同調しバイオクロックに従って進行するため、脂質二分子膜の分離、融合などと遺伝子の増殖のシステムは親密な関係にある。しかし、脂質膜を視点に据えた細胞膜の中での DNA の複製や分裂に関する研究はほとんど無く、モデル系での研究は全くない。本研究は、遺伝子複製システムに「能動的」に関与できる界面活性剤「人工の脂質膜」を開発する事を意識している。ここでは、遺伝子の複製の「開始」プロセスに作用する混合脂質膜のクラスター形成能力（相分離特性）の重要性について検討した。また、この目的とは直接関係しないが、本研究と並列して実行していたフォトダイナミックセラピー（PDT）用のポルフィリン性色素として混乱（反転）ポルフィリンの三重項酸素発生効率をコーセー中央研究所の荒金博士に評価して頂いた結果についても簡単にまとめる。

DNAの複製を開始するタンパクは、遺伝子の複製開始点に結合し、二重鎖をゆるめ、そこにヘリカーゼ活性を持つ次のタンパクを導く^{1, 2)}。従って、遺伝子の複製を開始するタンパクを制御することは、最も効率の良い、細胞複製の「スイッチング」を意味する。最も複製系が単純で、且つ、そのプロセスに広く一般性を持つ大腸菌の DNA 複製の開始は、「DnaA」タンパク質に司られている^{3~5)}。遺

伝子の複製を開始するこのタンパク質 DnaA の活性発現には ATP が不可欠である。ATP の結合を DnaA タンパク機能の「on-off 制御」の鍵として使用することができる^{6, 7)}。

大腸菌の二分子膜は、単一の脂質でなく数種類の脂質の混合膜として存在する。具体的には、四本鎖のカルジオリピン型アニオン性の脂質と二本鎖のフォスファチジルエタノールアミン型の双性イオン（中性）の脂質が混合している。これらの中で、アニオン性の天然脂質は、DnaA と ATP との親和性に影響する事が報告されている。しかしながら、その結果は全て単独のアニオン性脂質膜と DnaA タンパク質との実験から出されており、実際の細胞膜のような混合膜での取扱いはなされていない。異種の構成成分からなる混合膜の最大の特徴は、ある特定構成分子が集合したクラスター形成（相分離）能⁸⁻¹⁰⁾があるが、アニオン性脂質の相分離性と DnaA タンパク質の機能発現との関係は今まで一切実験されてこなかった。とりわけ、上述した四本鎖と二本鎖の脂質の組み合わせのように異なる鎖数の混合膜は、膜化学的に相分離しやすい事を考えると、相分離クラスターからの検討が必要なることは明確である。

合成の脂質膜の特徴は、天然膜と異なり分子設計によりその分子の並び方や流動性を制御できる点から生まれる。アゾベンゼンを含む一本鎖脂質（1P、1N）は、グルタミン酸型（2P、2N）の二本鎖型脂質の母体膜中で容易に相分離クラスターを形成することが既に知られている⁸⁻¹⁰⁾。本研究では、この明確なクラスター状態の混合膜を利用して、その DnaA タンパク質に与える効果を検討した¹¹⁻¹²⁾。

2 実験

実験に用いた合成脂質の構造を図 1 に示す。これら四種の化合物は、文献に従って合成した^{10, 13-15)}。脂質粉末は、プローブ型の超音波照射により、10 ~ 20mM の濃度で 1 mL の分散液を調整した。リン脂質の場合、等量モルのトリスヒドロキシメチルアミノメタンを中和のために添加した。



Synthetic membrane lipids regulating the DNA duplication.

Yuichi Ishikawa

Department of Applied Chemistry, Oita University

DnaA タンパク質は、水島らにより文献に従って調整された⁴⁾。このタンパク質の比活性は、 0.7×10^6 unit/mg である。タンパク質と脂質膜は、50 mM HEPES-KOH (pH8.0)、0.5mM Mg (OAc) 2、0.3mM EDTA、5mM dithiothreitol、10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、17 (v/v) %グリセリン、0.005 (v/v) % Triton X-100 の緩衝液に分散させた。

示差走査熱量計 (DSC) は、Seiko SSC-5200 (DSC120) により、銀製サンプルパンを用いて行った。

ATP と DnaA タンパク質の親和性は、 0°C の結合過程と、 37°C での解離過程を評価した。DnaA タンパク質が、定量的に Millipore $0.45\mu\text{m}$ の membrane filter に結合する事を利用した。ATP の結合かは、 α ^{32}P -ATP 同位体を使用して先の良く洗浄された filter をシンチレーションカウンターにより計測して、定量した。

3 結果と考察

3.1 カチオン性母体膜におけるアニオン性脂質膜のクラスター相分離特性

図2は、「単独」膜によりどの程度 ATP の DnaA タンパク質に対する親和性が低下するのか示している。一本鎖、二本鎖の鎖数に依らずカチオン性の 1N、2N 膜は ATP を取り込んだ DnaA タンパク質から ATP の解離をほとんど促進させない。これに対して、アニオン性の 1P、2P 膜は、ATP の解離を促進している事が明かである。即ち、カチオン性膜は DnaA タンパク質の ATP 親和性に対してサイ

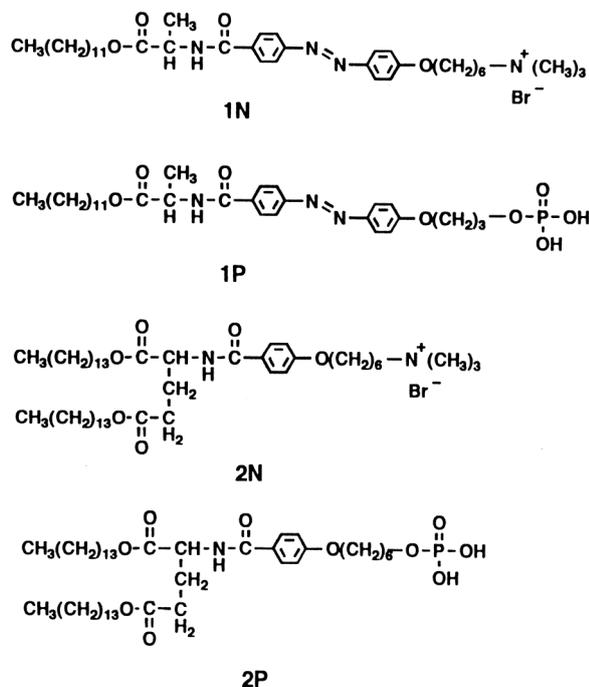


図1 合成樹脂の分子構造

アラニン骨格の一本鎖脂質とグルタミン酸骨格の二本鎖脂質を「1」と「2」で表わしている。リン酸親水基とアンモニウム親水基を大文字の P と N で示している。

レントなのでマトリックス母体膜として混合膜に使用できる事を確認した。

図3にアニオン性脂質を 1/10 等量ゲスト膜としカチオン性のマトリックス膜に混合した分散液の DSC 吸熱サーモグラムを示している。二本鎖のマトリックス膜に同じ鎖数のアニオン性ゲスト膜が混在する場合 (2P/2N: 図3 A) は、マトリックス 2N 単独膜のゲル-液晶相転移温度の 49°C とほぼ等しい温度に一つのブロード (吸熱幅約 5°C)

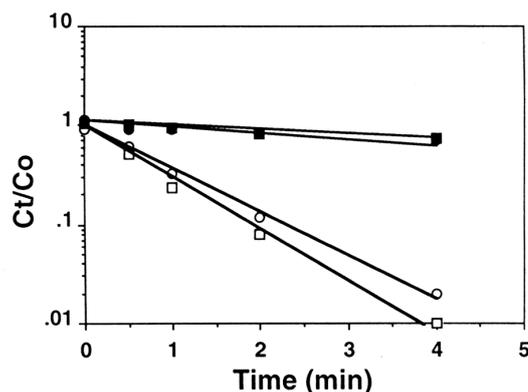


図2 ATP-DnaA タンパク質複合体からの ATP 放出過程の動力学
Ct、Co は ATP-DnaA の残存濃度と初濃度を示す。○: 1P、●: 1N、□: 2P、■: 2N、 37°C [ATP-DnaA] = $0.03\mu\text{M}$ 、[膜] = $30\mu\text{M}$

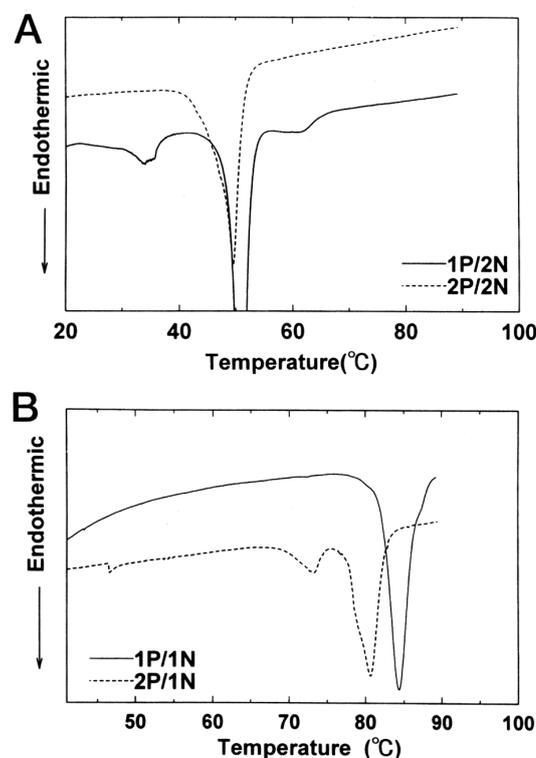


図3 二本鎖型マトリックス膜 2N (A) および一本鎖型マトリックス膜 1N (B) との混合膜分散液の DSC サーモグラム [アニオン性脂質] = 5mM、[カチオン性マトリックス膜] = 50mM、[トリスヒドロキシアミノメタン] = 5mM、17% (v/v) グリセリン水溶液

な吸熱ピークを与える。二本鎖のマトリックス膜と異なる鎖数である一本鎖のゲスト膜が混在すると、マトリックス膜の50℃近傍の比較的鋭い(吸熱幅2.2℃)主転移(80%)に加えて、35℃前後に約15%、62℃付近に5%前後の副転移を持つ。この場合の主転移の吸熱幅は、2N膜単独に比較し約二倍と幅広いが、同じ鎖数の混合膜のその半分の鋭さである。これらのDSC曲線は、次の二つの点を意味している。

(1)同じ鎖数のアニオン性のゲスト膜がカチオン性のホスト膜中でクラスタードメインを形成する事無く静電的に分散して存在している。その結果、マトリックス膜内に分散したゲスト膜によりマトリックス膜の協同性が低下し主吸熱ピークのプロード化となっている。

(2)異なる鎖数のゲスト膜は、マトリックス膜から弾き出されクラスター相分離化し主転移以外の吸熱ピークを示している。また、マトリックス内に取り込まれているゲスト膜分子が少ないため主転移は比較的鋭い。

一本鎖脂質はアゾベンゼンを剛直基として含んでいる。この発色団は、分子会合をそのUV-vis吸収スペクトルから簡単に評価できる。即ち、頭-頭型の会合状態であれば、360nmから数重nm短波長シフトする。1Pゲスト膜は、2Nマトリックス膜中、37℃で336nmに λ_{max} を示し、70℃で完璧に会合が解けた360nmを示す。この事も、DSCから得られる相分離クラスターの形成と矛盾しない。

1Nをマトリックス膜として使用したときも同じ傾向が認められる(図3B)。即ち、マトリックス膜と異なる鎖数の組み合わせ(1P/2N)ではクラスター形成にともなう吸熱が74℃にマトリックス膜の吸熱81℃に加えて存在する。これに対し、同じ鎖数の組み合わせの混合膜(1P/1N)では、84℃に一つの吸熱ピークを示すのみである。疎水基が全く同じ構造のアニオン脂質はカチオン母体膜に完全に均一分散していることが明かである。

まとめると、鎖数が同じ組み合わせの混合膜(1P/1N)、(2P/2N)は、均一分散し、今なる鎖数の混合膜(1P/2N)、(2P/1N)は、クラスター相分離している。

3.2 ATPのDnaAタンパク質への結合に与える混合膜の添加効果

カチオン性の膜は、ATPとDnaAタンパク質との親和性にほとんど影響を与えない事を上述した。図4には、低温でのATPの結合に対する混合膜の添加効果を示している。横軸は、アニオン脂質の量である。縦軸が大きい程ATPとの親和性が高い事を意味している。アニオン性脂質の添加効果が、二つのパターンに分類できる。相分離してアニオン脂質のクラスターが形成されている組み合わせの混合膜は、アニオン膜単独に匹敵するATP結合の阻害効果を示している。これは一本鎖アニオン膜でも二本鎖アニオン膜でも同じである。

3.3 ATP-DnaA複合体からのATP解離に対する混合膜の添加効果。

ATPとDnaAタンパク質との親和性を、高温における解離挙動からモニターした。図5にその結果を示している。縦軸は、ATPが結合したDnaAタンパク質の変化量を対数で、横軸を時間で示している。どの系も直線で減少していることからその直線の傾斜から見かけの一次の反応速度定数を見積もる事が可能である。1P、1P/1N、1P/2N、2P、2P/2N、2P/1N膜の解離速度定数は、各々、8.5m、5.7m、7.6m、11m、6.6m、9.2m(s⁻¹)である。ATPの解離は、鎖数の組み合わせに大きく依存している。異なる鎖数の組み合わせの混合膜(1P/2N、2P/1N)は、同じ鎖数の組み合わせよりもATPがより高速に解離している。これらの傾向は、低温でのATP結合過程の動向と一致している。

3.1節で述べたように、異なる鎖数の組み合わせの混合膜は、アニオン性脂質のクラスター相分離を母体膜中で取り易い。マトリックス膜中でのアニオン膜のクラスター構造は、アニオン膜単独と同じように作用する事が推察される。

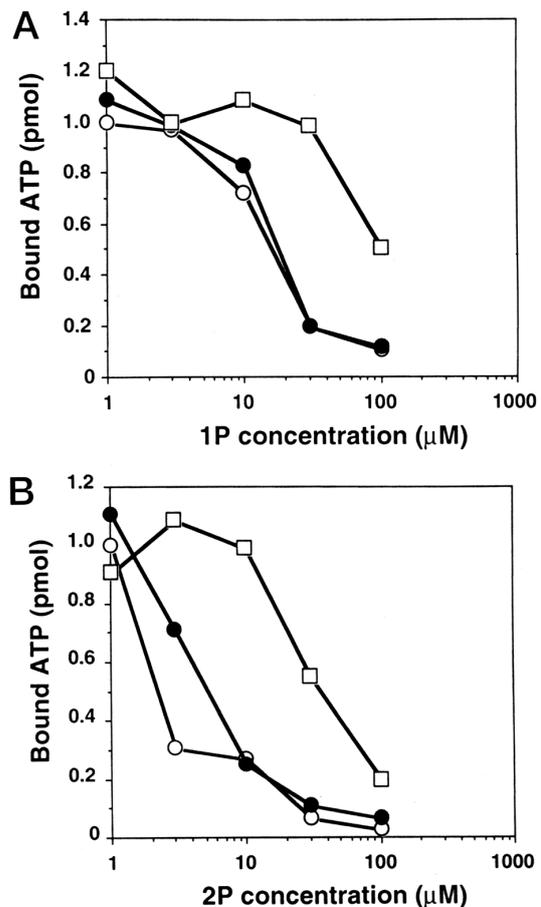


図4 DnaAタンパク質のATP取り込みに与える脂質膜の添加効果

図1と同じ濃度条件で行っている。4℃。
A, ○ 1P; ● 1P/2N, □ 1P/1N
B, ○ 2P; ● 2P/1N, □ 2P/2N
[アニオン膜] / [カチオン膜] = 1/10

4 総括 (クラスター相分離脂質と DnaA タンパク質との相互作用)

本研究では、混合膜におけるクラスター形成に焦点を当て、その DnaA タンパク質との相互作用に与えるインパクトを明らかにした。アルキル鎖数について同質でない組み合わせの混合膜は、アニオン性脂質のクラスターを形成する。これに対して、疎水部が同じ構造の組み合わせでは親水基間の静電相互作用によりアニオン性膜はカチオン性母体膜に分散してしまう。カチオン性の膜成分に取り囲まれたアニオン性脂質は、その DnaA タンパク質に対する親和性を低下させる。これに対し、アニオン性脂質同士が集合して一塊になりカチオン性膜に分散していれば、アニオン性の単独膜と同様な DnaA タンパク質との親和性を示す。母体膜中のアニオン性クラスタドメインの大きさに分布があり、これが、わずかな DnaA タンパク質との親和性の差として現れていると考えている。

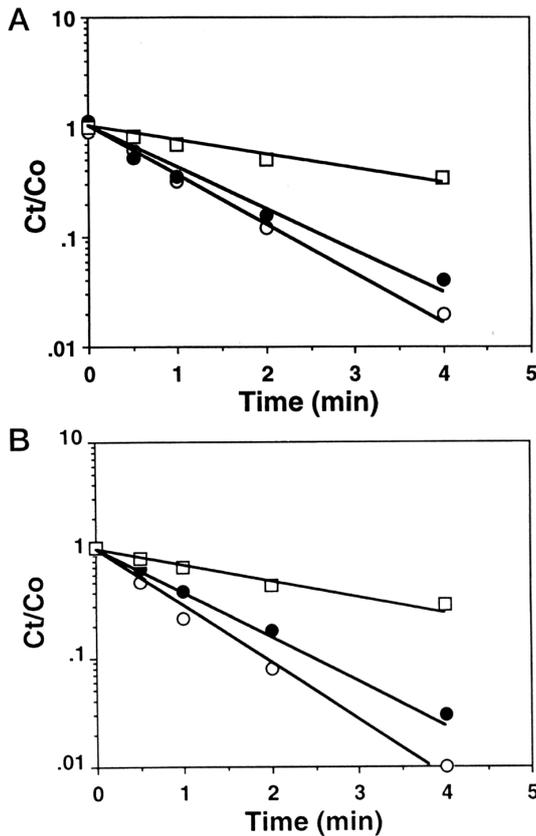


図5 ATP-DnaA 複合体からの ATP 放出の動力学に与える脂質膜の添加効

37°C、濃度条件はず 4 と同じ。

[ATP-DnaA (仕込み)] = 1.1 pmol/40L、[アニオン性脂質] = 30 μM、[カチオン性脂質] = 300 μM

A : ○ 1P ; ● 1P/2N ; □ 1P/1N

B : ○ 2P ; ● 2P/1N ; □ 2P/2N

5 その他 (反転 (N-混乱) ポルフィリンの光による一重項酸素発生効率)

本プロジェクトと並んで、我々の研究グループは、反転環をもつ全く新しいポルフィリンを扱っている。一般に、通常のポルフィリンは、光物理化学適療法 (photodynamic therapy : PDT) において、癌細胞に濃縮しやすく、さらに三重項酸素を効率良く一重項酸素へ光増感するため PDT の治療剤の一つの候補として知られている。癌細胞近傍での光照射による反応活性な一重項酸素の発生が制ガン効果につながっているものである。いかに効率的な一重項の発生が可能で代謝に負担が掛からない色素であるかどうかは、PDT 治療剤としての一つの重要な評価ポイントである。幸い、本研究助成財団の一つの基礎研究所であるコーセー基礎研究所の荒金久美博士グループが、この一重項評価システムをたちあげられておられ、ご厚意により、

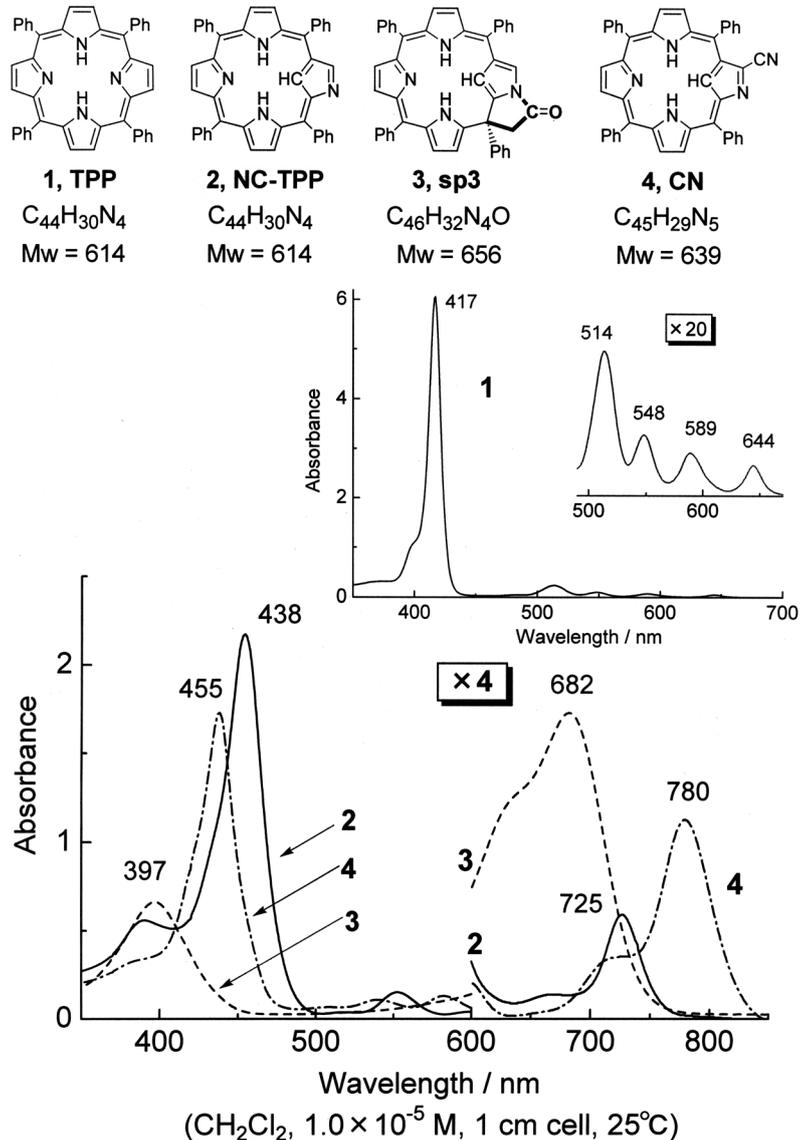


図6 各種ポルフィリンの分子構造と吸収スペクトル

私どもの新しいポルフィリンの一重項酸素の発生について定性的な評価を行って頂いた。忙しい中で、このような門外漢からの申し出を快く引き受けて頂き感謝して致します。

使用した化合物の分子構造とそれらの吸収スペクトルを図6に示す。測定条件は、Arレーザー:波長514nm(強度100mW)、試料濃度0.1mMで行った。相対標準化合物としてTPPを利用している。514nmの吸光度の化合物間の比は、TPP 1に対し、その他の反転体ポルフィリンは、約1/3から1/4の強度である。オーダーが異なる様な差はない。一重項酸素の発生は、その1268nmの吸光度の相対比から求めた。図7に化合物1から4の増感剤としてのプロファイルと比較している。TPPが明確に1268nmにピークとして一重項酸素の存在を示しているのに対し、全く同じ条件のもと反転環を持つポルフィリンの場合は、肩となって現れるのがやっとなのである事が判る。また、反転体の二つの互変異性体の効果を検討している。どちらの構造でも著しい一重項酸素の発生は認められなかった。これ以上、踏み込んで検討していない。通常ポルフィリンが一重項酸素の発生能力に優れている事が明かである。

(引用文献)

- 1) T. Atlung, Mol. & Gen. Genet., 197, 125-128 (1984) .
- 2) A. van der Ende, T. A. Baker, T. Ogawa, and A. Kornberg et al., Proc., Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 3954-3958 (1985) .
- 3) A. Kornberg, and T. A. Baker, in DNA Replication, 2nd Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1992) .
- 4) Y. Hirota, J. Mordoh, and F. Jacob, J. Mol. Biol, 53, 369-387 (1970) .
- 5) S. R. Fuller, and A. Kornberg, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 80, 5817-5821 (1983) .

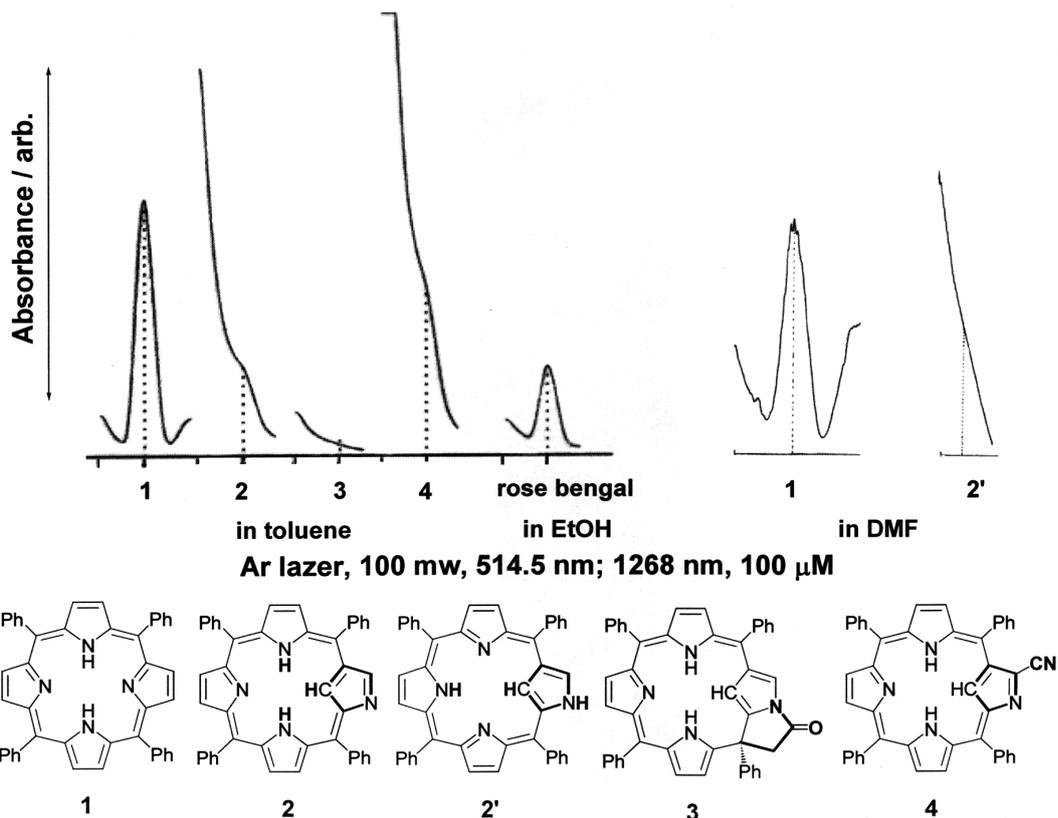


図7 各種ポルフィリンを光増感剤とした時の一重項酸素の発生と比較

- 6) T. Katayama, J. Biol. Chem., 269, 22075-22079 (1994) .
- 7) T. Katayama and E. Crooke, J. Biol. Chem., 270, 9265-9271 (1994) .
- 8) T. Kunitake, N. Kimizuka, N. Higashi, and N. Nakashima, J. Am. Chem. Soc., 106, 1978-1983 (1984) .
- 9) M. Shimomura, and T. Kunitake, J. Am. Chem. Soc., 104, 1757-1759 (1982) .
- 10) T. Kunitake, Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 31, 709-726 (1992) .
- 11) T. Mizushima, Y. Ishikawa, E. Obana, M. Hase, T. Kubota, T. Katayama, T. Kunitake, E. Watanabe, and K. Sekimizu, J. Biol. Chem., 271, 3633-3638 (1996) .
- 12) M. Hase, T. Yoshimi, Y. Ishikawa, A. Ohba, L. Guo, S. Mima, M. Makise, Y. Yamaguchi, T. Tsuchiya, and T. Mizushima, J. Biol. Chem., 273, 28651-28656 (1998) .
- 13) T. Kunitake, and N. Yamada, J. Chem. Commun., 655-656 (1986) .
- 14) Y. Ishikawa, and T. Kunitake, J. Am. Chem. Soc., 113, 621-630 (1991) .
- 15) T. Kunitake, J-M. Kim, and Y. Ishikawa, J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 6, 885-890 (1991) .

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

東京工業大学大学院 理工学研究科

大橋 直樹

Zinc oxide is an oxide semiconductor having direct band gap of 3.3 eV. It has been applied to white paint or additive for rubber forming. Recently, some new applications of ZnO have been developed because of its wide bandgap and capability of electron doping. For example, transparent electrodes for displays and solar cells, UV cut filters and coatings (sunscreen foundation), and light emitting diode including UV laser. For all electrical and/or optical applications, controlling of electronic states of defects and impurities is the most important technology to realize useful and efficient devices or components. Thus, in this study, growth of high quality ZnO single crystals, doping defects into them, and characterization of their electro-optical properties were carried out in order to investigate the electro-optical properties of ZnO.

The single crystals grown by CVT method exhibited high efficiency for UV emission, while the flux grown crystal showed relatively lower UV emission efficiency and/or relatively strong visible light emission originated by defects and impurities.

The origin of the visible light emission has been investigated by doping experiments and the following conclusions were given,

(1) the green emission due to deep donor is diminished by heat treatment, while that due to Cu impurity appear after the treatment.

(2) the yellow emission appears in the ZnO doped with donor (Al) and acceptor (Li, Na), simultaneously. Further, the reduction, which increase donor concentration, makes yellow emission intensity higher.

(3) red light emission was found by heavy doping of acceptors (Na, Li).

It is plausibly said that the understanding and controlling of light emission properties of ZnO will provides highly functional sunscreen cosmetics.

1. 緒言

酸化亜鉛は室温で約 3.3 eV という広いバンドギャップをもつ¹⁾ 直接遷移型の半導体である。そのため、酸化亜鉛粉末は白色であり、白色顔料として利用されてきた。また、特定の手法で合成された再結合中心を有する酸化亜鉛粉末は、低速の電子による励起に対して極めて高い効率で青緑色の発光を与えるため、蛍光表示管などの発光・表示デバイス用の蛍光剤として利用されてきた。また、光、ないし、電子励起によって酸化亜鉛中に形成される励起子は 60 meV という高い結合エネルギーを持つことが知られている。1970 年代に励起子発光の同定²⁾ や低温での励起子レーザー発振³⁾ の確認など、多くの研究がなされた。

近年、高純度化された亜鉛金属、酸化亜鉛原料の入手が容易になり、また、酸化物作製プロセスが高度化し、後に述べるような新たな応用が検討され、また、実用化されつつある。材料合成においては、1998 年に Reynolds ら⁴⁾ が気相輸送 (CVT) 法によって直径 5 cm、厚さ数センチにもなる高純度酸化亜鉛単結晶の育成に成功した。この CVT 法で育成された結晶は、低温においては、強度の低い励起光によってもレーザー発振することが報告された

5)。同じく 1998 年に、パルスレーザーを用いた真空蒸着プロセスによって形成された亜鉛薄膜が、室温においても紫外線励起子レーザーとして機能することが報告された⁶⁾。また、先述した広いバンドギャップに起因する紫外線吸収特性や白色性を応用し、化粧品用顔料として応用されている。また、可視光に対する透明性やキャリア注入の容易さから、各種発光表示板や太陽電池用の透明電極へ向けての開発研究が進められている。

ここに紹介したように酸化亜鉛の新たな用途はいずれも、そのバンドギャップに起因する短波長発光、紫外線吸収、可視透明性を利用している。そこで、本研究では、酸化亜鉛の光特性を支配する欠陥や不純物の状態を分析し、また、その欠陥を積極的に制御することによって酸化亜鉛の光機能の向上に資することを目的としている。

そのため、単結晶や粉末などの種々の形態を持つ酸化亜鉛を作製し、それらに熱処理、不純物の拡散などの処理をほどこし、その発効特性を中心に評価した。また、酸化亜鉛中の欠陥・不純物濃度を変えることで、欠陥発光特性を積極的に変化させることを試みた。

カソードルミネッセンス (CL) 法は電子線を用いた発光測定である。フォトルミネッセンス法に比べて励起エネルギーが高いため、試料中に存在する発光中心を網羅的に探すには有効な手段である。また、試料の微細構造と対応した発光スペクトルの観測が可能である⁷⁾。

2. 実験

粉体試料には市販の酸化亜鉛粉体、酸化亜鉛蛍光体粉体を用いた。欠陥量、欠陥の状態を変化させるため、粉体に

Spectroscopic analyses of surface and defects states of zinc oxide and controlling of its emission properties

Naoki Ohashi

Graduate school of science and technology,
Tokyo Institute of Technology



は熱処理を施した。熱処理は 800 ~ 1200℃においてアルゴン、酸素などのガス中で行った。

単結晶試料は、CVT法、フラックス法で育成した。CVT法では蒸発・輸送を担うガスとしてアルゴン/水素混合ガスを用い、再酸化・析出のためのガスとして酸素ガスを用いた。結晶育成にあたっては、原料および結晶析出部の温度(1000-1350℃)、アルゴン/水素混合ガスの混合比(水素:0-30%)と流量(10-200SCCM)、酸素ガスの流量(0-50SCCM)の3種の育成条件を検討した。

フラックス法では、原料としてZnO粉末、融剤として弗化鉛を用いて、1150℃で溶融した後、毎時5-10℃で徐冷することで結晶を得た。不純物による欠陥発光の変化を検討するため、原料中にアルミ、リチウム、銅等の添加物を加えた。

CLスペクトルは、室温から10Kの範囲で、1.5~4.0nmの波長域で測定した。励起電子線は、5keV、1nAとした。装置の詳細は、引用文献8に示されている。

3 結果と考察

3-1 酸化亜鉛単結晶の育成

図1にフラックス法で育成された酸化亜鉛単結晶を示す。長手方向で20mm、厚さ0.5mm程の結晶が得られた。組成分析の結果、電気炉の耐火物に由来するリチウム、アルミニウムが不純物として検出された。フラックスに用いた弗化鉛によって炉壁が浸食され、それが原因となって不純物が混入した物と推定された。アルミニウムは数百ppm、リチウムは数十ppmの濃度であった。このアルミニウム不純物により、キャリアが導入され、ホール計数測定により室温で 10^{17}cm^{-3} の電子濃度を持つことが確認された。

これに対して、CVT法で得られた結晶は針状結晶であ



図1 フラックス法で育成した酸化亜鉛単結晶

った。図2に写真を示す。本研究で得られたCVT結晶で最大の物は、太さ約1mm、長さ1cm程の六角形の自形をもつ結晶であった。フラックス法と異なり、炉壁の浸食は見られず、そのため、より高純度の結晶が得られた。その結果、電子濃度は、フラックス法の1/10以下にあたる、 10^{16}cm^{-3} のオーダーであった。

抵抗率、ホール係数の温度依存性から、フラックス法、CVT法で得られた結晶とも室温ですでにキャリアが出払った状態にあり、キャリアを与えているドナー準位は極めて浅いことが示唆された。

先に述べた比較的大型のCVT結晶はキャリアーガス中の水素濃度を高め、育成部位での亜鉛の濃度を高めた結果得られたものである。しかし、CVT法では、一般に、核生成が顕著であり、供給した原料が核形成に消費され、小型の結晶の集合体となりやすかった。また、原料の蒸発量、すなわち、結晶成長部位への亜鉛の供給量が低くなると、より結晶が細く針状になる傾向が認められた。

3-2 単結晶の発光

フラックス法で得られた結晶では、不純物量に対応した発光スペクトルの変化が確認された。特に、リチウムとアルミの濃度が高い結晶において欠陥に起因する可視光の発光が認められた。図3に代表的な発光スペクトルを示す。特に、育成直後の結晶に比べて、育成後に熱処理を加えた結晶において欠陥に由来する可視発光が顕著であった。

一方、CVT法で得られた結晶では強いバンド端発光が認められ、欠陥発光は認められなかった。この結果は、キャリアー濃度の測定結果と良く対応しており、欠陥が少ないために、再結合中心の濃度が低く、酸化亜鉛本来のバンド端発光が強調されたものと考えられる。CVT結晶の発光の特徴は、励起子発光のフォノンレプリカが強調されており、室温では、3次のTOフォノンレプリカが最も強い発光を与えた。すなわち、室温における発光は、可視と紫外にまたがった発光となっている。

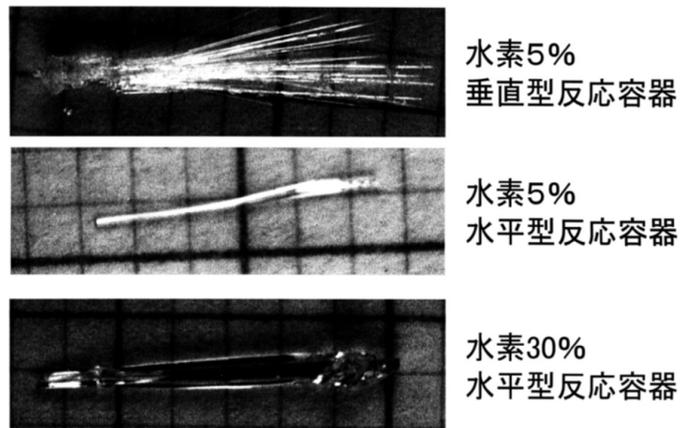
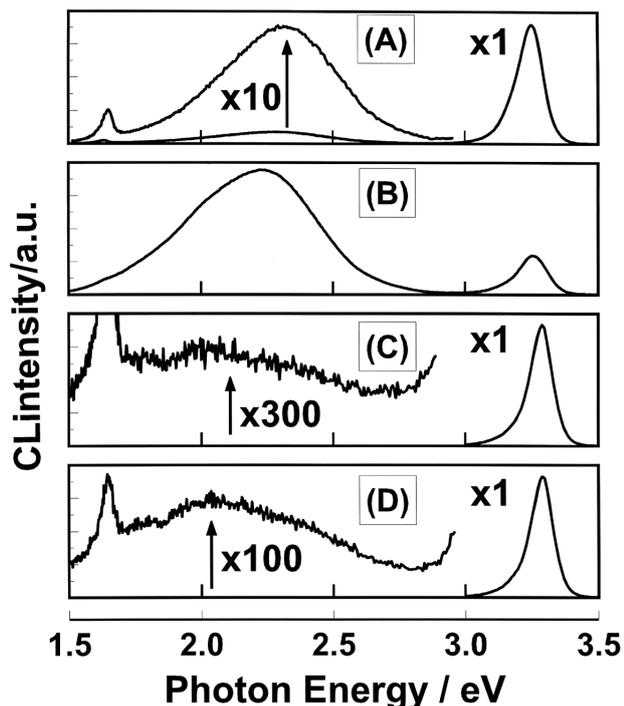


図2 CVT法で育成した酸化亜鉛単結(方眼は1mm)



(A) As-grown 結晶 (低純度) (B) 熱処理後の結晶 (低純度)
 (C) As-grown 結晶 (低純度) (D) 熱処理後の結晶 (低純度)

図3 フラックス法で育成した酸化亜鉛単結晶のCLスペクトル

3-3 欠陥発光の同定

ここで、フラックス法で得られた結晶の欠陥発光を同定するため、各種の添加物を加えた酸化亜鉛粉末や、酸化亜鉛単結晶の発光スペクトルを測定し、可視発光の同定を試みた。

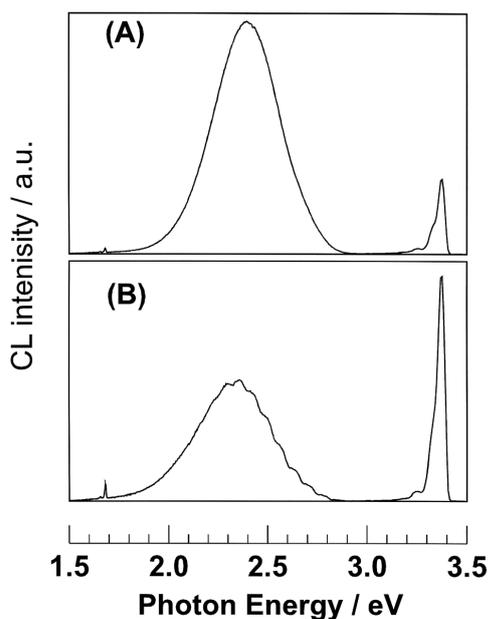
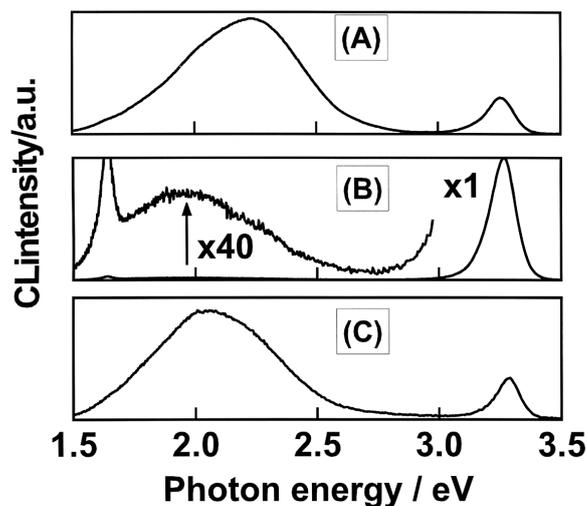


図4 市販の酸化亜鉛蛍光体に熱処理を施した際の発光スペクトルの変化。測定は、20°K (A) 熱処理前の市販品、(B) 熱処理後

図4に市販蛍光体粉末の熱処理前後の発光特性を示す。熱処理によって、発光ピークが若干長波長側にシフトとしており、熱処理によって発光機構が変化したことが分かる。特に、熱処理を施した後の試料では、低温においてフォノンとの相互作用に起因する60-70meV間隔の微細構造が観測された。

銅を添加した酸化亜鉛単結晶の発光スペクトルの温度依存性⁹⁾は、発光の強度が温度に対して単調増加ではなく、130K付近に発光強度の最大値をもっていた。この特徴は、熱処理後の市販蛍光体と一致した。これに対して、市販の青緑色光を発する酸化亜鉛蛍光体は、温度に対して発光強度があまり変化しなかった。これまで、緑色の発光について多くの議論がなされてきたが、酸素欠陥¹⁰⁾、不純物銅¹¹⁾などの諸説が存在し、明確な発光機構は明かされていなかった。上記の結果は、市販蛍光体粉末には、不純物銅が含まれているにもかかわらず銅を再結合中心としない発光が現れるが、熱処理によって、不純物銅の配位状態が変化し、発光中心となることが示唆された。

一方、図3に示したように不純物濃度が比較的高い、フラックス育成単結晶に熱処理を施すと、黄色(2.0eV)の発光が顕著となった。この黄色の発光は、これまでにLiが関与した発光であるとされている¹²⁾。しかし、フラックス結晶の主な不純物であるリチウムとアルミニウムを積極的に加えた結晶の発光特性を評価した結果、この黄色の発光が単純にLiの濃度との対応を示す物ではなく、酸化亜鉛中のドナー濃度とも強い相関を示すことを見いだした¹³⁾。すなわち、図5に示すようにアルミとリチウムを同時に添加した場合に黄色の発光強度が増した。特に、アルミを添加した試料をAr中で熱処理した際に、酸素中で熱処理し



(A) 熱処理後の無添加結晶 (低純度)
 (B) 熱処理前のアルミ添加結晶 (高純度)
 (C) 熱処理後のアルミ添加結晶 (高純度)

図5 アルミを添加した酸化亜鉛単結晶のCLスペクトル

た試料よりも強い黄色発光が観測された。また、図6に示すように酸化亜鉛中のドナーに関連した ESR シグナル ($g=1.96$) の強度と黄色の発光の強度が相関していることも確認された。これらのことから、黄色の発光強度が、単純にアクセプターである Li を介した発光ではなく、ESR シグナルを与えるドナーと相関していることがわかった。また、リチウム、ナトリウムなどのアルカリのみを添加した酸化亜鉛では、紫外線照射時に目視で赤色の発光が観測された。このことから、アルカリ添加のみでは、 2.0eV の発光が得られず、ドナーとアルカリの共ドーブによって実現することが確認された。

なお、紙面の都合で割愛した、助成に関連するその他の成果は、引用 13) - 19) に詳細が報告されている。

4 結論

本研究で得られた実験結果から酸化亜鉛のコスメトロジー応用に関連して以下の知見が得られた。

①高純度結晶

CVT 法が高純度酸化亜鉛結晶の育成に効果的であることが確認された。CVT 成長結晶では、励起子のフォノンレプリカによる発光が顕著で、見かけ上、 3.3eV 以上のエネルギーの紫外線を吸収し、紫色 (約 3eV) の光に変換する。そのため、化粧品応用においては必ずしもこの高純度・高品質結晶が有用ではないと考えられる。

②可視発光の長波長化

可視発光に関して、表 1 に示すの関係が導かれた。化粧品応用、特にサンスクリーン応用の観点からは、アルカリドーブの赤や共ドーブの黄色の色調が有用と考えられる。特に、ストロボ光などに含まれる紫外線成分を高効率で肌色に近い色に変換するという機能をもつことが可能と考えられる。

(引用文献)

- 1) D.M.Kolb and H.-J.Schulz, "Current Topics in Materials Science Vol. 7", Ed. E.Kaldis, Pub. North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1981), p226-268.
- 2) Tomizg and Helbig: *J.Luminescence*, 14 (1972) 403
- 3) C.F.Klingshirm, "Semiconductor Optics" Springer
- 4) D.C.Look, D.C.Reynolds, J.R.Sizelove 他, *Solid State Commun.*, 150 (1998) 399
- 5) D. C. Reynolds, D.C. Look, and B. Jogai, *J. Solid State Commun.*, 99 (1996) 869.
- 6) P.Zu, Z.K.Tang, G.K.L.Wong 他, *J. Solid State Commun.*, 103 (1997) 459.
- 7) S.Tanaka, T.Takahashi, T.Sekiguchi 他 *J.Appl. Phys.* 77 (1993) 4021

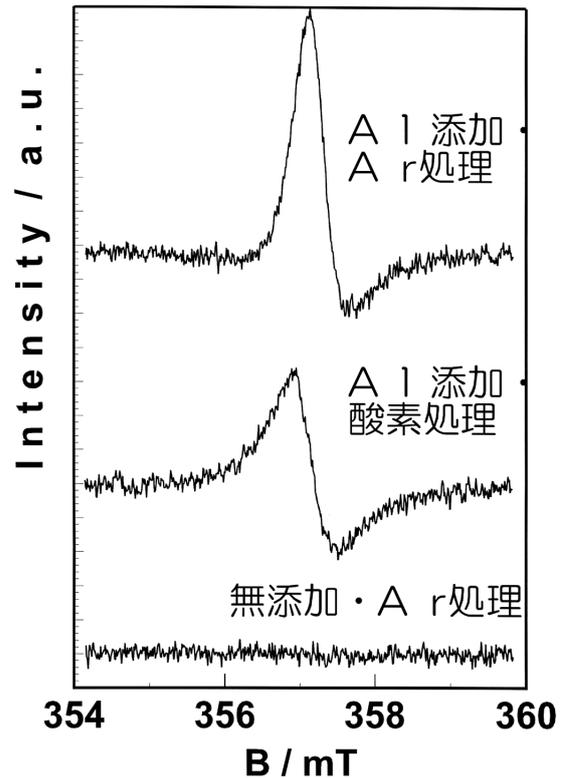


図6 アルミを加えた酸化亜鉛の ESR スペクトル

表 1 添加物と酸化亜鉛の発光の関係

欠陥種	発光のエネルギー
ドナー (酸素欠陥)	2.3eV (青緑)
アクセプタ (リチウム・ナトリウム)	1.7eV (赤色)
共ドーブ (アルミ+アルカリ)	2.0eV (黄色)

- 8) T.Sekiguchi and K.Sumino, *Rev. Sci. Instrum.*, 66 (1995) 4277
- 9) N. Ohashi, T. Ohgaki, T. Nakata 他, "Cathodoluminescence and Photoluminescence of Zinc Oxide Single Crystals Grown by a Flux method" *J. Kore. Phys. Soc.*, 35(1999)S287-290
- 10) K.Vanheusden, W.L.Warren, C.H.Seager, D.R.Tailant, J.A.Voigt and B.E.Grande, *J. Appl. Phys.*, 79_(1996) 7983.
- 11) R.Dingle, *Phys. Rev. Lett.*, 23 (1969) 579.
- 12) O.F.Schermer and D.Zwingle; *Solid State. Commun.*, 8 (1970) 1559
- 13) N.Ohashi, K.Nakata, T.Sekiguchi 他, "Yellow Emission from Zinc Oxide giving an electron spin resonance signal at $g=1.96$ " *Jpn. J. Appl. Phys.* 38 (1999) L113-115

- 14) N.Ohashi, S.Mitarai, T.Tsurumi 他 "Magnetization and Electric Properties of Pr-doped ZnO", *J.Electroceram* 4 Suppl.1 pp. 59 (1999)
- 15) N.Ohashi, Y.Terada, T.Ohgaki 他 "Synthesis of ZnO Bicrystals doped with Co or Mn and Electric Properties", *Jpn. J. Appl. Phys.* 38(1999)5028-32.
- 16) N.Ohashi, Y.Terada, T.Ohgaki 他 "Fabrication of ZnO bi-crystals with twist boundary using Co doped ZnO single crystals", *J. Kore. Phys. Soc.* 35(1999)S213-S215
- 17) 大橋直樹、田中 滋、鶴見敬章他 "プラセオジウム・コバルト添加酸化亜鉛バリスタのオージェ電子スペクトル", *日本セラミックス協会学術論文誌* 106(1998)914-919
- 18) H.MAKI, N.ICHINOSE, N.OHASHI "The Lattice Relaxation of ZnO Single Crystal (0001) Surface", accepted for publication in *J. Vac. Sci. Tech.*
- 19) T. Tsurumi, S. Nishizawa, N. Ohashi 他 "Electric Properties of Zinc Oxide Epitaxial Films Grown by Ion Beam Sputtering with Oxygen-Radical Irradiation", and T. Ohgaki, *Jpn J. Appl. Phys.*, 38(1999)3682-88.

Ⅱ. 生体作用、安全性に関する分野

新規蛍光プローブを用いた一酸化窒素 (NO) の 生細胞における作用解析

東京大学大学院 薬学系研究科

菊 地 和 也

Nitric Oxide (NO) is produced by a variety of cells and is involved in a broad array of physiological and pathophysiological processes. It is reported that NO perform in vasodilation, immunoregulation and neurotransmission. However, many proposed physiological roles of NO were not proved directly by measuring NO. One of the reasons for this is the difficulty of direct, real-time detection of this gaseous, free radical species. Although several methods of detecting NO, which is unstable and produced at low concentration, have been developed, a new method is required which is satisfactory for studies in living cells in terms of selectivity, sensitivity, and experimental feasibility. In order to obtain direct evidence for NO functions in cultured dermatological cells, I designed and synthesized fluorescent NO indicators to detect NO in living cells as a means to examine the physiological functions of NO. First, the reactivity of NO was examined in order to find a suitable reaction for selective NO trapping. I found that aromatic amines react with NO in the presence of dioxygen to produce the corresponding triazenes.

We started to investigate the design and synthesis of fluorescent compounds based originally on 2,3-diaminonaphthalene as a vicinal diamine. Based on these findings, we designed diaminofluoresceins (DAFs, Figure 1) as indicators for NO. The N-nitrosation of DAFs, yielding the highly green-fluorescent triazole form, offers the advantages of specificity, sensitivity, and a simple protocol for the direct detection of NO (detection limit: 5 nM). Fluorescence detection with visible light excitation and high sensitivity enabled the practical assay of NO production in living cells. These dyes were applied to NO detection from cultured macrophages, which have inducible NO synthase. The macrophages were cultured in a plate reader wells and the extracellular NO production was measured by their fluorescence intensity. These results were successfully shown to establish the basic fundamental of detecting NO from cultured dermatological cells.

1 緒 言

本研究は一酸化窒素 (NO) をターゲットとして、蛍光測定で可視化できるプローブを合成し、生きた状態での分子の作用を明らかにし、生細胞における NO の作用を示すことを目的とする。具体的には、まず、一酸化窒素 (NO) と反応して蛍光特性の変化する蛍光プローブを、分子種の化学反応性に基づいてデザイン・合成する。次に、作成したプローブを用いて生理活性物質をリアルタイムで画像として捉えること (バイオイメーjing) で、動的作用機序の解明を行う。

細胞生物学研究のゴールの1つは生きている状態における分子の働きをその場で明らかにすることである。細胞内での情報伝達物質やその物質を認識する分子が単離され、試験管内での性質が明らかにされるにつれ、次の目標である生理的条件下での機能が重要視されるようになってきた。具体的には、細胞のどこで、いつ、どれくらい情報伝達物質が生成し作用するか？ 情報伝達物質の濃度変化の分布や時間経過が異なるとシグナルの意味が異なるか？ 情報伝達物質のシグナルが細胞内のある一部に対してのみ向けられるか？ 等である。これらの問題点を解決するために

は細胞をすりつぶさないで、生きたまま機能を調べることができれば多くの情報が得られると考えられる。生体内分子を標的として生きたままの状態でも可視化することは、Ca²⁺を測定する蛍光色素の合成より細胞生理学的研究に広く用いられるようになった¹⁾。この成功の理由は、従来電極などで局部的に調べていた生理学的現象が、細胞あるいは組織全体として刻々変化する様子が観察でき新しい情報を得ることが出来るからである。

さて、NO は 1987 年に EDRF であると報告されて以来²⁾、循環系のみならず³⁾、免疫系や中枢系においても⁴⁾、その役割が論じられるようになっていく。この発見が 1998 年のノーベル賞受賞対象になったことは記憶に新しいところである。しかし、その真の活性に関しては未だに議論のあるところで、混沌としているのが現状である。その原因の一つとして、NO が生理的条件下不安定であり、低濃度での放出のために測定が困難であることから、生理的に機能している「生きた」NO の動きを直接捉え、議論することができないことが挙げられる⁵⁻⁷⁾。この状況下、NO の作用解析に有効な検出法という観点から、特異的な検出に向けた分子デザインが可能な蛍光法に基づくことにした。蛍光法に基づく測定法を開発し、バイオイメーjingできれば NO の役割の解明に寄与できると考えた。

蛍光法に基づく方法としては、2,3-diaminonaphthalene (DAN) を用いる NO₂⁻ の測定法が知られていた⁸⁾。申請者らは、NO の反応性を精査したところ、このようなジアミンで NO をダイレクトに測定できることを見出し、新しい測定法を開発した⁹⁾。しかし、DAN をそのまま用いたのでは、様々な化合物をデザイン・合成しつつ検討した結果、ジア



Detection and Functional Analysis of Nitric Oxide on Living Cells Using Novel Fluorescence Probe

Kazuya Kikuchi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

ミノフルオレセイン (DAF 類, Fig. 1) の開発に至った^{10, 11)}。

2 実験

2.1 ジアミノフルオレセイン (DAF) 類の合成

(Fig. 1)

2,3-Dimethyl-6-nitroacetanilide (I)

25.3g の 2,3-Dimethyl-6-nitroaniline を 290mL の酢酸中、15mL の無水酢酸を加え、1h 還流する。溶媒溜去後、EtOH から再結晶。(29.3g, y.98%)

3-Acetamido-4-nitrophthalic acid (II)

29.2g の (I) を 1L の水に懸濁させ、100g の $MgSO_4$ を加え、還流させ、133g の $KMnO_4$ を合計 2L の水に懸濁させながら、小分けにして入れる。熱時ブフナー濾過し、濾液に食塩を飽和させ、冷後 HCl で酸性にし析出物を濾取、濾液は AcOEt で抽出し、溶媒を溜去する。(19.6g, y.52%)

3-Acetamido-4-nitrophthalic anhydride (III)

0.538g の (II) を 10mL の無水酢酸に 80°C で溶かし AcCl 1 mL を加え、2h そのまま撹拌。溶媒を溜去し、少量の無水 CH_2Cl_2 を加え、析出物を濾取。(0.29g, y.58%)

3-Amino-4-nitrofluorescein (IV)

(III) と 2 当量の Resorcinol を 180°C で溶融し、2h 後 0.25 当量の $ZnCl_2$ を加え、210°C で乾燥固化させる。黒い固まりを砕いた後、0.6N HCl を加え、2h 還流。冷後沈殿物を濾取し、乾燥後、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製。(y. 5% 以上)

3,4-Diaminofluorescein

(DAF-1)

(IV) を Na_2S および $NaSH$ の水溶液中、24h 還流し、冷後 HCl で pH4 にし、沈殿物を濾取。乾燥後、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製。(y. 76%) 必要であれば、硫黄を除くため、2N HCl で再結晶した後、NaOH 水溶液に溶かし、再度 HCl で pH4 にし、沈殿物を濾取。

DAF-2、DAF-3 も同様の手順で作成した。

2.2 DAF-2 の NO による蛍光スペクトルの変化の測定

(Fig. 2)

ナトリウムリン酸緩衝液 (pH7.4、

100mM) 中に $10\mu M$ の濃度で DAF-2 を溶かし、 $100\mu M$ の NO 溶液を各最終濃度になるよう添加した。撹拌後、蛍光強度が安定した後、各スリット幅 2.5nm で励起光 (515nm の蛍光測定) 及び蛍光 (495nm の励起光測定) をスキャンして測定した。

2.3 DAF-2 の NO Donor による蛍光強度変化の時間経過の測定 (Fig. 3)

ナトリウムリン酸緩衝液 (pH7.4、100mM) 中に $10\mu M$ の濃度で DAF-2 を溶かし、各濃度の NO 放出生化合物 (NONOate) を添加した。37°C で撹拌後、蛍光強度の時間変化を 495nm 励起、515nm 蛍光において測定した。

2.4 DAF を用いたマクロファージ (RAW 264.7) からの NO の測定

96 穴マイクロプレート上でマクロファージ (RAW 264.7) を 10% FBS、13mM $NaHCO_3$ 、20mM glucose、70mg/mL benzylpenicillin、100mg/mL streptomycin を含む DMEM 中 5%

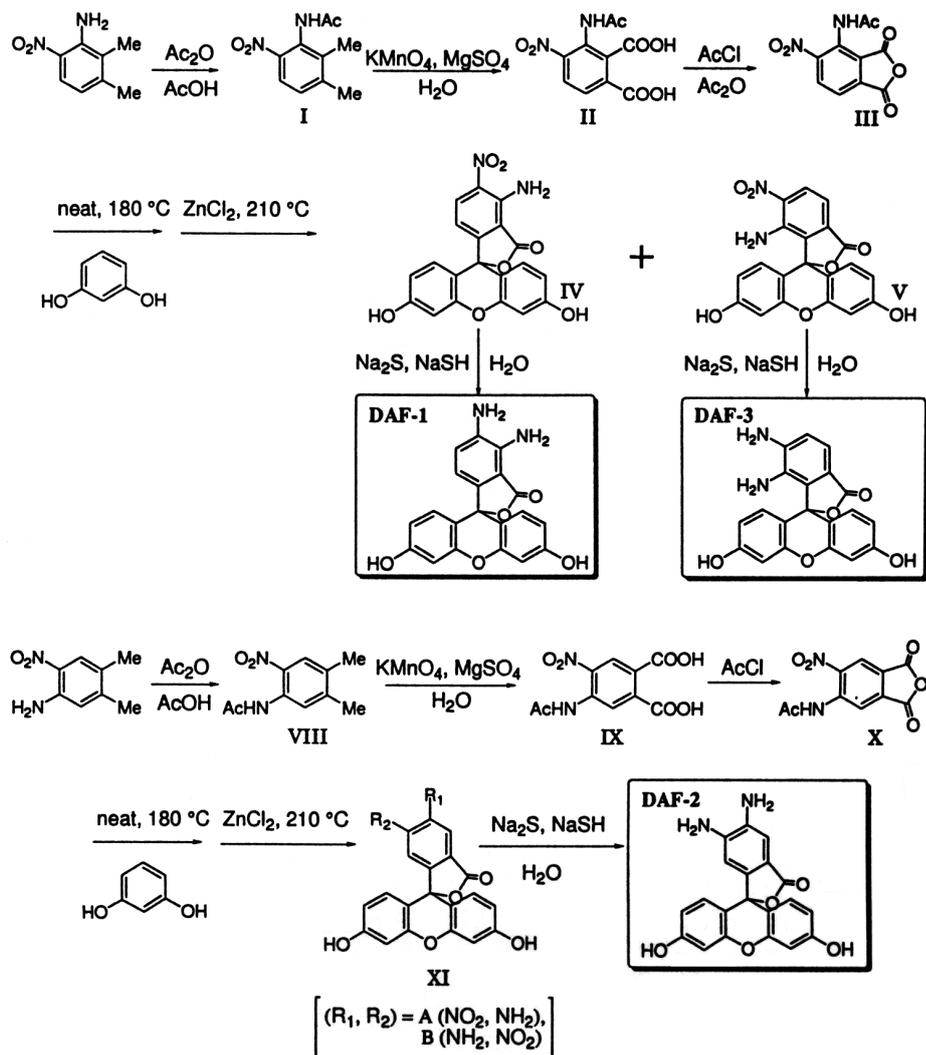


fig. 1 1DAF-1, 2, 3 の合成スキーム

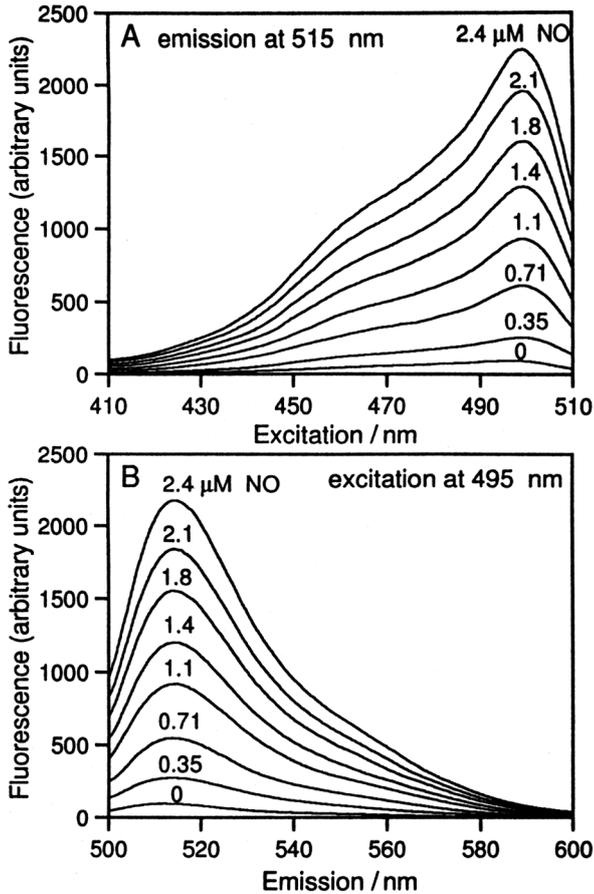


Fig. 2 NO 添加による DAF-2 の蛍光スペクトル変化
(A) 515nm 蛍光測定による励起光変化
(B) 495nm 励起光変化による蛍光変化

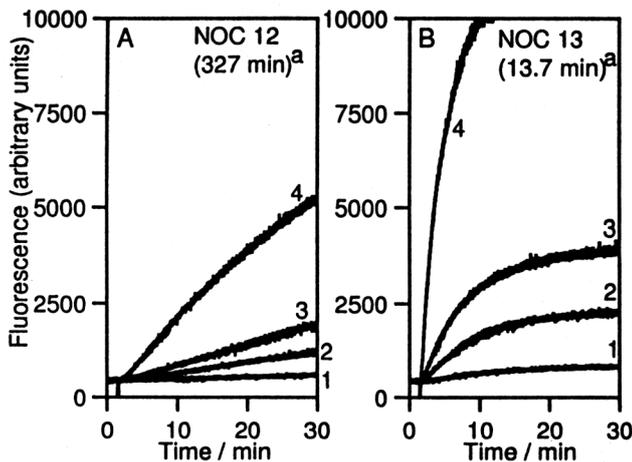


Fig. 3 NONOate から生成する NO による蛍光強度変化
(A) 長寿命型 NOC12 (半減期 327min)
による用 依存的時間経過
(B) 短寿命型 NOC13 (半減期 13.7min)
による用 依存的時間経過

CO₂/95% air incubator にて培養 (37°C) する (1 × 10⁶ cells/well)。

実験の前に無血清の D-MEM に取り替える。24 時間後各種濃度の LPS、IFN- γ を含む DMEM で培養細胞を刺

激し、i-NOS を誘導する。16 時間後、2 回 Krebs Ringer Phosphate (KRP) で洗い、DAF-2 (10mM)、L-Arg (1 mM)、NOS 阻害剤等を溶かした KRP (200mL/well) に取り替えて更に培養する。2 時間後、培養液の上清を蛍光測定用マイクロプレートに取り (180mL/well)、蛍光用マイクロプレートリーダーにて蛍光強度を測定した (Ex.485nm -Em.538nm)。

2.5 血管平滑筋細胞のイメージングの方法

細胞培養：雄性 Wistar ラットの大動脈血管平滑筋細胞を Ross らの方法により摘出し¹²⁾、10% FBS と抗生物質を含む DME 培地で培養する。底がガラス製のシャーレ (MatTek 社 P35G-101) 上に移して培養する。実験の前に無血清の DME 培地に取り替え、24 時間培養後、25 U/mL IL-1 β 、30 ng/mL TNF- α 、150 U/mL IFN- γ 、12.5mg/mL LPS を培地に加え、細胞を刺激し、さらに 12 時間ほど培養する。

実験には 10 ~ 20 代の細胞を用いた。

イメージング：それぞれの色素 (10mM) の KRP 溶液 (0.2% DMSO 含) に細胞の上清を取り替え、37°C で 1 時間ほどかけて色素を負荷する。wash out 後 L-Arg、L-NMMA を含む KRP に取り替え、DAF-2 誘導体の場合、励起フィルター 490nm、dichroic mirror 505nm、バリアフィルター 515nm (long pass) の付いた蛍光顕微鏡 (オリンパス IX-70) で観察する。なおステージは 37°C に保った。露光時間、撮像間隔は DAF-2 誘導体の場合 132ms、30s に設定した。

Charge-coupled device カメラに取り込んだ画像は MCID (Imaging Research 社) で処理、記録した。

3 結果と考察

3.1 NO 検出蛍光プローブ DAF-2 の開発とその化学的性質

申請者はすでに DAN のジアミノ基と NO が特異的に反応してトリアゾール体を生成することを見出したため⁹⁾、プローブをさらに最適化し生体サンプルから容易に NO を測定することを目指した。高感度かつ特異的に NO を検出できる蛍光プローブのデザインにあたり着目した点は、

- 1) 生理的な pH 及び温度で水中において NO と速やかに反応が進行すること
- 2) NO との反応により水中において量子収率が大きく増大すること
- 3) 可視光領域に励起光を持ち光照射により細胞内分子の自家蛍光が無視でき光照射により細胞への傷害が小さいこと

の 3 点である。フルオレセインは 500nm 付近の長波長に励起光を持つ。また、水中でも量子収率が減らず蛍光強度が環境要因によって影響されにくいいため広く生物応用が行

われている。モノアミノフルオレセインは量子収率が小さいことが報告されているが¹³⁾、この理由は電子供与性のアミノ基がフルオレセインのフタル酸部分に入り、キサンテン環とフタル酸部分の両方とも電子供与を行い電子の非局在化が起りにくいためと考えた。この原理を利用し、ジアミノフルオレセイン (DAF) 類を合成すれば量子収率が小さくなり、NO との反応でトリアゾール体を形成してはじめて蛍光強度が強くなることをもくろんだ。これをもとに DAF-1、DAF-2、DAF-3 をデザインし Fig. 1 に示すスキームで合成した。これら 3 つの分子ともそれぞれ自身ではほとんど蛍光を持たなかった。

作成した分子のうち DAF-2 は NO との反応で 100 倍もの蛍光増強が確認された。DAF-2 による NO の検出限界は 5 nM 程度であり、これは DAN に比べ約 30 倍、検出感度が改良されたことになる。NO との反応により、励起波長が 495 nm、蛍光波長が 515 nm (黄緑色) の蛍光が増強し、前述の可視光励起という目標を達成することができた (Fig. 2)。中性のバッファーへの溶解度も良いので、使用濃度の 10 mM で析出することはなく扱いやすい。NO 溶液だけではなく、NO を自然分解により生成する分子 NONOate を用いた場合でも、蛍光強度が時間を追って容量依存的に増強した (Fig. 3)。

pH 変化における蛍光強度の変化を Fig. 4 に示した。DAF-2 とそのクロル化体である DAF-4 について示したが、pH が 6 以下になると蛍光強度は大きく減弱する。この原因はフェノール性水酸基の脱プロトン化であると考えられたため、クロル化体の DAF-4 を合成した。DAF-4 ではフェノール性プロトンの pKa が小さくなったが、中性付近での蛍光安定性が低くなった。この原因はトリアゾール環上のプロトンの脱プロトン化によるものと考えられる。これらの結果より、細胞系の実験では、中性付近での蛍光強度のより安定な DAF-2 を用いることにした。

3.2 培養細胞を用いた NO 検出系の確立

生体サンプルとして、培養細胞から生成する NO を測定した。マクロファージの誘導型 NO 合成酵素 (i-NOS) の発現量は LPS 及び IFN- γ の濃度に伴って増加することが知られている¹⁴⁾。i-NOS は一旦誘導されれば酵素自身の発現量が増加するため、c-NOS とは異なり Ca^{2+} 非依存的に NO を産生し続けるので、LPS 及び IFN- γ の濃度依存的に NO 生成量は増加する。そこで、刺激する LPS、IFN- γ 及び細胞数を変化させてマクロファージを一定時間培養後、DAF を添加し、2 時間後の蛍光強度を測定した。なお、マクロファージは D-MEM 中で培養するのが一般的であるが、培地中のフェノールレッドおよび FBS による蛍光の消光を懸念したため DMEM は用いず、DAF を用いる際には KRP 中に溶解して用いた。

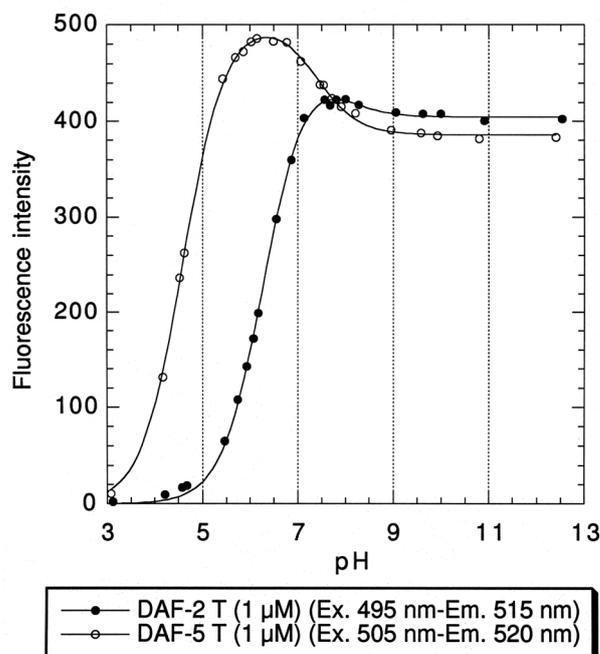


Fig. 4 トリアゾール体の蛍光強度への pH の影響

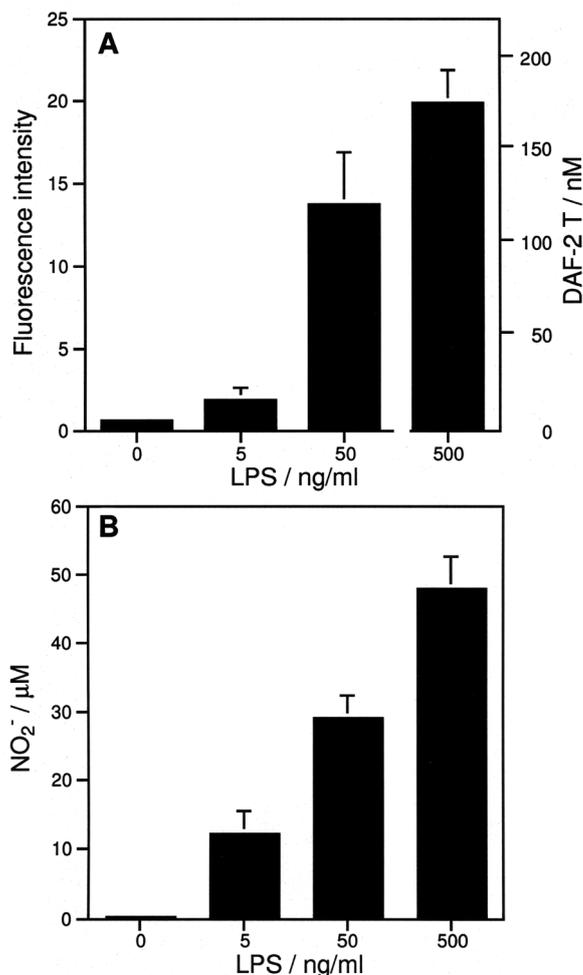


Fig. 5 マクロファージを用いた DAF-2 と Griess 反応による NO 検出の比較

- (A) DAF-2 を用いたマクロファージ (10⁶ cells/well) からの NO 検出。LPS 各濃度による i-NOS 誘導後、L-Arg 刺激 2 時間後の測定
(B) Griess 反応による NO 検出。L-Arg 刺激 48 時間後の培養土清の測定

Fig. 5はIFN- γ を加えない時の蛍光強度の増加率で、細胞数が 10^6 cells/wellと多いものの2時間の培養時間で蛍光強度はLPS濃度依存的に増加した。吸光度法を利用した既存のNO $_2^-$ 測定法であるグリース法でも同様の結果(Fig. 5)であったが、感度が低いため9~40時間の培養時間が一般的には要求される^{15, 16)}。両方法を比較して分かるように、DAFを用いることによってより短時間での簡便な手法によるNO測定が可能となった。

更に、この蛍光強度の増加はIFN- γ の添加によって顕著に増加した。マクロファージにおいてはLPSとIFN- γ を同時に刺激することによって、相乗的にNO産生能が増大することが知られており¹⁵⁾、以上の結果はマクロファージが生成するNOをDAFが捉えていることを示している。

3.3 DAF誘導体を用いたバイオイメーjing

DAFを用いたNO測定法が確立したので、培養細胞内でのNO産生の検出に応用することにした。そこで細胞に局在化のため、DAF-2を誘導化した。

3.3.1 NOイメーjingプローブ (DAF-2誘導体)

のデザイン、合成

細胞膜を透過し、細胞内のエステラーゼにより加水分解を受けるものとしてDAF-2 DAの2つのフェノール性水酸基をアセチル化することでデザイン、合成した(Fig. 6)。Rotmanらはフルオレセインのジアセチル体が細胞の中のエステラーゼにより加水分解を受けることを報告している¹⁷⁾。アセチル体はフェノール性水酸基及びカルボン酸の負電荷がなくなっており、脂溶性のため細胞膜を通過する。通過後、エステルの加水分解により再び電荷を生じ、細胞質内にとどまる。

3.3.2 DAF-2 DAを用いた血管平滑筋細胞の産生するNOのイメーjing

DAF-2 DAは非蛍光性であるため、エステルが加水分解されない限り蛍光を発しない。これを細胞外に加えることで、ラット大動脈由来血管平滑筋培養細胞に適用した。血管平滑筋細胞はi-NOSを有することが知られている。細胞にDAF-2 DAを負荷後細胞を観察すると明らかに蛍光強度は負荷していない細胞よりも強く、エステラーゼによりエステルが加水分解されていることが分かった。

Fig. 7aは刺激によりNOSを誘導した細胞の上清に1 mMのL-Argがあるとときの蛍光強度の経時変化、bはaの増加している後で上清を1 mMのL-NMMAに置換したときの経時変化、cはその後、さらに10 mMのL-Argに置換したときの経時変化、dは1 mMのL-Argに10 mMのL-NMMAを添加したものの、eは無刺激の細胞の上清に1 mMのL-Argを加えたときのものである。aで

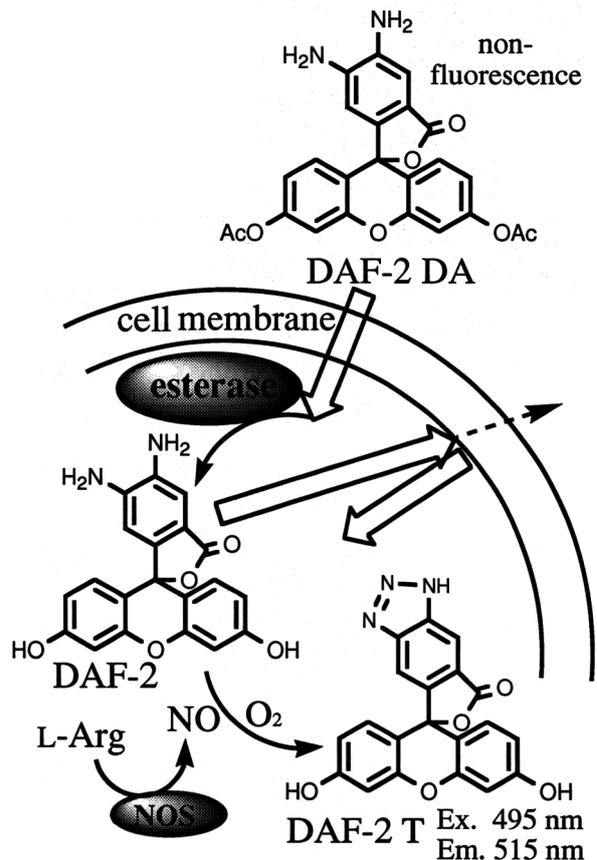


Fig. 6 DAF-2誘導体を用いたバイオイメーjingの原理

は蛍光が増加、dでは最初は阻害剤が効いていない細胞もあるが徐々に増加が止まる、eでは全く蛍光が増加しないという結果になり、NOをDAF-2 DAにより捕らえていることが分かる。bでは蛍光の増加が阻害されていく様子が、cでは蛍光の増加がNOSの基質のL-Argの供給により復活する様子が分かる。この様子をFig. 8に画像として示す。個々の細胞がNO産生により、蛍光を生じるようになる経時変化が示された。

DAF-2が捕らえるのはNO自身ではなく、酸化したNO $^+$ 等価体である。このためNOの持つ薬理作用はブロックしない。この性質はCa $^{2+}$ 等の他の生理活性物質との同時変化を調べるときに有利であると考えられる。

4 総括

NOの特異的蛍光プローブを作成するために、ジアミノベンゼン誘導体(DAF類)をデザイン・合成した。このうちDAF-2は感度、蛍光波長ともに最適であり生体サンプルから発生したNOを測定するために有用であった。生体サンプルとして誘導型NOSを持つマクロファージを用いた結果、細胞外に放出されたNOを蛍光強度変化として捉えることに成功した。細胞内に細胞無侵襲に加えることのできるDAF-2の誘導体を合成し、細胞内のNOの産生

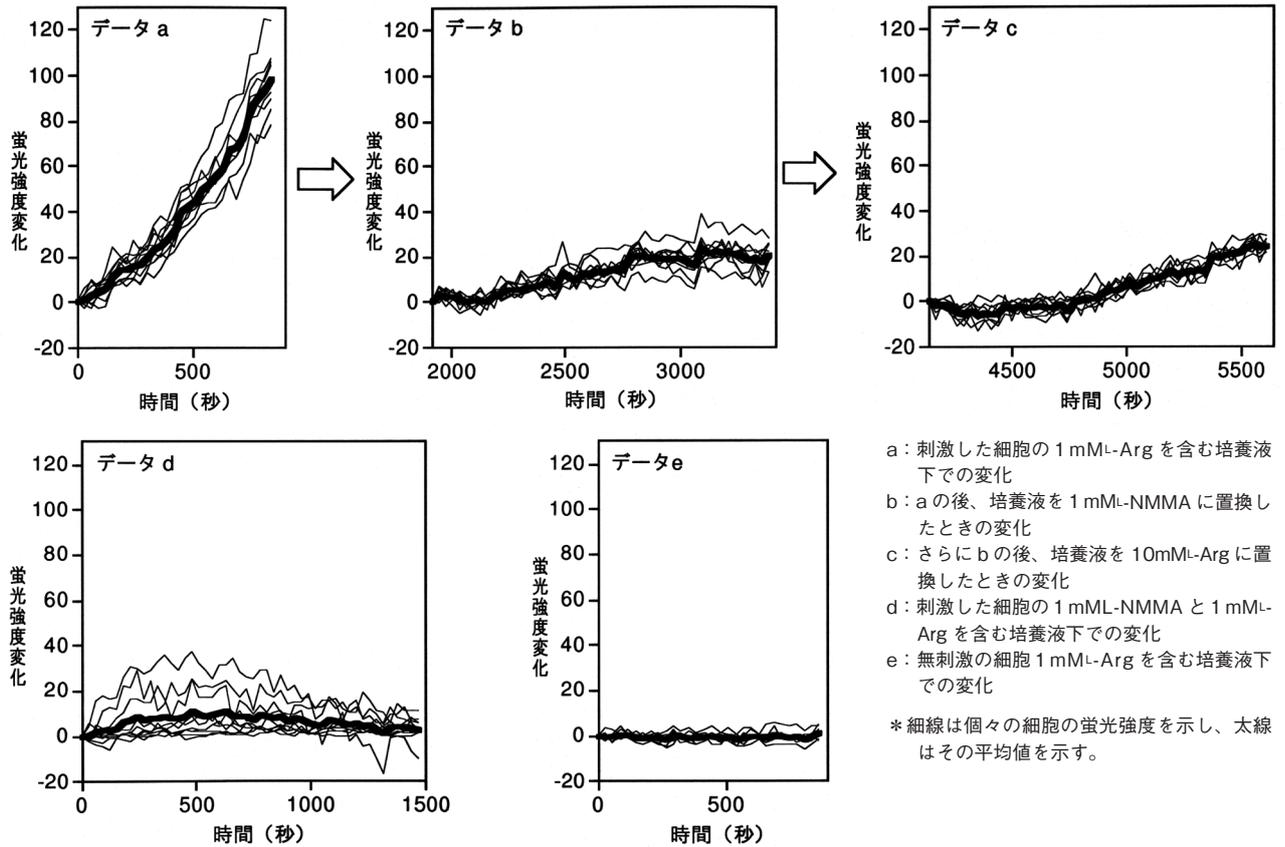


Fig. 7 各条件下における個々の血管平滑筋細胞の蛍光強度変化

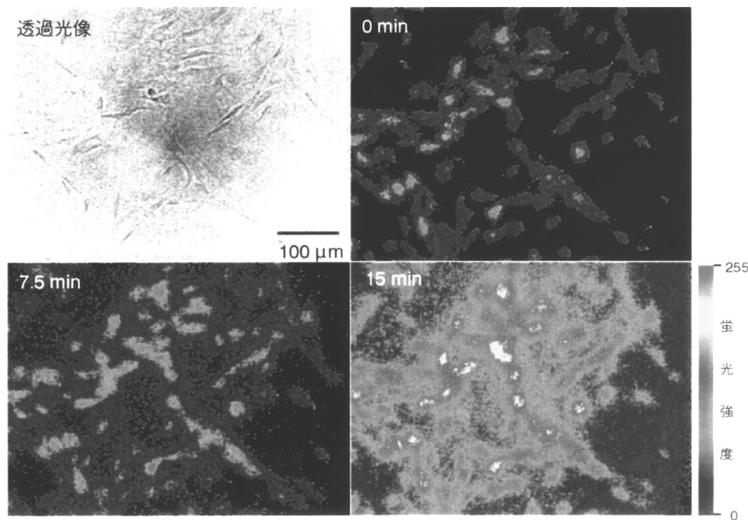


Fig. 8 ラット大動脈血管平滑筋細胞が生成する NO の可視化

を画像化することに成功した。これらの結果は、種々の培養細胞や組織に応用が可能であると考えられ、皮膚細胞及び組織の NO 産生機構を明らかにする上での基盤的研究である。

(参考文献)

1) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved

fluorescence properties, J. Biol. Chem., 260, 3440-3450, 1985.

2) Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, Nature., 327, 524-526, 1987.

3) Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, et al.: Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric

- oxide is an intermediate, *Biochemistry*, 27, 8706-8711, 1988.
- 4) Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH; Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide, *Nature*, 347, 768-770, 1990.
- 5) 長野哲雄, : NO の検出・測定法. NO 化学と生物, 日本化学会編, : 季刊化学総説, 30, 学会出版センター, 東京, 1996, 79-86 頁.
- 6) Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, et al., : Real time measurement of nitric oxide production ex vivo by luminol-H₂O₂ chemiluminescence method, *J. Biol. Chem.*, 268, 23106-23110, 1993.
- 7) Kojima H, Kikuchi K, Hirobe M, et al. : Real-time measurement of nitric oxide production in rat brain by the combination of luminol-H₂O₂ chemiluminescence and microdialysis, *Neurosci. Lett.*, 233, 157-159, 1997.
- 8) Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, et al., : A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples, *Anal. Biochem.*, 214, 11-16, 1993.
- 9) Kojima H, Sakurai K, Kikuchi K, et al., : Development of a fluorescent indicator for the bioimaging of nitric oxide, *Biol. Pharm. Bull.*, 20, 1229-1232, 1997.
- 10) Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, et al., : Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins, *FEBS Lett.*, 427, 263-266, 1998.
- 11) Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, et al., : Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins, *Anal. Chem.*, 70, 2446-2453, 1998.
- 12) Ross R, Glomset J, Kariya B, et al. : A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 1207-1210, 1974.
- 13) Munkholm C, Parkinson DR, Walt DR, : Intramolecular fluorescence self-quenching of fluoresceinamine, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 2608-2612, 1990.
- 14) Lorbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, et al., : Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide, *J. Biol. Chem.*, 268, 1908-1913, 1993.
- 15) Gross SS, Levi R, : Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, 267, 25722-25729, 1992.
- 16) Lewis RS, Tamir S, Tannenbaum SR, et al., : Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages in vitro, *J. Biol. Chem.*, 270, 29350-29355, 1995.
- 17) Rotman B, Papermaster BW, : Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 55, 134-141, 1966.

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

慶應義塾大学 医学部

田 中 勝

A computer assisted area of involvement measurement of skin lesions would be useful for the assessment of psoriatic patients. It is, however, sometimes difficult when lesions cannot simply be separated using the normal threshold tool of an image analyser. Because of the body curvature, the peripheral site of the body is usually shaded and the central site has glare. Shade correction is usually performed by use of the brightest point or the darkest point choosing programs in the small kernel basis, such as 5×5 or 9×9 . However, when the objectives are large such as psoriatic lesions, the procedure will have to be repeated several times. To avoid this repetition and to obtain a well fit curved line to account for the body curvature induced glare and shadow, we have devised a simple C-program for averaging from linear neighbouring pixels.

We used an Optomax V image analysis system and Image Pro Plus. An image from a patient with psoriasis was captured from a colour slide through a video camera attached to the system. Turbo C++ Ver 1.01 (Borland) was used for programming and compiling. First, 49 pixel moving point average was programmed. The image data were read line by line and the new grey level data for the averaged image were calculated. Secondly, the program written above was developed into the program for n pixels ($3 < n < 499$, n ; odd number).

Execution of the pixel averaging program with the original image resulted in the background brightness image file. When this was subtracted from the original image, Optomax produced an image which was easily detected using the standard thresholding tool and the percentage of area involved was calculated.

The pixel averaging was used in this study, because the size of the lesions was relatively small. If the plaque of the psoriatic lesion is very large, planimetry might be a better method. These methods are accurate enough to measure the area of lesions for assessment of disease severity.

We further applied the method to measure skin lesions in patients with pemphigus. The programs were run with images and the processed images were analyzed with an image analyzer, Image Pro Plus. The processed images were compared with the original images and shown to correspond to most of the lesions, which included blisters, erosions and erythemata. It was more difficult in pemphigus than in psoriasis, because the lesions in the former consist of new and old skin lesions and of more polymorphous lesions. Although there still are some difficulties in detecting polymorphous lesions, this method would be a useful and powerful tool when considering the statistical relationship, for example, between severity and ELISA titers for Desmogleins 1 and 3.

1 緒 言

皮膚病変の定量方法には、熱傷範囲を概算する、“9”の法則による方法、塩ビシートを用いてトレースする方法、画像解析を用いる方法などがある。しかし、測定者によるばらつきが大きかったり、手技が煩雑であるなど、問題は多い。通常、皮膚病変の重症度や改善度は主治医の主観や、その都度定義された項目によって、便宜上、分けられることが多い。著者らは、画像処理プログラムを開発し、コンピュータ上で皮膚病変を自動定量する方法を報告してきた¹⁻³⁾。しかし、これらのプログラムも個々の症例ごとに条件を変えねばならず、いまだ完全に自動定量するには至っていない。画像解析上の主な問題点はコントラスト、境界部の判定、影による画像の濃度偏りなどである。これらのすべてがある程度解決しないと自動定量は困難となる。

今回これらの問題点を解決するため、陰影補正プログラムの開発と適応、新しいイメージアナライザーを利用したエッジ部の判定、色分析、画像の背景の平坦化を行いさまざまな皮膚病変の定量を試みた。分析定量には、まず紅斑を主体とする病気である尋常性乾癬の患者の画像を用いたが、色素沈着などの病変に応用するため、多様性のある皮膚症状を有する紅斑性天疱瘡にも応用した。

本研究の最終的な目的は、画像処理解析法を応用して、色素沈着性皮膚病変の面積および色の自動定量化をおこない、色素沈着の程度や治療効果を判定するための客観的な指標をつくること、および老化に関連した色ベクトルの変化を定量的に解析することである。

2 実 験

まず初めに、皮膚病変を定量化するのに必要な解析プログラムが、確実に病変部の辺縁を認識し、オリジナルの病変を検出していることをイメージアナライザー上で確認した。紅斑性病変において、著者らが開発したプログラム (Figure 1) を実行し、画像処理したものを用いて画像解析定量化を行った。

次に、慶応病院皮膚科における色素沈着を伴う皮膚疾患の臨床写真を収集し、デジタル画像に変換、JPEG形式



Basic research for the development of automatic image analysis system on skin pigmentation due to ageing

Masaru Tanaka

Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

```

#include <stdio.h>
main()
{
    char    Header[94];
    unsigned char    GreyLevel[721];
    int    greylevel[720];
    float    newgreylevel[720];
    int    retgreylevel[720];
    unsigned char    NewGreyLevel[721];
    int    loopcount;
    long    loop;
    int    i;
    int    ip;
    FILE    *infile;
    FILE    *outfile;
    char    FName[20];
    char    fname[20] = "masnew.dat";
    printf("Input odd number of pixel for average (3-499) : ");
    scanf("%d",&ip);
    printf("Welcome to %d pixels averaging program!\n",ip);
    printf("\nInput an image file name : ");
    scanf("%s",FName);
    infile = fopen(FName, "rb");
    fseek(infile,0L,SEEK_SET);
    fread(Header,sizeof(Header)-1,1,infile);
    Header[93]='\0';
    outfile = fopen(fname,"a+b");
    fwrite(Header,sizeof(Header)-1,1,outfile);
    for(loop = 1; loop < 561; loop ++ )
    {
        fseek(infile,(loop-1L)*720L+93L,SEEK_SET);
        printf("\nSeeking to : %ld",ftell(infile));
        fread(GreyLevel,sizeof(GreyLevel)-1,1,infile);
        GreyLevel[720]='\0';
        for(loopcount = 0; loopcount < 720; loopcount ++ )
        {
            greylevel[loopcount] = (int)GreyLevel[loopcount];
        }
        newgreylevel[0] = greylevel[0];
        for(i = 1; i < (ip+1)/2; i ++ )
        {
            newgreylevel[i] = ((2*i-1)*newgreylevel[i-1]+greylevel[2*i-1]+greylevel[2*i])/(2*i+1);
        }
        for(i = (ip+1)/2; i < (1441-ip)/2; i ++ )
        {
            newgreylevel[i] = (ip*newgreylevel[i-1]+greylevel[i+(ip-1)/2]-greylevel[i-(ip+1)/2])/ip;
        }
        for(i = (1441-ip)/2; i < 720; i ++ )
        {
            newgreylevel[i] = ((1441-2*i)*newgreylevel[i-1]-greylevel[2*i-721]-greylevel[2*i-720])/(1439-2*i);
        }
        for(i = 0; i < 720; i ++ )
        {
            retgreylevel[i] = (int)newgreylevel[i];
        }
        for(i = 0; i < 720; i ++ )
        {
            NewGreyLevel[i] = (char)retgreylevel[i];
        }
        NewGreyLevel[720]='\0';
        fwrite(NewGreyLevel,sizeof(NewGreyLevel)-1,1,outfile);
    }
    /*Close the file*/
    fclose(infile);
    fclose(outfile);
    printf("\nThe output file is 'masnew.dat'\n");
}

```

Figure 1 The computer program to calculate averages of grey levels from n pixels in the neighbourhood

の圧縮ファイルとして、フロッピーまたは光磁気ディスク (MO) に保存した。これらの画像を著者らが開発したプログラムで処理できるよう、プログラムの移植を行い、さらに、ウィンドウズ 95 上で実行できるよう、また、Photoshop ver. 4.0 for Windows の画像ファイルを読み込めるようにプログラムをインストールした。これにより、著者らが開発したプログラムと新しいイメージアナライザーの両方を同じ画像ファイルに対して使うことができるようシステム

の環境を設定した。画像は、まず横 720 ピクセル、縦 560 ピクセルの画像として photoshop 上で白黒の raw data として保存し、著者らの開発したプログラムを実行できるよう、93 bytes の header を付加した。これらを用いて、さまざまな色素沈着性皮膚疾患の面積、色の定量化を試みた。

最初に用いた疾患は尋常性乾癬であり、ここでは主として紅斑部の面積定量を試みた。次に、より多様性のある病変を有する天疱瘡の画像定量を試みた。

3 結果

研究代表者らは画像解析により、乾癬の病変定量を行うためのプログラムの開発をし、患者の臨床写真の撮影状態を補正し、紅斑面積の画像解析による自動的定量に成功した。これらを用いて、皮膚病変を画像解析法によって定量化したところ、エッジ部の検出、紅斑性の病変定量については、ほぼ、オリジナルの病変を反映する結果が得られた (Figure 2 a-e)。すなわち、オリジナルの臨床写真においては体の側面に近づくにつれて陰影が強くなり、このため、単純な画像の2値化を行うと、病変部と側面健常皮膚がほぼ同じ明るさであるため、影の大部分を病変として認識してしまう。このオリジナル画像を水平方向49画素を平均化するプログラムにて処理し、オリジナル画像から引き算をすると、ほぼ背景の明るさが平坦化した画像に変換される。これを2値化すると、イメージアナライザーが影の部分を認識することなく病変部のみを定量することができる。

色素沈着性病変においては、ほぼオリジナルの画像を描出できたものの、一部色素沈着の程度が2段階に変化している部分などで、若干読みとられなくなる部分がみられた (Figure 3 a-e)。すなわち、大きめの色素沈着において、辺縁部が淡褐色、中心部が濃褐色の部位では辺縁部の淡褐色の部分が欠落し、中心部の色の濃い部分のみ、病変として、認識された。また、バックグラウンドの色が完全に黒でないため、平均化の過程で、側面の陰影部とバックグラウンドが相互作用を生じ、一部の影の部分も病変として認識されてしまった。したがって計測前にマニュアルで修正を行う必要性が生じた。完全に自動定量するためにはこれを解決する方法が、必要と思われた。

天疱瘡の皮膚病変定量においては、症例によりうまくいくものと、かなり大きな誤差を生じるものに分かれた。紅斑以外に落屑、びらん、色素沈

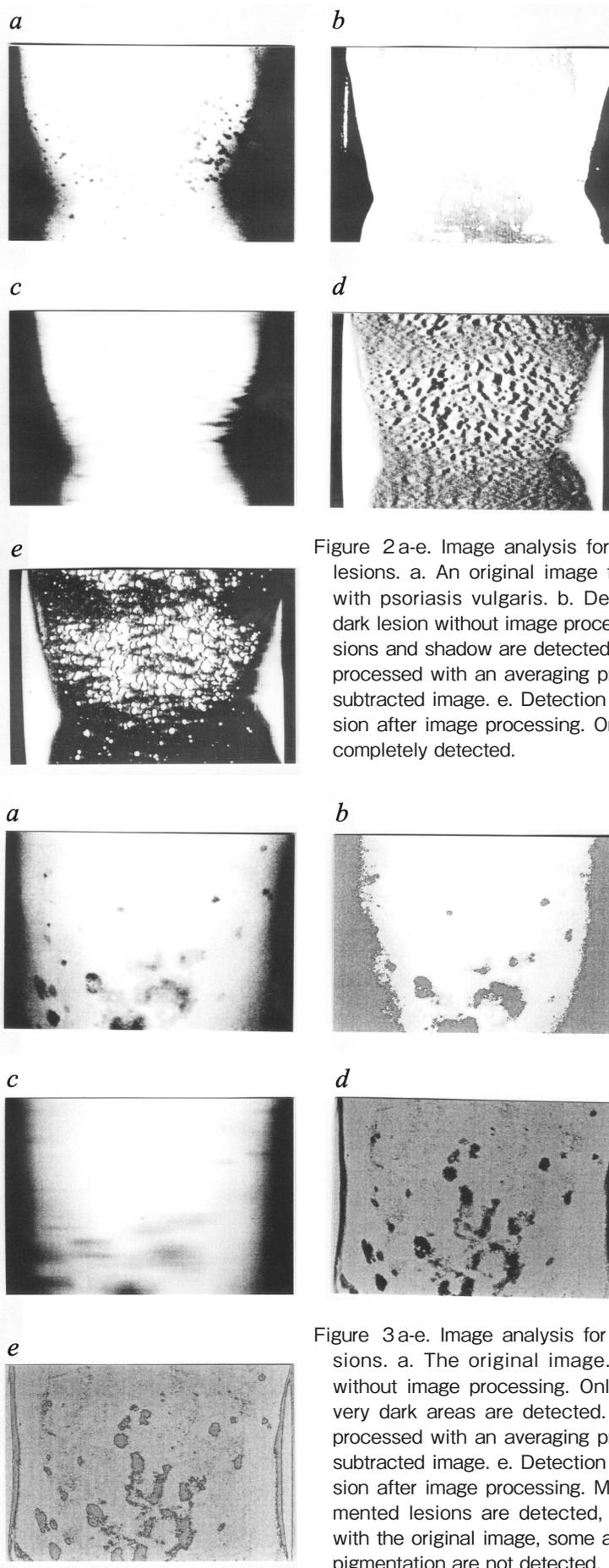


Figure 2 a-e. Image analysis for erythematous lesions. a. An original image for the patient with psoriasis vulgaris. b. Detection of the dark lesion without image processing. Both lesions and shadow are detected. c. The image processed with an averaging program. d. The subtracted image. e. Detection of the dark lesion after image processing. Only lesions are completely detected.

Figure 3 a-e. Image analysis for pigmented lesions. a. The original image. b. Detection without image processing. Only shadow and very dark areas are detected. c. The image processed with an averaging program. d. The subtracted image. e. Detection of the dark lesion after image processing. Most of the pigmented lesions are detected, but compared with the original image, some areas with light pigmentation are not detected.

着などが混在する病変においては目標をどの色に置くかで、定量に大きな違いを生じることがわかった。紅斑部を主として認識させる設定においてはびらん部や濃い色素沈着部は同時に認識されたが、淡い色素沈着部は検出されなかった (Figure 4 a-c)。今後自動定量するには、いくつかのカラーセグメントに分けたり、病変を区切って定量するなどの方法を考える必要があると思われる。

4 考察

病変を正確に描出するためには、やはり、オリジナルの写真の出来に大きく依存する部分がある。人間のからだは丸くできているため、常に写真の辺縁部には影ができやすい。フラッシュや照明を工夫することも必要であるが、自ずから限界がある。できあがった写真を最大限に生かすためには、画像処理を用いた、画像の明るさの平坦化が必須である。著者らは、オリジナル画像の病変の大きさにより、水平方向に平均化するピクセル数を変えることのできる平均化プログラムを開発した。これにより、ちょうどからだの丸みを横方向にのみ平均化するという非常にシンプルな画像処理による陰影補正が可能となった。プログラムが簡単なため、その実行にはほとんど時間がかからず、また使用メモリーも少なく済む。このプログラムは、比較的小さな病変が多数存在し、その融合傾向が少ないときに特に有用であった。

欠点としてはやはり、病変が多様化した場合に単純な平均化だけでは病変認識率が低下し、一部にマニュアルでの修正の必要性を生じた点である。また、バックグラウンドは黒い反射の少ない暗幕などの布を用いるのが適切であると思われる。コントラストはコンピュータ上である程度までは修正可能であったが、その分雑音も拾ってしまうため、あとからフィルター処理が必要であった。紅斑性病変を撮影するときは黄色またはグリーンフィルターをカメラに装着してから撮影することで、よいコントラストの写真が得られた。目標とする病変の色により、撮影時に使用するレンズのフィルターを変えることが、コントラストを上げるために必要であると思われる。

多様性のある病変定量には、さらなるプログラムの開発が必要であると思われる。すなわち、まず、色によりいくつかのセグメントに分けるプログラムそのセグメントごとに定量を行うことができるようなプログラムなど、複数のプログラムの統合が必要かもしれない。これらについては今後の課題といえよう。

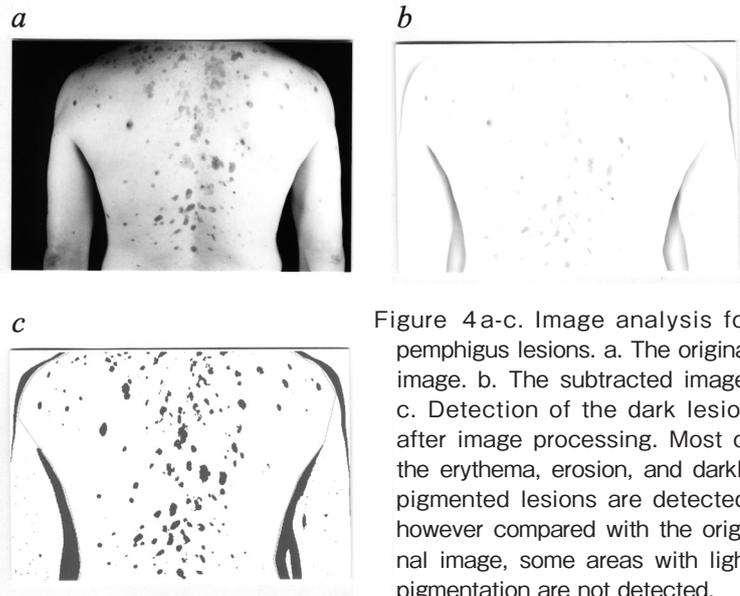


Figure 4a-c. Image analysis for pemphigus lesions. a. The original image. b. The subtracted image. c. Detection of the dark lesion after image processing. Most of the erythema, erosion, and darkly pigmented lesions are detected, however compared with the original image, some areas with light pigmentation are not detected.

5 総括

本研究の実現により、今まで難しかった病変定量の方法が一般化され、治療効果判定や重症度判定を客観的にこなうことができるであろう。たとえば、新しいタイプの化粧品を開発したときの効果を判定するための基準を数値により明確にできるという点で、きわめて実用的な意義が大きいと思われる。また老化に伴う皮膚の色調や凹凸の変化を客観的に数値で判定することができれば、それらをカバーするような化粧品の開発にも応用できる可能性があると思われる。

しかしながら、コンピュータ上の処理には限界があるため、やはり、まず撮影条件を最適にする必要があり、特にフラッシュや撮影ランプ、反射を防ぐための偏光フィルター、コントラストを上げるためのカラーフィルターを使用することが重要である。また、複数の写真を経時的に撮影していき比較する場合の撮影条件の統一が必要である。このような条件の統一は比較していく場合には最も重要な点である。そのためには同じ場所で撮影すること、被写体を同じ場所にたたせること、カメラマンが同一の場所で、同一の構えで撮影すること、などが求められる。

6 今後の研究

画像解析のための基本的なデータは今回の実験で多く得られた。今後はいろいろな症例に応用したり、健常人でのデータを集めて比較していくことが有用ではないかと思われる。また、人形などのモデルを使うことにより、照明の問題を少しでも解決して、よりよい画像を得られるような撮影条件をそろえることも必要ではないかと考えられた。

集めたデータを集計し、疾患による色ベクトルの違い、経過に伴う面積および色ベクトルの変化を定量し、統計学

的に解析する。

解析した結果を用いて、新たな症例の主成分分析、判別分析を行い、得られたデータを用い、特に老化に伴う色素沈着性皮膚病変の画像診断法の有用性を検討する。

さらに、健常部の色ベクトルに関しても年齢との相関関係を求め、最も老化との関連が高いと考えられるベクトル量を設定する。

(参考文献)

1) Tanaka M, Edwards C, Marks R: Methods to improve

area of involvement measurement by image analysis in psoriasis. *J Invest Dermatol* 105: 497, 1995.

2) Tanaka M, Edwards C, Gaskell S, et al.: An efficient method for shade correction in the image analysis of psoriatic lesion. *Br J Dermatol*, 134: 591, 1996.

3) Tanaka M, Edwards C, Gaskell, et al.: The usefulness of computer programs for shade correction in the image analysis of psoriatic lesions. *J Invest Dermatol*, 109: 457, 1997.

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

東京理科大学 基礎工学部

鈴木 高 広

Antimicrobial activity and the biocompatibility of titania were investigated using glass plates and beads coated with the photocatalyst. The activity of photocatalyst was stepwise regulated by the thickness of titania layer on the surface of soda-lime glass plates. Time-dependent growth profiles of *E. coli* cultured on the glass plates showed that the viability decreased due to the photocatalytic reaction induced by UV radiation. On the other hand, the UV absorption by titania powder was found to be effective on decreasing the damages for microbial cells. Similarly, the medium components including serum proteins for tissue culture of epithelial cell line were effective on protecting cells from the damages by UV radiation. These results suggested that the UV absorbent reaction is effective on protection of cells rather than damaging by the photocatalytic reaction.

1 緒 言

二酸化チタンの光触媒作用による環境浄化と抗菌技術が注目されているが、抗菌および滅菌効果を定量的に評価する技術が十分に確立されていないことが、光触媒技術の実用化において障害の一つとなっている。従来の無機系抗菌剤の多くは無機担体に銀を主剤、および銅、亜鉛を副剤として混入し、これらの金属イオンが徐々に溶出することにより、微生物の細胞膜を損傷したり電子伝達系を阻害することが知られている。一方、銀担持リン酸ジルコニウムは、結晶構造に組み込まれた銀イオンが光照射下で活性酸素の生成を促進し、殺菌作用が得られる¹⁾。同様に、二酸化チタンの光触媒作用による殺菌効果も活性酸素の生成に依存した反応であることが知られている^{2,3)}。二酸化チタン (n 型半導体) にそのバンドギャップ以上のエネルギーをもつ光を照射すると、伝導体に電子が、価電子帯に電子の抜け殻である正孔が生じる。この電子、正孔を半導体表面に取り出し、表面接触物質と反応させることで、二酸化チタン表面で酸化と還元との両反応が進行する。水や酸素が吸着した場合の酸化、還元反応は次のように考えられている⁴⁻⁶⁾。



このとき生じるヒドロキシラジカルやスーパーオキシドイオンなどの活性酸素や正孔が接触分子と反応する。二酸化チタンの正孔の酸化力はオゾンよりも強く、たいいていの有機化合物を水と二酸化炭素にまで分解することができる。

このような無機系抗菌剤の抗菌効果試験方法としては、

Effect of Photocatalytic Reaction on the Biocompatibility of UV Absorbent Titania

Takahiro Suzuki

Department of Biological Science and Technology, Science University of Tokyo



銀系無機抗菌剤研究会がフィルム密着法を用いた試験方法を規格化し、抗菌剤や抗菌製品の評価指標としている。そこで、このフィルム密着法に基づき酸化チタン材料の抗菌効果を評価する試験方法を検討した。酸化チタンの光触媒の抗菌作用を医療・衛生機器や環境浄化に利用するための研究は、近年活発に行われており、通常は、数時間の光照射による微生物の生菌率の変化を計測することによって比較検討されている⁷⁾。しかし、多くの細菌の比増殖速度は15分～1時間以内であることから再現性が乏しく、迅速な定量的評価技術の確立が望まれている。

二酸化チタンは、歯磨き粉の添加剤や食品添加物としても利用されるほど安全性の高い物質であるとされており、その紫外線吸収効果により化粧品の添加剤としても利用されている。大気汚染によるオゾン層の減少により紫外線が強まり皮膚癌の増加が危惧されており、紫外線吸収効果をもつ二酸化チタンは、紫外線から皮膚を保護する目的で化粧品の添加剤として用いられている。しかし、屋外における化粧品としての使用においては、二酸化チタンによる紫外線の吸収に伴い上述のように活性酸素の生成が避けられず、このような光触媒剤に接している皮膚組織に影響を与えることも危惧される。従来このような皮膚組織に対する光触媒作用の影響は十分な検討が行われてこなかったのが現状である。そこで、上記の抗菌性評価試験方法に基づき、二酸化チタンによる光触媒作用が皮膚組織に対する影響を解析するための評価試験方法も検討した。二酸化チタン材料が光照射下で皮膚組織に与える影響を明らかにするために、組織培養において細胞の生育と損傷に与える影響を定量的に測定する試験方法を検討し、さらに細胞炎症のメカニズムを解明することを試みた。皮膚に接する化粧品成分が、光照射下で直接的あるいは間接的に影響を与えていることは現実的であり、組織培養によりその影響を再現することが可能となれば、より生体に安全で生体保護作用を持つ化粧品や生体移植材料の開発と評価に役立つ。また、個体差や再現性に問題がある動物実験の代替試験法としても

有望である。

以上の背景に基づき本研究ではこれまでに、二酸化チタンの抗菌性を迅速に評価するための試験方法を検討し、その結果に基づき組織培養で二酸化チタンの光触媒反応の影響を解析する方法を検討した。

2 実験

2.1 抗菌性評価試験

2.1.1 検定用菌液の調製

検定用菌株には E.coli W3110 株を用いた。前培養には基本培地として、ラクトトリプトン;10g/L, 酵母エキス; 5g/L, NaCl; 5g/L, pH;7.0 に調製した培地を用いた。この基本培地 10mL を試験管に取り、120℃で15分間オートクレーブ滅菌したのち、冷蔵保存した寒天培地スラントから1白金耳を接種し、37℃で12時間振盪培養した。前培養時の菌体増殖は濁度計を用いて610nmの濁度が約1.0に達した時点で培養を終了し、回収した菌液を基本菌液とした。この時点で菌数は約 10^9 cells/mLに達した。光照射試験には、この菌液をさらに希釈し $10^5 \sim 10^7$ cells/mLに調製し、初期菌数の影響を比較した。この基本菌液の希釈には、基本培地を100倍に希釈した培地(希釈培地)を用いた場合と、蒸留水を用いて希釈した場合を比較した。

2.1.2 スライドガラス試験法

チタンのイソプロポキシドからチタニアゾルを調製し、ディップコーティングによりスライドガラス(76×26×1mm)面上に二酸化チタンの薄膜を形成した。乾燥の後、焼成する工程の回数により3, 5, 10層のTiO₂薄膜を用意し試験片とした。

図1に試験装置の概略図を示す。各スライドガラス面へ試験用菌液を100μL塗付し、この菌液をカバーガラスで覆い、図に示すように2本の紫外線ランプ(UV; 10W)または蛍光灯(10W)の中間の位置に置き、UVまたは蛍光灯で一定時間照射したのち菌液を回収し、寒天培地上で1日後のコロニー数(CFU)を調べた。光照射時のスライドガラス面の乾燥を防ぐために、シャーレをポリエチレンフィルムで蓋をするとともに、シャーレ内には無菌水を満たした。また、短時間での光触媒作用を解析するために、光照射時間を1, 3, 5, 10分間と設定した。

スライドガラス試験法では初期菌体濃度を約 6×10^5 cells/mLに設定した。光照射後は、無菌蒸留水1.9mLで洗浄しすべての菌液を回収し、光触媒作用による生菌数の変化を比較した。

2.1.3 ガラスビーズ試験法

光触媒作用による空間的な連続接触滅菌効果を解析するために、図2に示す振盪攪拌フラスコ(容積500mL)にUVランプ(6W)を挿入した光触媒反応試験装置を用

いて実験を行った。スライドガラスへのTiO₂コーティングと同様に、ガラスビーズ(φ3mm)に10層のTiO₂をコーティングした試験材料、および、シリカゲルビーズ(φ3mm)にTiO₂をコーティングした試験材料を使用した。振盪フラスコへ各試料100ccを添加し、試験用菌液を200mL加え、室温(約20℃)で光照射しつつ160rpmで往復振盪を行った。光照射時間が5, 10, 20, 30分間に達した時点で、サンプル液を少量抜き取り、適宜希釈し寒天培地でCFUを計測した。この攪拌式滅菌試験では、菌株にE.coliと一般細菌の混合菌液を使用し、それぞれ初期菌体濃度は約200cells/mLおよび2000cells/mLに設定した。また、菌体分散液には発酵廃液(廃糖蜜, コーンステイプリカー培地)を蒸留水で100倍希釈した水溶液を使用した。

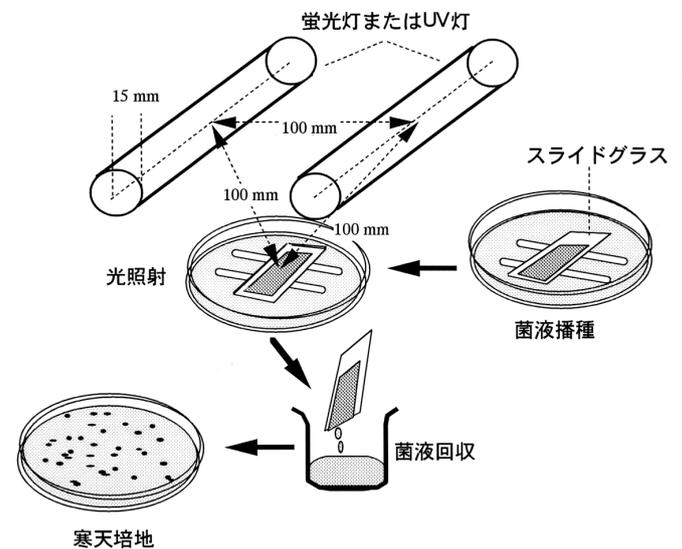


図1 スライドガラスを用いた光触媒反応実験の操作手順

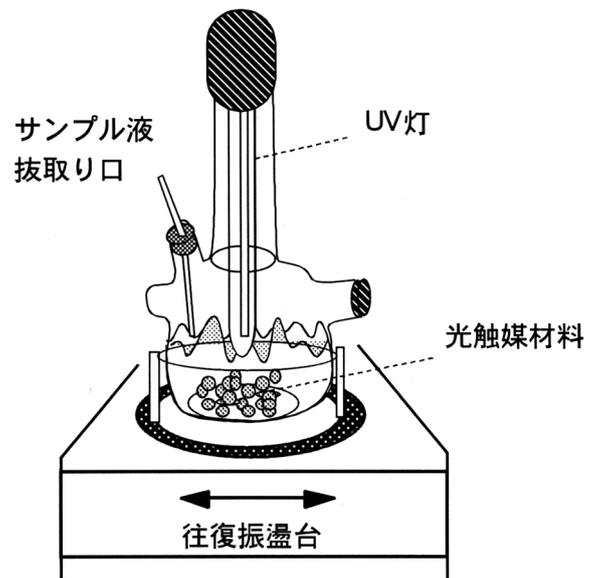


図2 振盪フラスコを用いた光触媒反応実験装置

2.1.4 ガラスビーズ試験法

各種酸化チタン材料による細胞損傷レベルを定量的、且つ迅速に評価する条件を検討するために、ヒト口腔類表皮癌由来の上皮系KB細胞を用いた。抗菌性試験に用いたTiO₂スライドガラス上にKB細胞を播種した後、シャーレ内の培地に浸漬し5% CO₂ インキュベーター内で静置培養した。培地には牛胎児血清を10%添加したMEM培地(10% FBS/MEM)を使用し、24時間静置培養した後、培地を除去し、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄後、図1に示した実験装置を用いて、蛍光灯またはUVランプで一定時間光照射し、細胞の生育へ与える影響を比較した。

3 結果

3.1 スライドガラス抗菌性評価試験

試験菌液の条件、培地条件、および播種菌数の影響を検討したところ、通常の前培養操作では菌の生育活性が不均一なため、光触媒反応の抗菌効果を定量的に評価することが困難であった。そこで、対数増殖期の前培養液を回収し分注液を-80℃に保存し、冷凍菌液を各試験毎に融解し、そのまま希釈して使用することで再現性の良い結果が得られることがわかった。また、LB培地で希釈した菌液を使用すると光照射中に増殖が進み、抗菌効果を得るまでに数時間の照射を要するとともに、試験液の乾燥や温度変化が大きく影響することがわかった。そこで、蒸留水を希釈に用いるとともに、乾燥を防ぐ方法を検討したところ、コーティング層に依存した生菌率の変化が10分間の光照射時間により定量的に再現性よく得られることがわかった。

このようにして最適化した実験条件下で行ったスライドガラス試験法における、光触媒反応による抗菌性試験の結果を図3に示した。初期菌体濃度を約 6×10^5 cells/mLに設定した場合に光照射後の回収液中の菌体濃度は約 3×10^3 cells/mLとなり、図に示すようにTiO₂のコーティング層数に依存して殺菌効果に変化した。図4には各死滅曲線から計算した死滅速度定数をまとめた。その結果、UV照射の場合にはTiO₂ 5層の場合に死滅速度がほぼ最大に達したが、蛍光灯の場合には、コーテ

ィング層数に依存して死滅効果が高まることがわかった。比較のためにTiO₂スライドガラスを用いて乳酸の分解を試みたところ、図5に示すように反応初期にはTiO₂層による分解反応が顕著であるが、徐々に反応性が低下し、TiO₂層数の差の影響も見られなくなった。これらの結果は、TiO₂層の表面へ乳酸の分解生成物が蓄積したことを示唆しており、抗菌性試験においても、死滅菌体や溶菌による菌体

分解産物が付着したことが考えられる。

以上の結果、TiO₂層の光触媒反応による抗菌性試験を、再現性良く、ある程度定量的に行うための実験条件を設定することが可能となった。

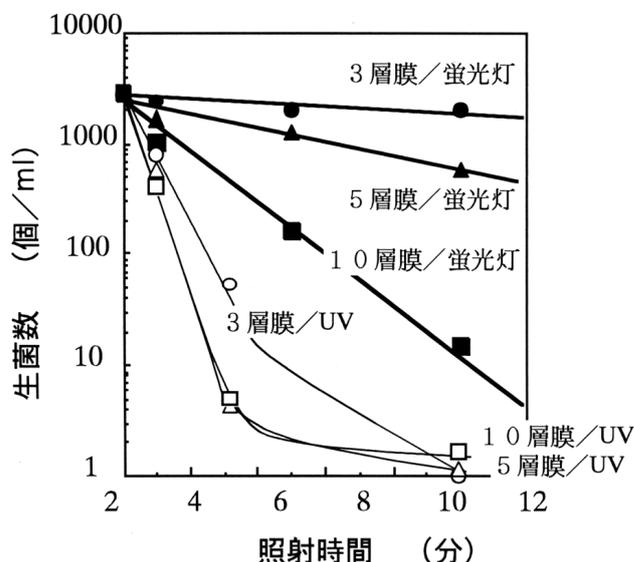


図3 蛍光灯およびUVランプの照射時間と残存生菌数

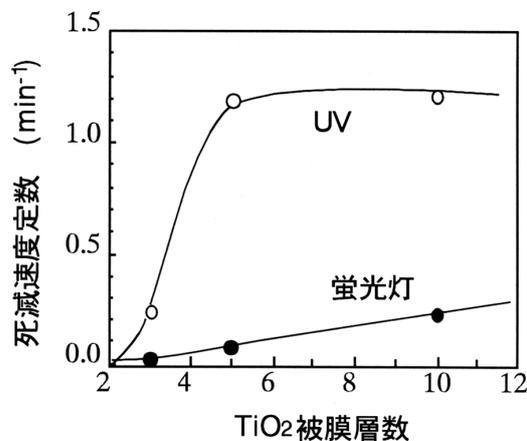


図4 酸化チタン被膜層数による死滅速度 r 変化

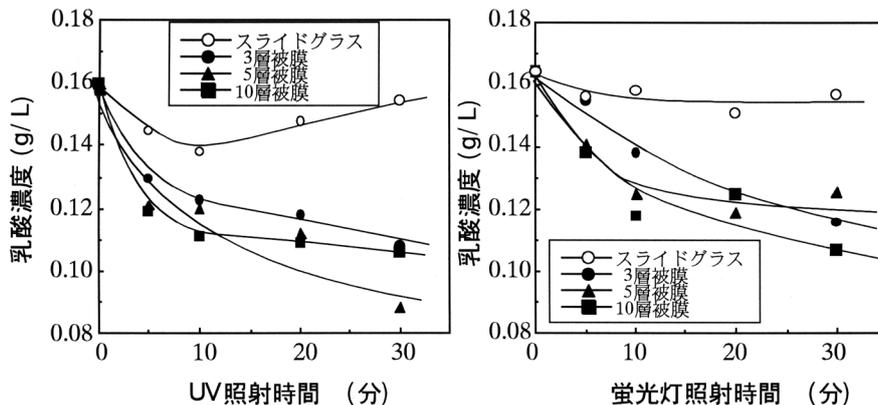


図5 TiO₂被膜スライドガラスによる乳酸の分解

3.2 ビーズ抗菌性評価試験

ガラスビーズおよびシリカゲルビーズにTiO₂をコーティングし、振盪フラスコを用いて空間的な抗菌性効果試験を行った結果を図6に示す。いずれの場合にも30分以内のUV照射により、E. coliおよび一般細菌の生菌数は急速に減少した。しかし、光触媒ビーズを添加せずにUV照射を行った場合よりも、滅菌速度が低下していることがわかった。表1には、処理前の菌液と各30分間の振盪後の、610nmにおける濁度の変化を示した。UV照射下での振盪では、濁度にはほとんど変化は認められなかったが、ビーズを添加した場合には著しく濁度が上昇したことがわかる。すなわち、振盪によりビーズ表面の崩壊とTiO₂の剥離が起きたために試験菌液が白濁し、その結果溶液の透光性が低下し、UVによる殺菌効果が抑えられたことがわかった。

このように、光触媒反応を空間的に利用する場合には、溶液中の透過光量を高く維持することが不可欠であった。すなわち、粉末状のTiO₂を分散させた場合には、TiO₂表面積が増大し光触媒反応量や菌体との接触効率を増加させる効果よりも、濁度が上昇することにより透過光量が減少し、UVの殺菌力が低下するために、死滅速度が減少することがわかった。

3.3 ビーズ抗菌性評価試験

光触媒スライドガラス上でKB細胞に一定時間照射した後、生細胞数を測定した。図7は通常の10% FBS/MEM 培養液に浸漬したまま照射した場合の生細胞数の変化を示す。UVおよび蛍光灯を照射したが、比較に用いたスライドガラス素面上の生細胞数といずれも大差なく、光触媒作用による細胞毒性は認められなかった。この結から、培地中の各種成分が光エネルギーを吸収していると考えられたため、PBS中に浸漬し照射を行ったところ、図8に示すように30分間の照射により細胞の死滅率に顕著な差が認められた。死滅速度は蛍光灯よりもUVの方が大きく、また、いずれの場合もTiO₂のコーティング層数に依存して死滅率が大きくなることがわかった。これらの結果は、TiO₂面における光エネルギーの利用効率が大きく影響していることを示しており、細胞密度にも影響されることが示唆された。そこで、細胞

表1 振盪処理による濁度

	菌体液	UV 処理液	ガラスビーズ TiO ₂ /UV 処理液	シリカゲル TiO ₂ /UV 処理液
濁度	0.018	0.020	0.50	1.08

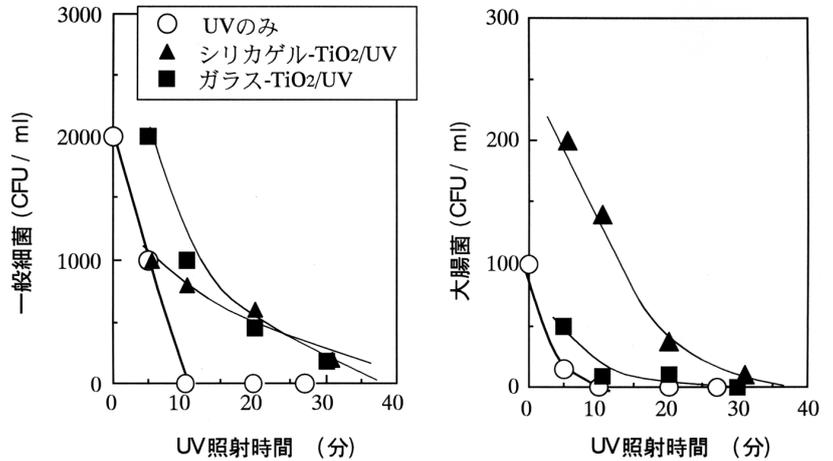


図6 振盪フラスコを用いたビーズ材の抗菌性評価試験

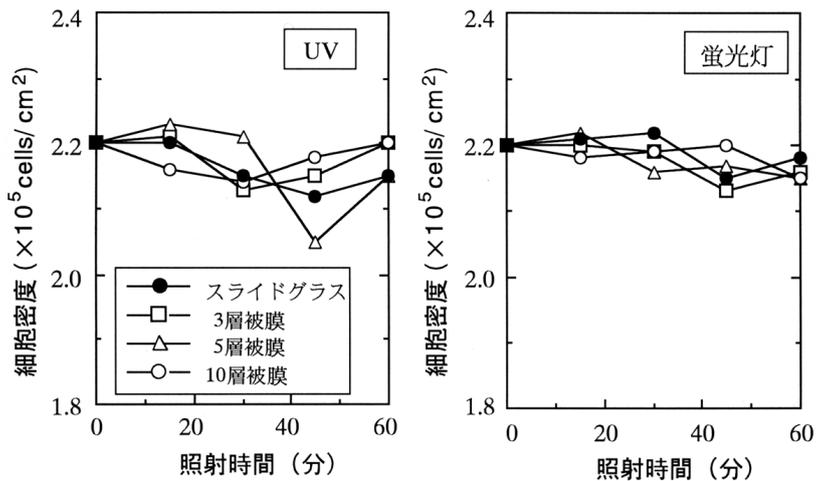


図7 10% FBS/MEM 培養液中のKB細胞に対する光触媒作用

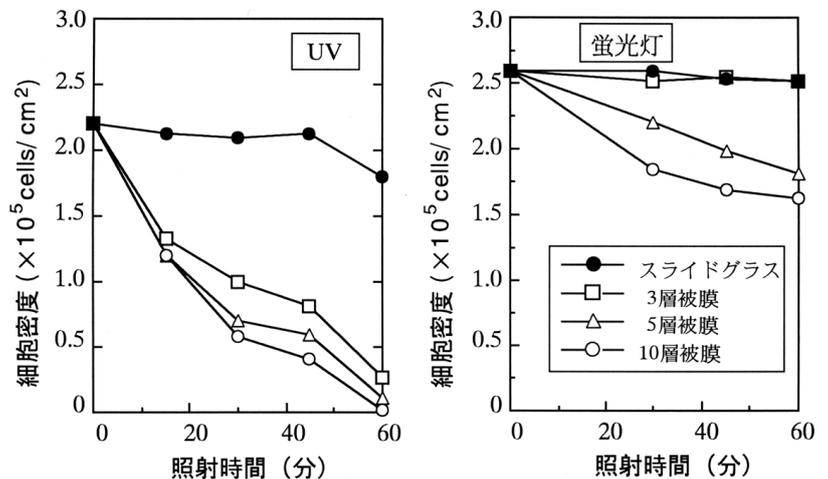


図8 PBS中のKB細胞に対する光触媒作用

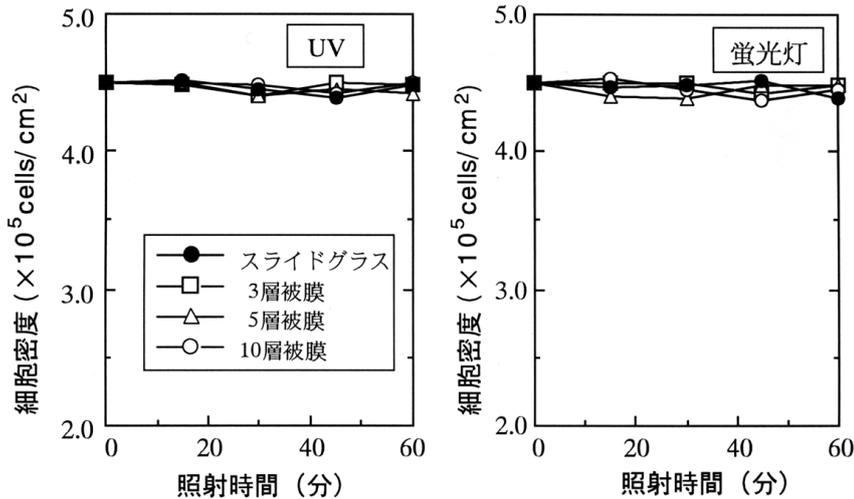


図9 PBS中の高密度KB細胞に対する光触媒作用

密度を2倍に高め、光触媒層の全面が細胞で覆われる条件下での影響を調べたところ、図9に示すように、光触媒の影響が消滅することがわかった。以上の結果、培地成分や細胞構成成分により光エネルギーが吸収され、TiO₂面での光触媒作用は細胞の生育にほとんど影響を与えないという結論に達した。

4 考察

酸化チタンの紫外線吸収効果と活性酸素生成が、培養組織に与える影響を解明するために、抗菌性試験および細胞毒性試験を行った。光触媒面で反応が著しい場合には、培養組織に対しても毒性をもつことがわかった。しかし、抗菌性および細胞毒性のいずれの場合でも、通常用いられる各種蛋白質やアミノ酸含有培地中では、光触媒作用が無視できる程低下することがわかった。これは、生体分子が光のエネルギーを吸収したり透過光量を減少させるために、光触媒面に達する光エネルギー量が減少するためであると考えられた。これらの結果から、紫外線吸収剤として化粧品に混合される酸化チタンの光触媒作用は、太陽光等にさらされる分散剤表面層でのみ反応しており、皮膚との接触面側では皮膚組織に影響を与える程の作用を及ぼすこ

とはないことが示唆される。また、抗菌性試験において濁度の上昇により光触媒作用が失われたことから、光触媒反応による毒性作用よりも、紫外線による直接的な毒性作用の方が細胞に対する影響が顕著であり、TiO₂により紫外線を吸収することで細胞保護効果が高まると考えられる。

各種生体材料開発において組織炎症マーカーとしての酵素系が見い出されてきており、中でも活性酸素の生成に関与するNO合成酵素の誘導発現は、組織の炎症と再構築の過程で重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。したがって、NO合成酵素と光触媒作用により活性酸素の生成が相乗的に高められる可能性も残されて

おり、これらの反応性と影響を皮膚組織培養において解析することで、さらに詳細に光触媒の保護作用と副作用を評価することが可能となるのではないかと考えられる。

(引用文献)

- 1) 鈴木昌二：抗菌剤及び抗菌加工製品の抗菌効力評価法，セラミックス，**31**, 590-593, 1996.
- 2) 橋本和仁，藤島昭：ニューセラミックス，**2**, 55-61, 1996.
- 3) 埴田博史：抗菌性セラミックス製品-酸化チタン光触媒，セラミックス，**31**, 587-589, 1996.
- 4) Ishibashi K, Nosaka Y, Hashimoto, K, Fujishima A: J. Phys. Chem., **102**, 2117-2120, 1998.
- 5) Hoffmann MR, Martin ST, Choi W, Bahnemann SW: Chem. Rev., **95**, 69-96, 1995.
- 6) Salama SB, Natarajan C, Nogami G, Kennedy JH: J. Electrochem. Soc., **142**, 806-810, 1995.
- 7) 砂田香矢乃，橋本和仁，藤島昭：酸化チタン光触媒反応による抗菌効，J. Antibact. Antifung. Agents, **11**, 611-620, 1998.

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

広島県立大学 生物資源学部生物資源開発学科

横尾 誠一、長尾 則男、三羽 信比古

Genuine degrees of cellular senescence of human skin are not necessarily in accordance with calendar ages, and were shown in the present study to be potently evaluated by measurement of length of telomeric DNA for a trace amount of human skin trash prepared with the ordered instrument rasp. Telomeric DNA was shortened in a manner dependent on calendar ages (0-72 years old, n=28) of donors as shown by Southern blot using epidermal DNA isolated from human skin. Prevention of age-dependent telomere shortening was achieved by pro-vitamin C, ascorbate-2-O-phosphate (Asc2P), but not by ascorbic acid(Asc) itself administered to human skin epidermal keratinocytes NHEK-F, which also acquired an elongated life span by 5.1 population doubling levels when administered with Asc2P but not Asc. UV-B induced cell mortality in human skin epidermal cells HaCaT was prevented by Asc2P but not Asc. Thus, Asc2P but not Asc is shown to protect human skin keratinocytes against telomere shortening, cellular senescence and UV-B injury.

1 緒言

年齢を経るに伴って皮膚に各種の「老化症状」を生じるが、この根本的な原因の一つとして、皮膚を構成する細胞の「分裂速度」の低下が重要である¹⁻³⁾。この細胞老化や細胞寿命を規定する要因として、細胞分裂に伴う「テロメア(46本の染色体の両端を保護するDNA繰り返し構造)の短縮化」が極めて本質的であるとして、近年急速に着眼され始めた。テロメアが短くなると、染色体が不安定となり、細胞寿命が尽きることが知られている⁴⁾。

一方、アスコルビン酸(ビタミンC)は、36億年もの生物進化の過程で淘汰選抜されてきた優れた抗酸化性の体内分子であるが、それにも関わらず、従来の研究では、外来的に動物に投与しても劇的な生物学的効果は少なかった。このため我々は、アスコルビン酸に酸化抵抗性を付与した誘導体を用いて、各種の動物細胞の細胞内アスコルビン酸濃度を、細胞外濃度よりも67~120倍もの「高濃度化」(エンリッチング効果)することを可能にした¹⁻⁹⁾が、未修飾のアスコルビン酸では9~21倍に過ぎなかった。我々はこの酸化抵抗型アスコルビン酸誘導体によって、従来は見られなかった顕著なフリーラジカル制御効果の幾つかを下記の通り見出した⁴⁻⁹⁾：

- ①ウシ血管内皮細胞の過酸化脂質障害の防御、
- ②ラット肝臓・心臓の虚血障害の防御、
- ③ヒト皮膚角化細胞のUV障害の防御、

- ④マウスでの皮膚癌転移の阻害効果。

この技術蓄積を活かして本研究では、次の点を解析する：

- ①ヒト皮膚表皮の角化細胞を用い、老化に伴うテロメア短縮化を解析し、皮膚老化の新規の指標になりうるかを明らかにする、
- ②老化に伴うテロメア短縮化を細胞内アスコルビン酸エンリッチングによって人為的に防御できるかを調べる、
- ③この作用機序として細胞内フリーラジカルの消長と皮膚老化との相関性を明確にする

2 実験

2.1 皮膚老化の新規の指標としての、テロメア長とテロメラーゼ活性の定量

- ①テロメア長は、(TTAGGG)_nをDNAプローブとして用いて、Southern blotを行ない、TRF(telomere restriction fragment)として求める。我々は既にヒト臍帯静脈の血管内皮HUVE細胞でテロメア長を求めた⁴⁾。
- ②テロメラーゼは、癌細胞と生殖細胞では強い活性であるため、僅か10~100細胞でも検出できるが、正常な体細胞では従来10⁵~10⁶細胞でも検出できないことが多く、殆ど活性がないと見なされてきた。我々は、Shay博士によるTRAP法を改良して10⁴個の正常細胞でも測定できる高感度な測定系を確立済みである⁴⁾。
- ③これらの方法により、ヒト皮膚表皮の角化細胞で加齢(継代培養)に伴ってテロメアが短縮化し、テロメラーゼ活性が消失することを示せると予想する。

2.2 皮膚老化モデルとしての、ヒト皮膚表皮の角化細胞NHEK-Fの継代培養^{2, 4)}

- ①この正常細胞(2倍体の染色体)は、細胞分裂する積算回数(population doubling level)が27~29に達すると、それ以上は分裂できなくなり「分裂寿命」となる(Hayflick's



Preventive effects of enrichment of intracellular ascorbate on age-dependent telomeric DNA shortening and free radical injury in the skin

Seiichi YOKOO, Norio NAGAO, Nobuhiko MIWA*

Laboratory of Gene Control Technology, Department of BioTechnology, Hiroshima Prefectural University School of BioSciences

limit)。この1ラウンドに3~4か月を必要とする。

- ②各継代培養ごとに一部の細胞を冷凍保存し、後日一括して解凍し、テロメア長とテロメラーゼ（テロメア伸長酵素）活性を測定する。
- ③各継代培養ごとに、細胞の継代直前密度（飽和細胞密度の75%）と細胞サイズ分布をコールター・カウンターとチャネライザーで定量する。

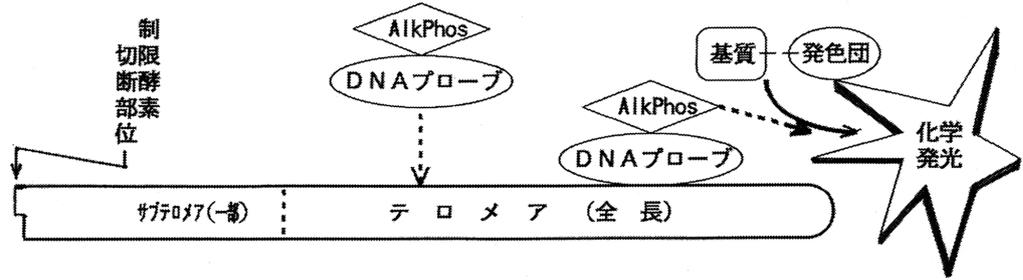


図1 AlkPhos 標識プローブ/化学発光法によるテロメア計測の原理

制限酵素（HinfI）はサブテロメアの特定の塩基配列の部で切断するが、テロメア部では切断しないので、取得された DNA 断片（TRF：terminal restriction fragment）はテロメア全長を含む。(1) TRF 中のテロメア部分を認識する DNA プローブである (TTAGGG)₄（分子、約 7900）に酵素 AlkPhos（分子、約 80000）を架橋剤 FA で結合させて、AlkPhos で標識した DNA プローブを作製する。(2) この場合に、DNA プローブによるテロメア認識力も、AlkPhos の酵素活性も、いずれをも低下させないような結合反応条件が求められる。(3) 架橋剤の添加が多過ぎると、特に酵素の側の多数の部で分子内架橋を引き起こすので不適切である。(4) と同時に、酵素と DNA プローブとは結合反応での混合比や添加濃度によっては、1 : 1 (mol/mol) から逸脱した結合比となってしまう、テロメア検出に不適切となる。(5) 発色団を含むリン酸エステル基質が酵素によって加水分解されてテロメアの置で化学発光を生じる。

2.3 細胞内アスコル

ビン酸エンリッチング（高濃度化）による皮膚老化の人為的防御^{4, 5, 6}

- ①各種の酸化抵抗型アスコルビン酸誘導体を細胞に投与し続けて、細胞内フリーラジカルを消去した場合、テロメア短縮化を防御して、細胞寿命を延長するかを調べる。
- ②この逆に、細胞死を起こさない程度の H₂O₂ や紫外線 B 波を弱いストレスとして負荷し続けた場合、テロメア短縮化が促進して、細胞寿命を縮めるかも、併せて調べる。

3 結果

3.1 テロメア計測技術の高感度化

従来のテロメア測定法はテロメアを識別する (TTAGGG)₄ DNA プローブの 5' 末端を [³²P] 標識してサザンプロットで検出していた。著者らは 300bp 未満の DNA には不向きとされてきた AlkPhos/FA 標識を 24bp のプローブでも高率化でき、これに適した ECL で強い化学発光を生じさせ従来の 15~100 倍ほど高感度に初めて非放射能 (Non-RF) 法での検出を可能とした (図 1)²⁾。DNA 20ng (従来の検出限界は 300~2000ng) を用いて AlkPhos/FA-ECL サザンプロットで定量できた (図 2)。

テロメア測定工程としては

- ①皮膚擦過屑を回収
- ②界面活性剤による細胞膜の溶解、RNA と蛋白の除去で DNA を抽出
- ③ DNA をサブテロメア部分で制限酵素 (HinfI) で切る
- ④ DNA 断片の混合液をアガロースゲル電気泳動で分離
- ⑤ DNA 断片を別の膜に転写
- ⑥ AlkPhos 結合させた (TTAGGG)₄ DNA プローブがテロメア含有 DNA 断片だけと結合

DNA (ng)	100	60	40	20	10
Cell Nr. (10 ³)	71	43	29	14	7.1

Long DNA fr
↑
TRF
↓
Short DNA fr

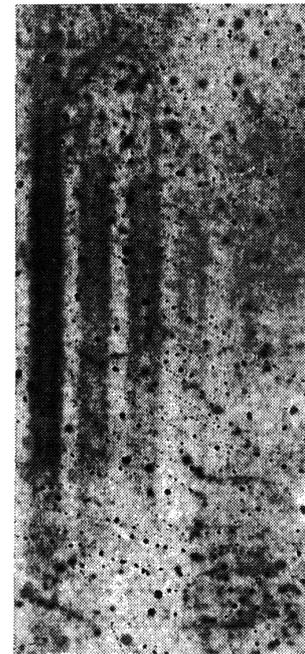


図2 AlkPhos 標識プローブ/化学発光法によるテロメア計測の感度

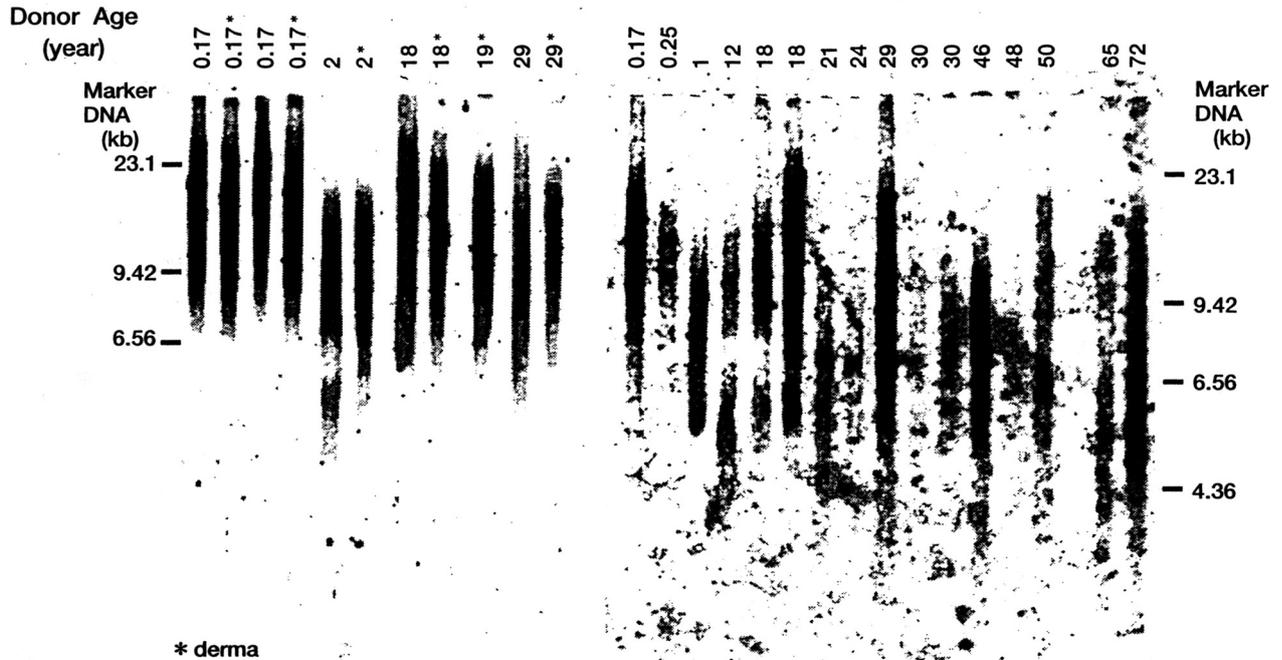
左から順に各々約 71000、43000、29000、14000、7100 個のヒト皮膚表皮細胞からの抽出に相当する 100、60、40、20、10ng の DNA を制限酵素 HinfI で切断してテロメアを化学発光法で検出した。20ngDNA (14000 細胞) で検出できることが示された。従来の放射能標識法は 100 万細胞が必要だった。

- ⑦酵素作用で化学発光を生じる反応物を与えるとテロメア部分だけが化学発光し、これを X 線フィルムで感光。

3.2 ヒト皮膚表皮のテロメアの年齢依存性

Cooke のグループはヒト皮膚片が年齢に伴ってテロメア短縮化を受けると報じたが、表皮・真皮の他に皮下組織も含みその含有率も不揃いだった。著者らは各年令のヒト皮膚片から表皮側を単離して DNA 抽出した結果、TRF (テロメア全長含有 DNA 断片) は0才の 11.6kb から次第に

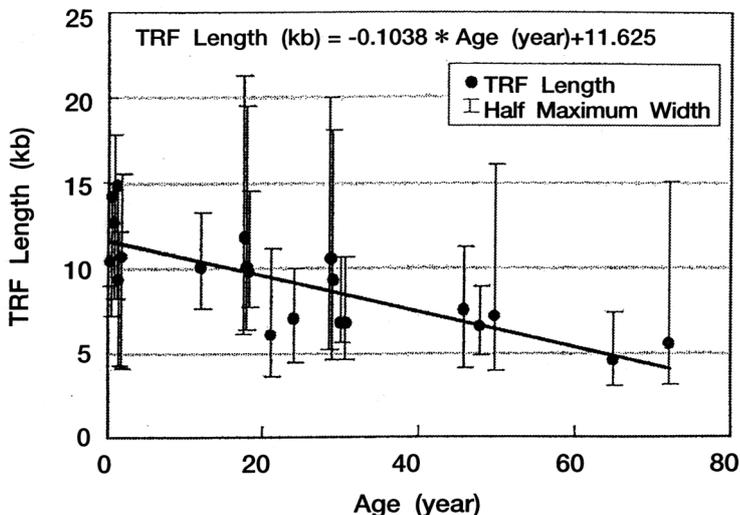
短縮化し 72 才まではほぼ直線的に短縮化していることを AlkPhos 標識プローブ法で見出した (図3、4)。ヒト皮膚表皮がテロメア短縮化を伴って老化していることを初めて示し、日本人の基準となる皮膚表皮テロメアの年齢依存性の 1 次方程式も算出した。



Chemiluminescence-utilizing quantification for telomeric DNA obtained from the human epidermis of diverse ages using an alkaline phosphatase-labelled (TTAGGG)_n DNA probe.

図3 ヒト皮膚表皮のテロメア長の年齢依存的な短縮

サザンブロットでの TRF (テロメア全長含有 DNA 断片) の電気泳動パターンにおいてスミア (ホウキ星状の感光部分) の「位置」が上であるほどテロメアが長いことを示す。したがって、若年→中年→老年……と老化するに伴ってテロメアの位置が下になってきているが、これはテロメア短縮化を意味する。テロメアは0才の 11.6kb から次第に短縮化し 70 才まではほぼ直線的に短縮化していることを AlkPhos 標識プローブ法で見出した



Dependency of telomeric DNA length of the epidermis on ages of skin donors as assessed by Southern blot and expressed as TRF length.

図4 ヒト皮膚表皮のテロメア年齢における診断システムの検基準線の作成

サザンブロットをデンストメトリによってピーク位置と半値幅を求めてグラフ化した。年齢に伴ってテロメアが直線的に短縮化するが、10才ほど年を取るとテロメアは約 1kb ずつ短くなることを示す。日光への露出部と非露出部との皮膚で短縮化率に違いがあるかは未確定だが、少なくとも圧倒的な差異があることはなかった。

3.3 ヒト皮膚表皮の角化細胞 NHEK-F のテロメア短縮化

ヒト表皮角化細胞 NHEK-F は細胞分裂回数を経るに伴ってテロメアが短縮化していた。我々は既にヒト静脈血管内皮細胞が細胞分裂回数を経るに伴ってテロメア短縮化が見られることを見出した⁴⁾が、これと同様な結果だった。ところがプロビタミンCの Asc2P を継続的に投与しておく、と、テロメア短縮化が抑制され、細胞寿命も増大した。

NHEK-F は 9.0 回まで細胞分裂して分裂停止した。プロビタミンCの ascorbic acid-2-O-phosphate-Mg_{1.5} (Asc2P) を添加しておく、と、13.7 回まで細胞分裂できるようになり細胞寿命が延長されたが、Asc (未修飾ビタミンC) 添加では 8.9 回の分裂に止まった (図5)。これは通常 1mm² にしか細胞増殖しない皮膚細胞が Asc2P による細胞寿命延長で、24mm² の皮膚面積にまで達する生涯細胞供給能をもたらすことを意味する (図6)。Asc2P 添加は細胞増殖速度の点でも対照の 2.6 倍に増大させ、皮膚の細胞供給速度も供給細胞数も向上させると示唆された (図7)。テロメア長 (TRF) は分裂停止前の対照細胞が 6.8kb、Asc は 6.3kb であるのに比し、7.3kb と維持することが示された (図8)。

3.4 皮膚の近い将来の老化度を予測する先行指標

皮膚テロメア診断は「肌の今の外見は良いが、今後は急変するのか、維持されるか」を明確にする。このため化粧

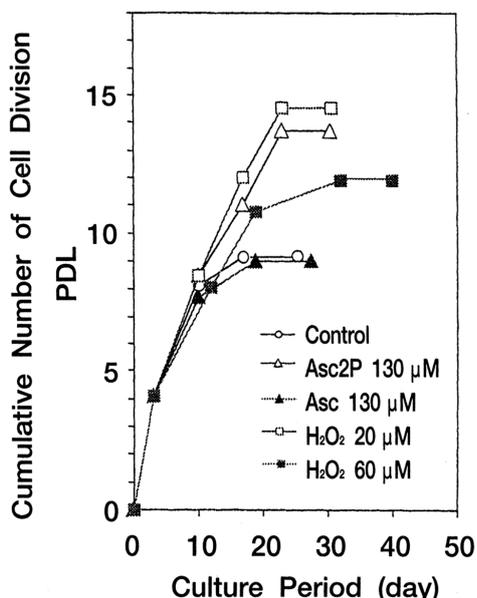


図5 正常ヒト皮膚表皮由来の角化細胞 NHEK-F の細胞分裂寿命

この角化細胞は 8.9 回まで細胞分裂してその後分裂停止した。プロビタミンCの ascorbic acid-2-O-phosphate-Mg_{1.5} (Asc2P) を添加しておく、と、13.7 回まで分裂できるようになり細胞寿命が延長されたが、Asc (未修飾ビタミンC) 添加では 8.9 回の分裂までに止まった。

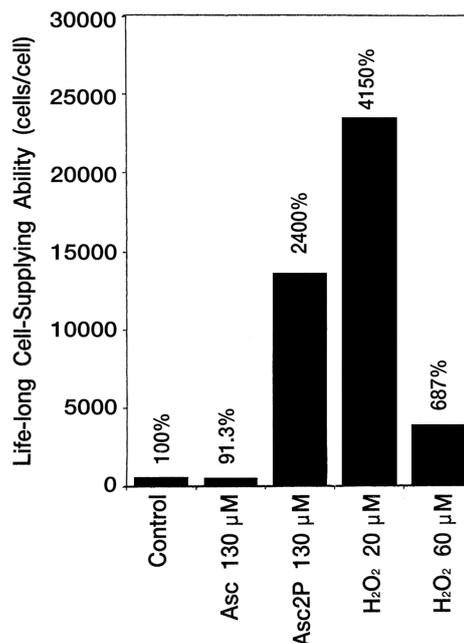


図6 正常ヒト皮膚表皮由来の角化細胞 NHEK-F の生涯細胞供給力 (Life-long Cell Supplying Ability)

ヒト新生児の皮膚 1mm² の表皮細胞 NHEK-F は、細胞寿命が尽きるまで 477mm² 相当 (「切手」サイズ) の算積分にまで増殖する。しかし、Asc2P 投与によるテロメア維持を介して、54% 多くの回数分、細胞分裂するので算積 13300mm² (一万円札サイズ) にまで増殖し、生涯での細胞供給総数を 27.9 倍に増大したことになる。

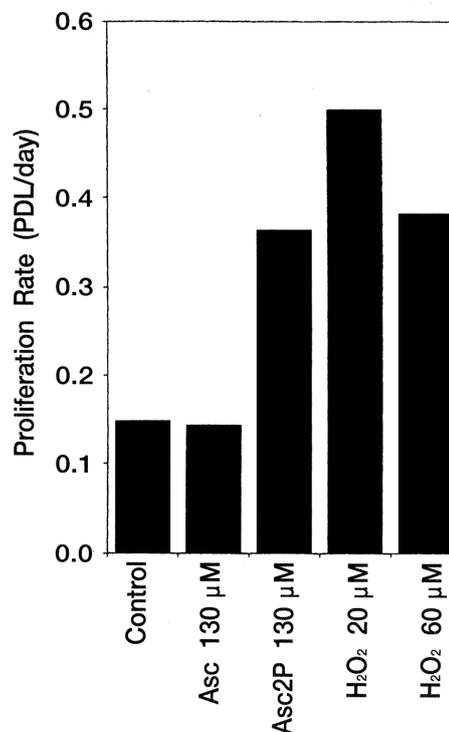


図7 正常ヒト皮膚表皮由来の角化細胞 NHEK-F の細胞増殖速度

Asc2P 投与は無投与の 2.6 倍の細胞増殖速度に増大させ、皮膚の細胞供給速度も供給細胞数も向上させるので、老化防御に働くと考えられる。

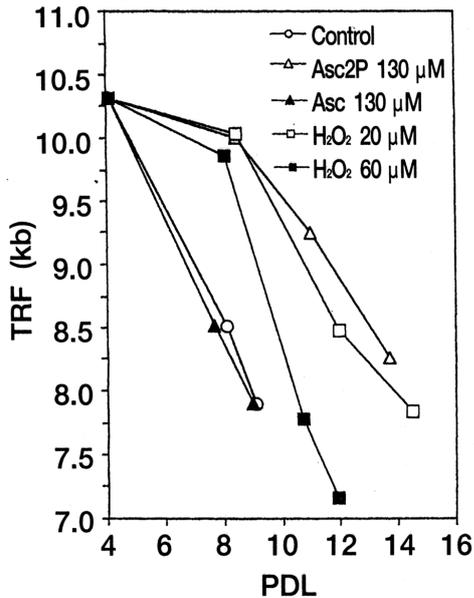


図8 正常ヒト皮膚表皮由来の角化細胞 NHEK-F の細胞分裂に伴うテロメア短縮化

この角化細胞は細胞分裂に伴ってテロメアが下限 (TRF6.8 kb) まで短縮化する。一方、Asc2P 投与による細胞寿命延長の場合はテロメア短縮化が緩慢で済んだ。しかし、寿命延長の場合もテロメア下限に近づくと同様に寿命が尽きる。この事実はテロメア短縮化速度が寿命の長短を決めると共に、一定値のテロメア下限までの短縮化が寿命の長短に関わらず寿命限界をもたらすことが示された。無投与細胞が分裂停止する直前の時点で比較すると、無投与細胞のテロメア長 (TRF) は 6.8kb、Asc 投与では 6.3kb であるのに比し、Asc2P 投与では 7.3kb と維持されている。

品消費者は今の肌の手入れ法や使用化粧品が適正かどうかを知る客観的な判断材料となる。「細胞の増殖速度」は死んだ皮膚細胞を補充する迅速性に関わるが、細胞増殖速度は暦年齢に画一的に規定されるのではなくテロメアの長短によって規定されていることを著者らは示した^{2, 4)}。

- ①テロメア短縮化の急激な進行中で細胞増殖が維持されていてもその直後に細胞増殖が遅延し始めることになる。
- ②一方、テロメアが維持されていると相当期間に及んで未だ盛んな細胞増殖を維持できることを意味する。よって、見掛けの細胞増殖や外見だけでは「肌の曲がり角」に近いかまだまだかは判別できず、テロメア計測でだけ判別できることになる。

4 考察

従来は肌年齢を科学的に実証する客観的な方法が殆どなかった。皮膚では真皮よりも表皮の方が紫外線B波・皮脂・微生物の影響を受けて老化が進行するので、表皮角化細胞のテロメア長を測定することが皮膚老化度の評価に有意義となる。テロメア長は測定時直前の生理状態や気候条件に左右されない真の皮膚老化度 (肌年齢) を客観的に算定できる。肌年齢を診断する意義は、

- ①今まで肌の受けた環境要因や肌ケアの良悪を判定する
 - ②外見の肌状態からは判らない近い将来に起こる皮膚変化を予測する
- にある。

テロメア計測の従来技術は、多量の細胞 (100 万個以上) が必要なため、人体から外科手術で 5mm² 程度の組織を摘出する必要があった。しかし、人体の皮膚などから微量の皮膚擦過屑を苦痛なく採取することは従来は困難だった。著者らは顔の皮膚のテロメア長を計測して DNA レベルでの肌年齢が判る診断システムを確立した。

- ①針の形状・材質、植込み密度・角度、植針面に各種の工夫を凝らしたラスプ (極細径ステンレス極短針を高密度に植えたディスプレイ) で頬の皮膚を無痛、無出血、無痕跡に擦る。テープストリッピングは局所的に皮膚を損傷し、DNA が粘着剤に包埋され後工程に支障を来す。
- ②皮膚擦過屑の付いたラスプ部分を切り離して搬送する。
- ③ 48-72 時間後に DNA 肌年齢が分かる。

テロメアとテロメラーゼの実体と生物学的意義の解析は近年、急展開した。老化に伴ってテロメア長が 12 ~ 15kb から 5 ~ 8 kb に短縮化する (Nature 1990) が、これはヒト肺の繊維芽細胞についてであり、本研究の皮膚の角化細胞ではわかっていない。血管内皮細胞では我々が初めて見出した (Life sci., 1998; Fragr. J. 1997)。癌のテロメア長は細胞によって極端に長い (>15kb)、短い (< 5 kb) が多いが、その周辺の正常組織は一定範囲内 (6 ~ 13kb) だった (Int.J. Oncol. 1995)。テロメラーゼは癌と生殖組織で高活性で、正常成人の体細胞は活性がないと見なされていたが、PCR を用いた TRAP 法で測定が高感度となった (Methods Cell Sci.'95)。テロメア長は DNA 複製の度に 50 ~ 150bp ずつ短縮する (EMBO J. '92) が、高酸素圧/フリーラジカルによる DNA 障害でもテロメア短縮化が起こる (Exptl. Cell Res. 1995)。この逆に、テロメア短縮化への抑制効果は、我々による細胞内アスコルビン酸の高濃度化だけが有効例であり^{2, 4)}、他に報告例はない。

我々は、ヒト臍帯静脈の血管内皮 HUVE 細胞を継代培養すると、細胞分裂の積算回数 (PDL) が 27 で分裂が停止したが、細胞に酸化抵抗型 ビタミン C の L-アスコルビン酸-2-O-リン酸 (Asc2P) を 50 ~ 130 μM 継続投与すると、PDL 42 まで延命し、テロメア短縮化も減速させた。継代開始で 12kb あったテロメア長は 7 kb にまで短縮化すると、細胞分裂が停止することは違いないが、テロメア短縮化の減速が細胞寿命の延長に直結するを初めて示した。

我々は HUVE 細胞がテロメラーゼ活性を微弱ながらもつことを、PCR を用いた TRAP 法で見出し、かつ、細胞の加齢に伴ってテロメラーゼ活性が次第に消失するが、延命効果のある Asc2P を投与した HUVE 細胞ではテロメラーゼ活性が長期間に及んで保持できることも示した。

細胞外のアスコルビン酸 (Asc) は細胞内に取込まれて、細胞外濃度の 8 ~ 22 倍に濃縮蓄積される程度であるが、Asc2P は細胞内取込みに伴って脱リン酸化され Asc の形で 67 ~ 120 倍という高濃度に細胞内に濃縮蓄積されることを、各種 (血管内皮・線維芽・表皮角化・悪性黒色腫) 細胞で我々は見出した^{4-6, 8, 9)}。ヒト・マウス皮膚表皮の角化細胞への紫外線 B 波の照射による細胞死は、Asc は抑えないが、Asc2P 投与で抑制されることを我々は WST-1 法 (ミトコンドリア脱水素酵素活性) と Ethidium homodimer / 蛍光プレートリーダー法 (細胞膜障害) で見出した (Cell. Mol. Biol. Res. '95)。今回ヒト皮膚表皮の角化細胞でも同様な細胞防護効果を見出したことになる。この時、Asc2P は脱リン酸化されて細胞内 Asc を高濃度化し、紫外線による DNA 鎖上のシクロブタン型ピリミジン 2 量体の形成 (Anti-CPD-Ab を用いた Slot blot)、ヌクレオソーム間 DNA 2 本鎖切断 (共焦点レーザー顕微鏡を用いた TUNEL 法、アガロース電気泳動)、癌抑制遺伝子 p53 発現 (野生型と変異型 p53 を識別した免疫染色、ウエスタン・プロット) のいずれもを抑えた。紫外線を照射された皮膚の角化細胞の内部にはフリーラジカルが多量生じることは、蛍光色素 CDCF H / 共焦点レーザー顕微鏡法、スピントラップ剤 DMPO / 電子スピン共鳴 (ESR) 法で定量したが、今後 Asc2P による防護効果におけるフリーラジカル消長をより詳細に解析する予定である。

(参考文献)

- 1) 三羽信比古・編「バイオ抗酸化剤プロビタミン C ~ 皮膚傷害・ガン・老化の防御と実用化研究～」フレグランスジャーナル社 (1999)
- 2) 横尾誠一ら: *Fragrance J.* 27 (7) :69-74 (1999) ; 日本化粧品科学会第 24 回学術大会 ,p.67 (1999)
- 3) 三羽信比古:「ビタミン C の知られざる働き」、*Sci & Technol Series* 第 33 巻、丸善 (1992)
- 4) Furumoto K, Inoue E, Nagao N, Hiyama E & Miwa N: *Life Sci.* 63 : 935-948 (1998)
- 5) Fujiwara M, Nagao N & Miwa N: *Free Radical Res.* 27 : 97-104 (1997)
- 6) Kanatate T, Nagao N & Miwa N: *Cell.Mol.Biol.Res.*, 41 : 561-567 (1995) ; *Biomed.Gerontol.* 19 : 78-81 (1995)
- 7) Saitoh Y, Nagao N & Miwa N: *Mol. Cell.Biochem.*, 173 : 43-50 (1997)
- 8) Kageyama K, Nagao N & Miwa N: *Anticancer Res.* 19 (5) : 4321-4326 (1999) ; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122 : 41-44 (1996) ; *Cancer Biochem. Biophys.* 14 : 273-280 (1995)
- 9) Liu J-W, Nagao N & Miwa N: *Anticancer Res.* 20 (1) 113-118 (2000) ; *Oncol Res.* in press (2000)

老化抑制遺伝子 *klotho* の結合組織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

1) 東京大学医学部循環器内科 2) 群馬大学医学部第二内科

永井良三¹⁾、須賀達夫²⁾、山洞善恒²⁾、倉林正彦²⁾

Homozygous mutant *klotho* ($KL^{-/-}$) mice exhibit multiple phenotypes resembling human aging. In the present study, we focused on examining the pathology of the lungs of *klotho* mice and found that it closely resembled pulmonary emphysema in humans both histologically and functionally. Histology of the lung of $KL^{-/-}$ mice was indistinguishable from those of wild-type littermates up to 2 wk of age. The first histological changes appeared at 4 wk of age, showing enlargement of the air spaces accompanied by destruction of the alveolar walls, and progressed gradually with age. In addition to these changes, we observed calcium deposits in type I collagen fibers in alveolar septa and degeneration of type II pneumocytes in 8- to 10-week-old $KL^{-/-}$ mice. Pulmonary function tests revealed prolonged expiration time in $KL^{-/-}$ mice, which is comparable with the pathophysiology of pulmonary emphysema. The expression level of messenger RNA for type IV collagen, surfactant protein-A was significantly increased in $KL^{-/-}$ mice, which may represent a compensatory response to alveolar destruction. The starvation of human lung fibroblast cells (MRC-5) for 96 hours decreased their ^3H -thymidine uptake up to 75%. The transfection of the *klotho* gene into MRC-5 cells using adenovirus vector, however, prevented their decline in ^3H -thymidine uptake. These results implied that connective tissue including fibroblasts played an important role in the pathogenesis of pulmonary emphysema in $KL^{-/-}$ lung.

1 緒言

現在、日本は高齢社会へと急速に変貌しつつある。個体の老化機構の解明は、医学的のみならず社会的にも最も重要な課題のひとつとなっている。個体の老化は、全身の諸臓器における老化のインテグレーションとも考えられるが、各臓器の老化はある程度、歩調を合わせて進行するのが普通である。この臓器間の老化の同時進行性には結合組織が深く関与していると考えられる。なぜなら、線維芽細胞をはじめとする結合組織細胞は、全身臓器に遍く存在し、形態の維持ばかりでなく、器官形成、炎症、創傷治癒機転などにおいて中心的な役割を果たしているからである。したがって、個体老化機構の解明には、結合組織細胞の老化を細胞生物学的に解明することが不可欠である。

我々は黒尾・鍋島らと共同で、個体老化に密接に関わる *klotho* という新規遺伝子を発見した⁽¹⁾。*klotho* 遺伝子は分子量が約 14kDa で、 β -glucosidase と 40% のホモロジーを示す膜蛋白または分泌蛋白をコードする。*klotho* 遺伝子ホモ欠損マウス (以下 $KL^{-/-}$ と記載) は、寿命の短縮、動脈硬化、異所性石灰化、骨粗鬆症、皮膚真皮層の菲薄化、皮下脂肪層の消失、脱毛などヒト老化に見られる多彩な変

化を早期に表現する。

肺は皮膚と同様に、直接外気と接し、しかも結合組織の老化が肺泡破壊 (肺気腫) として形態的・機能的に敏感に反映されうる臓器である。そこで、本研究では *klotho* 遺伝子欠損マウスにおける肺の変化を生理学的、形態学的にまず検討した。次に、肺培養線維芽細胞にアデノウイルスベクターを用いて *klotho* 遺伝子を導入し、導入前後の細胞増殖能の変化を観察した。

2 実験

2.1 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺の容積測定

肺気腫では気管支を外側に引っ張る elastic recoil の力が減少するため、胸腔内が陽圧になる呼気時に気道は狭窄・閉塞してしまう。そのため air trapping が起き、肺は過膨張所見を呈する。そこで、*klotho* 遺伝子欠損マウスの肺容積を測定し、過膨張所見があるか否かを検討した。

対象は 6 - 8 週令の *klotho* 遺伝子ホモ欠損マウス ($KL^{-/-}$)、*klotho* 遺伝子ヘテロ欠損マウス (以下 $KL^{+/-}$ と記載)、野生型マウス (以下 $KL^{+/+}$ と記載) を用いた。マウスをウレタンで麻酔後、脱血屠殺した。気管内に 4% パラフォルムアルデヒドを 20 cm 水柱の一定圧で 24 時間注入し、肺を進展固定した。進展固定後の肺を水没させ、肺容積を測定した。

2.2 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺の組織学的検討

対象は 2、4、8 - 10 週令の $KL^{-/-}$ 、 $KL^{+/+}$ である。2.1 と同様の方法で肺の進展固定を行った。進展固定した肺標本はパラフィンに包埋し、4 μm の厚さの切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。また、連続切片にコッサ染色を行い、石灰化病変を確認した。肺泡の破壊の程度の指標である Destructive index (D.I.) を Saetta らの方法⁽²⁾



Biological Role of Klotho Protein in Ageing of Connective Tissue and Its Therapeutic Application to Skin Diseases (Ryozo Nagai 1), Tatsuo Suga 2),

Yoshichika Sando 2), Masahiko Kurabayashi 2)

1) The Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

2) The Second Department of Internal Medicine, Gunma University, School of Medicine

に準じて計算した。さらに、隣接する肺胞間の平均距離である Mean linear intercept を計測し、肺胞腔の拡大の程度を評価した⁽³⁾。

2.3 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺の電子顕微鏡による検討

8週令の *KL*^{-/-} と *KL*^{+/+} を対象とした。サンプル肺は4℃の2%グルタルアルデヒドで前固定を、室温の1%オスミウム酸で後固定を行った。緩衝液で洗浄後、エタノールで脱水し、エポキシレジンに包埋した。厚さ60nmの超薄切片を作成し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色をした後に電子顕微鏡で観察した。

2.4 *klotho* 遺伝子欠損マウスの肺機能検査

6-8週令の *KL*^{-/-}、*KL*^{+/-}、*KL*^{+/+} を対象とし、ウレタン (1.5g/kg) を腹腔内注射した麻酔状態で自発呼吸下に肺機能を測定した。すなわち、短いポリエチレン製チューブを気管内に挿入し、Lilley型ニューモタコグラフ (日本光電社製 TV-241T と TP-602T) を用いて呼吸気流を測定した。胸腔内圧は下部食道内圧を代用し、肺容積はコンピュータを用いて気流を電氣的に積算し求めた^(4,5)。実験中のマウス体温は37℃の一定に保ち、呼吸状態が10分以上安定するのを待って、呼吸回数、一回換気量、分時換気量、呼気時間、動的コンプライアンス、総肺抵抗を測定した。動脈血液ガス分析も併せて行った。

2.5 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺における肺気腫関連遺伝子の発現状況の検討

7-9週令の *KL*^{-/-}、*KL*^{+/-}、*KL*^{+/+} 肺における以下の遺伝子の発現をノーザンブロット法により検討した。これらはいずれも肺気腫発症と関連すると考えられている遺伝子である；マンガン superoxide dismutase (Mn-SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ、transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1)、Early growth response-1 (Egr-1)、IV型コラーゲン、サーファクタント蛋白 A (SP-A)、specificity protein 1 (Sp1)。すなわち、標本肺より全 RNA (ribonucleic acid) を抽出し、1レーンあたり20μgのRNAをホルムアルデヒド-1%アガロースゲルで電気泳動し、ナイロンメンブレン (Hybond-N; Amersham, Arlington Heights, IL) に転写し、紫外線固定した。18Sと28SリボソームRNAをメチレンブルーで染色し、RNAの量と質を評価した。メンブレンは50%ホルムアミド、5×saline sodium phosphate ethylenediaminetetraacetic acid、10×Denhardt's solution、1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.1mg/mL herring sperm DNAを含む液でプレハイブリダイズした後、^[32P]deoxycytidine triphosphate (dCTP) (Amersham) でラベルしたDNAプローブで42℃で20時間ハイブリダイズした。メンブレンは2×saline sodium

citrate (SSC) (0.15M NaCl and 0.015 M sodium citrate, pH7.0) /0.1% SDS で二度室温で10分間洗浄した後、0.1×SSC/0.1% SDSで二度42℃で10分間洗浄し、Kodak XR film に-80℃で48時間オートラジオグラフィを行った。

2.6 線維芽細胞への *klotho* 遺伝子導入による細胞増殖の変化

klotho 遺伝子が線維芽細胞の増殖能に及ぼす影響について検討した。*klotho* 遺伝子の発現が予め確認されているヒト肺線維芽細胞 (MRC-5) に、adenovirus vector を用いて *klotho* 遺伝子または LacZ 遺伝子を導入・過剰発現させた。導入24時間後より飢餓状態とし、96時間後に³H-Thymidine 取り込みを測定し、*klotho* 遺伝子導入群、LacZ 遺伝子導入群、コントロール群で比較した。

2.7 統計処理

各測定値は、平均 ± 標準偏差の形式で記載した。また群間の有意差の検出には analysis of variance (ANOVA) 分析を用いた。

3 結果

3.1 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺の容積

6-8週令における *KL*^{-/-}、*KL*^{+/-}、*KL*^{+/+} の平均体長はそれぞれ、68.3 ± 4.7mm、91.8 ± 2.4mm、91.5 ± 1.0mmで、*KL*^{-/-} は他に比べ有意に体長が短かった (p < 0.05)。*KL*^{-/-}、*KL*^{+/-}、*KL*^{+/+} の平均肺容積はそれぞれ、703 ± 306μL、653 ± 180μL、663 ± 122μL で3群間に有意差はなかった。したがって、*KL*^{-/-} は *KL*^{+/-}、*KL*^{+/+} に比較し体長が短いにもかかわらず肺容積は不変で、*KL*^{-/-} 肺は過膨張状態であると推測された。

3.2 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺の組織変化

生後2週では *KL*^{-/-} の肺 (Fig.1A) は *KL*^{+/+} の肺 (Fig.1B) と組織学的に全く区別不能であった。肺胞破壊の程度を指標する Destructive index (D.I.) にも差がなかった (*KL*^{-/-} 1.7 ± 0.8 vs. *KL*^{+/+} 1.5 ± 0.8)。しかし生後4週になると *KL*^{-/-} 肺は肺胞腔の拡大と肺胞壁の破壊所見が認められるようになった (Fig. 1C)。この週令における *KL*^{-/-} の D.I. (12.0 ± 1.5) は、*KL*^{+/+} (2.7 ± 0.5) に比べ有意に大きかった。明らかな炎症細胞浸潤や間質の線維化の所見は認めず、4週令の *KL*^{-/-} の肺は組織学的に肺気腫と診断できた。8-10週齢になると *KL*^{-/-} 肺の気腫性変化は更に進行し、肺胞壁の石灰化所見も認められるようになった (Fig.1D)。肺胞腔の拡大の指標である Mean linear intercept は、8週令の *KL*^{-/-} では 104.8 ± 28.1μm であり、同週令の *KL*^{+/+} の 58.3 ± 24.2μm と比較して有意に大きかった。*KL*^{+/+} 肺の組織像は生後2週、4週、8-10週の間で大きな変化は無かった。

3.3 *klotho* 遺伝子欠損マウスの電子顕微鏡像

8週令の *KL*^{-/-} 肺の電子顕微鏡による観察では、肺胞壁のI型膠原線維へのカルシウム沈着を認めたが (Fig. 2)、肺胞基底膜の主要構成成分であるIV型膠原線維には異常を認めなかった。また、いくつかのII型肺胞上皮細胞の変性所見を認めた。8週令の *KL*^{+/+} 肺では明らかな電顕的異常を認めなかった。

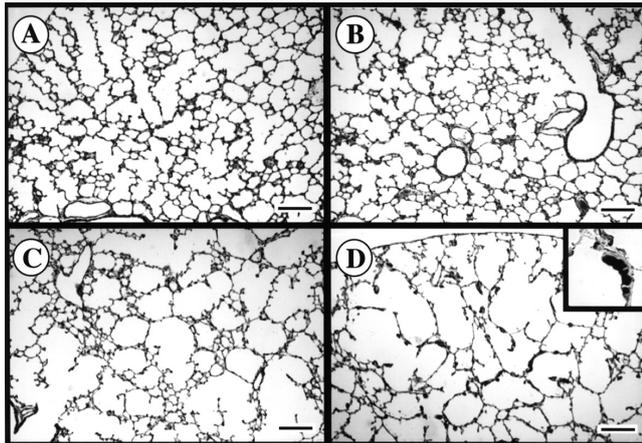


Fig.1 A 生後2週の *KL*^{-/-} 肺 (ヘマトキシリン・エオジン染色)
 B 生後2週の *KL*^{+/+} 肺 (ヘマトキシリン・エオジン染色)
 C 生後4週の *KL*^{-/-} 肺 (ヘマトキシリン・エオジン染色)
 D 生後10週の *KL*^{-/-} 肺 (ヘマトキシリン・エオジン染色、
 右上挿入図は Kossa 染色 (強拡大))

2週令では *KL*^{-/-}、*KL*^{+/+} とも肺胞の破壊は認められない。しかし4週令になると *KL*^{-/-} 肺には肺胞壁の破壊と気腔の拡大を認めた。10週令の *KL*^{-/-} 肺は気腫性変化が更に進行性し、肺胞壁の石灰化も認めた。(石灰化は Kossa 染色で黒色に染色される)

(Scale bar=100 μ m)

3.4 *klotho* 遺伝子欠損マウスの肺機能

6~8週令のマウスの肺機能解析結果を Table1 にまとめた。*KL*^{-/-} では呼気時間 (Te) の延長 ($p < 0.01$) と動肺コンプライアンス (Ctb) の増大傾向 ($p = 0.09$) を認めた。*KL*^{-/-} の一回換気量 (TV) は *KL*^{+/+} の TV より小さかったが ($p < 0.01$)、呼吸数や、体重あたりの分時換気量 (Ve) には *KL*^{-/-} と *KL*^{+/+} の間に差を認めなかった。*KL*^{-/-} マウスの動脈血ガス所見は WT マウスと差を認めず、酸素分圧の低下も二酸化炭素分圧の上昇もみられない。したがって、*KL*^{-/-} マウスの直接死因は呼吸不全とは考えにくい。

3.5 *klotho* 遺伝子欠損マウス肺における肺気腫関連遺伝子の発現状況

すでに著明な肺気腫が認められる7~9週令の *KL*^{-/-} マウス

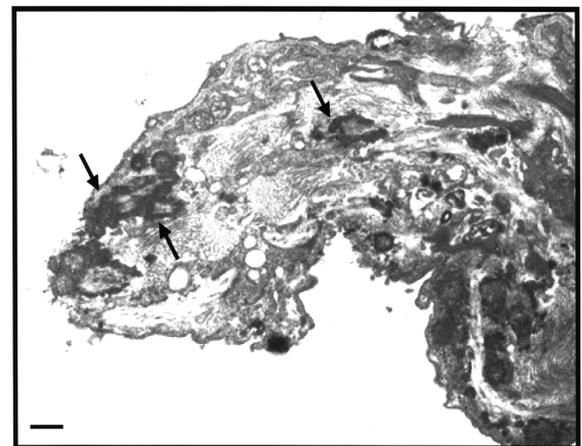


Fig.2 8週令の *KL*^{-/-} 肺の電子顕微鏡 真
 肺胞壁のI型膠原線維へのカルシウム沈着を認めた (矢印)
 (Scale bar=1 μ m)

Table 1 6~8週令のマウスの肺機能検査所見

KL^{-/-} マウスでは呼気時間 (Te) の延長所見と動肺コンプライアンス (Ctb) の増加傾向を認めた。

Pulmonary function tests of *klotho* mice

	Body weight, g	Respiratory rate, per min.	Tidal volume, μ l	Ve, ml/min/g	Te, msec	Ctb, μ l/cmH ₂ O	Rrs/BW, cmH ₂ O/ml/sec/kg
<i>KL</i> ^{-/-}	8.4 \pm 1.0 ^{*†}	229 \pm 45	130 \pm 30 ^{*†}	3.5 \pm 0.6	141 \pm 9 ^{*†}	67 \pm 35	54.4 \pm 16.7
<i>KL</i> ^{+/-}	16.3 \pm 2.1	258 \pm 28	260 \pm 30	4.1 \pm 0.6	113 \pm 4	31 \pm 6	50.2 \pm 15.2
WT	17.2 \pm 2.2	238 \pm 26	240 \pm 70	3.3 \pm 1.1	119 \pm 4	46 \pm 9	38.9 \pm 11.3

**KL*^{-/-} mice versus *KL*^{+/-} mice; †*KL*^{-/-} mice versus WT mice. ANOVA, $P < 0.01$.

ウスの肺における Mn-SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ、TGF- β 1、Egr-1 の mRNA 発現は、WT マウスと差を認めなかったが、基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンと SP-A の mRNA 発現が増加していた (Fig. 3)。反対に転写因子 Sp1 の発現は明らかに減少していた。

3.6 線維芽細胞への *klotho* 遺伝子導入による細胞増殖の変化

非飢餓状態における ^3H -Thymidine 取り込みは、コントロール群、LacZ 遺伝子導入群、*klotho* 遺伝子導入群で差を認めなかった。飢餓状態 96 時間後の ^3H -Thymidine 取り込みは、コントロール群では非飢餓状態の約 25% に減少した。この ^3H -Thymidine 取り込みを 1 とした場合、LacZ 遺伝子導入群では 0.8 ± 0.3 と差を認めなかったが、*klotho* 遺伝子導入群では 2.5 ± 0.3 と有意に取り込みが多かった。この値は非飢餓状態の約 80% に相当することから、*klotho* 遺伝子導入が飢餓状態による細胞増殖能の低下を抑制している可能性が示唆された。

4 考察

老化抑制遺伝子 *klotho* のホモ欠損マウスに肺気腫の発症を確認した。肺気腫は肺結合織の不可逆的な損傷により生じると考えられること、また、*klotho* 遺伝子の強制発現は飢餓による肺線維芽細胞の細胞増殖能低下を抑制することから、*klotho* は結合織細胞の老化抑制に重要な役割を果たしていると考えられた。

klotho 遺伝子は我々が黒尾・鍋島らと共同で発見した新しい老化抑制遺伝子である⁽¹⁾。*klotho* 遺伝子をただ一つだけ欠損したマウスは、ヒトの老化に類似した多彩な兆候を呈する。すなわち *klotho* 遺伝子ホモ欠損マウス (*KL*^{-/-})

は生後約 3 週までは野生型マウス (*KL*^{+/+}) と同様に発育するが、以後発育が停止し、平均寿命は 60 日で非常に短命である。加えて、生後 3~4 週頃より動脈硬化、異所性石灰化、骨粗鬆症、皮膚の萎縮、性腺の萎縮などが出現する。*klotho* 遺伝子は分子量が約 14kDa で、 β -glucosidase と 40% のホモロジーを示す膜蛋白または分泌蛋白をコードしている。その発現は主に腎と脳に局限し、肺での発現は認められていない。

肺気腫は高齢者の慢性呼吸不全・死亡の主要原因であり、社会の高齢化に伴いその重要性は増している。医学的には肺気腫は、肺胞壁が破壊された結果末梢気腔が病的に拡張する疾患で明らかな肺線維化は伴わないと定義されている⁽⁶⁾。軽い肺障害では肺胞上皮の変性・脱落が生じるものの肺胞壁の修復は可能であるが、肺胞基底膜などの結合織が障害される強い肺傷害では、肺胞壁の修復は最早不可能となり、肺胞壁は破壊され末梢気腔の病的な拡張が出現する。一般には、過度の喫煙が肺胞壁破壊の原因であり⁽⁷⁾、非喫煙者における肺気腫の発症は例外的である⁽⁸⁾。

今回の組織学的検討から、生後 4 週以降の *KL*^{-/-} 肺は肺胞壁破壊と末梢気腔の拡大を明らかに認め、肺気腫の発症が確認された。また、生理学的にも肺気腫に矛盾しない肺機能検査結果であった。すなわち、*KL*^{-/-} は呼吸時間の延長と動肺コンプライアンスの上昇を認めた。しかしながら、動脈血ガス分析では明らかな酸素分圧や二酸化炭素分圧の異常を認めず、*KL*^{-/-} の寿命短縮は呼吸不全以外の原因によるものと考えられた。

KL^{-/-} 肺の電子顕微鏡による検討では、肺胞壁の I 型コラーゲン線維への石灰沈着と II 型肺胞上皮細胞の変性の所見が得られた。II 型肺胞上皮細胞は、障害された肺胞の修復に中心的な役割をすることが明らかにされており⁽⁹⁾、II 型肺胞上皮細胞の変性は *KL*^{-/-} における肺修復機能の減弱の可能性を示唆した。

すでに肺気腫が認められる 7~9 週令の *KL*^{-/-} 肺における遺伝子発現の検討では、基底膜の構成成分である IV 型コラーゲンと SP-A の mRNA が著明に増加していた。この二つの蛋白は肺損傷に対し防御的に作用するため^(9,10)、これらの遺伝子発現の増加は肺損傷に対する代償的反応であると推測された。また、IV 型コラーゲンと SP-A 遺伝子のプロモーター領域には両遺伝子の発現を促進する多数の Sp1 結合部位を有している^(11,12)。しかし、*KL*^{-/-} 肺における Sp1 遺伝子の発現は減少していたため、*KL*^{-/-} 肺における IV 型コラーゲンと SP-A の遺伝子発現増強は Sp1 以外の経路を介して行われると考えられた。

klotho 遺伝子の導入は、飢餓による線維芽細胞の ^3H -Thymidine 取り込み減少を抑制した。したがって *KL*^{-/-} における肺気腫発症には、線維芽細胞をはじめとする結合織細胞の機能障害が関与している可能性がある。しかし、

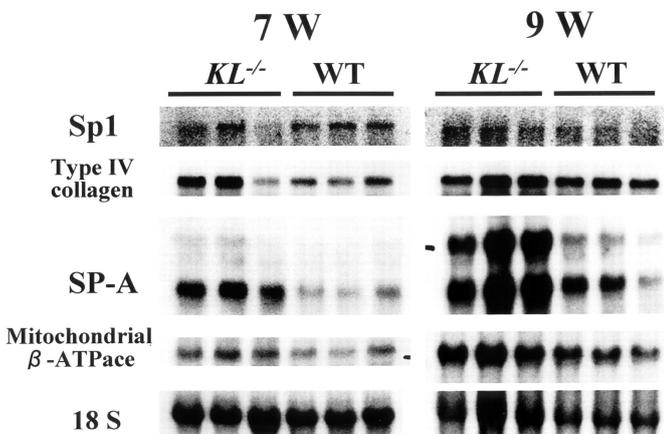


Fig.3 7~9週令のマウス肺における Northern blot 解析
この週令の *KL*^{-/-} 肺にはすでに著しい気腫性変化が認められる。*KL*^{-/-} 肺では IV 型コラーゲンとサーファクタント蛋白の mRNA 発現の増加を認めた。

ヒト肺気腫における結合組織細胞の関与についてはいまだ明らかでなく、今後の検討課題である。

5 総括

klotho 遺伝子ホモ欠損マウス *KL^{-/-}* は生後4週より肺気腫を発現することが組織学的、生理学的に確認された。7～9週令の *KL^{-/-}* 肺では、IV型コラーゲンとSP-A 遺伝子の発現が増強しており、これはSp1以外の経路を介していると考えられた。*klotho* 遺伝子の導入は、飢餓による線維芽細胞の³H-Thymidine 取り込み減少を抑制したことから、*KL^{-/-}* における肺気腫発症には、線維芽細胞をはじめとする結合組織細胞の機能障害が関与すると推測された。

以上の概略は Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2000 ; 22 (1) :26-33 に報告した。

(文 献)

1. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; 390 (6655) :45-51.
2. Saetta M, Shiner RJ, Angus GE, Kim WD, Wang N, King M, Ghezzi H, Cosio MG. Destructive index: a measurement of lung parenchymal destruction in smokers. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131:764-9.
3. Dunnill MS. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax* 1962; 17:320-328.
4. Palecek F. Measurement of ventilatory mechanics in the rat. *J Appl Physiol* 1969; 27 (1) :149-56.
5. Onodera M, Kuwaki T, Kumada M, Masuda Y. Determination of ventilatory volume in mice by whole body plethysmography. *Jpn J Physiol* 1997; 47 (4) :317-26.
6. Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133 (1) :149-69.
7. Snider GL. Chronic obstructive pulmonary disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Annu Rev Med* 1989; 40 (411) :411-29.
8. Bascom R. Differential susceptibility to tobacco smoke: possible mechanisms. *Pharmacogenetics* 1991; 1 (2) :102-6.
9. Lwebuga MJ. Matrix-driven pneumocyte differentiation. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144 (2) :452-7.
10. Otto VC, Ten HOA, Franken C, Hermans J, Dijkman JH. Protective effect of pulmonary surfactant on elastase-induced emphysema in mice. *Eur Respir J* 1992; 5 (10) :1223-30.
11. Young PP, Mendelson CR. A GT box element is essential for basal and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulation of the human surfactant protein A2 gene in alveolar type II cells: evidence for the binding of lung nuclear factors distinct from Sp1. *Mol Endocrinol* 1997; 11 (8) :1082-93.
12. Pollner R, Fischer G, Poschl E, Kuhn K. Regulation of divergent transcription of the genes coding for basement membrane type IV collagen. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 580 (44) :44-54.

紫外線による Ret チロシンキナーゼ活性化のメカニズム

名古屋大学 医学部免疫

加藤 昌志

The cellular proto-oncogene *c-RET* encodes a receptor-tyrosine kinase. The catalytic activities of Ret kinases as the products of oncogene *RET* with multiple endocrine neoplasia type 2A (Ret-MEN2A) or 2B (Ret-MEN2B) mutations and the hybrid gene from *c-RET* and *RFP* (Rfp-Ret) were higher than those of c-Ret. Here we demonstrate that ultraviolet light (UV) irradiation induced activation of c-Ret and superactivation of genetically activated Ret-MEN2A, Ret-MEN2B and Rfp-Ret. The UV-induced activation and superactivation of Ret was closely associated with the redox reaction-mediated dimerization or polymerization of the Ret proteins. UV also induced intracellular dimerization and activation of the extracellular domain-deleted mutant Ret (RET-PTC-1). Overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase in cells due to gene transfection prevented the promotion of UV-mediated dimerization and the superactivation of Ret-MEN2A kinase. These results suggest that the UV-induced intracellular oxidative condition mediates dimerization and the activation of Ret kinases.

1 緒言

皮膚の老化は、シワやシミ（肝斑）を誘導し、美容上の大きな問題となる。紫外線は、酸化ストレスの一種^{1, 2)}で、皮膚の老化を促進したり、悪性黒色腫などの皮膚癌を誘発する可能性が、古くより報告されている。近年、紫外線が細胞内シグナル伝達の初期段階であるチロシンキナーゼを活性化することが、報告された²⁾。Srcなどのチロシンキナーゼの活性化は、コラーゲン分解酵素の生成を誘導する³⁾ので、紫外線は、チロシンキナーゼを活性化を介してコラーゲン分解酵素の生成と活性化を誘導し、シワを誘導する可能性がある。ゆえに、紫外線によるチロシンキナーゼの活性化のメカニズムを解明することは、紫外線によるシワの形成などを防ぐために有用であると考えられる。

*c-RET*は、レセプタータイプのチロシンキナーゼをコードしており、腎臓や腸管神経節の形成に不可欠な遺伝子である⁴⁻⁶⁾。*c-RET*は、点変異やリアレンジメントを起こすことにより、ヒトの多発性内分泌腺腫2A型 (MEN2A) や2B型 (MEN2B) および甲状腺癌 (PTC) の発生に関与していると考えられている⁷⁻¹²⁾。

本研究では、紫外線がRetキナーゼを活性化するメカニズムを一部解明した。さらに、Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) が、紫外線によるRetチロシンキナーゼ活性化作用を抑制できることを示した。

2 実験



Control of ultraviolet light-mediated Ret tyrosine kinase activation

Masashi Kato

Department of Immunology, Nagoya University School of Medicine

2.1 Ret 変異体蛋白質を発現した細胞株の樹立

Figure 1に示すように、*c-RET* (Figure 1A)、*RET-MEN2A* (*c-RET* の634番目のシステインをアルギニンに変異; Figure 1A)、*RET-MEN2B* (*c-RET* の918番目のメチオニンをスレオニンに変異; Figure 1A) および細胞外領域を欠損した *RET-PTC-1* (Figure 1B)、*RET-PTC-1-C365A* (*RET-PTC-1* の365番目のシステインをアラニンに変異; Figure 1B)、*RET-PTC-1-C376A* (*RET-PTC-1* の376番目のシステインをアラニンに変異; Figure 1B) の遺伝子を NIH3T3 細胞に導入し、これらのRet変異体蛋白質を発現した細胞株の樹立した。また、HAのタグを

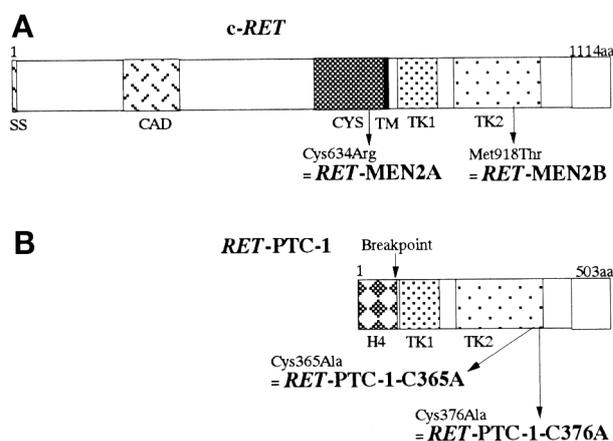


Figure 1. Schematic illustration of mutant *RET* cDNA constructs.

(A) *RET* cDNA encoding a long (1114 amino acids) isoform in which cysteine at codon 634 was replaced by arginine (C634R; *RET-MEN2A*), or methionine at codon 918 by threonine (M918T; *RET-MEN2B*). (B) Mutant *RET* cDNA encoding a long isoform in which the extracellular domain was deleted (*RET-PTC-1*). *RET-PTC-1* in which cysteine at codon 365 or 376 was replaced with alanine (*RET-TPC-1-C365A*, *Ret-TPC-1-C376A*). SS, signal sequence; CAD, cadherin-like domain; CYS, cysteine-rich region; TM, transmembrane domain; TK1, tyrosine kinase domain 1; TK2, tyrosine kinase domain 2; aa, amino acids. (参考文献 1 より引用)

つけた Cu/Zn superoxide dismutase (*HA-SOD1*) 遺伝子を RET-MEN2A 遺伝子と同時に NIH3T3 細胞に導入し、Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) と *Ret*-MEN2A の蛋白質を両方発現した細胞株も作製した。

2.2 ウェスタンブロット、免疫沈降、キナーゼアッセイ

本研究で施行したウェスタンブロットについては、以前記載した方法に準じた¹³⁾。また、免疫沈降およびキナーゼアッセイについても、同様に以前記載した方法に準じて施行した^{14, 15)}。

2.3 紫外線照射

細胞に対する紫外線の照射は、Dhanwada *et al.* の方法¹⁶⁾ に準じて施行された。紫外線 B の照射量はマイクロボル

トアンプメーター (UVR-3036/S; Topcon Corporation, Tokyo, Japan) にて測定した。

3 結果

3.1 Ret キナーゼは遺伝子レベルの変異により活性化される

Figure 2 に示したように、Ret-MEN2A および Ret-MEN2B は、Figure 1 で示したような遺伝子レベルの変異により、*c-Ret* に比較して 2 倍から数倍活性化されていた。

3.2 Ret キナーゼは紫外線により活性化される

c-Ret は、紫外線 B 照射後 5 分後に、著明に活性化された (Figure 3A-C)。さらに興味深いことには、遺伝子レベルの変異によりすでに活性化されている Ret-MEN2A および Ret-MEN2B は、紫外線 B の照射によりさらに活

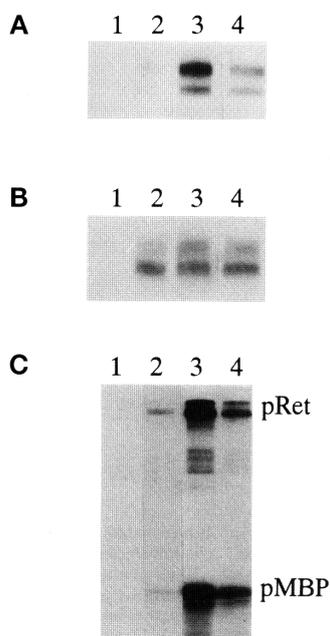


Figure 2. Comparison of kinase activity between *c-Ret*, Ret-MEN2A, and Ret-MEN2B.

Lysates from NIH 3T3 cells transfected with *c-RET* (lane 2 in A-C), *RET-MEN2A* (lane 3 in A-C) or *RET-MEN2B* (lane 4 in A-C) and non-transfected control NIH 3T3 cells (lane 1 in A-C) were immunoprecipitated with anti-Ret antibody. Then, those were subjected either to Western blotting with anti-phosphotyrosine antibody (A) or anti-Ret antibody (B) or to in vitro kinase assay (C). SDS-PAGE was done in 5% (A-B) or 13% (C) polyacrylamide gel. pRet (doublet band): autophosphorylated *c-Ret*, Ret-MEN2A or Ret-MEN2B; pMBP: phosphorylated MBP. All measurements were repeated 4 times with basically the same results. (参考文献 1 より引用)

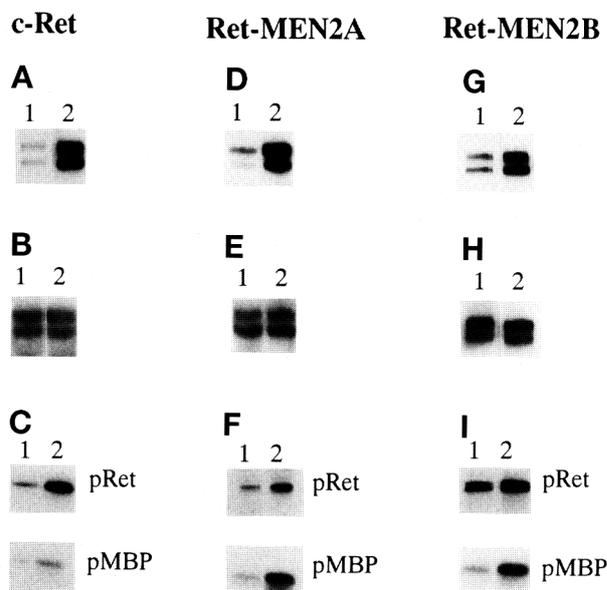


Figure 3. UV irradiation induces superactivation of mutant Ret.

Lysates from the NIH 3T3 cells transfected with *c-RET* (A-C), *RET-MEN2A* (D-F) or *RET-MEN2B* (G-I) after sham or UV irradiation were immunoprecipitated with anti-Ret antibody, and the resulting immunoprecipitates were subjected either to Western blotting with anti-phosphotyrosine antibody (A, D, G) or anti-Ret antibody (B, E, H) or to in vitro kinase assay (C, F, I). SDS-PAGE was done in 5% (A, B, D, E, G, H) or 13% (C, F, I) polyacrylamide gel. (A-I) lane 1: sham irradiation; lane 2: 5 min after 600 J/m² of UVB irradiation. pRet (doublet band): autophosphorylated *c-Ret* (C), Ret-MEN2A (F) or Ret-MEN2B (I); pMBP: phosphorylated MBP. All measurements were repeated 3-4 times with basically the same results. Representative results are provided. The exposure times to X-ray film for autoradiography for Figure A, D and G, and for Figure C, F and I were adjusted to develop bands with comparable density for lane 1 as sham irradiated control; see Figure 2 for comparison of the density of bands among *c-Ret*, Ret-MEN2A and Ret-MEN2B which were developed by the same exposure time. (参考文献 1 より引用)

活性化された。我々は、この反応を紫外線によるスーパーアクティベーションと呼んだ。

3.3 Ret キナーゼの下流に位置するシグナル伝達分子も紫外線により活性化される

Figure 4A-H に示したように、Ret-MEN2A の下流に位置するシグナル伝達分子である ERK、JNK、p38、cJun は、c-Ret のそれらに比較して活性化されていた。紫外線 B の照射は Ret-MEN2A の下流に位置するシグナル伝達分子を、さらに活性化（スーパーアクティベーション）させた (Figure 4I-L)。

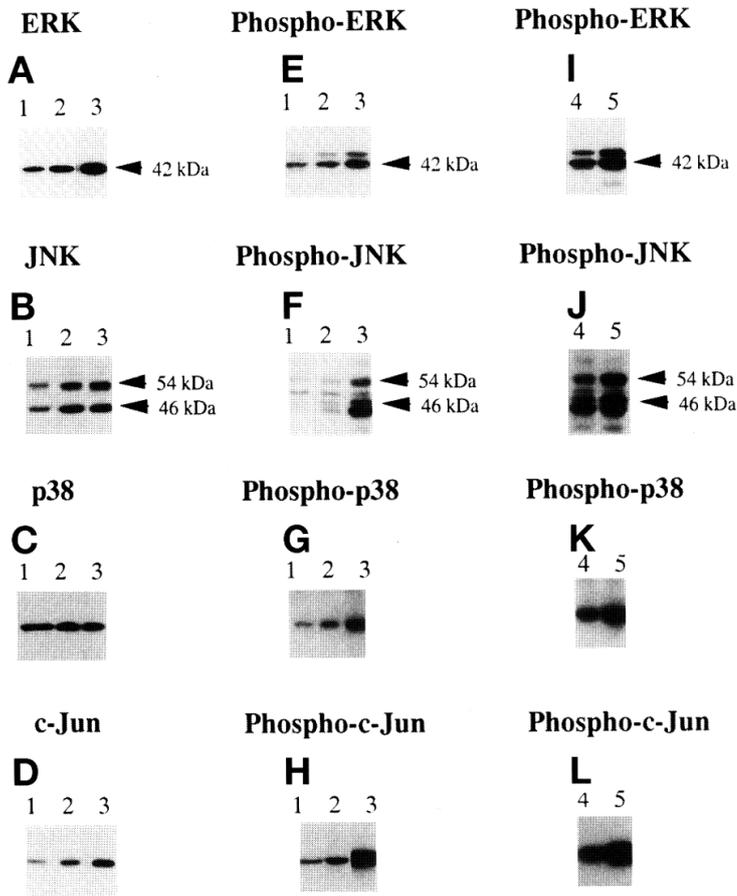


Figure 4 UV irradiation promotes phosphorylation of MAPK family and c-Jun.

Lysates from the NIH 3T3 cells transfected with *c-RET* (lane 2 in A-H) or *RET-MEN2A* (lane 3 in A-H, lane 4 and 5 in I-L) and non-transfected control NIH 3T3 cells (lane 1 in A-H) without stimulation (lane 1-3 in A-H, lane 4 in I-L) or 10 min after 600 J/m² of UVB irradiation (lane 5 in I-L) were subjected to Western blotting with anti-ERK (A), anti-phospho-ERK (E, I), anti-JNK (B), anti-phospho-JNK (F, J), anti-p38 (C), anti-phospho-p38 (G, K), anti-c-Jun (D) and anti-phospho-c-Jun (H, L) antibodies. SDS-PAGE was done in 10 % polyacrylamide gel (A-L). All measurements were repeated 3 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文献 1 より引用)

3.4 紫外線は Ret 分子の二量体形成を促進させ、Ret キナーゼを活性化させる

Figure 5 および Figure 6 に示したように、紫外線 B は、c-Ret、Ret-MEN2A、Ret-MEN2B 分子の SS 結合を介した二量体形成の促進し、それらのキナーゼを活性を亢進させた。

3.5 Ret 分子の細胞内領域は、紫外線のターゲットになる

Figure 7 に示したように、紫外線 B は細胞外領域を欠落した Ret-PTC-1 の SS 結合を介した二量体形成の促進し、

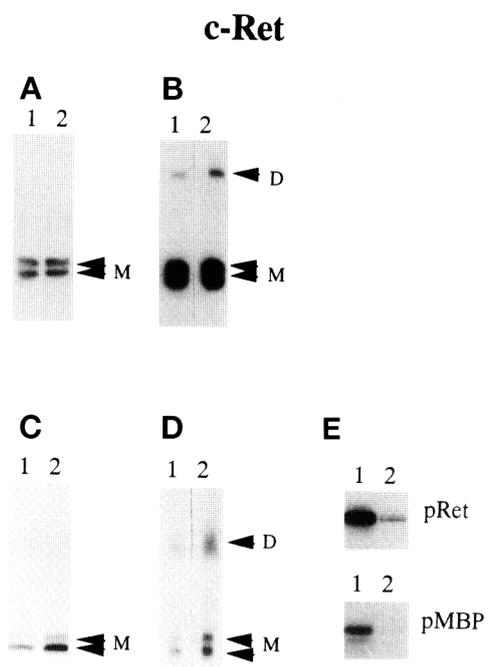


Figure 5 UV promotes dimerization of c-Ret.

Lysates from NIH 3T3 cells transfected with *c-RET* after sham or UV irradiation were subjected to Western blotting with anti-Ret antibody (A, B) or to *in vitro* kinase assay (C-E) after immunoprecipitation with anti-Ret antibody. SDS-PAGE was done under reducing (A, C, E) or unreducing (B, D) conditions in 5 % (A-D) or 13 % (E) polyacrylamide gel. (A-D) lane 1: sham irradiation; lane 2: 5 min after 600 J/m² of UVB irradiation. (E) Ret proteins were immunoprecipitated from the lysate of the transfectants that had received 600 J/m² of UVB irradiation 5 min before. The immunoprecipitated Ret proteins were untreated (lane 1) or treated with 5% 2ME for 30 min (lane 2), followed by 5 times washing for removing 2ME, and then subjected to *in vitro* kinase assay. pRet (doublet band): autophosphorylated c-Ret; pMBP: phosphorylated MBP; M: monomer Ret; D: dimer Ret. All measurements were repeated 3 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文献 1 より引用)

キナーゼ活性を亢進させた。これは、Ret 分子の細胞内領域が、紫外線の標的になることを示している。

3.6 Ret-PTC-1 分子の 376 番目のシステインは、紫外線のターゲットになる

Figure 8 に示したように、紫外線 B は Ret-PTC-1-C365A の SS 結合を介した二量体形成の促進し、そのキナーゼ活性を亢進させた。しかし、紫外線 B 照射により Ret-PTC-1-C376A の二量体形成とキナーゼ活性の亢進はおこらなかった。これらの結果は、Ret-PTC-1 分子の 376 番目のシステインが、紫外線の標的であることを示している。

3.7 SOD1 は、紫外線を介する Ret のスーパーアクティベーションを抑制できる

Figure 9 に示したように、Ret-MEN2A と SOD1 を同時に導入することにより紫外線 B 照射による SS 結合を介した Ret 分子の二量体形成を阻害し、そのキナーゼ活性の

亢進を抑制できた。

4 考 察

本研究では、試験管内において紫外線が c-Ret のみでなくすでに遺伝子の変異により活性化されている MEN2A 型 Ret (Ret-MEN2A) や MEN2B 型 Ret (Ret-MEN2B) を活性化する (スーパーアクティベーション) ことを示した¹⁾。さらに、紫外線が、Ret 分子の SS 結合を介した二量体形成を促進し、その活性を増強することを示すとともに、紫外線の標的となるアミノ酸を一つ特定した。また、SOD1 を用いて、これらの紫外線の作用を緩和することに成功した。これらの結果は、皮膚の老化や悪性黒色腫などの皮膚癌を誘発する紫外線に対する防護対策をこうじるための基礎データとして、有益であると考えられる。

一方、我々は Metallothionein-I (MT) をプロモーター

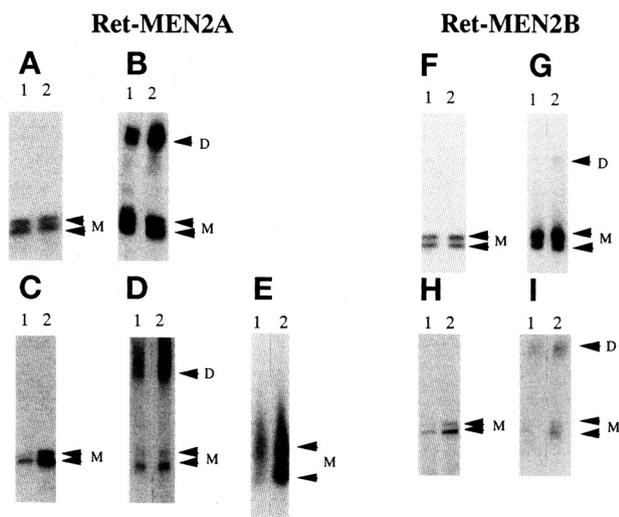


Figure 6. UV promotes dimerization of Ret-MEN2A and Ret-MEN2B.

Lysates from NIH 3T3 cells transfected with *RET*-MEN2A (A-E) or *RET*-MEN2B (F-I) after sham or UV irradiation were subjected either to Western blotting with anti-Ret antibody (A, B, F, G) or to in vitro kinase assay (C, D, E, H, I) after immunoprecipitation with anti-Ret antibody. SDS-PAGE was done under reducing (A, C, E, F, H) or unreducing (B, D, G, I) conditions in 5 % polyacrylamide gel. (E) The dimerized bands in D were cut out from the gel and separated under reducing condition. (A-I) lane 1: sham irradiation; lane 2: 5 min after 600 J/m² of UVB irradiation. M: monomer Ret; D: dimer Ret. For direct comparison of kinase activity between Ret-MEN2A and Ret-MEN2B, see Figure 2. All measurements were repeated 3 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文献 1 より引用)

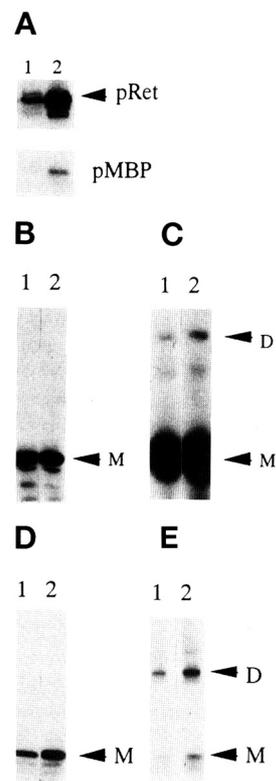


Figure 7. UV promotes activation and dimerization of extracellular domain-deleted Ret.

Lysates from NIH 3T3 cells transfected with *RET*-PTC-1 after sham or UV irradiation were analyzed either by Western blotting with anti-Ret antibody (B, C) or in vitro kinase assay after immunoprecipitation with anti-Ret antibody (A, D, E). SDS-PAGE was done under reducing (A, B, D) or unreducing (C, E) conditions in 7 % (B-E) or 13 % (A) polyacrylamide gel. (A-E) lane 1: sham irradiation; lane 2: 5 min after 600 J/m² of UVB irradiation. M: monomer Ret; D: dimer Ret. All measurements were repeated 3 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文献 1 より引用)

エンハンサーに用い、癌遺伝子 *ret* を導入することにより、メラノサイト系良性腫瘍を必発するが、悪性転化しない MT/*ret* トランスジェニックマウス 192 系を樹立した¹⁾。さらに、このトランスジェニックマウスに発症したメラノサイト系良性腫瘍に対する紫外線照射が、腫瘍細胞における Ret キナーゼの活性の増強を伴い、悪性黒色腫への転化を誘導することを見出した (Kato *et al.*, 投稿中)。これは、紫外線による Ret キナーゼのスーパーアクティベーションの生物学的意義を示していると考えられる。

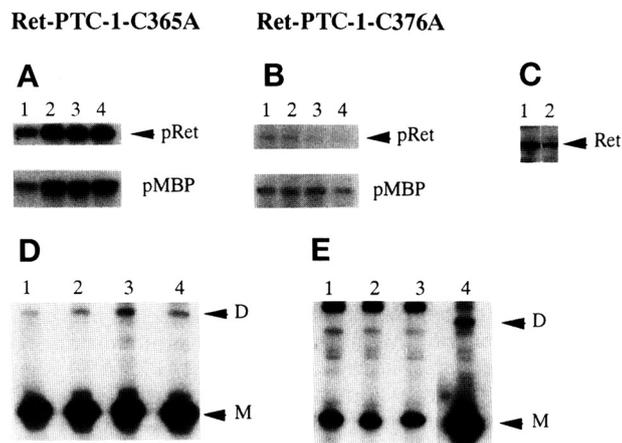


Figure 8. UV does not promote activation and dimerization of extracellular domain-deleted Ret whose cysteine 376 was replaced with alanine.

Lysates from NIH 3T3 cells transfected with original *RET*-TPC-1 (lane 4 in D and E), *RET*-TPC-1-C365A (A, lane 1 in C, lane 1-3 in D) and *RET*-TPC-1-C376A (B, lane 2 in C, lane 1-3 in E) after sham or UV irradiation were analyzed either by *in vitro* kinase assay after immunoprecipitation with anti-Ret antibody (A, B) or by Western blotting with anti-Ret antibody (C-E). SDS-PAGE was done under reducing (A-C) or unreducing (D-E) conditions in 8 % (C-E) or 13 % (A, B) polyacrylamide gel. (A, B) lane 1: sham irradiation; lanes 2-4: 5 min (lane 2), 10 min (lane 3) and 15 min (lane 4) after 600 J/m² of UVB irradiation. (D, E) lane 1 and 4: sham irradiation; lanes 2-3: 5 min (lane 2) and 15 min (lane 3) after 600 J/m² of UVB. pRet: autophosphorylated Ret-TPC-1-C365A (A) or Ret-TPC-1-C376A (B); pMBP: phosphorylated MBP. M: monomer Ret; D: dimer Ret. All measurements were repeated 3 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文献 1 より引用)

(参考文献)

1. Kato, M., Iwashita, T., Takeda, K., Akhand, A.A., Liu, W., Yoshihara, M., Asai, N., Suzuki, H., Takahashi, M. and Nakashima, I. (2000). Ultraviolet light induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases. *Mol. Biol. Cell* 11, 93-101.
2. Devary, Y., Gottlieb, R.A., Smeal, T., Karin, M. (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell* 71, 1081-1091.

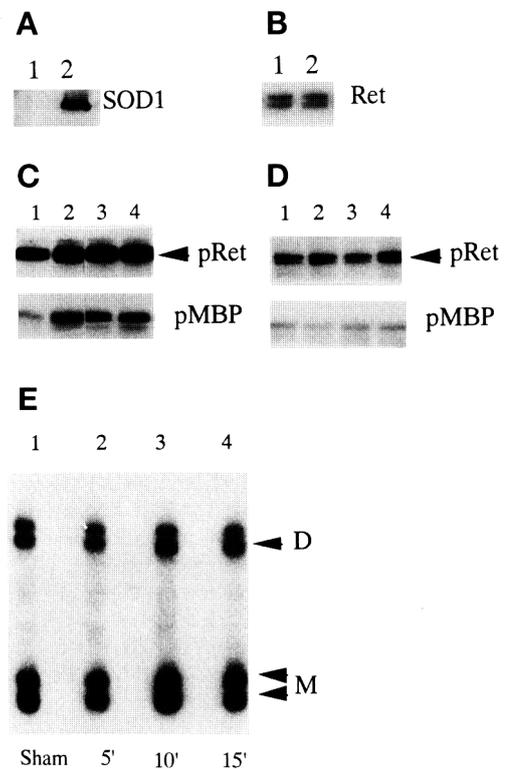


Figure 9. Over-expression of SOD1 in cells prevents UV-mediated superactivation of Ret.

Lysates from the HA-SOD1⁻ (C, lane 1 in A and B) or HA-SOD1⁺ (D, E, lane 2 in A and B) NIH 3T3 cells transfected with Ret-MEN2A were analyzed either by Western blotting with anti-HA (A) or anti-Ret antibody (B, E), or by *in vitro* kinase assay (C, D) after immunoprecipitation with anti-Ret antibody. SDS-PAGE was done under reducing (A-D) or unreducing (E) conditions in 5 % (E), 10% (A, B) or 13 % (C, D) polyacrylamide gel. (C-E) lane 1: sham irradiation; lanes 2-4: 5 min (lane 2), 10 min (lane 3) and 15 min (lane 4) after 600 J/m² of UVB irradiation. pRet (doublet band): autophosphorylated Ret-MEN2A with (C) or without (D) SOD1; pMBP: phosphorylated MBP; M: monomer Ret; D: dimer Ret. All measurements were repeated 3 times with basically the same results. Representative results are provided. (参考文献 1 より引用)

3. Sato H., Kita M., Seiki M. (1993). v-Src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to retinoblastoma control elements. *J Biol Chem* 268, 23460-23468.
4. Schuchardt, A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Costantini, F. and Pachnis, V. (1994). *Nature* 367, 380-383.
5. Takahashi, M. (1995). Oncogenic activation of the ret protooncogene in thyroid cancer. *Crit. Rev. Oncogenesis* 6, 35-46.
6. Takahashi, M. (1997). The role of the ret protooncogene in human disease. *Nagoya J. Med. Sci.* 60, 23-30.
7. Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, M.T., Melillo, R.M., Donghi, R., Bongarzone, I., Pierotti, M.A., Della Porta, G., Fusco, A. and Vecchio, G. (1990). PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and its frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60, 557-563.
8. Ishizaka, Y., Ushijima, T., Sugimura, T. and Nagao, M. (1990). cDNA cloning and characterization of ret activated in a human papillary thyroid carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 402-408.
9. Donis-Keller, H., Dou, S., Chi, D., Carlson, K.M., Toshima, T., Laimore, T.C., Howe, J.R., Moley, J.F., Goodfellow, P. and Wells, S.A.Jr. (1993). Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum. Mol. Genet.* 2, 851-856.
10. Mulligan, L.M., Kwok, J.B., Healey, C.S., Elsdon, M.J., Eng, C., Gardner, E., Love, D.R., Mole, S.E., Moore, J.K., Papi, L., Ponder, M.A., Telenius, H., Tunnacliffe, A. and Ponder, B.A.J. (1993). Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 363, 458-460.
11. Carlson, K.M., Dou, S., Chi, D., Scavarda, N., Toshima, K., Jackson, C.E., Wells, S.A.Jr., Goodfellow, P.J. and Donis-Keller, H. (1994). Single missense mutation in the tyrosine-kinase catalytic domain of the RET proto-oncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 1579-1583.
12. Hofstra, R.M.W., Landsvater, R.M., Ceccherini, I., Stulp, R.P., Stelwagen, T., Luo, Y., Pasini, B., Hoppener, J.W.M., van Amstel, H.K.P., Romeo, G., Lips, C.J.M. and Buys, C.H.C.M. (1994). A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature* 367, 375-376.
13. Kato, M., Liu, W., Yi, H., Asai, N., Hayakawa, A., Kozaki, K., Takahashi, M. and Nakashima, I. (1998a). The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits growth and metastasis of malignant melanoma primarily developed in ret-transgenic mice. *J. Invest. Dermatol.* 111, 640-644.
14. Kato, M., Takahashi, M., Akhand, A.A., Liu, W., Dai, Y., Shimizu, S., Iwamoto, T., Suzuki, H. and Nakashima, I. (1998b). Transgenic Mouse Model for Skin Malignant Melanoma. *Oncogene* 17, 1885-1888.
15. Kato, M., Liu, W., Akhand, A.A., Dai, Y., Ohbayashi, M., Tuzuki, T., Suzuki, H., Isobe, K., Takahashi, M. and Nakashima, I. (1999). Linkage between melanocytic tumor development and early burst of Ret protein expression for tolerance induction in metallothionein-I/ret transgenic mouse lines. *Oncogene* 18, 837-842.
16. Dhanwada, K.R., Dickens, M., Neades, R., Davis, R. and Pelling, J.C. (1995). Differential effects of UV-B and UV-C components of solar radiation on MAP kinase signal transduction pathways in epidermal keratinocytes. *Oncogene* 11, 1947-1953.
17. Iwamoto, T., Takahashi, M., Ito, M., Hamatani, K., Ohbayashi, M., Wajjwalku, W., Isobe, K. and Nakashima, I. (1991). Aberrant melanogenesis and melanocytic tumour development in transgenic mice that carry a metallothionein/ret fusion gene. *EMBO J.* 10, 3167-3175.

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

岡山大学 薬学部

根 岸 友 恵、豊 島 め ぐ み

The use of sunscreen seems to be important to avoid the damage caused by sunlight. There are numerous epidemiological investigations showing that the sunlight is carcinogenic to humans. The biological activity of sunscreen is evaluated by its ability to protection from erythema. However, we consider that the sunscreen's protective effect against sunlight induced-mutation should also be taken into account. In this study we examined the protective effect of two commercial sunscreens against the mutagenicity induced by natural sunlight and against the DNA damage induced by sunlight or UVB-irradiation. The mutagenicity was detected by the Drosophila wing spot test and DNA damaging activity was estimated by the Drosophila in vivo DNA repair test. When the sunscreen was pasted on the cover of petri dish in which Drosophila larvae were exposed to the sun, the mutagenicity was suppressed down to almost the control level. We prepared by ourselves sunscreens containing UVB absorbents at various concentrations, and measured the transmittance. From the results, it is suggested that the protection against the light of wavelength was shorter than 320 nm may be important to avoid the genotoxicity of sunlight.

1. 緒 言

太陽光紫外線はヒトの皮膚にさまざまな影響を与える重要な因子であり、その作用は波長により大きく異なっていることは知られているが、その詳細な波長特性は未だ不明である。従来、地表に届いている太陽光紫外線は波長によってUVB (290-320nm)、UVA (320-400nm) に分けられている¹⁾。一般にUVBは紅斑生成作用、UVAは黒化作用があると言われている。しかしながら、紫外線のスペクトラムが連続的なものである以上、このような分類は不完全なものである。太陽光紫外線の作用を解析するには、太陽光そのものを材料とする研究と合わせて、単色光照射により個々の波長における作用を調べる詳細な実験が必要である。また、従来UVA領域の光はUVBあるいはそれ以下の波長の光に比べてあまり研究されてこなかったが、短波長紫外線と違って大気や窓ガラスなどで吸収されず、ヒトの皮膚においてもUVBに比べて表皮の内部まで透過する²⁾ことから、その重要性が見直されてきている。太陽光紫外線の最も重大な作用は発がん作用であるが、発がん作用のスクリーニング法として、変異作用を指標とすることは広く認められている。そこで本研究では、UVBからUVA領域の種々の波長の光の変異作用と自然太陽光の変異作用を詳細に検討すると同時に、サンスクリーン塗布による変異抑制の実験を行った。

2. 実 験

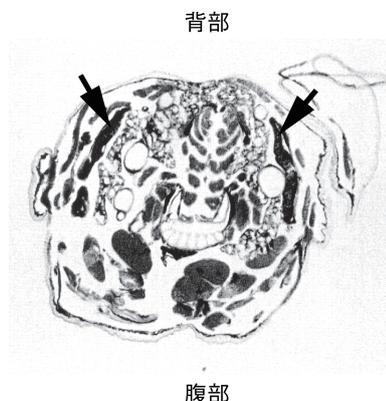
2.1 ショウジョウバエ体細胞突然変異検出系

ショウジョウバエは卵、幼虫、蛹、成虫と約10日間で完全変態する昆虫である。孵化後の体細胞分裂は幼虫期の4日間、成虫原基(将来成虫の器官となる組織)でしか行なわれない。したがって突然変異を検出できるのはこの時期に幼虫を処理したときに限られる。体細胞突然変異を検出する系として、ショウジョウバエ翅毛スポットテストを用いた³⁾。これは翅毛形態マーカーとして炎毛(*flr*)を持つ雄(*y; Dp (1;3) sc⁴, y⁺ flr/TM1, Me ri Sbd²*)と多翅毛(*mwh*)を持つ処女雌(*y; mwh j v*)を交配させて得た三齢幼虫を被験体として用い、成虫になったときのハネ翅毛に現れる形態の変化を指標として調べる方法である。すなわち標的器官とする成虫原基は翅原基である。この翅原基は図1のように成虫原基としては表皮近くに存在し、紫外線への曝露が可能と考えられる。この試験系では遺伝子突然



Mutagenicity of solar UV in Drosophila and its protection by sunscreen
Tomoe Negishi, Megumi Toyoshima

*
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Okayama University



矢印で示した部分が翅原基。左右1対の翅原基を持つ。

図1 ショウジョウバエ3齢幼虫の横断面

変異のみでなく、組換え、端部欠失、不分離等真核生物特有の染色体レベルでの変化も検出される。処理した三齢幼虫はインスタント培地 (Formula 4-24, Carolina Biological Supply Co.) に移し、成虫になるまで 25°C で飼育する。羽化したハエのハネを集め、スライド標本とした後、翅毛の形態変化を顕微鏡で観察する。変異した翅毛の集団をスポットと呼び、染色体組換えによってのみ生じる双子スポット (炎毛と多翅毛のスポットが隣接して存在するもの)、どちらか一種類のみのスポットであるシングルスポットに分類して計数する³⁾。

2.2 ショウジョウバエ DNA 傷害修復試験⁴⁾

この試験系に用いる株 (*sc z^{1 w+(TE)} mei-9^a mei-41^{D5/C(1)DX, y f}*) は図 2 に示したように常に雄は除去修復欠損、複製後修復欠損となるように工夫された株である。したがって雄はその体細胞 DNA に何らかの損傷を受けた場合、修復ができずに生存率が減少する。それに反して雌は正常に損傷を修復できるので生存数に変化は見られない。そこで成虫での雌雄の比を求めることによって DNA 損傷の程度を知ることができる。スポットテスト同様に処理し、羽化してきた成虫の雌雄の個体数を計数して性比を得る。

本研究で用いたショウジョウバエは梁治子博士 (大阪大学医学部) 並びに藤川和男博士 (近畿大学原子力研究所) に分与していただいた。

2.3 太陽光曝露方法⁵⁾

ショウジョウバエ三齢幼虫を集め、1.5mL ショ糖溶液の入ったプラスチックシャーレ (ADVANTEC) におよそ 150 匹の幼虫を入れ、曝露に用いた。長時間曝露中の幼虫の逃亡を避けるために、嫌気性菌培養用シャーレを用い、通気用にフタに径 5mm の穴を開けメッシュを張った。岡山大学のキャンパス草地に図 3 のような装置を組み、曝露中の温度を一定に保つために循環装置付きの恒温水槽の水面すれすれにシャーレを置いた。曝露中の温度はシャーレ内に張ったサーモテープでチェックし、25 ± 2°C に保った。日射量は MED (minimum erythema dose) を Erythema UV Intensity & Dose Meter (Solar Light Co.) で測定した。UVB は UVX radiometer (UVP, Inc.) に UVX-31 センサーを付けて測定

し、UVA 量は UVX-36 センサーで測定した。曝露後、幼虫をインスタント培地に移し暗所で成虫まで飼育し、翅毛スポットの観察あるいは性比の計数を行った。曝露後の幼虫の取扱は光回復の影響を避けるために黄色ランプの下で行った。サンスクリーンの効果を調べる時は、原則として日本化粧品工業 SPF 測定法基準及び UVA 防止効果測定法基準に従い、シャーレのフタに 2mg/cm² あるいは 2μL/cm² になるように塗布した。サンスクリーンとしては市販のものを用い、SPF16 と SPF87 の製品の効果を比較した。サンスクリーン塗布時の透過波長、透過率は分光光度計 (Hewlett Packard 8452A Diode Array Spectrophotometer) を用いて、フタを光路上において測定した。

2.4 健康線用蛍光ランプ照射

ブロードな波長域を持つ実験光として健康線用蛍光ランプ (FL20S・E, Toshiba, 波長 275-400nm、ピーク波長 310nm) (健康ランプ) を用いた。照射装置は図 4 に示

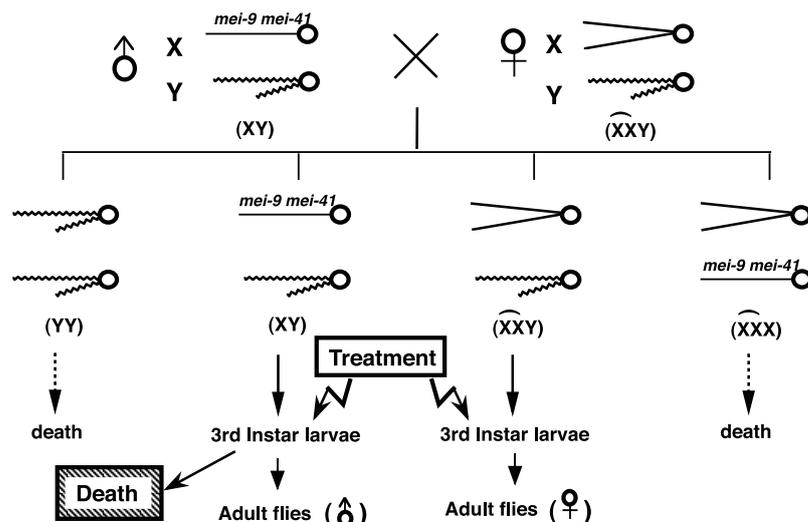


図 2 ショウジョウバエ DNA 傷害修復試験



図 3 太陽光曝露装置

した。2.3で述べたものと同様のシャーレを用いて照射し、線量測定はシャーレのフタの下で行なって、約3mW/m²であった。サンスクリーンの実験は太陽光曝露と同様にシャーレのフタに塗布して行なった。市販の製品に加えて、UVB吸収剤として4-dimethylaminobenzoic acid (東京化成)を吸水軟膏(Merk)を基剤として一定量混和したものを用意した。また、UVA吸収剤として2-(2-benzotriazolyl)-p-cresol (東京化成)を吸水軟膏製剤としたものを作製して効果を比較した。それぞれの吸収剤の紫外外部吸収曲線は図5のようである。吸収剤：基剤が1：40、1：4、5：4の製剤を調製した。また、吸水軟膏の代わりに紫外部に吸収が無い流動パラフィン(シオエ製薬)を溶剤として用いた製品を調製し、効果の検討を行なった。

2.5 単色光照射の変異原性

太陽光紫外線の波長による生物活性を見るために単色光照射による変異原性及びDNA傷害性を検察した。かなり広い範囲に一定波長の光が照射できる装置が必要であり、この実験は国立岡崎共同研究機構基礎生物学研究所にある大型スペクトログラフ⁶⁾を用いる共同研究グループ(代表者：檜枝光太郎(立教大学))で行った。水平方向に分光された光を鏡を使って垂直方向に方向を変え、先の実験と同様にプラスチックシャーレの上方から光が照射されるようにした。光強度はフォトダイオード(S1337-66BQ, Hamamatsu Photonics)でモニターしながら光電子密度計(photon density meter HK-1)を用いて測定した。照射時の室温は25℃に保たれるように空調した。照射および照射後の操作は太陽光ならびに健康ランプの実験と同様に行なった。

3. 結果

3.1 太陽光および健康線用蛍光ランプの活性とサンスクリーンの効果

翅毛スポットテストを用いた太陽光変異原性の2年間のモニター実験により、年間を通じて太陽光に変異原性が観察された。その強さは日射量に比例しており、冬期は夏期の1/3～1/5であった⁵⁾。今回、日差しの強くなる4月末にサンスクリーンによる効果を調べた。太陽光の変異原性と曝露時にサンスクリーンをフタ全体に約40mg塗布した場合の結果を図

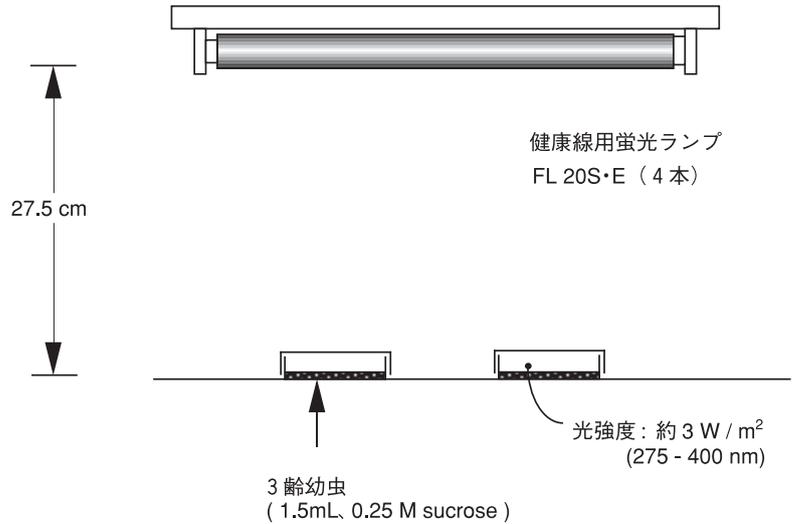
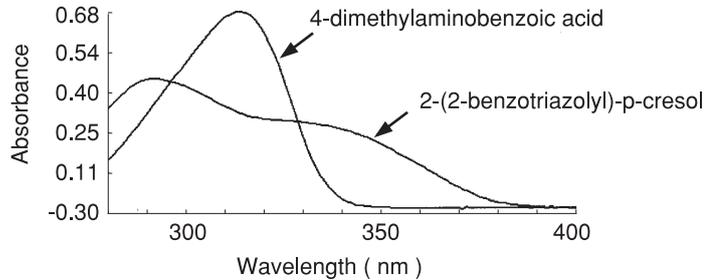
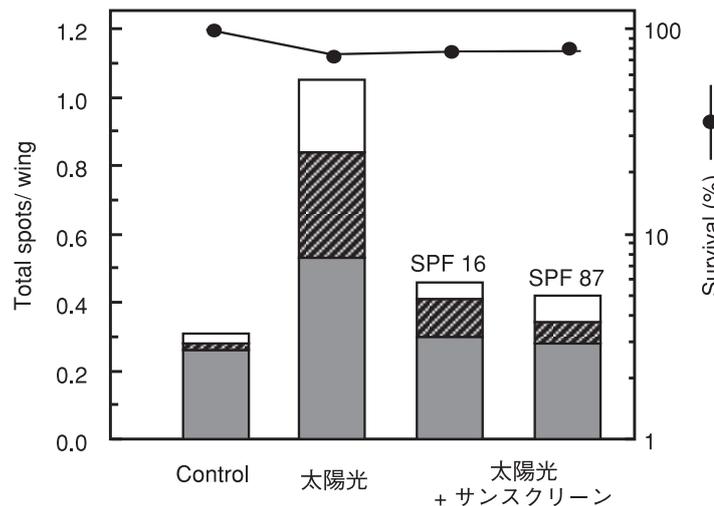


図4 健康線用蛍光ランプ照射装置



各吸収剤の濃度は4mg/L、溶媒としてはDMSOを用いた。

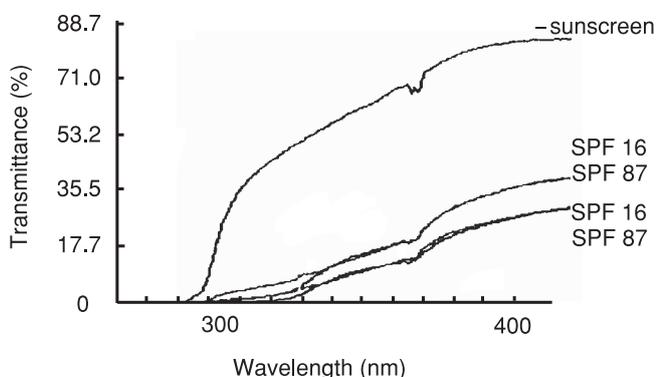
図5 紫外線吸収剤の紫外外部吸収曲線



太陽光曝露時(1998年4月29日午前10時～14時)の変異原性とその時シャーレのフタに各SPF値のサンスクリーンを40mg/20cm³塗布したときの変異原性。変異原性はtwin spots (□)、large single spots (▨)、small single spots (■)を合わせてハネ1枚あたりのスポット数で表した。生存率(●)は暗所で4時間置いた幼虫から羽化した成虫数を1として曝露処理後の成虫数から求めた。

図6 太陽光の変異原性に対するサンスクリーンの阻害効果

6に示した。4時間曝露時のMEDは8、UVAは170kJ/m²、UVBは57kJ/m²であった。サンスクリーンの塗布により、ほぼコントロールレベルまで変異原性が抑えられた。このときサンスクリーンを塗布したシャーレのフタの紫外線透過率は、SPF値に関わらず、図7のように300nm以下の光はほとんど透過せず、また320nm以上の紫外光でも80%以上の遮光効果が見られた。このことは変異原活性がいずれのサンスクリーンでもほぼ15-20%になったことと良く一致していると言える。一方、太陽光の細胞傷害はDNA傷害修復試験を用いることにより、より高感度に検出されることがわかったので、この試験系を用いてサンスクリーンの効果の検討を行なった。少し天候の違う日に2回の実験を行なったところ、図8のような結果



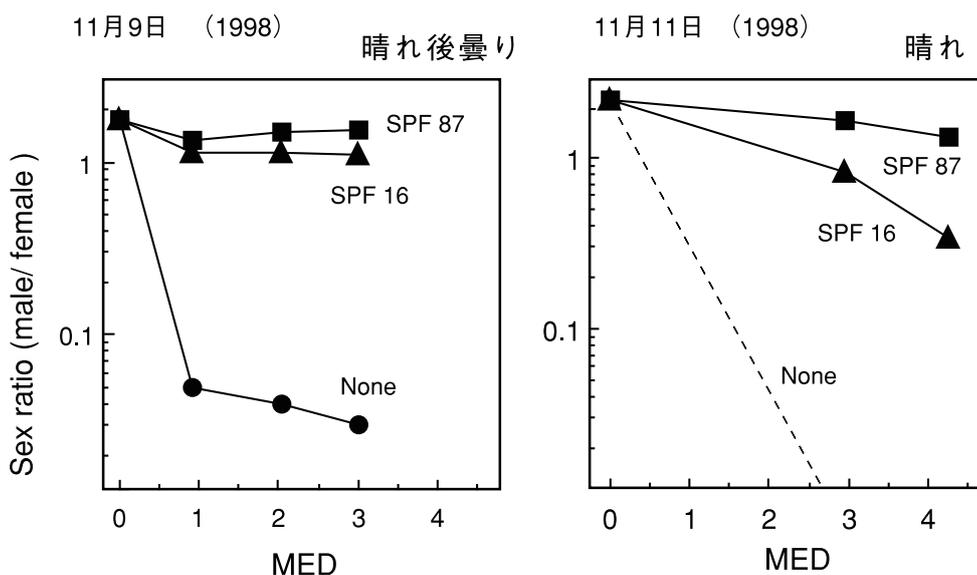
市販サンスクリーンは約 40mg/20cm²をプラスチックシャーレのフタに塗布し、キムワイプで薄く延ばした。フタを分光光度計の光路上に置き、数箇所まで透過率を測定した。

図7 市販サンスクリーン塗布時の透過光波長と透過率

が得られた。ここでMED3に相当する積算紫外線量は11月9日では5時間、11月11日では3時間で達成されており、同じMEDでも短時間で曝露されたときの方が致死作用が強いことが示された。この時のUVAおよびUVBは11月9日がそれぞれ、60.4kJ/m²、19.6kJ/m²、11日は89.3kJ/m²、25.5kJ/m²となり、UVでも11日の方が高かった。天候が良好で紫外線量が多いときにはSPF値の違いによる効果の差が明らかであり、紫外線量が多いときは高いSPF値のサンスクリーンを用いる必要があると言える。このとき用いたサンスクリーンは5mg/20cm²とした。このSPF値の違いによる効果の違いは健康ランプを用いたUVB照射実験においてより顕著に見られた。図9に見られるように線量が高くなるとSPF16のサンスクリーンを塗布した場合は雄に顕著な致死作用が観察された。それぞれのサンスクリーン塗布状態での透過光の波長と透過率に差がある(図10)のでこれらのどちらの違いがこの致死作用に寄与しているか調べる必要がある。

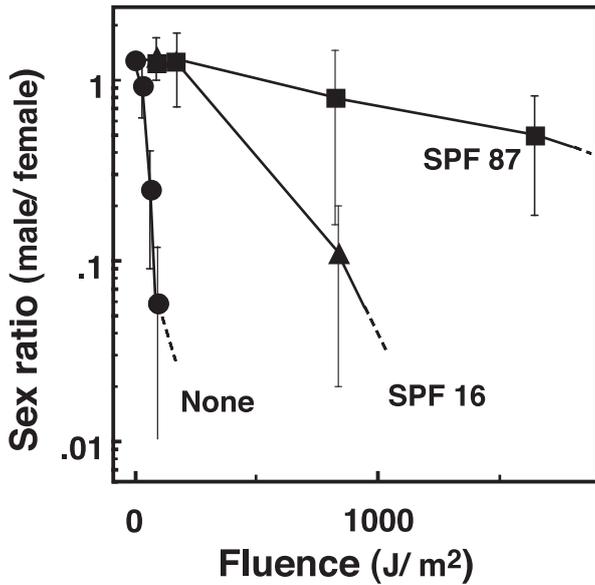
3.2 紫外線吸収剤を用いた実験

市販のサンスクリーンではUV吸収剤の成分が不明なので、吸収される紫外線領域と活性抑制の関係が明らかにしにくい。そこで、サンスクリーンの成分として使用されているUVAおよびUVB吸収剤を用いて、研究室でサンスクリーンを調製して健康ランプのDNA傷害作用に対する効果を調べた。基剤に吸水軟膏を使用して、UVB吸収剤の製剤を調製したところ図11のような結果を得た。UVA吸収剤ではいずれの混合比でも健康ランプによる致死傷害を抑制できなかった。UVB吸収剤では吸収剤が20%以上



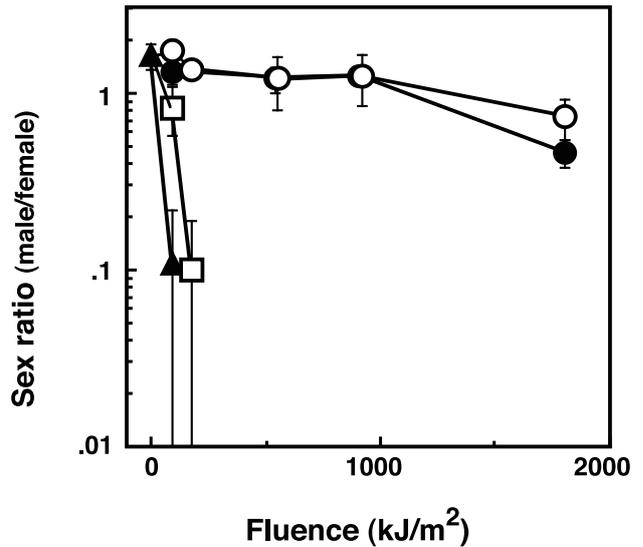
シャーレのフタにSPF87(■)あるいはSPF16(▲)のサンスクリーンを塗布した場合と何も塗布しなかった場合(●)の性比の減少を示す。

図8 太陽光曝露により誘導されるDNA傷害致死作用に対する市販サンスクリーンの効果



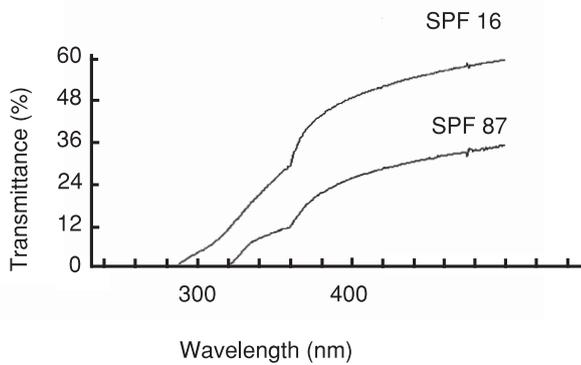
シャーレのフタに SPF87 (■) あるいは SPF16 (▲) のサンスクリーンを塗布した場合と何も塗布しなかった場合 (●) の性比の減少を示す。

図9 健康ランプ照射により誘導される DNA 傷害致死作用に対するサンスクリーンの抑制効果



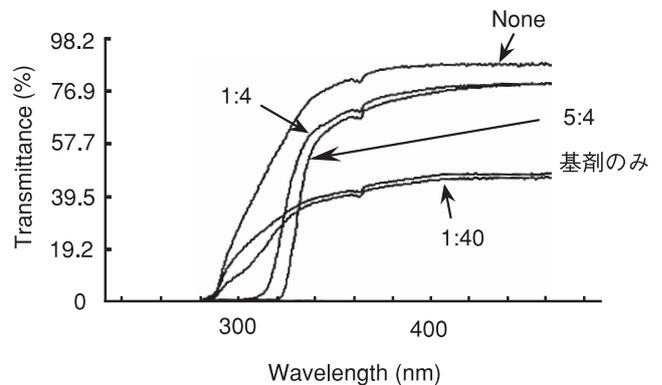
UVB吸収剤として使用される 4-dimethylaminobenzoic acid を用いて調製した紫外線吸収剤の効果を DNA 傷害修復試験を用いて検討した。吸水軟膏を基剤として紫外線吸収剤と吸水軟膏との比を1:40 (□)、1:4 (●)、5:4 (○) の割合で混合して作製し、基剤のみ (▲) を塗布したときの傷害性と比較した。3回の実験から平均値と偏差値を求めた。

図11 UVB誘導 DNA 傷害性に対する調製紫外線吸収剤の効果



それぞれのサンスクリーンを 5mg/20cm²塗布したシャーレのフタの透過波長と各波長での透過率を分光光度計を用いて測定した。

図10 サンスクリーン塗布による健康ランプの透過率



図中の比はUVB吸収剤：基剤の比を表す。また、None はプラスチックシャーレのフタの透過波長ならびに透過率を示している。

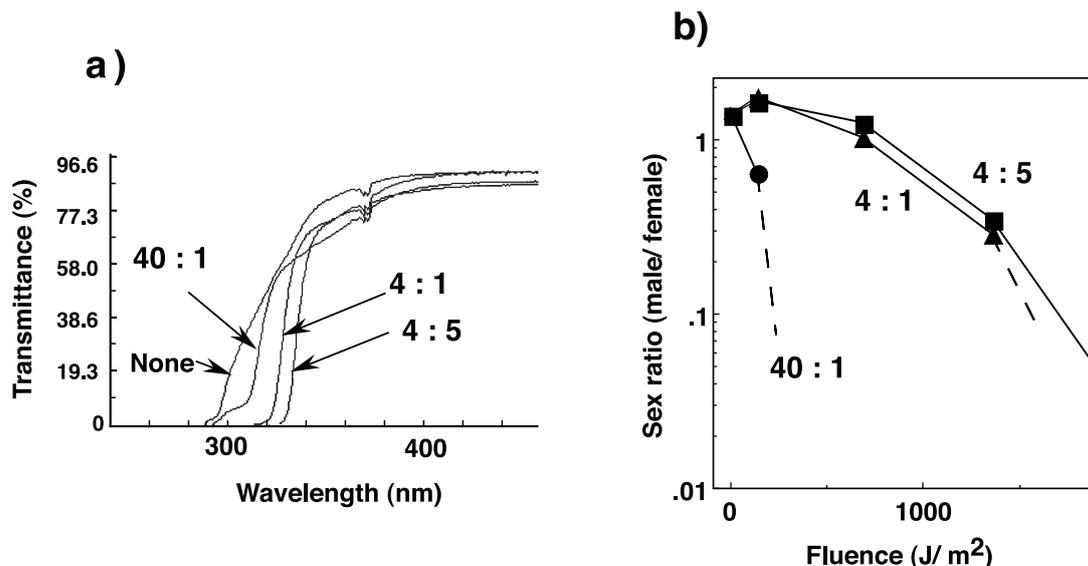
図12 UVB吸収剤と吸水軟膏で調製したサンスクリーンの透過波長と透過率

混合されることで顕著な抑制効果がみられた。しかしながらこの時、塗布されたシャーレにおける各波長の光の透過率を見ると、図12のように20%以上混合した場合は波長と透過率に差が見られた。長波長側での透過率の差を無くするために流動パラフィンを用いて製剤したところ、図13のような透過率になり、長波長側での透過率の差は解消された。それぞれの製剤の差は透過波長の違いと考えることができた。その時の致死傷害抑制作用は図11とほぼ同様な結果を示した。すなわちUVB吸収剤20%以上の混合によ

り抑制作用が見られた。従って抑制作用は320nm以下の紫外線を透過しなくなることによって発現すると考えられる。

3.3 単色光照射の変異原性と致死傷害性

サンスクリーンの吸収剤の吸収波長と作用スペクトルの関係を調べるため、まず単色光照射による変異原性と致死傷害性を調べた。310nm、320nm、330nm、340nm、360nm、380nm、400nmの光を照射し変異原性を調べ



流動パラフィン：4-dimethylaminobenzoic acidを 40:1で混合した製剤 (●)、4:1で混合した製剤 (▲)、4:5で混合した製剤 (■) をシャーレのフタに塗布した場合の紫外外部透過波長と透過率および DNA 傷害性抑制効果を示す。

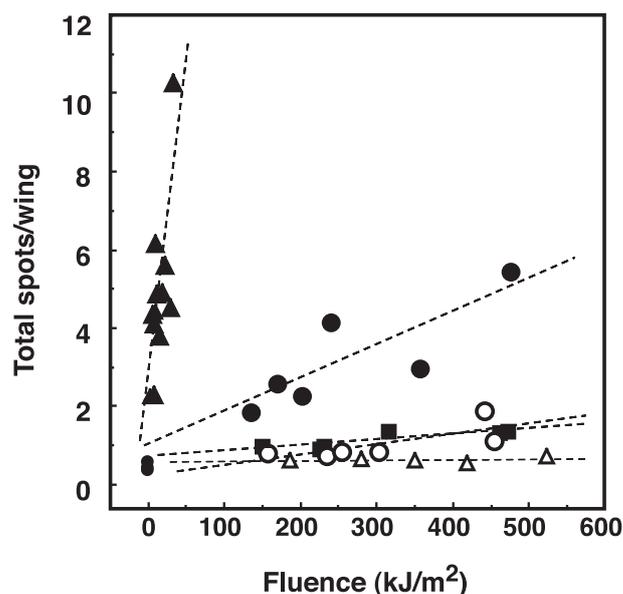
図13 流動パラフィンを基剤として調製したサンスクリーンの紫外外部透過曲線 a) と健康ランプ誘導致死傷害抑制作用 b)

たところ、340nm までの光で線量依存的に有意に突然変異を検出できた (図 14) 7)。DNA 傷害性は図 15 のようになった。320nm の光は修復欠損の雄に致死作用を示した。330nm、340nm の光は長時間照射することによって傷害が発現した。しかし 360nm 以上の長波長の紫外線では傷害は観察されず、突然変異が 360nm 以上の光でほとんど誘発されなかったことと一致した。

4. 考 察

本研究においてわれわれは、太陽光紫外線の生物影響のうち発がんに関わるとされる体細胞突然変異について、ショウジョウバエの系を用いて検討した。さらに太陽光の生物活性障害を防御するために使用されるサンスクリーンの活性評価に抗変異原性を加えることができるかどうかを検討した。

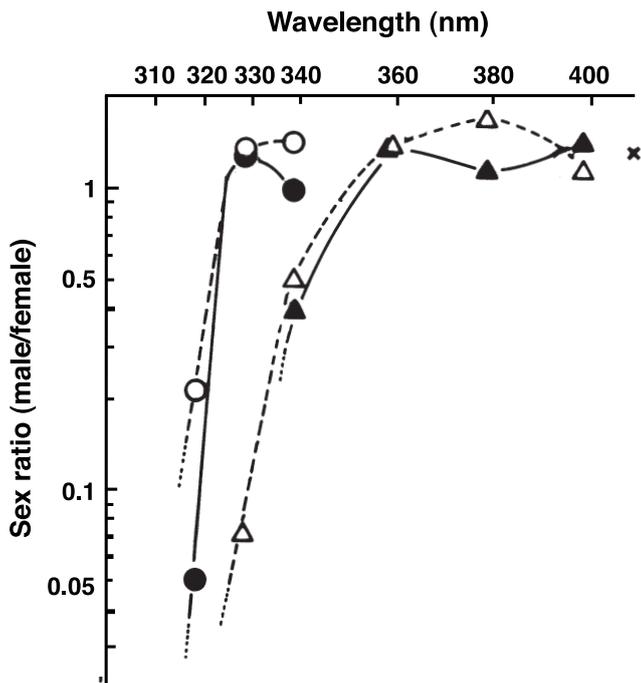
太陽光曝露時におけるサンスクリーンの効果は SPF 値に関わらず、基準量の 40mg/20cm² (20cm² はおよそのシャーレフタの面積) を塗布することによって顕著な防御効果が見られた (図 6)。しかしながらこの時、図 3 からわかるように、シャーレの表面は白塗りの状態で肉眼的にも光を透過しない状態と予想された。実際に図 7 に示したように 320nm 以下の光はほとんど透過していない。そこで、以後の DNA 傷害修復試験を用いた実験には 5mg/20cm² のを塗布し、肉眼的には透明感が残った状態で効果を調べた。DNA 傷害修復試験は翅毛スポットテストによる突然変異検出より高感度であり、雄に対す



各波長における照射線量と変異原性の関係。それぞれシンボルは、▲：310 nm、●：320 nm、■：330 nm、○：340 nm、△：360 nmを示す。

図14 単色光照射による変異原性

る致死作用は曝露約 1.5 時間 (MED 1) で顕著に見られた。DNA 傷害修復試験では紫外線量の違いに対する SPF 値の差が一層はっきり観察された (図 9)。すなわち線量が強いときには SPF 値の低いサンスクリーンでは効果が弱いことが示された。この時サンスクリーンを塗布したフタの紫外線透過の状況は図 10 に示したように、それぞれのサンスクリーンで透過波長と透過率いずれも違っていた。サ



320nm, 330nmの光では高線量 (23.1W/m², 28.5W/m²) (●) および低線量 (11.6 W/m², 14.8W/m²) (○) で30分照射を行なった。330nm以上の波長の光については高線量 (330nm:28.5W/m², 340nm: 35.0W/m², 360nm: 33.2W/m², 380nm: 33.6W/m², 400nm: 35.9W/m²) (▲) および低線量 (330nm: 14.8W/m², 340nm: 17.5W/m², 360nm: 16.7W/m², 380nm: 16.8W/m², 400nm: 17.8W/m²) (△) で6時間照射を行なった。暗所で6時間置いたもの (x) を陰性対照とした。

図15 単色光照射によるDNA傷害致死作用

ンスクリーンの防御効果は、透過率をさげることによるのか、透過波長が長くなるのが原因なのかは興味深い問題である。そこで、紫外部に吸収の無い流動パラフィンを用いた実験を行ったところ、サンスクリーンの効果は主に短い波長の光 (320nm 以下) を透過しなくなることによって示されることが示唆された (図 12, 13)。またここではデータを示していないが、UVA 吸収剤 (2- (2-benzotriazolyl) -p-cresol) を用いて調製した製剤では透過率のみ変化し、いずれの混合比でも 290nm 以上の光を透過しており、DNA 傷害作用の抑制効果が全く見られなかったことは、先の考察を支持するものであろう。従ってサンスクリーン製剤としては 320nm 以下の紫外線を透過しないものが望ましいと考えられる。

本研究のこのような結果は、紅斑生成に対する効果だけでなく、DNA 傷害性あるいは変異原性の防御作用の強さを考慮してサンスクリーンの評価を行う必要があることを支持するものである。

さらに太陽光紫外線のどの領域の波長が変異原活性や DNA 傷害性発現に寄与しているかを調べ、サンスクリーンの各波長での効果を検討するため、単色光照射による変異原性と DNA 傷害作用の検出を行った。その結果ショウ

ジョウバエ幼虫に対して紫外線は、波長が長くなるに従って変異原性が指数関数的に減少し、360nm 以上の光はほとんど傷害を示さなかった^{7, 8)}。培養細胞やある種の魚を用いた研究で 360nm 付近に変異原性や発がん性が見られるという報告^{9, 10)}があるが、ショウジョウバエ翅原基ではそのような活性は観察されなかった。これは生物材料の感受性の違いや、用いた検出方法においてどのような変化が検出されるのか、等の条件によるものと考えられる。

サンスクリーンを用いた太陽光や UVB の実験において示唆された、320nm 以下の光をカットすることが傷害を防御するために必要である可能性を確かめ、SPF 値との相関性を明らかにしていくために、さらに単色光での研究を進める必要がある。

なお、今回の実験ではサンスクリーンの適用をシャーレのフタに塗布するという方法で行ったが、実際にヒトに適用する場合は細胞に直接サンスクリーンが接触することになる。したがってショウジョウバエの系でも直接接触した場合の効果および有害性についても検討していく必要がある。

5. 謝 辞

本研究は岡山大学遺伝子実験施設根岸和雄博士、ならびに岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所大型スペクトログラフにおける檜枝光太郎博士 (立教大学)、古澤佳也博士 (放射線医学総合研究所) との共同研究であります。関係諸氏に深く感謝致します。また、本研究の遂行を可能にし御援助いただいた岡山大学薬学部早津彦哉教授並びにコスメトロジー研究振興財団研究助成に感謝致します。

(引用文献)

- 1) Roy CR, Gies HP, Lugg DJ, et al. : The measurement of solar ultraviolet radiation, *Mutation Res.*, 422, 7-14, 1998.
- 2) Bruls WAG, Slaper H, van der Leun JC, et al. : Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelength, *Photochem. Photobiol.*, 40, 485-494, 1984.
- 3) Graf U, Wügler FE, Katz AJ, et al. : Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.*, 6, 153-188, 1984.
- 4) Negishi T, Shiotani T, Fujikawa K, et al. : The genotoxicities of N-nitrosamines in *Drosophila melanogaster* in vivo: the correlation of mutagenicity in the wing spot test with the DNA damages detected by the DNA-repair test, *Mutat. Res.*, 252, 119-128, 1991.
- 5) Negishi T, Takinami S, Nikaido O, et al. : Somatic cell

- mutation induced by sunlight in *Drosophila*, *J. Epidem.*, 9, s66-s71, 1999.
- 6) Watanabe M, Furuya M, Miyoshi Y, et al., : Design and performance of the Okazaki large spectrograph for photobiological research, *Photochem. Photobiol.*, 36, 491-498, 1982.
- 7) Takinamai S, Mochizuki M, Hayatsu H, et al., : Somatic cell mutation and photoproduct formation induced by solar UV-radiation in *Drosophila*, *Environmental Toxicology*, in press.
- 8) Negishi T, Nagaoka C, Hayatsu H, et al., : Somatic cell mutation induced by UVA- and monochromatic UV-radiation in repair-proficient and -deficient *Drosophila melanogaster*. in preparation.
- 9) Coohill TP, Peak MJ, Peak JG, : The effects of the ultraviolet wavelength of radiation present in sunlight on human cells in vitro. *Photochem. Photobiol.*, 46, 1043-1050, 1987.
- 11) Setlow RB, Grist E, Thomson K, et al., : Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6666-6670, 1993.

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

近畿大学 医学部皮膚科学教室

川 田 暁

Peptidylarginine deiminase (PAD) catalyzes the post-translational modification of proteins through the conversion of arginine to citrulline in the presence of calcium ions.

In rodents, PAD has been classified into four isoforms, types I, II, III, and IV, which are distinct in their molecular weights, substrate specificities, and tissue localization. Of these isoforms, only type III was detected in epidermis and hair follicles. Although the role of this enzyme in these tissues is not yet clear, indirect data have shown that several structural proteins such as filaggrin, trichohyalin, and keratin are substrates for PAD. In this study, we cloned the full-length cDNA of human PAD type III (3,142 bp) from cultured human keratinocytes by the reverse transcription-polymerase chain reaction and by rapid amplification of cDNA ends methods. This cDNA contained a 1,995 bp open reading frame encoding 664 amino acids ($M_r = 74,770$). To explore the physicochemical and enzymatic properties of human PAD type III, we constructed a plasmid for producing a recombinant human PAD type III in bacteria. The enzymatic characteristics of the recombinant enzyme were very similar to those of the rodent PAD type III. Based on the enzyme's activity towards human filaggrin and trichohyalin, it appears that the enzyme prefers catalyzing the modification of arginine residues in filaggrin. These data imply that human PAD type III may function as a modulator of filaggrin in these tissues.

1. 緒 言

ペプチジルアルギニンデイミナーゼ [英名: Peptidylarginine deiminase, EC 3.5.3.15] (以下 PAD と略記) は、蛋白質の Arg 残基を脱イミノ反応により Ci t 残基に変換する極めてユニークな蛋白質修飾酵素であるが、その生理機能については未だ不明の点が多い。しかし、最近、表皮・毛嚢組織に存在するケラチンならびにケラチン結合蛋白質に Ci t 残基が存在することやこれら蛋白質の脱イミノ化に伴いトランスグルタミナーゼによる分子間架橋反応が著しく促進されることが明らかとなった。これらの知見は、PAD が表皮・毛嚢細胞の角質分化に大変重要な役割を果たすことを示唆している。我々は、以前より表皮・毛嚢組織特異的に発現する PAD (PAD type III) が存在することを見出し、本酵素の上記表皮・毛嚢蛋白質の脱イミノ化への関与を推定している。

我々は、同酵素の生化学的並びに分子生物学的な研究をまずラット・マウスの実験動物から開始し、その cDNA クローニングとその全一次構造を解明した^{1, 2)}。ついで、これらの知見を参考にし、ヒト PAD type III の表皮・毛嚢組織ならびに細胞内局在と分化に伴う発現変化、さらには表皮・毛嚢蛋白質への作用とその機能変化を通じ、本酵素の生理機能を解明を目指すこととした。そのためには、本酵素の cDNA クローニングが不可欠であり、同 cDNA

を用いた大腸菌での大量発現系の構築が極めて重要である。本研究では、ラット・マウスの PAD type III cDNA の塩基配列に基づくホモログ PCR による cDNA クローニングから研究に着手した。これまでに得られた研究成果を項目に分けると、1) ヒト PAD type III の cDNA クローニングとその塩基配列の決定 2) 同 cDNA の大腸菌での発現ベクターの構築と組換え型酵素の精製方法の確立 3) 同組換え型酵素の蛋白質化学的並びに酵素化学的性質の解明である。以下にこれらの成果の内容について紹介する。

2. 実 験

1) ヒト PAD type III の cDNA クローニングとその塩基配列の決定

まず、培養ヒト表皮細胞から poly (A)+mRNA を調製、ランダムプライマー法により一本鎖 cDNA を合成、これを鋳型として PCR を行い、DNA 断片を増幅した。尚、プライマーは N 末端側最上流の相同アミノ鎖配列 (ILLVNCD) と C 末端側最下流配列 (HCGTVRR) からデザインした合成 DNA を用いた。ついで、増幅 DNA を T-plasmid にクローニングし、得られたクローンの塩基配列分析を行った。さらに、未決定の 5' 並びに 3' 領域については RACE 法を用いてクローニングし、得られたクローンの塩基配列分析を行った。以上の実験により同 PADcDNA の全塩基配列を決定した。

2) ヒト PAD type III cDNA の大腸菌での発現ベクターの構築と組換え型酵素の精製

本 cDNA を大腸菌で発現させるために用いた発現ベクターは、先に報告した独立型 Two-Cistron 発現ベクター³⁾を用いた。翻訳領域にフレームが合うよう制限酵素サイトを付与したプライマーを合成後、上記 cDNA を鋳型として PCR により翻訳領域を増幅、配列を確認後、制限酵素



Molecular cloning of human hair follicle specific peptidylarginine deiminase cDNA and its function of hair regeneration

Akira Kawada

Department of Dermatology, Kinki University School of Medicine

処理し上述のベクターに挿入した。発現酵素の精製は、大腸菌抽出液を調製後、30-50%飽和硫酸分画、ついでDEAE-Sepharose Fast Flow カラムクロマトグラフィー、Aminohexyl-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより行った。

3. 結果

1) ヒト PAD type III cDNA の全塩基配列と推定アミノ酸配列

Figure 1 は本研究により決定されたヒト PAD type III

cDNA の全塩基配列と推定アミノ酸配列である。本 cDNA は全長 3,142bp から成り、1,995bp のオープンリーディングフレームから推定されるアミノ酸残基数は 664 残基、分子量は 74,770 と計算された。すでに明らかにしているラット、マウスの PAD type III^{1, 2)} とはそれぞれ 87.2%、87.3% の極めて高い相同性を示し、本 PAD が動物種を越えて保存されている酵素であることが判った。

2) 大腸菌組換え型ヒト PAD type III の性質

精製した大腸菌組換え型ヒト PAD type III を用い、各種の蛋白質化学的性質ならびに酵素化学的性質を明らかに

GAGTGTGGGGTGGCGGCCACAGCTAAGTCCAACACCAGCATGTCGCTGCAGAGAATCGTGGGTGTGTCCTGGAGCATCCACCACGGG	90
M S L Q R I V R V S L E H P T S A	17
CGGTGTGTGGCTGGCGTGGAGACCCCTCGTGGACATTTATGGGTCAGTGCCTGAGGGCACAGAAATGTTGAGGTCATGGGACGCCCT	180
V C V A G V E T L V D I Y G S V P E G T E M F E V Y G T P G	47
GGTGGACATCTACATCTCTCCCAACATGGAGGGGCGGGAGCGTGCAGACACCAGGCGGTGGCGCTTTGACGGGACTTTGGAGATCA	270
V D I Y I S P N M E R G R E A D T R R W R F D A T L E I I	77
TGTTGGTCACTGAACCTCCCAAGCAATGACCTCAACGACAGCCATGTTTCAGATTTCTTACCCTCCAGCCATGAGCCCTTGCCCTAGCCT	360
V V M N S P S N D L N D S H V Q I S Y H S S H E P L P L A Y	107
ATGCGGTGCTCACTCACTGTTGACATCTCTCTGGATTGCGACCTGAACTGTGAGGGAAGGCAGGACAGGAACCTTTGTAGACAAG	450
A V L Y L T C V D I S L D C D L N C E G R Q D R N F V D K R	137
GGCAGTGGTCTGGGGCCAGTGGGTATGGCGGACTCTGCTGGTGAACCTGTGACCGTGTATCCGAGCTGTGATGTCAGGACAATT	540
Q W V W G P S G Y G I L L V N C D R D D P S C D V Q D N C	167
GTGACCAGCAGTGCCTGCAAGACATGTCATGTCATGTCCTGGGAGCAGCGGCGCTGCAGCCCTCTTTGATGAGC	630
D Q H V H C L Q D L E D M S V M V L R T Q G P A A L F D D H	197
ACAACTTGTCTCCATACCTCCAGCTATGATGCCAAACGGGCACAGTCTTCCACATCTGGCGTCTGAGGATGTGTGAGGCGCTATA	720
K L V L H T S S Y D A K R A Q V F H I C G P E D V C E A Y R	227
GGCATGTGCTGGGCAAGATAAGGTGCTCTATGAGTACCCGCTTGCATGGGATGAGGAGCGCTTCTGCTGGAGGCGCTGTCCTTCC	810
H V L G Q D K V S Y E V P R L H G D E E R F F V E G C L S F P C	257
CTGATGCCGGCTTACAGGACTCATCTCTTCCATGCTCTGCTGGAGCAGCTCCAACGAGGATTTCTGGCATCCCTATCTTCACTG	900
D A G F T G L I S F H V T L L D D S N E D F S A S P I F T D	287
ACACTGTGGTGTCCGAGTGGCACCCTGGATCATGACCCGACACTCTGCCACCCCTAGAGGTGTATGTGCGGTGTGAGGAACAACA	990
K L V L H T S S Y D A K R A Q V F H I C G P E D V C E A Y R	317
CGTGTGTTGTTGGATGGGTGGCAGAGCTGGCCAGGAAGCGGCTGCAAGCTGACCATCTGCCACAGGCGGAGAACCGCAACGACCGCT	1080
C F V D A V A E L A R K A G C K L T I C P Q A E N R N D R W	347
GGATCCAGGATGAGATGGAGCTGGGCTACGTTGAGGCGCCGCAAGACCCCTCCCGGTGCTTTGACTCCCAAGGATGGGAACTGC	1170
I Q D E M E L G Y V Q A P H K T L P V V F D S P R N G E L Q	377
AGGATTTCCCTTACAAAAGAACTCTGGGTCCAGATTTTGGTTACGTGACTCGGGAACCCAGCGACAGGCTGTGAGTGGCCTGGACTCCT	1260
D F P Y K R I L G P D F G Y V T R E P R D R S V S G L S F	407
TTGGGAACCTGGAGGTGAGCCCTCCAGTGGTGGCCAATGGGAAGAGTACCCCTGGGAGGATCTCATTTGGGGCAACCTGCTGGGT	1350
G N L E V S P P V V A N G K E Y P L G R I L I G G N L P G S	437
CAAGTGGCGCAGGTCACCCAGTGGTGGGACTTCTCCATGCCAGAGGTGACGCCCCCGTGGAGCTCTTTGTGAGCTGTTGG	1440
S G R R V T Q V V R D F L H A Q K V Q P P V E L F V D W L A	467
CCGTGGCCATGTGGATGAGTTTCTGAGCTTTGTCCTTGTCCCGATGGGAAGGCTTCCGGATGCTCTGCGCAGCCCTGGGGCTCT	1530
V G H V D E F L S F V P V P D G K G F R M L L A S P G A C T	497
TCAGCTCTTCCAGGAAAAGCAGAAGTGTGGCCAGGGAGGGCCCTCTGTTCCAGGGGTTGTGTGATGATGAGCAGGTCAAGACATCT	1620
K L F Q E K Q K C G H G R A L L F Q G V V D D E Q V K T I S	527
CCATCAACAGGTCTCTCCAATAAAGACCTCACTCAATAAAGTTTGTGAGAGCTGCATGCACTGGAAACCGTGAATGCTGCAAGC	1710
I N Q V L S N K D L I N Y N K F V Q S C I D W N R E V L K R	557
GGGAGCTGGGCTGGCAGAGTGTGACATATTGACATCCACAGCTTCTCAAGACCGAGAGGAAAAAGCAACGGCCCTTCTCCCTGACT	1800
E L G L A E C D I I D I P Q L F K T E R K K A T A F F P D L	587
TGGTGAACATGCTGGTGGGAGAACCTGGGATCCCAAGCCCTTTGGGCCCATCATCAATGGCTGCTGCTGCTGGAGGAGAAG	1890
V N M L V L G K H L G I P K P F G P I I N G C C C L E E K V	617
TGCGTCCCTGCGAGCCTTGGGCTCCACTGCACCTTCAITGATGACTTCACTCCATCCACATGCTGCATGGGAGGTGCATGCTG	1980
R S L L E P L G L H C T F I D D F T P Y H M L H G E V H C G	647
GCACCAATGTGTGAGAAAGCCCTTCTCTTCAAGTGTGGAACATGTTGCTCCCTGAGACAGCTCCCAACCCACCTCTGCTCCCTGGG	2070
T N V C R K P F S F K W N M V P end	664
CGGCAATGGCCAGTGGTGGAGACAGAGCAGGCGCTGAACGATAAGCAACCAAGAGACCCAAAGGCTCCAGATGGAACACTGAGGTTGAC	2160
CTCCCTCTCAGAAGCTTTTCCCTGGAGTGTGATGCTCACTCCAGCCATGCTGCTCAGACTTGAATCTTCTGGCCCAAAAAT	2250
GAAGCACTCATTTCTTATAGCTCTCTCTGTGATTCACAGAACCCATGGAGATGCTCCCTTCTCACTCTGAATCATCCATTTGGGGAC	2340
AAATCCAGATTTGGGCTAGAAACATCCACTATCTCATCAGCCATCTCTCTGTCATCTCAACAGGAGAGGATCCATGATCTGCT	2430
TTGCTCAATTTGCTTCTCTCTGAGAGAACACCCCAAAACCAAGCCACTCCACCGAGGACAGGAGGATCTTCTCAAGCT	2520
CCCCATAAAAGAGGAGCTGTGATCCACTTGAATCAGGGCGGAACCATCTTTCAACCGGCAAGCTCTCCAGATTTGACTCT	2610
CCAGCTGAGCTTTCATATAGTGGAGCTCTTATGATGATGTTGAAAGCAATGAGATTTCTCCCTTACCTTAACTCCCACTGATCTG	2700
ACATGACAGAAATCCAGCTTCTGCAAGTCTCTCGAATGCTTGGAGGACGAAAGTATGCTGGGAGTGGTGGTACTTGGAGGACT	2790
GGTACAAAGGTTAAAAGTACTTCCCAATAATACACATGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT	2880
GTCTCTCATTTGGCCCTGGGACTTCTCTCCAGGAGGAGAGACGCTGCTCTCTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT	2970
GTCAGCTTTCACATCTGCTCTGCTGAG	3060
TGACCACTGAATTCAGGGGATGGGGTGGGGGCGGCTTCTGAGGTTGTGTCAGCTACACGTTGTTCTGTATGGGTCCAGCTGCGT	3150
TTCCATCACTCGCTAATAAATCAACGAAACAC	3183

Figure 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of human PAD type III. The DNA sequence is numbered from the first nucleotide of the cDNA. The numbers are on the right of each line. The deduced amino acid sequence is displayed below the nucleotide sequence in one letter code starting from the putative initiation methionine. A putative polyadenylation signal is underlined. The amino acid sequence indicated by wave line is that of a synthetic peptide for producing antiserum.

した。本酵素は SDS-PAGE で算出される分子量が 66.0kDa であり、アミノ酸配列からの推定分子量 74.77kDa と大きな隔たりがあった。これに関して質量分析計を用いて詳しく分析を行った結果、本酵素の分子量はアミノ酸配列からの推定分子量と一致することが確認された。

本酵素が SDS-PAGE で示す挙動については今後の研究

課題である。Table 1 は、各種のアルギニン誘導体に対する本酵素の反応性を比較したものである。本酵素は benzoyl-arginine-ethylester, benzoyl-arginine-amide には高い活性を示し、また天然のモデル基質であるプロタミンには特に強い活性を示すことが判った。これらの性質は、マウスの野生型 PAD type III と共通した性質⁴⁾であり、本組換え型酵素が野生型酵素と大きな性質の変化が生じて

Table 1 Substrate specificities of the recombinant human PAD type III towards various arginine derivatives.

Substrate ^a	Recombinant Type III		Native Type III ^b
	mol/min/mg	Relative activity (%) ^c	Relative activity (%) ^c
Bz-L-Arg-O-Et	1.96	100.0	100.0
Bz-L-Arg-O-Me	1.13	57.6	26.8
Bz-L-Arg-O-NH ₂	1.43	73.1	88.4
Tos-L-Arg-O-Me	0.36	18.2	27.4
Ac-L-Arg-O-Me	0.52	26.5	32.1
Bz-L-Arg O.39	19.7	11.6	
Ac-L-Arg O.14	7.2	11.6	
L-Arg-O-Me	0.11	5.7	15.3
L-Arg	0.08	4.2	8.9
Protamine	4.28	218.6	141.1

^a Concentration of each arginine derivatives were 10 mM and that of protamine was 4mg/ml.

^b Terakawa et al,⁴⁾

^c Relative activity was calculated on the basis of the activity towards Bz-L-Arg-O-Et.

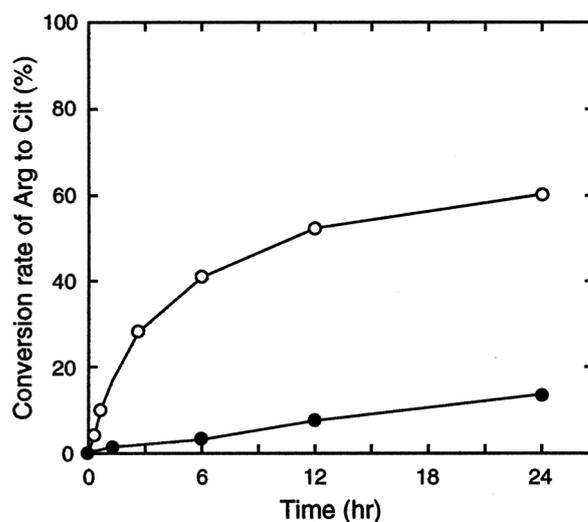


Figure 2 Time course of deimination of filaggrin unit and trichohyalin by human PAD type III. Each protein was deiminated by the enzyme as described in Materials and Methods. At the indicated times, the reaction was terminated by EDTA, and the citrulline residues in each preparations were determined by amino acid analysis. Conversion rate of arginine residues to citrulline residues of each protein (○ -, filaggrin unit; ● -, trichohyalin) was shown.

いないことが確認された。ついで、本酵素のフィラグリン及びトリコヒアリンに対する反応性について解析した。Figure 2 は本酵素と各蛋白質を 1 対 50 のモル比で反応させた時の結果である。本酵素はフィラグリンの Arg 残基を最大 60% 修飾して Cit 残基に変換するに対し、トリコヒアリンでは 13% 程度であり、本酵素がフィラグリンを効果的に修飾することが明らかとなった。

4. 考 察

本研究では、ヒトの表皮培養細胞から mRNA を得て、ホモログ PCR より PAD type III の cDNA のクローニングに成功した。今回得た cDNA が実際にヒト PAD type III をコードするものであることは、本 cDNA から推定されるアミノ酸配列がすでに明らかとなっているラット、マウスのそれらと極めて高い相同性を有すること、また、実際に本 cDNA を大腸菌で発現させた酵素の基質特異性は天然の PAD type III と変わらないことから判断できる。本酵素のアミノ酸配列の特徴として N 末端領域に Cys 残基が多く存在していることが挙げられる。今回の研究により、本酵素は低イオン強度化においても高い安定性を有していることが判ったが、本酵素のこのような安定性は、本酵素が常に外的刺激に晒される細胞表層において機能するために必要であり、そのための強固な立体構造の維持に N 末端領域の多数の Cys 残基が必要となっているのではないかと推測される。PAD type III が表皮・毛嚢組織においてどのような蛋白質を標的としていることを明らかにすることは、本酵素の生理機能の解明のうえで大変重要である。本研究において、PAD type III の標的蛋白質として推定されているフィラグリン及びトリコヒアリンに対する反応性を調べた結果、フィラグリンに対する反応性がトリコヒアリンに比べ迅速に且つ多くの Arg 残基を修飾することが判った。このような結果は、トリコヒアリンが本酵素の標的蛋白質である可能性が低いことを示唆するものである。

最近、リュウマチ性慢性関節炎の患者の血中には Cit 化されたフィラグリンのみを認識する自己抗体が含まれることが報告され⁵⁾、慢性関節炎の発症と Cit 化フィラグリンの免疫感作の成立との間の相関性に興味を持たれている。本研究により PAD type III がフィラグリンを標的蛋白質としている可能性が高くなったことから、本酵素遺伝子の発現制御機構に関する基礎的研究が今後大変重要であると思われる。

(文 献)

1. Nishijyo T, Kawada A, Kanno T, Shiraiwa M, Takahara H: Isolation and molecular cloning of epidermal- and hair follicle- specific peptidylarginine deiminase (type III) from rat, *J. Biochem.*, 868-875, 1997.
2. Rus'd AA, Ikejiri Y, Ono H, Yonekawa T, Shiraiwa M, Kawada A, Takahara H: Molecular cloning of cDNAs of mouse peptidylarginine deiminase type I, type III and type IV, and the expression pattern of type I in mouse, *Eur. J. Biochem.*, 259, 660-669, 1999.
3. Ohsugi I, Takahara H, Shiraiwa M, Sugawara K: Expression of mouse uterine peptidylarginine deiminase in *Escherichia coli*: construction of expression plasmid and properties of the recombinant enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 317, 62-68, 1995.
4. Terakawa H, Takahara H, Sugawara K: Three types of mouse peptidylarginine deiminase: characterization and tissue distribution, *J. Biochem.*, 110, 661-666, 1991.
5. Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, et al: The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro) filaggrin by deimination of arginine residues, *J. Immunol.*, 162, 585-594, 1999.

美白剤の紫外線色素沈着制御機構とその安全性に関する研究

神戸大学 医学部皮膚科学教室

船坂 陽子

α-Tocopheryl ferulate (*α*-TF) is a compound of *α*-tocopherol (*α*-T) and ferulic acid connected by an ester bond; ferulic acid is also an antioxidant, and could scavenge free radicals induced by ultraviolet (UV) radiation, and thus maintain the long-lasting antioxidative effect of *α*-T. *α*-TF inhibited melanogenesis in human melanoma cells by inhibiting tyrosinase activity. The strong inhibitory effect of *α*-TF on UVB-induced melanogenesis and erythema formation was observed in guinea pigs. *α*-TF inhibited the formation of not CPD or 6-4 photoproducts but 8OHdG. Taken together, *α*-TF could be a good candidate for the whitening agent which suppresses UV-induced melanogenesis with sparing DNA damages induced by oxidative stress.

1 緒言

顔面の色素沈着を引き起こす最も大きな要因の一つとして紫外線があげられる¹⁾。紫外線の色素沈着誘導機序としては、表皮メラノサイトへの直接作用と他の皮膚細胞、特に紫外線照射を受けた周囲ケラチノサイトから分泌される因子の paracrine による間接的な作用のあることが明らかにされている¹⁾。美白剤の開発は、主としてメラノサイトへ直接働いて、メラニン生成における律速酵素 tyrosinase を抑制する化合物のスクリーニングにより検討されてきた²⁾。最近では、後者の paracrine 機序に注目して、紫外線照射を受けたケラチノサイトから分泌される endothelin-1 (ET-1) が中波長紫外線 (ultraviolet B, UVB) による色素沈着に大きく作用することより、この ET-1 に対するメラノサイト上の受容体の活性化を抑制するカミツレエキスの開発が注目を集めている³⁾。しかしながらメラニン、特に黒いメラニンである eu-melanin は紫外線に対する一種の SOS 反応の産物であり、紫外線による DNA 損傷からの防御を担うことが明らかにされている⁴⁾。従って美白剤により melanin 産生を抑制した場合に、紫外線による DNA 損傷が増強するか否かの検討が、安全性の点から重要である⁵⁾。

抗酸化剤であるビタミン E (*α*-トコフェロール) の経口摂取が、顔面の色素沈着の治療に有効であること、特に、ビタミン C 内服との併用療法にて、より効果的であることが報告されてきた^{6, 7)}。ビタミン E には *α*-、*β*-、*γ*-、*δ*-トコフェロールおよびトコトリエノールの 8 種の同族体があるが、*α*-トコフェロールが最も生物活性が強い⁸⁾。細胞膜の脂質層に入って、クロマン環とフェノールの OH 基

を通じて抗酸化作用を示す。この構造的特徴より *α*-トコフェロールはトコフェロキシラジカルを形成し、脂質の過酸化を防ぐ⁹⁾。トコフェロキシラジカルはビタミン C、還元型グルタチオン、セレンウムなどの酸化還元物質との共役反応により還元されて、再度フリーの *α*-トコフェロールが再生される⁹⁾。

そこで、我々は紫外線吸収作用と抗酸化作用を有するフェルラ酸と、ビタミン E をエステル結合させたビタミン E フェルラ酸エステル (d,l-*α*-tocopheryl ferulate, 以下 TF) (図 1) の、美白剤としての効能を培養ヒトメラノサイトを用いて検討した。さらに、TF が効率のよい抗酸化作用を有することより、UVB により誘導される色素沈着・紅斑形成あるいは DNA 損傷への抑制効果を、既に多くの施設で研究が進められている *α*-トコフェロール (*α*-tocopherol, T) と比較検討したので以下に述べる。

2 実験

2.1 培養ヒトメラノサイトにおけるメラニン生成抑制実験 (メラニン量、tyrosinase 活性、DOPAchrome tautomerase 活性、DHICA polymerase 活性)

TF は脂溶性であるので、0.5% (w/v) レシチンに 0.1

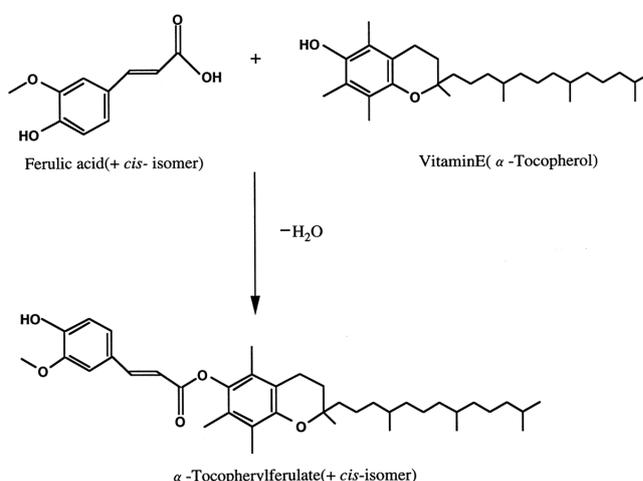
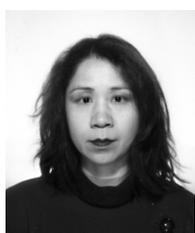


図 1 ビタミン E フェルラ酸エステルの構造



The inhibitory effect of *α*-tocopherylferulate on UVB-induced melanogenesis accompanied with protective effect of DNA damages

Yoko Funasaka

Department of Dermatology Kobe University School of Medicine

% (w/v) となるよう TF を混合 (即ち、レシチンは TF の 5 倍濃度、以下レシチン可溶 TF を TFL と呼ぶ) し、これをストック液とした。TF の溶媒コントロールとして、レシチン (以下 L と略す) 添加による影響も検討した。また、TF の、T やフェルラ酸 (ferulic acid, F) との比較のため、これらをエタノールに溶解したものとの比較実験も施行した。メラノテックなヒト黒色腫細胞 (HM3KO) に対して、細胞毒性を示さない濃度 (30 ないしは 100 µg/mL) で 5 日間培養した後、細胞をアルカリ処理し、メラニン可溶化してメラニン量を、また蛋白を抽出し、以下の如く酵素活性を測定した。Tyrosinase 活性は、トリチウム標識チロシンを用い、tyrosinase の働きで、チロシンがドーパになる際に生成されるトリチウム標識水量を測定することにより評価した。DOPAchrome tautomerase (TRP-2) 活性は DHICA の消失率を分光光度計で測定して評価した。DHICA polymerase 活性は、DHICA メラニンの生成量を 400nm の吸光度で測定して評価した。

2.2 UVB による色素沈着及び紅斑・DNA 損傷誘導に対する防御効果 (in vivo)

茶色モルモット背部に、1%濃度のエタノールに溶解した T、TF および TFL を UVB 照射前後に外用し、1J/cm² の UVB を 1 週間に 2 回、連続 2 週間照射し、第 3 週めに色素沈着度を、色差計を用いて測定した。

白色モルモット背部に、1%濃度のエタノールに溶解した T、TF、F および TFL、L を外用し、同様に 1.5-3J/cm² の UVB を照射して、4 時間および 24 時間後の紅斑

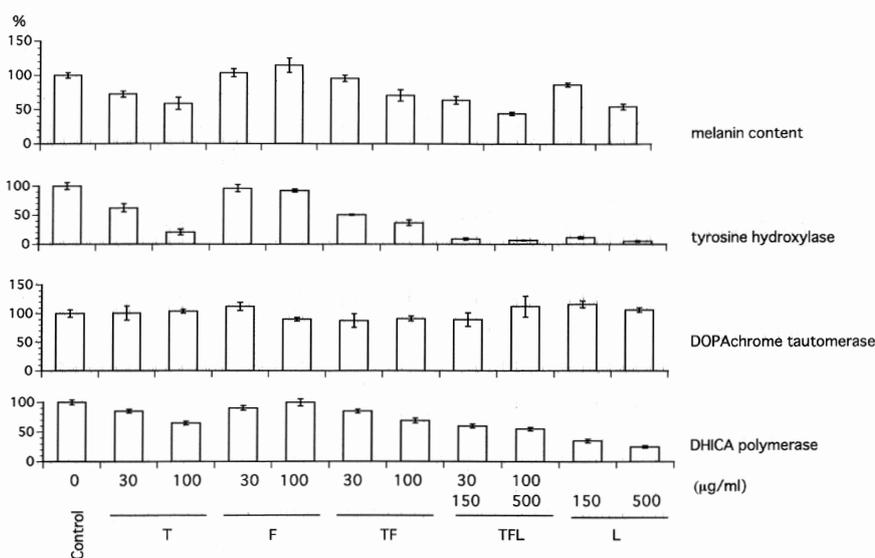


図2 α -トコフェロール、フェルラ酸、ビタミンEフェルラ酸、ビタミンEフェルラ酸レシチン、レシチンのメラニン生成抑制効 比較 (文献 10) を改変) ヒト黒色腫細胞 HM3KO を各種化合物の存在下に 5 日間培養した。Control: 無処理、T: α -トコフェロール、F: フェルラ酸、TF: ビタミンEフェルラ酸、TFL: ビタミンEフェルラ酸をレシチンに可溶化、L: レシチン。図中バーは標準誤差 (n=3)。

反応について観察した。

UVB による DNA 損傷は、照射 30 分、1 時間、3 時間、24 時間後に皮膚を採取し、チミン 2 量体、6-4 光産物、8-OHdG を認識する特異抗体で染色して評価した。

3 結果

3.1 培養細胞におけるメラニン生成抑制能

T、TF、TFL、L においてメラニン抑制効果を認め、これは tyrosinase 活性と DHICA polymerase 活性の抑制能と相関していたが、DOPAchrome tautomerase (TRP-2) 活性は、これらの処理にてほとんど影響を受けなかった (図 2)。

3.2 TF は in vivo における UVB による色素沈着及び紅斑・DNA 損傷誘導に対する防御効果を示す

図 3 に示すように、TF において明らかに色素沈着の形成抑制が認められた。

T と F 外用では、紅斑の抑制がみられるモルモットとみられないモルモットがそれぞれ約半数ずつ観察されたが、TF 外用では、検討した 10 匹のモルモット全てにおいて、著明な紅斑抑制がみられた。

TF 外用にて 8-OHdG 形成の明らかな抑制がみられたが、チミン 2 量体および 6-4 光産物の生成、および消退スピードにおいてはコントロールとの比較において TF、T、F い

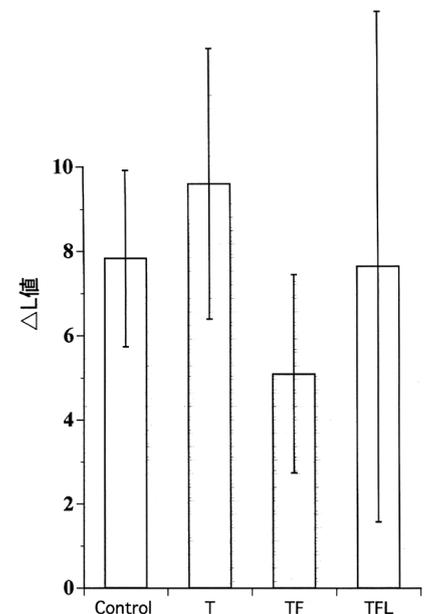


図3 茶色モルモット背部皮膚に形成された紫外線誘発色素沈着の L 値におよぼす各種抗酸化剤塗布の影響

Control: 無処理、T: α -トコフェロール、TF: ビタミンEフェルラ酸、TFL: ビタミンEフェルラ酸をレシチンに可溶化。図中バーは標準誤差 (n=4)。

ずれにおいても明らかな差は認められなかった。

4 考 察

UVB照射ヘアレスマウス皮膚でのTの作用についてはすでに多くの施設で検討が進められてきた。UVB照射後皮膚のT濃度が50%に減弱することが知られており¹¹⁾、これを補充することも兼ねて、外用によるUVBの急性反応の抑制について検討された結果、紅斑反応やサンバーン細胞の形成抑制が認められた¹²⁾。UVBの慢性効果としては、皮膚のしわ、膠原線維の損傷、そして腫瘍形成について検討され、T外用によりこれらがいずれも減弱することが報告されている¹³⁾。腫瘍形成抑制の機序としては、UVBによる細胞増殖、DNA損傷をTが抑制する可能性が考えられるが、McVeanらはマウス皮膚にUVBを照射する実験系で、Tを紫外線照射前に塗るとチミン二量体の形成が抑制されることを示した¹⁴⁾。Bertonらは紫外線照射後にTを外用し、1MEDのUVB照射後のチミン二量体および6-4光産物の修復がTにより増強すると報告している¹⁵⁾。しかし、細胞周期調節因子であるcyclinD1やP21の発現パターンが変化するにもかかわらず、DNA合成能には影響を及ぼさなかった。UVBによる腫瘍形成発現時期を遅らせ、また腫瘍部のテロメラーゼ活性がT外用群では低いことを見出ししている¹⁶⁾。Tはその吸収極大は295nmであり、UVBを直接吸収して分解する。従って、McVeanらの結果は一種のサンスクリーン効果により少量UVB照射により誘導されるチミン二量体の形成を抑制したと考えられる。我々の系で、チミン二量体および6-4光産物の形成抑制作用が認められなかったのは、照射量が多いためにサンスクリーンとしての効果を発揮できなかったものと思われる。実際、コントロールとして用いたサンスクリーン剤外用群では、これらDNA損傷の形成は全て抑制された。Bertonらが観察したチミン二量体および6-4光産物の修復がTにより増強したという点は、興味深いものの、この修復増強効果の機序については全く不明である。8-OHdGは酸化ストレス即ち、ヒドロキシラジカルや一重項酸素を介して形成されるとされているが、水溶性のビタミンEにて、このDNA損傷が抑制されることが報告されている¹⁶⁾。我々の系で、チミン二量体および6-4光産物のようなUVBの直接作用によるDNA損傷ではなく、この8-OHdGが選択的に抑制されたのは、TFがその抗酸化作用を効率よく発揮したためと考えられる。さらに、TFがUVBによる色素沈着、紅斑、8-OHdG形成抑制に α -トコフェロールよりも強力にその作用を発揮した理由として、エステル結合したフェルラ酸が α -トコフェロールの近傍に存在することより、抗酸化剤としてその効果を示した可能性が考えられる。しかしながら、TFにより抑制されたこれらUVBによる色素沈着、紅斑、DNA

損傷が一つの共通の機点に基づくものであるのか否かは不明である。

培養ヒト色素細胞を用いたin vitroの結果より、TFは強力にメラニン合成を抑制して、美白へと導くことを明らかにした。メラニンが少なくなると、ケラチノサイトの紫外線によるDNA損傷がより高度になり、紫外線発癌につながる危険性が増すと考えられている¹⁷⁾。しかしながら、TFは美白を保ちながらも、その抗酸化作用により紫外線による皮膚の損傷(DNA損傷および紅斑反応として認められる炎症反応)をも同時に防御しようと考えられる。今後、TFの生物効果をより詳細に分子生物学的に明らかにしていくことは、紫外線に曝露される顔面皮膚の光老化の防御や治療剤を開発していく上で重要と思われる。

(参考文献)

- 1) 船坂陽子、：メラノサイトと増殖因子、皮膚臨床、35、1371-1379、1993
- 2) 船坂陽子、市橋正光、：色素沈着の外用療法、臨床皮膚科、51、144-147、1997
- 3) Imokawa G, Kobayashi T, Miyagishi M et al.; The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis, Pigment Cell Res, 10,218-228, 1997
- 4) Eller M, Ostrom K, Gilchrest BA.; DNA damage enhances melanogenesis, Proc Natl Acad Sci, USA, 93, 1087-1092, 1996
- 5) Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M.; Depigmenting effect of α -tocopheryl ferulate on normal human melanocytes, Pigment Cell Res, in press, 2000
- 6) ビタミンE、C配合剤臨床研究班、：顔面色素沈着症にたいするビタミンEとビタミンCの配合剤および単味剤の治療効果、西日皮膚、42、1024-1034、1980
- 7) YEC-1研究班、：女子顔面色素沈着症に対するYEC-1(ユンケル(r)EC)の使用経験、基礎と臨床、25、312-323、1991
- 8) 赤田陽児、：ビタミンEと化粧品、フレグランスジャーナル、19、68-76、1976
- 9) 古瀬一磨、：ビタミンEと過酸化脂質、フレグランスジャーナル、14、53-56、1986
- 10) Funasaka Y, Chakraborty AK, Komoto M, et al.; Depigmenting effect of α -tocopheryl ferulate on human melanocytes, Br J Dermatol, 141, 20-29, 1999
- 11) Fuchs J, Huflejt ME, Rothfuss LM et al.; Impairment of enzymic and nonenzymic antioxidants in skin by UVB irradiation, J Invest Dermatol, 93, 769-773, 1989
- 12) Trevithick JR, Xiong H, Lee S, et al.; Topical tocopherol acetate reduces post-UVB, sunburn-

- associated erythema, edema, and skin sensitivity in hairless mice, Arch Biochem Biophys, 296, 575-582, 1992
- 13) Bissett DL, Chatterjee R, Hannon DP,: Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse, Photodermatol Photoimmunol Photomed, 7, 56-62, 1990
- 14) McVean M, Liebler DC,: Inhibition of UVB induced DNA photodamage in mouse epidermis by topically applied *α*-tocopherol, Carcinogenesis, 18, 1617-1622, 1997
- 15) Berton T., Conti CJ, Mitchell DL, et al; The effect of vitamin E acetate on ultraviolet-induced mouse skin carcinogenesis, Mol Carcinog, 23, 175-184, 1998
- 16) Stewart MS, Cameron GS, Pence BC,: Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture, J Invest Dermatol, 106, 1086-1089, 1996
- 17) Kobayashi N, Muramatsu T, Yamashina Y, et al; Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells, J Invest Dermatol, 101, 685-689, 1993

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

シルバーファッションショー出演者の被服に関する意識

京都大学大学院 教育学研究科

片本 恵利、木村 大生、西尾 新

The purpose of this study is to investigate the effects of clothing on self-awareness of aged person. The subjects are models and audiences of two fashion shows for aged. We investigated their attitudes to clothing for aged with observation, questionnaire, interview, and "the Clothing Completion Test" that we have developed in this study. "The Clothing completion Test" is a kind of drawing test and aimed for measuring interest in clothing numerically.

Some cases we met at the fashion shows imply that aged participants have changed their self-images by clothing. Thus, we may suggest that the important factor for aged person's clothing is not only design such as colors or materials, but also opportunities where aged people can experience change of their self-images by changing clothing. In addition, it is very important point that they can share the opportunities with others such as their families or their caretakers.

In conclusion, we would like to say that what is important for all of us is to produce wide choice of clothing for aged people and assist them in creating new self-images with clothing.

The results of the questionnaires on self-awareness and the Clothing completion Test show correlation between public self-awareness and the form quality of the Clothing Completion Test. This correlation may show the validity of the test.

はじめに

近年、急激な高齢化社会に対応するため、高齢者の生きがいや生活の質（QOL）に関する研究や取り組みが増えてきたことは周知のとおりである。しかし、個人の生活を「衣・食・住」に分けて考えた時、とりわけ「衣」への取り組みは不十分であると言えよう。わが国における高齢者の被服についての研究はほとんど蓄積がなく、それぞれの現場で暗中模索が続いているのが現状である。そこで、高齢者の被服について研究するには、先入観を排して事実を観察し、収集したデータを丁寧に検討し、考察を得ることから始めるべきである。しかし、高齢者が被服に関する意識を言語によって直接表現することには多くの困難を伴う。高齢者の多くは、これまで装うことを「贅沢」として抑圧する環境の中で過ごしてきた。また、痴呆や言語障害から言葉によるコミュニケーション自体がスムーズに行かない場合も多い。実際、筆者らがこれまでインタビューなどで被服に関して高齢者の意見を求めても、「年を取ったら服装などどうでもいい」・「年寄りになったら皆が勧めてくれる服を着ていればよい。あれこれいうのはみっともない」・「そんな話は若い人に聞いてほしい」・「年寄りをからかったらいかん」・「今のままで十分ありがたい。これ以上言うてはぜいたくだ」・「男は服装など構うものではない」・「目立たないのが一番。自分がどういふのを着たいなどということはない」などの、被服に無関心、あるいは関心を持つべきでないという反応がほとんどであった。これらの高齢者は嘘を言っているわけではないが、高齢者への社会的圧力やインタビューという特殊な状況が、彼らに遠慮や過剰適応を促し、被服への無関心を強調させている可能性がある。このように考えると、彼らの言語による報告は、必ずしも彼らの心の真実を反映しているとは言えない。そこで、筆者らは、塗り絵の手法を応用した「被服構成法」と、シルバーファッションショーという二つのアプローチを用いて、高齢者の着装行動に関する探索的研究を試みた。本研究では、このうちのシルバーファッションショーを取り上げる。

目 的

本研究では、シルバーファッションショーを一つの実験状況と捉え、高齢者の着装行動の観察結果をもとに分析を加えることによって、シルバーファッションショー出演者の自己意識の変化について考察を得ることを目的とする。

方 法

高齢者の被服に関する取り組みの一つとして、各地でシルバーファッションショーが催されるようになった。機能を重視したもの、リフォームを生かしたものなどさまざまなものがあるが、筆者らのファッションショーの特徴は、「衣裳やモデルに制限を設けなくて、高齢者自身の装いたいという気持ちを重視する」ことである。「制限を設けない」ことで普段の生活に「非日常」を持ちこむ本研究のショーは、「日常着」を「元気な高齢者」をモデルとして見せることが多かったこれまでのショーに比べて、普段は見られない高齢者の被服への関心、着装行動の特徴が表れやすくなることが期待される。具体的には、以下の事柄を柱とする。

1) モデルの選択に制限を設けない



Participants' awareness about clothing in a fashion show for aged

Eri Katamoto, Taisei Kimura, Arata Nishio,*
Graduate School of Education Kyoto University

誰でも、年をとり、身体が弱っても、自分の着たい被服を身に着けたいと願うであろうし、被服は生涯身につけ続けるものである。本人の希望があれば、危険のない範囲で生活自立度（ADL）にかかわらずモデルになれるようにスタッフが努力する。

2) 衣裳に制限を設けない

特別な日の装いなら、着脱は互いに助け合えばよい、転倒防止にはエスコートがつけばよいという考えに基づいている。着脱のしやすさや転倒防止など機能・安全面を考えるとボタンやファスナーのデザイン、丈やフレアーに制約が加えられやすいし、「高齢者らしい」となると地味で無難な色・形になりがちである。しかし、本研究におけるファッションショーでは、本人が着たいと思うデザイン、着た人を美しく輝かせるデザインを重視する。

調 査

1. ファッションショー 1

日 時：1997.11.23.

場 所：京都市内の特別養護老人ホーム

モデル：上述の特養入所者 15 名。（うち男性 3 名、女性 12 名。自力歩行 6 名、歩行器使用 3 名、車椅子 6 名。痴呆のある方を含む。）

モデルへの調査：

- i) 事前調査。調査内容は、被服構成法およびインタビュー、写真・ビデオ撮影である。
- ii) 当日調査。継時的な写真（更衣前、化粧後、更衣後、本番、本番終了後）撮影、ショー本番のビデオ撮影を行った。
- iii) 直後調査。調査内容は、事前調査と同じである。
- iv) 事後調査。調査内容は、事前調査と同じである。当日には、スタッフへの調査；シルバーファッションショー終了後、付き添い・カメラ・ビデオスタッフに、質問紙調査を行った。

施設スタッフへの調査：付き添いスタッフらと同じ質問紙調査を、後日回収という方式で行った。

2. ファッションショー 2

日 時：1999.3.13.

場 所：ハートピア京都

モデル：24 名。（うち老人クラブ会員 男性 2 名、女性 10 名、計 12 名。全て ADL 自立。特別養護老人ホーム入所者 男性 3 名、女性 9 名、計 12 名。自力歩行 3 名、歩行器使用 5 名、車椅子 4 名、痴呆のある方を含む。）

老人クラブ会員モデルへの調査：継時的写真撮影（更衣前、更衣・化粧後、本番後）、本番のビデオ撮影、ショー終了直後の集団法による被服構成法を行った。

特養入所者モデルへの調査：継時的写真（更衣前、更

衣後、本番後）撮影、本番のビデオ撮影と、後日、面接法による被服構成法およびインタビューを行った。

観客への調査：ショーのプログラムに、モデル・ファッションショーへの感想を質問項目とした記述式質問紙を添付し、ショー終了時に回収した。

スタッフへの調査：ショー終了直後、モデルの表情・行動の変化に関する質問紙調査を行った。

結 果

1. モデル^(注1)

- i) 赤い衣裳が着たかったが落ち着いた色の衣裳しかなかったところ、気がすまない様子であったが、スタッフが衣裳のエlegantさ、似合っていることを強調すると、次第に受け入れ、本番では堂々とパフォーマンスを披露する(女・75)。
- ii) 本人の選んだ明るい色の衣裳に家族が反対し、地味なものを選びなおす(女・75)。
- iii) 当初、モデル出演には慎重な態度を取っていたが本番では喜んで「冥土の土産にします」と言っていた。ところが後日写真を見て、思い描いていたイメージとの差にがっかりし、不満をスタッフに直接向ける代わりに「若い人 (= 80 代以下) に比べて自分は美しくない」と自己卑下する(女・93)。

2. 観 客

- i) 有効回答 51。うち男性 6 名、女性 45 名。
- ii) 年代別内訳：10 代 3 名、20 代 4 名、30 代 1 名、40 代 6 名、50 代 4 名、60 代 10 名、70 代 20 名、80 代 3 名。
- iii) 回答例
 - ・モデルが生き生きしている、楽しそう、美しい、笑顔が印象的(多数) / 若い人には似合わない服を高齢者が着こなせる(女・76, 26)。
 - ・デザインをもう少し機能的に(転倒の危険、着脱の便)(女・67, 46, 16) / 普段でも着れる服、楽に着れる服が見たかった(女・39, 13)。
 - ・高齢者には勇気がいる、派手(女・80, 24)。
 - ・明るい色がよい、赤い色がよい(女・82, 76, 69, 62, 44)。

全体的には肯定的な意見・感想や新鮮な発見への驚きを述べたものが多かった一方で、安全性や便利さを気にするもの、普段着られる服がよい、などの機能重視を求める意見、派手過ぎるといった拒否的な意見も見られた。

考 察

筆者らは当初、「ファッションショーによって高齢者の自己イメージが変わり、自己評価が向上する」という仮説を考えていた。しかし、実際に起こったことはより複雑で

あった。本研究から見てきたことの一つに、高齢者の被服と公的自己意識と私的自己意識との関係がある。興味深いのは、観客調査で、高齢者の観客の方が、明るい色がよいという回答が派手で嫌というものより多数だったこと、逆に50代以下の観客に「高齢者には勇気がある」という形で派手さに懸念を示したり、はっきり「派手過ぎる」と拒否反応を示す回答が見られたことである。事例からも分かるように、選択肢が示されれば明るい色の服を着たいと思ひ、着てみると似合うと感じる高齢者も多いし、加齢に伴い心身の機能が衰えた者にも、ハレの日の特別な一着があってもよいはずである。ところが、周囲の者が、高齢者の被服は機能を重視し無難なデザインにするべきである、との先入観から抜けられないために、装う本人の意思が必ずしも反映されず、機能的・安全・無難などの理由で周囲に承認されやすい被服を選んでしまう可能性が示唆される。

被服は、社会的コミュニケーションの道具の一つであり、装い、周囲に見せることによって一つの「記号」となり「意味」を持つ。しかも、事例でみたように、最初は気に入らなかった衣裳を受け入れ、周囲に承認されることによって自己イメージが膨らんだり、逆に本人の望む衣裳に周囲が承認を与えなかったために自己イメージの変容の機会が失われたりする。このように、ひとつの衣裳が与える「意味」は一義的に決まっているのではなく、常に変容しうるのである。被服による自己イメージの変化は、決して装う本人の内側だけで起こるのではない。被服による高齢者の

自己イメージの変容とは、高齢者が「私らしい」と感じられ、周囲も承認できる被服が増えることであるということも出来る。したがって、被服が高齢者の心理に及ぼす影響について考える時には、「この色を身につければ元気になる」というような、特定の効果を狙って被服のデザインそのものを検討することよりも、装う本人も周囲の者も心から「素敵」「似合っている」と思える被服を身につける「場」をつくることこそが重要である。筆者らの関わったファッションショーも、装う人を輝かせる衣裳をつくり、強制はせず心こめて衣裳を勧め、本人が納得のいく衣裳を選び、周囲が自然に承認を与えるプロセスが不可欠であった。「いい衣裳を作ったから嬉しいだろう、これを着れば元気になるだろう」という一方的な考えでは、本研究で観察されたような自己イメージの変化は起こらなかったであろう。

勿論、これらのことから直ちに被服のデザインや機能の開発・研究が無駄だということにはならない。高齢者の被服は極端に選択肢が少ないのが現状である。事例にもあるように、明治から戦前生まれまでの実に幅広い年齢層をひとくりに「高齢者」と呼ぶことにも限界がある。高齢者が「私らしい」と感じられる被服をさらに増やすためにも、我々の側の先入観を排して地道に研究を重ね、選択肢を増やすことこそ、高齢者が生き生きと暮らせる真の高齢化社会の実現に向けて我々が出来ることなのではないだろうか。

注1：スタッフへの質問紙調査の結果による。()内は性・年齢。

[資料] 被服構成法の作成

目 的

本文で述べたようにインタビュー調査によって、高齢者が被服に対して持つイメージを知ることは難しい。その原因としてインタビューを受けた高齢者がインタビューに慣れていないことに加えて、「被服」のイメージを言語化することが困難であり、また被服に対するイメージを表現することへのてらいがあったと考えられる。そこで筆者らは被服のイメージを比較的容易に表現できる非言語的手段として、クレヨンを用いた塗り絵形式の描画法を採用し、被服構成法と命名した。この被服構成法において塗り絵形式の描画法を採用した理由は以下の4点である。第1に非言語的表現にすることで、イメージの表現という困難な課題を容易にしたこと。第2に下絵があることにより、描画への抵抗感を低減させられること。第3にクレヨンを用いることで、細かい描画を要求しないこと^(注2)。第4に標準化が可能となること。

本被服構成法では、描かれたアイテム^(注3)や使用された色、描き方に注目することにより、高齢者が被服に対して抱いている興味・関心を数化する技法の開発を目指した。

被服構成法

1. 実施方法

図 版：冊子形式の下絵(図1)。

用 具：サクラクレパス 25色セット太巻き、鉛筆。

手続き：調査にあたり、各被験者に冊子とクレパスを配布し、集団により実施する。教示は以下に行なう。「自分が着てみたいと思う服を自由に描いて下さい」描画は被験者ペースで行なう(以下、下絵の上からクレヨンによって描かれた絵をサンプルと呼ぶ)。

2. 採点方法

得られたサンプルについて、(1)アイテムの数、(2)使用された色数、(3)形態水準の3つの基準から採点し、サンプルに関する数的分析を行なう。

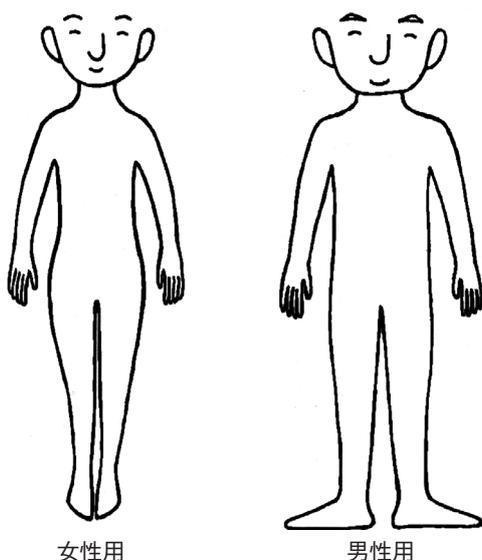


図1 被服構成法図版

(1) アイテムに関する数化

衣服(計11項目)とアクセサリ／化粧(計14項目)の下 カテゴリーに項目を分類する(表1)。

- 1) 衣服アイテムはジャケット類・シャツ類・スカート類・ズボン類・ワンピース類・セーター類・ベスト類・コート類・靴下類・着物類が描かれていれば、各1点と点数化し、その合計を衣服アイテム得点とする。なお上記カテゴリーでは分類できないアイテムはその他として扱い、各1点として点数化する。
- 2) アクセサリ／化粧アイテムに関して、髪・靴類・帽子類・イヤリング・ネックレス・ブローチ・ネクタイ・メガネ類・指輪・時計・口紅・頬紅・アイメイク・マニキュアのいずれかのアイテムが描かれていれば各1点として点数化し、その合計をアクセサリ／化粧アイテム得点とする。

(2) 使用された色に関する数化

筆記用具の25色を予備調査^(注4)によって明色群(計8色: だいたい・きみどり・黄色・あか・むらさき・レモン色・みどり・みかん色)と中間色群(計9色: ぐんじょう・朱色・明るいむらさき・ももいろ・みずいろ・あお・あいいろ・おうど色・しろ)と暗色群(計8色: はだいろ・ふかみどり・ちゃいろ・はいみどり・くちばいろ・はいいろ・くろ・こげちゃ)の3カテゴリーに分ける。数化に際しては、サンプルに使用された色を数え、各カテゴリーの合計点を算出する。

(3) 形態水準に関する数化

輪郭の有無、表の様子、言語的説明の有無、塗りの丁

表1 衣服アイテムとアクセサリ／化粧アイテムのカテゴリー

	カテゴリー	カテゴリーのアイテム
衣服アイテム	ジャケット類	ジャケット, カーディガン, ジャンパー, パーカー
	シャツ類	シャツ, ブラウス, カットソー, Tシャツ
	スカート類	スカート
	ズボン類	ズボン, スパッツ, スラックス
	ワンピース類	ワンピース, ドレス
	セーター類	セーター
	ベスト類	ベスト
	コート類	コート
	靴下類	靴下, 足袋, ストッキング
	着物類	着物(帯を含む)
その他	上記以外	
アクセサリ／化粧アイテム	頭髪	頭髪
	靴類	靴, 草履, 下駄
	帽子類	帽子, ヘアアクセサリ
	イヤリング	イヤリング
	ネックレス類	ネックレス
	ブローチ類	ブローチ
	ネクタイ類	ネクタイ, アスコットタイ
	眼鏡類	眼鏡, サングラス
	指輪類	指輪
	時計類	時計
	口紅類	口紅
	頬紅類	頬紅
アイメイク類	アイメイク	
マニキュア類	マニキュア	

寧度の4指標により点数化を行い、4指標の点数を合計したものを形態水準合計得点とする。

1) 輪郭の有無

輪郭の有無はさらに(1-1)外側の輪郭、(1-2)内側の輪郭、(1-3)髪型の輪郭の3下カテゴリーに分けられる。外側の輪郭とは下書きの線にとらわれないアイテムの輪郭のことである。一方内側の輪郭とは1つのアイテムの内部を線で分節化しているものであり、アイテム間の境界ではない。ここではポケット・襟・ボタン・袖の折り返しなどを指す。また後述の柄とも区される。

(1-1) 外側の輪郭 外側の輪郭がないものを「0点」、下書き内部にアイテムの輪郭を作っているものを「1点」、さらに下書き内部の輪郭に加えて下書きを越えてアイテムの輪郭を作っているものを「2点」とする。

(1-2) 内側の輪郭 内側の輪郭がないものを「0点」、アイテム内部を分節化しているものを「1点」、アイテム内部の分節が複数箇所見られるものを「2点」とする。

(1-3) 頭髪の輪郭 頭髪がないものを「0点」、頭の形に対して整合性のない頭髪を「1点」、普通の頭髪を「2点」とする。

2) 表の様子

表の様子は下カテゴリーとして(2-1)柄、(2-2)混色、(2-3)頭髪の混色の3カテゴリーに分ける。

(2-1) 柄 柄がないものを「0点」、1アイテムが色分

けされているか、あるいは塗り方による織・編み柄の表現がされているものを「1点」とする。

(2-2) 混色 混色が見られないものを「0点」、複数色の重ね塗りが見られたものを「1点」とする。

(2-3) 頭髪の色 頭髪の色がないものを「0点」、単一色の場合を「1点」、複数色の場合を「2点」とする。

3) 言語的説明の有無

描画に現れていない情報への言及

言及がないものを「0点」、言及があるものを「1点」とする。

4) 塗りの丁寧度

全く塗られていないものを「0点」、輪郭からはみだしや斜線による表現でアイテムの内側に白い部分が残るものを「1点」、アイテムの内側がほぼ塗りつぶされているもの(意図的に空白を用いた表現もこれに含める)を「2点」とする。

まとめ

本テストの構成概念妥当性を検証する手段として、被服構成法の各尺度と自己意識尺度との相関の検討が考えられる。筆者らは1999年3月のシルバーファッションショーの際に、ショーの出演者を対象にして被服構成法と菅

原(1984)の自己意識尺度を同時に実施した。被服構成法の各尺度と自己意識尺度との相関(ケンドールの順相関係数)を求めたところ、形態水準合計得点と公的自己意識尺度得点との間に、正の相関($r = 0.561$, $p < .05$, $n = 7$)が見出されたのに対し、私的自己意識尺度得点との間には相関は見出されなかった。この結果は、形態水準が自己意識の中でも「見られる自己」あるいは「場に規定される自己」を表わす公的自己意識と関係していることから、被服構成法の妥当性を部分的に示している。しかしサンプル数が少ないので、今後のさらなる検討が必要である。

注2: 描画法の1つにバウムテストがある。高齢者に対する実施は非常に困難であった。

注3: 描かれた衣服や化粧・アクセサリーのパーツを指す。

注4: 大学生・大学院生を被験者($n=15$)として用具のクレヨン25色各々につき、形容詞対「地味-派手」を5件法によって評定させた。

(引用文献)

菅原健介 1984 自己意識尺度(self-consciousness scale)日本語版作成の試み, 心理学研究, 55, 184-188.

(注: 代表研究者が吉川左紀子助教授から西尾新氏に代わって報告されたものです。)

健康な笑いづくりの方法について

福岡大学 人文学部

高 下 保 幸

KUBOTE WARAI-KOU(KUBOTE Laughters Club)is the friendly group whose members meet together in the foot of Mountain Kubote once a month and laugh voluntarily to promote their health. This study aims at finding the way of spontaneous laughing of the group members and the differences between voluntary laughs and happy-felt laughs.

As the first step of this investigation, two hundred and seventy-nine subjects watched the video-taped voluntary laughter scene (about five minutes)of the members and appreciated the laughs in comparison with natural laughs. It is suggested that voluntary laughs of the group members is regarded as exaggerated in both strength and length. And so, observing repeated laughter didn't raise energetic arousal(or evoke positive mood) as the previous studies of humor indicated the stress-moderating effects of humorous experiences and laughing.

1 緒 言

1.1 笑い・ユーモア療法の実践

これまで巷間で「笑う門には福来る」といわれてきた笑いやユーモア体験がもたらす幸福、すなわち効用のひとつが健康を支え維持することであろう。その効用の現代における実証の先駆けは、ようやく1970年代に米国のジャーナリストであるノーマン・カズンズ(Norman Cousins)が自らが罹患した膠原病を喜劇映画を視聴しジョーク集を看護婦から読んでもらうことに伴う笑いやユーモア体験を通して治癒したというエピソード¹⁾にみられる。これを発端として、笑うことやユーモア体験が、呼吸・循環機能や免疫機能を活性化する、肯定的なものの見方へ転換させる、対人関係を宥和化するなどの身体、感情、認知、社会の諸側面からストレスを緩和し健康を維持することが、多くの実験や調査によって確かめられている²⁾。

これらの研究成果をふまえて、笑うことやおかしさ(ユーモア)を体験をすることが健康支援の手軽な方法のひとつとして、食事の制御、各種の運動やスポーツ、自律訓練法などのセルフコントロール法などとならんで、日常生活に取り入れられようとしている。こうした笑いによる健康づくりの実践をより積極的に目指した先駆的な活動が「求菩提(くぼて)わらい講」である。

1.2 求菩提わらい講の健康づくり活動

求菩提わらい講は、福岡県の東部、周防灘に面する豊前市の求菩提山の山麓で毎月1回、男女の会員20名ほどが

参加して「一緒に」車座になって笑うことで健康づくりを進める親睦団体ならびにその活動である(図1)。

この月例会での笑う活動が笑う人自身の健康に即時的に及ぼす効果に関しては、(質問票「日本版POMS」³⁾による測定では)その場で笑うことが不快な気分や感情を軽減して快適な気分をより高揚させるという意味での精神的健康をもたらすものであった。またわらい講での笑う活動や訓練が日常生活に及ぼす効果として、ほとんどの会員が全版的に適応した健康な生活を送っていること(質問票「日本版GHQ精神健康調査票」⁴⁾による測定)、さらには楽天的なものの見方をするようになったこと(日常生活での効用に関する調査に基づく)などがあげられている⁵⁾。

1.3 求菩提わらい講の会員の笑いの作り方

この月に1回の月例会で会員がうまく笑う方法としては、他の人の笑いをひきがねにする、つまりは他の人の笑いにつられて笑うという要領を会員の多くが用いるものであった(表1)。このことから、こうした一緒に笑う会合に直接に参加しなくても側でみているだけで、笑ったり楽しんだりして、特に精神的健康に良い影響をうけるように思われる。ただし、わらい講での笑いは基本的にはつくった笑い、作為の笑いであることから、人から好意的に受け入れ



Voluntary Laughter for Promoting Good Health

Yasuyuki Takashita

Faculty of Humanities, Fukuoka University



図1 「求菩提わらい講」の笑い場(視聴ビデオの1シーン)

表1「求菩提わらい講」の会員の笑いのつくり方

(会員18名中各項目を選択した人数 複数回答)

アッハッハッなどの声を出すようにする	16 (88.9%)
車座になった向かい側の人の笑っている様子や顔を見る	15 (83.3%)
まず「大きく」息を吸うことから始める	11 (61.1%)
はく息をできるだけ長く続くようにする	10 (55.6%)
体の上体(腰から上)を前後にゆするようにする	10 (55.6%)
リーダーや上手な人の笑っているのをまねしようとする	9 (50.0%)
はく息を強く断続して出すようにする	8 (44.4%)
楽しい、愉快なことを思い浮かべる	8 (44.4%)
腹の筋肉をゆるめるようにする	7 (38.9%)
顔の特に目や口を笑う表情にする、つくる	7 (38.9%)
笑い出すときに背筋を伸ばして少しそり返るようにする	6 (33.3%)
頭を前後にゆするようにする	6 (33.3%)
車座になった向かい側の人の笑い(声)に自分の笑い(声)が合うようにする	4 (22.2%)
無心になる	4 (22.2%)
笑っているうちに自然におかしくなる	2 (11.1%)
アッハッハッよりもウワッハッハッと声を出す	1 (5.6%)

(高下, 1997から)

られないこともあるのではないかと推測される。

1.4 研究の目的

ここでは、わらい講の会員と一緒に笑っている場面のビデオ録画を被験者(大学生)に視聴させることで、不快な気分の解消、逆に快適な気分を高揚させる効果があるか、さらには観察者として大学生がわらい講の笑いをふだんの楽しいときの笑いに近いものとしてみなすかを確認することで、今後の笑いを取り入れた健康づくりの活動を進める上での手がかりとする。

2 実験

2.1 被験者

大学の2つの講義クラス(「心理学」の講義)の受講生である男性103名、女性172名。年齢は18歳から26歳の範囲で、大半が1年生である。

2.2 提示刺激

「求菩提わらい講」の月例会(平成9年11月16日日曜日、午前11時開始)での女性13名、男性2名の出席会員が車座になって一緒に笑うセッションを8ミリビデオカメラで収録した(図1)。車座になっている全景から始まって、座っている各会員の上半身ならびに顔面の笑う様子を横に移動するショットで撮影した。会員が声を合わせて笑い始めてから全体の笑いがおさまるまでが5分10秒ほどの時間であった。

この笑いビデオの効果を比較するための「笑いを喚起しない」対照用ビデオとして、放送大学の講義ビデオ・ライブラリーのなかの「数量化」に関する講義の第1回入門編の冒頭の約5分ほどを提示した。この講義ビデオのほとんどの時間が、男性講師が教卓から語りかける形式で推移し

た。

この2種のビデオは、半暗室照明下の講義室の正面の大型スクリーンに投影して被験者に提示された(図2)。

2.3 わらい講の笑い場面に対する評価

わらい講の笑い場面のビデオを被験者が視聴して、その笑いに対して感じた印象を、「ふだん自分や他の人が笑っている場合」との比較によって、「笑いの顔面表情の強さ」「笑う表情の左右対称性」「笑い声の大きさ」「笑い声の高さ」「笑うときの体の動き」「1回の笑いの時間」「笑いが繰り返し持続する時間」「全般的印象」に関して5段階(1が「非常に強い」「大きい」など、5が「非常に弱い」「小さい」など)で評価を求めた。

さらに「わらい講の笑っている人が楽しそうにみえるか」「笑っているのを見ていて被験者自らが笑ったか」「楽しくなったか」についても5段階(1が「大いにそうである」、5が「まったくそうでない」)で評価を求めた。

2.4 笑い場面の視聴による気分の変化の測定

笑いビデオと講義ビデオの各々の視聴が被験者の2種類の気分、「緊張覚醒 Tense Arousal : TA」ならびに「エネルギー覚醒 Energetic Arousal : EA」の変化に及ぼす影響を「日本語版 UMACL (UWIST 気分形容詞チェックリスト)」^{6, 7)}に対する自己評価によって測定した。緊張覚醒とは緊張などのストレス状態、不快な気分の状態にあるもので、「緊張している」「びくびくしている」など10項目の形容詞によって測定される。他方エネルギー覚醒とは活動的な状態、快適な気分の状態にあるもので、「活動的である」「元気がある」などの10項目の形容詞にあてはまる程度で評価される。合計20項目と項目数が少ないことから、その場の、そのときの気分の測定に利便性のある尺度である。石田ほか⁷⁾の実験研究では、ユーモアのあるア



図2「求菩提わらい講」の笑い場のビデオ視聴

ニメ（スラップスティック形式のコメディ・アニメ）のビデオの視聴後は緊張覚醒の低下とエネルギー覚醒の上昇が、単調な講義のビデオ視聴後は逆に緊張覚醒は高まりエネルギー覚醒の低下がみられた。本研究での笑いビデオと講義ビデオの視聴実験でも、同様の効果がみられると期待された。なお比較条件としてビデオ提示前の覚醒の水準の調査を行った。

2.5 ユーモアのセンスと感情表出性の測定

笑いビデオを視聴する際に、わらい講の会員の笑いにつられて笑ったり楽しんだりする被験者の背景にあると思われる資質として、「ユーモアのセンス」と「感情表出性」について測定した。

「ユーモアのセンス」尺度⁸⁾は15項目の質問紙で、ユーモラスな刺激に気づく程度に関する「メタメッセージに対する感受性」、ユーモアを価値あるものとみなす程度の「ユーモアに対する好み」、笑いを含めた情動全般に関してその情動を表出する程度である「情動の表出性」の3つの下位尺度から構成される。

もうひとつの被験者の資質として取りあげた「感情表出性」とは、対人場面で適切に感情を表出できる程度を意味するもので、「電話ですらでもたやすく感情を表すことができる」など全部で13項目に対して自分があてはまる程度を回答する「感情表出的コミュニケーションテスト Affective Communication Test : ACT」⁹⁾によって測定した。

ユーモアのセンスのなかでも特に情動の表出性の側面が高い人、ならびにACTによる感情表出性の高い人が笑いビデオを刺激として自ら笑ったり進んでユーモア体験を求める傾向のある人ではないかと予測された。

2.6 手続き

大学の300人収容の大講義室と150人収容の中講義室での2つのクラスの講義のなかで調査を行った。覚醒に関しては、まずビデオ提示前に、次いで2種類のビデオの各

提示（2つのクラス間で順序を入れ替えた）後に調査した。わらい講の笑いに対する評定は、笑いビデオ提示後の覚醒の調査に続いて被験者に求めた。最後に「ユーモアのセンス」「ACT」の順序で各調査票の回答を求めた。

3 結果と考察

3.1 わらい講の笑いに対する評定

わらい講の笑いに対して「ふだんの自分や他の人が笑っている場合」との比較による評定に関して被験者全体の平均値は、顔面表情の強さ ($M=1.68, SD=0.84$)、顔面表情の左右対称性 ($M=3.65, SD=1.05$)、声の大きさ ($M=1.33, SD=0.65$)、声の高さ ($M=1.60, SD=0.73$)、笑うときの体の動き ($M=1.71, SD=0.84$)、1回の笑いの時間 ($M=1.74, SD=0.85$)、笑いが繰り返し持続する時間 ($M=1.36, SD=0.73$)、全般的印象 ($M=1.48, SD=0.78$)のほとんどの項目で5段階評定の1（「非常に強い」「非常に大きい」など）と2（「やや強い」「やや大きい」など）の間にあった（評定段階1を「非常にきれい」とした「顔面表情の左右対称性」の評定平均値は3.65で「やや歪んでいる」に近い判定であった）。全体としてわらい講の笑いはふだんの自然の笑いよりも、誇張されている、やや歪んでいる、笑い声も唐突に大きく、かん高い、異様に体が動く、ひとつの笑いも妙に長い、5分間も持続することが普通ではないと見なされたと言えよう（図3）。このようにわらい講の笑いをふだんの笑いから区別する手がかりは、過剰な強度という量的な面での違いにあったが、調査項目にもある表情の対称性の有無などの微妙な質的違いによっても見分けている可能性もうかがわれた。

以上のようにかなりの被験者がわらい講の笑いを自然の笑いとして認めていないことと関係してか、評定の平均値が「笑っている人が楽しそうにみえる程度」について2.63 ($SD=1.24$)、「笑っているのを見ていて自分も笑ったか」について3.03 ($SD=1.29$)、「楽しくなったか」について

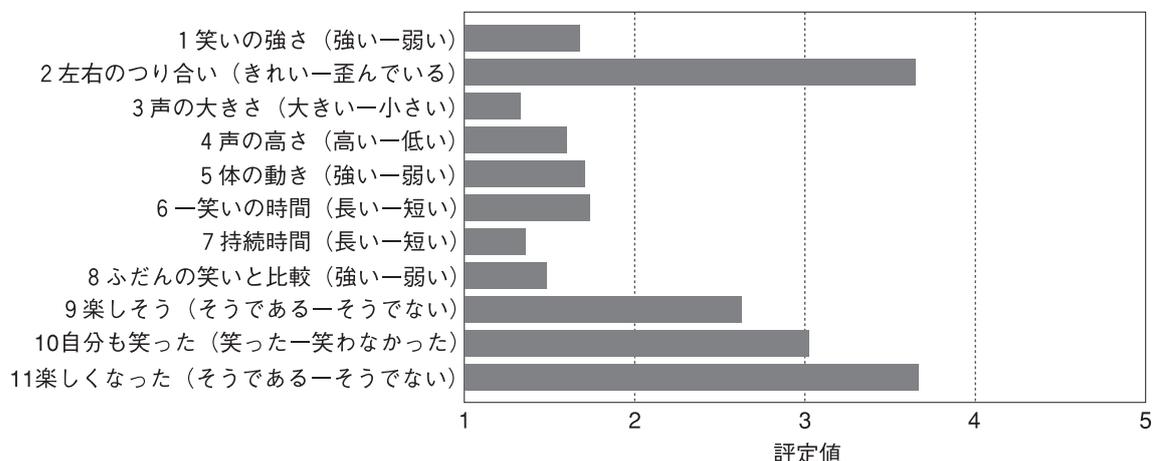


図3 「求菩提わらい講」の笑いに対するふだんの笑いとの比較による評定

3.67 (SD=1.23) と5段階評定の3 (「いずれでもない」) の前後に位置しており、笑いビデオの視聴によって笑いと陽気さが強く引き起こされたとは言えない(図3)。またこの3項目の評定の標準偏差が大きかったことから、笑い視聴による笑いの喚起や気分の変化の程度の個人差が大きいことがうかがわれた。

3.2 笑いの視聴が気分の変化に及ぼす効果

ビデオ視聴前、そして2種類のビデオ視聴後の緊張覚醒とエネルギー覚醒の変化をみた(図4)。

まず不快な気分状態を示す「緊張覚醒」についてビデオ視聴前(M=19.28)、講義ビデオ視聴後(M=18.25)、笑いビデオ視聴後(M=20.39)の平均値の間に有意な差がみられた(F=19.66, df=2,548, p<.01)。多重比較(テューキのHSD検定)すると、講義ビデオ視聴後、ビデオ視聴前、笑

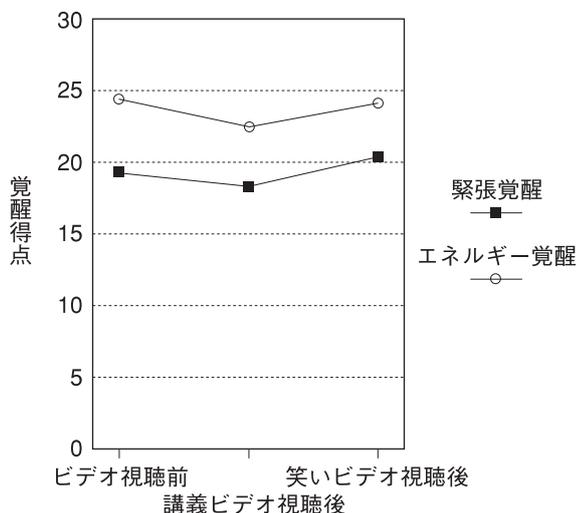


図4 笑いビデオ視聴と講義ビデオ視聴による緊張覚醒とエネルギー覚醒の変化

いビデオ視聴後の順により高くなっていた(p<.01)。予測に反して笑いビデオ視聴後がより不快なストレス状態にあった。

また快適な気分状態に対応する「エネルギー覚醒」についてビデオ視聴前(M=24.41)、講義ビデオ視聴後(M=22.49)、笑いビデオ視聴後(M=24.25)の平均値の比較をすると有意な差がみられた(F=18.85, df=2,548, p<.01)。多重比較(テューキのHSD検定)によると、ビデオ視聴前ならびに笑いビデオ視聴後は講義ビデオ視聴後よりも有意に高かった(p<.01)。このエネルギー覚醒については笑いビデオ視聴による快適な気分の促進効果があったが、ビデオ視聴前の水準からの上昇はなくて不十分な効果でしかなかった。

3.3 わらい講の笑いに対する反応の個人差

全体として笑いビデオ視聴による不快な気分の軽減ならば快適な気分の促進という効果がみられなかった理由として、笑いビデオの視聴による功罪が相半ばすることが推測される。すなわち笑いビデオのなかの笑いにひかれて笑う人、逆に反発や反感をもって笑えない人に分かれるのではないかと考えられる。そこで笑いビデオ視聴後にビデオ視聴前に比べてエネルギー覚醒が上昇して緊張覚醒が低下した人(それぞれ1得点以上の上昇と低下)——「快覚醒喚起群」(男性25名、女性29名)、逆にエネルギー覚醒が低下して緊張覚醒が上昇した人(それぞれ1得点以上の低下と上昇)——「不快覚醒喚起群」(男性21名、女性46名)を取り出した。

わらい講の笑いの評定に関しては、快覚醒喚起群(M=3.54)の方が不快覚醒喚起群(M=4.00)よりも「笑い顔が歪んでいる」とはみなさなかった(t=2.69, df=119, p<.01)。また「笑っている人たちは楽しそうである」(快

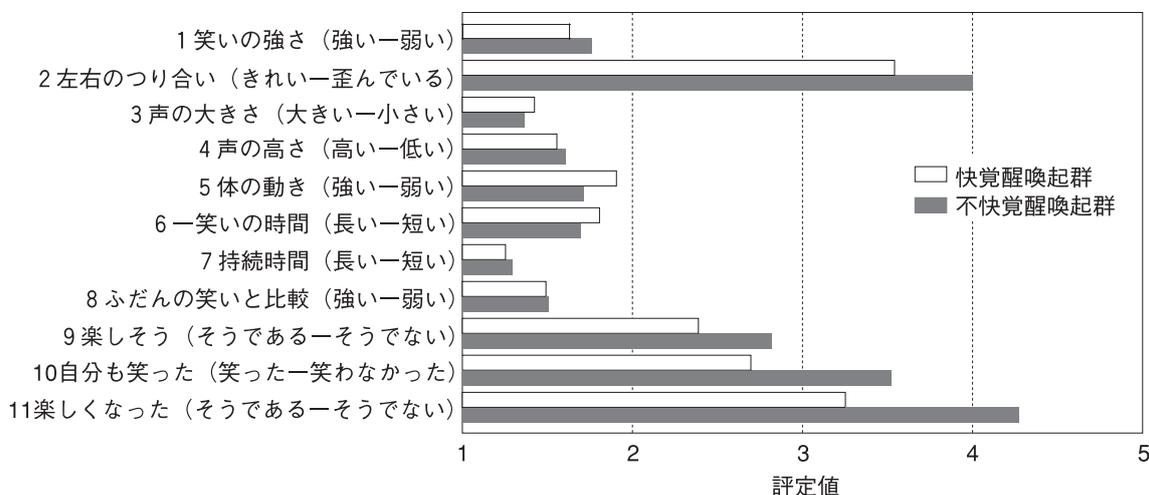


図5 快覚醒喚起群と不快覚醒喚起群による「求菩提わらい講」の笑いに対するふだんの笑いとの比較による評定

覚醒喚起群 $M=2.39$ 、不快覚醒喚起群 $M=2.82$; $t=2.26$, $df=119$, $p<.05$)、「自分も笑った」($M=2.70$ と $M=3.52$; $t=3.54$, $df=119$, $p<.01$)、そして「楽しくなった」($M=3.26$ と $M=4.27$; $t=4.93$, $df=119$, $p<.01$)についても、快覚醒喚起群の方がより肯定的な評定をしていた(図5)。

笑っている人を好意的にみて自らも笑い楽しむから、よい気分や覚醒に転じたと推測することができよう。ただこのように笑いに志向させる人的資源として予測されたユーモアのセンスや感情表出性の2つの側面については、両群間で差がみられなかった。ここでは笑い志向性の違いを発生させる何らかの要因が他にあるのではないかと提起するにとどめておく。

4 総括

「求菩提わらい講」の会員は、笑いをつくる訓練のなかからその笑いをふだんの笑いに近づけて、それを健康維持に生かそうと試みている。ただ現状ではまだ作為の強い笑いであり、外部からの観察者の多くはふだんの笑いに比べて過剰な強度と持続性がみられることから不自然な笑いとみなしている。この外部からの評価はこれからの自然な笑いづくりをするための重要な手がかりとなろう。

また人が笑っているのを見ているだけで気分が軽くなる効用があるかに関しては、提示する笑いの素材として用いたわらい講の笑いが不自然であまり受け入れられなかったためか部分的にしか確認されなかった。ただ被験者の大学生のなかには、その不自然な笑いでもつられ笑いを促される人もかなりいた。こうした「笑い志向性」の背景にある人的要因は、本調査で取りあげた限りのユーモアのセンスや感情表出性とは関連がみられず、他に探索の目を向けるべき問題として残された。

(引用文献)

- 1) Cousins, N. : *Anatomy of an Illness as Perceived by the Patient*. W.W.Norton & Company, New York, 27-48, 1979. [カズンズ, N. (松田 銑 訳), : 笑いと治癒力, 岩波書店, 東京, 1996, 1-30 頁.]
- 2) 高下保幸, 上野良重, : ストレス緩和剤としてのユーモアのセンス, 現代のエスプリ, No.290, 204-215 頁, 1991.
- 3) 横山和仁, 荒木俊一, : 日本版 POMS の手引き, 金子書房, 東京, 1994.
- 4) 中川泰彬, 大坊郁夫, : 日本版 GHQ 精神健康調査票——手引, 日本文化科学社, 東京, 1985.
- 5) 高下保幸 : 「求菩提わらい講」の健康づくり活動について, 健康文化 (明治生命厚生事業団健康文化研究助成論文集), No.3, 75-84 頁, 1997.
- 6) Matthews, G., Jones, D.M. & Chamberlain, A.G. : Refining the measurement of mood : The UWIST Mood Adjective Checklist. *British Journal of Psychology*, **81**, 17-42, 1990.
- 7) 石田多由美, 高下保幸, 原口雅浩, ほか1名, : 日本語版 UMACL の検討——ユーモア体験が EA, TA に及ぼす効果, 九州心理学会第 54 回大会発表論文集, 26 頁, 1993.
- 8) 上野良重, 高下保幸, 原口雅浩, ほか1名, : ストレス緩和要因としてのユーモアのセンス, 人間性心理学研究, **10**, 69-76 頁, 1992.
- 9) 大坊郁夫, : 非言語的表出性の測定 : ACT 尺度の構成, 北星学園大学文学部論集, **28**, 1-12 頁, 1991.

環境芳香の与える心理的影響に関する研究

1) 早稲田大学国際情報 信研究センター 2) 早稲田大学人間科学部

河合隆史¹⁾、萩原彰子²⁾

Two experiments to examine the environmental fragrances on the emotional states confirmed the following:

- (1) Environmental fragrances have psychological effects.
- (2) The effects continue in a constant time.
- (3) Favorable impression vary in the strength of the fragrance.
- (4) Psychological effects vary in the favorable impression.

1 緒言

化粧品は香粧品とも言われることから、化粧品と芳香は密接な関係にある。実際に化粧をするときを考えても、化粧をすることによって得られる外見的美しさと同時に、快い芳香を演出するという、眼に見えない美しさを装うことができる。また、身体に添付すること以外でも、快適な空間を演出するための要素として、環境芳香が注目を集めている。ここでの空間とは、オフィス環境やシアターなど、幅広い領域を対象とする。

しかしながら快い芳香には、個人差が大きく関わることが指摘されている^{1~2)}。また、芳香の種類や濃度といった、実用レベルでの呈示・演出に関する研究は、乏しいのが現状である。筆者らは、これまで立体映像シアターにおいて、環境芳香を随伴した演出を行ってきた³⁾。同時に、立体映像に環境芳香を随伴した際の、心理的影響に関する実験を実施した。結果から、心理効果を考慮した環境芳香の呈示法について、検討する必要性が示唆された⁴⁾。

そこで本研究では、特定の効果を意図した空間演出において、環境芳香を有効に用いるための基礎的な知見を得ることを目的とし、2つの実験を行った。具体的には、環境芳香の種類や濃度の観点から、さまざまな条件の空間を設定し、その心理的影響の検討を行った。実験にあたっては、香りの種類に対する嗜好性について、併せて調査を行った。

2 香りの種類に対する嗜好性の調査

2.1 目的

本調査の目的は、香りの種類に対する嗜好性を調査する



A Study on Psychological Effects of Environmental Fragrances

Takashi Kawaj¹⁾, Akiko Hagiwara²⁾

1) Global Information and Telecommunication Institute, Waseda University (Tokyo)

2) School of Human Sciences, Waseda University (Saitama)

ことによって、環境芳香を用いた実験的研究における刺激選択の指針を得ることである。

2.2 方法

調査に使用した16種類の精油(JULIQUE社)とその解説⁵⁾について、表1に示した。健常な大学生50名(男性25名・女性25名)を対象として、16種類の香りをランダムに呈示し、大変好ましい場合を100点、大変好ましくない場合を0点、どちらでもない場合を50点とする100点満点方式で、それぞれ採点を求めた。被験者に香りを呈示する際には、その種類が分からないよう注意した。また、調査中に被験者が嗅覚疲労を生じた場合には、休憩を取るよう教示した。

表1 調査に使用した精油

イランイラン	エキゾチックで官能的な、甘く重い香り
オレンジ	甘くフレッシュな、やや軽めのシトラス系の香り。
クラリセージ	甘くフローラルな、ハーブ調の香り。
グレープフルーツ	ビターでフレッシュさを感じる、シトラス系の香り。
サンダルウッド	スパイシーな、オリエンタル調の木の香り。
シダーウッド	サンダルウッドに似た、乾いた木の香り。
ジャスミン	甘く、エキゾチックな香り。
ゼラニウム	甘く、ローズに似た、フローラル系の香り。
ティートリー	清潔感がありフレッシュな、やや鋭い香り。
ネロリ	優雅で甘みのある、印象的なフローラル系の香り。
ベルガモット	甘くフレッシュな香り。レモンやオレンジよりもフローラルである。
ユーカリ	ショウノウのような、クリアで鋭い香り。
ラベンダー	さわやかでライトなフローラル系の香り。
レモングラス	レモンを強くしたような、鮮烈な香り。
ローズ	甘く深い、フローラル系の気品のある香り。
ローズマリー	フレッシュでウッディな、ハーブ調の強い香り。

2.3 結果

本調査の集計結果について、表2に示した。男性・女性共通して、グレープフルーツ、オレンジの順に好感度が高かった。3位以降については、男性のレモングラス、ラベ

ンダー対し、女性はローズ、ネロリを高く採点していた。

男性・女性の平均点について、図1に示した。1位～3位は柑橘系、4位～9位はフローラル系、10位以下はウッド系の香りという一定の傾向が認められた。

2.4 考察

結果から、性別による傾向と同時に、男女共通の嗜好傾向を把握できた。男女別の傾向としては、上位3種類の香りについては共通であったが、4位以降では、男性はすっきりした香りを好み、女性は甘い香りを好む傾向がみられた。また、男女共通の傾向として、柑橘系の香りを最も好み、次にフローラル系を好むが、ウッド系に対しては、あまり

好感を抱かないことがわかった。ただしこの傾向は、ウッド系の香りに日常的に接する機会の少ない、大学生を対象としたことが影響している可能性があり、他の年齢層を対象とした場合には、異なる結果が得られることも予想される。

3 環境芳香の呈示条件の与える心理的影響 (1)

3.1 目的

本研究課題の領域では、通常、芳香を呈示しない状態をベースラインとして芳香の呈示を行い、その際の効果を検討する機会が多い。これに対して本実験においては、芳香を呈示した実験室から呈示しない実験室へ移動するという条件を設定することにより、環境芳香によって与えられた、心理効果の継時的な変化について検討することを目的とした。

3.2 方法

3.2.1 刺激

呈示する環境芳香として、一般にリラックス効果が高いとされている⁶⁾ラベンダーの精油 (JULIQUE 社) を選択した。

3.2.2 測定項目

心理反応の測定にあたって、気分調査票を使用した。これは、ある特定の時点における気分の状態を調査することを目的とした質問票⁷⁾である。質問は32項目から成り立っており、緊張と興奮、爽快感、抑うつ感、不安感の4因子で形成されている。

表2 集計結果

順位	香りの種類 (女性)	香りの種類 (男性)
1位	グレープフルーツ	グレープフルーツ
2位	オレンジ	オレンジ
3位	ローズ	ローズ
4位	ネロリ	ラベンダー
5位	レモングラス	ベルガモット
6位	ラベンダー	ローズ
7位	ジャスミン	イランイラン
8位	イランイラン	ネロリ
9位	ベルガモット	サンダルウッド
10位	サンダルウッド	サンダルウッド
11位	クラリセージ	クラリセージ
12位	シダーウッド	ユーカリ
13位	ゼラニウム	シダーウッド
14位	ユーカリ	ゼラニウム
15位	ティートリー	ローズマリー
16位	ローズマリー	ティートリー

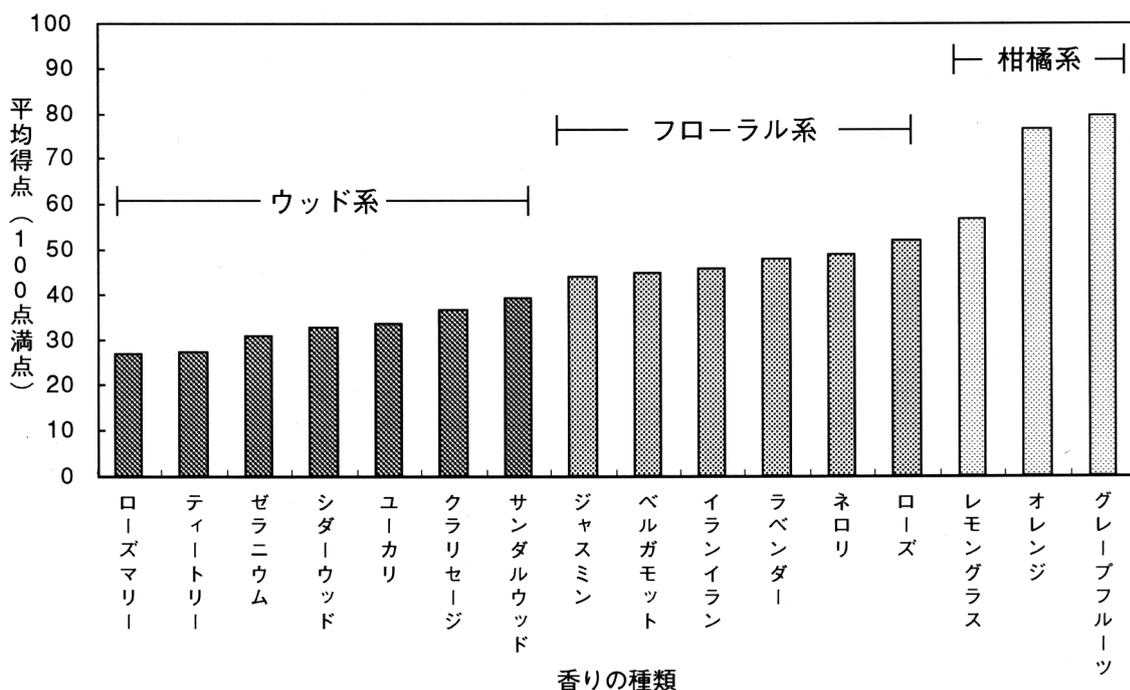


図1 男性・女性の平均結

3.2.3 手続き

環境芳香の有無を作り出すために、同体積で隣り合った2つの実験室を用意した。一方の実験室にラベンダーの環境芳香を呈示し、もう一方の実験室は無臭状態とした。実験室の脱臭には、最も効果の高いとされている⁸⁾光脱臭機(ダイキン工業)を用いた。環境芳香の強度は、予備調査を行い、ほのかに香る程度に調節した。具体的には、体積が54m³の実験室に対して、0.1mLの香料を使用した。芳香の呈示では、空調設備の送風口へ香料を設置することで、実験室内全体に循環させた。

被験者は、健常な大学生10名(男性5名・女性5名)を対象とした。被験者には、無臭の実験室、環境芳香を呈示した実験室、無臭の実験室の順に移動を求め、各室において気分調査票への回答を求めた。また、環境芳香を呈示した実験室においては、ラベンダーの香りについて、大変好ましい場合を100点、大変好ましくない場合を0点、どちらでもない場合を50点とする100点満点方式での採点を求めた。本実験のながれについて、図2に示した。

3.3 結果

気分調査票の結果について、最初に入室した無臭の実験室における評定点をベースラインとした変化率に変換し、環境芳香を呈示した直後、5分後、15分後の心理的变化の検討を行った(図3)。環境芳香の呈示直後において、緊張と興奮、抑うつ感、不安感は減少し、爽快感は増加した。これは、心理的な安静化方向の変化として、とらえることができる。その後、無臭状態においても、その変化は維持されていた。気分調査票による各因子と測定時期を要因とした、4×3の2要因の分散分析を行った結果、因子の主効果について有意差が認められた(F=11.610、P<.01)。下位検定の結果、他の因子に比べ、爽快感が有意に上昇していることが分かった。同時に、測定時期に有意差が認められなかったことは、環境芳香によって与えられた心理効果が持続したことを示唆している。

次に、呈示したラベンダーの香りの好ましさにについて、100点満点中0～50点を回答した群と51～100点を回答した群を、それぞれ高好感度群と低好感度群に分類し、各因子と香りの好ましさと関連について検討した(図4～7)。高好感度群では各因子において、環境芳香を呈示した直後から15分後にかけて、心理的变化が維持されていた。一方、低好感度群では、緊張と興奮、抑うつ感、不安感において、徐々に減少方向への変化が大きくなる傾向がみられた。各因子の変化について、被験者群と測定時期を要因とした、2×2の2要因の分散分析を行った。その結果、不安感において、群の主効果に有意差が認められた

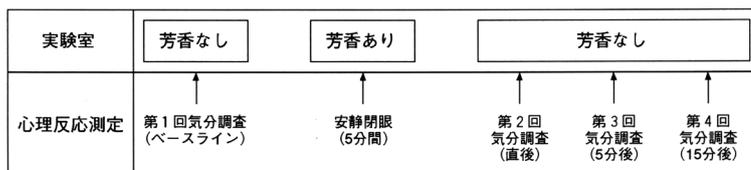


図2 実験の流れ

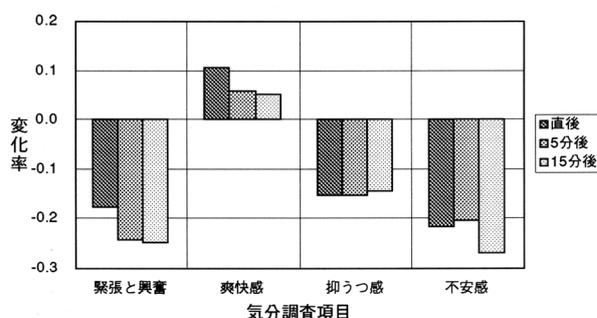


図3 気分調査結果

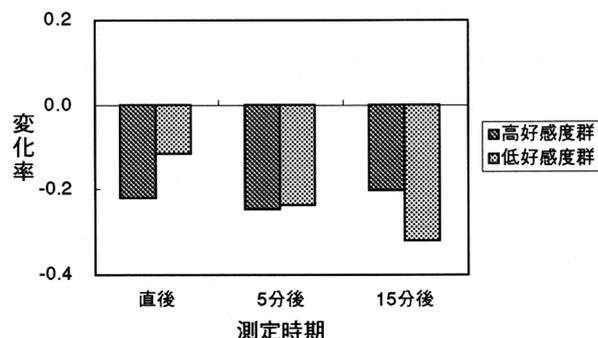


図4 緊張と興奮の変化

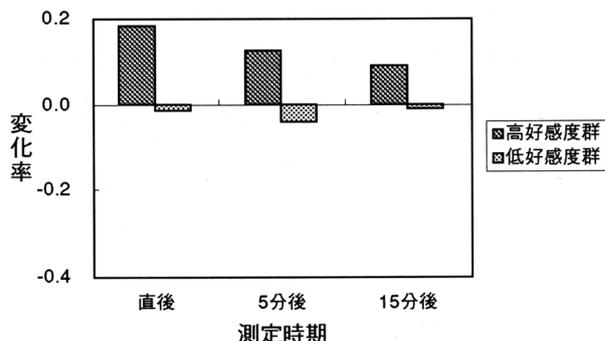


図5 爽快感の変化

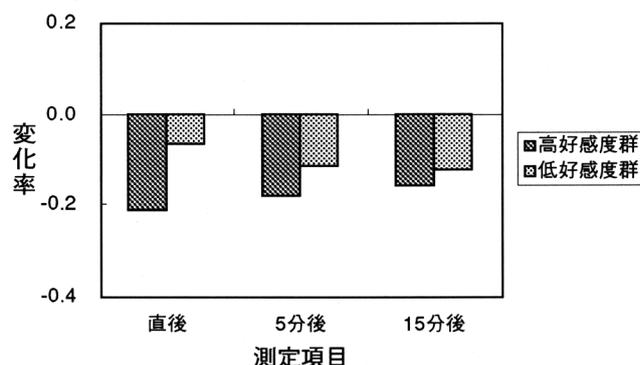


図6 抑うつ感の変化

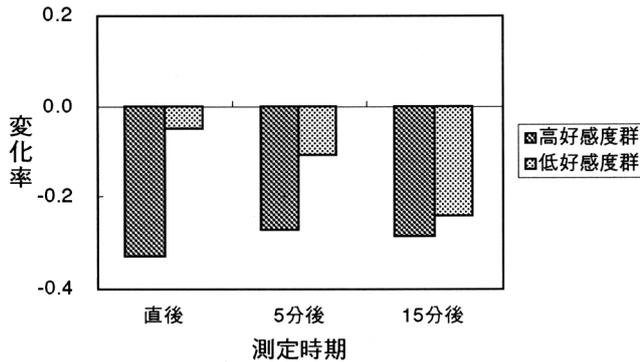


図7 不安感の変化

($F=4.916$, $P < .05$).

3.4 考察

本実験では、環境芳香の与える心理効果の継時的変化について検討を行った。その結果、ラベンダーの環境芳香の呈示によって安静化方向の変化を誘発し、無臭状態においても、一定時間は、その変化を維持することが認められた。また、香りに対する好感度によって、時間経過に伴う心理的な変化の大きさや傾向が、異なることが分かった。

4 環境芳香の呈示条件の与える心理的影響 (2)

4.1 目的

ある物質の香りの強さは、感覚を引き起こすのに必要な濃度の最小限で表すことができるが、同じ物質であっても濃度によって感じ方は異なる⁹⁾。例えば、好ましい香りであっても、濃度が強ければ不快臭にもなり得ることは、広く体験されることである。そこで本実験においては、環境芳香の呈示条件を、濃度によって変化させた際の心理的影響について検討を行った。

4.2 方法

4.2.1 刺激

呈示する環境芳香として、前章の実験において心理的な安静化方向への変化が認められたラベンダーの精油 (JULIQUE 社) と、本研究での調査において最も好感度の高かったグレープフルーツの精油 (JULIQUE 社) を選択した。

4.2.2 測定項目

心理反応の測定にあたって、気分調査票を使用した。

4.2.3 手続き

環境芳香の有無を作り出すために、同体積で隣り合った2つの実験室を用意した。一方の実験室に環境芳香を呈示し、もう一方の実験室は光脱臭機 (ダイキン工業) を用いて無臭状態とした。環境芳香の強度について予備調査を行

い、弱い芳香と強い芳香を呈示するための濃度の調整を行った。具体的には、ほのかに香る程度の弱い環境芳香を呈示する際には、体積が 54m^2 の実験室に対して、ラベンダーの精油を 0.1mL 、グレープフルーツの精油を 0.1mL 使用した。一方、香っていることが明らかに分かる程度の強い環境芳香を呈示する際には、ラベンダーの精油を 0.7mL 、グレープフルーツの精油を 0.9mL 使用した。芳香の呈示では、空調設備の送風口へ香料を設置することで、実験室内全体に循環させた。

被験者は、健常な大学生 20 名 (男性 10 名・女性 10 名) を対象とし、ラベンダーの環境芳香を呈示する群と、グレープフルーツの環境芳香を呈示する群の 2 群を設定した。被験者には、無臭の実験室、環境芳香を呈示した実験室の順に移動を求め、各室において気分調査票への回答を求めた。この手続きを 1 セッションとし、弱い芳香と強い芳香の実験室への入室をランダムに求めることにより、合計 2 セッションを 1 試行とした。さらに、環境芳香を呈示した実験室においては、香りについて、大変好ましい場合を 100 点、大変好ましくない場合を 0 点、どちらでもない場合を 50 点とする 100 点満点方式での採点を求めた。

4.3 結果

4.3.1 解析方法

気分調査票の結果について、最初に入室した無臭の実験室における評定点をベースラインとした変化率に変換し、検討を行った (図 8 ~ 11)。

ラベンダーの環境芳香を呈示した群では、弱い芳香の条件において安静化方向の心理的变化がみられたが、強い芳香の条件においては逆方向の心理的变化がみられた。一方、グレープフルーツの環境芳香を呈示した群では、芳香の強度に関わらず、一貫して安静化方向の心理的变化がみられた。気分調査票による各因子に対して、芳香の種類 (ラベンダー・グレープフルーツ) と強度 (弱い・強い) を要因とした、 2×2 の 2 要因の分散分析を行った。緊張と興奮では、交互作用が認められ ($F=10.707$, $P < .01$)、ラベンダーの強い芳香条件において、有意な上昇が認められた。爽快感では、交互作用が認められ ($F=4.984$, $P < .05$)、ラベンダーの強い芳香条件において、有意な下降が認められた。抑うつ感では、芳香の強度の主効果に有意差が認められた ($F=5.428$, $P < .05$)。不安感では、交互作用が認められ ($F=5.069$, $P < .05$)、ラベンダーの強い芳香条件において、有意な上昇が認められた。

また、環境芳香の種類に対する好感度の調査において、ラベンダーは、弱い芳香条件では高得点であったが、強い芳香条件においては低得点であった。これに対してグレープフルーツは、芳香の強度に関わらず高得点であった (図 12)。

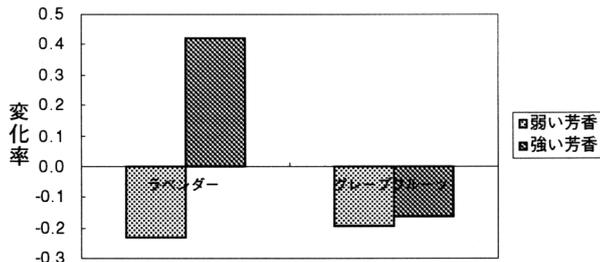


図8 緊張と興奮の変化

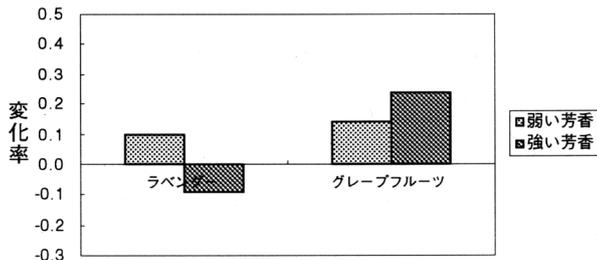


図9 爽快感の変化

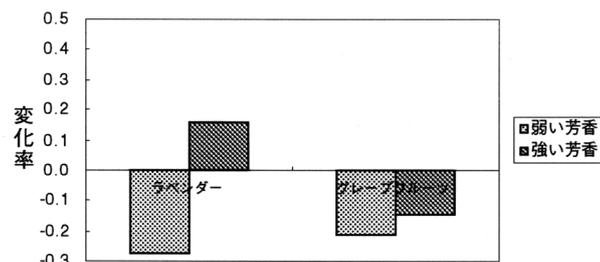


図10 抑うつ感の変化

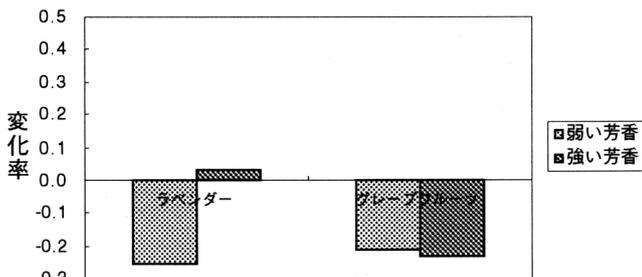


図11 不安感の変化

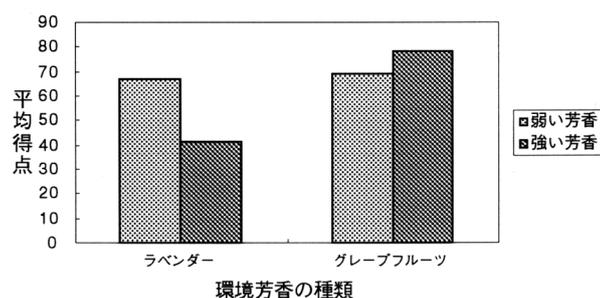


図12 芳香（種類・強度）に対する好感度

4.4 考察

本実験では、環境芳香の濃度を变化させた際の心理的変化について検討を行った。その結果、弱い芳香条件では、ラベンダーとグレープフルーツ共に安静化方向の変化を示していたが、強い芳香条件では、ラベンダーの芳香を呈示した群において、逆方向の変化が認められた。また、好感度の調査からは、ラベンダーの強い芳香条件が、顕著に低く採点されていることが分かった。これらの結果は、同一の環境芳香であっても、強度によって好ましさは変化し、それに伴って心理効果が変化する可能性を示唆している。

5 総括

本研究では、環境芳香の呈示条件を変化させた際の、心理的影響を検討するための2つの実験を行った。結果から、以下の4点が考察としてあげられた。

- (1)環境芳香の呈示は、心理的な変化の影響源となり得る。
- (2)環境芳香の与える心理的影響は、一定時間、持続される。
- (3)同一の環境芳香であっても、強度によって好感度は異なる。
- (4)芳香に対する好感度によって、心理効果が変化する。

これらは、住まいやオフィスといった日常空間での快適性の向上と同時に、劇場空間などでの非日常性の演出において、基礎的な知見を与えるものである。さらに、本研究で得られた知見を、今後の環境芳香を用いた空間演出へ応用していくためには、以下の3点が課題として残されている。

- (1)環境芳香の生理反応への影響調査と、簡易な測定方法の検討。
- (2)複数の芳香の組み合わせや呈示順序による影響調査。
- (3)映像や音響など、他の感覚刺激の随伴による影響調査。

謝辞

本研究の推進にあたっては、早稲田大学人間科学部の野呂影勇教授より、多大なるご指導を頂きました。ここに感謝の意を表します。

(参考文献)

- 1) 鳥居鎮夫：香りの謎，フレグランスジャーナル社，1996。
- 2) 高木貞敬，他：匂いの科学，朝倉書店，1989。
- 3) Takashi Kawai, et al : Virtual museum of Japanese-Buddhist temple features for intercultural communication, Proc. of SPIE 3295, 144-147, 1998。
- 4) Takashi Kawai, et al : Psychological Effect of Stereoscopic 3-D Images with Fragrances, Ergonomics, Vol.39, No.11, 1364-1369, 1996。
- 5) 黒澤路可：香りの事典，フレグランスジャーナル社，

- 1995.
- 6) 鳥居鎮夫：香りからみたハーブの生理・心理作用,
Food Style21, Vol.2, No.7, 49-52, 1998.
- 7) 坂野雄二, 他：新しい気分調査票の開発とその信頼性・
妥当性の検討：心身医学, Vol.34, No.8, 629-636, 1994.
- 8) 臭気対策研究協会 編：21世紀に向けての新しい脱臭
装置開発, 臭気の研究, Vol.29, No.6, 405-439, 1998.
- 9) 篠原 昭, 他：感性工学への招待, 森北出版, 1996.

記念講演

●
平成11年度記念講演 宮地良樹
●

紫外線とコスメトロジー

京都大学大学院医学研究科 皮膚病態学

宮地 良樹

場所 日本薬学会会長井記念ホール

日時 平成11年11月15日(月)

1 太陽紫外線の人の健康へのメリット

今日は紫外線というものが皮膚にどのような影響があるかということをお話したいとお話したいと思います。今日のように雨模様の日、あるいはこんな暗い部屋よりも太陽が燦々と降り注ぐ明るい日の方が人間は誰でも気持ちがよいものです。これは主に可視光線が眼から入って脳を刺激するトニック効果があるためですし、またエネルギーもありますからポカポカと暖かいといった恵みもあるわけです。私たち人間はその恵みを享受しながら、進化してきたわけですが、その恵みの大部分は実は紫外線とは無縁なものです。この太陽光線の中に含まれている一部の紫外線はとりわけ皮膚に関していくつかの功罪があることがわかってまいりました。

ご存知のように太陽からはいろいろな波長の光が出ております。ポカポカと暖かい赤外線が42%あり、目に見える7色の可視光線が51%ですから、これをあわせると90数%が赤外線と可視光線で占められています。生物学的に特に皮膚に対して大きな影響を与える光、これは紫外線であります。紫外線は波長によって長い方からA、B、Cと分けますが、幸いにしてオゾン層のバリアーがありますので、非常に毒性が強く試験管の中で発ガンの実験に使うようなC紫外線というものは皮膚あるいは地上には殆ど届いておりません。このA紫外線とB紫外線を合わせても僅か6.1%しかありませんが、皮膚に対する影響の殆どのはこの2つの波長によって起こります。日焼けですとか、日焼けの後の色をつくるシミとか、あるいは光老化と呼ばれる紫外線によって起こる老化現象、またはガンといった悪いことは全てB紫外線（これは全体の0.5%しかありません）によって起こります。そして、唯一紫外線のメリットとされているビタミンDの合成もこのB紫外線によって行われています。一方、A紫外線は紫外線の中の9割を占めていますが、エネルギー的には非常に弱い

為に、かつては害のない波長と考えられてきました。しかし、最近の研究でこのA紫外線もB紫外線の作用を増強するとか、あるいはとりわけ老化の反応とか、アレルギーの反応に大きな役割を果たすことがわかってまいりまして、A紫外線、B紫外線のどちらも皮膚に対して悪い影響があることが示されるようになってまいりました。B紫外線は波長が短いので皮膚の浅いところ、表皮・真皮境界部位までしか届きません。一方、A紫外線は真皮の奥深くまで届きます。従って、老化現象のシワというものは主に真皮の変化ですので、このA紫外線が重要な役割を果たすことが推測されます。紫外線が皮膚に対してどういう功罪があるかということをもとめてみますと、メリットは唯一、ビタミンDを合成するという点だけであります。それに対して幾つかの悪い点があるということになります。

功罪の功と思われるビタミンDについても、確かに19世紀の産業革命のあとの劣悪な環境下や、我が国でも戦後北海道の炭坑などでは、ビタミンDの不足によるくる病がでました。ではどのくらいの紫外線を浴びればビタミンDが作られるのかといいますと、最近の研究によれば、我が国の栄養学的なビタミンDの所要量は子どもと妊婦を除きますと、普通100国際単位と言われております。この量のビタミンDを作るためには顔と手で大体600cm²ありますが、これをどの位露出すればよいかを計算しますと、夏の神戸のデータからは30分で数百国際単位が作られますから、今日のような雨の日であってもこの程度外を歩けば、必要な量は概ね作られると考えられています。しかも、最近では口からもビタミンDが十分に摂れますので、くる病を恐れるあまりに肌を紫外線に晒すという必要はない。というのが皮膚科医の一致した意見であります。

2 太陽紫外線による生理的健康傷害

2.1 急性反応

2.1.1 サンバーン

誰でも一定以上の紫外線を浴びれば起こり得る現象としてサンバーンという日焼け、皮膚の老化、シミ、シワ、それからガンという問題があります。これはいろいろなバックボーンの違いもありますが生理的変化といわれています。それに対してごく一部の方々には紫外線によるアレルギー反応が起こることがあります。まず日焼けであります、



Photo dermatology in Cosmetology

Yoshiaki Miyachi

Department of Dermatology, Kyoto University Graduate School of Medicine

誰でも海に行くと赤くなってヒリヒリして、そしてやがて皮が剥けるという経験をお持ちだと思いますが、この中でまず赤くなる日焼けを、まさに太陽によるヤケドという意味でサンバーンと呼んでいます。つまりB紫外線が皮膚に加わってさまざまな生理活性物質、とりわけプロスタグランジンが作られて血管を拡張させ、24時間後をピークとして皮膚が赤く腫れる現象がサンバーンであります。

2.1.2 日焼け細胞

ところがこの皮膚の組織を取ってみますと、皮膚の表皮細胞の個別死、これをアポトーシスと言いますが、そういう細胞が散見されることがわかっています。これをサンバーンセル、日焼け細胞といって皮膚科では昔から注目して参りました。このメカニズムが何故起こるのか、というところから紫外線による皮膚の組織傷害の研究が始まったわけです。紫外線、特にB紫外線は直接DNAに傷害を及ぼしますし、一方、A紫外線は主に活性酸素を作ることによって細胞膜あるいはDNAにダメージを与えます。この結果として、日焼け細胞というものが作られるという状況証拠が出てまいりました。

例えば、私が80年代の研修医のころにやった仕事で、20年以上も前ですから、かなり簡単な実験ですが、紫外線を当てますと日焼け細胞がdose-dependentに増えてまいります。そこにSODのような抗酸化剤を添加しておきますと、やはりdoseに応じて日焼け細胞の形成が抑制される。ということは日焼け細胞の形成のメカニズムの一部に活性酸素による酸化組織傷害が介在するのではないかと私共は考えたわけです。紫外線を浴びることによって、皮膚では活性酸素、あるいはフリーラジカルというものが不断に作られています。何故かといいますと、皮膚は酸素に絶えず接する臓器であり、紫外線も浴びる、更には皮脂という油もありますので、活性酸素あるいは過酸化脂質を作りやすい状況にあるからです。このフリーラジカルが産生されて、さまざまな影響が表皮あるいは真皮の奥深くまで到達するというので、いくつかの病態が説明されるようになってまいりました。従って、このレベルでのフリーラジカル産生を抑制するという、コスメトロジーの領域でいえばスキンケアというドラッグデリバリーで制御することが可能であると思われる。今のところはサンスクリーンという紫外線をブロックするような方法が唯一ですが、今後はこのような抗酸化的なアプローチというものが注目されるべきではないかと思っています。

2.1.3 サンターンの意味とメカニズム

さて、赤い日焼けを過ぎますと今度は皮がボロボロ剥けて茶色になってきます。これをサンターンと申しますが、

サンターンというのは要するに大量の紫外線を浴びますと私たちの皮膚は防御反応をします。つまり角層という皮膚の死んだ細胞の重なり合った層がありますが、ここを分厚くして紫外線を吸収したり、散乱したり、反射をして、もうこれ以上皮膚に紫外線をくれるなという反応をおこします。又、もう少し深いところにいきますとメラニンキャップと申しますが、メラノサイトという色素細胞がメラニンという黒い色素を作って、これを周りの細胞に丁度帽子をかぶせるようにDNAに蓋をして紫外線の傷害から守ろうとする防御反応を起こします。

一般には小麦色の肌と非常に好ましいものと錯覚をされていますが、これは実は生体からの警告の反応であるといってもよろしいかと思えます。色素細胞というのはちょうどタコの足のように樹状突起という足を沢山出して、周りの表皮細胞のDNAを守るためにメラニンという色素を配っています。メラニンキャップをかぶりますと上から紫外線が来てもDNAが守られます。

こういう防御反応、これがサンターンのメカニズムであります。実際にサンターンをした皮膚を生検しますと、このようにメラノサイトから配られたメラニンがたっぷりあって私たちの皮膚を不断の酸素のストレスあるいは光酸素ストレスから守っています。このメラニンには単なるフィルター作用だけではなく、活性酸素を消去する作用があることもわかっています。かつては色素細胞に直接紫外線が当たって、この酸化反応が進むのであろうと考えられていましたが、最近の研究ではその間には1クッションがあってB紫外線が表皮細胞にまず当たって、それからさまざまなメディエータ、特にエンドセリンのようなものが出て、エンドセリンレセプターを介してメラニン産生を刺激するという違うステップもわかってまいりました。今、美白剤の開発が盛んでありますけれども、単純にこのチロシナーゼというメラニンを作る酵素の活性を制御するだけではなく、その他のステップをブロックするような方法やそれ以外にも美白剤の研究のターゲットとなるような物質が、最近続々とわかってきていますから化粧品業界でもこれに対する研究が進んでいるものと思います。

シミというものは本来は防御反応であるメラニン産生がいつまでたっても続くこと、つまりメラニンのサイトが暴走することによって起こるわけですが、これはある日突然シミができるわけではなく、特殊な方法で調べますと見えているシミは氷山の一角であって、その下にはいくつもの予備軍があることがわかります。従って、単に見えるシミがないからいいんだということではなくて、絶えず私たちはシミを抱えているんだということを頭に入れる必要があると思えますし、一般の人々にも啓発する必要があると思えます。

2.1.4 光線過敏症

ここまでは誰でもが経験しているような生理的な、しかも、急性の紫外線による傷害としてのサンバーンあるいはサンターンのご説明をしましたが、それ以外にもいくつかの反応があります。光アレルギー反応はここにおられるすべての方が被るわけではありません。しかし、皮膚科の外来では時々光線過敏症の方がみえます。例えば、テニスをしてひじが痛い、そして非ステロイド系の鎮痛剤を外用しながら、又、テニスをする。そうしますと半袖で隠れるところは、塗っただけではカブレていないわけですね。しかし、塗って、しかも紫外線を浴びたところでは湿疹ができてしまったという症例。これを光アレルギー性の接触皮膚炎と私たちは呼んでいます。これはケトプロフェンという薬剤が原因だったわけですが、こういう患者さんのテストをしますと、単純に貼るパッチテストでは何もできません。しかし、貼った後にA紫外線を当てますと陽性にでるといわけです。こういったことを繰り返していきますと慢性の光線皮膚症と申しますが、皮膚がゴワゴワと盛り上がってきて難治性の病気になってしまいます。こうなりますと非常に治療に苦慮します。近々予定されているFK506という免疫抑制外用剤がでますと、こういう患者さんが治療可能になると思いますが、今までは、なかなか遮光する以外にいい治療がなかったわけですね。ですから、カブレの段階で原因を見つけてあげて未然に防ぐことが、唯一の予防と治療であったわけです。

2.2 慢性反応

2.2.1 光老化

サンバーンに続いてもっと大事な、特にこのコスメトロジーの領域で最も関心が高いと思われる病態。これがphotoaging (光老化) と呼ばれる現象であります。例えば、お母さんと娘さんの写真を合成したのを見ますと、同じような肌質であても、生まれて何十年もたった母親の皮膚には深く刻まれたシワが出て、たるんで見える。これは皮膚の老化現象であります。こういう深く刻まれたシワというものは陽の当たらないところには決して出ないシワです。つまり、これは紫外線による産物であると考えられています。そういう状況証拠は沢山あります。例えば、同じ35歳のチベットのシェルパの女性と日本の普通の女性を比べますと、チベットのシェルパの女性は若い頃から紫外線をたっぷり浴びてきており、勿論、遺伝的な差異もあるでしょうけれども、日光露出部だけを見る限りでは皮膚の老化の兆しはかなり進んでいます。しかし、陽の当たらないところでは恐らく余り差がないのではないかと思います。大学を出る頃は多少老け顔もいますけれども大体年相応の顔をしています。しかし、それから40年後に、同窓会を開きますと、ある人はまだ40代に見える。また、あ

る人は70代に見えるというようになってくる。つまり、私たちは顔を見て相手の見かけの年齢を判断しているということがあります。なにも腕の内側とかお尻を見て判断するわけではありません。これはとりもなおさず、顔という日光露出部の過去数十年間の日光曝露の結果としての皮膚の老兆を見て、即座にああこの人は40代だ、この人は60代だと判断するわけですね。このようなことを私たちは普通の生理的な老化とは区別して光老化といっています。これは何故かといいますと、単に生理的な老化現象が促進されただけではなく、いろいろな証拠から質的に違う人為的な環境要因による老化現象であることがわかってきたためです。この光老化は紫外線に当たった時間と強さにほぼ比例しますし、顔のような日光露出部の皮膚の老兆の約80%は紫外線曝露によるものといえます。従って、老化に限らず、ガンもそうですが、光防御によって制御が可能な皮膚加齢現象であるという事が重要な点であり、研究のターゲットに成り得るわけであり。これに対して、高齢者の非露出部、お腹とか太股を見ますと、縮緬状の細かいシワがあります。これは生理的な老化現象といわれまして、表皮と真皮をつないでいるファイバーの老化によってズレが生じる結果であり、今の医学では乾燥をケアすることはできても治すことはできません。

2.2.2 光老化のメカニズム

深いシワの刻まれた組織をとってみますと、病理学的には日光変性といいますが、真皮の上層部に紫外線によって起こる変性物質、主に弾性線維の変性物質といわれていますが、こういったものが累々と貯まっている。これが光老化の典型的な組織像と考えられています。この要因として、私共は10数年前からフリーラジカル説を提唱していますが、いち早く一般向けの化粧品の宣伝にこれが取り上げられまして、「皮膚の老化の主な原因は紫外線で起こるフリーラジカルである。これがDNAにダメージを与え、真皮のさまざまな成分を傷つける」という謳い文句の下に、いくつかの抗酸化剤が化粧品の中に配合されるようになってまいりました。先ほど申しましたように紫外線を浴びる、そして皮脂がある、酸素がある。そうしますと活性酸素あるいは過酸化脂質が作られて、このダメージの蓄積によって表皮並びに真皮の光老化が起こるといって、そのメカニズムの一部が説明できるという状況証拠がいくつか蓄積されてまいりました。これを私共は光老化のフリーラジカル説といつて、コラーゲンやエラスチンのクロスリンクですとか、あるいは抗酸化酵素が不活化されるとか、最近ではAGEといわれるようなadvancedglycationend-productsが貯まるとか、いろいろなことがわかってきましたが、これらはすべて状況証拠でありまして、まだこのフリーラジカル説のみによって光老化のすべてが説明でき

るには至ってはいません。一方、皮膚には紫外線の酸化的なストレスに対して、幾重にもわたる防御機構があります。例えば、先ほど角層の話もしましたし、メラニンの話もしました。しかも DNA の修復をするというメカニズムもあります。いろいろなメカニズムによって、我々は自分で紫外線の酸素ストレスから皮膚を守っているわけですが、私たちが持っている防御機構を凌駕するような大量の紫外線を浴びた場合にいくつかのダメージが加わり、これが繰り返されることによって光老化というものが作られると考えられます。想定されるメカニズムとして、例えば中波長の紫外線は表皮レベルで活性酸素を出し、あるいは過酸化脂質を作ることがわかっています。又、長波長のものはもっと深くまで入り、酸化傷によって関与するであろうと考えられるいくつかの実験データが報告されています。

実際にシワというものが何故できるのかは、まだ詳しくはわかっていません。しかし、シワというのは表皮の変化ではなく真皮の変化です。真皮の構造は簡単に申し上げますと、建物に例えればコラーゲンという鉄骨が組まれていて、そこにエラスチンというゴムバンドが巻かれていて、そしてその間の壁土のようにムコ多糖が詰まっている。こういう構造をしています。従って、紫外線によってこの主な構成成分である線維成分とムコ多糖に影響があることで、このシワの形成の説明がつくべきであります。今申し上げた日光変性というものは主にエラスチンの変性と考えられていますし、このコラーゲンやエラスチンの変性物質が貯まることによって、深く刻まれたシワができるわけです。加齢に伴って、つまり、日光曝露の蓄積の量に応じて真皮の層に変性した elastotic materials といいますか、エラスチンの変性物質が貯まるということが昔から病理の組織所見からわかっていました。また、実際に動物実験をやってみますとこのエラスチンという線維は正常ではまっすぐ伸びているわけですが、ゴムバンドを長時間日向に置いておきますと、ある時プツリ切れてしまいます。それと同じようにもう伸びのない、変性してクルクルと巻き上がったようなエラスチンになってしまうことが報告されています。それ以外にも私共はムコ多糖の変性を報告していますし、コラーゲンの架橋のことも報告しています。それ以外にもコラーゲナーゼのようなプロテアーゼに対しても影響がある。いろいろなことがわかっていて、その総和として疾患ができるであろうというのが今の推測であります。これらに関して、化粧品技術者向けに「皮膚の老化と活性酸素・フリーラジカル」という本を数年前に出しております。

2.2.3 紫外線と肌タイプ

日本人ではあまり見られませんが、赤毛のアンのように色が白くて、毛が赤くてといった人達には若い時から沢山のシミが見られます。このように、メラニンの増え方は受

け皿の方、ホストの側の皮膚のタイプによっても随分違うわけです。日本人でも色白の人はすぐ赤くなりますが、黒くならない。それに対して地黒の人はあまり赤くならず、黒くなる一方の方がおられます。日本人でもこのようにスキントップと申しますか、皮膚の紫外線に対する反応性は違っています。それを米国の Fitzpatrick 博士が、外国人はケルト人のような赤毛の人から黒人まで肌質を 1～6 のタイプに分けました。日本人は大体この真ん中にありますので、日本の佐藤先生達が Japanese Skin Type (JST) として、色白ですぐ赤くなる人と、それから地黒で黒くなる一方の人、その中間というように 3 つのタイプに分けています。要するに色白のタイプの方がガンになり易いというわけです。実際にタイプ 1 というのは、すぐ赤くなるけれども黒くならない。こちらの方が紫外線に対する感受性が高く、弱いわけです。従って、自分の皮膚がどういうタイプであるかということを入れて、紫外線に対する防御を考える必要があると思います。弘前大学のデータによりますと日本人では、大体真ん中のタイプ 2 が一番多く、その次にタイプ 1 そしてタイプ 3 の順のようです。

2.2.4 光発ガン

そうしますとスキントップというものは、なにもシミができ易いというだけでなく、当然、皮膚ガンとも関係するわけです。皮膚が紫外線に対して感受性が高いか低いかということは、この紫外線による発ガンということを大きく左右します。オーストラリアのデータによりますと、黒くなるタイプの人、これを 1 としますとホクロのガンであるメラノーマ、基底細胞ガン、それから扁平上皮ガンなどの、いわゆる皮膚ガンの発生頻度がどの位変わるかといいますと、黒くならないタイプの人ですと皮膚ガンは 12 倍も増えています。我が国でも神戸大学のグループが、兵庫県加西市という所で調べたところ、やはりこれ程の差はありませんが数倍の差があることがわかりました。従って、スキントップと皮膚ガンは大きく関係することが日本人のデータからもわかってまいりました。勿論、ご存知のように一度 DNA のダメージが起こっても、私たちは絶えず DNA の修復をしていますからすぐにガンになるわけではありません。当然タイムラグがあって、ある日発ガンが起こるわけです。従って、戦後の太陽崇拜世代がアウトドアスポーツを始めて 40 年、50 年経った今、皮膚ガンが日本でも増えているわけです。その状況証拠は山ほどありますが、一番の証拠は動物実験です。紫外線一本で 100% 皮膚にガンを作ることができますし、それ以外にも日本人の皮膚ガンの 90% は日光露出部にできます。あるいはハワイの日系人は日本にいる日本人より 88 倍も皮膚ガンが多いとか、いろいろな疫学的なデータがあります。また、緯度が 10 度赤道に近づきますと、皮膚ガンは 2 倍になります。

このように紫外線と皮膚の発ガンということを示唆するような疫学データは枚挙にいとまがありません。例えば、以前私が居ました群馬大学のデータでは、日光角化症という紫外線によって起こる表皮内ガンがありますが、これも最近の5年間とその前の5年間を比べますと群馬県ではほぼ倍増していますし、全国の調査においても過去15年間に日光角化症は5.5倍に増えていますから、明らかにライフスタイルの変化によって、我が国の日本人の肌においても紫外線によるガンが増えていることは疑いの余地がないと思います。このようにシミ、シワといった整容的というか美容的な光老化というものだけではなくて、皮膚ガンを制御するというのも極めて重要です。これからは医療経済が段々厳しくなりますから、いたずらに日光浴をしてガンを作った人を皮膚科が治すだけではなくて、予防することの方が経済面からもメリットがあるといえます。そういった意味で、私たち皮膚科医の責務としてはコスメティックな面だけでなく、皮膚ガンを予防するために一般の人たちに対する啓発活動が求められると思います。

3 太陽紫外線防御と健康

我々が子供の頃、学校保健の場では夏休みが終わって色が白いと、何をしていたんだ、何故黒くならないといわれましたし、日焼け大会をやってみたり、そういう無駄なことを随分やったわけですが、この結果として、18歳までに生涯に浴びる紫外線の50%を既に被曝しています。しかも動物実験のデータを見ますと、若い頃に浴びた紫外線の方が皮膚ガンのリスクを倍増させます。また、例えばハワイに4泊6日で行って短い間に大量に紫外線を浴びた方がガンを作り易い。逆に少量を長く当てる場合にはガンリスクは減ります。大切なことは光防御によって光老化も光発ガンも、どちらも80%防止が可能であるという推計があるということです。こういう点から光防御というものは極めて重要なテーマになってまいります。19世紀までは色が白いことが美の象徴でしたが、戦後日本においては小麦色の肌の方が健康的でいいんだという審美観の変化があったために我が国においても皮膚ガンが増えていると考えられます。ではどうやって紫外線を防ぐかといいますと、太陽と皮膚との間になんらかのバリアーを作る、これが一番単純な防御法であります。一番のバリアーはオゾン層ですが、将来に亘ってオゾン層が破壊されることが予想されていますから、オゾン層を越えてきてしまった紫外線が皮膚に到達して光生物学的な反応を起こす前にブロックする。そのためにはまず安全な方法としては物理的に帽子を被るとか、長袖を着るとか、日傘をさすとかいったことでブロックできますし、それでもブロックできない顔とか手に関しては、これはまさに化粧品として作られているサンスクリーンによって紫外線を散乱したり、あるいは吸収すると

いったストラテジーがあるわけです。

これを更に越えてしまったものをどうするか。これは先ほど来、お話しているように、ここでは酸化反応、酸化ストレスが起こりますから、抗酸化的対応がやはり研究のターゲットになると思います。

3.1 物理的紫外線防御

まず物理的な防御、これが一番安上がりで最も効果的です。例えば、皮膚科領域では項部菱形皮膚といひまして、首の後ろにあるひし形のシワ、これはよく農業とか、漁業を長くやってこられた患者さんを見ますと殆どの方にこれがあります。これは典型的な光老化の皮膚の症状ですが、グサリと交又する線状のシワがあります。しかし、恐らくこのような方はシャツ一枚を着て、過去何十年間か作業をしてきたと思われそうですが、シャツの下の皮膚は隣り合った皮膚であるにも拘らず全く光老化の老兆がない。ということは物理的に紫外線をカットするだけで多くの光老化は防御できるということを如実に物語っているわけです。もともと、日本人の女性は肌が美しいといわれてきましたが、昔の農作業の格好を見ても、手甲、脚半というのか、長袖を着て紫外線防御という意味ではかなり理想的な格好をしているわけです。顔しか出さない、帽子を被る、日傘をさす、あるいは今日はお話してませんが、眼も白内障を中心として光酸素ストレスによって起こる光老化の病気が沢山ありますからサングラスも重要な光防御の手段になります。例えば、眼に入る紫外線に関していえば、野球帽を被りますとかなり紫外線がカットされます。最近の若い人は野球帽を後ろに被っていますから、あまりメリットはないかもしれませんが帽子一つでも眼や皮膚に入る紫外線がかなり減るんだということは重要なポイントだと思います。また、洋服もジーンズのようなものであれば100%紫外線をカットしますし、女性のストッキングのようにあんなに薄いものでも半分くらい紫外線をカットしますから、物理的防御というものは侮り難い効果があります。しかし、それでも無理な場所に関してはサンスクリーンによって紫外線を吸収させたり、あるいは反射、散乱させることが行われています。但し、紫外線吸収剤はどうしてもカブレを起こすことがありますので、最近のストラテジーとしては微粒子のチタンを使って見栄えを良くしながら吸収剤を除こうという、安全性を重視した日焼け止めクリームが主流に成りつつあると思います。また、紫外線はなにも太陽の方向からだけくるわけではありません。下からも反射してきます。ゴルフ場の芝生はいいんですが、砂浜とか、あるいは水とか、雪では反射します。スキー場にいきますと思いのほかの日焼けを経験すると思いますが、雪ですとほぼ80~100%反射しますから2倍の紫外線を受けます。従って、紫外線を浴びる状況に応じて、どのような

光防御を心がけるべきかということを入る必要があるわけです。

3.2 サンスクリーンと SPF

サンスクリーンはいろいろな会社から多彩な製剤が出ています。これは要するに皮膚に到達する前に未然に紫外線を吸収したり、反射して皮膚に到達させなければ、どんな光生物学的な反応あるいは光化学反応も起こりませんから、そういうコンセプトで作られたのがサンスクリーンです。丁度スクリーンを張るように紫外線をブロックするわけです。最近では SPF という数字がトピックスになっていますが、これは紫外線の防御能を表す指標として使われるもので、B 紫外線をカットする指標がこの SPF です。それから、最近、化粧品工業連合会では A 紫外線をカットする指標として PA (Protection grade of UV-A) というものが作られまして、サンスクリーン商品を見ますとこれらの表示が見られます。そして過去 5 年位の間に化粧品メーカーの間で SPF 競争という無駄な競争が行われてまいりました。例えば、沖縄で一日中日光浴をしても、SPF 17 があれば理論的にはカットできる位の紫外線しか浴びることはありません。ですから余程の光線過敏のある患者さんとか、或いはエベレストに登るとかいう場合を除けば、SPF は 20 もあれば普通の日常生活には充分対応できます。(但し、現実的には汗をかくとか、泳ぐとかでとれてしまいますから、もう少し高いものが必要な場合もあります。)にも拘らず、先ほど申し上げました SPF 競争で、一部のサンスクリーン商品には 100 を超えるものが出てまいりました。しかし、今年、京都で私共が「紫外線防御研究委員会のシンポジウム」を開きまして、化粧品工業連合会の方にもご参加を頂きました折りに、近々我が国では SPF 50 以上はもう表示をしない。従って、SPF 50 或いは 50+ という表示になるやに聞いていますので、やっこの無駄な SPF の競争が終って、今後はいかに安全に SPF を獲得するかという、つまり、SPF が 20 位でも良いから安全で、しかも安いサンスクリーンというものが求められてくると思います。この SPF というのは防御率を縦軸にとりますと、SPF が大体 20 位までいきますと、ほぼ 90 数% B 紫外線をカットします。これをたとえ SPF 100 にしてもその防御率の上昇はほんの数%なんですね。その僅かの遮断率を上げるためにいろいろな製剤を入れるわけです。それが、さまざまな化学反応を起こして副作用となり得るわけですから、このデータを見る限りは SPF 20 ~ 30 位で充分であろうということもわかりますし、先ほど申し上げましたように、私たちが浴びる紫外線の量からも SPF 20 あれば充分ですから、普通の日常生活で浴びるような生活紫外線であれば、私共は SPF 15 ~ 20 位を必要に応じて塗り替えるということを勧めています。但し、光線過敏の場合は

もっと高いものが必要となります。ですから健康な人と光線過敏のある患者さんとは区別して考えますが、いたずらな SPF 競争はもう終わりを告げて、今後は安全に、しかもいかに合理的に紫外線をカットするか、ということに議論が移るつつあることは、極めて好ましい現象であろうと思っています。ここまで、光老化に対するストラテジーの中で紫外線の物理的、あるいはサンスクリーンを使ったような物理化学的な防御のお話をしましたが、これは既に実用化しています。

3.3 抗酸化剤による傷害回避

もう一つのストラテジーは何度も申し上げているように、酸素ストレスで起こっているという状況証拠があるわけですから、この錆を止める、身体の錆びるのを止める方法が挙げられます。最近では活性酸素という言葉は、溜まるものではないのですが、ストレスと同じような意味で使われます。しかし、私たち現代人の生活を見ますと紫外線に限らずタバコですとか、例えばタバコを一服吸いますと 10 の 16 乗のフリーラジカルが肺で作られているといいますが、その他にも薬剤とか、あるいは過度の有酸素運動とかいろいろなことによって身体の内外で不断に活性酸素が作られて、その酸素ストレスを私たちは受けているわけです。これに対して何をすればいいか、といえ一番理想的な方法は酸素との接触を断つことです。例えば、クッキーを買いますと、エイジレスという名前の脱酸素剤が入っています。つまり酸素と接しなければ、あらゆるものは老化しないわけです。私たちが使うデイスポーザブルの注射器でも、窒素を充填した袋に入れて酸素と接触を断てば、日向に置いておいてもボロボロにならない。しかし、袋を破いて日向に長時間置いておけば、それはボロボロになってしまいます。このように、酸素との接触を断つのが理想的な抗老化、光老化に対するストラテジーです。しかし、残念ながら我々は酸素をエネルギー代謝に利用して生きている好気性の生物でありますから、酸素との接触を断って生き永らえることは不可能です。従って、この方法は採れません。そうしますと、次の方法はなにかといいますと酸素のストレスと呼ばれる酸素の毒性から身を守る方策として昔からいられてますのはビタミン剤です。ある OTC のビタミン剤の宣伝の中に「シミは過酸化脂質のせいである。ビタミン E が過酸化脂質の発生を防ぎます。活性酸素が脂質過酸化を起こす。ビタミン E はこれを防ぐ抗酸化剤です。」と一般向けのパンフレットにこういう難しいキーワードがちりばめられているようになりました。実際ビタミン E は脂溶性のもので細胞膜に溶け込んで、活性酸素の攻撃を受ける時に自らが身代わりとなって細胞膜の油が酸化されるのを防ぐ。そして、その時にビタミン C があるとこれももう少し何遍も繰り返されるといことが昔からいられて

ますように、確かに抗酸化剤として使われているものがあります。しかし、なにも薬だけではなく、一つは食生活で緑黄色野菜とか、 β -カロチンは最近議論がありますけれども、ビタミンを摂ること、それから、光老化に関してはサンスクリーンなどでブロックする。それから物理的な防御、さらにはライフスタイルの工夫です。甲羅干しなどで不要な紫外線を浴びないことが重要となります。こういうことを私たち、皮膚科医としては是非一般の人々に知って欲しいと思っています。

3.4 紫外線組織傷害修復

もう一つの方法、これは壊れてしまった皮膚の組織を元に戻そうという方法があります。欧米ではレチノイドというものがあります。この外用剤は元々ニキビの薬でしたが、光老化によるシワを元に戻すことがわかって、今かなり使われています。残念ながら我が国では刺激が強いために、このレチン A というものは許可されていません。しかし、化粧品の中にはレチノールというものを配合した化粧品が市販されていますし、近々皮膚科領域では、もう少し安全なレチノイドが医薬品として開発されようとしていますから、近い将来我が国でもこういったレチノイドが紫外線組織傷害修復に使われる時代が来ると思われれます。又、私共の教室では動物実験の段階で未だ実用化には至っていませんが、リポソームの中に回復酵素を入れてダメージを修復しようという試みも行っていますから、こういうドラッグデリバリーによって組織傷害が修復できる時代が来るかもしれません。

3.5 外科的手法による傷害修復

それ以外の方法としては、我が国でも美容外科の領域では、壊れたコラーゲンの代わりに牛のアテロコラーゲンを注射してシワを取ろうという方法があります。但し、この方法は場合によってはアレルギーを起こすことがあります。それから皮膚科では最近、コスメトロジーの領域にどんどん進出してまして、例えばレーザーの治療があります。赤アザでも青アザでも、美容的なシミに対してはなかなか効かない面がありますが、いずれハード面が進歩すれば効くものがでると思います。このようなレーザーとか或いはケミカルピールといったようなコスメトロジーに密着したようなジャンルに対して、私たちはそのスペシャリティーを今展開しようとしていますから、将来的にはコスメトロジーと皮膚科医というものは臨床皮膚科という領域でかなりリンクし、今以上に密接な関係になると思います。

4 太陽紫外線を知る

4.1 紫外線の強さと付き合い方

もう一つ大切なポイントとしてライフスタイルがありま

す。今オゾン層がだんだん破壊されているようですが、オゾンが1%減りますと、紫外線が2%増えて、皮膚ガンが数%増えるという3段論法の推計があります。ですから太陽をよく知って、そして自分の皮膚のレベルでのライフスタイルを検証するという作業、これも当然求められるわけです。紫外線がどのように変化しているのかということをお話したいと思います。例えば、日本気象協会の調べたものを拝借しましたが、我が国、北半球では当然6月が紫外線が一番多いはずですが、しかし、日本では梅雨がありますので6月よりもむしろ春先、4月とか5月の方が実質的に浴びる紫外線量は多くなります。つまり、日本ですと冬の間あまりどこへも出なかった人が丁度ゴールデンウィークになって行楽シーズンになり、一気に紫外線を浴びるようになるわけです。この時期にいろいろな紫外線をめぐる皮膚のトラブルが増えてまいりますし、光線過敏が発生する時期でもあります。紫外線予防というのは夏の間だけと考えがちですが、勿論、夏も大切ですが春先から紫外線に対する防御というものを考える必要があるわけです。一日の中で見ますと、朝10時から午後2時の4時間で大半の紫外線、50%以上の紫外線を浴びていることがわかっています。ですから、テニスをするにしても2時からにする。買い物は10時まで済ませるといった一寸した気配りでも皮膚に当たる紫外線量は大きく変わるわけです。今日のような小雨の日でも、晴れの日を100%とした場合、大体30%くらい、それから曇りの日でも半分の紫外線が来ています。やはり晴れているとどうしても暖かいし、明るいからチリチリと紫外線を浴びているという病識を持ちますが、雨であると、今日は大丈夫と思ってしまいます。しかし、それは錯覚であって、どんな日であっても紫外線は眼にも見えませんし、暖かくもありませんので忘れがちですが、紫外線を浴びていることを意識すべきです。例えば、主婦の場合ですと、特に泳いだり、スポーツするのでなければ、朝一回、ファンデーションに入ったようなサンスクリーンを一度塗るだけで一日有効になると思いますから、そういうライフスタイルも考えるべきではないかと思えます。日本は意外と赤道に近い所にあることも忘れてはいけません。ロンドンとかパリに比べますと東京は遥かに緯度が低くアルジェリアとかアフガニスタンとほぼ同緯度にあります。勿論、インドネシアとかタイ比べれば北にありますけれども、やはり他の先進国に比べると私たちはかなり南側に住んでいることを銘記する必要があります。

4.2 紫外線知識の啓発

これは東京のデータで一寸古いものですが、日本人の意識調査をしますと、「日光は健康に良いからできるだけ肌を焼いた方が良い」と思う人は、男性では大体外国並みですが、女性では半分くらいの方がそうだと思っています。

これは一寸特異なフランス人を除けば、他の外国に比べてかなり高いデータで、私たち日本人の紫外線傷害に対する認識はやはり遅れていると言わざるを得ないと思います。こういったものを啓発することによって、コスメティックな問題、或いは将来的には皮膚のガンというものを減少させることが可能ではないかと思っています。私はこのような啓発活動を10数年前からやってきました。例えば、京大の講師の頃ですから12・3年前になりますが、ウォークマンブックスから「素敵な女性は肌を焼かない」という本を出したのですが、見事に売れませんでした。当時はやはり小麦色の肌が一番もてはやされた時代であったため、敢えなく絶版になったというわけです。それが悔しかったものですから群馬に移ってから、今度は素敵な女性などといって女性にこびるのはやめて、「知的なスキンケア Q & A」という本を出しました。これは紫外線に限らずドライスキンとかアトピーの問題なども書きまして、これはそこそこ売れました。ところが、最近、台湾でこの翻訳本が出たとのことで、今年改訂版を出すことになりました。私共はこうして少しでも、一般の方々に紫外線も含めたスキンケアにもっと関心を持って欲しいと考えているわけです。

最後に一般の人々に私がどういうことを言いたいかと申しますと、一つは紫外線はやはり皮膚に有害な面が多いのですから殊更、紫外線を浴びない、くる病を恐れて日光浴をすとか、あるいは小麦色の肌が欲しいから肌を焼くとかといった無用なことをしない。それから大量の紫外線を浴びることが予想される場合、山に行くとか、スキーに行くとか、泳ぎに行くとか、そういった場合には今日申し上げたように必要な防御手段を講じて欲しいということです。日本人の場合であれば、この2つだけを守れば、それ程神経質になる必要はないと思っていますし、実現可能な光防御の方法ではないかと思っています。我が国でもそうですが、米国でも日焼けサロンというのが随分増えてまいりました。アメリカのいくつかの州では法的な規制が始まっ

ていますけれども、これは何が問題かといいますと皮膚を黒くするためには、今の方法では一旦皮膚を赤くしないと黒くはできないわけです。勿論、ほとんどの日焼けサロンは紫外線 A を使っていますが、5%ほどの紫外線 B が入っています。紅斑の作用波長と光発ガンの作用波長はほとんど一緒です。もしも、これが解離できれば安全な日焼けというものが可能になると思いますが、今のレベルでは全く紅斑を作る波長と発ガンの波長は一緒ですから、安全な日焼けというものは今のところないといわざるを得ません。アメリカのガン協会のポスターでは日焼けサロンの暗い側面ということで、「皮膚にガンを作る、あるいは白内障を作る、シミ、シワといった老化を進める。それから一部の患者さんでは光アレルギー反応を起こしますよ」という啓発活動をしています。ですから私共も日焼けサロンというものに対してはその功罪を充分に周知する必要があると思います。また、アメリカの皮膚ガン協会では、子供のころから日光に対する認識を高めて、必要な防御をする。そういったことを啓発するポスターを作っています。更に、アメリカの皮膚科学会のポスターでは、「日光浴、これはもう犯罪である」という程に過激なポスターを作っています。紫外線にはいくつかの功罪があり、その罪の方が多いわけです。従って、皮膚科医としては太陽の恵みをすべての人が享受できて、すべての人が太陽の下で楽しく生活ができることを目的として、「光線過敏の人であっても、健康な人と同じように太陽の下で生活ができること」と、逆に、「健康な人がその知識がないがゆえに紫外線の害に泣くことのないようにすること」の両方を啓発する必要があるわけです。今後益々この紫外線の研究を続ける中で、私たちは紫外線による皮膚のダメージというものを一般の人に知っていただいて、一人でもガンとか光老化によって、精神的にも容貌的にもダメージを受けることがないようにしたいと考えています。

コスメトロジー研究雑感

コスメトロジーとコロイド化学

江角 邦男

基財団の助成金による研究報告書をまとめている間に二つの事柄がふと脳裏に思い浮かびました。

ひとつはコスメトロジーの基礎となりますコロイド化学との出会いです。今から28年前、目黒謙次郎先生にコロイド化学ならびに応用コロイドに関するわかりやすくかつ興味ある講義を受けたことです。目黒謙次郎先生の研究に対する情熱に感銘し、またいろいろな界面での現象や界面活性剤の役割など我々の生活に密着する対象が多いことから、現在までの20年間の研究を界面ならびにコロイド化学に集中させてきました。最近は特に多鎖型界面活性剤の水溶液物性、微粒子表面への高分子、界面活性剤の動的吸着挙動、樹状型高分子であるデンドリマーをテンプレートとして貴金属超微粒子の調製などの研究に取り組んでいます。

もうひとつは今回の研究と関わりある“吸着可溶化”に纏わることです。我々が吸着可溶化の研究を始めたのは今から15年前です。このときは二酸化チタンや酸化鉄の微

粒子表面処理を目的に水中でこれらの粒子に陰イオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を添加、吸着させ、さらに難水溶性のスチレンモノマーを加える実験でありました。この結果、SDSの吸着層中にスチレンモノマーが取り込まれ、それらを重合することで微粒子表面にポリスチレンの膜が形成されることが明らかになりました。ほぼ同じ時期にアメリカのオクラホマ大学のHarwellらにより全く同じ発想でアルミナ粒子へのポリスチレン膜の形成に関する研究が行われていました。このような事柄はよくあることですがいざ自分たちに起こると研究成果の確かな発表がいかに重要かがわかります。この吸着可溶化に関する研究はアルコール、染料、医薬剤などに拡張し、また界面活性剤の構造と吸着可溶化の効率との関係について研究をさらに進めています。

最後に本研究に当たり、多大なご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。

(東京理科大学理学部)

不精者とコスメトロジー

半田 哲郎

若い頃から頭髪が少しうすいことに気づいていたが、それでもよいという女性と出会うことができ、無事に結婚した。以来20数年間、散髪は彼女がやってくれていた。15分間程度で終わるいかにも素人の簡単なかり方であったが、あまり気にしなかった。私は決して質実剛健であるとかバンカラであったわけでない。もともと不精な田舎者なので、特に噂の高い養毛剤やかつらなどにも関心をもたなかった。ただ、ここ数年来、夏や冬の盛りには直射日光や冷気が気になり帽子をかぶって自転車通勤をしている。

30代半ばの海外出張中に、それでもささやかなおしゃれ心から口ひげ (mustache) をはやしたことがあったが、その手入れは結構大変だった。忙しい日本に帰国する前にそり落としてしまった。もっと几帳面であれば口ひげは残っていたかもしれない。製薬会社などに務める元学生から養毛剤の新製品を試してくれと言われることがよくあるが、

今のところどれも私にはあまり効果がない。整髪液として使わせていただいている。

そのように、結構、無頓着にやってきたが、近頃はそうも言っておれなくなってきた。日頃接している大学院生や教室員との年齢差が広がり、写真を見ると私の歳が露にわかるようになってきた。それはそれで良いが、若い人たちの中に入り彼らとサシでやりあうには、お互いに違和感のない気持ちの良い雰囲気が必要である。人のなかに積極的に入り自分の考えを伝えたり他人の意見を受け入れるにはそれなりの雰囲気作り、互いのムード作りが必要と気づいてきた。それで、数年前から顔のスキンケア液体を使ったり、散髪も理髪店に行くようになった。それまで散髪をしてくれていた女性も面倒がなくなったと思っているようである。

私たちの意味も幸福も、結局は、人と人の結びつきにあ

るとするならば、コスメトロジーとは科学的のみならず哲学的な意味内容をもつことが無精者にもようやく気が付い

てきたこの頃である。

(京都大学大学院薬学研究科)

平成 10 年度 研究助成

日本人の美肌学 柴山 充弘

今から 20 年ほど前、まだ学生のころ、恩師の京大教授の家で、ポーランドの科学アカデミー所長とマサチューセッツ大学教授とともに談笑したときのことを思い出します。それは今日、若い女性の間に関心が高い美肌に関するものでした。所長曰く、「世界各国を回ったが日本の子供が一番かわいらしく肌もきめ細かい」。私はテレビなどで見る西洋の子供の方が、人形のようなかにかわいいというのが万人の認めるところであり、多くの日本人もそう信じているものと確信していましたので、断固その説に反対しました。これが発端となって、どこの国の人々が年齢より若く見えるかどうかについて日、欧、アメリカ代表(?)の間で議論を戦わせることになりました。結論は、やっぱり「日本人が一番若く見える」でした。これは、欧代表の日本人美肌説と相通じるものであるため、次にその理由付けをする事になりました。もちろん、「見た目の若さ」は肌のつやだけでなく、頭髪や人相などの諸因子を含めて総合的、しかし多分に主観的に判断するものでありますので、肌のきめ細かさや皺の多さに限定して議論しました。最初、肌のきめ細かさは人種に因るものだという意見が出ました。しかし、欧代表は「東洋人でも中国人の方が皺の多い人が多く、老けてみえる。」と主張し、人種説は否定されました。その後、食べ物説、紫外線説などがでてきましたが結論は出ませんでした。そこで、私は「秋田美人」の例を持ち出して、紫外線説のみならず「湿度」が重要なファクターであると湿度説を展開しました。雪国では紫外線被曝量が少

ないだけでなく、湿度も高いからです。現在のコスメトロジーでいかなる審判が下っているかは知りませんが、結局、こうしたファクターの複合効果であると言うことで素人による美肌に関するコスメトロジー会議は終わりました。

あれから 20 年の間に、私はアメリカをはじめ、フランスやドイツはもとより、カナダ、メキシコ、ロシア、イスラエル、チェコ、香港、韓国、インドネシアなどを訪問しましたが、「日本人が一般的に若く見える」という真理(?)を確信しつつあります。この研究報告の読者の中にも外国人から 10 歳も 20 歳も若く見られたことを経験した方が多くおられることと思います。その意味で、日本は美肌先進国なのかもしれません。気候風土の恩恵にとどまることなく、現代美肌学はシミを隠し、皺を伸ばし、肌の色を変えなどして、30 から 40 歳も若く見せることを可能にしました。

この例は随分矮小化したコスメトロジーではありますが、どんどん進む高齢化社会においてコスメトロジーが果たす役割はますます大きくなると確信しています。私は、美肌学とはほど遠い高分子物性という視点から乳性蛋白質であるラクトグロブリンの凝集機構について基財団からご支援をいただいた者ですが、合成高分子に比べてはるかに複雑な蛋白質の凝集・ゲル化機構にますます魅せられ、私なりのコスメトロジーを展開していきたいと考えています。

(京都工芸繊維大学繊維学部)

平成 10 年度 研究助成

私のコスメトロジー観と本研究について 藤本 治宏

先日、テレビで偶然視た取材番組の中に化粧品のリーツを見た。それは、南米はブラジルのアマゾン河流域奥地に

住み今日なお石器時代の生活を営む或る原住民部族を取材したものであったが、彼等も、人目を意識するときや特別

な行事のときには、男も女も念入りな化粧をしていた。例えば、お祭りの日に部落の広場で踊るとき、友好関係を築くために他の部族を訪問するときなどには、草木や岩石からつくった着色液体（彼等の化粧品）を顔、腕、脚などに丁寧に塗り、髪、鼻、腕、腰などには色々な飾りを付けて全身を飾り立てていた。その様子から、人は太古から、他の人から好ましく思われたい、或は、何か大事な行事（仕事）をうまく行いたいと、化粧をし、身なりを整えてきたものと思われた。石器時代人が既に持っていたこれら二つの欲求は、後世の人達に脈々と受け継がれ、しかも、文明が進み社会機構が複雑になるにつれてより強まった形で受け継がれて、現代人まで至ったものであろう。今日では、これらの欲求が男よりもより強いと思われる女の人を主たる

対象として、これらの欲求を満たすために、実に様々な用途の化粧品や装身具が存在している。さて、太古には草木、岩石から直接得られていた化粧品の内容も、時代の進展に伴って大いに改良され進歩して、今日では、肌に塗ったりつけたりした場合に、視覚的、嗅覚的な魅力を増進させる効果だけに注目するのではなく、肌の衛生、安全性、栄養、老化防止なども考慮に入れた製品化が計られるようになった。しかしながら、時には、化粧品中の成分によって皮膚かぶれなどのアレルギー症状が起こる事例も見られる。その様な禍を防止するために、発症原因となる成分に対し免疫寛容を誘導することが考えられ、その誘導のために役立つ新免疫抑制成分を天然から探索する本研究の意義がある。（千葉大学薬学部）

平成 10 年度 研究助成

私にとってのコスメトロジー研究助成

石川 雄一

私、貴研究財団の助成金を「遺伝子の増殖を制御する人工の脂質膜の開発」の題目で頂きました。大分大学を親大学として「流動定員」として九州大学の有機化学基礎研究センターに2年間お世話になり、2000年の春に大分へ戻ります。大分大学と九州大学との往復で不安定な時期での研究助成金であり、有意義に研究に使用させて頂きました。ありがとうございました。私、この目的に関連した研究として、一重項酸素を発生させて皮膚にダメージを与える事として知られているポルフィリン色素の合成化学的な展開も同時に進めております。新しい光増感剤としてのポルフィリンの評価のために「一重項酸素」の発生率を決定したく考えておりましたら、本助成金のついででコーサー研究

所の「一重項酸素検出装置の開発」を知る事ができました。まさに偶然ですが、貴財団の母体研究所でこのような装置を開発されているとは全く知らず、驚き、早速測定をお願いしました。荒金久美博士から、測定のご快諾頂き、お忙しいところいくつかの試料の一重項酸素の発生率の測定をお願いできました。この場をお借りして御礼申し上げます。

研究の結果は、直接、皮膚に還元できるものでは無かったかもしれませんが、しかし、自己複製と脂質の観点から新しい結果を出せたものと考えております。今後、貴財団の研究助成が、多様な生命科学の発想に対して広く支援されていかれる事を望んでおります。

（九州大学有機化学基礎研究センター）

平成 10 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

大橋 直樹

幸いにも、財団より研究助成を頂戴するに至り、半導体と化粧の関係、というあまり普段気にすることのない両者の関係を考察する機会をえた。

半導体の基本はバンドギャップである。酸化亜鉛は可視

光と紫外線の境目の領域に急峻な光吸収端を有し、その粉末は純度が高いほど真っ白になる。しかし、真っ白だけでは芸がないので色を着けようというのが発想である。方法は、①バンドギャップを狭くする、②光吸収準位を作る、③

発光準位を作る、の3つである。

①は難しい。格子定数を大きくすればバンドギャップが狭まり、吸収端が可視光側に移動する。すなわち、格子を伸ばせば黄色の酸化亜鉛になる。しかし、格子を大きくする適当な添加物が見あたらない。酸化亜鉛はウルツ鉱型の構造を持つが、酸化物でこの構造を持つものが少なく、混晶を形成しにくい。

②は可能である。たとえば、酸素欠陥を導入してやると薄黄色の色を持たせることが可能である。もちろん、マンガ、鉄などを固溶させればかなりの色のバリエーションが望める。最も簡単な方法である。

③が今回の研究の中心である。サンスクリーンとは、紫外線の遮断である。極めて純度の高い酸化亜鉛では、吸収した紫外線の一部は、若干波長の伸びた紫外線となり再び酸化亜鉛から発せられ、残りは熱に変わる。これを紫外線や熱ではなく、適当な可視光に変換してやることで、着色

できる。光る顔、というと不気味だが、完全に紫外線を遮断したい場合、吸収した紫外線の全てを熱に変えてしまうか、あるいは、熱と可視光に変換して放出させるしかない。本研究の提案は、紫外線を吸収し、青、黄色や赤の可視光を発する酸化亜鉛である。ストロボの光が当たったとき、最も生氣のある色を与えるような発光が実現できたら、それは、すばらしいに違いない。

しかし、あまりにも効率よく紫外線を可視光に変換できた場合、少々困った問題も生じてしまう。南国のビーチで楽しんだ晩、リゾートのディスコに行くとしたら、化粧直しをしなければならない。なぜならば、可視光発光タイプの酸化亜鉛サンスクリーンを使っているあなたの顔だけが、ディスコのブラックライトで、たとえば、黄色く発光してしまうからである。しかし、それも一興かもしれない。化粧は個性を強調するための手段でもあるわけだから。

(東京工業大学理工学研究所)

平成9年度 研究助成

香りの感じ方についての文化的違い

菊地 和也

6年前に米国に留学が決まった時、洋行経験のある友人に「異国文化に触れたときは、今までの価値観で良いとか悪いとかすぐに判断しないで、とりあえず受け入れてから時間をかけて好き嫌いを決めればよい。」とアドバイスしてもらいました。これはなかなかあたるアドバイスであり、この言葉の重さを、良い悪いにかかわらず経験を積むごとに感じました。

ひとつのきっかけで、それまでの価値観がゆらいだ経験のある人は多いと思います。私は以前、自分についても他人についてもコロンをつけることは好きではありませんでしたが、ここに書くきっかけをもとに、現在では好きになりました。勿論、適量はあります。留学中にグランドキャニオンを下りた時です、上って戻るのは大変疲れるため休憩を高頻度で取るのですが、休憩所で一人で歩いているアメリカ人女性と話す機会がありました。その女性はTシャツとジーンズに大きなリュックサックという格好なのですが、きれいに化粧をし、ほど良くコロンの匂いがしまし

た。汗はきれいに拭いているのでしょ、疲れては見えるのですが余裕があるというか、ある意味すぎがなく見えて感心しました。私にとってコロンによって人に好感を持つ初めての体験でした。

考えてみると、香水の匂いは以前からすごく好きだったのです。体に直接つけるということに抵抗があったのです。そういえば、日本古来の文化としてお香を焚く香道があります。日本人は環境にある自然の香りは好きでも、体につけることは多用しなかったのではないかと考えました。コロンが好きになって日本に戻ってみると、適量つけている人は少ないと思いました。つけている人は極端に強く臭うと思ひ、また体臭が気になることもあり、コロンや人から発せられるにおいて良い経験をしたことはありません。勿論、何もにおわないのは気になりません。日本には香水をつける文化は、それほど強くは根付いていないということでしょうか。これ以降、文化的な良い悪いはぬきにして香りを楽しみ、香りが生活にもたらす豊かさについて考えるようになりました。(東京大学大学院薬学系研究科)

皮膚とコスメトロジー

田中 勝

皮膚科ではたいいていの場合、明らかに病的な皮膚を見えますが、コスメトロジーの対象は健全な皮膚のごくわずかな変化だと思えます。皮膚の微妙な変化を読みとるのはたいへん難しいことだと思えますが、化粧をされる方というのは、そのわずかな変化だけでも大きな違いだと感じるのではないのでしょうか？したがって、その要求を満たすためにはちょっとした違いでも見逃さずにとらえて、その差を認識しなければならないと思えます。一方、皮膚科においても、異常であることは一目瞭然であるが鑑別診断に苦慮する、ということがよくあります。そのような場合に大切なことは、皮膚病変の細かい特徴をよく観察することにより、疾患ごとの違いをひとつずつ正確に認識していくことでしょう。正常な皮膚の加齢に伴う変化も、ごくわずかずつ進んでいくものですが、それを毎日見ている本人よりも他人の目に明らかな場合と、逆に本人にしかわからない

ような微妙な変化もあるかもしれません。

今回の私のテーマは皮膚病変の定量ですが、人間の目では明らかにその差を認識できているのにコンピュータがそれを同じと判断してしまうところに画像定量の難しさがありました。しかしながら、人間がそのわずかな違いを判断するときの情報を解析していくことにより、将来的にはより一層正確な画像処理、画像解析が可能になるのではないかと思われました。そこには、色の違い、凹凸、影などが大きく影響していますが、さらに、その柔らかさや光の透過性、吸収性、温度、真皮内の沈着物質など、さまざまな情報が微妙に影響を与えているに違いありません。今後、さらに細かい点に注意しながら日常の診療に、また、皮膚病変の画像解析の仕事に役立てたいと思えます。

(慶應義塾大学医学部)

コスメトロジーの観点から見た本研究の展開

鈴木 高広

紫外線吸収効果をもつ酸化チタンの光触媒作用を生体適合性の観点から評価することを目的に本研究を進めた。二酸化チタンの光触媒作用は、近年、環境浄化や抗菌技術の面から注目されている。例えば、ビルの壁面や道路の側壁、舗道の表面などを二酸化チタンでコーティングすることにより、車の排気ガスによる大気汚染物質を分解したり、あるいは抗菌力をさまざまな医療・衛生機器に応用することが期待されている。二酸化チタンの光触媒作用による抗菌効果は、活性酸素の生成に依存した反応であることが知られており、その酸化力はオゾンよりも強く、たいいていの有機化合物を水と二酸化炭素にまで分解することができる。このような、強力な酸化力や抗菌力をもつ二酸化チタンが、UVカット剤として化粧品にも利用されていることは意外と知られていない。日焼け防止剤の中にも含まれる二酸化チタンを、環境浄化や衛生機器の開発に利用することが可能になったのは、コーティング技術などが進歩したためでもある。このような光触媒剤の抗菌効果試験方法は、十分に

確立されているわけではなく、現在、評価方法の規格化が進められている。したがって、UVカット剤として用いられる二酸化チタンの酸化力が、生体に対してどのような影響を与えているかは未解明な点が多い。過剰な酸化力が生体組織の炎症を起因することも危惧される。しかしながら本研究では、生体に対する影響は二酸化チタンの酸化力による毒性よりも、紫外線吸収効果により紫外線から皮膚を保護する効果の方が大きいと考えられる結果を得た。皮膚組織に対する二酸化チタンの酸化力の影響は、今後さらに評価検討を要するが、適度な酸化力は生体組織を活性化することも考えられる。皮膚に接する成分が、光照射下で直接的あるいは間接的に生体組織の活性化を促すような化粧品の開発も可能になるであろう。

研究室に隠りっぱなしの生活をしていると、太陽光の紫外線にさらされる機会も少なく、自身は日焼け防止剤のお世話になったこともない。光触媒の研究者としては、やや反省すべき点でもある。(東京理科大学基礎工学部)

真の老化防御化粧品はテロメア DNA の短縮化を抑制する

三羽 信比古

ヒトの一生で出る垢（皮膚細胞の死骸）は日本人の平均寿命と体格を基礎にすると平均409kgに達すると試算される。これだけの大量の死細胞の穴埋めとして細胞補給するためには、どれだけ迅速に細胞分裂するか（分裂速度）、分裂する残余回数がどれだけあるか（分裂寿命）が重要である。

紫外線や過酸化脂質などで皮膚細胞が定常以上に大規模に死んだ場合、それを迅速な細胞分裂で穴埋めできなければ、皮膚にはシワ・タルミ・シミ・ソバカスなどが生じる。個体レベルでより重要なことは、ヘイフリック限界になる前段階でDNA合成の低下や細胞分裂の遅延といった細胞老化が分裂停止の「予兆」として起こるという事実である。これは、死細胞を穴埋めするための細胞供給が遅滞することを意味する。皮膚細胞において、お肌の曲がり角といわ

れる25才以降、様々な皮膚老化の症状が現われる主因として、細胞供給速度の遅滞を考慮すべきである。

ヒト皮膚の角化細胞において、今までの研究では、細胞増殖速度の低減はカレンダー年齢に伴う必然的なものと受け取られていたが、今回の我々の研究では、テロメアDNAの短縮化が進行するに伴って細胞増殖速度が低減し、テロメア短縮化を遅延すれば細胞増殖速度の低減を抑制できることが分かった。

今後テロメア計測なくしては真の老化防御化粧品は語れないのではないかと考える次第である。

（広島県立大学生物資源学部）

klotho 遺伝子とコスメトロジー

永井 良三

コスメトロジーすなわち化粧品学の目的は多岐にわたる。素肌を傷害から守るスキンケアは日常生活に不可欠であり、特に最近著しく増加したアトピー性皮膚炎の治療の基本である。より魅力的に自分を表現するメーキャップは、女性ばかりでなく男性にも浸透しつつあり、若者の重大な関心事となっている。しかしながら、皮膚をとわに若く美しく保つことがコスメトロジーの最も重要な課題の一つであることは明白である。そのためには、皮膚の老化機構の解明が不可欠である。

我々は黒尾・鍋島らと共同で個体老化に密接に関わるklothoという新規遺伝子を発見した。このklotho遺伝子が発現していない（ホモ欠損）マウスでは、寿命の短縮、動脈硬化、異所性石灰化、骨粗鬆症、肺気腫などのヒト老化に見られる多彩な変化が早期に出現する。興味深いことにklotho遺伝子ホモ欠損マウスでは皮膚真皮層の菲薄化

や皮下脂肪層の消失、脱毛が同時に観察される。

臓器別の発現状況を調べると、klotho遺伝子は主に腎と脳で発現し、骨、肺、皮膚などの変化の強い臓器では発現していないことがわかった。このことから、klotho遺伝子産物の外因性投与による治療の可能性が示唆される。換言すれば、klotho遺伝子産物を皮膚に塗布することで皮膚老化を抑制できるかもしれない。また、一方では、klotho遺伝子ホモ欠損マウスでは皮膚の老化が骨粗鬆症、動脈硬化などと同時に進行していることから、皮膚の老化抑制には全身的な対応が必要であることが示唆される。実際、糖尿病や肝硬変や腎不全患者の皮膚は張りがなく、がさついている。

いずれにしてもklotho遺伝子の研究がコスメトロジーの進歩に大きく貢献することが期待される。

（東京大学医学部）

本研究成果のコスメトロジーに及ぼす影響と今後の展開

加藤 昌志

研究完了報告書にも記載したように、本研究では、試験管内において紫外線がプロトオンコジーンのみでなく、遺伝子の変異によりすでに活性化されているオンコジーンのスーパリアクティベーションに関与していることを示した。さらに、紫外線が、Ret 分子の SS 結合を介した二量体形成を促進することにより、その活性を増強することを示すと同時に、紫外線の標的となるシステインを特定した。しかし、コスメトロジー上、最も重要であるのは、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD1) が、紫外線による Ret 分子の SS 結合を介した二量体形成の促進を阻害することにより、紫外線的作用を緩和することができることを示したことである。

生物は、その進化の過程で、ミトコンドリアにおいて、酸素を利用することにより、以前と比較にならないほどエネルギーを効率よく得る機構を発達させた。しかし、同時

に生物は、自身の作り出す酸化ストレスにより、様々な障害を受けることになった。現在では、老化にかかわる遺伝子が、ミトコンドリアでの細胞内呼吸に関与していることが、わかりつつある。SOD1 などの、抗酸化剤は、老化を防ぐ物質として、近年注目されているが、その作用機序は、完全には解明されていない。特に、生体に対する薬剤および化粧品としての応用は、これからの段階である。リポゾームなどを用いることにより、皮膚に対する遺伝子治療法は、確立されつつあるので、化粧品に SOD1 の遺伝子治療を導入することにより、皮膚の老化や紫外線の発癌作用を安全にしかも、有効に抑制できる時代が、到来するかもしれない。化粧品会社との共同研究というかたちで、我々の研究をさらに発展させることが、もし可能であれば、我々にとっても至上の喜びである。(名古屋大学医学部)

女性と化粧

根岸 友恵

女性にとって化粧は縁の切れないものであろう。私自身化粧品というものに最初に触れたのは、母の鏡台のいたずらであったらしい。証拠写真が残されている。鏡台をいたずらするのは誰が教えるでもなく女兒特有のことかもしれないと思ったのは、自分の子供を見てからである。男児は全く関心を示さなかったが、女兒の一人はいつの間にかいじって、口紅で赤鬼の如き化粧をしていたのである。最近では年頃になると男性もエステだとかで、化粧に気を使う人も出てきて話題になっているが、実は男性の化粧は、毛髪に対するものなどを含めて昔からたくさんの商品があったのではないと思う。私自身の経験でも、物心付いてからは、母が化粧気のない人であったこともあって、むしろ父のポマードのほうが視覚的にも嗅覚的にも印象深い。

ともかく化粧に気を配り美しく見せたいというのはヒトの本能と思われる。しかしながら最近の化粧は、生物としての営みを乱すものも多いように思う。私は、黒髪を脱色して染めることなど、頭皮の細胞を無駄に痛め付けている

ようなものであると信じて疑わない。その点、最近化粧品に紫外線防御の姿勢が強くなったことは皮膚細胞を守り、さらに個体レベルでの傷害をさけるためにも大変よい傾向であると喜んでいる。但し、正しい評価のもとに正しく使用されているかは、まだ議論の余地が残されているように思う。

ソラレンとの共同作用から紫外線の生物影響に興味を持って研究を始めて、太陽光に本当に突然変異を起こす力があるのか、SPF100 を越えるようなサンスクリーンは必要なのか、冬になるとサンスクリーンを入手するのが困難な状況になるのはいいのか、などの疑問から私は太陽光の変異原性とサンスクリーンの評価という研究テーマに取り組むことになった。ここで得た結果から、私はあまり化粧はしないが、サンスクリーンだけは天候や季節に合わせて使用している。冬でも天気の良い日はサンスクリーンが必要だし、夏の快晴では SPF 値のある程度大きいサンスクリーンを使用する必要がある。

サンスクリーンの使用は女性の化粧にとどまらず、子供や、紫外線の強いところで労働する人々の健康を守るため

に広がることを望んでいる。

(岡山大学薬学部)

平成 10 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

川田 暁

今回助成金をいただき有り難うございました。助成金によって行った研究は、ペプチジルアルギニンディミナーゼという、蛋白質の Arg 残基を脱イミノ反応により Cit 残基に変換するユニークな蛋白質修飾酵素についての研究です。詳しくは研究報告書に書きましたが、この酵素が表皮や毛嚢細胞の分化に重要な役割をしている可能性が高いと考えています。しかし、その生理機能については未だ不明の点が多く、少しずつ明らかにしたいと考えています。特に毛嚢細胞でのこの酵素の働きがわかって、毛についての疾病の病因や治療に結びつかないだろうか、と夢のようなことを考えています。

毛の病気として私がまず考えるのは、円形脱毛症です。皮膚科医として、円形脱毛症の患者さんを診てみると、なかには色々な治療の効果があまりみられない患者さんもいらっしゃいます。本来頭に生えていた毛髪がないという

状況が、ご本人にとってどれだけ辛いかを思い浮かべると、皮膚科医としての無力さを痛感してしまいます。どのような患者さんにも、魔法のように毛髪が生えてくるような薬があったら、どんなにいいでしょう。21 世紀中にはそんな薬が生まれることを願っています。そこで私が努力すべきことは、今回の研究をさらに進めて、毛髪に関して新しい科学的な evidence を見つけて、少しずつ積み重ねていくことだと考えています。そしてそこから breakthrough が生まれるように絶えず努力することだと思います。「雨垂れ石をうがう」という言葉がありますが、ささやかな努力でも継続していくことが、いい結果にむすびつくと信じています。

(近畿大学医学部)

平成 10 年度 研究助成

私のコスメトロジー感

船坂 陽子

化粧品のコマーシャルで、これを使うと肌がツルツルになるとか聞いたり、また店頭で販売のお姉さん方に褒められると、何となくそうかなと知っているような化粧品を購入してしまう。皮膚の質を改善することは、病気の治療ではないので、そんなに良くならなくて元々、少しでも改善されれば得をしたような気になる。化粧品は大抵、その使用感がとても良く、宣伝のイメージと重なって精神的な因子が働くのか、何となく使っていると皮膚の状態が改善されてくる。

近年では、平均寿命の延長と女性の社会進出および経済的な安定などの理由から、皮膚の若返りを願う要求が高まっている。その結果として、ケミカルピーリングなどによ

る skin rejuvenation が欧米の白人を対象に一大ブームとなり、実際その劇的な効果が確認されている。しかし、その作用機序を詳細に検討した研究は寡少なため、その手法などにおいても、経験則に頼っているのが現実である。皮膚でのその機序を明らかにすると共に、安全かつ有効な治療法、そしてその効果を維持するための安全性の高い化粧品の開発が望まれる。皮膚科医の存亡を危惧する声も高いが、まだまだやるべきことは多い。皮膚科のみならず、異なる分野の専門知識を互いに共有して、コスメトロジー、サイエンスを光老化の研究に活かしていくことが必要とされているのではないだろうか。

(神戸大学医学部)

高齢者研究の中で感じた予感

西尾 新

高齢者を対象に研究を進める中で、私には一つの予感がある。結論から言えば、おそらくこの10年で、「高齢者」と呼ばれる人達の、考え方や生活スタイル、趣味、嗜好など、精神性あるいは思考様式とも呼べるものが、これまでのものと大きく変化する、ということである。

もちろん、実際に調査してみたわけではなく、単なる感触にすぎない。しかし、考えてみれば、今60代で「高齢者」と呼ばれ始めた人たちは、1950年代に青春時代を過ごしてきた世代である。ダッコちゃんを腕に、フラフープを回し、ウエスタンカーニバルで失神し、プレスリーに憧れた若者たちなのだ。そのかつての若者たちが、今まさに、「高齢者」と呼ばれる時期に差し掛かってきたのである。

青春時代という、自己形成にとって重要な時期を、戦前の日本で過ごしたこれまでの「高齢者」と、大量のアメリカ文化流入後の、戦後の日本で過ごした、これからの「高齢者」とでは、その趣味、嗜好は言うに及ばず、意識や行動様式まで、かなり違ったものになることが予想される。

そしてこの変化は、まず最初に都市で生活する高齢者に顕著に表れるに違いない（もう既に始まっているのかもしれないが）。

このような、大きな変化の予感があるにもかかわらず、相変わらずわれわれの高齢者に対する認識は変化していないように見える。それは、現在マスメディアから流されているような、「日本の田舎のお年寄り」像に象徴される。しかしこのことは、単なる認識のギャップにとどまるものではない。これは現実のお年寄りに対して、ある種のノスタルジーに彩られた高齢者像を押し付けることに他ならない。そしてこの両者のギャップは、家庭というマイクロレベルから、社会経済というマクロレベルにおいてまで、大きな問題を引き起こしかねないことがらである。

あと10年もすれば、武道館でビートルズに失神した少女たちが、「高齢者」と呼ばれる時代が確実にやってくる。その時私たちは、「高齢者」像の急速な変化に柔軟に対応してゆけるのだろうか？（京都大学大学院教育学研究科）

コスメトロジーとしての笑顔術

高下 保幸

私が「異性の魅力」について大学生を対象に行った調査では、「魅力的な女性」の外見の特徴として男性回答者の7割近くが「よく笑う」を「華やかな」「健康的な」「セクシー」などの他の項目を引き離してあげていた。これは「魅力的な男性」の外見の特徴についても同様で、女性回答者の6割近くが「よく笑う」をあげていた。笑顔はこうした男女の間のみならず、上司と部下、教師と生徒など様々な人間関係の形成や維持に大いに効果がありそうである。

平成11年の春に封切られて人気を博したアメリカ映画『パッチ・アダムス』では、医者と患者の関係における笑顔の効用を示していたように思われる。ハンター（パッチ）・アダムスという実在の人物が、生きる意欲をなくして入院した精神病院の他の患者を励ました、特にユーモラスに励ましたことを契機に、患者を笑わすことを通して患者の生きる活力を取り戻す助けとなる医者を目指す奮闘話であ

る。彼は医学生になった当初、人と気持ちを交わすことができるのが医者としての出発点だと街中での実習を試みる。パッチが通りですれ違いざまに笑って声をかけた老婦人は、私の知らない人とばかりに戸惑いながらも振り返ってにっこり応えたのである。

この映画を観ての帰りの電車でのこと、降りる際にドアに近い席の母親に連れられた4、5歳の男の子と目が合ったとき、先ほどのパッチと老婦人との笑顔のやり取りの映画のシーンが思い出された。私もパッチ・アダムスになりきって、男の子に満面の笑みを投げかけた。すると男の子は笑って応えるどころか、私を指さしては母親になにやら言っている。「変なおじちゃんよ」とばかりに。そして私が駅に降りてからも私の方を指さしていた。私の笑いは、子どもの目にはひきつった笑いにしかみえなかったのだろうか。

しかしこの失敗にも懲りずに、機会あるごとにまずは自分の気持ちをたのしくして人に笑顔で対応することを心がけるようになった。そうしたなか、今年の学生から届けられた年賀状のなかに、「昨年はユニークな授業をありがと

うございます。キャンパスでまたあう機会には、あの笑顔を見せて下さい」と文面にあったのもので、「笑いの使い手」を目指した笑顔術修得の日頃の訓練もまったく実りのないものではなかったようである。(福岡大学人文学部)

平成 10 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

河合 隆史

私の研究テーマは、マルチメディアが人間に与える影響について、評価を行うことです。具体的には、立体映像や立体音響、環境芳香などが、生理・心理的な側面に、どのような影響を与えるか、実験的に検討しています。それと併行して、マルチメディアを用いた作品制作(最近では、コンテンツと呼ばれていますが)を行っているのが、私の特徴といえるかもしれません。今年、スペイン北部の修道院をテーマにした作品を制作し、アメリカのシリコンバレーで発表しました(於: Electronic Imaging 2000)。この作品は、ロマネスク彫刻の特徴や、グレゴリオ聖歌のロマンチックな美しさを、立体映像と立体音響を用いて表現することを目指しました。文化財をはじめとする知的情報を、デジタルメディアを用いて記録・保存・再生・共有することを、デジタルアーカイブといいます。私はこれまで

に、国宝の仏像や外科手術における手技などのアーカイブを手がけてきました。このような研究活動は、一見、コスメトロジーと無関係のように思えますが、美しさ、という点で、私は共通性を感じています。つまり、双方とも造形や動きの美しさを表現するメディアの研究として理解できるということです。人間には、自らが美しくありたいという欲求と同時に、知覚できる情報を、美的観点からもコントロールしたいという欲求があると思います。私の場合は、仮想的な環境を、美しく構築し、それを表現することです。今後は、それら仮想世界と現実世界での美しさの共存についても、検討していく必要があります。コスメトロジー研究振興財団に助成して頂いた、今回の研究テーマも、このような目的を背景としています。

(早稲田大学国際情報信研究センター)

平成 11 年度 外国人招聘助成

皮膚におけるヒアルロン酸の機能解析

招聘研究者: School of Medicine, University of California Davis 助教授 Andrew Paul Spicer

受入責任者: 理化学研究所 フロンティア研究システム 生体超分子システム研究グループ
グループディレクター (元財) 東京都臨床医学総合研究所) 鈴木 明身

今回、コスメトロジー財団の国際交流助成を受けて、カリフォルニア大学デービス校 Andrew Spicer 博士を招聘することができ、財団及び財団関係者の皆様に深く感謝申し上げます。博士はヒアルロン酸合成酵素遺伝子のクローニングに成功し、さらに、酵素遺伝子の破壊マウスを作成、ヒアルロン酸の機能解析に、大きな進歩をもたらす業績を上げている新進気鋭の研究者で、今後の研究の発展が大いに期待されています。一方、日本では愛知医科大学の木全弘治教授のグループが同様に遺伝子のクローニングに成

功し、ヒアルロン酸の生物機能の解析を行っており、世界的なレベルで研究が展開されています。このような状況で、博士を招聘し、親しく討論できる機会を持てたことの意義は大変大きいものがあります。皮膚でのヒアルロン酸の重要性は多くの研究者によって、既に認識されており、今後の研究の展開によって得られる情報は、コスメトロジーの分野にも応用され、その成果が期待される場所です。

一方で、私達の研究グループは皮膚特異的な脂質の研究にも関心を持っており、皮膚には、水分の漏出を防止

するために重要なウォーターバリアーがあり、それを構成する成分として、セラミドやアシルセラミドなどの特徴的な脂質が存在しています。これらの脂質の存在は表皮に特異的であり、ウォーターバリアーの形成とともに、ケラチノサイトの分化、さらに、プログラムされた細胞死によって、物理的、化学的に耐性の角化層を作るのに重要な役割

を果たしている可能性が指摘されていますが、その実体はまだ解明されていません。皮膚の脂質を研究しているグループは世界でもさほど多くはなく、今後とも、これらのグループとの情報交換を通じて、コスメトロジーの進歩に寄与できたらと考えております。財団のさらなるご発展を祈念いたします。

平成 11 年度 外国人招聘助成

哺乳動物における皮膚、毛髪、目に存在するメラニン色素のレベルを regulate する細胞、メラノサイトの役割について

招聘研究者：米国 National Institutes of Health (NIH), Chief, Pigment Cell Biology Section, Laboratory of Cell Biology, Vincent J. Hearing 博士

受入責任者：藤田保健衛生大学衛生学部化学教室 助教授 若松 一雅

第 17 回国際色素細胞会議が名古屋市の名古屋国際会議場で、平成 11 年 10 月 30 日から 11 月 4 日まで行われた。この国際会議は、生物学、化学、薬学、医学（基礎系と皮膚科）という、まったく異なった分野からの色素細胞を共通テーマに研究する科学者約 300 人が最新のデータを発表するというユニークな会議であり、したがって、講演会場には基礎科学者や臨床医が混在し、自分の専門分野以外の知識が得られる。おかげで、私もメラノーマについて少しは詳しくなった。この学会は、日本、ヨーロッパ、パンアメリカンの地域学会が 3 年のローテーションで主催しており、今回は私どもがお世話することになった。5 人の特別講演者を選考するに当たり、その一人に米国 NIH のヴィンセント・ヒアリング (Vincent J. Hearing) 博士を選考した。選んだ理由としては、Hearing 博士が、米国 NIH の主任研究員で、細胞生物学における研究の第一人者の一人であり、多大な研究業績があること、また、これまでに多くの日本人留学生が同博士の指導を受けており（特にコスメトロジー関係の企業や皮膚科からの留学生が多い）、日本でもこの分野の研究者が多いため興味を持ってもらえそう、などがその理由である。今回、貴財団の平成 11 年度

外国人招聘助成をいただき、平成 11 年 10 月 28 日から同年 11 月 5 日までの期間、この国際会議での特別講演者として招聘することができた。彼の研究の一つには、メラノサイトに存在するメラニン顆粒、メラノソームの膜構成タンパクであるチロシナーゼおよびチロシナーゼ関連蛋白-1 (TRP-1)、-2 (TRP-2) に関する *in vitro* の研究を主に分子生物学的手法を用いた、これら酵素の機能発現に関する作用機序の解明がある。今回は、「哺乳動物における皮膚、毛髪、目に存在するメラニン色素のレベルを regulate する細胞、メラノサイトの役割について」と題して講演し、生物学的応答機構を解明するためのメラノソームの役割について詳細に述べていただいた。

本国際会議は 20 ヶ国、300 余人の参加者があり、そのうち海外からは 170 名の参加があった。海外からの参加が多い国際会議というのも珍しいと思われるが、これもこの会議の特徴の一つである。選りすぐられた 88 名の演者による口頭発表、164 題のポスター発表があり、活発な討論と友好的な雰囲気の中に終了することができた。

最後に、この度の Hearing 博士の招聘にご援助いただいた(財)コスメトロジー研究振興財団に深謝申し上げます。

付 録

●
事業報告書（平成11年度）
役員
研究助成課題一覧
●

事業報告書

(自平成 11 年 4 月 1 日 至平成 12 年 3 月 31 日)

I . 平成 11 年度 (第 10 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 11 年 5 月 6 日より募集を開始し、同 11 年 7 月 9 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 234 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 11 年 9 月 24 日(金) 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 15 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 10 回功労賞・研究助成等の結果

以下のとおり合計 19 件が決定され研究助成金 2,000 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	17 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 11 年 6 月 7 日(月) 午後 2 時

開催場所 東京都中央区日本橋 3-6-2 (株)コーセー 2 階会議室

理事総数 13 名 本人出席 11 名 委任状出席 2 名 (賛成)

監事 2 名 出席 2 名

審議事項

第一号議案 平成10年度事業報告及び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10年度の実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。

報告事項

平成11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7号（収載論文18編）を発行予定であること、また助成金贈呈式を平成11年11月15日に開催予定であること及び記念講演の演者候補の報告がなされた。最後に金利低下の影響で基本財産の運用益の減少が続いている状況下において、事務局として財団の適切な管理運営の努力をしたい旨の報告がなされ、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 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。

第2回 常理事会

開催日時 平成11年11月15日(月) 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 9名 委任状出席 3名（賛成） 欠席 1名

監事 2名 出席 2名

審議事項

第一号議案 平成11年度（第10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11年度の研究助成課題（17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12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12年度の実業計画及び、平成12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並びに健全な財団運営の努力を続けることを含め、本議案は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

選考委員の植村展生氏の退任に伴い、後任として坂本 純氏（厚生省医薬安全局審査管理課化粧品担当）を選考委員として選任したい旨の提案がなされた。

慎重審議の結果、本議案は全員一致で可決承認された。

報告事項

立川雅美理事が業務上の都合で辞任されること並びにこれに伴う理事現在数 12 名は、寄附行為で定める員数枠を満たしていることから、後任理事の選任は行わないことが報告され、了承された。

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 9 名 委任状出席 2 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11年9月8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11年9月7日(火) 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11年9月20日(月) 午後6時30分
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11年9月24日(金) 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11年11月15日(月) 午後4時
開催場所 東京都渋谷区渋谷2-12-15 日本薬学会長井記念ホール

以上

第10回 研究助成を受けられたかたがた

(JA, JB: 一般研究助成 H: 国際交流援助)

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JA-99-01	匂いの感性計測を行うセンサーシステムの開発	感性工学 センサー工学	九州大学大学院 システム情報科学研究科教授 都 甲 潔
JA-99-02	ヒト皮膚線維芽細胞における脂肪酸、コレステロール代謝調節機構	分子細胞生物学 生化学	大阪大学大学院 薬学研究科助教授 佐 藤 隆一郎
JA-99-03	高発現型メラニン色素産生遺伝子のコスメトロジーへの応用	遺伝子治療学 遺伝子工学	広島大学医学部教授 杉 山 政 則
JB-99-01	新規化粧品素材としての植物由来クロロゲン酸代謝産物の配糖体合成と美白効果ならびに感作性の検討	有機合成化学	近畿大学工学部教授 野 村 正 人
JB-99-02	ヒト脂腺細胞に代るハムスター脂腺細胞を用いた皮脂代謝に関する基盤的研究	生化学 分子生物学	東京薬科大学薬学部講師 佐 藤 隆
JB-99-03	分散安定性に優れたサーファクタントフリーエマルジョンの調製法の確立とその凝集・合一過程の解明	界面化学 コロイド化学 物理化学	東京理科大学理工学部教授 阿 部 正 彦
JB-99-04	紫外線照射で生じるDNA損傷部位に特異的に結合するタンパク質DDBp48の発現調節	細胞生理学	熊本大学医学部附属 遺伝発生医学研究施設教授 山 泉 克
JB-99-05	サイトカインノックアウトマウスにおける免疫反応とストレス応答を指標とする皮膚機能の解析	毒性生化学 皮膚生化学	昭和大学薬学部教授 吉 田 武 美
JB-99-06	糖転移酵素の関与するメラニン産生制御の解析	生化学 糖鎖生物学	大阪大学大学院 医学系研究科教授 谷 口 直 之
JB-99-07	白血球分画が皮膚の健康状態と関連するメカニズム	免疫学 皮膚科学	新潟大学医学部教授 安 保 徹
JB-99-08	UVAによる酸化的遺伝子損傷の細胞内修復機構	生化学 放射線生物学	広島大学大学院 理学研究科教授 井 出 博
JB-99-09	化粧品素材としての含硫化合物の生産に関する研究	応用生物化学	早稲田大学理工学部教授 木 野 邦 器
JB-99-10	太陽紫外線による細胞のアポトーシスとサンスクリーンの効果	放射線生物学	放射線医学総合研究所主任研究官 古 澤 佳 也
JB-99-11	ゼラチンによるアレルギー反応のエピトープ解析と安全なゼラチンの開発	細胞外マトリックス の分子医化学	東京医科歯科大学 難治疾患研究所助手 堀 久 枝
JB-99-12	口唇口蓋裂患者の顔面の非対称感の改善に対する化粧品の効果	顎顔面口腔外科学 心理学	大阪大学歯学部助手 飯 田 征 二

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JB-99-13	皮膚色素性病変の新しい診断法の開発～デジタルマイクロスコープと病理組織三次元再構築法を用いた早期メラノーマ診断～	皮膚科学	北海道大学医学部助手 松村 哲理
JB-99-14	分子量および官能基を制御した新規キトサン系界面活性剤の機能化に関する研究	糖鎖工学 応用界面化学 生物化学工学	東京工業大学大学院 理工学研究科教授 梶内 俊夫
H-99-01	皮膚におけるヒアルロン酸の機能解析	糖鎖生物学	School of Medicine, University of California Davis助教授 Andrew Paul Spicer 受入責任者 (助)東京都臨床医学総合研究所 鈴木 明身
H-99-02	哺乳動物における皮膚、毛髪、目に存在するメラニン色素のレベルをregulateする細胞、メラノサイトの役割について	細胞生物学	National Institutes of Health Assistant Chief Vincent J. Hearing 受入責任者 藤田保健衛生大学衛生学部 若松 一雅

(敬称略 受付順)

役員

平成 12 年 3 月 31 日現在

理事長	小林禮次郎	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	博報堂取締役相談役
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	高砂香料工業代表取締役会長
理事	高橋 久	帝京大学名誉教授
理事	西川 武二	慶應義塾大学医学部教授
理事	花輪 隆昭	昭和館 館長
理事	廣部 雅昭	静岡県立大学学長
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	千歳科学技術大学教授
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ポ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ポソームの基礎研究	高分子合成	早稲田大学工学部教授 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	東京理科大学工学部講師 阿部正彦
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	明星大学工学部教授 日高久夫

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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メトロジーへの応用ー	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Crocin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
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	材料表面ー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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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
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 斎藤佑尚
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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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
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
JA-99-01	匂いの感性計測を行うセンサーシステムの開発	感性工学 センサー工学	九州大学大学院 システム情報科学研究科教授 都甲潔
JB-99-01	新規化粧品素材としての植物由来クロロゲン酸代謝産物の配糖体合成と美白効果ならびに感作性の検討	有機合成化学	近畿大学工学部教授 野村正人
JB-99-03	分散安定性に優れたサーファクタントフリーエマルションの調製法の確立とその凝集・合一過程の解明	界面化学 コロイド化学 物理化学	東京理科大学理工学部教授 阿部正彦
JB-99-09	化粧品素材としての含硫化合物の生産に関する研究	応用生物化学	早稲田大学理工学部教授 木野邦器
JB-99-14	分子量および官能基を制御した新規キトサン系界面活性剤の機能化に関する研究	糖鎖工学 応用界面化学 生物化学工学	東京工業大学大学院 理工学研究科教授 梶内俊夫

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 金ヶ崎 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 瀬崎 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
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ーマスト細胞欠損動物を用いた検定法の開発ー	実験病理学	大阪大学医学部教授 北村 幸彦

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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
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合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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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-β-D-グルコシドの生物学的有用性研究—経皮吸収によるビタミンC活性発現の評価—	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 生命科学研究所講師 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
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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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プテンとしての性格	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 式
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ポ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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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
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	日光老化についてとくに日光弾性線維症の発症機構ならびにUV ^S 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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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—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
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 医学部附属市原病院助教授 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
JA-99-02	ヒト皮膚線維芽細胞における脂肪酸、コレステロール代謝調節機構	分子細胞生物学 生化学	大阪大学大学院 薬学研究科助教授 佐藤隆一郎
JA-99-03	高発現型メラニン色素産生遺伝子のコスメトロジーへの応用	遺伝子治療学 遺伝子工学	広島大学医学部教授 杉山政則
JB-99-02	ヒト脂腺細胞に代るハムスター脂腺細胞を用いた皮脂代謝に関する基盤的研究	生化学 分子生物学	東京薬科大学薬学部講師 佐藤隆
JB-99-04	紫外線照射で生じるDNA損傷部位に特異的に結合するタンパクDDBp48の発現調節	細胞生理学	熊本大学医学部附属 遺伝発生医学研究施設教授 山泉克
JB-99-05	サイトカインノックアウトマウスにおける免疫反応とストレス応答を指標とする皮膚機能の解析	毒性生化学 皮膚生化学	昭和大学薬学部教授 吉田武美
JB-99-06	糖転移酵素の関与するメラニン産生制御の解析	生化学 糖鎖生物学	大阪大学大学院 医学系研究科教授 谷口直之
JB-99-07	白血球分画が皮膚の健康状態と関連するメカニズム	免疫学 皮膚科学	新潟大学医学部教授 安保徹
JB-99-08	UVAによる酸化的遺伝子損傷の細胞内修復機構	生化学 放射線生物学	広島大学大学院 理学研究科教授 井出博
JB-99-10	太陽紫外線による細胞のアポトーシスとサンスクリーンの効果	放射線生物学	放射線医学総合研究所主任研究官 古澤佳也
JB-99-11	ゼラチンによるアレルギー反応のエピトープ解析と安全なゼラチンの開発	細胞外マトリックス の分子医化学	東京医科歯科大学 難治疾患研究所助手 堀久枝
JB-99-13	皮膚色素性病変の新しい診断法の開発～デジタルマイクロスコープと病理組織三次元再構築法を用いた早期メラノーマ診断～	皮膚科学	北海道大学医学部助手 松村哲理

研究助成課題一覧 3

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
JA-96-04	化粧品の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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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
JB-99-12	口唇口蓋裂患者の顔面の非対称感の改善に対する化粧の効果	顎顔面口腔外科学 心理学	大阪大学歯学部助手 飯田 征二

*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.8 / 2000

非売品

2000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

制作 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