

ごあいさつ

昨年暮れは日本から3年連続、しかも同時に2人のノーベル賞受賞者が出て長期経済低迷の中で明るい話題として騒がれたのはまだ記憶に新しいところです。ノーベル化学賞を受賞した白川、野依、田中氏の3人はいずれも30歳前後の研究が受賞対象となっており、その成果は産業に活かされています。また物理学賞を受賞した小柴氏の研究には民間企業の研究成果が重要な役割をしたとのことですが、これらの受賞者の話の中で印象に残るのは自由な研究ができる環境が重要であること、常識にとらわれない思考を持ち失敗と思える実験の中でも真実を追究する姿勢が大事であるという言葉です。

もう一つ印象に残るできごととしてはJ. D. ワトソンとF. H. C. クリックがDNAの二重らせん構造モデルを提唱してから今年50年目となるそうですが、最近の遺伝子技術の発展の中で話題となったことのひとつにはヒトの全遺伝子情報解読が完了したことであり、一方ではクローン技術で生まれた羊の「ドリー」が通常の羊の寿命の半分である6歳で安楽死させられたことです。こうした生命科学の本質的解明には、基本的な技術のブレークスルーがあったとしても、その完成にはまだまだ究明しなければならないことが多いということを再認識させられたということです。

私どものコスメトロジー財団の研究助成事業においても、より技術の完成を目指す研究と共に、若手研究者の萌芽的な研究や独創的な研究にも目を向けて助成を行ってきましたが、今後とも化粧品学の発展を目指して更なる努力を継続し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15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

- ・ 逆ミセルの微細構造を利用した生理活性物質内包型ナノカプセルの創製 2
九州大学大学院工学研究院 小野 努
- ・ 水分子の移動とその速度制御のための分子膜の開発 8
九州大学大学院理学研究院 師井 義清
- ・ $^1\text{C}_4$ 配座のグルコース環状六面体, 反転シクロデキストリンの創製研究12
関西学院大学理工学部 山田 英俊
- ・ 4 位置換レゾルシノール誘導体のメラニン生成抑制効果16
九州大学農学研究院森林資源科学部門 清水 邦義
- ・ カンキツ精油の有する生体作用の生化学的解析23
高知大学農学部 受田 浩之
- ・ 脂質-高分子界面活性剤混合系による新規分散系“液晶エマルジョン”の形成28
京都大学大学院薬学研究科 中野 実
- ・ 光で透過制御可能な人工ベシクルを形成する新規多鎖型両親媒性化合物の開発33
大阪大学大学院工学研究科 中辻 洋司

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・ ヒト皮膚における遊離脂肪酸の動態に及ぼす皮膚常在細菌ならびに化粧品の影響に関する研究40
東京薬科大学薬学部 小谷 明
- ・ 紫外線及び化学合成化合物のヘアレスラット皮膚に対する障害作用及びその防御46
城西大学薬学部城西大学生命科学研究センター 谷 學
- ・ 老化マウス klotho における皮膚変化の検討50
群馬大学医学部第2内科 倉林 正彦
- ・ 発生再生の分子メカニズムを応用した人工皮膚作製53
秋田大学医学部生化学第一講座 杉山 俊博
- ・ 紫外線防御因子メタロチオネインのヒノキチオールによる合成誘導とその意義57
東北大学大学院薬学研究科 永沼 章
- ・ Wnt シグナルによるメラニン産生の制御機構の解析62
東北大学大学院医学系研究科 武田 和久
- ・ 皮膚におけるアクアポリン3の発現調節67
自治医科大学薬理学教室 石橋 賢一

目 次

- ・接触皮膚炎への p38 mitogen-activated protein kinase の関与機構の解明71
千葉大学大学院医学研究院 粕谷 善俊

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

- ・がん患者への「化粧品」支援プログラムの日本への適用可能性に関する研究78
東京大学大学院医学系研究科 高橋 都
- ・化粧品文化史の変遷と流行した化粧の受け入れ方についての研究83
武庫川女子大学大学院家政学研究科 玉置 育子
- ・日本の化粧意識の近代化をめぐる比較史的考察——清潔習慣の展開をめぐって95
奈良女子大学生生活環境学部 鈴木 則子
- ・痴呆高齢者の表情分析と主観的 Quality of Life の評価手法に関する研究99
三重県立看護大学 鈴木 みずえ

■記念講演

- 平成 14 年度記念講演 『人のこころと遺伝子のはたらき』107
東京大学大学院総合文化研究科 石浦 章一

■コスメトロジー研究雑感121

■付 録

- 平成 14 年度事業報告135
- 役員一覧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

逆ミセルの微細構造を利用した生理活性物質内包型ナノカプセルの創製

九州大学大学院 工学研究院化学工学部門

小 野 努

Reversed micelles and water-in-oil microemulsions can disperse nano-size water droplets in a polar solvents. The nano water droplets stably solubilize biomolecules such as proteins, peptides and DNA, and the size is controllable by adjusting water contents. On the other hand, the sol-gel method is a low temperature process widely used to produce optically transparent, microporous glasses by the polycondensation of liquid phase alkoxide precursors. Reversed micellar solution facilitates forming nano-size glasses in the hydrophilic core containing bioactive molecules. The hydrophilic nano sphere is favorable for solubilizing biomolecules and for hydrolysis of the alkoxide precursors. To create a novel nano carrier for bioactive materials, therefore, my strategy is based on the sol-gel encapsulation of the nano-size water droplets solubilizing biomolecules. Transmission electron microscope (TEM) observation shows that nano particles can be produced by the AOT and NP-5 reversed micellar droplets. The monodispersed particles with 10 - 20 nm diameter were obtained. However, in fact, almost all the immobilized protein preparations we obtained are a micro-size aggregate of the nano particles. In addition, the protein encapsulation profiles indicate that proteins solubilized in reversed micelles are completely incorporated into them with the growth of silica particles. The efficiency of protein encapsulation into the nano silica particles depends on the water droplet pH, Wo value (= [water]/[surfactant]), and the composition of alkoxide precursors. It seems that these factors affected not only the surface condition of cytochrome c but also the sol-gel processing. The encapsulated cytochrome c and subtilisin Carlsberg in nano silica particles retain their catalytic activities. Subtilisin Carlsberg entrapped in nano silica particles shows 40-fold greater transesterification activity than any other immobilized subtilisin Carlsberg. Protein encapsulation in silica gel prevents from denaturing protein by organic solvent. Molecular isolation of proteins in nano silica particles enhances the effective enzyme quantity and the surface area to contact with bulk substrate solution. These effects facilitate the high performance of subtilisin Carlsberg entrapped in nano silica particles for transesterification reaction in organic media. Hereafter we will develop new nanocapsules including biomolecules with high dispersibility and good reactivity.

1. 緒 言

生命活動を司る酵素や核酸はナノレベルの機能性分子であり、医療、美容、触媒など今後更に広い範囲で利用されている。そのため、これらの極めて特異的な機能を様々な媒体へ安定かつ高効率に適応させるための手法は、今後重要な技術になると期待される。近年、「ナノテクノロジー」と呼ばれる分野が世界的規模で注目されるようになっていくが¹⁾、本研究もナノスケールのバイオ分子を効率よく使いこなすためのデザインという面で、広義のナノテクノロジーと言えるであろう。

従来の生理活性物質包括担体は小さいものでもマイクロスケール (10^{-6} m オーダー) の担体であり、回収・再利用性に長けてはいるものの極めて高価なバイオ分子を効率よく利用することには十分でなく、生体への適応範囲も限定されてしまう。これに対して、ナノカプセルはそのサイズから角質層間隙へも浸透できるほどであり、安定に包括した

ドラッグキャリアとして、またナノカプセル表層へのターゲティング機能の付与することにより、目的細胞への特異的な遺伝子導入やサイトカイン放出が期待できる²⁾。

このようなナノキャリアを創製するために、筆者は有機溶媒中で特殊な界面活性剤が自己組織化によって形成する逆ミセルのナノオーダーの微小水滴核に着目し、この微小水滴核にバイオ分子を可溶化した後に外部からマトリクス形成因子となるシリカ前駆体を投入し、高効率でバイオ分子を包括したナノカプセル調製法を提案している。既往の研究において、逆ミセル内で金属アルコキシドなどのゾルーゲル反応を行うことによって、金属触媒を担持するシリカ微粒子^{3, 4)} や半導体への応用を目指した金属酸化物のナノ微粒子調製^{5, 6)} あるいは単なるナノシリカ微粒子調製^{7~10)} のツールとして利用されている。また一方、低温ゾルーゲル反応は穏和な条件で生体物質を包括固定化できる手法として知られている^{11, 12)}。それ故、生体分子の可溶化能力に優れた逆ミセルの微小液滴¹³⁾ をゾルーゲル反応でカプセル化することによって、極めて効率的な生体分子包括法となることが期待される。

本研究では、逆ミセルに可溶化したタンパク質分子がいかにして効率よくナノカプセルに包括されるかを、AOT 逆ミセルの微小液滴におけるシトクロム c の包括挙動について検討した。また包括されたタンパク質 (酵素) の触媒特性に関しては、NP-5 逆ミセルを用いて調製したナノシリ



Development of nano particles encapsulating bioactive molecules by using microstructure of reversed micelles

Tsutomu Ono

Department of Chemical Engineering,
Faculty of Engineering, Kyushu University

カ包括 subtilisin Carlsberg を用いて W_o 値の影響や他の固定化酵素との比較を行った。

2. 実験

2-1. 試薬

包括実験のモデルタンパク質として Horse heart cytochrome *c* (分子量 12,384, Sigma 社製)、ナノ微粒子包括固定化酵素の実験のモデル酵素として Bacillus licheniformis 由来の subtilisin Carlsberg を精製等をせずそのまま用いた。シリカゲル前駆体としては、東京化成工業社製のテトラメトキシシラン (TMOS)、メチルトリメトキシシラン (MTTrMOS)、ジメチルジメトキシシラン (DMDMOS)、アミノプロピルトリメトキシシラン (APTTrMOS) を用いた。また、逆ミセル構成因子である界面活性剤には、ジ-2-エチルヘキシルスルホコハク酸ナトリウム (AOT) と非イオン性界面活性剤であるポリエチレングリコールモノ-4-ノニルフェニルエーテル (NP-5) を用いた。酵素活性測定用の基質には、東京化成工業社製の (2,2'-Azinodi (2-Ethyl Benzthiazoline Sulfonic Acid)) Diammonium Salt (ABTS)、酢酸ビニル、ベンジルアルコールを用いた。

2-2. タンパク質含有ナノ微粒子の調製

タンパク質に Tris-HCl 緩衝液と 250mM AOT/イソオクタン溶液あるいは NP-5/シクロヘキサン溶液を添加し、所定の W_o ($=[H_2O]/[Surfactant]$) 値となるタンパク質含有逆ミセル溶液を調製した。シトクロム *c* の最終的な溶液濃度は 0.2 mg/ml になるように、subtilisin Carlsberg は 10 mg/ml となるように設定した。これらの逆ミセル溶液へ 150mM となるようにシリカ前駆体を溶解させ、恒温往復振盪器 (25°C) で所定の反応時間インキュベーションすることによってゾル-ゲル反応を進行させてシリカ微粒子の成長を促した。所定時間後、3,500rpm, 10min の遠心分離によって調製されたシリカ微粒子を沈殿物から回収した。シトクロム *c* の包括率は、このときの上澄み液のシトクロム *c* 濃度とシリカ前駆体投入前の逆ミセル溶液中のシトクロム *c* 濃度と比較して算出した。シトクロム *c* 濃度の測定は、分光光度計 (Shimadzu UV-2500PC) により 408nm の吸光度より求めた。遠心分離によって回収されたナノシリカ微粒子包括 subtilisin Carlsberg は、24 時間凍結乾燥させ、得られた標品を各種水活 $a_w = 0.44$ を有する飽和 KCO_3 溶液で 24 時間水和処理して反応実験に用いた。

2-3. 包括シトクロム *c* の酵素活性測定

遠心分離によって回収したナノカプセル包括シトクロム *c* は、24 時間凍結乾燥させ、得られた標品を所定濃度の ABTS 水溶液へ再分散させて、過酸化水素添加後における ABTS の吸光度の時間変化から、ナノカプセル包括シ

トクロム *c* の酵素活性を測定した。

2-5. 包括 subtilisin Carlsberg の酵素活性測定

エステル交換反応実験は、0.2M 酢酸ビニルと 0.02M ベンジルアルコールを含むシクロヘキサン溶液中へ調製したナノカプセル包括 subtilisin Carlsberg 標品を分散させ、反応温度 35°C で往復振盪器で振盪させながら行った。所定反応時間後の試料中の生成物濃度をガスクロマトグラフィー (Shimadzu GC-14B) によって測定して初期反応速度および反応率を求めた。

2-4. 透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察

ゾル-ゲル反応を開始して 24 時間後の溶液サンプルをマイクログリッド上の垂らし、十分乾燥させた後に、日本電子製透過型電子顕微鏡 (JEM-200CX, 加速電圧 200kV) を用いて観察を行った。

3. 結果

3-1. シトクロム *c* のナノカプセル中への包括

シトクロム *c* を溶解させた逆ミセル内相の pH を 4, 8, 12 としたときのシトクロム *c* の包括挙動を Figure 1 に示した。また、それぞれの pH で調製されたシトクロム *c* 含有シリカ微粒子の TEM 写真を Figure 2 に示した。

Fig.1 より、pH が高くなるほどシトクロム *c* の包括が早くなることが明らかである。また、調製時の pH が高くなるにつれて、得られたシリカ微粒子の粒径も大きくなるのが TEM 観察の結果明らかとなった。(Figure 2)。上記 pH 領域では、シトクロム *c* の電荷状態も大きく変化して微細空間を形成する界面活性剤である AOT との相互作用にも大きな影響を与えられ考えられる。しかしながら、い

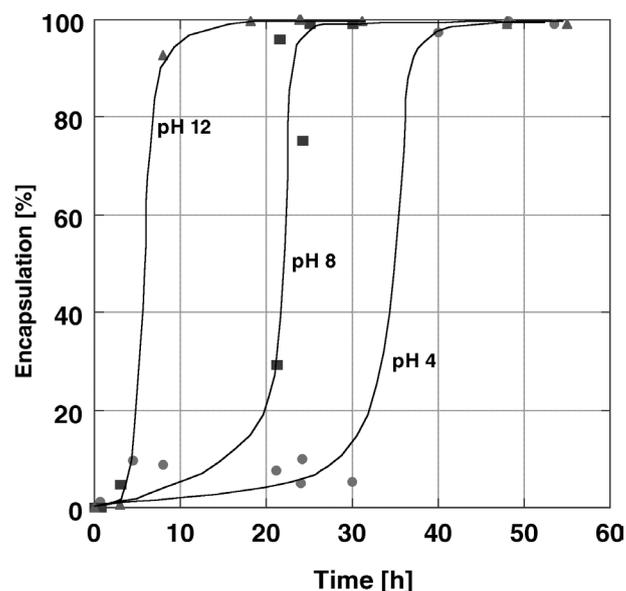


Figure 1. Effect of pH on the cytochrome *c* encapsulation in nano-silica particles prepared by AOT reversed micelles.

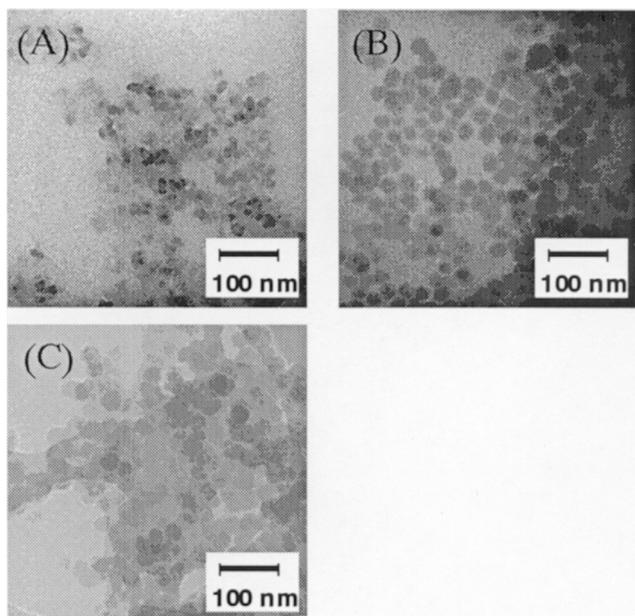


Figure 2. TEM images of nano silica particles prepared by AOT reversed micelles: (A) pH 4, (B) pH 8, (C) pH12.

ずれの pH においてもほぼ 100% のシトクロム *c* がシリカ微粒子内に包括されており、シトクロム *c* 非存在下でもほぼ同様の粒子成長過程を示すことから、各 pH におけるシトクロム *c* の包括挙動は、主にシリカゲル微粒子の成長速度によって支配されていると考えられる。

Figure 3 にはシトクロム *c* の包括率に及ぼす W_o 値の影響を示した。溶液中の界面活性剤濃度に対する水分子濃度として定義される W_o 値は、逆ミセル溶液の特徴を示す数値としてしばしば用いられる。界面活性剤濃度一定な逆ミセル溶液中で水分量が増加すると（すなわち、 W_o 値が増加すると）、逆ミセルは各分子集合体の数を増やすのではなく、分子集合体が抱える微小水滴核の径を増加させることになる。既往の実験事実より、 W_o 値と逆ミセル半径には一次の相関があることが知られている¹⁴⁾。本実験結果では、 W_o 値が小さい場合に、すなわち逆ミセルのサイズが小さい場合に、より迅速にシトクロム *c* の包括が達成されている。

また、無機シリカ前駆体である TMOS と有機シリカ前駆体である MTrMOS や DMDMOS あるいは表面電荷をカチオン性に変えるアミノ基含有シリカ前駆体である APTTrMOS を混合して調製したハイブリッドナノシリカカプセルに関する検討も行ったが、シトクロム *c* 包括挙動にはほとんど影響を与えなかった。さらに、包括されたシトクロム *c* は、ナノカプセル内の包括後もペルオキシダーゼ様の酵素活性を十分に維持していることが、ABTS を用いた実験より明らかとなった。

3-2. ナノカプセル包括 subtilisin Carlsberg の触媒特性 非イオン性界面活性剤である NP-5 によって形成された

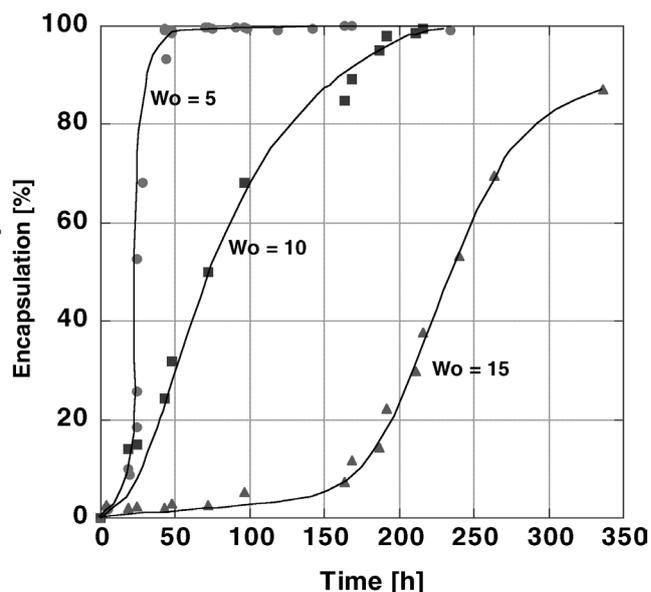


Figure 3. Effect of W_o value, the molar ratio of water to surfactant in reversed micellar solution, on the cytochrome *c* encapsulation in nano-silica particles prepared by AOT reversed micelles.

逆ミセル液滴を利用して、subtilisin Carlsberg を包括したナノシリカ微粒子を調製した。NP-5 逆ミセルによって調製されたナノシリカ微粒子は、AOT 逆ミセルで調製されたナノシリカ微粒子に比べて単分散性が高く、本実験では平均粒径が約 13 nm の単分散シリカ微粒子が調製できる条件で subtilisin Carlsberg を包括した。酢酸ビニルとベンジルアルコールのエステル交換反応において、同量の subtilisin Carlsberg を用いて調製したその他の固定化酵素に比べて、ナノシリカ包括 subtilisin Carlsberg では約 40 倍ほど初期反応速度が高いことが明らかとなった (Figure 4)。また Fig.4 の挿入図より、通常の酵素反応と同様の反応挙動を示し、24 時間で約 80% 近くの生成物を与えていることも明らかである。

粉末酵素よりも凍結乾燥処理で有機溶媒中での酵素活性を大きく向上することができるという報告^{15, 16)}もあるが、ナノシリカ包括酵素はそれよりも非常に高い酵素活性を示すことができた。また、セライトのような無機担体に吸着させた場合よりも高い酵素活性を示し、さらに酵素なしで調製したナノシリカ微粒子にその後酵素を吸着させたナノシリカ微粒子吸着 subtilisin Carlsberg よりも大幅に高い初期反応速度を得たことから、ナノシリカ微粒子内へ包括することによって有機溶媒による失活を抑制されていることが酵素活性の大幅な向上に影響していると考えられる。さらに、NP-5 逆ミセル溶液中における均一反応系よりもナノシリカ包括 subtilisin Carlsberg の不均一反応系の方が触媒活性の点で勝っているところは、酵素分子への基質のアクセシビリティが原因になっていると思われる。逆ミセルの液滴中へ可溶

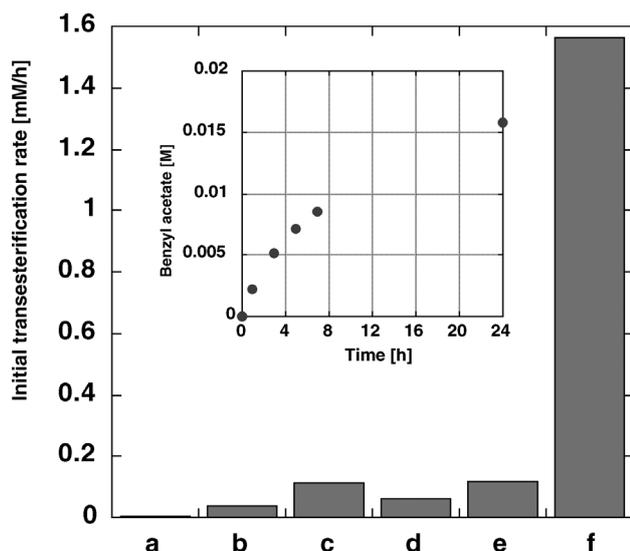


Figure 4. Transesterification activity of subtilisin Carlsberg immobilized by various method. Modes of immobilization of subtilisin Carlsberg: a, without immobilization (powder enzyme); b, lyophilized from aqueous buffer; c, solubilized into reversed micelles; d, attached onto Celite 545; e, attached onto nano silica particles; f, encapsulated in nano silica particles. Inset, the time course of the product concentration from transesterification by subtilisin Carlsberg encapsulated in nano silica particles are shown. Initial concentration of vinyl acetate and benzyl alcohol are 0.2 M and 0.02 M, respectively.

化した subtilisin Carlsberg は、周囲を水と界面活性剤層で覆われているために求核種であるベンジルアルコールの接近が強く抑制された結果、エステル交換活性はナノシリカ包括 subtilisin Carlsberg よりも低くなったと推察される。上記のように有機溶媒による失活抑制は、ナノシリカ包括 subtilisin Carlsberg が高い酵素活性を示す大きな要因のひとつと考えられるが、ナノシリカ微粒子に酵素を包括することでさらにもうひとつの大きな効果が得られていることも示唆されている。Figure 5 は遠心分離によって回収された凝集物を TEM で観察したものであり、多数のナノシリカ微粒子が連結して多孔性の凝集物となっていることがわかる。この結果から、ナノシリカ包括酵素は、膨大な表面積を獲得することで埋没による酵素の無効化を防ぎ、酵素へのアクセシビリティも向上させたことも今回の活性向上の大きな要因であると考えられることができる。

Figure 6 ではナノシリカ包括 subtilisin Carlsberg のエステル交換活性に与える微粒子調製時の W_o 値の影響を示した結果である。その結果、 $W_o < 5$ においては極めて低いエステル交換活性を示した。これに対して、 $W_o > 5$ で調製されたナノシリカ包括 subtilisin Carlsberg はほぼ一定の触媒活性を示している。

4. 考察

一般に、ゾルーゲル反応はケイ素アルコキシドの加水分

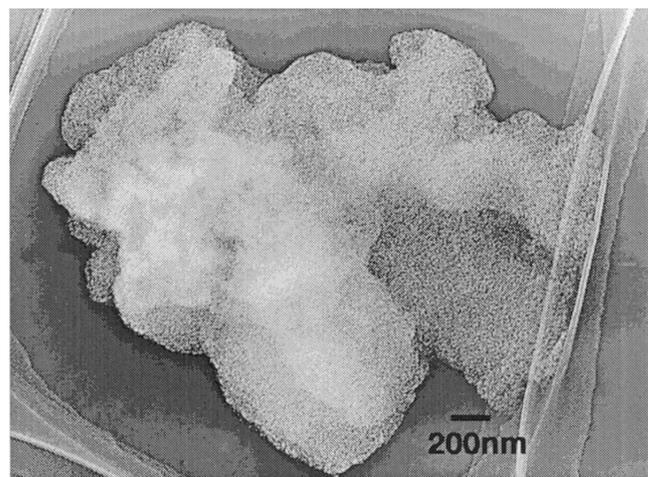


Figure 5. TEM images of the aggregate of nano silica particles prepared by NP-5 reversed micelles.

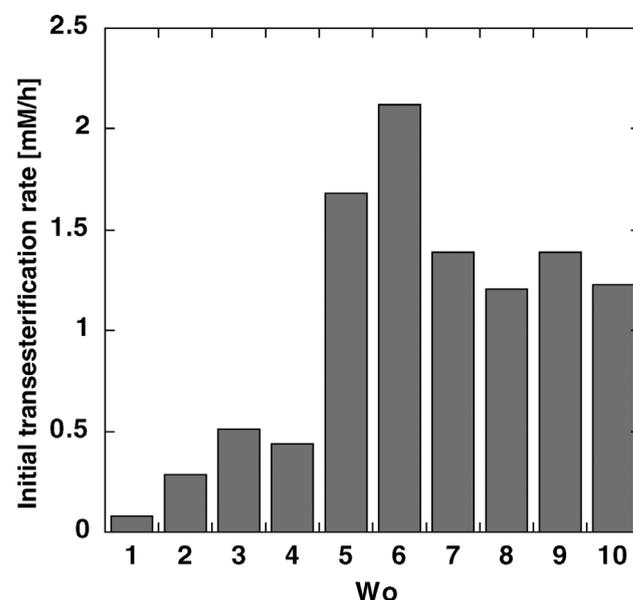


Figure 6. Effect of water content, W_o , on the transesterification activity of subtilisin Carlsberg encapsulated in nano silica particles.

解とその加水分解によって生じるシラノール基間の重縮合反応によって三次元シリカマトリックスが形成され、そのうち、重縮合反応はアルカリ性において促進されることが知られている。従って、今回得られた実験結果より、シトクロム c の包括挙動はシリカゲルの形成と密接に関係していることが示唆された。逆ミセル液滴内の pH が高くなるにつれて、ゾルーゲル反応の進行が促進され、それによってシリカ粒子の成長が進むとともに、逆ミセルの液滴交換時におけるシリカ粒子の合一も盛んになることが Fig. 2 より明らかである。シリカ微粒子どうしの合一によって、溶液中に均一に分散できるナノシリカ微粒子としては存在が難しくなるが、タンパク質を包括したシリカ微粒子凝集体 (Fig. 5) はナノシリカ微粒子の性質を残しているため、固定化された酵素による反応実験の

際にはその固定化状態が大きく反映された結果となった (Fig. 4)。ナノシリカ包括酵素は、粉末酵素や凍結乾燥処理酵素と同様に有機溶媒中で不均一系を呈している。しかしながら、粉末酵素や凍結乾燥処理酵素が多数の酵素分子の凝集体であり埋没しているがゆえ有効に酵素機能を発揮できない酵素の割合は極めて多いと考えられるが、ナノシリカ包括酵素の場合は各逆ミセル液滴中に酵素分子を分散して固定化されており、得られた凝集体は多孔性の極めて大きな表面積を有した固定化酵素となっている点で、ナノスケールで包括して効果が明瞭に現れている。

また、逆ミセルの形状に大きく影響を与える水分量 (W_o 値) は、包括挙動においては顕著な違いを示したが、包括された subtilisin Carlsberg の酵素活性にはそれほど大きな影響を与えることはなかった。ただし、Fig. 3 および Fig. 5 の結果からみると、 $W_o=5$ 付近で包括挙動、酵素活性ともに良好な結果が得られている。一般に、ゾルーゲル反応が油水界面近傍で開始すると考えられており、タンパク質周辺においてゾルーゲル反応が進行することが可能な逆ミセル径の小さな $W_o=5$ の系で最も効率的に包括が行われているためだと推察されるが、現在のところその詳細については不明である。

これより低水分量の逆ミセル液滴中でゾルーゲル反応を行った場合には、シリカ微粒子の成長は小さく、凝集体を形成するには不十分であったと考えられる。 $W_o<5$ の逆ミセルにおいては、液滴中の水分子はほとんどが界面活性剤による相互作用によって束縛されており、通常の水分子と異なる性質を有していると言われており、ゾルーゲル反応の進行にも何らかの影響を及ぼしていると考えられる。

5. 総括

本年度の研究成果より、逆ミセルのナノスケールの微細構造を利用することによって、生体分子であるタンパク質をナノシリカ微粒子内に包括することが可能であることが明らかとなった。さらにナノシリカカプセル内に包括されたタンパク質は本来の触媒機能を保持しており、ゾルーゲル反応を経て安定にシリカ微粒子内に包括固定化されることが明らかとなった。しかしながら、実際に得られているタンパク質固定化シリカゲルは、これらのナノカプセルの凝集体であり、溶液中に均一に分散できるほどの細かなサイズではないことも同時に明らかとなった (Fig. 5)。ただ、多孔性の固定化酵素としては極めて有効であることが subtilisin Carlsberg の触媒特性から示された。今後はナノカプセル形成後の各粒子間の凝集を巧みに制御することが必要であり、目的に応じてナノカプセルのモルフォロジーを設計することも極めて重要であることが示唆されたこととなる。生理活性物質内包型ナノシリカカプセルの表面化学修飾によって凝集力の抑制を行い、溶液への分散性の向

上を達成できれば、均一系でありながら生体分子とは異なる表面特性を有した生体分子溶液を調製できる。固定化担体に生分解性や徐放性のような機能を付与することによって、サイトカイン徐放特性を有した培地などの開発が可能となる。

なお本実験結果から、生体物質の包括挙動はする逆ミセルの性質だけでなく、シリカゲル形成および成長挙動と深く関連していることが示唆されており、効率的な生体物質の包括方法に関してはさらなる詳細な検討が必要であろう。

生理活性物質内包型ナノカプセルは、そのサイズから皮膚中の細胞層に対して効率よく浸透することが可能であり、そこで内包する生理活性物質の効果を発揮させることが期待できる¹⁾。それゆえ、本技術を利用して高機能性皮膚浸透キャリアの開発や生体内の患部へとドラッグターゲティングを行うナノキャリアの開発へと研究を展開したいと考えている。

(参考文献)

- 1) 川合知二 監修：図解 ナノテクノロジーのすべて、工業調査会
- 2) Lawrence MJ, Rees GD : Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 45, 89-121, 2000.
- 3) Blum J, Avnir D, Schumann H : Sol-gel encapsulated transition-metal catalysts, 1999, 32-38, 1999.
- 4) Kishida M, Hanaoka T, Kim WY, Nagata H, Wakabayashi K : Size control of rhodium particles of silica supported catalysts using water-in-oil microemulsion, *Appl. Surf. Sci.*, 121/122, 347-350, 1997.
- 5) Kawai T, Usui Y, Kon-no K : Synthesis and growth mechanism of GeO_2 particles in AOT reversed micelles, *Colloids Surf. A*, 149, 39-47, 1999.
- 6) Pileni MP, Tanori J, Filankembo A : Biomimetic strategies for the control of size, shape and self-organization of nanoparticles, *Langmuir*, 13, 561-573, 1997.
- 7) Arriagada FJ, Osseo-Asare K : Phase and dispersion stability effects in the synthesis of silica nanoparticles in a non-ionic reverse microemulsion, *Colloids Surf.*, 69, 105-115, 1992.
- 8) Arriagada FJ, Osseo-Asare K : Synthesis of nanosize silica in Aerosol OT reverse microemulsions, *J. Colloid Interf. Sci.*, 170, 8-17, 1995
- 9) Osseo-Asare K, Arriagada FJ : Growth kinetics of nanosize silica in a nonionic water-in-oil microemulsion: A reverse micellar pseudophase reaction model, *J.*

- Colloind Interf. Sci., 218, 68-76, 1999
- 10) Arriagada FJ, Osseo-Asare K : Synthesis of nanosize silica in a nonionic water-in-oil microemulsion: Effects of the water/surfactant molar ratio and ammonia concentration, J. Colloid Interf. Sci., 211, 210-220, 1999.
 - 11) Furukawa S, Ono T, Ijima H, Kawakami K : Enhancement of activity of sol-gel immobilized lipase in organic media by pretreatment with substrate analogues, J. Mol. Catal. B., 15, 65-70, 2001.
 - 12) Edmiston PL, Wambolt CL, Smith MK, Saavedra SS : Spectroscopic Characterization of albumin and myoglobin entrapped in bulk sol-gel glasses, J. Colloid Interf. Sci., 395-406, 1994.
 - 13) Ono T, Kawakami K, Goto M, Furusaki S : Catalytic oxidation of o-phenylenediamine by cytochrome c encapsulated in reversed micelles, J. Mol. Catal. B., 11, 955-959, 2001.
 - 14) Pileni MP, Zemb T, Petit C : Solubilization by reverse micelles: Solute localization and structure perturbation, Chem. Phys. Lett., 118, 414-420, 1985.
 - 15) Klibanov AM : Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents, Trends Biochem. Sci., 14, 141-144, 1989.
 - 16) Ke T, Klibanov AM : On Enzymatic activity in organic solvents as a function of enzyme history, Biotechnol. Bioeng., 57, 746-750, 1998.

水分子の移動とその速度制御のための分子膜の開発

九州大学大学院 理学研究院化学部門

師 井 義 清

Evaporation rate measurement of water molecules across the air/solution interface covered by amphiphilic molecules is quite valuable for a basic study on molecular transport across an interface. This can be made by using the remodeled apparatus for a thermal gravitational analysis. The activation energy of water evaporation is quite useful to see the process through which evaporation takes place. This can be investigated by determining the temperature dependence of the evaporation rates. The amphiphiles examined were cationic, anionic, and nonionic ones to see if there exists any difference in effect on the rate among the kinds of soluble surfactants. The rate was also examined from the viewpoint of molecular surface area of the amphiphiles at the air/solution interface derived from the surface excess obtained by surface tension vs. concentration relationship. The effect of insoluble monolayer on the water evaporation was also examined using long chain n-alkanols.

The evaporation rate of water molecules across three kinds of interfaces (an air/water interface(1), an air/surfactant solution interface(2), and air/water interface covered by an insoluble monolayer(3)) was examined using the remodeled thermogravimetric balance. There was no difference in both the evaporation rate and the activation energy between the first and the second for three kinds of surfactant solutions not only below but also above the cmc. This means that the molecular surface area from the Gibbs surface excess has nothing to do with the evaporation rate. In the third case, the insoluble monolayer of n-alkanols decreased the evaporation rate and increased the activation energy, indicating a clear difference between an insoluble monolayer and a conventional adsorbed film of a soluble surfactant. The concentration profile of water molecule in an air/liquid interface region was drawn using the equations derived by solving the Fick's second law. The profile indicates that a definite layer just below the air/liquid interface of surfactant solution is made of water molecules only and that the layer width is a few times the root mean square displacement($\sqrt{2Dt}$) of surfactant molecules. The width was found to be longer than a few nm, judging from several relaxation times of kinetics of amphiphile molecules in aqueous systems and from a maximum evaporation rate of just purified water.

1. 緒 言

「液体の蒸発速度に及ぼす単分子膜の効果」に関する研究は、古くは1800年代に遡る。水の有効利用は強く望まれながらも、大量の水が蒸発によって失われている。そこで、1950年代の初頭、蒸発速度を抑える研究が砂漠保有国で活発になり、単分子膜を用いて水の損失を60%も抑えることに成功した。しかしながら、水面上の単分子膜は風によって容易に流され、失われるので、この研究は以後衰退していった。これまでの研究の対象は専ら水であり、貯水池の水の蒸発を抑える研究が主であったが、それ以降果物の保湿、最近では稲作への利用(水の蒸発を抑え、水田の温度低下を防ぐ)まで非常に広範囲に渡る研究が進行中である。

水分子は我々の身近に固体・液体・気体の3形態で多量に存在し、生命体の維持、環境の維持・浄化等に果たしている役割は計り知れない。その重要性は空気と全く同様でありながら、日本では身近にあまりに多量に存在し而も安

価に手に入るため、改めて水の浄化、換言すれば水分子の分離・移動・精製についてミクロな分子レベルで詳細に検討されていない。分子膜を介しての水分子の透過はマクロサイズのイオン交換膜による水の透過を更に一步深めた研究である。水分子の分子膜透過の速度制御が可能となれば広範囲の分野で応用され且つ実用化の研究に大きく寄与できるものと確信し、この研究を提案し、実験を開始した。幸いにも、コスメトロジー研究振興財団より研究助成金を頂き、本研究を更に発展させることが出来た。

2. 実 験

水分子の蒸発速度の測定には、熱天秤(理学電気株、Thermo Plus 2)を改良して用いた(Fig. 1)。蒸発表面に及ぼす周辺効果になるべく小さくなるように、面積の広いサンプルパン(0.739 cm²)を用いた。試料には150 μ lの水を用い、試料温度は $\pm 0.1^\circ\text{C}$ に制御した。水面上にできる停滞水蒸気層をなるべく取り除くために清浄な乾燥空気を46.4 ml min⁻¹の流速で流した。この装置では、水の重量変化と温度変化を同時に追跡することが可能である(Fig. 2)。75%以上蒸発すると、重量変化は小さくなり直線から少しづつ上方にずれてくるが、これはパンの底に白金面が現れてくるためである。それ故に、重量変化が50%迄の前半の直線部分を蒸発速度の決定に使用した。

活性剤には水に可溶性の3種類(陽イオン性にはN-(1,1-



Development of Membrane for Molecular Transport of Water and Its Rate Control

Yoshikiyo Moroi

Department of Chemistry, Graduate School of Sciences, Kyushu University

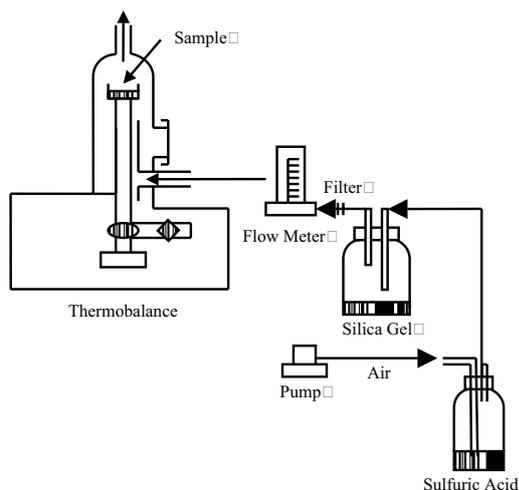


Fig.1 Schematic illustration of modified apparatus for thermogravimetry.

dihydroperfluoro octyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride (C8-TAC)、陰イオン性には sodium dodecyl sulfate (DSD)、非イオン性には N-decanoyl-N-methylglucamide (MEGA-1/0) と水に不溶性の 1-heptadecanol を用いた。前者は水の蒸発に及ぼす吸着膜の効果を、後者は水に不溶性の単分子膜の効果を検討するためである。

3. 結果と考察

3.1 装置の精度

水分子の蒸発速度（移動速度）の研究にとって、速度測定装置の開発は最も重要な課題である。気体/液体界面を介しての物質移動速度の測定は、液体からの分子の蒸発速度を測定することにより可能となる。以前の研究では、液面上に乾燥剤を置き、乾燥剤の重量変化を測定する方法を用いたが、本研究では蒸発速度を重量変化として直接求めた。まず、空気/水界面を介しての水の蒸発速度を熱天秤内に流す乾燥空気の流速を変えて測定した。毎分 2 ml の流速の差でも十分に蒸発速度に差が認められる程に高感度の装置であった。不溶性単分子膜の水の蒸発速度に及ぼす効果を見るために、1-ヘプタデカノールの不溶性単分子膜を水面上に展開し、水の蒸発速度も調べた。その結果、蒸発速度は顕著に減少し、単分子膜の効果が明らかとなった。また、可溶性の両親媒性物質の界面における吸着膜の効果を調べたが、吸着膜の効果は全く観測されず、純水の蒸発速度と何ら変わることは無かった。この結果については、再度詳細に検討することにした。以上の結果は、Langmuir, 16 (25), 9697-9698 (2001) に報告済みである。

3.2 炭化弗素系活性剤の吸着膜

本研究では、吸着分子膜に酸素の透過が可能な炭化弗素系膜も用いた。その際、分子膜が形成され易くなるためには、パッキングパラメーターが 1 に近い物質が望ましい。そ

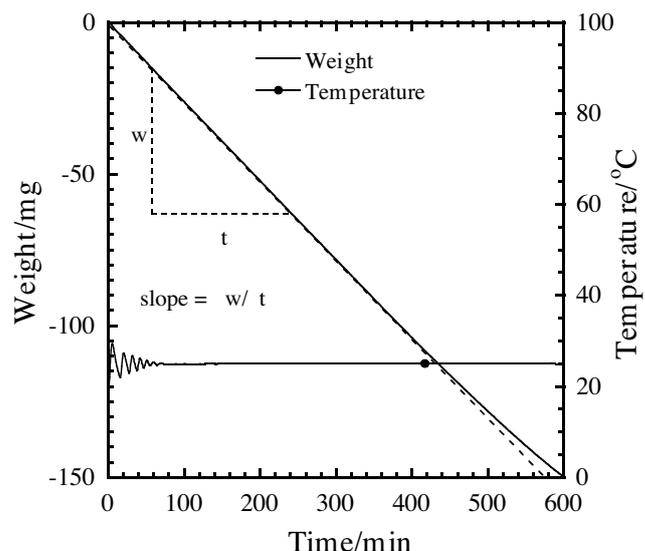


Fig. 2. Raw data for change of weight and temperature (solid line: experimental change, broken line: straight line fit)

□

ここで、本研究では炭化弗素鎖長の異なる N-(1,1-dihydroperfluoroalkyl)-N,N,N-trimethylammonium Chloride (Cn-TAC) を新規に合成し、その水溶液中での物性を検討することから開始した。物性としては、ミセル形成と界面吸着を選び、CMC 並びに表面張力の濃度変化から求まる表面過剰量について調べた。CMC は電導度の濃度変化より決定した。C8-TAC では、CMC の温度変化は 25°C 付近に極小をもつが、C10-TAC では温度の上昇とともに単調に増加した。疎水基の炭素数に対する CMC の変化から、メチレン基当たりのミセル形成に及ぼす疎水性の効果は炭化弗素では炭化水素の 1.7 倍となった。表面過剰量から分子占有面積を算出し、表面圧力と分子占有面積の関係を求めた。その結果、炭素数 10 の C10-TAC では、広い分子占有面積でも高い表面圧力を持ち、狭い分子占有面積まで容易に圧縮されることが分かった。得られた分子占有面積-表面圧力の関係から、C8-TAC、C10-TAC 共に表面上の吸着膜は液体膨張膜であることが判明した。表面張力の温度変化から求まる吸着のエントロピー変化に関しては、C8-TAC では濃度の増加と共に正から負へとかなりの減少を示すのに反し、C10-TAC では全て負の値で濃度と共に急激に減少した。特に、C10-TAC では、分子占有面積が 0.35 nm² まで圧縮できるので、水分子の蒸発を抑える点でかなりの効果が期待できる。以上の結果は、Langmuir, 16 (25), 9754-9758 (2001) に報告済みである。

3.3 純粋液体の蒸発速度の測定と蒸発の活性化エネルギー

これまでの研究で、本研究課題である「水分子の移動とその速度制御のための分子膜の開発」の基本的な部分を押さえることができた。そこで、熱天秤内に流す乾燥空気の

流速を変えて水の蒸発速度を測定し、安定な蒸発速度が得られる流速を決定した。その結果、流速が遅い場合、蒸発速度は流速に顕著に影響されるが、ある流速以上になると、蒸発速度は殆ど影響を受けなくなる。それは、温度に殆ど無関係であった。これは、ある流速以上になると試料皿の水面上に形成される水蒸気の停滞層が蒸発皿の側を流れる空気により充分にかき乱された結果である (Fig. 3)。それ故、実験は流速の影響が少なくなる流速を用いた。次に蒸発速度に及ぼす温度変化を調べ、蒸発の活性化エネルギーを求めた。その結果、活性化エネルギーは温度と共に減少したが、蒸発のエントルピー変化よりも大きかった。更に、この結果を正しく解釈出来るように、蒸発速度に関する理論式を新しく展開した。其れは、従来から良く知られた Hertz-Knudsen 式と本質的に似ており、係数だけが異なっていた。

次に、水の蒸発の理解を更に深める目的で、液体状態の n-alkanols の蒸発速度の測定並びにその温度効果を検討し、蒸発の活性化エネルギーに及ぼす疎水基と親水基の効果を調べた。その結果、親水基となるメタノール基の効果は温度の上昇と共に減少するが、メチレン基の効果は温度の上昇と共に増大し、且つアルキル鎖が伸びると共に温度効果は減少していった。更に、活性化エネルギーの値より、75℃迄の液体状態では、アルキル鎖の形状は炭素数で 10 までは線状であるが、11 以上になると環状になっていることが窺えた。しかし、それ以上の温度になると、炭素数 11 以上のアルコールでも線状であることが明らかとなった。

以上の結果は Evaporation Rate Measurement of Water and Liquid n-Alkanols across Air-liquid Interface Using Thermogravimetry の標題で、Bull. Chem. Soc. Jpn. に掲載予定 (5月号) である。

3.4 空気/水界面上の吸着分子膜を介しての水の蒸発速度

3の蒸発速度の測定装置の開発の中で、可溶性両親媒性物質の空気/水溶液界面への吸着膜が水の蒸発速度に殆ど影響しないことを述べた。界面への表面過剰量から算出される分子占有面積の値では、表面の 85% が両親媒性物質で覆われているにも拘らず、水の蒸発速度に何らの影響も見られないのは如何にも不思議である。そこで、3種類の可溶性両親媒性物質を選び、それらの水溶液の蒸発速度とその温度変化を詳しく調べた。用いた活性剤は、陽イオン性の C8-TAC、陰イオン性のドデシル硫

酸ナトリウム、非イオン性の N-decanoyl-N-methylglucamide (MEGA-10) である。これらの活性剤の初濃度が CMC と CMC/2 の異なる 2 種類の溶液について、水の蒸発速度とその温度変化を測定し、蒸発の活性化エネルギーを求めた。その結果、蒸発速度並びに活性化エネルギー共に初濃度とは関係なく、純水の値と何ら変わらなかった。水分子は空気/溶液界面から蒸発している筈であり、両者の値が純水の値と同一であるということは、活性剤溶液表面が蒸発速度を規定する領域内で純水と同一でないと説明できない。そこで、蒸発を水分子のフラックスと見做し、拡散に関するフィックの方程式を用いて解析を行なった。得られた結果は、界面から一定の距離の範囲内で水分子の濃度変化が認められた。純水からの蒸発速度を式に入れてこの濃度領域を見積もると、約 123nm であった (Fig. 4)。

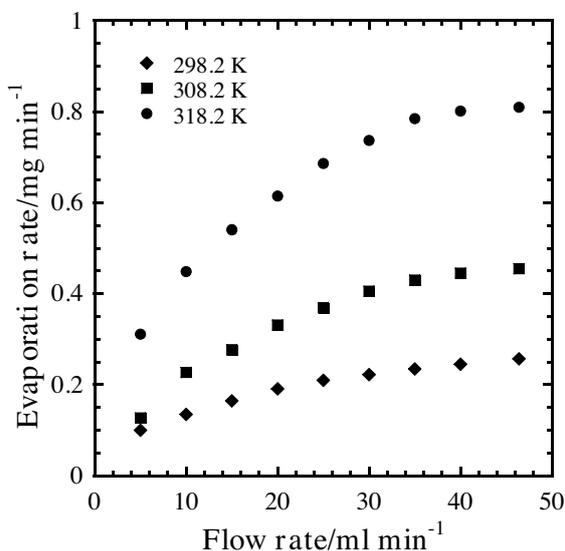


Fig. 3. Dependence of evaporation rate by weight of water on flow rate of dry air.

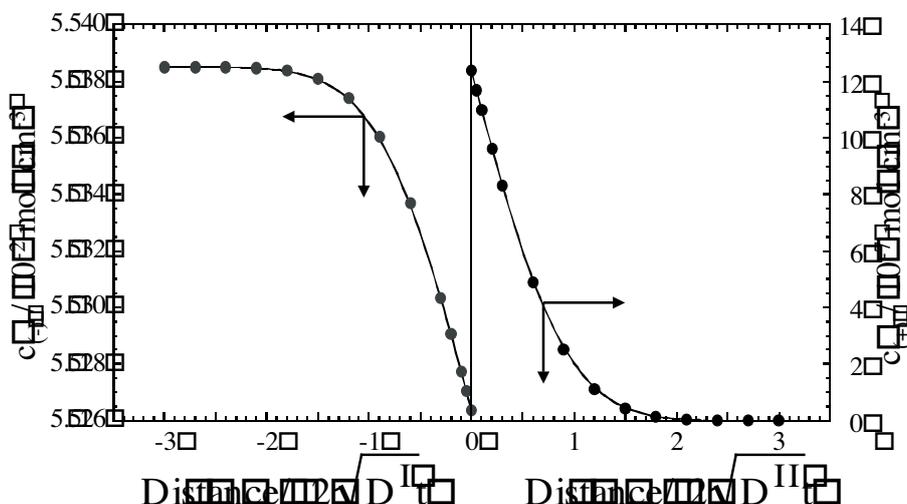


Fig. 4. Concentration profile of water molecule in the interfacial region; $D^I=2.28 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$, $D^{II}=2.19 \times 10^{-1} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$, $C_0(I)=5.539 \times 10^{-2} \text{ mol cm}^{-3}$, $C_0(II)=1.240 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$

以上の結果は、Gibbsの等温吸着式から求まる表面過剰量が物理化学的にどのような意味を持つのか、表面過剰量から求まる分子占有面積が一体何を意味するのかという新しい課題を投げ掛けている。この課題に対して、色々の角度から現在検討中であり、研究成果を纏めて近い将来投稿する予定である。投稿原稿の表題は、"Difference in Surface Properties between Insoluble Monolayer and Adsorbed Film from Kinetics of Water Evaporation"である。

3.5 空気／水界面の不溶性単分子膜を介しての水の蒸発速度

上記3で述べたように、水面上に展開された1-ヘプタデカノールの不溶性単分子膜は、水の蒸発速度を顕著に減少させ、単分子膜の効果が明らかとなった。不溶性単分子膜は吸着膜と異なり、実際に空気／水界面に存在することより水の蒸発の活性化エネルギーも純水の活性化エネルギーの1.25倍に増大することが明らかとなった (Fig. 5)。今後は、炭化水素系の1-アルカノールのアルキル鎖の炭素数を変え、水に溶解性の物質から不溶性の物質に渡って幅広く検討し、吸着膜と不溶性単分子膜の相違を水の蒸発速度の観点から明らかにしていく。

4. 総括

長鎖のアルキル基を有する炭化水素系の両親媒性物質は、水面上に不溶性単分子膜として容易に展開できる。しかし、炭化水素系の物質は単分子膜としての展開が極めて困難であることが、これまでの実験から明らかとなった。炭化水素系の膜であれば、酸素も容易に透過でき、且つ分

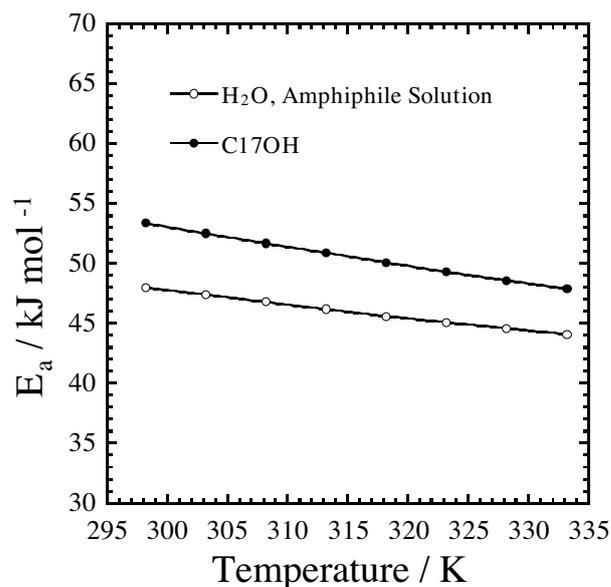


Fig. 5. Dependence of the activation energy of water evaporation on temperature for purified water, amphiphile solutions at the cmc, and water covered by insoluble monolayer of C17-OH.

解性も少ないので、実用の観点からも興味の対象としては炭化水素系の両親媒性物質となる。この意味も含めて、合成の困難な炭化水素系陽イオン性界面活性剤に挑戦してきた。しかし、現在迄のところ、良い結果が得られていない。今後は、時間をかけて、新規に合成した炭化水素系物質を単分子膜として展開することを検討する。膜厚を変えながら水の蒸発速度とその活性化エネルギーを詳細に検討し、合目的な分子膜の開発に引き続き努力する。

$^1\text{C}_4$ 配座のグルコース環状六量体, 反転シクロデキストリンの創製研究

関西学院大学 理工学部

山田 英俊

Ring conformations of glucose derivatives bearing with bulky trialkyl or alkyldiaryl silyl protecting groups at the C-2 and C-3 oxygen functionalities have investigated with the aim of synthetic approach to flipped α -cyclodextrin, a cyclic hexamer of D-glucose in the $^1\text{C}_4$ ring conformation. To the same purpose, synthetic route of a glucose derivative flipped by introduction of a bridged protecting group tethering two oxygens at C-3 and C-6 of glucose.

Among 8 glucose derivatives that have bulky silyl protecting groups at the C-2 and C-3 oxygens, the ring conformation of the following 3 compounds flipped to be $^1\text{C}_4$ form; 2,3-di-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl- α , and β -D-glucopyranose, and 2,3-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl- β -D-glucopyranose. These compounds demonstrated the first ring flip due to introduction of bulky silyl protecting group on C-2 and C-3 oxygens. The ring conformations were determined based on the coupling constants of the ^1H NMR spectra.

Composition of the flipped derivative of glucose to the flipped cyclodextrin requires a high α -selective glycosylation reaction. However, a preliminary glycosylation of a flipped sugar with *tert*-butyldiphenylsilyl group on the C-2 oxygen showed moderate β -selectivity. This result indicates the inadequacy of the application of such silyl-based flipped sugars; we then designed and prepared a glucose derivative flipped by introduction of a bridged protecting group tethering two oxygens at C-3 and C-6 of glucose.

1. 緒言

反転したシクロデキストリンの合成を目的として, 嵩高いシリル保護基を2, 3位に導入したグルコース誘導体の環立体配座を詳細に調べ, 環反転が可能であることを明らかにした. 保護基を3, 6位に架橋させて導入することで反転したグルコース誘導体の合成ルートを確認した.

椅子型立体配座の6員環は, 置換基がより多くエカトリアル配座を取る方が安定である. これは糖の6員環にもあてはまり, グルコースは $^1\text{C}_4$ 配座ではほとんど存在せず熱力学的により安定な $^4\text{C}_1$ 配座で通常存在する. 糖の複数の水酸基を嵩高いトリアルキルあるいはアルキルジアルキルシリル基で保護すると環立体配座が反転し, アキシアル配向した置換基が多いす型で安定に存在する例が知られている¹⁾. しかし単糖の場合, 当然のことながら嵩高いシリル基を除去すると元のエカトリアル置換基がより多い立体配座に戻る. 私達はこのような糖の環配座反転を保護基以外の要因で起こすことはできないかと考え, 大員環による束縛が期待できる反転したシクロデキストリン (2) を着想した. 反転シクロデキストリンは, 環の内部にも外部にも水酸基を持つ. 外部の水酸基は, エステル結合によって脂肪酸などを結合させることができる. 従って, 従来のシク

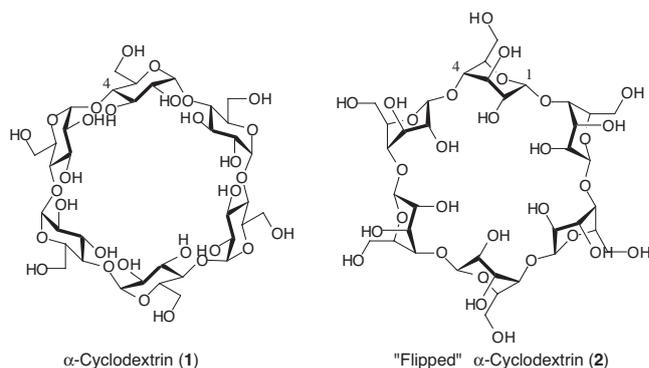


Fig.1

ロデキストリンとは対称的に, 内部が親水性, 外部が親油性となる化合物を容易に合成することができる. この様な化合物を合成できれば親水性の各種化合物を包摂し, 全体として親油性の性質を有する化合物のベースとなると考えている.

反転した α -シクロデキストリン (2) の合成計画を Fig. 2 に示した. 予め環反転させたグルコース誘導体を合成し, これを繋いで直鎖六量体とした後環状化させる計画を立てた. シクロデキストリンは, グルコースの1位と4位が酸素を介して結合している. 従って, 環反転をさせるためにこれら以外の水酸基を修飾して利用する事が前提になる. これまで知られているシリル保護基による環反転は, いずれも糖の4位水酸基が関わっている. 一方, 2, 3位のシリル保護のみで反転させた例は無かった. そこで, グルコースの2, 3位に嵩高いシリル保護基を導入した場合のグルコースの立体配座変化を調べ, 3 に示すような反転が可能であるか否かを調査した. また, 環反転させるもう一つの可能性として, 3位と6位の水酸基を架橋する保護基を



Synthetic study of flipped cyclodextrin, a cyclic hexamer of D-glucose in the $^1\text{C}_4$ ring conformation

Hidetoshi Yamada

School of Science and Technology,
Kwansei Gakuin University

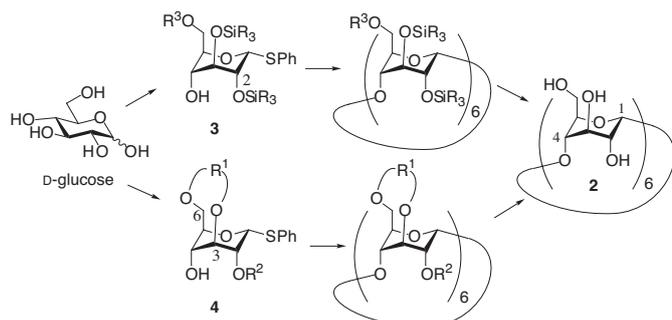


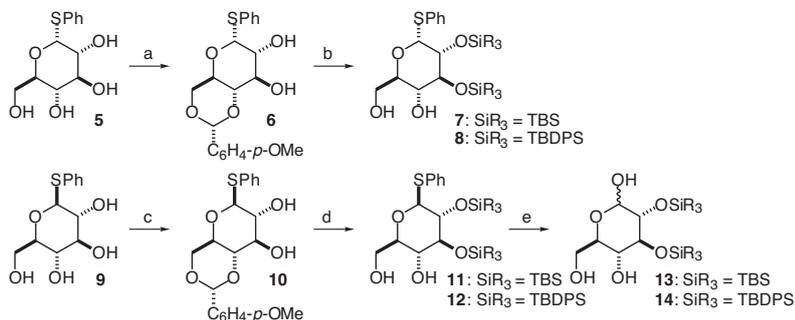
Fig.2

導入し、4に示したような構造にすることで環反転させることを目的にグルコースからの合成を行った。

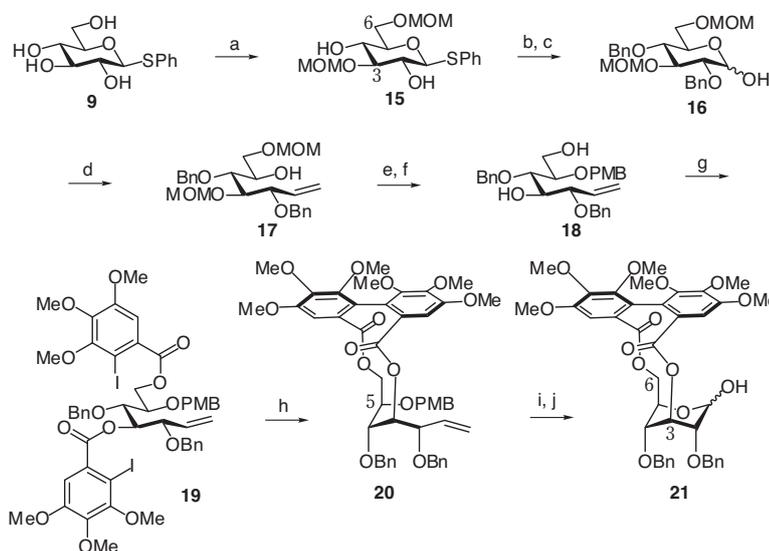
2. 実験

2・1 2, 3位に嵩高いシリル保護基を導入したグルコース誘導体の合成

1- α -フェニルチオグルコシド (5)²⁾ の4, 6位水酸基をアニシリデン保護して6とした後, 残った2, 3位水酸基に *tert*-butyldimethylsilyl (TBS) 基あるいは *tert*-butyldiphenylsilyl (TBDPS) 基を導入して2, 3位に嵩高いシリル保護基を有する α -チオグルコシド 7, 8を合成



Scheme1 Preparation of 2,3-trialkyl or alkyl diarylsilylated derivatives of D-glucose.



Scheme 2 Preparation of bridged compound between C-3 and C-6 oxygens.

した。一方, 対応する 1- β -フェニルチオグルコシド (9)³⁾ を原料として同様の合成段階を経て2, 3位に嵩高いシリル保護基を有する β -チオグルコシド 11, 12を合成した。また 11, 12はそれぞれ1位フェニルチオ基を加水分解して, 2, 3位のみが修飾されたグルコース 13, 14へと導いた。合成した化合物はそれぞれ各種二次元 NMR の手法を用いて ¹H NMR の全てのシグナルを帰属したのち, ピラノース環上の水素に基づく結合定数を J 分解スペクトル法を用いて測定した。測定結果は結果の部にまとめた。

2・2 3位 - 6位水酸基の架橋による環反転

1- β -フェニルチオグルコシド (9) の3, 6位水酸基を選択的にメトキシメチル基で保護して 15とした⁴⁾。残った2, 4位水酸基をベンジル保護し, 次いで1位フェニルチオ基を加水分解して 16とした。Wittig 反応を用いてピラノース環を開環しながら末端ビニル基を有する 17へと変換した後, 5位水酸基を *p*-メトキシベンジル基で保護し2, 4位のメトキシメチル基を脱保護して 18とした。18の2, 4位水酸基に 2-iodo-3,4,5-trimethoxybenzoyl 基を導入して 19へ導いた後⁵⁾, Ullmann カップリングを用いてビフェニル部分を構築して 20とした⁶⁾。このとき, 二種

(a) (MeO)₂CHC₆H₄-*p*-OMe, TsOH, 50 C, 2 h, 57%; (b) TBSOTf, 2,6-lutidine, DMF, 100C, 12 h, then TsOH, THF/MeOH, rt, 6 h, 56% for 7; TBDPSOTf, 2,6-lutidine, DMF, 100C, 12 h, then TsOH, THF/MeOH, rt, 6 h, 41% for 8; (c) (MeO)₂CHC₆H₄-*p*-OMe, TsOH, 50 C, 4 h, 60%; (d) TBSOTf, 2,6-lutidine, DMF, 100 C, 12 h, then TsOH, THF/MeOH, rt, 6h, 73% for 11; TBDPSOTf, 2,6-lutidine, DMF, 100 C, 12 h, then TsOH, THF/MeOH, rt, 6 h, 59% for 12; (e) NBS, THF/H₂O, rt, 2 min, 75%, for 13

(a) MOMCl, *i*-Pr₂NEt, DMF, 0 C →rt, 1 day, 51%; (b) NaH, rt, 1 h, then BnBr, DMF, 0 C →rt, 2.5 h, 75%; (c) NBS, THF/H₂O, 0C, 20 min, 92%; (d) Ph₃PCH₂, THF, -50C →rt, overnight, 82%; (e) NaH, rt, 20 min, then PMBCl, DMF, rt, 2 h, 93%; (f) conc. HCl, *i*-PrOH, 60 C, 7 h, 59%; (g) 2-iodo-2,3,5-trimethoxybenzoic acid, EDCl (WSC), DMAP, CH₂Cl₂, rt 10 h, 94%; (h) Cu, DMF, reflux, 17 h, 48%; (i) DDQ, CH₂Cl₂, H₂O, rt, 1 h, 85%; cat. OsO₄, NaIO₄, THF/H₂O (1:1), rt, 6h, 70%

類の回転異性体に基づくジアステレオマーの生成が考えられるが、得られた化合物は単一であった。ピフェニル部分の立体化学はその誘導体の単結晶 X 線解析で決定した。20 の 5 位 *p*-メトキシベンジル基を脱保護し、末端ビニル部分をオスmium酸化と過ヨウ素酸ナトリウムにより開裂させピラノース環を再構築し 21 を合成した。

3. 結果

3・1 2, 3 位に嵩高いシリル保護基を導入したグルコース誘導体の環立体配座

合成した 2, 3 位に嵩高いシリル保護基を導入したグルコース誘導体の環立体配座を推定するため、¹H NMR の結合定数を測定した。ピラノース体である 13, 14 は α 体、β 体の分離ができないため混合物のまま NMR を測定し各 J 値を測定した。結果は Table 1 にまとめた。比較のため、Jackson らによって報告されている TBDMS 基を 3 個導入して反転させた化合物 phenylthio 3,4,6-tri-O-tert-butylidimethyl silyl-α-D-glucopyranoside (15) (Fig 3) ^{1f)}、及びシリル基を導入していないテトラオール 5, 9 のデータを並べて記載した。

α-チオグルコシド 7 が示した各結合定数はシリル基を導入していない 5 の値に近く、環反転は起こっていないことが判る。8 の値は H2 から H5 にかけて 5 の値よりも若干小さくなっている。そのため元のいす型から少し変形していることが考えられるが、基本的にもとの ⁴C₁ 配座である

Table 1 Coupling constants between two hydrogens on the pyranose rings.

| compound | ³ J (Hz) | | | | ⁴ J (Hz) | | |
|----------|---------------------|-------|-------|-------|---------------------|-------|-------|
| | H1-H2 | H2-H3 | H3-H4 | H4-H5 | H1-H3 | H2-H4 | H3-H5 |
| 7 | 5.2 | 9.0 | 8.2 | 9.8 | - | - | - |
| 8 | 4.7 | 8.6 | 7.3 | 9.4 | - | - | - |
| 11 | 8.2 | 6.9 | 7.7 | 8.9 | - | - | - |
| 12 | 2.3 | 2.5 | 3.7 | 8.1 | 1.3 | 1.1 | - |
| 13α | 3.3 | 8.9 | 8.5 | 9.9 | - | - | - |
| 13β | 1.9 | 2.1 | 1.6 | 2.9 | 0.8 | 0.7 | 0.7 |
| 14α | 1.0 | 2.9 | 0.5 | 0.0 | - | 1.4 | - |
| 14β | 2.9 | 2.1 | 1.0 | 3.2 | 0.8 | 1.4 | - |
| 15 | 2.9 | 5.5 | 4.5 | 3.1 | - | 1.0 | - |
| 5 | 5.2 | 10.0 | 8.8 | 10.0 | - | - | - |
| 9 | 9.6 | 8.8 | 8.0 | 9.2 | - | - | - |

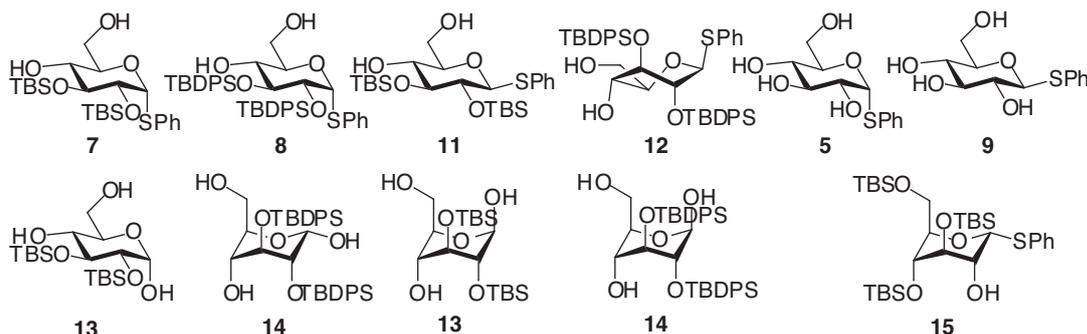


Fig. 3

るとして妥当である (Fig 3). β-チオグルコシド 11 が示した値も H2 から H5 にかけて 9 の値よりも若干小さくなっているため、元のいす型から少し変形しているものの基本的にもとの ⁴C₁ 配座で存在すると考えられる。TBDPS 基で保護した 12 の H1-H2, H2-H3, H3-H4 での値が元の 9 と比較して小さくなっており、Karplus の式を参考にすると何れも約 30° の二面角である。また、H1-H3 及び H2-H4 間に W 字型遠隔カップリングが観測されたことから H1 から H4 がエカトリアル配向していることを支持している。一方、H4-H5 の結合定数は 9 の値と比較してもそれほど大きな変化は観測されなかった。これらの情報から、12 は 1, 2, 3, 4 位はアキシャル配向した置換基を有し、6 位の置換基はエカトリアル配向したツイストボート型の環配座で存在することが明らかになった。1 位フェニルチオ基を除去したピラノース体のうち、13α が示した各結合定数はシリル基を導入していない 5 の値に近く、環反転は起こっていないことが判る。一方、13β, 14α, 14β の各結合定数は何れも小さく、また W 字型遠隔カップリングが観測されたことから環反転したことを示している。

3・2 3 位 - 6 位水酸基を架橋した化合物 21 の環立体配座

化合物 21 はアノマー混合物であり、またピラノース環上の水素とメチル基の水素が重なり非常に複雑なパターンであるため、¹H NMR を基にした環配座の解析は困難であった。そのため、21 はさらに二段階を経て天然物から誘導されるコリラジンノナメチルエーテル (22) に変換してその構造を確認した (Fig. 4) ⁷⁾。

4. 考察

2, 3 位に嵩高いシリル保護基を導入した各グルコース誘導体の環配座から、2, 3 位に TBDPS 基を導入したピラノース体は α 体、β 体にかかわらず反転した ¹C₄ 配座であることが明らかになった。この構造は合成の目的として反転シクロデキストリンの単糖部分の構造をよく反映していると考えられる。一方、2, 3, 4 位に TBDPS 基を有する糖供与体 23 を用いたグリコシル化反応では、β

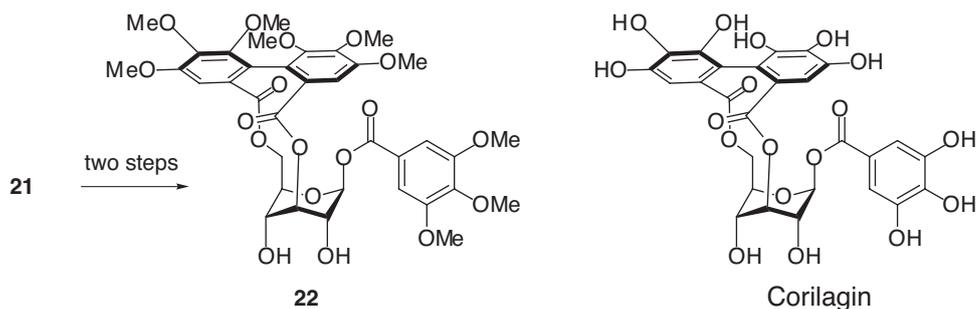


Fig. 4

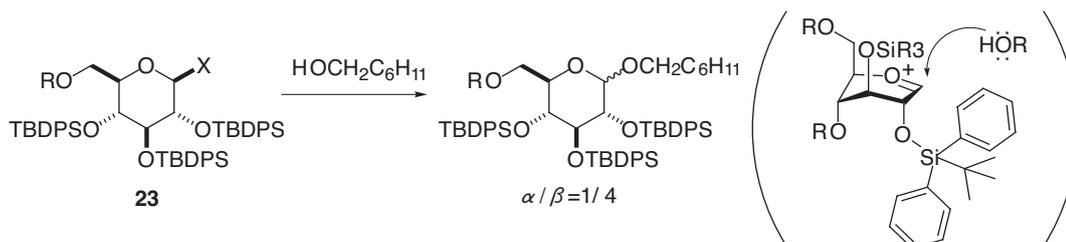


Fig. 5

選択的な反応が観測された。2位の TBDPS 基が α からのアルコールの接近を妨害した結果であると考えられる (Fig. 5)。2位に嵩高いシリル保護基を有する反転したグルコース誘導体を用いてグリコシル化反応を行うと、 β 選択性が出るという知見は、従来2位アシル保護基の隣接基関与による制御に頼ってきた β 選択的グリコシル化反応の別法となるべき芽ではあるが、反転シクロデキストリンを合成するためにはグリコシル化反応において高い α 選択性の発現が必要である。そのため、本法は反転シクロデキストリンの合成には適さないと判断した。

一方、3位 - 6位水酸基を架橋した化合物 **21** から糖供与体を誘導した場合、糖の β 面を大きく覆うビフェニル部分がアルコールの接近を妨害し、 α 選択的なグリコシル化反応が期待できる。今後、**21** を基に反転シクロデキストリンの合成を行う。

5. 総括

反転したシクロデキストリンの合成を目的に、嵩高いシリル保護基を2, 3位に導入したグルコース誘導体の環立体配座を詳細に調べ、環反転が可能であることを明らかにした。嵩高いシリル保護基の導入による環反転例はこれまでも報告があるが、どの例も3, 4位の水酸基に嵩高いシリル保護基が導入されており、2, 3位への導入での反転が可能であることを初めて示すことができた。また今回合成した2, 3位に嵩高いシリル保護基を導入して反転させたグルコース誘導体は、 β 選択的な反応を示した。しかし、シクロデキストリンの合成には α 選択的なグリコシル化反応が必須である。従って新たな β 選択的グリコシル化反応の芽としては期待できるが、シクロデキストリンの合成には利用できない。今後、3, 6架橋体を用いた合成を進める。

(参考文献)

- 1) a) H. Abe, S. Shuto, S. Tamura, A. Matsuda, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6159-6161.
- b) K. S. Feldman, M. D. Lawlor, K. Sahasrabudhe, *J. Org. Chem.* **2001**, *65*, 8011-8019.
- c) S. Ichikawa, S. Shuto, A. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10270-10280.
- d) H. Yamada, M. Nakatani, T. Ikeda, Y. Marumoto, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5573-5576.
- e) Y. Yahiro, S. Ichikawa, S. Shuto, A. Matsuda, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5527-5531.
- f) C. Walford, R. F. W. Jackson, N. H. Rees, W. Clegg, S. L. Heath, *Chem. Commun.* **1997**, 1855-1856.
- g) T. Hosoya, Y. Ohashi, T. Matsumoto, K. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 663-666.
- h) M. A. Tius, J. Busch-Petersen, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5181-5184
- 2) M. S. Motawia, C. E. Olsen, K. Enevoldsen, J. Marcussen, and B. L. Møller, *Carbohydrate Res.*, **1995**, *277*, 109-123.
- 3) S. Hanessian and Y. Guindon, *Carbohydrate Res.*, **1980**, *86*, C3-C6.
- 4) Y. Ikeda, K. Furukawa, H. Yamada, *Carbohydrate Res.*, **2002**, *337*, 1499-1501.
- 5) R. Beugelmans, J. Chastanet, H. Ginsburg, L. Quintero-Cortes, G. Roussi, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4933-4938.
- 6) Dai, D.; Martin, O, R. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7628-7633.
- 7) a) R. Saijo, G. Nonaka, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2624-2630.
- b) T. Tanaka, G. Nonaka, I. Nishioka, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2075-2078.

4置換レゾルシノール誘導体のメラニン生成抑制効

九州大学農学研究院 森林資源科学部門森林圏環境資源科学講座

清水 邦義、安武 政司、近藤 隆一郎

The color of mammalian skin and hair is determined by a number of factors. The most important factor is the degree and distribution of melanin pigmentation. Melanin synthesis inhibitory compounds are useful not only for the material used in cosmetics as skin-whitening agents but also as a remedy for disturbances in pigmentation. Tyrosinase (phenol oxidase) is known to be a key enzyme for melanin biosynthesis in plants, microorganism and mammalian cells. Therefore, many tyrosinase inhibitors have been tested in cosmetics and pharmaceuticals as a way of preventing overproduction of melanin in epidermal layers. Also, various types of stimulation, including exposure to ultraviolet (UV) radiation, induce lipid peroxidation in the skin, which might in turn cause damage to epidermal cells, leading to postinflammatory hyperpigmentation. Considering the importance of counteracting oxidative stress caused by UV to prevent harmful skin damage, it is important to design the multifunctional skin whitening agent with both antioxidant and anti-tyrosinase abilities.

A novel vitamin E derivative, (6''-hydroxy-2'',5'',7'',8''-tetramethylchroman-2''-yl)methyl 3-(2,4'-dihydroxyphenyl)propionate (TM4R) which has chromanoxyl ring and 4-substituted resorcinol moieties, was synthesized and its inhibitory effect on tyrosinase, antioxidant ability and lightening effect of ultraviolet B (UVB)-induced hyperpigmentation were estimated. TM4R showed potent inhibitory activity on tyrosinase, which is the rate-limiting enzyme in the melanogenesis. The scavenging activities of TM4R on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl radicals were found to be nearly the same as those of α -tocopherol. Furthermore, an efficient lightening effect was observed following topical application of TM4R to UVB-stimulated hyperpigmented dorsal skin of brownish guinea pigs. These results suggest that TM4R may be a candidate for an efficient whitening agent, possibly by inhibiting tyrosinase activity and biological reactions caused by reactive oxygen species.

1. 緒言

紫外線から誘起される色素沈着メカニズムは、多岐に渡っている。少なくとも、紫外線照射における活性酸素種の生成¹⁾、ケラチノサイトでの各種炎症性シグナル物質の産生、それに引き続くメラノサイトの活性化、メラニン生合成酵素であるチロシナーゼなど一連の酵素活性の亢進、さらには、生成したメラニンのケラチノサイトへの受け渡しなどが、色素沈着メカニズムに関与していると考えられる。したがって、色素沈着を抑える物質（美白剤や色素沈着症治療薬）の開発には、上記メカニズムの数段階を抑制する多機能性美白剤のドラッグデザインが有効であろう。

筆者らは、これまでに未だ不明な点の多く残されている熱帯産樹木心材成分に、美白剤原料を求め、パプアニューギニア産樹木であるクワ科の *Artocarpus incisus* (パンノキ) の心材抽出物が強力なチロシナーゼ阻害活性を有することを見出した²⁾。さらに、7種の活性成分を単離、同定した^{2,3)}。これらの活性成分の構造的共通は、Fig. 1のボックス部分で示した4位置換レゾルシノール構造である。さら

に、4位アルキル置換レゾルシノール類が強力なチロシナーゼ阻害効果を有することが知られている^{4,5)}ことから、*A. incisus* より見出された阻害物質の活性発現には、4位置換レゾルシノール構造が大きく関与していると予想した。そこで、本研究ではチロシナーゼ阻害活性に関する上記知見を基に、チロシナーゼ阻害活性とともに、美白剤として求められている主要な生理活性の一つである抗酸化活性を有する多機能性分子の創出及びその美白効果（茶色モルモット背部皮膚を用いた UVB-誘導色素沈着抑制効果）について検討した。

2. 実験⁶⁾

2・1 チロシナーゼ活性測定法

チロシナーゼは、マッシュルーム由来チロシナーゼ [EC

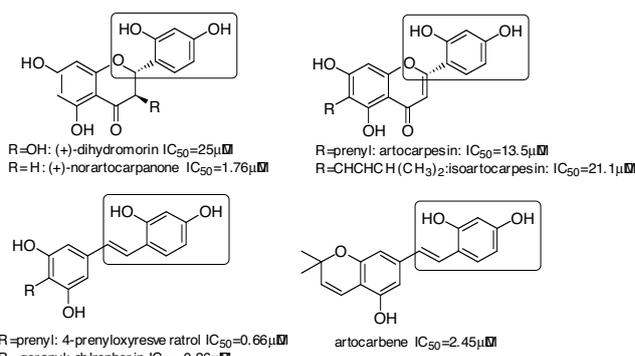


Fig.1 The chemical structures and IC₅₀ of active components from *A. incisus*. The boxed part:4-substituted resorcinol skeleton.(substrate:L-tyrosine)



The inhibitory effects of 4-substituted resorcinol derivatives on melanin biosynthesis

Kuniyoshi Shimizu, Seiji Yasutake, Ryuichiro Kondo *

Laboratory of Systematic Forest and Forest Products Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University

1.14.18.1] (シグマ) を用い、前報に従い、それぞれ基質としてL-チロシン²⁾もしくはDL-DOPA⁷⁾を用いて、反応により生じるドーパクロムの極大吸収波長である475nmの吸光度を測定し、活性を算出した。ポジティブコントロールとしては、強力なチロシナーゼ阻害物質として知られているコウジ酸⁸⁾を用いた。

2・2 ヒドロキシラジカル捕捉活性測定

既報⁹⁾に従い、ESRスピントラッピング法により算出した。

2・3 UV-B 誘導色素沈着抑制活性試験

既報¹⁰⁾に従い、茶色モルモット背部に、UV-Bを照射後の色素沈着を色彩色度計にて評価した。

3. 結果及び考察

Fig. 1に示すように、*A. incisus*の心材抽出物から単離されたチロシナーゼ阻害活性物質の構造を比較することにより、チロシナーゼ阻害活性発現には、ボックスで囲んだ4位置換レゾルシノール構造が活性発現に重要であること

が示唆された。しかしながら、同樹木より単離された化合物であるartocarpin (16)は4位置換レゾルシノール構造をB環に有しているにも関わらず、チロシナーゼ阻害活性を示さなかった (Fig. 2)。したがって、4位置換レゾルシノール構造だけでなく、他の構造的特徴も活性発現に重要な役割を果たしていることが予想された。4位置換レゾルシノール構造に起因したチロシナーゼ阻害活性をベースとした多機能性分子を設計するためには、4位置換側鎖の構造に着目した、詳細な構造活性相関の知見が必要である。まず、Fig.1に示した化合物群がフラボノイド及びビスチルベンに属することから、当該グループに属する25種の化合物に対して、チロシナーゼ阻害活性を検討した (Table 1, Fig. 3)。

5種のスチルベン (21-25) で検討したところ4位置換

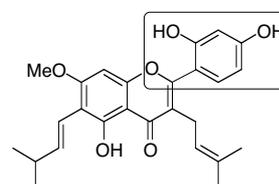


Fig. 2 The chemical structure of artocarpin (16) isolated from *A. incisus*. The boxed part: 4-substituted resorcinol skeleton

Table 1 Inhibitory activity of flavonoids and stilbenes on tyrosinase (substrate: L-tyrosine)

| No. | name | R3 | R5 | R6 | R7 | R2' | R3' | R4' | R5' | (C2, C3) | IC ₅₀ (μ M) |
|-----|--------------------------|----|-----|---------------------------------------|------------------|-----|-----|-----|-----|--------------------|--------------------------------|
| 1 | (±)-flavanone | H | H | H | H | H | H | H | H | 2S, 2R | >200 |
| 2 | (-)-pinoembrin | H | OH | H | OH | H | H | H | H | 2S | >200 |
| 3 | (±)-naringenin | H | OH | H | OH | H | H | OH | H | 2S, 2R | >200 |
| 4 | (+)-aromadendrin | OH | OH | H | OH | H | H | OH | H | (2R, 3R) | lag time decrease ^a |
| 5 | (±)-fustin | OH | H | H | OH | H | OH | OH | H | (2R, 3R), (2S, 3S) | lag time decrease ^a |
| 6 | (±)-taxifolin | OH | OH | H | OH | H | OH | OH | H | (2R, 3R), (2S, 3S) | lag time decrease ^a |
| 7 | (+)-dihydromyricetin | OH | OH | H | OH | H | OH | OH | OH | (2R, 3R) | lag time decrease ^a |
| 8 | (+)-dihydromorin | OH | OH | H | OH | OH | H | OH | H | (2R, 3R) | 25 |
| 9 | (+)-norartocarpinone | H | OH | H | OH | OH | H | OH | H | 2S | 1.76 |
| 10 | flavone | H | H | H | H | H | H | H | H | | >200 |
| 11 | chrysin | OH | OH | H | H | H | H | H | H | | >200 |
| 12 | apigenin | H | OH | H | OH | H | H | OH | H | | >185 |
| 13 | kaempferol | OH | OH | H | OH | H | H | OH | H | | 103 |
| 14 | quercetin | OH | OH | H | OH | H | OH | OH | H | | lag time decrease ^a |
| 15 | myricetin | OH | OH | H | OH | H | OH | OH | OH | | lag time decrease ^a |
| 16 | artocarpin | Pr | OH | CHCHCH(CH ₃) ₂ | OCH ₃ | OH | H | OH | H | | >228 |
| 17 | morin | OH | OH | H | OH | OH | H | OH | H | | >330 |
| 18 | artocarpesin | H | OH | Pr | OH | OH | H | OH | H | | 13.5 |
| 19 | isoartocarpesin | H | OH | CHCHCH(CH ₃) ₂ | OH | OH | H | OH | H | | 21.1 |
| 20 | (-)-angolensin | | | | | | | | | | >200 |
| 21 | pinosylvin | R3 | R4 | R5 | R2' | R4' | | | | | >46 |
| 22 | oxyresveratrol | OH | H | OH | OH | OH | | | | | 0.98 |
| 23 | 4-prenyloxyresveratrol | OH | Pr | OH | OH | OH | | | | | 0.66 |
| 24 | chlorophorin | OH | Ger | OH | OH | OH | | | | | 0.26 |
| 25 | artocarbene ^c | | | | | | | | | | 2.45 |

^a means promotion effect which could act as cofactor like diphenol

^c See Fig. 3.

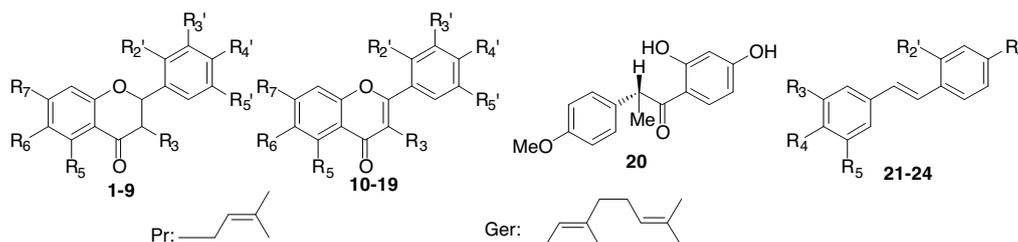


Fig.3 The chemical structures of 1-24

レゾルシノール構造を有する4種のスチルベン類 (22-25) に強力なチロシナーゼ阻害活性が観察されたが4位置換レゾルシノール構造を有さない pinosylvin (21) は、強力な阻害活性を示さなかった。したがって、スチルベンに関しては、4位置換レゾルシノール構造が活性発現に極めて重要であることが示唆された。

続いて、20種のフラボノイド (1-20) について検討した。その結果、B環に4位置換レゾルシノール構造を有する4種のフラボノイドのみ (8, 9, 18 及び 19) に高いチロシナーゼ阻害活性が観察された。しかしながら、16, 17 及び 20 はB環に4位置換レゾルシノール構造を有するにも関わらず、高い阻害活性を示さなかった。これらの結果からフラボノイド類に関しては、4位置換レゾルシノール構造だけでなく、さらに他の構造的特徴が活性発現には、必要であることが示唆された。

4位置換レゾルシノール構造を有するフラバノン及びフラボン型フラボノイドの場合には、3位に置換基を有する場合に、チロシナーゼ阻害活性が激減することが判明した (9 → 8, 18 及び 19 → 16 及び 17)。つまり、Fig. 4 に示すようにB環に4位置換レゾルシノール構造を有したとしても、3位になんらかの側鎖置換基を有する場合には、その立体障害のために、4位置換レゾルシノール構造部分がチロシナーゼに結合できず阻害活性が低減したことが考えられる。

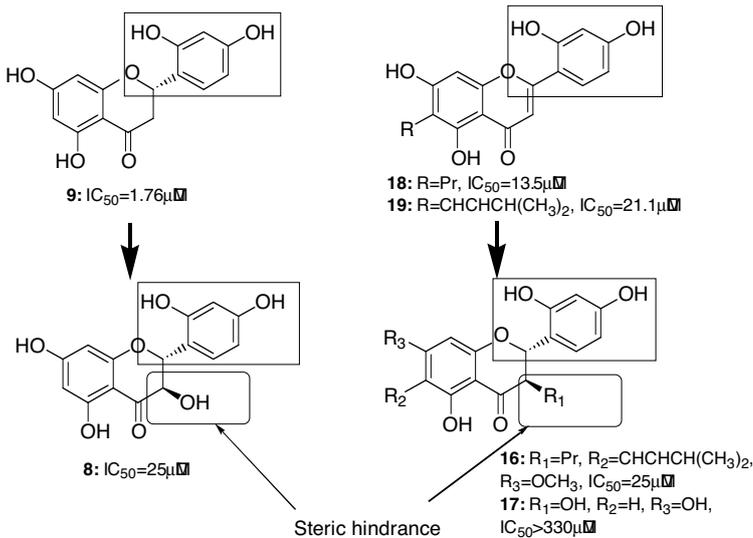
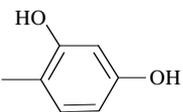
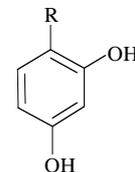


Fig.4 The effect of the introduction of C3 substituent of flavonoids which have 4-substituted resorcinol skeleton tyrosinase (substrate: L-tyrosine)

また、一方、(-)-angolensin (20) (Fig. 3) も4位置換レゾルシノール構造を有するにも関わらず、阻害活性を示さなかった。しかし、上述のような立体障害による活性の低減効果は、考えにくい。したがって、阻害活性低減要因を明らかにするために、4位置換レゾルシノール類の特に側鎖に着目した構造活性相関検討を行った。Table 2 に示すように、4位置換基の構造によって、大きく活性が変動することが判明した。特に、カルボニル基 (26-30) を有する場合、阻害活性が消失した。また、アゾ基 (31, 33) を有する場合にも阻害活性が著しく減少した。カルボニル基及びアゾ基は、両置換基ともに、オルソ位の水酸基と水素結合を形成可能である。この分子内水素結合が存在することによって、活性発現に必須なレゾルシノール部分がチロシナーゼに強固に結合できず、阻害活性が著しく減弱したと考えられる。さらに、側鎖の極性のチロシナーゼ阻害活性に及ぼす影響について検討した。Fig. 5 に示すように、側鎖に水酸基やカルボニル基などの極性基が存在すると活性が弱く、逆に疎水性が高いと強力な阻害活性を示すことが判明した。これらの結果を Fig. 6 にまとめた。これらの知見を基に、筆者らは、4位置換レゾルシノール構造に由来する強力なチロシナーゼ阻害活性を有し、かつ抗酸化活性を有する化合物の設計を試みた。抗酸化活性発現構造として α

Table 2 Inhibitory activity of 4-substituted resorcinols on tyrosinase (substrate: L-tyrosine)

| No. | Substituent (R) | IC ₅₀ (μM) |
|-----|--|-----------------------|
| 26 | CHO | >200 |
| 27 | COCH ₃ | >200 |
| 28 | COOH | >200 |
| 29 | CONHCH ₂ CH ₂ OH | >200 |
| 30 | COC ₆ H ₅ | >200 |
| 31 | N=N-  | 436 |
| 32 | H | 227 |
| 33 | N=N-  | 185 |
| 34 |  | 58.0 |
| 35 | Cl | 13.0 |
| 36 | CH ₃ | 12.0 |
| 37 | CH ₂ C ₆ H ₅ | 2.80 |
| 38 | CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃ | 1.98 |
| 39 | CH ₂ (CH ₂) ₁₀ CH ₃ | 1.63 |
| 40 | CH ₂ CH ₃ | 1.10 |
| 41 | CH ₂ CH ₂ CH ₃ | 0.91 |



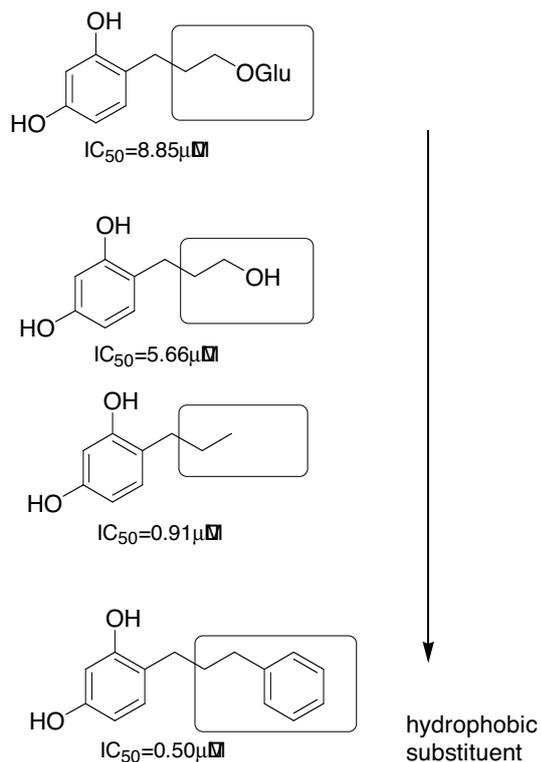


Fig. 5 The chemical structures and IC_{50} of 4-substituted resorcinols. (substrate: L-tyrosine) Glu: glucose moiety.

-tocopherol のラジカル捕捉活性発現部分構造であるクロマノール環に着目し、(6"-hydroxy-2",5",7",8"-tetramethyl chroman- 2"-yl) methyl 3- (2',4'-dihydroxyphenyl) propionate (TM4R) を分子設計・合成した (Fig. 7)。TM4R は、上記のチロシナーゼ阻害に関する構造活性相関検討により、コウジ酸以上の阻害活性が期待され、また、その抗酸化効果も α -tocopherol (ビタミン E)¹¹⁾ に匹敵するものと予想された。そこで、TM4R のチロシナーゼ阻害活性ならびに抗酸化活性を測定した。また、比較のために 2-carboxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-ol (Trolox)、2-hydroxymethyl-2,5,7,8-tetramethyl chroman-6-ol (TM) 及び 3- (2',4'-dihydroxyphenyl) propionic acid (DPPacid) を用いた (Fig. 8)。Table 3 に示すように、4 位置換レゾルシノール構造を有する TM4R 及び DPPacid には高いチロシナーゼ阻害活性が観察されたが、クロマノール環を有する Trolox 及び TM には、阻害活性は観察されなかった。さらに、その阻害機構は、競争型であった (Fig.9)。4 位置換レゾルシノール類によるチロシナーゼの阻害は競争型であることが報告されている^{5,7)} ことから、TM4R の強力なチロシナーゼ阻害活性には、4 位置換レゾルシノール構造が強く関与していることが明らかとなった。また、DPPacid と比較して高い阻害活性が観察されたことから、

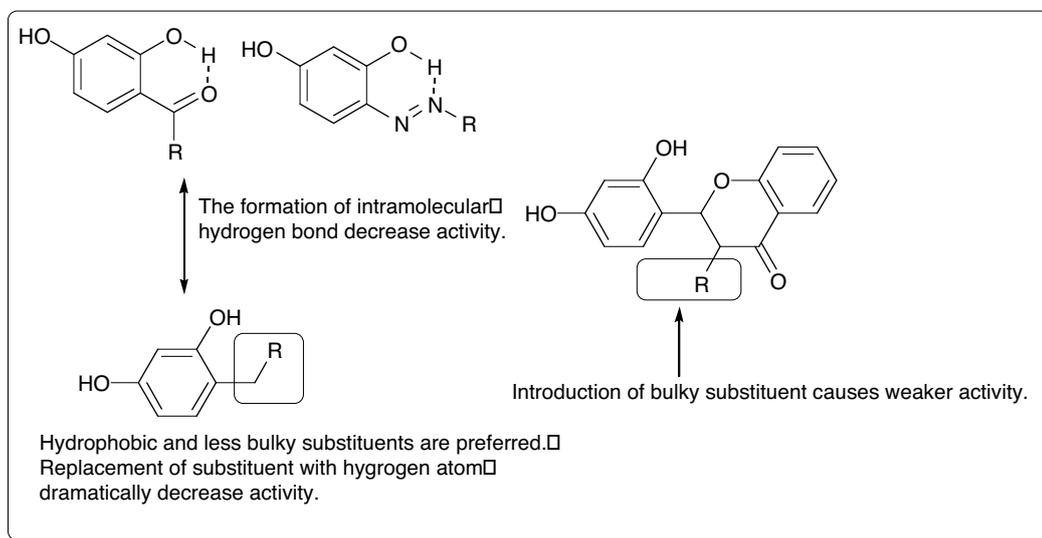


Fig.6 Summarized structure-activity relationship of compounds with 4-substituted resorcinol skeleton

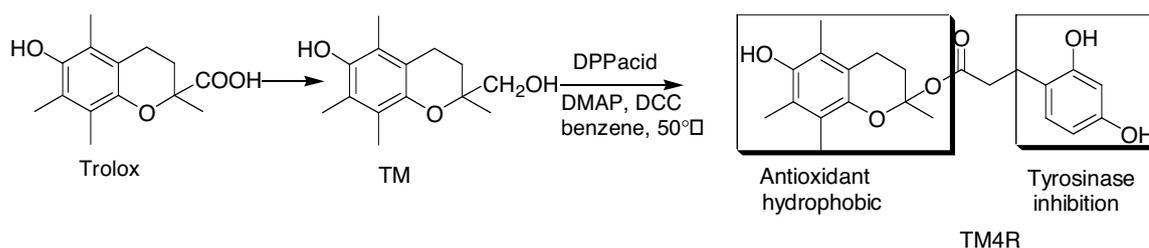


Fig. 7 Structure and synthesis of TM4R

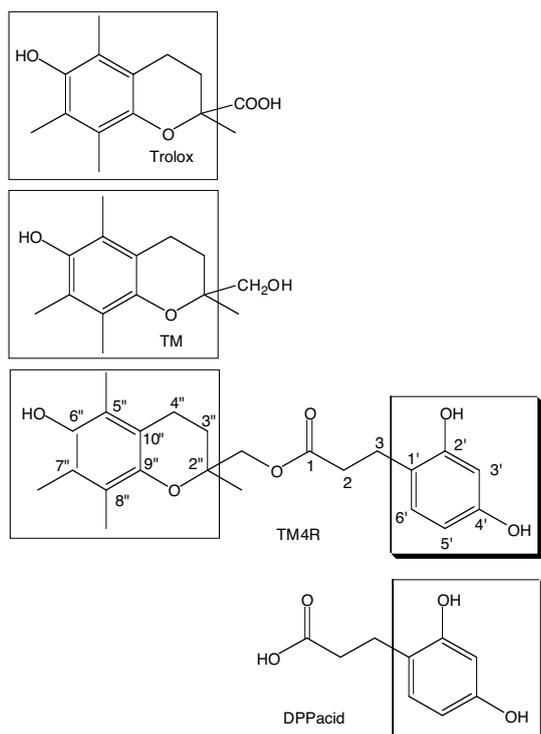


Fig.8 The chemical structures of Trolox, TM, TM4R and DPPacid
 The boxed part with shadow: 4-substituted resorcinol skeleton
 The boxed part without shadow: chromanoxyl ring moiety

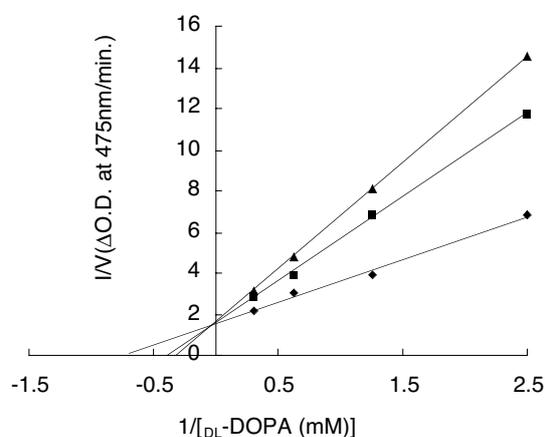


Fig.9 Lineweaver-Burk plots of mushroom tyrosinase and DL -DOPA in the absence or presence of TM4R
 ◆ Control, ■ 1.88 μ M, ▲ 3.75 μ M

Table 3 Effects of Compounds on Mushroom Tyrosinase

| Compound | Substrate | | | |
|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|--------------------|
| | L-Tyrosine | | DL-DOPA | |
| | IC_{50} (μ M) | IC_{50} (μ M) | K_i (μ M) | Type of inhibition |
| TM4R | 0.325 | 23 | 2.74 | Competitive |
| DPPacid | 3.02 | 62 | 11.5 | Competitive |
| TM | >423 | n.d. | n.d. | n.d. |
| Trolox | >400 | n.d. | n.d. | n.d. |
| α -tocopherol | >232 | n.d. | n.d. | n.d. |
| kojic acid | 8.66 ^a | 17 ^a | 11.8 ^a | Mixed ^a |
| arbutin | 306 | 104000 | n.d. | n.d. |

n.d.: Not determined. ^a:Obtained from data of Ref. 7.

クロマン環の疎水性が活性増強にも寄与していることが示唆された。また、Table 4 に示すように、クロマンノール環を有する Trolox、TM 及び TM4R には、強力な抗酸化物質として知られる α -tocopherol と同等の抗酸化活性が観察された。このように TM4R は、強力なチロシナーゼ阻害活性ならびに抗酸化活性を有する多機能性分子であることが確認された。チロシナーゼはメラニン生合成の鍵酵素として知られており、事実、コウジ酸のようなチロシナーゼ阻害剤が、美白剤原料として知られている。一方で、紫

外線による皮膚ダメージならびに脂質過酸化により引き起こされる炎症後の色素沈着も知られている。色素沈着の最大の要因として紫外線照射後の酸化ストレスの関与が報告されている¹⁾。したがって、強力なチロシナーゼ阻害活性ならびに抗酸化活性を有する多機能性分子である TM4R は、紫外線により惹起される色素沈着を効果的に抑制し、かつ皮膚の酸化ストレスダメージを防ぐ機能が期待された。そこで、UV-B により誘導される色素沈着に対する TM4R の効果を検討した (Fig. 10)。TM4R は、市販の美

Table 4 Antioxidant Activity of the Compounds

| Compound | Hydroxyl radical (%) ^a | | DPPH [IC ₅₀ (μ M)] ^b |
|----------------------|-----------------------------------|-------|---|
| | 1.0 mM | 10 mM | |
| TM4R | 91 | 100 | 3.9 |
| TM | n.d. | n.d. | 3.2 |
| Trolox | n.d. | n.d. | 3.3 |
| α -tocopherol | 70 | 93 | 3.9 |
| DPPacid | n.d. | n.d. | No activity at 50 μ M |

n.d.: Not determined.

^aHydroxyl radical scavenging activity was expressed as % inhibition concentration of hydroxyl radicals generated by Fe (II) and H₂O₂ (Fenton reaction).

^bThe IC₅₀ values were calculated from regression lines where the abscissa represented the concentration of tested compound and the ordinate the average percent reduction of DPPH radical from three separate tests.

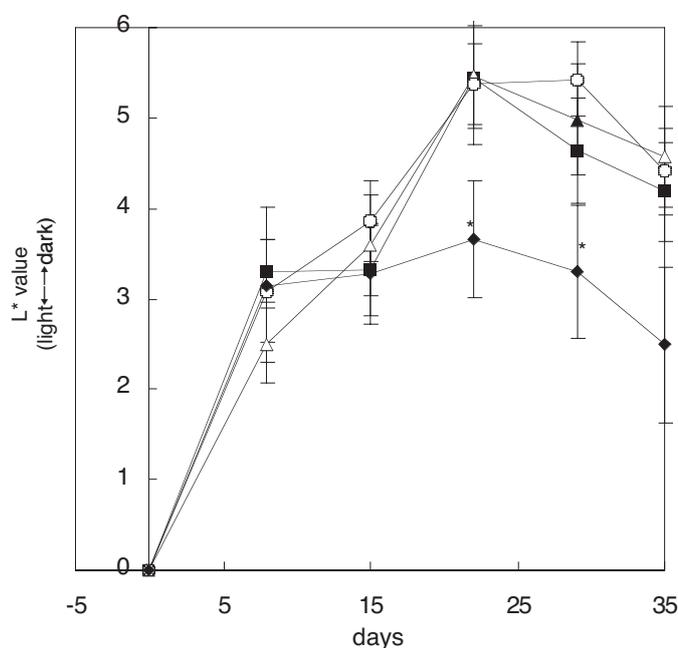


FIG.10 The degree of pigmentation (L* value) before and after daily topical applications (five times per week) of base solution [propylene glycol/ethanol (1/6)](control,○), TM4R (0.25M in base solution,◆), kojic acid (0.25M in base solution,■), or arbutin [0.25M in base solution,▲). The applications were continued for 35 days. Data are expressed as mean L values \pm SEM (n=8). L* value at day 0 are 49.9 \pm 2.7 (control), 48.9 \pm 3.4 (TMR), 50.1 \pm 2.9 (kojic acid) and 49.9 \pm 2.8 (arbutin). Student's t-test was used for the statistical analysis of the data. (* P<0.05, vs control)

白剤原料として知られるコウジ酸やアルブチンと比較して、顕著な色素沈着抑制効果を示した。この色素沈着抑制効果メカニズムには、in vitro の結果を考慮すると、少なくともチロシナーゼ阻害及び酸化ストレス抑制が関与していると考えられる。

4. 総括

A.incisus 樹木心材から強力なチロシナーゼ阻害物質として、分子内に 4 位置換レゾルシノール構造を有する一

連のフラボノイド及びスチルベンを見出した。活性発現には、分子内の 4 位置換レゾルシノール構造が関与していると考え、4 位置換レゾルシノール類の構造活性相関を特に、その側鎖置換基の構造に着目して行い、ある特定の構造的特徴（疎水性・分子内水素結合・立体障害）が阻害活性に大きく影響を与えていることを見出した。さらにその知見を基に、美白剤として求められている主要な生理活性の一つである抗酸化能を分子に付与することを試みた。その結果、抗酸化活性とチロシナーゼ阻害活性を有する多機能

性新規ビタミン E 誘導体 (TM4R: (6"-hydroxy-2",5",7",8"-tetramethylchroman-2"-yl) methyl-3-(2',4'-dihydroxyphenyl) propionate) を合成し、動物実験において、顕著な UV-B 誘導色素沈着抑制効果を有することを見出した。

(引用文献)

- 1) Gilchrest BA, Park HY, Eller MS and Yaar M: Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation, *Photochem. Photobiol.* 63, 1-10, 1996.
- 2) Shimizu K, Kondo R, Sakai K, Lee S.-H. and Sato H: The Inhibitory Components from *Artocarpus incisus* on Melanin Biosynthesis, *Planta Med.*, 64, 408-412, 1998.
- 3) Shimizu K, Kondo R and Sakai K: A Stilbene Derivative from *Artocarpus incisus*., *Phytochemistry* 45, 1297-1298, 1997.
- 4) McEvily AJ, Iyengar R, Gross AT: Inhibition of polyphenol oxidase by phenolic compounds. *ACS Symposium Series.* 506, 318-325, 1992.
- 5) Jimenez M, García-Carmona FJ: 4-Substituted resorcinols (sulfite alternatives) as slow-binding inhibitors of tyrosinase catecholase activity. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2061-2065, 1997.
- 6) Shimizu K, Kondo R, Sakai K, Takeda N, Nagahata T and Oniki T: Novel vitamin E derivative with 4-substituted resorcinol moiety has both antioxidant and tyrosinase inhibitory properties. *Lipids* 36, 1321-1326, 2001.
- 7) Shimizu K, Kondo R, Sakai K: Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: structure-activity investigations. *Planta Med.* 66, 11-15. 2000.
- 8) Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F: Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase, *J. Pharm. Pharmacol.* 46. 982-985, 1994.
- 9) Arroyo CM, Wade JV, Ichimori K and Nakazawa H: The scavenging of hydroxyl radical (\cdot OH) by a prostacyclin analogue, taprostene, *Chem.-Biol. Interact.*, 91,29-38, 1994.
- 10) Yokota T, Nishio H, Kubota Y and Mizoguchi M: The inhibitory effect of grabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation, *Pigment. Cell. Res.*, 11, 355-361, 1998.
- 11) Murase H, Yamauchi R, Kato K, Kunieda T, Terao J: Synthesis of a novel vitamin E derivative, 2-(α -D-glucopyranosyl)methyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-6-ol, by α -glucosidase-catalyzed transglycosylation, *Lipids* 32, 73-78, 1997.

カンキツ精油の有する生体作用の生化学的解析

高知大学 農学部

受 田 浩 之

Citrus peel essential oils are natural flavoring materials of commercial importance. The peel oil from each citrus variety not only adds much of the characteristic aroma and flavor to juice products made from that fruit but also has a physiological activity such as antioxidative action and inhibition of carcinogen formation. In order to elucidate the potential of citrus peel essential oils as a functional biomaterial, in the present investigation, I examined several in vitro biochemical activities of essential oils from 13 kinds of citrus fruits. Although yuzu essential oil did not covalently bind to human serum albumin (HSA), the presence clearly promoted the modification of glucose into HSA. The effect of the essential oil on the Maillard reaction partly resulted from the micro-environmental change around Trp-214 of HSA. The enzyme tyrosinase was significantly inhibited by some essential oils such as Eureka lemon, Lisbon and Kiyookaidai. The comparison of the composition with others suggested the involvement of sabinene, neral, geranial, neryl acetate and geranyl acetate. Interestingly, these essential oils showed the remarkable superoxide anion-scavenging activity. The intensity of those activities showed no significant relationship with DPPH radical-scavenging activity. As the tyrosinase involves in melanin production, the result obtained by the present investigation indicates that some citrus peel essential oils might be applicable to the field of cosmetology.

1 緒 言

カンキツ果皮の最も外側の黄橙色組織には無数の小さい油胞が存在しており、その中にフレーバー成分、すなわち精油が蓄積されている。この精油はカンキツ特有の爽快な香りの源であるが、最近では精油の有する多様な薬理学的作用、生理的・心理的効果が注目を集め、「アロマセラピー」、「アロマコロジー」の中心的な役割を担っている¹⁾。しかしながら、実用面での華やかさとは対照的に、精油の有する多彩な機能の発現メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

一方、最近、生活習慣病や老化の原因として、活性酸素や生体内メイラード反応の関与が指摘されている^{2,3)}。従って、反応性の高い活性酸素の消去作用を有する物質⁴⁾、またメイラード反応の阻害活性を示す物質群⁵⁾が、それらの予防に有効であると期待される。これまでにカンキツ精油には高い抗酸化能が認められていることから⁶⁾、活性酸素に対して消去活性を示す精油成分が存在している可能性は高いと考えられる。また精油成分の中には、タンパク質への高い吸着能を示す成分や、カルボニル基を有する成分も含まれていることから⁷⁾、皮膚や組織のタンパク質をクロスリンクすることで老化へと導いている生体内メイラード反応に対して、阻害効果を発揮することも期待される。

そこで本研究では、カンキツ精油が有する新しい機能として、皮膚や組織の老化、並びに疾病の予防効果を系統的に、かつ成分化学的に追求することを目的として、生体内タンパク質、酵素並びに活性酸素を中心としたフリーラジカルに対する精油成分の作用を詳細に解析することを目的とした。

2 実 験

2.1 実験試料

実験材料として、レモン・ライム類、ブンタン類、ダイダイ類、ユズ類、ミカン類などのカンキツを含む13品種を用いた。各品種名、学術名、並びに略号は以下の通りである：①ユーレカレモン, *Citrus limon* Burm. f., cv Lisbon, EUR, ②トサブタン, *C. grandis* Osbeck forma Tosa-buntan, TOS, ③ナオシチ, *C. taguma-sudachi* Hort. Ex Y. Tanaka, NAO, ④ユズ, *C. junos* Sieb. Ex Tanaka, YUZ, ⑤ケラジ, *C. keraji* Hort. Ex Tanaka, KER, ⑥ダイダイ, *C. aurantium* Linn. Var. *Cyathifera* Y. Tanaka, DAI, ⑦リスボン, *C. limon* Burm. f., cv Lisbon, LIS, ⑧キミカン, *C. flaviculpus* Hort. Ex Tanaka, KIM, ⑨イーチャンレモン, *C. wilsonii* Tanaka, ICH, ⑩キヨオカダイダイ, *C. sp.*, KIY, ⑪カボス, *C. sphaerocarpa* Hort. Ex Tanaka, KAB, ⑫ポンカン, *C. reticulata* Blanco, PON, ⑬モチユ, *C. inflata* Hort. ex Tanaka, MOC. 実験材料は2001年10月から12月に高知県果樹試験場、愛媛県果樹試験場、愛媛県果樹試験場岩城分場、静岡県柑橘試験場、静岡県柑橘試験場伊豆分場、鹿児島県果樹試験場、大分県柑橘試験場津久見分場、広島県工業技術センター果樹研究所、農林水産省果樹試験場興津支場などで収穫したものを、収穫直後に入手した。



Biochemical Analysis of Physiological Activity of Citrus Peel Oil

Hiroyuki Ukeda

Department of Bioresources Science,
Faculty of Agriculture, Kochi University

2.2 カンキツ精油の調製

精油抽出法としては冷圧油 (Cold-pressed oil: CPO) 法を用いた。これはフラベド (外果皮) の油胞中に存在する精油を、フラベドを圧搾して抽出する方法である。この方法は溶媒抽出法などの他の精油抽出法と比較して、最も天然のフレーバー組成に近い精油が得られる方法である⁷⁾。まず果皮を剥皮し、果皮からアルベド (内果皮) を取り除いてフラベドのみとした。フラベドを折り曲げて圧搾し、得られた粗精油を集めて飽和食塩水で塩析後、遠心分離 (4000 rpm×15 min, 4℃) して油層と水層に分離した。上部油層を取り出し、無水硫酸ナトリウムを少量加えて冷蔵庫内 (5℃) で一晩放置した。生じた沈殿及び無水硫酸ナトリウムを除去したものを精油試料とした。

2.3 DPPH ラジカル消去活性

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性の測定は常法⁸⁾を一部変更して行った。すなわち精油試料 10 μL に 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を 900 μL, エタノール 40 μL, 並びに 0.5% (w/w) Tween 20 水溶液 50 μL を添加して十分混和した。ここにエタノールで調製した 0.5mM DPPH 溶液を 1 mL 添加して、暗所、室温にて 30 分間反応させ、DPPH ラジカルの吸収に基づく 517nm の吸光度を測定した。試料の代わりに水を添加した際に観察される吸光度をコントロールとして、試料添加による吸光度の減少を DPPH ラジカル消去能とした。標準物質としては水溶性ビタミン E 誘導体 Trolox を用いた。

2.4 O₂⁻ (スーパーオキシドアニオン) 消去活性

著者の開発した WST-1 アッセイ法を用いた⁹⁾。本法はキサンチンオキシダーゼ (XOD) の反応で生成させた O₂⁻ を WST-1 と試料中の O₂ 消去物質との間で競合させる間接法である。本測定原理に基づいてマイクロプレートでの多検体測定を可能とした SOD assay kit-WST (同仁化学研究所製) を本実験では使用した。WST-1 ホルマザンの生成に基づく 440 nm の吸光度変化はマイクロプレートリーダー (Immuno Mini NJ-2300, ナルジェヌンクインターナショナル製) を用いて測定した。試料の代わりに水を添加した際の吸光度変化を Ac, 試料添加での吸光度変化を As, さらに試料に由来する 440nm の吸光度の影響を除くために XOD 溶液の代わりに緩衝液を添加した際の吸光度 Ab を測定して、阻害率 I (%) を

$$I = [Ac - (As - Ab) / Ac] \times 100$$

で計算した。

2.5 チロシナーゼ阻害活性

Kubo らの方法に従ってチロシナーゼ阻害活性を測定した¹⁰⁾。すなわち 1mL の 2.5 mM L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine)

に 1.8 mL のリン酸塩緩衝液 (0.1 mM, pH6.8) を添加し、25℃で 10 分間インキュベートした。その後、0.1mL の試料溶液、0.1mL のチロシナーゼ溶液 (mushroom 由来, Sigma 製, 138 units) を添加して反応を開始させた。チロシナーゼの活性は dopachrome の生成を 475nm の吸光度変化速度 (dA/min) としてモニターした。試料濃度は終濃度として 167 μg/mL になるように DMSO で希釈した。試料の代わりに DMSO のみを用いた際の吸光度変化速度をコントロールとした。

2.6 メイラード反応に対するユズ精油の影響

0.5M リン酸塩緩衝液 (pH 7.4) を用いてヒト血清アルブミン (HSA: Sigma 製) を 30 mg/mL に調製した。これにユズ精油を 0 または 10 μL/mL になるように添加して 37℃で 3 日間インキュベートした。その後、各溶液にグルコースを 0, 36, 300 mg/mL となるように添加してさらに 15 日間、37℃でインキュベートした。0, 3, 6, 9, 12, 15 日後、それぞれ試料を分取して、MALDI-TOF-MS (Bruker 製 Protein-TOF MALDI-TOF-mass spectrometer) を用いて、各試料の分子量を測定した。なおマトリックスにはシナピン酸を用いた。各試料の分子量はモノマー HSA の分子量分布におけるピークの質量数として表示した。

3 結果

3.1 生体内メイラード反応に対する影響

図1に示すように HSA をグルコースとインキュベートすると、インキュベート時間、及びグルコース添加濃度の増加と共に HSA の分子量が増加した。増加した分子量から考えて、36 mg/mL と 300 mg/mL のグルコース濃度において、それぞれ 15 日間で、4 分子と 22 分子のグルコースが HSA 分子に結合していることが明らかとなった。一方、ユズ精油と HSA をインキュベートしても分子量の

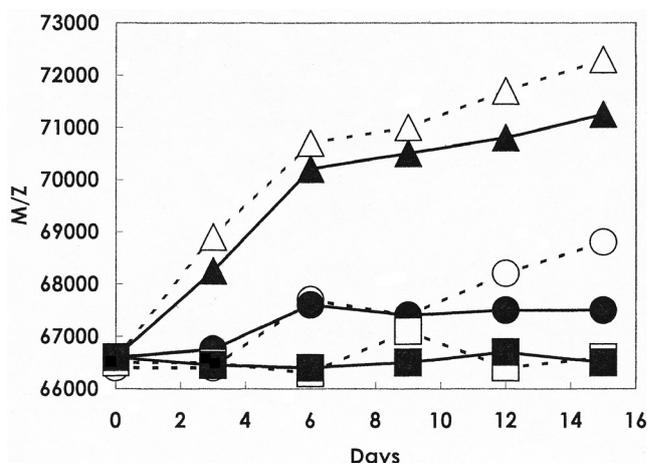


図1 HSA とグルコースのメイラード反応に及ぼすユズ精油の影響
ユズ精油存在下 (破線) 及び無添加 (実線) において、異なる濃度のグルコース (▲, △; 300 mg/ml, ●, ○; 30 mg/ml, ■, □; 0 mg/ml) とインキュベートした HSA の分子 変化

増加傾向は認められず、ユズ精油中の化合物はHSAと共有的に結合しないことが明らかとなった。ユズ精油と15日間インキュベートした反応液を透析後、Shaklaiらの方法に従って励起波長285nm、蛍光波長240nmから480nmの範囲で蛍光スペクトルを測定した¹¹⁾。観測された極大吸収波長はネイティブHSAと比較して約10nm長波長側にシフトしており、トリプトファン残基(Trp-214)の周辺環境がユズ精油の添加により変化していることが明らかとなった。ユズ精油を添加したHSAにグルコースを添加すると、ユズ精油無添加の試料と比べてHSA分子量の増加幅が明らかに大きくなることが観察された。しかしながらグルコースの濃度に依存した分子量の増加傾向は認められず、両条件で共に4~5分子程度の増加であった。3日間ユズ精油とHSAをインキュベートした反応物から、遊離のユズ精油を透析で取り除いてグルコースを添加した場合には、分子量の増加傾向は認められなかった。

3.2 精油のDPPHラジカル消去能

常法に従い種々の精油についてDPPHラジカルの消去活性を測定したところ、反応液に濁りが生じ、通常の分光学的な測定が困難であることが判明した。そこで標準物質としてTroloxを用いて、各精油のラジカル消去活性を目視によりTrolox等価濃度として表示した(表1)。測定に供した13種類のDPPHラジカル消去活性はEUR=YUZ=ICH>TOS=LIS=KIM>NAO=KER=KIYの順であった。

3.3 精油のO₂⁻消去活性

WST-1法を用いてO₂⁻の消去活性を測定した。本法はO₂⁻によるWST-1の還元を阻害する活性として評価するもので、WST-1ホルマザンの生成を440nmの吸光度変化としてモニターする。今回用いた精油試料の中には、カロテノイドに起因すると考えられる強い黄橙色を呈するものが含まれていた。そこで、試料の色に基づく着色の影響を差し引くために、各試料のブランク吸光度(A_b)を測定し、アッセイ溶液の示す吸光度(A_s)との差を求めた。使用した13種類の精油が示したコントロールに対する阻害活性を表1に示した。なおこの表において、阻害率が高い程、O₂⁻の消去能が強いことを示す。消去能は精油の種類に依存して大きな差が認められた。特にKIY, LIS, KAB, KERで消去能は強く、次にKIM, EUR, TOS, NAO, DAIにも活性が認められた。カロテノイド含量と関連があると推測されるA_bの値とO₂⁻消去能との間には相関は認められず、精油中のカロテノイド以外の成分が活性に寄与していることが示唆された。

3.4 精油のチロシナーゼ阻害活性

Kuboらの方法に従い、DOPAからのdopachromeの生成をモニターすることでチロシナーゼの阻害を調べた。各

表1 各種カンキツ精油の示すDPPHラジカル消去能, 及びスーパーオキシドアニオン消去活性

| | DPPHラジカル消去能 | スーパーオキシドアニオン消去活性(阻害率:%) |
|-----|-------------|-------------------------|
| EUR | +++ | 65.5 |
| TOS | ++ | 64.3 |
| NAO | + | 62.9 |
| YUZ | +++ | 21.2 |
| KER | + | 72.2 |
| DAI | --- | 61.5 |
| LIS | ++ | 75.6 |
| KIM | ++ | 67.6 |
| ICH | +++ | 41.5 |
| KIY | + | 96.3 |
| KAB | ± | 72.9 |
| PON | --- | 49.7 |
| MOC | --- | 54.2 |

DPPHラジカル消去能はTrolox等価濃度として表示された。各記号が示す等価濃度: +++, 15mM; ++, 10mM; +, 5mM; ±, 2.5mM; ---, 0mM

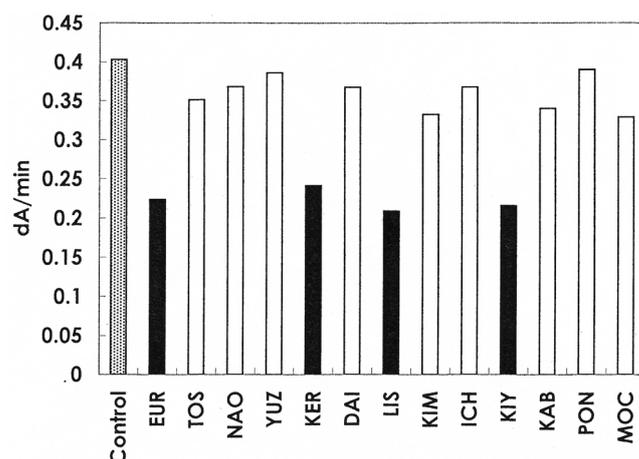


図2 各種カンキツ精油が示すチロシナーゼ阻害活性

精油のチロシナーゼ阻害活性を図2に示す。13種類の精油のうち、LIS, KIY, EUR, KERの4種類の精油で顕著な阻害活性が認められた。

4 考察

生体内メイラード反応は糖尿病合併症の原因であるばかりでなく、アルツハイマー病や動脈硬化症を含めて、様々な生活習慣病や老化の原因であることが知られている。精油成分にはシトラールをはじめ生体内メイラード反応に関与するグルコースと同様に、カルボニル基を有する化合物が多数存在していることから、生体内メイラード反応に対して影響を与える可能性が高いと考えられた。さらにタンパク質のアミノ基に直接作用して、そのタンパク質の機能を変化させる可能性もあると予想された。そこで本研究ではまず、HSAをモデルタンパク質に選び、グルコースと

のメイラード反応を分子量変化でモニターすることにより、精油の生体内メイラード反応に対する影響を調べた。

図1に示したように、ユズ精油はHSAに対するグルコースの修飾を加速させることが明らかとなった。反応の機構については今後の検討課題であるが、蛍光スペクトルによると、ユズ精油の添加がHSAのTrp-214周辺の構造を変化させていることから、精油のHSAへの吸着がその立体構造を変化させ、グルコースに対する反応性に影響を与えたと推察された。透析によって遊離のユズ精油を除去した際には無添加のHSAと差が認められなかったことから、精油成分のHSAに対する作用は可逆的な吸着によるものと推測される。

結果的にユズ精油はメイラード反応の予防効果を示さなかったが、タンパク質の立体構造を変化させ、メイラード反応の進行に影響を与えることが明らかとなった。今後他の精油と様々なタンパク質との相互作用を詳細に調べること、メイラード反応の阻害作用を示す精油を開発することも可能であると考えられる。

次に、精油成分のタンパク質に対する直接的な影響を調べるために、モデルタンパク質として酵素チロシナーゼを用いて、その触媒作用に対する精油の影響を調べた。顕著な阻害活性が認められたLIS, EUR, KIYは他の精油に比べてsabinene, neral, geranial, neryl acetate, geranyl acetateを多く含有している(図3)。このうちneralとgeranialはすでにチロシナーゼのアミノ基とシッフ塩基を形成することでチロシナーゼを阻害することが報告されているが、今回これらの成分を多く含むカンキツ精油においても、チロシナーゼの阻害活性が認められることが初めて明らかとなった。チロシナーゼはメラニン色素の生成に関与していることから、その阻害活性を示すカンキツ精油がメラニンの生成を抑制する可能性もあり今後の実用的な利用が期待される。

メイラード反応と並んで、老化や生活習慣病の大きな要因として活性酸素をはじめとするフリーラジカルの関与が指摘されている。そこで本研究では、カンキツ精油が有する O_2^- とDPPHラジカルに対する消去能を測定した。 O_2^- の消去活性はKER, LIS, KIYに特に強いことが明らかとなった。注目すべきはこれらが同時にチロシナーゼ阻害活性を示している点である。チロシナーゼはDOPAの酸化で O_2^- を生成することが報告されているが、dopachromeの生成に O_2^- は関与していないことから¹²⁾、カンキツ精油が有する O_2^- の消去活性により、見掛け上チロシナーゼ阻害活性が認められたとは考え難い。従って、現時点ではチロシナーゼ阻害に関与していると推察されるsabinene, neral, geranial, neryl acetate, geranyl acetateなどの成分が同時に O_2^- の消去能を有する、あるいは他の成分で O_2^- の消去活性を有する物質が偶然それらのカンキツ精油に含まれて

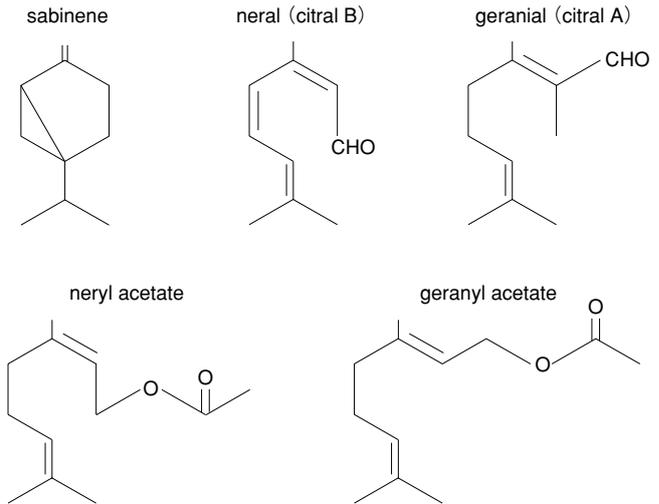


図3 チロシナーゼ阻害に関する精油成分

いる、などいくつかの可能性が考えられる。

一方、DPPHラジカルの消去活性と O_2^- 消去活性、チロシナーゼ阻害活性との間には明確な関連は認められなかった。これまでにChoiらが同様にカンキツ精油のDPPHラジカル消去能について報告しているが⁸⁾、成分的には特にgeraniol, terpinolene, γ -terpineneの寄与が大きいとしている。これらの関与成分は明らかにチロシナーゼの阻害とは異なる物質であり、 O_2^- の消去に関与している物質とも異なるものと推察される。

以上の結果、カンキツ精油はタンパク質、酵素に共有的に、あるいは可逆的に吸着して、それらの分子の生化学的な機能を変化させ得ることが明らかとなった。さらに活性酸素やフリーラジカルの反応性を消去する作用も持ち合わせており、それらの関与成分がお互いに異なる可能性も示唆された。従って、複雑な多成分共存系であるカンキツ精油は複数の生化学的な作用を備えている、言い換えれば多様な機能性スペクトルを示す素材であることが示された。得られた成果の中で、チロシナーゼの阻害活性は美白効につながることから、その実用的な利用に向けて今後詳細な検討を進めていく予定である。

謝辞

本研究をするに当たりご支援をいただきました(株)コスメトロジー研究振興財団、並びにご指導頂きました高知大学農学部・沢村正義教授に感謝申し上げます。

(文献)

- 1) 井上重治：香りの抗菌作用—アロマセラピーへの応用, 化学と生物, 39, 475-481, 2001.
- 2) 受田浩之：酵素スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の活性測定法, Dojin News, 96, 1-6, 2000.

- 3) Ukeda, H., Hasegawa, Y., Ishii, T. and Sawamura, M.: Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by intermediates of Maillard reaction and glycolytic pathway and some sugars, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61, 2039-2042, 1997.
- 4) 森山洋憲, 片山泰幸, 中林錦一, 受田浩之, 沢村正義: 高知県産茶および青物の有するスーパーオキシドアニオン消去能の測定, *食科工*, 49, 679-682, 2002.
- 5) Ukeda, H., Hasegawa, Y., Harada, Y. and Sawamura, M.: Effect of carnosine and related compounds on the inactivation of human Cu,Zn-superoxide dismutase by modification of fructose and glycolaldehyde, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 36-43, 2002.
- 6) Song, H.-S., Ukeda, H. and Sawamura, M.: Antioxidative activities of Citrus peel essential oils and their components against linoleic acid oxidation, *Food Sci. Technol. Res.*, 7, 50-56, 2001.
- 7) Sawamura, M., Song, H.-S., Sagawa, K. and Ukeda, H.: Characteristic aroma components of Tosa-buntan (*Citrus grandis* Osbeck forma Tosa) fruit, *Food Sci. Technol. Res.*, 7, 45-49, 2001.
- 8) Choi, H.-S., Song, H.S., Ukeda, H. and Sawamura, M.: Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4156-4161, 2000.
- 9) Ukeda, H., Kawana, D., Maeda, S. and Sawamura, M.: Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 485-488, 1999.
- 10) Kubo, I. And Kinst-Hori, I.: Tyrosinase inhibitory activity of the olive oil flavor compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4574-4578, 1999.
- 11) Shaklai, N., Garlick, R.I. and Bunn, H.F.: Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function, *J. Biol. Chem.*, 25, 3812-3817, 1984.
- 12) Koga, S., Nakano, M. and Tero-Kubota, S.: Generation of superoxide during the enzymatic action of tyrosinase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 292, 570-575, 1992.

脂質-高分子界面活性剤混合系による新規分散系 “液晶エマルジョン”の形成

京都大学大学院 薬学研究科

中野 実

Aqueous dispersions of lyotropic liquid crystalline phases were prepared by high-pressure emulsification using lipid mixtures, monoolein (MO) and oleic acid (OA), and emulsifier Pluronic F127 with changing their composition. The size and internal structure of the prepared particles were characterized by dynamic light scattering and small-angle X-ray scattering, respectively. In MO/F127/buffer system with 8 wt % F127 to MO, particles with a diameter of ca.180 nm and including bicontinuous cubic phases (cubosomes) were formed. The lipid ratios strongly affected the morphology of the internal structure of the particles. By increasing the weight fraction of OA in the lipid mixtures, the internal structure transformed in the order of bicontinuous cubic-inverted hexagonal-inverted cubic.

^{13}C NMR experiments with paramagnetic shift reagent showed that the signal of carbonyl carbon of oleic- ^{13}C acid mixed in the cubosomes readily shifted to a lower magnetic field by addition of europium ion (Eu^{3+}), indicating high accessibility of the ion into the water channel inside the particles.

The cubosomes were stable in buffer, but collapsed in the presence of serum albumin or plasma. Gel filtration experiments revealed that albumin has the ability to extract MO from cubosomes and subsequently disintegrate the particles.

1. 緒言

脂質分子の多くは水中で自己会合し、ラメラ、逆ヘキサゴナル、逆キュービックなどの多様な集合構造（リオトロピック液晶）を形成する。両連続キュービック、逆ヘキサゴナル液晶などの非ラメラ液晶構造は、生体内で過渡的、部分的に形成され、蛋白質の活性を制御すると考えられており、この構造の特徴と機能についての物理化学的あるいは生化学的関心が持たれている¹⁻³⁾。特に、脂質 monoolein (MO) は、両連続キュービック液晶相を形成する典型的な脂質であり^{4, 5)}、非ラメラ構造研究に多く用いられている。これらの非ラメラ相は水和により形成されるわけであるが、疎水的な相であり、過剰な水の存在下では水相とは相分離して存在する。

一般の疎水性液体（油）を界面活性剤によって水中に乳化できるのと同様に、この水に不溶な液晶相も分散安定化できれば、粒子内部に液晶構造を有する脂質ナノパーティクル（液晶エマルジョン）が得られると考えられる。これはエマルジョン（液体分散系）やサスペンション（固体分散系）、あるいはリポソームなどとは異なる特性を有した、新規微粒子分散系となることが期待される。しかしながら、このような分散微粒子の調製は困難であるとされてきた。それは、微粒子の分散安定化に寄与する界面活性剤が、

同時に液晶構造を壊してしまうためであった。しかし、高分子の界面活性剤はこれらの構造に対する相溶性が低いため、このような微粒子の調製に有効であると考えられる。そこで、本研究では、高分子乳化剤 Pluronic が液晶相との相溶性が低いこと、及び、液晶相の分散微粒化剤として有効であることを実証し、得られた微粒子の構造、機能性を評価した^{6, 7)}。

2. 実験

2.1 微粒子の調製

脂質 monoolein (MO)、oleic acid (OA) の混合物に対し 8 wt% の Pluronic F127 を混合後、脂質濃度が 10 g/L となるようにリン酸緩衝液 (50 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH7) を加え約 80°C で水和した。Vortex ミキサーやホモジナイザーを用いて試料を粗分散させた後、高圧乳化機 (Nanomizer, 吉田機械興業) により 35 MPa、60°C、30 min の条件で分散微粒化を行った。得られた微粒子の粒径は動的光散乱 (DLS) (Photal LPA-3000/3100、大塚電子) により測定した。

2.2 X線小角散乱 (SAXS)

分散後に限外濾過により濃縮した試料、および、分散させていない水和試料を測定用ガラスキャピラリーに封入し測定した。測定は X 線小角散乱装置 (理学電機) を用い、出力 200kV-50mA、波長 1.54 Å、カメラ長 505 mm の条件で行った。回折パターンから非分散試料が形成する液晶相、および、分散微粒子の内部構造を同定した。

2.3 ^{13}C NMR

カルボニル炭素を ^{13}C 標識した OA (^{13}C -OA) を、MO



Formation of the Novel Dispersion System
“Liquid Crystalline Emulsion” with Lipid-
Polymer Surfactant Mixtures

Minoru Nakano

Graduate School of Pharmaceutical
Sciences, Kyoto University

に対し5%混合して微粒子を調製し、濃縮後 ^{13}C NMR測定 (Varian Gemini 300) を行った。常磁性シフト試薬 EuCl_3 添加前後における標識炭素のケミカルシフトの変化を観察し微粒子内部へのイオン透過性を評価した。

2.4 ゲル濾過クロマトグラフィ

調製微粒子をウシ血清アルブミン (BSA) あるいはラット血漿と30minインキュベーション後、アガロースゲルカラムにより微粒子画分とタンパク画分とに分離し、それぞれのタンパク量、脂質濃度を酵素法により定量した。

3. 結果

3.1 非分散試料の液晶相形成

MO/OA/F127/buffer 混合非分散試料 (lipids/buffer = 10g/L, F127/lipids = 0 および8wt%) は、液晶相の形成を示す明瞭な SAXS パターンを与えた。Figure 1に MO:OA がそれぞれ10:0、5:5、0:10における SAXS プロファイルを示す。10:0では、F127が存在しない場合、6次までの回折((110), (111), (200), (211), (220), (221/300))が観察され、 $Pn3m$ 型の両連続キュービック相が形成されていることが判明した。8% F127の存在下では(110), (200), (211), (310), (222), (321)の回折より $Im3m$ 型の両連続キュービック相であることが判明した。一方、5:5においては、F127の有無によらず同一の回折パターン((10), (11), (20))が得られ、逆へキサゴナル(H_{II})相の形成が確認された。また、0:10においても、回折パターンはF127によって変化せず、(111), (220), (311), (222), (400), (331)の回折ピークから、 $Fd3m$ 型の逆ミセルキュービック相が形成されていることが判明した。

3.2 液晶相を有する分散微粒子の調製

高圧乳化法により微粒子の調製を行い、その粒径と内部構造をそれぞれDLS、SAXSにより評価した。F127を全脂質の8wt%とし、脂質混合比(MO:OA)を変えて微粒子を調製した。その結果、粒径はOAの割合の増加により、いったん減少し、その後増加するという傾向を示した(Figure 2)。このようにして調製した微粒子の SAXS プロファイルを Figure 3に示す。OAの無い場合(MO:OA = 10:0)、両連続キュービック液晶相を有する微粒子、キュボソームの形成が明らかになった。この際、 $Pn3m$ の明瞭な第1、第2ピークと、より小角側に $Im3m$ の第1ピークが出現し、2種類の両連続キュービック構造の共存が示唆された。9:1から6:4においては、不明瞭ながら $Im3m$ の回折ピークが観察された。この範囲においては、OAの増加によりピークが小角側に移動する傾向が見られた。5:5から2:8においては H_{II} 構造を示唆する回折パターンが得られ、逆へキサゴナル液晶相を有する微粒子、へキサソームの形成が明らかになった。1:9および

0:10では、 $Fd3m$ の回折パターンが得られ、逆ミセルキュービック相を内部に有する微粒子の形成が確認できた。 H_{II} および $Fd3m$ 構造の組成範囲では、OAの増加によりピークが広角側に移動した。またこの範囲においてはF127濃度を増加させると粒子径は減少したが、回折パターンは変化せず、内部構造がF127濃度によって変化していないことが判明した。

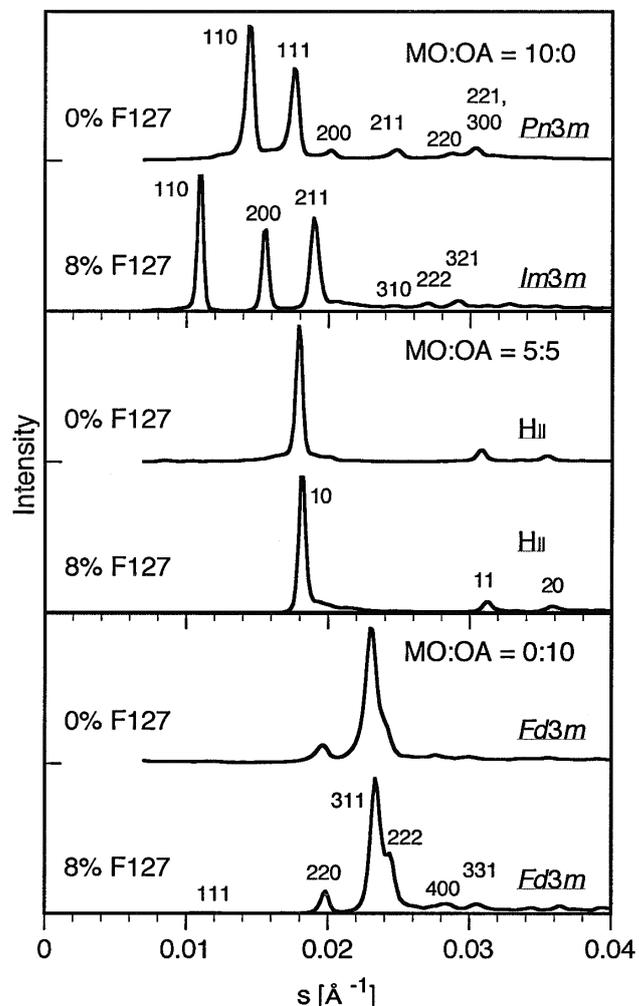


Figure 1 SAXS profiles of nondispersed MO/OA mixtures in phosphate buffered saline with different weight ratios in the presence and absence of F127.

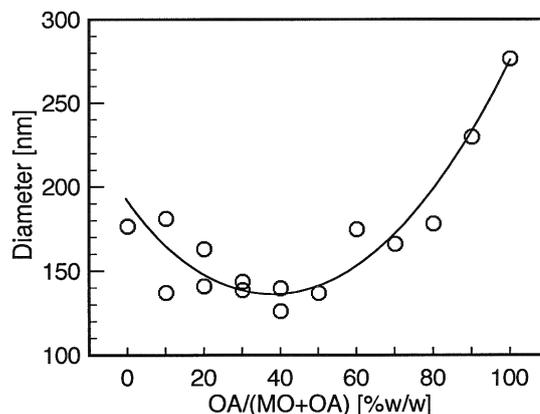


Figure 2 Mean diameter of particles prepared in MO/OA/F127/buffer system with 8% F127 and different MO/OA ratios.

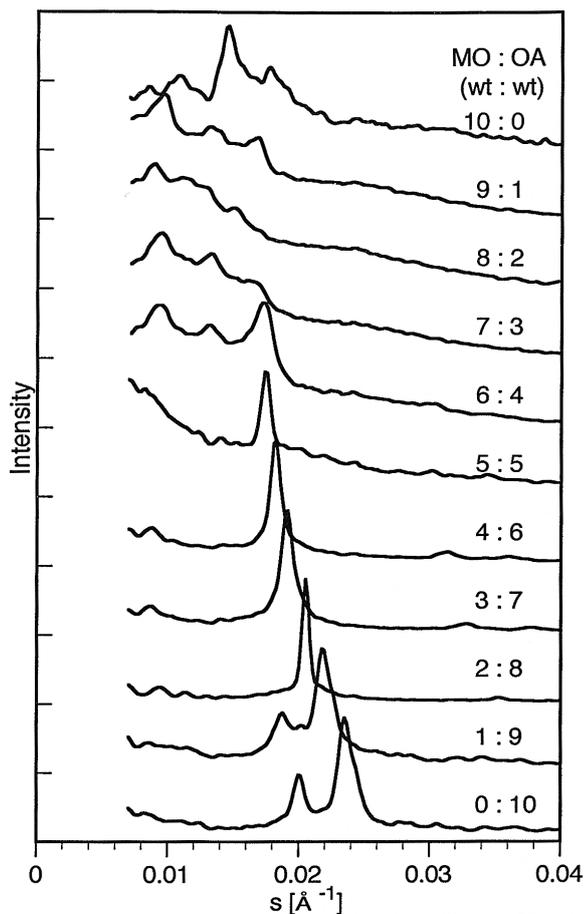


Figure 3 SAXS profiles of MO/OA/F127/ buffer dispersed system with 8% F127 and different MO/OA ratios.

3.3 キュボソーム内部へのイオン透過性

^{13}C -OA を 5% 含むキュボソームを調製し、濃縮後 ^{13}C NMR 測定を行った。低磁場領域に 2 本のピーク (176, 179ppm) が観察され、それぞれ MO、OA カルボニル炭素と帰属された (Figure 4 下)。このうち、カチオンと相互作用しうる OA カルボニルの方に注目すると、シフト試薬である Eu^{3+} 添加後、ピークは速やかに低磁場シフトし、元の位置にはシグナルが観察されなかったことから、微粒子内部の全ての OA が外部から添加された Eu^{3+} の影響を受けたことが判明した (Figure 4 中、上)。OA は微粒子内部に分布していることから、イオンは微粒子内部に容易に浸入できることが明らかになった。

3.4 キュボソームと血清アルブミン及び血漿との相互作用

キュボソームを BSA あるいはラット血漿と 30min インキュベーション後、ゲル濾過クロマトグラフィにより微粒子画分とタンパク画分とに分離した。その結果、微粒子画分における MO 濃度の低下、およびタンパク画分の MO 濃度の上昇が観察され、逆に、微粒子画分にはアルブミンは検出されなかった。このことから、キュボソーム中の

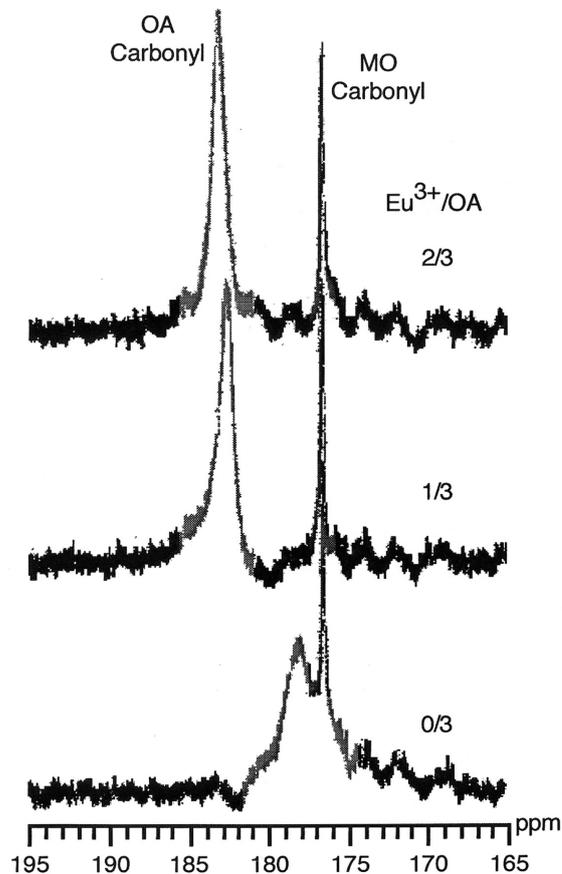


Figure 4 ^{13}C NMR spectra of MO/ ^{13}C -OA/F127/buffer dispersed system with 8% F127 and 5% ^{13}C -OA before and after addition of shift reagent (Eu^{3+}).

MO がアルブミンによって引き抜かれることが判明した。また、血漿とのインキュベーションによって MO は引き抜きに続いて加水分解を受けることも判明した。

4. 考察

4.1 非分散試料の液晶相形成と Pluronic F127 の効果

脂質は水中で疎水性相互作用によって会合し、種々の液晶相を形成する。その会合様式は分子の持つ親水、疎水基の大きさのバランスによって決まる。例えば、レシチンは曲率の無いラメラ相を形成するが、MO はやや負の自発曲率を有し、両連続キュービック液晶相を形成する。両連続キュービック相は水相、脂質相それぞれが連続相である立方晶であり、脂質二分子膜によって隔てられた水のチューブが規則正しく三次元的に繋がった構造をしている。3 種類の両連続キュービック相 Q^{224} (Figure 5 (a))、 Q^{229} (Figure 5 (b))、 Q^{230} が知られており、それぞれ $Pn3m$ 、 $Im3m$ 、 $Ia3d$ の回折パターンを与える²⁾。OA は MO と同じアシル鎖を有するが親水基が小さいため、膜に負の曲率を誘起する⁸⁾。従って、MO に OA を添加すると両連続キュービックから、逆ヘキサゴナル、逆ミセルキュービックへと相が転移する (Figure 1)。Figure 5 にはこれらの相

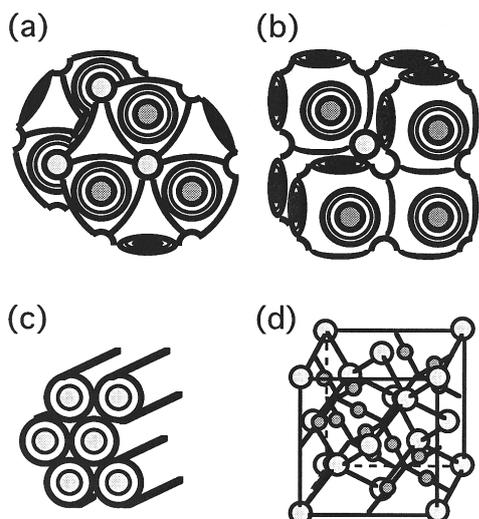


Figure 5 Schematic representation of nonlamellar liquid crystalline phases. (a) Bicontinuous cubic phase of $Pn3m$, (b) $Im3m$, (c) inverted hexagonal phase, and (d) inverted micellar cubic phase of $Fd3m$.

の模式図を示した。逆ミセルキュービック相は両連続キュービック相とは異なり、不連続 (discrete) 型のキュービック相であり、大小2種類の球状逆ミセルが配列し面心立方晶を形成していると考えられている⁹⁻¹¹⁾。脂質の種類や混合組成を変えることで膜の曲率を変化させ、これらの非ラメラ相を形成させることが出来る。

F127の添加により、両連続キュービック相の場合のみ相変化が生じた。これらのことから、F127は $Pn3m$ 相に対しては混合して $Im3m$ 相へと変化させるが、 H_{II} 相および $Fd3m$ 相に対してはほとんど相互作用しないことが明らかとなった。このことはこれらの液晶相の分散を行う上で重要な知見を与える。水に溶解しないこれらの液晶相を分散させるためには、用いる分散剤 (乳化剤) として、比較的親水性の高い界面活性剤が要求される。しかしそれらは高い正の自発曲率を持っているため、液晶相とよく混ざり合うならば膜の曲率を大きく変化させてしまう。低分子の界面活性剤ではその傾向が強いのにに対し、高分子界面活性剤では脂質との相溶性が低いため¹²⁾、分散剤として有効であると考えられる。実際に、F127は、 H_{II} 相および $Fd3m$ 相に対する相溶性は非常に低く、また $Pn3m$ 相に対してはある程度の相溶性はあるものの別の両連続キュービック構造 ($Im3m$) を保っているため、分散に用いることが出来ると結論づけられた。

4.2 液晶相を有する分散微粒子の調製

F127を用いて高压乳化法を行った結果、MO/OA混合物が形成する液晶相を保持した微粒子 (液晶エマルジョン) が得られることが判明した。OAの割合の増加により、微粒子内部の構造が、両連続キュービック (キューボソーム)

から、 H_{II} (ヘキサソーム)、そして $Fd3m$ へと変化した。これは、OAが膜に負の曲率を与えるためである。しかし、OAが低濃度 (脂質の40%以下) においては、OAの増加によりピークが小角側に移動する傾向が見られた。これは、低濃度においてはOAの解離度が高く、膜に正の曲率を与えるためと考えられる。この範囲における、OAの増加による粒径の減少も、OAの解離によって親水性が高まるためと解釈できる。逆に、OAが高濃度であれば疎水性が増加し、粒径は増加する (Figure 2)。

OAが高濃度 (脂質の50%以上) においては、F127濃度によって微粒子の内部構造は変化しなかった。これは上述のように、F127は H_{II} 相および $Fd3m$ 相に対する相溶性が非常に低いために、微粒子の分散安定性のみを寄与し、内部構造に影響を与えないことを表している。

4.3 キューボソーム内部へのイオン透過性

リン脂質リポソームの場合、イオンの膜透過性は非常に低いことが知られており、このことは³¹P NMRにおいてシフト試薬の添加によってピークのスプリットが観察されることから確認できる。これは、リポソーム外葉のリン脂質のみがカチオンであるシフト試薬と相互作用しケミカルシフトの変化が生じるのに対し、内葉のリン脂質はシフト試薬の影響を受けないためである¹³⁻¹⁵⁾。

キューボソームにも同様の手法を適用し、イオンの粒子内部への透過性を評価した。この際、微粒子の構成脂質であるMOは電荷を持たず、シフト試薬によるケミカルシフトの変化が起らないので、5%の¹³C-OAを導入し、OAカルボニルピークの変化を観察した。その結果、ピークは完全にシフトしたことから、シフト試薬が容易に粒子内部に浸透したことが判明した。イオンは微粒子表面のF127の層を透過した後、内部キュービック相の水のチャンネルを自由に移動するものと考えられる。このことから、水溶性物質を微粒子に封入するのは困難であることが示唆された。

4.4 キューボソームと血清アルブミン及び血漿との相互作用

微粒子のDDSへの応用を考える上で、血漿タンパク質との相互作用を明らかにする必要がある。その中でも血清アルブミンはMOやOAと結合することが知られており^{16, 17)}、この微粒子の代謝挙動を左右する可能性がある。実際、微粒子中のMOは血清アルブミンや血漿により速やかに微粒子外へ引き抜かれることがゲル濾過クロマトグラフィにより明らかとなった。このことはこの微粒子が血中において急速に崩壊することを示しており、微粒子からの薬物のsustained releaseを想定するとこの特性は不利であると考えられる。しかしながら、調製、保存時には安定でありながら、血中投与後速やかに薬物が放出されるという

メカニズムは、場合によっては一つの投与形態として有効であると考えられる。

今後、キューボソーム、ヘキサソームの液晶担持微粒子としての特性を最大限に生かすためには、血漿タンパク質による構成脂質の引き抜きという微粒子崩壊メカニズムを回避させなければならない。そのためには、微粒子の構成脂質を変える必要がある。脂肪酸やモノグリセリドはアルブミンに対して高い親和性を有するが、二本鎖の脂質は結合しないので、ジグリセリドやリン脂質などを加えることでこの崩壊メカニズムを軽減あるいは回避できると考えられる。液晶構造を維持したまま脂質組成をどこまで変化させられるかがこれからの課題である。

5. 総括

高分子界面活性剤を用いることで、液晶エマルジョンの調製、すなわち液晶構造を維持したまま安定に分散微粒子化することが可能となった。微粒子の薬物キャリアとしての性能を考えると、水溶性物質に関してはその保持は困難であることが示唆されたが、疎水性あるいは膜結合性のある物質は、微粒子内部の広大な脂質-水界面を利用してトラップすることができると考えられる。血中での微粒子の早い崩壊挙動を改善すれば、液晶としての性質を生かした新規 DDS の構築が可能であると考えられる。

References

- 1) Mariani P, Luzzati V, Delacroix H: Cubic phases of lipid-containing systems, *J. Mol. Biol.*, 204, 165-189, 1988.
- 2) Lindblom G, Rilfors L: Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids - possible biological relevance, *Biochim. Biophys. Acta*, 988, 221-256, 1989.
- 3) Seddon JM: Structure of the inverted hexagonal (H_{II}) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids, *Biochim. Biophys. Acta*, 1031, 1-69, 1990.
- 4) Hyde ST, Andersson S, Ericsson B et al.: A cubic structure consisting of a lipid bilayer forming an infinite periodic minimum surface of the gyroid type in the glyceromonooleate-water system, *Z. Kristallogr.*, 168, 213-219, 1984.
- 5) Qiu H, Caffrey M: The phase diagram of the monoolein/water system: metastability and equilibrium aspects, *Biomaterials*, 21, 223-234, 2000.
- 6) Nakano M, Sugita A, Matsuoka H et al.: Small-angle X-ray scattering and ¹³C NMR investigation on the internal structure of "cubosomes", *Langmuir*, 17, 3917-3922, 2001.
- 7) Nakano M, Teshigawara T, Sugita A et al.: Dispersions of liquid crystalline phases of the monoolein/oleic acid/Pluronic F127 system, *Langmuir*, 18, in press, 2002.
- 8) Borne J, Nylander T, Khan A: Phase Behavior and Aggregate Formation for the Aqueous Monoolein System Mixed with Sodium Oleate and Oleic Acid, *Langmuir*, 17, 7742-7751, 2001.
- 9) Luzzati V, Vargas R, Gulik A et al.: Lipid polymorphism: a correction. The structure of the cubic phase of extinction symbol Fd $\bar{3}$ consists of two types of disjointed reverse micelles embedded in a three-dimensional hydrocarbon matrix, *Biochemistry*, 31, 279-285, 1992.
- 10) Luzzati V, Vargas R, Mariani P et al.: Cubic phases of lipid-containing systems. Elements of a theory and biological connotations, *J. Mol. Biol.*, 229, 540-551, 1993.
- 11) Cribier S, Gulik A, Fellmann P: Cubic phases of lipid-containing systems. A translational diffusion study by fluorescence recovery after photobleaching, *J. Mol. Biol.* 229, 517-525, 1993.
- 12) Kunieda H, Uddin MH, Furukawa, H et al.: Phase behavior of a mixture of poly (oxyethylene) -Poly (dimethylsiloxane) copolymer and nonionic surfactant in water, *Macromolecules*, 34, 9093-9099, 2001.
- 13) Barsukov LI, Victorov AV, Vasilenko IA et al.: Investigation of the inside-outside distribution, intermembrane exchange and transbilayer movement of phospholipids in sonicated vesicles by shift reagent NMR, *Biochim. Biophys. Acta.*, 598, 153-168, 1980.
- 14) Ivanov NN, Rykov SV, Isakova OL et al.: Estimation of liposome integrity by ¹H-NMR spectroscopy, *Anal. Biochem.*, 147, 280-284, 1985.
- 15) Saito H, Nishiwaki K, Handa T et al.: Comparative study of fluorescence anisotropy in surface monolayers of emulsions and bilayers of vesicles, *Langmuir*, 11, 3742-3747, 1995.
- 16) Hamilton JA, Era S, Bhamidipati SP et al.: Locations of the three primary binding sites for long-chain fatty acids on bovine serum albumin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2051-2054, 1991.
- 17) Thumser AEA, Buckland AG, Wilton DC, Monoacylglycerol binding to human serum albumin: Evidence that monooleoylglycerol binds at the dansylsarcosine site, *J. Lipid Res.*, 39, 1033-1038, 1998.

光で透過制御可能な人工ベシクルを形成する新規多鎖型両親媒性化合物の開発

大阪大学大学院 工学研究科分子化学専攻

中 辻 洋 司

In order to develop novel type of artificial vesicles which can regulate the release ability of entrapped substances by light, four cinnamic acid-derived amphiphiles **1-4** were prepared, and their photoreactivity and aggregation behavior in the solution, the aqueous dispersion, and the DPPC (L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine) bilayer matrix were examined. Although 4-hexadecyloxy-cinnamic acid (**3**) was converted to the *syn* head to head dimer in the DPPC bilayer matrix by irradiation at above 280 nm light with formation of *cis* isomer, the corresponding 3-bromo-4-hexadecyloxy-cinnamic acid (**4**) dimerized without formation of the *cis* isomer. The release of entrapped glucose from the vesicle composed of a 1:1 mixture of cinnamic acid-derived amphiphile **1** (or **2**) and DPPC was suppressed by irradiation at above 280 nm light and the extent of suppression was much larger in the case of **2**. The formation of *cis* isomer accelerated the leakage of the entrapped glucose. In addition, the release of entrapped glucose from the vesicle containing **2** was accelerated by irradiation at 254 nm, which can convert the dimer to the monomer.

1. 緒 言

生体膜の構成成分であるホスファチジルコリン等のリン脂質は水中で分散させるとベシクルと呼ばれる小胞体を形成する。このベシクルは二分子膜によって外水相から隔てられた内水相をもつためその中に水溶性物質を保持させることができ、マイクロカプセルとしての利用が考えられる。そのため、ドラッグデリバリーシステムの構築など特に医療分野で注目されている。一方、化粧品素材としても既に利用されているが、リン脂質のみからなるベシクルでは、水溶性物質の容物としての機能を果たしているにすぎず、その利用は自ずと限定される。従って、この機能に加えて内包物の透過速度を自在に制御することができればさらに利用範囲が拡大され、新しい化粧品素材の開発に大きな可能性を提供するものと期待される。

最近、著者らは、スチリルピラジン型両親媒性化合物が光により単量体と二量体間を可逆的に変換できること、さらに当該化合物とジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)で調製した混合ベシクルでは、光制御により内包物の完全な抑制—促進が行えることを見いだした¹⁻⁴⁾。このような光応答性を示す機能性分子は数多く知られており⁵⁾、それぞれ固有の機能を示すことが期待されるので、さらなる高性能化を指向して新しい構造を有する両親媒性化合物を開発することは極めて重要な課題といえる。その一つに桂皮酸誘導体があるが、光反応に関する研究⁶⁻⁸⁾も

古くから行われており、*cis-trans*異性化の他に、[2+2]付加環化(以下、光二量化と呼ぶ)することが知られている。固体状態での光反応はその結晶構造に依存した光反応生成物を与えるが、溶液中の光反応においては*cis-trans*異性化が優先的に進行する。また最近では、桂皮酸誘導体をミセルやLB膜中に導入することで分子間の配向を変化させ、光反応生成物を制御する研究が盛んに行われている⁹⁻¹³⁾。

そこで本研究では、光により自在に内包物の透過制御ができる新規な人工ベシクルの構築を目的として、光応答部位に桂皮酸ユニットをもつ二鎖型リン脂質類縁体(**1, 2**)並びに対応する一鎖型類縁体(**3, 4**)を新たに設計合成し、その光反応性、会合状態、並びに光による内包物の透過制御について検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 合成

市販の3-bromo-4-methoxybenzaldehyde (**7**)から二鎖型桂皮酸系両親媒性化合物(**2**)の合成方法をScheme 1に示す。化合物**1**は同様の方法により合成した。

2.1.1 化合物**8**の合成

ナスフラスコに、**7** (5.00 g, 23.3 mmol)、マロン酸 (4.84 g, 46.5 mmol)、ピリジン 10 mL、ピペリジン 4 滴を入れ、100°Cで24時間加熱した。反応終了後、氷 20 g—濃塩酸 20 mL中に投入した。析出した固体をろ別し、水洗後乾燥した。さらにこの固体をクロロホルムで洗浄し、メタノールから再結晶して白色固体を得た。収量 4.5 g (74%)。

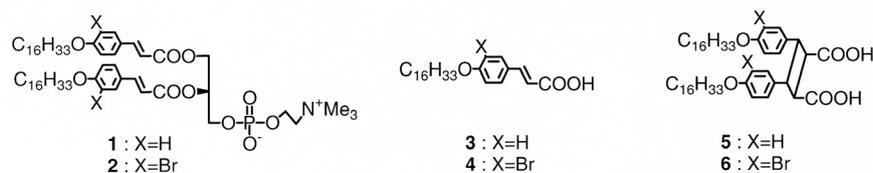
¹H-NMR (400MHz, d₆-acetone) : δ 7.91 (d, 1H, $J=2.2$ Hz, aromatic), 7.67 (dd, 1H, $J= 8.4, 2.2$ Hz, aromatic), 7.58 (d, 1H, $J= 16.1$ Hz, CH=CH), 7.14 (d, 1H, $J= 8.4$ Hz, aromatic), 6.45 (d, 1H, $J= 16.1$ Hz, CH=CH), 3.95 (s, 3H, ArOCH₃).



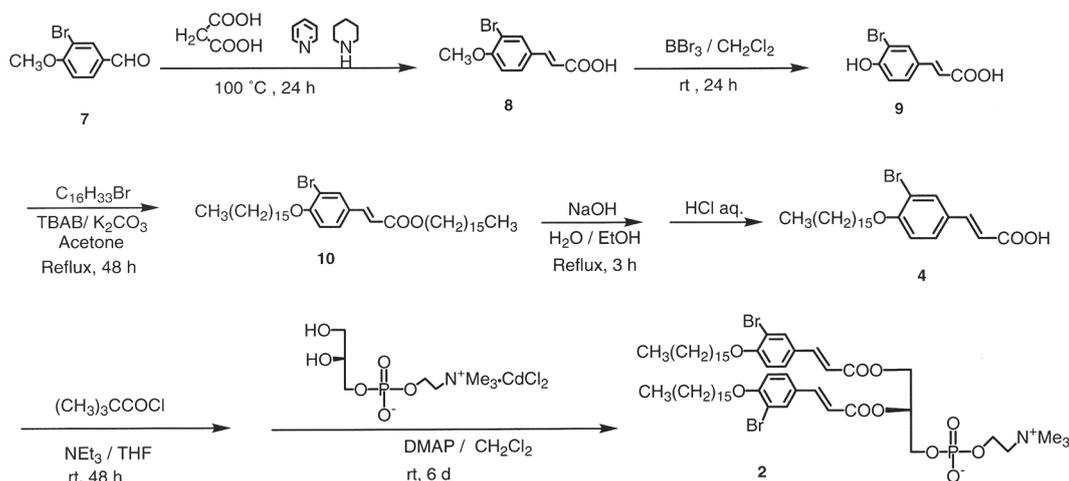
Development of Novel Amphiphilic Compounds with Multiple Hydrophilic Groups Forming Artificial Photoresponsive Vesicles

Yohji Nakatsuji

Department of Molecular Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University



構造式



Scheme 1

Anal. Found: H, 3.42; C, 46.43; Br, 30.97. Calcd. for $C_{10}H_9BrO_3$: H, 3.53; C, 46.72; Br, 31.08.

2.1.2 化合物 9 の合成

化合物 8 (2.34 g, 9.1mmol) を二口ナスフラスコに入れ、Ar 置換を行った後、ジクロロメタン 18mL を反応容器へ加えた。そこへ三臭化ホウ素 (0.1M ジクロロメタン溶液) (18mL, 18mmol) を加えた。室温で 24 時間反応後、反応溶液に水 10mL を加え三臭化ホウ素を失活した後、さらに水 40mL を加えて酢酸エチル (100mL×2) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水 (100mL×3) で洗浄後、NaOH 水溶液 (100mL) で有機層を抽出した。この水層を塩酸水溶液で酸性にした後、水層を酢酸エチル (100mL×2) にて抽出した。無水硫酸マグネシウムで脱水した後、溶媒を完全に留去し淡黄色固体を得た。

収量 1.97 g (収率 89%)

1H -NMR (400 MHz, d_6 -acetone) : δ 7.85 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, aromatic), 7.59-7.50 (m, 2H, $CH=CH$, aromatic), 7.05 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, aromatic), 6.39 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, $CH=CH$).

2.1.3 化合物 10 の合成

化合物 9 (1.30g, 5.35mmol)、臭化セチル (6.53g, 21.4 mmol)、炭酸カリウム (5.90g, 42.8mmol)、触媒量の tetrabutylammonium bromide (TBAB) を二口ナスフラスコに入れ、Ar 置換を行った。この反応容器にアセトン 20

mL を Ar バブリングしながら加えた後、48 時間加熱還流した。放冷後、析出した固体をろ別して白色固体を得た。

収量 3.29g (収率 89%)

mp 140-141 °C .

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.75 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, aromatic), 7.56 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, $CH=CH$), 7.41 (dd, 1H, $J = 8.4, 2.2$ Hz, aromatic), 6.87 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, aromatic), 6.31 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, $CH=CH$), 4.19 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, $ArCOOCH_2R$), 4.06 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, $ArOCH_2R$), 1.85 (m, 2H), 1.75-1.21 (m, 54H), 0.89 (t, 6H, $J = 6.8$ Hz).

Anal. Found : H, 10.24; C, 70.79; Br, 11.68. Calcd. for $C_{41}H_{71}BrO_3$: H, 10.34; C, 71.17; Br, 11.55.

2.1.4 化合物 4 の合成

ナスフラスコに化合物 10 (3.30 g, 4.77 mmol) を入れ、2.5 N 水酸化ナトリウム水溶液 4 mL、エタノール 8 mL を加えて、3 時間加熱還流した。放冷後、析出した固体をメンブランフィルターで吸引ろ過し、水 (4 mL) とエタノール (4 mL) で洗浄した (白色固体 2.2 g / 収率 94%)。得られた固体 0.40 g に 10% 塩酸 (100 mL) を加えて、クロロホルム (100 mL×3) により抽出を行った。この有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を留去した (白色固体)。

収量 0.32 g (収率 84%)

mp 50-51 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 4/1$): δ 7.73 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, aromatic), 7.42-7.34 (m, 2H, aromatic, $\text{CH}=\text{CH}$), 6.85 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, aromatic), 6.57 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$), 4.03 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, ArOCH_2R), 1.82 (m, 2H, $\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{R}$), 1.51-1.16 (m, 26H), 0.89 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz).

2.1.5 化合物 2 の合成

二口反応管に化合物 4 (ナトリウム塩) (49 mg, 0.10 mmol) を入れて Ar 置換を行い、トリエチルアミン (90 μL , 0.64 mmol)、THF 4 mL を加えた。これを -78°C に冷却してトリメチルアセチルクロライド (40 μL , 0.32 mmol) をゆっくり加えた。その後室温に戻し、さらに 48 時間攪拌した。溶媒を留去して得られた白色固体に、 L - α -グリセロホスファチジルコリン (GPC) (13 mg, 0.03 mmol)、ジメチルアミノピリジン (DMAP) (13 mg, 0.10 mmol) を加え、Ar 置換を行い、ジクロロメタン 4 mL を加えて室温で 6 日間攪拌した。溶媒を留去して得られた淡黄色固体を CHCl_3 に溶解し、陽イオン交換樹脂 DOWEX-50W を詰めたカラム (展開溶媒: CHCl_3) を通すことにより Cd を除去し、トリエチルアミンを数滴加えて攪拌した後、溶媒を留去した。次に、シリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}=7/3/0 \rightarrow 65/25/4$) を行い、白色固体を得た。

収率 17 mg (収率 50%)

FAB-MASS (m/z , %) : 1156 ($[M^+ + 1]$, 7), 184 (100). $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): δ 7.57 (m, 2H, aromatic), 7.40 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.27 (m, 2H, aromatic), 6.72 (m, 2H, aromatic), 6.15 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.24 (m, 1H), 4.38 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 4.10 (m, 2H), 3.98 (m, 2H), 3.89 (m, 4H), 3.43 (m, 2H), 3.05 (s, 9H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 1.73-1.07 (m, 56H), 0.71 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz).

Anal. Found: H, 8.09; C, 57.39; N, 1.27; Br, 12.84. Calcd. for $\text{C}_{58}\text{H}_{94}\text{Br}_2\text{NO}_{10}\text{P} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: H, 8.33; C, 57.56; N, 1.16; Br, 13.20.

2.2 DPPC 二分子膜中における化合物 3, 4 の光反応

Pyrex 製試験管に、両親媒性化合物 10 μmol (3 : 3.89 mg, 4 : 4.67 mg)、DPPC 10 μmol (7.34 mg) を入れ、クロロホルムを加えて溶解した。ロータリーエバポレータで溶媒を留去した後、デシケーター内で一晚減圧乾燥させ、試験管内壁に薄膜を形成させた。ここに、超純水 2.0 mL を加え、 80°C の水浴中で加温し、振とう、膨潤によって、試験管内壁から剥離させた後、 80°C の水浴中で、25 W プローブ型ソニケーターを用いて、5 分間断続的 (10 秒 ON、10 秒 OFF の繰り返し) に超音波照射した。放冷後、この分散液に超純水 4.0 mL を加えて、6.0 mL とし、こ

の分散液を 9 つに分取した。それぞれの分散液は Ar バブリングを行い空気を除去した後、Xe 灯光 (波長 >280 nm) で所定時間照射した。光照射後、 $^1\text{H-NMR}$ により光反応生成物の同定を行った。

2.3 化合物 1, 2/DPPC 混合ベシクルにおける内包物流出実験

化合物 10 μmol (1 : 9.98 mg, 2 : 11.56 mg)、DPPC 10 μmol (7.34 mg) を Pyrex 製の試験管に入れ、クロロホルムを加えて溶解した。ロータリーエバポレータで溶媒を留去した後、デシケーター内で一晚減圧乾燥させ、試験管内壁に薄膜を形成させた。ここに、グルコース水溶液 (20 mM Tris-HCl Buffer, 300 mM グルコース, pH7.5) 2.0 mL を加え、 80°C の水浴中で加温し、振とう、膨潤によって、試験管内壁から剥離させた後、 80°C の水浴中で、25 W プローブ型ソニケーターを用いて、5 分間断続的 (10 秒 ON、10 秒 OFF の繰り返し) に超音波照射した。3 時間後、分散液を 2 分し、一方に Ar 置換を行い、波長 >280 nm の光を 1 時間照射した。2 つのベシクル分散液は、そのまま一晚静置した。その後、各分散液 1 mL を、バッファー水溶液 (20 mM Tris-HCl Buffer, 300 mM スクロース, pH 7.5) を溶離液として、ゲル濾過 (Sephadex G-50, 2 g, 15×100 mm) し、ベシクルフラクション 3.0 mL を集めた。このベシクル分散液を 25°C の恒温槽中で静置し、所定時間ごとにサンプリングして相対蛍光強度の測定を行った。流出性の測定は酵素法を用いて行った¹⁴⁾。

3. 結果と考察

3.1 一鎖型桂皮酸系両親媒性化合物 3, 4 の光反応性

化合物 3, 4 ともにジクロロメタン均一溶液系で光照射 >280 nm) すると、*cis* 体への異性化が優先するが、水分散系では対応する β 二量体 5, 6 をそれぞれ選択的に与える。化合物 3 の構造で、ヘキサデシル基をメチル基に置き換えた誘導体では水分散系で光二量化は進行しないが、長鎖誘導体により光二量化が起こることは興味深い。3-プロモ置換体ではメチル基でも光二量化が優先する。化合物 3, 4 単独系ではベシクルを形成しないことがわかったので、化合物 3, 4 と DPPC の 1:1 混合ベシクルを調製し、カルボキシフルオレセインを内包物とする取り込み実験を行い、ベシクルを形成していることを確認した。この混合ベシクルの光反応の結果を Fig. 1 に示す。興味深いことに、化合物 3 では光二量体に加えて *cis* 体の生成が観測されたのに対して、プロモ置換基をもつ化合物 4 では *cis* 体を形成することなく対応する光二量体を与えていることがわかった。

3.2 二鎖型桂皮酸系両親媒性化合物 1, 2 の光反応性

クロロホルム均一溶液中では、UV スペクトルから化合

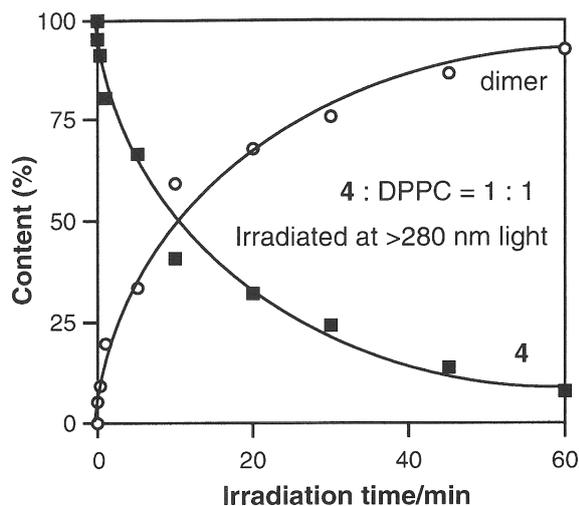
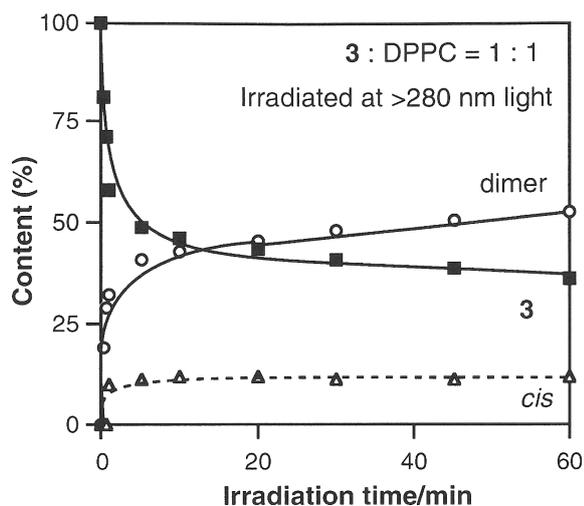


Fig.1

物 **1**, **2** ともに二量化反応の進行が示唆されたが、¹HNMR からいずれも二量体に加えて *cis* 体が生成していることを確認した。各生成物を GPC 並びに MALDI-TOF MASS を用いて分析したところ、GPC ではともに原料よりも遅い保持時間にピークが観測され、また MALDI-TOF MASS でも、ともに分子内二量化反応生成物の分子イオンピークしか観測されなかった。一方、水分散系では、UV スペクトルから化合物 **1**, **2** ともに二量化反応が進行していることが示唆されたが、溶液中とは異なり両化合物で顕著な違いが見られた。化合物 **2** では光照射直後に UV スペクトルにおいて短波長側へのシフトが起こった。これは *cis* 体の生成が考えられる。一方、化合物 **2** ではそのような変化はなく、また光照射とともに極大吸収波長 (295nm) のピークが単量体の濃度に換算して二次速度式に従って減少し、定量的に光二量化反応が進行していることがわかった。化合物 **1** ではこの速度式に当てはめて直線関係が得られないことから *cis* 体の生成が支持される。光を 1 時間照射したサンプルを GPC により分析したところ、いずれも原料よりも保持時間の早いピークが観測され、分子間二量化反応が起こっていることがわかった。MALDI-TOF MASS でも分子間二量体の存在を確認した。同様の光照射実験を DPPC との 1:1 混合ベシクルを用いて行った。この場合には水分散系と同様に、化合物 **1** では *cis* 体の生成が認められたが、化合物 **2** では *cis* 体の生成は認められなかった。

以上の結果から、二鎖型両親媒性化合物 **1**, **2** は溶液中においては分子内光二量化反応と *cis* 体への異性化が進行すること、また水分散系においては分子間二量化反応も進行し、特に化合物 **2** では *cis* 体への異性化が殆ど起こらないという興味深い知見を得た。

3.3 二鎖型桂皮酸系両親媒性化合物 **1**, **2**/DPPC 混合

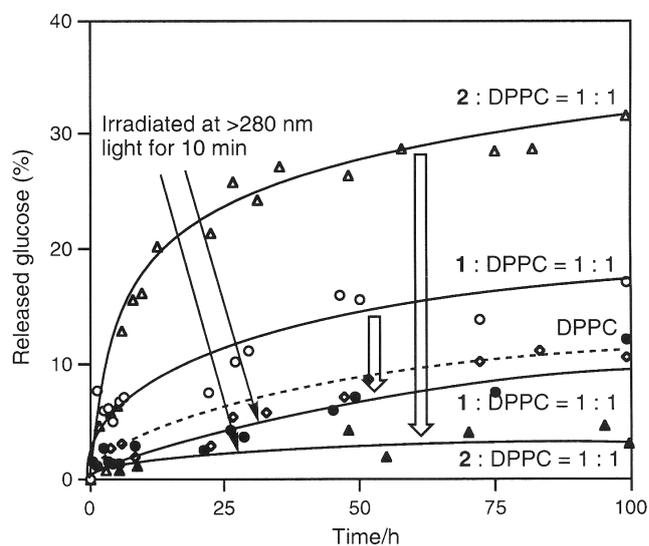


Fig.2

ベシクルの内包物流出性

化合物 **1** あるいは **2**/DPPC 混合ベシクルからのグルコースの流出実験の結果を Fig. 2 に示す。**2**/DPPC 混合ベシクルは **1**/DPPC 混合ベシクルに比べ流出性が大きいことがわかった。しかし、光を照射することで、**2**/DPPC 混合ベシクルは流出の少ない安定なベシクルを形成することが示された。この光照射による流出性の変化は、光照射により DPPC 二分子膜中で桂皮酸ユニットが二量化して膜がタイトになることによると考えられるが、その二量化反応が分子内よりも分子間で進行することで膜がよりタイトになっていることがわかった。**2**/DPPC 混合ベシクルは、光照射による流出性抑制の効果が大きいことから、分子間での反応が **1**/DPPC 混合ベシクルに比べて進行しやすいことが考えられる。また光反応の結果から明らかになったように **1** での *cis* 体への異性化もこの結果に影響していると思われる。

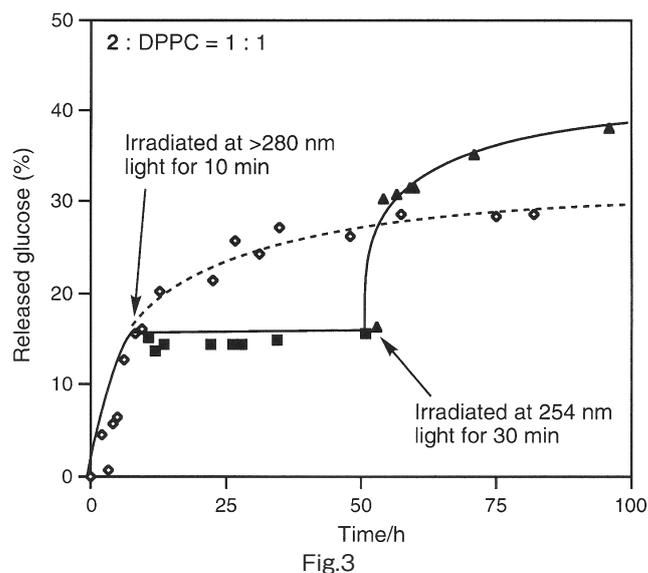
二鎖型桂皮酸系両親媒性化合物が分子間で光二量化し、膜の高分子化が期待できること、またプロモ基を導入することで光照射による流出性の変化が大きいことから、次に、異なる波長の光照射による 2/DPPC 混合ベシクル膜からの内包物の流出制御実験を行った。その結果を Fig. 3 に示す。2/DPPC 混合ベシクルに波長 >280 nm の光を照射することで流出が抑制されるが、この混合ベシクルに波長 254 nm の光を照射すると流出の促進が認められた。このことから、異なる波長の光照射による内包物の流出制御が可能ながことが明らかとなった。

4. 総括

本研究では、桂皮酸ユニットを有する両親媒性化合物の光反応性と二分子膜挙動について検討した。水分散系における光反応性を調べたところ、一鎖型桂皮酸系両親媒性化合物 3, 4 ではほぼ定量的に二量化反応が進行することがわかった。一方、DPPC 二分子膜中では、Br 基を導入した 4 は *cis* 異性化を伴わずに二量化反応だけが進行するが、3 では *cis* 異性化を伴うことが明らかになった。*cis* 体の生成は膜の安定化に不利なことから、Br 基を導入した化合物は、DPPC との混合ベシクルにおける内包物流出制御に適した化合物であることが示唆された。次に、二鎖型桂皮酸系両親媒性化合物であるホスファチジルコリン誘導体 1, 2 の光反応性と二分子膜挙動について検討した。溶液中では、どちらの化合物も二量化反応と *cis* 異性化がともに進行することが確認された。水分散系での光反応では Br 基を導入した化合物 2 が *cis* 体への異性化を伴わずに二量化反応のみが進行していることがわかった。これらのホスファチジルコリン誘導体 1, 2 と DPPC との混合ベシクルからの内包物の流出性を検討したところ、Br 基の導入により流出性が増加すること、また光照射による流出性抑制の効果が大きいことがわかった。Br 基を導入した化合物 2 と DPPC との混合ベシクルの内包物流出制御を検討したところ、波長 >280 nm の光照射により流出の抑制、波長 254 nm の光照射により流出の促進が観測され、異なる波長の光照射による内包物の流出制御に成功した。

(参考文献)

- 1) J. Park, W. Zhang, Y. Nakatsuji ほか 2 名, *Chem. Lett.*, **1999**, 1309.
- 2) J. Park, W. Zhang, Y. Nakatsuji ほか 2 名, *Chem. Lett.*, **2000**, 182.
- 3) J. Park, S. Aoyama, W. Zhang ほか 2 名, *Chem. Commun.*, (3), 231-232 (2000).
- 4) J. Park, S. Aoyama, W. Zhang ほか 2 名, *J. Jpn. Oil*



Chem. Soc., **49**, (3), 271-274 (2000).

- 5) D. G. Whitten, *Acc. Chem. Res.*, **26**, 502 (1993).
- 6) P. Venugopalan, T. Bharati, and K. Venkatesan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1991**, 981-987.
- 7) M. D'Auria, and A. Vantaggi, *Tetrahedron*, **1992**, **48**, 2523-2528.
- 8) D. Stewart, G. W. Robertson, and I. M. Morrison, *Rapid Communication Mass Spectrometry*, **1992**, **6**, 46-53.
- 9) T. Nakamura, K. Takagi, M. Itoh ほか 4 名, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1997**, 2751-2755.
- 10) M. Yamamoto, N. Furuyama, and K. Itoh, *J. Phys. Chem.*, **1996**, **100**, 18483-18490.
- 11) T. Imae, T. Tsubota, H. Okumura ほか 4 名, *J. Phys. Chem.*, **1995**, **99**, 6046-6053.
- 12) H. Koch, A. Laschewsky, H. Ringsdorf ほか 1 名, *Makromol. Chem.*, **1986**, **187**, 1843-1853.
- 13) M. Sugimoto, K. Shibahara, K. Kuroda ほか 3 名, *Langmuir*, **1996**, **12**, 2785-2790.
- 14) I. Miwa, J. Okuda, K. Maeda ほか 1 名, *Clin. Chim. Acta*, **37**, 538 (1972).

Ⅱ. 生体作用、安全性に関する分野

ヒト皮膚における遊離脂肪酸の動態に及ぼす皮膚常在細菌ならびに化粧品の影響に関する研究

東京薬科大学 薬学部

小 谷 明

Free fatty acids (FFAs) in skin surface lipids function as a barrier to diseases caused by bacteria and keep the surface acidity constant. In this study FFAs in human skin surface lipids were determined by HPLC with electrochemical detection (HPLC-ECD). The electrochemical detection of FFAs was based on electrochemical reduction of quinone, 2-methyl-1,4-naphthoquinone (vitamin K₃, VK₃) in unbuffered solution. The HPLC-ECD system was composed of a mobile phase of acetonitrile-ethanol (80:20), an ODS column, a sample injector, 6 mmol/L VK₃ solution containing 76 mmol/L LiClO₄ which was mixed with eluate, and an electrochemical detector.

The peak heights for lauric, myristic, palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic, linolenic, and arachidonic acids at a detection potential of -415 mV vs. a saturated calomel electrode (SCE) showed a linear relation to acid amounts in the range of 50-1600 pmol. FFAs from about 1 mg of skin surface lipids absorbed on oil absorbing paper 5 mm x 5 mm in size were extracted with 200 μ L of ethanol-acetonitrile (20:80) to prepare the test solution, of which 20 μ L was injected on the ODS column. This method requires small sample amounts and the procedure is quite simple without derivatization of FFAs, leading to a considerable reduction in analysis time. Since the lipid sample size was very small for the analysis by the method, it is easy to investigate the distribution of FFAs on a human face or scalp. Determination of FFAs in skin surface lipids at 50 points on the head of a male volunteer was carried out and FFA distribution on his face and scalp was mapped out. It has become apparent that oleic, linoleic, and palmitoleic acids are distributed at relatively high concentrations on the forehead and nose, and that steric acid mainly distributed on the cheeks.

The sampling using a piece of oil absorbing paper can be applied to a human subject with skin trouble, as well as men and women of all ages. Furthermore, it is possible to determine the amounts of FFAs on human skin at pathological sites such as acne. Thus, the present method should be very useful in the cosmetic and clinical fields.

1. 緒 言

ヒトの皮膚表面は皮表脂質（以下、皮脂と略す）という薄い脂肪膜で覆われている。皮脂中の遊離脂肪酸は、皮膚常在細菌のリパーゼによるトリグリセリドの加水分解によって生成される¹⁾。皮脂には、種々の遊離脂肪酸が含まれ、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸には抗白癬菌作用が、ラウリン酸、オレイン酸には表皮ブドウ球菌の発育抑制作用があるといわれている²⁻⁴⁾。また、肌のテカリや化粧崩れの原因にはパルミチン酸、オレイン酸が、尋常性ざ瘡（にきび）には起炎性を示す遊離脂肪酸が関与するといわれている⁵⁾。従来、ヒト皮脂中の遊離脂肪酸の分離定量については、ガスクロマトグラフィーや蛍光検出 HPLC が利用されているが、いずれも遊離脂肪酸の誘導体化を行った上で分析を行っており、そのためある程度多量の試料量を確保する必要があった。従って、皮脂の採取方法ではカップ法をはじめとする種々の方法が用いられた⁶⁾。これらの方法は、採取時間が長かったり、特別な大がかりな装置を

必要としたり、アセトンやヘキサンなどの有機溶媒を使用するため⁷⁾ 被験者に対し大きな負担を課するなど多くの欠点があった。

我々は過塩素酸リチウムを含む 2-methyl-1,4-naphthoquinone (ビタミン K₃, VK₃) の非緩衝溶液であるエタノール溶液に脂肪酸が存在すると、ボルタモグラム上にキノンの還元前置波が現れ、この波高 (i_H) が酸の濃度に比例することを明らかにした (図 1)。さらに、この原理を利用した電気化学検出 - 高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を作製し、これにより、植物油⁸⁾、血漿⁹⁾ 中に含まれる遊離脂肪酸の高感度定量が可能であることを報告した。

本研究では、この HPLC-ECD を応用して、ヒト皮脂中の遊離脂肪酸の動態を解析できる分離定量法を確立し、頭部 50 箇所 of 皮脂中の遊離脂肪酸の分布とその組成を明らかにした¹⁰⁾。さらに、本法を利用して、皮脂中の遊離脂肪酸の量の変動および組成を測定し、皮脂の分泌を抑制する美容液や洗顔料の使用による影響を検討した。

2. 実 験

2・1 HPLC-ECD および測定条件

装置の概略図を図 2 に示す。電気化学検出器は、作用電極にグラッシーカーボン、参照電極に飽和カロメル電極 (SCE)、対極にステンレススチールを用いた三電極法の電気化学セルおよびポテンシオスタットを用いた。カラムには、市販の ODS カラム LiChrospher 100 RP-18



Effect of Indigenous Bacterium and Cosmetics on the Kinetics of Free Fatty Acids in Skin Surface Lipids

Akira Kotani

School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

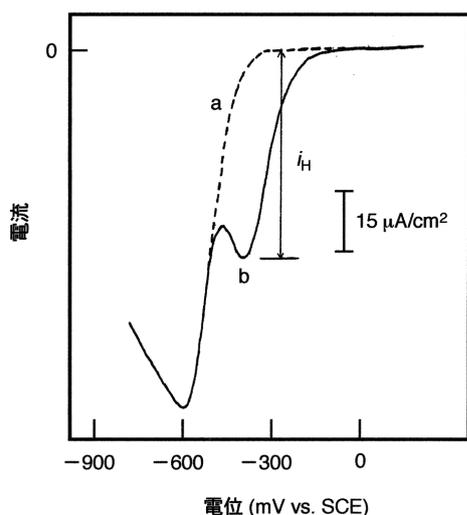


図1 ビタミン K₃ (3.0 mmol/L) のボルタモグラム

(a), 0 mmol/L ; (b), 3.2 mmol/L パルミチン酸を含む。
測定条件：測定溶液, 38 mmol/L LiClO₄ のエタノール溶液；
作用電極, グラッシーカーボン；参照電極, 飽和カロメル電
極 (SCE)；対極, 白金線；走査速度, 5 mV/s.

(250 mm × 4.0 mm i.d., 5 μm), 移動相にはアセトニトリル -
エタノールの混合溶媒 (80:20), キノン溶液には 6 mmol/L
VK₃ と 76 mmol/L の過塩素酸リチウムを含むアセトニ
トリル - エタノールの混合溶媒 (80:20) とした。流速 1.1
mL/min, 検出電位は, -415 mV vs. SCE とした。

2・2 皮脂の採取方法および試料溶液の調製方法

健康な男性 7 人 (21-25 歳), 女性 5 人 (21-23 歳) を
被験者とした。頭髪および顔面を石鹼を用いて洗った後,
被検部位への化粧および激しい運動による発汗を避け, 約
4 時間後に皮脂採取部位に油取り紙 (麻 100%, マックス
ファクター) を 30 秒間押し付けて, 皮脂を吸着させて採
取した。油取り紙の大きさは 5 mm × 5 mm とした。

皮脂を採取した油取り紙をマイクロチューブに入れ,
50 μmol/L のマルガリン酸 (C17:0, 内標準物質) を含む
アセトニトリル - エタノールの混合溶媒 (80:20) を加え,
30 秒間攪拌して遊離脂肪酸を抽出し, 試料溶液とした。
このうち 20 μL を HPLC に注入し, クロマトグラムを得た。

2・3 美容液および洗顔料の使用による皮脂中遊離脂肪酸量・組成の比較

健康な男性 (26 歳) を被験者とし, 顔を石鹼で洗顔の後,
テカリやにきびの予防が同時にできるジェル状美容液 (植
物物語素肌力, ライオン) を塗布, または余分な皮脂を吸
着する洗顔料 (レシピオ, コーサー) で洗顔した。美容液
や洗顔料を使用した箇所と使用していない箇所から経時的
に皮脂を 2・2 の方法で採取して, HPLC-ECD で皮脂中
の遊離脂肪酸量および組成の変化を追跡した。

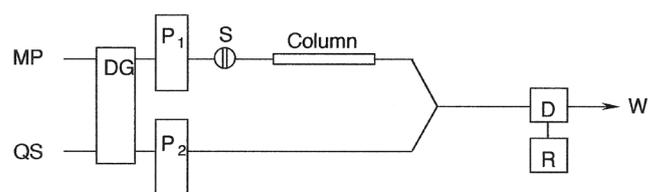


図2 HPLC の流路図: MP, 移動相:アセトニトリル - エタノール
混合溶媒 (80:20, v/v) ; QS, キノン溶液: 6 mmol/L VK₃
+ 76 mmol/L LiClO₄ のアセトニトリル - エタノール混合溶
媒 (80:20, v/v) ; DG, デガッサー; P₁ および P₂, ポンプ; S,
試料注入部 (20 μL); カラム, LiChrospher 100 RP-18 (250
mm x 4 mm i.d., 5 μm); D, 電気化学検出器 (電気化学セルとポテ
ンシオスタット); R, 記録計; W, 廃液.

3. 結果および考察

3・1 額の皮脂に含まれる遊離脂肪酸

ラウリン酸 (C12:0), ミリスチン酸 (C14:0), パルミ
チン酸 (C16:0), マルガリン酸 (C17:0, 内標準物質),
ステアリン酸 (C18:0), パルミトオレイン酸 (C16:1),
オレイン酸 (C18:1), リノール酸 (C18:2), リノレン酸
(C18:3), アラキドン酸 (C20:4) の標準混合溶液 (5 ×
10⁻⁵ mol/L) 20 μL を HPLC-ECD に注入して得たクロマト
グラムを図 3 A に示す。ラウリン酸とリノレン酸, リノレ
ン酸とアラキドン酸, パルミトオレイン酸とリノール酸の
分離度は, それぞれ 0.15, 0.18, 0.12 であったため分離
は困難だったが, 他の脂肪酸については, 10 分間以内に
分離ができた。ピーク高さは, それぞれの脂肪酸量につ
いて 50-1600 pmol の範囲で良い直線性 (r > 0.997) を示した。
上述した 9 種類の脂肪酸標準混合溶液 (1 × 10⁻⁵ mol/L) に
ついて 5 回の繰り返し測定を行ったところ, 相対標準偏差
(RSD) は, それぞれの脂肪酸について 1.5% 以下であった。
また, 検出限界は, 50 pmol (S/N = 3) であった。上述の
方法に従って, 額から採取した皮脂の試料溶液を HPLC
に注入して得たクロマトグラムを図 3 B に示す。

表 1 に示すように, 25 歳男性の額の皮脂について繰
り返し測定と添加回収試験を行ったところ, それぞれの遊離
脂肪酸について RSD (n=5) は 4.5% 以下, 回収率は, 94
% 以上と良好な結果が得られた。以上のことから, この
HPLC-ECD により, ヒト皮脂中の遊離脂肪酸の定量を精
度良く行うことができることが明らかとなった。

続いて, 表 2 には男性 5 人, 女性 5 人について, 額から
皮脂を採取し, 同上の方法で遊離脂肪酸の定量を行った結
果を示す。遊離脂肪酸総量は, 上述の 9 種類の脂肪酸の総
量であり, 脂肪酸組成は, その総量に対するそれぞれの脂
肪酸の割合である。表 2 に示すように, 遊離脂肪酸の量お
よび組成には個人差があることが示された。

被験者 (23 歳男性) について額および頭皮の遊離脂肪
酸組成の 3 日間の日間変動を追跡したところ, 表 3 に示

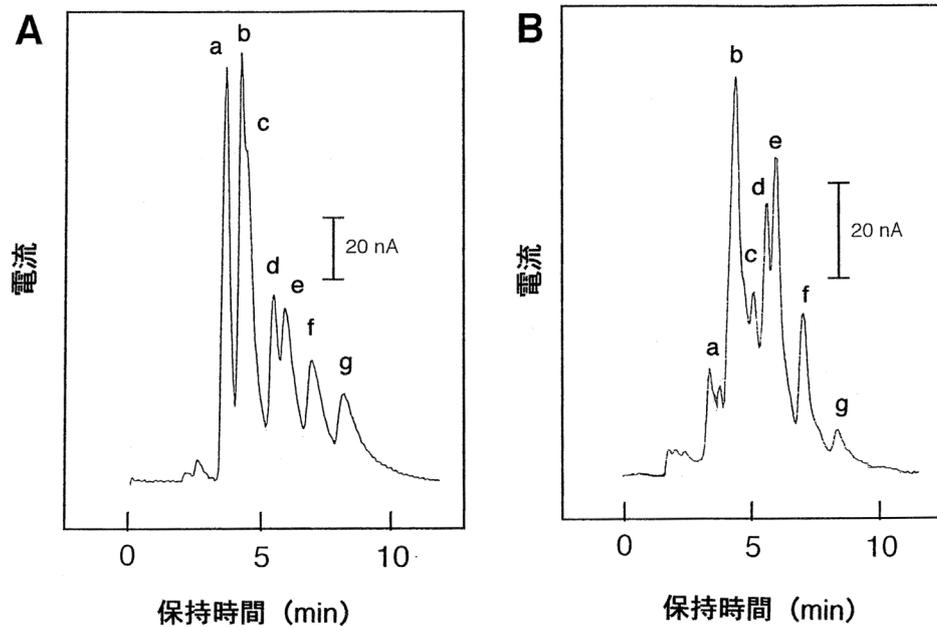


図3 (A) 遊離脂肪酸標準混合溶液 (5×10^{-5} mol/L) と (B) 皮脂中の遊離脂肪酸のクロマトグラム
 皮脂は、23歳男性の額から採取した。HPLCの条件：移動相，アセトニトリル-エタノール混合溶媒 (80:20, v/v)；キノン溶液，6 mmol/L VK_3 と 76 mmol/L $LiClO_4$ を含むアセトニトリル-エタノール混合溶媒 (80:20, v/v)；試料注入量，20 μ L；カラム，LiChrospher 100 RP-18, (250 mm x 4 mm i.d., 5 μ m)；カラム温度，室温；流速，1.1 mL/min；検出電位，-415 mV vs. SCE。ピーク：a, C12:0 + C18:3 + C20:4；b, C16:1 + C18:2；c, C14:0；d, C18:1；e, C16:0；f, C17:0 (内標準物質)；g, C18:0。

表1 ヒト皮脂中遊離脂肪酸の繰り返し測定と添加回収試験

| 遊離脂肪酸 | 繰り返し測定 (n=5) | | 添加回収試験 (n=5) | | |
|-----------------------|------------------------------|---------|-----------------------------|---------|---------|
| | 脂肪酸量 (nmol/cm ²) | RSD (%) | 添加量 (nmol/cm ²) | 回収率 (%) | RSD (%) |
| C12:0 + C18:3 + C20:4 | 12.6 | 4.5 | 13 | 94 | 2.3 |
| C14:0 | 8.7 | 1.2 | 10 | 102 | 0.71 |
| C16:0 | 15.0 | 3.4 | 10 | 94 | 2.9 |
| C16:1 + C18:2 | 11.1 | 2.0 | 12 | 96 | 4.7 |
| C18:0 | 4.8 | 1.5 | 5.0 | 103 | 1.6 |
| C18:1 | 9.5 | 2.6 | 10 | 97 | 3.4 |

25歳男性の額から10 mm x 15 mmの油取り紙で皮膚を採取した。皮膚の吸着した油取り紙は、5 mm x 5 mmに細分し、それぞれにエタノール-アセトニトリル混合溶液を加え、遊離脂肪酸を抽出した。

表2 ヒト額における皮脂中遊離脂肪酸の総量とその組成

| 被験者 | 遊離脂肪酸総量 (nmol/cm ²) | 組成 (%) | | | | | |
|------|---------------------------------|-------------------------|-------|-------|----------------|-------|-------|
| | | C12:0 C18:3 C20:4 | C14:0 | C16:0 | C16:1 C18:2 | C18:0 | C18:1 |
| 男性 1 | 112.2 | 46.3 | 9.8 | 11.6 | 17.8 | 2.0 | 12.5 |
| 2 | 67.5 | 31.1 | 10.8 | 23.7 | 13.2 | 4.9 | 16.3 |
| 3 | 79.4 | 17.6 | 13.9 | 26.4 | 22.7 | 3.0 | 16.4 |
| 4 | 114.2 | 14.0 | 14.0 | 4.9 | 42.0 | 3.2 | 21.9 |
| 5 | 42.0 | 33.3 | 10.5 | 16.4 | 19.0 | 10.7 | 10.0 |
| 女性 1 | 52.7 | 17.6 | 18.6 | 32.3 | 14.4 | 1.7 | 15.4 |
| 2 | 74.3 | 17.5 | 10.2 | 29.6 | 16.2 | 14.8 | 11.7 |
| 3 | 84.9 | 16.5 | 15.3 | 34.2 | 14.1 | 1.1 | 18.8 |
| 4 | 62.7 | 4.0 | 19.1 | 35.1 | 3.5 | 15.9 | 22.3 |
| 5 | 32.0 | 3.1 | 19.1 | 27.5 | 3.1 | 27.2 | 20.0 |

すように遊離脂肪酸組成の日間変動のRSDは11%以下であった。このことから、同じ場所における皮脂の遊離脂肪酸の組成は日によってあまり変化しないことが示された。

3・2 頭部50箇所における遊離脂肪酸の組成

顔と頭皮50箇所の皮脂を上述の方法で採取し、遊離脂肪酸の定量を行った。顔30箇所についての結果を図4に、頭皮20箇所についての結果を図5に示す。円グラフは、その遊離脂肪酸の組成を示し、その大きさは遊離脂肪酸の総量を相対的に示している。その上の数値はその部位の遊離脂肪酸総量 (nmol/cm²) を示す。図4が示すように、脂漏部位である額、鼻、顎は遊離脂肪酸量が多く、脂漏部位でない頬は、それらの部位に比べ遊離脂肪酸量が少ないことがわかった。また、頭皮では顔面より、遊離脂肪酸の量が多いことがわかった。

表3 顔と頭皮における皮脂中遊離脂肪酸の日間変動

| 遊離脂肪酸 | 顔 | | 頭皮 | |
|-----------------------|--------|----------|--------|----------|
| | 組成 (%) | RSD* (%) | 組成 (%) | RSD* (%) |
| C12:0 + C18:3 + C20:4 | 4.7 | 11 | 5.1 | 9.0 |
| C14:0 | 21.2 | 3.3 | 30.0 | 0.50 |
| C16:0 | 26.3 | 3.5 | 17.9 | 5.5 |
| C16:1 + C18:2 | 18.8 | 5.8 | 15.0 | 5.3 |
| C18:0 | 8.9 | 1.0 | 15.4 | 5.5 |
| C18:1 | 20.0 | 5.2 | 16.5 | 1.9 |

*23歳男性の同じ場所の顔と頭皮から3日間皮膚を採取した。

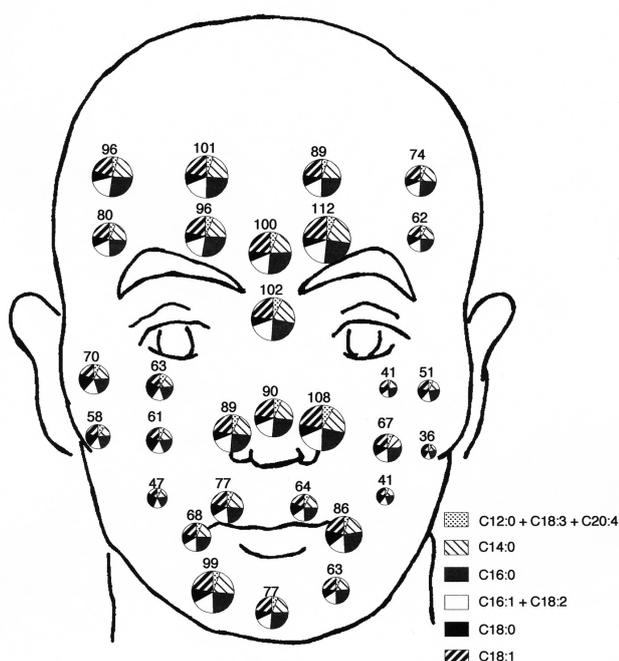


図4 顔における遊離脂肪酸の分布

皮脂は、23歳男性から採取した。円グラフの大きさは、遊離脂肪酸の総量を相対的に示し、上の数値はその部位の遊離脂肪酸総量 (nmol/cm²) で表した。

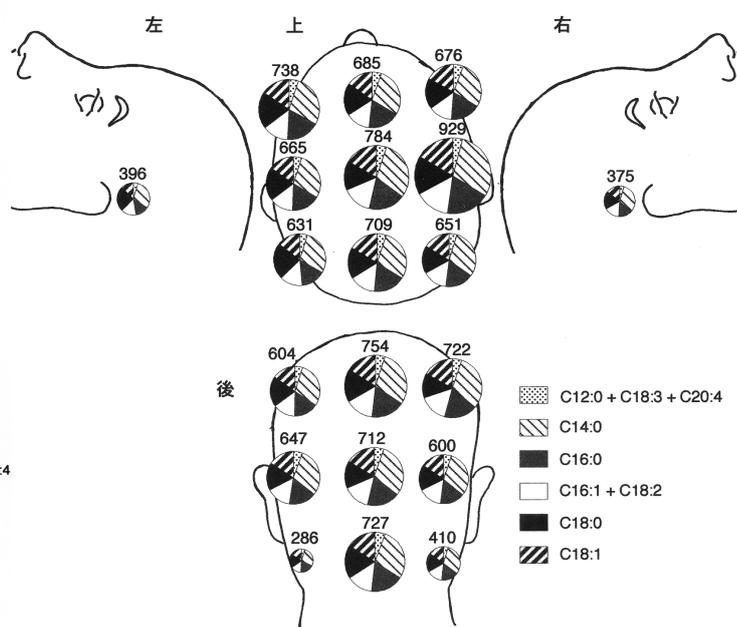


図5 頭皮における遊離脂肪酸の分布

皮脂は、23歳男性から採取した。円グラフの大きさは、遊離脂肪酸の総量を相対的に示し、上の数値はその部位の遊離脂肪酸総量 (nmol/cm²) で表した。

特に、パルミトオレイン酸とリノール酸、オレイン酸は、脂漏部位である額、鼻、顎に多く存在し、頬にはあまり存在しないことがわかった。また、ステアリン酸は皮膚が乾燥しやすい頬に多く存在することがわかった (図6)。以上のように、本法は油取り紙に吸着させた極微量の試料で遊離脂肪酸の定量が行えるため、顔面および頭皮50箇所の遊離脂肪酸を定量し、分布図を作成することができた。

3・3 美容液および洗顔料の使用による皮脂中遊離脂肪酸量・組成の変化

本方法は、試料の採取方法、前処理方法が簡単であるので、化粧品や皮膚治療薬を塗布した後の皮脂中遊離脂肪酸の動態を細かく追跡することが可能であると考えられる。

そこで、市販の美容液と洗顔料を使用したとき、皮脂中の遊離脂肪酸量と組成に及ぼす影響について検討した。

図7Aには、テカリやにきび予防が同時にできるジェル状美容液 (植物物語素肌力) を塗布した場合と、使用していない場合の皮脂中遊離脂肪酸の総量の変化を示した。洗顔した直後は、皮脂中に遊離脂肪酸は検出されなかったが、時間が経つにつれて遊離脂肪酸は増加した。美容液を使用した部位の遊離脂肪酸の増加量は、使用していない場合に比べ抑制されていた。図7Bには、それぞれの遊離脂肪酸の組成を示した。遊離脂肪酸の組成は、美容液の使用に関らずあまり変化しなかった。

また、余分な皮脂を吸着する洗顔料 (レシピオ) を使用

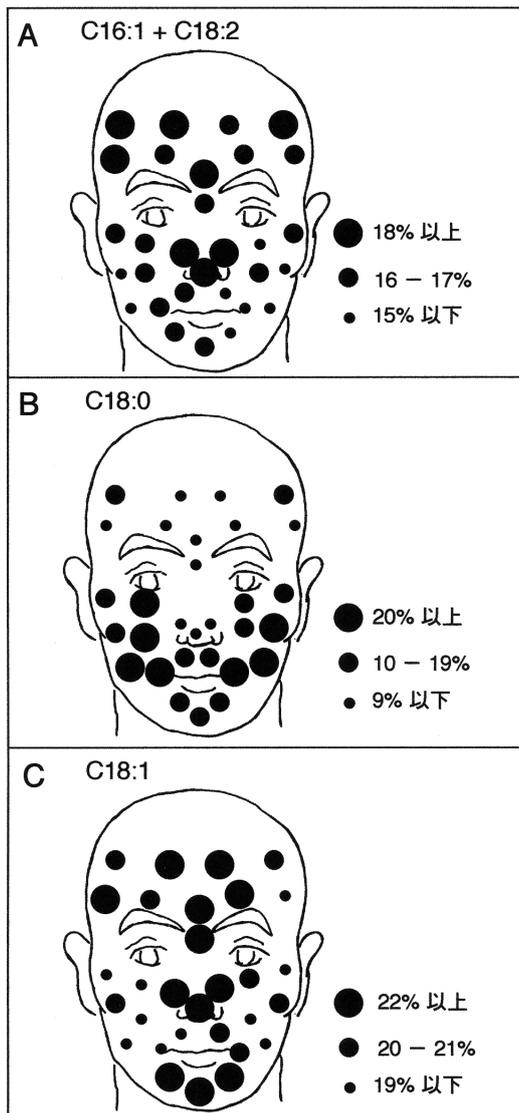


図6 顔における (A) パルミトオレイン酸 (C16:1) とリノール酸 (C18:2)、(B) ステアリン酸 (C18:0)、(C) オレイン酸 (C18:1) の分布
 皮脂は、23 歳男性から採取した。

した場合も同様に比較した (図8)。美容液と同様、皮脂中の遊離脂肪酸量の増加は抑制するが、組成にはあまり影響を与えなかった。

4. 総括

皮膚における遊離脂肪酸の機能を明らかにするために、皮脂中の遊離脂肪酸を HPLC-ECD で測定した。本法は、1 mg 程度の試料で測定が可能であり、サンプリングは 5 mm × 5 mm の油取り紙に皮脂を吸着させて採取した。皮脂の採取に要する時間は 30 秒であり、このため、幅広い年齢層の被験者やにきびなどといった皮膚の病変部位から皮脂を採取するのも容易であると考えられる。また、検出のための誘導体化も必要ないため、皮脂を採取する時間も含

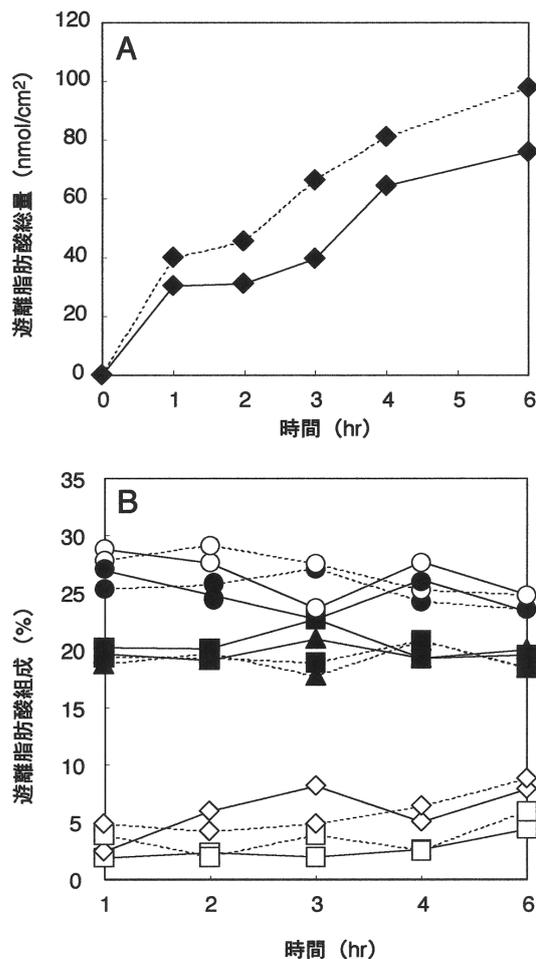


図7 ジェル状美容液 (植物物語素肌力) の使用による皮脂中遊離脂肪酸 (A) 総 および (B) 組成の変化

皮脂は、26 歳男性の額から採取した。(…), 美容液を塗布していない場所; (—), 美容液を塗布した場所; ◆, 遊離脂肪酸総量; □, C12:0 + C18:3 + C20:4; ■, C16:1 + C18:2; ▲, C14:0; ○, C18:1; ●, C16:0; ◇, C18:0。

めた測定時間は、わずか 15 分であり、従来の方法に比べ、被験者の協力も得やすく、より多くのサンプルを扱えることが可能である。また、美容液や洗顔料が皮脂中の遊離脂肪酸の生成に対する影響も本法によってモニターすることができる。殺菌効果、保湿効果、収れん作用などを有するその他の化粧品や皮膚治療薬を用いた場合でも、皮脂中の遊離脂肪酸量や組成を求めることが可能であり、皮膚常在細菌が生成する遊離脂肪酸の皮膚に対する影響を明らかにできると思われる。

本法は、上述した利点があるので、皮膚における遊離脂肪酸の役割および動態を明らかにするための有力な手段であり、化粧品領域だけではなく、生理学、薬理学、皮膚科学などといった幅広い分野に応用が可能であると考えられる。

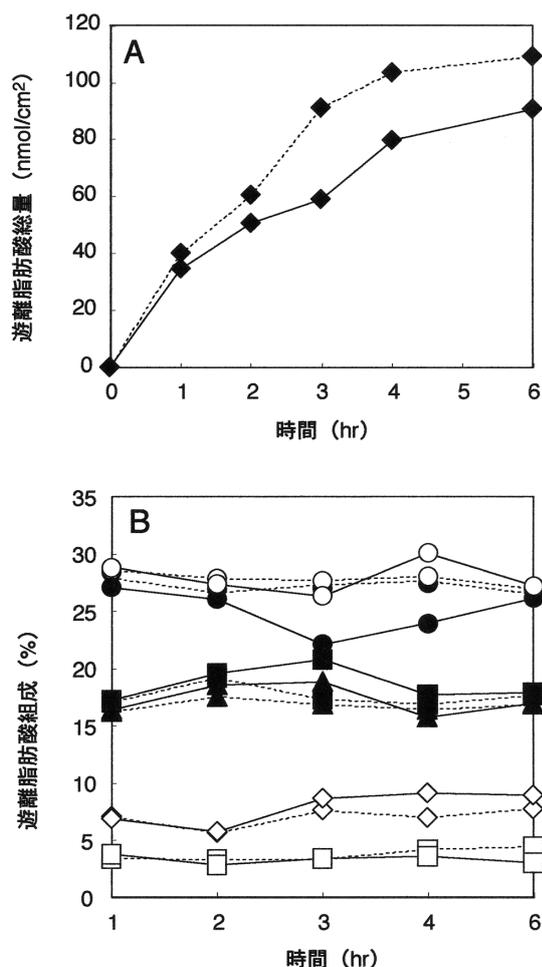


図8 洗顔料（レシピオ）の使用による皮脂中遊離脂肪酸（A）総および（B）組成の変化

皮脂は、26歳男性の額から採取した。(…), 洗顔料を使用していない場所；(—), 洗顔料を使用した場所；◆, 遊離脂肪酸総量；□, C12:0 + C18:3 + C20:4；■, C16:1 + C18:2；▲, C14:0；○, C18:1；●, C16:0；◇, C18:0。

謝辞

本研究を遂行するにあたりご支援いただきましたコスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

(参考文献)

- 1) Strauss JS, Downing DT, Stewart ME: in Physiology, biochemistry, and molecular biology of skin. Goldsmith LA, ed., Oxford University Press, New York, 1991, 712-740.
- 2) 松尾聿朗, 犬飼則子, : 表皮脂質の生理的役割. 油化学, 37, 827-831, 1988.
- 3) Elias PM, Feingold KR, : Lipids and the epidermal water barrier: metabolism, regulation, and pathophysiology. Semin. Dermatol. 11, 176-182, 1992.
- 4) Elias PM, Menon GK, : Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. Adv. Lipid Res. 24, 1-26, 1991.
- 5) Kellum RE, Strangfeld K, : Studies in pathogenesis: fatty acids of human surface triglycerides from patients with and without acne. J. Invest. Dermatol. 58, 315-318, 1972.
- 6) 安部 隆, : 皮脂の測定方法について. 香粧会誌, 7, 154-158, 1983.
- 7) Stewart ME, Steele WA, Downing DT, : Change in the relative amount of endogenous and exogenous fatty acids in sebaceous lipids during early adolescence. J. Invest. Dermatol. 92, 371-378, 1989.
- 8) Fuse T, Kusu F, Takamura K, : Determination of higher fatty acids in oils by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. J. Chromatogr. A, 764, 177-182, 1997.
- 9) Kotani A, Fuse T, Kusu F, : Determination of plasma free fatty acids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Anal. Biochem. 284, 65-69, 2000.
- 10) Kotani A, Kusu F, : HPLC with electrochemical detection for determining the distribution of free fatty acids in skin surface lipids from the human face and scalp. Arch. Dermatol. Res. 294, 172-177, 2002.

紫外線及び化学合成化合物のヘアレスラット皮膚に対する障害作用及びその防御

城西大学 薬学部城西大学生命科学研究センター

谷 覺

The protection of the skin from ultraviolet rays is the urgent issue, because the harmful sun's rays increase recently. However, there is no good and simple method for the evaluation of effects of ultraviolet rays on the skin. Then, I improved an animal model using the hairless rats, that were breeding in Life Science Research Center, Josai University.

After irradiation with ultraviolet rays on the back of hairless rats, the skin was turned to reddish like sunburn with passage of days. The skin color was recorded with a digital camera, and analyzed as the density by the NIH image software, after the images were changed to gray. The skin color increased during 3 days, and after 4 days the skin was gradually recovered from the lesion. Therefore, the degree of skin lesion was evaluated by measuring the skin color at 3rd day after irradiation with ultraviolet rays.

Using this method I investigated the fundamental study on hairless rat skin lesion induced by ultraviolet ray. In conclusion the skin lesion of hairless rat were different in each rat and the part of the back. Therefore, it is possible to evaluate the protective or accelerated effect of the chemical against ultraviolet ray by comparing the right and left skin lesion after one side treatment by the chemical. However, in cases of general administration of the chemical, we must statistically evaluate the results with enough amount of rats.

1 緒言

近年、大気圏におけるオゾン層の破壊による紫外線の増加が心配されるなか、紫外線が皮膚に多大の障害を及ぼす可能性が示唆され、サンスクリーン効果を持つ化粧品の開発が望まれている。

現在、化粧品に表示される UVB 領域の紫外線防止効果を示すものとして Sun Protection Factor が用いられ、この測定法は極めて厳密で、かつ煩雑であるが、ヒトにおける効果を見る上では信頼性も高く優れた方法である。しかし、化粧品の開発の観点に立てば、ひとつ一つの化合物の効果をヒト皮膚で検討するには、時間的にも経済的にも効率が悪く、また安全性の面でも問題がある。そこでヒトの皮膚に近く、更に均一な結果が得られる実験動物を用いた方法の開発が望まれる。

城西大学生命科学研究センターでは、Wistar 系ラットの突然変異種であるヘアレスラットを specific pathogen free 化し繁殖、供給している。このラットは貧毛以外はほとんど正常のラットと変わりなく、生化学的異常も見出されていない¹⁾。当研究センターでは、従来よりヒト皮膚のモデルとしてヘアレスラットの皮膚を用いて経皮吸収などの実験を進展させてきた。そこで、今回は化粧品開発の分野においても、様々な面でこのヘアレスラットが利用でき



Skin Lesion by Ultraviolet Ray and Chemicals on the Hairless Rats, and its Protection

Satoru Tani

Faculty of Pharmaceutical Science, and Life Science Research Center, Josai University

るのではないかと考えた。まず化粧品は皮膚に直接塗布して用いることから、皮膚に対する刺激性や毒性などの作用が観察できると考えられる。しかし、この分野では既に多くの知見が得られているので、紫外線からの防御を中心として検討することを試みた。そのためにはヘアレスラットの皮膚に対して、紫外線がどのような効果をもたらすのかを基礎的に検討することが必要がある。今回は上記の目的で若干の検討を行い結果を得たので報告する。さらに、尋常性白斑症の治療薬であるメトキサレンの紫外線増感効果についても検討したので合わせて報告する。

2 実験

2.1 実験材料

雌のヘアレスラットは城西大学生命科学研究センターで飼育されているものを用い、週齢は特に選ばなかったが、概ね 8 週齢以後のものを用いた。メトキサレン (Methoxalen) は和光純薬 (大阪) から購入して用いた。

2.2 紫外線照射法

ヘアレスラットをペントバルビタール麻酔下、頸部から背部にかけてバリカン (ナショナル丸刈り用) で毛を刈り、腹位に固定し、背部に 1.0×2.0 cm に切り抜いたアルミ箔を両面テープで貼り付け、そこ以外の場所には光が当たらないようにアルミ箔で覆って健康紫外灯 (ナショナル PL20 もしくは同等品) 2 本で照射した。ラットは紫外線蛍光灯の下に光がなるべく均等に当たるように固定した。2 匹を用いる場合は対称に並べ、比較検討する場合は、片側を対照とした。紫外線蛍光灯と背部皮膚との距離は 5 及び 10 cm とし 2 本の蛍光灯の距離も 5 及び 10 cm とし、必要に応じ 15 cm も用いた。照射時間はそれぞれ 10 及び 20 分とした。

2.3 皮膚変化の数値化

紫外線照射後1～4日のラットをペントバルビタール麻酔し、腹位に固定し、紫外線照射部、非照射部位、及び約1×1cmの標準色（財団法人日本色彩研究所発行の新配色カード199aのPI-8）を約1cm程度の距離で配置し、デジタルカメラで記録した。写真をグレイスケールに変換し、NIH imageにより紅斑を灰色の濃淡の変化として数値化した。更に、標準色と紫外線照射部位の数値から紫外線照射をしていない部位の数値を差し引き、紫外線照射部位を、標準色を100にした時の相対値で表した。

2.4 メトキサレンの投与

メトキサレン（5mg/ml of propylene glycol）（1, 5, or 25 mg/kg）を腹腔内注射し、約1時間後に紫外線を照射した。

3 結果

3.1 紫外線照射による皮膚の経日変化

紫外線を照射した直後の皮膚は、若干赤みを帯びヒトの日焼けと類似する所見であった。この皮膚は1日後では赤みを帯びているが、まだほとんど変化が見られなかった。しかし、2、3日と経過するに従い皮膚が赤褐色に変化し、4日目には皮膚の下部に新たな皮膚の再生が見られ、かさぶた様に変化した。

Fig. 1に紫外線を照射して3日後のラットを示した。この写真のように紫外線照射部位が紅斑として認められる。

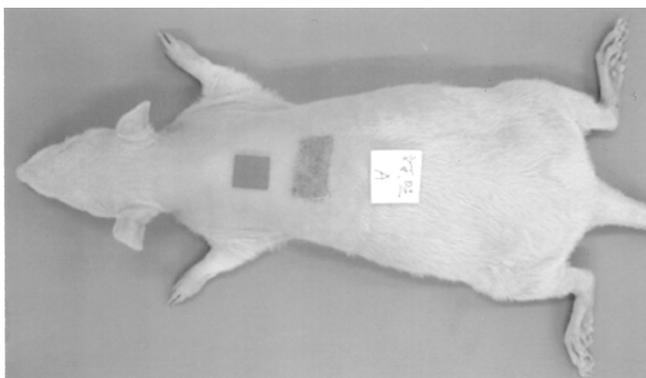


Fig. 1 紫外線照射3日後のヘアレスラットの皮膚
麻酔したラットの背部皮膚の真。頭方に標準色を配置し、尾方に説明の紙片を置き、デジタルカメラで撮影した。

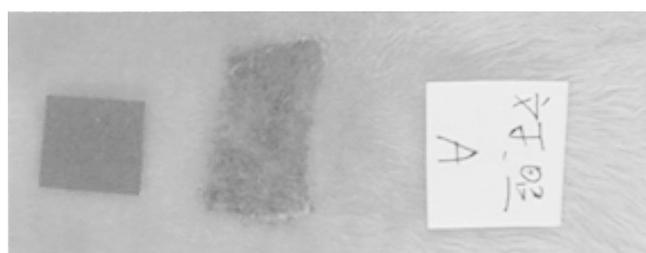


Fig. 2 皮膚紅斑の測定法
皮膚の真をデジタルカメラで記録し、標準色を100としたときの数値を紅斑強度とした。

このラットを毎日、麻酔下でデジタルカメラで記録し、それをグレイスケールで濃淡として測定した（Fig. 2）。4日間の紅斑の変化を示したのがFig. 3である。Fig. 3には2本の紫外線灯間及び皮膚との距離を10cm、照射時間10分にしたものを示した。全ての場合に3日目に最大値を示し、以後色調は持続するものの毛が生え、それが無視できなくなったり、皮膚にかさぶた様の剥離が生じ、定量には耐えられなくなった（Fig. 4）。光源からの距離10cm、照射時間10あるいは20分とし、照射3日後に測定することにしたが、また実験によっては様々な検討も加えた。

3.2 ヘアレスラットの紫外線による皮膚障害の個体差

上記実験の過程でヘアレスラット間で紫外線に対する感受性に個体差が観察されたので、同一個体で時期を変えて紫外線照射を行い、紅斑の程度を調べ、その結果をFig. 5に示した。紫外線照射を始めた週齢は8週齢以降であるが、必ずしも同じではなく、また初回と次の照射との間隔も一定ではない。しかし、同一の個体であっても照射回数に従い上昇するものと、下降するものがあり、また紅斑の程度も個体により全く異なっていた。そこで更に、同一個体で同時に照射距離を変え紅斑の程度を観察した。結果をFig. 6に示すが、程度に差はあるものの同一個体では光源からの距離が近いほど紅斑の程度が強いことが確認された。しかも紅斑の程度は実測した紫外線の強度と近似していた。

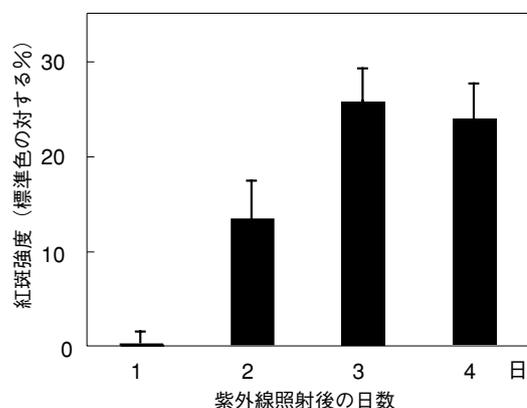


Fig. 3 紫外線照射による紅斑の経日変化
二本の紫外線灯間及びラットとの距離を10cmとし、照射時間を10分間としたときの紅斑の強度

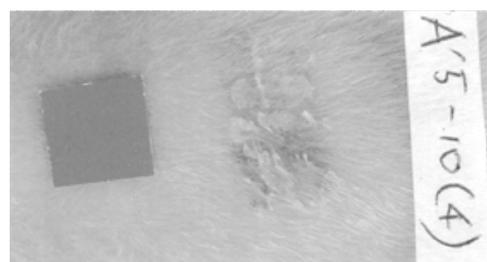


Fig. 4 紫外線照射4日後の皮膚
皮膚の再生が起こり、かさぶた状に皮膚が剥がれている。

3.3 背部皮膚の部位による差

より均一な結果を得るために、背部部位の違いにより紫外線に対する感受性の違いがあるのかどうかを観察した。ヘアレスラットの背部皮膚の毛を全て刈り、全面を紫外線で照射し、紅斑の程度を調べた (Fig. 7)。ラットの背部の形状から頸部及び尾部は凹凸があり、均一な部位が見つからなかった。比較的均一な背部を観察すると、中心に近い部分が左右、前後共に均一な紅斑の程度を示していた。

3.4 紫外線照射による皮膚紅斑に対するメトキサレンの効果

尋常性白斑症の治療薬であり、紫外線増感剤であるメトキサレンの効果を検討した。メトキサレンをプロピレングリコールに溶解し、ラットに1, 5, 及び25 mg/kgをそれぞれ腹腔内に投与し、約1時間後にペントバルビタール麻酔下紫外線照射した。紫外線蛍光灯による紅斑強度のバラツキを小さくする目的で、実験は同じ紫外灯の左右対称にラットを配置し、一方を対照、他方にメトキサレンを投与し、対照ラットとの紅斑の強度を比較した。その結果 Fig.

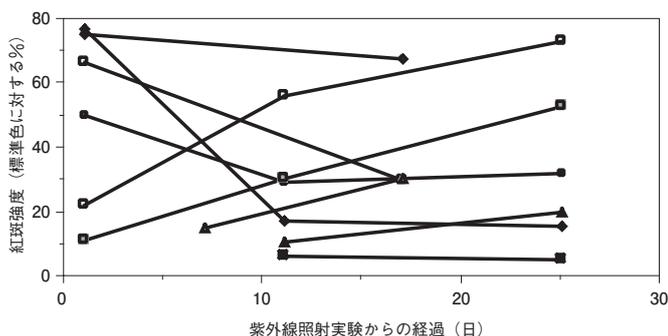


Fig. 5 同一ラットの紫外線照射による紅斑強度のばらつき
動物に紫外線を照射し、3日後に紅斑を測定し、同様の操作を間隔をあけて実施し、その値を示した。同じ動物は同一線で示してある。

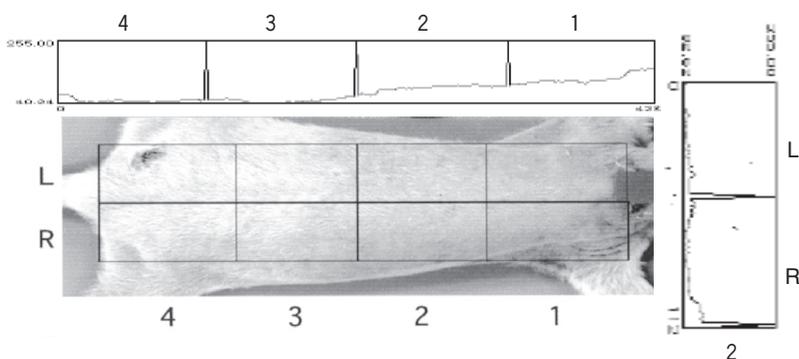


Fig. 7 背部皮膚の紫外線感受性の違い
ラット背部全に紫外線を照射し、脊椎に頭方から尾方に線を引き、全身を約4等分し、それぞれの部分の紅斑強度を測定した。

8に示したように、メトキサレンの投与により、紅斑強度の増加が観察された。しかし、紅斑の程度はメトキサレンの投与量に比例せず、むしろ高用量で紅斑強度の減少が見られた。

4 考察

4.1 紫外線による皮膚障害の指標としての紅斑

紫外線による皮膚障害が紅斑の強度と比例すると仮定した場合、紅斑をどのように定量化するかという問題がある。今回は、紅斑をグレイスケールに変換し、黒化度として NIH image で定量したが、実際の濃さと若干相違すると考えられる。今回のグラフでも1日目はほとんど紅斑強度が認められないが、肉眼的にはわずかではあるが、紅斑が認められる。このことは例えば500nm付近の波長で測定すれば、もっと良い定量性が得られる可能性が考えられる。しかし、紫外線照射後は薄いピンク色をしているが、3日

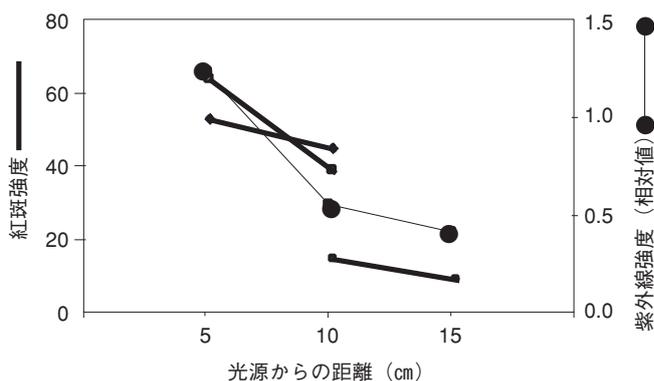


Fig. 6 紫外線強度と紅斑強度の関係
同一ラットの同一時期に異なった紫外線光源からの距離からの照射による紅斑強度の変化。同一ラットは同一線で示してある。

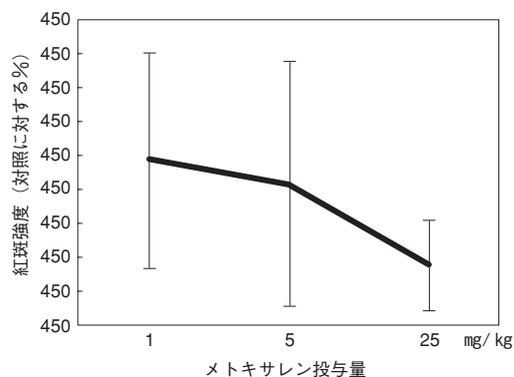


Fig. 8 メトキサレンの用 反応曲線
メトキサレンを腹腔内投与し、紫外線を照射した後、3日後の対照に対する相対的紅斑強度の変化。同一条件でメトキサレンを投与しなかったもの(対照)を、100としたときの相対値で示してある。

目には赤褐色に変化する。今回は3日目の紅斑になるべく近い色調を選んだが、ラットの状態によっても少しずつ色調が変化するので、どの標準色を用いるかによっても測定値が変わる可能性がある。

次に、紫外線照射後の皮膚傷害を、皮膚の紅斑の強度によって評価できるのかどうかについて検討した。太陽光線による皮膚の変化として、ヒトでは黒化と皮膚障害が総合して現れると考えられる。ラットの皮膚に対する紫外線の作用として、皮膚の紅斑を指標とすると、皮膚に紅斑が生じる機序として、紫外線の細胞に対する障害作用によって、細胞から様々な起炎物質が放出され、それにより毛細血管の拡張が起こったと考えられる。著者は紫外線による皮膚障害の強度を紅斑の強度で評価できるという作業仮説を立て、実験を進めた。今回用いた紫外灯の紫外線の強度はFig.6に示すように、ほぼ光源からの距離の二乗に反比例する変化を示した。例数が少なく確定的なことは言えないが、ラットの皮膚の紅斑強度は紫外線の強度の曲線と概ね一致した。このことは、紫外線による皮膚の紅斑は定量的評価は困難であるが、少なくとも傷害がどのように生じるのかの検討には用いることが出来るのではないかと考えられる。

4.2 紫外線照射による紅斑の個体差

ラットの個体間の差に関しては、同一条件下で紫外線を照射しても紅斑の程度がラットによって異なる等の個体差が見られた。現在は、同腹のラットを用い、同一条件下の片方を対照とするなどの工夫をおこなっているが、バラツキが大きい。そこで同一のラットを用い、数回の紫外線照射を行い、紅斑強度を比較した。ラットの個体によっては、紅斑の程度が強くなるもの、あるいは弱くなるものなどが観察され、必ずしも同じ程度の紅斑の強度を示さなかった。このことは、個体差のみでなくラットの状態や、年齢などによっても紅斑の程度が変化することを示している。即ち、紫外線による紅斑の変化は個体間では比較できないことを示している。

紫外線照射による紅斑は4日程でかさぶた様になり5～6日後には剥離して、障害のない皮膚が再生してくる。このことから、皮膚の紫外線による障害で、皮膚の細胞がアポトーシスを起こしたことを示している。今後は個体間で差が見られない他の生化学的パラメータ、例えばアポトーシスの程度なども検討することが必要であろう。

前項の検討から紅斑を個体間で比較するのでは、個体差が大きく困難が予想されたので、同一個体で比較する場合を想定し、どの部分を用いれば比較検討が可能かを調べた。その結果、背部の頸部と尾部の中間点がほぼ均等な紅斑の程度を示すことが明らかとなった。即ち、仮に紫外線防御物質などの検討を行う場合は背部の中心あたりを選び、更

に脊柱の左右に対称に同一の範囲で紫外線を照射することにより、防御物質などの効果を比較することができると考えられる。

4.3 メトキサレンの光増感作用

前節で、紫外線の感受性に個体差があることから、紅斑を個体間で比較することは困難であるという結論を導いた。他方、紫外線の皮膚に対する作用を薬剤が増感あるいは減弱させる作用を検討する場合は、同一個体で検討するのは困難である。光過敏症を生じさせる薬物は、一般に全身投与される。即ち、光増感物質などの作用を検討する場合は薬物を皮膚適用するのではなく、全身投与して検討する必要がある。この検討のため、紫外線増感物質であるメトキサレンをモデル薬物として検討した。メトキサレンは尋常性白斑症の治療薬として用いられる光増感物質であるが、Fig. 8に示すように、例数を重ねることで光増感作用を検出することはできるが、用量反応曲線は得られず、かえって高濃度で紅斑の減少が見られた。これは個体差による見かけ上の反応なのか、何か原因があってこのような反応が起こっているのか、今回は判断がつかなかった。メトキサレンは、ヒトにおける作用では皮膚に存在するメラニン細胞の活性化を起こすが、アルビノ化したラットではメラニン細胞が存在しないため別の機構が働いて皮膚障害を増強した可能性がある。即ち、ヒトの皮膚の黒化をもたらす効果がヘアレスラットの皮膚に対する紅斑強度の増強で表されることが判明した。このことは光線過敏症を起こす化合物の検出などには多くの動物を用いて統計処理を行うことによりある程度可能になることが考えられた。

5 総括

1. ヘアレスラットを用いて、紫外線防御物質などの効果を検討する場合は、同一ラットの背部の中心を用い左右の片方を対照とし、もう一方に検体を塗布して、紫外線を照射することで検査が可能である。
2. 光過敏症などを起こす物質の検討には、薬物投与したラットと無処理のラットを左右対称に並べ、紫外線を均等に照射し、多数の動物を用い統計処理をすることで検出可能である。ただし、この場合は個体差にかなりのバラツキがあるため、対照となるラットには同腹、同齡のラットを用いることが望ましい。
3. ヒトのメラニン細胞刺激による黒化をラットの皮膚紅斑という反応で評価できる可能性がある。

参考文献

- 1) Tani S, Noguchi M, Hosoda Y, Sugibayashi K, Morimoto Y, : Characteristics of Spontaneous Erythema Appeared in Hairless Rats. Exp. Anim. 47, 253 - 256, 1998.

老化マウス *klotho* における皮膚変化の検討

群馬大学 医学部第2内科

倉林 正彦

The *klotho* mouse is a novel presenile mouse strain developed by insertional mutagenesis. The homozygous mutant *klotho* mice ($KL^{-/-}$), which have a defect in *klotho* gene expression, present a short life span and a syndrome resembling human aging. Skin atrophy and hair loss are observed in $KL^{-/-}$, in addition to pulmonary emphysema, arteriosclerosis, osteoporosis, and ectopic calcifications.

The goal of the present study is to understand the pathogenesis of the skin changes observed in $KL^{-/-}$, and to develop a new strategy to prevent the skin change during aging. We have generated some experimental tools for the study: (1) Adenovirus has been generated, which expresses the mouse *klotho* cDNA, has been generated. (2) Two transgenic rat strains have been established, which overexpress the *klotho* gene. Regarding the function of the *klotho* gene, we have shown that apoptosis of the type II pneumocytes is much more frequently observed in the $KL^{-/-}$ lung when compared with that in the wild-type lung. Further study is now under progress to show the pathogenesis of the skin lesion in the *klotho* mutant mice, with special reference to the apoptosis of the epidermal cells.

1. 緒言

皮膚の老化防止はコスメトロジーの最も重要な課題の一つである。著者らは黒尾・鍋島らと共同で、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、肺気腫、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。著者らはコスメトロジー研究振興財団の第9回 (平成10年度) 助成により、 $KL^{-/-}$ は生後4週より肺気腫を発現すること²⁾、7~9週令の $KL^{-/-}$ 肺では、型コラーゲンと SP-A 遺伝子の発現が増強していること²⁾、飢餓状態の線維芽細胞に *klotho* 遺伝子を導入することにより、その飢餓による DNA 合成能の低下を抑制しうること³⁾ を明らかにし、 $KL^{-/-}$ における老化徴候の早期発現には、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した。

本研究の目的は、*klotho* マウスにおける老化類似の皮膚変化の出現機構を明らかにし、皮膚老化の予防法を開発することである。

2. 実験

2.1 創傷治癒過程の観察

$KL^{-/-}$ および野生型マウス (以下 $KL^{+/+}$) を用いる。それぞれの背部を剃毛後、同部位にパンチ生検を行い、皮膚に全層性の創傷を与える。その治癒過程を観察する。

2.2 $KL^{-/-}$ の皮膚へのアデノウイルスベクターを用いた *klotho* 遺伝子の局所導入

まず第一に、*klotho* 遺伝子を発現するアデノウイルスを作製する。アデノウイルスベクターにマウスの *klotho* 遺伝子 (膜貫通ドメインを含む全長の cDNA) を組み込む。

2.3 *klotho* 遺伝子過剰発現ラットにおける皮膚傷害の検討

準備として、*klotho* 遺伝子過剰発現ラットの系を確立する。本ラットの系の中で、導入 *klotho* 遺伝子の発現量が多いと考えられる系を選択する。さらに導入 *klotho* 遺伝子に関してホモ接合体である個体を選別し、その個体同士を交配することによって、*klotho* 遺伝子の発現量の多い個体を安定して利用できるような系を確立する。

2.4 線維芽細胞の培養実験

細胞は $KL^{-/-}$ および $KL^{+/+}$ から採取する。それぞれの皮膚および肺を摘出し細切したのち、細胞培養用プレートに固着させる。これに 10% FBS 加 DMEM 培地を加えて培養し、線維芽細胞を培養する。この線維芽細胞を利用し、各種の実験に用いる。

2.5 肺組織におけるアポトーシスの解析

2週齢の $KL^{-/-}$ および $KL^{+/+}$ から肺を取り出し、10%



Investigation on the Skin Change of the aging model mouse "klotho".

Masahiko Kurabayashi

Second Department of Internal Medicine,
Gunma University School of Medicine

ホルマリンを用いて定圧固定したのちパラフィン包埋する。この肺組織を TACS™ 2 TdT-DAB In Situ Apoptosis Detection Kit を用いて TUNEL 染色する。さらに細胞レベルの酸化ストレスの指標としてベルリン青染色を行う。それぞれ陽性細胞の比率を $KL^{-/-}$ と $KL^{+/+}$ とで比較する。

3. 結果

3.1 創傷治癒過程の観察

$KL^{-/-}$ は皮膚損傷を与えた直後に死亡する個体が多かった。 $KL^{-/-}$ がストレスに非常に弱いことは良く知られており、本法を用いて皮膚に全層性の傷害を与えて創傷治癒過程を観察するのは困難と考えられた。

3.2 $KL^{-/-}$ の皮膚へのアデノウイルスベクターを用いた *klotho* 遺伝子の局所導入

マウスの *klotho* 遺伝子（膜貫通ドメインを含む全長の cDNA）を発現するアデノウイルスを作製した。このアデノウイルスを CHO 細胞に感染させ、Western blot 法を用いて *klotho* 蛋白が発現していることを確認した。

3.3 *klotho* 遺伝子過剰発現ラットにおける皮膚傷害の検討

klotho 遺伝子過剰発現ラットを 2 系統得ることができた。RT-PCR 法を用いた解析では、導入 *klotho* 遺伝子は Strain1 においては肺・腎・心・脳で、Strain2 においては肝・肺・腎・心・脳で、mRNA 発現を認めた (Fig.1)。現在、導入 *klotho* 遺伝子に関してホモ接合体である個体を選別し、交配を行っている。

3.4 線維芽細胞の培養実験

$KL^{-/-}$ および $KL^{+/+}$ の皮膚および肺から線維芽細胞を培養した (primary culture)。しかしながら、培養の条件によって細胞の生育状態にばらつきが生じることが明らかとなった。このため、 $KL^{-/-}$ 由来の線維芽細胞と $KL^{+/+}$ 由来の線維芽細胞の増殖などを単純に比較することは困難であると考えられた。

3.5 肺組織におけるアポトーシスの解析

3.4 に示した培養実験系が機能しなかったことから、 $KL^{-/-}$ のヒト老化類似病変形成のメカニズムを解明する別の方法として、組織 (in vivo) を用いた病態解析を行うことにした。まず始めに、肺にみられる気腫化病態におけるアポトーシスの関与を検討した。

$KL^{+/+}$ と比較して $KL^{-/-}$ の肺では TUNEL 染色陽性細胞が高頻度に認められた (Fig.2)。組織学的な特徴から、陽性細胞は II 型肺胞上皮細胞と考えられた。ベルリン青染色陽性細胞は $KL^{-/-}$ では認められたが、 $KL^{+/+}$ では指摘できなかった (Fig.3)。

4. 考察

本研究を進めていく上で重要なツールとなる (1) マウス *klotho* 遺伝子（膜貫通ドメインを含む全長の cDNA）を発現するアデノウイルス、(2) *klotho* 遺伝子を過剰に発現するラットの系統、を確立することができた。これらのツールは、 $KL^{-/-}$ に認められる皮膚真皮層の菲薄化、皮下脂肪層の消失、脱毛などのヒト老化にみられる変化の病態に *klotho* 遺伝子がどのように関与しているかを解明するうえで非常に重要であり、今後これらのツールを用いた研究を行う予定である。

一方、当初実験計画の柱として期待した $KL^{-/-}$ および $KL^{+/+}$ を用いた創傷治癒過程の観察、あるいは同マウスか

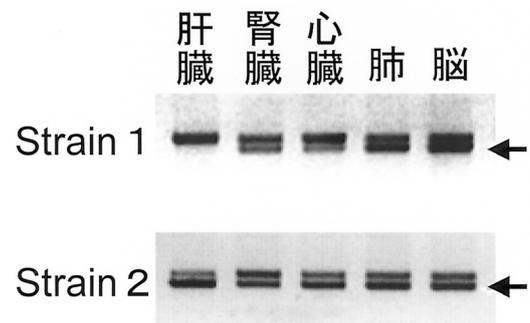


Fig.1 *klotho* 遺伝子過剰発現ラットの作製。2 系統で導入 *klotho* 遺伝子の発現が認められる (矢印、RT-PCR 法)

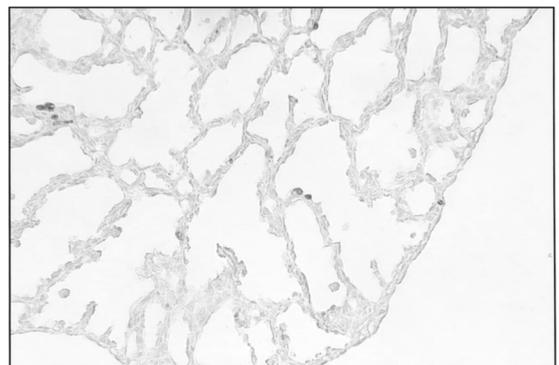


Fig.2 $KL^{+/-}$ の肺では、II 型肺胞上皮細胞のアポトーシスが認められる (2 週齢、TUNEL 染色)。

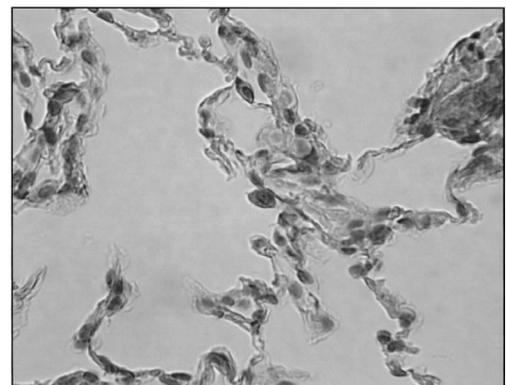


Fig.3 $KL^{+/-}$ の肺では、ベルリン青染色陽性細胞が認められる (5 週齢)。

らの線維芽細胞の培養 (primary culture) 実験は、残念ながら実験系として機能しなかった。このため著者らは、*KL^{-/-}*において肺気腫と皮膚の萎縮・脱毛所見が認められることに着目し、それらに共通する病態としてアポトーシスが関与するという仮説をたてた。これまでの検討から、*KL^{-/-}*の肺組織においてはII型肺胞上皮細胞のアポトーシスが高頻度に認められることが明らかとなった。今後、*KL^{-/-}*の皮膚組織におけるアポトーシスの関与を解析していく予定であり、本実験計画の一つの柱として、*klotho*遺伝子がアポトーシスの抑制を介して皮膚の老化を抑制している可能性を追究していくことにしている。

これまでの解析によって、*klotho*マウスは外界からのストレスに対する反応が異常であることが明らかとなっている。*klotho*遺伝子ヘテロ欠損マウスは、若年では肺気腫を発症しないが、タバコ主流煙曝露やブレオマイシン肺傷害に対して気腫化しやすい⁴⁾。今回のベルリン青染色の結果からは*klotho*マウスの肺は野生型マウスに比べて酸化ストレス環境下にあることが示唆された。皮膚は外界からのストレスに直接さらされ続ける部分であることから、本マウスにみられるヒト老化に類似した皮膚病変 (皮膚老化) の

発症メカニズムを解明することが、コスメトロジーに大きな貢献をしていくものと信じている。

(参考文献)

- 1) Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. : Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 390: 45-51,1997.
- 2) Suga T, Kurabayashi M, Sando Y, et al. : Disruption of the *klotho* gene causes pulmonary emphysema in mice. Defect in maintenance of pulmonary integrity during postnatal life. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 22: 26-33,2000.
- 3) 田島俊児、須賀達夫、山洞善恒、ほか : *klotho* 遺伝子は細胞増殖の調節に関与している可能性がある。日呼吸会誌. 37 (増刊号) :253, 1999.
- 4) Maeno Y, Suga T, Sando Y, et al. : The heterozygous *klotho* mice develop pulmonary emphysema after exposure to cigarette smoke and intratracheal instillation of bleomycin. *Am J Respir Crit Care Med*. 159: A447, 1999.

発生再生の分子メカニズムを応用した人工皮膚作製

秋田大学 医学部生化学第一講座

杉山 俊博、亀田 隆

Sonic hedgehog (Shh) regulates the principal processes in many developmental stages including the epithelial-mesenchymal interaction. The extraordinary acceleration of signaling by Shh is responsible for the development of human basal cell carcinomas and trichoepitheliomas; they might originate from the very immature keratinocytes including the stem cells. We tried to utilize the mitogenic effect of Shh to accelerate the formation of cultured epithelium, which is already used in the medical field practically. To this end, we transfected shh cDNA into a Swiss-3T3 cell line, widely used as a feeder for keratinocytes, and established a Shh expressing cell line. The lethally irradiated Shh expressing feeder cells remarkably accelerated the growth of keratinocyte colonies obtained from the human neonatal foreskin, and the formation of well-stratified cultured epithelium, which is rich in immature small keratinocytes, expressing cytokeratin 14. This acceleration was suppressed by the addition of cyclopamine, a specific inhibitor of Shh signaling. These data indicate that the Shh is a promising mitogen to improve the technology for cultured epithelium formation.

1. 緒言

人体外表面はケラチノサイトが形成する表皮により覆われている。この薄い層は人体を乾燥・紫外線・物理的障害・免疫学的侵襲から保護する上で重要な役割を担っている。このように重要な役割を担う表皮細胞層は非常に高い再生能力を持っているが事故などによりその大半が失われると生命活動の維持が危機に陥る。

培養表皮は再生医工学技術による最も初期の産物である。1970年代にGreen博士らはSwiss-3T3細胞をフィーダー細胞として利用することでヒト表皮角質化細胞の増殖をコントロールし、培養人工表皮を作製することに成功した¹⁾。この技術は火傷や母斑の治療に広く応用され成功を取っている²⁾。現在ではベンチャービジネス企業群により同種移植用の培養表皮が凍結品として供給されているが、恒久的な生着を可能とする自家移植用培養表皮を迅速に供給する為には培養表皮作製に要する期間をより短縮することが重要である。

hedgehog 遺伝子産物はショウジョウバエに発生異常を引き起こす変異遺伝子として同定されたが、哺乳類ではsonic hedgehog・indian hedgehog・desert hedgehogの3種が相同遺伝子として報告されている³⁾。このうちsonic hedgehog 遺伝子産物 (Shh) は哺乳類の発生において肢芽の前後軸決定など形態形成のシグナル因子として重要な役割を担っていることが知られている。生化学的には

Hedgehog タンパク質がリガンドとしてPatchedという膜レセプターに結合することでSmoothedという別の膜蛋白への抑制が解除され転写因子Gliを介した標的遺伝子の発現制御が誘導されると考えられている⁴⁾。

近年、ヒトの表皮基底細胞がんや毛包腫等の極未熟なケラチノサイトが癌化したと考えられる腫瘍では高頻度でpatched-1に変異が生じていることが報告され、また遺伝子改変動物を用いた実験からHedgehogシグナル系を人為的に活性化することにより、これらのがんを誘発できることが報告されている⁴⁾。これらの報告はHedgehogタンパク質を介したシグナル伝達が表皮幹細胞の増殖制御において重要な役割を担っていることを示唆する。本研究で我々はこのような未熟なケラチノサイトにおけるHedgehogシグナル系の生理作用を培養表皮作製系へ応用することを旨とした。

2. 実験

2.1 細胞

Swiss-3T3細胞 (JCRB no. 9019 from HSRRB, Osaka, Japan) 並びに遺伝子導入Swiss-3T3細胞は全て10%のウシ胎児血清を加えたダルベッコ改変MEM培地にて培養を行った。継代培養には0.05%トリプシンと0.02% EDTAを加えたPBSを用いた。Swiss-3T3細胞はクローン化されていない細胞株であるため遺伝的なバックグラウンドを揃えた実験のために我々はケラチノサイトに対して優れたフィーダー効果を示すクローン (クローン no.5; 以下 no.5 cell と標記) を選択した。実験に用いたヒト新生児包皮由来ケラチノサイトは全て米国Cell Applications, Inc. より購入した。凍結細胞を融解後、インビトロゲン社のケラチノサイト培養用培地で2日ほど快復培養を行った後に培養表皮作製実験に用いた。



A new technology for cultured skin formation using developmental molecular mechanism

Toshiro Sugiyama, Takashi Kameda

Department of Biochemistry Akita University School of Medicine

2.2 Shh 発現ベクターの作製と遺伝子導入

ニワトリの sonic hedgehog 遺伝子 cDNA (ハーバード大学 Tabin 博士より分与) をクロンテック社の真核細胞用発現ベクター pEGFP-N1 に組み込み Shh 発現用ベクター pSHH を作製した。本ベクターを組み込んだ細胞はジェネティシンによる選択が可能である。我々は no.5 cell への pShh ベクターの導入 (インビトロゲン社リポフェクタミンプラスキットを使用) とジェネティシン (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) による選択を行い、Shh 蛋白を安定的に発現するフィーダー細胞株 (no.5-Shh) を樹立した。Shh 蛋白の発現はサンタクルツ社の抗 Shh 抗体 (H-160) を用いたウエスタンブロット法にて確認した。

2.3 培養表皮作製

フィーダー細胞の増殖停止のためにはガンマー線照射法を用いた。培養皿でコンフレントにまで増殖した no.5 または no.5-Shh 細胞に対して約 70 Gy の照射を行ったのちトリプシナイズを行い 60mm 培養皿当たり 4×10^5 個の割合で播種した。12-24 時間後に培養表皮作成用培地 (10% ウシ胎児血清・ 1.8×10^{-4} M アデニン・ $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ デキサメサゾン・ 1×10^{-10} M コレラ毒素・ $10\text{ng}/\text{ml}$ EGF・ 2×10^{-9} M トリヨードサイロニンを含むダルベッコ改変 MEM 培地) に培地を交換し、快復培養を終えたヒト表皮ケラチノサイトは 60 mm 培養皿あたり 5000-20000 細胞 (lot により調節) を播種した。培地交換は週に 2 回のペースで行った。

2.4 ケラチノサイトコロニーの染色と培養表皮の組織化学的解析

ケラチノサイトコロニーの染色は培養皿をホルマリン固定した後、ローダニル染色液 (1% Rhodamin B, 1% Nile Blue) を用いて行った。培養表皮の組織化学的解析のためには、培養表皮をディスペーゼを用いて培養皿より剥離させた後にホルマリン固定を行いパラフィン切片を作製した。HE 染色並びにバイオメダ社の抗サイトケラチン 14 抗体を用いた免疫染色による解析を行った。

3. 結果

3.1 Shh 発現フィーダー細胞株の樹立と Shh 遺伝子産物の発現確認

Shh 遺伝子産物のケラチノサイト増殖促進効果は再生医学分野においても利用可能であると考えられるが、現在までのところ生理活性を持った Shh 精製タンパク質を入手することは一般的に困難である。またヒト表皮ケラチノサイトへの直接的な Shh 発現ベクターの導入は細胞のがん化を誘発する可能性が高く安全面での不安が大きい。これらの問題を解決するために我々は上皮系細胞の培養や培養表皮作製にフィーダー細胞として広く用いられている

Swiss-3T3 細胞へ Shh 発現遺伝子を導入することを計画した (図 1 A)。本法では Shh 発現フィーダー細胞とケラチノサイトを共培養することで十分な Shh タンパク質の供給が可能になると期待される。またケラチノサイト自体の遺伝子改変は行わないため細胞がん化などの危険性も低いと期待される。

Swiss-3T3 はクローン化された細胞株ではないため、フィーダー細胞のバックグラウンドを揃えるために我々はケラチノサイトへのフィーディング効果を指標に Swiss-3T3 由来クローン化細胞株 (no.5 cell) を樹立した (詳細は省略)。Shh 発現誘導のため、我々は CMV プロモータによりニワトリ shh mRFNA を発現し、G418 による細胞株の選択を可能とする発現プラスミド p-Shh を作製した。リポフェクション法により no.5 cell に p-Shh プラスミドを導入後、G418 による選択を行った。選択した細胞株における Shh タンパク質の発現を抗 Shh タンパク質抗体を用いてウエスタンブロット法により検出した (図 1 B)。Shh タンパク質は合成後に自己触媒作用で N 末断片 (Shh-N) と C 末断片 (Shh-C) に分離する。使用した抗体は生理活性を持つ N 末断片に特異的であり、p-Shh 導入細胞におけるニワトリの Shh-N (23kD) の発現が確認された。我々はこの細胞株を no.5-Shh と名付けた。No.5-Shh は親株の

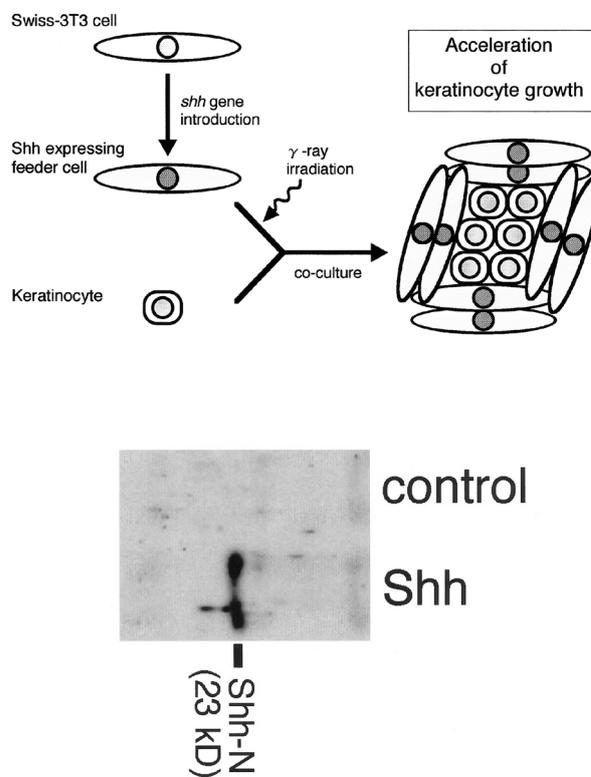


図 1 : A 本研究開発の概念図 Swiss-3T3 細胞に Shh 発現遺伝子を導入し改良フィーダーを作製する。

B Shh 発現ベクターの導入による Swiss-3T3 細胞株における Shh タンパク質の発現。

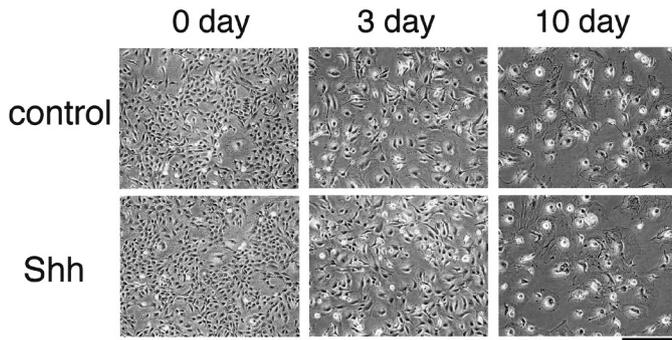


図2：放射線照射によるno.5ならびにno.5-Shh細胞のフィーダー化。

no.5に形態・増殖とも類似している（図2・データ省略）。放射線照射後は両細胞株とも増殖停止・細胞肥大化が誘発され、良好なフィーダー細胞として利用可能であると考えられた（図2）。

3.2 培養表皮の増殖における Shh 発現フィーダー細胞の有用性

我々は Shh 発現フィーダー細胞の有用性を確認するためにヒト包皮由来ケラチノサイトを用いた培養表皮作製実験を行った。放射線照射によりフィーダー化した no.5 細胞ならびに no.5-Shh 細胞とケラチノサイトを共培養し1週ごとに、各培養系でのコロニーの成長を比較した（図3）。ケラチノサイト播種後1週目では顕著な差を認めなかったが、2・3週目では Shh 発現フィーダー細胞との共培養において顕著なケラチノサイトコロニーの増殖促進が観察された。顕微鏡下において成長の良いケラチノサイトコロニーを観察したところ Shh 発現フィーダー細胞との共培養で、コントロールではほとんど観察されない極小サイズのケラチノサイトの活発な増殖像が観察された（図4）。以上の効果が実際に Shh の生理作用によるものかを確認するために Shh のシグナル伝達系を強力且つ高い特異性で抑制するサイクロパミンを用いた実験を行ったところ Shh 発現フィーダーによるケラチノサイト増殖促進はサイクロパミンにより顕著に抑制された（図5）。Shh 発現フィーダー細胞を用いて作製した培養表皮を組織化学的に解析したところ基底細胞層に重層した細胞層の形成が認められた（図6）。これらの細胞層は免疫染色により、未熟なケラチノサイトのマーカーであるサイトケラチン14陽性を示した。

4. 考 察

線維芽細胞との共培養が上皮系細胞の増殖に有用であることは古くから知られているが、その分子メカニズムについては未だ解明されていない点が多い。現在では完全合成培地によりケラチノサイトを培養して培養表皮を作製する

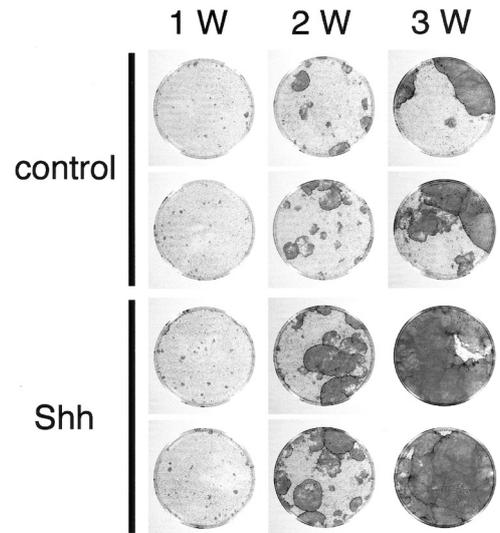


図3：Shh発現フィーダーによるケラチノサイトコロニーの増殖促進。

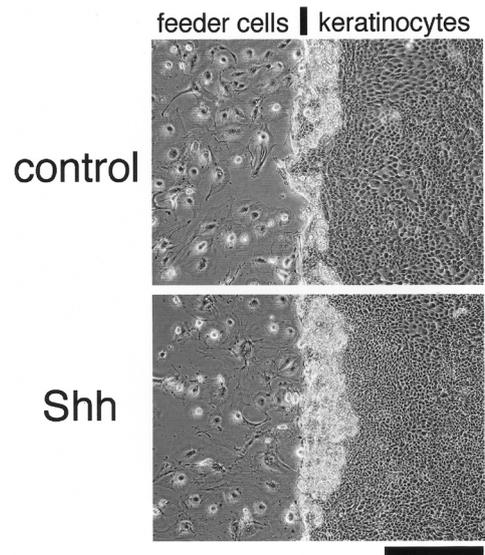


図4：Shh発現フィーダー細胞との共培養で観察された極小サイズケラチノサイトの活発な増殖像。

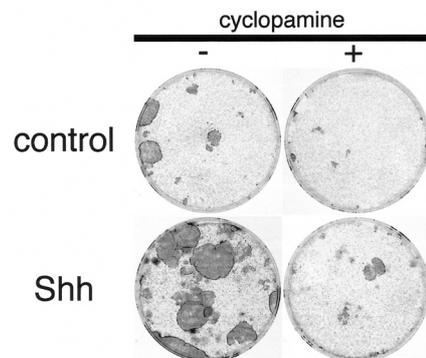


図5：Shh発現フィーダー細胞によるケラチノサイト増殖促進のHedgehogシグナル伝達系阻害剤サイクロパミンによる抑制。



図6：Shh 発現フィーダー細胞を用いて作製された培養表皮の組織切片像。(上段：HE 染色 下段：抗サイトケラチン 14 抗体による免疫染色)

ことも可能であるが非常に高価な成長因子などを必要とするため Green らによる Swiss-3T3 フィーダー細胞を用いる手法は依然として培養表皮作製のための簡便且つ確実なプロトコルである。我々はこの Swiss-3T3 細胞に表皮細胞の増殖・分化の調節に重要な役割をなしていると考えられる Shh 遺伝子産物を発現させることで培養表皮作製法の改良を目指した。Shh 発現フィーダー細胞はヒト包皮由来ケラチノサイトの増殖を有意に促進した。Hedgehog シグナルは体性幹細胞に対する増殖因子である可能性が示唆されており、我々の開発した手法は表皮再生医工学技術

の開発ならびに幹細胞研究のためのツールとして有用であると期待される⁵⁾。

(引用文献)

- 1) Reinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6, 331-343, 1975
- 2) O'connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel, et al. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1, 75-78, 1981
- 3) Murone M, Rosenthal A, deSavauge FJ. Hedgehog signal transduction: from flies to vertebrates. *Exp. Cell. Res.* 253, 25-33, 1999
- 4) Bale AE, Yu K. The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. *Human Mol Gen.* 10, 757-762, 2001.
- 5) Kameda T, Hatakeyama S, Terada K, Sukiyama T. Acceleration of the formation of cultured epithelium using the hedgehog expressing feeder cells. *Tissue Eng.* 7, 545-555, 2001

紫外線防御因子メタロチオネインのヒノキチオールによる合成誘導とその意義

東北大学大学院 薬学研究科

永 沼 章

Metallothionein has been known as one of photoprotection proteins. Effective inducers of metallothionein are needed for protection of skin from UVB-solar radiation. We have performed a search for non-metallic substances which activate metallothionein gene expression. Hinokitiol, an extract of steam distillation of the root or trunk of Japanese cypress, was found to activate the metallothionein promoter. The results of our study for elucidation of the mechanism of induction of metallothionein synthesis by hinokitiol suggest that hinokitiol activates MTF-1, a transcriptional factor, through mobilization of zinc, an activator of MTF-1, from medium to cells.

1. 緒言

メタロチオネイン (MT) は 1957 年にウマの腎臓中からカドミウム結合蛋白質として発見された分子量約 6000 の蛋白質で、構成アミノ酸の約 1/3 をシステインが占めていながら S-S 結合を一つも持たず、かつ芳香族性アミノ酸を一つも持たないという特徴的な構造を有している¹⁾。MT およびその類似蛋白質 (銅-ケラチン、フィトケラチンなど) は生物界に広く存在し、ヒトやげっ歯類などのほ乳類をはじめとした脊椎動物、酵母、植物などの真核生物のみならず、ラン藻などの原核生物にもその存在が認められている。

MT の性質として最もよく知られているのは重金属毒性軽減作用であり、MT はその SH 基を介して重金属と強固に結合することによって毒性の発現を抑制する。また、フリーラジカル消去作用や紫外線防御作用なども報告されており、生体内において多機能な防御因子として働いていると考えられている。

MT の合成は重金属に加え、グルココルチコイド、パラコート、インターロイキン 6 (IL-6)、紫外線照射²⁾ などの様々な刺激によって誘導される。重金属やグルココルチコイドによる MT の誘導は転写レベルで行われており、MT 遺伝子のプロモーター領域には重金属およびグルココルチコイドによる転写促進に必須の cis- エlement としてそれぞれ metal response element (MRE) および glucocorticoid responsive element (GRE) の存在が確認されている。ま

た、過酸化水素の刺激に応答する antioxidant responsive element (ARE) や IL-6 に応答する STAT3-binding site の存在も報告されている。しかしながら、これまで知られている非金属性の MT 誘導剤の MT 誘導能は亜鉛やカドミウムといった重金属と比べると非常に低い。

我々は、MT の示す紫外線防御作用に着目し、皮膚の MT 合成を誘導する金属を検索したが一般的に金属化合物は毒性が比較的高く、毒性の発現しない濃度範囲で効率良く MT 合成を誘導する金属は見出せなかった。そこで MT 遺伝子プロモーターを活性化する非金属化合物を約 400 種類の化合物中からスクリーニングしたところ、ヒノキチオール (ヒノキチオール, 別名 β -thujaplicin) が MT プロモーターを著しく活性化することを見出すことに成功した。ヒノキチオールは、タイワンヒノキや青森ヒバの精油に含まれる結晶性酸性物質で、1936 年に野副らによって天然物として初めて発見された炭素七員環芳香族化合物である^{3,4)}。ヒノキチオールは殺菌・抗菌力に優れ^{5,6)}、メラニン生成抑制作用^{7,8)} などが認められているため、基礎化粧品や養毛剤等に広く用いられている。さらに、ある種の癌細胞を分化させたり、アポトーシスを引き起こしたりすることや、ヒノキチオールの基本骨格であるトロポロンの誘導体が抗腫瘍活性を持つことなどが数多く報告されている。しかし、これまでヒノキチオールが蛋白質の誘導合成に関与したり、特定の転写因子に作用したりするといった報告はほとんどなく、その MT プロモーター活性化機序に興味を持たれる。そこでヒノキチオールの MT プロモーター活性化機構の解明を試みた。

2. 実験

2.1 細胞

マウス線維芽細胞株の Ltk-細胞、およびマウス MT-I プロモーター (MT-I 遺伝子の転写開始点から 1400bp 上



Induction of synthesis of metallothionein, a photoprotection protein, by hinokitiol

Akira Naganuma

Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku University

流までの領域)の下流に lacZ 遺伝子を連結したプラスミド 41) を Ltk-細胞に導入して得られた安定形質転換体である L13-17 細胞を実験に用いた)。

2・2 メタロチオネインの定量

細胞の超音波破砕液を沸騰水浴中で5分間加熱して得た上清を ammonium 7-fluorobenz-2-oxa-1,3-diazole-sulfonate (SBD-F) と反応させて MT の SH 基を SBD 蛍光標識した。この反応液中の MT 濃度を蛍光検出高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 法⁹⁾により定量した。

2・3 リポータージーンアッセイ

種々の長さのマウス MT-I プロモーターの下流に lacZ 遺伝子を連結したプラスミドと SV40 プロモーターの支配下でルシフェラーゼを発現するプラスミドを同時に Ltk-細胞に導入した。レポーター活性は、細胞抽出液に X-gal を加えて反応させた後、マイクロプレートリーダーで 650nm の吸光度を測定して求めた。遺伝子の導入効率は細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定して求めた。

3. 結果と考察

マウス MT-I プロモーターの支配下で β -ガラクトシダーゼを発現する安定形質転換体である L13-17 細胞を用いてヒノキチオール (HT) の MT-I プロモーター活性化作用を検討したところ、80 μ M までのヒノキチオールによって濃度依存的に β -ガラクトシダーゼ活性が上昇し、それ以上高い濃度ではプラトーに達した (Fig. 1)。一方、最も強力な MT 誘導剤の一つである亜鉛で処理した場合は、200 μ M 付近でピークに達し最大の β -ガラクトシダーゼ活性を示したが (Fig. 1)、ここに比較的 low 濃度のヒノキチオール (15, 25 μ M) を共存させることでそのピークが亜鉛の low 濃度側に移動する現象が認められた (Fig. 2)。このとき、単独ではほとんど β -ガラクトシダーゼ活性が認められない 15 μ M のヒノキチオールと 40 μ M の亜鉛の共存により、200 μ M の亜鉛処理の場合と同等の強力な β -ガラクトシダーゼ活性が認められることから (Fig. 2)、ヒノキチオールと亜鉛は非常に強力な相乗作用により MT プロモーターを活性化させると見ることもできる。しかし、ヒノキチオールは亜鉛処理によって得られる最大のプロモーター活性をさらに亢進させることはなかった (Fig. 2)。

次に、L13-17 細胞を用いた検討で見い出されたこれらの現象が実際の MT の合成誘導に反映するか否かを L13-17 細胞の親株である Ltk-細胞を用いて検討した。その結果、MT mRNA レベルおよび細胞内 MT 量は共にヒノキチ奥ールの濃度依存的に増加することが明らかになった。さらに、亜鉛 (10-80 μ M) とヒノキチオール (15 μ M) を併用することによって MT mRNA レベルが劇的に上昇

することおよび亜鉛処理による細胞内 MT 量の増加のピークが、ヒノキチ奥ールの共存により低濃度側に移動することが明らかになった。従って、これまでの検討により明らかになったヒノキチ奥ールの MT プロモーター活性化作用およびヒノキチオールと亜鉛の併用によるピークの移動を伴う MT プロモーター活性化促進作用は実際の MT mRNA レベルの上昇や MT 蛋白質量の増加に反映するものであることが明らかになった。

またこのとき、解糖系の酵素である GAPDH の mRNA レベルがヒノキチ奥ールの濃度依存的に上昇することが観察された。GAPDH は house keeping gene であり、生体試料中の特定の蛋白質および mRNA を定量する際の内部標準として広く用いられているが、場合によってはそのレベルが変動することがいくつか報告されている。特に培養

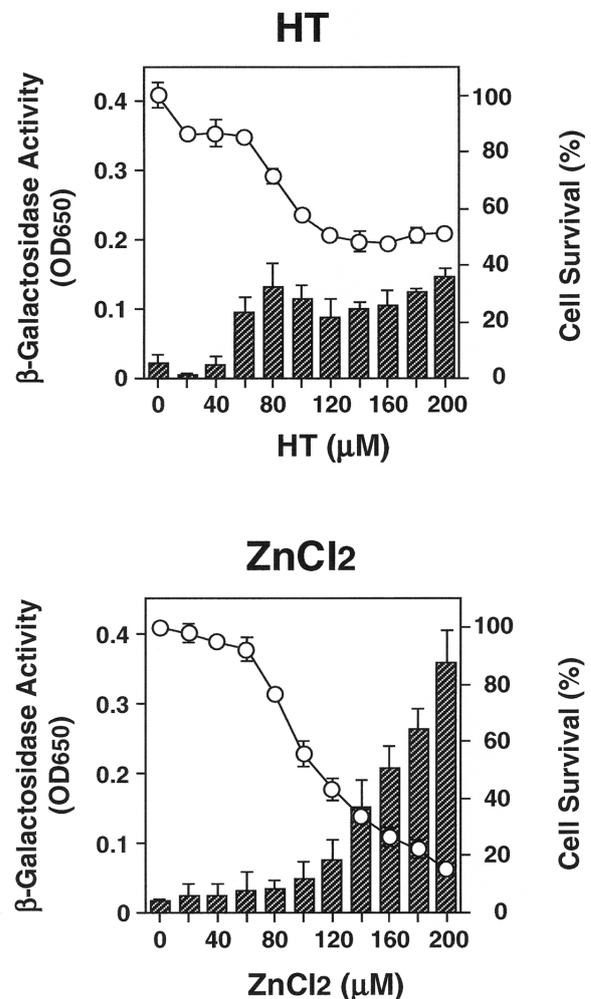


Figure 1 Effects of hinokitiol or ZnCl₂ on β -galactosidase activity and cell survival in L13-17 cells.

L13-17 cells (1×10^4 cells) were incubated for 24h in medium containing various concentrations hinokitiol (HT) or ZnCl₂. Then β -galactosidase activity (■) and cell survival (○) were determined. Values are the means \pm SD from 4 samples. The results were confirmed three separate experiments.

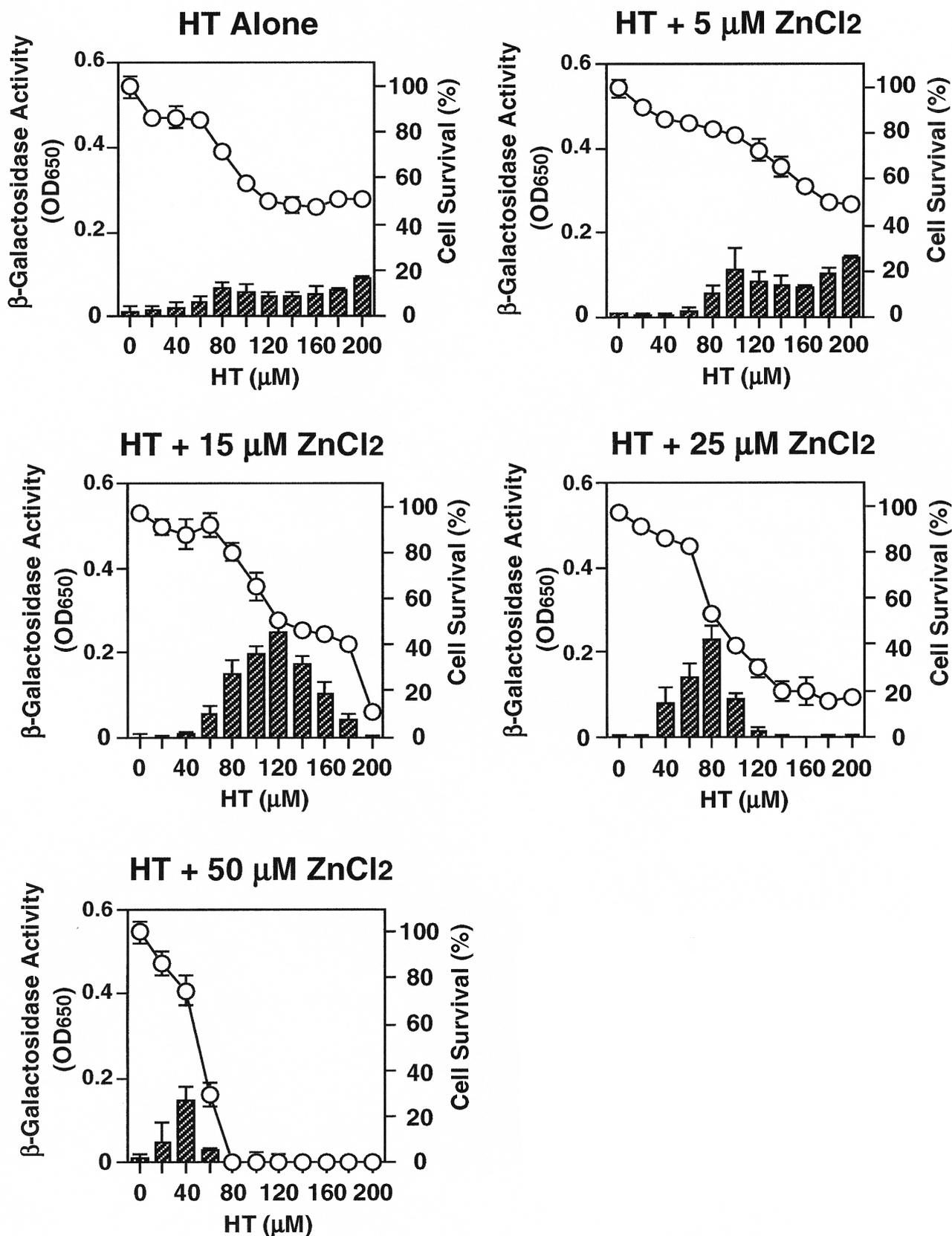


Figure 2 Effects of ZnCl₂ on β -galactosidase activity and cell survival in hinokitiol-treated L13-17 cells.

L13-17 cells (1×10^4 cells) were incubated for 24 h in medium containing various concentrations of hinokitiol (HT) with ZnCl₂. Then β -galactosidase activity (■) and cell survival (○) were determined. Values are the means \pm SD from 4 samples. The results were confirmed three separate experiments.

細胞を低酸素条件下で培養することや低酸素状態をミミックすると考えられている遷移金属のコバルトや鉄キレーターの deferoxamine の存在下で培養することで GAPDH mRNA レベルが上昇するという報告が多くある。一方で、ヒノキチオールはその分子内に β -diketone 構造を持っておりキレーターとして働くことが知られている。その金属錯塩の形成能は $\text{Cu (II)} > \text{Ni} > \text{Pb} > \text{Zn}$ の順であり、またヒノキチオールの母核である tropolone の場合も、一般の β -diketone の場合と同様に、 $\text{Cu (II)} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Cd} > \text{Fe (II)} > \text{Mn (II)} > \text{Mg} > \text{Ca}$ の順である¹⁰⁾。ヒノキチオールが赤色の鉄錯体である hinokitin から単離精製されたことからわかるように、ヒノキチオールは鉄ともキレートを形成する。そのためヒノキチオールが deferoxamine と同様の機構により GAPDH mRNA レベルを上昇させることも考えられる。最近、低酸素条件下で細胞を培養すると MTF-1/MRE 系を介して MT が誘導されるという報告¹¹⁾ がなされているため、ヒノキチオールが MT プロモーター活性化する機構の一つとして、ヒノキチオールが低酸素状態をミミックし、その低酸素ストレスにより MT プロモーターが活性化されるという可能性も考えられる。しかし、どうして鉄キレーターが GAPDH を誘導させるのか、鉄キレーターが本当に低酸素状態をミミックしているのかといった点に関しては未だ明らかにされていない。

一方、本研究によってヒノキチオールの共存により亜鉛による MT プロモーター活性化のピークが移動し、より低濃度の亜鉛で最大のプロモーター活性が得られるようになるという興味深い現象が起きることが明らかになった。そこでこの現象が亜鉛に特異的なものであるかどうかを調べるために、亜鉛以外の MT 誘導剤 (DEX, カドミウム、銅、水銀、鉛およびビスマス) について検討したが、亜鉛の場合に見られたようなピークの移動は認められなかった。従って、ヒノキチオールによるピークの移動を伴う MT プロモーター活性化促進作用は亜鉛との併用の場合に比較的特異的に認められる現象であることが示唆された。なおこれらの MT 誘導剤のうち、ビスマスはヒノキチオールと併用すると非常に強く MT プロモーターを活性化させ、且つほとんど細胞毒性を示さないことが明らかになった。そのため、ヒノキチオールとビスマスの併用は MT プロモーターを活性化するための理想的な方法であることが示唆された。

次に、ヒノキチオールによる MT プロモーター活性化機構を明らかにするため、MT プロモーター上のヒノキチオール応答領域の検索を行った。その結果、MT プロモーターの -150bp から -135bp の領域にヒノキチオールの応答領域の一つが存在すると考えられた。この領域には亜鉛やカドミウムなどの重金属に加え、過酸化水素や低酸素ストレスといった重金属以外の刺激による MT の誘導にも必須

のエレメントである MRE の一つ、MREd が存在している。この MREd はマウス MT プロモーター上に存在する 6 つの MRE の中で、亜鉛で処理した場合最も高い転写活性化能を示すエレメントである。また、この MREd が欠失している変異体 (-135 - -1) にもわずかにヒノキチオール応答能があったが、MREd とその下流の MREc を欠失した変異体 (-117 - -1) ではヒノキチオールに対する応答が全く無かったため、MREc も弱いながらヒノキチオール応答エレメントとして働いていることが示唆された。

さらに TATA box 領域から MREd までの MT プロモーターを 3' 側から短くすると、最も転写開始点に近い MRE である MREa を欠失しただけで著しいプロモーター活性の減少が認められた。しかし、MREd と MREc を欠失させた場合と異なり、ヒノキチオールに対する応答の完全な消失は認められなかった。従って、MREa には MREd と MREc によるヒノキチオール応答を増強するはたらきがあると考えられる。

また以上のリポータージーンアッセイすべてに渡って、ヒノキチオール処理群と亜鉛処理群のリポーター活性はプロモーターの欠失に対しほぼ同様の変動パターンを示した。このことから、ヒノキチオールは最終的には亜鉛と同一の作用点、つまり MRE に作用して MT プロモーター活性を上昇させる可能性が強く示唆された。ヒノキチオールと亜鉛の併用によっても、亜鉛によって得られる最大のプロモーター活性を越えるような活性が得られなかったことも、このようにヒノキチオールと亜鉛の作用点が同一であると考えたと説明できるものと思われる。

ほ乳類の MT の誘導において亜鉛は特別の役割があると考えられている。MT プロモーター上に存在する MRE に結合する転写因子として MTF-1 が知られており、重金属による MT の誘導は主に MTF-1/MRE の系を介していると考えられている。リコンビナント MTF-1 を用いた無細胞系での実験では亜鉛、カドミウム、ニッケル、銀、銅、コバルトといった遷移金属のうち亜鉛だけが MTF-1 のコンセンサス MRE への結合を促進することが報告されている¹²⁾。つまり、亜鉛だけが MTF-1 に直接作用して MTF-1 の MRE への結合活性を促進し、MT プロモーターを活性化するのであり、亜鉛以外の重金属は亜鉛の redistribution を介して間接的に MTF-1/MRE に作用するか、カドミウムのように MRE 以外の cis- エレメントにも作用することで MT プロモーターを活性化すると考えられている。

先の結果からヒノキチオールがこの亜鉛を介して間接的に MT プロモーターを活性化させる可能性が考えられた。そこで次に、ヒノキチオールによる MT プロモーター活性化における亜鉛の影響を検討した。細胞培養に使用した培地には通常、約 $4 \mu\text{M}$ の亜鉛が含まれており、この亜鉛は

全て血清由来だと考えられる。そこで亜鉛を含まない無血清培地において、ヒノキチオールのMTプロモーター活性化能について検討したところ、ヒノキチオールによるMTプロモーターの活性化はほとんど認められなかった。さらに、この無血清培地に亜鉛を添加して通常の半分量に当たる $2\mu\text{M}$ の亜鉛を存在させた場合にはヒノキチオールによるMTプロモーターの活性化が認められた。従って、ヒノキチオールは細胞外の亜鉛に依存してMTプロモーターを活性化させるものと考えられる。

4. まとめ

本研究の結果、ヒノキチオールによるMTプロモーターの活性化には亜鉛の動員を介したMTF-1のMREへの結合活性の促進が関与していることが強く示唆された。これまでに報告されているヒノキチオールの多彩な生理作用の一部もこのような亜鉛の動員を介している可能性が考えられる。

(文献)

- 1) Webb, M., :The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium. Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, 196-266, 1979.
- 2) Angel, P., Potting, A., Mallick, U., et al. :Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 1760-1766, 1986.
- 3) Nozoe, T., :Uber die farbstoffe im holzteil des "Hinoki"-baumes. I. Hinokitin und hinokitiol, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 11, 295-298, 1936.
- 4) Kubo, M., Nozoe, T. and Kurita, U., :Dipole moments of tropolone and related compounds, *Nature*, 167, 688-689, 1951.
- 5) Miyamoto, D. et al., :Thujapulicin-copper chelates inhibit replication of human influenza viruses, *Antiviral Res.*, 39, 89-100, 1998.
- 6) Akiyama, H., Yamasaki, O., Kanzaki, H., et al. :Effects of zinc oxide on the attachment of *Staphylococcus aureus* strains, *J. Dermatol. Sci.*, 17, 67-74, 1998.
- 7) Baba, T., et al. :Inhibitory effect of beta-thujapulicin on ultraviolet B-induced apoptosis in mouse keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 110, 24-28, 1998.
- 8) Sakuma, K., Ogawa, M., Sugibayashi, K., et al. :Relationship between tyrosinase inhibitory action and oxidation-reduction potential of cosmetic whitening ingredients and phenol derivatives, *Arch. Pharm. Res.*, 22, 335-339, 1999.
- 9) Miyairi, S., Shibata, S., and Naganuma, A., :Determination of metallothionein by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using an isocratic solvent system, *Analytical Biochemistry* 258, 168-175, 1998.
- 10) 野副鐵男, :トロポロン (II), *化学*, 7, 344-351, 1952.
- 11) Murphy, B.J., Andrews, G.K., Bittel, D., et al. :Activation of metallothionein gene expression by hypoxia involves metal response elements and metal transcriptional factor-1, *Cancer Res.* 59, 1315-1322, 1999.
- 12) Bittel, D., Dalton, T., Samson, S.L.A., et al. :The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated in vivo and in vitro by zinc, but not by other transition metals, *J. Biol. Chem.*, 273, 7127-7133, 1998.

Wnt シグナルによるメラニン産生の制御機構の解析

東北大学大学院 医学系研究科医学生物化学講座分子生物学分野

武田 和久

Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) consists of many isoforms that differ at their N-termini but share a basic helix-loop-helix and leucine-zipper (bHLH-LZ) structure. Among the isoforms, melanocyte-specific MITF (MITF-M) is of particular interest, because expression of MITF-M is under the regulation of the melanocyte-specific promoter (*M* promoter) of the *MITF* gene, and transcription from the *M* promoter is induced by Wnt signals through a nuclear mediator, lymphoid-enhancing factor 1 (LEF-1). Wnt, a group of secretory signaling molecule, evokes a signal to regulate the melanocyte differentiation. The binding of Wnt to its receptor Frizzled leads to inactivation of glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β), followed by the accumulation of β -catenin and its translocation to nucleus. LEF-1/TCF transcription factors can bind to the β -catenin, and the formed complexes transactivate the target genes. Recently, we have shown that functional cooperation of MITF-M with LEF-1 could lead to transcriptional activation of the *M* promoter and the dopachrome tautomerase (*DCT*) gene, an early melanoblast marker. The bHLH-LZ region of MITF-M is responsible for the physical interaction with LEF-1, and β -catenin is required for the collaboration between LEF-1 and MITF-M. Importantly, MITF-M could function as a non-DNA-binding cofactor for LEF-1. These results suggest that MITF-M may function as a self-regulator of its own expression to maintain a threshold level of MITF-M at a certain sensitive stage of melanocyte development, which could account for dominant inheritance of Waardenburg syndrome type 2 (WS2) that is characterized by deafness and hypopigmentation due to lack of melanocytes in the inner ear and skin. MITF-M therefore plays dual roles in the Wnt signaling pathway; MITF-M represents a downstream target and a nuclear mediator of Wnt signals in melanocytes.

1. 緒言

小眼球症関連転写因子 (MITF) は塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス-ロイシンジッパー (bHLH-LZ) 構造を持つ転写因子であり、神経堤由来のメラノサイトと脳由来の網膜色素上皮細胞 (RPE) の分化制御因子である^{1, 2)}。Wnt は胚の形態形成や毛包の再生などに重要な細胞間シグナル分子であり、MITF 及びメラノブラストの初期分化マーカーである DCT (dopachrome tautomerase) の発現を誘導する³⁻⁵⁾。DCT はメラニン合成系酵素の一つであり、可溶性のメラニン前駆物質の解毒にも関与すると考えられている⁶⁾。

MITF は少なくとも 5 種のアイソフォーム (A, B, C, H, M) から成り、アイソフォームのアミノ末端はそれぞれ特異的なエキソン 1 によりコードされ、各エキソン 1 は固有のプロモーターの制御下にある (図 1)⁷⁻⁹⁾。MITF-M の発現がメラノサイト特異的であるのに対し、MITF-A など他のアイソフォームは RPE やメラノサイトを含めた種々の細胞で発現されている。すなわち、MITF-M の N 末をコードするエキソン 1 M は最も下流に位置する第一エキソンであり、その転写はメラノサイト特異的プロモーター

(M プロモーター) により制御される。

MITF 遺伝子の変異による難聴を伴う色素異常症としてワーデンブルグ症候群 2 型 (Waardenburg syndrome type 2, WS2) が知られている¹⁰⁾。WS2 患者は先天性感音難聴の他に、皮膚白斑、早発性白髪、虹彩色素異常を呈する。WS2 の発症は MITF-M の量不足 (haploinsufficiency) によると推定されている¹¹⁾。

MITF の機能異常は色素異常症 (シミあるいは白斑)、毛包の機能低下 (白髪や脱毛) など、加齢に伴い遭遇する諸問題と関連する。本研究では、MITF の機能発現の多様な制御機構を解明し、肝斑などの色素沈着や白斑の有効な予防法と治療法の開発を目ざす。誰も美しく老いたいと願うものであり、本研究は高齢者の良好な QOL の達成に貢献する。

2. 実験

2・1 RT-PCR 法による新規アイソフォームの探索と発現解析

マウス RPE で発現される新規 *Mitf* アイソフォームを探索するため、マウス眼球組織由来の mRNA を用いた cDNA の 5' 端増幅法 (5'-RACE 法) にて、*Mitf* cDNA を解析した。その結果、*Mitf*-D を新たに同定した¹²⁾。ついで、そのヒト cDNA である MITF-D をヒト RPE 細胞株からクローン化した。さらに、マウス及びヒト遺伝子断片を単離し、該当するエキソン (エキソン 1D) の位置を決定した (図 1)。種々ヒト細胞やマウス組織における MITF-D mRNA の発現をノーザンブロット法により解析した。



Role of Wnt signaling in the regulation of melanin biosynthesis

Kazuhisa Takeda

Department of Molecular Biology and Applied Physiology, Tohoku University School of Medicine

2・2 M プロモーター機能解析によるエンハンサーの探索

MITF-M を発現するメラノーマ細胞における M プロモーター機能解析用の融合遺伝子の一時的発現法により、エンハンサーを探索し、MDE を同定した¹³⁾。さらに、MDE の機能を詳細に解析し、結合タンパクを探索した。

2・3 MITF の機能制御因子の探索

DCT プロモーター機能解析用の融合遺伝子との一時的共発現法により、MITF-M と LEF-1 の相互作用を解析し、

関与するシスエレメントを探索した。Tag 付きの各蛋白を調製し、pull-down 法と免疫沈降法により in vivo での結合を解析した。

2・4 cAMP シグナルと Wnt シグナルのクロストークの解析

上記実験により、DCT 遺伝子の CRE 類似配列が、MITF-M と LEF-1 の相互作用による活性化に必須なことが判明した (図2A)⁵⁾。そこで、DCT 遺伝子の CRE 類似配

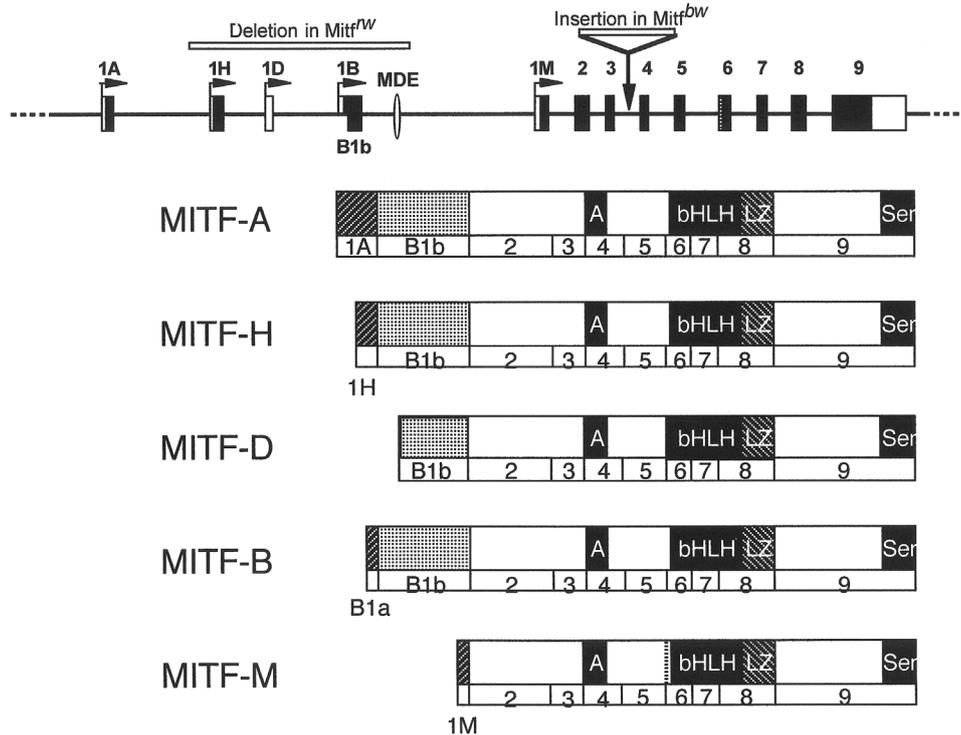


図1 MITF 遺伝子と MITF アイソフォームの模式図

黒い部分はタンパクをコードするエクソン領域を、白い部分は 5' あるいは 3' の非翻訳領域を示す。エクソン 2～9 はすべてのアイソフォームに共通である。4 種の MITF アイソフォームの N 末をエクソン 1 N と示した。エクソン 1 B の 3' 側の B1b 領域は、MITF-A mRNA などの生成の際に第 2 エクソンとして利用される。M プロモーター (エクソン 1 M の転写開始点の上流) はメラノサイト特異的に機能する。bw マウスの外来 DNA 挿入部と rw マウスで見られる DNA 欠失領域に相当する部分も示す。後者の欠失領域には、M プロモーターのエンハンサー (MDE) が存在する。

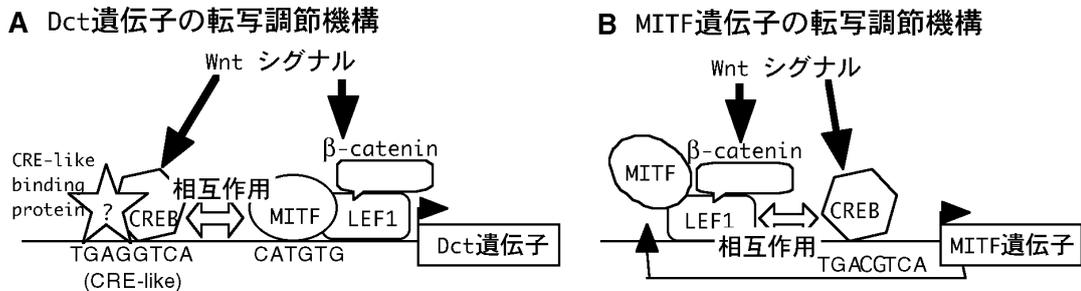


図2 MITF と LEF-1 の相互作用による転写調節

A. DCT 遺伝子の転写調節機構。DCT プロモーター領域には、MITF 結合部位、LEF-1 結合部位、及び CRE 類似配列が存在する。CRE 類似配列に結合するタンパクはまだ不明である。
 B. M プロモーターの転写調節機構。MITF 遺伝子の M プロモーター領域を模式的に示す。M プロモーターには LEF-1 結合部位と CRE は存在するが、MITF の結合部位は存在しない。

列をプローブにしたゲルシフトアッセイにより解析する。場合によっては、サウスウェスタン法にて結合蛋白を探索する。

2・5 MITF-M による M プロモーターの自己制御機構の解析

培養細胞での一時的発現解析では、MITF-M は LEF-1 による M プロモーターの活性化を促進する¹⁴⁾。しかし、同領域には MITF-M の結合部位は存在しない (図 2B)。よって、LEF-1 を介した MITF-M による未知の転写活性化機構の存在が示唆され、その分子基盤を明らかにする。

3. 結果

3・1 新規アイソフォーム MITF-D の同定

RPE と破骨細胞で発現される MITF-D を新たに同定した (図 1)¹²⁾。MITF-D の翻訳開始 Met は下流のエキソン 1B に位置する。MITF-D mRNA の非翻訳領域はエキソン 1D によりコードされる。

3・2 M プロモーターの上流エンハンサー MDE の同定

M プロモーターの機能解析により、エキソン 1M の上流約 14kb にエンハンサー MDE を同定した (図 1)¹³⁾。MDE には 2 つの SOX10 結合部位が存在し、エンハンサー機能に必須である。事実、SOX10 は MDE に作用して、M プロモーターを活性化した。さらに、Mitf 変異マウスである red-eyed white (rw) のホモ接合体は赤眼、小眼球、広範な白毛を呈する¹⁵⁾。その本態はエキソン 1H、エキソン 1D、及びエキソン 1B を含む DNA 断片の欠失である (図 1)¹⁶⁾。よって、rw マウスは MITF-A など B1b 領域を持つすべてのアイソフォームを欠損する。さらに、白毛を呈することから、MITF-M の発現も欠損していることが示唆される。実際、rw マウスでは、MDE が欠失していることを明らかにした¹³⁾。

これらの結果は Pigment Cell Research 誌に発表され、2002 年の最優秀論文賞を受賞した (文献 13)。

3・3 Wnt シグナル伝達系の構成因子としての MITF

MITF-M が Wnt シグナル伝達系の転写因子 LEF-1 と協調的に作用してメラノblastoma マーカーでもある DCT 遺伝子プロモーターを活性化することを発見した⁵⁾。この作用には、LEF-1 と共に β -カテニンも関与する (図 2A)。ヒト培養細胞における two-hybrid 法と抗体を用いた pull-down 解析法により、MITF の bHLH-LZ 領域が LEF-1 と相互作用することを明らかにした。よって、MITF-M は Wnt シグナル伝達系の構成因子でもある。MITF は DNA との結合の有無に関わらず LEF-1 のコアクチベーターとして機能する。

bHLH-LZ 領域はすべての MITF アイソフォームに共通であり、MITF-A などのアイソフォームも LEF-1 と相互

作用する⁵⁾。すなわち、MITF は Wnt シグナル伝達系の構成因子としての役割も担うことが示唆される。この結果、Wnt シグナルは種々細胞において効率的に伝達されると考えられる。一方、LEF-1 ファミリーに属する TCF-1 は MITF と相互作用しない¹⁷⁾。よって、Wnt シグナル伝達経路における LEF-1 と TCF 1 との機能的差異が明らかになった。

3・4 Wnt シグナル伝達系と cAMP シグナル伝達系のクロストーク

cAMP と Wnt シグナルによる DCT プロモーターの活性化には、共通の cAMP-response element (CRE) 類似配列が関与するが、既知の CREB はこの配列には結合しない⁵⁾。Wnt シグナル伝達系と cAMP シグナル伝達系のクロストークの可能性が示唆される (図 2A)。

3・5 MITF による M プロモーターの自己活性化機構

WS2 の発症は MITF-M の量不足 (haploinsufficiency) によると考えられるが、その発症機構は不明であった。MITF 自身が、LEF-1 を介して M プロモーター (自己遺伝子) の転写を促進する事を明らかにした (図 2B)¹⁴⁾。この場合、MITF は M プロモーターに結合する必要は無い。すなわち、DNA との結合に関わらず MITF は LEF-1 のコアクチベーターとして機能し得る。よって、発生過程で効率良く MITF-M の発現量を維持できると考えられる。

3・6 RPE における OTX2 の役割

RPE は脱落・生成を繰り返す杆体細胞外節片を絶えず貪食・処理するのみならず、ロドプシンの構成成分である 11-シス-レチナールを再生し視細胞に供給する。このように、RPE は視細胞の機能維持に必須である。また、RPE はメラニン合成という分化形質を持ち、メラニン合成系の 3 つの酵素 (チロシナーゼ、TRP1、DCT) を発現する。RPE に存在するメラニンは視覚機能に重要であるばかりでなく、視神経の適正な伸張にも関与する。転写因子 OTX2 が RPE 特異的に DCT プロモーターを活性化することを発見した^{18,19)}。

4. 考察

最近の美白ブームによりメラニンに対する一般の関心は高く、美白のためのさまざまな化粧品が登場している。さらに、高齢化が進む我が国においては、単に健康で長生きできればよいというわけではなく、その余生の質が重要視されている。今や、美しく老いるという願望は必ずしも女性だけのものではない。実際、皮膚の老化の指標の一つである色素沈着 (シミ) を予防できるような化粧品・薬剤の開発が待ち望まれている。

オゾン層の破壊により地上に到達する紫外線量が増加

し、世界的にメラノーマが増加している。メラニンの主な機能は紫外線に対する防護作用であるが、様々な皮膚の炎症後にもメラニン色素の沈着がおこる。また、加齢に伴う白髪形成には、毛包メラノサイトの細胞死による脱落などの病態が考えられる。しかし、現時点でもメラノサイトの機能制御因子が続々と発見されており、メラノサイトの分化・生存には従来考えられてきたよりも複雑な制御機構が存在する。本研究は、メラノサイトの分化と機能維持に重要な液性因子 Wnt に焦点を当てるものであり、コスメトロジーにとって重要な知見を提供する。すなわち、我々が明らかにする Wnt シグナル伝達に関連する新規因子の機能制御法を開発することにより、将来、皮膚を守る化粧品・薬剤の開発へと発展する可能性がある。

MITF は色素細胞のみならずマスト細胞、破骨細胞などの分化制御因子であり、MITF 変異が及ぼす効果の多面性の分子基盤の解明も今後の重要な研究課題である。一方、Wnt シグナルは、メラノサイトを含めた毛包細胞間の相互作用にも関与する。Wnt が毛包メラノサイトの生存維持をどのように制御するのも興味深い問題である。

(文 献)

- 1) Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Arnheiter H. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein: *Cell* 1993; 74: 395-404.
- 2) Hughes MJ, Lingrel JB, Krakowsky JM, Anderson KP. A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the mi locus: *J Biol Chem* 1993; 268: 20687-20690.
- 3) Dorsky RI, Raible DW, Moon RT. Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway: *Genes Dev* 2000; 14: 158-162.
- 4) Takeda K, Yasumoto K, Takada R, Takada S, Watanabe K, Uono T, Saito H, Takahashi K, Shibahara S. Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a: *J Biol Chem* 2000; 275: 14013-14016.
- 5) Yasumoto K, Takeda K, Saito H, Watanabe K, Takahashi K, Shibahara S. Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *EMBO J* 2002; 21: 2703-2714.
- 6) Steel KP, Davidson DR, Jackson IJ. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor: *Development* 1992; 115: 1111-1119.
- 7) Amae S, Fuse N, Yasumoto K, Sato S, Yajima I, Yamamoto H, Uono T, Durlu YK, Tamai M, Takahashi K, Shibahara S. Identification of a novel isoform of microphthalmia-associated transcription factor that is enriched in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 710-715.
- 8) Uono T, Yasumoto K, Takeda K, Amae S, Watanabe K, Saito H, Fuse N, Tachibana M, Takahashi K, Tamai M, Shibahara S. Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters: *Biochim Biophys Acta* 2000; 1491: 205-219.
- 9) Fuse N, Yasumoto K, Takeda K, Amae S, Yoshizawa M, Uono T, Takahashi K, Tamai M, Tomita Y, Tachibana M, Shibahara S. Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus: *J Biochem (Tokyo)* 1999; 126: 1043-1051.
- 10) Tassabehji M, Newton VE, Read AP. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene: *Nature Genet* 1994; 8: 251-255.
- 11) Nobukuni Y, Watanabe A, Takeda K, Skarka H, Tachibana M. Analyses of loss-of-function mutations of the MITF gene suggest that haploinsufficiency is a cause of Waardenburg syndrome type 2A: *Am J Hum Genet* 1996; 59: 76-83.
- 12) Takeda K, Yasumoto K, Kawaguchi N, Uono T, Watanabe K, Saito H, Takahashi K, Noda M, Shibahara S. Mitf-D, a newly identified isoform, expressed in the retinal pigment epithelium and monocyte-lineage cells affected by Mitf mutations: *Biochim Biophys Acta* 2002; 1574: 15-23.
- 13) Watanabe K, Takeda K, Yasumoto K, Uono T, Saito H, Ikeda K, Takasaka T, Takahashi K, Kobayashi T, Tachibana M, Shibahara S. Identification of a distal enhancer for the melanocyte-specific promoter of the MITF gene: *Pigment Cell Res* 2002; 15: 201-212. (2002年の最優秀論文賞を受賞)
- 14) Saito H, Yasumoto K, Takeda K, Takahashi K, Fukuzaki A, Orikasa S, Shibahara S. Melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform activates its own gene promoter through physical interaction with lymphoid-enhancing factor 1: *J Biol Chem* 2002; 277: 28787-28794.
- 15) Steingrímsson E, Moore KJ, Lamoreux ML, Ferr_-D'Amaré AR, Burley SK, Sanders Zimring DC, Skow LC, Hodgkinson CA, Arnheiter H, Copeland NG, Jenkins NA. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi)

-
- mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences: *Nature Genet* 1994; 8: 256-263.
- 16) Hallsson JH, Favor J, Hodgkinson C, Glaser T, Lamoreux ML, Magnusdottir R, Gunnarsson GJ, Sweet HO, Copeland NG, Jenkins NA, Steingrímsson E. Genomic, transcriptional and mutational analysis of the mouse microphthalmia locus: *Genetics* 2000; 155: 291-300.
- 17) Waterman ML, Fischer WH, Jones KA. A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C α enhancer: *Genes Dev* 1991; 5: 656-669.
- 18) Simeone A, Acampora D, Mallamaci A, Stornaiuolo A, D'Apice MR, Nigro V, Boncinelli E. A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo: *EMBO J* 1993; 12: 2735-2747.
- 19) Takeda K, Yokoyama S, Yasumoto K, Saito H, Uono T, Takahashi K, Shibahara S. OTX2 regulates expression of DOPAchrome tautomerase in human retinal pigment epithelium: *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 908-914.

皮膚におけるアクアポリン3の発現調節

自治医科大学 薬理学教室

石橋 賢一、中越 雅道

Water is important for skin to keep its moisture. Water transport is conducted by channel proteins named aquaporins. Several aquaporins play pivotal roles in water metabolism in our body. AQP3 is expressed in the skin and its importance for the skin moisture is demonstrated by the study of AQP3 knockout mice which have accelerated drying of the skin. The prevention of dry skin is important not only from the cosmetic point of view but also from the clinical point of view, i.e. it is responsible for an itch especially in aged people. This study was intended to search for the substances which upregulate the expression of AQP3 in the skin. We used rat skins and human keratinocytes as models. In rat skins, vitamin A increased the AQP3 expression in a high dose (10%) but not in lower doses. However, the AQP3 expression was unaffected by vitamin A in a cell line from human keratocarcinoma. On the other hand, the expression of AQP3 in this cell line responded to hypertonic stimulation with sorbitol suggesting that this cell line is useful for the screening of the candidate substances which increase AQP3 expression.

1. 緒言

水は生命にとって不可欠の物質であり、それを選択的に通す水チャンネルが発見されてこの分野の研究は急速に進展した。水チャンネルは瞬時に大量の水を運ぶ必要がある細胞や浸透圧格差が小さくても水の輸送が必要とされる細胞に存在している。水チャンネルの実体はアクアポリン (aqua water porin 穴) と呼ばれる膜蛋白であるがヒトにおいて13個の遺伝子がみついている。この数は植物のシロイヌナズナの38個に比べるには少なく、また線虫の11個に比べても少ないように思える。一方アクアポリンは水だけを通すのでないこともあきらかになり名前にとらわれていると他の重要な機能を見落とす危険がある。水のみならずグリセリンや尿素などの小粒子をとおす aquaglyceroporin と呼ばれるサブグループも存在する (AQP3, 7, 9, 10)¹⁾。

皮膚では角質層に適度な水分 (20-30%) が含まれており皮膚の柔らかさを生み出している。一方体内にたまった熱を体外に放出するために皮膚から水を蒸発させているので、角質層はそれにあうだけの水を透過させる性質も有している。このダイナミックな水の動きに水チャンネルが関与していることが最近 AQP3 のノックアウトマウスが報告された²⁾。このマウスでは腎性尿崩症のほかに皮膚の異常な乾燥が認められた。しかしその機構は直接水の輸送に関与しているという単純なものではなく、ノックアウトマウスの皮膚のグリセリンの含有量が減少していることよ

りグリセリンの輸送を介して皮膚の保湿を保っていると考えられている³⁾。従って AQP3 の発現を調節することで皮膚の保湿性を変える事が期待される。ヒト鼻腔上皮の AQP3 の発現はビタミン A では変化しないようである⁴⁾。AQP3 はケラチノサイトに発現しているがその発現がビタミン A で変化するかどうかは不明である。一方 AQP1 と AQP5 は汗腺に分布しているが直接は皮膚の保湿性には関与しないと考えられる。

そこで今回の研究では皮膚の保湿性に重要な役割を演じる AQP3 の発現を調節する物質を検索し、特にその発現を増やすものを見つけることを目標とした。皮膚の保湿を維持する事で老人に多い乾燥性の掻痒症やアトピー性皮膚炎の治療や皮膚の創傷の治癒の促進をはかることが可能になると考えられる。また化粧品の多くが皮膚の保湿性を向上させる働きがあることを考えると、化粧品の成分としても有望である。さらに加齢による皺を減らす事ができれば美容的にも重要な物質を見つける契機にもなりうる。

2. 実験

2・1 材料

200g の成体オス SD ラットを用いた。エーテル麻酔下に背部の毛を剃ったあとに薬剤を塗布した。24 時間後に皮膚を採取した。培養細胞は自治医科大学皮膚科教室で系代化したヒト皮膚癌細胞 (keratocarcinoma) を用いた。High glucose の DMEM (ダルベッコ変法イーグルスmedium) にペニシリン (50unit/ml) およびストレプトマイシン (50ug/ml) と 5% 牛胎児血清 (FCS) を添加したもので培養した。Subconfluent の状態で試薬を加え、24 時間後に細胞を採取した。試薬はシグマから購入した。

2・2 RNA, タンパクの抽出

ラットの皮膚はなるべく真皮を含まないようにはぎと



The regulation of AQP3 in skin and keratinocytes.

Kenichi Ishibashi, Masamichi Nakakoshi

Jichi Medical School, Department of Pharmacology

り、液体窒素に入れ固まった状態でクリオプレスをを用いてすみやかにパウダーにした。それをRNAeasy (キアゲン) の lysis buffer に入れ、protenase K 処理をおこなったあとカラムで total RNA を抽出した。培養細胞から RNA を抽出するには培養液を PBS (リン酸緩衝生理食塩水) であったあと lysis buffer を入れて機械的に細胞をこすりとった。それを RNAeasy のカラムを通して total RNA の抽出をおこなった。RNA は 20ug を 1% アガロース RNA 用ゲルの各レーンに電気泳動した。20XSSC でナイロン膜 (Hybond plus) にトランスファーした。培養細胞のタンパクの抽出にはホモジナイザーバッファー (0.32M sucrose, 5mM Tris pH7.2, 2mM EDTA, 0.1mM PMSF, 1ug/ml pepstatin A) 内で超音波破碎したあと、1000g で 10 分遠心した上清を 250,000g で 30 分超遠心した沈澱をホモジナイザーバッファーにけん濁した。

2・3 ノーザンブロット

ナイロン膜を 50% formamide 入りのハイブリ液で 42 度 16 時間ハイブリさせたあと 2XSSC で室温にて 15 分洗ったあと、2XSSC で 42 度 15 分、0.2XSSC で 58 度 15 分洗って増感紙といっしょにレントゲンフィルムにはさんだ。プローブはラットあるいはヒト AQP3 cDNA の全長をランダムプライマーで 32P-dCTP でラベルした。ニックカラムで未反応の 32P-dCTP を除いた。一方 RNA のトランスファーの定量性を検定するために、脱プローブ後ヒト GAPDH cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。GAPDH のデンシトメーター値で AQP3 の値を補正して比較した。

2・4 ウェスタンブロット

サンプルバッファー (75mM Tris, 2% SDS, 15% glycerol, 3% 2-mercaptoethanol, pH6.8) にタンパク 10ug を溶かし、95 度で 5 分変性させたあと 15% のポリアクリアミドゲルで

SDS-PAGE をおこなった。セミドライ・トランスファー装置でゲルから PVDF 膜 (Immobilon) にタンパクを転写した。膜は TBST (Tris-buffered saline, 0.05% Tween20) に 2% スキムミルクを加えたブロッキングバッファーで 4 度一晚処理した。抗ラット AQP3 抗体を 500 倍に TBST で希釈し室温で 1 時間インキュベートした。TBST で洗浄後、パーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体と室温で 1 時間インキュベートした。TBST で洗浄後、化学発光検出キットで発光させ ECL フィルムに感光させた。

3. 結果

3・1 ラット皮膚へのビタミン A の AQP3 発現への影響

ラット皮膚には 1.8kb のサイズの AQP3 のバンドが検出された (Fig. 1)。ラット背部の剃毛した皮膚にビタミン A (all trans retinoic acid) を溶かすのに用いた DMSO 単独投与しただけで AQP3 の発現が増加することがあきらかになった (Fig. 1)。さらにビタミン A の影響をみるために 0.1%, 1%, 10% のビタミン A を塗布して 24 時間後の AQP3 の発現をノーザンブロットで調べた。10% で増加がみられたが、0.1%, 1% の低容量では DMSO のコントロールと較べて変化がみられなかった。これは 5 匹のラットでおこなったが同様の結果であった。

つぎに剃毛による傷が AQP3 の発現に影響する可能性があるのも毛のはえていない後ろ足に塗布した。やはり 10% ビタミン A で AQP3 の発現が誘導されることがわかった (Fig. 2)。

3・2 ヒト皮膚癌培養細胞での AQP3 の発現

皮膚での AQP3 の発現はケラチノサイトに局限している。従って AQP3 の発現をケラチノサイトで直接検討できれば有用性が高い。そこで当大学皮膚科に保存されているヒト皮膚癌培養細胞に AQP3 が発現しているものがないかスクリ

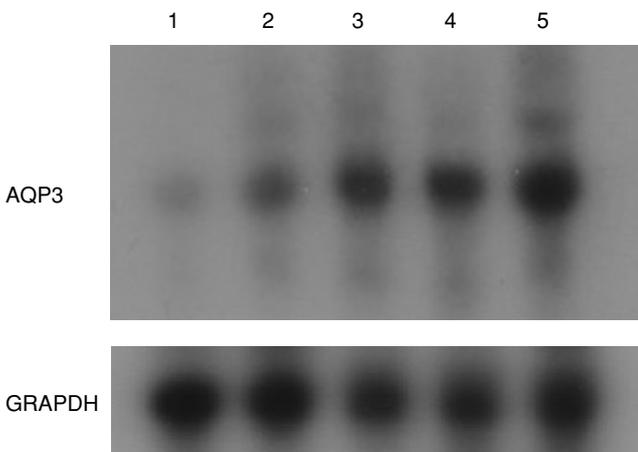


Fig.1. AQP3 mRNA expression in rat skins
Northern blot analysis of rat skins 24 h after treatment with 1: no treatment, 2: DMSO treated, 3: 0.1% vitamin A, 4: 1% vitamin A, 5: 10% vitamin A(all trans retinoic acid).

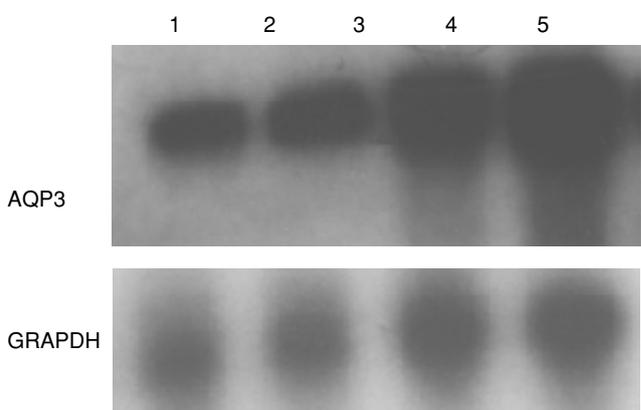


Fig.2. AQP3 mRNA expression in rat hind feet.
Northern blot analysis of rat hind foot skins 24 h after treatment with 1 and 2: DMSO, 3 and 4: 10% vitamin A.

ーニングしたところ kishi となづけられた細胞に AQP3 が発現していることが明らかになった。まずこの細胞の AQP3 の発現が浸透圧の変化に応じて変化するかどうか調べた。細胞に取り込まれない浸透圧物質であるソルビトールによる浸透圧の刺激に反応して AQP3 の発現が増加することがわかった (Fig. 3)。一方、細胞にとりこまれて浸透圧格差の生じない尿素では浸透圧に対する反応がみられなかった (Fig.3)。これらの結果はウェスタンブロットでは 30kDa のバンドと 40kDa 付近の幅の広いバンドが見られたが後者は糖鎖のついた AQP3 と考えられる。ノーザンブロットと同様の結果がウェスタンブロットでも見られ、タンパクレベルの発現でも

AQP3 がソルビトールで増加し尿素ではかわらないという上記の結果が確認された (Fig. 4)。以上の結果からこの細胞は AQP3 の発現が正常のケラチノサイトと同様の変化をする⁵⁾ので AQP3 の発現を調節する物質の検索に使えると考えられる。まずラットで用いたビタミン A の影響を調べてみた。この細胞では 10⁻⁶M のビタミン A でも AQP3 のノーザンブロットでの変化はみられなかった (Fig. 5)。

同じく、dexamethasone(10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M), dibutyl-cAMP(10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷M), dibutyl-cGMP (10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷M)でも 24 時間後の AQP3 の発現のノーザンブロットでの変化はみられなかった。

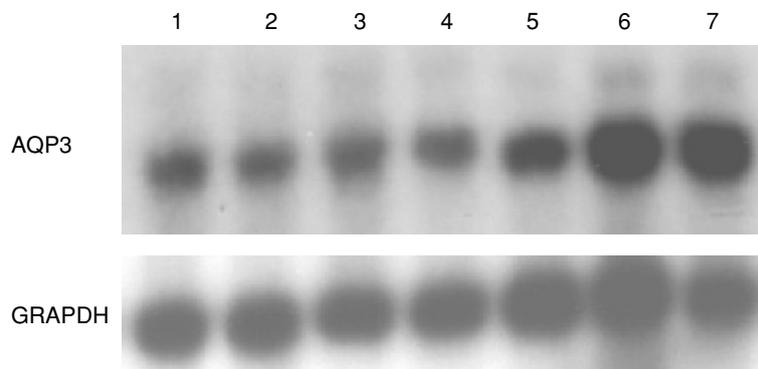


Fig.3. AQP3 mRNA expression in a human keratocarcinoma with hypertonic medium.

Northern blot analysis of a human keratocarcinoma cell line 24 h after treatment with 1: 200 mM urea, 2: 100 mM urea, 3: 50 mM urea, 4: control, 5: 100 mM sorbitol, 6: 200 mM sorbitol, 7: 300 mM sorbitol.

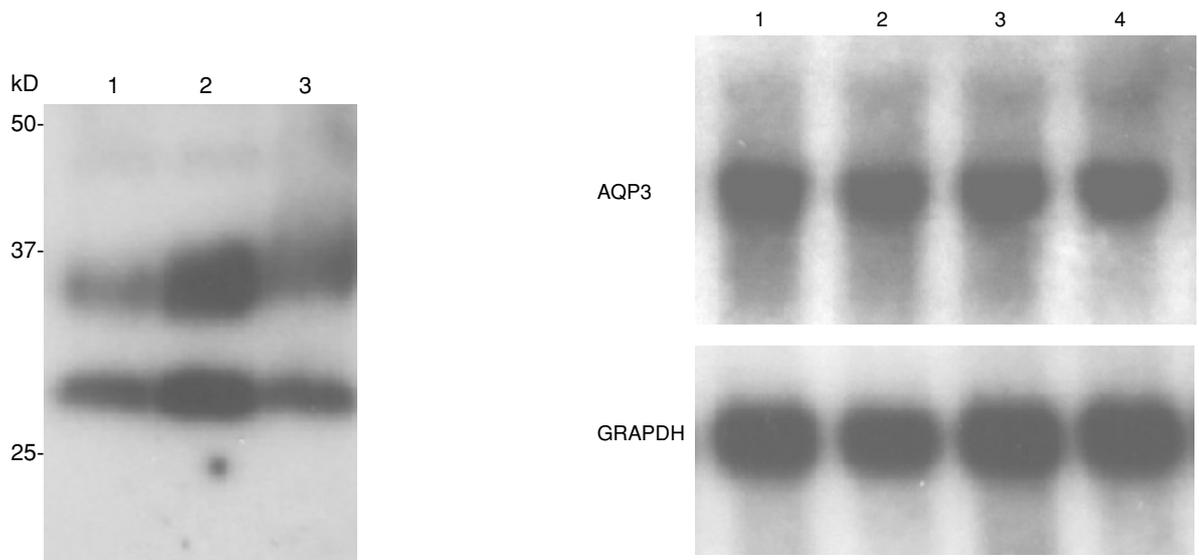


Fig.4. AQP3 protein expression in a human keratocarcinoma cell line.

Western blot analysis of a human keratocarcinoma cell line 24 h after treatment with 1: control, 2: 200 mM sorbitol, 3: 200 mM urea.

Fig.5. AQP3 mRNA expression in a human keratocarcinoma cell with vitamin A.

Northern blot analysis of a human keratocarcinoma cell line 24 h after treatment with 1. vehicle(DMSO), 2: 10⁻⁸M vitamin A, 3: : 10⁻⁷M vitamin A, 4: : 10⁻⁶M vitamin A.

4 考 察

皮膚の保湿に重要な水チャネルである AQP3 の発現の変化を調節する物質を検索するために2つの実験モデルを用いた。1つはラットの皮膚であり、もう1つはヒト皮膚癌培養細胞である。ラットの皮膚では DMSO の塗布だけでも AQP3 の発現がふえたことから剃毛により皮膚が傷付き炎症などの影響や DMSO による浸透圧の変化が原因として考えられる。よりヒトに近い毛のはえていない足の裏の皮膚を用いても、ビタミン A による AQP3 の発現誘導がみられたのでヒトの皮膚でも同様の結果が期待される。ただ皮膚の RNA を足の裏の皮膚から十分な量をこわさないでとることは困難であり、クリオプレスという凍った皮膚をパウダーにする装置と protenaseK 処理を行う事でやっと可能になった。これは表皮では細胞間結合が強固なため、細胞内に RNase の活性を抑える lysis buffer が入りにくく、RNA の崩壊を防ぐのがむづかしいためと考えられる。クリオプレスで機械的にバラバラにするだけでなく、proteinase K で化学的にも個々の細胞に分ける事で壊れていない RNA を十分量うることができると思われる。真皮部分の細胞成分は少ないので RNA は表皮それもケラチノサイトの RNA を反映していると考えられる。従ってより簡便なスクリーニングのシステムが望まれるので、ヒト皮膚癌培養細胞で AQP3 の発現を調べたところ1つの cell line で AQP3 が発現しているのを見つけた。この細胞は浸透圧の変化に応じて AQP3 の mRNA だけでなくタンパクも変化させることがあきらかになり、正常のケラチノサイトに近い性質をもっていると考えられる。しかし癌細胞であるので性質が変わっている可能性もあり、結果の解釈に注意が必要である。とくに薬物に対するレセプターの発現や細胞内シグナリングが変わっていると適切な反応が期待できない。それでも AQP3 を増加させる物質のスクリーニングの手始めとしては簡便であり、タンパクや RNA の抽出が容易でありきれいな結果がえられるので有用と考えられる。

ビタミン A はヒトにおいて皺をへらすことが美容的にも利用されている。従って AQP3 の発現が変化するかどうかは興味あるところである。今回は24時間という短い時間にもかかわらずビタミン A によって AQP3 の発現が増加することがあきらかになった。10%という高用量で変化がみられたのであるが長期にわたれば低用量でも効果が期待できる。しかし一方で長期になるとビタミン A 直接の作用だけでなく組織の変化に伴う二次的な影響をみる可能性もあるので解釈はむづかしい。一方培養細胞ではビタミン A の効果が認められなかった。これは癌細胞によって形質が変化しているためでないことは primary culture のケラチノサイトでビタミン A の AQP3 への影響を調べてみる必要がある。もしケラチノサイトでもビタミン A の AQP3 への影響が見られないならば、ビタミン A の皮

膚の AQP3 発現への影響は二次的な可能性があり、ビタミン A により誘導される未知の物質が AQP3 の誘導をしていると考えられる。今後この機構の解明が必要である。

ヒト皮膚癌培養細胞はスクリーニングとして有用なのでよく用いられる誘導物質であるデキサメサゾン（ステロイドホルモン）、サイクリック AMP、サイクリック GMP について検討してみたが AQP3 は誘導されなかった。これは AQP3 がヒト気管培養細胞 (A549 cells) においてデキサメサゾンで誘導されるというこれまでの報告⁶⁾と違って、細胞の違いや実験条件の違いを考慮に入れる必要がある。今後この細胞を用いて AQP3 を誘導するものが見つかれば、皮膚においても誘導できるかどうか、またそれによって皮膚の保湿性が高まるかどうか、また毒性がないかどうかを検討していく必要がある。

5. 総 括

皮膚の保湿性に重要な役割を演じる AQP3 の発現を調節する物質の検索をおこなった。ラット皮膚ではビタミン A による AQP3 の発現増加がみられたが、ヒト皮膚癌細胞ではビタミン A の AQP3 への影響は認められなかった。この培養細胞はソルビトールによる浸透圧の上昇に応じて AQP3 の発現が増加し、AQP3 の発現を調節する物質のスクリーニングに有用であると考えられる。

(引用文献)

- 1) 石橋賢一：水チャネルの構造と機能。医学のあゆみ 201, 1077-1082, 2002.
- 2) Ma T, Hara M, Sougrat R, et al.: Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *J Biol Chem.* 277, 17147-17153, 2002.
- 3) Hara M, Ma T, Verkman AS.: Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery. *J Biol Chem.* 277, 46616-46621, 2002.
- 4) Jun ES, Kim YS, Yoo MA, et al.: Changes in expression of ion channels and aquaporins mRNA during differentiation in normal human nasal epithelial cells. *Life Sciences* 68, 827-840, 2001.
- 5) Sugiyama Y, Ota Y, Hara M et al.: Osmotic stress up-regulates aquaporin-3 gene expression in cultured human keratinocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1522, 82-88, 2001.
- 6) Tanaka M, Inase N, Fushimi K. et al.: Induction of aquaporin 3 by corticosteroid in human airway epithelial cell line. *Am J Physiol* 273, L1090-L1095, 1997.

接触皮膚炎への p38 mitogen-activated protein kinase の 関与機構の解明

千葉大学大学院 医学研究院分子生体制御学

粕谷 善俊

To elucidate the role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38) in the pathogenesis of inflammation, a mouse contact hypersensitivity (CHS) model induced by 2,4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB) was used. Ear swelling was induced by challenge with DNFB, accompanied by infiltration of mononuclear cells, neutrophils and eosinophils, and a marked increase in mRNA levels of cytokines such as interleukin (IL)-2, interferon (IFN)- γ , IL-4, IL-5, IL-1 β , IL-18 and tumor necrosis factor (TNF)- α in the challenged ear skin. Both ear swelling and the number of infiltrated cells in DNFB-challenged ear skin were significantly inhibited by treatment with SB202190, a p38 inhibitor. Furthermore, the DNFB-induced expression of all cytokines except IL-4 was significantly inhibited by treatment with SB202190. Ribonuclease protection assay revealed that the mRNA levels of chemokines such as IP-10 and MCP-1 in ear skin were markedly increased at 24 h after challenge with DNFB. The induction of these chemokines was significantly inhibited by treatment with SB202190. In p38 α +/- mice, both ear swelling and infiltration of cells induced by DNFB were reduced compared with those in wild-type mice. However, induction of cytokines by DNFB was also observed in p38 α +/- mice, although the induction of IFN- γ , IL-5 and IL-18 was typically reduced compared with that in wild-type mice. Challenge with DNFB slightly induced IP-10 and MCP-1 mRNA in p38 α +/- mice, with weaker signals than those in SB202190-treated wild-type mice. These results suggest that p38 plays a key role in CHS and is an important target for the treatment of CHS.

1. 緒言

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーは、細胞外からの刺激を核内の転写機構制御にまで変換・伝達するリン酸化酵素群であり、細胞の増殖、分化、形質転換、生存、アポトーシス等の様々な生物現象において中心的役割を演ずる重要な酵素である。哺乳類における MAPKs は Extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38 MAPK (p38) の3つに分類することができる。

p38 は特にサイトカイン、UV 等の細胞外ストレスにより活性化されるとともに、サイトカインの産生にも積極的に関与している¹⁾。したがって、炎症を伴う病態伸展に密接に関与すると考えられ、p38 をターゲットとしたサイトカイン抑制が炎症性疾患治療の良好な strategy になることを示唆している。一方、p38 阻害剤の適用は場合によっては一部のサイトカインの産生をむしろ上げるという報告もあり、p38 をターゲットとすることに異論を唱える説も登場している²⁾。これらの議論があるにもかかわらず、現時点では、炎症性病態伸展への p38 の関与様式を個体レベルで証明した研究はほとんど存在しないとともに、炎症性皮膚疾患に関連した研究報告は存在しない。

そこで我々は、2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) によるマウス接触皮膚炎 (Contact Hypersensitivity: CHS) モデルを用い、p38 阻害剤の効果を検討するとともに p38 α ノックアウトマウス (ヘテロ接合体; ホモ接合体は胎生致死³⁾) の DNFB による接触皮膚炎誘導に対する応答を検討し、p38 の接触皮膚炎への関与機構を分子レベルで解明し、p38 阻害剤の適用法を含めた新たな治療法の開発を目的とした。

2. 実験

2.1 実験動物

C57BL/6J 雄マウスを p38 α 遺伝子ヘテロ接合体雌マウスとかけ合わせ、p38 α 遺伝子ヘテロ接合体マウス (p38 α +/-) と野生型マウス (Wt: p38 α +/+) を得た。F6 世代以降の雌マウスを実験に用いた。Genotyping に用いた3種の PCR プライマーと条件は以下の通り: A, 5'-CCCTATACTCCCTCTCTGTGTAACCTTTG-3'; B, 5'-CCCAAACCCAGAAAGAAATGATG-3'; and C, 5'-TTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTG-3' : 94 (30 秒), 55 (30 秒), 72 (1 分) で 35 サイクル / 800-bp および 450-bp の PCR 産物をそれぞれ変異および野生型アリアルとして認識した。

2.2 接触皮膚炎モデル

0.5% DNFB (in acetone/olive oil (A/O) soln.) 100 μ l をマウス・8週令雌の背部に塗布 (感作) し、5日後、20 μ l の同液を耳介部に塗布した (惹起)。耳介腫脹と組織変化を経時的に計測・観察した。対照実験として、同様に感作したマウス耳介部に DNFB を含まない A/O soln. を 20 μ l 塗布した。p38 阻害剤: SB202190 は、惹起 30 分前に 10⁻⁵ M を 25 μ l 塗布した。



Essential Role of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Contact Hypersensitivity.

Yoshitoshi Kasuya

Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Graduate School of Medicine, Chiba University

2.3 形態学的検討

耳介部のパラフィン包埋切片 (3 μ m) を作製しヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色後、高倍率下で組織浸潤炎症細胞を確認した。

2.4 局所サイトカイン mRNA 発現量の検討

耳介部より total RNA を調製し、各 2 μ g の total RNA を RT-PCR に供し、各種サイトカインの発現量を確認した。各サイトカインの検出用プライマー、アニーリング温度、サイクル数は Table 1 に記載した。

2.5 RNase protection assay による局所ケモカイン発現量の検討

マウス LTN、RANTES、eotaxin、macrophage inflammatory protein (MIP) -1 α 、1 β &2、IFN- γ inducible protein (IP) -10、monocyte chemoattractant protein (MCP) -1、TCA-3 とハウスキープングジンである L32 (ribosomal RNA) および GAPDH に対するマルチプローブテンプレート (mCK-5/BD Pharmingen) を用いた RNase protection assay に、耳介部より調製した total RNA 各 10 μ g を供した。

2.6 リンパ球の皮下移植実験

感作した Wt および p38 α +/- マウスの所属リンパ節よりリンパ球をそれぞれ調製し、2 \times 10⁵ cells in 20 μ l PBS の懸濁液を未感作の Wt マウス耳介部の表皮下にインジェクションし、そこに 2020 μ l の 0.5% DNFB (in A/O soln.) または A/O soln. を塗布して 24 時間後の耳介腫脹を観察した。対照実験として、細胞を含まない in 20 μ l PBS を、未感作の Wt マウス耳介部の表皮下にインジェクションし、20 μ l の 0.5% DNFB (in A/O soln.) を塗布した。

3. 結果

3.1 DNFB による CHS に対する p38 阻害剤の効果

DNFB は経時的に耳介腫脹を誘導した。p38 阻害剤である SB202190 の投与はこの耳介腫脹を有意に抑制した (Fig. 1)。また、その組織所見から、SB202190 の投与は、DNFB による炎症細胞の組織内浸潤と表皮細胞間浮腫を抑制した (Fig. 2)。惹起 24 時間後の浸潤細胞の構成は、リンパ球を主体とした単核球細胞が主であるが、好中球および好酸球も確認され、これら細胞の浸潤数も SB202190 の投与により抑制された (Fig. 3)。

3.2 局所サイトカイン発現量に対する p38 阻害剤の効果

惹起前にはほとんど検出されない耳介部のサイトカイン mRNA レベルが、DNFB による惹起によって時間依存的に一律誘導された。また、SB202190 の投与は IL-4 を除くサイトカイン (IL-2、IFN- γ 、IL-5、IL-1 β 、IL-18 および

Table 1 : Primer sequence, annealing temperature (A. temp), number of cycles (Cycle#) and size of PCR product used for detection of each cytokine.

| Gene | Sequence (5' to 3') | A. temp. | Cycle# | Size |
|---------------|----------------------------------|----------|--------|-------|
| IL-2 | Sense CAAGCTCTACAGCGGAAG | 58°C | 33 | 370bp |
| | Antisense TCCACCACAGTTGCTGAC | | | |
| IFN- γ | Sense ATCCTTTGGACCCTCTGACT | 60°C | 33 | 529bp |
| | Antisense CGACTCCTTTTCGGCTTCCT | | | |
| IL-4 | Sense ACGGCACAGAGCTATTGATG | 60°C | 35 | 454bp |
| | Antisense ATGGTGGCTCAGTACTACGA | | | |
| IL-5 | Sense ATGTCCTGTAGTCAGTTAAACC | 60°C | 33 | 733bp |
| | Antisense AAGTTCAGTTACACGGAGAAGT | | | |
| IL1- β | Sense TGGCAGCTACTGTGTCTTT | 60°C | 35 | 525bp |
| | Antisense AGGCTTGTGCTCTGCTTGTG | | | |
| TNF- α | Sense CCTCCCTCTCATCAGTTCTATG | 60°C | 35 | 992bp |
| | Antisense ACACCCATTCCCTTCACAGA | | | |
| IL-18 | Sense ACTGTACAACCGGAGTAATACGG | 60°C | 33 | 319bp |
| | Antisense TCCATCTTGTGTGCTCTGG | | | |
| GAPDH | Sense AATGTATCCGTTGTGGATCT | 60°C | 25 | 262bp |
| | Antisense TCCACCACCCTGTTGCTGTA | | | |

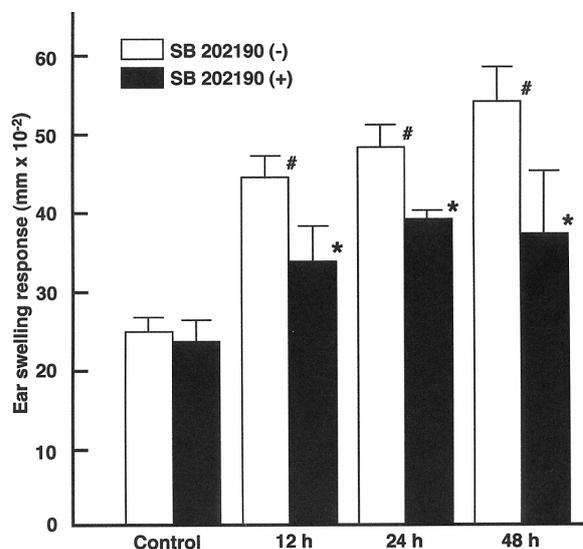


Fig. 1: Effect of SB202190 on time-dependent ear swelling response of mice after DNFB challenge. Mice were contact sensitized for 5 days with 0.5% DNFB and thereafter challenged. Before challenge (control) and 12, 24 and 48 h afterward, the thickness of the ears was measured (SB202190 (-); open bars, SB202190 (+); closed bars). SB202190 was topically applied to sensitized mice 30 min prior to challenge. Data presented are mean \pm SD of 12-18 mice. [#]Significantly different from control with $P < 0.01$ (ANOVA with Bonferroni method). ^{*}Significantly different from SB202190-untreated value for each time period ($P < 0.05$, ANOVA with Bonferroni method).

TNF- α) の DNFB による発現誘導を有意に抑制した (Fig. 4)。

3.3 p38 α +/- を用いた CHS の検討

Wt に比して p38 α +/- では、DNFB による惹起 24 時間後の耳介腫脹、単核球細胞等の組織内浸潤が有意に抑えら

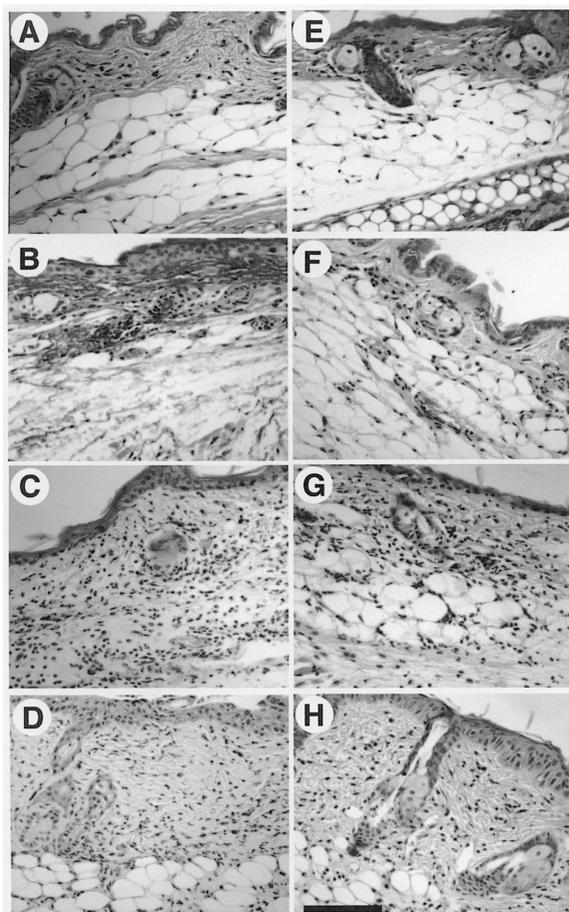


Fig. 2: Effect of SB202190 on time-dependent histopathological findings of CHS induced by DNFB.
 Histological features of CHS ear skin reaction were observed in control (A and E) mice, and mice at 12 h (B and F), 24 h (C and G), and 48 h (D and H) after challenge. Time-dependent severe infiltration and hyperplasia observed in the challenged ear skin (B-D) were apparently reduced in SB202190-treated mice (F-H). Mouse ear sections were stained with hematoxylin and eosin. Bar represents 200 μ m. Similar results were confirmed in eight independent experiments.

れていた。また、耳介部のサイトカイン mRNA レベルの DNFB による誘導は、IFN- γ 、IL-5 および IL-18 は p38 α +/- では抑えられているものの、他のサイトカインは Wt とほぼ同等であった (Fig. 5)。

3.4 局所ケモカイン発現量の検討

DNFB による惹起 24 時間後の耳介部のケモカイン mRNA 発現誘導と SB202190 投与の効果、および p38 α +/- でのケモカインの挙動を検討した。Wt においてはコントロールレベルでは、MIP-1 β および MIP-1 α mRNA の微弱な発現と MIP-2 mRNA の強い発現が認められるが、DNFB による惹起によって付加的に IP-10 および MCP-1 mRNA の強い発現誘導が確認された。この典型的な IP-10 および MCP-1 の発現誘導が SB202190 投与によって有意に抑えられた。一方 p38 α +/- では、Wt および SB202190 投与群のコントロールレベルで認められた

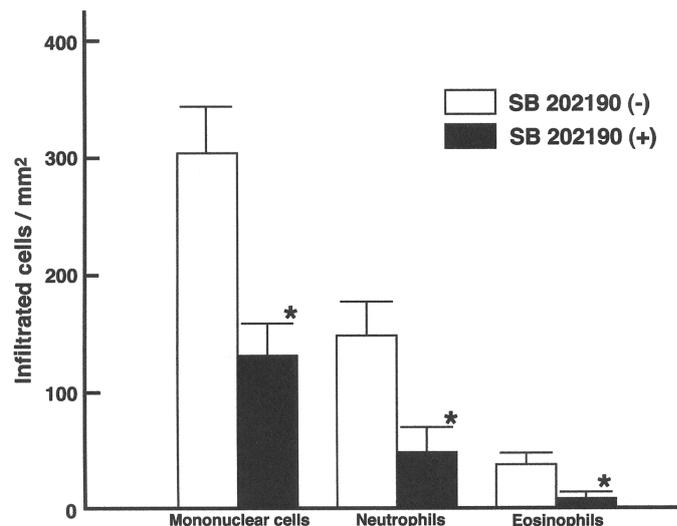


Fig. 3: Effect of SB202190 on cellular distribution of 24 h-challenged skin.
 Bars represent number of mononuclear cells, neutrophils, and eosinophils that infiltrated the challenged skin of SB202190-untreated mice (open bars) and SB202190-treated mice (closed bars). Data presented are mean \pm SD of 12 mice. *Significantly different from SB202190-untreated values with $P < 0.01$ (Student's t-test for unpaired values).

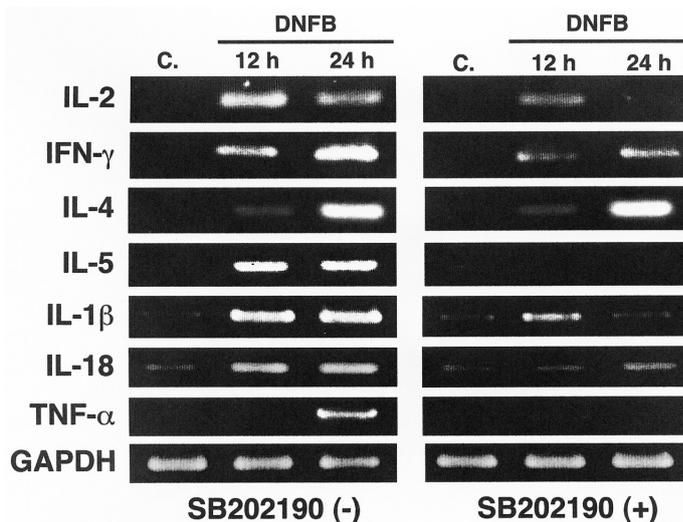


Fig. 4: Effect of SB202190 on expression of cytokine mRNA in DNFB-challenged ear skin.
 Total RNA was prepared from the ear of control mice, and challenged mice with or without SB202190 treatment at various times (12 and 24 h) after challenge. RT-PCR was performed under the experimental conditions defined in Table I. PCR product samples were subjected to 1.2% agarose gel electrophoresis and visualized by staining with ethidium bromide. Left and right panels represent the data in SB202190-untreated mice and SB202190-treated mice, respectively. Similar results were confirmed in three independent experiments.

MIP-1 β 、MIP-1 α および MIP-2 mRNA がほとんど認められず、DNFB による惹起によって誘導される IP-10 および MCP-1 mRNA の発現も微弱であった (Fig. 6)。

3.5 p38 α +/- の CHS 抵抗性機構の検討

p38 α +/- の CHS 抵抗性獲得は感作段階か否かを、移植実験により検討した。未感作 Wt 耳介部への DNFB 塗布は CHS を誘導しないが、感作した Wt および p38 α +/- から調製したリンパ球の未感作 Wt 耳介部への移植は、いずれの場合も DNFB 塗布によって CHS を誘導した。また、

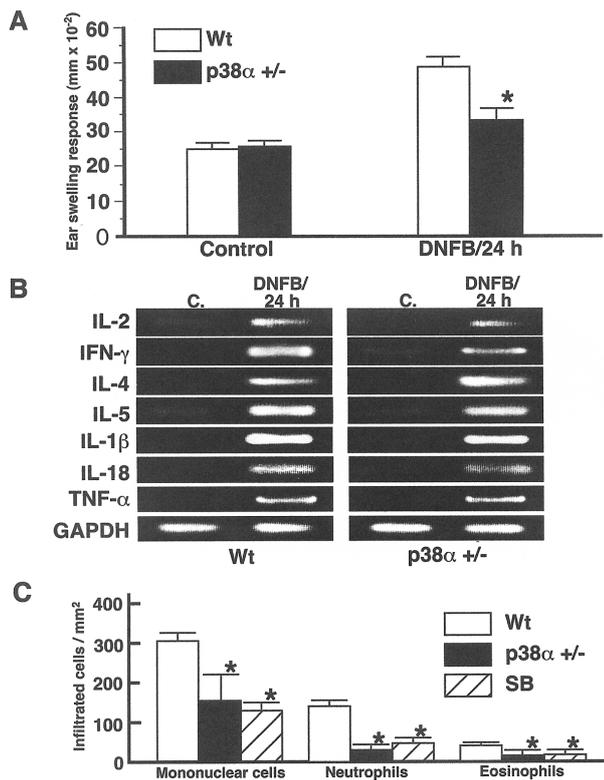


Fig. 5: Change of 24 h CHS ear skin reaction in p38α +/- mice. (A). DNFB-induced ear swelling response in p38α +/- mice (closed bars) and Wt littermates (open bars). Data presented are mean ± SD of 8-10 mice. *Significantly different from value for Wt with P < 0.01 (Student's t-test for unpaired values). (B). Expression of cytokine mRNA in DNFB-challenged ear skin of p38α +/- mice (right panel) and Wt littermates (left panel). Total RNA was prepared from control and challenged (24 h) ears of p38α +/- mice and Wt littermates and subjected to RT-PCR. Similar results were confirmed in three independent experiments. (C). Cellular distribution of challenged ear skin of p38α +/- mice (closed bars) and Wt littermates (SB202190-untreated: open bars and SB202190-treated: hatched bars). Data presented are mean ± SD of 6 mice. *Significantly different from SB202190-untreated Wt value (P < 0.01, ANOVA with Bonferroni method).

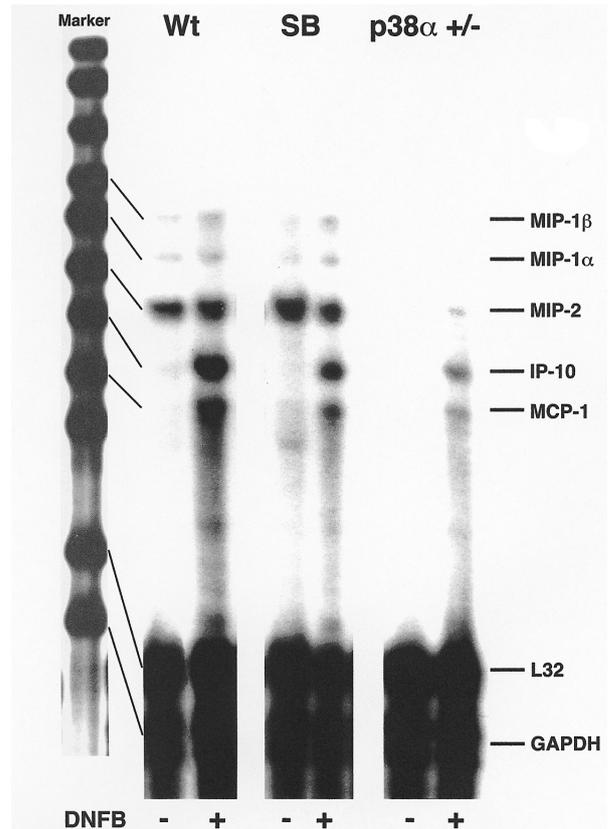


Fig. 6: Expression of chemokine mRNA in DNFB-challenged ear skin. Total RNA was prepared from control (-) ears and challenged (24 h: +) ears of p38α +/- mice (right column) and Wt littermates with (middle column) or without (left column) SB202190 treatment. RNA samples were subjected to RNase protection assay followed by electrophoresis and radioautography. Undigested labeled ³²P probes were used as markers, and bands were matched to chemokines based on the predicted digested length. Similar results were confirmed in three independent experiments.

リンパ球の耳介部への移植後、DNFB-free A/O soln. の塗布ではCHSは誘導されなかった (Fig. 7)。

4. 考察

本研究から、p38がCHSの発症に密接に関与することが示唆され、p38阻害剤が、経皮的投与という簡便な投与方法でCHSに治療効果を発揮する可能性が示された。

p38アイソフォームの関与様式

p38の関与様式としては、少なくとも局所におけるサイトカイン-ケモカインネットワークの産生制御を介してCHSの成立に寄与していると考えられた。p38には、α、β、γ、δの4つのアイソフォームの存在が知られている。このうち、様々な種類の細胞に広汎に存在するのはαおよびβであり、p38阻害剤が効果を発揮する対象もαおよびβである。したがって、本研究で示された、p38阻害剤のCHSの病態進展に対する抑制効果およびp38α +/- ではCHS発症が抑えられることを考慮すると、p38の4つのアイソフォームのうち、少なくともαが中心的な役割を演じていることが考えられた。

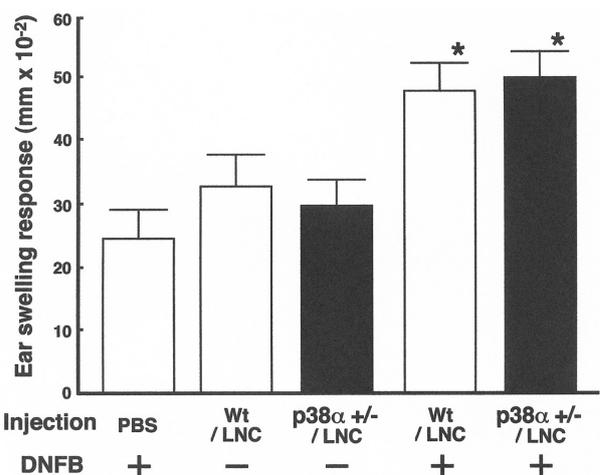


Fig. 7: LNC from sensitized p38α +/- mice could induce CHS in Wt mice. LNC (2 x 10⁵ cells per 20 μl PBS) from the sensitized p38α +/- mice (closed column) or Wt littermates (open column) were subcutaneously injected into the ears of naive Wt mice. The mice were immediately challenged by applying 20 μl of 0.5% DNFB in A/O solution or 20 μl of A/O solution alone on the ear. As a negative control, 20 μl cell-free PBS was subcutaneously injected into the ears of naive Wt mice and immediately challenged with 0.5% DNFB (N.C., shaded column). Data presented are mean ± SD of 4 mice. *Significantly different from value for N.C. (P < 0.01, ANOVA with Bonferroni method).

p38 の時間的・空間的関与機構

CHS の発症には、感作段階、惹起段階の 2 つのステップを経るが、少なくとも p38 阻害剤を用いた実験では、すでに感作したマウスに DNFB による惹起直前に p38 阻害剤を投与しているため、惹起段階での p38 の関与が明らかである。そこで、p38 α +/- において「はたして正常に感作が成されるか」をリンパ球の移植実験により検討した。感作した p38 α +/- の所属リンパ節から調製したリンパ球の未感作 (naive) Wt への移植によって、移植耳介部位への DNFB の塗布で耳介部腫脹を誘導できた。この事実は、p38 α +/- においても正常に感作されうることを示している。したがって、CHS における p38 の関与の時間的特性としては、感作段階よりもむしろ惹起段階にあると結論できる。次に、p38 の空間的関与機構については、DNFB による惹起 24 時間後の組織に浸潤した CD4 陽性細胞を回収・純化し、RT-PCR により Th1 サイトカインである IL-2 と IFN- γ 、Th2 サイトカインである IL-4 と IL-5 の発現を確認することで検討を加えた。p38 阻害剤を投与した Wt における浸潤 CD4 陽性細胞のサイトカイン産生能は、p38 阻害剤未投与の Wt のそれと同等であった。一方、p38 α +/- における浸潤 CD4 陽性細胞のサイトカイン産生能は IFN- γ および IL-5 で低下が見られた (データは示さず：本研究結果の報告論文 4) 参照)。p38 α +/- における浸潤 CD4 陽性細胞の IFN- γ および IL-5 の産生低下は、CHS 病変部におけるサイトカイン低下のプロファイルと相関していたことから、p38 α +/- では、細胞内の p38 の内活量の低下が一部のサイトカインおよびケモカインの産生抑制に直接的に寄与している可能性が考えられた。一方、p38 阻害剤による局所サイトカイン—ケモカインネットワークの産生制御は、浸潤細胞自体の p38 の内活量に影響することなく、少なくとも浸潤炎症細胞数の抑制を介して寄与することが示唆された。しかし、p38 阻害剤投与による CHS 病変部におけるサイトカイン低下はかなり顕著であったことから、p38 阻害剤は表皮構成細胞でのサイトカイン産生を付加的に抑えることも考えられた。

p38 阻害剤の治療応用の今後の課題

p38 阻害剤の治療応用上の 1 つの問題点は、その特異性

にある。p38 阻害剤は、高濃度用いると異なるタイプの MAPK である JNK も阻害する⁵⁾。JNK は p38 と共有する上流のキナーゼ (MAPK Kinase Kinase) を有しており、p38 が活性化する細胞環境下では往々にして JNK も並行して活性化する。本研究の CHS モデルにおいても、p38 とほぼ同じ時間経過で JNK は活性化していた。しかしながら、本研究で用いた p38 阻害剤の投与方法・投与量では、p38 を特異的に阻害し JNK の活性には何ら影響しないことを確認している (未発表データ)。JNK が CHS にどのように関与しているかは今のところ不明であるが、治療応用を考慮する上で p38 阻害剤の JNK への影響を無視することはできない。次に、本研究において p38 阻害剤は惹起段階の直前に投与したが、惹起後の p38 阻害剤投与による効果の検討が、実用性を考える上で重要となる。また、ステロイド剤の繰り返し投与で確認されるような病変増悪効果が、はたして p38 阻害剤では成立しないか否かも今後の課題として検討が必要となる。

参考文献

- 1) Rincón, M., Enslin, H., Raingeaud, J., et al. : Interferon- γ expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J.*, 17, 2817-2829, 1998.
- 2) van den Blink, B., Juffermans, N.P., ten Hove, et al. : p38 Mitogen-activated protein kinase inhibition increases cytokine release by macrophages in vitro and during infection in vivo. *J. Immunol.*, 166, 582-587, 2001.
- 3) Tamura, K., Sudo, T., Senftleben, et al. : Requirement for p38 α in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell*, 102, 221-231, 2000.
- 4) Takanami-Ohnishi, Y., Amano, S., Kimura, S., et al. : Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in contact hypersensitivity. *J. Biol. Chem.*, 277, 37896-37903, 2002.
- 5) Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuya, Y., et al. : Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 751-763, 1999.

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

がん患者への「化粧」支援プログラムの日本への適用可能性に関する研究

東京大学大学院 医学系研究科健康科学

高橋 都

Cancer treatments are often accompanied by drastic changes in patients' appearances. Complications such as hair-loss, changes in skin color, loss of body weight have a tremendous impact on body image and self esteem. Despite these impacts medical professionals focus their interest on treating the disease itself seldom giving comprehensive advice on body image issues in the clinical setting.

This research focused on the "Look Good ...Feel Better" program that has been catering to cancer patients' needs regarding body and self esteem issues for more than ten years in the USA. The "Look Good ...Feel Better" program is a free, national public service that helps women undergoing cancer treatment learn to cope with the appearance related side effects of treatment and regain a sense of self-confidence and control over their lives. The program was founded in 1989 through a partnership between the Cosmetic, Toiletry, Fragrance Association Foundation (CTFA) , American Cancer Society (ACS) and National Cosmetology Association (NCA) . The three partners support the program through the provision of funding, volunteer training, and supply of free educational materials and cosmetics.

In order to investigate the possibility of implementing this program in Japan, the author participated in a "patient session" and a "volunteer training session" workshops held by the "Look Good ...Feel Better" program in Los Angeles area in 2001. The author also conducted interviews with local American Cancer Society staff who were in charge of the program to get detailed information on how the project is structured and managed. As for activities in Japan, the author collected information on the groups/individuals that provide profit/non-profit activities that aim to increase people's quality of life using cosmetics. The information was obtained through the Internet homepages, an online database "Igaku-chuoasshi", newspapers and magazines.

This report describes the outline of the "Look Good ...Feel Better" program. It includes the breakdown of responsibility of the three partners who oversee the program, principles and content of the program, training processes for volunteers, and the author's impression on the "patient session" and "volunteer training session". The report also describes the current situation of the activities related to cosmetology in clinical settings in Japan. Lastly, the author discussed some points that are particularly relevant to implementing the program in Japan.

1. 緒言

がんは日本人の死因の第一位であり¹⁾、我々の日常生活に極めて身近な疾病である。がん治療は全身の脱毛、顔色の変化、体重減少など、種々の外見変化を引き起こすことがあり、それら副作用は患者のボディ・イメージを大きく変容させ、生活の質（以下 QOL）や自尊心の低下にもつながる²⁾。しかし多忙な臨床現場では、患者の外見の変化にまで細やかに対応する余裕がなく、患者は個人的努力で工夫や情報収集を余儀なくされているのが現状である。

アメリカでは、全米化粧品工業会（Cosmetic, Toiletry, Fragrance Association Foundation : 以下 CTFA）、アメリカがん協会（American Cancer Society: 以下 ACS）、全米コスメトロジー協会（National Cosmetology Association: 以下 NCA）の3者が共催で「Look Good...Feel Better」（以下 LGFB）という無料支援プログラムを展開している。



"Look Good ... Feel Better" program: its importance and applicability to Japanese clinical settings

miyako takahashi

Department of Social Gerontology, School of Health Sciences and Nursing, University of Tokyo

これは、美容師やメイクアップアーティストの資格を持つボランティアが、がん患者に治療中の化粧のヒントや脱毛時の工夫に関するアドバイスを提供するプログラムであり、がん患者の心身のリハビリテーションの一貫として高い評価を得ている^{3, 4)}。

わが国では LGFB のような化粧ボランティアによる無料サービスはほとんど見られないが、治療を受けながら活発な社会生活を送るがん患者の一層の増加が見込まれる現在、外見の変容への支援を検討することは極めて重要である。

本研究の目的は以下の2点である。

1. アメリカにおける LGFB の活動に参加し、運営の実際を詳細に検討すること。
2. 日本国内における、「化粧療法」の実施主体や活動内容を調査し、1. との比較を通じて、LGFB の日本における実現可能性を考察すること。

2. 研究方法

2-1 LGFB の患者セッション及びボランティア養成セッションへの参与観察

平成 13 年 10 月 22 日にロサンゼルス の UCLA メディカルセンターで行われた患者向けセッションに参加し、スタッフの役割分担や進行の様子の観察、および参加者に提

供される資料や化粧品の確認を行った。

同12月1日カリフォルニア州パサデナのアメリカがん協会支部で開かれたボランティア養成セッションに参加した。また、ボランティア養成セッションを担当したアメリカがん協会ソーシャルワーカー Kim Young 氏に、セッション教材に記載されていないプログラム実務についてヒアリングを行うとともに、関連資料を収集してプログラム運営の詳細を把握した。

2-2 日本国内の「化粧療法」の実施主体や活動内容の実態把握

インターネット、医学中央雑誌データベース、新聞雑誌などの活字メディアを通じて、国内で「化粧療法」を提供する団体・個人・医療機関に関する情報を収集した。

3. 結果

3-1 LGFBプログラムの概要

3-1-1 プログラムの目的と歴史

LGFBプログラムは、抗がん剤治療や放射線治療の副作用によって外見の変化をきたした患者に美容専門家の資格を持つボランティアが化粧の仕方や脱毛時の対処方法を直接アドバイスする、成人女性がん患者対象の無料プログラムである。1989年に始まったこのプログラムは、全米で年間約3万人のがん患者に利用され、プログラム開始当初からの総利用者数は20万人を超える。アメリカ以外でも展開され、現在までにイギリス、カナダ、オランダ、アルゼンチン、オーストラリア、ニュージーランド、ノルウェー、シンガポールの8カ国で実施されている。なお、13～17歳までの患者（男女）を対象にした、「10代プログラム（Look Good ... Feel Better for Teens）」というプログラムが別に実施されている。また、成人男性患者を対象にしたプログラムも開発中である。

3-1-2 プログラムの実施主体

LGFBプログラムは、アメリカのCTFA、ACS、NCAの3者の共催で、全米展開されている。

■ Cosmetic, Toiletry, Fragrance Association (CTFA)

化粧品・トイレ用品・香水関連商品を扱う会社が400以上参加する業界団体。プログラム全体への財政的支援、患者セッションで使用する化粧品の寄付、ボランティアトレーニングや患者用の教材制作、患者のニーズアセスメントやプログラムの評価を担当する。

■ National Cosmetology Association (NCA)

全米で5万人以上の会員を持つメイクアップアーティストやヘアスタイリストの団体。以前はNCAの会員であることがLGFBプログラムにボランティアとして参加するための必須条件だったが、現在は非会員でも参加できる。

■ American Cancer Society (ACS)

がん患者への各種情報提供や支援プログラムを実施する全米最大の非営利団体。プログラム実施の実務（参加者の募集、会場となる病院のスタッフとの調整等）を担当する。

3-1-3 プログラム内容

LGFBプログラムには以下の3原則に基づいて運営されている。

1. プログラムは医学的な情報を提供するものではないこと
2. プログラムは無料で提供されること
3. プログラムを通じて特定の製品を推奨しないこと

患者セッションの会場はほとんどが病院内の一室であり、ACS担当者と受け入れ病院担当者（多くの場合ソーシャルワーカー）の事前打ち合わせで決定される。ボランティアが参加者に十分個人指導できるよう、参加者数は5～12名に限られている。プログラム所用時間は全体で約2時間である。この時間内に、スキンケア、メイクアップ、かつら等の利用法、ネイルケアの4トピックが取り上げられ、参加者の一人をモデルにしたメイクアップの実演が行われる。

患者セッションでは参加者一人一人に「ツールボックス」と呼ばれる化粧用品セットが無償提供され、参加者はそれを用いてボランティアの指導を受ける。一つのツールボックスには、総額\$200～\$300相当の化粧品が入っており、CTFAに属する企業によって無償提供される。化粧品会社が寄付をする場合、試供品ではなく市販品を、一つの製品につき最低1000個以上の提供することが義務づけられている。ツールボックスは、製品の色調によってLight, Medium, Dark, Extra Darkの4種類がある。参加者の人種によってACSコーディネーターが前もって手配するが、あくまでプログラムからの「贈り物」であって参加者が購入する商品ではないため、参加者の肌色と完全にマッチするとは限らない旨、説明されている。遠隔地に住む患者のために、ボランティアが例外的に個人指導をすることもあがるが、この場合ツールボックスは提供されず患者個人の化粧品を用いる。

3-1-4 ボランティアの養成方法と質の維持

LGFBボランティアとして応募できるのは、コスメトロジスト、エステティシャン、ネイルテクニシャン等、美容専門家として既に正規の資格を持つ者だけである。一度ボランティア養成セッションを修了し、LGFBボランティアとして登録した者は、2年に一度更新研修を受けることを強く勧められる。更新研修では基本的技術の復習を行うとともに、その2年間のLGFBプログラムの変更点などが伝えられる。

ACS本部は各地区で中心的役割を果たす美容専門家（State Trainer；全米で8名）とその地区のACSスタッ

フを招いて“Train-the-Trainer”という会合を定期的に行き、各地区の養成セッションを指導する美容専門家を確保する方策をたてている。State Trainerの下にはRegional Trainerと呼ばれるボランティア指導者が配置されている。

LGFプログラムでは、ボランティアへの感謝を表すため“Look Good ... Feel Better Volunteer Recognition and Award Program”という活動も実施している。ボランティアとして参加する美容専門家とともに、受け入れ病院などの担当者（サイトコーディネーター）やACSのスタッフも表彰し、その後もプログラムに積極的に関わるよう動機付けをしている。

3-1-5 患者セッション及びボランティア養成セッションの印象

実際に参加した患者セッションとボランティア養成セッションの進行内容や参加者の様子は中間報告書⁵⁾に詳述したので、本報告書では両セッションを通じて特に印象に残った点のみ記す。

■ボランティアの当事者体験

ボランティアとして参加を希望するメイクアップアーティストは、自分自身あるいは家族や親しい友人ががん体験を有していることが多かった。ボランティア自身、がんに伴う社会生活上の苦労を実感していることが、参加患者への共感を高め、セッション運営を円滑にしていると考えられた。

■同病者交流の効果

参加した患者の病名は、乳がん2名、卵巣がん4名。5名が脱毛中で、残り1名も脱毛が予想される治療を受ける予定。人種構成はアジア系、ラテン系が一人ずつで、残り4名は白人。参加者は、会場に入った時点から自らの経験談を語り合い、極めて和やかな雰囲気の中でプログラムが進行する。セッション会場は、がん・脱毛・外見的变化という問題を共有する同病者が安全に交流できる場所でもあり、参加者の心理的安寧にも効果があると考えられた。

■訴追回避の努力

ボランティア養成セッションでは、LGFプログラムの範囲で実施していること／してはいけないことが明確に区別されていた。（例えば、カツラの装着アドバイスはするが、参加者が持参したカツラのトリミングは一切行わない。ネイルケアについても実演はせず、注意点を口頭で伝えるに留める。）本プログラム及びボランティアが参加患者から訴追されることがないように、法的責任範囲を考慮してプログラムが立案・実施されていた。

■セッション運営上の問題

セッション中、実際に以下のような問題が観察された。
・モデルの実演の進行が早い場合、他の参加者が追いつかないことがある。

- ・ ツールボックスの製品の色調は種々の人種的背景に対応する目的で4段階用意されているが、参加者の肌色に必ずしもマッチするとは限らない。
- ・ 参加者、ボランティアとも圧倒的に白人が多いので、メイクアップのアドバイスも白人女性を基準につくられている印象がある。
- ・ ツールボックス内の化粧品は複数の化粧品会社から寄付されているため、ボランティア自身が普段使用しない製品も含まれており、製品の使用方法に関する知識が乏しい場合がある。
- ・ 特定の製品を勧めない原則にもかかわらず、ボランティアによっては普段使い慣れている製品を患者に勧めることがある。

3-2 日本における高齢者などへの化粧指導の現状

近年国内でも、高齢者への化粧や、ケガ・病気・先天性変化による外見の変化を目立たなくする化粧が目目されている⁶⁾。活動主体も様々であり、化粧品会社（資生堂・カネボウ・ポーラ等）、メイクアップアーティスト個人やオフィス（小林照子氏、矢野実千代氏、トニータナカ氏・かづきれいこ氏等）、一般医療機関、老人医療機関・福祉施設、地方自治体などが含まれる。サービスは無償であることも、営利事業として実施される場合もある。

高齢者（痴呆高齢者を含む）を対象としたサービスは主にボランティアによって無償提供されており、「化粧療法」「お化粧セラピー」「ケアメイク」「コスメティックセラピー」等と呼ばれて化粧行為による心理的効果やリハビリ効果が期待されている。化粧品会社の専門スタッフやメイクアップアーティストが老人医療・福祉施設に出張して高齢者に化粧指導を行う活動が多い。岐阜県では県介護普及・実習センターが老人ホーム職員などを対象に各種療法の専門研修を実施しており、平成7年度から化粧療法を取り入れている。その結果、老人医療・福祉施設内の美容室設置、化粧品会社の訪問化粧教室などの試みが増加して効果を上げている⁷⁾。

一方ケガ・病気・先天性疾患による外見変化については、カバーアップの特殊技術が求められ、有償サービスであることが多く、「リハビリメイク」「メディカルメイクアップ」のように、より医学との連携を強調した呼び方をされている。特定の大学病院の形成外科や皮膚科と連携して医療現場に出張するケースもあれば（例：資生堂と昭和大学医学部）、メイクアップアーティストが複数の医療専門家の協力を得て専門の相談施設を設置する例も見られる（例：アピランスリハビリセンター）。

近年はサービスの対象を拡げ、院内にエステ施設を開設して一般入院患者にスキンケアも含めた「化粧エステ療法」を提供している拡げる一般病院も見られる（<http://www3.ocn.ne.jp/~johoku/>）。

このように美容専門家が専門技術を生かして医療・福祉領域で活動する機会は増加しており、今後の需要を見込んで「美容福祉コース」を設ける福祉・医療技術系の専門学校も増えている。これら教育機関のカリキュラムには、美容技法と共に社会福祉論・障害者論・リハビリテーション理論・カウンセリング理論などが組み込まれていることが多い。

学術研究面からも注目を集めており、平成11年には美容専門家による医療・福祉領域の活動をより学術的に研究する目的で日本美容福祉学会が設立された。

心理学領域でも化粧行為の心理的効果に関する実証研究が蓄積されており⁸⁾、日本社会心理学会でも自主企画が組まれている⁹⁾。これらの研究は「化粧心理学」として心理学の一分野となりつつある。また、学術領域と実践を結びつける活動として、医・美・心研究会によるメイクセラピスト養成講座の試みも見られる。

このような趨勢の中で、がん患者を対象とした活動や研究報告はほとんど見られない。継続的な活動としては、わずかに、北里大学病院における乳がん患者を対象とした試み¹⁰⁾や、がん治療のため一時的に脱毛した人にかつらを貸与する「夏目雅子ひまわり基金」(<http://www.himawari.ne.jp/>)が挙げられる程度である。その中で、乳癌当事者団体であるVOL-NET (<http://www.vol-net.jp/>)が平成14年から始めた「おしゃれわくわくプロジェクト」という活動は注目に値する。VOL-NETは、脱毛経験者を対象としたアンケート調査¹¹⁾やかつらメーカーへの訪問調査¹²⁾を通じて、当事者のニーズをメーカーに伝えるとともに、患者向けパンフレットの作成を行っている。当事者自身によるこのような活動は、今後一層の広がりを見せる可能性があるだろう。

4. 考 察

4-1 LGFB の特徴

LGFBプログラムは美容専門家が無償で専門技術を提供するボランティア活動であるが、活動に関わる4者である患者自身・ボランティア・化粧品会社・病院のそれぞれにとっての利点があげられる。1. 参加する患者同士の交流を促進する自助グループ効果 2. 美容専門家が専門技術を生かして参加できる個人ボランティア活動 3. 個々の企業、および業界全体としての社会貢献 4. 病院サービスの差別化、の4点である。

1. 自助グループ効果

がん治療のために何らかの外見の変容をきたした患者は、治療のために必要な最低限の外出を除けば自宅にひきこもりがちになりやすい。LGFBは外見の変容をきたした患者に具体的な対応方策を伝授するとともに、似たような状況にある他の患者と出会う場も提供している。日常生活の苦勞を分かち合い情報交換をすることを通じて参加者

の孤独感が軽減され、自助グループに類似した効果が期待できる。

2. 専門技術を生かした個人ボランティア活動

LGFBは美容専門家が自らの専門技術を生かして取り組めるボランティア活動である。ボランティアは特定の化粧品会社の枠を超えて募集されているので、化粧品会社主導の活動が少ない地方在住の専門家も活動に参加できるのは大きなメリットである。

3. 企業単位・業界としての社会貢献

参加企業は、製品を無償提供することでプログラムに貢献している。さらにCTFAがプログラムの共催者として本プログラムを強力に推進していることは、化粧品業界全体のイメージアップにもつながっている。

4. 新たな病院サービスの提供による医療施設の差別化

LGFBを病院で行うプログラムの一貫として取り入れることで、その病院が単にがんという疾患の身体的治療だけでなく、全人的な心理社会的支援にも取り組んでいるというアピールになっている。特にがん患者の外見の変容に対処するプログラムがほとんど見られないわが国では、病院サービスの新たな差別化戦略としての効果も期待される。

4-2 LGFB の日本適用可能性について

LGFBプログラムはアメリカの他にも世界8カ国で展開されて高い評価を受けている。前述のように国内におけるがん患者を対象「化粧療法」の実践報告は数少ないが、何らかの外見の変容を補うことを目的とした「化粧」に関する研究や実践活動が活発化してきた昨今、わが国においてもがん患者を対象とした同様のプログラムは十分に実現可能性があると言えよう。しかし、LGFBを日本国内で実施するにあたっては、検討すべきいくつかの留意点がある。

4-2-1 プログラムの運営主体の課題

LGFBプログラムはCTFA、ACS、NCAのパートナーシップで実施されている。業界団体であるCTFAは、財政的支援、化粧用品の調達、教材の作成などプログラムのハード面の中核部分を担当している。アメリカにおける本プログラムの成功はこのCTFAの全面協力に負うところが大きく、他の国々でもCTFAに相当する業界団体の支援が得られている。複数の化粧品会社による連携は本プログラム最大の特徴であり、フリーや地方在住の美容専門家のボランティア参加を容易にする重要なポイントでもある。わが国においても、特定の会社だけでなく広く業界全体の協力を得ることが不可欠であろう。

CTFAはプログラムのハード面を担うが、美容専門家であるボランティアは実際に患者に接してメイクアップのアドバイスを提供するソフト部分の要である。ボランティアの多くは自分自身や家族・友人ががん体験を有しており、

その個人的経験が活動に参加する最大の動機になっていると考えられた。この点は、患者に対する共感を保つ上で非常に重要である。ただし、がん体験には個人差が大きく、ボランティア各自の経験に基づいた価値観を患者セッションに持ち込まないよう、トレーニング段階で十分留意することも必要であろう。

プログラム全体の調整役である ACS の機能を受けもつ団体が国内に存在しないのも問題である。ACS は、LGFB プログラムの全米への広報、会場となる個々の病院との連絡調整、ボランティア応募者のトレーニングなどに関わり、プログラム全体の運営を円滑にしていた。日本の場合、がん患者会は各地に存在するものの、現時点では ACS に相当するような全国規模の非営利支援組織が存在しない。この調整役割を誰が担当するのか、新たな NPO 設立の必要性なども含めて今後詳細な検討が必要である。

4-2-2 プログラム内容の課題

LGFB プログラムの内容は、スキンケアとメイクアップを基礎としており、かつらやネイルケアに費やす時間は相対的に短い。しかし抗がん剤治療などで脱毛をきたす場合、患者の社会生活に及ぼす影響が大きく、患者にとってはメイクアップよりも脱毛への具体的対策に関する情報提供のニーズが高い可能性もある。LGFB では、かつらについては法的トラブルを回避するために総論にとどめているが、購入方法・使用方法・手入れの仕方など、より具体的な情報提供が求められよう。その際、VOL-NET などの当事者団体が作成したパンフレットなど、既存資料の発掘と活用も課題である。

5. 総括

がん患者対象の「化粧療法」プログラムである LGFB に参加し、運営の実験を検討するとともに日本国内における適用可能性を考察した。本プログラムはわが国においても新たな患者サービスとして、また専門技能を生かした美容専門家のボランティアプログラムとして、さらには企業や化粧品業界全体の社会貢献活動として、大きな可能性が期待できる。

(引用文献)

- 1) 厚生統計協会：国民衛生の動向，2000
- 2) Noyes DD and Mellody P: Beauty and Cancer, Taylor Publishing, Dallas, 1992.

- 3) Anderson MS and Johnson J: Restoring of body image and self-esteem for women after cancer treatment - a rehabilitative strategy. Cancer Practice, 2, 345-359. 1994.
- 4) Landis NT: Pharmacy technician helps cancer patients look good. American Journal of Health-System Pharmacy, 56, 208, 1999.
- 5) 高橋 都：癌患者への「化粧」技術指導プログラムの日本への適用可能性に関する研究．コスメトロジー研究振興財団 研究業績中間報告集第 11 号 33-43, 2002
- 6) 村澤博人：外見に対する意識の変化がもつめるこれからの社会．フレグランスジャーナル 49-52, 2003
- 7) 岐阜県県政トピックス 健康増進課「化粧でいきいき健康に！ -- おしゃれ健康法の実践」<http://www.pref.gifu.jp/kouhou-c/futrai/9708/topics/topics05.htm> (2003 年 1 月 20 日アクセス)
- 8) 大坊郁夫：Well-being としての化粧の心理的効果．ストレス科学 15, 269-275, 2001
- 9) 大坊郁夫, 箱井英寿企画 日本社会心理学会自主企画「装い」セラピーの可能性を探る - 化粧と被服の心理的効果．日本社会心理学会第 43 回大会発表論文集 876-877, 2002
- 10) 小越明美、蔵並 勝、越田佳朋他：乳癌在院患者に対する精神的 QOL の改善を目的とした化粧療法 第 10 回日本乳癌学会総会抄録集, 125, 2002
- 11) VOL-NET：化学療法に伴う脱毛経験者の声と問題点 - 乳がん患者アンケート結果から．<http://www.vol-net.jp/01opensite/Main2/Sub9-2.htm>
- 12) VOL-NET：私達が廻ったかつら屋さんの特徴と印象．<http://www.vol-net.jp/01opensite/image/021216katura.pdf>

(参考文献)

- 1) Look Good ... Feel Better -- How to conduct a patient session. CTFA Foundation, 1997.
- 2) Look Good ... Feel Better Homepage: <http://lookgoodfeelbetter.org/>
- 3) Look Good ... Feel Better -- Guide for American Cancer Society Volunteers. American Cancer Society.
- 4) Look Good ... Feel Better -- Education material for Los Angeles Region Certification Class. December 10, 2001.
- 5) Look Good ... Feel Better News, Volume 101, Number 1, 2001.

化粧文化史の変遷と流行した化粧の受け入れ方についての研究

武庫川女子大学大学院 家政学研究科

玉置育子、横川公子

This research considered formation of modernistic makeup, and makeup in the present age. When I studying modern makeup, it is made reference the magazine "FUJIN-SEKAI" and the "SHUFU NO TOMO" were used. The beauty by soul was recited in the Meiji era. A woman began to carry out makeup united with the going-out place to Taisho Era. And it came to carry out "modern makeup" which emphasizes that eyes go into the Showa time. People called a cosmetics house introduced Occidental cosmetology to Japan, and one of them had a face massage. A cosmetics house holds a school in a beauty parlor, a company, etc. which oneself manages. There was an idea of calling it ready "Aesthetic thought" in modern makeup. However, the view was finished by establishment of the law of the Showa 30s.

It investigated about fashion of the present makeup. A 30 or older-year women likes red makeup. In order to know makeup of a young man, personal-effects investigation of makeup was conducted. The young person had all the members mascara.

はじめに

多くの女性はいつの時代も化粧をしつづけている。さらに大げさな表現をすれば、人類が化粧をしなかった時代は無かったと言っても過言ではない。化粧は変わることなく続けられた行為であり、時代によって化粧で様々な顔が作られてきた。例えば、白い肌が良いとされた時代があれば、日焼けした肌が良いという時代もある。唇の輪郭を小さくおちょぼ口に描き真っ赤な口紅を塗る時代もあれば、ピンクの口紅を唇いっぱい描いた時代もある。多くの女性は時代と共に大きく変化する価値基準によって技巧を凝らしながら化粧をし、どんな化粧したら良いのかを模索し続けている。本研究では、時代と共に変化する化粧への基準を追うと共に、学問としての化粧文化の可能性を追求したいと考えている。

本研究において、まず近代における化粧がどのような変容をたどってきたのかを追う。また、現在の化粧についても考察を行うこととする。

本論では、次の通りに章を設定した。第一章、これまでの化粧文化研究の変遷。第二章、近代的化粧の形成。第三章：現代における化粧環境について。

これらの研究を遂行する上で次のような方法を用いた。第一章では、これまでの化粧文化研究の変遷を追っている。第二章では、化粧に携わる美の実践者として美容家たちの提唱内容に耳を傾けることとする。近代に台頭してきた美

容家と称される人々の活躍とその根底に流れる思想を追っている。その際の主な資料としては、美容家の著書や当時発行されていた雑誌「婦人世界」や「主婦之友」などでの美容家の発言を参考としている。

第三章は、現代において化粧をしている女性たちをとりまく化粧に関する環境について調査を行った。これまでの化粧文化及び化粧史に関する研究は、どのような化粧が提唱されてきたのかを述べることに重点が置かれてきた傾向が強く、実際の化粧の調査はあまりなされていない。本章ではアンケート調査を行い化粧の傾向を年代別に見ることとする。さらに、18歳19歳の学生を対象に化粧ポーチの所持品調査を行った。18・19歳の学生を調査対象としたのは、学校、バイト先、家とあらゆる環境において化粧を許されるようになった年齢であり、化粧に興味を持ちやすい年代だと考えたからである。また、化粧ポーチの調査を行った理由は、顔を作るための道具箱でもあり、即座に顔を修正できるようにと救急箱のような存在であると考えたからである。

第1章：これまでの化粧文化研究の変遷

化粧が研究テーマにされることは、決して多くなかった。まず、化粧文化に関するこれまでの研究を振り返ってみることとする。

日本における化粧文化研究の端緒を、久下司、江馬務に見ることができる。

もちろん久下司、江馬務より以前にも、化粧関連の書籍として『容顔美艶考』、『都風俗化粧伝』など化粧を扱った書は多く発行されているが、これらは女性が化粧をする際に参考にする美容書であるため、資料としては貴重であるが、化粧を歴史的、文化的に総括した研究的視座をとるものとはいえない。従って、久下司、江馬務の化粧研究によって、以下、日本における化粧文化史の系譜を辿ることに



A study of the change in Make-up practices through History and the Acceptance of Make-up fashion, among young women

Yasuko Tamaki, Kimiko Yokogawa

Human Environmental Science, Mukogawa Women's University

する。

久下司の化粧文化研究を『化粧』（法政大学出版、1970年）で、江馬務による化粧文化研究は『江馬務著作集第四巻 装身と化粧』（中央公論社、1976年）などで確認できる。久下と江馬の研究は、化粧の歴史をたどることに重点が置かれている。両者における化粧の歴史は、日本での化粧の発生を原始時代に見出し、記紀の時代、奈良・平安時代を経て江戸時代までを扱っている。両者の研究は化粧を広義の意味で捉えおり、白粉や紅などの化粧品や化粧方法だけではなく、髭、額の形状など顔面における装飾や加工も扱っている。江馬は、これらの変遷を「固有風俗時代」、「韓風輸入時代」、「唐風模倣時代」、「国風発達時代」、「国風発達全盛期」のような時代区分を設定して位置づけ、大陸からの影響を受けた化粧が日本において独自の変容を追っている。

記紀の時代から明治前期にかけての化粧史を、より詳細に記載した資料として、『化粧史文献資料年表』（ポーラ文化研究所、1978年）がある。この資料集には、あらゆる文献における化粧関連の記述が通史的に掲載され、貴重な化粧文化関連資料の一つと考えられる。

しかし、これまでの化粧史は、化粧と人との関わりの中で全く語られていないため、化粧の目的等は全く不明である。

樋口清之は『日本風俗史事典¹⁾』で、「化粧」の目的を①宗教的目的（呪術、禁忌など）、②本能的目的（快感、美的本能など）、③実用的目的（防衛、保温など）、④表示的目的（経歴、地位）と四分類して述べている。しかし、現代社会において化粧の行為の目的は、個々の生活によって細分化され、様々な要因が絡み合っているために、容易に目的を定めることはできない。

明治時代以降の化粧史は、『モダン化粧史 粧いの80年』（ポーラ文化研究所、1986年）や1996年に資生堂より創刊された研究紀要『おいでるみんな』では、の陶智子による「近代化粧の基礎的研究」でも確認できる。

2002年に発行された『研究紀要 おいでるみんな 化粧文化特集号 日本の化粧文化—明治維新から平成まで—』では、スキンケア、礼儀、ジェンダー、フレグランス等、これまでの化粧史を多角的に分析する研究報告がなされている。

高橋雅夫の検討は、「化粧文化」12号、13号、14号における「広告における明治期の化粧品」や著書『化粧ものがたり』（雄山閣、1997年）でも確認できる。さらに高橋は、著書において化粧の基本となる色を白・赤・黒とわけて個々に考察を行い、1990年代までの化粧史を追っている。

また、化粧に関する民俗学的考察として、石上七輔『化粧の民俗』（おうふう、1999年）で取りあげられる化粧にまつわる伝承に関する論考を知ることが出来る。

南博は『化粧とゆらぐ性』（ネスコ、1991年）で学問としての化粧の可能性を摸索し、化粧に関する研究を“化粧

学”と命名し、更に自然科学、人間科学、社会科学と三点からのアプローチが可能であると述べており、化粧文化研究の可能性を示唆している。

現在において化粧文化研究を遂行する上で、村澤博人と石田かおりの存在も無視できない。村澤博人はポーラ文化研究所で「化粧文化」の編集を行うなど長年にわたり“化粧文化”という言葉の生みの親でもある。現在は顔・化粧文化研究所にて研究を継続している。これまでの研究を著書『美人進化論』（東京書籍、1987年）、『顔の文化誌』（東京書籍、1992年）『これがわたしの顔²⁾』（ポプラ社、1998年）などで確認できる。村澤は顔と化粧を関連づけて考察を行っている。化粧を通史的に追っていることはもちろんだが、興味深い報告の一つに、顔を横から捉える“横顔文化”と顔を正面から捉える“正面文化”比較文化研究がある。これらに基づき、日本は顔を真正面から捉えようとする“正面文化”であるとし、韓国などは顔を横からとらえる“横顔文化”であるという分析を行っている。

石田かおりは、著書『おしゃれの哲学』（理想社、1995年）、『「裸のサル」は化粧好き』（求龍堂、1999年）『化粧せずには生きられない人間の歴史』（2000年、講談社）などで化粧文化研究を確認できる。これまでの化粧を古今東西取り上げ、日本、西洋を問わず化粧をし続けてきた歴史と清潔感との関係を述べている。

産業史や社史による化粧史は、資料がまとまっている資生堂に頼らざるを得なかった。しかし、戦後の化粧品業界の変遷を追う際には、水尾順一による『化粧品ブランド史』（中央公論社、1998年）がおおいに参考になる。

また、これまでの化粧文化の研究は歴史を追う傾向が強かったが、米澤泉による化粧文化研究は言語化学的要素を取り入れた方法を用いており、電車での化粧行為を読者参加型の「読み」行為と位置づけている点が大変興味深い。

これまでの化粧研究からは、古代記紀の時代から現在に至るまでの化粧史の総論を確認できた。しかし、化粧史研究は多くの研究者によってなされているが断片的でしかない。一次資料として当時の雑誌を通史的に読み解いていく方法はほとんどなされていない。今後の課題としてはより詳細な化粧史の構築の必要を感じる。

第2章：近代的化粧の形成

第1項：近世から近代への移行

江戸時代までは、既婚した女性は眉を剃り、歯を黒く染める＝鉄漿など日本独特の化粧をしていた。その風習が1868（明治元）年の太政官布告によって禁止された。明治政府が鉄漿や眉剃りは諸外国には無い野蛮な風習とみなし、これらの風習を公卿たちに止めさせたのである。引き続き、1870（明治3）年の太政官布告でも華族の鉄漿が止め、1873（明治6）年も昭憲皇太后もお歯黒を止めたので

あった。公卿や皇室から端を発した眉剃り・鉄漿の排除は、次第に一般の人々の間でも広がり始めた。しかし、太政官布告はこれらの風習を排除したが「しなくてよい」という程度であるため、眉剃り・鉄漿などの日本独特の風習は即座に無くなったとは言いきれないⁱⁱⁱ⁾。これらの太政官布告はこれまでの化粧の風習を禁止し、海外の化粧法を取り入れるきっかけの一つでもあったため近代的化粧の発端と考える。

太政官布告以降の新しい化粧法＝近代的化粧は、当時の新聞・雑誌で提唱されることはほとんど無かった。当時の「読売新聞」では新商品の紹介が化粧関連の主な記事である。例えば、明治13年5月に田所町の井善の「井桁香水」の発売、同年10月に浅草の「天香水」の発売、11月には馬喰町の岳陽堂で「小町水」などである。

次に、雑誌「風俗画報^{iv)}」の化粧関連記事を参考とする。「風俗画報」における化粧関連記事は全22件確認できた。化粧関連記事で鉄漿が詳細に述べられている。先にも述べたように、太政官布告によって鉄漿は一応禁止とされているが、明治20年頃、女の歯の白いは恐ろしいとして再び鉄漿をつける女性が増え^{v)}、明治32年の記事でも鉄漿を止める風習はまだまだ浸透していないと述べられている。さらに明治34年の記事では、始めて鉄漿をつける時に鉄漿親（かね親）をたてる風習や初めてつける鉄漿は近所の人を持っている鉄漿壺に入っている鉄漿水を少しずつつけてもらうなど、鉄漿に儀礼的風習が残っていたことも確認できる。太政官布告が発布されるなか、鉄漿で歯を黒く染める風習が残っているこの様子を明治34年の「風俗画報」では当時の女性を「半和半洋」（半分和風、半分洋風）が混乱した様子だと述べている。

第2項：美容家の誕生

本章では美容に関する情報を発信している人達—美容家の提唱内容について追うこととする。明治30年代頃に日本における美容家が登場し始めた。明治時代、美容家の祖として、芝山兼太郎の名は無視できない。芝山兼太郎は、西洋理髪師の祖の一人である松本定吉のもとで理髪を修得し、横浜の山下町に明治28年「日之出軒」という店を構える理髪師であった。明治38年11月に芝山兼太郎はアメリカ人の医師、キャンブルーと出会い、血行療法を主としたマッサージ法を学んだ。そのマッサージは「フェイシャル・マッサージ」として「日之出軒」の営業品目に加えられると、「生理的マッサージで、顔がとてもきれいになる」と評判になり「美顔術」とよばれた^{vi)}。しかし、これまでマッサージは目の不自由な人の仕事であったため、職業妨害であるとの非難を受けたが、芝山兼太郎は美容を目的にした顔のマッサージであり、これまで行われていたマッサージとの違いを明確に示した。

明治40年11月13日の読売新聞の記事より医師キャン

ブルーにフェイスマッサージを学んだ人物として荘司直子の存在も確認できる。荘司直子は、夫の七之助が理髪店を経営しており、夫の仕事を助けたいという思いから英語を修得し医師キャンブルーのもとでフェイスマッサージを学んだ。その後荘司直子は独学で生理学・解剖学の研究し、明治39年10月から夫が経営する理髪店で婦人部を設け、フェイスマッサージを行っている。しかし、美容家荘司直子は雑誌記事や書籍は確認できない。

美容家の祖として遠藤波津子の存在も無視できない。遠藤波津子は明治34年に帝国ホテルで着つけ業務を開始し、その後明治38年に東京の京橋で「理容館」を開業し「美顔術」を本格的に開始した。遠藤波津子は「大日本美髪会」の講習会で芝山兼太郎からフェイスマッサージを習得し、アメリカ式のフェイスマッサージを行っている^{vii)}。アメリカ式美顔術はエレクトリックボールという電気の球で顔を撫で、それから蒸したタオルで顔を蒸らした後にマッサージクリームを顔に塗り込み、パンピングバルブというゴムで作った機械を用いてクリームを吸い上げる方法をとっている。

当時の美顔術は人気を博しており、荘司七之助の経営する理髪店の顧客の割合は男4割、女6割で、主な顧客は学者、令嬢、令嬢夫人などであった。遠藤波津子の「理容館」も人気を博し、大阪、神戸、広島に支部が存在した。遠藤の主な顧客は山手のお屋敷の婦人令嬢たちであった。主な男性客は学校帰りの学習院の男子生徒たちであった。日本で導入され始めた美顔術は男女問わず、裕福と言われた人々に受け入れられた。

当時の美容はマッサージだけではなく、医学的・化学的見地から美容を唱える整容医学（Kosmetik）と称される思想も存在した。“整容医学”とは、肌や髪の毛の荒れを薬で治療することである。しかし、整容医学は医学とも異なる。医学は悪い部分を取り除き、整容医学は痕を残さず取り除くことを目的としている。例えば、医学的では、ホクロや雀斑は痛みが生じないので取り除かないが、整容医学では肌を美しく見せるためにホクロや雀斑を痕が残らないように薬などを用いて取り除くのである。治療に使用する薬は整容医学を提唱する医師らの著書や婦人雑誌での化粧記事で述べられている。

当時、整容医学を提唱する医師として北原十三男や高橋毅一郎などが存在する。

北原十三男は欧米諸国を調査旅行し、医師と白粉屋、髪結い屋の合の子のような職業の必要を感じ、顔の表面だけを綺麗にするのではなく、肌を荒らしている原因をしらなければならぬと、整容医学を率先して取り入れた。北原十三男は雑誌「婦人世界」の誌面に度々登場し、特に読者から寄せられる美容関連の質問コーナーである美容問答を担当し、読者に対して随時薬の作り方を指示していた^{viii)}。また著書『実際美容』でも、皮膚の荒れる原因を突き止める

ために基礎知識として皮膚の構造を説明し、化粧品に入っている薬品の成分の説明もしている。

高橋毅一郎は美容家早見君子と『新化粧品法・整容医学』を執筆し、整容医学の章を担当している。まず、高橋は整容医学における大きな枠組について次のように述べている。美容科学という言葉があり、その中に化粧の医学と整容医学がある。「化粧の医学」とは人体の美を維持し増進すること、「整容医学」とは人体美の妨げとなるものを除去することと述べている。

他に、整容医学を捉えた著書に『科学的化粧品法』大正2年、『美容医学 (Kosmetik)』が大正15年に出版されている。『科学的化粧品法』は、医師と薬剤士によって執筆されており、これまでの整容医学と同様に皮膚・毛髪・における薬の作り方を示唆している。そして、最後には結論として、心身共に健康な体であることが美しさの条件である。

当時の美容家は美容院を開業していることが多い。山本久栄は明治44年に美顔術の店「美粧倶楽部」を大阪の本町に開業、大正14年には女子整容大学園（今でいう美容専門学校）を設立している。他にも、大正元年に来日したフランス人マリールキズ^{ix)}が大正2年に美容講習所を設立、ハリー牛山^{x)}・メイ牛山^{xi)}夫妻が大正14年にハリウッド美容専門学校、ハリウッド美容院を設立している。

これら設立された美容院や美容学校は、新しい美容を普及させる拠点として、美容家による講習会が度々行われた。例えば、東京の神田の東京女子美髪学校では、大正9年8月1日より15日まで結髪法・婚礼用美顔術化粧品法、消毒法の夏期講習を開催しており、山本久栄が主催する東京の赤坂の美粧倶楽部でも、同年8月15日から三日間の午前中に自分でできる結髪法や外出時の化粧品などの講習会を行っている。さらに大正9年10月1日から3日まで東京の赤坂見附にある東京美粧倶楽部に、全国女教員大会へ出席のため上京していた女教員を招いている。女性教員に対して山本久栄は、「教育に従事する人間は質素を重んじるあまり身の回りの修飾を疎んじる傾向がありましたが、品位ある容儀を保つためには、整身法を用いるほうが良い^{xii)}」と述べている。引き続き、山本久栄は、講習会だけでは、参加できる人数に限りがあると、山本久栄は弟子6人を引き連れて、大正9年12月美粧行脚に出かけた。美容講習会は、神戸、姫路、岡山などにある各女学校で開催された。山本久栄が美粧行脚を行った理由を、美粧倶楽部を開業して10年経ち、これまでの経験や研究を公開しようと思ったこと、20万円の資産ができたことと述べている。

大正10年代頃から企業が盛んに美容研究所を設置し、これらの研究所でも美容に関する新しい情報が発信されたのであった。

確認出来る範囲では、資生堂が、大正11年に化粧品部の2階を改装し、美髪科、美容科、子供服科を設置してい

る。美容科では早見君子と共著を執筆している医師高橋毅一郎が美容相談を担当している。美髪科では、アメリカ在住の美容家ヘレン・グロスマンを資生堂の講師として呼び寄せた。

クラブコスメティックで有名な中山太陽堂が大正12年に創業20周年を記念して大阪堂島ビルの5階に中山研究所が設置し、同年15年にも東京麹町東洋ビルに同様の研究所が設置された。中山文化研究所では、4つの研究所が設けられている。女性文化研究所、西洋美粧研究所、口腔衛生研究所、児童教養研究所の四つである。その中で美容に関する研究機関は、西洋美粧研究所が担当しており、所長は医師三内健治が勤めている。

当時は、企業が人々に美容を教授するための機関を設けているが、いずれも医師が担当しており、整容医学の思想に基づく美容が強かったということ、いずれも子供に関する研究所が併設されているため主婦をターゲットとした研究所であったことも考えられる。

大正時代の終わりから昭和の初期にかけて、これまでの肌の美しさを重んじる化粧品法から、顔のパーツを技巧的に化粧する方法が提唱され始めた。その際には、化粧美・自然美という言葉で表現されていた。

資生堂では、美容部長の小幡恵津子が自然美や化粧美という言葉を用いながら個々人の肌の色や顔のパーツに合わせた化粧品法を著書『整容^{xiii)}』で述べている。本来の自分の持っている自然な顔を生かした化粧が自然美である。また、化粧美では、目の化粧には瞼を眉墨でなぞったり、睫にオイルを塗ったり後に、目を“パッチリ”させるという表現をし始めた。また、小幡の提唱する美顔術は、自宅でできるコールドクリームを使用した手軽なフェイスマッサージと、美容室で機械などを用いて行うフェイスマッサージを紹介している。美容室でのフェイスマッサージは、機械のランプの光を顔を当てマッサージを行い、拡大鏡で皮膚の検査を行うなど、医学的な見地から美容を述べる“整容医学”の思想も根強く残っている。小幡は美顔術の意義は、著書において「美顔術によって皮膚の組織を改造し、蘇らせる」と述べている。この頃から基礎化粧品やマッサージ用として使用されていたバニシングクリームは戦後も人気の化粧品として使い続けられるが、化粧は戦争によって封印されることとなる。

第3項：封印される化粧

戦争ムードが高まると共に、化粧は余剰品、贅沢行為だとして封印される^{xiv)}。まず、昭和14年に文部省はいっその自奮を促すために女生徒に口紅、白粉、頬紅、パーマネットを禁止。昭和15年7月7日奢侈贅沢品製造発売禁止規制、昭和15年には化粧品の一時製造停止が増える。化粧品は生産できても品薄の状態であった。

しかし、戦争中全く化粧ができなかったと言うわけでもなかったようだ。例えば、宇野千代や吉行あぐりのエッセイなどでは、戦争中で化粧ができないときはマツチを刷った後の筈で眉を書いた。と、女性たちは様々なアイデアをしながら化粧をしていたようだ。

戦争が終わり、封印された化粧が解放された時に美容家は細分化され、近代的化粧は大きな転換点と終焉を迎えることとなる。

本項では美容家を顔を中心とした美容の提唱者もしくは実践者として扱ってきたが、実践者としての美容家は、化粧のみならず、頭髪や整容医学に関する知識を持ち合わせていたのである。また、当時は法令による規制もなく、美容と理容の差異も見受けられなかった。

しかし、昭和32年に制定された理容師法、美容師法によって美容家が頭髪を扱う仕事して都道府県の知事による免許を取得しなくなってきた^{xv)}。また、この法令により、理容とは「頭髪の刈込、顔そり等の方法により、容姿を整えること」(理容師法1条の2)。美容とは「パーマネントウェーブ、結髪、化粧等の方法により、容姿を美しくすること」(美容師法2条)と規定され差異が明確化されたのであった。近代美容家は、顔・髪・整容医学の知識を兼ね備えていた実践者であったが、制度上で髪と顔とが分けられるようになった^{xvi)}。

さらに昭和35年の薬事法制定に伴い整容医学が終焉を迎える。薬事法において、化粧品とは、人の身体を清潔にし、美化し、魅力を増し、容貌を変え、又は皮膚若しくは毛髪をすこやかに保つために、身体に塗擦、散布その他これらに類似する方法で使用されることが目的とされている物で、人体に対する作用が緩和なものを示している。つまり、近代に貫かれた整容医学の化粧品によって“治る”という言葉の使用が禁止された。近代的化粧は、昭和30年代の法令によって美容に携わる仕事が頭を扱うのかハサミを使用するのか、剃刀を使用するかなどによって差異化が図られ、整容医学は薬事法によって終焉を余儀なくされたのであった。

第3章：現代における化粧環境について

第1項：第二次世界大戦以降から現在までのこれまでの化粧史

第一章では、これまでの化粧文化の変遷を追ってきた。第二章では近代における化粧の形成と変容について追ってきた。

本章においては現在における化粧観について追究したい。まず、第二次世界大戦から現在までの化粧の流れをおさえておくこととする。その際には高橋雅夫『化粧ものがたり』、村澤博人『顔の文化誌』、『研究紀要 おいでるみんな化粧文化特集号 日本の化粧文化—明治維新から平成まで

—』、拙稿「変わらない化粧、変わり行く化粧」を参考とした。

第二次世界大戦の終わりは、新しい化粧の始まりでもあり、化粧の自由が獲得された瞬間でもあった。しかし、本格的に化粧が普及し始めたのは1950年頃になってからである。当時の化粧法はバニシングクリームやコールドクリームを化粧下に使用する“光る化粧”であった。ファンデーションはピンク化粧と称されたように赤みがかかった色を使用し、ポイントメイクにも口紅が中心で赤色やピンクが好まれており、眉を含む目元は脇役でしかなかった。当時の化粧で好まれたキーワードは「明るい」、「清潔」、「健康」などが化粧によって演出され、“健康美”を感じさせるような顔を目指していたのであった。

その後口元に気を配る化粧から徐々に化粧の中心は目元へと変化していった。その目元の化粧法は目尻に三角州を作るなどアイラインを技巧的に使用して目元を演出している。目元の化粧は1960年代以降更に強調された。それは1967年に来日したツイギーによる影響も一因と考えられる。ツイギーの化粧は目元を強調しており、目元を強調際にはつけ睫毛を二段重ねて使用し、濃いアイラインを描き、さらに下瞼には書き睫毛を施すといった具合である。彼女の影響を受け目元を強調した化粧を試みた女性達に「たんねんに目の化粧をするときはおしろいや口紅はあくまでも控えめに^{xvii)}」と警鐘を鳴らす記事もあった。その後、化粧法は短期間に目まぐるしく変化するファッション的要素を強めていく事となった。化粧品業界によって様々な商品PRが盛んになり、新しい化粧法も季節毎に唱えられ始めたのであった。1962年「青い化粧」が提唱されたが、その直後には「ワイントーン」、1964年には「青白さは過去のもの」と1年間に化粧法が目まぐるしく変化していた。

1960年代は化粧人口が増大したといわれる時期でもあるが質的变化のみならず、女性達の化粧がより自分を美しく見せる為の化粧に変わったといわれている。

さらに自分を良く見せようとする化粧法は1970年代頃には眉を含めた目元に化粧をするようになった。特に眉の化粧は1970年代に入ってから雑誌でも注目され始めた。「明るくて健康な眉」、「温和でやさしい眉」、「女の子らしい眉」、「情熱の眉」など女性の顔は眉と言葉によって、なりたい女性を演出するのであった。

その後、言葉による演出を始めた化粧は、化粧に自らの意思を託すようになり、その矛先は眉へと向けられ、人類史上最も太い眉を作り出したのである。1985年の男女雇用機会均等法の制定が後押ししてか、彼女たちの眉は「男に媚びない自立心の現れ」というメッセージがこめられていたのである。一方、男性の方は化粧を他人事では済まされなくなった。「男らしさ」を眉墨やファンデーションなどの化粧で演出しようとした。しかし、当時の男性の化粧を全てが容認し賛成したわけでもなかった。昔気質の年配

者たちは否定的な意見を新聞に投稿していたのだ。「本当に美しくなりたければ、自分の内面をファンデーションやシャドーなどで色づけできないことに早く気づくべきだ」と。

女性達の化粧は引き続き眉へと関心は向けられた。1990年代は「トレンドードラマ」が流行し始め、女性達は“流行の女優の顔”にあこがれたのであった。その際に即座に形状を変化させられる眉が重要な位置を占めていた。

戦後の化粧のポイントメイクは口元が中心的な化粧から目に移り、それから眉へと移行したと考えられる。それらの背景には人気のモデルや企業のキャンペーンなど生活の様々な場面でも情報によって我々の顔はつくられている。次項では、これら戦後の化粧が顔にどのように刻み込まれているかを検証したい。

第2項：各年代に見られる化粧観

前項では第二次世界大戦から現在までの化粧の流れを大きくとらえた。しかし、その流れの中で現在の化粧についてはまだまだ研究がなされていない。そこで本項ではアンケート調査を行い化粧の傾向を年代別に見ることとする。アンケート実施時期は、平成14年7月から8月。対象とした年齢は10歳代から60歳代まで、計237人に調査を行った。年代別にみると、10歳代が110人、20歳代が57人、30歳代が10人、40歳代が8人、50歳代が11人、60歳代以上は5人であった。年齢にかなりの偏りが見られるためこれらのデータは一般化しにくい、現代における化粧

に関する情報として、有効な資料として扱いたい。

アンケート内容は、①化粧の情報源について、②化粧開始年齢、③化粧で気を配っている顔の箇所、④目元でもっとも気を配っている箇所、⑤ファンデーション・口紅のメーカー名と色、⑥化粧に求めるイメージ、以上について調査を行った。

まず、①情報源について。化粧に関する情報を採取する際、どのような雑誌を読み、参考としているかを知るため調査を行った（表1）。

10歳代では36種類の雑誌の名前があげられた。その中で最も良く読まれている雑誌は「Non-no」が42件、「Zipper」が40件であった。20歳代でも30種類の雑誌の名があげられた。特に「JJ」の19件、「Non-no」の18件と購読率が高い。ちなみに10歳代で「JJ」は20件と第四位に入っており、10歳代と20歳代との情報に多少のずれはあるが共通した情報を入手している傾向がある。30歳代では16種類の雑誌の名が上げられた。「MORE」が6件、「WITH」が5件である。やはり、30歳になると、「DOMANI」や「VERY」などの30歳前後の主婦をターゲットとした雑誌の名が上げられ20歳とは確実に差が見られ始めている。40歳代では15種類の雑誌が上げられた。そのうち「主婦の友」が3件、「家庭画報」が3件と読者層を主婦に限定した雑誌が登場し始める。大正時代に発行された“主婦の友”は読者層も主婦に限定しているが、現在は主婦といっても40歳代以降の主婦が主に愛読しているということがこのデータから読み取れる。50歳代も40歳代同様「主

表1 よく読まれている雑誌

| 10代 | | 20代 | | 30代 | | 40代 | | 50代 | | 60代 | |
|-------------|----|-------------|----|-----------|---|-----------|---|--------|---|---------|---|
| 雑誌名 | 数 | 雑誌名 | 数 | 雑誌名 | 数 | 雑誌名 | 数 | 雑誌名 | 数 | 雑誌名 | 数 |
| Non-no | 42 | JJ | 19 | MORE | 6 | 主婦の友 | 3 | With | 1 | 婦人画報 | 2 |
| zipper | 40 | Non-no | 18 | With | 5 | 家庭画報 | 3 | 主婦の友 | 1 | スタイルブック | 1 |
| ViVi | 22 | MORE | 15 | JJ | 4 | MORE | 2 | 家庭画報 | 1 | | |
| JJ | 12 | ViVi | 15 | CanCam | 2 | With | 1 | Oggi | 1 | | |
| spring | 8 | WITH | 11 | ViVi | 2 | VERY | 1 | anan | 1 | | |
| bea'sup | 7 | anan | 7 | LUCI | 1 | Oggi | 1 | Zipper | 1 | | |
| anan | 5 | Zipper | 7 | DOMANI | 1 | 婦人画報 | 1 | クロワッサン | 1 | | |
| CanCam | 4 | LUCI | 6 | VERY | 1 | オレンジページ | 1 | UP | 1 | | |
| vita | 3 | spring | 6 | 家庭画報 | 1 | 通信販売のカタログ | 1 | | | | |
| MORE | 3 | VOCE | 4 | SAVVY | 1 | 25ans | 1 | | | | |
| mini | 3 | 美的 | 3 | LEE | 1 | SPUR | 1 | | | | |
| s cawaii | 3 | SPUR | 3 | 通信販売のカタログ | 1 | BAILA | 1 | | | | |
| popteen | 3 | Oggi | 2 | 美的 | 1 | VERY | 1 | | | | |
| SEDA | 3 | BAILA | 2 | SPUR | 1 | Non-no | 1 | | | | |
| With | 2 | VERY | 2 | ef | 1 | | | | | | |
| 美的 | 2 | Vingtaine | 1 | Non-no | 1 | | | | | | |
| olive | 2 | FRaU | 1 | | | | | | | | |
| cawaii | 2 | VERY | 1 | | | | | | | | |
| cutie | 2 | カジカジ | 1 | | | | | | | | |
| up | 2 | SWEET | 1 | | | | | | | | |
| happy | 2 | ルイール | 1 | | | | | | | | |
| FRaU | 1 | SEDA | 1 | | | | | | | | |
| LUCI | 1 | VITA | 1 | | | | | | | | |
| Oggi | 1 | Ray | 1 | | | | | | | | |
| FIGAROJapon | 1 | JILLE | 1 | | | | | | | | |
| SPUR | 1 | FIGAROJapon | 1 | | | | | | | | |
| ef | 1 | ef | 1 | | | | | | | | |
| Hanako | 1 | Hanako | 1 | | | | | | | | |
| ルイール | 1 | olive | 1 | | | | | | | | |
| ray | 1 | | | | | | | | | | |
| egg | 1 | | | | | | | | | | |
| カジカジ | 1 | | | | | | | | | | |
| mina | 1 | | | | | | | | | | |
| セブンティーン | 1 | | | | | | | | | | |
| Fine | 1 | | | | | | | | | | |

婦の友」と「家庭画報」を愛読している。50歳代で「With」、「anan」、「Zipper」などの雑誌は娘からのお下がりであろう。60歳以上では、「スタイルブック」、「家庭画法」となっている。これらのデータにより、10歳代、20歳代とそれほど愛読雑誌に差は見られないが、30歳代を転換点とし、若者が愛読する雑誌から主婦の雑誌へと移行していく。50歳代では娘の雑誌に目を通すことも度々ある。50歳代の女性達がこれらの雑誌を参考に化粧を模倣するのはなく、あくまでも参考として若者文化を参照しているのだろう。

愛読雑誌のデータで興味の引かれたのは、いずれもコスメマガジンといわれる化粧に関する専門雑誌の購読率が低いことだ。10歳代では「Bea's-up」は8件、「美的」は2件、「Voce」に至っては読まれていない。20歳代でようやく「Voce」が4件、「美的」が3件であるが、「Bea's-up」は読まれていない。30歳代でも「美的」の1件といった具合である。

コスメマガジンの購読率の低さを次のように推測した。コスメマガジンを読まなくてもファッション雑誌においては化粧に関する情報は掲載されている。10歳代で多く読まれている雑誌「Non-no」、「Zipper」、「Vivi」などは雑誌の傾向がはっきりと打ち出されている。あえてコスメマガジンの化粧に関する情報を参考しなくとも、化粧法や新しい化粧品の発売情報は掲載されていており、化粧もファッションも購読している雑誌のモデルを参考にすればよいのだ。また、コスメマガジンは化粧法の指南することが多いが、新商品の掲載の記事がとにかく多い。コスメマガジンは消費者に対して「あなたは何を选ぶのか」と言わんばかりに選択を迫っており、どのような化粧品を用いてどんな化粧をするのかまさに「化粧センス^{xviii}」を問うているの

でもある。なりたい顔を参考するには好みの雑誌で十分とあったところである。

雑誌以外の情報源について。いずれの年代も百貨店、ドラッグストア、ソニープラザなどの化粧品を扱う店舗にて情報を入手している(表2)。その他、雑誌広告や友人知人との会話等にそれほど差は見られないが、インターネットのサイトによる情報収集が意外と少ない。インターネットには化粧品についての日本最大級の「化粧品口コミ情報」サイト「@コスメ」が存在するし、MSNやYAHOOなどのトップページなどにも化粧関連サイトが存在しているが今回の調査協力者による利用者が多くはないようだ。10代後半の女性たちによる店舗における情報収集についての詳細は化粧品ポーチの所持品調査にて詳細に述べることとする。

②化粧開始年齢について。化粧開始年齢についての質問に対して有効回答数は以下の通りであった。10歳代100人、20歳代67人、30歳代11人、40歳代25人、50歳代12人、60歳代以上5人であった(表3)。

化粧を開始した時期は10歳代では14歳に28人。15歳で31人と、中学生三年か高校一年生のうちに半数以上は化粧を開始している。20歳代でも15歳が16人、16歳が18人、ついで18歳が13人である。しかし、30歳代になると、化粧開始年齢は18歳が3人、19歳が3人である。40歳代では20歳が7人という結果が出ている。50歳代、60歳代も化粧開始時期は18歳くらいだそうだ。

かつて花王が1992年に首都圏の女子高生に初めて化粧をした時期について調査している^{xix}。初めて化粧をした時期が高校2年生9%、高校1年生21%、中学校3年生が11%という報告があるが、子供の化粧開始時期について親は高校を卒業してからだを望んでいると述べられている

表2 雑誌以外の情報源について

| 10歳代 | | 20歳代 | | 30歳代 | | 40歳代 | | 50歳代 | | 60歳代 | |
|---------------|----|---------------|----|---------------|---|---------------|----|---------------|---|---------------|---|
| 情報源 | 数 | 情報源 | 数 | 情報源 | 数 | 情報源 | 数 | 情報源 | 数 | 情報源 | 数 |
| 百貨店・ドラッグストアなど | 73 | 百貨店・ドラッグストアなど | 53 | 百貨店・ドラッグストアなど | 8 | 百貨店・ドラッグストアなど | 10 | 百貨店・ドラッグストアなど | 6 | 百貨店・ドラッグストアなど | 1 |
| 雑誌広告 | 51 | 雑誌広告 | 33 | 友人知人との会話 | 6 | 友人知人との会話 | 10 | 友人知人との会話 | 2 | 友人知人との会話 | 1 |
| 友人知人との会話 | 51 | 友人知人との会話 | 26 | 雑誌広告 | 4 | 雑誌広告 | 7 | 雑誌広告 | 2 | 雑誌広告 | 1 |
| テレビ | 5 | テレビ | 4 | 新聞広告 | 4 | 新聞広告 | 2 | 新聞広告 | 2 | 新聞広告 | 1 |
| 新聞広告 | 0 | 新聞広告 | 1 | インターネット | 2 | テレビ | 2 | テレビ | 2 | テレビ | 0 |
| インターネット | 0 | その他(自然食品のお店) | 1 | テレビ | 1 | その他(娘) | 1 | その他(娘) | 1 | その他(娘) | 0 |
| その他 | 0 | インターネット | 0 | その他(訪問販売の人) | 1 | インターネット | 0 | インターネット | 0 | インターネット | 0 |

表3 化粧開始年齢について

| 10代 | | 20代 | | 30代 | | 40代 | | 50代 | | 60代 | |
|--------|----|--------|----|--------|---|--------|---|--------|---|--------|---|
| 化粧開始年齢 | 数 | 化粧開始年齢 | 数 | 化粧開始年齢 | 数 | 化粧開始年齢 | 数 | 化粧開始年齢 | 数 | 化粧開始年齢 | 数 |
| 12歳 | 2 | 12歳 | 0 | 12歳 | 0 | 14歳 | 0 | 18歳 | 6 | 18歳 | 5 |
| 13歳 | 7 | 13歳 | 1 | 13歳 | 1 | 15歳 | 0 | 19歳 | 3 | | |
| 14歳 | 28 | 14歳 | 2 | 14歳 | 0 | 16歳 | 1 | 20歳 | 1 | | |
| 15歳 | 31 | 15歳 | 16 | 15歳 | 1 | 17歳 | 0 | 21歳 | | | |
| 16歳 | 19 | 16歳 | 18 | 16歳 | 1 | 18歳 | 5 | 25歳 | 1 | | |
| 17歳 | 4 | 17歳 | 7 | 17歳 | 0 | 19歳 | 6 | | | | |
| 18歳 | 9 | 18歳 | 13 | 18歳 | 3 | 20歳 | 7 | | | | |
| | | 19歳 | 4 | 19歳 | 3 | 22歳 | 5 | | | | |
| | | 20歳 | 4 | 20歳 | 1 | 26歳 | 1 | | | | |
| | | 21歳 | 1 | 24歳 | 1 | | | | | | |
| | | 23歳 | 1 | | | | | | | | |

た。先述の結果から分るとおり、化粧開始時期の低年齢化は1990年代に入ってから加速し、さらに低年齢化しているとも言える。

アンケート調査に協力してくれた10歳代の彼女たちは化粧をするようになった背景を次のように述べていた。中学生時代の頃に眉を異常なまでに細くするのが流行し、中高校生時代は授業中に眉を抜くのが習慣化していたそうだ。どんどん抜き続ける眉は次第に細くなり、一時的に生えてこなくなった眉をどうすることもできず、睫毛に着眼しマスカラを始めたという。マスカラで固めてビューラーで上向きになる睫毛は目が大きく見えるため、プリクラなどで可愛く映るという理由からマスカラが定着し始めたそうだ。また、中学生や高校生で行う化粧とはマスカラとファンデーションを示しているという。ファンデーションを用いる理由は、赤い頬は子供のようだと恥ずかしさの対象となり、赤みを消す為にファンデーションを塗るようになったと言う。10歳代における化粧行為とはファンデーションとマスカラの使用開始を指していたのであった。

③化粧で気を使う顔の箇所について本調査では気になる部分を三箇所述べてもらった(表4)。いずれの年代も化粧をする際に気を配る顔の箇所として目元とファンデーションが上げられている。さらに目元の化粧については10歳代、20歳代では圧倒的にマスカラを重視する傾向が見られる。30歳代では目元に気を配る箇所として、アイライン、マスカラが上げられている。40歳代以上に至ってはアイシャドウに気を配る傾向が強そうだ。いずれの年代も目に気を配っている(表5)。「目は口ほどにもの言う」という通り、目は表情を伝わりやすい箇所であるため特に気を使う場所であるとも考えられる。また、マスカラで睫毛にマスカラを塗ることで睫毛の長さやボリュームが増し、アイシャドウで目の上に色を乗せることで、即座に目が大きくなったような印象に変わるからであろう。

顔の中ではもう一箇所、ファンデーションに気を使っている傾向が強いことがわかる。肌が顔の多くを占めているため気を使う個所であり、赤ら顔、ニキビの痕、シミ、毛穴などを隠すことでツルンとした、年齢不詳の肌を獲得できる手っ取り早い方法である。

次にファンデーションに使用している化粧品のブランドなどを追った。興味を引かれる結果として、10歳代20歳代は国内ブランドの化粧品であるコーセー、資生堂、花王を使用が多くみられる一方、百貨店に店舗を構える海外ブランド系の化粧品も一通りということである所持し、多種多様のブランドを使用している点である。しかし、30歳代以降になると、メナード、オッペンなど百貨店に店舗を持たない訪問販売系の化粧品の使用頻度が高いことがわかる。新興勢力として最近日本で発売され始めた海外ブランドの化粧品を使用は年齢を重ねる毎に購入頻度が少なくなり、同じ化粧品のブランドを使い続けていると推測できる。

次に、化粧に求めるイメージとして、次の言葉から選んでもらった(表6)。透明感、女らしさ、若々しさ、肌の滑らかさ、さっぱり感、みずみずしさ、しっとり感、うるおい感、りりしさ。その中で、10歳代、20歳代では“透明感”という言葉が最も多く、次に女らしさが多かった。しかし、30歳代になると若々しさを求めるようになり、ついで透明感を求めている。40、50歳代では、しっとり感を求め、ついで若々しさとなっている。

これらの結果から推測すると、10、20歳代の間は化粧で透明感のある肌を作りながら女らしさを求めているが、30歳代以降は、化粧で若く見えるように化粧に励むのである。いずれの年代も透明感を求めた化粧を望んでいる。透明感という言葉は、肌が化粧をしていないような透明な肌つまり自然な化粧という意味である。これまでの自然的な化粧法は、昭和初期には化粧をしても真っ白ではない化粧法を“自然美”と表現し、1980年代にも化粧をしても

表4 化粧で気を使う顔の箇所

| 10歳代 | | 20歳代 | | 30歳代 | | 40歳代 | | 50歳代 | | 60歳代 | |
|------------|-----|----------|----|----------|----|----------|----|----------|----|----------|---|
| 顔の箇所 | 数 | 顔の箇所 | 数 | 顔の箇所 | 数 | 顔の箇所 | 数 | 顔の箇所 | 数 | 顔の箇所 | 数 |
| 目元 | 102 | 目元 | 63 | 目元 | 11 | 目元 | 20 | 目元 | 10 | 目元 | 2 |
| ファンデーション | 83 | ファンデーション | 54 | ファンデーション | 10 | ファンデーション | 15 | ファンデーション | 6 | ファンデーション | 1 |
| 眉 | 79 | 眉 | 52 | 眉 | 11 | 眉 | 18 | 眉 | 10 | 眉 | 3 |
| 頬 | 21 | 頬 | 4 | 頬 | 1 | 頬 | 1 | 頬 | 1 | 頬 | 2 |
| 口 | 13 | 口 | 13 | 口 | 3 | 口 | 11 | 口 | 4 | 口 | 2 |
| 鼻 | 9 | 鼻 | 10 | 鼻 | 10 | 鼻 | 2 | 鼻 | 6 | 鼻 | 0 |
| 輪郭 | 2 | 輪郭 | 5 | 輪郭 | 2 | 輪郭 | 2 | 輪郭 | 0 | 輪郭 | 1 |
| 骨格 | 2 | 骨格 | 5 | 骨格 | 2 | 骨格 | 1 | 骨格 | 1 | 骨格 | 0 |
| その他(つけまつげ) | 1 | その他(にきび) | 1 | その他 | 0 | その他 | 0 | その他 | 0 | その他(皺) | 1 |

表5 目の周り特に気を配る化粧

| 10歳代 | | 20歳代 | | 30歳代 | | 40歳代 | | 50歳代 | | 60歳代 | |
|----------|----|----------|----|----------|---|----------|----|----------|---|----------|---|
| 目元の化粧 | 数 | 目元の化粧 | 数 | 目元の化粧 | 数 | 目元の化粧 | 数 | 目元の化粧 | 数 | 目元の化粧 | 数 |
| マスカラ | 70 | マスカラ | 47 | マスカラ | 5 | マスカラ | 5 | マスカラ | 3 | マスカラ | 1 |
| アイライン | 49 | アイライン | 30 | アイライン | 6 | アイライン | 5 | アイライン | 2 | アイライン | 1 |
| アイシャドウ | 28 | アイシャドウ | 23 | アイシャドウ | 4 | アイシャドウ | 13 | アイシャドウ | 6 | アイシャドウ | 1 |
| アイブロウ(眉) | 12 | アイブロウ(眉) | 8 | アイブロウ(眉) | 3 | アイブロウ(眉) | 1 | アイブロウ(眉) | 1 | アイブロウ(眉) | 0 |
| ハイライト | 8 | ハイライト | 4 | ハイライト | 1 | ハイライト | 4 | ハイライト | 2 | ハイライト | |
| その他(つけ睫) | 1 | その他(くま) | 1 | その他(つけ睫) | 0 | つけ睫 | 0 | つけ睫 | 0 | つけ睫 | |

化粧をしていないような化粧法を“ナチュラルメイク”と表現したものだった。現在もファンデーションは自然的な化粧法を好む傾向があり、これまでの言い方とは異なる“透明感”という言葉で表現し、誰もが求める共通したキーワードとして認識されている。

第3項：化粧ポーチが語る化粧観

本項では化粧ポーチの中に入っている化粧品の所持品調査を行った。聞き取り調査実施日は、平成15年1月13日20日。対象者：18歳、19歳の専門学校生15人に行った。

まず、毎日使用している化粧ポーチを取り出してもらい、その中に入っているもの全てを書き出してもらった(表7、図1・2)

まず、全員が持ち合わせていた化粧品は、マスカラであった。18歳19歳の彼女たちはマスカラが何よりも重要な化粧品であったのである。“パッチリとした目”にはマスカラを何度も塗り込むようだ。平均2本のマスカラを所持し、最も多くマスカラを所持していた人は6本だった。これら6本のマスカラは用途別に使用している。その用途とは、マスカラの下地、ボリュームを出すために塗るマスカラ、カールする為に塗るマスカラ、長く見せるために塗るマスカラそして下睫毛に塗るマスカラで、二度付け用のマスカラなどもある。カネボウでの意識調査においても、睫毛は「長くて上向き」がいいという報告がなされており、より具体的なイメージとしては“バービー人形”のようなパッチリとした目を理想としている^{xx)}。これらのマスカラブームによりファイバーウィッグと称されるマスカラが開発され、そのマスカラの塗布により、つけ睫毛をつけているような睫毛が得られるのである。これらの化粧の流行をイミュマーケティング部主査の西山泰乃は「今は目を自然な形で印象づけて、自分を主張したい」と分析している。目を印象付けるために雑誌では、目の周りに気を配る化粧法を“目力”と称して、目元を強調した化粧品が流行する中マスカラが最も重要な化粧品であったことは言うまでもない。

さらにマスカラとセットとして持ち合わせている化粧道具にビューラーと綿棒がある。

ビューラーはよりカールしたマスカラを獲得するために必要な道具として欠かせない。綿棒はマスカラを睫に塗る

際にマスカラが瞼に付いた時に拭き取るために使用する。綿棒に関する面白い発言の一つとして、マスカラはスパや入浴施設などに出かけた際の洗面台から拝借してくることが多いようだ。

顔の中で特に動きのある箇所として目と同様に口も忘れてはならない。しかし、口元に彼女たちはそれほど気を配っていない。口はほとんど化粧をせず薬用リップを塗るか、グロスで唇に塗れた感じを出す程度である。中にはアレルギー体質で口紅やグロスを塗布すると唇がただれてしまうこともあり、全く何もつけない人もいた。唇に何も塗らなくても気にならず、彼女達は口元の化粧をあまり重要視していない。

他に所持品率が高かった化粧品にパウダリーファンデーションがあった。化粧ポーチの中でのファンデーションは、日常生活の中で化粧が崩れて光り始めた鼻の頭の脂分を抑える程度に使用している。

先述のアンケート調査結果で、化粧に関する情報は百貨店、ドラッグストア、ソニープラザなどのファンシーショップ系を参考としていたが、さらに詳細を聞いてみた。

百貨店は海外ブランド(シャネル、ランコムなど)の化粧品購入であり、美容部員(ビューティーアドバイザー)の化粧法を模倣したり、メーカー所属のメークアップアーティストの来店の際に直接化粧をしてもらうことで“流行”の化粧法を習得するのだという。百貨店の化粧品コーナーは新商品の情報の入手場所でもあり、化粧法を伝授してもらう場所でもある。

これに比べてドラッグストアは資生堂、コーセーなどの国内ブランドの化粧品を購入場所である。言い方を換えると、国内ブランドの化粧品はドラッグストアで購入するものであり、同じ商品が百貨店に並んでいても購入しないようだ。ドラッグストアはあくまでも安価な商品を手入する場所なのだ。ドラッグストアにも美容部員は常駐しているが彼女たちに化粧法を学んだりすることは無い。あくまでも化粧品のより安い化粧品を求めていく場所にしか過ぎない。この際のドラッグストアはマツキヨ、ココミン、ダイコクなどの大手のディスカウント薬局を指し示しており、街の小さな薬局兼メーカーの代理店などを指し示しているのではない。

最近のドラッグストアは大規模店舗方の改正と薬の価格改定と安価な化粧品が購入できるという理由により、店舗数や売上なども好調に伸ばし2002年5月で全国に一万二千店となっている。ドラッグストアにおける化粧品

表6 化粧に求めるイメージ

| 10歳代 | | 20歳代 | | 30歳代 | | 40歳代 | | 50歳代 | |
|-------------|----|---------|----|--------|---|--------|----|--------|---|
| イメージ | 数 | イメージ | 数 | イメージ | 数 | イメージ | 数 | イメージ | 数 |
| 透明感 | 52 | 透明感 | 28 | 透明感 | 0 | 透明感 | 4 | 透明感 | 2 |
| 女らしさ | 25 | 女らしさ | 23 | 女らしさ | 4 | 女らしさ | 11 | 女らしさ | 5 |
| 若々しさ | 14 | 若々しさ | 16 | 若々しさ | 5 | 若々しさ | 7 | 若々しさ | 5 |
| 肌の滑らかさ | 12 | 肌の滑らかさ | 13 | 肌の滑らかさ | 0 | 肌の滑らかさ | 4 | 肌の滑らかさ | 1 |
| さっぱり感 | 8 | さっぱり感 | 7 | さっぱり感 | 1 | さっぱり感 | 1 | さっぱり感 | 0 |
| みずみずしさ | 7 | みずみずしさ | 4 | みずみずしさ | 2 | みずみずしさ | 5 | みずみずしさ | 0 |
| しっとり感 | 4 | しっとり感 | 3 | しっとり感 | 8 | しっとり感 | 8 | しっとり感 | 3 |
| うるおい感 | 4 | うるおい感 | 3 | うるおい感 | 1 | うるおい感 | 2 | うるおい感 | 1 |
| りりしさ | 4 | りりしさ | 2 | りりしさ | 0 | りりしさ | 0 | りりしさ | 0 |
| その他(かわいらしさ) | 1 | その他(清楚) | 1 | かわいらしさ | 0 | かわいらしさ | 0 | かわいらしさ | 0 |

表7 化粧ポーチに入っている化粧品を全て書き出した

| | Y | AR | H | SS | H | | | | |
|----------|----|----------|----|----------|----|----------|----|----------|----|
| アイライン | 2 | アイライン | 2 | アイライン | 3 | アイライン | 3 | | |
| マスカラ | 2 | マスカラ | 2 | マスカラ | 1 | マスカラ | 6 | マスカラ | 4 |
| 口紅 | 0 | 口紅 | 1 | 口紅 | 1 | 口紅 | 1 | 口紅 | 2 |
| グロス | 2 | グロス | 1 | グロス | 1 | グロス | 2 | グロス | 1 |
| アイシャドー | 0 | アイシャドー | 3 | アイシャドー | 1 | アイシャドー | 3 | アイシャドー | 1 |
| アイブロウ | 1 | アイブロウ | 1 | アイブロウ | 1 | アイブロウ | 2 | アイブロウ | 5 |
| ファンデーション | 1 | ファンデーション | 1 | ファンデーション | 2 | ファンデーション | 1 | ファンデーション | 0 |
| チーク | 1 | チーク | 3 | チーク | 1 | チーク | 1 | チーク | 0 |
| ハイライト | 0 | ハイライト | 1 | ハイライト | 0 | ハイライト | 0 | ハイライト | 0 |
| コンシーラー | 0 | コンシーラー | 1 | コンシーラー | 0 | コンシーラー | 0 | コンシーラー | 0 |
| 下地 | 0 |
| その他 | 0 | その他 | 0 | その他 | 0 | その他 | 2 | その他 | 0 |
| 化粧道具 | 1 | 化粧道具 | 7 | 化粧道具 | 4 | 化粧道具 | 4 | 化粧道具 | 0 |
| 計 | 10 | | 23 | | 13 | | 25 | | 16 |

| | S | A | MN | Y | MS | | | | |
|----------|---|----------|----|----------|----|----------|---|----------|---|
| アイライン | 3 | アイライン | 1 | アイライン | 0 | アイライン | 1 | アイライン | 1 |
| マスカラ | 5 | マスカラ | 3 | マスカラ | 1 | マスカラ | 1 | マスカラ | 1 |
| 口紅 | 1 | 口紅 | 1 | 口紅 | 1 | 口紅 | 1 | 口紅 | 1 |
| グロス | 0 | グロス | 1 | グロス | 1 | グロス | 4 | グロス | 0 |
| アイシャドー | 1 | アイシャドー | 3 | アイシャドー | 1 | アイシャドー | 3 | アイシャドー | 0 |
| アイブロウ | 1 | アイブロウ | 1 | アイブロウ | 2 | アイブロウ | 0 | アイブロウ | 0 |
| ファンデーション | 2 | ファンデーション | 2 | ファンデーション | 1 | ファンデーション | 1 | ファンデーション | 2 |
| チーク | 1 | チーク | 1 | チーク | 1 | チーク | 0 | チーク | 0 |
| ハイライト | 0 | ハイライト | 2 | ハイライト | 0 | ハイライト | 0 | ハイライト | 0 |
| コンシーラー | 0 | コンシーラー | 0 | コンシーラー | 0 | コンシーラー | 0 | コンシーラー | 0 |
| その他 | 3 | その他 | 0 | その他 | 2 | その他 | 3 | その他 | 3 |
| 化粧道具 | 2 | 化粧道具 | 5 | 化粧道具 | 5 | 化粧道具 | 1 | 化粧道具 | 2 |

| | T | OO | YM | TM | OK | | | | |
|----------|----|----------|----|----------|----|----------|----|----------|----|
| アイライン | 4 | アイライン | 2 | アイライン | 3 | アイライン | 2 | アイライン | 3 |
| マスカラ | 4 | マスカラ | 3 | マスカラ | 3 | マスカラ | 6 | マスカラ | 3 |
| 口紅 | 3 | 口紅 | 0 | 口紅 | 2 | 口紅 | 1 | 口紅 | 0 |
| グロス | 1 |
| アイシャドー | 7 | アイシャドー | 3 | アイシャドー | 0 | アイシャドー | 2 | アイシャドー | 3 |
| アイブロウ | 2 | アイブロウ | 2 | アイブロウ | 1 | アイブロウ | 2 | アイブロウ | 1 |
| ファンデーション | 2 | ファンデーション | 1 | ファンデーション | 1 | ファンデーション | 1 | ファンデーション | 2 |
| チーク | 1 | チーク | 1 | チーク | 0 | チーク | 1 | チーク | 1 |
| ハイライト | 1 | ハイライト | 0 | ハイライト | 0 | ハイライト | 0 | ハイライト | 0 |
| コンシーラー | 1 | コンシーラー | 1 | コンシーラー | 0 | コンシーラー | 0 | コンシーラー | 0 |
| 下地 | 0 | 下地 | 2 | 下地 | 1 | 下地 | 0 | 下地 | 0 |
| その他 | 1 | その他 | 3 | その他 | 0 | その他 | 1 | その他 | 1 |
| 化粧道具 | 1 | 化粧道具 | 4 | 化粧道具 | 3 | 化粧道具 | 5 | 化粧道具 | 1 |
| 計 | 28 | | 23 | | 15 | | 22 | | 16 |

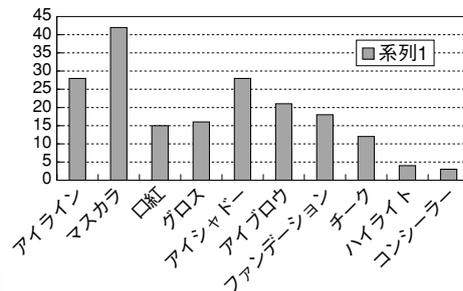


図1 化粧ポーチの中に入っている化粧品

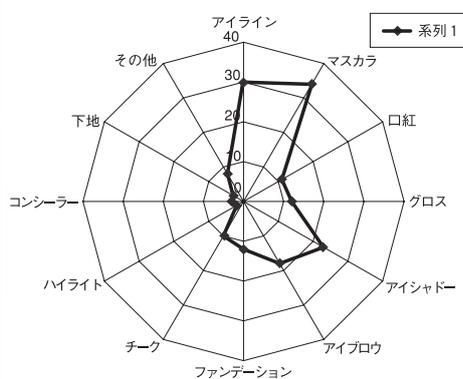


図2 化粧ポーチの中に入っている化粧品の頻度

の売上も全体の約23%を占めるようだ^{xxi)}。

そして、ソニープラザなどのファンシーショップは情報収集の場所として訪れ、気に入った商品があれば購入する程度である。チープコスメと称される安価な化粧品など掘り出し物を探すにはうってつけの場所なのである。

化粧品は多くの場所で売られ、多くの商品が陳列している。そんな多くの情報を耳にし、多くの商品も目にした「何を買おうか?」と迷ってしまう。そんな時、彼女たちは、欲しい化粧品について友人などに相談するという。そして、「友達の友達が良いいって言っていたよ」という発言によって商品の購入を決めるようだ。雑誌などで掲載されている美容ジャーナリストの発言よりも、見知らぬ「友達の友達」の存在が影響力は大きいようだ。「友達の友達」は誰を特定しているかは定かではないが、しかし見知らぬ第三者の存在が化粧品購入に第一歩を踏み出させるのである。

さいごに

本研究では、明治時代、大正時代、昭和時代そして平成時代までと大まかな流れであるが化粧史を追うことができた。ここで本研究を振り返りながらまとめていきたい。

明治以降の化粧にまつわる風俗は、これまでに日本古来

の風習を払拭するのに躍起となった時代でもあった。それは、明治元年（1868年）1月30日に朝廷・公卿にお園黒・点眉は古制に基づくものではないとして、必ずしも厳守しないように通告したことに近代的化粧の発端をみることが出来る。しかし、明治30年代頃に美容家が誕生し、欧米の美容法を日本の美容法に取り入れようとしたこれらの働きが日本における西洋化の流れをより強くうえつけたといえよう。新しい美容法は、婦人雑誌の美容関連記事などで掲載されたり、経営する学校や美容院などの美容事業が講習会等から発信されていた。大正時代中期から企業に所属した美容家が台頭し始め、企業は研究所を設立するなど化粧品を売るだけでなく美容の提唱にも乗り出したのであった。明治30年代以降美容家は常に存在し、新しい美容法を提唱し続けたのであった。つまり、これらの新しい美容法は常に美容家から発信されたのであった。

さらに、近代的化粧の根本にあり続けた思想があった。近代的化粧の思想の根底には、人体美の妨げとなるものを除去しようとする「整容医学」が昭和35年まで常に貫かれて続けた。医学や薬の知識等を化粧に生かそうとする思想は北原十三男が欧米を視察した頃に日本に持ち込まれたと考えられる。欧米の化粧法が日本に導入されたと同時に欧米での化粧に関する思想も導入されたのである。化

粧を科学的に捉えようとした点が近代的化粧の特徴でもある。近代的化粧は昭和30年代に制定された美容師法、理容師法、薬事法などで制度上終焉を迎えたが、美容家の遠藤波津子は現在4代目が襲名し、メイ牛山も存命である。美容術の祖芝山兼太郎の娘芝山みよかは現在日本エステティック協会会長を勤めるなど、西洋から取り入れられた近代的美容法は終焉を迎えるのではなく、美容家によって当時の技術は受け継がれているのである。

第三章では、化粧に関する情報源、使用している化粧品など化粧環境に関する調査を行った。今回の調査はアンケートを実施した年齢に偏りが見られるため、一般か出来ないが、現在の化粧に関する現状であることには変わり無いため、これらのデータを使用した。

まず、10歳代、20歳代では好みの雑誌などはあるがとにかく多種多様の雑誌を読み、多くの化粧品ブランドを使用していた。しかし、30歳代ごろから参考にする雑誌や購入する化粧品などが10代の女性たちと異なってきた。それは、化粧品の購入場所が店舗に向いて行く方法から販売員が自宅に商品を持ち込む形式へと移行しているということである。

また18、19歳の学生を対象に化粧ポーチの所持品検査を行い、化粧にまつわるインタビューをおこなった。彼女たちの化粧はとにかく睫毛を中心とした化粧を行っていた。使用する化粧品の購入場所などもメーカーや値段によって使い分け、用途に合わせた店の利用などが確認できた。そして、認識できない“第三者の声”によって購入を決定するなどという点に興味を引かれた。

彼女たちは化粧によって劇的に変身を遂げることを望んでいるのではなく、とにかく上に向いた、長くて、カールした睫毛の獲得を日々試みている。マスカラを塗布した睫毛に美しさが宿るのではなく、マスカラで固まった睫毛がかみで見ることが自己確認の一種の行為でもあるのだ。本研究の全体を通して今後の化粧文化研究には次のような問題が課題として考えられる。これまでの化粧文化論では、主に化粧の歴史が研究されてきたため、化粧の総論のような大枠で捉えることができたといえる。今後の課題としては、当時の雑誌の化粧関連記事を細かく読み解き、化粧の傾向を把握すると共に、化粧に含まれる行為の意味や行為の解釈など、化粧の担い手との関係に関する研究の必要性が要請されると思う。

謝 辞

研究を遂行する上で、「ケンショク 食の資料館」所蔵の大部にわたる「主婦之友」誌を使用させていただいた。資料を使用するにあたり、「ケンショク 食の資料館」の吉積さんに多大な便宜をはかっていただいた。また、アンケート調査に関しては、大阪ビジネスカレッジ専門学校ト

タルビューティーコースの生徒の皆さんにご協力いただいた。記して感謝の意を表したい。

- i) 日本風俗史学会編、平成6年、弘文堂
- ii) 1998年、ポプラ社
- iii) 高橋雅夫『化粧ものがたり』で「お園黒おばあさん訪問記」で昭和51年、秋田市在住の山崎スガさんを訪ね、鉄槳の習慣について取材を行っている。
- iv) 「風俗画報」とは、1889年の明治22年に創刊され1916年の大正5年まで27年間にわたって発行されていた日本初のグラフ雑誌である。出版総数は、全518冊にもおよび、内容は、江戸・明治・大正の世相風俗・歴史・文学・事物・地理・戦争・災害という全ての分野に及んでいる。
- v) 下川耿史、家庭総合研究会編『明治・大正家庭史年表1868→1925』2000年、河出書房
- vi) 芝山兼太郎『芝山美容術』1986年、女性モード社
- vii) そのアメリカ式美顔術の詳細が明治40年の「婦人世界」2号の付録「化粧かがみ」で紹介されている。アメリカ式の「美顔術」とは、洗顔だけではとれない顔のゴミを取り除くことを目的としている。アメリカでは「ハイジエコック・フェーシャル・カルチャー」と称する
- viii) 例えば、「婦人世界」の美容問答では「夏冬の別なく、手が荒れて指に割れめも生じ仕立物をするとき困る、よき方法なきや」という相談に対して、「カセイカリ5,0。グリセリン30,0。酒精40,0。水120,0。」を混ぜ合わせて薬つまり化粧水を作るように述べている。
- ix) マリールイズは、当時アメリカ式の美容が主流であった日本にフランス式の方法を伝えた人物の一人である。
- x) ハリー牛山は早川雪洲の付き人兼ボディガードをしていた際に、「ここで学んだメイクアップ技術と化粧品の知識を持ち帰って、日本で大成しなさい」と助言を受け、帰国後美容院及び美容学校を始めた
- xi) メイ牛山はアメリカでエディセンズやレオアメンドラなどの美容家にヘアスタイルやメイクの技術を学んで海外の新しい技術を日本に紹介した。
- xii) 読売新聞、大正9年10月22日
- xiii) 1940年、大地社
- xiv) ここで、化粧に対して“封印”という言葉を用いるのは、自らの意思で化粧をしないのではなく、命令として化粧を止めざる得ない業況であったため封印という言葉を用いている。
- xv) 平成5年には厚生省の免許へと変わっている
- xvi) 現在において人に化粧をする仕事（例えば、メイクアップアーティストなど）では、特に国家試験や免許は交付されていない

- xvii) 「朝日新聞」1967年9月15日
xviii) 米澤泉「教授される化粧」『日本顔学会誌』1巻2号にて、
米澤は化粧にも着こなしがあると指摘している。
xix) 「朝日新聞」1992年2月7日
xx) 「朝日新聞」2002年6月16日
xxi) 「朝日新聞」2002年5月5日

(参考文献)

- 1) 青木保ら編『近代日本文化論』岩波書店 1999年
- 2) 小山田兼・三本松清吉『科学的化粧法』東亜堂 1913年
- 3) 川村邦光『オトメの祈り』紀伊国屋書店 1993年
- 4) 川村邦光『オトメの身体』紀伊国屋書店 1994年
- 5) 北原十三男『実際美容術』婦女界社 1932年
- 6) 芝山兼太郎『芝山美容術』女性モード社 1986年
- 7) 下川耿史編『明治大正家庭史年表』、河出出版研究所、2000年
- 8) 新美容出版『全国著名美容家名鑑』新美容出版株式会社 1965年
- 9) 津田紀代ら編『モダン化粧史 粧いの80年史』ポーラ文化研究所 1986年
- 10) 早見君子・高橋源一郎『新化粧法・整容医学』文化生活研究会 1928年
- 11) 廣澤榮『黒髪と化粧の昭和史』1993年岩波書店
- 12) 前田愛『近代読者の成立』岩波書店 2001年
- 13) 三須豊『化粧美學』都新聞社 1925年
- 14) 村澤博人『顔の文化誌』東京書籍 1992年
- 15) 水谷八重子『舞台の合間に』演劇研究社 1933年

日本の化粧意識の近代化をめぐる比較史的考察——清潔習慣の展開をめぐる

奈良女子大学 生活環境学部

鈴木 則子

The aim of this paper is considering the relation of makeup and development of the concept of cleanliness in the late Edo period, and comparing it with European cosmetics consciousness.

In the Edo period, the textbook for girls used at the educational institutes encouraged washed the body, and keeping it clean, the textbook for boys does not contain such a statement. This is because cleanliness was deeply connected with one of the virtues of the woman "fuyo (婦容)".

The makeup document in the late Edo period "Miyako Fuzoku Kewai-den (都風俗化粧伝)" teaches the repairing method for aiming at the skin not to carry out oil or grease to keep clean, and white with powder, and the medicine for removing body odor, and the "Kinsei Fuzoku-shi (近世風俗志)" of the period points out current fashion of the hairstyle using only light makeup without perfumed hair oil. It was the beauty which will not be able to be realized without the thorough body management which pursues the beauty of the natural body. These new makeup customs pass to aesthetic senses, such as "ada (婀娜)" and "iki (意気)". Although the opportunity of light makeup of Edo has been conventionally explained in connection with customs control of Tempō reform, probably, the side of the thorough cleanliness accompanying it should also be indicated to be the spread of the bathing customs in the second half of Edo.

On the other hand, fashion of light makeup will be seen also in Europe after the 19th century. By having given encouragement medically, it is deeply concerned with the odorless body in which the bourgeoisie aim transparent body that neither closes pore with dirt nor with cosmetics. The leaders of Japanese clean culture and light makeup fashion were common people represented by prostitutes, and that was a remarkable difference between Japan and Europe.

1. 緒言

私はこれまでの研究で、江戸時代後期における庶民の化粧意識が、従来の嗜みとしての化粧の域を越えて、自分の身体をどれだけ価値あるものに演出するか、という積極的意識に変化することを明らかにしてきた¹⁾。その背景には社会全体が、身体は自分の努力次第でより価値のあるものへ変えられる、という近代的な身体観にからめ取られていくという変化があったことも指摘した。現在は江戸後期の化粧意識の変化を、欧米・韓国・中国の化粧意識との比較の中で考察することによって、化粧意識の近代化の日本の特徴を明らかにすることをめざしている。

この研究助成報告においては、日本社会における「清潔」概念の展開に焦点をあて、それが美容意識にどのような影響を与えたのか、またヨーロッパの「清潔」と「化粧」の関係の仕方との比較を行う²⁾。

2. 身体をめぐる女子教育

江戸時代、体を洗って清潔にすることを、より直接的に説くのは、庶民の女子教育の場で使われた女訓書である。ま

ず江戸時代の和製の女訓書のさきがけであり、後の女訓書に多大な影響を与えた、貝原益軒著『女子を教ゆる法』(1710年)³⁾を見てみよう。本書は女性が努力すべき四つの徳目のひとつに、「婦容」をあげる。「婦容とはかたちをよきをいう。あながちに飾りを専らにせざれども、女は容なよやかにて、雄々しからず。装いのあではか(上品)に、身持ちきれいにいさぎよく、衣服もあかつきけがれなき」をよしとしている。美しくあることは女性のつとめであり、美しさには「身持ち」、すなわち身体を「きれい」に「いさぎよく(潔く)」することも含まれた。

『女大学宝箱』(1936年)⁴⁾は、『女子を教ゆる法』の基本的教育方針を継承しながら、様々な実用知識も網羅した大部の女訓書である。その後の女訓書は、本書の内容の一部分を展開して一書を成す形を取ることが多い。本書は装いについて、華美な衣装を禁ずるとともに、「身と衣服との穢れずして潔げなるはよし」と述べる。身体に付着する垢も、衣服に移った垢も、汚らわしく、その人自身を醜悪にするものとみなされた。

だが、ひとつ考えねばならないのは、体を清潔に保つことを勧める言説が、女訓書に限定されていて、男子の用いる寺子屋用教科書には、殆ど登場しないという点である。清潔は、とりわけ女子に厳しく強要される徳目だったらしい。江戸の銭湯における糠袋の使用率が、男性よりも圧倒的に女性の方が高いことも、その反映だろう⁵⁾。

「銭湯へ行かぬで下女は毒づかれ」⁶⁾という川柳がある。下女のような下層の女性であっても、湯で垢を落とすことは不可欠の社会常識であって、他者から非難されるものだ



Modernization of the makeup consciousness of Japan — Deployment of a clean custom.

Noriko Suzuki

Nara Women's University

った。だがここで非難されるのが、下男ではなく下女であることに、注意しなければならない。なぜ女子は、男子よりも清潔を心がけねばならなかったのだろうか。それは身ぎれいにすることが、「婦容」という容姿に関する女性独自の徳目に含まれることと関係している。

3. 美しく臭わない身体

女性の美しさと身体を洗うこととは、どのように関連づけられていたのか。この問題を考えるために、美容関係の史料をひもといてみよう。江戸時代、化粧法に関連する記事を比較的詳しく載せた女性向けの本は、10種類ほど確認されている⁷⁾。中でも『都風俗化粧伝』⁸⁾は、その量と詳しさを群を抜く。本書は1813年に出版されて以来、1922年に至るまで、幾度となく版を重ねた、化粧本のベストセラーだった。

その出版年が示すように、ここに説かれる化粧法等は、江戸後期の流行と嗜好を示すものである。出版されたのは京都で、著者も京都の公家という形を取る。これは京都が江戸時代中後期以降、経済の中心から退いた後も、実態はともかく、形の上では一貫して文化、とりわけファッションの中心地であり続けたことを示している。京・大坂を示す「上方風」という言葉は、ある種の憧憬を持って江戸の女たちの心を捉え続けたのである。

さて、本書はその冒頭で「みがきよそおわざればひかりなし」と断言する。女子の容貌の美しさは、玉と同じで磨くか否かにかかっており、どのような醜女でも磨けば美しくなることができるという。そして以下、具体的に肌の手入れ法、化粧、着物、髪の手入れ、髪型などについて詳しく説明している。本書から、当時どのような女性が美しいとみなされたのか、また女性がどのような美を求めて努力をしていたのかを抽出してみよう。

本書のかなりの部分を占める記述は、肌を美しくする、もしくは美しく見せる方法である。特に白くて、かつ油が浮いていない肌が理想とされた。本書の記述は、読者が毎朝糠を用いて湯で洗顔していることを前提にしているが、その糠に種々の漢方薬などを混ぜて洗うよう勧める。しかも、それは単に顔面に限定されない。白い肌は全身に及ぶことが求められ、行水や銭湯での入浴の際には、こういったものを全身にすり込むよう指示される。そして曰く、「或る人の処女、生まれつき色黒きを嘆き、或る家に秘め置きたるこの法をつたえ用いしかば、忽ち色を白くして、双なき美人となりたる奇法也」。肌は努力次第で白くなり、白い肌は美女の誉れを保証した。

髪の新しさも、洗う頻度にかかっている。「髪を洗うことは、髪をつやを出だし、髪脂（あか）ねばりを去らんがためなれば、たびたび洗うてよし。夏の日には汗と油の腐りたるにて、はなはだあしき臭いすれば、嗜みて、ことに

たびたび洗い、悪しき臭いを去るべきことなり」とある。艶やかでべとつかず、汗くささのない髪がめざされた。

それ以外の全身のみだしなみとて、おろそかにはできない。「女の身の嗜みのよしあしにて、その人の意気よく見ゆるものなれば、心を用い、身だしなみを専一とすべし。身だしなみのあしきは、大いにけおとされて、あなどられ、笑わるるもの」だからである。具体的には、爪垢・耳垢を除き、鼻毛、耳の毛といったむだ毛を処理し、口の中の清潔のために毎朝歯ブラシで歯垢を取り、舌槽を除いた。口臭、体の汗の臭い、髪臭いも常に注意することが求められた。身体から汗が出るのを止めるためには、薬草を煎じて飲んだり、米の粉を全身にはたく。口臭をおさえるのには、薬草を粉にして食後に飲んだ。腋臭は、薬草を脇の下に塗る。清潔のための身体管理は、単に肌の表面上だけではなく、体臭の管理にまで及び、入浴だけではことたりなくなっていた。

清潔で臭わない身体を実現するための熱意は、式亭三馬著『浮世風呂』⁹⁾に登場する人々の、念入りな入浴風景と重なってくる。糠や洗い粉で身体を洗うだけでは飽きたらず、舌を洗ったり、さらには「腋臭ぶんぶん」(『浮世風呂』)とそしられぬために、身体から発散されるあらゆる臭いを排除しようとした。

ことさらに女性に要求された、身体を磨くという徳目、これを実践する、いかにも受け身に見える女性たち。しかしながら彼女たちは、その磨き抜いた身体にふさわしい、新しいファッションの流れを作り上げた。

4. 薄化粧の流行

『近世風俗志』¹⁰⁾は、江戸時代後期の江戸・上方それぞれの化粧風俗について、詳しく紹介している。1809年生まれたの著者・喜田川守貞は、「美人」とは時代によって変化するものであると断った上で、「今世絶世の美貌」の絵を載せている。この図に添えられた、「江戸洗ひ髪兵庫結び」という髪型の名前に注目したい。まず「江戸」という言葉から、彼女の美しさが上方ではなく、江戸のものであったことがわかる。また「洗い髪」が意味するのは濡れた髪ではなく、洗髪後、鬢付け油で固めたり、香油を振りかける前の状態をいう。本来は、洗髪後にきちんと髪を結うまでの、一時的な髪型に過ぎなかったのが、ひとつのヘアスタイルとして流行していったのである。守貞によれば、当時こういった風貌の女性を、「婀娜（あだ）な女」、「意気なあねさん」といった。しかも、この女性の年齢を守貞は、当時花盛りの年齢とみなされた二八(16才)の娘ではなく、二十歳過ぎの「中年増」、つまり成熟した女性に設定している。江戸時代後期の江戸に出現したこの新しい美意識、「婀娜」・「意気」とは、どのようなものだったのだろうか。

『浮世風呂』の描写する、入浴中の二人の下女の会話は、

「婀娜」という江戸の美意識をよく示す。「なぜあんなに上方風を嬉しがらうか、気がしれねへよ。」「さうさ。あのまあ、化粧の仕様を御らんか。目のふちへ紅を付け置いて、その上へ白粉をするから、目のふちが薄くなって、少しほろ酔いという顔色に見えるが、否なことたねへ。」「そしておめへ、そればかりぢやねへはな。顔の白粉と生際の白粉とは、別々にあっての、眉掃きも三本入るとさ。」「をや大騒らしい。私らは眉掃きさへ遣ねへものをや。」「それだからあのぞまをお見。本面屋ともいひさうに、顔がてらてらして誠に本塗りだはな。あんまりべたべた化粧したのも、助兵衛らしくしつつこくて見つともないよ。諸事婀娜とかいって薄化粧がさっぱりしていいはな。」

町で見かける上方風の化粧の女に対する、同性としての辛辣な批判であり、手間暇かけた厚化粧を「助兵衛」と受け取る感性は、男への露骨な媚びをいさぎよしとしない姿勢のあらわれである。

自然な髪、薄化粧を尊ぶ「婀娜」・「意気」の美意識は、当時の女性の化粧や髪型の流行を、大きく変えていった。江戸時代後期、化粧の流行は江戸を中心に、明らかに薄化粧の時代へと移っている。『近世風俗志』は、「今世江戸の粧ひ、平日は素顔多し。式日及他行にも淡粧多く、口紅も桃花色にす。」というような、薄化粧の流れを記す。

その動きの背景は従来、天保改革の贅沢の禁止のためと説明され、上方に比して江戸のほうが薄化粧になるのも、将軍のお膝元のほうが取り締まりが厳しかったからだとされてきた¹¹⁾。しかしながら江戸と上方と比較したとき、両者の差異は、単に化粧の濃さの問題にとどまらない。

たとえば洗髪頻度がまったくちがう。19世紀前半、江戸の女性は毎月一二回髪を洗い、特に夏期は頻繁に洗う。しかも「匂油」や髪に香を焚きしめることもしなくなっていった。ところが上方の女性は減多に髪を洗わず、櫛で垢を梳いて「匂油」で臭気を防いだ。銭湯の数が、江戸と上方では圧倒的に江戸のほうが多いことも、入浴習慣の普及度、すなわち身体を洗って磨き上げる習慣の差を物語る¹²⁾。江戸の女性の、香りも含めて薄化粧をよしとする感性は、単に儉約の結果というよりも、身体を磨くことの延長線上にあるのであって、天保改革という政治的契機によってのみ説明しきれものではない。

山東京伝『賢愚湊銭湯新話』(1802年)¹³⁾は、「そもそも湯上がりの時美しき女はまことの美人なり。はたけ・そばかす・いぼ・ほくろ・頬の赤きも□あ□たも、紅白粉でくろめれば、相応に見ゆるものなり。」と、湯上がりの美女の磨き上げた肌を賛美し、紅白粉でとりつくろった美に対して否定的である。

湯上がりの肌や髪 of 自然な美しさ（実はそれが女性たちの涙ぐましい努力の結果であったとしても）への賛美は、それまでの人形のような白塗りの化粧や、油で固めた人工

的な髪 of 美意識の否定の上に成り立つものである。

このような美意識の変化の中で、理想とされる肌の質感も変わる。17世紀に流行した「花之露」という化粧品は、顔につやを出す油だった。だが19世紀の女性の肌に塗られたのは、顔の脂浮き、てかりをおさえるための、「江戸の水」に代表される、さっぱりとした化粧水である。しかも普通の女性はこれさえあまり用いず、古風を守る御殿女中が愛用した¹⁴⁾。

首筋、襟足の美の表現のしかたにも、変化が見られる。江戸時代、島田髻の普及と人工的な髪 of 張りによって、バランスの都合上後ろのたぼが小さくなり、襟足が強調されると、襟足にも白粉を塗ることが普及した¹⁵⁾。額、襟足や首筋は、顔よりも一段濃く白粉を塗るのが普通だった。しかし守貞は云う。「近年は頸額とも白粉と肌と際立ず、幽に塗る者もあり。娼妓は幽にする者多きか。然ども坊間には、きつときはたてたと際立ずかすかに粧たると半々なるべし。十女に四人素顔、三人は幽粧、三人は際立てぬる。御殿女中は此形にて際立て粧ふ者多し」。襟足の化粧は十人中四人はしておらず、三人は薄く塗るに留めている。いまだに襟足を真っ白にしているのは、ここでもやはり流行と無縁の御殿女中だけだった。

香りに対する感覚の変化も見逃せない。先に触れた髪だけではなく、衣服に香りをつけることも、江戸ではされなくなる。かつて高価な伽羅を頂点とする濃厚な香りは、非日常の世界への誘いであり、遊女たちの美しさを一層引き立て、舞台装置としての機能を果たした。それは江戸初期の浮世草子における美女の類型的描写に、彼女たちの放つ伽羅の香りが切り離せなかったことから明らかである¹⁶⁾。しかし入浴によってあらゆる体臭を排除してきた清潔志向は、人為的で濃厚な香りをも拒否していく。露骨にあざとい香りは、「粧」の対極たる「野暮」に通じていった。

5. 「いき」の美意識

ここで想起すべきは、「婀娜」や「意気」といった文化・文政期の美意識を論じた九鬼周造の名著『「いき」の構造』¹⁷⁾である。九鬼は「いき」を以下のように説明する。「いき」の内包的構造は、異性にたいする「媚態」、「意気地」、「諦め」の三者に求められる。「意気地」とは、媚態を持ちつつ、なお異性に対して一種の反抗を示す強みを持った意識である。「諦め」は、執着を離脱した無関心であり、これを獲得するには数多の恋を経る必要がある。従って若い女よりも、年増女に「いき」を見出すことが多い。最終的に九鬼は、「いき」を「垢抜して（諦）、張のある（意気地）、色っぽさ（媚態）」と定義する。

そして「いき」の「身体的発表」として、言葉遣い、身振り、体型、表情、装いなどをあげる。このうち、本論考と関係の深い、装いについて紹介しよう。

「いき」な姿としては湯上がり姿もある。裸体を回想として近世の過去に持ち、あっさりした浴衣を無造作に着ているところに、媚態とその形相因とが表現を完うしている。「いつも立寄る湯帰りの、姿も粋な」とは『春色辰巳園』の米八だけに限ったことではない。「垢抜」した湯上がり姿は浮世絵にも多い画面である。

上記の九鬼の指摘は、九鬼の意図するところではないにしても、「いき」と身体を洗うこととの関係性を浮かび上がらせている。「いき」に必要な、「あっさり」と「無造作」であること、「垢抜」けることは、銭湯で身体を洗うという行為を媒介に可能となる。

続けて九鬼は「薄化粧」、油を用いない「水髪」や略式の髪型、首筋を強調する抜き衣紋、ふくらはぎをかいま見せる左袂、冬でも足袋をはかずに素足で通すことなどについて言及する。いずれも日常的な肌の手入れを前提とする美である。守貞のいう「婀娜」・「意気」といった美意識が、上方ではなく江戸の地で花開いたのは、背景に入浴による身だしなみを、より強く求めた江戸文化がある。

入浴によって清潔な身体を保つことは、女訓書によって特に女子に対して徹底された徳目だった。しかしながら、それによって自己の身体と向き合い、磨き抜いた身体でもって女性たちが表現したのは、男に媚びない意志ある美しさ、豊富な人生経験を感じさせる美という、本来の封建的価値観から逸脱した女性美だった。そしてまた、こういった美しさを『浮世風呂』に登場する下女のような、当時広範に存在した、都会に働く女性たちが身近に感じている点に、彼女たちが身体表面だけでなく、内面的にも変化を遂げつつあったことを見て取ることができるだろう。

6. ヨーロッパの清潔と化粧

さて、このように清潔感の展開は化粧のあり方も深く関わっているのだが、それについて論じた先行研究を、中国・韓国で探すのは難しい。たとえば韓国の化粧史は、韓国文化が歴史的に白い肌を重視してきたことを指摘する。だがその背景は、韓国を含むシャーマニズム文化圏が白い皮膚を尊敬する傾向をもつことや、美しい肉体に美しい精神が宿るという「霊肉一致思想」に求められるにすぎない。

これに対してヨーロッパの社会史研究は、アラン・コルバン『においの歴史』¹⁹⁾ や、ジョルジュ・ヴィガレロ『清潔になる「私」—身体管理の文化誌—』²⁰⁾、ジュリア・クセルゴン『自由・平等・清潔』²¹⁾ のような、清潔・衛生といった感覚の展開が、社会の近代化の中で果たした役割を、化粧をはじめとする身体作法の側面から論じている。これらの研究は、ヨーロッパでは19世紀以降、体を洗うことをはじめとする清潔の習慣が、身体衛生の普及を一つの背景に、ブルジョアジーを中心に広がっていく様を明ら

かにしている。垢や化粧品で毛穴を塞がないことが医学的に奨励され、透き通った無臭の体を志向するブルジョアと、不潔な大衆との社会的差異は際だっていく。このような状況は、同時期の日本の清潔文化が医学のあり方とは無関係に、「粋」の美意識として遊郭を中心とする庶民文化の中で花開いたことと、大きな隔たりがある。

またヨーロッパでは近代衛生学が、入浴を中心とする衛生習慣の普及のために、健康的な美しさを人々に宣伝した結果、薄化粧が流行した。それは、若さの美や肉体美の賞賛へと結びつく。これに対し、日本の「いき」の美意識は、健康そのものとは全く無縁であり、むしろ精神的洗練を高く評価する点で、非常に対照的である。

明治維新を迎えて、日本は西洋の身体観・美意識・清潔観・衛生思想の攻勢を受けることになる。そのことによって、日本の化粧意識がどのように変化するかを検討することを、今後の研究課題としてあげておく。

- 1) 「鏡中美女—— 従江戸時代的化粧書看美容意識の変遷」『新史学』第11巻第2期、2000年6月。
- 2) 江戸時代の清潔観と入浴の普及の関係については、拙稿「江戸の銭湯に見る養生と清潔」(吉田忠他編『東と西の医療文化』思文閣出版、2001年所収)参照。
- 3) 石川松太郎編『女大学集』、東洋文庫302、平凡社。
- 4) 前掲『女大学集』所収。
- 5) 室松岩雄編『類従近世風俗志』下巻、名著刊行会。
- 6) 安永4(1775)年版『川柳評万句合勝句刷』収録。
- 7) 江戸時代初期のものでは『女鏡秘伝書』(1650年)がある。この他著名なものとしては『女重宝記』(1692年)、『当世化粧容顔美艶考』(1819年)など。
- 8) 佐山半七丸著・速水春暁画図。東洋文庫414。
- 9) 『新古典文学大系』86、岩波書店。
- 10) 前掲『近世風俗志』。
- 11) この説は1908年の前掲『近世風俗志』に書かれ、以後日本の化粧史は、江戸時代の化粧を論ずるときに、本書のこの記述をよく引用するが、その真偽は検討されたことがない。
- 12) 前掲『近世風俗志』。
- 13) 京都大学頤原文庫蔵本。
- 14) 前掲『近世風俗志』。
- 15) ポーラ文化研究初編『日本の化粧』、ポーラ文化研究所、1989年。
- 16) 佐伯順子『遊女の文化史』、中公新書853、1987年。
- 17) 初版は1930年刊(岩波書店)。本稿では岩波文庫版(1979年)を参照した。
- 18) 全完吉「韓国の化粧文化史」『化粧文化』36号、1997年5月、ポーラ文化研究所。
- 19) 山田登世子・鹿島茂訳、藤原書店、1990年。
- 20) 見市雅俊監訳、同文館、1994年。
- 21) 河出書房新社、1992年。

痴呆高齢者の表情分析と主観的 Quality of Life の評価手法に関する研究

三重県立看護大学*、びわこ成蹊スポーツ大学**、遠江病院***

鈴木 みずえ*、金森 雅夫**、大城 一***

This study clarified a relationship between Japanese version Dementia Quality of Life Instrument (DQoL) and facial expression analysis using Philadelphia Affect Rating Scale (PARS). There was significant positive correlation between anxiety/fear (PARS) and negative feelings (DQoL), depression (PARS) and sense of aesthetic (DQoL). Interest (PARS) and sense of aesthetic (DQoL) showed a significant negative correlation. It was suggested that DQOL was related to PARS, moreover, DQOL was able to evaluate the QOL in elderly patients with dementia.

1. 緒言

Quality of Life は、生命の質あるいは生活の質などとして訳されるが、医療においては患者個人の主観的満足感あるいは幸福度と考えられている。痴呆性高齢者に関しては、記名力および認知機能の障害が中核をなす疾患であることから、本人による QOL 評価は不可能とされてきた¹⁾。しかし、従来の観察による QOL 評価が果たして適切であるかは、十分明らかではない。痴呆高齢者の QOL は、痴呆の進行、自立度によっては損なわれる部分もあるが、QOL を保つことも可能であり、本人のおかれた環境および家族などの周囲の人々との相互関係の結果として表情、行動を中心として評価されてきた²⁾。著者らは痴呆性高齢者の QOL 評価³⁾として表情分析について取り組み表情分析に関する先行研究を 1 対 1 の構造面接法であるコミュニケーション行動による表情評価^{4) 5)}を行った。しかしながらこの面接手法は、言語的コミュニケーションを理解できない痴呆性高齢者には不安や心理的負担を生じさせ日常と比べて笑顔の表出が少ない対象者も認められた。これらの結果から施設およびデイケア、デイサービスの通所サービスの痴呆性高齢者のケア評価として日常生活における笑顔などを簡便に評価する表情分析評価法が必要である。

痴呆性高齢者の QOL 評価については、中程度の痴呆であれば主観による評価も可能であることが、近年、米国でも報告されている。痴呆性老人は他者とのコミュニケーションに対して積極的に関わろうとする動機が低くなり、認知機能の更なる低下を引き起こす。我々はデイケアにおいて心理社会的療法の一つである動物介在療法を行い、痴呆性高齢者の表情が豊かになり、精神的にも安定し、介

護負担が減少していることを報告した⁴⁾。痴呆性高齢者にとっての表情の活性化は、精神的安定および社会生活の適応を促し、問題行動の減少に繋がることが考えられる。Lawton⁶⁾はアルツハイマー患者の情動評価として表情分析に関する研究を行っており、評価基準が明らかであり、訓練された看護師、介護福祉士であれば使用可能であることから本研究にて用いた。痴呆性高齢者の主観的 QOL 指標については、1999 年に Brod⁷⁾が質的研究手法を踏まえ定量化に関する研究を行った。本研究では、著者らのこれまでの研究を踏まえ、痴呆高齢者の表情分析と主観的な QOL の評価手法を組み合わせることで痴呆性老人の表情の活性化が QOL の維持につながることを明らかにしたい。本研究では、日本語版 Dementia Quality of Life Instrument (DQoL) を用いて、わが国の痴呆高齢者の主観的 QOL の測定を行い、主観的 QOL 評価と Laton の表情分析評価である Philadelphia Geriatric Center Affect Rating Scale (フィラデルフィア老年医学センター情動スケール) との関係を明らかにすることが目的である。

2. 実験

2.1 痴呆性高齢者の表情分析

表情分析研究の第 1 人者である Ekman⁸⁾は、幸福、悲しみ、怒り、嫌悪、驚き、恐れ の 6 種であると考え、感情を表す表情の特徴が、世界の文化を超えて共通していると報告している。Lawton らは Ekman の研究にもとづき生活の中で Philadelphia Geriatric Center Affect Rating Scale (Affect Rating Scale : ARS) を開発した⁶⁾(表 1)。訓練された看護助手によって行われ、尺度としての妥当性が示されている。わが国での高齢者の表情分析については、増谷らが高齢者の表情の他者からの認知を研究し、喜びと驚きによく表出され、怒り、恐れ、軽蔑、嫌悪などにおいて個人差が著名であることを報告している。

表情の中で最も QOL を表現しているのは笑顔である。笑顔は、単に自己の情動を表現するだけでなく、笑うことで他者との快の感情を他者に伝達して社会的関係を深める作用もある。軽度の痴呆性高齢者であれば自発的な



Evaluation Technique of Facial Expression Analysis in Elderly Patients with Dementia and Subjective Quality of Life

Mizue Suzuki¹⁾, Masao Kanamori²⁾, Hajime Ooshiro³⁾ *

Mie Prefectural College of Nursing¹⁾, Biwako Seikei Sport College²⁾, Totomi hospital³⁾

表1 Philadelphia Geriatric Center Affect Rating
Lanton MP, observed Affect and Quality of Life in dementia, Scale Assessing
Quality of Life
Alzheimer's Disease, 95-110, Springer Publishing Company, 2000

| | |
|--|---|
| <p>楽しみ (pleasure) ほほ笑む、笑う、なでる、親しみのある様子で触れる、うなづく、歌う、腕を開いた身振り、手や腕を伸ばす</p> |  |
| <p>怒り (anger) 歯を食いしばる、しかめっ面、叫ぶ、悪態をつく、しかる、押しのける、こぶしを振る口をとがらせる、眼を細める、眉をひそめるなどの怒りを示す身振り</p> |  |
| <p>不安・恐れ (anxiety/fear) 額にしわを寄せる、落ち着きなくそわそわする、同じ動作を繰り返す、恐れやイライラした表情、ため息、他から孤立している、震え、緊張した表情、頻回に呼ぶ、手を握りしめる、足を揺する</p> |  |
| <p>抑うつ・悲哀 (depression/sadness) 声をあげて泣く、涙を流す、嘆く、うなだれる、無表情、眼を拭く</p> |  |
| <p>関心 (interest) 眼で物を追う、人や物をじっと見たり、追う、表情や動作、言葉での反応がある、アイコンタクトがある、音楽に身体の動きや言葉での反応がある、人や物に対して身体を向けたり 動かす</p> |  |
| <p>満足 (contentment) くつろいだ姿勢で座ったり、横になっている、緊張のない表情、動作が穏やか 訳:本間昭、痴呆性高齢者のQOL精神科の観点から、11(5)、483-488,2000</p> |  |

笑顔がみられるが、重度の痴呆性高齢者の笑顔は受身であり、相手から話し掛けられた際に微笑む。また、矢富らは痴呆性老人の笑いの表出について研究しており、認知機能の低下に伴い情動的笑い、内発的社会的笑いの低下を報告している⁹⁾。痴呆高齢者の取り繕う行動や不安行動は、コミュニケーションの失敗とそれに伴う他者の評価を意識した行動と言われている。痴呆性高齢者の笑顔の表出は、介護者との意識の共有化だけではなく、介護負担の緩和作用にもなりうると思われる。Affect Rating Scale は、楽しみ (Pleasure)、怒り (Anger)、不安・恐れ (Anxiety/Fear)、抑うつ・悲哀 (Depression/Sadness)、関心 (Interest)、満足 (Contentment) の6つの感情を表情から分析する。

2.2 痴呆性高齢者の QOL の概念化

生活の質は、近年において医療の目的として挙げられた比較的新しい概念であり、医療評価として患者側からの評価することの重要性が認識されるようになった。QOL は人間の身体・心理・社会経済的な各領域を含む包括的な概念であり、1980年代に実証研究が行われ、保健・医療領域においては健康関連 QOL に限定して報告されている。痴呆性老人の QOL については、近年、抗痴呆薬開発にあたり、その有効性を評価するための評価手法としても開発された。(1) 行動能力 (Behavioral competence)、(2) 外的環境の質 (External environment quality)、(3) 心理的 Well-being、(4) 知覚された生活の質 (Perceived quality of life) の4領域にまとめている。痴呆は記名力、認知機能低下が中核となる疾患であり、心理的 well-being、知覚された生活の質の測定が、痴呆性高齢者の場合には最も大きな課題となるため従来は本人が QOL について表現できないとされてき

た。しかし、新しい痴呆高齢者の評価手法として本人に直接インタビューする試みも増えてきている。著者らは、早期痴呆患者に対する病気の受容に関する研究を行い、早期患者の場合には、病気の受容が痴呆症状の軽減ないし進行に影響を及ぼしていることを報告した。図1に示したように表情の絵を用いて、重度痴呆患者に対する情動を測定する Dementia Mood PictureTest (痴呆情緒を測定するための検査)¹⁰⁾を用いた報告などの報告もみられる。しかし、重度痴呆性患者の場合には言語的なコミュニケーションが困難な場合が多く、主観的判断は非常に困難な点が多い。米国の Goldmad 老化研究所の Dr. Brod は中程度の痴呆の高齢者を対象に主観的な QOL を測定する 29 項目からなる

Dementia Quality of Life Instrument (DQOL)⁶⁾を開発した。従来の観察者による QOL 評価尺度は、認知機能、身体機能、ADL、行動範囲、レクリエーション活動、社会的交流、対話能力である。痴呆性高齢者の主観的 QOL は表2に示したが、(1) 自己尊重、(2) 肯定的感情、(3) 否定的感情、(4) 所属感、(5) 審美的感覚の5つの下位尺度に分かれている。本研究では Dr. Brod から DQOL 翻訳の作成の許可を受けており、日本語版を開発し、その信頼性、妥当性についても検証し、痴呆性高齢者の心理社会療法およびケア評価に有効に活用可能なものとした。本尺度は、介護保険制度にお

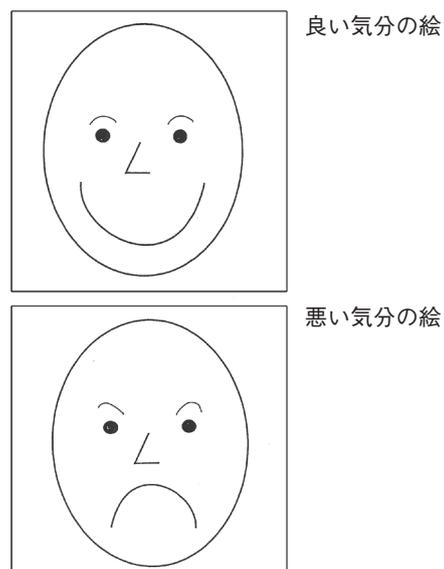


図1 Dementia Mood Picture Test
Tappen RM, Barry CB, Assessment of affect in advanced Alzheimer's disease : the dementia mood picture test, Journal of Gerontological Nursing, 21(3), 44-46, 1995

表2 痴呆性高齢者の QOL 測定尺度の5つの領域

- ・自己尊重：自分の考え、感情（自信、自分に対する満足感、自己決定の頻度）
- ・肯定的感情（ユーモア）：幸福、楽しみ、満足、希望を感じたり、笑ったり、冗談を言ったりする頻度
- ・否定的感情：恐怖、孤独、失望、悲しいなどと感じる頻度
- ・所属感：人の役に立ったり、人から愛されているなどと感じる頻度
- ・審美的感覚：音楽、自然の音を聞いたりする、動物、鳥、空などを見るにより美しさを認識したり、意識する感覚

ける課題である高齢者の自己決定の尊重、残存能力の活用といった側面から痴呆性高齢者の新しい主観的 QOL を明らかにすることは、ノーマライゼーションの理念からも痴呆性高齢者の保護といった側面からも、超高齢社会に向かうわが国において、今後、重要な課題である。

2.3 研究方法

平成 14 年 10 月から平成 14 年 1 月 31 日までにデイケアおよびデイサービスにおいて痴呆症と診断された在宅高齢者のうち、調査の参加の承諾の得られた 56 名に対して面接調査を実施した。DQOL 日本語版の翻訳に関しては、翻訳許可を受けて看護研究者、老年精神医学専門医、臨床心理学研究者、バイリンガルなどにて検討した。質問項目はわが国の痴呆性高齢者に理解しやすい言葉を用い、概念枠組みに適した内容を基本とした。10 名の痴呆性高齢者にプレテスト実施した。回答が得にくい項目を検討後、バックトランスレーションとして、別のバイリンガル 1 名に日本語から英語に翻訳後、DQoL 開発者の Brod 博士に最終確認を依頼し、修正項目をさらに検討し、最終の日本語版 DQoL を作成した。認知機能検査である Mini-Mental State (MMSE)¹¹⁾、行動評価尺度である N-ADL (N 式老年者用日常生活動作能力評価尺度)¹²⁾ を実施した。日本語版 DQOL は自己尊重、肯定的感情 (ユーモア)、否定的感情、所属感、審美的感覚の 5 つの領域からなる 29 項目に対して視覚スケールを用いて回答してもらった。DQoL の質問の前は 3 項目のプレテストを行い、視覚による 5 段階のスケールを理解して回答が適切かを確かめた。Affect Rating Scale に関しては、看護師が DQOL を回答した同日の患者の様子を 20 分間観察して評価した。

3. 結果

対象者の属性については、表 3 に示した。痴呆高齢者 56 名 (アルツハイマー型 11 名、血管性 46 名、混合型 2 名、男性 17 名、女性 42 名)、平均年齢は 82.66 (±8.18) 歳であった。MMSE は 20.37 (±4.48) であり、NM スケールは 33.77 (±8.72)、N-ADL は 39.88 (±39.88) であった。DQOL の 2 週間後の再テストでは、5 項目の下位尺度の相関係数は

表3 対象者の特性

| | 男性 (17名) | 女性 (42名) | 合計 (59名) |
|----------------|----------------|---------------|----------------|
| 年齢 | 78.71 (±8.73) | 84.26 (±8.24) | 82.66 (±8.18) |
| MMSE (0-30) | 20.07 (±4.60) | 21.12 (±4.20) | 20.37 (±4.48) |
| N-ADL (0-50) | 39.88 (±39.27) | 39.88 (±7.82) | 39.88 (±39.88) |
| NM スケール (0-55) | 33.00 (±8.78) | 34.07 (±8.78) | 33.77 (±8.72) |

表4 Affect Rating Scale の結果

| | 男性 | | 女性 | |
|----------------------------------|------|------|------|------|
| | 平均値 | 標準偏差 | 平均値 | 標準偏差 |
| Affect Rating Scale (1-5) | | | | |
| 楽しみ | 2.75 | 1.18 | 2.60 | 1.03 |
| 怒り | 1.06 | 0.25 | 1.00 | 0.00 |
| 不安 | 1.31 | 0.79 | 1.13 | 0.40 |
| 抑うつ | 1.50 | 1.37 | 1.63 | 1.31 |
| 関心 | 4.88 | 0.34 | 4.98 | 0.16 |
| 満足 | 4.94 | 0.25 | 5.00 | 0.00 |
| DQoL (1-5) | | | | |
| 自己尊重 | 2.98 | 0.82 | 2.99 | 0.79 |
| 肯定的感情 | 2.84 | 1.00 | 3.33 | 0.86 |
| 否定的感情 | 2.23 | 0.65 | 1.89 | 0.67 |
| 所属感 | 3.00 | 0.86 | 3.42 | 0.80 |
| 審美的感覚 | 3.15 | 0.93 | 3.70 | 0.61 |

0.730 ~ 0.857 (p<0.05) であり、クロンバッハによる信頼係数は 0.66 ~ 0.864 であった。表 4 に Affect Rating Scale および DQOL の平均値を示した。Affect Rating Scale では満足が最も高く、男性 4.94 (±0.25)、女性 5.00、次に関心 4.88 (±0.34)、4.98 (±0.16) であった。最も低かったのは怒り、男性 1.06 (±0.25)、女性 1.00 であった。DQOL では、審美的感覚が最も高く男性 3.15 (±0.93)、女性 3.70 (±0.61) であった。最も低かったのは否定的感情で男性 2.23 (±0.65)、女性 1.89 (±0.67) であった。表 5 は Affect Rating Scale、DQOL と NM スケール、NADL の相関を示した。Affect Rating Scale (ARS) では、抑うつ (ARS) と関心 (NM)、抑うつ (ARS) と見当識 (NM)、抑うつ (ARS) と歩行 (N-ADL) が負の有意な相関を示した。関心 (ARS) と見当識 (NM)、歩行 (N-ADL) が正の相関を示した。DQOL では、否定的感情と見当識 (NM)、審美的感覚と見当識 (NM) が負の相関を示した。表 6 に Affect Rating Scale と DQOL の相関を示したが、不安 (ARS) と否定的感情 (DQOL)、抑うつ (ARS) と審美的感覚 (DQOL) が正の有意な相関を示した。関心 (ARS) と審美的感覚 (DQOL) は負の有意な相関を示した。

4. 考察

本研究では、従来、注目されることが少なかった痴呆性高齢者の表情分析と主観的 QOL の側面に着目した。日本語版 DQoL に関しては、内的一貫性も英語版とほぼ同様の傾向が認められ、信頼性も確認された。本研究により、MMSE が 13 点以上の中度から軽度痴呆症高齢者において視覚による 5 段階のスケールが理解できる場合には、主観的

表5 Affect Rating Scale、DQOL と NM スケール、NADL の相関

| | Affect Rating Scale | | | | | DQOL | | | | | |
|---------------|---------------------|--------|--------|----------|----------|--------|--------|--------|---------|--------|----------|
| | 楽しみ | 怒り | 不安 | 抑うつ | 関心 | 満足 | 自己尊重 | 肯定的感情 | 否定的感情 | 所属感 | 審美的感覚 |
| NMスケール | | | | | | | | | | | |
| 家事 | -0.085 | 0.184 | 0.133 | -0.176 | 0.058 | -0.184 | -0.046 | -0.187 | 0.186 | -0.157 | -0.203 |
| 関心 | 0.145 | 0.177 | 0.070 | -0.284 * | 0.091 | -0.177 | 0.078 | -0.080 | 0.128 | -0.040 | -0.151 |
| 会話 | 0.165 | 0.175 | 0.044 | -0.151 | -0.045 | -0.175 | -0.173 | -0.082 | 0.122 | -0.070 | -0.115 |
| 記銘 | -0.097 | -0.129 | -0.008 | -0.273 | 0.227 | 0.129 | 0.098 | 0.035 | 0.108 | -0.060 | -0.079 |
| 見当識 | -0.173 | -0.158 | 0.043 | -0.319 * | 0.278 * | 0.158 | -0.086 | -0.190 | 0.272 * | -0.189 | -0.344 * |
| 合計 | -0.030 | 0.082 | 0.067 | -0.294 | 0.138 | -0.082 | -0.025 | -0.121 | 0.210 | -0.128 | -0.190 |
| N-ADL | | | | | | | | | | | |
| 歩行 | 0.163 | 0.110 | 0.080 | -0.315 * | 0.366 ** | -0.110 | 0.076 | -0.023 | 0.134 | -0.055 | -0.216 |
| 生活 | 0.071 | 0.190 | 0.046 | -0.192 | 0.148 | -0.190 | -0.073 | -0.134 | 0.152 | -0.096 | -0.180 |
| 着脱 | 0.207 | 0.129 | -0.002 | -0.325 | 0.254 | -0.129 | -0.071 | -0.026 | 0.096 | -0.108 | -0.196 |
| 摂食 | 0.154 | 0.183 | 0.007 | 0.004 | -0.088 | -0.183 | 0.037 | 0.057 | -0.062 | 0.005 | 0.083 |
| 排泄 | 0.093 | 0.103 | 0.003 | -0.293 | 0.075 | -0.103 | -0.049 | -0.026 | 0.030 | -0.070 | -0.096 |
| 合計 | 0.159 | 0.163 | 0.046 | -0.284 | 0.206 | -0.163 | -0.022 | -0.044 | 0.092 | -0.083 | -0.168 |

* p<0.05, p<0.001

表6 Affect Rating Scale と DQOL の相関

| DQOL/ARS | 楽しみ | 怒り | 不安 | 抑うつ | 関心 | 満足 |
|----------|--------|--------|---------|---------|----------|--------|
| 自己尊重 | 0.009 | 0.224 | 0.288 * | -0.114 | 0.093 | -0.224 |
| 肯定的感情 | 0.164 | 0.022 | 0.036 | 0.010 | 0.082 | -0.022 |
| 否定的感情 | -0.090 | 0.020 | 0.202 | -0.160 | 0.198 | -0.020 |
| 所属感 | 0.060 | -0.106 | 0.023 | 0.070 | 0.155 | 0.106 |
| 審美的感覚 | -0.027 | 0.159 | 0.069 | 0.341 * | -0.281 * | -0.159 |

QOL の測定が可能であることが示唆された。本尺度は、痴呆性高齢者に対するアクティビティなどケア介入の評価などにおいても有効であると思われる。Affect Rating Scale に関しては、デイケア、デイサービスのプログラム中の様子を観察したため、「満足」が最も高く、「怒り」が最も低かったと思われる。Affect Rating Scale の抑うつと NM スケールの関心、見当識、NADL の歩行と負の有意な相関を示した。これは、痴呆性高齢者の見当識が高いほど抑うつ傾向にあったり、意欲を低下させることから周囲への関心を低下させることが明らかになった。しかし、歩行機能は維持されている対象者ほど、抑うつ傾向にある。DQOL の否定的感情と見当識は有意な関連があり、否定的感情が少ないほど見当識が良好であることが示唆された。これらの結果からは、自己の否定感情が低い高齢者ほど痴呆症状の進行が遅い可能性があり、今後、本尺度を用いて追跡調査が必要である。

DQOL の審美的感覚と NM スケールの見当識は負の有意な関連があり、見当識が良好な人は審美的感覚が低いことが示唆された。わが国では、高齢者の日常生活において動物、鳥、空などをみることで美しさを意識したり、認識することが少ないなどの欧米と習慣の違いなどの影響も考えられる。しかし、認知機能の低下した高齢者では、デイケアなどにおける動物介在療法などにおける変化もみられ³⁾、残存機能や残された感性を刺激することで認知機能の低下を予防したり、問題行動の軽減につなげる可能性も高い。Hall¹⁾ は、痴呆高齢者の問題行動はストレス閾値が

低下し、ストレスに対処できなくなった結果として引き起こされると仮定している。DQOL は高齢者の生活の主観的な側面を評価しており、Affect Rating Scale を用いてその妥当性を検証した。介護保険制度における痴呆の進行を予防するためのケアの開発および痴呆患者の尊厳を守るためのケアの評価の一つとして活用が可能であることが示唆された。

5. 総括

平成 14 年 10 月から平成 14 年 1 月 31 日にデイケアおよびデイサービスにおいて調査の参加の承諾の得られた痴呆性高齢者 56 名に対して面接調査を実施した。日本語版 Dementia Quality of Life Instrument (DQoL) と Philadelphia Affect Rating Scale (PARS) を用いて表情分析の関係を明らかにした。不安 (PARS) と否定的感情 (DQoL)、抑うつ (PARS) と審美的感覚 (DQoL) が正の有意な相関を示した。関心 (PARS) と審美的感覚 (DQoL) は負の有意な相関を示した。DQOL は高齢者の生活の主観的な側面を評価しており、Affect Rating Scale を用いてその妥当性を検証した。DQOL、PARS とともに臨床において活用可能であることが示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたりご支援頂きましたコスメトロジー研究財団に感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) 本間昭：痴呆性高齢者の QOL 精神科の観点から、11 (5)、483-488,2000
- 2) 山本則子、阿部俊子、稲毛田美香：痴呆性高齢者の QOL：看護介入を評価する尺度開発、日本老年精神医学雑誌、11 (5)、489-495,2000
- 3) 金森雅夫、鈴木みずえ、山本清美、神田政宏、他：：痴呆性老人デイケアにおける動物介在療法の試みとその評価方法に関する研究。日本老年医学会雑誌、38(5)：659-664 (2001) .
- 4) 矢富直美、宇良千秋、吉田圭子、他：痴呆性老人における笑いの表出、老年精神医学雑誌、7 (7) 783-791、
- 5) 中谷陽明、野村豊子、和気純子、矢富直美： 痴呆性老人に対する回想法の効果に関する研究。平成6年度ジェロントロジー研究報告2：114-119(1996).
- 6) Lowton MP：Quality of Life in Alzheimer's Disease. Alzheimer's Dis Assoc Disord,8(S.3)138-150,1994
- 7) Brod MB, Stewart AL, Sands L, Walton P：Conceptualization and measurement of quality of life instrument: the dementia quality of life instrument(DQoL), Gerontologist, 39(1), 25-35, 1999.
- 8) P・エクマン：表情分析入門—表情に隠された意味をさぐる、信誠書房、1987
- 9) 矢富直美：痴呆性老人のコミュニケーション行動、看護研究、29 (3)、243-252、1996
- 10) Tappen RM, Barry CB：Assessment of affect in advanced Alzheimer's disease: the dementia mood picture test, Journal of Gerontological Nursing, 21(3), 44-46,1995
- 11) Folstein MF, Folstein SE McHugh PR: Mini-mental State; Practical method for grading the cognitive state for the clinician. J Psychiatr Res, 12, 189-198(1975).
- 12) 小林敏子、播口之朗、西村健、武田雅俊：行動観察による痴呆患者の精神状態尺度 (NM スケール) および日常生活動作能力評価尺度 (N-ADL の作成)：臨床精神医学、17 (11) :1653-1668(1988)
- 13) Hall GR, Buckwalter CB：Progressively lowered stress threshold: A conceptual model for care adults with Alzheimer's disease, Achieves of Psychiatric Nursing, 1(6): 399-406(1987).

記念講演

●
平成14年度記念講演 石 浦 章 一
●

人のこころと遺伝子のはたらき

東京大学大学院総合文化研究科

石浦 章 一

場所 (株)コーサー本社2階会議室
日時 平成14年11月20日(木)

I 序

私は現在、東京大学の文系と理系の中間として新しくできた生物学と心理学が一緒になった学科にいます。そこで私たちの精神の働きというものを何とか遺伝子の働きと結びつけることができないかという研究をしておりますので、少しそれについてご紹介させていただきます。ご高名な先生方がたくさんおられるので、大変失礼な話をするかもしれませんが、その時はハハハと笑っていただければ非常にありがたいと思います。

今日は遺伝子の働きから話をさせていただきます。そのあとアルツハイマーの話、最後に人間のこころの働きについて話をさせていただきます。

II 遺伝子の働き

II-1 遺伝するものとしらないもの

遺伝するものとしらないものというのが世の中にはいっぱいありますが、どれが遺伝するかというのはいろいろ問題が出てくるんです。まず、遺伝しそうなものというのはご存じのように顔の造り、髪とか私の顔を見ていただければ判りますが、私の父親がどのような顔をしているか、大体推測がつくわけです。その他によくいわれていますのは、眉毛が濃いか、ほほ骨が張っているなどは遺伝するのではないかとされています。しかし、どのような遺伝子がそれに拘ってくるかというのはよく判っておらず、最近ようやく、例えば耳垢が湿っているとか、耳垢が乾いているという特性の遺伝子が判ったという段階です。

その他に体全体の骨格というのはだいたい似ています。電車の中で親子を見ますと、あれは親だ、子だというのは必ず判ります。その他に血液型もそうですが、それ以外に今日問題にしたいのは、長寿とか身体醜形障害、自分が醜いと思って何度も整形を繰り返す、そういうことは遺伝するのだろうか、ヒステリーは遺伝するのだろうかということです。周囲の人を

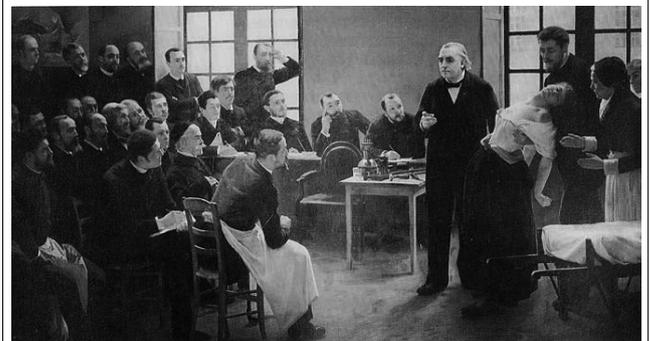
見ていると遺伝するのではないかと思うのですが、それはどうして証明したらいいのでしょうか。人のクリエイティビティ、創造性とか、計算の才能、金儲けの才能はどこまで遺伝するかということが問題になるわけです(表-1)。

そこで、2,3ご紹介したいと思うのですが、例えば、これは有名な神経学者のシャルコーが講義をしているところですが(図-1)。フランスのサルペトリエール病院の壁画にあるのですが、シャルコーが女の人をかかえて、講演をしています。この講演は筋肉麻痺の若い女性、つまりヒステリーを起こして筋肉が固くなって倒れている女性について、心理的抑圧が身体症状に転化した時にこういう症状が出ると講義をしているところなんです。このシャルコーという人と、ご存じのフロイトという人が、この筋肉麻痺、ヒステリーの治療はどうすればいいかを研究し、催眠術によってこのような症状が劇的に治るということが判ったわけです。そこで、この当時フロイトは脳の

表-1

| 遺伝するもの、しないもの | |
|---|----------|
| ● 遺伝しそうなもの | ● 遺伝する？ |
| ・ 顔のつくり (髪、まぶた、まゆ毛、頬骨、 えくぼ、そばかす、体毛) | ・ 長寿 |
| ・ 身体全体の骨格 | ・ 身体醜形障害 |
| ・ 血液型 | ・ ヒステリー |
| | ・ 創造性 |
| | ・ 計算の才能 |
| | ・ 金儲けの才能 |

シャルコーの講義 (筋肉麻痺の若い女性)



心理的抑圧が身体症状に転化
↓
催眠によって劇的に治る！

「心の病気と分子生物学」(日経サイエンス)より引用

図-1



Mind and genes
Shoichi Ishiura

Department of Life Sciences, Graduate
School of Arts and Sciences, The
University of Tokyo.

研究をするのではなくて催眠という心理分析によって、精神症状が治るのではないかと考え、新しい学問を打ち立てました。これが100年以上前の話です。

ところが最近では心理分析だけでは人のこころは治らない、例えば鬱病の症状は薬の方がよく治って、精神分析では治らないということで、人間のこころも精神医学という面で見なければいけないようになってきています。先ほどご紹介した身体醜形障害、例えば自分の顔が醜いと思うような心を持っているのはどういう人だろうか、その人の脳を見たらどうだろうか、ということが研究で非常に大事だということが言われるようになってきました。今日はそれらのいろいろな例をご紹介します。

II - 2 脳の研究と遺伝子

一番最初になにが遺伝し、なにが遺伝しないかというお話をしましたが、例えば計算能力は遺伝するのでしょうか。これについてもいろいろなテストや、いろいろな家系調査があります。例えば今、世界にはこういう方がいます。2桁の数字であれば2乗から5乗はもう暗記している人がいる。ということは5桁と5桁の掛け算はたちどころにできる、という方が世界中にいて、数時間前に覚えた数字は絶対に覚えている。1割の113の答えを永久に暗算で続けることができる。1950年12月8日、私の誕生日なのですが、これは何曜日かをたちどころに言うことができるというような人が世の中にいるそうです。こういう能力は遺伝するのでしょうか。もう一つは学習だけで、勉強だけでこういうことができるのか、ということを探る研究が行われています。この人は普通の人よりも神経細胞の数が違うのだろうか、それとも神経の伝達スピードが速いのでしょうか。光が光ったときにボタンを押すというテストをやりますと、頭のいい人は早くボタンを押すといわれていますが、それは神経の伝達スピードが速いせいだという理論もある。もう一つはこの人は使っている脳の場所が違うのではなからうか。この3つの仮説が立てられて、この他に遺伝するかという仮説があるわけですが、遺伝は現在のところ否定されているのです。こういう頭のいい人は、どこで決まっているか、皆さんはご存じですか。これは脳の研究から明らかになりました。正解はこの人は使う脳の個所が違うということが判ってきたのです。即ち、計算の練習をすればするほど、今まで使っていなかった脳の個所が使えるようになる。こういうことをきちっとやりますと、この計算能力は遺伝ではなくて、実は後天的に獲得する、学習で獲得できる能力であるということが判るわけです。そういうことをきちっと示していくことで、何が遺伝か何が遺伝ではないかということが明らかになってきました。

II - 3 遺伝子の構造

ここで、簡単な遺伝子のお話を先生方にするのは大変恐縮

ですが、今どれくらい判っているかをちょっとだけ紹介します。人間の遺伝子というのは、33,000個位あることがゲノムプロジェクトで明らかになっています。理論的にはそれが全部判れば、私たちのこころや、病気の素因とかがわかるはずですが、ところが人間はハエとか、土の中にいる線虫とか、植物であるナズナなどの他の生物に比べて、そんなにたくさん遺伝子を持っているわけではないのです。酵母菌とか大腸菌などのように、もっと下等な生物は遺伝子はもちろん少ないことは判っています。といてピロリ菌の1,500個の遺伝子が全部判ればヘリコバクターピロリが判って胃潰瘍は無くなるかという、そこは判らないわけで、遺伝子が判ったとしても人間そのものが判るとは限らないのです。それを今皆さんが一生懸命に調べているところです。

遺伝子は今どうなっているかと申しますと、一般的に一つの遺伝子というのは、遺伝子の部分とそれ以外の意味の無い部分だいたい3:7位になっていると考えられています。人間の遺伝子の約3割の部分非常に大事な部分であって、その大事な部分の中でも最終的には私たちの体のタンパク質を造る部分、これをエクソンといいます。このエクソンの部分はだいたい2%位です。後で切り取られてしまう残りの部分をイントロンなどと言うのですが、このイントロンの部分はエクソンの部分の約20倍位の大きさで、一つの遺伝子は平均8個から9個のエクソンでできているといわれていますから、全体の一つの遺伝子の大きさは平均約3万塩基でできていると考えられます。

そうしますと遺伝子診断をすると、全部最初から最後まで調べなくては行けないので、一回のPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)で約500塩基が判りますから、3万の塩基を全部調べるには30,000/500でだいたい60回PCRをしないと、全部の遺伝子の中のどこに変異があるか判らないわけです。皆さんと隣の人が少し性格が違うなどというのを簡単に遺伝子で調べようと思えば調べられるのですが、非常に大変なことであるということが現在判っています。

II - 4 遺伝子診断

そこで遺伝子診断というのはどのようにやるかということ、私に髪の毛を3本いただければ、特定の遺伝子が診断できます。将来60歳になったらポケやすくなるか、そういう遺伝子も今判っていますから、何だって判るわけです。私がやっているある病気の人は嘘をつきやすくなるという特徴がありますが、もしその原因遺伝子が判ると、皆さんの髪の毛を診断して、この人は嘘をつきやすい、私を騙しているのではないか、などということが判るかもしれないのです。今はどこの大学でも血液だったら一滴でもいいですし、うがい水の中にはホップタの中の細胞が含まれていますから、そこからDNAを抽出して、遺伝子診断ができるようになっていきます。

例えば、これは有名な教科書から採ってきたDNAプロフ

アイリングの図ですが、親子鑑定の図がこのAというところに描いてあります。Mというのがお母さんで、隣のCというのが子供で、F1とF2のどちらがお父さんか判らない、という場合を示しています。そうしますとCという真中の子供はお父さんとお母さんから遺伝子が半分ずつきてこの真中のCという人になるわけですから、父親がどちらか、皆さんは判りますか。ぱっと見てF1の遺伝子がそのまま子供にきていることがお判りになるかと思います。F2の遺伝子はいずれの線も子供に伝わっていませんから、F2は違うということが見てすぐ判ります。F1がお父さんです。本当に横田めぐみさんの子供かどうかともすぐに判るわけです。ところが法律家は99.999%の確率で正しいが、違うかもしれないなどと言っているのですが、そういう問題ではなくすぐ判ります(図-2,A)。

また、犯罪の被害者の中に精子の試料が残されていた。女性の遺伝子が被害者の遺伝子であり、そこに残されていた精子の試料の遺伝子がこれだとしますと、怪しい容疑者が3人います。誰が犯人ですか、などと言われると1番が犯人であることがすぐに判ります(図-2,B)。

このように遺伝子診断というのは殆ど確実に答えがでますから、皆さんもあまり悪いことはできないということがお判りになるかと思います。車の中に髪の毛が1本落ちていたら、私のところに持ってきていただければ、どの女性かということがすぐ判るはずで。遺伝子はすぐ診断できるし、病気の遺伝子が判ると、皆さんが将来どうなるかというのはすぐ判るわけです。

II - 5 遺伝子情報の取扱い

遺伝子診断の逸話の一つご紹介したいと思います。これは女性の話ですが、ある時ジョンという男の人とサラという女の人が結婚して、子供を産みました。この2人はユダヤ人だったので、その子供がユダヤ人に非常に多いテイサックス病の遺伝子を持っているかどうかを診断しました。テイサックス病にかかると2歳から4歳で亡くなってしまいますから、生まれた子供がこの病気かどうかはこの夫婦にとって非常に大事なことで、ユダヤ人の方はだいたい診断をしているのです。その結果、その子供はジョンの子供ではないことが判りました。こういう時皆さんはどうしますか。この結果を二人に伝えますか、伝えませんか。問題ですよ、遺伝カウンセラーはどう伝えるかが問題になります。

これはある学会で話題になった話です。病気のことを聞かれたのだから、実子かどうかを言う必要は無いという考え方で、いや将来のことを聞かれたのだから、本当のことを言わなかったと訴えられたら困るから、やはり両方に正しいことを言うべきだという考え方の2つがある。学会で最初にどう決まったかと言うと、この結果をサラだけに伝えると決まったのです。つまり、本当の子供かどうかを知っているのは母親だけ

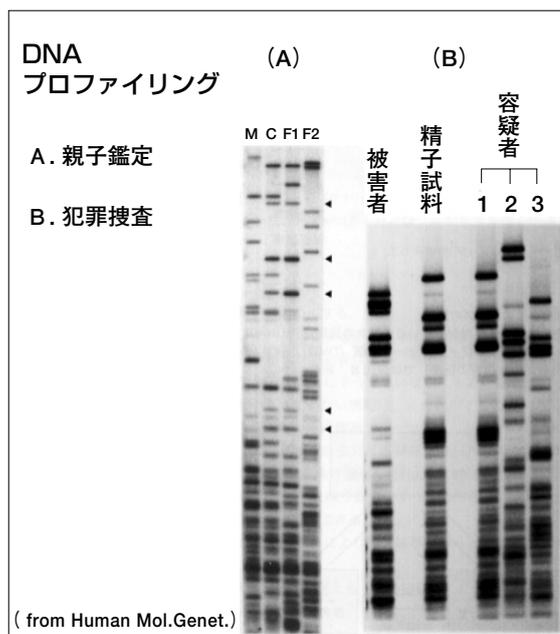


図 - 2

だということで、母親にあとは判断してもらおう、ということになったのです。ところがどんでん返しが起こりました。何が起こったかと言うと、現実は何の国で診断しても、日本でもアメリカでもソ連でもフランスでも200組の父子のうち父子が違うということが、必ず起こったわけでした。つまりどの国でも遺伝子診断をすると本当の父親ではないということが何%かは確実にあるということが判って、実子かどうかは無意味である、だから病気のことだけ伝えればいいというのが最後の結論になったのです。

皆さんはこの結論と最初の私の話を聞いてどう思いますか。やはり実際と違うということがお判りになるかと思います。即ち、遺伝子診断というのはこういう問題を含んでいるから、簡単に遺伝子を調べなさいと言われても、簡単に調べてその結果を人に言うことはなかなか難しい、ということがお判りいただけるのではないかと思います。そこで、今日お話ししたいのはもっとナイーブな、いろいろ難しい問題を話したいわけです。例えば、もしPTSDと呼ばれているトラウマになりやすい人の素因の遺伝子が見つかったとしたら、その遺伝子のことを本人に言ったほうがいいのか。または、自分が醜いと思っている女性がいたとすると、その人の遺伝子診断をすると、ある素因の遺伝子を持っていたということが判る。その時、その人に対してどう言えばいいのだろうかという問題がいろいろ出てくるわけで、遺伝子診断というのは問題を非常にたくさん含んでいるということをお判りいただくとありがたいと思います。

II - 6 遺伝子変異

血液型のO型の方はこの中にたくさんいらっしゃいますが、O型は赤血球の中にガラクトースとフコースという糖

がついている。A型の方は GalNAC という糖が一つ余計についていますから、A型の人の方がO型の人よりも複雑な人間である、まあ進化した人間であるというように考えることができます。B型はどうかというとB型は余分にガラクトースという糖がついていて、B型とA型はついてるものが違う関係です。何が違うかというと、アという反応の酵素を持っている人はA型になり、イという反応を司る酵素を持っている人はB型になるわけです。そこでA型の酵素とB型の酵素の遺伝子を調べてみると、遺伝子は全く同一であるということが判ってきました。何が違うかというと、遺伝子の4箇所が違って、4箇所タンパク質のアミノ酸が違っていると基質特異性が違ってきて、このグリコシルトランスフェラーゼという酵素は糖をくっつける酵素なのですが、違う糖をくっつけるということが判りました。つまり、A型の人とB型の方は同じ遺伝子の遺伝子変異によって酵素の働きが少し違うということが判ってきました。ではO型の方はどうかというと、O型の方は実はタンパク質が半分しかできていないということが判ってきました。O型の方は途中でストップコドンというものが入って未成熟なタンパク質ができて、完全なタンパク質ができない。つまり、アとイという反応を行うことができないわけです。O型は遺伝子変異なんですね。つまりO型の方は遺伝病ということです。でもそんなことは私たちの生活には全然無関係であり、そういうことでO型の人を差別などできないわけです。私は自分がA型ですから自分は進化した人類だと思っていますが、といてO型の人を差別しているわけではないのです(図-3)。

ところが、病気の場合は遺伝子が判るとやはり差別されるという問題が起こります。例えば、化粧品を塗るときに色盲の人が塗ると変な色に塗るかもしれないわけです。といて、子供のときに色盲を測ると、その子供は差別される可能性があるわけです。だから、そういう問題がいろいろでくるとということが、この遺伝子の取扱いで難しい問題であるということをお判りいただけるとありがたいと思います。そこ

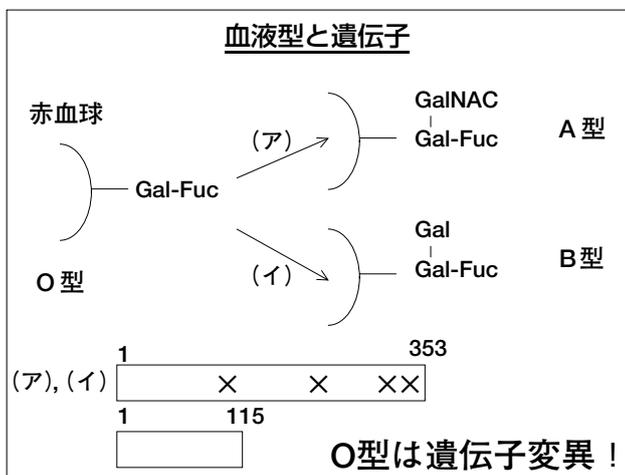


図-3

で、遺伝子変異の話をするのですが、これは決して劣っているというものではないということをお判りいただきたいと思えます。

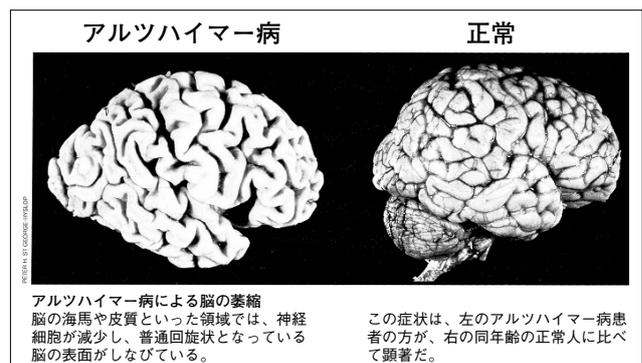
ところで環境が遺伝子を変えることは絶対にありません。うちの大学の一年生に聞くと、遺伝子を変えることができるなどと思っている人がいるのです。ところが遺伝子というのは体中の細胞に同じものがありますから、遺伝子は一生の間絶対に変わることはありません。どんなに努力しても変えることはできません。しかし、環境つまりライフスタイルによって遺伝子のオン・オフは変えることができるので、これが学習とか環境の大事さである、ということがお判りになるとありがたいのですが、これすら判っていない大学生がいるというのは非常に嘆かわしいことです。ここで、2番目の話題に入ります。遺伝子でということが判ってくるかというお話をさせていただきます。

Ⅲ アルツハイマー病

Ⅲ-1 アルツハイマー病とは

アルツハイマー病は全ての病気の中で全員がリスクを持っている病気です。ガンは3人に1人が亡くなりますが、アルツハイマー病は長生きすれば必ず誰でもなる可能性があるわけで、これは大きな問題かと思えます。アルツハイマー病は今日本では65歳以上の高齢者の約8%位を占めると考えられています。ちょっと、あの人の名前を忘れたなどというのはアルツハイマー病ではなくて、アルツハイマー病の人というのは自分の家の場所を忘れるとか、朝何を食べたかを忘れるとか、とんでもない忘れ方をします。アルツハイマー病の原因は3つありまして、頭を怪我したり、サッカーをし過ぎたりするとアルツハイマー病になる。また、脳卒中の後遺症でもアルツハイマー病になりますが、一番問題なのは何か原因が判らないのにボケてくるという、これが現在のアルツハイマー病の定義です。

実際脳がどうなるか写真を持ってきました。正常の脳はびっしり詰まっていますが、アルツハイマー病では脳がスカスカになっていることがお判りいただけると思えます(図-4)。今、皆さんの脳を見るとアルツハイマー病かどうか判る時



「日経サイエンス」より引用

図-4

代が来ています。でもその話はちょっと自分のことにも拘わる問題ですからあまり言いたくないので、まず良い話からしましょう。

Ⅲ - 2 長寿の条件

どんな人が100歳になるか知っていますか。今、日本でどういう生活をした人が100歳まで生きるかという、生活習慣がバラバラなのです。走っている人もいるし、朝から晩まで酒を飲んでる人もいます。泉重千代さんを覚えていますか。あの人はお酒を飲むことが生甲斐だったわけです。タバコを手放さない人もいます。こういう人がいるから本当に困るのですが、タバコは本当は悪いのですが、タバコを手放さなくて100歳まで生きられる非常に頑丈な方もいらっしゃる。でも、私が伺ったところによると、平均的に適度な運動を毎日されているとか、歩いているとかそういうことをしている人です。あとは、非常に楽天的な生活をしていて、非常にフレキシビリティがある。何か違うぞと言われると、ああそうですねというような方が良い、あまり頑固な生活はまずいですよということです。あと今一番問題になっているのは、動脈硬化との問題で、食生活であまり肉を食べないような生活をしていた方がよかろうということです。だいたい平均的にはこういう人が100歳に達すると言われてい

Ⅲ - 3 脳とボケ

ここで脳を見てください。これはアルツハイマーの人の脳です。この人は毎回健康診断で脳を見ていったわけです。そうしますと、1年半、3年と経っていくとだんだん萎縮しているのがお判りいただけるかと思いますが、脳の中でも海馬という部分が非常にきれいに萎縮しているのがお判りになるかと思いますが(図-5)。つまり、皆さんの脳を見るだけで、萎縮が起こると将来ボケるぞということが判ってきます。

これをグラフにしますと、この人はアルツハイマーになってお医者さんに行くたびに脳を測ってもらっていたわけです。

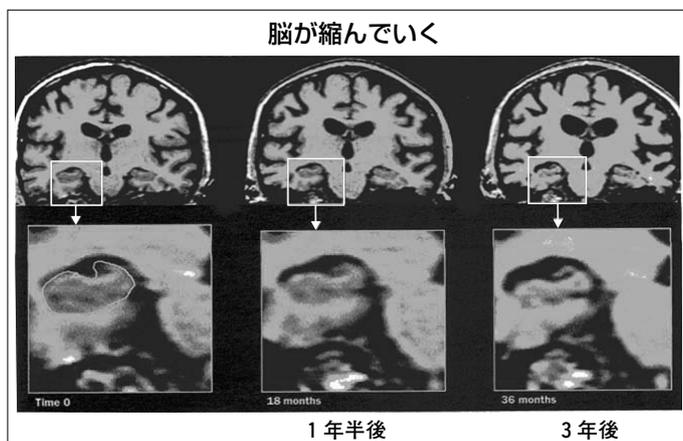


図 - 5

最初から3,000日ですからかなり測定している例ですが、脳がだんだん萎縮していきます。そうしますと最初の矢印の所で症状が出現して、ちょっとこの人は変なことを言っているとか、そういうことが判ってきて、だんだん萎縮してきて最期にこの辺りでアルツハイマー病だと診断が確定するわけです(図-6)。

自分の脳がだんだん減っていくと、これはまずいと普通は思うわけです。だから今、皆さんは自分で脳を見れば、これは危ないかどうか判る時代がきているのです。このグラフの脳の減り方は非常に顕著な人の例で、一般の方はあまり萎縮しない。でもご老人になるとだんだんと萎縮してくることは確かで、私くらいの年代でももうずいぶん萎縮していると言われてい

Ⅲ - 4 アルツハイマーと遺伝子診断

ところが、遺伝子の研究で大事なことはなにかというと、非常に若い段階で判るということです。例えば、私がアルツハイマーの遺伝子を持っているとすると、20歳位からタバコは止める、酒は止める、運動をするというような生活をする。そうすればアルツハイマーを防ぐことが可能になるわけで、やはり、遺伝子でアルツハイマーを調べるということは非常に大事なことだと思うのですが、今、日本でこういうことができるかどうかというのは問題になっているところです。

これも日経サイエンスの本から採ってきた図ですが、これは人間の卵の話です。人の受精卵の8細胞の卵で1個だけピペットで吸って、この1個の細胞で遺伝子診断をすることが可能です。だから卵の段階でこの卵は将来アルツハイマーになるかどうか判るわけです。残り7/8をお母さんのお腹の中に返すと子供が誕生するわけで、人間の子供がこうして生まれることは現在もう証明されています(図-7)。

ということは遺伝病はこういうことができるわけですが、誰が悪い科学者がいてアルツハイマーの遺伝子をこうやって

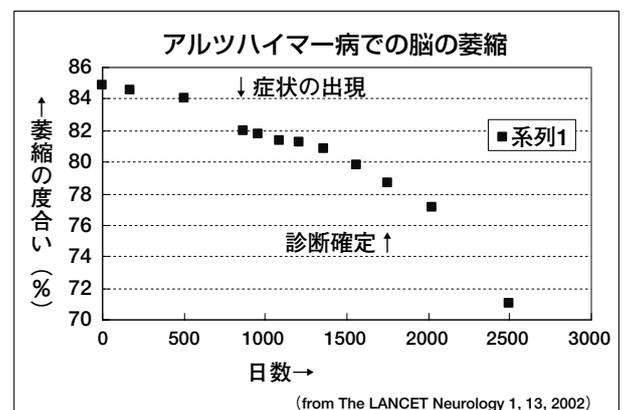


図 - 6

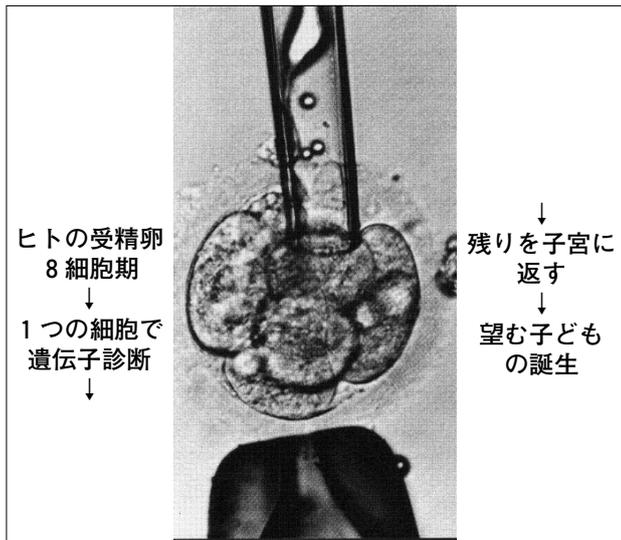


図 - 7

【日経サイエンス】より引用

調べてお母さんのお腹の中に戻せば、今は絶対アルツハイマーにならない子供を作ることが可能になっています。もっと怖いのは、現在遺伝性の精神遅滞の遺伝子が判り始めています。細胞にはいろいろな化学反応があって、先ほど全部で 33,000 遺伝子があると申しましたが、人間の遺伝子産物はこの中で何かの働きをしているわけです。いろいろな働きがあります。例えば細胞の中の化学反応を促進する働きとか、外からホルモンの刺激があった時にそれをいろいろ伝えていく反応があったり、細胞の形を変えるような反応があったりしますが、現在判っているいろいろな病気からこういうことが明らかになってきました。

Ⅲ - 5 遺伝子の作用

例えば、癲癇と不整脈は両方とも細胞膜のイオンを外から中に、また、中から外に出すイオンチャンネルに異常があると、脳では癲癇、心臓だと不整脈という病気が起こることが判ってきました。つまり、不整脈と癲癇は同じ種類の病気であり、発現する臓器が違うだけということが判ってきたのです。また、筋肉の形を造るタンパク質があって、いろいろなタンパク質が複合体を造っていますが、このうちどれか1個でも無くなると筋ジストロフィーという病気が出てくるとも判ってきました。筋ジストロフィーは全部で 10 種類近くの病気があるのですが、それは全部細胞膜上で同じ一つの塊を作っているということが判ってきました。

それでは皆さんの知能を規定する遺伝子はどの反応を規定しているかということ、33,000 の遺伝子があるうち、いま遺伝性の精神遅滞、知的障害が起こる遺伝子が全部で 20 個位判っています。その 20 個の半分は全部一定のタンパク質がおかしいということが判ってきた。これはどういうタンパク質かということ、細胞の外からの刺激を細胞の中に伝える一番最初の働きをしていて、このタンパク質があるという

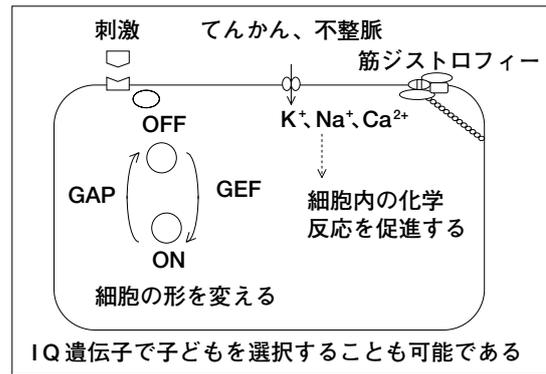


図 - 8

いろいろな反応が進むということが判っています。この反応タンパク質は細胞の中でオンとオフを繰り返しているスイッチみたいなタンパク質で、細胞の中の化学反応をオンにしたりオフにしたりする。オンにすると何が起こるかということ、細胞の形が変わっていく。神経だったら神経細胞が伸びていくのに効いている一番最初のスイッチのタンパク質だということが判る。スイッチがおかしくなるとどうなるかということ、神経が伸びていかない、回路が作れないということで精神遅滞が起こることということが判ってきました (図 - 8)。

この遺伝子を遺伝子診断すると、ひょっとして頭のいい人が造れるかもしれないわけです。IQ が低い遺伝子は異常がいい方に移ると、ここにいらっしゃる皆さんのように頭の良い方ができるわけです。そうすると先ほどの卵で遺伝子診断をしてそんな卵をお母さんのお腹の中に戻せば、IQ の高い子供だって造れる。つまり、今はゲノム研究からIQ 遺伝子で子供を選択することも理論的には可能であることが判ってきている。このような時代がきているということで、これは非常に厳しい状況です。どうやって、それをちゃんと守っていくか。勝手にこういうことやっていいかという問題が出てきます。

そこで、アルツハイマー病にならないためにはどうしたらよいかと言うと、例えば、ポリフェノール、 β -カロテンとかビタミンBなどを食べていると思いますが、これは活性酸素を減らすという役割があって、こうすれば多分長生きできるだろう。その一つの証拠は、活性酸素を減らしたハエを造る。つまりスーパーオキシドディスムターゼという酵素を入れたハエを造ると、ハエの寿命が3割延びた。これはハエだけでなくネズミでも寿命が延びる。たった1個の遺伝子を入れただけで寿命が延びるということは、活性酸素が非常に悪者なのだ、だから活性酸素を減らせば良い。活性酸素を減らすのはビタミンEとかポリフェノールだといってワインばかり飲んでいる人もいらっしゃいますが、これではアル中で死んでしまうわけです。だから、本当にこれが正しいかどうか判りませんが、寿命というのは、たった1個の遺伝子で動き得ることが、今判ってきました。これは非常に

興味あることで、長寿の遺伝子に結びつく研究になるのではないかというのが現在の研究の進展具合になります(図-9)。

Ⅲ-6 アルツハイマー病の発症機序

一つくらい自分の研究の話をしなさいといけないと思ってアルツハイマーの話を持ってきました。アルツハイマー病の脳の中には老人斑というものが溜まっていて、これはAβというタンパク質が溜まっています(図-10)。アルツハイマー病の人はなぜこのようなものが溜まるかという、きれいな化学反応で溜まってくるのが判ってきました。それはAPPという遺伝子からできる。脳の中に溜まっているAβというタンパク質は大きなAPPというタンパク質の部分なのです。これがなぜ溜まるかという、βセクレターゼという酵素で左側が切れ、γセクレターゼという酵素で右側が切れてAβができる(図-11)。

これを防ぐためにはこの反応を止めてやればいわけです。皆さんのようにしゃきとした人の頭の中では何が起きているかという、Aβが溜まらないで、この真中が切れているのです。普通の人ではこの真中が切れているために老人斑ができない。これは正常ではαセクレターゼが働いている。だからαを上げてやって、βを下げてやればいわけで、私のやっている研究は、このαセクレターゼと呼ばれているいろいろな種類の酵素(ADAM 9, 10, 17)、βセクレターゼと呼ばれているBACE 1という酵素、γセクレターゼと呼ばれているこの4種類のタンパク質(プレセニン、ニカストリン、PEN-2、APH-1)の複合体、こういうものを採って来て、それぞれ反応を左側に進めて右側に進めないようにすればいわけです。

理論的には誰でもできる反応ですが、こんな薬を探すのは非常に難しく、今、世界中で競争しています。私が今やっているのはαセクレターゼとβセクレターゼで、これらは細胞の中でくっついている。βセクレターゼとγセクレターゼは細胞の中でニカストリンを介してくっついていることを示して、片方を上げて片方を下げるしくみを探しています。特に左側の反応を促進すれば良いということが判り、βセクレターゼを阻害すると、もう一つのαが上がるということを見つけました。今こういう薬を使って、アルツハイマー病が治るのではないかという研究をやっているわけです。皆さんも興味があれば一緒に研究させていただければありがたいと思います。

Ⅳ 行動の生物学的要因(人間のこころの働き)

Ⅳ-1 習慣行動と分子機構

最後に行動の話をしていきます。この中にたくさんいらっしゃるタバコをお飲みになる方から入っていきます。タバコが絶対やめられないのはニコチンという物質が依存に拘って

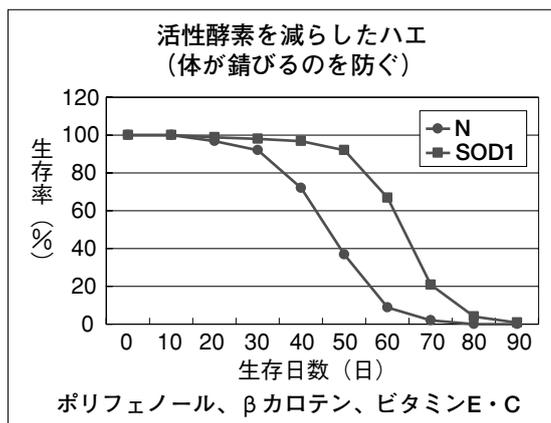
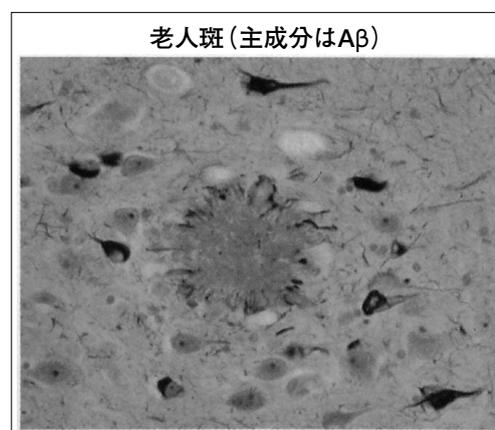


図-9



「日経サイエンス」より引用

図-10

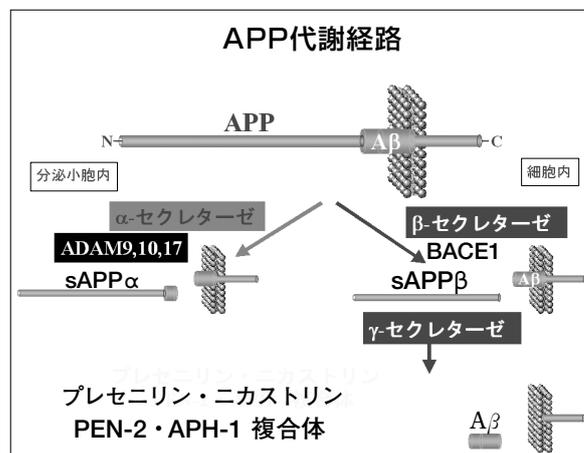


図-11

ます。ところがベンゾピレンという物質はガンを誘発する物質で、タバコのなかにはこの両方が入っています。タバコを朝起き抜けに一服吸うと気持ちよくなるというのは、これは煙は7秒で脳に到達して、ニコチンがアセチルコリンというものの代わりにくっつくということが明らかになっています。この話はこれからお話する行動の話と非常に密接に拘ってきますので、ちょっと例として挙げました。皆さんが物事をじっと集中して勉強している、例えば私のスライドを今ご覧になっている

とき、アセチルコリンというものが脳から出ていて集中しているわけです。ところがタバコを吸うと同じようにシャキッとするのは、ニコチンが同じ働きをするということが判っています。

では何故止められないかという、ドーパミンという別の物質が出て、それが快感を感じタバコを吸うと気持ちが良いな、ということでタバコを止められなくなるわけです。皆さんタバコを吸うとニコチンという物質が受容体にくっついて集中し気持ちが良くなってくるわけですが、これは実はアセチルコリンという皆さんの脳の中にある物質の代わりにニコチンが働いているわけです(図-12)。

そうするとタバコを飲みすぎるとどうなると思いますか。タバコ飲みの方はこの本当に大事なアセチルコリンが来るのではなくてニコチンだけが脳の中に入ってくるわけです。朝から晩までタバコを吸っているとだんだんアセチルコリンが出なくなると言われています。だからタバコ飲みはタバコを吸わない時はものを考えることができないというのはこれから判ってくるわけです。それはもう証明されている。このようなことが脳の中で他のことでも起こっているということが判ってきました。

簡単にご紹介しますと、神経末端、神経終末にはある物質が溜まっていて、これが出てくる。アセチルコリンの場合もこういう物質が出てくると、それが次の神経にくっついて神経が伝達していくわけです。つまり、このアセチルコリンとか、そういう伝達物質は次の細胞の受容体というものに結合いたします。出た神経伝達物質は出っ放しになると困りますから、トランスポーターという分子で戻っていくことが判っています。これが私たちの脳の中で行われているわけです。

IV - 2 精神障害と分子機構

先ほどちょっとだけご紹介しました、Body Dysmorphic disorder, BDDと呼ばれている身体醜形障害という病気、精神障害があります。これは体の一部、例えば髪の毛とか、皮膚とか、鼻が醜いと思ひ込む症状で、こういう人はいつでも鏡を見ます。そして若い女の方に非常に多いということが判っています。女性は気をつけてくださいね。毎日鏡を見ているとこの病気じゃないかと疑われます。もっと問題は、醜いと思うとそれをカモフラージュしようとして何時でも帽子を被ったりします。何度も何度も美容整形に行きますが、マイケルジャクソンみたいに、なかなかそれが治らないということになる。そういう人はいっぱいいるのですが、これが何故問題かという、これがひどくなると鬱病とか社会恐怖症などと一緒になり、ひどい場合は自殺する人もいますということです。したがって、なるべく早くこれはどういう症状かということを知りたいわけです。そうすれば治療法ができる。

これは実はセロトニン再吸収阻害薬 SSRI という薬が効

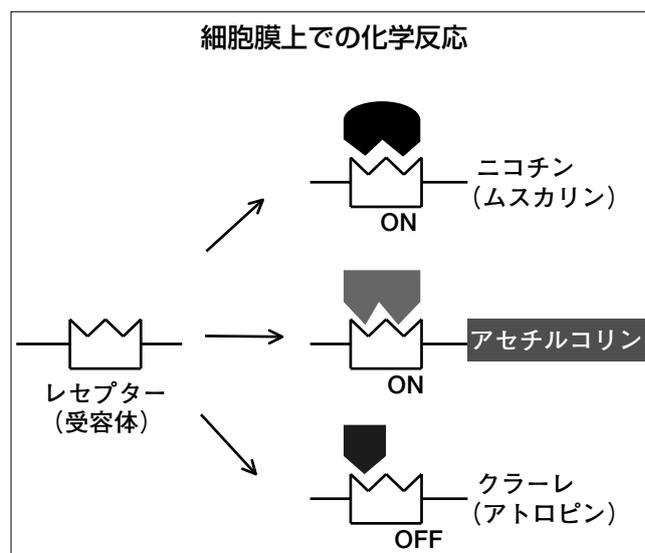


図-12

くということが判ってきました。これは心理的なものだと思ひ込んでいたのに、セロトニンという先ほどの伝達物質に拘ってくる脳の問題ではないかということが判ってきて、これは調べる価値があるというわけです。こういうことがもしちゃんと判れば、Body Dysmorphic disorder になり易い人とか、なり難い人もチェックできるということで研究が進み、こんなことが判ってきたわけです。

選択的セロトニン再吸収阻害薬とはどういうことかという、神経の末端からセロトニンという物質が出てくるのですが、このセロトニンは私たちが安心したりする時、たくさん出ていると考えられます。イライラするとセロトニンが少なくなると考えられるのです。このセロトニンがトランスポーターで戻っていくはずなのですが、この戻っていくところをこの薬がブロックするわけです。そうすると何が起るかと言うと、出たセロトニンが非常に過剰になる。セロトニンが多くなって安心し、この病気が治るのではないかと考えられるようになりました。ということは、これになり易い人となり難い人がいるとすれば、人によってこのセロトニントランスポーターの分子に異常があるかも知れないわけです。だからこういう遺伝子を調べると、こういう病気になり易いか、なり難いかというのが判るといふ考え方が現在出てまいりました。

IV - 3 生活意欲と分子機構 (受容体異常と行動特性)

今、セロトニンのお話をしましたが、また、元に戻ります。今度はドーパミンという物質について考えます。ドーパミンという物質ができないネズミを造ってみました。ドーパミンがないとネズミはどうなるかという、なにもしない。じっとして、水も飲まない、ご飯も食べない、友達とも遊ばない。そのまま20日位で死んでしまうというネズミが造られる。つまり、生きる意欲が無いネズミが造られたわけです。このネズミにドーパミンを造る薬を投与します。L-Dopa とう

いう物質を投与しますと L-Dopa が脳の中に入ってドーパミンを造っていく。そうすると2時間位でドーパミンがたくさんできるのですが、そのドーパミンがある時だけ動き始めて、ご飯を食べたりする。友達と遊んだりする。ところが、ドーパミンが無くなると一切何もしなくなる。

つまり人間の意欲というのは、ドーパミンという物質が決めているのではないかということが判ってきた。こういう研究がだんだん進みますと、例えば、皆さんもご存じの覚醒剤はどこに効いているか、覚醒剤を脳に打つと覚醒剤は今度はドーパミントランスポーターにくっつくことが判り、トランスポーターをブロックしますからドーパミンが出っ放しになって元に戻っていかなくなるわけです。そうすると、ドーパミンが過剰になるという状況が、幻覚症状、被害妄想という症状ではないか、こういうことがだんだん明らかになってまいりました。

注意欠陥多動性障害という病気がありますが、これは ADHD という病気です。この ADHD にはリタリンという治療薬が非常に良く効きます。このリタリンは実はドーパミントランスポーターに結合することが判ってきました。ということはどういうことかと言うと、この注意欠陥多動性障害というお子さんはもともとトランスポーターの分子の機能がおかしいのではないか。そうすると動き回って落ち着きの無い子供になる。落ち着きの無い大人も結構いますが、そういう人かもしれません。落ち着きの無い子供さんというのは生まれつき何か遺伝子に異常がある可能性がある、こういう考えが出てきたわけです。あとで申しますが、ドーパミントランスポーターの遺伝子にやはりある特定の型を持っている人が、この ADHD が多いということが判ってきて、それらが私たちの行動の素因になっている可能性があるということが最近の研究で明らかになりました。

クロロクロマジンという薬は分裂病の治療薬なのですが、この分裂病の治療薬もドーパミンの受容体に結合することが明らかになってきました。即ち、私たちの行動に脳の中

の物質の行き来が非常によく効いていて、その物質の行き来に関係するような遺伝子がおかしいいろいろな病気が出てくる。また、そういう行動の素因になり得るということが判ってきたわけです。即ち、私が言いたいのは、例えばドーパミンの受け取るレセプター、受容体に遺伝子変異があれば、意欲や薬物常習の素因である可能性がある。意欲が非常にある人と無い人というのは遺伝子が違う可能性があるというわけです。

IV-4 探究心と遺伝子

こんな話があります。ここにいらっしゃる皆さんはどちらかに入るとお思いますので見てください。それはドーパミンの受容体というのが脳の中にあって、グジャグジャしている分子なのですが、ここにいらっしゃる皆さんは人によって、その途中の繰り返し数が2つの人と4つの人と7つの人がいるというわけです(図-13)。

これは皆さんから毛髪をもらえばこのように遺伝子診断がすぐできます。2の人と4の人と7の人は線が違うところに出てきますから、皆さんから遺伝子を探って調べると、例えば、一番右の人を見てください。Kという人を見てください。この人は4というところと2というところに線がでていますから、この人は2の遺伝子と4の遺伝子を持っているということが判ります。これは皆さん遺伝子を必ずお父さんとお母さんから一個ずつ貰っていますから2個あるわけです。どういう遺伝子を持っているかが判るわけです(図-14)。

そうすると、先ほど話した繰り返しが多ければ多いほど、人間の行動でよく遺伝すると言われていた新奇探求行動に効いているということが判ってきました。皆さんはどちらか見てみてください。新しい強烈な経験を望む性格がノベルティシーキングが高いと言います。これは強烈なセンセーションが得られるのだったら少し位のリスクは厭わなくて、一般的に衝動的で、気まぐれであり、短気で、浪費家であって、ドライブが好きで、バンジージャンプが大好きだ、ジェットコ

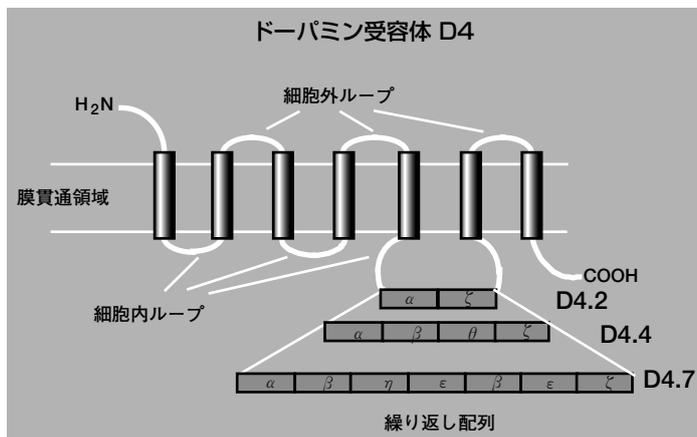


図-13

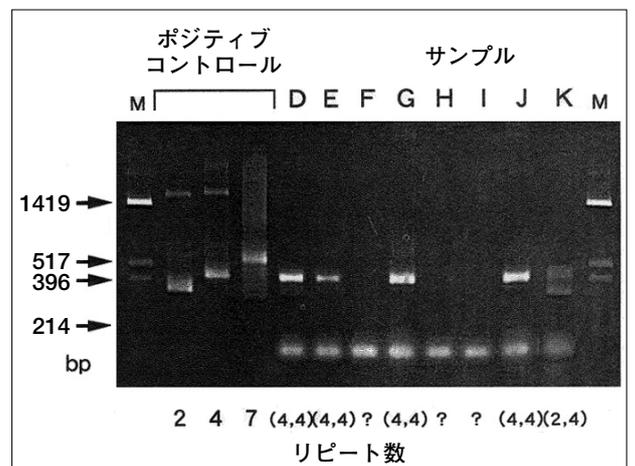


図-14

ースターが好きで、研究をやる時も必ず新しいDNAチップなどを取り入れて研究をやっている、知らないエキゾチックな場所へ旅行するのが好きで、新しいレコードが出ると直ぐ買うようなタイプの人。こういうタイプと、安寧を求めて非常に堅実な性格で、研究でも一切危険を冒すのは嫌いで、この道一筋という方がいて、一般的に非常に気長で、質素であり、古い友人と付き合い、環境の変化を好まず、電車に乗るときも同じドアから乗るといったタイプの人間です。

イスラエルとアメリカからこの特性が遺伝する、その遺伝子が先ほどの遺伝子であるという発表があった。これは面白い、もし行動にこういう遺伝的な要因が効いているのであれば非常に面白いわけです。例えば、私の大学の学生100何人かを調べますと、例えば新奇探究というのは非常に探究心があり、その辺に虫がいると必ず触ってみるというタイプの人と、踏みつけてしまうタイプの人がいるわけです。この探究心がある人、もう一つは切れやすい人というのが点数で出てきます。

右から2列目が平均点で、例えば損害回避というのは神経質の指標です。将来の不安があるとか、そういう神経質の指標も点数で出てきます。右側に書いてある8、8というのはこれは実は私の点数で、私は全く将来の不安を感じない楽天的な人間であるということが直ぐ判ります。一番下の固執と書いてあるのはねちっこさを示す指標で、うちの研究室の女性で、私が怒ると一時間でもじっと自分の意見を通すまでそこに座っている学生がいますが、その女性はこの試験をすると8点位を採ります。それで、多分確かだろうと思っているのですが……(表-2)。

このテストで新奇探求性が先ほどのドーパミン受容体の遺伝子に関係あるというのが結果です。例数は少ないのですが、例えば男性の新奇探求性の値、先ほど言った衝動性とか、新奇探求とか、全部で4つ項目があって、それを足し算した値がここに出ています。例えば先ほどドーパミン受容体の遺伝子が2と4の人、繰り返ししが4と4の人が日本人に非常に多いのですが、それでも少し差が出た。このように遺伝子によって素因の差が出てくるわけです(表-3)。

この場合はドーパミントランスポーターの遺伝子型を一定

表-2

| 大学生115人の性格 | | | 私 |
|------------|----------|-------------|---|
| 新奇性探求 | 探究心 | 6.53 + 2.40 | 8 |
| | 衝動性 | 4.24 + 2.20 | 8 |
| 損害回避 | 将来の不安 | 5.61 + 2.54 | 0 |
| | 不確実性への恐れ | 5.96 + 2.00 | 7 |
| 固執 | | 3.80 + 2.00 | 4 |

にして測定していますが、こういうことでひょっとして人間の性格と遺伝との関係があるのではないかと。私は細胞にこの繰り返しをもつタンパク質を造らせて、タンパク質の機能がどう違うかということ調べて、確かに機能の違いがあることが、今判っています。このように遺伝子というのは、これで性格が100%決まるわけではなくて素因になるわけです。

これに関連して不登校のお子さんを調べた例があります。今のドーパミン受容体の遺伝子も調べたり、不登校ですから朝起きられないということで、この会場にも専門の先生がいらっしゃいますが、生体リズムの遺伝子等をいろいろ調べてみて、不登校とそうでないのと差があるかどうか調べる。こういう研究は結構日本でたくさん行われているわけですが、この不登校とか自閉症とか多動障害などの問題のあるお子さんの遺伝子を調べて、差があるかどうかを今見ているところですが、今のところあまり差が無い。こういうのは、例えば性格に関係する遺伝子20個位をいっぺんに調べないとも判らないのではないかとというのが現状です。

IV-5 オカルトと科学の境目

このようにして遺伝子を調べると、私たちの素因とか、そういうのが判る。面白い発表が『NATURE』という雑誌にされました。皆さんご存じかもしれませんが、これは脳です。癲癇の人の脳で、この脳の矢印のところに針を突っ込んで、刺激をした。その時、角回という部分を電気刺激すると、この人は非常に面白いことを言うようになったのです(図-15)。それは『私の心が私を抜けて、天井から私を覗き込んでいる』というようなことを言いはじめたわけです。これはどういうことかと言うと、ご存じの臨死体験と呼ばれていて、死にそんな人でよく行われることで、自分が死の淵に入った人は、お医者さんが自分の息を吹き返そうとしているのを遠くから見ている、などいうことを昔からよく言っていたわけです。

科学者は「そんな馬鹿ことを」と皆思っていたわけです。ところが、この脳のここを刺激するだけで同じようなことが

表-3

| 新奇探求性と衝動性との関係 | | | |
|---------------|------------------|--------------|-------------|
| | DRD4の 遺伝子型(n) | 新奇探求性* | 衝動性* |
| 全サンプル | 2/4 (15) | 19.07 (4.53) | 3.40 (1.99) |
| | 4/4 (77) | 20.90 (6.11) | 4.36 (2.25) |
| 男性 | 2/4 (8) | 17.88 (3.14) | 2.63 (1.77) |
| | 4/4 (35) | 21.11 (6.01) | 4.74 (2.37) |
| 女性 | 2/4 (7) | 20.43 (5.68) | 4.29 (1.98) |
| | 4/4 (42) | 20.71 (6.26) | 4.05 (2.12) |

DAT1の遺伝子型を10/10に固定した時

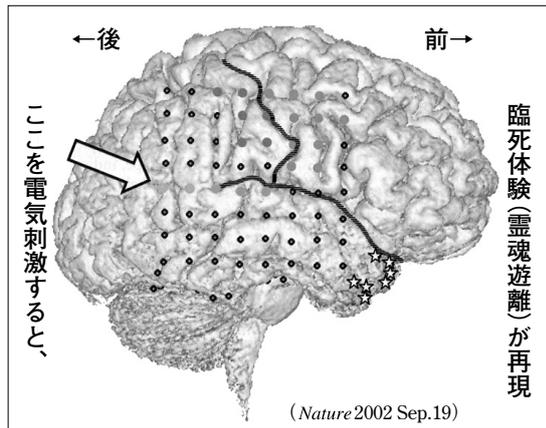


図-15

起こる。もし、これが本当だったら、再現性があるって誰でもこういうことが起こるのだったら、臨死という今まで科学の範疇に無かったようなことが、これは単に脳の問題であり、脳のこの辺に異常がある人がそういうことを起こす可能性が

あるということが明らかになってきたわけです。そうだとしたら、脳の研究というのは、もう少し深いところまでいくかもしれない。だから私の言いたいことは、例えば、マインドコントロールなども、ひょっとして判るかもしれない。今、オウム真理教とか宗教に一途になる人がいっぱい世の中にいらっしゃいますが、そういうことも、ひょっとして脳の研究で判るかもしれないというのが私の印象です。攻撃性、暴力などは、ある遺伝子を潰すだけでネズミは暴力的になるわけですが、そういう全体像が今判ってきているところです。

V 結語

心の研究というのは、私たちが思っている以上に面白いところに入ってきて、遺伝子を調べることで、病気ではなくてそういう素因がある、そういう病気になり易い人とか、そういうことがこれから判るのではないかと思ひ、私もこういう研究をやっていこうと思っております。皆様の中で興味のある方がいらっしゃいましたら、是非一緒にやっていきたいと思ひます。ご清聴ありがとうございました。

コスメトロジー研究雑感

平成 12 年度 研究助成

コスメトロジーとナノ微粒子

小野 努

コスメトロジーというのは単なる化粧品の域に留まらず、医学的な分野まで広がりをもつ奥の深い学問だと本研究助成を受けて改めて感じました。実際に、私の回りにも乾燥肌やアトピー性皮膚炎に悩む女性がいることを考えると、コスメトロジーがクオリティーオブライフ (QOL) の向上に果たす役割は非常に大きいと実感しているところです。また、私が行ってきたナノ微粒子中への生体分子の包括に関する研究がこのような学問にどのように貢献できるか考える良い機会も得たと思います。

約 50 ナノメートル以下のサイズの薬物伝達媒体があれば、角質細胞間隙から効果的に皮膚へ浸透することが可能と言われており、バリア層として存在する角質層を透過して皮膚中の生きた細胞層に効率よく働きかけることができます。それゆえ、生体成分などを包括したナノ微粒子を用いることによって高い皮膚浸透性をもつ化粧品あるいはドラッグデリバリーシステムが構築できると期待されます。現在行っているナノシリカ微粒子の場合、微粒子作製条件

が穏和であるため生体分子の包括に適しており、また微粒子表面の化学的加工が容易であることやシリカが生体不活性という性質から生体内研究を行ううえでは適した材料のひとつでありましょう。この包括担体を生分解性高分子などの材料へと応用できれば、より体に優しい機能性化粧品となると期待されます。

また最近では、肌の保湿成分でもあるセラミドなどのスフィンゴ脂質に関する研究も始めており、細胞機能に深く関与していると言われるスフィンゴ脂質代謝を制御できるドラッグとその伝達手法に関する研究にも興味を持っています。ナノ微粒子中へ酵素や遺伝子を包括し、その包括担体をドラッグキャリアとして皮膚からの有効な治療法が提案できればと期待しています。

近い将来、コスメトロジー精神をもった新製品が社会へ浸透することを願っていますし、私の研究も微力ながら本学問の発展に貢献できれば幸いです。

(九州大学大学院工学研究院)

平成 12 年度 研究助成

化粧品雑感

師井 義清

化粧の意味付けは、歴史的にも、性別によっても、個人によっても夫々異なっている。斯くして、斯も多様な化粧の定義は極めて困難である。しかし、今日の意味付けは、個人的な価値観に頼らざるを得ないように思える。「健康な笑顔は化粧に勝り、実に美しい」と思うのも個人的な価値観に過ぎない。化粧の意味付けは、化粧品を製造・販売している企業では誰もが受け入れてくれる一般的な内容になっている筈である。それを否定する積もりはさらさらないが、通り一遍の意味付けが出来ないのが化粧ではあるまいか。例えば、動物に関しては、鳥類では雄が外見上姿・體共に優れて見えるが、昆虫類では雌が優れて見えるのが一般的である。これには、生物学上それなりの理由がある筈である。個人によっても、外見の判断基準はまちまちである。

本来無粋な我が身にとって、化粧は想像の域を出ない。されば、「化粧は女性にとって何であるか」を問うてみた。

結果は次の三つに要約できる。身だしなみ、外出着、元気づけである。始めの二つは見た目と関係する。見た目が大切だとすれば、中身はさておいて外見を競うことに意味が出てくる。人間には視覚、嗅覚、触覚、聴覚、味覚の五感がある。他人に良い印象を与える、即ち見た目を良くするにはできるだけ多くの五感に訴えるほど効果的である。香水も化粧品に入るとすれば、化粧は最初の二つの感覚で好印象を与えるのに有効である。握手をし、会話を交わし、食事のもてなしまで進めば、他人も他人では無くなっていく。そこまで進むための入口にあるのが化粧であると見ることも出来る。平成 14 年の秋、パリでフランスの女性研究者と会話する機会があった。その際、仄かに匂う香水の効能を実感できた。化粧品も、最初の二感だけに留まらず、出来るだけ五感に訴える方向で研究開発は出来ないものか？ 脳を刺激して面白い話題が提供できるよう記憶を魅らせ、相手を空腹にして食事に誘えるような物質を化粧水中

に入れておくとか、出来ないものか。否、これは刑法に触れるかもしれない。「他人の視覚と臭覚だけに訴えて、自分と他人をどれだけ化かすことが出来るか否かで、勝負し

なければならぬ」のが、化粧品であろう。勿論、使用者の健康を害することが有ってはならない。何だか、つまらない結論になってしまった。(九州大学大学院理学研究院)

平成 12 年度 研究助成

コスメロジー雑感

山田 英俊

背が低い、胴の割に足が短い、顔が長いので5頭身である……悩み多きティーンだった頃の私のコンプレックスである。親からもらった健康な体である。見栄えがしないことを不満に思うと罰が当たること、骨格の問題だからどうしようも無いことを承知の上でのコンプレックスである。今となってはもう全く気にならない。いつから、なぜ気にならなくなったのかさえ覚えていない。オジサン化現象の一形態である精神的鈍感化が起こっているのだろうか。

不便が無いわけではない。結婚式では身長バランスを取るために無理矢理履かされた踵ばかり高い靴のために足がつってしまったり、珍しく座ったグリーン席のフットレストに足が届かず残念な想いをしたことがある。しかしその程度である。一方、飛行機のエコノミー席が苦にならない、私が車を運転すると後席の人がリラックスできるメリットもある。

どうにもならない事はさて置いて、どうにかなる事に関しては見栄えのために努力の仕様がある。その努力発現の一形態がコスメロジーではないかと受け取っている。コンプレックスを克服し精神的安定性を保ったり、生きる力を与えることさえあるという。気から来る病を未然に防ぐ人類に備わった上等な智恵だと思う。価値観の多様化で、その努力のベクトルが気になることもあるが、個人的には努力は素直に評価しよう、どうしようも無いことは大目に見ようと思っている。これは、そうして欲しいという希望の裏返しであるのかも知れない。

根本から変えてしまおうとする gene cosmetology などという言葉が巷にあふれ出す時代の到来を恐れながらも、一介の科学に携わる者として、「どうにかなること」を増やす一旦を担えれば幸である。(関西学院大学理工学部)

平成 13 年度 研究助成

コスメロジーにおける化学物質と生体との相互作用

清水 邦義

私は、ひょんなところから、化粧品原料の探索研究に足を突っ込んだ。いくつか有望そうな素材を見出すことはできたが、実用化への道は、極めて険しい。皮膚の構造の複雑さと、その調和の美しさに圧倒されながらも、本来持つその皮膚の持つ機能の長所を失うことなく、目的的作用だけを有する物質を見出すのは、なんと難しいことだろうか？ 近年、化学物質のリスク評価が盛んに叫ばれている。化粧品を含む機能性を有する化学物質というのは、別の言葉で表現すると、体に何らかの影響を与えるものである。それを、いかに制御して、人体に良い機能だけを抽出するか。本来、皮膚は、角質、表皮及び真皮と呼ばれる組織で、完全なハーモニーを奏でており、多機能性である。一方、天然抽出物を含む一連の化学物質は、本質的に多機能性であ

る。一般的に、化粧品を含む薬理活性物質を議論する際に、選択的な一つの都合の良い活性のみに目を向けがちであるが、それは、危険なことである。安全性試験をクリアし、認可されていたとしても、化学物質は、本質的に多機能性であることを認識して、その潜在的リスクから目をそらさないようにせねばならない。

先日、美白剤原料として使われていたコウジ酸の発がん性が報道されていた。当化合物の美白化粧品として用いた場合のリスクがどの程度あるかは、筆者は不明であるが、皮膚外用剤として用いた場合のリスク評価が極めて難しいことを物語っているのだろう。科学が進歩したとはいえ、化学物質と生体分子との、分子レベルの相互作用については、不明な点が極めて多い。いわんや、複雑な組織で構成され

ている皮膚全体への作用については、予測困難である。今後、皮膚組織の分子レベルでの挙動及び化学物質の相互作用を明らかにするサイエンスの必要性を強く感じる。真に

安全で、皮膚と調和し、ハーモニーを形成するような化粧品、科学の粋を結集してなしとげたいものである。
(九州大学大学院農学研究院)

平成 13 年度 研究助成

コスメトロジーと食品化学の融合

受田 浩之

日常我々が口にしている食品には生命活動を営むための栄養成分が含まれている。さらに最近では、食品が単にエネルギーとして役に立つだけでなく、病気の予防にも有効であることが明らかにされ、「特定保健用食品」の誕生へ結びついたことはご承知の通りである。

通常、経口摂取された栄養成分は腸管から吸収されることで体の隅々まで運ばれていく。吸収された成分は、体内に存在している様々な物質と混ぜ合わされ、それらが特に生合成されたものであるか、食品に由来するものか、薬として摂取されたものかは区別できなくなる。もちろん肺や皮膚から吸収された物質も存在しているので複雑である。食品化学に携わっている研究者は、主に経口摂取を唯一の吸収経路として研究を行っている。しかしながら吸収された後の食品成分の運命を考えると、有用な食品成分の摂取経路を経口のみ限定して考えるのはもったいないように思えてきた。たとえば食品として有効な成分を呼吸器や皮膚から吸収させて、健康の維持・増進に役立たせることはできないだろうか。

今回、貴財団にご採択頂いたテーマはこのような考えに基づき、本来経口で摂取されていた食素材をガス状にして呼吸器、あるいは経皮で吸収させ、病気を予防しようというコンセプトである。経口で摂取させる場合と比べて鼻や皮膚からであれば特に食事時間を設ける必要も無く、有効な成分を常時環境中に維持しておける。問題は揮発性成分の中に、病気予防に役立つ成分が存在しているかどうかである。今回、我々は爽やかな香りとして知られるカンキツの精油成分に活性酸素を消去する作用やチロシナーゼ活性を阻害する働きがあることを明らかにした。この結果は将来、香りによる美白効果や、皮膚の老化予防が可能になることを示唆しており、化粧品に含まれる香りが感覚的な役割に加え、もっと高次な病気予防機能まで担えることを予感させる。

食品化学とコスメトロジーの融合で新しい機能を持った化粧品を誕生させることを期待しつつ今後もこの研究を発展させていきたい。
(高知大学大学農学部)

平成 13 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

中野 実

辞書を開くとコスメトロジー = 美容とある。化粧のない妻と、当分化粧をしない娘（1歳）を持つ私には、このテの話は苦手であるが、研究助成いただいたことに感謝しつつ、少々述べさせていただく。

私もついこの間まで若者であったはずなのだが、今の学生たちを見ているとギャップを感じてしまうようになった。茶髪がフツーであり、みんな携帯を手放せなくなった。私が大学院に進学した頃は、ポケベルを持っている人もまばらであったのに。この10年で世の中は大きく変わり、それとともに人々の考え方も変わってきているように思

う。これは、コスメトロジーについても言えるのでは（少々強引な話の展開か）。

今の化粧品には、保湿性とか、肌本来の力を呼び起こす、などの色々な機能が重視されるようになった。また、化粧は、そのひとの心を映したり、隠したり、変えたりするパワーを持つことも理解されている。つまり、化粧の役割ははただ単に表面上の美を追究するだけのものではなくなり、体と心の内面から美しさを引き出す手段になったのである。また一方で、 GANGURO のように誰が見ても美しいとは思えないものでも、「= 女子高生」といった、一つのス

テーマを形成する手段として用いられたりもする。また、この例は化粧がその時代、世相を色濃く反映するものであることを表している。

これらを踏まえれば、コスメトロジー研究とは、常に時代の最先端で社会のニーズに応え、人間の生命と精神の本

質を追究する研究であると言うのは言い過ぎであろうか。さて、10 数年後はどんな時代で、ガングロを越えるどんな化粧が流行っているのかと考えると、娘を持つ親として少し心配になるが…。 (京都大学大学院薬学系研究科)

平成 13 年度 研究助成

コスメトロジーとインターネット検索

中辻 洋司

コスメトロジーという名前はかなり専門的で一般には余り普及していないようだ。というのは、この小文を書くに当たって研究室の学生（大学院工学研究科院生）5、6人に聞いてみたところ、残念ながら誰一人としてコスメトロジーを耳にしたことがないという返事であった。もちろん、コスメチックであれば化粧品ということは彼らはすぐわかったのだが、それからコスメトロジーは連想できなかったようだ。恥ずかしながら小生もコスメトロジー研究振興財団の存在によってその言葉とその意味するところを知ったのが最初である。

ところで最近、わからないことや困ったことがあるとインターネットでとりあえず検索してみる習慣がついている。そこで、ヤフーのホームページを立ち上げ、検索のところで「コスメトロジー」と入力してみた。すると130件のページの一致があり、結構あるものだなと最初は思った。しかしながら、内容を一つずつ見てみると、実はそうではないことがわかってきた。まず、その先頭には「コス

メトロジー研究振興財団のホームページ」とある。その他のものも大半は当財団に関係しており、研究者が業績欄に当財団の援助を受けたことを記したHPも多数見受けられる。なるほど、コスメトロジーといえばコスメトロジー研究振興財団が代表しているのだなと妙に納得してしまう。確かにわずかではあるが、おなじみの化粧品会社のHPもあってコスメトロジーの解説をしているが、これらは例外的な存在で、どうやら我が国ではコスメトロジーはこの財団のためにあるような言葉らしい。何でも外来語がそのまま入って定着する我が国のことでもあり、また、化粧品というすべての人が使うものを対象としている学問なので、大手化粧品のCMにでも使ってもらえば、コスメトロジーという名前もすぐに定着するかも知れない。それがどうしたといわれれば言葉もないが、小生が貴財団から援助を受けたことにより、少なくとも小生の周りの学生だけはコスメトロジーとは何かを知ったことだけは確かである。

(大阪大学大学院工学研究科)

平成 12 年度 研究助成

コスメトロジーと分析化学

小谷 明

この度、貴研究振興財団の研究助成をいただき、心から御礼申し上げます。

私の所属する研究室は総合テーマとして「高性能分析法の開発とその生体機能解明への応用」を掲げる、いわゆる分析化学の研究室です。誰でも簡単に、短時間に、少ない試料で測定できる方法を開発するのが主な研究です。

今回、貴財団から本研究が選ばれたことをきっかけに、皮膚の状態の評価法について考えるうちに、デパートの化粧品売り場で、センサーのようなものを使って、お客様個

人のお肌に適した化粧品を提案するコーナーがあることを思い出しました。分析化学者の性といひましようか、何を測定し、どのような結果をだして判断するかということに、とても興味を持ちました。しかし、売り場のお客様、店員はほとんど女性のため、こういうチェックを男性がしてもらうのはいささか抵抗がありました。そこで、私の妻と義妹に頼んで、付き添いというかたちで、化粧品売り場に行ってみました。二人がチェックを受けているのを隣で観察していましたが、その時は、マイクロスコープで皮膚表面

を拡大し、肌のきめ細かさや皮膚の厚さを観察したり、皮膚の油分と水分をセンサーで測定して、それらの結果から皮膚の状態を4つのパターンに分類し、判定するものでした。きめ細かい肌の状態、皮膚の油分と水分の理想的な割合など、とても勉強になりました。妻達より、私のほうがいろいろ聞いていたので、店員さんもさぞ不思議に思ったかもしれません。二人とも皮膚の油分、水分ともにいい状態であり、特に、妻は皮膚の水分が平均より10倍も多いという結果が得られました。妻の皮膚の厚さは普通でしたが、義妹の方は皮膚が薄いのでとてもデリケートな肌であ

ることがわかりました。同じ血のつながった姉妹でも、肌質がこうも違うのは驚きでした。

最近、オーダーメイドの化粧品に注目が寄せられていることから、個人の肌質を評価することは重要であり、評価項目が増えても、それらを簡単に測定できる方法が必要になると考えられます。本研究で構築したHPLCは遊離脂肪酸組成の個人差などを簡単に評価できる方法として活用できると思います。今後開発する新たな分析方法も皮膚の評価に応用できればと考えています。(東京薬科大学薬学部)

平成 12 年度 研究助成

ヒトの皮膚の奥深さと厚さ 谷 覺

コスメトロジーの研究助成金をいただき感謝し、お礼を申し上げます。

同時に、この研究を通してヒトの皮膚に関して色々なことを考えるきっかけになった。まず、人の皮膚の多様性と特異性である。肌の色に関して、ヒトほど多様性に富む動物が、他にいるのだろうか？我々が研究する実験動物ではモルモットのように有色有毛の動物もいるが、ほとんどはアルビノ化したラットで、元々は黒毛である。このような有毛の動物には皮膚にメラニン細胞があるのかどうか、筆者には分からない。ヒトの場合、肌の色は白(?)、ブラウン、赤色、黄色、黒等があり、色調に差はあるが、メラニン細胞があるといわれている。一方、写真で見るとゴリラは黒い肌で、ニホンザルは黄色く、チンパンジーはその中間のように見える。中国にいる、孫悟空のモデルのキンシコウ(金絲猴)は、さしずめ白人といったところか。次に、毛の生えていないむき出しの皮膚を持った哺乳動物はどの位いるのだろうか？ブタ、ゾウ、サイ、カバ、クジラ……。思い出すのもなかなか難しい。ヒトでも毛が申し訳

程度に生えているので、むき出しの肌という訳ではないのかも知れない。しかし、象の皮膚が日焼けして黒くなったなどとはあまり聞いたことがない。

このような皮膚の多様性は類人猿から始まったのかも知れない。このように考えると、ヒトの肌は、元来服を着るようにならざるを得ないのが当然だとも考えられる。地球環境に対応するために、日差しの強いアラブの女性がベールで覆うのも、熱帯アジアやアフリカで色の付いた泥や植物の粉末を塗るのも根本は同じであろう。地球温暖化による急激な地球環境の変化に対応し、従来何万年もかけて適応してきた肌を守るために、何かで肌を覆うのが人類がこの地球で生き延びていくための手段であろう。その覆うものとは正に機能性化粧品であろう。折角、化粧品を使うのであれば、より美しく、より肌を為になれば、それに越したことはない。「化粧品は人類を救う」かも知れない。

ひるがえって、他人のそしりを面の皮の厚さでカバーするようになった小生は、進化の最先端をいっているのかも知れない。(城西大学薬学部)

平成 12 年度 研究助成

コスメトロジーと klotho 遺伝子 倉林 正彦

皮膚の老化防止はコスメトロジーの最も重要な課題の一つである。私たちが発見した klotho マウスは、非常にユニークな老化モデル動物として位置づけられている。「ヒ

トの老化に類似した徴候がマウスに現れる」のであるが、マウスは1~2年という寿命を全うして死亡する間際になってもそのような老化徴候は示さないで「マウスの老化」

とは異なり、話はややこしい。つまり、「ヒトの老化をマウスでみる」ということになる。遺伝子工学を用いた最新の研究ツールではあるが、この辺りを間違えてはならないということである。

さて、この klotho 遺伝子は最初マウスで発見されたが、私たちヒトにも存在することが明らかになっている。klotho 遺伝子の働きを完全に欠損する（ホモ欠損）マウスには、寿命の短縮（約8週間）、動脈硬化、異所性石灰化、骨粗鬆症、肺気腫、などがみられる。そして皮膚真皮層の菲薄化、皮下脂肪層の消失、脱毛などのヒトの皮膚老化に類似した所見がみられるのが興味深い。私たちの身体では、顔や背格好に個人差があるのと同様に、さまざまな遺伝子の働き（発現）の個人差も存在する。klotho 遺伝子の働きの個人差（遺伝子多型など）が存在するとすれば、これら

の老化徴候の現れやすさにも個人差があるだろう。加齢、日焼けなどさまざまなストレスによる皮膚のダメージをどのくらい消去できるか、どのくらい健康な皮膚に修復できるのか、といった能力が klotho 遺伝子の働きの個人差に依存している可能性もある。

皮膚の老化の出現を少しでも遅らせ、可能であれば若々しい皮膚を取り戻すこと、これによって美しく豊かな人間生活を実現することがコスメトロジーの目標である。老化モデルマウス「klotho」を研究することは、「不老不死」を実現することを目標とするものではない。「klotho 遺伝子を皮膚に導入する」などといえおよそ情緒を欠くかもしれないが、将来「klotho 蛋白」や「klotho 遺伝子の働きの助ける成分」を配合した化粧品が実現し、世の女性が幸福になるとしたら素晴らしい。（群馬大学医学部）

平成 13 年度 研究助成

美^{さと}しき人の郷とコスメトロジー

杉山 俊博

秋田県の観光パンフレットを開きますと、「美」の冠のついた秋田がいくつあるか、ご存知ですか。代表的なものは秋田美人、秋田美酒、日本三大美林秋田杉、美味しい秋田米……。秋田美人について例えると、それは容姿の美貌よりも、きめ細かな色白肌への称賛。酒、杉、米もきめ細かい滑らかさが決め手といわれます。”と書かれています。そこで「秋田の美」についてふれたいと思います。

秋田県は小野小町の時代から美人の里とされています。秋田美人には、色白できめ細かい健康な肌、豊かな髪といった伝統的なイメージがあります。肌色の白さについては、冬場の日照時間の少ないこと、ヨーロッパやアジアとの混血などが理由としてあげられています。秋田美人研究で知られている湯沢市の医師、杉本元祐さんの調査（高校生4000人）によると、秋田県人の肌の白色比率は平均29.6%、全国平均の22.0%を大きく上回っていたそうです。

食べ物との関連では、秋田では麴を使用した自家製の味噌や漬け物などを多く摂ります。麴には脂質と蛋白質からなる複合蛋白質が多く含まれていて、肌を滑らかにする効果があるといわれています。

特に秋田のお酒は大変美味しいことで有名です。日本酒はもともと、老化の三大原因と呼ばれる紫外線、活性酸素、乾燥を防ぐ効果があるといわれています。これに加えて美白や育毛の効果までも持ち合わせています。最近話題のコウジ酸 kojic acid (5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyrone) は、日常的に麴（酒粕など）を扱う人の手が白くなることから発見されました。抗菌作用や酸化作用、シミやソバカスの原因となるメラニン色素形成の抑制作用があることや、保湿効果もあることから、今日ではバイオ技術によって作り出されたコウジ酸はいろいろな美白化粧品に応用されています。また、コウジ酸を含む養毛剤、育毛剤には、老化して発毛力が衰えた頭皮や毛根に働きかけ、育毛を助ける効果が確認されています。このような秋田美酒の美容効果が、色白で髪ゆたかな秋田美人を育てているのでしょう。

私たちの研究室は、秋田産の麴菌・納豆菌や白神山地の放線菌から産生される生理活性物質に注目して、これをコスメトロジー分野へ展開しようと考えています。

(注) 最近、コウジ酸に発癌性の疑いが指摘され、その使用が見合わされています。（秋田大学医学部）

平成 13 年度 研究助成

細胞内制御因子とコスメトロジー

永沼 章

皮膚がん発症率が増加しているが、その原因のひとつが紫外線である。我が国では紫外線から皮膚を守るためのスキンケア商品が数多く販売されており、これらの使用が皮膚がんの発症率をいくらかでも低下させているものと予想される。皮膚を紫外線から守る方法は沢山あると思われるが、皮膚細胞が本来有する防御機構を充進させるのも有効な方法ではないだろうか。ビタミンEなどの抗酸化因子が紫外線の細胞障害性を軽減することが知られているが、細胞内には酸化ストレスに対する防御因子としてグルタチオン、チオレドキシニンなどの還元作用を有する物質やカタラーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、メタロチオネインなどフリーラジカルを除去する蛋白質群が存在するので、これら防御因子の細胞内濃度を上昇させたり、活性を高めたりすることによって

紫外線から効率良く皮膚を守ることが可能になると思われる。このような効果を皮膚細胞に与える化合物や方法を見出したり確立したりすることは容易ではないが、理論的にその有効性は大きいと期待できる。我々もこのような考えから、抗酸化作用を有する誘導性蛋白質であるメタロチオネインを対象としてその合成誘導剤の検索を行ってきた。残念ながら、未だ実用可能な化合物の発見には至っていないが、ヒノキチオールをはじめその候補となり得る化合物をいくつか見出している。このような新しい理論に基づいた新しいコスメトロジーの展開が、これまでにない画期的な効果を生みだして皮膚がんの予防などに貢献するのではないだろうか。コスメトロジーがこれまで以上に発展して、付加価値のある新しい化粧品が開発されることを願っている。

(東北大学大学院薬学研究科)

平成 13 年度 研究助成

コスメトロジー観と本研究の位置付け

武田 和久

コスメトロジーとは人が美しく心地よく生活するあり方だと思ふ。しかしこんな表現は曖昧なもので、個人のコスメトロジー観は一見多様である。肌を美しくしたい、脱毛を防ぎたい、老いてもなお美しくあり続けたいなど、強いて言えば身体的に理想の状態を願う人たち。黒髪を金髪にしたり、ピアスなどの身体の修飾に一所懸命な人たち。一方、精神的に『内なる美しさ』を追求する人たち。さらにこの頃は、コスメトロジー観に男性、女性の違いが薄れて来た。いやむしろ、女性に近くなったと言うべきか。

こんな多様な要求の中に普遍的な研究課題を見出すとすれば、何か。精神的にもむろん同様なのだが、身体的に如何に健康であり続けるかは重要な問題の一つである。医学的に私達の肌(皮膚組織)は、ウイルス、細菌、紫外線などの様々なストレスから私達を守っている。あまりにも当然すぎて意識されることはほとんど無いが、色素沈着や肌荒れなどコスメトロジーに関わる身体的な問題は、私達の肌の正常な生理機能による応答およびその破綻に起因す

る。したがって正常な肌の生理機能やその破綻の原因を理解することはコスメトロジーにとって重要である。様々な化粧法にとってもその知識は不可欠である。

最近は芸能界ばかりでなくスポーツ界でも金髪にする人々を頻りに目にするようになった。当初はそれに批判的な意見を耳にしたが、今はあまり聞かない。批判的となった本人たちが本来のスポーツにおいて私達を感動させてくれるからに他ならない。彼等は日々身体的能力の機能保持に努力していることだろう。心地よく生きる術として、化粧が仕事やその他様々な面でいい影響が期待できるならば好ましいことである。

本研究における Wnt という分泌性蛋白質はメラニン合成の調節(色素形成)や毛髪の成長に関与する重要な因子と考えられ、肌の生理機能の基本的理解に必須である。さらに将来 Wnt に関連して物質的発見、発明がコスメトロジー分野にもたらされる可能性を願いたい。

(東北大学大学院医学系研究科)

水チャネルと人のコミュニケーション

石橋 賢一

皮膚における水チャネルの研究は始まったばかりである。これまで細胞外物質による研究が主体であったが、AQP3 ノックアウトマウスの知見から細胞膜の輸送体とくに水チャネルの役割も重要であることが明らかになり、皮膚の保湿性の研究の方向に変化がおきると考えられる。プローブとして調べやすいので、それぞれの局所の皮膚での AQP3 の発現状況をしらべるとおもしろい結果がえられそうな気がする。例えば有毛のところと無毛のところの差、手のひらと手の甲の差、腹部と背部の差など。

さらに AQP3 に関しては次の二ヶ所での発現が興味深いと思われる。またこれは人のコミュニケーションともかかわるので重要である。1 つはまぶたである。ここは浮腫になると目があけられなくなるのでこまるであろうし、十分な弾力性も要求されるので水の出入りが厳しくコントロ

ールされていると考えられる。自然に二重まぶたになるのもこの微妙なバランスの上に成り立っているように思える。アイシャドウの例をみてもまぶたは表情のなかでも重要なポイントであり、もっと研究されてもよいと思う。もう一つは声帯の AQP3 である。いろいろな声をだすときには非常な高速で振動しているが、水を失わないように水のバランスが厳密にコントロールされていると思われる。その動物の出す声に応じた AQP3 の発現があるような気がする。アルコールを飲んだり、お風呂で歌うといい声で歌えるのも声帯の水の含有量と関係しているような気がする。従ってここにも AQP3 の関与が考えられる。生まれつき声の良い人はひょっとして声帯の AQP3 の発現が多いのではないだろうか。(自治医科大学薬理学教室)

コスメロジー研究に選ばれて思うこと

粕谷 善俊

コスメロジー研究振興財団からの研究助成は、現実的には研究テーマの推進に、また、精神的には助成対象課題に選ばれたという自負が研究遂行上の motivation に多大なプラス効果をもたらしてくれた。

これまで皮膚に関連するテーマを対象にしたことはなく、興味対象の細胞内分子がたまたま接触皮膚炎と関連することを見いだして、「生体作用、安全性に関する分野」で選んで頂いた。しかも、化粧品に関する知識は当然の事ながら持ち合わせておらず、はたして本助成にマッチしているのだろうかという疑問を持ちつつも、一応の研究成果を上げ報告書を提出できたことは、個人的には感慨深い。また、逆に助成対象に選んで頂き、特に本コラムを書くに当たって、友人から化粧品を選ぶ基準を聞くことで、化粧品に関して

考える機会が持てたことも貴重な経験となった。

「安全性」は化粧品を含めた生体への適用物質に課せられたハードルである。特に化粧品に関しては、消費者の商品別危害情報件数で常にトップにランクされ、その利用者数および使用頻度の点から高いハードルを突きつけられていると感じる。美の追究と安全性の両立が化粧品の理想的な方向性と思われ、また、本研究助成はその観点に根拠して成立していると理解している。研究者にとっては、研究成果の社会還元への直結は 1 つの理想である。その意味で、本研究が化粧品の安全性推進の一助になることを期待しつつ貴研究振興財団の益々のご発展を祈っております。

(千葉大学大学院医学研究院)

平成 12 年度 研究助成

きれいになって、気分よく!

高橋 都

私の研究テーマは、がん治療を受ける人の暮らし全般に関わっている。究極のゴールは、人が命にかかわる病いを得ても自分らしく暮らし続けられるよう、医療現場や社会の環境を少しでも整えることだと思っている。今回取り上げた Look Good ... Feel Better プログラムを初めて知ったのは、もう 8 年前のことだ。がん・化粧・ボランティアという取り合わせには一見何の脈絡もなさそうだし、私は普段減多に化粧もしない。それでも興味をひかれたのは、パンフレットやビデオに登場する女性患者たちの表情が、化粧前後で一変していたからだった。何が彼女たちをこれほど変えるのだろうか？

今回アメリカで実際に患者セッションとボランティア養成セッションに参加し、その魅力の一端を理解することができた。患者セッションは何となく静かに始まるのだが、進行するにつれ参加者の笑顔が増え、声が大きくなり、会場が賑やかな井戸端会議のようになっていく。普通、がん患者は治療をこなすのに必死で生活を楽しむ余裕はほとん

どないし、周囲も特別扱いしがちである。しかし、たった 3 時間のプログラムのあいだに、化粧を通じて女性たちは自分自身と向き合い、意識的に自分の優先順位を上げ、見せたい自分になるためのコントロール感を取り戻していくのだ。必ずしもメイクの出来の良し悪しは重要ではない。化粧という身近な行為を通じて楽しもうとする姿勢がプログラムに満ちあふれ、それが参加者を内側から変えていくように感じた。まさに、Look Good ... Feel Better (きれいになって、気分よくなる) 効果なのである。そして、ボランティアとしてプログラムを支える美容専門家たちの深い共感と配慮、そして外見の問題への認識の高さも印象的だった。

漠然と興味をもっていたプログラムを体験し、その効用を実感する機会を与えてくださったコスメトロジー研究振興財団に、心から御礼を申し上げたい。今後は、賛同者を増やして Look Good ... Feel Better の国内展開を目指したいと考えている。(東京大学大学院医学系研究科)

平成 12 年度 研究助成

微笑む化粧

玉置 育子

これまで私は何度か失笑されたことがある。そんな失笑されたときには必ず「何の研究をしているのですか？」と質問をされ、「化粧文化の研究をしています」と答えた時である。

どうやら失笑した人たちの言い分は皆一緒のようだ。「化粧の研究なんか…」というのである。多くの人々は研究は難しく、わからなくて…というのが“研究”に対する思い込みの相場らしい。

化粧には、チャラチャラしたイメージが付きまとうから、そんなものを研究にするの？ という戸惑いを感じるようだ。また、“化粧文化”と聞くと、さらに戸惑いは募る。文化という言葉に含まれる多様な意味がそうさせているの

だろう。たとえば、日本文化と聞くと茶道や華道のような高尚なイメージを彷彿とさせる一方、文化包丁や文化住宅という簡易的なイメージがあるからだ。化粧は果たして高尚なのか？ そんな質問は愚問だろう。化粧はこうすべきという雛形がない状態でカメレオンのようにころころと色を変えながら我々の生活に浸透しているような気がする。

化粧に愛着をある程度感じるものが個人的にある。だから、化粧は笑われる対象ではなく、微笑みかけられるような存在であってほしいと願っている。そして、そんな化粧を研究対象としての“化粧文化論”を支える一人であり続けたいと思う。(武庫川女子大学大学院家政学研究科)

コスメロジー雑感

鈴木 則子

私は日本の医療社会史の研究の一環として、化粧史研究にここ何年か取り組み、勤務先の大学でも、日本やヨーロッパの化粧史を講義の中にとりいれている。だが、「女性はなぜ化粧するのか？」という問いかけを、私は人から受けたことがない。それはどうも多くの人が、美しくなりたがるのは女性の本能だから、こんなことは聞くまでもないと思っているかららしい。すると化粧しない女性というのは、女性としての本能の欠落した人間であったりするのだろうか。ちなみにかくいう私も、仕事の時以外は滅多に化粧をしない。

実は化粧をしたり、ダイエットをしたら、誰でも綺麗になれるという考え方が日本の文献に登場するのは、江戸後期以降である。江戸時代前期の貝原益軒という医者・思想家は、その著書の中で、「容姿は努力しても変えられないから、無駄なことに時間を費やさずに、中身を磨きなさい」と女性たちに説いているくらいである。美しくない女性が、いくら化粧しても痩せても、厚化粧で痩せた醜婦にしかたれないとしたら、だれがこのようなことに血道をあげるだろうか。

これに対してヨーロッパは、早い段階からキリスト教が「化粧は、神が下さった容姿に手を加えて別物に仕立て上げる、悪魔の仕業」と位置づけてきた。どうもヨーロッパ人は、化粧で相当変身可能と信じてきたらしい。

日本のメディアが、努力次第で誰でも綺麗になれる、と喧伝し始めるのは殆ど幕末、19世紀以降であり、それは化粧品業界の発展や、都市の女性の購買力の向上などと密接に関わっている。

誰もが綺麗になれるという夢は、時には女性にとって、誰もが綺麗であらねば、という強迫観念ともなる。最近の小中学生のプチ整形流行の新聞記事を見て、幼くしてすでに、容姿が美しくありさえすれば幸せになれると信じ込んでいることにも驚く。美貌など一過性のもの、諸行無常だと言ってみても、昨今のアンチ・エイジングの技術の展開と言説の攻勢の中で、そんな言葉はかき消されてしまいそうだ。今世紀、科学の発展は、高齢化社会を迎えてもとりあえず見かけは若く美しい男女であふれた世界を実現するのだろうか。
(奈良女子大学生生活環境学部)

痴呆高齢者の笑顔とコスメロジー

鈴木 みずえ

わが国では高齢化が著しく、2000年から介護保険が施行されるようになり、高齢者の介護の問題が注目されます。レーガン元大統領が自らアルツハイマー病であることを公表しました。このニュースが非常に衝撃的であったのは、アルツハイマー病を初めとした痴呆症が、私たちが一生を掛けて培った知識、記憶を破壊するだけでなく、人としての人格や尊厳までも脅かす病気として考えられてきたからです。介護保険以前、痴呆性高齢者が興奮したり、便をこねるなどの問題行動がみられると、なすすべがないために対処的につなぎ服を着せたり、鍵のついた個室に入れていました。しかし、痴呆性高齢者は単に記憶や認知に障害を起こす病気であり、問題行動は、自分がなぜここにいるのさえもわからないなどのストレスによって生じることがわかってきました。そしてケアの方向性も変わってきました。

痴呆性高齢者の表情、特に笑顔は快の情動反応の一つであり、ケア評価あるいは残されたコミュニケーション機能として重要な役割を果たします。現在、我々の研究グループは、今回の痴呆性高齢者の主観的QOLを初めとして、動物介在療法、音楽療法などの研究を行っていますが、これらは痴呆性高齢者の笑顔を表出してもらうための研究とも言えます。私が音楽療法で関わったFさんは、認知機能の低下が著しく、介護への抵抗があり、興奮行動が激しい方でした。しかし、音楽療法では「船頭小唄」を聴いた時には、懐かしいと涙ぐみました。それ以降、笑顔を見せたり、懐かしい歌では目を潤ませて泣いているような、笑っているような表情を何度か見せました。笑顔がみられると同時に問題行動と呼ばれる介護の負担となる行動も少なくなりました。

コスメトロジーは、より美しくなるための皮膚や化粧品に関する研究が主流かと思われませんが、今回、痴呆性高齢者の主観的評価と表情分析をテーマとした地道な研究にも助成を賜ったことを深く感謝申し上げます。さらに高齢者

がいつまでも笑顔などの豊かな感情の表情においても表出して暮らしていけるための研究をめざしていきたいと思えます。貴財団のますますのご発展をお祈り致します。

(三重県立看護大学)

平成 13 年度 外国人招聘助成

アジアとの架け橋

招聘研究者：タイ チェンマイ大学医薬部助教授 Yanee Pongpaibul

受入責任者：東京理科大学理工学部教授 阿部 正彦

数年前、やはり貴財団の助成のお陰で、タイ国チェンマイ大学薬学部のラダ・ワウングパヤプクル助教授を招聘することができ、かなりの成果を上げることができました。特に、同助教授は本来の明るい性格の性もあり、日本における異文化生活も十分に堪能され、かつ、学問的刺激もかなり受けておられた様子です。そのことが分かりましたのは、ラダ先生の同僚でもあり、同時に彼女の博士課程の指導教官でもあるヤニー・プングパイブル博士（今回の招聘者）から伺ったからです。

チェンマイ大学の薬学部では、無数に生育する熱帯植物から抽出した天然物を化粧品に応用するための開発研究が盛んであり、学科としても化粧品学講座として設置する予定のようです。また、同学部の正面玄関近くには一般人を対象とした薬局が設置されており、驚いたことに薬学部の先生方が直に薬品や化粧品の販売に携わっています。したがって、化粧品と密接に関係しているコスメトロジー財団の助成により、特に化粧品製造技術に優れている日本社会に身を置くことに強い関心をもっています。このような事情により、ヤニー先生の来日の機会が設定された次第です。

日本におけるヤニー博士の研究目的は、スキンケア製品

を目的としたリポソームの調製とその物性評価を行うことにあります。特に小生が感じたことは、滞在中、小生と同年輩にもかかわらず、実に意欲的に、精力的に動き回っていたことです。例えば、リポソームの調製法を種々学ばれた直後、ご自分で調製されたりリポソームの形態を観察するために、休みもとらずに当研究室の博士課程の学生に指導を受けながら、原子力顕微鏡、透過型電子顕微鏡などの測定法を短時間で習得され、熱心に観察されておられました。一方、学生に与えた影響も大きく、特に同助教授は学位を長期間のアメリカ留学で取得されたためにコミュニケーションの手段は自ずから英語となりましたので、当研究室の学生の英語のレベルアップに大きく貢献していただきました。

嬉しいことに、ごく最近、当大学ではチェンマイ大学との学術交流の締結を目指して準備を始めることになりました。もし、この締結がうまく進めば、近い将来、交換教授制度や交換留学生制度も完備され、アジアがもっと近くなるような気がしてきます。

そんなチャンスを、財団が与えて下さったものと深く感謝している次第であります。

平成 14 年度 外国人招聘助成

海外交流とコスメトロジー研究振興財団の国際交流助成

招聘研究者：台湾 台湾大学皮膚科教授 余 幸司

受入責任者：聖マリアンナ医科大学皮膚科助教授 相馬 良直

研究者の国際交流は、年々盛んになっている国際学会で交流するのも1つの良い機会ではあるが、同じテーマの海外の研究者を講演に招待し、あるいは招待されることにより、より深い交流となり、若い研究者に留学のチャンスが出来ることもある。

しかしながら、最近の日本経済の低迷、医療費の逼迫などの関係で研究費は減少し、ましてや国際交流に使用できる費用は年々乏しくなっている。

色素産生細胞（メラノサイト）およびメラニン産生の研究はコスメトロジーと密接な関係のある分野である。この

分野の研究者は、日本色素細胞学会（Japanese Society of Pigment Cell Research, JSPCR）という学会を設立し、共に知識の交換、共同研究企画の場となっている。化粧品・医薬部外品を産出する企業の研究者も、両学会の会員であり活躍している。

この関係もあり、これまで JSPCR の年次大会（東京）と IFPCS の 3 年に 1 回開かれる国際会議（名古屋）の計 2 回の学会に、コスメトロジー研究振興財団から国際交流助成をいただいた。この助成のお陰で世界的に有名な米国の Weston 博士とイギリスの Bennett 博士を招待し、交流を深めることができた。

平成 15 年 2 月、聖マリアンナ医科大学皮膚科が、第 66 回日本皮膚科学会東京支部学術大会を開催した。当研究室

の研究テーマの 1 つはメラノサイトであるため、メラノサイトの異常に関する講演を企画した。今回も活発な討論があった。尋常性白斑の世界的権威である台湾大学皮膚科の余幸司教授をお招きすることが出来た。素晴らしい講演で活発な討論があった。

このためもあり、余教授が本年 1 月まで勤務していた高雄大学から留学生が、本年 7 月から約 1 ヶ月間共同研究のために聖マリアンナ医科大学の皮膚科に来ることになった。

以上のように交流が出来たのもコスメトロジー研究振興財団と関連が深く、国際交流助成を頂戴したお陰である。心より御礼申し上げたい。

付 録

●
事業報告書（平成14年度）

役 員
●

事業報告書

(自平成 14 年 4 月 1 日 至平成 15 年 3 月 31 日)

《研究助成等の選考関連》

| | | | | |
|------|----|------|--------------|---|
| 2002 | 5 | 7 | 公募開始 | 全国 259 ヶ所の大学・病院・研究機関等、関係学術雑誌 8 誌 当財団 HP 他 2 HP に掲載 |
| | 7 | 5 | 公募締切り | 応募数 87 件 |
| | 9 | 3 | 選考委員会(分科会 1) | 素材、物性に関する分野の選考 |
| | 9 | 11 | 選考委員会(分科会 3) | 精神、文化に関する分野の選考 |
| | 9 | 13 | 選考委員会(分科会 2) | 生体作用、安全性に関する分野の選考 |
| | 9 | 26 | 本選考委員会 | 各分科会の結を総合的に判断して研究助成 19 課題、国際交 流援助 1 課題を選考 |
| | 11 | 20 | 表彰贈呈式 | 記念講演：「人のこころと遺伝子のはたらき」 東京大学大学院総合文化研究科教授 石浦 章一氏 |
| | 11 | 20 ~ | 助成課題の公表 | 関係学術雑誌 7 誌、当財団 HP に掲載 |
| 2003 | 2 | 中旬 | 持ち回り企画委員会 | 平成 15 年度の研究助成課題選考に関して |

《理事会関連》

| | | | | |
|------|----|----|------------|--|
| 2002 | 6 | 20 | 常理事会 員の | 平成 13 年度事業報告ならびに収支決算報告、第 7 期評議 選任、理事長及び専務理事の互選、選考委員の選任、株主と しての議決権行使について、報告事項 |
| | 11 | 20 | 常理事会 | 平成 14 年度（第 13 回）研究助成者等の承認 平成 15 年度事業計画及び予算案の承認、選考委員の補選 |

《評議員会関連》

| | | | | |
|------|----|----|-------|---|
| 2002 | 6 | 20 | 常評議員会 | 平成 13 年度事業報告及び収支決算報告、第 7 期理事及び監 事の選任、報告事項 |
| | 11 | 20 | 常評議員会 | 平成 14 年度（第 13 回）研究助成者等の承認 平成 15 年度事業計画及び予算案の承認 |

《その他》

| | | | | |
|------|----|----|-------------|-------------------------------------|
| 2002 | 6 | | 財団活動の情報更新 | 当財団 HP へ平成 13 年度計画・事業報告を記載 |
| | 9 | | コスメトロジー研究報告 | 「コスメトロジー研究報告」9 号の概要を当財団 HP に記載 |
| | 11 | 20 | 基本財産 | 保有株式が無償分割により 874,023 株から 961,425 株へ |
| | 12 | | コスメトロジー研究報告 | 「コスメトロジー研究報告」10 号の概要を当財団 HP に記載 |

第 13 回 研究助成を受けられたかたがた

(J：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 |
|---------|--|--------------------------|----------------------------------|
| J-02-01 | エストロゲンの皮膚老化防御における分子機構の解明 | 機能再生学 分子移植学 産科婦人科学 | 金沢大学大学院医学系研究科教授 井上正樹 |
| J-02-02 | 正常皮膚角化における蛋白質脱イミノ化の役割解明 —瑞々しい肌をいつまでも保つために— | 皮膚科学 皮膚老年学 蛋白質化学 | 東京都老人総合研究所研究員 石神昭人 |
| J-02-03 | 環境に適した新規な糖型界面活性剤の開発と応用 | 界面・コロイド | 東京理科大学理学部助手 吉村倫一 |
| J-02-04 | 生体内環境を再現するポリホスフェートヒドロゲルの調製と機能 | 機能性高分子材料学 バイオマテリアル学 | 東京医科歯科大学生体材料工学 研究所助教授 岩崎泰彦 |
| J-02-05 | コラゲナーゼ抑制作用をもつ天然物の探索 | 天然物化学 | 千葉大学大学院薬学研究院教授 石橋正己 |
| J-02-06 | フレグランスの減量および生活習慣改善効果 —特に内臓脂肪、酸化ストレスに対する影響— | 内科学 | 福島大学保健管理センター助教授 渡辺英綱 |
| J-02-07 | 生体適合性超薄膜の吸水および保湿特性の評価 | 機能性薄膜 高分子化学 | 東北大学大学院薬学研究科教授 安斉順一 |
| J-02-08 | 毛包、汗腺、皮脂腺など皮膚附属器官の形成に関わる細胞内シグナル伝達経路の解明 | 分子生物学 | 東京大学医科学研究所教授 井上純一郎 |
| J-02-09 | 皮膚における生体リズムの分子機構 | 時間医学 分子生物学 細胞生物学 | 神戸大学大学院医学系研究科教授 岡村均 |
| J-02-10 | トリクロロ酢酸とフェノールの生体におよぼす安全性に関する研究 | 皮膚老化 皮膚科学 創傷治癒 | 和歌山県立医科大学教授 古川福実 |
| J-02-11 | 紫外線遮断剤用単分散球状酸化セリウムナノ粒子の低環境負荷な製造法の開発 | 無機材料化学 物理化学 | 千葉大学工学部助手 上川直文 |
| J-02-12 | 新規化粧品素材としての、コウジ酸、 β -ツツヤプリシン、 <i>p</i> -アミノ安息香酸、及び、アルブチンのさらなる高機能化を目的とした酵素的分子設計 | 酵素化学 生物工程学 | 岡山県立大学保健福祉学部専任講師 中島伸佳 |
| J-02-13 | 集合して生体に作用する有機分子の設計と合成および機能評価 | 有機合成 有機物理化学 | 東京大学大学院薬学系研究科教授 大和田智彦 |
| J-02-14 | 日本人と韓国人の化粧観の国際比較研究 | 化粧文化学 | 日本大学芸術学部非常勤講師 村澤博人 |
| J-02-15 | ヒアルロン酸水溶液のナノコットン効果の研究 | 物理化学 | 理化学研究所先任研究員 丑田公規 |

| 管理番号 | 研究課題 | 分野 | 代表研究者 |
|---------|--|-----------------------------|---|
| J-02-16 | リボザイムを用いた皮膚細胞新規老化遺伝子の単離と解析 | 分子生物学 | 筑波大学応用生物化学系教授 柳澤 純 |
| J-02-17 | モーションキャプチャーシステムを用いた、スマイルトレーニング前後の笑顔の動的変化に関する研究 | 顎口腔機能再建学 歯科材料学 | 大阪大学大学院歯学研究科助教授 荘村 泰治 |
| J-02-18 | コラーゲン経口摂取が結合組織（骨、皮膚）におよぼす作用 | 薬理学 生化学 整形外科学 皮膚科学 | 東京医科歯科大学大学院医歯学 総合研究科教授 春日井 昇平 |
| J-02-19 | 表皮細胞に対する機械的刺激の作用についての検討 | 皮膚科学 | 東京大学医学部附属病院講師 小宮根 真弓 |
| H-02-01 | 尋常性白斑におけるメラノサイト消失と再生の機序 | 皮膚科学 | 高雄医学院大学皮膚科教授 余 幸司 受入責任者 聖マリアンナ医科大学皮膚科助教授 相馬 良直 (敬称略・受付順) |

※第1回～12回の研究助成課題はホームページ (<http://www.cosmetology.or.jp/>) でご覧ください。

役員

平成15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(常勤) | 有本 亨 | (元厚生省薬務局安全課長) |
| 理事 | 磯邊 律男 | (株)博報堂相談役(元国税庁長官) |
| 理事 | 宇佐美昭次 | 早稲田大学工学部教授 |
| 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 | 高橋 久 | 帝京大学名誉教授 |
| 理事 | 新村 嘉也 | 高砂香料工業代表取締役社長 |
| 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(元厚生省援護局長) |
| 理事 | 廣部 雅昭 | 静岡県立大学学長 |
| 理事 | 牧野 利孝 | 日本化粧品工業連合会専務理事 (元厚生省生活衛生局食品化学課長) |
| 監事 | 小田倉正典 | 公認会計士 |
| 監事 | 黒田 節哉 | 弁護士 |
| 評議員 | 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 (元厚生省大臣官房審議官) |
| 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 | 野田 裕充 | (株)コーセー常務取締役 |
| 評議員 | 野呂 影勇 | 早稲田大学大学院人間科学研究科教授 |
| 評議員 | 福内 靖男 | 足利赤十字病院院長 |
| 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 |

(専務理事以外は全員非常勤)

*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 03 (3564) 6731

コスメトロジー研究報告 Vol.11/2003

非売品

2003年9月1日発行

編集責任者 有本 亨
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 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 03 (3590) 5375
印刷 太陽印刷工業

記念講演

●
平成14年度記念講演 石浦章一
●

コスメトロジー研究雑感

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

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