

ごあいさつ

当財団は14年前の1990年に設立されました。人々が美しく豊かな生活を実現することに寄与するため、化粧品学の振興を目指して今日まで247件の研究に対して助成を行い、研究分野での海外交流を促進させるために受け入れ・派遣を含めて31件の助成をしてきました。

この14年を振り返ってみますと、素材や薬剤、あるいは化粧品そのものに関する研究から、肌の生理、肌細胞がもつ機能に関する研究、紫外線など肌に直接影響を及ぼす環境要因に関するものまで、さまざまな分野の研究を助成してきました。最近では化粧と心の健康に関する研究など、心理学の分野に関するものも増えてくるなど、新しい動きも見られます。

今回の研究報告書でも大衆文化と化粧の関係、顔の魅力に関する因子分析、歯の噛み合わせと顔貌の関係など興味深い研究がいくつも報告されています。もちろん、皮膚科学やナノテクノロジー、バイオテクノロジー等を駆使した素材研究など、化粧品の発展に結びつくものも数多く報告されていますし、研究分野での文理融合が進んでいることを実感いたしました。

本年4月より国立大学の独立行政法人化がスタートしましたが、知的財産の活用が注目されていることもあり、産学共同研究も今まで以上に進むものと思われまます。企業の側からの、大学や公的機関による研究に対する期待はかつてなかったほど高まっていますし、実際に大きな成果をあげていることも事実です。

当財団といたしましても、化粧品学のさらなる発展と体系化のために、分野の枠、さらには大学や公的研究機関など公私の別にとらわれることなく、真に優れた研究に対して積極的な助成活動を堅持していきたいと考えております。

今後とも皆様のますますのご協力とご支援をお願い申し上げます。

平成16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

- ・ ナノ構造配列制御を基盤とする光学活性材料の開発 2
山口大学工学部 鬼村 謙二郎
- ・ 再構築機能を有する新規の粘土材料の作製とその吸着特性 8
東京工業大学大学院理工学研究科 亀島 欣一
- ・ 独自のチタン反応を利用するムスク・ジャスミン系高級香料の実用的化学合成14
関西学院大学理工学部 田辺 陽
- ・ 環境に適した新規な糖型界面活性剤の開発と応用20
東京理科大学理学部 吉村 倫一
- ・ 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24
東京医科歯科大学生体材料工学研究所 岩崎 泰彦
- ・ コラゲナーゼ抑制作用をもつ天然物の探索31
千葉大学大学院薬学研究院 石橋 正己
- ・ 生体適合性超薄膜の吸水および保湿特性の評価35
東北大学大学院薬学研究科 安斉 順一
- ・ 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40
千葉大学工学部 上川 直文
- ・ 新規な化粧品素材としてのコウジ酸、 β -ツァヤプリシン、p-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45
岡山県立大学保健福祉学部 中島 伸佳
- ・ 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52
東京大学大学院薬学系研究科 大和田 智彦

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・ 接着分子シグナルを利用した皮膚老化防止の新戦略58
群馬大学生体調節研究所 的崎 尚
- ・ 皮膚の老化によるⅦ型コラーゲンの代謝及び遺伝子発現調節機構について63
弘前大学医学部 今 淳
- ・ 皮膚表皮細胞への生理活性タンパク遺伝子のデリバリーと分泌方向性の制御66
京都大学大学院薬学研究科 高倉 喜信
- ・ 早老性疾患遺伝子による皮膚線維芽細胞の老化とテロメア制御74
京都大学放射線生物研究センター 小松 賢志

目 次

- ・エストロゲンの皮膚老化防御における分子構築の解明78
金沢大学医学系研究科 井上 正 樹
- ・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-82
東京老人総合研究所 石 神 昭 人
- ・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85
東京大学医科学研究所 井上 純一郎
- ・皮膚における生体リズムの分子機構94
神戸大学大学院医学系研究科 岡 村 均
- ・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99
和歌山県立医科大学皮膚科 古 川 福 実
- ・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103
筑波大学応用生物化学系 柳 澤 純
- ・コラーゲン経口摂取が結合組織（骨、皮膚）におよぼす作用107
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 春 日 井 昇

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

- ・かみ合わせのずれが大きく笑った顔貌の非対称性に及ぼす影響114
大阪大学大学院歯学研究科 中 村 隆 志
- ・アトピー疾患者の自尊感情の向上を目指した集団認知行動療法の開発117
宮崎大学教育文化学部 富 家 直 明
- ・顔の魅力を規定する要因の実験計量心理学的分析124
東北大学大学院文学研究科 行 場 次 朗
- ・奇抜な化粧—文化の表現と表情？（ヴィジュアル系の顔：原因と影響）131
千歳科学技術大学 Johnathon John

■ 記念講演

- 平成 15 年度記念講演 『色白美人はなぜ永遠か —日本人の化粧に見られる美意識—』147
駒沢女子大学人文学部 石 田 かおり

■ コスメトロジー研究雑感157

■ 付 録

- 平成 15 年度事業報告173
- 役員一覧176

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

ナノ構造配列制御を基盤とする光学活性材料の開発

山口大学 工学部応用化学工学科

鬼村 謙二郎

Asymmetric synthesis of optically active compounds from prochiral substrate using chiral catalysts is a very attractive methodology in organic chemistry. However, removal of the expensive chiral catalyst from the crude reaction product after the completion of reaction is a tedious job. Polymer-supported catalysts are advantageous, as they can be recovered from the reaction product by simple filtration and can be reused, thus, making the process economically viable. A study of the addition of ketoester to α, β -unsaturated ketones in the presence of cinchona alkaloids as chiral catalyst has been reported. Polymer-supported cinchona alkaloids have been synthesized chemically. 2-Methacryloyloxyethyl isocyanate (MOI) is a bifunctional monomer with both a reactive isocyanate group and a polymerizable double bond, and is convenient and widely used for crosslinking agents. It has been reported that in trans-carbamoylation reaction catalyzed by 4-N,N'-dimethylaminopyridine (DMAP), the secondary -OH group of cinchonine was carbamoylated by MOI. This article describes the syntheses and polymerizations of new chiral cinchoninyl (2-methacryloyloxyethyl) carbamate (CIMOC) from 2-methacryloyloxyethyl isocyanate (MOI) and cinchonine. Radical homopolymerizations were performed with AIBN as initiator in suitable solvent in a sealed tube at 60°C. Number average molecular weights (M_n) of poly (CIMOC) were $2.6 \sim 11.8 \times 10^3$. Specific optical rotations ($[\alpha]_{435}$) of poly (CIMOC) were $+84.0^\circ \sim 0.72^\circ$ in THF. The polymers obtained were tested for their efficiency in catalyzing the Michael addition of ethyl 1-oxo-2-indan carboxylate to methylvinyl ketones. The Michael adducts using poly (CIMOC-co-styrene) showed higher enantio excess (20% ee) compared to those obtained by using non-polymeric catalyst CIMOC (14% ee) and poly(CIMOC) (13% ee). This method may be of importance in the synthesis of the compounds, where selectivity as well as mild reaction conditions is required by simultaneously replacing conventional catalysts with environment-friendly 'green catalysis'.

1. 緒言

天然蛋白質を構成するアミノ酸は主としてL体の α -アミノ酸である。 α -アミノ酸は、化学合成法、発酵法、酵素法等により製造される。化学合成法は大量合成には適しているが、ラセミ体が得られる。発酵法や酵素法では光学活性体を得られるが、多くの場合L体のみが得られて、D体の合成は困難である。そのためD体の化学合成法の確立が急務となった。この問題の解決策として、不斉合成が考えられる。従来の低分子不斉触媒は生成物の不斉収率および化学収率の向上を第一目標として開発され、幾つかの例は実用的レベルに達してきている。一方、高分子試薬または高分子触媒を有機反応に用いた場合、通常低分子触媒に比べ次のような利点が期待される。

i) 高分子触媒は主鎖構造、即ちモノマーや架橋構造の有無により溶解性を制御することが可能であり、均一系あるいは不均一系での不斉反応が行える。

ii) さらに反応終了後、濾過等の操作により反応系から容易に分離でき、再使用もできる。したがって高分子試薬、

高分子触媒を有機反応に用いることにより操作性を大幅に向上することができ、反応の自動化も可能と成りえる。このような利点を持つ高分子試薬、高分子触媒の側鎖に光学活性部位、即ち不斉配位子を担持した高分子を合成し、不斉合成反応に用いた場合、不斉源はほぼ定量的に回収され再利用することも可能となる。これら高分子触媒の性質を利用することで、省資源化、廃棄物の低減が実現でき、環境に優しい有機合成法と成りえる^{1, 2)}。

本研究では窒素の非共有電子対を利用した光学活性ルイス塩基触媒としてシンコナルカロイドを用いることとした。また、重合性官能基と不斉触媒部位の連結する場合、選択的に不斉触媒部位の特定官能基に導入する必要がある。この課題に対して本研究では重合性基と反応性基を合わせ持つ2-メタクリロイルオキシエチルイソシアネート (MOI) を用いることにした (Fig. 1)。

2. 実験方法

2.1 シンコナルメタクリロイルオキシエチルカルバメート (RMOC) の合成^{3, 4)}

合成経路を Scheme 1 に示す。

窒素雰囲気下でシンコナルカロイドとジブチルスズジラウラート (DBTDL) の THF 溶液に MOI を滴下し、40°C で 24 時間攪拌した。反応終了後、再結晶により精製を行い、無色の針状結晶として RMOC を得た。得られた RMOC は ¹H NMR, ¹³C NMR, 融点, 比旋光度を測定し、構造を確認した。



Synthesis of Optically Active Materials Based on Nano Structure

Kenjiro Onimura

Department of Applied Chemistry & Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Yamaguchi University

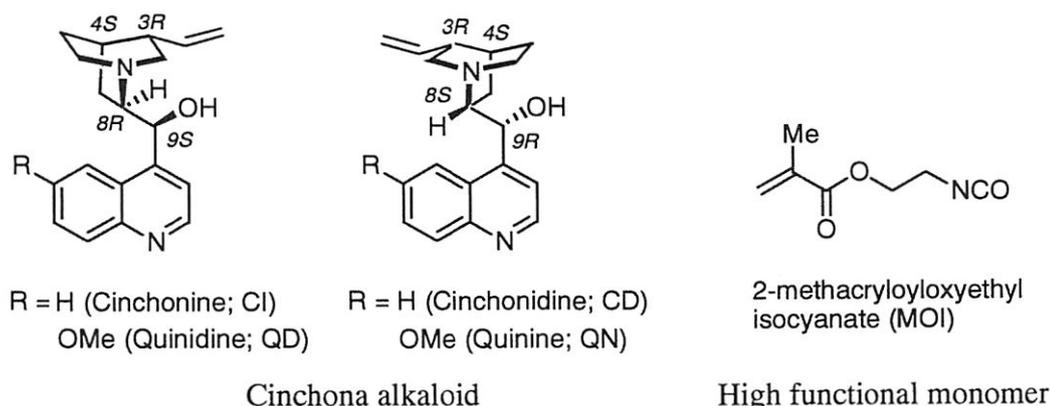
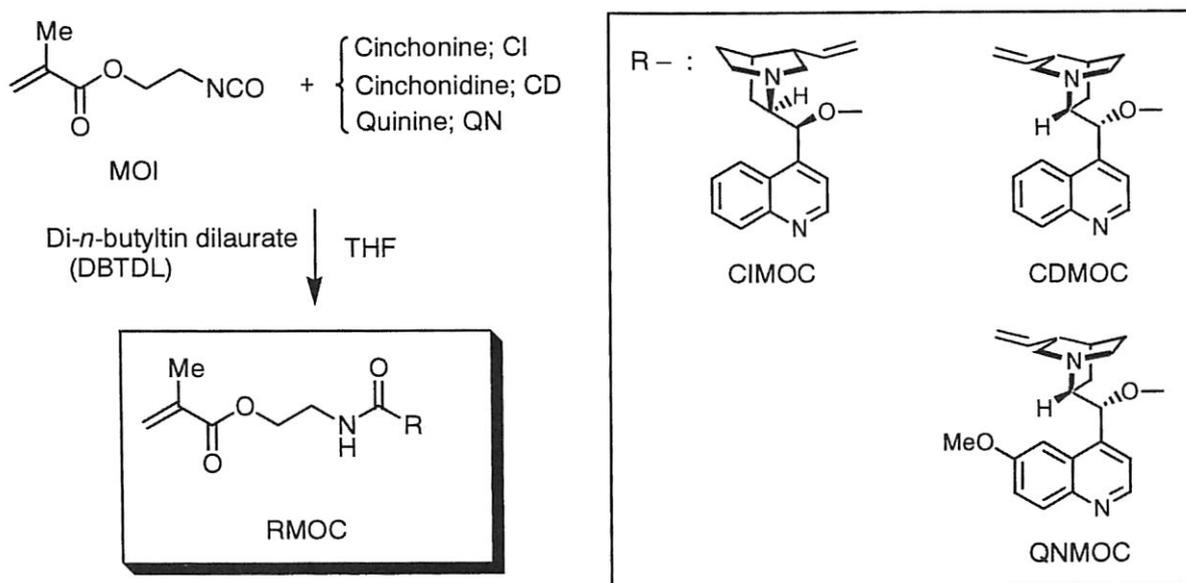


Fig. 1



Scheme 1

Cinchoninyl (2-methacryloyloxyethyl) carbamate (CIMOC):
Yield 75%, mp 113-115.8°C, $[\alpha]_{435} +110.4^\circ$ (c=1.0 g/dL, l=10 cm, THF)

Cinchonidinyl (2-methacryloyloxyethyl) carbamate (CDMOC):
Yield 52%, mp 143-144°C, $[\alpha]_{435} +0.7^\circ$ (c=1.0 g/dL, l=10 cm, THF)

Quininyl (2-methacryloyloxyethyl) carbamate (QNMOC):
Yield 53%

2.2 高分子不斉触媒の合成

反応管に所定のモノマーを秤量し、所定の溶媒にAIBNを溶解させた開始剤溶液を加え、60°Cで24時間重合を行った。重合後、大量のメタノールに投じて、さらにポリマーをTHF-メタノール系で再沈殿することにより精製した。

2.3 高分子不斉触媒を用いた不斉 Michael 反応

不斉触媒とエチル 1-オキソ-2-インダンカルボキシレート (EOIC) とのトルエン溶液にメチルビニルケトンのト

ルエン溶液を加え、室温で48時間攪拌した。反応後、不斉触媒を除き、Michael 付加体を得た。Michael 付加体の光学純度はCHIRALPAK AD (hexane/2-propanol=9/1) にて測定した。

3. 結果及び考察

3.1 RMOCのラジカル重合による高分子不斉触媒の合成

本研究で使用する不斉触媒部位を有するモノマーはシンコナアルカロイドとMOIを触媒存在下で攪拌することにより高収率で得ることができた。次に新規モノマーであるRMOCの重合性と旋光性について検討した。Table 1にRMOCのラジカル重合の条件及び結果を示す。種々の溶媒中においてAIBNを開始剤として60°C, 24時間重合を行った。Fig. 2にCDMOCとそのスチレン (St) との共重合体 (poly (CDMOC-co-St)) の¹H NMRスペクトルを示す。重合は6.04, 5.52 ppmの二重結合に由来するピークが完全に消失したことから、重合は完全に進行している

Table 1 Radical polymerizations of CIMOC (M₁) or CDMOC (M₁) with St (M₂) in THF (1mL) at 60°C^a

Run	M ₁	M ₁ in monomer mol%	Polym. time h	Yield ^b %	M ₁ in copolymer ^c mol% (wt%)	M _n ^d x10 ⁻³	M _w /M _n ^d	[α] ₄₃₅ ^e deg.
1	CIMOC	100	24	53.6	100	9.6	1.70	84.0
2	CIMOC	20.2	9	34.1	26.1 (60.4)	11.8	3.22	54.4
3	CDMOC	100	24	44.2	100	7.3	2.17	0.72 ^g
4	CDMOC	20.0	24	32.0 ^f	19.7 (51.4)	2.6	1.76	8.0 ^h

a) Initiator: [AIBN]=0.03 mol/L, M₁+M₂=0.5 g. b) *n*-Hexane insoluble part. c) By ¹H NMR. d) By GPC with standard polystyrene. e) c=1.0 g/dL, l=10 cm, in THF. f) MeOH:H₂O=1:1 insoluble part. g) c=1.0 g/dL, l=10 cm, in DMF. h) c=1.0 g/dL, l=5 cm, in THF

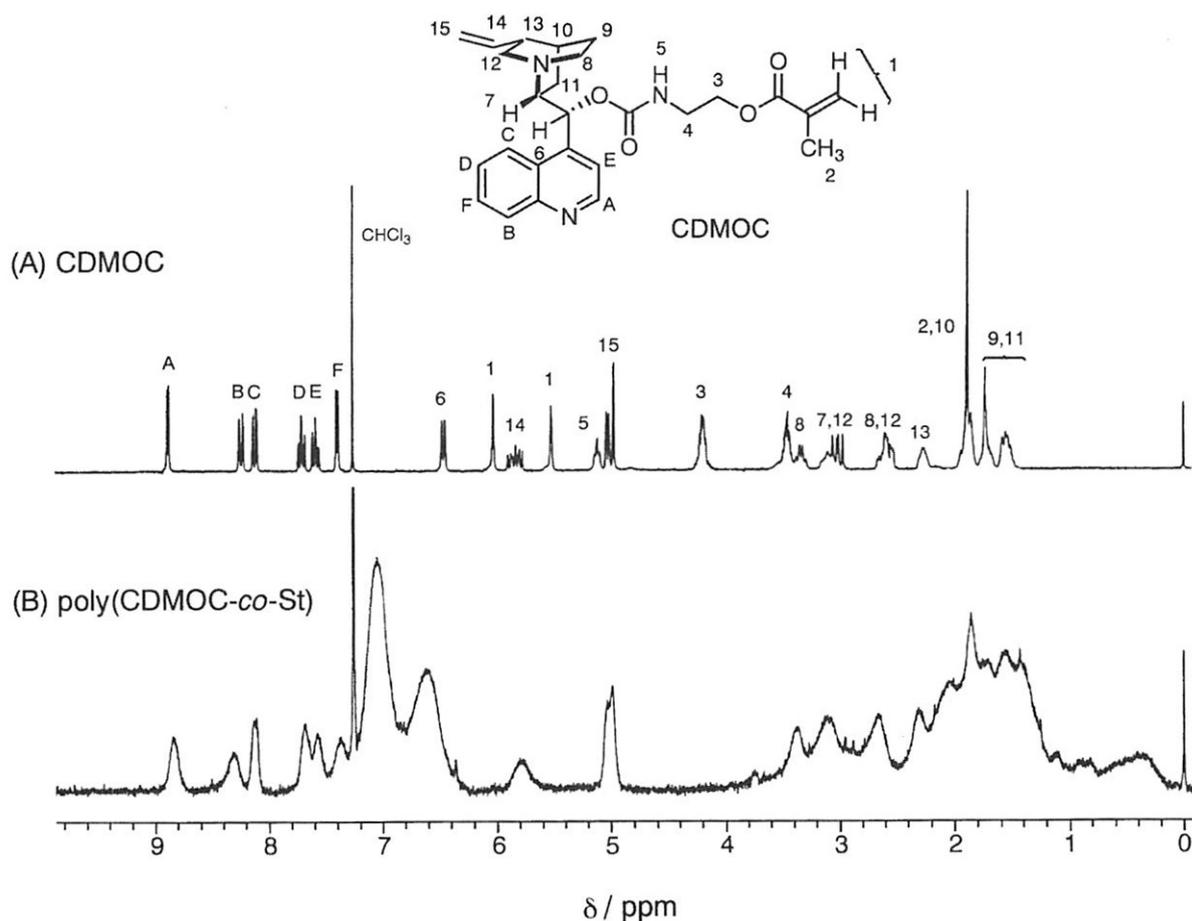


Fig. 2 ¹H NMR spectra for CDMOC and poly (CDMOC-co-St) (run 4 in Table 1) in CDCl₃ at 23°C (270MHz)

と判断した。また、共重合体の組成比は¹H NMR スペクトルから決定した。

得られたポリマーは殆どの有機溶媒には可溶であったが、poly (CDMOC) のみは DMF 以外の溶媒には溶けなかった。ポリマーの数平均分子量 (*M_n*) は 2.6 ~ 11.8 × 10³ であり、CDMOC 系ポリマーより CIMOC 系ポリマーの方が *M_n* は大きくなる傾向があった。poly (CIMOC) の数平均分子量 (*M_n*) が poly (CDMOC) より大きい理由として、重合中ある分子量以上の poly (CDMOC) が析出

したため重合が停止し、低分子量になった可能性があるが、肉眼で確認できる様なポリマーの析出は認められなかった。以前、DMF 中で得られた poly (CDMOC) は THF 中で得られた場合より分子量が大きくなることを報告している⁵⁾。その結果 poly (CDMOC) の *M_n* は THF 中では 7300、DMF 中では 21400 と溶媒効果を大きく受けた。この原因は明らかではないが、分子内あるいは分子間で高分子側鎖が水素結合等の相互作用によりクラスターを形成し、接近するため重合が阻害され、より極性の低い THF の方が低分子量になった

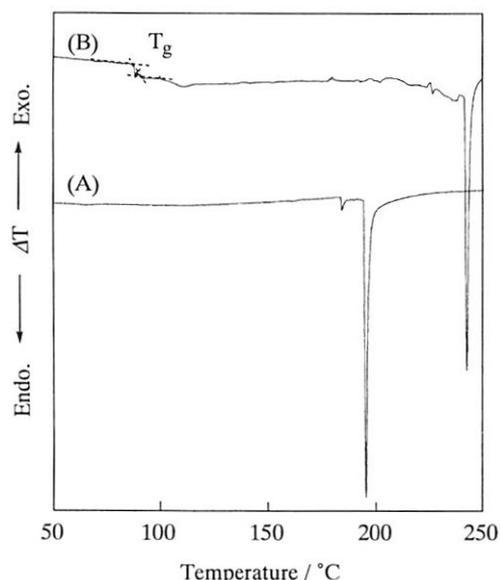


Fig. 3 DSC curves for (A) poly (CDMOC) (run 3 in Table 1) and (B) poly (CDMOC-co-St) (run 4 in Table 1). Heating from 30 to 250°C at a heating rate of 5°C min⁻¹.

可能性がある。しかし本研究の目的の高分子触媒として使用する場合、反応後の処理を考慮して低沸点である THF に可溶性ポリマーを合成したほうが有利と考えられる。

Fig. 3 に poly (CDMOC) および poly (CDMOC-co-St) の熱分析結果を示す (run 4,5)。poly (CDMOC) (A) は 196°C に融点による吸熱が観られるが、相転移による吸熱ピークは観測されなかった。しかし poly (CDMOC-co-St) では 89°C と 242°C に吸熱ピークが観測され、それぞれ

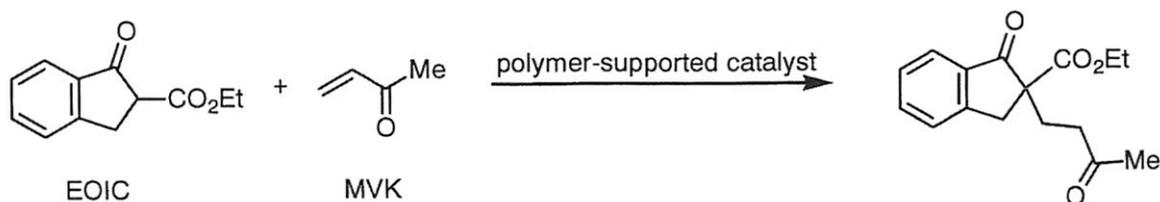
ガラス転移温度 (T_g) と融点と帰属した。

poly (CIMOC) と poly (CDMOC) の THF 中での比旋光度はそれぞれ + 84.0° と + 0.72° であった。poly (CIMOC-co-St) の比旋光度は + 54.4° であり、共重合体中の CIMOC ユニットの重量比とほぼ一致した。一方、poly (CDMOC-co-St) の場合は CDMOC と St のシーケンスに大きく影響を受けた。

3.2 高分子触媒を用いた不斉反応への展開

シンコナルカロイド類を用いた不斉反応として本研究ではシンコニジンのルイス塩基性を活かした Michael 付加反応について検討した (Scheme 2)。本反応終了後、濾過操作で触媒を回収でき、付加体はカラムクロマトグラフィーにより精製した。回収された触媒は ¹H NMR から反応前後で変化は認められなかった。エチル 1-オキソ-2-インダンカルボキシレート (EOIC) とメチルビニルケトンとのトルエン溶液に不斉触媒を添加することで行い、条件と結果を Table 2 にまとめた。

付加体の絶対立体化学は比旋光度の符号と既知の報告により決定した⁶⁾。モノマーの CDMOC を触媒と用いた場合以外は付加体の化学収率は定量的であった。この収率低下の原因はウレタン結合を側鎖に有する RMOC 及びそのホモポリマーは分子内または分子間で水素結合により複合体を形成すると考えらる^{3,4)}。そのため不斉触媒の活性が塩基性の低下や立体障害により著しく阻害されていることが推定される。この錯体形成は CIMOC より CDMOC



Scheme 2

Table 2 Enantioselective addition of methyl vinyl ketone to β -ketoester in toluene (3ml) at r. t.^a

Run	Catalyst	Time (h)	Yield ^b (%)	e.e. ^c (%)	Absolute config.
1	CIMOC ^d	99	100	14.3	S
2	poly(CIMOC) ^d	48	100	13.3	S
3	poly(CIMOC-co-ST) ^e	48	100	20.0	S
4	CDMOC ^d	72	40	10.3	R
5	poly(CDMOC-co-ST) ^f	72	100	20.4	R
6	QNMOCD ^d	96	85	9.2	R
7	NaH ^d	2	100	-	-

a) [methyl vinyl ketone]/[β -ketoester]=2. b) Isolated yield. c) Determined by CHIRALPAK AD (*n*-hexane/2-propanol=9/1). d) [Catalyst]/[β -ketoester]=0.05. e) [CIMOC in copolymer]/[β -Ketoester]=0.024. f) [CDMOC in copolymer]/[β -Ketoester]=0.018.

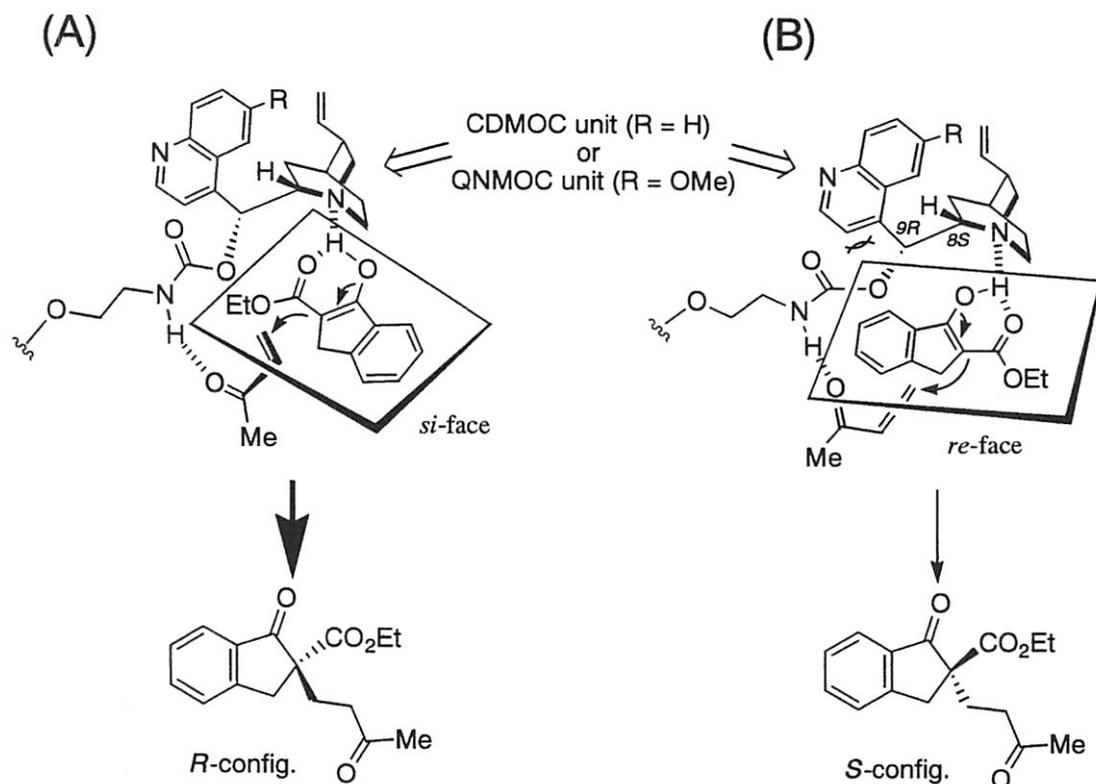


Fig. 4 Two possible orientations of enolate in the transition states of the cinchonidine or quinine derivative-catalyzed addition to a methylvinylketone: (A) leading to R enantiomer, (B) leading to S enantiomer.

の方がより強固に起こるため不斉反応や重合収率が低下したと考えられる。

モノマーである CIMOC や CIMOC ホモポリマーを触媒とした場合、得られた付加体の光学純度は 13 ~ 14% ee であった (Run 1, 2) が、共重合体 poly (CIMOC-co-St) を触媒とした場合、付加体の光学純度は 20% ee に向上した (Run 3)。CDMOC 系でも共重合体の方が光学収率は向上した (Run 5)。この立体選択性の向上はポリマーマトリックスの高次構造に起因していると考えられる。シンコニン系から得られた付加体は S 体が主生成物、シンコニジン系からは R 体が主生成物として得られている。またシンコナルカロイドの類縁体のキニンを用いた QNMOC においては R 体が 9.2% ee で得られた。シンコナルカロイドを不斉触媒に用いた場合、不斉選択性は C-8, C-9 位に大きく依存する。本不斉反応における遷移状態を Fig. 4 に示した。

- (1) シンコナルカロイドのキヌクリジン窒素が 1-インダノンの水素を引き抜き、エノラートが生成する。
- (2) ウレタン結合と MVK が水素結合により配位して 3 分子錯体を形成する。
- (3) エノラートの二重結合への付加は速度論支配により 2 つの経路が考えられる。
- (4) エノラートの si 面から付加体は R 体、あるいは re 面から付加体は S 体をそれぞれ与える。

CDMOC 系ではインダノンの芳香族部と触媒のキノリ

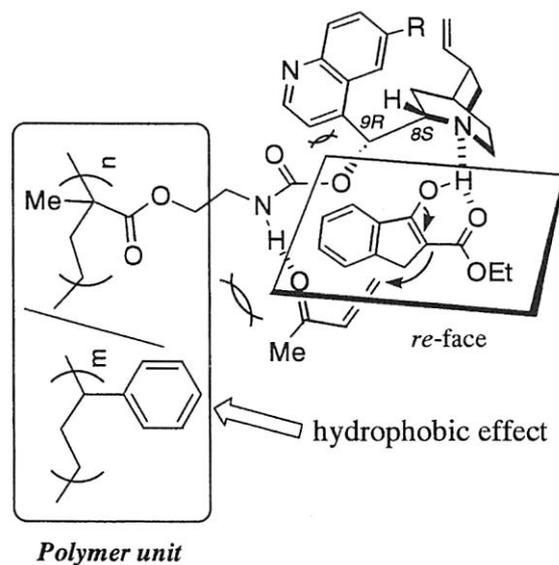


Fig. 5 Effect of polymer unit on stereoselectivity.

ン部の立体反発により R 体を主生成物として与えた。共重合体では疎水性のスチレンユニットが隣接しているため他の触媒部位との錯体形成を立体的あるいは活性部位の疎水性が増加し、その結果より強く基質を補足する事ため不斉収率が向上したと考えられる (Fig. 5)。

またシンコナルカロイドの不斉収率は 9 位の水酸基が重要な役割を果たすことが知られているが 7、本研究で用い

たRMOCやその重合体では9位をウレタン結合により重合性基やポリマー主鎖と結合している。そのため基質と不斉炭素との距離が離れ有効な不斉空間を構築することが困難になる。そのため一般的なシンコナルカロイド触媒の不斉収率よりも低くなったと考えられる。さらに9位以外に重合性基を結合させた高分子触媒を開発できれば高い不斉収率も期待できる。

総括

本研究ではシンコナルカロイドと側鎖に有するキラルメタクリレート誘導体を新規に合成し、単独重合およびスチレンとの共重合を行った。得られた高分子を不斉触媒として用いたMichael反応を検討し、その有効性や不斉選択性について検討した。高分子の溶解性の相違を利用して生成物の分離・精製を簡略化することに成功した。不斉選択性はスチレンとの共重合体の方が高い結果となり、触媒部位の有効利用が可能となった。不斉収率は通常のコナルカロイドを使用した場合より低下したが、重合性基を連結させる部位や不斉反応の最適化により今後高い不斉収率が期待できる。

謝辞

実験を担当した松崎 公平氏に感謝いたします。最後に本研究を遂行するにあたり助成金を賜りました財団法人コスメトロジー研究振興財団に心から感謝いたします。

(参考文献)

- 1) D. E. De Vos, I. F. J. Vankelecom, and P. A. Jacobs, Eds. In *Chiral Catalyst Immobilization and Recycling*, Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2000.
- 2) For a recent review on the use of polymeric catalysts see: (a) Q.-H. Fan, Y.-M. Li, and A. S. C. Chan, *Chem. Rev.*, **102**, 3385 (2002); (b) B. Clapham, T. S. Reger, and K. Janda, *Tetrahedron*, **57**, 4637 (2001).
- 3) (a) Y.-K. Lee, Y. Nakashima, K. Onimura, 他2名, *Macromolecules*, **36**, 4735 (2003); (b) Y.-K. Lee, N. Hisamitsu, K. Onimura, H. 他2名, *Polym. J.*, **34**, 9 (2002).
- 4) (a) Y.-K. Lee, K. Onimura, H. Tsutsumi, 他1名, *Polym. J.*, **33**, 411 (2001); (b) Y.-K. Lee, K. Onimura, H. Tsutsumi, 他1名, *Polym. J.*, **32**, 1007 (2000); (c) Y.-K. Lee, K. Onimura, H. Tsutsumi, 他1名, *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, **38**, 4315 (2000).
- 5) Y.-K. Lee, K. Yamashita, M. Eto, K. Onimura, 他2名, *Polymer*, **43**, 7539 (2002).
- 6) (a) M. Nakajima, Y. Yamaguchi, and S. Hashimoto, *Chem. Comm.*, **2001**, 1596; (b) M. Nakajima, S. Yamamoto, Y. Yamaguchi, 他2名, *Tetrahedron*, **59**, 7307 (2003).
- 7) A. Sera, K. Takagi, H. Katayama, H. Yamada, *J. Org. Chem.*, **53**, 1157 (1998).

再構築機能を有する新規の粘土材料の作製とその吸着特性

東京工業大学大学院 理工学研究科

亀 島 欣 一

Clay materials form an important group of inorganic layered compound and are useful materials with a great variety of applications as adsorbents, decolorizing agents, and ion exchangers. In this work, composites of smectite with layered double hydroxide (LDH) were synthesized by various methods and their porous properties and microstructures examined. Commercial saponite and co-precipitated LDH $[\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{CO}_3)(\text{OH})_{16}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ powders were used. Composites prepared by dry mechanical mixing, wet mechanical mixing and soft-chemical processing were characterized by XRD, FT-IR, XPS, SEM, TEM, and N_2 and H_2O adsorption and desorption. The specific surface area of saponite / LDH composites were intermediate between those of LDH and saponite. The value for the dry milled sample ($167 \text{ m}^2/\text{g}$) was smaller than for the other samples (about $250 \text{ m}^2/\text{g}$). The pore size distributions of the saponite / LDH composites differ from those of saponite and LDH, the peaks ranging from 1nm to 30nm according to the synthetic method. The resulting porous properties depend on the laminate structure. The specific surface area estimated from H_2O adsorption of the saponite / LDH composites were ranged from 326 to $390 \text{ m}^2/\text{g}$. These values were very higher than that estimated by N_2 adsorption because of peculiar adsorption of H_2O . A hydrophilicity of these composites was evaluated using a coefficient of specific surface area by H_2O and N_2 , described as $S_{\text{H}_2\text{O}}/S_{\text{N}_2}$. The estimated coefficient of the saponite / LDH composites were ranged from 1.2 to 2.1. The value for the dry milled sample (2.1) was extremely higher than for the other samples (1.2 ~ 1.5). Consequently, dry milling was the most effective method for modifying the porous properties of the composites. Furthermore, the reconstructing function of the laminate structure was controllable by heat treatment in the dry-milled composite.

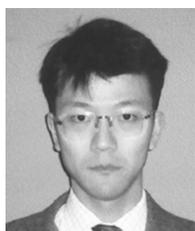
1. 緒 言

粘土は、粒径で言えば $2\mu\text{m}$ 以下の粒子のことを指す言葉である。その主成分は粘土鉱物であり、粘土鉱物の多くは無機層状化合物に分類される。無機層状化合物は、主に SiO_2 の層構造を基本とした積層構造から成り立っており、積層状態の違いで分類される¹⁾。この SiO_2 層の Si 原子は主に Al 原子に置換されることが多く、このために層が負に帯電する。これを補うために層間に陽イオンが配位しているのが一般的である。また、これとは逆に層が正に帯電した粘土鉱物としてハイドロタルサイトがある。これは $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 八面体層が層構造を構成し、Mg 原子の一部が Al 原子に置換している。このために層は正に帯電し、層間に負イオンが配位する。この一連のグループは層状複水酸化物 (LDH) と呼ばれる。どちらの物質も、層間を有する高比表面積な材料であり、イオン交換性能を持つ。

この粘土鉱物が持つ機能の中に「再生機能」がある。これは、物理的に層構造を壊された層状化合物が自己組織化して元の構造に戻る現象のことである。例えば、スメクタイトのように層電荷が弱い物質は、水中に投じるだけで層

が剥離してバラバラとなってしまう。このような性質を無限膨張性と言う。このバラバラの層は、乾燥時には再び元の 001 方向の積層を復元する。この機能を利用して、有機物、あるいは無機物をピラーとして層間に立て、細孔特性を制御する研究が行われている^{2)~5)}。これに対して、LDH は 500°C の焼成で層間の炭酸塩を完全に分解させた後に、試料を水中に保持させるだけで、元の構造にまで戻ることが知られている。これを再構築機能という。この時、溶液中の陰イオンを任意に制御することで細孔特性を制御する研究^{6)~8)} やイオン交換による有害物質の除去⁹⁾ に利用されている。

一方、異なる層状化合物が組み合わさった物質に、混合層鉱物がある。これは、例えば雲母の層間のアルカリイオンがスメクタイトの層構造で置き換わることで、各々の積層構造とは異なる新たな周期性が生じた鉱物であり、種々の系が研究されている^{10)~13)}。しかし、前述のような機能性を持つ物質ではない。天然鉱物のクロライトは、負電荷の層がスメクタイトと同構造、正電荷の層が LDH 同様のブルーサイト構造という異なる層状化合物の複合体である。クロライトでは多孔体特性は見られず、これは 2 種類の層が同サイズであるためと考えられる。ここで、比較的粒子の小さいスメクタイトと粒子成長が容易な LDH (ハイドロタルサイト) の組み合わせで多孔化を図ると、前述の各相の機能面が利用可能となり、新たな機能性の付与が期待できると考えられる。そこで、本課題ではスメクタイト / LDH 複合体を合成して、細孔構造と吸着性能の異なる新しい粘土材料の可能性を検討した。



Preparation of clay materials with reconstructive function and their adsorption properties

Yoshikazu KAMESHIMA

Department of Metallurgy and Ceramic Science, Graduate School of Science and Engineering, TOKYO INSTITUTE of TECHNOLOGY

この複合粘土材料を作製するにあたり、まず前述した再生機能を活かした手法を考えた。1つはLDHの再構築機能を複合化に用いる方法で、LDHの再構築中に負の層電荷を持つ分散したスメクタイトを層間に取り込ませる。これにより、均質な複合化が達成され、新たな細孔を有する多孔体材料の作製が可能である。もう1つは、LDHを熱分解させずにスメクタイトと複合化させる方法で、層構造の複雑化（デラミネーション）による反応サイトの拡大が期待される。これにより、熱分解後の再構築時に長鎖の有機酸取り込む等の新たな機能の発現が可能である。

本研究では、スメクタイトとしてサポナイトを、LDHとして $Mg_6Al_2(CO_3)(OH)_{16} \cdot 4H_2O$ を選択して、実験を行った。作製した複合体の多孔体特性と再構築性、および機能性について評価し、新たな機能を有する粘土材料の創製を目的とした。

2. 実験

2.1 試料調製

原料には市販のサポナイト粉末（スメクトンSA：クミネ工業㈱製）と共沈法により作製したLDH（ハイドロタルサイト： $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ ）を用いた。硝酸マグネシウム六水和物と硝酸アルミニウム九水和物をMg/Al比が3となるように所定の濃度に調製し、ここに水酸化ナトリウムと炭酸ナトリウムの混合溶液を投入し、共沈ゲルを作製した。室温で2時間熟成した後、遠心分離器を用いて固液分離・水洗を行い、110℃の恒温槽で乾燥させ、乳鉢で解細して試料粉末とした。

2.2 複合化処理

試料の混合比は、サポナイトとLDHの重量比が1:1と、全層電荷量が等しくなる1:0.157とした。複合化には3つの方法を用いた。1つはボールミルを用いたメカノケミカル効果を利用して混合・複合化を進行させる方法であり、混合粉末を遊星ボールミル中で乾式粉碎（300rpm-1h）して複合粉末を得た[dm]。もう1つは熱分解したLDHの水中での再構築反応を利用して複合化させる方法であり、500℃で1時間熱処理した熱分解LDHとサポナイトの混合粉末を蒸留水中に固液比0.6:100で5時間攪拌し、110℃で乾燥させて複合粉末を得た[sol]。さらに両方を組み合わせた方法として、500℃で1時間熱処理した熱分解LDHとサポナイトの混合粉末を蒸留水中で湿式粉碎（300rpm-1h）し、110℃で乾燥させて複合粉末を得た[w]。対象試料には、同じ重量比で乳鉢混合した試料を用いた[mix]。

2.3 キャラクターゼーション

試料の結晶相は、粉末X線回折装置（XRD：XRD-6100、島津製作所㈱製）を用いて調査した。また、熱重量

変化とそれに伴う発熱・吸熱挙動を、示差熱重量分析装置（DTA/TG：サーモプラス TG-8120、リガク㈱製）を用いて、細孔構造の測定は窒素吸着法により行い、全自動型窒素吸着測定装置（オートソープ1、カンタクローム㈱製）を用いてそれぞれ測定した。さらに、水蒸気吸着装置（ベルソープ18、日本ベル㈱製）を用いて水蒸気吸着の測定を行った。

試料の微構造、および形態を走査型電子顕微鏡（SEM：JSM-5310、日本電子データム㈱製）と透過型電子顕微鏡（TEM：H-9000、日立㈱製）で観察した。

2.4 機能性の評価

細孔特性などで特異な結果を示したdm試料について、その機能性の評価を行った。dm試料を300、及び500℃で12時間熱処理し、試料0.1gを50mLの蒸留水中に分散させて1晩静置した。その後、110℃の恒温槽で乾燥させた。静置前後の変化をXRDと窒素吸着法により評価した。

3. 結果と考察

3.1 結晶相

作製した複合試料及び出発原料のXRD回折パターンをFig. 1に示す。尚、ここでは良好な結果が得られたサポナイト：LDHの重量比が1:0.157の試料について報告する。参照のmix試料では混合比に応じた回折強度が観察され、LDHのピークも明確に認められた。これに対して複合試料ではLDHの回折強度が著しく低下した。これは、複合化の過程で00lの積層を完全に復元できなかったことが原因と考えられる。また、サポナイトの00lに対応するピーク形状にも変化が見られた。

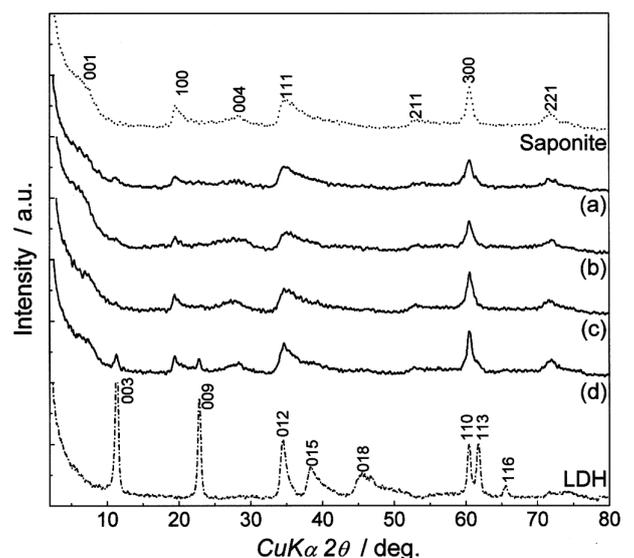


Fig. 1 XRD patterns of smectite / LDH composites prepared from various method (a) dry-mill [dm], (b) wet-mill [wm], (c) solution reaction [sol] and (d) only mix[mix], compared with starting materials.

3.2 比表面積と細孔径分布

窒素吸着における各複合試料の吸・脱着等温線をサポナイトとLDHの等温線とともにFig. 2に示す。いずれの試料もヒステリシスが見られ、BDDTの分類¹⁴⁾によればLDHはV型、他の試料はIV型であった。mix試料では、相対圧が0.8以下の領域ではサポナイトと同様の等温線を示し、0.8以上の高相対圧側ではLDH様の立ち上がりが観察された。これはサポナイトとLDHの両方の特徴を有しているためと考えられる。これに対して、wm・sol試料では全体についてサポナイトと同様の変化が観察された。この時、各々の吸着量の差に応じてヒステリシスの大きさに違いが見られた。一方、dm試料の等温線は明らかに他の試料とは異なり、高相対圧での急激な立ち上がりを示した。この違いはメソ領域において何らかの微細構造の変化が生じたことに対応する結果と考えられた。

そこで、各試料の脱離曲線をもとにBJH法¹⁵⁾を用いて細孔径分布を見積もった。この結果をFig. 3にサポナイトとLDHの結果と共に細孔分布曲線として示す。なお、2nmに見られる鋭いピークは計算課程で生じるfalseピークであり、ここでは無視して構わない。サポナイトの細孔はマイクロ孔が主であり明確な細孔は見られないのに対して、LDHでは8nmを中心としたメソ孔が見られた。この8nmを中心とするメソ孔は、参照であるmix試料でも見られた。一方、複合試料では8nmのメソ孔は全く見られなかった。wm・sol試料では1nm以下のマイクロ孔の増加が認められたのに対し、dm試料では30nmを中心とした

比較的にブロードなメソ孔の生成が認められた。

Fig. 4に各試料の水蒸気吸着における吸・脱着等温線をサポナイトとLDHの結果とともに示す。窒素吸着の結果

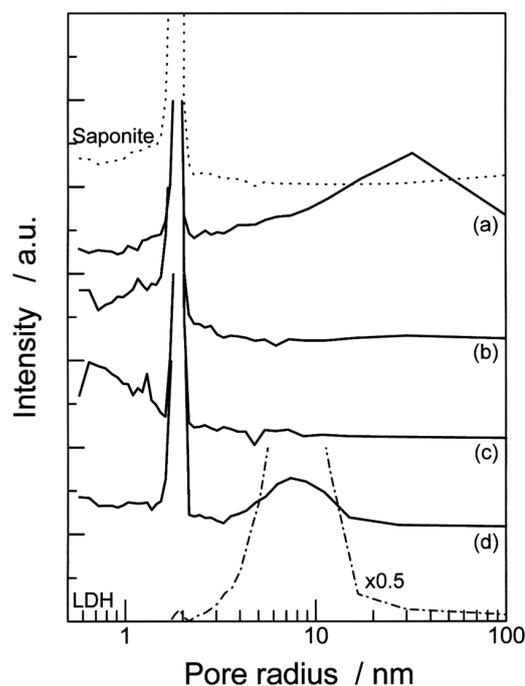


Fig. 3 Pore size distribution of smectite / LDH composites prepared from various method (a) dm, (b) wm, (c) sol and (d) mix, compared with starting materials.

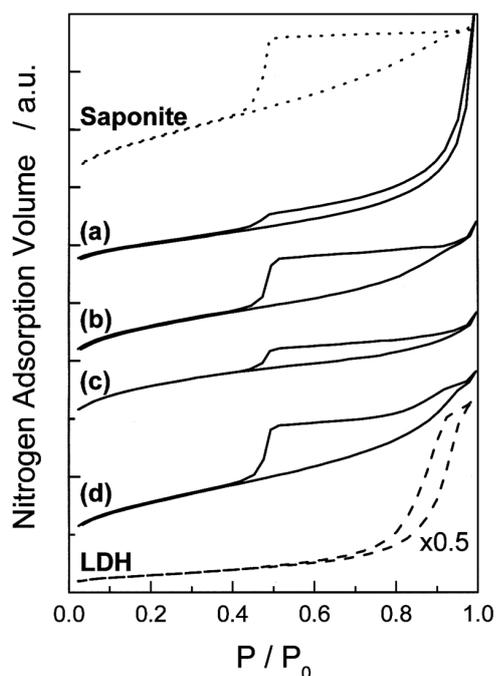


Fig.2 N₂ adsorption and desorption isotherms of smectite / LDH composites prepared from various method (a) dm, (b) wm, (c) sol and (d) mix, compared with starting materials.

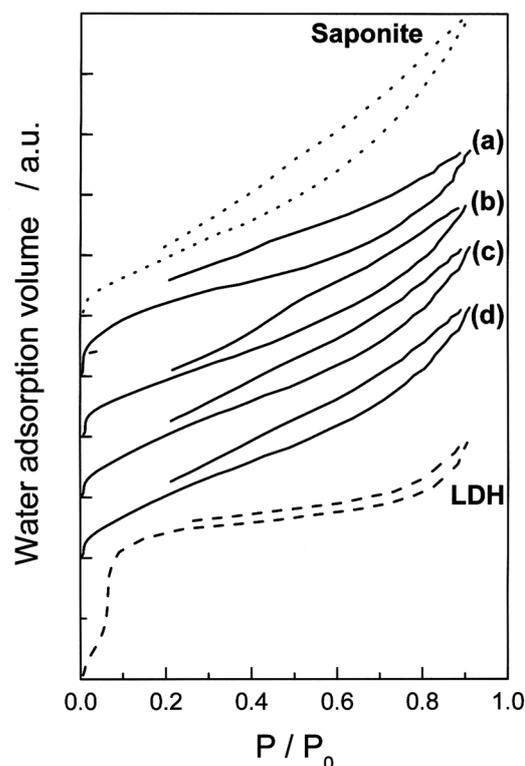


Fig.4 Isotherm curves of smectite / LDH composites prepared from various method (a) dm, (b) wm, (c) sol and (d) mix, compared with starting materials.

とは異なり、脱着曲線ほどの試料でも閉じなかった。これは水蒸気と試料表面との間に何らかの親和性があることに対応した結果である。LDHの等温線は低相対圧で急峻な立ち上がりを示す特異な形状を示していた。これは、LDHに含まれるOH基が

低相対圧で急激に水蒸気と水素結合を生じることが原因と考えられる。しかし、複合試料ではLDHのような変化は見られず、サポナイトの等温線に類似の吸着・脱離等温線が見られた。mix試料はほぼサポナイトと同様の結果であった。これに対し、複合試料ではヒステリシスが大きくなり、それとともに最大吸着量は減少した。また、dm試料のヒステリシスが最も大きく、脱着曲線の戻りも悪いことから、水に対する親和性が他の試料と異なっていることが示唆された。

複合試料の窒素吸着による比表面積と細孔容積の算出結果を、水蒸気吸着の結果より求めた比表面積と細孔容積と併せてTable 1に示す。水蒸気吸着による比表面積 (S_{H_2O}) と窒素吸着による比表面積 (S_{N_2}) の値から S_{H_2O}/S_{N_2} を求め、この比率で試料の水との親和性を判断する方法がSaadaらによって提案されている¹⁶⁾。この値もTable 1に併せて示した。

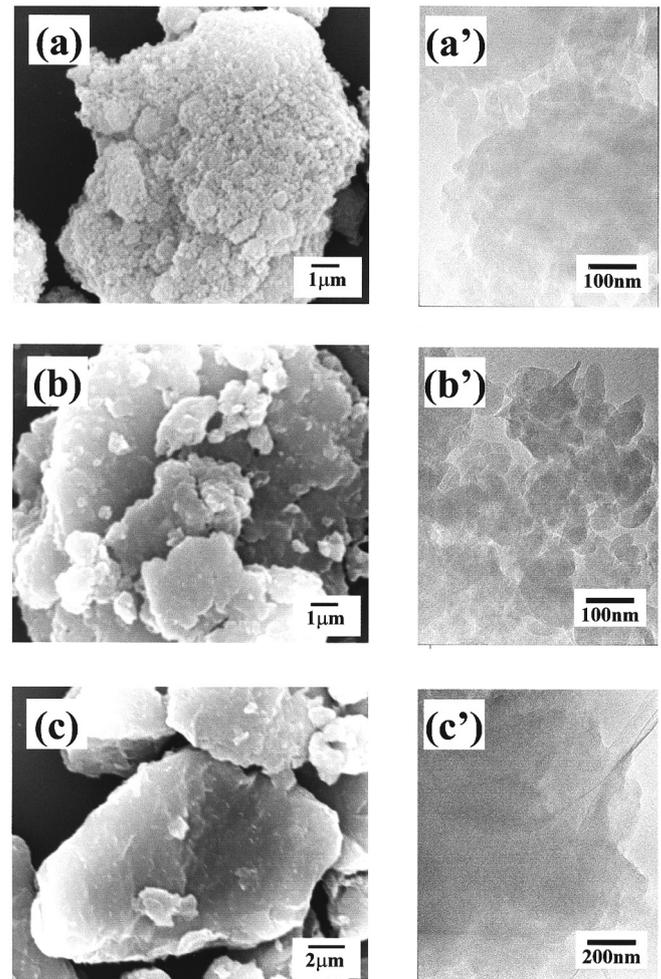
複合体試料の比表面積は170～270 m^2/g となり、これはサポナイトとLDHの間に位置した。しかし、単純な混合比から算出した理論比表面積278 m^2/g よりも小さな値であった。dm試料の比表面積は167 m^2/g で、他の試料に比べ顕著に小さな値であった。乾式粉碎ではメカノケミカル効果により粒子同士の凝着が生じ、これにより比表面積が低下するという報告^{17, 18)}があり、dm試料ではこの効果が顕著であったと考えられる。一方、細孔容積は0.22～0.40 mL/g となった。理論細孔容積を求めると0.34 mL/g となった。dm試料ではこの理論値を超える細孔容積を持っており、複合化の効果が大きく現れていた。一方、他の試料ではいずれも理論値を超えることはなく、mix試料は理論値とほぼ同じ値であった。

水蒸気吸着から算出した比表面積は、窒素吸着による比表面積のような大きな差は複合試料間に見られなかった。wm試料の326 m^2/g が最も小さく、mix試料の390 m^2/g が最も大きな値であった。窒素吸着同様に算術値を求めたところ、380 m^2/g となったことから、mix試料は単純な混合物の値を示しており、他の複合試料は複合化に伴い水蒸気でも比表面積が低下したことが明らかになった。また、全細孔量に関しても同様な結果であった。

各比表面積から算出した試料の親水性には、複合試料間で大きな差が見られた。dm以外の試料では大きな差は見られず、サポナイトと同程度の値であった。一方、dm試料では他の試料が1.2～1.5であるのに対して、2.1という大きな値であった。混合比率から求めた値は1.4になることから、こ

Table 1 Specific surface area (SSA) and total pore volume (TPV) for nitrogen and water adsorption

Sample	N ₂ adsorption		H ₂ O adsorption		Hydrophilicity (S_{H_2O}/S_{N_2})
	SSA [m^2/g]	TPV [mL/g]	SSA [m^2/g]	TPV [mL/g]	
dm	167	0.40	353	105	2.1
wm	268	0.29	326	97	1.2
sol	251	0.22	357	106	1.4
mix	256	0.30	390	116	1.5
SmectonSA	305	0.31	351	104	1.2
LDH syn	104	0.52	563	168	5.4



Figs.5 SEM and TEM photographs of smectite / LDH composites; (a) dm, (b) wm, (c) sol.

の値は複合試料の割には高い値を示しており、複合化にともなう親水性の発現と考えられる。これは乾式粉碎により生じる30nmを中心としたメソ孔が、想定通りにLDHと粘土の複合構造で構成されていることと、粉碎によるメカノケミカル効果の導入により生じた親水性と言える。これとは逆に、他の複合試料ではサポナイトとLDHのそれぞれの凝集構造が生じてしまい、dm試料のような顕著な変化が現れなかったと推察される。

3.3 微構造

Figs. 5に各試料のSEM写真とTEM写真を示す。SEM

写真では、各複合試料は数 μm の凝集粒子で構成されているが、その表面形態が試料により異なることが観察された。dm 試料では微細な粉末に覆われた形態が観察されたのに対し、wm 試料ではそのような微細構造は僅かにしか観察されず、sol 試料では表面が平坦な粒子のみが観察された。また、TEM の結果から、dm 試料では数 10nm 程度の細孔を有する多孔構造が形成していることが観察された。一方、wm 試料と sol 試料では明確なメソ細孔は観察されなかった。特に、sol 試料では TEM 像でも明確な細孔構造は観察できなかった。この結果は、各試料の細孔径分布の結果と一致した。

3.4 再構築機能

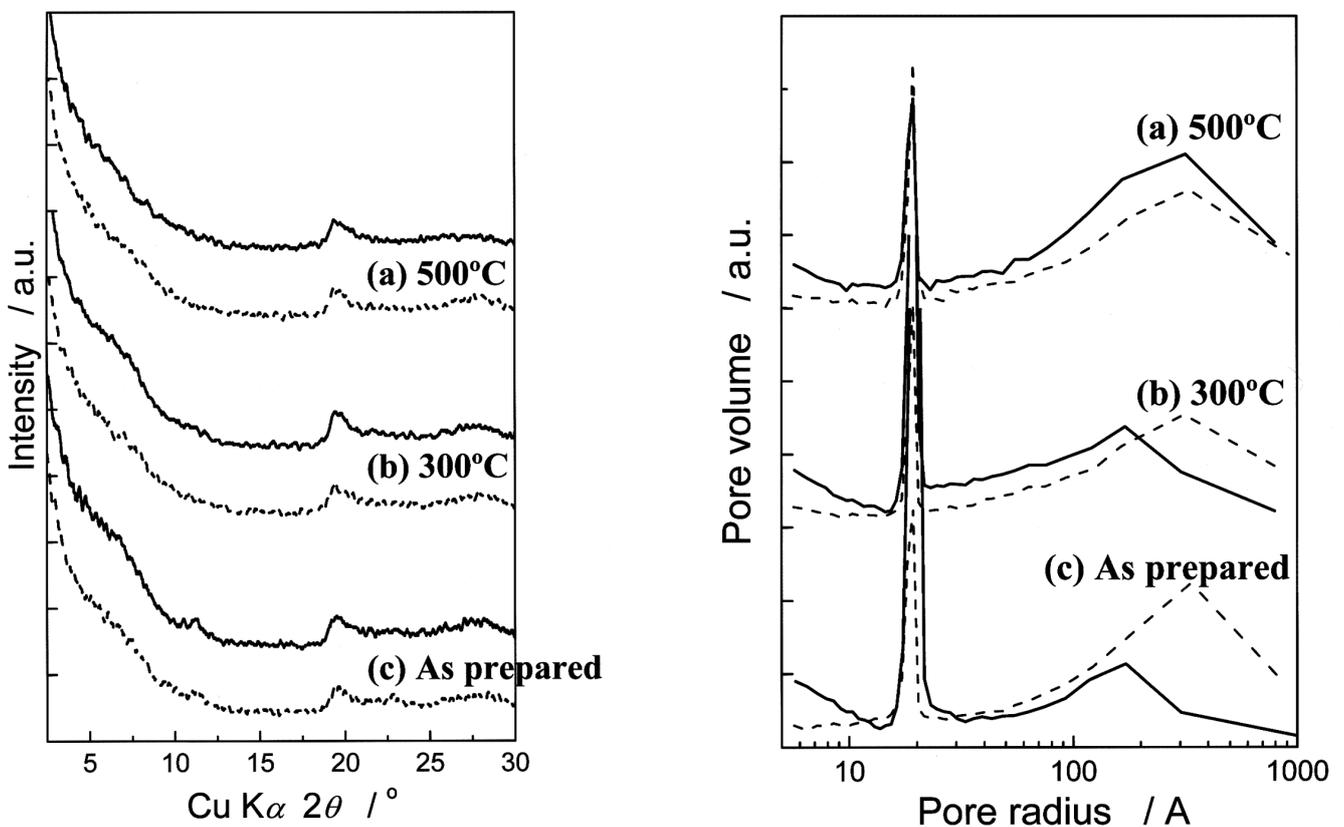
水中で静置させる前後の XRD 回折パターンと窒素吸着より求めた細孔径分布を Figs. 6 に示す。未熱処理、および 300°C 焼成試料では水処理後に 8° 付近のサポナイトの 001 ピークが現れた。また、未熱処理の試料では LDH の 001 ピークも観察された。これに対して、500°C 焼成試料では、このようなサポナイトや LDH の復元は観察されなかった。この変化は、未熱処理試料では、サポナイトと LDH の両方の再構築が生じ、300°C 熱処理試料ではサポナイトの再構築のみが生じたのに対し、500°C 熱処理試料ではどちらの再構築も生じなかったことを示している。

細孔径分布の変化では、各試料による差がより顕著であった。未熱処理試料ではサポナイトによるマイクロ孔の増加と複合化の特徴であった 30nm 付近のメソ孔の減少が見られた。10nm に現れた細孔は LDH の再生によるものと考えられる。300°C 熱処理試料では、マイクロ孔の増加は観察されたが、メソ孔付近は未熱処理試料ほど顕著な変化は見られず、全体にブロードな分布となった。これに対し、500°C 熱処理試料では細孔径分布に大きな変化は観察されず、メソ孔については水処理前処理も水処理後の方が増加した。これは複合化で導入した細孔構造が、500°C の熱処理により強固に保持された結果である。

これらの結果、乾式粉碎処理により合成したサポナイト / LDH 複合多孔体は、その後の熱処理により再構築機能を制御でき、また合成時に導入したメソ孔を 500°C の熱処理で保持できる多機能な多孔体であることが明らかになった。

4. 総括

再構築機能を有する粘土の合成に、サポナイトと LDH の複合体を用いることについて検討した結果、以下のことが明らかになった。(1) 乾式粉碎、熱分解 LDH を用いた湿式粉碎、および熱分解 LDH の再構築反応を利用した溶液処理の 3 つの手法を検討したところ、乾式粉碎試料で



Figs.6 XRD patterns and pore size distribution of (a) 500oC, (b) 300oC heated and (c) as prepared samples. [solid: after water treatment, broken: before one]

30nm 程度を中心とした新しいメソ孔を有するサポナイト / LDH 複合多孔体が作製できた。(2) この多孔体は比表面積が 167m²/g と低いものの細孔容積は 0.4ml/g で単純比より求まる容積を凌駕した。これはサポナイトと LDH がミクロなレベルで均質混合体となった為であることが TEM 観察より明らかになった。(3) この多孔体を熱処理することで、500℃の熱処理では堅固なメソ多孔体、300℃の熱処理でサポナイトの再生能を有する多孔体、および熱処理無しでサポナイトの再生能と LDH の再構築能の両機能を持つ多孔体という機能性の制御が可能であることが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、御支援を頂きました(財)コスメトロジー研究振興財団、および共同研究者に深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) R.E.Grim, Clay Mineralogy-2nd ed., McGraw-Hill (1968), 森本伸男, 砂川一郎, 都城秋穂, 鉱物学, 岩波書店 (1975)
- 2) R.M.Barrer & D.M.MacLeod, Trans. Faraday Soc., 51, 1290 (1955)
- 3) G.W.Brindley & R.E.Semples, Clay Miner., 12, 229 (1977)
- 4) S.Yamanaka, T.Doi, S.Sakako & M.Hattori, Mater.Res Bull., 19, 161 (1984)
- 5) S.Sterte, Clays Clay Miner., 34, 658 (1986)
- 6) S.Miyata & T.Kumura, Chem. Lett., 1973, 843 (1973)
- 7) T.Kwon & T.J.Pinnavaia, Chem. Mater., 1, 381 (1989)
- 8) I.Y.Park, K.Kuroda & C.Kato, Chem. Lett., 1989, 2057 (1989)
- 9) 山岸俊秀, 大柳祐一, 成田栄一.: ハイドロタルサイト様層間化合物の形成と熱処理による有害重金属オキソ酸イオンの除去・固定化, 日本化学会誌, 1993, 329 (1993)
- 10) J.Srodon: Synthesis of mixed-layer kaolinite / smectite, Clays Clay Miner., 28, 419-424 (1980)
- 11) D.D.Eberl, B.Velde, T.McCormick: Synthesis of illite-smectite from smectite at Earth surface temperatures and high pH, Clay Miner., 28, 49 (1993)
- 12) T.Matsuda: Synthesis of a regularly interstratified 2:1 margarite and beidellite (34 angstroms phase), Clay Miner., 33, 363-367 (1998)
- 13) D.Guillaume, A.Neaman, M.Cathelineau, 他 7 名: Experimental synthesis of chlorite from smectite at 300°C in the presence of metallic Fe, Clay Miner., 38, 281-302 (2003)
- 14) S.J.Gregg & K.S.W.Sing, "Adsorption, Surface Area, and Porosity", 2nd Ed., Academic press (1982)
- 15) E.P.Barrett, L.G.Joyner and P.H.Halenda, J. Amer. Chem. Soc., 73, 373 (1951)
- 16) A.Saada, B.Sifert and E.Papirer, "Comparison of the hydrophilicity / hydrophobicity of illites and kaolinites", J. Colloid & Interface Sci., 174, 185 (1995)
- 17) G.Suraj, C.S.P.Iyer, S.Rugmini and M.Lalithambika, "The effect of micronization on kaolinites and their sorption behaviour", Applied Clay Sci., 12, 111 (1997)
- 18) P.J.Sanchez-Soto, A.Wiewio'ra, M.A.Avile's, 他 4 名, "Talc from Puebla de Lillo, Spain. II. Effect of dry grinding on particle size and shape", Applied Clay Sci., 12, 297 (1997)

独自のチタン反応を利用するムスク・ジャスミン系高級香料の実用的化学合成

関西学院大学 理工学部化学科

田 辺 陽

We engage in the exploitation of new practical organic reactions directed toward the process chemistry utilizing our original reactions. Especially, we focused our attention on the Ti-Claisen condensation and aldol additions from a recent standpoint of the environmentally benign organic synthesis for the valuable perfumes such as macrocyclic musks (civetone and muscone), jasmine (furanone analogs of jasmone), and mints, and for 1 β -methylcarbapenem antibiotics (meropenem).

- (1) Practical synthesis of natural macrocyclic musks, especially civetone and muscone, is one of the most important topics in perfume chemistry. An efficient, practical, and stereocontrolled synthesis of natural *Z*-civetone, a representative musk perfume, was performed utilizing a Ti-Dieckmann (intramolecular Ti-Claisen) condensation of dimethyl *Z*-9-octadecanedioate as the key step. This cyclization reaction to afford the 17-membered β -keto ester has some advantages compared with the traditional basic Dieckmann condensation such as higher concentration (100~300 mM), lower reaction temperature (0 - 5 $^{\circ}$ C), shorter reaction time (1 - 3 h), use of environmentally benign (low toxicity and safe) reagents (TiCl₄ and Et₃N or Bu₃N), and economical reagents and solvents.
- (2) A laboratory scale synthesis was also performed utilizing intermolecular the Ti-Claisen condensation of methyl 10-decenoate followed by an intramolecular olefin metathesis using the Grubbs' reagent afforded the 17-membered β -keto ester. Characteristic features of this synthesis are as follows; simplest synthesis ever reported, highest overall yields, not only a stepwise but also a one-pot procedures.
- (3) A formal synthesis of *R*-muscone was achieved utilizing the intramolecular powerful Ti-aldol addition of available 2,15-hexadecanedione to afford the 15-membered aldol. Salient features are as follows. Aldol adduct was obtained for the first time. The reaction proceeded with a higher concentration (10-50 mM) compared with ring closing metathesis. Stereoselective dehydration of aldol adduct using Ti(O*i*-R)₄ afforded *E*-3-methylcyclopentadecenone, which is a key precursor of the Noyori asymmetric hydrogenation using Ru-BINAP.
- (4) TiCl₄-Bu₃N-mediated condensation of ketones with α,α -dimethoxyketones afforded trialkylsubstituted 2(5*H*)-furanones in a one-pot manner, wherein aldol addition and furanone formation occurred sequentially. Its application to straightforward synthesis of (*R*)-mintlactone and (*R*)-menthofuran, two representative natural mint perfumes, was demonstrated. Because of their interesting structure and usefulness, these compounds have been challenging synthetic targets. Our present method of (*R*)-mintlactone seems to be the simplest of the reported methods, because of the one-step synthesis.
- (5) We developed the present protocol for the aldol-type addition using simple phenyl esters and its application to a short step synthesis of the lactone analogs of dihydrojasmone and jasmone, which are representative perfumes with jasmine odor. The analogs were found to possess unique odor for fragrance.
- (6) As a notable recent application of the present reagent (TiCl₄ - Bu₃N), the Merck process group demonstrated a multi-kilogram scale practical synthesis of the anti-MRSA carbapenem intermediate utilizing the TiCl₄ - Bu₃N reagent as its key step. We found that Ti-reaction successfully applied to a couple of key reactions to construct 1 β -carbapenem skeleton. In particular, a short step synthesis of 1 β -methylcarbapenem, ex. Meropenem[®] was performed utilizing a new dehydration Ti-Claisen condensation.

1. 緒 言

21世紀の現在、人間生活を強く支える有機合成化学は環境問題を踏まえた新たな局面を迎えている。すなわち、いわゆるグリーンケミストリーを考慮した有機反応の開発と合成への適用が急務である。例えば、野依教授らによる不斉合成反応の開発が天然香料1-メントールの工業生産に結びつき、天然植物の伐採による環境破壊を防ぎ、また、

カルバペネム抗生物質の生産においては、向山・野依・村橋教授法という純国産の独自技術が医療に寄与した。すなわち、これらプロセス化学という科（化）学技術が人類に貢献し、大きなインパクトを与えた事実は記憶に新しい。

私達は、数年前からこの考えに共鳴し、グリーンなチタン=クライゼン縮合・アルドール付加という独自反応の開発と有用ファインケミカルズ合成への応用（プロダクトアウト指向）(Fig. 1)、さらには各種エステル化・アミド化・スルホニル化・シリル化などの汎用反応の実用的合理化（マーケットイン指向）を行ってきた。

すなわちコスメトロジーの分野に展開すべく、特に、香料業界最大のテーマの一つである天然大環状ムスク香料（= *Z*-シベトン・*R*-ムスコン等）の実用的化学合成を行い、初期の成果を得ている。これらの天然ムスクの有用性は、言うまでも無く香料化学で認められており、その実用生産



Practical chemical syntheses of high-grade musk and jasmine perfumes utilizing original titanium mediated reactions.

Yoo Tanabe

Department of Chemistry, School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University

が最大の懸案である。また、植物性香料シス-ジャスモンの新規フラン誘導体を合成を行い、調香にかけたところ非常に残効性の優れた個性的なメンズフレグランスとして期待されることが分かった。さらに、閾値が非常に小さい(香気が強い)天然ミント香料であるミントラクトンやメントフランの最もシンプルで短段階な合成法を見出した。加えて、最も進化した抗生物質である1β-メチルカルバペネムには2つの炭素骨格形成鍵段階があるが、そのいずれにもTi-反応を適用した。特に後段のTi-クライゼン縮合は従来の塩基法と異なり脱水型で進行することを見出した。高活性・高性能で重要なメロベネム中間体にも適用できる。

これらの化合物の合成はチタン=アルドール・クライゼン反応で初めて可能になり、工業的にも期待できる方法である (Fig. 2)。

2.3. 実験・結果

2.3.1 チタン=クライゼン縮合・アルドール付加の基本的性能

クライゼン縮合は有機合成上基本的に重要であるが、従来塩基法は反応性や選択性に限界があった。チタン (Ti) [ジルコニウム (Zr)] -クライゼン縮合や類型の重要なアルドール付加は以下の優れた特徴を有す。

- ①塩基法 (NaH, LDA 等) に比べ高い反応速度・強力な反応性・高収率・高立体選択性
- ②エノールシリルエーテル・ケテンシリルアセタールを基質とする向山法²⁾と異なり、ケトン・エステルを用いる直接法であるためアトムエコノミー大・低コスト・省

エネルギー³⁾

- ③塩基法に比べ温和・実用的な温度条件 (-40 ~ +50 °C)、安価・安全な反応剤・溶媒 (トルエン・ジクロロメタン) で可能 (高価で、工業的に不利なエーテル系溶媒、LDA 反応剤を使用しない)
- ④塩基に不安定な官能基 (ハロゲン・ケトン・アルコール・トシルオキシ) 共存する基質への適応
- ⑤極めて低毒で、安価な Ti, Zr 試剤の使用にて環境調和型
- ⑥ Zr 試剤法は熱力学的不利で従来困難であった α,α-二置換エステルのクライゼン縮合が可能 (最強のクライゼン縮合)
- ⑦ルイス酸で困難である単純エステルの直接アルドール型反応が可能 (適応範囲の大幅な拡大)

2.3.2 天然大環状ムスク香料: Z-シベトン・R-ムスコンの短段階・実用合成

天然大環状ムスク香料である Z-シベトン・R-ムスコンの実用合成は、香料化学の最重要課題である。まず、Ti-クライゼン縮合を利用して、シベトンの合成を2つの方法で行った。一方は実験室的に効率的な方法で、他方は工業化を志向した実用的製法である。さらに、R-ムスコンの実用合成へ向けての展開を行った。

2.3.2.1 Ti-ディークマン (分子内クライゼン) 縮合を用いる Z-シベトンの実用合成⁴⁾

Z-オレイン酸を出発物質とする方法である。Z-オレイン酸をジャパンエナジーで確立されている長鎖カルボン酸

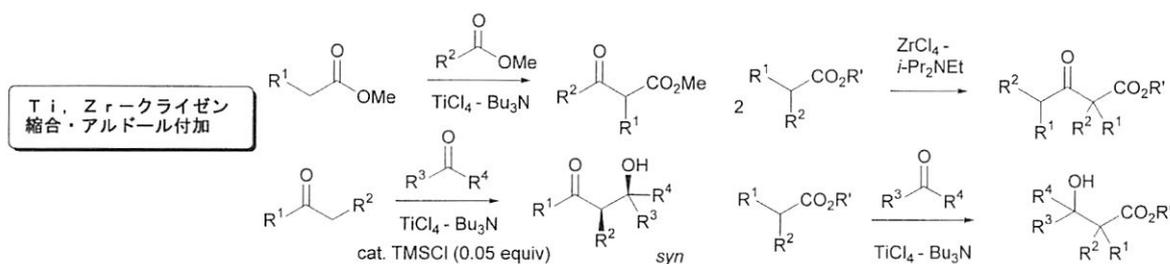


Fig. 1

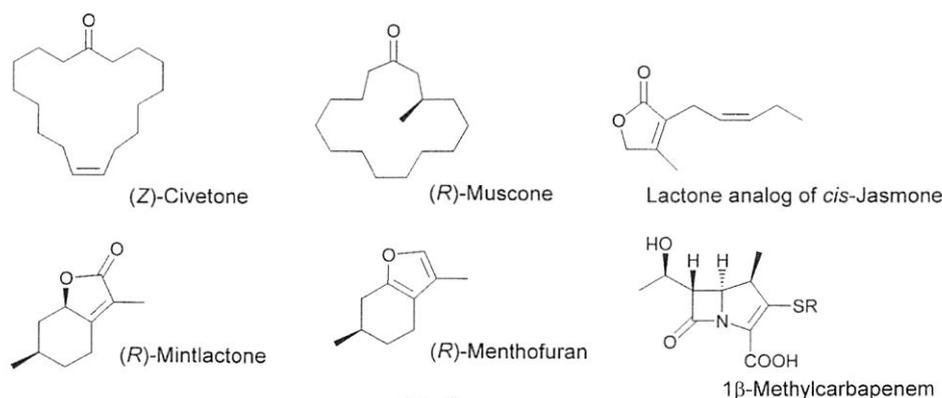
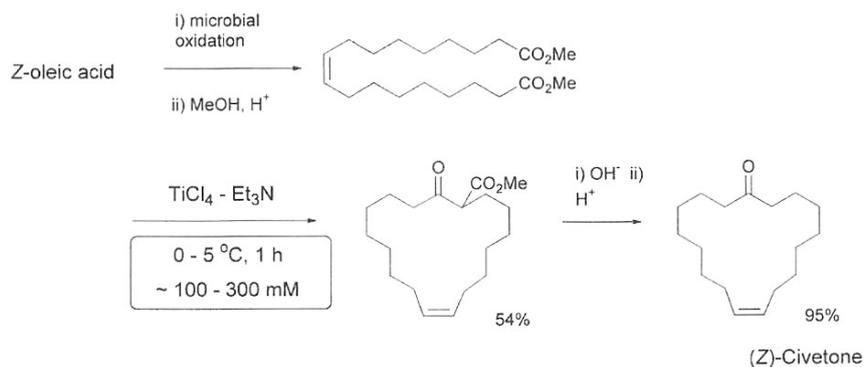


Fig. 2

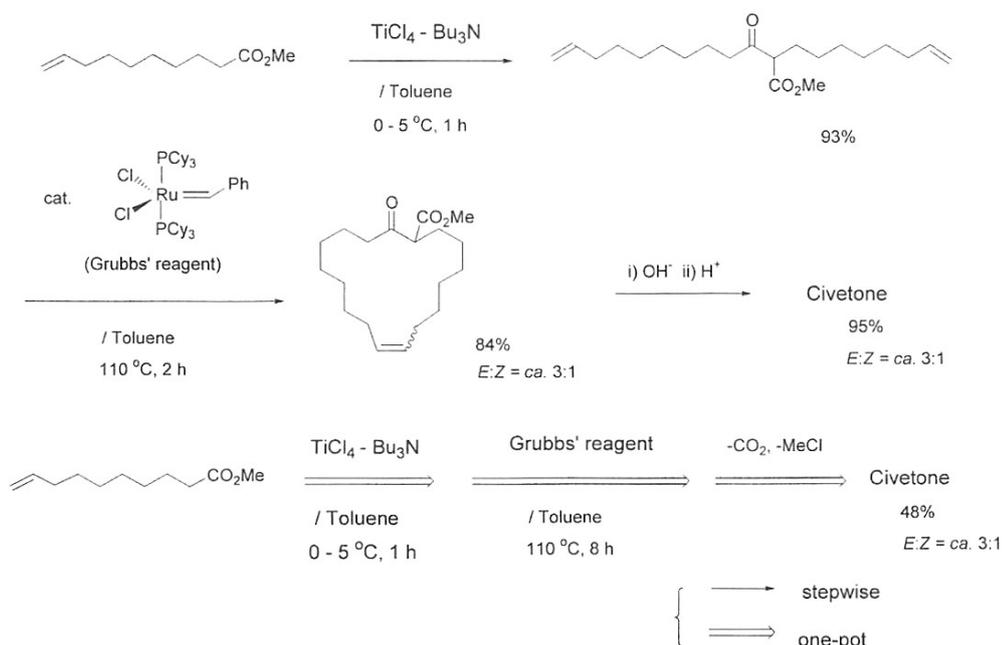
の末端酸化技術⁵⁾によりジカルボン酸とし、これをメチルエステル化しジメチルエステルに導く (Fig. 3). このジメチルエステルを分子内 Ti-クライゼン(ディークマン)縮合によって 17 員環状 β -ケトエステルに導くことができた. 引き続き加水分解・脱炭酸することで、天然物と同一である *Z*-体のシベトン合成することに成功した (Fig. 3). この鍵段階である環化の最大の特徴は、強力な炭素-炭素結合能を有す反応のため、類型の環化反応に比べ高濃度、短時間で進行する点でいわゆるグリーンケミカルなものである. (Ti-ディークマン環化と TiCl_3 -Zn/Cu を用いる McMurry カップリングを比較してみる. Ti-ディークマン環化: $0 - 5^\circ\text{C}$, $\sim 100\text{mM}$, 1 h. McMurry カップリング: 80°C , $\sim 5\text{mM}$, $\sim 50\text{h}$).

これは *Z*-シベトンの唯一ともいえる実用的合成であり、天然品と同一の *Z*-体であるため製品の差別化が期待される. しかも、安価な原料 (*Z*-オレイン酸)・反応剤 (TiCl_4 , Et_3N 等) を使用しているため工業的に有望な製法である.



2.3.2.2 Ti-クライゼン縮合およびメタセシス環化を利用したシベトンの短段階製法⁵⁾

まず、末端に二重結合を持つメチル = 2-デセノアートを Ti-クライゼン縮合によって鎖状 β -ケトエステルに導く (Fig. 4). この反応も従来塩基法に比べかなり優れている. 続いて最近天然物合成で盛んに用いられている Grubbs 触媒を用いるオレフィンメタセシス環化により 17 員環状 β -ケトエステル ($E/Z = \text{ca. } 3:1$) を得ることができた. 1.1 の方法と同様に加水分解・脱炭酸することによりシベトン ($E/Z = \text{ca. } 3:1$) を合成することができた (Fig. 4). 3 段階の通算収率が 74% であり、これまでのシベトン合成の中で最も高い. しかも興味深いことにこれら一連の反応がワンポットで進行することを見出した. すなわち、各段階の収率が高く同じトルエン溶媒を使用しているため可能であったが、脱メトキシカルボニル化まで反応が一気に進行するという、これまでの合成法の中で最もシンプルな製法となった. ただし、Grubbs 触媒が非常に高価であ



ること、環化の容積効率がTi-ディークマン縮合反応に比べ約30-100倍の高希釈を必要とすることから大量合成には不向きな実験室的方法である。

2.3.2.3 Ti-アルドール付加・クライゼン縮合を用いるR-ムスコンの短段階合成

Ti-アルドール付加を利用してR-ムスコンの短段階形式合成を行った (Fig. 5)。入手容易なジメチルジケトンのアルドール反応は、従来法では縮合まで進行し、得られた α, β -不飽和エノンはE,Z混合物となる。すなわち混合物の状態ではRu-BINAP不斉還元⁶⁾によってR-ムスコンを得ることはできない。最近、温和で強力なTi-アルドール付加を利用して初めて付加体を単離できた。引き続き立体選択的脱水で、E-richの α, β -不飽和エノン (E/Z = ca. 9:1) を得ることができた^{3 d)}。このエノンを既知のRu-BINAP不斉水素化⁶⁾を想定すれば、約80% eeのR-ムス

コンの形式合成に相当する。

また別の方法として、入手容易なエステルと安価な酸クロリドを用いる交差型Ti-クライゼン縮合・メタセシス環化を利用し、短段階のR-ムスコンの合成を達成した⁷⁾ (Fig. 6)。

2.3.3 Ti-アルドール型付加を用いる天然ジャスミン香料cis-ジャスモンのラクトンアナログの創生と合成⁷⁾

代表的ジャスミン天然香料cis-ジャスモンのラクトンアナログは合成香料としての期待されていたが、これまで適当な合成法がなかった。すなわち、環状ケトンのラクトンへの等価変換は新規香料を探索する一手法であり、事実、デヒドロジャスモン (cis-ジャスモンの二重結合飽和体) のアナログはジ・ボーゲン社が合成している。筆者らは温和で強力なエステルのTi-アルドール型付加を利用して合成を可能にした (Fig. 7)。調香評価の結果、個性的な新

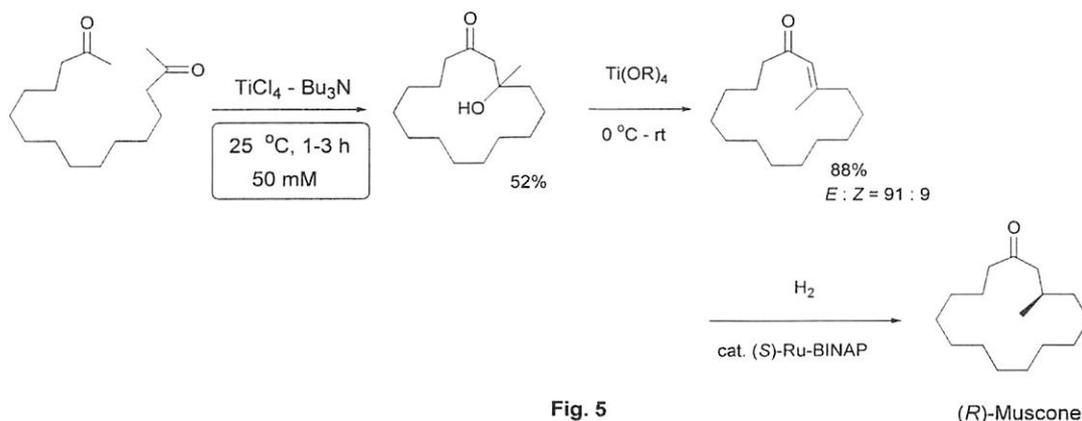


Fig. 5

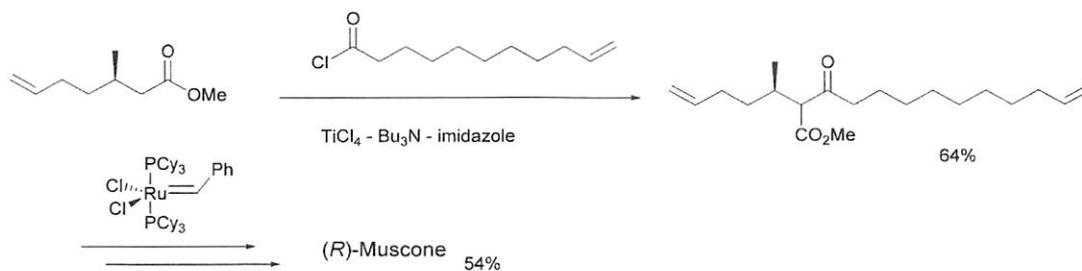


Fig. 6

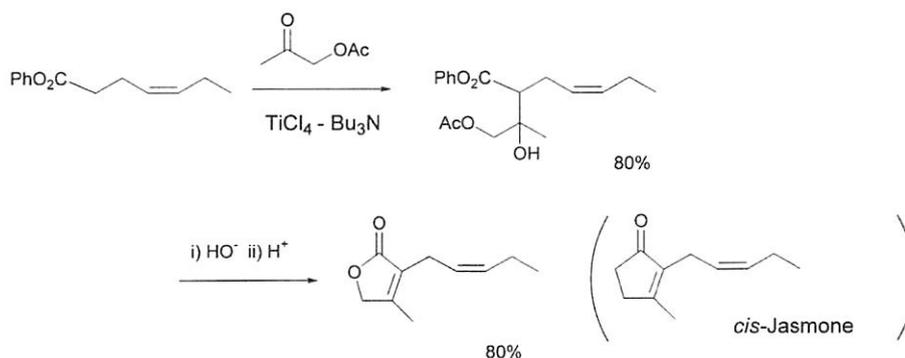


Fig. 7

規香料であることが分かった。低コストの製法となれば製品化が期待される。

2.3.4 Ti-アルドール縮合を用いる三置換フラノンの一段階合成と天然ミントラクトンの合成への応用⁸⁾

2 (5*H*)-フラノンは天然物の基本骨格としてまた合成中間体として基本的に重要な複素環であるが、三置換体の一般的・実用的合成法は少ない。最近筆者らは Ti-アルドール縮合を利用する一般法を見出し、その応用として、ミント香料として重要な (*R*)-ミントラクトン・(*R*)-メントフランの短段階合成を見出した (Fig. 8)。これまでの

幾つかの既存法は多段階を要した。すべて市販の原料・反応剤を用いる最もシンプルな合成と考えられる。今後、アメニティーライフの向上化に対しこの種の香料の利用が増すものと予想される。

2.3.5 新規 Ti-クライゼン縮合 1β-メチルカルバペネムの短段階・実用合成⁹⁾

最も進化した抗生物質である 1β-メチルカルバペネムの実用合成法の確立ならびに合理化は重要な課題である。2つの炭素骨格形成鍵段階があるが、そのいずれにも Ti-反応を適用した (Fig. 9)。特に後段の Ti-クライゼン縮

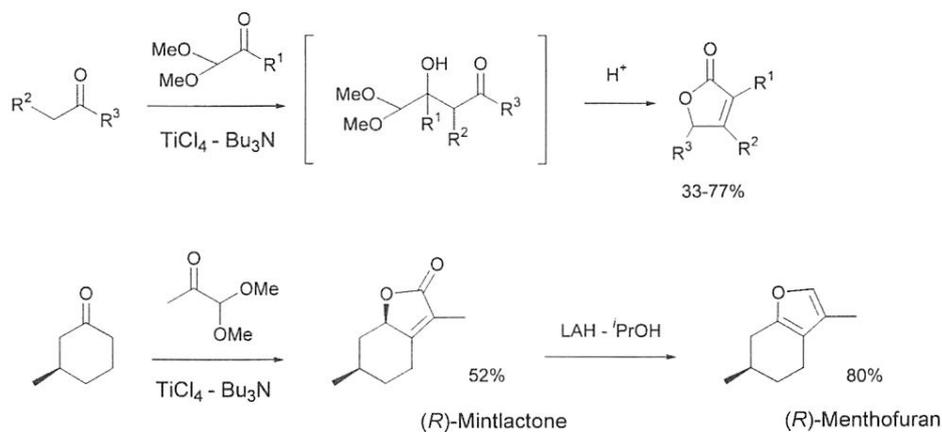


Fig. 8

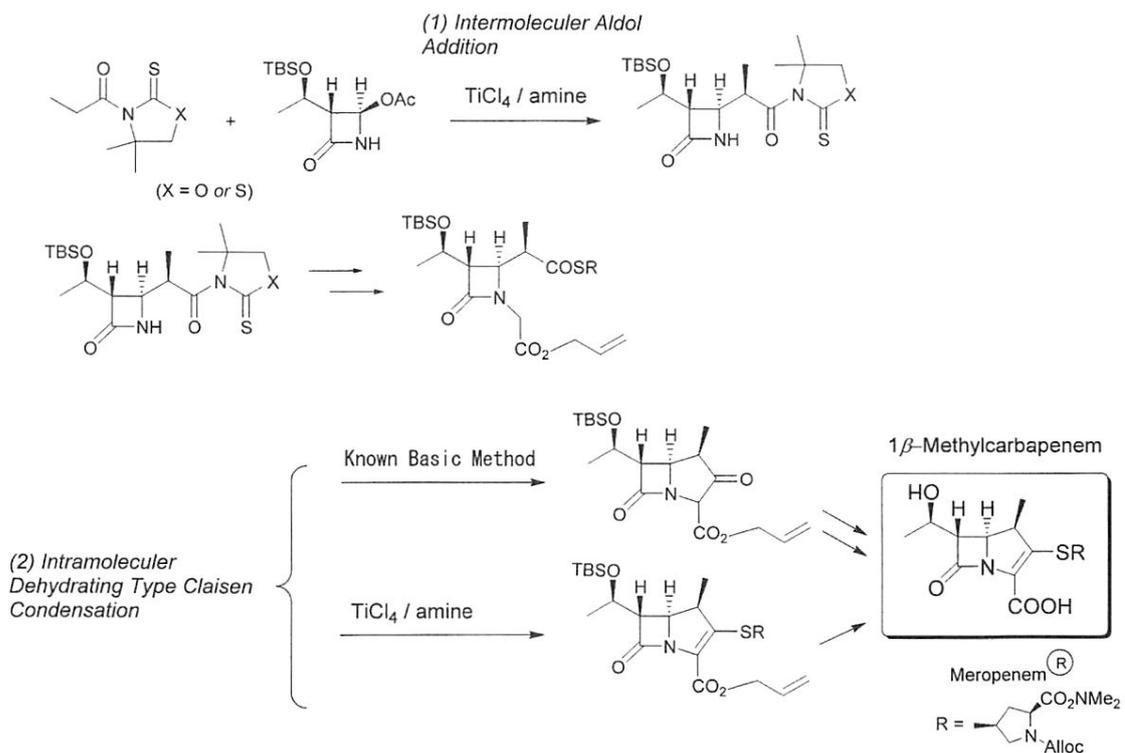


Fig. 9

合は従来の塩基法と異なり脱水型で進行することが分かり、結果として従来法より短段階である。高活性・高性能で重要なメロペネム中間体にも適用できる。

4. 考察

以上、チタン・ジルコニウムを利用するグリーンケミカルなクライゼン縮合・アルドール付加反応の開発と有用香料・医薬の実用合成法への応用について述べた。従来法である塩基反応剤を用いる方法と異なる特性を有すこの方法は、応用範囲が広く、今後も様々なファインケミカルズ合成への展開が今後もなされると期待できる。

特にコスメトロジーの分野における重要テーマである天然大環状ムスク香料 (= Z-シベトン・R-ムスコン等) の商業レベルでの化学合成が実現できればインパクトのある研究となろう。

5. 総括

これらの独自チタン反応の有用性を活かし、特に各種有用天然・合成香料化合物・医薬のこれまでにない斬新な実践的合成方法を提供することを目的とし、幾つかの実施例について紹介した。

なお、Z-シベトンの合成に関しては朝日・読売・日経新聞に掲載された<朝日新聞夕刊(関西版)2000, 9/7; 読売新聞夕刊(関東版)2000, 9/14; 日本経済新聞朝刊(全国版)2000, 10/9>。

ところで、この独自チタン反応は、最近、世界最大の抗生物質メーカー・メルク社の抗院内感染抗生物質 (anti-MRSA) 合成で実際に工業化規模で実施された(当然火急求められている医薬 (Fig. 10))¹⁰⁾。これは、チタン反応が十分に工業的に可能なプロセスであるという、一つの先駆けと見なせる。

最後に、本研究を遂行するに当たりお世話になりましたコスメトロジー財団に感謝申し上げます。なお、発表した論文 3d, 4, 8 に関しては、以下の Acknowledgement を付記しました。

This research was partially supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (A) "Exploitation of Multi-Element Cyclic Molecules" and on Basic Areas (C) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, and by the Cosmetology Foundation in Japan.

(参考文献)

- 1) a) Tanabe, Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1988**, 62, 1917.
b) Yoshida, Y.; Hayashi, R.; Sumihara, H.; Tanabe, Y. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 8727. c) Yoshida, Y.; Matsumoto, N.; Hamasaki, R.; Tanabe, Y. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 4227. d) Tanabe, Y.; Hamasaki, R.; Funakoshi, S. *Chem. Commun.*, 2001, 1674.
- 2) a) Mukaiyama, T.; Banno, K.; Narasaka, K. *Chem. Lett.*, **1973**, 1011; *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 96, 7503. b) Mukaiyama, T. *Organic Reactions*; Wiley: New York, **1982**; Vol. 28, p. 203.
- 3) a) 1b, b) 1c, c) Tanabe, Y.; Matsumoto, N.; Funakoshi, S.; Manta, N. *Synlett*, **2001**, 1959. d) Tanabe, Y.; Matsumoto, N.; Higashi, T.; Misaki, T.; Itoh, T.; Yamamoto, M.; Mitarai, K.; Nishii, Y. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 8269.
- 4) Tanabe, Y.; Makita, A.; Funakoshi, S.; Hamasaki, R.; Kawakusu, T. *Adv. Synth. Catal.*, **2002**, 344, 507.
- 5) Hamasaki, R.; Funakoshi, S.; Misaki, T.; Tanabe, Y. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 7423.
- 6) Ogura, S.; Yamamoto, T. JP 94192161; *Chem. Abstr.*, **1995**, 122, 132836.
- 7) 田辺 陽, 文科省科研費特定領域研究 (A) 第2回公開シンポジウム「多元素環状化合物」(大阪大学) 9月25日 (2002年).
- 8) Tanabe, Y.; Mitarai, K.; Higashi, T.; Misaki, T.; Nishii, Y. *Chem. Commun.*, **2002**, 2542.
- 9) Tanabe, Y.; Manta, N.; Nagase, R.; Misaki, T.; Nishii, Y.; Sunagawa, M.; Sasaki, A. *Adv. Synth. Catal.*, 345, 967 (2003).
- 10) Humphrey, G. R.; Miller, R. A.; Pye, P. J.; Rossen, K.; Reamer, R. A.; Maliakal, A.; Ceglia, S. S.; Grabowski, E. J. J.; Volante, R. P.; Reider, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11261.

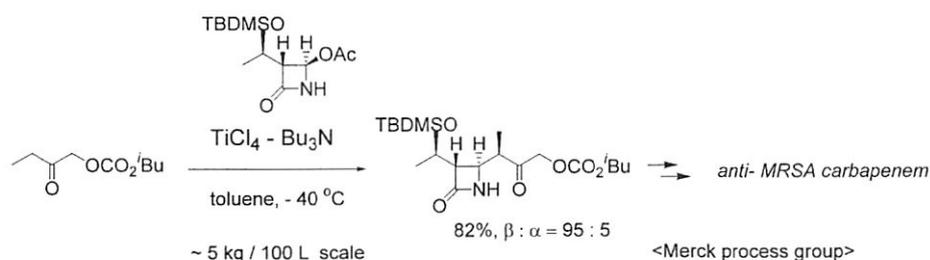


Fig. 10

環境に適した新規な糖型界面活性剤の開発と応用

東京理科大学 理学部

吉 村 倫 一

Novel nonionic gemini surfactants such as N, N'-dialkyl-N, N'-dilactobionylamidoethylenediamine (2CnLac, n is hydrocarbon chain length of 8, 10, and 12) and N-[2-(N'-alkyl-N'-lactobionylamino)ethyl]-N, N-dimethyl-1-alkylammonium bromide (2CnAmLac, n = 8, 10, and 12) were synthesized, and characterized by investigating surface tension, dynamic light-scattering, and fluorescence spectrum of pyrene. 2CnLac with two hydrocarbon chains and two sugar hydrophilic groups were obtained by the reaction of ethylenediamine and alkyl bromide, followed by the reaction with lactobionic acid. 2CnAmLac with two hydrocarbon chains and one ammonium and one sugar hydrophilic groups were prepared by the reaction of N, N-dimethylethylenediamine and alkyl bromide, followed by the reaction with lactobionic acid. The solution properties of nonionic gemini surfactants, 2CnLac and 2CnAmLac, were influenced significantly by the hydrocarbon chain length, number of chains, and nature of hydrophilic groups. The critical micelle concentrations (cmc) of gemini surfactants shifted to lower concentrations with increasing hydrocarbon chain length, and their values were smaller by about one to three orders of magnitude than those of the corresponding monomeric surfactants with the same chain length. The areas per molecule occupied by gemini surfactants were extremely small, showing they were highly compact at the air/water interface. In addition, adsorption and micellization behavior of gemini surfactants was estimated by parameters such as pC20 (the efficiency of surface adsorption), cmc/C20 (the ease of adsorption relative to the ease of micellization), and Gibbs free energy of adsorption and micellization. From the dynamic light-scattering measurements, the aggregates of gemini surfactants were very small, and two hydrodynamic diameters above the cmc were observed. The fluorescence intensity ratio of the first to the third band in the emission spectra of pyrene started to lower from far above the cmc for gemini surfactants. This suggests that loose micelles or premicellar aggregates are formed in solutions. Thus, sugar-based gemini surfactants exhibited unique properties superior to the conventional monomeric surfactants.

1. 緒 言

界面活性剤は非常に広範囲な用途を持つ化学工業製品の1つであり、家庭用・業務用洗剤、化粧品、繊維、土木、建築などの様々な製品に用いられている。近年では、バイオテクノロジーやウイルス研究などの先端技術分野への界面活性剤の応用拡大が図られ¹⁾、さらに最小限の量で最大限の効果を発揮する新規界面活性剤の研究・開発が進められている。界面活性剤の向上・改良を進める上で、従来の性能と同等あるいはそれ以上の性能を持ち、低毒性で分解性が良くかつ環境にやさしいなどの機能を付した機能性界面活性剤の開発が望まれている。界面活性剤の性能を向上させるには、(1)異なる種類の界面活性剤を混合させる、(2)界面活性剤への新たな官能基の付与、(3)新しい構造を有する界面活性剤の分子設計・合成などが挙げられる。特に、1分子内に2本の疎水鎖と2個の親水基を持ち、ポリエチレンなどの短い連結基(スパーサー)によって繋いだ構造のGemini型界面活性剤^{2)~4)}は、近年多いに注目

されている。一般に、Gemini型界面活性剤は、従来の単鎖型界面活性剤と比べて、高い水への溶解性、低い臨界ミセル濃度 (cmc) や高い表面張力低下能を有することで知られている。これまでに、Gemini型界面活性剤の合成や物性に関する数多くの研究が報告されてきたが、構造と物性との間には不明瞭な点が多く残されている。

近年、グルコースやマルトースなどの糖を骨格とし、長鎖アルキル鎖をグリコシド結合により導入した糖型界面活性剤が注目されている^{5)~7)}。これらは、従来工業的に合成されている界面活性剤とは異なる特異的な化学構造と界面活性性、さらに優れた生分解性および生物活性などの特性を有している。そのため、資源、環境、安全をコンセプトとする次世代の工業資源として大きく期待されており、化粧品や石油三次回収において実用化が進められている。さらに、糖型界面活性剤は良好な起泡力と泡沫安定性を持ち、洗浄力が強く硬水中での使用も可能で、1980年代後半からは洗剤に使用されている。また、糖型界面活性剤のほとんどは1あるいは2本の長鎖アルキル基をグリコシド結合などにより糖と連結させたものであり^{8)・9)}、アルキル基含有の化合物に複数の糖鎖を導入した研究例^{10)・11)}は少ない。

本研究では、糖鎖を有するGemini型界面活性剤を分子設計、合成して、表面張力や光散乱測定などから界面化学的特性を評価し、さらに、化粧品や洗浄分野における分散剤、乳化剤、洗浄剤としての効果を調べ、実用条件で効率の優れた機能性界面活性剤の開発を目指すことを目的とする。



Development and Applications of Novel Sugar-Based Surfactants

Tomokazu Yoshimura

Faculty of Science, Tokyo University of Science

2. 実験

2.1 糖鎖を有する Gemini 型界面活性剤の合成

2.1.1 2鎖型化合物の合成¹²⁾

1-プロパノールに溶解させたエチレンジアミンに、2.2倍モルの臭化アルキル（オクチル、デシル、ドデシル）を加え、還流下30時間加熱撹拌した。反応中はアルカリ条件を保つため、水酸化ナトリウム-メタノール溶液を滴下しながら、チモールフタレインにより溶液が青色であることを確認した。反応終了後、1-プロパノールを減圧留去して、粘状物を pH13 の NaOH 水溶液で洗浄し、ろ過した。得られた固体をジエチルエーテルに溶解させて、この溶液に HCl ガスを約1時間流し、析出物をエタノールで再結晶することにより N, N'-ジアルキルエチレンジアミン塩酸塩を得た。IR および ¹H NMR スペクトル、元素分析により構造を確認した後、N, N'-ジアルキルエチレンジアミン塩酸塩をアルカリ水溶液に入れて加熱撹拌した。室温に冷却した後、ジエチルエーテルで数回抽出を行い、エーテル層を減圧留去して得られた固体物をアセトンで再結晶して、N, N'-ジアルキルエチレンジアミンを得た。

2.1.2 糖鎖の導入

メタノールに溶解させた N, N'-ジアルキルエチレンジアミンに、大過剰量のラクトビオン酸を加え、窒素雰囲気、還流下、100時間加熱撹拌した。反応終了後、メタノールを減圧留去して、残物をヘキサンで洗浄し、次いでメタノール-クロロホルム-アンモニア水の混合溶液（5:4:1）で2回洗浄して未反応のラクトビオン酸を除去した。得られた固体を2-プロパノールで再結晶することにより N, N'-ジアルキル-N, N'-ジラクトビオニルエチレンジアミン (2C_nLac, n は炭化水素鎖長で 8, 10, 12) を得た (Fig.1)。構造は、IR および ¹H NMR スペクトル、元素分析により確認した。

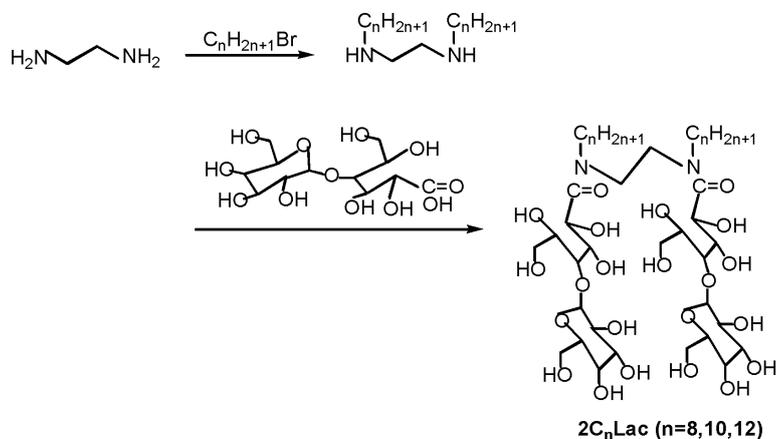


Fig.1

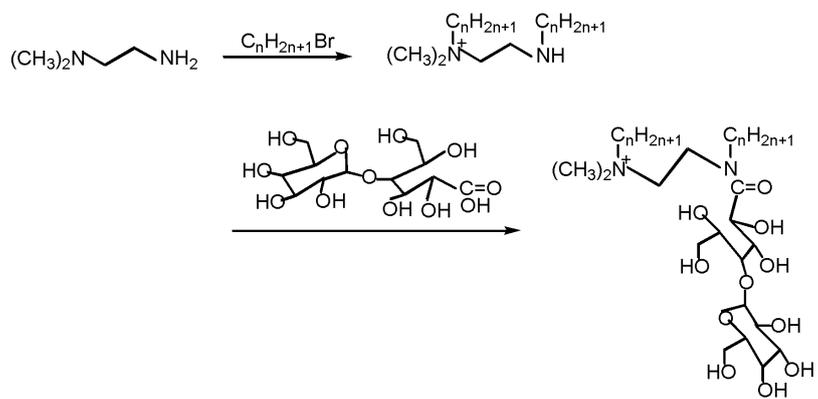


Fig.2

2.2 糖鎖とアンモニウム基を有する

Heterogemini 型界面活性剤の合成

2.2.1 2鎖1親水基型化合物の合成

メタノールに溶解させた N, N'-ジメチルエチレンジアミンに、2.0倍モルの臭化アルキル（オクチル、デシル、ドデシル）を加え、還流下10時間加熱撹拌した。反応中はアルカリ条件を保つため、水酸化ナトリウム-メタノール溶液を滴下しながら、

チモールフタレインにより溶液が青色であることを確認した。反応終了後、メタノールを減圧留去して、残った粘状物をアセトンに溶解させて不溶物の塩を取り除いた。さらにアセトンを除いて、得られた固体を酢酸エチルおよびヘキサンで洗浄、酢酸エチルで再結晶して、N-[2-(アルキルアミノ)エチル]-N, N'-ジメチル-1-アルキルアンモニウム臭化物を得た。構造は、IR および ¹H NMR スペクトル、元素分析により確認した。

2.2.2 糖鎖の導入

メタノールに溶解させた N-[2-(アルキルアミノ)エチル]-N, N'-ジメチル-1-アルキルアンモニウム臭化物に、大過剰量のラクトビオン酸を加え、窒素雰囲気、還流下、50時間加熱撹拌した。反応終了後、メタノールを減圧留去して、残物をヘキサンで洗浄し、次いでメタノール-クロロホルム-アンモニア水の混合溶液（5:4:1）で2回洗浄して未反応のラクトビオン酸を除去した。得られた固体を2-プロパノールで再結晶することにより N-[2-(N'-アルキル-N'-ラクトビオニルアミノ)エチル]-N, N'-ジメチル-1-アルキルアンモニウム臭化物 (2C_nAmLac, n は炭化水素鎖長で 8, 10, 12) を得た (Fig.2)。構造は、IR および ¹H NMR スペクトル、元素分析により確認した。

2.3 界面化学的特性

合成した新規な糖鎖を有する Gemini 型界面活性剤の表面張力を、自動表面張力計 Kruss K100 を用いてウィルヘルミー法により 25°C で測定した。各濃度での平衡表面張力を得るために、表面張力値の変化が毎 9 分で 0.05 mN m⁻¹ 以下となるまで測定を行なった。cmc と cmc における表面張力は、表面張力と濃度の対数曲線の屈曲点から決定した。

会合体の流体力学的直径は、大塚電子製 DLS-7000 装置により 488nm のアルゴンレーザーを用いて散乱角 90 度で測定した。全ての溶液は、測定前にセルロースエステル製の 0.2μm フィルターでろ過して用いた。解析はヒストグラム法により拡散係数を決定し、Stokes-Einstein の式を用いて流体力学的直径を算出した。

界面活性剤水溶液の蛍光測定は、日立 650-10S 蛍光分光光度計によりプローブにピレンを用いて測定した。スペクトルは 335nm の励起波長、360 ~ 400nm で記録し、ピレンの濃度は 1 × 10⁻⁵ mol dm⁻³ とした。ピレン蛍光スペクトルの振動バンドの低波長側から数えて 1 番目と 3 番目の強度比 (I₁/I₃) より、水溶液中の会合体の疎水的環境を評価した。

3. 結果及び考察

合成した糖鎖を有する Gemini 型界面活性剤 2C_nLac および 2C_nAmLac は、高い水溶性を示し、室温から温度を上げても溶液は濁ることなく、曇点は認められなかった。2C_nLac および 2C_nAmLac の水溶液は、従来型の界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウム SDS に劣らず高い起泡力と泡沫安定性を示した。

糖鎖を有する Gemini 型界面活性剤 2C_nLac および 2C_nAmLac は、水溶液中で高い界面活性を有した。2C₁₀Lac の表面張力と濃度の関係を、類似構造の単鎖型 N-decylactobionamide (C₁₀Lac) とともに Fig. 3 に示す。表面張力は濃度の増加とともに低下し、cmc と考えられる明瞭な屈曲点が認められた。Gemini 型 2C₁₀Lac の cmc は、単鎖型 C₁₀Lac の cmc の約 100 分の 1 であり、低濃度で優れたミセル形成能が見られた。2C₁₀Lac の cmc における表面張力は、C₁₀Lac とほぼ同等の値であり、32.3mN m⁻¹ であった。Gibbs の吸着等温式を用いて算出した 2C₁₀Lac の表面過剰濃度と分子占有面積は、それぞれ 4.63 × 10⁻⁶ mol m⁻²、0.36nm² molecule⁻¹ となり、Gemini 型界面活性剤が水表面に効率よく高密度に吸着配向していることがわかった。

pC₂₀ 値は溶液の表面張力を 20mN m⁻¹ 低下させるのに必要なバルク液相の界面活性剤濃度 (C₂₀) の逆数の対数値であり、吸着効率を示す尺度として用いられ、また、cmc/C₂₀ 比の値は優先的に吸着するかあるいはミセルを形成するかを相対的に示す値である。pC₂₀ が大きくなると界

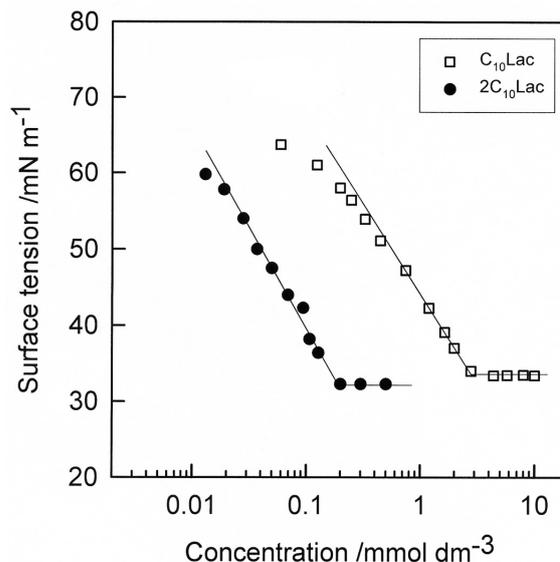


Fig. 3

面活性剤は一層効率的に界面に吸着し、表面張力低下能は高くなる。cmc/C₂₀ 比が大きいと吸着が促進されたかあるいはミセル形成が吸着よりも阻害されたかであり、小さいとミセル形成が促進されたかあるいは吸着がミセル形成よりも阻害されたことを意味する。糖鎖を有する Gemini 型界面活性剤の pC₂₀ 値は単鎖型に比べてやや小さく、cmc/C₂₀ 比は大きくなった。これは、単鎖から Gemini 型になると、ミセル形成よりも界面への吸着が促進され、その吸着はかなり強いことが示唆される。

糖鎖を有する Gemini 型界面活性剤の水溶液中での会合体の大きさを動的光散乱を用いて求めた結果、予想に反してかなり小さな値が得られ、数百 nm にも分布が認められた。これは、おそらくミセル以外にも大きな会合体が存在することを示している。また、プローブにピレンを用いた蛍光スペクトル法より、表面張力で得た cmc 以上の濃度で Gemini 型界面活性剤のミセルにピレンが可溶化され、濃度の増加とともに徐々に会合体が形成されることがわかった。

4. 総括

このように分子設計、合成した糖鎖を有する Gemini 型界面活性剤は、優れた界面活性を有するだけでなく、従来の単鎖型界面活性剤には見られない特異的な性質を持つことがわかった。特に、単鎖型から疎水鎖を 2 本にし、親水基に糖を用いることにより気液界面での吸着効率が高くなり、水溶液中では小さな会合体と大きな会合体が存在することが明らかとなった。これらの性質は大変興味深いものであり、今後の研究が期待される。また、化粧品や洗浄分野で重要な分散剤、乳化剤、洗浄剤としての効果を調べ、

実用条件で効率の優れた機能性界面活性剤の開発を進める予定である。

(参考文献)

- 1) 堀内照夫, : 機能性界面活性剤の開発技術. シーエムシー 1994
- 2) Zana R, : Dimeric (Gemini) - Surfactants, in Novel Surfactants: Preparation, Applications, and Biodegradability, In : Holmberg K, (ed) : Surfactant Science Series Vol. 74, Marcel Dekker, New York, 1998, 241 - 260.
- 3) Zana R, : Dimeric (Gemini) Surfactants, in Structure - Performance Relationships in Surfactants, 2 nd., In : Esumi K, Ueno M, (eds) : Surfactant Science Series Vol. 112, Marcel Dekker, New York, 2003, 341 - 380.
- 4) Rosen M J, : Geminis : A New Generation of Surfactants, CHEMTECH, 23, 30 - 33, 1993.
- 5) 石上裕 : バイオサーファクタントの特性と機能, 表面, 27, 457 - 472, 1989.
- 6) 石上裕 : 界面活性剤の化学構造と機能の関する研究, 日本油化学会誌, 45, 229 - 242, 1996.
- 7) 藤井富美子 : バイオサーファクタント, 日本油化学会誌, 45, 1013 - 1021, 1996.
- 8) Wilk K A, Syper L, Burczyk B, Maliszewska I, Jon M, Domagalska B W, J. Surfact. Deterg., 4, 155 - 161, 2001.
- 9) Burczyk B, Wilk K A, Sokolowski A, Syper L, J. Colloid Interface Sci., 240, 552 - 558, 2001.
- 10) Pilakowska-Pietras D, Lunkenheimer K, Piasecki A, J. Colloid Interface Sci., 271, 192 - 200, 2004.
- 11) Komarek U, Wilk K A, J. Colloid Interface Sci., 271, 206 - 211, 2004.
- 12) Yoshimura T, Esumi K, for submitted.

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

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所有機材料分野

岩 崎 泰 彦

Hydrogels are insoluble, cross-linked polymer networks that can absorb significant amounts of water. From a biological viewpoint, hydrogels are as flexible as soft tissues, which minimize their potential irritation to surrounding tissue. More recent trends in hydrogel research are macromolecular drug delivery and cell entrapment for tissue engineering. For these applications, biodegradability and biocompatibility of hydrogels are important.

There has been a great deal of interest in polyphosphates, which are biodegradable through hydrolysis, and possibly enzymatic digestion of phosphate linkages under physiological conditions. These biodegradable polyphosphates appear interesting for biological and pharmaceutical applications because of their biocompatibility and structural similarities to the naturally occurring nucleic and teichoic acid.

To obtain a novel biodegradable cross-linker, polymerizable polyphosphate (PIOP) was synthesized by ring-opening polymerization of 2-*i*-propyl-2-oxo-1,3,2-dioxaphospholane with 2-(2-oxo-1,3,2-dioxaphosphoroyloxyethyl methacrylate) (OPEMA). The number averaged molecular weight of the PIOP was 1.2×10^4 and the number of OPEMA units in one PIOP molecules was 2.2. Nonenzymatic degradation of the PIOP was evaluated in various pH aqueous media. The degree of hydrolysis was dependent on the pH, that is, it increased with an increase in the pH of the medium. At pH 11.0, the PIOP completely degraded only 6 days. The poly[2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)] cross-linked with the PIOP was prepared by radical polymerization. This polymer could form hydrogel and the free water fraction in the hydrogel was high. The enzymatic activity of trypsin in contact with the hydrogel was similar to that in buffer solution. There is no adverse effect caused by the hydrogel to reduce the function of the trypsin. The cytotoxicity of poly(MPC) and degraded PIOP was evaluated using v79 cells and it was not observed in either case.

In conclusion, PIOP is a hydrolyzable polymer, which can be used as a cross-linker, and novel hydrogels having biodegradability and biocompatibility were prepared from poly(MPC) cross-linked with the PIOP.

1. はじめに

軟組織を対象とした医療において、柔らかく、ある程度の体積をもち、ひずみをかけると変形し、可逆的に元に戻るポリマーゲルは非常に効果的である。

ゲルを定義すると“三次元の網目構造をもった分子量が無限大の物質”、“あらゆる溶媒に不溶の三次元の網目構造をもつポリマーおよびその膨潤体”あるいは“液相と固相とが同時に存在している状態”などがあげられる。ゲル化は架橋によってもたらされるが、架橋構造の生成は必ずしも化学反応による必要はない。

近年、ヒドロゲルの分子設計は多岐にわたり、その機能も単に高吸水を目的とするだけでなく、物理的または化学的刺激に応じて物性を変化させるインテリジェントゲル^{1,2)}、分子の選択的に認識できる分子インプリントゲル³⁾、生体内で一定期間存在した後、分解吸収されるバイオデグラダブルゲル（生分解性ゲル）⁴⁾が調製されている。これらの

ゲルは、物質透過性を周囲の環境に応じて変化させることができるため、薬物徐放担体としての利用が検討されている。特にタンパク質などの生体高分子の徐放担体や細胞を天然の状態で内包することができる人工細胞外マトリックスとしての利用が、ヒドロゲルの新たな展開として注目されている。

生体内での安定性と適度な強度を考慮すると化学結合型のゲルが有効であるが、架橋剤には毒性を示すものもあるため、分解生成物と同様に生体に悪影響を及ぼさない分子を選択する必要がある。一方、物理架橋型ゲルは、架橋剤を必要としないため、安全性、分解性の面で有利であるが、生体分子やイオン強度によってゲルの性質変化しやすいため、生理的条件下で安定に存在し、ある特定の刺激に応じて解離もしくは分解するゲルを調製することが課題である。

生体内におけるポリマーの分解機構は、酵素的、非酵素的分解の二つに分けられる。前者は、生体内に存在する酵素による特異的な分解であるのに対し、後者は、水との接触にともなう加水分解である。このような機構により分解され得る官能基をポリマーの主鎖に導入することにより、生分解性を有するポリマーを得ることができる。その多くは、天然の代謝物であるアミノ酸、糖、 α -ヒドロキシ酸、あるいは脂肪酸をポリマーの主鎖に含むポリマーが合成される。



A novel biodegradable polyphosphate cross-linker for making biomimetic hydrogel

Yasuhiko IWASAKI

Tokyo Medical and Dental University

天然ポリマーであるゼラチンのヒドロゲルやコラーゲンスポンジは、組織工学に用いられている分解性ゲルの代表例である。特にコラーゲンは天然の細胞外マトリックスに含まれ、細胞の接着、増殖には非常に適したマテリアルである。これらのゲルに様々な細胞増殖因子を含ませ徐放することにより、心臓冠動脈の再建や脂肪組織の再生が可能なることが報告されている⁵⁾。一方、天然ポリマーを原料とした場合、ポリマーの構造安定性や生物学的安全性がしばしば問題となるため、これらの点を十分に注意しなければならない。

本研究では、生体に優しいヒドロゲルの創製を目的とし、生体の構造に注目して新たに分子設計された分解性ゲルを合成し、その特性を詳細に評価した。

2. 生分解性ゲル

生体内で分解するポリマーは、縫合糸、硬組織の修復材、癒着防止膜、徐放性医薬等、医療に関係した様々な用途に用いられている。これまで透水性に分解性を制御するためポリ乳酸やポリグリコール酸など、比較的疎水性の高い脂肪族ポリエステルが用いられる。これら脂肪族ポリエステルは酵素的、非酵素的に加水分解し、分解生成物が生体の代謝経路に取り込まれるため、生体適合性に優れていると考えられ、旧来の生分解性ポリマーの用途に加え、組織を再生するための細胞の足場となる多孔質体（スキャホールド）にも利用されている。しかしながら、ポリマー自身の生体適合性に関する検討は十分でなく、分解速度が小さいことや高い結晶性と乏しい溶解性によるポリマーの生体内での残留⁶⁾、分解による極度なpH低下が細胞、組織にあたる影響⁷⁾など危惧される点も多い。また、タンパク質やペプチドを医薬として連続的に徐放するための担体や、細胞を患部に注入し一定期間留めておく担体として分解性ポリマーが有効と考えられるが、疎水性の高い旧来の分解性ポリマーでは、タンパク質や細胞を失活させずに内包することは不可能であり、生体と同様な高い含水特性を有するハイドロゲルタイプの分解性ポリマーが必要となる。

表-1に分解性ゲルの架橋の方法とその例をまとめた³⁾。この表に示すようにゲルの分子設計は様々であり、化学架橋、物理架橋それぞれ多くのゲルが設計されて

いる。化学架橋のゲルはデキストラン等の多糖を縮合や付加反応により架橋したものや酵素でペプチド結合を形成させたゲルも報告されている。一方、物理的に架橋したゲルは、様々な分子間相互作用を巧みに利用しゲル化を誘導している。すなわち、ポリマー自身の分解が起らなくとも、何らかの外的要因にともない分子間相互作用が阻害されることにより、ゲルは崩壊する。物理架橋の現象は天然ポリマーに多く見られる。天然ポリマーのゲル化は調理法を含む食品関係と共に、薬剤にも広く用いられており、アルギン酸とカルシウムイオンを混ぜることにより得られるゲルはその代表例である⁸⁾。また、温度に応答してゲル化するポリマーには、ゼラチン、アガロース、アミロース、アミロペクチン、セルロース類縁体、カラギナン、Gellan[®]に代表される多糖などがあげられる。ここにあげた全ての天然ポリマーは有機溶媒中にくらべ水中でゲルを形成しやすい。その機構はポリマーが3重螺旋構造（ゼラチン）や2重螺旋構造（多糖）を形成することによって結晶化がすすみ、この結晶の成長に伴いゲル化がおこる⁹⁾。高い温度では、これらのポリマーはランダムコイル状態をとっている。温度を下げることにより、螺旋構造が形成される。

一方、温度に応答してゾルゲル相転移を示すポリマーも分子間力を巧みに利用して形成されるヒドロゲルとして興味深い。親水性ユニット（HPL）と疎水性ユニット（HPB）を交互に結合したトリブロックコポリマー（HPL-HPB-HPL）水溶液が温度変化に伴いゾルゲル相転移を示すことが報告されている^{10,11)}。HPLにポリエチレングリコ

表-1 分解性ゲルの設計

	橋架け形成機構	例
化学架橋	重合と同時に橋架け	グリシジルメタクリレートとデキストランポリホスフェートゲル
	高分子鎖を後橋架け	水酸基、アミン、ヒドラジド基をもつポリマーとアルデヒド
	付加反応	ジイソシアネートとデキストラン
	縮合反応	縮合剤によるゼラチンの架橋
	γ線	PVA, PEG, PA
	酵素反応	アミド結合生成
物理架橋	イオン結合	アルギン酸とカルシウムイオン
	結晶性	PVA
	ステレオコンプレックス	PLLA-PEG-PLLAとPDLA-PEG-PDLA
	疎水結合	両親媒性ポリマー
	水素結合	ポリメタクリル酸とPEG
	タンパク質相互作用	人工タンパク質 抗原抗体反応

ール (PEG) に HPB にポリプロピレンオキシド (PPO) を有する PEG-PPO-PEG はその代表例である。PEG-PPO-PEG は Pluronic[®] または Poloxamer[®] と称され、非イオン性界面活性剤として一般に使用されている。Alexandridis らは PEG-PPO-PEG 水溶液の物理化学的性質やその応用を明確に報告している¹²⁾。一方、Kim らは HPB に分解性ポリマーであるポリ-L-ラクチド (PLLA) を有する PEG-PLLA-PEG を合成し、このブロックポリマーも温度に依存したゾル-ゲル転移を示すことを見出した¹³⁾。この他にも HPB にポリ-L-ラクチドとポリグリコリドのコポリマー (PLGA) を有する PEG-PLGA-PEG¹⁴⁾、PEG とポリ(ε-カプロラクトン) (PCL) のマルチブロックコポリマー¹⁵⁾、PLGA に PEG をグラフトしたコポリマー¹⁶⁾ や PEG に PLGA をグラフトしたコポリマー¹⁷⁾ がゾル-ゲル転移を示すことが明らかとなっている。

一方、ポリマーの立体構造を制御することによりゲルを調製することも可能である。ポリラクチドの L 体、D 体を PEG 両端にもつトリブロックポリマーを水中で混ぜることによりポリラクチドがステレオコンプレックスを形成し、これが架橋点となりゲル化する¹⁸⁾。ステレオコンプレックスの形成により物理架橋型ゲルの中でも比較的強固なゲルが調製できる。Hennik らは、デキストランに L 体と D 体のラクチドオリゴマーを導入し、ラクチドオリゴマー間のステレオコンプレックス形成を介したヒドロゲルの調製に成功した¹⁹⁾。このように 2 種類のポリマーを混ぜることにより得られるゲルは、温度などの外的な環境を変化させることなくゲルを調製できるため非常に有効である。

3. 生体に倣って設計された分解性ヒドロゲル

筆者らは、これまでに生体膜の構造に着目し、図-1 に示した MPC を一成分とする種々のポリマーを合成し、これらのポリマーが優れた生体適合性を示すことを明らかにした²⁰⁻²²⁾。MPC および MPC ホモポリマーは水溶性であり、疎水性のアルキルメタクリレートと共重合することにより、その溶解性を制御できる。例えば、MPC とブチルメタクリレート (BMA) とのランダムコポリマーでは分子量により多少の変動はあるものの、MPC 組成が 30% を境に水に対するポリマーの溶解性が変化する。このように MPC ユニットは非常に高い親水性を示すが、旧来の親水性ポリマーとは異なり、水との相互作用が極めて小さいことが MPC ポリマーの特徴である。MPC ポリマーに含水した、もしくは、MPC ポリマーを溶解した水の構造を調べてみると、自由水の割合が非常に多い²⁰⁾。全ての生体反応の媒体として働く水の構造がポリマーとタンパク質との相互作用に影響をあたえることが近年報告されている²³⁾。すなわち、水の構造を壊すことにより、ポリマー表面へのタンパク質吸着や吸着タンパク質の変性が誘導される。タンパク質吸着は生体とポリマーが接触した際に最も短時間に見られる現象

であり、非特異的なタンパク質吸着はポリマーに対する生体の異物認識反応の原因となる。高い親水性を示しながら水の構造を破壊しない MPC ポリマーは、タンパク質と非特異的に相互作用せず、生体と伴に用いられるヒドロゲルを調製するための最適なポリマーであると言える。

Nam らは MPC と BMA のコポリマーと MPC とメタクリル酸のコポリマーの水溶液を混合することにより、容易にヒドロゲルが形成されることを見出した²⁴⁾。両者のポリマーは水溶液中で疎水性相互作用と水素結合を駆動力としゲル化することが、ラマン分光分析法から明らかとなっている (図-2)。すなわちこれらの相互作用を利用することにより、ゲルの形成、崩壊を自由にコントロールすることが可能になる。彼等は、この物理ゲルをタンパク質の担体とし用いることを考えた。MPC ポリマーはタンパク質等の生体ポリマーとの相互作用が極めて弱く、MPC ポリマーがタンパク質の構造変化や機能低下を惹起しないため、このような目的には最適な材料と言える。インスリン等のポリペプチドを体内に投与する場合、消化器官を利用することが得策である。しかしながら、消化器官にはタンパク質分解酵素が存在するため、ポリペプチドを保護し、消化器官に吸収されやすくするために水溶性ポリマーで覆うことにより効率の良い送達が可能である。

筆者らは脂肪族ポリエステルに代わる分解性結合を主鎖にもつポリマーとしてポリホスフェートを採用し、新しいヒドロゲルを調製した²⁵⁾。ホスフェート結合は核酸をはじめ

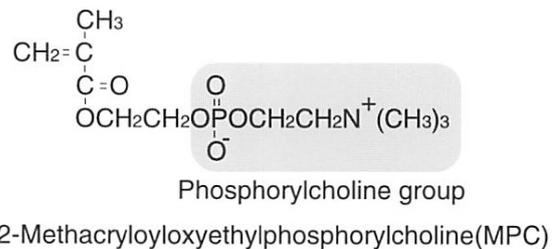


図-1 MPCの構造

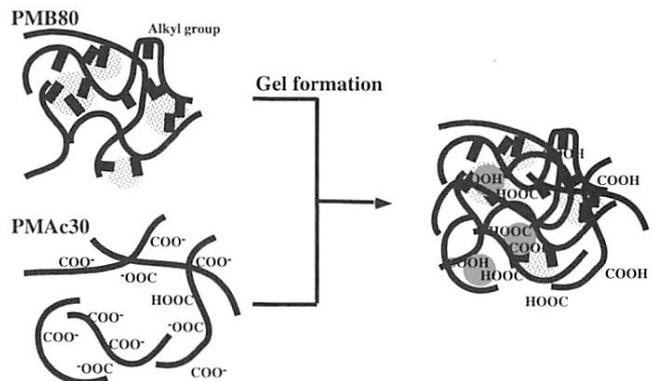


図-2 水溶性MPCポリマーのゲル化機構

め生体内に存在し、この結合を主鎖にもつポリホスフェートは非酵素的な加水分解および酵素的に分解される。ポリホスフェートの合成の検討は比較的古くから行われ、環状リン酸化合物の開環重合、塩化リン化合物の重縮合によりものが一般的である。最近では、リパーゼを用いた酵素重合でもポリホスフェートが得られることが明らかとなっている。ポリホスフェートの溶解性は側鎖の構造によって制御可能であり、イソプロピル基や*t*-ブチル基等のアルキル鎖を有するポリマーは、水に不溶であるが、加水分解に伴い脱アルコール化されることにより、水に可溶となる。

近年、このホスフェート結合を主鎖にもつポリマーのバイオマテリアルとしての有効性が認められはじめている。Wangらは、エチルジクロロホスフェートを鎖延長剤としてポリエチレンテレフタレートにホスフェート結合でつないだポリホスホエステルの中空糸を調製し、神経再生のガイドチューブとしての有効性を見出した²⁶⁾。Leongらは、側鎖にスベルミジン等のカチオン性基を有する水溶性ポリホスフェートはポリエチレンジイミンに比べ細胞毒性がほとんど認められず、DNAと安定なコンプレックスを形成することから、カチオン性ポリホスフェートが遺伝子キャリアとして有効に働くことを明らかにした²⁷⁾。

ポリホスフェートは溶解性や分解性が典型的な脂肪族ポリエステルに比べ優れており、化学修飾も容易なため新規な生分解性バイオマテリアルとしてとても興味深い。ホス

フェート結合をもつ新しい分解性ゲルの検討もすすめられている。Wangらはポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)(PHEMA)とポリエチレンオキシドをホスフェート結合でつなぎ含水ゲルを得た²⁸⁾。この含水ゲルは細胞を生存させたまま内包することが示されている。しかしながら、分解生成物の中に水に不溶なPHEMAが含まれるため、更なる分子設計が望まれる。

筆者は、重合性をもつポリホスフェートを得るために2種類の環状リン酸化合物、2-*i*-プロピル-2-オキソ-1,3,2-ジオキサホスホラン(IPP)と2-(2-オキソ-1,3,2-ジオキサホスホロイルオキシ)エチルメタクリレート(OPEMA)は既報に従い合成した²⁹⁾。トリイソブチルアルミニウム(TIBA)を開始剤として用い、開環重合によりIPPとOPEMAのコポリマー(PIOP)を合成した。PIOPの構造を図-3に示す。ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)および¹H-NMRによりPIOPを解析したところ、トリイソブチルアルミニウム(TIBA)とOPEMAの濃度を0.3 mol%、2.0 mol%とした時、分子量(Mw)11000、分子量分布1.3と単分散に近いポリホスフェートが得られ、PIOPの単分子当たりのOPEMAのユニット組成が2.2となった(表-2)。PIOPはエタノール、THF、DMSO、クロロホルムに溶解し、水、ジエチルエーテル、ヘキサンに不溶であった。

pHを変化させてPIOPの加水分解を調べたところ、pH4.0でPIOPの分解は極めて遅く、40日後も95%残存

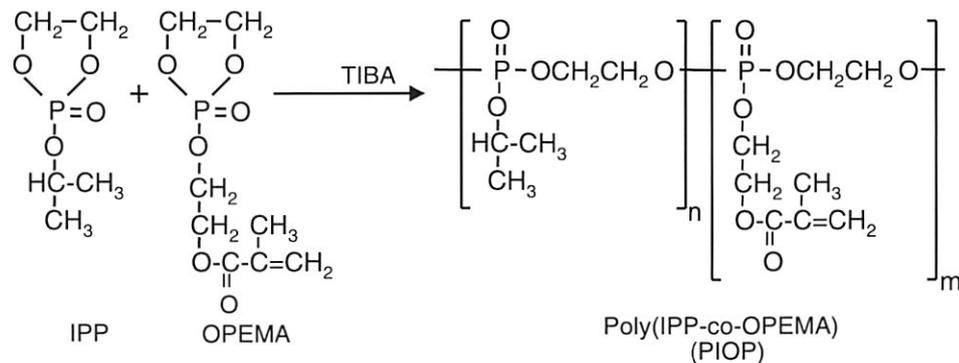


図-3 重合性基を有するポリホスフェートの合成

表-2 PIOPの合成結果

重合時間	重合温度	[開始剤]	[OPEMA]		収率	分子量	Mw/Mn	PIOP一本鎖当りに含まれるPIOPのユニット数
(h)	(°C)	(mol%)	仕込み	ポリマー中	(%)	($\times 10^3$)		
2	0	0.30	2.0	3.0	17	12.0	1.3	2.2

a) ゲル浸透クロマトグラフィーを用い解析

b) ¹H-NMR解析より算出

していたのに対し、pH11.0では6日でほぼ完全に分解した。PIOPの加水分解はpH環境に大きく影響を受けることが分かった。Penczeckらは、ポリホスフェートの加水分解とpHの関係について詳細に検討しており、PIOPの加水分解とpHの関係は彼等の見解に一致していた。また、彼等は塩基性条件下では側鎖と主鎖の分解がほぼ同時に、酸性条件では主鎖より側鎖の方が早く分解することも明らかにしている [30]。

続いて所定濃度のPIOPとMPC、および重合開始剤である2,2'-アゾビスイソブチロニトリルをエタノールに溶解し、溶液を十分脱気した後、ポリエチレン製の型の中で重合することによりPIOPで架橋した無色透明のPMPCゲル(PCPG)を得た。図-4にPCPGの写真を示す。このゲルは水中で膨潤し、PIOPの仕込み濃度により膨潤度が変化した(表-3)。PCPG中に含まれた水の構造を示す差走査熱量計(DSC)により解析し、自由水と束縛水の割合を求めた。MPCとPIOPによるヒドロゲル(PCPG)に含まれる自由水含率は高く、平衡膨潤時にPCPGに含まれた水の77%が自由水であったのに対し、MPCの代わりにポリエチレングリコール鎖を有するメタクリレートを用い調製したゲル(PEPG)に含まれる自由水の割合は56%であった。すなわちPCPGは含水した水の構造からも生体との相互作用を惹起し難いこと理解できる。PCPGおよびPEPGに所定時間接触させたトリプシンの活性を図-5に示す。トリプシンは自己消化により、水溶液の状態を経時的にその活性が低下する。PCPGに接触したトリプシンの活性は緩衝液に溶解したトリプシンと同様な活性を維持していることがわかった。一方、PEPGに接触したトリプシンの活性は有意に低下した。PCPGはトリプシンの活性に全く影響を与えず、生体分子に対し不活性なゲルであることが明らかとなった。

図-6にPCPGゲルの加水分解特性を示す。pH4.0およびpH7.4では分解速度が極めて小さく、40日後でも重量が初期値の80%以上であるのに対し、pH11.0では40日間でPCPGは消失した。すなわち塩基性環境下でPCPGの加水分解は著しく、架橋剤であるPIOPの分解性と一致していた。分解生成物の化学構造を¹H-NMR、分子量をGPCで確認すると、pH4.0およびpH7.4で分解した物質には、主に低分子量のリン酸系化合物が確認されたのに対し、pH11.0の分解生成物には、リン酸化合物に加え、分子量10万程度のMPCのホモポリマーが存在することを確認した。

分解生成物の毒性をハムスター繊維芽細胞(v79細胞)のコロニー形成能に与える影響により調べた。PIOPの分解生成物およびMPCホモポリマーがv79細胞のコロニー形成におよぼす結果を図-7に示す。コントロール試薬として用いた亜鉛化合物は細胞毒性を示し、濃度の増加に伴

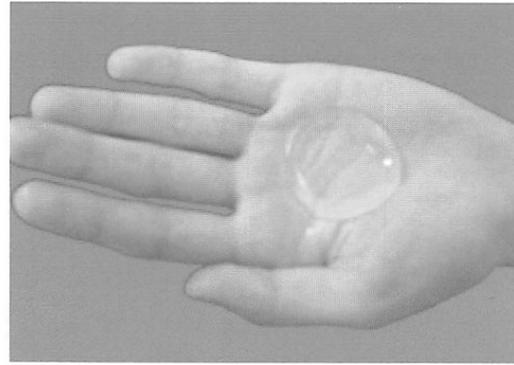


図-4 PIOPで架橋したPMPCゲル(PCPG)

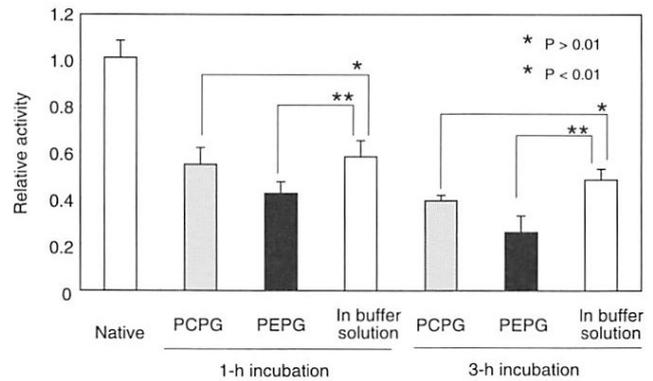


図-5 ポリマーゲルに所定時間接触したトリプシンの活性

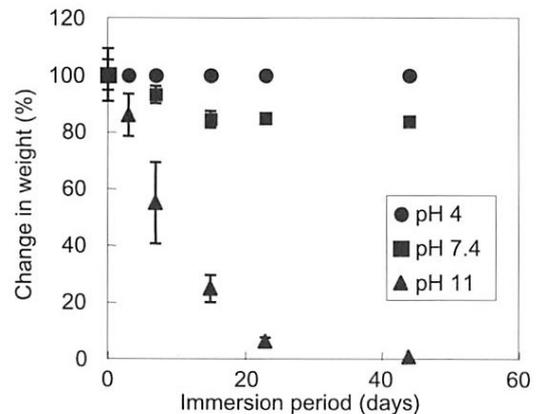


図-6 様々なpHにおけるPCPGの加水分解速度

表-3 ゲルの含水率

Abb.	モノマーの仕込み比 ^{a)} MPCとPIOP内のOPEMA ユニットとの割合 (mol%)	含水率 ^{b)} (wt%)	自由水含率 ^{c)}
PCPG 1.0	99.0/1.0	90.2	0.77 (0.02)
PCPG 0.2	99.8/0.2	92.8	—
PCPG 0.1	99.9/0.1	97.8	—
PEPG 1.0 ^{d)}	99.0/1.0	83.3	0.56 (0.03)

^{a)} [モノマー] = 1.0 mol/L, [AIBN] = 5 mmol/L

^{b)} 含水率 = (ゲルに含まれる水の重さ / 含水ゲルの重さ) × 100

^{c)} 示差走査熱量計により算出: 平均 (標準偏差)

^{d)} ジエチレンオキシド鎖を有するモノマーをMPCの代わりに使用

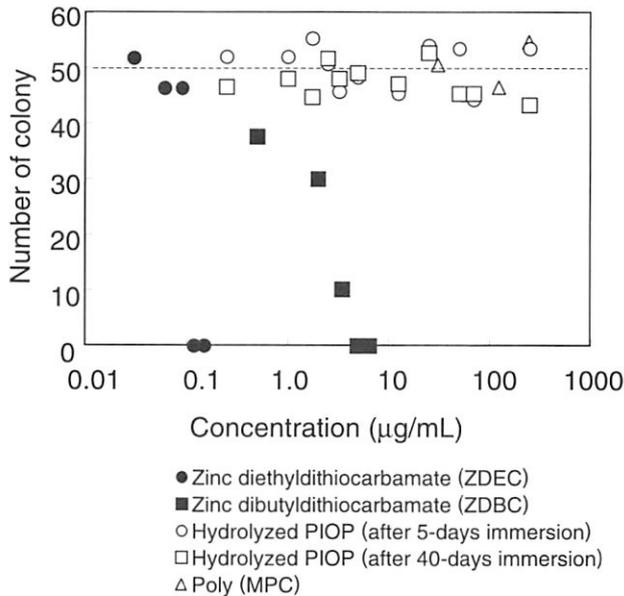


図-7 分解生成物の細胞毒性評価

い、コロニー形成は阻害された。一方、PIOPの分解生成物およびMPCホモポリマーが共存してもコロニー形成に全く影響なかった。

4. まとめ

本研究では、生体の構造に倣った分子設計手法に基づき、新しい生分解性ヒドロゲルを調製した。ヒドロゲルは生体と同様な高含水特性を有することから、生体に適したポリマー材料と考えられているが、生体適合性に優れ生体内環境に応じて分解する架橋材や、分子間相互作用を巧みに利用した架橋形態を利用することにより、より高度な生分解性ヒドロゲルを得ることができる。ポリホスフェートで架橋したMPCポリマーヒドロゲルは、分子設計により分解の制御が可能であり、生体適合性にも優れていることから、コスメトロジーへの利用はもちろんのこと、医療や薬学でも非常に有効なヒドロゲルとして期待できる。

貴財団にご支援頂きましたこの一年間、生体に優しい新たなポリマーの開発を遂行しすることが出来ました。謹んで感謝いたします。

(参考文献)

- 1) Qiu Y, Park K, :Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 53, 321-339, 2001.
- 2) Kikuchi A, Okano T, :Pulsatile drug release control using hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 53-77 2002.
- 3) 浦上忠, 宮田隆志, :選択的分子認識インテリジェント高分子ゲルの開発, *バイオインダストリー*, 20, 23-35 2003.
- 4) Hennink WE, van Nostrum CF, :Novel crosslinking

methods to design hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 13-36, 2002.

- 5) Yamamoto M, Ikada Y, Tabata Y, :Controlled release of growth factors based on biodegradation of gelatin hydrogel, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn*, 12, 77-88, 2001.
- 6) Kimura T, :Biodegradable polymers, In :Tsuruta T, Hayashi T, Kataoka K, Ishihara K, Kimura Y (eds) :*Biomedical applications of polymeric materials*", p.163, CRC press, Boca Raton, FL,1993, 163-189.
- 7) Li SM, Garreau H, Vert M, :Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(a-hydroxy acids) in aqueous media. part 1: poly(DL-lactic acid), *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 1, 123-130 1990.
- 8) P. Gacesa et al., :Alginates, *Carbohydr. Polym.*, 8, 161-182, 1988.
- 9) Park K, Shalaby W, Park H (eds), :*Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*, Technomic, Lancaster,1993.
- 10) Jeong B, Kim SW, Bae YH, :Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 37-51, 2002.
- 11) Kissel T, Li Y, Unger F, :ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 99-134, 2002.
- 12) Alexandridis P, Hatton TA, :Poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modelling *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 96, 1-46, 1995.
- 13) Jeong B, Bae YH, Lee DS, Kim SW, :Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems, *Nature*, 388, 860-862, 1997.
- 14) Jeong B, Choi YK, Bae YH, Zentner G et al., :New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems, *J. Controlled Release*, 62, 109-114, 1999.
- 15) Lee JW, Hua F, Lee DS, :Thermoreversible gelation of biodegradable poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene glycol) multiblock copolymers in aqueous solutions *J. Controlled Release*, 73, 315-327, 2001.
- 16) Jeong B, Wang LQ, Gutowska A, :Biodegradable thermoreversible gelling PLGA-g-PEG copolymers, *Chem. Commun.*, 16, 1516-1517, 2001.
- 17) Jeong B, Kibbey MR, Birnbaum JC, Won YY et

-
- al., :Thermogelling biodegradable polymers with hydrophilic backbones: PEG-g-PLGA, *Macromolecules* 33, 8317-8322, 2000.
- 18) Willem M. Stevels MW, Ankone MJK, Dijkstra PJ, Feij_n J, :Stereocomplex formation in ABA triblock copolymers of poly(lactide) (A) and poly(ethylene glycol) (B), *Macromol. Chem. Phys.*, 11, 3687-3694, 1995.
- 19) de Jong SJ, De Smedt SC, Wahls MWC, Hennink WE et al., :Novel self-assembled hydrogels by stereocomplex formation in aqueous solution of enantiomeric lactic acid oligomers grafted to dextran, *Macromolecules*, 33, 3680, 2000.
- 20) Ishihara K, Nomura H, Mihara T, Kurita K et al., :Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption?, *J. Biomed. Mater. Res.*, 39, 323-330, 1998.
- 21) Iwasaki Y, Nakabayashi N, Ishihara K, :Preservation of platelet function on 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-graft polymer as compared to various water-soluble graft polymers, *J. Biomed. Mater. Res.*, 57, 72-78, 2001.
- 22) Iwasaki Y, Sawada S, Ishihara K, Khang G et al., :Reduction of surface-induced inflammatory reaction on PLGA/MPC polymer blend, *Biomaterials*, 23, 3897-3903, 2002.
- 23) Tsuruta T, :Contemporary topics in polymeric materials for biomedical applications, *Adv. Polym. Sci.*, 126, 1-51, 1996.
- 24) Nam KW, Watanabe J, Ishihara K, :Characterization of the spontaneously forming hydrogels composed of water-soluble phospholipid polymers, *Biomacromolecules*, 3, 100-105, 2002.
- 25) Iwasaki Y, Komatsu S, Narita T, Akiyoshi K et al., :Biodegradable phosphorylcholine polymer hydrogels cross-linked with vinyl-functionalized polyphosphate, *Macromol. Biosci.*, 3, 238-242, 2003.
- 26) Wang S, Wan AC, Xu X, Gao S et al., :A new nerve guide conduit material composed of a biodegradable poly(phosphoester), *Biomaterials*, 22, 1157-1169, 2001.
- 27) Zhao Z, Wang J, Mao HQ et al., Polyphosphoesters in drug and gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55, 483-499, 2003.
- 28) Wang DA, Williams CG, Li Q, Sharma B et al., : Synthesis and characterization of a novel degradable phosphate-containing hydrogel, *Biomaterials*, 24, 3969-3980, 2003.
- 29) Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N, :Preparation of phospholipids polymers and their properties as polymer hydrogel membrane, *Polym. J.*, 22, 355-360, 1990.
- 30) Baran J, Pencze S, :Hydrolysis of Polyesters of Phosphoric Acid. I. Kinetics and the pH Profile, *Macromolecules*, 28, 5167-5176, 1995.

コラゲナーゼ抑制作用をもつ天然物の探索

千葉大学大学院 薬学研究院

石橋 正己

In order to maintain the elasticity of the skin it is important to prevent reduction of collagen with collagen decomposition enzyme (collagenase). Search and development of a compound with collagenase inhibitory activity is therefore one effective method for aging prevention of the skin. During our studies on search for new biologically active natural products from unexploited tropical plants, marine algae, and nudibranchs, here we investigated a search for collagenase-inhibitory substances from natural resources. As a result of our screening program against collagenase inhibitory activity using extracts of 92 medicinal tropical plants, 100 marine algae, and 27 nudibranchs, we selected 7 plants, 6 algae, and 3 nudibranchs as active samples. The leaves of *Melastoma polyanthum* (Melastomataceae), collected in Thailand, were extracted methanol, and the methanol extract was successively partitioned with ethyl acetate and water. The ethyl acetate soluble fraction, which was found to be active against collagenase inhibitory test, was subjected to repeated chromatographies on silica gel column and reverse-phase HPLC to isolate four flavonoids, kaempferol 2,4-di-*O*-(*trans*-p-coumaroyl)- β -D-galactopyranoside, 3-*O*-kaempferol 2-*cis*-p-coumaryl-6-*trans*-p-coumaryl- β -D-galactopyranoside, 3-*O*-kaempferol 2-*trans*-p-coumaryl-6-*cis*-p-coumaryl- β -D-galactopyranoside, and 3-*O*-kaempferol 6-galloyl- β -D-galactopyranoside, and these compounds exhibited collagenase inhibitory activity. From a brown alga *Ishige okamurai* (Ishigeaceae), collected at Boso Peninsula, a phlorotannin, diphloretohydroxycarmalol, was first isolated as a naturally occurring form and was fully characterized here, while from another brown alga *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae), two sterols, 24-methylenecholesterol and fucosterol, were isolated. From a nudibranch *Pleurobranchus hirasei* (Pleurobranchidae) collected also at Boso Peninsula, a sterol peroxide, 5,8 α -epidioxy-5 α -cholest-6-en-3 β -ol, was obtained and identified on the basis of spectral data. While extracts of these algae and nudibranchs showed collagenase inhibitory activity, isolated sterols did not show the inhibitory activity and active components of these extracts have not been isolated yet.

1. 緒言

皮膚は表皮と真皮から構成されており、中でも、表皮の内側で皮膚の構造の大部分を占める真皮が、皮膚の弾力性やハリを保つ役割を担っている。真皮の約9割は膠原線維からなり、その主要成分はコラーゲンである。シワやタルミ、シミなどの皮膚の老化現象は、この真皮の主要成分であるコラーゲンの減少・変性に起因することが多いと考えられる。従って、皮膚の弾力性やハリを保つためには、コラーゲンの減少を防ぐことが重要であり、また一方、コラーゲンの分解はコラーゲン分解酵素（コラゲナーゼ）によって引き起こされる。以上のことから、コラゲナーゼの作用を抑制することは皮膚の老化防止のための一つの有効な方法であると考えられる。従って、コラーゲンを分解するコラーゲン分解酵素（コラゲナーゼ）を抑制する作用をもつ化合物の探索および開発が強くのぞまれる。本研究では、コラゲナーゼ抑制作用を示す低分子化合物を、とくに天然物を素材として探索し、皮膚老化防止に役立つ物質を発見

することを第一の目的とする。

一方、コラーゲンは、いわゆる細胞外マトリックスの一種である。ここ十数年程の細胞生物学、分子生物学の飛躍的な進歩により、細胞間の接着あるいは細胞内外でのシグナル伝達等多様な生物現象において、細胞外マトリックスがきわめて重要な役割を果たしていることが次第に明らかとなり、今後、最も注目される分子の一つとも考えられている。従って、細胞外マトリックス分解酵素（別名、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP））の一つとして位置付けられるコラゲナーゼの作用を抑制する低分子化合物を発見できれば、コスメトロジーへの貢献はもちろんであるが、それに加えて、コラーゲンが関わる多様な生理現象の分子機構の解明等に寄与することも大いに期待される。

コラゲナーゼ群には、4種のMMP（すなわち、MMP-1, MMP-8, MMP-13, およびMMP18）が属することが知られている。これまでにMMP阻害物質の天然物からの探索に関しては、伏谷、清木らによるマトリックスプロテアーゼ（＝コラゲナーゼ）阻害剤を海綿動物から探索したという報告はあるものの、まだそれほど研究例は多くない。合成化合物に関してもMMP阻害作用を示すいくつかのペプチド性合成化合物が知られているものの、コラゲナーゼに特異的に結合する有効な低分子化合物の開発のためにさらに異なったタイプの基本構造をもつ低分子リード化合物の出現がのぞまれている。



Search for Natural Products with Collagenase Inhibitory Activity

Masami Ishibashi
Chiba University

2. 実験

2.1. スクリーニング

実験試料として、熱帯薬用植物 92 種、千葉県房総半島産海藻 100 種、千葉県房総半島産ウミウシ 27 種を用いて、コラゲナーゼ阻害作用に関するスクリーニングを行った。コラゲナーゼ阻害活性試験は、96 穴プレートを用い、次のような方法で行った。

- ① サンプル溶液 (1% MeOH 水溶液) を 1 穴あたり 50 L 分注する。
- ② 酵素溶液 (10 g/mL, pH7.4, 50 mM Tris-HCl 溶液) を 1 穴あたり 100 L 分注する。
- ③ 37℃にて、10 分間プレインキュベーション後、基質溶液 (5 M, pH7.4, 50 mM Tris-HCl 溶液) を 50 L 分注する。
- ④ 37℃にて、60 分間インキュベーション後、励起波長 320nm, 検出波長 405nm で測定する。
- ⑤ 60 分間の MOCAC 遊離量をコントロール (サンプル 0 μg/mL) と比較し、MOCAC 遊離率とする。遊離率が低いほど酵素が阻害されている [遊離率 (%) = 100 - 阻害率 (%)]。

ここで、基質としては、MOCAC-Pro-Leu-Gly-Leu-A2pr (Dnp) -Ala-Arg-NH₂ (MOCAC : (7-Methoxycoumarin-4-yl) acetyl, Dnp : Nε - (2,4-Dinitrophenyl)) を用いる。また、Phosphoramidon (N-(α-Rhamnopyranosyloxyhydroxy phosphinyl)-Leucyl-Tryptophan) を陽性対照として用いた。

スクリーニングの結果、熱帯薬用植物 7 種、海藻 6 種、ウミウシ 3 種を活性サンプルとして選別した (表 1)。

2.2. 活性成分の分離・精製

2.1. で選別した活性サンプルをメタノールで抽出し、続いて溶媒分画により数種の画分に分配した。得られた画分について、各種分離用担体を用いたカラムクロマトグラフィーを行い、化学成分を単離した。

2.3. 単離された成分の化学構造の決定

2.2. で分離された成分に対して、核磁気共鳴法や高分解能質量分析法などの最新の各種機器分析法を駆使することにより、化学構造の解明を行った。

2.4. 単離された成分の生物活性の測定

2.2. で分離された成分に対して、コラゲナーゼ抑制活性に関する再測定を行った。以下、これらの実験の結果について、その概要を記す。

3. 結果

3.1. 植物成分の研究

コラゲナーゼ抑制活性を示した熱帯薬用植物 7 種のう

表 1 コラゲナーゼ抑制活性を示したサンプル

学名	科	遊離率 (%) (100 μg/mL)
熱帯薬用植物		
<i>Bridelia siamensis</i>	Euphorbiaceae	38.4
<i>Pluchea indica</i>	Compositae	25.5
<i>Ehretia microphylla</i>	Boraginaceae	39.3
<i>Ipomoea pescaprae</i>	Convolvulaceae	26.3
<i>Melastoma polyanthum</i>	Melastomataceae	17.6
<i>Curcuma domestica</i>	Zingiberaceae	12.6
<i>Emilia sonitifolia</i>	Compositae	33.6
海藻		
<i>Ishige okamurae</i>	Ishigeaceae	49.6
<i>Sargassum ringgoldianum</i>	Sargassaceae	46.6
<i>Undaria pinnatifida</i>	Phaeophyceae	40.3
<i>Cladophora wrightiana</i>	Cladophoraceae	19.1
<i>Chaetomorpha spiralis</i>	Cladophoraceae	34.8
<i>Padina japonica</i>	Dictyotaceae	36.7
ウミウシ		
<i>Elysia abei</i>	Elysiidae	59.0
<i>Pleurobranchus hirasei</i>	Pleurobranchidae	54.0
<i>Doriopsilla miniata</i>	Dendrodorididae	58.0

ち、まず、ノボタン科 *Melastoma polyanthum* の成分研究を行った。

今回入手した *Melastoma polyanthum* の葉のメタノール抽出物 6.9 g を用いて、まず、溶媒分配により、酢酸エチル可溶部 1.94g, ブタノール可溶部 2.07g, 水可溶部 2.7g を得た。各画分のコラゲナーゼ抑制活性は 100 g/mL で、各々、15.6, 38.0, および 33.9% であった。従ってまず、最も顕著な活性が認められた酢酸エチル可溶部について、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル系およびクロロホルム/メタノール系) を行った後、最も顕著な活性を示したフラクションを最終的に逆相 HPLC (Develosil RPAQUEOUS-AR-5, 10×250 mm; 70% MeOH; UV 220 nm) にて精製し、4 種のフラボノイド配糖体 MP1 ~ MP4 を各々 19.5, 3.0, 1.0, および 1.1 mg 単離した。MP1 ~ MP4 は各種スペクトルデータの文献値¹⁾ との比較により、3-*O*-kaempferol 2,4-di-*O*-(*trans*-*p*-coumaroyl)-β-D-galactopyranoside, 3-*O*-kaempferol 2-*cis*-*p*-coumaroyl-6-*trans*-*p*-coumaroyl-β-D-galactopyranoside, 3-*O*-kaempferol 2-*trans*-*p*-coumaroyl-6-*cis*-*p*-coumaroyl-β-D-galactopyranoside, および 3-*O*-kaempferol 6-galloyl-β-D-galactopyranoside と同定した (図 1)。これらのうち、MP2 と MP3 は新規化合物であった。

MP1 ~ MP4 の他にも、同抽出物から 4 種以上の類縁化合物を単離しており、それらの化学構造の決定について検討している。

単離した MP1 ~ MP4 についてコラゲナーゼ抑制活性を調べたところ、MP1 に最も強い活性が認められた (表 2)。しかしながら、MP1 ~ MP4 だけでは粗抽出物の活性の強さを説明できなかった。

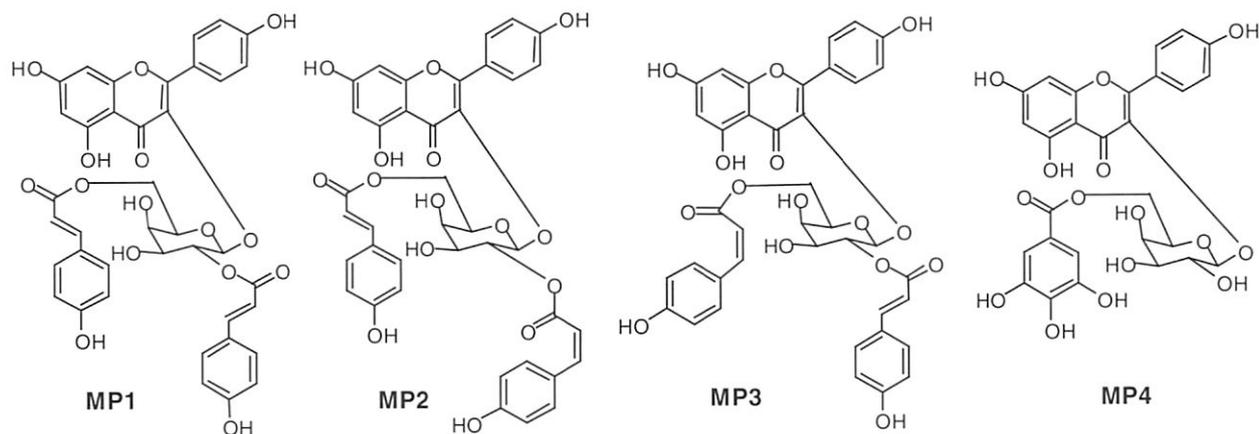
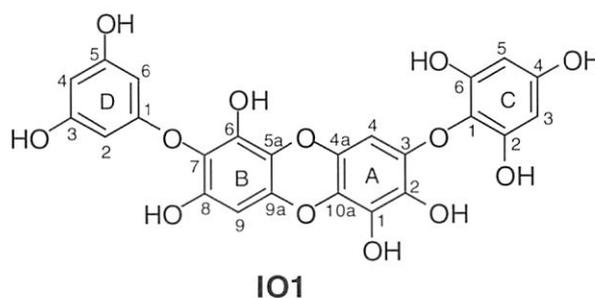


図1 MP1~MP4の化学構造

表2 MP1~MP4のコラゲナーゼ抑制活性

化合物	遊離率 (%)	
	100 μ g/mL	10 μ g/mL
MP1	15.5	76.1
MP2	27.6	83.3
MP3	39.4	87.1
MP4	23.2	85.6



IO1

図2 IO1の化学構造

3. 2. 海藻成分の研究

2. 1. で選別した海藻6種のうち、まず、褐藻 *Ishige okamurae* および *Undaria pinnatifida* の成分研究を行った。

房総半島・天津小湊町で採取した褐藻 *Ishige okamurae* (湿重 280 g) のメタノール抽出物 21.7 g に対して、ヘキササンと 90% メタノールで溶媒分配を行った。90% メタノール可溶部 (17.8 g) について、ダイヤイオン HP-20 によるカラムクロマトグラフィーを行って色素を除去した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返し行い [(i) 2.0 \times 18 cm, クロロホルム/メタノール (5:2); (ii) 1.5 \times 22cm, クロロホルム/メタノール/水 (16:8:1)], 最終的にセファデックス LH-20 カラム (1.0 \times 38cm, メタノール) にて精製し、1 種のプロロタンニン IO1 を 153 mg 単離した。IO1 は褐色非晶質固体として得られ、高分解能マスペクトルにより分子式 $C_{24}H_{16}O_{13}$ をもつことが分かった (m/z 512.0589, Δ -0.2 mmu)。各種スペクトルデータの解析の結果、IO1 は以前、褐藻 *Carpophyllum maschalocarpum* より分離されていた diphlorethohydroxycarmalol²⁾ と同定した (図2)。ただし、diphlorethohydroxycarmalol は以前はノナアセタート体として単離され、ヒドロキシ型では単離された報告はなかったため、今回詳細にスペクトルデータの帰属を行った (表3)。

一方、同様に房総半島・天津小湊町で採取した褐藻 *Undaria pinnatifida* のメタノール抽出物 36.8 g を用いて、まず、溶媒分配により、酢酸エチル可溶部 2.6 g、ブタノ

表3 IO1 (diphlorethohydroxycarmalol) の¹H および¹³C NMRデータ

position	δ_H (J in Hz)	δ_C
Ring A		
1		139.5
2		126.3
3		145.9
4	6.05 s	94.1
4a		138.6
10a		124.0
1-OH	9.12 s	
Ring B		
5a		130.6
6		135.0
7		142.8
8		125.4
9	5.69 s	92.2
9a		133.7
6-OH	8.47 br s	
8-OH	8.98 br s	
Ring C		
1		122.8
2, 6		151.2 (2C)
3, 5	5.86 s (2H)	94.9 (2C)
4		154.8
2, 6-OH	9.12 br s (2H)	
4-OH	9.02 br s	
Ring D		
1		160.0
2, 6	5.67 d 1.8 Hz (2H)	93.6 (2C)
3, 5		158.8 (2C)
4	5.77 t 1.8 Hz	96.0
3, 5-OH	9.09 br s (2H)	

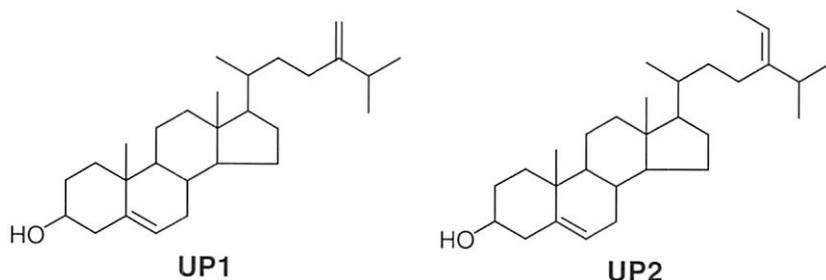


図3 UP1およびUP2の化学構造

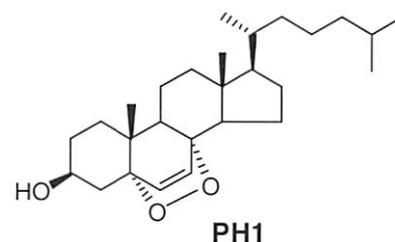


図4 UP1およびUP2の化学構造

ール可溶部 1.7 g, 水可溶部 30.9 g を得た. 各画分のコラゲナーゼ抑制活性は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において, 各々, 42.8, 93.8, および 100% であった. 従って酢酸エチル可溶部に本活性が集約したため, 酢酸エチル可溶部について, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル系およびクロロホルム/メタノール系) を行った後, ダイイオン HP-20 カラムにて色素を除去し, 最終的に逆相 HPLC (Develosil ODS HG-5, 20 x 250 mm; 100% MeOH; UV 220 nm) にて精製し, 2 種のステロール UP1 および UP2 を各々 1.2 および 1.3 mg 単離した. UP1 および UP2 は各種スペクトルデータの解析の結果, 各々 24-methylenecholesterol および fucosterol と同定した (図 3). 単離した UP1 および UP2 についてコラゲナーゼ抑制活性を調べたところ, これらの化合物には活性が認められなかった.

3. 2. ウミウシ成分の研究

2. 1. で選別したウミウシ 3 種のうち, まず, カメノコフシエラガイ *Pleurobranchus hirasei* の成分研究を行った.

房総半島・天津小湊町で採取したカメノコフシエラガイ *Pleurobranchus hirasei* (湿重 25.7g) のメタノール抽出物 0.97 g に対して, 酢酸エチルと水で溶媒分配を行った. コラゲナーゼ抑制活性が認められた酢酸エチル可溶部について, シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い (1.0 x 35 cm, ヘキサン/酢酸エチル系), つづいて逆相 HPLC (Develosil RPAQUEOUS-AR-5, 10 x 250 mm; 70% MeOH; UV 220 nm) にて精製し, 1 種のステロールパーオキシド PH1 を 0.5 mg 単離した. PH1 は各種スペクトルデータの解析の結果, 5,8 α -epidioxy-5 α -cholest-6-en-3 β -ol と同定した (図 4). 単離した PH1 についてコラゲナーゼ抑制活

性を調べたが, 活性が認められなかった.

4. 考 察

熱帯薬用植物, 海藻, ウミウシを材料として, コラゲナーゼ抑制成分の探索を行った. これまでのところ, 活性成分として, ノボタン科植物 *Melastoma polyanthum* から 3-*O*-kaempferol 2,4-di-*O*-(trans-*p*-coumaroyl)- β -D-galactopyranoside (MP1) を得た. 同時に, MP1 に関連する構造をもつ新規化合物を単離した. 一方, 他の材料からは現在のところ, 明確な活性成分の単離には至っていない. これまでのスクリーニングの結果を概観すると, 植物に含まれるタンニン類等, 高極性のフェノール系化合物にはコラゲナーゼ阻害活性を有する可能性が高いことが示唆された. さらに研究を継続して, 当研究室でこれまでに構築した未開拓天然物材料ライブラリーを素材として, 総合的かつ系統的な材料の確保およびスクリーニングを行えば, 新しいタイプのコラゲナーゼ抑制物質の発見が可能であると考えられる.

謝 辞

本研究を遂行するに当たり, ご支援をいただきましたコスメトロジー研究振興財団に感謝申し上げます.

(文 献)

- 1) Romussi G, Bignardi G, Pizza C, De Tommasi N.; Constituents of Cupuliferae. XIII. New and revised structures of acylated flavonoids from *Quercus suber* L., *Archiv der Pharmazie*, 324, 519-524, 1991.
- 2) Li SM, Glombitza KW.; Carmalols and phlorethofuhalols from the brown alga *Carpophyllum maschalocarpum*, *Phytochemistry*, 30, 3417-3421, 1991.

生体適合性超薄膜の吸水および保湿特性の評価

東北大学大学院 薬学研究科

安 齊 順 一

Polyelectrolyte multilayer films were prepared using polysaccharides as materials to elucidate the wetting properties of the thin films. Glycogen was successfully assembled into multilayer films using poly (ethyleneimine) (PEI) as a counterpart of the alternating deposition, probably through hydrogen bonding as driving force. On the other hand, anionic polysaccharides including dextran sulfate (SD), chondroitin sulfuric acid (SC), alginic acid (Alg), and sulfonated α - and β -cyclodextrins (α -SCD and β -SCD) can be assembled into thin films using PEI as a cationic component of the films. The kinetics of evaporation of water from the swelled films was studied using quartz crystal microbalance (QCM). The kinetics are composed of an initial fast evaporation and consecutive slow process. Thus, it is speculated that water is entrapped in the two different kinds of environment in the films.

1. 緒 言

各種の高分子化合物は薄膜形成が可能であり材料の表面処理などに幅広く利用されている。また、生体適合材料の開発という観点から、生体類似高分子や生体親和性高分子で材料表面に処理を施すことも行われている。生体適合材料は、人工臓器や生体センサーの開発など広範囲な利用分野があり、高機能材料の開発はきわめて重要な課題である。生体適合材料としては生体高分子を用いることが最も容易であるが、製膜特性などの性質が必ずしも好適であるとはかぎらない。特に、薄膜として利用する場合には、良好な物性の薄膜を得るためには製膜方法などに工夫が必要である。とりわけ、膜厚や膜構造を精密に制御することが、膜物性を向上させるためには重要である。

本研究では、生体適合性超薄膜を作製するために交互累積膜法を採用し、高分子材料として多糖類を用いた際の超薄膜の吸水および保湿特性について検討した。交互累積膜法は約10年前に Decher 教授らにより確立された超薄膜作製法で、正および負の電荷を持つ高分子化合物の希薄溶液にガラスや金属の基板を交互に浸すことにより、基板表面に正負の高分子化合物を静電的引力により交互に吸着固定化する方法である¹⁾。ナノメートル程度の厚さの超薄膜が作製できることや、累積回数を加減して膜厚を任意に制御できることなどの利点があり、簡便な薄膜作製技術として注目されている。Decher らの方法は、正負の電荷による静電的引力に基づくものであったが、その他の相互

作用による引力を利用する方法も確立されており、水素結合や生物的特異結合なども利用できる。この方法により、タンパク質やDNAなどを利用した超薄膜の研究も進んでいる²⁻⁵⁾。これまでに、種々の材料がこの方法により薄膜に形成されて物性が研究されているが、吸水特性や保湿性に関する検討は行われていない。良好な吸水および保湿特性の生体適合性交互累積膜が開発されれば、皮膚保護材料としての利用も可能であろう。

2. 実 験

2-1 材料

ポリエチレンイミン 30%水溶液 (PEI, 分子量 60,000-80,000) およびポリアリルアミン 20%水溶液 (PAA, 分子量 10,000) は市販品を所定の濃度に希釈して用いた。グリコーゲン (Gly)、デキストラン (Dex)、デキストラン硫酸 (SD)、コンドロイチン硫酸 (SC)、アルギン酸 (Alg)、 α -, β -, γ -シクロデキストリン (α -, β -, γ -CD)、および硫酸化シクロデキストリン (α -SCD, β -SCD) は市販品を精製することなくそのまま使用した。実験に用いた材料の化学構造を図1にまとめて示した。これらの材料の水溶液は精製水を使用した緩衝液で作製した。

2-2 装置

交互累積膜の評価と水分含量の測定には、水晶振動子マイクロバランス (QCA920、セイコー EG & G) を用いた。プローブとして用いた水晶振動子は、基準振動数 9MHz の AT カット素子で表面に直径 0.4mm の円盤状に白金が薄く被覆してある。このプローブでは、水晶振動子への物質 1ng の吸着量を約 0.9Hz の振動数変化として検出することができる。

2-3 超薄膜の作製と吸水量および保湿特性の評価

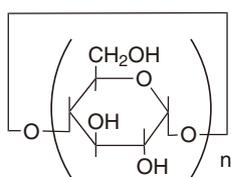
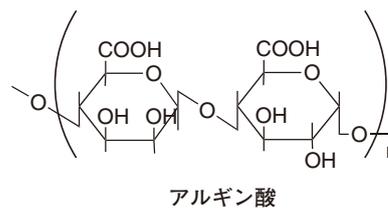
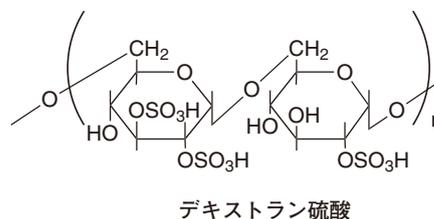
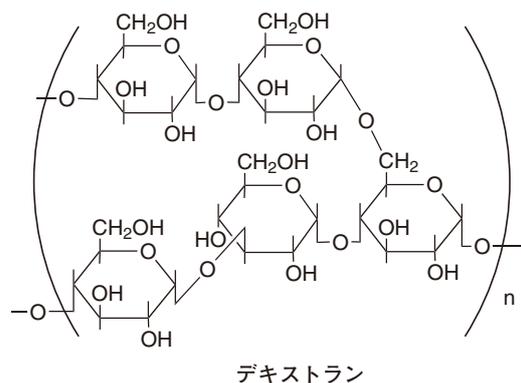
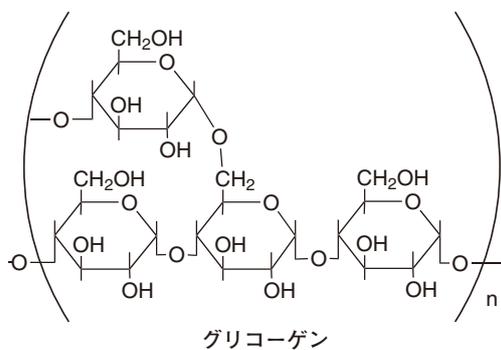
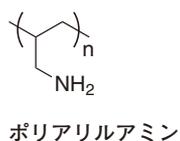
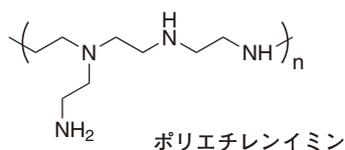
本研究では、交互累積膜の作製には2種類の異なる駆動力を用いた。すなわち、正負の静電的引力による吸着によ



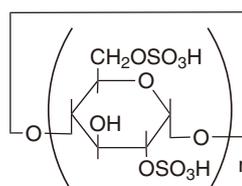
Evaluation of wetting and dewetting properties of biocompatible thin films

Jun-ichi Anzai

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University



n=6 α -シクロデキストリン
 n=7 β -シクロデキストリン
 n=8 γ -シクロデキストリン



n=6 α -硫酸シクロデキストリン
 n=7 β -硫酸シクロデキストリン

図1 本研究に用いた多糖類など高分子材料の化学構造

る方法と水素結合による方法である。前者には、多糖類として Gly、Dex、 α -、 β -、および γ -CD を用いて PEI と交互累積膜とした。この際には、これらの膜材料は 2 mg mL^{-1} の濃度のリン酸緩衝液 (pH7) として累積膜作製に用いた。また、後者には、SD、SC、Alg、 α -SCD および β -SCD を負電荷を有する多糖類とし、正電荷を持つ PAA と累積膜を作製した。この場合には、溶液濃度は 0.1 mg mL^{-1} とした。

表面を水でよく洗浄した水晶振動子を、はじめ PEI または PAA 溶液に 30 分間浸して吸着させ、つづいて蒸留水で 10 分間洗浄した。次に、多糖類の溶液に 30 分間浸して吸着させた後同様に洗浄した。この操作をくり返して任意の総数の交互累積膜を作製した。水晶振動子に上述の材料を吸着させた後に乾燥して QCM による振動数の測定を行った。表面に累積膜を被覆した水晶振動子を蒸留水に浸して充

分に吸水させてから空気中に引き上げて、そのまま風乾して水を蒸発させた。この過程の振動数変化を QCM により追跡した。

3. 結果

3-1 多糖類の累積膜の調製

はじめに、電荷を持たない多糖類と PEI を用いて交互累積膜を作製することを試みた。Gly と PEI を用いて交互累積膜を作製した際の QCM における振動数変化を図 2 に示した。縦軸に Gly と PEI を吸着させた後に乾燥させて測定した振動数を、横軸には累積膜の層数を示した。図から明らかなように、Gly および PEI を吸着させるたびに振動数が減少することがわかった。QCM の振動数変化 ($\Delta F / \text{Hz}$) と吸着物質の質量には式 (1) の関係があるので、振動数が減少したことは、水晶振動子表面に Gly と PEI が交互に吸着していることを示している。振動数変化は、5 層の累積膜、5 (Gly / PEI) 膜、で $-10,700\text{Hz}$ 、10 (Gly / PEI) 膜で $-25,100\text{Hz}$ であった。質量に換算するとそれぞれ 12mg および 28mg の (Gly / PEI) が累積膜として吸着したことを示している。

$$\text{振動数変化}(\Delta F / \text{Hz}) = -0.91 \times \text{吸着質量}(\text{M} / \text{ng}) \quad (1)$$

同様に、Dex、 α -、 β -、および γ -CD 用いた累積膜の調製を試みた。5 層の累積膜を作製したときの振動数変化は、 -550Hz (Dex)、 -730Hz (α -CD)、 -760Hz (β -CD)、および -430Hz (γ -CD) であった。これらの値は、同条件で累積膜を作製したにもかかわらず Gly に比べて 10% 以下であり著しく低いものであった。すなわち、PEI とこれらの多糖類は良好な交互累積膜になりにくいことを示している。

次に、正負の電荷の静電的引力を利用して多糖類累積膜を作製するために、SD、SC、Alg、 α -SCD、および β -SCD を用いた。これらの多糖類はどれも分子中にスルホン酸またはカルボン酸に基づく負電荷を有している。正電荷をもつ高分子材料として PAA を用いた。上記の 5 種の負電荷多糖類と PAA から交互累積膜を作製した際の QCM における振動数変化を図 3 にまとめて示した。いずれの場合にも、累積操作を重ねるに伴って振動数の減少が観察された。これは、良好に交互累積膜が作製できたことを示している。それぞれ 5 層の交互累積膜としたときの振動数変化は、 $-4,200\text{Hz}$ (SD)、 $-6,800\text{Hz}$ (SC)、 $-4,600\text{Hz}$ (Alg)、 $-6,200\text{Hz}$ (α -SCD)、および $-4,200\text{Hz}$ (β -SCD) であった。重量に換算すると、 $4,700\text{ng}$ (SD)、 $7,500\text{ng}$ (SC)、 $5,100\text{ng}$ (Alg)、 $6,900\text{ng}$ (α -SCD)、および $4,700\text{ng}$ (β -SCD) であった。これらの値は、静電的引力を利用しないで作製を試みた累積膜に比べてかなり大きな値であり、良好な累積膜が形成されていると判断できる。

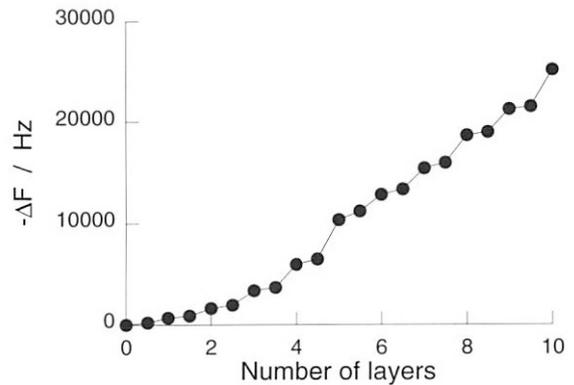


図2 PEI/Gly 交互累積膜の調製：水晶振動子マイクロバランスによる評価

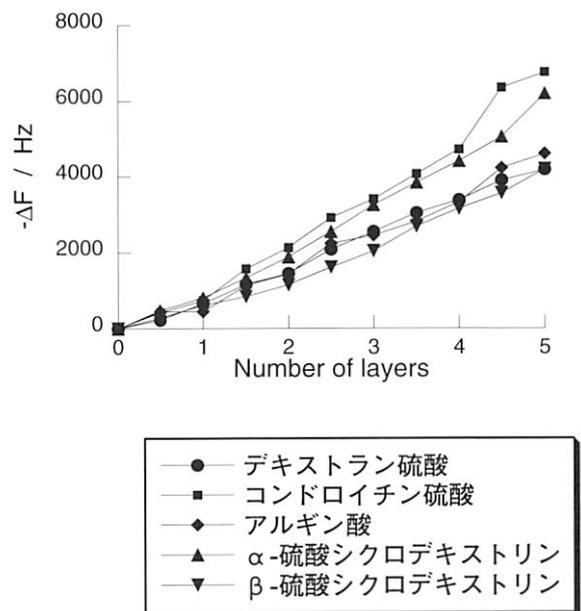


図3 種々の多糖類の累積膜の調製

3-2 多糖類交互累積膜の吸水量および保湿特性

PEI と Gly を用いて作製した 5 層の累積膜を蒸留水に浸して十分に吸水させた後に、空気中で自然乾燥したときの QCM の振動数の経時変化を図 4 に示す。はじめの 1 分程度で振動数の急激な増大がみられ、引き続いて振動数は徐々に増大して約 20 分後にはほぼ一定の値になった。この過程の振動数変化は、急激な変化は約 $10,000\text{Hz}$ 、後続の遅い過程の変化量は約 $8,500\text{Hz}$ であった。振動数が増大したことは、水晶振動子表面に形成された多糖類累積膜中から水が蒸発したために、振動子表面の質量が減少したことを示している。累積膜中から蒸発したと考えられる水の量は、それぞれの過程で 11mg および 9.4mg と計算される。既に述べたようにこの累積膜の重量は 28mg なので、膜重量にほぼ匹敵する水が累積膜の中に含まれていたと思われる。他の多糖類を用いた累積膜を用いた実験結果も、振動

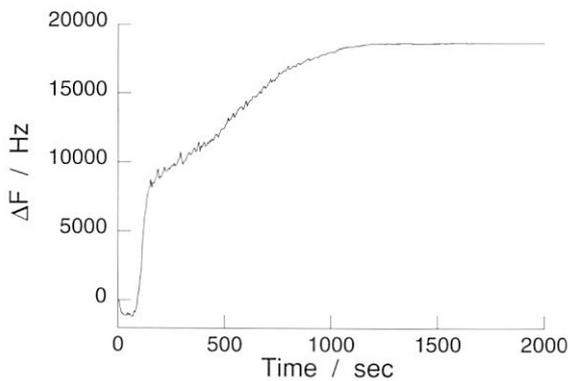


図4 PEI/Gly 交互累積膜からの水の蒸発過程

数変化の値は異なるが Gly と同様に振動数変化の早い過程と遅い過程が観察された。

次に、SD、SC、Alg、 α -SCD、および β -SCD を用いて作製した累積膜についても同様の検討を行った。QCM による結果を図5にまとめて示した。いずれの累積膜でも、図4に示した(Gly/PEI)累積膜と同様の挙動が観察された。水の蒸発に伴う振動数変化果から、これらの累積膜中に含まれていた水の重量は、7,800ng (SD)、8,800ng (SC)、10,000ng (Alg)、5,000ng (a-SCD)、および 7,800ng (b-SCD) と計算される。

4. 考察

図2の結果は、PEIとGlyを用いると交互累積膜を作製できることを示している。PEIは中性付近のpHでアミノ基の一部は水素イオンが付加して正電荷を有していると考えられるが、Glyは電荷をもたないので、この両者はアミノ基と水酸基の水素結合を介して結合したのではないかと考えられる。また、Dex、 α -CD、 β -CD、および γ -CDでも僅かの振動数変化が観察され、これらの物質が吸着していることが示唆されたが、吸着量はGlyを用いた場合に比べて非常に少なかった。これは、水素結合は弱い結合であり、結合点間の距離や配向に依存する性質をもっていることから理解できる。換言すれば、用いる材料間の構造的な相補性がよくないと良好な累積膜は形成されないことを示唆している。

一方、正負の電荷の間に作用する静電的引力を利用する累積膜では、材料の構造に著しく依存することなく概ね良好な累積膜が作製できた。各種の合成高分子を用いた交互累積膜の作製条件は詳細に検討されており、多糖類を材料として用いる場合にもこれらの条件は適用できるものと思われる。したがって、多糖類の累積膜を作製する場合には、水素結合などによって吸着させるよりも静電的相互作用による方が汎用性に富むものと思われる。なお、今回用いた多糖類材料の中には、SD、SC、Algのような鎖状多糖類とともに α -SCDおよび β -SCDのような環状オ

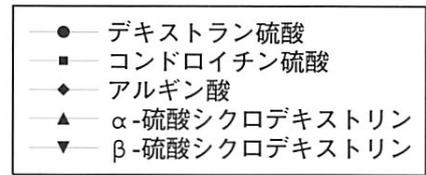
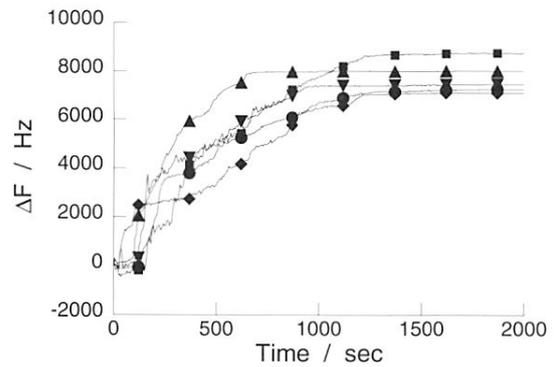


図5 種々の多糖類累積膜からの水の蒸発過程

リゴ糖も含まれ、これらも静電的引力により薄膜となることは興味深い。今回の研究目的からは逸脱するが、CD化合物は溶解補助や除放の目的で食品や医薬品の広く利用されており、CD含有超薄膜として新たな用途が広がるかも知れない^{6,7)}。

作製した多糖類累積膜の吸水過程については本研究では明らかにすることはできなかったが、累積膜中に含まれる水が蒸発する過程に関して興味ある現象が観察された。すなわち、QCMにより累積膜からの水の蒸発を追跡した結果、急激に振動数変化が起きる初期の過程と後続する緩慢な過程が、いずれの累積膜でも観察された。これは、累積膜の表面付近に存在する水の蒸発と累積膜内部に存在する水の蒸発過程に対応するのではないかと推定される。本研究で使用した多糖類累積膜の厚さは、用いた材料の密度を 1.2 g cm^{-3} と仮定すると⁸⁾、例えば10層の10 (Gly / PEI) 膜で約700ナノメートル程度、5層の5 (Alg / PEI) 膜では約130ナノメートルと計算されるが、このように薄い膜においても膜表面と膜内部に存在する水の蒸発過程(保湿特性)に差異があることは興味深い。これは、内部の水が蒸発する過程は水の膜表面までの拡散速度も蒸発速度に影響する重要な因子であり、膜表面と内部では蒸発速度を決める過程が異なることに起因するものと推定される。

本研究では、多糖類高分子として合計10種の材料を用いたが、吸水および保湿特性に関しては、材料の構造による明確な相違を明らかにすることはできなかった。また、多糖類累積膜の膜厚を変えて実験を行ったが、厚い膜には多量の吸水が観察された以外、蒸発速度に関しては膜厚の影響は観察されなかった。これらの点に関しては今後の検討課題として残った。

(参考文献)

- 1) G. Decher, J. D. Hong, Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process: II. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 95, 1430-1434, 1991.
- 2) Y. Lvov, G. Decher, G. Sukhorukov, Assembly of Thin Films by Means of Successive Deposition of Alternate Layers of DNA and Poly (allylamine) , *Macromolecules*, 26, 5396-5399, 1993
- 3) J. Anzai, Y. Kobayashi, N. Nakamura, M. Nishimura, T. Hoshi, Layer-by-layer Construction of Multilayer Thin Films Composed of Avidin and Biotin-labeled Poly (amine) s, *Langmuir*, 15, 221-226, 1999.
- 4) J. Anzai, Y. Kobayashi, Construction of Multilayer Thin Films of Enzymes by Means of Sugar-Lectin Interactions, *Langmuir*, 16, 2851-2856, 2000.
- 5) J. Anzai, T. Hoshi, N. Nakamura, Construction of Multilayer Thin Films Containing Avidin by a Layer-by-layer Deposition of Avidin and Poly (anion) s, *Langmuir*, 16, 6306-6311, 2000.
- 6) K. Sato, I. Suzuki, J. Anzai, Preparation of Polyelectrolyte-Layered Assemblies Containing Cyclodextrin and Their Binding Properties, *Langmuir*, 19, 7406-7412, 2003.
- 7) K. Sato, I. Suzuki, J. Anzai, Layered Seemblies Composed of Sulfonated Cyclodextrin and Poly (allylamine) , *Colloid Polym. Sci.*, 282, 287-290, 2004.

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

千葉大学 工学部物質工学科

上 川 直 文

Cerium (IV) oxide (CeO_2) is an n-type semiconductor and an oxygen ion conductor. It has many applications, such as in solid oxide fuel cells and oxygen sensors. Furthermore, the use of CeO_2 to shield materials from ultraviolet light has been intensively investigated. For these applications, regulation of the particle size distribution and the morphology are important issues. Furthermore, the processes by which CeO_2 particles are prepared must be as simple as possible. Here, we have reported that polyethylene glycol (PEG HO-($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_n$ -H) can be used as a solvent for inorganic salts, with the ether oxygen in the PEG acting as a base. In this research, the novel preparation method of CeO_2 fine particles were developed by using PEG solution of cerium nitrate hydrate.

Cerium oxide (CeO_2) nanoparticles were obtained by heating a polyethylene glycol solution (PEG) of cerium nitrate hydrate ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) at 383 K for 3h. When the PEG whose molecular weight was 20000, was used for the preparation, the monodispersed CeO_2 , whose particle size was *ca.* 102 nm, was obtained. When the mixture of PEG20000 and ethylene glycol (EG) was used to prepare the PEG solution of cerium nitrate hydrate, the average particle size increased from 102 nm to 660 nm with an increase in the EG content of the solution. In order to investigate the formation mechanism of CeO_2 , UV-VIS spectra and FT-IR spectra of the PEG solution of cerium nitrate hydrate were measured. According to the FT-IR spectra, the strength of hydrogen bond of water molecules in the PEG solutions was stronger than that of the pure water. Furthermore, the coordination strength of EG to cerium ion was stronger than that of PEG20000. These facts affected the solvation and oxolation process to form CeO_2 particles from the aquo complex of cerium ion.

1. 緒 言

日焼け止めとして様々な紫外線遮断材料・サンスクリーニング剤が用いられてきた。また、近年のオゾン層破壊による地上への有害紫外線照射量の増加による皮膚障害の増加、そして様々な化学物質の影響による光線過敏症の問題など有害紫外線の皮膚に与える影響が問題となっており、有害紫外線が皮膚に与えるダメージを防止するためにも紫外線遮断材料の重要性が高まっている¹⁻³⁾。

紫外線遮断材料に要求される機能は、単に紫外線を吸収するのみでなく、その効果の安定性と持続性を有しかつ生体に対する安全性を有していなければならない。また、皮膚に塗布した場合における色調の問題など紫外線防止材料として様々な観点から最適な特性を有する材料を開発して行かなければならない。今現在、以上の様な要求を満たす材料として酸化セリウム (CeO_2) が注目されている。そして更に、 CeO_2 の持つ機能を有効に活用した材料を開発するには、粒径と形態の揃った特に球状の CeO_2 粒子を合成する方法を開発する必要がある。また、この合成法は環境負荷の低いものでなければならない。

近年、低エネルギーな無機微粒子合成プロセスとして水溶液を用いた様々な合成法が報告されている。 CeO_2 においても、水酸化セリウム ($\text{Ce}(\text{OH})_3$) の水熱処理による CeO_2 粒子の調製法、ヒドラジン法、尿素を用いた均一沈殿法など様々な合成法が報告されている⁴⁻⁶⁾。しかし、これらの合成法においても、ナノレベルの粒径を有する CeO_2 粒子を効率よく合成し、粒子形態を制御するなど研究すべき課題が残されている。

本研究者は、水溶性有機高分子であるポリエチレングリコール (PEG, HO ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_n$ H) が無機塩を溶解する性質があることに注目した。そして、PEG を溶媒として用いる無機合成反応について検討を行ってきた^{7,8)}。本研究では、PEG 分子中に存在するエーテル酸素が塩基として作用することに着目した。ここで、セリウム塩の PEG 溶液を加熱処理することで PEG が溶媒としてだけでなく塩基としても作用することで溶液中で均一な粒子生成が起こり粒径の均一性の高い粒子が得られると期待される。さらに、溶媒として用いる PEG の分子量により粒子の成長速度が制御可能であり、それによって粒径や粒子形態の制御が可能であると考えられる。本研究では PEG を溶媒かつ沈澱剤として用いる新しい溶液プロセスにより CeO_2 粒子を合成する方法について検討した。

2. 実 験

2.1 CeO_2 微粒子の合成

平均分子量 1000 の PEG (PEG1000) 10.0g をビーカーに秤取り 80℃ で融解した後、硝酸セリウム 6 水和物 (Ce



Development of Spherical CeO_2 Particles for UV Shield Material with Low Environmental Load Process.

Naofumi Uekawa

Faculty of Engineering, Chiba University

(NO₃)₃·6H₂O) 5.0g を加え攪拌し溶解した。得られた透明で均一な硝酸セリウム水和物の PEG 溶液を油浴中 110℃、3h 静置し加熱処理することで沈殿物が生成した。そこで、この沈殿物を分離するために、加熱処理が終わった後の PEG 溶液を蒸留水 100ml 中に分散した後、未反応の PEG 及びセリウム塩を溶解し、遠心分離により得られた沈殿物を分離した。この沈殿物を 75℃、6h 乾燥し粉体を得た。

以上の調製法を、モノマーであるエチレングリコール (EG)、平均分子量 7500 の PEG (PEG7500)、平均分子量 20000 の PEG (PEG20000) を用いて同様の操作により合成を行った。また、EG と PEG20000 の混合溶液を用いても同様の方法で調製を行った。

2.2 キャラクターゼーション

得られた粉体について、XRD (BRUKER AXS MXP18VAHF, Cu Kα 40kV, 200mA) による結晶構造及び結晶化度の検討をおこなった。また、FE-SEM (JEOL JSM-6330) により粒子の形態及び粒径の検討を行った。さらに、77K での窒素吸着等温線測定により BET 比表面積を求め細孔構造を調べた。次に、PEG 溶液からの CeO₂ 粒子の生成過程について検討するために、硝酸セリウム水和物の PEG 溶液の FT-IR (JASCO FT/IR-350) スペクト

ルおよび UV-VIS (HITACHI U2000A) スペクトルの測定を行った。

3. 結果・考察

3.1 硝酸セリウム水和物の PEG 溶液からの球状 CeO₂ 粒子の析出現象

Fig. 1 に硝酸セリウム水和物の PEG 溶液から得られた生成物の XRD パターンを示す。溶媒として EG, PEG1000, PEG7500, PEG20000 を用いた場合すべてにおいて CeO₂ に帰属される回折ピークが得られた。これより、硝酸セリウム水和物の PEG 溶液を 110℃、3h 加熱処理するという非常に簡便な合成法により CeO₂ が得られる事がわかった。また、原料である硝酸セリウム水和物中の Ce イオンは 3 価であるが溶液中に共存する硝酸イオンによって酸化され Ce⁴⁺ が生成し CeO₂ が得られたと考えられる。また、水溶液中での CeO₂ 粒子の生成は通常塩基性条件下で起こるが、PEG 溶液を用いた場合新たに溶液に塩基を添加することなく CeO₂ が生成した。これは PEG が塩基として作用したことを示している。

Fig. 2 は得られた CeO₂ 粒子の FE-SEM 像である。Fig. 2 (a) より、エチレングリコール (EG) を用いた場合は、粒径が 50nm 以下の微細な粒子が不規則に強く凝集した構造が見られた。また Fig. 2 (b) より、PEG1000 を

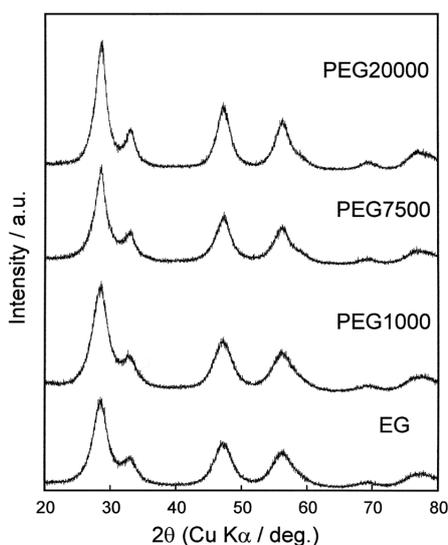


Fig.1 The XRD patterns of the powders prepared by heating the PEG solution of cerium nitrate hydrate.

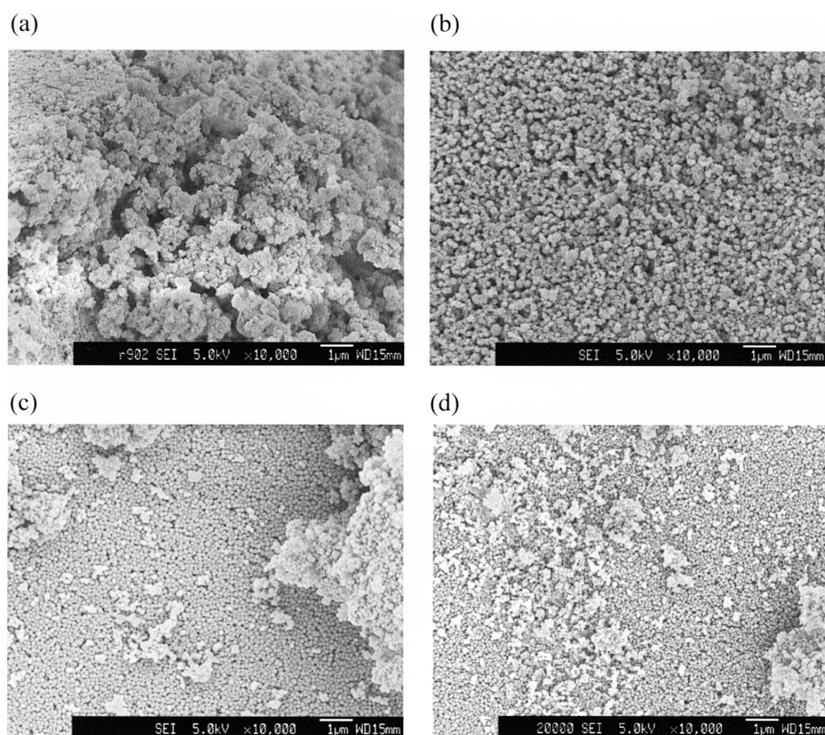


Fig.2 The FE-SEM images of the obtained CeO₂ particles from the PEG solution of cerium nitrate hydrate. The PEGs used for preparing PEG solution were : (a)EG, (b) PEG1000, (c)PEG7500, and (d)PEG20000.

用いた場合は粒径が 40nm から 300nm の球状粒子が得られる事がわかった。さらに、Fig. 2 (c), (d)より、PEG7500, PEG20000 を用いた場合、それぞれ平均粒径が 140nm と 105nm の粒径が比較的揃った球状 CeO₂ 粒子が得られる事がわかった。以上より、分子量が 1000 以上の PEG を用いることによって球状に近い形態を有する CeO₂ 粒子が得られる事が明らかとなった。この様に PEG 分子量によって粒子形態が変化したのは PEG 溶液中での CeO₂ 核発生頻度と粒子成長速度が PEG 分子量により影響を受けたためであると考えられる。また、本反応は主に水溶性化合物のみ用いられており、揮発性の高い有機溶媒を一切用いていないことから環境負荷の点からも好ましい合成法であるといえる。

3.2 硝酸セリウム水和物の EG-PEG 混合溶液からの CeO₂ 粒子の析出現象

前節でも述べたが、Fig. 2 より EG 溶液から得られた

CeO₂ 粒子と PEG20000 溶液から得られた CeO₂ 粒子はまったく異なった粒子形態を有していた。そこで、これらの異なる特性を有する EG と PEG20000 の混合物を溶媒として用いた場合にどのような CeO₂ 粒子が得られるかを検討した。Fig. 3 は、EG - PEG20000 混合物を溶媒として用いて得られた CeO₂ 粒子の FE-SEM 像である。調製に用いた EG - PEG20000 混合溶液中の EG 含有割合 (EG/(EG+PEG20000) 重量比) が 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 の時、得られた CeO₂ 粒子の平均粒径は 0.14 μ m, 0.27 μ m, 0.52 μ m, 0.66 μ m であった。この様に、硝酸セリウム水和物溶液中の EG 含有割合が増加するに従い得られる粒子の粒径が増加し、EG 含有割合によって粒径が制御可能である事がわかった。

3.3 硝酸セリウム水和物の PEG 溶液のキャラクターゼーションと CeO₂ 粒子生成機構

酸化セリウム粒子の粒子形態や粒径をより精密にコント

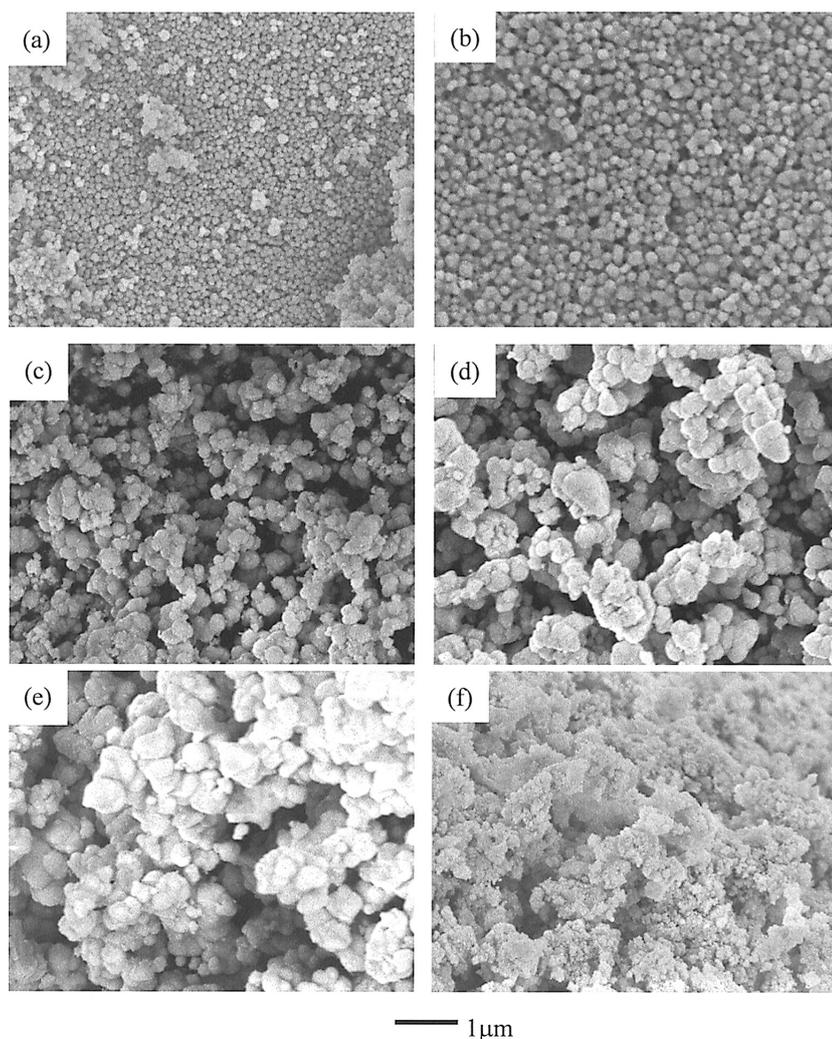


Fig.3 The FE-SEM images of the CeO₂ particles prepared by heating the PEG solution of cerium nitrate hydrate at 383K for 3h. The weight ratios EG/(EG+PEG20000) of the PEG solution were (a) 0 (PEG20000), (b) 0.05, (c) 0.1, (d) 0.2, (e) 0.5, and (f) 1 (EG).

ロールするためには硝酸セリウム水和物の PEG 溶液の加熱処理による CeO_2 粒子の生成機構について詳しく検討し理解する必要がある。一般に溶液中で CeO_2 結晶の核が生成した後粒子が成長し、さらにその表面に新たな結晶核が発生して粒成長する過程を繰り返して球状粒子の生成が起こったものと考えられる。 CeO_2 粒子表面での核発生は、溶液からの核発生と比べてより容易に起こるものと推測される。そして、溶液から直接 CeO_2 核が発生する頻度が粒子径などに大きな影響を与えると考えられる。そこで硝酸セリウム水和物の PEG 溶液中の Ce イオンの存在状態について FT-IR および UV-VIS スペクトル測定によって検討した。

Fig. 4 は硝酸セリウム水和物の PEG 溶液の FT-IR スペクトルである。Fig. 4 (a), (b) に示した硝酸セリウム水和物の EG 溶液および PEG20000 溶液に見られる 3400cm^{-1} 付近の吸収は、水素結合した OH 基によるものである。Fig. 4 (b), (c) に見られる 2800cm^{-1} 付近の吸収は CH_2 基の伸縮振動によるものである。また、Fig. 4 (b), (c) に見られる 1600cm^{-1} 付近の吸収は H_2O の変角振動によるものである。さらに Fig. 4 (a) - (c) に見られる 1400cm^{-1} 付近および 1113cm^{-1} の吸収はそれぞれ CH_2 基の変角振動と C-O-C エーテル結合の伸縮振動によるものである⁹⁾。

水溶液から CeO_2 粒子が生成する場合、溶液中に存在するアコイオン ($\text{Ce}(\text{H}_2\text{O})_n^{3+}$) が脱水縮合反応を起こしながら CeO_2 核を生成し粒子の成長が起こると考えられる^{9, 10)} したがって硝酸セリウム水和物の PEG 溶液中での H_2O 分子の存在状態が CeO_2 粒子生成過程に重要な影響を及ぼすと考えられる。したがって、PEG 溶液中の H_2O の存在状態について検討する必要がある。ここで、OH 伸縮

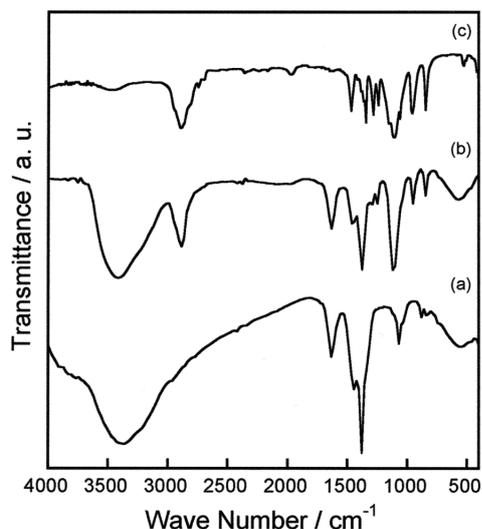


Fig.4 The FT-IR spectra of the PEG solution of cerium nitrate hydrate. (a) EG solution, (b) PEG20000 solution, and (c) pure PEG20000.

振動の吸収ピーク位置は水素結合の強さが強くなるほど低波数側へシフトすることが知られている¹¹⁾。Fig. 4 (b), (c) に示された FT-IR スペクトルから PEG20000 溶液と EG 溶液の吸収ピーク位置は、 3413cm^{-1} と 3363cm^{-1} であった。水素結合した OH 基は硝酸セリウム水和物の結晶水および EG、PEG20000 分子の分子末端に存在する水酸基に由来する。これより、EG 溶液中の H_2O 分子は PEG20000 溶液中に存在する H_2O 分子より強い水素結合相互作用をしている事がわかる。また、EG 溶液および PEG20000 溶液の吸収波数位置は、純粋な液体状態の H_2O の場合の吸収ピーク位置である 3450cm^{-1} よりも低波数側であった¹¹⁾。これは PEG 溶液中での H_2O 分子は通常の液体の H_2O 分子より強い水素結合相互作用有している事を示している。Table 1 は EG-PEG20000 混合溶液の FT-IR スペクトルから求めた OH 伸縮振動による吸収ピーク位置と溶液中の EG 含有割合の関係である。EG 含有割合が増加するにしたがって吸収ピーク位置は低波数側へシフトしている。これより、EG 含有割合が増加すると EG-PEG20000 混合溶液中に存在する H_2O 分子間の水素結合が強くなることがわかった。この様な水素結合相互作用によってアコ錯体中の H_2O 分子が解離しやすくなりヒドロキソ錯体が生成することで CeO_2 核が生成すると考えられる。そしてこの様なプロセスによって塩基を加えることなく CeO_2 粒子が生成したと考えられる。

Table 1 Peak position of the FT-IR absorption bands corresponds to the stretching vibration of the hydrogen-bonded OH group in PEG solution of cerium nitrate hydrate.

EG/(EG+PEG20000)	0	0.1	0.2	0.5	1
Peak position of H_2O n1,3	3413cm^{-1}	3402cm^{-1}	3400cm^{-1}	3389cm^{-1}	3363cm^{-1}

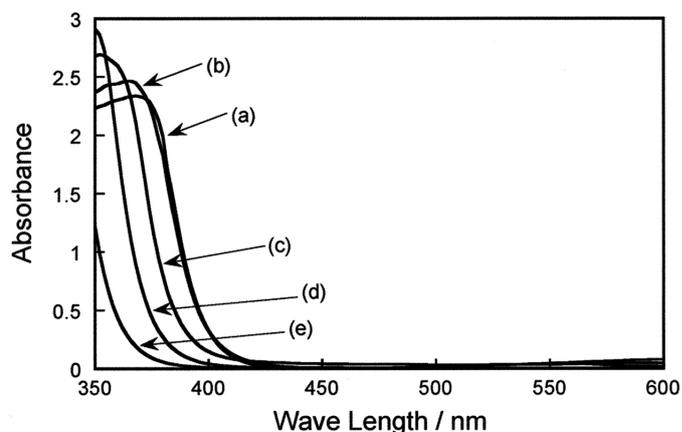


Fig.5 The UV-VIS absorption spectra of the PEG solutions of cerium nitrate hydrate. The weight ratios EG/(EG+PEG20000) of the PEG solutions were : (a) 0 (PEG20000), (b) 0.2, (c) 0.5, (d) 1 (EG), and (e) aqueous solution of cerium solution of cerium nitrate hydrate..

次に、PEGとCeイオンの相互作用について検討するために硝酸セリウム水和物のPEG溶液のUV-VIS吸収スペクトルを測定した。この結果をFig. 5に示す。波長400nm以下での強い吸収CeイオンとO²⁻イオン間の電荷移動吸収によるものである。そして、EG-PEG20000混合溶液中のEG含有割合が増加するとその吸収端は短波長側へシフトすることがわかった。この事実は、PEG20000よりEGの方がより強くCeイオンに配位することを表している¹²⁾。そして、EGおよびPEG20000のCeイオンへの配位は、溶液中でのアコ錯体およびヒドロキシ錯体の脱水縮合反応によるCeO₂核の生成および粒成長を抑制する。従って、Ceイオンにより強く配位するEG溶液から得られたCeO₂粒子は非常に微細な粒子が強く凝集した構造を有したと考えられる。また、PEGのCeイオンへの配位は、CeO₂表面での核発生より溶液からのCeO₂核生成に大きな影響を与える。従って、EG-PEG20000溶液を用いた場合EG含有割合が増加すると溶液からのCeO₂核の発生頻度が低下し、その事によって得られた粒子の粒径の変化が増加したと考えられる。以上を踏まえ、PEG溶液からのCeO₂粒子の生成過程についてFig. 6に模式的にまとめた。

4. 総括

本研究では、溶媒かつ塩基として作用することのできるポリエチレングリコール(PEG)に注目して新しいCeO₂微粒子の合成法について検討を行った。溶媒分子に塩基としての機能を持たせることによって、溶液内で非常に高い均一性を保持したまま核発生と粒成長を起こさせることが可能になった。この結果、硝酸セリウム水和物のPEG溶液を110℃で加熱処理するという非常に簡便なプロセスによって粒径の揃ったCeO₂球状粒子の調製が可能になった。さらに、溶媒としてEGとPEG20000の混合溶液を用い、EG含有割合を変えることでCeO₂粒子の粒径制御が可能であることが明らかとなった。本研究において、現在まで無機合成反応の溶媒としてまったく用いられることのなかったPEGに注目することによって、非常に簡便で環境負荷の低い合成条件及び方法で形態および粒径のコントロールされたCeO₂微粒子を得る方法を開発することが出来た。今後の研究の展開により、より粒径の小さな10nm~20nmレベルの粒径を有するCeO₂ナノ粒子の調製と応用法の開発について検討していく。

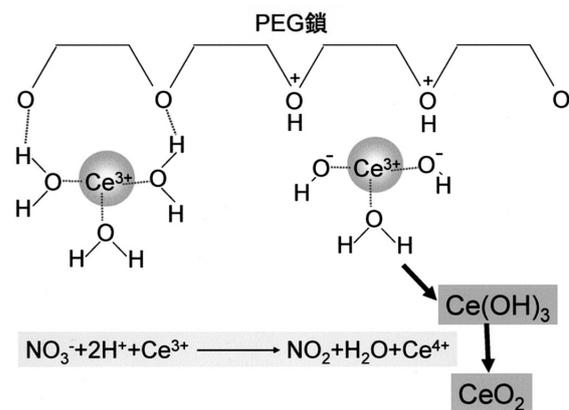


Fig.6 Schematic representation of CeO₂ formation in the PEG solution of cerium nitrate hydrate.

(参考文献)

- 1) H. Inaba and H. Tagawa, Solid State Ionics, 83, 1 (1996).
- 2) S. Yabe, M. Yamashita, S. Momose, K. Tahira, S. Yoshida, R. Li, S. Yin, and T. Sato, Int. J. Inorg. Mater., 3, 1003 (2001).
- 3) R. Li, S. Yabe, M. Yamashita, S. Momose, S. Yoshida, S. Yin, and T. Sato, Mater. Chem. Phys., 75, 39 (2002).
- 4) M. Hirano and E. Kato, J. Am. Ceram. Soc., 79, 777 (1996).
- 5) X. Yang and M. N. Rahaman, J. Eur. Ceram. Soc., 17, 525 (1997).
- 6) P.-L. Chen and I.-W. Chen, J. Am. Ceram. Soc., 76, 1577 (1993).
- 7) N. Uekawa, M. Endo, K. Kakegawa, and Y. Sasaki, Phys. Chem. Chem. Phys., 2, 5485 (2000).
- 8) N. Uekawa, T. Sukegawa, K. Kakegawa, and Y. Sasaki, J. Am. Ceram. Soc., 85, 329 (2002)
- 9) J. Livage, M. Henry, and C. Sanchez, Prog. Solid St. Chem., 18, 259 (1988).
- 10) J. P. Jolivet, Metal Oxide Chemistry and Synthesis (Jhonn Wiley & Sons: New York, U. S. A., 2000), Chap. 5.
- 11) K. Nakamoto, Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds (John Wiley & Sons: New York U. S. A., 1986), Chap. 2, pp. 115.
- 12) N. _zer, Solar Energy Materials & Solar Cells, 68, 391 (2001).

新規な化粧品素材としてのコウジ酸、 β -ツージャプリシン、*p*-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

岡山県立大学 保健福祉学部栄養学科

中 島 伸 佳

Kojic acid, β -thujaplicin, and *p*-aminobenzoic acid were glucosylated to their monoglucosides by UDP-glucosyltransferase reaction. Arbutin and polyphenol glucosides (naturally occurring plant pigments) were acylated with aromatic acids to their acylated forms by lipase or acyltransferase reactions. As the results, further stabilization and functionalization of the natural-bioactive compounds as the cosmetic materials has been achieved by the enzymatic-modification method.

1. 緒 言

近年、自然環境の破壊や環境汚染、生活習慣の変化や食生活の多様化により、「人類を取り巻く地球環境に関わる諸問題」が注視されるに至っている。このような状況下において、天然資源の大量消費による有用な植物資源の枯渇にも伴い、天然由来の生薬成分や生理機能性物質の価値が見直されてきた。

これらの機能性物質の中で、広義の植物性（ポリ）フェノール関連化合物は、抗菌作用、抗酸化作用やラジカル消去能などを有し、さらには免疫力の向上効果、抗ウイルス作用や制癌作用などの様々な有用生理機能を示すことから、最近では、化粧品、食品添加物、医薬品などとしても注目されている。

本研究では、植物色素類を始めとした天然由来の（ポリ）フェノール化合物の、「化粧品素材」としての使用上の安全性と有効性を拡大させること、すなわち、安定化と高機能化を通して、これらの機能性物質の薬理・生理活性を向上させ、有効に活用できる新機能性成分へと「分子設計」を行うことを主目的に、「グルコシル化とアシル化を介した酵素的機能改変」の方法を開発した。

2. 実 験

2. 1 化粧品素材としての（ポリ）フェノールグルコシド類の酵素的アシル化

リパーゼ（主に、Chirazyme L-2、10mg）のエステル交換反応を利用して、ポリフェノールグルコシド 10mg、及び、芳香族酸ビニル 100mg を、アセトン 10ml 中で、数日間、37℃で攪拌しながら反応させ、フラボノイド（ポリフェノール）グルコシドの芳香族酸エステル化を行なった。

また、アシル CoA 合成酵素とフラボノイド：アシル転移酵素を含むムラサキイモ培養細胞由来の無細胞抽出液（粗酵素液）を生体触媒として、ATP と Coenzyme A の存在下、フラボノイドグルコシドの糖部分への遊離の芳香族酸によるアシル（エステル）化について検討した。

2. 2 化粧品素材としての（ポリ）フェノール性化合物の酵素的グルコシル化

（ポリ）フェノール類 10 μ mol、UDPglucose 70 μ mol、及び、100 μ mol Tris-HCl buffer (pH 7.8) を含む 1 ml の反応液中に、ユーカリ培養細胞由来の UDP-グルコシルトランスフェラーゼ含有膜画分 0.1g（湿潤状態、培養細胞 0.5g に相当）を加え、30℃で緩やかに攪拌しながら、一昼夜グルコシル化反応を行なった。

さらに、ユーカリ膜画分を用いて連続的にグルコシル化反応を行う「膜型バイオリクターシステム」の開発や、パン酵母による UDP-グルコース発酵を同時進行させた UDP-グルコシルトランスフェラーゼ共役反応系による効果的なグルコシル化について検討した。

3. 結果と考察

3. 1 化粧品素材としての（ポリ）フェノールグルコシド類の酵素的アシル化による機能改変

3. 1. 1 アルブチンの芳香族酸エルテル化

天然植物色素（ポリフェノールグルコシド類）は、ある種の植物細胞中において、そのグルコシド糖の一部が様々な芳香族酸によりエステル化された「アシル化植物色素」として、光や熱に対して安定に存在し、抗酸化性を始めとした有用な生理機能を発揮していると考えられている。そこで、本研究においては、リパーゼのエステル交換反応を応用して、（ポリ）フェノールグルコシド類の安定化と高機能化（機能改変）を主目的に、アルブチンや天然植物色素類（フラボノイド系、並びに、アントシアン系植物色素）の、芳香族酸（桂皮酸や*p*-クマール酸）ビニルによる酵素的エステル（アシル）化を可能にした。



Enzymatic Stabilization and Functionalization of Natural-Bioactive Compounds as the Cosmetic Materials

Nobuyoshi Nakajima

Department of Nutritional Science, Okayama Prefectural University

まず、美白作用を有することが報告されているヒドロキノン β -D-グルコシドであるアルブチンをアシル基受容体に、桂皮酸ビニルをアシル基供与体として、リパーゼのエルテル交換反応を利用することによりアルブチンシンナメートを合成した。本エステル化反応は、アルブチンのグルコシド糖であるグルコースのC6位の一級OH基に位置特異的であった(図1)¹⁾。

3. 1. 2 イソクエルシトリン (フラボノイド系植物色素) の芳香族酸エルテル化

リパーゼのエルテル交換反応を利用して、フラボノイド系植物色素のひとつであるイソクエルシトリン(クエルセチン-3-O- β -D-グルコピラノシド)と各種の芳香族酸ビニル(桂皮酸ビニルや

-クマール酸ビニル等)⁶⁾を原料に、そのグルコシド糖への芳香族酸エステル化を行った(図2)。

各種のアシル化イソクエルシトリンの収量は、30~60%であった。単離精製した芳香族酸エステル誘導体について、¹³C-NMR測定を行い、糖の一級アルコール(C6)部位由来のシグナルにおいて高磁場側へのシフトが認められた。また、芳香族酸の酸部分のカルボニル炭素由来のピークの低磁場側へのシフトも観測された。しかし、ポリフェノール骨格のフェノール性水酸基やグルコシド糖の二級水酸基の炭素については、ピークのシフトは全く確認されなかった。以上の結果から、イソクエルシトリンの糖部分の一級水酸基に芳香族酸が位置特異的にエステル化されて

おり、他の水酸基はエステル化されていないことが確認された^{4,15)}。

また、そのアグリコンであるクエルセチンやグルコシドであるイソクエルシトリンと比較して、イソクエルシトリン

-クマレートやイソクエルシトリンシンナメートが、熱や光に対して最も安定であることが確認された(図3)。しかも、ラジカル消去能も保持していた(表1)^{13,15)}。

3. 1. 3 クリサンテミン (アントシアニン系植物色素) の芳香族酸エステル化

リパーゼのエルテル交換反応を利用して、アントシアニン系植物色素のひとつであるクリサンテミン(シアニジン-3-O- β -D-グルコピラノシド)と各種の芳香族酸ビニル⁶⁾を原料に、そのグルコシド糖への位置特異的な芳香族酸エステル化を行った^{4,13)}。

これらの酵素的に合成したアシル化クリサンテミン類の中で、クリサンテミン

-クマレートやシンナメートが、熱や光に対して最も安定であることが確認され(図3)、ラジカル消去能も保持していた(表1)^{13,15)}。

3. 1. 4 植物培養細胞由来の酵素反応系を用いたフラボノイド系植物色素のアシル化

ムラサキイモ細胞由来の酵素反応系を用いて、遊離の芳香族酸を原料としたフラボノイド系植物色素のアシル化法を開発した。

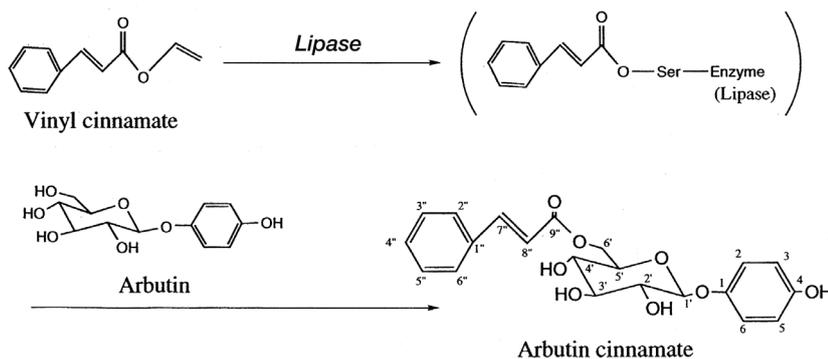


図1 Reaction scheme for lipase-catalyzed regioselective transesterification to synthesize arbutin cinnamate.

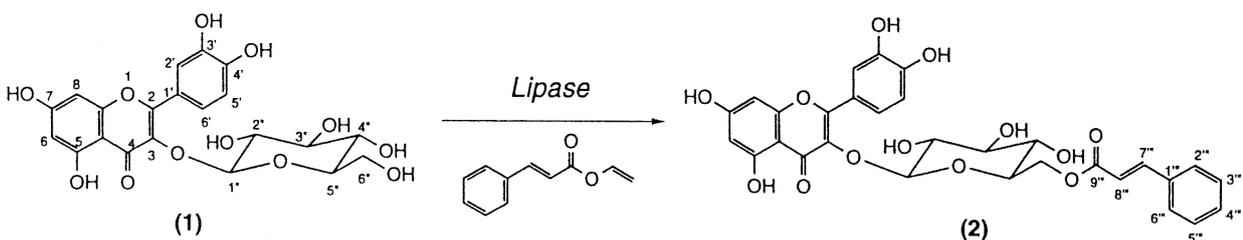


図2 Reaction scheme for lipase-catalyzed regioselective transesterification to synthesize isoquercitrin cinnamate.

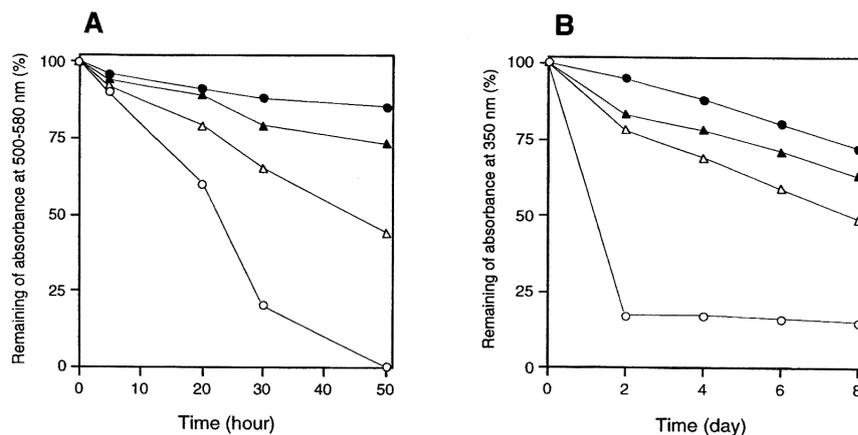
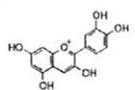
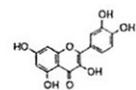
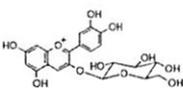
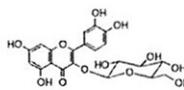
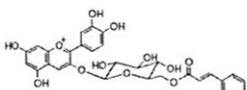
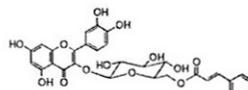
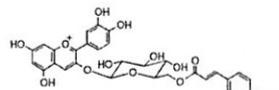
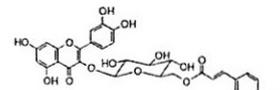


図3 Comparison of the Light-resistance of the Flavonoid Compounds.

The acylated flavonoid glucosides were synthesized from their non-acylated forms with vinyl cinnamate or vinyl p-coumarate in dry acetone by Chirazyme L-2, and their structures were elucidated by NMR(¹H-and¹³C-) and MS analyses as described previously. The residual amounts of the plant pigments without incubation are expressed as 100%. **A:** anthocyanins(450mM) were incubated at room temperature in 1 ml of a 100mM Mcl \varnothing vain buffer (pH6.0) under illumination by white fluorescent light (one side, 5,000 lx) for various times; chrysanthem p-coumarate (500nm, ●), chrysanthem cinnamate (500nm, ▲); chrysanthem (530nm, △), cyanidin (580nm, ○). **B:** flavonols (40mM) were incubated under illumination by light (one side, 20,000lx) in 1 ml of the buffer (pH7.0); isoquercitrin p-coumarate (350nm, ●); isoquercitrin cinnamate (350nm, ▲); isoquercitrin (350nm, △); quercetin (350nm, ○).

表1 Radical-scavenging abilities of plant pigments and their derivatives

Antioxidative substrate (30 nmol)	TAS ¹⁾ (mmol/l)	Antioxidative substrate (30 nmol)	TAS ¹⁾ (mmol/l)
Anthocyanins		Flavonols	
	7.16		3.57
	3.72		3.44
	2.48		3.42
	3.49		2.47

¹⁾ TAS = Total antioxidant status.

本反応に用いたムラサキイモ培養細胞由来の無細胞抽出液中には、芳香族酸からアシル-Coenzyme Aを合成する酵素（アシル-CoAリガーゼ）と、アシル-CoAをアシル基供与体として、ポリフェノールグルコシド類の糖の一級OH基に対してアシル基転移反応を触媒するトランスフェラーゼが存在すると考えられ、イソケルシトリンの、特にカフェー酸、及び、p-クマール酸によるそれぞれのアシル化が可能となった。本アシル化反応においても、ポリフェノールグルコシド糖の一級OH基に対して位置特異的であることが確認された（図4）⁷⁾。

3. 1. 5 ポリフェノールジグルコシドの芳香族酸エステル化

リパーゼのエステル交換反応を利用して、植物性ポリフェノールジグルコシドのひとつであるルチン、及び、ナリンギンへの芳香族酸エステル化を行った。

その結果、ナリンギン（図5）の場合は、ジグルコシド構造のグルコースのC6位の一級OH基がアシル化されたが、グルコシド糖に一級OH基が存在しないルチン（クエ

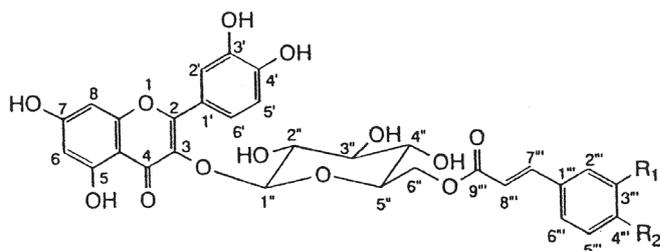


図4 Structure of acylated flavonoid glucosides (isoquercitrin aromatic acid esters).
 R1=R2=OH: isoquercitrin caffeate; R1=H, R2=OH: isoquercitrin p-coumarate;
 R1=OMe, R2=OH; isoquercitrin ferulate; R1=R2=H; isoquercitrin cinnamate.

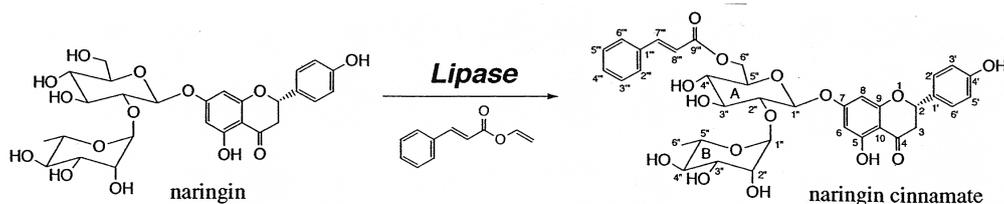


図5 Reaction scheme for lipase-catalyzed regioselective acylation for synthesis of naringin cinnamate.

ルセチンチノシド) (図6) においては、主としてグルコースのC3位の二級OH基へのアシル化が生じていることが確認された¹¹⁾。

3. 2 化粧品素材としての(ポリ)フェノール化合物の酵素的グルコシル化による機能改変

3. 2. 1 グルコシルトランスフェラーゼによるβ-thujaplicinのグルコシル化

グルコシル化は、様々な外来物質の効果的な構造改変法の一つであり、不安定で疎水性の高い、すなわち水への溶解度が低い化合物を、より安定で、かつ親水性の高い化合物に変換することができる。

本研究においては、有用な生理機能を持つ様々な難溶性フェノール化合物のβ-グルコシル化を可能にした。その具体例として、ユーカリ培養細胞由来の膜結合型UDP-グルコーストランスフェラーゼを用いた、β-thujaplicin (ヒノキチオール)、*p*-アミノ安息香酸、サリチルアルコール、コウジ酸、ダイゼイン、及び、フラボノイド化合物等の酵素的グルコシル化による機能改変を行った。

まず、天然の抗菌成分であるヒノキチオールの酵素的モノグルコシル化を可能にした。ヒノキチオールモノグルコシドへの変換率は約45%であった。本反応系では、ユーカリ培養細胞由来の膜結合型UDP-グルコシルトランスフェラーゼが、糖供与体であるUDPglucoseの存在下、(ポリ)フェノール類の「フェノール性OH基」へのグルコシル化を位置特異的に触媒していると考えられる。また、糖供与体はCDPglucoseを用いても同様に進行した。

さらに、ユーカリ膜画分を用いて連続的にグルコシル化反応を行う「膜型バイオリアクターシステム」を開発した(図7)²⁾。

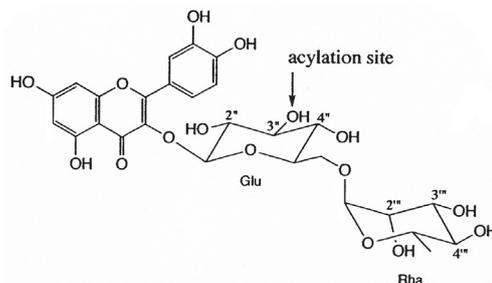


図6 Regioselectivity of the enzymatic acylation to rutin.

3. 2. 2 グルコシルトランスフェラーゼによる*p*-アミノ安息香酸のグルコシル化

次に、ユーカリ培養細胞由来のUDP-グルコシルトランスフェラーゼ反応系を用いて、「UVプロテクター」として用いられている*p*-アミノ安息香酸のモノグルコシル化を可能にした。

本法により可能となったグルコシル化は、*p*-アミノ安息香酸のCOOH基への位置特異的なモノグルコシド化であった。変換率は上記のヒノキチオールの場合とほぼ同様であった^{2, 5)}。

3. 2. 3 グルコシルトランスフェラーゼによるサリチルアルコールのグルコシル化

さらに、サリチルアルコールのサリシンへのグルコシル化も可能であった²⁾。

3. 2. 4 グルコシルトランスフェラーゼによるコウジ酸のグルコシル化

メラニン沈着を防ぐ働きを保持し美白作用を示すと考えられているコウジ酸の酵素的グルコシル化を可能にした

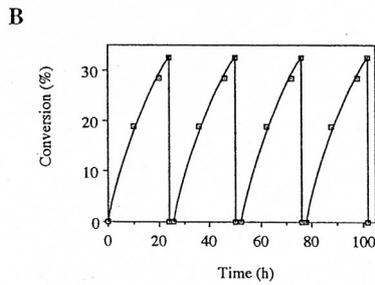
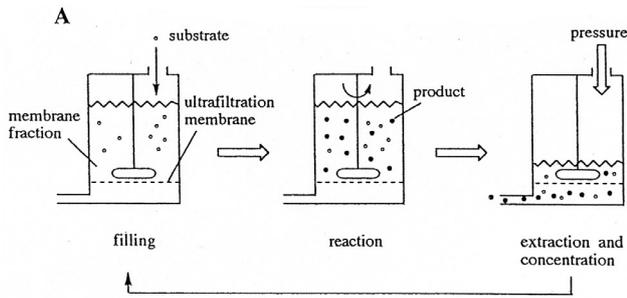


図7 Continuous enzymatic glucosylation of β -thujaplicin to the monoglucoside in a membrane reactor system. (A) Schematic diagram of repetitive batch system; (B) Continuous conversion of β -thujaplicin to the monoglucoside. The glucosylation reaction was performed at 30°C with gentle stirring in a stirred cell (10ml, Filtron Co., USA) equipped with an ultrafiltration membrane (M.W. 100,000 cut).

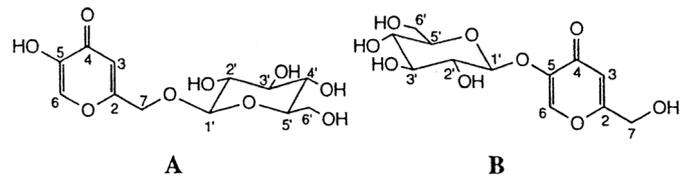


図8 Structures of kojic acid glucosides. (A) Kojic acid 7-O- β -D-glucopyranoside; (B) kojic acid 5-O- β -D-glucopyranoside.

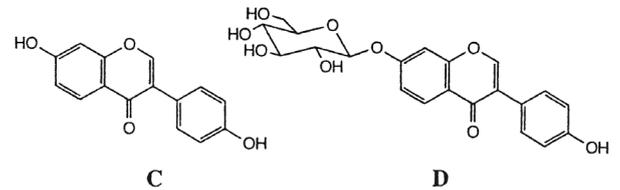


図9 Structures of daidzein glucosides. (C) Daidzein; (D) daidzin (daidzein 7-O- β -D-glucopyranoside).

(図8)。コウジ酸の約40%がモノグルコシドへと変換された。また、5-O- β -D-グルコピラノシドが、7-O- β -D-グルコピラノシドよりも圧倒的に優位に生産された⁹⁾。

3. 2. 5 グルコシルトランスフェラーゼによるダイゼインのグルコシル化

同様の方法により、植物エストロゲン、イソフラボンのひとつであるダイゼインも本酵素反応を用いて、約20%の変換率でダイジン(ダイゼイン7-O- β -D-グルコピラノシド)に変換することが可能であった(図9)⁹⁾。

3. 2. 6 グルコシルトランスフェラーゼによる各種のフラボノイド化合物のグルコシル化

フラボン類、フラボノール類、イソフラボン類、並びに、カルコン類等の植物性ポリフェノール類を基質として、ユーカリ培養細胞由来のUDP-グルコシルトランスフェラーゼによるグルコシル化を検討した。

その結果、本酵素反応によるグルコシル化は、アピゲニンやルテオリン(フラボン類)のモノグルコシド化、ケンフェロール(フラボノール類)のアストラガリンへのモノグルコシル化、ケルセチン(フラボノール類)のモノグルコシドであるイソケルシトリン(ケルセチン-3-O- β -D-グルコピラノシド)やケルシメリトリン(ケルセチン-7-O- β -D-グルコピラノシド)へのグルコシル化、

並びに、エキナチン(カルコン)や上述したダイゼイン(イソフラボン)の位置選択的なモノグルコシル化が確認された²⁾。

3. 2. 7 パン酵母によるUDP-グルコース発酵を共役させUDP-グルコシルトランスフェラーゼ反応系によるグルコシル化

マグネシウムイオンとリン酸イオンの存在下、AMPとグルコースを原料に、「パン酵母」によるUDPglucose発酵により生産させたUDPglucoseを糖供与体として、ユーカリ培養細胞由来のUDP-グルコシルトランスフェラーゼによるモノグルコシル化を行う「共役反応系」を構築した(図10)⁵⁾。

3. 2. 8 植物培養細胞変換法と酵素法によるカプサイシン関連化合物のグルコシル化

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるカプサイシン関連化合物のフェノール性OH基へのモノグルコシル化(図11)を経て、さらに、デンプンを糖供与体としたCGTaseによるカプサイシンオリゴサッカライド類の合成を可能にした^{10,12)}。

4. 総括

以上、「化粧品素材」として有用な天然植物色素を始め

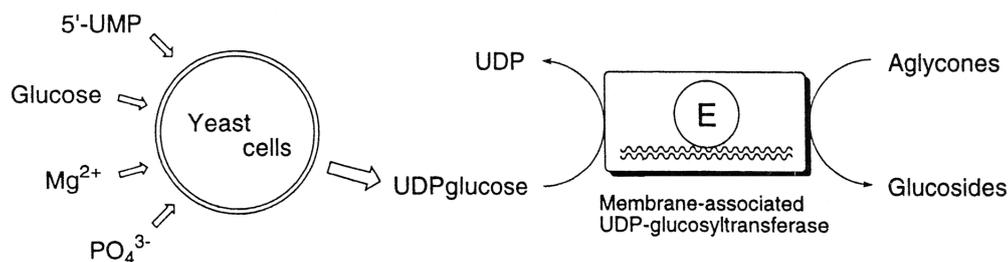


図 10 Reaction scheme for synthesis of β -D-glucosides by the coupled enzymatic reaction with UDP-glucosyltransferase and yeast cells.

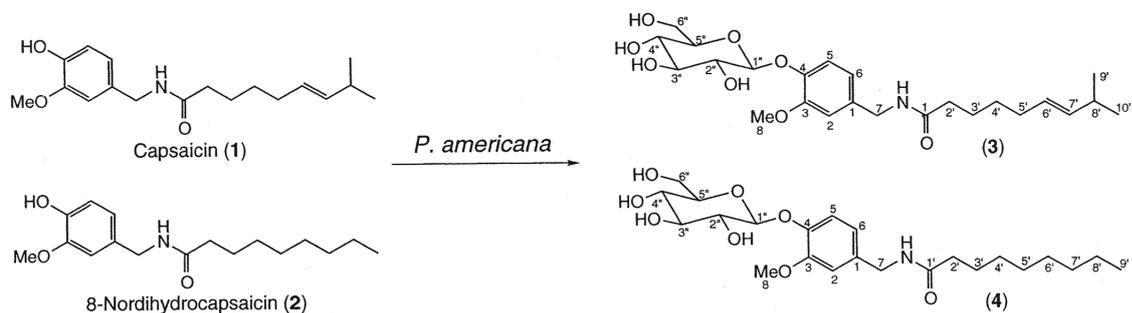


図 11 Synthesis of capsaicin β -D-glucopyranoside (3) and 8-nordihydrocapsaicin β -D-glucopyranoside (4) from 1 or 2 by the cultured cells of *P.americana*.

とした（ポリ）フェノールグルコシド類の安定化と生理機能の高機能化を目指して、微生物由来のリパーゼのエステル交換反応や植物細胞由来の酵素共役反応系を利用した、ポリフェノールグルコシド類の芳香族酸エステル化（アシル化）のための方法を開発した。

さらに、抗酸化性（ポリ）フェノール化合物等の機能改変と「化粧品素材」としての有効利用方法のさらなる拡大を主目的に、植物や微生物由来の酵素反応を利用した、各種のフェノール性化合物やフラボノイド類のグルコシル化による構造機能改変を可能にした。

謝 辞

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

(引用文献)

- 1) N. Nakajima, K. Ishihara, S. Matsumura, H. Hamada, K. Nakamura, and T. Furuya, Lipase-catalyzed Synthesis of Arbutin Cinnamate in Organic Solvent and Application of Transesterification to Stabilize Plant Pigments. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**(11), pp. 1926-1928, 1997.
- 2) N. Nakajima, T. Furuya, K. Ishihara, S. Matsumura,

S. Mizobata, and H. Hamada, Effective Production of β -Thujaplicin 2-*O*- β -D-glucoside by UDP-glucosyltransferase Fraction from Cultured Cells of *Eucalyptus perriniana* in a Membrane Reactor. *J. Ferment. Bioeng.*, **84**(5), pp. 455-460, 1997.

- 3) H. Hamada, Y. Miyamoto, N. Nakajima, and T. Furuya, High Selective Transformation by Plant Catalysts. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **5**, pp. 187-189, 1998.
- 4) N. Nakajima, K. Ishihara, T. Itoh, T. Furuya, and H. Hamada, Lipase-catalyzed Regioselective and Direct Acylation of Flavonoid Glucoside for Mechanistic Investigation of Stable Plant-pigment. *J. Biosci. Bioeng.*, **87**(1), pp. 105-107, 1999.
- 5) N. Nakajima, K. Ishihara, H. Hamada, S. Yamane, K. Nakamura, and T. Furuya, Multi-enzymatic Glucosylation Using *Eucalyptus* UDP-glucosyltransferase Coupled UDPglucose-fermentation by Bakers' yeast. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**(5), pp. 934-936, 1999.
- 6) K. Ishihara, N. Nakajima, T. Itoh, H. Yamaguchi, T. Furuya, and H. Hamada, A Chemoenzymatic Synthesis of Aromatic Carboxylic Acid Vinyl Esters. *J. Mol.*

- Catal. B: Enzymatic, **7**, pp. 307-310, 1999.
- 7) N. Nakajima, K. Ishihara, H. Hamada, S. Kawabe, and T. Furuya, Regioselective Acylation of Flavonoid Glucoside with Aromatic Acid by an Enzymatic Reaction System from *Ipomoea batatas*. J. Biosci. Biotech., **90**(3), pp. 347-349, 2000.
- 8) K. Sanada, A. Kawaguchi, T. Furuya, K. Ishihara, N. Nakajima, and H. Hamada, High Production of β-Thujaplicin with *Thuja dolabrata* var. *hondai* cells in a Semi-continuous Culture System. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, **11**, pp. 59-61, 2000.
- 9) N. Nakajima, K. Ishihara, and H. Hamada, Functional Glucosylation of Kojic acid and Daidzein with the Eucalyptus Membrane-Associated UDP-Glucosyltransferase Reaction System. J. Biosci. Biotech., **92**(5), pp. 469-471, 2001.
- 10) H. Hamada, K. Nishida, T. Furuya, K. Ishihara, and N. Nakajima, Preparation of a New Papper: Chemoenzymatic Synthesis of Capsaicin oligosaccharide and 8-Nordihydrocapsaicin oligosaccharide. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, **16**, pp. 115-119, 2001.
- 11) K. Ishihara, Y. Nishimura, T. Kubo, C. Okada, H. Hamada, and N. Nakajima, Enzyme-Catalyzed Acylation of Plant Polyphenols for Interpretation of their Functions. Plant Biotechnol., **19**(3), pp. 211-214, 2002.
- 12) H. Hamada, S. Ohiwa, T. Nishida, H. Katsuragi, T. Takeda, H. Hamada, N. Nakajima, and K. Ishihara, One-step Glucosylation of Capsaicinoids by Cultured Cells of *Phytolacca americana*. Plant Biotechnol., **20**(3), pp. 252-255, 2003.
- 13) N. Nakajima, M. Sugimoto, H. Yokoi, H. Tsuji, and K. Ishihara, Comparison on Acylated Plant Pigments: Light-resistibility and Radical Scavenging Ability. Biosci. Biotech. Biochem., **67**(8), pp. 1823-1832, 2003.
- 14) K. Ishihara, H. Hamada, T. Hirata, and N. Nakajima, Biotransformation using Plant Cultured Cells. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, **23**, pp. 145-170, 2003.
- 15) K. Ishihara and N. Nakajima, Structural Aspects of Acylated Plant Pigments: Stabilization of Flavonoid Glucosides and Interpretation of their Functions. J. Mol. Catal. B: Enzymatic, **23**, pp. 411-417, 2003.

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

東京大学大学院 薬学系研究科分子薬学専攻 薬化学教室

大和田 智彦

A synthetic method was developed for synthesizing α,α -disubstituted glycines bearing a large hydrophobic ring (more than 15-membered ring) based on ring-closing metathesis. Ring-closing metathesis reactions of the dialkenylated malonate precursors turned out to proceed efficiently, particularly when long methylene chains adequately tether both terminal olefin groups. Surprisingly, the amino groups of the α,α -disubstituted glycines bearing a large hydrophobic ring are inert to conventional protective reactions (e.g., N-Boc-protection: Boc²O/DMAP/CH₂Cl₂; N-Z-protection: Z-Cl (benzyloxycarbonyl chloride)/DMAP/CH₂Cl₂). The Curtius rearrangement of the carboxylic acid functionality of the malonate derivatives, obtained after the ring-closing metathesis, to an amine functionality can be catalyzed by diphenylphosphoryl azide (DPPA), but unexpectedly, only the intermediate isocyanates can be isolated, even in the presence of alcohols such as benzyl alcohol. Thus, the corresponding isocyanates were isolated in high yields when this Curtius rearrangement was carried out in an aprotic solvent (benzene). The resultant isocyanate was treated with 9-fluorenylmethanol in a high boiling point solvent such as toluene under reflux to give the N-Fmoc-protected aminomalonnate derivatives in high yield. These hydrophobic amino acids can be incorporated into a peptide by Fmoc-solid phase peptide synthesis using the acid fluoride activation method. In a 17-amino-acid peptide sequence known to take a monomeric α -helix structure, the replacement of two alanines with two new hydrophobic amino acids bearing a cyclic 18-membered ring enhanced the stability of the helical structure. Assembly to hexamers was also suggested by the results of sedimentation equilibrium studies in the presence of 100 mM NaCl.

1. 緒言

Aib (α -aminoisobutyric acid) などの $C_{\alpha,\alpha}$ -二置換グリシン誘導体は β -bend、 3_{10} もしくは α ヘリックス構造をとりやすく、またこれらの構造を安定化させることが知られている。なかでも、 C_{α} のジ置換基をシクロアルカンとしたものは 1-aminocycloalkane-1-carboxylic acid 残基 (Acnc) として知られ、Tonio らを中心に現在までに Ac3c (3員環) -Ac12c (12員環) の合成および数残基のホモオリゴマーもしくはオリゴマー中への挿入ペプチドの構造特性が調査されている¹⁾。

一方、天然に存在する疎水性アミノ酸、特にアルキル側鎖をもつアミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシンなどで、アルキル炭素数も 1~4 とその疎水性の違いが比較的小さい。疎水性領域を大きく変化させたアミノ酸の機能は不明である。さらに、長いペプチド鎖に $C_{\alpha,\alpha}$ -二置換グリシン誘導体を導入した際の単独ペプチド構造および自己組織化構造への効果は未知である。このような考えのもとに、本研究者は新規疎水性 α,α -二置換グリシン誘導体 1, 2, 3 を設計し、その自己組織化構造への効果を調査した (Figure 1)。

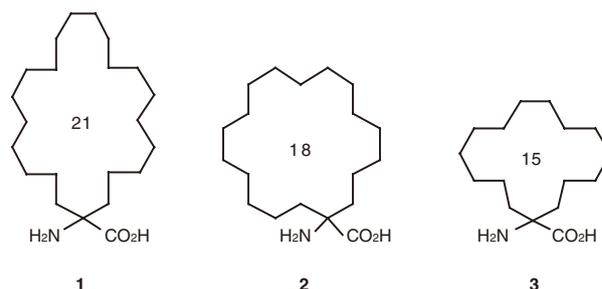


Figure 1

2. 実験

2.1 大きな疎水性領域を持つ α,α -二置換グリシン誘導体の合成法

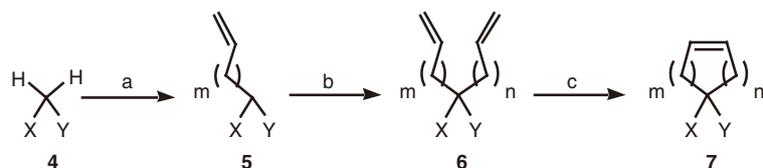
今まで Tonio らによって報告され構造解析がされた Acnc の合成法は Strecker 反応を用いたものがほとんどである¹⁾。しかし、この合成法では無保護のアミノ酸を合成してから NH₂ および CO₂H に保護基を導入する必要がある。環が小さい場合はあまり問題にならないが、環が大きくなった場合、無保護のアミノ酸の溶解性の低さ、立体障害が問題となり保護基を導入することが困難になってくる事が予想される。そこで本研究者はマロン酸誘導体を出発物質とし、Grubbs 触媒を用いた Ring Closing Metathesis (ROM) による環形成の後 Curtius 転位反応を行うことで大環状アミノ酸誘導体の合成を計画した (Scheme 1)。すなわち、マロン酸誘導体 4 をジアルケニル化後 (6)、閉環オレフィンメタセシス反応を用いて環化を行い (7)、それに続く Curtius 転位反応を経て (9) アミノ酸誘導体 12



Design, synthesis and functions of self-assembled biomolecules.

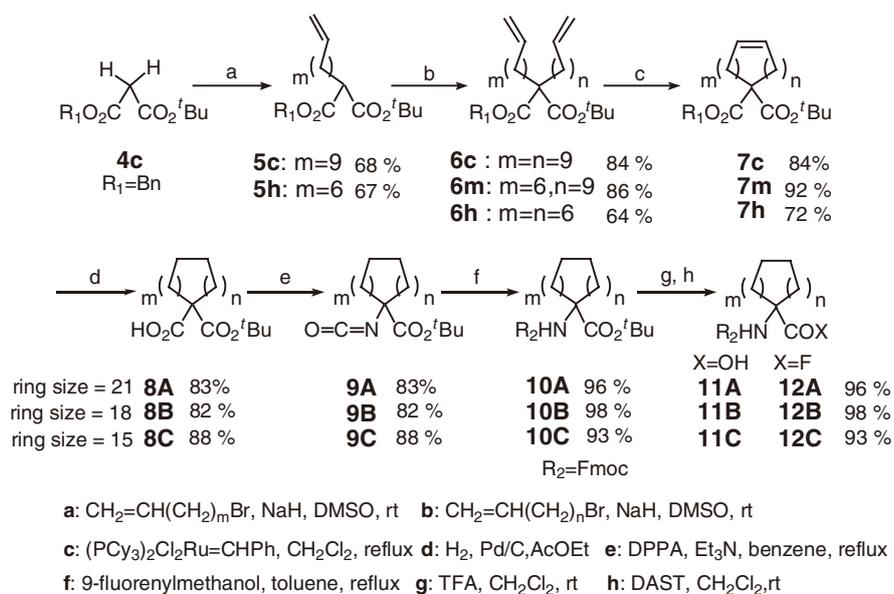
Tomohiko Ohwada

Graduate School of Pharmaceutical Sciences The University of Tokyo



Reagents a,b and c are shown in Scheme 2

Scheme 1



Scheme 2

を得る合成法を計画した (Scheme 2)。

2. 1. 1 ジエン 6 の合成

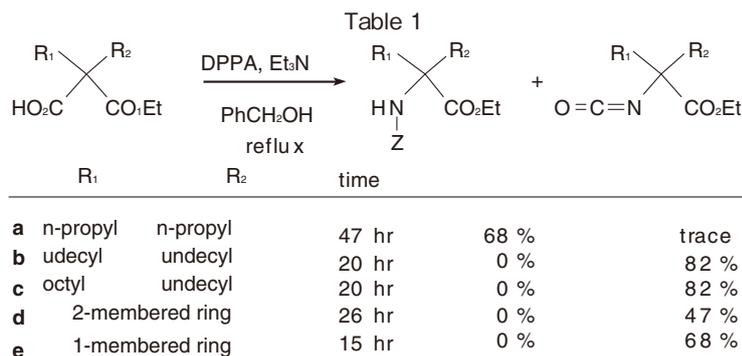
マロン酸エステルからは Curtius 転位反応により α アミノ酸を、ニトリル化合物からは還元により β アミノ酸を合成できると考え、基質としてマロン酸ジエステル、シアノ酢酸エチル、マロニトリルを用いた。これらの基質 **4** に塩基存在下、alkenyl bromide を付加させることでジエン **6** を得た。反応の副生成物を避けるため、一気にジアルケニル化する方法ではなく、モノアルケニル体 **5** を経てからジアルケニル化する方法を用い、比較的高収率で **6** を得た。

2. 1. 2 閉環メタセシス反応 (ROM)

市販の第一世代の Grubbs 触媒を用いて、様々な置換基、アルキル鎖をもつジエン **6** の閉環メタセシス反応を行った (Scheme 2)²⁾。その結果、置換基とアルキル鎖の長さにより反応の効率が異なることがわかった。特に、ニトリル置換基を持つ化合物や一方の炭素鎖が短い場合 (n=2) の収率は低かったが、それ以外では比較的高い収率で環化体 **7** が得られた。反応によっては分子間で反応が進行したダイマーも得られた。環化した **7** のオレフィンの E/Z 比を ¹³CNMR の積分値から見積もったところ、E 体が優先的に得られていることがわかった。

2. 1. 3 Z-Acnc-F18 の合成 (合成経路の探索研究)

21,18,15 員環をもったアミノ酸誘導体の N-Z (benzyloxy carbonyl) - 酸フッ化物の合成を t-butylbenzyl malonate (**4c**) を用いての合成を行った (Scheme 2)。Pd/C を用いて **7** のオレフィンを接触還元すると同時にベンジルエステルをカルボン酸としてモノエステル **8** を得た。得られた **8** に対し DPPA (diphenylphosphoryl azide) を用いた Curtius 転位反応を検討した。アルコール存在下でカルボン酸を DPPA と反応させると通常はイソシアネートを経由してアルコールが反応して一気にウレタン誘導体を与えるが (Table 1)³⁾、 α の二置換基のアルキル鎖が大きくなるとアルコール共存下でもイソシアネートが単離されることが判明した (Table 1)。そこでモノエステル **8** を非プロトン性溶媒 (ベンゼン) 中 DPPA と加熱環流下反応させると、イソシアネート **9** が収率良く得ることが出来た。イソシアネート **9** をベンジルアルコール中 neat で加熱することで Z-保護アミノ酸エステルを得た (Table 1)。この反応スキームは N-Fmoc 保護体の合成にも適用した。一方、別法で得たアミノ基を塩化メチレン溶液中触媒量の DMAP (N,N-dimethylaminopyridine) 存在下 N-benzyloxycarbonyl chloride (Z-Cl) で N-Z 化や DMAP 存在下塩化メチレン溶液中 Boc₂O で処理し、N-Boc 化を試みても反応せず、先の合成法の有効性が判明した。



2. 1. 4 Fmoc-Ac20c-F の合成

Fmoc 固相合成法を用いてペプチドを伸長するため、N-Fmoc 保護のアミノ酸を合成した (Scheme 2)。21,18,15 員環をもった benzylt-butyl malonate (4c) を Pd/C を用いて接触還元してモノエステル体 8 とし、得られた 8 に対し、DPPA を用いた Curtius 転位反応を行い、イソシアネート 9 とした。9 をトルエン中、高濃度の 9-fluorenylmethanol と加熱還流することで N-Fmoc アミノ酸 t-butyl エステル 10 とし、10 を TFA で処理することによりカルボン酸 11 とした。11 を DAST (diethylamino) sulfur trifluoride) を用いて酸フッ化物とし目的物 12 が得られた。ここで得られた酸フッ化物はカラムクロマトグラフィーで分離精製可能である。

2. 2 大きな疎水性領域を持つ α,α -二置換グリシン誘導体の置換による α ヘリックス構造への効果

2. 2. 1 疎水性アミノ酸の評価

通常ペプチドは水溶液中では、水との水素結合が優先し、ペプチドは規則構造は取らない。TFE (tetrafluoro ethanol) などの疎水性有機溶媒の共存化で分子内水素結合を形成し α ヘリックスなどの自己組織化構造を形成することが知られている。そのため α ヘリックス構造は分子間や分子内で会合しその疎水性ゆえに安定化される。一方、Baldwin らは Ac- (N) Ala-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala (CO) NH₂ (peptide I) の配列をもつペプチドが水溶液中で会合することなく単独で α ヘリックスをとることを報告している⁴⁾。このペプチドはらせんに沿って酸性アミノ酸の Glu (-) と塩基性アミノ酸の Lys (+) の塩橋 (salt bridge) が存在し α ヘリックスを安定化すると考えられている。本研究者はこのペプチドの疎水性アミノ酸である Ala を 1 つまたは 2 つ新規疎水性アミノ酸 2 (12B) に置換したものを合成し、CD スペクトルを用いて大きな疎水性領域を持つ α,α -二置換グリシン誘導体の α ヘリックス構造への効果を調査した。大きい疎水場を持つアミノ酸を導入することで塩橋による固定化が壊れ α ヘリックス性が減少する可能性と、疎水場を中心に集合体をつくることで α ヘリ

ックス性が增大する可能性が考えられ、また、 α ヘリックス性が変化しないとしても、安定性に大きな違いがみられる可能性があり、疎水性アミノ酸の評価方法として適当であると考えたからである。

なお、ペプチド合成は N-Fmoc と酸フルオリドを用いた Rink amide resin を用いた固相合成法によって行った。Ac-AE3AAAKEAA10AKEAAAKA-NH₂ peptide I (native)
Ac-AE (2,C18) AAKEAA (2,C18) KEAAAKA-NH₂ peptide II
Ac-AEAAAKEAA (2,C18) KEAAAKA-NH₂ peptide II
Ac-AE (2,C18) AAKEAAAKEAAAKA-NH₂ peptide IV
(A=Ala, E=Glutamic acid, K=Lysine)

水溶液中の CD 測定から大きな疎水性領域を持つ α,α -二置換グリシン誘導体の一つまたは二つアラニンの代わりに置換したアミド鎖は Baldwin の原形と同じく α -ヘリックスを取る事が分かった (Figure 2 (A))。すなわち、2 を二つ置換基した peptide II の α ヘリシティーは原形 (peptide I) より増強されていた。peptide II では大きな疎水性領域を持つ α,α -二置換グリシン誘導体がヘリックス鎖に沿って重なるように位置を選定している。一方 1 つ置換した peptide III もしくは Peptide IV では α ヘリシティーは原形 (peptide I) より減弱している。さらに温度上昇によるヘリックス構造の減少速度から 2 を二つ置換基した peptide II はヘリックス構造の安定化の亢進が観測された (Figure 2 (B))。

また、peptide II は塩濃度増加 (10mM->100mM) により CD 曲線から α ヘリシティーの増加が観測された(データ省略)。

2. 3 大きな疎水性領域コアを持つ α ヘリックスペプチドの自己集合構造

peptide II の 40000 回転 (一分間当たり) における遠心沈降実験を行ったところ⁵⁾、100mM の塩濃度でテトラマーを形成することが分かった。特にモノマー \leftrightarrow テトラマー間の直接的な会合現象であり、途中でダイマーやトリマーは存在しない。ペプチド鎖は大きな疎水性コアによって会合し、ヘリックスバンドル間水素結合の関与も考えられる。ペプチド鎖同士は双分子モーメントをうち消すアンチパラレル構造を取ると推測している。

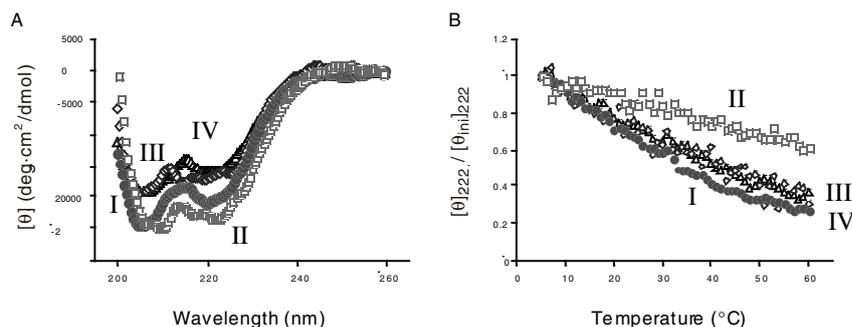


Figure 2

3. 結果と考察

本研究において本研究者は新規疎水性アミノ酸 **1**, **2**, **3** を得るため、マロン酸誘導体 **4** をジアルケニル化後 (**6**)、閉環オレフィンメタセシス反応を用いて環化を行い (**7**)、それに続く Curtius 転位反応を経てアミノ酸誘導体 **11** を得る、という合成法を計画し、N-Fmoc 化されたアミノ酸 **11** を得ることに成功した。大環状疎水基を持つアミノ酸において無保護のアミンを Z 化することができず、カルボン酸も無保護の場合には有機溶媒に不溶であることから推測すると、Strecker 合成を用いてアミンを保護した **1**, **2**, **3** を合成するのは非常に困難であると考えられる。本合成法は Strecker 合成と異なり、無保護のアミノ酸を保護する過程がなく、合成の各段階において比較的高収率で目的物を得られる。また、最初のジアルケニル化に用いるアルキル基の長さを変えることにより、様々な大きさの環をもつアミノ酸誘導体を得ることができる。さらに、安定に単離できるイソシアネート **9** と反応させるアルコールを変えることにより、アミンの保護基も選択できるなど、様々な利点を有する。今後、この合成法を用いて様々な大きさの環や原子種を持つ新規疎水性アミノ酸を合成する予定である。

本合成法の key step である閉環オレフィンメタセシス反応を様々な基質 **6** を用いて調査した結果、置換基とアルキル鎖の長さにより反応の効率が異なることがわかった。ニトリル置換基を持つ化合物や、一方の炭素鎖が短い場合の収率が低かったが、それ以外では比較的高収率で環化体 **7** が得られ、反応によっては分子間で反応が進行したダイマーも得られた。この結果から、反応には置換基のかさ高さによる立体的な影響、触媒と置換基のキレーションによる収率の変化など様々な要因が関与していると考えられる。

まとめ

本研究により、高次構造をとり得るような長さのペプチドに **1**, **2**, **3** などの大環状疎水性アミノ酸を導入できるこ

とが明らかとなった。導入効率などの改善点は残るものの、今後、これらのアミノ酸を導入したペプチドの性質を詳細に検討し、本研究で示した疎水性コアによる水溶液中でのヘリックスペプチドの自己集合組織化の一般性の調査を行うことは今後の重要な課題である⁶⁾。従来にない新しい構造とそれに由来する生体機能を持ったペプチドの創製を目指したいと考えている。

本研究は、小嶋大輔修士、京都大学化学研究所 黄檗達人博士、二木史朗博士、杉浦幸雄教授、大阪大学大学院薬学研究所 西 義則博士、小林祐次教授、千葉大学分析センター山口健太郎博士との共同研究である。

- 1) a) A. Moretto, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, M. Saviano, R. Iacovino, R. M. Vitale and E. Benedetti, *J. Pept. Res.*, 57, 307 (2001). b) M. Saviano, R. Iacovino, V. Manchise, E. Benedetti, G. M. Bonora, M. Gatos, L. Graci, F. Formaggio, M. Crisma and C. Toniolo, *Biopolymers*, 53, 200 (2000).
- 2) a) R. H. Grubbs and S. Chang, *Tetrahedron*, 54, 4413 (1998) b) T. A. Kirkland and R. H. Grubbs, *J. Org. Chem.*, 62, 7310 (1997).
- 3) T. Shioiri; K. Ninomiya; S. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 6203-6205 (1972). b) K. Ninomiya; T. Shioiri; S. Yamada, *Tetrahedron*, 30, 2151-2157 (1974).
- 4) S. Marqusee and R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 8898 (1987).
- 5) M. Doi; Y. Nishi; S. Uchiyama; Y. Nishiuchi; T. Nakazawa; T. Ohkubo; Y. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 9922-9923 (2003).
- 6) T. Ohwada.; D. Kojima; T. Kiwada; S. Futaki; Y. Sugiura; K. Yamaguchi; Y. Nishi, Y. Kobayashi, *Chemistry-A European Journal*, 10, 617-626 (2004).

Ⅱ. 生体作用、安全性に関する分野

接着分子シグナルを利用した皮膚老化防止の新戦略

群馬大学 生体調節研究所

的 崎 尚

SHPS-1 is a transmembrane protein whose extracellular region interacts with CD47 and whose cytoplasmic region undergoes tyrosine phosphorylation and thereby binds the protein tyrosine phosphatase SHP-2. Formation of this complex is implicated in regulation of cell migration by an unknown mechanism. A CD47-Fc fusion protein or antibodies to SHPS-1 inhibited migration of human melanoma cells or of CHO cells overexpressing SHPS-1. Overexpression of wild-type SHPS-1 promoted CHO cell migration, whereas expression of the SHPS-1-4F mutant, which lacks the phosphorylation sites required for SHP-2 binding, had no effect. Antibodies to SHPS-1 failed to inhibit migration of CHO cells expressing SHPS-1-4F. SHPS-1 ligands induced the dephosphorylation of SHPS-1 and dissociation of SHP-2. Antibodies to SHPS-1 also enhanced Rho activity and induced both formation of stress fibers and adoption of a less polarized morphology in melanoma cells. Our results suggest that engagement of SHPS-1 by CD47 prevents the positive regulation of cell migration by this protein. The CD47-SHPS-1 system and SHP-2 might thus contribute to the inhibition of cell migration by cell-cell contact.

1. 緒 言

皮膚は、年齢変化が最も顕著に認められる組織の1つである。皮膚老化のバイオロジーを研究することは、生命科学における老化の基本メカニズムを明らかにする上においても、また皮膚の老化を防止あるいは遅延させて美容に役立つ薬剤の開発を行う面においても、極めて意義深い成果をもたらすと考えられる。私共は、これまで蛋白質チロシンリン酸化を介した細胞内シグナル伝達系の役割を中心として、細胞の増殖と接着の制御機構につき研究を続けている。特に、私共は、SH2ドメインを有しているチロシンホスファターゼ SHP-2が、増殖因子刺激による Ras 低分子量 G 蛋白質の活性化に重要な役割を果たしていることを明らかにした¹⁾。また、SHP-2の脱リン酸化基質蛋白質として、イムノグロブリンファミリーに属する受容体型の蛋白質 SHPS-1²⁾ およびドッキング蛋白質 Gab-1を見い出しており、SHPS-1/SHP-2系や Gab-1/SHP-2系が細胞接着装置であるインテグリン系やカドヘリン系と相互作用して、Rho 低分子量 G 蛋白質の活性化を介して細胞運動をも制御することを示した。即ち、SHP-2は、増殖因子と細胞接着の両方のシグナル経路の下流に位置し、2つの異なる低分子量 G 蛋白質 Ras と Rho を制御する多機能なシグナル分子であることを明らかにした。私共は、最近、SHPS-1がその細胞外領域の生理的なリガンドである受容体型の分

子 CD47 と相互作用することにより新しい細胞間シグナル伝達系 (CD47-SHPS-1 系) を形成していることを明らかにしつつある³⁾。

SHPS-1は、その細胞外領域に3個の免疫グロブリン様構造をもち、さらにリン酸化を受ける複数のチロシン残基を細胞内領域にもつ蛋白質である。一方、CD47は、細胞接着分子であるインテグリンに関連する分子として同定され、組織普遍的に発現する5回細胞膜貫通型の蛋白質である。CD47は、その細胞外領域に1個の免疫グロブリン様構造をもち、これがSHPS-1のN末端側の免疫グロブリン様構造に結合する。

SHPS-1とCD47は相互作用することにより双方向性にシグナルを伝えると考えている。そこで本研究では、将来皮膚の再生や老化の防止につながる手法や薬剤の開発の端緒を得ることを目的として、細胞接着や細胞運動の制御におけるCD47-SHPS-1系によるの機能を分子レベルでさらに詳細に検討しようと試みた。

2. 実 験

2. 1 細胞、抗体および融合蛋白質

細胞として、ヒト悪性黒色腫細胞 WM239a と CHO 細胞を用いた。CHO 細胞には外来性にヒトまたはラット SHPS-1 遺伝子を導入し、安定発現株とした。抗体は、抗ヒト SHPS-1 抗体(SE12C3) および抗ラット SHPS-1 抗体(2F34, 9F10)を用いた。さらに、CD47の細胞外領域と Ig-Fc との融合タンパク質 (CD47-Fc) を分泌する CHO 細胞株を樹立し、この細胞培養上清より CD47-Fc を回収し Protein-A を用い精製して、これを SHPS-1 リガンドとして用いた。

2. 2 SHPS-1 および CD47 の発現の検討

悪性黒色腫細胞および CHO 細胞での SHPS-1、CD47 の



A new strategy for protection of skin senescence by utilizing adhesion molecules

Takashi Matozaki

Biosignal Research Center, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University

発現は、Flowcytometry またはウェスタンブロッティング法で検討を行った。

2. 3 細胞運動の測定

細胞運動の測定には、Transwell apparatus (Corning社)を用い、既報⁴⁾に基づき行った。また同様に Wound healing assay 法によっても検討を行った。

2. 4 SHPS-1 リガンド処理による細胞形態への影響

蛍光免疫染色法で細胞形態の観察を行った。

2. 5 シグナル分子のチロシンリン酸化の検討

各種分子のチロシンリン酸化を免疫沈降法と抗チロシンリン酸化抗体を用いて検討した。

2. 6 Rho 活性の測定

GST 融合 Rhotekin を用いて活性化 Rho を沈降させ、Rho の活性化状態の検討を行った。

3. 結果

3. 1 細胞運動に対する SHPS-1 リガンドの効果

CD47-SHPS-1 系による細胞運動の制御機構を詳細に解析するために、SHPS-1 を発現する種々の培養細胞の運動能を解析できるシステムを構築した (図1)。特に、ヒト悪性黒色腫細胞に SHPS-1 を発現することを確認し、これをモデル細胞として用い、この系における CD47 と SHPS-1 の相互作用による細胞運動への影響を検討した。悪性黒色腫細胞に SHPS-1 抗体あるいは CD47-Fc を作用させると、細胞運動の抑制が観察された (図2、3)。この効果は、2次抗

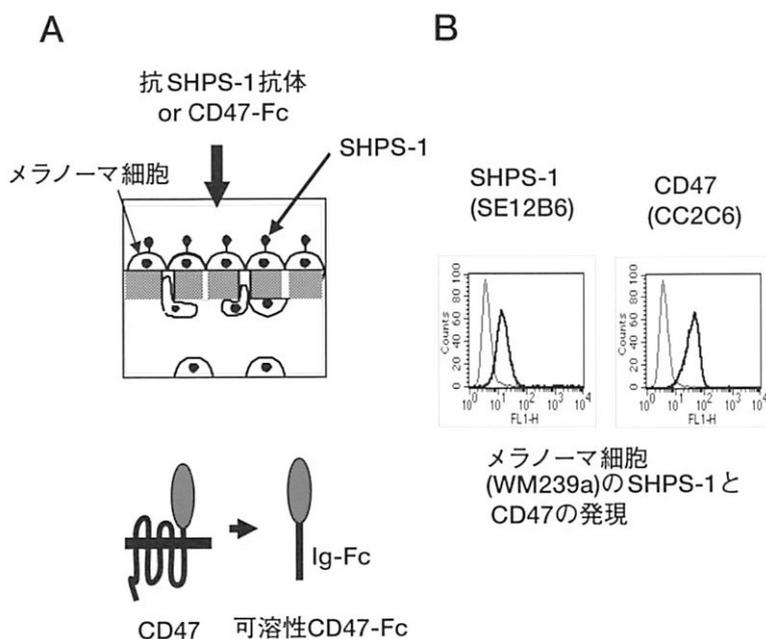


図1 A 細胞運動測定系の概念図
B ヒト悪性黒色腫細胞上での CD47, SHPS-1 の発現

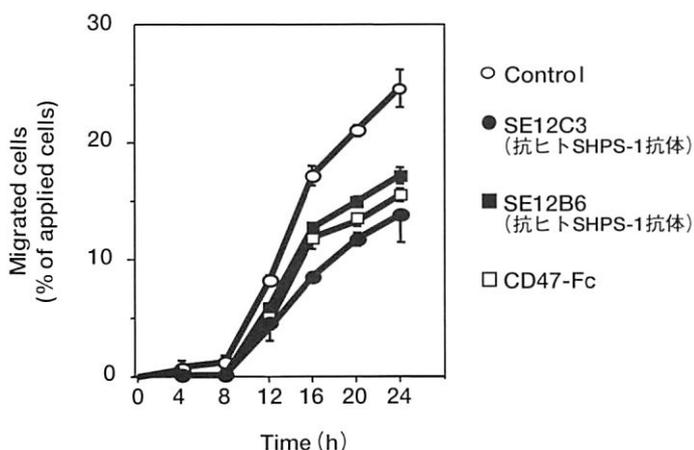


図2 細胞運動に対する SHPS-1 リガンドの効果

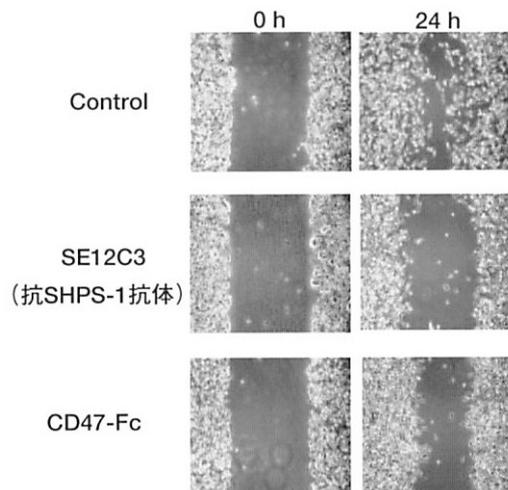


図3 SHPS-1 リガンドによる細胞運動抑制

体の添加によりさらに増強された。すなわち、SHPS-1 抗体あるいは CD47-Fc による細胞運動の抑制は、細胞表面上の SHPS-1 の ligation によるものと考えられた。

SHPS-1 抗体あるいは CD47-Fc による細胞運動の抑制は、SHPS-1 を外来性に発現させた CHO 細胞においても認められ、この効果は SHP-2 を結合しないタイプの変異型 SHPS-1 発現 CHO 細胞では観察されなかった (図 4)。

3. 2 細胞内シグナル分子への SHPS-1 リガンドの効果

ヒト悪性黒色腫細胞に、抗 SHPS-1 抗体をリガンドとして用い、処理したところ、SHPS-1 が脱リン酸化され、同時に SHP-2 との結合も見られなくなった (図 5)。この効果は抗体処理後 15 分後より著明となり、60 分後も持続した。同様の結果が、CD47-Fc 処理によっても得られた。

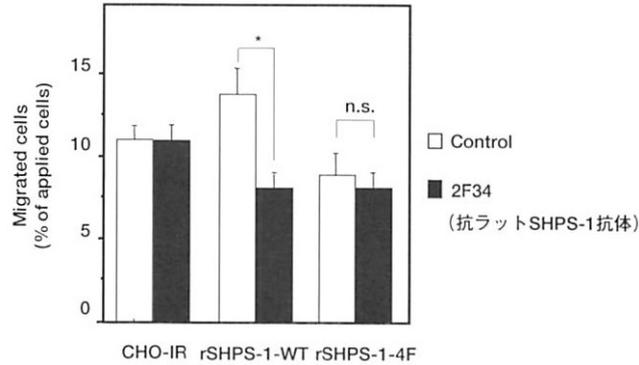


図 4 細胞運動抑制に対する SHPS-1 細胞内領域チロシンリン酸化部の役割
SHPS-1 4F (リン酸化をうけるチロシンをフェニルアラニンに置換した変異体) では SHPS-1 リガンドによる細胞運動抑制効果 を認めない。

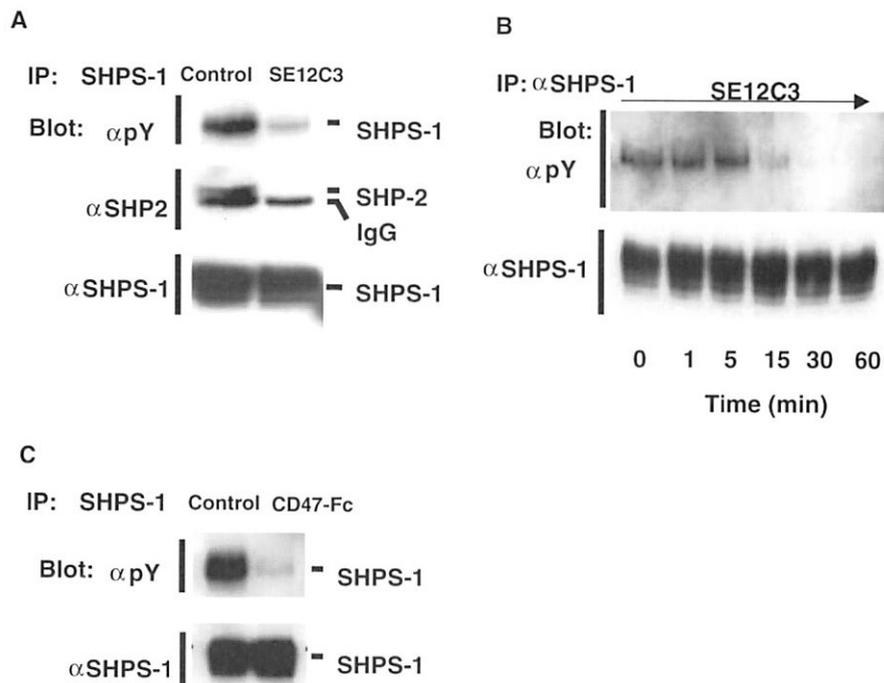


図 5 SHPS-1 リガンド処理による SHPS-1 リン酸化への影響
A : SHPS-1 抗体処理により SHPS-1 は脱チロシンリン酸化され、SHP-2 との結合も解除される。
B : この効果は 15 分後より著明となり、60 分後も持続する。
C : 可溶性 CD47 処理によっても脱リン酸化が認められる。

3. 3 細胞形態に対する SHPS-1 リガンドの効果

ヒト悪性黒色腫細胞を抗 SHPS-1 抗体処理することにより、紡錘形を示す悪性黒色腫細胞が多角化し、アクチンストレスファイバーの増強を認めた (図 6)。Vinculin、Paxillin といった接着斑関連蛋白質には著明な変化を認めなかった。

3. 4 SHPS-1 リガンド処理による Rho 活性への影響

アクチンストレスファイバーの増強を認めたため、細胞骨格系の制御に関与する Rho 活性への影響を検討したところ、抗 SHPS-1 抗体処理により Rho 活性の上昇を認めた。また Rho のエフェクターである p160ROCK の阻害剤 Y-27632 処理により、SHPS-1 リガンドによる細胞運動抑制の部分的な解除を認めた (図 7)。

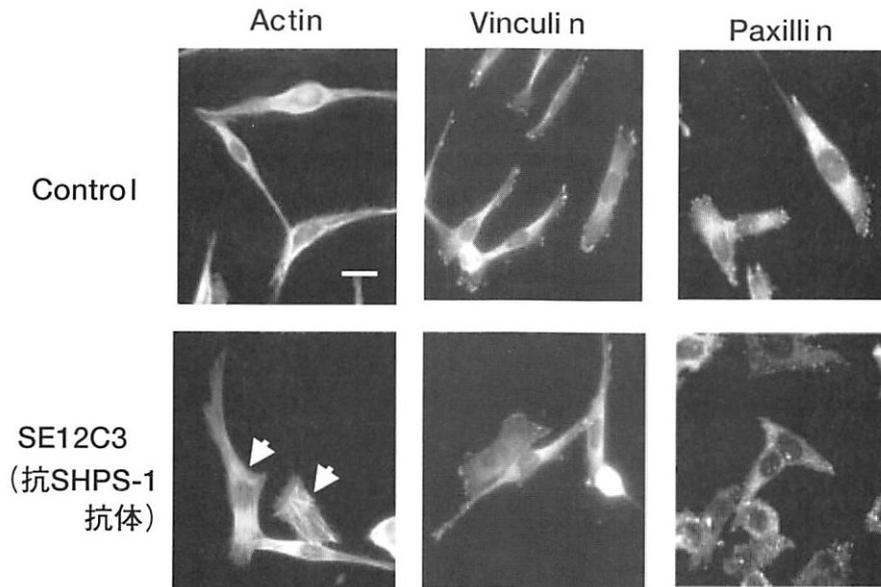


図 6 SHPS-1 リガンドによるアクチン及び細胞形態の変化
SHPS-1 抗体処理により悪性黒色腫細胞は、多角化し、アクチンストレスファイバーの増強を認める。

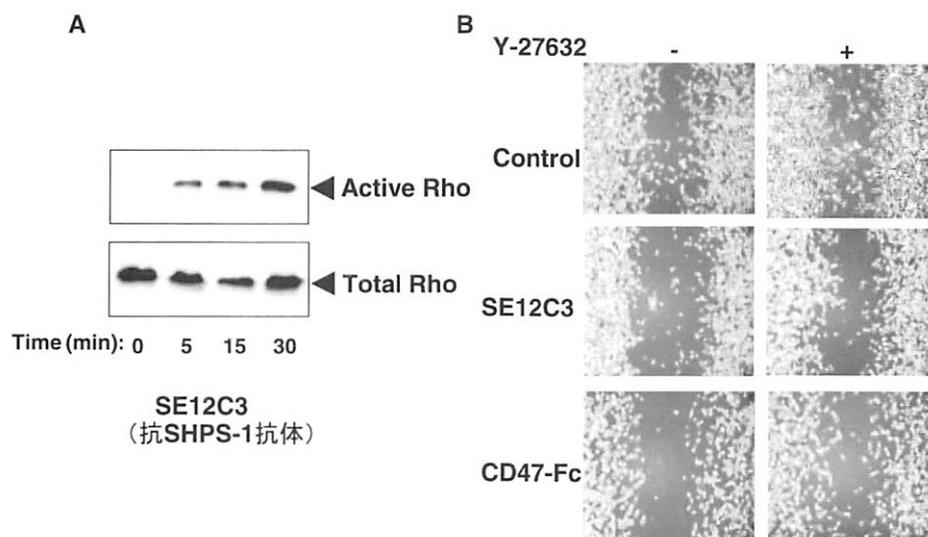


図 7 SHPS-1 リガンドによる Rho 活性への影響
A : SHPS-1 抗体処理 5 分後より、Rho の活性化を認めた。
B : ROCK 阻害剤 (Y-27632) 処理により、SHPS-1 リガンドによる細胞運動抑制が部分的に解除された。

4. 考 察

本研究では CD47-SHPS-1 系が、普遍的な細胞運動の負の制御に関与していることを明らかにした⁵⁾。

CD47-SHPS-1 系はこれらの分子を各々発現する細胞同士との接触により双方向性に細胞運動を抑制すると想定され、CD47-SHPS-1 系が接触障害の分子機構に関わっている可能性が高い (図 8)。この結果から、例えば CD47-SHPS-1 系のがんにおける異常が、浸潤・転移の分子機構に関与する可能性が考えられる。皮膚においては、メラノサイト以外にケラチノサイトにも SHPS-1 の発現が観察される。CD47 は、かなり普遍的に発現しており、CD47-SHPS-1 系が皮膚を構成する細胞群の増殖、接着、運動の制御に重要な役割を果たしていることが想定される。最近、T 細胞上の CD47 が、樹状細胞上の SHPS-1 と相互作用することにより互いの細胞機能を負に調節することも報告されている⁶⁾。皮膚のランゲルハンス細胞には SHPS-1 の高い発現があることから、CD47-SHPS-1 系が皮膚の免疫系においても重要である可能性が高い。今後、これらの点につき詳細な検討を行う予定である。

(参考文献)

- 1) Noguchi T, Matozaki T, Horita K, et al.: Role of SH-PTP2, a protein-tyrosine phosphatase with Src homology 2 domains, in insulin-stimulated Ras activation. *Mol Cell Biol.* 14: 6674-6682, 1994.
- 2) Fujioka Y, Matozaki T, Noguchi T, et al.: A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion. *Mol Cell Biol.* 16: 6887-6899, 1996.
- 3) Yamao T, Noguchi T, Takeuchi O, et al.: Negative

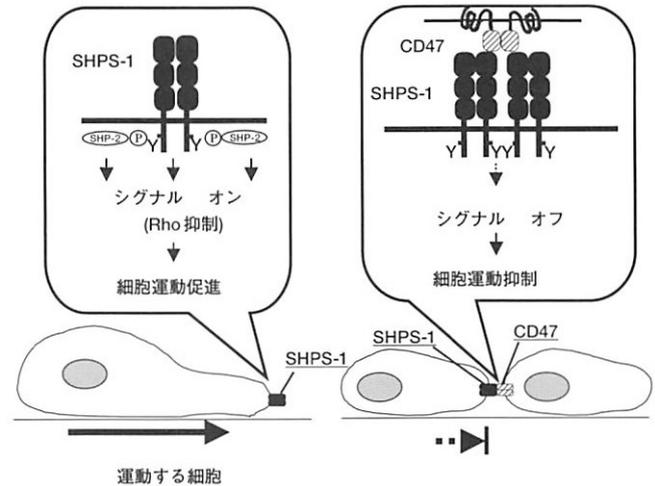


図 8 CD47-SHPS-1 系による細胞運動抑制機構のモデル

regulation of platelet clearance and of the macrophage phagocytic response by the transmembrane glycoprotein SHPS-1. *J Biol Chem* 277: 39833-39839, 2002.

- 4) Longo N, Yanez-Mo M, Mittelbrunn M, et al.: Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. *Blood.* 98: 3717-3726, 2001.
- 5) Motegi S, Okazawa H, Ohnishi H, et al.: Role of the CD47-SHPS-1 System in Regulation of Cell Migration. *EMBO J.* 22: 2634-2644, 2003
- 6) Latour S, Tanaka H, Demeure C, et al.: Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein- α : down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol.* 167: 2547-2554, 2001.

皮膚の老化によるⅦ型コラーゲンの代謝及び 遺伝子発現調節機構について

弘前大学 医学部生化学第1講座

今 淳

Type VII collagen is the major component of anchoring fibrils, attachment structures stabilizing the association of cutaneous basement membrane to the underlying dermis. Previous studies have shown that the reduction of type VII collagen expression and anchoring fibril formation may involve intrinsic-/photo-aging of the skin, including wrinkle formation, laxity, and roughness. In order to understand the molecular mechanisms underlie these clinical features, I investigated 1) the transcriptional mechanisms of type VII collagen gene (COL7A1) and 2) the effects of ultraviolet (UV) radiation-induced cytokines (TNF- α , IL-1 β) on COL7A1 expression. 1) Transient cell transfection assays with COL7A1 promoter/luciferase reporter gene construct into epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts revealed that a GC box (-155/-150) as well as a GT box (-512/-505) previously published are crucial for the high basal activity of COL7A1 promoter. Electrophoresis mobility shift assays revealed that transcription factors Sp1 and Sp3 bind to this region. Co-transfection experiments of COL7A1 promoter construct with Sp1 and Sp3 expression vectors demonstrated that Sp1 is essential for high COL7A1 expression, whereas Sp3 represses Sp1-mediated transcriptional activation. However, point mutation into -155/-150 site markedly reduced the activity of the promoter, suggesting -155/-150 is an Sp1-family-mediated cis-acting element involved in transcription of COL7A1. 2) Northern blot analyses demonstrated that both TNF- α and IL-1 β reduced COL7A1 mRNA levels in epidermal keratinocytes in a dose- and time-dependent manner, whereas they enhanced the expression of COL7A1 in dermal fibroblasts. The inhibitory effects were also observed at the protein level as well as at the mRNA level. In addition, nuclear run-on assays revealed that TNF- α and IL-1 β reduced the COL7A1 transcripts, suggesting that the inhibitory effects of TNF- α and IL-1 β on COL7A1 expression was occurred, at least in part, at the transcriptional level. Thus, COL7A1 regulation by these inflammatory cytokines is cell type-specific. Down-regulation of COL7A1 expression in epidermal keratinocytes may contribute to the reduction of anchoring fibrils formation, resulting in intrinsic- /photo-aging of the skin, characterized by wrinkle formation.

1. 緒言

皮膚のⅦ型コラーゲンは、表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞により生合成され、細胞外に移動した後、基底膜 (BM) に結合してアンカーリングフィブリル(AF)を形成する(図1)。そして、このⅦ型コラーゲン/AFは、基底膜と真皮との結合を強固にし、皮膚の構築を維持する重要な役割を担っていると考えられている¹⁾。

皮膚の老化には、加齢に伴い全身の皮膚に生じる自然老化と、紫外線暴露により生じる露光部の光老化が存在するが、何れの老化した皮膚においてもAFの減少が認められ、しかも光老化皮膚ではその程度が更に増強していることから²⁾、所謂“皺”など皮膚の老徴出現にはⅦ型コラーゲンが何らかの関与をしていると考えられる。

本研究完了報告では、最終的に、いつまでも“皺”を生じない若々しい皮膚を保つ方法の確立を目的とし、その一端としてⅦ型コラーゲンタンパク質及びコードする遺伝子

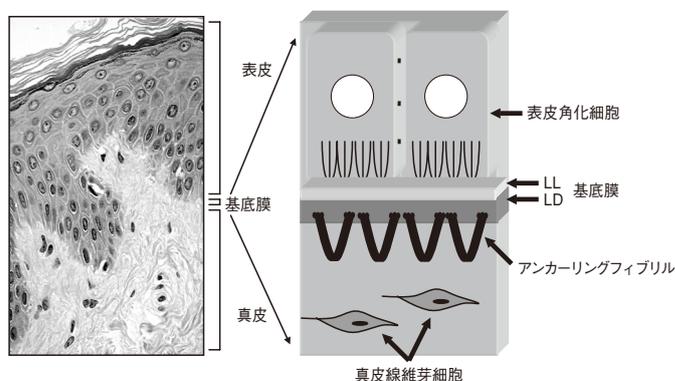


図1. 皮膚基底膜領域へのアンカーリングフィブリルの結合
表皮角化細胞と真皮線維芽細胞で生合成されたⅦ型コラーゲンは、lamina lucida (LL) 及び lamina densa (LD) からなる基底膜領域に移動・結合し、アンカーリングフィブリルを形成する。

COL7A1の発現と老化との関係について報告する。特に、1) 皮膚のCOL7A1基本転写調節機構、2) 光老化に関する各種炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) による皮膚のCOL7A1発現調節機構の解析結果を報告し、老化による皮膚の老徴との関連についても考察する。

2. 実験

2.1 ルシフェラーゼアッセイ法

培養ヒト表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞における



Metabolism and gene regulation of type VII collagen in skin aging.

Kon Atsushi

Department of Biochemistry, Hirosaki University School of Medicine

COL7A1 の転写制御領域の解析・同定は、ルシフェラーゼアッセイ法を用いて行った³⁾。尚、ルシフェラーゼコンストラクト(-1804COL7A1-Luc) は、PCR 法により増幅した COL7A1 プロモーター領域 (-1804/+108) をインサートとし、これをルシフェラーゼ発現ベクターに組み込み調整した。また、インサートの 5' 末端からプロモーター領域を順次欠失させた各種欠失変異体も同様に調製した。

2.2 ゲルシフトアッセイ法

COL7A1 の転写制御領域に結合する転写因子の解析・同定は、ゲルシフトアッセイ法を用いて行った³⁾。

2.3 ノーザンブロット法

炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) による、培養ヒト表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞の COL7A1 mRNA の発現変化は、ノーザンブロット法で解析した⁴⁾。

2.4 ウェスタンブロット法

炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) による、培養ヒト表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞の VII 型コラーゲンタンパク質の発現変化は、ウェスタンブロット法で解析した⁵⁾。

2.5 核 run-on アッセイ法

炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β) による COL7A1 の転写産物量の変化を、核 run-on アッセイ法によって解析した⁶⁾。

3. 結果及び考察

3.1 COL7A1 の基本転写調節機構

既に約 3.8kb のヒト COL7A1 プロモーター領域がクローニングされ、解析された。しかし、(1) COL7A1 が TATA-less 遺伝子であること、(2) プロモーター領域 -512/-505 (転写開始点を +1 とする) の GT box が基本転写の cis-element であり、Sp1 の結合する、こと以外明らかにされておらず³⁾、皮膚の COL7A1 基本転写調節機構の詳細を更に解析した。

-1804COL7A1/Luc 及びその欠失変異体を培養ヒト表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞にそれぞれ導入して、ルシフェラーゼアッセイ法を行った結果、両細胞とも、-458 まで欠失させると活性が 40% にまで低下した。これは、上記 -512/-505 の GT box が欠失したためであった。更に -230 までは変化しなかったが、-144 まで欠失させると活性が消失した。以上から、-230/-140 にも cis-element が存在すると考えられた。コンピューターによるモチーフ解析を行った結果、-155/-150 に Sp1 の結合し得る GC box が存在していた。ゲルシフトアッセイ法で確認したところ、この領域には Sp1-family の Sp1 及び Sp3 が結合していた (図 2)。次に、Sp1 及び Sp3 の発現ベクターを各細

胞に導入して co-transfection 実験を行った結果、Sp1 はルシフェラーゼ活性を促進し、Sp3 は Sp1 の作用を抑制した。そこで、上記 GT box 及びこの GC box に変異を入れた -524COL7A1/Luc を各細胞に導入して、同様にルシフェラーゼアッセイ法を行った結果、活性は著しく低下するものの完全には消失しなかった。即ち、これら GT/GC box は COL7A1 転写の initiation を制御する領域ではなく、エンハンサーとして互いに協同しながら COL7A1 の転写を制御していた (図 3)。

3.2 各種サイトカインによる皮膚の COL7A1 発現調節機構

皮膚が紫外線に暴露されると、“皴”などの老徴に代表される光老化が生じる。この光老化の生じた皮膚では、AF の形成が低下しており、この機構に VII 型コラーゲンが

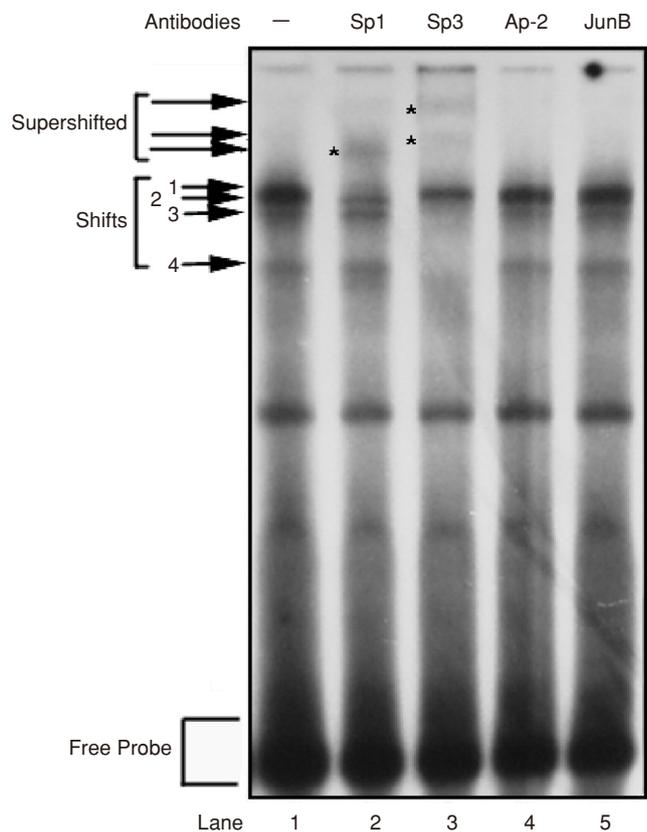


図 2. -155/-150 の領域への Sp1 及び Sp3 の結合

GC box である -155/-150 領域をプローブとしてスーパーシフトアッセイ法を行った結果、Sp-family の Sp1 及び Sp3 のスーパーシフトのバンド (Supershifted bands, ★印) を認めた。

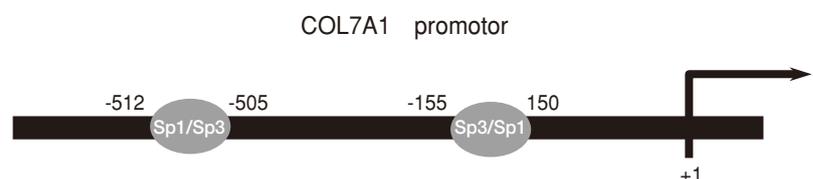


図 3. VII 型コラーゲン遺伝子 COL7A1 の基本転写調節機構

関与するのではないかと考えられている²⁾。最近、紫外線 UVA による COL7A1 の発現調節に関する報告がなされ、表皮角化細胞における COL7A1 の発現を抑制し、逆に真皮線維芽細胞は促進することが明らかになった⁵⁾。更に、紫外線により誘導される炎症性サイトカイン TNF- α 、及び IL-1 β も、COL7A1 の発現を制御していることが報告され⁴⁾、真皮線維芽細胞における COL7A1 の発現を促進し、特に TNF- α は NF- κ B を誘導して、これが COL7A1 プロモーター領域の応答配列に結合、転写レベルで発現を促進することが明らかになった⁷⁾。しかし、表皮角化細胞に対する機構は全く不明であり、その詳細を解析した。

培養ヒト表皮角化細胞に TNF- α (10 ng/mL)、IL-1 β (100 U/mL) を添加して 24 時間培養し、次いで細胞を回収、COL7A1 の発現をノーザンブロット法で解析した。その結果、両炎症性サイトカインとも COL7A1 の発現を抑制した (図 4)。しかも、この抑制効果は濃度及び時間依存的であった。培地中にタンパク質合成阻害剤 cycloheximide を添加すると、この抑制効果が消失したことから、この反応には de novo のタンパク質新生を必要とした。次に、核 run-on アッセイでにより、各炎症性サイトカインの作用が転写レベルで行われているかを解析した。その結果、各炎症性サイトカインの刺激により転写産物量が減少し、抑制効果は転写レベルでの調節を受けていた。ウエスタンブロット法で、培地中に分泌されるⅦ型コラーゲンタンパク量を解析したところ、発現が抑制されており、遺伝子レベルのみならずタンパクレベルでも抑制効果を認めた。この様に、炎症性サイトカインの表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞における COL7A1 発現調節機構は全く異なっており、組織特異的発現調節機構の存在が示された。

以上から、光老化の原因となり紫外線で誘導される炎症性サイトカイン TNF- α 及び IL-1 β も、紫外線 UVA の場合と同様に表皮角化細胞の COL7A1 の発現を抑制しており、AF の低形成への関与が考えられた。AF の低形成は基底膜領域を脆弱にし、そこに外力が掛かることで深い溝ができ、皺形成に繋がる可能性が考えられた。しかしながら、真皮線維芽細胞における効果も UVA と同様促進的であり、発現したⅦ型コラーゲンがどのような機構で AF を形成するのか、今後更なる解析が必要である。事実、表皮角化細胞と真皮線維芽細胞の何れが AF を形成するのか、例えば表皮角化細胞由来のⅦ型コラーゲンが優位に形成するのかなど不明な部分が多い。更に、各炎症性サイトカインはⅦ型コラーゲンの異化分解酵素の一つである matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の発現も促進することが知られ⁸⁾、このことも AF の分

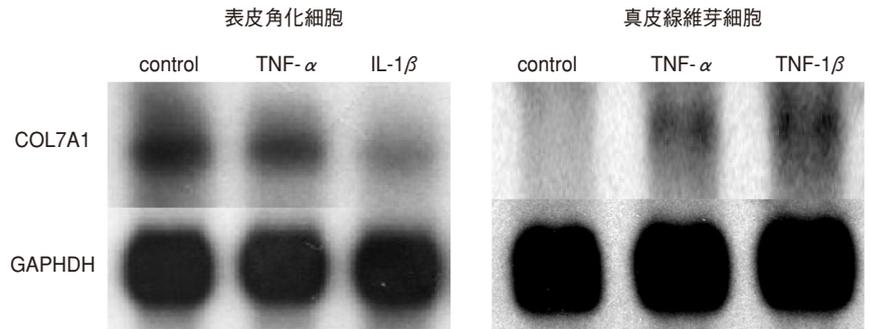


図 4. 表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞の COL7A1 の発現に対する、炎症性サイトカイン TNF- α 及び IL-1 β の影響

TNF- α (10 ng/mL) 及び IL-1 β (100 U/mL) で培養ヒト表皮角化細胞を刺激すると、COL7A1 の発現は抑制された。一方、真皮線維芽細胞では促進され、組織特異的発現調節機構が認められた。

解・低形成を引き起こしている可能性が否定できない。従って、皮膚の老徴出現の解析には、Ⅶ型コラーゲンの生合成、COL7A1 の発現調節機構のみならず、異化分解系の関与も検討する必要があると考えられた。

(参考文献)

- 1) 今 淳: 表皮角化細胞及び真皮線維芽細胞におけるⅦ型コラーゲン遺伝子の発現調節機構について. *Connec Tissue* **34**: 127-135, 2002.
- 2) Craven NM, Watson RE, Jones CJ et al.: Clinical features of photodamaged human skin are associated with a reduction in collagen VII. *Br J Dermatol* **137**: 344-350, 1997.
- 3) Vindevoghel L, Kon A, Lechlerider RJ et al.: Smad-dependent transcriptional activation of human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **273**: 13053-13057, 1998.
- 4) Chen YQ, Mauviel A, Ryynanen J et al.: Type VII collagen gene expression by human skin fibroblasts and keratinocytes in culture: influence of donor age and cytokine responses. *J Invest Dermatol* **102**: 205-209, 1994.
- 5) Chen M, Petersen MJ, Li HL et al.: Ultraviolet A irradiation upregulates type VII collagen expression in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* **108**: 125-128, 1997.
- 6) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- 7) Kon A, Vindevoghel L, Kouba DJ et al.: Cooperation between SMAD and NF- κ B in growth factor regulated type VII collagen gene expression. *Oncogene* **18**: 1837-1844, 1999.
- 8) Salo T, Makela M, Kylmaniemi M et al.: Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest* **70**: 176-182, 1994.

皮膚表皮細胞への生理活性タンパク遺伝子のデリバリーと分泌方向性の制御

京都大学大学院 薬学研究科

高倉 喜信

Epithelial cells, generally displaying cell polarity, are considered to be good targets for gene therapy because of their distribution of enormous surface area of various tissues and organs in animal bodies. Polarized epithelial cells possess two functionally and compositionally distinct cell surface domains that are separated from each other by tight junctions. They play fundamental roles in the specialized vectorial transport and secretion of proteins in tissue and organs.

Newly synthesized domain-specific membrane proteins are conveyed through the endoplasmic reticulum (ER)-Golgi apparatus to the trans-Golgi network (TGN), and packaged into transport carriers for membrane integration. The destination of the membrane proteins seems to be determined by interrelation between some signal sequences on the protein and various cellular components playing roles in sorting and trafficking. Secretory proteins are also considered to be transported in the same manner as the membrane proteins. In spite of many investigations of the issue, the mechanisms regulating apical or basolateral sorting of secretory proteins remain elusive.

The green fluorescent protein (GFP) of the jellyfish *Aequorea victoria* and its variants are widely used in cell imaging applications to reveal the location of proteins. Results from those applications are providing new insights into protein function and cellular processes in the complex environment of the cell. The GFP-tagging technology is useful for directly investigating the intracellular localization, movement and fate of secretory proteins of interest in living cells.

We have recently examined the mode of secretion polarity of interferon (IFN)- β expressed exogenously in several epithelial cell lines. The secretion of constitutive IFN- β from the stable transformants was apparently unpolarized. Meanwhile, intriguingly, IFN- β transiently expressed by gene transfection was predominantly secreted from the cell membrane side to which the transfection or the induction was carried out. In this study, we have investigated the subcellular localization of the cytokine using GFP-tagged IFN- β under confocal laser scanning microscopy (CLSM). Our results suggested that IFNs expressed stably and transiently are transported via different post-TGN vesicles. The same secretory protein, at least as far as IFN is concerned, can be sorted to the apical or basolateral membrane side depending on the gene expression strategy, which deems to be regulated at the post-TGN stages.

1. 緒言

上皮細胞は体表面や体腔の表面を覆う極性を有する細胞で^{1,2)}、広大な表面積を有しており遺伝子治療の重要なターゲットと考えられる。その形質膜はタイトジャンクションにより頂側膜 (apical) 側と基底膜 (basal) 側に物理的に隔てられ、膜を構成するタンパク質や、脂質の組成も異なっている³⁾。このように、性質の異なる形質膜ドメインを持つことで、上皮細胞は外から内、または内から外へと一方向性の物質の流れを生み出し⁴⁻⁶⁾、生体内の恒常性を保つ重要な働きを担っている。このような性質を利用して、上皮細胞にサイトカインなどの分泌性生理活性タンパク質をコードした治療用遺伝子を導入・発現させた後、方向選択的に分泌させることができれば、タンパク質医薬品の局所あるいは、全身循環へのデリバ

リーが可能になると考えられる。この際、遺伝子産物の分泌方向性、すなわち apical, basal どちら側に分泌されてくるかは、効果を左右する重要な因子となる。細胞生物学の分野では、発現したタンパク質は、それ自身のシグナルと細胞選別機構によって、存在するべき場所へと輸送されることが知られている。しかしながら、我々は既に多孔性フィルター上でモノレイヤーを形成した上皮細胞において、インターフェロン- β (IFN- β) をモデルとした遺伝子導入実験を行った結果、IFN β を構成的に発現させた場合には、極性を示すことなく apical 側及び basal 側にほぼ同量の IFN β が分泌され、一過性に発現させた場合には、apical 側から遺伝子導入した場合には apical 側へ、basal 側から遺伝子導入した場合には basal 側への導入方向選択的な分泌が観察され、同一タンパク質であるにも関わらず、遺伝子発現様式に依存した異なる分泌方向性を示すことを見出している⁷⁾ (Fig. 1)。そこで、Green fluorescent protein (GFP) とヒト IFN- β との融合タンパク質発現ベクターを作製し、発現させた IFN のトランスゴルジネットワーク (TGN) 以降の小胞輸送過程について、イヌ腎上皮細胞株 MDCK 細胞を中心に用いて詳細な検討を行った。



Control of secretion polarity of bioactive protein after gene delivery to the skin

Yoshinobu Takakura

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

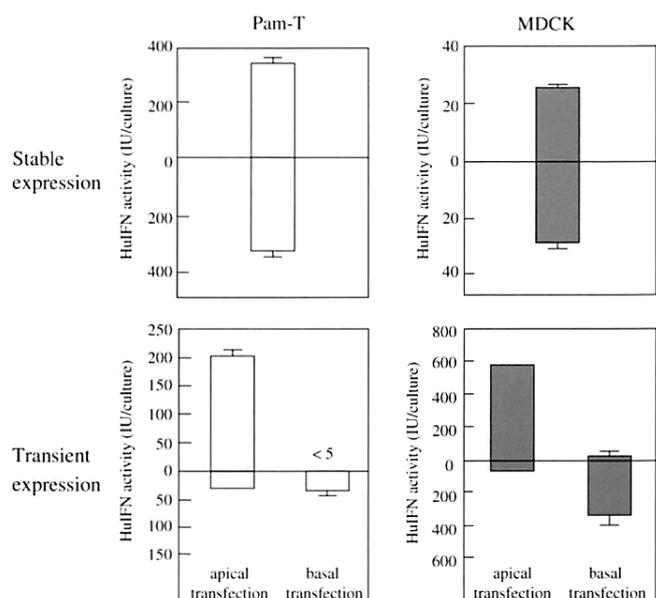


Fig. 1 Secretion polarity of stably or transiently expressed human IFN- β in Pam-T and MDCK cells. Cells were culture on Transwell for 5 days. In transient expression experiments, human IFN- β gene was transfected onto apical or basal side. Open bars and gray bars showed human IFN activities in Pam-T and MDCK cells, respectively. The values represent the mean of three determinations with S.D.

2. 実験

2.1 ヒトIFN- β とGFPとの融合タンパク質 (HuIFN β -GFP) 発現ベクターの作製

ヒトIFN- β 遺伝子をコードした pCMV-HuIFN β のヒトIFN- β cDNA 部位をPCRで増幅し、GFP発現ベクターのレポーター遺伝子のN末に組み込み、ヒトIFN- β (HuIFN β) とGFPとの融合タンパク質 (HuIFN β -GFP) を発現するベクター (pCMV-HuIFN β -GFP) を作製した。

2.2 安定発現株の作製

播種後24時間培養した細胞に対し、ベクターとカチオン性リポソームであるLipofectAMINE2000TMとの複合体を用いてトランスフェクションを行った。細胞を100mm培養皿に移し、抗生物質G418で培養した。G418耐性コロニーを回収して、さらに培養後、上清中のIFN量をバイオアッセイにより定量し⁸⁾、最も活性が高かったものを安定発現株として確立した。同様の方法を用いて蛍光の有無を指標にGFP安定発現株を樹立した。

2.3 分泌方向性の検討

安定発現株を、多孔性フィルター (TranswellTM) 上で5日間培養後、培地を交換し、24時間までに細胞層のapical側及びbasal側に分泌された細胞上清中のIFN量を

測定し、安定発現における分泌方向性を評価した。一方、一過性の遺伝子発現実験においては、プラスミドDNA (3 μ g/mL) とLipofectAMINE2000TM (10 μ g/mL) の複合体を、多孔性フィルター上で5日間培養した細胞のapical側及びbasal側から導入した。複合体を含むOpti-MEM培地で4時間培養後、通常の培地と交換し、導入後24時間までに各コンパートメント中へ分泌したIFN量を測定した。いずれの実験においても、IFNの細胞層を介した漏出の有無を調べるために、遺伝子導入したものとは異種のIFNをマーカーとして添加し、透過の有無を確認した。

2.4 遺伝子導入により発現した融合タンパク質の局在の観察

HuIFN β -GFP及びGFP安定発現株は、フィルター上で5日間培養後固定した。固定前に5 μ g/mLのbrefeldin A (BFA) で30分間処理、もしくは20 $^{\circ}$ Cの10mM HEPES入りDMEMに培地を交換後20 $^{\circ}$ Cで2時間処理し、固定した。また、一過性の遺伝子発現実験においては、融合タンパク質発現ベクターを導入して、10時間後に固定した。固定前に、BFA処理、及び20 $^{\circ}$ C低温度処理を行った。固定、透過後、免疫染色により各オルガネラを染色あるいはpropidium iodide (PI) で核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。一次抗体に小胞体、ゴルジ体、トランスゴルジネットワーク (TGN) のマーカータンパクであるprotein disulfide isomerase (PDI) (1D3)、Golgi-58K (58K-9)、furin convertase に対する抗体を用いた。いずれの場合も二次抗体に、Alexa Fluor 594 標識2次抗体を用いた。免疫染色後共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

2.5 シクロヘキシミド (CHX) 及び20 $^{\circ}$ C低温度処理のIFN- β 分泌過程に与える影響

CHX及び20 $^{\circ}$ C低温度処理の融合タンパク質細胞内輸送に与える影響を観察するため、 1×10^5 個の融合タンパク質安定発現細胞をカバーガラス上に播種し、1日間培養した。その後、0、10、20 μ g/mLのCHXを含んだ20 $^{\circ}$ Cまたは37 $^{\circ}$ CのDMEMに培地を交換して2、4時間培養し、固定後共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。また、分泌に与える影響を調べるため 1×10^5 個の融合タンパク質安定発現MDCK細胞を24穴プレートに播種し、0、10、20 μ g/mLのCHXを含んだ37 $^{\circ}$ CのDMEMに培地を交換して2時間培養後、CHXを含有しないDMEMに交換してさらに10、30、60、120分間培養した上清を回収し、IFN量を測定した。

2.6 TGN以降の小胞輸送過程の解析

カバーガラス上でMDCK細胞及び融合タンパク質安定発現細胞を1日間培養した。MDCK細胞に対しては、マウスIFN- β 発現プラスミド (pCMV-MuIFN β) 及びpCMV-

HuIFN β を同時に導入し、融合タンパク質安定発現細胞に対しては pCMV-MuIFN β を導入した。導入後8時間から、10 μ g/mLの cycloheximide (CHX)、10mM HEPESを含んだDMEMで、20 $^{\circ}$ C 2時間培養した。その後、37 $^{\circ}$ Cの10 μ g/mLのCHXを含んだ培地に交換し、0、5、10、15、30分間培養後、固定した。固定後、一次抗体にマウスIFN- β 抗体⁹⁾(6D-G8)、2次抗体にAlexa Fluor 546標識二次抗体を用いて、免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。画像解析はImage-Pro Plus ver. 4.5を用いて作製したFluorogramの対角線上の任意の場所を選び、コロライゼーション係数M1、M2を算出した¹⁰⁾。

3. 結果

3. 1 融合タンパク質の分泌方向性の検討

まず、Pam-T細胞及びMDCK細胞において、融合タンパク質を安定に発現させた場合と一過性に発現させた場合の分泌方向性について検討した (Fig. 2)。その結果、安定発現株からは両方向にほぼ均等な分泌が見られたのに対し、一過性に発現させた場合には、遺伝子導入方向選択的な分泌を示した。これより、GFPと融合させた場合でもIFN- β の活性は失われず、IFN- β 単独の場合の一過性及び構成的な発現パターン (Fig. 1)と同様の細胞外への分泌方向性を示すことが明らかとなった。

3. 2 融合タンパク質の細胞内オルガネラへの局在解析

遺伝子発現様式に依存したIFN- β の分泌方向性の違いが細胞内のいずれの部位において生じるかを解明するため、共焦点レーザー顕微鏡を用いてPam-T及びMDCK細胞に発現させた融合タンパク質の細胞内における局在をX-Z軸方向のスキャンにより観察した (Fig. 3)。その際、融合タンパク質を細胞内に蓄積させて観察を容易にするためBFA及び20 $^{\circ}$ C低温度処理を行った。BFAは、ゴルジ体を分解させる化合物としてよく知られており、タンパク質の分泌を阻害することが報告されている^{11,12)}。20 $^{\circ}$ C低温度処理は新たに生合成されたタンパク質をTGNに蓄積させる方法として知られている¹³⁾。

まず、BFAを用いて観察を行った場合 (Fig. 3A)、GFP安定発現株では両細胞において細胞内全体に強いGFP由来のシグナルが局在していた。これに対し、融合タンパク質安定発現細胞では、融合タンパク質はPam-T細胞では核周辺に局在が認められ、その分布は核をはさんでapical側及びbasal側にほぼ均等に観察された。またMDCK細胞では、主として核に対してapical側にその局在が偏っている様子が観察された。一方apical及びbasal側から遺伝子導入後、一過性に発現させた融合タンパク質の細胞内局在は、各々の細胞の融合タンパク質安定発現株における局在パターンと同様であることが示された。以上

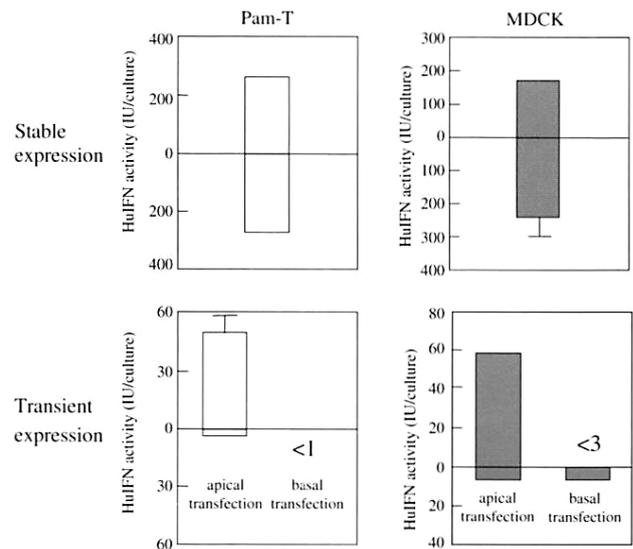


Fig. 2 Secretion polarity of stably or transiently expressed HuIFN β -GFP in Pam-T and MDCK cells. Cells were culture on Transwell for 5 days. In transient expression experiments, HuIFN β -GFP gene was transfected onto apical or basal side. Open bars and gray bars showed human IFN activities in Pam-T and MDCK cells, respectively. The values represent the mean of three determinations with S.D.

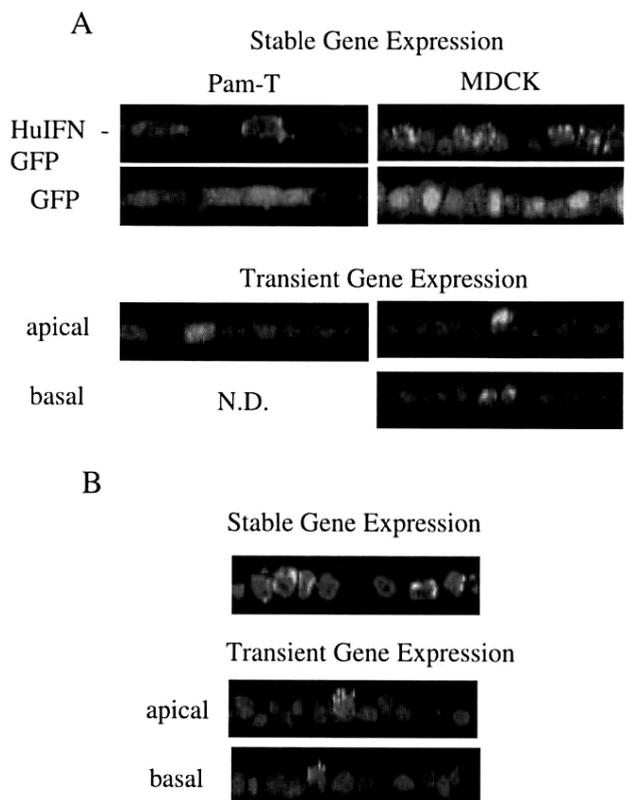


Fig. 3 Confocal microscopic observation of stably or transiently expressed HuIFN β -GFP in Pam-T and MDCK cells (X-Z section). A shows the intracellular localization of stably or transiently expressed HuIFN β -GFP in Pam-T and MDCK cells under BFA treatment. B shows that in MDCK cells under 20 $^{\circ}$ C temperature treatment. N.D. indicates not detection.

より、安定及び一過性に発現させた融合タンパク質の細胞外への分泌方向性は異なるにも関わらず、BFA 処理下の細胞内局在パターンは同様であることが示された。

BFA は MDCK 細胞における選別輸送を消失させることや、オルガネラに対し様々な形態変化を起すことが知られている。そこで MDCK 細胞については、20°C 低温度処理により融合タンパク質を TGN に蓄積させた場合についても検討した。しかしながら、この場合にも BFA 処理の時とほぼ同様の細胞内局在パターンを示した (Fig. 3B)。

次に、MDCK 細胞において発現させた融合タンパク質の細胞内オルガネラへの局在について解析した。その際、BFA 及び 20°C 低温度処理を行った場合についても検討した。まず、いずれの処理も行わずに検討した結果、融合タンパク質を安定に発現する MDCK 細胞 (MDCK (HuIFN β -GFP)) では、融合タンパク質は主として核に対して apical 側にその局在が偏っており、オルガネラ染色との比較により、主に TGN/Golgi 体に局在していることが示された (Fig. 4A, control)。一方、apical 側からの遺伝子導入により、一過性に発現させた HuIFN β -GFP も安

定発現株の場合と同様、主に TGN/Golgi 体への分布が観察された (Fig. 4B, control)。また、BFA 及び 20°C 低温度処理を行った場合にも同様の結果が得られた (Fig. 4, BFA, 20°C)。これより、HuIFN β -GFP を安定に発現させた場合及び一過性に発現させた場合の細胞内局在は BFA、20°C 低温度処理の有無によらず同様であり、主として TGN/Golgi 体に局在していることが示された。

3. 3 異なる様式により発現させた IFN- β の TGN 以降における小胞輸送過程の解析

次に、同一細胞において異なる様式により発現させた融合タンパク質とマウス IFN- β の TGN 以降の小胞輸送課程について検討した。実験方法は、カバーガラス上で培養した MDCK (HuIFN β -GFP) に対してマウス IFN- β を一過性に発現、あるいは MDCK 細胞に対して融合タンパク質と、マウス IFN- β を同時に一過性に発現させた。発現させた 2 種類の IFN- β を CHX 含有培地で、20°C 低温度処理により TGN へ蓄積させ、その後 37°C で培養することにより TGN 以降の輸送を再開させ、経時的に細胞を固定し、

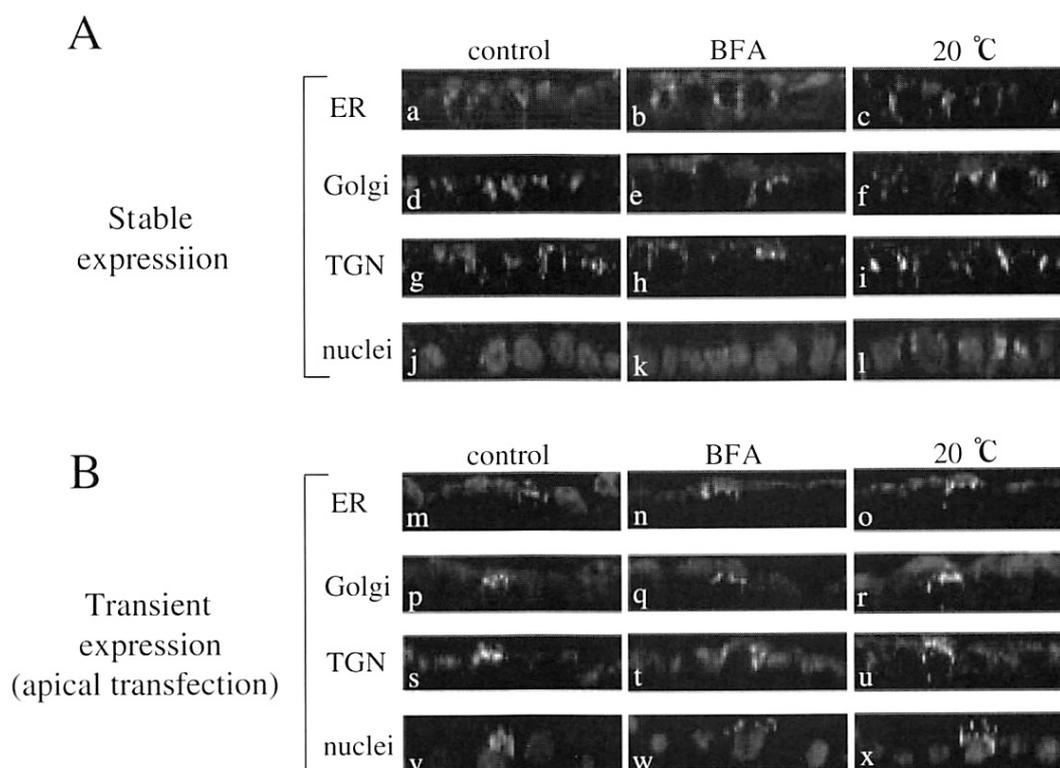


Fig. 4 Relative localization of HuIFN β -GFP expressed in MDCK monolayers to various organelles. MDCK(HuIFN β -GFP) (A) and parental MDCK (B) monolayers were grown on Transwell for 5 days. The latter monolayers were apically transfected with HuIFN β -GFP gene and incubated for 10 h. Either monolayer was treated with 20°C for 2 h or with BFA (5 μ g/mL) for 30 min just prior fixation, followed by staining with the ER- (a-c, m-o), Golgi- (d-f, p-r), or TGN-specific antibodies (g-i, s-u) and appropriate secondary antibodies, or alternatively with PI for nuclei (j-l, v-x). In control experiments, no 20°C treatment or BFA treatment was carried out. Typical x-z sections of the confocal images are shown.

観察した。

まず、実験に先立ち、タンパク質合成阻害剤である CHX 及び 20°C 低温度処理の最適条件を検討した。MDCK (HuIFN β -GFP) をカバーガラス上で培養し、0、10、20 μ g/mL の各濃度の CHX 存在下、20°C (Fig. 5A) 及び 37°C (Fig. 5B) で 2、4 時間培養し観察した。その結果、37°C において 10 μ g/mL 以上の CHX では 2 時間以上処理を行った場合、発現させた融合タンパク質が細胞内において観察されなかったのに対し (Fig. 5B, h, i, k, l)、20°C で培養した場合には、細胞内に蓄積した融合タンパク質が確認された (Fig. 5A, b, c, e, f)。以上より、発現させた融合タンパク質を TGN に蓄積させるための最適条件として、10 μ g/mL CHX 処理下、20°C、2 時間培養を選択し、以下の実験条件とした。また、

CHX 除去後の融合タンパク質の分泌について検討した結果、IFN- β は新たに細胞内で合成されてから分泌されるまでに少なくとも 30 分を要することが示された (Fig. 5C)。

また、HuIFN β -GFP とマウス IFN- β を異なる様式から発現させた場合、それぞれ異なる分泌方向性が維持されるかどうかを検討するため、フィルター上で培養した MDCK (HuIFN β -GFP) に対し、マウス IFN- β を一過性に発現させた。その結果、両方向へほぼ均等に分泌する融合タンパク質の分泌方向性に影響を与えることなく、マウス IFN- β は導入方向選択的な分泌を示すことが確認された (Fig. 6)。

Fig. 7 は、カバーガラス上で培養した MDCK (HuIFN β -GFP) に対してマウス IFN- β を一過性に発現、あるいは MDCK 細胞に対して GFP 融合タンパク質とマ

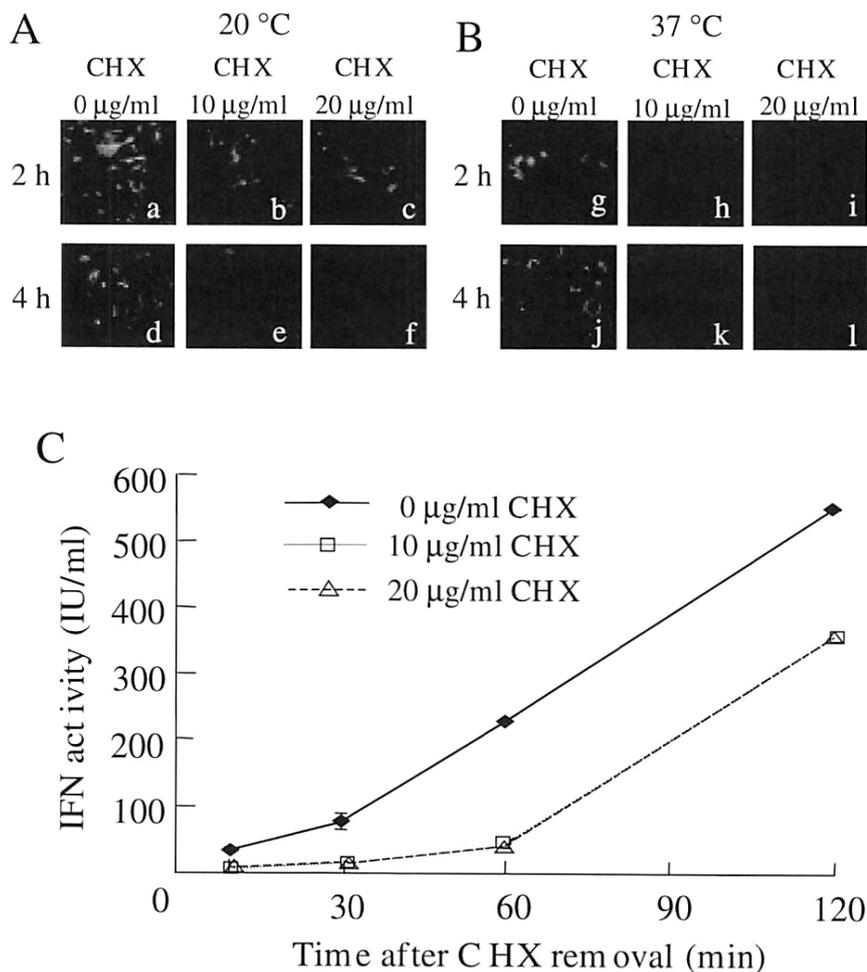


Fig. 5 Effects of CHX and temperature on cellular processing and secretion of HuIFN β -GFP. Stable MDCK(HuIFN β -GFP) cells cultured on coverslips were treated for 2 or 4 h with 0, 10 or 20 μ g/mL CHX at 20°C (A) or 37°C (B), followed by fixation and confocal microscopy. In parallel, secretion of the IFN activity from MDCK(HuIFN β -GFP) (C) was examined; After treatment with 0, 10 or 20 μ g/mL CHX for 2 h, cells were incubated in regular medium without CHX at 37°C. During the incubation, aliquots of culture fluids were picked up at indicated time points and assayed for antiviral activity. Each value represents the mean \pm SD of three separated experiments.

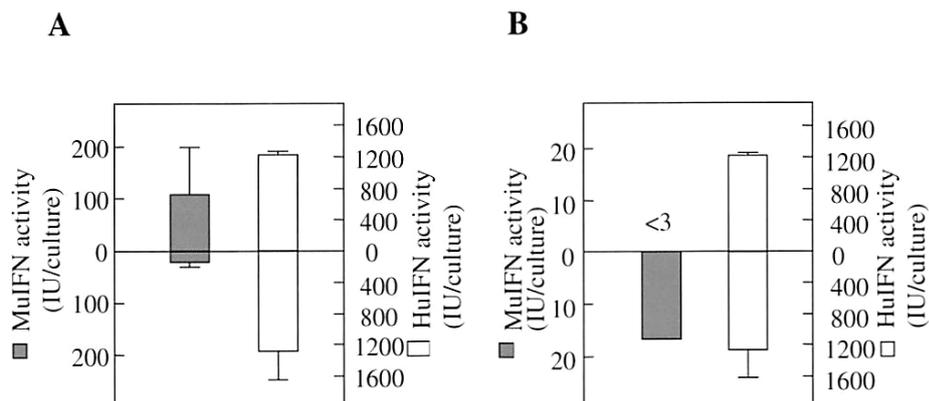


Fig. 6 Secretion of IFN- β from MDCK(HuIFN β -GFP) cells following transfection of the mouse IFN- β gene. pCMV-MuIFN β was applied to the apical side (A) or to the basal side (B). Shaded and open bars indicate mouse and human IFN activities, respectively. The values represent the means of three determinations with S.D.

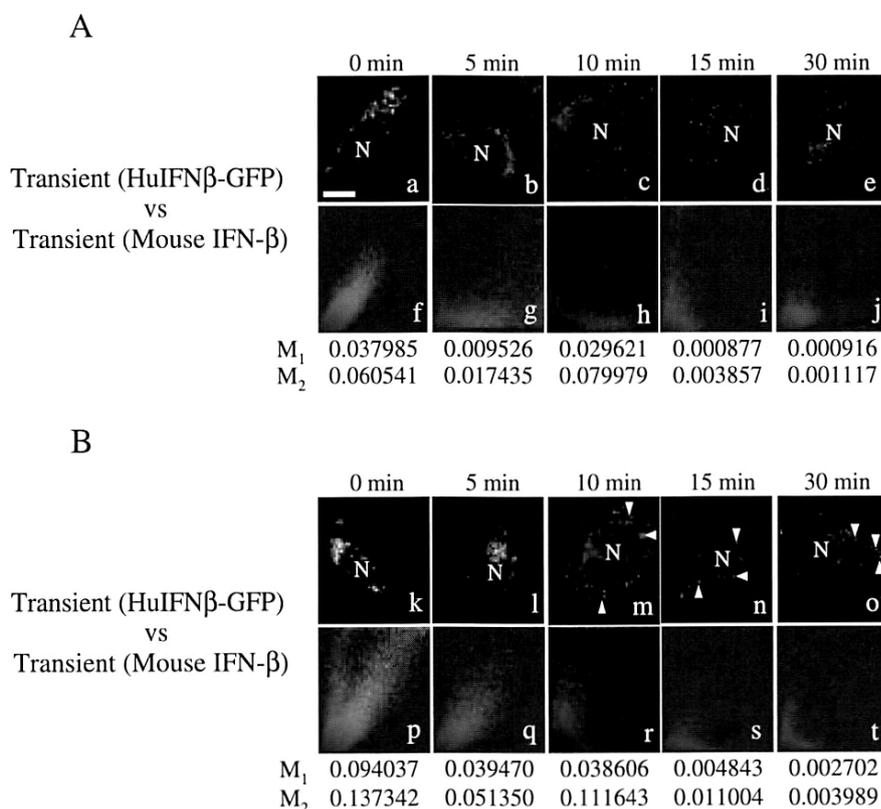


Fig. 7 Post-TGN localization of mouse IFN- β and HuIFN β -GFP expressed in MDCK cells. In A, stable MDCK(HuIFN β -GFP) cells were transfected with MuIFN β gene. In B, parental MDCK cells were co-transfected with pCMV-HuIFN β -GFP and pCMV-MuIFN β . After transfection, cells were incubated for 8 h and then subjected to 20 $^{\circ}$ C-treatment for 2 h. Thereafter, cells were warmed to 37 $^{\circ}$ C (time 0) (a, k) and incubated for 5 min (b, l), 10 min (c, m), 15 min (d, n) and 30 min (e, o), followed by fixation and immunostaining of mouse IFN- β (red signal). N indicates the nucleus area. Notice that several orange-yellow spots are pointed by arrowheads in panels m-o. Scatter-plots of the pixel fluorogram (ordinate for green; abscissa for red) of the merged images (a-e, k-o) are shown in the respective lower panels (f-j, p-t), and colocalization coefficients, M_1 (contribution of green) and M_2 (contribution of red), which were computed for intensity ranges defined by arbitrary area of interest (AOI) along the diagonal line of each panel, are shown at the bottom of the panels. The scale bar in panel a represents 10 μ m.

ウス IFN- β を同時に一過性に発現させた場合の結果で、赤いシグナルは免疫染色したマウス IFN- β を、緑色が融合タンパク質を示している。上段は同一細胞において安定に発現させた融合タンパク質と一過性に発現させたマウス IFN- β の分布を (Fig. 7A)、下段はコントロールとして、同一細胞において一過性に発現させた両タンパク質の分布を示している (Fig. 7B)。その結果、それぞれ 0 分においては両タンパク質が共に TGN に蓄積している像が観察されたが、時間の経過と共に、異なる様式により発現させた IFN- β のそれぞれのシグナルは別々に分布した。一方、両タンパク質とも一過性に発現させた場合には、時間が経過しても、矢印で示すように、それぞれのシグナルが一部共存している様子が観察された。画像解析から求めた colocalization coefficients (M1, M2) も¹⁰⁾、これらの結論を支持していると考えられる。以上より、MDCK 細胞において異なる様式により発現させた IFN- β は、TGN 以降異なる小胞輸送系により運ばれる可能性が示された。

4. 考 察

我々は既に、外来性の IFN- β 遺伝子を特定の上皮細胞において発現させると、同一タンパク質であるにも関わらず、遺伝子発現様式に依存した異なる分泌方向性を示すことを明らかにしている。そこで、GFP をヒト IFN- β の C 末端に結合させた融合タンパク質発現ベクターを作製し、発現させた融合タンパク質の細胞内における局在を可視化することで、一過性及び構成的に発現させた IFN- β の異なる分泌方向性が細胞内のいずれの部位において生じるかを詳細に検討した。

発現させた融合タンパク質の細胞内局在について Pam-T 細胞及び MDCK 細胞を用いて検討した結果 (Fig. 3)、異なる様式において発現させた IFN- β の分泌方向性は異なるにも関わらず、細胞内局在パターンは同様であることが明らかとなった。Pam-T 細胞と MDCK 細胞において細胞内融合タンパク質の局在パターンに違いが生じたのは、おそらく、これらの細胞におけるオルガネラの局在パターンが異なるためと考えられる。

また、分泌経路に関わるオルガネラを免疫染色し、発現させた HuIFN β -GFP と細胞内オルガネラとの局在を比較検討した。MDCK 細胞を用いて解析した結果、HuIFN β -GFP を安定に発現させた場合及び一過性に発現させた場合のいずれにおいても、融合タンパク質は主に TGN/Golgi 体に局在しており、BFA、20°C 低温度処理の有無によらず同様であった。よって、MDCK 細胞において発現させた融合タンパク質は、分泌方向性が異なっても同様の細胞内局在パターンを示したため、異なる様式により発現させた IFN- β は小胞体で生合成後、TGN/Golgi 体まで見かけ上選別を受けることなく輸送され、他のタンパク質と同様に

TGN で選別を受けた後、遺伝子発現様式に依存した異なる経路を介して輸送されると考えられた。

この可能性について検討するため、同一細胞において融合タンパク質とマウス IFN- β を異なる様式で発現させた場合の TGN 以降における小胞輸送過程を解析した。トランスウェル上で培養した細胞を用いた場合、遺伝子導入効率も低く蛍光のシグナルも弱いため、カバーガラス上で培養した非極性細胞を用いた。非極性状態の細胞においても、apical 側へ輸送されるタンパク質、basal 側へ輸送されるタンパク質はそれぞれ TGN 以降、異なる小胞によって輸送されることが報告されている¹⁴⁾。また、この実験にはマウス IFN- β を用いたが、MDCK 細胞において一過性に発現させた場合には導入方向選択的に分泌されること、ヒト IFN- β との間にはアミノ酸配列の相同性 (約 50%) があることから、ヒト IFN- β と同様の分泌経路によって輸送されることが考えられる。また実験に先立ち、MDCK 細胞の融合タンパク質安定発現細胞に対してマウス IFN- β を apical 側あるいは basal 側から導入した場合、両方向にほぼ均等に分泌する融合タンパク質の分泌方向性に影響を与えることなく、マウス IFN- β は導入方向選択的に分泌されることを確認しており、それぞれ異なる経路を介して輸送されている可能性が考えられる (Fig. 6)。検討の結果、MDCK 細胞に対して融合タンパク質とマウス IFN- β を同時に一過性に発現させた場合、時間が経過してもそれぞれのシグナルが一部共存している様子が観察され、両タンパク質が TGN 以降共通の経路により輸送されている可能性が示唆された (Fig. 7B)。これに対し、融合タンパク質安定発現細胞に対してマウス IFN- β を一過性に発現させた場合では、時間の経過と共に、異なる様式より発現させた IFN のそれぞれのシグナルが別々に分布している様子が観察され、両タンパク質が異なる経路を介して輸送されている可能性が示された (Fig. 7A)。

観察に使用した共焦点レーザー顕微鏡の実験条件における分解能の問題や、カバーガラスとトランスウェルでの培養条件の違い、生細胞におけるリアルタイムイメージングの必要性などはデータ解釈の際に留意すべき点ではあるが、得られた結果は MDCK 細胞において安定及び一過性に発現させた IFN- β は、TGN 以降それぞれ異なる経路を介して輸送される結果、分泌方向性が異なる可能性を示すものである。

(引用文献)

- 1) Lau C, Soriano HE, Ledley FD, et al. Retroviral gene transfer into the intestinal epithelium. Hum. Gene Ther. 6, 1145-1151, 1995.
- 2) Lozier JN, Yankaskas JR, Ramsey WJ, et al. Gut epithelial cells as targets for gene therapy of

- hemophilia. *Hum. Gene Ther.* 8, 1481-1490, 1997.
- 3) Rodriguez-Boulan E, Nelson WJ. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245, 718-725, 1989.
- 4) Casanova JE, Apodaca G, Mostov KE. An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* 66, 65-75, 1991.
- 5) Rodriguez-Boulan E, Powell SK. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 395-427, 1992.
- 6) Pimplikar SW, Simons K. Regulation of apical transport in epithelial cells by a Gs class of heterotrimeric G protein. *Nature* 362, 456-458, 1993.
- 7) Nakanishi K, Watanabe Y, Maruyama M, et al. Secretion polarity of interferon-beta in epithelial cell lines. *Arch. Biochem. Biophys.* 402, 201-207, 2002.
- 8) Watanabe Y, Kawade Y. : Induction, production and purification of natural mouse IFN- α and - β . In : Clemens MJ, Morris AG, Gearing AJH. (eds) : *Lymphokines and Interferons: a practical approach.* IRL Press, Oxford, 1987, 1-14.
- 9) Kawade Y, Watanabe Y. : Characterization of rat monoclonal antibodies to mouse interferon- α and - β . In : Cantell K, Schellekens H. (eds) : *The Biology of the Interferon System.* Martinus Nijhoff, Dordrecht, 1987, 27-29.
- 10) Manders EMM, Verbeek FJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microscopy* 169, 375-382, 1993.
- 11) Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, et al. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 261, 11398-11403, 1986.
- 12) Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacino JS, et al. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 56, 801-813, 1989.
- 13) Wang E, Pennington JG, Goldenring JR, et al. Brefeldin A rapidly disrupts plasma membrane polarity by blocking polar sorting in common endosomes of MDCK cells. *J. Cell Sci.* 114, 3309-3321, 2001.
- 14) Rustom A, Bajohrs M, Kaether C, et al. Selective delivery of secretory cargo in Golgi-derived carriers of nonepithelial cells. *Traffic* 3, 279-288, 2002.

早老性疾患遺伝子による皮膚線維芽細胞の老化とテロメア制御

京都大学 放射線生物研究センター

小松 賢 志

Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) is an autosomal recessive disorder characterized by chromosome instability, defect in repair of double strand break and high incidence of lymphoid cancers. Here, we show that NBS1 is recruited to telomere ends by alternative mechanism, in which NBS1 interacts with TRF2, possibly through telomeric DNA, and forms discrete foci in ATM-independent manner. This is demonstrated by the evidences that NBS1 foci are formed in ATM-defective cells, and that both NBS cells lacking FHA/BRCT domains and S278/343A clone, mutated in ATM-phosphorylated sites, can interact with TRF2. Moreover, C-terminus of NBS1, MRE11 nuclease-binding region, was essential for the interaction with TRF2. It is consistent that NBS1 lacking the C-terminus was failed to elongate the short telomere length in NBS cells, although transfection both with full length of the NBS1 cDNA and of the S278/343A cDNA restored the telomere length. Furthermore, the short G-tail length of NBS cell line has not changed significantly following transfection with NBS1 cDNA lacking of the C-terminus region, while the full length of cDNA complements the G-tail length. These findings suggest that NBS1 is recruited to telomere by MRE11/RAD50/NBS1 complex formation in ATR- and ATM-independent manner and is implicated in telomere length maintenance, possibly through G-tail regulation.

1. 緒 言

老化に伴い細胞の染色体異常や突然変異の増加などゲノム不安定性が誘発される事は以前から知られていたが、最近、モデル動物の線虫の研究からゲノム不安定性が逆に老化を促進する事が明らかになってきた。実際ゲノム不安定性を呈するヒト遺伝病では、がんや免疫不全と共に早期老化を示す。本研究ではゲノム不安定性による老化機構を明らかにするために、研究材料として染色体不安定症候群のナイミーヘン症候群 (NBS) 及び毛細血管拡張性運動失調症 (AT) のゲノム不安定性を呈するヒト遺伝病を用いる。これらの細胞では細胞老化の原因となる染色体テロメアが異常に早く短縮する可能性が指摘されている。恐らくゲノム安定化に関わるこれら遺伝病の蛋白が直接 DNA 末端のテロメア延長制御に関わっていると思われる。このために染色体不安定症候群におけるテロメア長の測定を行う。さらに、テロメア長の延長機構を解明するために、テロメア G テールの測定やテロメア蛋白 TRF2 相互作用について解析する。また、ナイミーヘン症候群 (NBS) のノックアウトマウス細胞作製によるテロメア短縮機構を明らかにする事を目的とする。

2. 実 験

NBS1 蛋白によるテロメア延長機構：NBS 及び AT 初代培養細胞の分裂テロメア短縮を TTAGGG リピートをプローブとしたサザン法、AE プローブによる加水分解時の発光を比較する HPA 法、テロメア FISH のシグナル強度の高精度計測により分裂毎のテロメア長減少を正常細胞の 150bp/分裂と定量比較する。また S1 ヌクレアーゼによる 5' 一本鎖 DNA 生成能や細胞内 ECR などによりテロメア異常短縮の原因を解明する。続いて、NBS 細胞が NBS1cDNA 導入後にテロメアが延長することを確認した後に、その延長機構を明らかにする。すなわち、ChIP 法でテロメア複製期の NBS1 と TRF2 の相互作用、NBS1 リン酸化と hTERT など関連蛋白との相互作用、免疫染色による共局在そして G-tail やテロメア長を指標とした deletion mutant 実験によりテロメア蛋白の作用機序を解析する。NBS 患者の皮膚由来の線維芽細胞を SV40 で不死化した GM07166V A7 細胞、及び正常細胞として子宮内腫由来の HeLa 細胞、ヒト肺由来細胞を不死化した MRC-55V 細胞と GM07166VA7 に全身 NBS1 cDNA を発現ベクター pIRES-hyg で導入した放射線感受性が回復したクローンを用いる。

細胞同調は aphidicolin 2µg/mL で 16～20 時間培養後に、通常培地に戻して行う。除去後 0～3 時間が G1/S 期、3～5 時間後が S 期初期、5～8 時間後が S 期後期、8 時間以降が G2/M 期に対応することをフローサイトメトリで確認する。

NBS1 と TRF2 の二重免疫染色は細胞を Triton X-100 で処理後に NBS1 (rabbit) 抗体と TRF2 (goat) 抗



Cellular aging and abnormal regulation of telomeres in skin fibroblasts from a patient with an accelerated aging disorder.

Kenshi Komatsu

Radiation Biology Center, Kyoto University

体でインキュベートし、それぞれ anti-goat IgG-TRITC と anti-rabbit IgG-Alexa 488 で染色する。また、細胞を lysisbuffer で抽出した lysate を NBS1 抗体で沈殿した免疫複合体を NBS1 抗体及び TRF2 抗体を用いたウエスタンブロット法で解析する。

G-tail 長の測定は細胞から抽出した DNA を二本鎖のままゲル上でハイブリダイズする in gel hybridization を行う。プローブには 5' (CCCTAA) 43' オリゴヌクレオチドを、そして 3'-エキソヌクレアーゼとして Mung Bean Nuclease (MBN) を用いる。

チキン B 細胞由来の DT40 細胞は遺伝子ノックアウトの効率が通常の高等真核細胞の数百倍高頻度であるのでノックアウト細胞の作製に良く使用される。我々は初めに NBS1 の N 末側保存領域 FHA/BRCT ドメインに設計した変成プライマーを用いて、RT-PCR によりチキン胚由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングする。続いて、ノックアウトコンストラクトを作製するためにエクソン 2 からエクソン 6 に相当する約 5.5kb のゲノム DNA を用いて DT40 細胞の Nbs1 遺伝子をターゲティングする。Nbs1 の個体レベルでの発現解析のためノックアウトマウスを作製する。Nbs1 のエクソン 2 部位に PGK-neo-poly A/HSD-tk ターゲティングベクター導入によりヌル突然変異 ES 細胞を得る。この変異 ES 細胞のターゲティングベクターを Cre-Loxp で除去した細胞あるいは除去しない ES 細胞を、C57BL/6 の 3.5 日胚から回収したプラストシスト内に移入する。続いて偽妊娠 ICR マウスの子宮内に戻して得られるキメラマウス交配により F1 の尾 DNA の PCR 法により変異マウスを確認する。このマウス肺線維芽細胞を樹立後、放射線致死感受性や染色体異常頻度ならびに遺伝子突然変異頻度を比較し、個体レベルの発現をリンパ球サブセット解析、Nbs1 蛋白発現の組織特異性を測定する。

3. 結果

NBS1 がテロメア維持に関わっていることは NBS 患者の皮膚線維芽細胞の細胞分裂によるテロメア長をサザン法により測定した結果、テロメア短縮が促進される事から明らかとなった。そこで二重免疫染色法によりテロメアに於ける NBS1 フォーカス形成を観察した結果、フォーカスは細胞周期の S 期において見られた。また、この時期に一致してテロメア蛋白 TRF2 と NBS1 が結合していることが IP-ウエスタン法により確認できた。DNA 修復では NBS1 蛋白の損傷部位へのリクルートに ATM が関与しているので、ATM が欠損している毛細血管拡張性運動失調症細胞を用いて S 期でのテロメアへの NBS1 蛋白のリクルートを検討した。しかしながら、毛細血管拡張性運動失調症細胞でも正常細胞と同様に NBS1 は TRF2 と結合が出来、またフォーカスが形成されることが判明した。この事から

NBS1 蛋白のリクルート機構は DNA 修復とテロメア維持では異なることが確認された。

NBS1 抗体及び TRF2 抗体を用いて MRC-5SV 細胞の免疫染色を行った結果、NBS1 及び TRF2 ともに細胞周期依存性にフォーカスを形成することが示された。特に NBS1 フォーカスは S 期初期にドット状のフォーカスを形成して、NBS1 と TRF2 の二重染色は両フォーカスが一致することが確認された。また、テロメア FISH 法により細胞内局在を検討した結果、両フォーカスはテロメア上に存在することが判明した。一方、NBS1 と TRF2 の生体内での結合が免疫複合体での解析により明らかになった。つまり、NBS1 抗体での複合体を TRF2 抗体を用いてウエスタンブロット解析したところ、TRF2 の存在が確認された。この両者の結合は、NBS1 と TRF2 フォーカスの共局在の結果と一致して、S 期初期においてのみ検出された。

続いて、テロメア端に存在する一本鎖 DNA (G-tail) を in gel hybridization により測定した結果、NBS 細胞の G-tail は正常 HeLa 細胞及び NBS1 タンパクを強制再現させた NBS 細胞よりも約 80% 短いことが明らかになった。テロメアプローブが G-tail のみに Hybrize していることは、MBN 処理によりサザン法のシグナルが消失したことにより確認できた。

個体レベルでの発現を比較するためにマウス Nbs1 遺伝子のエクソン 4 以降をターゲティングしたマウス二種類の性質を比較した。ターゲティングベクターがそのままのノックアウトマウスでは胎生 8.5 日で致死になるが、細胞株は樹立可能であった。これに対して、Cre-Lox によりターゲティングベクターを除いたノックアウトマウスでは胎生 3.5 日で致死になり、細胞株化も不可能であった。両者のノックアウトマウスの違いは Nbs1 の C 末側蛋白の発現にあるので、ヒト NBS 細胞同様に生存には C 末側蛋白が必要であることが示された。一方、正常細胞が極一部存在するキメラマウスが偶発的に発生した。このマウスは免疫グロブリンの低下や性腺低形成などヒト NBS 患者の臨床症状を呈すると共に、放射線照射後に体毛が早期に白色化して正常マウスに比較して老化傾向を示した。また、このマウスから樹立した Nbs マウス細胞は、ヒトマウス細胞と同程度の放射線感受性を示した。このため、テロメア結合蛋白 TRF2 と NBS1 との相互作用を解析した。免疫共沈法及び細胞のフォーカス形成による共局在は NBS1 と TRF2 は S 期初期に相互作用することを示した。NBS 細胞ではテロメア G-tail が短いことから、NBS1 と TRF2 が G-tail の延長とテロメア安定に機能していると思われる。また、Nbs1 マウスと ATM 及び Ku マウスとの交配では、これらの遺伝子のダブルノックアウトマウスは作製出来なかった。恐らく胚発生の極く初期に致死になると思われる。

しかしながら、同時に作成したチキン Nbs1 エクソン 2

からエクソン6に相当する約5.5kbのゲノムDNAをターゲットしたDT40細胞は生存しており実験に使用可能であった。Nbs1ノックアウト細胞はヒトNBS細胞と同じく生存可能であるが、野性型DT40細胞と比較して顕著に増殖速度が低下していた。また、ヒトNBS細胞と同様に自然及び放射線誘発染色体の高頻度の発生と放射線致死高感受性を示した。一方、ターゲットインテグレーションを指標に相同組換え能を野性型DT40細胞と比較した結果、Nbs1ノックアウト細胞では顕著に相同組換え能が低下している事が判明した。また姉妹染色分体交換(SCE)は相同組換えによることが知られているが、MMC誘発のSCE頻度はチキンNbs1細胞で極端に低下していることが示された。これらの結果はSC-neoを導入した細胞で、I-SceI制限酵素を細胞内に一時的に発現させてDNA二重鎖切断を発生させて相同組換えをアッセイする実験系とも良く一致して、Nbs1ノックアウト細胞では相同組換えが野性型に比較して1/100以下に低下していた。もう一方のDNA二重鎖切断の再結合過程である非相同DNA末端再結合をpDVH14レポーター遺伝子を用いてアッセイした結果、direct joiningとmicro-homology associated joiningのいずれもNbs細胞では正常であることが確認された。これはATM欠損のAT細胞で異常な相同組換え能を呈するが、非相同DNA末端再結合が正常であることと一致する。

4. 考 察

NBSは歴史的にATのバリエーションに分類されてきた。実際、本研究で示したように放射線損傷の修復に対してATと同じ修復経路の欠損を示した。しかしながら、テロメア維持に関してはAT細胞でもNBS1フォーカス形成の異常が見られない。また、NBS1のTRF2やhMre11への結合も正常細胞と同様にS期前期で観察された。このことから上述のDNA損傷と異なって、ATMがNBS1と同一のテロメア維持経路で機能しているとは言い難い。テロメア複製の場合には染色体上の定まった位置テロメアで起こる現象であり、しかもそこにはhMre11/Rad50が細胞周期を通じて結合していることからヒストンH2AXリン酸化による蛋白のリクルートが必要でないと思われる。テロメア維持に於ける魅力的なATMの機能は、何らかの原因でテロメアが短縮した細胞をアポトーシスに誘導する事である。アポトーシス誘導はDNA損傷応答におけるATMの重要な機能であり、本研究のAT細胞を使用した実験結果とも矛盾しない。しかし、ATMの酵母ホモログTEL1がテロメア維持で重要な機能をしていると思われる酵母ではアポトーシスが確認されていないことから、さらに重要なテロメア維持機能がATMに存在すると思われる。

テロメラーゼ活性のないヒト組織の初代培養細胞は細胞分裂毎にテロメアが短縮するが、テロメラーゼ活性を有す

る不死化細胞では、S期初期にG-tailをプライマーにテロメアが延長することが知られている。これと一致して、我々の結果はNBS1がG-tail形成に重要であること、そしてNBS1がTRF2とS期初期に複合体を形成することを示した。NBS1のテロメア維持機構はS期初期にG-tailを延長することが示唆されるが、その詳細は不明である。我々は既にNBS1が放射線誘発DNA二重鎖切断の再結合過程である相同組換えに必要な5'-突出型単鎖DNA形成と同様の機構による可能性が指摘される。G-tailは染色体末端のT-loopの開環やGカルテットの解消にも関与しているため、NBS細胞におけるこれらの解析が哺乳動物細胞でのテロメア維持機構の解明につながると期待される。

我々が作製した二種類のノックアウトマウスのうち、Cre-LoxpでNeo遺伝子を除いたコンストラクトでは胚発生の極く初期(E3.5日以前)に致死になった。これに対してNeo遺伝子が存在するマウスでは少なくともE7.0~8日迄生存可能であった。後者ではNbs1のC末が発現していることが確認されており、C末側の存在が発生に大きな影響を及ぼすことが確認出来た。チキンNbs1ターゲット細胞を用いた解析ではNbs1はエンドジョイニングよりも相同組換えの蛋白であることが示された。この点は高等真核生物と酵母での機能の大きな違いである。既に我々はNbs1 C末側がヌクレアーゼ活性を有するMre11/Rad50との結合に必須であることを示したので、相同組換えの初期に必要な突出型1本鎖DNAが出来ないことがNbs1の相同組換え能や胚発生初期での死に繋がると考えられる。従ってテロメア維持に重要なG-tailも同様の一本鎖DNAから構成されるのでNbs1もテロメアの異常短縮、そして今回示された個体レベルでの老化の原因であると考えられる。ATMやDNA-PK(Ku70/80)はヒストンのリン酸化に相補的に作用していることが知られているためそのダブルノックアウトマウスはクロマチン・リモデリングの失敗から致死になると予想される。Nbs1とのダブルノックアウトマウスについても他の原因が予想されるので今後さらに解析が必要である。

5. 総 括

NBS1のテロメア維持における役割を解析した結果、NBS1蛋白はテロメア結合タンパクTRF2とテロメア部位で共局在することが免疫染色法により示された。また、NBS1抗体を用いた免疫共沈物のウエスタンブロット解析は、TRF2とNBS1が物理的に結合していることが確認された。この結合は細胞周期依存性でS期初期のテロメアが延長する時期と一致した。NBS1はヌクレアーゼ活性を有するMre11/Rad50と複合体を形成することから、テロメラーゼによるテロメア延長に必要な一本鎖DNAのG-

tail を測定したところ、NBS 細胞では正常細胞に比較して短いことが判明した。一方、Nbs1 のノックアウトマウスを 2 種類のターゲティングベクターを用いて作製した結果、Nbs1 の C 末側が発現した ES 細胞では胎生 7.5 日まで生存したが、ヌル変異体のマウスでは 3.0 日以前に胚が消失した。Nbs1 の C 末側発現の変異体からは細胞株樹立が可能で、患者細胞と同様の放射線感受性を示した。また、Nbs1 の野性型と変異体から構成されるキメラマウスでは免疫不全や性腺低形成、そしてマウス由来細胞は放射線高感受性及び染色体不安定性など、ヒト疾患と同様の症状を呈して病態解析に有用であることを示した。一方、チキン B 細胞由来の DT40 細胞を用いて Nbs1 のターゲティングを行った結果、相同組換え能が野性型の 1/100 以下に低下していることから、ATM 同様に Nbs1 は相同組換え修復の蛋白であることが判明した。しかしながら、テロメア維持に関しては A T 細胞でも NBS1 フォーカス形成の異常が

見られない。また、NBS1 の TRF2 や hMre11 への結合も正常細胞と同様に S 期前期で観察された。このことから上述の DNA 損傷と異なって、NBS1 が ATM とは別経路のテロメア維持機能を有していることが示唆された。

(関連論文)

- 1) H. Tauchi, J. Kobayashi, K. Morishima, et al.: Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature*, 420:93-98, 2002
- 2) J. Kobayashi, H. Tauchi, S. Sakamoto, et al.: NBS1 localizes to g-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr. Biol.*, 12:1846-1851, 2002
- 3) H. Tauchi, S. Matsuura, J. Kobayashi, et al.: Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability. *Oncogene*, 21: 8967-8980, 2002

エストロゲンの皮膚老化防御における分子機構の解明

金沢大学医学系研究科 分子移植学 (産婦人科学講座)

井上 正 樹

Telomerase activity is present in most malignant cells and provides a mechanism for the unlimited potential for division on neoplastic cells. Although telomerase is known to be regulated by several factors, the roles of sex steroid hormones have not been understood in target tissues such as breast, uterine endometrium and skin. In the series of our studies, we have examined the effect of sex steroid hormones including estrogen, progesterone and SERM on the telomerase activity and investigated the molecular mechanism of their effects. Estrogen has up-regulated telomerase activity as well as hTERT mRNA in ER-positive cells. Gel shift and luciferase assays have revealed that estrogen-responsive element of hTERT promoter sequences is responsible for transcriptional activation by activated ER. Estrogen has also activated c-Myc expression and then it has been cleared that c-Myc/Max play additional role in estrogen-induced transactivation of hTERT. On the other hand, progesterone significantly induced hTERT mRNA expression in short-time exposure and inhibited the estrogen-induced activation of hTERT expression in long time exposure. The p21/Waf1/Cip1 played an integral role in this inhibition. SERM has up-regulated hTERT mRNA in uterine endometrial cells and down-regulated in breast cancer cells. hTERT protein was immunohistochemically detected in stem cells of the skin. The immortalized cells with normal structural and functional characteristics which we have established could be a powerful tool for the understanding of the roles of sex steroid in aging and the clinical application.

1. 緒 言

日本においては高齢化が進み、高齢者の生活習慣に関連した慢性疾患克服が国民の福利厚生上重要な課題となっている。これら疾病の予防的見地から、欧米を中心に最近では日本においても閉経後におけるホルモン補充療法が推奨されている。これらエストロゲンを主軸にした補充療法は皮膚の幼若化を促すことが臨床的に示されている。しかし、エストロゲンなどステロイドホルモンの皮膚構成細胞に与える影響、特に細胞寿命に与える効 について細胞分子レベルでの解明はなされていない。

最近の分子生物学の研究成 により、細胞の老化機構が明らかになりつつある。即ち、細胞の老化は染色体末端に存在する6塩基 (TTAGGG) の繰り返し配列 (テロメア) が細胞分裂ごとに短縮し、老化、細胞死に至るいわゆる“テロメア分子時計”により制御されている。この分子時計の制御にはテロメア - の短縮や延長が関与することが示唆されている。テロメアを延長させる酵素、テロメラーゼは細胞が増殖に際するテロメアの短縮を防ぎ、細胞に永久分裂寿命を与えうると考えられている¹⁾。

そこで、エストロゲンを初めとする女性ホルモンがテロメア・テロメラーゼ分子を介して細胞老化を刻む分子時計

に与える影響や各種ホルモン剤の相互作用を分子生物学的に調べ、中高年者の皮膚老化防止に対するホルモン治療の効、最適のホルモン剤の組み合わせやその薬剤を探ること、さらにはホルモンの生命維持機構の解明を本研究の一連の目的とする。

2. 実験と結

2. 1 hTERT プロモーターのクローニング

テロメアの伸長作用を有する酵素；テロメラーゼは3つのサブユニット (*hTR*: human telomerase RNA, *TPI*: telomerase associated protein, *hTERT*: human telomerase reverse transcriptase) からなることが明らかとなり、1997年8月には Nakamura らと Myerson らによって *hTERT* 遺伝子がクローニングされた²⁾。さらに、1999年には蛋白発現にきわめて重要な役割を担うプロ - モーターのクローニングは世界に先駆け我々によってなされた³⁾。h TERT 遺伝子プロモーターは TATA-box と呼ばれる転 開始配列を有しCG塩基配列に極めて富んでいた (図1)。各種癌細胞や正常細胞に hTERT プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーター遺伝子を導入して活性を調べたところ癌細胞にはテロメラーゼの転 活性が強く見られた。転 活性化に必要な部は180bpであり、c - MYC や SP1 が転 因子として作動する事も示してきた⁴⁾。

2. 2 TERT の組織学的局在

テロメラーゼ活性を担う hTERT 蛋白に対する抗体を作成し免疫染色にて蛋白の局在を調べた。皮膚組織に於いては正常の成熟角化細胞には hTERT の蛋白発現はないが、基底の顆粒細胞には癌細胞と同様の強い発現を認めた。抗



Molecular mechanism of estrogen against the senescence of skin cells.

Masaki Inoue

Department of reproductive biology,
Medical science, Kanazawa University

原の発現は細胞核のみならず細胞質にも認めた(図2)。しかし、細胞質における存在の意味は現在不明である⁵⁾。若年者皮膚には蛋白発現が強い事も判明した。

2. 3 ホルモンのテロメラーゼ活性に対する影響

これまで、テロメラーゼ活性は弱いながらも血液幹細胞、消化管クレプトの幹細胞に観察されることは知られていた。我々は女性ホルモン(エストロゲンとプロゲステロ

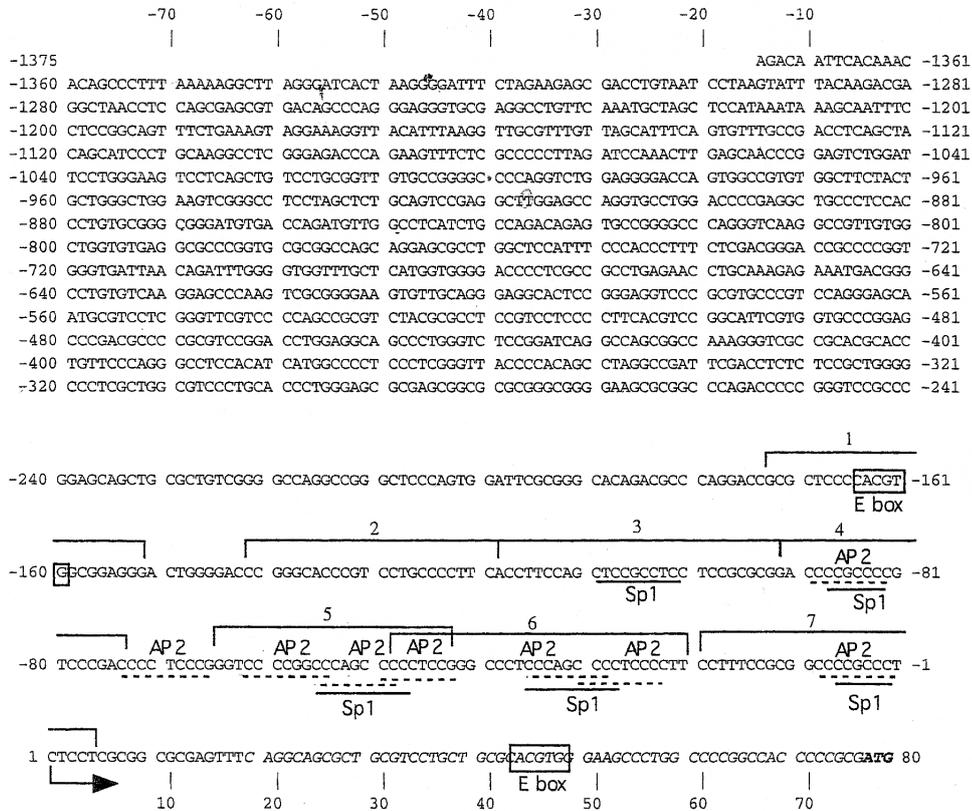


図1 hTERT プロモーターの塩基配列。CG 配列に富み TATA-box を有する。主たる転 領域には SP1、cMyc などの転 因子の結合部 が存在する。

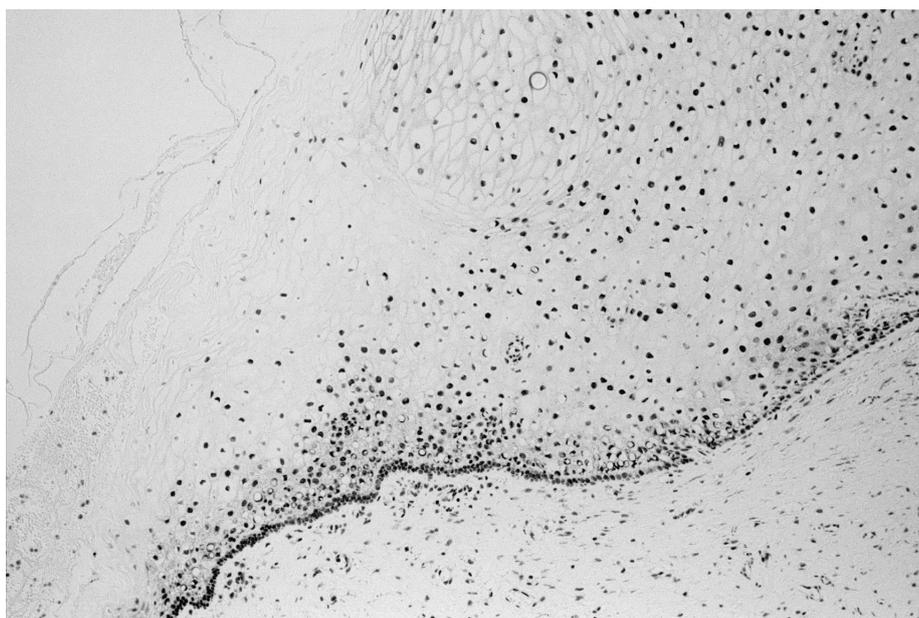


図2 上皮細胞における hTERT 蛋白の局在。hTERT 蛋白は扁平上皮細胞の顆粒層細胞(上皮幹細胞)には発現を見るが、分化した角化層には認めない。免疫組織染色 x 33

ン) によって月経周期を惹起する子宮内膜に周期的にテロメラーゼ活性と hTERT 遺伝子の発現が同期して強く発現する事を見出した^{6,7)}。即ち、ホルモンによりテロメラーゼ活性が制御されテロメアの延長を介して細胞寿命に影響を与える事が示唆された。

そこで、エストロゲンとプロゲステロゲンの両者を発現する内膜癌細胞株 (Ishikawa 株, HEC 株) や乳癌株 (T47D) を用いてルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフト法を用いてホルモンによるテロメラーゼ活性や hTERT の制御機構を調べた⁸⁾。

エストロゲンの標的細胞である皮膚のケラチノサイト、皮下の繊維芽細胞、骨細胞、乳癌細胞、内膜癌細胞についてエストロゲン付与するとテロメア長やテロメラーゼ活性が上昇する事が判明した。ルシフェラーゼアッセイでエストロゲン受容体結合部 が hTERT プロモーター上流の約 1500pb に存在しエストロゲン添加でテロメラーゼ活性やルシフェラーゼ活性が増加する事が示された。ゲルシフトアッセイでも受容体が結合する事が確認された。即ち、エストロゲンが hTERT プロモーターに受容体を介して結合しテロメラーゼ活性を増加しテロメアを延長する事により細胞老化に抵抗性に作用する事が示された。さらに、エストロゲンは c Myc 蛋白を活性化してテロメラーゼ活性を挙げる間接的な作用も判明した。

一方、プロゲステロンは hTERT mRNA の発現を短時間では有意に誘導した。即ち、この活性増加は一過性であり、3 時間から有意に増加し 12 時間でピークに達しその後減少した。しかし、24 時間以上の長時間作用させるとプロゲステロンはエストロゲンによる hTERT 発現増強作用を抑制した。プロゲステロンによる抑制作用は MAP・ERK キナーゼインヒビターにより抑制される事が判明した。従って、プロゲステロンによるテロメラーゼ制御機構には MAP キナーゼを介する経路が極めて重要である事が明らかとなった。プロゲステロン添加により初期変化としては未知の転 因子のリン酸化を じて活性化された転 因子が作動しテロメラーゼ活性を挙げるが、晩期には P21 の誘導を じて転 因子を抑制する 2 相性の作用を有する事が明らかとなった⁹⁾。

エストロゲンと同様にエストロゲン受容体に作用して抗エストロゲン作用を有する SERM (選択的エストロゲン受容体制御因子) であるタモキシフェンは乳癌細胞株では hTERT を抑制的に、子宮内膜癌細胞株では促進的に作用する事が示された¹⁰⁾。タモキシフェンは実際に臨床的に乳癌治療薬として使用されているが、副作用として内膜癌発生が高まる事が知られている。我々の結 論は臨床的な事実に対して分子生物学的な根拠を与えるものである。これはホルモン剤が臓器によりその作用が微妙に異なる事を示しており、皮膚細胞における効 果や作用の結 論は興味ある

点である。

2. 4 エストロゲンの皮膚に対する細胞生物学的変化

文献的にはエストロゲンが皮膚の弾力性増強のために必要なコラーゲンの産生能に対する影響、皮膚の保水性維持のために必要なヒアルロン酸の分泌能、などを上昇させる事が知られているが、その分子機構には不明な点が多い。これらについてはについてホルモン受容体を有する細胞株で検討中である。純正の女性ホルモンのみならず SERM や女性ホルモン作用を有する内分泌攪乱物質いわゆる環境ホルモンについても興味ある点である。正常細胞に腫瘍抑制遺伝子を抑制した後に hTERT 遺伝子を導入すれば容易に正常機能を持つ正常不死化細胞を作る事が可能となったので¹¹⁾、皮膚細胞においても同様に不死化細胞株を樹立し、細胞レベルでのアポトーシスや増殖能、形態変化など老化との関連について今後検討する。

2. 5 紫外線や活性酸素の皮膚障害に対する効 果

テロメラーゼの酵素活性の中心をなす hTERT はテロメア延長を介して老化防止機能を有するのみならず、 の作用もあることが推測されている。即ち DNA 複製時の遺伝子エラーや外部刺激による遺伝子障害の修復作用である。皮膚由来の正常不死化細胞を用いて、放射線や紫外線さらには活性酸素による遺伝子障害に対する修復機構の分子メカニズムの解明と臨床応用への展開を図る予定である。癌の放射線感受性の回復や外部刺激からの皮膚の保護薬や基材の開発に道を開く可能性がある。

3. 考 察

我々の研究成 果によってホルモン特にエストロゲンがテロメラーゼ活性化機構を介して細胞寿命延長に作用する事が示された。一方、エストロゲンや黄体ホルモンなどの女性ホルモンはホルモン補充療法として既に臨床の現場で使用されている。その効 果として保水性の維持や弾力性の増加が示唆されているが、皮膚老化の側 面から分子レベルでの検討はされていない。女性ホルモンや関連物質がどのような作用を持つのか、有効性のみならず副作用を検討する上でも、これら分子機構の解明に大変興味を持たれている。我々の実証した方法で正常不死化細胞株を樹立し、それら細胞を用いた実験系でその効 果が解明されるものと期待される。

正常細胞は分裂回数が有限で、この限界状態を細胞の senescence (老化) という。この細胞老化は細胞分裂を重ねることで生じるが、分子レベルでの調節はテロメアを短縮することで成り立つ。この分子時計を巻き戻し、細胞の若々しさを維持するにはテロメラーゼを活性化させることにより可能となる。従来より、女性ホルモンは個体の発

生・発育・若年性維持に生理的な役割をなすことが知られていたが、分子レベルでの研究は進んでいない。エストロゲンの分子標的としてテロメラーゼ hTERT 遺伝子プロモーターが解析され、女性ホルモンが直接あるいは間接的に hTERT 遺伝子を制御し、テロメア長の支配を介して生命維持現象に関与する事が本研究で明らかになった (図3)。

臨床の現場ではエストロゲンが更年期後の女性にホルモン補充療法として、欧米では DHEA, 成長ホルモンや甲状腺ホルモンなどの混合薬が老化防止薬として使われ始めている現在、早急にこれらホルモン剤の分子レベルでの生命機能に関する検討は独創的で且つ時代の要請でもある。さらに、皮膚由来の正常機能を持つ不死化細胞株の樹立はコスメトロジー研究に利用できるだけでなく、将来の再生医療に利用できるものと期待される。

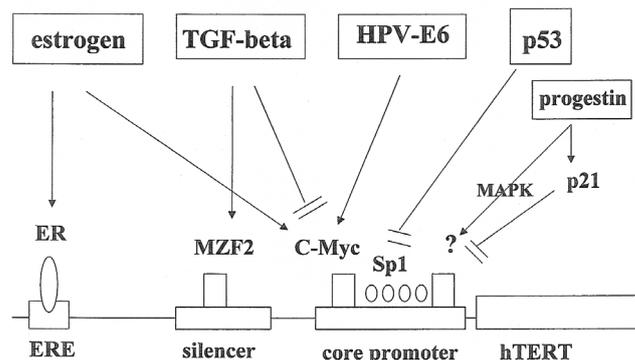


図3 hTERT の転 制御。エストロゲンを始めとした種々の転 因子が hTERT プロモーターに間接的あるいは直接的に結合して転 制御する。テロメラーゼ活性を支配する事により細胞老化を制御する。

(文 献)

- 1) Heyflick L, et al. The serial cultivation of human diploid strains. *Exp Cell Res*, 25:585-621, 1961.
- 2) Nakayama J et al. TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell*, 88:875-884, 1997.
- 3) Takakura M, et al. Cloning of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene promoter and identification proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res*. 59:551-557, 1999.
- 4) Kyo S, Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells. How can we apply them for cancer therapy? *Oncogene* 21:688-697, 2002.
- 5) Kyo S, Masutomi K, Maida Y, Kanaya T, Yatabe N, Nakamura M, Tanaka M, Takarada M, Sugawara I, Murakami S, Taira T, Inoue M. Significance of immunological detection of human telomerase reverse transcriptase. *Am J Pathol* 163:859-867, 2003.
- 6) Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res*.57:610-614, 1997.
- 7) Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Wang Zhuo, Fujimoto

- K, Nishio Y, Orimo A, Inoue M. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res*. 59:5917-5921, 1999.
- 8) Tanaka M, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Sagawa T, Yamashita K, Inoue M. Expression of telomerase activity in human endometrium is localized to epithelial glandular cells and regulated in a menstrual phase-dependent manner correlated with cell proliferation. *Am. J. Pathology* 153: 1985-1991, 1998.
- 9) Wang Z, Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Maida Y, Fujiwara M, Hayakawa J, Ohmichi M, Koike K, Inoue M. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression via activation of MAP kinase signaling pathway. *Cancer Res*. 60: 5376-5381, 2000.
- 10) Wang Z, Kyo S, Maida Y, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Koike K, Hayakawa J, Ohmichi M, Inoue M. Tamoxifen regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression differently in breast and endometrial cancer cells. *Oncogene*, 21:3517-3524,2002.
- 11) Kyo S, Nakamura M, Kiyono T, et al. Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structure and functional characteristics. *Am J Pathol* 163:2259-2269,2003.

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 —

東京都老人総合研究所 加齢臓器障害研究グループ

石 神 昭 人

Peptidylarginine deiminases (PADs) are a group of enzymes which convert protein arginine residues to citrulline residues in the presence of calcium ion. Enzymatic deimination abolishes positive charges of protein molecules inevitably causing significant alteration in the structure and function of native proteins. In mammalian tissues, PADs are found as four different isoforms (type I, type II, type III and type IV), which differ in specificity for various synthetic substrates and in tissue distribution. We have previously reported that multiple deiminated proteins, composed largely of keratins and filaggrin, which is a keratinocyte terminal differentiation marker synthesized in granular cell layers, were present and localized in the granular and cornified cell layers of the epidermis. The presence of deiminated proteins in such a restricted region of the epidermis strongly suggests that PAD enzyme is involved in the cornification of epidermal keratinocytes.

In this study, we analyzed the localization of deiminated proteins in psoriatic epidermis and atopic epidermis. Immunostaining based on chemical modification of citrulline residues showed that both the psoriatic epidermis and atopic epidermis had no detectable levels of deiminated proteins. On the other hand, immunostaining with polyclonal antibody against filaggrin showed no significant change in psoriatic epidermis and atopic epidermis. These results indicated that the causes of psoriasis vulgaris and atopic dermatitis may be defective in protein deimination.

1. 緒 言

蛋白質翻訳後修飾は情報伝達、遺伝子発現、細胞分化や老化に深く関与している。特に、蛋白質中のアルギニン残基がシトルリン残基に変わる脱イミノ化反応は、アルギニン残基の塩基性が失われる分、蛋白質の等電点が酸性側にシフトするなど、蛋白質の本来の電化や高次構造に著しい変化をもたらすことから機能解明が急がれている。ヒトの皮膚角層や毛嚢には脱イミノ化蛋白質が多く存在する。プロテオーム解析により中間径フィラメント蛋白質のケラチン K1 や K10、皮膚水分保湿に重要なフィラグリンやトリコヒアリンが高度に脱イミノ化していることを明らかにした¹⁻³⁾。興味深いことに、炎症性角化症の1つである乾癬では脱イミノ化蛋白質がまったく検出されなかった。乾癬は、表皮の角層と有棘層が肥厚し、少し盛り上がった赤い皮疹（紅色局面という）ができるのが特徴である。また、皮膚表面には、白くてかさかさした乾燥した厚い垢（鱗屑-りんせつという）が付着する。乾癬の原因の1つは、不完全な角化にあると考えられている。乾癬では、脱イミノ化蛋白質がほとんど検出されないことから、蛋白質脱イミノ化反応は、正常な表皮角化に重要な役割を果たしていることが推察される。

蛋白質脱イミノ化反応は、蛋白質脱イミノ化酵素（ペプチジルアルギニンデイミナーゼ、PAD）により触媒される。遺伝子解析により生体内には、4種類の異なるアイソフォーム（I, II, III, IV型）が存在し、表皮では、I, II, III, IV型全てのPADが発現している⁴⁻⁶⁾。同じ活性を持つ4種類の酵素がどうして皮膚で発現しているのか、その生理的意義については現在明らかではない。

本研究は、正常皮膚角化における蛋白質脱イミノ化の役割解明を目的としている。特に、乾癬と同じように皮膚炎症症状を呈するアトピー性皮膚炎での脱イミノ化蛋白質の動態を詳細に解析した。歳をとってもしわのない瑞々しい肌をいつまでも保ち、化粧品と健康とのバランス良い関係を保つことを最終目的とした基礎的研究である。

2. 実 験

2.1 皮膚組織

正常なヒト皮膚組織は、整形外科時に患者同意を得て採取した。また、乾癬やアトピー性皮膚炎の皮膚組織は、外科的処置時に患者同意を得て採取した。本研究は、東京都老人総合研究所倫理委員会、東京都老人医療センター倫理委員会の承認を得ている。本研究では、個人の情報は、公表しない。個人や病院の承諾書を得る。研究により生じた対象者への不利益及び危険性はない。など倫理面において最大の配慮をしている。

2.2 脱イミノ化蛋白質の免疫組織化学的染色

皮膚組織は4%パラホルムアルデヒド固定し、OCT compound 4583 (Miles) で包埋した。次に、6μm厚に切片化し、スライドガラスに接着させた。脱イミノ化蛋白質



Role of the protein deimination during the cornification of epidermal keratinocytes

Akihito Ishigami

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology (TMIG) Organ Disorder and Aging Research Group

の検出は、以下のように行った⁷⁾。

皮膚切片を2.5%グルタルアルデヒドで後固定した。次に、誘導体化溶液*を切片にかけ、37℃の保温器で3時間保温してシトルリン残基を誘導体化した。1次抗体には、ウサギ抗誘導体化シトルリン抗体⁸⁾を用いた。呈色には、Elite ABC kit (Vector Laboratories) と発色基質としてジアミノベンチジンをを用いた。組織観察のため、ヘマトキシリン染色を行った。

*誘導体化溶液は、蒸留水と下記の保存溶液1および2を、容積比で1:1:2の割合で使用時に混合して使用。

保存溶液1 (2% ジアセチルモノキシムと1% アンチピリンを含む1N 酢酸)。

保存溶液2 (0.025% FeCl₃を含む水と85% リン酸および95% 硫酸を55:20:25の容積比で混合した溶液)。

2.3 フィラグリンの免疫組織化学的染色

皮膚組織をOCT compound 4583で包埋し、6μm厚に切片化した。1次抗体としてウサギ抗ラットフィラグリン抗体¹⁾を用いた。呈色には、Elite ABC kit (Vector Laboratories) と発色基質としてジアミノベンチジンを用いた。組織観察のため、ヘマトキシリン染色を行った。

3. 結果と考察

3.1 皮膚での脱イミノ化蛋白質の役割

ヒト皮膚における脱イミノ化蛋白質の局在を免疫組織化学的検出法を用いて調べた。脱イミノ化蛋白質の検出は、我々が独自に開発した化学修飾したシトルリン残基に特異的な抗体、組織切片上でのシトルリン残基の化学修飾法を用いている。この方法では、シトルリン残基の前後のアミノ酸配列に拘わらず、微量の脱イミノ化蛋白質を高感度に検出できる。ヒト正常皮膚では、表皮顆粒層上部から角層にかけて脱イミノ化蛋白質が陽性であった(図A)。特に、角層下部には脱イミノ化蛋白質が多く存在しており、基底層や有棘層ではまったく検出されなかった。また、真皮においても脱イミノ化蛋白質は陰性であった。一方、フィラグリンは有棘層上部から角層下部にかけて陽性であった(図D)。

表皮では、I, II, III, IV型全てのPADが発現している⁴⁻⁶⁾。免疫組織染色により、I, II型PADは基底層から有棘層、顆粒層に分布しており、角層では検出されなかった。何れのPADも酵素活性発現にカルシウムイオンを必要とする。

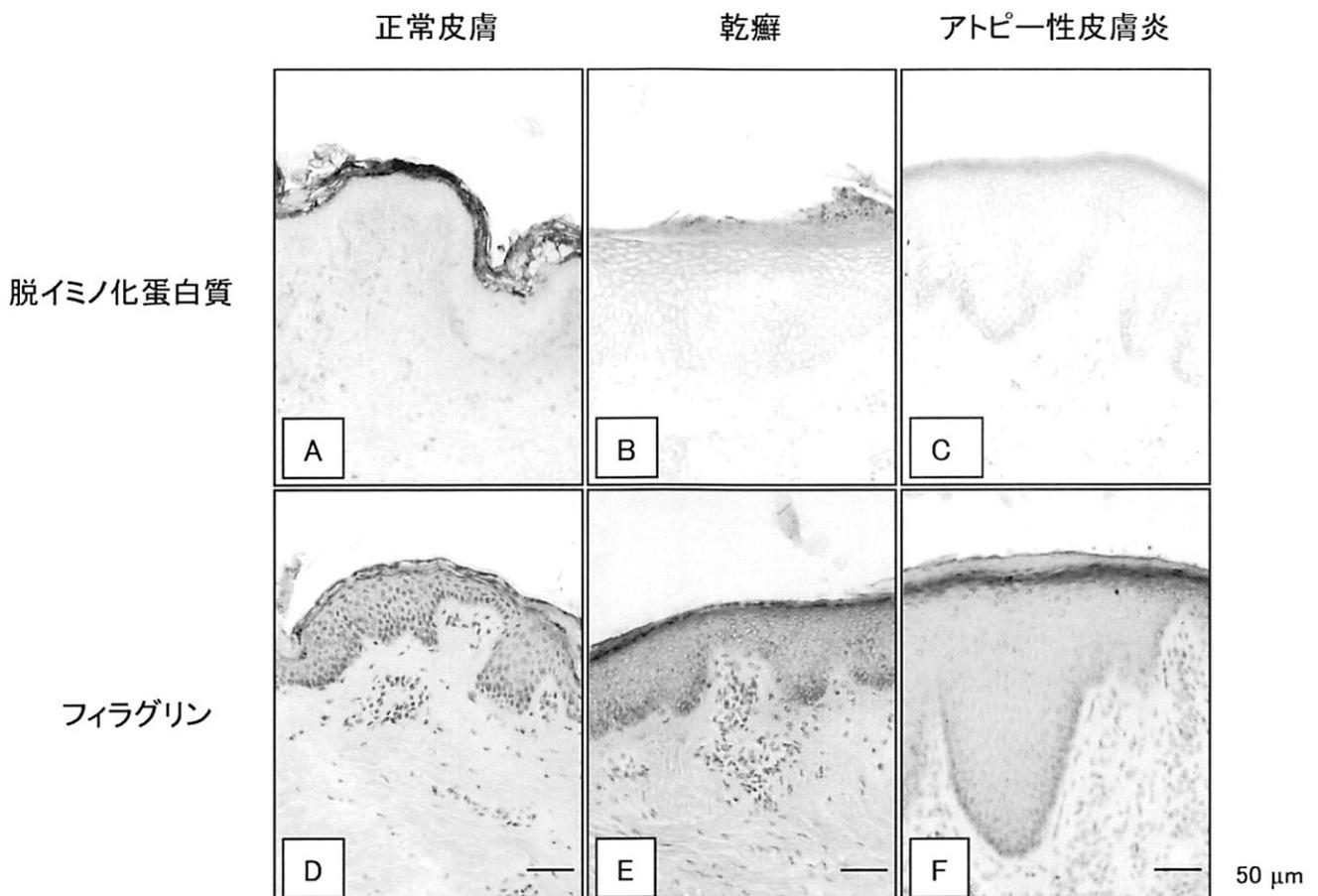


図 ヒト皮膚における脱イミノ化蛋白質、フィラグリンの免疫組織染色

A, D: 正常、B, E: 乾癬、C, F: アトピー性皮膚炎

A, B, C: 脱イミノ化蛋白質、D, E, F: フィラグリン

表皮は、基底層から表層に移行するに連れ、カルシウム濃度が高くなるよう濃度勾配が形成されている。PADは、基底層、有棘層、顆粒層の細胞で発現し、そのほとんどが活性化されない状態で蓄積し、顆粒層上部まで移行する。顆粒層の外側では、細胞核消失、ケラチン繊維の凝集、辺縁帯形成を含む急激な形態変化（角化）が起こり角層を形成する。顆粒層上部では、細胞内カルシウム濃度が臨界点に達し、一気に蛋白質脱イミノ化反応が進行すると考えられる。この時、脱イミノ化される蛋白質は、角層のケラチン模様を構成するケラチンK1やK10、皮膚の水分保湿因子として働くフィラグリンを同定した¹⁻³⁾。特に、ケラチンの脱イミノ化は、ケラチン繊維の凝集や辺縁帯形成に重要である。また、フィラグリンの脱イミノ化は、ケラチンとの電気的相互作用を弱め、ケラチン繊維からの離脱と分解に働いていると考えられる。フィラグリンは、角層上部でアミノ酸にまで切断されて皮膚の保湿成分として働く。

3.2 皮膚疾患における PAD の関与

乾癬では、脱イミノ化蛋白質がほとんど検出されなかった（図B）。しかし、フィラグリンの分布に特に異常は認められなかった（図E）。乾癬は、ウイルスや細菌、かびが原因となる皮膚疾患ではないため、ヒトにうつる心配はない。また、乾癬の根本的治療法や有効な医薬品は、未だ確立されていない。従ってその治療法は、対症療法的なものとなり、症状が良くなっている期間をできる限り長くすることが治療の目的になる。乾癬の角層では、脱イミノ化蛋白質が検出されないことから、表皮角化に蛋白質脱イミノ化反応が非常に重要であることがわかる。では、同じような皮膚炎症反応を呈するアトピー性皮膚炎の皮膚では、脱イミノ化蛋白質は存在するのであろうか。アトピー性皮膚炎における脱イミノ化蛋白質の動態を調べた。その結果、アトピー性皮膚炎では、乾癬同様に角層に脱イミノ化蛋白質がまったく検出されなかった（図C）。また、フィラグリンの分布には、特に異常は認められなかった（図F）。アトピー性皮膚炎でのPADの発現は、未だ明らかではない。しかし、フィラグリンの発現に異常が見られないことから、PADの正常な発現が予想される。PADは、酵素活性発現にカルシウムイオンを必要とする。アトピー性皮膚炎では、カルシウム濃度勾配がきちんと形成されていない可能性がある。

4. 総括

今回の研究により、アトピー性皮膚炎の原因が皮膚角層での蛋白質脱イミノ化の機能不全による可能性が強く示唆された。また、アトピー性皮膚炎の治療への可能性として次のように考える。『皮膚軟膏へのカルシウムの添加』である。これは、化粧品への応用も可能であると考えている。

歳をとってもしわのない瑞々しい肌を維持することは、女性のみならず男性でも望みである。皮膚における脱イミノ化蛋白質、PADの役割がもっとはっきりすれば、様々な皮膚疾患の治療のみならず、瑞々しい肌を保つための美容療法に新しい光を浴びせかけるものと期待している。

謝辞

本研究に対して助成いただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

(文献)

- 1) Senshu T, Akiyama K, Kan S, Asaga H, Ishigami A, Manabe M: Detection of deiminated proteins in rat skin: probing with a monospecific antibody after modification of citrulline residues, *J. Invest. Dermatol.*, 105, 163-169, 1995.
- 2) Senshu T, Akiyama K, Ishigami A, Nomura K: Studies on specificity of peptidylarginine deiminase reactions using an immunochemical probe that recognizes an enzymatically deiminated partial sequence of mouse keratin K1, *J. Dermatol. Sci.*, 21, 113-126, 1999.
- 3) Ishigami A, Asaga H, Ohsawa T, Akiyama K, Maruyama N: Protein deimination and peptidylarginine deiminase expression during cornification of rat epidermal keratinocytes, *Biomed. Res.*, 23, 145-151, 2002.
- 4) Ishigami A, Asaga H, Ohsawa T, Akiyama K, Maruyama N: Peptidylarginine deiminase type I, type II, type III and type IV are expressed in rat epidermis, *Biomed. Res.*, 22, 63-65, 2001.
- 5) Ishigami A, Ohsawa T, Asaga H, Akiyama K, Kuramoto M, Maruyama N: Human peptidylarginine deiminase type II: molecular cloning, gene organization, and expression in human skin, *Arch. Biochem. Biophys.*, 407, 25-31, 2002.
- 6) Guerrin M, Ishigami A, Mechin MC, Nachat R, Valmary S, Sebbag M, Simon M, Senshu T, Serre G: cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I, *Biochem. J.*, 370, 167-174, 2003.
- 7) Asaga H, Ishigami A: Protein deimination in the rat brain: Generation of citrulline-containing proteins in cerebrum perfused with oxygen-deprived media, *Biomed. Res.*, 21, 197-205, 2000.
- 8) Senshu T, Sato T, Inoue T, Akiyama K, Asaga H: Detection of citrulline residues in deiminated proteins on polyvinylidene difluoride membrane, *Anal. Biochem.*, 203, 94-100, 1992.

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

東京大学医科学研究所 癌・細胞増殖大部門 分子発癌分野

井上 純一郎

Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 (TRAF6) transduces signals from members of the Toll/interleukin-1 (IL-1) receptor and members of the TNF receptor super family including CD40 and RANK. We have reported recently that TRAF6 deficiency results in defective development of epidermal appendices including guard hair follicles and sweat glands. Furthermore, our results suggest that this defect may be due to the impaired signaling of EDAR, XEDAR or TROY, members of the TNFR super family expressed in skin. Although TRAF6 plays a crucial role in formation of the skin appendices, the molecular mechanisms underlying regulation of TRAF6 are largely unknown. Thus, we began to search for proteins that bind to and activate TRAF6. We have identified TIFA, a TRAF-interacting protein with a forkhead-associated (FHA) domain. The FHA domain is a motif known to bind directly to phosphothreonine and phosphoserine. In transient transfection assays, TIFA activates NF κ B and JNK. However, TIFA carrying a mutation that abolishes TRAF6 binding or mutations in the FHA domain that are known to abolish FHA domain binding to phospho-peptide fails to activate NF κ B and JNK. TIFA, when overexpressed, binds both TRAF6 and IRAK-1 and significantly enhances the IRAK-1/TRAF6 interaction. Furthermore, analysis of endogenous proteins indicates that TIFA associates with TRAF6 constitutively, whereas it associates with IRAK-1 in an IL-1 stimulation-dependent manner *in vivo*. Thus, TIFA is likely to mediate IRAK-1/TRAF6 interaction upon IL-1 stimulation. These results suggest that TIFA may be involved in signaling that leads to the development of skin appendices. In such a case, TIFA could be important target molecule for drugs that affect skin condition. Inhibition of TIFA or TRAF6 may reduce the number of hair follicles. In contrast, activation of TIFA or TRAF6 may increase their number. Thus, TIFA and TRAF6 could be target molecules for developing compounds that could be used by hairy or bald-headed persons.

1. 緒言

毛包、汗腺、皮脂腺などいわゆる皮膚附属器官の形成の分子機構は、不明な点が多い。我々は最近、細胞内シグナル伝達因子 TRAF6 の遺伝子欠損マウスを作成し、その表現型の一つがヒト遺伝性疾患である無汗性外胚葉形成不全症 (Hypohidrotic ectodermal dysplasia:HED) のモデルマウスである Tabby (Ta), downless (dl), crinkled (cr) といった変異マウスに酷似していることを報告した¹⁾。この疾患を有するヒトやマウスでは汗腺や皮脂腺などの顆粒分泌腺、毛包の形成が著しく阻害されている。本研究では、これら皮膚附属器官の形成機構を TRAF6 を中心に明らかにし皮膚を標的とする化粧品の開発、皮膚に副作用を有する化粧品の改良及び、毛生え薬や脱毛剤の開発などの基礎となる成果を挙げることを研究目的とした。

前述の HED のモデルマウス Ta では EDAR と呼ばれる TNF ファミリーリガンドタンパク質に²⁾、dl では EDAR と呼ばれる TNF 受容体ファミリータンパク質に³⁾、さらに cr では EDAR の細胞質領域に結合する EDARADD と呼ばれ

るシグナル伝達因子に⁴⁾ 遺伝子レベルで異常が存在することが報告されている。すなわち、EDAR → EDARADD と伝達されるシグナルが皮膚附属器形成に必須であることを示している。一方で、皮膚には EDAR に類似した受容体分子 XEDAR⁵⁾ や TROY⁶⁾ が発現しておりやはり皮膚附属器形成に関与していると考えられている。我々の実験から TRAF6 はいずれの受容体からのシグナルにも関与していると判断されることから¹⁾、TRAF6 のシグナル伝達機構を解明することにより本研究の目的が達成されると思った。我々は、TRAF6 シグナルの解明を目指し、TRAF6 に結合し TRAF6 の活性を制御する分子を探索してきた。新規 TRAF6 結合分子の同定に関して以下に報告する。

2. 実験

2.1 酵母 two-hybrid スクリーニングとノザンブロットティング

全長マウス TRAF6 を pBD-GAL4-Cam (Stratagene, La Jolla, CA) にサブクローニングし餌として pAD-GAL4-2.1 (Stratagene) で作成した ICR マウス (8-週齢メス) 骨髄 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。ヒト TIFA cDNA はヒト B-cell cDNA ライブラリーからクローニングした。マウス及びヒト TIFA の配列については DDBJ/EMBL/GenBank に accession number AB062111 及び AB062110 として各々登録した。マウス組織 RNA ブロット (Clontech, Palo Alto, CA) を [³²P]-ラベル全長マウス TIFA cDNA または β -actin cDNA で 65°C においてハイブリダイズした。フィルターは 0.5 X



Identification of signal transduction pathways involved in formation of skin appendices including hair follicles, sweat glands and sebaceous gland.

Jun-ichiro Inoue

Division of Cellular and Molecular Biology
Department of Cancer Biology
Institute of Medical Science, University of Tokyo

SSC, 0.2 (w/v) % SDS, 65°C、30 分洗浄した。

2.2 GST 沈降アッセイ、免疫沈降アッセイ、ウェスタンブロットティング

GST 沈降アッセイでは、まず HEK293T 細胞に図に示した組み合わせと量で遺伝子導入した。36 時間後、細胞を 500 μ l の TNE buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5 mM dithiothreitol) 破碎後、遠心し未破碎細胞を除去した sup を得、それを細胞破碎液とした。細胞破碎液を Glutathione-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) と混合し、吸着複合体を 8.5% polyacrylamide/SDS ゲルで分離した。免疫沈降アッセイでは同様に調製した細胞破碎液に示された抗体と protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) を混合した。免疫沈降複合体を 10% または 12.5% polyacrylamide/SDS ゲルで分離した。各々のタンパク質の発現チェックの場合は細胞破碎液をそのまま用いた。ゲルで分離されたタンパク質は PVDF メンブレン (Millipore, Bedford, MA) にトランスファーした後、特異抗体と適当な horseradish peroxidase (HRP) - 2 次抗体、ECL Western blotting system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて同定した。

2.3 リコンビナント TIFA タンパク質のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分離

Maltose-binding protein (MBP) -TIFA 融合タンパク質 (MBP-TIFA) を E. coli BL21 で発現させ Amylose-resin (New England BioLabs, Beverly, MA) をもちいてアフィニティー精製した。MBP-TIFA (24 μ g) を 2.4U の PreScission Protease (Amersham Pharmacia Biotech) で 4°C、4 時間反応させ MBP と TIFA の境界を切断した。その反応液を Superdex 75 column (0.32 \times 30cm) にて分離し、各々のフラクションを 10% polyacrylamide-SDS ゲルで分離した。ゲルをクマシー染色しタンパク質を同定した。

2.4 ルシフェラーゼリポーターアッセイと JNK の *in vitro* キナーゼアッセイ

HEK293T 細胞に 1 ng の 3 \times κ B-luc または 3 \times M κ B-luc (mutant κ B sites), 10ng の β -actin- β -gal と図に示された種々の発現プラスミドを遺伝子導入した。36 時間後、ルシフェラーゼ活性を Luciferase Assay System (TOYO INK, Tokyo) で測定した。また β -galactosidase 活性を測定し遺伝子導入効率の換算に用いた。JNK キナーゼアッセイでは、まず HEK293T 細胞に 10ng の pEF-T7-JNK と図に示した量の pME-FLAG-TIFA を遺伝子導入した。36 時間後 His-JNK を抗 T7 抗体で免疫沈降後、2 μ g の GST-c-JUN (1-89) 融合タンパク質 (New England BioLabs)

と 20 μ l の kinase buffer (20mM HEPES pH7.5, 20mM MgCl₂, 5 μ Ci [γ -³²P]ATP (3000Ci/mmol)) の中で 30°C、30 分反応させた。

3. 結果

3.1 TRAF6 結合タンパク質としての TIFA の同定

TRAF6 を餌として酵母 two-hybrid 法によりマウス骨髄 cDNA ライブラリーをスクリーニングして 184 アミノ酸からなるタンパク質をコードする cDNA を得た。このタンパク質が動物細胞内で TRAF6 と結合すること、一過性の遺伝子導入により NF κ B や JNK を活性化すること及び分子中央に Forkhead-associated (FHA) ドメイン⁷⁾を有することから、このタンパク質を TRAF-interacting protein with an FHA domain (TIFA) と呼ぶことにした (Fig.1 A, C, D)⁸⁾。ノザンプロット解析から TIFA は脾臓に非常に多く発現し他の組織での発現は低かった (Fig.1 B)。FHA ドメインは 60 から 100 アミノ酸からなり主に真核細胞の核において細胞周期、DNA 修復や転位に関与するタンパク質に同定されている^{9), 10)}。さらに重要なことに FHA ドメイン中にはリン酸化セリンやリン酸化スレオニン残基に直接結合する機能を有するものが報告されていることである^{11), 12)}。これはちょうど SH2 ドメインがリン酸化チロシンに結合することがシグナル伝達で重要な役割を果たしていること¹³⁾を考えると TIFA の機能解析により TRAF6 のリン酸化が関与する新しい制御機構の解明につながる可能性を示唆する。

TIFA による NF κ B や JNK 活性化における TRAF6 の関与を解明するため、TIFA における TRAF6 結合部位を同定した。種々の TIFA 欠失変異体を用いた結合実験から TIFA の C-ドメインが TRAF6 との結合に十分であることが判明した (Fig.2A, B)。さらのその C-ドメイン内にこれまで CD40, RANK, IRAK-1 で同定された TRAF6 結合配列 XXPXEXX- (aromatic/acidic) に合致する配列が存在していた¹⁴⁾。我々はすでに CD40 と TRAF6 との結合実験から結合配列中の E を A に置換するとその結合能が全く喪失することを明らかにしている¹⁵⁾。そこで TIFA の同配列に同様の変異を導入した (E178A 変異体) とすると TRAF6 結合能が喪失すると同時に TIFA による NF κ B や JNK の活性化もなくなった (Fig.2C, D)。即ち、この結果は TIFA のシグナル伝達に TRAF6 との結合が必須であることを示している。次に FHA ドメインの機能を解析した。そのために TIFA の 50 番目のグリシンをグルタミン酸にしかつ 66 番目のセリンをアラニンに置換した (G50E/S66A) 変異体を作成した。なぜならば、FHA ドメインを持つシロイヌナズナの KAPP タンパク質において同じ変異体が発現した際の結合相手であるリン酸化タンパク質に結合しないことが報告されているからである¹⁶⁾。興味あ

ることにより G50E/S66A 変異体は TRAF6 と結合するものの NF κ B や JNK の活性化能を持っていなかった (Fig. 2C, D)。この結果は TIFA のシグナル伝達において TRAF6 との結合は必須であるが、十分でなく FHA ドメインの何らかの機能が必要であることを示唆している。

3.2 TRAF6 活性化における TIFA の自己集合能の関与 TRAF6 を細胞内で強制的に多量体形成させると下流に

シグナルを伝達することが報告されている¹⁷⁾。また同じ TRAF ファミリーである TRAF2 の結晶解析から TRAF2 はホモ 3 量体であると考えられている¹⁸⁾。従って我々は TIFA が TRAF6 の多量体形成を促進することにより TRAF6 を活性化するという仮説を立てた。この仮説を検討するためまず TIFA 自身の多量体形成とその活性との関係を検討した。GST-TIFA と FLAG-TIFA と共発現させ GST 沈降法により検討したところ TIFA は自己集合するこ

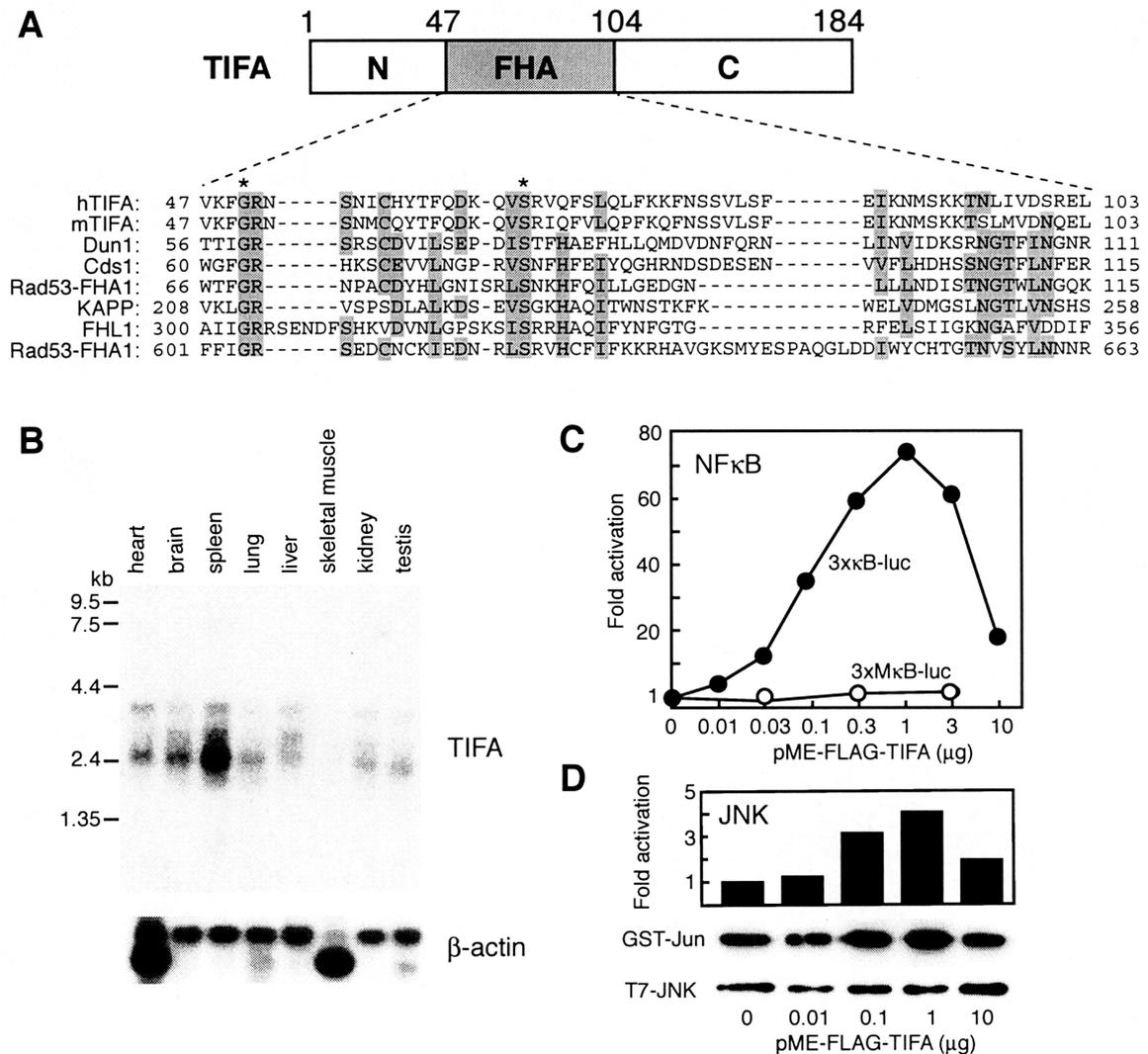


Figure 1 TIFA contains an FHA domain and activates NF κ B and JNK. (A) Diagram of the overall structure of TIFA and alignment of the FHA domain of TIFA with that of other proteins. Amino acids identical or similar in at least six proteins are indicated by gray boxes. Asterisks indicate amino acids selected for site-directed mutagenesis. (B) Multiple-tissue Northern blot. A mouse multiple-tissue Northern blot (Clontech) was probed with a cDNA fragment of mouse TIFA (upper) or β -actin (lower). (C) Activation of NF κ B by TIFA. HEK293T cells were transfected with 1 ng of 3xkB-luc or 3xM κ B-luc (mutant κ B sites), 10 ng of β -actin- β -gal and the indicated amounts of TIFA expression plasmid. Thirty-six hours after transfection, luciferase assays were performed. The results shown are the mean of duplicate experiments. (D) Activation of JNK by TIFA. HEK293T cells were transfected with 10 ng of pEF-T7-JNK and the indicated amounts of pME-FLAG-TIFA. Thirty-six hours after transfection, His-JNK was immunoprecipitated with anti-T7 antibody. Immunoprecipitates were subjected to an in vitro kinase assay using GST-Jun as a substrate. The results shown were representative of duplicate experiments.

とが明らかとなった (Fig. 3A)。さらに種々の欠失変異体を用いて検討したところ自己集合能にはFHAドメインとCドメインが両方とも必要でこれは欠失変異体のNFκBやJNKの活性化能と一致した (Fig. 2C, 3A)。即ち、TIFAの自己集合能がTRAF6の活性化に必要であることが強く示唆された。ところがG50ES66A変異体においてNFκBやJNKの活性化能がないのに自己集合能があることから、単にTRAF6と結合して自己集合するのでは十分でないことがあきらかとなった。そこで自己集合体の大き

さを調べるため大腸菌でTIFA及びそのG50ES66A変異体のリコンビナントタンパク質を発現後精製しSuperdex75ゲルろ過カラムで解析した (Fig. 3B)。その結果、TIFAの野生型が3量体に相当する大きさのところに溶出されたのに対してG50ES66A変異体は5量体あるいは6量体に相当する大きさのところに溶出された。従ってTRAF6の活性化にはTIFAの3量体形成が必要でありそれよりも大きい複合体を形成した場合にはTRAF6を活性化できないと考えられた。

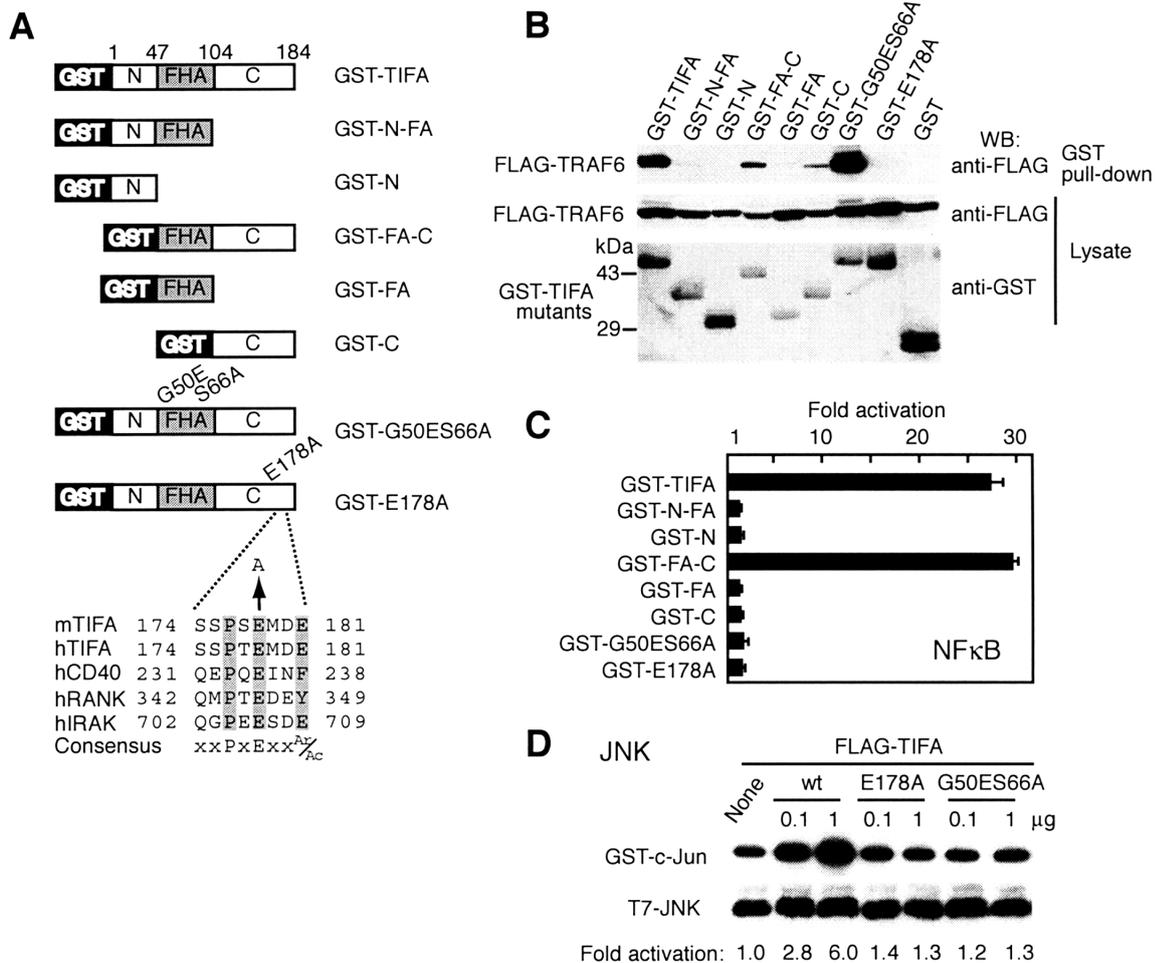


Figure 2 Both the TRAF6 binding site and the intact FHA domain are required for TIFA-induced activation of NFκB and JNK. (A) Structure of TIFA and its mutants and alignment of TRAF6 binding sites. (B) Identification of the TRAF6 binding site in TIFA. HEK293T cells were cotransfected with pME-GST-TIFA or pME-GST-TIFA mutant and pME-FLAG-TRAF6. Thirty-six hours after transfection, cell lysates were subjected to GST pull-down assay. (C) Activation of NFκB by TIFA mutants. HEK293T cell were transfected with 1 ng of 3xκB-luc or 3xMκB-luc (mutant κB sites), 10 ng of β-actin-β-gal and 5 μg of expression plasmid for TIFA or its mutants. Thirty-six hours after transfection, luciferase assays were performed. Results shown are the mean ± sd of triplicate experiments and are representative of two independent experiments. (D) Activation of JNK by TIFA mutants. HEK293T cells were transfected with 10 ng of pEF-T7-JNK and the indicated amounts of expression plasmid for TIFA or its mutants. Thirty-six hours after transfection, His-JNK was immunoprecipitated with anti-T7 antibody. Immunoprecipitates were subjected to in vitro kinase assay using GST-Jun as a substrate. The results shown are representative of duplicate experiments.

3.3 TIFAによる TRAF6 と IRAK-1 の相互作用の促進

これまでの実験から TIFA は TRAF6 の上流で働くと考えられたので、既に報告されている TRAF6 の上流分子と TIFA の結合を調べたところ IRAK-1 と結合した (Fig. 4A)。しかし、G50ES66A 変異体も IRAK-1 と効率良く結

合することから FHA ドメインの標的リン酸化タンパク質が存在するとしても IRAK-1 ではないと考えられた。つぎに TIFA が TRAF6 と IRAK-1 の両方に結合することから TIFA が TRAF6 と IRAK-1 との結合を促進する可能性を検討した。一定量の TRAF6 と IRAK-1 を発現させそこに

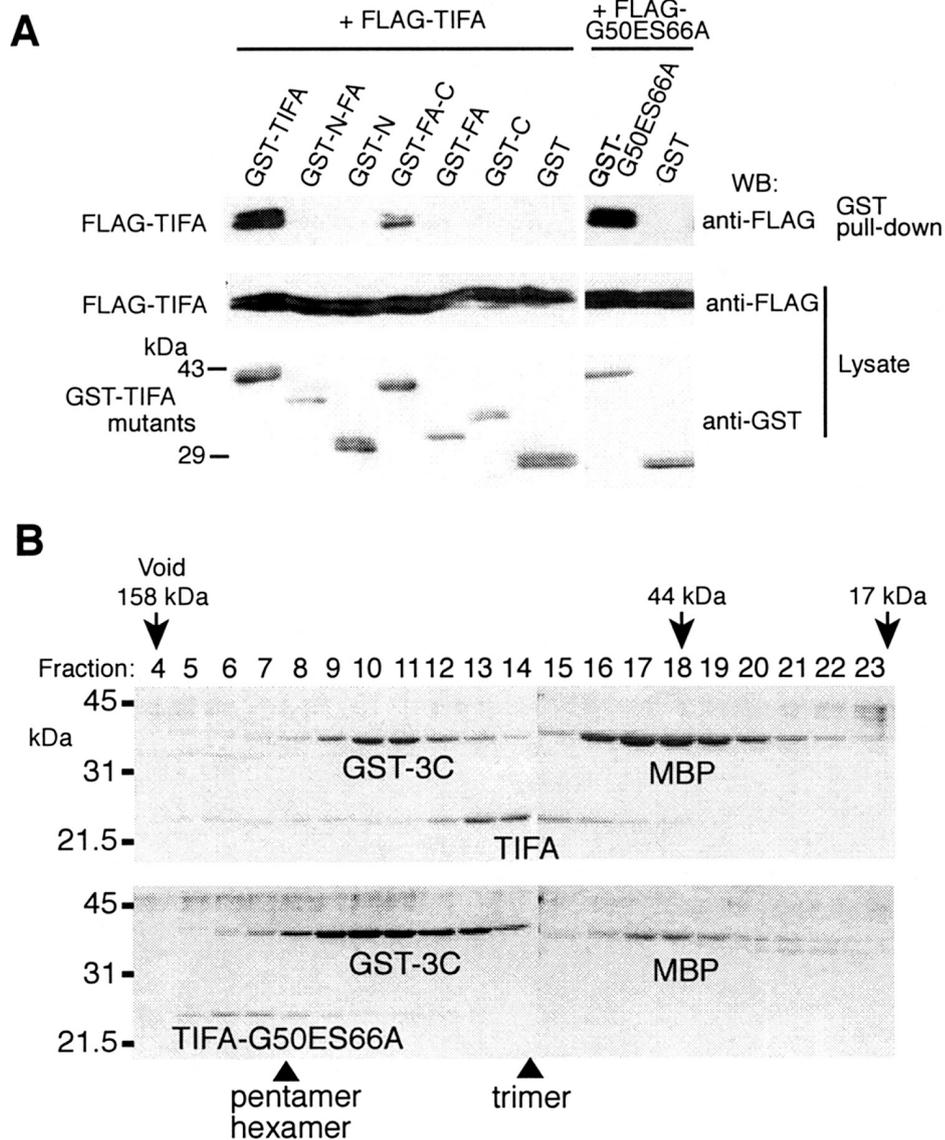


Fig. 3 Self-association of TIFA. A, Identification of the domain required for TIFA self-association. GST-TIFA or its mutants were coexpressed with FLAG-TIFA or FLAG-G50ES66A in HEK293T cells. GST pull-down assays were performed, and coprecipitated FLAG-TIFA was analyzed by Western blotting with anti-FLAG antibody. B, Oligomer formation of recombinant TIFA protein and that of mutant TIFA protein. MBP-TIFA (24 μ g, upper) or MBP-TIFA-G50ES66A (lower) was cleaved with 2.4 U of PreScission Protease (GST-3C) at 4°C for 4 hr. The reaction mixture was applied to a Superdex 75 column, and fractions (20 μ l) were collected. Fractions were analyzed on 10% polyacrylamide-SDS gel and proteins were visualized by coomassie brilliant blue staining. Arrows indicate the elution profile of the molecular-weight marker proteins (158 kDa, γ -globulin; 44 kDa, ovalbumin; 17 kDa, myoglobin) and the position of the void volume.

TIFA の量を変えて加えた場合での TRAF6 と IRAK-1 との結合を調べたところ、TIFA が存在しない場合に比較して TIFA の適当量添加により顕著に両者の結合が増加した (Fig. 4B)。この結果は TIFA がシグナル伝達時に TRAF6 と IRAK-1 の相互作用を促進する可能性を示唆している。次にこのことが生理的条件下に *in vivo* で再現されるか否かを検討した。まず抗 TIFA 抗体をウサギで作

成し、内在性 TIFA が TIFA cDNA から発現するタンパク質と一致することを確認した。IL-1 刺激有無で内在性 TRAF6 と TIFA の結合を調べたところ両者の結合は刺激に依存せず恒常的であることが明らかとなった (Fig. 5A)。つぎに IRAK-1 と TIFA の結合を調べた。まず FLAG-TIFA を発現するレトロウイルスベクターをマウス胎児線維芽細胞に感染させた。この際 FLAG-TIFA の過剰発現

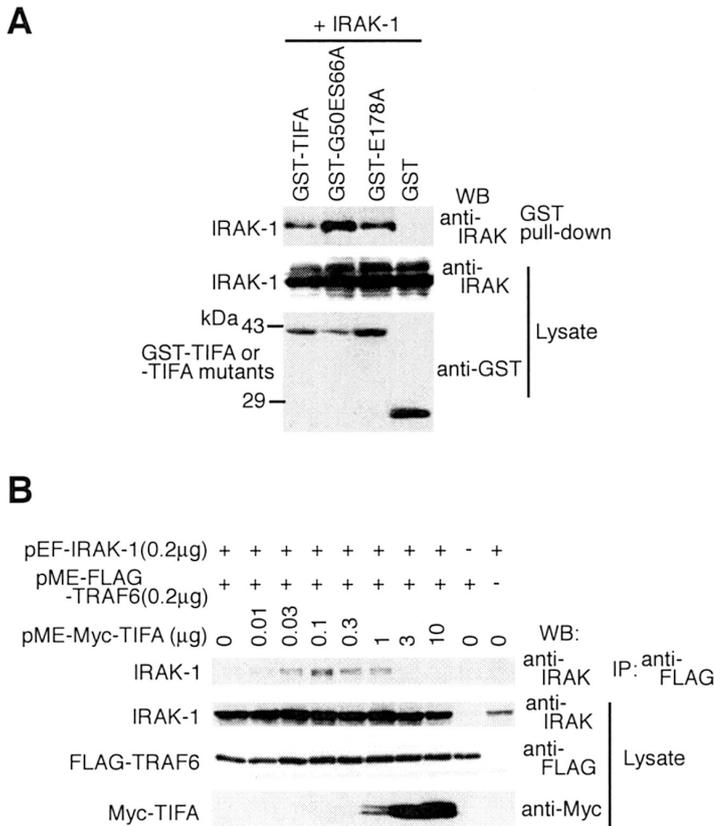


Figure 4 TIFA enhances the association of TRAF6 and IRAK-1. (A) Interaction of TIFA with IRAK-1. HEK293T cells were cotransfected with pME-GST-TIFA, pME-GST-TIFA mutant or pME-GST and pEF-IRAK-1. Thirty-six hours after transfection, cell lysates were subjected to GST pull-down assay. (B) TIFA links TRAF6 to IRAK-1. HEK293T cells were cotransfected with 0.2 μg of pME-FLAG-TRAF6 and/or pEF-IRAK-1 and increasing amounts of pME-Myc-TIFA. FLAG-TRAF6 was immunoprecipitated with anti-FLAG antibody.

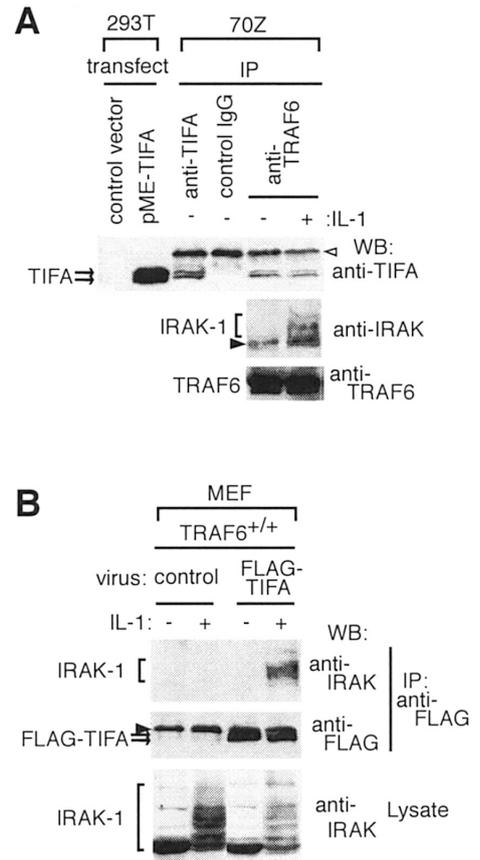


Figure 5 Interaction of TIFA with TRAF6 and IRAK-1 in vivo. (A) Interaction of TRAF6 with TIFA in 70Z pre-B cells. Lysates prepared from 70Z cells with (+) or without (-) IL-1 stimulation (20 ng/ml, 5 min) were immunoprecipitated with either anti-TIFA, control rabbit IgG or anti-TRAF6 antibody. Immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with anti-TIFA, anti-IRAK and anti-TRAF6 antibodies. Lysates prepared from HEK293T cells transfected with pME-TIFA or control vector were analyzed on identical gels. Open and solid arrowheads indicate the Ig light chain and non-specific bands, respectively. (B) IL-1 stimulation-dependent interaction of TIFA and IRAK-1 in MEF cells. Wild-type MEFs were infected with retrovirus expressing FLAG-TIFA or control virus. Both types of MEFs were unstimulated (-) or stimulated (+) with IL-1 (20 ng/ml, 5 min). Anti-FLAG antibody immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with anti-IRAK antibody. Solid arrowhead indicates Ig light chain. Lysates were also subjected to immunoblotting directly to analyze IRAK-1 expression.

を避けるためウイルス量を低く設定した。その結果内在性 FLAG-TIFA の発現は内在性 TIFA の約3倍であり、無刺激時の NF κ B や JNK の活性化も起こっておらず、FLAG-TIFA を内在性 TIFA と考えて実験を進めて良いと判断した。IL-1 刺激有無において TIFA を免疫沈降し共沈してくる IRAK-1 を調べたところ、両者は無刺激時には結合しておらず、刺激依存的に結合することが明らかとなった (Fig. 5B)。さらに TIFA と共沈する IRAK-1 がリン酸化 IRAK-1 であることから、IRAK-1 が刺激により受容体複合体にリクルートされた後に複合体から解離してきた IRAK-1 が TIFA と結合すると考えられた。IRAK-1 は IRAK-4 によりリン酸化されるとともに複合体から解離し TRAF6 と結合すると考えられている¹⁹⁾。

3.4 NF κ B 活性化における TIFA/IRAK-1/TRAF6 の位置関係

さらに NF κ B 活性化シグナルにおける TIFA/IRAK-1/TRAF6 の位置関係を確認するためドミナントネガティブ変異体 (DN) として機能する G50ES66A 変異体の NF κ B 活性化に与える影響を NF κ B-ルシフェラーゼリポータープラスミドを用いて行った。IL-1 受容体、TLR4 による NF κ B 活性化は TIFA-DN により抑制されたが TNF α による NF κ B 活性化には影響がなかった (Fig. 6A)。TNF α のシグナルには TRAF6 が関与しないことからこの結果は TIFA が TRAF6 特異的に働くことを強く示唆するものである。次に TRAF6 の上流で働く MyD88, IRAK-1 による NF κ B 活性化は抑制されたが、TRAF6 の下流で働く TAK1 による NF κ B 活性化は抑制されなかった (Fig. 6B)。これは「TIFA が IRAK-1 と TRAF6 の間で働く」という考えを指示するものである。ところが TRAF6 による NF κ B 活性化は TIFA-DN によりさらに活性化されてしまった (Fig. 6C)。これはおそらく TRAF6 がある程度活性化されていると TIFA-DN である G50ES66A 変異体でも TRAF6 結合能と自己集合能があるため TRAF6 をさらに活性化できると考えられる。従って、「TIFA が IRAK-1 と TRAF6 の間で働く」という考えに特に矛盾しないと考えられる。次に TIFA のよる NF κ B 活性化に他のシグナル伝達因子の DN がどのような影響を及ぼすかを解析した。MyD88-DN は何も影響を与えなかったが、TRAF6-DN, TAK1-DN, Ubc13-DN は TIFA のよる NF κ B 活性化を抑制した。また TIFA の上流と思われる IRAK-1 の DN も抑制した (Fig. 6D, E)。たとえ上流であっても TIFA の活性化に必要なプロセス (例えば 3 量体形成) を IRAK-1-DN が抑制することは考えられる。従っていずれの結果も「TIFA が IRAK-1 と TRAF6 の間で働く」という考えを指示するものである (Fig. 6C)。

4. 考察

これらの結果から IL-1 刺激において TRAF6 と結合してシグナル伝達に関与する分子 TIFA を同定できたと考える。また、IL-1 と同様に IRAK-1 や TRAF6 が関与する TLR シグナルにおいても TIFA が関与することが十分に考えられる。実際、TIFA-DN は TLR4 による NF κ B 活性化を抑制する。また、内在性 TIFA が恒常的に TRAF6 と結合していることから皮膚附属器形成に関与する EDAR, XEDAR, TROY などのシグナルに TIFA が関与する可能性も十分に考えられ現在解析中である。

毛包、汗腺及び皮脂腺などの皮膚から派生する皮膚附属器は、外胚葉由来の表皮の細胞と中胚葉由来の真皮との細胞とのシグナルの相互のやり取りによって形成される。近年、皮膚附属器形成に必須な細胞間や細胞内シグナル伝達に関わるタンパク質が同定されているが、その詳細な分子機構は今だ不明な点が多い。また発生学的な観点とは別に、臨床的にも、毛髪を喪失した患者、火傷などで皮膚を失った患者、あるいは遺伝的疾患で皮膚附属器に欠陥が存在する患者などにおいて皮膚附属器を再生することは、患者の日常生活の QOL (Quality of Life) を高める意味で重要である。前述のように皮膚附属器形成に TRAF6 を介するシグナルが必須である。また最近、毛包原基形成のかなり初期の段階で TNF 受容体ファミリーである EDAR \rightarrow TRAF6 シグナルが働いていることを見出した²⁰⁾。即ち表皮細胞における TRAF6 シグナルは皮膚附属器形成におけるキーポイントであり、TRAF6 の活性化を人工的に制御することにより皮膚附属器の人為的生成 (再生) を可能にすると考えられる。本研究から明らかになったように TIFA は TRAF6 の活性化因子と考えられしかもタンパク質としては分子量が小さい。従って、もし適当な方法で TIFA タンパク質を皮膚細胞内に導入できるならば毛包や汗腺の人為的な形成も可能になると考えられる。従来活性化型 β -catenin の発現による毛包形成が報告されているが、そのあとにそこから腫瘍が発生している。本申請では TRAF6 シグナルを適時 OFF にすることにより腫瘍発生の抑制を実現し得る可能性もあり、検討する価値が十分に存在すると考えられる。また、化粧品においては特に皮膚に悪影響を与えるものは避けなければならない。例えば、それが TIFA/TRAF6 経路を活性化してしまう作用があれば、毛包形成が起こり毛深くなってしまいう可能性も考えられる。従って、今後開発された化粧品について TIFA/TRAF6 経路に何らかの影響を与えないかチェックすることが必要かもしれない。

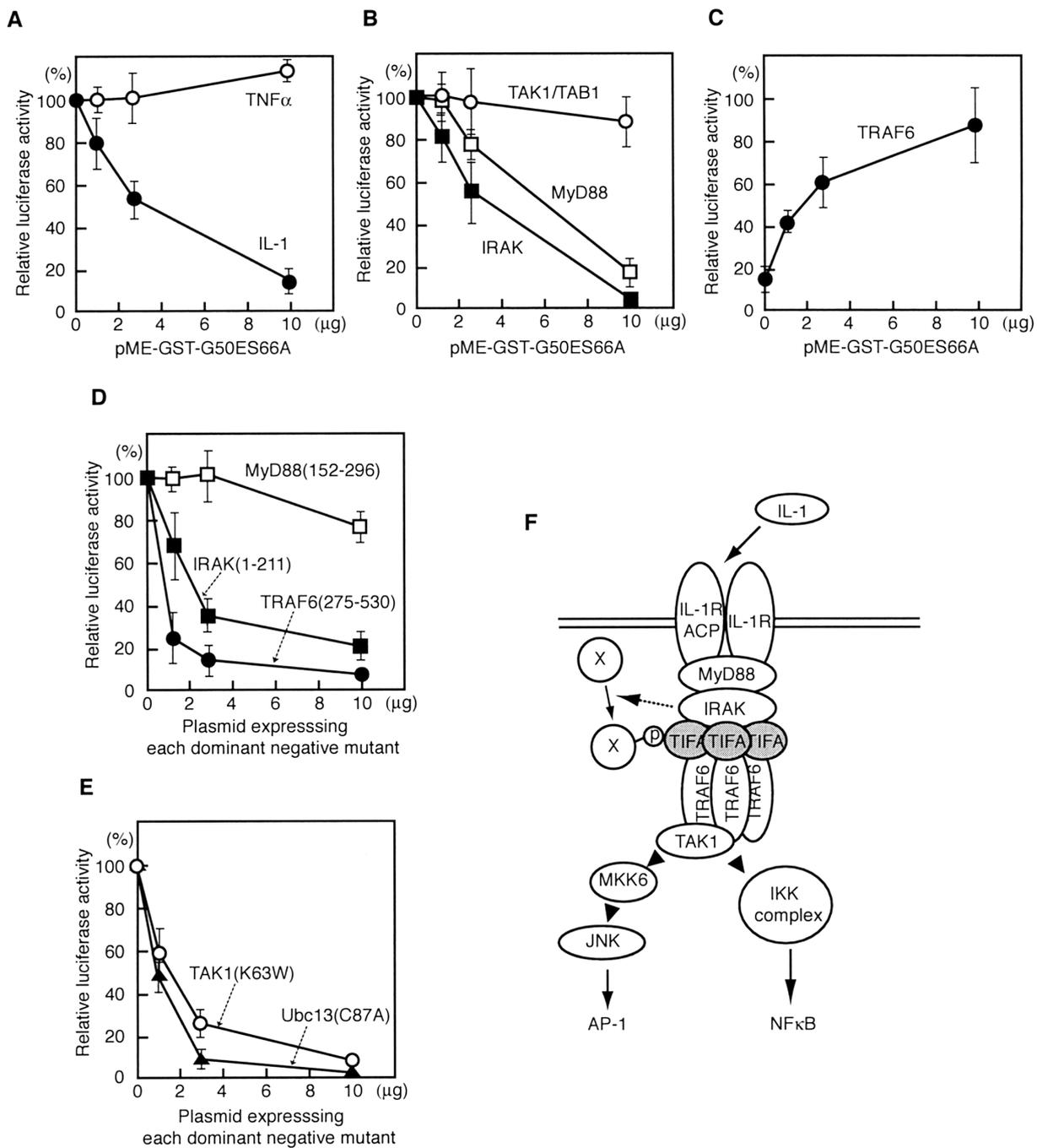


Figure 6 TIFA functions upstream of TRAF6 and downstream of IRAK-1. (A) HEK293T cells or HepG2 cells were transfected with 3xκB-luc and increasing amounts (0, 3 or 10 μg) of pME-GST-G50ES66A. Thirty hours after transfection, cells were either stimulated with TNFα(10 ng/ml, HEK293T) or IL-1 (20 ng/ml, HepG2) for 6 hr. (B, C) HEK293T cells were transfected with an expression plasmid encoding one of the NFκB activators including MyD88, IRAK-1, TAK1/TAB1 or TRAF6 in the presence of increasing amounts (0, 3 or 10 μg) of pME-GST-G50ES66A. (D, E) HEK293T cells were transfected with 0.1 μg of pME-TIFA in the absence or presence of expression vector encoding MyD88(152-296), IRAK-1(1-211), TRAF6(275-530), TAK1(K63W) or Ubc13(C87A). Thirty-six hours after transfection, luciferase activity was measured. Relative values in which the fold activation in the absence of each dominant-negative mutant was set to 100 (A, B, D, E) or in which the luciferase activity with reporter alone was set to 1 (C) are shown. Results shown are the mean ± sd of triplicate experiments and are representative of two independent experiments. (F) hypothesis of the TIFA-mediated signal pathways.

(引用文献)

- 1) Naito, A, Yoshida, H, Nishioka, E, et al., TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8766-8771, 2002.
- 2) Srivastava, AK, Pispas, J, Hartung, AJ, et al., The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 13069-13074, 1997.
- 3) Headon, DJ and Overbeek, PA, Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nat Genet*, 22, 370-374, 1999.
- 4) Headon, DJ, Emmal, SA, Ferguson, BM, et al., Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature*, 414, 913-916, 2001.
- 5) Yan, M, Wang, LC, Hymowitz, SG, et al., Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science*, 290, 523-527, 2000.
- 6) Kojima, T, Morikawa, Y, Copeland, NG, et al., TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *J Biol Chem*, 275, 20742-20747, 2000.
- 7) Hofmann, K and Bucher, P, The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem Sci*, 20, 347-349, 1995.
- 8) Takatsuna, H, Kato, H, Gohda, J, et al., Identification of TIFA as an adapter protein that links tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) to interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) in IL-1 receptor signaling. *J Biol Chem*, 278, 12144-12150, 2003.
- 9) Li, J, Lee, GI, Van Doren, SR, et al., The FHA domain mediates phosphoprotein interactions. *J Cell Sci*, 113, 4143-4149, 2000.
- 10) Sun, Z, Hsiao, J, Fay, DS, et al., Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science*, 281, 272-274, 1998.
- 11) Durocher, D, Henckel, J, Fersht, AR, et al., The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol Cell*, 4, 387-394, 1999.
- 12) Durocher, D, Taylor, IA, Sarbassova, D, et al., The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Mol Cell*, 6, 1169-1182, 2000.
- 13) Yaffe, MB and Cantley, LC, Signal transduction. Grabbing phosphoproteins. *Nature*, 402, 30-31, 1999.
- 14) Ye, H, Arron, JR, Lamothe, B, et al., Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature*, 418, 443-447, 2002.
- 15) Tsukamoto, N, Kobayashi, N, Azuma, S, et al., Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1234-1239, 1999.
- 16) Li, J, Smith, GP, and Walker, JC, Kinase interaction domain of kinase-associated protein phosphatase, a phosphoprotein-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7821-7826, 1999.
- 17) Wang, C, Deng, L, Hong, M, et al., TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, 412, 346-351, 2001.
- 18) Park, YC, Burkitt, V, Villa, AR, et al., Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature*, 398, 533-538, 1999.
- 19) Kobayashi, K, Hernandez, LD, Galan, JE, et al., IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 110, 191-202, 2002.
- 20) Nishioka, E, Tanaka, T, Yoshida, H, et al., Mucosal addressin cell adhesion molecule 1 plays an unexpected role in the development of mouse guard hair. *J Invest Dermatol*, 119, 632-638, 2002.

皮膚における生体リズムの分子機構

神戸大学大学院 医学系研究科脳科学講座分子脳科学分野

岡村 均

Most organisms living on earth have an internal clock and thus circadian rhythm represent a basic feature of life. In mammals, as in other many organisms, cellular circadian core oscillator is thought to be composed of an autoregulatory transcription-(post)translation-based feedback loop involving a set of clock genes. Although master clock of the body was localized in the suprachiasmatic nucleus of the brain, the molecular core clock oscillatory loop is known to exist in most of the cells in the body including skin. Here we investigated the expression of *mPer1* and *mPer2* genes in the skin, and found that skin keratinocytes and fibroblasts rhythmically expressed *mPer1* and *mPer2* genes. Clock signals were transmitted from the SCN to peripheral tissues through oscillation conducting systems, in which corticosterone and adrenergic signals may play the important part. Arrived clock signals entrain the cell-clock in the skin, and the intracellular oscillating loop coordinates the timing of the expression of a variety of genes with specific cellular function.

1. 緒言

体内時計（生物時計 biological clock）は24時間周期で自転する地球の環境変動に適応するため地球上の生命が獲得した基本的な生命原理である。この体内時計を司る、長らく囑望されていた哺乳類時計遺伝子 *clock*, *mPer1* が、我々を含む複数グループにより、1990年代後半に発見されたのをきっかけに、哺乳類リズム研究は全く新しい局面を迎え急速に仕事が進んでいる。

今回着目するのは、皮膚における時計遺伝子の発現である。時計遺伝子の発見とともに体内時計のある視交叉上核以外の皮膚を含む末梢臓器に時計遺伝子がリズムに発現することが注目された。今回、この分子メカニズムを解明する。この末梢臓器における時計機構の発見により、体内の24時間リズムは、視床下部の視交叉上核を頂点とし、他の神経系や内分泌系を中間とし、末梢臓器を底辺とする階層的時計機構により精妙に制御されていると想定されている。従来より、皮膚の代謝・血管・運動・立毛・発汗・細胞分裂像が日内リズムを呈する事は知られているが、体系的に検索はされていない。今回我々は、正常マウスにおける時計遺伝子の日内リズムを検索し、皮膚のサーカディアンリズムと活動の相関を検索した。

2. 実験

2.1 マウス皮膚における時計遺伝子の発現のサーカディアンリズム

時計遺伝子 *mPer1*, *mPer2* の皮膚における日周変動を、ノーザンプロットにて4時間毎、12時間明・12時間暗の明暗条件下で検索した。次に、これらの変化が、光刺激によるものか、内因性リズムによるものかを判別するため、恒常暗条件下で検索した。

2.2 マウス皮膚における時計遺伝子の発現のミクロ解析

哺乳類 *mPer2* 遺伝子の産物である mPER2 蛋白質に対する特異的抗血清を用いて、マウス皮膚における時計蛋白質発現のサーカディアンリズムを検索した。

2.3 時計遺伝子の転写制御機構

時計遺伝子の発振機構で注目されるのは、転写から行動まで、地球上の生物で共通する法則があることである。それは、時計遺伝子が転写・翻訳後産生された時計蛋白質が、自分自身の転写制御を抑制するというオートフィードバックループによる発振分子機構である。哺乳類では、コア振動体を構成する発振の中心となる振動子は、*mPer1* と *mPer2* の2つの遺伝子である。*mPer1*, *mPer2* の転写によって産生された *mPer1* mRNA, *mPer2* mRNA から、PER1 蛋白質、PER2 蛋白質ができる。これが、細胞質から核の中へ入って CRY 蛋白質と結合して、ポジティブ因子の転写を押さえる。これでループが閉じ、転写減少に続く PER1、PER2 蛋白質減少にともなう抑制効果の減少により、*mPer1*, *mPer2* 時計遺伝子の転写が再開される¹⁾。*mPer1* の5つの E-box (CACGTG, CACGTT) を介する転写制御を、bHLH-PAS 蛋白質である CLOCK と BMAL1、CRY1、



Molecular Mechanisms of Biological Clocks in the Skin

Hitoshi Okamura

Division of Molecular Brain Science,
Department of Brain Sciences, Kobe
University Graduate School of Medicine.

CRY2を用いて検索し、DBP結合部位(D-box: RTTAY-GTAAAY (R: purine, Y: pyrimidine))のPAR蛋白質群(HLF, TEF, DBP)と転写抑制因子であるE4BP4との結合解析を行った。

2.4 時計遺伝子の転写制御と時計蛋白質PER2の細胞内での時間的・空間的位置変化

時計遺伝子の単純なフィードバックループにさらに、蛋白質レベルの修飾が加わり、24時間リズムができると考えられる。まず初めは、リン酸化による分解制御である。まず、できたPER1, PER2蛋白質モノマーは、細胞質中に存在するcasein kinase Iε (CKIε)によりリン酸化され²⁾、リン酸化されたPER1, PER2は分解される。時計蛋白質PER1, PER2の分解に、ユビキチン・プロテアソームが関与しているかどうかを検索した。

2.5 視交叉上核の中核時計が末梢臓器の末梢時計に与える影響

視交叉上核では*mPer1*, *mPer2*を中心とする分子時計が昼をピークとする発現振動を起こし、これが全身のリズムを引き起こすと考えられている(図1)。1998年Schiblerのグループは*rat1*線維芽細胞系に血清刺激を加えると、

約24時間の時計遺伝子の振動が認められるという事実を発見した³⁾。このリズムは¹⁾、*mPer1* mRNA, *mPer2* mRNAとPER1蛋白質、PER2蛋白質の発現差異が4-8時間あること²⁾、*Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-}のダブルノックアウトマウスがリズム消失すること、*Cry1*^{-/-}が短周期を示すこと、*Cry2*^{-/-}が長周期を示すことなど、行動リズムと全く同じ変異を示した。行動リズムの性質は視交叉上核で完全に決定されるので、末梢臓器の時計も視交叉上核と同じ完全なサーカディアン時計があるといえる。

次に、この末梢時計が自律的なリズムを持つかどうか決定するため、視交叉上核を電気凝固の方法で破壊した後の、末梢臓器の末梢時計の時計遺伝子の発現リズムを経時的に免疫組織化学とノーザンブロットにて検索した。

3. 結果

3.1 マウス皮膚における時計遺伝子の発現のサーカディアンリズム

時計遺伝子*mPer1*, *mPer2*の皮膚における日周変動を、ノーザンブロットにて4時間毎、12時間明・12時間暗の明暗条件下で検索すると、著明な昼夜差が認められた。次に、これらの変化が、光刺激によるものか、内因性リズムによるものかを判別するため、恒常暗条件下で検索しても、

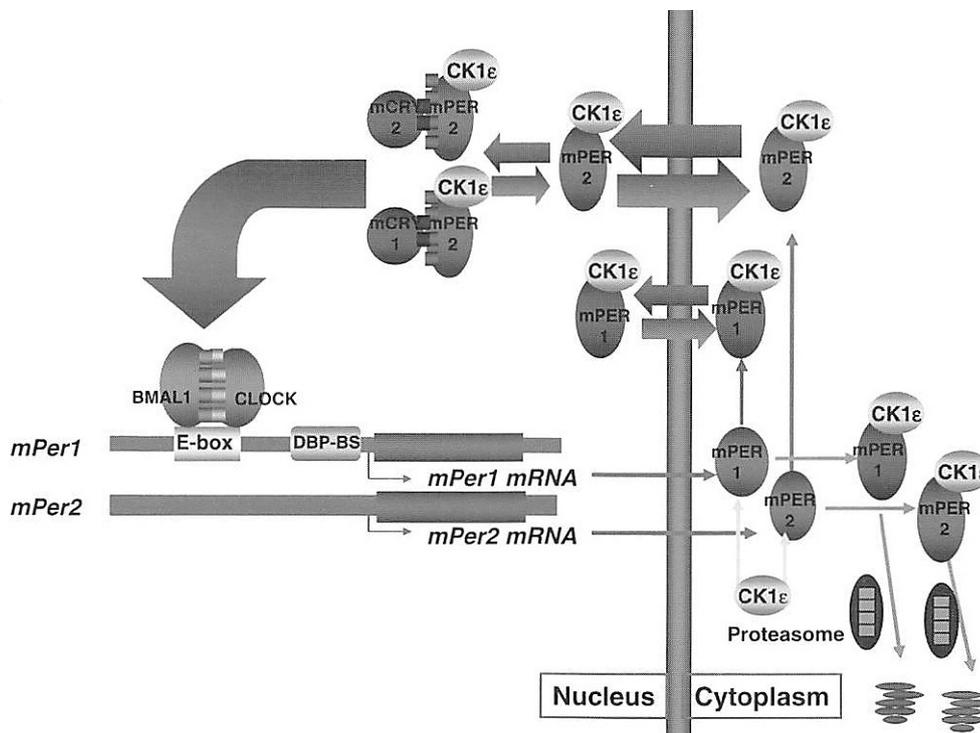


図1 哺乳類における時計のコア・ループ

時計遺伝子群のE-boxにCLOCK/BMAL1のヘテロ二量体が結合し、*mPer1*, *mPer2*転写を促進する。*mPER1*, *mPER2*はカゼインキナーゼIε (CKIε)によるリン酸化を受けた後分解されるため、蓄積するのに時間がかかる。核・細胞質にはシャトリング機構があり、これもPER2の核内移行に時間がかからせる原因である。核内では、PER2, CRY1, CRY2抑制性の複合体がCLOCK/BMAL1による転写の活性化を解除し、自分自身(時計遺伝子群)の転写を抑制することによりループが取れる。この繰り返しが約24時間の周期を作り出す。

著明な昼夜差が認められた (図2)。この結果は、皮膚にも内因性リズムが存在すること、時計のコア・ループによる発振が行われていることを示唆する。

3.2 マウス皮膚における時計遺伝子の発現のミクロ的解析

哺乳類時計遺伝子の中でリズム発振に最も重要な遺伝子と目される *mPer2* 遺伝子の産物である mPER2 蛋白質に対する特異的抗血清を用いて、皮膚におけるサーカディアンリズムを検索した。ケラチノサイトに時計遺伝子が体内時計の夜の時間に強く発現していることを見出した。これは、上記のノーザンブロットの結果とよく一致して、転写の増大は、時計蛋白質の増大を引き起こすことを示している。

3.3 時計遺伝子の転写制御機構

mPer1, *mPer2* の転写は、bHLH-PAS 蛋白質である CLOCK と BMAL1 のヘテロダイマーが *mPer1*, *mPer2* のプロモーターの E-box にポジティブ因子として結合して促進される (図1)。また *mPer1* プロモーターには、転写促進因子である PAR 蛋白質群 (HLF, TEF, DBP) と転写抑制因子である E4BP4 があり、D-box での競合制御が重要である。PAR 蛋白質は昼間に発現し転写を促進するが、E4BP4 は夜に発現し、転写を抑制した⁴⁾。

3.4 時計遺伝子の転写制御と時計蛋白質 PER2 の細胞内での時間的・空間的位置変化

PER1, PER2 の蛋白質分解は、MG132 で抑制され、MG132 で処理した PER2 はユビキチン化されていた。従って、PER2 分解にはユビキチン・プロテアソームが関与していると想定される⁵⁾。従って、転写のはじめの段階では、RNA はできても、蛋白質は次々に分解されて、いっこうに貯まらないという状態が続く (図3)。ところが、*mPer1*, *mPer2* の転写は刻々と増大し、PER1, PER2 蛋白質もたくさんできてくると、CKIε は一日中一定であるので、蛋白質をリン酸化し分解しきれない状態となる。リン酸化が時計ループの周期を決定する重要な過程であることはヒトでも示されている。最近米国の家系調査により、PER2 のリン酸化の障害を示す家系が、体内時計の周期が短いことで、時計遺伝子の転写フィードバックループの存在とリン酸化反応の重要性が劇的に証明された⁶⁾。

分解されなかった PER1 と PER2 は、PER3 等とダイマー形成し、自身の NLS (nuclear localization signal) を利用して、核内に移行する。ここで、第二の抑制遅延機構が存在する。それは、PER2 蛋白質内の NES (nuclear export sequence) による制御であり、核内から細胞外に PER2 蛋白質は排出される。このシャトリングは mPER2 (1-916) GFP を発現する NIH3T3 細胞と Hela 細胞の細胞融合系で

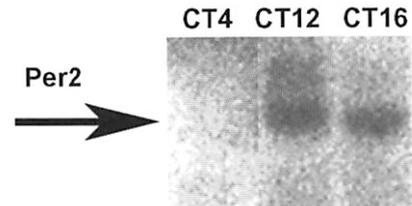


図2 皮膚の mPer2 mRNA 発現の昼夜差
恒常暗条件で、CT4 (体内時計の朝)、CT12 (体内時計の夕刻)、CT16 (体内時計の夜半) の時期での皮膚 mPer2 mRNA のノーザンブロットによる検出。

証明した⁵⁾。この NLS-NES によるシャトリング機構により PER1, PER2 蛋白質の核内濃度は調節される。

この核—細胞質間の平衡状態を打ち破るのが、核蛋白質 CRY1, CRY2 である。CRY1, CRY2 の核内出現は厳密に時間によりコントロールされているが、これが核内に多量になると、PER2 と結合し、安定な PER2-CRY1 及び PER2-CRY2 複合体を形成し、これがポジティブ因子に結合して引き剥がし、Per1, Per2 の転写を阻害する。これで時計発振のフィードバックループが閉じると考えられる。この PER2, CRY1, CRY2 による抑制を解除するのが、ユビキチン・プロテアソームによる分解である。この抑制因子の分解により、転写は再開される。

3.5 視交叉上核の中核時計が末梢臓器の末梢時計に与える影響

全身のマスター時計は脳の視交叉上核にある。最近我々は、Per1 プロモーター・ルシフェラーゼ (*mPer1-luc*) を導入したトランスジェニックマウスを開発し、細胞組織レベルで mPer1 の転写発現を可視化することで長時間リアルタイムで観察することに成功した^{7, 8)}。この *mPer1-luc* から取った視交叉上核のスライス培養系を極微弱光検出冷却 CCD カメラにて観察することにより、細胞一個一個のリズムを観察することが可能となった⁸⁾。この結果、驚くべきことに、視交叉上核の一つ一つは独立した細胞時計であり、各々のリズム位相は微妙に違い、最大では 10 時間ものピーク位相の格差が存在する。お互いの細胞時計は連絡しており、全体は絶妙なハーモニーを奏でて視交叉上核の強力な振動を生み出すことが明らかとなった。このような検出システムは、細胞内の遺伝子振動がいかにしてトータルとしての脳・生体機能である行動にまで至るかを解析する有力な実験系として、今後末梢組織のサーカディアンリズムの研究に広く用いられて行くであろう。

末梢組織では、血管平滑筋の時計遺伝子が非常に大きい振幅を持って振動すること⁹⁾、線維芽細胞でもペプチド刺激により時計遺伝子の 24 時間周期のリズムが数周期惹起された¹⁰⁾。従来リズム発振機能が全く無いとされてきた

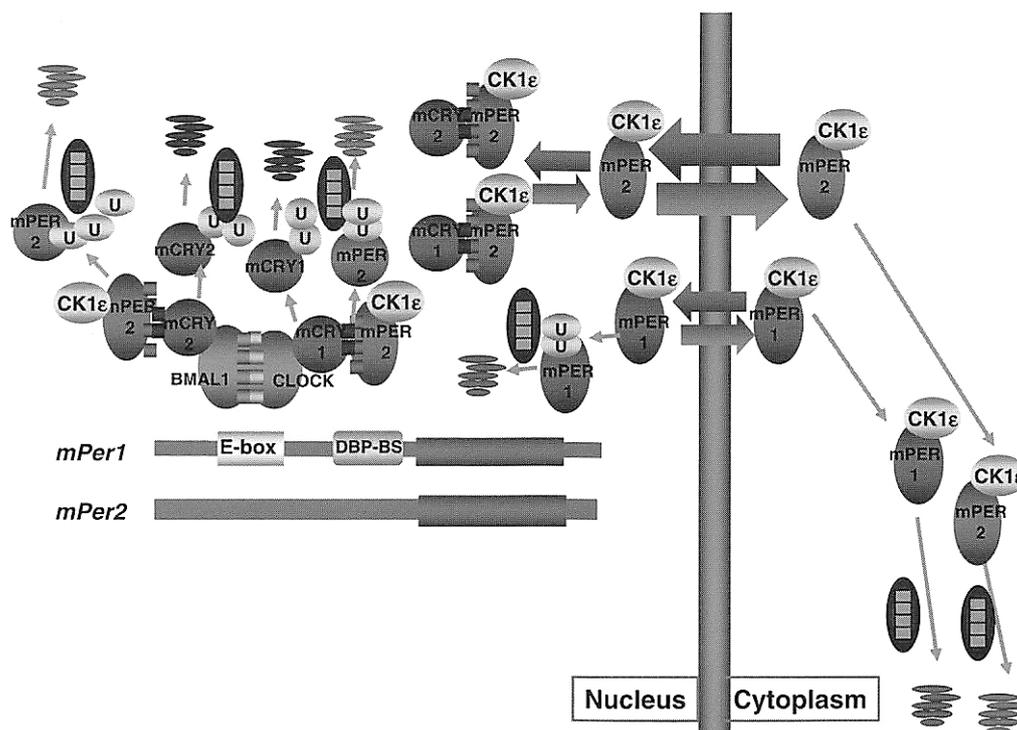


図3 哺乳類におけるコア・ループを構成する時計蛋白質の分解
 コア・ループの抑制機構を司る PER1, PER2, CRY1, CRY2 はユビキチン化されプロテアソームにより分解され、再びフリーとなった CLOCK/BMAL1 が E-box に再結合し、転写が再開する。

肝臓や胃腸などの末梢臓器にも、食餌に同調する、基本的な時計発振機構が備わっている¹¹⁾。では、視交叉上核と同様、末梢臓器の時計は自律発振能を持っているのだろうか？最近、リズム異常の線維芽細胞を正常の個体に移植してこの線維芽細胞の時計遺伝子発現を検索すると、正常のリズムを示すことがわかった¹²⁾。これは、末梢臓器の時計は自律振動能が弱く、中枢時計の支配下にあることを示している。今回、視交叉上核を破壊したマウスでは、末梢臓器のリズムは消失していた。

4. 考察

皮膚における発汗、皮膚血流、表皮細胞分裂など、さまざまな皮膚組織で起こる現象に概日リズムがあることがわかっているが、その詳細は未だ検索されていない。前記したように、この数年間で生体リズムの分子機構が次々に解明されつつあり、時計遺伝子の発振シグナルが、コレステロール合成酵素、アルブミン産生、各種ミトコンドリア酵素など生体機能のベーシックな遺伝子の転写をコントロールすることが知られている。

皮膚組織は、ケラチノサイトを中心とした表皮、線維芽細胞が主たる真皮、血管・神経の豊富な疎な結合組織である皮下組織よりなる。今回の検索で皮膚組織もサーカディアン振動体を持つことがわかった。細胞内のコア振動体は

細胞時計として働き、さまざまな細胞内プロセスに時刻シグナルを伝達する。時計シグナルにより転写レベルで制御されている遺伝子を被時計制御遺伝子 clock controlled genes (ccg) と総称しているが、この ccg が想定されているよりはるかに多く、少なくとも数百の遺伝子にのぼることは、最近のジーンチップ解析から明らかとなった¹³⁾。このコア・ループのシグナルが、これら遺伝子のリズムを引き起こす最初の機序は、やはり BMAL/CLOCK の E-box への結合だと考えられている。

CLOCK/BMAL1 ヘテロダイマーは vasopressin, dbp など多くの遺伝子が持つプロモーターの部位にある E-box に結合し、転写を増大させる。また、先ほど述べた、転写促進因子である PAR 蛋白質群 (HLF, TEF, DBP) と転写抑制因子である E4BP4 との DBP-bs での競合制御も重要である。PAR 蛋白質は昼間に発現し転写を促進するが、E4BP4 は夜に発現し、転写を抑制する⁴⁾。これにより、アルブミン、cholesterol 7 α hydroxylase、ドーパ脱炭酸酵素などの遺伝子が転写制御されると考えられる。夜に発現する多くの遺伝子は抑制性の転写因子 RevErba α によって引き起こされる。

多細胞生物において、非常に分化した多種類の細胞に時計機能が存在することは、その細胞に特殊化した機能にリズムがあることが想定される。ケラチノサイトにおいて

も各種酵素の発現の日内リズムはあるであろう。エネルギー代謝、膜蛋白の機能、さらに細胞周期のコントロールなど多くの必須の細胞機能に時計シグナルは利用されていると考えられる。

皮膚の細胞種のうち、どれがもっとも時計遺伝子の発振がなされているのかは、非常に重要な問題である。この解明により、皮膚の粘性、湿潤など、時間特異的な化粧品が開発が可能になるかもしれない。また、細胞増殖の時期やその制御因子がわかれば、紫外線などによる皮膚の障害に「時間特異的に」防護できる新しい方法が可能になるのかもしれない。リズム遺伝子が高いときは効率的な代謝変動になり、リズム遺伝子が低いときは非効率となる。したがって、時計遺伝子の転写変動が滞ると、代謝が低下し、細胞ダメージが増大する。従って、ストレスなどによるリズムの乱れが、代謝の滞りを引き起こし、細胞障害を急速に増大する可能性が高い。これを防止する化粧品の開発が可能かもしれない。

(文 献)

- 1) Okamura H, Yamaguchi S and Yagita K.: Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res.*, 309: 47-56, 2002.
- 2) Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, et al.: Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*, 288, 483-492, 2000.
- 3) Balsalobre A, Damiola F, Schibler U.: A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93, 929-937, 1998.
- 4) Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, et al.: Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Develop.* 15, 995-1006, 2001.
- 5) Yagita K, Tamanini F, Yasuda M et al.: Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY dependent inhibition of ubiquitination of the mPER2 clock protein. *EMBO J.*, 21, 1301-1314, 2002.
- 6) Toh KL, Jones CR, He Y, et al.: An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, 291, 1040-1043, 2001.
- 7) Asai M, Yamaguchi S, Isejima H, et al.: Visualization of mPer1 transcription in vitro by luciferase mediated bioluminescence: NMDA induces a rapid phase-shift of mPer1 gene in cultured SCN. *Curr. Biol.*, 11, 1524-1527, 2001.
- 8) Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, et al.: Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science*, 302, 1408-1412, 2003.
- 9) Nonaka, H., Emoto N., Ikeda K., et al.: Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 104, 1746-1748, 2001.
- 10) Yagita K, Tamanini F, van der Horst GTJ, et al.: Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*, 292, 278-292, 2001.
- 11) Hara R, Wan K, Wakamatsu H, et al.: Restricted feeding entrains circadian clock in the mouse liver without participation of suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*, 6, 269-278, 2001.
- 12) Pando MP, Morse D, Cermakian N, et al.: Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell*, 110, 107-117, 2002.
- 13) Panda S, Antoch MP, Miller BH, et al.: Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109, 307-320, 2002.

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

和歌山県立医科大学 皮膚科

古川 福実、山本 有紀

Chemical peeling is one of dermatological treatments for certain cutaneous diseases or conditions or aesthetic improvement; it consists of the application of one or more chemical exfoliating agents to the skin. Recently in Japan, chemical peeling has been very popular in medical as well as aesthetic treatment. Because the scientific background and an adequate approach are not completely understood or established, medical and social problems have been reported. To address these issues, we evaluated the chemical peeling agents such as phenol and trichloroacetic acid (TCA). The studies of human skins revealed that topical treatment of phenol induced deeper degeneration of the skin than that of 40-60% TCA. Under the careful monitoring and examinations, such agents had little damages to the skins. In addition, when compared with standard surgical therapy and some of non-invasive therapies, the chemical peeling therapy by phenol and TCA have several advantages such as easy procedures, non time-wasting, no requirements of special equipments, easy control of pain and easy post-treatment follow-up. Phenol and/or TCA peeling will be a new tool for the aged patients with skin tumors, although the careful follow-up will be needed to determine the ratio of recurrence and appropriate intervals of peeling.

1. 緒言

ケミカルピーリングは、いわゆる、しみ、しわ、色素沈着、にきびなどに広く用いられている美容皮膚科の標準的な手技である(表1)。皮膚科医、形成外科医、美容関係の医師によって、年々普及している。その基本は、創傷治癒機転による皮膚の再生が主なものであり、皮膚科学に立脚した施術がなされなければならない。美容的な側面のみが注目されるためか、ケミカルピーリングが安易に行われる傾向にある。このような観点から、日本皮膚科学会ケミカルピーリングに関するガイドラインが作成された¹⁾。しかし、その評価や皮膚科学に立脚した学問的裏付けは未だ十分でなく多くの解決すべき問題が存在する。

ケミカルピーリングは、皮膚(肌)の性状によって、その効果は全く異なってくる。振り返って、日本人の皮膚による発表を調べるに、研究成果に見るべきものはほとんどない。多くが、欧米の知見をそのまま採用しているに過ぎない。一方、マウスを用いた研究は、サリチル酸のヘアレスマウス皮膚への影響に関する優れた論文がUedaらによって発表されている²⁾。また、培養細胞を用いた検討も、グリコール酸に関し国内外から幾つか論文が発表されている³⁾。しかし、ヒト皮膚に関する長期的あるいは短期的観察の報告は、とりわけトリクロロ酢酸(trichloroacetic acid: TCA)とフェノールに関しては、信頼すべきものが

表1 ケミカルピーリング適応疾患+状態

高い適応のある疾患
ざ瘡
適応のある疾患
毛孔性苔癬
炎症後色素沈着
日光性色素斑
肝斑
雀卵斑
適応の可能性を検討すべき疾患、状態
脂漏性角化症
日光角化症
魚鱗癬
疣贅
伝染性軟属腫
アクトコルドン
稗粒腫
しわ
脂漏
その他

(日本皮膚科学会
ケミカルピーリングガイドライン2001より)

無いのが現状である。また、2002年の日本皮膚科学会では、マウスを用いた実験からケミカルピーリングに類用されるTCAの発癌性が指摘された⁴⁾。

われわれは、2年半前より、さまざまな理由で手術できない患者の治療方法のひとつとして、TCAやフェノールを用いたケミカルピーリングを行っている⁵⁾。このような経緯の中でヒト皮膚を用いた研究も行ってきたので、その一部を紹介する。

2. 実験と結果

組織学的検討

ケミカルピーリングに用いられる試薬は、表2の如くである⁶⁾。この中で、しばしば用いられるのがグリコール酸、サリチル酸、TCA、フェノール等である。これらの試薬がどのようにヒト皮膚に組織障害を与えるかは、十分には



Studies on the safety of agents for chemical peeling

Fukumi Furukawa, Yuki Yamamoto

Department of Dermatology, Wakayama Medical University

*

表2 ケミカルピーリングの使用薬剤例

α-ヒドロキシ酸
グリコール酸
乳酸
トリクロロ酢酸 trichloroacetic acid (TCA)
サリチル酸
エタノール基剤
マクログール基剤
ジェスナー液
レチノイン酸
ジェスナー液 + TCA
グリコール酸 + TCA
サリチル酸 + TCA
ベーカーゴードン液
フェノール

(日本皮膚科学会
ケミカルピーリングガイドライン2004より)

表3 剥離深度と使用薬剤例

レベル I, II
20~30%グリコール酸
20~30%サリチル酸
ジェスナー液
10~20%TCA
レベル I, II, III
50~70%グリコール酸
35~50%TCA
レベル III, IV
ベーカーゴードン液
フェノール (濃度88%以上)

(日本皮膚科学会
ケミカルピーリングガイドライン2004より)

分かってはいない。グリコール酸はレベル I、TCA、フェノールは主にレベル II、IIIの深達度の組織障害をしめす(表3)。なお、実験方法の詳細は、原著に譲る⁷⁻⁹⁾。本研究は本学の倫理委員会で承認されている。

グリコール酸

ピーリングに一番よく使われているグリコール酸には、①急性バリア障害と②グリコール酸自体の作用がある。①は表皮角化細胞に IL-1 α 、表皮基底層の分裂、表皮肥厚、真皮肥厚やコラーゲンの増生、ヒアルロン酸の増生、角層のヒアルロン酸の増生を促す。②は線維芽細胞への直接作用があり、チロシナーゼの活性を抑制する。塗布に際しては、濃度、pH、塗布時間、塗布方法、塗布量、患者の皮膚の状態や部位がキーポイントとなる。塗布時間、塗布方法、塗布量は個人の技量、経験に大きく依存する。また、濃度についても、ウェイト/ウェイト (W/W) とウェイト/ボリューム (W/V) の二つの表記法があり、例えば濃度表示が同じでも塗布される試薬の絶対量は濃度が大きくなるにつれてその差異が大きくなる。

図1は50%グリコール酸によるヒト皮膚の組織傷害である。pH0.9とpH2.5の試薬による、1分、5分、10分後の所見を示している(左pH0.9、右pH2.5)。pH2.5の1分後、pH0.9の1、5、10分後で、角層の配列の乱れが観察される。その角層の変化は、HE所見では反映されない表皮細胞の変性、あるいは当然その次に起こるサイトカインの変化を示唆する。

真皮(例えば5分後)では、pH0.9はpH2.5に比べ、真皮中層までに多数のapoptosisのマーカーであるTUNEL陽性細胞を誘導することも分かっている。

TCAとフェノール

2日目と7日目の、TCA40%・60%とフェノールで起こった肉眼的変化を図2に示す。塗布後2日目の組織では、コントロールの液体窒素に比較して、表皮の変成が著明で、

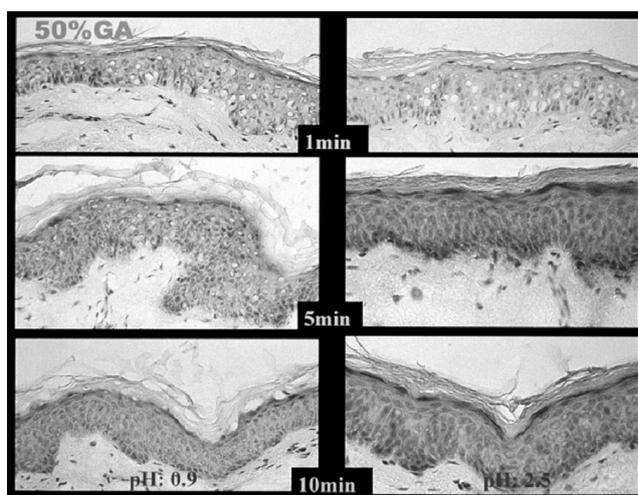


図1 グリコール酸塗布後の皮膚の組織学的変化 (HE染色) 成人上腕内側の健常皮膚に塗布。グリコール酸は50%とし、塗布1, 5, 10分後に生検。左はpH0.9、右はpH2.5に調整した試薬による変化を示した。

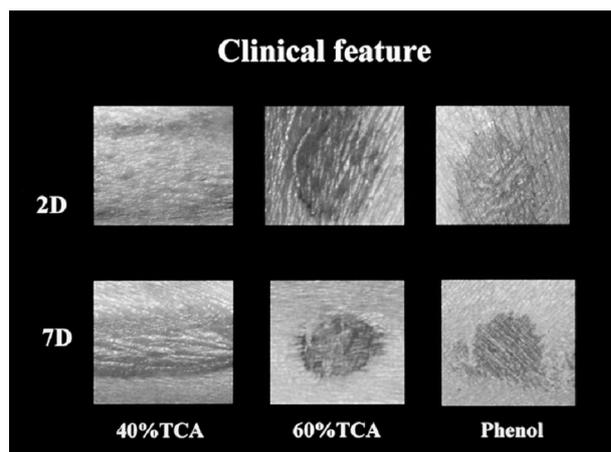


図2 TCA、フェノール塗布後2日、7日後の臨床像 成人上腕内側の健常皮膚に塗布。

特に真皮の血管内皮細胞の変性がフェノールで目立つ(図3)。7日目(図3)になると、液体窒素や40%のTCAでは、表皮の再生性の変化が観察されるが、60%TCAやフェノールでは真皮の変成が主体となっている。

TUNEL法で真皮の血管内皮細胞をみると、フェノール

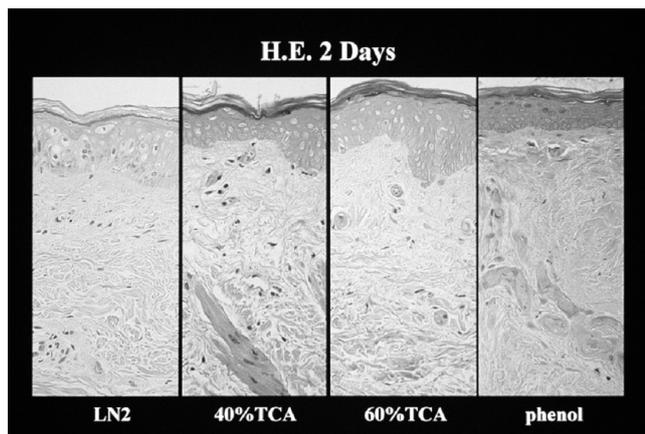


図3 液体窒素、TCA、フェノール塗布後2日後のHE組織像

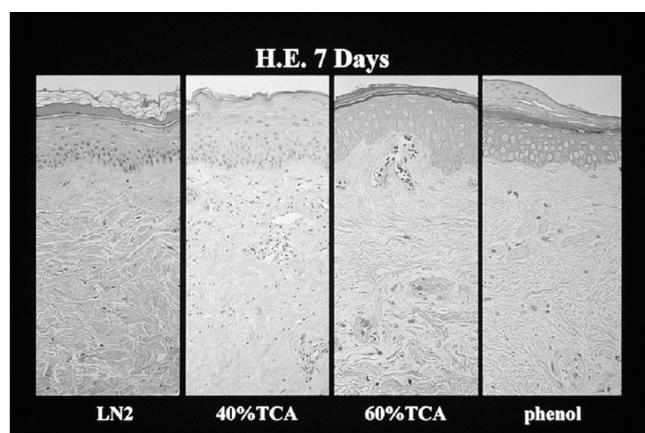


図4 液体窒素、TCA、フェノール塗布後7日後のHE組織像

はTCAに比べて、早期にかつ深部に変性をもたらしている。このような真皮での変化は血管内皮のみならず beta-1 integrin や tenascin などの細胞接着分子の発現の変化を誘導する^{7,8)}。さらに、再生性変化が表皮に及んだ場合、P-cadherin がユニークな発現を示すことも判明している⁹⁾。

TCAの組織障害は経時的に表皮から真皮へと変成していくが、フェノールは真皮の血管内皮細胞が表皮の変化に先行して変性が誘導される。この変性の違いが、何故生じるのかは不明であるが、下記に述べる腫瘍へのケミカルピーリング療法の基礎的背景として重要である。

腫瘍へのケミカルピーリング療法の概要

1) 対象疾患

2001年1月より2003年4月までに、当科で治療を行ったのは計42人(男性21人、女性21人)で、平均年齢は78歳であった。日光角化症が16例と最も多く、ボーエン病11例、表在性基底細胞癌10例等となっている。この患者数は、同じ期間に同じ対象疾患で受信した患者(183名)の23%を占める(表4)。尚、この治療は、本学の倫理委員会の許可を得ている。

表4 ケミカルピーリングによる皮膚腫瘍患者内視
—和歌山県立医科大学皮膚科外来—

	Male	Female	Mean age
Actinic keratosis (47)	7	9	76
BCC (61)	5*	5*	73
Trichoepithelioma (3)	0	1	76
Bowen's disease (28)	6	5	84
genital Paget's disease (12)	3	0	88
SCC (32)	0	1	80
Total (183)	21	21	78

(): Number of cases who visited our clinic from January 2001 to April 2003.
34 of 42 cases were evaluated in Table 2 and 8 cases are now under therapy.
* : superficial type

表5 ケミカルピーリング (TCA とフェノール) による皮膚腫瘍への効果

	No. of treated cases	No. of CR cases (Mean times of topical treatment)	No. of PR cases	No. of NC cases
Actinic keratosis	16	15 (3.7)	1	0
BCC	7	6 (8.0)	1	0
Trichoepithelioma	1	1 (6)	0	0
Bowen's disease	6	5 (7)	0	1
genital Paget's disease	3	1 (3)	1	1
SCC	1	1 (4)	0	0
total	34	29	3	2

2) 方法

主に無水フェノールを用いているが、多量に使用した場合に心毒性や腎毒性があるため、広範囲に治療が必要な場合や表皮が薄いため浸透率が高いと推測される部位に対しては、40%や60% TCAを使用している。TCA液は蒸留水100mlにトリクロロ酢酸40gあるいは、60gを溶解したものである。

皮膚腫瘍に対するケミカルピーリングの試薬としては、前述した組織学的検索からフェノールが最も有効であると考えている。部位により綿球、綿棒、爪楊枝などを用い、単純塗布を原法としているが、症例により重ね塗り等の工夫をしている。

3) 結果

表4に示した症例の内、少なくとも1年以上の経過を観察し得た34例のうち、CR(complete remission)を認めた患者数とその平均塗布回数を示した(表5)。日光角化症、表在性基底細胞癌、ボーエン病では良好な成績を示している。平均塗布回数は、疾患によって異なり、表在性基底細胞癌、ボーエン病では7回以上の塗布が必要であった。し

かし、それぞれの疾患で組織学的に毛包に及んだり腫瘍病変が深い場合はPR (partial remission) やNC (no change) が少数みられた。日光角化症では組織学的な異型性の程度も治療効果を予想するうえで重要で、最近、初診時の臨床像と生検像より TCA による非観血的治療での根治が可能と考えたが、結局根治に到らなかった日光角化症を経験した¹⁰⁾。

3. 考 察

フェノールや TCA による治療は簡便であり、治療に伴う疼痛も、患者や治療部位にもよるが許容範囲内である。また、凝固壊死となるために自宅での処置も不必要で、患者の日常の生活に支障をきたさない。手技的に熟練した場合は、特に癬痕を伴うようなざ瘡に対しても極めて有効性が高い。従って、日常診療で用いられる濃度・頻度で、なおかつ皮膚の病態に精通している皮膚科専門医クラスの医師の管理下で施術されれば、安全性並びに有効性は高いと判断される。

TCA はマウスの紫外線発癌の実験系で興味深い作用を有する¹¹⁾。即ち、コントロール (非塗布) に比べると皮膚腫瘍の発生は抑制されるが、塗布部と非塗布部の境界領域にあっては、一見すると腫瘍発生が増加したような変化が生じる。その機序は不明であるが、ヒト皮膚に TCA を塗布すると細胞増生のマーカーである PCNA が表皮に増加する。従って、TCA を塗布した場合、特に塗布回数が多い患者においては慎重な長期観察が必要である。

フェノールや TCA によるケミカルピーリングは、それぞれの試薬の浸透性に特徴があり、それらを踏まえて適正に使用すれば、安全性にも優れ、臨床的応用範囲が広いと判断された。

(文 献)

- 1) 古川福実、松永佳世子、上田節子、菊地克子、戸佐真弓、船坂陽子、宮崎隆夫、藤沢有紀、山本有紀、飯塚一、伊藤雅章、片山一郎、川島 真、塩原哲夫、島田真路、中川秀巳、橋本公二、橋本 隆、古江増隆 (日本皮膚科学会ケミカルピーリングに関する検討委員会) : 日本皮膚科学会ケミカルピーリングガイドライン 2001、日本皮膚科学会雑誌 111 : 2081-2085, 2001
- 2) Dainichi T, Ueda S, Isoda M, Koga T, Kinukawa N, Nose Y, Ishii K, Amano S, Horii I, Furue M : Chemical peeling with salicylic acid in polyethylene glycol vehicle suppresses skin tumour development in hairless mice. *Br J Dermatol.* 148:906-912, 2003.
- 3) Funasaka Y, Sato H, Usuki A, Ohashi A, Kotoya H, Miyamoto K, Hillebrand GG, Ichihashi M: The efficacy of glycolic acid for treating wrinkles: analysis using newly developed facial imaging systems equipped with fluorescent illumination. *J Dermatol Sci.* 27 Suppl 1:S53-59,2001.
- 4) 上田説子、磯田美登里、大日輝紀、古賀哲也、古江増隆 : TCA ピーリングへの警告、日本皮膚科学会雑誌 112 : 68、2002 (抄録)
- 5) 山本有紀 : ケミカルピーリング、皮膚腫瘍、皮膚臨床 44 : 42 ; 1219 - 1223, 2002
- 6) 古川 福実、松永佳世子、伊藤正俊、上田 説子、菊地 克子、戸佐 真弓、船坂 陽子、宮崎 孝夫、久野 有紀、山本 有紀、岸岡亜紀子、北島康雄、古江増隆 : 日本皮膚科学会ケミカルピーリングガイドライン 2004、日本皮膚科学会雑誌 (印刷中)
- 7) Yamamoto Y, Uede K, Ueda M, Furukawa F: Characterization of monoclonal anti-human skin basal cell antibody 3B4-6 and its reactivity to the skin peeled with phenol or trichloroacetic acid (TCA). *Aesthet Dermatol* 12: 70-76
- 8) Yamamoto Y, Uede K, Yonei N, Kaminaka C, Furukawa F: Expression of tenascin and human α_1 -1 integrin in the skin peeled with phenol or trichloroacetic acid. *Aesthet Dermatol* 13: 17-24, 2003
- 9) Yamamoto Y, Uede K, Ohtani T, Wakita W, Furukawa F: P-cadherin expression in skin peeled with phenol or trichloroacetic acid (TCA). *J Dermatol* 30: 920-923, 2003
- 10) 山本有紀、岸岡亜紀子、浜野理佐、古川福実 : トリクロロ酢酸治療に抵抗性であった日光角化症の 1 例、日本美容皮膚科学会雑誌 13: 180-184, 2003
- 11) Dainichi T, Koga T, Furue M, Ueda S, Isoda M: Paradoxical effect of trichloroacetic acid (TCA) on ultraviolet B-induced skin tumor formation. *J Dermatol Sci* 2003; 31:229-231

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

筑波大学 応用生物化学系

柳 澤 純

In the somatic cells of humans, the telomere repeats have been proposed to provide each cell with a counting mechanism that helps prevent the unlimited proliferation of wayward cells in adult tissues. According to this idea, somatic cells are born with a full complement of telomeric repeats; however, the telomerase enzyme, hTERT, is turned off in a tissue like the skin, so that each time a cell divides, it loses 50-100 nucleotides from each of its telomeres. After many cell generations, the descendant cells will inherit defective chromosomes and consequently will withdraw permanently from the cell cycle and cease dividing—a process called replicative cell senescence. In theory, such a mechanism could provide a safeguard against the uncontrolled cell proliferation of abnormal cells in somatic tissues.

The idea that telomere length acts as a “measuring stick” to count cell division and thereby regulate the cell’s life time has been tested in several ways. For certain types of human cells grown in tissue culture, the experimental results support the theory. However, the molecular mechanism of replicative cell senescence remains unknown. To investigate this process, we tried to identify new genes, those are involved in the process of replicative cell senescence by the method using ribozyme library. In addition, we examined the transcriptional regulation of hTERT, a human telomerase enzyme. hTERT expression is regulated by the methylation status of its promoter region. To express the TERT, the promoter region should be hypermethylated. In contrast, in somatic cells, the promoter region of TERT is hypomethylated to inhibit the expression of TERT gene. Therefore, we tried to examine the regulation mechanism for DNA methylation and demethylation.

1. 緒 言

ヒト正常体細胞を培養すると無限には分裂できず、分列可能回数には限界がある。これを体細胞の有限分裂寿命、または発見者の名をとって Hayflick の分裂限界と呼んでいる。“細胞の老化”とはこの分裂限界に近づくその過程のことをいい、ヒトでは細胞分裂回数が 50～70 回と決まった範囲内で停止する。この分裂寿命は細胞自身の持つテロメア短縮という現象と関連が深いことが明らかになっている。

テロメアとは染色体の両末端に存在する部分で 6 塩基 (–TAAGGG–) の反復配列からなる 12kbp (ヒト) の塩基配列からなる。DNA 複製の際に約 50～150bp ずつ短縮していき、テロメアサイズが 5000bp に近づくと増殖停止機能を持つ CDK inhibitor 遺伝子ファミリーなどの遺伝子群の発現が上昇することにより、細胞増殖を停止する。

このようにテロメア短縮、それに伴う CDK inhibitor 遺伝子ファミリーの発現と細胞の分裂停止には相関関係があると推測されるが、その分子機構については未だ不明のままである。本研究では未だ明らかにされていない細胞老化の分子機構の解明を目的とし、老化を規定する新規の因子の同定を試みる。老化に伴い細胞増殖が抑制されることか

ら細胞増殖抑制を制御する因子が細胞の老化に関与していることが示唆される。増殖抑制に関わる因子の多くは癌抑制因子として知られており、p53 や p21 のように老化関連因子・癌抑制因子両方の因子として機能しているものも知られている。そこで新規癌抑制遺伝子を探索するとともにこれらの遺伝子と老化との関連を解析する。

テロメアの長さは、テロメラーゼ (hTERT) と呼ばれる酵素によって調節を受けている。HTERT は germ cell と stem cell において発現が認められ、normal somatic cell では発現が見られない。HTERT 遺伝子の normal somatic cell での発現は、テロメアの伸長による細胞の不死化とそれに引き続く癌化を引き起こす可能性がある。したがって、TERT 遺伝子の発現調節は極めて厳密に行なわれなくてはならない。近年、hTERT 遺伝子の発現調節に TERT 遺伝子プロモーター上の DNA メチル化状態が関与することが報告された。ゲノム DNA の CpG シトシンのメチル化修飾は哺乳類や植物などで広く認められる。DNA のメチル化修飾は遺伝子発現を調節するエピジェネティクス機構の一つとして知られており、遺伝子の転写抑制やヘテロクロマチン形成を介して、初期発生や分化・X 染色体の不活性化・インプリンティングなど様々な生命現象に関わっていると考えられている。また、多くの腫瘍でメチル化異常は癌抑制遺伝子を不活性化したり、ゲノムの不安定化を助長することが知られている。ゲノムのメチル化シトシンは脱アミノ反応で値チミンに変化しやすく、この結果生じた T-G ミスマッチが修復されないと、様々な疾患を引き起こす。

現在、DNA メチル化はメチル化維持活性をもつ Dnmt1 と de novo メチル化活性をもつ Dnmt3a および Dnmt3b に



Molecular cloning of novel genes involved in the aging

Jun Yanagisawa

Institute of Applied Biochemistry,
Tsukuba University

よって調節されていると考えられている。一方、DNA 脱メチル化はその現象は捕らえられているものの、制御機構についてはほとんど明らかになっていないが、受動的脱メチル化と能動的脱メチル化機構があると考えられている。受動的脱メチル化とは、DNA 複製後の新規の DNA 鎖にメチル化がおこらずに維持されることである。能動的脱メチル化とは、複製に依存せずに酵素などの働きによってメチル基が外れることである。

また、メチル化 DNA に特異的に結合するタンパクの存在も明らかになった。現在、MeCP2・MBD1・MBD2・MBD3・MBD4 の 5 種類が知られており、主に DNA メチル化とヒストンの修飾やクロマチンとの相互作用を仲介している。MBD4 は T-G ミスマッチに対するグリコシラーゼ活性をもち、その他は転写抑制に働くと考えられている。そして、これらメチル化 DNA 結合タンパクの異常が遺伝病や腫瘍で認められている。

このように、DNA メチル化脱メチル化がさまざまな生命現象に関わり、また、疾患の原因にもなりうることが明らかになってきた。しかしながら、どのようにして DNA メチル化パターンが決定し維持され、そして解除されるかという DNA メチル化の時間的空間的制御ネットワークの分子基盤はほとんど解明されていない。そこで我々は hTERT 遺伝子の DNA メチル化・脱メチル化による転写制御機構を明らかにするため、DNA 脱メチル化に関する因子の取得と、脱メチル化機構の解明を目的とし研究を行なった。

2. 実験

2.1 リボゾームライブラリーを用いた老化遺伝子・癌抑制遺伝子のスクリーニング

上記のように、老化遺伝子は、癌抑制遺伝子としての性質を併せ持つ可能性が高い。そこでリボザイムライブラリーを用い、癌抑制遺伝子のスクリーニングを試みた。リボザイムライブラリーとは、酵素 RNA で特異的 mRNA にアニールし触媒活性により mRNA を破壊するリボザイムの集合である。癌抑制因子 mRNA が破壊されると細胞は癌化し、足場依存性が低くなるため、軟寒天培地中での増殖が可能になる。そこでランダムに基質 mRNA を破壊するリボザイムライブラリーを正常細胞に導入し、癌抑制因子 mRNA の破壊された細胞株について、軟寒天培地中での増殖を指標にクリーニングすることを試みた。

2.2 hTERT 遺伝子プロモーター上の脱メチル化機構の解明

前述したように hTERT 遺伝子プロモーターはメチル化・脱メチル化によってその活性の制御が行なわれている。HTERT の発現は、プロモーターの hypermethylation で促進し、逆に hypomethylation で抑制される。DNA のメ

チル化・脱メチル化は、シトシン残基に起こり、hTERT のみならず、多くのプロモーター活性を制御し、転写の活性化・不活化において重要な役割を担っているものと考えられているが、その分子機構についてはほとんど明らかになっていないのが現状である。そこで、今回はとくに不明な点が多い DNA の脱メチル化機構に焦点をあて、その解析を行なうこととし、まず、DNA 脱メチル化が認められる細胞株を探索することとした。

2.2.1 ヒト IL-2 遺伝子の刺激による脱メチル化誘導

2003 年 3 月にマウス T リンパ球では IL-2 遺伝子プロモーターが刺激により脱メチル化し、IL-2 の分泌が高まると報告された。(nature immunology, 4,235,2003) この脱メチル化反応は 20min で生じ、複製に関わらず脱メチル化することも明らかとなった。そこで、我々は T リンパ球系の細胞株である Jurkat 細胞を用いて、脱メチル化が誘導されるか否か検討した。Jurkat 細胞株に PMA (Phorbol-12-Myristate-13-acetate) 20ng/ml および Ca-ionophore1_M 処理を 24hr 行い、RT-PCR にて IL-2mRNA の発現誘導を検討し、さらに、Bisulfite を用いてメチル化状態を検討した。

2.2.2 マウス APRT 遺伝子の in vivo, in vitro assay を用いた脱メチル化誘導

Cedar らは teratocarcinoma 由来の F9 細胞内で、APRT 遺伝子の脱メチル化が誘導されることを報告した。彼等は plasmid に CpG を含む APRT 遺伝子上流の 25Kb をサブクローニングし、それを F9 細胞に transfection することによって、脱メチル化が誘導されること (nature 371,435,1994)、また、F9 細胞の細胞抽出液と APRT 遺伝子上流のメチル化 DNA fragment とを反応させることによって、脱メチル化されることを明らかにした (Cell, 86, 709, 1996)。そこで、彼らのデータの再現性を調べるため、同様の実験を行なった。

2.2.3 TAT 遺伝子のグルココルチコイドによる脱メチル化誘導

Tyrosine aminotransferase (TAT) 遺伝子は肝臓特異的に発現している。肝細胞において、この遺伝子上流約 24Kb 付近の 4 つの CpG は脱メチル化していることが知られている。一方、発現していない組織では TAT 遺伝子上流の CpG はメチル化していることが報告されている。また、肝細胞ではグルココルチコイドによりこの領域の脱メチル化を誘導できると報告されている。そこで、まず、Bisulfite を用いて実際にグルココルチコイド (Dexamethasone) で、脱メチル化が誘導されるかどうかの検討を行なった。Dex 10^{-7} M で 24 時間処理した後、Bisulfite sequence を行なった。次に、TAT 遺伝子の Dex による脱メチル化反応が複製に関わっているかどうかを検討した。ミモシン mimosine という

G1 期での細胞周期停止薬で処理して、複製を止めた状態で、Dex 処理を行った。なお、mimosine の効果は細胞内への BrdU の取込みの有無で確認した。あらかじめ mimosine 0.5mM で 12 時間処理した細胞に、Dex 10^{-7} M を加え、さらに 12 時間処理した。その後、bisulfite にてメチル化状態を検討した。

① Dexamethasone (dex) による TAT 遺伝子発現誘導

肝細胞に合成グルココルチコイドである dexamethasone (Dex) [10^{-7} M] 処理を 24 時間行い、TAT 遺伝子の上流 -2.5kb 付近の CpG に脱メチル化誘導をかけた。同時に細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行い、dex による Tat 遺伝子発現を確認した。

② TAT 遺伝子プロモーターのメチル化確認

Bisulfite sequencing PCR (DNA の CpG ジヌクレオチドのシトシンをチミンへ化学変化させる方法。メチル化シトシンはチミンに変化しないので、シーケンスによりメチル化を確認できる。) 肝細胞のゲノム DNA を Sodium bisulfite で処理し特定の部分 (図 1 参照) をクローニングし、シーケンスを行った。

③ 細胞周期を同調させた場合の脱メチル化確認

細胞を Mimosine [0.5mM] 処理を 12 時間行い、細胞周期を G1 終盤に同調させて、続いて dex [10^{-7} M] 処理を 12 時間行った。その後、Bisulfite sequencing 法を用いて、メチル化状況を調べた。なお、肝細胞の同調は、BrdU の取り込みにより確認した。

3. 結果と考察

3.1 リボゾームライブラリーを用いた老化遺伝子・癌抑制遺伝子のスクリーニング

軟寒天培地中での増殖を見るため、メチルセルロース濃度 1.8% で癌細胞 (HeLa)、正常細胞 (NIH3T3) をそれぞれ培養した。その結果、HeLa 細胞は癌化しコロニーを形成したが NIH 3 T3 細胞も増殖してしまった。そこで、NIH 3 T3 細胞が増殖を示さない至的培地条件の検討をメチルセルロース濃度を変えて行った。(図)

その結果、NIH 3 T3 細胞はメチルセルロース濃度 2.0% 以降増殖を示さなくなった。一方、HeLa 細胞は 3.0% 以降コロニー形成率が半分ほどに落ち込んだ。これは、メチルセルロースが細胞増殖に悪影響を与えたためと考えられた。

これらの結果から、メチルセルロース濃度を 2.4% とし、リボザイムライブラリーをレトロウイルスを用いて NIH3t3 に感染させスクリーニングを行なった。3 回の独立したスクリーニングを行なったが、足場非依存的増殖を示すクローンが得られなかった。良好な結果が得られない原因として、リボザイムライブラリーの品質とリボザイムによるターゲットの切断効率の低さが考えられるため、今後改良を加え続行をする予定である。

3.2 hTERT 遺伝子プロモーター上の脱メチル化機構の解明

3.2.1 ヒト IL-2 遺伝子の刺激による脱メチル化誘導

Jurkat 細胞では刺激処理によって IL-2 遺伝子の発現が確認されたが、DNA のメチル化については刺激により誘導されておらず、刺激処理前よりすでに脱メチル化されていることが明らかになった。この細胞株は T 細胞系由来のものであり、すでに分化が終了しているものと考えられる、したがって、刺激前より CpG は脱メチル化状態であったと考えられる。この細胞を使って、脱メチル化酵素の精製は行えないと判断した。また、in vitro の脱メチル化活性測定系を用いて、Jurkat 細胞の細胞抽出液中の脱メチル化活性を測定したが、測定可能な脱メチル化活性は Jurkat 細胞抽出液中には存在しないことが明らかとなった。

3.2.2 APRT 遺伝子の in vivo, in vitro assay を用いた脱メチル化誘導

Cedar らとまったく同じ実験系を用いて teratocarcinoma 由来の F9 細胞内で、APRT 遺伝子の脱メチル化が誘導されるか否かを検討した。plasmid に CpG を含む APRT 遺伝子上流の 2.5Kb をサブクローニングし、それを F9 細胞に transfection することによって、脱メチル化が誘導されること、また、F9 細胞の細胞抽出液と APRT 遺伝子上流のメチル化 DNA fragment とを反応させることによって、脱メチル化されることを同様の実験系を用いて確認した。しかしながら、実際に Bisulfite PCR を行い sequence を調べてみると、脱メチル化は誘導されていなかった。以上の結果から、Cedar らの Nature と Cell は実験操作の問題で脱メチル化が誘導されたように見えただけであるとの結論に至った。F9 細胞内で脱メチル化が起こるという報告は、実験操作上のアーティファクトであり、事実ではない。

3.2.3 TAT 遺伝子のグルココルチコイドによる脱メチル化誘導

肝細胞の TAT 遺伝子は、dex 処理によって遺伝子発現が強く誘導されることを RT-PCR で確認した。次に TAT 遺伝子プロモーターのメチル化状態をみるため、Bisulfite sequencing PCR を行った。その結果、CpG 3-5 では dex 処理前は 65% メチル化していたが、処理後メチル化は 4% へと減少した。このことから、dex 処理によって TAT 遺伝子プロモーターの脱メチル化が誘導されることが明らかとなった (Fig. 1 A)。そこで、この脱メチル化が複製依存的かどうかをみるために、細胞周期の同調を施し、dex 処理による脱メチル化誘導を行った。その結果、CpG 3-5 では dex 処理により、脱メチル化が誘導された。このことから、脱メチル化が複製依存的ではなく、積極的な機構によることが証明された (Fig. 1 B)。

一方、GREs より上流の部分の CpG 1,2 については、dex 処理により特に脱メチル化されることはなかった (細胞周期の同調を行った場合も、同様の結果が得られた) (Fig.1 A,B)。Dex 刺激により、GREs の上流で脱メチル化されず、下流で脱メチル化する理由としては、次に示すように様々なものが考えられる。第一に、CpG 1,2 は CpG 3-5 よりも GREs から離れているために、脱メチル化され

にくいという可能性がある。第二に、GRE の上流のクロマチン構造が密になっているために、クロマチンのリモデリングが起こりにくく、脱メチル化機構が抑えられている可能性がある。今後、本系を用いて脱メチル化の分子機構の解析を行い、hTERT 遺伝子制御機構の解明へとつなげたいと考えている。

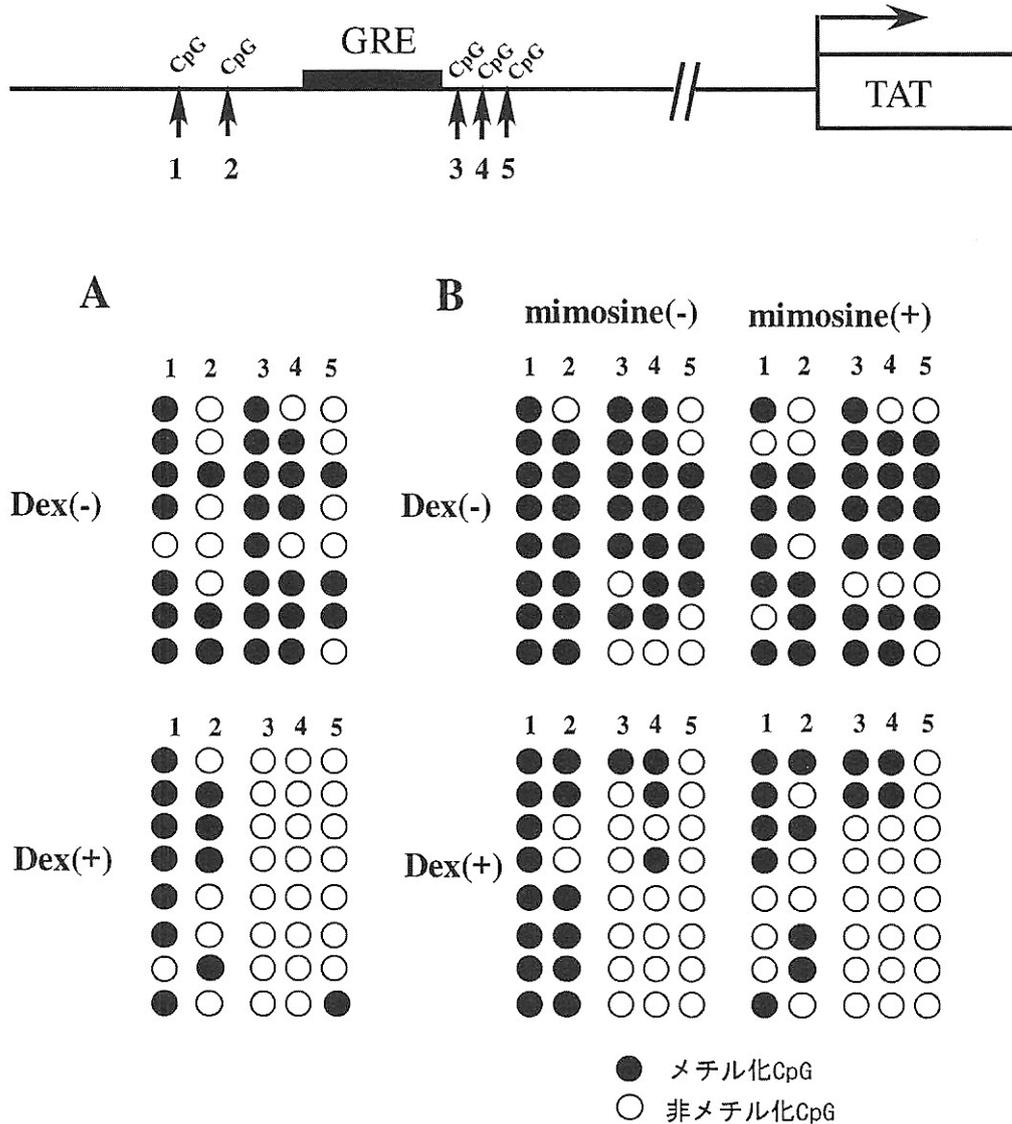


Fig. 1 TAT 遺伝子のグルココルチコイドによる脱メチル化誘導
 A. TAT 遺伝子プロモーターの dexamethasone による脱メチル化誘導
 H4IIE 細胞をグルココルチコイドの合成リガンドである dexamethasone (10^{-7} M) で処理し、24 時間後、Bisulfite sequencing 法でメチル化状態について検討した。
 B. 複製非依的な脱メチル化誘導
 G1 期への細胞周期同調剤である mimosine (0.5mM) を 12 時間処理後、dexamethasone (10^{-7} M) で 12 時間処理し、Bisulfite sequencing 法でメチル化状態について検討した。

コラーゲン経口摂取が結合組織（骨、皮膚）におよぼす作用

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 インプラント・口腔再生医学分野*、株式会社ニッピ バイオマトリックス研究所**

春日井 昇平*、小山 洋一**

Gelatin or gelatin peptide are called "collagen" and "collagen" is a nutritional supplement, which is believed to exert cosmetic effect and to promote health. However, these effects of collagen intake have not been clarified. In the present study, effects of collagen intake on connective tissues were examined. In the first experiment, forty female students in their twenties were divided into two groups. One group was given a drink containing 10g collagen (porcine gelatin peptide) per day whereas another group was given a drink without collagen. At eight weeks, in the collagen intake group, water sorption-desorption test with Skicon-200EX on the skin of the upper arm revealed that the ability to keep water in the skin increased slightly but significantly, compared to the one of the same group at the beginning of the experiment. However, bone mineral density of the heel and bone metabolic markers (bone-type alkaline phosphatase, osteocalcin, Ca, pyridinolin and deoxypyridinolin) were not affected. In the second experiment, the lower incisors of male Wistar rats (13 weeks) were extracted and divided into 5 groups. Each group was given one of the four different powder foods (14% casein; 6% casein + 8% collagen; 10% casein; 6% casein + 4% collagen) or solid food (14% casein). At 4 weeks measurement of bone mineral density of the extracted region of the mandible with a dual-energy X-ray absorptiometry demonstrated no significant difference between the groups. In the third experiment, 5 mm incisions were made on the back skins of Hairless male mice (6 weeks). The animals were divided into 3 groups and each group was given one of the three different foods: 8% casein; 4% casein + 4% collagen; 14% casein. At 7 days and 13 days, tensile strength test of the incised skin did not show any difference between the groups. Conclusively, collagen intake increased skin moisture slightly; however, it did not affect bone metabolism and healing process of bone and skin lesions.

1. 緒言

健康や美容に対する関心が高まり、多種多様な健康補助食品（サプリメント）が市場に登場している。そのようなサプリメントの一つに「コラーゲン」がある。ゼラチンおよびその分解産物であるゼラチンペプチドは、「コラーゲン」という名称で健康食品に幅広く利用されている。結合組織の最大の構成要素であるコラーゲンには、美容と健康に有効な作用があると言われている。コラーゲンを含有する化粧品の皮膚に対する保湿作用は明らかである。しかし、サプリメントとしてコラーゲンを経口摂取した場合においても、皮膚や骨の結合組織に対して有効な作用が表われるかについては科学的には検証されていない。

コラーゲンを経口摂取した場合の作用として、骨関節炎の症状を緩和する作用¹⁾、毛髪を太くする作用²⁾、ツメの状態を改善する作用³⁾、指の血流量を増加させる作用⁴⁾、胃潰瘍を予防する作用や血圧下降作用⁵⁾等が報告されている。また、最近我々はコラーゲンをマウスに摂取させると骨量が増加することを観察した⁶⁾。さらに、一部の国においては外科手術後の治癒促進を期待して、患者にコラー

ゲンを経口摂取させることが行われているようである。したがって、コラーゲンの経口摂取が皮膚や骨の結合組織に対して何らかの作用を示す可能性が考えられる。本研究の目的はコラーゲンの経口摂取が結合組織（骨、皮膚）に及ぼす作用を実験的に検証することである。

2. 実験

2.1 コラーゲンの経口摂取がヒトの皮膚と骨に及ぼす作用

コラーゲン（ゼラチンペプチド、ブタ由来、分子量3,000-5,000）10gを含む100mlのドリンクを作成し茶色のガラスビンに密封した。試験開始前に健康状態に問題の無い20代の女性40名（本学歯学部学生ボランティア）の踵の骨密度を骨密度測定装置（UXA-300、アロカ社）により測定し、2群に分けた。一群にはコラーゲンを含むドリンクを、他群は対照群としてコラーゲンを含まないドリンクを一日一本任意の時間に経口摂取させた。本試験においては、被験者がコラーゲンを摂取しているか否かについては知らせず、また測定者も被験者がどちらの群に属するかが判らない二重盲検法をおこなった。

実験開始時、4週後、8週後に、表皮角層の水分量をSkicon-200EX（アイ・ビー・エス社）で電気伝導度（ μS ）として測定した。測定は高橋の方法⁷⁾に順じておこない、角層水分量、角層吸水能、水分保持能を得た。被験者を室温23-26℃、湿度40-45%の環境に20分間順化させた後、左上腕内側の電気伝導度を10回測定し、数値が安定する後半5回の測定の平均値を「角層水分量」の測定値とした。



Effect of Collagen Ingestion on Connective Tissues (Bone and Skin)

Shouhei Kasugai¹, Yoichi Koyama²

Tokyo Medical and Dental University¹,
Nippi Research Institute of Biomatrix²

次にこの測定部位に 200 μ l の水を滴下し、10 秒後に濾紙で拭き取り電気伝導度を測定しこの値を「角層吸水能」とした。その後、30 秒毎に 3 分後まで電気伝導度を測定しこれらの値を「水分保持能」とした。

実験開始時、4 週後、8 週後に、血液中の骨型アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性とカルシウム (Ca)、オステオカルシン (Oc)、尿中のピリジノリン (PYR)、デオキシピリジノリン (DPYR) 量を測定した。また、8 週後に踵の骨密度を測定した。

2.2 コラーゲン摂取が抜歯後の治癒過程に及ぼす作用

13 週齢の雄性 Wistar ラットを使用した。エーテル麻酔下で 3 日毎に 3 回下顎右側切歯の歯肉から上に露出した部分を歯科用の切削器具を使用した削除した。最後に歯を削除して 3 日後に切歯を抜去した。その後経時的にラットを屠殺し、下顎骨を摘出し中性ホルマリンに浸漬固定した。下顎骨を軟 X 線撮影装置 (SPO-M50; Sofron 社) を用いて撮影し、抜歯した部位 (図 1) の骨密度を二重エネルギー X 線吸収法 (DCS-600R, アロカ社) を用いて測定した。

次に上記と同様に下顎右側切歯を抜歯したラットに、AIN-93M (OYC 改変 AIN-93 精製飼料、オリエンタル酵母工業株式会社) を基本にして成分を表 1 に示すように改変した粉餌を与えて飼育した。コラーゲンとして株式会社ニッピ製のコラーゲンペプチド (タイプ PRA、ウシ皮由来、酵素分解されており分子量 4000 ~ 5000)、カゼインとしては AIN-93M に添加されているものを使用した。抜歯して 4 週後に屠殺し、下顎骨を摘出し中性ホルマリンに浸漬固定し、軟 X 線撮影をおこない抜歯した部位の骨塩量測定をおこなった。

2.3 コラーゲン摂取が皮膚の創傷治癒に及ぼす作用

6 週齢 Hairless mouse (HR-1) を使用した。ネンプタール麻酔下で背部に、体軸に平行に左右対称に 5 mm の切開創を作成し、ナイロン糸を用いて 1 糸縫合をおこなった。

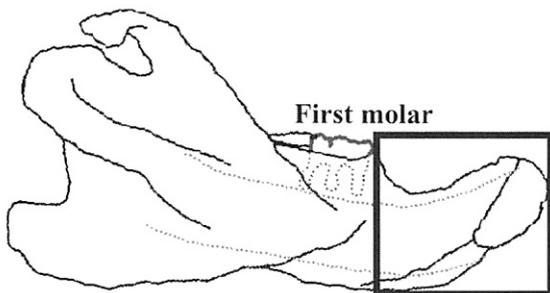


図 1 骨量を測定した部位

ラット下顎切歯を抜去して 1 ヶ月後に、臼歯前方の四角で囲った抜歯した部位の骨量を測定した。

その後経時的にマウスを屠殺し、創部を中央に含むように約 10 mm 長さに背部皮膚を切り取った。創部を中央にして皮膚の両端を 5 mm 離して引っ張り試験機に固定し、1 分間に 5 mm の速度で引っ張り、創部破断時の力を測定した。

6 週齢の Hairless mouse を 3 群に分け、表 2 に示した 3 種類の異なる飼料を与え 6 週間飼育した。本来 AIN-93M はミルクカゼインを 14% 含んでおり、今回調整した飼料のタンパクの不足分はコーンスターチを加え補正した。上記と同様にマウスの背部に切開創を作成し縫合し、切開創を作成して 7 日後と 13 日後に屠殺し、同様に創部の破断時に必要な力を測定した。さらに、大腿骨を摘出して二重エネルギー X 線吸収法を用いて骨密度を測定した。

3. 結果

3.1 コラーゲンの経口摂取がヒトの皮膚と骨に及ぼす作用

表皮角層の水分量は、皮膚の電気伝導度によって表わすことができる。皮膚の電気伝導度の測定結果を図 2 に示した。図 2 のグラフにおいて、角層水分量は一番左側の点、角層吸水能は左から二番目の点、水分保持能は左から三番目以降の点によって示される。

角層水分量は、コラーゲン摂取群と対照群のいずれにおいても、実験開始時に比較して 4 週後と 8 週後において有意に増加していた ($p < 0.05$, paired t-test)。しかし、実験開始時、4 週後、8 週後の 3 時点において、角層水分量はコラーゲン摂取群と対照群の間で有意な差はみとめられなかった (unpaired t-test)。

角層吸水能は、実験開始時、4 週後、8 週後の 3 時点において、コラーゲン摂取群と対照群の間で有意な差はみとめられなかった (unpaired t-test)。統計的に有意な差ではないが、角層吸水能は 4 週後と 8 週後においてコラーゲン摂取群が対照群に比較して上昇していた。コラーゲン摂取群の角層吸水量は、実験開始時に比較して 8 週後において有意に増加していた ($p < 0.05$, paired t-test)。一方対照

表 1 抜歯後の治癒実験に使用した餌の成分

Group	餌の成分	
A	AIN-93M (粉末)	14% カゼイン
B	AIN-93M (粉末) を改変	6% カゼイン + 8% コラーゲン
C	AIN-93M (粉末) を改変	10% カゼイン
D	AIN-93M (粉末) を改変	6% カゼイン + 4% コラーゲン
E	AFM (通常固形飼料)	14% カゼイン

表 2 皮膚の創傷治癒実験に使用した餌の成分

Group	餌の成分	
A	AIN-93M (固形飼料) を改変	8% カゼイン
B	AIN-93M (固形飼料) を改変	4% カゼイン + 4% コラーゲン
C	AFM (通常固形飼料)	14% カゼイン

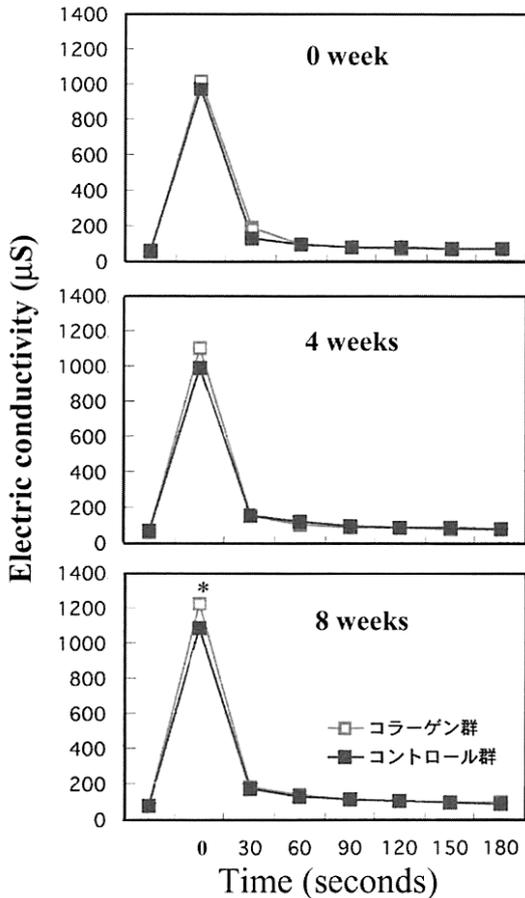


図2 皮膚の水分量の測定結果

20代の女性40名を2群に分け、一群は1日10gのコラーゲンを摂取し、対照群は摂取しなかった。実験開始時、4週後、8週後に左側上腕内側の電気伝導度を測定し、皮膚の水分量とした。測定方法の詳細については、本文中に記述した。

群の角層吸水量は、実験開始時に比較して4週後と8週後において有意な差は認められなかった。

骨密度および骨代謝マーカーの測定結果を表3に示した。実験開始時、4週後、8週後の3時点において、コラーゲン摂取群と対照群の間で、これらの測定値に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$, unpaired t-test)。また、それぞれの群内で、実験開始時に比較して、4週後と8週後のこれらの測定値に有意な差は認められなかった ($p > 0.05$, paired t-test)。

なお、実験期間中コラーゲン摂取群と対照群全ての被験者の中に、何らかの不快症状を訴えた者はいなかった。

3.2 コラーゲン摂取が抜歯後の治癒過程に及ぼす作用

ラット下顎切歯の歯肉から露出した部分を3回3日毎に削除することで、この切歯を容易に抜歯することが可能となった。図3に示したように、ラットの切歯は大きく、下

表3 骨密度および骨代謝マーカーの測定値

対照群

	開始時	4週	8週
BMD	0.425(0.073)	測定せず	0.427(0.078)
ALP (U/l)	24.13(5.95)	20.62(5.45)	20.33(4.55)
Ca (mg/dl)	9.59(0.30)	9.55(0.23)	9.47(0.26)
Oc (ng/ml)	6.42(2.59)	5.26(1.60)	6.69(2.46)
PYR (pM/microM)	22.13(3.84)	22.44(5.38)	19.60(3.25)
DPYR (pM/microM)	3.76(0.56)	3.41(1.01)	3.31(0.73)

コラーゲン摂取群

	開始時	4週	8週
BMD	0.415(0.070)	測定せず	0.417(0.065)
ALP (U/l)	24.31(4.76)	21.62(4.38)	19.89(4.29)
Ca (mg/dl)	9.61(0.31)	9.61(0.35)	9.36(0.44)
Oc (ng/ml)	6.04(1.44)	4.73(1.58)	5.97(1.44)
PYR (pM/microM)	22.04(4.45)	22.12(5.56)	20.03(5.43)
DPYR (pM/microM)	3.93(0.87)	4.04(1.26)	3.36(0.89)

n=20, 平均値(1SD)を表示した。それぞれの時点における両群の測定値の間、それぞれの群内において各時点での測定値の間に、統計的に有意な差はなかった。

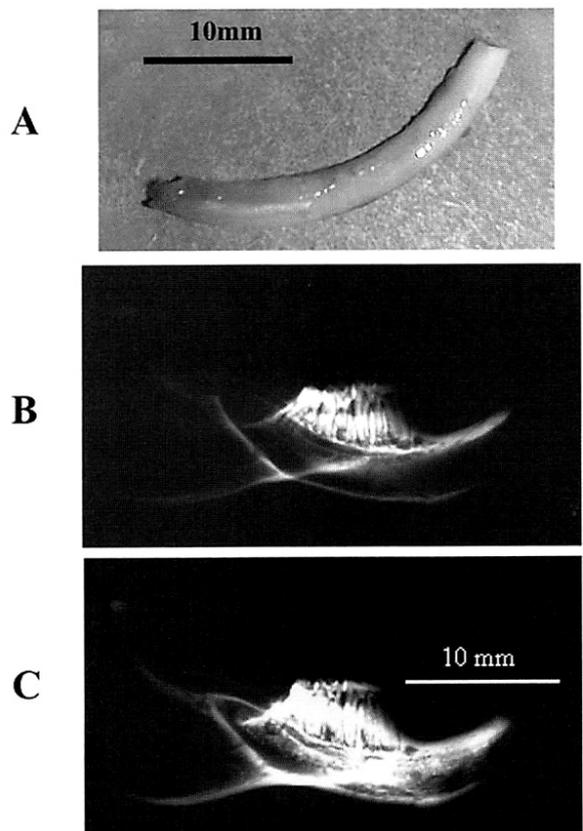


図3 抜去したラット下顎切歯 (A) と切歯抜歯後の下顎の軟X線像 (B,C)
B: 抜歯直後 C: 抜歯の1ヶ月後

顎骨全体のかなりの部分を占めているため、抜歯後には大きな抜歯窩が形成される。軟X線写真(図3 C)で明らかに抜歯窩には新生骨が形成された。この抜歯窩の新生骨の形成によって、抜歯した部位の骨密度は次第に増加した(図4)。

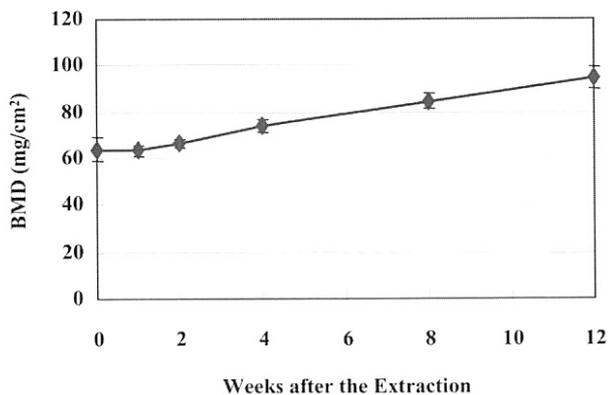


図4 ラット下顎切歯を抜歯した後の抜歯した部位（図1）の骨密度の変化

この実験モデルにおいて、抜歯後に5種類の組成の異なる飼料を与え1ヶ月飼育し、抜歯部の骨量を測定した結果を表4に示した。各群間に統計的に有意な差は認められなかった。

3.3 コラーゲン摂取が皮膚の創傷治癒過程に及ぼす作用

Hairless マウスの背部に切開創を作成し、経時的に創部の強度を引っ張り試験により測定した。結果を図5に示した。時間の経過とともに創部の強度は増大し、10日ではほぼプラトーに達して13日で安定した値を示した。

Hairless マウスに3種類の組成の異なる飼料を与え6週間飼育し、背部に切開創を作成した。7日後と13日後に測定した創部の強度、さらにそれらのマウスの大腿骨骨密度を表5に示した。3つの群の間で、創部の強度と大腿骨の骨密度に有意な差はなかった。

4. 考 察

コラーゲンを含有する化粧品が保湿効果を示すことは明らかである。しかし、経口で摂取したコラーゲンが皮膚に対して何らかの有効な作用を示すかについては明らかでない。本実験において、20代の女性にコラーゲンを含有するドリンクを8週間摂取させ、種々の計測をおこなった。本実験は2重盲検法でおこなわれた実験であり、可能な限り客観的な結果が得られるように実験をおこなった。実験開始時、4週後、8週後の3時点において、コラーゲン摂取群と対照群の間に皮膚の水分量に有意な差はなかった。しかし、コラーゲン摂取群においては、実験開始時に比較して8週後において角層吸水能が統計的に有意に上昇していた。それ以外の測定値は有意な差を示さなかったが、この結果からコラーゲンを経口摂取することで皮膚の保湿度が改善されることが示唆される。

論文に発表された結果ではないが、20 - 50代の女性 25

表4 抜歯後1ヶ月後の抜歯部骨量

Group	BMC (g)	Area (cm ²)	BMD (g/cm ³)
A	29.56 (0.95)	0.40 (0.02)	74.12 (4.51)
B	28.16 (1.26)	0.39 (0.03)	73.04 (4.39)
C	27.78 (2.30)	0.38 (0.02)	72.26 (4.31)
D	28.44 (3.44)	0.38 (0.02)	75.26 (4.48)
E	29.30 (2.02)	0.38 (0.02)	76.44 (2.58)

n=5, 平均値(1SD)を表示した。BMC (Bone Mineral Content), BMD (Bone Mineral Density). $BMD=BMC/Area$ の計算式が成立する。各群間に統計的に有意な差はなかった。

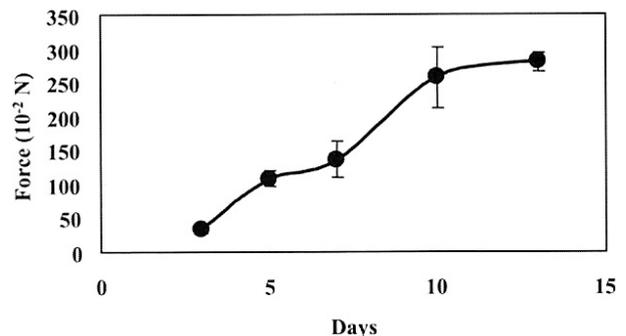
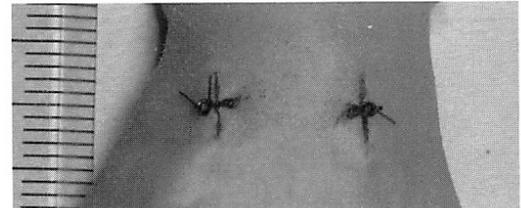


図5 Hairless マウス背部の切開創と創部強度の経時変化

表5 マウスの切開部の強度と大腿骨骨密度

Group	切開部の強度 (10 ⁻² N)		BMD (g/cm ³)
	7日	13日	
A	141.9 (23.5)	276.5 (35.4)	37.40 (1.37)
B	149.2 (28.6)	285.3 (30.1)	37.35 (1.75)
C	152.3 (34.7)	273.7 (38.5)	37.06 (1.92)

n=5, 平均値(1SD)を表示した。BMD (Bone Mineral Density). 各群間に統計的に有意な差はなかった。

名にコラーゲンを一日5g、6週間摂取させた場合、上腕と背中中の皮膚の水分量が上昇し、皮膚の柔軟性と弾力性が上昇したという結果が報告されている。この実験においては、実験開始時と実験終了時の測定値の比較がおこなわれており、2群に分けておこなった我々の実験とは実験のデザインが異なる⁸⁾。また、被験者数を含め実験の詳細は不明であるが、10 - 40代の女性に一日1gのコラーゲンを8週間摂取させた場合、プラシーボを摂取した場合や何も摂取しなかった場合に比較して、上腕の皮膚の水分保持能が高くなることが報告されている⁹⁾。いずれにせよ、これらの実験結果は我々の実験結果を支持するものである。

本実験において、20代の女性にコラーゲンを含有する

ドリンクを8週間摂取させ、踵の骨密度と5種類の骨代謝マーカーを測定した。コラーゲン摂取群と対照群のこれら測定値の間に有意な差は認められなかった。骨組織においては骨のリモデリング（改造）すなわち破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成がおこなわれており、骨の吸収量と形成量の収支によって骨量が決まる。本実験においては、コラーゲン摂取が8週間の期間が短期間であったため骨密度の変化として表れなかった可能性が考えられる。骨型アルカリフォスファターゼ（ALP）は骨芽細胞に存在する酵素であり、オステオカルシン（Oc）は骨芽細胞が分泌する基質タンパクであり、これらの血中濃度は骨芽細胞の活性を表わし、骨形成マーカーである¹⁰⁾。骨基質中のI型コラーゲンはピリジノリンおよびデオキシピリジノリンにより架橋結合している。破骨細胞による骨吸収により、これらの架橋成分が血液中に放出され尿中に排泄される。尿中のピリジノリン（PYR）とデオキシピリジノリン（DPYR）の濃度は、骨吸収のマーカーと考えられる。本実験において、これらの骨代謝マーカーに変化が観察されなかったことから、コラーゲン摂取は健康な20代女性の骨のリモデリングに影響を与えないと考えられる。

歯を失った後にその部位の骨の減少が起き、その後の義歯やインプラントによる治療が難しくなることが多い。抜歯窩の治癒を促進することにより、歯を失った部位の骨の減少を予防することが可能になる。抜歯窩の治癒を促進させる方法を検討するためには、簡便な実験動物モデルが必要である。ラットの臼歯を抜去する実験モデルが多く用いられてきた。しかし、ラットの臼歯は多根であり根が肥厚しているため根を破折することなく抜歯することが困難である。さらに、抜歯窩の治癒を定量するためには組織切片を作成する必要がある。一方、ラットの切歯は巨大であり、抜歯後に顎骨に大きな欠損を生じる。ラットの切歯は生涯萌出を続ける歯であり、先端を削除することで萌出速度が増加し、容易に抜歯することが可能になる¹¹⁾。本研究で示したように、ラットの下顎切歯を抜歯した場合、X線を用いて抜歯窩の治癒過程を容易に定量することが可能である。この実験動物モデルは、抜歯窩の治癒を促進させる方法を検討するために有用な実験モデルであると考えられる。

本研究では、Hairlessマウスの背部に切開創を作成しその強度を測定した。他の系統のマウスやラットを用いて同様の実験が他の研究者によっておこなわれている。Hairlessマウスは文字通り毛がないため切開創を作成し易く、創部の治癒状態を観察し易い利点がある。この実験動物モデルは、切開創の治癒を促進させる方法を検討するために有用な実験モデルであると考えられる。

本研究において、コラーゲンを含有する飼料を与えることは、ラット切歯抜歯後の抜歯窩の治癒と、マウスの背部

切開創の治癒に影響を与えなかった。これらの結果から、コラーゲンを摂取することによって、骨組織修復や皮膚損傷の治癒が促進される可能性は少ないと考えられる。最近我々はコラーゲンをマウスに摂取させると骨量が増加することを観察した⁶⁾。この実験は以下のおこなわれた。通常の飼料は14%のタンパクを含んでいる。このタンパク量を10%に減少した2種類の異なる飼料（10%カゼイン、6%カゼイン+4%コラーゲン）をマウスに10週間与えた後、大腿骨の骨密度を測定した。すると6%カゼイン+4%コラーゲンの飼料で飼育したマウスの大腿骨骨密度は、10%カゼインの飼料で飼育したマウスの大腿骨骨密度に比較して高かった。しかし、14%のタンパクを含む2種類の異なる飼料（14%カゼイン、6%カゼイン+8%コラーゲン）でマウスを飼育した場合には、大腿骨骨密度に差はなかった。これらの結果は、タンパク摂取量が少ない状態では、コラーゲン摂取により骨密度が上昇するが、タンパク摂取量が充分な状態では、コラーゲン摂取は骨密度上昇作用を表さないことを示している。

本研究においては、上記の我々の以前の実験と比較してさらに低栄養の8%タンパク量の飼料を用いたにもかかわらず、コラーゲン摂取はマウスの大腿骨骨密度に影響を与えなかった。その理由としてはマウスの系統の違いや摂取期間が6週間であったことが考えられるが、明確ではない。ところで、卵巣摘出ラットは閉経後骨粗鬆症の動物実験モデルであり、この動物においては骨が減少する。我々の共同研究者の野村は、低タンパク食で飼育した卵巣摘出ラットにおいては、コラーゲン摂取が骨密度上昇作用を示すことを報告している¹²⁾。したがって、正常動物に通常の栄養状態でコラーゲンを摂取させた場合には、骨量に変化をおよぼさないが、卵巣摘出した骨減少症の動物に低栄養状態でコラーゲンを摂取させた場合には骨量が増加すると考えられる。本研究においては、正常動物にコラーゲンを摂取させた場合、抜歯窩の治癒や皮膚の切開創の治癒に影響を与えなかった。しかし、骨粗鬆症や糖尿病の疾患動物モデルに低栄養状態でコラーゲンを摂取させた場合には、治癒促進効果が表れる可能性も考えられる。

5. 総括

20代の健康な女性において、コラーゲン摂取は皮膚の保湿度を増加させた。しかし、骨密度と骨代謝マーカーには影響を与えなかった。また、コラーゲンを含む飼料での飼育は、ラットの切歯抜歯窩の治癒と、マウスの背部切開創の治癒と大腿骨骨密度に影響を与えなかった。したがって、実験動物の骨や皮膚の修復過程に対しては、コラーゲン摂取は顕著な作用を示さないと考えられる。サプリメントとしてコラーゲンを摂取することの有効性に関しては、今後その機序を含めてさらに検討をおこなう必要がある。

謝 辞

本研究は、株式会社ニッピの桑葉くみ子様と広田亜里彩様、東京医科歯科大学医学部附属病院整形外科の宗田大教授、さらに東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科先端材料評価学分野の高橋英和助教授、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科摂食機能制御学分野大学院生の角田愛美君と石岡樹成君と佐藤大輔先君のご協力によりおこなわれました。ここに深く感謝致します。

(参考文献)

- 1) Adam M. Welche Wirkung haben Gelatinepraeparate? Therapiewoche 38:2456-2461, 1994
- 2) Scala J, Hollies NRS, Sucher KP. Effect of daily gelatine ingestion on human scalp hair. Nut Rep Int 13:579-592, 1976
- 3) Schwimmer M, Mulinos MG. Salutary effects of gelatin on nail defects in normal subjects. Antibiotic Med Clin Ther 4:403-407, 1957
- 4) Mulinos MG, Kadison ED. Effect of gelatin on the vascularity of the finger. Angiology 16:170-176, 1965
- 5) 梶原苗美 等. コラーゲン由来ペプチドの栄養・生理機能特性について. 必須アミノ酸研究 140:43-46, 1994
- 6) Koyama Y et al. Ingestion of gelatin has differential effect on bone mineral density and body weight in protein undernutrition. J Nutr Sci Vitaminol 47(1):84-86, 2001
- 7) 高橋元次. 皮膚保湿効果の測定法とその評価. Fragrance Journal 臨時増刊 17:61-70, 2000
- 8) <http://net.meiji.co.jp/health/amino/verify1.html> 明治製菓ホームページ
- 9) 田口靖希 他. 経口投与したニワトリ由来コラーゲンペプチドが皮膚の組織再生および保水能におよぼす影響、ならびに血中濃度の検討. 第42回日本食肉研究会(2001.3.29 仙台) 講演要旨 :23-25, 2001
- 10) 井上俊 他. 骨代謝マーカー測定の意義. The Bone 12(4):35-39, 1998
- 11) Chiba M et al. Effects of repeated shortenings and of artificial restraint on the tensile strength of the periodontium of the rat mandibular incisor. Arch Oral Biol 26: 135-41, 1981
- 12) Nomura Y et al. Effect of the administration of shark type I collagen to ovariectomized rats. 第34回日本結合組織学会学術大会(2002.4.4-5 浜松) 講演要旨, 2002

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

かみ合わせのずれが大きく笑った顔貌の非対称性に及ぼす影響

大阪大学大学院 歯学研究科顎口腔咬合学

中 村 隆 志、若 林 一 道

There are few people who can make the natural smile in the presence of other people or a camera, a lot of people cover their mouth and control their smile. Until now, many books say “To make good smile, it is important to have high self-esteem and improve themselves.” In dentistry, it is often said that white and well-arranged teeth is necessary to make good expression (smile), it was thought that this matter is expected on the psychological implication. But focusing attention on our specialized area, prosthodontics, the jaw of recent young people is smaller than before, based on this, malocclusion is occurred and the jaw position is not locate normal position. It was reported that the jaw displacement makes effort to the cervical or facial muscle, it was suggested that this result prevent to make good smile physically.

The aim of this study is to analyze objectively the effect of the jaw displacement on the asymmetry of the big smile on face and to obtain the suggestion to obtain good smile. The nine subjects' normal and smiling face were measured three-dimensionally. And the length between the center of upper and lower labial and the both sides of the angle of the mouth was measured. To analyze asymmetry on the normal and big smiling face, the asymmetry index (AI) were used. As a result, for the big smiling face of the 3 in 4 subjects, the length of labial in the displacement side of the jaw is longer than the other side. For 4 in 5 subjects without jaw displacement, the longer side of labial in normal face is longer than the other side in smiling face.

1. 緒 言

人前やカメラの前で自然な笑顔を作れる人は少なく、多くの人が口（歯）を隠し、笑いを抑えようとする。それはよい形が作れず、顔が崩れてしまうためと考えられる。これまで多くの本などで、よい表情（笑顔）を作るためには自分に自信を持ち内面を磨くことが大事であると述べられている。我々歯科の分野においても、白い歯やきれいな歯並びなどがいい表情を作るために必要であるとよくいわれるが^{1, 2)}、これも心理的な要因を期待しているものが大きいように思われる。

しかし、我々の専門分野であるかみ合わせに着目して考えてみると、現代の若年者の顎は昔前と比べ小さくなっており、それに伴い不正咬合が生じ、下顎の位置が上顎に対して3次元的にずれている。顎のずれは、顎部や顔面周囲の筋肉に影響を及ぼすことがわかっており^{3, 4)}、これらが原因で肉体的にもよい形（よい笑顔）を作ることが困難な状況であるものと考えられるが、これまで顎のずれと微笑時顔貌について客観的に評価した研究はみられない。

そこで本研究の目的は、かみ合わせのずれが大きく笑った時の顔貌の非対称性に及ぼす影響を客観的に分析することにより、よい表情（笑顔）を得るための示唆を得ることである。



The effect of jaw displacement on the asymmetry of big smile on face

Takashi Nakamura, Kazumichi Wakabayashi

Division of Oromaxillofacial Regeneration, Osaka University Graduate School of Dentistry

2. 実 験

2. 1. 被験者

被験者は本学歯学部学生および職員より、矯正治療および顎顔面外傷の既往がない20歳代9名（男性7名、女性2名）を選択した。

2. 2. 計測装置

非接触式三次元形状計測装置 VIVID900（株式会社ミノルタ、大阪）を使用した（図1）。この装置は、ラインレーザを装置上部から走査し、計測対象に照射する。その反射光を装置下部のCCD素子で受光し、三角測量法の原理によって、計測対象の三次元形状データを得る。走査時間は1計測あたり1秒と非常に高速である。装置から計測対象の顔面までの距離は1mとした。計測ピッチは約0.2mmであり、得られたデータは、等間隔のX軸座標とY軸座標の点のZ座標を表記した形式である。



図1 本実験に用いた非接触型3次元形状計測装置 VIVID900

2.3. 顔面正貌三次元データの取得および分析

顔面正貌三次元データの取得は、VIVID900を被験者との距離1mに、高さが被験者の鼻尖と一致になるように三脚に固定して行った。そして、被験者に自然頭位の座位をとらせ、安静時および大きく笑ったときの正貌三次元データを計測した。安静時の顎位は咬頭嵌合位とした。計測した顔面三次元データをフォーマット変換し、三次元データ解析ソフト 3D-Rugle3 (株)メディックエンジニアリング、京都)を用い顔面形態の分析を行った。分析時は左右瞳孔の中心点のY座標(上下)およびZ座標(前後)が同じ座標となるように座標変換を行った。計測基準線は鼻尖を通り、左右瞳孔を結んだ直線に垂直となる直線を正中線と設定した。そして上下口唇の上部および下部と正中線の交点をそれぞれUU, UL, LU, LLとし、各点から左右の口角までの距離R UU, R UL, R LU, R LL, L UU, L UL, L LU, L LLを計測した(図2)。

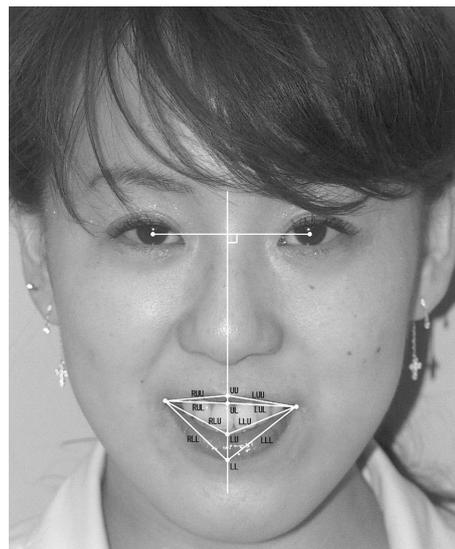


図2 左右対称性分析における計測基準線および計測項目

顔貌の左右非対称性の判定には、左右非対称性指数(Asymmetry Index, 以下 AI と略す)を用いた。

$$AI(\text{Asymmetry Index}) = \frac{|R - L|}{(R+L)} \times 100$$

そして、VIVID900により同時に撮影した顔面テクスチャから、下顎の正中が左右どちらに偏位しているかを分析し、各被験者の AI と比較検討を行った。

3. 結果

各被験者における上下口唇の上部および下部それぞれの距離および AI を表1に示す。上口唇に関して、大きく笑うことにより AI の増加した者は全体の 33%に認められた。44%の者は大きく笑った際、AIは減少した。また大きく笑うことにより安静時に比べ反体側に非対称性が移行する者は 22%認められた。下口唇に関して、大きく笑うことにより AI の増加した者は全体の 44%に認められた。33%の者は大きく笑った際、AIは減少した。安静時に比べ反体側に非対称性が移行する者は 22%認められた。また、下顎偏位と正中と口角との距離については、下顎の偏位側

と同側の方が距離が長いものは4名中3名であった。下顎がほぼ顔面の正中に位置している者に関しては、5名中4名が安静時距離の長い側が笑ったときも距離が長かった。

4. 考察

4.1. 実験方法について

顔貌の左右対称性を検討する方法として、顔面正貌写真⁵⁾、頭部X線規格写真⁶⁾、モアレトポグラフィー^{7, 8)}が用いられる。顔面正貌写真では写真撮影の際の頭部の向きが、左右対称性に影響を及ぼす可能性が高いと考えられる。また頭部X線規格写真やモアレトポグラフィーは、頭部を固定した状態で撮影を行うため、被験者の自然な状態を記録することができない。これらの問題点を考慮し、本研究では非接触型三次元計測装置を用いた。本装置を用いることにより、頭部を規制することなく自然な状態で静止時および笑った際の顔面を計測できた。また得られた三次元データはコンピュータ上で自由に座標変換を行えるため、安静時および笑った際の頭部のずれを可及的に補正することができた。また二点間距離の分析は三次元座標を用いて行な

表1 安静時および大きく笑った際の各被験者における上下口唇の AI と下顎偏位

		Subject1	Subject2	Subject3	Subject4	Subject5	Subject6	Subject7	Subject8	Subject9
UU	ノーマル	1.18	-1.93	-2.52	-2.80	-1.48	0.65	1.05	-2.43	-0.05
	スマイル	1.50	0.89	-0.26	-2.08	-0.43	-2.41	1.43	-1.37	-0.52
UL	ノーマル	0.99	-2.32	-1.27	-5.35	-2.68	1.55	1.04	-2.00	0.63
	スマイル	1.80	1.85	-0.46	-2.38	-0.17	0.70	1.25	-1.63	-0.90
LU	ノーマル	0.93	-5.15	-2.27	-6.64	-2.68	0.21	0.62	-2.48	0.63
	スマイル	1.60	-0.49	-2.49	-3.73	2.01	-0.37	1.65	-1.10	-5.45
LL	ノーマル	0.02	-4.24	-1.95	-4.73	-3.23	0.63	1.21	-1.73	0.64
	スマイル	1.35	-0.02	-1.96	-3.62	0.48	0.40	1.64	-0.82	-5.33
下顎の位置		Center	Left	Center	Center	Right	Center	Center	Right	Right

るため、顔面の向きによる影響をより少なくしかつ正確な分析項目の距離を計測することができた。

左右対称性の判定には、顔面の正中線の設定が必要となる。正中線の設定には、必ずしも一致した見解はないが、本研究では過去の報告でも用いられることの多い左右の瞳孔の中心点を、前後のおよび左右回転の補正のための基準点とした。また分析時口唇周囲のデータから正中線を決定できるように、鼻尖部を通り瞳孔線に直交する直線を顔面正中線に設定した。

4.2. 実験結果について

人の顔の表情は、精神活動のなかでも特に感情状態を最も顕著に反映し、その感情の伝達に重要な役割を果たしている。とりわけ笑顔は相手に好意と安心を与える貴重な財産とされている。顔の表情における非対称性には左右の筋活動量の差や下顎偏位によるものなどが考えられる。当講座東らは、「笑い」の表情が表出されたときの表情筋の筋活動について評価を行った結果、表情の大きさと、下唇下制筋、大頬骨筋、口輪筋の筋活動量との間には、正の相関を示す傾向がみられたと報告している⁹⁾。また、モアレトポグラフィーによる顔貌の非対称性について分析を行った筆者らの研究では、下顎偏位者の左右非対称性は健常者よりも大きく、下顎偏位は、顔貌の三次元的な左右対称性に影響を及ぼすことを報告している¹⁰⁾。

本実験結果では、笑った際、顎偏位側に口唇の距離が長くなる被験者が4名中3名認められた。また顎偏位を有しない被験者に関しては安静時に口角への距離の長い側が笑ったときも長くなる被験者が5名中4名認められた。本実験結果からも、安静時における筋緊張が笑ったときの筋緊張にも影響を及ぼすものと推測された。

5. 総括

かみ合わせのずれが大きく笑った時の顔貌の非対称性に及ぼす影響を9名の被験者について3次元計測装置を用い分析した結果、

1. 3次元データを用いて分析を行うことにより、安静時および笑った際の頭部のずれを可及的に補正することができ、顔面の向きによる影響をより少なくしかつ正確な分析項目の距離を計測することができた。

2. 笑った際、顎偏位側に口唇の距離が長くなる被験者が4名中3名認められた。また顎偏位を有しない被験者に関しては安静時に口角への距離の長い側が笑ったときも長くなる被験者が5名中4名認められた。

本実験結果から、安静時における筋緊張が笑ったときの顔貌の左右非対称性に影響を及ぼすものと推測された。また、下顎偏位を有する者の多くは、同側に筋緊張が認められ、大きく笑った時の顔貌の非対称性にもかみ合わせのずれが影響を及ぼす傾向が示唆された。

(参考文献)

- 1) Claude R. Rufenacht: Fundamentals of Esthetics. Quintessence Publishing, 1990.
- 2) Ronald E. Goldstein: Change Your Smile Quintessence Publishing, 1990.
- 3) Bakke, M. and Moller, E. : Craniomandibular disorders and masticatory muscle function. Scandinavian Journal of Dental Research, 100, 32-38, 1992.
- 4) 中村隆志, 宇田恵子, 小路芳子, 岡本 啓, 丸山剛郎: 顔貌の左右対称性と全身症状の関連性に関する研究. 全身咬合 5, 34-38, 1999.
- 5) 大作武彦, 李 団団, 上田路和子, 佐藤義孝, 中村昌幸: 顔(正貌)と咬合との研究-正貌顔面規格写真の分析-. ベッグ矯正歯科ジャーナル 8, 47-51, 1997.
- 6) 原 三正: 顔面及び頭部の非対称性について. 歯界展望 9, 186-187, 1952.
- 7) 河相安彦: モアレトポグラフィーによる顔面形態に関する研究 -咀嚼の習慣が顔面形態に及ぼす影響について-. 日大口腔科学 18, 1-4, 1992.
- 8) 北條健三: モアレ縞による顔面の対称性に関する研究. 歯科学報 81, 1203-1235, 1981.
- 9) 東 和生, 丸山剛郎: よい表情を生み出す筋肉. 微笑みをあなたに 7, 6, 1995.
- 10) 中村隆志, 岡本 啓, 池田友紀, もて木伸子, 東 和生, 高島史男, 丸山剛郎: 顔貌の左右対称性に関するモアレトポグラフィーによる観察-健常者および下顎偏位者について-. 歯科審美 12, 30-36, 1999.

アトピー疾患者の自尊感情の向上を目指した集団認知行動療法の開発

宮崎大学 教育文化学部

富 家 直 明

The purpose of this study is the development of the group cognitive behavioral therapy (group-CBT) program for Atopic Dermatitis. The technique of attributional training and assertion training is included for this program. Whether this program contributes to the improvement in the self-estimation of the AD patient is verified. In the study 1, we investigate the relevance to attributional style and assertiveness style for high school student including AD patient. In the study 2, the treatment by group-CBT was carried out for the ED patient and AD patient group. As the result, the improvement on the self-estimation was also confirmed both groups.

緒 言

アトピー性皮膚炎 (Atopic dermatitis; AD) は、増悪・寛解を繰り返して掻痒性に湿疹病変を主体とする疾患であり、患者の多くはアトピー素因を有している。日本における総患者数は30万人程度と推定されている。特に、思春期 (12歳以後) のアトピー性皮膚炎は、顔面等に苔癬化局面が広がり、淡紅色丘疹を混じて赤みのある皮膚を呈する。眉毛の外側1/3が薄くなる Hertoghe 徴候を示す場合もある。多くは小児期より症状が継続しており、顔面部皮膚症状の増悪・寛解を繰り返しながら現在に至っている。

掻くという行為には、症状の炎症悪化という結末と同時に、快感によるストレス解消の効果が現れる (図1)。そのため、ストレス低減効果の効用ゆえに掻くことをなかなかやめられない。症状悪化とその持続はAD患者の二次的集団対人適応の障害をきたし、自尊感情を適切に維持できなくなる心理的弊害をもたらす。心理的ストレスの増加は、典型的な皮膚心身症である本疾患の治療経過にとっても、また精神的健康や社会適応にとっても望ましいことではない。AD患者のストレスに着目した研究によれば、AD患者は健常者に比較して抑うつ、不安、怒りなどの心理的ストレス反応が高いという (奥野他、2000)。AD患者のストレスサーは、症状、治療の困難さ、対人関係、行動の制約、周囲の人の理解の5因子に及び、特異的な因子構造を有する (奥野他、1999)。

ところで、自分の意見や感情を余さず表現し、また、他人の気持ちを十分に斟酌できる対人関係の状態をアサーティブネス (対人主張性) と呼ぶ。対人主張性を身につける

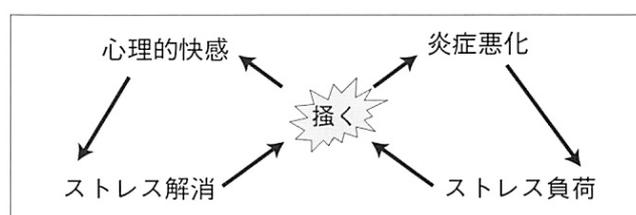


図1 思春期 (成人型) ADの悪化メカニズム

ことは、対人関係ストレスを軽減することのみならず、自己評価の向上に結びつくことが知られている (Rees.Sら、1991)。しかし、本人に帰属の偏りがある場合、アサーティブネスの獲得が困難になりやすい。このことは、アサーティブネスの獲得にあたって、帰属療法を加える必要性を示唆する。

本研究の目的は、思春期AD患者の対人ストレスの改善に及ぼす、帰属変容、及びアサーション・トレーニングを主体とする集団認知行動療法を開発することである。こうした治療技法の適用の結果、自己評価の向上が観察されるかどうかを検証したい。研究1においては、健常者とAD患者を対比しながら、帰属とアサーションの関連性を検討し、帰属とアサーティブネスのタイプ分類を解明した。次に、研究2において、集団認知行動療法のパッケージを作成し、AD患者と摂食障害患者を比較しながら適用し、その効果を検証した。その際、とりわけ自尊心の向上に及ぼす影響を分析した。

研究1：帰属とアサーティブネスのタイプ分類の解明

相手に対し主張的であるということは自己表現が十分に行われていることを意味し、その結果、高い自己評価が保持しやすいと考えられる (Rees.Sら、1991)。

しかし、対人コミュニケーションが上手にできるかどうかは相手次第でもある。その失敗に相手側の要因が過剰に関与した場合、自己のコントロールの限界を超えたと判断して自己関与性を低めなければならないであろう。対人コミュニケーションが相手側の要因によってうまくいかなか



Development of Group cognitive behavior therapy for self-esteem in Atopic Dermatitis.

Tadaaki Tomiie

Miyazaki University, Faculty of Education and Culture

った場合に、どのような認知的要因が作用して自己評価を守るかは明らかでない。

そこで、健常群とAD群を対比させながら、主張スキルが自己評価を高める心理学機序に認知要因が影響を及ぼしているか否かを検証する。とりわけ帰属認知は失敗経験からの感情立ち直りに寄与する重要な要因として考えられている(Weiner, 1974)。ネガティブ感情は主張スキルの妨害因子であり(相川, 1999)、帰属認知が感情調整に寄与して緩衝的役割を果たす可能性がある。

【方法】

I. 調査対象

有意抽出法で得られた宮崎県内の健常高校生(総合進学科、英語進学科、情報ビジネス学科、情報デザイン学科、普通科)8校2408名(1年生:男494名・女664名、2年生:男237名・女474名、3年生:男208名・女331名)

高等学校養護教諭によってリクルートされた、医療機関においてAD疾患と診断され、かつ現在も治療を継続しているAD高校生男女53名(1年生:男12名・女8名、2年生:男5名・女15名、3年生:男3名・女10名)。

II. 調査材料

1) 楽観的帰属様式尺度—「正—(永続性+全体性)」

Seligman (1991) が開発した楽観的帰属様式尺度を沢宮・田上が日本版に改変したもの(1997)で、全23項目からなり、二者択一方式である。「負—(永続性+全体性)」(Permanence & Pervasiveness Bad)「負—内在性」(Personalization Bad)「正—(永続性+全体性)」(Permanence & Pervasiveness Good; 以下PPG)の3つの下位尺度からなるが、本研究ではこのうちPPGのみを使用した。正の出来事を永続性次元と全体性次元に、これは自分にとってよい出来事つまり正の出来事が起きたとき、その原因を永続性(永続的か、一時的か)または全体性(全体的か、特異的か)のいずれかに帰属する次元であり、尺度得点が高いものほど楽観的な帰属様式であることを意味している。

2) Kiss-18 (Kikuchi' s Social Skill Scale・18項目版)

Goldstein(1980)らのリストをもとに菊池によって開発された、社会的スキルの度合を測定する尺度であり、18項目からなる。本尺度は、主張性項目を多く含んだものであるため、本研究では、主張的スキルの度合を測る尺度として使用した。6件法を用いて得点化した。

3) SES (Self-Esteem Scale)

Rosenberg (1965) が作成したものを山本・松井・山成が邦訳したもの(1982)で、自尊感情を測定する尺度。10項目からなり、得点化には6件法を用いた。

【結果】

表1は、PPG、Kiss18およびSESそれぞれの尺度得点の平均値および標準偏差を、学年別、性別に示したものである。それぞれの尺度得点平均値において統計的に有意な性差および学年差は認められなかった。また各尺度得点分布の正規性に問題はなかった。したがって以下の分析は性差および学年差を考慮せず全データを集約した。楽観的帰属、主張性、自尊心のいずれもAD患者が低位であった。

次に、社会的スキル獲得の程度と楽観的原因帰属様式の関係が自己評価に及ぼす影響を探るため、Kiss18とPPGの得点に基づいて、対象者の中から4群を抽出し、自己評価(SES)得点を従属変数とした一要因の分散分析を行った。4群の抽出方法は、Kiss18の平均得点から0.5SD以上をH群、平均-0.5以下をL群とし、PPGの平均得点から0.5SD以上をh群、平均-0.5SD以下をl群としてH/h、H/l、L/h、L/lを組み合わせた。各群の人数、平均得点を表2に示す。また、H/h群とH/l群の差異は、ともに高い主張スキル得点を有しながらも、楽観的帰属の強弱に違いを認めるものである。その違いはKiss-18のどの項目得点に反映されているかを検討するために、対応のないt検定を行った。さらに、L/hとL/lの間でも同様の検定を行った。結果を表3に示す。

研究2:アトピー患者を対象とした集団認知行動療法の適用

日本皮膚科学会が提案する思春期ADの治療目標とは、

表1 各尺度別にみたAD患者の特徴

学年 性別	対象人数		帰属 (PPG)				主張性 (KISS18)				自尊心 (SES)						
	健常者	AD患者	健常者 (SD)	AD患者 (SD)	p	健常者 (SD)	AD患者 (SD)	p	健常者 (SD)	AD患者 (SD)	p						
1年生男子	494	12	3.36	2	2.51	2.1	**	61.6	13.8	50.6	8.6	*	36.3	7.8	30.5	6.4	**
女子	664	8	3.37	1.8	2.88	2.3	*	61.1	15.2	51.2	10.6	*	33.9	7.3	28.6	9.4	**
2年生男子	237	5	3.2	1.9	2.9	2	**	63.1	12.3	50.2	19.1	ns	37.2	7.3	30.5	10.1	**
女子	474	15	3.12	1.7	2.75	2.1	*	61.7	13.4	53.68	9.8	*	34.2	7.3	27.6	8.6	**
3年生男子	208	3	3.54	2	2.65	1.6	**	61.2	16.4	50.69	10.4	*	35.9	7.6	29.4	7.6	**
女子	331	10	3.29	1.8	2.53	1.9	**	61	13.3	54.5	13.9	*	33.4	7.3	28.5	7.9	**

** P<0.01 * P<.05

表2 主張性と帰属の4大類型別に見た自己評価得点

	H/h条件		H/l条件		L/h条件		L/l条件	
	健常群	AD群	健常群	AD群	健常群	AD群	健常群	AD群
N	273	7	123	9	102	15	352	22
Kiss-18	79.4 (9.5)	58.2 (10.2)	76.6 (7.3)	53.2 (9.4)	46.2 (8.6)	47.7 (8.3)	43.9 (8.7)	42.6 (7.9)
PPG	5.9 (1.1)	4.5 (1.9)	1.4 (0.7)	0.9 (1.1)	5.6 (0.8)	2.7 (1.5)	1.2 (0.8)	1.2 (0.8)
SES	38.4 (6.7)	35.6 (7.6)	34.1 (6.9)	30.3 (9.4)	33.2 (7.1)	26.4 (6.7)	29.4 (6.9)	20.1 (10.1)

表3 Kiss-18の項目別にみたH/hとH/l及びL/hとL/lの差

質問項目	H/h	H/l	L/h	L/l
1. 他人と話していて、あまり会話がとぎれないほうだ。	—	—	—	—
2. 他人にやってもらいたいことを、うまく指示することができる。	—	—	—	—
3. 他人を助けることを、上手にやれる。	H/h>H/l**	—	L/h>L/l*	—
4. 相手が怒っているときに、うまくなだめることができる。	H/h>H/l*	—	L/h>L/l*	—
5. 知らない人とでも、すぐに会話が始められる。	—	—	—	—
6. まわりの人たちとの間でトラブルが起きても、それを上手に処理できる。	H/h>H/l**	—	—	—
7. こわさや恐ろしさを感じた時に、それをうまく処理できる。	—	—	—	—
8. 気まづいことが合った相手と、上手に和解できる。	—	—	—	—
9. 仕事をする時に、何をどうやったらよいか決めることができる。	—	—	—	—
10. 他人が話しているところに、気軽に参加できる。	—	—	—	—
11. 相手から非難された時にも、それをうまく片付けることができる。	H/h>H/l*	—	—	—
12. 仕事の上で、どこに問題があるかすぐに見つけることができる。	—	—	—	—
13. 自分の感情や気持ちを、素直に表現できる。	H/h>H/l*	—	—	—
14. あちこちから矛盾した話が伝わってきても、うまく処理できる。	—	—	—	—
15. 初対面の人に、自己紹介が上手にできる。	—	—	L/h>L/l**	—
16. 何か失敗した時に、すぐに謝ることができる。	—	—	—	—
17. まわりの人たちが自分とは違った考えをもっていても、うまくやっつけていける。	—	—	—	—
18. 仕事の目標を立てるのに、あまり困難を感じないほうである。	—	—	—	—

**p<0.01, *p<0.05

1) 症状はないか、あっても軽く、日常生活に支障がなく、薬物療法もあまり必要としない。2) 軽い症状は続くが、急激に悪化することはまれで、悪化しても持続しない、というものである。これらの目的を達成するためには、認知行動的な変容とその維持が有効であろう。そこで、AD疾患の症状を有し、現在も専門医で治療を継続している中学から大学期までの思春期事例を対象に予備調査を行い、そこであられた知見と上記研究を参考にしながら、AD患者向け集団認知行動療法を計画した。これはリラクセーションの習得、帰属認知の変容、対人コミュニケーションの向上、適切なスキンケアと健康習慣行動に関する心理教育からなる。その結果、AD疾患者の自己評価が向上するか否か検証した。

【方 法】

予備調査：

皮膚科通院 AD 患者の皮膚症状の増悪・軽快と帰属の

実態の手がかりを得るために日記分析を行った。

皮膚科通院中の AD 疾患患者 17 名（高校生 13 名大学生 4 名、全員女子）に 2 ヶ月間日記をつけてもらい、皮膚症状の増悪、軽快の原因を記載するように指示した。分析は日記の文章中から、軽快・悪化の事由に相当する記述を抜き出した。2 ヶ月の期間に、1 人が複数回軽快と悪化を繰り返す、その都度、推測する原因も異なるので、表 4 に示す結果は延べ 60 日間、17 名の AD 疾患者が記述したすべての事由の個数である。

この結果から、AD 疾患者の帰属様式が、①アレルギー除去食固執型・・・症状増悪が食事のコントロールに起因するという考え方、②季節・湿度固執型・・・季節や湿度に関連して増悪するという考え方、③薬剤固執型・・・特定の薬剤の効用に固執する考え方、④行動制御型・・・自分の行動が影響を持っているという考え方、に大別できると思われる。帰属の変容が適応行動をもたらす可能性は十分に考えられるので、AD 向け集団認知行動療法の役割を

表4 AD患者が記述した軽快・悪化の事由

軽快の事由	悪化の事由
薬剤が効いているせい (34) ここのところ涼しいので (22) わからない (16) 季節のせい (28) 爪を切ったせい (12) 化粧品のせい (37) その他 (24)	蒸し暑さのせい (35) 搔くせい (17) 空気の乾燥のせい (26) 爪が長いせい (17) 食事、お酒のせい (37) 睡眠不足のせい (23) 化粧品のせい (14) その他 (16)

表5 集団認知行動療法の役割

- 1) ストレス解消目的では搔かないようにする。
- 2) リラクゼーションを継続できるようになる。
- 3) 特定の原因帰属に固執せず、多様かつ柔軟な帰属思考ができる。
- 4) 自肯他肯の対人関係が維持できる。
- 5) セルフヘルプができるようになる。

表5に示すように、帰属変容法を中心に計画した。

集団認知行動療法の介入研究：

被験者：AD患者17名。いずれも皮膚科に通院している高校生女子で、年齢は15歳3名、16歳7名、17歳6名、18歳1名、平均年齢16.2歳。参加にあたっては書面でインフォームドコンセントを得た。

方法：集団認知行動療法の構成内容（富家他、2000）は以下の通りである。

- 1) 心理教育—嗜癖化した搔破行動の消去、2) リラクゼーション、3) 帰属認知の改善、4) 対人主張性の獲得、5) 母子関係の改善

実施期間：8週間8回の集団認知行動療法

アセスメント：視察による皮膚医学的診断（軽、中、重の3段階評価）及び心理社会的アセスメントを実施した。

セッションの構成

第1セッション（リラクゼーション）

不安・緊張が強いときは指先などの末梢の循環が悪くなっており、リラックスしているときは逆にその部位が温まっているときであることを説明する。あらかじめ各患者の前に2つの洗面器をおき、片方に氷冷水、片方に温水をいれておく。氷冷水に両手をつけて、30秒程度数える。そのときどのような感じがするかをよく味わうように教示する。次に温水に手を入れる。このとき指先が次第に温まっていく感覚や、リラックスする気持ちをよく味わうようにする。この動作を2、3回反復したのち、感想を聞きあう。冷水時、指先の冷たさ以外に頭痛や呼吸の乱れなどを体感できたかどうか確認する。温水時には指先の温感が手のひらの付け根から指先にかけてゆっくりと上っていく様子や、そのときに心臓や呼吸、筋肉の弛緩などにどのような変化が現れたかを確認させる。冷水につけたあと、温水につけないで温感イメージだけで温度の回復を試行する。指先まで温まりきらない人もいるが、手のひらの部分は十分に温まることをお互いに触って確認する。

第2セッション（再帰属療法）

〈ねらい〉

日常的に経験している思考上の癖が、感情や行動に強い影響を及ぼしていることを知る。特に原因帰属が動機づけや自己評価に及ぼす影響の強いことを知り、そのコントロール方法を体験する。多様な原因を考えられることと、その中から適応的なものを自由に選択する方法を知る。参加者に対しては、原因帰属のことを「原因選び」というわかりやすい用語に直し、親和性を保つことにする。

〈方法〉

ホームワークのセルフモニタリングにもとづいた話し合いを行う。Good大賞とBad大賞に選ばれた事項を板書し、生じた状況を説明する。1つの事象に対するさまざまな原因が列記されたところで、「原因は1つではなく、人によってさまざまに想起されるものである」ことを指摘する。さらに、さまざまな原因が列記されているのを見て、その中でどれが一番受け入れやすい原因であるかを問う。どの原因を選ぶかによって、受け取る感情が異なることを考える。帰属のレーダーチャートを示し、原因が運・能力・努力・体調・他人・時期に分類できることを説明する。また、各カテゴリーについて具体的に何を思いつけるかを考えさせる。これまでが自由想起であったのに対して、これは課題想起となっている。さらに、レーダーチャートに10点満点で当てはまると思う程度を記入し、プロットする（図2）。

第3セッション（再帰属療法—帰属レーダーチャートと自由討議）

宿題にしていたレーダーチャートを発表してもらい、みなでもっと違った帰属はないか考える。大勢の知恵でたくさんさんの帰属が考え出されることを経験する。その後、どう

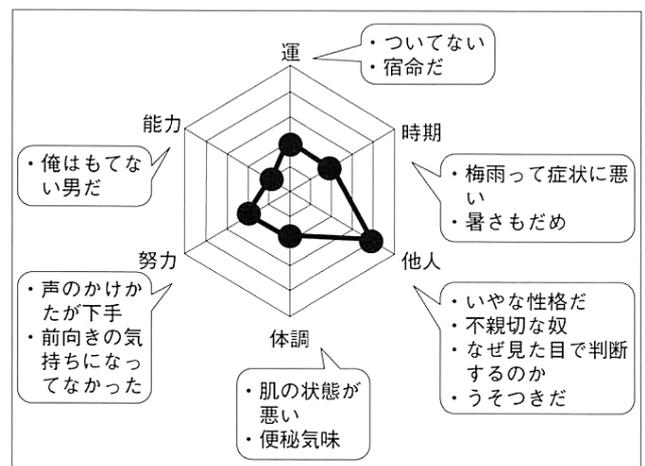


図2 さまざまな原因の記録（思いついた個数をカウント）

いう帰属がもっとも気持ちによい影響を与えるかについて全員の意見を聞く。

第4セッション（アサーショントレーニング第1回—アサーション宣言）

対人関係の仕組みについて学び、アサーショントレーニングの説明を受ける。はじめに、対人関係のさまざまな場面（客であるあなたにウエイトレスが間違えたお皿を持ってきてしまったとき、あなたは間違いを指摘して正しいお皿を持ってこさせる、など）というような対人主張性を測る質問紙に回答させる。回答終了後、質問項目の中でもっとも苦手とする対人場面について1つ選ばせる。どの場面を選んだかを集団全員に回答させるが、同時に「なぜそれが苦手であるか」という原因も聞く。そのときの理由はさまざまに回答されるが、それとは異なる原因を考えた人がいないかを確認する。「苦手である」と感じている人はたくさんいても、その原因の選び方にはさまざまな個人差があることを知ってもらうためである。また、自分はその項目は苦手でないとする人がいないかも確認する。苦手でないと感じるのはどうしてか、その原因を聞く。このようにして、質問紙をネタにして皆で意見を出し合い、多様な考え方が可能であることを知ってもらう。

モデル提示を行う。治療者2名が、円座の前に出て要求—拒否のやりとりを実演する。その際、ノンアサーティブ、アグレッシブ、アサーティブの3つのパターンを例示する。また、ゼスチャーやボリュームコントロールなどノンバーバル行動の例についてもモデル提示する。

動機づけを高めるために、「私のアサーション宣言5か条」を暗記する。その場で暗記できる人に対しては暗誦させてみる。そうでない人に対しては暗誦することをすすめる。

第5セッション（アサーショントレーニング—伝言ゲーム式ロールプレイング要求場面）

〈ねらい〉

ロールプレイングにより、要求場面のアサーションができるように練習する。参加予定者の不安が高いことも予想されるため、開始前夜、または数時間前には状況を観察したり声かけをしておく。当日は治療者が部屋の前で迎えて立ち、ひとりひとりに握手してもよい。また、円座の部屋作りを全員で行っても不安軽減作用がある。全員がそろったら、入室者にウォームアップとして温感リラクゼーションか軽い体操を行う。要求場面の伝言ゲームに関する言語教示を行う。伝言ゲームとは、まず隣人とペアになりお互いに分身役となる。そして、自分が要求したい内容を告げる相手（会場の中から自由に選ぶ）に対して要求内容（自由想定でもヒント集から選んでもよい）を自分の分身役に伝言してもらうという方法である。自分の要求内容を自分

自身で告げるよりも、分身役に代理で告げてもらった方が、強く緊張しなくてすみ、かつ分身役の技術を観察学習できるメリットがある。

うまくできない場合、その原因を考えさせる。たいていはコミュニケーションの推移を悲観的に予測しているなど、妨害的な認知要因を持っている。的確な「原因選び」ができていないかどうかを確認し、本人にフィードバックする。時間になったら終了し、講評を行う。評価ポイントは12項目ある。1；表情の豊かさ、2；視線の一致、3；正しい姿勢の保持、4；ジェスチャーの有無、5；声の適切な大きさ、6；相手に伝わりやすい言葉を選んだか、7；自分の気持ちを正直に述べたかどうか、8；相手の気持ちを確認する言葉やゼスチャーを入れたかどうか、9；臨機応変な対応ができたかどうか、10；不安の程度、11；思考の混乱の有無、12；無気力、やる気のなさ、の合計12項目である。最後に、「アサーションのコツ」という小冊子を配布してヒントになりそうな部分を読み上げる。

第6セッション（アサーショントレーニング—伝言ゲーム式ロールプレイング拒否場面）

今回のテーマは拒否場面であるので、断ったり誤ったりする場面を選ぶ。また拒否された側の気持ちも聞きだす。①～⑥までの流れはほぼ同様。

第7セッション（アサーショントレーニング—伝言ゲーム式ロールプレイング感情表出場面）

感情表出場面とは、単なる用件の伝達ではなく、現在の自分の気持ちや気分を述べる、相手に対する感想を伝える、挨拶をする、などのことである。

第8セッション（アサーショントレーニング—伝言ゲーム式ロールプレイング総合場面）

基本的な流れは同じであるが、最後は、要求、拒否、感情表出の3つの場面を自由にとりまぜてロールプレイングを行う（図3）。総合的な評価を中心にする。

【結果】

AD群の8週間にわたる認知行動療法（CBT）の治療結

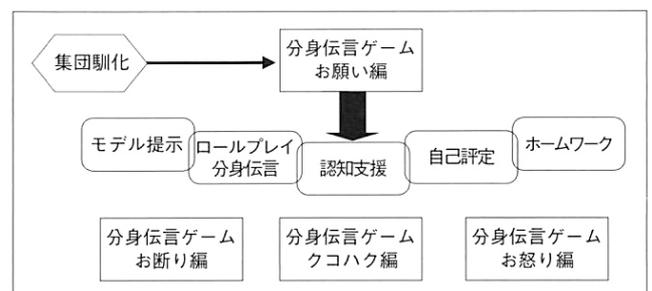


図3 アサーショントレーニングの流れ

果を表6に示す。8週間の集団療法期間の前後で比較すると、自己主張性 (P<0.05)、相手への配慮 (P<0.05)、自尊感情 (P<0.05) はいずれも有意に改善していた。

また、介入期間中は毎日日記をつけるように指示し、特に良かったことと嫌であったことを記載するよう指示した。この快・不快各事態に対する帰属表現部分を抜粋し、帰属表現数に占める分量を100%で表記したものが図4である。再帰属法が話題になる第2セッションまでの日記(約1ヶ月)をPreの解析に用い、介入終了前最後の1ヶ月をPostの解析に使用した。Preにおいては、快・不快の事態間で差異があった。すなわち、快事態における帰属は「努力」などの比較的個人裁量性の高い帰属が可能であるのに対して、不快事態になると一転して「努力」帰属が困難になる。また、不快事態では体調、能力、季節などの裁量性の低い原因に帰属する傾向が顕著であった。このことから、特に不快経験をしたときに不適応をきたしやすい帰属思考の特徴を有しているといえよう。これらの現象がPostでは改善され、快不快の事態間差がなくなっており、適応的帰属が可能になったといえる。

さらに、掻破行動の自己観察を行い、介入後に掻破行動が有意に減少 (p<0.05) し、その効果が介入終了後2ヶ月は持続していた(図5)。

【考察】

研究1の結果、AD群において、また健常群においても

楽観的帰属と主張スキルの間には特徴的な相互補完的関係があることが明らかになった。AD者は健常者に比べてすべての心理検査値が悪かった。帰属と主張性の組み合わせから4分割すると、AD群も健常群も、自己評価に及ぼす影響は高い主張スキルと強い楽観帰属傾向を有するH/h群がもっとも良性であり、L/l群が悪い結果であった。このことは、自己評価との関連を論じた従来のスキル研究や帰属研究を鳥瞰しても何ら矛盾しない(Rees&Graham, 1991;Weiner, 1979)。

またH/l群はL/h群と自己評価への影響に有意な差がないことから、主張スキルに楽観的帰属が伴わない場合、スキルの効果は半減する。このことから、主張性と帰属は互いに補完し合いながら自己評価に寄与していると考えられる。さらに興味深いことは、Kiss-18全項目をH/h群とH/l群、及びL/h群とL/l群の比較したところ、6項目で有意差が出たが、その中の半数は“対人トラブルへの対処”に関連した項目であった、主張スキルが良くても楽観的帰属が未熟なタイプは、“対人トラブルへの対処”を苦手としていることが判明した。

では、なぜ“対人トラブルへの対処”には帰属の良し悪しが効力をもつのであろうか。Graham, S. (1990)は帰属スタイルが対人トラブルの行動過程に影響することを指摘し、Milner(1993)は社会的認知理論の中で、帰属の歪みが正確な対人情報のインプットを妨害することを明らかにしている。またWeiner (1974)は、帰属は失敗経験時の

表6 AD患者の行動観察によるアサーティブネスと自尊感情の変化

	得点範囲	Pre	SD	Post	SD	After	SD	p
自己主張	[0-5]	2.1	3.2	3.2	1.4	2.9	2.1	Pre > Post*
相手への配慮	[0-5]	1.8	2.4	2.7	1.6	2.4	1.7	Pre > Post*
自尊感情	[10-40]	19.1	14.3	29.3	5.4	30.4	8.9	Pre > Post*

n=17

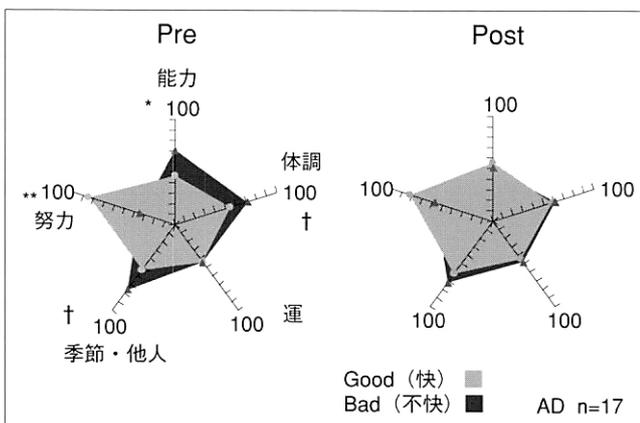


図4 治療期間中の帰属の日記分析

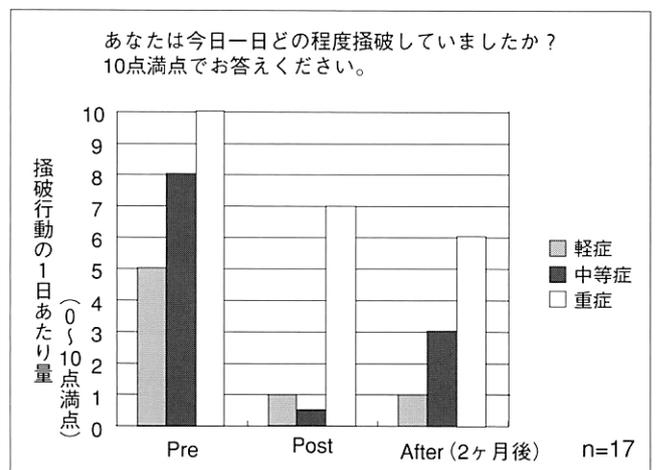


図5 掻破行動の変化

感情の調整に寄与すると指摘している。悪化した感情はスキルの妨害因子であり、対人トラブル場面におけるアサーティブコミュニケーションを阻害し得るのではないかと考えられる。それに対して、良い帰属は失敗経験後の感情の悪化を防ぐ機能を持ち、このことは“対人トラブルへの対処”をスムーズに遂行させる要因になるだろう。

研究2の結果は、AD患者に対して、集団認知行動療法は主張性の向上、及び帰属認知の改善に寄与し、また搔破行動を減少させた。このことは、皮膚科医療や学校保健室などでAD患者向けに実施する心理的サポートが本人の状態を改善することを示す。今後の同疾患者に対するケアのあり方に対し、1つの重要な提言となるだろう。ところで、主張行動の改善が自尊心を向上させた他に、おそらく社会的ストレスを減少させた可能性がある。今後はストレス関連変数を加味したADの認知行動モデルを検証し、より改善効果の高い認知行動的介入パッケージを作成したい。

(文 献)

- 1) 奥野英美・勝岡憲生他 2000 成人アトピー性皮膚炎患者の心理・社会的要因の研究. 日本皮膚科学会雑誌、110、837-844.
- 2) 奥野英美・上里一郎 1999 アトピー性皮膚炎患者のストレス尺度の作成 日本カウンセリング学会第32回大会発表論文集、207-208.
- 3) 富家直明・松坂香奈枝・内海 厚 2000 摂食障害の再帰属療法と主張訓練 教育科学 6、13-25.
- 4) Seligman, M.E.P. 1991 Learned Optimism. New York: A.A.Knopf.
- 5) 山本真理子・松井豊・山成由紀子 1982 認知された自己の諸側面の構造 教育心理学研究 30 64-68
- 6) シェーン・リー /R.S. グレイアム共著 1996 高山巖・吉牟田直孝・吉牟田直 (共訳) 自己表現トレーニング - ありのままの自分を生きるために - 岩崎学術出版社 67-83 113-129

顔の魅力を規定する要因の実験計量心理学的分析

東北大学大学院文学研究科人間科学専攻心理学講座*、ATR 人間情報科学研究所**

行場 次朗*、伊師 華江*、蒲池 みゆき**

Two experiments were conducted in order to investigate the psychological factors affecting attractiveness on composite faces. Feminized or juvenilized Japanese faces were created by morphing between average male and female adult faces or between average male (female) adult and boy (girl) faces. In Experiment 1, the participants were asked to rank the attractiveness of these faces. The results showed moderately juvenilized faces to be highly attractive. In Experiment 2, we analyzed the impressions on the composite faces by the semantic differential method and determined the factors that largely affected attractiveness. Based on the factor scores, we plotted the faces in factor spaces and analyzed the locations of attractive faces. We found that most of the attractive juvenilized faces involved impressions corresponding with the augmentation of femininity characterized by the factors of “elegance”, “mildness”, and “youthfulness”, which the attractive faces potentially had.

1. 緒言

顔の魅力の評価は、文化的な要因や個人的な好みによって左右されると思いがちであるが、近年の研究では、異文化間でも個人間でも魅力の評定にかなりの一致がみられることが報告されている¹⁾。それらの研究では、平均顔や対称性の問題が取り上げられることが多い^{2, 3, 4)}。

最近、男性顔でも女性顔でも、平均顔を適度に女性化すると魅力が増すことが報告されている。この要因として Perrett et al³⁾ は、女性的な顔が温和性や誠実性などのポジティブな性格特性を感じさせるのに対し、男性的な顔は支配性、攻撃性、冷徹性などのよりネガティブな性格特性を感じさせることをあげた。

しかし、Meyer & Quong⁵⁾ は、女性化の効果は、3つの異なった側面、つまり生物学的、画像的、心理的側面から注意深く考察する必要があると説いた。生物学的側面とは、成長に伴うホルモン変化によって、顔の形態がどのように変容するかに対応する。画像的側面とは、モーフィングによって作り出される男性顔と女性顔の間を連続的に移行する変形特性にあたる。心理的側面は、種々の形状の顔からどのような印象が感じられるか、人間の感受特性に対応する。Meyer & Quong⁵⁾ は、顔の画像的変形は生物学的変形とは異なるものであり、心理的側面でも予想外の影響があらわれる場合があることを指摘した。例えば、画像的に女性化された顔は、生物学的側面における女性的特性を増強させたというより、むしろ若さが強調されてしまう

可能性が高いという。この指摘に関して、Perrett et al⁶⁾ は、成長期において男性の顔は子供の顔から大きく変形するのに、女性の顔はわずかしかな変形しないので、女性的特性と若年の特性はもともと複雑に交絡していると主張している。

顔の魅力とネオテニー（幼態成熟）の間には関連性があることが以前から指摘されてきたが⁷⁾、男性顔と女性顔に女性化ならびに子供化変形を施し、それらの顔の魅力度を定量的に比較検討した実験的研究はほとんどない。そこで今回の研究では、日本人男性、女性、男児、女児の平均顔をそれぞれ作成し、女性顔と男性顔の間でモーフィングを行うだけでなく、女性顔と女児顔、男性顔と男児顔の間でもモーフィングを行って合成顔を作成した。そして、実験1では、被験者にそれらの合成顔の魅力度を順位付けしてもらい、女性化変形と子供化変形のどちらが魅力度をより高めるのか検討した。実験2では女性化変形と子供化変形の心理的側面を分析するために、セマンティックディファレンシャル (SD: semantic differential) 法⁸⁾ をもちいてそれらの変形を施した顔が生み出す種々の印象を測定し、主要因子を抽出した。そして、それらの因子の中で、魅力度に特に大きな影響を与える因子を確定し、従来の知見もふまえて包括的な考察を行った。

2. 実験1

女性化ならびに子供化変形を施した合成顔の魅力度を測定する際に、本研究では順位法を用いた。これは、複数の合成顔を同時に被験者に見せ、その中から魅力度が高いと感じられるものを第1位から3位まで順位をつけて選んでもらう課題である。このような方法を採用した理由は、平均顔をモーフィングして作成される合成顔は、一般にどれも整った顔立ちで類似性が高いので、それらの間で魅力度の相対的違いを判断するには、同時比較を行い、高低を決



Psychophysical investigation of factors affecting facial attractiveness

Jiro Gyoba

Department of Psychology, Graduate School of Arts & Letters, Tohoku University

める必要があったためである。

2.1. 方法

2.1.1. 被験者

男女大学生それぞれ 28 名ずつが実験に参加した。平均年齢は 21.02 歳であった。

2.1.2. 顔画像の作成

最初に日本人女性、男性、女児、男児の平均顔を作成した。図 1 に示すように以後、それぞれの平均顔を F100、M100、G100、B100 とよぶことにする。平均顔のモデルとなったのは、年齢が 20 歳から 30 歳の成人女性と男性それぞれ 20 名、6 歳から 7 歳の女児と男児それぞれ 20 名であった。顔画像はすべて特定の表情を表出していない真顔を正面から撮影したもので、FUTON システム⁹⁾ を用いて 87 個の特徴点にもとづいて数値化され、XY 座標値と RGB 値について平均値が計算された。すべての顔画像のサイズは、瞳孔間距離が一定になるように標準化された。顔のテクスチャーについても標準化してから一定に設定されたが、これは今回の実験では顔の魅力度に及ぼす形状的要因に焦点をあてて検討するためである。

つぎに、F100 と M100、F100 と G100、M100 と B100 の間で 10% きざみでモーフィングを行った (図 2)。例えば、mf90 という符号がつけられた合成顔は、男性の平均顔の特性を 90% と女性の平均顔の特性を 10% 含むように作成された中間的画像である。一方、mf110 と呼ばれる合成顔は、男性の平均顔を女性の平均顔からより反対方向に離れるように 10% 誇張した画像である。図 2 において

m50 と fm50 は男性平均顔と女性平均顔の特性を 50% ずつ含む画像なので両者は同一の画像となるが、本実験では、それらを男性の顔、あるいは女性の顔として取り扱う場合があるので、別の名前を付けて呼ぶことにする。合成顔は全部で 80 パターン作成され、楕円形のフレームをつけて切り出したのち、高画質プリンター (Epson MP840C) を使って A6 サイズで印刷された。

2.1.3. 顔画像の提示

図 2 に示すように男性の平均顔 M100 を中心として女性

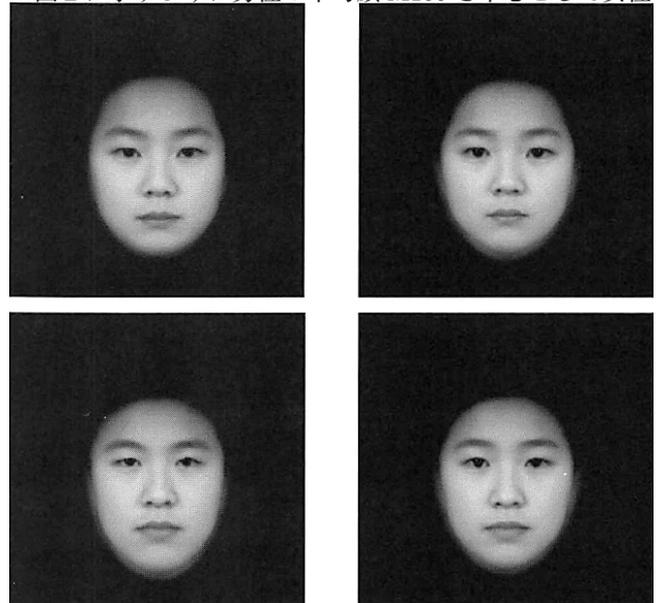


図 1 本研究で用いられた平均顔 (左上:男児の平均顔、右上:女児の平均顔、左下:男性の平均顔、右下:女性の平均顔)。その他の合成顔はこれらの平均顔に基づいて作成された (図 2 参照)。

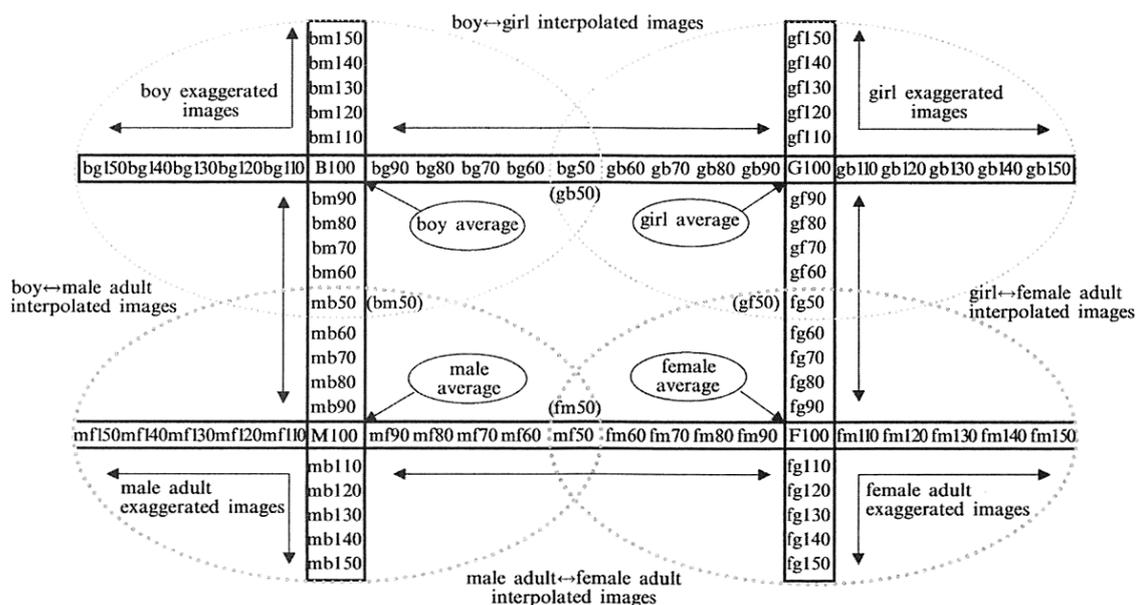


図 2 合成顔の作成方法を図式的に示したもの (詳しくは本文参照)。左下の円内の合成顔は男性顔に対応し、右下の円内のそれらは女性顔に対応する。

化変形と子供化変形の2方向にわたってモーフィングされた21個を男性合成顔として提示した。同様に、女性の平均顔F100を中心としてモーフィングされた21個を女性顔として提示した。すべての顔画像はA6サイズのカードケースに入れて被験者に提示された。

2.1.4. 手続き

被験者は2グループ（それぞれ男女14名ずつ）に分けられ、各グループの被験者は、11個の男性顔と11個の女性顔を別々に評価した。それらの合成顔は20%きざみでモーフィングした10個にM100あるいはF100を加えたものである。2グループの被験者は、相補的に異なったモーフィング率の合成顔を評価したので、両グループのデータをあわせれば結果として10%きざみに変形されたすべての合成顔についてデータが集められた。両グループの評価の等質性はすべての被験者に提示されたM100とF100に対する判断に差がないことをチェックすることで確認された。各グループにおいて、半数の被験者は男性顔を先に、残りの半数は女性顔を先に評価した。いずれの場合でも被験者の課題は、同時に机の上にランダムに並べられた11個の合成顔の中から、魅力度が高いと感じられるものを第1位から3位まで順位をつけて選んでもらうことであった。

2.2. 結果

被験者が第1位に選んだ場合には3点、第2位は2点、第3位は3点を与え、各合成顔で合計して魅力度得点(attractiveness scores)を算出した。この得点は、それぞれの顔の絶対的な魅力度を表すものではなく、男性顔、女性顔内の相対的な魅力度の違いをあらわす。魅力度得点が高かった合成顔を表1に示した。

被験者間の判断の一致性をみるために、それぞれの顔を第3位以内に選んだ被験者の人数をカウントした。表1に示された魅力度得点が高い顔はどれも多数の被験者が選んでおり、被験者間の一致性は高いといえる。特に女性顔でその傾向が顕著である。

表1にあげられた高魅力度得点の女性顔は、大部分が子供化変形を施した合成顔であることがわかる。このデータを見る限り、女性顔では、女性化変形よりも子供化変形が

より魅力度を増強しているといえる。男性顔では、女性化変形と子供化変形をしたものの両方において魅力度が高い顔として選定されているが、上位にあげられた合成顔の魅力度得点の差はわずかである。

つぎに、女性化変形率と子供化変形率を説明変数として、魅力度得点を予測する重回帰分析を行った。その結果を表2に示す。男性顔では回帰式の重相関係数は高く、女性化変形率と子供化変形率の標準偏回帰係数はともに有意であった。女性顔でも回帰式は有意であったが、子供化変形率の標準偏回帰係数のみが大きく、有意であった。これらの結果は、表1の結果と同じ傾向を示しており、男性顔においては女性化変形と子供化変形の両方が魅力度を増加させるのに有効であるのに対し、女性顔においては、子供化変形のほうが魅力度をあげるより優勢な要因になっていることを示している。

2.3. 考察

Perrett et al³⁾の研究では、被験者は女性化変形を連続

表1 魅力が高いと判断された上 5つの合成顔。

魅力度得点(attractiveness score)は順法(本文参照)に基づいて算出されたものである。選出頻度(percent frequency)は、全被験者の判断をして、それぞれの顔がどれくらいの確率で上3内に選ばれたのかを示す。

Male faces					
ranking	attractiveness score	images	transformation		percent frequency
1	27	mb60	juvenilized	40%	43%
1	27	mb70	〃	30%	43%
3	26	mb80	〃	20%	43%
4	25	mf90	feminized	10%	43%
5	23	mb50	juvenilized	50%	36%

Female faces					
ranking	attractiveness score	images	transformation		percent frequency
1	43	fg60	juvenilized	40%	64%
2	32	fg80	〃	20%	61%
3	29	fg70	〃	30%	50%
4	25	fg90	〃	10%	50%
5	24	F100	female adult average	0%	43%

表2 女性化変形率と子供化変形率を説明変数とした魅力度得点の重回帰予測。

Variable	Male faces $R^2 = 0.68, F(2,19) = 19.86^{**}$		Female faces $R^2 = 0.27, F(2,19) = 3.54^*$	
	Standardized partial regression coefficient	F value	Standardized partial regression coefficient	F value
Feminization	0.50	14.69 **	0.25	1.69
Juvenilization	0.65	25.02 **	0.45	5.39 *

$p < .01^{**}, p < .05^*$

的に施した合成顔の一覧からもっとも魅力度が高いものを選ぶように教示された。その結果、男性顔でも女性顔でも、女性化変形を適度に施した顔が好まれた。今回の実験では、女性化変形だけではなく、子供化変形についても実験的検討がなされたが、特に女性顔については女性化変形よりも子供化変形のほうが魅力度を増加させるのに有効であることを示す結果が得られた。

Cunningham¹⁰⁾ は以前より、若年性は魅力を規定する重要な要因の一部であることを主張している。また、若年性は Meyer and Quong⁵⁾ によって、画像的女性化により潜在的にもたらされる効果であることが指摘されている。実際、若い女性の顔が小さくて狭い顎、大きな目と短い鼻など、物理的にも子供に似た特徴をもっていることが示されている^{11,12)}。また、コンピュータグラフィックツールを用いて、被験者のイメージにもとづいて顔を生成させると、女性の顔と子供の顔は計量的には同一のカテゴリーに分類できることが報告されている¹³⁾。これらの結果は魅力的な女性の顔と子供の顔には、心理的に共通する意味や特性が含まれる可能性を示唆している。

したがって、つぎの実験では、女性化変形や子供化変形を施した合成顔が、実際にどのような印象をかもしたのか SD 法を用いて調べ、顔の魅力度に実質的な影響を与える心理的要因を抽出する。

3. 実験 2

実験 2 の主要な目的は、合成顔が生み出す種々の印象と魅力度の関係を分析することである。顔の魅力を評価する

プロセスは、種々の印象によって影響を受けるが、それらの印象は、比較的少数の潜在的な心理的要因にまとめられると考えられる。もしそうなら、顔の魅力とそれらの要因の間には相関関係があるはずである。

実験 2 では最初に SD 法を用いて合成顔の印象を複数の評定尺度で測定した。つぎにそれらの印象を規定する因子と、実験 1 で求めた魅力度得点の間の相関係数を算出し、魅力度に有意に影響を与える主要因子を抽出した。それらの主要因子で規定される空間上に平均顔とともに高魅力の合成顔をプロットし、それらの位置関係の意味を考察した。

3.1. 方法

3.1.1. 被験者

日本人大学生および大学院生男女各 27 名で、全員、実験 1 に参加しておらず、平均年齢は 20.95 歳であった。

3.1.2. 顔画像

実験 1 で作成した 80 個の合成顔について、半数の被験者が半数の顔画像を、残りの半数が残りの顔画像を評定した。

3.1.3 SD 尺度の選定と手続き

実験 2 に先立って行われた予備実験では、SD 法を用いた顔印象の測定でよく使われる 31 個の形容詞対を用いた。被験者は実験 1 に参加しておらず、実験 2 にも参加する予定のない 20 名であった。40 個の顔を被験者間で統制された順序で提示し、7 段階尺度で評定を行った。得られた評定値について予備的な因子分析を行い、因子負荷量と共通

表 3 SD 法により得られた合成顔の印象の因子構造

Adjective-pairs		Factor loadings after varimax rotation				communalities	
		F1	F2	F3	F4		
gentle	fearful	0.8116	0.3050	0.1072	-0.0206	0.764	mildness
warm	cold	0.7826	0.1832	0.0020	0.1508	0.669	
mild	violent	0.7629	0.2892	0.0148	-0.2011	0.706	
altruistic	selfish	0.7266	0.2146	-0.2061	-0.0196	0.617	
obedient	dominant	0.7011	-0.0928	-0.3367	0.2919	0.699	
flexible	stubborn	0.6719	0.2822	0.2240	-0.0369	0.583	
beautiful	ugly	0.2258	0.7949	0.2267	0.1013	0.745	elegance
charming	non-attractive	0.2596	0.7001	0.1638	0.2918	0.669	
like	dislike	0.4606	0.6450	0.0853	0.2217	0.685	
elegant	inelegant	-0.4277	0.6381	0.0365	-0.1205	0.606	
feminine	masculine	0.3085	0.5353	0.4771	-0.0536	0.612	
childish	adult	0.0614	0.1761	0.7983	0.0066	0.672	
young	old	0.0182	0.4354	0.6223	0.1892	0.613	
weak	brawny	0.4132	0.2335	0.5674	-0.3610	0.678	
emotional	rational	-0.1920	-0.1048	0.5343	0.0731	0.339	
cheerful	dismal	0.0270	0.2161	0.0348	0.7318	0.584	vivaciousness
lively	tired	-0.0916	0.1584	0.0734	0.7231	0.562	
active	passive	-0.5202	-0.0036	-0.2434	0.5510	0.633	
eigen value		4.4241	2.9342	2.2299	1.8459		
contribution of each factor (%)		24.5782	16.3012	12.3882	10.2548		
cumulative contribution (%)		24.5782	40.8795	53.2677	63.5225		

性を考慮して有効性の高い形容詞対を18個選定した(表3参照)。実験2の被験者はそれらの尺度で評定を行った。その他の手続きは予備実験と同じであった。

3.2. 結果と考察

3.2.1 因子分析

全被験者の評定データはまとめて直交解主因子法による因子分析にかけられ、バリマックス回転が施された。固有値が1以上の因子が4つ抽出されたが、それらの因子負荷量を表3に示す。これらの因子はそれぞれ、「柔和性」(代表的形容詞: やさしい、あたたかい)、「美感性」(美しい、上品な)、「若年性」(若い、こどもらしい)、「活力性」(元気な、活発な)と名づけられ、累積寄与率は63.5%であった。

3.2.2 因子得点と魅力度得点の相関

実験1で求めた魅力度得点と因子得点の相関を求めたところ、有意な相関が得られたのは「柔和性」(男性顔、 $r=0.558$ $p < .05$; 女性顔、 $r=0.460$ $p < .05$)、「美感性」(男性顔、 $r=0.814$ $p < .01$; 女性顔、 $r=0.576$ $p < .01$)、そして「若年性」(男性顔、 $r=0.490$ $p < .05$; 女性顔、 $r=0.406$ $p < .05$)であった。したがって、これら3つの因子が魅力度を規定していることが示された。

3.2.3 因子得点による魅力度得点の重回帰分析

表4に3つの因子得点を説明変数として、魅力度得点を重回帰予測した結果を示す。男性顔における重相関係数は $R^2=0.73$ 、女性顔のそれは $R^2=0.38$ であり、どちらも有意であった。標準偏回帰係数をみると、「若年性」につく係数に比べて、「柔和性」と「美感性」には比較的大きな係数がついていることがわかる。このことは、心理的な要因では、「柔和性」と「美感性」のほうが「若年性」よりも魅力度に大きな影響を与えていることあらわしている。

3.2.4 因子空間上での高魅力度合成顔のプロット

合成顔ごとに因子得点を求めた。さらに、それぞれ21枚ずつの男性、女性、男児、女児の合成顔について、それらの平均因子得点を求め、それぞれ Male Adult、Female

Adult、Boy、および Girl という記号で図3にプロットした。さらに、それぞれの平均顔 (M100, F100, B100, G100) と、魅力度得点が高かった上位3つの合成顔 (mb60, mb70, mb80、ならび fg60, fg80, fg70) も同時にプロットした。

「美感性-柔和性」の因子空間では(図3A)、Girlの「美感性」が最も高く、つぎに Female Adult、Boyの順になっている。Male Adultの「美感性」はかなり低い。「柔和性」に関しては、Female Adultが最も高く、Girlが2番目である。Boyと Male Adultの「柔和性」得点はともに低い。同様の傾向は、平均顔である M100, F100, B100, G100の間でも認めることができる。最も魅力度得点が高かった女性顔 (fg60) は、Female Adult や Girl よりも「美感性」が高く、「柔和性」に関しては、Female Adult と同じくらいの得点であった。興味深い点は、fg60は40%女児化したものにもかかわらず、この因子空間内では、Male Adult と Female Adult を結んだ線の延長上にあることである。同様の傾向は、魅力度得点の高い fg80 と fg70 についてもいえる。このことは、画像的に子供化した高魅力の女性の顔は、実は心理的には女性的印象の増強に対応した特性を持つことを示している。一方、男性顔でもっとも魅力度得点が高かった mb60 は、「柔和性」に関しては Male Adult と同程度であったが、「美感性」は Male Adult よりも Boy に近かった。

「美感性-若年性」の因子空間では(図3B)、Girlの「若年性」得点が最も高く、つぎに Boy、Female Adult、Male Adultの順であった。同様の傾向は、平均顔である M100, F100, B100, G100の間でも認められた。非常に興味深い点は、この因子空間上では、魅力度得点が高かったすべての合成顔 (mb60, mb70, mb80, fg60, fg80, fg70) は、Male Adult と Female Adult を結ぶ直線上か、その延長上にあり、しかもより女性的特性を強める方向に位置することである。

これらの結果は、男性顔でも女性顔でも、画像的に子供化され、魅力度が高いと評価された合成顔は、心理印象空間上では、実は女性的特性を増強した特性を持っていることを示している。

表4 因子得点に基づく魅力度得点の重回帰予測

Variable	Male faces $R^2 = 0.73, F(3,17) = 15.62^{**}$		Female faces $R^2 = 0.38, F(3,17) = 3.52^*$	
	Standardized partial regression coefficient	F value	Standardized partial regression coefficient	F value
"mildness"	0.33	4.51 *	0.27	1.37
"elegance"	0.56	8.55 **	0.35	1.31
"youthfulness"	0.19	1.18	0.14	0.29

$p < .01$ **, $p < .05$ *

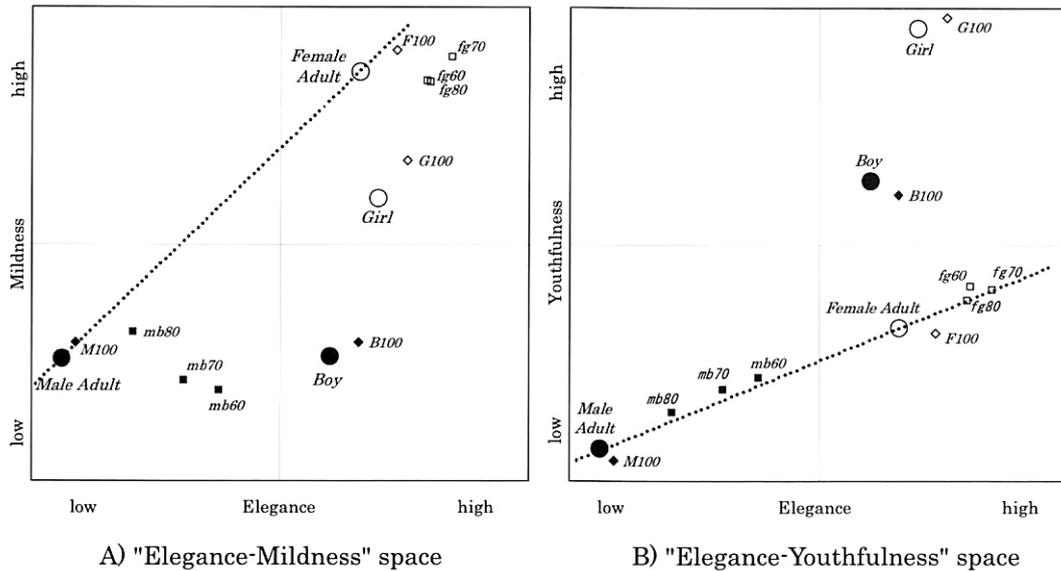


図3 因子空間上での魅力的な顔のプロット。Male Adult、Female Adult、Boy、Girlなどの記号は、それぞれ男性、女性、男児、女児の合成顔の平均因子得点をあらわす。その他の記号については図2を参照のこと。Male AdultとFemale Adultをつなぐ点線は、心理印象空間上における男性顔と女性顔の連続的変化に対応する。A) 横軸は「美感性」因子、縦軸は「柔和性」因子の高低をあらわす。B) 横軸は「美感性」因子、縦軸は「若年性」因子の高低をあらわす。

4. 総合考察

本研究では、日本人男性と女性の平均顔間でモーフィングを行い、女性化変形をかけた合成顔だけでなく、男性と男児、女性と女児の平均顔間でもモーフィングを行い、子供化変形を施した合成顔についても魅力度や印象特性を調べる2つの実験が行われた。

実験1では、順位法によって魅力度得点を求め、女性化変形と子供化変形のどちらが魅力度を増大させるのに効果的であるのかを調べた。その結果、女性顔では女性化変形よりも子供化変形を施した合成顔のほうがより魅力度が高いと評価された。男性顔では、両変形が同程度に好まれた。これらの傾向は、女性化変形率と子供化変形率を説明変数に用いて魅力度得点を予測した重回帰分析でも確かめられた。

しかし、実験2で合成顔の種々の印象をSD法によって分析したところ、魅力度が高いと評価された合成顔の大部分は、画像的に子供化変形を施したもので、実際には女性的印象を増強した特性をもっていることがわかった。因子得点から魅力度得点を予測する重回帰分析では、「若年性」因子の効果はそれほど強いものではなく、むしろ「美感性」や「柔和性」が魅力度を増強するのに大きな影響力を持っていることが明らかになった。

本研究で得られたこれらの結果は、顔の魅力を考察する際に、生物学的側面や画像的側面だけでなく、心理的側面の考察が重要であることを示すものである。画像的に子供

化された顔に魅力を感じるのは、心理的側面から分析すると、子供らしい印象に依拠するものではなく、むしろ女性顔が潜在的にもつ「美感性」や「柔和性」に代表される特性を強めた印象に基づくものであることが明らかにされた。

最後に、本研究では顔形状の効果に焦点をあてたために、合成顔のテクスチャーは一定に操作されたが、テクスチャーが魅力におよぼす影響は重要であることが知られており¹⁴⁾、今後はテクスチャー情報についても女性化および子供化変容を施し、より総合的に顔の魅力の規定する心理的要因を検討する研究が望まれる。

付記 本稿は著者らにより執筆され、Perception誌に掲載された同内容の論文¹⁵⁾を和訳し、編集したものである。

(引用文献)

- 1) Langlois, J. H., Kalakanis, L., Rubenstein, A. J., Larson, A., Hallam, M., and Smoot, M. 2000 Maxims or myths of beauty? A meta-analytic and theoretical review. *Psychological Bulletin*, 126, 390-423.
- 2) Langlois, J. H. and Roggman, L. A. 1990 Attractive faces are only average. *Psychological Science*, 1, 115-121.
- 3) Perrett, D. I., Lee, K. J., Penton-Voak, I., Rowland, D., Yoshikawa, S., Burt, D. M., Henzi, S. P., Castles, D., and Akamatsu, S. 1998 Effects of sexual dimorphism on

-
- facial attractiveness. *Nature*, 394, 884-887.
- 4) Rhodes, G., Yoshikawa, S., Jeffery, L., Clark, A., Lee, K., McKay, R., and Akamatsu, S. 2001 Attractiveness of facial averageness and symmetry in non-western cultures: In search of biologically based standards of beauty. *Perception*, 30, 611-625.
 - 5) Meyer, D. A. and Quong, M. W. 1999 The bio-logic of facial geometry. *Nature*, 397, 661-662.
 - 6) Perrett, D. I. and Penton-Voak, I. S. 1999 Reply: The bio-logic of facial geometry *Nature*, 397, 662.
 - 7) Jones, D. 1995 Sexual selection, physical attractiveness, and facial neoteny cross-cultural evidence and implications. *Current Anthropology*, 36, 723-748.
 - 8) Osgood, C. E., Suci, G. J., and Tannenbaum, P. H. 1957 The measurements of meaning. Univ. of Illinois Press, 275-284.
 - 9) Kamachi, M., Bruce, V., Mukaida, S., Gyoba, J., Yoshikawa, S., and Akamatsu, S. 2001 Dynamic properties influence the perception of facial expressions. *Perception*, 30, 875-887.
 - 10) Cunningham, M. R. 1986 Measuring the physical in physical attractiveness. Quasiexperiments on the sociobiology of female facial beauty. *Journal of Personality and Social Psychology*, 50, 925-935.
 - 11) Montague, A. 1989 *Growing young*. 2nd edition (New York: Bergin & Garrey Publishers)
 - 12) Zebrowitz, L. A. 1997 *Reading faces - Window to the Soul?* (Westview Press, A Division of HarperCollins Publishers, Inc.)
 - 13) Yamaguchi, K. M. and Oda, M. 1996 Study on creating different facial images for age and sex. Information Processing Society of Japan, SIG Notes, HI64-2, 7-12. [in Japanese]
 - 14) Fink, B., Grammer, K., and Thornhill, R. 2001 Human (*Homo sapiens*) facial attractiveness in relation to skin texture and color. *Journal of Comparative Psychology*, 115, 92-99.
 - 15) Ishi, H., Gyoda, J., Kamachi, M., Mukaida, S., and Akamatsu, S. 2004 Analyses of facial attractiveness on feminized and juvenilized faces. *Perception*, 33, 135-145.

奇抜な化粧—文化の表現と表情? (ヴィジュアル系の顔: 原因と影響)

千歳科学技術大学

Johnathon John

The Harajuku Jingu-bashi cosplay is a remarkable expression of youth sub-culture which, through Media attention inside and outside of Japan, has come to represent: 'The Face of Japan'. The sources of the cosplay are the costume, hairstyles and make-up of Japanese Visual Bands (Visual Kei). Though the use of eXtreme make-up by rock bands is not unknown outside Japan, and though the mimicking of bands' style by fans is nothing new, yet the Jingu-bashi phenomenon is unique in itself, and the Visual Kei trend is uniquely Japanese-not least in that Japan has a tradition of eXtreme make-up in Popular Culture: Kabuki, Geisha, Takarazuka. Though these have had and do have a strong following of dedicated-even fanatical-fans, none of them have had the direct spill-over effect of the Visual Kei.

Since my research interests lie in various aspects of 'face'-physical and metaphorical-and even though in actuality 'face' cannot be isolated from other aspects of human display, I was motivated to delve into the significance of the phenomenon in general and, more specifically, to search for meaning in the eXtreme make-up tradition:

- What is the significance of the eXtreme make-up tradition?
- Are Japanese Visual Kei a manifestation of this tradition?
- Is the Jingu-bashi phenomenon indicative of traits in Japanese self-expression?
- What conclusions (if any) can be drawn with regard to Japanese face, make-up, and self-expression?

It is a complex matter, overlapping several fields and eras. Simply:

- Traditional geisha and kabuki faces (modes of facial-display using eXtreme make-up) have come to be symbolic of Japan and Japanese-and they express certain ideals of demeanor and expression.
- Though the roots go back further in time, these faces are redolent of the Edo era-in particular the ethos of the 'Floating World'.
- Such ideals and ethos have been powerful influences on the cultural psyche of contemporary Japan, perpetuating traditions of facial-display in relation to status, gender, and emotions. These traditions seem to be based on the concept of 'ideals'.
- The Visual Kei ethos exhibits many parallels with that of the 'Floating World', but a sub-culture of young Japanese are using it to subvert the traditions of facial- display and self-expression.
- Though Visual Kei Cosplay is, in its entirety: 'copying'-yet it is seen as 'self-expression' by those who do it.

Though it is impossible to assess the historical or socio-cultural significance of trends and events while they are happening, my personal sense is that the Visual Kei / Cosplay phenomenon represents tradition in transition.

1. 緒言

1.1 状況

この研究の出発点は原宿神宮橋コスプレ現象であった。そのような現象が組織も経済的基盤もなく、階級制度もなく、いかなる種類の計画もマネジメントもなく何年もの間起こっているということは、私にとって驚くべきことであった。それはサブカルチャーの純粋な現れであるばかりでなく、顔に関する研究のいくつかの関心事という見地からまた私の興味を惹いた。

今から8、9年前に私は偶然神宮橋コスプレイヤーを目



eXtreme Make-up — eXpression(s) of a Culture? (The Faces of 'Visual Kei': Origins & Influences)

Johnathon John

Chitose Institute of Science & Technology

にした。日本人の若者たちが、お気に入りのヴィジュアル系バンド—その突飛な化粧と衣装のためにそう呼ばれる—と張り合うように、手の込んだ衣装、ヘアスタイル、化粧を身に着け神宮橋周辺を練り歩いていた。同じ興味を共有する人間のどの集団でも明白である一種の仲間意識とは別に、そこにパフォーマンスあるいはディスプレイの大きな要素も見られる。そして常にコスプレイヤーと同じくらい多くの見物人—一般大衆やマスメディア—がいて、写真に撮られたり撮ったりで周辺は大変な活気である。また、一人一人が、そしてお互いに、化粧や髪直しといった身づくろいに多くの時間をかける。これらの活動は儀式的で部族的に見え、民族誌研究の写真や 'Decorated Skin'¹⁾ のようなボディディスプレイの本や Leni Riefenstahl のアフリカの写真を思い出させる。このような本はナショナルジオグラフィックのような雑誌と同様、そのような人間の行動を「異国風の別のもの」—一種の文化覗き趣味—として常に視線を向けている。そしてマスメディアの神宮橋への大規模な取材には大いにその傾向が見られる。

神宮橋現象がマスメディアの注目を大いに集めているという事実は、小サブカルチャーの数百人の参加者たちを現代日本の世界的な代表という立場まで押し上げているという理由で興味深い。eXtremeディスプレイをしたこれらの少女たち（ほとんどが少女である）は、世界中で「日本の顔」となった。実際彼女たちは、自分たちに刺激を与えたバンドよりもはるかに世界的なマスメディアに登場している。

最も驚くべきことは、それが公衆の出来事であるという事実である。私には現代若者文化—（おそらく他の国よりも日本で）社会に幅広く普及する影響を持つ文化—の強力な流れを示唆しているように思えた。実際のところ最初は若者の間でさえも主流のファッションでもなく一般的な公衆の行動でもなかったが、ファッションに広く及ぼす影響はすでに明確で、最も顕著なのは、最近日本中のストリートで見られるゴシックロリータスタイルである。また化粧品にも変化の形跡が見られ、直接的にヴィジュアル系に帰属していてもそうでなくても、発展し続ける流行の徴候であることは明らかである。

1.2 状況1：ヴィジュアル世界

[ここからはヴィジュアル世界とその精神を意味するのにヴィジュアルという言葉を用いる。これはこの世界で一般的に使われている意味である。視覚の要素に触れるときは英語の「visual」を用いる]

神宮橋現象は、驚くほど広範囲で複雑で変化に富んだ世界—ヴィジュアル世界—であると私が感じたこの国の若者の流行の最も人目を引いた現れである。

ヴィジュアル世界：

- 多数のヴィジュアル系、幅広い音楽、視覚的な概念の多様性
- ライブコンサートに向けられる全国的規模の演奏会場ネットワーク、無数のバンドが日本国内で演奏を展開
- 月刊または月2回発行の専門誌、CD、DVD、書籍、ポスター、他の商品等を扱う専門店
- 個々のバンドのホームページ、ファンによって作られた非公式サイト、VISUNAVICOMのような専門のウェブサイト
- PunkのK.Naotoから「ゴシックロリータ」のAtelier Boz、Alice Aluuaの暗鬱なS/Mに影響されたスタイルに至るまで、「盛装」の全サブカルチャーに深く浸透したその全国的なファッションレーベル

一口に言えば、事実と心象と感銘の紛れもない万華鏡によって、私の知識は拡張し、私の視野は広がり、私の見地は変わったのであった。

1.3 状況2：'Looking Japanese'

この研究は私の「顔」に関する全調査—'Looking Japanese'

—の一部であるため、いくつか副題をつけ説明することにより論を進めていくことにする。

- The Face of Japan¹—日本と日本人の本質—「日本人らしさ」を描き分類するためにマスメディアで頻繁に使われる言葉
- 「顔」と日本に関連する典型表現、決まり文句
- 「顔」の形象と象徴表現を通しての日本のマスメディアの代表表現—特に、謎、仮面、二重性、反射鏡²⁾(図1～8)
- 徳川時代の「顔」図像研究—芸者、歌舞伎を通しての日本のマスメディアの代表表現(図1～8)
- 性の伝統的、現代的代表表現
- 顔、謎めき、表情、自己表現

原宿コスプレ現象は、'Looking Japanese'に総体的に関連するものとして私の関心を惹き、特に以下のことについての調査を思い立った。

- 全ヴィジュアル系・コスプレ現象の魅力
- 表現方法としての奇抜な化粧の個人的および社会文化的意義とは？
- ヴィジュアル系・コスプレに見られる化粧/フェイシャルディスプレイと、日本の大衆文化における伝統的なそれとの関係

これらのことは厳密に求められるとは思わないが、この研究を進めることによって人と顔に関する何かを発見し、現代日本人の「顔表現」の諸局面をまとめようと思った。

2. 方法：目標・内容・意義

2.1 目標

日本の社会におけるサブカルチャーのある行動パターンやそれらの成り行きを同時代的に実証しようとするのは、困難な仕事である。実際のところ、私は後付で文脈を整えるというぜいたくなことはしないで社会の歴史を目指していた。このように当研究を進めるうちにいくつか困難な面が持ち上がってきた。解明すると以下ようになる。

2.1.1 内容

- 前述のようにヴィジュアル世界は広大で複雑である。—従って私は読み手側の予めの知識を想定しないことにした。
- 実際のところ化粧の役割とコスプレの他の面（衣装、ポーズ、表情）との間に一線を画するのは不可能であるため、これらのことも同様に考慮に入れている。
- ヴィジュアル系の視覚的な局面は、日本の他の形の大衆文化—特に、歌舞伎、浮世絵、芸者の世界、宝塚、アニメ、そして少女漫画—と密接に相互の原点を同じくするものである。そのためこれらを切り離して考えることは



図1～8 The Face of Japan：仮と二性と江戸時代のスタイル

不可能と言える。

- 世界的大衆文化の現代世界においては、外国の影響もまたプレイに入り込んでいる。例えば、Glam、Glitter、Punkなどでそれらはより複雑さをもたらしている。

本テーマはこのように非常に広範囲に及んだため、私の収集した情報と構築した考えは、複雑で、様々で、幾重にも重なり、そして明確な表現法には十分に適しているとは言えない。しかしながら、私はできるだけ首尾一貫した包括的な方法を用いて、前述の「事実、心象、感銘...の万華鏡」を可能な限り多く表すように努めたい。

2.1.2 意義：主観的さ・客観的さ

中間報告書で述べたように、世界間の接点を見出すことは問題の余地を残している。私が捜し求める意義はただバンドメンバーとコスプレヤーを考えるのに何の役割も持たない。—主観的な見方と客観的な見方の間に以下のように格差がある。

- バンドメンバーに配られた約100のアンケートのうち、戻ってきたのはわずか2枚であった。
- コスプレヤーへの120のアンケートのうち7枚だけが戻ってきた。
- 私の研究に興味を持つ学生の一人—ヴィジュアル系のフ

ァン—は「このテーマに関して誰でも深く考察できるとは夢にも思わなかった」と述べた。

彼女はその後、実に詳しくそして非常に啓発的に2時間話し続けた。残念ながらそのような思慮深く一貫した入力情報はヴィジュアル系のファンの間では珍しく、私が関心を持つ要素は意識的な意義を持っていない。

- 同様に私は東京でShoxx誌の編集長と話してみた。熱狂的な音楽信者（週4回のライブ）であるが、彼にとっての「顔」の局面はまったく関係のないものであった。
- このように直接的な情報は私が期待したよりも乏しかった。

3. 結果：ヴィジュアル系・コスプレ・自己表現

3.1 ヴィジュアル系

十分興味深いことであるが、私が'eXtreme make-up'という表現を用いて以来、ヴィジュアル系現象を呼び起こしていると常に信じられていた日本のバンドは、Xと呼ばれた。後にX Japanと名前を変えるが、この名前では広く知られている。「X Japanは、その独特な化粧、重力に逆らうカラフルな髪型、風変わりな衣装、そして芝居がかったステージ上の奇怪な行動で、間違いなく伝説と呼ぶことができる数少ないロックバンドのうちの一つである。」³⁾

驚くべきことに、visual要素はヴィジュアル現象全体に

とって明らかに中心的なものなので、私が接近した情報源は衣装や化粧にほとんど注意を向けていない。音楽評論家の市川哲史はヴィジュアル系へのアメリカの影響として Kiss や The New York Dolls を、イギリスの影響として David Bowie や Marc Bolan を挙げているけれども、かなりの情報を載せている「X Japan と「ヴィジュアル系」黄金伝説」の中でさえも visual はほとんど考慮されていない。社会の流行は空白の中には存在しない、がそのような流行を追跡することは厳密な科学ではない。いずれにしても、文化の同化作用は常に大部分が無意識の過程なのである。従って、ヴィジュアルの情報源やインスピレーションを正確に量ることは不可能である。しかしながら、

- 文書化はされていないが、X Japan と歌舞伎の間には明らかに visual 関連があると思われる (図9)。
- X Japan が解散したとき、Shoxx 誌の特集で、大衆文化の様々な分野で働く日本人の反応を載せていた。歌舞伎役者の坂東亀三郎は、「同じ匂いがした…。僕たちのパクリ！！って思った。」⁴⁾ と述べた。
- 私は、X Japan 創設メンバーの一人である Yoshiki が、Glam や Punk が流行っていた 1970 年代に登場した Kiss、T-Rex、Queen⁵⁾ のようなバンドのファンであったというのを読んだことがある。これらのバンドのスタイルが影響していたということは驚くことではない。
- 別のメンバーである Hide は、「Kiss を崇拝していた」⁶⁾ と言われている。
- The New York Dolls (1970 年代のアメリカのバンド) もまた影響を与えたとして引き合いに出される。
- その原点として時折話題に上るバンドには、Boy George

率いる Culture Club がある。

(しかしまた私は、Kiss や David Bowie は歌舞伎からのイメージに影響を受けたということを読んだことがある。従って、X Japan やヴィジュアル系に影響したものは再び廻ってきたのかもしれない。)

市川哲史はまた、日本にはロックンロールの土台がないので、ミュージシャンたちは音楽的にも他の面でもあらゆる種類の影響を受け入れることができ、そのため日本独特のスタイルを「何でも通用する」方式で創り出すことができた、と述べている。

けれどもヴィジュアル系は決して X Japan のクローンではなく、かなりの多様性を持っている。それでは、ある一つのバンドをヴィジュアルと分類するためにいかなる基準を用いなければならないのであろうか？ それは音楽に基づくものではないことは確かである。なぜなら音楽は、ヘビメタルからインダストリアル・ゴス、ロック、ポップロック、バラードに至るまで幅広く網羅するからである。

visual 面は明らかに主要な部分である。前述のように、ヴィジュアルは舞台での演奏と同じく個人のディスプレイにまで及ぶ。私の焦点は「ディスプレイ」であり、この中にはまたかなりの多様性が存在している。

- 宝塚風の La Reine.
- アニメらしい Psycho le Ce Mu.
- Gothic-Versailles っぽい Moi dix Mois.
- ダンジョン風 Deadman か Schwartzstein.
- または美少年っぽい人格ラジオ
- または Kagrra の徳川時代スタイル



図9 X Japan と歌舞伎

- またはヘビメタル陰陽座の平安時代スタイル
- または幾何学的な Pierrot
- そして（将来性のある）Malice Mizer

このような多様性を持ち合わせる状態で共通の要素を見分けることは実際に可能であろうか？「X Japan と「ヴィジュアル系」黄金伝説」の中で、ヴィジュアル系のメンバーであるための必要事項が、幾分冗談混じりだが目立った一覧表となって出ている。タイトルの下には、美しい誕生し、美しい生き、美しい終わるべし⁷⁾とある。基準の中には、

- 派手である化粧、髪は奇抜な色に染めるべし。
- バンドの歴史にはドラマがなくてはならない。
- 体はあまり丈夫じゃない事だ。最低ツアー、ライブ中に一度は倒れる事或いはそう言う虚弱なイメージを積極的に演出する事。
- 衣装は中性ヨーロッパ風もしくはニューロマ風（つまり昔の少女漫画的であればよい）。

これらの基準は大まかに visual であるけれども、visual を通してある感性が表現されている。それはロマン主義や優雅さや退廃や感情の脆さへの傾向を持つかなり刹那的なものである。別の記事では、ヴィジュアルの中核は「変わったことをする」、「現実を避ける」、無邪気なままでいる、自己表現に集中する、ということへの願望であると言われている⁸⁾。

このような考え—感性が若者を惹きつけているということがわかる。そして（非常に商業的に進められた）この巨大な努力の結果的分野は、確かに大衆の要求がなければ存在しないであろうが、それでは一体なぜ若いファンはこれらのバンドやスタイルや表現法に惹き付けられるのであろうか？なぜそのようなサブカルチャーがそもそも存在するのであろうか？コスプレとして分類するだけで十分なのであろうか？どこまでが日本人の本質で、どこまでが単に「人間」の本質なのであろうか？

3.2 コスプレ：コスプレカルチャー・神宮橋カルチャー・コスプレのプレイ・自己表現

3.2.1 コスプレカルチャー

ある意味で、人生はコスプレである。われわれは皆社会背景に応じて表現法（衣類、アクセサリ、化粧、髪型、振舞を用いる。しかしながら、コスプレは一般的に、大衆文化、特にアニメや漫画や「ゲーム」のキャラクターを真似した衣装で正装することを言う。コスプレは日本だけに限られたものではないが、特に日本では支持され流行している現象である。そしてこのようにしてヴィジュアルの中心となっている。Wired 誌にあるように、「1990年代には一部で流行っていたコスプレが

その後主流の座を獲得していった」⁹⁾。

3.2.2 神宮橋カルチャー¹⁰⁾

ヴィジュアル系現象の最も人目を引く影響が見られるのは神宮橋コスプレであり、それはこの研究へのインスピレーションとなった。中間報告書で述べたように、「実際それは極めて有名でかつ独特なので、コスプレーヤーの数と、それを見物したりビデオや写真に撮るために（一緒に撮られるために）やって来る「旅行者」の数とがしばしば同じになるほどである。それは見物人もまた参加できるかもしれない「見物人のスポーツ」となった。このイベントは世界の出版—スクリーン媒体にとって一般的と言えるほど世界的に有名な日本の典型となったのである。すなわち、数年の間に、世界中の観客の注目を浴びそしてまた影響を与える非常に注目を集める毎週のイベントとなったのである。」

原宿コスプレに関しては次のような様々な出版物で見ることができる。ウィングズ（JAL 機内誌）、J magazine — 表紙に「The Changing Face of Japan」¹¹⁾の見出しと共に原宿コスプレーヤーを掲載、Time 誌。ほとんどの場合、強調されているのは、「奇抜さ」と抑圧された社会における自己表現である。

- Time 誌、「現実逃避」の見出し：「日本の傲慢で押し付けがましい秩序がウサギ穴に逃げ込みたいという強い衝動を駆り立てる。技術力とマスメディアはその願望を満たすのに役立っている。バーチャルペットや毎週末原宿で見られるゴシック風豪華さで盛装した「コスプレ」少女を考えればいい。」¹²⁾
- West East Magazine 誌：「われわれ西洋人は、日本の文化を、別の惑星から来たような服装と髪を染めたティーンエージャーのイメージで見ているように思われる。（中略）原宿ムーブメントは、Goth から漫画のヒーローまであらゆるものを身に着けた若者と共に 1980 年代の後半にピークに達した。（中略）今日では「個人」表現への必要性が 10 代の多くに広がっている。」¹³⁾
- [V] 誌、2 ページに渡る大判の写真付き：「この万華鏡像は過去数年間で発達してきた日本のサブカルチャーの目を見張る奇抜さにスポットライトを当てた。（中略）これは変化している Face of Japan に対応して発達しているサブカルチャーの肖像写真である。それは個々の本質を探し求める世代の始まりである。彼女たちは日本のアニメから飛び出してきた何かに見えるかもしれない。が、この少女たちはテクニカラーの現実なのである。」¹⁴⁾ [下線部筆者強調]
- 再び West East Magazine 誌、神宮橋で撮った 20 人のコスプレーヤーの写真：「私が日本を旅し生活した 2 ヶ月間で体験した中で最も心を動かされたのは、日本の若

い女性の文化であった。これらの少女たちは... 奇妙なゴシック風、Lolita-esque、Holly Hobbie、Clockwork Orange、レイヴァー、Leigh Bowery-ish、血まみれの看護婦や外科医や患者の格好や化粧... を身につけ、全体的に狂気じみて、セクシーで、野性的で、愚かで、何かに取り付かれたようで、多くの点で一風変わっていた。」¹⁵⁾

しかしながら、そのような注目は雑誌文化以外にも広がっている。2000年7月、日本とオランダの400年の国際関係を印して、AmsterdamのArti et Amicitiae Art Galleryが日本と他の国からの芸術家による作品を含むCOS-PLAYと銘打った展覧会を開いた。ウェブサイトによれば、「展覧会の中心はコスプレや盛装といった日本の現象である¹⁶⁾。この現象が起こった理由として、工業化がBrave New Worldのほとんど不気味な反響音となり、従業員の生活はレジャー費を稼ぐための仕事で占拠され、プライバシーが贅沢品となり、生産性に全精力が注がれ、創造力は端へ追いやられた社会では、個人的な本質で遊ぶことは集団の単調さからの逃避を可能にするということがある。」¹⁷⁾ 言い換えれば、こういう状況により、日本の社会は個人の本質や個性や自己表現のための余地がないということが言える。

これらの例は、明らかに矛盾しているのであるが、風変わりな個人の表現に集中することにより広く普及した代表的な見解となっていて、芸術/学問団体と同様にマスコミ組織は、自己表現は日本では抑圧されていないと事実上指摘している。

実際、原宿の若者の光景は、特にこの極めて突飛に映る形において新しいメディアの典型—新しいFace of Japanになった(図10~12)。この現象の意義は、しかしながら以下のように解釈されている。:

- 「彼女たちのほとんどは単に盛装を楽しんでいるだけである。純粹に部分的な美学を身にまとい正に流行そのものである。そしてそのほとんどが25歳くらいまでに大人になり、スーツを着て、みんなと同じように会社へ行く。」¹⁸⁾
- 「明らかにここには仕事からの現実逃避の要素がある。個人よりも集団に重点を置く厳しい任務と規則を持つ堅苦しさで有名な日本の社会は、大きな変化の真っ只中にある。」¹⁹⁾

社会は若者に「遊ぶ」ことは許すが実際は何も変わらないという意見もあれば、「遊び」は実は変化を表しているという意見もある。いずれにせよ事実としては、若者が新しいアイコンになったということである。

3.2.3 コスプレのプレイ

これは全て客観的見解の産物である。参加するものによってそれはどんな意味があるのだろうか？ 私は「遊び」がこれに対する鍵であると思う。ディスプレイのスタイルは時間と空間を隔てたそれと類似点を見せるかもしれないが、その精神は、神宮橋であろうとライブであろうと、非常に日本的である。ライブでは30分から40の間、痛めつけられたギターを激しくたたき、ボーカルは叫びながら頭をぶつけまわり、観客に唾を飛ばしていたバンドだが、それが終わると天気のことを礼儀正しく話したり、少女たちをやさしくからかったりする。雰囲気は常に穏やかで、楽しく、非攻撃的で、脅迫的でもない。—まさしくこれは遊びである。

一方海外では、若者は、自分がある思想や行動(punk, goth, mod, rocker)のグループの一員であることを示すために、Gothのようなスタイルを取り入れ、常にその「衣装」を身につけるといった傾向がある。日本のヴィジュアル

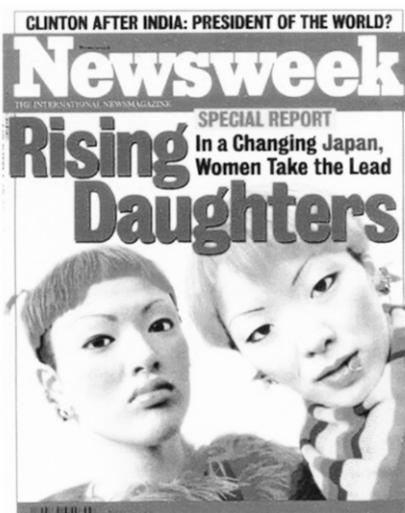


図10~12 新しいFace of Japan

系コスプレイヤーにとってそれはパーティや結婚式のために盛装するようなもので、毎日の自己認識表現ではない。たとえば Punk スタイルは怒りの批判声明であり、社会へのある政治的な姿勢であった。しかし日本のコスプレイヤーの場合は、「外見から見れば彼女たちは反逆者や過激主義者であると思われるかもしれないが、(中略) 政治的なものは何も存在しない。彼女たちのほとんどはただ盛装して遊んでいるだけである。」²⁰⁾ それは本質的に異なった行動なのである。

なぜ盛装して遊ぶのか？

- 「自分と似たような趣味を持つ人と会うのにはいい方法だから」²¹⁾
- 「同じような趣味を共有する人に会い、典型的な「色のない」日本の社会と何か違ったことを体験するため」²²⁾
- 「アーティストのようになるため」、「美しくなるため」、「美しい顔を見せるため」、「理想」、「目立つために」、「違う自分になるために」²³⁾
- 明治神宮の入り口に立つ警備員の話：「彼女たちは主に東京周辺から集まって来て、地元では個性を出す機会のない若者たちだ。自分自身になるためここへやって来る。」²⁴⁾

私はここで、神宮橋での雰囲気はここ数年のうちに変わってきたことを書くべきであろう。最近、参加者の年齢が圧倒的に低くなってきており、化粧や衣装に向けられる細かな注意のレベルが下がってしまった。すなわち、その効果が数年前ほど本物ではなくなってきている。私には動機付けが変化したように思われる。活動が「一般的」になり、コンセプトを強調しないファッションの一例になったのだ。今や若者は、最新流行を創り出すよりもファッションを追いかけているようだ。従って神宮橋現象に関しては、私がここで書いていることはすでに過去のことであり、広く社会に浸透してほとんどファッションの本流となった事柄である。ヴィジュアル系の中で最も将来性があり、最も独創的であった Malice Mizer と Shazna の二つのバンドが解散したということにはおそらく意義深いことである。

「本物のヴィジュアル系コスプレ」（私がこう呼ぶ）をもちやファッショントレンドとしてしか見ないのはあまりにも短絡的であると考え。全ての人間社会は個人の、または部族の儀式に関連してなんらかのディスプレイの型—通例 eXtreme — に携わっている。本質的にそのような儀式的「盛装」活動は、それがオーストラリアのアボリジニ人のボディペインティングであろうと、イギリス王室の結婚式であろうと、あるグループの一員であることを確認し、変身を印すのに役立つ。そしてそのような活動ではお互いに装飾しあうことがしばしば起こる。花嫁の付添い人は花嫁が白いガウンを着るのを手伝い、着付け人は日本の花嫁に伝統的な着物を着せ、Ethiopian Surma 部族民は友達

のボディペイントを手伝う。前に触れたように、神宮橋イベントは「部族的」である。上記のコメントは単に所属し、共有する必要性を表しているのである。これらは基本的な人間の欲求であるが、若者の視野が広がり、行動半径が伸び、選択肢が劇的に増えている情報世界では、伝統的な慣習や価値観や人間関係は不適切あるいは不十分であり、直接的な社会環境の外からの影響は必ず行動パターンに作用し、個別性の問題を引き起こしてくる。

3.2.4 自己表現

コスプレでは表現の要素が強いので、カメラのレンズを通してそうでなくても、コスプレイヤーにとって見られることは明らかにどういう意味を持つのかを私は時間をかけて多くのコスプレイヤーたちに尋ねた。「なぜ？」に対して、彼女たちは常に「自己表現」をコスプレをする第一の理由として答えた。しかし、彼女たちが実際にやっているのは、お気に入りのアーティストをできるだけ忠実に「真似る」ことである。従って、「彼女たちは自分自身になるためにここへ来る」（上記引用コメント）に関しては、私はむしろ、彼女たちは他の誰かになるために来る、と言いたい。実際、彼女たちは自分自身を変えるためにやって来るのである。

事実、日本の大衆文化で繰り返されるテーマの一つは変身である。：新世紀エヴァンゲリオン、セーラームーン、Akira、Ghost in the Shell—攻殻機動隊、一般少女漫画。変身は、イメージ、アイデンティティー、個人、社会、セックス、性別などと関係している。最後の項目に関しては、先述のように、コスプレイヤーのほとんどは女性である。しかし、ヴィジュアル系のほとんどすべては男性であり、彼らは主として、スタイルや振る舞いの中で極端な女性らしさやあるいは少なくとも幾分女性的な男性を描いている。私達は向かい合う性の興味深い状況に包まれる。ヴィジュアル系のメンバーは女性の性役割を取り入れて、次にそれを女性のコスプレイヤーが「再生」し、女性と張り合い、女性の典型を表してさえいる男性に共鳴し、張り合う女になる。

主題が非常に複雑な方向に進むのはすべて知識の分野が幾重にも重なるからである。しかしながら、この問題に触れている文献に不足はないけれども、そのうちで「顔」の役割に注目しているものはない。「顔」は明らかに人のコミュニケーションとディスプレイの中心にあるものであり、変身と自己表現のために最もよく使われる身体の部分なのであるが。われわれが自己表現をする場合は孤立してやるのではない。文化の様々な影響を受けながら行うのである。自分自身を表現するときにはまた、自分たちの文化的背景について発言をしているのである。「Anime: from Akira to Princess Mononoke」の中で Susan Napier

は、アニメの変身テーマの研究は、日本人のアイデンティティーにおける原型を表面に出すばかりでなく、最も劇的な問題のいくつかを浮き出させる、と述べている。「…世代間の分裂、両性間の緊張、そして男性らしさと女性らしさに関する問題…」²⁵⁾ この発言の中ではヴィジュアルをアニメと入れ替えることができると考える。

3.3 eXpression(s) of a culture? 文化の表現と表情か?

「自己」一個人のアイデンティティーを表現する場合に、人は同時に、自分が自己同一視するグループやサブカルチャーに関する何かを表現している。そしてまた自分がその産物であるより広い文化—実際その文化を映している、について何かを表している。

3.3.1 What is Japanese about Japanese ヴィジュアル系?

海外のバンドの中には化粧を彼らのステージパフォーマンスの一部として用いるものもいるが、その目的はかなり異なっていると思われる。The New York Dolls、David Bowie、Alice Cooper、Kiss、Marc Bolan、Roxy Music、Gary Glitter、Boy George、Marilyn Mansonのようなミュージシャンたちが用いた奇抜な化粧は、以下の二つの分類のどちらかに入る傾向を持っていた。:

○政治的な声明: 同性愛宣言や反社会声明のような衝撃戦術

○Camp—ふざけたドラッグクイーンのパルソナか両性具有のBowie/Bolan型またはGlam/GlitterのLas Vegas/Liberaceスタイルのどちらか

私は、日本のヴィジュアル系の化粧は先述のようにある感性を表現するという異なった目的を持っていると考える。: やや悲劇的な不気味さや「変わったことをする」ことを通しての自己表現。これらの概念は私に江戸時代の大衆文化—物の哀れや歌舞伎物の概念を匂わせる。

さらに、ヴィジュアルにはかなりの多様なスタイルがある。「ヴィジュアル系ファッションはGoth、Punk、Rockのスタイルに見られるファッショントレンドを包含しており、バロック風のガウンから未来的なMatrixスタイルのコートに至るまで、あらゆるものを大量に混ぜ合わせている。」²⁶⁾ そしてそれは明確に分類することを難しくしている。そして、ヴィジュアル系について書かれたものには化粧に特別な焦点を当てたものはない。けれども音楽的、演奏スタイル的な範囲を超えて、visualスタイルの原典間の複雑さを通り抜けて、一つ普遍的なものは化粧である、と思われる。それは奇抜さのスタイルや程度においてあまりにも大きく変化するが、化粧はそれが用いられている状況と特

に関連性を持たないけれども、いやまさに持たないからこそ、一貫して流れる筋道なのである。バンドが自分たちのvisualイメージのために参考にするものが、アニメまたは中世ヨーロッパまたはニューロマまたはGothic Horrorであろうと、そのスタイルの中のどれも化粧が用いられる方法の説明にはならないし、「eXtreme make-up」という事実の説明にはならない。

「eXtreme make-up」にはまた日本の歴史において先例があり、その起源ははるか昔に遡るけれども、そのような化粧が、特に歌舞伎場を通して、今日日本のアイコン—the Face of Japanになるような方法で発達したのは江戸時代であった。

3.3.2 The 'Face of Japan'

世界のマスメディアは日本の社会を「顔」という見地からしばしば言及し、「顔」のイコノグラフィーを通して日本人を特徴付けている。そのようなアイコンの中で最も広く用いられたのは芸者と歌舞伎役者（特に荒事や女形）である。これらの「顔」は西洋人が非常に意識を集中する部分なので日本の同義語になってしまった。似たような同義語として、日本人は不可解である、言い換えると、日本人は顔の表情で考えや感情を表現したり明かしたりはしない、という概念がある。

もちろん日本人にとっても歌舞伎や芸者の顔はアイコン的である。これらは日本人の精神の中に日本らしいという認識でしっかり張り巡らされている。そしてその認識で、性に関するものから郵便切手に至るまであらゆる商品として用いられたことがあった。

これらのアイコン的な顔は日本人の日常の顔とほとんど似ているところはないが、それでも長い伝統を通して一つの文化の表現、一つの民族の表現になっている。これらの顔は、その民族の本質や、そしてどのようなフェイシャルディスプレイ法が受け入れられ好まれてきたかを知る手掛かりを映し出す鏡である。そしてこれらは江戸時代—浮世—の大衆文化の顔なのである。

3.3.3 大衆文化の顔

いかなる時代でも大衆文化というものは、一般的に普及している振舞、ファッション、慣習を映す時代の鏡として現れる。社会を映す一方で、新しい着想やスタイルや行動方法として活動しながら社会に影響を与えている。

伝統的な日本の「eXtreme make-up」は芸者や歌舞伎の世界では現存している。歌舞伎は、今日では「芸術」として分類されるけれども、江戸時代の初期では最先端の大衆文化で遊郭の一部であった。江戸吉原の歓楽地帯の「魅惑的な」世界では、芸者や花魁や歌舞伎役者や美少年たちがその当時の状況に絶えず挑んでいた。この歓楽世界の住

民たちは、直接的にまた間接的に、大衆の幅広い層に影響を与えた。一気に全人口へ流出したこのサブカルチャーの構成員たちの間で、「…ファッションや言葉や他の新しい文化の流動的な交換」²⁷⁾が行われた。

「売春宿での流行りの方法と最新のスラングが遊びの中に入ってきて一般大衆へと広まっていった。衣服の色や型、化粧品、そして髪型におけるスタイル…」²⁸⁾
 「…舞台上で見られるファッションはそっくり真似され…人気役者のせりふや特徴を張り合った。」²⁹⁾

もう一つ大きな影響力を持っていたのは浮世-絵であった。これも「芸術」として安置されるようになった別の形の徳川大衆文化である。これらの版画の多くは歓楽地帯の有名人や活動やスタイルを描いており、それゆえ、当時の大衆文化と大衆との関係の記録であり、顔や化粧や一般的な「ディスプレイ」に関する visual 情報を少なからず与えてくれている。浮世-絵の発達は「…都市生活の共有された経験から切り離すことができなかった。」³⁰⁾

図 13～17 では、ある音楽ライターがそのスタイルを「glam-kabuki-drag」³¹⁾と描写した、ヴィジュアル系に対

する歌舞伎や芸者の明らかな影響がわかる。

歌舞伎が庶民の文化に影響を及ぼしたように、「…舞台上で見られるファッションは真似され…人気役者のせりふや特徴を張り合った。」³²⁾、コスプレイヤーたちの振舞も同じで、写真用にポーズを取るときは、特に Shoxx、Fool's Mate、UV、Cure、Zy のような雑誌の広告写真に出ているように、バンドと競うため典型的なポーズやしぐさや表情を取り入れることになる（図 18～20）。実際これらの雑誌はまさしく浮世-絵と同じ役割を果たしている。それは確かに広告であり、事実上のコマーシャルである、が、衣服、髪、フェイシャルディスプレイ、振舞、そして姿勢などのライフスタイルに影響する効果を付随している。実際、それらの雑誌は、衣装や化粧がライブコンサート用よりも念入りで、ポーズをとるためにより型通りのものとなるスタジオでの写真撮影を広める傾向がある。それらはかなり理想化されたものを提供しているのである。

ここでは歌舞伎や芸者の顔以外に影響を与えるものはないと言っているのではない。3.1ではわれわれがヴィジュアル系ジャンルと呼ぶものを図解している。しかしなが



図 13～17 歌舞伎と芸者に受けた影響

ら、ジャンルに拘らずヴィジュアル系の顔に関しては、化粧はeXtremeである傾向がある。この例外が美少年顔である（図21～22）。それに匹敵するものはこのほかに浮世絵やShoxxの中で描かれている。そのようなペルソナは日本の大衆文化では長い間に渡って登場している、そして、浮世絵、少女漫画、アニメ、ポップグループ、宝塚のキャラクターの人気の証明されるように、あらゆる時代の女性たちの心を引き付けている。

3.4 顔

3.4.1 典型

ここでは簡潔にするために、ヴィジュアル系の顔を、芸

者／女性、歌舞伎／男性、両性具の三つに分類できるかもしれない。この三つの原型は、日本の大衆文化や社会において明白な歴史的一貫性を呈している。このほかに、と言ってもこれらと密接に結びついているのだが、服装倒錯や性変換の伝統がある。ここで

性の概念を明らかにするために以下を引用する。:

…「セックスロール」と「ジェンダーロール」の間には大きな違いがある。前者は、男性と女性の生殖器の多様な能力に関連があり、後者は、男性、女性それぞれの属性である立ち振舞や服装の、社会文化的、歴史的取り決めなのである³³⁾。

これは、全部の役が女性によって演じられる宝塚レビュー



図18～20 コスプレヤーの見え



図21～22 美少年モード

一についての記事の中に書かれたことである。歌舞伎はこの正反対で、役の全てが男性によって演じられる。350年続いている歌舞伎の歴史の中で、その初期に、女性はその状態が刺激的過ぎる、あまりにも聖像破壊的であるという理由で舞台に出ることを禁じられた。（意義深いことには、歌舞伎をやる人は当初、「変わったこと」をする人という意味で、かぶき物と実際に呼ばれていた。）その後少年たちも、かき乱し過ぎるという理由で禁止されるまで女性の役を演じていた。

こうして女性らしさの理想を演じると言われる女形は進化した。女形役者の芳沢あやめ（1673～1729）は次のように考えていた：

もし女性の役者が舞台に立っても自分の肉体的特徴に頼ってしまうので理想的な女らしさを表現することはできない、そのため合成的な理想を表すことは不可能である…³⁴⁾

女形の顔は、白く、目や口に鮮明な色を付ける花魁や芸者に見られる女性の顔の男性的描写である。芸者の顔は以下のように描写されてきた。：「その白い顔は、いかなる個人の本質も切り捨てて芸者の外観を様式化している。…」さらに、「匿名であることが、その顔を、客が自分の願いを投影するスクリーンにしている。」³⁵⁾ 言い換えると、それは個人のアイデンティティーを表しているのではなく、表現の一つの型を表していて、実際、個人のアイデンティティーの仮面としての役割を果たしてしる。女形の場合はその工程が非常に完璧であるため、性のアイデンティティーでさえも消されてしまう。もちろん、ここで顔、化粧、振舞、衣装を切り離すことはできない、しかし、顔は人の相互作用の中心であり、その顔—ペルソナ—を特定の個人でなくしているのは、白い化粧と様式化された目や口なのである。

その「白い顔」が、平安時代から現代まで、女性の美しさ、優雅さ、高貴さの社会文化的表示であるということはいくつも知られている。しかし、その「謎めいたもの」は、女性の美しさや女性の好ましさにおける要因である、と言えるであろうか？ 望ましい女性の顔は匿名であることにより特徴付けられるのであろうか？

「このようにして昔から、隠すということ、隠れていることは美しさへの手段であると考えられた。」³⁶⁾

「…伝統的な日本の美意識は、化粧品や指示された顔の表情や肉体的特徴でさえもその使い方を口述することに帰着した。それは、顔を、…何か隠されたものとしてみなした美の概念を理想化した。そしてそれは顔の存在を認めない美の概念であった。…」³⁷⁾

日本を典型的に表すのによく用いられるアイコン的な女性の顔は、化粧によって謎めいたものとなっている。—それは「合成的な理想」となっているのである。言い換える

と、望ましい女性の顔は、実際、「顔がない」ということなのである。型は実際のものよりも重要となってくる。

男版の歌舞伎顔は、隈取の力強い色やデザインが極めて表現豊かなので、初めは全く異なった問題であるように見える。Ruth Shaverによれば：

「隈取を用いるのは、個人的な感情の即座の反応、ほとんどの場合、怒りを表現するためである。…隈取の特質は、舞台の登場人物の精神状態を生き生きと表す技術にある。」³⁸⁾

しかしながら、この化粧の目的は、

「…人の顔に表現の演技を与えることであり、…もし可能であれば、個人としての役者の肉体的個性を消し、彼の顔の表情を、演じる役と伝統的に結びついている顔の表情まで変えることである。」³⁹⁾

すなわち、男性も女性も型または典型として表現されている。両者ともある意味で、全く顔ではなく、概念や願望や典型的表現なのである。それらは象徴なのである。それらはある特定の型、すなわち、伝統という琥珀のなかで固定されてきた特定の振舞と結びついた化粧スタイルからなる「表現方法」なのである。従って、そこには男性と女性（現実の男、女というよりはむしろ）の理想の典型的な表現の一つの伝統があるばかりでなく、これらの典型は「無表情」—謎めいたもの、と言いつつ、言い換えてもよい—の強い要素を合わせ持っているのである。

日本の大衆文化の中で一貫性を示す他の原型には、浮世絵、少女漫画、アニメに代表される美少年のそれがあり、今ではヴィジュアル系に引き継がれて見られる。実際、これはヴィジュアル系ディスプレイの顕著な原型であり、より荒事的 visual スタイルにまで浸透している。「彼らの外観は、男性でも女性でもないある種の典型を表そうとしている両性具有のものである。」⁴⁰⁾ しかしながら、海外のミュージシャンたちはこの外観を同性愛を宣言するために用いてきたが、一方、日本の場合はそうではなく、純粹に美の表現であり、より曖昧なものである。

もし実際にここで示されている歴史的一貫性があるならば、もし日本の社会のいくつかの局面を、謎めいたもの、匿名性、曖昧さを含む個人の表現を受け入れる水準を持つ体制の中で、自己を押さえつけるという典型によって特徴付けることができるならば、ヴィジュアルの鼓舞された表現方法を通してそれらの水準を覆そうとする試みを理解するのは困難ではない。これが事実そうであれば、伝統的な型—eXtreme ディスプレイ（化粧、顔の表情、髪、衣装）—はこの目的の道具として用いられているということは興味深いことである。

そうならばeXtreme化粧は、ヴィジュアル系/コスプレにおける主要な共通要素であると思われる。吉村栄一は、人格になるために、雰囲気作り化粧は不可欠のものである

⁴¹⁾、と述べている。「しかしながら理解すべき重要なことは、化粧は写実主義とは無関係であるということである。それは衣装や... (中略) ... ポーズと正に同じくらい型の一部なのである。」⁴²⁾

4. 考察

この研究は元来試験的なものとして開始したのであるが、終わりに当たっていながら始まりのような思いであると言いうのが適切であろう。私には答えよりもはるかに疑問点の方が多く、常に興味の対象となるのは以下の事柄である。:

日本人の精神、認識、原型、ディスプレイ法に見られる明らかな一貫性。

- ロマン主義、空想と劇；優雅さと退廃一物の哀れ
- 「変わったことをする」、自己表現、変身
- 振舞や個人の表現に関する独特の歴史的姿勢—合成的な理想、謎めき、匿名性、曖昧さに本来備わっていると思われる、日本の大衆文化における extreme 化粧の伝統
- 大衆文化の専門家と、服装や振舞の受容できるスタイル (型) の間の現在も続く関係

そして、ヴィジュアル系現象の複雑さと微妙さ。私にとってその本質は以下の言葉に表されている。:

- 美しい誕生し、美しい生き、美しい終わるべし。
- 「アーティストとファンはお互いに助け合っている。誰かを愛することは、人に大きな力をくれる。だからわれわれは彼らが必要なのだ！特にヴィジュアルバンドはそのファンを大事にする。そしてファンもまたバンドを心から愛する。両者は情熱的な愛でお互いに結びついている。ファンはヴィジュアルバンドと同じ気持ちを味わうことができる。なぜなら彼女たちはコスプレをすることができるし、ライブコンサートに行くことができるからである。」⁴³⁾

われわれは「伝統」を、普通長い期間を超えて過去から引き継がれるものと考える傾向がある。しかしながら、伝統はすべて、歌舞伎や浮世—絵、そして振舞や身のこなしの標準のように、かつては「新しいもの」であった。それゆえ、フェイシャルディスプレイにおける流行は今、未来の伝統の萌芽を表しているのかもしれない。ヴィジュアル系 / コスプレ現象は変化の中における伝統を象徴しているのではないだろうか。

その伝統は変身の一つであり、一個人的そして社会文化的なもので、この研究の範疇の外にある日本の社会の様々な局面において明白なのである。— 再びアニメとヴィジュアルへ触れて:

「[ヴィジュアル] は、変化とスペクタクルに取り付かれ

た社会にとってある徴候であり隠喩なのである。(中略) われわれの時代のおそらく最も重要な問題、絶えず変化する社会におけるアイデンティティーの移り変わる本質をつかむための完璧な手段なのかもしれない。」⁴⁴⁾

- 1) Groning, Karl (ed) : Decorated Skin - A World Survey of Body Art, Thames & Hudson, London 2001
- 2) 'Behind Japan's Mask', 'Behind The Mask', 'Unmasking Japan: myths and realities about the emotions of the Japanese', Unmasking Japan Today', Japan Behind the Fan', 'Caught in a Mirror: Reflections of Japan', 'A Japanese Mirror: Heroes and Villains of Japanese Culture', and many more.
- 3) <http://www.tomobiki.com/wagaku/artists/x.html>
- 4) Fool's Mate No.242 December 2001 p.14
- 5) notice-board at Japan Forum Archive. <<http://forum.japan.com/archive/topic/989-1.html>>
- 6) Spotlight, In: Eye-Ai August 1998, p.8 Riverfield Inc. Tokyo.
- 7) 吉村栄一, : 美しい誕生し、美しい生き、美しい終わるべし in: 'X Japan と「ヴィジュアル系」黄金伝説' 高島社 東京 2003 p.78.
- 8) 'X Japan と「ヴィジュアル系」黄金伝説' p.72
- 9) Getting Into Character, In: Wired 09/2003 p.062
- 10) It should be noted that the phenomenon as it is reflected regionally is a rather more tame and self-conscious version. At ライブ I went to in Fukushima, Naha, Osaka, and Sapporo costumes are not so authentic, make-up much less extreme, and in general the occasions are used merely as an excuse/opportunity to dress more extravagantly than usual, with a prevalence of Gothic Lolita. Cosplayers even refused to take a questionnaire,
- 11) J Select vol.7 No.8 Business World Corp. Tokyo August 1999
- 12) Frederick, Jim, : A History of Japanese Cool, In: Time August 11, 2003, p.24. Time Asia, Hong Kong.
- 13) Pernet, Diane, : the glittery tide, In: WestEast Magazine 04, Autumn 2002, p.38. WestEast Publishing, Hong Kong
- 14) Godoy, Tiffany, :In Living Color, In: V17 May/June 2002, V Magazine, New York.
- 15) Collins, Liz, :wild in the streets, In: WestEast Magazine 04, Autumn 2002, p.74. WestEast Publishing, Hong Kong
- 16) exhibition information at: <<http://cosplay2000.cjb>>

- net=20>
- 17) *ibid.*
- 18) Godoy, Tiffany, : *ibid.*
- 19) Escape Artists, In: *Cosplay Girls*, (Introduction), DH Publishing, Tokyo, 2003
- 20) Godoy, Tiffany, :In *Living Color*, In: V17 May/June 2002, V Magazine, New York.
- 21) quoted in: Larking David, :All Harajuku's a Stage (Quick-change teens strut 'visual music' In: *The Japan Times*, July 28, 2000.
- 22) *ibid.*
- 23) respondents to questionnaires.
- 24) quoted in: Larking David, :*ibid.*
- 25) Napier, Susan J, :*Anime: from Akira to Princess Mononoke*, Palgrave, New York 2001 p.36
- 26) Heard Jodi, :*J-Rock: Visual Kei*, <<http://www.akadot.com/article-visualkei-01.html>>
- 27) Shively, Donald H, : *The Social Environment Tokugawa Kabuki*, In : *Studies In Kabuki*, The University Press of Hawaii, 1973, 51
- 28) *ibid.*
- 29) *ibid.* 55
- 30) Guth, Christine, : *Japanese Art of the Edo Period*, : Calmann and King 1996 89.
- 31) Caffrey, Rori, :*The Many Faces of the Ever-changing Hyde*, (Popcetera), In: *The Daily Yomiuri* Nov. 29 2001, 8
- 32) Shively, Donald H, :*The Social Environment of Tokugawa Kabuki* In : *Studies in Kabuki*, The University Press of Hawai'i 1973 55.
- 33) Robertson, Jennifer, : *Doing and Undoing "Female" and "Male" in Japan: The Takarazuka Review*, In : Takie Sugiyama Lebra (ed) *Japanese Social Organization*, University of Hawaii Press 1992 166.
- 34) Deutsch, Sanna Saks, : An Abstract from 'Patchwork: A History of Women in Japan' In : *The Feminine Image: Women in Japan*, Honolulu Academy of Arts 1985 24.
- 35) Saller, Martin, : *Japan: painted skin, decorated bodies*, In: Groning, Karl (ed) *Decorated Skin - A World Survey of Body Art*. Thames & Hudson, London 2001, p.213
- 36) Yokoyama, Masami, : *Whitening: The rise of a new standard in beauty* In: *家庭画報 International Edition Inaugural Issue 2003* p.140
- 37) Murasawa, Hiroto, : *Untitled Document*, <http://www.linkclub.or.jp/murasawa/e/bibou.html>
- 38) Shaver, Ruth M, : *Kabuki Costume*, Charles Tuttle, Tokyo 1966 338.
- 39) Halford, A.S. & G.M. : *The Kabuki Handbook*, Charles Tuttle, Tokyo 1998 [1956] p.436.
- 40) Heard, Jodi *J-Rock: Visual Kei* @: www.akadot.com/article/article-visualkei-01.html
- 41) 吉村栄一, : *美しい誕生し、美しい生き、美しい終わるべし* in: '*X Japan と「ヴィジュアル系」黄金伝説*' 高島社 東京 2003 p.78.
- 42) Halford, A.S. & G.M. : *The Kabuki Handbook*, Charles Tuttle, Tokyo 1998 [1956] p.436
- 43) Tsuda Nanae, : *Visual bands (Course of International and Cultural Studies, Kyoto Nishi High School)* <<http://www.ma.ultranet.com/~knhsinne/sgvis.html>> 1998
- 44) Napier, Susan J, *ibid.* p.12

記念講演

●
平成15年度記念講演 石田 かつり
●

色白美人はなぜ永遠か —日本人の化粧に見られる美意識—

駒沢女子大学人文学部人間関係学科、資生堂客員研究員

石田 かおり

場所 榎コーサー本社2階会議室
日時 平成15年11月19日水

I はじめに

私は化粧文化研究を専門にしています。文化研究の範囲は広く、何を専門にしているのかわかりにくいと思います。私の場合は大学時代に西洋哲学が専門でしたので、哲学的な方法を、生活の中の化粧という人間の行動や人間の生きざまに応用し、生活行動に焦点を当てて化粧を哲学的に考えるということをしています。大学の授業では「きれいを学問する」というコンセプトを掲げ、そこに全ての授業を位置づけています。

今回は、色白美人というものを捉えてみようという試みをしました。本日の内容は、1. 永遠の色白美人、2. 肌色意識の大革命、3. 美人とはという章立てとなっています。

II 永遠の色白美人

II-1 色白は世界の憧れ

色白は世界の憧れという事実があります。「どんな女性が美人なのか」という質問を世界各地で発すると、「色白」という答えが非常に多いという結果が得られています。日本は言うまでもなく、日本の近隣の東アジア地域、もう少し離れた東南アジア地域、中東、欧米、アフリカでも色白が挙がっています。オセアニアと南アメリカでは、まだ質問していないのですが、多分色白という答えが返ってくるのではないかと予測されます。このように世界中で色白が女性の美しさの条件として挙がってくる事実があります。

ところが、現地の人たちはどんな肌の色をしているのかを見ると、土地の人の肌色と色白の美意識は必ずしも一致しているわけではありません。また、美白行動とも無関係という傾向が、調査をしてみるとわかっています。

私もバリ島に行ったときに「どんな人が美人か」と聞いてみました。ちょうど日本の秋田美人みたいに、ある特定の地域で美人の産地として有名などころがあると言うのです。「その女性は一体どういうタイプか」と聞くと、丸顔で色白で長い黒髪、目がぱっちりとしていると言うのです。

では、バリ島の方が美白をしているかという、全然見たことも、そんな話を聞いたことがありません。赤道と南回帰線の間ですからものすごく日差しが強いのですが、日よけに気をつけているかという、全くそういうこともせずに焼け放題です。髪の毛もアップヘアにするので整髪料で固めているのですが、整髪料と日差しが相俟って非常に髪の毛が傷んでいて、しかし傷みを気にしていないというのが実態でした。

美人が色白だからといっても、日焼けをしないように努力する、あるいは美白に努力することと必ずしも結びついていないことが、いろんな調査でわかっています。けれども、ここに書いてありますように「近年少し変化あり」とは、「美白」という言葉は日本でつくられたのですが、「美白」の文字を書いて韓国や台湾に行きますと完全に通じる時代になりましたし、中国でも通じるようになり始めています。徐々に日本の近隣の国々から美白という運動が広がりつつあるところでは

II-2 色白が美人の条件であり続ける歴史

いま、色白ということを地域的な広がり、つまり現在という同時代で切って、空間的な広がりで見えてきました。今度は時間軸で見ると、色白は歴史上ずっと美人の条件であり続けています。

幾つか例を挙げます。1番目は「ネロ帝の後ポッパエアのミルク風呂」。最初はよい政治を行っていたローマ皇帝ネロですが、途中から豹変して暴君になり、ローマの町に火までつけてしまいました。その後がポッパエアです。彼女のミルク風呂が、西洋古代の色白を求める行動として知られています。

このミルクは牛ではなくロバです。ポッパエアは旅行に行くときにロバを6~7頭連れていったという記録があります。旅先でもミルク風呂に入れるように連れていったのです。そのくらい美容に常に熱心でした。朝起きてからお昼まで丸々半日、毎日大勢の女奴隷を使い、自分の全身を洗わせ、磨かせ、マッサージをさせ、香油をすり込ませていました。それと同時に髪にはパーマをかけさせました。このように毎日「半日エステ」をしていたという記録もあります。

2番目が東洋古代の色白美人で、それは「殷の紂王の後、妲己の白粉」です。殷の紂王も圧制を敷き「酒池肉林」で知られる暴君です。この紂王の後、妲己が中国で初めて白粉を使ったという伝説があります。実はこれは伝説で、実際の調査では、既に妲己の時代に宮廷の人たちが白粉をじゅうぶん



Why Light Skin Has Been So Important for Beauty? — A Historical Approach in Makeup and Skincare —
Kaori Ishida

Faculty of Humanities Department of Human Relations Lecture, Komazawa Women's University
Shiseido Guest Researcher

に使える状態になっていたということです。

妲己は非常に美人として知られ、また、大変な悪女としても有名です。少し前、テレビゲームと漫画を通して小学生ぐらいの男の子を中心に「封神演義」という中国の伝説が流行りました。その中で妲己はその正体が人間ではなく「千年の女狐」で、美貌で紂王をたぶらかして世界全体を支配下に置いてしまおうという企みを持っていたと描かれています。ポッパエアも妲己も悪女として知られ、美容に熱心で暴君の妻という不思議な共通点があります。

時代を少し下ると、「エリザベス1世の厚塗りとメアリ・スチュワートのワイン洗顔」が挙げられます。エリザベス1世は、若いころはそうではなかったのですが、晩年には白粉を3センチくらい厚塗りしていたことで知られています。

なぜ、そんなに厚塗りにしたかという点、「バージンクイーン」として生涯独身だった女王ですが、それは下手にどこかの国王からの求婚を受け入れて結婚してしまうと、イギリスが乗っ取られてしまうからです。国を背負い、大変な責任感を持っていた女性で、ヨーロッパの権力構造を読みながら、大航海時代に植民地政策を強力に進めてイギリスを世界の帝国に導いた。大きな野望も持ち、自分の位置づけを大変に気にしていた人です。女王というのは人々から見られる国のシンボルですから、若く美しくあらねばならない、人々の憧れるような人間でなくてはいけないと考えていたのです。

エリザベス1世の肖像画を見ると大変に豪華な衣装で、全身にパールを縫い込み、襟にはレース。きわめて高価なレース生地を、宮廷の襟専門の係がきれいに洗ってのりをつけて折りたたんで管理していました。それだけ手間のかかった衣装を身につけていました。衣服と並んで化粧も、高価な白粉をたくさん塗ることができるのは富と権力の象徴としての自分自身を演出するためであったのです。

それに対して、同じ時代に女王メアリ・スチュワートがいました。エリザベス1世は当時のファッションリーダーでしたが、彼女自身が美人だったかわかりません。しかし、メアリ・スチュワートは生まれながらの美人として知られています。彼女はスコットランド女王でフランス王女でもあったのですが、夫を殺害した嫌疑のためにエリザベス1世との戦いに敗れ、エリザベス1世のもとに幽閉され、そこで亡くなってしまいます。その牢獄の中からエリザベス1世に大量のワインを要求しました。それは飲むためのものではなくて、ワイン洗顔を欠かさなかったためです。ワインには、ブドウの皮のAHAのために美白作用があります。エリザベス1世は白塗りの色白ですが、メアリ・スチュワートは美白の色白だったのです。結局、この闘いは白塗りが勝ったと見ることもできます。

日本では「色の白いは七難隠す」という諺があります。調べてみると、この諺がいつできたかわからないくらい古く、人口に膾炙しています。長い間の日本人の色白信仰を物語る

ています。

このように時間軸で見ても、いつの時代も色白は美人の条件であり続けました。そして空間軸で見ても、世界中で女性の美しさにとって色白が重視されているわけです。

古代ローマの貴婦人の壁画。頭頂部にパーマをかけて形をつくった絵が描かれています。ローマの貴婦人は白粉もたくさん使った記録があり、剥落が激しいのですが、鼻のあたりにちょっと白いのが残っているのが白粉かもしれません。

それからエリザベス1世の衣装。全身にパールが縫い付けであり、ふんだんに宝石を使っています。襟にも注目してください。メイクも服に負けないうくらい厚塗りでした。

古代中国の宮廷女性を描いた壁画。こちらも剥落が激しく、お化粧の様子がはっきりしませんが、中国では古くから白粉が発達していました。

II-3 なぜ色白は美人か

では、なぜ色白は美人なのでしょう。1番に、「色白イコール日焼けしない肌」ということがあります。サンスクリーン剤が発明されたのは1950年代、普及したのは60年代以降です。それまでの長い歴史は、日焼けをしたくなかったら物理的に焼かないことしかなかった、反対に言えば、嫌でも焼けてしまう時代が長かったと言えます。

すると、色白は日焼けをしないことだから、労働をしないことの証にもなります。外出するときには乗り物に乗る、あるいは傘や帽子や被ぎなどの覆い下にある人、つまり身分の高い人ということになります。下働きの、洗濯や買い物などをしなければいけない女性は、焼けたくなくても焼けてしまうわけです。

2番目に、「色白イコールスキンケアができること」。それは1つには高価な化粧品が使えることです。化粧品は20世紀になってから誰でも簡単に手に入るようになりましたが、時代が遡れば遡るほど、貴重で高価なものになっていきます。

また、スキンケアをする時間があること。身分の低い人たちは仕事のためにスキンケアをする時間がありません。身分の高い人は、ポッパエアのように半日座っていれば使用人が全部やってくれたわけです。

それから、人手の余裕があること。さらに、スキンケアをした肌を傷めない生活をしていることも挙げられます。今ネイルアートが流行っていますが、きれいにネイルアートをした人に「お米をどうやって研ぐのか」と聞くと、「やらない」という答えが返ってきます。今は無洗米もありますからそれでも済みますが、台所仕事などの家事をするとネイルアートがとれるし、指先が痛んでしまいます。スキンケアをしたきれいな肌を傷めないのはとても大変なことだと痛感します。だから、やはり色白は高貴な人の証になるのです。

3番目に、「色白イコール望んでも手に入らない」ということです。1番目と2番目の条件を満たしていないと色白で

いられないわけですから、生まれたときに色白でも、だんだんと日焼けをし、それが蓄積してしまう。色白は望んでも手に入らない時代が長かったのです。

ですから、色白が憧れの対象になり、高嶺の花のイメージになった。お姫様や深窓の令嬢と聞きけば思い浮かぶのは色白の人です。現実はそうではないのかもしれませんが、そういうイメージが成り立ってしまったというわけです。

まとめれば、色白は高貴さの象徴であり、富と権力の象徴であり、そして希少価値だということです。だから、時代と地域を問わず色白が美人になったのだと思います。

Ⅱ-4 色白美人の2タイプ

さらに詳しく調べてみると、色白美人の中には2つのタイプがあります。1番目は、白粉できれいな色白肌になるというタイプ。先のエリザベス1世対メアリ・スチュアートの例ではエリザベス1世のタイプです。姐己もそうです。日本では平安貴族がそうです。しかも日本では、平安貴族以来ずっと京の美意識として今日まで受け継がれています。

2番目は、素肌がきれいな色白です。それが現代人にとっての色白美人です。しかし、日本で最初に登場したのは江戸末期の辰巳芸者からです。ヨーロッパでは先のメアリ・スチュアートのほかに、ナポレオンの皇后ジョゼフィーヌもそうです。

日本の女性は世界で一番スキンケアに熱心です。スキンケア商品の消費量をみてれば明らかですが、価格で比べるとちょっと微妙です。ヨーロッパでは、お金持ちの高齢の方がスキンケアにとっても熱心で、高い商品をたくさん買います。しかしそうしたお客さんの人数は少ないのです。むしろ日本は、ほとんど全員と言っていいくらいの一般の人たちがスキンケアをするので、スキンケアに対する意識と行動の平均水準が高いです。つまり、人々の生活の隅々にまでスキンケアという意識が普及しているとも言えます。

なぜそうなったのでしょうか。これには幾つか原因が考えられるのですが、今回の色白美人という観点からしますと、素肌美そのものを重視する美意識と、化粧美の土台としての素肌美の重視、つまりメイクをしたときにきれいに仕上がるためには素肌もきれいでなくてはいけないという意識です。この両方を求めるようになったためと考えられます。

Ⅲ 肌色意識の大革命

Ⅲ-1 赤から白へ

さて、日本人の肌の美意識ですが、化粧史の上で大きなターニングポイントがありました。「肌色意識の大革命1、赤から白へ」。縄文時代から平安時代の初期までは赤い印象のメイクをしていました。これを一言で「赤化粧の時代」と言います。まず縄文時代から古墳時代までを見ると、顔や体に直接赤い顔料を塗布するメイクがされていたと考えられています。

飛鳥時代から平安初期になると、中国大陸から白粉が入ってきます。それで白塗りになったかということ、そうではなく、白粉に赤い粉を混ぜます。ベンガラだったり紅花だったり、色んな粉がありますが、それらを使って濃いピンク色の粉を作り、それを額や頬といった顔の広い面積の部分に塗っていきます。だから、パッと見ると赤い印象の顔になっているわけです。

縄文時代は赤い顔料がたくさん出土しています。縄文土器の中に赤い顔料が詰まっていた、それがベンガラです。貝殻の裏側にも詰められています。大体縄文時代はベンガラが多い。土器に模様を描くときに漆にまぜて塗られましたが、これを人体に塗っていなかったかということ、塗っていたかもしれないのです。

埴輪のお化粧には、額に三日月型の少し黒っぽくなった部分が見られます。目の下から頬にかけても少し黒っぽくなっています。それから鼻筋、そしておとがいも黒くなっていますが、この黒い部分は赤く塗られていました。人間が埴輪の格好をして行列して歩いている写真は、千葉県芝山町の「埴輪祭り」の模様です。

白粉が入ってきてからの時代です。唐と奈良の宮廷女性の化粧の様子。有名な正倉院の「鳥毛立女屏風」では、頬の広い範囲が赤くなっています。唐の「弈棋図」の女性の絵は、眉の下から頬にかけ広い範囲で赤くなっています。これらは白粉を顔全体に1回塗ってから、頬、瞼、広い範囲に白粉に紅をまぜた粉をつけ、しかも濃くつけている。当時の記録を読んでも、「最近女性が顔を赤々とさせていて、お化粧が濃すぎてけしからん」なんて記述が出てくるのです。いつの時代にも「化粧が濃すぎてけしからん」という話はあるのですね。

【あかあかの美意識】

万葉集の時代に「あかあかの美意識」というものがあります。「春の苑紅にほふ桃の花、下照る道にいで立つをとめ」、大伴家持の有名な歌です。これは桃の花の下に若い女性が立っている、その女性の輝くような美しさを歌っています。桃の花は桜の花に比べるとピンクがとても濃く、桃の花が満開の下に立っている女性の肌の色も赤々としている風景が思い浮かびます。

「あからひく色妙の子をしば見れば、人妻ゆゑに我恋ひめやも」、柿本人麻呂の歌です。こちらは万葉集には採録されていません。この「あからひく」は枕詞です。「子」にかかる枕詞で、「子」というのは親しみを込めて女性を呼ぶときの呼び方です。「色妙」は「美しい色をした肌」という意味で、「あからひく」には「赤みを帯びた美しい肌」という意味を持っています。歌の意味は、「赤みを帯びた美しい肌をしているあなたをちらっと見てしまったので、(ここでの「ゆゑ」には理由ではなくて逆接ですが、)人妻であるにもかかわらず、あなたに恋をしてしまった」という歌です。肌の美しさはあかあかとした美しさ、赤みを帯びている美しさ、

それがこの時代です。お化粧にもそれが反映されていると考えることができるのではないかと思います。

【白化粧の時代】

ところがこの後、お化粧が突然真っ白になってしまいます。白化粧の時代です。平安時代の中期、国風文化の時代に、顔から赤みが消滅します。いわゆる白塗りメイクです。以後、素肌に近い色の白粉が普及する昭和初期まで、白化粧は約1000年間続きました。

国風文化は遣唐使の廃止によってもたらされました。中国からの文化の輸入が途絶えて日本独自の文化がつくられていった時代です。日本独特の美意識もここで登場しました。

源氏物語絵巻の平安貴族。この頃には男性も女性と同じメイクをするようになっていきます。院政が始まった頃です。女性と男性とが全く同じ顔になりました。最初に眉を剃るか抜くかして取り去ってしまい、顔全体に白粉を塗ります。額の高いところに円形、または楕円形で眉を描き、お歯黒をして、ほんの小さく口紅を点す。今の若い人は「口紅を塗る」と言いますが、まさに点状に赤を点します。服にはお香を焚きしめました。

以後ずっとこの色白の美意識が続き、白塗りが続いています。月岡芳年の絵にある大奥の女中は、顔全体を白塗りにしている上に、額とそれから鼻筋、いわゆるTゾーンが特に白くなっています。さらに白を強調することで鼻筋を通してみせています。それから眉の下あたりにうっすらと、紅をほかし、シャドーとして上手に使っています。実物は眉が薄い青で描かれています。これは剃り跡です。この剃り跡の青さというのも女性の色気にとって大切なものだったのですが、色白の美人ならではの美しさです。それから口が開いていますが、お歯黒をした黒く小さい歯が並んでいるのが見えます。先ほどの平安貴族のときに確立した同じパターンのメイクをしていました。

伊東深水の美人画も、江戸時代ほど白塗りではありませんが、やはり白っぽい白粉を塗っている時代の美人画です。

博多人形と御所人形。女性の理想の肌の1つに「博多人形のような肌」という言い方がありますが、やはり白くてなめらかな肌をしています。

御所人形は、全身、顔から足の裏まで真っ白にきれいに塗られています。胡粉（ハマグリ）の裏側を何十回と塗り重ね、厚さが0.5ミリぐらいという大変精緻な作業です。今の女性の理想の肌が赤ちゃん肌ですが、まさにこの御所人形の肌の白さでしょう。しみもしわも吹き出物も何もない、ツルツと均一な、色の白い、そういう肌です。

【白粉の色革命】

有史以来白粉は世界中で白しかありませんでした。ようやく1900年ごろにヨーロッパで素肌に近い色が登場してい

ます。1900年のパリ万博に出演したマダム貞奴が、当時のヨーロッパの女性たちを見て日記に、「パリの女性たちは日本の女性と違って、自分の肌の色に近い色の白粉を選んでつけている。やがて日本の女性もそうなるだろう」と書いている。彼女の予言は当たり、1906年、明治39年に黄色、肉色と、初めて日本で国産の有色白粉が発売されています。1917年になると、「七色粉白粉」というものが発売されます。自分の肌の色に合わせて何色か選んで調製して使うものです。今コントロールカラーという発想があります（特にベースクリーム）。顔に赤みがあって、それを気にし、もう少し白くなりたいという人は例えばグリーンのベース、コントロールベースを塗る。逆に血色が悪いので、オレンジ系のコントロールベースを塗ることもあります。その発想が既に大正時代にはあったのです。

こうした経過を辿り、現在は素肌に近い色のファンデーションを使うようになりました。とは申しても、購買行動を調べると、60代から上の方は自分の肌の色よりは少し明るく見える色を選びがちです。その方が顔が映えて若く見えるという気持ちもあると思うのですが、やはりまだ白粉は白という時代の記憶というのも影響しているのではないかと考えられます。

江戸時代の白粉の模様。溪斎英泉の「美艶仙女香」は宣伝の絵です。枠で区切った中に白粉のパッケージがあり、商標が書いてあります。刷毛にも書いてあり、美人画であると同時に宣伝画でもあるものが江戸時代にたくさんありました。江戸時代は白粉のブランド品がたくさん出ています。ファッションリーダーとして歌舞伎役者がいましたが、役者ブランドの白粉もたくさんあり、有名な白粉専門店に女性が行列をして買うように、既にマスコミとブランドが確立していた時代です。

江戸時代の白粉と白粉道具。三段のお重があり、1つの段には粉白粉を入れます。錦絵が印刷されているものは白粉のパッケージです。この中に入っている粉を1つの段に入れます。もう1つの段には水を入れます。残りの1段で混ぜ合わせて、練り白粉にして塗っていきます。

練り白粉は英泉の絵の人が持っている平刷毛で塗り、その後ボタン刷毛で粉を塗っていく。ちょうど現在のリキッドファンデーションの後に粉おしろいを塗るのと同じテクニックで使っていました。

「かへで」と「はな」の最初の広告と、「七色粉白粉」の写真です（図1）。この7色の中から自分のなりたい肌色、あるいは自分自身の肌



図1 [資生堂企業資料館提供]

に合った色を何色か選んで混ぜて使うというものでした。

Ⅲ-2 白粉から素肌へ

今迄は白粉の肌の色革命の1として「赤から白へ」でしたが、今度は2の「白粉から素肌へ」という変革です。化政文化の時代です。史上初の江戸からの文化発信が行われたのがこの化政文化の時代です。それまではずっと京都、それから元禄も大阪で、上方からでしたが、ここで初めて箱根の山を越えて江戸から文化が発信されました。江戸っ子は京文化に大変な対抗意識を燃やしました。そこで登場したのが薄化粧、素顔を評価するという美意識です。

江戸の美人と言ったら辰巳芸者（今深川の芸者さんはいなくなりましたが）でした。それから湯上がり女、そして洗い髪。いかに薄化粧であったかがわかります。

素肌そのものが美しいということと、化粧美の土台としての素肌美を追究するようになったのもこのときからです。そして、その傾向から、当然スキンケア意識と行動が芽生え、普及するのです。その典型的なものが「糠袋」というわけです。

【京と江戸、美意識の対比】

京都、江戸の美意識というものを比較してみたいと思います。

京で「はんなり」という言葉は最高の美しさをあらわす形容詞ですが、江戸は「いき」です。「粋」と書き、江戸では「いき」と読み、京では「すい」と読むという違いもあります。九鬼周造の『粋の構造』に詳しく書かれています。

京では華やかな色彩、赤や金を多用しているが、江戸で好まれたのは渋い色彩で、茶、鼠、黒、藍でした。特に「四十八茶百鼠」という言葉があり、茶色は「いろは」の48文字あるくらい、茶色にこだわった。鼠色も100色あるくらい、非常に微妙な鼠色の違いにこだわったのが江戸の人です。今、東京駅の通路、八重洲側と丸の内側を結ぶ通路で南口の通路を歩きますと、その横の壁のタイルに日本の伝統色名で「百鼠」の一部が実際に焼きつけてあり、見ることができます。

それから、紫は京では京紫、江戸では江戸紫です。

京の人が好んだのが有職柄、友禅柄。有職柄というのは公家の衣装で、伝統がある。友禅柄というのは金や赤が使われた華やかな柄です。それに対して江戸はしま柄や細かい小紋柄を好みました。

京は上品で奥ゆかしくてしっとりした美しさを求めたのに対して、江戸は生きのいい単純明快でさっぱりした美しさを求めました。

京の人たちの憧れは宮廷人ですが、江戸の人たちは辰巳芸者に憧れた。

お祭りをとりましても、葵祭や祇園祭といった奥ゆかしくしっとりしたお祭りに対して、三社祭や神田祭といった

いきのいいお祭りが江戸の祭りです。

そしてお化粧では、京は化粧美、つまりメイクしたときの美しさを求めたのに対して、江戸は素肌美を求めたのです。

有職柄の十二単と京友禅。鈴木春信の絵（風流四季哥仙）ですが、縞柄で黒と茶を軸にコーディネートしています。鯨小紋は江戸小紋を代表するもので、針で刺したような細かな型紙で染められている。遠くから見ると無地に見える柄です。

雅な宮廷女性と粋な辰巳芸者の絵。辰巳芸者は紺と茶と黒を軸に、裏にちょっと赤をきかせてコーディネートしています。

お祭りの写真。葵祭と三社祭です。

辰巳芸者は薄化粧で、冬でも絶対足袋をはかないで素足です。「素」という感覚で非常に気風のいい芸者さんです。それに憧れた江戸の女性たちは湯屋、現在の銭湯で、一生懸命糠袋で全身を磨いて、全身スキンケアをしたのです。

「糠袋美人図」には、糠袋を口にくわえている女性の絵が描かれています（図2、月岡芳年画）。化政文化から大正時代まで、糠袋をくわえた女性が美人画の定番ポーズとして確立してしま

ましたが、糠袋をくわえていることはイコール湯上がりなのです。湯上がりということは素肌美人なわけで、そういうポーズです。糠というのはスキンケア、汚れを落とすのではなくて、油分が入っていますし、ビタミン類も豊富で、本当にいいスキンケアです。実際私も使ってみて、とてもびっくりしました。



図2 〔資生堂企業資料館提供〕

江戸時代の後期の化政文化にスキンケアの意識と行動が芽生えて普及しました。現代の日本女性のスキンケア意識と行動の原点は、化政文化の江戸期に求めることができます。日本人の薄化粧好みの原点というのもここにあると考えられます。

ここから明治、大正、昭和、そして平成とずっと素肌美を求めて日本の女性は生きてきたのですが、それだけではありません。他人を見るときに肌の状態を大変に気にします。特にあら探しの視線がそうです。知らず知らずのうちに吹き出物のところに目が行ってしまうとか、黒子のところに目が行ってしまうというのが日本人の不思議な心情で、世界でどこもそうかという決してそうではない。とにか

くしみとかそばかすを大変に嫌い、しわも嫌い、それから黒子も嫌い。そういうものを「汚点」と考えるのが日本人の大きな特徴です。汚点をとにかくどんどん消して行って理想を求めていくと、赤ちゃん肌になるわけです。生まれたての、本当に無垢の状態というイメージを追求している。

【小麦色の衝撃】

ところが、こういうことがありました。小麦色の衝撃です。1950年代に欧米で日焼け肌が流行しました。日焼け肌というのはバカンスを享受することができるステータスシンボルだった。今でも、ヨーロッパのお金持ちは2カ月ぐらい夏にお休みがあって、地中海沿岸、アメリカ人ですとフロリダや西海岸に行きますね。すると、真っ黒に日焼けして帰ってくる。夏休み明けに日焼けをしているのがステータスシンボルでした。

1950年代の末に日本に入り、ちょうど高度成長期ですが、「小麦色の肌」という流行になりました。時代背景は高度経済成長が始まり、レジャーブーム。「レジャー」という言葉が初めて普及した時代です。自動車が1家に1台普及するようになり始めた時代です。それと、企業では夏休みが2日か3日とることができるようになったという時代です。日焼けした肌は日本では健康美と受け取られました。

この小麦色の肌は、70年代になりサーファーファッションという形で、色白とはまた別の流れとなり、若者ファッションとして定着しています。

少し前にガングロというのが渋谷にもいっぱいありましたし、当時非常勤で行っていた大学にも結構いたのですが、今はすっかりガングロはいなくなりました。日焼け肌というのは、ときどき流行っては廃れるということを繰り返してきています。

今年の春・夏にブロンズのような肌が各メーカーから出ました。実は私もブロンズパウダーを買って、きょうも実は使っているのですが、この通り、だからといってブロンズ色の顔かというところではありません。このブロンズ商品、売れたのですが、どこに消えたのだろうか。考えてみると、日本人は明治以降、ずっと顔の立体化を追求してきています。日本人は扁平な顔ですので、欧米人のように彫りの深い顔になりたい。それを演出するのにこのブロンズ商品が便利なのです。例えばUゾーンに塗るとか、頬紅としてちょっと入れるなど。私もそうですが、どうやらそういう人が非常に多い。このように日焼け肌は流行はするけれど定着はせず、流行になり、廃れ、流行り、廃れという形で今日まで続いてきています。

1966年の「小麦色の肌」のポスター写真。前田美波里さんのデビューポスターと言ってもいいくらいの作品です(図3)。当時、この角度からこの水着を着て写真を撮るというのは大変センセーショナルなことだったと聞いて

います。でも、もっと日焼けしているのが夏目雅子さんのポスターで、だんだんと日焼けの度合いと露出の度合いがエスカレートしてきているのがわかります。そしてガングロの女子高生の集合写真。

III-3 化粧は高度な文化

こうして見て来ます 図3 [資生堂企業資料館提供] と、化粧というのは高度な文化であるということがわかります。化粧の変遷を見ると、時代ごとの美意識の変化を知ることができます。何を美しいとするか、何をよしとするかには時代の価値観が反映されています。

同時に、どんな外見にするかは本人の価値観や生き方が反映されている。つまり時代の価値観と当人の価値観が相俟って、1つの表現形となって化粧に出ていると考えることができるわけです。

化粧を考えるということは人がいかに生きるべきか、自分はどう生きるかを考える手がかりにもなるわけです。ですから、化粧は人をつくるということができないのではないかと思います。

私の専門は哲学で、化粧は人間にとってどういう意味を持っているのかを、ずっと一貫したテーマで考え続けてきています。お手許の資料(2002年3月16日毎日新聞記事)、「化粧が感動を呼ぶわけ」に書いてあります(資料参照)。

歴史上、化粧が悪用された例はたくさんあります。日本では太平洋戦争中の国家によって人々の外見が統制され、それによって人々の気持ちまで統制する1つの力になっていましたし、文化大革命中の中国もそういう政策がありました。少し前に犯罪を犯した宗教団体がそういったことをしていたという例もあります。化粧というのはアイデンティティに非常に大きくかかわっています。自分が自分のアイデンティティをどうつくっていくかということに自由がある間はよいのですが、何かの権力に個人の外見を握られたときの怖さともあるわけです。

化粧を考えることが「人はいかに生きるべきか」、「自分はどう生きるべきか」を考える手がかりにもなる。だから、「化粧は人をつくる」ということができるというわけです。

化粧の持つ力も取り込んで化粧をよりよく生きる手段にすることもできるし、反対に自己抑圧や自己喪失のきっかけにもなり得る。その化粧の力の例として、老人性痴呆症や鬱病の患者さんに対し、それからPTSD(心的外傷性ストレス障害)など、いろんなショックを受けた後の精神的な状態の症

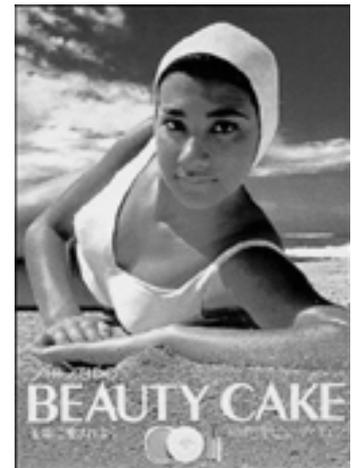


図3 [資生堂企業資料館提供]

状の軽減や改善に役立っています。またお化粧品で対人積極性が出る、あるいは社会性が回復するという例がたくさんあります。それから、社会性が拡大していくという例もたくさんあり、そういう化粧の力を上手に生かしていくことが、1人ひとりが生きやすい社会をつくる上で特に重要になってくるのではないかと思います。

IV 美人とは何か

IV-1 美人の基準

これまでのことを踏まえて、最後に「美人とは何か」についてお話ししたいと思います。

歴史を通じて普遍的な美人の基準、世界中どの地域にも共通する基準があります。これは若さです。デズモンド・モリスという動物行動学者がいます。動物をずっと観察していたのですが、人間の行動も観察し続けて、『マンウオッチング』や『裸のサル』などを書いている人です。彼と対談したときに、彼は200の文化を調べた結果、美しさの基準の中で唯一共通しているのが若さだったと言うのです。この若さの美しさというのは確かにだれが見てもわかりやすい。単純明快で、現在、大変に強力な美しさの基準にもなっています。

肌の美しさというのも色白、つまりしみとか吹き出物とかしわがないということは、若さの証でもあるわけです。それが現在も最強の女性美になっています。また、若い世代になればなるほどこの傾向が強まるような気がしてなりません。少し前ですが、電車に乗っていたときに、自分のすぐ後ろで男の子3人組が話しているのが耳に入ってきました。どうも高校の卒業式が終わって間もないらしいのですが、「もう人生終わりだな」という話をしていました。社会の中で自分の価値が最も高く流通する年齢があります。それが高校生、今ちょっと中学生に移りつつありますけれども、もう高校出たら、あとはおしまいだという話になるわけです。若い人ほどそれを敏感に感じ取っています。

「若さイコール美しさ」という価値観に由来する現象には、女性の価値は若いうちだけというものがあります。女性には経験と円熟よりかわいさと初々しさが求められる傾向が強い。男性には「いい顔」という表現がありますが、女性ではどうでしょうか。アイドルやスポーツ選手の年齢が急速に低下して、今やオリンピックでは美しさを競う競技、例えば床運動やアイススケートなど、特に床運動は「お子様スポーツ大会」みたいになっています。アイドルタレントも今や10代です。20代になるとアイドルおしまいという時代になってきています。

平均寿命が80歳という現在、ある年齢を過ぎるとあとの長い人生はどんどん価値が下がっていくことになってしまう。するとエイジング、つまり年を重ねることは不幸が増すのみということになってしまうわけで、本当におかしな話です。実際美人に関する現状というのはこうです。どうしてこうい

うことが起こったかを考えると、美しさの基準が個人の外に置かれているからです。個人に外在的な美の基準がもたらすものとして何があるかといいますと、美的基準と異なる人物、ファッションモデルや女優などですが、それは社会の中に1人、またはごく少数しか存在していない。ごく少数の人しか美しさの基準として社会の中にないわけです。それ以外の一般人は、自分とそのモデルを比較すると、美容上の欠点を抱えているということになるのです。美容指導は現に欠点克服型です。「あなたはここが少し出っ張り過ぎだから引っ込んで見せるようにしましょうね」と、そういうやり方をしているのです。

大正時代に女性雑誌が次々と創刊されて、美容相談コーナーができて、以来ずっとありますが、それもやはりずっと悩み克服型です。すると、目指す顔が同じパターンになってしまいます。実際、資生堂の実験結果からも、メイクをすればだれもが同じ顔になってしまうという傾向が確かにあります。

IV-2 新しい「美人」とは

これからの時代をよく生きる、充実して生きるために必要なことは発想の転換、価値観の転換ではないでしょうか。それは美しさの基準が個々人の内にある、「人それぞれの美しさ」ということです。これは、社会の中で価値基準を多様化するということでもあります。

「人それぞれの美しさ」で個人の中に基準を置いただけではまだ足りないのです。年を重ねることに対する美的価値の転換というものも併せて必要です。例えば10年前の私と、現在の私と、10年後の私を比較したときに、どれも違って、どれもよくて、どれが一番いいかというのはもうナンセンス、それが実現できたら、こんなにいいことはないのではないのでしょうか。

これを「年それぞれの美しさ」と名づけます。これは個人の内部での美的価値の基準の多様化です。女性にこの話をするとすごくよくわかってくれます。例えば「1年前の自分が一番よく見えるヘアスタイルとメイクと服装を思い出してみてください」。「では、現在自分が一番よく見えるヘアスタイルとメイクと服装はどうですか、1年前と同じですか」。違います。毎年毎年自分は変わっていくのです。その年その年の美しさというものがあるわけです。もちろん流行の違いも反映されていますが、流行のピークは結構若いところにあります。それを超えると、むしろその年の自分が、どれが一番よく見えるかがより実感としてわかってくると思います。先ほどは社会の中の価値基準の多様化、「人それぞれの美しさ」でしたが、今度は個人の内部の価値基準の多様化、「年それぞれの美しさ」です。

新しい美人というのは「人それぞれ・年それぞれの美しさ」です。こういう考え方で周りの人も評価し、本人もまたそれを実現していく、こういう方向にあるべきではないでしょう

か。本人がひとりいくら頑張っても周りが認めてくれないと挫折するのです。ちゃんとそうやっている人を周りが評価してあげるということは非常に大事です。特に化粧品メーカーにはプロがたくさんいますので、プロの目でその人なりの美しさの基準というのを見出してあげて、表現している人の表現を応援してあげるといこと、それがとても大事なことでないかと思えます。

実は「人それぞれ・年それぞれの美しさ」という活動は資生堂が「サクセスフル エイジング」という活動を89年から始めて、97年の段階で、「サクセスフル エイジング」イコール「美しく年を重ねる」の「美しさ」の部分の解釈として、「人それぞれ・年それぞれの美しさ」というのを社長、会長にまで認めていただいて、そこに付け加える形で現在展開しています。資生堂の外でも私はこういう活動をずっと行なっています。

この「人それぞれ・年それぞれの美しさ」が求められる背景ですが、ちょうど今流行っている歌にスマップの「世界に1つだけの花」があります。大ヒットして、しかもかなり長い間ヒットしています。あの歌詞は「ナンバーワン」より「オンリーワン」という意味です。ナンバーワンというのは価値の基準がごく少数しかなくて、その同じ基準の中で競争していく、それがナンバーワンです。ところが、オンリーワンというのは価値基準が社会の中に多様化している。自分の中でもナンバーワンとオンリーワンというのを考えてみますと、若いある年齢に美しさのピークがあって、そのときの自分が美的にナンバーワンだった。あとはだんだん下がっていくというわけですが、その年その年しかない自分の美しさというのはオンリーワンなわけです。

自分価値、自分基準の時代というのを現在迎えています。これからさらにボーダレス化が進展し、それから高齢社会もますます進みます。成熟型社会、スローライフということも今言われていますけれど、スマップの歌も「人それぞれ・年それぞれの美しさ」というこの価値観も、まさに成熟型社会のあり方です。そういう時代は多様な価値基準が必要とされてきています。美しさの基準や美容の発想、美容の方法というのも変わるべきときに来ているのではないのでしょうか。

「毎日新聞」の記事、「美は美しさの第一歩」(2003年9月6日)と、「化粧品を子供にどう教える」(2003年11月4日)という資料ですが、今日私が和服を着てきているのも実は大いに関係をしています。私は和服が大好きで、小さいときから日本舞踊も習っています。たしかに好きで着ているのですが、それだけではないのです。

女子大学で教えるようになり、学生たちを見て、「美女は

増えたけど美人は減った」という感じを強く持っています。つまり今の若い人というのは、安い物を上手に組み合わせで自分なりのファッションをつくっていく。メイクにしても服装にしても、美しさの表現はとても上手になっているのに、話をしてみると、一言口を開けたらがっくりくる子がたいへんに増えているような気がしてなりません。自分のことを棚に上げて言うのもなんですが、教育者という視点から言わせてもらいますと、何かとても品がない感じがするのです。どうしてなのかは2～3年の間わからなかったのですが、あるとき気がつき、その気がついたことを書いています。

私は「きれいを学問する」というコンセプトのもとに講義型の授業と、実習型の授業と、演習型、つまりゼミの授業と、それからグループ学習の授業と、4つのパターンの授業を展開しています。実習型の授業として「ライフスタイル論」を持っていますが、伝統的なライフスタイルの中から日本人の伝統的な美意識をもう一度学び取って、自分の体を使って、頭と体の間を往復しながら考えていくことで、自分の美しさをつくっていく態度を身につけてほしいと思って行なっています。どんな美しさを身につけたいか、最初に目標を立てさせて、授業の終わりにはフィードバックの自己評価をします。この授業では学生が和服を着ます。それは大きなモードチェンジになります。和服を着ると自分の行動が一々気になるはずで、美しさということをも自分でもう一度意識するために、和服はとていい道具だと私は考えています。また日本舞踊に代表される美しい動作の訓練にも和服が非常に役に立っています。そうした私の経験からも、このような授業を展開しています。

また、最近研究を始めたばかりの「これからの時代の新しい美しさ」のテーマにも和服が大いにかかわっています。こうしたことから、最近人様の前でお話するときには和服を着ることが多くなっています。

V 最後に

最後に今日お話ししたことの参考文献です。化粧を哲学的に考えるのは『おしゃれの哲学』という本に書きました。今日お話しした中の多くは歴史研究から採ってしまっていて、それは『化粧せずには生きられない人間の歴史』(講談社現代新書)に書いたものがたくさんあります。そして、小学校の5年生から中学生向けに化粧の歴史と化粧教育を書きました『お化粧大研究』は、つい先日出たばかりです。今日のお話で興味を持ってお読みいただきましたら幸いに存じます。

本日はありがとうございました。

コスメトロジー研究雑感

平成 13 年度 研究助成

コスメトロジーと高分子化学

鬼村 謙二郎

コスメトロジー（化粧品学）は人類が誕生し最初の「文化・学問」ではないだろうか。例えば祭りや信仰、あるいは部族間の区別や階級、職種など原始時代から現代に至るまで世界中で行われている。科学的な面から考えると、太古では鮮やかで神秘的な色を求めて顔料の探索や調合が日常的に行われ、天然の植物（花や実、根）、動物、さらに岩石などの鉱物に至るまで調査が行われていた。これらの探索過程で薬理作用がある植物が見つかり、金や銀などの貴金属やダイヤモンドが発見され、さらに調合過程では化学反応により全く新しい色や機能を持つ顔料が見つかったのだろう。現代風に言えば化学、生物学、薬学、医学、地球科学といった重要な科学分野にあたる。即ち人がより美しく見せたいという願望、欲求がサイエンスを発展させていったのだと思う。

一方、現代の化粧品学はどうであろうか。化学、生理学、生物学、物理学、医学、薬学、色彩学、工学など細分科さ

れた科学技術を結集して一つの化粧品が出来上がるため、一個人としては化粧品を開発することは困難である。私が専門としている化学、特に高分子化学や有機化学分野での化粧品開発への貢献は新素材の開発、平たく言うともより新しい色を発する物質や肌への低刺激性化粧品の開発などがあげられる。最近はナノテクノロジーという言葉をよく耳にする。ナノとは10の-9乗を意味するが、化粧品との関係ではナノ粒子の活用が実用化されている。ナノ粒子は無機あるいは有機化合物を数ナノ～数百ナノメートルの粉にして化粧品に混ぜ肌のきめ細かさを表現している。ナノメートルの大きさは化学で言うと分子がたくさん繋がった高分子の領域である。高分子化学や有機化学は比較的個人レベルの考え（アイデア）で全く新しい物質を世に産み出せる学問の一つだと思う。今後、人類の「美しく見せたい」という根底にある願望が科学技術の発展の力になるだろう。

（山口大学工学部応用化学工学科）

平成 13 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

亀島 欣一

この度、コスメトロジー振興財団の研究助成金を頂き、心から御礼申し上げます。

コスメトロジーという言葉は、化粧などに関する言葉だとは知りつつも、私などが普段使う言葉ではありませんでした。言葉の本来の意味は「美容術」というのが正しいようで、つまりは「化粧」と同義と考えて良いのでしょうか。この為、男性にとって馴染みが薄い言葉ですが、女性にとっては敏感に反応する言葉であると思われれます。普段は理系的なことには関心を示さない女性でも、「コスメトロジーに絡んだ研究」と言うと理解して頂けたことに、少し驚きつつもなるほどと感心したものです。

似たようなことが「粘土」という言葉にも見られます。粘土というと大多数の方は陶芸などの「焼き物の原料」を思い浮かべますが、女性の場合は泥パックなどの「美容」に関することも連想するそうです。泥パックに代表されるように、粘土と化粧の関係は古くから続いてきました。現在でも、ファンデーションに伸びを与える材料として、あ

るいはアイシャドーやマニキュアに均質に色づけする基材として使われていますし、子供の頃にお世話になったベビーパウダーも主成分はタルクという粘土です。最近では、乾燥肌対策の保湿成分として粘土の保湿性や保油性が利用されています。

本研究では、この粘土材料が持つ再生性というユニークな機能を上手く活かすことで、クレンジングや肌の保護などに活かせる新しい用途開発が行えると考えました。ここで、本研究で得られた粘土材料の特徴について簡単に述べます。比較的大きな細孔であるメソ孔を保持した粘土材料では、より長鎖の脂肪酸の吸着が可能となります。サポナイトの再生性を有する粘土材料では、サポナイトの膨張性を制御することで、吸着性能などを制御した粘土材料です。また、層状複水酸化物とサポナイトの両方の再生性を有する粘土材料では、陽・陰の両方を取り込むという「複吸着能」が生じることで新たな用途が期待できます。これらの材料について、今後はいかに制御性を向上させるか検討し

ていきたいと考えています。

今後の粘土材料に関する研究の発展がコスметロジーの発展にも寄与するものと確信しております。また、微力な

からそのお役に立てる研究が続けられれば幸いです。

(東京工業大学大学院理工学研究科)

平成 13 年度 研究助成

コスメロジーに興味を持った理由

田辺 陽

私は、独自の有機反応を開発し、それを有用ファインケミカルズ合成に応用する、すなわち実験室レベルから工業的規模まで視野に入れた研究を行っている。企業（住友化学）で 10 年、さらに 5 大学で研究したことがこのような研究に取り組む経緯である。

特に若いころ東大理学部向山研究室で研究生として学び、「チタン＝クライゼン縮合」に出会い、学位論文としてまとめた。最近、この反応の大幅な合理化をテーマにしていたところ、タイミング良くジャパンエナジーから「ジャコウネコから採取される天然ムスク香料：シベトン」へ実用合成に応用できないかとの要請を受けた。シベトンやムスコンなどの天然ムスクの実用化学合成は香料業界の最大テーマの一つである。ワシントン条約に謳われる野生動物の乱獲虐待防止の観点からも重要である。

おかげで初期の成果、「チタン＝クライゼン縮合」を利用する、現在まで唯一ともいえる「シベトン」の実用合成法を確立できた。＜朝日新聞夕刊（関西版）2000, 9/7; 読売新聞夕刊（関東版）2000, 9/14; 日本経済新聞朝刊（全国版）2000, 10/9 掲載＞。

これを契機に、コスメロジー研究に興味を持ち、この独自チタン反応を最も閾値が低い（最も強力な）天然香料とされるミント系香料である R-ミントラクトンや R-メントフランの非常に短段階のシンプルな合成や植物性香料シスージャスモンの新規フラン誘導体（調香で残効性の優れた個性的なメンズフレグランスとしての商品価値）の合成に展開できた。ところで、この独自チタン反応は、最近、メルク社の抗院内感染抗生物質（*anti*-MRSA）合成で実際に工業化規模で実施され、さらに現在、最高性能の抗生物質とされるメロペネムの短段階合成法も可能となった。

ひょんなことからコスメロジーに関わることになったというところが実感である。個人的には「シベトン」の方が「ムスコン」より好きである。おかげ様で最近では香水に興味を持つようになり、デパートの一階でのショッピングを楽しむようになった。仕事から趣味が広がったことを関係の方々感謝する次第です。

最後にお世話になりましたコスメロジー財団に感謝申し上げますと同時にますますのご発展をお祈り申し上げます。

(関西学院大学理工学部化学科)

平成 14 年度 研究助成

界面活性剤とコスメロジー

吉村 倫一

私は、化粧品や洗浄剤などに含まれる界面活性剤の研究を行っています。具体的には、目的や使用に応じて分子をデザインして実際に合成し、これらの性質について様々な測定によって詳しく調べています。また、工業的に有用であるか評価しています。界面活性剤は水表面や水と油の界面などに吸着して配向し、水溶液中ではミセルのような会合体を形成して、その結果、乳化や洗浄などの効果を発揮しています。現在、化粧品などに使用されている界面活性剤と同等、あるいはそれ以上の性能を有する新規界面活性

剤の開発を目指して研究に取り組んでいます。いろいろな分野で「環境にやさしい」とか「地球にやさしい」などと言われていますが、私も環境や人体にやさしく、害のない界面活性剤を作り出したいと強く思い、現在では、糖やアミノ酸を用いた新規な界面活性剤の開発に精力的に取り組んでいます。自ら分子設計して合成した新規界面活性剤には予期せぬ優れた性能の発見があり、非常に興味を持たれます。

私の開発した界面活性剤が、将来化粧品などの成分表示

に記載されることを夢見ながら研究を進めていますが、これからは材料などのコスト面や界面活性剤の機能性という面についても重要であると思われます。自ら分子設計して合成した界面活性剤が実用化され、少しでも世の中に貢献

できたら研究もさらにやりがいのあるものとなります。人体や環境にやさしくかつ機能的な化粧品を創り出すコスメトロジーの研究が、今後ますます発展することを期待しております。
(東京理科大学理学部)

平成 14 年度 研究助成

コスメトロジーに役立つマテリアル

岩崎 泰彦

生体に優しいポリマーマテリアルの研究を始め、およそ10年が経ちました。生体と伴に用いるマテリアルに安全性が問われることは、言うまでもなく、生体の構造や機能に倣って分子設計することが極めて重要です。しかしながら、生体に関連して用いられているポリマーマテリアルの多くは、機能のみが優先され、生体のことを考慮して設計されておられません。そのため、これらのマテリアルは生体と接触した瞬間から生体の巧みな防御反応の対象となり、生理的環境においてマテリアル本来の機能を発揮できないことが問題となっています。

私たちは、生体反応を制御できる究極の界面は生体膜により構築されるとの考えから、生体膜を構成するリン脂質と同じ構造を持つポリマーを合成しました。その結果、このポリマー表面では、様々な生体反応の原因となるタンパク質吸着や細胞粘着が起こらない、すなわち生体がこのポリマーを異物として認識しないことがわかりました。現在このポリマーは、血液と接触して用いられる医療用デバイスの表面改質に用いられています。

一方、このポリマーが肌に対し高い親和性を示すことも明らかにされ、さらに肌の木目を整える効果があること、ポリマーであるがゆえに皮膚に吸収されず表面に長期間存

在し、外界からの刺激に対する見えない手袋として働くことも認められ、現在では、多くの化粧料や洗髪料など幅広く用いられるようになってきました。

最近、私の3歳の娘がお化粧品に夢中です。お化粧品は年齢を問わず女性（最近は男性も？）を外見のみならず精神的にも豊かにすることを、娘の楽しくも真剣な姿をみながら実感しています（娘の練習相手には少々困っておりますが..）。そのため、多くの人に受け入れられる生体に優しいマテリアルを作ること極めて大切なことであり、私たちのマテリアルがその一端を担っていることをうれしく思っています。

貴財団にご支援頂きましたこの一年間、生体に優しい新たなポリマーの開発を遂行してきました。核酸の構造をモチーフとしたこのポリマーが、代表的な生分解性ポリマーであるポリエステルに比べ優れた溶解性と分解性を示し、ポリマーおよび分解生成物の細胞毒性は認められなかったことから、極めて安全であることを明らかにできました。本研究で生まれたマテリアルが近い将来、コスメトロジーの分野で重宝されることを確信しておりますし、これからも貴財団を通じ優れた多くのマテリアルが生み出されることを祈念いたします。
(東京医科歯科大学)

コスメトロジーと天然物化学

石橋 正己

薬学部に所属し、有機化学を専攻している者として、コスメトロジーに役立つ低分子の探索というテーマで研究課題を提案したところ、研究助成を賜り心から感謝申し上げます。有機化学でも天然物化学を専門としているので、提案した研究課題は低分子探索の素材を合成化合物でなく天然物に求めている点の特徴であると考えている。スクアレンをはじめとして、これまでもコスメトロジーに対して天然成分は大きく貢献してきている。合成化合物が危険で、天然成分が安全だといった風潮があることは否めないが、そのこと自体は科学的には決して正しくない。しかしながら、天然成分からは人知の及ばない化学構造と作用をもつものが見出されることが期待され、天然成分の探索の重要性は今後も変わることはないと考えられる。

今でも世界の人口の 60% は普通の病気やけがの治療に植物あるいは植物由来の生薬にたよっているという。19

世紀初頭のモルヒネの発見以降、20 世紀の抗生物質の登場など、天然物（天然資源に含まれる化合物）は人々に対してきわめて大きな役割を果たしてきた。当研究室では、天然成分探索の素材として、とくに未利用資源に着目している。本研究課題の報告書では、熱帯薬用植物、海藻、ウミウシの研究を取り上げたが、この他に变形菌というユニークな生物も対象として研究している。元気な学生さんたちと森に入って採集も行う。ただし、研究の遂行のためといっても、人間と地球環境との共存・保全の立場から、貴重な植物・海洋生物等の材料生物を大量採取する方法は可能な限り回避する必要がある。それを補う方法の一つとして、人工培養または栽培による再生産による目的物質の持続的供給の実現を重視することが大切である。また、天然物分析技術の超高効率化をはかり、一連の実験を格段に小スケール化することに努めたい。（千葉大学大学院薬学研究院）

超薄膜とコスメトロジー

安斉 順一

タンパク質や脂質のような生体物質や合成高分子などの材料を利用して、分子レベルで構造の制御された超薄膜を設計製造することを専門としている。これらの薄膜は、厚さにすればナノメートルサイズなので、肉眼にも見えずそれ自身で取り出すことは困難なことがほとんどで、金属やガラスなど種々の固体基板表面に被覆された形で研究対象としている。このような研究の目的を一言で言うならば、固体と液体または気体の接するところ（界面）で何らかの機能を発揮させることにある。すなわち、界面に材料を組織化することにより、均一な溶液中では実現できないような機能を達成したいと思っている。考えられる機能は沢山あり、材料の表面保護などごく初歩的なものから、化学物質の選択的透過や分離機能、固体表面での化学反応（触媒）、溶液や気体中の物質のセンシング、情報変換、など多岐に

わたる。特に、タンパク質などの生体材料を用いた薄膜はそれらの生物機能を膜中で発揮させることができるので、生体膜の機能を模倣するには格好であり、電極などのトランスジューサー表面に被覆された薄膜では信号変換を同時に行える（言うのはやさしいが実現するのはけっこう難しい）。すでに存在する物質や材料の構造や機能を解明するような目指す頂が明確な研究と異なり、はじめの見通しがはずれると全く意味のない（と思われる）珍品を設計してしまうことも希ではない。他人と違う面白い系を設計したいというのが第一の研究動機なので、平均点でまとまるよりはいいとも言える。さて、このような研究の一端であった今回の私の研究結果がコスメトロジーの発展に少しではあっても貢献できたのであろうか？ 答えがイエスであることを願う。（東北大学大学院薬学研究科）

平成 14 年度 研究助成

コスメトロジーと材料科学

上川 直文

コスメトロジーは、人が健康で生き生きと人間らしく生きていくための学問として、自然科学を専門とする研究者にとっても様々な学問領域にまたがる非常に学際的で興味深い研究対象である。たぶん人類がこの地球上に誕生した時から体を美しく彩るための顔料の探索という形でコスメトロジーと材料科学は切っても切れない強い関係を有してきたと考えられる。そして、これからの 21 世紀においてコスメトロジーは性別、年齢の枠を超えこれまで以上に多くの人々の生き方にも影響をおよぼす非常に重要な学問分野へと成長していくと期待される。そしてこれに伴い、材料科学の観点からも人と地球に優しく作りそして使うことの出来る化粧品用材料の開発が重要になっていることを研究を通して実感しているところである。材料を開発する研究者は、ともすると材料自身の機能や製造法にのみ関心が向いてしまい、それを使う人の側に立った視点を忘れてし

まうことが多い。また、薬学やバイオマテリアルの研究分野においては常に病的な状態を有する人を念頭において研究が行われるわけであるが、材料科学にコスメトロジーという視点をより多く取り入れることで普通の人が普通に生きるための材料開発といういままでともすると軽視されがちであった分野に光をあてこれからの社会の発展に寄与しう新しい研究開発分野を創造できると期待しているところである。そして、コスメトロジーと材料科学が共に協調しあうことで、ライフスタイルの創造から新しい文化の創造へとその学問領域を広げ、これからの 21 世紀を我々人間がより人間らしく生きられることを可能にしてくれると期待している。そして、一つの学問分野としてコスメトロジーがこれまで以上に多くの人の関心を集めることを願っている。

(千葉大学工学部)

平成 14 年度 研究助成

コスメトロジーと研究事例

中島 伸佳

「化粧」という言葉から私が連想するものは、「幼きころの故郷・古都奈良の時代祭の武者化粧」、そして「大学生時代に過ぎた我が第 2 の故郷・南国土佐の飲み屋のお姉さんの少し暑苦しい程のファンデーション」と「大学院時代の京都の下町の舞妓さんのきらびやかな風情」というような俗びたものばかりであり、普段、男性用化粧品も殆ど使わない私は、「コスメトロジー」には全く無縁であった。

しかし、今回、私の専門である「応用酵素学」を基礎とした「化粧品素材としての生理機能性物質の安定化と機能改変に関する研究」が「ご縁」となり、コスメトロジー研究振興財団から研究助成を戴く機会を得て、幸いにも私の研究対象に広がりを持たせることができた。

近年、「コスメトロジー」は、単に肌につけるだけの従来の化粧品や香水の領域から、医薬品、食品、そして健康、福祉、あるいは環境の分野までへと大きな広がりを成してきた事は周知の事実である。

ここで、私の近縁の大学でのこの分野の研究事例を取り上げるのは、いささか「手前味噌」になるような気もする

が、私の知人に「浜田博喜博士」という「大学発のバイオベンチャー企業」も手掛ける有名な大学教授がいる。彼は飛び抜けたバイタリティーと学際的な研究連携体制を持って、ご自身の所属大学である岡山理科大学理学部に、今春より「臨床生命科学科」を新設し、その学科長も引き受ける多忙な人物である。

彼は「医食同源」という観点のもとに、しかも、ヒトが手にする食品、化粧品、医薬品の全てを一元的に、かつ有機的に位置付けるという現代社会に先見の発想で、「有用な生理活性成分や医薬品の経皮吸収法の開発」、「新しい免疫療法や制癌剤の開発」、「新規な経口サプリメントの開発」、あるいは「東洋医学やアロマセラピーを念頭に入れた様々な疾患や成人病の予防・治療法の開発」、さらには「未知の有用生理機能性物質の探索と創造」に日夜取り組んでおられる。近く「付加価値のある疾患予防化粧品」なるものも開発されると期待して止まないところである。

(岡山県立大学保健福祉学部)

コスメロジーは未来を映す鏡?

大和田 智彦

私たちの分野では、現実的な問題はあつもののテーラーメイド（もしくはパーソナライズド）医療もしくは医薬の実現が掲げられている。これは個人のもつ遺伝子のわずかな相違（例えば DNA 1 塩基の相違）によって医薬品の効き目や毒性の発揮に違いがあることが知られているため、遺伝子を調べ、理想的にはその個人に合った最適な医薬を提供すべきだという方向である。確かに、薬には副作用があり、薬を飲むと体がかゆくなったり、眠くなったり、場合によっては症状が悪化する場合すらあることを私たちは経験によって知っている。くすりにはリスク（くすりを逆から読むと）を伴うことが多い。そのため処方箋を持って薬局で薬を買う場合、医薬品情報提供と称して薬の飲み方、薬の効果や伴う副作用が私たちに伝えられるようになった。しかし考えてみるとこのようなパーソナライズドな処方（？）や情報提供は化粧品の世界では既に対面販売という形で以前から行われていたのではないであろうか。コスメロジーという言葉には化粧品学という学問的な側面

と（そのため私たちが研究助成金を頂戴する機会を与えていただいているのだが）美容術という技術的な側面の両方の意味があるようだ。同じ〇〇ロジーという言葉でもバイオロジー（生物学）は学問的な側であり、テクノロジーはまさに技術そのものであり、本当の意味でカタカナで書かれたコスメロジーの意図するものは分からないが、この言葉が広い意味を持つことは理解できる。この財団のネーミングには先見性が感じられる。パーソナライズド医療の根拠となるのは個人情報である。情報の蓄積とその科学的な解析により、このような遺伝子をもつ人にはこのような化粧品が適切といったテーラーメイド（パーソナライズド）コスメロジーが出現する可能性もある。また化粧品（特に女性用の基礎化粧品）は概して価格が高い。健康保険制度がさらに後退した際の私たちが薬局で薬代として支払う金額が化粧品なみになることは想像外ではない。コスメロジーと医薬は思った以上に似ているのかもしれない。

（東京大学大学院薬学系研究科）

コスメロジー雑感

的崎 尚

私の所属する研究所の所在地群馬県前橋市は、関東平野の奥まったところに位置し、雄大な自然を眺めつつ研究をおこなっている。こちらに赴任するまでは、ずっと関西に住んでいたため、ことあるごとに関東平野の広さに圧倒され、関西とはまた違った自然の移り変わりを楽しんでいる。上州前橋名物といえば、からっ風も有名で、これにはいまだに慣れることができない。秋も深くなると、新潟県側で雨や雪を降らし、水分をそぎ落とし乾燥した北風が、山脈をこえ吹き下ろしはじめる。私などは、冬場は室内での加湿器が手放せない。

今回、本研究助成をいただいて、改めて皮膚の防御機構の重要性を考え直した。表皮は外界からの異物の侵入を防ぐとともに、体内の水分を保つのに必須である。皮膚が老化したり、損傷したりすれば、美容上のみならず、医療上も多大な問題が起こる。特に顔の部分は、厳しい冬場の環

境でも常に外気にさらされている。化粧品も季節にあわせて色合いばかりではなく、皮膚防御成分の配合も変えられているのであろうか。不勉強にして、実際はどうだか知らないが、こんなことをふと考えたりしている。

上州名物といえばからっ風の他にカカア天下が有名であるが、こちらで一緒に仕事をしている女性陣は皆、勤勉でしっかりしたかたばかりである。女性が働き者であるということが、カカア天下というようにひろめられただけで、これは男性陣のやっかみであろう。冬場は天気も曇りがちで、街の景色も何となく暗い印象があるが、そんな中で華やいだ女性の装いとお化粧が、雰囲気明るくしてくれる。北風にも負けない、皮膚に優しい化粧品が、今後とも街の景色を飾っていくことを期待する。

（群馬大学生体調節研究所）

平成 13 年度 研究助成

皮膚の研究はおもしろい

今 淳

昨年の4月、これまで所属していた弘前大学医学部皮膚科学講座から同・生化学第1講座へと移動し、皮膚の再生、創傷治癒、老化に関する糖鎖医学的研究を開始しました。皮膚科医として様々な皮膚病の患者さんを診察していると、「病気自体は完全に治らないまでも、見た目だけは何とかしてほしい」ということを強く希望される方に多く出会います。この様な訴えを聞く度に、ずうずうしくも私は、自分の力で何か出来ないかと思い上がり、研究の世界にどっぷりと浸かることを決意しました。現在、ひどい爛れ・傷跡が残らない皮膚を再生・修復する研究、加齢や太陽光紫外線の暴露により生じる“皺”など皮膚老化を予防及び治療することを目指した研究を行っています。しかしながら、生命科学研究の進歩は速く、周りも優秀な研究者ばかりで、生き残りには必死な状態です。そのため、当たり前ではありますが、自分独自の発想による研究を行うこと、人の後ろを追いかける研究は決して行わないことを強く心に誓っています。

さて、本助成ではVII型コラーゲンと皮膚の老化との関係を研究しました。VII型コラーゲンの機能として、基底膜と真皮とを結合させ皮膚を強固にする重要な役割を担うことが既に知られていましたので、研究開始当初は、「老化とは関係無いよ！そんな研究やってどうするの！」と言う方もいました。しかし、「石の上にも三年」の気持ちで、そして目の前に助成金もあるわけですから奮闘努力しないわけにはゆきません、その結果、皮膚老化、特に“皺”形成への関わりの方が見えてきました。今後はこの結果を予防や治療に関する研究へと活かし発展させる予定です。

最後に、私の夢物語？に対して研究費を助成下さいましたコスメトロジー研究振興財団に心から感謝するとともに今後の更なる御発展をお祈りいたします。また、私をスタッフとして快く迎えて下さり、私の研究を講座プロジェクトの一つとして立ち上げて下さった生化学第1講座の高垣啓一教授並びにスタッフの皆様にも感謝申し上げます。

(弘前大学医学部)

平成 13 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

高倉 喜信

世紀末から、「21世紀の夢の治療法」と言われ続けてきた遺伝子治療には、今なお大きな期待が寄せられているが、新世紀に入ってしばらく年月が経過した現在でも、まだ夢の続きの状態である。まだまだ、この病気にはこの遺伝子治療をとるわけにはいかない様である。しかしながら、遺伝病や癌やエイズなど、これまでの治療法では不治の病とされてきた病気がこの新しい方法で直るようになるかもしれないとの強い期待に支えられて、基礎研究、臨床研究が続けられている。

私の専門であるくすりの研究とコスメトロジーは「皮膚に塗る」という接点において古くから非常に密接な関係にある。化粧品のターゲットである角質層は塗り薬の適用部位でもあり、くすりの全身作用を望む場合にはバリアーともなる。角質層の下にある表皮細胞もまた同様であり、皮膚にできる癌、メラノーマも重要な標的である。最近では、遺伝子治療や遺伝子をワクチンとして使うDNAワクチン

の研究でも、表皮細胞やメラノーマ細胞が遺伝子を導入する直接のターゲットにされたり、表皮細胞に治療用遺伝子を発現させ、そこで治療用タンパクを作らせ、皮膚局所や全身へのデリバリーを狙う研究も進められている。ますます、コスメトロジーと薬学は近い関係になっていくような感じがする。

もともと遺伝子治療は、不治の病の治療法として開始されたが、最近は動脈硬化症や糖尿病など致死的な病気ではなく極めて患者のQOLを損なう疾病にも展開されている。もちろん、今は治療目的以外の応用、例えば頭を良くしたり運動能力を高めたりする目的には、倫理的観点から望ましくないので禁止されている。しかし、22世紀くらいに遺伝子治療が当たり前の治療法になっていけば、美容のために皮膚に遺伝子を入れることが許され、人々が新しい美白獲得法を手に行っている時代が来るかも知れない。コスメトロジーも大きな変貌をとげているに違いない。

(京都大学大学院薬学研究科)

コスメロジー雑感

小松 賢志

私の故郷の秋田には小町伝説がある。小野小町は県南の湯沢市に近い小野町で生まれたと言われている。これが秋田には美人が多いと言われる所以であろう。しかしながら、小野小町は謎の多い女性で秋田生まれとする根拠は希薄であり、確かなのは彼女が残した数編の和歌だけだそうである。和歌の中では、深草の少将を 100 日間通わせた美人も寄る年波には勝てない例の「花の色はうつろいにけり」が特に有名である。前置きが長くなったが、美しさと加齢は昔からの女性の関心事である。誰もがいつまでも若く願いながらも、年齢とともに皮膚はたるみ、乾燥そして黒ずんでくる。太陽光の紫外線に当たると皮膚は黒ずんでくるが、しばらくすると元の色に戻り可逆的である。これに対して加齢による黒ずみは不可逆的である。紫外線照射の場合にはチミンダイマーのような DNA 損傷がヌクレオチド除去修復によって取り除かれ、これがメラニン色素を誘導する細胞の防御機構の一つと思われている。それでは老化による皮膚の黒ずみも防御機構であろうか。紫外線を遮蔽

すると加齢による皮膚の黒ずみはある程度押さえることが出来るが、非可逆的であることを考えると原因は別のところにあると思われる。メラニン色素誘導系の破綻も考えられるが、生体内で発生したチミンダイマー様の化合物がメラニン色素を誘導する説は魅力的である。染色体末端を構成するテロメアは TTAGGG の繰り返し配列からなり、チミンを多く含む化学構造と細胞分裂ごとにエキソヌクレアーゼにより除去されることからその有力候補である。実際、Eller らは細胞に TTAGGG の繰り返し配列からなるオリゴマーを導入するとメラニン色素の合成が促進されると報告している。本研究では、ナイミーヘン症候群ではテロメア短縮が促進、つまり患者皮膚細胞では正常人よりも多くの TTAGGG オリゴマーが細胞に放出される可能性を示した。今後は患者皮膚が正常人よりも老化による皮膚の黒ずみが促進されているのかどうかの実証が必要であろう。

(京大放射線生物研究センター)

コスメロジー雑感

井上 正樹

平家物語を紐解くまでもなく「盛者必衰の理」があることは誰もが承知している。生命には寿命があり次世代の誕生を持って今日まで種が保存されてきた。生命体の躍動期には各臓器は活発に機能を発揮し、老齢期にはその機能は衰退する。これを如実に示してくれるのが生命体を覆う皮膚である。しかし、この皮膚を構成する個々の細胞にも固有の寿命がある事は認知されてもその分子機構は理解されていない。

個体を構成する正常細胞は個体固有の寿命がある。正常細胞は分裂回数が有限で、この限界状態を細胞の senescence(老化)という。この細胞老化は細胞分裂を重ねることで生じるが、分子レベルでの調節は染色体末端構造のテロメアを短縮することで成り立つ。この分子時計を巻き戻し、細胞の若々しさを維持するにはテロメラーゼを活性化

させ、テロメアの再延長をはかることにより可能となる。古くから女性ホルモンは個体の発生・発育・若年性維持に生理的な役割をなすことが知られていたが、分子レベルでの機能解析は進んでいない。エストロゲンの分子標的としてテロメラーゼ h TERT 遺伝子プロモーターが解析され、分子レベルでの女性ホルモンの生命維持現象の解明をなすことはコスメロジーの本質に迫るものと言える。

将来は皮膚細胞に h TERT 遺伝子導入する事で皮膚の不死化細胞株の樹立が可能となろう。さすれば、各個人が自前の皮膚細胞株を持ち表面を覆うことで化粧品を表面に塗ることで見た目の若さを保つのではなく皮膚を器官としての再生させる事が可能となる日も近いのではと思う。

(金沢大学医学系研究科)

コスメトロジーと老化研究

石神 昭人

最近、元気で肌のきれいな高齢者が増えています。高齢者とは一体、幾つからなのでしょう？「高齢者」の定義として、総務省のホームページには「一般的には 65 歳以上の者をいう」とあります。毎年、9 月の「敬老の日」に総務省から我が国の高齢者人口の統計データが発表されます。今年度（2003 年）の統計データによると我が国の 65 歳以上人口は 2431 万人、総人口の 19.0% を占め、人口、その割合とも過去最高となりました。また、平成 27 年（2015 年）には総人口の 26.0%（3277 万人）と、およそ 4 人に 1 人が 65 歳以上になると見込まれています。

私は、老化研究に携わってから今年でちょうど 20 年目になります。研究開始当初、高齢者人口も少なかったですし、地味な老化研究はほとんど見向きもされませんでした。しかし、急速に発達した高齢化社会に於いて老化研究の重要性は誰も疑う余地がありません。街中で行き交う人を見て、その人の年齢が幾つぐらいかを判断する基準として、始めに挙げられるのが、皮膚の色艶や皺などの皮膚形状ではないでしょうか。この基準は、多少誤差があるかもしれ

ませんが、極端にはずれることはありません。例えば、15 歳の青少年を見て 65 歳以上の高齢者とは思わないでしょう。私は、皮膚の老化研究を通して老化機構の本質に迫れるのではと思い、研究を行ってきました。皮膚老化を抑えられれば、元気で活発な高齢者が増えるのではないかと考えたからです。皮膚老化研究は、予想外に困難を極めました。しかし、皮膚老化研究からは少し外れるかもしれませんが、最近になって、少しずつ灯りが見えてきた気がします。それは、年齢を推察できない程にきれいな肌を持つ高齢者が増えてきたからです。決して効果的な皮膚老化抑制薬が開発されたからではありません。きっと、歳をとってもきれいでありたいという高齢者の気持ちが、化粧品に表れているのではないのでしょうか。

私は、誰もがやがて訪れる「老い」に対して恐れることなく、天寿を全うできるような社会を構築するため、今後も老化研究を継続して行きたいと考えています。

（東京都老人総合研究所 加齢臓器障害研究グループ）

皮膚と免疫

井上 純一郎

「皮膚は体の最も外側にあり、生体防御の第一線である。だから皮膚は、免疫系で重要な役割を果たしている。」というよく免疫の教科書に書いてあることを言いたい訳ではない。私と皮膚研究との出会いを説明したいのである。そもそも大学院を出てヒト T 細胞白血病ウイルスの研究に従事した。このウイルスは Tax というタンパク質を発現することにより宿主の転写因子 NFκB を活性化して宿主細胞（T 細胞）の増殖因子受容体（IL-2R）遺伝子を発現誘導させる。それにより自分自身が組み込まれた細胞の増殖を誘導して生き残ろうとする優れたものである。私はこのウイルス研究を介して NFκB と出会いそれ以降 NFκB と離れていない。NFκB は当初 B 細胞の抗体発現を制御する転写因子として研究が始まり、リンパ球を中心にした獲得免疫において重要な働きをしていると考えられていた。最近になって NFκB は、自然免疫でも必須な転写因子であることがわかり、さらに皮膚の正常な分化に欠くことができないこと

も判明した。皮膚での NFκB の活性化を抑制するような遺伝子的変化があると外胚葉形成不全、表皮細胞の形成異常や色素失調症などが発症することが明らかになってきた。そんな皮膚での NFκB の役割が明らかになりつつあったころ、私の研究室で作成した TRAF6 ノックアウトマウスも TRAF6 が皮膚での NFκB の活性化に関与していたために外胚葉形成不全症であることがわかった。実は「NFκB は免疫に関わる」と一つ覚えであった私は研究室の学生が皮膚や毛の異常を指摘しても「そんなものはストレスだよ！」と言ってしばらくの間取り合わなかったのである。やはり思い込みは新しいものの発見を邪魔するようだ。常に心に余裕を持って広い気持ちであらゆる可能性について公平な目でみることが大切であることをこの時痛感した次第である。前出のヒト T 細胞白血病ウイルスほど優れたものでない私は皮膚との苦い出会いを思い出しながら二度と失敗はしまいと心に念じ、今も学生と話している。（東京大学医科学研究所）

皮膚とリズム

岡村 均

ヒトは死ぬ存在であり、受精により次世代を作り出すことにより、ヒトは存続している。ここでは、老化および死は、ヒトという種を存続させるためにきわめて重要な過程である。皮膚は神秘的な臓器である。特に、乳幼児、青年、壮年、老年とヒトの一生があるとき、「しっとりなめらか」から「かさかさしわしわ」まで皮膚に全てその変貌が現れてくる。言い換えれば、皮膚を見れば年齢がわかるのである。老化の特徴的な皮膚所見の出現は、そのヒトの生物学的な個体としての種の維持から開放されたことを意味することで、それはそれでめでたいことである。

しかし、ヒトは個体としての自由度が高く、発達した「脳」は個体としての完結を求める。言い換えれば、脳にとっては、自分が無くなれば、全て消滅するのである。脳は死を連想させる老化を恐れる。いつまでも活動的であることが自分の力を示すことであるから、若さを求める。視覚が認知の最も主要な感覚受容器であるヒトは、他人の年齢を判断する最も有力な方法は皮膚の観察である。従って、老化の変貌を押しとどめたように見せる「化粧」は、人類のは

るか昔から開発されてきた。化粧は主に対症療法であり、根本的な老化を防止する化粧法が待たれているが、生体リズムはそのヒントになるのではと考えている。

我々の研究する時計遺伝子が、なぜ皮膚で24時間リズムを形成するのか？発汗、皮膚血流、表皮細胞分裂など、さまざまな皮膚組織で起こる現象に概日リズムがある。なぜ皮膚にあるかということであるが、この組織では毎日活動に伴い活性酸素が大量に発現して、その除去が毎日必要だからではないか。したがって、ストレスなどによるリズムの乱れが、時計遺伝子の転写変動の変調を来し、細胞ダメージが増大する可能性は高い。生体リズムの発振機構がわかれば、皮膚のリズムを保つ方策がわかり、皮膚の老化を防止する化粧品の開発が可能かもしれない。これは、対症療法を越えた、根本的な皮膚の若返りにつながるのではないだろうか。この治療が完成されると、ヒトはまた一段と一般の生物から離れるが、それも壮大な夢の一步であろう。

(神戸大学大学院医学系研究科)

コスメロジー雑感

古川 福実

一昨年から、日本美容皮膚科学会の理事を拝命し、しかもその機関誌の編集長を押し付けられている(?)。もともと、美容皮膚科には全く興味もなかった。しかし、この学会を科学的な批判に耐え得るようにしようとの、日本皮膚科学会の強い意向があり、指名を引き受けることとした。学会員も700名を越え、日本皮膚学会の認定学会となり前後実績が与えられ、機関誌の論文も日本皮膚科学会専門医資格の為の論文と認定された。今まで、4回雑誌を発刊しているが、その中で思いついたことを書いてみたい。

21世紀を迎え、美容皮膚科を取り巻く環境は激しく動いている。美容皮膚科に開業医のみならず勤務医も診療に積極的に取り組むようになった。この背景には、皮膚科診療の領域を拡大し経営的な基盤を強化しようという目的のほかに、皮膚に関すること(人々の美しくありたいとの思い)に皮膚科医が目を見てはならないという意識が確立しつつあることがあげられる。

しかし、美容皮膚科の皮膚科学における位置づけを、どのように考えるかは、簡単なようで難しい。患者の目線とか皮膚科学に立脚した視点とか、言葉を羅列するのは比較的容易であるが、それらを語る自らの人生観とか哲学が色濃く反映されないと空虚なものになってしまいます。逆に、色濃く反映されすぎるとドグマになってしまう。

また、当然のことながら、基礎的な研究なくして、美容皮膚科学はあり得ない。基礎的な研究が美容皮膚科という何となくファジーな分野をより科学的に検証していくことにつながる。本財団の研究助成の目的もまさにこの点にあるのではなからうか。個人的には、二度目の助成をいただいた訳であるが、一回目はほとんど貢献できなかったと自負(?)しているが、今回は立派に役目を果たせた。

ちなみに、上記機関誌の名は、日本美容皮膚科学会雑誌 AESTHETIC DERMATOLOGY です。

(和歌山県立医科大学皮膚科)

平成 14 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

柳澤 純

化粧品という「イメージ」で売れるものという先入観があったが、「コスメトロジー」の報告書に目を通すとさまざまな方面から研究がなされていることがわかる。しかしながら、医薬品などと比較すると、分子生物学的には立ち遅れており、顔面を painting するという一種の対症療法が行われている。顔面の painting には“若く見せる”“美しく見せる”といった意味合いだけでなく、“変身願望”やら“宗教上の理由”やら「分化人類学的？」背景があるに違いないので、それには一定の価値があるのであろう。化粧気のない私にはわからないが……。一方、肌を若く見

せる、美しく見せるというのはすべての女性の極めて強い願望なのである。なぜそのような強い願望を持つのかは謎だが、まわりの女性がそう言うのだからそうなのだ。男性もきれいな女性が増えれば毎日が楽しくなるので、それはそれでいいことだ。肌を若く、美しく見せるには、皮膚の老化の研究が必須である。皮膚の老化を遅らせることができれば、40 歳でも 10 歳児の皮膚をもつことが可能だ。80 歳でも 3 歳児の皮膚を持つことも可能になるかもしれないが、これは少々気味が悪いかもしれない。

(筑波大学応用生物化学系)

平成 14 年度 研究助成

コラーゲンの不思議

春日井 昇平

医食同源とは「病気をなおすも食事をするのも、生命を養い健康を保つため、その本質は同じだということ」(広辞苑より)を意味しており、この考えは中国から伝わったといわれています。古来より中国では「臓器の機能が低下した場合は、動物の同じ臓器を食すると良い」と言い伝えられているそうです。例えば、肝機能が低下した場合はレバーを、関節(軟骨)が弱った場合は大変高価ですが軟骨であるフカヒレを食べると効果があるようです。近年健康や美容に対する関心が著しく高まり、様々な栄養補助食品いわゆるサプリメントが登場しています。コラーゲンは皮膚や骨の結合組織の主要なタンパクです。中国の言い伝えを当てはめれば、コラーゲンを摂取することで結合組織の改善効果が期待できるということになります。

コラーゲン摂取は、高血圧や骨粗鬆症の予防、関節症状の軽減、皮膚の保湿性の増加に効果があると言われていま

す。しかし、コラーゲン摂取によるこれらの効果は科学的に十分に検証されていません。そこで、我々はコラーゲン摂取が皮膚や骨の結合組織に及ぼす効果について検討をおこないました。健康な 20 代女性に 1 日 10 g のコラーゲンを 8 週間摂取させたところ、皮膚の保湿性の増加が観察されましたが、骨の密度と骨代謝マーカーは変化しませんでした。また実験動物において、コラーゲン摂取は抜歯後の抜歯窩の治癒や切開創の治癒に影響を与えませんでした。一方、骨粗鬆症の動物実験モデルや低栄養状態で飼育した動物では、コラーゲン摂取によって骨密度が増加したという報告があります。コラーゲン摂取が結合組織にとって良い作用を示すことは確かなようですが、その効果については作用機序を含めて今後さらに検討する必要があると考えています。

(東京医科歯科大学歯学部)

かみ合わせから美と健康を

中村 隆志

私が診療に携わっている大学の歯学部附属病院では、数年前から各診療科がそれぞれモットーを表示することになりました。私の診療科は顎関節・咬合科といい、クラウンやブリッジとよばれる修復物や入れ歯といった一般的な歯科治療だけでなく、あごの関節の痛みや開口障害を訴えて来院される患者さんの治療にあたっています。実際の治療では、正しいかみ合わせをつくるのが重要であり、当科のモットーも「かみ合わせから美と健康を」となりました。このフレーズが意味するとおり、我々がかみ合わせをなおすことによって患者さんの美しさと健康を回復しようと日々診療に励んでいます。

歯科医の仕事を通して、人間の顔や表情、心理などを見つめていくと実に興味深いことが多数あります。スマイルは、顔の中でも目と口の周辺が関与しており、中でも口の部分の比重は特に大きいものと思われます。日本人は西洋人と比べ笑うのが下手といわれています。このようなスマイルの後進性を認識したとき、歯科医療の目的である、ものをかむ機能の回復や、痛みをなくす治療以外に審美歯科

(歯科治療への美学の適用) という視点からスマイルづくりに貢献できないだろうかと考え研究を行いました。

今回の研究において痛感したのは、カメラの前ではみんな本当に笑えないということでした。表情において歯と口もとは大きな役割を果たし、第一印象を左右しています。乏しい表情、あいまいな返事や笑いに代表される日本人の自己表現の下手さが、国際的にしばしば誤解を生んでいます。自分を主張し、賛否をはっきりさせることが当たり前の欧米では、スマイルは絶対に必要です。笑顔の良い人が成功し、よき友人を得て、人生を豊かにすることができるでしょう。

『機能美』という言葉がありますが、機能的に優れたものは美しさをもっています。治療した歯の多くで機能美が見られないのは、歯科医が『医療』という目的を未だ見極められていないためではないかもしれません。今回このコスメトロジー助成金での研究で得られた経験を活かし、日本人のスマイルづくり、しいては歯科医療の向上に貢献していきたいと思います。(大阪大学大学院歯学研究科)

アトピーを活かす

富家 直明

私は教員養成系学部の教員をしている。そこで出会ったある女子学生のアトピーがひどかった。年頃の女性としてはいたく心を傷つけられたことだろう。この学生はたいへんアグレッシブな性格であった。ツンケンしていてズケズケ言うので、友だちが少しずつ去っていき、最後はほとんど1人ぼっちになった。彼女のアトピー対策はアレルギー除去固執型で、これはもっともストレスがたまる割には症状改善に成果のみられないタイプである。

ある時、彼女が教員採用試験を受験すると言い出した。しかし私は落ちるだろうと言った。給食指導ができないからだ。そうしたらそれは病者への差別である、訴える、と言う。私は彼女の他罰的な考えを否定して、新しい考え方を提案した。「自分はアレルギーがひどくてほとんどの食事が食べられない。給食も食べられないことが多い。しかしその苦勞を通じて、子ども達にアレルギーとは何か、食事の大切さとは何か、食事の楽しみ方とは何かを教えていきたい」という風に考えて欲しいのだ、と。

楽しくないことであっても、自分の思いのままになっていると考えるか、運命や他人に操作されていると考えるかによって気分は異なる。これをローカスオブコントロール(統制の位置)という。アレルギー除去固執型というのは、アトピーの原因をアレルギーに求めている考え方である。もちろんそれは一理あるが、人体はそれほど直球型の反応をするものではない。生活習慣全般が複雑に作用して症状が生じる。柔軟に考えた方がよいのだ。アレルギー除去固執も、病者差別で訴えるという考え方もどちらも他人のせいである。これでは楽しくない。自分の人生は自分で操縦していった方が楽しい。

アトピー患者への心理的ケアは上記の考えにそって計画された。このようにして緩和されたストレスは間接的に病状を和らげる。その後、くだんの彼女はつかえ棒がとれた樹木のようにすくすく成長し、この4月から教壇に立っている。(宮崎大学教育文化学部)

平成 13 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

行場 次朗

成長期において男性の顔は子供の顔から大きく変形するのに比べると、女性の顔はわずかしき変化しないことが知られている。今回助成を受けた研究でも、SD 法によって得られた心理印象空間に男性、女性、男児、女児の平均顔をプロットしてみると、男性だけが大きく逸脱した位置にあり、あとの3者間の距離は小さかった。やはり顔の印象を取り上げてみても女性が元型であることが実感できたように思う。最近、男性の顔でも適度に女性化したほうが魅力的であることが報告されているが、これも大きく見れば

元型への回帰傾向と受け取られなくもない。また、画像的に子供化された顔に魅力を感じることがあるが、今回、実験計量心理学的に分析を行うと、それは子供の印象に依拠するものではなく、むしろ女性顔が潜在的にもつ「美感性」や「柔和性」に代表される特性を強めた印象に基づくものであることが明らかにされた。これは元型を増強する方向に対応していると考えることができよう。そうすると化粧も基本的には、女性的元型を志向する行為とみなすことができるのだろうか。（東北大学大学院文学研究科）

平成 13 年度 研究助成

Facial Display ディスプレーとしての顔

johnathon john (ジョナソン・ジョン)

このプロジェクトまでほとんどの顔の研究は社会・文化的な要素に集中していましたが、この事を通じて、いろいろな新しい事を試みて、または化粧に初めて集中してみたいへん面白くて楽しかったです。しかし回顧してみると方法と結果にあまり満足していませんがこれからの顔研究のテーマの準備としては大いに役に立ちました。これから

このプロジェクトと関係がある「変身の伝統・伝統の変身」という事を調査する予定で、今年の日本顔学会フォーラムで発表するつもりです。研究の内容以外にはこのプロジェクトを通じて日本の社会に更に深く入り込むことが出来ましたので非常にいい事でした。このプロジェクトをする機会を頂いたことに感謝します。（千歳科学技術大学）

外国人研究者招聘助成による国際交流

菊地和也

この度はコスメトロジー研究振興財団の助成金をいただきまして大変有り難うございました。おかげさまで国際交流を行うことができ研究推進にあたって有用な情報を得ることができました。

今回、ロックフェラー大学の Tom W. Muir 教授を招聘し、第一回生命化学国際シンポジウム (ISBC2003) における招待講演と私が所属する東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室における講演及び研究討論を行う機会が得られました。日本の大学の研究レベルは相当高くなってきたため、国際交流自身は今では昔ほどの有り難みがないのではと言う人もいますし、実際にこの様な助成金は減っているそうです。しかし、研究を行う上での大切な要素に人的交流が挙げられます。これは時代がどのように変化しようとも、特に欧米から距離的に離れた日本で研究する私たちにとっては大切にすべき要因です。確かに、コンピューターの発達と日本の研究レベルの向上により国際的な垣根は以前より小さくはなっています。しかし、国際交流は研究の向上のため是非とも必要です。今回の国際交流で得ら

れたことを報告いたします。まず、私どもの研究室にとっては Muir 教授の講演を聴くこととで、自分たちが直接活用することができる技術につきまして論文には書いてない実験レベルでの議論ができました。この結果、時間の節約とともに具体的な応用案に気がつくことができました。この議論は私ども研究室のスタッフだけでなく大学院生とも一緒に行われます。私どもが大学院生の教育上教えられない限界に研究を進める臨場感があります。外国の有名な研究者を身近に感じることで自分達が研究の進行に寄与しているという実感がわいたのではと思いました。次に、ISBC2003 について簡単に紹介いたします。この学会は日本化学会の生命化学研究会が主催する初めての国際会議でした。この会は私ども若手研究者が自分達の手で開いた会で 300 名近くの参加者があり大盛況になりました。この会の中でも Muir 教授の講演は大変着目されるものでした。

今回の交流のおかげで今後の共同研究や議論が大変行いやすくなりました。この様な機会をいただきまして本当に有り難うございました。(東京大学大学院薬学系研究科)

付 録

●
事業報告書（平成15年度）

役 員
●

事業報告書

(自平成 15 年 4 月 1 日 至平成 16 年 3 月 31 日)

《研究助成等の選考関連》

2003	5	6	公募開始	全国 277 ヶ所の大学・病院・研究機関等に揭示案内、関係学術雑誌 8 誌及び当財団 HP 他 3 HP に掲載
	7	4	公募締切り	応募数 84 件
	8	28	選考委員会 (分科会 1)	素材、物性に関する分野の選考
	9	1	選考委員会 (分科会 3)	精神、文化に関する分野の選考
	9	9	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 20 課題、国際交流援助 1 課題を選考
	11	19	表彰贈呈式	記念講演：「色白美人はなぜ永遠か」 駒沢女子大学文学部人間関係学専任講師 資生堂生活者情報研究部客員研究員 石田 かおり氏
	11	19	～ 助成課題の公表	関係学術雑誌 7 誌、当財団 HP に掲載
2004	2	中旬	持ち回り企画委員会	平成 16 年度の研究助成課題選考に関して

《理事会関連》

2003	6	19	常理事会	平成 14 年度事業報告及び収支決算報告、株主としての議決権行使について、報告事項
	11	19	常理事会	平成 15 年度 (第 14 回) 研究助成者等の承認、平成 16 年度事業計画及び予算案の承認

《評議員会関連》

2003	6	19	常評議員会	平成 14 年度事業報告及び収支決算報告、報告事項
	11	19	常評議員会	平成 15 年度 (第 14 回) 研究助成者等の承認、平成 16 年度事業計画及び予算案の承認

《その他》

2002	3	末	財団活動の情報更新	当財団 HP へ平成 15 年度事業計画を掲載
	6	末		当財団 HP へ平成 14 年度事業報告を掲載
	12		コスメトロジー研究報告	「コスメトロジー研究報告」11 号の概要を当財団 HP に掲載

第 14 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-03-01	化粧品としてのヒアルロン酸およびその誘導体の物性と生理的安全性に関する研究	分析化学	千葉大学大学院薬学研究部教授 戸井田 敏彦
J-03-02	半導体ナノ粒子の紫外光吸収による活性酸素生成とその抑制に関する研究	無機材料化学	東北大学多元物質科学研究所教授 佐藤 次雄
J-03-03	ダイエット効果を有する脂質が皮膚の状態に及ぼす影響	動物栄養学	九州大学大学院農学研究部教授 古瀬 充宏
J-03-04	性ホルモンと性ホルモン結合蛋白による皮膚メラニン産生の検討	色素細胞	大阪大学医学部皮膚科学教室講師 田所 丈嗣
J-03-05	統合失調症における化粧顔の認知に関する研究	精神医学	大阪大学大学院医学系研究科 精神医学教室助手 岩瀬 真生
J-03-06	ヒト皮膚における血管新生刺激サイトカインの発現とその作用機序に関する包括的研究	皮膚科学	聖マリアンナ医科大学皮膚科 助教授 相馬 良直
J-03-07	タイ産マンゴスチン果実抽出物の多機能性化粧品への応用研究	天然物薬理	東北大学大学院薬学研究科教授 大泉 康
J-03-08	生体適合性アパタイト粒子の結晶形態制御プロセスの確立とその応用	無機材料合成 生体材料	明治大学理工学部工業化学科 助教授 相澤 守
J-03-09	メラニン産生の制御機序の解析を介して新しい美白剤を開発するための研究	分子生物学 皮膚科学 環境医学	金沢大学大学院医学系研究科 助教授 加藤 昌志
J-03-10	機能性香料の開発：匂い物質による月経前緊張症(PMS)の治療	神経内分泌学	長崎大学医歯薬学総合研究科医療科学専攻病態解析・制御学講座教授 篠原 一之
J-03-11	SOD1欠損マウスを用いた皮膚炎の発症とセラチノサイト増殖における活性酸素の役割の解明	生化学 分子生物学	山形大学医学部教授 藤井 順逸
J-03-12	XVII型コラーゲン異常に起因する表皮真皮結合破綻の分子機構	遺伝性皮膚疾患	北海道大学大学院医学研究科 皮膚科学分野教授 澤村 大輔
J-03-13	熱応答性インテリジェント高分子の皮膚ゲル化機能を付与した新規化粧品素材の開発	臨床薬剤学	北海道医療大学薬学部教授 宮崎 正三
J-03-14	哺乳動物におけるフェロモンの受容機構と生理作用の解析	感覚生理学	北海道大学大学院薬学研究科 助教授 柏柳 誠
J-03-15	太陽紫外線による皮膚タンパク質の損傷と老化	生命科学	京都大学原子炉実験所教授 藤井 紀子

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J-03-16	近赤外分光法による毛髪中の自由水、結合水の非破壊構造解析	化学	関西学院大学理工学部教授 尾崎 幸洋
J-03-17	動的特性が表情認知に与える影響 —皮溝（シワ）の分析—	認知心理学	立教大学文学部教授 長田 佳久
J-03-18	超臨界二酸化炭素を用いたナノポーラスシリコンゲルの合成とその構造特性	高分子合成 構造解析	京都大学化学研究所構造解析基礎研究部文部科学教官助手 妹尾 政宣
J-03-19	疾患をカバーするための化粧の有効性と自己意識に与える影響—顔に疾患を抱える女性たちへのインタビュー調査から—	社会学	お茶の水女子大学大学院人間文化研究科大学院生 西倉 実季
J-03-20	骨髄細胞を用いた皮膚の構築	細胞生物学	岡山大学大学院医歯学総合研究科教授 許 南浩
H-03-01	新規のタンパク質改変法の開発による、タンパク質機能の解明研究	バイオ有機化学	ロックフェラー大学 合成タンパク化学科教授 Tom W. Muir 受入責任者 東京大学大学院薬学系研究科助教授 菊地 和也

(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16年3月31日現在

理事長	小林禮次郎	(株)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	早稲田大学名誉教授
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(株)代表取締役会長
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	元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)日本製薬団体連合会理事長 (元厚生省大臣官房審議官)
評議員	長野 哲雄	東京大学大学院薬学系研究科教授
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)コーセー顧問
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	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.12/2004

非売品

2004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