

## ごあいさつ

16年前に当財団を設立して、今回で14冊目の研究報告書をお届けできるようになりました。平成15～16年度に研究助成をした方のうち19名の研究成果を掲載いたしました。化粧品は原料や素材に関するものから、生命科学、精神医学など様々な分野にわたっております。これはコスメトロジー（化粧品学）が学際的な性格を持つことによるものですが、私は毎年応募されてくる研究テーマに興味深く観察させていただいています。

まだこの財団が設立されて数年しかたっていない頃ですが、日本で化粧品分野の国際会議が行われたことがあります。その国際会議で、私は基調講演を行ったのですが、「4つのM」という話をさせていただきました。4つのMは当時の日本経済を説明するために、牧野昇さんが使われた言葉ですが、私はそれを借用して将来の化粧品産業の方向性を語ったのです。メディアのM、メディカルM、モビリティのM、メンタルのMです。

13年後の今日、この4つのMはことごとく今の化粧品の状況に当てはまっているので自分でも驚いています。メディアはいうまでもなくハイビジョンの普及でとすると毛穴まで見えてしまうので、メイクアップの役割がますます重要になってきています。メディカルは高効果高効能化粧品の普及や新原料の開発競争など、モビリティは旅行用や携帯型化粧品の登場など。24時間営業しているコンビニエンスストアでの化粧品の売上増もこの影響を受けているかもしれません。そして、メンタルはライフスタイルの変化による影響や心理学との係わり合いなどですが、これらの要素はここ数年の研究報告を拝見させていただいても如実に感じます。

今後、ライフサイエンスに関する研究では産学協同がますます盛んになるでしょうし、科学技術に関する情報のデータベース化なども急速に進むと思われます。今後とも当財団は、このようなコスメトロジーやライフサイエンスの進化に深くかかわってまいりたいと考えております。

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18年7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

- ・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 ..... 2  
千葉大学大学院薬学研究院 戸井田 敏彦
- ・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制御に関する研究 ..... 9  
東北大学多元物質科学研究所 佐藤 次雄
- ・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 ..... 16  
明治大学理工学部応用化学科 相澤 守
- ・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 ..... 22  
北海道医療大学薬学部 宮崎 正三
- ・超臨界二酸化炭素を用いたナノポーラスシリコーンゲルの合成とその構造特性 ..... 27  
京都大学化学研究所 妹尾 政宣
- ・連結基を持たない新規ビスアンモニウム塩型 Gemini 界面活性剤の合成と物性 ..... 32  
京都工芸繊維大学工学部物質工学科 老田 達生
- ・新たな生理機能を付加させることを目的とした新規化粧品素材の酵素的分子創製 ..... 42  
岡山理科大学理学部臨床生命科学科 石原 浩二
- ・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 ..... 45  
中部大学生命健康科学部生命医科学科 加藤 昌志

#### II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・共役リノール酸単独または他の脂肪酸との混合投与による皮膚特性の修飾 ..... 52  
九州大学大学院農学研究院 古瀬 充宏
- ・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 ..... 58  
独立行政法人国立病院機構大阪医療センター皮膚科・形成外科 田所 丈嗣
- ・SOD1 ノックアウトマウスに発症する皮膚炎への活性酸素の関与の解明 ..... 63  
山形大学大学院医学系研究科 藤井 順逸
- ・哺乳動物における蛋白性フェロモンの引き起こす血中性ホルモン濃度の増加 ..... 68  
旭川医科大学生理学講座 柏柳 誠
- ・骨髄細胞を用いた皮膚の構築 ..... 73  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 許 南浩
- ・メラノソーム輸送に必須の因子Slac2-aの分解メカニズムの解明とメラノソーム輸送制御への応用 ..... 78  
独立行政法人理化学研究所 福田 光則

## 目 次

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| ・新しい皮膚成分の分析手法としてのコレステロールセンサの開発 .....  | 83 |
| 大阪府立大学先端科学イノベーションセンター 椎 木 弘           |    |
| ・大豆ビクニンを用いた日焼け止めクリームの開発 .....         | 88 |
| 奈良県立医科大学産婦人科 小 林 浩                    |    |
| ・タイ産マンゴスティーナ果実抽出物の多機能性化粧品への応用研究 ..... | 92 |
| 東北大学大学院薬学研究科 大 泉 康                    |    |

### Ⅲ. 精神、文化に関する分野

|                                     |     |
|-------------------------------------|-----|
| ・統合失調症における化粧顔の認知に関する研究 .....        | 100 |
| 大阪大学大学院医学系研究科 岩 瀬 真 生               |     |
| ・機能性香料の開発:匂いによる月経前緊張症(PMS)の治療 ..... | 106 |
| 長崎大学医歯薬学総合研究科 篠 原 一 之               |     |

### ■記念講演

|                                         |     |
|-----------------------------------------|-----|
| 平成 17 年度記念講演 『これからの MAKE(化粧)…男の顔』 ..... | 115 |
| 美粧師 岡 野 宏                               |     |

|                    |     |
|--------------------|-----|
| ■コスメトロジー研究雑感 ..... | 125 |
|--------------------|-----|

### ■付 録

|                    |     |
|--------------------|-----|
| 平成 17 年度事業報告 ..... | 137 |
| 役員一覧 .....         | 140 |

# 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**

# 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

千葉大学大学院薬学研究院

戸 井 田 敏 彦

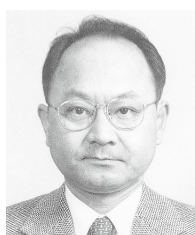
Hyaluronan (HA) is a non-sulfated glycosaminoglycan (GAG) that plays an important biological and physiological role in normal and pathogenic states. The physiological function of HA is highly dependent on its molecular weight (MW). As a normal constituent of the extracellular matrix (ECM), and in its native form, HA exists as a high MW polysaccharide, typically in excess of 106 Da, where it is associated with the structural fluid dynamic, homeostasis and maintenance of tissue connective tissue integrity. In biological fluids such as blood or lymph, or at sites of inflammation or disease, the molecular weight of HA is often significantly lower. Both intermediate (200–500 kDa) and smaller MW HA (<20 kDa) are involved in cellular processes, in particular as signaling molecules for angiogenesis, induction of inflammatory gene expression, wound repair, cell proliferation and migration. These processes are important in inflammation and tumor invasion. On the other hand, hyaluronan is very popular as one of cosmetic materials based on its physiological and physical property, however, the physical and chemical stability of hyaluronan which is used as cosmetics and/or functional food is still unclear. The objective of this work is: 1) to obtain the knowledge of the physical stability of hyaluronan under several pH conditions by using polyacrylamide electrophoresis (PAGE), capillary electrophoresis (CE) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy; 2) to investigate its physiological safety by orally administration to rats. We have found that the chemical stability of HA and the oral availability of hyaluronan by the grant. Interestingly, orally administered HA is existing as a complex with plasma proteins in blood circulation. The metabolic fate and function of the orally administered HA will be investigated in detail in the near future.

## 1. 緒言

グリコサミノグリカン (GAG) はヘキシサミン (D-グルコサミン (GlcN), D-ガラクトサミン (GalN)) とウロン酸 (D-グルクロン酸 (GlcA), L-イズロン酸) または D-ガラクトースとの二糖の繰り返し構造からなる、分子量数千から数万の枝分かれのない直鎖の酸性多糖類である<sup>1)</sup>。GAG はその構成糖の種類や硫酸化修飾の部位、程度により、コンドロイチン硫酸 (CS)、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸 (HS)、ヘパリン (HP)、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸 (HA) に分類される<sup>2)</sup>。HA を除く GAG はコアタンパク質に結合したプロテオグリカン (PG) として生合成され、生体内に広く存在し、組織中の水分保持、イオン代謝を担っている。また、細胞外では細胞接着に関わるタンパク質とともに細胞外マトリックスと呼ばれる複合体を形成し、中枢神経系組織の発達および維持に関わり、細胞表面や細胞内では、各種細胞増殖因子と相互作用して、構造維持、細胞接着、細胞運動性、発生、血液凝固など、多くの生命現象に関わると考えられている<sup>3-5)</sup>。そのため

GAG を用いた新しい医薬品の創製、および化粧品も含めた生体工学への応用が期待されている。

HA はウシの眼球の硝子体成分として 1934 年 Karl Meyer 博士により発見され<sup>6)</sup>、皮膚、軟骨、腱、筋肉、血管、脳など広範囲に存在している<sup>7)</sup>。その構造は GlcA と N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) が  $\beta$ -1, 3 結合した二糖の繰り返し構造を有し、硫酸基を含まず、タンパク質に結合していない遊離の多糖として、細胞膜で合成されるという点で他の GAG とは一線を画す。HA はきわめて単純な構造であるにも関わらず、さまざまな HA 結合タンパク質や PG との相互作用を有することで免疫細胞の接着や細胞内シグナル伝達活性化など幅広い生物活性を示す<sup>8-10)</sup>。生体に存在する HA は分子量が 60 万～100 万と極めて大きく、高度に水和された分子として存在する。HA が溶液中で大量の水と水和する現象は、関節における潤滑剤やショック吸収剤として働くのに役立つ極めて特徴的な物理的性質である<sup>11)</sup>。さらに HA はコラーゲン、フィブロネクチン、プロテオグリカンとともに細胞外マトリックスを構築するほか、特異的な受容体 CD44 を介して細胞の移動などを制御していることが知られている<sup>12)</sup>。また臨床面において HA は眼科手術補助剤や変形性関節症の治療薬として有用性が認められている<sup>13,14)</sup>。最近では、腫瘍細胞の増殖や炎症反応への関与が認められており<sup>15)</sup>、医療現場での実用化への期待が高まっている。さらに近年、化粧品や洗髪剤にヒアルロン酸を含む製品が市販されている他、食用ヒアルロン酸の作用も注目されている。しかし、HA の



Study on physical property and physiological safety of hyaluronan and its derivatives as cosmetic materials

Toshihiko Toida

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

体内動態, すなわち腸管吸収の可能性および代謝経路などは未だ不明な点が多く, 実際に経口投与した HA の薬理効果は定かでない。

現在, 米国 NIH (国立健康研究所) によって, グルコサミンおよびコンドイチン硫酸の経口投与と関節炎治療に関する大規模な臨床試験が実施されており近々吸収, 効果に関して明確な結論が出されるものとして期待されている<sup>16)</sup>。さらに, 生体内における GAG の生理活性とその機能が注目されており, 特に食用ヒアルロン酸などが健康食品として広く普及していることから, 経口投与した GAG の吸収に関する解明が必要であると考えられる。また, これまで GAG の体内動態を調べるため, GAG 分析を目的とした前処理法も検討されてきた。従来法である CPC 沈殿法は煩雑な操作に熟練を要し, 長時間を必要とする難点があった。

そこで本研究では, さまざまな条件下で一定期間 HA を保存し, その安定性を明らかにするとともに, 当研究室で新たに確立された限外濾過膜を用いた前処理法を用いて HA の体内動態を明らかにすることを目的とし, ヒアルロン酸を経口投与したラットの血清中 HA の定量を行った。

## 2. 実験

### 2-1 試料および試薬

#### ① HA 標準品

HA (*Streptococcus zooepidemicus* 由来) は, 平均分子量 20,000 および 80,000 の試料を紀文フードケミファ株式会社から購入した。

#### ②その他の試薬

試薬はすべて市販の特級品を使用した。水はミリポア超純粋装置により得られた精製水を用いた。

#### ③実験動物

メスの 7 週令 Balb/c マウスを購入し, 1 週間予備飼育して実験に用いた。

### 2-2 装置および測定条件

#### ①核磁気共鳴 (NMR) 装置

NMR 装置は JEOL JNM-ECP600 を使用した。<sup>1</sup>H-NMR の化学シフト値は, トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウムのピーク ( $\delta$ , 0 ppm) を基準として示した。

#### ②キャピラリー電気泳動 (CE)

キャピラリー電気泳動装置は Beckman 製 P/ACE 5010 (UV detector 装備) を使用した。キャピラリーはジェールサイエンス社製ヒューズドシリカカラム (75 mm i.d., 375 mm o.d.) を用いた。システムコントロールには Compaq 社製コンピュータ, プログラムは Beckman P/ACE Station ver.1.0 を用いた。

#### ③ HA の HPLC 分析

血液中の HA の定量には, ヒアルロニダーゼにより分解して生成する不飽和二糖 ( $\Delta$ Di-HA) をカーボンカラムを装着したポストカラム HPLC で分離定量した。血液試料の前処理は分子量分画用限外ろ過膜を装着した遠心チューブを用いて行った。

## 3. 結果

### 3-1 酸・塩基性条件下での HA の安定性

Table 1 に示す条件に従って HA を保存し, 保存 1 週間後, 2 週間後, 4 週間後, 8 週間後, 12 週間後に回収し, 凍結乾燥を行った。HA の保存濃度は 1000 ppm とした。

以下の図中では, Condition (保存条件) を C, 保存週を W と略し, Condition 1 で 1 週間保存したものを 1WC1 などと記載する。

### 3-2 <sup>1</sup>H-NMR による構造解析

各条件下にて一定期間保存した場合の HA のコンフォメーション変化を観察するため, 標準品の NMR スペクトルを Fig. 1 に, 保存 1 週目の Condition 1 ~ 6 の NMR スペクトルを Fig. 2 に示す。保存温度によるスペクトルの変化は認められなかったが, 酸性条件である Condition 3 および 6 では標準品のスペクトルと比較し, 大きな変化が認められた。

また, Condition 3 におけるスペクトルの経時的変化を Fig. 3 に示す。保存 1 週目以降にスペクトルの変化が認められないことが確認できる。

また, Condition 3 においてみられたスペクトルの変化が, より緩和な酸性条件でも認められるかどうかを確認するため, Condition 7, 8 にて保存 1 週目の <sup>1</sup>H-NMR を測定した。その結果を Fig. 4 に示す。

### 3-3 キャピラリー電気泳動 (CE) による分子量測定

HA を各条件下にて一定期間保存した場合の分子量分布の変化を観察するため, CE によって分析を行った。分離は Normal polarity, 検出は UV200nm にて行った。Fig. 5 に標準品, Fig. 6 に保存 1 週目の Condition 1 ~ 6, Fig. 7 に NMR スペクトルに変化が認められた Condition 3 の CE 分析結果を, それぞれの NMR スペクトルと対比させて示す。CE 分析結果は再現性を考慮し n=3 で行った。標準品と比較すると, いずれのピークも分子量分布が広がっているものの, 保存条件による変化は明確には観察されなかった。

### 3-4 ゲル電気泳動による分子量測定

分子量分布の変化をより詳細に検討するため, ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。ゲル濃度は

Table1 Conditions of HA preservation.

| pH | 11          | 7           | 3           | 5           |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| RT | Condition 1 | Condition 2 | Condition 3 | Condition 7 |
| 4℃ | Condition 4 | Condition 5 | Condition 6 | Condition 8 |

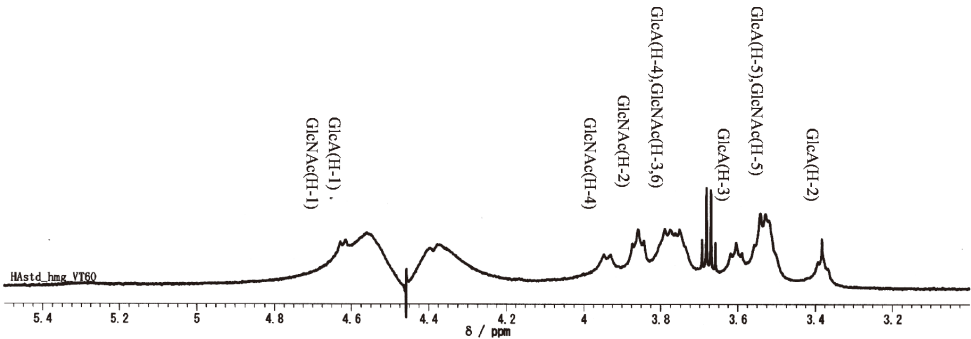


Fig.1 NMR spectrum of an HA standard.

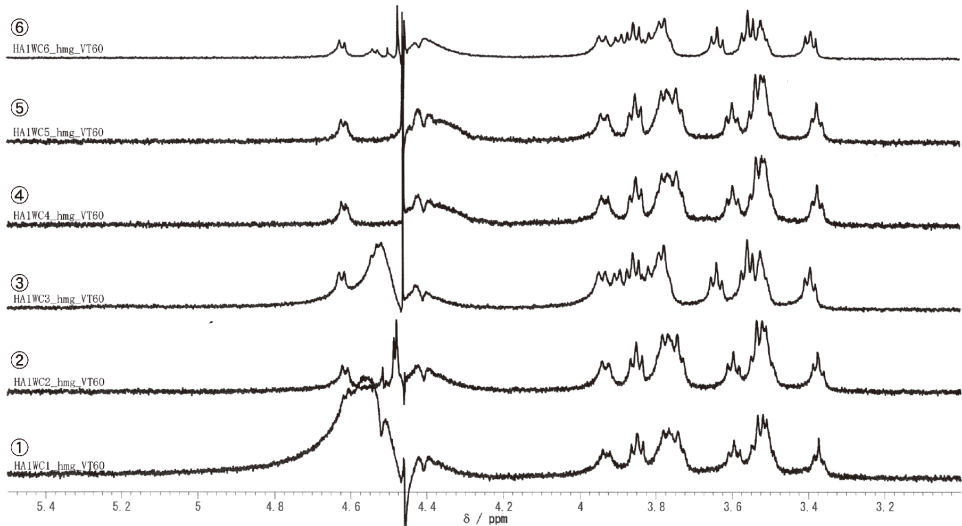


Fig.2 NMR spectra of HA in each condition.

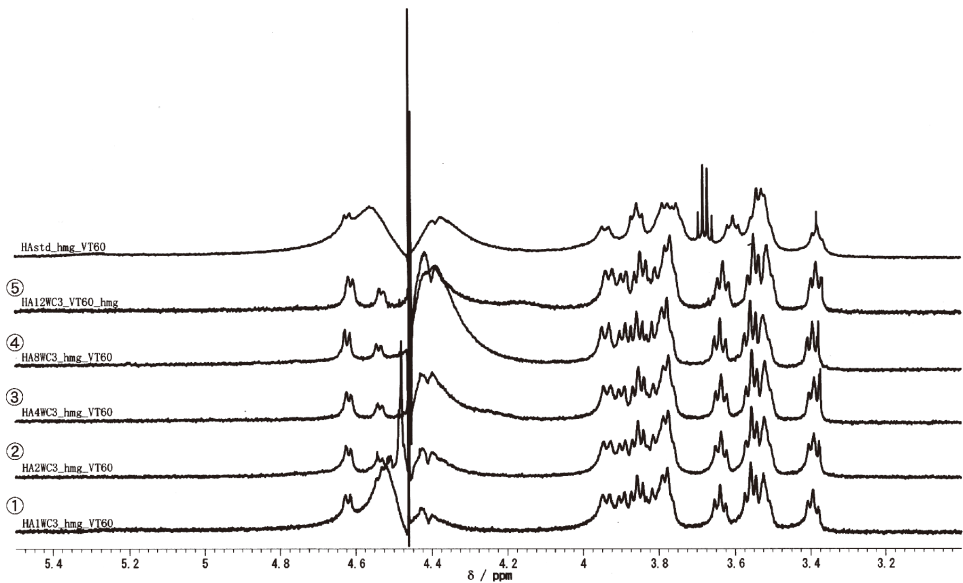


Fig.3 NMR spectra of HA in condition 3.

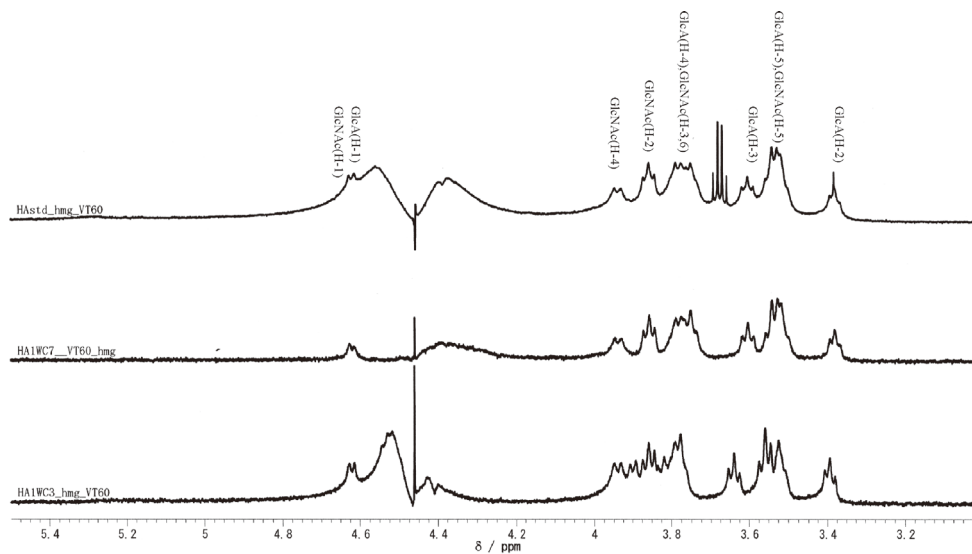


Fig.4 NMR spectra of HA.

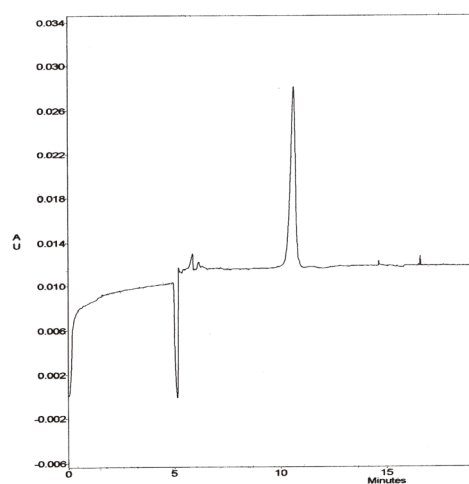


Fig.5 Capillary electropherogram of an HA standard.

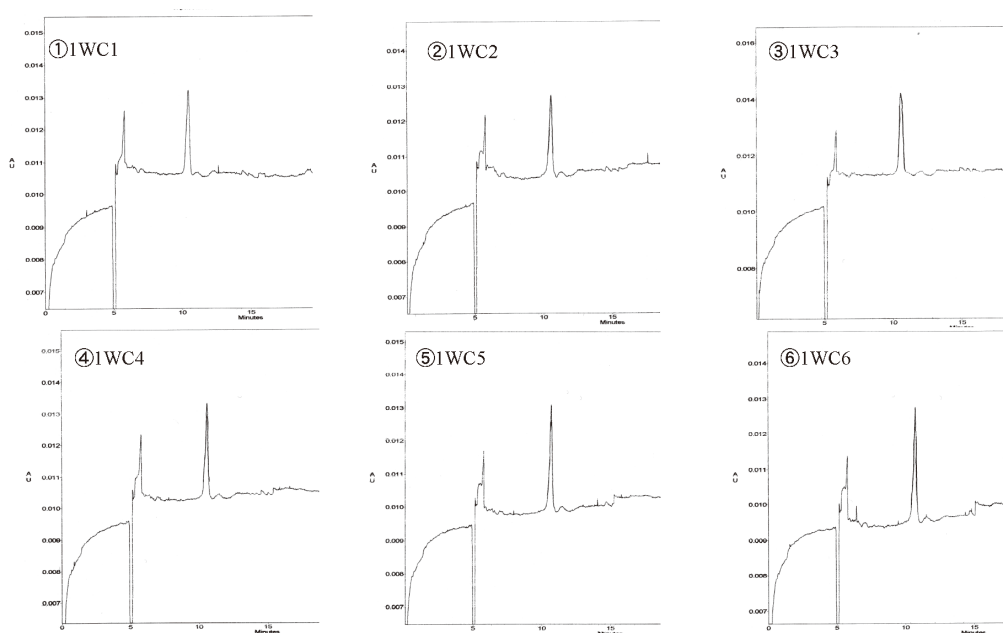


Fig.6 Capillary electropherogram of HA in each condition.

12.5%ゲルを用い, 0.005% Stains-all in 50% EtOH で染色した結果を Fig. 8 に示す. 中性で保存したものは標準品と同様の分子量分布を示したが, アルカリ性, 中性, 酸性の保存条件の違いにより, 分子量分布は変化することが確認された.

また, アルカリ性および酸性条件にて保存した HA は濃縮ゾーンを通過しにくいという特徴が見られたため, 試料の pH 調整を行い, すべて中性条件で電気泳動を行ったが, 変化は認められなかった.

### 3-5 経口投与した HA の血液中存在状態

HA の経口吸収の有無を明らかにするため, 雄性 ddY マウス 6 週齢に対して HA 250 mg/kg (body weight) を単回経口投与し, 5, 15, 30, 60, 120, 240 分後に大静脈より採血を行った. HA は本来血漿中に僅かしか存在していないことが知られている. そこで, HA 投与前後で血中 HA 濃度の挙動を分析することによって血中への吸収を観察した. 消化管吸収の際の消化管膜通過を考慮し, 比較的低分子量の 20kDa の HA を用いて投与実験を行った. 採取

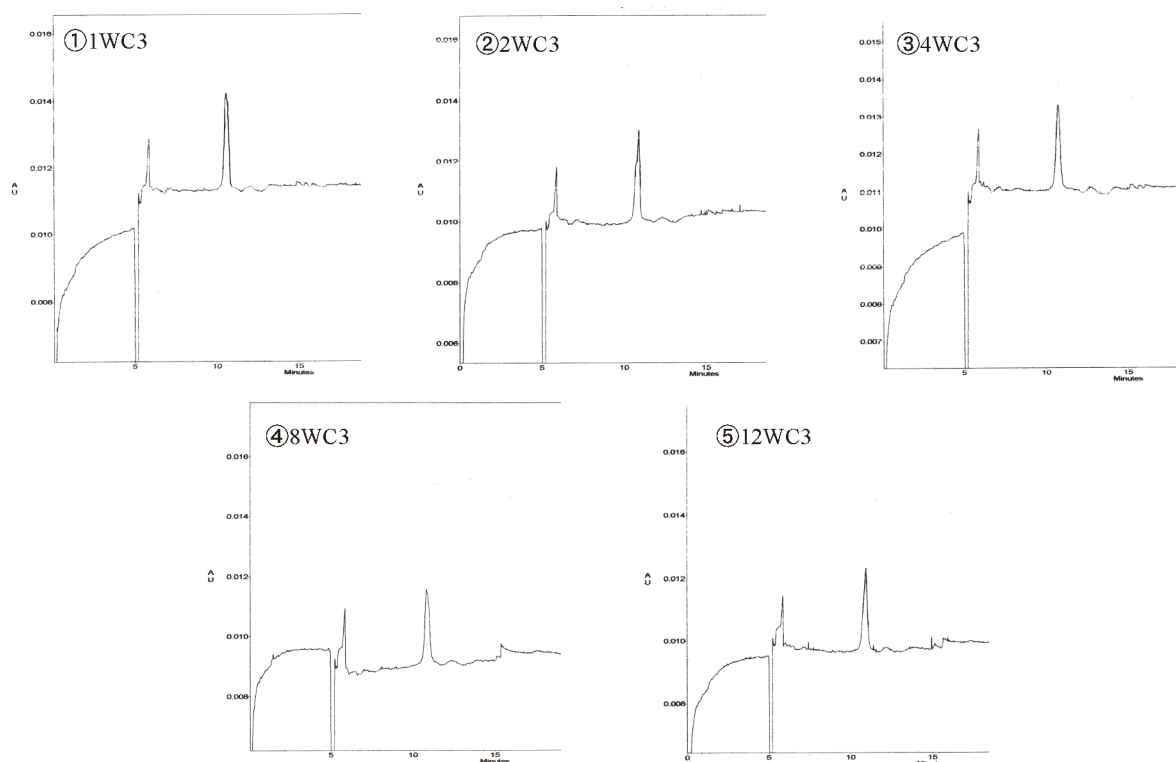


Fig.7 Capillary electropherogram of HA in condition 3.



Electric current; 30 mA,  
Polyacrylamide gel concentration; 12.5%,  
Load volume; ①5  $\mu$ g, ②-⑨10  $\mu$ g,  
Staining; 0.005% stains-all in 50% EtOH.

- |          |                |
|----------|----------------|
| ① HA STD | ⑧メチルエステル化HA    |
| ② 4WC1   | ⑨不完全メチルエステル化HA |
| ③ 4WC2   |                |
| ④ 4WC3   |                |
| ⑤ 4WC4   |                |
| ⑥ 4WC5   |                |
| ⑦ 4WC6   |                |

Fig.8 SDS-PAGE patterns of HA in each condition.

した血漿は限外濾過膜を用いて前処理し、コンドロイチナーゼ ABC で特異的に分解される不飽和二糖のうち HA 由来の  $\Delta$ Di-HA を HPLC により定量し、マウス血漿中 HA 分析を行った。その結果、HA は経口投与によって投与前よりも血中濃度が上昇し、経口吸収されることが明らかとなり、最高血中濃度は 120 分後であった。一般に、CS および HA を静注投与した際の消失は数分から十数分と比較的早いことが知られている。しかし経口投与では比較的長時間後に HA の上昇が観察された。採血時に偶然 HA が血中に存在することは考えにくく、投与した HA のままで血中に存在している可能性は低いと予想できる。すなわち、経口投与した HA が体内で何らかの修飾を受け、血中に存在している可能性が示唆される。

#### 4. 考察

$^1\text{H-NMR}$  による構造解析の結果、保存 1 週目において、酸性条件 pH 3 で保存した Condition 3 では、標準品と比較し、3.6ppm 付近の GlcA の 3 位のシグナルが低磁場にシフトし、また 3.7 ~ 3.9ppm 付近の GlcA の 4 位と GlcNAc の 3 位と 6 位、GlcNAc の 2 位、GlcNAc の 4 位のシグナルが重なりあい、大きく変化している。それに対し、pH 5 で保存した Condition 7 の NMR スペクトルは、標準品とほぼ同様であった。このことから、酸性条件におけるコンフォメーション変化には、比較的厳しい酸性条件が必要であることが示唆される。また、Condition 3 において NMR スペクトルの経時的変化は認められないことから、酸性条件におけるコンフォメーション変化は HA 保存後すぐに起こるものであり、その後はそのまま変化しないと推定される。

CE による分子量測定の結果、各条件で保存した HA は、標準品と比較し、分子量分布が広がっていると考えられるものの、保存期間や保存条件の違いによる分子量分布の変化は明確には確認されなかった。そのため、分子量分布の変化をさらに詳細に検討すべく、ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。その結果、中性条件で保存した HA は標準品と同様の分子量分布を示したが、アルカリ性、酸性で保存した HA はそれぞれ異なる分子量分布を示した。さらに、試料を pH 調整し、すべての試料を中性条件において電気泳動を行ったが、結果は同様であった。このことから、保存条件の違いにより、分子量分布は変化することが示唆される。

一方、現在に至るまで、GAG の経口吸収についてはその詳細は明らかにされておらず、その生理的作用を期待する場合も、量的な変動と効果の相関はみられていない。しかし、HA が経口によって体内に吸収されることが判明した今、その存在量および存在様態を明らかにすることが

HA の生理機能の解明に重要であると考えられる。今後の検討が期待される。

#### (引用文献)

- 1) Kjellen L, Lindahl U.: "Proteoglycans, structures and interactions." *Ann. Rev. Biochem.*, 60, 443-75 (1991) .
- 2) Hook M, Kjellen L, Johansson S.: "Cell-surface glycosaminoglycans." *Ann. Rev. Biochem.*, 53, 847-869 (1984) .
- 3) Zako M, Iwaki M, Yoneda M, Miyaishi O, Zhao J, Suzuki Y, Takeuchi M, Miyake G, Ikagawa H, Kimata K. Molecular cloning and characterization of chick sialoprotein associated with cones and rods, a developmentally regulated glycoprotein of interphotoreceptor matrix. *J. Biol. Chem.*, 277, 25592-600 (2002) .
- 4) Taylor K. R., Gallo R. L.: "Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation." *FASEB J.*, 20, 9-22 (2006) .
- 5) Fuster M. M., Esko J. D.: "The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets." *Nat. Rev. Cancer*, 5, 526-542 (2005) .
- 6) Meyer K., Palmer J. W.: "The polysaccharide of the vitreous humor." *J. Biol. Chem.*, 107, 629-634 (1934) .
- 7) "The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives" (Laurent T. C., ed) Wenner-Gren International Series, Vol 72, Portland Press, London (1998) .
- 8) Scott J. E., Cummings C., Brass A., Chen Y.: "Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer." *Biochem. J.*, 274: 699-705 (1991) .
- 9) Scott J. E.: "Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, *in vitro* and in the tissues." *FASEB J.*, 6, 2639-2645 (1992) .
- 10) Toole B. P.: "Proteoglycans and hyaluronan in morphogenesis and differentiation." In: Hay E., ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd edition. New York: Plenum Press, 1991:305-341.
- 11) Weissman B., Meyer K.: "The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord." *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 1753-1757, 1954.
- 12) Sherman L., Sleeman J., Herrlich P., Ponta H.: "Hyaluronate receptors; key players in growth,

- differentiation, migration and tumor progression." *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6, 726-733 (1994) .
- 13) Gotoh S., Onaya J., Abe M., Miyazaki K., Hamai A., Horie K., Tokuyasu K.: "Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats." *Ann. Rheum. Dis.*, 52, 817-822 (1993) .
- 14) Miller D., "Viscocanalostomy procedures." *Arch. Ophthalmol.*, 123, 1455-1456 (2005) .
- 15) Zeng C., Toole B. P., Kinney S. D., Kuo J. W., "Stamenkovic I: Inhibition of tumor growth in vivo by hyaluronan oligomers." *Int. J. Cancer.* 77, 396-401 (1998) .
- 16) <http://nccam.nih.gov/news/19972000/121100/qa.htm>

# 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制御に関する研究

東北大学多元物質科学研究所

佐藤 次雄

Fine powders of semiconductors such as  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$  and  $\text{CeO}_2$  possessing band gap energy ca. 3eV are of potential interest as an UV radiation blocking material in personal care products to cut off UV ray less than 400nm of wavelength. However, it is suspected that active oxygen species such as singlet oxygen and oxygen radicals are formed by UV irradiation on semiconductors and cause damages to the human health. The goal of the present study was to find a way to overcome this problem and to develop a safe and stable inorganic sunscreen with excellent UV absorption capability. In order to reduce the generation of active oxygen species, semiconductor particles were coated with amorphous silica by seeded polymerization method using sodium silicate and tetraethylorthosilicate as the silica sources.

White nanoparticles of ceria doped ceria were prepared by reacting  $\text{CeCl}_3\text{-CaCl}_2$  mixed solution with NaOH solution at pH12 followed by the oxidation with hydrogen peroxide solution at 40°C. Then the samples were calcined at 700°C for 1 h to prepare white ceria nanopowder. After that ceria doped ceria was coated with amorphous silica by means of seeded polymerization technique using hydrolysis of tetraethylorthosilicate (TEOS) or acid hydrolysis of sodium silicate. The silica shell is confirmed by TEM, XPS and FT-IR. It is confirmed that ceria-doped ceria showed much lower photocatalytic activity as well as lower generation of singlet oxygen under UV light irradiation than those with titania and zinc oxide. The silica coating by seeded polymerization with TEOS was much more efficient for the reduction of the catalytic activity of ceria for the oxidation of organic materials without loss of UV-shielding ability than that by acid hydrolysis of sodium silicate.

## 1. 緒言

皮膚を紫外線から守る目的で様々な紫外線遮蔽剤が開発されているが、有機系化合物の人体に対する安全性に対する不安から無機系紫外線遮蔽剤が注目されている。無機化合物により紫外線を吸収するためには、半導体のバンド励起に基づく光吸収が利用され、波長 400nm 以下の紫外線をカットするためには、バンドギャップエネルギー 3eV 程度の半導体が必要である。また、可視光の透明性を高めるためには光散乱を防ぐため、微粒子化が必要となる。このような背景のもとに、酸化チタンおよび酸化亜鉛ナノ粒子が既に紫外線遮蔽剤として汎用され、さらに酸化セリウム（セリア）<sup>1, 2)</sup> ナノ粒子の利用も検討されている。酸化チタンや酸化亜鉛は代表的な光触媒でもあり、光照射により活性酸素を発生し、有機物を速やかに酸化分解したり、抗菌性を示すことが知られているが、近年、酸化チタン等の半導体の光励起により生成される活性酸素による DNA 損傷が報告されており、肌上に塗布する化粧品に半導体ナノ粒子を配合する場合は、半導体ナノ粒子の光励起による活性酸素の生成挙動についても配慮する必要がある。なお、

半導体による紫外線遮蔽特性の向上のためには、半導体自身の紫外線吸収能を向上させるとともに、半導体粒子の凝集を制御し、肌上にち密に配列させることが必要である。そこで、本研究では、代表的な無機系紫外線遮蔽剤である酸化チタン、酸化亜鉛、セリアナノ粒子の表面にシリカのナノ薄膜を被覆した被覆型半導体ナノ複合体を作成し、半導体ナノ粒子の活性酸素生成を抑制するとともに、粉末の凝集を抑制することにより、紫外線遮蔽特性を損なうことなく、活性酸素生成を低減する半導体のナノ構造制御技術の確立を目的として研究を行った。なお、可視光領域での透明性が高い紫外線遮蔽剤として注目されているセリアは、有機物の酸化を促進する触媒活性が強いことから紫外線遮蔽剤として利用されていなかったが、当研究者らは、カルシアの固溶およびシリカ被覆によりセリアの酸化触媒活性を低減可能であることを見出し、新規紫外線遮蔽材料としての利用を検討している<sup>1-6)</sup>。無機ナノ粒子は凝集しやすく肌上に塗布した時の感触が劣る。無機ナノ粒子の肌上での感触を向上させるため、雲母等の板状粒子との複合化が行われているが、複合化により紫外線遮蔽特性が損なわれる。本研究では、紫外線遮蔽能を有する雲母状レピドクロサイト型チタン酸  $[\text{K}_{3x}(\text{Ti}_{2-x}\text{Li}_x)\text{O}_4]$  粒子をフラックス法により合成し、図 1 のようにセリアナノ粒子と複合化し、紫外線遮蔽能を損なうことなく肌上での流動性（感触）を改善することを試みた<sup>7)</sup>。

一般に、高い紫外線遮蔽効果を持つ日焼け止め化粧品においては、無機系紫外線遮蔽剤と有機系紫外線吸収剤との併用が行われることから、カルシア固溶セリア、酸化チタ



Generation and Control of Active Oxygen Species by the UV irradiation on Semiconductor Particles

Tsugio Sato

Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials

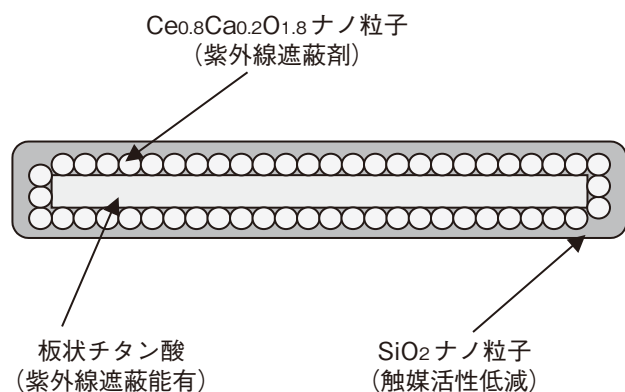


図1 雲母状チタン酸／セリア／シリカナノ複合体

ンおよび酸化亜鉛の光照射下における一重項酸素生成挙動を検討するとともに、光触媒活性を、最も汎用されている桂皮酸エステル系の紫外線吸収剤に対する分解により評価した。また、半導体の紫外線照射下における DNA 損傷挙動についても検討した<sup>8)</sup>。

## 2. 実験方法

**カルシア固溶セリアナノ粒子 ( $\text{Ce}_{0.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$ ) の合成：**

$0.8\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  の塩化セリウム -  $0.2\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  塩化カルシウム混合水溶液と  $3\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaOH 水溶液を水に滴下し pH12 で生成した沈殿を過酸化水素で酸化後、水でよく洗浄し、 $150^\circ\text{C}$  で乾燥した後  $700^\circ\text{C}$  で 1 時間仮焼したものを実験として用いた<sup>3)</sup>。

**雲母状レピドクロサイト型リチウム固溶チタン酸カリウム [ $\text{K}_{3x}(\text{Ti}_{2-x}\text{Li}_x)\text{O}_4$ ] の合成：**

所定量の  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{Li}_2\text{CO}_3$  および  $\text{TiO}_2$  粉末を白金坩堝中  $800^\circ\text{C}$  で 3 h 仮焼した後、所定量の  $\text{K}_2\text{MoO}_4$  をフラックスとして、所定温度で所定時間反応させた。

**$\text{K}_{3x}(\text{Ti}_{2-x}\text{Li}_x)\text{O}_4/\text{Ce}_{0.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$  複合体の合成：**

所定量の  $\text{K}_{3x}(\text{Ti}_{2-x}\text{Li}_x)\text{O}_4$  粉末を蒸留水中に分散した後、 $0.8\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  の塩化セリウム -  $0.2\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  塩化カルシウム混合水溶液と  $3\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaOH 水溶液を同時に滴下し、pH12 で沈殿を生成させ、さらに過酸化水素を滴下し沈殿中の  $\text{Ce}^{3+}$  を  $\text{Ce}^{4+}$  に酸化し、水で洗浄・乾燥後  $700^\circ\text{C}$  で 1 時間仮焼し白色の  $\text{Ce}_{0.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$  を雲母状  $\text{K}_{3x}(\text{Ti}_{2-x}\text{Li}_x)\text{O}_4$  上に形成させた。

**光触媒活性評価：**

試料をデカメチルシクロペンタシロキサン、トリオクタン酸グリセリルおよび紫外線吸収剤である 4-tert-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタンおよびパラメトキシ桂皮酸オクチルの混合溶液に加え、太陽光を 1 日照射後の有機紫外線吸収剤の残存量を GC/MS により定量した。また、比較のため粒子径 35nm および 10nm のシリカ・アルミナ被覆チタニアおよび酸化亜鉛ナノ粒子を用いた同様の実験を

行った。

**DNA 損傷試験：**

試料粉末および DNA 試料 (pUC 18 Plasmid DNA: Nippon Gene) を水中に分散した後、水冷しながら水銀ランプの紫外線 (360 nm、3.5mW) を照射し、DNA の構造変化をゲル電気泳動法により調べた。

**一重項酸素生成特性評価：**

試料の光照射により生成する活性酸素量を化学発光分析により評価し、光触媒活性との相関について検討した。一方、20mol% カルシア固溶セリア粒子を原料として用い、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  水溶液の酸加水分解およびアンモニアを触媒としたチタンテトライソプロポキシド (TEOS) 溶液の加水分解 (シード重合) により粒子表面にシリカ被覆を行い、得られた試料の酸化触媒活性をランシマット法により評価した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 雲母状レピドクロサイト型チタン酸 [ $\text{K}_{3x}(\text{Ti}_{2-x}\text{Li}_x)\text{O}_4$ ] 粒子の合成

$\text{K}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{Li}_2\text{CO}_3$  および  $\text{TiO}_2$  の配合比を変え、 $1000^\circ\text{C}$  で 2 h 反応させた試料の XRD パターンを図 2 に示す。仕込み組成  $x=0.19$  では  $\text{K}_2\text{Ti}_4\text{O}_9$ 、 $x>0.363$  では  $\text{Li}_2\text{TiO}_3$  が共存し、単一相レピドクロサイト型化合物が得られたのは  $x=0.27$  の時のみであった。

また、 $x=0.19$  の試料には柱状粒子、 $x=0.52$  の試料には不定形粒子が共存しており、 $x=0.27$  の試料はほとんど板状粒子のみであった (図 3)。これより、板状粒子はレピドクロサイト型チタン酸、柱状粒子は  $\text{K}_2\text{Ti}_4\text{O}_9$ 、不定形粒子は  $\text{Li}_2\text{TiO}_3$  に帰属されることがわかる。

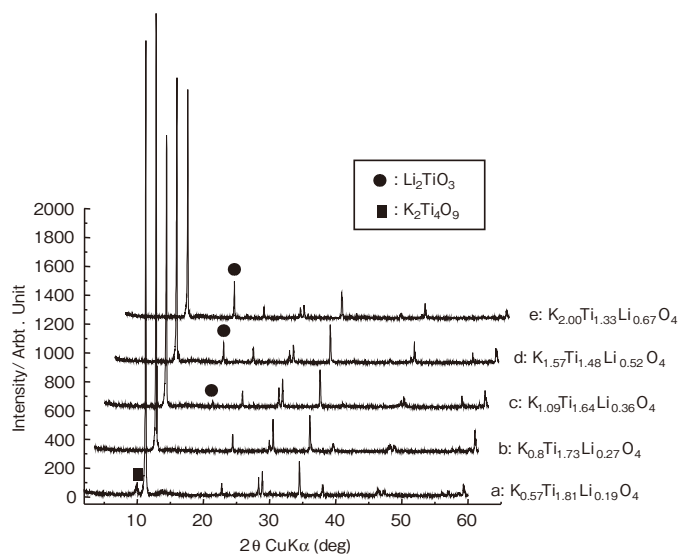
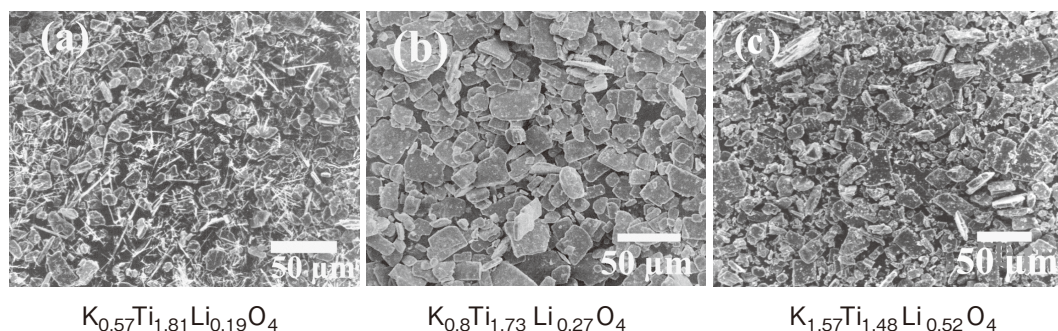


図2  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{Li}_2\text{CO}_3$  および  $\text{TiO}_2$  の配合比の生成物相に及ぼす影響 (原料:  $\text{K}_2\text{MoO}_4$  重量比 = 1:1、反応温度:  $1000^\circ\text{C}$ 、反応時間: 2 h)

図3 粒子形態に及ぼす  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{Li}_2\text{CO}_3$  および  $\text{TiO}_2$  の配合比の影響

$x=0.27$ 、 $\text{K}_2\text{TlMoO}_4$  フラックス無では単一相レピドクロサイト化合物の生成に  $1200^\circ\text{C}$  の高温が必要であったが、50wt% の  $\text{K}_2\text{TlMoO}_4$  フラックス存在下では反応温度  $900\sim 1100^\circ\text{C}$  でいずれもレピドクロサイト相単一相が得られ、 $\text{K}_2\text{TlMoO}_4$  フラックスが著しく反応を促進することがわかった。なお、 $900^\circ\text{C}$  では結晶成長が不十分であり、 $1100^\circ\text{C}$  では粒子が粗大化した (図4)。

$x=0.27$ 、 $\text{K}_2\text{TlMoO}_4$  フラックス添加量 50wt%、反応温度  $1000^\circ\text{C}$  での反応時間の影響を図5に示す。反応時間 2～15h でアスペクト比はあまり変化しなかったが、粒径が  $20\sim 50\mu\text{m}$  に増大しており、反応時間の制御により粒径を制御できることがわかった。

### 3.2 $\text{K}_{3x}(\text{Ti}_{2-x}\text{Li}_x)\text{O}_4/\text{Ce}_{0.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$ 複合体の合成

$x=0.27$ 、 $\text{K}_2\text{TlMoO}_4$  フラックス添加量 50wt%、 $950^\circ\text{C}$ 、2h の反応で合成した  $\text{K}_{0.8}\text{Ti}_{1.73}\text{Li}_{0.27}\text{O}_4$ 、 $\text{K}_{0.8}\text{Ti}_{1.73}\text{Li}_{0.27}\text{O}_4/70\text{wt}\%$   $\text{Ce}_{1.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$  複合体および複合体表面の  $\text{Ce}_{1.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$  の SEM 写真を図6に示す。5～ $20\mu\text{m}$  の滑らかな表面を有する  $\text{K}_{0.8}\text{Ti}_{1.73}\text{Li}_{0.27}\text{O}_4$  が合成でき、その表面に粒径 5～15nm の  $\text{Ce}_{1.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$  ナノ粒子が析出していることが確認できる。

30wt%  $\text{K}_{0.8}\text{Ti}_{1.73}\text{Li}_{0.27}\text{O}_4/70\text{wt}\%$   $\text{Ce}_{1.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$  複合体の薄膜透過スペクトルを図7に示す。予想通り  $\text{Ce}_{1.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$  に紫外線遮蔽能の無い雲母を複合化すると紫外線遮蔽能が低下したが、紫外線遮蔽能を有する  $\text{K}_{0.8}\text{Ti}_{1.73}\text{Li}_{0.27}\text{O}_4$  との複合化ではむしろ  $\text{Ce}_{1.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$  単独よりも紫外線遮蔽能の向上が認められた。なお、いずれの試料も可視部の透明性はほぼ等しかった。これより、雲母状チタン酸カリウムとの複合化では紫外線遮蔽能を損なうことなく、肌上での感触を向上させることが可能であることが明らかとなった。

### 3.3 半導体微粒子の光触媒活性および一重項酸素生成特性評価

$700^\circ\text{C}$  で仮焼後のカルシア固溶セリア粒子 (直径  $10\sim 20\text{nm}$ ) とともに太陽光に1日間暴露した後のパラメトキシ桂皮酸オクチルおよび 4-tert-ブチル-4'-メトキシジベ

ンゾイルメタン量を図8に示す。パラメトキシ桂皮酸オクチルは、いずれの試料でも照射後に cis 体の生成が見られたものの、試料残存率は、無添加で 99.4%、20mol カルシア固溶セリアでは 98.3%であったのに対し、チタニアでは 97.4%、酸化亜鉛で 88.6%であった。また、4-tert-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタンについても同様の結果が得られ、酸化チタンおよび酸化亜鉛による有機紫外線吸収剤の損傷と比較して、カルシア固溶セリアによる損傷は極めて少なかった。

紫外光照射による一重項酸素の生成を、一重項酸素から三重項酸素への変化に基づく発光 [ $(^1\text{O}_2+^1\text{O}_2 \rightarrow ^3\text{O}_2+h\nu$  (634, 762nm)] の強度測定により評価したところ一重項酸素生成量は、酸化亜鉛>酸化チタン>セリア>カルシア固溶セリアの順 (図9) <sup>4,5)</sup> であり、図8に示される光触媒活性の順と良く一致した。

### 3.4 紫外線照射下における DNA 損傷

図10に (a) 試料無添加 (Blank)、(b)  $\text{TiO}_2$  (Degussa P25)、(c)  $\text{ZnO}$  (和光純薬) および (d)  $\text{Ce}_{1.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$  存在下で DNA に紫外線照射した後のゲル電気泳動パターンを示す。紫外線照射前の下部の強い蛍光はラセン構造 DNA (Supercoil)、上部の弱い蛍光はラセン構造の解けた DNA (Relax) に帰属され、紫外線照射後、中間に現れる蛍光は Relax DNA の切断による直鎖構造 DNA (Linear) に帰属される。 $\text{TiO}_2$  や  $\text{ZnO}$  存在下では Linear DNA の生成が認められるが  $\text{Ce}_{1.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$  では全く認められなかった。

種々の試料存在下での Supercoil DNA および Relax DNA の蛍光の相対強度の経時変化を図11に示す。 $\text{ZnO}$  存在下では 30分程度で Supercoil DNA が消失し、Relax DNA は 15 min で最大となった後減少しており、Supercoil  $\rightarrow$  Relax  $\rightarrow$  Linear と変化する DNA 損傷が起こることがわかる。一方、 $\text{CeO}_2$ 、 $\text{Ce}_{1.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}$ 、 $\text{Ce}_{1.8}\text{Ca}_{0.2}\text{O}_{1.8}/10\text{wt}\%$   $\text{SiO}_2$  いずれの試料でも Relax DNA の生成は認められるものの、その量はブランクトと同様であり、Supercoil DNA の減少は極めて僅かであった。これよりセリアは紫外線照射下における DNA 損傷に対する加速効果は有せず、

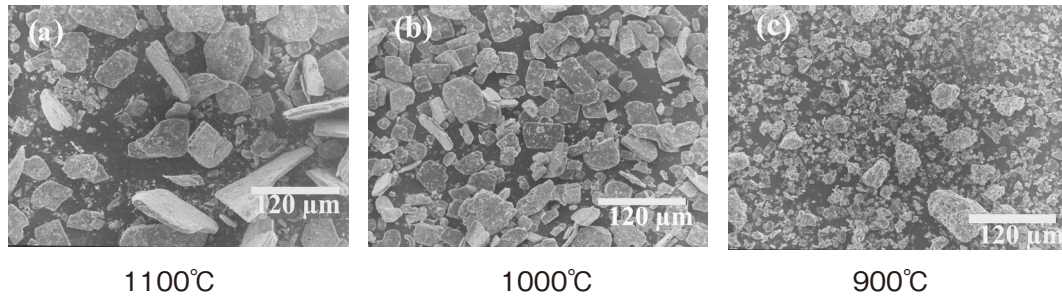


図 4 反応温度の影響 (原料:  $K_2MoO_4$  重量比 = 1:1、反応時間: 15 h)

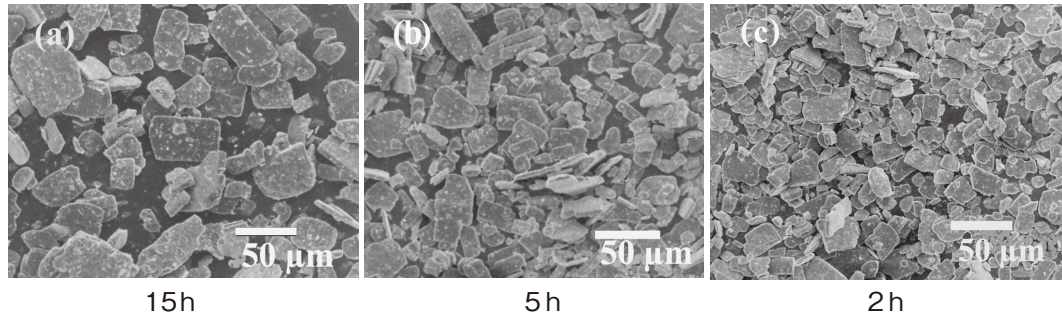


図 5 反応時間の影響 (原料:  $K_2MoO_4$  重量比 = 1:1、反応温度: 1000°C)

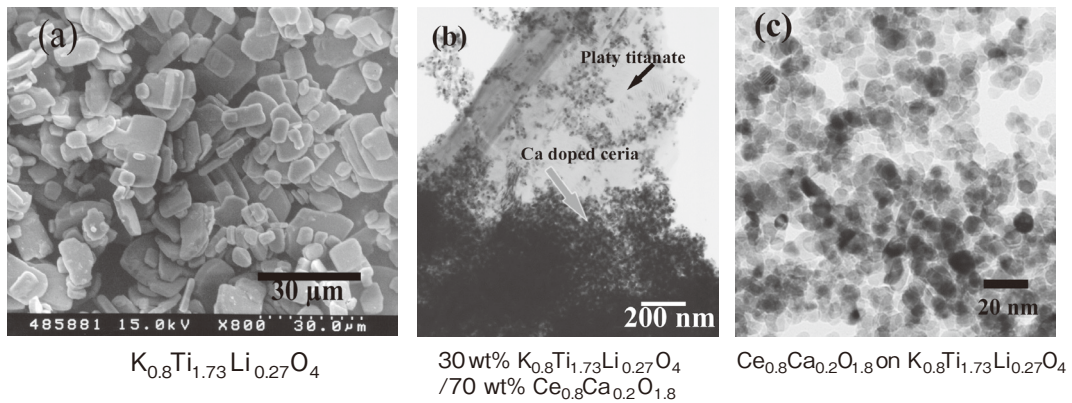


図 6  $K_{0.8}Ti_{1.73}Li_{0.27}O_4$  ( $K_2MoO_4$  フラックス添加量 50wt%、950°C、2h)、30wt%  $K_{0.8}Ti_{1.73}Li_{0.27}O_4$  / 70wt%  $Ce_{1.8}Ca_{0.2}O_{1.8}$  複合体および複合体表面の  $Ce_{1.8}Ca_{0.2}O_{1.8}$  の SEM 写真

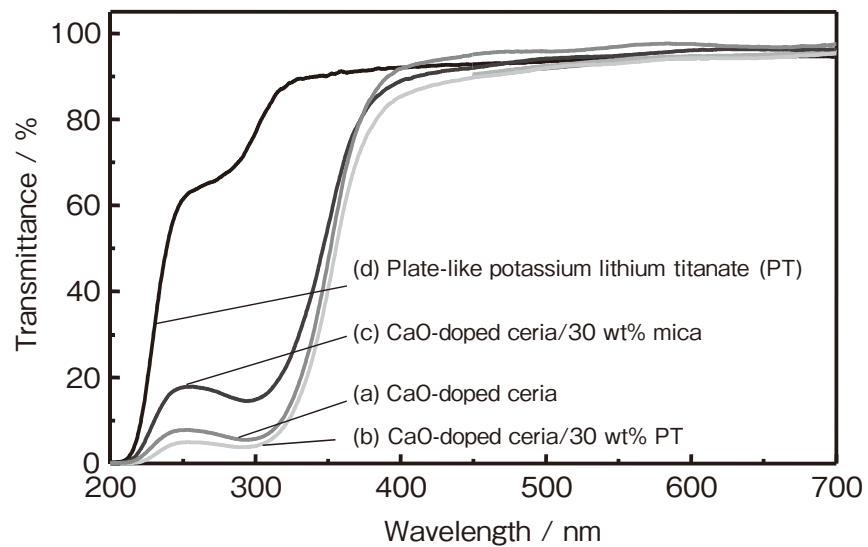


図 7 a)  $Ce_{1.8}Ca_{0.2}O_{1.8}$ 、(b) 30wt%  $K_{0.8}Ti_{1.73}Li_{0.27}O_4$  / 70wt%  $Ce_{1.8}Ca_{0.2}O_{1.8}$ 、(c) 30wt% Mica / 70wt%  $Ce_{1.8}Ca_{0.2}O_{1.8}$  および (d)  $K_{0.8}Ti_{1.73}Li_{0.27}O_4$  の薄膜透過スペクトル

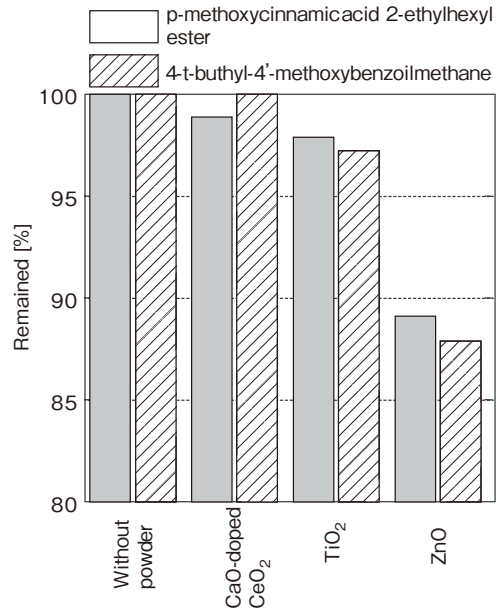


図8 太陽光1日照射後の(a)パラメトキシ桂皮酸オクチルおよび(b)4-t-ブチル-4'-メトキシベンゾイルメタンの残存量(溶液組成:61wt%デカメチルシクロペンタシロキサン+2wt%+16wt%4-t-ブチル-4'-メトキシベンゾイルメタンパラメトキシ桂皮酸+1wt%トリオクタタン酸グリセリル)

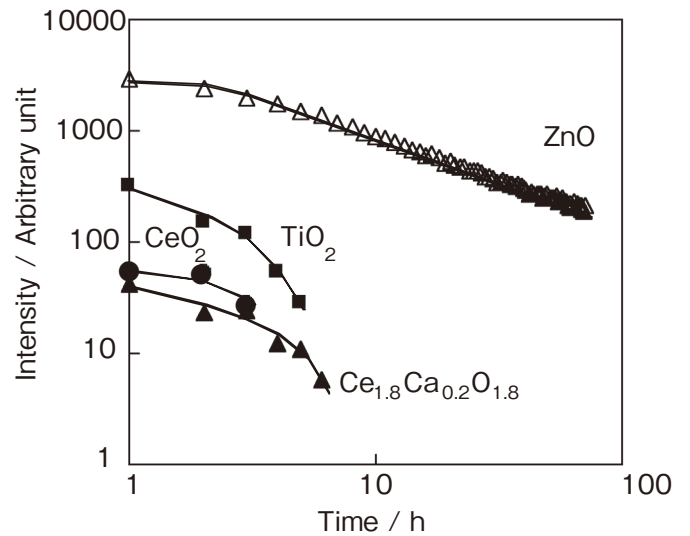


図9 紫外線励起による発光( $\lambda > 600\text{nm}$ )測定による一重項酸素生成量評価

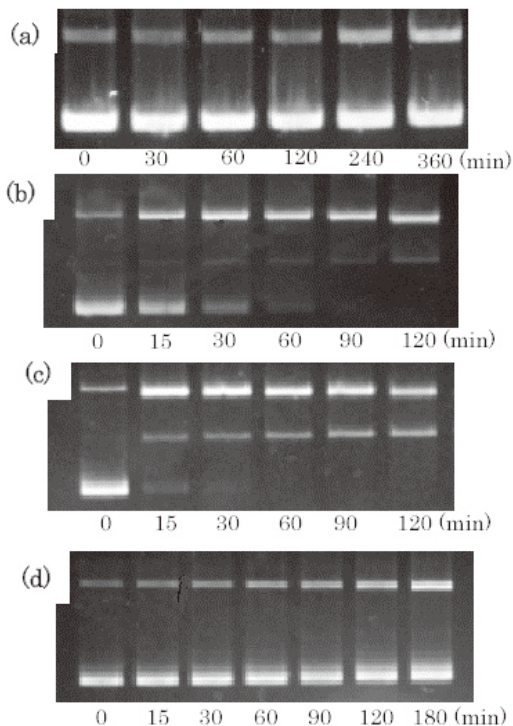


図10 (a) 試料無添加 (Blank)、(b) TiO<sub>2</sub> (Degussa P25)、(c) ZnO (和光純薬) および (d) Ce<sub>1.8</sub>Ca<sub>0.2</sub>O<sub>1.8</sub> 存在下で DNA に紫外線照射した後のゲル電気泳動パターン

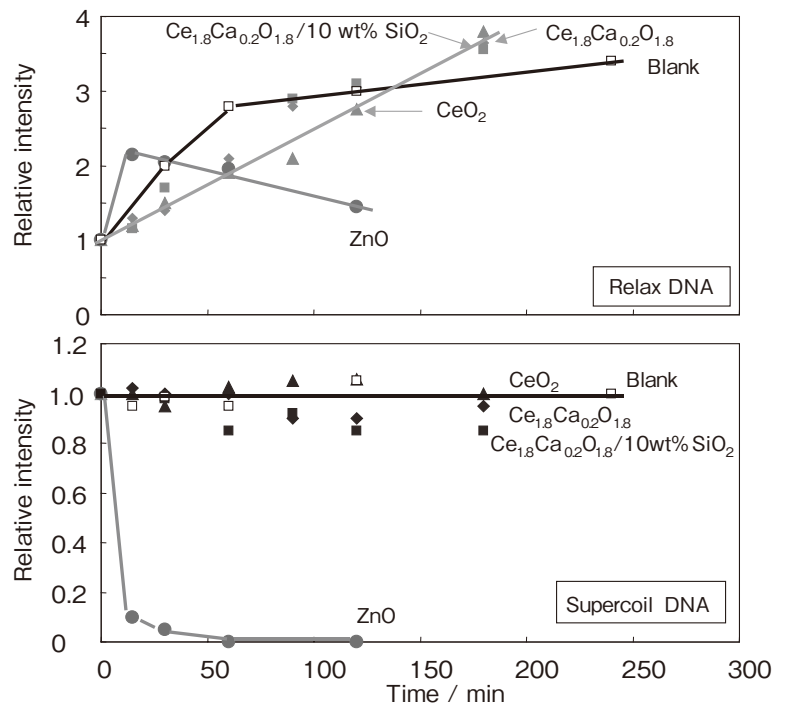


図11 (a) 試料無添加 (Blank)、(b) ZnO (和光純薬)、(c) CeO<sub>2</sub>、(d) Ce<sub>1.8</sub>Ca<sub>0.2</sub>O<sub>1.8</sub> および (e) Ce<sub>1.8</sub>Ca<sub>0.2</sub>O<sub>1.8</sub>/10wt% SiO<sub>2</sub> 存在下で紫外線照射した DNA の Supercoil および Relax 構造の相対変化

人体に対する安全性に優れているといえる。

### 3.5 シリカ被覆セリアの特性評価

アンモニアを触媒とする TEOS のシード重合  $[\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_4 + 2\text{H}_2\text{O} = \text{SiO}_2 + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}]$  により得られたシリカ被覆カルシア固溶セリアの TEM 写真を図 12 に示す。10 – 20nm 程度のセリア粒子状に数 nm のシリカ層が比較的均一に被覆されているのが観察される。

図 13 に XPS O1s スペクトルを示す。シリカ被覆前のカルシア固溶セリアには 2つのピークが観察され、528.8eV の強いピークは格子酸素、531eV の弱いピークは表面吸着酸素に起因すると考えられる。シリカ被覆試料に観察される 533.1eV ピークはシリカの格子酸素に起因し、529.5 eV のピークはカルシア固溶セリアの格子酸素に起因する。シリカの格子酸素に起因する 533.1eV のピークは、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  を用いたシリカ被覆の場合、TEOS を用いた場合より弱いことから、 $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  の酸加水分解では自発核の生成が多く、セリア表面に析出するシリカが TEOS のシード重合の場

合より少ないと予想される。また、セリアの格子酸素に起因するピークは、シリカ被覆により 528.8eV より 529.5eV に +0.7eV シフトした。これはセリア表面に被覆されたシリカは Ce-O-Si 結合を形成し、より電気陰性度の強い Si との結合による影響が現れたものと考えられる。

各試料の XPS Ce3d<sub>5/2</sub> スペクトルを図 14 に示す。シリカ被覆によりピーク位置が 881.3eV から 882.5eV にピーク位置がシフトしており、この結果からも表面での Ce-O-Si 結合の形成が示唆される。

図 15 にランシマット法によるひまし油の酸化に対するカルシア固溶セリアの触媒活性評価結果を示す。シリカ被覆量の増加に伴い紫外線遮蔽能は低下したが、5 wt% 程度のシリカ被覆では紫外線遮蔽能の低下はわずかであった。シリカ被覆により酸化触媒活性が低減されたが、低減効果は、TEOS のシード重合による被覆の方が  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  の酸加水分解による被覆より効果的であった。これは、本実験条件下では、TEOS のシード重合の方がシリカの生成速度が遅く、均一なシリカ薄膜が形成されたためと考えられる。

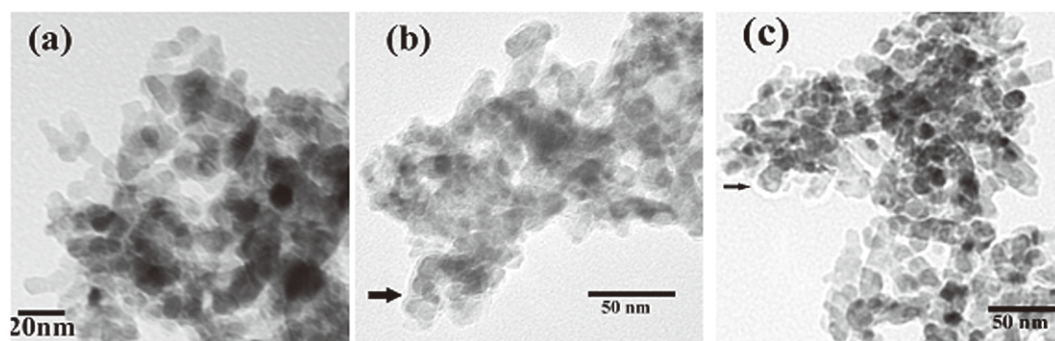


図 12 シリカ被覆カルシア固溶セリアの TEM 写真 (a) 被覆前 (b) 20wt% シリカ被覆 (45 min) 、 (c) 5 wt% シリカ被覆 (3 h)

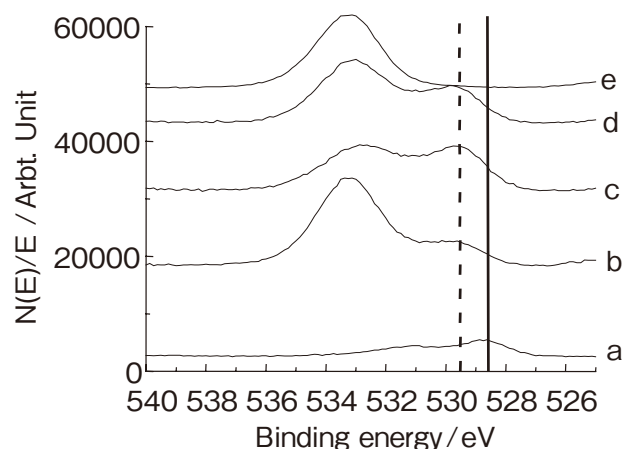


図 13 各試料 XPS O1s スペクトル、a: カルシア固溶セリア、b: 20wt% シリカ被覆カルシア固溶セリア ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , 45min) 、c: 20wt% シリカ被覆カルシア固溶セリア (TEOS, 45min) 、d: 20wt% シリカ被覆カルシア固溶セリア (TEOS, 3h) 、e: シリカ

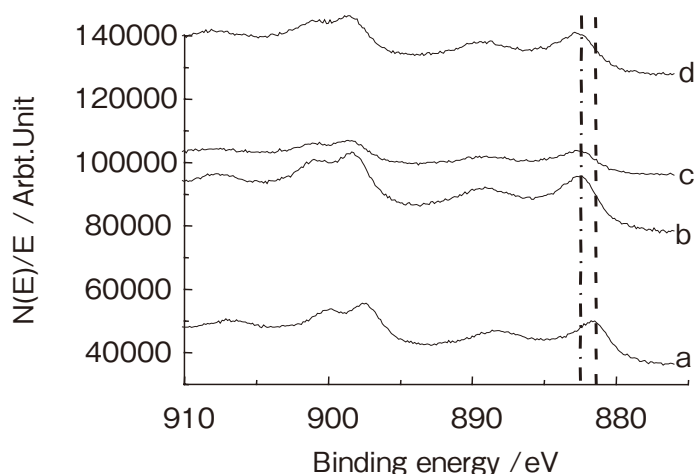


図 14 XPS Ce3d<sub>5/2</sub> スペクトル、a: カルシア固溶セリア、b: 20wt% シリカ被覆カルシア固溶セリア ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , 45 min) 、c: 20wt% シリカ被覆カルシア固溶セリア (TEOS, 45min) 、d: 20 wt% シリカ被覆カルシア固溶セリア (TEOS, 3h)

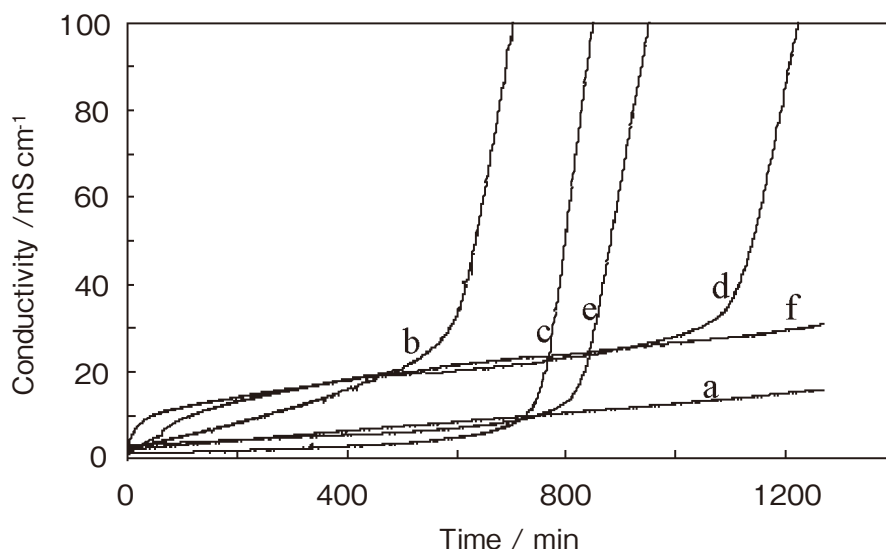


図 15 ランシマット法による酸化触媒活性評価（酸化基質：ひまし油、温度：120℃）、a：ブランク、b：被覆無、c：10wt% SiO<sub>2</sub> (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>)、d：20wt% SiO<sub>2</sub> (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>)、e：10 wt% SiO<sub>2</sub> (TEOS)、f：20 wt% SiO<sub>2</sub> (TEOS)

#### 4. まとめ

以上より、カルシア固溶セリアは、酸化チタンや酸化亜鉛と比較し光触媒活性、DNA 損傷促進および活性酸素の生成が少なく、人体に対する安全性に優れた紫外線遮蔽材料であることがわかった。また、セリアの有機物の酸化に対する触媒活性は、TEOS のシード重合によるシリカ被覆により効果的に低減可能であることがわかった。

#### (参考文献)

- 1) 矢部信良、百瀬禎一、佐藤次雄、藤本津佳、玉置篤、金属酸化物固溶酸化セリウム及びそれを配合した樹脂組成物又は化粧料、特願 2003-091584.
- 2) S. Yabe, T. Sato, Cerium Oxide for Sunscreen Cosmetics, *J. Solid State Chem.*, **171**, 7 (2003).
- 3) T. Sato, T. Katakura, S. Yin, T. Fujimoto, S. Yabe, Synthesis and UV-shielding Properties of Calcia-doped Ceria Nanoparticles Coated with Amorphous Silica, *Solid State Ionics*, **172**, 377 (2004).
- 4) 佐藤次雄、殷シュウ、藤代芳伸、長谷川恵、李鋭星、矢部信良、シリカ被覆セリアナノ複合体の合成と紫外線遮蔽特性、粉体および粉末冶金, **51**, 107 (2004).
- 5) 矢部信良、佐藤次雄、ナノサイズセリアを用いた新しい紫外線遮蔽剤の開発と応用, *J. Soc. Inorg. Mater. Japan*, **11**, 389 (2004).
- 6) A.M. El-Toni, S. Yin, Y. Hayasaka, T. Sato, Coating and Photochemical Properties of Calcina-doped Ceria with Amorphous Silica by a Seeded Polymerization Technique, *J. Mater. Chem.*, **15**, 1293 (2005).
- 7) A.M. El-Toni, S. Yin, T. Sato, Particle Size Control of Plate-like Lepidocrocite-related Potassium Lithium Titanate Through Optimization of Synthesis Parameters, *Mater. Lett.*, **60**, 185 (2006).
- 8) A.M. El-Toni, S. Yin, Y. Hayasaka, T. Sato, Synthesis and UV-shielding Properties of Silica-coated Calcia-doped Ceria Nanoparticles via Soft Solution Processes, *J. Mater. Sci.*, (2006), in press.

# 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

明治大学理工学部応用化学科

相澤 守

Hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; HAp) has been applied widely as a biomaterial for substituting human hard tissues and as an adsorbent for chromatography. The HAp crystal has two crystal planes with different charges: positive on  $a$ -planes and negative on  $c$ -planes. Thus, novel properties of the HAp may be produced by controlling the orientation of the crystal planes. Controlled orientation may be achieved by modifying the morphology of HAp crystals. For example, in order to increase the positive charge on the surface of the HAp fibres, it is possible to grow hexagonal-shaped HAp fibres which are oriented along the  $c$ -axis so that the  $a(b)$ -plane is wider than the  $c$ -plane. It is expected that these apatite fibres have high specificity of adsorption to acidic proteins with negative charges. One of the objectives of the present investigation was to establish the novel process for the syntheses of the HAp crystals with well-controlled morphology. We indicated the novel syntheses process of plate-shaped HAp crystals using amorphous calcium phosphate (ACP) as a starting material. This process contains the control of growth direction of ACP to HAp by the absorption of amino acids, and the accelerated crystal growth using an enzyme reaction of urea and urease. In particular, in the case using a glutamine acid as an amino acid, the plate-shaped HAp crystals were synthesized by hydrothermal treatment of the HEPES buffer including the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  ions, as well as urea and urease.

## 1. 目的

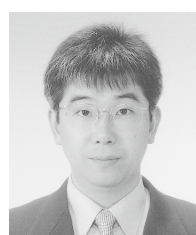
水酸アパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; HAp) は生体硬組織を構成する無機成分と極めて近い化学組成をもち、これを骨欠損部などにインプラントすると新生骨と直接結合するという優れた生体適合性を有する。このアパタイトは緻密質や多孔質のセラミックスや顆粒などに加工されて整形外科および口腔歯科領域において臨床応用されている。また、アパタイトはタンパク質などの生理活性物質の吸着剤としても有用であり、吸着操作中にタンパク質の変性をほとんど起こさない吸着剤として知られている。

アパタイトは結晶学的には六方晶系に属する。そのモデル図を図1に記載する。このモデル図のように、アパタイトには $a$ 面と $c$ 面という二つの結晶面がある<sup>[1]</sup>。一般的に、 $a$ 面側は $\text{Ca}^{2+}$ が多く存在して正に帯電し、一方、 $c$ 面側は主に $\text{OH}^-$ と $\text{PO}_4^{3-}$ が存在するために負に帯電している。この結晶面の電荷により、タンパク質が吸着すると考えることができ、 $a$ 面には負電荷をもつ酸性タンパク質が、 $c$ 面には塩基性タンパク質が特異的に吸着する。我々はこれまでにアパタイトのタンパク質吸着の特異性を向上させるために、アパタイト結晶の形態制御法の確立を試み、 $a$ 面を多く露出した構造をもつアパタイト単結晶ファイバー

の合成に成功している<sup>[2,4]</sup>。しかしながら、いまだ $c$ 面を多く露出した板状アパタイトの合成には成功していない。

板状アパタイトの合成に関する報告には、結晶学的に板状の形態をとりやすいリン酸水素カルシウムを前駆物質として、これを加水分解させて板状アパタイトを得る方法があるが、この手法で得られる板状アパタイトは多結晶体であり壊れやすい。また、アルコール共存下での水熱法により合成する方法も報告されているが、サブミクロンオーダーの微細なものしか得られない<sup>[5]</sup>。我々の知る限り、図1に示したような六角板状のアパタイト単結晶の合成に関する報告はなく、もし本提案でこの板状アパタイトの合成に成功すれば、世界で初めての合成例を示すことになると考えている。

もし、この板状アパタイトの合成に成功すれば、上述したタンパク質吸着剤としての用途だけでなく、その形状を活用することによりコスメトロジー分野への応用が十分に期待できる。例えば、板状粒子は表皮への接着性がよく(化粧のりがよい)、また屈折率を変化させるため、くすみなどを薄く見せる効果が期待できる。さらに、もともと生体適合性の高い物質を素材に用いているためにアレルギー



Processing of biocompatible apatite particles with well-controlled morphology and its application

Mamoru Aizawa

Department of Applied chemistry,  
Faculty of Science and Technology,  
Meiji University

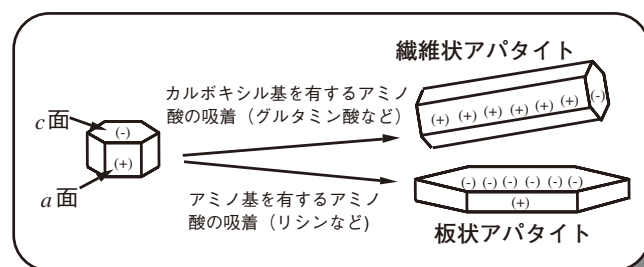


図1 アミノ酸共存下におけるHApの結晶成長 (モデル)

やアトピー性皮膚疾患をもつユーザーへの安心感も高いと考えられる。

そこで、本研究では、HApの形態制御プロセスの確立を指向し、特に板状アパタイトの合成方法について2つのプロセスで検討した。具体的には、1) HApと近い構造をもつ非晶質リン酸カルシウム (Amorphous calcium phosphate; ACP) を出発物質とし、ACPとアミノ酸の官能基とを相互作用させて、ACPからHApへの転化反応およびその結晶成長を制御することでHAp粒子の形態制御を試みた。もうひとつのプロセスは、2) 炭酸カルシウム ( $\text{CaCO}_3$ ) とオルトリン酸 ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) との水溶液反応および尿素とウレアーゼとの酵素反応を併用し、板状のリン酸水素カルシウム (dicalcium phosphate anhydrate: DCPA) を経由して、その形態を維持したままc面を多く露出したHApに転化させる合成方法である。

## 2. 実験

### 2.1 非晶質リン酸カルシウムを出発物質とする板状アパタイトの合成とキャラクター化

出発物質の非晶質リン酸カルシウム (ACP) は以下のような手順で合成した。すなわち、 $0.75 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Ca}(\text{NO}_3)_2$  水溶液 (pH 10)  $50.0 \text{ cm}^3$  に  $0.25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  水溶液 (pH 10)  $87.7 \text{ cm}^3$  を加え、氷冷下で1分間攪拌した。生成した沈殿を固液分離した後、洗浄後、凍結乾燥してACP粉体を調製した。

次に、合成したACP粉体を用いて板状アパタイトの合成を試みた。今回、適用したプロセスは、(i) ACPへのアミノ酸の吸着および(ii) HAp合成バッファー中でのACPからのHApへの転化および結晶成長からなる。その実験プロセスおよび実験条件をそれぞれ図2および表1に

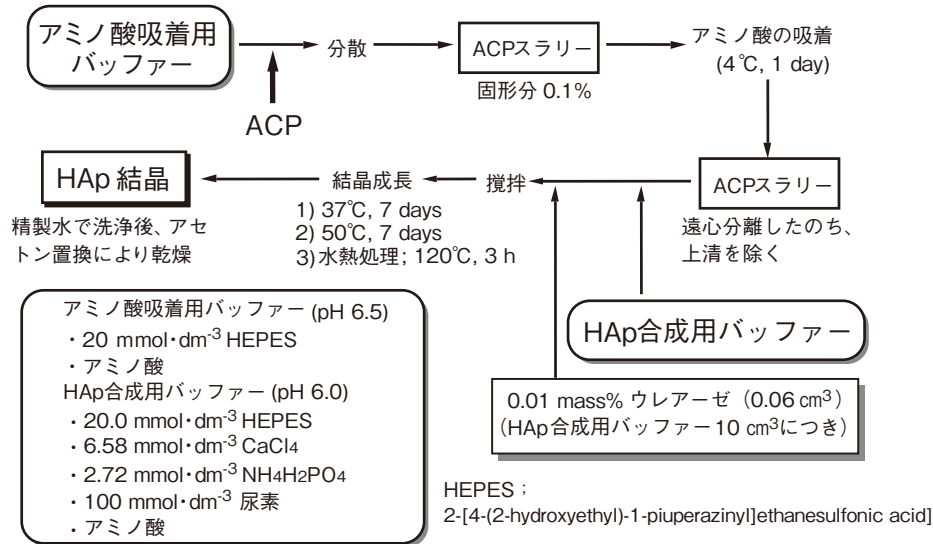


図2 ACPからのHAp合成プロセス

表1 ACPへのアミノ酸の吸着およびHApの合成条件

| ACPへのアミノ酸の吸着<br>(20 mM HEPESバッファー使用) |                           |            |           | HApへの転化反応および結晶成長 |                 |                   |
|--------------------------------------|---------------------------|------------|-----------|------------------|-----------------|-------------------|
| 添加アミノ酸**                             | アミノ酸濃度<br>mM              | pH         | 吸着温度      | 成分               | アミノ酸濃度<br>mM    | 合成条件              |
| 無添加                                  | ---                       | 6.5        | 4℃        | *                | 50, 100         | 37℃, 7 day        |
| Glu                                  | 50, 100, <b>200</b> , 300 | 6.5        | 4℃        | *                | <b>50</b> , 100 | <b>37℃, 7 day</b> |
| Lys                                  | 50, 100, 200, 300         | 6.5        | 4℃        | *                | 50, 100         | 37℃, 7 day        |
| 無添加                                  | ---                       | <b>6.5</b> | <b>4℃</b> | *                | <b>50</b> , 100 | <b>50℃, 7 day</b> |
| Glu                                  | 50, 100, <b>200</b> , 300 | <b>6.5</b> | <b>4℃</b> | *                | <b>50</b> , 100 | <b>50℃, 7 day</b> |
| Lys                                  | 50, 100, <b>200</b> , 300 | <b>6.5</b> | <b>4℃</b> | *                | <b>50</b> , 100 | <b>50℃, 7 day</b> |
| 無添加                                  | ---                       | <b>6.5</b> | <b>4℃</b> | *                | <b>50</b> , 100 | <b>120℃, 3 h</b>  |
| Glu                                  | 50, 100, <b>200</b> , 300 | <b>6.5</b> | <b>4℃</b> | *                | <b>50</b> , 100 | <b>120℃, 3 h</b>  |
| Lys                                  | 50, 100, <b>200</b> , 300 | <b>6.5</b> | <b>4℃</b> | *                | <b>50</b> , 100 | <b>120℃, 3 h</b>  |

\*) 20 mM HEPES + 6.58 mM  $\text{CaCl}_2$  + 2.72 mM  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  + 100 mM Urea (10 cm $^3$ ), 0.1% Urease (0.6 cm $^3$ )

\*\*) ここで、添加したアミノ酸はグルタミン酸ナトリウムおよびリシン塩酸塩の形で使用した。

示す。ACP を所定濃度のアミノ酸を添加した HEPES バッファーに分散させてスラリー（固形分 0.1 mass%）を調製し、4℃で1日静置した。アミノ酸は酸性アミノ酸としてグルタミン酸ナトリウム（Glu）、塩基性アミノ酸としてリシン塩酸塩（Lys）を使用した。続いて、遠心分離によりアミノ酸を吸着させた ACP を固液分離し、それに所定量の HAp 合成バッファー（アミノ酸、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、尿素、ウレアーゼを含む溶液）を加え、37℃および50℃で7日間保持して HAp を合成した。また、水熱条件（120℃、3 h）下でも同様に合成した。HAp 合成バッファー中の尿素とウレアーゼは合成中に反応系の pH を増加させ、さらにバッファー中の  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{PO}_4^{3-}$  が HAp 生成を促進させる。

合成した ACP および HAp は粉末 X 線回折法（XRD）および赤外吸収スペクトル法（FT-IR）により同定し、それらの化学組成を高周波誘導結合プラズマ分析（ICP）により決定した。得られた粒子の形態は走査型電子顕微鏡（SEM）および透過型電子顕微鏡（TEM）により観察した。

## 2.2 炭酸カルシウムとオルトリン酸との水溶液反応による板状アパタイトの合成とキャラクタリゼーション

本プロセスでは、炭酸カルシウム（ $\text{CaCO}_3$ ）とオルトリン酸（ $\text{H}_3\text{PO}_4$ ）との水溶液反応および尿素とウレアーゼとの酵素反応を併用し、最初に板状リン酸水素カルシウムを形成させ、その形態を維持したまま HAp に転化させて板状アパタイトの合成を試みた。

0.01, 0.05, 0.10  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  の炭酸カルシウムと沈殿剤である尿素を 0.5, 1.0, 1.5, 2.0  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  を含むスラリー（1000  $\text{cm}^3$ ）に、Ca/P 比が 1.67 となるようにオルトリン酸水溶液（1000  $\text{cm}^3$ ）を滴下した。1 時間攪拌後、硝酸を添加して pH を 3.00 に調整し、水溶液とした。その試料溶液にウレアーゼを添加して 50℃で 24 時間加熱し、尿素を加水分解

させてアパタイトを合成した。なお、ウレアーゼは試料溶液中の尿素に対して 24h 以内に加水分解するように添加した。得られた粉体のキャラクタリゼーションは 2.1 節と同様な方法で行なった。

## 3. 結果と考察

### 3.1 非晶質リン酸カルシウムを出発物質とする板状アパタイトの合成とキャラクタリゼーション

図 3 に HAp 合成の出発物質に用いた ACP の XRD 図を示す。HAp の最大ピークである  $31.7^\circ$  近傍を中心としてブロードな回折パターンが得られた。この粉体を TEM により観察したところ（図 4）、粒径約 100 nm の微粒子の集合体であることが分かった。これらの粒子の制限視野電子線回折（SAED）図形はハローパターンを示し、図 3 の XRD の結果と併せてこれらの粒子が非晶質であることが分かった。この粒子の化学組成を ICP 発光分析により調べたところ、カルシウム含有量 33.46 mass% およびリン含有量 17.48 mass% であった。その Ca/P モル比は 1.48 と計算され、約 1.5 と見積もりことができる。また、示差熱重量分析（DTA-TG）によりこの ACP 粉体の加熱変化を調べたところ、600℃までの加熱で加熱による重量減少は一定となり、その減少率は 14.6 mass% であった。

これらの結果から、今回の実験で使用した ACP は  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6 \cdot 8.8\text{H}_2\text{O}$  と表記できる。伊藤らの報告によれば<sup>[6]</sup>、非晶質リン酸カルシウム（ACP）の構造単位は組成式  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  で表せるクラスターであり、最近、ヒトの血漿の無機イオン濃度と等しくした生体疑似体液（SBF）中でのアパタイトの成長がこの ACP を成長単位とするクラスター成長であることが明らかにされている。本研究で得られている ACP もほぼ同様な化学組成であり、これを出発物質として用い、所定の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンおよび  $\text{PO}_4^{3-}$  イオンを含む溶液中に懸濁し、結晶成長させることにより水酸アパタイトの結晶形態制御法の確立を試行した。

この ACP 粉体を出発原料として板状アパタイトの合成

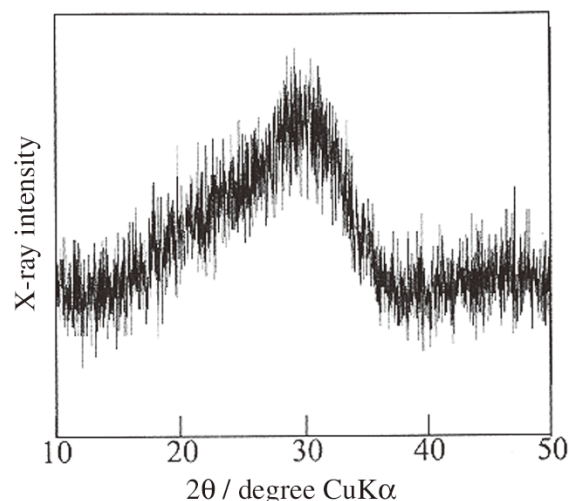


図3 ACPのXRDパターン

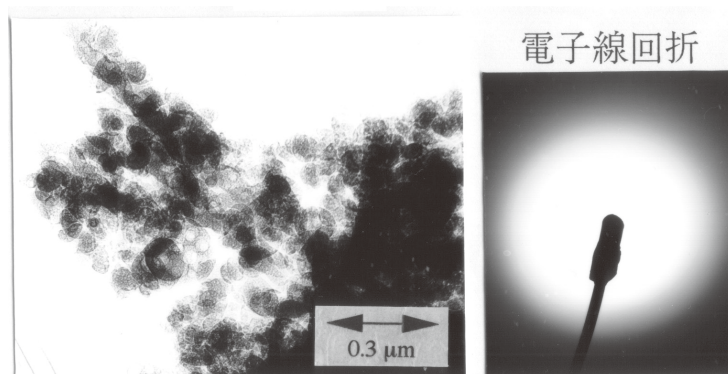


図4 ACPのTEM写真及びその電子線回折

を行なった。まず、合成プロセスを確立するための予備的検討として、

- 1) 異なるバッファーを用いた HAp 合成
- 2) 異なる pH 条件下での HAp 合成 (pH 一定)
- 3) 弱酸性からアルカリ性への pH のダイナミックな変化を利用した合成
- 4) HAp 生成に必要な  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{PO}_4^{3-}$  イオンの供給の 4 つの独立した実験を行なった。

これらの知見を総括すると、バッファーとしては HEPES を利用し、pH をダイナミックに変化させながら  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{PO}_4^{3-}$  イオンを供給することが ACP から HAP への転化反応に有効であることが分かった。そこで、これらの知見をもとに次のプロセスを考案し、合成実験を行なった。

本合成プロセスは、(i) ACP へのアミノ酸の吸着および (ii) HAp 合成バッファー中での ACP からの HAp への転化および結晶成長からなる。その実験プロセスおよび実験条件は既にそれぞれ図 2 および表 1 に示している。なお、(i) で吸着させたアミノ酸と (ii) の結晶成長で使用

されるアミノ酸は同一のものである。

先に述べた ACP を用いて HAp の合成を試みたところ、すべての実験条件において ACP は HAp に転化した。その結晶性は合成温度が高くなるにつれて向上し、水熱条件下で最も結晶性の高い HAp が生成した。また、IR スペクトルから、生成した HAp が炭酸イオンを含有していることが分かった。その炭酸イオンに帰属されるスペクトルの吸収は合成温度が低い方がより顕著であった。

代表例として、アミノ酸として Glu を使用し、異なる温度で合成した HAp の XRD パターンと SEM 写真を図 5 に示す。XRD パターンでは、いずれも HAp に帰属される回折線が見受けられるが、37℃ および 50℃ では結晶性が低く、120℃ の水熱条件下では結晶性の比較的高い HAp が得られた。特に、酸性アミノ酸である Glu を用いて合成した場合には HAp の (002) 面 ( $2\theta=25.8^\circ$ ) が比較的高い強度で検出された。SEM 観察では、得られた粉体は板状粒子から構成されて、合成温度の増加とともにその粒径も増大することが分かった。XRD の結果と併せて考えると、板状の平面が HAp の c 面に対応している可能性がある。

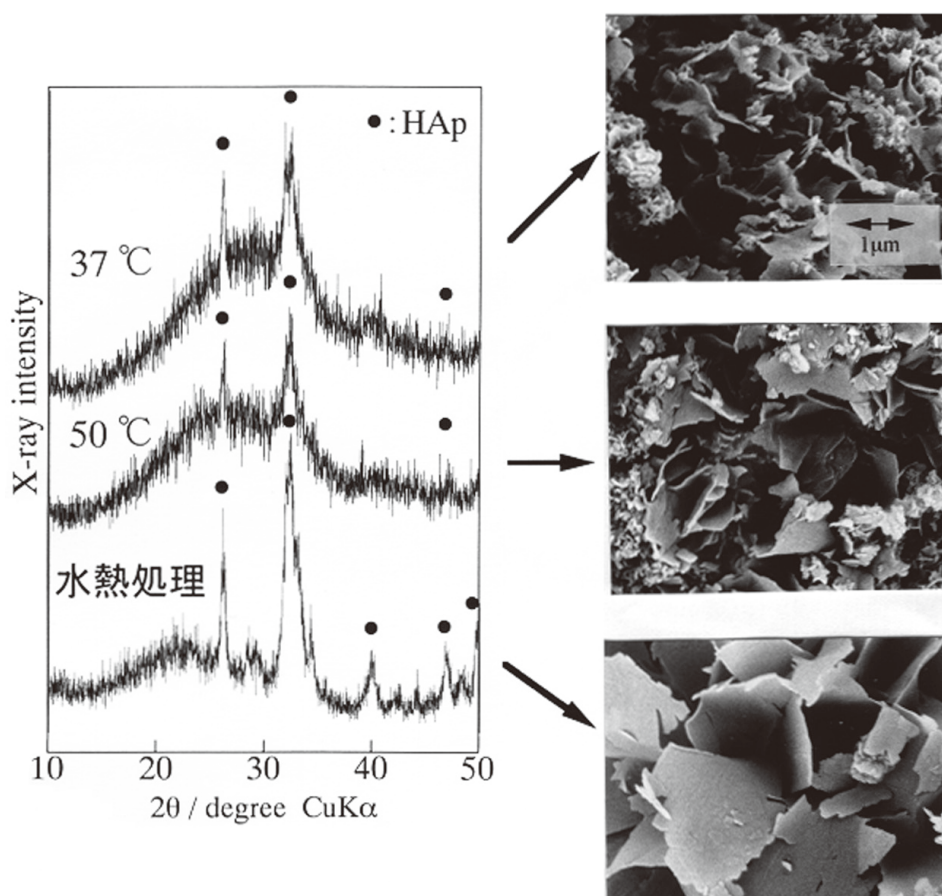


図5 HApの形態に及ぼす合成温度の影響

- \*アミノ酸 (Glu) 共存下での合成： 1) アミノ酸吸着バッファー：200 mM  
2) HAp合成バッファー：50 mM

次に、50℃および水熱条件下で合成した HAp の粒子形態を図 6 に示す。これらの SEM 写真は表 1 の Bold で示した実験条件に対応している。合成温度を 50℃とし、アミノ酸無添加で合成した場合は粒状、酸性アミノ酸 (Glu) および塩基性アミノ酸 (Lys) を添加して合成した場合はいずれも板状結晶が生成した。カルボキシル基を多くもつ Glu を添加した方がアミノ基を多くもつ Lys を添加した場合よりも板状粒子が生成しやすい傾向が認められた。

これらの結果より、アミノ酸共存下で ACP から HAp への添加反応および結晶成長を行なうと板状粒子が生成することが見いだされた。また、結晶成長を水熱条件下で行なうと 50℃の場合よりも結晶性の高いより大きな HAp 結晶が得られることが分かった。逆に、37℃で合成した場合には 50℃や水熱条件に比べて微細な HAp 結晶が生成した。

アミノ酸共存下での HAp 合成により板状粒子が生成した理由として、HAp を構成する ACP クラスタは HAp と類似した構造をであり、その負に帯電した *c* 面とアミノ酸のアミノ基が相互作用して *c* 面方向の結晶成長速度が遅くなるため、板状粒子が生成したものと考えられる。また、アミノ酸のカルボキシル基は溶液中の  $\text{Ca}^{2+}$  とキレート化して、ACP クラスタの *a* 面と相互作用しにくくなるため、*a* 面方向への特異的な結晶成長が起こらなかったものと思われる。

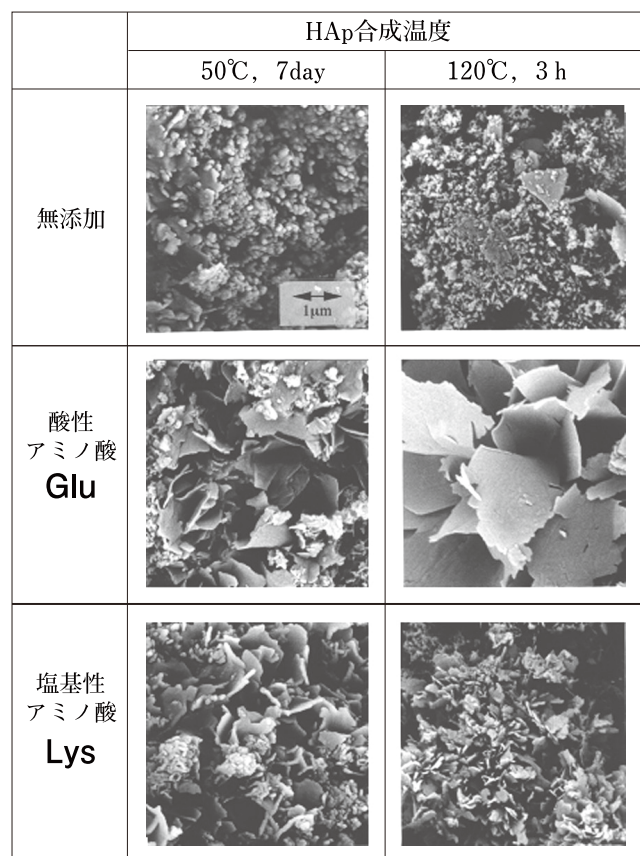


図 6 HApの形態に及ぼすアミノ酸添加の影響

### 3.2 炭酸カルシウムとオルトリン酸との水溶液反応による板状アパタイトの合成とキャラクターシオン

3.1 節のプロセスでアパタイトの板状化には成功したが、目的とするアパタイトの配向性 (*c* 面が多く露出した表面構造) という観点ではいまだ課題を残していた。そこで、別のアプローチにより *c* 面が多く露出した板状アパタイトの合成を試みた。具体的には、1) 炭酸カルシウムとオルトリン酸との水溶液反応および 2) 尿素とウレアーゼとの酵素反応を併用して板状アパタイトを合成するという試みである。

今回の報告では、炭酸カルシウムとオルトリン酸との水溶液反応に限定しているが、この出発原料の組み合わせは他の種類のカルシウム原料とリン酸塩原料との組み合わせを実際に試した実験結果に基づいて決定したものである。

まず、炭酸カルシウムとオルトリン酸の各出発原料の濃度および尿素濃度をパラメータとして変動させ、トータル 24 種類の実験を行なった。 $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{PO}_4^{3-}$  の濃度をあげると pH が上昇しにくくなるためリン酸水素カルシウム (DCPD) が多く存在し、尿素濃度が高い場合にも HAp とリン酸八カルシウム (Octacalcium phosphate: OCP) が生成した。

特に、 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{CaCO}_3$ ,  $0.006 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{H}_3\text{PO}_4$  の場合、いずれの尿素濃度でも HAp と OCP との混合相となり、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  尿素のときは配向性が見られず、特に  $1.0\text{--}2.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  尿素のとき *c* 面に相当する (002), (004) 面の回折強度が特異的に高い HAp が生成した (図 7 (a))。

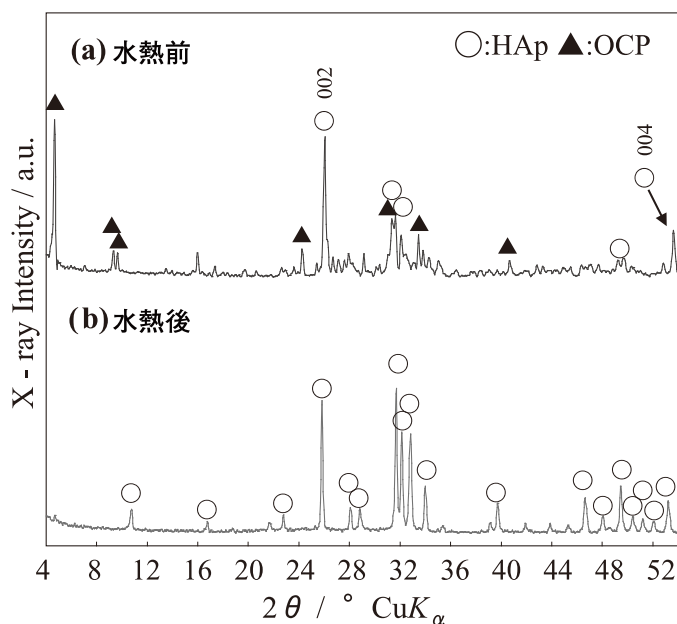


図 7 酵素反応を利用して合成した HAp 粉体の XRD 図  
 出発物質:  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{CaCO}_3$ ,  $0.006 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{CH}_3\text{PO}_4$   
 $1.50 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} (\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ,  $\text{HNO}_3$  により pH 3 に調整  
 (a) 合成粉体 (50℃, 24 h)  
 (b) (a) を 120℃ 24 h 水熱処理した粉体

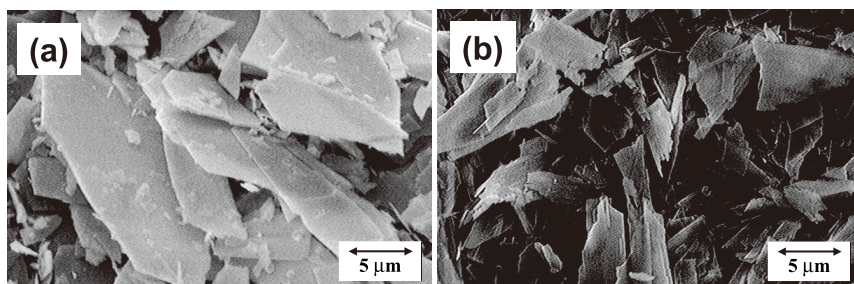


図8 c面を多く露出したHAp粉体のSEM写真  
 出発物質： $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ CaCO}_3$ ,  $0.006 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ CH}_3\text{PO}_4$   
 $1.50 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} (\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ,  $\text{HNO}_3$ によりpH 3に調整  
 (a) 合成粉体 (50°C, 24 h) (b) (a)を120°C, 24 h水熱処理した粉体

また、この粉体の粒子形態を図8 (a)に記載したが、板状の形態をしていることが観察された。この表面に多く露出している面がHApのc面に相当すると思われる。

この配向性の原因は出発原料の $\text{CaCO}_3$ の緩衝能により尿素の加水分解によるpHの上昇が緩やかに起こり、DCPDからOCPそしてHApへとDCPDの形態を維持したまま加水分解が進行したためと考えられる。

さらに、この配向性の高いHApとOCPとの混合粉体を120°C, 24 hで水熱処理した結果を図7 (b)および図8 (b)に示す。図7 (a)のXRD図から、水熱処理後にOCPはすべてHApに転化していること、および(002)面に対応する反射が比較的強く検出されていることが分かる。この結果は水熱処理後も目的とするc面を多く露出したアパタイトが合成できていることを示している。また、図8 (b)のSEM写真からも板状の形態が水熱処理後も維持されていることが確認できる。

したがって、本プロセスはACPを出発物質とする方法よりもアパタイトの配向性を制御可能な方法として有望であり、今後、大量合成の方法を構築することにより従来のアパタイトとは異なる新しい機能を持った「生体適合性粒子」の創出が可能となると考えられる。

#### 4. 総括

アパタイトの形態制御プロセスの確立を指向して2つのプロセスにより板状アパタイトの合成を試みた。まず、ACPを出発物質として、アミノ酸の吸着による成長方向の制御と尿素とウレアーゼの酵素反応を利用した新規な板状アパタイトの合成プロセスを提案した。特に、アミノ酸としてグルタミン酸(Glu)を利用し、ACPにGluを吸着させた後、それを尿素およびウレアーゼとともに $\text{Ca}^{2+}$ および $\text{PO}_4^{3-}$ を含むHEPESバッファーに懸濁させて、水熱

処理することにより板状のアパタイトを合成できることが分かった。

また、1)炭酸カルシウムとオルトリン酸との水溶液反応および2)尿素とウレアーゼとの酵素反応を併用し、板状アパタイトの合成を試みたところ、前述の方法よりも高い配向性を維持した板状アパタイトが生成することが分かった。

アパタイトは生体適合性が高く、しかも板状の粒子形態はコスメトロジー分野への応用が大いに期待できる。例えば、板状粒子は表皮への接着性がよいと考えられ、また屈折率を変化させるため、くすみなどを薄く見せる効果が期待できる。さらに、アパタイトはあらゆる素材のなかで最も生体適合性の高い物質のひとつであるため、アレルギーやアトピー性皮膚疾患をもつユーザーへの適用も可能であろう。今後は産学連携も視野に入れながら、この新素材のコスメトロジー分野への応用を検討していきたい。

#### (引用文献)

- 1) T. Kawasaki, *J. Chromatogr.*, **544**, 147 (1991).
- 2) M. Aizawa, A. E. Porter, S. M. Best and W. Bonfield, *Biomaterials*, **26**, 3427-3433 (2005).
- 3) M. Aizawa, F. S. Howell, K. Itatani, Y. Yokogawa, K. Nishizawa, M. Toriyama and T. Kameyama, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **108**, 249-253 (2000).
- 4) 相澤守, 木下真喜雄, 山田耕二, 板谷清司, 岸岡昭, 無機マテリアル, **5**, 387-397 (1998).
- 5) F. Nagata, Y. Yokogawa, M. Toriyama, Y. Kawamoto, T. Suzuki and K. Nishizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **103**, 70-73 (1995).
- 6) 伊藤敦夫, 小沼一雄, 立石哲也, 日本結晶成長学会誌, **25**, A134 (1998).

# 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

北海道医療大学薬学部

宮崎 正三

Pluronic F127(PLF-127) is a high molecular weight poly(oxyethylene) /poly(oxypropylene)/poly(oxyethylene) triblock copolymer, aqueous solutions of which form thermally reversible gels on warming to body temperature. When xyloglucan derived from tamarind seed is partially degraded by  $\beta$ galactosidase, the resultant product (GXG-TG) exhibits thermally reversible gelation in dilute aqueous solution. The gelation behaviour is similar to that observed with Pluronic F127, with a sol-gel transition on warming from refrigerator temperature. We previously reported the potential use of these thermo- responsible intelligent polymers for drug delivery systems. We now compared the potential of Pluronic F127 and xyloglucan gels as cosmetic materials. Chilled aqueous solutions of PLF-127 and GXG-TG formed gels at concentrations of 20-30%w/w and 1-2%w/w when warmed to 37°C, respectively. The xyloglucan sol had higher viscosity than the Pluronic sol. Stress-strain plots of the xyloglucan gels were typical of those for elastic gels, but the Pluronic showed different rheological behaviour to that of the xyloglucan gel. All of the Pluronic and xyloglucan sols formed gels at gelation temperatures decreasing over the range 21.5 to 10.2°C and 27.0 to 22.0°C with increasing concentration, respectively. The difference in gelling properties of sols was attributed to differences in the structure of the gels. The xyloglucan has recognized non-toxicity and higher moisture content in rat skin compared to that of the Pluronic. These results suggest that novel liquid cosmetic materials with on skin gelling properties can be developed by thermo- responsible intelligent polymers.

## 1. 緒言

ポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンのブロック共重合体であるポロキサマー (Poloxamer) は、プルロニック (Pluronic<sup>®</sup>) として市販されている非イオン性界面活性剤である。このうちプルロニック F-127 (PLF-127) はエチレンオキサイドとプロピレンオキサイドが7対3から成る分子量 11,500 の高分子化合物であり (Fig. 1)、プルロニック類の中で最も毒性の少ないもののひとつとして知られている<sup>1)</sup>。さらに PLF-127 の濃厚溶液 (20-30% w/w) は低温では液体でゾル状態であるが、室温や体温ではゲルを形成する性質 (熱応答性ゲル化) がある。

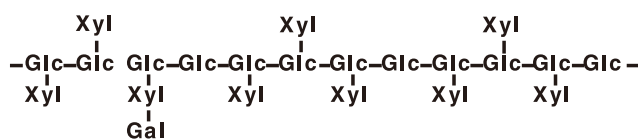
PLF-127 は、当初は人工皮膚として使用された<sup>1)</sup>。このゲルに殺菌剤として硝酸銀や乳酸銀を混合したものを熱傷面に塗ると、感染や敗血症を防止し、しかも創傷治癒を妨げないという。Nalbandian ら<sup>2)</sup> は、火傷皮膚の治療に人工皮膚として PLF-127 を用いると、治癒速度が促進されることを報告している。これらのことから、PLF-127 は経皮吸収剤のゲル基剤としての有用性も期待された<sup>3)</sup>。低温で保存したプルロニック溶液を皮膚や傷の深いところに適

用すると、皮膚や創傷面の深部にまで達する。しかし、体温では急速にゲル化するため、局所滞留性や薬物徐放性を示す。また、プルロニックは水溶性であるため、使用後は水洗で簡単に除去することができるなどの特徴がある<sup>4)</sup>。

豆科植物タマリンド (Tamarindus indica) の種子中に存在するガラクトキシログルカン (GXG) は、増粘安定剤として主に食品分野で広く用いられている。GXG はセルロースと同じ  $\beta$ -1, 4 グルカン主鎖とし、側鎖に  $\alpha$ -1, 6 でキシロース、このキシロースに  $\beta$ -1, 2 でガラクトースが結合している (Fig. 1)。この側鎖ガラクトースの個数が0個の7糖、1個の8糖、2個の9糖がGXGの基本ユニットとなっている。最近、このGXGの側鎖ガラクトースを $\beta$ -ガラクトシダーゼによって除去率30-55%で部分除去した物質 (GXG-TG, Fig. 1) が、低濃度 (1-3% w/w) で可逆的に冷却によってゾル化、加熱によって



Pluronic F-127 ( PLF-127 )



Galactoxyloglucan Trimming Galactose

Fig.1 Structures of PLF-127 and GXG-TG



Development of novel cosmetic materials with on skin gelling properties of thermo- responsible intelligent polymers

Shozo Miyazaki

Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Health Science University of Hokkaido

ゲル化するという、通常のゲル化多糖と異なる現象を示すことが見いだされた<sup>5)</sup>。この物質は天然物由来の多糖であり、1-3 % w/w の低濃度で熱応答性ゲル化を示すことから、生体に対して安全なことが予想された。

著者らは先に、PLF-127 及び GXG-TG の熱応答性ゲル化の特性にもとづいて、投与時は液体（ゾル）であるが体内ではゲルとなる新しい投与技術を開発した。すなわち、薬を PLF-127<sup>6)</sup> あるいは GXG-TG<sup>7)</sup> に溶解して直腸に投与したところ、薬の効果が持続する結果が得られた。したがって、薬を投与する時には液体であるため容易に適用でき、また体温ではゲルとなるために薬の徐放性や投与部位に薬を長時間留めておくことが可能である。また、直腸ばかりでなく液剤のように飲み易い経口投与あるいは眼、鼻、皮膚、腹腔内など様々な薬の投与に応用できることが示唆された<sup>8-11)</sup>。

本研究では、この熱応答性ゲル化の新技術を化粧品素材に応用し、「皮膚で固まる（ゲルとなる）新タイプの液体化粧品」の開発を試みた。そのためにまず、化粧品素材としての最適処方、基礎的物性及びゾル-ゲル転移について検討した。

## 2. 実験方法

### 2-1 試料

Pluronic F-127 (PLF-127) は Sigma 社から購入したものを、GXG-TG (Lot. 9530L、ガラクトース除去率 44%) は大日本製薬(株)より供与されたものを使用した。その他の試薬等は、すべて一級以上のものを使用した。

### 2-2 ゾルの調製

20%、25% 及び 30% w/w PLF-127 水溶液（ゾル）は、秤量した試料を低温で穏やかに攪拌しながら徐々に精製水あるいは pH 7.4 リン酸緩衝液に加え、分散・溶解させ冷蔵庫で一晩放置し、調製した。1、1.5 及び 2 % w/w GXG-TG 水溶液（ゾル）は、秤量した試料を精製水あるいは pH 7.4 リン酸緩衝液に加え、混合物をホモジナイザー（CM-200、(株)井内盛栄堂）で攪拌（室温及び氷冷下）することにより調製した。

### 2-3 ゾル粘度の測定

試料の水溶液（ゾル）の粘度は、E 型粘度計（TV-20 H model E、(株)トキメック）を用いて測定した。粘度計にコーンロータ（1° 34'×R24）を取り付け、ずり速度に対する粘度の関係を 5℃で測定した。

### 2-4 ゲル強度の測定

ゲルの破断強度解析は、レオメーター（RHEOMETER

CR-200D、(株)サン科学）を用いて行った。試料溶液 30g を 50 ml ビーカーに注入し、3 時間一定温度（37℃）に保存した後にいった。アダプターは直径 2.5cm の円形平板型を用い、試料台の上昇速度は 60mm/min で測定した。試験開始後、ゲルが破断され応力が大きく低下する点における荷重をゲル強度とした。また、ゲル強度が得られるまでにアダプターが移動した距離を変形とし、試料の厚みで除して歪みとした。

### 2-5 ゾル-ゲル転移の測定

PLF-127：一定温度（5℃）に保った 20 ml のゾル試料を入れたバイアル瓶を 37℃ の水浴に入れ、一定速度で攪拌する時、攪拌子（20 mm）がプルロニックのゲル化により停止する時の温度（TAKARA・複合モード温度プリンタ D613、宝工業(株)）及び時間をゲル化温度及びゲル化時間とした。

GXG-TG：GXG-TG ゾルのゲル化挙動（ゲル化温度及びゲル化時間）は、試験管倒立法により測定した。すなわち、試験管に試料溶液（10g、2-3℃）を注入し、一定温度（10℃）の恒温槽に垂直に入れ、恒温槽内の温度を約 1℃ / 2 min の速度で昇温させ、ゲルを形成した時の温度を測定し、ゲル化温度とした。また、試験管を一定温度（20、30 及び 40℃）の恒温槽に垂直に入れ、ゲルを形成した時の時間を測定し、ゲル化時間とした。

### 2-6 皮膚水分量の測定

実験には、体重約 290g の Wistar 系雄性ラットを用いた。実験前日にペントバルビタール麻酔下、電気バリカン及び電気カミソリを用いて腹部を徐毛した。実験当日、ウレタン麻酔後背位固定し、1.5% w/w GXG-TG あるいは 25% w/w PLF-127 のゾル 0.5g を直径 2.12cm の面積に塗布した。2 時間後ゲルを取り除き、肌水分計（DM-R1-A、松下電器）により皮膚水分量を測定した。

## 3. 結果及び考察

### 3-1 液状化粧品としてのゾルの調製

ゾルの流動性は、化粧品適用時の使用性や展延性あるいは皮膚浸透性と関連して重要となる。塗りやすく細かいしわにも入り込むことの可能なゾル粘性を示し、皮膚で化粧品素材として十分な強度を有するゲルを形成するための最適処方を検討した。その結果、プルロニック（PLF-127）は 25% w/w 以上で、キシログルカン（GXG-TG）は 1.5% w/w 以上で、低温（> 5-7℃）ではゾルであるが体温では良好なゲルを形成することが判明した。

Fig. 2 は、pH 7.4 リン酸緩衝液を用いて調製した 25% w/w PLF-127 と 1.5% w/w GXG-TG の 5℃におけるゾル

粘性をE型粘度計により測定した結果である。キシログルカンのゾルは、プルロニックより大きな粘性を示した。またプルロニックはニュートン流動を示したのに対し、キシログルカンの粘性はずり速度の増加に伴い粘度は減少する非ニュートン性の流動を示した。

### 3-2 ゲル強度

Fig. 3は、レオメーターにより測定した37℃でのゲル破壊曲線を示したものである。この曲線においては、ゲル強度が大きいほどゲルは固く、また応力の傾きが小さいほど変形しやすいことを示す。ゲル強度が小で応力の傾きが大きければ、もろいゲルであることになる。キシログルカンではstrain（ひずみ、変形）が約0.6に破断点をもち、これ以降でstress（応力、ずり）は急激に減少した。このことから、キシログルカンはゼラチンのような弾力と寒天のようなもろさを併せ持っていることが判った。一方、プ

ルロニックはキシログルカンと異なる曲線流動を示した。これは、両者のゲル構造の違いによるものと考えられる。すなわち、ポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンのブロック重合体であるPLF-127では、温度が上昇による球状ミセルの疎水の会合が生じるためにゲル化が起こる。一方GXG-TGのゲル化は、直鎖状糖類の架橋形成によりゲル化するものと推察される。

### 3-3 化粧品素材としてのゾル-ゲル転移の評価

PLF-127及びGXG-TGを液体（ゾル）として皮膚に適用した時のゲル化の転移温度及び転移時間を測定し、本ゲル化反応の定量的解析を行った。また、ゾル-ゲル転移機構についても考察を加えた。

20%、25%及び30% w/wのPLF-127ゾル（5℃、20 ml）を37℃に放置し、ゲルを形成する温度及び時間を測定した時の結果を、Fig. 4（A）に示す。プルロニック濃度が

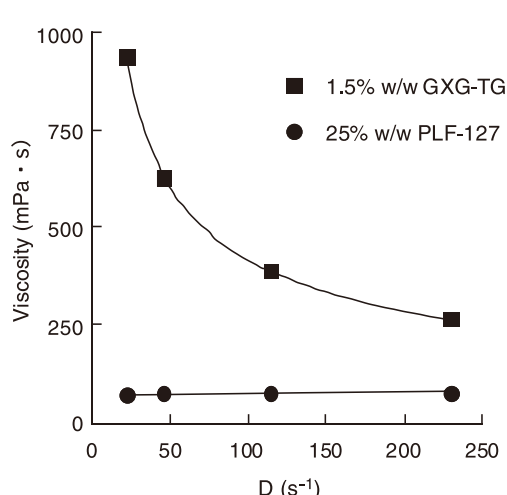


Fig.2 Viscosity of Sols of 1.5% w/w Xyloglucan and 25% w/w Pluronic F-127 in pH7.4 Phosphate Buffer at 5°C

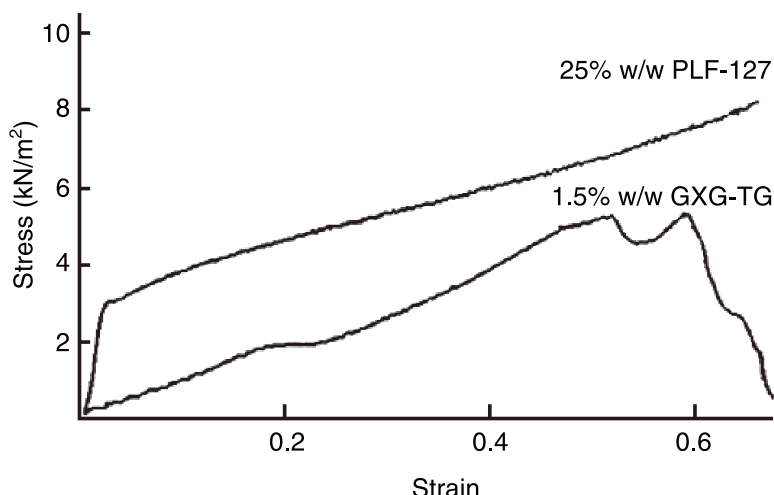


Fig.3 Rheological Properties of 1.5% w/w Xyloglucan and 25% w/w Pluronic F-127 in pH7.4 Phosphate Buffer at 37°C

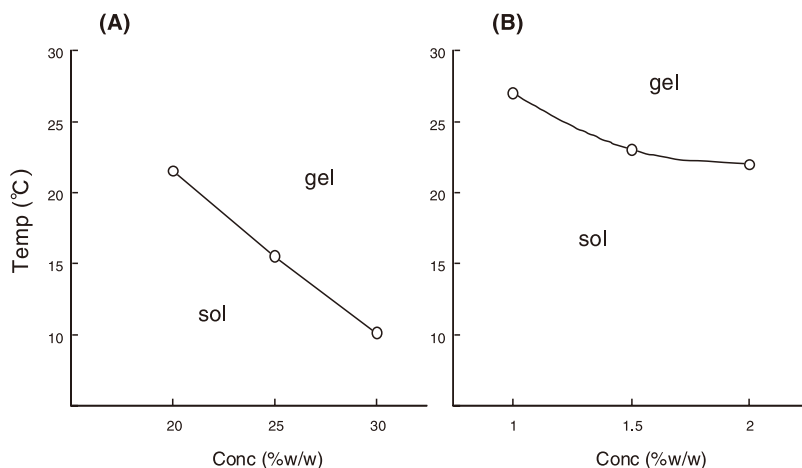


Fig.4 Sol-gel Transition Temperatures as a Function of PLF-127 (A) and GXG-TG (B) Concentration

高くなると、PLF-127 の熱容量が一定であることを反映してほぼ直線的に減少することが認められた。この結果から、25% w/w PLF-127 ゼルのゲル化温度は約 15.5℃であることが判った。また、この時のゲル化時間は約 1.7 分だった。

プルロニックは 2 個の親水性ポリオキシエチレン鎖 (POE) の間に疎水性ポリオキシプロピレン鎖 (POP) が位置する構造から成り、POE/POP/POE トリブロック重合体のミセルの充填により形成される立方体ゲルである<sup>12)</sup>。低温では水素結合により溶解しているが、温度が上昇すると疎水基近傍の水分子 (構造水) がはじきだされ、POP 同志の疎水的会合が生じるためにゲル化が起こるものと考えられる<sup>13)</sup>。従って、プルロニックの濃度が高い程、また疎水性の大きい程この会合が生じやすく、ゲル化が起こりやすいものと推察される。

1、1.5 及び 2% w/w GXG-TG ゼルのゾル-ゲル転移挙動を検討し、得られたゲル化温度を Fig. 4 (B) に示した。プルロニックと同様に、GXG-TG 濃度が高くなるに従いゲル化温度がほぼ直線的に減少することが認められた。この結果から、1.5% w/w の GXG-TG は約 23℃でゲル化することを示している。また、1.5% GXG-TG のゲル化時間は 30℃で約 3.4 分、40℃で約 1.8 分だった。

GXG-TG のゾル-ゲル転移機構についてはまだ明らかにされていないが、メチルセルロースのゲル化機構とほぼ同じであると考えられる。メチルセルロースにおいては、温度の上昇によってメチル基置換度の高いグルコース間の疎水的相互作用が強くなり、疎水性グルコースの多い領域が会合したフリンジドミセルを形成し、これがさらに架橋を形成してゲル化が起こることが示唆されている<sup>14, 15)</sup>。これらの結果から、GXG-TG の濃度が高い程また疎水性の大きい程、この架橋形成が生じ易く、ゲル化が起こりやすいものと推察される。

### 3-4 皮膚保湿効果

PLF-127 及び GXG-TG は低温 (5℃) では液体でゾル状態であるが、室温 (25℃) や体温 (37℃) ではゲルを形成する性質 (熱応答性ゲル化) がある (Fig. 5)。プルロニック及びキシログルカンの皮膚保湿効果を、ゾルをラット腹部に塗布し、肌水分計により皮膚水分量を測定することにより評価した。肌水分計で測定した 2 時間後の水分量は、1.5% w/w GXG-TG で約 36% ( $35.8 \pm 3.7$ , mean  $\pm$  S.E.,  $n=3$ ) だったのに対し、25% w/w PLF-127 では約 30% ( $29.6 \pm 1.7$ , mean  $\pm$  S.E.,  $n=3$ ) だった。25% w/w PLF-127 ゼルを皮膚に塗布すると、皮膚表面で薄い、フィルム状ゲルを迅速に形成した。1.5% w/w GXG-TG ゼルの水分含量は 98.5%と高く、そのゲル形成はプルロニックより遅い。キシログルカンでは水分の蒸発によるゲルの水分含量の変化が皮膚の水和に与える影響はプルロニックより少なく、皮膚保湿効果が大きいことが予想された。

## 4. 総括

化粧品には固形 (パウダー、スティック) から半固形 (クリーム、ジェル) の他に液状 (化粧水、ローション) まで様々なタイプがあり、多くの物質が基剤として使用されている。ポリオキシエチレン (POE) とポリオキシプロピレン (POP) のブロック共重合体であるポロキサマーは、プルロニック (PLF-127) として市販されている非イオン性界面活性剤である。GXG-TG は、豆科植物タマリンドの種子中に存在するキシログルカン多糖の側鎖ガラクトースを  $\beta$ -ガラクトシダーゼによって約 44%除去した物質である。これらは何れも低温ではゾルであるが、体温ではゲルを形成する熱応答性ゲル化の特性がある。著者らは先に、PLF-127 及び GXG-TG の熱応答性ゲル化の特性にもとづ

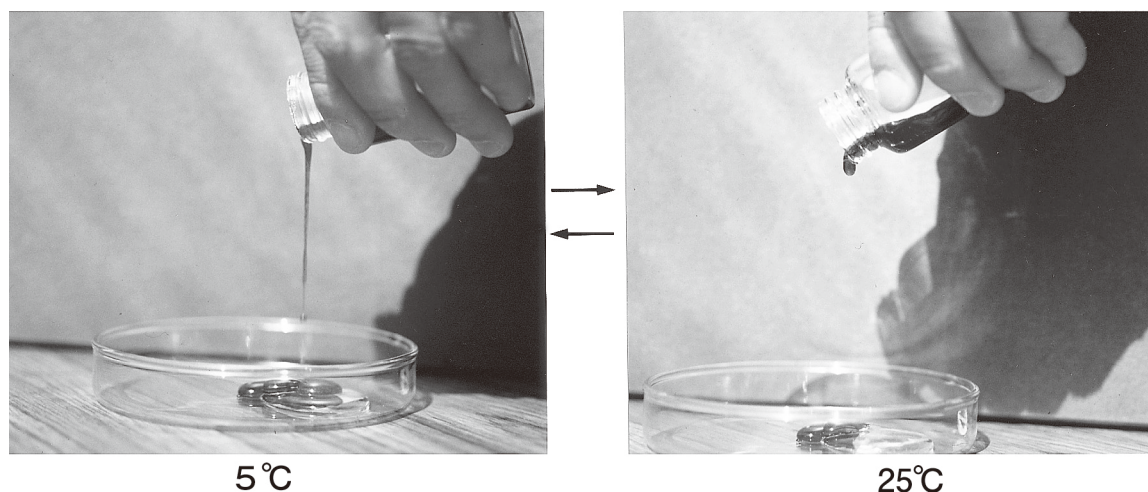


Fig.5 The Sol (5℃) or Gel (25℃) State of 25% w/w Pluronic F-127

いて、投与時は液体（ゾル）であるが体内ではゲルとなる新しい投与技術を開発した。本研究では、この熱応答性ゲル化の新技术を化粧品素材に応用し、「皮膚で固まる（ゲルとなる）新タイプの液体化粧品」を開発する。そのためにまず、化粧品素材としての最適処方を検討し、基礎的物性及びゾル-ゲル転移について検討した。その結果、低温で保存したゾルを液状化粧品として皮膚に適用すると体温ではゲル化するために、化粧品成分の浸透性や皮膚の保湿力を制御できることが期待された。さらに、皮膚やしわの細かな凹凸や深部にまでゾルが侵入できる。また PLF-127 及び GXG-TG は水溶性であるため、使用後は水洗で簡単に除去することができる。特にキシログルカンは天然多糖であり、低濃度（1-3 % w/w）で熱応答性ゲル化を生じるため毒性がなく、ヒトにやさしい化粧品素材（ヒューマンフレンドリーコスメ）として、また付加価値の高い新タイプの化粧品素材として今後の発展が大いに期待される。

## 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及び共同研究者に深謝いたします。

## (参考文献)

- 1) Schmolka, I.R. : Artificial skin I. Preparation and properties of Pluronic F-127 gels for treatment of burns, *J. Biomed. Mater. Res.*, 6, 571-582, 1972.
- 2) Nalbandian, R.M. , Henry, R.L., Wilks, H.S. : Artificial skin II. Pluronic F-127 silver nitrate or silver lactate gel in the treatment of thermal burns, *J. Biomed. Mater. Res.*, 6, 583-590, 1972.
- 3) Chen-Chow, P.-C. , Frank, S.G. : In vitro release of lidocaine from Pluronic F-127 gels, *Int. J. Pharm.*, 8, 89-99, 1981.
- 4) Henry, R.L., Schmolka I.R. Burn wound coverings and the use of poloxamer preparations, *Cri. Rev. Biocompat.*, 5, 207-220, 1989.
- 5) Shirakawa, M., Yamatoya, K., Nishinari, K.: Tailoring of xyloglucan properties using an enzyme, *Food Hydrocolloids*, 12, 25-28, 1998.
- 6) Miyazaki, S., Yokouchi, C., Nakamura, T., Hashiguchi, N., Hou, W.M., Takada, M.: Pluronic F127 gels as a novel vehicle for rectal administration of indomethacin, *Chem. Pharm. Bull.* , 34, 1801-1808, 1986 .
- 7) Miyazaki, S., Suisha, F., Kawasaki, N., Shirakawa, M., Yamatoya, K., Attwood, D., Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery, *J. Control. Release*, 56, 75-83, 1998.
- 8) Miyazaki, S., Tobiyama, T., Takada, M., Attwood, D.: Percutaneous absorption of indomethacin from Pluronic F127 gels in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 47, 455-457, 1995.
- 9) Suisha, F., Miyazaki, S., Kawasaki, N., Shirakawa, M., Yamatoya, K., Sasaki, M., Attwood, D. : Thermally gelling tamarind-derived Xyloglucan gels as sustained release vehicle for intraperitoneal administration of mitomycin C . *Int. J. Pharm.*, 172, 27-32 , 1998.
- 10) Miyazaki, S., Kawasaki, N., Endo, K., Attwood, D.: Oral sustained delivery of theophylline from thermally reversible xyloglucan gels, *J. Pharm. Pharmacol.*, 53, 1185-1191, 2001.
- 11) Miyazaki, S., Suzuki, S., Kawasaki, N., Attwood, D.: In situ gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride, *Int. J. Pharm.*, 229, 29-36, 2001.
- 12) Attwood, D., Collett, J.H., Tait, C.J. : The micellar properties of the poly (oxyethylene) -poly (oxypropylene) copolymer Pluronic F-127 in water and electrolyte solution, *Int. J. Pharm.*, 26, 25-33 , 1985.
- 13) Booth, C., Attwood, D., Effects of block architecture and composition on the association properties of poly (oxyalkylene) copolymers in aqueous solution. *Macromol. Rapid Commun.* , 21, 501 (2000)
- 14) Haque A., Jones K., Richardson R.K., Morris E.R., Thermal gelation of methylcellulose: mechanism and structure, *Gums and Stabilizers for the Food Industry*, 7, 291-300, 1988.
- 15) Yuguchi, Y., Mimura, M., Urakawa, H., Kajiwar, K., Shirakawa, M., Yamatoya, K., Kitamura, S., Cross-linking structure formation of some polysaccharides in aqueous solution. In *Proceedings of the international workshop on green polymers -Re-evaluation of natural polymers.* Adishesha, H. T., Sudirjo, S. T., Panggabean, P. R., Arda, J. and Soetrono, C. W., (Eds.) Indonesian Polymer Association, Indonesia, 306-329 , 1997.

# 超臨界二酸化炭素を用いたナノポーラスシリコーンゲルの合成とその構造特性

京都大学化学研究所高分子機能化学研究領域

妹尾 政宣

Three-dimensional crosslinked silicone gels were synthesized using Poly (dimethylsiloxane) (PDMS) macromonomers with the polymeric functional groups in both ends as crosslinked agents. The distance between crosslink points in the gel was increased with an increase of molecular weights of PDMS. We confirmed that the degree of swelling in toluene was increased with an increase in the distance between crosslink points of gels. Silicon gels were treated by supercritical carbon dioxide ( $^{\text{sc}}\text{CO}_2$ ) at  $40^\circ\text{C}$ , 11MPa for 2 hours. We observed that the degree of swelling of treated gels was little different from the untreated one, though unreacting monomers in gels were efficiently extracted by  $^{\text{sc}}\text{CO}_2$ . This is a first preliminary result on the treatment of the silicone gel by  $^{\text{sc}}\text{CO}_2$ , which shows the unique behavior unlike foaming technique. Additionally, a silicone gel was also obtained from a homogeneous solution consisting of s-PS and PDMS in dichloroethane (DCE) when it was cooled at the rate of  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  from  $155^\circ\text{C}$  to room temperature. After drying gelled samples at  $70^\circ\text{C}$  for 24 hours, a novel polymer blend type of the physical gel consisting of s-PS and PDMS was obtained. DMA measurements revealed that the novel type of a physical gel had a strong mechanical property and a high thermal stability. The crystallite of s-PS not only plays a role of the network junction in the physical gel but also prevents the macroscopic phase separation between s-PS and PDMS.

## 1. 緒言

シリコーンゲルはスキンケアやヘアケアなどの化粧品における基質材料として最も幅広く用いられている<sup>1)</sup>。通常、シリコーンゲルと各種用途に用いるための化合物を有機溶媒中で機械的に分散させることにより、新油性のシリコーン含有製品が得られる<sup>2)</sup>。シリコーンゲルはそれ自身が親油性化合物であるため、皮膚や角質層に浸透しやすい性質を有している。しかしながら、耐溶媒性や耐酸化性に劣るため、各種用途に用いるための化合物との配合ブレンドが不安定になり、均一な分散を得ることは難しく、シリコーンゲルを用いた配合用途は限られるのが現状である。また、ポリスチレンなどの炭化水素系化粧品原料とは相溶性が悪く配合技術の更なる進歩が待たれている。

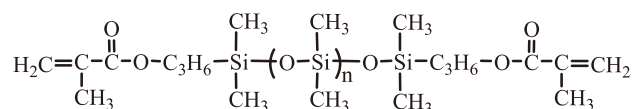
そこで本研究では超臨界二酸化炭素 ( $^{\text{sc}}\text{CO}_2$ ) を溶媒として用いてシリコーンゲルを合成することにより、有害な有機溶媒を使用せず、かつ、ナノスケールの多孔を有する新規な機能性ゲルを創製することを目的とする。また、得られるナノポーラスシリコーンゲル中の多孔構造はゲスト分子を包接出来るため、更なる反応場として利用できることが期待される。このような高性能ゲルはナノメートルサイズの多孔が均一に分散しているので滑らかでしっとり

した肌触りだけでなく、耐薬品性、薬品混和性などが著しく上昇することが期待され、次世代のコスメトロジーを支えていく基盤技術になり得る。さらに、ナノポーラスシリコーンゲルの合成と同時に  $^{\text{sc}}\text{CO}_2$  で低温抽出された天然香料などをワンポットで孔の中に均一に分散できれば、配合プロセスの面においても革新的な影響が期待される。また、ポリジメチルシロキサン (PDMS) マトリックス中でシンジオタクト立体規則性ポリスチレン (s-PS) の包接結晶を架橋点として分散させた新しいタイプのナノポーラスゲルの合成も試みた。本プロセスは均一溶液からの s-PS の結晶化によるシリコーンポリマーとのブレンド物理ゲル形成の新しい試みであり、得られた物理ゲルは通常では見られない特異な粘弾性挙動を示したので報告する。

## 2. 実験

### 2-1 シリコーンゲルの合成

本目的のため、まず分子量の異なる 3 種の両末端メタクリレート型ポリジメチルシロキサンテレケリックマクロモノマー (MA-PDMS-MA-1450, 6100, 10500) を用いて、2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) を開始剤として  $60^\circ\text{C}$  にて真空中で架橋反応を行うことにより、架橋密度の異なるシリコーンゲルを合成した (スキーム 1)。MA-PDMS-MA-1450, 6100, 10500 はチッソ(株)より提供して頂い



スキーム 1 MA-PDMS-MA マクロモノマー



Synthesis and characterization of nanoporous silicone gel using supercritical carbon dioxide

Kazunobu Senoo

Kyoto University, Institute for Chemical Research

たものを用いた。AIBN はメタノールからの再結晶法により精製したものを用いた<sup>3-5)</sup>。

## 2-2 超臨界二酸化炭素 ( $^{sc}CO_2$ ) を用いた膨潤実験

3 種類の架橋密度の異なるシリコーンゲルを二酸化炭素溶媒中に封入し、圧力および温度を増加させることにより、40℃、11MPa の超臨界状態の条件に設定し 2 時間制置した。その後、室温まで戻し、注意深く二酸化炭素ガスを開放した後、重量を測定した。

## 2-3 膨潤度測定試験

真空中で得られた 3 種のシリコーンゲルおよび超臨界二酸化炭素にて処理を施した 3 種のシリコーンゲルについて、和光純薬工業の脱水トルエン中に 24 時間浸漬した後、その前後の質量を測定した。それぞれの膨潤度は (1) 式により求めた。ここで、値が 100% とは、膨潤前後で変化しないことを意味する。

$$\text{質量膨潤度} = (\text{膨潤後質量} / \text{膨潤前質量}) \times 100 \quad \cdots (1)$$

## 2-4 s-PS と PDMS からなるナノポーラスゲルの合成

s-PS は  $M_w = 1.12 \times 10^6$ ,  $M_w/M_n = 2.41$  のものをアモルファスに調製して用いた。揮発性溶媒として 1, 2-ジクロロエタン (DCE) を、不揮発性物質として M. W. 410 の PDMS (Alfa Aesar, Johnson Matthey 社製) を用いた。s-PS を種々の重量比の DCE と PDMS とともに耐圧容器に封入し、窒素置換したのち 155℃ で 1 時間保持することにより均一な溶液とした。その後、室温になるまで放冷し、48 時間真空乾燥した。形成したゲル状化合物を、70℃ で 72 時間真空乾燥させたものについて、-200 ~ 300℃、周波数 1 Hz にて動的粘弾性測定試験 (DMA) を行った。また、ゲル状化合物について、ドライアイス / メタノール浴中で 24 時間凍結乾燥させたものを、アセトン・メタノール抽出により粉末状にした後、室温で WAXD 測定を行い、s-PS の結晶構造を観察した。

# 3. 結果と考察

## 3-1 シリコーンゲルの合成

表 1 に用いた 3 種の両末端メタクリレート型ポリジメチルシロキサンテレケリックマクロモノマー (MA-PDMS-MA-1450, 6100, 10500) のゲル浸透クロマトグラフィーに

表 1 ポリジメチルシロキサンテレケリックマクロモノマー

|                  | $M_n$ | $M_w/M_n$ | 粘度(cSt) | 比重<br>(25/4℃) |
|------------------|-------|-----------|---------|---------------|
| MA-PDMS-MA-1450  | 1450  | 1.33      | 15.4    | 0.976         |
| MA-PDMS-MA-6100  | 6100  | 1.13      | 67.9    | 0.976         |
| MA-PDMS-MA-10500 | 10500 | 1.08      | 146     | 0.976         |

よる分子量測定およびキャラクタリゼーションの結果を示す。最も分子量の小さいマクロモノマーは微黄色の透明液体であり、他のマクロモノマーは無色透明液体であった。図 1 に合成されたシリコーンゲルの写真を示す。ほぼ 2 時間で流動性を失い、完全にゲル化したことが観察された。いずれの分子量のマクロモノマーを用いた場合にも透明なゲルが形成されたが、多くの気泡が確認された。これは真空中で合成したことにより、気泡が発生し、ゲル化点で流動性を失ったため気泡が固定化されたことに起因する。また、定性的ではあるが、分子量の小さいものから得られたゲルは比較的硬く、分子量の大きなものから得られたゲルは軟らかいものとなった。このことから、分子量の増加に依存して架橋点間距離が増加したため、架橋密度が減少することが示唆された<sup>6-9)</sup>。

## 3-2 $^{sc}CO_2$ を用いた膨潤実験

図 2 にシリコーンゲルの  $^{sc}CO_2$  を用いた膨潤実験における測定条件を示す。3 種類のゲルはいずれも同様の温度および圧力条件 (40℃、11MPa) で処理を行った。二酸化炭

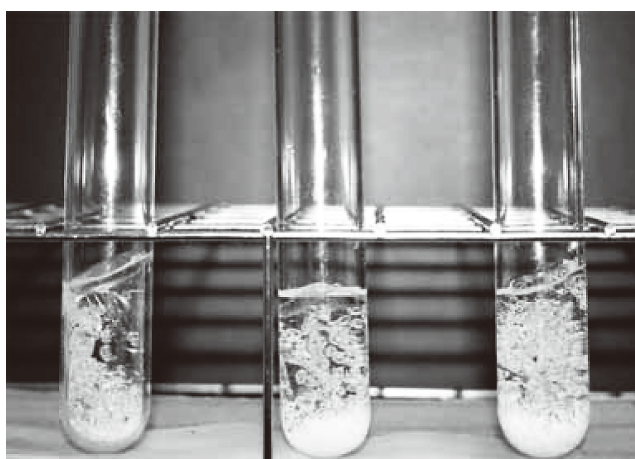


図 1 架橋点間分子量の異なるシリコーンゲル a) MA-PDMS-MA-1450, b) MA-PDMS-MA-6100, and c) MA-PDMS-MA-10500

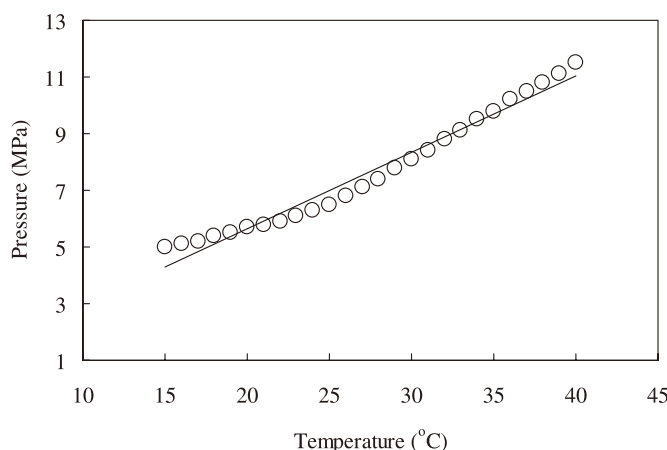


図 2  $^{sc}CO_2$  を用いた膨潤実験における圧力と温度の関係

素の臨界温度および圧力がおよそ 31.1℃, 7.38MPa なので超臨界状態中での処理であることが分かる。また、図より温度が増加するにつれて、圧力がほぼ直線的に増加することから、再現性よく実験がなされたことが分かった。

MA-PDMS-MA-1450, 6100 および 10500 から得られたゲルは超臨界処理前後において、それぞれ 0.9, 2.5, および 4.6% の質量の減少が確認された。このことから  $^{sc}\text{CO}_2$  により未反応のマクロモノマーが生成ゲル中から効率よく抽出されたことがわかった。ポリジメチルシロキサン鎖は  $^{sc}\text{CO}_2$  に溶解することが知られている<sup>10-12)</sup>。そのため、ゲルは  $^{sc}\text{CO}_2$  により膨潤した後、架橋反応に寄与していない PDMS 鎖が抽出されたものと考えられる。

### 3-3 膨潤度測定試験

図3に架橋点間分子量の異なる3種のシリコーンゲルおよびその  $^{sc}\text{CO}_2$  処理後のゲルについての膨潤度測定の結果を示す。いずれのゲルにおいても、トルエンにより著しく膨潤した。また、 $^{sc}\text{CO}_2$  処理前のシリコーンゲルは膨潤により透明になったのに対して、 $^{sc}\text{CO}_2$  で処理したシリコーンゲルは膨潤後も多数の内包が存在した。

図3からいずれの場合においても用いたマクロモノマーの分子量の増加につれて、膨潤度は160%から250%まで直線的に増加したことがわかった。このことから、ゲルの架橋点間距離の増加は膨潤度を増加させることが確かめられた。また、 $^{sc}\text{CO}_2$  による処理前後ではほとんど膨潤度の違いは見られなかった。 $^{sc}\text{CO}_2$  によるポリスチレンやポリプロピレンの発泡化技術<sup>13)</sup>や可塑性効果<sup>14)</sup>は知られているが、シリコーンゲルの  $^{sc}\text{CO}_2$  処理ではこれらに起因する膨潤度の違いは観察されなかった。それにも関わらず重量減少や内包が確認できたことから、シリコーンゲルはいったん  $^{sc}\text{CO}_2$  により膨潤し、ガスの開放により発泡するが、ゲル独特の収縮性より元の構造に戻ったものと考えられる。さらに、架橋点間距離が最も小さいゲルサンプルの膨潤度が  $^{sc}\text{CO}_2$  により処理した方が小さいことは、収縮性の小さいゲルが未反応モノマーの抽出によりさらにリジットになったためであると考えられる。

### 3-4 s-PS と PDMS からなるナノポーラスゲルの合成

s-PS の  $\delta$  型包接結晶形は、ゲスト化合物として揮発性溶媒 (DCE) および不揮発性溶媒 (1-クロロテトラデカン (CTD)) を用いて膨潤させると、ポリマーリッチ相が DCE を包接し、ポリマープア相は CTD のような巨大分子が取り込まれた構造になる。さらに揮発性溶媒を揮発させると、s-PS と CTD からなるゲル状化合物が形成され、強い力学的性質を有することが報告されている<sup>15-16)</sup>。そこで、s-PS を DCE と不揮発性物質である PDMS とともに膨潤させた後、DCE を揮発させることにより s-PS

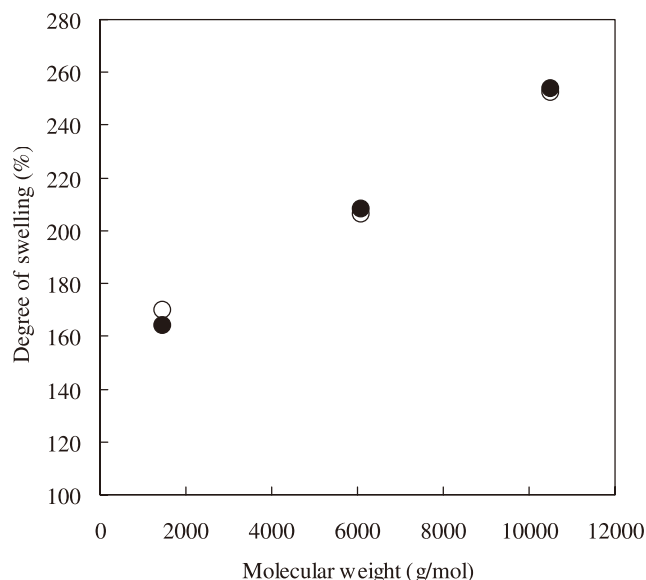


図3 ゲルの膨潤度と架橋点間分子量の関係 (○): 未処理のシリコーンゲル, (●):  $^{sc}\text{CO}_2$  処理のシリコーンゲル

と PDMS からなる新規なゲルを調製し、WAXD および DMA を用いて、その構造と力学的性質との関係を調べた。その結果、DCE と PDMS の組成比が 9:1 について均一な溶液からの放冷により、白色のゲル状化合物の形成が確認できた。s-PS と PDMS のみでは、PDMS の量を変えてもゲルは形成せず、二相に分離した。s-PS と DCE のみではゲルは形成されるが、室温で真空乾燥させることにより粉末状の固体となった<sup>17)</sup>。

ゲルおよび二相分離した s-PS について WAXD 測定を行うと、ゲルが形成するサンプルは s-PS の  $\delta$  型包接結晶形に起因する回折ピークが見られるのに対して、二相分離する s-PS はより安定な  $\beta$  型結晶形の回折ピークが確認できる。このことから、放冷の際に s-PS が DCE を取り込んだ  $\delta$  型結晶形で結晶化することにより、ゲルが形成されることが示唆された<sup>18)</sup>。図4に70℃で72時間真空乾燥させ DCE を取り除いた s-PS と PDMS からなるゲルについての DMA 測定結果を示す。貯蔵弾性率  $G'$  が損失弾性率  $G''$  より常に大きく、-130℃から250℃においてゴム状の平坦領域が確認されたことから、s-PS と PDMS からなるゲルが強い力学的性質を持つ物理ゲルであることがわかった。

s-PS/DCE/PDMS からなるゲルについて、70℃での72時間の乾燥は s-PS 結晶構造の  $\delta$  型から  $\gamma$  型への転移を伴った s-PS/PDMS ゲルを与える。そこで凍結乾燥法を用いて s-PS の結晶構造が  $\delta$  型から結晶内にキャビティーを有する  $\delta e$  型へと変化することを利用して、s-PS と PDMS からなるポーラスゲルの調製が成された<sup>19)</sup>。また、 $^{sc}\text{CO}_2$  を用いると s-PS の  $\delta$  型包接結晶構造から完全に DCE を取り除く

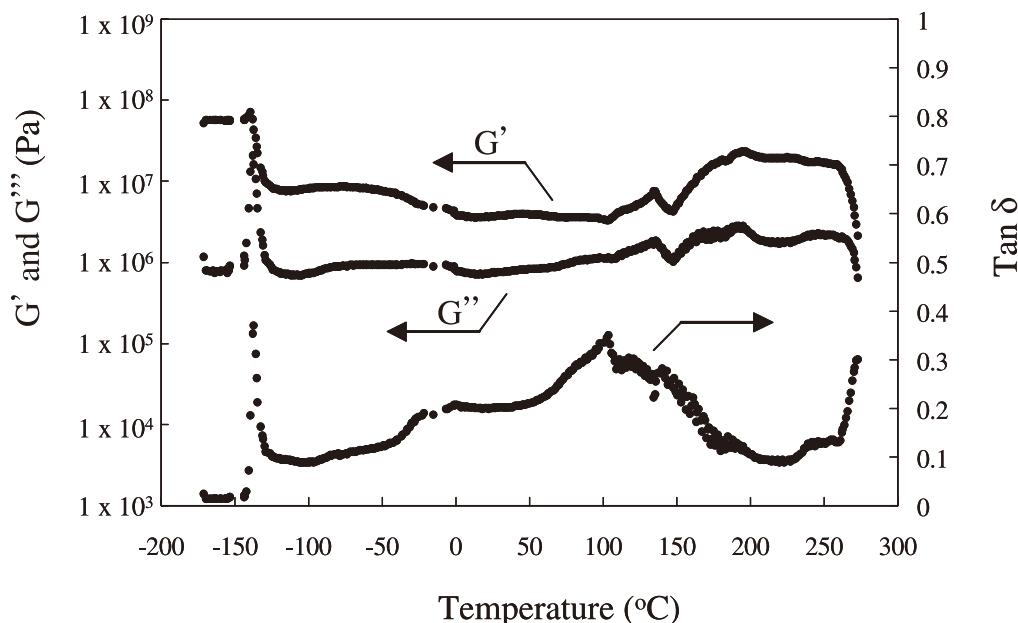


図4 s-PS/PDMS のポリマーブレンドからなる物理ゲルの貯蔵弾性率  $G'$ 、損失弾性率  $G''$  および  $\tan\delta$  の温度依存性

ことができ、二層に分離することなく s-PS/PDMS からなるゲルが形成することが期待される<sup>20)</sup>。

#### 4. 総括

分子量の異なる両末端に重合性官能基を有する PDMS マクロモノマーを用いて重合を行うと架橋点間距離が異なるシリコーンゲルが合成できることを示した。また架橋点間距離の増加に伴い膨潤度が直線的に増加することを確認した。さらに $^{\text{sc}}\text{CO}_2$ で処理を行うと未反応モノマーを効率よく抽出するが、膨潤度は処理により大きく変化しないことがわかった。これはエンジニアリングプラスチックを用いた発泡化とは異なる挙動であり、シリコーンゲルのような収縮性の大きいソフトマテリアルに特有の結果である。また、PDMS マトリックス中で s-PS の包接結晶を架橋点として分散させた新しいタイプのナノポーラスゲルの合成も行った。本プロセスは均一溶液からの s-PS の結晶化によるシリコーンポリマーとのブレンド物理ゲル形成の新しい試みであり、得られた物理ゲルは通常では見られない特異な粘弾性挙動を示した。さらに凍結乾燥法により s-PS の包接結晶から効率よく DCE 溶媒のみを取り除くことが出来る。 $^{\text{sc}}\text{CO}_2$ による包接結晶からの溶媒抽出法も報告されており、今後さらに改良が期待される。

#### 謝辞

3種の両末端メタクリレート型ポリジメチルシロキサンテレケリックマクロモノマー (MA-PDMS-MA-1600, 6100, 10300) を提供して頂いたチッソ(株)に感謝致します。また、

s-PS を提供して頂いた出光石油化学(株)に感謝致します。最後に、本研究に対して助成頂きました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝致します。

#### (参考文献)

- 1) 第4章 化粧品工業への応用, 東芝シリコーン編, : 新・シリコーンとその応用, 1994, 249-256 頁.
- 2) 山下雄也, : マクロモノマーの化学と工業, アイピーシー出版, 1988, 225-272 頁
- 3) Hebb AK, Senoo K, Cooper AI: Synthesis of porous cross-linked polymer monoliths using 1,1,1,2-tetrafluoroethane (R134a) as the porogen, *Composites Science & Technology*, 63, 2379-2387, 2003.
- 4) Hebb AK, Senoo K, Bhat R, Cooper AI: Structural Control in Porous Cross-Linked Poly(methacrylate) Monoliths Using Supercritical Carbon Dioxide as a Pressure-Adjustable Porogenic Solvent, *Chem. Materials*, 15, 2061-2069, 2003.
- 5) Wood CD, Senoo K, Martin C, Cuellar J, Cooper AI: Polymer Synthesis Using Hydrofluorocarbon Solvents. 1. Synthesis of Cross-Linked Polymers by Dispersion Polymerization in 1,1,1,2-Tetrafluoroethane, *Macromolecules*, 35, 6743-6746, 2002.
- 6) Urayama K, Kawamura T, Kohjiya S: Elastic modulus and equilibrium swelling of networks crosslinked by end-linking oligodimethylsiloxane at solution state, *J. Chemical Phys.*, 105, 4833-4840, 1996.
- 7) Urayama K, Kawamura T, Hirata Y, Kohjiya S: SAXS study on poly(dimethylsiloxane) networks with

- controlled distributions of chain lengths between crosslinks, *Polymer*, 39, 3827–3833, 1998.
- 8) Kawamura T, Urayama K, Kohjiya S: Multiaxial deformations of end-linked poly(dimethylsiloxane) networks. 1. Phenomenological approach to strain energy density function, *Macromolecules*, 34, 8252–8260, 2001.
  - 9) Urayama K, Kawamura T, Kohjiya S: Multiaxial deformations of end-linked poly(dimethylsiloxane) networks. 2. Experimental tests of molecular entanglement models of rubber elasticity, *Macromolecules*, 34, 8261–8269, 2001.
  - 10) Giles MR, Hay JN, Howdle SM, Winder RJ: Macromonomer surfactants for the polymerisation of methyl methacrylate in supercritical CO<sub>2</sub>, *Polymer*, 41, 6715–6721, 2000.
  - 11) Desimone JM, Guan Z, Elsbernd CS: Synthesis of Fluoropolymers in supercritical carbon-dioxide, *Science*, 257, 945–947, 1992.
  - 12) Desimone JM, Maury EE, Menciloglu YZ, McClain JB, Romack TJ, Combes JR: Dispersion polymerization in supercritical carbon-dioxide, *Science*, 265, 356–359, 1994.
  - 13) Arora KA, Lesser AJ, McCarthy TJ: Preparation and Characterization of Microcellular Polystyrene Foams Processed in Supercritical Carbon Dioxide, *Macromolecules*, 31, 4614–4620, 1998.
  - 14) Goel SK, Beckman EJ: Generation of microcellular polymeric foams using supercritical carbon-dioxide. 1. Effect of pressure and temperature on nucleation, *Polym. Eng. Sci.*, 34, 1137–1147, 1994.
  - 15) Kobayashi, M, Nakaoki, T, Ishihara, N: Molecular conformation in glasses and gels of syndiotactic and isotactic polystyrenes, *Macromolecules*, 23, 78–83, 1990.
  - 16) Daniel, C, Alfano D, Guerra G, Musto P: Physical Gelation of Syndiotactic Polystyrene in the Presence of Large Molar Volume Solvents Induced by Volatile Guests of Clathrate Phases, *Macromolecules*, 36, 1713–1716, 2003.
  - 17) Senoo K, Matsuda S, Kohjiya, S: Preparation of physical gel consisting of syndiotactic polystyrene and poly(ethylene glycol), *Polymer*, 46, 7819, 2005.
  - 18) Senoo K, Matsuda S, Kohjiya S: Physical Gelation of Syndiotactic Polystyrene in the Presence of Poly(ethylene oxide), *e-Journal of Soft Material*, in press.
  - 19) Senoo K, Matsuda S, Kohjiya S: Nanoporous Physical Gel Prepared from Syndiotactic Polystyrene in the Presence of Poly(ethylene oxide) *Proceedings of IMTCE2004 in Malaysia*, 228–236, 2004.
  - 20) Reverchon E, Guerra G, Venditto V: Regeneration of nanoporous crystalline syndiotactic polystyrene by supercritical CO<sub>2</sub>, *J. Appl. Polym. Sci.*, 74, 2077–2082, 1999.

# 連結基を持たない新規ビスアンモニウム塩型 Gemini 界面活性剤の合成と物性

京都工芸繊維大学工芸学部物質工学科界面材料科学研究室

老 田 達 生、真 田 祐 介

The novel bis-ammonium Gemini surfactants without connecting chain which have a  $C_{2v}$  symmetry ( $C_2$  Gemini) were prepared from malonic acid derivatives. It was found that the  $C_2$  Gemini have superior surface activities, such as the remarkably small critical micelle concentration (cmc) and the specially low surface tension at cmc ( $\gamma_{cmc}$ ) of  $C_2$  Gemini, similar to that of other Geminis. Also, it was found that the intramolecular hydrophobic interaction would be very important for the excellent properties of Gemini surfactant.

## 1. 緒言

一般的な界面活性剤 (conventional type) は、1 本の親水基と一つ疎水基を共有結合でつないだ 1 鎖 1 親水基型 (1+1 type) の構造を有する。界面活性剤はその化学構造ゆえ、界面に吸着され、その界面張力を低下する。水溶性の界面活性剤については、水表面に吸着して表面張力を下げる。また水溶液中では、界面活性剤分子が会合し、種々の分子集合体を形成する。一定の濃度以上の水溶液になると、界面活性剤の水表面への吸着が飽和し、水溶液中では大きな集合体、すなわちミセルを形成するとされている (Fig. 1-1)。このミセルは内部に疎水場を有し、この疎水場に疎水性化合物を取り込むことによって可溶化などが起こる。すなわち界面活性剤の主な機能をミセルが担う。

すなわち界面活性剤は低濃度では単分子状に溶解する。また少し濃度が高くなると小さい集合体を形成するとされている。そしてある濃度 (表面吸着が飽和する濃度) で初めてミセルが形成される。その時の濃度を臨界ミセル濃度 (critical micelle concentration : cmc) と呼ぶ。ミセルが界面活性剤の主な機能を担うので、このミセルが形成されていない cmc 以下の濃度で界面活性剤を使用することはほとんどない。界面活性剤は多くの商品に含まれ、日常的に我々が使用しているが、使用後回収されることなく環境に排出される。その為、環境への負荷は大きくなりがちである。昨今の環境意識の高まりから、環境負荷を小さくすることが求められており、界面活性剤の使用量をできるだけ少なくする必要がある。それゆえ、この cmc を小さくすることで、界面活性剤の使用量を少なくし、環境に対す

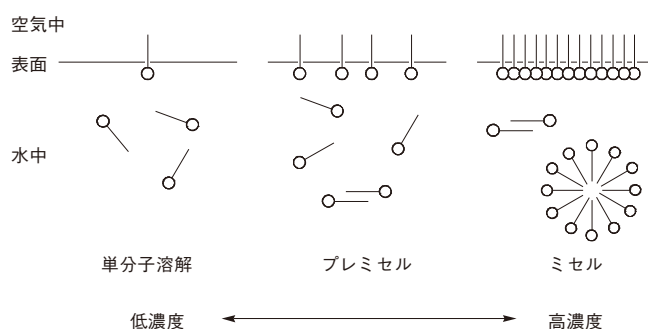


Fig. 1-1 界面活性剤の水溶液

る負荷を軽減することが出来る。そこで cmc ができるだけ小さい界面活性剤を合成することが望まれる。

水表面について見れば、界面活性剤が吸着され、活性剤濃度が高くなるに従い吸着量が増加する。それにともない表面張力も低下する。cmc で吸着量は飽和するので、表面張力 ( $\gamma$ ) はそれ以上低下せず一定となる。この一定になった時の表面張力を  $\gamma_{cmc}$  と呼ぶ。この  $\gamma_{cmc}$  は表面張力低下能と呼ぶこともでき、小さい界面活性剤の方が優れていると言える。

界面活性剤は一般的な化合物と同じように、温度が上昇するにつれて溶解度が徐々に大きくなる。温度が上昇し、溶解度が cmc に達するとミセルを形成する。その後、ミセルに界面活性剤自身が可溶化される (自己可溶化) ため、溶解度が急激に増加する。この現象をクラフト現象といい、このときの温度をクラフト点 (Krafft point : Kp) と呼ぶ。この Kp 以下では、飽和溶解度が cmc に達していない為、界面活性剤の飽和溶液でさえミセルが形成されない。ミセルが界面活性剤の重要な機能を担うので、Kp 以下ではほとんど使用できない。それゆえ、Kp が室温以上の界面活性剤は使用温度が制限されるので、Kp は室温以下が望ましい。

以上の cmc、 $\gamma_{cmc}$ 、Kp が界面活性剤の基本物性と言え、その cmc、 $\gamma_{cmc}$  は小さいほど良く、Kp は低いほど良いと言える。



Synthesis and properties of the novel bis-ammonium Gemini surfactants without connecting chain.

Tatsuo Oida

Department of Chemistry and Material Technology, Kyoto Institute of Technology

界面活性剤の化学構造がこれらの物性に対する影響を示す指標の1つとしてHLB (Hydrophile Lipophile Balance) があり、これは親水性と疎水性のバランスを数値化したものである。HLB が大きいということは親水性が大きいということを示し、cmc、 $\gamma_{cmc}$  は大きく、Kp は低くなる。逆にHLB が小さいということは疎水性が大きいということを示し、cmc、 $\gamma_{cmc}$  が小さく、Kp が高くなる。長鎖アルキル基を短くする、もしくは親水基の親水性を大きくなどしてHLBを大きくすると、Kp は低くなるが、cmc、 $\gamma_{cmc}$  は大きくなりより多くの界面活性剤が必要となり、それでも十分に界面張力を低下しない。一方、長鎖アルキル基を長くするなどしてHLBを小さくすると、cmc、 $\gamma_{cmc}$  は小さくなり、界面活性剤の使用量が少なくなるが、Kp は高くなり、低温では使用できなくなる。その為、cmc、 $\gamma_{cmc}$  と Kp の値のいずれもが小さい界面活性剤が望まれる。1鎖1親水基型 (conventional, 1+1 type) の界面活性剤に対して2鎖2親水基型の Gemini 界面活性剤 (2+2 type) は、1+1 type を連結基 (spacer) によりで共有結合でつないだ双子型の化学構造を持つ新しいタイプの界面活性剤である (Fig. 1-2)。この Gemini は 1+1 type と比べて、親水基と疎水基の割合が同じであるので、HLB がほぼ同じとなり、このことから cmc や  $\gamma_{cmc}$ 、Kp 等が同程度と推定される。しかし、実際には同じHLBを持つ1+1 type と比べて、Gemini は臨界ミセル濃度、cmc が特異的に小さい (1桁~2桁)、 $\gamma_{cmc}$  が小さい、クラフト点が低いなど、基本的な界面物性がいずれも優れている。そのため、使用量が少なく済む、使用できる温度範囲が広いなどの利点がある。このため実用化が期待されており、次世代型界面活性剤として注目されている。しかし、Gemini は、

その化学構造上の特徴である2量体構造のため、合成経路が長くなり、1+1 type に比べ合成が困難である。このことが原因で Gemini の開発例が十分ではなく、応用研究を阻害している。

当研究室では、酒石酸を原料とする酒石酸 Gemini やテトラヒドロフタル酸を原料とする Gemsurf<sup>®</sup> などの種々の Gemini を合成してきた。ビスアンモニウム塩型 Gemini としては、ビスアンモニウム塩型酒石酸 Gemini と長鎖アルキルジメチルアミンと 1, $\omega$ -ジブromoアルカンから簡便に合成できるビスアンモニウム塩型 Gemini を合成している (Fig. 1-3)。そして、主にはその水溶液の表面張力測定より、なぜ Gemini が優れた界面物性を持つか、すなわち界面物性 - 化学構造の相関について検討をしている。

Gemini は前述したように2量体構造を持ち、2本の疎水基、2個の親水基と連結から成っている。この2量対構造が Gemini の優れた界面物性の要因に間違いはないが、詳細は判っていない。しかし、この連結基付近のわずかな構造の違い (例えば dl 体とメソ体) が、界面物性に大きな影響を与えることが判っている。

この連結基には、数個のメチレン鎖やオキシエチレン鎖、芳香環など様々なグループが使われているが、酒石酸 Gemini や Gemsurf<sup>®</sup> の場合は最も短く一本の炭素 - 炭素単結合のみである。

本研究では、その連結基に注目し、2鎖2親水基型を持つが連結基を持たない  $C_{2v}$  対称性を持った2鎖2親水基型界面活性剤 ( $C_2$  Gemini と命名する) について興味をもった (Fig. 1-4)。すなわち、2量体構造とは言い難い2鎖2親水基型界面活性剤が一般の Gemini と同様の界面物性を有するかについて検討し、それより Gemini における連結

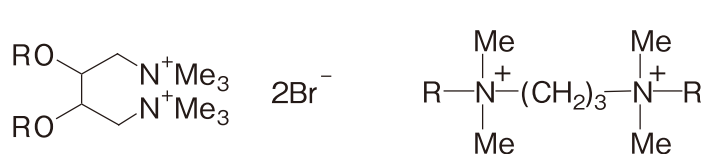
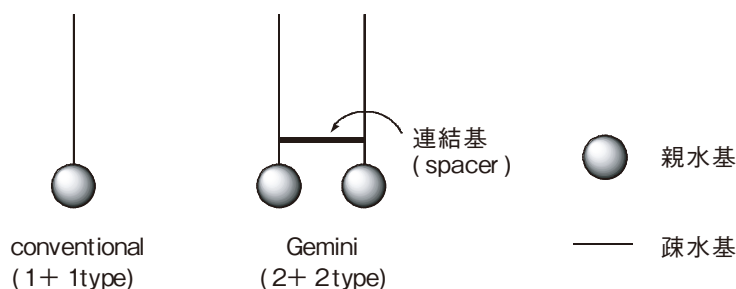
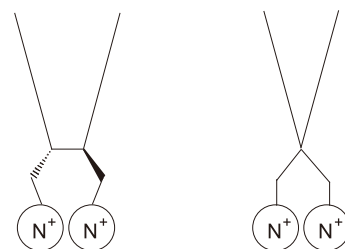


Fig. 1-3 ビスアンモニウム塩型 Gemini 界面活性剤


 Fig. 1-4 酒石酸 Gemini と  $C_2$  Gemini の構造

基の持つ意味を探究した。

またカチオン界面活性剤は、ベンザルコニウム塩のように殺菌、静菌といった機能を持つことは以前から良く知られている。Gemini について言えば、先のビスアンモニウム塩型酒石酸 Gemini が、ベンジル基などを持たないにも関わらず、ベンザルコニウム塩と同等の強い静菌活性を持つことを見出している (Table 1-1)。一方で合成が容易な 1,ω ビスアンモニウム塩型 Gemini は静菌活性が弱い結果も得ている。これは 2 つのトリメチルアンモニウム基がキレート効果を示し、より強く吸着するためと考えている。同様の構造を C<sub>2</sub> Gemini が持ち、静菌性についても興味を持たれる。

マロン酸エステル等は活性メチレンを持つ代表的な化合物であり、そのエノラートアニオンは求核剤として挙動する。それゆえ、マロン酸の中央の活性メチレンに 2 本の長

鎖アルキル基を導入することは容易である。またマロン酸のエステルをトリメチルアンモニウム基へと官能基変換することも可能である (Fig. 1-5)。

そこで本研究では、この合成計画に基づいて C<sub>2</sub> Gemini 7 の合成を行い、滴容法により表面張力を測定し、その物性について議論した。

## 2. 結果と考察

### 2. 1 2+2 type の合成

#### 2. 1. 1 ジアルキルマロンアミド, 3 の合成

まず、出発原料のマロン酸ジエチル, 1 をアルキル化し、その後アミド化することによって 3 を合成することを検討した (Scheme 1)<sup>2)</sup>。塩基に水素化ナトリウム、触媒にヨウ化ナトリウムを用い 3 等量のドデシルブロミドより

Table 1-1 静菌性の比較

| 供与菌 (Test Organism) |               | MIC (最小発育阻止濃度, µg/mL) |              |              |
|---------------------|---------------|-----------------------|--------------|--------------|
|                     |               | Tartaric Gemini       | Bis-ammonium | Benzalkonium |
| グラム陽性菌              | 表皮ブドウ球菌 KB210 | 2.5                   | 25           | 1            |
|                     | 枯草菌 KB211     | 2.5                   | 25           | 1            |
|                     | 八連球菌 KB212    | 1                     | 50           | 1            |
| グラム陰性菌              | 大腸菌 KB213     | 100                   | 200          | 200          |
|                     | チフス菌 KB20     | 100                   | 200          | 200          |
|                     | 緑膿菌 KB115     | 200                   | 400          | 400          |

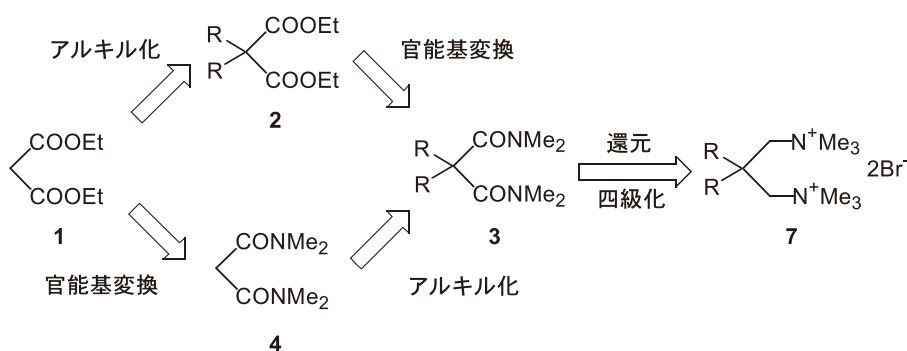
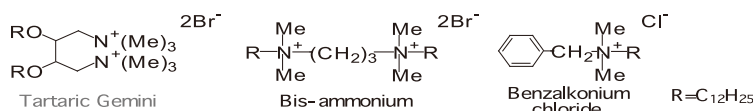
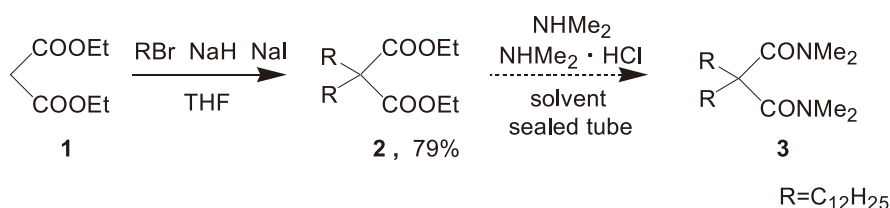


Fig. 1-5 Synthesis Strategy of Surfactant 7



Scheme 1

アルキル化することによってジアルキルエステル、**2**を収率79%の高収率で得た。得られた**2**を加圧容器中、ジメチルアミン、ジメチルアミン塩酸塩と neat もしくはメタノール中でアミド化を行ったが、目的のジアルキルマロンアミド、**3**を得ることは出来なかった。これは、立体障害が大きいために目的物が得られなかったと考えた。

そこで、マロン酸ジエチル、**1**を先にアミド化し、その後アルキル化することによって**3**を合成することを検討した (Scheme 2)。

マロン酸ジエチル、**1**を加圧容器中、ジメチルアミン、ジメチルアミン塩酸塩を入れ、neat で 150℃、3 日間加熱攪拌することによって N, N, N' N' - テトラメチルマロンアミド、**4**を収率 65% で得た。この**4**を用い種々の条件下で Scheme 2 に示す**4**のアルキル化を検討し、その結果を Table 1 にまとめた。

まず、run 1 では塩基にマロン酸合成でよく用いられるナトリウムメトキシド、溶媒にエタノールを用いてアルキル化を行ったが、アミド、**3**は得られなかった。次に run 2 として、塩基に炭酸ナトリウム、溶媒にジメチルスルホキシドを用いて行ったが、IR よりアミドの吸収を確認することができなかった。

そこで、run 3 として塩基をより強力な水素化ナトリウム、触媒にヨウ化ナトリウム、溶媒にテトラヒドロフランを用いて室温で行ったところ、モノアルキルマロンアミド、**5**はほぼ定量的に得られたが、ジアルキルマロンアミド、**3**は得られなかった。これは、長鎖アルキル基の立体障害が大きく、アミド**5**のエノールアニオンの反応性が抑えられてしまったために2分子目のアルキルプロマイドが反応し難かったと考えた。

そこで反応温度を室温から加熱還流 (run 4) と条件をより厳しくしたが、目的物の**3**が得られないだけでなく、アミド**5**の収率も下がってしまった。溶媒をジメチルホルムアミドとし還流下 (150℃) で行った (run 5) が、run 4 とほぼ同じ結果となった。

エノールアニオン等炭素アニオンの反応において、そのカウンターアニオンをクラウンエーテル等で配位しそのカチオンをより引き離すことで、エノールアニオンがより“naked”になり反応性がより高くなることが知られている<sup>3)</sup>。クラウンエーテルより安価なポリエチレングリコールモノメチルエーテルも同様の効果が期待できるので、このポリエチレングリコールモノメチルエーテルを触媒量加えて反応を行ったところ (Table 1 run 6)、わずかではあるがアミド**3**を得ることが出来た。これはポリエチレングリコールモノメチルエーテルがナトリウムイオンに配位し、アミド**5**のエノールアニオンが期待通りより反応しやすくなったためではないかと考えた。

アルキル鎖を1本導入したアミド**5**は収率よく得られたので、この**5**を単離精製後、更にアルキル化することを検討

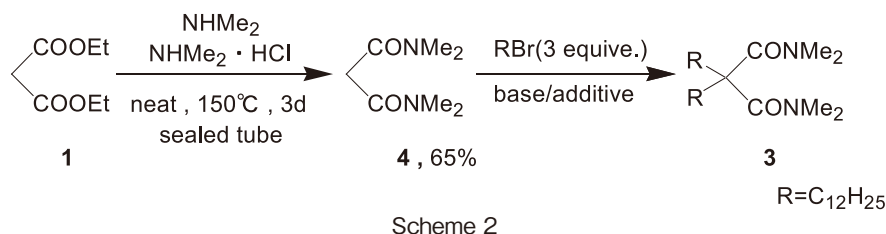
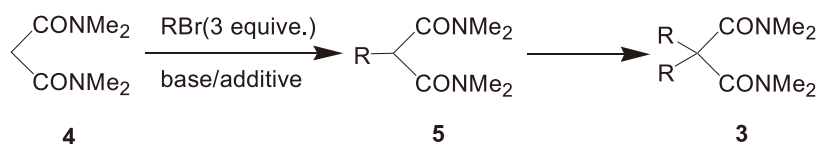


Table 1 Conditions for Alkylation of **4**

| run | base / additive                 | solvent | time | temp.  | yield, <b>3</b> | yield, <b>5</b> |
|-----|---------------------------------|---------|------|--------|-----------------|-----------------|
| 1   | NaOMe                           | EtOH    | 1d   | reflux | —               | —               |
| 2   | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | DMSO    | 1d   | rt     | —               | —               |
| 3   | NaH / NaI                       | THF     | 1d   | rt     | —               | 95%             |
| 4   | NaH / NaI                       | THF     | 1d   | reflux | —               | 51%             |
| 5   | NaH / NaI                       | DMF     | 1d   | reflux | —               | 64%             |
| 6   | NaH / PEG-OMe<br>TBAI           | THF     | 1d   | reflux | 5%              | 90%             |



討した (Scheme 4)。

以下の run 1～5 の条件でアルキル化を検討したが原料回収に終わった。そこで、先のアミド **3** が少量できた条件 (Table 1 run 4) で検討したところ、収率 84% で **3** を得た (Table 2 run 6)。しかしながら、同じ条件でスケールを大きくして反応を行ったが、TLC ではわずかにアミド **3** を確認することができたが、ほぼ原料回収に終わった。

## 2. 1. 2 ジアルキルアミン, **6** の合成

得られたアミド **3** を種々の還元剤を用いて還元し、第3アミン **6** にすることを検討した。

一般にアミドの還元にはリチウムアルミニウムヒドラ

イドを用いる。そこで、溶媒にテトラヒドロフラン用いるなど種々の条件でアミド **3** の還元を行ったが、原料回収もしくは複雑な混合物を与えるのみで、アミン **6** は得られなかった。次にアミドを選択的に還元するとされている THF·BH<sub>3</sub><sup>4)</sup> を用いて還元を行ったがこれも原料回収となった。そこで、リチウムアルミニウムヒドライドより還元力が強いとされているアラン、AlH<sub>3</sub><sup>5)</sup> を用いて還元することによってアミン **6** を 92% の高収率で得ることができた (Table 3)。

## 2. 1. 3 2鎖2親水基型ビスアンモニウム塩, **7** の合成

Scheme 6 に示すように、第3アミン **6** をメチルプロミドで4級化することによって、最終目的物であるビスアン

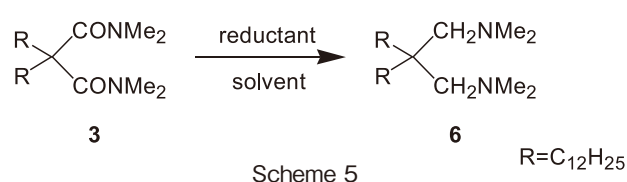
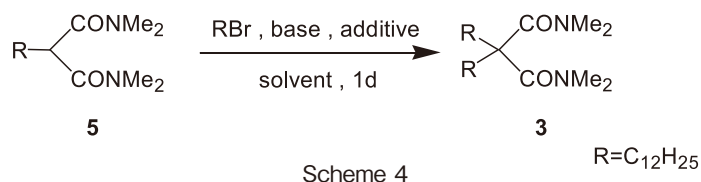


Table 2 Conditions for Alkylation of **5**

| run | 5<br>mmol | base / additive.                                 | solvent                                                            | temp.  | result                    |
|-----|-----------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------|
| 1   | 1         | NaH / TBAI, DMI* <sup>1</sup>                    | THF                                                                | rt     | no reaction               |
| 2   | 1         |                                                  |                                                                    | reflux | no reaction               |
| 3   | 3         | <sup>t</sup> BuOK / NaI                          | (CH <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O | rt     | no reaction               |
| 4   | 3         |                                                  |                                                                    | 60°C   | no reaction               |
| 5   | 2         | NaH / PEG-OMe* <sup>2</sup> , TBAI* <sup>3</sup> | THF                                                                | rt     | no reaction               |
| 6   | 2         |                                                  |                                                                    | reflux | <b>3</b> , 84%            |
| 7   | 10        |                                                  |                                                                    | reflux | no reaction* <sup>4</sup> |

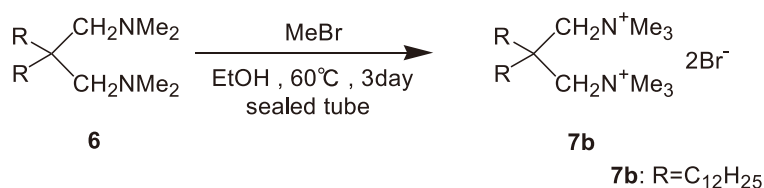
\*<sup>1</sup>DMI: 1,3-Dimethyl-2-imidazolidinone    \*<sup>2</sup>PEG-Me: Poly(ethylene glycol) methyl ether (M.W=2000)

\*<sup>3</sup>TBAI: Tetrabutylammonium Iodide    \*<sup>4</sup>few **5** was detected by TLC

Table 3 Conditions for Reduction of **3**

| run | reductant                       | solvent           | temp.  | time | result          |
|-----|---------------------------------|-------------------|--------|------|-----------------|
| i   | LiAlH <sub>4</sub>              | Et <sub>2</sub> O | reflux | 4h   | no reaction     |
| ii  |                                 | THF               | reflux | 4h   | complex mixture |
| iii | BH <sub>3</sub> ·THF            | THF               | rt     | 4h   | no reaction     |
| iv  | AlH <sub>3</sub> * <sup>1</sup> | THF               | rt     | 3h   | <b>6</b> , 92%  |

\* LiAlH<sub>4</sub>:AlCl<sub>3</sub>=3:1



モニウム塩 **7** の合成を検討した。

アミン **6** のエタノール溶液を加圧容器に入れよく冷やし、その後メチルプロミドを入れ密封し 60℃ で 3 日間加熱撹拌した。エタノール / ジイソプロピルエーテルで再結晶後、1,4-ジオキサンで洗うことによってビスアンモニウム塩 **7b** を収率 45% で得た。収率が低いのは、生成物が結晶化し難く、再結晶による精製においてロスが大きかったためである。

## 合成戦略 2

**3** を大量に合成することが困難なので別ルートを検討した。Scheme 7 に示すように、出発原料としてマロノニトリル, **8** を用いることを計画した。このマロノニトリルはより酸性度の高い活性メチレンを持ち、その為、エノールアニオンが生成しやすい。また、ジメチルアミド基に比べ立体障害が小さいため、長鎖アルキルプロミドと反応し易く<sup>6)</sup>、その主生成物を同様に還元することで第 1 アミンに変換することができ、これを 4 級化することで目的物の **7** が合成しやすいのではないかと考えた。

### 2.1.4 ジアルキルニトリル, **9** の合成

マロノニトリル, **8** のテトラヒドロフラン溶液に、水素化ナトリウムとヨウ化ナトリウムを加えてからしばらく撹

拌し、更にアルキルプロミドを加えて 1 日加熱還流した。反応後処理し、カラムクロマトグラフィーにより **9** を高収率で得、**9a** を 75%、**9b** を 91%、**9c** を 81% の収率で得た。

### 2.1.5 ジアルキルアミン, **10** の合成

ニトリル **9** からアミン **10** への還元を検討した。まず、金属触媒を用いた接触水添による還元がより簡便で後処理が容易であると考え、接触水添について検討した (Scheme 9)。

パラジウムカーボン (10%) を触媒とし、酢酸エチルを溶媒に用いて、100℃ で 1 日加熱撹拌して接触水素添加を行った。しかしながら、全く反応せず、原料をすべて回収し、アミン **10** を得ることができなかった。触媒として用いたパラジウムカーボン (10%) の活性が衰えている可能性があったので、新規に試薬を購入し、開封後すぐ先と同様に反応を行ったが、同じ結果となった。次に反応性のより高い触媒であるパラジウムブラックや水酸化パラジウムを触媒とし、エタノールを溶媒として反応を行ったが、同様に反応せず、原料を回収するのみであった (Table 4)。

接触水素添加による **9** の還元ができなかったので、還元剤として金属水素化<sup>7)</sup> 物を用いることを検討した (Table 5)。

還元剤としてリチウムアルミニウムヒドライドを用いて

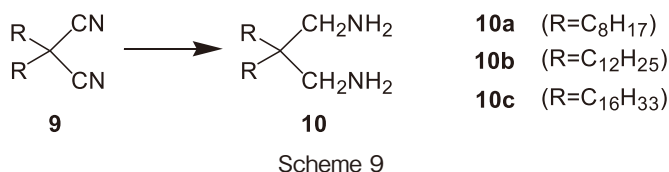
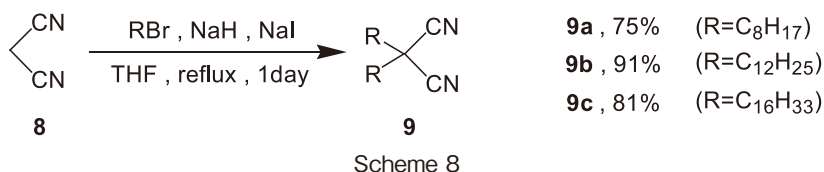
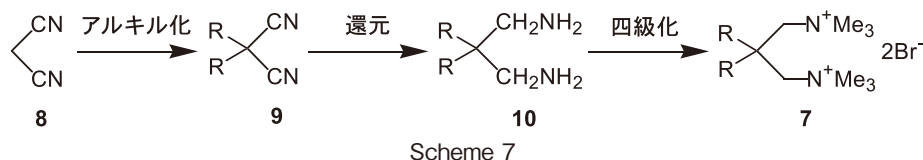


Table 4 Conditions for Hydrogenolysis of **9b**

| run | cat.                | solvent | results     |
|-----|---------------------|---------|-------------|
| i   | Pd (10%)            | AcOEt   | no reaction |
| ii  | Pd Black            |         | no reaction |
| iii | Pd(OH) <sub>2</sub> | EtOH    | no reaction |

Table 5 Conditions for Reduction of **9b**

| run | reductant                      | solvent           | temp.  | time | results          |
|-----|--------------------------------|-------------------|--------|------|------------------|
| i   | LiAlH <sub>4</sub>             | Et <sub>2</sub> O | reflux | 1d   | <b>9b</b> , <50% |
| ii  | H-Co <sup>*1</sup>             | MeOH              | rt     | 2h   | complex mixture  |
| iii | AlH <sub>3</sub> <sup>*2</sup> | Et <sub>2</sub> O | rt     | 3h   | <b>9b</b> , 88%  |

<sup>\*1</sup> H-Co: cobalt boride    <sup>\*2</sup> LiAlH<sub>4</sub> : AlCl<sub>3</sub> = 3 : 1

行ったところアミン **10** を得ることができたが副生成物も多く、単離が困難で、50%以下の収率でしか目的物を得られなかった。次にニトリルをアミンにする還元剤として知られているコバルトボライド<sup>8)</sup>を用いて行ったが、複雑な混合物を与えるのみで **10** を得ることはできなかった。そこでアミドの還元条件と同様にしてアラン、 $\text{AlH}_3$ を用いて還元を行ったところ、**10b** を収率 88% で得た。また、同様にすることによって **10a** を 87%、**10c** を 89% の収率で得た。

## 2. 1. 6 2鎖2親水基型ビスアンモニウム塩、**7**の合成

Scheme10にあるように、加圧容器中でアミン **10** をメチルプロマイドと炭酸カリウムで反応させることによって、**7a** を 62%、**7b** を 48%、**7c** を 56% の収率で得た。**7a** と **7c** は **7b** より大きいスケールで反応を行ったため、若干収率がよいものとなった。**6** の4級化と同様にこの4級化においても収率が低く、先と同様再結晶によるロスが大きかったと考えられる。第3アミン **6** の4級化による **7** の合成とは違い、第1アミン **10** からの合成には塩基が必要となる。このことも副生成物が多くなり、**7** の単離精製を困難にする原因の1つと考えられる。

以上の各合成段階における収率と総収率を Table 6 と Table 7 にまとめた。

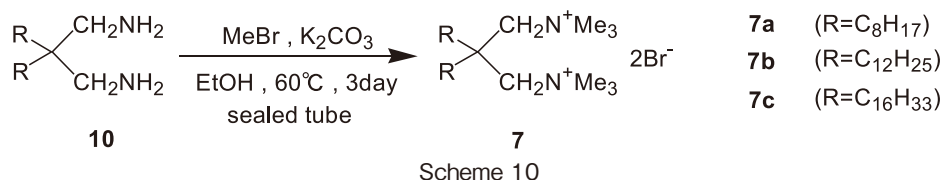
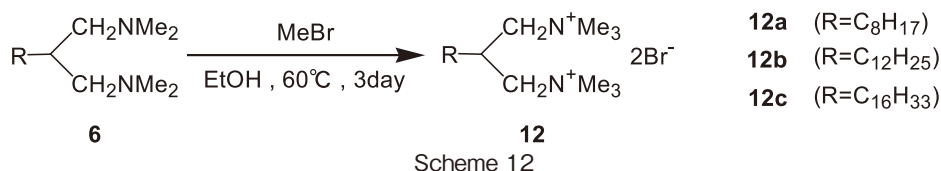
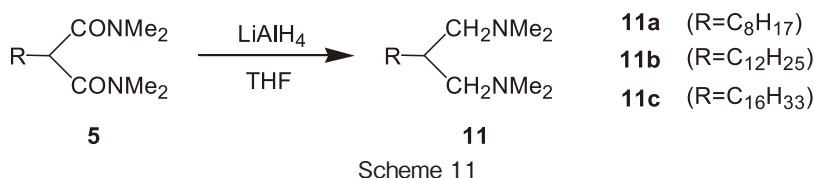


Table 6

| R                               | Yield |     |     |     | overall Yield |
|---------------------------------|-------|-----|-----|-----|---------------|
|                                 | 4→5   | 5→3 | 3→6 | 6→7 |               |
| C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 95%   | 84% | 92% | 45% | 33%           |

Table 7

| R                               | Yield |      |      | overall Yield (isolated) |
|---------------------------------|-------|------|------|--------------------------|
|                                 | 8→9   | 9→10 | 10→7 |                          |
| C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | 75%   | 87%  | 62%  | 40%                      |
| C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> | 91%   | 88%  | 48%  | 38%                      |
| C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> | 81%   | 89%  | 56%  | 40%                      |



## 2.3 濃度－表面張力曲線の比較

### 2.3.1 濃度－表面張力曲線

$C_8H_{17}$  の長鎖アルキル基を持つ界面活性剤 **7a** と **12a**、及び対応する 1 鎖 1 親水基型アンモニウム塩であるデシルトリメチルアンモニウムブロマイド、**13a** の濃度－表面張力曲線を Fig. 2-1 に、 $C_{12}H_{25}$  の長鎖アルキル基を持つ界面活性剤 **7b** と **12b**、及び対応する 1 鎖 1 親水基型アンモニウム塩であるテトラデシルトリメチルアンモニウムブロマイド、**13b** の濃度－表面張力曲線を Fig. 2-2 に、さらに  $C_{16}H_{33}$  の長鎖アルキル基を持つ界面活性剤 **12c**、及び対応する 1 鎖 1 親水基型アンモニウム塩であるオクタデシルトリメチルアンモニウムブロマイド、**13c** の濃度－表面張力曲線を Fig. 2-3 に示した。**7c** については水に溶解しなかったため、表面張力測定ができず、cmc 及び  $\gamma_{cmc}$  は測定することができなかった。

またこれらの曲線の cmc 付近の接線の傾き ( $\delta\gamma/\delta\ln C$ ) より、Gibbs の吸着等温式 (eq.1) を用いて分子占有面積を求めた。この活動度  $\nu$  は、 $C_2$  Gemini と 1+2 type は  $\nu=3$ 、1+1 type は  $\nu=2$  とした。

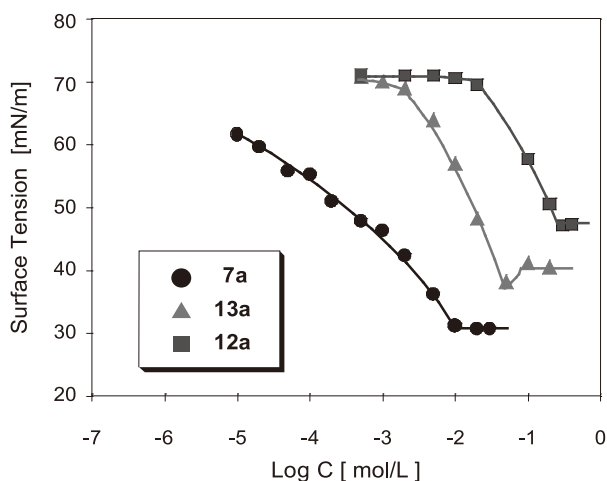


Fig. 2-1 **7a** と **12a**、**13a** の濃度－表面張力曲線

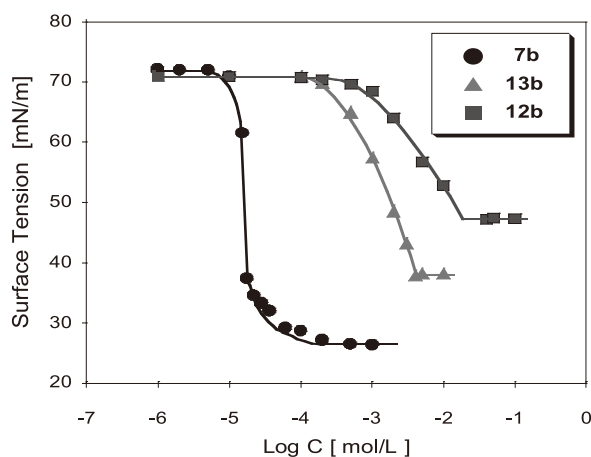


Fig. 2-2 **7b** と **12b**、**13b** の濃度－表面張力曲線

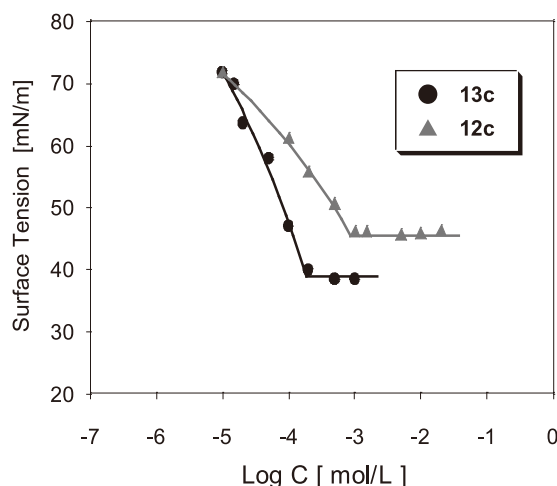


Fig. 3-3 **12c**、**13c** の濃度－表面張力曲線

$$\Gamma = - \frac{1}{\nu RT} \frac{\partial \gamma}{\partial \ln C} \quad \text{eq.1}$$

$$\left[ \begin{array}{ll} \Gamma : \text{表面過剰量} & T : \text{絶対温度} \\ \nu : \text{活動度} & C : \text{活動度} \\ R : \text{気体定数} & \gamma : \text{表面張力} \end{array} \right]$$

$$A = \frac{1}{\Gamma a} \quad \text{eq.2}$$

$$[A : \text{分子占有面積} \quad a : \text{アボガドロ定数}]$$

先の濃度－表面張力曲線から求めた cmc 及び  $\gamma_{cmc}$  の値と Gibbs の吸着等温式から求めた分子占有面積の値を下の Table 8 に示す。

**7** (2+2 type) と **13** (1+1 type) を比較すると、小さい cmc と  $\gamma_{cmc}$  を持ったことから、この  $C_2$  Gemini も一般の Gemini と同様に優れた界面物性を持ち、「Gemini」と呼べることが分かった。**7** の中で疎水鎖の違いを検討すると、**7b** ( $R=C_{12}H_{25}$ ) は対応する 1+1 type の **13b** と比べて、cmc が 2 桁以上小さく、 $\gamma_{cmc}$  も 10mN/m 以上小さくなり、一般の Gemini と同様の挙動を示した。**7a** ( $R=C_8H_{17}$ ) は **13a** より、 $\gamma_{cmc}$  が 10mN/m 以上小さくなったものの、cmc は 4 分の 1 ほどになっただけであり、分子占有面積も含め Gemini としてはかなり大きな数値となった。**7** の合成において、2 本目のアルキル化や還元の結果から、連結点付近の立体障害が大きいことは明らかである。その為、長鎖アルキル基は連結点で広がり、**7a** ( $R=C_8H_{17}$ ) の時はそれ自身の疎水性がより小さいため、連結点付近の立体障害によって分子内疎水性相互作用が更に弱くなり 1+1 type により近い値になったと考えられる。逆に **7b** ( $R=C_{12}H_{25}$ ) は、分子内の疎水性相互作用が連結点付近の立体障害に打ち勝ち、その影響が顕著になるため、

Gemini の特性が表れたと考えられる。このことから、分子内の疎水性相互作用は Gemini の優れた界面物性を示す重要な要因の 1 つであると考えられる (Fig. 3-7)。

前述した Fig. 3-3 から分かるように、長鎖アルキル基が長くなるにつれ log cmc が直線的に小さくなることが知られている。しかし、Gemini ではこのような直線性が失われており、疎水基の炭素数が 12 ~ 14 付近で特に顕著である<sup>9)</sup>。この原因については解明されていなかった。このことも長鎖アルキル基が長くなるにつれ、分子内の疎水性相互作用から説明できるかもしれない。すなわち Gemini においては長鎖アルキル鎖が長くなるにつれて、1 次的に疎水性が大きくなるだけでなく、分子内の疎水性相互作用が大きくなる要因が加わることで、log cmc と長鎖アルキル基との間の直線性が失われたと考えられる。

1+2 type は親水基が 2 個あるので親水性が高くなり、それゆえ cmc 及び  $\gamma_{cmc}$  は大きくなった。1+1 type との比較において、**12c** と **13a** は親水基 ( $-N^+Me_3$ ) 1 個当りのアルキル鎖がほぼ同じで HLB は同じになる。このことから同じような界面物性を持つと予想されるが、**12c** は **13a** と比べて cmc は約半分となったが、 $\gamma_{cmc}$  は大きい値をとった。このことから親水基が 2 個あることは、cmc を小さくするかもしれないが、親水基が 2 個あることで長

鎖アルキル基が表面に疎に吸着され  $\gamma_{cmc}$  を大きくすると考えられる

### 3. 結言

本研究では、N, N, N', N' - テトラメチルマロンアミドとマロノニトリルの活性メチレンに長鎖アルキルを導入し、還元、4 級化することによって C<sub>2</sub> 対称性を有し、スパーサーを持たないビスアンモニウム塩型 C<sub>2</sub> Gemini 界面活性剤の合成ルートを確立した。またモノアルキル化したマロンアミドより、同様に 1+2 type のビスアンモニウム塩型界面活性剤も合成した。

得られた C<sub>2</sub> Gemini の濃度 - 表面張力曲線より、C<sub>2</sub> Gemini の界面物性について議論した。その結果、1+1 type との比較において **7a** (R=C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>) と **7b** (R=C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>) の挙動に大きな違いを見出した。これは疎水鎖による分子内の疎水性相互作用が大きく寄与していると考えられる。C<sub>2</sub> Gemini がスパーサーを持たないため、連結点での立体障害が大きくなって長鎖アルキル基が広がってしまい、長鎖アルキル基が短いと分子内疎水性相互作用が小さくなることが強調されたために cmc が大きくなり、逆に長鎖アルキル基が長くなると十分な分子内疎水性相互作用が得ら

Table 8 cmc、 $\gamma_{cmc}$ 、分子占有面積の比較

|            | cmc (mol/L)          | $\gamma_{cmc}$ (mN/m) | A (nm <sup>2</sup> ) |
|------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>7a</b>  | $1.0 \times 10^{-2}$ | 30                    | 1.41                 |
| <b>13a</b> | $4.0 \times 10^{-2}$ | 40                    | 0.64                 |
| <b>12a</b> | $3.0 \times 10^{-1}$ | 47                    | 1.55                 |
| <b>7b</b>  | $3.4 \times 10^{-5}$ | 26                    | 0.84                 |
| <b>13b</b> | $5.0 \times 10^{-3}$ | 38                    | 0.65                 |
| <b>12b</b> | $2.5 \times 10^{-2}$ | 47                    | 1.69                 |
| <b>7c</b>  | —                    | —                     | —                    |
| <b>13c</b> | $2.2 \times 10^{-4}$ | 38                    | 0.64                 |
| <b>12c</b> | $1.0 \times 10^{-3}$ | 46                    | 1.71                 |

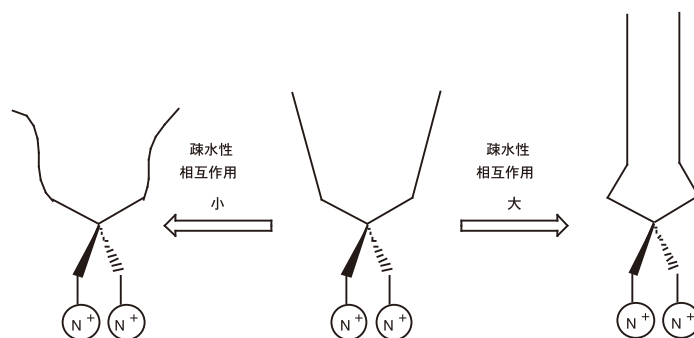


Fig. 3-4

れ、立体障害が打ち消されることによって cmc が小さくなると考えた。

以上より、小さい cmc と  $\gamma_{cmc}$  を持ったことから、このも一般の Gemini と同様に優れた界面物性を持ち、「Gemini」と呼べるのが解った。また分子内の疎水性相互作用が Gemini の優れた界面物性を示す重要な要因であるということを見出した。

これらの C<sub>2</sub> Gemini (2+2 type) と 1+2 type のビスアンモニウム塩型界面活性剤の静菌について、現在検討中である。

#### (参考文献)

- 1) R. Oda, I. Huc, J. Homo, B. Heinrich, M. Schmutz, S. Candau, *Langmuir*, **15**, 2384 (2003)
- 2) R. Adams, R. M. KAMM, *Org. Syn., Coll. Vol. I*, 250
- 3) G. W. Gokel, H. D. Durst, *Selections from the Aldrichimica Acta*, 79-99.
- 4) H. C. Brown, P. Heim, *J. Org. Chem.* **38**, 912 (1973)
- 5) E. M. Marlett, W. S. Park, *J. Org. Chem.* **55**, 2968 (1990)
- 6) Fatiadi, *Synthesis*, 165 (1978)
- 7) C. B. A. Briggs, I. M. Newington, A. R. Pitt, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 379 (1995)
- 8) T. Satoh, S. Suzuki, *Tetrahedron Letters*, **52**, 4555 (1969)
- 9) M. J. Rosen, J. H. Mathias, L. Davenport, *Langmuir*. **15**, 7340 (1999)
- 10) 三洋化成工業株式会社 全訂版「新・界面活性剤入門」藤本武彦著 (1981)
- 11) 界面活性剤と界面現象 Milton J. Rosen 著 坪根和幸、坂本一民監訳 (1995)
- 12) 「入門コロイドと界面の科学」近藤保、鈴木四郎 共著 (1995)
- 13) 「界面活現象」花井哲也 著 (1995)

# 新たな生理機能を付加させることを目的とした 新規化粧品素材の酵素的分子創製

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

石 原 浩 二

Arbutin was acylated with aromatic acids and related compounds to the corresponding acylated forms by a lipase-catalyzed transesterification. As the results, further stabilization and functionalization of natural bioactive compounds as cosmetic materials have been achieved by the enzymatic-modification method.

## 1. 緒 言

近年、生活習慣の変化や食生活の多様化により、我々人類を取り巻く環境に関わる問題がクローズアップされている。このような状況の中、天然資源の大量消費による有用な植物資源の枯渇に伴い、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るようになってきた。これら機能性化合物の中で、特に、植物色素の生理機能に大きな注目が集まっている。

花の色の多彩さ、美しさを担う天然の植物色素は、フェノール性のフラボノイドを基本骨格とした配糖体（グルコシド）構造を有している。さらに植物色素は糖の特定の水酸基が *p*-クマール酸やカフェー酸、フェルラ酸などの各種芳香族酸によるエステル化を受けており、この化学的な修飾が植物色素の安定化や生理作用に深く関与していると考えられている。天然の植物色素は、健康食品としても注目される一方、美白効果作用を有する化合物も存在しており、化粧品素材としての利用や研究も盛んに行われている。

そこで本研究は、天然植物色素への効率的かつ実用的な芳香族酸エステル化を方法確立し、応用することで、植物色素の光や熱に対する安定性を高め、また、抗酸化能やラジカルスカベンジング能および紫外線遮蔽効果（紫外線からの遺伝子の保護作用）などの生理機能を付加させることで、新規化粧品素材開発を念頭に置いた植物色素の機能性向上を主目的とする。対象とする化合物は美白効果があるとされているアルブチンとし、申請者が既に確立している方法を応用することで、アルブチンに桂皮酸、*p*-クマール酸、フェルラ酸などの各種芳香族酸エステル基を導入したアシル化アルブチンを酵素的に合成し、美白効果だけでなく、ラジカルスカベンジング能、抗酸化作用、紫外線遮

蔽効果などの第三次機能を付加させた、高機能性新規化粧品素材の開発を検討することにした。

## 2. 実 験

### 2.1 化粧品素材としてのアルブチンの酵素的アシル化

我々がこれまでに開発した合成方法は、芳香族酸を化学合成によりビニルエステルへと変換し、この芳香族酸ビニルエステルをアシルドナーとした、リパーゼによるエステル交換反応を利用したポリフェノールグルコシドのアシル化法であった<sup>1-5)</sup>。しかし、この方法では、アシルドナーとしてビニルエステルが必要であり、アシルドナーをいかにして準備するかがキーステップとなっていた<sup>2)</sup>。そこで、本実験では、アシルドナーを経由しない、酸成分とアルコール成分を直接エステル化するダイレクトな合成ルートについて検討を行うことにした。

リパーゼ (Chirazyme L-2) 50 mg、アルブチン (基質) 10 mg、芳香族酸として *p*-クマール酸 50 mg、溶媒 (アセトン、アセトニトリル、アルコール系溶媒など) 3 mL、モレキュラーシーブス 100 mg を 37℃～65℃ で攪拌し、最適な反応温度、攪拌方法、芳香族酸の種類について調査した。生成物は TLC 分析 (展開溶媒、クロロホルム:メタノール=5:1) し、UV 及びヨウ素発色により確認し、<sup>1</sup>H-、<sup>13</sup>C-NMR、FAB-MS 分析により同定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 溶媒の影響

リパーゼを用いたトランスエステル化で汎用される溶媒として、アセトニトリル、アセトン、イソプロピルエーテル、そしてアルコール系溶媒としてメタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、*tert*-ブタノールを使用し、変換率を比較したところ、*tert*-ブタノールを用いた時が最も高い変換率を示した。

また、あらかじめモレキュラーシーブスで脱水した溶媒を用いた方がより高い変換率を示すことがわかり、さらに、



Enzymatic Stabilization and Functionalization of Natural Plant Pigment as Cosmetic Materials

Kohji Ishihara

Department of Life Science, Okayama University of Science

脱水溶媒の中でも *t*-ブタノールを用いた時が最もよい変換率を示した。しかしながら、脱水操作をより厳密に行い、無水系で有機合成を行うレベルにまで溶媒を脱水してしまうと、アシル化反応はほとんど進行しなくなった。これは、リパーゼ反応が微水系で進行することを示唆しているものと考えられる。

### 3.2 反応温度

3.1で最も高い変換率を示した脱水 *t*-ブタノールを溶媒として用い、酵素反応で最もよく用いられる反応温度である 37℃ 及び 45℃ で反応を行った。しかし、いずれにおいても変換率は低いものであった。そこで、さらに反応温度を上げ、55℃ もしくは 65℃ で反応を行った結果、反応温度 55℃ が最も高い変換率を示し、65℃ ではほとんど反応が進行しないことがわかった。これは、65℃ という高温では、酵素であるリパーゼが失活するためであると考えられる。

### 3.3 攪拌方法

攪拌方法として、上下転倒型、攪拌子による回転型、ボルテックスミキサーによるバイブレーション型と3種類の攪拌方法を試した。その結果、バイブレーション型攪拌が最も変換率が高く、また再現性もあった。これは、攪拌方法としてかなり激しい条件が必要であることを示唆していると考えられる。

そこで、3.1～3.3で検討した条件検討の結果を用い、ベストな組み合わせ、すなわち、溶媒に *t*-ブタノール（事前にモレキュラーシーブスで脱水したもの）、反応温度 55℃、バイブレーション型攪拌という条件でアルブチンの *p*-クマレート化反応を行ったところ、65% にまで変換率を高めることに成功した。

### 3.4 生成物の確認

TLC 分析の結果、基質であるアルブチンが Rf 値 0.22、アシルドナーである *p*-クマール酸が Rf 値 0.56、生成物ら

しいスポットが Rf 値 0.39 に一つだけ確認できた。そこで、プレパラティブ TLC にて分離し、生成物と考えられるスポット部分を取り出し、クロロホルムで抽出、減圧下で溶媒を除去後、残った白色粉末について NMR 分析を行った。その結果、アルブチンに特有なピークと *p*-クマール酸に特有なピークの両方が観測された。また、*p*-クマール酸のカルボキシル基の炭素とアルブチンの糖の C6 位の炭素が高磁場側へシフトしていること、その他の炭素のシグナルについてはシフトがなかったことから考えて、アルブチンの糖の 1 級水酸基がある C6 位と *p*-クマール酸の酸部分が脱水縮合してエステル結合が生成していると判断した。また、FAB-MS 分析の結果からも、アルブチンと *p*-クマール酸がエステル結合していることを示唆するデータが得られ、以上の結果から、図 1 にあるように、アルブチンの *p*-クマレートの生成を確認した。

### 3.5 他のアシルドナーを用いたアルブチンのアシル化

アシルドナーとして、フェルラ酸、カフェー酸、*p*-アミノ安息香酸、 $\alpha$ -リボ酸、キナ酸を用い、同様の実験を行った。その結果、フェルラ酸（変換率 30%）、*p*-アミノ安息香酸（変換率 75%）、 $\alpha$ -リボ酸（変換率 >90%）をアシルドナーとした場合に、生成物のスポットが確認できた。アシル化の変換率については、アシルドナーとして  $\alpha$ -リボ酸を用いた場合が最も高く、次いで *p*-アミノ安息香酸、そして *p*-クマール酸の順であった。この結果から、本研究で用いた酵素リパーゼは芳香族酸だけでなく、 $\alpha$ -リボ酸に対して高い特異性を有していると考えられる。アルブチンの  $\alpha$ -リボ酸エステルと考えられる生成物に関しては、現在、化学構造と生理活性について調査中である。

## 4. 総 括

以上、「化粧品素材」として有用なアルブチンの安定化と高機能化を目標に、微生物由来のリパーゼの優れた触媒作用を高度に利用した芳香族酸エステル化（アシル化）の

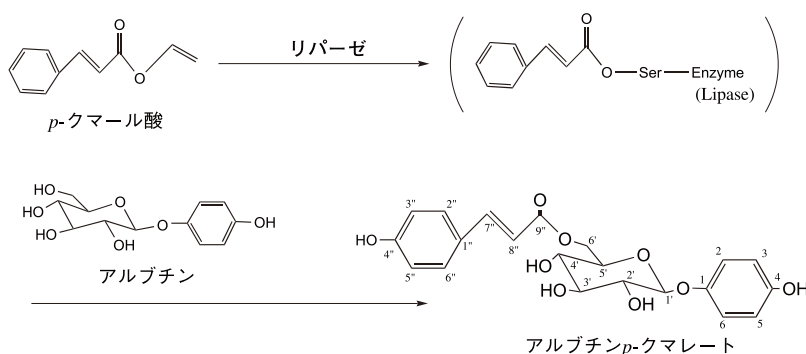


図 1 Reaction scheme for lipase-catalyzed transesterification to synthesize arbutin *p*-coumarate.

ための方法について検討を行った。その結果、酸成分（芳香族カルボン酸）をビニルエステルへと変換することなく、ダイレクトにアルブチンへと縮合させる方法を確立し、効率的なアシル化アルブチンの酵素的合成に成功した。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を頂いた(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, H. Hamada et. al., Lipase-Catalyzed Direct and Regioselective Acylation of Flavonoid Glucoside for Mechanistic Investigation of Stable Plant Pigments, *J. Biosci. Bioeng.*, 87 (1), pp. 105-107 (1999).
- 2) K. Ishihara, N. Nakajima, H. Hamada, et. al., A Chemoenzymatic Synthesis of Aromatic Carboxylic Acid Vinyl Esters, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 7, pp. 307-310 (1999).
- 3) N. Nakajima, K. Ishihara, H. Hamada, et al., Regioselective Acylation of Flavonoid Glucoside with Aromatic Acid by an Enzymatic Reaction System from Cultured Cells of *Ipomoea batatas*, *J. Biosci. Bioeng.*, 90(3), pp. 347-349 (2000).
- 4) K. Ishihara, Y. Nishimura, T. Kubo et. al., Enzyme-Catalyzed Acylation of Plant Polyphenols for Interpretation of Their Functions, *Plant Biotechnology*, 19(3), pp. 211-214 (2002).
- 5) K. Ishihara and N. Nakajima, Structural Aspects of Acylated Plant Pigments: Stabilization of Flavonoid Glucosides and Interpretation of Their Functions, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 23, pp. 411-417 (2003).

# 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

中部大学生命健康科学部生命医科学科環境衛生学

加藤 昌志

Malignant melanoma is one of the most aggressive tumors. Incidence of melanomas is increasing by upregulation of ultraviolet irradiation. Therefore, it is necessary to establish a new drug for preventing against and curing melanoma though the clarification of its mechanism. We established the RET-transgenic mouse line (304/B6), in which spontaneously develops benign melanocytic tumor(s) without exception. About 70% of the benign tumors will be changed to malignant melanomas. We investigated the role of c-Kit in the hereditary melanoma developed in the RET-transgenic mice (line 304/B6). In  $W^V/W^V$ -RET (304/B6)-transgenic mice, in which c-Kit function was severely impaired, development of melanoma was strongly suppressed. Whereas 31 of the 44 original RET-transgenic mice died of rapidly growing melanoma within 12 months after birth, only 8 of the 44  $W^V/W^V$ -RET-transgenic mice developed slowly-growing melanocytic tumors with a greatly prolonged mean tumor-free period, two of which died of melanoma at a late stage. Even  $W^V/+$ -RET-transgenic mice had a clearly prolonged tumor-free period and a definitely reduced frequency (6/61) of tumor death within 12 months after birth. Melanin production in the skin of these mice was not strongly impaired, suggesting that c-Kit affects the development of melanomas in these mice with only minor effects in melanin production. More importantly, a single injection of anti-c-Kit antibody (ACK2) into RET-transgenic mice soon after birth caused a surprisingly long-lasting suppression of development of melanoma, greatly prolonging the tumor-free period, and none of the 28 ACK2-treated RET-transgenic mice had died from tumors at 12 months of age. The c-Kit function needed for melanin production was also suppressed for an unusual long time in ACK2-treated RET-transgenic mice. These results suggest that c-Kit can be a unique target molecule to prevent against melanoma. In the next step, we should clarify whether c-Kit can be a target of therapy for the developed melanoma or not.

## 1 緒言

生活水準が向上に伴い、ヒトは外見に気を配るようになる。服装にもこだわるが、最終的には一般的に自身の美しさ重視するようになる。シミ（肝斑）、ソバカス（雀斑）、アザ（広範囲にわたる先天母斑）などは、自身の美を障害するものとして、しばしば大きな問題となる。これらの疾患には、すべてメラノサイトとメラニンの過剰産生が関与している。ゆえに、メラノサイト増殖やメラニン産生のメカニズムを探ることは、より質の高い安全な化粧品（美白剤）を提供するために不可欠である。一方、メラノサイト増殖やメラニン産生には c-Kit 分子（チロシンキナーゼ）が関連していることが知られている<sup>1)</sup>。申請者らは近年全身の皮膚黒色症を必発する RET-トランスジェニックマウスを樹立し<sup>2)</sup>、RET チロシンキナーゼも c-Kit チロシンキナーゼと同様にメラノサイト増殖やメラニン産生に深く関与していることを報告してきた<sup>3-8)</sup>。さらに、最近では RET-トランスジェニックマウスにおける IL-6 の役割を一

部解明することに成功した<sup>9)</sup>。

本研究では、申請者らが樹立した RET-トランスジェニックマウス<sup>2)</sup>と c-Kit の機能の 80% 以上低下している  $W^V$ -マウスと交配させる。これにより、RET キナーゼと Kit キナーゼが個体のメラノサイト増殖やメラニン産生において、どのように影響し合うかを調べる。また、抗 c-Kit 抗体を用いて、メラノサイトやメラニンの個体レベルでのコントロールをめざす。

## 2 実験方法

RET-トランスジェニックマウス（黒色毛）と  $W^V$ -マウス（白色毛）を交配することにより c-Kit の機能の著しく低下した RET-トランスジェニックマウス ( $W^V/W^V$ -RET-トランスジェニックマウス) を作製することにより、RET と c-Kit の相互作用を個体レベルで解析する。さらに、マウスの検体を用いてウエスタンブロット、免疫沈降、キナーゼアッセイ、免疫組織染色等の手法を用いて RET と c-Kit の相互作用を分子レベルで解析する。

ACK2 のハイブリドーマをヌードマウスに注射し、腹水採取することにより、高濃度で多量の抗 c-Kit モノクローナル抗体を作製する。生後 1 日以内の RET-マウスに抗 c-Kit 抗体 (ACK2) を注射すると、マウスの毛色や皮膚の色を観察する。さらに、抗 c-Kit 抗体を注射されたマウスの皮膚について、免疫組織染色、ウエスタンブロット、



The research to establish the drug for white skin through analysis of melanin production

Masashi Kato

Department of Environmental and Preventive Medicine, Research Institute of Life and Health Sciences, Chubu University

免疫沈降、キナーゼアッセイ等の方法を用いて、抗 c-Kit 抗体がどのようなメカニズムで毛色に作用するのかを解析する。

### 3 結果と考察

a)  $W^V$ -マウスと RET-トランスジェニックマウスを交配させることにより、c-Kit 機能の低下した RET-マウスを作製し、毛色と腫瘍の大きさを調べる

a-1) RET-トランスジェニックマウス（黒色毛）と  $W^V$ -マウス（図 1 A：左端の白色マウス）を交配することにより c-Kit の機能の著しく低下した RET-トランスジェニックマウス（図 A：右側の 3 匹）を作製すると、このマウスの毛色は黒色毛と白色毛が混じったパンダ様となった。これは、c-Kit の機能低下によるメラニン産生の低下が、RET キナーゼにより部分的に補われる可能性を示している。

a-2) c-Kit の機能の著しく低下した RET-トランスジェニックマウスでは、白毛部分のメラニン産生は見られない（図 1：B1）。一方、黒毛部分では、毛根からこぼれ落ちるほどのメラニン過剰産生が観察される（図 1：B2）。これは、オリジナル RET-トランスジェニックマウスの毛泡と同じ表現型である。少なくとも毛泡に関しては、白毛部分は  $W^V$ -マウスの、黒毛部分は RET-マウスのモザイクになっているかもしれない。

a-3) 生後 8 ヶ月 RET-トランスジェニックマウスでは図 1 C の下段に示すように腫瘍が発症している。しかし、生後 c-Kit の機能の著しく低下した RET-マウスでは、生後 8 ヶ月になっても通常腫瘍の発症はみられなかった。この結果は、RET-マウスにおいて c-Kit 機能が低下することにより、腫瘍の発症を抑制する事ができる可能性を示している。これを証明するためには、数を増やして統計学的検討が必要となる。

a-4) RET-トランスジェニックマウス（図 2 A：RET）、c-Kit 機能の一部低下した RET-トランスジェニックマウス（図 2 A： $W^V/+$ -RET）、c-Kit 機能が著明に低下した RET-トランスジェニックマウス（図 2 A： $W^V/W^V$ -RET）の寿命を生存曲線にて比較すると通常の RET-マウスに比較して c-Kit 機能の一部低下した RET-トランスジェニックマウスの寿命は統計学的に有意に延びていた。c-Kit 機能が著明に低下した RET-トランスジェニックマウスでは、さらに有意に寿命が延びた。

a-5) RET-トランスジェニックマウス（図 2 B：RET）では、100%のマウスに腫瘍が発症し、70%の腫瘍が悪性転化をおこし、メラノーマを発症している。ところが、c-Kit 機能の一部低下した RET-トランスジェニックマウス（図 2 B： $W^V/+$ -RET）では 30%以上のマウスで、

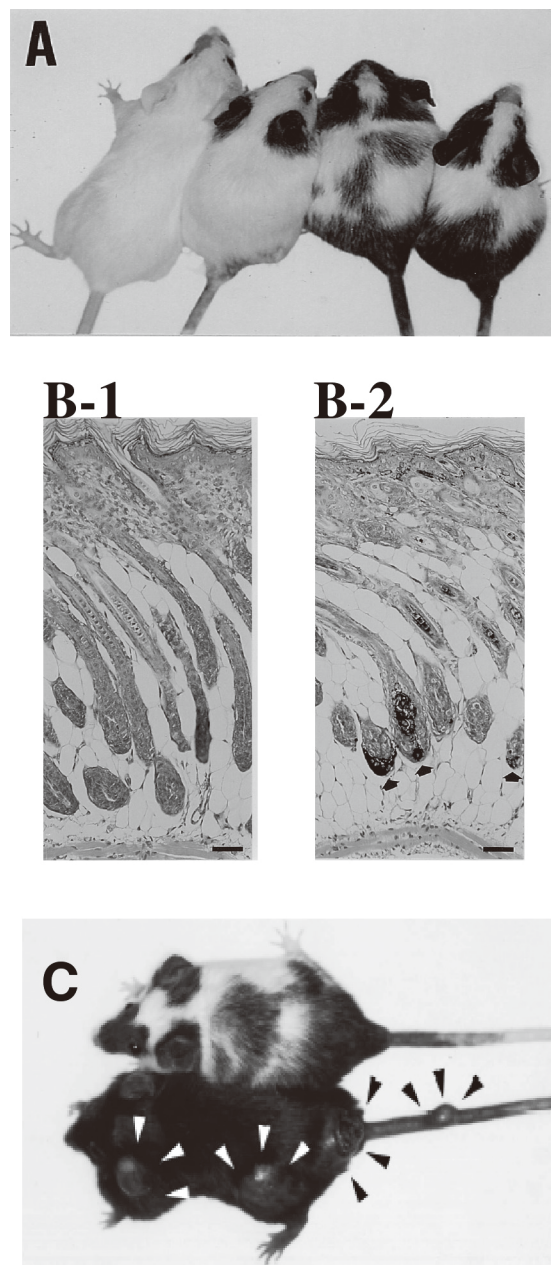


図 1  
A：4 週齢の  $W^V/W^V$ -マウス（左端）及び同腹の  $W^V/W^V$ -RET-トランスジェニックマウス（右側の 3 匹： $W^V/W^V$  遺伝子を持つ RET-トランスジェニックマウス）。  
B： $W^V/W^V$ -RET-トランスジェニックマウスの白色毛部分の皮膚（B-1）と黒色毛部分の皮膚（B-2）の組織像。  
C：生後 8 ヶ月の RET-トランスジェニックマウス（上段）と  $W^V/W^V$ -RET-トランスジェニックマウス（下段）（Kato M et al. Cancer Res 64:801-806, 2004 の Fig.1 を改変して掲載）。

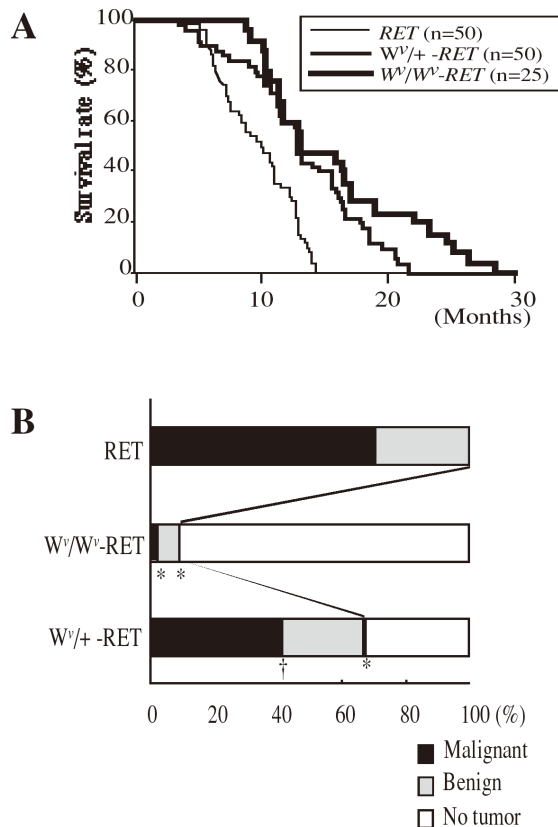


図2

A: RET- トランスジェニックマウス (RET; n=50)、W<sup>V</sup>/+RET- トランスジェニックマウス (W<sup>V</sup>/+RET; n=50)、W<sup>V</sup>/W<sup>V</sup>-RET- トランスジェニックマウス (W<sup>V</sup>/W<sup>V</sup>-RET; n=25) における寿命。

B: RET- トランスジェニックマウス (RET; n=44)、W<sup>V</sup>/+RET- トランスジェニックマウス (W<sup>V</sup>/+RET; n=61)、W<sup>V</sup>/W<sup>V</sup>-RET- トランスジェニックマウス (W<sup>V</sup>/W<sup>V</sup>-RET; n=44) における悪性腫瘍 (Malignant)、良性腫瘍 (Benign) の発症率 (Kato M et al. Cancer Res 64:801-806, 2004 の Fig.1 を改変して掲載)。

良性腫瘍さえ発症しなかった。良性腫瘍が発症したマウスは全体の2/3程度であり、悪性転化をおこしたマウスは40%以下であった。さらに、興味深いことに、c-Kit機能が著明に低下したRET- トランスジェニックマウス (図2 B: W<sup>V</sup>/W<sup>V</sup>-RET) では、90%以上のマウスが良性腫瘍さえ発症しなかった。また、悪性転化した腫瘍は全体の5%以下であった。

上記a-1)～a-5)の結果は、1) c-Kit分子を介したメラノサイト増殖メラニン産生はRET分子により一部補う事ができる可能性があること、2) メラノーマを自然発症するRET- トランスジェニックマウスのc-Kit機能を調整することによりメラノサイト系腫瘍の発症をコントロールできる可能性があること、を示している。

b) 抗c-Kit抗体を用いてRET- トランスジェニックマウスのc-Kit機能を人為的に低下させたRET- マウスにて毛色と腫瘍の大きさを調べる

b-1) RET- トランスジェニックマウスに対し、生後24時間以内に0.5mgの抗c-Kit抗体 (ACK2) を一度だけ注射し、その後の腫瘍の大きさについて注射を受けていないRET- マウスと比較した (図3 A)。ACK2を注射されたマウス (図3 A: RET ACK2(+)) では、ACK2投与を受けていないRET- マウス (図3 A: RET) に比較して、特に生後11-12ヶ月頃まで、著しく腫瘍増殖が抑制された。さらに、オリジナルのRET- マウスでは100%のマウスに腫瘍が発症し、70%の腫瘍が悪性転化をおこし、メラノーマを発症している (図3 C: RET ACK2(-)) のに対してACK2を投与されたRET- マウスでは、40%以上のマウスに良性腫瘍さえ発症しなかった (図3 C: RET ACK2(+))。また、悪性転化した腫瘍は1/3程度に抑制された。以上のように本研究では、メラノーマを自然発症するRET- トランスジェニックマウスにおいてc-Kit機能を調整することによりメラノサイト系腫瘍の発症をコントロールできることをより臨床応用しやすいかたちで示した。

b-2) オリジナルのRET- トランスジェニックマウスでは毛色は一生黒色のままである (図3 B: 下段マウス)。生後24時間以内に0.5mgの抗c-Kit抗体 (ACK2) を注射されたRet- マウスの毛色は一生グレーままであった (図3 B: 上段マウス)。一方、アダルトRET- マウスに対して0.5mgのACK2を注射しても、ほとんど毛色に変化はなかった。

これらの結果は、c-Kit分子は恒常的に発現しているのではなく、年齢特異的に発現している可能性があることを示している。

b-3) 生後24時間以内のACK2投与によりコントロールのC57BL/6マウス (黒色毛) の毛色はいったん完全に白色になるにもかかわらず (図4 Cの2)、生後3-4ヶ月後には黒色毛に戻った (図4 Cの2)。一方、生後24時間以内に0.5mgの抗c-Kit抗体 (ACK2) を注射されたRet- マウスの毛色はグレーのままである (図4 Cの4)。野生型C57BL/6マウスとRET- マウスにおけるACK2に対する毛色の違いを説明することは難しい。筆者らは、RET- マウスでは生後24時間以内にほとんどメラノサイトの幹細胞 (おそらくc-Kitを発現している) がシンクロナイズして分化するために皮膚黒色症が誘導される。しかし、野生型マウスでは生後24時間以内に一部のメラノサイトの幹細胞が分化するのみであるので、数ヶ月後には白髪が黒く変化するのではないかと考えている。

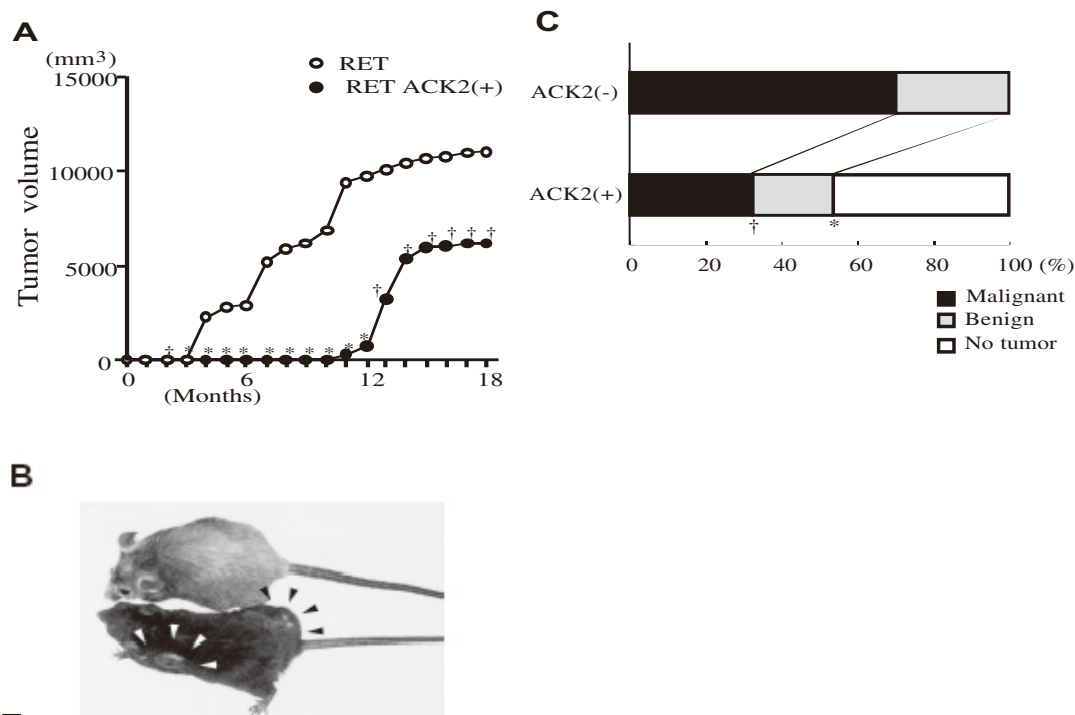


図3

A: 抗 c-Kit 抗体 0.5 mg を生後 24 時間以内に皮下に注射された RET- トランスジェニックマウス (RET ACK2(+): n=21) 及び注射を受けていない RET- トランスジェニックマウス (RET: n=42) の月齢と腫瘍サイズ (\*; P<0.0001、†; P<0.01)。

B: 8 ヶ月齢の抗 c-Kit 抗体 0.5mg を生後 24 時間以内に皮下に注射された RET- トランスジェニックマウス (上段) と同腹の注射を受けていない RET- トランスジェニックマウス (下段) のマクロ所見。

C: 抗 c-Kit 抗体 0.5mg を生後 24 時間以内に皮下に注射された RET- トランスジェニックマウス (RET ACK2(+): n=22) 及び注射を受けていない RET- トランスジェニックマウス (RET: n=46) の悪性腫瘍 (Malignant)、良性腫瘍 (Benign) の発症率 (\*; P<0.0001、†; P<0.005) (Kato M et al. Cancer Res 64:801-806, 2004 の Fig.3 を改変して掲載)。

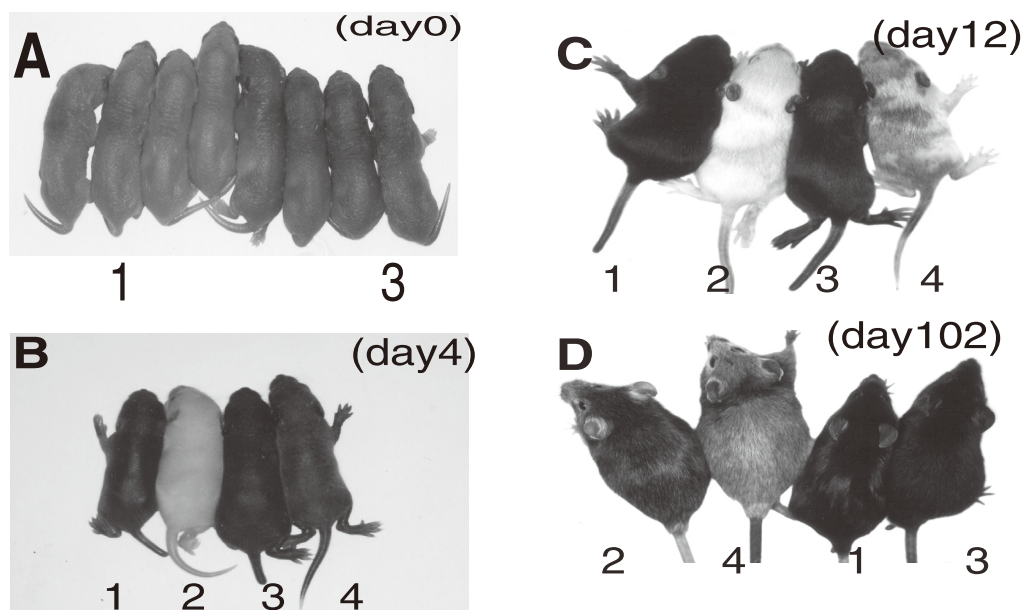


図4

A - D: 抗 c-Kit 抗体 0.5mg を生後 24 時間以内に皮下に注射されたコントロール C57BL/6 マウス (B-D: No.2) と RET- トランスジェニックマウス (B-D: No.4)、注射を受けていない C57BL/6 マウス (A-D: No.1) と RET- トランスジェニックマウス (A-D: No.3) のマクロ所見 (Kato M et al. Cancer Res 64:801-806, 2004 の Fig.4 を改変して掲載)。

#### 4 結語

RET と c-Kit の両チロシンキナーゼは、メラノサイトの増殖及びメラニン産生において相補的に作用していると考えられる。

##### (参考文献)

- 1) Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, Tsuzuki T, Hossain K, Tamakoshi A, Kunisada T, Kambayashi Y, Ogino K, Takahashi M, Nakashima I. c-Kit-targeting immunotherapy for hereditary melanoma in a mouse model. **Cancer Res** 64:801-806, 2004.
- 2) Kato M, Takahashi M, Akhand AA, et al. Transgenic Mouse Model for Skin Malignant Melanoma. **Oncogene** 17: 1885-1888,
- 3) Kato M, Liu W, Akhand AA, et al. Linkage between melanocytic tumor development and early burst of Ret protein expression for tolerance induction in metallothionein-I/ret transgenic mouse lines. **Oncogene** 18: 837-842, 1999.
- 4) Kato M, Isobe K, Dai Y, et al. Further characterization of the Sho-saiko-to-mediated anti-tumor effect on melanoma developed in RET- transgenic mice. **J Invest Dermatol** 114: 599-601, 2000a.
- 5) Kato M, Iwashita T, Takeda K, et al. Ultraviolet light induces redox reaction-mediated dimerization and superactivation of oncogenic Ret tyrosine kinases. **Mol Biol Cell** 11: 93-101, 2000.
- 6) Kato M, Liu W, Akhand AA, et al. Ultraviolet Radiation Induces Both Full Activation of Ret Kinase and Malignant Melanocytic Tumor Promotion in RFP-RET-Transgenic Mice. **J Invest Dermatol** 115: 1157-1158, 2000.
- 7) Kato M, Liu W, Yi H, et al. The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits growth and metastasis of malignant melanoma primarily developed in ret-transgenic mice. **J Invest Dermatol** 111: 640-644, 1998.
- 8) Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, et al. Repair by Src Kinase of Function-impaired RET with Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A Mutation with Substitutions of Tyrosines in the COOH-Terminal Kinase Domain for Phenylalanine. **Cancer Res** 62:2414-22, 2002.
- 9) von Felbert V, Cordoba F, Weissenberger J, Vallan C, Kato M, Nakashima I, Braathen LR, Weis J. Interleukin-6 gene ablation in a transgenic mouse model of malignant skin melanoma. **Am J Pathol** 166:831-41, 2005.

## **Ⅱ. 生体作用、安全性に関する分野**

# 共役リノール酸単独または他の脂肪酸との混合投与による皮膚特性の修飾

九州大学大学院農学研究院

古瀬 充宏

The effects of conjugated linoleic acid (CLA),  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) and linoleic acid (LA), and their combinations, on skin properties were investigated in mice. Mice (8-week-old) were orally administrated with either LA, GLA, CLA, LA + GLA, LA + CLA, or CLA + GLA for 4 weeks. Then, the skin was analyzed for triacylglycerol content, fatty acid composition, and collagen content. Additionally, thicknesses of the dermis layer and subcutaneous tissue layer, and the size and number of adipocytes were measured histologically. The skin fatty acid composition was modified depending upon the fatty acid composition of supplemented oils. In each oil-alone group, skin triacylglycerol content was the highest in LA, followed by GLA and CLA. Combinations with CLA reduced triacylglycerol content comparable to the level of CLA alone. No significant changes in collagen content were observed among any treatments. The results for the thickness of subcutaneous tissue were similar to the results obtained in triacylglycerol contents, while no significant difference was detected in the thickness of the dermis layers. The numbers of adipocytes were also reduced by CLA. These results suggest that supplementation with CLA alone or in combination with other fatty acids has an anti-obesity effect on skin properties in mice.

## 1 緒言

細菌や紫外線などの外部環境から生命を保護するために皮膚は重要な役割を果たしている<sup>3)</sup>。表皮、真皮および皮下組織の3層に皮膚は分けられるが、真皮は皮膚の弾力性や柔軟性に関わり、皮下組織は脂肪細胞として脂質を蓄積する。その皮膚の機能と魅力さは栄養状態によって大きく変化を受ける。例えば、摂取した脂肪酸は皮膚特性に影響を及ぼす<sup>3)</sup>。長鎖 n-6 系および n-3 系不飽和脂肪酸は必須脂肪酸であり、伸長反応や不飽和化を受け代謝される。n-6 系不飽和脂肪酸において、リノール酸 (LA) は、 $\gamma$  リノレン酸 (GLA)、ジホモ- $\gamma$  リノレン酸 (DGLA)、プロスタグランジン E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) やアラキドン酸 (AA) へと代謝される。プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) やロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) などの AA 由来のエイコサノイドは、皮膚において炎症やアレルギーを引き起こすことが報告されている<sup>10, 12)</sup>。また、LA 欠乏によって、ラットで皮膚の角質化が観察された<sup>25)</sup>。この事実は、LA が皮膚の健康維持における重要な因子の一つであることを示唆する。一方、LA は皮膚に豊富に存在するが<sup>21)</sup>、過剰な LA の摂取は皮膚を含む様々な器官で炎症やアレルギー反応の原因となる<sup>7, 9)</sup>。

マツヨイグサ油、クロスグリ油とボラージ油には、

GLA が豊富に含まれるが、これら植物油の補給で消炎や免疫調節性効果が報告されている<sup>6, 30)</sup>。PGE<sub>1</sub> または 15-ヒドロキシエイコサトリエン酸 (15-HETrE) は、シクロオキシゲナーゼまたは 15-リポキシゲナーゼで DGLA から産生され、生理活性脂質として作用するロイコトリエンを阻害する<sup>31)</sup>。

共役リノール酸 (CLA) は、LA の構造および幾何異性体の総称であって、主に反芻動物から作り出される食品材料に含まれる。CLA は、精巢上体と腸間膜の白色脂肪組織重量と皮下の組織の脂肪細胞を減少させることが報告された<sup>19, 21, 28)</sup>。CLA は n-6 系不飽和脂肪酸における LA から GLA への代謝を阻害する<sup>4)</sup>。結果としていくつかの組織において AA と PGE<sub>2</sub> の水準は減少する<sup>1)</sup>。さらに、CLA は癌細胞の成長を阻害し、肝臓と脂肪組織においてアポトーシスを誘発することも知られている<sup>1)</sup>。

加えて、摂取した CLA は皮膚に容易に移行<sup>21)</sup> し、アレルギー性そう痒症に影響を及ぼすことが報告<sup>11)</sup> された。これらの点から、CLA は皮膚性状に有益であると理解される。しかし、CLA はマウスにおいて肝臓の重量を増加させることが報告されていた<sup>18, 28)</sup>。その後、Nakanishi *et al.*<sup>18)</sup> は CLA と GLA の組合せが CLA によって誘発される脂肪肝を予防すると報告した。これらの事実は、CLA によって修飾される皮膚性状が他の脂肪酸との相互作用により影響を受ける可能性を示唆する。

本研究の目的は、マウスの皮膚性状における CLA, GLA あるいは LA 単独の効果とそれぞれの組合せによる効果を調査することである。



Modification of skin properties by CLA alone or with combination of other fatty acids

Mitsuhiko Furuse

Faculty of Agriculture, Kyushu University

## 2 実験

### 2.1 動物

雄マウス（8週齢、Sea:ddY 系統、セアック吉富、福岡県より購入）は 24℃、12 時間照明条件で個別飼育し、市販飼料（MF、オリエンタル酵母、東京）と水を自由摂取させた。マウスは体重によって 5 匹ずつで 6 つのグループに分けた。LA、GLA および CLA 単独投与区はそれぞれの油脂を毎日 250 $\mu$ L ずつ 4 週間経口投与した。組み合わせ投与区（LA + GLA、LA + CLA ならびに CLA + GLA 区）は各油脂をそれぞれ 250 $\mu$ L ずつ（計 500 $\mu$ L ずつ）を毎日 4 週間経口投与した。LA 区を対照区とし、71.8% LA を含む紅花油（リノール油脂、名古屋）を与えた。GLA 区は 95.0% GLA（出光テクノファイン、東京）を、CLA 区は 70.8% CLA（リノール油脂、名古屋）を含む油脂を用いた。CLA の内訳は、9c, 11t-CLA が 32.4%、10t, 12c-CLA が 33.2% であった。これらの油脂の脂肪酸組成を表 1 に示す。

### 2.2 皮膚組織の採集

実験終了時にジエチルエーテル麻酔によりマウスを屠殺し、毛と共に全皮膚を剥がした。皮膚シート（1 cm × 1 cm）を組織学検討のために背側から切り取った。残りの皮膚の半分はコラーゲン分析のために、他の半分は脂肪酸組成測定のために用いた。重量測定後、皮膚は分析まで -80℃ で保存した。

### 2.3 コラーゲン含量の測定

皮膚サンプルは、10mL の 0.15M NaCl 溶液中で 1 時間超音波破碎を行った。その後、20mL の 6 N HCl を加え、懸濁液を 20℃ で 24 時間加水分解した後、120℃ で 10 時間保った。加水分解したサンプルは、フィルター後、蒸留水で 100mL に定容した。サンプル（1 mL）は蒸発乾固

表 1 試験油脂の組成（脂肪酸の%）

|             | LA   | GLA  | CLA  |
|-------------|------|------|------|
| C16:0       | 6.5  | -    | 6.6  |
| C18:0       | 2.5  | -    | 2.4  |
| C18:1       | 17.1 | -    | 16.6 |
| C18:2 (n-6) | 71.8 | -    | 1.5  |
| CLA         | -    | -    | 70.8 |
| 9c, 11t-    | -    | -    | 32.4 |
| 10t, 12c-   | -    | -    | 33.2 |
| c, c-       | -    | -    | 2.3  |
| t, t-       | -    | -    | 2.9  |
| C18:3 (n-6) | -    | 95.0 | -    |
| 他           | 2.1  | 5.0  | 2.1  |

略語: LA, リノール酸; CLA, 共役リノール酸; GLA,  $\gamma$ -リノレン酸。

後、蒸留水で希釈した。サンプル 0.2mL とイソプロパノール 0.4mL を混ぜ、そして 0.2mL のオキシダント溶液（75% wt/vol のクロラミン T と酢酸塩 / クエン酸塩バッファー（pH 6.0）を 3 : 1 の比率で混合したもの）を混合した。室温で 4 分間保った後に 2.6mL のエールリッヒ試薬溶液を加え、60℃ で 25 分間培養した。冷却後、6.6mL のイソプロパノールで希釈した。サンプル溶液の中のヒドロキシプロリン濃度は、分光光度計で 560nm の波長で測定した<sup>2)</sup>。

### 2.4 トリアシルグリセロール含量および脂肪酸組成の測定

皮膚の総脂質は Folch の変法で抽出した<sup>8, 24)</sup>。トリアシルグリセロール含量は、市販キット（トリグリセリドワークス、和光純薬、大阪）で、脂肪酸組成は、ガスクロマトグラフィーで測定した<sup>14)</sup>。

### 2.5 皮膚層の観察

皮膚サンプルは常法により処理を行った<sup>20)</sup>。標本はリン酸緩衝液（pH 7.5）で希釈した 3% グルタルアルデヒドを用い 4℃ で固定した。固定サンプルは、4 日間 10% NaOH に、それから 3 日間蒸留水に浸漬した。その後、1% タンニン酸溶液に 2 時間、2% 四酸化オスミウム溶液に 1 時間浸漬した。エタノールにより脱水後、ヒプシルアルコールに留置し、凍結乾燥した。サンプルを、アルミニウムホルダーにのせ、Pt Pd で蒸着し、ss-550 走査型電子顕微鏡で観察を行った。真皮層および真皮層と筋膜にはさまれた皮下組織層の厚さを顕微鏡写真で測定した。

### 2.6 脂肪細胞のサイズの測定

標本はリン酸緩衝液（pH 7.5）で希釈した 3% グルタルアルデヒドを用い 4℃ で固定した。その後、1% タンニン酸溶液に 30 分、1% 四酸化オスミウム溶液に 1 時間浸漬した。その他は、上述通りであった。皮下組織層の脂肪細胞のサイズと数を測定した。脂肪細胞のサイズは、細胞の長径と短径の平均で求めた。1 mm<sup>2</sup> 当たりの直径 10 $\mu$ m 以上の脂肪細胞の数を測定し、20 $\mu$ m の間隔でグループ分けした。

### 2.7 統計方法

データは、一元配置分散分析法によって統計的に解析した。有意な効果が検出された時、Fisher の PLSD 検定または Tukey-Kramer の検定を行い個々のグループを比較した。統計的な有意差は、 $P < 0.05$  とした。結果は、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

## 3 結果

図 1 には皮膚トリアシルグリセロール含量に及ぼす

CLA、GLA、LA あるいはそれらの組み合わせの効果を示した。個々の油脂間の比較では、LA 区が最も高く、GLA、CLA の順となった。LA と GLA を組み合わせるとトリアシルグリセロール含量は LA 単独よりむしろ GLA 単独区に近かった。LA+CLA あるいは CLA+GLA 区のトリアシルグリセロール含量は CLA 単独区に近いものであった。コラーゲン含量には、どの区間においても有意な差は認められなかった（データは示さず）。

皮膚の脂肪酸組成に及ぼす油脂源とそれらの組み合わせ効果については表 2 に示す。脂肪酸組成は明らかに投与した油脂に依存して変化した。特に、LA、GLA および CLA の量は投与した油脂により修飾を受けた。LA 単独区または LA+GLA および LA+CLA 組み合わせ区の LA 含量は 33% 以上であったが、残りの 3 区では 28% 以下であった。GLA 含量は、GLA 単独区よりも GLA と他の油脂を組み合わせた区で高くなった。しかし、CLA 含量においては

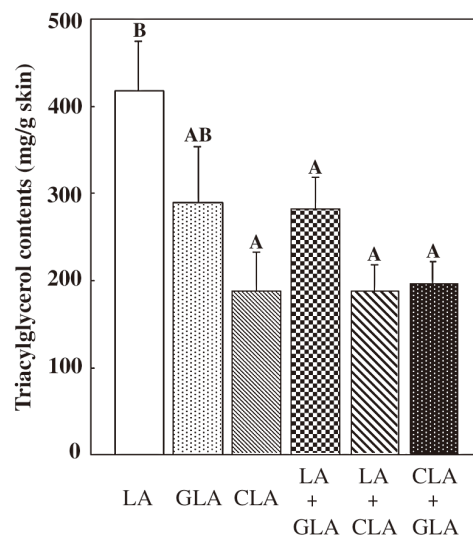


図 1 LA、GLA、CLA またはそれらの組合せを投与したマウスの皮膚のトリアシルグリセロール含量。マウスは 1 区当たり 5 頭用いた。値は平均値 ± 標準誤差で示す。異なる文字間に有意差あり (P<0.05)。

表 2 皮膚の脂肪酸組成 (%)

| Oil         | LA                       | GLA                      | CLA                     | LA+GLA                   | LA+CLA                   | CLA+GLA                  |
|-------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| C14:0       | 1.17±0.07 <sup>a</sup>   | 1.71±0.37 <sup>b</sup>   | 0.83±0.13 <sup>a</sup>  | 1.02±0.06 <sup>a</sup>   | 0.74±0.02 <sup>a</sup>   | 1.05±0.08 <sup>a</sup>   |
| C16:0       | 18.78±0.65 <sup>bc</sup> | 20.72±0.80 <sup>c</sup>  | 20.56±0.60 <sup>c</sup> | 17.54±0.37 <sup>a</sup>  | 18.10±0.40 <sup>bc</sup> | 19.41±0.63 <sup>ab</sup> |
| C16:1       | 4.41±0.40 <sup>bc</sup>  | 5.84±0.71 <sup>c</sup>   | 2.28±0.59 <sup>a</sup>  | 4.13±0.44 <sup>b</sup>   | 2.45±0.66 <sup>a</sup>   | 2.42±0.16 <sup>a</sup>   |
| C18:0       | 2.60±0.16 <sup>a</sup>   | 3.29±0.44 <sup>ab</sup>  | 4.31±0.27 <sup>c</sup>  | 2.84±0.10 <sup>a</sup>   | 3.89±0.14 <sup>bc</sup>  | 3.81±0.26 <sup>bc</sup>  |
| C18:1       | 31.77±0.64 <sup>b</sup>  | 31.10±0.53 <sup>ab</sup> | 34.14±0.56 <sup>c</sup> | 29.15±0.54 <sup>a</sup>  | 30.86±1.03 <sup>ab</sup> | 29.36±0.69 <sup>a</sup>  |
| C18:2       | 36.31±0.75 <sup>d</sup>  | 27.65±0.79 <sup>b</sup>  | 23.71±1.49 <sup>a</sup> | 35.15±0.55 <sup>cd</sup> | 33.35±0.99 <sup>c</sup>  | 25.16±0.64 <sup>ab</sup> |
| CLA         | 0.50±0.07 <sup>a</sup>   | 0.49±0.13 <sup>a</sup>   | 8.11±0.63 <sup>c</sup>  | 0.56±0.14 <sup>a</sup>   | 5.29±0.36 <sup>b</sup>   | 6.98±0.80 <sup>c</sup>   |
| 9c,11t      | 0.29±0.04 <sup>a</sup>   | 0.27±0.07 <sup>a</sup>   | 4.71±0.37 <sup>d</sup>  | 0.32±0.08 <sup>a</sup>   | 3.02±0.19 <sup>b</sup>   | 3.84±0.42 <sup>c</sup>   |
| 10t,12c     | 0.13±0.02 <sup>a</sup>   | 0.13±0.05 <sup>a</sup>   | 2.77±0.25 <sup>c</sup>  | 0.09±0.04 <sup>a</sup>   | 1.78±0.16 <sup>b</sup>   | 2.53±0.33 <sup>c</sup>   |
| c,c         | 0.01±0.01 <sup>a</sup>   | 0.03±0.01 <sup>ab</sup>  | 0.28±0.02 <sup>d</sup>  | 0.08±0.03 <sup>b</sup>   | 0.20±0.01 <sup>c</sup>   | 0.27±0.03 <sup>d</sup>   |
| t,t         | 0.08±0.01 <sup>a</sup>   | 0.05±0.00 <sup>a</sup>   | 0.35±0.01 <sup>b</sup>  | 0.06±0.01 <sup>a</sup>   | 0.29±0.02 <sup>b</sup>   | 0.33±0.04 <sup>b</sup>   |
| C18:3 (n-6) | 0.37±0.17 <sup>a</sup>   | 2.99±0.31 <sup>b</sup>   | 0.23±0.09 <sup>a</sup>  | 4.72±0.56 <sup>c</sup>   | 0.42±0.21 <sup>a</sup>   | 4.50±0.52 <sup>c</sup>   |
| C18:3 (n-3) | 1.05±0.06 <sup>c</sup>   | 1.14±0.04 <sup>c</sup>   | 0.63±0.10 <sup>a</sup>  | 1.03±0.08 <sup>c</sup>   | 0.57±0.04 <sup>a</sup>   | 0.84±0.06 <sup>b</sup>   |
| C20:3       | 0.23±0.04 <sup>a</sup>   | 0.51±0.05 <sup>cd</sup>  | 0.42±0.12 <sup>bc</sup> | 0.67±0.04 <sup>de</sup>  | 0.31±0.05 <sup>ab</sup>  | 0.83±0.01 <sup>e</sup>   |
| C20:4       | 0.48±0.04                | 1.08±0.37                | 0.75±0.18               | 0.84±0.07                | 0.75±0.10                | 1.42±0.29                |
| 他           | 11.60±0.17               | 3.49±1.00                | 4.03±0.61               | 2.30±0.14                | 3.25±0.20                | 4.25±0.61                |
| 飽和脂肪酸       | 23.1±0.62                | 27.0±1.10                | 27.1±1.02               | 22.0±0.49                | 23.8±0.34                | 25.9±0.70                |
| 不飽和脂肪酸      | 76.9±0.62                | 73.0±1.10                | 72.9±1.02               | 78.0±0.49                | 76.2±0.34                | 74.1±0.70                |

略語: LA, リノール酸; CLA, 共役リノール酸; GLA, γ-リノレン酸。マウスは 1 区当たり

5 頭用いた。値は平均値 ± 標準誤差で示す。異なる文字間に有意差あり (P<0.05)。

CLA 単独区の方が CLA と他の油脂を組み合わせた区よりも高かった。CLA の異性体では、9c, 11t-CLA が 10t, 12c-CLA に比して高かった。AA 含量に関しては処理の効果は認められなかった。

図 2 には CLA、GLA、LA あるいはそれらを組み合わせて投与したマウスの真皮ならびに皮下組織層の走査型電

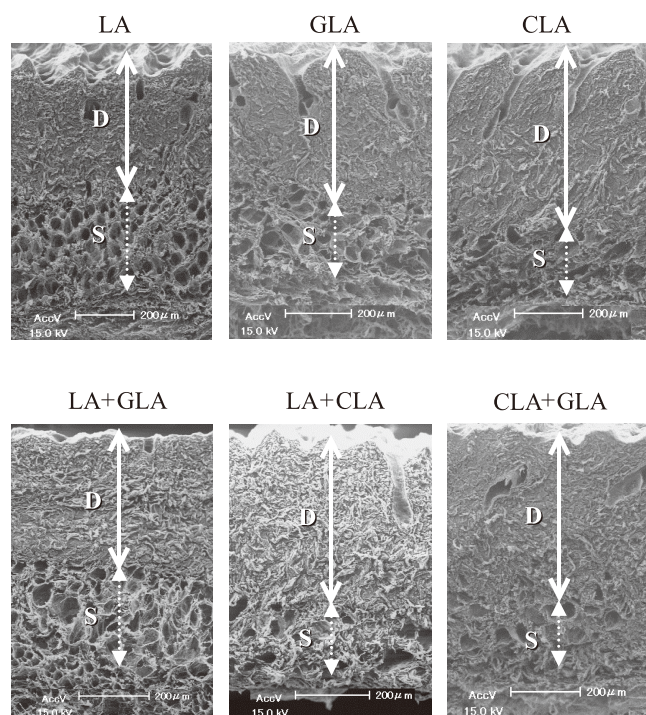


図 2 LA、GLA、CLA またはそれらの組合せを投与したマウスの真皮と皮下組織の代表的走査電子顕微鏡写真。略語：D, 真皮層；S, 皮下組織層。バーは 200  $\mu\text{m}$  を示す。

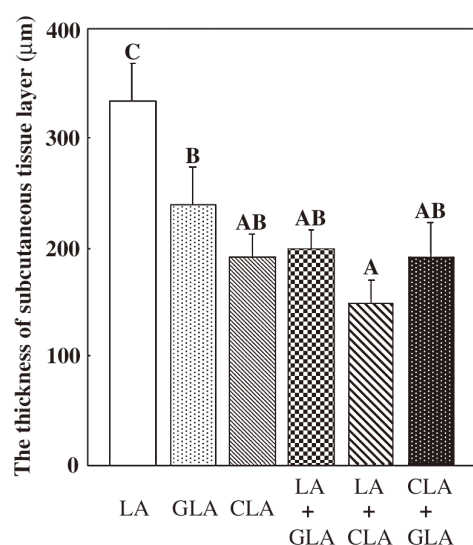


図 3 LA、GLA、CLA またはそれらの組合せを投与したマウスの皮下組織層の厚さ。マウスは 1 区当たり 5 頭用いた。値は平均値  $\pm$  標準誤差で示す。異なる文字間に有意差あり ( $P < 0.05$ )。

子顕微鏡写真を示す。真皮層の厚さにおいては処理間に有意な差は認められなかった。一方、皮下組織層においては処理による有意な効果が検出され、他の区に比して LA 区で最も厚かった (図 3)。また、LA+CLA 区で最も薄くなった。

図 4a は、走査型電子顕微鏡による皮下組織層の代表的な写真を示す。図 4b は、皮下組織の脂肪細胞の数を 20  $\mu\text{m}$  の間隔で区分した結果を示す。脂肪細胞の数は、LA+GLA 区で最も多かった。割合では、CLA 区で 10–30  $\mu\text{m}$  の直径の脂肪細胞が高かった。

#### 4 考察

本研究で用いた CLA 油脂は、主に 9c, 11t-CLA (32.4%) と 10t, 12c-CLA (33.2%) から構成された。しかし、CLA 区における 9c, 11t-CLA の割合は、10t, 12c-CLA の 1.7 倍となった。この結果は前報と良く一致している<sup>21)</sup>。他の脂肪酸と混合して与えた際にも 9c, 11t-CLA の割合は 1.7 倍 (LA+CLA 区) と 1.5 倍 (CLA+GLA 区) 高かった。CLA を投与しなくともマウスの皮膚にはわずかながらの CLA が含まれ、9c, 11t-CLA の割合は 10t, 12c-CLA の

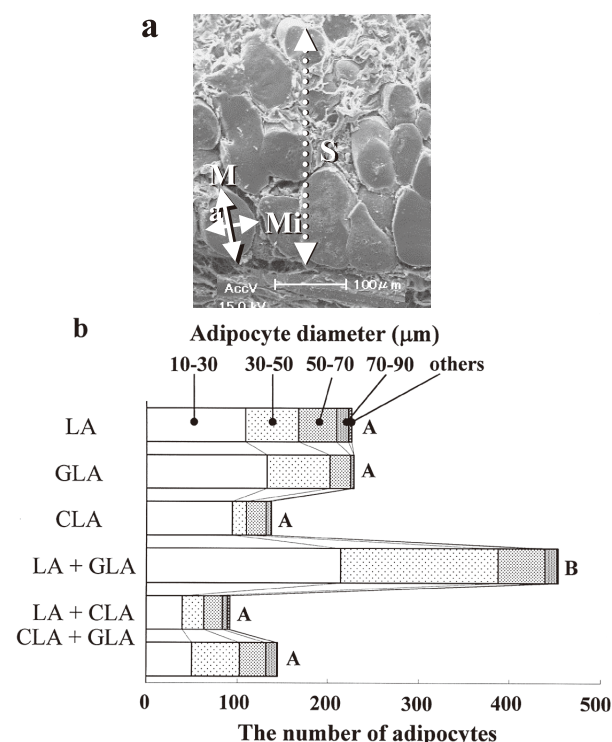


図 4 a; LA、GLA、CLA またはそれらの組合せを投与したマウスの皮下組織の代表的走査電子顕微鏡写真。略語：Ma、長径；Mi、短径；S, 皮下組織層。バーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。b; LA、GLA、CLA またはそれらの組合せを投与したマウスの脂肪細胞の総数。マウスは 1 区当たり 5 頭用いた。値は平均値  $\pm$  標準誤差で示す。異なる文字間に有意差あり ( $P < 0.05$ )。

2.2–3.6 倍高いものであった。これらの結果は、CLA は天然に存在する脂肪酸であり、9c, 11t-CLA は皮膚に移行しやすい脂肪酸であることを示す。また、9c, 11t-CLA と 10t, 12c-CLA の比は同時に投与される脂肪酸により変化を受けることが示唆される。一方、Brown *et al.*<sup>5)</sup> は 10t, 12c-CLA が体脂肪の蓄積を抑制すると報告している。それは肝臓のステアロイル-CoA 不飽和化酵素を阻害する効果<sup>22)</sup> やリポタンパク質リパーゼの活性に影響を及ぼす<sup>17)</sup> からである。まとめると、本研究で得られたトリアシルグリセロール含量の減少や皮下脂肪組織の薄さは、9c, 11t-CLA よりむしろ 10t, 12c-CLA によるものかもしれない。

CLA は内臓脂肪の蓄積を阻害する<sup>19, 28)</sup>。その反面、過剰の CLA 摂取はマウスにおいて脂肪肝を誘発する<sup>18)</sup>。CLA によって誘発される脂肪肝は、GLA を同時に投与することにより抗肥満効果を有したままで改善されると Nakanishi *et al.*<sup>18)</sup> は報告した。本研究でも、CLA+GLA 区と CLA 単独区が皮膚のトリアシルグリセロールと皮下組織層の厚さを抑えた（図 1 と 3）。CLA の効果は内臓脂肪ばかりか皮膚にも及ぶことが明らかとなった。

GLA の割合は、GLA 単独区よりも LA+GLA 区と CLA+GLA 区で高くなった。LA+GLA 区においては、LA から GLA の代謝により GLA の割合が高くなったと考えられる。CLA+GLA 区で高くなった理由は明らかでないが、何らかの代謝に CLA が影響した可能性がある。さらに、皮下組織の厚さは LA 単独区よりも GLA 単独区で薄くなった（図 3）が、これは GLA によりカルニチン・パルミトイルトランスフェラーゼとペルオキシソームの  $\beta$ -酸化活性が高まったことによると考えられる<sup>26, 27)</sup>。

PGE<sub>2</sub> はコラーゲン合成を高<sup>16)</sup>、PGE<sub>1</sub> はヒトの培養線維芽細胞においてコラゲナーゼの遺伝子発現を抑制した<sup>23)</sup>。本研究においてプロスタグランジンは測定していないが、CLA によって減少することは報告されている<sup>1)</sup>。しかし、真皮の厚さとコラーゲン含量に区間で差は認められなかった。これらの結果は、前報と同様であった<sup>21)</sup>。

食餌由来の LA は容易に皮膚に移行した（表 2）。LA は AA を介して産生される PGE<sub>2</sub> の起源であるために、過剰の LA 摂取は皮膚に炎症を誘発することが報告されている<sup>7, 9)</sup>。PGE<sub>2</sub> は皮膚の炎症を強く誘導する<sup>13)</sup>。CLA は LA の不飽和化酵素<sup>1, 15)</sup> を阻害し、リン脂質からの AA の放出と AA からのエイコサノイドの産生を抑制する<sup>29)</sup> ために、CLA により皮膚の PGE<sub>2</sub> は減少する可能性がある。

結論として、CLA は皮膚の脂肪酸組成を変え、トリアシルグリセロール含量と皮下組織の厚みと脂肪細胞の数を減少させる。その上、CLA の効果は他の脂肪酸を同時に投与しても機能することが明らかとなった。

## (引用文献)

- 1) Belury MA, :Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action, *Annu Rev Nutr.*, 22, 505–531, 2002.
- 2) Bergman I, Loxley R, :Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline, *Anal Chem.*, 35, 1961–1965, 1963.
- 3) Boelsma E, Hendriks FJH, Roza L, :Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids, *Am J Clin Nutr.*, 73, 853–864, 2001.
- 4) Bretillon, L, Chardigny JM, Gregoire S, *et al.*, :Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro, *Lipids*, 34, 965–969, 1999.
- 5) Brown JM, Halvorsen YD, Lea-Currie YR, *et al.*, :Trans-10, cis-12, but not cis-9, trans-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue, *J Nutr.*, 131, 2316–2321, 2001.
- 6) Chung S, Kong S, Seong K, *et al.*, : $\gamma$ -linolenic acid in borage oil reverses epidermal hyperproliferation in guinea pigs, *J Nutr.*, 132, 3090–3097, 2002.
- 7) Fogh K, Kragballe K, :Eicosanoids in inflammatory skin diseases, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 63, 43–54, 2000.
- 8) Folch J, Lees M, Stanley GHS, :A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J Biol Chem.*, 226, 497–509, 1957.
- 9) Gleich GJ, Kita H, :Bronchial asthma: Lessons from murine models, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 2101–2102, 1997.
- 10) Horrobin DF, :Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema, *Am J Clin Nutr.*, 71 suppl., 367S–372S, 2000.
- 11) Ishiguro K, Oku H, Suitani A, *et al.*, :Effects of conjugated linoleic acid on anaphylaxis and allergic pruritus, *Biol Pharm Bull.*, 25, 1655–1657, 2002.
- 12) James MJ, Gibson RA, Cleland LG, :Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production, *Am J Clin Nutr.*, 71 suppl., 343S–348S, 2000.
- 13) Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, *et al.*, :Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of langerhans cells, *Nat Med.*, 9, 744–749, 2003.
- 14) Kamegai T, Kasai M, Ikeda I, :Improved method for preparation of the methyl ester of conjugated linoleic acid, *J Oleo Sci.*, 50, 237–241, 2001.

- 15) Kavanaugh CJ, Liu KL, Belury MA, :Effect of dietary conjugated linoleic acid on phorbol ester-induced PGE2 production and hyperplasia in mouse epidermis, *Nutr Cancer*, 33, 132-138, 1999.
- 16) Levi-Schaffer F, Baram D, Segal V, *et al.*, :Prostaglandin E2 production by chronic graft-versus-host disease dermal fibroblasts, *Immunol Lett.*, 48, 11-15, 1995.
- 17) Lin Y, Kreeft A, Schuurbiens JAE, *et al.*, :Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes, *J Nutr Biochem.*, 12, 183-189, 2001.
- 18) Nakanishi T, Oikawa D, Koutoku T, *et al.*, : $\gamma$ -linolenic acid prevents conjugated linoleic acid-induced fatty liver in mice, *Nutrition*, 20, 390-393, 2004.
- 19) Nakanishi T, Ohgushi A, Yamashita T, *et al.*, :Effect of orally administered conjugated linoleic acids on behaviors and tissue fatty acid compositions in mice, *J Appl Anim Res.*, 20, 157-170, 2001.
- 20) Ohtani O, Ushiki T, Taguchi T, *et al.*, :Collagen fibrillar networks as skeletal frameworks: A demonstration by cell-maceration/scanning electron microscope method, *Arch Histo Cytol.*, 51, 249-261, 1988.
- 21) Oikawa D, Nakanishi T, Nakamura Y, *et al.*, :CLA and DHA modify skin properties in mice, *Lipids*, 38, 609-614, 2003.
- 22) Park Y, Storkson JM, Ntambi JM, *et al.*, :Inhibition of hepatic stearyl-CoA desaturase activity by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives, *Biochim Biophys Acta*, 1486, 285-292, 2000.
- 23) Salvatori R, Guidon PT Jr, Rapuano BE, *et al.*, :Prostaglandin E1 inhibits collagenase gene expression in rabbit synoviocytes and human fibroblasts, *Endocrinology*, 131, 21-28, 1992.
- 24) Seya K, Ohkohchi N, Shibuya H, *et al.*, :A chemiluminescent assay for hydroperoxide level of phosphatidylcholine hydroperoxide fraction purified by two sep-pak cartridges in biological samples, *J Pharm Biomed Anal.*, 23, 515-520, 2000.
- 25) Sinclair HM, :History of essential fatty acids, In *Omega-6 Essential Fatty Acids: pathophysiology and roles in clinical medicine* (Horrobin DF, ed.), New York: Alan R Liss Inc., 1990, 1-20.
- 26) Takada R, Saitoh M, Mori T, :Dietary gamma-linolenic acid-enriched oil reduces body fat content and induces liver enzyme activities relating to fatty acid beta-oxidation in rats, *J Nutr.*, 124, 469-474, 1994.
- 27) Takahashi Y, Ide T, Fujita H, :Dietary gamma-linolenic acid in the form of borage oil causes less body fat accumulation accompanying an increase in uncoupling protein 1 mRNA level in brown adipose tissue, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 127, 213-222, 2000.
- 28) Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, *et al.*, :Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice, *Diabetes*, 49, 1534-1542, 2000.
- 29) Urquhart P, Parkin SM, Rogers JS, *et al.*, :The effect of conjugated linoleic acid on arachidonic acid metabolism and eicosanoid production in human saphenous vein endothelial cells, *Biochim Biophys Acta.*, 1580, 150-160, 2002.
- 30) Wu D, Meydani M, Leka LS, *et al.*, :Effect of dietary supplementation with black currant seed oil on the immune response of healthy elderly subjects, *Am J Clin Nutr.*, 70, 536-543, 1999.
- 31) Ziboh VA, Miller CC, Cho Y, :Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites, *Am J Clin Nutr.*, 71 suppl., 361S-366S, 2000.

# 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

大阪大学大学院医学系研究科分子病態医学皮膚科学講座\*、独立行政法人国立病院機構大阪医療センター皮膚科・形成外科\*\*

大畑 千佳\*、田所 丈嗣\*\*、板見 智\*

Sex hormone is known to be associated with the increase of human melanocytes and melanin production. However, the absence of estrogen receptor  $\alpha$ , that was cloned in 1986, in melanocytic lesions has been confirmed to date. In 1996, the new subset of estrogen receptor was cloned, and named estrogen receptor  $\beta$ . We studied immunohistochemical staining of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in melanocytic nevi and malignant melanomas, and found that both lesions were stained by estrogen receptor  $\beta$ , but not stained by estrogen receptor  $\alpha$ . The normal sebaceous glands and hair follicles were positive for estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . Other adnexal structures in the skin were stained by estrogen receptor  $\beta$ , but not stained by estrogen receptor  $\alpha$ .

## 1 緒言

これまでに我々はヒトメラノサイトが男性ホルモン標的細胞であることを明らかにし<sup>1)</sup>、核内のアンドロゲン受容体を介する経路のみならず、男性ホルモンと性ホルモン結合蛋白が関与する細胞膜シグナル伝達経路によりチロジナーゼ活性が影響を受けることを示してきた<sup>2)</sup>。しかし、男性ホルモンだけでなく、悪性黒色腫や色素性母斑などで、メラノサイトの増殖や色素産生に女性ホルモンが関与していることがよく知られている。妊婦の悪性黒色腫の予後が悪いこと<sup>3-8)</sup>や、妊婦に生じる悪性黒色腫は妊娠していない女性に生じる悪性黒色腫と比べると、腫瘍厚が大きいこと<sup>9)</sup>また、統計学的に男性よりも女性の悪性黒色腫患者の予後がよいこと<sup>10)</sup>が報告されており、女性で妊娠中に母斑が大きくなったり、母斑の色調が濃くなったこと<sup>11-13)</sup>も報告されている。生化学的手法を用いてエストロゲン結合タンパクが悪性黒色腫に存在することが報告されたこともあったが、これらの結果は今日では誤りであったことが知られている<sup>14,15)</sup>。近年、エストロゲンレセプターを用いた免疫組織学的検索の感受性と特異性が高いことから、生化学的検索の代わりに用いられるようになったが、悪性黒色腫や色素性母斑では1986年に発見されたエストロゲンレセプター  $\alpha$  は染色されなかった<sup>16-20)</sup>。その後、1996年にエストロゲンレセプター  $\beta$  が発見され、ヒト皮膚で染色されることがわかった<sup>21-24)</sup>。今回、我々は悪性黒色腫や色

素性母斑でエストロゲンレセプター  $\alpha$  と  $\beta$  の発現を調べたので報告する。また、同時に正常皮膚における ER の発現に関しても有益な知見を得たため併せて報告する。

## 2 実験

### 1) 対象

1998年から2003年の間に大阪大学皮膚科を受診した色素性母斑の女性17例（1歳から79歳、平均27.2歳）男性11例（5歳から71歳、平均21.3歳）および悪性黒色腫の女性6例（27歳から79歳、平均48.5歳）男性6例（50歳から66歳、平均57歳）を対象とした。悪性黒色腫の女性のうち1例は28歳の妊婦で、妊娠後、腫瘍が増大していた。

### 2) 方法

パラフィン包埋された皮膚組織を4  $\mu$ mに薄切し、DAKO社のChemMate ENVISION キットを用い、用手法で染色を行った。一次抗体として、ER $\alpha$ はDAKO社の1D5を50倍希釈で用い、30分作用させた。ER $\beta$ はGene Tex社の14C8を200倍希釈で用い、over nightで作用させた。それぞれマイクロウェーブ(600W)30分の熱処理を行った。

## 3 結果

### 1) 色素性母斑

男性、女性とも全症例でメラノサイトにおけるER $\alpha$ 染色は陰性であった。また、ER $\beta$ 染色については全症例の全てのメラノサイトで陽性であった(図1)。年齢、性別による染色程度の違いは認めなかった。

### 2) 悪性黒色腫

男性、女性とも全症例でメラノサイトにおけるER $\alpha$ 染色は陰性であった。また、ER $\beta$ 染色については全症例の



The study of melanin production in human skin induced by sex hormone and sex hormone binding protein

Chika Ohata, Taketsugu Tadokoro\*, Satoshi Itami

Department of Dermatology, Course of Molecular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine Department of Dermatology and Plastic Surgery, Osaka National Hospital

\*

全てのメラノサイトで陽性であった(図2)。妊婦と非妊婦、男性と女性の間に染色程度の差はなかった。

### 3) 正常皮膚構造

#### ① ER $\alpha$

脂腺を含む23例中14例(70.0%)で脂腺にER $\alpha$ 陽性細胞が認められた(図3)。これらの14例は9例の女性(1歳から79歳、平均36.3歳)と5例の男性(5歳から71歳、平均37.6歳)であった。脂腺にER $\alpha$ 陽性細胞が認められなかった6例は5例の女性(2歳から70歳、平均23.2歳)と1例の男性(5歳)であった。

毛包を含む28例中5例(17.9%)で毛包にER $\alpha$ 陽性細胞が認められた(図3)。これらの5例は4例の女性(8歳から36歳、平均24.8歳)と1例の男性(5歳)であった。毛包にER $\alpha$ 陽性細胞が認められなかった23例は13例の女性(1歳から79歳、平均32.5歳)と10例の男性(5歳から71歳、平均27.3歳)であった。毛母の乳頭部を含

む全症例(うち2例は女性の頭部)で乳頭部にER $\alpha$ 陽性細胞は認められなかった。

脂腺、毛包以外で皮膚にER $\alpha$ 陽性細胞は認められなかった。

#### ② ER $\beta$

脂腺、毛包上皮、表皮細胞、汗腺、神経、血管内皮細胞、血管平滑筋、立毛筋、脂肪細胞、線維芽細胞、顔面の表情筋(骨格筋)を含む全症例でそれぞれの構造にER $\beta$ 陽性細胞が認められた(図1, 4)。また、毛母の乳頭部を含む9例中4例(44.4%)で乳頭部にER $\beta$ 陽性細胞が認められた(図4-5)。これらの4例はすべて女性(28歳から70歳、平均48.5歳)であった(うち2例は女性の頭部)。乳頭部にER $\beta$ 陽性細胞が認められなかった5例は3例の女性(36歳から52歳、平均42歳)と2例の男性(5歳と70歳)で、全て頭部以外の皮膚であった。

## 4 考察

今回の検討で、色素性母斑と悪性黒色腫はER $\alpha$ を発現していないがER $\beta$ を発現していることがわかった。エストロゲンは培養メラノサイトに対してメラニン量とチロシナーゼ活性を減少させる一方でメラノサイトそのものの数を増やす作用があること<sup>25)</sup>がわかっていたが、免疫染色学的にメラノサイトがER $\alpha$ で染色されないことから、臨床的にはエストロゲンとメラノサイトの関連性はないとされていた<sup>16-20)</sup>。その後、ER $\beta$ が発見されたが、色素性母斑と悪性黒色腫に関してER $\beta$ の発現は調べられていない。今回の我々の検討で初めて免疫組織学的にエストロゲンとメラノサイトの関連性を証明することができた。

ER $\beta$ の染色程度に関しては色素性母斑と悪性黒色腫の間に差はなかった。よって両者の鑑別にER $\beta$ は有益ではない。また、細胞形態による染色性の違いもなかった。色

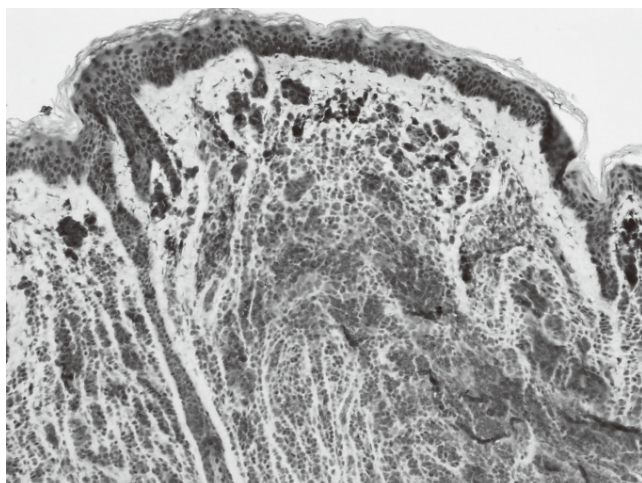


図1 色素性母斑と表皮細胞がER $\beta$ で染色されている。

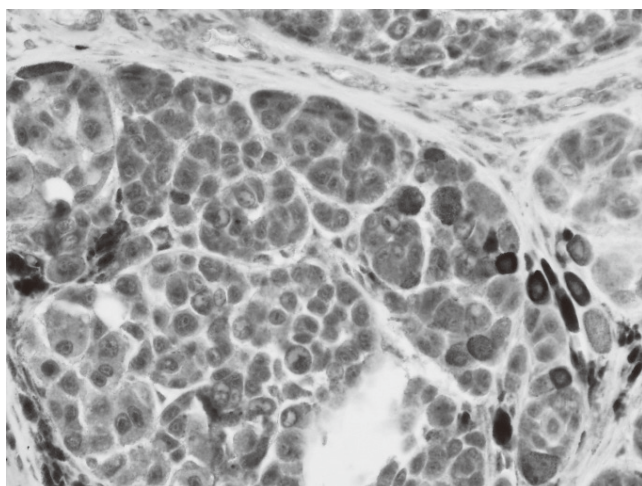


図2 大小不同のある悪性黒色腫の細胞がER $\beta$ で染色されている。

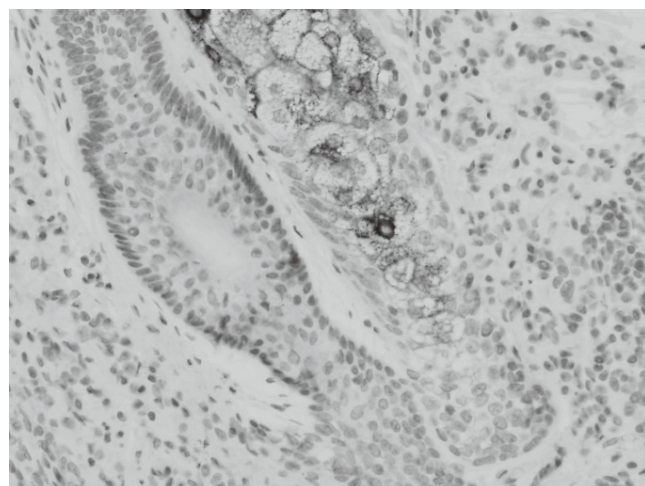


図3 脂腺と毛包がER $\alpha$ で染色されている。

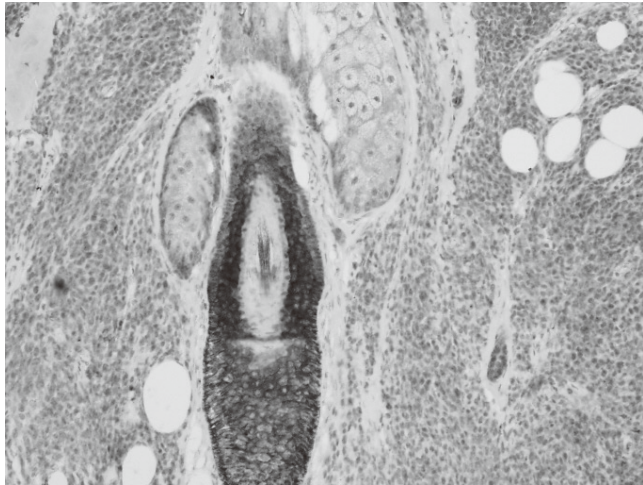


図 4-1 脂腺と毛包が ER $\beta$  で染色されている。その周囲に ER $\beta$  で染色された色素性母斑の細胞が見られる。

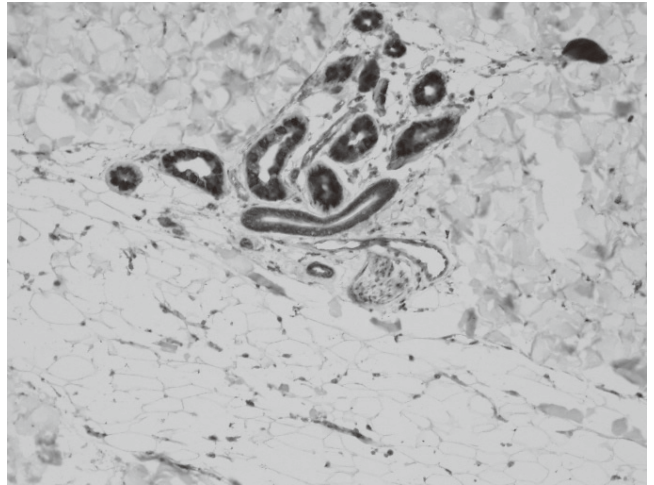


図 4-2 汗腺、神経、血管内皮、線維芽細胞、脂肪細胞が ER $\beta$  で染色されている。

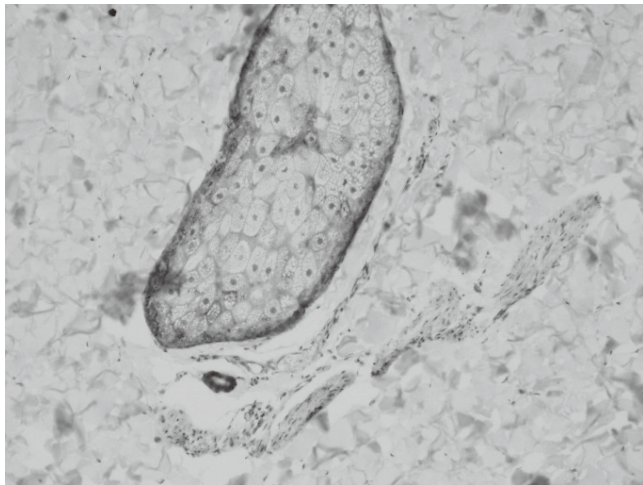


図 4-3 立毛筋、脂腺、血管内皮、線維芽細胞が ER $\beta$  で染色されている。

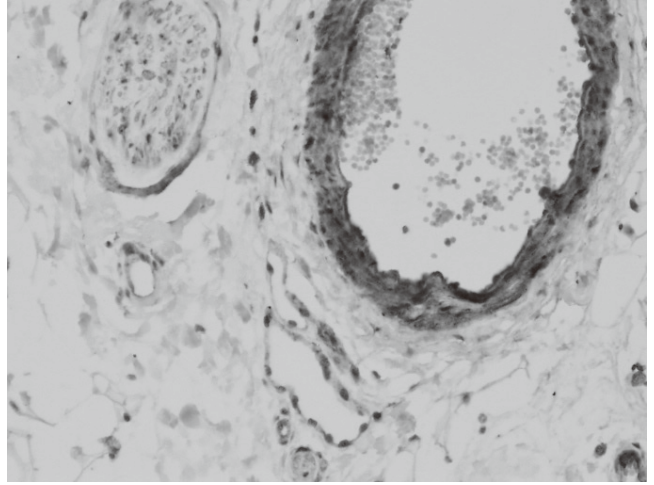


図 4-4 血管壁の平滑筋、神経、血管内皮、線維芽細胞が ER $\beta$  で染色されている。

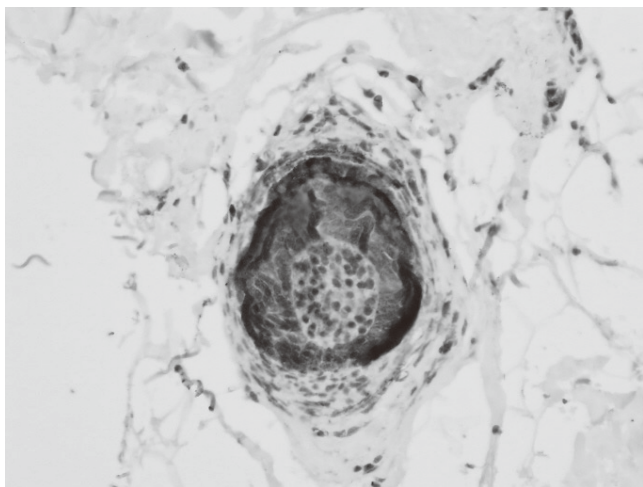


図 4-5 毛母と乳頭部の細胞、線維芽細胞が ER $\beta$  で染色されている。

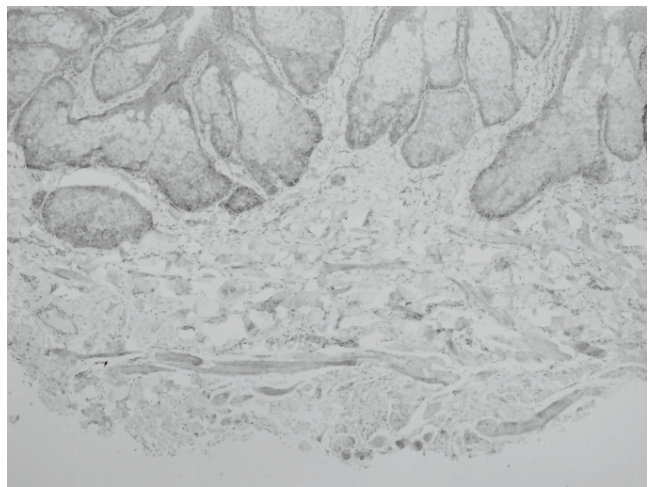


図 4-6 顔面の表情筋（骨格筋）と脂腺が ER $\beta$  で染色されている。

素性母斑も悪性黒色腫も、ER $\beta$ の染色程度に関しては男性、女性の間で差はなかった。女性の血中のエストロゲン量に関しては年齢による差があることが知られているが、女性の年齢によるメラノサイトの染色程度に差は認めなかった。更に、妊婦の悪性黒色腫では妊娠後に腫瘍が増大していることから、腫瘍に対するエストロゲンの影響が強く示唆されたが、妊婦の悪性黒色腫でも染色程度は他の症例と同等であった。以上から、メラノサイト中のエストロゲンレセプター量は色素性母斑でも悪性黒色腫でも年齢、性別、妊娠の有無による差がないことがわかった。近年、エストロゲンの作用として、遺伝子転写を直接、間接的に調節するだけでなく、細胞質内のシグナル伝達経路に影響を及ぼし、細胞の生存や他の成長因子の調整に関与する効果があることがわかってきた<sup>26)</sup>。メラノサイトに対するエストロゲンとER $\beta$ の作用に関してはさらに詳細な検討が必要であろう。

正常皮膚構造のER $\alpha$ とER $\beta$ の発現については、頭部の皮膚を用いて検討されたものが多い<sup>21-23)</sup>。そのため、毛母の乳頭部の細胞という、頭部以外ではあまり見られない部分に関しても調べられており、ER $\alpha$ 陽性細胞<sup>21, 23)</sup>とER $\beta$ 陽性細胞<sup>21-23)</sup>があることが報告されている。いろいろな部位の皮膚を用いた報告<sup>24)</sup>では、毛母の乳頭部の細胞については検討がなされておらず、おそらく乳頭部の構造がほとんど含まれない症例が多かったためと考えられる。我々の検討では乳頭部の細胞にはER $\alpha$ は染まらなかったが、ER $\beta$ が染まるものは44.4%あった。頭部皮膚で毛母の乳頭部の細胞を含んでいた症例は2例あったが、2例ともER $\beta$ が染まっていた。頭髪は他部位の毛髪と比べ、ホルモンの影響を強く受ける部位であるため、頭部の乳頭部でER $\beta$ が発現しやすいのかもしれない。しかし、頭部以外の皮膚でも乳頭部の細胞が染まっているものもあり、部位による差はあまりない可能性も考えられる。今回の我々の検討では症例数も少ないため、今後症例数を増やして検討が必要であろう。

ER $\alpha$ 陽性細胞は毛包<sup>24)</sup>、脂腺<sup>21-24)</sup>に存在することが報告されている。我々の検討では70.0%の脂腺と17.9%の毛包にER $\alpha$ 陽性細胞が認められ、これまでの報告とほぼ同様であった。エクリン腺、表皮にもER $\alpha$ 陽性細胞が存在することが報告されているが<sup>24)</sup>、我々の検討ではエクリン腺、表皮でER $\alpha$ は染まらなかった。サンプル数は少ないものの、脂腺も毛包も男女とも染まっており、性差による違いはないものと考えた。

ER $\beta$ 陽性細胞は脂腺<sup>21-24)</sup>、毛包<sup>21-23)</sup>、表皮<sup>21, 22, 24)</sup>、エクリン腺<sup>21, 24)</sup>、血管<sup>22)</sup>、線維芽細胞<sup>22)</sup>に存在することが報告されている。我々の検討では脂腺、毛包上皮、表皮細胞、汗腺、血管内皮細胞、血管平滑筋、線維芽細胞に全症例で認められた。我々の結果ではこれら以外にも神経、立

毛筋、脂肪細胞、顔面の表情筋（骨格筋）にもER $\beta$ が染まることがわかった。すなわち、今回の我々の結果はヒト皮膚を構成する全ての成分においてER $\beta$ が広範に存在することを証明した。エストロゲンは皮膚厚を高めたり、血管新生を促進することがわかっている<sup>27)</sup>が、我々の結果はこれを裏付け、エストロゲンがER $\beta$ を介して、ヒト皮膚に大きな影響を及ぼしていることを明らかにした。

## (引用文献)

- 1) Tadokoro T, Itami S, Hosokawa K, et al.: Human genital melanocytes as androgen target cells, *J Invest Dermatol*, 109, 513-517, 1997.
- 2) Tadokoro T, Rouzaud F, Itami S, et al.: The inhibitory effect of androgen and sex hormone-binding globulin on the intracellular cAMP level and tyrosinase activity of normal human melanocytes, *Pigment Cell Res*, 16, 190-197, 2003.
- 3) Pack GT, Scharnagel IM. The prognosis for malignant melanoma in the pregnant woman. *Cancer*. 1951; 4: 324-334.
- 4) Byrd BF Jr, McGanity WJ. The effect of pregnancy on the clinical course of malignant melanoma. *South Med J*. 1954; 47: 196-200.
- 5) Conybeare RC. Malignant melanoma and pregnancy: report of 3 cases. *Obstet Gynecol*. 1964; 24: 451-454.
- 6) Riberti C, Marola G, Bertani A. Malignant melanoma: the adverse effect of pregnancy. *Br J Plast Surg*. 1981; 34: 338-339.
- 7) Sutherland CM, Loutfi A, Mather FJ, et al. Effect of pregnancy upon malignant melanoma. *Surg Gynecol Obstet*. 1983; 157: 443-446.
- 8) Pennington DG. Multiple primary melanoma in pregnancy: a case report. *Br J Plast Surg*. 1983; 36: 260-261.
- 9) MacKie RM, Bufalino R, Morabito A, et al. Lack of effect of pregnancy on outcome of melanoma. For the world health organisation melanoma programme. *Lancet*. 1991; 337: 653-655.
- 10) White LP. Studies on melanoma. II. Sex and survival in human melanoma. *N Engl J Med*. 1959; 260: 789-797.
- 11) Ellis DL. Pregnancy and sex steroid hormone effects on nevi of patients with the dysplastic nevus syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 1991; 25: 467-482.
- 12) Foucar E, Bentley TJ, Laube DW, et al. A histopathologic evaluation of nevocellular nevi in pregnancy. *Arch Dermatol*. 1985; 121: 350-354.
- 13) Winton GB, Lewis CW. Dermatoses of pregnancy. *J Am*

- Acad Dermatol.* 1982; 6: 977-998.
- 14) Zava DT, Goldhirsch A. Estrogen receptor in malignant melanoma: fact or artefact? *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1983; 19: 1151-1159.
  - 15) McCarty KS Jr, Wortman J, Stowers S, et al. Sex steroid receptor analysis in human melanoma. *Cancer.* 1980; 46: 1463-1470.
  - 16) Cohen C, DeRose PB, Campbell WG, et al. Estrogen receptor status in malignant melanoma. *Am J Dermatopathol.* 1990; 12: 562-564.
  - 17) Flowers JL, Seigler HF, McCarty KS Sr, et al. Absence of estrogen receptor in human melanoma as evaluated by a monoclonal antiestrogen receptor antibody. *Arch Dermatol.* 1987; 123: 764-765.
  - 18) Delarue JC, Avril MF, Charpentier P, et al. Estrogen receptors in malignant melanoma. *Arch Dermatol.* 1987; 123: 159-160.
  - 19) Lecavalier MA, From L, Gaid N. Absence of estrogen receptors in dysplastic nevi and malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 1990; 23: 242-246.
  - 20) Duncan LM, Travers RL, Koerner FC, et al. Estrogen and progesterone receptor analysis in pregnancy-associated melanoma: absence of immunohistochemically detectable hormone receptors. *Hum Pathol.* 1994; 25: 36-41.
  - 21) Thornton MJ, Taylor AH, Mulligan K, et al. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. *Exp Dermatol.* 2003; 12: 181-190.
  - 22) Thornton MJ, Taylor AH, Mulligan K, et al. The distribution of estrogen receptor beta is distinct to that of estrogen receptor alpha and the androgen receptor in human skin and the pilosebaceous unit. *J Investing Dermatol Symp Proc.* 2003; 8: 100-103.
  - 23) Kwon OS, Han JH, Yoo HG, et al. Expression of androgen receptor, estrogen receptor alpha and beta in the dermal papilla of human hair follicles in vivo. *J Dermatol Sci.* 2004; 36: 176-179.
  - 24) Kariya Y, Moriya T, Suzuki T, et al. Sex steroid hormone receptors in human skin appendage and its neoplasms. *Endocr J.* 2005; 52: 317-325.
  - 25) Jee SH, Lee SY, Chiu HC, et al. Effects of estrogen and estrogen receptor in normal human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 199: 1407-1412.
  - 26) Hall G, Phillips TJ. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol.* 2005; 53: 555-568.
  - 27) Brincat MP. Hormone replacement therapy and the skin. *Maturitas.* 2000; 35: 107-117.

# SOD1 ノックアウトマウスに発症する皮膚炎への 活性酸素の関与の解明

山形大学大学院医学系研究科生命環境医科学専攻 生体分子機能学

藤 井 順 逸

Superoxide dismutase (SOD) is a principal enzyme to protect cells from cytotoxic effects of reactive oxygen species. We first examined mechanism of singlet oxygen-induced cell damage and also established detection systems for oxidized Trp and glutathionylated proteins. SOD1-deficient mice showed accelerated aging, such as inflammation in facial skin. Keratinocyte from SOD1-deficient mice was less capable of adhesion and proliferation in primary culture probably due to elevated oxidative stress.

## 1. 緒言

酸素呼吸を行う生物においては活性酸素種が不可避免的に生じ、それが生体を傷害し老化の原因となると考えられている。こうした活性酸素から生体を防御する抗酸化物質や抗酸化酵素が幾つか知られている。中でも Superoxide dismutase (SOD) は酸素分子が一電子還元を受けて生じる最初の活性酸素・スーパーオキシドを消去するため、酸化ストレスからの防御の上で中心的な役割を果たすと考えられてきた<sup>1)</sup>。しかし一方で、SOD の中でも最も量の多い Cu, ZnSOD の遺伝子 SOD1 を欠損するマウスは、老化その他について顕著な表現型を示さないと報告されており、その役割について疑問が投げかけられている<sup>2)</sup>。

活性酸素種の生成量はストレスなどにより増し、皮膚では特に紫外線 (UV) 照射により生成し、皮膚がんや光老化に関わると考えられている。UVB がスーパーオキシドやヒドロキシルラジカルといった細胞傷害性の高い活性酸素種を生成するのに対して、UVA は主にフラビンやヘムなどの色素化合物と反応して一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) の生成に関係する。UVB は様々な化学反応を起こすため影響が現れやすく、それに関する研究は多数ある<sup>3)</sup>。しかし一重項酸素については、その効果を厳密に評価することができないため解明が遅れている。これまでは一重項酸素に関する研究のほとんどが色素に光を照射して生成させる光増感反応に頼っていた。しかしこの方法では生成量のコントロールが難しい上に、副産物として他の活性分子種が生成するため、一重項酸素の影響だけを純粋に評価することは難しい。最近、共同研究者が開発した、一重項酸素のみを生成

するナフタレン誘導体エンドペルオキシドを用いることによって、細胞への一重項酸素の効果を純粋に評価することが可能となった<sup>4)</sup>。

本研究では、(1) このナフタレン誘導体エンドペルオキシドを用いて、アポトーシスとその誘導にかかわるカスパーゼならびにチトクローム-c (cyt-c) に対する一重項酸素による細胞傷害作用について検討した。また、(2) システインプロテアーゼであるカスパーゼと活性基との関連を調べるために、ヒト皮膚線維芽細胞のリソソーム酵素であるカテプシン群での検討を行った。さらに、(3) 皮膚の光老化現象と酸化ストレスの関連を調べるために、酸化アミノ酸とグルタチオン化タンパクの2つの酸化ストレスマーカーの検出法を開発した。(4) そして活性酸素からの防御の上で重要と考えられている SOD1 を欠くマウスの皮膚への影響について検討を行った。

## 2. 実験

### 2-1 一重項酸素による細胞傷害性の解析

ヒト由来培養細胞 HepG2 を用いて、ナフタレン誘導体エンドペルオキシドから生じる一重項酸素による細胞傷害活性を調べた。ミトコンドリアからの cyt-c 流出・クロマチン凝集・DNA ラダー形成・カスパーゼ活性化といったアポトーシスの指標となる項目について検討し、細胞をエトポシド処理して典型的なアポトーシスを誘導させた場合と比較した。

また、精製ウマ cyt-c を用いて、その酸化還元 (レドックス) 状態とアポトーシス誘導能との関連について解析した。さらに、細胞抽出液を用いた無細胞再構成系を用いて、一重項酸素処理した cyt-c によるアポトーシス誘導能について検討した。

### 2-2 ヒト皮膚線維芽細胞のカテプシンアイソザイムに対する一重項酸素の影響

正常ヒト皮膚線維芽細胞ならびにその細胞抽出画分をエ



Investigation on Involvement of  
Reactive Oxygen Species in Dermatitis  
Developed in SOD1-Knockout Mice

Junichi Fujii

Department of Biomolecular Function,  
Major of Environmental Life Science,  
Graduate School of Medical Science,  
Yamagata University

ンドペルオキシド処理し、生成した一重項酸素のカテプシン B、L/S、D/E 活性に対する影響を検討した。さらに、精製ヒトカテプシン B を用いて活性測定ならびにタンパク化学的解析を行った。

### 2-3 酸化ストレスマーカーの検出系の開発

酸化に弱いアミノ酸のうち、Met, His, Tyr, Trp の 4 種類を、一重項酸素・スーパーオキシド・ヒドロキシラジカルの各活性酸素種に曝し、生成する酸化物の構造決定を行った。その中の一つで、Trp の主要な酸化物である N-formylkynurenine (NFK) に対する抗体を作成した。

Glutathione S-transferase (GST) がグルタチオンを特異的に認識・結合することを利用した検出系の開発を行った。ビオチン化した GST をグルタチオン化タンパクに結合させ、horse radish peroxidase (HRP) 標識した streptavidin で検出した。

### 2-4 SOD1 欠損マウスの解析

SOD1 欠損マウスの加齢に伴い、皮膚の炎症の出現、体重、臓器重量の変動といった表現型がどのように変化するか観察・測定した。貧血との関連が疑われたので、赤血球含量について計測した。また、皮膚よりケラチノサイトを初代培養し、細胞分裂能や接着性ならびに栄養要求性について調べた。

## 3. 結果

### 3-1

ナフレン誘導体エンドペルオキシドを用いた解析から、一重項酸素は強力な細胞傷害作用を有することが分った。この細胞傷害過程でミトコンドリアからの cyt-c 流出を促進することから、その細胞傷害の機構としてはアポトーシスが疑われた。しかし、DNA ラダー形成・カスパーゼ

の活性化といったアポトーシスの過程で起こる現象は、エンドペルオキシド処理した場合に比較して著しく低く、アポトーシス経路はむしろ抑制されていた<sup>5)</sup>。詳細な解析を行った結果、一重項酸素はカスパーゼ活性を阻害すること、さらに cyt-c により活性化される apoptosome の形成を阻害し、典型的なアポトーシスとは異なる細胞死をもたらすことが分った (図 1)。

cyt-c はアポトーシスを誘導するが、結合しているヘムが還元型と酸化型のいずれでアポトーシスを誘導するかについては一致した見解が得られていなかった。そこで精製ウマ cyt-c を用いて、結合しているヘムの酸化還元 (レドックス) 状態について解析した。その結果、酸化型 cyt-c にのみアポトーシス誘導能が認められ、還元型 cyt-c にはなかった (図 2)<sup>6)</sup>。一重項酸素処理することによってアポトーシス誘導能は不可逆的に消失し、タンパク中のカルボニル含量が増加した。以上の結果は、ヘムの酸化還元ではなく、タンパクの酸化的修飾が cyt-c のアポトーシス誘導能喪失の原因となっていることを示している<sup>7)</sup>。

### 3-2

細胞内小器官であるリソソームに含まれる酸性プロテアーゼ・カテプシンに対する一重項酸素の影響を解析したところ、システインプロテアーゼ群に属するカテプシン B と L/S 活性のみが阻害され、アスパラギン酸プロテアーゼ群に属する D/E 活性はまったく影響を受けなかった<sup>8)</sup>。システインはこの一重項酸素による阻害効果に対して極めて有効な保護作用を示した。しかし、一重項酸素処理で失活したカテプシン B と L/S 活性は還元剤処理によって回復しなかった。精製カテプシン B を用いた場合でも同様の結果が得られた (図 3)。

### 3-3 酸化ストレスマーカーの検出系の開発

酸化に弱い Met, His, Tyr, Trp の 4 種類のアミノ酸を各

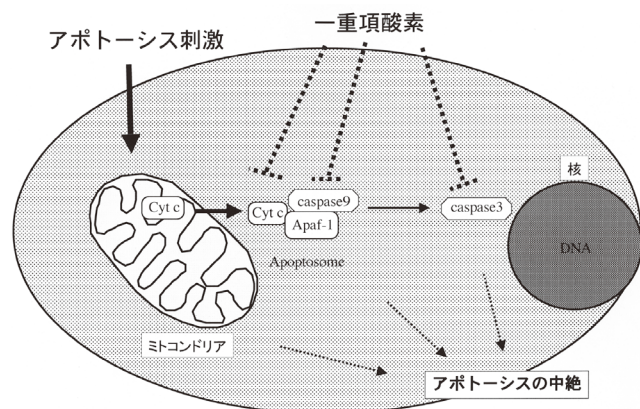


図 1 一重項酸素によるアポトーシス経路の抑制

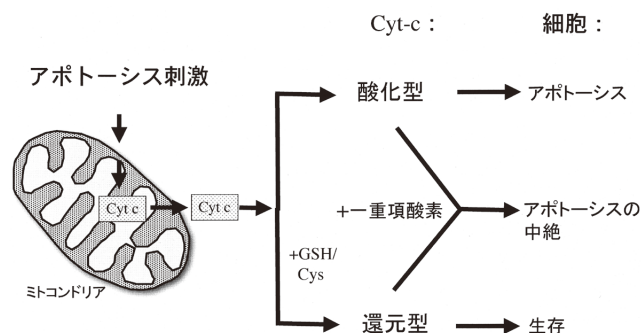


図 2 cyt-c は酸化型でのみアポトーシスを誘導する。一重項酸素はアポトーシス刺激を受けた細胞でもアポトーシスを中絶させる。

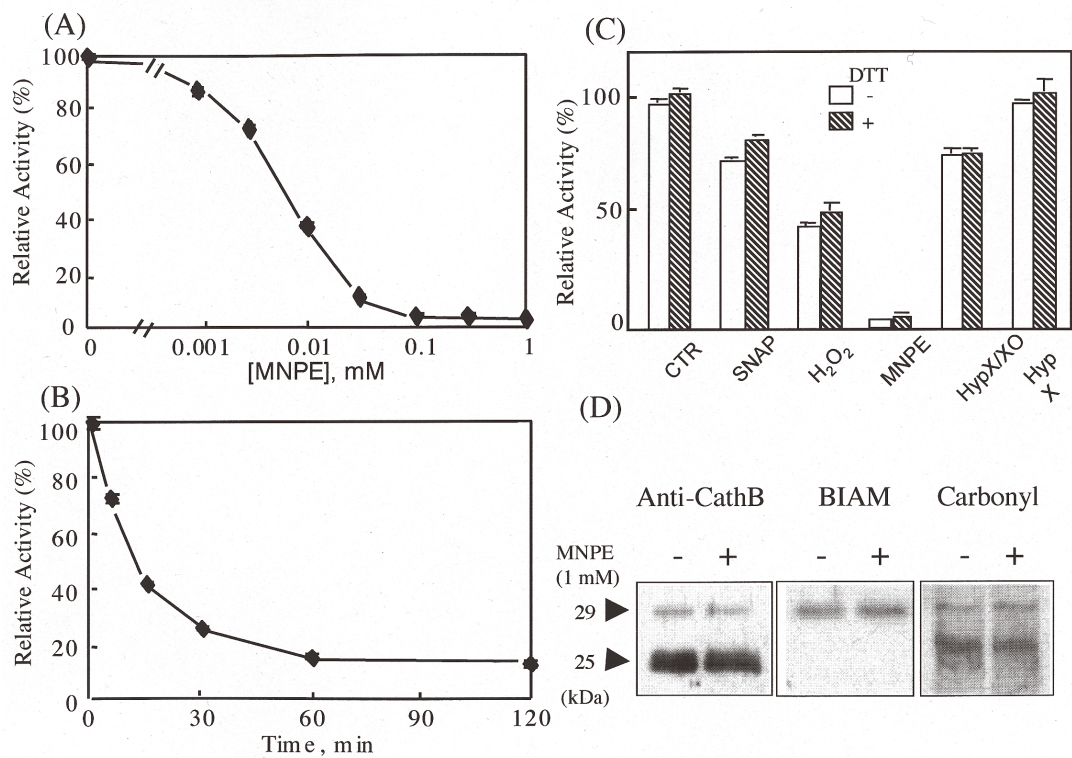


図3 精製ヒト・カテプシンBの一重項酸素 (MNPE) による阻害：濃度依存性 (A)、経時変化 (B)、不可逆性 (C)、アミノ酸修飾の解析 (D)

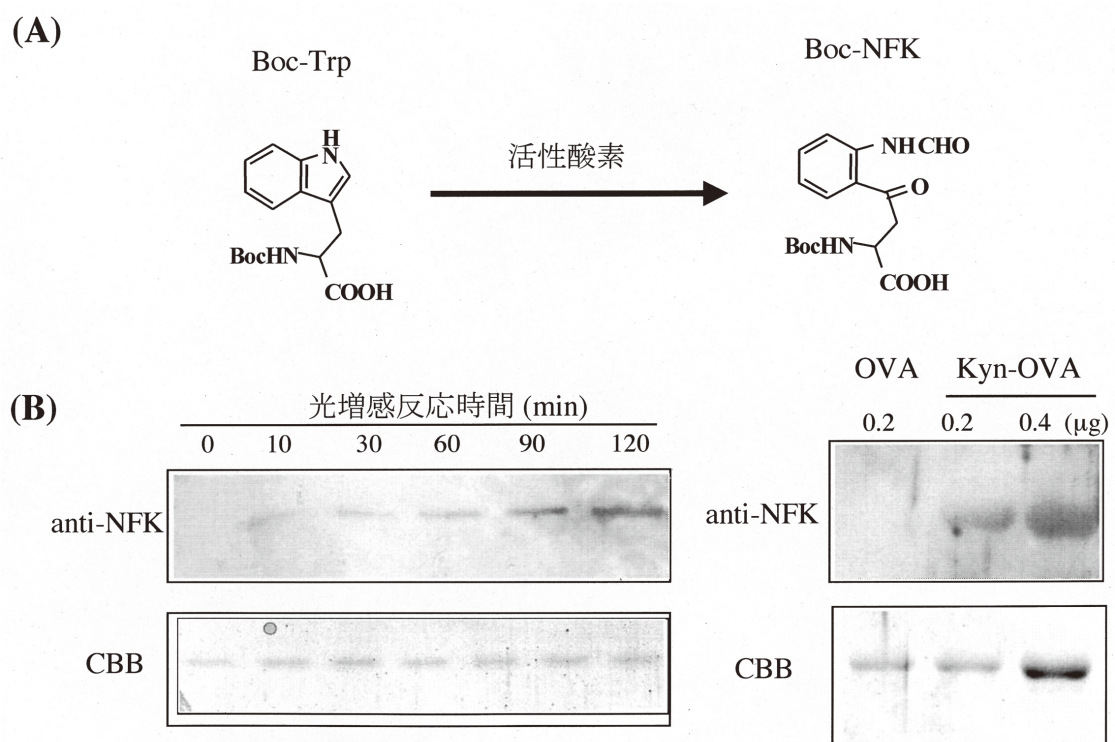


図4 (A) Trp は活性酸素により NFK に酸化される。  
(B) 抗 NFK 抗体の特異性と、kynurenine (Kyn) との反応性。

活性酸素種に曝し、生成する酸化物の構造決定を行った。その中の1つ N-formylkynurenine (NFK) は、Trp から酵素的に kynurenine が精製する際の重要な前駆体であるため、牛胎児血清アルブミン (BSA) に結合させ抗原としてウサギに免疫し、抗体を作成した<sup>9)</sup>。トリプシンを一重項酸素処理してウエスタンブロット解析に用いた場合、得られた抗血清は処理時間に依存して反応性が増したことから、NFK を認識する抗体ができている事が分かった (図4)。Kynurenine を結合させた卵白アルブミン (OVA) を用いてウエスタン解析したところ特異的に検出されたことから、本抗体は kynurenine も認識することが分かった。

また、日本住血吸虫の GST をビオチン化し、これをプローブとしてグルタチオン化タンパクを検出する系を確立した<sup>10)</sup>。結合したビオチン化 GST は、HRP-streptavidin で検出された (図5)。この方法により、グルタチオン化タンパクを簡便に検出し、酸化ストレスの評価をより詳細に行うことが可能となった。本法による解析から、S-ニトロソグルタチオンが最もタンパクの S-グルタチオン化を促進することが分かった。

### 3-4 SOD1 欠損マウスの解析

SOD1 欠損マウスの全身ならびに皮膚に現れる老化現象について解析した。SOD1 欠損マウスを長期に渡って飼育し体重の変動を調べたところ、野生型に比べて有意に軽いことが分かった。また、赤血球含量の加齢変化を調べたと

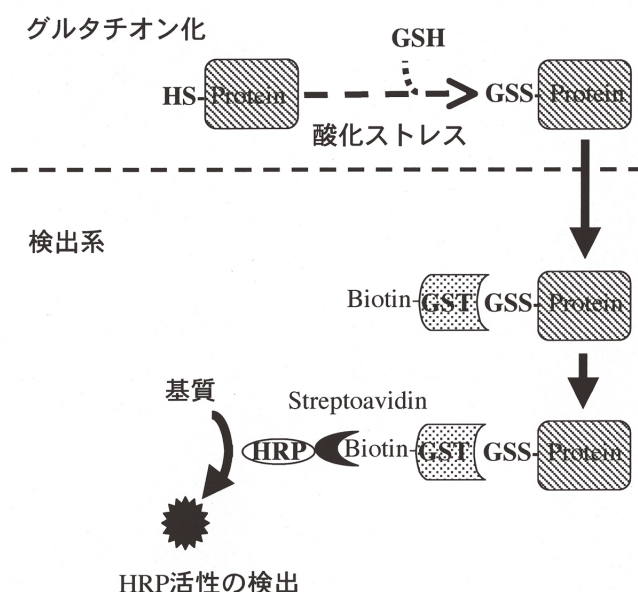
ころ、野生型よりも低く貧血の症状を呈していた。解剖したところ、脾臓の肥大が認められ、組織学的解析から赤血球の破壊とそれを代償するために造血が亢進していると考えられた。さらに、顔面に皮膚炎が見られたことからその原因を解明するために、新生仔皮膚よりケラチノサイトを単離・培養し、解析を行った。SOD1 欠損マウス由来細胞は培養皿への接着性が低下していた。その主な原因としては、培養に用いる血清中の成分が関係していることをつきとめた。

## 4. 考察

### 4-1

細胞はアポトーシスを起こす事によって断片化され、マクロファージなどの貪食細胞に取込まれるため、細胞内内容物は細胞外にほとんど漏れ出ない。しかし、ネクロシスやアポトーシスが中絶された場合には細胞外に内容物が漏れ出る事から、貪食によるアポトーシス細胞の除去が阻害された場合文献 11) と同様に、それが抗原となり、自己免疫疾患を惹起する可能性がある。今回の結果から、UVA が一重項酸素の生成をもたらし、それがアポトーシスを阻害することで、死んだ細胞の内容物が細胞外に漏れ出ることが UVB による炎症の劇症化につながる可能性を示唆している。

(A)



(B)

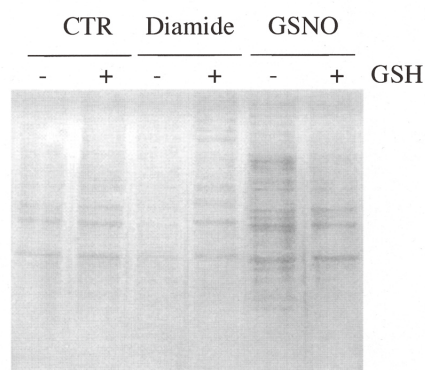


図5 新たに開発した GST によるグルタチオン化タンパク検出系の原理 (A) と結果の例 (B)

## 4-2

一重項酸素処理によってカスパーゼだけではなくカテプシン群についても、システインプロテアーゼに属するアイソザイムのみが阻害された。これはシステインプロテアーゼの酵素活性にかかわるアミノ酸が特異的に酸化された可能性を示唆している。調べた限り、触媒中心を形成するシステインが酸化されていないことから、触媒活性に必要なヒスチジンが一重項酸素の標的となっている可能性がある。

## 4-3 酸化ストレスマーカーの検出系の開発

Kynurenine は、Trp が脳で酵素的に代謝されてドーパミンに変換される過程で生成する中間体化合物である。これまでに kynurenine を認識する抗体を作成したとの報告はなく、本報告がはじめてである。本抗体を用いる事によって組織切片での検出が可能となるので、今後の組織学的応用が考えられる。グルタチオン化タンパクについては、従来の方法では放射性同位元素を用いるなど、その検出には煩雑で特殊な技術ならびに設備を必要とした。しかし、今回開発した方法を用いる事によって、免疫学的方法に準じた手軽さで、しかも高感度の検出が可能である。

## 4-4 SOD1 欠損マウスの解析

SOD1 欠損マウスは通常の飼育下では目立った表現型は示さないとされていたが、長時間に渡る多数のマウスの観察結果から、SOD1 欠損は血液や皮膚に老化現象を引き起こす事が分かった。初代培養実験から、皮膚の炎症と増殖因子との関連が示唆された。この SOD1 欠損マウスの皮膚に現れる炎症の原因解明のために、個体・組織・細胞・そして分子レベルのより詳細な検討を進めている。

## 5. 総括

本研究では、まず活性酸素種の 1 つ一重項酸素の細胞傷害機構を調べ、光老化を解明する上でタンパク質の酸化的修飾の解析の重要性を示した。酸化アミノ酸を検出するために有用な、トリプトファン酸化物と反応する抗体を作成し、またグルタチオン化タンパクの簡便な検出法を開発した。SOD1 欠損マウス顔面の皮膚の炎症について、初代培養を行う事で分子レベルの解析を行った。

## 謝辞

本研究にご助成いただきましたコスメトロジー研究振興財団に深謝申し上げます。また、本研究の遂行にご尽力い

たきました共同研究者の皆様に厚く御礼申し上げます。

## (参考文献)

- 1) Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 97-112, 1995.
- 2) Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, ほか: Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 3, 43-47, 1996.
- 3) Halliwell B, and Gutteridge JMC. (eds) *Free Radical Biology and Medicine*, 3rd ed. Clarendon Press, Oxford, 1999.
- 4) Liu W, Ogata T, Sato K, ほか: Syntheses of water-soluble endoperoxides as a singlet oxygen source. *ITE Letters on Batteries, New Technologies and Medicine* 2, 98-101, 2001.
- 5) Otsu K, Sato K, Ikeda Y, ほか: Abortive apoptotic pathway by singlet oxygen due to the suppression of caspase activation. *Biochem. J.* 389, 197-206, 2005.
- 6) Suto D, Sato K, Ohba Y, ほか: Abolished pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via heme redox state-independent mechanism. in "Natural Antioxidants and Micronutrients" (B Zhao, G Liu, L Packer, eds), Medimond, Bologna, 87-90, 2005.
- 7) Suto D, Sato K, Ohba Y, ほか: Suppression of the pro-apoptotic function of cytochrome c by singlet oxygen via a heme redox state-independent mechanism. *Biochem. J.* 392, 399-406, 2005.
- 8) Nagaoka Y, Otsu K, Okada F, ほか: Specific inactivation of cysteine protease-type cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 215-223, 2005.
- 9) Suto D, Ikeda Y, Fujii J, ほか: Structural analysis of amino acids, oxidized by reactive oxygen species and an antibody against N-Formylkynurenine. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 38, 107-111, 2006.
- 10) Cheng G, Ikeda Y, Iuchi Y, ほか: Detection of S-glutathionylated proteins by glutathione S-transferase overlay. *Arch. Biochem. Biophys.* 435, 42-49, 2005.
- 11) Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, ほか: Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* 304, 1147-1150, 2004.

# 哺乳動物における蛋白性フェロモンの引き起こす 血中性ホルモン濃度の増加

旭川医科大学生理学講座神経機能分野

柏 柳 誠

Pheromones affect gonadal functions and sexual behaviors. They are received by the vomeronasal organ. Plasma progesterone concentrations in female Wistar rats after exposure to urine preparations with and without protease-treatment were measured to explore the effects of protease-sensitive pheromones on the endocrine state. Exposure to crude urine excreted from male rats induced an increase in the plasma progesterone concentration in female rats. The progesterone concentration of oestrous females increased with an increase in the protein concentration in urine samples. Exposure of females in the oestrous state to urine preparations treated with protease did not induce increases in plasma progesterone. These results suggest that the presence of a protease-sensitive component in male urine exerts an influence on the endocrine state of oestrous females.

## 1. 緒言

フェロモンは、多くの動物で生殖をスムーズに遂行するために必須であり、重要な役割を演じている<sup>1, 2)</sup>。例えば、オスのフェロモンは、未成熟なメスの子宮重量の増加を促進し、初めての排卵日を早めるようにメスの性成熟を促進する。また、オスのフェロモンはメスの規則正しい排卵周期を維持する機能を有している。メスは、発情期に自分が子供を作ることが可能であることを知らせるフェロモンを放出する。ゾウの排卵周期は3ヶ月以上と長いために、一年のうちで妊娠できる期間が限られている。その上、メスゾウは普段はオスと分かれて生活している。このような状況の中で確実に子孫を残すために、メスのゾウは妊娠可能になったことを尿の中に混ぜたフェロモンを介してオスに伝えている。メスゾウの発情を知らせるフェロモンが化学的に調べられたところ、(Z)-7-dodecen-1-yl acetate がフェロモンとして働くことがわかった<sup>3)</sup>。驚いたことにこの物質はキャベツ尺取虫、トマト尺取虫、カブラ蛾、ヨトウ虫やキクイ虫など126種類の虫でフェロモンとして使われていることが既に発見されていた。すなわち、体の大きさが非常に異なるばかりではなく、昆虫と哺乳動物と種が全く異なっている動物が同一の化学物質をフェロモンとして用いていることが示された。

ラットでは、性経験を有するオスは、発情期のメスと発情期のメスの尿に対して異なる嗜好性を有することが行動学的に示されていた。一方、性経験を持たないオスはこの

ような嗜好性を示さなかった。最近、我々は、性経験をすることにより、フェロモン中枢の一部の介在神経細胞の発情フェロモンに対する興奮性が昂進することを見いだしている<sup>4)</sup>。このように、フェロモンは生理的に重要な情報の個体間でのやりとりを仲立ちするという側面からの研究対象としての意義を持つばかりではなく、記憶形成の機構を解明することを目的とした脳神経科学的な側面からも興味深い研究対象といえる。

ヒトにおいても、フェロモンを介する異性間および同性間におけるケミカルコミュニケーションは社会的行動および生殖行動に重要な役割を果たしている可能性を示す証拠が得られている<sup>5)</sup>。たとえば、共同生活をしている女性同士の月経周期は、だんだんと同期してくる<sup>6)</sup>。この現象が寄宿舍（ドミトリー）で共同生活している女子学生の間で初めて科学的に証明されたことから、ドミトリー効果と名付けられた。月経周期を延長するフェロモンと短縮するフェロモンがヒトに存在することが見いだされ、これらの2種類のフェロモンが月経周期の同期を引き起こすと考えられている<sup>7)</sup>。また、ヒトの細胞表面にはHLAクラスI抗原が存在していて、自己と非自己を識別するのに使われている。女性は、自分と異なるタイプのHLAクラスI抗原を有する男性の匂い（フェロモン？）を好む傾向が見られる。これは、自分の子供の遺伝子の多様性を増大させるためと解釈される。また、フェロモンを受容する可能性を有する遺伝子がヒトのジェノミックDNAから見つかっている<sup>8)</sup>。フェロモンを専門的に受容する器官である鋤鼻器は、ヒト胎児では明瞭に認められているが大人では特に退化している。ヒトで見つかったフェロモン受容体は、一般の匂いを受容している嗅上皮に存在することが示されている。魚類でも鋤鼻器は独立して存在せず、フェロモンを受容する細胞が嗅上皮に存在しているので、ヒトの嗅上皮にフェロモン受容細胞が存在して、フェロモンを受容する機能を有する可能性も十分に考えられる。



Protease-sensitive urinary pheromones increased plasma concentration of progesterone in mammals

Makoto Kashiwayanagi

Department of Physiology, Asahikawa Medical College

マウスでは、交尾後妊娠したメスが交尾相手とは異なる系統のオスの匂いを嗅ぐと、妊娠していたメスが流産する現象が見られる<sup>9)</sup>。この現象は Bruce 効果と呼ばれ、異系統のオスのフェロモンにより視床下部-下垂体系が刺激され、体内のホルモン濃度が変化することにより生じると考えられている。また、オスラットの尿には若年メスラットの性成熟を早めたり、不規則な排卵周期を正常に戻す効果が見られる。このように哺乳動物で見られるフェロモンの効果の多くには、内分泌系の変化を引き起こす効果を有している。現在、どのような物質がメスラットの体内において内分泌系変化を引き起こすのかは明らかではない。そこで、オスラットの尿中に存在する、メスラットの内分泌系変化を引き起こす物質がどのような性質をもつかを、生化学的手法を用いて検討した。

## 2. 実験

### 2-1 動物

実験には Wister 系オスラットおよびメスラットを用い、北海道大学大学院薬学研究科動物実験指針に基づいて行った。メスラットの性周期は、午後3時に膣垢検査を行うことにより確認した。角化上皮細胞のみが見られたメスラットを発情期とし、白血球が多数見られたメスラットを非発情期とした。

### 2-2 フェロモン刺激

1 年齢のオスラットより採取した尿サンプル 10 ml を 10 分おきに 3 回、計 30 ml をメスラットの鼻先にスプレーで噴霧した。また、一群の 11 週齢オスラットをメスラットと同じケージに入れて交尾を経験させ 12 週齢で採尿した。さらに、オスラットのみで飼育した 12 週齢のオスラットからも採尿した。これらの尿サンプルをメスラットに提示して、プロゲステロン濃度を測定した。

### 2-3 プロゲステロン濃度の測定

尿提示終了から 1 時間静置した後エーテル麻酔下で、尾の血管より約 1 ml の血液を採取した。得られた血液を 4℃で 4 時間静置した後、3000×g で 15 分遠心し、約 400  $\mu$ l の血清を得た。血清中のプロゲステロン濃度の測定は、DPC プロゲステロンキット (Disgnostic Products Corporation, California, USA) を用いた RIA チューブ固相法にて行った。抗プロゲステロン抗体結合チューブに血清を反応させた。反応後デカントで反応液を取り除き、チューブに結合した放射能を  $\gamma$  カウンター (WALLAC 1460SLR、ファルマシア、USA) にて測定した<sup>10)</sup>。

### 2-4 尿中蛋白の Pronase 処理

尿 1 ml あたり 6.96mg tris (hydroxyethyl) aminomethane を加え、適当量の 5N HCl にて pH を 7.0 に調整した。次に、10 mg Pronase (typeXIV、SIGMA、USA) を加えて溶解後、インキュベート (37℃、60 分) し、尿中の蛋白質の消化を行った。

## 3. 結果

### 3-1 性周期によるオスフェロモン感受性の変化

ヒトやマウスのように性周期をもつ動物は、嗅覚系の生理機能が周期に伴い変化することが知られている。例えば、マウス嗅粘膜の匂い応答は発情期に上昇し、嗅覚行動実験では発情前期に嗅覚閾値が最も低くなり、発情後期に最も高くなる。また、性周期の安定している女性は月経期に限り嗅覚コントラストが有意に増大することが報告されている。これらのことから、フェロモンを受容する鋤鼻器官の匂い感受性も性周期により変化することが考えられる。性周期に伴うメスラットの血中プロゲステロン濃度を確認したところ、プロゲステロン濃度は排卵後に上昇し、妊娠が成立しないと徐々に低下した。

次に、非発情期メスラット、発情期メスラットそれぞれにオスラット尿を提示し、血中のエストロン濃度およびプロゲステロン濃度を測定した。非発情期メスラットにオスラット尿を提示した際の血中エストロン濃度 (尿提示時:  $19.3 \pm 4.16$  pg/ml  $n = 3$ ) は、定常時とほぼ同濃度 (定常時:  $20.9 \pm 5.11$  pg/ml) であった。発情期メスラットにオスラット尿を提示した際の血中エストロン濃度 (尿提示時:  $32.7 \pm 15.4$  pg/ml  $n = 3$ ) は、上昇する傾向 (定常時:  $15.0 \pm 3.65$  pg/ml) が見られたが、有意な差を認められなかった。また、非発情期メスラットにオスラット尿を提示した際の血中プロゲステロン濃度に関しても、上昇する傾向が見られたが有意な差を認められなかった (図 1)。一方、発情期メスラットにオスラット尿を提示した際の血中プロゲステロン濃度は、顕著に増加し、定常時の 3～4 倍の濃度であった ( $F(1, 12) = 4.7, p = 0.05$ )。これらの結果は、メスラットの鋤鼻系の性ホルモン濃度に影響を与える匂い感受性は、非発情期では低く、発情期に高くなることが示唆した。

血中のプロゲステロン濃度は、フェロモン等の化学的刺激がない状態であっても性周期に伴い変動する。しかしながら、尿と同じ塩組成の溶液をコントロールとして発情期メスラットに提示したところ、血中プロゲステロン濃度は定常時とほぼ同濃度であった。この結果は、尿提示開始から採血に到るまでの時間経過に伴う血中プロゲステロン濃度の変動が生じたことや噴霧による機械的刺激のために、発情期の尿刺激後にプロゲステロンの濃度が上昇した可能

性よりも、尿フェロモンの作用によりプロゲステロン濃度が増加したことを示唆した。

### 3-2 発情期メスラットの血中プロゲステロン濃度変化を引き起こす物質の性質

現在のところ、ラットにおいて血中性ホルモン濃度の変化を引き起こす物質は同定されていない。一方、オスラットの尿中にはプロテアーゼ感受性の異なる少なくとも2種類の蛋白性フェロモン物質が存在している<sup>11)</sup>。このことから、発情期メスラットの体内においてプロゲステロン濃度の変化を引き起こす物質が蛋白質である可能性が考えられる。そこで、刺激液中の蛋白質濃度のメスラット血中プロゲステロン濃度に対する影響を解析した。通常、オスラットから排出される尿の総蛋白質濃度は12.0 mg/ml程度である。尿を希釈し総蛋白質濃度が0.1 mg/ml、1.0 mg/mlおよび5.0 mg/mlの3種類の尿サンプルを調整し、それぞれを発情期メスラットに提示し、血中プロゲステロン濃度を測定した(図2)。血中プロゲステロン濃度は、刺激液中の蛋白質濃度が増加するとともに濃度依存的に増加する傾向が見られた。0.1 mg/mlの尿サンプルを提示すると、血中プロゲステロン濃度は定常時の2倍近くに上昇したが統計的な有意差は見られなかった。さらに高い蛋白質濃度の刺激液中で刺激すると、有意な血中プロゲステロン濃度の増加が見られた( $p<0.001$ )。

図3は、刺激液中の蛋白質をプロナーゼで分解した後に発情期メスラットを刺激し、血中プロゲステロン濃度を測定した結果を示している。プロナーゼ処理をしていない尿を発情期メスラットに提示すると、血中プロゲステロン濃度は定常時の3~4倍に上昇した。一方、プロナーゼ処理をした尿を発情期メスラットに提示すると、血中プロゲステロン濃度の上昇は認められず、定常時とほぼ同濃度であった。これらの結果は、発情期メスラットの体内においてプロゲステロン濃度の増加を引き起こすフェロモン物質が蛋白分解酵素に感受性を有する可能性を示唆した。

### 3-3 プロゲステロン濃度上昇を引き起こすオスラットフェロモンに対する性経験の影響

性経験は、副嗅球の特定の領域に発情フェロモンに対する応答性の亢進を引き起こすような大きな変化を脳神経系に引き起こす。また、副嗅球内の神経活動をFos蛋白質の発現を指標として、オスから放出されるフェロモン活性の変化を解析すると、性経験によりフェロモン活性が顕著に増強する。すなわち、12週齢の性経験をしていないオス由来の尿サンプルは、10週齢サンプルと比べて、ややFos陽性細胞の密度が増加している傾向が見られたが、それほど顕著ではなかった<sup>4)</sup>。一方、同じ12週齢でも性経験をしたラットからのサンプルは、10週齢のサンプルを

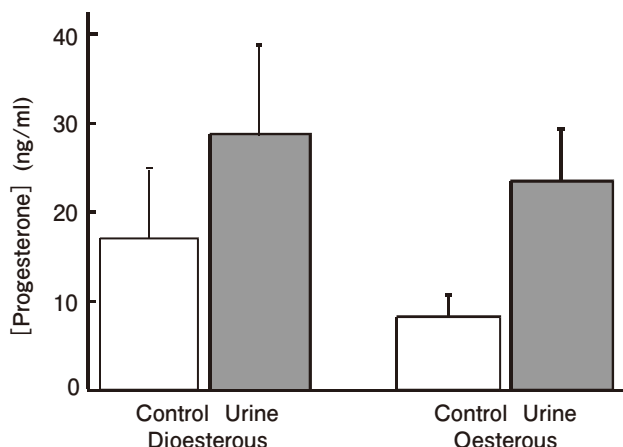


図1 非発情期および発情期メスラット血中プロゲステロン濃度に対するオスラット由来の尿フェロモンの効果

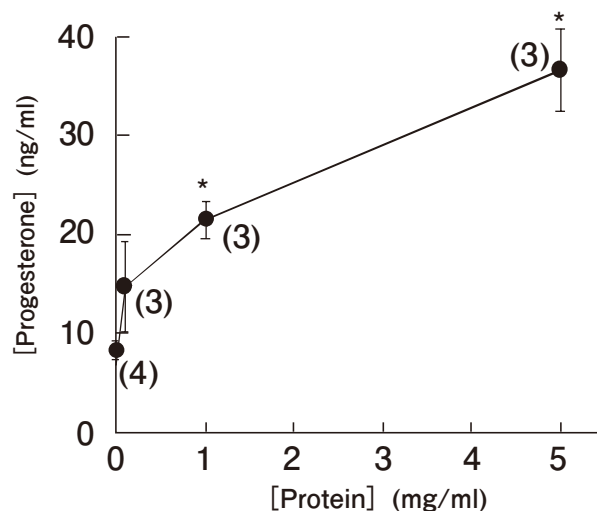


図2 メスラット血中プロゲステロン濃度と刺激に用いたオスラット由来尿フェロモン中の蛋白質濃度の関係

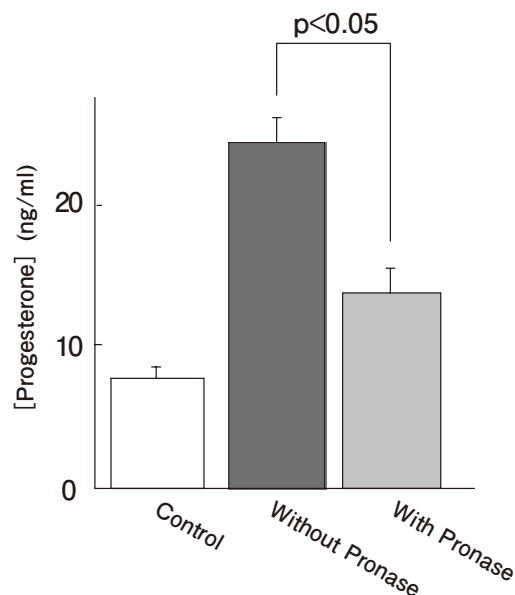


図3 オス尿中フェロモン活性に対するプロナーゼの効果

提示したときと比べ、倍以上の Fos 陽性細胞の発現を引き起こした。そこで、血中プロゲステロン濃度を上昇させるフェロモン効果に対する性経験の影響を発情期メスラットで検討した。性経験を持たないオスラット尿を発情期メスラットに提示すると、血中プロゲステロン濃度は定常時と比べ 3.3 倍強に増加した (図 4)。性経験を持つオスラット尿を発情期メスラットに提示した際の血中プロゲステロン濃度は、定常時と比べるとさらに顕著に増加した ( $p<0.05$ )。この結果は、オスラットにおいて性経験により副嗅球へ強く伝達されたフェロモン情報が、メスラットの血中プロゲステロン濃度を上昇させる作用を有するフェロモンの放出を亢進することを示唆した。

#### 4. 考察

本研究は、メスラットの血中プロゲステロン濃度は、発情期にオスラット尿中フェロモンにより増加することを示した。また、プロゲステロン濃度を増加させるフェロモンの活性は蛋白質分解酵素により消失することを示した。さらに、オスラットが性経験をすると、プロゲステロン濃度を増加させるフェロモン活性が増強されることを明らかにした。

齧歯類では、フェロモンは筒状の形態をして鼻腔下部に存在する鋤鼻器で受容される。鋤鼻器内には太い血管が長軸方向に走行し、収縮による血管径の変化により鋤鼻器内の容量が変化して、粘液に溶解したフェロモンを鋤鼻器内に吸引する鋤鼻ポンプと呼ばれる機能を有している。このため、揮発する性質を持たない蛋白質もフェロモンとして作用することが可能となっている。我々は、ラットの尿中に分子量 500 以下と 500 以上の少なくとも 2 種類以上のフェロモン分子が存在することを見いだしている<sup>12)</sup>。これらのフェロモンは、それぞれ単独では副嗅球の神経細胞を興奮させることは不可能であるが、両者が共存すると副嗅球神経細胞を興奮させる。本研究では、サンプルを蛋白質分解酵素で処理すると、プロゲステロン濃度上昇作用が見られなくなった。この結果は、ラットにおいて、蛋白性のフェロモン分子を受容する副嗅球を介したフェロモン受容系が内分泌系の調節を行っていることを示唆している。

オスラット尿を発情期と非発情期のメスラットにそれぞれ提示すると、発情期のメスラットにおいて有意に血中プロゲステロン濃度を上昇させたことから、プロゲステロン濃度を上昇させるオスラットフェロモンの効果は、発情期のメスラットに特徴的に見られることが示唆された。成熟動物では、排卵前は血中プロゲステロン濃度が低く、排卵後のその濃度は上昇し、黄体形成が始まる。黄体形成開始にともないエストロゲン濃度が上昇しはじめる。これより、オスラットの尿により尿提示開始から採血に到るまでの間

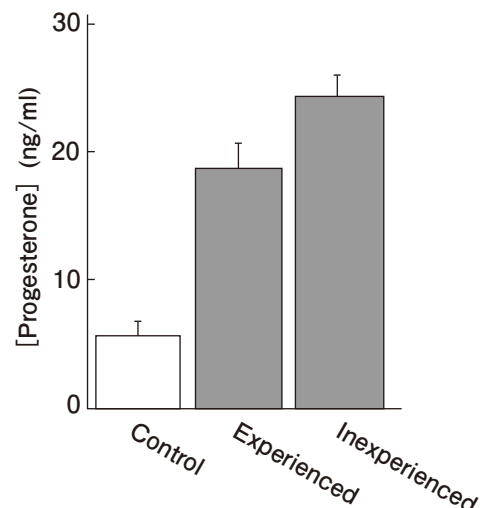


図4 性経験により増強したオスラットフェロモン活性のメスラット血中プロゲステロン濃度への効果

に、本来ならまだ起こらない排卵が起きた可能性も考えられる。また、オスラット尿提示によるプロゲステロン濃度の変化は、発情期メスラットのみに見られたが、非発情期メスラットの体内においても、プロゲステロン以外のホルモンに変動が生じ、発情期のメスに対する効果とは別の効果を引き起こしている可能性も考えられる。

我々は、オスラット由来のフェロモン活性をメスラット副嗅球における神経細胞の興奮を指標に解析したところ、オスラットの性経験により尿中フェロモン活性が性経験により増強することを見いだした<sup>4)</sup>。性経験のあるオスラット尿を提示した時の血中プロゲステロン濃度は、性経験のないオスラット尿を発情期メスラットに提示した時の血中プロゲステロン濃度と比べ、高い値を示した。この結果は、性経験を有するオスは、メスの内分泌系に対してより強い影響を及ぼすフェロモンを放出することを示唆した。

#### 謝辞

本研究は、北海道大学大学院薬学研究科の富岡真由美との共同研究として行った。また、本研究を遂行する上で、暖かい支援を頂いた財団法人コスメトロジー研究振興財団に感謝する。

#### (Reference List)

- 1) Kashiwayanagi, M.: Molecular recognition and intracellular transduction mechanisms in olfactory and vomeronasal systems. *Hormones, Brain and Behavior*, 1-16, Academic Press, San Diego (2002)
- 2) Halpern, M. and Martinez-Marcos, A.: Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog. Neurobiol.* 70, 245-318 (2003)
- 3) Rasmussen, L. E., Lee, T. D., Roelofs, W. L., Zhang,

- A., and Daves Jr., G. D.: Insect pheromone in elephants. *Nature* 379, 684–684 (1996)
- 4) Kashiwayanagi, M.: Augmentation of sensitivity to urinary pheromone and excreting of urinary pheromone by sexual experiences. *Chem. Senses* 30, i138-i139 (2005)
- 5) Wysocki, C. J. and Preti, G.: Facts, fallacies, fears, and frustrations with human pheromones. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 281, 1201–1211 (2004)
- 6) McClintock, M. K.: Menstrual synchrony and suppression. *Nature* 229, 244–245 (1971)
- 7) Stern, K. and McClintock, M. K.: Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature* 392, 177–179 (1998)
- 8) Rodriguez, I., Greer, C. A., Mok, M. Y., and Mombaerts, P.: A putative pheromone receptor gene expressed in human olfactory mucosa. *Nature Genet.* 26, 18–19 (2000)
- 9) Bruce, H. M.: An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature* 184, 105 (1959)
- 10) Tomioka, M., Murayama, T., and Kashiwayanagi, M.: Increases in plasma concentration of progesterone by protease-sensitive urinary pheromones in female rats. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1770–1772 (2005)
- 11) Tsujikawa, K. and Kashiwayanagi, M.: Protease-Sensitive Urinary Pheromones Induce Region-Specific Fos- Expression in Rat Accessory Olfactory Bulb. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 222–224 (1999)
- 12) Yamaguchi, T., Inamura, K., and Kashiwayanagi, M.: Increases in Fos-immunoreactivity after exposure to a combination of two male urinary components in the accessory olfactory bulb of the female rat. *Brain Res.* 876, 211-214 (2000)

# 骨髄細胞を用いた皮膚の構築

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生物学分野

許 南 浩

Recently we demonstrated the participation of whole bone marrow cells from adult mice in the reconstitution of skin including the epidermis and hair follicles (Kataoka et al., Am J Pathol 163:1227-1231, 2003). To get an insight into cell populations that give rise to the epithelial components of the reconstituted skin, we fractionated bone marrow cells derived from green fluorescent protein-transgenic mice by density gradient. Unexpectedly, we found that a substantial amount of mononucleated cells (~30%) was recovered in the pellet fraction and that the cells in the pellet fraction preferentially differentiated into epithelial components of skin than the cells in the mononuclear cell fraction. The pellet fraction contained more CD45-negative (thus uncommitted to the hematopoietic cell lineage) cells than the mononuclear cell fraction. These results indicate that the density gradient fractionation results in significant loss of specific progenitor cells into the usually discarded pellet fraction.

## 1. 緒言

近年、骨髄に由来する細胞が血液細胞以外の様々な組織細胞、例えば骨、軟骨、筋肉、肝臓、肺、心臓、脳、皮膚などの細胞に分化する能力をもつことが明らかにされた。このことに対応して、骨髄から複数の幹細胞・前駆細胞が単離同定されている。血液幹細胞は血液細胞のみでなく、肝臓や皮膚細胞にも分化しうる。間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪、腱、筋肉の他に、神経細胞まで生み出す能力があることが示された。また、Verfaillie 等が単離した MAPC (multipotent adult progenitor cells) と呼ばれる細胞は、分裂能力も高く、多様な細胞に分化する。さらに、薬剤排出能力が高いことを指標に単離される SP 細胞も、多分化能を示す。このように骨髄は、最も豊かな幹細胞の供給源であると考えられる。

骨髄の他にも、多様な成体組織から多分化能を持つ幹細胞が単離されている。しかし、現在のところ、その生理的意義は十分明らかではない。皮膚は独自の幹細胞を保持しており、傷害を受けるとそれらを動員して組織を修復する。それでは何故、他の体組織に皮膚に分化しうる幹細胞が存在するのであろうか？ また、どのような幹細胞が最も効率よく皮膚構成細胞に分化するのであろうか？ 皮膚にもともと存在していた幹細胞から分化した表皮細胞と、他の組織幹細胞から分化した表皮細胞では、その性質に違いがあるであろうか？このような問題を明らかにする

ことは、皮膚の生理、病理、さらにはコスメトロジーの観点からも、大きな意義を持つ。

我々は、ヌードマウスの背部皮膚切除部に特殊なシリコンチャンバーを装着し、その内部に細胞浮遊液を播種することによって比較的短期間に皮膚組織を再構築する実験系を樹立した。本研究はこのシステムを用いて、骨髄細胞の中でどのような細胞集団が効率よく表皮角化細胞をはじめとする皮膚構成細胞に分化するのかを明らかにしようというものである。

## 2. 実験

### 2.1 マウス

骨髄細胞は、GFP-トランスジェニックマウス（阪大、岡部勝教授より提供を受けた）から調製した。このマウスは強力なプロモーターの下流に GFP を繋いだベクターが導入されており、全身殆どの細胞が蛍光をあてると緑色に光る。胎児皮膚細胞の調製には、胎生 16.5 日の ICR マウスを用いた。組織構築は、成体 BALB/c ヌードマウスを用いて行った。

### 2.2 胎児皮膚細胞の調製

胎児皮膚を切り出し、0.05% コラゲナーゼ、4 度で一晩消化した後、実体顕微鏡下で表皮を真皮から剥離した。それぞれをピペティングによって浮遊し、メッシュを通して細胞浮遊液とした。

### 2.3 骨髄細胞の調製と解析

大腿骨の両端を切除し、骨髄を生理食塩水で洗い出すことにより骨髄細胞を採取した。この浮遊液を Histopaque 1083 に上層して 400xg 30 分間遠心して、細胞を分画した (Fig. 3)。各分画の細胞を 3 回生理食塩水で洗浄した後、



Reconstitution of skin using bone marrow-derived cells

Nam-ho Huh

Department of Cell Biology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

FACS Calibur (BD Biosciences) を用いた細胞の前方および側方散乱解析と、免疫染色を行った。

## 2.4 細胞移植

移植した皮膚細胞は、表皮由来細胞と真皮由来細胞を各々 500 万個ずつ混合したものである。実験によってこの浮遊液に 500 ~ 1,000 万個の骨髄細胞を混入した。ネブタール麻酔下のヌードマウスの背部皮膚全層を直径約 1 cm の円形に切除し、下部シリコンチャンバーを装着した (Fig. 1)。細胞浮遊液を遠心して可能な限り少量の液に浮遊した後、チャンバー内に播種し、上部シリコンチャンバーをかぶせた。1 週間後にシリコンチャンバーを取り除き、経過を観察した。

## 2.5 組織採取、免疫染色

細胞を移植して 3 週間後に移植部位に形成された皮膚組織を切除し、4 % パラホルムアルデヒドで固定、Technovit 8100 (Heraeus Kulzer) に包埋した。1 サンプルについて切片を少なくとも 20 枚作製し、GFP- 陽性細胞 (すなわち骨髄由来細胞) を検索した。GFP- 陽性細胞の計測は、写真上で行った。サイトケラチン (上皮細胞マーカー) と von-Willebrand factor (血管内皮細胞マーカー) に対する抗体を用いて免疫染色を行った。また切片を 60% イソプロピルアルコールで処理した後、0.18% Oil Red O で染色することによって、皮脂腺細胞を同定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 骨髄細胞の分画

胎生 16.5 日のマウス胎児皮膚から調製した細胞浮遊液をシリコンチャンバー内に播種すると、3 週間で皮膚組織が構築され、表皮は勿論、毛のうや皮脂腺も形成される (Fig. 1)。この細胞浮遊液に GFP- 陽性の骨髄細胞を混入すると、その細胞が周囲の環境の影響を受けて、表皮角化細胞、毛のう細胞、皮脂腺、血管内皮細胞などに分化した (Fig. 2)。この実験では、骨髄細胞を未分画のまま用いたが、どのような細胞集団が皮膚構成細胞に分化するのかを明らかにするために、骨髄細胞をまず分画した。

骨髄細胞浮遊液には大量の赤血球が含まれる。従って、通常、細胞の分画実験を行うには、まず密度勾配遠心によって単核細胞分画を調製し、それをさらに分画するのが一般的である。そこで我々もまず単核細胞を調製し、それをマウス胎児皮膚細胞と混合して移植し、皮膚組織構築への貢献度を検討した。単核細胞分画というのは骨髄中の有核細胞の大部分が回収されると考えられているので、当然未分画の骨髄細胞と同様な結果が得られると期待したが、予想に反して皮膚の上皮成分への貢献は大幅に低下していた。その原因を明らかにするために、以下の検討を行った。

骨髄細胞を密度勾配遠心によって分画すると、上清、単核細胞分画、中間層、沈渣にそれぞれ 0 %、62 %、7 %、31 % の細胞が回収された (Fig. 3)。赤血球は部分的に溶血しており、単核細胞分画、沈渣中の有核細胞率は、68 % と

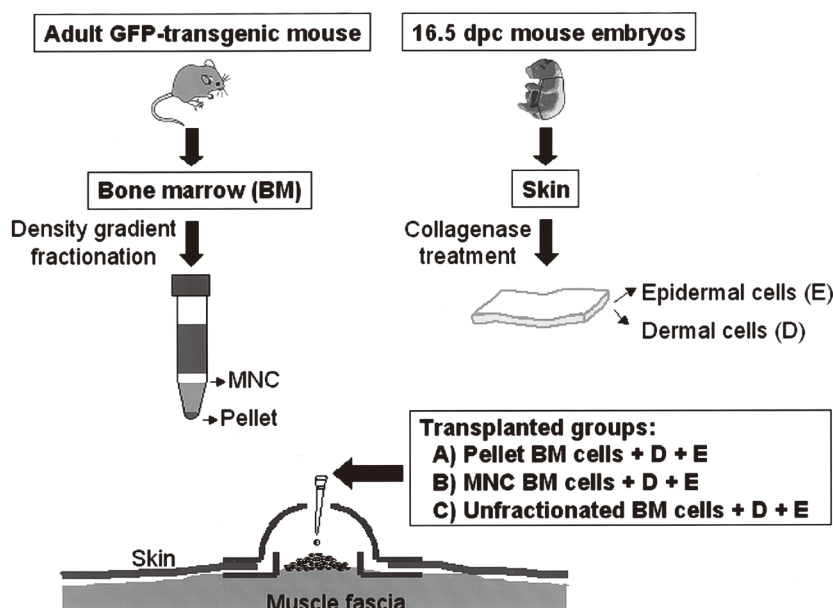


Figure 1 Skin reconstitution assay using a silicon chamber. Bone marrow cells from adult GFP-transgenic mice were fractionated by density gradient centrifugation, mixed with embryonic mouse skin cells, and transplanted into skin defects made on the backs of nude mice. MNC, mononuclear cells.

41%であった。このような分画パターンは、密度勾配遠心の媒体を変えても、大きな変化は見られなかったので、一般的な現象だと考えられる。

### 3.2 再構築された皮膚組織中の細胞の同定

移植した骨髄細胞によってどのような皮膚構成細胞が形成されたかは、GFP-陽性細胞の形態、局在、脂肪染色、免疫染色によるマーカータンパク質の検出等によって判定した (Fig. 2)。表皮角化細胞と毛のう細胞は、その形態や局在に加えてサイトケラチンを発現することが指標となる。皮脂腺細胞は Oil Red O 染色陽性である。樹状細胞は表皮内に存在し、その特徴的な形態から容易に同定できる。血管内皮細胞は環状構造をなし、von Willebrand factor を発現する。筋肉細胞と脂肪細胞はその形態と局在から同定した。それ以外の細胞は、その形態によって球形細胞と紡

錘形細胞に分類した。

### 3.3 単核細胞分画と沈渣分画の皮膚細胞への分化

骨髄沈渣分画の細胞は単核細胞分画に比較して、毛のうに分化する頻度が高かった (Table I, Fig. 4)。骨髄沈渣分画を移植した8回の実験ではその全てで毛のうに分化した細胞が検出できたが、単核細胞分画では12回の移植実験中、毛のうに分化した骨髄細胞を検出できたのは2回にとどまっていた。再構築された皮膚に存在するGFP-陽性細胞 (すなわち骨髄由来細胞) のうちの毛のう細胞の比率は、沈渣分画を移植した場合は23.1%、単核細胞分画を移植した場合は4.9%であって、統計的に明確な有意差があった。同様に、沈渣分画細胞は単核細胞分画に比べて皮脂腺細胞にもより高い頻度で分化した。反対に、血管内皮細胞に分化する確率は、単核細胞分画が高かった。

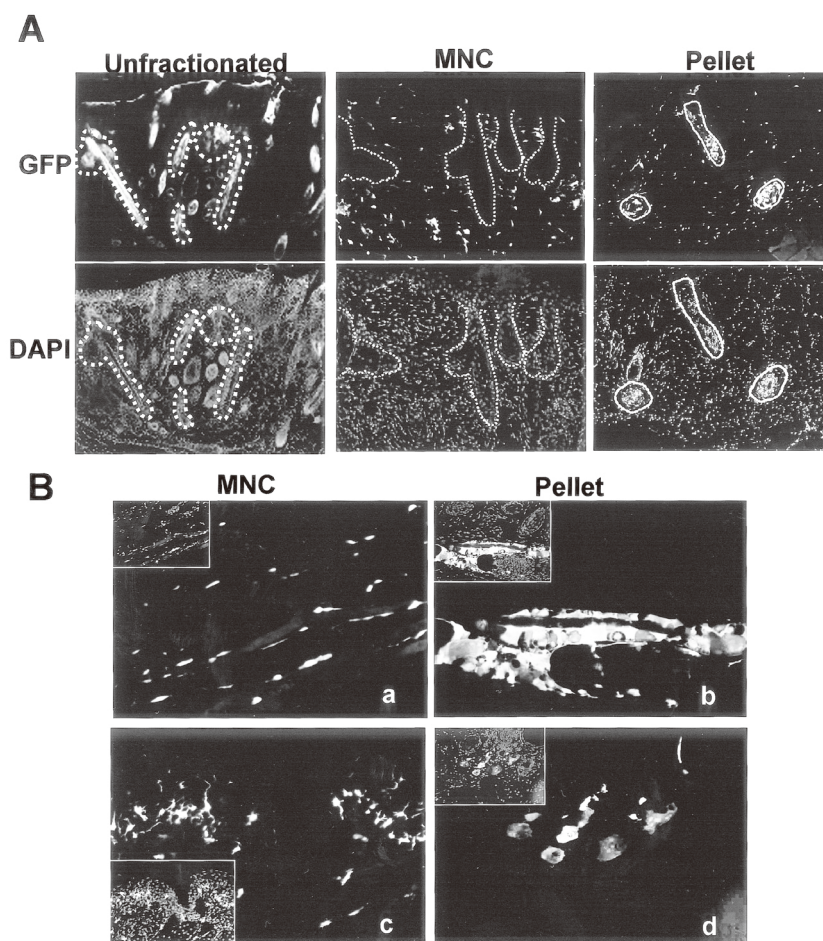


Figure 2 Density gradient fractionation of adult mouse bone marrow cells. (A) Density gradient fractionation divides the bone marrow cells into four fractions. Most of the nucleated cells were recovered in the MNC fraction (low density) and pellet fraction (high density). (B, C) Flow cytometric analysis of the MNC and pellet fractions. The abscissa and ordinate are forward scatter and side scatter, respectively. GFP-positive cells (viable nucleated cells) are indicated in red. GFP-negative large (viable nucleated cells) and small cells (erythrocytes and dead cells) are indicated in blue and black, respectively.

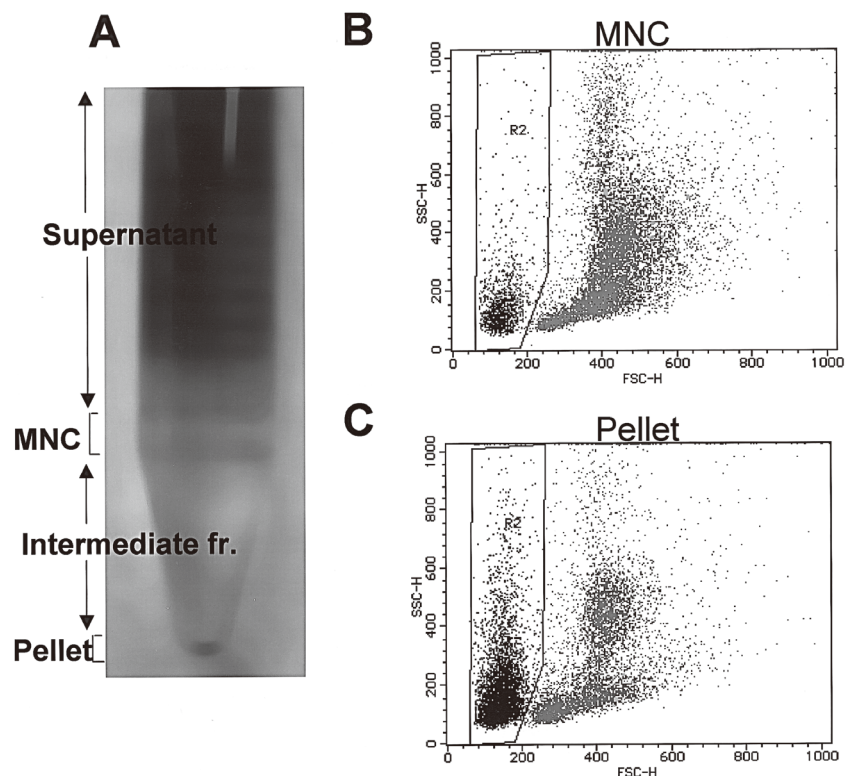


Figure 3 Immunohistochemistry showing multipotent differentiation capacity of bone marrow cells. (A) Cells composing hair follicles formed by transplantation of the pellet fraction. Co-localization of GFP signal (A2) and cytokeratin expression (A3). Nuclei were stained with DAPI (A2). (B) Peri-sebaceous gland cells after transplantation of the pellet fraction. (B1), DAPI staining with dotted lines indicating the sebaceous glands; (B2), GFP signal present in the outer layer of sebaceous glands; (B3), a merged image of GFP and Oil red O staining. (C) Endothelial cells after transplantation of the MNC fraction. GFP signal (C1) was co-localized with von Willebrand factor (C2) as indicated by arrowheads. Erythrocytes were observed in the vessel lumen (\*).

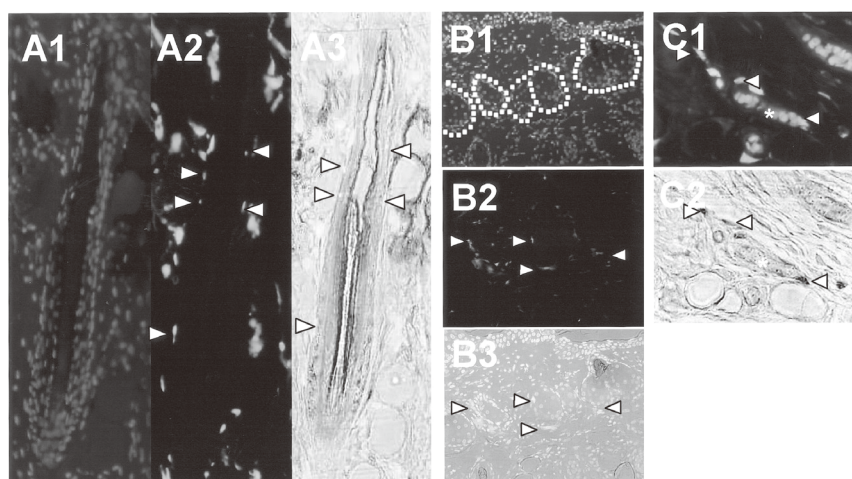


Figure 4 Fluorescent-activated cell sorter analysis of the cells recovered in the MNC and pellet fractions after density gradient fractionation. The antibodies against CD45 was conjugated with fluorescein isothiocyanate (green; detected by FL1 covering 515 to 545 nm) and the antibodies against CD117 (c-kit) and CD200 were conjugated with phycoerythrin (red; detected by FL2 covering 653 to 669 nm).

Table I. Differentiation of bone marrow cells into various cell types in skin

|                                                                | Incidence of differentiation events |         |        | No. of GFP-positive cells |                 |                       |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------|--------|---------------------------|-----------------|-----------------------|
|                                                                | Whole                               | MNC     | Pellet | MNC                       | Pellet          |                       |
| No. of experiments                                             | 7                                   | 12      | 8      |                           |                 |                       |
| No. of GFP(+) cells counted<br>(Total number of cells counted) |                                     |         |        | 100%<br>(2,455)           | 100%<br>(1,579) |                       |
| Epidermal keratinocytes                                        | 2 / 7                               | 1 / 12  | 2 / 8  | 0.3%                      | 0.5%            |                       |
| Hair follicle cells                                            | 4 / 7                               | 2 / 12  | 8 / 8  | 4.9%                      | 23.1% *         |                       |
| Sebaceous gland cells                                          | 3 / 7                               | 3 / 12  | 7 / 8  | 3.3%                      | 8.3% **         |                       |
| Dendritic gland cells                                          | 7 / 7                               | 11 / 12 | 8 / 8  | 4.3%                      | 4.1%            |                       |
| Endothelial cells                                              | 4 / 7                               | 12 / 12 | 3 / 8  | 2.6%                      | 0.9% ***        |                       |
| Muscle cells                                                   | -                                   | 2 / 12  | 3 / 8  | 0.3%                      | 0.6%            | *) MNC<Pellet p<0.0   |
| Adipocytes                                                     | -                                   | 2 / 12  | 0 / 8  | 0.6%                      | 0.0%            | **) MNC<Pellet p<0.0  |
| Spindle cells                                                  | 7 / 7                               | 12 / 12 | 8 / 8  | 58.4%                     | 52.7%           | ***) MNC>Pellet p<0.0 |
| Round cells                                                    | 7 / 7                               | 12 / 12 | 8 / 8  | 25.9%                     | 9.8%            | (Mann-Whitney test)   |

Table II. Percentage of cells positive for expression of cell surface markers in the MNC and pellet fractions.

|                    | MNC          | Pellet       | No. of experiments |    |
|--------------------|--------------|--------------|--------------------|----|
| CD45               | 85.7 +/- 2.3 | 35.5 +/- 4.4 | 4                  | *  |
| CD90               | 4.5 +/- 1.8  | 2.6 +/- 0.2  | 4                  |    |
| $\gamma\delta$ TCR | 12.0 +/- 1.9 | 7.4 +/- 1.4  | 3                  | ** |
| CD34               | 1.2 +/- 1.3  | 1.5 +/- 0.7  | 4                  |    |
| CD29               | 95.2 +/- 2.7 | 94.0 +/- 0.7 | 4                  |    |
| CD49f              | 13.7 +/- 2.3 | 9.0 +/- 2.2  | 4                  | ** |
| CD200              | 28.4 +/- 0.4 | 9.3 +/- 0.5  | 3                  | *  |
| CD117              | 14.0 +/- 2.5 | 4.9 +/- 1.3  | 9                  | *  |

\*) MNC&gt;Pellet p&lt;0.001

\*\*) MNC&gt;Pellet p&lt;0.05

(ANOVA method)

### 3.4 単核細胞分画と沈渣分画に含まれる細胞のマーカータンパク質の解析

単核細胞分画と沈渣分画にそれぞれどのような特徴を持つ細胞が含まれているのかを明らかにするため、いろいろなマーカータンパク質に対する抗体で染色した後に、FACSで解析した (Table II)。CD45、CD117、CD200 陽性の細胞の頻度は、沈渣分画が単核細胞分画に比較して低かった。CD49f、 $\gamma\delta$ TCR 陽性細胞の頻度の差はわずかで、CD90、CD34、CD29 の発現は両分画で差が認められなかった。二重染色による解析では、CD117 や CD200 の陽性細胞は CD45 陽性細胞集団中にのみ検出され、CD45 陽性細胞集団中の CD117 や CD200 の発現頻度は、両分画で差が認められなかった。以上を総合すると、沈渣分画は血液細胞に分化するよう決定づけられている細胞を含む頻度が低い、言い換えれば血液細胞系以外の幹細胞がより高い頻度で含まれるという可能性が示唆された。

### 3.5 本研究の意義

骨髄から細胞を採取すると、一般に多数の赤血球が含まれている。そこで、殆ど全ての実験が密度勾配遠心によって赤血球を沈渣として取り除き、その上部に層を形成する単核細胞分画を使用した行われている。本研究は、通常行われている密度勾配遠心の後、赤血球として廃棄されている沈渣分画にも単核細胞分画の四分の一程度の有核細胞が含まれていること、しかも沈渣分画に回収される細胞集団にはより幅広い細胞系列に分化する幹細胞が含まれていることを明らかにしたもので、その意義は大きい。

我々の一連の研究によって、骨髄細胞は適当な環境におかれれば短期間に予想以上の頻度で皮膚細胞に分化しうることが明らかになった。ヒトで同様なことが起こるのか、もし起こるとすれば皮膚内部から再生増殖してきた細胞と、骨髄をはじめ皮膚外組織に由来する細胞とで機能的にどのような違いがあるのか、このような問題は皮膚の生理・病理を明らかにするだけでなく、コスメトロジーの観点からも非常に興味のある課題である。

# メラノソーム輸送に必須の因子 Slac2-a の 分解メカニズムの解明とメラノソーム輸送制御への応用

独立行政法人理化学研究所 福田独立主幹研究ユニット

福田 光 則

Slac2-a/melanophilin was recently identified as the "missing link" between the small GTPase Rab27A and the actin-based motor protein myosin Va. Formation of a tripartite protein complex by three molecules is essential for melanosome transfer from microtubules to actin filaments and subsequent actin-based melanosome transport in melanocytes. However, the regulatory mechanisms of the disassembly of the complex after actin-based melanosome transport had never been elucidated. In this study, we discovered that Slac2-a and a closely related isoform, Slac2-c, contain multiple PEST-like sequences (potential signals for rapid protein degradation) in the myosin Va- and actin-binding domains at the C terminus. We found that the C-terminal domain of Slac2-a/c is highly sensitive to low concentrations of proteases, such as trypsin and calpain, *in vitro*, whereas the N-terminal Rab27A-binding domain is highly resistant to these proteases. We further found that endogenous calpains selectively cleave Slac2-a, but not Rab27A or myosin Va, in melanocytes. A mutant Slac2-a lacking one of the PEST-like sequences located at the interface between the myosin Va- and actin-binding domains ( $\Delta$ PEST; amino acids 399-405) is more stable than the wild-type protein, both *in vitro* and in melanocytes. Expression of the mutant Slac2-a- $\Delta$ PEST with an N-terminal green fluorescence protein tag often induced perinuclear aggregation of melanosomes (approximately 40% of the transfected cells) compared with the wild-type Slac2-a. Our findings suggest that protein degradation of Slac2-a is an essential process for proper melanosome distribution in melanocytes.

## 1. 緒言

我々の体を紫外線から守ってくれるメラニン色素は、メラノサイトと呼ばれる特殊な細胞で合成され、メラノソームと呼ばれる小胞に貯蔵されている。核周辺で成熟したメラノソームは、細胞内に張り巡らされた二種類の交通網(微小管及びアクチン線維)によって細胞膜周辺へと輸送される。その後、メラノソームは隣接するケラチノサイトあるいは毛母細胞に受け渡され、皮膚や毛髪の色化が引き起こされる<sup>1) 2)</sup>。これまでの研究で、メラノソーム輸送(特に微小管からアクチン線維へのメラノソームの受け渡しのステップ)には低分子量G蛋白質Rab27A、リンカー蛋白質Slac2-a(スラックツー)及びアクチン依存性モーター蛋白質ミオシンVaの三者複合体の形成が不可欠であることが明らかになっている<sup>3)-8)</sup>。生体内でこのRab27A・Slac2-a・ミオシンVa複合体の形成が損なわれると、メラノソームを正しく輸送することができず、皮膚や毛髪の色化を特徴とするヒト遺伝病Griscelli症候群が発症する<sup>9) 10)</sup>。従って、もしRab27A・Slac2-a・ミオシンVa複合体の解離を人為的に操作することができれば、メラノソームの輸送ひいては皮膚におけるメラニン色素沈着の制御も可能と

考えられる。しかしながら、Rab27A・Slac2-a・ミオシンVa複合体解離の分子メカニズムはこれまで全く解明されていなかった。私達は最近、Slac2-aの分子内にプロリン(P)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、トレオニン(T)の四つのアミノ酸からなる配列が多数存在することを見出した(図1)<sup>11)</sup>。これらの配列は蛋白質分解のシグナルとされているPEST配列と考えられ、Slac2-a分子が選択的分解を受けることによりRab27A・Slac2-a・ミオシンVa複合体の解離が引き起こされる可能性が考えられた。そこで本研究では、メラノサイトにおいてどのようなシグナルを受けてSlac2-aが分解されるのか、Slac2-aのどの部位が切断されるのか、さらにはどのようなプロテアーゼにより選択的に分解されるのかを解明することを目指した。また、Slac2-aの相同分子で網膜上皮細胞に発現し、網膜メラノソームを輸送すると考えられているSlac2-c<sup>12) 13)</sup>に関しても同様にプロテアーゼによる分解の可能性を検討した。

## 2. 実験

### 2.1 Slac2-a/c分子のプロテアーゼによる *in vitro* 限定分解

Slac2-a及びSlac2-cは共に三つの機能ドメイン(アミノ末端側のRab27A結合ドメイン(SHD)、中央部分のミオシン結合ドメイン(MBD)、そしてカルボキシル末端側のアクチン結合ドメイン(ABD))により構成されている<sup>5) 14)</sup>。PEST様の配列はSlac2分子の中央部分からカルボキシル末端側にかけて多数存在している(図1)。アミノ末端



Elucidation of the Degradation Mechanism of Melanosomal Protein Slac2-a.

Mitsunori Fukuda

Fukuda Initiative Research Unit, RIKEN

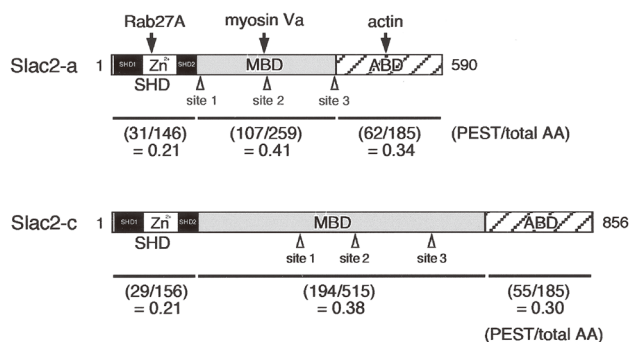


図1 Slac2-a 及び Slac2-c の分子構造と PEST 様配列

Slac2 分子はアミノ末端側の Rab27A 結合ドメイン (SHD, synaptotagmin-like protein homology domain)、中央部分のミオシン結合ドメイン (MBD, myosin-binding domain)、カルボキシル末端部分のアクチン結合ドメイン (ABD, actin-binding domain) により構成されている。特に MBD 領域において Pro, Glu, Ser, Thr (PEST) の四つのアミノ酸の含量が多く、矢頭で示した site 1～3 でまずプロテアーゼによる分解を受けると考えられる。

側に T7 タグ、カルボキシル末端側に FLAG タグを付加したりコンビナント Slac2 分子をアガロースカラムに固定化し、低濃度のトリプシン (Sigma ; 10～250ng/ml in 50mM HEPES-KOH, pH7.2 ; 25℃, 30 分) 及び  $\mu$ カルパイン (Calbiochem; 5～500nM in 50mM HEPES-KOH, pH7.2 + 0.75mM CaCl<sub>2</sub> ; 30℃, 15 分) 溶液中でインキュベーションした<sup>11)</sup>。酵素消化後の Slac2 分子を 10% SDS 電気泳動に流し、分解の様子を抗 T7 タグ抗体 (Novagen) 及び抗 FLAG タグ抗体 (Sigma) を用いてイムノプロット法でモニターした。

## 2.2 メラノサイト内在性カルパインによる Slac2-a 分子の分解

培養メラノサイト (melan-a 細胞) は Dorothy C. Bennett 博士 (St. George's Hospital Medical School, London, UK) よりご供与頂いた<sup>15)</sup>。10 cm シャーレに培養した melan-a 細胞 (培養条件の詳細は文献 5 に記載) を 500 $\mu$ l のプロテアーゼインヒビターを含まないバッファー (50 mM HEPES-KOH, pH 7.2, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 150mM NaCl) 中でホモジェナイズした。最終濃度 1% Triton X-100 で蛋白質を可溶化後 (4℃, 1 時間)、不溶性画分を遠心により除去した (15,000rpm, 10 分)。得られた細胞抽出液を 2 mM EGTA あるいは 0.75 mM CaCl<sub>2</sub> 存在下で 30℃, 1 時間インキュベーションした。反応溶液を 10% SDS-PAGE に流し、Slac2-a 分子の分解の様子を抗 Slac2-a-SHD 抗体<sup>16)</sup> を用いてイムノプロット法で評価した。また、内在性  $\mu$ カルパインによる分解を確認するため、反応溶液中に  $\mu$ カルパインインヒビター (10 $\mu$ M calpastatin peptide あるいは calpain inhibitor III、いずれも Calbiochem) を共存させて同様の

実験を行った。

## 2.3 PEST 配列欠損 Slac2-a 分子の作成

Slac2-a 分子の MBD と ABD 領域の境界に存在する PEST 様配列 (STSSSEDET : アミノ酸 399～406) を欠損させた Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体を下記の変異プライマーを用いて 2 ステップ PCR 法<sup>17)</sup> により作成した (5'-GGTACCA TCTGGCTTGGTGGGAACCACTGATGTTGCTGG-3' 及び 5'-GGTACCTTCCTTGGAGGGTC-3')。作成した Slac2-a- $\Delta$ PEST の cDNA を pEGFP-C1 ベクター (BD Clontech) 及び pEF-T7 ベクター<sup>18)</sup> にサブクローニングした。Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体のプロテアーゼに対する抵抗性は上記 2.1 の手法により確認を行った。

## 2.4 メラノソーム凝集アッセイ

トランスフェクション前日に  $1 \times 10^5$  個の melan-a 細胞を 3.5 cm シャーレに培養し、2  $\mu$ g の各種発現ベクター (pEGFP-C1, pEGFP-C1-Slac2-a, pEGFP-C1-Slac2-a- $\Delta$ PEST) を 3  $\mu$ l の FuGene 6 (Roche) を用いて遺伝子導入した。二日後に細胞を 4% パラホルムアルデヒドで 20 分間固定し、GFP の蛍光を指標に遺伝子導入された細胞を同定し、メラノソームの分布 (細胞膜周辺あるいは核周辺に凝集) を観察した (詳細は文献 5 を参照)。

## 3. 結果

### 3.1 PEST 配列依存的 Slac2-a/c 分子の分解

Slac2-a/c の分子内には多数の PEST 様配列が存在することから (図 1)、まずこれらが実際に蛋白質分解のシグナルとして機能するのかを検討した。リコンビナント Slac2-a 及び Slac2-c を低濃度のトリプシン及び  $\mu$ カルパインで処理すると、濃度依存的な Slac2 分子の分解が観察された (図 2)。アミノ末端側を認識する抗 T7 タグ抗体で分解過程をモニターすると、多数の分解産物が観察されたが (図 2 A, site 1～3, 白矢頭)、カルボキシル末端側を認識する抗 FLAG タグ抗体では分解産物は全く検出されず、全長の Slac2 分子のみが特異的に認識された (図 2 B, 黒矢頭)。つまり、Slac2 分子は PEST 様配列が多数存在する MBD 及び ABD の領域でプロテアーゼによる分解を受け易く、PEST 様配列を含まない SHD では分解を受けにくいことが明らかとなった。また、Slac2 分子の分解産物の分子量から類推して、Slac2 分子は MBD 領域 (PEST 含量が最も高い領域) に存在する site 1～3 でまず切断されると考えられた (図 1、矢頭)。さらに、site 3 に相当すると考えられる PEST 様配列 (STSSSEDET : アミノ酸 399～406) を遺伝子工学的手法により欠損させた Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体ではプロテアーゼに対する抵抗性が強く

ることから、Slac2 分子の PEST 様配列が蛋白質分解のシグナルとして機能している可能性が強く示唆された<sup>11)</sup>。

次に、メラノサイトに内在性の Slac2-a 分子が実際にプロテアーゼによる分解を受け易いのかを検討してみた。予想通り、メラノサイトの細胞抽出液をカルシウム存在下で 30℃、1 時間処理すると Slac2-a 分子が選択的に分解された (図 3)。この条件下では、総蛋白質量 (アミドブラック染色)、アクチン、ミオシン Va、Rab27A のいずれにも影響が無いことから、分解は Slac2-a 分子に特異的と考えられた<sup>11)</sup>。カルシウム依存的に PEST 配列を分解するプロテアーゼの候補としては  $\mu$  カルパインが考えられたので<sup>19)</sup>、 $\mu$  カルパインインヒビター存在下で同様の実験を行ったところ、Slac2-a 分子の分解が完全に阻害された (図 3、レーン 3 及び 4)。

### 3. 2 Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体によるメラノソーム凝集の誘導

Slac2-a の PEST 様配列依存的分解のメラノソーム輸送における役割を検討するため、PEST 様配列の一部を欠

損した Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体を作成し、培養メラノサイトに発現させた (図 4)。Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体は一部の PEST 様配列を欠損するため、野生型よりも安定してメラノサイトに発現し、主にアクチン線維上に蓄積していた (野生型の Slac2-a では主にメラノソーム上に存在する)。さらに、Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体を発現する約 4 割の細胞でメラノソームの凝集が観察され、正常なメラノソーム分布を維持するためには Slac2-a 分子の分解が不可欠である可能性が示唆された。

## 4. 考察

モーター蛋白質ミオシン Va は積み荷であるメラノソームを直接認識するのではなく、リンカー蛋白質 Slac2-a を介してメラノソーム上の Rab27A と結合している。アクチン依存性のメラノソーム輸送が終了すると、Rab27A・Slac2-a・ミオシン Va 複合体は解離すると考えられているが、これまでその分子メカニズムは全く分かっていなかった。今回の研究により、Slac2-a 分子内には複数の

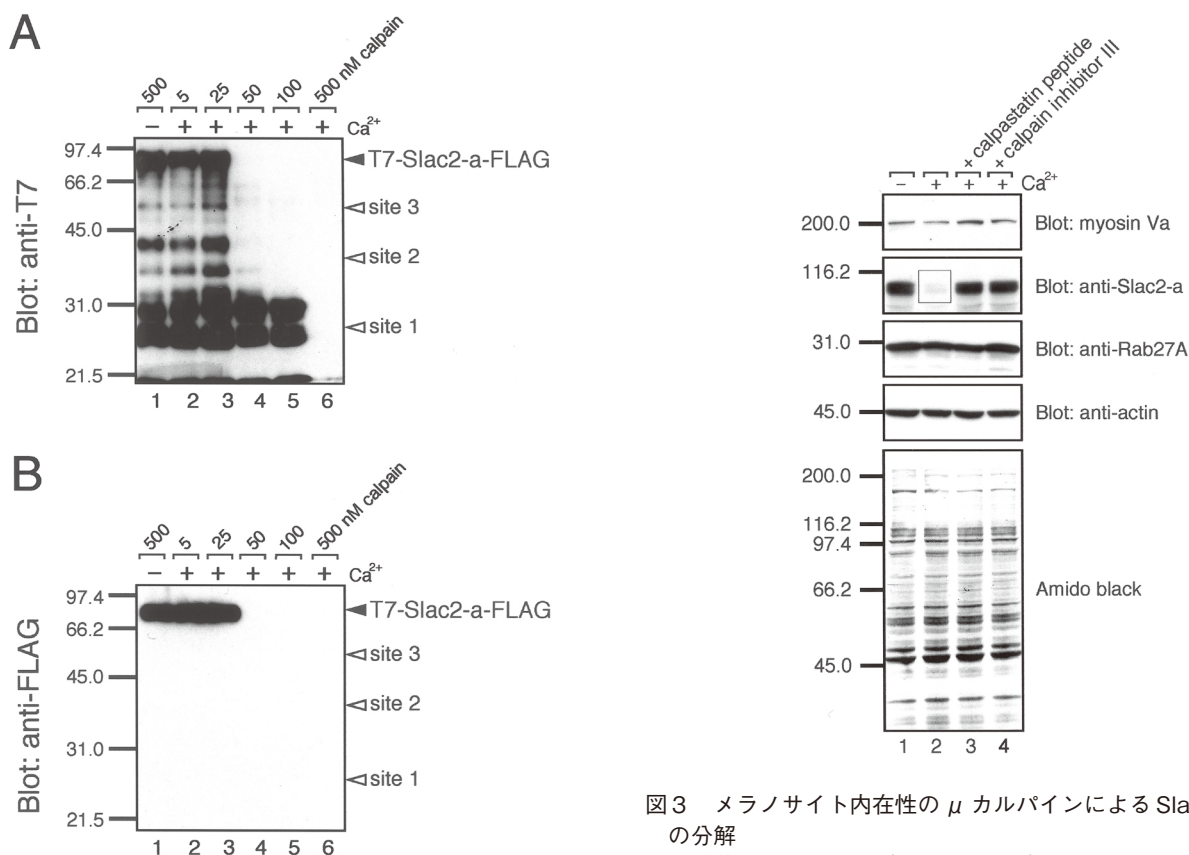


図 3 メラノサイト内在性の  $\mu$  カルパインによる Slac2-a 分子の分解

図 2  $\mu$  カルパインによるリコンビナント Slac2-a 分子の分解  
精製リコンビナント T7-Slac2-a-FLAG 分子を表示量のカルシウム/ $\mu$  カルパインで処理し (30℃, 15min)、分解の様子を抗 T7 タグ抗体 (A) 及び抗 FLAG タグ抗体 (B) でモニターした。

培養メラノサイト (melan-a 細胞) の抽出液を 30℃、1 時間処理すると Slac2-a 分子が選択的に分解される (二段目のパネル、四角)。この分解は  $\mu$  カルパインのインヒビターにより完全に阻害された。なお、この条件下ではミオシン Va、Rab27A、アクチン、総蛋白質量には特に影響は見られなかった。

PEST 様配列が存在し、内在性のプロテアーゼにより特に MBD の領域が選択的に分解されることが明らかとなった。MBD 領域がプロテアーゼにより分解されるとミオシン Va との結合が損なわれることから、Slac2-a 分子の分解は Rab27A・Slac2-a・ミオシン Va 複合体の解離を引き起こし、輸送終了のシグナルとして機能する可能性が十分に考えられる。「リンカー蛋白質を分解することにより積み荷を降ろす」というメカニズムは一見無駄なように思えるが、酵母の液胞輸送においては、実際に Myo2p という V 型ミオシンのリンカー蛋白質 Vac17p が PEST 配列依存的に分解されることがにより、液胞輸送終了のシグナルとなることが最近報告されている<sup>20)</sup>。興味深いことに、PEST 配列を欠損した Vac17p が液胞を正しく輸送できないように、Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体も頻繁にメラノソーム凝集を引き起こすことが明らかになった。詳細な阻害機構は現段階では明らかではないが、Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体は直接メラノソーム輸送を阻害するのではなく、恐らくアクチン線維上に蓄積し ABD 領域を介してアクチン線維の束化を促進することにより、微細管からアクチン線維へのメラノソームの受け渡しを二次的に阻害するのではないかと推察される。

もしこの説が正しいとすると、Slac2-a をターゲットとするプロテアーゼはアクチン依存性のメラノソーム輸送が終了する時にのみ活性化される必要がある（輸送途中で Slac2-a を分解するとメラノソーム輸送が阻害されてしまうため）。今後の重要な研究課題の一つは Slac2-a を分解するプロテアーゼ候補  $\mu$  カルパインの時空間的活性化

機構を明らかにすることである。カルパインが細胞膜近傍（すなわちメラノソームの積みおろし場）で活性化されるという報告もあり<sup>21) 22)</sup>、*in vivo* でも Slac2-a の分解制御に関与する可能性は十分にあるが、他のプロテアーゼの関与も否定はできない。今後、他の内在性プロテアーゼによる Slac2-a 分子の分解に関しても検討して行く予定である。

## 謝辞

本研究は理化学研究所福田独立主幹研究ユニットの伊藤敬博士、黒田垂歩博士、菅野栄子氏との共同研究で行われたもので、ここに深く感謝致します。

## (引用文献)

- 1) Marks MS, Seabra MC, : The melanosome: Membrane dynamics in black and white, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 738-748, 2001.
- 2) 黒田垂歩, 福田光則, : 美白への新たなアプローチーメラニン輸送をストップさせるー, *BIONICS*, 2(11), 68-71, 2005.
- 3) Fukuda M, Kuroda TS, Mikoshiba K, : Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: Implications of a tripartite protein complex for melanosome transport, *J. Biol. Chem.*, 277, 12432-12436, 2002.
- 4) Wu XS, Rao K, Zhang H, *et al.*, : Identification of an organelle receptor for myosin-Va, *Nat. Cell Biol.*, 4, 271-278, 2002.
- 5) Kuroda TS, Ariga H, Fukuda M, : The actin-binding domain of Slac2-a/melanophilin is required for melanosome distribution in melanocytes, *Mol. Cell. Biol.*, 23, 5245-5255, 2003.
- 6) Fukuda M, Kuroda TS, : Missense mutations in the globular tail of myosin-Va in *dilute* mice partially impair binding of Slac2-a/melanophilin, *J. Cell Sci.*, 117, 583-591, 2004.
- 7) Kuroda TS, Fukuda M, : Rab27A-binding protein Slp2-a is required for peripheral, melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes, *Nat. Cell Biol.*, 6, 1195-1203, 2004.
- 8) 福田光則, : Slac2-a と Slp2-a : メラニン色素輸送のしくみ, *医学のあゆみ*, 212, 769-770, 2005.
- 9) Ménasché G, Pastural E, Feldmann J, *et al.*, : Mutations in *RAB27A* cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome, *Nat. Genet.*, 25, 173-176, 2000.
- 10) 黒田垂歩, 福田光則, : リソソーム関連疾患と低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab - Rab27A とミオシン Va の運

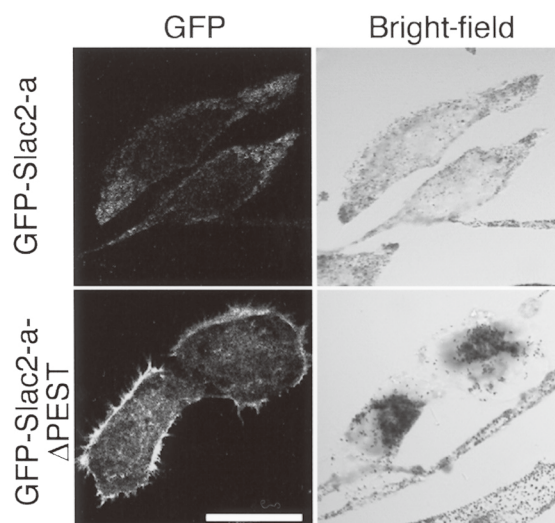


図4 Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体によるメラノソーム凝集の誘導  
野生型の GFP-Slac2-a 分子はメラノソーム上に発現し、メラノソームの分布には大きな影響を与えないが（上段）、Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体は野生型よりも安定に発現し（主にアクチン線維上に蓄積）、約40%の細胞でメラノソームの凝集が観察された（下段）。スケールバー、10 $\mu$ m。

- 命的出会いー, 実験医学増刊号「細胞内輸送研究の最前線」, 21, 2039-2047, 2003.
- 11) Fukuda M, Itoh T, : Slac2-a/melanophilin contains multiple PEST-like sequences that are highly sensitive to proteolysis, J. Biol. Chem., 279, 22314-22321, 2004.
  - 12) Fukuda M, Kuroda TS, : Slac2-c (synaptotagmin-like protein homologue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin, J. Biol. Chem., 277, 43096-43103, 2002.
  - 13) Kuroda TS, Fukuda M, : Functional analysis of Slac2-c/MyRIP as a linker protein between melanosomes and myosin VIIa, J. Biol. Chem., 280, 28015-28022, 2005.
  - 14) Fukuda M, : Versatile role of Rab27 in membrane trafficking: Focus on the Rab27 effector families, J. Biochem., 137, 9-16, 2005.
  - 15) Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR, : A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth, Int. J. Cancer, 39, 414-418, 1987.
  - 16) Imai A, Yoshie S, Nashida T, *et al.*, : The small GTPase Rab27B regulates amylase release from rat parotid acinar cells, J. Cell Sci., 117, 1945-1953, 2004.
  - 17) Fukuda M, Kojima T, Aruga J, *et al.*, : Functional diversity of C2 domains of synaptotagmin family: Mutational analysis of inositol high polyphosphate binding domain, J. Biol. Chem., 270, 26523-26527, 1995.
  - 18) Fukuda M, Kanno E, Mikoshiba K, : Conserved N-terminal cysteine motif is essential for homo- and heterodimer formation of synaptotagmins III, V, VI, and X, J. Biol. Chem., 274, 31421-31427, 1999.
  - 19) Goll DE, Thompson VF, Li H, *et al.*, : The calpain system, Physiol. Rev., 83, 731-801, 2003.
  - 20) Tang F, Kauffman EJ, Novak JL, *et al.*, : Regulated degradation of a class V myosin receptor directs movement of the yeast vacuole, Nature, 422, 87-92, 2003.
  - 21) Schollmeyer JE, : Calpain II involvement in mitosis, Science, 240, 911-913, 1988.
  - 22) Saido TC, Suzuki H, Yamazaki H, *et al.*, : *In situ* capture of  $\mu$ -calpain activation in platelets, J. Biol. Chem., 268, 7422-7426, 1993.

# 新しい皮膚成分の分析手法としてのコレステロールセンサの開発

大阪府立大学 先端科学イノベーションセンター

椎 木 弘

Control of the skin cholesterol level plays an important role for preventing the life-style related diseases and goes a long way in skin health. However, the conventional method is troublesome due to its sensitivity and the necessity of using the enzyme reaction through many procedures. Therefore, we focus on the simple electrochemical measurement of cholesterol using the molecularly imprinted self-assembled monolayer (SAM). A detection of the electroinactive cholesterol has been achieved by electrochemical method with a potassium ferrocyanide as a redox marker. The change of the oxidation peak current ( $I$ ) has shown a linear relationship with the concentration of cholesterol. The change of  $I$  related to the cavity concentration for the mass-transport of redox marker on the molecularly imprinted SAM. When the cholesterol-sensitive SAM recognizes cholesterol, the  $I$  decreases due to the rejection of diffusion of the marker to the gold electrode surface. On contrary, when the SAM extracts cholesterol, the marker diffuses to the electrode surface, and the  $I$  increases. The sensing properties of molecularly imprinted SAM, such as sensitivity, selectivity, and reproducibility, have been examined and it has been applied for simple and speedy electrochemical sensor development.

## 1. 緒 言

コレステロールは皮膚の保湿、老化防止に関する重要な成分として、また、細胞膜や細胞内の物質の移動を防ぐ生体膜を構成する成分としても知られており、さらに胆汁酸、各種ホルモンの原料になるなど様々な役割を担っているなど、身体を維持していくために不可欠な化合物であるが、過剰摂取は動脈硬化や狭心症の危険因子である高脂血症の発症に深く関わると言われている<sup>1-4)</sup>。食文化の相違から、高コレステロール血症を含む高脂血症は欧米人に多く見られ、東洋人、とりわけ日本人には軽視されがちであったが、その人口は日本国内においても年々増大し、平成2年には700万人であった患者は平成12年では2000万人を超えるまでに増大している。さらに、他の生活習慣病や疾患・疾病などとの合併症のリスクから計測による管理の必要性が増しており、コレステロール濃度の適正レベルの維持はゆとりある日常生活を送るための必要条件となっている。したがって、簡易なコレステロール計測法および機器の開発は、医療従事者だけでなく、家庭での健康の自己管理を望む多くの人々に切望されている。しかしながら、医療機関で行われる計測の全てが酵素法によるもので、採血（侵襲）を伴うため自宅での簡単な検査は困難である。

近年、米国FDAは皮膚コレステロールが体内コレス

テロール全体の約11%を占めていることを報告し、加国International Medical Innovations社と米国クリーブランドクリニックの研究グループはコレステロール検査法*Cholesterol I, 2, 3™*を開発した<sup>5)</sup>。この方法は検査パッドを手のひらに貼り付け、酵素反応による色の変化で皮膚のコレステロール量を判断できるというもので非侵襲的な検査が可能である。しかしながら、低感度なために定量的な計測は困難で、一般母集団を対象としたCADのリスクを判定するスクリーニングテストとしては不適応であるとされており、標準的な血液検査に取って代わる検査法ではない。実際に皮膚と血中のコレステロールに相関が在るか否かという問題はいくつかの報告<sup>5-7)</sup>に結論を委ねるが、コレステロールを非侵襲的に計測するひとつの新しい試みとして、また、皮膚の健康状態を客観的に調べる一つの指標として、分子鑄型<sup>8, 9)</sup>を刷り込んだ自己集合単分子膜を利用した測定法の開発を行い、皮膚コレステロールの定量を行った。

## 2. 実 験

### 2.1 電極の作製と測定

作用極（センサ部）に金電極（直径1mm）、対極に白金線および参照極としてAg/AgCl [基準参照極Ag/AgClの標準水素電極（SHE）との電位差は25℃で+0.199V]を使用した。以下、全ての電気化学計測により得られた値はAg/AgClに対するもので、その表記はvs. Ag/AgClとする。金電極の表面を研磨および超音波洗浄した後、0.1M硫酸水溶液中で-0.2～+1.5V (vs. Ag/AgCl)、掃引速度100mV/sで電位サイクルして洗浄した。この電極を20mMコレステロールと100μMステアリルメルカプタ



Development of novel analytical method for skin cholesterol

Hiroshi Shiigi

Frontier Science Innovation Center,  
Osaka Prefecture University

ンを含む修飾エタノール溶液 50mL に 30min 浸けて金電極上に自己集合単分子膜 (self-assembled monolayer 以下 SAM と略) を形成した。SAM 電極をエタノール中に浸し 3 時間攪拌することで、鑄型分子であるコレステロールを洗い流して分子鑄型電極とした。SAM はチオール分子の -SH 部位が金に吸着することを利用したもので、下式 [1] のような反応により形成されることが知られている<sup>10)</sup>。



アルキルチオールを用いた場合、金電極上に吸着した隣り合うチオール分子のアルキル基がファンデルワールス力によって引き合うことで高密度にパッキングされる<sup>11-13)</sup>。本研究ではチオール分子として長鎖アルキル基を有するステアリルメルカプタン ( $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{SH}$ ) を使用し、コレステロールとの混合溶液に金電極を浸漬することで、金電極上に SAM を形成した。エタノール中で SAM 修飾電極を洗浄すると、コレステロールだけが洗い流され、コレステロール分子の鑄型を有する SAM 膜が形成される。これを分子鑄型電極としてコレステロールの計測を行った。コレステロールは非常に高い酸化電位を持つため、その電気化学検出は広い電位窓を有するダイヤモンド電極を用いるなどの必要がある<sup>14)</sup>。したがって、通常の電気化学系では電気化学的に不活性な物質として取り扱われている。そこで、本法では酸化還元活性化学種 ( $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ) をマーカーとして用い、コレステロールの認識に伴う酸化電流の変化を読み取ることで間接的にコレステロールの定量を行った<sup>15)</sup>。分子鑄型によるコレステロールの認識は以下により説明できる (図 1)。SAM 上に構築された分子鑄型が空の場合 (a)、マーカーは金電極表面に拡散し、酸化電流を生じる。一方、

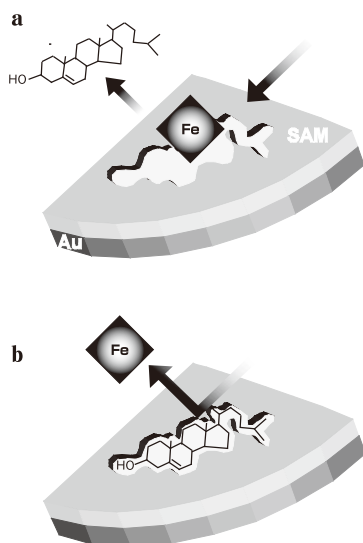


図 1 分子鑄型 SAM 電極のコレステロール認識機構の概念図、吐き出し (a) と取り込み (b)。

分子鑄型がコレステロールを認識するとマーカーは電極表面に接近することができないため (b)、その濃度に依存して酸化電流は減少する。

分子鑄型電極によるコレステロールの計測 (マーカーの酸化電流測定) は、5mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  を含む 50mM 過塩素酸カリウム電解液中、サイクリックボルタンメトリー (CV) により行った。このとき、修飾電極からコレステロールを溶出させることで増加した酸化電流値を  $I_0$ 、鑄型電極がコレステロールを取り込んだ後の電流値を  $I_r$  と表すと、コレステロール認識による酸化電流変化は  $I_0 - I_r$  から求めることが可能で、これを  $\Delta I$  と定義する。

## 2.2 血中コレステロールの定量

血中の総コレステロール値は総合病院の臨床検査部により、採血と測定を行った後に得られた。採血は食後 2～3 時間 (15 時～15 時半) に行った。4 人の被験者に対しては、informed consent 後にすべての実験を行った。

## 2.3 皮膚コレステロールの抽出

皮膚コレステロールの計測を行うために、プラスチックカップ (内径 25mm、容量 8mL) にエタノールを 1.0mL 入れ、せっけんで手洗して 30 分後、手のひらにカップを接触 (60s) させコレステロールを抽出した。食後 2～3 時間に行った採血の一時間後 (16～16 時半) に、皮膚コレステロールの抽出操作を行った。

## 2.4 従来法による皮膚コレステロールの定量

酵素法では総コレステロール測定キット (コレステロール E-テストワコー, 和光純薬工業) を使用した。反応溶液に抽出液 20μL を加えて攪拌し、37℃ で 5 分間静置した後に 600nm の吸光度を測定した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量には LC-10A システム (島津製作所) または 1100 Series (Agilent 社) を使用した。カラムには Luna 5u C18 (Phenomenex 社、150 mm × 4.6 mm) を用い、カラム温度、流速、検出波長はそれぞれ 40℃、1.2mL/min、212nm で行った。また、溶離液としてアセトニトリル / 2-プロパノールの混合溶液 (1 : 1) を使用した。

## 3. 結果

### 3.1 電気化学応答

電気化学的に洗浄した後、裸の金電極では典型的なマーカーの CV 曲線が得られた (図 2a)。しかし、SAM 電極では酸化還元電流はほとんど見られない (b)。これは、電気化学的に不活性なステアリルメルカプタンとコレステロールにより、電極上に絶縁膜が形成されたため、電極表面

にマーカーが接近できなくなったものと考えられる。分子鑄型電極ではマーカーの酸化還元電流が曲線 a より小さい値であるが再び現れた (c)。これは SAM 中のコレステロール分子が溶出した際、マーカーの拡散が可能な分子の形の孔 (分子鑄型) が形成されたことを意味する。分子鑄型電極における酸化還元電流はコレステロール溶液に浸漬した後に再び減少した (d)。このとき、酸化電流は浸漬時間に依存して減少したが、約 30s 以上では変化は見られず、ほぼ一定になった。分子鑄型法は酵素反応とは異なり、分子鑄型を構成するステアリルメルカプタンが目的分子 (コレステロール) と特異的に反応する部位を持たないが、両分子に大きな疎水基が存在する。このため、溶液中のコレステロール分子は疎水-疎水相互作用により電極近傍に濃

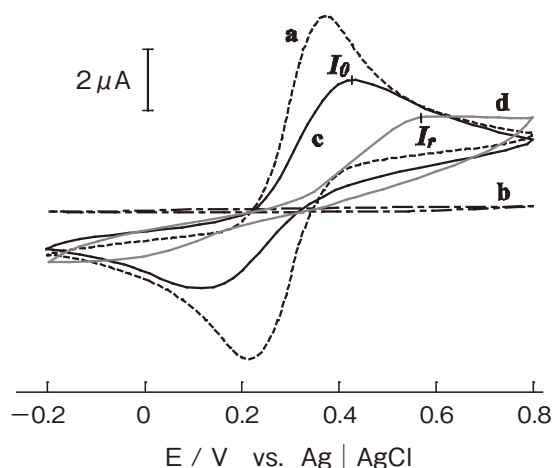


図2 サイクリックボルタンモグラム, 裸の金 (a), SAM 修飾電極 (b), 分子鑄型 SAM 電極 (c) と 3mM コレステロール溶液に浸漬後 (d). 5mM  $K_4Fe(CN)_6$  を酸化還元マーカー, 50mM  $KClO_4$  をバックグラウンド電解質として含む溶液中.  $I_0$ : マーカーの酸化電流値,  $I_r$ : コレステロールを認識した後の酸化電流値. 電流応答 ( $\Delta I$ ) は次式により算出される.  $\Delta I = I_0 - I_r$ . (Shiigi et al.)

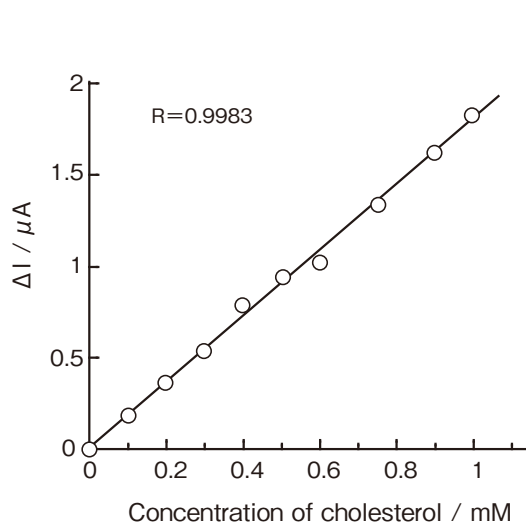


図3  $\Delta I$  のコレステロール濃度依存性. (Shiigi et al.)

縮され、分子鑄型に取り込まれると考えられる。このようなコレステロールの認識過程が 30s で達成されるものと推測される。つまり、分子鑄型のコレステロールへの応答時間として取り扱うことが出来る。以下、コレステロール溶液への電極の浸漬時間を 30s とした。鑄型電極のコレステロールの認識に伴う  $\Delta I$  と濃度との関係を図 3 に示す。0 ~ 1.0mM の濃度領域において直線的な変化が観察された (相関係数 0.9983)。1.0mM 以上では  $\Delta I$  はなだらかに増加し、約 3mM で飽和に達した。標準的な酵素法による測定の場合、求められた 600nm の吸光度をコレステロールの濃度に対してプロットすると (図 4)、2.0 ~ 10mM ( $70 \sim 400 \text{ mg dL}^{-1}$  に相当し、酵素法の実用測定領域) での相関係数は 0.9995 (inset) であるが、1.0mM 以下では 0.8980 にまで低下する。したがって、1.0mM 以下の低濃度領域 (0.1 ~ 1.0mM) での定量は分子鑄型法 (精度 5 % 以内、感度  $1.67 \mu\text{A}/\text{mM}$ ) が適すると考えられる。

### 3.2 分子鑄型の選択性

皮膚に存在する物質のほか、コレステロールと類似した構造を有する化合物について測定を行った。各物質の分子体積、相対感度 (コレステロール ( $\Delta I$ ) を 1 とした時の相対値) を表 1 に示した。ステロイド骨格を持ち、コレステロールと似た構造を持つ胆汁酸では、分子体積の最も小さいデヒドロコール酸の相対感度は 0.52、最も大きなタウロコール酸においては 0.24 となり、分子体積の増加に伴って相対感度は減少した。デヒドロコール酸、デオキシコール酸、コール酸は、コレステロールよりも小さい分子であるが、カルボニル基 (親水基) を持つため疎水雰囲気 of 鑄型に取り込まれにくいものと考えられる。しかしながら、これらの胆汁酸は 0.52 ~ 0.24 とコレステロールの認識に

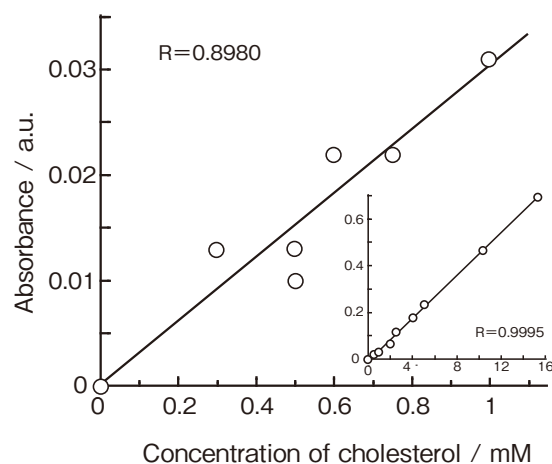


図4 酵素反応溶液の 600nm での吸収ピーク強度のコレステロール濃度依存性. 挿入図は 16mM までの広い範囲での濃度依存性. (Shiigi et al.)

において無視できない相対感度を示す。また、コレステロールエステルでは体積の最も小さなコレステロールアセートで 0.49、最も大きなリノール酸コレステロールにおいては 0.37 となり、分子体積が増加するにつれて相対感度に減少が見られた。エステル型は胆汁酸と比べ、疎水性の強い化合物であるが、3 位の置換基 (R-) の存在により分子体積がコレステロール (HO-) より大きくなり、鑄型に取り込まれにくいものと考えられる。このような選択特性の相違から、分子鑄型がコレステロールとのわずかな構造の違い (R= CH<sub>3</sub>OCO-, C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>OCO-, C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>OCO-) を認識していることが示唆された。また、コレステロールは光や熱によって酸化されるため、皮膚コレステロールは酸化コレステロールとして存在する場合がある。それらに対する相対感度はケトコレステロールで 0.97、コレステロールエポキシドで 0.88 であり、コレステロールと同程度の選択特性を示した。一方、コレステロールの前駆体、皮膚に多く存在する物質として知られるスクワレン<sup>16)</sup> はステロイド骨格の環が開いた構造をしており、疎水性が強くコレステロールと類似しているが相対感度は 0.39 と比較的小さい。皮膚に広く分布しているトリオレインやオレイン酸などの脂肪酸については 0.20 以下の低い値を示した。

### 3.3 皮膚コレステロールの測定

皮膚からのコレステロール抽出液を用いて、酵素法、HPLC 法と分子鑄型法のそれぞれの方法によりコレステロールの定量を行った。抽出液中のコレステロール濃度は抽出時間に依存したが 60s 以上では変化が見られないことから、抽出時間は 60s とした。酵素法および HPLC 法では抽出液そのままでは吸光計の感度が得られないため、加熱・減圧により 5 倍に濃縮した。それぞれの方法から得られた値は等しいものとなった。以上のことから、分子鑄型法は酵素法や HPLC 法と比較して同等の認識能を持つだけでなく、5 倍以上の感度を有するため、皮膚コレステロールの計測に適していることがわかった。また、コレステロールの非侵襲計測の観点から、血中の総コレステロール値と分子鑄型法により得られた皮膚コレステロールの値を比較した。4 人の被験者はいずれも 20 代男性 (22 ~ 29 歳) で、血中総コレステロール濃度が最も高い被験者 (220mg/dL) では皮膚コレステロールは 0.37mM、血中濃度が低い人 (159mg/dL) では 0.17mM となり、血中総コレステロールと皮膚コレステロールの間に相関が見られた (相関係数 0.9886)。同一抽出液を加熱・減圧により 5 倍に濃縮した後、酵素法および HPLC 法により計測した結果と良く一致した。

Table 1 Selectivity of molecularly imprinted SAM electrode.

| Substance <sup>a</sup>     | Molecular volume <sup>b</sup> /<br>Å <sup>3</sup> | Selectivity <sup>c</sup> |
|----------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------|
| <b>cholesterol</b>         | 292.2                                             | 1.00                     |
| <b>bile acid</b>           |                                                   |                          |
| cholate                    | 286.5                                             | 0.44                     |
| dehydrocholate             | 276.2                                             | 0.52                     |
| deoxycholate               | 279.6                                             | 0.50                     |
| taurocholate               | 345.0                                             | 0.24                     |
| <b>cholesterol ester</b>   |                                                   |                          |
| cholesterol acetate        | 318.5                                             | 0.49                     |
| cholesterol n-caprylate    | 390.9                                             | 0.45                     |
| cholesterol linoleate      | 504.7                                             | 0.37                     |
| <b>cholesterol oxide</b>   |                                                   |                          |
| 7-keto cholesterol         | 295.9                                             | 0.97                     |
| cholesterol 5α, 6α-epoxide | 298.5                                             | 0.88                     |
| <b>hydrophobe</b>          |                                                   |                          |
| squalene                   | 310.8                                             | 0.39                     |
| anthracene                 | 119.4                                             | 0.32                     |
| triolein                   | 614.9                                             | 0.19                     |
| oleic acid                 | 203.0                                             | 0.14                     |
| toluene                    | 65.9                                              | 0.08                     |
| L-phenylalanine            | 105.0                                             | 0.03                     |

<sup>a</sup>The concentration of respective ethanolic solutions were 0.5mM. <sup>b</sup>The molecular volume was evaluated with Fujitsu WinMOPAC software (ver. 2.0) using the PM3 approximation, along with FREE WHEEL ver. 0.57T (BUTCH SOFTWARE). <sup>c</sup>Relative selectivity was derived from dividing respective DI and DI for cholesterol.

エタノールで抽出した後に、同一箇所から再び抽出した場合、4時間の間隔を保つことで皮膚コレステロール値に回復が見られた。室内外における大気環境の変化が皮膚に与える影響を考えると、コレステロールは少なくとも4時間で分泌され、保湿の役割を果たすと考えられる。さらに、抽出操作における溶媒の与える影響としてメタノール、ヘキサン、プロパノール、アセトニトリルなどを用いて実験を行った。各条件はエタノールの場合と同じで、溶媒の化学的性質、皮膚に与える影響を調べた。アセトニトリル、ヘキサンでは、コレステロールの抽出量に関して増加の傾向にあったが、いわゆる手荒れが認められ、2～3日間元に戻ることは無かった。メタノール、プロパノールの場合、手荒れは見られなかったが、コレステロール抽出量は減少した。

#### 4. 考 察

実際の計測を考えると、総コレステロールの正常値に個人差はあるが通常130～230 mg/dLと言われており、3.4～5.9mMに相当する。皮膚に存在するコレステロールは0.37～0.65mMであり、従来法による定量は抽出液の濃縮工程を要したが、我々が開発した分子鑄型法では1.0mM以下の濃度領域においても十分な感度(1.67 $\mu$ A/mM)が得られ、皮膚コレステロールの定量が可能になった。さらに、血中濃度との良好な相関が得られたことから、総コレステロール値の測定の可能性も示唆された。しかしながら、妨害が予測される角層、皮脂、表皮、真皮などに存在する種々の物質に対しては、十分な選択性が得られたものと、今後、抽出法や前処理などによる解決法が必要な物質が存在した。例えば胆汁酸は、分子鑄型の選択特性に大きな影響を与える値を示したが、生体中では腸で再吸収されて肝臓に戻るといった閉鎖的な循環を行っており、その低い血中濃度(1～8 $\mu$ M)のために皮膚での存在は計測に関してほとんど影響しない濃度であることが予測される。また、スクワレンや脂肪酸などの疎水性が強い物質の、同じく疎水性の強い分子鑄型膜への非特異吸着が、コレステロール計測に与える影響はほとんど見られなかった。エステル型では、分子鑄型がコレステロールとのわずかな構造の違いを認識していることが示唆されたが、選択特性に与える影響は大きく、今後の検討課題である。

#### 5. 総 括

本研究により開発した分子鑄型によるコレステロール計測法は従来の酵素法よりも工程が少なく、取り扱いが容易であることに加え、低濃度領域(<1.0mM)の測定が可

能であることから、皮膚コレステロールの測定に適していることがわかった。しかしながら、皮膚に存在する汚れや皮脂などさまざまな妨害物質の存在のため、更なるセンシング特性の向上や皮膚からの抽出法の最適化の必要がある。実際には個人差や生活習慣だけでなく、抽出法により大きく左右されるため、本方法を多くの被験者に対して実施し、臨床データを取得することが必要である。

#### (参考文献)

- 1) 山中 學, 村地 孝, 林 康之, 臨床検査 MOOK, No.4, 血清脂質, 金原出版, 1 (1980).
- 2) 岡 芳知, 倉林正彦, 福内靖男, 山田信博, Molecular Medicine, **38**, 92, 生活習慣病 分子メカニズムと治療, 中山書店 (2002).
- 3) P. M Ridker, J. Genest, P. Libby, Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, 6<sup>th</sup> ed., W. B. Saunders, 1010 Philadelphia (2001).
- 4) H. Bouissou, J. De Graeve, C. Legendre, M. L. Solera, E. Wulfert, J. C. Thiers, Biomed Pharmacother, **36**, 159 (1982).
- 5) R. Zawdziwski, D. L. Sprecher, M. J. Eveleigh, P. Orsewood, C. Carte, M. Patterson, Clin. Chem., **7**, 1302 (2001).
- 6) J. Mancini, S. Chan, J. Frohlich, L. Kuramoto, M. Schulzer, D. Abbott, Am. J. Cardiol., **89**, 1313 (2002).
- 7) L. Edouard, F. Doucet, J. C. Buxtorf, J. L. Beaumont, Clin. Physiol. Biochem., **3**, 323 (1985).
- 8) H. Shiigi, K. Okamura, D. Kijima, A. Hironaka, B. Deore, U. Sree, T. Nagaoka, Electrochemical and Solid-State Letters, **6**, H1 (2003).
- 9) H. Okuno, T. Kitano, H. Yakabe, B. Deore, H. Shiigi, T. Nagaoka, Anal. Chem., **74**, 4184 (2002).
- 10) 桑畑 進, Electrochemistry, **67**, 90(1999).
- 11) P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, D. L. Allara, Yu.-T. Tao, A. N. Parikh, R. G. Nuzzo, J. Am. Chem. Soc., **113**, 7152 (1991).
- 12) M. C. Porter, T. B. Bright, D. L. Allara, C. E. D. Chidsey, J. Am. Chem. Soc., **109**, 3559 (1987).
- 13) 原 正彦, 表面科学, **21**, 724 (2000).
- 14) A. Kotani, F. Kusu, Arch. Dermatol. Res., **294**, 172 (2002).
- 15) S. A. Piletsky, E. V. Piletskaya, T. A. Sergeyeva, T. L. Panasyuk, A. V. El' skaya, Sensors and Actuators B, **60**, 216 (1999).
- 16) 見城 勝, 大倉さゆり, 任田美穂, 金子智佳子, 太田尚子, J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn., **34**, 365 (2000).

# 大豆ビクニンを用いた日焼け止めクリームの開発

奈良県立医科大学産婦人科

小林 浩

Background: Cytokines are produced as a consequence of photo-damaged DNA and oxidative stress in ultraviolet (UV)-exposed keratinocytes. A soybean Kunitz trypsin inhibitor (KTI) down-regulates the expression of proinflammatory cytokines such as TNF-alpha in tumor cells and inflammatory cells.

Purpose: We analyze the effect of KTI on TNF-alpha production in UV-exposed primary human keratinocytes.

Results: Here, we show 1) UV induced up-regulation of TNF-alpha mRNA and protein expression in keratinocytes; 2) cells treated with KTI before UV irradiation showed a significantly lower accumulation of TNF-alpha protein in a dose-dependent manner and reduces UV-induced up-regulation of TNF-alpha mRNA expression; 3) KTI inhibits the induction of TNF-alpha target molecules interleukin-1beta (IL-1beta) and IL-6 proteins; 4) UV irradiation transiently activates JNK and Akt signaling but only weakly activates ERK and p38; 5) KTI specifically inhibits UV-induced activation of ERK, JNK and p38, but not Akt; 6) treatment of cells with SP600125, a pharmacological inhibitor of JNK, predominantly suppresses UV-induced up-regulation of TNF-alpha expression; 6) KTI does not enhance suppression of UV-induced JNK phosphorylation by SP600125.

Conclusions: KTI specifically inhibits UV-induced up-regulation of cytokine expression predominantly through suppression of JNK signaling pathway.

## 緒言

紫外線照射による発赤や皮膚の炎症は身近に経験するが、抗ヒスタミン剤やステロイド等により治療されることが多い。しかし、ステロイドによる反応性皮膚障害の報告もあり、多用・長期使用することは困難である。

最近、我々は、大豆蛋白中に炎症を抑制する成分があることを発見し、精製した結果、この物質は Kunitz trypsin inhibitor (KTI) と呼ばれている分子量 20kDa の蛋白質であった。Kunitz inhibitor は大豆のみならず、羊水・尿にも存在し、国際的にはビクニンと命名されている。ヒトのビクニンの分子量は 40kDa である。ビクニン及び KTI には抗炎症作用があることが報告されている。その作用機序は TNF-alpha や IL-1beta 等のサイトカイン産生抑制である。

紫外線照射によって DNA が損傷したり、酸化ストレスが起こった結果皮膚からサイトカインが産生されるので、もし、紫外線照射による皮膚の炎症をビクニンや KTI が抑制することができるのであれば、日焼け止めクリームとして利用可能であると考えた。

そこで、今回、皮膚の keratinocytes の初代培養系を使用し、KTI が紫外線照射に伴うサイトカイン産生抑制を

おこなうかどうか実験した。

## 実験

### 1) 培養細胞

ヒト keratinocytes の初代培養は手術時に採取した組織より調整した<sup>1)</sup>。培養液は MCDB153 を使い、3-5 代目の培養細胞を今回の実験に用いた。

### 2) 紫外線照射

培養液を除去後に UV 0-800J/m<sup>2</sup> のエネルギーで培養細胞に照射した。Westinghouse broad-band sunlamp を使用して培養皿の後面から照射した。290nm の UVC を除去する為に Kodacel TA 401/407 を使用した。細胞に直接照射されたエネルギーは UVB60 - 70%、UVA30 - 40% の構成であった。照射エネルギーのモニタリングは常に UV-340 photometer/photodetector system により監視した。

培養細胞には照射前に KTI や pharmacological inhibitor を添加しておいてから 1 時間後に紫外線照射した。

培養細胞に紫外線照射したときの TNF-alpha 産生に対する KTI の抑制効果をみるために、KTI の濃度を 0.1, 1, 5, 10 microM に設定して事前に添加した。その 2 時間後に紫外線照射を行ない、TNF-alpha 濃度を測定した。この KTI の抑制がどのようなシグナル伝達に関与しているかを見るために、MEK, JNK, p38, EGFR に対するインヒビターを 0.5-1 時間前に投与することにより比較検討した。

培養液を採取し、サイトカイン測定まで凍結保存した。TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 はそれぞれの特異的 ELISA に



Inhibition of ultraviolet-induced sunburn by a soybean Kunitz trypsin inhibitor

Hiroshi Kobayashi

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Nara Medical University

て測定した。実験の一部では、KTIを照射前、照射中、照射後に添加して、その効果を確認した。

細胞障害性はMTTアッセイと培養液中のLDH測定、ならびにトリパンブルー法により評価した。また、アポトーシスはHoechst 33342の取り込みにより蛍光顕微鏡で評価した。Western blotやRT-PCRは既報のごとくである。

## 結果

### 1) 紫外線照射後における細胞内シグナル伝達

図1は紫外線照射後、5, 15, 30, 60分後におけるMAPキナーゼとAktのリン酸化と総蛋白量との関係をWestern blotにより示したものである。この実験では400J/m<sup>2</sup>のエネルギーを照射した場合の結果を示す。紫外線により最も活性化されるのは、JNKとAktであり、いずれも15分後にピークを認めた。ERKとp38のリン酸化は非常に僅かではあるが、これらも活性化されていた。紫外線照射は200–400J/m<sup>2</sup>のエネルギーでリン酸化が最大を示した。

### 2) 紫外線依存性のAktのリン酸化はEGFRとPI3Kを介している

図2は紫外線によるAktのリン酸化はEGFRとPI3Kを介していることを示したものである。400J/m<sup>2</sup>のエネルギー照射によるAktのリン酸化はAG1478 (EGFR inhibitor)とLY294002 (PI3K inhibitor) およびWortmannin (PI3K inhibitor)により抑制されたが、SP600125 (JNK inhibitor)の影響を受けなかった。

### 3) KTIはMAPキナーゼのリン酸化は抑制するが、Aktのリン酸化は抑制しなかった

図3には紫外線400J/m<sup>2</sup>で刺激する前に、KTI, LY294002, SP600125を事前投与することにより、JNKとAktのリン酸化を検討した結果を示したものである。KTIは紫外線400J/m<sup>2</sup>によるJNKのリン酸化は抑制するが、Aktのリン酸化は抑制しなかった。コントロール実験ではJNKのリン酸化はSP600125により抑制されるが、LY294002では無効であった。KTIとSP600125の同時添加によってもSP600125の効果を促進することはなかった。

### 4) KTIは紫外線照射によるkeratinocytesからのTNF-alpha産生を濃度依存性に抑制する

図4aに示したように紫外線照射によるTNF-alpha産生はSP600125事前添加により著明に減少した。一方、図4bに示したように紫外線照射によるTNF-alpha産生はKTI事前添加により濃度依存性に減少した。50%抑制はKTI約5 microMであった。これはJNKのリン酸化抑制する濃度と類似していた。

### 5) KTIは紫外線照射によるkeratinocytesからのTNF-alpha mRNA産生を抑制する

図5に示したように紫外線照射によるTNF-alpha mRNA産生はSP600125事前添加により著明に減少した。一方、紫外線照射によるTNF-alpha mRNA産生はSP600125あるいはKTI事前添加により減少した。このデータはTNF-alpha蛋白産生と一致した。

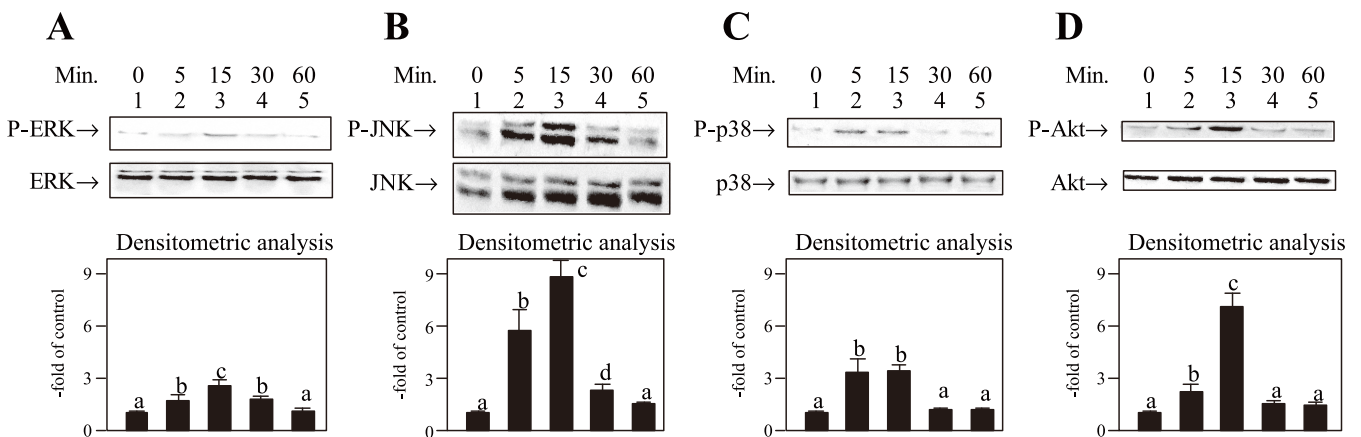


図1 Keratinocytesを培養し400 J/m<sup>2</sup> UV照射後のERK, JNK, p38, Aktの経時的なリン酸化の状態をWestern blotで示す。AはERKのリン酸化、BはJNKのリン酸化、Cはp38のリン酸化、DはAktのリン酸化を示す。上段はリン酸化蛋白で、下段は総蛋白を示す。a, b, c, dのラベルは5%の有意差があることを示す。

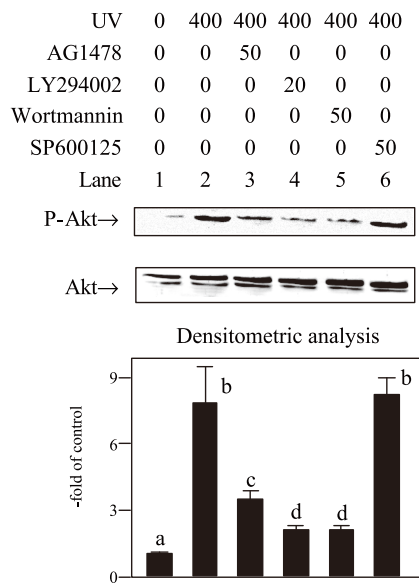


図2 Keratinocytes を培養し 400J/m<sup>2</sup> UV 照射後の Akt のリン酸化の状態を Western blot で示す。それぞれのレーンには AG1478, LY294002, Wortmannin, SP600125 を前添加してある。上段はリン酸化蛋白で、下段は総蛋白を示す。a, b, c, d のラベルは 5 % の有意差があることを示す。

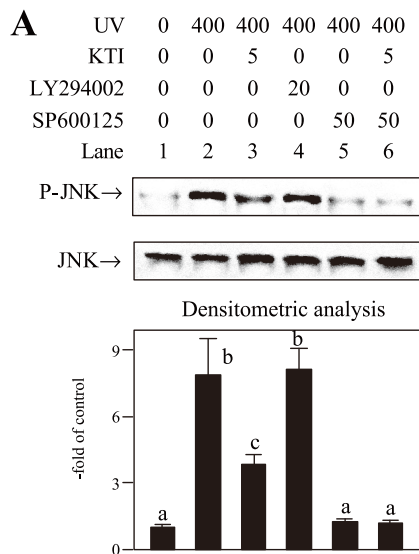


図3 Keratinocytes を培養し 400J/m<sup>2</sup> UV 照射後の JNK (A) 及び Akt (B) のリン酸化の状態を Western blot で示す。それぞれのレーンには KTI, LY294002, SP600125 を前添加してある。上段はリン酸化蛋白で、下段は総蛋白を示す。a, b, c のラベルは 5 % の有意差があることを示す。

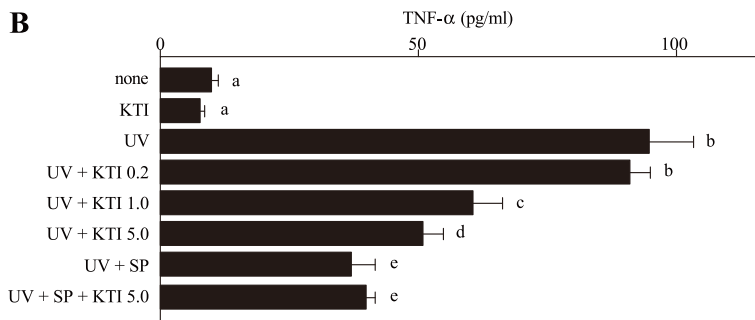
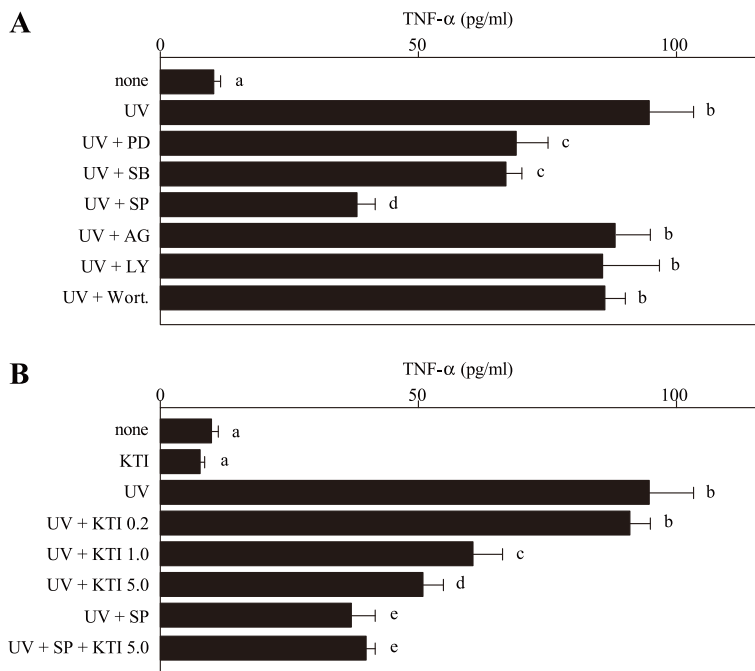
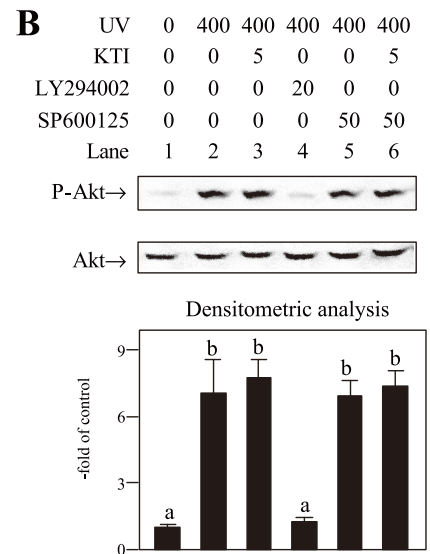


図4 Keratinocytes を培養し 400J/m<sup>2</sup> UV 照射後の培養液中の TNF-alpha の濃度を ELISA で測定した結果を示す。それぞれのレーンには各種インヒビターを前添加してある。a, b, c, d, e のラベルは 5 % の有意差があることを示す。

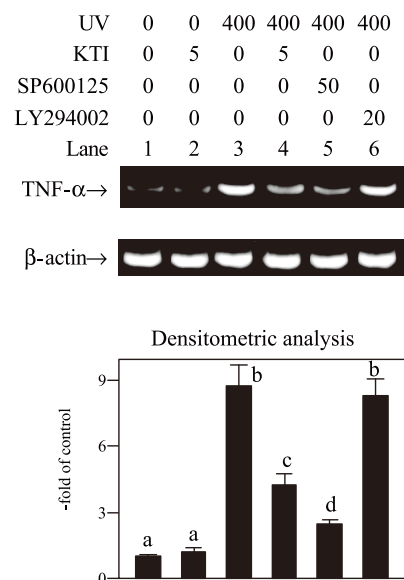


図5 Keratinocytes を培養し 400J/m<sup>2</sup> UV 照射後の培養細胞中の TNF-alpha の mRNA を示す。それぞれのレーンには各種インヒビターを前添加してある。下段はコントロールとしての beta-actin を示す。a, b, c, d のラベルは 5 % の有意差があることを示す。

## 6) KTI は紫外線照射による keratinocytes からの IL-1beta および IL-6 産生を抑制する

TNF-alpha のターゲットサイトカインである IL-1beta および IL-6 産生についても検討した。予想されたとおり、KTI により IL-1beta および IL-6 産生も抑制された (図 6)。

### 考案

我々はヒト羊水・尿中より抗炎症作用を有する糖蛋白質としてビクニン (bikunin, urinary trypsin inhibitor [UTI]) を発見し、①切迫早産治療薬、および、②癌転移抑制薬として開発してきた。切迫早産治療薬はすでにウリナスタチン膈座薬として臨床で使用されている。また、癌転移抑制薬としては現在、特許申請も終了した段階である。我々はクニッツ型構造に着目し、類似構造を有する物質を探索してきた。その結果、大豆蛋白中に存在するクニッツ型構造である KTI が、ビクニン同様に、抗炎症作用を有していることが判明した<sup>2, 3)</sup>。

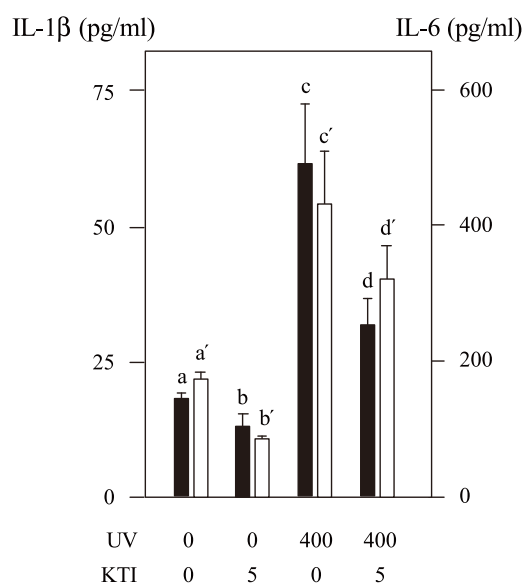


図 6 Keratinocytes を培養し 400J/m<sup>2</sup> UV 照射後の培養液中の IL-1beta と IL-6 の濃度を ELISA で測定した結果を示す。それぞれのレーンには各種インヒビターを前添加してある。a, b, c, d および a', b', c', d' のラベルは 5% の有意差があることを示す。

今回、ヒト keratinocytes の初代培養を利用して、KTI の持つ抗炎症作用として紫外線照射によるサイトカイン産生抑制が可能であるかどうかを検討した。その結果、KTI の濃度依存性に紫外線照射による TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 産生が mRNA レベルで産生抑制されており、日焼け止めクリームとしての効果を有しているものと推定された。50%抑制濃度は 5 microM であり、十分臨床応用可能な濃度である。この KTI は主に細胞内シグナル伝達の JNK を介する系を制御することにより得られた結果であった。

今後は実際にヒトの皮膚で紫外線照射前に KTI 入りクリームを塗布することにより、日焼けや炎症反応がどの程度抑制されるのかを検討する必要がある。

今回の実験にかかった経費は全て「コスメトロジー研究振興財団」から頂いたものであることを報告する。

### 総括

現在の日焼け止めクリームはあくまで対症療法が主体であったが、大豆やヒト尿から精製した蛋白は抗ヒスタミン剤やステロイド剤とは異なり、全く副作用がなく、紫外線照射によるサイトカイン産生を抑制することを始めて確認できた。今後は、臨床研究を通して市場への拡大を計っていきたいと考えている。

### (文献)

- 1) Fisher G, Tavakkol A, Leach K, et al. Differential expression of protein kinase C isoenzymes in normal and psoriatic adult human skin: reduced expression of protein kinase C-beta II in psoriasis. *J Invest Dermatol* 1993; 101, 553-559.
- 2) Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. A soybean Kunitz trypsin inhibitor suppresses ovarian cancer cell invasion by blocking urokinase upregulation. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21: 159-166.
- 3) Kobayashi H, Yoshida R, Kanada Y, Fukuda Y, Yagyu T, Inagaki K, Kondo T, Kurita N, Suzuki M, Kanayama N, and Terao T. Dietary Supplementation of Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor (KTI) Reduces Lipopolysaccharide-induced Lethality in Mouse Model. *Shock* 2005, 23: 441-447.

# タイ産マンゴスチーン果実抽出物の 多機能性化粧品への応用研究

東北大学大学院薬学研究科分子生物薬学

大 泉 康

The fruit hull of mangosteen, *Garcinia mangostana*, has been used for many years as traditional medicine for treatment of skin infection, wounds, and diarrhea in Thai. However, its mechanism of action as a medicine has not been elucidated. In the present study, we examined the effects of mangosteen extracts (100% ethanol, 70% ethanol, 40% ethanol and water) on prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> synthesis and histamine release. All extracts of mangosteen potently inhibited A23187-induced PGE<sub>2</sub> synthesis in C6 glioma cells. Also it was found that the 40% ethanol extract of mangosteen appreciably reduced IgE-mediated histamine release from RBL-2H3 cells. Furthermore  $\gamma$ -mangostin, one of main constituents in the fruit hull of this plant, inhibited COX-2 gene transcription by preventing the IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B system in C6 rat glioma cells. These results suggest that the 40% ethanol extract of mangosteen has potent inhibitory activities of both PGE<sub>2</sub> synthesis and histamine release. It is also suggested that  $\gamma$ -mangostin serves as an anti-inflammatory agent.

## 1. 緒言

タイやインドネシア等の東南アジアで広く栽培されているマンゴスチーンは、古くから抗炎症作用や抗アレルギー作用を示す民間薬として使用されてきた (Harborne and Baxter, 1993; Chairungsrilerd *et al.*, 1996)。このように長年使用され、強い治療効果を示すにもかかわらず、これまでその科学的根拠について、殆ど検討されていなかった。本研究では、炎症やアレルギー反応の重要なケミカルメデエ이터であるプロスタグランジンおよびヒスタミンに着目し、マンゴスチーン果実 (果皮) 抽出物のプロスタグランジン生合成・遊離阻害活性およびヒスタミン遊離阻害活性の検討、さらにシクロオキシゲナーゼ (COX) の発現に対するマンゴスチーン果皮の主成分の一つである  $\gamma$ -mangostin の抗炎症作用の機構について解明研究を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 マンゴスチーン果実抽出物の調製および $\gamma$ -mangostin の単離精製

乾燥させたマンゴスチーン果皮 1 kg に対し、water、40% ethanol、70% ethanol 若しくは 100% ethanol、各々 10 l で抽出を行った。抽出 1 時間後、各溶出溶媒を濃縮させて、各溶媒の抽出物とした。 $\gamma$ -mangostin の単離精製



Approach for application of extracts of the fruit hull of mangosteen, *Garcinia mangostana*, to development of multifunctional cosmetics

Yasushi Ohizumi

Department of Pharmaceutical Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

は既報の方法に従った (Nakatani *et al.*, 2004)。

### 2.2 動物

Wistar 系雄性ラット (7 ~ 8 週令, 180 ~ 200g, specific pathogen-free, Charles River Japan, Kanagawa, Japan) を使用した。なお、動物実験は、東北大学大学院薬学研究科動物実験委員会の「実験動物取り扱いに関する指針」に基づいて行った。

### 2.3 カラゲニンによるラット足蹠浮腫法

エーテル麻酔後、懸濁液 500 ml を腹腔内に投与した。懸濁液の種類が分かるよう尾の付け根周辺に印をつけた。両後肢の踝まで Milli Q 水を入れた測定用試験管に浸け、体積を測定した。測定から 30 分後、再び麻酔し、前日調製した 1% カラゲニン生理食塩水懸濁液を両後肢の足蹠に投与した。カラゲニン投与 5 時間後麻酔し、浮腫をおこさせた両後肢を再び測定用試験管に浸け、体積を測定した。カラゲニン投与前後の後肢体積  $V_0$ 、 $V_t$  を用い、次式により浮腫率を算出した (Tasaka *et al.*, 1980)。

$$\text{浮腫率} : E = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100 (\%)$$

$V_0$  = 起炎物質投与前の足容積

$V_t$  = 起炎物質投与後の足容積

### 2.4 細胞の培養

ラット肥満細胞 RBL2H3 細胞および C6 ラットグリオーマ細胞の培養は既報の方法に従った (Nakatani *et al.*, 2002)。

### 2.5 抗原抗体反応による RBL-2H3 細胞からのヒスタミン遊離

RBL-2H3 を 12 穴プレートに培養し、PIPES バッファー (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 mM CaCl<sub>2</sub>,

5.5 mM glucose, 10 mM PIPES, pH 7.4) にて洗浄後、細胞をマウス抗 DNP 抗体 (IgE) と 37°C でインキュベートし、細胞を感作した。細胞を洗浄後、各被験サンプルとインキュベートした後、ホスファチジルセリン 10 mg / ml を処理し、さらに抗原である DNP-BSA によって細胞を刺激した。メディアウム中に遊離したヒスタミン量と細胞内に残存したヒスタミン量をそれぞれ測定し、全量に対する遊離量を百分率で表した。

## 2. 6 PGE<sub>2</sub> の測定

C6 細胞を Eagle's minimum essential medium-20 mM HEPES, pH 7.35 (EMEM-HEPES) 中で各被験サンプルを加えて 10 分間インキュベートした。その後、A23187 を 10 分間刺激することにより、細胞からの PGE<sub>2</sub> 遊離を誘導した。インキュベート後の上清に氷冷した EDTA- インドメタシンを速やかに加え、- 20°C で保存した。PGE<sub>2</sub> の定量は既報の方法 (Nakatani *et al.*, 2004) に従った。

## 2. 7 RT-PCR 法による COX-1 および COX-2 mRNA の発現解析

C6 細胞を 6 ウェルプレートに  $2.0 \times 10^5$  cells/ ウェルの濃度で播き、2 日間培養した。γ-mangostin または vehicle を加えて 1 時間インキュベートした後、10 μg / ml LPS を加えて、更に 1 時間インキュベートした。RT-PCR 法による COX-1 及び COX-2 mRNA の発現解析は既報の方法 (Nakatani *et al.*, 2004) に従った。

## 2. 8 IKK 活性の測定

C6 細胞を 150 mm dish に  $5.0 \times 10^5$  cells/dish の濃度で播き、2 日間培養した。10 μg / ml LPS と 10 分間インキュベートし、PBS を用いて直ちに洗浄した。細胞抽出物から免疫沈降法により、anti-IKKα/β antibody で IKKα/β を回収した。Kinase 反応溶液 (25 mM Tris, pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM DTT, 5 mM β-glycerolphosphate, 1 μg of IκBα (1-317), [<sup>32</sup>γ-P]-ATP) に回収した IKKα/β を加え、γ-mangostin または vehicle と 30°C の恒温槽中で 30 分間インキュベートした。その後、サンプルは SDS-PAGE で分離し、molecular imager (GS363, Bio-Rad) を用いて解析を行った (Nakatani *et al.*, 2004)。

## 2. 9 トランスフェクションおよびレポータージェンアッセイ

C6 細胞を 24 ウェルプレートに  $3.0 \times 10^4$  cells/ ウェルの濃度で播き、2 日間培養した。Lipofectamine 2000 を用いてレポータージェンを C6 細胞にトランスフェクションした (Nakatani *et al.*, 2004)。また同時に pRG-TK ベ

クターもトランスフェクションした。13 時間培養後、γ-mangostin または vehicle を加えて 3 時間インキュベートした。その後、1 μg / ml LPS を加えて更に 8 時間インキュベートした後、細胞を回収し、luciferase 活性を測定した (Nakatani *et al.*, 2004)。

## 2. 10 データの統計処理

実験値は、平均値 ± 標準誤差として示し、有意差検定は analysis of variance (ANOVA) を用いて行った。

## 3. 実験結果

### 3. 1 カラゲニンによるラット足趾浮腫に対するマンゴスチーン果皮抽出物の作用

Wistar 系雄性ラットの後肢にカラゲニンを投与すると、誘発性血管透過性亢進に基づく浮腫を発症することが知られている。この炎症モデルを用いて、後肢の浮腫の変化を測定することにより、マンゴスチーン果皮抽出物の抗炎症作用を検討した。カラゲニンを 1% の濃度にした溶液を 75 μl 投与した際に 5 時間後に誘発される浮腫を 100% とし、マンゴスチーン果皮各抽出物による浮腫の抑制作用を検討した (Fig. 1)。抽出物の中で、70% ethanol 抽出物及び 100% ethanol 抽出物は、100 mg / kg の投与量で約 50% の抑制活性を示した。マンゴスチーン果皮 water 抽出物は、100 mg / kg の投与量で約 60% の抑制活性を示し、40% ethanol 抽出物は約 75% の顕著な抑制活性を示した。対照薬として用いた甜茶 (Rubus Suavissimus) 抽出物は、10 mg / kg の投与量で約 70% と比較的強い抑制活性を示したが、100 mg / kg の投与量で比較すると、マンゴスチーン果皮 water 抽出物及び 40% ethanol 抽出物と同等な活性であった。

### 3. 2 抗原抗体反応誘発性ヒスタミン遊離に対するマンゴスチーン果皮抽出物の作用

これまでの *in vivo* レベルの実験結果から、マンゴスチーン果皮抽出物が抗炎症作用を示すことが明らかになった。その作用メカニズムを検討するため、*in vitro* レベルの検討を行った。まず炎症の初期段階において、細胞内のケミカルメディエーターとして増加することが知られているヒスタミン遊離について検討した。

RBL2H3 細胞は、抗炎症のメカニズムの解明を行うときに汎用される細胞で、抗原抗体反応によりヒスタミン遊離を引き起こすことが知られている。RBL2H3 細胞を monoclonal mouse anti-DNP-BSA IgE 抗体感作させた後、DNP-BSA 刺激により遊離されるヒスタミン量を指標とし、抗ヒスタミン遊離作用の検討を行った

マンゴスチーン果皮各抽出物はヒスタミン遊離抑制作

用を示した。その中で、300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で water 抽出物が約 40% の抑制活性および 40% ethanol 抽出物が約 80% の抑制活性をそれぞれ示した (Fig. 2)。対照薬である甜茶

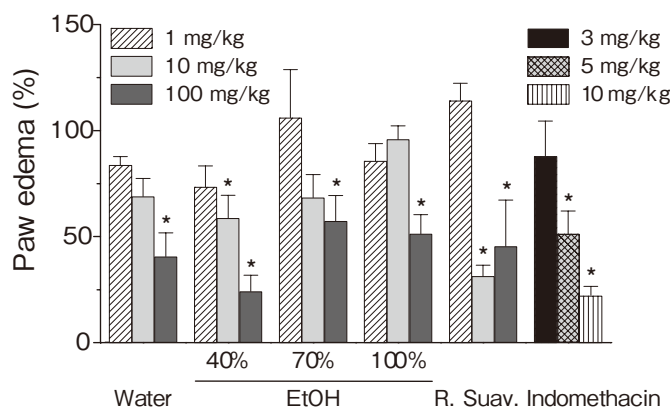


Fig. 1 Concentration-dependent inhibitory effects of several mangosteen extracts, water extract of *rubus suavissimus* and indomethacin on carrageenan-induced rat paw edema.

Foot volume was measured in 5 h after carrageenan (1%, 75  $\mu\text{l}$ ) injection into the hind paw. Each extract, indomethacin or vehicle was administered subcutaneously 30 min before the carrageenan injection. Each column represents the mean ( $n = 6$ ) with S.E. of three independent determinations. \*,  $p < 0.05$  compared with the value for non-treated rat without carrageenan.

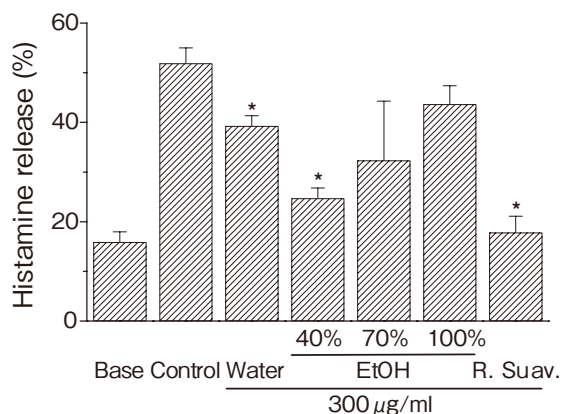


Fig. 2 Inhibitory effects of several mangosteen extracts and water extract of *rubus suavissimus* on histamine release from RBL2H3 cells.

The cells were sensitized by anti-DNP-BSA IgE antibody (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 1 h. After sensitization, the cells were incubated with each extract or vehicle for 5 min. The cells were stimulated by antigen (DNP-BSA, 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 30 min. Results were expressed as percentage of histamine release (released histamine plus histamine remaining in the cells as 100%). Each column represents the mean of percentage of histamine release with S.E. of three independent experiments. \*,  $p < 0.05$  compared with the value for non-treated cells without antigen and antibody.

抽出物も同じ濃度で 90% 以上の抑制活性を示した。有意な抑制活性が認められた 3 種の抽出物において、濃度依存的な解析を行った。40% ethanol 抽出物は、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度において約 80% の顕著な抑制作用が認められ、同濃度で殆ど抑制活性の見られなかった甜茶抽出物と比較してかなり強いものであった。

### 3.3 PGE<sub>2</sub> 生成に対するマンゴスチーン果皮抽出物の作用

炎症の中期から後期にかけて、PGE<sub>2</sub> が重要な働きを示すことが知られている。PGE<sub>2</sub> は炎症反応を仲介するケミカルメディエーターであり、血管拡張及び血管透過性亢進等の作用を示す。Ca<sup>2+</sup> イオノフォアとして知られている A23187 は、中枢神経系のグリア細胞において PLA<sub>2</sub> を活性化し、アラキドン酸遊離を引き起こして、プロスタグランジン類の生成を誘発することが知られている。グリア細胞のモデル細胞として広く使用されている C6 細胞を用いて、A23187 刺激による PGE<sub>2</sub> 生成に対するマンゴスチーン果皮各抽出物の作用を検討した (Fig. 3)。マンゴスチーン果皮各抽出物は 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度において、A23187 誘発性 PGE<sub>2</sub> 生成を顕著に抑制したが、対照薬の甜茶抽出物はほとんど作用を示さなかった。また、各抽出物の濃度依存性を検討した結果、マンゴスチーン果皮 70% ethanol 抽出物は、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度でほぼ完全に PGE<sub>2</sub> 生成を抑制し、40% 及び 100% ethanol 抽出物においても、

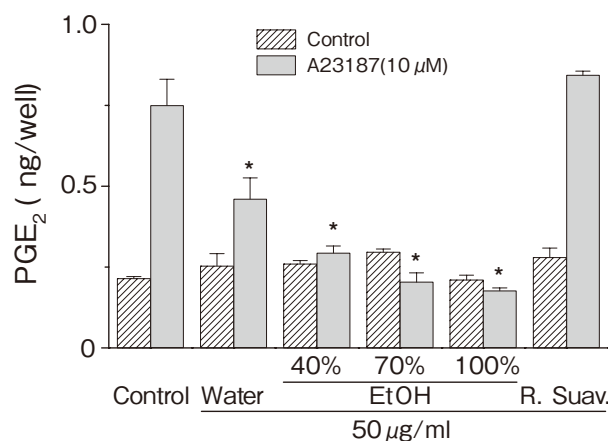


Fig. 3 Inhibitory effects of several mangosteen extracts and water extract of *rubus suavissimus* on A23187-induced PGE<sub>2</sub> release from C6 cells.

The cells were pre-incubated with each extract or vehicle for 10 min, and stimulated by 10  $\mu\text{M}$  A23187 for 10 min. The PGE<sub>2</sub> released in the medium was determined by radioimmunoassay. Each column represents the mean of PGE<sub>2</sub> with S.E. of three independent determinations. \*,  $p < 0.05$  compared with the value for non-treated cells without A23187.

30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でほぼ100%の抑制活性を示した。甜茶抽出物は、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで濃度を上げて、ほとんど抑制活性を示さなかった。

### 3.4 PGE<sub>2</sub> 生成に対する $\gamma$ -mangostin の作用

つぎに、この A23187 誘発性 PGE<sub>2</sub> 生成に対する  $\gamma$ -mangostin の作用を検討した (Fig. 4)。A23187 により増加した PGE<sub>2</sub> 生成を、 $\gamma$ -mangostin は前処置することにより濃度依存的に抑制し、その IC<sub>50</sub> 値は、約 5.0  $\mu\text{M}$  であった。

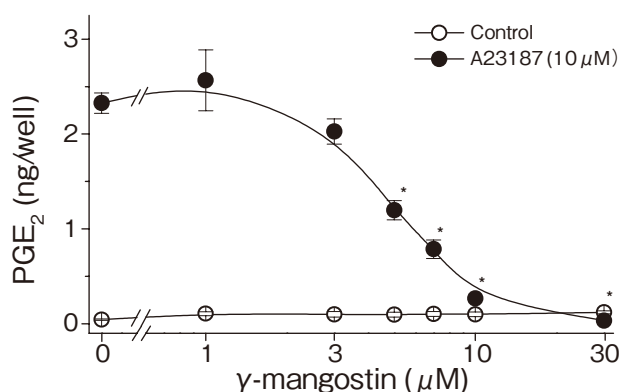


Fig. 4 Concentration-dependent inhibitory effects of  $\gamma$ -mangostin on A23187-induced PGE<sub>2</sub> release from C6 cells.

The cells were pre-incubated with the indicated concentrations of  $\gamma$ -mangostin for 10 min and stimulated by 10  $\mu\text{M}$  A23187 for 10 min. The PGE<sub>2</sub> released in the medium was determined by radioimmunoassay. Each point represents the mean of PGE<sub>2</sub> with S.E. of three independent determinations. \*,  $p < 0.05$  compared with the value for non-treated cells without A23187.

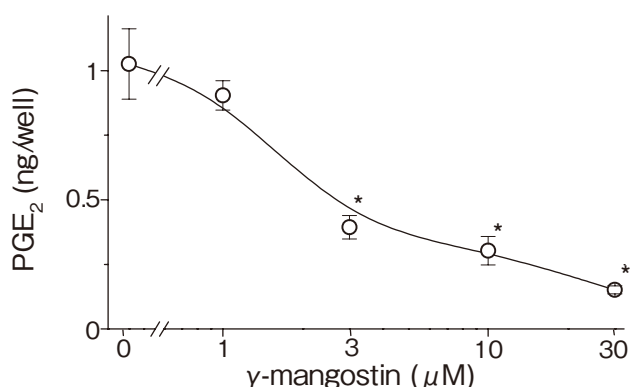


Fig. 5 Concentration-dependent inhibitory effects of  $\gamma$ -mangostin on endogenous PGE<sub>2</sub> release from C6 cells.

The cells were incubated with the indicated concentrations of  $\gamma$ -mangostin for 18 h. The PGE<sub>2</sub> released in the medium was determined by radioimmunoassay. Each point represents the mean of PGE<sub>2</sub> with S.E. of three independent determinations. \*,  $p < 0.05$  compared with the value for non-treated cells.

### 3.5 内因性 PGE<sub>2</sub> 生成に対する $\gamma$ -mangostin の作用

また、 $\gamma$ -mangostin を C6 細胞に加え、18 時間後培養メディアウム中に遊離された PGE<sub>2</sub> 量を測定した結果、 $\gamma$ -mangostin は濃度依存的に PGE<sub>2</sub> 生成を抑制し、IC<sub>50</sub> 値は約 2  $\mu\text{M}$  であった (Fig. 5)。

### 3.6 $\gamma$ -mangostin は IKK 活性を阻害して NF- $\kappa$ B の標的遺伝子である COX-2 遺伝子の発現を抑制する

LPS および TNF $\alpha$  などの炎症性サイトカインによる COX-2 mRNA の発現誘導に、NF- $\kappa$ B の活性化が関与することが知られている。COX は、アラキドン酸から PGE<sub>2</sub> への変換を行う酵素であり、炎症時に大量に生成される COX-2 は、炎症刺激後数時間内に発現する酵素である。この NF- $\kappa$ B の制御系において、IKK は I $\kappa$ B をリン酸化して NF- $\kappa$ B の転写活性を促進する。すなわち、 $\gamma$ -mangostin による LPS 誘発性 COX-2 mRNA 発現誘導の抑制作用は、NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 系を介した COX-2 遺伝子の転写抑制の可能性が考えられた。そこで、IKK 活性に対する  $\gamma$ -mangostin の作用を検討した。 $\gamma$ -mangostin は IKK 活性を濃度依存的に抑制した (Fig. 6)。

また、 $\gamma$ -mangostin は LPS 誘発性の NF- $\kappa$ B 依存的な転写促進を抑制した (Fig. 7)。さらに COX-2 遺伝子の NF- $\kappa$ B 応答配列を含むプロモーター領域に依存的な転写促進を

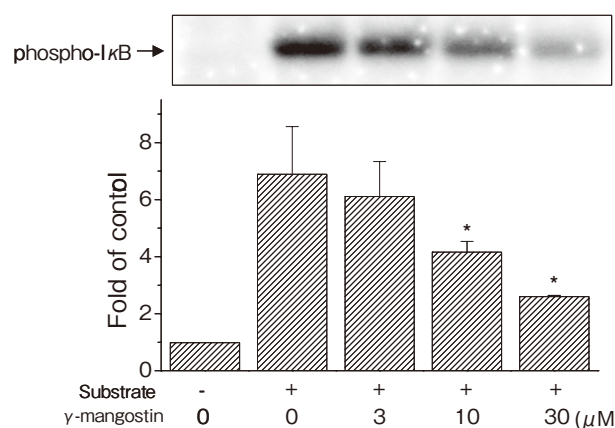


Fig. 6 Concentration-dependent inhibitory effects of  $\gamma$ -mangostin on IKK activity of C6 cells.

The cells were harvested, lysed and immunoprecipitated with anti-IKK $\alpha\beta$  antibody. The kinase assay was carried out in 25  $\mu\text{l}$  of kinase buffer containing 5  $\mu\text{M}$  cold ATP, 10  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (5000 Ci/mmol) and 1  $\mu\text{g}$  of I $\kappa$ B $\alpha$  as a substrate and incubated with the indicated concentrations of  $\gamma$ -mangostin at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min. The proteins were resolved by 11% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The densitometric data is calculated as the fold increases of non-treated cells. Each column represents the mean of phosphorylation of I $\kappa$ B with S.E. of three independent determinations. \*,  $p < 0.05$  compared with the value for cells incubated with ATP and substrate.

抑制した。このような転写抑制活性を持つ  $\gamma$ -mangostin は、予想通り LPS 誘発性の COX-2 mRNA の発現を抑制し (Fig 8)、その結果  $\gamma$ -mangostin によって COX-2 タンパク質の発現も抑制された。

#### 4. 考察

今回、マンゴステーンの果皮を water、40% ethanol、70% ethanol 及び 100% ethanol の各溶媒を用いて抽出し、各々の抽出物の抗炎症および抗アレルギー作用について検討し、その作用機序の解析を行った。これらのマンゴステーン果皮抽出物は、ヒスタミン遊離及び PGE<sub>2</sub> 生成の抑制作用を示すことが明らかになった。その中でも 40% ethanol 抽出物が、ヒスタミン遊離及び PGE<sub>2</sub> 生成に対して抑制作用を示した。一方、花粉症やアトピー性皮膚炎等の炎症及びアレルギー作用に対し、有効性を示す生薬として近年、日本国内で甜茶抽出物が注目されている。甜茶抽出物は、ヒスタミン遊離を有意に抑制したが、PGE<sub>2</sub> 生成に対しては、全く影響を与えなかった。マンゴステーン果皮抽出物、特に 40% ethanol 抽出物は、炎症及びアレルギーに対してきわめて有用である可能性が考えられ、また、興味深い化合物がそれに含まれている可能性も考えられる。

COX には構成的な発現を示す COX-1 と、炎症性サイトカインや LPS 等様々な刺激により誘導される COX-2

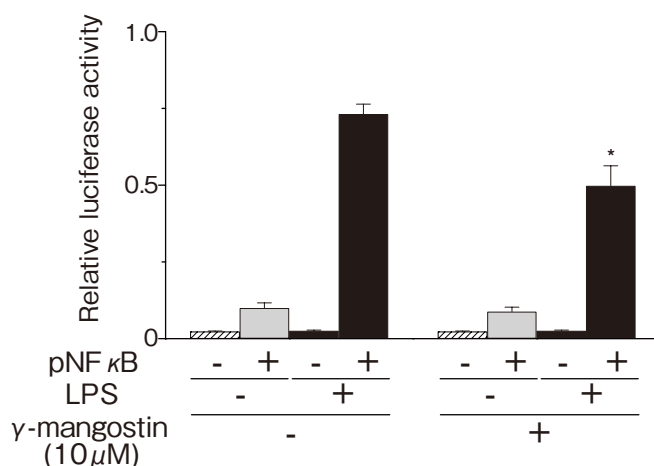


Fig. 7 Inhibitory effects of  $\gamma$ -mangostin on LPS-induced enhancement of luciferase activity of pNF- $\kappa$ B-Luc in C6 cells.

The cells were transfected with 0.475  $\mu$ g of pNF- $\kappa$ B-Luc, dN-Luc (the NF- $\kappa$ B-responsive element-deficient pNF- $\kappa$ B-Luc) and 0.025  $\mu$ g of pRG-TK plasmid. After transfection, the cells were pre-incubated with the indicated concentration of  $\gamma$ -mangostin for 3 h and incubated with 1  $\mu$ g/ml of LPS for 8 h. Relative luciferase activity was calculated as the ratio of firefly luciferase activity to *Renilla* luciferase activity. Each column represents the mean of luciferase activity with S.E. of three independent determinations. \*,  $p < 0.05$  compared with the value for co-transfected cells with pNF- $\kappa$ B-Luc and pRG-TK plasmid which were treated with LPS alone.

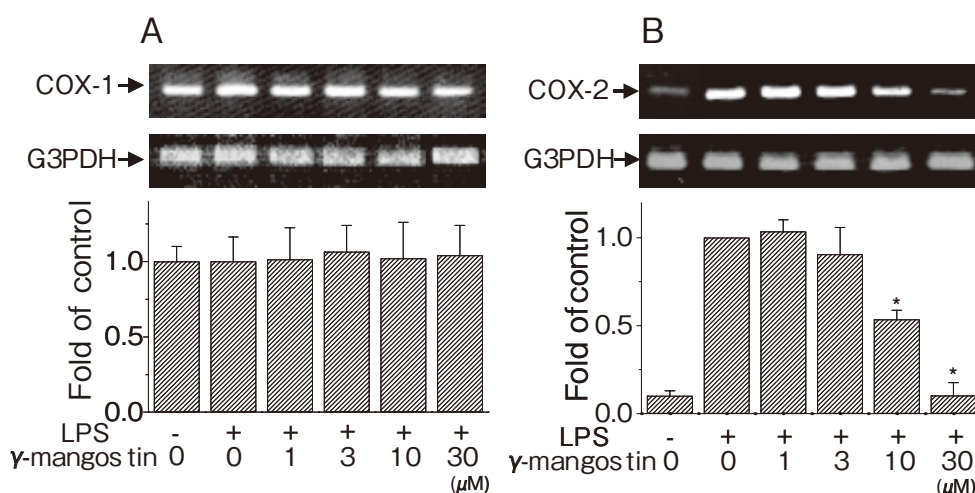


Fig. 8 Concentration-dependent effects of  $\gamma$ -mangostin on the LPS-induced expressions of COX-1 (A) and COX-2 (B) mRNAs in C6 cells as measured by RT-PCR.

The cells were pre-incubated with the indicated concentrations of  $\gamma$ -mangostin for 1 h and incubated with 10  $\mu$ g/ml of LPS for 1 h. Total RNA from C6 cells was reverse transcribed for cDNA synthesis and subjected to PCR. G3PDH mRNAs, which were included to serve as internal control, were shown. The densitometric data is calculated as the fold increases of non-treated cells. Each point represents the mean of expression of COX-1 or COX-2 with S.E. of three independent determinations. \*,  $p < 0.05$  compared with the value for non-treated cells without LPS.

の2種類のアイソザイムが存在し、種々のプロスタノイドの産生に関与している。本研究では、COX-2 遺伝子に対する転写レベルでの  $\gamma$ -mangostin の作用機序について詳細に検討したところ、 $\gamma$ -mangostin の COX-2 転写抑制作用は、IKK 阻害に基づく NF- $\kappa$ B の活性化の抑制によるものであることが明らかになった。RT-PCR 法を用いて、COX-2 mRNA レベルの発現について検討したところ、 $\gamma$ -mangostin は濃度依存的に COX-2 mRNA の発現上昇を阻害した。

本研究では、マンゴスチーン果皮各抽出物の抗アレルギーおよび抗炎症作用メカニズム、さらに  $\gamma$ -mangostin の IKK/I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 系を介した COX-2 遺伝子の転写抑制による抗炎症作用メカニズムを明らかにした。以上の結果より、タイ産マンゴスチーン果実抽出物の多機能性化粧品への応用が期待される。

#### (参考文献)

- 1) Chairungsrilerd N., Takeuchi K., Ohizumi Y., Nozoe S., Ohta T. Mangostanol, a prenyl xanthone from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* **43**, 1099-1102 (1996).
- 2) Harborne J.B., Baxter H. "Phytochemical Dictionary," A Hand book of Bioactive Compounds from Plants, Taylor and Francis, London, 1993.
- 3) Nakatani K., Atsumi M., Arakawa T., Oosawa K., Shimura S., Nakahata N., Ohizumi Y. Inhibitions of histamine release and prostaglandin E2 synthesis by mangosteen, a Thai medicinal plant. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1137-1141 (2002).
- 4) Nakatani K., Yamakuni T., Kondo N., Arakawa T., Oosawa K., Shimura S., Inoue H., Ohizumi Y.  $\gamma$ -Mangostin inhibits Inhibitor- $\kappa$ B kinase activity and decreases lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 gene expression in C6 rat glioma cells. *Mol. Pharmacol.*, **66**, 667-674(2004).
- 5) Tasaka K., Meshi T., Akagi M., Kakimoto M., Saito R., Okada I., Maki K. Anti-inflammatory activity of a proteolytic enzyme, Prozime-10. *Pharmacology* **21**. 43-52 (1980).

### **Ⅲ. 精神、文化に関する分野**

# 統合失調症における化粧顔の認知に関する研究

大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室

岩瀬 真生

Non-verbal communication is important, especially in expressing emotion and intention of senders. Facial expression is probably most important in non-verbal communication. Recently, cognitive functions are considered as important factor to evaluate and improve social functioning of patients with schizophrenia. Facial recognition is supposed to be important for communication skill, but actually, there is little clinical evidence to prove that. We investigated the recognition of facial expression in 38 patients with schizophrenia and 28 normal subjects. We used two photograph sets of emotional faces and neutral faces, called Japanese and Caucasian facial expressions of emotion (JACFEE) and neutral face (JACNeuF), respectively. JACFEE consists of 28 photographs of 7 emotional expressions (anger, contempt, disgust, fear, happiness, sadness, surprise). JACNeuF consists of 28 photographs of emotionally neutral faces. These sets of photographs were presented to the participants and they were required to tell the emotion expressed in the photographs from the word lists of emotions. Patients with schizophrenia exhibited significantly lower accuracy rate of recognition of facial expression. The low accuracy rate in schizophrenia was significantly correlated with low social activity, low language skills and severity of cognitive symptoms. The recognition of fear was mostly impaired in patients with schizophrenia. It was suggested that the emotional labeling test of facial expression could be a useful tool to evaluate social functioning in schizophrenia and that recognition of facial expression was closely linked to the psychopathology of schizophrenia. To predict social functioning in schizophrenia using this test, longitudinal clinical study will be required.

## 1. 緒言

ヒトのコミュニケーションには言語によるものと、非言語的なものの2種類がある。言語は情報の意味内容を伝える上で重要な働きをするが、一方で話し手の意図、感情や微妙なニュアンスを伝える上では非言語的なコミュニケーションが決定的な役割を果たしている。非言語的コミュニケーションには表情、姿勢、声色、身振り、手振りなどが含まれるが、そのなかでも表情の重要性は抜きん出ている。

統合失調症は幻覚や妄想などを主症状とする精神疾患であり、思春期以降人口の約1%に発症する。経過は長期に及ぶことが多く、患者は疾患のため、認知機能、情動機能、社会機能など広範な領域の能力が障害される。統合失調症患者の中核的特徴のひとつとして社会機能の低下は極めて重要である。その障害について、いろいろな角度から多数の研究が行われてきた。近年、認知機能と社会機能の関連について検討した研究は多数見られ、Greenらの総説<sup>1)</sup>では secondary verbal memory、card sorting/executive function、verbal fluency、psychomotor ability、reaction time と community functioning が一貫して関連すると言

われている。しかしこれらの事物処理に関連した認知機能と社会機能との関連を検討した研究は多数報告されているが、社会的認知、情動機能といった統合失調症の重要な障害領域と社会機能との関連を調べた研究は少なく、その関連についてコンセンサスは得られていない。

情動機能を評価する課題の中では、非言語的 social cue である表情認知の障害があることが古くから指摘されており、過去20年間にわたり多数の報告がある。そこで、われわれは主に慢性期の入院中の統合失調症患者を対象に、標準化された表情写真集である JACFEE および JACNeuF<sup>2)</sup> を用いて表情認知課題を行い、社会機能との関連を調べることにした。

実験を行なうに当たり、先行研究から導かれた仮説として、表情認知課題の成績は社会的活動性、身支度の能力との関連が見られると仮定した。

また日常我々が目にするヒトの顔、特に女性の顔は化粧をしている場合がほとんどである。化粧はヒトの顔の魅力を増すための操作であるが、同時に人物や表情の同定にも影響を及ぼす。統合失調症において化粧顔の認知は化粧をしていない顔の認知よりも困難であると予想される。現実の生活環境により近い課題の成績と患者の社会生活機能との関連を研究することは重要な研究テーマであり、この研究課題の最終目標としている。

## 2. 方法

### 2.1 対象

本実験では統合失調症患者及び健常被験者それぞれ50



Recognition of made up face in patients with schizophrenia.

Masao Iwase

Psychiatry, Department of Clinical Neuroscience, Osaka University Graduate School of Medicine

名のデータを集める予定であるが、今回は統合失調症患者 38 名および、二親等以内に統合失調症患者を持たない健常被験者 28 名での報告となる。対象のプロフィールを表 1 に示した。対象となる患者は、2 週間以内の処方変更がない、精神症状の安定した患者とした。慢性期の患者が中心で、半数以上が開放病棟に入院中もしくは退院準備を進めている患者であった。頭部外傷、アルコール等物質関連障害の既往のある患者は除外した。患者の平均年齢は 47 歳、平均入院期間は 115 ヶ月、服薬量はクロルプロマジン換算で一日あたり 715mg であった。すべての被験者より、書面にて自由意志による参加の承諾を得た。

## 2.2 表情認知課題

Paul Ekman による表情写真集 (Japanese and Caucasian facial Expressions of Emotion (JACFEE) and Neutral Faces (JACNeuF))<sup>2)</sup> から、日本人の顔写真 56 枚、うち表情写真: Emotional Face 28 枚と情動的にニュートラルな写真: Neutral Face 28 枚を選んだ。表情写真は Ekman の提唱する 7 つの表情 (怒り、軽蔑、嫌悪、恐怖、幸せ、悲しみ、驚き) それぞれについて男女 2 名ずつ、4 枚があり、合計 28 枚からなる。また Neutral Face は表情写真と同一の 28 名のモデルのものを用いている。

これら 56 枚を 1 セットとして一枚ずつ PC 上に提示し、既述した 7 つの表情を記した解答用紙から、最も写真の表情と近いものを一つ選ぶという課題を被験者に課した。写真提示の順序はランダム化して、順序効果が実験結果に及ぶのを防止した。回答には制限時間は特に設けず、回答出来次第、数秒間マスクスライドを提示した後に次の写真を

提示した。課題の成績は表情写真 28 枚に対する正解率で評価した。

## 2.3 その他の検査

患者群、健常者群共に、主に言語能力等を含む知能 (IQ) の影響の有無の確認のために WAIS-R<sup>3)</sup> を施行した。ただし、患者群ではすべての下位尺度を評価したが、健常者群では知識、絵画完成、符号、類似の 4 つの下位尺度から導かれる推定 IQ を評価した。患者の病前 IQ を評価するために Japanese Adult Reading Test (JART)<sup>4)</sup> を施行した。JART とは欧米で病前 IQ 推定に用いられる National Adult Reading Test (NART) に習い日本で開発されたもので、漢字で構成された熟語の読みを答える課題であり、認知症や統合失調症患者の病前 IQ を推定することができる。JART は全ての被験者に対し施行した。更に検査施行時の気分、情動の影響を考慮して POMS を施行している。

これらに加え、患者群で Positive and Negative symptoms scale (PANSS)<sup>5)</sup> による精神症状評価、Rehabilitation Evaluation Hall and Baker (REHAB)<sup>6)</sup> による社会機能評価を行った。

PANSS は統合失調症患者の 30 項目の精神症状を半構造化面接により評価するための尺度である。マニュアルに従いトレーニングされた 2 人の精神科医により評価された。PANSS の評価は他の検査結果を知らされていない状態で行った。Lindenmayer の 5 因子モデル<sup>7)</sup> を採用して、症状評価尺度の点数を集計した。これは Negative (N1-4, 6, G16), Positive (P1, 5, 6, G4, 9), Excitement (P4, 7, G14), Cognitive (P2, N5, G5, 10, 11, 13), Depressive (G1,

表 1 被験者のプロフィール

|            | 患者群           | 健常群           | P       |
|------------|---------------|---------------|---------|
| n (M/F)    | 38 (16/22)    | 28 (11/17)    |         |
| Age        | 47.3±13.7     | 42.6±15.1     | n.s.    |
| Education  | 13.0±2.1      | 13.9±2.2 n.s. |         |
| IQ         | 85.8±14.3     | 108.9±11.8    | P<0.001 |
| JART (誤答数) | 35.3±12.2     | 29.2±14.4     | n.s.    |
| 服薬量 (CP換算) | 715.8±491.9mg |               |         |
| PANSStotal | 63.9±18.2     |               |         |
| Negative   | 14.7±6.8      |               |         |
| Positive   | 10.9±4.6      |               |         |
| Excite     | 5.1±2.2       |               |         |
| Cognitive  | 12.5±5.0      |               |         |
| Depressive | 9.6±4.1       |               |         |
| REHABtotal | 44.9±16.5     |               |         |

2, 3, 6, 15) の5因子からなり PANSS 全 30 項目のうち 25 項目が組み込まれている。これら 5 因子の得点とその他の評価尺度や表情認知課題の成績との相関を解析した。

入院患者の社会機能を測定するためのツールとして REHAB 日本語版を用いた。これは病院や施設における統合失調症患者の社会機能を評価するものである。本研究の目的、表情認知課題等その他の成績を知らされていない看護師または臨床心理士が 1 週間の行動を観察し評価した。REHAB の評価に先立ち、これらの評価者に対し十分なトレーニングを行った。REHAB は問題行動の評価 (Deviant Behavior) と、全般的な行動の評価 (General Behavior: GB) という二つのパートからなっており、今回の研究では問題行動のある患者は少なかったことより、全般的な行動の評価のみについて検討した。この GB は全 16 項目の VAS 形式となっており、各下位尺度ごとに 0 (ほぼ問題なし) から 9 (非常に悪い) の 10 段階にスコアリングして評価する。このスコアの合計のみならず、因子分析によって導かれた 5 つの因子 (社会的活動性、言葉のわかり易さ、言葉の技能、セルフケア、社会生活技能) による解析が出来る。

REHAB の得点は、高得点であるほど社会生活機能が低いことを表している。合計スコアが 40 以下であればコミュニティのグループに属する可能性が十分あり、60 以下であればグループホーム、援護寮、家族との同居といった保護的環境では暮らすことが出来ると考えられている。本研究に参加した患者の平均合計スコアは  $44.9 \pm 16.5$  であった。

### 3. 結果

#### 3.1 健常者および患者群の表情認知課題の成績比較 (表 2)

患者群は健常群に比して表情認知課題の正解率は有意に悪かった (健常群 63.1%, 患者群 55.8%,  $t=2.29$ ,  $p=0.025$ )。慢性期の統合失調症患者において、表情認知課題の成績は、年齢、教育年数、発症年齢、罹病期間、入院期間、服薬量に有意な相関が無かった。健常者においても同様に教育年数との相関は見られなかったが、加齢に伴い成績が低下する傾向 ( $r = -0.44$ ,  $p=0.023$ ) が見られた。また、女性は患者群、健常群共に男性よりも正解率が高い傾向があったが、有意ではなかった。

各情動ごとに 2 群の正解率を比較すると、恐怖 (健常群 37.5%, 患者群 23.0%,  $t=2.03$ ,  $p=0.046$ ) のみ患者群で成績が有意に低かった。誤答のパターンとしては怒り提示時に悲しみと回答する誤答 ( $t=2.18$ ,  $p=0.034$ ) や、軽蔑提示時に幸福と回答する誤答 ( $t=2.15$ ,  $p=0.036$ ) が患者群で有意に多く見られた。

#### 3.2 表情認知と社会生活機能との相関 (表 3)

統合失調症患者では、表情認知課題の成績と、REHAB の「社会的活動性」( $r = -0.37$ ,  $p=0.02$ )、「言葉の技能」( $r = -0.34$ ,  $p=0.041$ )、「言葉のわかり易さ」( $r = -0.34$ ,  $p=0.038$ ) という 3 つの因子において、有意な相関関係が見られた。下位尺度毎に表情認知課題の正解率との相関を

表 2 表情認知課題の正解率 (%)

|        | total                 | 怒り   | 軽蔑   | 嫌悪   | 恐怖                    | 幸福   | 悲しみ  | 驚き   |
|--------|-----------------------|------|------|------|-----------------------|------|------|------|
| PT ave | 55.8                  | 53.9 | 31.6 | 55.9 | 23.0                  | 94.7 | 48.0 | 84.2 |
| HC ave | 63.1                  | 63.4 | 45.5 | 49.1 | 37.5                  | 98.2 | 55.4 | 88.4 |
| 有意差    | $t=2.29$<br>$p=0.025$ |      |      |      | $t=2.03$<br>$p=0.046$ |      |      |      |

表 3 表情認知課題の正解率と REHAB 得点の相関

|    |   | 社会的活動性 | 言葉の技能 | 言葉のわかり易さ | セルフケア | 社会生活技能 | 全般的評価 | TOTAL |
|----|---|--------|-------|----------|-------|--------|-------|-------|
| 成績 | r | -0.37  | -0.34 | -0.34    | 0.037 | 0.09   | 0.14  | -0.26 |
|    | p | 0.02   | 0.041 | 0.038    | 0.82  | 0.57   | 0.37  | 0.12  |

表 4 表情認知課題の正解率と PANSS 各因子得点の相関

|    |   | Negative | Positive | Excite | Cognitive | Depressive |
|----|---|----------|----------|--------|-----------|------------|
| 成績 | r | -0.14    | -0.18    | 0.11   | -0.32     | 0.26       |
|    | p | 0.41     | 0.28     | 0.53   | 0.057     | 0.12       |

検討すると「病棟内交流」( $r = -0.35, p = 0.032$ )、「言葉の明瞭さ」( $r = -0.35, p = 0.032$ )との間に相関が認められた。なお、「言葉のわかり易さ」のスコアと抗精神病薬の服薬量に有意な相関は見られなかった。

### 3.3 表情認知と精神症状の相関 (表4)

表情認知課題の成績は、Lindenmayer の5つの各因子との間に有意な相関関係を示さなかったが、その中では cognitive symptoms の強いものは課題の成績が低い傾向 ( $r = -0.32, p = 0.058$ ) がみられた。

### 3.4 表情認知と知能との相関

患者群において表情認知課題の成績と WAIS-R の成績にも相関関係が認められた。それは full IQ ( $r = 0.37, p = 0.048$ ) の他、類似 ( $r = 0.47, p = 0.0077$ )、組み合わせ ( $r = 0.44, p = 0.019$ ) であった。健常群においては、推定 IQ との相関は見られず、健常群で施行した4下位検査の中では、符号の成績と正の相関をする傾向があった。

## 4. 考察

統合失調症患者と、年齢性別がマッチした健常者群に表情認知課題を行い、統合失調症群においては、その成績と観察によって得られた社会機能、精神症状等との間の関連について検討した。その結果、統合失調症患者の表情認知課題の正解率は、健常者より有意に悪い成績であった。患者群において課題の成績は、年齢、性別、発症年齢、入院期間、教育年数などの臨床的データとは相関が見られなかった。これらは先行研究から得られた知見とも一致した。臨床データとの相関が見られなかったことは、統合失調症における表情認知の障害は state marker というよりはむしろ trait marker となる可能性を示唆している。本研究では表情認知課題の二群間の成績差は小さかった。この理由としては、本研究において健常者の正解率が JACFEE に添付の標準化データよりも低かったためと考えられた。

統合失調症群の表情認知課題の成績は、REHAB によって評価された社会機能のいくつかのエリアと相関した。つまり好成績は、高い社会的活動性、高い言葉の技能、よりわかりやすい言葉と関連しており、研究仮説を証明することが出来た。表情認知は相手の感情や意図を読み取る上で重要な役割を果たしており、対人関係を円滑に行う上で不可欠な要素である。表情認知能力の高い患者が高い社会的活動性を示したというのは妥当な結果と考えられる。表情認知課題の成績が社会的活動性と相関することは数少ない先行研究の殆ど<sup>8-10)</sup>とも一致しており、この知見を裏付けることが出来た。

本研究では更に、REHAB の二つの言語的因子 (言葉の

技能、言葉のわかり易さ) と課題の成績の間に相関を認めた。特に「言葉のわかり易さ」という因子を構成する「言葉の明瞭さ」という尺度において有意な相関を認めた。本研究で用いた表情認知課題は表情写真を見て、その情動を表す言葉をリストから挙げる labeling 課題であり、表情認知能力の他に適切な言葉を選択するという言語的な能力が介在する。本研究で課題成績と言語的能力との間に相関が見られたのは、labeling 課題が言語を介した課題であることが一つの理由として挙げられるかもしれない。表情認知課題の成績と会話における言語的能力との間に有意な関連を見出した研究は、本研究の他にもひとつあり<sup>11)</sup>、この研究でも表情認知課題として labeling 課題を使用している。そのため、labeling による表情認知課題と言葉の明瞭さとの有意な関連は表情認知によるものか課題に必要な言語的能力によるものか、区別する必要がある。本研究の場合、WAIS-R の言語性 IQ との相関はみとめておらず、その下位項目検査では類似で相関を認めたのみであり、labeling による表情認知課題と患者の言語的能力との関連は低いと考えられた。そのため、本研究の結果は表情認知障害と言葉の明瞭さとの間に有意な関連があると解釈しても妥当であろう。

一方で本研究では、先行研究と異なり、REHAB の「セルフケア」に相当するエリアには相関が見られなかった。これは課題の性質の差異が影響している可能性がある。従来「セルフケア」に相当する社会生活機能は情報処理速度や注意力といった認知機能との関連が指摘されてきた。例えば、Penn らはその論文の中で表情認知課題の成績が CPT/SPAN の成績と相関したと報告している<sup>9)</sup>。表情認知課題の成績と「セルフケア」に関連する領域の社会機能について関連を認めたいくつかの研究<sup>8,9)</sup>ではいずれも表情認知課題の時間制限が設けられており、表情認知能力以外に情報処理速度や注意力などを要したために「セルフケア」に相当する社会機能との相関を示した可能性がある。本研究課題では課題の作成にあたり表情認知機能以外の認知的要素の混入をできるかぎり避けることを意図して、課題の遂行に時間制限を設けなかったため、「セルフケア」との相関が見られなかったものと考えられた。これらをまとめると、「セルフケア」の能力はむしろ表情認知の能力と関連を有さないと解釈することが妥当であるかもしれない。この点に関しては、今後のより適切な研究デザインによる追試が必要であろう。

本研究では表情認知課題の成績と精神症状の間には有意な相関は認められなかったが cognitive symptoms の強さと低成績が相関する傾向が見られた。本研究と同様に Lindenmayer の5因子モデルに基づいて解析した Bozikas らの研究<sup>12)</sup>では、cognitive symptom の強さが課題の低成績と関連したと報告している。いくつかの研究では表情認

知課題の低成績と陰性症状との関連を報告している<sup>8, 13-15)</sup>。また解体症状や陽性症状の強さが課題の低成績と関連する<sup>16)</sup>という報告や、精神症状との関連を認めなかったという研究<sup>17)</sup>もある。これらの研究の中には、統合失調症の精神症状を陽性症状と陰性症状に二分する2症候モデルで解析しているものもあり、Lindenmayerの5因子モデルなど精神症状の因子分析に基づく解析をしている研究とは区別する必要がある。2症候モデルの陽性症状には5因子モデルでの positive, cognitive, excitement の要素が、陰性症状には negative, cognitive, depressive の要素が混入しているため、2症候モデルを用いた研究の結果を5因子モデルに還元して解釈することは困難である。精神症状と表情認知との関連に関しては、おそらくは5因子モデルでの cognitive ないしは negative symptoms との関連を示す研究が多いように思われるが、この見解が本当に正しいかどうかは今後の研究で再現されるかどうかを待つ必要がある。

本研究では表情認知課題の正解率と WAIS-R の full scale IQ、組み合わせ、類似との間に有意な相関が得られた。表情認知課題の成績と WAIS-R の下位尺度の成績に関しての報告は無いが、表情認知課題と他の neurocognitive battery の成績の関連については、WCST に代表される実行機能、CPT, SPAN に代表される注意機能との相関が比較的多く報告され、psychomotor speed, visual memory などとの相関を報告するものもある。本研究では full scale IQ との相関は見られるものの、下位検査項目で有意な相関を示したものはむしろ少数であった。これは、表情認知機能は全般的な知能とは相関するが、個々の非情動的な認知機能とはむしろ独立であるということを示しているのかもしれない。

今回の研究の結果から、統合失調症では表情認知の異常があり、その異常がさまざまな障害と密接に結びついていることが示された。統合失調症では特に、恐怖の症状を認知することに障害が強く認められた。このことは、化粧された顔を認知する際に、顔の表情を明るくしたり、暗くしたりする化粧の仕方により、統合失調症患者の表情認知が変化しうること示している。このことは患者が実社会で感じる、対人関係、表情認知の困難を研究していく上で重要な手がかりになると考えられる。今後、さらに結果を詳細に解析していく必要がある。

#### (参考文献)

- 1) Green MF, Kern RS, Braff DL, Mintz J. Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the "right stuff"? Schizophr. Bull. 26: 119-136, 2000.
- 2) Ekman P, Mastumoto D: Japanese and Caucasian Facial Expressions of Emotion (JACFEE) and Neutral Faces (JACNeuF): 1998
- 3) Wechsler D. WAIS-R Manual: Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised. Psychological Corp, New York, 1981
- 4) 松岡恵子 金吉晴 廣尚典 宮本有紀 藤田久美子 田中邦明 小山恵子 香月菜々子 日本語版 National Adult reading Test (JART) の作成 精神医学 44: 503-511, 2002
- 5) Kay, S.R., Fiszbein, A., Opler, L.A., The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for schizophrenia. Schizophrenia Bulletin 13 (2), 261-269, 1987
- 6) Baker R, Hall JN. REHAB: Rehabilitation Evaluation of Hall and Baker. Vine Publishing, Aberdeen, 1984
- 7) Lindenmayer, J.P., Bernstein-Hyman, R., Grochowski, S., Bark, N., Psychopathology of schizophrenia: initial validation of a 5-factor model. Psychopathology 28 (1), 22-31, 1995
- 8) Mueser KT, Doonan R, Penn DL, Blanchard JJ, Bellack AS, Nishith P, DeLeon J, Emotion recognition and Social Competence in Chronic Schizophrenia J Abnorm Psychol 105: 271-275, 1996
- 9) Penn DL, Spaulding W, Reed D, Sullivan M, The relationship of social cognition to ward behavior in chronic schizophrenia Schizophr Res 20: 327-335, 1996
- 10) Hooker C, Park S: Emotion Processing and its relationship to social functioning in schizophrenia patients: Psychiatry Res 112: 41-50, 2002
- 11) Ihnen GH, Penn DL, Corrigan PW, Martin J, Social perception and social skill in schizophrenia. Psychiatry Res 80: 275-286, 1998
- 12) Bozikas VP, Kosmidis MH, Anezoulaki D, Giannakou M, Karavatos A, Relationship of affect recognition with psychopathology and cognitive performance in schizophrenia. J Int Neuropsychol Soc 10(4): 549-558, 2004
- 13) Martin F, Baudouin JY, Tiberghien G, Franck N. Processing emotional expression and facial identity in schizophrenia. Psychiatry Res 134: 43-53, 2005
- 14) Sachs G, Steger-Wuchse D, Kryspin-Exner I, Gur RC, Katschnig H, Facial recognition deficits and cognition in schizophrenia. Schizophr Res 68: 27-35, 2004
- 15) Suslow T, Roestel C, Ohrmann P, Arolt V, Detection of facial expressions of emotions in schizophrenia. Schizophr Res 64: 137-145, 2003
- 16) Poole JH, Tobias FC, Vinogradov S. The functional relevance of affect recognition errors in schizophrenia. J

- Int Neuropsychol Soc 6(6): 649–58, 2000
- 17) Bediou B, Franck N, Saoud M, Baudouin JY, Tiberghien G, Dalery J, d’Amato T. Effects of emotion and identity on facial affect processing in schizophrenia. *Psychiatry Res* 133: 149–157, 2005

# 機能性香料の開発：匂いによる月経前緊張症（PMS）の治療

長崎大学医歯薬学総合研究科医療科学専攻 生命医科学講座 神経機能学分野

篠原 一之

Most women are troubled with a women's unidentified complaints such as premenstrual syndrome (PMS), maternity blues and menopausal disorder that is characterized by mental and somatic symptoms (depression, lassitude, a will fall, sleeplessness, overeating and anxiety). On the other hand, it is well known that olfactory system is directly connected to the hypothalamus and the limbic system. Thus, olfactory stimulation pathway may be a new method to modulate the emotion. We aim to identify the odor compounds which improve the women's unidentified complaints and to apply it to the cosmetics.

It is reported that citrus essential oil odors reduced the depressive symptoms. 1) We assessed whether citral odor which including citrus oil also reduced the immobility time (an index of the depressive symptoms) in forced swim test in female mice. In addition, it is well known that chamomile roman essential oil odors reduced the anxiety symptoms in relation to the menopausal disorder. 2) We assessed whether chamomile odor increased the moving distance and duration in the light box (an index of the anxiety symptoms) in the LD box test in female menopausal disorder model mice. 3) Moreover, we focused whether  $\beta$ -caryophyllene and linalool odors which including ylang-ylang essential oil improve the symptoms of the PMS. We used a psychological VAS (visual analog scales) method to assess the subject's mental symptoms (friendliness, alertness, happiness, eagerness and fatigue). The protocol observed the tenets of the Helsinki Declaration and was approved by the Ethics Committee at Nagasaki University.

1) As a result of the forced swim test, citral odor group tended to reduce the immobility time compared with the control group. Thus, citral odor may reduce the depression as consider in previous report. 2) In the LD box test, chamomile odor group increased the moving distance and duration in the light box. It is suggested that chamomile odor reduce the anxiety in menopausal disorder. 3) In human subjects,  $\beta$ -caryophyllene significantly improved the PMS symptoms.  $\beta$ -caryophyllene increased friendliness, eagerness and happiness scores in luteal phase. In addition,  $\beta$ -caryophyllene reduced fatigue score in luteal phase, but not in alertness. On the other hand, linalool significantly increased alertness in follicular phase, but not in other PMS symptoms. These results suggest that  $\beta$ -caryophyllene may improve the PMS symptoms, such as depressive, lassitude and a will fall symptoms.

## 1. 緒言

黄体後期、出産直後、更年期に起こる女性特有の不定愁訴（抑うつ気分、倦怠感、意欲低下、不眠・過眠、食欲不振・過食、不安）は、プロゲステロンの低下によって引き起こされると考えられている。排卵後受精しないと、黄体後期にプロゲステロンが低下するので、月経前緊張症（premenstrual syndrome:PMS）が起こる。PMSの症状は、月経開始7日前から出現し、月経開始と共に消失する疾患である。生殖年齢にある女性の50%以上はPMSの少なくとも一つの症状を有することが知られているので、多くの女性は思春期から閉経期までの約35年間のうち1/4（28日中7日）の期間は、こうしたPMSの症状に悩まされなければならない。PMSの症状は一定期間が経過すれば症

状が消失することから、これだけ多数の女性が症状を有するにも関わらず、ホルモン療法以外の治療法は確立していないので治療されず、我慢をしている女性が多い。

一方、最近では代替医療として、アロマセラピー（芳香療法）などの匂い物質による健康改善法が広まりつつあるが、効用は経験に基づくものであり、基礎医学研究による裏付けがあまりない。しかし、嗅覚情報が脳新皮質を介さず、直接、情動の中枢である脳辺縁系や本能（摂食、睡眠）やホルモンの中枢である視床下部に入力することを考えると、匂い物質は経口、経静脈、経皮的ルートを紹介しない新しい向中枢神経系薬物として発展しうる可能性がある。

ところで、女性が集団で生活していると月経開始日が一致するという「月経同期」は、卵胞期の腋下フェロモンが月経周期を短縮し、排卵期の腋下フェロモンが月経周期を延長することによってもたらされることが報告されている。そこで、腋下フェロモンを嗅がせることによって、下垂体から放出される黄体形成ホルモン（LH）のパルス状分泌がいかなる影響を受けるかを調べた。その結果、卵胞期腋下フェロモンはLHパルスの頻度を増し、排卵期腋下フェロモンはLHパルスの頻度を減らすことがわかった。した



Application of Functional aromas, which improve premenstrual syndrome (PMS)

Kazuyuki Shinohara

Division of Neurobiology and Behavior  
Department of Basic Medical Sciences  
Course of Medical and Dental Sciences  
Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

がって、1) ヒトでもフェロモンが存在する可能性、2) フェロモンは嗅覚系を介して視床下部に作用し、LHパルスの頻度を変えることによって、卵胞の発育・成熟を調節する可能性が示唆された<sup>1)</sup>。さらに、androst-enolを嗅がせるとLHパルスの頻度を減らすこと<sup>2)</sup>、および月経同期群は月経非同期群に比べandrost-enolに対する感受性が高いことを示し、androst-enolが排卵期腋下フェロモンである可能性を示唆した<sup>3)</sup>。したがって、匂い物質は経口、経静脈、経皮的ルートを紹介しない新しい向中枢神経系薬物として発展しうる可能性が考えられる為、PMS、マタニティブルーズ、更年期障害などの不定愁訴を改善する機能性香料の開発を考えるに至った。

これまでに国内外における匂い物質の研究はいくつか存在している。梅津らは、ゼラニウム、ラベンダーなどの精油（単一物質ではない）をマウスの腹腔内に投与したところ、抗不安作用があることを報告している<sup>4)</sup>。また、同様にマウス腹腔内にメントールを投与した際の移所運動活性（ドパミンの活性を示す）が増加することを報告している<sup>5)</sup>。しかし、彼等の方法は血流を介した作用であり、嗅覚系を介した中枢作用を調べたものではない。傳田らはストレスを付加すると皮膚のバリア機能の回復が遅れることを報告し、匂い物質がこれを軽減させる作用があることを報告している<sup>6)</sup>。傳田らの方法であるテープストリッピングテストは我々も行っており、実際に皮膚バリアの回復を早める匂い物質も見出すことができた。しかし、この方法は皮膚バリアの改善効果のみに焦点を当てているため、その他の効果についても検討する必要がある。また、海外においても匂い物質が中枢へ作用し、ストレスを軽減する作用や、抑うつ症状を緩和する作用を見出している研究は今のところ存在しない。以上のことから、国内外を問わず、匂い物質の中枢神経への作用を利用し、女性の不定愁訴の症状を軽減する作用を見出すことを目的とする試みはされていない。そこで、本研究では、これまで経験的に女性の不定愁訴の症状を軽減すると言われているいくつかのアロマセラピーの精油に注目し、精油、またはそれらが共通して含んでいる主成分（単一物質）のうち、女性の不定愁訴の症状を緩和する物質の同定を研究目的とし、1) 抑うつ気分（動物）、2) 不安（動物）、3) 親しみ、やる気、幸福感、疲労感、眠気（ヒト）への作用を調べた。

## 2. 実験

### 1) マウスー強制水泳試験（抑うつ気分）

小森らは、ラットおよび男性うつ病患者に対し、柑橘系香料は抗うつ作用があることを報告している<sup>7)</sup>。しかし、彼らは主に臨床上的での効果に注目し、柑橘系の精油を混合物のまま使用しているため、具体的にどの成分が効果を及

ぼすかなどの単一物質レベルでの検討はしていない。そこで、マウスを用いて、抑うつ気分の評価系として知られている強制水泳試験による無動時間の測定を行い、柑橘系香料の主成分のうち、シトラール（単一物質）が抑うつ気分を軽減する作用があるか否かを調べた。

ICR系雌マウスを用いて、強制水泳試験を5分間行い、無動時間の測定を行った。実験群は強制水泳試験の2時間前より、溶媒を曝露した群と3%シトラールを曝露した2群に分け、student t-testによる比較を行った。

### 2) 更年期障害モデルマウスー明暗ボックス試験（不安）

ローマンカモミールは、更年期障害の症状である神経過敏、不安を軽減する作用があると言われている。そこで、更年期障害モデルマウスを用いて、不安の評価系として知られている明暗ボックス試験を行い、ローマンカモミール（精油）が不安を軽減する作用があるか否かを調べた。

更年期障害モデルマウスの作成は、ICR系雌マウスをエーテル麻酔下に背側に小切開を加え、両卵巢を摘出した後縫合した。卵巢摘除後20週から37週が経過した動物は、FSH、LH、ACTH分泌の増加・持続が確認され、更年期障害の女性の内分泌の特徴が類似することが報告されている為、卵巢摘除後20週以上が経過した雌マウスを更年期障害モデルマウスとして実験に用いた<sup>8)</sup>。一方、卵巢摘除後2週間の雌マウスを更年期障害モデルマウスとの比較対象に用いた。

明暗ボックス試験は、予め拘束ストレスを与えた後に5分間行った。拘束ストレスは、3日間のうち17:00-10:00に金網による拘束を行い、続く2日間は通常の飼育を行った。実験では、明暗ボックス側での移動距離および滞在時間の測定を行った。実験群は、拘束ストレスを与えないコントロール群、拘束ストレス群、拘束ストレス+3%カモミール群の3群とした。実験は、拘束ストレスを行う第一日目の13:00に開始し、拘束ストレス前（S0）および拘束ストレス後1回目（S1）、2回目（S2）、3回目（S3）の計4回の測定を行った。各拘束ストレス後の実験値の比較は、Dunnett検定またはstudent t-testを用いた。

### 3) ヒト女性ーVAS（親しみ、やる気、幸福感、疲労感、眠気）

イランイランは主に花の部分から水蒸気蒸留法より抽出した精油であり、鎮痛作用やリラックス効果、セクシヤリティーを高めると言われている。イランイランの匂い成分は、 $\beta$  カリオフィレンが15-20%、リナロールが11.6-30%である<sup>9)</sup>。 $\beta$  カリオフィレンはその他、カモミール（10%）、ラベンダー（3.7%）、クラリセージ（1.3%）にも含まれる。そこで、正常月経周期を回復する健康女性を対象に、イランイランの成分である $\beta$  カリオフィレン（単

一物質)、リナロール (単一物質) が月経周期に伴う PMS の症状 (親しみ、やる気、幸福感、疲労感、眠気) を軽減する作用があるか否かを調べた。

健常で喫煙歴のない女性 26 人に実験の主旨を説明し、書面による同意を得た後、基礎体温の測定を依頼し、月経周期と排卵の有無を確認した。そのうち正常月経周期を回帰する女性 6 人に被験者を依頼した。実験は月経ステージの卵胞期 (月経開始後 5-10 日)、排卵期 (LH サージ後 0-2 日)、黄体前期 (LH サージ後 4-7 日)、黄体後期 (LH サージ後 9-12 日) の 4 ステージで行った。なお排卵期は排卵日検査薬 (ドゥーテスト LH; ロート製薬株式会社) を用いて調べた。本研究は長崎大学医学部倫理委員会に承認され、書面による被験者の同意を得て行った。

実験は、開始する前に 4 段階の濃度に希釈した匂い物質のサンプルを嗅いでもらい、嗅覚が正常であることを確認した上で行った。匂い物質の希釈には、ジプロピレングリコールを溶媒に用いた。ジプロピレングリコールを入れたガラス瓶から 2 L/min の風量で空気を送り出し、吹き出し口に付けた漏斗から放出される匂い物質を含む空気を 30 分間椅子に座りリラックスした状態で嗅いでもらい、実験開始 10 分後と 30 分後に心理検査を行った。次に 3 % に希釈した  $\beta$  カリオフィレン、もしくはリナロールを嗅いでもらい、同様に心理検査を行った。心理検査は VAS (Visual Analog Scales) を用いて、10 分後、30 分後の溶媒、もしくは匂い物質を嗅いだ時の被験者の幸福感、親しみ、頭の冴え、やる気、疲労感、眠気の度合いの測定を行った。各心理検査の結果は、溶媒 (ジプロピレングリコール) と匂い物質 ( $\beta$  カリオフィレン、リナロール) を student t-test による統計学的有意差の有無を検定した。なお、実験中には心電図、血圧測定を行うと共に、副作用のチェックリストの記入もしてもらった。

### 3. 結果

#### 1) マウスー強制水泳試験 (抑うつ気分)

強制水泳試験の結果、シトラール群はコントロール群に比べ、無動時間が短くなる傾向が見られた (図 1)。これより、シトラールは雌マウスの抑うつ気分を軽減する作用を有することが示唆された。

#### 2) 更年期障害モデルマウスー明暗ボックス試験 (不安)

正常動物では、ストレス負荷の回数と日数により一端上昇した ACTH の分泌が徐々に減少することが報告されているが、更年期障害モデル動物は、ストレス負荷の日数に従ってさらに ACTH の分泌が増加することが報告されている<sup>8)</sup>。本実験の拘束ストレス後 3 回目において、卵巣摘除後 2 週間のマウスでは、コントロール群、拘束ストレス

群ともに明暗ボックス内での移動距離および滞在時間が、拘束ストレス後 2 回目よりも有意に長くなった ( $p < 0.05$ ) (図 2)。一方、更年期障害モデルマウスでは、このような慣れは見られなかった為、従来の更年期障害モデル動物の報告との一致が見られた。この更年期障害モデルマウスにおいて、拘束ストレス+カモミール群では、拘束ストレス後 3 回目の明暗ボックス試験で明暗ボックス内での移動距離および滞在時間が 2 回目よりも有意に長くなった ( $p < 0.05$ )。更年期モデルマウスにおいて、拘束ストレス群では拘束ストレス後 3 回目になると移動距離および滞在時間が有意に減少したが、拘束ストレス時にカモミールを曝露することで、拘束ストレス後 3 回目の移動距離および滞在時間が増加した (図 2)。一方、卵巣摘除マウスにおいては、移動距離および滞在時間を増加させる効果は見られなかった (図 2)。したがって、カモミールは更年期に由来する不安を軽減する作用を有することが示唆された。

#### 3) ヒト女性ー VAS (親しみ、やる気、幸福感、疲労感、眠気)

$\beta$  カリオフィレンを 30 分間嗅ぐことにより「親しみ」が黄体前期において有意に増加した ( $p < 0.05$ ) (図 3)。また、「やる気」が黄体後期において有意に増加した ( $p = 0.05$ ) (図 3)。「幸福感」の項目に関しては黄体前期において増加する傾向が見られ、「疲労感」に関しては黄体後期において軽減する傾向が見られた (図 3)。また、「眠気」に関しては各月経ステージを通じて変化が認められなかった。一方、リナロールを 30 分間嗅いだ場合では黄体後期において「眠気」が有意に改善された ( $p = 0.05$ ) が、情動に関する項目においては変化が認められなかった (図 3)。

### 4. 考察

今回の実験結果から、1) 柑橘系香料の主成分の一つであるシトラールは、抑うつ気分を軽減する傾向があること、2) 更年期障害の不安を軽減すると言われているローマンカモミールは、更年期障害モデルマウスにおいて明暗ボックス試験の明暗ボックス内での移動距離および滞在時間を増やしたことから、不安を軽減する作用を有すること、3) 黄体期特異的に、抗うつ効果、疲労感の改善が見られたので、 $\beta$  カリオフィレンが PMS の症状を改善する可能性があること、30 分間  $\beta$  カリオフィレンを嗅ぐことでこれらの効果をより得られること、が示唆された。

PMS はプロゲステロンの低下により引き起こされる症状であるため、また、 $\beta$  カリオフィレンはローマンカモミールの主成分のひとつでもある為、同様の機序で引き起こされるマタニティーブルーズ、更年期障害においても  $\beta$  カリオフィレンは症状の改善に効果が期待できるものと考え

えられる。 $\beta$  カリオフィレンは、嗅覚神経を介する方法によって投与できるので、短時間で効果を発揮させること、血液を介さないで肝臓や腎臓に副作用を及ぼさないこと、また、現在アロマセラピーが広まりつつあるため、嗅覚神経を介する方法は受け入れられやすいこと、という利点がある。時期が過ぎれば治るもの、と軽視されてきたこれら

の症状を緩和することは、今後女性の QOL を向上させる上で重要と考えられる。また、 $\beta$  カリオフィレンを各種化粧品用の香料として用いることで、普段の化粧品を使用しながら、PMS 等の症状を緩和するといった多くの女性を対象にした機能性香料の開発が可能であると考えられる。

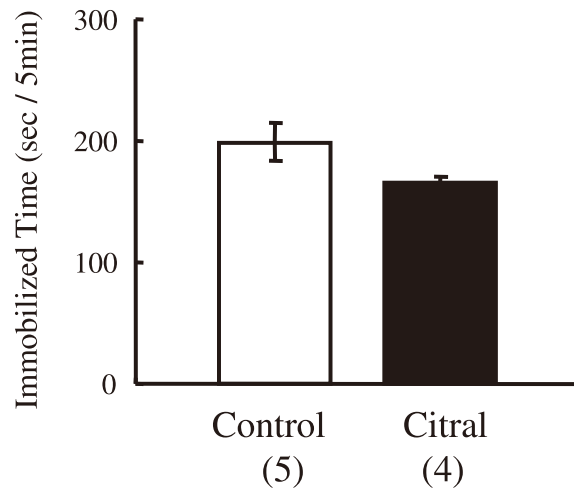


図1 強制水泳試験による無動時間の測定

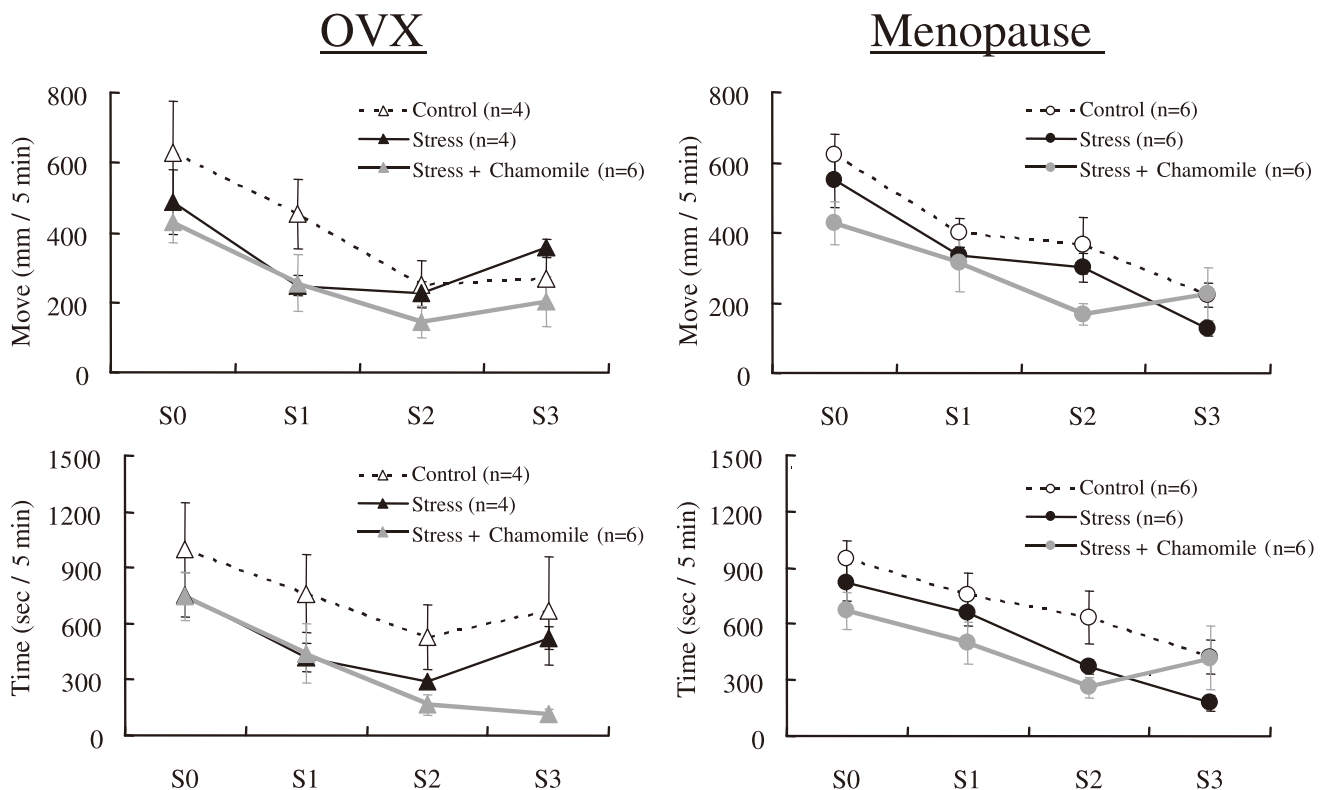


図2 明暗ボックス試験による明ボックス内での移動距離および滞在時間の測定

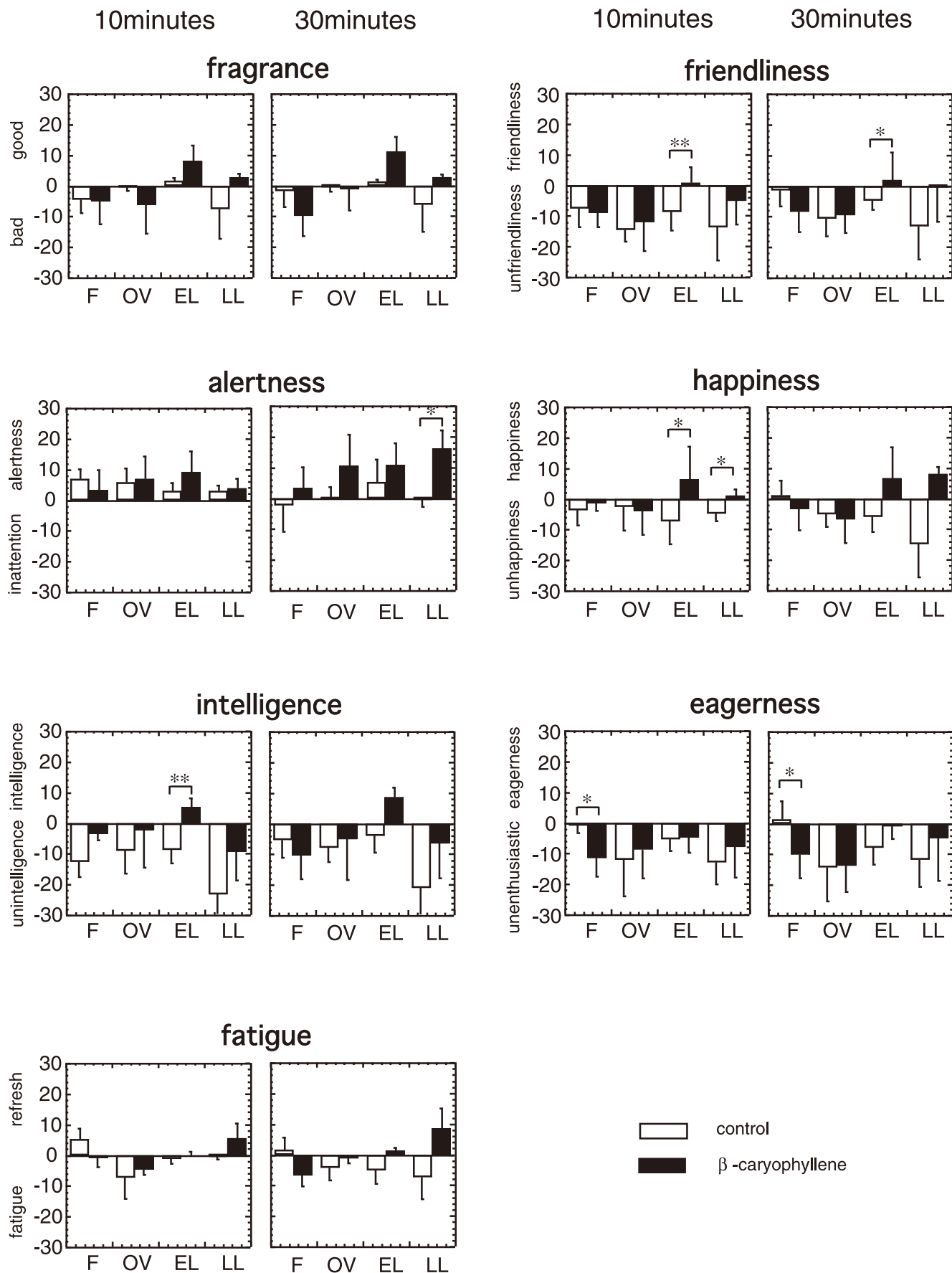


図3 月経ステージ毎の  $\beta$  カリオフィレンの作用

表1  $\beta$  カリオフィレンおよびリナロールの作用

|                     | $\beta$ -caryophyllene |            | linalool   |            |
|---------------------|------------------------|------------|------------|------------|
|                     | 10 minutes             | 30 minutes | 10 minutes | 30 minutes |
| <b>fragrance</b>    |                        |            |            |            |
| F                   | 0.95                   | 0.42       | 0.79       | 0.89       |
| OV                  | 0.54                   | 0.87       | 0.54       | 0.45       |
| EL                  | 0.28                   | 0.11       | 0.11       | 0.13       |
| LL                  | 0.31                   | 0.33       | 0.27       | 0.93       |
| <b>friendliness</b> |                        |            |            |            |
| F                   | 0.77                   | 0.10       | 0.39       | 0.26       |
| OV                  | 0.78                   | 0.50       | 0.65       | 0.69       |
| EL                  | 0.03 **                | 0.06 *     | 0.83       | 0.74       |
| LL                  | 0.15                   | 0.56       | 0.84       | 0.21       |
| <b>alertness</b>    |                        |            |            |            |
| F                   | 0.50                   | 0.69       | 0.29       | 0.60       |
| OV                  | 0.80                   | 0.37       | 0.20       | 0.42       |
| EL                  | 0.21                   | 0.14       | 0.80       | 0.34       |
| LL                  | 0.79                   | 0.06 *     | 0.23       | 0.34       |
| <b>happiness</b>    |                        |            |            |            |
| F                   | 0.69                   | 0.51       | 0.64       | 0.43       |
| OV                  | 0.69                   | 0.75       | 0.17       | 0.31       |
| EL                  | 0.06 *                 | 0.21       | 0.89       | 0.90       |
| LL                  | 0.07 *                 | 0.16       | 0.49       | 0.90       |
| <b>intelligence</b> |                        |            |            |            |
| F                   | 0.17                   | 0.63       | 0.57       | 0.37       |
| OV                  | 0.56                   | 0.85       | 0.41       | 0.47       |
| EL                  | 0.05 **                | 0.13       | 0.52       | 0.48       |
| LL                  | 0.36                   | 0.53       | 0.82       | 0.88       |
| <b>eagerness</b>    |                        |            |            |            |
| F                   | 0.06 *                 | 0.06 *     | 0.78       | 0.11       |
| OV                  | 0.31                   | 0.91       | 0.65       | 0.82       |
| EL                  | 0.88                   | 0.13       | 0.16       | 0.14       |
| LL                  | 0.48                   | 0.68       | 0.54       | 0.61       |
| <b>fatigue</b>      |                        |            |            |            |
| F                   | 0.29                   | 0.12       | 0.97       | 0.19       |
| OV                  | 0.61                   | 0.33       | 0.07 *     | 0.47       |
| EL                  | 0.53                   | 0.15       | 0.74       | 0.75       |
| LL                  | 0.31                   | 0.30       | 0.99       | 0.36       |

## 5. 総括

アロマセラピーは、植物の精油をマッサージや入浴に用いたり、蒸発させたものを吸入することによって、精油の癒す性質を活用する療法である。アロマセラピーという言葉葉を初めて用いたのは、フランスの化学者ガットフォセで、1920年代に精油の薬効を研究した人物である。植物の精油は古今の様々な文化において身体だけでなく心や感情に働きかける療法に用いられてきた。今日再び植物の精油を用いたアロマセラピーに対する関心が高まりつつあり、家庭でも気軽に用いられる程である。また、医療施設においても植物の精油が持つ痛みの緩和や抗うつ作用などを利用した代替医療を取り入れ始めている。しかしながら、効用は経験に基づくものであり、基礎医学研究による裏付けがあまりない。一方、本研究は、PMSの症状を軽減すると経験的に言われているアロマセラピーの精油のうち、イランイランに注目し、その主成分である $\beta$ カリオフィレン(単一物質)がPMSの症状を緩和する作用を見出した。したがって、嗅覚系を介した単一物質による特異的な作用という点に、従来のアロマセラピーにはなかった新規性がある。

嗅覚情報は脳新皮質を介さず、直接、情動の中核である脳辺縁系や本能(摂食、睡眠)やホルモンの中核である視床下部に inputs する。その為、匂い物質は経口、経静脈、経皮的ルートを介さない新しい向中枢神経系薬物として発展しうる可能性があり、今後、様々な分野に広く応用されていくことが望まれる。

### (参考文献)

1) Shinohara K., Morofushi M., Funabashi T., *et al.*,

Axillary pheromones modulate pulsatile LH secretion in humans. *Neuroreport*. 17, 893-895 (2001).

2) Shinohara, K., Morofushi M., Funabashi T., *et al.*, Effects of 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol on the pulsatile secretion of luteinizing hormone in human females. *Chem Senses*. 25, 465-467 (2000).

3) Morofushi, M., Shinohara, K., Funabashi T., *et al.*, Positive relationship between menstrual synchrony and ability to smell 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol. *Chem. Senses*. 25, 407-411 (2000).

4) Umezu, T., Behavioral effect of plant-derived essential oils in the geller type conflict test in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 83, 150-153 (2000).

5) Umezu, T., Morita, M., Evidence for the involvement of dopamine in ambulation promoted by menthol in mice. *J. Pharmacol Sci.* 91, 125-135 (2003)

6) Denda, M., Tsuchiya, T., Barrier recovery rate varies time-dependently in human skin. *Br. J. Dermatol.* 142 (5), 881-884 (2000)

7) Komori, T., Fujiwara, R., Tanida, M., *et al.*, Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states. *Neuroimmunomodulation*. 2(3), 174-80 (1995)

8) 山田健二、三浦丈治、三巻祥浩、指田豊、拘束ストレス下更年期障害モデルラットの血中 ACTH に対する向精神薬と香草精油の効果、Aroma Research, Vol.1, No.1 (2000)

9) Price, S. and Price: Aromatherapy for health professionals, Hal Graphic Press, arrangement through Orion Literary Agency, Tokyo, p295 (1995)

# 記念講演

●  
平成17年度記念講演 岡野 宏  
●

## これからの MAKE（化粧）…男の顔

美粧師

岡野 宏

場所：(株)コーセー本社2階会議室

日時：平成17年11月17日(木)

本日はおめでとうございます。私の仕事は人の顔をつくるのですが、人の顔をつくりながらその気にさせるのも私の仕事なのです。長年やっていましてよく聞かれることで、そんなに人の顔ばかりつくっていて、人の顔が嫌になりませんかと必ず聞かれるのですけれども、私はきっと人間が好きなのでしょうね、嫌になったことはないのです。

でも、あまり騒がしい番組の大河とかテレビ小説とか、紅白歌合戦などにかをやりますと、静かなところに行きたくなるのです。ちょうど静かなところがあります。私が逃げ込むところがありまして、そこは、東京一静かなところで、身の危険が一番ないところ。それは総理の官邸です。そこに逃げ込むことにしております。総理の仕事の関係で、2、3時間前に必ず行きます。そして、お茶などを出していただきまして2、3時間いますと、静かな気持ちになるのです。そういう逃げ込むところがあります。

仕事上がさがして来て、優雅な気持ちになりたいなんていうときは迎賓館がございますね。四谷に、あそこに逃げ込むのです。そういう逃げ込むところを幾つもつくっておくのです。各国の王様たちが来ます。エリザベス女王からトンガの王様まで見えます。また、名もない王様が来まして、新聞にもテレビにも出ないで、また静かに去っていく方が意外と多いのです。あそこは王様と言われましても、いろんな王様が来るのです。その人たちと話していると、心豊かになり、私も豊かな気になって帰るのですけれども、どうも貧乏性なのですね、私は。そこに1週間もおりますと、また騒がしいところへすぐ行きたくなるのが私の性格なのです。

NHKで一番騒がしい、一番がやがやしているところが、一番私の好きなおところなのです。それはNHKの報道です。世界のニュースが集まってくところがあります。そこで、美容関係のことだけを私はチェックをして美容関係のニュースだけ集めております。そうしますと、世界の美容の動

きみたいなものがわかったような気になっております。世界中の美容のニュースを集めることができるのです。ことはまたパリコレとかミラノコレクション、もちろんニューヨークも東京もそうなのですが、いつもとあまりこのところ変わらないのです。三宅一生さんとかヨージ・ヤマモトとか島田順子さんなんか活躍したあのときのような派手やかなことはなくなりまして、日本人は必ず活躍しているのですが、あまり目立たないような存在です。

ヘアのほうもそうですね。ここ10年ばかりはあまり変わりません。サッスーンという方が出まして、世界中の髪型をがらっと変えましたね。ああいうことは、もうこのごろほとんど起きません。ただ、小さいニュースは年中あります。どことこの会社から新しいヘアダイができましたとか、新しい何かができました。そういえばことしの夏ごろですか、飲む毛生え薬が出ましたというニュースが飛び込んできまして、こういうものは必ずまゆつばものものが大体なのです。それで、そういう場合は出どころがアメリカなので、ニューヨークのほうに連絡するのです。そうするとニュースとして返ってくるのです。本当でした。飲む毛生え薬ができたそうです。もう皆さんも新聞やテレビで発表されたのでおなじみだと思いますけれども、日本の会社がもう特約しまして、ことしもう出るのじゃないかなんて言われておりました。ただ、副作用が強いので、お医者さんを経由しないと飲めないなんていうことになっており、そんなニュースをもらいました。

化粧品もそうですね。化粧品もメーキャップのほうも世界のニュースを集めていて、あまり変わったことってここ10年ほとんど変わっておりません。新しい口紅の色ができたとか、去年よりも何ミリか伸びるマスカラができましたとか、そういうことはあるのですが、大きい変化はないようですね、ここのところ。そんなニュースを集めたりなんかしておりました中で、一番集めにくいのが日本のニュースです。実は、日本のニュースを集める場合は、じゃ、どうしようか。駆けずり回るのもうこの年ですからしないのです。そういう場合は日本に特派員がいっぱい来ておりますね。その特派員が書いた原稿をまたカムバックしてもらうのです。その国からまた送ってもらうのです。すると、的確な日本の現状がわかるような気がするのです。日本にいと、本当に日本のことがわかりません。



Hiroshi Okano

Make Up Artist

そのように日本の現状をわかるようにしているのです。その中でもおもしろいニュースがことし2、3ありました。日本の今、化粧の世界で、男の化粧が出てきたというのがニュースになっておりました。これはたしかフランスのほうだったと思います。それと、日本の男が、おしゃれがうまくなったというのもありました。このように男のニュースが何か気になります。それで、私もちょっと思い返してみますと、こここのところ、ことしの初めころから男のおしゃれの雑誌が2、3、ポンポンポンと出ましたよね。そこに便乗してではないのですが、私も日経で男の顔学、成功の顔学ですか。ちょっと自分が書いたのを忘れちゃったので、その連載を始めました。11月から。興味のある方はぜひ読んでいただきたいと思います。男のおしゃれがビジネスものに連載されるのは初めてなのです。それが11月から始まりました。それから、東京には外国系のホテルがたくさんできてまいりました。その高級ホテルの中には、必ずエステというものがつくようになったのです。そのお客様の30%が男性だそうです。これは六本木ヒルズもそうです。それから、汐留の高級ホテルのほうもそうです。それから、町の中に男専門の美顔をやる所も大分できておまして、そういうところに行くのですけれども、何かまだ物足りないような感じがします。

それから、一番特派員の男の世界の目についたのは、ことし大分男の化粧品が売り出されました。それが特派員の目にとまった大きな原因ではないかと思っています。けれども、男の化粧というのは今始まったものではないのです。私が知っていて皆さんが知っているところだと、源氏絵巻なんかを見ますと、もう光源氏にしても貴族たちはまゆをそってまして、その上にまゆをかいています。そして、お化粧をしまして、お歯黒もつけております。このように男のお化粧はこのごろ始まったのではないのです。平家の公達も町を歩くときにお化粧をしています。そして、戦に出るときは完全に立派なお化粧をして馬に乗っておりますね。

このように男のお化粧というのは、美輪明宏さんとかピーターとかが始めたものでもないのです。相当昔からしているものなのです。それが表になったり裏になったりずっと流れてきているのです。ただ、途中ブツンととまっている間があるのです。それが明治の終わりから先ごろの昭和20年まで、この間が戦争でとまっているのです。男のおしゃれというものは女々しいという、こういう教育をしたのです。そのためにその間ブツンと切れております。ちょうどうちの父親なんかはその年代に当たっておりまして、ちょっとおしゃれを隠れてし、見つかりますと、いや、これは身だしなみだよなんて、何かちょっとかわいそうな気がしました。そのような教育を受けた人たちは、おしゃれに対してとても独特なものを持っております。戦後にな

りまして、女性たちがまずおしゃれに飛びつくのです。サツマイモをかじりながらもやっぱり真っ赤な口紅が欲しかったのですね。女の人たちが最初におしゃれに行くのです。先ごろ終わりましたアフガニスタンでの戦争、それで、一番早く手に欲しい物というのが化粧品だったそうです。市場にいろんなものがいっぱい出ました。ほかの国からどんどん入りました。その中で一番早くなくなったのは、男の人はひげを整える用具だそうです、女性の方はマスカラだったそうです。やはりおなかの飢えより心の飢えを先にとったのですね。豊かさをとったわけですよ、心の。このくらいお化粧というのは顔を塗るだけじゃなくて、もう心の中に入り込んでいるのですよね。やはりおなかを満たすよりも心を満たしたかったのですね。

戦争が終わりますと、男の社会もおしゃれがだんだんだんだん出てきます。石津謙介さんという方が、男のジャケットのデザインを始めます。VANという会社をつくりまして、アイビールックというのがつけられるわけですね。これがアメリカの若い学生のジャケットなのです。ちょうどそれを着たのが私なのです。私はそのジャケットを着まして銀座のみゆき通りを行ったり着たりしたのを覚えております。それでみゆき族なんて名前をつけられたのですけれども、その同じ時代に MG5 というのができたのです。それで、いろんな会社でいろんな男性の物が出たと思いますが、私の印象に残っているのは、あとチャールズ・ブロンソンの宣伝でマングラムというのが出ました。化粧と衣服が一緒になりまして、新聞や雑誌に書き立てられるわけですね。「男のおしゃれの時代が来た」とか、「ようやく花開く男のおしゃれ」とか、「美しい男性誕生」みたいな、こう書き立てられるのですけれども、その記事を書いたのは、男のおしゃれは女々しいと教育をされた人たちが、ちょうど編集長でありデスクであったわけですね。ですから、よく読みますと、それはおしゃれを認めたのではなかったのです。よく読みますと、必ず最後には、「男のおしゃれは、外見をきれいにするものではなくて、心をきれいにするものである」という、これは必ず書いてあったのです。華やかなのは題名だけでよく読みますとけなしてあったのです。

そんなことがありまして、時代は流れていきますと、編集長たちも変わってきます。そして、我々の世代がいすに座るわけなのですが、その中で化粧が一番変わったのは、一番女々しいと言っていた代議士さんとか政財界の方なのです。その人たちが選挙に出てきますと、そのころちょうどテレビの政見放送が始まり、外見の大事さというものがわかってくるのです。今まで女々しいと言っていた人ががらっと態度が変わりまして、それで我々が自民党から共産党まで、男のおしゃれはこうする、ああするということで飛び回って勉強会を開くのです。そんなことがありました。その人たちががらっと態度を変えたことによって、大分化

粧に関する世間の考え方が変わったように感じました。そのころはまだ女性は美しい、きれいということを目指して動いていましたよね。ところが、そのころ我々の世界では、もう男性のおしゃれはそのまま向こうの見せ方、生かし方まで行っていたのです。ですから、きれいというのは通過点に過ぎなかったのです。その向こうにある見せ方、生かし方まで男のおしゃれは行っていました。

その男のおしゃれの生かし方、見せ方のヒントになったのは、1960年、ケネディとニクソンのテレビ討論です。そのニュースをNHKで衛星放送のテスト版で中継をしました。ケネディというのは、本番前にメーキャップに先に来ているのです。テレビ写りの良いようにメーキャップしていくのです。衣装も四、五着持ってきて、その中から一番写りのいいのを着て出るわけです。そうして全部外見がで上がったところにニクソンが来まして討論が始まるのですが、その討論というのはほとんど内容は、どちらがいいとかどちらが悪いということにはなかったそうです。テレビ写りのその差が票にそのまま出たのです。それでケネディが大統領になるわけですね。アメリカ人格好い男がケネディになるわけなのです。それから、新聞の見出しというものは、化粧の差でケネディは勝ちました。それを見て日本の議員さんたちが、また外見の大事さというものがわかってくるわけなのです。そのころのおしゃれな人といいますが、アメリカはケネディです。ヨーロッパといいますがギリシャのオナシスという方がいました、格好い男として。そしてもう1人いたのです。それは音楽の帝王カラヤンです。この3人が世界のトップの格好い男として君臨していたのです。それで、その中の1人と私が仕事をします。それがカラヤンなのです。最初に私がカラヤンに会ったとき、ぱっと見まして第一印象はええっという感じだったのです。何でこんな真っ白けのじいさんがと思ったのです。全然魅力がなかったのです。よぼよぼぽかったのです。もうちょうど今の私の段階で、よぼよぼぽいのを全部受けているのですけれども、そんな私みたいな感じでした。よぼよぼだったのです。一つも魅力がないのです。

そのカラヤンがきのうまでベルリンでレコードの収録をされていて、そのまま自家用ジェットで羽田に着きまして、それで羽田からNHKに来るわけなのですが、それにしてもくたびれ方がちょっと違うなというぐらい老けて見えました。けれども、1時間半かけがらと変わりました。その1時間半というのは、準備を始めるのは1時間半前から始めるのです、カラヤンは。まず両手を蒸します。蒸してマッサージをします。そして、指の先まできれいに磨きます。その次が頭に行くのです。女性と同じようにカーラーを巻くのです。その後ドライヤーをかけます。そしてきれいに流れをつくって、スプレーでかちかちに固

めてしまうのです。その後、私が出番になるのですが、やろうと思ったらやれないのですね。その前にやはり顔も蒸すのです。そして蒸気を当てます。それで、魔法の瓶みたいな薬を顔に塗りましてマッサージを始めるのですね。そして、それをとりまして私の番にようやくとなるのです。私がカラヤンのベースを塗るときは、3種類使いました。ベースとシャドーとハイライト、これはもう皆さんが使っている物と同じ物なのですが、カラヤンの色に合わせてオーケーをとったものを塗りました。目鼻立ちをつくっていきます。そして、最後はしわを1本1本筆で埋めていくのです。細かいしわを全部、50本から100本近く、全部筆で埋めていくのです。それでカラヤンの顔が何となく、ああ、そうだったのかな、やっぱりこの人カラヤンかなというぐらいになります。

それで、作業が終わります。頭と顔と手が終わったわけです。そして、あとは衣装を着るだけなのですが、私が去ろうとしましたら、ちょっと待ってくださいと。きれいにした頭を全部ブラッシングしてしまうのです。壊してしまうのです。そこには理由があったのです。ブラッシングをされていて、カラヤンがブルブルブルブルッと首を振るのです。また上下に振るのですね。これは舞台に出て指揮をするときに髪の毛が揺れます。その計算がどのぐらいちゃんとなっているかというのを調べたのです。また、指を指しますと、その美容師さんがブラッシングをするのです。それで振るいまして、きれいになびいてもとに戻りますと、それがオーケーなのです。このようにして、やはり細かい計算が成り立っているのです。それが見せるカラヤンなのですね。あと舞台の袖で10分前に着てくださいと言われるわけです。その間カラヤンは衣装を着るのですが、衣装を着たら舞台に出て帰るまで絶対に座らないそうです。その衣装というのは、立ってスタイルをよく見せるための衣装なのです。ですから、座る衣装ではないそうです。ですから、カラヤンというのは立って格好がいいのだなんて思いながら見ていたのです。

私は15分前に舞台の袖に行くのです。等身大より一回り大きい鏡が備えられておりました。そして、その周りにはライトがついております。その明るさというのは、舞台の明るさと同じ明るさなのです。お客さんが舞台で見るカラヤンの同じ明るさを舞台の袖につくってあるのです。ですから、カラヤンがそこに立ちますと、お客様が見るそのスタイルと同じスタイルのカラヤンを見ることができるわけですね。そのような状態のところカラヤンがやってきます。やはり座りません。立っております。私が最後の直しをするわけなのです。そのときにつやがないと言う。つやがないと言われて道具を渡されたのが、このぐらい小さい入れ物だったのですが、あとそれと日本のはけでした、漆のはけでした。それを持ちまして、先ほどもう聞いてお

りましたその箇所につやを出すのですね。若さのつやを入れていくのです。それがパウダーなのです。そのパウダーというのが、ほどよく光るようになっているのですね。そのパウダーというのは何でできているかというと、日本の真珠の外側の膜だそうです。それを集めたのです。100個、200個集めても少しの量にきりならないそうです。ですから、ものすごい値段の粉ですよ。それをちょっと塗りますと、本当に人間のつやと変わらないような色合いになります。私たちは、若い人を老け役にするときは粉をいっぱいたたいてしまいます。その逆で、若く見せるときはほどよくつやを出します。その状態と同じ状態をカラヤンはつくったわけです。それで、大体全部が仕上がりました。私たちは一歩下がります。1人の女の子が出てきて、シュッシュシュッシュと何かをまくのですね。それがにおいなのです。レモンのにおいでもないし、バラのにおいでもないし、じゃこのにおいか、いろんなにおいがまざっているのですけども、そのにおいというのは、カラヤンの気持ちがハイになるためのにおいなのだそうです。そのにおいをシュートとまきました。そばにいた私は、ハイにはなりませんでした。

ですから、それはやはりカラヤンに合わせたにおいなのですね。カラヤンがぐっと気持ちを高めるためのにおいなのだそうです。そして、周りの電気がぱっと消されます。そうすると、カラヤンと鏡だけが浮かび上がってくるのです。そうするとカラヤンは、その自分の姿を鏡の中に上から下までずっと確認をします。ちょうどガマの油みたいなのですよ。そのように上から下まで見ます。それは確認ではなかったのです。自分の外見に酔うためだったのです。そのスタイルを自分で見て、酔っているのです。その次に、じっと顔を見るのです。そうしますと、顔がピンク色に変わってきました。そして、もう少し強くぎいっと最後のにらみをカラヤンはするのです。そうすると、がらっと変わるのです。あの私たちがテレビで知っているカラヤンにがらっと変わるのです。そして、ポンと舞台に出るのです。ですから、私たちはよく話に聞いていたのですけど、内面は外見に作用する、外見は内面に作用するというのを聞いておりました、深い関係にあると。それをカラヤンは実行で見せてくれたのです。私はそういうことに初めて立ち会いました。それで、舞台の客席のほうにカラヤンのマネジャーに引っ張られていくのです。客席のほうから見ますと、本当に私が知っている、新聞や雑誌で見るカラヤンのスタイルになっているのです。やはり外見というもの、メーカーキャップというものは大事だということがわかりました。

そして、それを見ていた日本の指揮者がいます。最初から私が担当している山本直純さんでした。山本さんがまだ皆さんの山本さんではないころ、まだNHKに出始めて、まだ自分のイメージができていないころ、それでどうしよ

うかというのでカラヤンを見に来たわけなのです。それで、私の考えとちょうど彼の考えが一緒に、自分らしさをここでつくろう。格好いいのは絶対負けると。そのころは黛さんや格好いい団さんがいましたからね。それに負けてしまうから、自分らしさを出そうと。ちょっと土臭さを出そうというので、ぼさぼさの頭にしました。それまではちょっと格好よくしていたのです。彼なりに。ところが、ぼさぼさの頭にしまして、カラヤンのまねをし、指揮をするとちょっと揺れるような、1つぐらいカラヤンをとろうというので髪の毛だけとりました。それで、あとはひげを生やし、まゆもやぼったく整えたのです。全体的には田舎のおじさんの雰囲気でした。その田舎のおじさんの雰囲気をつくったので、あの寅さんの主題歌ができたのですね。格好よくしていたら、きっと寅さんの主題歌はできていなかったかと思います。

このように外見と自分の内面というのはとっても大事なものです。ことしの2月、クリントン大統領が日本にきました。朝日新聞のほうから電話が来まして、クリントンが回顧録を出して、朝日新聞が売りに出しましたので、その記念で来ますけれどもお会いになりますかということで、私はホテルオークラに会いに行きます。次の部屋からクリントンが出てくるのですけども、その出てきたときに「あっ」という言葉を私は言うってしまうのですね。そのあつというのはその前に、もう大分前なのですから、カーターさんとお会いしているのですね。大統領をやめてちょうど1年ぐらいたったときですか、もうそのころは大統領の雰囲気は全然ありませんでした。もう田舎の牧場のおやじさん、そういう感じでした。ちょうどやめてから1年ぐらいたったときなのですね。それで、1年たつとこういうふうに違うのだと思うぐらい全然違っていました。鼻の頭とほっぺが赤かったのです。それは牧場焼けか酒焼けか、ちょっと私は見分けがつかなかったのですけども。でも、私はどちらかというと大統領のときよりもその顔のほうが好きでした。とっても人間くさくてよかったのですけども、そのカーター大統領の1年後の顔を見ているから、クリントンはもうやめて3年以上、足かけ5年ぐらいたっているのです。それで出てきたクリントンが、全然大統領のときから変わっていないのです。それで、「あっ」と言ってしまったのです。後で記者の方たちと何で変わっていないのだろうという話になったのです。それで、何でなんだろうねなんて話した結果が、奥様を大統領にするまでは、大統領の雰囲気を壊さないほうが絶対得ですよ。それを考えたらしいのです。それで、クリントンはそれを維持しているのです。

それも大変なことなのです。向こうの部屋から出てきたドアがちょうど30センチぐらいあいていたのです。そのドアの向こうに、やはり同じ大きさの鏡があったのです。

カラヤンと同じぐらいの鏡でした。きつと鏡に向かって背広を着ます。大統領時代の背広の雰囲気のものでした。頭の形も全然変わっておりませんでした。そして、その外見をつくって、きつと鏡の前にカラヤンみたいに立ったのでしょね。そして、自分の気持ちをあの大統領の気持ちにぐっと押し上げて我々の前に出てきたのではないかと思ったのです。それで、後でクリントンさんに聞いたのです。なぜいつまでもそんなに変わらないのですかと聞いたのです。そしたら、このごろは記者の人たちに追っかけられなくなりました。それとスキャンダラスなことはしなくなりましたとおっしゃってありました。

しゃれた返事が返ってきたのです。このように外見をうまくつくる見せ方、生かし方、それとお化粧を高く評価してくれた日本の方もいらっしゃいました。それはホンダ自動車の本田宗一郎さんでした。本田さんというのは変わり者だと皆さんの印象があると思うのですが、変わり者でした、ええ。私たちは外見のおつき合いなのですから、おしゃれも普通偉くなりますと、皆さんですとちゃんと紺なりなんりのウールのスーツなりを着ますよね。ところが、本田さんというのは、あまり着ないのです。平気で会合やなんかでコットンのジャケットなんかを着ていくのです。本田さんがなぜそういう格好をするかということを新聞社に聞かれたときに、若い格好をすると若い気持ちになるからだと答えるのですけど、それは間違いないと思います。本田さんがアメリカでオハイオ州のコロンバスというところに工場を建てるのです。そのオハイオ州の工場の視察に行き、時間のあいたときに、オハイオ州の大学で心理学の勉強をしているのです。そして、外見と内面の違いみたいなことを勉強していたのです。何で勉強しているのだろうと。ただ、私はおしゃれが好きだからだよなんておっしゃっていましたが、そうじゃないような気がします。

本田さんは、最初は二輪車で世界を制覇しますね。ところが、四輪車に変わるときに、やはり世界のホンダになれば四輪車には手を出さないというようなことを考えていたそうです。ところが、エンジンのいいのができるわけですね。そして、本田さんも、じゃ、やろうかということになりまして四輪の世界に入るのですけれども、いいエンジンを認めさすにはどうしようか。それで、じゃ、ヨーロッパのすごいレースにぶつけようということで、最初はとてもだめだったそうですね。それが3位になり、2位になり、1位になりまして優勝するわけですね。日本で初めてF1か何かで、僕はちょっとそこは詳しくないのですけど優勝するのです。優勝は確かなのですけど、優勝します。ところが、本田さんは、その1回の優勝ではまぐれだって人に言われるのが嫌だったそうです。それで、もう1回優勝しなければ四輪車に動かないと言い出したのです。技術

者たちは、もう一段階上のヨーロッパのレースに出すわけですね。それも優勝させてしまうのです。そして、日本で四輪の生産を始めるのですけれども、売り出しました。お金の関係は本田さんは全然だめだそうです。お金の計算やなんかをする社長さんがおりまして、四輪車が出てすぐもうかっているのだそうです。ところが、本田さんはいまいち乗れなかったそうです。世間の騒ぎ方が足りなかったのだそうです。もっと騒がれると思ったらしいのです。あまり本田さんが思うような動きにはならなかったのです。

ある時、社長室から外を見ていまして、ホンダの会社ですからホンダの車がずらっと並んでいますよね。そこにずっと1台格好いい車が入ってくるのです。それでおりたのが、自分の会社のいつも知っている女の子が乗ってきちゃったのです。それで、本田さんが、何でうちの会社の車に乗らないのだと。そしたらその女の子は、私は別に速く走ろうとか性能がいいとかというのは私には関係ないと言うのです。外見がよければいいと、スタイルがよければいいの、そんな1位とか2位とかスピードを競う車は私には関係ないですと言うのです。それで、本田さんがふと自分の考えていたことと同じところに一致して、それからエンジンとともに外見の大事さを持ってくるわけなのです。

本田さんが会うたびに、私の仕事とあなたの仕事と同じだよとよくおっしゃるのです。それは、私が担当しております吉永小百合さんというのは、きれいにを見せてくださいねと絶対言わないのです。私らしくしてくださいねと言うのです。吉永さんらしさというのはどういうことかと言うと、吉永さんの内面がうまく出す事。今までお化粧していたのを1引き、2引き、引き算を始めるのです。それで、吉永さんの内面がずっと出やすいようにしてあげたのです。ですから、色物は口紅ぐらいきり使っておりません。あとベースとまゆをしっかりとその分カバーできる完全なものをつくってあげればいわけです。その顔が吉永さんなのです。そういう話を本田さんによくしておりました。

希林さんも同じなのですね。樹木希林さんもどういうふうに売ろうか。デビューのときからずっと一緒だったのですけど、彼女は頭がよくて、もう何十年も前からトップを走っております。トップと言ってもうまいトップの来かたです。お正月になるとポーンと出て、またへこんだり、上がったししながらずっと寿命の長い女優さんでいます。そのよさというのは頭のよさなのですね。その頭のよさをどういうふうに見せようかなと。希林さんをつくれば、意外と美人の一番下ぐらいには行きそうな気がするのです。ところが、それをやめました。それで、希林さんらしさを出すには、また希林さんの頭のよさを出そう。それは流行を追わないことではないかということになりまして、じゃ、流行を追わないということは、お化粧をしないことではな

いのです。お化粧をしないように見せるお化粧をしようということになったのですね。やはり年になればそれなりにいろんなカバーをしなければなりません。そのためにお化粧をしたと見せないようにしましょう。ですから、今でも希林さんは、私は普段お化粧しないわよと言っているのですけれども、お化粧しております。ですけれども、それは見えないようにお化粧しているのですね。流行を追ってしまいますと、その流行が去ってしまうと、その女優さんも一緒に去らなければならないのです。そんなにうまく世の中渡れる女優さんはおりません。

ですから、流行を追う女優さんというのは、そのままずっと流行とともに去ります。それを逃れているのが、吉永さんであり樹木希林さんなのですね。そういうことを話していますと、本田さんが同じだと言うのですね。やはり内面がどんなによくても、それを外にうまくあらわさなければだめなのですね。内面と外見のバランスというものはとても大事なもののなのです。ですから、そのようなことをよく駆け出しのプロダクションで話すのです。なかなかわかってもらえなくて、厚化粧のタレントさんがいっぱい出ていますけれども、本当の美しさというのはどういうものかというものをもう1回考えていただくのです。ここで男のお化粧に戻りたいと思います。このごろ若い男の子たちで気になることはありませんか。

実は高校野球を見ますと、細いまゆのこう上がったまゆがテレビ中継なんかで出てきますよね。とっても気になります。あの細く上がったまゆというのは、私たちはどういうところで会ったかと言いますと、それは暴走族がそういうまゆをしておりました。それから、ヤンキーと言われる男の子たちがいます。コンビニなんかの前でまたを広げてたばこを吸って、捨てて、吸っては捨てて、その子たちが細いまゆをこう逆立てているのですね。それは人を威嚇するためにそういうまゆをつくっているわけです。人から怖がられるためのまゆ、自分の存在感を示したかったわけです。そのためのまゆなのです。ところが、高校生たちはまたちょっと意味が違います。細くて上に上がったそれは、高校生だけではないのです。箱根駅伝の大学生までそうなのです。それから、国体の男の子たちにもおります。

それから、世界陸上がこの前ありました。私は外国の特派員と見ておりました。中国の人と韓国の人と日本人が予選のとき駆けます。昔は顔の見分けができなかったのだそうです。やはりそれは無理ですよ。我々だってわからないときがありますよね。この人は韓国の方かな、この人は中国の方かな、何となくわかりますけれども、何となくわかりません。そういうのが現状ですね。ところが、その特派員はわかると言うのですね。日本人の陸上の選手というのは、大体おかしいまゆをしているのが日本人の選手だと言うのです。本当にそうなのです。100メートルで、ちよ

と名前は忘れましたが、おもしろい、おかしいまゆをしている人を皆さんも気づいていると思います。いい記録を出した方なのですけども、そのようにまゆをつくっております。じゃ、何でそういうまゆをしているのでしょうか。今おかしいその細いまゆは、彼たちのバイブル的存在である漫画の本、それからアニメ、今の漫画の主人公たちはまゆが細くて上がっているのですね。昔の主人公たちというのは「巨人の星」の星飛雄馬とか。「あしたのジョー」の矢吹丈とか、力石徹とか、まゆが太くて男らしかったですね。このごろのまゆは、ここに見本がありますけれども、「スラムダンク」とか「バガボンド」のヒーローたちはまゆが細く上がっているのです。皆さんに渡した写真のそのとおり、それはその強く格好いい主人公にあやかりたい、そのようになりたいというのでスポーツ界ではそのようなまゆをつくってしまったのです。ですけれども、そのまゆというのは、私たちはもう先に嫌な印象があるわけです。やぐざの、チンピラなんかはやはりまゆが上がっております。そういう悪い印象がそのまんま細いまゆで上がっているまゆには出ております。この子たちは違うのです。やはり漫画の主人公に似て強くなりたいという目的ですからちょっと違うのです。それは彼たちの世界に切り通用しないものですね。

世間一般にテレビに映り出すと意味が変わってきます。でも、そういうことを彼たちはまだわからないのです。ですから、どれが正しくどれが正しくないということがわからないのです。そのまゆのまま海外に選手で行きます。サッカーの中田なんかがそうですね。細いまゆ海外に出ました。そして、自分の存在がおかしいなと気がついたのです。それから、何カ月かたちまして日本に帰ってきました。そのときのまゆはもう太くなっておりました。それはイチローも同じですね。日本にいるときはちょっと細かったのです。ところが、シアトルに行きまして、やはり周りの環境がそれはおかしいということを知らせてくれたのです。それでまゆがおかしくないまゆに変わったのです。じゃ、外国ではこのまゆ、上がったまゆはどういう意味を持っているかという、皆さんご存じのようにドラキュラやなんかは全部まゆが上がっていますよね。悪い印象なのです。ドラキュラとか怪物は、みんなまゆが上がったり細くなってきました。その印象が外国にはあるのです。ですから、外国に行つてあの細いまゆをしていたならば、悪い印象なのは当たり前なのです。でも、それは注意をしてあげなければわからないのです。私たちが若者たちと話しますと、ああ、そういうことだったのかとわかります。その注意をされない地方の男の子たちはそのまんま細いまゆでまだいます。今年の春から高野連、高校野球連盟は、その細いまゆと茶髪を禁止しました。それはNHKもちょっとかんでいるのですけど、画面上やはり学生らし

くないし、スポーツマンらしくないですね。それでやめてもらったのですが、地方の人たちは、じゃ、やめろと言ったからといって、どういう格好をすればいいのかわからないのです。やめろと言っただけでは無責任過ぎます。それを直していくのはだれがするべきなのでしょう、ということなのですが、皆さんはどうお考えでしょうか。

やはり私も直すほうの役で、この前も名古屋のトヨタ関係の男性だけのところになぜか呼ばれることが多いのですが、男の子たちも正しいまゆのカットの仕方から、まゆのあり方、格好いいまゆのつくり方のその向こうの見せ方、生かし方までちゃんと指導しますと、素直に我々の年齢の者まで全部メモを始めるのです。それは部下たちが、1人おかしいのがいるとチームワークができなくなるというのです。それで、正しいまゆを教えたいというので、そういう講習会がだんだん開かれております。そのために、私となるだけなら男の人優先に話をしに行っているのです。正しい男の肌のつくり方とか顔のつくり方は、やはり化粧品会社と我々で直していかなければいけないのじゃないかと思うのです。いかがでしょうか。難しいところなのだと思います。

見せ方、生かし方はとてもまたうまい方がいらっしゃいます。川端康成さんという作家なのです。何で川端さんが見せ方、生かし方がうまいかといいますと、私はメーキャップなのですと川端さんがおっしゃるのです。えっ、川端先生、何でメーキャップなのですかと言いますと、川端先生は「雪国」などを書くときに想像します。「伊豆の踊子」でも想像するそうです。それで、ストーリーができましたら主人公をつくります。主人公をつくる時に、この子は目が大きいか、ちいちゃいかな、それからまゆはどんなまゆなのだろう、顔は面長なのだろうか、自分で想像するのだそうです。これできっと赤い口紅をつけると何か印象が変わるかな。自然の色をつけようかなと、自分の小説の主人公を全部頭の中でメーキャップをするそうです。そうしてドラマをつくっていくのが川端先生なのだそうです。それで、私はメーキャップをしますよなんていうことを話しておりました。

それから、松本清張さんという方が、NHKの清張シリーズというものに出ることになりました。ヒッチコックがよく昔出ていましたね、テレビや映画に、そのように本当は出したかったのです。わからないように出したいのですけど、ヒッチコックはどこにでもいる真ん丸なおやじさんですから、通行人で出ればわからないのですけど、清張さんの顔はそうはいきませんよね。あの顔は通行人ですと通ってもぱっと目立ってしまいます。ですから、どうしようかと考えたのです。ああ、あの印象的な唇を消しちゃおうということになったのです。それにはどうしようか。ひげをつけることになったのです。清張さんもオーケーをし

てくれました。それで、ちいちゃいひげ、格好いいひげ、それと中ぐらいのひげ、それと清張さんに本当はつけてもらいたかったのは大きいひげで、唇が半分ぐらい隠れるひげなのです。それで、最初それをつけたのです。大きいひげを。どうでしょうかとつけたのです。そしたら、ぱっと見てブツととってしまいました。こんな三枚目みたいなのは嫌だと言うのです。じゃ、清張さん、どれがお好きですかと言ったら、一番格好いいクラーク・ゲブルみたいなひげをつけたのです、ここに。ああ、これ、おれに似合うよと言うのです。私たちちょっと黙ってしまったのです。そして、清張さん、それに気がつきまして、でも君たちというのはこれをつけたいのだよねと。そんな話になって、じゃあというので清張さんが考え始めてしまったのです。清張さん、考えておいてくださいねと言って、山崎努さんのメーキャップに参りました。そして、頭と衣装の相談とかいろいろ相談しまして、2、30分かったと思います。帰ってきたら、まだひげの前でずっと見ているのです、清張さんは。やはりそのぐらい外見てとっても気にするのです。幾つになっても、どう見せたいかというものをちゃんと持っている人なのです。これは川端康成さんにしても、それから遠藤周作さんにしてもそうです。

遠藤周作さんはよくメーキャップするときに、きょうは先生どうしましょうかと言うと、格好よくしてくれと言うのです。あるときは、きょうはどうしましょうかと聞いたなら、五木寛之さんみたいにしてくれと言うのです。あの人は、顔で何部かおれよりも余分に本が売れているからああいうふうにしてくれと頼まれました。はい、わかりました。これが五木寛之かと言って、そうですと言ったら納得していきました。幾つになっても外見というものは、だれでも大事にするものなのですね。

日本人の一番いい顔色に合う色はこういう色だよと女性と話していたのです。それが女性の肌の色はサーモンピンクが一番日本人に合うのです。ピンクを着たいのですけども、きれいなピンクは着られません。我々黄色人種ですから。ピンクにサーモンのオレンジ色を混ぜるのです。そうすると日本人の肌に一番合うのです。きれいなピンクは、白人用なのです。白人の肌にとっても合います。それをちょっとくすんでオレンジ色にしますと日本人の肌にしっとりくる。それを遠藤さんが聞いていまして、ニュースの焦点のときに、NHKの廊下というのは200メートルぐらいあるのですけども、向こうから派手な背広を着てくる人がいるのです。遠藤先生で、サーモンピンクの背広をつくってきちゃったのです。それで、ちょうど森繁久弥さんと番組を一緒にしておりまして、あれ、似合うって言うのです。役者でも15分アップになんかしてもらえない。ところが、NHKのニュースやなんかは「視点・論点」というのは15分ぐらいアップになります。それを持ちこたえるのは話と

あの背広の色だよなんて森繁さんはおっしゃっていました。そのように遠藤さんというのは素直に聞いてくれるのです。外見と内面をととても気にする方でした。

時間が来たようですけれども、私の仕事というのは、顔をつくっているようで実は内面をつくっているのじゃないかと思います。

# コスメトロジー研究雑感

平成 15 年度 研究助成

## ヒアルロン酸研究とコスメトロジー

戸井田 敏彦

私がヒアルロン酸の研究に手を染め始めた 1980 年代の初めは、ヒアルロン酸は非常に高価で、研究室の先生方の顔色をうかがいながら試薬の注文を行っていた。その後、化粧品、医薬品あるいは健康食品としての需要が高まるにつれてヒアルロン酸の価格も下がり、今では食品添加物としていろいろな食品に用いられるほど廉価になった。

一方、関節炎の治療あるいは眼外科領域で医薬品としてのヒアルロン酸の有用性が認められ、さらにはヒアルロン酸が細胞の分化・誘導など様々な生命現象に関わることが次々と明らかになってきており、現在世界中が注目する高分子材料の一つとなっている。化粧品の分野でも、単に保湿性に富む化粧品材料としてだけでなく、“機能性化粧品”としてのヒアルロン酸は魅力的な素材であるに違いない。効能・効果を謳いすぎると法律上問題があるためか、“ひじ、膝の痛みが気になる方”、“小じわ、皮膚のたるみが気になる方”が、ヒアルロン酸を健康食品あるいはサプリメント

ントとして摂取する機会も多いらしく、その市場は急激に拡大しているという。

ヒアルロン酸が生体内で重要な役割を担っていることは間違いのないとしても、ヒアルロン酸のあまりに急激な化粧品・健康食品・サプリメントとしての普及は、心配の種でもある。というのもヒアルロン酸は、かつて化学的に非常に不安定な高分子として認識されており、天然のヒアルロン酸が分解して生成する低分子化ヒアルロン酸は、様々な生物活性を示すことが明らかになってきている。化粧品としてだけでなく、医薬品としてのヒアルロン酸の用途は現在広がる傾向にあり、今後さらに応用研究は進展することと確信しているが、ヒアルロン酸の安定性などに関する基礎研究は、今後もおろそかにされることがないよう心より願っている。

今後益々のコスメトロジーの発展をお祈りします。有難うございました。  
(千葉大学大学院薬学研究院)

平成 15 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

佐藤 次雄

セリア系無機系紫外線遮蔽剤の開発に携わることになり、コスメトロジーという学問に関係するようになりました。私は、それまで長年ソフト溶液反応による無機微粒子の形態制御と機能性の高度発現について研究しており、粉体の焼結性の改善、光触媒活性の改善、酸化還元触媒活性の改善など、主にエネルギーと環境浄化に関する無機材料を取り扱っておりました。紫外線遮蔽剤の開発では、それまでの研究とは逆に酸化触媒活性や光触媒活性の低減が必要とされる点が新鮮に感じられました。セリアの酸化触媒活性の低減では、セリアの結晶構造の安定性を改善することが有効と考え、予想通りカルシア固溶によりセリアの酸化触媒活性が低減できたのは感慨深いものでした。なお、この研究で当初予想していなかったカルシア固溶によるセリアの微粒子化や、仮焼によるセリアの白色化等の現象も見出すことができましたが、良く考えてみるとこれらの現象も全て結晶化学的に説明可能であり、無機構造化学

の奥深さを実感致しました。また、化粧料としての無機系紫外線遮蔽剤には紫外線遮蔽能とともに肌上での感触が重要であり、粉末の形態・凝集制御や表面処理技術の重要性を改めて認識できました。なお、最近ではナノ粒子の体内への取込み等も懸念されるようになっておりますが、幸いセリアは体内に取込まれても健康阻害は認められないようです。

これまで化粧品として利用されている無機化合物はあまり多くありません。これは、性能と安全性を両立できる化合物が少ないためですが、多様な無機化合物の中にはまだまだ有用な物質が潜んでいると思われます。私どもが今回取り扱った雲母状チタン酸等もその一つではないかと期待しておりますが、今後さらに無機化合物のパノスコピックな形態制御の研究により、人間の美容と健康に貢献できる材料を開発していきたいと考えております。

(東北大学多元物質科学研究所)

## アパタイトの魅力とコスメトロジー

相澤 守

まず、私の申請課題「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」を平成 15 年度コスメトロジー研究振興財団研究助成に採択してくださったことに感謝申し上げます。ちょうど、明治大学に移動して研究室の立ち上げに奔走していた時期で貴財団からの助成は私にとって精神的に（もちろん金銭的にも）大きな励みになりました。心より御礼申し上げます。

さて、私は無機材料合成の立場からアパタイトの研究を進めています。アパタイトは非常に興味深い物質で、我々の骨や歯と非常に類似した結晶構造をもっています。そのため、骨や歯の代替材料として整形外科や歯科領域で積極的に用いられていますが、実は体の部位によってアパタイトの配向性は異なってきます。アパタイトは私の研究報告の図 1 に示したように、*a* 面と *c* 面という 2 つの結晶面を持ちます。骨は *a* 面が多く露出した構造で、歯のエナメル質は逆に *c* 面が多く露出した構造をとっています。ジュースを飲んだときなど少し時間が経つと口腔内の pH が下がってきますが、*c* 面のアパタイトは溶けにくい性質なので

歯はすぐに溶けたりはしません。一方、骨は体内で破骨細胞という細胞に溶かされて、さらに骨芽細胞が骨を作るということを繰り返していますが、その際には溶けやすい *a* 面が多く露出している方が体にとっては都合がよいわけです。我々の体のなかのアパタイトは実に適材適所でその構造を変えて機能しています。

私はそのようなアパタイトの性質に非常に興味があり、合成だけでなくアパタイトの結晶面と骨芽細胞との相互作用を調べる研究も行なっていますが、アパタイトというやはり骨や歯の代替材料というイメージが強く、コスメトロジーの分野で大いに活用されているという話はあまり聞きません。アパタイトは人類が長い年月をかけて選び抜いた素材であり、現存する材料のなかでアパタイトよりも生体適合性に秀でたものはほとんどありません。近い将来、生体適合性アパタイトがコスメトロジーの分野で大いに活用されることを祈りつつ、私もこの分野の発展に微力ながら貢献していきたいと考えています。

(明治大学理工学部応用化学科)

## 熱応答性インテリジェント高分子とコスメトロジー

宮崎 正三

本研究は、これまで私共が実施してきたインテリジェント高分子 (PLF-127 及び GXG-TG) の熱応答性ゲル化を利用した医薬品製剤に関する研究をさらに発展させて、これらの熱応答性ゲル化の特性を利用した各種化粧品素材を開発するものです。PLF-127 及び GXG-TG は、低温ではゾル、体温ではゲル化する極めて興味ある性質を有しているにもかかわらず、その化粧品素材への応用研究はほとんど実施されていません。

「皮膚で固まる（ゲルとなる）新タイプの液体化粧品」を皮膚やしわの深いところに適用すると、皮膚やしわの深部にまで到達します。体温ではゲル化し、化粧品成分の浸透性や皮膚の保湿力を制御することが可能になります。また PLF-127 及び GXG-TG は水溶性であるため、使用後は水洗で簡単に除去することができます。これらはいずれも毒性が少なく、かつ皮膚に対する刺激性がないことを確認

しています。特にキシログルカンは天然多糖であり、低濃度（1-3% w/w）で熱応答性ゲル化を生じるため毒性がなく、ヒトにやさしい化粧品素材として今後の発展が大いに期待されます。

この熱応答性ゲル化の特性を利用すると、化粧水や美容液のスキンケアのための基礎化粧品の親水性基剤として、コスメトロジーの領域でその特徴を活かした新たな展開が期待できます。熱応答性ゲル剤を用いた新規液体化粧品の開発は、スキンケアすなわち「肌の保護や予防」にも寄与できます。また、日焼け、光老化、皮膚癌などの予防を目的とした sunscreen (UV filter) の新規素材として、あるいは発毛剤や発汗防止剤などにも有用なことが期待されます。

近年、その粒子径がナノメートル領域（10 ~ 1,000nm）のナノカプセル子が、各種領域で注目されています。すでに、ナノカプセルを用いた化粧品も開発されています。ナ

ノカプセルは、サブミクロンサイズのため角質層・粘膜層に浸透して化粧品成分を放出する可能性があるので、皮膚に浸透しにくい化粧品成分の吸収改善も期待できます。そ

こで、ナノカプセルと上記熱応答性ゲル剤を組み合わせることにより、化粧品成分の吸収をさらに促進・制御する試みも行っているところです。（北海道医療大学薬学部）

平成 15 年度 研究助成

## コスメトロジーの視点から見た本研究の展開

妹尾 政宣

私とコスメトロジーとの出会いは私が英国リバプール大学でシニアリサーチアシスタントとして職していたときにお世話になったコスメティックカンパニーとの共同研究に遡ります。そのときは化粧品科学の新規性と未来への意外な展開構想に驚かされました。今回、助成を頂いた研究題目は「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」です。近年、シリコンやその機能性ゲルはコスメトロジーの分野では添加剤から必要不可欠な基材へと移り変わり、べたつきがなく、さらりとした使用感の化粧品原料として、光沢や気体透過性、撥水性などの優れた性質とともに注目を浴びています。このような性質と同時に、コスメトロジーの分野において大事なことはシリコンが生理的に不活性であることです。しかしながら、実際の配合になりますと水に分散させるだけでなくエタノールなどの有機溶剤を用いることになります。本研究の超臨界二酸化炭素（ $^{\text{sc}}\text{CO}_2$ ）を溶媒として用いる提案は有害な溶媒を使用せず各種基材を均一に配合させることが出来るのではないかと思います。一方、 $^{\text{sc}}\text{CO}_2$  溶媒に

よりシリコンを *in situ* でゲル化させる技術は環境にも配慮した今後のさらなる展開が望まれると思います。また、架橋点間距離を狭めることにより比較的形狀が保たれたゲルが合成できました。 $^{\text{sc}}\text{CO}_2$  溶媒中で発生した内部のポーラスな気孔はシリコンゲルに更なる機能化のための反応場を提供することになると期待しています。研究の展開の中で立体規則性炭化水素であるシンジオタクチックポリスチレンとシリコンとの均一な溶液からの熱可逆的なゲル化に成功しました。炭化水素系化粧品原料とシリコンとの相溶性の悪さを考えますと興味ある結果だと思います。さらに  $^{\text{sc}}\text{CO}_2$  による溶媒の効率的な抽出により、こちらでもまたナノポーラスな相溶ブレンドゲルが得られました。以上、コスメトロジーの問題点のいくつかを解決できそうな構造を有する新材料が得られたと自負しております。本研究助成を頂いたコスメトロジー研究振興財団に心から感謝いたします。今後のさらなるご発展を祈念いたします。

（京都大学化学研究所高分子機能化学研究領域）

平成 16 年度 研究助成

## コスメトロジーを支える界面材料

老田 達生

男性まで「お化粧」をする人が増え、昨今では「お化粧」しないことの方がマイナーになったと思われる（私としては受け入れがたいが）。その「お化粧」を支える化粧品も、皮膚科学の進歩とともに、飛躍的に進んでいる。その化粧品の成分で必須の存在が「界面材料」（界面活性剤、両親媒性化合物とも言う）であり、水以外では最も多い成分であることがほとんどである。極言して「化粧品＝界面材料」と言いたい。それにもかかわらず、一般消費者（特に主たる消費者の女性）が持っておられる界面材料のイメージは良くない（ある人には毒とまで言われた）。界面材料を合

成し、その物性を検討している研究者にとって、実に寂しいことである。

ナノマテリアルの研究が急速に進み、それが化粧品に応用されるようになっていく。高倍率の顕微鏡でやっと見えるナノ粒子のサイズが均一かどうかを、我々の目で「しっとり感」など、「サイズ」とは異なる感覚量でナノマテリアルを評価しているとのことである。その人の能力の奥深さには驚かされる。その一方でそのナノサイズのコントロール、すなわちナノマテリアルを支えるのが界面材料であることにも、もっと感嘆の声をあげていただきたい。その

ために、新しい化学構造を持つ界面材料の開発やその応用についての研究に取り組んでいる。そのような新規界面材料はどうしてもコストが高くなるので、より高度の機能を要求する医薬用や化粧品用の界面材料をターゲットとするのがよい。その意味でも「コスメトロジー」の発展は欠かせない。もっと高度な機能を要求していただき、それに何とか応えていきたい。

しかし、界面材料がいくら高機能になっても、キャッチフレーズに「界面材料」の言葉は考えられない。やはり「縁の下」の力持ちの地位は抜け出せないか。抗うことなくその地位を真面目に全うし、「知る人ぞ知る」で満足するべきか。悩ましいところです。

(京都工芸繊維大学工芸学部物質工学科)

平成 16 年度 研究助成

## コスメトロジーと医食同源

石原 浩二

近年、コスメトロジーは、化粧品や香水という嗜好品の立場から、食品や医薬品、さらには健康・福祉に至るまで大きな広がりを見せ、大学における重要な研究テーマの一つとなっている。私の専門は「酵素化学、応用微生物学」であるが、「新たな生理機能を付加させることを目的とした新規化粧品素材の酵素的分子創製」というテーマで研究課題提案したところ、コスメトロジー研究振興財団より研究助成を賜う機会を得て、自分の研究に広がりを持たせることができた。この場をお借りして心から感謝申し上げたい。

さてここで、私の所属する大学の学科と、ある先生を紹介したい。岡山理科大学理科学部の臨床生命科学科は、「医食同源」というキーワードを軸に、人の健康と食品、化粧品、医薬品の全てを一元的に捉え、有用な生理活性成分の

医薬品への応用、新規サプリメントの開発、未知の有用な生理機能性物質の探索などを目標に、平成 16 年春に設立された新しい学科である。この学科には、「浜田博喜博士」という全国的にも有名な教授が在籍している。

浜田教授は臨床生命科学科の初代学科長であると同時に、「大学発バイオベンチャー企業」を手がけ、これまでに安定な CoQ<sub>10</sub> のサプリメントの開発に成功している。昨年は、沖縄の地域特産品を利用した新規化粧品開発に力を注ぎ、長命草（サクナ）のエキスを利用した化粧水やクリームの商品化に成功し、昨年末より、浜田教授が社長を務める(株)バイオ・タキソールより販売されるに至っている。今後も精力的な研究を行い、付加価値の高い、予防医学的な観点からの新規化粧品が開発、販売されることを期待してやまない。

(岡山理科大学理科学部臨床生命科学科)

平成 15 年度 研究助成

## 白髪治すことができる化粧品・機能性食品の開発

加藤 昌志

日本人の生活が豊かになり、美容に対する関心がますます高まっている。インターネット等を用いて調べると世の中には白髪治療に対する有効性をうたった多くの薬物があふれている。しかし、これら薬物には科学的根拠に乏しいものが少なくない。結局、最も有効な白髪治療は白髪染色剤ということになり、これを越える有効な白髪治療剤は開発されていないのが現状である。この原因の一つとして、白髪を自然発症する動物モデルは世界的にみても極めて限られていることが挙げられる。動物実験を介した科学的な手法に基づいて白髪治療薬を開発することが極めて困難な

状況なのである。筆者は、「加齢とともに白髪を自然発症するモデル動物」の新規樹立に成功した。この動物モデルを使用することにより、動物レベルでのスクリーニングを施行し、食品として摂取または頭髪・頭皮に塗布等の方法により、白髪の発症予防や、すでに発症した白髪を黒髪に還元できる保健機能食品や化粧品を開発することができるかもしれないと期待している。この共同開発に参画していただける企業があれば、筆者としては望外の喜びである。

(中部大学生命健康科学部生命医科学科環境衛生学)

平成 15 年度 研究助成

## 肌の栄養

古瀬 充宏

現在、体脂肪の蓄積量に関しては大きな関心が寄せられている。特に痩身願望が強い場合には、サプリメントを経口摂取することで目的を達成しようとする動きが近年増加傾向にある。体脂肪の減少は、内臓脂肪のみに留まるとは考えにくい。現時点におけるサプリメントの体脂肪減少効果は、Body Mass Index や「体脂肪率」という大まかな指標における数値に依存している。過度にダイエットをすることで肌の艶や張りは失われ、かさかさの状態になる。これを補うために皮膚の表面に保湿剤や栄養素入り化粧品を使用しても、長時間うるおいの保った状態を持続させることができず、肌の状態をより悪化させることもある。そこで、ダイエット効果を有する成分を摂取した場合の皮膚の状態を観察することで、その利点や欠点を見いだし、体の内面から皮膚の状態を改善することを目標に掲げてきた。肥満に関すれば、最も敵対視されるものが食用油

脂である。ところが、油脂の中にもダイエット効果を有するものがある。それが、共役リノール酸である。共役リノール酸は、リノール酸と同様に炭素数は 18 で、二重結合も 2 つ有する。しかし、二重結合の位置とシス型 (c) とトランス型 (t) の位置関係がリノール酸とは異なる。元々、共役リノール酸には皮膚ガンの予防効果などが示唆されていたが、経口摂取すると皮下組織の層が薄くなることを確認した。その原因の一つは、共役リノール酸により脂肪細胞の容積が小さくなることであった。また、共役リノール酸が皮下組織に取り込まれやすいことも確認している。アトピー性皮膚炎に効果があるとされている  $\gamma$ -リノレン酸と共役リノール酸を同時に摂取しても共役リノール酸の効果は失われないことも判明した。今後は、共役リノール酸を用いて様々な角度から皮膚状態の改善を目指していきたい。(九州大学大学院農学研究院)

平成 15 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

田所 丈嗣

大学を卒業した昭和末期と比較すれば、人々の美容分野に対する認識は大転換を遂げたように思われる。当時は、一部の専門家を除いた医療従事者の間にさえ「美容」という言葉に否定的な感情を抱くものもあったが、現在に至ってはエステからプチ整形まで百花繚乱の様相を呈している。しかも、相変わらずデパートのフロアには広大な化粧品売り場が存在し、ドラッグストアのタイムセールには人だかりが出来ている。傷跡やシミ、あざ、ホクロをきれいに治したいと受診する患者数がここ数年大きく減少したと言う実感もない。この変化は日本人の意識の米国人化に起因するのだろうかなどと社会学者風に自分勝手に結論づけていたりする。しかし、外来語の取り込みに長けた日本人が「コスメトロジー」という言葉をもものにする前に、世間が「美容」という言葉に対する違和感を多少とも喪失してしまった事に関して個人的にはいささか残念でもある。確かに「コスメ」「コスメティック」などの言葉も多

用されるようにはなったが、従来からの「美容」という言葉に込められたものが全て内包されているとは思えない。現状では、本来の化粧品という意味以外では、なんだか美しくなりそうと云うイメージを誘起させる飾り言葉として一般には認識されていないようである。しかしながら、「コスメトロジー」は「美容」という言葉にまわりついてきたある種の負のイメージを完全に払拭し、かつ、科学的なデータに基づく学問であるとの認識が得られる言葉となる可能性を秘めている。コスメトロジーをまず言葉として日本に定着させるためには、美容が花盛りのこの状況こそまたとない機会ではないだろうか。「コスメトロジー」という言葉が手垢にまみれる前に、好ましい感情をもって広く世の中に受け入れられるための活動も重要であると確信している。

(独立行政法人国立病院機構大阪医療センター

皮膚科・形成外科)

## コスメトロジーと活性酸素

藤井 順逸

私が大学の卒業研究以来携わってきたカルシウム・筋肉から、まったく異なる領域にある活性酸素・SODの研究に移り15年になります。ポスドクとして留学中の身分のため、「日本でポジションを得るためにはテーマを選び好みできる身分ではない」と自分に言い聞かせての帰国であり転身でした。それから機会あるごとにこのテーマから抜け出し、面白いテーマはないか模索してきました。それが、いざ独立して自分の好きなテーマを選べるようになった今も活性酸素・SODの研究を続けている自分が不思議でもあります。その理由として、『老化』といった生命科学に残された未解明な現象に活性酸素が深く関わっていることがあると思います。酸化を起こす毒であった酸素を使ってエネルギーを引き出すことが、生命の進化と人類の反映を可能にしたわけですが、同時に負の財産とも言える活性酸素との戦いも始まりました。これまでの研究は活性酸素＝悪者、皮膚では老化の原因という考えが一般的であり、

おそらく活性酸素の作用の大半を正確に説明していると思われる。

しかし、使いようによっては活性酸素も有効な道具となりうるものが次第に分かってきました。カルシウムは大量では細胞に毒なので細胞内は低く保たれている、だからこそ刺激が来た時にシグナルとなりえます。同様に、活性酸素は反応性が高いため毒性が強いのですが、その反応性の強さをうまく利用すれば、例えば好中球の殺菌作用のように活かすことが可能です。活性酸素研究は、生物が活性酸素をどのように利用しているかを解き明かす段階に来ているかもしれません。この度のコスメトロジー研究では、従来からの活性酸素＝悪者といった観点からの研究しかできませんでしたが、今後は活性酸素の生理機能に焦点を当てた研究ができないものかと考えております。

(山形大学大学院医学系研究科生命環境医科学専攻)

## コスメトロジーとフェロモン

柏柳 誠

化粧とは、言語以外の手法で他の個体に情報を伝える手段と考える。伝えたい情報は、自己主張であろうし、自分の魅力を異性、同性に伝えるものであろう。ここで用いられる感覚情報は、視覚および嗅覚を介して伝達される。動物の究極的な目標は、自分の子孫を残すことである。ヒトは、自分の遺伝子を子孫に残すために、ジムに行って体を鍛えたり、エステに行って本来持っている美しさを磨いたり、美容整形を受けて人工的な美を身につけたりして、自分がいかに魅力的であるかを主に視覚に訴える。まれに、ホリエモンのようにお金の力に頼る場合もある。化粧は、単に視覚に訴えるだけでなく、匂いを介して嗅覚系に訴える力も有している。デパートに入った瞬間に襲ってくる化粧品売場の強烈な嗅覚攻撃は、強すぎるためにへきへきとしてしまうが、ほどよい香りはその人物の魅力を際立たせてくれる。動物の場合は、自分が交尾相手として優れていることを主に匂いで伝えている。我々は、齧歯類のオ

スは自分が優れた交尾相手であることを自らが放出するフェロモン活性を強くすることにより伝えているのを見いだした。このような力をもったフェロモン・匂いがヒトにも存在するのであろうか。惚れ薬を作り出す努力は、長年続けられているが、現在に至るまで有効な効果を有するものが見つかっていない。しかし、これからも見つからないと悲観することはないと思える。今までの評価方法は、あまり、科学的とは言えないと思われる。ヒトでのフェロモンの効果は、おそらく弱いものだろう。このような場合、評価条件をより、整える必要がある。細部まで入念に実験準備をすれば、人類の夢の一つである惚れ薬を手に入れることが出来る可能性があると考えている。ただし、動物で見られるほどに、その効果は劇的ではなく、その他の面で魅力をもったヒトにのみ有効であろう。

(旭川医科大学生理学講座神経機能分野)

平成 15 年度 研究助成

## 骨かくす皮

許 南浩

「骨かくす皮には誰も迷いけん 美人というも皮のわざなり」

これは一休禅師と親交のあった蜷川新右衛門（親当）の歌だそうである。これに対して、一休禅師は、「皮にこそ男女のへだてあれ 骨にはかわる人かたもなし」と返した。たかが皮一枚とは言うものの、皮膚のもつ意味は重いのか軽いのか、誠にその含むところは深い。

皮膚に関わる疾患は、直接命に関わる度合いが低い（少なくともそう考える人が沢山いる）こともあって、医学分野では軽視されがちであった。まして美容となると、ちゃんとした病院で美容整形科をもつところは最近まで殆どなかったことから伺えるように、医学の領域に入るのかどうかさえも微妙であったといえよう。しかし、例えば片方の腎臓失ったり人工肛門を持つことに比べて、顔面の皮膚に欠損や深刻な異常がある場合に起こる社会生活上の困難

さはまさるとも劣らない。骨どころか肉にも全く問題がないのに、皮に異常があるだけで、多くの人は迷い、そのために当事者は甚だしい苦痛を受けるのである。医療が自らの価値観から出発してその活動内容を決めるのではなく、人々の願いに応えることにその活動の原点をおくなら、美容も含めて皮膚の問題は決して軽々に扱うべきではないと言えよう。

コスメトロジーは、美しく装う術という意味だそうである。日本古来の茶道、華道は、定まった所作を守ることを通じて精神を磨き上げてきた。美しく装うという技術は、上記のような病的皮膚をもつ人の QOL の改善に大きな貢献をするばかりでなく、広く一般の人に形をとおして精神に凛とした筋を通す。人間は、他人の皮にも自分の皮にも迷う存在なのである。

（岡山大学医歯薬学総合研究科）

平成 16 年度 研究助成

## 本研究成果のコスメトロジーへの応用を夢見て

福田 光則

私がメラニン色素の輸送に興味を持ち、本格的にメラノソーム輸送の分子メカニズムの解明に取り組みはじめたのは 2002 年頃のことです。この当時は純粋に学問的な興味で研究を行っており、メラノソーム輸送は私の中ではオルガネラ（細胞内小器官）輸送機構解析のモデルシステムという位置付けでした（他のオルガネラと異なり、黒いメラノソームの動きは普通の明視野顕微鏡で観察することが可能です）。2004 年末に、Rab27A, Slac2-a, myosin Va, Slp2-a によるメラノソーム輸送の分子メカニズムの解明にはじめて成功し、当初の目的は達成された訳ですが、この解明した分子メカニズムを利用して何かもっと応用的なことはできないかという気持ちが湧いてきました。メラニン色素と言えば「美白」という言葉に代表されるように化粧品と密接な関連があります。私なりに美白剤と言われる化粧品の作用機序を勉強してみたところ、そのほとんどがメラニン色素を合成するのに重要な酵素チロシナーゼの

活性を阻害していることが分かりました。上述の Rab27A, Slac2-a, myosin Va を欠損することにより発症するヒト遺伝病 Griscelli 症候群の患者では、メラニン色素の合成には全く影響がなく、メラノソームが輸送されないために髪の毛や肌の白色化が起こります。つまり、メラニン色素の合成では無く、輸送のレベルを阻害しても美白を保つことが理論的には可能と考えられます。「メラニン色素輸送を抑える新しい化粧品の開発」という夢物語を描いていた折、コスメトロジー研究振興財団の研究助成金の募集を知り、早速応募させて頂きました。現在の研究は Rab27A・Slac2-a・myosin Va 複合体解離の分子メカニズムというかなり基礎的なものですが、将来的にはここで得られた知見を何らかの形でコスメトロジーに応用できればと思っています。

（独立行政法人理化学研究所福田独立主幹研究ユニット）

## コスメトロジー雑感

椎木 弘

私は古いクルマが好きなのですが、運転しているときよりも洗車して WAX をふき取った瞬間が非常に好きです。古い車ですのでよく壊れますし、めっきパーツは磨いてもなかなか曇りが消えません。しかし、前のオーナーが大事に乗っておられたそうで、そういった話を聞くと、ぶつけた傷跡も少し愛おしく感じられます。また大学で始めたバイオリンも、オールドで前のオーナーのつけた傷やニスの斑もひとつの個性でした。そちらも腕に磨きをかけるという本来の目的よりも楽器に磨きをかけるほうが熱心でした。しかし、物は新品のときは同じ商品であれば個性があってもはならない場合がほとんどで、その機能は一律にみなせますから、個性を見出す場合、その所有者の手入れの状態、使い方にのみ依存します。しかし、人間の場合、いわゆる先天的な性質ですでに個性を有しておりますし、さらに食事や風習など生活習慣により後年に影響します。今回助成して頂いた研究は生活習慣病に関連するものですが、体の

発するさまざまなシグナルを読み取ることは、エンジンオイルの交換などのように「3000km または 3 ヶ月が交換時期です」といったように一律でなく、個人差があるため、自分の体を客観的に知る必要があります。そういったシグナルを皮膚から読み取ろうというのが私の試みなのですが、皮膚の状態はさまざまな生活習慣により影響を受けます。食事、気候、さまざまな風習など長い歴史の中で民族の違いとして生じている皮膚の色や機能の差は、人類の誕生から言えば後天的ですが、現代の私たち一人ひとりが誕生する際は、先天的な相違とみなされますし、またその中でも個体差を持っています。ですから、研究はまず私たちの小さな研究室からはじまり、日本人、東洋人、そして世界中の人たちについて展開したいと思っています。やりがいのあるそして夢のあるテーマですが、クルマはなるべく新しくて手がかからない方が良くように最近思えてなりません。（大阪府立大学先端科学イノベーションセンター）

## 産婦人科とコスメトロジー

小林 浩

私は産婦人科の臨床医であり、過去 25 年間にわたり、早産予防やがん転移予防の基礎的・臨床的研究を行ってきた。ヒト羊水から抽出した物質（ビクニン）と出会ってから、抗炎症薬、早産予防薬、がん転移抑制薬の開発を行ってきた。関連協力企業や TLO のおかげで基礎研究所とも共同研究を行うことができ、いずれも臨床応用可能な段階にまできている。

過去に、ビクニンの本当の作用を知りたくて、ビクニンノックアウトマウスを用いた研究を行ったが、ビクニンがなくても早産することはなくちょっとがっかりしたことを覚えている。しかし、ビクニンノックアウトマウスは炎症に極端に弱く、例えば、LPS を注射するとほんの少量で

も死んでしまう。したがって、炎症などの特殊な環境におかれたときにのみ作用するのがビクニンであり、正常状態ではビクニンがなくても何事も起こらないのである。

その後も炎症に興味があり、ビクニンを用いた数々の研究を行い、紫外線照射による炎症予防、歯周病予防などの開発にも従事している。最近の研究は、ナプキンかぶれを防ぐために 1 ミクロンのシルク粒子にビクニンを固相し、これをナプキンの不織布の表面にコーティングしたものを試作している。産婦人科の全ての分野がコスメトロジーと密接に関連しているのである。今回はこの研究で申請したいと考えている。（奈良県立医科大学産婦人科）

平成 15 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

大泉 康

古来、人類は自然界の植物や動物を栄養源として食し、生活してきた。また、健康を害した時には、先人が得た膨大な経験則（知識）を元に、植物や時には動物を薬として利用してきた。このような人類の経験から「医食同源」、「薬食同源」の考えも生まれてきたものと推測される。これら人類の経験・知識は後世に継承され、現在でも世界各地に独特の土着文化とし息長く根付いている。例えば、今回研究に用いたマンゴスチーン果皮は、タイやインドネシア等の東南アジア地域の先人の知識に基づいて、この地域で抗アレルギーおよび抗炎症作用を示す民間薬として長年用いられてきたものである。マンゴスチーン果皮抽出物やそのほかの実に多様な天然物に関する薬理学的研究を通し

て、それらの作用が科学的に証明されるのを目の当たりにすると、先人の知恵の合理性や確かさ・偉大さに改めて感銘を覚えるのは、はたして私一人だけであろうか？

最近医療の現場でも、漢方薬が難治疾患、特に高齢者特有疾患の治療に必須な治療薬として見直されている。私たちの研究室では、アトピー性皮膚炎等に用いられる漢方薬（生薬）の有効性と作用メカニズムを生化学的・分子生物学的手法を駆使して解明する研究を推進しているが、このようなアプローチが今後コスメトロジーの発展にも多大な貢献をするものと確信している。

（東北大学大学院薬学研究科）

平成 15 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

岩瀬 真生

顔の魅力の生物学的価値とは何であろうか。サルからヒトへの進化の過程を考える際に、顔の美醜というのはどのような意義があるのであろうか。外敵からの防御や食料の獲得といった野生の環境の中で生存の確率を高める役割は残念ながら顔の美醜とは無縁であろう。サルにおいて顔の果たす直接的な役割は、群れの中での非言語的なコミュニケーションの発信である。コミュニケーションを効率よくするためには、相手にわかりやすい表情を作る能力が重要で、顔の形態そのものはかならずしも重要でないようにも思える。しかし顔の形態によってはより豊かな表情を作りやすい顔とそうでない顔があるのかもしれない。そうだとすればある特定の顔の形態に強く魅力を感じるということに生物学的な合目的性が生じる。このように顔の魅力はより多くの異性を獲得する機会と密接に結びついて、よ

り多くの子孫を残すことになったのだろう。こうした過程を経て、顔の魅力および顔の魅力を検出する能力が進化の過程を経て磨かれ、ヒトに受け継がれてきたのであろう。この能力の原型はおそらくは生得的に備わっているものと思われる。生後まもない赤ん坊でも、ヒトの顔の表情に敏感に反応し、養育者の笑顔には笑って応えるし、怖い顔には泣いて反応するからである。化粧によりヒトの顔の魅力を増すことはそうした進化の過程に挑戦する試みと言えるのかもしれない。もし化粧により素顔の美醜を完全に克服することができたら、顔の魅力はそれ以上進化しなくなってしまうのだろうか。もっとも厚化粧を見破る能力のほうにさらに発達するだけの気もするが。

（大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室）

## コスメトロジーと嗅覚研究

篠原 一之

最近、疾患の性差が注目され、内科的疾患に対して性差を考慮した診断・治療を行う女性外来が話題を呼んでいます。しかし、まだ女性のメンタルヘルスについて本格的に取り組んでいる病院はあまりありません。一方、私たちは現在、匂い物質の中枢における作用について、また、作用後の内分泌様態への影響について研究を行っているのです。匂い物質や嗅覚の科学を女性のメンタルヘルスに応用したいと考えていました。

今日再び植物の精油を用いたアロマセラピーに対する関心が高まりつつあり、家庭でも気軽に用いられる程になったと思います。アロマセラピーは、植物の精油をマッサージや入浴に用いたり、蒸発させたものを吸入することによって、精油の癒す性質を活用する療法であり、古今の様々な文化において身体だけでなく、心や感情に働きかける療法に用いられてきたと言われています。また、医療施設においても植物の精油が持つ痛みの緩和や抗うつ作用などを

利用した代替医療を取り入れ始めています。しかしながら、効用は未だに経験に基づくものであり、基礎医学研究による裏付けがあまりないのが現実と言えます。そこで、私たちは従来の経験に基づき、女性の不定愁訴を軽減すると言われてきた精油に注目し、その単一主成分にも同様な効果があるかを調べたいと考えました。単一主成分で効果があることがわかれば、様々な分野に広く応用ができると考えた為です。嗅覚情報は脳新皮質を介さず、直接、情動の中枢である脳辺縁系や本能（摂食、睡眠）やホルモンの中枢である視床下部に入力すると言われています。その為、アロマセラピーの精油から同定される単一主成分物質は、経口、経静脈、経皮的ルートを介さない新しい向中枢神経系薬物として発展しうる可能性があり、今後、新たな化粧品の開発といった、コスメトロジー分野にも広く応用されていくことが望まれます。（長崎大学医歯薬学総合研究科）

# 付 録

●  
事業報告書（平成17年度）

役 員  
●

## 事業報告書

(自平成 17 年 4 月 1 日 至平成 18 年 3 月 31 日)

## 《研究助成等の選考関連》

|      |    |     |              |                                                    |
|------|----|-----|--------------|----------------------------------------------------|
| 2005 | 5  | 6   | 公募開始         | 全国 265 ヶ所の大学・病院・研究機関等、関係学術雑誌 8 誌、当財団 HP 他 2 HP に掲載 |
|      | 7  | 1   | 公募締切り        | 応募数 103 件                                          |
|      | 9  | 8   | 選考委員会（分科会 1） | 素材、物性に関する分野の選考                                     |
|      | 9  | 6   | 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  | 5   | 選考委員会（分科会 3） | 精神、文化に関する分野の選考                                     |
|      | 9  | 21  | 本選考委員会       | 各分科会の結果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 | 17  | 表彰贈呈式        | 記念講演：「これからの MAKE（化粧）…男の顔」<br>美粧師 岡野 宏氏             |
|      | 11 | 17～ | 助成課題の公表      | 関係学術雑誌 7 誌、当財団 HP に掲載                              |
| 2006 | 2  | 中旬  | 持ち回り企画委員会    | 平成 18 年度の研究助成課題選考に関して                              |

## 《理事会関連》

|      |    |    |       |                                                                        |
|------|----|----|-------|------------------------------------------------------------------------|
| 2005 | 6  | 17 | 通常理事会 | 平成 16 年度事業報告ならびに収支決算報告、株主としての議決権行使について、報告事項                            |
|      | 11 | 17 | 通常理事会 | 平成 17 年度（第 16 回）研究助成者等の承認、<br>平成 18 年度事業計画及び予算案の承認<br>事務所所在地の変更等に関する承認 |

## 《評議員会関連》

|      |    |    |        |                                                                        |
|------|----|----|--------|------------------------------------------------------------------------|
| 2005 | 6  | 17 | 通常評議員会 | 平成 16 年度事業報告及び収支決算報告、報告事項                                              |
|      | 11 | 17 | 通常評議員会 | 平成 17 年度（第 16 回）研究助成者等の承認、<br>平成 18 年度事業計画及び予算案の承認<br>事務所所在地の変更等に関する承認 |

## 《その他》

|      |    |    |             |                                         |
|------|----|----|-------------|-----------------------------------------|
| 2005 | 3  | 末  | 財団活動の情報更新   | 当財団 HP へ平成 17 年度事業計画を記載                 |
|      | 6  | 末  |             | 当財団 HP へ平成 16 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」13 号の概要を当財団 HP に記載         |
| 2004 | 5  | 20 | 基本財産        | 保有株式が無償分割により 961,425 株から 1,057,567 株へ   |
| 2005 | 5  | 20 | 基本財産        | 保有株式が無償分割により 1,057,568 株から 1,163,323 株へ |

## 第 16 回 研究助成を受けられたかたがた

(J：一般研究助成)

| 管理番号    | 研 究 課 題                                            | 分 野             | 代 表 研 究 者                              |
|---------|----------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------|
| J-05-01 | コラーゲンに正しい構造をとらせる、HSP47誘導剤の発見                       | 細胞生物学           | 熊本大学大学院医学薬学研究部教授<br>水 島 徹              |
| J-05-02 | 化粧意識についての日仏文化比較研究<br>ーフランス・ディスクール分析の観点からー          | 比較文化学           | 大阪大学大学院言語文化研究科<br>博士後期課程院生<br>石 丸 久美子  |
| J-05-03 | メラニン生成阻害作用を有する環状ジアリルヘプタ<br>ノイド類の美白効果と発がん予防効果に関する研究 | 生薬学             | 星薬科大学生薬学教室教授<br>森 田 博 史                |
| J-05-04 | ヒト由来の生体素材を用いたテラーメイド型化粧品<br>基材の創出                   | 生体材料工学          | 信州大学繊維学部感性工学科<br>教授<br>藤 井 敏 弘         |
| J-05-05 | プロスタグランジンD2受容体を標的とした皮膚アレ<br>ルギー性炎症治療法開発            | 皮膚免疫学           | 東京医科歯科大学大学院助教授<br>佐 藤 貴 浩              |
| J-05-06 | ヒト汗に存在する核酸分解酵素を含有させた化粧品<br>や医薬品軟膏が有する生理作用や薬理作用の推定  | 生化学<br>分子遺伝学    | 島根大学医学部法医学教室教授<br>竹 下 治 男              |
| J-05-07 | 色素細胞幹細胞の制御による白斑症治療モデルの開<br>発                       | 幹細胞生物学<br>発生生物学 | 岐阜大学大学院医学研究科教授<br>國 貞 隆 弘              |
| J-05-08 | 脂質を中心とした非蛋白抗原に対する皮膚免疫応答<br>機構の解明とその制御法の確立          | 皮膚免疫学           | 京都大学ウイルス研究所教授<br>杉 田 昌 彦               |
| J-05-09 | 「聞香」による香りの言語化プロセスと脳内情報構造<br>化機能の解明                 | 神経科学            | 理化学研究所脳科学総合研究セ<br>ンター研究員<br>椎 名 さやか    |
| J-05-10 | 化粧品の香料がヒト自律神経系に及ぼす生理学的効<br>用の研究                    | 神経科学            | 藤田保健衛生大学医学部助教授<br>河 合 房 夫              |
| J-05-11 | Apollonによる細胞老化の制御機構                                | 細胞生物学           | 東京大学分子細胞生物学研究所<br>助教授<br>内 藤 幹 彦       |
| J-05-12 | 安定分散かつ耐熱性を併せ持つ酵素担持ナノ粒子の<br>設計                      | 材料設計学           | 筑波大学大学院数理物質科学研究科教授<br>長 崎 幸 夫          |
| J-05-13 | 骨髄由来表皮細胞の分化ならびに遊走機序の解明                             | 再生医療<br>皮膚科学    | 北海道大学病院助手<br>阿 部 理一郎                   |
| J-05-14 | 白皮症の病因遺伝子の解明とその遺伝子産物のメラ<br>ニン色素生成における機能解析          | 皮膚科学            | 名古屋大学大学院医学系研究科<br>助教授<br>鈴 木 民 夫       |
| J-05-15 | 真皮幹細胞を利用した皮膚の若返り治療                                 | 美容外科学           | 京都大学医学研究科先端領域融<br>合医学研究機構助手<br>内 藤 素 子 |

| 管理番号    | 研 究 課 題                                                | 分 野             | 代 表 研 究 者                          |
|---------|--------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| J-05-16 | 二酸化チタン上に形成した脂質二重膜への表面特性の影響およびUV照射効果                    | コロイド化学<br>界面化学  | 分子科学研究所研究技官<br>手 老 龍 吾             |
| J-05-17 | 皮膚ボディイメージ評価尺度Cutaneous Body Image Scale (CBIS) 日本語版の作成 | 皮膚心身医学<br>臨床疫学  | 東京女子医科大学附属女性生涯健康センター助教授<br>檜 垣 祐 子 |
| J-05-18 | 紫外線誘発メラニン合成へのスフィンゴシン1-ホスフェートの抑制効果の検討                   | 皮膚科学            | 神戸大学大学院医学系研究科教授<br>錦 織 千佳子         |
| J-05-19 | 皮膚再生を促す non-drug 細胞間脂質類似構造体（リオトロピック液晶）の開発              | 物理化学<br>薬理学     | 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター助教授<br>五十嵐 理 慧 |
| J-05-20 | 均一径リボソームと細胞の融合のためのマイクロ流路デバイスの作成                        | 生化学<br>マイクロ加工技術 | 東京大学生産技術研究所助教授<br>竹 内 昌 治          |

(敬称略・受付順)

## 役 員

平成18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)日本公定書協会 会長                       |
| 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 | 慶應義塾大学名誉教授                          |
| 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 | 静岡県学術教育政策顧問                         |
| 理 事       | 牧野 利孝 | 日本化粧品工業連合会専務理事<br>(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  | 日本製薬団体連合会理事長<br>(元厚生省大臣官房審議官)       |
| 評議員       | 多島 新吾 | 防衛医科大学校教授                           |
| 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  | 横浜赤十字病院 院長                          |
| 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名誉教授                      |
| 評議員       | 宮崎 榮三 | 東京工業大学特任教授                          |
| 評議員       | 山崎 幹夫 | 新潟薬科大学 学長                           |

(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**

〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目7番20号  
電話 03 (3278) 5561

**コスメトロジー研究報告 Vol.14／2006**

非売品

2006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<br>〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目7番20号<br>電話 03 (3278) 5561 |
| 制作    | エイエム企画<br>〒170-0013 東京都豊島区東池袋三丁目15番2号<br>電話 03 (3590) 5375             |
| 印刷    | 太陽印刷工業                                                                 |

表紙デザイン監修：(株)コーセー 商品デザイン部デザイン室