

ごあいさつ



公益財団法人 コスメトロジー研究振興財団
理事長

小林 保清

この度コスメトロジー研究振興財団として、20冊目の研究報告書を刊行いたしました。

設立以来20年以上に渡って、化粧品にかかわる多くの技術のブレイクスルーを実現し、コスメトロジーへの継続的発展に貢献できたと考えております。ひとえに関係者の皆様のご理解ご協力によるものと、改めて感謝申し上げます次第です。

この20年間の変遷を顧みますと、時代や社会環境とともに研究テーマは多岐に渡ってきており、基礎研究の深化と、応用研究の拡大が顕著にみられるようになりました。コスメトロジー関連の科学技術、化粧品科学の発展に対して当財団の活動がその一助になっていることを幸いに思っております。

今回の報告書では平成21～22年度に助成を受けられた方の中から33名の方の研修成果を掲載いたしました。

素材・物性に関する分野では製剤設計と生体作用の両面からのアプローチを考えた研究テーマが顕著であり、全体的に応用性の高い研究成果がみられております。

生体作用、安全性に関する分野では生体そのものを追求する研究、健康を捉え実現するための研究、安全性についての新しい考えなど、コスメトロジーへの貢献度が強く感じられます。

精神、文化に関する分野の研究につきましては化粧の本質を心理生理的に捉え、新たな化粧品の役割を提案する示唆的な内容であったと考えています。

すべての研究テーマに共通している点は化粧品学への高い貢献度ということですが、当財団は分野の枠や研究機関の属性などにとらわれることなく、化粧品学のさらなる発展のために、優れた研究に対して今後も積極的に助成を行っていきたいと考えております。今後とも、皆さま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24年7月

目 次

■ごあいさつ

■研究報告

I. 素材、物性に関する分野

- ・核内受容体 PPAR を介して皮膚の美容効果を発揮する化粧品素材の探索 2
大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野 橘 敬 祐
- ・界面活性粒子を利用した多重エマルジョンおよびマイクロカプセルの開発 11
山形大学大学院理工学研究科 野々村 美宗
- ・アロエの美白成分クロモン類の生合成研究 15
東京大学大学院薬学系研究科 阿 部 郁 朗
- ・エレクトロスプレーを利用した高機能性粉体調製技術の開発 19
物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 生体機能材料ユニット 川上 亘作
- ・アロエ含有物による UV ケアの研究 —紫外線防御と一重項酸素消去作用— 23
愛媛大学理工学研究科環境機能科学専攻 長岡 伸一
- ・加齢に伴う皮膚脂質の変化に対するリピドーム解析 28
京都府立医科大学消化器内科 守田 麻由子
- ・自生ハマナス (*Rosa rugosa*) の精油成分とその抗菌活性
～コスメトロジーへの有効利用を目的とした基礎的研究～ 31
弘前大学大学院理工学研究科 長岐 正彦
- ・新規角質保護素材応用へ向けた抗炎症性スフィンゴ糖脂質の精製と性質解明に関する研究 40
独立行政法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門 奥田 徹哉
- ・能動的標的化技術を搭載した新規ドラッグデリバリーシステムキャリア
「バイオナノカプセル」の次世代化粧品分野での応用可否の検討 44
名古屋大学 黒田 俊一
- ・海洋生物に由来する機能性化粧品素材の探索 50
熊本大学大学院生命科学研究部 塚本 佐知子

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・小皺形成に関わる皮膚特異的プロテアーゼ SASPase 活性と加齢との関係 56
京都大学物質-細胞統合システム拠点終極研究室 松井 毅
- ・栄養障害型表皮水疱症の原因遺伝子である VII 型コラーゲンの分泌メカニズムの解析 62
東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室 齋藤 康太
- ・タイトジャンクション動的平衡を制御する低分子化合物の探索 66
名古屋大学大学院創薬科学研究科構造分子薬理学分野 廣明 秀一
- ・皮膚の健康・老化状態の非侵襲的解析法：
質量分析法を基盤としたケラチン上の化学修飾スクリーニング法の開発 73
東北大学大学院薬学研究科臨床分析化学分野 大江 知行
- ・皮膚細胞を用いた化粧品中のナノマテリアルの安全性評価
～ナノマテリアルの皮膚ランゲルハンス細胞に対する影響評価～ 78
大阪大学薬学研究科毒性学分野 堤 康央
- ・細胞外マトリックス糖タンパク質による皮膚の再生・修復のグリコバイオロジー 84
お茶の水女子大学大学院・糖鎖科学教育研究センター 小川 温子
- ・物質の輸送・代謝リズムの分子時計機構の解明と操作要因の開発 88
九州大学大学院薬学研究院薬剤学 大戸 茂弘
- ・遺伝子改変動物を用いた脂肪酸受容体の皮膚における作用の検討 93
京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学分野 平澤 明

| | |
|---|-----|
| ・皮膚表皮でのナノマテリアルの動態と免疫応答の可視化 —ナノマテリアルに対する新たな安全性評価法の確立に向けて— | 97 |
| 大阪大学免疫学フロンティア研究センター 藤井 文彦 | |
| ・海藻カロテノイドの皮膚における光老化抑制作用 | 102 |
| 京都大学大学院農学研究科 平田 孝 | |
| ・ヒト表皮角化幹細胞の動態制御を目指した低分子化合物の探索 | 107 |
| 愛媛大学上級研究員センター 難波 大輔 | |
| ・炎症性皮膚疾患におけるストレス応答性キナーゼ ASK1 の機能解析 | 112 |
| 東京大学大学院薬学系研究科 一條 秀憲 | |
| ・接触性皮膚炎における IL-17 ファミリーサイトカインの役割 | 117 |
| 東京大学医科学研究所フロンティア研究拠点 中江 進 | |
| ・糖脂質による増殖シグナル向上のメカニズムの解明 | 122 |
| 独立行政法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門 川島 永子 | |
| ・加齢および創傷治癒に伴う皮膚真皮細胞外マトリックスの組成変化：パーシカン発現に注目して | 128 |
| 京都大学大学院医学研究科皮膚科学 室賀 絵里 | |
| ・皮膚状マイクロ触覚センサによるテクスチャ計測に関する研究 | 132 |
| 東京大学大学院情報理工学系研究科知能機械情報学専攻 野田 堅太郎 | |
| ・妊娠期における肌の乾燥メカニズムの究明 エストロゲン過剰分泌状態にも関わらず皮膚が乾燥する原因はなにか | 138 |
| 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 山口 琴美 | |

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

| | |
|---------------------------------------|-----|
| ・「少女」の化粧—近代および現代の化粧文化からの一考察 | 142 |
| 立命館大学大学院一貫制博士課程 小出 治都子 | |
| ・化粧の消費と身体規範の転換—現代カイロの化粧をめぐる世代間の衝突 | 148 |
| お茶の水女子大学大学院博士後期課程 鳥山 純子 | |
| ・産褥ケア、医学美容からみる台湾女性の素肌観および化粧観 | 152 |
| 都留文科大学 山本 芳美 | |
| ・化粧がもつ自尊心昂揚効果に関する発達脳科学的研究 | 159 |
| 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科神経機能学分野 土居 裕和 | |
| ・化粧による顔表情の豊かさをオプティカルフローで表情運動量として定量化する | 163 |
| 千歳科学技術大学総合光科学部バイオ・マテリアル学科 南谷 晴之 | |
| ・香りによる快・不快の感情が新生神経細胞の発達に与える影響の研究 | 169 |
| 奈良県立医科大学先端医学研究機構脳神経システム医科学 吉原 誠一 | |

■記念講演

| | |
|--------------------------|-----|
| ・第22回表彰・贈呈式記念講演『科学研究と社会』 | 177 |
| 毎日新聞社科学環境部副部長 元村 有希子 | |

| | |
|--------------|-----|
| ■コスメトロジー研究雑感 | 187 |
|--------------|-----|

■付録

| | |
|--------------------|-----|
| 事業報告書(特例民法法人) | 207 |
| 事業報告書(公益財団法人) | 208 |
| 第22回研究助成を受けられたかたがた | 209 |
| 役員一覧 | 211 |

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

核内受容体PPARを介して皮膚の美容効果を発揮する 化粧品素材の探索

大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野

橘 敬 祐

The permeability barrier is required for terrestrial life and it is localized at the outermost layer of the epidermis, the stratum corneum, where extracellular lipid membranes inhibit water movement. The stratum corneum is the end product of keratinocyte differentiation and comprises a layer of cross-linked proteins and lipids. Epidermal homeostasis and the barrier function integrity depend on the tight coordination of keratinocyte proliferation, differentiation, and programmed death.

Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) is a ligand-activated transcription factor belonging to the nuclear hormone receptor superfamily. PPAR α is mainly expressed in the liver, and is also present in the epidermis. PPAR α binds to peroxisome proliferator responsive element (PPRE) and activates several target genes, which leads to fatty acid catabolism. PPAR α ligands have been used to treat dyslipidemia by reducing plasma triglycerides and increasing high-density lipoprotein cholesterol. On the other hand, various cell culture and in vivo approaches suggest that PPAR α contributes to fetal skin development, epidermal barrier maturation, and sebocyte activity. Thus, PPAR α represents a research target for understanding and improving the recovery of skin barrier function.

Previously, we established a tightly tetracycline-regulated human hepatoblastoma cell line that can be induced to express human PPAR α (HepG2-tet-off-hPPAR α). We subsequently engineered reporter cell line expressing the luciferase gene that can be used to quantify the PPAR α activity by modulators using HepG2-tet-off-hPPAR α .

In this study, we evaluated extracts of approximately 200 natural products and found an extract that enhanced reporter gene activity. Furthermore, this extract up-regulated the expression of adipose differentiation-related protein (ADRP), which is a known PPAR α target gene. These findings suggest that the extract is a candidate agent for improving epidermal permeability barrier function.

1. 緒 言

ヒトの表皮は、基底膜に接する表皮ケラチノサイトが分裂、分化、成熟することにより形成される。表皮には、水分の蒸散を防ぐバリア機能が備わっている。バリア機能には細胞間脂質が大きな役割を果たしており、この機能が損なわれると肌が乾燥状態になり、荒れ肌になる。一方、バリア機能が正常に保たれていると、皮膚は適度に水分を保持することができ、きめが整った美しい肌を維持できる。すなわち、バリア機能を改善する物質は、優れた化粧品素材になり得る^{1,2)}。

核内受容体ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 α (PPAR α)は、PPREとよばれる認識配列に結合し、リガンドや翻訳後修飾により活性化されることで標的遺伝子群の発現を調節し、機能を発揮する転写因子である³⁾。PPAR α は肝臓で脂肪酸の代謝や善玉コレステロール(HDL)の産生を促し代謝を改善することから、PPAR α のリガンドは高脂血症治療薬として用いられている⁴⁾。また、PPAR α は表皮にも発現しており、ケラチノサイトの分化

誘導、脂質産生の促進、バリア機能の向上、皮膚炎症の抑制などに関わっており、その機能に注目が集まっている⁵⁾。これらのことから、皮膚のPPAR α の活性を調節できる化合物(PPAR α モジュレーター)は、皮膚疾患の改善、美容の用途に貢献できる可能性が期待でき、機能性化粧品の素材として有望と考えられる。

我々はこれまでに、ヒトPPAR α の機能を解析するために、テトラサイクリン誘導システムを用いたPPAR α の発現量を制御できるヒト細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用いてトランスクリプトーム解析を行った結果、本細胞株においてもヒトPPAR α が脂肪酸代謝や脂質の代謝に深く関わる事が明らかになった⁶⁻⁹⁾。さらに、樹立した細胞株にレポーター遺伝子を組み込むことで、全長のヒトPPAR α の発現量を制御でき、かつ、PPAR α の転写活性を生体内に近い環境で簡便・迅速に測定できる、セルベースのPPAR α モジュレータースクリーニングシステムを構築した。

本研究課題では、構築したスクリーニングシステムを用いて、約200種類の天然物抽出エキスの中から、PPAR α の機能を制御し、皮膚疾患やバリア機能改善等の美容効果を発揮し得る素材の探索を行った。

2. 実 験

2・1 PPAR α モジュレータースクリーニング細胞を用いた活性測定試験

PPAR α モジュレータースクリーニング細胞は、DMEM



Screening of natural products to find cosmetic agents that modulate PPAR function

Keisuke Tachibana

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

(10%charcoal/dextran treated FBS, 100IU/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 2 μ g/mL tetracycline, 300 μ g/mL G418, 0.5 μ g/mL puromycin, 2 μ g/mL blasticidin) 中で培養した。PPAR α の発現誘導は、トリプシン処理後回収した細胞を1 \times PBS (-) で3回洗浄し、tetracyclineを除去することにより行った。Tetracycline除去後、96穴マイクロプレートに、各ウェルあたり150 μ LのDMEM (10% charcoal/dextran treated FBS, 100IU/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin) 培地中に 2.5×10^4 個になるように細胞を播種し、24時間培養した。培地を除去後、各種天然物抽出エキスを3、10、30 μ g/mLになるように調製したDMEM (10% charcoal/dextran treated FBS, 100IU/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin) を150 μ L添加し、48時間培養した。培地を除去後、70 μ Lの細胞溶解液 (25mM Tris-phosphate (pH7.8), 2mM DTT, 2mM *trans*-1,2-diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (CDTA), 10%glycerol, 1%Triton X-100) を加えて室温下15分以上攪拌し、細胞を溶解した。20 μ Lの細胞溶解液に、50 μ Lの発光基質液 (20mM Tricine-NaOH (pH7.8), 2.67mM MgSO₄, 0.1mM EDTA, 33.3mM DTT, 270 μ M Coenzyme A, 530 μ M ATP, 470 μ M luciferin) を添加して、ルミネッセンスプレートリーダーを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。なお、PPAR α を発現させていないコントロールとして、培地に終濃度2 μ g/mLのtetracyclineを添加して培養した細胞を用い、同様の処理を行い活性を測定した (Fig. 1)。

2・2 天然物からの活性成分の探索

スクリーニング検体として、植物を中心とする約200種類の天然物抽出エキスをを用いた。

天然物抽出エキスの分画精製は、常法に従い以下のように行った。まず、天然物をMeOHで抽出し、得られたMeOHエキスをEtOAcと水で分配した。水層は*n*-BuOHを用い、*n*-BuOH可溶部と水可溶部に分配した。一方、EtOAc可溶部は、*n*-hexaneと90%MeOHで分配した。さらに、*n*-hexane-CHCl₃系、CHCl₃-MeOH系、または、CHCl₃-EtOAc系の溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、それぞれの画分を得た。これら画分のうち活性の見られた画分については、さらに、MeOH-CHCl₃の溶媒系でODSカラムを用いたHPLCにより分画した (Fig. 2)。

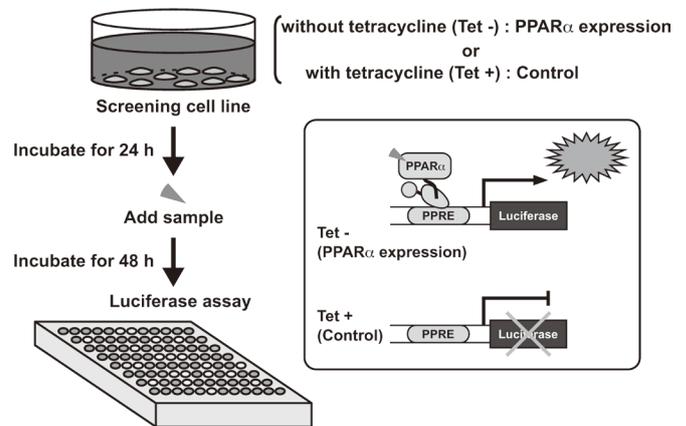


Fig. 1 Screening system of PPAR α modulators.

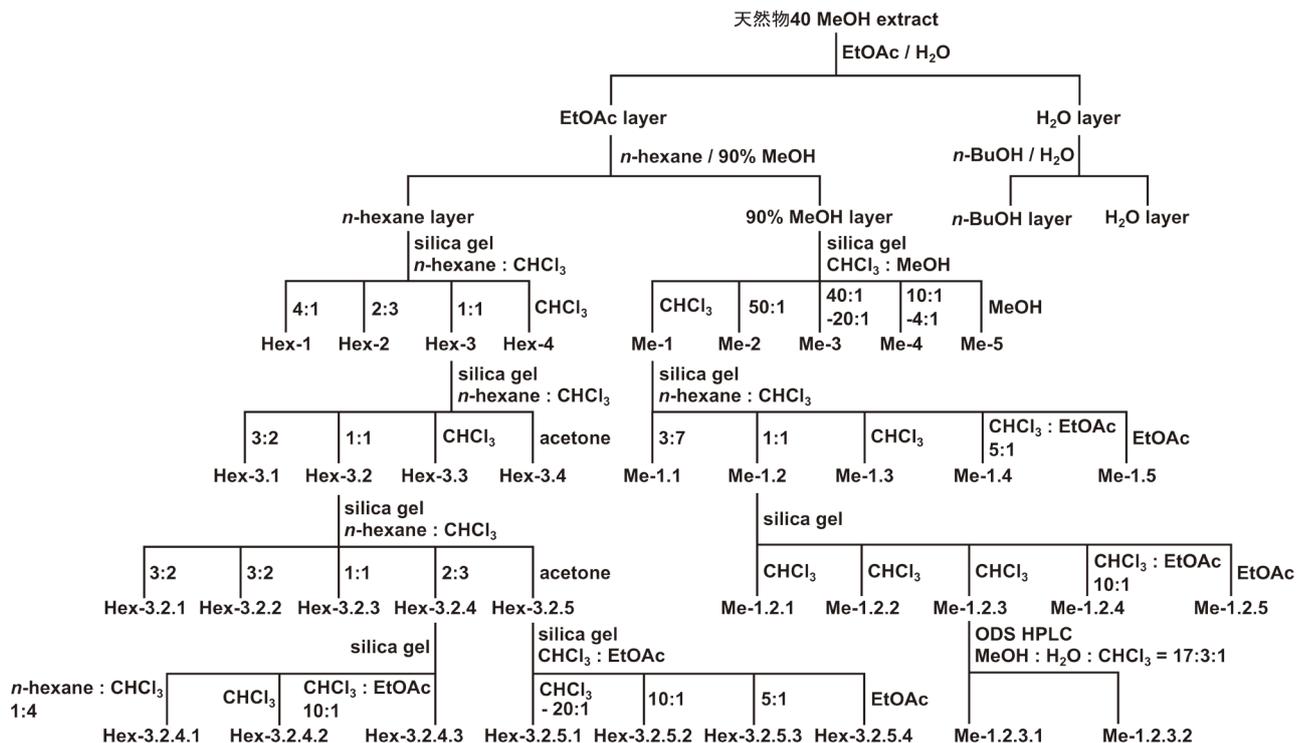


Fig. 2 Extraction-fractionation scheme of the natural product 40.

2・3 定量 RT-PCR

培養細胞からの total RNA の抽出は、QuickGene RNA cultured cell kit S を用いてキットに添付のプロトコールに従って行った。SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR を用いて、キットに添付のプロトコールに従い、抽出した total RNA から cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として、QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit を用いて定量的 real-time PCR を行った。

3. 結果

3・1 天然物抽出エキスのスクリーニング

PPAR α の活性を調節する天然物抽出エキスのスクリーニングには、我々が開発した PPAR α モジュレータースクリーニング細胞を用いた。本スクリーニング細胞は、テトラサイクリン誘導システムを応用した PPAR α の発現を制御できるヒト肝癌由来細胞株 HepG2-tet-off-hPPAR α 細胞を用いて樹立した^{6,7)}。すなわち本細胞株は、培地中に tetracycline が存在すると PPAR α は発現せず (Tet+), tetracycline を除去することで発現量が上昇する (Tet-)。さらに、この細胞のゲノムには、PPAR α の応答配列 PPRE を含むプロモーターの下流にルシフェラーゼをコードする遺伝子が組み込まれている。従って、ルシフェラーゼ活性を指標にすることで、各種サンプルの PPAR α に対する活性化効果を評価することができる。このように、本スクリーニング細胞株は、全長のヒト PPAR α の発現量を制御可能であり、またレポーター遺伝子もゲノム上に組み込まれていることから、生体内に近い条件で活性の評価を行える優れたスクリーニング細胞株である。

上記スクリーニング細胞株を用いて、約 200 種類の天然物抽出液のスクリーニングを行った。スクリーニングの手順を以下に示す (Fig. 1)。まず、リガンドスクリーニング細胞を 96 穴マイクロプレートに播種し、tetracycline を除去した培地で培養することで PPAR α の発現を誘導した (Tet-)。24 時間培養後、各種天然物抽出液を 3 μ g/mL または 30 μ g/mL になるように添加した。添加 48 時間後にルシフェラーゼアッセイを行い、ルシフェラーゼ活性を指標に各種抽出液による PPAR α の転写活性化効果を評価した。なお、コントロールとして tetracycline を除去せずに、PPAR α を発現させていない条件でもアッセイを行った (Tet+)。

その結果、Fig. 3 に示すように tetracycline を除去し PPAR α を発現させた時に、既知の PPAR α リガンドであるフェノフィブリン酸 (終濃度 50 μ M) よりも高い活性化効果を示した抽出液が 7 種類得られた (サンプル 10、16、40、42、61、241、264 番の抽出液)。特に、サンプル 40 番の抽出液では、3 μ g/mL の濃度でもフェノフィブリン酸と同程度の活性が認められた。

3・2 天然物 40 番からの活性成分の探索

PPAR α の転写活性の上昇が認められた 7 種類の抽出液の中から、3 μ g/mL の濃度でも活性が認められたサンプル 40 番を選択し、本抽出液に含まれる活性成分のさらなる探索研究を行った。

まず、サンプル 40 番の MeOH 抽出エキスを EtOAc と水で分配した。さらに、水層を *n*-BuOH と水で分配した。これら MeOH 抽出エキス、EtOAc 可溶部、*n*-BuOH 可溶部、水可溶部の 4 つの抽出画分を用いてスクリーニングを行った。その結果、EtOAc 可溶部および *n*-BuOH 可溶部において濃度依存的な活性化効果が認められた。この時、EtOAc 可溶部では、10 μ g/mL 以上の濃度において、他の画分よりも強い活性化効果が認められた (Fig. 4)。

そこで、EtOAc 可溶部をさらに *n*-hexane と 90% MeOH で分配した。まず、MeOH 可溶部を CHCl₃-MeOH 系溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、Me-1~5 の 5 つの画分を得た。これら画分を用いてスクリーニングを行った結果、Me-1 画分に活性が認められた (Fig. 5A)。そこで、Me-1 画分をさらに *n*-hexane-CHCl₃ 系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、Me-1.1~1.5 の 5 つの画分を得た。これら画分を用いて活性を評価した結果、Me-1.1、1.2、1.3 の画分に活性化効果が認められた (Fig. 5B)。興味深いことに、Me-1.2 画分は 3 μ g/mL の低い濃度で最も高い活性化効果が得られた。そこで、Me-1.2 画分を選択し、CHCl₃-EtOAc 系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、Me-1.2.1~1.2.5 の 5 つの画分を得た。これら画分を用いて活性を評価した結果、Me-1.2.2~1.2.4 の画分に転写活性の上昇が認められた (Fig. 5C)。そこで、Me-1.2 画分と同様に 3 μ g/mL の濃度で活性の認められた Me-1.2.3 画分を選択し、MeOH-CHCl₃ 系の溶媒系で ODS カラムを用いた HPLC により精製した。得られた画分 Me-1.2.3.1 および Me-1.2.3.2 を用いて活性を評価した結果、Me-1.2.3.1 画分に転写活性化効果が認められた (Fig. 5D)。

一方、*n*-hexane 可溶部は *n*-hexane-CHCl₃ 系の溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、Hex-1~4 の 4 つの画分を得た。これら画分を用いてスクリーニングを行った結果、Hex-3 画分に活性が認められた (Fig. 6A)。そこで、Hex-3 画分をさらに *n*-hexane-CHCl₃ 系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、Hex-3.1~3.4 の 4 つの画分を得た。これら画分を用いて活性を評価した結果、Hex-3.2 画分にフェノフィブリン酸と同程度の活性化効果が認められた (Fig. 6B)。Hex-3.2 画分をさらに *n*-hexane-CHCl₃ 系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、Hex-3.2.1~3.2.5 の 5 つの画分を得た。これら画分を用いて活性を評価した結果、Hex-3.2.4 画分と Hex-3.2.5 画分に活

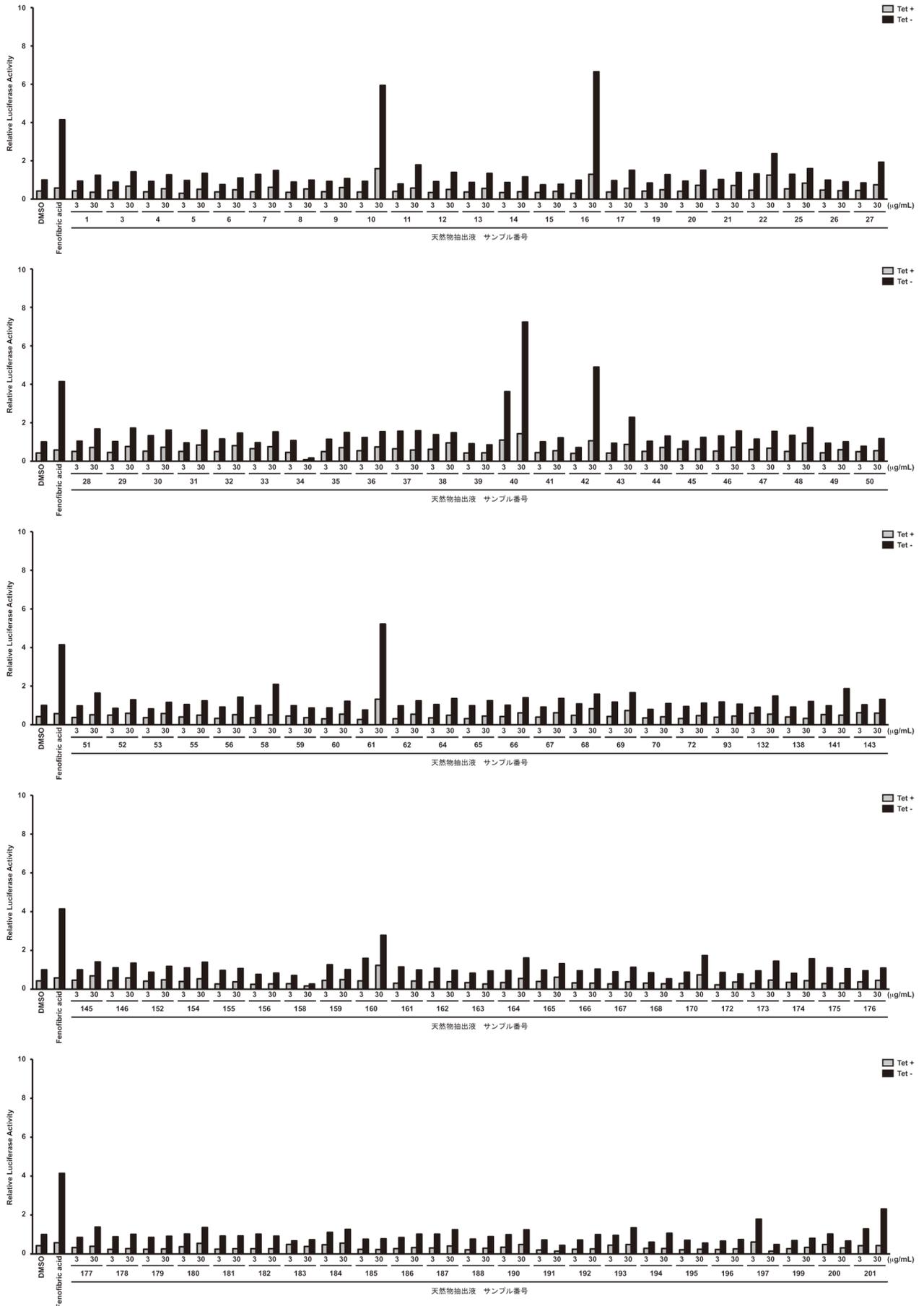


Fig.3 Screening of the MeOH extracts of the natural products for PPAR α modulators.

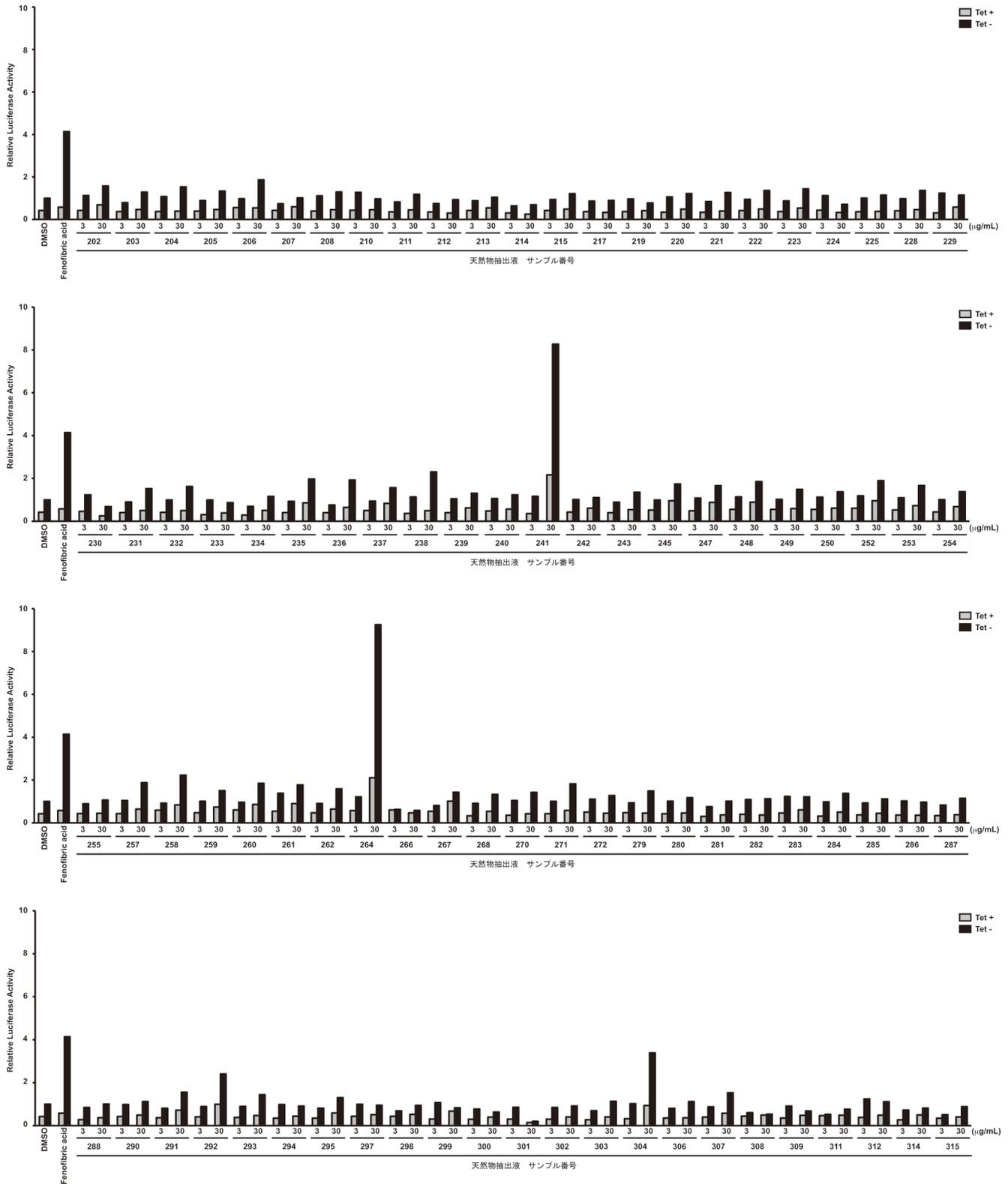


Fig.3 -continued.

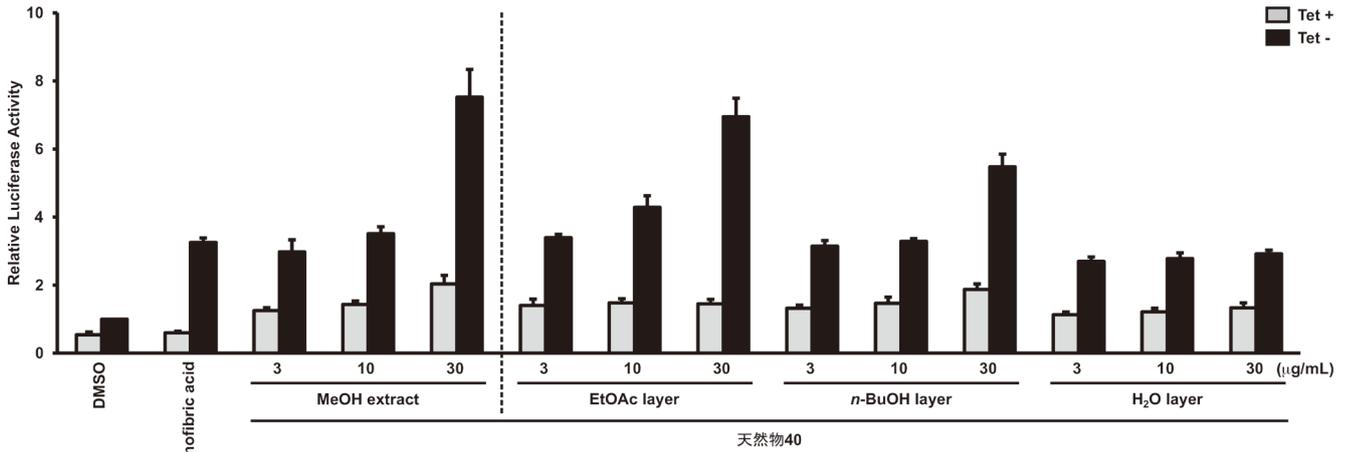


Fig. 4 Screening of the natural product 40 extracts for PPAR α modulators.

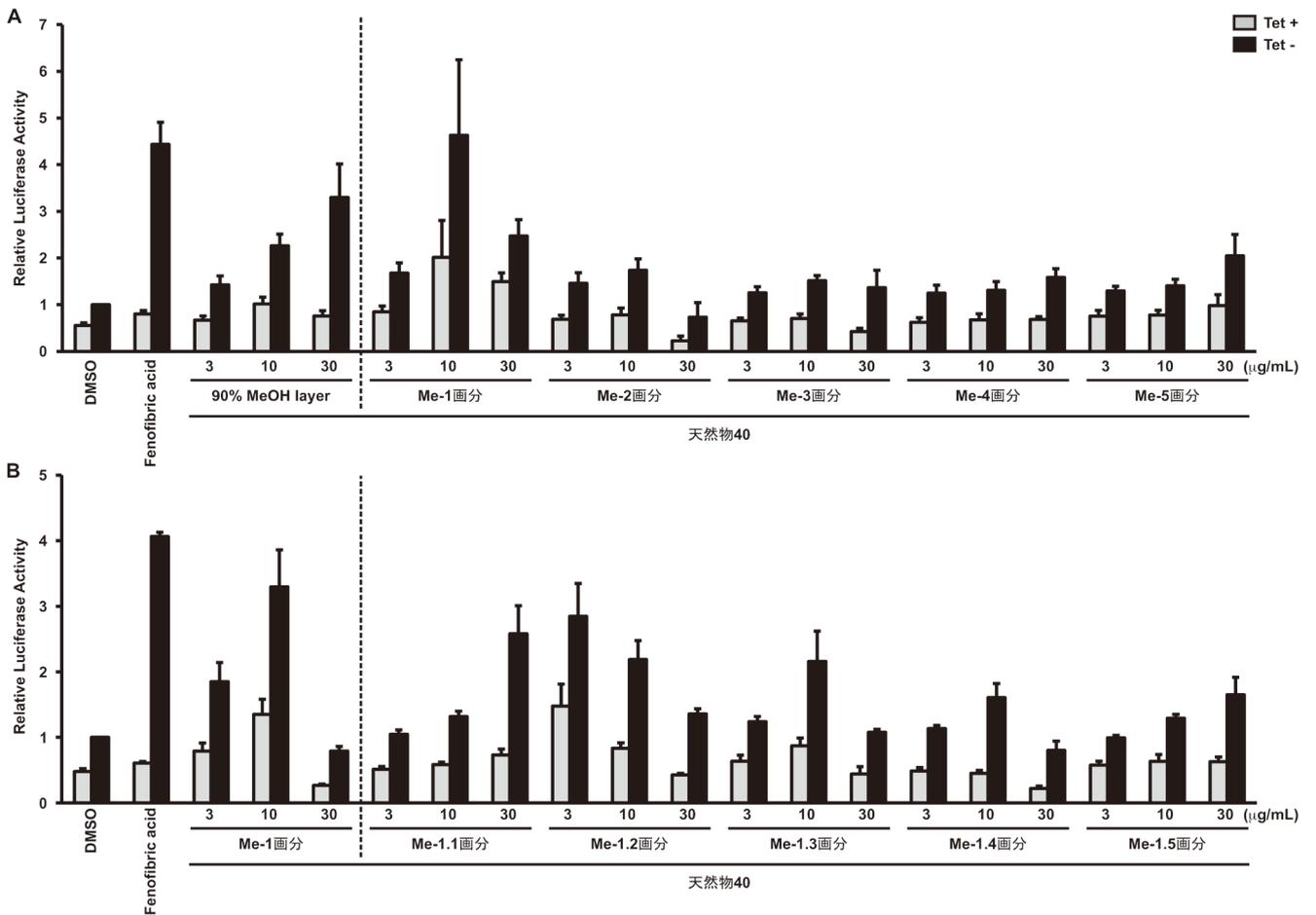


Fig. 5 Screening of the MeOH layer of the natural product 40 for PPAR α modulators.

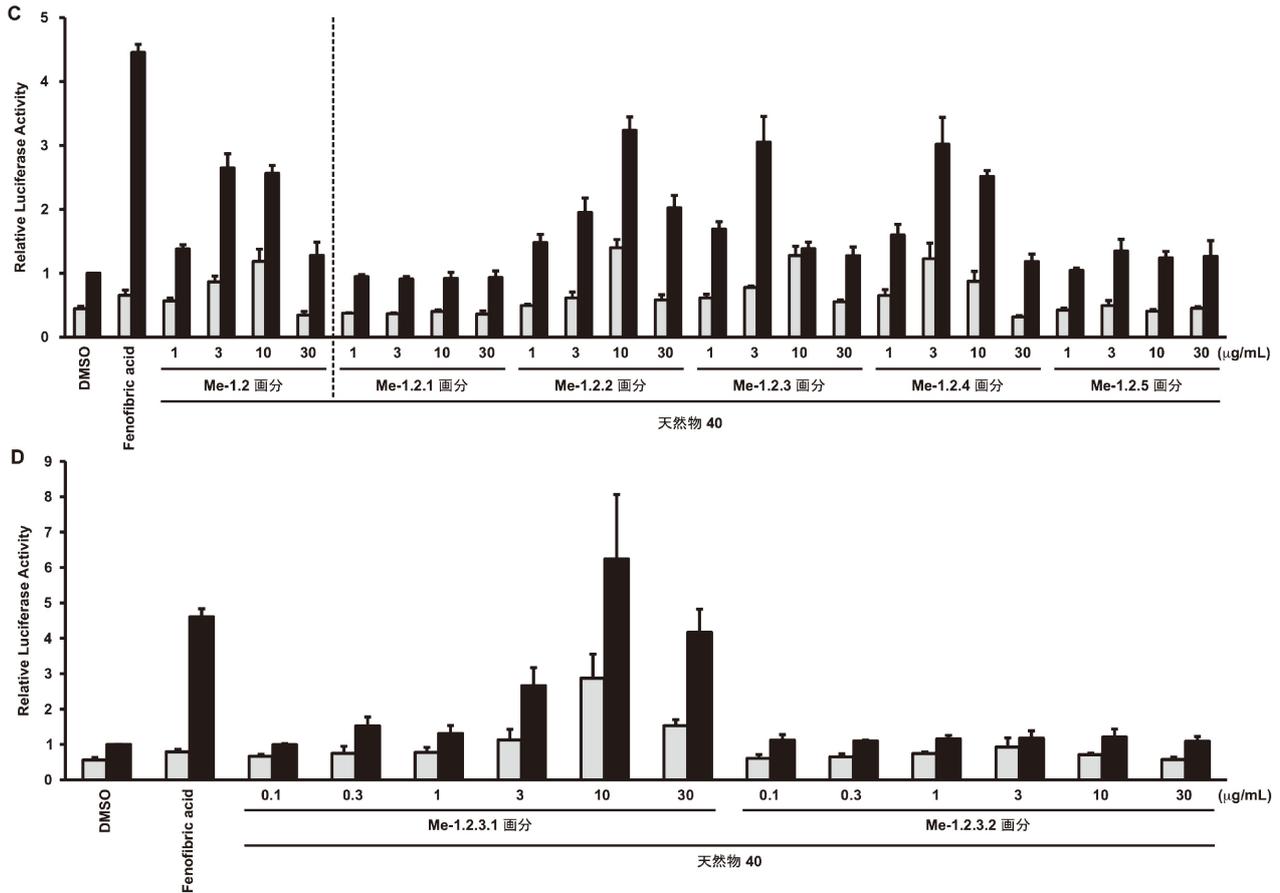


Fig. 5 -continued.

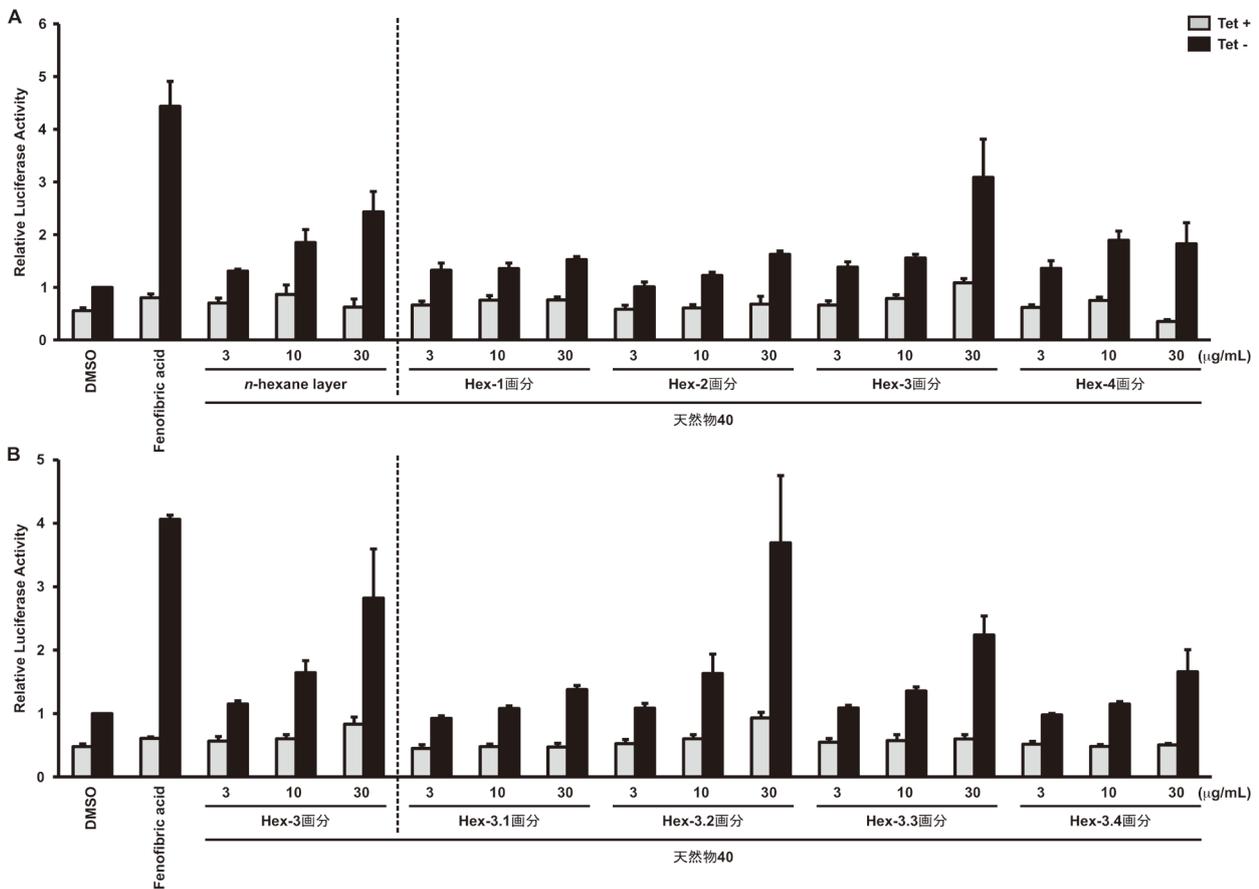


Fig. 6 Screening of the *n*-hexane layer of the natural product 40 for PPAR α modulators.

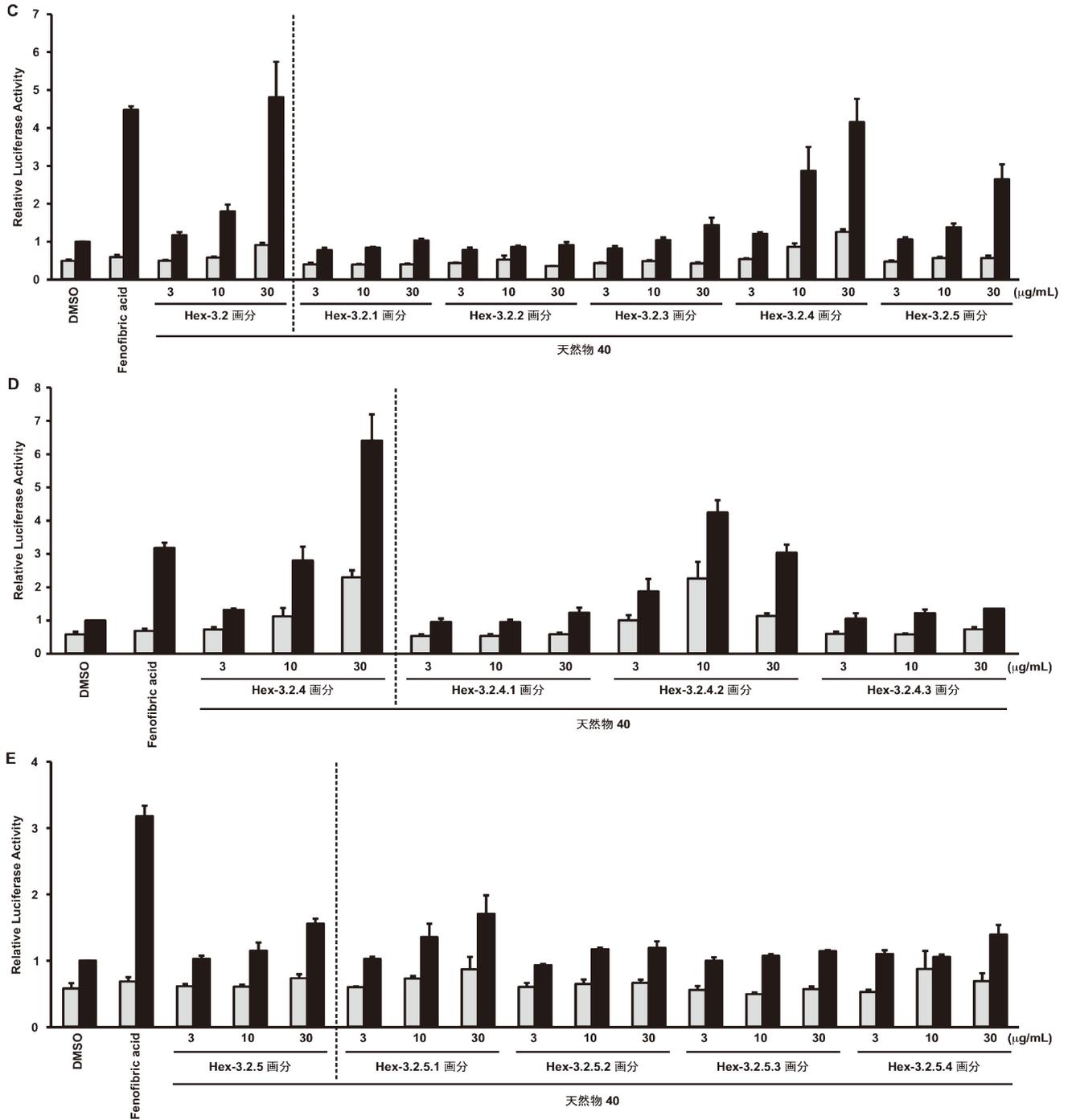


Fig. 6 -continued.

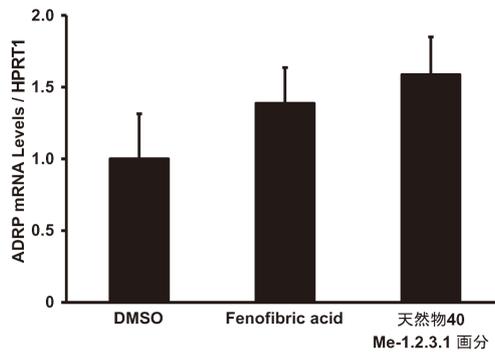


Fig. 7 Me-1.2.3.1 fraction up-regulated the expression of ADRP.

活性化効果が認められた (Fig. 6C)。まず、Hex-3.2.4画分を、*n*-hexane-CHCl₃-EtOAc系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、Hex-3.2.4.1～3.2.4.3画分を得た。これら画分を用いて活性を評価した結果、Hex-3.2.4.2画分に活性化効果が認められた (Fig. 6D)。一方、Hex-3.2.5画分は、CHCl₃-EtOAc系の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、Hex-3.2.5.1～3.2.5.4画分を得た。これら画分を用いて活性を評価した結果、弱いながらもHex-3.2.5.1画分に活性化効果が認められた (Fig. 6E)。興味深いことに、これら画分を薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて解析した結果、これら画分にはそのスポットのパターンよりMe-1.2.3.1画分に含まれる成分と同じものが含まれていることが明らかになった。

3・3 活性成分を用いた遺伝子発現解析

スクリーニングの結果、サンプル40番から精製したMe-1.2.3.1画分に含まれる成分が、本スクリーニング系で活性を示す成分として考えられた。そこで、本成分を用いて、PPAR α の標的遺伝子の発現が誘導されるか否かを調べた。PPAR α の発現が確認されているヒト肝癌由来Huh-7細胞を⁸⁾、Me-1.2.3.1画分で処理し、48時間後にtotal RNAを回収した。回収したtotal RNAからcDNAを合成し、PPAR α の標的遺伝子である脂肪滴形成に関わるadipose differentiation-related protein (ADRP) 遺伝子⁶⁾の発現を解析した。その結果、Me-1.2.3.1画分の添加によってADRPの発現量が、約1.5倍程度に上昇した (Fig. 7)。

4. 考 察

我々が構築したスクリーニング系を用いて、PPAR α の転写活性化能を促進する成分の探索を行った。今回、約200種類の天然物抽出エキスを評価した結果、7種類の天然物抽出エキスにPPAR α を活性化する成分が含まれている可能性が示唆された。このうち、サンプル40番の抽出エキスをさらに分画した結果、PPAR α を活性化する成分を、Me-1.2.3.1画分にまで絞り込むことに成功した。今後、この画分に含まれる成分を同定すると共に、どのようなメカニズムでPPAR α の活性を制御するのかを、アンタゴニストなどの薬剤を用いてさらに詳細に解析する必要がある。

一方、Me-1.2.3.1画分はPPAR α の標的遺伝子であるADRPの発現量を増加させた。これまでに、表皮ケラチノサイトにおけるADRPの発現量の上昇に伴う脂質の増加が、SDSなどの刺激による細胞膜の損傷の修復に関わっていることが報告されている¹⁰⁾。従って、Me-1.2.3.1画分に含まれる成分も、皮膚のバリア機能向上による肌荒れ防止、改善作用を有している可能性が考えられる。

今後本研究課題で得た知見をもとに、皮膚における

PPAR α の生理機能を明らかにすると共に、PPAR α を活性化する成分が皮膚の恒常性や機能を改善し美容を促進するという、新たな化粧品素材開発へのアプローチを提唱することで、コスメトロジーの発展に寄与したい。

5. 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、御支援頂きました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Feingold KR, : Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis., *J Lipid Res*, 48, 2531-2546, 2007.
- 2) Rawlings AV & Harding CR, : Moisturization and skin barrier function., *Dermatol Ther*, 17 Suppl 1, 43-48, 2004.
- 3) Tachibana K, Yamasaki D, Ishimoto K, et al., : The role of PPARs in cancer., *PPAR Research*, Volume 2008, Article ID 102737, 2008.
- 4) Evans RM, Barish GD & Wang YX, : PPARs and the complex journey to obesity., *Nat Med*, 10, 355-361, 2004.
- 5) Michalik L, & Wahli W, : Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease., *Biochim Biophys Acta*, 1771, 991-998, 2007.
- 6) Tachibana K, Kobayashi Y, Tanaka T, et al., : Gene expression profiling of potential peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) target genes in human hepatoblastoma cell lines inducibly expressing different PPAR isoforms., *Nuclear Receptor*, 3, 3, 2005.
- 7) Tachibana K, : Application of the Human Hepatoblastoma Cell Lines Inducibly Expressing Peroxisome Proliferator-activated Receptors (PPARs), *Yakugaku Zasshi*, 127, 1223-1229, 2007.
- 8) Tachibana K, Anzai N, Ueda C, et al., : Regulation of the human PDZK1 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha., *FEBS Letters*, 582, 3884-3888, 2008.
- 9) Tachibana K, Takeuchi K, Inada H, et al., : Regulation of the human SLC25A20 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human hepatoblastoma cells., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389, 501-505, 2009.
- 10) Corsini E, Viviani B, Zancanella O, et al., : Induction of adipose differentiation related protein and neutral lipid droplet accumulation in keratinocytes by skin irritants., *The Journal of investigative dermatology*, 121, 337-344, 2003.

界面活性粒子を利用した多重エマルジョンおよびマイクロカプセルの開発

山形大学大学院理工学研究科

野々村 美宗

Some researchers have focused on the adsorption of solid particles at fluid-fluid interfaces and prepared emulsions called "Pickering emulsions." However, while several reports exist on simple spherical emulsions, few reports are available on the formation of more complex structures. Firstly, we show that holes on particle surfaces are a key factor in establishing the variety and complexity of mesoscale structures. Microbowls, which are hollow particles with holes on their surfaces, form multiple emulsions (water-in-oil-in-water and oil-in-water-in-oil emulsions) by simply mixing them with water and oil. Furthermore, stable potato-like emulsions are also obtained, although nonspherical emulsions are usually unstable because of their larger interfacial energies. Secondly, we observed the drying processes of Pickering emulsions and found that some wrinkles were formed on the droplet surfaces. The formulation made of Pickering w/o emulsions is desirable to achieve uniform distribution of ingredients on a wide area after drying. These findings are useful in designing the building blocks of complex supracolloidal systems for pharmaceutical, food, and cosmetic products.

1. 緒言

固体粒子が水と油/空気の界面に吸着し、ピッカリングエマルジョン/フォームと呼ばれるエマルジョンや泡を安定化する場合がある¹⁻⁵⁾。粒子は水と油の両方に濡れ性を有するとき界面活性を示し、自己組織化構造を構築する。この粒子表面に凸凹が存在すると、粒子のふるまいが劇的に変化することが予想されている⁶⁻⁸⁾。そこで我々は、粒子表面に細孔の存在するお椀型異方性粒子(以後、BSP)に着目し、この粒子を水/油相と混合したときの状態を観察した。その結果、水相と油相が多層構造を構築した多相エマルジョンが生成したり、固体粒子の添加法によって相状態が変化するヒステリシスが現れることを見出した⁹⁾。また、ピッカリングエマルジョンを乾燥させることによって変わった形状のエマルジョンが得られることを見出した¹⁰⁾。油相中に水滴が分散したW/O型ピッカリングエマルジョンを乾燥させると、エマルジョン滴の表面に多数の陥没が発生し、梅干し状エマルジョンが得られた。この現象はBSPだけでなく、疎水化シリカ、疎水化マイカ、シリコーン樹脂など様々な固体粒子によって安定化されたエマルジョンについて観察された。これらの知見はピッカリングエマルジョンを医薬品、食品、化粧品の製剤に応用する上で有用である。

2. 実験

お椀型シリコーン樹脂粒子 (Fig.1、竹本油脂、平均粒径2.5 μ m) を分散させた *n*-ドデカンに水を加え、ボルテックスミキサーで10分間混合した。混合物の総量は10gとした。水相にはRose Bengalを添加し、赤く着色した。混合物の状態は、光学顕微鏡観察と蛍光顕微鏡観察、電気伝導度測定によって同定した。固体粒子/油相/水三成分系において、固体粒子に球状シリコーン樹脂粒子を用いたものや、油相にドデカノール、ジメチルポリシロキサン(DMS)、パーフルオロポリエーテル(PFPE)を用いたものも観察した。お椀型粒子を水に分散させたものに *n*-ドデカンを添加した系についても状態を系統的に観察した。本文においてBSP、水、*n*-ドデカンは、各々S、W、Oを用いて示す。また、 α = 固体粒子 / (固体粒子 + 油相)、 β = 水 / (固体粒子 + 油相 + 水) とする。

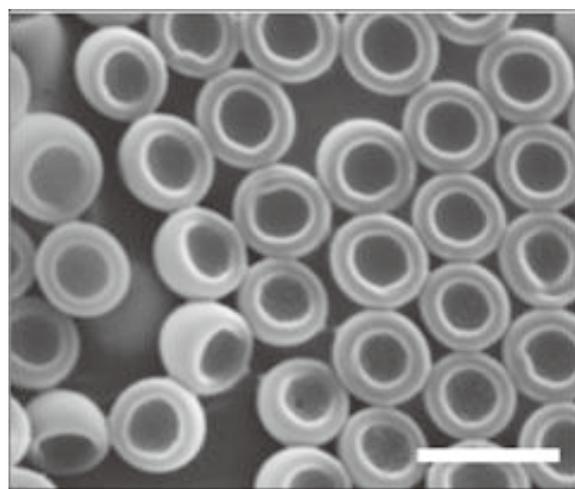
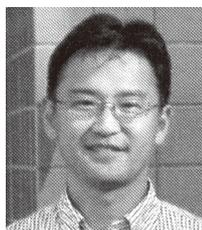


Fig. 1 Scanning electron microscopic image of bowl-shaped particles. Scale bar = 5 μ m.



Multiple emulsions and capsules stabilized by surface-active particles

Yoshimune Nonomura

Graduate School of Science and Engineering,
Yamagata University

3. 結果

3.1 お椀型粒子によって安定化されたエマルションの相挙動

Fig. 2にBSP / *n*-ドデカン / 水 三成分系の状態図を示す。BSPによって安定化された4種類のエマルションが観察された。

(i) W/O型エマルション:

0.05 ≤ β ≤ 0.3の時は、油相中に水滴が分散したW/O型エマルションが観察された。この系では油相が連続相のため、混合物は導電性を示さなかった。エマルション滴の表面にはBSPが吸着していた。また、球型の液滴だけでなく、楕円型の液滴も混在していた (Fig.3a)。

(ii) O/W型エマルション:

0.5 ≤ β ≤ 0.95の時、水相中に油滴が分散したO/W型エマルションが生成した。このときは連続相が水相であるため、導電性が示された。エマルションの液滴はほとんど全て球状だった (Fig.3b)。

(iii) 多相エマルション:

W/O型エマルション領域とO/W型エマルション領域の間では、O/W型エマルションの油滴中に水が分散したW/O/W型エマルションやW/O型エマルションの水滴中に油が分散したO/W/O型エマルションが生成した (Fig. 3cd)。これら多相エマルションの2重の界面はどちらもBSPで覆われていた。

3.2 固体粒子の形状及び油相の影響

球状シリコン粒子を用いた場合はW/O型エマルシヨ

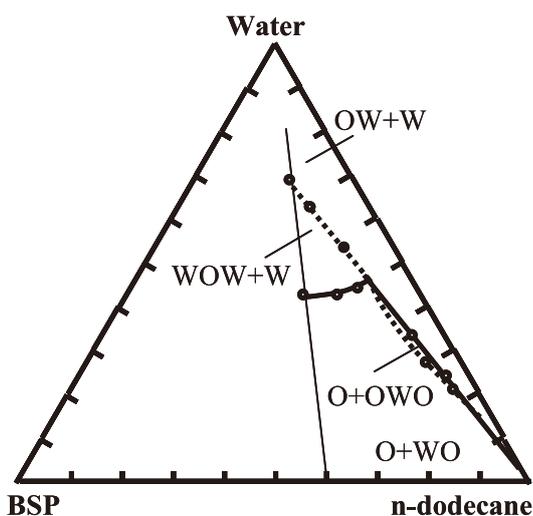


Fig. 2 Mixed state diagram of BSP/water/*n*-dodecane ternary systems. The notations O+W+O, OW+W, O+OWO, WOW+W indicate two phase regions consisting of an emulsion phase and an excess oil (or water) phase, while the notation O+W+O+W indicates three phase region consisting of an emulsion phase and oil and water phases.

ンは観察されたものの、多相エマルションやO/W型エマルションは生成しなかった。一方で、油相組成は相挙動に大きな影響を及ぼした。Fig.4にα=0.3、β=0-0.8の時のBSP/油層/水三成分系の状態図を示す。W/O型エマルシ

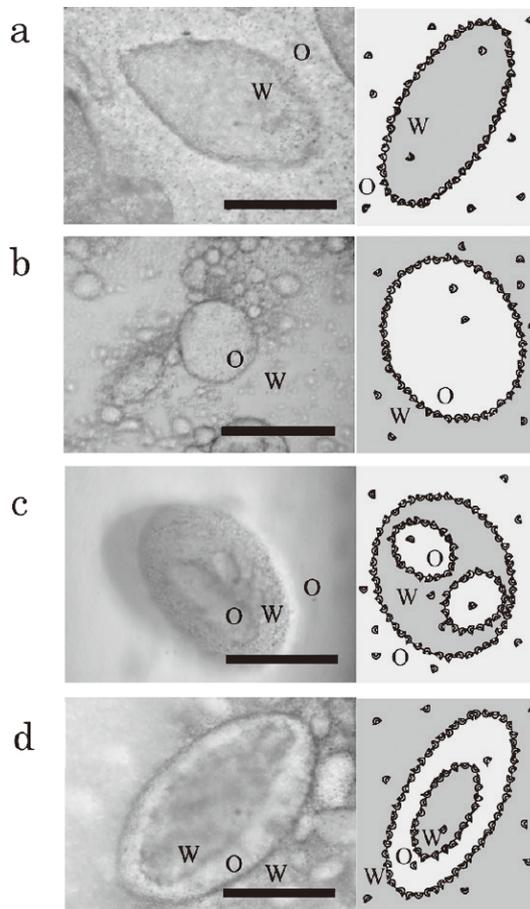


Fig. 3 Optical microscopic images of microbowls/water/*n*-dodecane ternary systems: (a)W/O emulsion state, (b) O/W emulsion state, (c) O/W/O emulsion state, and (d) W/O/W emulsion state. Prior to emulsification, rhodamine B was added to the water phase. Scale bar is 100μm.

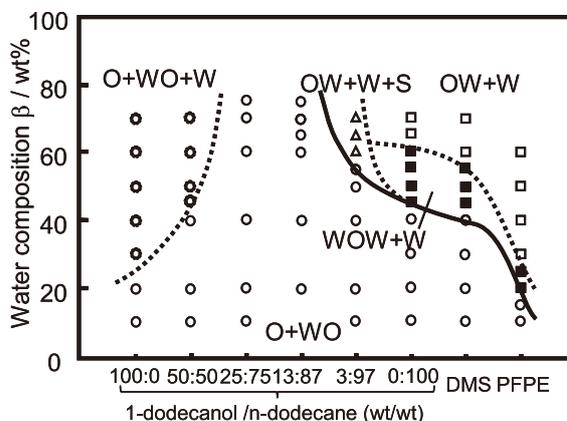


Fig. 4 Mixed state diagram of BSP/water/some oils, i.e., *n*-dodecane, 1-dodecanol, dimethylpolysiloxane (DMS), perfluoropolyether (PFPE), and their mixtures ternary systems when α=0.3.

オンからO/W型エマルジョンへの相転移や、W/O/W型エマルジョンの形成はPFPEやシリコン油、*n*-ドデカンなどの極性の低い油を含む系で観察された。これに対し、ドデカノールやほとんどのドデカノール/ドデカン混合系ではO/W型エマルジョンのみが生成した。

3.3 エマルジョン調製方法の影響

BSPを油相に分散させてから水相を加えた場合は上記で示したW/O型エマルジョンからO/Wエマルジョンへの相転移や多重エマルジョンの形成が確認されたのに対し、水相に分散させてから油相を添加した場合はO/W型エマルジョンのみが観察され、相転移現象はみられなかった。

3.4 エマルジョンの乾燥過程で生成する異形エマルジョン

BSPで安定化されたエマルジョンは密閉されたガラス容器中に保存した時、1カ月以上その状態を維持していた。しかし、約5mgのエマルジョンをスライドガラスに薄く塗布すると、わずかの時間の間で変化が現れた。すなわち、塗布後数分で、エマルジョン滴の表面には窪みが発生した。この窪みは徐々に成長し、コーヒー豆状のエマルジョン滴となった (Fig.5)。さらに約数十分後にはエマルジョン滴が突然消失し、滴のあった場所には水相中に添加した着色剤と予想される赤色の模様が残った。球状シリコン樹脂粒子、疎水化シリカ及び疎水化マイカによって安定化されたエマルジョンでもBSPの場合と同じように液滴表面における複数の窪みの発生と突然の液滴の消失が観察された。

ノニオン性界面活性剤イソステアリルグリセリルエーテルによって安定化されたW/O型エマルジョンの乾燥過程はPickeringエマルジョンの場合とは全く異なった。スライドガラス上に塗布した直後は約26 μ mだった球状の液滴は、その形態を維持しながら徐々に収縮していった。この時、液滴の表面に窪みは発生しなかった。乾燥に伴う粒径の減少は速くなり、水相の赤色は次第に濃くなった。

4. 考察

本研究によってBSPと水と油を混合するだけで多相エマルジョンが生成することが確認された。一般に多相エ

マルジョンの調製には、二段階乳化法が用いられる。この時、親水性の活性剤と親油性の活性剤の二種類が存在することが多相エマルジョンを安定化する上では必要である。すなわち、BSP/水/*n*-ドデカン三成分系は1種類の界面活性物質しか含まないにもかかわらず、多相エマルジョンが生成したことは極めて珍しい、アブノーマルな現象であると言える。我々はこの多相エマルジョン生成は、お椀型粒子の細孔を持つ特殊な粒子形状によって引き起こされると考えた。すなわち、細孔を満たす液体が粒子の濡れ性をドラステックに変える。固体粒子の細孔が水相によって満たされた時は親水的となり、油相によって満たされた時は親油的となる。このように、お椀型粒子が親水的な界面活性剤と親油的な界面活性剤の役割を同時に担うことができたため、多相エマルジョンが生成することが可能になった。細孔中への水相及び油相の取り込みは共焦点蛍光顕微鏡によって確認した。

さらに、「刷り込み現象」のメカニズムについても考察する。この現象においても粒子上の細孔の存在が重要である。固体粒子を初めに油相に添加した時は細孔内は油によって満たされており、固体粒子は親油的である。一方で、固体粒子を初めに水相に添加した時は細孔内は水によって満たされているため、粒子は親水的であることが予想される。このように固体粒子の濡れ性が異なるためにその相挙動にも違いが生じたものと考えられる。

ピッカリングエマルジョンは、その乾燥過程において液滴の表面が陥没し、異形エマルジョンとなることが明らかになった。一般的な界面活性剤によって安定化されたエマルジョン系では、媒質中でミセルを形成した界面活性剤は、単分子状態に溶解し、液液界面に吸着する。これらの三つの状態は平衡関係にあるため、乾燥によってエマルジョン滴の表面積が小さくなると過剰な界面活性分子は界面から脱離してミセルを形成する。一方、ピッカリングエマルジョンの場合も媒質中に分散した状態と液液界面に吸着した状態は平衡関係にあるが、固体粒子は大きいために、吸脱着の速度は遅く、粒子の界面への吸着プロセスは実質的には不可逆であるといわれている。そのため、乾燥によってエマルジョン滴の表面積が小さくなくても過剰な固体粒子は界面から脱離せず、液液界面の面積を維持するために界

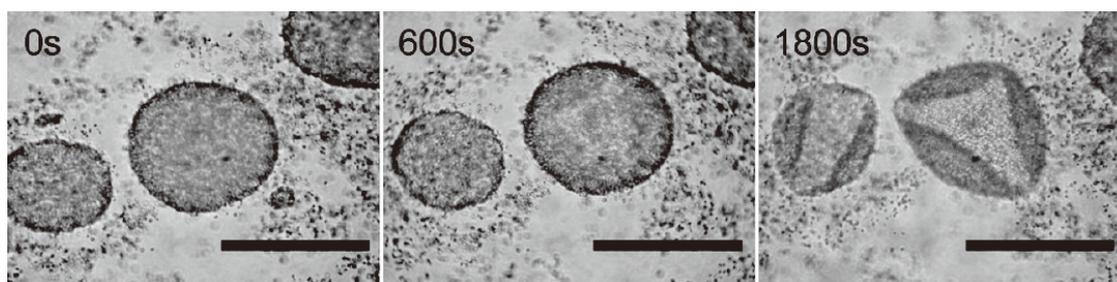


Fig. 5 Optical microscope images of BSP/water/*n*-dodecane (8:20:72, wt/wt/wt). Scale bar is 100 μ m.

面を押し曲げ、窪みが形成されるものと考えられる。

5. 総括

われわれは、お椀型粒子が多相エマルションや非球形エマルションの生成など一般的な乳化系では見られない珍しい現象を引き起こすことを見出した。これらの相挙動は異方性粒子の特異な形態に起因することが示された。さらに、ピッカリングエマルションの内相を寒天ゲルなどで固化することによってカプセルを調製することにも成功している¹¹⁾。本研究で見出された知見により、粒子の形状がその組織構造に及ぼす影響が明らかになり、新しい粒子設計の指針となることが期待される。

(文献)

- 1) 野々村美宗, 固体粒子の自己組織化, オレオサイエンス, **9**, 505-510, 2009.
- 2) Nonomura Y, Sugawara T, Kashimoto, A et al.: Self-assembly of surface-active powder at the interfaces of selective liquids 1: Multiple Structural Polymorphism, *Langmuir* **18**, 10163-10167, 2002.
- 3) Nonomura Y, Fukuda K, Komura S et al.: Self-assembly of surface-active powder at the interfaces of selective liquids 2: Behavior of the organic crystalline powder, *Langmuir* **19**, 10152-10156, 2003.
- 4) Nonomura Y, Kobayashi N: Phase inversion of the Pickering emulsions stabilized by plate-shaped clay particles, *J. Colloid Interface Sci.* **330**, 463-466, 2009.
- 5) Nonomura Y, Ikeda T, Sugimoto M et al.: Phase inversion of Pickering foam and dry water stabilized by microbowls, *Chem. Lett.* **40**, 136-137, 2011.
- 6) Nonomura Y, Komura S, Tsujii K: Surface-active particles with microstructured surfaces, *Langmuir* **21**, 9409-9411, 2005.
- 7) Nonomura Y, Komura S, Tsujii K: Adsorption of microstructured particles at liquid-liquid interfaces, *J. Phys. Chem. B* **110**, 13124-13129, 2006.
- 8) Nonomura Y, Komura S: Surface-active particles with extremely rough surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* **317**, 501-506, 2008.
- 9) Nonomura Y, Kobayashi N, Nakagawa N: Multiple Pickering emulsions stabilized by microbowls, *Langmuir* **27**, 4457-4562, 2011.
- 10) Nakagawa N, Nonomura Y.: Drying process of emulsions stabilized by solid particles, *Chem. Lett.* **40**, 818-819, 2011.
- 11) Hikima T, Nonomura Y: Pickering emulsions and capsules stabilized by wool powder particles, *J. Oleo Sci.* **60**, 351-354, 2011.

アロエの美白成分クロモン類の生合成研究

東京大学大学院薬学系研究科

阿部 郁朗

Octaketide synthase (OKS) from *Aloe arborescens* is a plant-specific type III polyketide synthase (PKS) that catalyzes iterative condensations of eight molecules of malonyl-CoA to produce the C₁₆ aromatic octaketides SEK4 and SEK4b. On the basis of the crystal structures of OKS, the F66L/N222G double mutant was constructed and shown to produce an unnatural dodecaketide TW95a by sequential condensations of twelve molecules of malonyl-CoA. The C₂₄ naphthophenone TW95a is a product of the minimal type II PKS, and is structurally related to the C₂₀ decaketide benzophenone SEK15, the product of the OKS N222G point mutant. The C₂₄ dodecaketide naphthophenone TW95a is the first and the longest polyketide scaffold generated by a structurally simple type III PKS. A homology model predicted that the active-site cavity volume of the F66L/N222G mutant is increased to 748 Å³, from 652 Å³ of the wild-type OKS. The structure-based engineering thus greatly expanded the catalytic repertoire of the simple type III PKS to further produce larger and more complex polyketide molecules.

1. 緒言

多彩な生理活性と構造多様性を有する植物ポリフェノールは、医薬品原料や健康食品以外にも、美肌、シミ抑制効果など化粧品原料としても重要な天然資源である。特に静岡県特産の薬用植物であるアロエに含まれるクロモン類には、抗炎症や抗アレルギー作用に加えて、メラニン色素生産の原因となる酵素チロシナーゼの阻害活性やメラノサイトそのものの増殖抑制によるシミの生成抑制効果などが報告され注目を集めている。筆者は、長年にわたり植物ポリフェノールの生合成と生理活性に関する研究に従事してきたが^{1,2)}、最近、アロエよりペンタケタイドクロモン合成酵素やアロエソン合成酵素など、アロエクロモン類の生合成に関わる数種の酵素遺伝子のクローニングに世界に先駆けて成功した^{3,4)}。これにより、多様な骨格を有し薬用成分として著名な植物ポリフェノールの生合成に、一連の植物ポリケタイド合成酵素スーパーファミリーが広く関与することを明らかにし、これまで関連性が考えられなかった植物二次代謝産物の生合成に統一的な視点を与えた。また、これら酵素の部位特異的変異実験の結果から、基質及び生成物特異性を決定する活性中心アミノ酸残基を同定し、さらに、X線結晶構造解析及び分子モデリングの結果に基づく合理的な変異の導入により、これまで困難とされてきた酵素触媒機能の拡張にも展望を開きつつある^{5,6)}。

本研究では、こうした一連の研究成果を踏まえ、人為的

な酵素機能の制御と分子多様性創出の格好のモデルともいえる、薬用植物キダチアロエ由来オクタケタイド合成酵素をとりあげ、酵素結晶構造に基づく合理的な部位特異的変異の導入により、酵素触媒機能のさらなる拡張と非天然型新規化合物の創出をめざした⁷⁾。

2. 実験

薬用植物のキダチアロエ (*Aloe arborescens*) からクローニングに成功した、オクタケタイド合成酵素 (OKS) は、8分子のマロニルCoAの縮合により芳香族オクタケタイドの骨格を構築する新規Ⅲ型ポリケタイド合成酵素 (PKS) である (Fig. 1A, Fig. 2A)⁴⁾。これまでに大腸菌において異種発現した組み替え酵素を用いて、OKSの活性中心キャビティを構成する Gly207への部位特異的変異の導入により、マロニルCoA縮合数と生成物特異性が決定されることを明らかにした⁴⁾。またOKSとアミノ酸レベルで92%相同性を示し、本来5分子のマロニルCoAの縮合反応を触媒する、キダチアロエ由来ペンタケタイドクロモン合成酵素 (PCS) についても、活性中心キャビティを構成するアミノ酸残基への点変異M207G、及び、結晶構造に基づくトリプル変異F80A/Y82A/M207Gの導入により、マロニルCoAの縮合数をそれぞれ8分子、及び、9分子まで伸長することに成功している^{5,6)}。

そこで本来8分子のマロニルCoAを縮合するOKSについても、PCSの場合と同様に、X線結晶構造解析、そして、結晶構造に基づく合理的な酵素機能の改変へと研究を展開した⁷⁾。まず、Cysを起点としてポリケタイド鎖が伸張していく際に壁となるAsn222にランダムミューテーションを導入した結果、Gly置換体でマロニルCoA縮合数が10分子まで拡大して、非天然型デカケタイド・ベンゾフェノン化合物SEK15を単一生成物として与えることを見出した (Fig. 1B, Fig. 2B)。また、X線結晶構造解析の結果、



Engineered biosynthesis of Aloe chromones

Ikuro Abe

The University of Tokyo Graduate School of Pharmaceutical Sciences

変異の導入によってCAVが実際に拡大することも確認した。このように、合理的な部位特異的変異導入により酵素機能が拡大し最大で10分子のマロニルCoAの縮合が可能となった⁷⁾。そこで今回、更なるポリケタイド鎖長の増大による新規ポリケタイドの創出を目的としてX線結晶構造に基づく部位特異的変異導入を行った。即ち、Asn222近傍に位置するF66残基にも同時に変異を導入したF66L/N222G二重変異酵素を設計した。大腸菌において異種発現、精製した組み替え酵素を用いて、この部位特異的変異の導入が酵素活性に与える影響を精査した⁷⁾。

3. 結果

本来8分子のマロニルCoAの縮合により芳香族オクタケタイドの骨格を構築する新規Ⅲ型PKSである。本来8分子のマロニルCoAを縮合するキダチアロエ由来OKSについて、X線結晶構造解析に基づく合理的な酵素機能の改変へと研究を展開した。その結果、Cysを起点としてポリケタイド鎖が伸張していく際にキャビティの壁となるPhe66とAsn222に同時に変異を導入した二重変異酵素F66L/N222Gが、マロニルCoA縮合数を12分子まで拡大して、非天然型ドデカデカケタイド・ナフトフェノンTW95aを高収率で生成することを見出した (Fig. 1C, Fig. 2C)⁷⁾。

炭素数24からなる非天然型ナフトフェノンTW95aは、単純な構造をもつⅢ型PKSが生産するポリケタイドの中で、炭素鎖長が最大であり、しかも興味深いことに、上述した非天然型デカケタイド・ベンゾフェノン化合物SEK15と構造類似性を示す。また、酵素反応のキネティクスを比較した場合、野生型酵素と比較して顕著な活性の低下は認められなかった⁷⁾。一方、二重変異酵素F66L/N222Gについて、結晶構造に基づくホモロジーモデルを構築したところ、活性中心キャビティの大きさが、野生型酵素の652 Å³から、748 Å³に拡大していることが予想された (Fig. 3)⁷⁾。

以上、筆者らは、この特異な酵素の立体構造を基盤として、酵素活性中心構造を解明し、さらに結晶構造に基づく合理的な部位特異的変異の導入により、C₂単位縮合数の拡大、非天然型炭素-炭素結合の形成、芳香環縮合系の構築など、これまで困難とされてきた酵素触媒機能の操作にも展望を開いた。即ち、本研究により、ポリケタイド鎖長及び生成物特異性を決定する活性中心アミノ酸残基を明らかにし、活性中心キャビティの大きさと形状に応じて、マロニルCoA縮合数の人為的な制御が可能であることを示した。一連の生理活性二次代謝産物の基本骨格構築において決定的な役割を演ずるⅢ型PKSの酵素触媒機能の人為的な制御にむけて大きな前進といえる。今後の課題として、

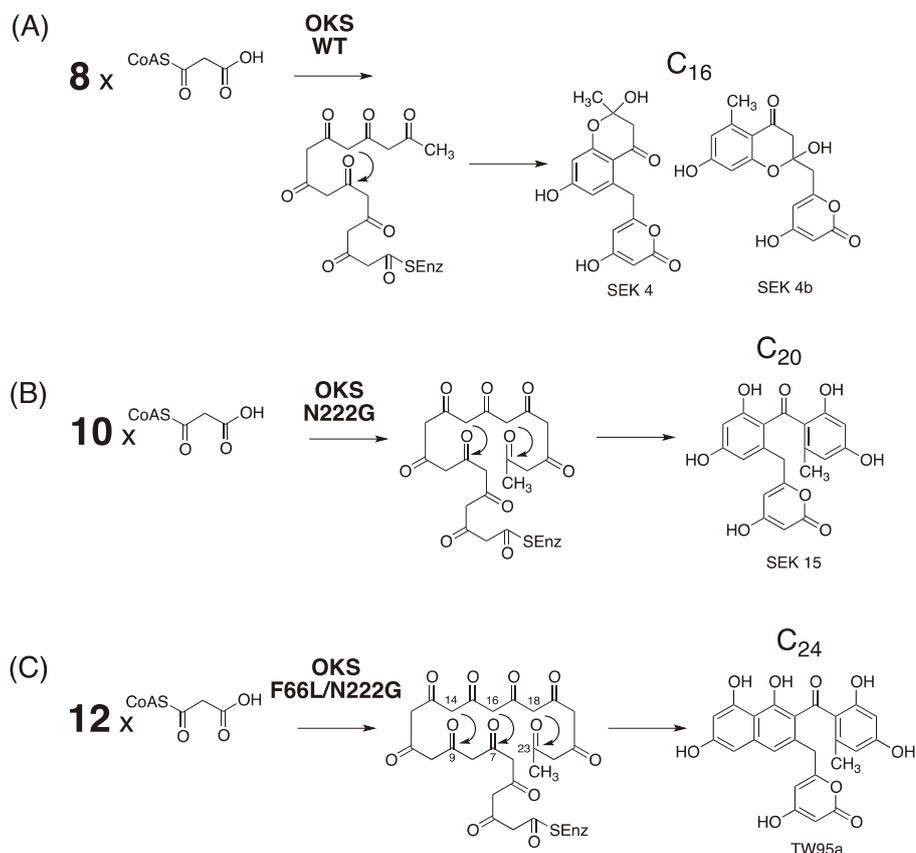


Figure 1 Proposed mechanism for the formation of (A) SEK4 and SEK4b by the wild-type OKS, (B) SEK 15 by the N222G mutant OKS, and (C) TW95a by the F66L/N222G mutant OKS.

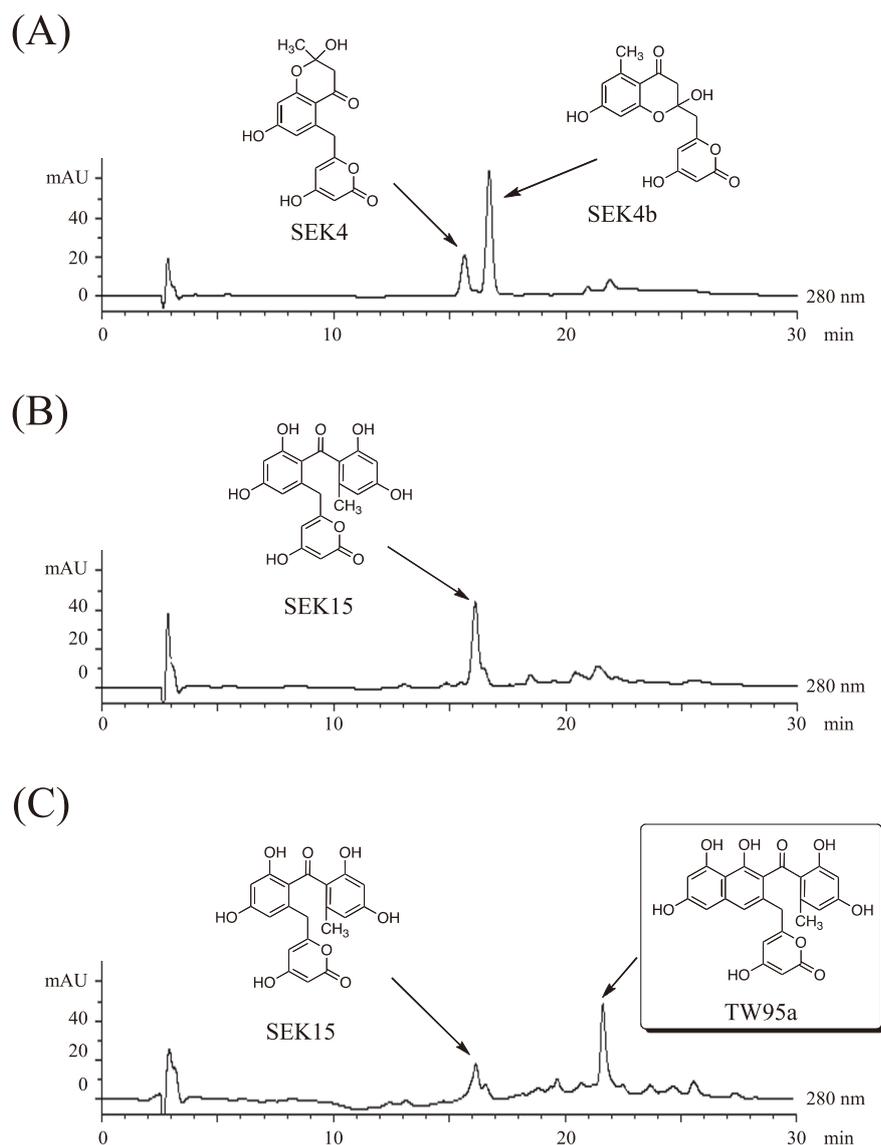


Figure 2 HPLC elution profiles of the enzyme reaction products of (A) the wild-type OKS, (B) the N222G mutant OKS, and (C) the F66L/N222G mutant OKS.

酵素反応基質やポリケタイド鎖長の制御に加えて、閉環・芳香環形成反応機構の解明と人為的な制御にも挑戦していきたい。進化分子工学などの手法を取り入れた変異酵素の触媒活性の最適化や、遺伝子導入による新機能賦与生物の作出など、非天然型新規化合物の生産効率の向上と実用に供する有用物質生産系の構築についても検討を加えたい。

4. 考察

植物PKS酵素が示す最大の特徴の一つに、その広範な基質特異性と触媒ポテンシャルが挙げられる。Ⅲ型PKSの反応は、立体化学が厳密に制御された精巧な酵素システムとは言い難く、むしろ単純なアシル基転移の繰り返しによる「炭素鎖伸長マシン」と捉えるのが適当かもしれない (Cys-His-Asnからなる活性中心触媒残基は、全てのⅢ型PKSにおいて例外なく保存されており、同一のケミスト

リーで炭素鎖伸長反応が進行する)。従って、こうした性質を利用して、一連の人工基質を作用させることにより、効率的な化合物ライブラリーの構築が可能になる。一方、炭素、水素、酸素原子で構成される、単純なカルボニルの化学を触媒するⅢ型PKSに、さらに窒素などヘテロ原子を導入した人工基質を作用させれば、窒素原子の塩基性を利用した新たな炭素-炭素結合の形成も可能になる。Robinsonのトロピノン合成やHeathcockのエズリハアルカロイドの化学合成にみられるように、ポリケトメチレン鎖からシッフ塩基の形成を介した分子内環化反応が連続的に進行して、複雑なアルカロイドの骨格を一举に効率的に構築することができれば、Ⅲ型PKSの酵素触媒機能の可能性をさらに大きく拡張することになる。

上述したように、Ⅲ型PKSは人為的な酵素機能の制御と分子多様性創出の格好のモデルと言える。X線結晶構造

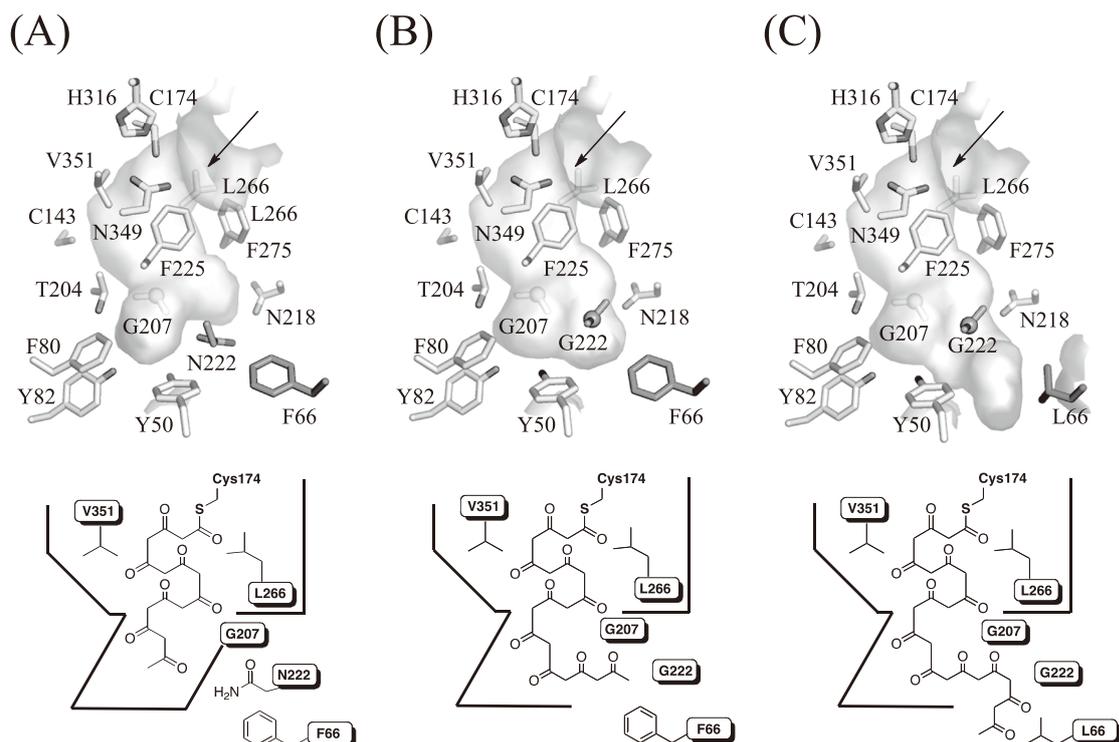


Figure 3 Surface and schematic representations of the active-site architectures of the wild-type and mutant OKSs. Crystal structure of (A) the wild-type OKS, and (B) the N222G mutant OKS, and homology model of (C) the F66L/N222G mutant OKS. The substrate entrances are indicated with arrows. The bottoms of the active-site are indicated by purple surfaces. The Cys-His-Asn catalytic triads are shown as yellow stick models. The mutated residues Asn222 (Gly222) and Phe66 (Leu66) are highlighted as blue and purple stick models, respectively.

解析に基づく合理的な変異の導入により、 C_2 単位縮合数の拡大、非天然型炭素-炭素結合や炭素-窒素結合の形成、また、芳香環縮合系の構築など、これまで困難とされてきた酵素触媒機能の操作にも展望を開きつつあるが、今後はポリケチド鎖長をどこまで伸ばせるか、また、閉環反応の様式をいかに制御するかといった点が課題になる。結晶構造解析に基づけば、少なくともマロニルCoA16分子程度の縮合は可能であるものと予想される。一方、閉環・芳香環形成反応の制御に関しては、今回OKS二重変異酵素が、ナフトフェノン骨格の合成能を新たに獲得した結果がヒントになる。アンスロンやアンスラキノン骨格の形成など、Ⅲ型PKS酵素触媒機能のさらなる拡張と、新規触媒活性を有するスーパー生体触媒の創出に引き続き挑戦したい。

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コスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

(参考文献)

1) Abe I, Morita H, :Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases, *Nat. Prod. Rep.*, 27, 809-838, 2010.

- 2) Abe I, :Engineered biosynthesis of plant polyketides: structure-based and precursor-directed approach, *Top. Curr. Chem.*, 297, 45-66, 2010.
- 3) Abe I, Utsumi Y, Oguro S, et al., :A plant type III polyketide synthase that produces pentaketide chromone, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 1362-1363, 2005.
- 4) Abe I, Oguro S, Utsumi Y, et al., :Engineered biosynthesis of plant polyketides: chain length control in an octaketide-producing plant type III polyketide synthase, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 12709-12716, 2005.
- 5) Morita H, Kondo S, Oguro S, et al., :Structural insight into chain-length control and product specificity of pentaketide chromone synthase from *Aloe arborescens*, *Chem. Biol.*, 14, 359-369, 2007.
- 6) Abe I, Morita H, Oguro S, et al., :Structure-based engineering of a plant type III polyketide synthase: formation of an unnatural nonaketide naphthopyron, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 5976-5980, 2007.
- 7) Wanibuchi K, Morita H, Noguchi H, Abe I, :Enzymatic formation of an aromatic dodecaketide by engineered plant polyketide synthase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 2083-2086, 2011.

エレクトロスプレーを利用した高機能性粉体調製技術の開発

物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトゥクス研究拠点 生体機能材料ユニット

川上 亘作

Many formulation technologies have been developed to overcome low-solubility problem of drug candidates. Herein introduced is the application of the electrospray technology as a new option. This method can produce solid amorphous nanoparticles in one-step. Moreover, it can be operated under ambient temperature condition. The coaxial nozzle was used to control surface characteristic of the particle. Dissolution rate of griseofulvin was significantly enhanced by coating the surface by Eudragit L-100.

1. 緒言

難水溶性薬物の製剤化手段として、可溶化、非晶化、ナノ分散化など様々な特殊技術が実用化されている。とくに非晶質製剤とナノ分散製剤は、固形製剤でありながら高い吸収改善効果が得られる可能性があり、今後の普及に対する期待が大きい。しかしながら、その製造手段や物理安定性の確保にはまだまだ問題点が多く、広い普及の障害となっている。

エレクトロスプレー法は、質量分析のイオン化手段として、またナノファイバーの調製手段として（この場合はエレクトロスピンニング法と呼ばれる）注目されているが、本研究においては、ナノ粒子化と非晶化を同時に達成する製剤化手段として利用した。とくに本手法は、通常は湿式で調製した製剤を乾燥することによって得られるナノ分散固体を1ステップで調製できること、さらには、非晶質の調製には通常温度ストレス等が必要となるが、極めてマイルドな常温・常圧条件下で調製できることが大きな特長と言える。本研究においては、まず小スケールの装置で溶液条件・操作条件が粒子調製に与える影響を精査したのち、スケールアップ装置による薬物粒子の調製、および同軸二重ノズルを用いた粒子の高機能化を行った。

2. 実験

2.1 試料

高分子基剤として、キトサン、オイドラギットL-100、ポリビニルピロリドン (PVP) K30およびK90、モデル薬物としてカルバマゼピン (CBZ)、プレドニゾロン (PDN)、



Application of Electrospray Deposition for Preparing Functional Powders

Kohsaku Kawakami

National Institute for Materials Science, International Center for Materials Nanoarchitectonics, Biomaterials Center

グリセオフルビン (GF) を用いた。

2.2 エレクトロスプレー粒子の調製と評価

目的に応じて、3種類の装置を用いた。全ての調製は、常温・窒素雰囲気下で行った。

各溶液・操作条件が粒子形成に及ぼす影響を精査するためには、小スケール装置を用いた。装置の構成をFig.1に示す。キトサン/酢酸水溶液をシリンジポンプでキャピラリーノズル (23G注射針) に最大0.6 mL/h以下で供給し、7 cm離れたステンレスターゲットに -25kV の負電圧を印加することによって、噴霧を行った。粒子はターゲット上に堆積したままの状態、電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。粒子径は、300個の粒子を抽出して画像解析ソフトを用いてHeywood径を求め、体積平均径で評価した。

バルク製剤は、内径約1 mmのノズルが8本並んだマニホールドに、25kVを印加することにより調製した。15 cm離れたターゲットに噴霧を用い、流速はとくに記述のない限り5 mL/hとした。本実験には、PVP K90とCBZもしくはPDNのエタノール溶液を用い、粒子はターゲットから回収した。評価はSEM観察に加え、粉末X線回折と示差走査熱量測定 (DSC) より行った。

さらに、同軸二重ノズルを用いて2種類の溶液を同時に供給することにより (内外とも0.36 mL/h)、コアシェル

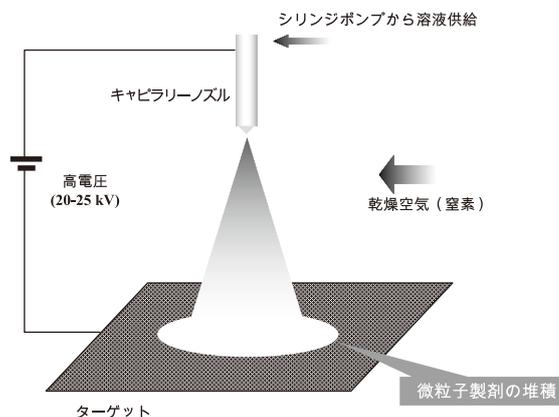


Fig. 1 エレクトロスプレー装置の構成

型粒子を調製した。本実験には、GFのクロロホルム溶液と、オイドラギットL-100のエタノール溶液を用いた。コアシェル構造は、偶発的に調製された比較的大きな粒子（～5 μm）について、共焦点顕微鏡観察を行うことによって確認した。本観察のためには、ローダミンとクマリンを内外層に含有させた粒子を調製した。溶解性試験は、常温条件下において、スターラー攪拌した100mLのJP-2液（pH6.8のリン酸緩衝液）に、GF量として3mgの製剤を乳鉢粉砕後添加することにより評価した。一定時間経過後に抜き取った溶液は、HPLCにより定量した。

3. 結果と考察

3.1 溶液条件・操作条件の検討^{1,2)}

液滴を乾燥して固体粒子を得る場合、溶液濃度が高いほど粒子径は大きくなる。粒子が球形で単分散と仮定すると、質量保存の観点から、粒子径 d_p と液滴径 d_d の間には次式が成立する。

$$d_p = d_d \left(\frac{\rho_d}{\rho_p} C \right)^{\frac{1}{3}} \quad (1)$$

ここで C は溶質濃度、 ρ_d と ρ_p はそれぞれ液滴と粒子の密度である。つまり同一径の液滴から形成される粒子の大きさは、密度変化が無視できるとすると溶液濃度の1/3乗に比例するはずであるが、実際の濃度依存性はそれよりも大きいことが分かった（Fig. 2）。これは濃度の上昇に伴い、溶液粘度が上昇するため、液滴形成時の破断が困難となり、液滴が大きくなるためと推測された。また酢酸濃度を下げることによって導電率を上昇させると、粒子径は低下した。エレクトロスプレーによって形成される液滴の粒子径と、流速 Q 、導電率 K の間には、次式が成立する。

$$d_d \propto \left(\frac{\epsilon_0 \epsilon_r Q}{K} \right)^{\frac{1}{3}} \quad (2)$$

ここで ϵ_0 および ϵ_r は、真空の誘電率および比誘電率である。粒子径の導電率依存性を調べると、流速条件一定の場合その傾きはおよそ-1/3であり、(2)式が成立した。これは導電率の変化によって溶液内電子間の反発が影響を受け、電荷密度の許容量、すなわちレイリー限界が変わる

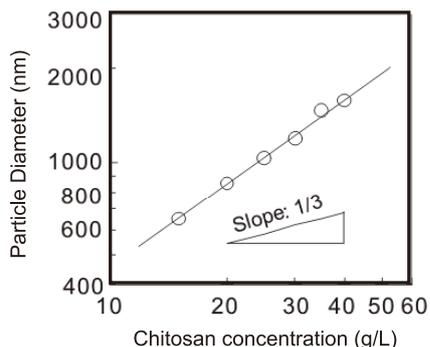


Fig. 2 粒子径のキトサン濃度依存性

ためと解釈できた。溶液粘度を下げることによって、粒子が微細化した。しかし導電率の上昇と粘度低下によって噴霧挙動は次第に不安定となり、閾値を超えると微細な液滴の噴霧が不可能となり、粒子が得られなくなった。なお溶液物性の中で、表面張力などはほとんど粒子径に影響を与えず、上記2因子が支配的要素となることが分かった。

操作パラメータの中では、(2)式で表される通り、送液速度が粒子径に大きく影響することが分かった。その依存性は、導電率が低く安定に噴霧が行える溶液については、-1/3乗に比例することが確認された。印加電圧と噴霧距離は、いずれも電界の強さに影響を及ぼす因子であり、その条件設定が不適切な場合には粒子を得ることができないものの、粒子を得ることができる条件範囲内においては、粒子径などに大きな影響は及ぼさなかった。ノズル径も重要な因子とはならなかったが、エレクトロスプレー滴は溶液表面の歪みの先端が破断されて生じるものであるため、100μm オーダーのノズル径は十分に大きいために、影響因子とならなかったものと解釈できる。

3.2 薬物を搭載した製剤の調製

エレクトロスプレー装置は、現状噴霧乾燥法などと比較すると調製速度が大幅に遅く、それは実用化に向けて克服すべき課題のひとつであるが、単純にノズル数を増やすことで調製効率を高めることができる。本研究においては、ノズル数を8本に増やしたスケールアップ装置を利用して製剤調製を行った。本装置は、薬物と添加物の合計濃度が4%の場合で200mg/hr程度の製剤調製が可能であるが、上記小スケール装置によって見出された濃度依存性、溶液供給速度依存性などは、そのまま成立することが分かった。なお以下の実験ではエタノール溶液を用いており、溶液導電率は全ての検体において10μS/cm以下と非常に低いため、粒子径はμmオーダーとなった。

薬物の溶解性を改善するためには、微粒子化に加えて非晶化も行うことが望ましい。そのためには、まず高分子添加物と薬物の混合比が重要な因子となる。Fig. 3 (a) は、PVP K90とCBZを様々な濃度で含有する粒子について、DSC測定を行った結果である³⁾。いずれの混合比においても、まず50℃付近で混合相に由来すると考えられるガラス転移が観察され、大きな脱水ピークののち、170-180℃付近にPVPリッチ相由来と考えられるガラス転移が観察された。さらにCBZ量が80%となると、160℃付近にCBZの融解挙動も観察されており、CBZリッチな結晶相が分離していることが分かる。なお同様にPVP/CBZ製剤を凍結乾燥で調製すると、CBZが67%含有されていても、PVPとCBZは完全に相溶した。この違いは、分子量が大きく異なる2成分を液滴から乾燥した場合、拡散速度の違いから径方向に相分離が起こるためと解釈される^{3,4)}。脱

水ピークを除去するため、140℃で乾燥処理を行った製剤のDSC測定結果をFig. 3 (b) に示す。混合相のガラス転移温度が脱水により上昇し、100-120℃付近で観察された。PVPリッチ相のガラス転移挙動は乾燥前と差異が認められないことから、脱水によって相状態に大きな影響はないものと思われるが、CBZの融解ピークが少し大きくなっており、さらにはPVP/CBZ=10/6においても小さな融解ピークが出現していることから、CBZリッチ相が少し増えたものと解釈できる。さらに、これらの製剤を200℃で乾燥し、DSC測定を行った結果をFig. 3 (c) に示す。いずれの混合比においてもガラス転移温度はひとつとなり、相

溶した製剤が調製できた。本来CBZの融解が観察されていた製剤については、この状態は熱力学的に不安定と解釈されるため、長期安定性を担保しなければならない。しかしながら、効率的に薬物を分散させる手段として、熱処理は非常に有用であることが分かった。

PDNはCBZよりPVPへの溶解度が高く、PVPの1.5倍量から2倍量を分散できることが分かった。さらに、過剰なPDNも非晶質状態で存在することが分かった。ただしDSC測定を行うと、過剰なPDNは結晶化するため、長期安定性を担保するためには、1.5倍量以下の搭載が望ましいと考えられた。

Fig. 4に、CBZもしくはPDNをPVPに搭載した製剤の粒子径と、全溶質濃度との関係を示す。薬物濃度の増加はほとんど溶液粘度に影響を与えないため、(1)式から期待される通りの1/3の傾きが得られていることが分かる。薬物を全く含まない場合の粒子径が少し大きくなっているが、これは粒子内部に空洞ができていたためと解釈される。Fig. 5に代表的な製剤のSEM写真を示すが、薬物を含まない場合に観察される粒子表面の陥没構造が、CBZを取り込むことによって消失していることが分かる。

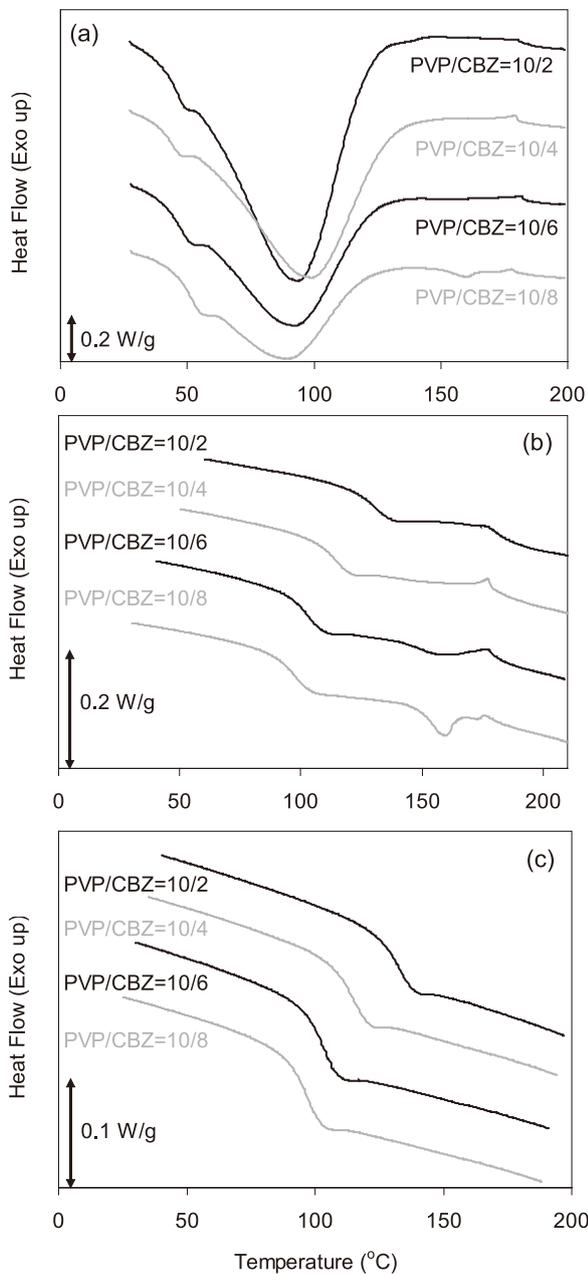


Fig. 3 PVP/CBZ エレクトロスプレー製剤のDSC 曲線 (a) 前処理なし、(b) 140℃で1分乾燥、(c) 200℃で1分乾燥

3.3 コア-シェル粒子の調製⁵⁾

同軸二重ノズルを利用して、GFとオイドラギットL-100のコア-シェル粒子調製を試みたところ、GFを内相にした粒子は理想的なコア-シェル構造を形成することが共焦点顕微鏡より確認されたが、GFを外相とした場合は両成分が均一に分散した製剤が得られた (Fig. 6)。GF溶液を単独で噴霧しても粒子は形成されず、それは粘度の低さが原因と考えられた。同軸二重ノズル使用時にも、外相溶液については微粒子形成能が必要であると推察された。各々の粒子について溶出試験を行ったところ、いずれの粒子もGF原薬と比較して溶出性が改善されたが、とくにGFを内相にした粒子について改善効果が顕著であった。GF原薬の平均粒子径は2.5μmであるが、電子顕微鏡観察では

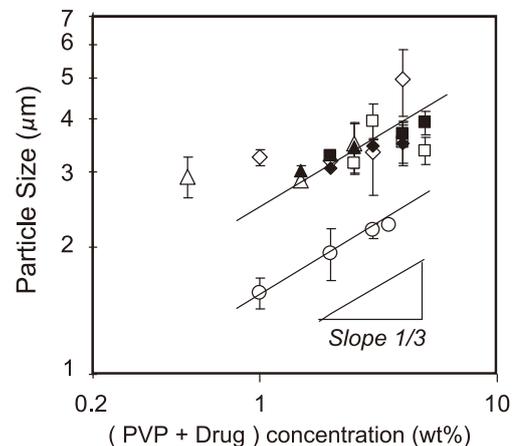


Fig. 4 粒子径 (バルク製剤) の溶質濃度依存性

強く凝集していた。従ってオイドラギットで被覆した製剤による溶出改善は、粒子径が840 nmまで微細化されたのに加え、分散性が大きく改善されたため、さらには非晶化されたためと解釈できた。GFを外相とした粒子は、溶出挙動においても物理混合物と同程度であった。同軸二重ノズルを用いた粒子調製は、各々を独立に設計できることから設計の自由度が高く、非常に有用な製剤調製法であることが分かった。

4. 総括

エレクトロスプレー法を用いることにより、微粒子化、非晶化、高分散性化など、様々な観点から粉体機能を制御できることが分かった。さらには常温・常圧下で操作が可能であることから、安定性に問題を抱える生理活性物質の製剤化に有用であるため、バイオ医薬品などへの利用も期待される。現状は粒子調製に特化した市販装置が存在しないが、装置開発を行うことによって、本手法は広く普及する可能性を秘めた粉体調製技術であると考えられる。

(参考文献)

- 1) Zhang S, Kawakami K: One-step Preparation of Chitosan Solid Nanoparticles by Electrospray Deposition, *Int. J. Pharm.*, 397, 211-217, 2010.
- 2) 川上亘作, 張 紹玲, 飯野京子: エレクトロスプレー法を利用した難水溶性薬物のナノ粒子製剤化, *粉体工学* 会誌, 48, 167-172, 2011.
- 3) Kawakami K: Miscibility Analysis of Particulate Solid Dispersions Prepared by Electrospray Deposition, *Int. J. Pharm.*, in press.
- 4) Kawakami K, Sumitani C, Yoshihashi Y, et al.: Investigation of the Dynamic Process during Spray-drying to Improve Aerodynamic Performance of Inhalation Particles, *Int. J. Pharm.*, 390, 250-259, 2010.
- 5) Zhang S, Kawakami K, Yamamoto M, et al.: Coaxial Electrospray Formulations for Improving Oral Absorption of a Poorly Water-Soluble Drug, *Mol. Pharm.*, 8, 807-813, 2011.

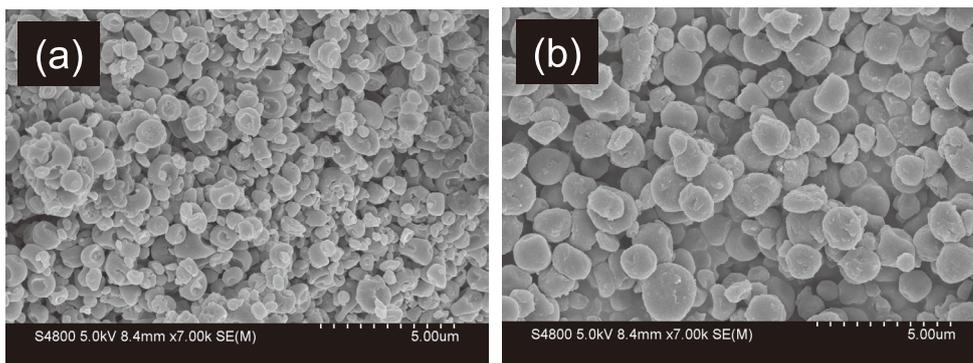


Fig. 5 エレクトロスプレー粒子のSEM写真 (流速 1 mL/min)
 (a) 1% PVP K30, 1mL/min. (b) 1% PVP K30 + 1% CBZ

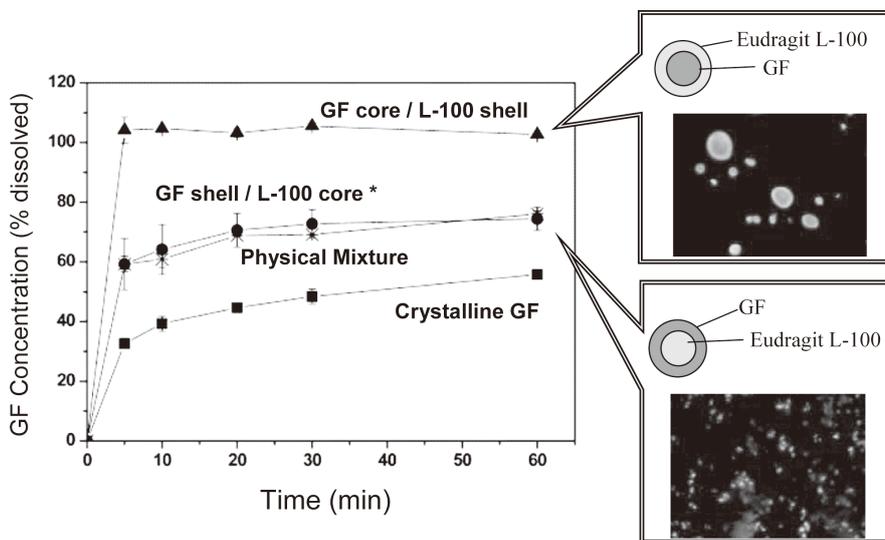


Fig. 6 コアシェル型グリセオフルビン粒子の溶出挙動
 製剤のモデル図は粒子設計戦略、その下は実際の粒子の共焦点顕微鏡写真 (* 共焦点顕微鏡写真に示す通り、実際にはコアシェル構造ではない)

アロエ含有物によるUVケアの研究 —紫外線防御と一重項酸素消去作用—

愛媛大学理工学研究科環境機能科学専攻

長岡 伸一、小原 敬士

The UV protection and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) quenching activity of intramolecularly hydrogen-bonded hydroxyanthraquinone derivatives found in aloe have been studied by means of laser spectroscopy. The UV protective activity provided by excited-state intramolecular proton-transfer (ESIPT) in these molecules correlates with their $^1\text{O}_2$ quenching activity, and the UV protective molecules have high $^1\text{O}_2$ -quenching function. The reason for this correlation can be understood by considering ESIPT-induced distortion of ground-state potential surfaces in encounter complexes with $^1\text{O}_2$. Some molecules contained in aloe have a quenching rate constant larger than that of vitamin E and have a long duration of action due to its resistance to UV degradation and chemical attacks by singlet oxygen and free radicals.

1. 緒言

アロエは鋭く厚い葉を持つ多肉植物であり(図1)、その化粧品やヒーリング用品としての性質は数千年にわたって多くの人々によって高く評価されている¹⁾。伝説に依ればアロエはエジプトの女王で世界三美人の一人であるクレオパトラの美しさの秘密の一つとも言われており、現在でもアロエは、スキンローション、日焼け止めなど、各種化粧品に広く用いられている。

アロエにはO-H...O分子内水素結合を持つ多くの分子が含有されており、分子内水素結合を持つ分子はしばしば有害な紫外線を吸収して励起状態における分子内プロトン移動(ESIPT)によって一部のエネルギーを失わせて無害化するので、アロエに含まれる分子内水素結合を持つ分子にはサリチル酸誘導体と同様に紫外線防御機能^{2a)}が期待される。また、皮膚に光が当たると活性酸素の一つであり有害な一重項酸素が生成されることがあるが、OH基を持つアロエ含有分子はビタミンEなどと同様に抗酸化作用の一部である一重項酸素消去機能^{2b)}が期待される。

そこで我々は、発光分光とレーザー分光を用いて、アロエに含まれる分子内水素結合を持つ種々のヒドロキシアントラキノン類³⁾及び置換基を除いた骨格だけの各種ヒドロキシアントラキノン類(図2)のESIPTに基づいた紫外線防御機能とそれらの分子の一重項酸素消去機能を研究した。本研究の内容は、国際英文誌に文献4として報告した。



図1 アロエ

2. 実験

吸収スペクトルは島津の吸光分光光度計UVmini-1240、蛍光スペクトルは島津の蛍光分光装置RF-5000を用いて測定した。蛍光量子収率 ϕ_f は窒素置換したエタノール溶液で測定したサンプルの蛍光スペクトルを9,10-diphenyl anthraceneの蛍光スペクトル($\phi_f=1.0$)⁵⁾と比較することによって求めた。

一重項酸素のリン光減衰速度定数(k)は浜松ホトニクス製の近赤外蛍光寿命測定装置C7990-01を用いて測定した。励起光源には浜松ホトニクスのNd:YAGレーザーC8597-02(532nm)を用いた。空気飽和のエタノール中で増感剤としてrose bengalを用いて一重項酸素を発生させた。一重項消去剤Qを溶液に添加すると、一重項酸素は次のように消去される。



この反応の二次反応速度定数 k_Q は、MerkelとKearnsの方法⁶⁾を使って次の式から求められる。

$$k = k_0 + k_Q[\text{Q}] \quad (2)$$

ここで、 $[\text{Q}]$ はヒドロキシアントラキノン類のモル濃度、



A study of UV care by molecules contained in aloe - UV protection and singlet-oxygen quenching -

Shin-ichi Nagaoka*, Keishi Ohara
Division of Chemistry and Biology, Graduate School of Science and Engineering, Ehime University

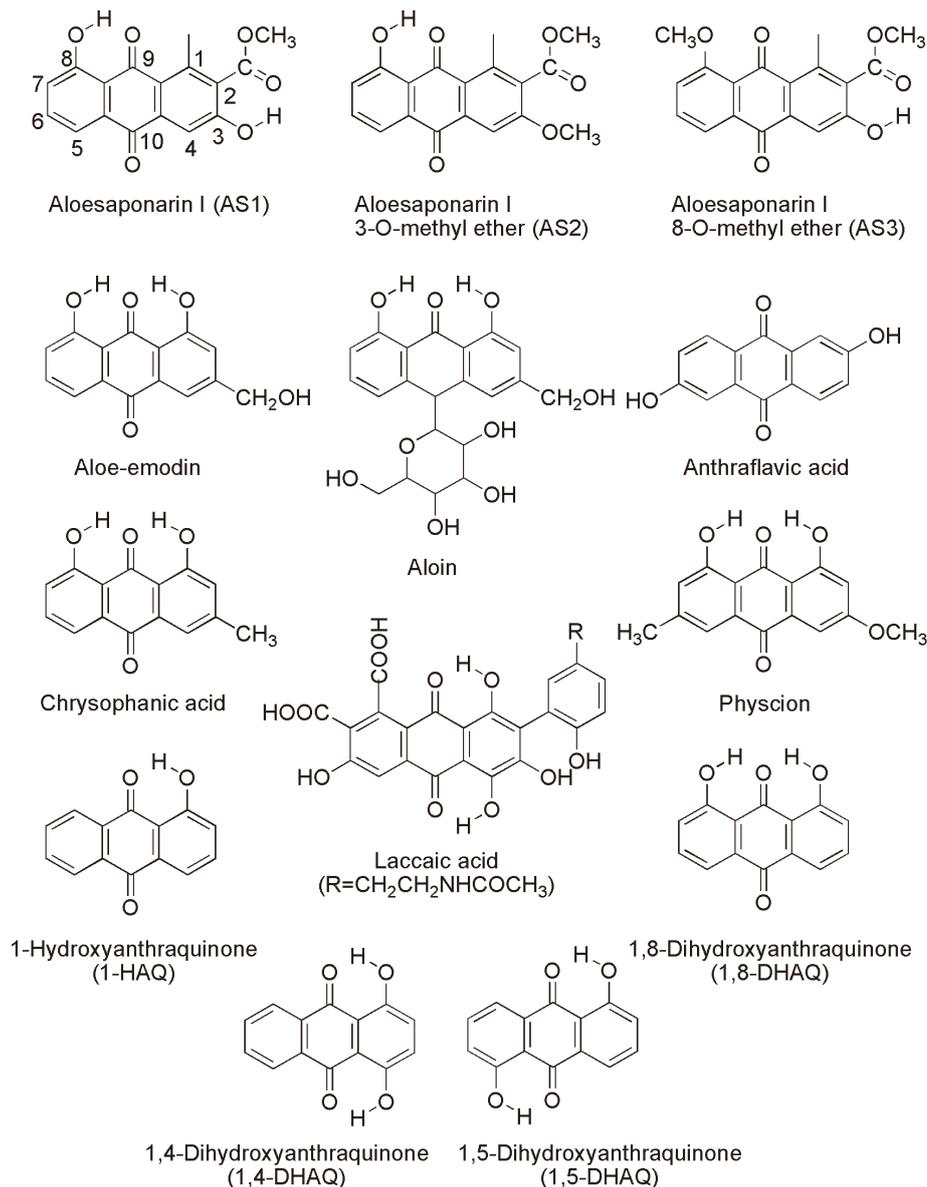


図2 用いた分子の構造
HAQ は hydroxyanthraquinone、DHAQ は dihydroxyanthraquinone を示す。

k_0 は一重項酸素の自然減衰速度定数(自然寿命の逆数)を示す。

3. 結果

3.1 紫外線防御機能

図3にエタノール中の aloesaponarin I (AS1), laccaic acid, chrysophanic acidの吸収スペクトル(点線)と蛍光スペクトル(実線)を示す。AS1は600 nm付近に吸収スペクトルから大きく長波長シフトした蛍光スペクトル(LWE)を示す。LWEは有害な紫外線を吸収してESIPTによって一部のエネルギーを失わせて無害化されていることを示している。AS1のような蛍光を示す分子をグループAと呼ぶことにする。laccaic acidにはこうした長波長シフトは見ら

れず、ESIPTに基づいた紫外線防御機能は全く見られない。このような分子をグループC、その蛍光量子収率を $\phi_{\text{non-PT}}$ と書くことにする。chrysophanic acidでは550 nmより長波長側に紫外線防御機能を示すLWEを示すが、それに加えて550 nmよりも短波長側に1個のピーク(SWE)が見られる。このような分子をグループBと呼ぶ。SWEはESIPTによる紫外光の無害化がないことを示している。そこで、LWEの量子収率 ϕ_{LWE} とSWEの量子収率 ϕ_{SWE} の比($\phi_{\text{LWE}}/\phi_{\text{SWE}}$)が大きいほど紫外線防御機能が大きいことになる。表1に種々のヒドロキシアントラキノン類の $\phi_{\text{non-PT}}$ 、 ϕ_{LWE} 、 ϕ_{SWE} と比 $\phi_{\text{LWE}}/\phi_{\text{SWE}}$ を示す。ヒドロキシアントラキノン類のESIPTのメカニズム及びSWEとLWEの大小については長岡らが提唱している節面モデル^{7,8)}に

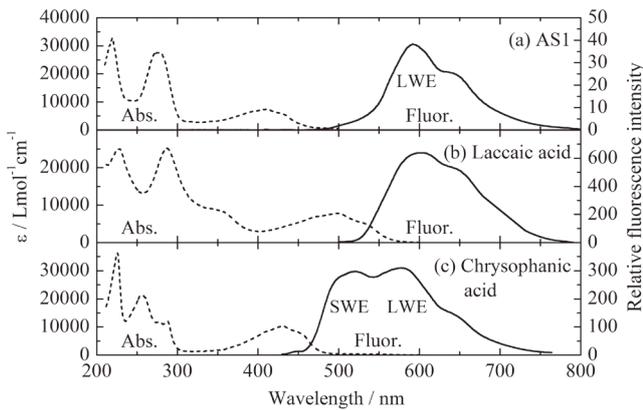


図3 aloesaponarin I (AS1), laccaic acid, chrysophanic acid の吸収スペクトル (Abs. 点線) と蛍光スペクトル (Fluor. 実線)

よって説明できる。

3.2 一重項酸素消去機能

図4aにエタノール中の一重項酸素のリン光スペクトル、図4bにリン光の時間減衰を示す。1,5-DHAQを加えると一重項酸素が1,5-DHAQによって消去され、減衰速度が増加していることが分かる(図4b)。図5にエタノール中の一重項酸素のリン光減衰速度定数(k)と1,5-DHAQ(グループA)、chrysophanic acid(グループB)、anthraflavic acid(グループC)のモル濃度 $[Q]$ との関係を示す。式(2)を用いて図5のグラフの傾きから k_Q を求めることができる。表1に種々のヒドロキシアントラキノン類の k_Q を示す。グループAの k_Q は一重項酸素消去機能を持つ典型的な分子であるビタミンE⁹⁾の値よりも大きく、アロエ含有分子において一重項酸素消去機能が有効であることが分かる。

3.3 紫外線防御機能と一重項酸素消去機能の相関

表1からわかるように、グループAのように ϕ_{LWE}/ϕ_{SWE} が大きくて紫外線防御機能が高い分子ほど k_Q が大きくて一重項酸素消去機能が大きい、グループCでは紫外線防御機能も一重項酸素消去機能も見られない。グループBはグループAとBの中間的な性質を示す。グループA、Bの分子の ϕ_{LWE}/ϕ_{SWE} と k_Q の関係を図6に示す。 ϕ_{LWE}/ϕ_{SWE} と k_Q には正の相関があることがわかる。こうした相関はヒドロキシアントラキノン類の分子と一重項酸素の会合体における基底状態のポテンシャル曲面がESIPTによってゆがむことで説明することができる⁴⁾。

4. 考察

従来の化粧品に紫外線防御剤として用いられているサリチル酸誘導体やベンゾフェノン誘導体などは^{2a)}、天然物で

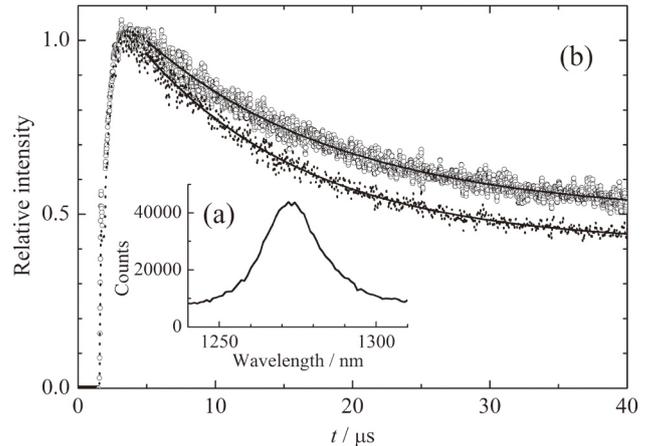


図4

(a) エタノール中の一重項酸素のリン光スペクトル。
(b) 一重項酸素のリン光減衰。白丸は1,5-DHAQが無い場合。黒丸は1,5-DHAQを加えた場合。

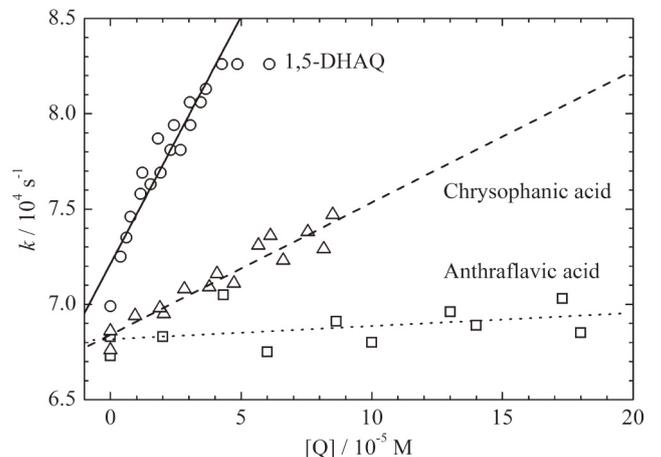


図5 エタノール中の一重項酸素のリン光減衰速度定数(k)と1,5-DHAQ, chrysophanic acid, anthraflavic acidのモル濃度 $[Q]$ との関係

はない上にフリーラジカルや一重項酸素に対する抗酸化活性を持たない。同様にフリーラジカルや一重項酸素に対する抗酸化剤として化粧品に用いられている天然のビタミンE類やコエンザイムQ10など^{2b)}では抗酸化反応によって生じるラジカルが酸化促進効果¹⁰⁾を示して逆効果となりうる。最近、一重項酸素に対する抗酸化剤として化粧品に用いられているアスタキサンチン¹¹⁾などの天然カロテン類は反応速度が速いが⁶⁾、紫外線などによって化学的な劣化を受けやすい¹²⁾。このように従来の素材は長所の陰に短所を含んでいる。

それに対してアロエは、天然の化粧品としてクレオパトラ以前から用いられてきており、アロエの化粧品としての起源はビタミンE、コエンザイムQ10、アスタキサンチンなどのカロテン類よりもはるかに古く、光毒性を示す含有分子もあるが¹³⁾、全般的に安全性が長い歴史の中で確立し

表1 蛍光量子収率 ($\phi_{\text{non-PT}}$, ϕ_{SWE} , ϕ_{LWE}) と比 $\phi_{\text{LWE}}/\phi_{\text{SWE}}$ 及び k_Q の値

| 分子 | $\phi_{\text{non-PT}}$ | ϕ_{SWE} | ϕ_{LWE} | $\phi_{\text{LWE}}/\phi_{\text{SWE}}$ | $k_Q / \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ |
|-------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| グループA | | | | | |
| AS1 ⁹⁾ | | negligible | 9.8×10^{-3} | large | 2.8×10^8 |
| AS1 ⁹⁾ | | negligible | 9.2×10^{-3} | large | 3.1×10^8 |
| 1-HAQ | | 2.3×10^{-3} | 1.5×10^{-2} | 6.5 | 1.8×10^8 |
| 1,5-DHAQ | | 3.0×10^{-3} | 2.5×10^{-2} | 8.3 | 2.6×10^8 |
| グループB | | | | | |
| Aloe-emodin | | 6.8×10^{-3} | 2.0×10^{-2} | 2.9 | 0.5×10^8 |
| Chrysophanic acid | | 8.8×10^{-3} | 2.1×10^{-2} | 2.4 | 0.7×10^8 |
| Physcion | | 2.2×10^{-2} | 4.9×10^{-2} | 2.2 | 0.7×10^8 |
| 1,8-DHAQ | | 6.4×10^{-3} | 1.7×10^{-2} | 2.7 | 1.2×10^8 |
| グループC | | | | | |
| Anthraflavic acid | negligible | negligible | negligible | | negligible |
| AS3 ⁹⁾ | negligible | negligible | negligible | | negligible |
| Laccaic acid | 4.0×10^{-3} | | | | negligible |
| 1,4-DHAQ | 0.20 | | | | negligible |
| その他 | | | | | |
| Aloin | | 1.7×10^{-4} | 2.2×10^{-3} | 13 | negligible |
| Vitamin E ⁹⁾ | | | | | 1.2×10^8 |

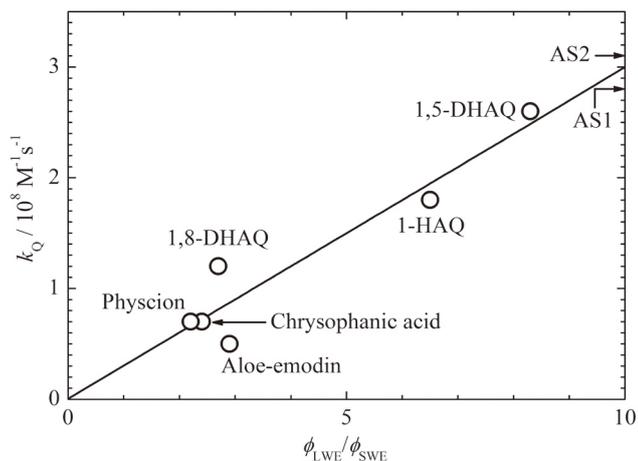


図6 グループ A, B の分子の $\phi_{\text{LWE}}/\phi_{\text{SWE}}$ と k_Q の関係

ている。しかも、その中に含まれる分子内水素結合を含むヒドロキシアントラキノンの一部は、フリーラジカルに対する抗酸化活性こそ持たないけれども紫外線による劣化や一重項酸素やフリーラジカルによる化学的劣化に耐性を持ち⁹⁾、結果のセクションに示したように、紫外線防御機能をサリチル酸誘導体などと同様に持ち、一部の分子の一重項酸素消去活性はビタミンE類を上回る。そこで分子内水素結合を持つアロエ含有分子の紫外線防御と一重項酸素消去作用というUVケア特性を詳細に検討し、長岡らが提唱する節面モデル^{7,8)}を理論的指標として分子設計することによって、紫外線防御機能と一重項酸素消去機能が強く、化学的耐性が強い分子を天然物から抽出するか化学合成すれば、UVケア化粧品の有用な素材を得ることができるで

あろう。

最近異なる報道もあるが¹⁴⁾、一般にはクレオパトラはギリシャの白人と考えられている。それにもかかわらず、アロエを用いることによって、激しく紫外線の降り注ぐアレキサンドリアで世界三大美人の名声を保ち続けた。アロエ含有物によるUVケアがコスメトロジーに及ぼす影響は大きいに違いない。

謝辞

以上の研究は愛媛大学理学部化学科の武井美紀さんと中村真理さんらとの共同研究である。コスメトロジー研究振興財団からは研究資金の支援をいただいた。心より感謝する。

(参考文献)

- 1) Kemper KJ, Chiou V, : Aloe Vela, <http://www.longwoodherbal.org/aloe/aloe.pdf> (2012年5月アクセス) 及び引用文献.
- 2) 光井武夫編, : 新化粧品学 第2版, 南山堂, 東京, 2001年, a) 5-5節, b) 5-6節.
- 3) Dagne E, Bisrat D, Viljoen A, ほか1名, : Chemistry of *aloe* species, *Curr. Org. Chem.*, 4, 1055-1078, 2000.
- 4) Nagaoka S, Ohara K, Takei M, ほか3名, : UV protection and singlet-oxygen quenching activity of intramolecularly hydrogen-bonded hydroxyanthraquinone derivatives found in aloe, *J. Photochem. Photobiol. A*, 225, 106-112 (2011).

- 5) Chen RF, : Measurements of absolute values in biochemical fluorescence spectroscopy, J. Res. Nat. Bureau Stand., 76A, 593-606, 1972.
- 6) Wilkinson F, Helman W, Ross AB, : Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation, J. Phys. Chem. Ref. Data, 24, 663-1021, 1995 及び引用文献.
- 7) Nagaoka S, Nagashima U, : Effects of node of wave function upon excited-state intramolecular proton transfer of hydroxyanthraquinones and aminoanthraquinones, Chem. Phys., 206, 353-362, 1996.
- 8) Nagaoka S, Nakamura A, Nagashima U, : Nodal-plane model for excited-state intramolecular proton transfer of o-hydroxybenzaldehyde: substituent effect, J. Photochem. Photobiol. A, 154, 23-32, 2002.
- 9) Nagaoka S, Fujii A, Hino M, ほか7名, : UV protection and singlet oxygen quenching activity of aloesaponarin I, J. Phys. Chem. B, 111, 13116-13123, 2007.
- 10) Terao J, Matsushita S, : The peroxydizing effect of α -tocopherol on autoxydation of methyl linoleate in bulk phase, Lipids, 21, 255-260, 1986 及び引用文献.
- 11) <http://www.fujifilm.co.jp/rd/field/story/cosmetic/index02.html> (2012年5月アクセス).
- 12) The Merck Index, 13th ed., Budavari, S, O' Neil MJ, Smith A, ほか2名, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, 1996, pp.303-304.
- 13) Wamer, WG, Vath P, Falvey DE, : In vitro studies on the photobiological properties of aloe emodin and aloin A, Free Radical Biol. Med., 34, 233-242, 2003 及び引用文献.
- 14) <http://www.nhk.or.jp/special/onair/090802.html> 及び <http://blog.livedoor.jp/myanchan/archives/65231839.html> (2012年5月アクセス).

加齢に伴う皮膚脂質の変化に対するリピドーム解析

京都府立医科大学 消化器内科

守田 麻由子

Human skin is exposed to some environmental stress. Because phospholipid (PL) and cholesterol esters (CE) are major component of cellular membrane, it is expected that the lipid change is a cause of the morphological change of the human skin. To analyze the morphological change and the lipid change of the skin according to aging would be important. In this study, to investigate the correlation of histology change and lipid change of skin, we analyzed lipid class, fatty acid composition using HaCaT cells.

The major component of lipid extracted from HaCaT cells was PL. The relative amount of CE was also high. The total relative amount of saturated fatty acid and unsaturated fatty acid was the almost same, but it of poly unsaturated fatty acid was low. Elaidic acid and/or oleic acid (18:1 ; carbon numbers : degree of unsaturation) would be the key component of skin lipid. The major molecular species of phosphatidyl choline (PC) were 32:1PC, 34:1PC, 34:2PC and 36:2PC. These molecules contained more than one unsaturated fatty acid acyl chain. We will examine the structural analysis for triacylglycerol (TG) molecular species and PC molecular species and these oxidation products of skin tissue.

1 緒言

皮膚は異物との接触や、紫外線、乾燥など、常にストレスを受けている組織である。皮膚脂質に関して脂質過酸化物質による皮膚炎の発症、コレステロール酸化物の発がん性などが報告されている¹⁾。脂質過酸化物質は加齢による量的変動を示し²⁾、リン脂質やコレステロールは生体膜の構成成分であることから、脂質変化が皮膚の形態変化の一因であることが予想される。皮膚では加齢に伴って表皮、真皮、脂肪層が薄くなり、弾力を損失するなど形態が変化する。皮膚脂質を網羅的に解析し、脂質変動の全体像のプロファイリングから加齢に伴う皮膚の形態変化および脂質変動を解析することが重要であると考えられる。

本研究では質量分析法を用いて皮膚のリピドーム解析を行い、皮膚が受けるストレスに起因する皮膚の組織学的な変化と脂質変動の相関関係を明らかにすることを目的とし、皮膚細胞を用いてリピドーム解析へ向けた予備検討を行った。

2 実験

2-1 脂質抽出

クロロホルム-メタノール混合溶液を用い、細胞から脂質を抽出した。



Lipidomic analysis of skin lipid changing by aging

Mayuko Morita

Molecular Gastroenterology and Hepatology,
Kyoto Prefectural University of Medicine

2-2 脂質クラス分析

脂質クラス分析はTLC-FID法に従った^{3,4)}。活性化させたクロマロッド (Chromarods S III, 三菱化学メディエンス) に脂質サンプルを1μLスポットし、溶媒中で展開した。脂質種の検出はイアトロスキャン (Iatroscan MK-6 三菱化学メディエンス) を用いた。各脂質クラス同定は、標準物質との保持時間の比較により行った。

【TLC条件】

・展開溶媒

ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸=80：20：1 (v/v/v)

【検出器条件】

・水素流量 160mL/min、空気流量1500mL/min

・スキャンスピード 30sec/scan

2-3 脂肪酸組成分析

脂肪酸組成分析はGC-MSを用いて行った。抽出した脂質を三フッ化ホウ素・メタノール法⁵⁾に従ってメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィー・質量分析計 (GC-17A-HP5000 (Shimadzu)) に供した。脂肪酸メチルエステルの同定は標準試薬 (Supelco 37 Component FAME Mix, SUPELCO) の保持時間との比較およびライブラリサーチによって行った。

【GC-MS条件】

・カラム DB-23 (Agilent Technologies)

・カラム温度 170℃ 1分間→4℃ /minで230℃まで昇温
→230℃で5分間保持

・キャリアガス ヘリウム (流速 1mL/min)

・スプリット比 40：1

・気化室温度 270℃

・インターフェイス部温度 290℃

2-4 質量分析

質量分析法を用いて、脂質カラムの代わりにユニオンを接続した、フローインジェクションを行った。

【測定条件】

- ・イオン化法 エレクトロスプレーイオン化法
- ・質量分析計 esquire HCT plus (BRUKER DALTONICS)
- ・溶媒 メタノール：水=90：10 (pH=7.0, 1% ギ酸)
- ・流速 20 μ L/min
- ・測定モード Positive mode、Negative mode

3 結果

3-1 脂質クラス分析

HaCaT細胞から抽出した脂質の脂質クラスをTable 1に示した。HaCaT細胞抽出脂質ではリン脂質の割合が高く、次いでステロール類、TGの割合が高かった。

3-2 脂肪酸組成分析

HaCaT細胞抽出脂質の脂肪酸組成をTable 2に示した。主な脂肪酸は16:0 (ステアリン酸)、18:0 (パルミチン酸)、18:1 (エライジン酸、オレイン酸)であった。エライジン酸の割合はオレイン酸と同等であった。HaCaT細胞抽出脂質は、飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸の割合がほぼ同じであり、高度不飽和脂肪酸の割合は低い(図1)。

3-3 脂質の網羅的解析

HaCaT細胞抽出脂質では、Table 1に示したようにリン

Table 1 HaCaT細胞抽出脂質の脂質クラス

| | ① | ② | ③ | Ave. |
|--------|-------|-------|-------|------------------|
| CE | 11.20 | 12.15 | 16.19 | 13.17 \pm 2.65 |
| TG | 8.52 | 5.73 | 10.34 | 8.20 \pm 2.32 |
| FFA | 6.40 | 3.83 | 6.02 | 5.42 \pm 1.39 |
| Ch1+DG | 6.21 | 5.85 | 7.49 | 6.52 \pm 0.86 |
| PL | 67.67 | 72.44 | 57.94 | 66.1 \pm 7.38 |

Table 3 HaCaT細胞抽出脂質の主な PC、TG 分子種 (Positive mode)

| PC [M+H] ⁺ | m/z | Intensity | TG [M+NH ₄] | m/z | Intensity |
|-----------------------|-------|-----------|-------------------------|-------|-----------|
| 30 : 1PC | 706.5 | 951998 | 46 : 0TG | 796.5 | 313125 |
| 32 : 1PC | 732.5 | 4201270 | 48 : 0TG | 824.6 | 316770 |
| 32 : 2PC | 730.5 | 939616 | 48 : 1TG | 822.6 | 385241 |
| 34 : 0PC | 762.5 | 1093622 | 48 : 2TG | 820.5 | 327803 |
| 34 : 1PC | 760.5 | 7121840 | 50 : 1TG | 850.6 | 524523 |
| 34 : 2PC | 758.5 | 4265662 | 50 : 2TG | 848.6 | 665469 |
| 34 : 3PC | 756.5 | 517890 | 52 : 1TG | 878.6 | 283877 |
| 36 : 1PC | 788.5 | 1346654 | 52 : 2TG | 876.6 | 939291 |
| 36 : 2PC | 786.5 | 4647872 | 52 : 3TG | 874.6 | 656301 |
| 36 : 4PC | 782.5 | 529874 | 54 : 2TG | 904.6 | 287452 |
| 38 : 2PC | 814.5 | 967667 | | | |
| 38 : 3PC | 812.5 | 545545 | | | |
| 38 : 4PC | 810.5 | 541770 | | | |

4 考察

脂質の割合が高かったが、リン脂質の中でも細胞膜の構成成分であるPCが主要成分であった。Positive modeで検出された主なPC分子種、TG分子種を図2A、Table 3に示した。飽和脂肪酸だけで構成されたPC、TG分子種のIntensityは弱く、多くが分子内に1個以上の不飽和脂肪酸を含むPC、TG分子種であった。Negative modeで検出された主なPC分子種をTable 4に示した。遊離脂肪酸(～m/z400)はほとんど検出されず、検出された主な脂質はPCであった(図2B、Table 4)。

HaCaT細胞を用いて皮膚脂質の解析を行った。細胞抽出脂質の主な脂質成分はリン脂質であり、質量分析計による分析により、リン脂質の中でも特にPCを多く含んでい

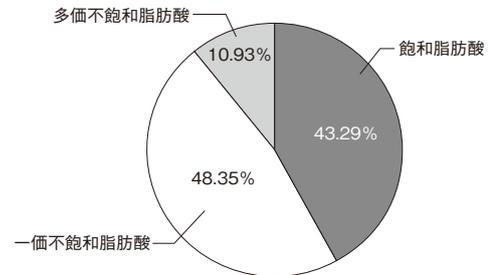


図1 HaCaT抽出脂質の脂肪酸組成

Table 2 HaCaT細胞抽出脂質の脂肪酸組成

| | ① | ② | ③ | Ave. |
|---------|-------|-------|-------|------------------|
| C14 : 0 | 4.28 | 3.15 | 3.04 | 13.49 \pm 0.69 |
| C16 : 0 | 32.47 | 26.82 | 26.11 | 28.47 \pm 3.49 |
| C16 : 1 | 2.97 | 3.14 | 2.87 | 2.99 \pm 0.14 |
| C16 : 1 | 9.25 | 9.49 | 10.03 | 9.59 \pm 0.40 |
| C18 : 0 | 11.30 | 11.94 | 10.77 | 11.34 \pm 0.59 |
| C18 : 1 | 19.50 | 19.19 | 18.62 | 19.10 \pm 0.45 |
| C18 : 1 | 14.91 | 16.25 | 18.83 | 16.66 \pm 1.99 |
| C18 : 2 | 2.14 | 4.12 | 2.48 | 2.91 \pm 1.06 |
| C18 : 2 | 3.13 | 2.97 | 3.69 | 3.26 \pm 0.38 |
| C20 : 4 | 3.85 | 6.03 | 4.39 | 4.75 \pm 1.13 |

Table 4 HaCaT細胞抽出脂質の主な PC 分子種 (Negative mode)

| PC [M+HOO] ⁺ | m/z | Intensity |
|-------------------------|-------|-----------|
| 30 : 1PC | 750.5 | 18760 |
| 32 : 0PC | 778.5 | 33925 |
| 32 : 1PC | 776.5 | 58922 |
| 32 : 2PC | 774.5 | 13071 |
| 34 : 0PC | 806.4 | 15502 |
| 34 : 1PC | 804.5 | 103839 |
| 34 : 2PC | 802.5 | 54970 |
| 36 : 1PC | 832.4 | 17334 |
| 36 : 2PC | 830.5 | 66767 |
| 38 : 2PC | 858.5 | 19594 |

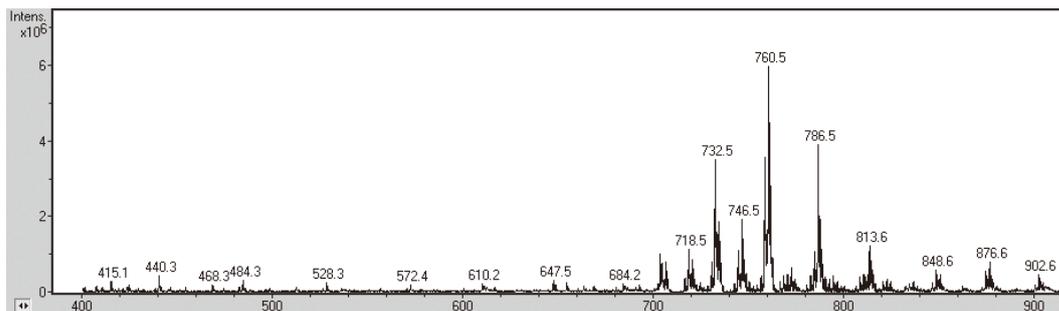


図 2A フローインジェクションによる測定結果 (Positive mode)

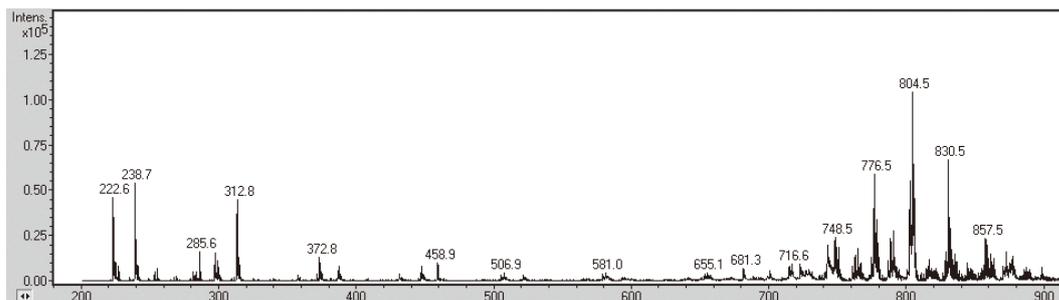


図 2B フローインジェクションによる測定結果 (Negative mode)

ることが示された。脂肪酸組成の特徴として、飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸の割合がほぼ同じであること、エライジン酸の割合が高いことが挙げられる。フローインジェクションによる網羅的測定において、ポジティブモード、ネガティブモードともにPCが顕著に検出され、それらは分子内に1個以上の不飽和脂肪酸をアシル基にもつPC分子種であった。

細胞膜の主要構成成分であるPCの組成変化は、加齢に伴う皮膚組織の形態変化の指標になると考えられる。特に一価不飽和脂肪酸を含むPC分子種やTG分子種、これらに由来する化合物や酸化生成物が加齢に伴う皮膚脂質の指標になると考えられる。

(参考文献)

1) Black HS, DR Douglas: Formation of carcinogen of natural origin in the etiology of ultraviolet light-induced carcinogenesis, *Cancer Res*, 33, 2094-2096, 1973.
 2) 金子孝夫, 田原正一, 松尾光秀: 老化に伴う皮膚脂質の

過酸化物質の加齢変化

3) N.C.Shantha: Thin-layer chromatography-flame ionization detection Iatroscan system. *J. Chromatography*, 624, 21-35, 1992.
 4) Laurent Striby, Raymond Lafont, Madeleine Goutx: Improvement in the Iatroscan thin-layer chromatographic-flame ionization detection analysis of marine lipids. Separation and quantitation of monoacylglycerols and diacylglycerols in standards and natural samples. *J. Chromatogr. A*, 849, 371-380, 1999.
 5) Shirai N, Suzuki H, Tokairin S, Ehara H, Wada S: Dietary and seasonal effects on the dorsal meat lipid composition of Japanese (*Silurus asotus*) and Thai catfish (*Clarias macrocephalus* and hybrid *Clarias macrocephalus* and *Clarias galipinus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 32, 609-619, 2002.

自生ハマナス (*Rosa rugosa*) の精油成分とその抗菌活性 ～コスメトロジーへの有効利用を目的とした基礎的研究～

弘前大学大学院 理工学研究科

長 岐 正 彦

The essential oils and distilled-water extracts of *Rosa rugosa* flower, leaf, and fruit were analyzed by flame ionization detector-gas chromatography and mass spectrometer-gas chromatography. The principle components in the flower oil and water were citronellyl acetate, citronellol, and geranyl acetate, and citronellol and geraniol, respectively. For the leaf oil and water, it was γ -muurolene and geraniol and linalool, respectively. The main component in fruit water was terpinen-4-ol. Fruit oil, on the other hand, could not be extracted. Additionally, combining the *Rosa rugosa* distilled-water with one of the isoprenoids geraniol, farnesol, or citral showed higher antibacterial activity than the isoprenoid alone.

1. ハマナスの成分分析

1.1 緒 言

isoprenoidは植物や昆虫、菌類など多くの生物の生体内でisoprene (C₅) から合成される生体物質である。また、isoprenoidは植物から発散される香り成分としても知られており、森林浴やアロマセラピー等の分野で注目されている。アロマセラピーにおいて、バラの精油は古くから人気が高いが、現在その殆どはトルコなどで栽培されるダマスクローズ (*Rosa damascena*) から精製されている¹⁻¹⁾。ハマナス (*Rosa rugosa*) は東アジアに広く分布するバラの原種の一つであり、日本に於いては北海道から山陰地方までの日本海沿岸に広く分布する。青森県では、青森市や鱒ヶ沢町がハマナスの花を市町村の花に指定しており、県民に広く親しまれている。ハマナスの花の成分に関しては、中国産のものを中心に幾つか報告されているが^{1-2)~1-6)}、葉や実等その他の部位に関する研究は少ない。我々は、県産ハマナスが含有する有用成分を検索するため、花や葉、実について成分を分析し、部位による成分の違いを調査した。また、ハマナスの花の香りについて研究する目的で、Head-Space法 (HS法) GC-MS測定による香気成分の分析も行った。

1.2 実 験

1.2.1 植物原料

ハマナスの花及び葉は青森県西津軽郡鱒ヶ沢町で2009年の6月に採取し、実は同年9月に採取した。



Composition and antimicrobial activity of the essential oil and water extract from Japanese wild *Rosa rugosa* ~Fundamental study on the effective use to cosmetology~

Masahiko Nagaki

Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University

1.2.2 成分抽出

植物からの成分の抽出には水蒸気蒸留法を使用した。蒸留は6時間行い精油を分取した。ハマナスの花2.5kgからは精油が0.15g (蒸留量に対し0.0058%) 得られた。また、ハマナスの葉634gからは精油が0.39g (0.062%) 得られたが、実からは精油は得られなかった。

水蒸気蒸留により得られた蒸留湯は、それぞれ1Lに対してhexaneを用いて4回 (100ml, 80ml, 60ml, 60ml、全量300ml) 抽出を行い、無水硫酸マグネシウムを用いた乾燥の後、溶媒を留去した。

1.2.3 分析

精油、及び蒸留湯からの抽出物の成分分析はGas chromatography-Flame ionization detector (GC-FID) 及びGas chromatography-Mass spectrometer (GC-MS) により行った。GC-FID分析はHitachi Gas Chromatograph G-5000Aにより行い、carrier gasはN₂を60ml/minで使用した。カラムはpoly (alkylene glycol) カラム (Sigma-Aldrich, 30m×0.25mm i.d.) を用い、昇温プログラムは40℃ (5min) - 10℃ /min - 200℃で行い、Injector、及びDetectorはそれぞれ150℃、250℃で使用した。GC-MS分析はJEOL Q1000 GC-Mk-IIを使用してHP-5カラム (Agilent, 30m×0.32mm i.d.) により分離した。carrier Heガスは1ml/minで用い、温度プログラムは50℃ (4.7min) - 15℃ /min - 280℃ (2min) で行った。injectorとGC-transfer lineは共に200℃に設定した。

HS法GC-MS測定は、JEOL12031 Headspace auto samplerと結合させたJEOL Q1000GC-Mk-IIにより行い、カラムはACUATIC (Agilent, 60m×0.32mm i.d.) を使用した。carrier Heは圧力15psiで使用し、昇温プログラムは40℃ (3min) - 10℃ /min - 170℃ - 20℃ /min - 200℃ (12.5min) で行った。Sample Loopモード、sample加熱は68℃により香気成分をGC部へ導入し、HS-transfer line及びGC-transfer lineはそれぞれ150℃、200℃で使用した。

成分の同定には、GC-MSにより得られたマススペクトルとNIST MSスペクトルライブラリデータ (<http://www>.

nist.gov/srd/nist1a.cfm との比較、GC retention time (RT) の比較により行った。保持時間の一致は、標品との co-injection 測定、n-alkane (C₇ - C₄₀) のピーク時間から算出される Retention Index (RI) の文献値との比較により行った。また、各成分の割合は GC ピーク面積比から算出した。

1.3 結果と考察

1.3.1 ハマナスの花

ハマナスの花から得られた精油、及び蒸留湯からの抽出物成分を Table 1-1 に示す。精油からは全体の 85.2% に相当する 37 成分が同定され、citronellyl acetate を 12.1% と最も多く含有していた。Babuらの報告によれば、バラの精油生産に世界的に用いられているダマスクローズ (*Rosa damascena*) の精油は、citronellol と nerol の 2 成分で 35% を構成しており、geraniol も 21% と高い含有率で見られる¹⁻⁷⁾。これに対して、ハマナスの花から得られた精油は citronellol が 7.7%、nerol が 1.4% と、その合計 9.1% はダマスクローズの精油と比較して 3分の1以下であり、geraniol もハマナスの花の精油には 1.5% しか見られなかった。また、ダマスクローズでは、ハマナスの花の精油の最多成分である citronellyl acetate は殆ど見られていない¹⁻⁷⁾。この事から、ハマナスはダマスクローズよりも acetate 体を生成しやすいのではないかと考えられる。ハマナスの花の蒸留湯から抽出された成分は精油とは異なり citronellol を 31.4%、geraniol を 13.4%、nerol を 11.1% 含有と多く含有

しており、全体的に精油より alcohol 体の成分比が高く、acetate 体の成分比が低く見られた。geraniol や citronellol はその甘い香りにより香料等に広く用いられており、ハマナスの蒸留湯に含まれる成分も香水などへの応用に有用ではないかと考えている。

1.3.2 ハマナスの葉

葉の精油及び蒸留湯に含まれる成分を Table 1-2 に示した。葉の精油に最も多く見られた成分は γ -muurolene (10.4%) であるが、この化合物は蒸留湯抽出物では全く見られなかった。ハマナスは葉に於いても、geraniol、linalool の成分比が精油の 0.4%、0.2% に比べて蒸留湯では 4.2%、3.9% と高く見られた。青臭い香りにもかかわらず、ハマナスの葉がバラやラベンダーの花の香り成分である geraniol や linalool を含有していると言う事実は興味深い結果である。

1.3.3 ハマナスの実

ハマナスの実から得られた蒸留湯に含まれる成分は全体の 92.3% に相当する 52 成分が同定された (Table 1-3)。実の成分は樟脳様の香りを持つ terpinen-4-ol とラベンダー様の香りを持つ linalool がそれぞれ 19.1%、15.6% と非常に多く見られた。また、花・葉の蒸留湯では何れの acetate 化合物も 1% 未満の含有率だったのに対し、実の蒸留湯では lavandulyl acetate (6.6%)、linalyl acetate (3.4%)、geranyl acetate (3.2%) など比較的多く見られた。

1.3.4 ハマナスの花の香気成分

HS法GC-MS測定によるハマナスの花の香気成分を

Table1-1 ハマナスの花に含まれる成分

| No. | components | EO (%) | DW ex. (%) | RT | RI | CI | No. | components | EO (%) | DW ex. (%) | RT | RI | CI |
|-----|----------------------------|--------|------------|-------|------|----|-----|--|--------|------------|-------|------|----|
| 1 | α -pinene | - | 0.1 | 5:40 | 938 | ○ | 24 | geranyl acetate | 5.5 | 0.2 | 11:46 | 1385 | ○ |
| 2 | β -myrcene | - | 0.8 | 6:56 | 994 | ○ | 25 | methyl eugenol | 0.5 | 2.3 | 11:58 | 1405 | - |
| 3 | α -terpinene | - | 0.2 | 7:21 | 1019 | ○ | 26 | β -cedrene | 0.9 | - | 12:08 | 1426 | - |
| 4 | <i>p</i> -cymene | 0.7 | 1.4 | 7:29 | 1027 | ○ | 27 | α -bergamotene | 1.6 | - | 12:17 | 1443 | - |
| 5 | limonene | 1.6 | 3.7 | 7:34 | 1032 | ○ | 28 | epi- β -santalene | 0.6 | - | 12:23 | 1454 | - |
| 6 | γ -terpinene | - | 0.4 | 8:03 | 1063 | - | 29 | γ -muurolene | 6.1 | - | 12:31 | 1469 | - |
| 7 | acetophenone | - | 0.6 | 8:10 | 1071 | - | 30 | α -curcumene | 1.0 | - | 12:41 | 1489 | - |
| 8 | <i>cis</i> -linalool oxide | - | 0.5 | 8:17 | 1078 | - | 31 | 2-tridecanone | 6.0 | - | 12:45 | 1496 | - |
| 9 | linalool | 0.5 | 9.0 | 8:38 | 1100 | ○ | 32 | 8-isopropyl-1,5-dimethyl cyclodeca-1,5-diene | 5.5 | - | 12:53 | 1520 | - |
| 10 | 2-phenylethanol | 0.9 | 8.1 | 8:50 | 1116 | ○ | 33 | nerolidol | 0.7 | - | 12:59 | 1524 | - |
| 11 | <i>trans</i> -rose oxide | - | 0.1 | 9:02 | 1132 | - | 34 | caryophyllene oxide | 0.3 | - | 13:32 | 1590 | - |
| 12 | menthone | 0.6 | 0.5 | 9:22 | 1158 | ○ | 35 | widdrol | - | 0.4 | 13:46 | 1620 | - |
| 13 | terpinen-4-ol | - | 0.7 | 9:40 | 1183 | ○ | 36 | nerolidyl acetate | 0.5 | - | 14:10 | 1672 | - |
| 14 | α -terpineol | - | 5.2 | 9:49 | 1195 | ○ | 37 | β -bisabolol | 0.5 | 0.1 | 14:21 | 1696 | - |
| 15 | citronellol | 7.7 | 31.4 | 10:13 | 1227 | ○ | 38 | 2-pentadecanone | 1.4 | - | 14:23 | 1700 | - |
| 16 | nerol | 1.4 | 11.1 | 10:23 | 1242 | - | 39 | farnesol | 1.0 | 0.2 | 14:35 | 1728 | ○ |
| 17 | neral | 0.2 | 0.1 | 10:30 | 1254 | ○ | 40 | farnesal | 0.4 | - | 14:44 | 1748 | - |
| 18 | geraniol | 1.5 | 13.4 | 10:33 | 1260 | - | 41 | hexadecanal | 0.2 | - | 15:15 | 1819 | - |
| 19 | 2-phenyl ethyl acetate | - | 0.7 | 10:41 | 1267 | - | 42 | hexadecanol acetate | 0.4 | - | 16:33 | 2008 | - |
| 20 | geranial | 0.2 | 0.1 | 10:42 | 1270 | - | - | n-alkane (C ₂₁ ~C ₂₇) | 23.2 | - | - | - | - |
| 21 | citronellyl formate | 1.4 | - | 11:29 | 1355 | ○ | | Total | 85.2 | 96.3 | | | |
| 22 | citronellyl acetate | 12.1 | 0.8 | 11:34 | 1365 | ○ | | | | | | | |
| 23 | eugenol | - | 4.1 | | | | | | | | | | |

EO : essential oil
DW ex. distilled water extract

Table1-2 ハマナスの葉に含まれる成分

| No. | components | EO (%) | DW ex. (%) | RT | RI | CI | No. | components | EO (%) | DW ex. (%) | RT | RI | CI |
|-----|---------------------------------|--------|------------|-------|------|----|-----|--|--------|------------|-------|------|----|
| 1 | 1-octen-3-ol | - | 0.1 | 6:44 | 981 | - | 32 | 1,2-dihydro-1,1,6-trimethyl naphthalene | 0.2 | - | 11:31 | 1360 | - |
| 2 | β -myrcene | - | 0.2 | 6:55 | 993 | ○ | 33 | eugenol | - | 0.1 | 11:33 | 1363 | - |
| 3 | <i>p</i> -cymene | 0.1 | tr | 7:30 | 1028 | ○ | 34 | 4-methylene-2,8,8-trimethyl-2-vinyl-bicyclo[5.2.0]nonane | 1.0 | - | 11:44 | 1382 | - |
| 4 | limonene | - | 0.1 | 7:33 | 1031 | ○ | 35 | β -damascenone | - | 0.2 | 11:50 | 1393 | - |
| 5 | benzyl alcohol | - | tr | 7:40 | 1039 | - | 36 | 2,5-diisopropyl phenol | - | 0.2 | 11:58 | 1408 | - |
| 6 | <i>trans</i> -ocimene | - | tr | 7:44 | 1043 | - | 37 | β -cedrene | 1.7 | - | 12:08 | 1426 | - |
| 7 | benzenacetaldehyde | tr | tr | 7:50 | 1050 | - | 38 | α -cedrene | 0.7 | - | 12:12 | 1434 | - |
| 8 | ocimene (isomer) | - | 0.1 | 7:54 | 1054 | - | 39 | α -bergamotene | 1.2 | - | 12:16 | 1442 | - |
| 9 | <i>trans</i> -linalool oxide | - | 0.7 | 8:16 | 1077 | - | 40 | elemene | 0.9 | - | 12:19 | 1447 | - |
| 10 | <i>cis</i> -linalool oxide | - | 0.5 | 8:30 | 1087 | - | 41 | α -amorphene | 3.7 | - | 12:23 | 1455 | - |
| 11 | linalool | 0.2 | 3.9 | 8:39 | 1101 | ○ | 42 | γ -muurolene | 10.4 | - | 12:31 | 1470 | - |
| 12 | nonanal | 0.3 | 0.3 | 8:43 | 1107 | - | 43 | α -curcumene | 1.2 | - | 12:41 | 1489 | - |
| 13 | 2-phenylethanol | - | 0.2 | 8:50 | 1116 | ○ | 44 | calamenene | 0.1 | - | 13:09 | 1544 | - |
| 14 | methoxy citronellol | 0.1 | - | 9:17 | 1153 | - | 45 | spathulenol | 0.3 | - | 13:24 | 1574 | - |
| 15 | 2-nonenal | - | 0.2 | 9:26 | 1165 | - | 46 | caryophyllene oxide | 0.8 | - | 13:32 | 1590 | - |
| 16 | menthone | - | tr | 9:30 | 1169 | ○ | 47 | aromadendrene oxide | 2.7 | 3.5 | 14:06 | 1663 | - |
| 17 | nonyl alcohol | tr | - | 9:34 | 1174 | ○ | 48 | α -bisabolol oxide | - | 1.0 | 14:09 | 1670 | - |
| 18 | terpinen-4-ol | tr | 1.2 | 9:39 | 1181 | ○ | 49 | isolongifolol, methyl ether | - | 0.8 | 14:11 | 1672 | - |
| 19 | 2-methyl acetophenone | tr | 0.3 | 9:44 | 1188 | - | 50 | β -eudesmol | 0.3 | - | 14:15 | 1683 | - |
| 20 | α -terpineol | tr | 1.5 | 9:49 | 1195 | ○ | 51 | α -bisabolol | 1.6 | - | 14:20 | 1685 | - |
| 21 | decanal | 0.1 | - | 9:58 | 1207 | - | 52 | 2,2,7,7-tetramethyl tricyclo[6.2.1.0(1,6)]undec-4-en-3-one | 3.1 | 0.9 | 14:27 | 1709 | - |
| 22 | citronellol | tr | 0.4 | 10:13 | 1231 | ○ | 53 | eudesma-5,11(13)-dien-8,12-olide | 1.4 | - | 15:00 | 1784 | - |
| 23 | neral | - | 0.1 | 10:23 | 1247 | ○ | 54 | isophytol | 0.3 | - | 16:09 | 1948 | - |
| 24 | 2-butanoic acid, hexyl ester | 0.1 | - | 10:27 | 1253 | - | 55 | parthenium | 0.8 | - | 16:11 | 1960 | - |
| 25 | geraniol | 0.4 | 4.2 | 10:29 | 1256 | ○ | 56 | phytol | 1.9 | - | 17:13 | 2114 | - |
| 26 | piperitone | - | 0.8 | 10:32 | 1260 | - | - | n-alkane (C ₂₃ ~C ₂₇) | 1.5 | - | - | - | - |
| 27 | geranial | - | 0.5 | 10:41 | 1275 | ○ | - | Total | 37.2 | 23.6 | - | - | - |
| 28 | nonanal dimethyl acetal | 0.1 | - | 10:43 | 1278 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 29 | geranyl formate | tr | 0.5 | 10:59 | 1303 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 30 | undecanal | 0.1 | - | 11:02 | 1307 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 31 | 4-hydroxy-3-methyl acetophenone | - | 1.3 | 11:05 | 1313 | - | - | - | - | - | - | - | - |

tr : trace<0.1%

Table1-3 ハマナスの実に含まれる成分

| No. | components | DW ex. (%) | RT | RI | CI | No. | components | DW ex. (%) | RT | RI | CI |
|-----|------------------------------|------------|-------|------|----|-----|---|------------|-------|------|----|
| 1 | ethyl tiglate | 0.1 | 5:50 | 947 | - | 27 | carvacrol | 0.4 | 10:58 | 1302 | - |
| 2 | 6-methyl-5-hepten-2-one | 0.2 | 6:50 | 990 | - | 28 | undecanal | tr | 11:01 | 1305 | - |
| 3 | β -myrcene | 1.5 | 6:52 | 992 | ○ | 29 | neryl acetate | 1.7 | 11:34 | 1365 | ○ |
| 4 | <i>p</i> -cymene | 0.1 | 7:27 | 1025 | - | 30 | geranyl acetate | 3.2 | 11:45 | 1384 | ○ |
| 5 | limonene | 0.5 | 7:31 | 1029 | ○ | 31 | β -caryophyllene | 5.1 | 12:10 | 1430 | ○ |
| 6 | <i>trans</i> -ocimene | 0.4 | 7:42 | 1041 | - | 32 | α -bergamotene | 0.3 | 12:16 | 1442 | - |
| 7 | ocimene (isomer) | 0.6 | 7:52 | 1052 | - | 33 | β -farnesene | 4.1 | 12:25 | 1458 | - |
| 8 | γ -terpinene | 0.2 | 8:00 | 1060 | - | 34 | α -caryophyllene | 0.2 | 12:28 | 1464 | - |
| 9 | <i>trans</i> -linalool oxide | 0.4 | 8:14 | 1075 | - | 35 | γ -muurolene | 0.1 | 12:31 | 1470 | - |
| 10 | <i>cis</i> -linalool oxide | 0.4 | 8:28 | 1089 | - | 36 | eremophilene | 0.1 | 12:39 | 1485 | - |
| 11 | linalool | 15.6 | 8:37 | 1099 | ○ | 37 | β -bisabolene | 0.1 | 12:54 | 1514 | - |
| 12 | nonanal | 0.8 | 8:41 | 1104 | - | 38 | γ -cadinene | 1.7 | 12:59 | 1524 | - |
| 13 | 1-octen-3-yl-acetate | 0.8 | 8:48 | 1113 | - | 39 | calamenene | 0.3 | 13:03 | 1532 | - |
| 14 | camphor | 0.1 | 9:14 | 1148 | - | 40 | caryophyllene oxide I | 0.3 | 13:20 | 1566 | - |
| 15 | borneol | 1.0 | 9:30 | 1169 | ○ | 41 | caryophyllene oxide II | 3.5 | 13:36 | 1598 | - |
| 16 | nonyl alcohol | 0.1 | 9:33 | 1173 | - | 42 | cubenol | 0.3 | 13:50 | 1628 | - |
| 17 | terpinen-4-ol | 19.1 | 9:37 | 1179 | ○ | 43 | γ -eudesmol | 0.1 | 13:58 | 1643 | - |
| 18 | <i>p</i> -cymen-8-ol | 0.2 | 9:40 | 1183 | - | 44 | τ -cadinol | 4.2 | 14:01 | 1652 | - |
| 19 | α -terpineol | 6.4 | 9:47 | 1192 | ○ | 45 | <i>cis</i> -Z- α -bisabolene epoxide | 0.7 | 14:10 | 1672 | - |
| 20 | citronellol | 0.4 | 10:12 | 1230 | ○ | 46 | cadalene | 0.2 | 14:18 | 1689 | - |
| 21 | nerol | 0.9 | 10:12 | 1230 | ○ | 47 | longipinocarvone | 0.4 | 14:49 | 1759 | - |
| 22 | geraniol | 2.9 | 10:29 | 1256 | ○ | 48 | 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone | 0.8 | 15:27 | 1847 | - |
| 23 | linalyl acetate | 3.4 | 10:33 | 1263 | - | - | n-alkane (C ₂₁ , C ₂₃ , C ₂₅ , C ₂₇) | 1.4 | - | - | - |
| 24 | carvenone | 0.2 | 10:33 | 1263 | - | - | Total | 92.3 | - | - | - |
| 25 | geranial | 0.1 | 10:40 | 1273 | ○ | - | - | - | - | - | - |
| 26 | lavandulyl acetate | 6.6 | 10:51 | 1290 | - | - | - | - | - | - | - |

Table1-4 ハマナスの花の香気成分

| No. | compound | RT | proportion (%) | MS agreement (%) | No. | Compound | RT | proportion (%) | MS agreement (%) |
|-----|--------------------------|-------|----------------|------------------|-----|---------------------|-------|----------------|------------------|
| 1 | 2-methyl pentanal | 9:23 | 1.0 | 88 | 19 | benzaldehyde | 17:51 | 0.6 | 83 |
| 2 | 2-pentanone | 10:19 | 0.1 | 72 | 20 | citronellol epoxide | 18:51 | 0.1 | 79 |
| 3 | 2-methyl butanal | 10:31 | 0.3 | 95 | 21 | linalool | 19:06 | 0.5 | 86 |
| 4 | unknown | 11:11 | 0.6 | - | 22 | benzyl alcohol | 19:12 | 2.4 | 92 |
| 5 | 4-methyl-1-hexene | 11:15 | 0.6 | 86 | 23 | rose oxide | 19:27 | 5.2 | 95 |
| 6 | acetoin | 11:37 | 0.1 | 85 | 24 | rose oxide | 19:54 | 1.8 | 97 |
| 7 | 2,6-dimethyl-3-octene | 12:02 | 0.3 | 86 | 25 | citronellal | 20:16 | 0.2 | 88 |
| 8 | hexanal | 12:59 | 0.2 | 95 | 26 | 2-nonenal | 20:31 | 0.7 | 91 |
| 9 | 3-methyl-1-pentanol | 14:24 | 0.4 | 94 | 27 | cucumbaraldehyde | 20:39 | 0.3 | 81 |
| 10 | cis-2-hexen-1-ol | 14:30 | 0.1 | 88 | 28 | 2-phenylethanol | 20:54 | 37.6 | 93 |
| 11 | 5-methyl-2-hexanol | 14:57 | 0.3 | 94 | 29 | citronellol | 21:43 | 37.5 | 99 |
| 12 | methylonylketone | 15:02 | 0.1 | 88 | 30 | geraniol | 22:37 | 1.9 | 97 |
| 13 | 4-methyl hexanal | 15:17 | 0.3 | 89 | 31 | citral | 23:24 | 0.2 | 81 |
| 14 | 1-octen-3-ol | 16:43 | 1.0 | 97 | 32 | 2-phenethyl acetate | 23:45 | 0.3 | 96 |
| 15 | 2-pentyl fran | 16:59 | 2.1 | 95 | 33 | citronellyl acetate | 24:24 | 0.5 | 96 |
| 16 | octyl oxirane | 17:05 | 0.1 | 84 | 34 | γ-cadinene | 26:01 | 0.7 | 87 |
| 17 | 6-methyl-5-hepten-2-one | 17:13 | tr | 78 | 35 | methyl eugenol | 28:36 | 1.5 | 98 |
| 18 | trans-2-(2-pentenyl)fran | 17:21 | 0.3 | 88 | 36 | α-farnesene | 29:43 | 0.2 | 90 |

Table1-4 に示す。ハマナスの花の香気成分は35成分が見られ、中でも2-phenylethanol (37.6%) と citronellol (37.5%) の2成分で75%以上を構成していた。このことから、ハマナスの花の香りにはこの2成分が大きく寄与していると考えられる。また、花の蒸留湯抽出物にのみ、0.1%と微量に含まれていた rose oxide の割合が合計7%と高く見られた。

1. 4 総括

ハマナスの花、葉からは蒸留重量に対してそれぞれ0.0058%、0.062%の精油が得られたが、実からは精油は得られなかった。ハマナスの花の精油は、一般的なダマスクローズオイルには殆ど見られない citronellyl acetate を12.1%と多く含有していた。この結果から、ハマナスの花の精油はダマスクローズとは異なる香気特性を持つ香料としての応用が期待される。また、花の蒸留湯から得られた成分は精油と比べ citronellol (31.4%) 等の flower like な香りを有するアルコール成分の含有率が高く見られ、化粧品などへの有用性が示された。また、ハマナスの葉はその青臭い香りにもかかわらず、geraniol や linalool といった花の香り成分を含有していた。ハマナスの実は、樟脳様の terpinen-4-ol を19.1%、ラベンダー様の linalool を15.6%と、香りの大きく異なる2つの成分を非常に多く含有している事が分かった。ハマナスの香気成分分析を行い、ハマナスの花の香りは2-phenylethanol (37.6%) と citronellol (37.5%) の2成分でその7割以上を構成していることが分かった。

(References)

1-1) N. G. Baydar, H. Baydar, T. Debener, Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in turkev by using AFLP and microsatellite makers. *J. Biotechnol.*, 111, 263-267 (2004).

1-2) Y. Wensheng, S. Lihua, Z. Dezhi, et al., Study on the Chemical Constituents of Essential Oil from Flower of *Rosa rugosa* Thunb. Var. alba Warb. *J. jilin For. Inst.*, 2, 7-11 (1992).

1-3) L. Zhaolin, Z. Fanxuzhi, C. Nengyu, et al., Study on Chemical Constituents of Fragrance Volatiles and Essential Oil of Lanzhou Rose (*Rosa rugosa* Thunb.). *Chin. J. Chromatogr.*, 1, 18-23 (1988).

1-4) P. Yan-li, Z. Bing-zhen, M. Zong-hui, et al., Study on Constituents of Volatile Oils from Flos Rosae Rugosa in Different Areas by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food and Drug*, 2, 2009.

1-5) Y. Ueyama, S. Hashimoto, H. Nii, et al., The essential oil from the flowers of *Rosa rugosa* Thunb. Var. *plema* Regel. *Flavor Fragr. J.*, 5 (2), 219-222 (1990).

1-6) Y. Hashidoko, THE PHYTOCHEMISTRY OF ROSA RUGOSA. *Phytomedicine*, 43 (3), 535-549 (1996).

1-7) K. G. D. Babu, B. Singh, V. P. Joshi, et al., Essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) distilled under different pressures and temperatures. *Fravor Fragr. J.*, 17, 136-140 (2002).

2. 抗菌活性試験

2.1 緒言

現代は地球のグローバル化が進む中、世界の小さな村などで発生した感染症もすぐに全世界へと蔓延してしまう可能性が高いといえる。また、その世界の中でちょうど日本は歴史上類を見ないほどの少子高齢化を迎えている。そして、最近ニュースでも話題になった多剤耐性菌の出現による院内感染なども報告されるようになってきている。このような状況の中で21世紀は感染症の時代と言われている。NDM-1 遺伝子を持った毒性の強い細菌による感染症や、鳥や豚からによる新型インフルエンザやSARSなどの新興感染症や黄色ブドウ球菌感染症、麻疹や結核などの再興感染症などが危惧されている²⁻¹⁾。

植物にはロシア語で「樹木から放散されて周囲の微生物などを殺すはたらきをもつ物質」を意味するフィトンチッドと呼ばれる森林浴の効果の元が含まれている。1930年頃、旧ソ連のB. P. トーキン博士は、この植物の不思議な力を発見し、フィトン(植物が)チッド(殺す)と名付けた。そのフィトンチッドとは植物が発する揮発性のイソプレノイド類のことである。そのイソプレノイド類には植物自らが大きく成長して繁殖するために、他の植物に対する成長阻害や自己防衛、アリやダニなどの小動物に対する摂食阻害、蛾や蝶などの昆虫に対する忌避・誘引、そしてカビなどに対する殺菌効果という働きを示すことが知られている²⁻²⁾。その中で、本研究ではイソプレノイド類の殺菌効果に着目し、院内感染の予防や公衆衛生に利用できる消臭・除菌剤の開発を目指している。さまざまな菌類に対してのイソプレノイド類の抗菌活性を明確にすることを目的とし、さらに天然の植物から抽出した精油や蒸留湯を使用した商品の開発を最終的な目標としている。

2.2 実験

試験は日本化学療法学会で推奨する寒天平板希釈法に従って行い、最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。寒天培地にはMüller-Hinton Agar培地(MHA培地)を使用し、界面活性剤として5%HCO-50で濃度調整した被試験薬のイソプレノイド類を加えておく。その培地に植菌する菌類はOD550値を測定し、 1×10^6 CFU/mlに濃度を調整して播種する。また「MICの値が800 µg/ml以下で抗菌活性があると判断する」という日本化学療法学会の判定基準に従って、イソプレノイド類の抗菌活性の有無を判断する(Fig. 2-1)。

・グラム陽性菌とグラム陰性菌について

使用した菌類はグラム陽性菌とグラム陰性菌、真菌を用いた。そのグラム陽性菌とグラム陰性菌の違いは細胞壁の構造にある。グラム陽性菌は細胞膜の外側に分厚いペプチドグリカン層のみを持っている。一方、グラム陰性菌は薄いペプチドグリカン層の外側にさらに外膜を有している。この構造の違いをグラム染色法によって判断される。グラム染色によりペプチドグリカン層と外膜が青紫色になる。しかし、アルコールなどで処理すると、グラム陰性菌の染色された外膜は容易に壊れ流れ落ち、脱色される。グラム陽性菌ではペプチドグリカンの層が厚いため脱色されず色素が残り、青紫色が保持される。そのような染色の違いからグラム陽性菌とグラム陰性菌を区別することができる(Fig. 2-2)^{2-3, 2-4)}。

・真菌類について

真菌は微生物の中で、核が核膜に包まれた真核細胞で、細菌より大きく真核生物中もっとも原始的な生物であり、ミトコンドリアや小胞体などの細胞器官を持っている。また細菌と異なり、細胞壁は主に多糖類(グルカン、マンナン、キチン)で構成され、蛋白質や脂肪が存在する(Fig. 2-3)。

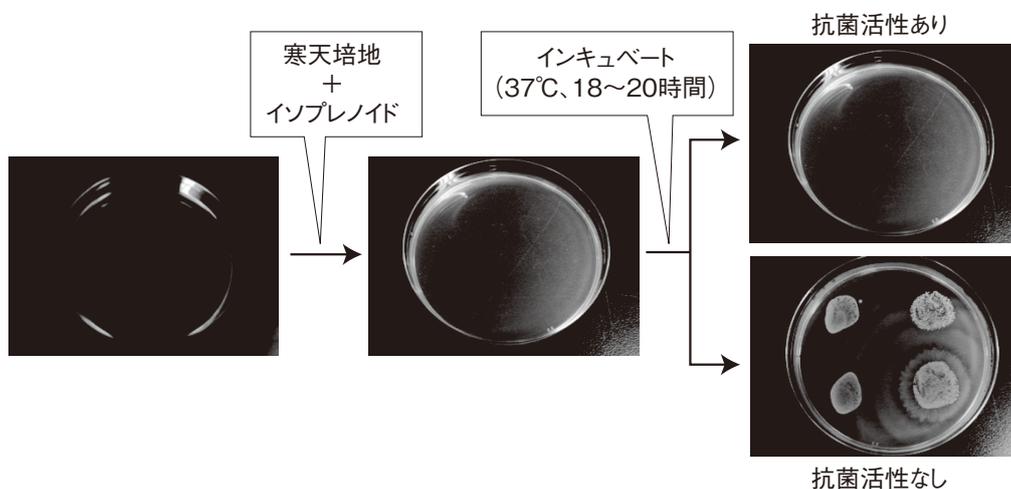


Fig. 2-1 寒天平板希釈法

・使用した菌株

グラム陽性菌 (Gram-positive bacteria) ^{2-5~2-7)}

- ・ *Staphylococcus aureus* 209P
：黄色ブドウ球菌 (*S.aureus*)
- ・ *Staphylococcus aureus* 834
：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)
- ・ *Listeria monocytogenes* 1b-1684
：リステリア・モノサイトゲネス (*L.monocytogenes*)

グラム陰性菌 (Gram-) ^{2-8, 2-9)}

- ・ *Escherichia coli* IFO-3806
：大腸菌 (*E.coli*)
- ・ *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* χ 3306
：サルモネラ・ネズミチフス菌 (*S.Typhimurium*)
- ・ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC7853
：緑膿菌 (*P.eruginosa*)
- ・ *Serratia marcescens*
：セラチア・マルセッセンス (*S.marcescens*)
- ・ *Shigella sonnei*
：赤痢菌 (*S.sonnei*)
- ・ *Proteus mirabilis*
：プロテウス・ミラビリス (*P.mirabilis*)

真菌 (fungus/(複) fungi)

- ・ *Candida albicans*

：カンジダ菌 (*C. albicans*)

- ・ *Trichophyton sp.*
：白癬菌
- ・ *Malassezia furfur*
：マラセチアフルフル真菌 ²⁻¹⁰⁾

・被試験薬

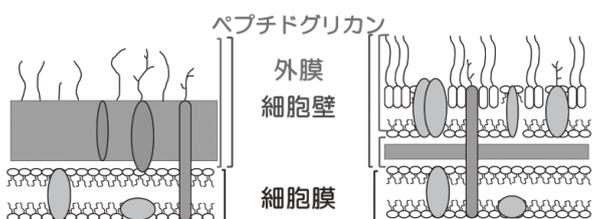
ハマナスの花の蒸留湯のヘキササン抽出物に含まれる geraniol、citronellol やラベンダーの精油成分に含まれている linalool、terpinen-4-ol など、本抗菌・抗真菌試験に用いた被試験薬のイソプレノイド類を構造式とともに Fig. 2-4 に記載する ²⁻¹¹⁾。

・寒天培地

Müller-Hinton Agar 寒天培地 (MHA 培地) は蒸留水に対して培地を 21g/L、寒天 15g/L の割合で加える。加熱攪拌して溶解させ、ピペットで試験管に 12 mL/本の割合で分注し、121℃、15 分間オートクレーブにて滅菌する。

Müller-Hinton Broth の成分 (1L 分)

| | |
|-----------------------|-------|
| Beef Extract Powder | 2.0g |
| Acid Digest of Casein | 17.5g |
| Soluble Starch | 1.5g |
| (pH7.3±0.1) | |



グラム陽性菌

グラム陰性菌

Fig. 2-2 グラム陽性菌とグラム陰性菌の違い

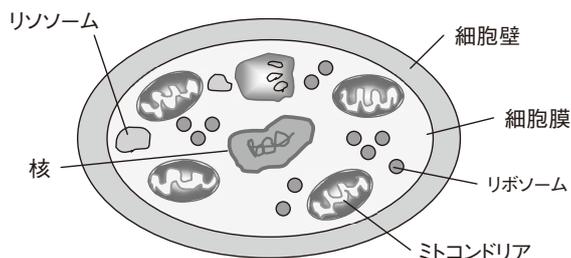


Fig. 2-3 真菌類の細胞構造

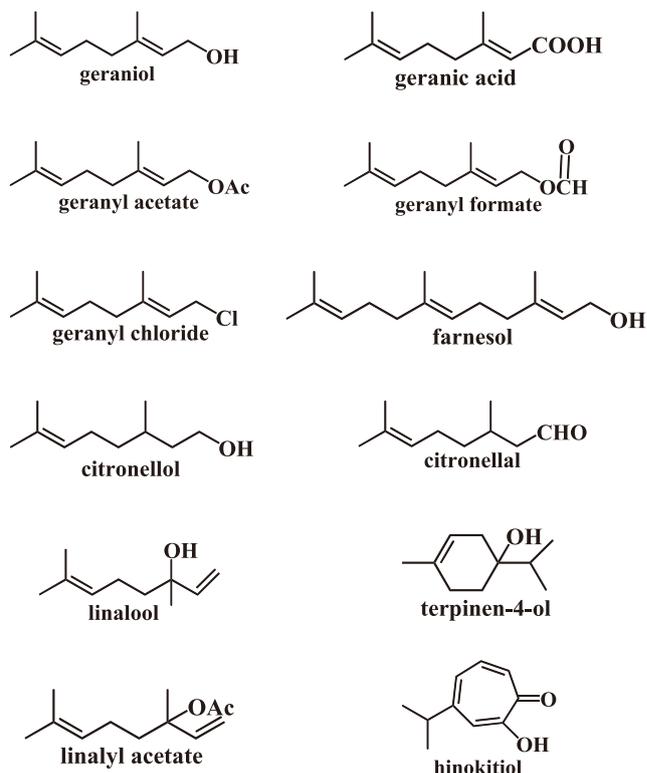


Fig. 2-4

・界面活性剤

被試験薬の親油性であるイソプレノイド類を寒天培地と円滑に混合させるために、界面活性剤であるHCO-50 (NIKKOL) を使用した^{2-12~2-16)}。HCO-50はポリオキシエチレン硬化ヒマシ油で白色～微黄色のワセリン様又はろう状物質で、わずかに特異なにおいが特徴の界面活性剤である。また、皮膚に対する刺激や溶血性がほとんどなく、脂溶性物質の水への可溶化剤として優れている。実験に用いるときは蒸留水で5%に濃度にした状態の5%HCO-50にしてイソプレノイド類と混合させて使用した。

2.3 結果

・単一試験

Table 2-1 グラム陽性菌に対する単一試験の MIC

| | MIC (µg/ml) | | |
|---------------|------------------------|-------------|------------------------|
| | Gram-positive bacteria | | |
| | <i>S.aureus</i> | MRSA | <i>L.monocytogenes</i> |
| geraniol | 534 | 534 | 378 |
| geranic acid | 1900 | 1900 | 970 |
| citral | 720 | 720 | 720 |
| farnesol | 184 | 184 | 133 |
| farnesal | 40 | 40 | n.t. |
| citronellol | 279 | 321 | 321 |
| linalool | 1310 | 1310 | n.t. |
| terpinen-4-ol | 1400 | 1400 | n.a. |
| hinokitiol | 40 | 1.25 | 0.68 |

800 µg/ml以下で抗菌活性があるものは太字で示している。バラの香りの成分である geraniol は黄色ブドウ球菌と MRSA に対して 534 µg/ml で抗菌活性を示した。また farnesol は geraniol よりもグラム陽性菌に対して高い抗菌活性を示した。しかし、ラベンダーに含まれる linalool と terpinen-4-ol はグラム陽性菌に対して抗菌活性を示さなかった。

Table 2-2 グラム陰性菌に対する単一試験の MIC

| | MIC (µg/ml) | | | | |
|---------------|------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| | Gram-negative bacteria | | | | |
| | <i>E.coli</i> | <i>S.Typhimurium</i> | <i>S.marcesens</i> | <i>P.mirabilis</i> | <i>S.sonnei</i> |
| geraniol | 445 | 400 | 700 | 540 | 445 |
| geranic acid | 1900 | 1900 | 7800 | 1900 | 1900 |
| citral | 1800 | 1800 | 7200 | 720 | 900 |
| farnesol | - | - | - | - | - |
| farnesal | - | n.t. | n.t. | n.t. | n.t. |
| citronellol | - | - | - | - | 471 |
| linalool | 656 | n.t. | n.t. | n.t. | 656 |
| terpinen-4-ol | 676 | n.t. | 793 | n.t. | 700 |
| hinokitiol | 34 | 34 | n.t. | n.t. | 25 |

geraniol は大腸菌、赤痢菌に対して 445 µg/ml で抗菌活性を示し、他のグラム陰性菌にも抗菌活性があることがわかった。しかし、グラム陽性菌に対して geraniol よりも高い抗菌活性を示していた farnesol はグラム陰性菌に対して

は全く抗菌活性を示さなかった。そして注目すべき点は、その farnesol とは逆にグラム陽性菌に対して抗菌活性を示さなかった linalool と terpinen-4-ol が大腸菌と赤痢菌に対して抗菌活性を示した。一般的にグラム陽性菌よりグラム陰性菌の方が抗菌活性を示しにくいといわれていることから、linalool と terpinen-4-ol の結果は興味深い結果と思われる。

Table 2-3 真菌に対する単一試験の MIC

| | MIC (µg/ml) | |
|---------------|-------------------|-------------------------|
| | Fungi | |
| | <i>C.albicans</i> | <i>Trichophyton</i> sp. |
| geraniol | 378 | 88 |
| geranic acid | 750 | 18 |
| farnesol | - | 3.5 |
| citronellol | 340 | 34 |
| citronellal | 340 | 180 |
| linalool | 523 | 830 |
| terpinen-4-ol | 467 | 438 |
| hinokitiol | n.t. | 17 |

水虫の原因で知られる白癬菌に対して、ファルネソールは 3.5 µg/ml と非常に高い抗菌活性を示し、そのほかのイソプレノイド類も高い抗菌活性を示した。

・併用試験

Table 2-4 geraniol と farnesol を併用させ MRSA に対しての抗菌試験

| Against MRSA | geraniol (µg/ml) | | | 単一の MIC geraniol : 700 µg/ml farnesol : 180 µg/ml |
|------------------|------------------|----|------------|---|
| | 880 | 88 | 8.8 | |
| farnesol (µg/ml) | 880 | + | + | + |
| | 88 | + | + | + |
| | 70 | + | + | + |
| | 35 | + | + | + |
| | 18 | + | + | + |
| | 8.8 | + | - | - |

MRSA に対して単一の場合で geraniol は 700 µg/ml、farnesol は 180 µg/ml で抗菌活性を示すのに対し、併用すると geraniol は 8.8 µg/ml、farnesol は 18 µg/ml で抗菌活性を示した。単一に比べ 10 倍以上高い抗菌活性を示すことがわかった。

Table 2-5 farnesol と hinokitiol を併用させ *Trichophyton* sp. に対しての抗菌試験

| Against <i>Trichophyton</i> sp. | farnesol (µg/ml) | | 単一の MIC farnesol : 3.5 µg/ml hinokitiol : 17 µg/ml |
|---------------------------------|------------------|-------------|--|
| | 8.8 | 0.88 | |
| hinokitiol (µg/ml) | 8.4 | + | + |
| | 6.8 | + | + |
| | 3.4 | + | - |
| | 1.7 | + | - |
| | 0.84 | + | - |

Trichophyton sp. に対して単一の場合で farnesol は 3.5 µg/ml、hinokitiol は 17 µg/ml で抗菌活性を示すのに対

し、併用すると farnesol は 0.88µg/ml、hinokitiol は 6.8µg/ml で抗菌活性を示した。これは単一の結果と比較すると飛躍的に高い抗菌活性を示した。

Table 2-6 citral と farnesol を併用させ MRSA に対する抗菌試験

| Against MRSA | citral (µg/ml) | | | 単一の MIC citral : 720 µg/ml farnesol : 180 µg/ml |
|----------------------------|----------------|----|-----|---|
| | 850 | 90 | 9.0 | |
| 880 | + | + | + | |
| 88 | + | + | + | |
| farnesol (µg/ml) | 70 | + | + | |
| 35 | + | + | + | |
| 18 | + | + | + | |
| 8.8 | + | - | - | |

MRSA に対して単一の場合で citral は 720µg/ml、farnesol は 180µg/ml で抗菌活性を示すのに対し、併用すると citral は 9.0µg/ml、farnesol は 180µg/ml で抗菌活性を示した。これは単一の結果と比較すると非常に高い抗菌活性を示している。

Table 2-7 citronellol と farnesol を併用させ S. aureus に対する抗菌試験

| Against S. aureus | citronellol (µg/ml) | | | | 単一の MIC citronellol : 279 µg/ml farnesol : 184 µg/ml |
|-------------------|---------------------|-----|-----|-----|--|
| | 257 | 214 | 171 | 150 | |
| 133 | + | + | + | + | |
| 111 | + | + | + | - | |
| 89 | + | + | - | - | |

S. aureus に対して単一の場合で citronellol は 279µg/ml、farnesol は 184µg/ml で抗菌活性を示すのに対し、併用すると citronellol は 171µg/ml、farnesol は 111µg/ml で抗菌活性を示した。これは単一の結果と比較すると高い抗菌活性を示している。

・相加・相乗効果の検討

単一時より併用させた方が抗菌活性が高まること明らかになったが、その併用時に働いている効果が相加効果であるのか、相乗効果であるのかを明らかにするためにアイソボログラム (Isobologram) を用いて実験を試みた。

アイソボログラムについて

薬物の相乗作用について検討するためによく用いられる方法であり、ここでは併用発育阻止濃度指数 (Fractional Inhibitory Concentration index : FIC index) を測定する。FICindex が 0.5 以下 (Fig. 2-5 の (I) のエリア) では相乗効果を示し、FICindex が 0.5 ~ 1 (Fig. 2-5 の (II) のエリア) では相加作用を、FICindex が 1 以上 (Fig. 2-5 の (III) のエリア) では拮抗作用を示す。

$$FICindex = \frac{MICa (併用)}{MICa (単一)} + \frac{MICb (併用)}{MICb (単一)}$$

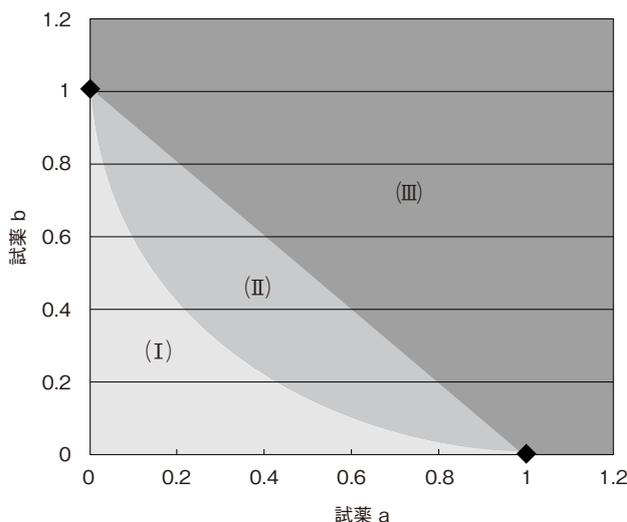
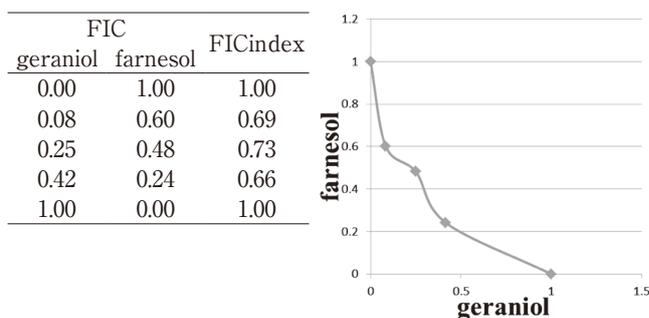


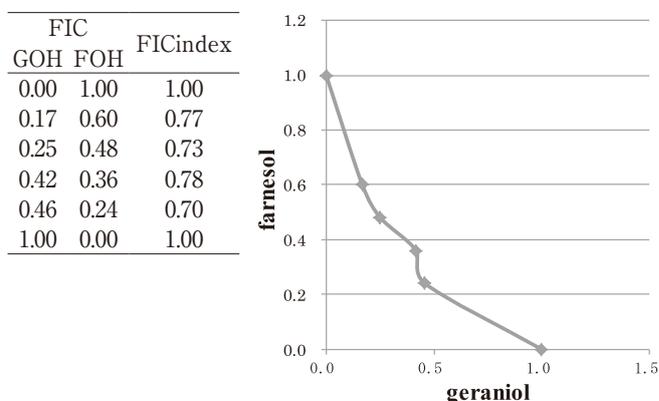
Fig. 2-5 試薬 a と試薬 b の併用の場合

Table 2-8 S. aureus に対して geraniol と farnesol 併用での抗菌試験のアイソボログラム



S. aureus に対して geraniol と farnesol 併用での抗菌試験で、FICindex が 0.66 ~ 0.73 で 0.5 以上であった。相乗効果は確認できなかったものの、相乗効果に近い相加効果が働いていることが今回初めて判明した。

Table 2-9 MRSA に対して geraniol と farnesol 併用での抗菌試験のアイソボログラム



MRSA に対して geraniol と farnesol 併用での抗菌試験で、FICindex が 0.70 ~ 0.78 で 0.5 以上であった。相乗効果は確認できなかったものの、相乗効果に近い相加効果が働いていることが判明した。

Table 2-10 ハマナス蒸留湯 MHA 培地に geraniol を添加した結果

| geraniol (µg/ml) (+Floral water of <i>rosa rugosa</i>) | Gram-positive bacteria | | Gram-negative bacteria | |
|--|------------------------|------|------------------------|------------------|
| | <i>S. aureus</i> | MRSA | <i>E. coli</i> | <i>S. sonnei</i> |
| 467 | + | + | + | + |
| 445 | + | + | + | + |
| 423 | + | + | + | + |
| 400 | - | - | - | - |
| 378 | - | - | - | - |
| Each of MIC (µg/ml) | 534 | 534 | 445 | 445 |

Table 2-11 ハマナス蒸留湯 MHA 培地に farnesol を添加した結果

| farnesol (µg/ml) (+Floral water of <i>rosa rugosa</i>) | Gram-positive bacteria | | Gram-negative bacteria | |
|--|------------------------|------|------------------------|------------------|
| | <i>S. aureus</i> | MRSA | <i>E. coli</i> | <i>S. sonnei</i> |
| 155 | + | + | - | - |
| 133 | + | + | - | - |
| 111 | + | + | - | - |
| 89 | - | - | - | - |
| 67 | - | - | - | - |
| Each of MIC (µg/ml) | 184 | 184 | - | - |

抗菌活性のあるイソプレノイド類を併用すると抗菌効果が高まることから、蒸留湯を使用した培地にイソプレノイドを添加した抗菌試験を行った。

ハマナス蒸留湯MHA培地にgeraniolを添加すると、Table 2-10のようにgeraniol単一MICの値よりグラム陽性菌の*S.aureus*とMRSAに対しては534µg/mlから423µg/mlまでにMICが減少し、抗菌活性が高まった。またグラム陰性菌の*E.coli*と*S.sonnei*に対しては445mg/mlから423µg/mlと抗菌活性のわずかであるが高められた。

ハマナス蒸留湯MHA培地にfarnesolを添加すると、Table 2-11のようにfarnesol単一MICの値よりグラム陽性菌の*S.aureus*とMRSAに対しては184µg/mlから111µg/mlまでにMICが減少し、抗菌活性が高まった。

2.4 考察

ハマナスの花に含まれるgeraniolやfarnesol、citronellolなどのイソプレノイド類には抗菌活性があることが明らかになり、その作用機序についてはわかってはいないが併用して用いるとその抗菌作用は高まる。そしてgeraniolとfarnesolを併用し、*S.aureus*とMRSAに対してはFICindexの値が0.66～0.78と相乗効果に近い相加効果が働いていると考えられる。そして、その効果でgeraniol、farnesolのどちらかの試薬に対しての濃度依存などはあまりしていないと考えられる。さらに、蒸留湯を使用した培地だけでは、グラム陽性菌とグラム陰性菌に対して抗菌活性は全くないにも関わらず、イソプレノイド類を添加することでそのイソプレノイド類の抗菌作用が高まることから、ハマナス蒸留湯には抗菌作用を補助する作用があると考えられる。

(References)

- 2-1) Po-Ren Hsueh *J Formos Med Assoc* **109** (10) (2010) 685-687.
- 2-2) S. Limsuwan, E. N. Trip, T. R. H. M. Kouwen, et al, *Phytomedicine* **16** (2009) 645-651.
- 2-3) 東匡伸、小熊恵二編 『シンプル微生物学(改訂第3版)』 南江堂 (2000)
- 2-4) C. M. Mann, S. D. Cox, J. L. Markham, *Lett Appl Microbiol* **30** (2000) 294-297.
- 2-5) I. Kubo, K. Fujita, K. Nihei, *Bioorg. Med. Chem.*, **11** (2003) 4255-4262.
- 2-6) A. Tanitame, Y. Oyamada, K. Ofuji, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, **12** (2004) 5515-5524.
- 2-7) Stuart B. Levy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57** (2005) 1446-1450.
- 2-8) E. John Threlfall, *FEMS Microbiol. Rev.*, **26** (2002) 141-148.
- 2-9) P. L. Winokur, D. L. Vonsterin, L. J. Hoffman, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **Vol. 45** No. 10 (2001) 2716-2722.
- 2-10) V. Nalamothu, A. L. O'Leary, S. Kandavilli, et al., *MD Clinics in Dermatology* **27** (2009) S41-S43.
- 2-11) 弘前大学 21年度 理工学部 卒業論文 後藤嘉文 『青森県産植物(ハマナス)の精油・香気成分について』
- 2-12) 「Nikko Chemicals」 サイト内
< http://www.nikkol.co.jp/jp/nikkol/nikkol_hco-50.html > (2010/03/11 アクセス)
- 2-13) Harihara M. Mehendale: *Int. J. Toxicology*, **16** (3), 269 (1964).
- 2-14) 小西宏明: 信州医誌, **25** (3), 246 (1977).
- 2-15) 美間博之ほか: 薬学雑誌, **77** (1), 1201 (1957).
- 2-16) 鈴木守ほか: 表面, **6** (6), 392 (1968).

新規角質保護素材応用へ向けた 抗炎症性スフィンゴ糖脂質の精製と性質解明に関する研究

独立行政法人産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

奥田 徹哉

In several vascular inflammatory reactions, inflammatory mediators lead to the activation of vascular endothelial cells (EC). To date, a number of functional molecules induced on the surface of activated-EC have been identified. In this study, we found Globotetraosylceramide (Gb4), a glycosphingolipid expressed in EC, as a novel inducible molecule on EC activated by TNF- α . After TNF- α stimulation for 24 hours, the expression level of Gb4 in activated-EC became approximately three times higher than that of non-treated EC. MALDI-TOFMS analysis revealed that the enhanced Gb4 predominantly contains C24:0 or C24:1 fatty acids in the ceramide moiety. Isolated caveolae/lipid raft-enriched detergent insoluble membrane domains in activated-EC predominantly contain this molecular species of Gb4 (C24-Gb4). Real time RT-PCR analysis revealed that the increased expression of C24-Gb4 was regulated by transcriptional control of key genes for C24-Gb4 synthesis. These observations suggest that Gb4, especially those containing a very long chain fatty acid, play an important role in the inflammatory response of EC.

1. 緒言

セラミドやセラミドより合成されるスフィンゴリピッドは、皮膚表面の角質保護成分として利用されている。これらは水に対して難溶性であるため、角質層内へ効率よく水分を維持するための重要なブロックとして機能する。スフィンゴ糖脂質は皮膚に存在するスフィンゴリピッド成分の一つであり、セラミドとこれに結合する糖鎖から成る分子である。なかでも中性糖から構成される中性スフィンゴ糖脂質 (Neutral glycosphingolipids : N-GSL) は、難水溶性かつエタノールなどの極性の高い有機溶媒へ容易に可溶化できる性質を兼ね備えている。このセラミドよりも加工し易い性質から、近年、新規な化粧品素材として注目されている。これまでの関連研究では、生体内におけるスフィンゴ糖脂質の発現量を、遺伝子工学的手法に基づき変化させたマウスにおいて、皮膚の異物に対する反応が過敏になり、難治性の皮膚炎が発症することが報告されている¹⁻²⁾。しかしながら、スフィンゴ糖脂質の変化と皮膚炎発症との因果関係については未だ不明である。

我々はこれまでの研究過程にて、初代培養下のヒト臍帯由来血管内皮細胞を炎症性サイトカインにより刺激し炎症応答を惹起させると、細胞のN-GSL成分が増大する現象を発見した³⁻⁴⁾。この増大現象は、細胞の炎症応答が衰退し始める時期に一致して観察されることから、炎症の抑制に関与する現象であると推察される。我々は、この増大す

る成分中に抗炎症活性を有するスフィンゴ糖脂質が含まれると予想し、その検証に向けて解析を進めている。本研究期間では、目的とするN-GSL成分の組成分析及び主要成分の構造決定、更には同定した主要成分の発現制御機構及び細胞内局在について検討した。

2. 実験方法

2.1 培養細胞からのスフィンゴ糖脂質成分の大量調製

HuMedia-EG2培地にて培養したヒト初代培養血管内皮細胞 (HUVEC) を検討に用いた。培地中に炎症性物質TNF- α を終濃度20ng/mlに加えて細胞に炎症を惹起し、24時間インキュベートした後に細胞を回収した。

2.2 スフィンゴ糖脂質の抽出

回収した細胞より、クロロホルム：メタノール (2:1) 溶媒を用いて総脂質を抽出した。この総脂質に含まれるN-GSL成分を、Folch分配法により抽出した。

2.3 HPLCを用いたN-GSLの組成分析

抽出したN-GSLはrEndoglycoceramidase II (タカラバイオ) にて酵素消化することで糖鎖部分を遊離させ、これを蛍光分子アントラニル酸で標識し、HPLCにて標識蛍光を指標とした組成分析を行った。HPLC分析にはTSKgel Amido-80カラムを用い、移動層には20%100mM ammonium acetate (pH 3.85)-80% acetonitrile、及び20%100mM ammonium acetate (pH 3.85)-60% DW-20% acetonitrileを用いた。蛍光検出器は励起波長360nmに設定し、蛍光波長425nmを検出した。

2.4 質量分析によるセラミド構造の解析

抽出した中性スフィンゴ糖脂質成分を α -CHCAマトリ



Purification and Characterization of Neutral Glycosphingolipids in Human Vascular Endothelial Cells under Inflammatory Condition.

Tetsuya Okuda

Bioproduction Research Institute National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

クスと混合して結晶化し、質量分析装置 (MALDI-TOF-MS) にて分析した。標準物質のMSスペクトルとの比較により構造を決定した。

2.5 Real time RT-PCR による遺伝子発現解析

炎症刺激前後のHUVECよりmRNAを抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAを合成した。合成したcDNAを鋳型として、目的糖脂質の生合成に関わる酵素遺伝子群の発現量を、LightCycler[®] 480 システム (ロシュ・ダイアグノスティックス) を用いたReal Time RT-PCRにて測定した。

2.6 脂質ラフト画分の調製

炎症刺激後のHUVECを界面活性剤 (1% Triton-X100) 存在下にてDounce型ホモジナイザーにて破碎し、5 - 40% のショ糖密度勾配にて遠心することで、脂質ラフトが含まれる界面活性剤不溶性膜を分離した。分離後のサンプルは10分画し、各種ラフトマーカー、及びコントロールタンパク質の発現についてウエスタンブロッティング法により検討することで、脂質ラフトを含む画分を同定した。同定した画分よりN-GSLを抽出し、上記質量分析法により目的とするN-GSL成分のMSスペクトルを測定した。

3. 結果

3.1

HPLC分析の結果、通常培養下のHUVEC由来のN-GSL成分には、グロボテトラオシルセラミド (Gb4) およびその前駆体であるグロボトリアオシルセラミド (Gb3) が主成分として存在していることが判明した (Fig.1A)。その他、マイナー成分として、Gb3の前駆体であるラクトシルセラミド (LacCer) や、構造未同定のN-GSLが数種存在することが確認された。炎症を惹起させ24時間経過させた細胞では、これら全てに増加傾向が見られ、特に主要成分であるGb4の変化が大きく、炎症惹起前と比較して約3倍

に増加していることが判明した (Fig.1B)。

3.2

スフィンゴ糖脂質はセラミド部位の構造にも多様性がある。その構造について、質量分析装置 (MALDI-TOF-MS) を用いて分析した (Fig. 2)。標準物質と比較から、通常培養下のHUVEC由来のGb4は、セラミドの脂肪酸部位にパルミチン酸 (C16:0)、リグノセリン酸 (C24:0)、ネルボン酸 (C24:1) を主成分として有していることが明らかになった (Fig. 2,中段)。これらのGb4分子種に由来するMSスペクトルは、炎症を惹起した後のHUVECに由来する試料中ではより強く検出された。特に、C24:0及びC24:1を有するGb4 (C24-Gb4) に由来するシグナルの増強が見られた (Fig. 2,下段)。

3.3

C24-Gb4の発現量の増加が、どのような細胞内制御機構にて調節されているのかを検証すべく、その生合成に関与する酵素遺伝子群の転写レベルについてReal time RT-PCRにて解析した (Fig. 3)。まずC24-Gb4の糖鎖の合成酵素遺伝子群について検討したところ、TNF- α 刺激後 (12時間後) に一様に発現量が上昇していた。一方で、C24-Gb4と前駆体 (LacCer) を競合して合成される酸性糖脂質GM3の合成酵素遺伝子 (GM3S) の発現量には大きな変化が見られなかった。次に、セラミド部位の合成酵素遺伝子群について検討したところ、C24:0及びC24:1脂肪酸の生合成酵素 (脂肪酸鎖長伸長酵素) であるElovl1-3のうち、Elovl1遺伝子が強く発現上昇していることを見いだした。一方、脂肪酸をスフィンゴシンに転移しセラミドを合成するセラミド合成酵素 (CerS) については、C24脂肪酸を選択的に転移するCerS2遺伝子の発現上昇が見られたが、C16脂肪酸の転移酵素であるCerS5遺伝子についても同様に発現量が上昇していた。これらの結果は、C24-Gb4の発

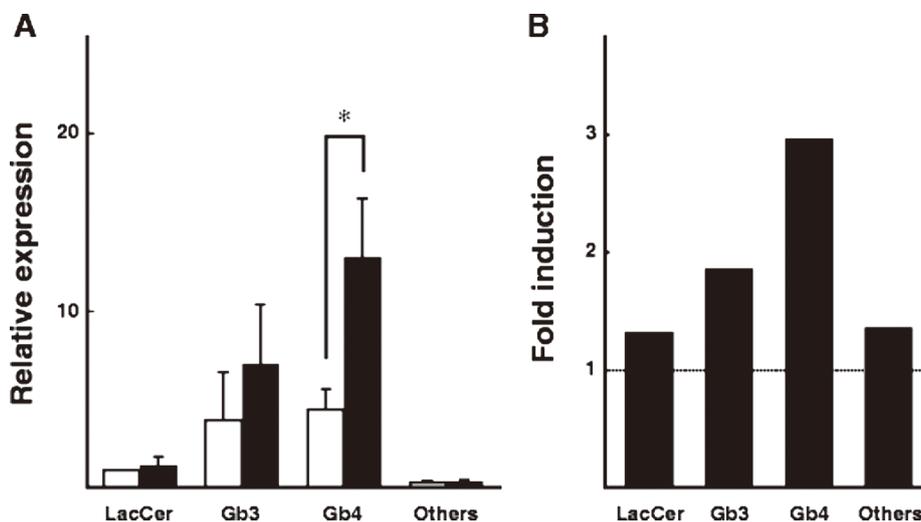


Fig.1 TNF- α 刺激後の HUVEC における N-GSL の発現変化。

(A) HPLC を用いて N-GSL の各分子種の発現量を、TNF- α 刺激前後で比較検討した。未処理 HUVEC (Open bars) 及び TNF- α 刺激後の HUVEC (closed bars) に由来する N-GSL 各分子種の発現量を示す。Error bars, mean \pm SE, n=3, from three independent experiments, *P < 0.05.

(B) N-GSL 各分子種について、炎症刺激後の増加率 (TNF- α 刺激後 HUVEC / 未処理 HUVEC) を示した。

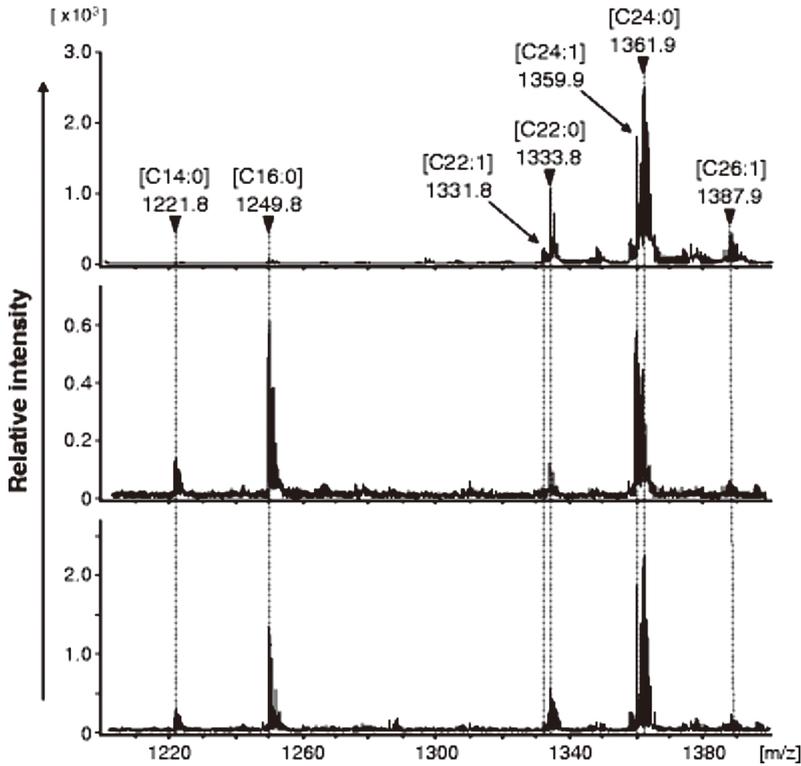


Fig. 2 MALDI-TOF-MS による HUVEC 由来 Gb4 の測定。
 (上段) 標準物質としてヒト赤血球由来精製 Gb4 の MS スペクトルを測定。
 (中段) 未処理 HUVEC より抽出した N-GSL 成分中の Gb4 由来 MS スペクトル。
 (下段) TNF α にて刺激後の HUVEC に由来する Gb4 の MS スペクトル。HUVEC に発現する Gb4 には、脂肪酸構造の差異に由来する分子種 (C14:0 ~ C26:1) が存在することが MS スペクトルより予測され、その位置を上段に示した (arrow heads)。

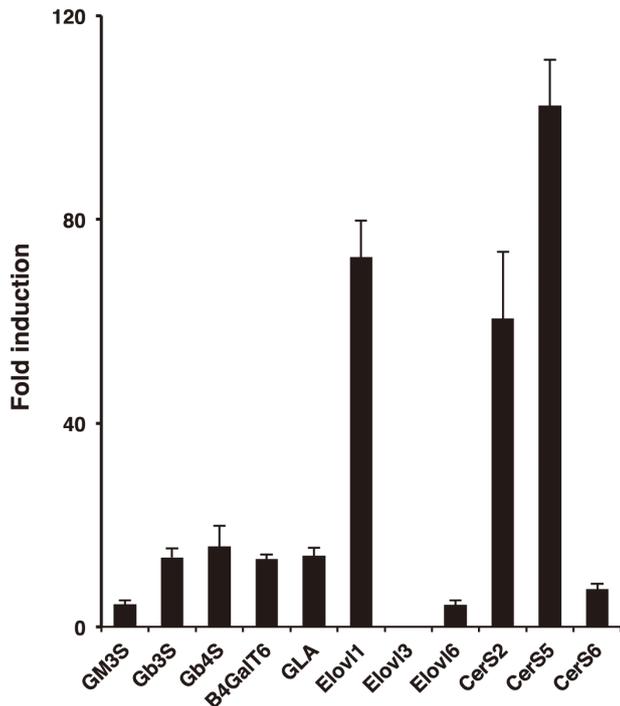


Fig. 3 Real time RT-PCR による C24-Gb4 合成酵素遺伝子群の発現解析。
 TNF α 刺激後 (12 時間後) の HUVEC 及び未処理の HUVEC より調製した cDNA を用いて、C24-Gb4 の合成に関与する生合成酵素遺伝子群の発現量を比較解析した。図は、炎症刺激後 (12 時間) の増加率 (TNF α 刺激後 HUVEC / 未処理 HUVEC) として示してある。C24-Gb4 の糖鎖部位の生合成酵素遺伝子として Gb3S, Gb4S, B4GalT6, C24 脂肪酸生合成酵素として Elovl1, 3, 6, C24 脂肪酸を基質としてセラミドを生合成する酵素である CerS2 について、それぞれ発現量を解析した。また比較対象として、HUVEC に存在する酸性スフィンゴ糖脂質の糖鎖合成酵素遺伝子である GM3S, Gb4 の前駆体の糖鎖分解酵素である GLA, C16 脂肪酸を基質としてセラミドを生合成する酵素遺伝子 CerS5, 6 についても、その発現増加率を示した。Error bars, mean \pm SE, n=4, from two independent experiments.

現量増加においてセラミド合成酵素レベルでの選択性は無く、Elovl1 による C24 脂肪酸合成量の増加が中心的な役割を担うことを意味する。

3. 4

細胞の炎症応答における C24-Gb4 増大の意義について検討するべく、その細胞内における局在について解析した。

スフィンゴ糖脂質は細胞膜内にて脂質ラフトと定義されるシグナル伝達の足場構造を形成すると考えられている。そこで生化学的手法により、C24-Gb4 の脂質ラフトにおける局在について検討した (Fig. 4)。界面活性剤不溶性膜 (DIM) を遠心分離した試料を 10 分画し、そのうち脂質ラフトマーカーが検出される画分 (Fig. 4A, 2-3) から N-GSL を抽出し、MALDI-TOF-MS にて解析したところ、C24-

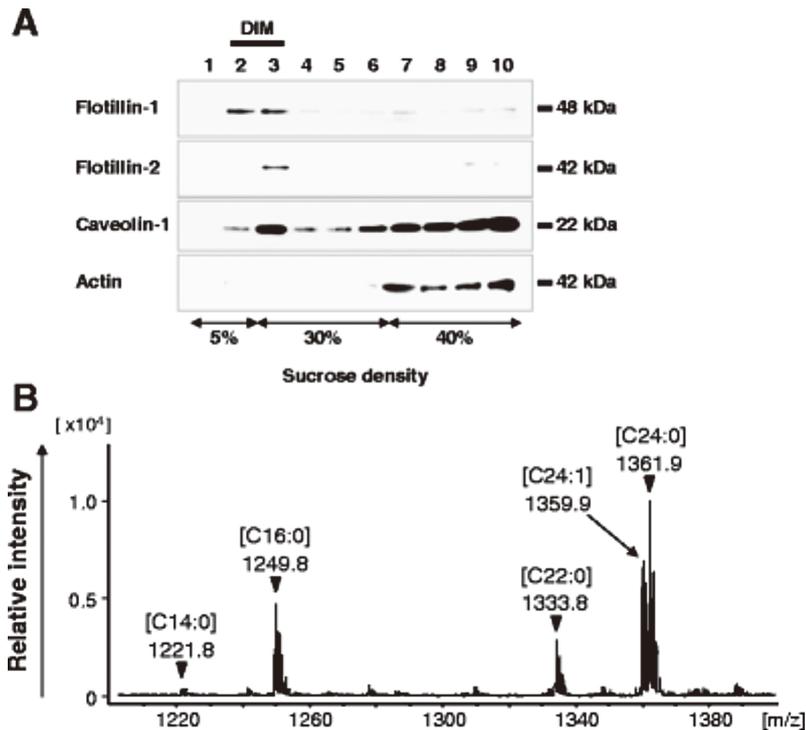


Fig. 4 細胞膜における C24-Gb4 の局在解析
 炎症刺激後の HUVEC より界面活性剤不溶性膜 (DIM) をシヨ糖密度勾配遠心法により分離し, C24-Gb4 の局在を MALDI-TOF-MS により解析した.
 (A) ウェスタンブロットングにより、各画分における脂質ラフト (Flotillin-1,2) 及びカベオラ膜 (Caveolin-1) のマーカー分子の局在について検討した. また、コントロールとしてアクチンタンパク質 (Actin) の局在についても検討した.
 (B) 分離した脂質ラフト濃縮画分における C24-Gb4 の発現を、MALDI-TOF-MS により解析した.

Gb4のMSスペクトルが検出された (Fig.4B)。一方で、非脂質ラフト画分 (Fig.4A, 7-10) からは、Gb4に由来するいずれのMSスペクトルも検出されなかった。

4. 考察

本研究にて、炎症を惹起した血管内皮細胞では超長鎖脂肪酸を含有する N-GSL の発現量が増加することが明らかとなり、その主成分は C24 脂肪酸を含有する Gb4 (C24-Gb4) であった。C24 脂肪酸を含有するスフィンゴ糖脂質は、形質膜の脂質二重層構造において、二つの層間に存在する分子の相互作用を媒介する役割があると考えられている⁵⁾。一方で、炎症性サイトカインにより炎症惹起した血管内皮細胞では、脂質ラフトを介したシグナル伝達が細胞の炎症応答に関与することが知られており⁶⁾、C24-Gb4 の脂質ラフトへの局在からもこれらの現象への関与が示唆される。また遺伝子発現解析の結果から、炎症時における C24-Gb4 の発現増加は遺伝子転写レベルで制御されていることが明らかとなり、その脂肪酸構造の異なる各分子種の発現量まで転写レベルで厳密に制御されていることが判明した。

以上の結果は、炎症下の血管内皮細胞における C24-Gb4 の増加が、細胞の炎症応答にて重要な役割を担うことを示唆しており、今後は C24-Gb4 の関与が予想される膜シグナル伝達経路を中心に、その機能についてアプローチする予定である。

(参考文献)

- 1) Fukumoto S, Yamamoto A, Hasegawa T, et al: Genetic remodeling of gangliosides resulted in the enhanced reactions to the foreign substances in skin. *Glycobiology*, 7, 1111-1120, 1997.
- 2) Inoue M, Fujii Y, Furukawa K, et al: Refractory skin injury in complex knock-out mice expressing only the GM3 ganglioside. *J. Biol. Chem.*, 277, 29881-29888, 2002.
- 3) Okuda T, Tokuda N, Numata S, et al: Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *J. Biol. Chem.*, 281, 10230-10235, 2006.
- 4) Okuda T, Nakakita S, Nakayama K: Structural characterization and dynamics of globotetraosylceramide in vascular endothelial cells under TNF-alpha stimulation. *Glycoconj. J.*, 27, 287-296, 2011.
- 5) Iwabuchi K, Nakayama H, Iwahara C, Takamori K: Significance of glycosphingolipid fatty acid chain length on membrane microdomain-mediated signal transduction. *FEBS Lett.*, 2584, 1642-1652, 2010.
- 6) Kiely JM, Hu Y, García-Cardena G, Gimbrone MA Jr: Lipid raft localization of cell surface E-selectin is required for ligation-induced activation of phospholipase C gamma. *J. Immunol.*, 171, 3216-3224, 2003.

能動的標的化技術を搭載した新規ドラッグデリバリーシステムキャリア「バイオナノカプセル」の次世代化粧品分野での応用可否の検討

名古屋大学

黒田 俊一

Bio-nanocapsule (BNC) is a hollow particle consisting of liposome and hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) L proteins. Due to the high similarity in surface structure between HBV and BNC, BNC is considered to harbor three functions like HBV: active targeting activity (originally to human liver), membrane fusogenic activity, and stealth activity (escaping from reticuloendothelial system in body). Recently, we have developed *in vivo* pinpoint drug and gene delivery system using BNC as a platform by replacing the human liver-specific recognition region (pre-S region) on BNC surface to the targeting molecules of interest. In this study, I have evaluated the applicability of BNC technology for the transdermal delivery, which would be useful technology in the forthcoming cosmetic field.

1. 緒言

化粧品は、有効成分を作用させる部位（標的部位）が皮膚や毛髪の細胞であり、それらが外部に直接露出するか、外部から至近距離にあることから、長年、有効成分の投与方法は表皮部分に直接塗布するのみで、特に大きな工夫はなされていなかった。しかし、その方法では、有効成分の物性（極性に基づく皮膚浸透性等）により非特異的に生体内に吸収されており、また、生体内に吸収された有効成分のごく一部のみが標的部位に到達すれば良しとされていた。正確な計測値は利用可能ではないが、皮膚表面での有効成分の捕捉、表皮及び真皮組織内での標的部位以外への有効成分のリーク（漏れ）などは当然起きるはずで、我々の医薬品の体内動態解析等の経験から、ベストコンディションでも有効成分の全投与量の数%程度しか標的部位に到達していないのではないかと考えている。

そこで我々は、2005年に *Fragrance Journal* 誌¹⁾で指摘したように、近年著しく進歩している DDS (drug delivery system: 薬物送達) 技術を、世界に先駆けて化粧品分野に応用し、上記問題を改善し、次世代の化粧品開発に資することを目的としている。具体的には、我々が開発した B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染機構とヒト肝臓特異的な細胞及び臓器認識機構を有する非ウイルス性ベクターであるバイオナノカプセル (bio-nanocapsule, BNC) を用いる²⁾ (Fig. 1)。BNC は HBV 表面抗原 (HBV surface antigen, HBsAg) L タンパク質を出芽酵母内で過剰発現させることで得られる³⁾ 直径約 70 nm の中空ナノ粒子である。BNC は



Evaluation of novel drug delivery system carrier "bio-nanocapsules" possessing active targeting machinery in the forthcoming cosmetics field

Shun'ichi Kuroda
Nagoya University

酵母小胞体膜由来脂質二重膜に HBsAg L タンパク質約 100 分子が膜タンパク質として存在している。これは既に 30 年に亘って世界的に臨床応用されている B 型肝炎ワクチンの抗原と同様の構造であるため、ヒトにする安全性が高いと考えられており、実際に動物を用いた安全性試験でも安全性が認められている。また、近年では臨床応用されているガーダシルやサーバリスクという子宮頸部癌ワクチンの抗原提示用足場タンパク質としても用いられている。本キャリアは「リボソーム (liposome, LP) とウイルスベクターのハイブリッド (The Lancet 誌 (2003 年 7 月)、Nature Materials 誌 (2003 年 8 月))」と称され、今は複数の医薬品に搭載され、臨床研究に使用されている程、安全性と有効性が高い。本研究では、表皮、真皮、毛髪部位における任意の細胞に対して、外部から直接投与して効率よく到達する BNC の開発を行う。

2. 実験

2.1 実験材料

BNC は、HBsAg L タンパク質発現プラスミド pGLDLIIP39-RcT を保有する *Saccharomyces cerevisiae* AH22R-株³⁾ から既報⁴⁾に従い精製し、凍結乾燥して保存した。

2.2 蛍光標識アニオン性 LP の作製

Cholesterol (SIGMA, St. Louis, MO, USA)、DPPC (Dipalmitoylphosphatidylcholine, 日油株式会社、東京)、DPPE (Dipalmitoylphosphatidylethanolamine, 日油株式会社)、DPPGNa (Dipalmitoylphosphoglycerol, sodium salt, 日油株式会社)、NBD-PE (7-nitrobellzo-2-oxa-1, 3-diazole, dihexanooylphosphothanolamine, trithylammonium salt, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (励起光波長: 470 nm, 蛍光波長: 530 nm) を使用して水和法により (最終モル比は Cholesterol : DPPC : DPPE : DPPG = 40 : 15 : 13 : 30 : 2 (mol/mol)) NBD 標識アニオン性 LP を得た。

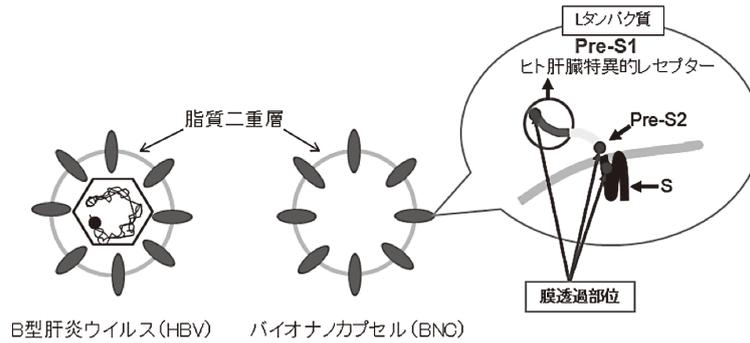


Fig.1 HBV と BNC の構造

2.3 第2.5世代BNC技術を用いたBNC-LP複合体の作製

LP溶液700 μ l (脂質量3mg分)を15mlファルコンチューブに分注し、Britton Robinson buffer (0.1 M ホウ酸, 0.1 M 酢酸, 0.1 M リン酸, 0.5 M NaOHによりpH 3に調整)を800 μ l、BNCを300 μ l (タンパク質量として300 μ g)添加し、37 $^{\circ}$ C、30分間インキュベートした後、5%、10%、15%、20%、30%及び40% (w/v)の塩化セシウム溶液をそれぞれ6.5ml、6.5ml、5ml、5ml、5ml、5mlずつP28ST用遠心管(日立工機, 東京)に重層し、調製したサンプル溶液1800 μ lを重層して全量34.8mlとし、分離用超遠心機CP100MX(日立工機, 東京)を用いて24,000 rpm、室温、16時間の条件で塩化セシウム密度勾配超遠心を行った。超遠心終了後、上層から1mlずつ分取した各フラクションを0.1%(w/v)SDS(sodium dodecyl sulfate)を含む10%(w/v)ポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)(ゲルサイズ10cm \times 10cm)に負荷し、80V、80mA、30分泳動した後、160V、80mA、60分泳動した。電気泳動後、ゲルを銀染色してBNCが存在するフラクションを特定した。また、各フラクションのNBD蛍光標識LPの定量は、NBD由来蛍光強度(励起光波長:470nm, 蛍光波長:530nm)を1mg/mlのNBD蛍光標識LPを標準物質としてVarioskan(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)により評価し、BNCに約80%(重量比)含まれるタンパク質成分の定量はMicro BCA Protein Assay Kit(Thermo SCIENTIFIC, Rockford, IL, USA)を用いて1mg/mlのBSAを標準物質として定量した。目的のフラクションをまとめた後、500mlのPBS(Phosphate buffered saline; 140mM NaCl, 3mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄)を用いて室温で2時間透析した後、同量のPBSに交換して、さらに室温で一晩透析したものをBNC-LP複合体として、4 $^{\circ}$ Cで一晩保存した。

2.4 性状解析

BNC-LP複合体の粒子径と ζ 電位は、ゼータサイザーナノシリーズZS(Malvern Instruments Ltd.,Worcestershire,

UK)を用いて測定した。具体的には、ブラウン運動中の粒子群にレーザー光を当て、その散乱光を光電子倍增管にて検出するDLS法(動的光散乱法)による粒子径測定と、M3(mixed mode measurement)測定技術とPALS(Phase Analysis Light Scattering)法をあわせたM3-PALSによる ζ 電位測定を行った。

2.5 イオントフォレシス

ラット(8~10週齢のオスSprague-Dawley)背部皮膚の毛を剃り、首もとの脊柱を挟んで左右(1cm間隔)の皮膚表面において、BNC-LP複合体を不織布にHEPES(pH7.4)300 μ lを用いて含浸させ、銀-塩化銀電極を使用して、イオントフォレシス(TTIエルビュー, TCCR-3005, 東京)により0.3mA/cm²の条件で1時間行って皮膚内に投与した。イオントフォレシス後、3時間遮光して放置して、投与部位の凍結皮膚切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡FV1000D(オリンパス, 東京)により皮膚内におけるBNC-LP複合体の動態を評価した。

3. 結果

3.1 蛍光標識アニオン性LPとBNCとの複合体作製

第2.5世代型BNC技術は本来DNA送達の為に開発されたもので、カチオン性LPとDNAを複合体(lipoplex, LPX)化した後に、酸性条件下でBNCと融合させて、塩化セシウム密度勾配超遠心法でBNC-LPX複合体を精製した(Fig.2)。そこで、本研究では薬剤をアニオン性LPに封入して、第2.5世代型BNC技術により、酸性条件下でBNCを混合して融合を促し、塩化セシウム密度勾配超遠心法に供してBNC-LP複合体の生成を試みた。超遠心後、上層より1mlずつフラクションを回収し、全フラクションについてNBD(LP)の蛍光強度、BNCのタンパク質濃度、密度を測定した(Fig.3)。その結果、フラクション番号8においてLPの単一ピークが形成された。また、各フラクションをSDS-PAGEで展開して銀染色し、デンストメトリ解析を行った結果、大部分のBNCはフラクション番号17をピークとして集約していたが、一部はフラクシ

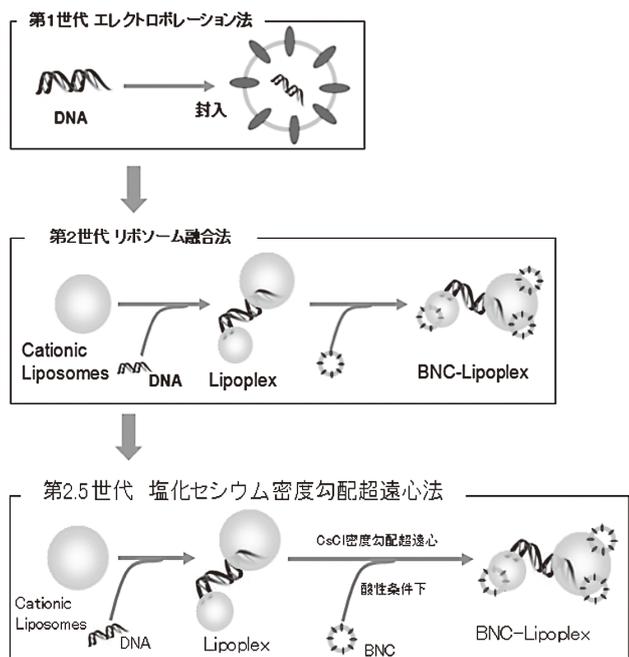


Fig. 2 BNC 内部への遺伝子封入法の変遷

ン番号8においてピークを形成していた。以上の結果から、酸性条件下でアニオン性LPはBNCと効率よくBNC-LP複合体を形成することが判明した。

3.2 BNC-LP 複合体の性状

得られたBNC-LP複合体は、薬剤をLP内に封入することが可能であり、本研究の目的に対してモデルキャリアとして考えることができる。そこで、DDS分野において重要な物性を決定した。まず、BNC濃度(タンパク質として)は200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、LP濃度は700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。第2世代型BNC作製法までのBNC-LP複合体はBNC濃度はLP濃度の5%程度であったことから、今回は30%程度なので幾分BNC濃度が高かった。また、粒子径はDLS法で測定すると200nm前後であった(Fig. 4)。ただし、PDI(多分散係数)は1であり、粒度分布が不均一であることを示していた。また、表面電荷(ζ 電位)は-69.2mVであり、生体内での非特異的吸着が起こりにくいアニオン性であったが、粒度分布が不均一でないことにより電荷分布も均一でなかった。

3.3 イオンフォレシス

本来であれば、BNC自身が有する膜透過活性により、皮膚表面にBNC-LP複合体が接触すれば、ある程度は皮膚内に浸透するものと期待されたが、まずは強制的にどこまで皮膚内に浸透できるかイオンフォレシス⁵⁾を行ってみた。その結果、BNC-LP複合体の皮膚内への顕著な浸透は見られなかった(データ示さず)。そこで、BNC単体で皮膚内に浸透できるか検討するために、蛍光色素Cy5で標識した後、粒子径及び ζ 電位を測定した(Fig. 5)。その結果、

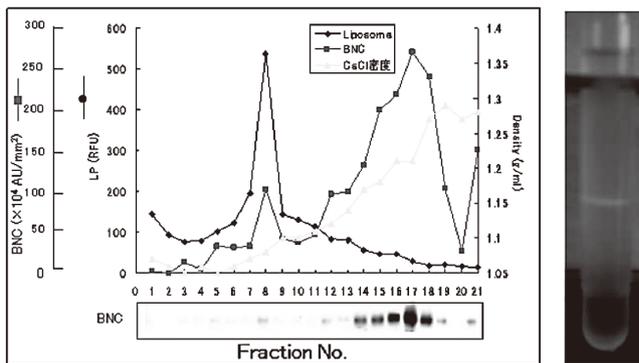


Fig. 3 第2.5世代型BNC作製法による蛍光標識アニオン性LPとBNCの融合パターン(左)及び塩化セシウム超遠心分離パターン(右)

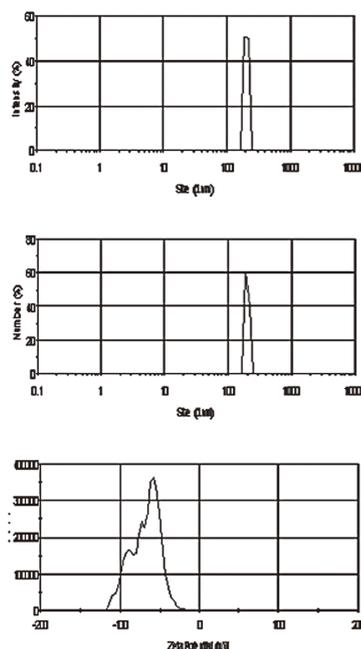


Fig. 4 BNC-LP 複合体の粒子径(上、Intensityモード; 中、Numberモード)と ζ 電位(下)

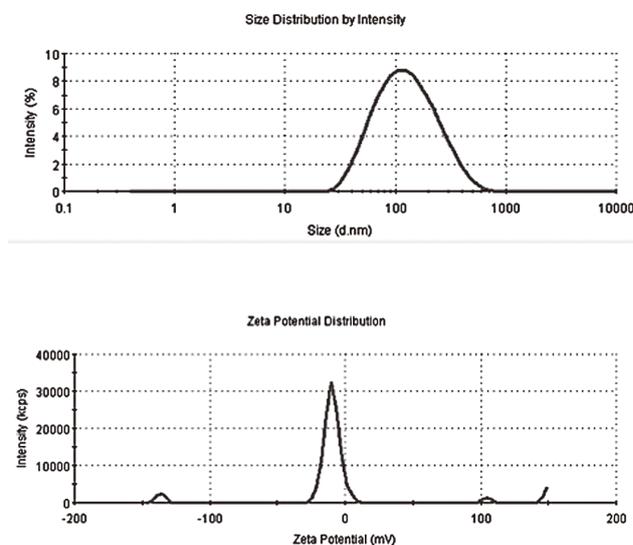


Fig. 5 Cy5 標識 BNC の粒子径(上、Intensityモード)と ζ 電位(下)

粒子径は102nmでPDIが0.228と均一な粒子を形成していた。次に、 ζ 電位を測定すると、粒度分布が均一なためにシャープな電位を示しており、 -4.54mV と生体内投与に好適な弱アニオン性であった。

次に、Cy5標識BNC（タンパク質量として $833\mu\text{g/ml}$ ）溶液 300ml を用いて同様にイオントフォレーシスを1時間行い、3時間遮光放置して、皮膚切片を観察した（Fig.6）。その結果、BNCは皮膚表面から満遍なく入っており、浸透している領域は、表面から数 $10\mu\text{m}$ から $100\mu\text{m}$ 弱の「表皮層」であった。これは、カチオン性LPを投与した場合⁵⁾と同じ皮膚内浸透能力をBNCが有していることを示していた。

3.4 蛍光標識アニオン性LPとBNCとの複合体作製条件の再検討

BNC-LP複合体を皮膚内に一層浸透させるために、BNC-LP間の相互作用を高めて複合体の安定性を高めることが必要と考えた。そこで、再度複合体作成条件の検討を行うことにした。具体的には、3.1で記載した酸性条件下でのBNCとアニオン性LPとの融合に際して、脂質膜の流動性を高めるために高温条件（ 37°C 30分から、 50°C 、 60°C 、 70°C で2時間に変更）で行い、BNC-LP複合体が効率よく形成されるか検討した（Fig. 7）。その結果、塩化セシウム密度勾配超遠心法により分離したBNC-LP複合体に含まれるBNC及びLPの回収率が高音になるに従って一段と向上した。また、同複合体のバンドも明確に視認できる

ようになった（Fig.8）。特に、 60°C で生成させたBNC-LP複合体を透過型電子顕微鏡で観察したところ、 40°C 30分間（ 37°C と同じ）で生成した同複合体と同じ形状を示していた（Fig.9上段）。また、 60°C 及び 70°C で生成させたBNC-LP複合体の粒子径及び表面電荷を測定したところ、特に 60°C で生成した分は粒子径及び表面電荷ともに生体内投与に適していた（Fig.9下段）。

4. 考察

今回、化粧品の有効成分を封入したナノキャリアを効果的に皮膚内に浸透させるために、我々の開発したBNCを用いて条件検討を行った。まず、最近、BNC内部に物質封入する方法が改良された（第2.5世代型BNC作製法）ので、同方法を用いてアニオン性LP内部にモデル化合物（今回は蛍光色素）を封入し、BNCと融合させ、BNC-LP複合体とした。今回は、能動的標的化は期待していなかったため、ヒト肝臓特異的BNCを使用した。その結果、同複合体の ζ 電位はアニオン性で生体内非特異的吸着が少ないことが期待されたが、粒子径が 200nm 程度となり、また、粒度分布が不均一なために、単純塗布でもイオントフォレーシスでも皮膚内に効率的に侵入することはなかった。そこで、BNC単独で同様な検討を行ったところ、粒子径 100nm で ζ 電位は弱アニオン性となり、単純塗布では難しかったが、イオントフォレーシスでは効率よく皮膚内に浸透した。その経路は毛根を介して入っているように見えた。今回は、イオントフォレーシスの作用時間は1時間であり、

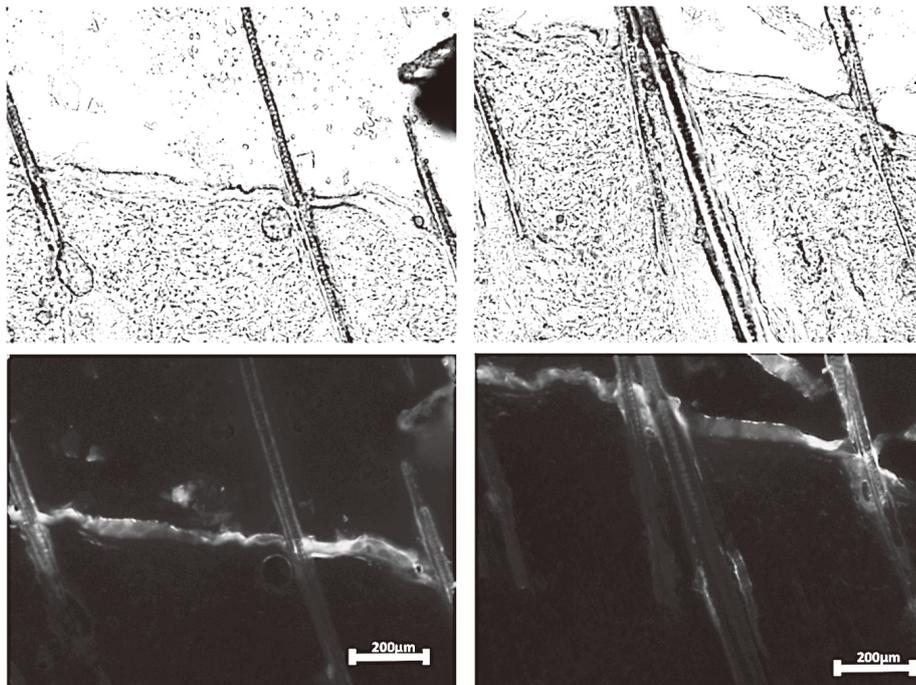
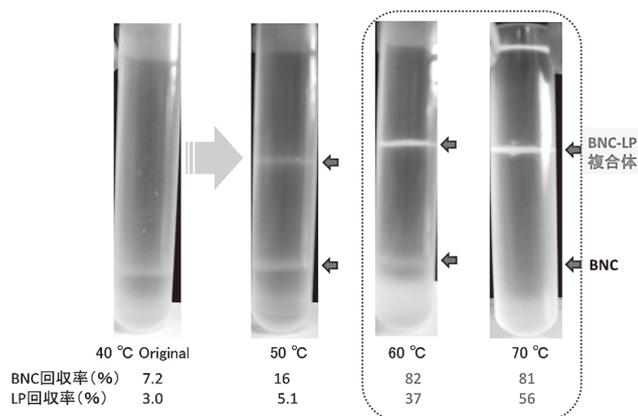
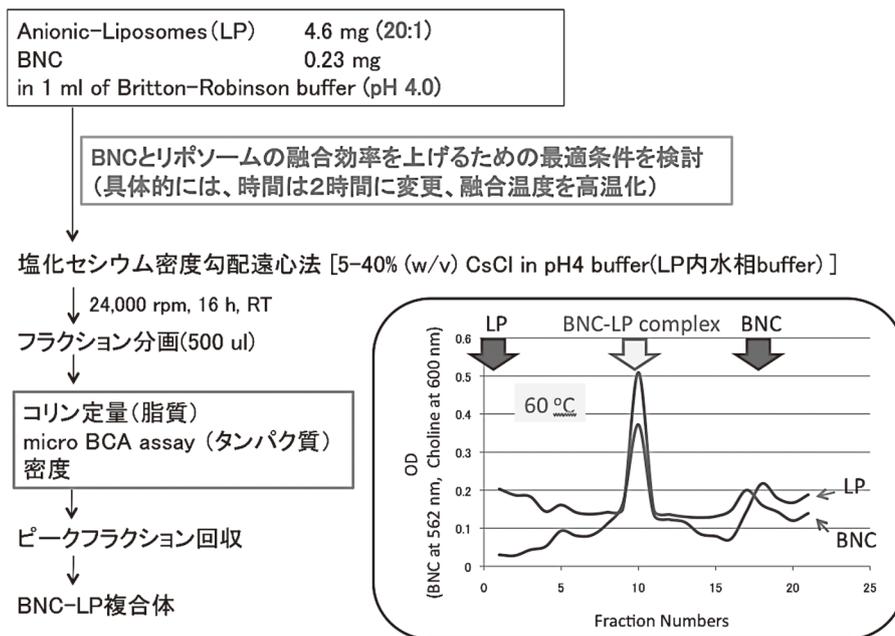
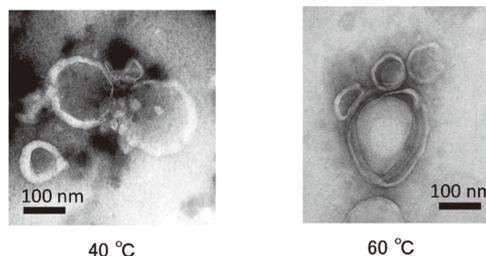


Fig. 6 Cy5 標識 BNC のイオントフォレーシス結果 1
（上、明視野；下、蛍光像）



TEM (Transmission Electron Microscopy) 観察



DLS (Dynamic Light Scattering) 解析

| 融合温度 | 粒子径 | 表面電荷 |
|-------|--------|----------|
| 40 °C | 232 nm | -70.8 mv |
| 60 °C | 227 nm | -28.7 mv |
| 70 °C | 342 nm | -31.6 mv |

Fig. 9 高温で形成された BNC-LP 複合体の性質

電流値も大きかった(これ以上長いと、皮膚に炎症が起こる可能性がある)ので、次回からは作用時間及び電流値も下げて検討を行う必要がある。また、膜透過活性の高いペプチドを提示させた改良型BNCについても同様な実験を行い、単純塗布でも皮膚内に侵入できるBNCの開発も行いたい。

その後、BNC-LP複合体の作製法を改良し、皮膚内投与しても崩壊しないような強固かつ粒子性状も好ましい複合体の作製に成功した。現在、本複合体のアッセイをおこなっており、皮膚内に安定かつ容易に浸透するか否か検討している。

5. 総括

従来血液中投与を目的として開発されたナノキャリアーであるBNCは、今回の検討により、少なくともイオントフォoresisにより皮膚内に浸透できることが判明した。今後は、BNC表層の改良、粒子径の改良、表面電荷の改良を行い、単純塗布でも皮膚内に浸透できるナノキャリアー化を目指したい。また、能動的標的化機構も搭載して、化粧品のみならず医薬品まで展開できるグレードのナノキャリアーを目指したい。

(引用文献)

- 1) 黒田俊一：バイオナノカプセルの開発と化粧品への応用, *Fragrance Journal*, 33, 22-28, 2005.
- 2) Yamada, T., Iwasaki, Y., Tada, H., Iwabuki, H., Chuah, M. K. L., VandenDriessche, T., Fukuda, H., Kondo, A., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: Nanoparticles for the Delivery of Genes and Drugs to Human Hepatocytes, *Nature Biotechnology*, 21, 885-890, 2003.
- 3) Kuroda, S., Otaka, S., Miyazaki, T., Nakao, M., and Fujisawa, Y.: Hepatitis B Virus Envelope L Protein Particles: Synthesis and Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*, Purification and Characterization, *J. Biol. Chem.*, 267, 1953-1961, 1992.
- 4) Yamada, T., Iwabuki, H., Kanno, T., Tanaka, H., Kawai, T., Fukuda, H., Kondo, A., Seno, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S.: Physicochemical and Immunological Characterization of Hepatitis B Virus Envelope Particles Exclusively Consisting of the Entire L (Pre-S1+Pre-S2+S) Protein, *Vaccine*, 19, 3154-3163, 2001.
- 5) Kajimoto K, Yamamoto M, Watanabe M, Kigasawa K, Kanamura K, Harashima H, and Kogure K.: Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis, *Int. J. Pharm.*, 403, 57-65, 2011.

海洋生物に由来する機能性化粧品素材の探索

熊本大学大学院生命科学研究部

塚本 佐知子

In Japan, we have used medicinal plants for the efficient ingredients in functional cosmetics so far. Recently, thalassotherapy has been popular in Japan, and marine algae, dried material of seawater, and marine mud are used for the therapy. However, only a few marine-derived compounds, e.g. pseudopterosin, astaxanthin, chitin, chitosan, and sodium alginate, are used for the efficient ingredients in functional cosmetics. Marine organisms inhabit under strong ultraviolet rays, and they may contain antioxidants, radical scavengers, and ultraviolet-absorbing substances. Since many drug leads were isolated from marine organisms, leads of efficient ingredients in functional cosmetics may also be discovered from marine sources. We screened the DPPH radical scavenging activity of extracts of marine organisms (360 samples) and found that the extracts of 22 samples showed more than 30% radical scavenging activity. The bioassay-guided purification of the extracts of two marine sponges (06M046, 07M105) afforded 4,7-dihydrotribastrine (1), epinine-3-*O*-sulfate (2), 5-hydroxyindole-3-aldehyde (3), 5-hydroxy-3-(2-hydroxyethyl)indol (4), 5-hydroxytryptophane (5), hyrtioerectin B (6), and hyrtiosulawesine (7). Their IC₅₀ values of the DPPH radical scavenging activity were 5.0, 50, 49, 5.2, 9.0, 49, and 9.5 μg/mL, respectively.

1. 緒言

我国においては、民間薬や漢方薬を古くから利用してきた歴史がある。その関係もあって、従来、アロエやオリーブエキスなど多くの植物成分が機能性化粧品素材として利用されてきた。そして最近では、ヨーロッパを中心として広く普及していた海洋療法（タラソテラピー）が、我国においても急速に広まってきている。タラソテラピーとは、海藻、海水乾燥物、海泥などを利用することにより、新陳代謝の促進による解毒効果や皮膚の保湿効果による美肌効果を得ることを目的とするとともに、さらに循環器や神経系統の障害を解消することにより健康を増進することを目的としたものである。我国においても最近、女性を中心としてタラソテラピーに対する関心が高まっている。しかし我国は周りを海に囲まれているにもかかわらず、現在化粧品素材として用いられている海洋資源由来の機能性化粧品素材は、抗酸化・抗炎症効果を示すシュードプテロシン、抗酸化作用を示すアスタキサンチン、保湿作用を示すキチン・キトサンやアルギン酸ナトリウムなどに限られていて、それ以外の海洋資源由来の成分については研究がほとんど行われていないのが現状である。機能性素材の中でも特に抗酸化物質は、皮脂の酸化やメラニンの産生を抑制するので、美白やアンチエイジング効果が期待できるということ

で注目されている。私たちは、現在、インドネシアのスラウエシ島北部にあるサムラトランギ大学と共同研究を行うことにより、熱帯サンゴ礁海域に棲息する海洋生物や微生物からの医薬品シーズの探索を行っている。そして、研究室において自ら各種アッセイを行いながら化合物の探索を進めることにより、生物活性を有する多くの新規天然低分子化合物を発見してきた。そこで本研究においては、これまで研究室で独自に構築した海洋資源ライブラリーを用いて、新規な機能性化粧品素材を探索することを目的とした。特に海洋生物は、強い紫外線から身を守るために、抗酸化、ラジカル消去、紫外線吸収などの各作用を示す成分を生体内に豊富に蓄えていると考えられるが、これまでに、そのような成分が発見された例はあまり知られていない。当研究室で所有するライブラリーは、機能性化粧品素材の探索資源として従来あまり利用されてこなかった海洋生物の抽出物を多く含むので、本研究の遂行により、これまでに用いられてきた化粧品素材とは全く異なったタイプの新規機能性素材が発見されると考え、本研究課題を遂行した。

2. 実験、結果

2・1 研究材料

これまでインドネシアにおいて、海洋無脊椎動物を1,400サンプル、海洋微生物を1,300サンプル収集している。また、前任地である金沢大学在任中に能登半島で海洋微生物を1,000サンプル単離している。当研究室では、それぞれのサンプルをアルコール抽出し、濃縮後に得られた水溶液を酢酸エチルと分配することにより、脂溶性画分と水溶性画分に分離しそれぞれを海洋資源ライブラリーとしている。本研究では、ライブラリーの中から360サンプルを用いてスクリーニングを行った。



Search for leads of efficient ingredients in functional cosmetics from marine organisms

Sachiko Tsukamoto

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

2・2 スクリーニング

抗酸化作用は、DPPHラジカル消去能により検定した。私たちは、既にこの方法を用いて、キノコから新規骨格を有する抗酸化物質の単離と構造決定に成功している¹⁾。最初にDPPHを 6×10^{-5} Mになるようにメタノールに溶かし、96穴プレートに200 μ Lずつ入れ、そこにサンプルのDMSO溶液を1 μ Lずつ添加した(サンプルの最終濃度は50 μ g/mLとなる)。そして、DPPH試薬を加えずにサンプル溶液のみ加えたものをブランクとし、サンプル溶液の代わりにDMSOを1 μ L加えたものをコントロールとした。反応液を25度で30分間インキュベートした後、492nmでの吸光度を測定し、以下の式を用いてDPPHラジカル消去能を計算した。

$$\text{DPPHラジカル消去能(\%)} = \frac{[\text{ABS}_D - (\text{ABS}_S - \text{ABS}_B)]}{\text{ABS}_D} \times 100$$

ABS_D: コントロールの吸光度

ABS_S: サンプルの吸光度

ABS_B: ブランクの吸光度

スクリーニングを行った360サンプルのうち、DPPHラジカル消去能を示したサンプルの数は表1に示す通りである。

2・3 抗酸化物質の精製と構造決定

DPPHラジカル消去能を示したサンプルのうち2種類の海綿(06M046, 07M105)について、活性を指標にして抗酸化物質の精製を行った。精製には、各種カラムクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーを用いた。得られた成分の構造決定は、核磁気共鳴(NMR)スペクトルを中心とした各種機器分析により行った。

2・3・1 インドネシア産海綿06M046から得られた抗酸化物質の精製

2006年にインドネシアのスラウエシ島北部に位置するマンテハゲ島において採集した海綿06M046(湿重量1200g)のエタノール抽出液を濃縮し、濃縮後の水溶液を酢酸エチルで分配した。得られた2つの画分を用いて、50 μ g/mLの濃度でDPPHラジカル消去能を測定したところ、17%(酢酸エチル画分)および30%(水画分)の阻害

表1 360サンプル中、スクリーニングによりDPPHラジカル消去能を示したサンプル数

| DPPHラジカル消去能(%)* | サンプル数(個) |
|-----------------|----------|
| 30-39 | 16 |
| 40-49 | 2 |
| 50-59 | 3 |
| 60-69 | 1 |

*サンプル濃度50 μ g/mL

作用を示した。活性を指標にして分画を行い、水画分から4,7-dihydrotubastrine²⁾(**1**, 604mg)およびepinine-3-O-sulfate³⁾(**2**, 2.9mg)を単離した(図1)。n-ブタノール画分は、TLCで水画分とほぼ同じ成分を含んでいると判断したので精製は行わなかった。化合物**1**と**2**のDPPHラジカル消去能は表2に示す通りである。

2・3・2 インドネシア産海綿07M105から得られた抗酸化物質の精製

2007年にインドネシアのスラウエシ島北部に位置するマンテハゲ島において採集した海綿07M105(湿重量800g)のエタノール抽出液を濃縮し、濃縮後の水溶液を酢酸エチルとn-ブタノールで分配した。得られた3つの画分を用いて、50 μ g/mLの濃度でDPPHラジカル消去能を測定したところ、84%(酢酸エチル画分)、72%(n-ブタノール画分)および45%(水画分)の阻害作用を示した。活性を指標にして分画を行い、酢酸エチル画分から5-hydroxyindole-3-aldehyde⁴⁾(**3**, 1.7mg)、5-hydroxy-3-(2-hydroxyethyl)indol⁵⁾(**4**, 5.3mg)、hyrtiosulawesine⁵⁾(**7**, 3.4mg)が、また水画分からは5-hydroxytryptophane⁶⁾(**5**, 5.6mg)およびhyrtioerectin B⁷⁾(**6**, 1.5mg)が得られた(図2)。n-ブタノール画分もDPPHラジカル消去能を示したが、TLCにより水画分とほぼ同じ成分を含んでいると判断されたので精製は行わなかった。化合物**1**–**5**のDPPHラジカル消去能は表3に示す通りである。

3. 考察

現在、海洋資源由来の機能性化粧品素材の多くは、海藻、海水乾燥物、海泥を原料としたものである。海藻から得られるものとして、多糖類であるアルギン酸ナトリウム、カラギーナン、寒天、フコイダンなどが保湿剤として用いられている。また、海水乾燥物はミネラル分を多く含むが、その組成はヒトの体液組成に類似しているため、タラソテ

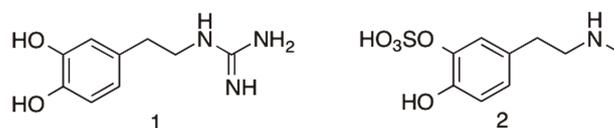


図1 7,8-Dihydrotubastrine(**1**)およびepinine-3-O-sulfate(**2**)の構造

表2 インドネシア産海綿06M046から得られた抗酸化物質のDPPHラジカル消去能

| サンプル | DPPHラジカル消去能 IC ₅₀ (μ g/mL) |
|------------------------------------|--|
| 4,7-Dihydrotubastrine (1) | 5.0 |
| Epinine-3-O-sulfate (2) | 50 |
| Ascorbic acid* | 3.0 |

*ポジティブ・コントロール

ラピーではミネラル成分が体内に吸収されることにより新陳代謝を促し解毒効果が得られると考えられている。海泥は、海水中の各種成分と海藻などの有機物が海底に堆積して形成されたもので、洗浄剤やパック剤として用いられている。一方、海藻、海水乾燥物、海泥以外の海洋資源由来の機能性化粧品素材として、最近、魚や甲殻類などの生物資源を起源とするものが製品化されている。たとえば魚の表皮から得られる加水分解コラーゲンや、サメの軟骨から得られるコンドロイチン硫酸、甲殻類から得られるキチンやキトサンが保湿剤などに用いられている。また、サメの

スクワランが油分や皮膜形成成分として用いられている。以上に示した機能性素材はいずれも高分子化合物であるのに対して、低分子の機能性化粧品素材としては、カリブ海に生息する腔腸動物から得られたシュードプトロシンC⁸⁾ (pseudopterosin C, **8**) (図3) が、強い抗酸化・抗炎症効果を示す成分としてアメリカでスキンケアクリームに配合されている。また、甲殻類やヘマトコッカス(藻類)に豊富に含まれるアスタキサンチン⁹⁾ (astaxanthin, **9**) も、強い抗酸化効果を示すことからシミやしわの防止(アンチエイジング)を目的としてスキンケアクリームに配合されている。海洋資源から多くの医薬品シーズが発見されていることを考慮すると、機能性化粧品素材の多くが未だ海洋資源に埋もれていると考えられる。本研究課題では、1年間の研究期間内でDPPHラジカル消去能についてスクリーニングを行い、さらにラジカル消去能を示した2種類の海綿(06M046, 07M105)から合計7種類の抗酸化物質を発見することができた。特に06M046の海綿からは、IC₅₀値で5.0μg/Lというアスコルビン酸に匹敵するラジカル消去能を有する4,7-dihydrotubastrineを604mgという高い収量で得ることができた。今後も研究を継続することにより、抗酸化物質を初めとする有用な機能性化粧品素材が海洋資源から発見できると考えられる。

表3 インドネシア産海綿07M105から得られた抗酸化物質のDPPHラジカル消去能

| サンプル | DPPHラジカル消去能 IC ₅₀ (μg/mL) |
|--|---|
| 5-Hydroxyindole-3-aldehyde (3) | 49 |
| 5-Hydroxy-3-(2-hydroxyethyl)indol (4) | 5.2 |
| 5-Hydroxytryptophane (5) | 9.0 |
| Hyrzioerectin B (6) | 49 |
| Hyrtilowawesine (7) | 9.5 |
| Ascorbic acid* | 3.0 |

*ポジティブ・コントロール

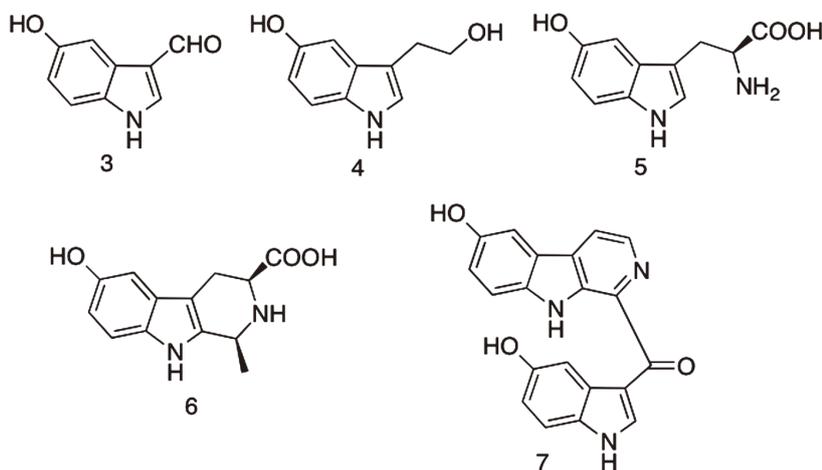


図2 5-Hydroxyindole-3-aldehyde (**3**)、5-hydroxy-3-(2-hydroxyethyl) indol (**4**)、5-hydroxytryptophane (**5**)、hyrtioerectin B (**6**)およびhyrtiosulawesine (**7**)の構造

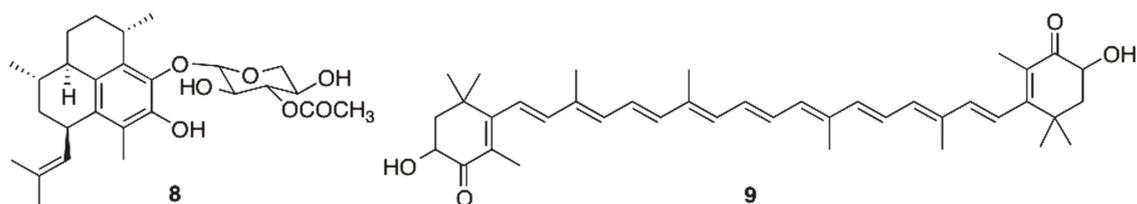


図3 Pseudopterosin C (**8**) および astaxanthin (**9**) の構造

(参考文献)

- 1) Tsukamoto S, Macabalang AD, Abe T, *et al.*: Thelephorin A: a new radical scavenger from the mushroom *Thelephora vialis*. *Tetrahedron*, **58**, 1103-1105, 2002.
- 2) Sakai R, Higa T: Tubastrine, a new guanidinostyrene from the coral *Tubastrea aurea*. *Chem. Lett.*, 127-128, 1987.
- 3) Ferrini R, Merlo L, Miragoli G: Pharmacological characterization of epinine 3-*O*-sulphate and 4-*O*-sulphate. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **289**, 37-45, 1987.
- 4) Kobayashi J, Murayama T, Ishibashi M, *et al.*: Hyrtiosins A and B, new indole alkaloids from the Okinawan marine sponge *Hyrtios erecta*. *Tetrahedron*, **46**, 7699-7702, 1990.
- 5) Salmoun M, Devijver C, Daloze D, *et al.*: 5-Hydroxytryptamine-derived alkaloids from two marine sponges of the genus *Hyrtios*. *J. Nat. Prod.*, **65**, 1173-1176, 2002.
- 6) Morin D, Monteau R, Hilaire G: 5-Hydroxytryptamine modulates central respiratory activity in the newborn rat: an in vitro study. *Eur. J. Pharmacol.*, **192**, 89-95, 1991.
- 7) Youssef DTA: Hyrtioerectines A-C, cytotoxic alkaloids from the Red sea sponge *Hyrtios erectus*. *J. Nat. Prod.*, **68**, 1416-1419, 2005.
- 8) Look SA, Fenical W, Jacobs RS, *et al.*: The pseudopterosins: Anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6238-6240, 1986.
- 9) Mortensen A, Skibsted LH: Importance of carotenoid structure in radical scavenging reactions. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2970-2977, 1997.

Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

小皺形成に関わる 皮膚特異的プロテアーゼSASPase活性と加齢との関係

京都大学 物質-細胞統合システム拠点 終研究室

松井 毅

The epidermis layer of the skin is composed of basal, spinous, granular, and cornified cell layers. Skin aspartic protease (SASPase) is expressed primarily in the granular layer of human and mouse stratified epithelia. In a previous report, we used high throughput *in situ* hybridization screening to identify the mouse homolog of SASPase. We recently reported that SASPase-deficient hairless adult mice showed characteristic dry-skin like phenotype. In this study, we analyzed the relationship between the mode of activation of SASPase and the aging of skin. In addition, we identified profilaggrin, as one of endogenous substrates of SASPase. Profilaggrin processing activity by SASPase would be an important hallmark of aging of skin.

Copyright 2011 Wiley. Used with permission from Matsui *et al.*, SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol. Med.* 3:320-333, 2011.

1. 緒言

しわのない肌は、若い皮膚の特徴であり、若々しく、美しい肌を長い間維持する事は、精神や気力の充実に大きな影響を与える。皮膚は、表皮・真皮・皮下組織の三つの区画から構成されるが、しわの形成は表皮・真皮の老化が原因である事が明らかにされつつある。加齢に伴う、真皮におけるコラーゲンや弾性繊維等の劣化は大きなしわ（大じわ）の形成を促す事が知られている。一方、表皮における水分蒸発量の変化や表皮柔軟性の変化により目尻等に出現する小じわが誘導されると考えられている¹⁾。大じわの形成機構は、UV照射やFiblin-5欠損マウス²⁾等を用いる事により解析が可能であるが、小じわに関しては、その形成機構は依然として不明な部分が多く、モデルマウスも存在していなかった。我々は、皮膚特異的であり、表皮顆粒層に発現するレトロウイルス型アスパラギン酸プロテアーゼSASPase (Skin ASpartic Protease) の欠損マウスを作製し、その体側に小じわが形成される事を発見した³⁾。また、最近、我々は、SASPase 欠損無毛マウスが、小じわのみならず、乾燥肌様表皮を呈する事も明らかにした(図1)⁴⁾。このように、SASPaseは、角質層水分量の調節に関わるプロテアーゼである事が明らかになってきているが、正常なマウス表皮において、加齢と共にSASPaseの活性がどのように変化するのか、発現量はどのように変化するのか、活性型SASPaseの産生量はどのように変化するのか、その比活性はどのように変化するのか、など基本的なコス

メに関する問題は明らかになっていない。そこで、本研究課題では、マウスを用いて、SASPaseの活性型定量法の検討と、SASPaseの基質がProfilaggrinである事の証明と、SASPaseによるProfilaggrinの切断部位決定を行い、ヒトにおける活性測定法を将来的に行う為の基盤研究を行った。

2. 実験

2.1 マウス表皮角質層における前駆体型・活性型SASPaseの検出

無毛マウス (Hos:HR-1、4週齢及び14週齢、雌)の全身の表皮角質層のテープストリッピング(SCOTCH, 3M, Book tape)を1~5回、6~10回行った。得られた角質層をそれぞれ5mlのUrea抽出液(5M urea, 2M thiourea, PBS, 1mM EDTA)を用いて回収し、Amicon-ultra 10kDaを用いて50ulに濃縮した。得られた角質層抽出液をブラットフォード法により蛋白質を定量し、5ugをSDS-PAGEに供した。その後、抗SASPase抗体³⁾(99-217 aaを認識する抗体)を用いてイムノプロットを行い、前駆体型(32kDa)・活性型(15kDa)のSASPaseを検出した。

2.2 SASPase 欠損無毛マウスにおける表皮分化マーカーの発現

SASPase 欠損マウスを無毛マウス(Hos:HR-1)と戻し交配する事で作製したSASPase 欠損無毛マウスの皮膚表皮に対してUrea抽出液(5ml)を用いて表皮抽出液を調製し、様々な表皮分化マーカー(Keratin14, Keratin1, Involucrin, Loricrin)に対する抗体(COVANCE社)を用いたイムノプロットを行った。また、Profilaggrinの分解パターンを解析する為に、2.1の方法を用いて、テープストリップ10回分からの抽出液に対して抗Filaggrin抗体(COVANCE社)を用いたイムノプロットを行った。



Activity of SASPase in Stratum Corneum and Aging of Skin

Takeshi Matsui

Hiiragi Laboratory Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University

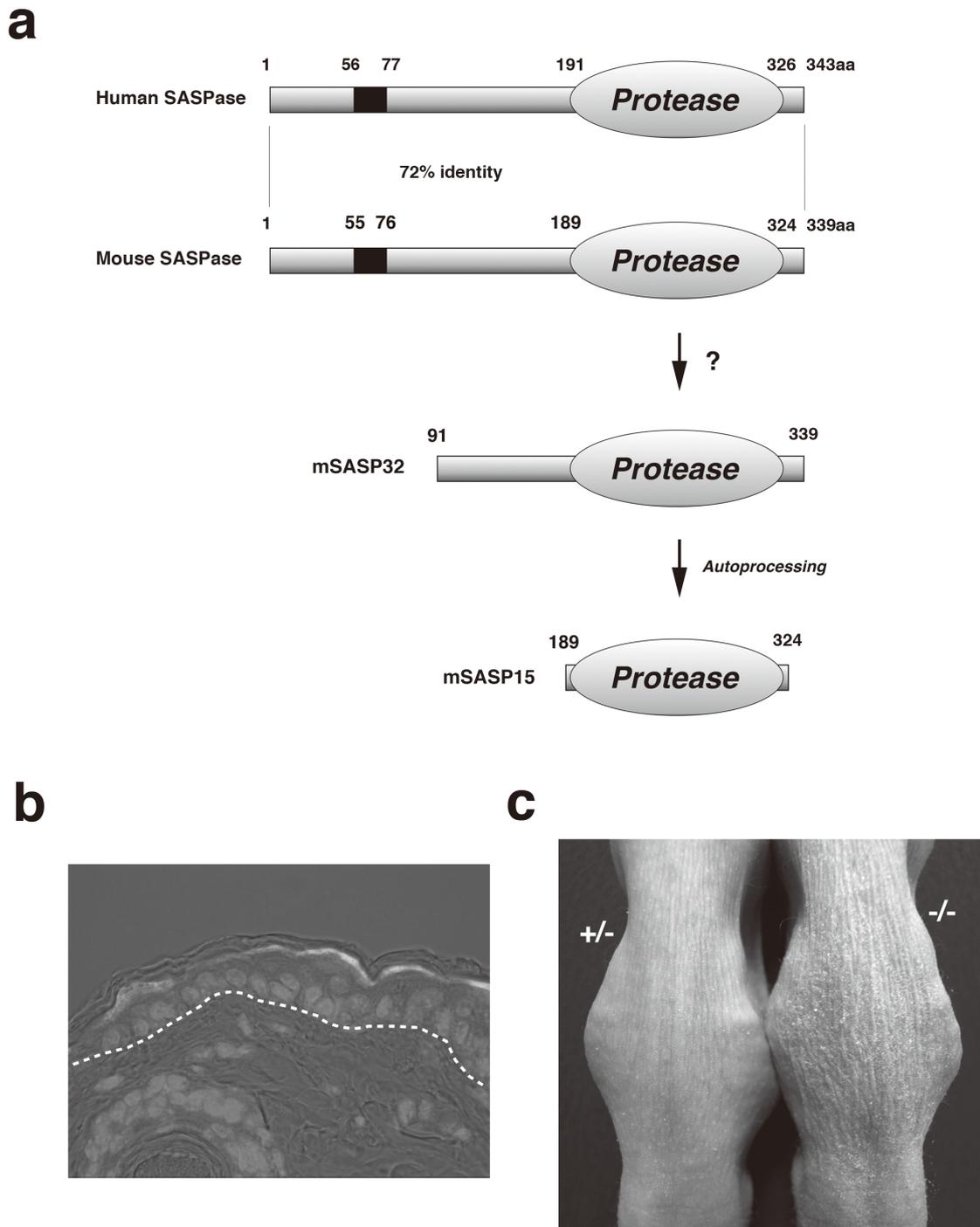


図1 レトロウイルス型アスパラギン酸プロテアーゼ SASPase

(a) ヒト及びマウス SASPase の構造

ヒト及びマウス SASPase は、N 末端側に膜貫通ドメインを持つがその役割は不明である。(黒エリア) また C 末端側にプロテアーゼ活性ドメインを持つが、ヒト・マウス顆粒層において、ヒトでは 28kDa 型 (hSASP28)、マウスでは 32kDa 型 (mSASP32) として細胞質に局在していると考えられる。マウスでは、mSASP32 は 91 – 339aa として存在しており、それらはホモダイマーを形成し、自己分解により活性化し、プロテアーゼドメイン (Protease) のみを産生する。(ヒトでは 14kDa ; hSASP14、マウスでは 15kDa ; mSASP15)

(b) 抗 SASPase 抗体による成体無毛マウス皮膚表皮凍結切片に対する免疫蛍光染色像 SASPase は表皮顆粒層の最上層に発現する。点線；表皮と真皮の境界

(c) SASPase 欠損無毛マウスは、小じわと乾燥肌様表皮を呈する。

Reproduced and modified with permission from John Wiley and Sons (Matsui *et al.*, *EMBO Mol. Med.* 3: 320-333, 2011)

2.3 SASPaseの内在性基質としてのProfilaggrinリンカー配列のin vitro切断実験

2.2で得られた結果より、ダイマー・トリマーのProfilaggrinがSASPase欠損無毛マウスに蓄積していたことから、Profilaggrinリンカー配列がSASPaseの基質である可能性が考えられた。そこで、Maltose-binding proteinとリンカー配列とヒトFilaggrinの融合蛋白質(MBP-hFilaggrin)を大腸菌にて発現させ、Maltose resinにて精製を行った。リコンビナントヒトSASPaseはGST融合蛋白質としてGST-SASP28 (28 Da型)を大腸菌にて、発現・精製を行い、5mg/mlの濃度のGST-SASP28を50 mM phosphate buffer (pH6.0), 700 mM NaCl, 1 mM EDTA, protease inhibitor cocktail (Nakarai Tesque)において自己分解反応を37°C, 60分間行った。次に、1 mlの5 mM phosphate buffer (pH6.0), 70 mM NaClにより希釈した後、200 mlのGlutathione Sepharose 4Bビーズに対して二回素通りさせる事により、活性型ヒトSASPase (14kDa; hSASP14)を精製した。精製したhSASP14 (419 pmol)を3.6 mMのMBP-hFilaggrinと100 mlの50 mM phosphate buffer (pH6.0), 0.7 M NaCl, 1 mM EDTA, protease inhibitor cocktail中において37°C, 60分反応させ50 ulの3×SDS sample bufferにて停止させ、10 ulをSDS-PAGEに供し、それぞれ切断された断片をN末端アミノ酸シーケンス解析を行い、切断点を決定した。

3. 結果と考察

3.1 マウス表皮角質層における前駆体型・活性型SASPase検出法の確立

雌の4週齢と14週齢の無毛マウス表皮角質層抽出液に対する抗SASPase抗体を用いたイムノブロット解析により、角質層において、SASPaseの前駆体型(mSASP32)・活性型(mSASP15)の両型が存在する事が明らかとなった(図2)。またmSASP32とmSASP15のバンド強度から両者の比率は、活性型(角質層の表層(1~5回のテープストリップ)の方が、多く存在している事が明らかとなった。4週齢と14週齢の間に大きなパターンの違いは認められなかったが、老齢個体においては、発現量の個体毎のばらつきが大きく、定量性の低いImmunoblottingを用いた活性の定量は、困難であると考えられた。一方で、SASPaseは角質層上層程、高い活性を示す可能性があり、SASPaseの基質切断活性を測定する事で、簡便な活性測定法が検出されると考えられた(図2)。

3.2 SASPaseの内在性基質の同定

そこで、SASPaseの内在性基質を決定する事を試みた。我々は、乾燥肌様表皮を示すSASPase欠損無毛マウスは小じわ形成とともに、乾燥肌様表皮を呈する事を発見していた。このマウスにおいては、SASPaseの内在性基質が

分解されずに蓄積し、このような表現系を呈する事が推測される。すなわち、SASPaseの内在性の基質を探索し、その基質配列の切断活性を解析する事によりSASPaseの活性を測定すれば、皮膚老化との関連性を検討できる可能性がある。そこで、SASPase欠損無毛マウスの表皮抽出液に対して、様々な表皮分化マーカー(Keratin 14, Keratin 1, Involucrin, Loricrin)の免疫蛍光染色とイムノブロットを行った(図3)⁴⁾。SASPase欠損無毛マウスにおいては、これらの表皮分化マーカーには異常は認められなかった。しかし、3.1のような角質層抽出液に対するイムノブロット法によって、バリア蛋白質Filaggrinの分解パターンが異常になり、異常蓄積している事が明らかになった(図4)⁴⁾。またイムノブロットのパターンから、SASPaseの基質はProfilaggrinのリンカー配列である事が予測された。そこで、リコンビナントProfilaggrinのリンカー配列をSASPaseが切断するかどうかを検討した。マウスProfilaggrinのリンカー配列を大腸菌内で発現させようとしたが、十分に発現させる事ができなかった。そこで、ヒトProfilaggrinのリンカー配列とモノマーFilaggrinをMBPとの融合蛋白質として大腸菌内で発現・精製し、リコンビナントヒト活性型SASPase(hSASP14)とともに、その最適pHである弱酸性条件で、反応させたところ、分解産物(バンド)が出現した。それぞれのバンドをN末端アミノ酸シーケンスにより解析し、ヒトSASPaseによるヒトProfilaggrinリンカー配列の切断点を決定した。その結果、hSASP14はMBP-hFilaggrinのリンカー配列の“GSFLY”と“QVSTH”との間を切断する事が明らかと

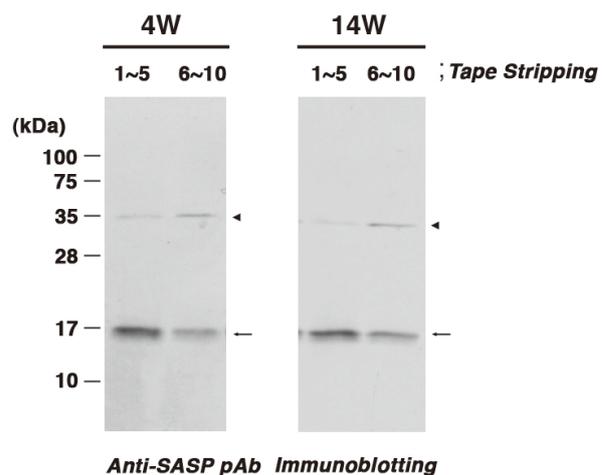


図2 抗SASPase抗体を用いたマウス角質層抽出液に対するイムノブロット

4週齢、14週齢の雌のヘアレスマウスの背中からの1~5回及び6~10回のテープストリッピング(1~5, 6~10)の抽出液(5 µg)をSDS-PAGEに供し、抗SASPase抗体を用いてイムノブロットを行った。角質上層においては、前駆体型(32kDa; mSASP32; 矢頭)よりも活性型(15kDa; mSASP15; 矢印)の方が多く存在している。

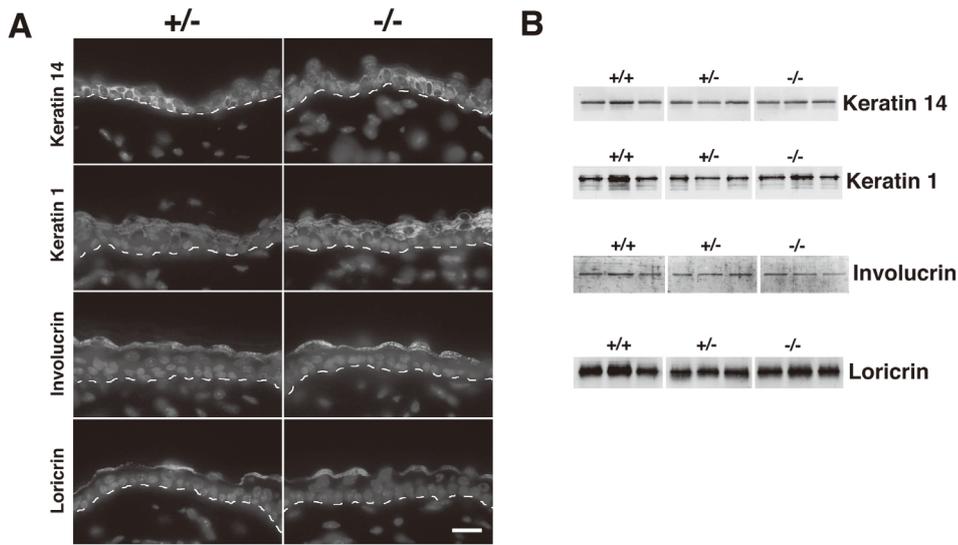


図3 SASPase 欠損無毛マウスにおける表皮分化マーカーの発現
 (A) SASP^{+/+} 及び SASP^{-/-} 無毛マウスの背皮膚の凍結切片に対する抗 keratin 14, keratin 1, Involucrin, Loricrin 抗体による、免疫染色像。これらの表皮分化マーカーは SASP^{-/-} 無毛マウスでは、正常な発現部位を示していた。Scale bar: 10 μ m 点線: 表皮と真皮の境界
 (B) SASP^{+/+}, SASP^{+/+} 及び SASP^{-/-} 無毛マウスの表皮抽出液に対する抗 keratin 14, keratin 1, Involucrin, Loricrin 抗体による、イムノブロット。これらの表皮分化マーカーは SASP^{-/-} 無毛マウスでは正常な発現量を示していた。

Reproduced and modified with permission from John Wiley and Sons (Matsui *et al.*, *EMBO Mol. Med.* 3:320-333, 2011).

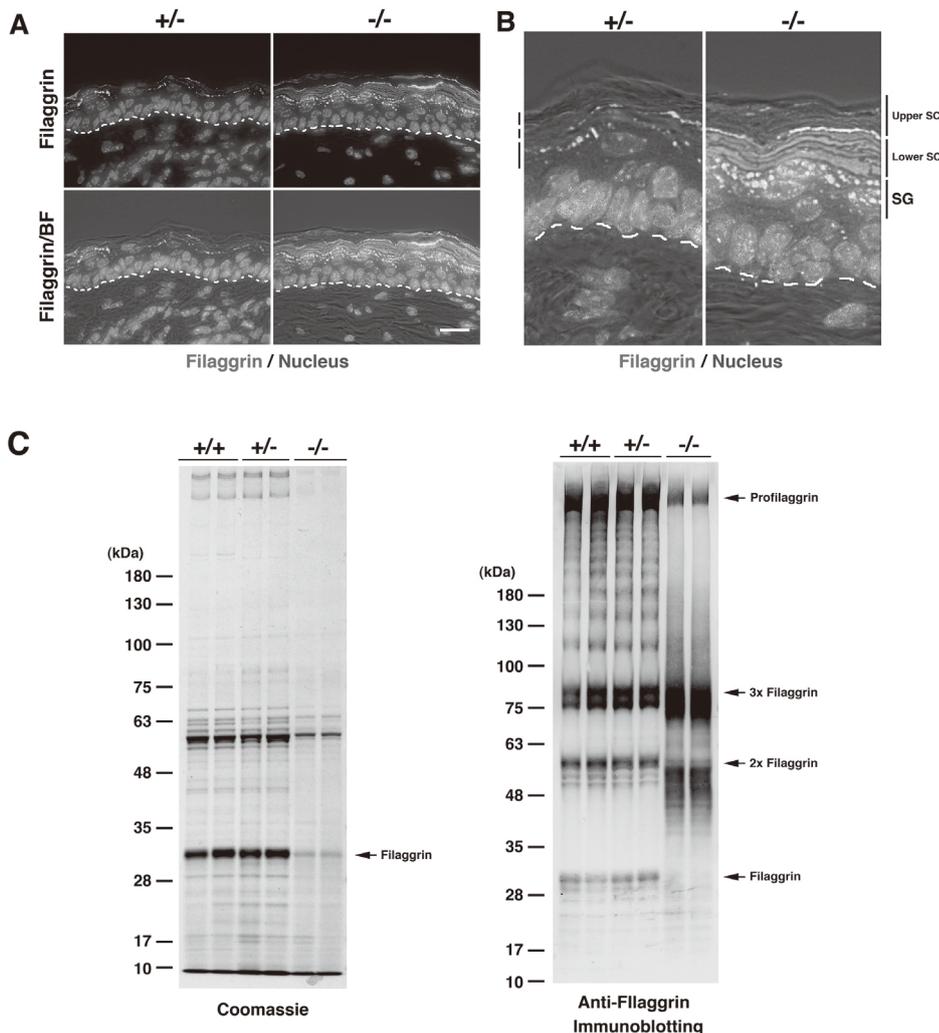


図4 SASPase 欠損無毛マウスにおける Filaggrin の発現
 (A, B) SASP^{+/+} 及び SASP^{-/-} 無毛マウスの背皮膚の凍結切片に対する抗 Filaggrin 抗体による免疫染色。(核は Bisbenzimidazole により染色した。) Filaggrin (核の上部のシグナル) は SASP^{-/-} 無毛マウスでは、角質層下層部分 (Lower SC) に濃縮していることが明らかとなった。Scale bar: 10 μ m, 点線: 表皮と真皮の境界
 (C) 無毛マウスの表皮のテープストリップ抽出液に対するクマシー染色と抗 Filaggrin 抗体による、イムノブロット。Filaggrin は、SASP^{+/+} では Profilaggrin から段階的にリンカーが切断され、トリマー、ダイマー、モノマーへと分解されていくパターンが検出されているが、SASP^{-/-} 無毛マウスではトリマー、ダイマーからスミアになるパターンが検出された。この事は、SASP^{-/-} マウスにおける角質層下層における蓄積は、Profilaggrin の分解異常によるトリマー、ダイマーの蓄積が原因と考えられた。

Reproduced and modified with permission from John Wiley and Sons (Matsui *et al.*, *EMBO Mol. Med.* 3:320-333, 2011).

なり、ヒトProfilaggrinのリンカー配列を特異的にSASPaseが切断する事が明らかとなった。切断点のN末端側配列は既に報告されているヒト精製Filaggrinの質量分析解析において、ピログルタミン酸化されていたQに相当する事から、本来のProfilaggrinの切断部位であると考えられる(図5)^{5,6)}。

以上のようなSASPaseに対する新規基質Profilaggrinの同定によって、その切断部位の基質peptideを設計する事により、検出感度の高いSASPase活性検出法を構築でき

る可能性がある。また、Filaggrinはアトピー性皮膚炎発症の最大の疾患素因とされている事⁷⁾から、この活性検出法によって角質層バリアー構築とSASPase活性との関連性にも手がかりを与えらる。その結果と3.1に示したようなhSASP14/hSASP28の存在比を統合する事により、皮膚の老化・小じわ形成・乾燥肌といったコスメトロジーに重要な現象の定量的指標を構築できる可能性が本研究により示された。

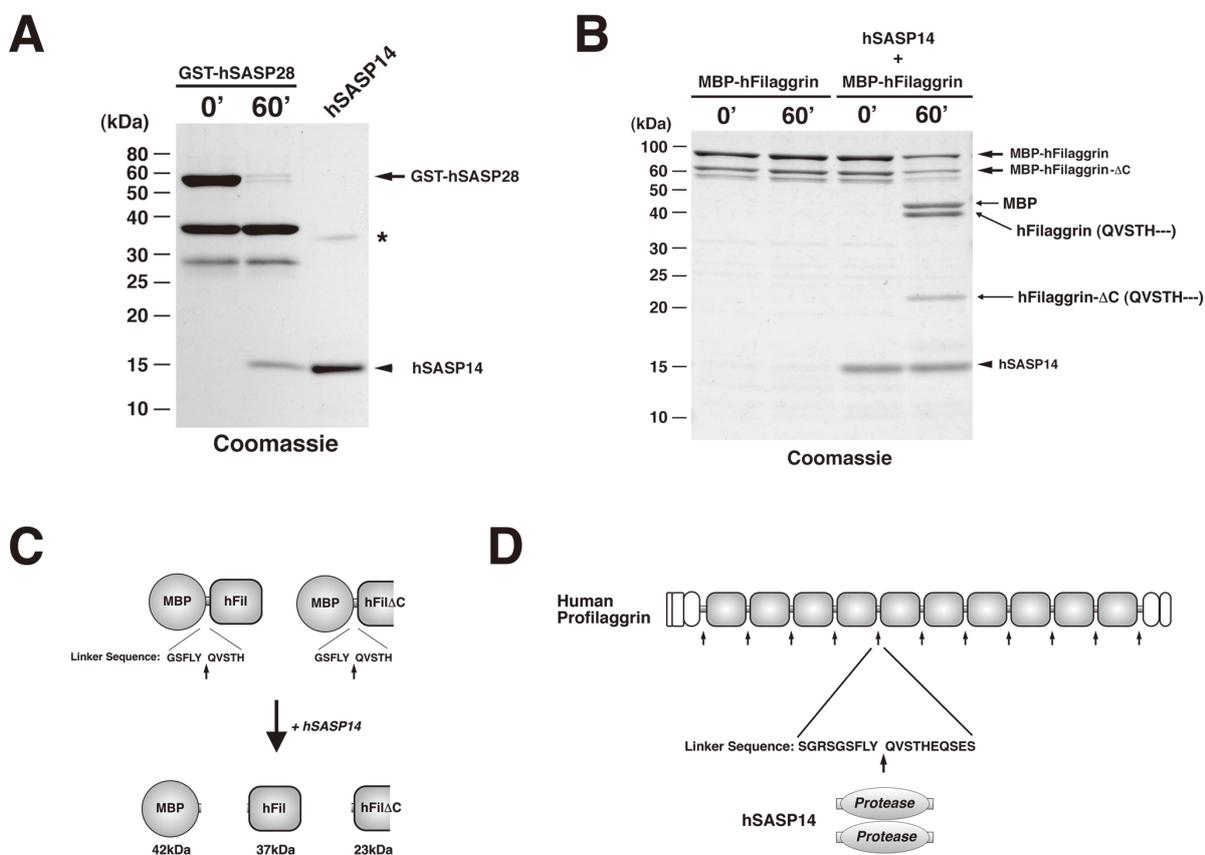


図5 リコンビナント活性型ヒトSASPase (hSASP14) はProfilaggrinのリンカー配列を *in vitro* で切断する。
 (A) GST-SASP28からの自己分解活性によるhSASP14の産生と精製
 精製したGST-SASP28(矢印)を700mM NaCl存在下で、0分、60分間、pH6.0の条件下でインキュベートした。GST-SASP28は自己分解反応を行い、hSASP14を産生した(矢頭)。切断されたGST融合蛋白質は、グルタチオンビーズにより除かれ、hSASP14が精製された。ダイマーのhSASP14のバンドもわずかながら検出されている(*)
 (B) hSASP14によるProfilaggrinリンカー配列の切断
 精製したMBP-hFilaggrin(C末がtruncateされた産物も含む:MBP-hFilaggrin-ΔC)をhSASP14存在下・非存在下で700mM NaCl, pH6.0の条件下で60分間インキュベートした。その結果MBPとhFilaggrinとの間のリンカー配列が切断され、MBP(42kDa)、hFilaggrin(37kDa)、hFilaggrin-ΔC(23kDa)が産生されている事が、各バンドのN末端アミノ酸配列解析により明らかになった。
 (C) (B)の実験における切断様式の模式図
 (D) ヒトSASPaseによるヒトProfilaggrinリンカー配列の切断の模式図
 ホモダイマーを形成したhSASP14はProfilaggrinリンカーのGSFLY-QVSTHの間を切断する事が明らかとなった。

Reproduced and modified with permission from John Wiley and Sons (Matsui *et al.*, *EMBO Mol.Med.* 3:320-333, 2011)

(引用文献)

- 1) Imokawa G, Takema Y: Analysis of etiologic factors involved in stratum corneum function in fine wrinkle formation and its prevention, *Frag J.*, 20, 29-42, 1992.
- 2) Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y et al: Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo, *Nature*, 415, 171-5, 2002.
- 3) Matsui T, Kinoshita-Ida Y, Hayashi-Kisumi F et al: Mouse homologue of skin-specific retroviral-like aspartic protease involved in wrinkle formation, *J Biol Chem*, 281, 27512-27525, 2006.
- 4) Matsui, T., Miyamoto, K., Kubo, A. et al: SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol. Med.* 3 : 320-333, 2011.
- 5) Thulin CD, Taylor JA, Walsh KA Microheterogeneity of human filaggrin: analysis of a complex peptide mixture using mass spectrometry. *Protein Sci* 5 : 1157-1164, 1996.
- 6) Thulin CD, Walsh KA Identification of the amino terminus of human filaggrin using differential LC/MS techniques: implications for profilaggrin processing. *Biochemistry* 34 : 8687-8692, 1995.
- 7) Brown SJ, McLean WH One remarkable molecule : filaggrin. *J Invest Dermatol* 132 : 751-762, 2012.

栄養障害型表皮水疱症の原因遺伝子であるⅦ型コラーゲンの分泌メカニズムの解析

東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室

齋藤 康太

Collagen is synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) and secreted to the cell surface via secretory pathway. Collagen is too big to fit into conventional secretory vesicles and the mechanism of collagen exit from the ER has not been elucidated. We have recently identified cTAGE5, a protein localized at the ER exit site, and revealed that it is specifically required for collagen export from the ER. Furthermore, cTAGE5 directly interacts with TANGO1, therefore, we suggest that cTAGE5/TANGO1 complex form a collagen receptor complex within the ER.

1 緒言

小胞体 (Endoplasmic Reticulum ; ER) において合成されたタンパク質は、輸送小胞に積み込まれゴルジ体を経て細胞内の様々な小器官へと運ばれる。この小胞輸送系に着目した研究は、出芽酵母を用いた分泌阻害因子の網羅的なスクリーニングにより数多くの変異体が単離されたことによって飛躍的に進展し、現在までに数多くの構成因子が明らかとなっている。一方で高等真核生物の小胞輸送系は、出芽酵母に比べ分泌するタンパク質が多様であることを反映して、更に多くの制御因子が存在することが考えられる。

申請者は以前、ショウジョウバエ S2 細胞において分泌変異体を単離するため、dsRNA 法を用いた網羅的 RNAi スクリーニングを行なった。その結果、出芽酵母では保存されておらず、高等真核生物においてのみ存在する遺伝子として TANGO1 を単離、同定した (Nature, 2006)。

TANGO1 は小胞体における COPII 被覆小胞出芽ドメインである ER exit site に特異的に局在し、小胞体内腔に配向する SH3 ドメインでⅦ型コラーゲンと、細胞質中に配向するプロリンリッチ領域で COPII 被覆の複合体構成因子の一部である Sec23/24 と結合することが明らかとなった。さらに、TANGO1 を発現抑制した細胞においては、Ⅶ型コラーゲンが小胞体に蓄積し、その分泌が抑制されることを見出した。また、この分泌阻害効果は、Ⅶ型コラーゲンに特異的であり、その他の多くのタンパク質の分泌には大きな影響を及ぼさなかった。以上の結果から、TANGO1 はⅦ型コラーゲンに対する積み荷受容体として機能する可能性が示唆された (Cell, 2009)。



The mechanism of collagen VII secretion; Understanding the etiology of dystrophic epidermolysis bullosa (DEB)

Kota Saito

Department of Physiological Chemistry,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
University of Tokyo

一般に現在までに知られている積み荷受容体は、積み荷と結合し、共に COPII 被覆小胞に取り込まれ出芽することで小胞体からの輸送を制御する。一方で、TANGO1 は出芽することなく、小胞体に留まったままで機能することから、TANGO1 は既存の積み荷受容体とは異なったメカニズムで機能している可能性が考えられた。

コラーゲンはその形成する複合体が巨大であり (Ⅶ型コラーゲンの場合は 400–500nm)、通常の COPII 被覆小胞 (直径 60–90nm) には入りきらないと考えられている。しかし、その分泌の分子メカニズムは解明されていない。そこで、申請者は TANGO1 の制御機構を理解することで、コラーゲン分子分泌の分子機構に迫ることができると考えた。

また、Ⅶ型コラーゲンは栄養障害型表皮水疱症 (DEB) の原因遺伝子である。DEB は難治性疾患に登録されており、未だに根本的治療法は確立されていない。Ⅶ型コラーゲンが小胞体に蓄積し、分泌が阻害されることで、本疾患に罹患する患者の存在も知られていることから、本研究は細胞生物学的知見のみならず、疾患生物学的貢献も期待される。

2 実験

TANGO1 と同様のドメイン構造を有するタンパク質をデータベースから探索し、cTAGE5 を同定した。そこで遺伝子のクローニング、抗体の作製を行ない、細胞内局在をはじめ、細胞内動態の解析を行なった。

さらに cTAGE5 の各種欠失変異体をリコンビナントタンパク質として大腸菌より精製し、生化学的解析を行なうことで結合様式の同定をはかった。また、RNAi 法による発現抑制系を用いることにより、遺伝子の細胞内における機能同定を試みた。

2.1 抗体の作製

抗原部位のペプチドおよび GST-fusion タンパク質を精製し、ウサギに免疫することにより作製した。作製した抗血清はそれぞれ、ペプチド及びタンパク質カラムによりア

フィニティー精製後、実験に用いた。

2.2 細胞培養及びトランスフェクション

HeLa細胞を始め、各種培養細胞はDMEM, 10%FCSで37°C、5%CO₂で培養した。トランスフェクションはLipofectamine 2000 (Invitrogen) を常法通りに用いた。またsiRNAの導入にはLipofectamine RNAimax (invitrogen) を用いた。

2.3 結合因子の探索

HeLa細胞を20mM Tris-HCl (pH7.4), 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100及びプロテアーゼ阻害剤を含む溶液で可溶化し、65000 rpm 30 min 超遠心した。遠心後の上清にプロテインAビーズに結合させた抗体を添加し、免疫沈降した。その後、ビーズをTBS/0.1% Triton X-100で洗浄後、サンプルバッファーを加えボイルし、SDS-PAGEにより分離した。

3 結果

3.1 クローニング

データベース検索により、TANGO1と同様のドメイン構造を有するタンパク質としてcTAGE5を単離した。この因子は、SH3ドメインを有していないが、TANGO1のC末端側の配列と相同性を有し、コイルドコイルドメイン及びプロリンリッチ領域を有していた。

3.2 局在の観察

cTAGE5に対する抗体を作製し、内在性タンパク質の局在を検討したところ、ER exit siteのマーカであるSec31Aと共局在した。また、ERGIC53との局在を比較した結果、一部で共に局在する様子が観察された。一方、COPI被覆複合体の構成因子の一つであるb-COPとの共染色においては局在の一致は観察されなかった。以上の実験結果より、cTAGE5はER exit siteに局在して機能している可能性が考えられた。

3.3 cTAGE5 結合因子の探索

次に、cTAGE5に結合するタンパク質を探索する目的で、抗体を用いた免疫沈降画分中の共沈降物の有無を検討した。

HeLa細胞から抗体を用いて内在性タンパク質を免疫沈降し、共沈降画分を銀染色法により検出した。その結果、cTAGE5に相当する110kDaのシグナルに加え約250kDaのシグナルが銀染色により認められた。ウエスタンブロット法による解析の結果、250kDa付近のシグナルはTANGO1であることが判明した。よってcTAGE5にTANGO1が特異的に結合することが明らかになった。

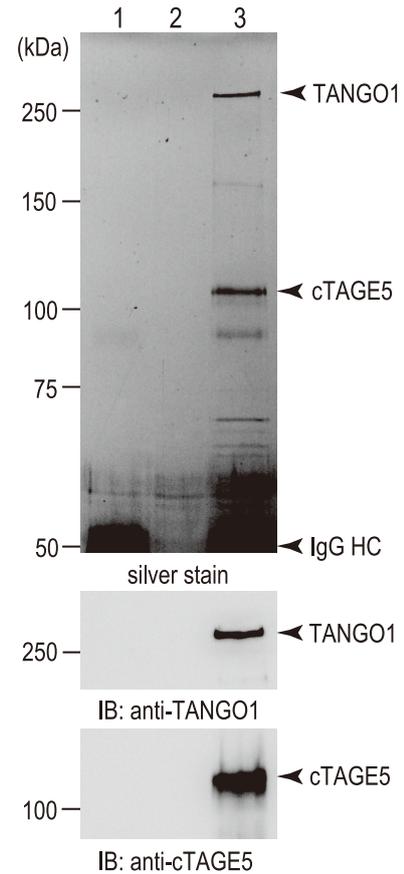


図1 cTAGE5とTANGO1は結合する MBC:22:2301 Protein A ビーズにそれぞれ 1.cTAGE5抗体 2.HeLa lysate 3. cTAGE5抗体 + HeLa lysate を添加し免疫沈降した

3.4 結合ドメインの同定

TANGO1とcTAGE5の結合ドメインを調べる目的で、各種欠失変異体どうしの結合実験を行なったところ、TANGO1とcTAGE5の結合は、細胞質中に存在するcoiled-coilドメインを介していることが示された。

3.5 結合因子の同定

またcTAGE5はTANGO1と同様に、C末端にプロリンリッチドメインを有している。TANGO1はプロリンリッチドメインを介してSec23/24と結合することが認められていることから、cTAGE5についても同様の検討を行った。Yeast two hybrid 法を用いた解析の結果、cTAGE5も同様にCOPII被覆複合体の構成因子であるSec23/24と結合する事が明らかとなった。

3.6 コラーゲン分泌に対する影響

最後にcTAGE5の分泌に対する影響をノックダウン法によって検討した。その結果、ノックダウンは多くのタンパク質の分泌には影響を与えないのに対し、TANGO1と同様にⅦ型コラーゲンの分泌を顕著に阻害することが明らかとなった。

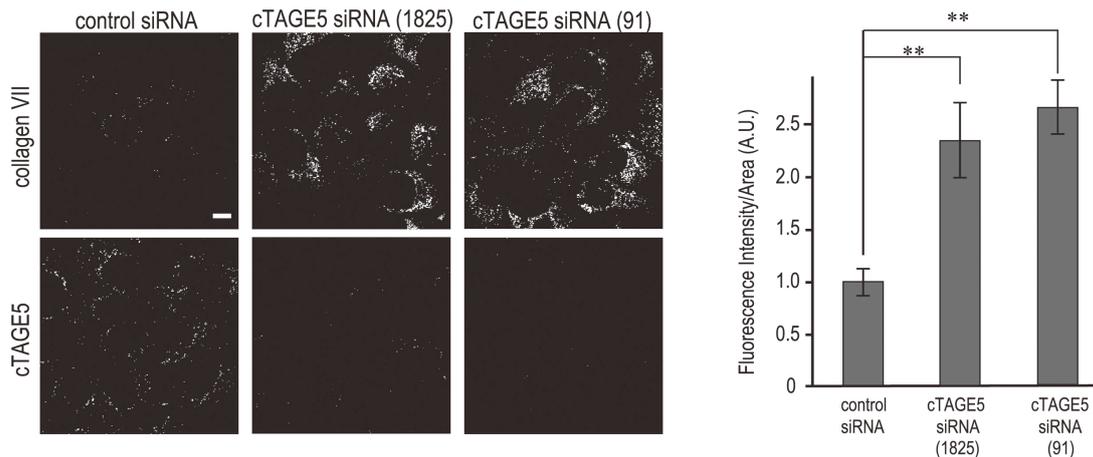


図2 ノックダウン時のⅦ型コラーゲンの小胞体蓄積量
ノックダウンにより、有意にⅦ型コラーゲンが小胞体に蓄積した。 MBC:22:2301

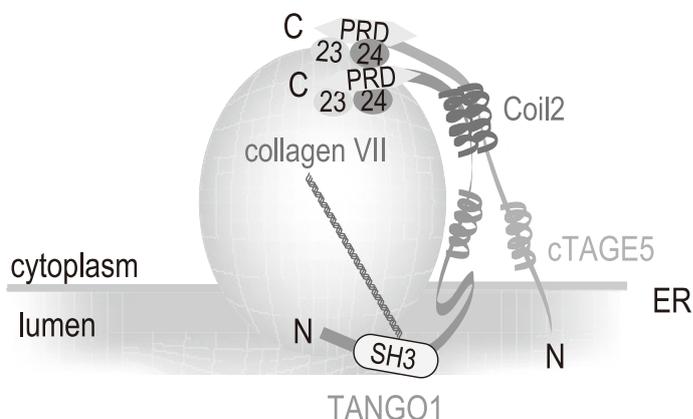


図3 TANGO1,新規因子の協調によるⅦ型コラーゲン詰め込みモデル MBC:22:2301

4 考察

以上のように、今回単離した新規因子cTAGE5はER exit siteに局在し、TANGO1と特異的に結合することが明らかとなった。さらに、cTAGE5のノックダウンは、TANGO1のノックダウンと同様にⅦ型コラーゲンの分泌を特異的に抑制した。以上の結果から、申請者は、cTAGE5がTANGO1と協調して小胞体からのⅦ型コラーゲンの分泌を特異的に制御していると考えられる(図3参照)。cTAGE5は、小胞体内腔側にはほとんど配向しておらず、Ⅶ型コラーゲンとの結合は主にTANGO1によって担われていることが考えられる。つまり、cTAGE5はTANGO1の補助因子あるいは制御因子として働く可能性が考えられる。

今後、どのような分子メカニズムによって、TANGO1とcTAGE5が協調的にⅦ型コラーゲンの分泌を担っているのかを解明していくことが課題である。

5 総括

本研究により、コラーゲン分子の積み荷受容体として新たにTANGO1とcTAGE5が協調的に作用することが見出された。

現在のコスメトロジーにおいては、コラーゲンは化粧品構成要素として注目されている。本研究をさらに発展させ、コラーゲン分子の分泌機構を明らかにすることができれば、コラーゲン分泌を制御することが可能になると考える。これにより、内在するコラーゲンの分泌を促進するような化粧品あるいは薬剤の作成に将来的に寄与できると考える。

謝辞

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご援助賜りましたことを深く感謝申し上げます。

(発表論文、参考文献)

- 1) Frederic Bard, Laetitia Casano, Arrate Mallabiarrena, Erin Wallace, Kota Saito, Hitoshi Kitayama, Gianni Guizzunti, Yue Hu, Franz Wendler, Ramanuj DasGupta, Norbert Perrimon and Vivek Malhotra (2006) Functional genomics reveals novel components involved in protein secretion and Golgi organization. *Nature*, 439, 604-7.
- 2) Kota Saito, Mei Chen, Fred Bard, Shenghong Chen, Huilin Zhou, David Woodley, Roman Polischuk, Randy Schekman, Vivek Malhotra (2009) TANGO1 facilitates cargo loading at Endoplasmic Reticulum exit sites. *Cell*, 136, 891-902
- 3) Yoko Nagail, Yoichi Asaoka¹, Misako Namae, Kota Saito, Haruka Momose, Hiroshi Mitani, Makoto Furutani-Seiki, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2010) The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 887-893 (IContributed equally).
- 4) Shinya Takahashi, Kyoko Sakurai, Arisa Ebihara, Hiroaki Kajiho, Kota Saito, Kenji Kontani, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada (2011) RhoA activation participates in rearrangement of processing bodies and release of nucleated AU-rich mRNAs. *Nucleic Acids Res.* Apr;39(8):3446-57.
- 5) Kota Saito, Koh Yamashiro, Yuki Ichikawa, Patrik Erlmann, Kenji Kontani, Vivek Malhotra and Toshiaki Katada (2011) cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell* Jul 1;22(13):2301-8

タイトジャンクション動的平衡を制御する低分子化合物の探索

名古屋大学大学院創薬科学研究科構造分子薬理学分野

廣 明 秀 一

The cellular maintenance of tight junctions (TJs) is considered as dynamic remodeling processes of equilibrium between internalization / degradation and generation of claudin-based TJ strands. While the mechanism of biogenesis of TJs driven by ZO-1 and its paralogs were well understood, the molecular mechanism behind TJs' turnover remains unknown. Recently, the E3 ubiquitin ligase ligand of Numb-protein X1 (LNX1p80) was identified as a responsible factor that binds to claudin-1 and promotes its endocytosis. Since the first PDZ domain of ZO-1 is indispensable for claudin interaction in the TJ biogenesis, a competition between ZO-1 and LNX1p80 against claudin is assumed. We analyzed in vitro binding activity of the several claudin-derived peptides and the other peptides derived from the TJ-related proteins. We found that some of the claudin-derived peptide could bind LNX1-PDZ2, whereas none of claudins bind LNX1-PDZ3. Notably, all of these claudin-derived peptides bound ZO1-PDZ1. CAST and JAM-4 are the strong binders to LNX1-PDZ2 domain, which also did not bind ZO1-PDZ1. For further clarifying the molecular recognition mechanisms underlying the claudin competition among LNX1 and ZO-1 PDZ domains, we started the structural studies. We also succeeded in determining the NMR structure of mouse ZO1-PDZ1 domain, which was further subjected to a virtual screening study for identifying ZO1-PDZ1 inhibitors. We succeeded in crystallizing the LNX1-PDZ2 in a certain condition, and the structural determination at 1.5Å resolution was mostly completed. This high-resolution structure of LNX1-PDZ1 is also planned to be subjected to a virtual screening study. These structural informations of TJ-related PDZ domains will provide the molecular basis towards discovery and development of TJ-regulating (promoting and inhibiting) small molecular weight compounds.

1. 緒 言

細胞接着装置は、組織や臓器の形成に必須の構造体であり、その異常はがんや他の多くの疾患の原因になっている。細胞接着装置は、まず直接細胞間の接着に関与する膜タンパク質である接着分子の細胞質側に、その分子の機能を制御する足場タンパク質、それを安定化するための細胞骨格、ならびに接着分子によって制御されているシグナル伝達因子など、数多くのタンパク質から構成されている。これらの多数のタンパク質が巨大な分子複合体を形成して、生体膜に存在する膜ドメイン構造とともに、最終的に細胞間接着を完成させているのである。接着装置は、特に上皮細胞で発達しており、頭頂部のタイトジャンクション (TJ) と、それより内側に位置するアドヘレンスジャンクション (AJ) により構成されている。

このうち TJ は、4 回膜貫通構造をもつ接着分子クロロディン (CLD) およびオクルーディンと、CLD の裏打ちタンパク質 ZO-1/ZO-2 と呼ばれるマルチドメイン蛋白質からなる。具体的には、CLD の C 末端に存在する PDZ 結合モチーフと、ZO-1/ZO-2 が持つ PDZ ドメインが結合する。

TJ の形成には、この裏打ちタンパク質群の特定の PDZ ドメインと CLD の相互作用が、必須であることが知られている (図 1 a)。TJ は腸管や血液脳関門などの上皮細胞に存在し、細胞極性を維持すると同時に、水分子やイオンの透過を調節するバリア機能を持つ¹⁾。皮膚においては、水分子の透過を制御するバリアとして、保湿・保水などコスメトロジー研究の観点からも注目される。例えば、TJ の主成分の一つ claudin-1 を欠損したマウスが、全身の乾燥にともなう脱水症状により生後すぐに死んでしまうことから、TJ は皮膚バリア機能における保水・保湿に極めて重要な役割を果たすと考えられてきた¹⁾。

これまで、TJ の制御は、ZO-1 による形成促進のメカニズムのみが知られており^{2,3)}、一方、その分解経路ないしダウンレギュレーション過程についてはほとんど研究がなされていなかった。しかし 2008 年に、筆者らの共同研究者である神戸大学医学研究科の古瀬教授らのグループが、CLD のエンドサイトーシスを促進する因子としてマルチ PDZ ドメイン蛋白質である LNX1p80 を発見・同定した⁴⁾。LNX1 (Ligand of Numb X1) は、もともとは神経前駆細胞の維持と胎生期の神経発生に必須の因子 Numb の相互作用因子として同定されたユビキチン化酵素 E3 であり、Numb との結合モチーフ NPXY の下流に、4 つの PDZ ドメイン、N 末端に RING ドメインを持つ (図 1 b)。古瀬らは、この LNX1 の PDZ ドメインが CLD の C 末端に結合することで CLD をユビキチン化し、そのエンドサイトーシスの促進と細胞表面からの TJ 構造の消失を誘導することを見出した。興味深いことに、ZO-1/ZO-2 と LNX1 は、いず



A search for low-molecular weight ligands that regulate a dynamic equilibrium of tight-junction.

Hidekazu Hiroaki

Division of Structural Molecular Pharmacology,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Nagoya University

れもそのPDZドメインによってTJを構成する鍵分子であるクローデインのC末端を認識して結合するため、お互いに競合関係にある。言い換えれば、CLDとの相互作用において両タンパク質のPDZドメインが拮抗し、TJの形成と消失の動的平衡を達成していると考えられる(図1c)。

筆者らは、皮膚バリア機能を強化する低分子化合物を、構造生物学に基づいた創薬手法を援用して探索することを目的として、研究を開始した。その際に、特にCLDとLNX1の相互作用を特異的に阻害する低分子化合物を開発することができれば、前述の動的平衡がTJ形成側に偏り、結果的にTJが担う皮膚のバリア機能を強化できるのではないかと考えた。すでに皮膚バリア機能を強化することを目的とした化粧品成分として、タイトジャンクション形成促進剤の報告がある一方で、TJの形成過程における細胞質内タンパク質を標的とした、タイトジャンクション形成促進剤の報告はまだない。しかし、通常、タンパク質-タンパク質相互作用 (protein-protein interaction, PPI) を創薬標的とする場合には、低分子化合物によりその相互作用を強化することは原理的に難しい一方で、PDZドメインのような相互作用ポケットの形状が明らかなドメインに対しては、PPI阻害剤の開発は不可能ではない。ここで問題になるのは、LNX1に4つあるPDZドメインのどのドメインがCLDとの結合に寄与しているか不明であるということである。そこで、筆者らは、構造生物学的手法と分子間相互作用解析により各PDZドメインの特徴付けを行うことを目指した。まず、LNX1のPDZドメインの結晶解析を行った。分子間相互作用解析では、LNX1のPDZ2ドメインとCLDの一部に相互作用を検出し、一方PDZ3はいずれとも相互作用しなかった。更に、JAM-4/CASTがLNX1-PDZ2にCLDよりも強く結合することが明らかになった。それと並行して、CLD結合においてそれと拮抗するZO-1

の1番目のPDZドメイン (ZO1-PDZ1) の立体構造決定を行った。一連の研究結果から得られる知見、とくに原子レベルでの立体構造情報は、インシリコ創薬の手法などと組み合わせることで、LNX1に特異的な薬剤を設計・探索することを可能にするであろう。

2. 実験

2.1 GST融合LNX1のドメイン発現系構築と精製

本研究の最終的なゴールの一つはLNX1のPDZドメインの立体構造決定であるが、構造解析には大量の精製したタンパク質試料が必要である。従って、研究に先立ち、効率のよい大腸菌組換えタンパク質発現系の構築と精製法の確立は必須である。

ヒト (h)・マウス (m) LNX1のドメイン領域 (表1) の遺伝子をpGEX-6P3-PRESATベクターに挿入した発現用プラスミドを作製した⁵⁾。このプラスミドを大腸菌BL21 (DE3) に導入した。その大腸菌をLB培地で培養し、IPTGによって発現誘導することで目的タンパク質を大量

表1

| LNX1 | domain領域 | アミノ酸残基数 | |
|-------|----------|-----------|-----|
| mouse | PDZ1 | 258 – 367 | 110 |
| | PDZ2 | 381 – 467 | 87 |
| | PDZ3 | 505 – 591 | 87 |
| | PDZ4 | 621 – 726 | 106 |
| human | RING | 16 – 140 | 125 |
| | PDZ1 | 254 – 363 | 110 |
| | PDZ2 | 377 – 463 | 87 |
| | PDZ3 | 504 – 590 | 87 |
| | PDZ4 | 621 – 726 | 106 |

本研究において構築されたLNX1p80の各領域の発現系。数字は、発現系を構築した領域のN末端とC末端の残基番号を示す。右欄は、各発現系のアミノ酸残基数である。

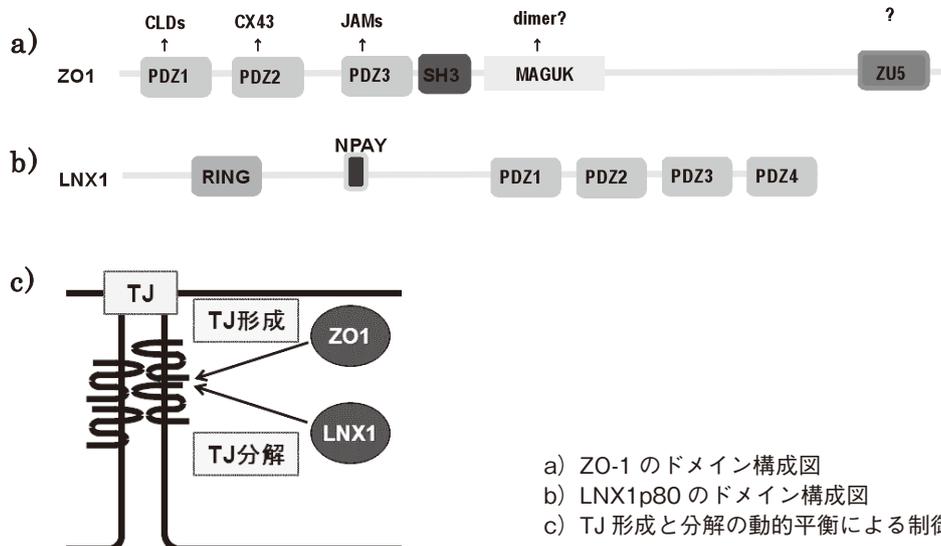


図1

発現させた。集菌後、超音波により大腸菌を破碎し、DEAE-sepharose カラム、Glutathione-sepharose カラムを順に用いて融合タンパク質を精製した。さらにPreScission Proteaseによりカラム上でGST部分を切断し、ゲル濾過カラムに通した。精製後、限外濾過によるタンパク質の濃縮を行った。これを透析し結晶化用サンプルとした。相互作用解析にはGST融合タンパク質を用いた。条件を精査したがヒト・マウスいずれの由来のLNX1においても1番目のPDZドメインと4番目のPDZドメインについては、溶解度の高い、かつアグリゲーションしにくい良質なタンパク質試料を得ることができなかった。従って、今後の研究は2番目と3番目のPDZドメインに限って続行することとした。

2・2 LNX1-PDZ2 と相互作用するペプチドの作成

本研究ではLNX1-PDZ2 に相互作用するパートナーに注目し、そのC末端10アミノ酸をチオレドキシシン (Trx) 融合ペプチドとして発現系を構築ののち、発現・精製した⁶⁾。精製にはDEAE-sepharose カラム、Niキレート sepharose カラムを順に用い、imidazolを含むバッファーで溶出した。溶出したタンパク質を透析し、以降の実験に用いた。用意したペプチドの配列を表2に示す。

2・3 X線結晶解析

24 mg/mLまで濃縮したマウスLNX1-PDZ2の試料を、リガンドフリー状態で、結晶化を試みた。大規模スクリーニングには大阪大学蛋白質研究所Phoenixを使用し、約870条件の探索を行った。結晶化は、4℃で蒸気拡散法 (sitting drop法)で行った。晶出した結晶がタンパク質の結晶であることを確認する為に、神戸大学研究基盤センターにおいてX線照射実験を行った。更に有望な結晶については、flash cooling法により凍結し、大阪大学鈴木准教授に共同研究を依頼して、つくばの高輝度放射高施設 (Photon Factory, PF) で構造決定用のデータセットを取得した (表3)。

マウスLNX1-PDZ2の結晶構造決定には分子置換法を用

表2

| | | | |
|--------|-------------|----------|-------------|
| mCLD1 | -PTPSSGKDYV | hCAR | -PAQSKDGSIV |
| mCLD3 | -GTAYDRKDYV | hJAM4 | -PEKVSNTTVV |
| mCLD4 | -ARSVPASNYV | mJAM4 | -PQKVRNVTLV |
| mCLD7 | -PKSNSKEYV | h(m)CAST | -DQDDEEGIWA |
| mCLD15 | -FGKYGKNAYV | | |

本研究において構築された claudin ならびにタイトジャンクション関連蛋白質のC末端ペプチドの配列。添え字のm/hはそれぞれマウス・ヒト由来であることを示す。CASTではヒトとマウスでこの領域のアミノ酸が完全一致している。すべてのペプチドはチオレドキシシン融合タンパク質発現系として構築された。

いた。まず、構造解析ソフトCCP4の中のプログラムMolrep⁷⁾を用い位相を決定した。モデルにはProtein Data Bankに登録されているhLNX2-PDZ2 (PDB ID: 2VWR)を用いた。モデルとの兼ね合いで、mLNX1PDZ2の87個のアミノ酸のうちN末端側2残基はカットした。またUnit cell内に1分子というシンプルな構造であった。この構造をCCP4中のプログラムRefmac5⁸⁾によって精密化した。構造の確認には、プログラムCootを用いた。精密化を20サイクルかけた後、Cootによる構造の確認・修正をした。Cootで出力された電子密度図は非常に精巧であり、マップのおりに座標を合わせるようにした。この作業を5セット程度行った後、CootのFind waterを用い、水をassignした。ただし、非常に高分解能データであることを考慮し、1σのレベルで電子密度が球状であるもの以外の場所にassignされた水はすべて削除した。R factor、Free Rの値が20%程度から落ちなくなったところで、構造解析ソフトPhenix中にあるPhenix.refineを用い、simulated annealingを行った。最後にmulti conformer (alternative conformer)のアミノ酸、および対称軸上に存在する水を0.5の占有率でassignした。この構造をRefmac5で20サイクル精密化したモデルを最終的なマウスLNX1-PDZ2の構造とした。立体構造は、現在、PDB登録準備中である。

2・4 LNX1-PDZ2とペプチドの相互作用解析

Trx融合ペプチドをCo²⁺ レジンに固定し、そこへ5nmol GSTあるいはGST融合LNX1-PDZ2を添加した。4℃で1時間半攪拌しバッファーで3回washした後、500mM imidazolを含むバッファーで溶出した。差を明瞭にするため銀染色を行った。表面プラズモン共鳴センサー (BIACORE[®] 3000) をもちいた相互作用解析においては、10mM CH₃COONa水溶液 (pH5.0) で希釈した20μg/mL Trx融合ペプチドをセンサーチップCM3に固定した。そこへHBS-EPバッファーに溶解した0, 10, 25, 50, 100μg/mLの濃度のLNX1-PDZをアナライトとして測定した。CLDと相互作用することが明らかなmZO1-PDZ1を、陽性の標準試料として測定し、結果を比較した。

表3

| | | |
|-------|--------------------------------|----------------------------|
| 施設名 | 神戸大学 研究基盤センター | 高エネルギー加速器研究機構 放射光科学研究施設 |
| 装置名 | RIGAKU R-AXIS IV ⁺⁺ | PFAR-NW12A |
| 波長 | 1.0Å | 1.0Å |
| 露光時間 | 10分 | 2秒 |
| 回転角度 | 0, 90° | +1° |
| 撮影枚数 | 2枚 | 360枚 |
| カメラ距離 | 150mm | 100mm |

In house回折装置 (神戸大学) ならびにつくば高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設 (PF) におけるマウスLNX1-PDZ2の結晶回折実験の諸条件

2・5 ZO1-PDZ1 の NMR 立体構造解析

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ で二重標識したマウス ZO-1 の一番目の PDZ ドメイン (mZO1-PDZ1) について、NMR を用いて立体構造決定を行った。0.7mM のタンパク質を 20mM MES 緩衝液 (pH 5.8) に溶解し、シゲミサンプル管に封入して、一連の 2D-NMR、3D-NMR の測定を行った。測定は、大阪大学蛋白質研究所 Bruker DRX-600 ならびに神戸大学医学研究科設置の Bruker Avance-III 測定装置を使用した。データ解析は NMRPipe⁹⁾、Sparky¹⁰⁾ をそれぞれ使い、構造計算には CYANA ver.2.1¹¹⁾ ならびに CNS1.2¹²⁾ を用いた。

3. 結果

3・1 mLNX1-PDZ2 の結晶構造解析

mLNX1-PDZ2 の結晶構造解析は、後述する結晶化キットを用いて、Sitting drop 法 (リザーバ 80 μL , drop1+1 μL) により行った。その際、マウス LNX1-PDZ2 は溶解度が極めて高い試料であったため、低い母液からは再現よく結晶が得られなかった。そこで、濃度を濃縮限界と考えられる 24mg/mL まであげ、さらに結晶化温度を 4 $^{\circ}\text{C}$ として条件の探索を行った。その結果、結晶化キット Structure Screen (Molecular Dimensions 社) 中の 3 条件 (A7, B6, D1)、および Index (Hampton research 社) F11、Crystal Screen Cryo (Hampton research 社) C4 で結晶の析出が認められた。

結晶が得られた条件のうち、Structure Screen A7 は、以前に 2.8 \AA 分解能の結晶が得られたものの、これまで再現が取れていなかった条件と全く同じ組成であった。そのため、再度得られた結晶は、以前に得られた結晶の再現であると考えられる。一方、結晶が得られた条件である Structure Screen B6 と Crystal Screen Cryo C4 は、供給元が異なるもののバッファー組成が同じであった。従って、母液濃度を濃くコントロールすることで、いくつかの結晶

化条件で再現性のよい結晶が得られたことになる。

それを踏まえて、更に高分解能の反射を与える結晶を得るために、前述の条件の組成を出発点に、1% もしくは 0.1M 刻みに沈殿剤および塩濃度を変化させて、最適条件を探索した。ただし条件 B6 に用いるカコジル酸は毒物であり、試薬の入手ならびにハンドリングが煩雑であったため、pH が同じ条件として 0.1M Bis-Tris (pH 6.5) で代用した。緩衝液成分を替えたにも拘わらず、結晶は 4 $^{\circ}\text{C}$ 、over night の静置で再現よく析出した (図 2A)。一方、結晶の大きさは PEG の量に大きく依存することがわかった。すなわち、PEG が最適結晶化領域よりも 1% でも多いと結晶の大きさは半分以下になる。これらの観察により、pH 6.5 の近傍が最適 pH なのかもしれないと考えられる。

次にこれらの結晶がタンパク質の結晶であることを確認する為に、神戸大学研究基盤センターにおいて X 線照射実験を行った。Structure Screen で析出した 3 条件では、中心に程近い点で回折点が得られ、タンパク質の結晶であることが確認できた。図 2B は B6 の回折像を示している。この B6 条件の回折像はそれぞれの回折点が独立して存在しており、極めて良好であった。そこで、これらの結晶を flash cooling 法により凍結し、PF でシンクロトロン光により回折実験を行い、立体構造決定と精密化に用いた。

図 3A にはマウス LNX1-PDZ2 の精密化途中での電子密度図に側鎖モデルを当てはめている途中経過の図を、図 3B には得られた PDZ ドメインの立体構造のリボン図を示している。図中の右側のヘリックスのすぐ左側が、ペプチド結合部位のポケットである。この PDZ ドメインは、CLD1 など一部の (後述のように全てではない) クローニン C 末端ペプチドに結合することができる。ここで、CLD1 を含む、ほぼすべてのクローニンの C 末端は、ZO1-PDZ1 と優先的に結合可能であることから、同じ PDZ ドメインであって

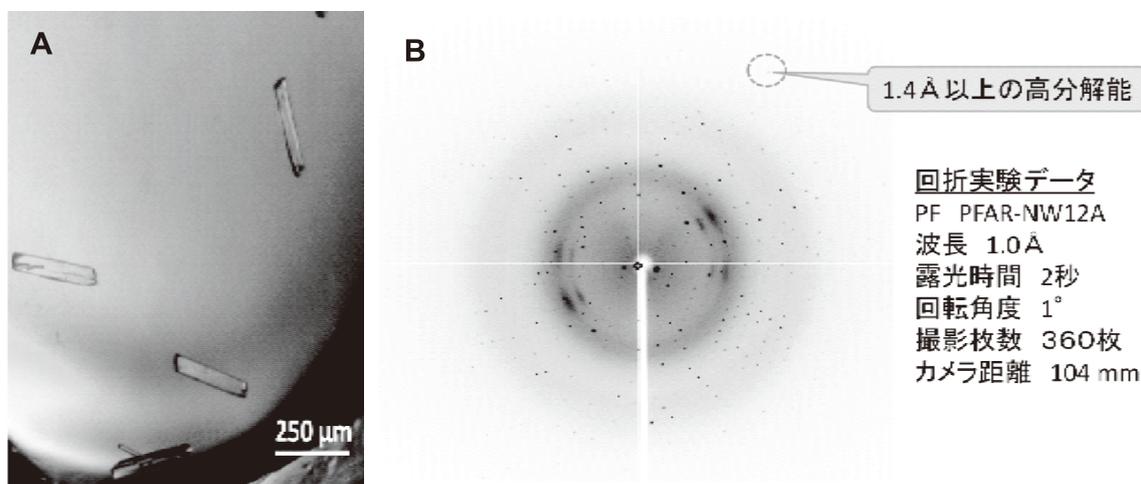


図 2

(A) mLNX1-PDZ2 の結晶の写真、(B) 結晶回折像の拡大図。数字は分解能を示す。

も、基質ペプチドの分子認識の様式はかなり異なることが予想される。この予想は、リガンドフリー状態でのポケット形状の差異からも、ある程度裏付けられた。

3・2 試験管内タンパク質相互作用実験による LNX1 の CLD 結合ドメインの決定

試験管内タンパク質結合実験 (pull-down 実験、data not shown) ならびに BIACORE を用いた相互作用実験から、PDZ2 と PDZ3 の二つの PDZ ドメインのうち、どちらが CLD に結合するかの判定を行った。表 4 には、種々のペプチドと PDZ ドメインとの解離定数 K_D の結果を示した。

その結果、mLNX1-PDZ2 は一部の CLD と相互作用するが一方全く相互作用をしない CLD もあることが明らかになった。通常、PDZ ドメインの多くはペプチドの C 末端 4 アミノ酸を必要十分条件として認識するが、CLD ではこの 4 残基はどれも配列がよく似ている。従って、mLNX1-PDZ2 には通常の PDZ ドメインとは異なる分子認識機構が内在している可能性が示唆された。これに対し mLNX1-PDZ3 は実験したどの CLD とも相互作用せず、同じ LNX1 内の PDZ 間でも結合に差が見られた。

3・3 LNX1 に優先的に結合する CLD 以外の基質の決定

更に、TJ に存在するタンパク質には、CLD のほかにも、その C 末端が LNX1 の PDZ ドメインと相互作用すると報告されているタンパク質が多数存在する。これらの中から、CLD よりも強く LNX1 と結合し、CLD と拮抗することのできるタンパク質を探索することができれば、そのペプチドの構造をもとに、CLD と LNX1 の相互作用を特異的に阻害する低分子化合物を設計することにつながる。そこで、CLD を含む 9 種の LNX1 結合タンパク質由来ペプチドと LNX1 の PDZ ドメインとの溶液中での会合を精査した。その結果、JAM ファミリーのひとつである JAM4 の C 末端ペプチドが、mLNX1-PDZ2 と強く相互作用することがわかった。また mLNX1-PDZ2 は hCAST とも相互作用するとわかった。これは前述の pull down assay の結果と一致した。

3・4 mZO1-PDZ1 のリガンドフリー体の溶液構造決定

NMR を用いて、mZO1-PDZ1 (95 アミノ酸残基) 由来の主鎖ならびに側鎖のほぼすべての水素、窒素、炭素の NMR シグナルを帰属することができた。帰属した結果は、

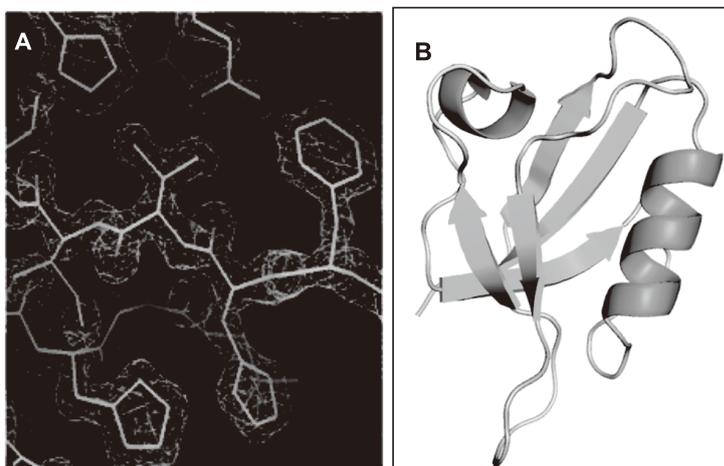


図 3

(A) マウス LNX1-PDZ2 の精密化途中の電子密度図。
(B) マウス LNX1-PDZ2 の立体構造のリボン表示。

表 4

| K_D /M | hCAR | hJAM4 | mJAM4 | hCAST |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| hLNX1PDZ2 | n.d. | 1.4×10^{-7} | 8.0×10^{-8} | 9.9×10^{-8} |
| mLNX1PDZ2 | n.d. | n.d. | 3.3×10^{-8} | 2.3×10^{-8} |
| mLNX1PDZ3 | n.d. | 7.2×10^{-9} | n.d. | n.d. |
| mZO1PDZ1 | 6.3×10^{-8} | 3.9×10^{-7} | 1.1×10^{-8} | n.d. |

| K_D /M | mCLD1 | mCLD3 | mCLD4 | mCLD7 | mCLD15 |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| hLNX1PDZ2 | n.d. | - | n.d. | - | - |
| mLNX1PDZ2 | n.d. | 2.8×10^{-7} | 2.0×10^{-7} | n.d. | 1.2×10^{-7} |
| mLNX1PDZ3 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| mZO1PDZ1 | 7.0×10^{-9} | 1.7×10^{-7} | 3.2×10^{-8} | 1.9×10^{-7} | 5.8×10^{-8} |

表面プラズモンセンサー解析による解離定数 K_D の比較。
n.d.) 実験を行ったが結合が弱く検出できなかったもの。
ハイフン) 実験を行っていないもの。

国際データベースであるBioMagResBankに登録した (deposition code 11424)。この結果は、Biomolecular NMR Assignment誌に報告した¹³⁾。

得られた化学シフト情報をもとに、更にNOE情報によるプロトン間距離を解析して、立体構造の決定に成功した。決定した立体構造座標は、国際データベースProtein Data Bankに登録した (PDB code ; 2RRM)。収束した20個の立体構造の重ね合わせ構造を図4Aに、既に報告されているZO1-PDZ1の結晶構造 (PDB : 2H3M) との比較を図4Bに、示す。既知の結晶構造との最大の構造の差異は、ペプチドリガンド (=CLD) 結合ポケットの入口付近に存在する $\beta 2/\beta 3$ loopの向きである。なお、結晶中では、このループ部分に硫酸イオンが結合していることが知られている。我々が決定した立体構造では、このループ部分に比較的大きな構造揺らぎがあることが明らかになった。

4. 考察

本研究の最終目的は、TJを分解する因子であるLNX1について、それを分子標的とみなして、それに特異的な阻害剤を開発し、コスメトロジー分野研究に展開することである。今回得られた結果からは、LNX1の二番目のPDZドメインが、CLDとの相互作用の一端を担うことが示され、LNX1-PDZ2を標的とした「立体構造に基づいた」創薬アプローチの妥当性は検証できた。しかし、LNX1のPDZ1ドメイン、PDZ4ドメインが、CLDとの相互作用の責任ドメインではないという確証を得るまでにはいたっていない (preliminaryにはCLDとは結合しないという結果を得ている)。これは、タンパク質試料としての性質が悪く、大腸菌発現系で大量の可溶性のタンパク質試料を調製することが困難だったからである。そこで、この問題点を解決

するために、現在、哺乳動物での培養細胞系で発現するLNX1全長のプラスミドをもとに、それぞれのPDZドメインをドメインごと欠失した変異体を作成した。この変異体プラスミドを培養細胞に導入して、4つあるPDZドメインのうちのPDZ2を破壊した場合にのみTJのエンドサイトーシスと分解が起きないことを確認する、という細胞生物学的実験を、神戸大学医学研究科古瀬教授と共同で進めている。また、CLD1のC末端ペプチドと¹⁵N標識したmLNX1-PDZ2を用いて、滴定実験を行った結果、LNX1はかなり広いインタフェースを用いてCLD1を認識しているという予備実験結果も既に得ている。そこで、これらの結果がまとも次第、マウスLNX1-PDZ2の立体構造ならびにペプチドとの相互作用の結果を査読付き専門誌に発表する予定である。

それらを踏まえた上で、mLNX1-PDZ2のフリーの立体構造を利用したインシリコスクリーニングと、それにより探索された低分子化合物がmLNX1-PDZ2に結合するかどうかの検証実験が、次に解決すべき課題である。筆者が2011年に神戸大から名古屋大に異動した関係で、特にインシリコスクリーニング関連の研究環境の再始動に手間取ってしまい、現時点でmLNX1-PDZ2のバーチャルスクリーニングは開始していない。また、インシリコスクリーニングの結果を実験的に検証するためには、NMRを利用した滴定実験を予定しているが、その結果を解釈するためにも、mLNX1-PDZ2のNMR解析を進め、シグナルの全帰属を行う予定である。これまでにZO1-PDZ1に関してインシリコスクリーニング実験を行った結果では、20個程度の化合物からでも数個の結合化合物が得られている。従って、インシリコスクリーニングの精度そのものについては、既存の技術 (市販ドッキングソフトの精度など) が十分実

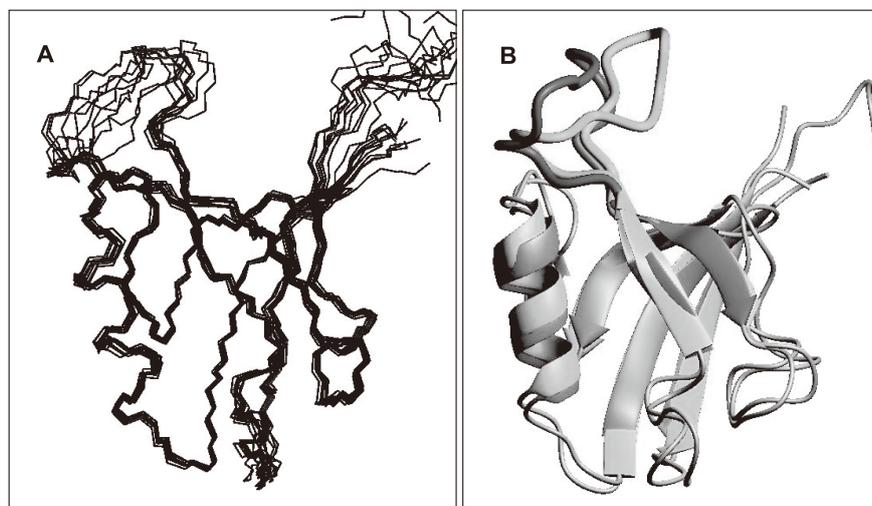


図4

(A)mZO1-PDZ1のNMR溶液構造、10個の解の重ね合せ図。(B)今回著者らが決定したNMR構造 (濃色) と既知の結晶構造 (淡色, PDB:2H3M) の比較。太く表示されたloop部分の構造が大きく変化している。

用可能なレベルに達していると考えられる。今後の研究の進展が期待できる。

一方、本研究で得られた結果であるところの、JAM4のC末端ペプチドが、mLNX1-PDZ2に対して、CLDのいずれのペプチドよりも強く結合するという発見の持つ意義は大きい。すなわち、例えば細胞膜透過ペプチド(CPP)のような方法論を援用して、JAM4ペプチドを細胞内に送り込むことによって、LNX1のTJ分解機能が阻害できる可能性が示された。これは、今後、検証するに値する有力な仮説である。その一方で、細胞接着分子であるJAM4については、これまで、TJ近傍に共局在することは知られていたが、TJ形成においてどのような役割を果たしているかなどの報告はほとんどなかった。また、生理的に、JAM4がLNX1によってエンドサイトーシスされるのかどうかについては、未だ明らかではない。今回の筆者らの知見は、JAM4がTJ近傍においてTJ抑制因子であるLNX1と優先的に結合することによって、間接的にCLDのユビキチン化を抑え、TJの安定化に寄与しているのではないか、という新しいモデルを示唆している。更に、LNX1にはスプライシングバリエーションとしてRINGドメインのないE3活性を欠失したLNX1p70というイソフォームが存在しているが、その分子は、細胞接着装置の足場タンパク質として機能する可能性が高い。本助成金によって行われた研究が端緒となり、コスメトロジー研究における新規作用メカニズムにおける皮膚保湿助剤が開発できるとともに、細胞接着装置研究に新たな光をあてる一助となれば幸いである。

最後に、本研究を遂行するにあたり、ご支援いただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に心より感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S: Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice., *J Cell Biol*, **156**, 1099-111, 2002.
- 2) Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S: Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins., *J Cell Biol*, **147**, 1351-1363, 1999.
- 3) Ikenouchi J, Umeda K, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S: Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization., *J Cell Biol*, **176**, 779-786, 2007.
- 4) Takahashi S, Iwamoto N, Sasaki H, Ohashi M, Oda Y, Tsukita S, Furuse M: The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells., *J Cell Sci*, **122**, 985-994, 2009.
- 5) Goda N, Tenno T, Takasu H, Hiroaki H, Shirakawa M: The PRESAT-vector: asymmetric T-vector for high-throughput screening of soluble protein domains for structural proteomics., *Protein Sci.*, **13**, 652-658, 2004.
- 6) Tenno T, Goda N, Tateishi Y, Tochio H, Mishima M, Hayashi H, Shirakawa M, Hiroaki H: High-throughput construction method for expression vector of peptides for NMR study suited for isotopic labeling., *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**, 305-314, 2004.
- 7) Vagin AA, Teplyakov A: MOLREP: an automated program for molecular replacement., *J. Appl. Cryst.*, **30**, 1022-1025, 1997.
- 8) Vagin, AA, Steiner, RS, Lebedev, AA, Potterton, L, McNicholas, S, Long, F and Murshudov, GN: REFMAC5 dictionary: organisation of prior chemical knowledge and guidelines for its use., *Acta Cryst. D*, **60**, 2284-2295, 2004.
- 9) Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A: NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes., *J. Biomol. NMR*, **6**, 277-293, 1995.
- 10) Goddard TD, Kneller DG: Sparky 3, University of California, San Francisco.
- 11) Guntert P: Automated NMR protein structure calculation, *Prog. Nuc. Magn. Reson. Spect.*, **43**, 105-125, 2003.
- 12) Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse RWK, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL: Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**, 905-921, 1998.
- 13) Umetsu Y, Taniguchi R, Satomura R, Goda N, Ikegami T, Furuse M, Hiroaki H*: ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignment of the first PDZ domain of mouse ZO-1, *Biomol. NMR Assign*, **5**, 207-210, 2011.

皮膚の健康・老化状態の非侵襲的解析法： 質量分析法を基盤としたケラチン上の化学修飾スクリーニング法の開発

東北大学大学院薬学研究科 臨床分析化学分野

大江 知行、李 宣和、後藤 貴章、宮本 浩平

Purpose: Human skin is one of the major barriers of our body against environmental stimuli such as UV and chemical exposures. Therefore, as the main constituent of the skin, keratins have recently been recognized as the major target proteins to various chemical modifications. However, because of the difficulties associated with their insolubility and handling, there have been lack of studies to identify the sites of chemical modification in keratins. Here, we introduce a combination of non-invasive sampling, simple clean-up, efficient digestion method, and MS analysis to screen keratin modifications. This approach would provide significant information of the chemical modifications including oxidative modifications on keratins that could be useful as biomarkers of the skin damage.

Experimental: The analytical methodology to detect chemical modifications on skin keratins were optimized using tape stripping, filter-aided sample preparation, tryptic digestion, MALDI-TOF/MS *etc.* The tryptic keratins in human skin with/without H₂O₂ treatment were analyzed by MALDI-TOF/MS to confirm the oxidative modification sites.

Results and Discussion: We have developed the methodology to identify chemical modifications in human skin keratins. Using the methodology, we have identified that Met^{259, 262, 295, 469}, located in the α -helical rod domain of K1, were the most susceptible sites to oxidation induced by H₂O₂ in vitro and in vivo.

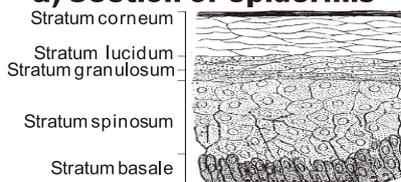
1. 緒言

1-1 目的

表皮で作られるケラチンは、皮膚の最外側の角質層として28日程度のサイクルで剥離、脱落する疎水性蛋白質である (Fig.1)¹⁾。即ち、このものは、酸化やUV照射に対する防護壁として常に外部からの刺激に直接晒されており、他の生体構成蛋白質とは極めて異なる環境にある。それ故、ケラチン上の状態変化を分別し情報源として活用することは、皮膚の健康・老化状態を知る上で極めて有用な方法論となると思われる。

蛋白質上の微小な状態変化を明らかにする手段としては、その蛋白質上の化学修飾 (酸化修飾など) を精査することが有効である。例えば、ケラチン上の化学修飾としては、活性酸素種^{2,3)}、UV照射⁴⁾によるカルボニル化、更には脂質過酸化を介した脂質化修飾など、数多くの可能性が考えられる。しかしながら、このような微小な変化を分別するには、抗体やプローブを用いたイメージングでは不十分であり、他の精緻な分析基盤が必要となる。

a) Section of epidermis



◆Barrier of our body

Skin is continuously exposed to external stimuli such as UV, chemicals.

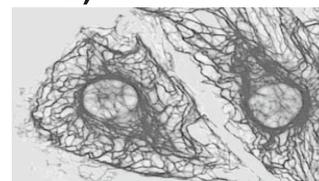
◆Short turn over

The most exterior layer of the skin (stratum corneum; SC) is replaced in 28 days.

◆Cells of the SC contain keratins

Keratin (K) base/acid pairs K1/K10, K2/K9 are mainly in the SC.

b) Keratins



◆Intermediate filament proteins

Keratins are members of a family composing important structures of cells.

◆High proportion of Gly and Ala

Sterically-unhindered hydrogen bonding facilitate to form helical filaments.

◆Cys-Cys

Disulfide bonds confer additional strength rigidity and insolubility.

Fig.1 Section of epidermis (a) and Keratins (b)

以上の事を鑑み申請者は、化粧品の抗酸化・UVカット作用による皮膚の保護効果をも解析し得る非侵襲的かつ簡便な皮膚状態評価法を開発するため、質量分析法を基盤としたケラチン上の化学修飾、取り分け酸化修飾スクリーニングの方法論を確立することを目的とする。

1-2 背景

皮膚状態評価法の現状：非侵襲的な皮膚状態評価法の試みとして、筑波大とカネボウのグループによる皮膚内コラーゲン構造の3次元画像化が報告されている⁵⁾。しかし、特殊な分析機器を必要とすること、データから皮膚状態の質的变化の原因を直接フィードバック出来ないこと、などの制限もある。

化学修飾研究の現状：生体高分子上の化学修飾を情報源と

* Non-invasive analysis to monitor skin aging conditions: screening of chemical modifications on keratin proteins by mass spectrometry

Tomoyuki Oe*, Seon Hwa Lee, Takaaki Goto, Kohei Miyamoto

Department of Bio-analytical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University



する dosimetry 研究は、化学物質の曝露・毒性評価などで広く行われており、生体内のアルブミン、DNAの修飾体が広く用いられてきた。しかしながら、皮膚の健康・老化状態を評価する研究例は皆無である。

研究対象としてのケラチン：ケラチンは、皮膚に多量に局在し、非侵襲的に採取可能である一方、疎水性で取り扱い困難な蛋白質である。更に生理活性が無い事も相まって研究対象としての例も乏しかった。しかし最近、化学工場労働者皮膚から、環境被曝としてのナフタレン修飾ケラチンが示されるなど⁶⁾、ケラチンを用いた興味深い研究が報告され始めている。

2. 実験

2-1 試薬・器材類

テープはアサヒバイオメッド社(東京)製の角質チェッカー用(25×25mm)を用いた。超純水は大和薬品社(仙台)製を、更に Millipore 社 (Billerica, MA, USA) 製 Milli-Q でろ過した物を、LC用アセトニトリルは関東化学社(東京)製を用いた。2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) は東京化成社(東京)製、dithiothreitol (DTT)、iodoacetamide (IAA)、mercaptoethanol、H₂O₂、sodium dodecyl sulfate (SDS)、重炭酸水素ナトリウム、塩酸、尿素、リン酸、リン酸二ナトリウム(12水和物)、リン酸一ナトリウム(無水物)、NaCl はナカライテスク社(京都)製、2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris)、2,6-di-t-butyl-4-methylphenol (butylated hydroxytoluene; BHT) は和光純薬社(大阪)製、トリプシンは Promega 社 (Madison, WI, USA) 製の物を用いた。ヒト angiotensin (Ang) II は Calbiochem 社 (San Diego, CA, USA) 製、ACTH (18-39) は Bachem 社 (Budendorf, Switzerland) 製、insuline chain B (酸化体) は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) 製を用いた。Amicon Ultra molecular cut off filter (0.5mL, <30K) は Millipore 社 (Billerica, MA, USA) 製を、ZipTipC18 カートリッジは Waters 社 (Bedford, MA, USA) 製を用いた。また、ヒト表皮ケラチンは、実験者(K.M.)の上腕部より採取した。ホモジナイザーはフナコシ社(東京)製グラインダーに Scientist Specialities 社 (Omaha, NE, USA) 製を用いた。

2-2 分析機器

MALDI-TOF/MS (Voyager-DE STR, Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) を以下の条件で用いた: mode: positive reflectron, mass range: m/z 500–5000; extraction delay time: 100 sec; accelerating voltage: 20kV.; spectra: average of 100–150 laser shots. カリブレーションは、Ang II (m/z 1046.5418)、Ang I (m/z 1296.6800)、ACTH (m/z 2465.1989)、insuline chain B (oxidized) (m/z

3494.6513) を用いて行った。蛋白質同定の peptide mass fingerprinting (PMF) 法は、MS-Fit (ProteinProspector Version 5.2.1 Basic, UCSF Mass Spectrometry Facility) を以下の検索条件で用いた: データベース, SwissProt. 2008. 12. 16; 消化酵素, トリプシン; maximum number of missed cleavages, 2; constant modifications, carbamidomethyl (C), minimum matches, 4; sort type, score sort; considered modifications, oxidation of M; min precursor ion matches, 1; MOWSE On, 1; MOWSE P factor, 0.4; masses, monoisotopic; mass tolerance, 0.2Da。検索にはシグナル/ノイズ比が14.0以上のピークを用いた。サンプル調製は、試料 (0.5μL) 及び150mMDHB溶液 (0.1%v/vリン酸を含む50%v/vアセトニトリル溶液) (0.5μL) をステンレス製MALDIプレート上に順次滴下し、室温で乾燥させて用いた。

2-3 ケラチンの皮膚からの採取、回収、精製、酵素消化 (Fig.2)

表皮蛋白質の採取と回収：表皮上の脂質等を除くため、上腕部皮膚を予めエタノールで清拭し、テープを張り3回押しつけ、一回目のテープは廃棄した。次いで2回目のテープを同様に3回押しつけ、この物を分析に用いた。テープの1/4 (6.25×25mm) を0.1%SDS/PBS緩衝液 (50mM sodium phosphate buffer, 0.15M NaCl, 2mM BHT, pH7.0, 200μL) 中、handy pestleでそぎ落とし、11,300g、4℃、10分間遠心し、その上清を0.65mLの遠心チューブに移した。

酵素消化と精製：常法に従い、20mM DTT/RCM緩衝液 (8mM 尿素、50mM Tris, 0.1M mercaptoethanol, 2mM BHT, pH8.6) 中54℃、1時間の還元反応に付し、110mM iodoacetamide/RCM緩衝液中、室温、暗所で45分間アルキル化に付した。還元アルキル化後の試料は、molecular cut off filter (<30K) に付し、11,300g、

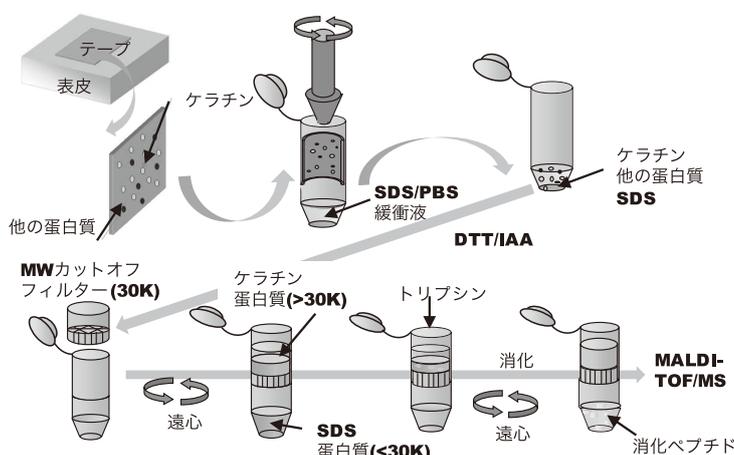


Fig. 2 Sample preparation for non-invasive skin keratin analysis

4℃、12分間遠心し、分析の妨害となるSDS及び共存する小蛋白質を濾液として除去した。フィルター上の残渣を100mM 重炭酸アンモニア水溶液 (100 μ L, 2mM BHTを含む) に溶解し、トリプシン (0.75 μ g) 存在下、37℃、オーバーナイトでインキュベートした。消化ペプチドは、11,300g、12分間遠心し濾液として回収、フィルター上に残った溶液もフィルターユニットを逆さまにし1,000g、3分間遠心する事により回収した。消化ペプチド溶液は窒素気流下で乾固させ0.1%TFAを含む5% (v/v) アセトニトリル水溶液50 μ Lに再溶解した。

脱塩操作：再溶解後の試料の脱塩精製は、予めアセトニトリル (10 μ L \times 3)、次いで0.1% TFA水溶液 (10 μ L \times 3) で平衡化したZipTipC18カートリッジに数回通導する事により保持、0.1%TFA水溶液 (10 μ L \times 3) で洗浄、0.1%TFAを含む75% (v/v) アセトニトリル水溶液 (10 μ L \times 5) で溶出し、溶出液を窒素気流下で乾固させた。残渣は50%アセトニトリル水溶液 (40 μ L) で再溶解後、その一部 (0.5 μ L) をMALDI-TOF/MS分析に付した。

2-4 酸化実験

in vitroでの酸化実験：2-3で得られた2回目のテープの1/4 (6.25 \times 25mm) を、1.8mLのH₂O₂溶液 (0, 2, 5, 10, 40mM) と37℃、30分間インキュベーションした。反応後、テープを水 (1mL \times 2) で洗浄し、以下の操作は、2-3と同様に行い、試料とした。

in vivoでの酸化実験：エタノールで清浄したヒト上腕部に、3%H₂O₂溶液で湿潤した脱脂綿 (30mm \times 30mm) を軽く押し当て、一定時間後、水に浸した脱脂綿 (30mm \times 30mm) で酸化部位を洗浄した。乾燥後、テープを張り3回押しつけ、その1/4 (6.25 \times 25mm) を試料とし、以下の操作は2-3と同様に行った。

3. 結果

3-1 ケラチンの回収実験

皮膚角質層蛋白質の非侵襲的採取には、表皮中薬物の抽出等に用いられるテープストリッピング法⁷⁾を、試料の精製にはプロテオミクスで多用される filter-aided sample preparation (FASP) 法⁸⁾を検討した。最適条件を用いた時のトリプシン消化後のMALDI-TOF/MSスペクトルをFig.3

に示した。その結果、角質層蛋白質由来の75のペプチドピークの内、61ピーク (K1:15; K2:11; K9:21; K10:14. Total81%) がケラチンに帰属された。この事は、極めて難溶性で取扱いの困難なケラチンを、テープストリッピング法による採取およびFASP法のみで、ほぼ選択的に精製・回収可能である事が示された。

3-2 酸化修飾位置の同定

次いで、3%H₂O₂で30min処理したヒト上腕部から試料を得、ケラチン酸化修飾を精査した。その結果、主要な酸化修飾ターゲットはK1とK10であり、とりわけK1の α -ヘリックスドメイン上のMet^{259, 262, 296, 469}が濃度依存的に酸化を受け、MALDI-TOF/MSにより容易に分別可能であった (Fig.4)。ちなみに、操作中の酸化はBHT添加により抑制された。また、修飾アミノ酸は、MS/MS解析により別途確認した。

3-3 反応時間と酸化修飾の関係

ついで、これらのMet上の酸化修飾が、酸化ストレスを量的に反映するマーカーとなるか否かを判断する目的で、上記Metの酸化を、H₂O₂との処理時間との関連でも精査した。その結果、いずれも酸化修飾の割合は、処置時間を

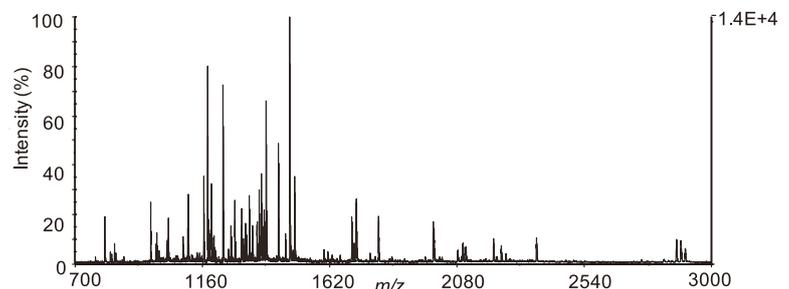


Fig. 3 MALDI-TOF/MS spectrum of human skin proteins after tryptic digestion

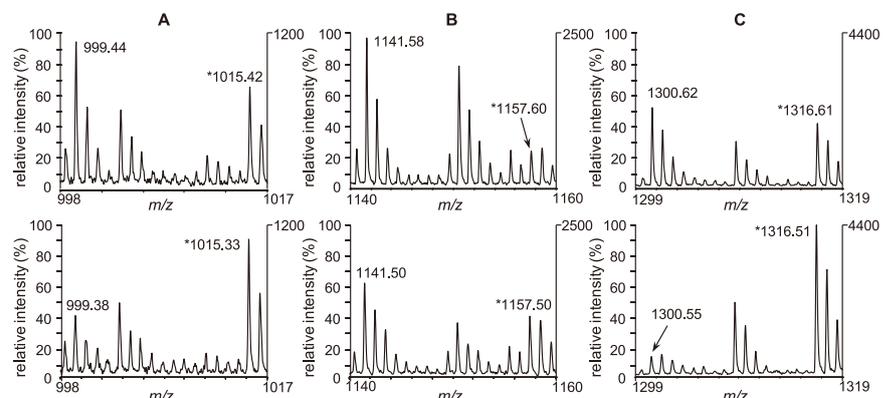


Fig. 4 MALDI-TOF/MS spectra of keratins from human skin (A) D²⁹⁰VDGAYMTK²⁹⁸ (K1, MH⁺; m/z 999.44), (B) D⁴⁶⁴YQELMNTK⁴⁷² (K1, MH⁺; m/z 1141.52), and (C) N²⁵⁸MQDMVEDYR²⁶⁷ (K1, MH⁺; m/z 1300.40) after treatment with 3% H₂O₂ for 0 min (upper) and 30 min (bottom).

* represents an oxidized peptide (+ 16 Da).

反映しており、酸化ストレスの指標となると考えられた (Fig.5)。

4. 考察

今回、皮膚の健康・老化状態の非侵襲的解析法開発を目的として、皮膚角質層ケラチンの採取を粘着テープによるテープストリッピング法、クリーンアップをmolecular cut off filterによるFASP法により行い、トリプシン消化とMALDI-TOF/MSの利用により、ケラチン上の化学修飾を簡便に分別出来る方法論の開発を試みた。

その結果、極めて疎水性で取扱い困難なケラチン上の化学修飾を簡便に評価する系を確立し、ケラチンが皮膚の健康・老化状態を知る情報源となり得る事、Metの酸化が酸化ストレスの指標となり得る事を確認した。

今後、他の生理的酸化条件 (Cu^{II}/アスコルビン酸、MnO₂)、UV照射 (254nm)、脂質化条件 (過酸化脂質 13-HPODE、分解物 4-hydroxy-2 (E)-nonenal) でも検討し、これら修飾体の表皮での存在を確認する。また、ベースラインレベルの酸化修飾を市販抗酸化クリーム継続的塗布で減少し得るか否か、多変量解析により皮膚状態を定量的に解析出来るか否かも精査し、本コンセプトの妥当性を検討する予定である。

5. 総括

『非侵襲的かつ汎用機器で簡便に皮膚状態を評価する方法論』は、現在のところ国内外で見るとべき物がない。それ故、プロテオミクスと dosimetry 研究の概念を取り入れた本研究は、通常分析施設で常備している機器 (MALDI-TOF-MS) でも対応可能であり、国内外に高いインパクトを与える物と期待される。

更に、本法は、皮膚の健康・老化状態、更には皮膚環境のみならず、化粧品の抗酸化・UVカット効果をも非侵襲的に評価出来るため、極めて有用な方法論と考えられる。また、角質層でのケラチンのサイクルが28日程度であることを考える時、同一被験者をコントロールとした、より具体的な効能評価を可能とするばかりか、真皮中コラーゲンを指標とした皮膚評価法とは全く異質の情報を得ることも期待される。

一方ケラチンは、非侵襲的に採取可能であるばかりか、室温でも極めて安定な蛋白質である。それ故、被験者自身による試料採取と郵送可能な安定性を考える時、化粧品会社が顧客のアフターサービスの一環としての試料分析も可能と考える。

更に、ケラチンは毛髪中にも多量に含まれていることか

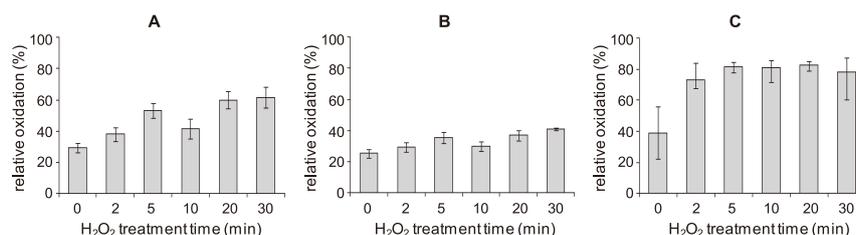


Fig. 5 Time course on *in vivo* keratin oxidation

(A) D²⁹⁰VDGAYMTK²⁹⁸ (K1, MH⁺; *m/z* 999.44), (B) D⁴⁶⁴YQELMNTK⁴⁷² (K1, MH⁺; *m/z* 1141.52), and (C) N²⁵⁸MQDMVEDYR²⁶⁷ (K1, MH⁺; *m/z* 1300.40). Relative oxidation (%) with 3% H₂O₂ for increasing times. Data are presented as means ± SEM (error bars) from quintuplicate samples.

ら、シャンプー・リンス・ヘアトニック等のヘアケア製品の評価、また未だ例は無いが裁判科学分野で規制薬物の長期使用履歴の評価にも応用できるものと思われる。

以上、本研究は非侵襲的かつ汎用機器で簡便に皮膚状態を客観的に数値化、評価できるという独創的なものであり、コスメトロジー分野の製品開発における効能評価・安全性評価の迅速化、コストの低減、更には顧客サービスの向上等にも幅広く寄与するものと期待される。

6. 謝辞

本研究は、平成21年度コスメトロジー研究振興財団の研究助成を受けて行ったものである⁹⁻¹³⁾。同助成会に心より感謝致します。また、MALDI-TOF/MS装置は本学医学研究科共通機器室の物であり、ここに感謝致します。

(引用文献)

- 1) Plowman JE: The proteomics of keratin proteins. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **849**, 181-189 (2007).
- 2) Thiele JJ, Hsieh SN, Briviba K, Sies H: Protein oxidation in human stratum corneum: susceptibility of keratins to oxidation *in vitro* and presence of a keratin oxidation gradient *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, **113**, 335-339 (1999).
- 3) Hirao T, Takahashi M: Carbonylation of cornified envelopes in the stratum corneum. *FEBS Lett.*, **579**, 6870-6874 (2005).
- 4) Sander CS, Chang H, Salzmann S, Muller CS, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P, Thiele JJ: Photoaging is associated with protein oxidation in human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, **118**, 618-625 (2002).
- 5) Sakai S, Yamanari M, Miyazawa A, Matsumoto M, Nakagawa N, Sugawara T, Kawabata K, Yatagai T, Yasuno Y: *In vivo* three-dimensional birefringence

analysis shows collagen differences between young and old photo-aged human skin. *J. Invest. Dermatol.*, **128**, 1641-1647 (2008).

6) Kang-Sickel JC, Fox DD, Nam TG, Jayaraj K, Ball LM, French JE, Klapper DG, Gold A, Nylander-French LA: S-arylcysteine-keratin adducts as biomarkers of human dermal exposure to aromatic hydrocarbons. *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 852-858 (2008).

7) Chao YC, Nylander-French LA: Determination of keratin protein in a tape-stripped skin sample from jet fuel exposed skin. *Ann. Occup. Hyg.*, **48**, 65-73 (2004).

8) Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M: Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods*, **6**, 359-362 (2009).

(本助成金による業績)

9) 宮本浩平、李 宣和、後藤貴章、大江知行："非侵襲的サンプリングによる表皮ケラチン分析と酸化修飾解析への応用". 日本分析化学会第59年会、2010年9月15～

17日、仙台

10) 宮本浩平、李 宣和、後藤貴章、大江知行："非侵襲的な表皮ケラチン分析法の開発と酸化修飾解析への応用". 米ちのく分析科学シンポジウム2011、2011年7月23日、米沢

11) 宮本浩平、李 宣和、後藤貴章、大江知行："Development of non-invasive proteomic analysis to monitor skin conditions by mass spectrometry". 第50回日本薬学会東北支部大会、2011年10月29日～30日、仙台

12) Lee SH, Miyamoto K, Goto T, Oe T: "Non-invasive proteomic analysis of human skin keratins: screening of methionine oxidation in keratins by mass spectrometry". *J. Proteomics*, **75**, 435-449 (2011).

13) Lee SH, Miyamoto K, Goto T, Oe T: "Non-invasive analysis to evaluate skin conditions : screening of chemical modifications in human skin keratins by mass spectrometry" 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, may 20-24, 2012, Vancouver, Canada.

皮膚細胞を用いた化粧品中のナノマテリアルの安全性評価 ～ナノマテリアルの皮膚ランゲルハンス細胞に対する影響評価～

大阪大学薬学研究科毒性学分野

堤 康 央

Amorphous silica nanoparticles (nSPs), widely used in cosmetics, medicines, and foods, are thought to pose risks induced by changes in the biologic reactivity and kinetics of bulk materials due to the reduction of the particle size. In a previous study, we demonstrated that silica particles with a diameter of 70 nm penetrated the stratum corneum (SC) of mouse skin and were taken up by living cells such as keratinocytes and Langerhans cells. Here, to reveal the relationship among particle size, distribution, and cellular response, we evaluated size-dependent intercellular localization and cytotoxicity of silica particles in a mouse epidermal Langerhans cell line (XS52). Treatment with silica particles of various diameters (70, 300, or 1000nm) increased both the amount of silica particles taken up into the cells and cytotoxicity in accordance with the reduction of particle size. These findings suggest that smaller-sized silica particles induce greater cytotoxicity against Langerhans cells in association with a greater quantity of silica particles taken up by the cells.

1. 緒 言

近年のナノテクノロジーの発展に伴い、化粧品や食品、医薬品分野を中心として、ナノマテリアルを配合した数多くの製品が既に実用化・上市されている。ナノマテリアルは、サイズの減少に伴い、電気的・磁氣的・光学的特性や組織浸透性などといった点において、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは異なる特徴的な機能を有することが明らかとなっている。そのため種々の産業に革命を起こす新素材として強く期待されている。化粧品産業においては、粒子サイズを小さくすることにより得られる使用感の向上や紫外線遮蔽能の向上といった利点から、ナノシリカやナノ酸化チタンなどのナノマテリアルが多くの製品に使用されており、その使用量は、世界で年間約2000トンにも達することが報告されている。

このようにナノマテリアルが我々の日常生活に欠かせない素材となっている一方で、ナノマテリアルは、これら特徴的な機能を反映して、サブミクロンサイズ以上の従来素材とは異なる生体内動態や生体影響を發揮する可能性が危惧され始めている。実際に近年、遺伝子改変マウスなどを用いた安全性試験から、カーボンナノチューブがアスベスト様の発がんリスクを有するなど、ヒトの健康を確保する上で軽視できない事実が続々と報告されている^{1), 2)}。事実、我々の研究グループの検討結果においても、直径が100nm以下の非晶質ナノシリカが、皮膚角質バリアを通過して体

内に吸収され得る可能性を見出している。しかしながら、ナノマテリアルの安全性研究は世界経済協力機構 (OECD) の主導のもとで進められているものの、ハザード情報が散在するばかりで具体的な安全性評価指針の策定や安全なナノマテリアルの設計指針に関する情報は皆無である。これは、従来までのサブミクロンサイズの素材の知見に基づき、ナノマテリアルの場合でも曝露されても吸収されないだろうという誤った認識にも大きく影響されている。このままでは、ナノマテリアルの体内吸収性/生体内動態に関する検討がなされぬまま、ハザード情報のみを鵜呑みにした科学的根拠に乏しい無闇な使用規制が施行されてしまい、ナノマテリアルの有用性を享受した豊かな社会の構築や産業発展が阻害されてしまいかねない。従って、ナノマテリアルと従来までのサブミクロンサイズ以上の素材との体内/細胞内動態や生体/細胞への影響における相違点を科学的根拠に基づいて立証し、ナノマテリアルの物性を反映した安全性を評価し、それらの情報を基盤としてより具体的な安全性評価の推進と情報発信、安全設計指針の提示が急務となっている。

本稿では、マウスランゲルハンス細胞株 (XS52細胞) を用いて、化粧品基材としての非晶質ナノシリカの粒子サイズと細胞内局在や細胞傷害性/酸化ストレス誘導との関連に焦点を絞って解析し、興味深い知見を得たので報告し、当該成果が、安全で安心、そして魅力的な化粧品/化粧品の創出に結びつくことを期待している。

2. 実 験

2.1 シリカ粒子

本研究では、赤色蛍光色素 (RedF) で標識された直径70nm (nSP70)、300nm (nSP300)、1000nm (mSP1000) の非晶質ナノシリカを使用した。



Safety science for nanomaterials in cosmetics using skin-related cells

Yasuo Tsutsumi

Laboratory of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

2.2 細胞培養

マウスランゲルハンス細胞株 (XS52細胞) はマウス GM-CSF (2 ng/ml)、10% マウス皮膚由来繊維芽細胞 (NS47細胞) の培養上清、10% 非働化ウシ胎児血清、1% 非必須アミノ酸、1% L-グルタミン、1mM ピルビン酸ナトリウム、1% 2-メルカプトエタノール、10mM HEPES緩衝液、1% 抗生物質を含む RPMI-1640 medium (ナカライテスク) を用いて、37℃、5% CO₂条件下で培養した。

2.3 透過型電子顕微鏡観察

1×10⁴個のXS52細胞を8穴チャンバースライドに播種し、24時間後に終濃度が100μg/mlになるようにnSP70、nSP300、mSP1000を添加した。ナノシリカを添加して24時間培養したXS52細胞をPBSで洗浄した後に、氷冷した2.5%グルタルアルデヒド液で1時間固定した。続いて0.1Mリン酸緩衝液で洗浄した後に1%四酸化オスミウムで30分間後固定し、さらに上昇エチルアルコールで脱水した。常法に従ってこれらの標本をエポキシ樹脂で包埋し、熱重合により硬化させた。この標本からダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作製し、無染色あるいは酢酸ウラニウムおよびクエン酸鉛の二重電子染色を施した後に、透過電子顕微鏡を用いて観察した。

2.4 細胞増殖試験 (³H)チミジン取り込み試験

1×10⁴cellsのXS52細胞を96穴プレートに予め播種し、24時間後に種々の濃度に調製したnSP70、nSP300、mSP1000を添加した。各ナノシリカを添加して18時間後に、1μCi/wellとなるように³Hチミジンを添加し、さらに6時間培養した。培養終了後に細胞内に取り込まれた³Hチミジンの放射活性(cpm)を液体シンチレーションカウンター (TopCounter, PerkinElmer, MA, USA) を用いて測定した。

2.5 細胞膜傷害性試験 (LDH release assay)

ナノシリカの細胞膜傷害性は、ナノシリカを曝露したXS52細胞の上清中に放出されたLactate dehydrogenase (LDH) 量を指標として評価した。1×10⁴cellsのXS52細胞を96穴プレートに予め播種し、24時間後に種々の濃度に調製したnSP70、nSP300、mSP1000を添加した。各ナノシリカを添加して24時間後、細胞上清を回収し、上清中のLDH量をLDH cytotoxicity test (WAKO, Osaka, Japan) を用いて定量した。尚、細胞膜傷害性 (% of control) は0. % Tweenを添加群のLDH放出量を100%として算出した。

2.6 非晶質ナノシリカ添加時の活性酸素種 (ROS) の測定

活性酸素種 (ROS) 量の評価には蛍光プローブである

2',7'-dichlorofluorescein (DCFH-DA)を用いた。DCFH-DAは、細胞内においてROSと反応してDCFHとなり、蛍光を発する。3×10⁴個のXS52細胞を96プレートに予め播種し、24時間後に種々の濃度に調製したnSP70、nSP300、mSP1000を添加した。各シリカを添加して3時間後、phenol red freeのRPMI-1640培地 (ナカライテスク) で3回洗浄操作を行い、10μMに調製したDCFH-DAを含有したphenol red freeのRPMI-1640培地を添加し、37℃、5% CO₂条件下で培養した。30分培養後、DCFHの蛍光強度を励起波長485nm、蛍光波長530nmで蛍光プレートリーダーを用いて測定した。

3. 結果

これまでに我々は、化粧品基材として粒子径70nmの非晶質ナノシリカをマウスの皮膚に塗布したところ、角質層を通過し、角化細胞やランゲルハンス細胞などの細胞内に取り込まれることを明らかとしている。これらの結果は、直径が数百nm以上の従来素材では見られない現象であり、従来素材では予想もしなかった想定外の生体影響を誘発する可能性を示している。これらの結果を踏まえて、本論文ではマウスランゲルハンス細胞株 (XS52細胞) のin vitro培養系を用いて、ナノシリカの粒子径と細胞内動態や細胞影響との関連を解析した。初めに、非晶質ナノシリカの粒子径が細胞内局在に与える影響について評価する為に、100μg/mlのnSP70、nSP300、mSP1000を24時間処理したXS52細胞を透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、Fig. 1に示すように、nSP300あるいはmSP1000を適用したいずれの群において各シリカが細胞内に侵入した像が認められた (Fig. 1c, d)。それに対して、nSP70は、細胞内に侵入するばかりか核膜を透過して核内に侵入していた (Fig. 1a, b)。更に、粒子サイズの減少に伴い、細胞に取り込まれる粒子量の増加が認められた。これらの結果は、直径70nmの非晶質ナノシリカが従来までのサブミクロンサイズ以上のシリカとは異なる細胞内動態特性を示すことを示唆している。更に、nSP70は、nSP300、mSP1000とは異なる細胞内局在を示すことから、細胞に対する反応性も異なる可能性が示された。

そこで次に、シリカの粒子サイズがXS52細胞の増殖能に与える影響について評価した。その結果、Fig. 2に示すように、ナノシリカ処理により、XS52細胞の増殖は粒子径依存的に阻害されることが示された。nSP70、nSP300、mSP1000のIC₅₀値は、それぞれ4.2μg/ml、32.6μg/ml、75.0μg/mlであり、粒子サイズの小さいシリカほど、より低濃度でXS52細胞の増殖阻害を示すことが明らかになった。以上の結果は、粒子サイズが、細胞内局在と同様に細胞に対する反応性に対しても大きく影響を及ぼすことを示唆している。続いて、ナノシリカによる粒子径依存的な細胞

胞傷害性の機構解明を目的に、膜傷害性による細胞傷害性の指標である Lactate dehydrogenase (LDH) 量の測定を行った。ナノシリカを XS52 細胞に添加し、24 時間後に回収した培養上清中の LDH 放出量は、Fig. 3 に示すように、nSP300、nSP70 添加群では濃度依存的な LDH の放出量の増加が認められた。特に 30 μ g/ml の nSP70 添加群において非常に高い LDH 放出量 (193 \pm 6.8% of the control) が認

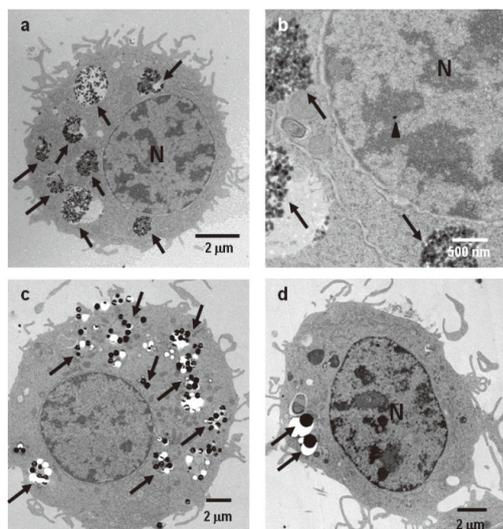


Fig.1 Localization of each silica particles in XS52 cells (arrows).

XS52 cells were treated for 24 hr with nSP70 (a and b), nSP300 (c) and mSP1000 (d). nSP300 and mSP1000 were only located cytoplasm. On the other hands, nSP70 was located in nucleus as well as cytoplasm (b, arrow head). Scale bars; 2 μ m (a, c and d), 500 nm (b)

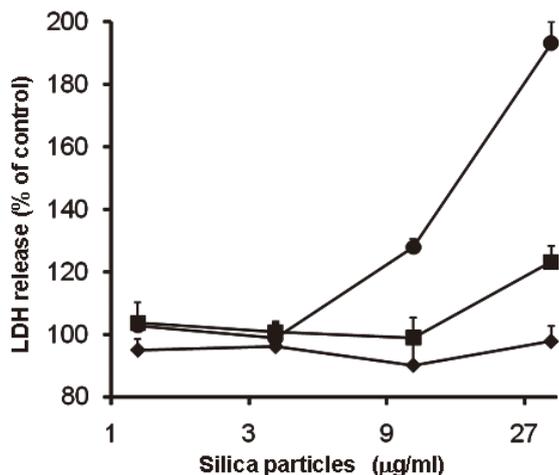


Fig. 3 Effect of silica particles against membrane damage of XS52 cells.

Cellular membrane damage on XS52 cells after incubation with nSP70 (circle), nSP300 (square) and mSP1000 (diamond) for 24 hr were evaluated by LDH release assay. The percentage of cellular membrane damage rate was relative data as compared to the negative (medium) and positive (0.2% Tween20) control. The data were presented with means \pm SD.

められた。一方で、mSP1000 添加群では LDH の放出は確認できなかった。この結果より、ナノシリカによる XS52 細胞に対する粒子サイズ依存的な細胞傷害性は細胞膜に対する傷害性の違いに起因していることが示された。

安全なナノシリカの創出や開発支援を念頭に、ROS 産生の観点から XS52 細胞の細胞傷害性をはじめとした細胞毒性の発現メカニズムの解明を試みた (Fig. 4)。各粒子サ

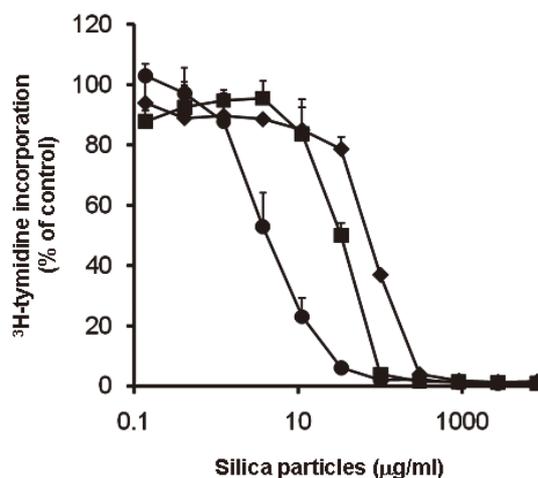


Fig. 2 Effect of various sized silica particles against the proliferation of XS52 cells.

The proliferation of XS52 cells after incubation with nSP70 (circle), nSP300 (square) and mSP1000 (diamond) for 24 hr were evaluated using tritium thymidine uptake assay. The percentage of cell proliferation rate was relative data as compared to the negative control. The data were presented with means \pm SD.

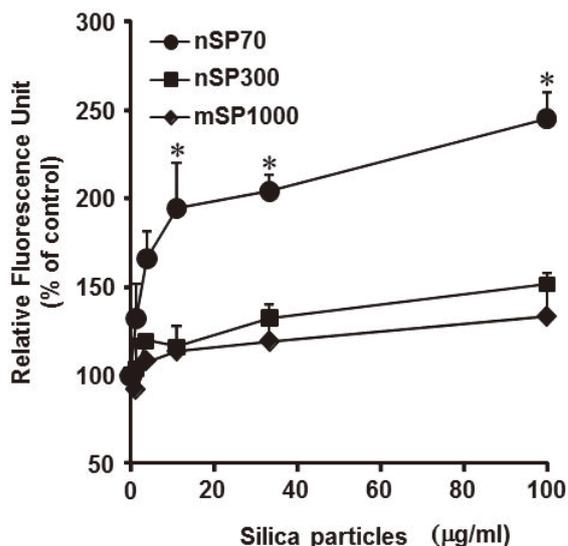


Fig. 4 Detection of reactive oxygen species (ROS) induced by silica particle treatment in XS52 cells.

XS52 cells were incubated with various concentrations of nSP70 (circles), nSP300 (squares), and mSP1000 (diamonds) for 3 h. Total ROS induced by silica particles were expressed as relative fluorescence units in the DCFH assay. Data are presented as means \pm SD (n=4). *P < 0.01 vs same dose of nSP300 and mSP1000.

イズのシリカをXS52細胞に添加し、3時間後のROS産生量をDCFH-DAを用いて測定した結果、全てのサイズの非晶質シリカにおいて、作用濃度に依存したROS産生が認められた。特にnSP70添加群では、nSP300、mSP1000ではROS産生が認められなかった低濃度添加時においても、コントロール群と比較して約2倍のROS産生が認められており、サブミクロンサイズのシリカよりも高いROS産生能を有することが明らかとなった。ROSは、DNA傷害や炎症反応の起点となり得る。従って、直径100nm以下の素材を対象として安全性を評価するに当たっては、ROSを起点とした遺伝毒性や免疫毒性について特に精査する必要があるものと考えられた。また、これらの事実、ナノシリカにROS産生を誘導しない何らかの修飾を施すことが出来れば、安全かつ有用なナノシリカを創製できることを示すものである。現在、ナノ材料に加え、サブナノ材料の経皮安全性の解析やアトピーといった皮膚疾患との関係など、さらなる追求を始めている。

4. 考 察

化粧品分野において、ナノ材料は紫外線遮蔽能の向上や使用感の向上といった利点から我々の生活に多大なる恩恵をもたらす新素材として大きな期待が寄せられている。しかし一方で、ナノ材料のリスク評価に関する情報開示は極めて少なく、本邦におけるナノ材料の安全性評価研究は欧米諸国に比べると圧倒的に立ち遅れている。従って、これまで殆ど検討されていなかったナノ材料の体内吸収性やハザードの明確化およびメカニズムの解明を積極的に推進すると共に、ナノシリカの物性が体内/細胞内動態や生体/細胞に対する反応性に与える影響について精査する必要がある。そこで我々は、非晶質ナノシリカに関して物性-動態-安全性の連関解析を進めており、これまでの検討において、粒子サイズが皮膚透過性に与える影響について解析を行い、nSP70のみがマウスの角質層を通過し皮膚ランゲルハンス細胞に取り込まれることを明らかとしている。そこで本検討においては、マウスランゲルハンス細胞を用いて粒子サイズが細胞内局在と細胞に対する反応性に与える影響について評価するために、nSP70、nSP300、mSP1000それぞれの細胞内局在と細胞傷害性を解析した。その結果、粒子径依存的に細胞内への取り込み量・細胞傷害性が増加すること、更に、核内移行性という点において、nSP70のみが独自の細胞内動態を示すことを明らかとした。そこで次に、安全なナノシリカの創出や開発支援を念頭に、XS52細胞を用いて、非晶質ナノシリカによる細胞傷害性の発現をROS産生の観点から解析した。その結果、粒子径依存的なROS産生の増大が認められ、細胞傷害性の発現と同様の傾向を示すものであった。ROSは、生体内のエネルギー代謝や感染症防御過

程において発生する一連の活性分子種 (O_2^- 、 H_2O_2) である。実際に、動脈硬化などの生活習慣病や代謝疾患性疾患、アルツハイマー病など様々な疾患の発症・悪化や、細胞レベルにおいてもアポトーシスやDNA損傷などの多くの細胞内ストレス応答に関与していることが知られている。我々はこれまでに、ヒト皮膚角化細胞を用いた検討において、非晶質ナノシリカによるDNA損傷には、ROS産生の関与が関与していることを見出している。この事実を踏まえると、貪食能を有するランゲルハンス細胞においても同様に、エンドサイトーシスによる非晶質ナノシリカの細胞内取り込みを介したROS産生により、DNA損傷などの細胞毒性を誘発していることが予想され、これが細胞傷害性の発現につながる可能性を考えている。ROS産生と細胞応答性の関係について、未だ不明な点は多くあるが、近年、ROS産生経路の一つであるNADPH oxidaseが、異物が細胞内に取り込まれる際にエンドソーム膜にリクルートされ、ROS産生を通じて異物の除去に寄与することが明らかとなっている。例えば、アスベストや結晶性シリカなどの微粒子状の異物が炎症を引き起こす際に、粒子が細胞に侵入することにより発現するNADPH oxidaseの関与が報告され、これらの報告ではNADPH oxidaseから産生されたROSがNALP3を活性化することが明らかとされている。以上の点を踏まえ、現在我々はROS産生経路と細胞毒性の発現についてROS産生経路の観点から解析を進めている。また、ランゲルハンス細胞や皮膚上皮細胞のROS産生を介して、皮膚免疫系の攪乱が誘発されることも報告されており、この点も加味すると、非晶質ナノシリカが皮膚免疫系に対する影響も精査する必要があると考えている。一方で我々は、これまでの検討において、ナノシリカの粒子表面をアミノ基やカルボキシル基で修飾することで、ナノシリカの細胞毒性を軽減できることを見出している。今後、Nano-Safety Science研究の推進の観点からナノ材料の安全性確保と社会受容の促進を実現するためには、曝露実態とハザード情報を詳細に収集し、ナノ材料のリスクを把握すると共に、これらのハザードを回避するための方法論の確立が必須であろう。

以上、本研究では非晶質ナノシリカがランゲルハンス細胞に対して細胞傷害性を発現すること、ならびにその細胞傷害性にはROS産生が関与している可能性を見出した。ランゲルハンス細胞は、皮膚の抗原提示細胞として免疫応答に大きく関与している細胞である。そのため、ランゲルハンス細胞の機能不全は免疫応答の攪乱を引き起こすことが報告されている^{3)~6)}。そのため、我々の今回明らかとした事実^{7)~10)}は、免疫応答が攪乱される可能性を示唆するものである。また、nSP70が細胞の核内にまで侵入していることから、既にナノシリカによって引き起こされることが報告されている核内蛋白質の凝集、RNA転写阻害¹¹⁾

等、核の機能不全に繋がる可能性が示唆される。そこで今後は、ナノシリカの細胞内局在情報を基盤とした各種ハザード評価を実施中であると共に、皮膚ケラチノサイト等の他の細胞種を対象として同様の検討を進めると共に、アトピーや皮膚炎との関係などを精査しているところである。

5. 総括

以上、本検討において我々は、70nmの非晶質ナノシリカは、XS52細胞に対して、細胞内動態・細胞に対する反応性という点においてサブミクロン以上のサイズのバルクマテリアルとは異なる性質を発揮することを明らかとした^{7), 8), 9), 10)}。即ち、ナノマテリアルの安全性確保と社会受容の促進を実現するためには、ナノマテリアルをバルクマテリアルとは別個の新素材として捉え、細胞内動態や組織浸透性/蓄積性といった生体内動態をより慎重に解析し、免疫応答や遺伝毒性等といった安全性情報を収集する必要があることを示している。更に、動態と細胞に対する反応性が相関しているという本検討の結果は、ナノマテリアルの動態情報を基盤とした安全性評価がNanoTox研究において重要であることを示している。我々は現在、ナノシリカの粒子サイズが動態-安全性に影響を与える機構を解明するために、細胞内への取り込み機構やストレス応答の観点から解析を進めている。これによって、ナノマテリアルの物性と安全性の因果関係を明確化することが可能になるものと考えている。これら物性-動態-安全性の連関解析から得られる情報が安全なナノマテリアルの設計指針の提示、さらには安全性評価法の確立に繋がり、安全なナノマテリアルの開発とその支援、そして安全・安心で魅力的な化粧品/化粧品の誕生と豊かな社会への展開に寄与することを期待している。

6. 成果発表(コスメトロジー研究振興財団への謝辞記載)

- 1) Nabeshi H, Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., **Tsutsumi Y.** : Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application., *Biomaterials.*, 32(11):2713-2724, 2011.
 - 2) Nabeshi H, Yoshikawa T., Arimori A., Yoshida T., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshioka Y., **Tsutsumi Y.** : Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages., *Nanoscale Res. Lett.*, 6 (1) : 93-98, 2011.
 - 3) Nabeshi H, Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., **Tsutsumi Y.** : Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes., *Part. Fibre. Toxicol.*, 8 (1) : 1-10, 2011.
 - 4) Nabeshi H, Yoshikawa T., Akase T., Yoshida T., Tochigi S., Hirai T., Uji M., Ichihashi K., Yamashita T., Higashisaka K., Morishita Y., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshioka Y., **Tsutsumi Y.** : Effect of amorphous silica nanoparticles on in vitro RANKL-induced osteoclast differentiation in murine macrophages., *Nanoscale Res. Lett.*, 6 (1) : 464-468, 2011.
- (引用文献)
- 1) Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., *et al.*: Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci.*, 33: 105-16, 2008.
 - 2) Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., *et al.*: Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol.*, 3: 423-8, 2008.
 - 3) Bennett, C.L., van Rijn, E., Jung, S., *et al.*: Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol.*, 169: 56 x 9-576, 2005.
 - 4) Tinkle, S., Antonini, J.M., Rich, B.A., *et al.*: Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.*, 111: 1202-120814, 2003.
 - 5) Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, *et al.*: Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol.*, 173: 3148-3154, 2004.
 - 6) Palucka, K., and Banchereau, J.: How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol.*, 14: 420-431, 2002.
 - 7) Nabeshi H, Yoshikawa T., Arimori A., Yoshida T., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshioka Y., **Tsutsumi Y.** : Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular

- distribution in murine macrophages., *Nanoscale Res. Lett.*, in press.
- 8) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., Arimori A., Isobe M., Tochigi, S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., **Tsutsumi Y.** : Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application, *Biomaterials.*, in press.
- 9) Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., **Tsutsumi Y.** : Safety evaluation study of nanomaterials aimed at the promotion of the social reception., *Genes and Environment*, in press.
- 10) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., **Tsutsumi Y.** : Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes., *Part. Fibre. Toxicol.*, in press.
- 11) Chen, M., and von Mikecz, A.: Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exp Cell Res.*, 305: 51-62, 2005.

細胞外マトリックス糖タンパク質による 皮膚の再生・修復のグリコバイオロジー

お茶の水女子大学大学院・糖鎖科学教育研究センター

小川 温子

We discovered that the survival of rat hepatic stellate cells (rHSC) were suppressed on vitronectin (VN) which had been synthesized in the early stage of liver regeneration after partial hepatectomy¹). The changes in glycosylation of VN, especially decreased sialylation plays a modulatory role for rHSC spreading. In this study, we aimed at elucidating whether VN regulates the dermal fibroblast adhesion and motility during the tissue-remodeling. Primary culture of the mouse dermal fibroblast (MDF) was isolated and analyzed for adhesion and spreading on glycosylation-modified VNs. It was found that decreased sialylation of VN not only attenuated the cell adhesion and spreading but changed the cellular signaling of dermal fibroblasts, MDF and Swiss 3T3.

1. 緒言

組織再生時において細胞外マトリックス (ECM) の分子性状は、糖鎖合成に関わる多くのタンパク質の発現と活性が変動するために正常組織のものとは異なる。ECM分子は生物過程や疾患において多くの役割を果たしているが、主要なECM分子の1つであるビトロネクチン (VN) は主に肝臓で産生され、血漿中や組織中に存在する多機能性糖タンパク質である。VNは多くのリガンドと結合とする (図1)。細胞表面のインテグリンと結合して細胞接着や細胞運動に関わるほか、1型プラスミノゲン活性化因子阻害因子 (PAI-1)、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子 (uPA)、およびuPA受容体 (uPAR) と結合して組織溶解に関連する細胞挙動を調節するなど、組織再生において重要な役割を果たす。VNはこのようなりガンド結合ならびに組織溶解系、血液凝固系の調節を介してマトリックスの再構築に関わる。またそのN-型糖鎖結合部位はよく保存され、シアリル化糖鎖の存在は動物種間で共通性が高い²⁾ (図1)。

当研究室ではこれまでに、ラット肝再生初期過程におけるVNのシアリル化の低下がコラーゲン結合性を増強する一方^{3,4)}、肝星細胞の生存につながる接着伸展を著しく抑制し、その過剰な活性化を抑制調節していることを報告した¹⁾。同時期のフィブロネクチンでは、VNの様な糖鎖変化は観測されなかった⁵⁾。

本研究では、肝とならんで再生能力の高い組織である皮膚組織の再生時に、主要な役割を果たすマウス皮膚線維芽

細胞 (MDF、Swiss3T3) に着目した。MDFはVNレセプターである α Vインテグリンを発現するので、初代培養によりMDFを単離し、組織再生時に重要な細胞の接着・伸展ならびに形態変化を中心に、VNの糖鎖調節機構を明らかにすることを目的とした。

2. 実験

1) ラットの部分的肝切除手術と血液採取

5週齢のMale Wistar rats (平均体重約110g、日本生物材料) を、飼育室 (23.5°C, 明6:00–18:00, 暗18:00–6:00) で飼育した。70%部分肝切除はエーテル麻酔後、HigginsとAndersonの方法⁶⁾に従って行った。シャム手術は体外に肝臓を出し、切除せずに再び肝臓を体内に戻す操作を行った。何も処置をしていないラットを非手術 (Non-operated: NO) とした。術後24, 48, 72時間経過後に、採血量の約10% (v/v) の3.8%クエン酸ナトリウムを抗凝固剤としてそれぞれ腹部大動脈より採血を行った。これを4°Cで1,200xg、10分間遠心分離により、上清を集め血漿とし、-80°Cで保存した。

2) 血漿ビトロネクチンの精製

Yatohgoらの方法⁷⁾に従い、非手術 (NO)、シャム手術24時間後 (SH)、部分肝切除24時間後 (PH) のラット血漿あるいはブタ血漿からVNの精製を行った。ヘパリン-Sepharose 4Bは還元アミノ化法で調製した。血漿に1/50量 (v/v) の1.0 M CaCl₂ (終濃度20mM) を加え攪拌したのち、室温で約1時間放置し血漿を凝固させた。さらに4°Cで1時間以上放置した後、凝固した血漿をはさみで細断し、13,000g, 4°C, で10分間遠心分離を行って血清を得た。この血清にフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) (終濃度1mM) とエチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸二ナトリウム (EDTA) (pH 7.0, 終濃度5mM) を加え、Sepharose 4Bカラムをプレカラムとするヘパリン-Sepharose 4Bカラムにかけた。通過画分を集め、尿素を最終濃度8Mまで加えて



Glycobiology of an extracellular matrix glycoprotein, vitronectin, during skin regeneration and repair

Haruko Ogawa

Graduate School of Humanities and Sciences and Glycoscience Institute, Ochanomizu University

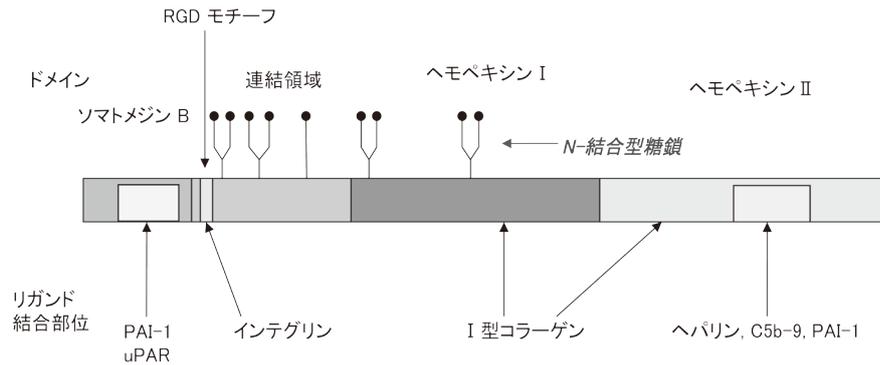


図1 ラットVNの一次構造とリガンド結合部位

溶解し、室温で2時間以上静置した。その後、8 M 尿素を含む0.13 M NaCl, PB-EDTAで平衡化したヘパリン-Sepharoseカラムに通過画分をかけ、平衡化溶液で洗浄、ついで10 mM 2-メルカプトエタノール (2-ME) を含む0.13 M NaCl, PB-EDTAをゲル体積の2倍以上流した後カラムを止め、2時間静置した。その後、同緩衝液で全量でゲル体積の5倍以上流した後に、0.5 M NaCl, Phosphate buffer (PB)-EDTAでヘパリン結合タンパク質を溶出した。さらに2.0 M NaCl, PB-EDTAで完全に溶出を行った。各フラクションについて280 nmにおける吸光度を測定することによりタンパク質の検出を行い、溶出ピークが現れている画分を集め、SDS-PAGEでVNの精製を確認した。回収した画分は透析によって尿素濃度、ついでNaCl濃度を下げ、最終的に0.13 M NaCl, PB-EDTAに対して透析し、タンパク質濃度をBCA法によって決定し、 -20°C で保存した。

3) 精製VNのグリコシダーゼ処理

①ノイラミニダーゼ (シアリダーゼ) 処理

精製VNを 4°C で50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) に対して透析し、 CaCl_2 を加えた (終濃度4 mM)。これをタンパク定量した後ノイラミニダーゼを加え (VN 0.8 mgに対し0.02 U)、 37°C で24時間消化したのち、TBSに対して透析した。

②N-グリコシダーゼF (PNGase F) 処理

精製VNを 4°C において0.13 M NaCl, PB-EDTAに対して透析し、N-グリコシダーゼFを加え (VN 0.3 mgに対し2 U)、 37°C で48時間消化したのちTBSに対して透析した。

4) 細胞接着伸展活性の測定

①細胞継代培養

生後3日目の新生マウスの皮膚より初代培養を行い、MDFを単離した。MDFとSwiss3T3細胞 (お茶の水女子大学宮本泰則准教授より提供) を以下の条件下で継代、培養を行った。

10% FBS, 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含むDMEM培地中で、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養し、継代は3-4日

ごとに0.25%トリプシン, 0.02% EDTA, PBS (5 mL/10 cm 径ディッシュ) を加えて 37°C 、5分間処理し、細胞を回収して行った。

②接着伸展実験

Adhesion medium: 攪拌しながら5 M NaCl, 1 M KCl, 1 M MgCl_2 , 0.5 M Na_2HPO_4 , 1 M KH_2PO_4 および1 M CaCl_2 を、MilliQに対してそれぞれ終濃度が150 mM, 3 mM, 0.5 mM, 6 mM, 1 mMおよび1 mMになるように順に加え、約1時間攪拌した。沈殿が生じていないことを確認してから $0.22\ \mu\text{m}$ 孔径のフィルター (Millex-GV, Millipore) でろ過し、以下の操作に用いた。

継代後の細胞浮遊液を室温で130 g, 3分間遠心後上清を捨てた。さらにAdhesion mediumを加えてよく懸濁したのち、再び130 gで3分間遠心し、上清を捨てた。この操作を2回行った後、Adhesion mediumを2 mL加え、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。 2.0×10^5 cells/mLとなるようにAdhesion mediumに懸濁し、これを細胞懸濁液とした。組織培養プレート (96穴) の各ウェルに2倍希釈液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を作成したVNを100 μL ずつ加え、 37°C で1時間以上あるいは 4°C で一晩固定化させた。組織培養プレートからVN溶液を排液し、細胞懸濁液を100 μL ずつ加え、 37°C 、5% CO_2 条件下で60-120分間インキュベートした。ピペットで各ウェルから50 μL ずつ液を吸引、排液し、ただちに12.3%パラホルムアルデヒド溶液を50 μL 加え、室温で30分以上固定した。ウェルをPBSで満たし、スライドガラスを乗せ、位相差顕微鏡で観察した。各ウェルで3視野ずつ、各視野ごとに細胞100個前後中の伸展している細胞数を数え、伸展率 (%) = 伸展細胞数 / 全細胞数を求めた。同一の培養細胞について少なくとも3回、異なる2回の培養細胞でそれぞれ実験を行った。

③細胞接着伸展形態の観察

滅菌したカバーガラス上に種々濃度のVNをコートし、洗浄後、細胞を播種し、 37°C 、5% CO_2 条件下で90分間インキュベートした。3.7%パラホルムアルデヒド溶液で20分間固定し、PBSで洗浄した。0.1% Triton X-100/リン酸緩衝液で5分間、透過処理を行い、PBS洗浄後、10% BSA

/PBSで室温にて60分間ブロッキングした。PBSにより洗浄後、1.5% BSA/PBSに溶解した抗ヘパリン硫酸抗体またはAlexa488-ファロイジンと室温、60分間反応させた。PBSにより洗浄後、10% BSA/PBSに溶解した二次抗体と反応させた。蛍光顕微鏡FSX-100（オリンパス）で観察、撮影した。

3. 結果

1) VN 上での MDF の細胞接着伸展活性

70% 肝切除手術 (PH)、コントロールとしての偽手術 (SH) を行い、術後24時間後のラット及び非手術 (NO) ラットから血漿を採取し、肝手術 (PH)・シャム手術 (SH)・非手術ラット (NO) の各精製VN基質上でのMDFならびにSwiss 3T3細胞の接着伸展率を測定した。その結果、肝切除後24時間のVN (PH-VN) 基質上では、NO-およびSH-VNに比べ、著しくMDFおよび3T3細胞の接着伸展が低下した (図2)。われわれは以前に、肝再生初期過程における各VNにはそれぞれ高シアル化された分子種と、相対的にシアル酸含量が低い分子種が存在し、PH-VNではいずれのシアル化も著しく減少することを見出した¹⁾ので、ノイラミニダーゼ処理したNO-VN上での初代培養MDFおよびSwiss3T3線維芽細胞の接着伸展率を測定したところ、いずれもコントロール処理の約7割以下に減少することが示された (データ示さず)。この結果は、ラット肝再生に重要な役割を担う肝星細胞の接着伸展が、NO-およびSH-VNと比較してPH-VN上で約1/2にまで減少し、VNのノイラミニダーゼ処理によっても同様に細胞接着伸展率が大きく減少したと一致した。よってMDFおよびSwiss3T3細胞ではラット肝星細胞と同様に、VNのシアル化糖鎖の減少による細胞生存の抑制が示唆された。

2) VN 上の糖鎖によるストレスファイバー形成への影響

VNのノイラミニダーゼ処理前後の変化から、MDF接着伸展率ばかりでなく、伸展した細胞の形状においても著

しく異なる状況を示唆された。そこで細胞骨格を形成するストレスファイバーの状態を比較した。ラット血漿からのVN精製量は少ないため、正常なブタ血漿から精製したVN (pVN) を用いて、ノイラミニダーゼ処理、またはN-グリコシダーゼ処理により糖鎖を除去し、各VN基質上で接着伸展したMDF細胞において、アクチンストレスファイバーをファロイジンにより染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

ノイラミニダーゼ処理pVN上では、未処理pVN上で伸展したMDF細胞と比較して、アクチンフィラメントの短小化と辺縁部への分布の変化、および伸展面積の有意な減少が見出され、ラメリポディア (糸状仮足) の形成が示唆された (図3上段)。このような伸展形態の変化から、細胞上のレセプターが異なる可能性が考えられた。以前の細胞伸展とシグナル伝達に関連するSaoncella⁸⁾ならびにHall⁹⁾らの研究報告より、図3下段に示すように、細胞のストレスファイバー形成と伸展状態の変化には、インテグリンとヘパリン硫酸プロテオグリカン (シンデカン) が関与している。これらはいずれもVNのレセプターであるが、シンデカン依存性なシグナル伝達と非依存性な伝達では、形成されるストレスファイバーの分布が異なることがSwiss3T3細胞を用いて示されている^{8,9)}。細胞の接着と移動が行われるためには細胞表面のインテグリンとシンデカンの相互作用が必要であるが、本研究結果から、VN上のシアル化の変化がこれらのシグナル伝達を調節する事が示唆された。一方、細胞のヘパラーゼ処理によって細胞表面のシンデカンのヘパリン硫酸鎖を酵素的に除去したり、ヘパリンを細胞に添加することによりVNとの相互作用を

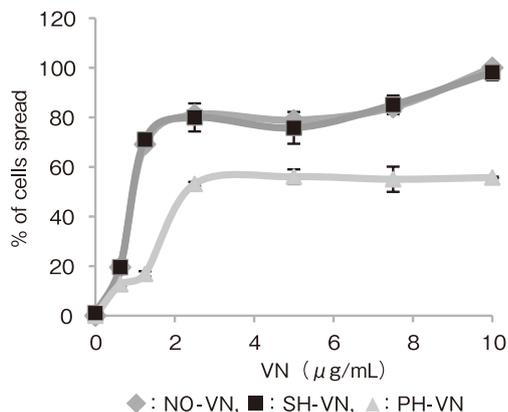


図2 肝切除 VN 基質上での MDF 接着伸展活性

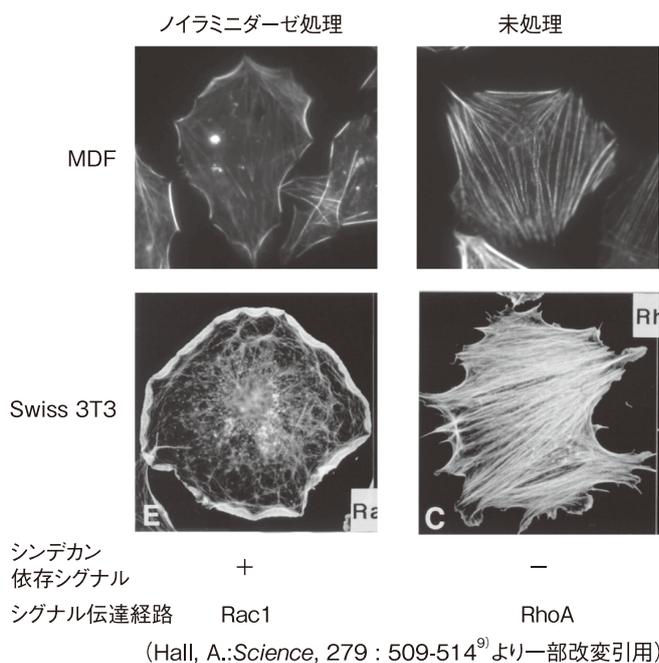


図3 VNのアシアロ化によるMDFのアクチンフィラメント形成への影響

阻害すると、pVN上でのMDFの伸展形態に逆の変化が認められ、シンデカン依存性シグナルの影響が弱まった（データ示さず）。組織修復時、VN糖鎖のシアリル化が低下すると、MDFの接着伸展に対するインテグリンとの相互作用を減弱する一方、シンデカンとの相互作用の寄与が相対的に高まる、すなわち細胞活性化をVNの糖鎖が調節する可能性が示唆された。Swiss3T3細胞についても同様の傾向が認められた（データ示さず）。

4. 考 察

本研究成果から肝再生におけるVNがその糖鎖変化によって、マウス皮膚組織の修復においても線維芽細胞の細胞外マトリックスへの接着など、組織修復の多段階を制御しうる可能性が示唆された。特に我々はMDFの生存シグナルとVNの糖鎖修飾の関連に着目し、次のことを明らかにした。

1. 肝再生初期過程においてVNではシアリル化の減少が起こる。この変化が肝星細胞（RSC）と同様に、MDFとSwiss3T3細胞の接着伸展活性を減少させた。組織再生時におけるVN糖鎖のシアリル化の程度が、RSCとMDFの生存につながる接着伸展、すなわちインテグリン活性化の調節に共通して重要であることが示された。
2. ノイラミナーゼ処理VNを基質としたMDF接着伸展時のストレスファイバーの形成状態は、コントロールVN上と比較してアクチン線維が短小化し、細胞伸展面積が小さく、ラメリポディアを形成することが示唆された。このことから、VNのシアリル化の低下により、VNで誘導される細胞内シグナルの下流で起こるアクチン系の細胞骨格の再構築や接着斑の形成を介したシグナル伝達経路に変化が生じていることが示された。VN糖鎖修飾、特にシアリル化が、細胞表面インテグリンとシンデカンとの相互作用による細胞活性化を調節する可能性が示唆された。

今後、本研究から得られた知見をもとに、皮膚組織修復に与える糖鎖によるVN機能の調節機構を、細胞移動性、増殖、線維増生の各段階についても研究する。細胞接着と細胞骨格形成のVN糖鎖による制御機構を明らかにすることで、ECM分子の糖鎖修飾という観点からの、皮膚再生の分子メカニズム解明と細胞接着異常による癌浸潤やケロイドなどの線維化疾患制圧への手がかりにつながることを期待される。

謝 辞

以上の研究は、お茶の水女子大学大学院自然応用科学系の宮本泰則准教授、大学院生でライフサイエンス専攻糖鎖情報研究室に所属する田邊美音らとの共同研究によるものです。また、コスメトロジー研究振興財団からは多大な

ご支援をいただき、心よりお礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Sano, K., Miyamoto, Y., Kawasaki, N., Hashii, N., Itoh, S., Murase, M., Date, K., Yokoyama, M., Sato, C., Kitajima, K., and Ogawa, H, Survival of Hepatic Stellate Cell during Liver Regeneration is Regulated by the Changes in Glycosylation of Rat Vitronectin especially the Decreased Hypersialylation. *J Biol Chem* **285**, 17301-09, 2010.
- 2) Kitagaki-Ogawa, H., Yatohgo, T., Izumi, M., Hayashi, M., Kashiwagi, H., Matsumoto, I., and Seno, N. Diversities in animal vitronectins. Differences in molecular weight, immunoreactivity and carbohydrate chains *Biochim. Biophys. Acta*, **1033**, 41-56, 1990.
- 3) Sano, K., Asanuma-Date, K., Arisaka, F., Hattori, S., and Ogawa, H, Changes in Glycosylation of Vitronectin Modulate Multimerization and Collagen Binding During Liver Regeneration. *Glycobiology*, **17**, 784-794, 2007.
- 4) Uchibori-Iwaki, H., Yoneda, A., Oda-Tamai, S., Kato, S., Akamatsu, N., Otsuka, M., Murase, Kojima, K., Suzuki, R., Maeya, Y., and Ogawa, H, The changes in glycosylation after partial hepatectomy enhance collagen binding of vitronectin in plasma. *Glycobiology* **10**, 865-74, 2000.
- 5) Sano, K., Yanagibashi, M., Hashii, N., Itoh, S., Kawasaki, N., Ogawa, H, Glycosylation and ligand-binding activities of rat plasma fibronectin during liver regeneration after partial hepatectomy. *Carbohydr. Res.*, **343**, 2329-2335, 2008.
- 6) Higgins, G.M. and Anderson, R.M, Experimental pathology of liver. I. Restoration of the white rat following partial surgical removal *Arch. Pathol.* **12**, 6-202, 1931.
- 7) Yatohgo, T., M. Izumi, H. Kashiwagi, and M. Hayashi, Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography *Cell Struct Funct* **13**, 281-92, 1988.
- 8) Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J.K., Mosher, D., Robinson, S.D., Hynes, R.O., Goetinck, P.F., Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 2805-2810, 1999.
- 9) Hall, A, Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514, 1998.

物質の輸送・代謝リズムの分子時計機構の解明と操作要因の開発

九州大学大学院薬学研究科薬剤学

大戸 茂弘

Mammalian circadian pacemaker resides in the paired suprachiasmatic nuclei (SCN) and influences a multitude of biological processes. Clock genes are the genes that control the circadian rhythms in physiology and behavior. Not only disease but also the effectiveness and toxicity of many drugs vary depending on dosing time. Identification of a rhythmic marker for selecting dosing time will lead to improved progress and diffusion of chronotherapy. The mechanisms underlying chronopharmacological findings should be clarified from viewpoint of clock genes. On the other hand, several drugs have an effect on molecular clock. Furthermore, to produce new rhythmicity by manipulating the conditions of living organs appears to lead to the new concept of chronopharmacotherapy. The knowledge of interactions between molecular clock and drug should be very useful for the clinical practice. In the present study, we demonstrated the circadian rhythm of CYP and transporter transcription in mice and in vitro cell culture system. Then we clarified the regulatory mechanisms underlying the rhythmicity of CYP and transporter transcription from viewpoints of molecular clock. Furthermore, we produced new rhythmicity by manipulating the conditions of living organs or culture cell by using rhythmic administration of altered feeding schedules or serum shock. The monitoring of rhythm and manipulation of rhythm from viewpoints of molecular clock are essential to improved progress and diffusion of chronopharmacotherapy. Therefore, we show the regulatory system of biological rhythm from viewpoints of clock genes and the possibility of chronopharmaceutics based on molecular clock.

1. 緒言

生体リズムは生物界に広く普遍的に存在する生命現象であり、近年、一連の遺伝子群（時計遺伝子）が約24時間周期で発現の増減を繰り返すことが、リズム発振の中心機構であることが明らかになってきた。哺乳類における生体リズム中枢（体内時計）は視床下部の視交叉上核に位置し、神経の活動やホルモン分泌、免疫機能など多くの生体機能の日周リズムを制御している。哺乳類における生体リズム中枢は、視神経が交差する視交叉上核(SCN; suprachiasmatic nucleus)に位置し、神経伝達物質や液性因子などを介して末梢組織における時計遺伝子の発現リズムを制御している(図1)。概日リズム発振の本体は、CLOCK、BMAL1を初めとする時計遺伝子間で起こる発現の促進、抑制によるフィードバック機構であることが明らかとなっている(図2)。すなわち、CLOCK/BMAL1の複合体がPeriod(Per)およびCryptochrome(Cry)遺伝子の各転写を促進する。産生されたPER、CRYの各蛋白質は複合体を形成し、CLOCK/BMAL1による自らの転写活性を抑制することにより、その遺伝子および蛋白質の発現に日周リズムが生じる。また、これらの時計遺伝子群は他の遺伝子の転写にも

関与しており、その発現をリズムカルに制御している。

一方、薬物の体内動態を規定する吸収・分布・代謝・排泄の各過程に関わる生体機能にも日周リズムが認められる。体内動態を規定する因子の一つであるトランスポーターは、生体内において、医薬品の輸送に関与しており、吸収、分布、排泄の各過程において重要な役割を担っている。小腸は経口投与された薬物の主な吸収部位であり、薬物の体内への移行を制限している。薬物の消化管吸収におけるトランスポーターの役割は大きく、消化管腔からの血中への移行や消化管腔への排出など薬物の膜透過に重要な役割を担っている。近年、マウスの小腸でのmdr1a/abcb1aおよびpepT1/slc15a1の発現は日周リズムを示すことが報告され、薬物の吸収にも影響を及ぼすことが指摘されている。しかしながら、これらトランスポーターの発現に何故日周リズムが生じるのか、その分子機構は解明されていない。一方、代表的な薬物代謝酵素であるP450(CYP)は大部分の医薬品の代謝に関与するため、薬物の体内動態を規定する重要な因子と位置づけられている。中でも、CYP3A4は薬物代謝への寄与が大きいこと、また、肝臓における含有量が最も多いことなどから高い注目を集めてきたが、ヒトにおけるCYP3A4の酵素活性にも日周リズムが認められることが報告された。しかしながら、その酵素活性の日周リズムの制御メカニズムは解明されておらず、CYP3A4の活性リズムと体内時計の分子機構とを結びつける因子の存在についても、何ら明らかにされていない。こうした状況の中で、時計遺伝子の機能と役割が生理学的側面より明らかにされつつあるが、今後の重要な課題として医薬品、化粧品、食品など社会応用があげられる。そこで本研究では、まず



Molecular clock mechanisms of transporter and metabolic enzyme and the manipulation of biological rhythm

Shigehiro Ohdo

Department of Pharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

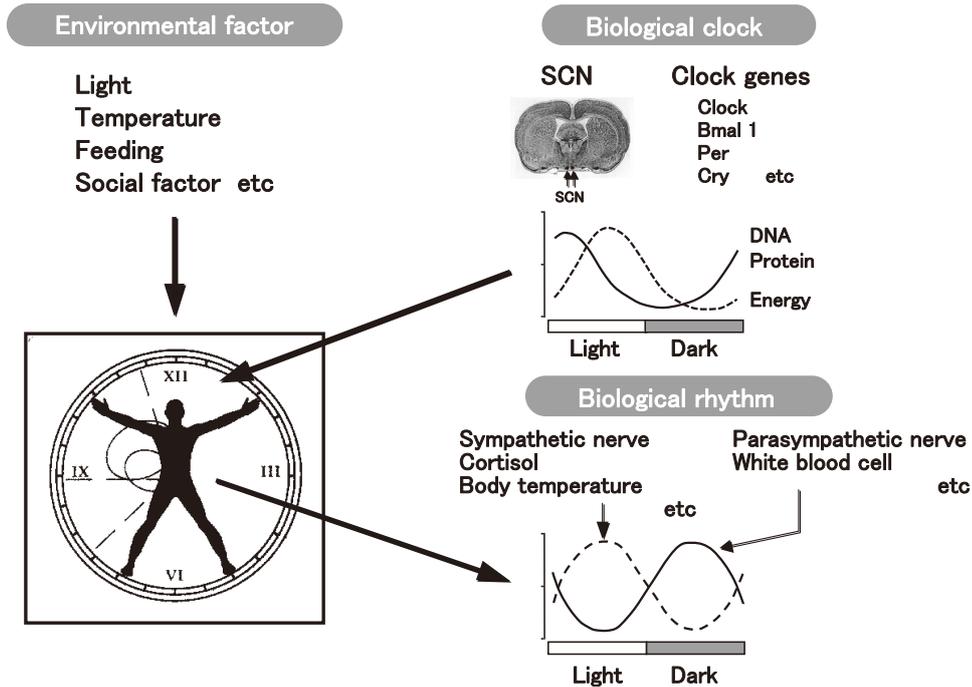


図1 生体リズムの制御図。生体には体内時計が存在し、その本体は視神経が交差する視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus、SCN) に位置し、時計遺伝子により制御されている。この機構により多くの生体機能や疾患症状に24時間周期のリズムが認められる。

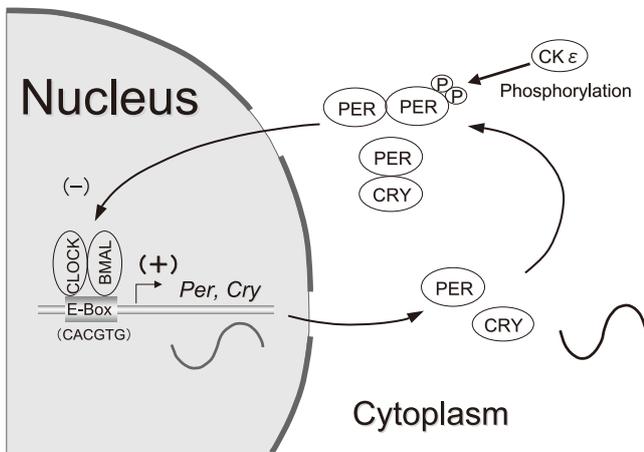


図2 哺乳類における体内時計の分子機構。時計振動遺伝子の転写は負のフィードバック機構で制御されている。例えば、Per 遺伝子の転写はポジティブ因子である CLOCK と BMAL1 のヘテロ二量体が Per 遺伝子上流に存在する E-box 配列 (CACGTG) に結合することによって活性化される。また Per 遺伝子産物がネガティブ因子となり、自らの転写を抑制する。

動物実験系で、物質の輸送・代謝リズムの分子時計機構を解明する。次に動物実験系および in vitro 細胞培養系で、物質の輸送・代謝リズムの分子時計機構の操作要因を開発する。なお本研究では、種々の分子について検討したが、mdr1a/abcb1a、CYP3A4、CYP2E1 などを中心に紹介する。

2. 実験

自由摂食摂水・明暗周期 (明期 : 07:00 - 19:00) 条件下で飼育した Clock 遺伝子変異マウス (Clk/Clk) および野生型 (Wild-type) マウスを対象に 09:00、13:00、17:00、21:00、01:00、05:00 の 6 時点に種々の細胞を採取した。物質輸送および代謝関連遺伝子および時計遺伝子を含む周期的に変動する遺伝子 mRNA の日周リズムを RT-PCR 法で測定する。物質輸送および代謝関連遺伝子リズムの存在と時計遺伝子リズムとの相互関連を明らかにする。mRNA の定量は、上記 6 時点において、Wild-type および Clk/Clk マウスから小腸を摘出後、DNA を抽出した。GAPDH を内部標準として、Real time RT-PCR 法により Abcb1a mRNA の相対的な発現量を測定した。ルシフェラーゼレポーター解析は、マウス Abcb1a 遺伝子の 5' 上流域を含むルシフェラーゼレポーターベクターを各時計遺伝子の発現ベクターと共に NIH3T3 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトから 24 時間後のルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。また、時計遺伝子応答配列を変異させたルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、同様の検討を行った。ゲルシフトアッセイは、マウス Abcb1a 遺伝子 5' 上流域における時計遺伝子応答配列およびその変異配列を含むビオチンラベル化 DNA プローブを合成し、各プローブと in vitro translational system を用いて合成した各転写因子 (HLF、E4BP4) を反応させ、ゲルシフトアッセイ法で各

転写因子の時計遺伝子応答配列への結合能を検討した。Small interfering RNAは、BLOCK-iTTM RNAi Designerを用いて、HLFおよびE4BP4に対するsiRNAを合成し、colon26細胞にトランスフェクトした。細胞を50%血清を含む培地に2時間曝露後、Abcb1a mRNA発現量の経時的变化をReal time RT-PCR法で測定した。ウエスタンブロットリングは、Wild-typeおよびClk/Clkマウスの小腸またはColon26細胞における、HLFおよびE4BP4のタンパク発現をウエスタンブロットリング法で測定した。クロマチン免疫沈降は、Wild-typeおよびClk/Clkマウスから小腸を摘出し、氷冷した1%パラホルムアルデヒド溶液に浸すことでタンパク-DNAのクロスリンクを形成させた。クロスリンクを形成させた小腸の組織片から核タンパクを抽出し、抗HLF抗体および抗E4BP4抗体を用いて、これら各タンパクと結合したDNA断片を免疫沈降法で精製した。各転写因子とDNAとの結合量は、PCR法で定量した。

次に、in vitroで物質輸送および代謝関連遺伝子の日周リズムの制御機構を検証した。数種の細胞を対象に50% horse serumを添加することにより時計遺伝子など周期的変動遺伝子のリズムを形成する。すなわち生体で認められるリズムをin vitroで再現する実験系を構築する。Serum shock後、経時的に細胞を採取する。上記の物質輸送、代謝、薬効関連遺伝子および時計遺伝子を含む周期的に変動する遺伝子のmRNAをRT-PCR法で測定し、物質輸送、代謝および薬効関連遺伝子リズムの存在と時計遺伝子リズムとの相互関連を明らかにする。

生体内環境の操作方法として、in vivoでは摂食条件、in vitroではserum shock、ステロイド shockを用いる。時計遺伝子を含む周期的に変動する遺伝子の中からリズム操作要因を抽出した。上記と同様の手法を用いて、in vivoおよびin vitroで要因の妥当性を検証した。コンフルエント状態のヒト由来肝癌細胞(HepG2)を、高濃度(50%)血清培地に2時間曝露させ、処置後経時的にRNAおよび蛋白を抽出した。RNAはTRIZOL試薬を用いて抽出した。GAPDHを内部標準とし、RT-PCR法により各遺伝子のmRNAの相対的な発現量を測定した。CYP3A4の酵素活性の測定は、P450-Glo™ Glo Assaysを用いて、高濃度血清処理後、経時的にCYP3A4の酵素活性を測定した。ヒトCYP3A4遺伝子の5'上流域の塩基配列を含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、各時計遺伝子の発現ベクターと共に、HepG2細胞にトランスフェクトした。トランスフェクト48時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。

自由摂食群は、自由摂食摂水、明暗周期(明期:07:00-19:00)条件下で2週間飼育した7週齢ICR雄性マウスを使用した。時間制限摂食群は、摂食時間(09:00-17:00)、自由摂水、明暗周期(明期:07:00-19:00)条件下で2週間飼育した7週齢ICR雄性マウスを使用した。タ

ンパク質量測定は、Western blotting法で測定した。mRNA量測定は、RT-PCR法により測定した。ルシフェラーゼ活性測定は、Mouse CYP2E1のpromoter領域を対象にHNF-1 α 及び時計遺伝子による影響を測定した。CYP2E1プロモーターへの転写因子結合測定は、クロマチン免疫沈降法で測定した。CYP2E1プロモーター領域における転写因子の相互作用は、ChIP再免疫沈降法で測定した。

培養細胞はヒト新生児線維芽細胞(NB1RGB)を、 α -MEM培地中、37°C、5% CO₂条件下で培養した。またヒトケラチノサイト細胞(HaCat)を、DMEM (high glucose)培地、37°C、5% CO₂条件下で培養した。50%血清刺激による時計遺伝子のリズムを再構築する目的で、NB1RGBを2 \times 10⁵ cells/wellになるように6 well plateに播種した。播種24時間後に無血清培地に交換し12時間培養した。その後50%血清培地に2時間曝露後、1%血清培地に交換し細胞内時計遺伝子のリズムを再構築した。細胞は、4時間ごと血清刺激後52時間にわたり回収した。mRNA量測定は、real time RT-PCR法およびRT-PCR法により測定した。

統計解析は、独立多群の比較には一元配置分散分析法(One-way ANOVA)およびTukey multiple comparison testを用いた。また、独立2群の比較にはStudent's t-testを用い、5%以下を有意な差とした。

3. 結果

Wild-typeマウスの小腸におけるAbcb1a mRNAの発現量は、明期後半から暗期前半にかけて高値を示す有意な日周リズムが認められた(図3)。一方、Clk/Clkマウスの小腸におけるAbcb1a mRNAの発現量には、有意な日周リズムは認められなかった。転写調節領域にE-boxやD-siteを有する遺伝子の多くは、時計遺伝子群によって構成されるフィードバックループ機構によって、その遺伝子発現に日

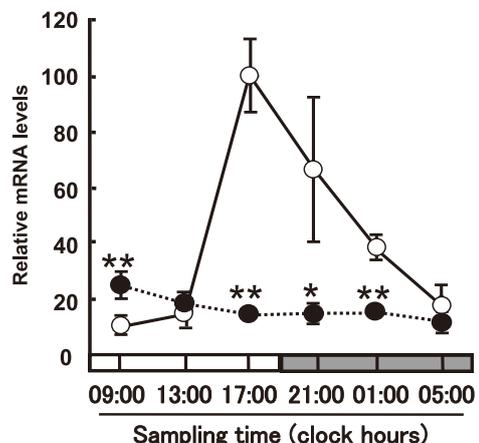


図3 マウス小腸細胞におけるAbcb1a mRNAの日周リズム。野生型マウス(○)のAbcb1a mRNAの発現は日周リズムを示したが、clock変異型マウス(●)のリズムは消失した。(N=3, mean \pm SE, 6時点P<0.01; ANOVA, **P<0.01: Tukey-Kramer's test)

周リズムが生じることが知られている。マウス *Abcb1a* 遺伝子の5'上流域約1,000bp内の塩基配列について解析を行ったところ、E-boxおよびD-siteが数カ所存在することが確認された。そこで、これら塩基配列を含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、その転写活性に及ぼす各時計遺伝子の影響について検討した結果、PAR basic leucine zipper (bZIP) 転写促進因子によって *Abcb1a* の転写活性は上昇し、その転写活性はPAR bZIP 転写因子のリプレッサーであるE4BP4によって抑制された。また、ゲルシフトアッセイによる解析の結果から、これらタンパクは、*Abcb1a* 遺伝子上のD-site 様配列に直接結合することで、その転写活性を制御している可能性が示唆された。また、マウス小腸におけるHLF、E4BP4の蛋白発現量の経時的变化をウエスタンブロットング法で検討した結果、HLFの発現リズムは *Abcb1a* mRNA と同位相を、E4BP4発現リズムは逆位相を示した。さらに、クロマチン免疫沈降による解析の結果、*Abcb1a* mRNA の発現量が低下する時間帯にE4BP4のプロモーター領域への結合量の増加が認められた。これらの結果から、マウス小腸における *Abcb1a* 遺伝子の発現は、HLFとE4BP4の働きによりリズムミカルに制御されていることが示唆された。すなわち、CLOCK、BMAL1、PER、CRYにより構成されるフィードバックループ機構により、HLFおよびE4BP4タンパクの発現にはそれぞれ逆位相の日周リズムが生じる。*Abcb1a* 遺伝子は、これらPAR bZIPタンパクの発現リズムにより、転写の「促進」と「抑制」の切り替え調節を交互に受ける結果、その発現に日周リズムが生じると考えられた。

高濃度血清処理後の HepG2 細胞内における Bmal1、Per2、Dbp および E4bp4 の各時計遺伝子の発現量は経時

的に変化し、それぞれ約24時間周期のリズミカルな変動を示した。また、同一条件下において、CYP3A4 遺伝子の mRNA の発現量およびその酵素活性にもそれぞれ24時間周期の変動が認められ、本酵素活性の日周リズムは転写レベルで制御されている可能性が示唆された(図4)。転写調節領域にE-box(CANGTG)やD-site(TTA[C/T][A/G]TAA)を有する遺伝子の多くは、時計遺伝子群によって構成されるフィードバックループ機構によって、その遺伝子発現に日周リズムが生じることが知られている。ヒトCYP3A4遺伝子の5'上流域約1,800bp内の塩基配列について解析したところ、E-boxおよびD-siteが数カ所存在することが確認された。そこで、これら塩基配列を含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、その転写活性に及ぼす各時計遺伝子の影響について検討した結果、CYP3A4遺伝子の転写活性リズムはDBPおよびE4BP4の各時計遺伝子により、制御されていることが明らかになった。また、この転写活性の調節には5'上流域-45~-38bp内に存在するD-site配列が重要な役割を担っている可能性が示唆された。同様の所見は、高濃度血清処理した培養 colon26細胞においても、*Abcb1a* mRNA の発現量に約24時間周期のリズミカルな変動が認められた。すなわち、高濃度血清処理した培養 colon26細胞においても、*Abcb1a* mRNA の発現量には約24時間周期のリズミカルな変動が認められた。しかしながら、siRNA法によってHLFまたはE4BP4の各タンパクの発現を抑制した細胞では *Abcb1a* mRNA の発現リズムは観察されず、本遺伝子の発現リズムの形成にHLFとE4BP4とが関与していることが示唆された。

マウスの肝臓において、CYP2E1活性およびmRNA発現量に日周リズムが認められた(図5)。その機序としHNF-1 α が転写促進因子とし作用し、時計遺伝子(CRY1)

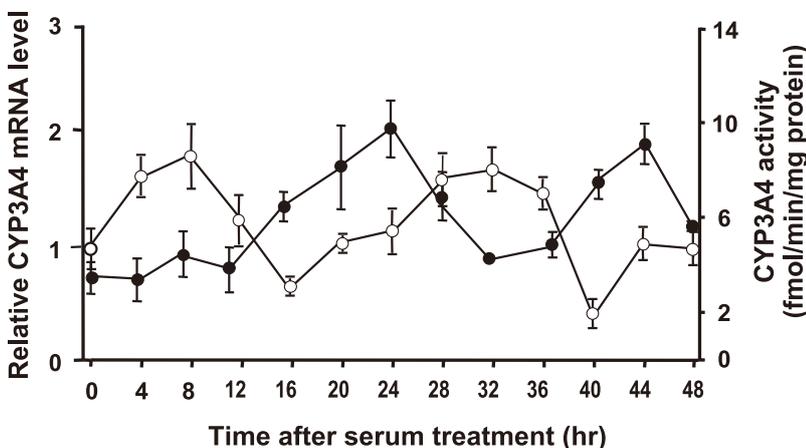


図4 高濃度血清刺激後の HepG2 細胞における CYP3A4 の mRNA (○) および酵素活性 (●) のリズム。(N=3, mean±SE, P<0.01; ANOVA)

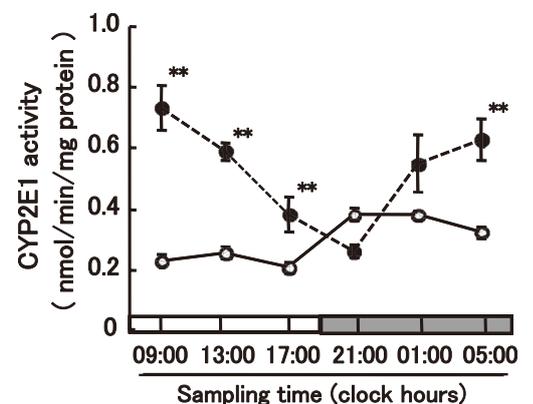


図5 マウス肝臓における CYP2E1 mRNA の日周リズムに及ぼす摂食条件の影響。自由摂食時 (○) に認められる CYP2E1 mRNA の日周リズムは、時間制限摂食 (●) によりリズムの位相が大きくシフトした。(N=10, mean±SE, 6時点 P<0.01; ANOVA, **P<0.01: Tukey-Kramer's test)

が転写抑制因子として作用していることが示唆された。これらのリズムは、時間制限摂食でも認められたが、互いにはほぼ逆位相を示した。

50%血清刺激後のヒト新生児線維芽細胞およびヒトケラチノサイト細胞における時計遺伝子のmRNA発現リズムを測定した結果、約24時間を周期とするリズムカルな発現変動を示すことが明らかとなった(図6)。また酵素やトランスポーターにも約24時間を周期とするリズムカルな発現変動が認められ、時計遺伝子の発現リズムとの関連が示唆された。以上の結果より、50%血清刺激後の1%血清培地存在下で培養した細胞においては、細胞内の時計遺伝子リズムの再構築に成功した。他の酵素およびトランスポーターについても同様の所見が認められた。

4. 考察

本研究ではマウスを対象に、CYPやトランスポーターに日周リズムが存在することを明らかにした。その機序として時計遺伝子が関与していることを明らかにした。またClock遺伝子の変異マウスにおいてはそれら各遺伝子の発現リズムが消失することを見出した。マイクロアレイを用いた解析結果などからPAR bZIP 転写因子は、薬物動態に関与する多くの遺伝子の発現制御に関与していることが指摘されていたが、本研究における解析の結果から、それら転写制御因子によるCYPやトランスポーターの遺伝子の発現リズム制御メカニズムが明らかになった。例えば、マウス小腸におけるAbcb1a 遺伝子の発現は、HLFとE4BP4の働きによってリズムカルに制御されていることを明らかにした。現在までに、投薬時刻によって体内動態に変化が生じる薬物が複数知られているが、その中には今回検証したCYPやトランスポーターの基質となるものも

含まれている。本研究で明らかになったCYPやトランスポーター発現リズムの制御メカニズムは、投薬時刻の違いによる体内動態の変動の原因の理解のみならず、それら薬物の至適投薬タイミングを設定する上で重要な知見となりうると思われる。

次に、本研究では、ヒト培養細胞を用いた生体リズムの再構築を試み、CYPやトランスポーターのリズムの調節メカニズムを解明することに成功した。例えば、ヒトCYP3A4の活性リズムは転写レベルで制御され、その遺伝子発現はD-siteを介して時計遺伝子であるDBPとE4BP4とによってリズムカルに制御されていることが明らかになった。これらの結果から、CYP3A4の基質薬物を用いて治療を行う際には、体内時計の分子機構に基づいた至適投薬タイミングを設定することで、より効率的な治療が可能になることが示唆された。また、本研究で構築されたヒト培養細胞でのリズム評価系は、これまで困難であったヒトにおける生体リズム研究の分子レベルでの進展にも寄与できるものと考えられた。さらに、摂食条件を操作することにより、CYPやトランスポーターの日周リズムをコントロールできる可能性が示唆された。同様に、皮膚培養細胞を用いた検討においても時計遺伝子の発現に約24時間を周期とするリズムカルな発現変動が認められた。また酵素やトランスポーターの発現にも約24時間を周期とするリズムカルな発現変動が認められた。これらのことから、皮膚細胞においても高血清処理により生体リズムを再現し、リズムを操作できることが明らかとなった。

本研究により、体内時計の分子機構の所見を効率よく化粧品品の適正使用に応用するためのリズム診断法、リズム操作法を開発できる可能性が示唆された。また生命体がうまく機能していくうえで最重要と考えられている「生体のホメオスタシス機構の維持」に大きく貢献できるものと考えられる。

5. 謝辞

本研究はコスメトロジー研究振興財団の研究助成により行われました。心より感謝申し上げます。また研究の進展にご協力を頂きました共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

(文献)

- 1) Ohdo S: Chronotherapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62: 859-875, 2010.
- 2) Ohdo S, Koyanagi S, Matsunaga N: Chrono-drug-delivery focused on biological clock: Intra- and inter-individual variability of molecular clock. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62: 885-897, 2010.

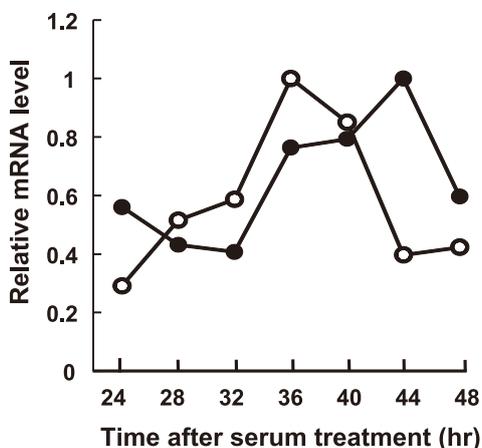


図6 高濃度血清刺激後のヒト新生児線維芽細胞 (NB1RGB) における時計遺伝子 (○; hBmal1, ●; hPer1) のmRNAの発現リズム。(N=3、mean、P<0.01; ANOVA)

遺伝子改変動物を用いた脂肪酸受容体の皮膚における作用の検討

京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学分野

平澤 明

Free fatty acids are not only essential nutritional components but they also function as signaling molecules. By utilizing the human genome database and G-protein-coupled receptor (GPCR) deorphanizing strategy, we successfully identified multiple receptors for free fatty acids (FFAs) which have been proposed to play a critical role in various components of metabolic regulation. Among the FFA receptors, we previously showed that GPR120, which is expressed in large intestine, adipose tissue, lung and skin, functions as a receptor for unsaturated long-chain FFAs such as alpha-linolenic acid (α -LA). We also developed specific antibody against the extracellular domain of GPR120 and GPR40, respectively. We also found that GPR120-deficient mice were obese with high-fat diet feeding, suggesting that GPR120 plays an important role in lipid metabolism. Furthermore, we have been able to use these antibodies to describe for the first time and in detail the expression and localization of the GPR120 protein in a number of mouse tissues; skin, lung, large intestine and adipose tissue. This anti-GPR120 antibody and selective ligand should prove useful for further analysis of the physiological role of fatty acid receptor GPR120 in skin.

1. 緒言

脂肪酸は、栄養成分として非常に重要であるのみならず、生体内での情報伝達にも重要な役割を果たすことが明らかとなっている。生体内の脂肪酸制御メカニズムとしては、細胞外の脂肪酸を細胞内へ輸送するトランスポーター、細胞内の脂肪酸結合タンパク質、核内受容体群の研究が従来から進められてきた。最近、我々を含む複数のグループにより、7回膜貫通型受容体の中に、細胞膜表面に発現し脂肪酸を検知することで生理機能の調節に重要な役割を果たす脂肪酸受容体群 (GPR120, GPR40, GPR41, GPR43) の存在が明らかにされた (Table 1)¹⁾。我々は特に脂肪酸受容体GPR120に関して、リガンドの発見から、生理機能の解明までを系統的に研究を進めてきた²⁾。また、リガンドが類似する脂肪酸受容体として、GPR40も見出されたため、これと比較しつつ、解析を進めている。その過程でGPR120が、皮膚組織および毛根の周辺に存在することを見出した。皮脂成分は、表皮中の細菌等による代謝により、水解され脂肪酸として存在する成分も多いため十分高い局所濃度になる可能性がある。従って、脂肪酸受容体が生理的に機能する可能性は十分ありうる。本研究では、皮膚表皮および、毛根に発現する脂肪酸受容体GPR120の生理機能の詳細を明らかにし、コスメトロジーにおける新たな役割を見出し、貢献することを目的とする。

2. 実験

動物：GPR120受容体の生体内での機能解析を目的として、GPR120をノックアウトしたマウスをgene targeting法を用いて作製した。

抗体の作製：マウスGPR120受容体細胞外第2ループ内の26アミノ酸 (177-202アミノ酸) にあたるペプチドに、キャリアタンパク質としてKeyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を付加したものをrabbitに免疫し、その血清から抗体を精製した。抗体の反応性はELISAにより確認した。

GPR120発現細胞の作製：N末端にFLAGタグを付加したマウスGPR120受容体 (以下FLAG-mGPR120) の発現ベクターを作製し、HEK293細胞に一過性に発現させた。

抗GPR120抗体の評価：FLAG-mGPR120発現HEK293細胞を用いた、免疫沈降、ウエスタンブロットティング、フローサイトメトリー、及び免疫染色により本抗体の特異性評価を行った。

組織分布：各組織のRNAについて、RT-PCRにより、発現解析を行った。また、GPR40、GPR120特異体抗体^{3, 4)}を用いて免疫組織染色を行い、局在を解析した。GPR120 mRNAの発現が報告されている肺において抗GPR120抗体による免疫染色を行うために、GPR120野生型マウス及びGPR120欠損型マウスから上記各組織のパラフィン切片を作製し、DAB染色を行った。肺組織においては、肺サーファクタント分泌細胞であるクララ細胞特異的な抗体である抗CC10抗体と抗GPR120抗体との連続切片染色を行った。マウス皮膚組織は表皮、真皮、皮下組織を毛乳頭を含めて切片を作成し、免疫染色により観察を行った。

表現型解析：通常食及び高脂肪食の給餌状態で野生型と遺



Role of free fatty acid receptor GPR120 in skin

Akira Hirasawa

Kyoto University Graduate School of Pharmaceutical Sciences Department of Genomic Drug Discovery Science

Table 1 Free fatty acid receptors family

| Nomenclature | <i>GPR120</i> | GPR40 | GPR41 | GPR43 | GPR84 |
|--------------------|--|--------------------------|--|--|----------|
| Agonist(FFA) | <i>Medium-long</i> | Medium-long | Short Chain, | Short Chain, | Medium |
| G protein coupling | <i>Gq/11</i> | Gq/11 | Gi/o | Gq/11,Gi/o | Gi/o |
| Expression | <i>Colon</i> <i>Adipose tissue</i> Macrophage | Pancreatic β -cell | Adipose tissue Colon <i>Ganglion</i> | Adipose tissue Colon Neutrophils | Spleen |
| Physiological role | <i>GLP-1 secretion</i> <i>Adipose differentiation</i> | Insulin secretion | Leptin production <i>Peripheral nerve control</i> | Adipose differentiation Immune response | IL-12p40 |

伝子欠損マウスの体重の推移を比較した。さらに、白色脂肪組織について、ヘマトキシリン・エオシン染色法及び組織免疫染色法で染色、観察した。

3. 結果と考察

GPR120は中鎖遊離脂肪酸をリガンドとするGタンパク質共役型受容体(GPCR)であり、その生理機能は現在判明している腸管からのGLP-1分泌促進だけでなく、脂質代謝調節など多岐に渡ると推定される。今回我々はGPR120ノックアウトマウスの脂肪組織、肺及び皮膚について組織レベルおよび細胞レベルで観察し、野生型と比較した。

これまでの研究により、GPR120のmRNAは大腸、肺および脂肪細胞に強く発現することが確認されたが、タンパク質レベルでの検出、解析はほとんど行われていない。まず、我々はGPR120受容体に対する抗体を作製し、その特異性を免疫沈降、ウエスタンブロットティング、フローサイトメトリー、及び免疫染色によって確認した。

トランスフェクションにより一過性にFLAG-mGPR120を発現させたHEK293細胞の可溶画分を抗GPR120抗体または抗FLAG抗体により免疫沈降、引き続き同抗体によりウエスタンブロットティングを行った。その結果、単量体と考えられる約35kDa、二量体と考えられる約70kDa、及び多量体と考えられるスミアなバンドを検出した。さらに、抗GPR120抗体によるフローサイトメトリーおよび免疫細胞染色においても、対照細胞と比較し、GPR120発現細胞で強い蛍光シグナルの検出に成功した。これらの実験により、本抗体は免疫沈降、ウエスタンブロットティング、フローサイトメトリー、細胞免疫染色に用いることが可能であることを確認した⁴⁾。

GPR120ノックアウトマウスの皮膚および白色脂肪組織、肺、腸管について組織レベルで観察し、野生型と比較した上で組織分布を調査した。肺組織を解剖により単離し、組織切片を作製した。これらの標本について、ヘマトキシリン・エオシン染色法で染色した後観察した(Fig.1A)。肺

の組織像については野生型とGPR120ノックアウトマウスの間に顕著な差は見られなかった。免疫染色により、マウス肺においては、GPR120は終末気管支の上皮細胞に発現していることを初めて同定した。さらに、肺サーファクタント分泌細胞であるクララ細胞特異的な抗体である抗CC10抗体との連続切片免疫染色により、GPR120はクララ細胞に特異的に発現していることが示された。

また脂肪細胞においては、GPR120は大半の細胞膜上に強く発現していることを見出した。GPR120ノックアウトマウスおよび野生型の体重を、通常食の給餌時と高脂肪食の給餌時において生後5週間から16週間までの体重の推移を比較したところ、通常食を給餌している状態では野生型とGPR120遺伝子欠損マウスの間に有意な差は観察されなかった。しかし、高脂肪食を給餌して同様に比較したところ、野生型と比べ、GPR120遺伝子欠損マウスでは顕著かつ有意な体重の増加が認められた。これは、脂肪の蓄積によるものであった。また、脂肪細胞径の増加、マクロファージの浸潤も認められた(Fig.1B)。

さらに、皮膚組織についてRT-PCRを行い、皮膚にGPR120が発現していることを確認した(Fig.2A)。免疫染色により、GPR120は毛乳頭付近に特異的に発現していることを同定した(Fig.2B)。毛乳頭細胞は毛髪の伸長に関わる細胞であることから、GPR120は毛髪の伸長に関与している可能性がある。皮膚組織については形態上顕著な差は認められなかった。

4. 総括

皮膚においてGPR120が発現していることをRT-PCRにより確認し、免疫染色によってGPR120は毛乳頭付近に特異的に発現していることを同定した。毛乳頭細胞は毛髪の伸長に関わる細胞であることから、GPR120は毛髪の伸長にも関与している可能性がある。また最近、脂肪酸受容体であるGPR120が脂肪センサーとして正常に機能することで、脂質生合成調節を通じて体内のエネルギーバランスを保っていることを明らかにした。この成果はNature誌

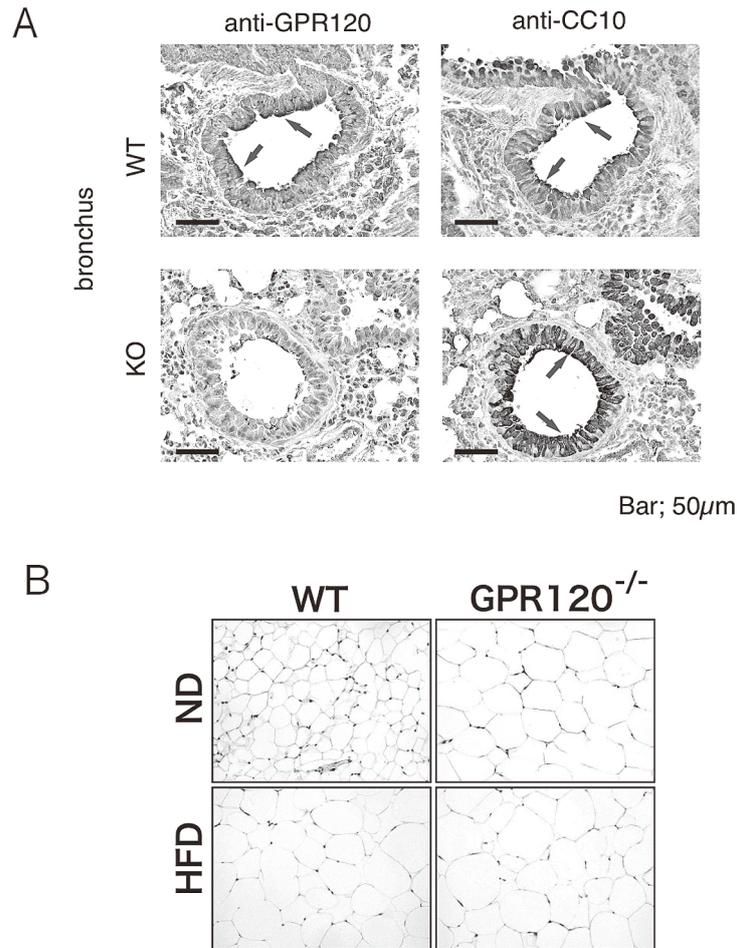


Fig. 1 A Immunohistochemical staining of sections of the lung of GPR120^{+/+} and GPR120^{-/-} mouse with antibodies against GPR120 and CC10.
 B H&E staining of epididymal white adipose tissue from 16-week-old GPR120^{-/-} or wild-type (WT) mice fed a standard diet or 16-week-old mice fed a high-fat diet.

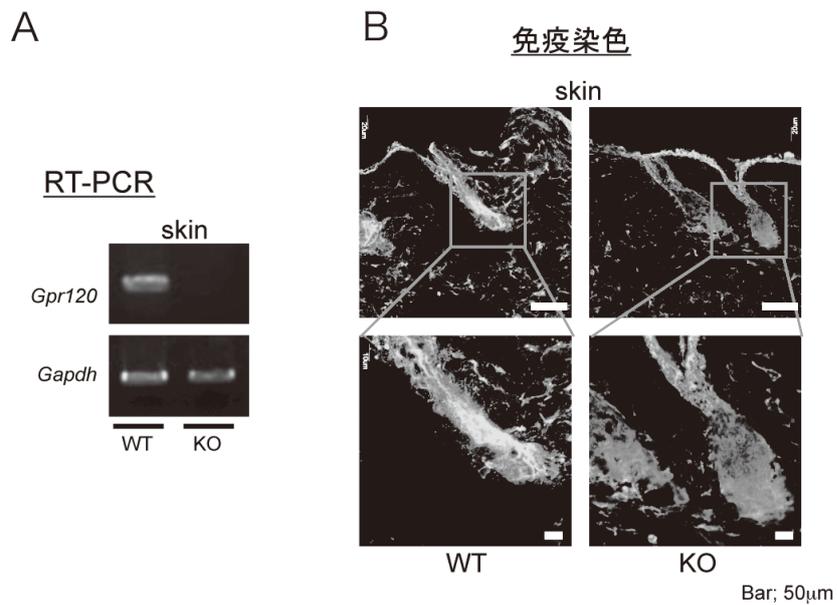


Fig. 2 A RT-PCRにより、skinにGPR120が発現していることを確認した。
 B 免疫染色により、GPR120は毛乳頭付近に特異的に発現していることを同定した。

に掲載された⁵⁾。

肺および皮膚では、現在のところ野生型に対して顕著な変化は観察できていないが、アレルギー感作時などでの検討によって、今後未知の機能が明らかになることが期待される。今後、ノックアウトマウスを用いた更なる解析と、特異的な化合物の開発とを組み合わせることにより、詳細な生理機能が明らかにされ、特に皮膚における機能を明らかにできるはずである。

5. 謝 辞

本研究を実施するにあたり、ご支援いただいた財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

(参考文献)

- 1) Hirasawa A, Hara T, Katsuma S, *et al.*, : Free fatty acid receptors and drug discovery, *Biol Pharm Bull.*, 31, 1847-1851, 2008.
- 2) Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, *et al.*, : Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120, *Nat Med.*, 11, 90-94, 2005.
- 3) Hirasawa A, Itsubo C, Sadakane K, *et al.*, : Production and characterization of a monoclonal antibody against GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1), *Biochem Biophys Res Commun.*, 365, 22-28, 2008.
- 4) Miyauchi S, Hirasawa A, Iga T, *et al.*, : Distribution and regulation of protein expression of the free fatty acid receptor GPR120, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 379, 427-434, 2009.
- 5) Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, *et al.*, : Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human, *Nature.*, 483 (7389), 350-354, 2012.
- 6) Gotoh C, Hong Y H, Iga T, *et al.*, : The regulation of adipogenesis through GPR120, *Biochem Biophys Res Commun.*, 354, 591-597, 2007.
- 7) Suzuki T, Igari S, Hirasawa A, *et al.*, : Identification of G protein-coupled receptor 120-selective agonists derived from PPARgamma agonists, *J Med Chem.*, 51, 7640-7644, 2008.
- 8) Hara T, Hirasawa A, Sun Q, *et al.*, : Flow cytometry-based binding assay for GPR40 (FFAR1; free fatty acid receptor 1), *Mol Pharmacol.*, 75, 85-91, 2009.
- 9) Hara T, Hirasawa A, Sun Q, *et al.*, : Novel selective ligands for free fatty acid receptors GPR120 and GPR40, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 380, 247-255, 2009.
- 10) Sun Q, Hirasawa A, Hara T, *et al.*, : Structure-Activity Relationships of GPR120 Agonists Based on a Docking Simulation, *Mol Pharmacol.*, 78, 804-810, 2010.

皮膚表皮でのナノマテリアルの動態と免疫応答の可視化 —ナノマテリアルに対する新たな安全性評価法の確立に向けて—

大阪大学免疫学フロンティア研究センター

藤井 文彦

Nanomaterials have been used in various fields, such as cosmetic products. The skin, as the primary interface between the body and the environment, provides the first line of defense against pathogens. We are especially interested in the motion of nanomaterials in the skin. In addition to three dimensional (3D) motion of nanomaterials, their rotational motion is also crucial to reveal their dynamics in tissue. To track nanomaterials at single particle level, first, we synthesized fluorescent probes based on semiconductor nanocrystals. In previous period, we reported on rod-shaped nanocrystals, quantum rods (QRs), for rotational measurement. In present period, we have developed a system that combines nanometry and nanomaterial science to simultaneously measure 3D and rotational motion. Then, we demonstrated simultaneous 3D and rotational single particle tracking of membrane receptors, CD36, in freshly isolated macrophages. The receptors were tracked three dimensionally at nanometer accuracy and had their relative orientations determined simultaneously. The combined technology presented here will be able to provide new information on motion and function of various nanomaterials in tissue, such as skin.

1. 緒言

近年、ナノメートルサイズの物質を用いた化粧品やその他の製品が数多く存在し、日常的にナノマテリアルに接する機会が増えている。様々なナノマテリアルを化粧品に利用していくためには、ナノマテリアルと生体間、特に皮膚組織との相互作用を観察し、理解しなければならない。詳細なナノマテリアルの体内動態と分子間相互作用を把握するためには、高い時空間分解能をもった観察法を利用することが必要である。光を使った生体イメージングは、光の回折限界や生体分子による多重散乱の問題を伴うものの、生体分子や生きた細胞のダイナミクスを観るための強力な手法である。量子ドット (QD) を含むナノメートルサイズの半導体ナノ結晶は、蛍光タンパク質や色素の弱点を克服できる次世代の蛍光イメージング用プローブである。本研究では、光イメージング法と半導体ナノ結晶を用いて、ナノマテリアルの動態とそれに対する免疫応答を皮膚表皮で明らかにし、化粧品の安全性に関する新たな評価法を提案することを目的としている。上記の目的のために、去年度はシリカ被覆ナノ粒子や超高輝度ナノ粒子に加えて、回転運動を可視化するために棒状の半導体ナノ結晶、量子ロッド (Quantum rod: QR) を合成した。今年度は特にこのQRに注目して、ナノ粒子の回転運動の可視化を1粒子精度で行った。1例として、免疫細胞の膜上受容体をQRで標識し、受容体の回転運動を可視化することに成功した。

将来的には、本技術を2光子顕微鏡などの小動物観察用顕微鏡に応用することによって、皮膚組織におけるこれまでに無い観察法を提案したい。

2. 実験方法

2.1 量子ロッド (Quantum rod: QR) の合成

QRはコア (CdSe) とシェル (CdS) から成る半導体のナノ結晶である。コアの合成は、tri-*n*-octylphosphine oxide (TOPO)、octadecylphosphonic acid (ODPA)、cadmium oxide (CdO) および Tri-*n*-octylphosphine (TOP) の混合溶液を、窒素ガス雰囲気下で370℃まで加熱し、TOPに溶解したSeを加えて行った。得られたCdSeのナノ結晶と、TOPO、ODPA、hexylphosphonic acid (HPA)、CdOが入った溶液の温度を350℃に保ち、TOPに溶解したSを加えてコアの周りにシェル構造を成長させた。

2.2 グルタチオン被覆 QR (Glutathione coated QR: GSH-QR) の合成

還元型グルタチオン (Glutathione: GSH) を用いて、以下の手順でQRを被覆した。QR溶液からクロロホルムを除いた後、QRをテトラヒドロフラン (Tetrahydrofuran: THF) に溶解した。GSH水溶液をQR溶液に加えて混合した後、70℃まで温度を上昇させた。混合溶液が2層に分離することを確認した後、遠心操作を行ってGSH-QRを回収した。得られたペレットに蒸留水を加えた後、カリウムブトキシド (Potassium *t*-butoxide: KOBu_t) を加えることによって半透明のGSH-QR溶液を得た。

2.3 抗体付加 QR (Monoclonal antibody conjugated QR: mAb-QR) の合成

まず、GSH-QRの細胞膜への非特異的な吸着を抑制するために、以下の手順でGSHのアミノ基にPEGを付加した。



Visualization for movement of nanomaterials and immune responses to them in epidermis
—Toward establishment of a new safety evaluation method for nanomaterials—

Fumihiko Fujii

WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University

GSH-QR 溶液にクロスリンカー試薬として sulfo-SMCC を加えた後、続いて PEG-SH を加えて室温で 2 時間反応させた。

次に、GSH のカルボキシル基に以下の手順で抗 CD36 抗体を付加した。GSH-QR 溶液にクロスリンカー試薬として EDCSulfo-NHS を加えた後、続いて抗 CD36 抗体を加えて 4℃ で一晩反応させた。最後に PEG-NH₂ を加えることによって、未反応のカルボキシル基を終端した。

2.4 QR の物性評価

QR 溶液の蛍光スペクトルと量子収率は、それぞれ蛍光光度計 (FP-6200, Jasco) と絶対量子収率測定装置 (C10027, Hamamatu photonics) を用いて測定した。QR の形状は、カーボン支持膜がコートされた銅製グリット上に QR 溶液を載せて乾燥させた後、transmission electron microscope (H-800, Hitachi) を用いて観察した。GSH-QR の水和半径と GSH-QR への抗体の付加の評価は、それぞれ Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) と compact FCS 装置 (C9413-01MOD, Hamamatsu Photonics K.K., Japan) を用いて行った。

2.5 マクロファージの単離と観察

腹腔由来のマクロファージは、6-10 週例の C57BL/6 マウスから採取した。採集したマクロファージは、 1.0×10^5 cells/well の密度で 8-well LabTek chambers (Nalge Nunc International, Rochester, NY) に培養した。mAb-QR を加えた後のマクロファージの観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus) で、473nm の励起光と 575-675nm の検出用フィルターを用いて行った。

2.6 回転と 3 次元運動観察用の顕微鏡の構築

回転運動および 3 次元運動を同時に観察するための顕微鏡は、IX-71 (Olympus)、対物レンズ (Olympus 60X PlanApo, 1.45NA, oil)、リレー光学系 (GA01, G-angstrom, Japan)、CCD カメラ (EM-CCD, Ixon DV887, Andor Technology plc., UK)、レーザー (J050BS-18-11-11, Showa optronics Co., Japan) を用いて構築した。

回転運動を解析するために、観察対象からの蛍光を偏光ビームスプリッターを用いて分離し、3 次元運動を解析するために、分離した信号を凸型および凹型のレンズペアに通し、信号を CCD カメラに導いた。

3. 結果と考察

3.1 QR, GSH-QR, mAb-QR の特性

量子ロッド (QR) は、量子ドット (QD) と同じく半導体元素からなるナノサイズの結晶である^{1), 2)}。QD と同様に高輝度で光退色に耐性があり、サイズを変化させることに

よって発光波長を nm ステップで変えることが出来る。したがって長時間このナノ結晶を生体中で追跡することが可能であり、多色の光イメージングにも適している。QD に似た特性に加えて、QR は細長い形状をしているため偏光特性をもっており、QR で標識した生体分子の回転情報、つまり方向を知ることができる。このナノマテリアルを使って、皮膚表皮からのナノマテリアルの取り込みを、3次元でトレースするだけでなく、回転情報を交えた詳細な情報を得ることができる。そこで、QR を作製し、その特性を調べた。

QR はコア (CdSe) とシェル (CdS) から成る構造をしており、コアの周りにシェルを一定方向に伸長させることによって得られる。得られた QR を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察したところ、幅は平均 4nm、長さは 50nm であり、縦横比 (Aspect ratio: AR) は 13 だった (Figure 1)。AR が 5 以上のときは偏光度は 0.6 以上となることから²⁾、得られた QR の 99% 以上が 0.6 以上の偏光度をもつことが示唆された。

得られた疎水性 QR を水溶化するために、トリペプチド鎖の 1 種である還元型グルタチオン (GSH) を用いて QR

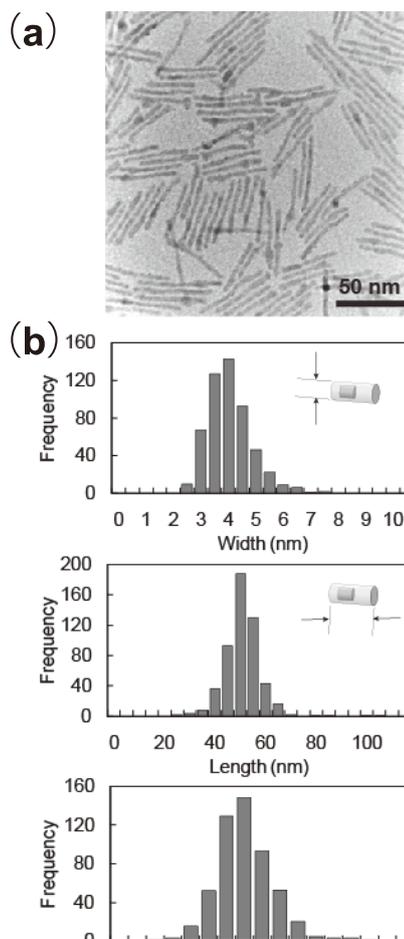


Figure 1 (a) TEM images of QRs. (b) Distribution of width (upper panel), length (middle panel) and aspect ratio (lower panel) of QRs.

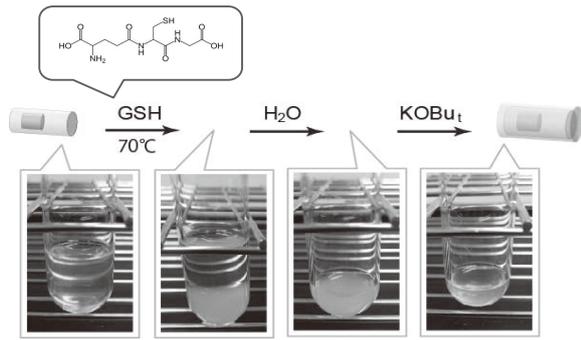


Figure 2 Schematic representation for the preparation of GSH-QRs. Four pictures show that QRs in tetrahydrofuran (THF) (leftmost), after adding of GSH and heating at 70°C (second from left), in water (second from right) and after adding of potassium t-butoxide (KOBu_t) (rightmost).

を被覆した。Figure 2に示したように、疎水性QRとGSH溶液を混合して熱を加え、脱プロトン化剤であるKOBu_tを加えることで簡単に水溶化QRを得ることが出来る。GSHは、生体中にも存在する低分子化合物であり毒性が低い。加えて、アミノ基とカルボキシル基の官能基をもつため、抗体等の生体分子をQR表面に簡単に付加することができる。

疎水性QRとGSH-QRの蛍光スペクトルを比較したところ大差は無く (Figure 3)、両者の量子収率はそれぞれ49および48%だった。半導体ナノ結晶は、水溶化の過程で表面に欠陥が生じることによって、量子収率が著しく低下することが知られている。したがって、ここで示したGSHを用いた被覆法は、簡便さに加えてQRの特性を損なわない水溶化法といえる。広く用いられているポリマー被覆QR (Poly-QR) とサイズを比較した場合、半分程度の水和半径であった (Figure 4 a)。従来の被覆法よりも小さな水溶化QRを調製可能ということで、生体分子の標識にもより適した被覆法といえる。先に述べたGSHの利点として、GSH-QR表面に簡単に抗体を付加できることも確認した (Figure 4 b)。

以上の特性をもったGSH-QRを標識剤として用いて、膜受容体CD36の運動を観察した (Figure 5 a)。CD36は、マクロファージの膜上に存在するスカベンジャーレセプターの1種であり、様々なリガンドとの結合によって細胞質中に移行することが知られている。ここでは、CD36の3次元運動および回転運動を1分子の精度で観察することによって、合成したQRの有用性を実証した。

QRをCD36に特異的に結合させるために、クロスリンカー試薬を用いてGSH-QRの表面に抗CD36抗体を付加した (mAb-QR)。Figure 5 bに示したように、マクロファージの培養液にmAb-QRを加えることによって、マウス腹腔由来のマクロファージが染色された。この現象は、非標識の抗CD36抗体を事前に過剰に加えることによって阻害

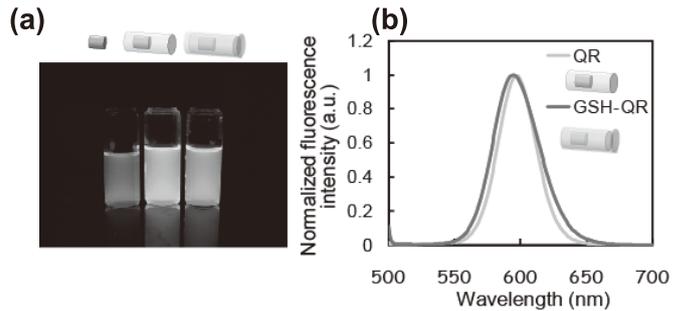


Figure 3 (a) Fluorescent image of CdSe, CdSe/CdS (QRs) and GSH coated CdSe/CdS (GSH-QRs). (b) Normalized fluorescence spectra (lower panel) of CdSe, QRs and GSH-QRs.

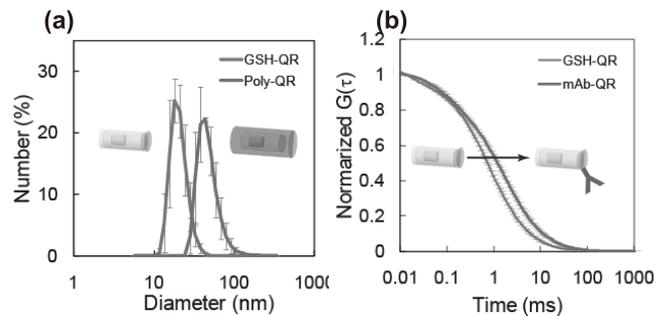


Figure 4 (a) DLS histograms of GSH-QRs (blue line) and polymer coated QRs (Poly-QRs, red line). (b) Autocorrelation functions of GSH-QRs (blue line) and mAb-QRs (red line). The arrow marks an increase in QR diffusion time.

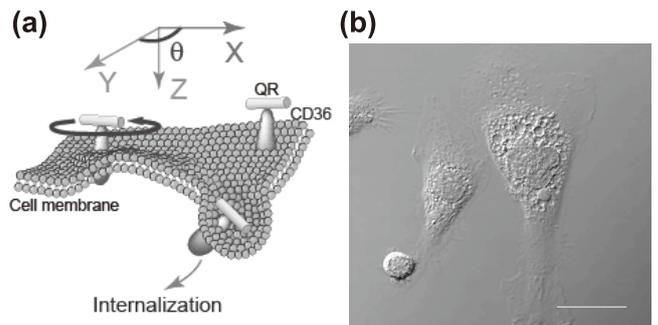


Figure 5 (a) Schematic description of the internalization of mAb-QR labeled CD36 from the cell membrane to the cytoplasm. (b) The merged image of fluorescent and differential interference contrast (DIC). Red represents mAb-QR signals through a band path filter (575 – 675 nm).

されたことから、目的どおり大部分のmAb-QRがCD36に結合していることが確認できた。

3.2 回転と3次元運動を同時観察するための顕微鏡の構築

CD36の回転運動および3次元運動を観察するために、

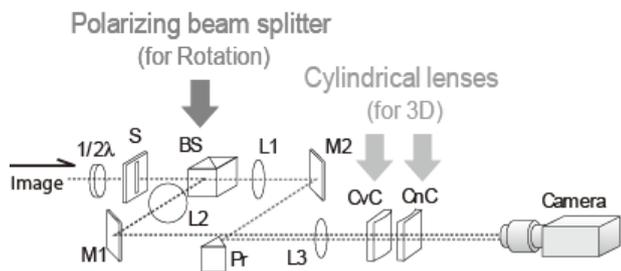


Figure 6 Optical setup for simultaneous 3D and rotational single particle tracking. $1/2\lambda$, $1/2$ phase plate; S, slit; BS, beam splitter; L, lens; M, mirror; Pr, prism; CvC, convex cylindrical lens; and CnC, concave cylindrical lens.

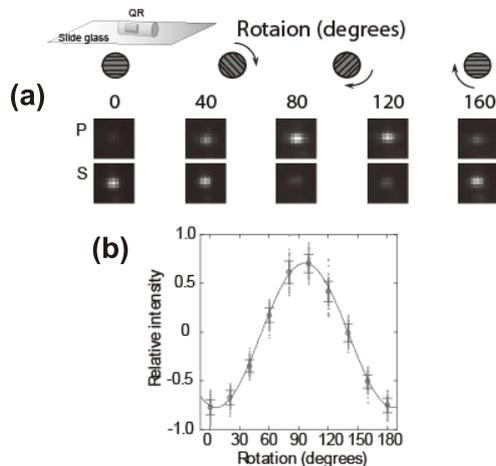


Figure 7 Polarization dependency. (a) Fluorescent images of a single GSH-QR on a coverslip simultaneously recorded in p- (upper images) and s-polarizations (lower images). The detection angle was changed from 0° to 180° . (b) The relative fluorescence intensity of a single GSH-QR as a function of detection angle.

Figure 6 のような 2 つの特徴をもった光学系を組んだ。まず、回転運動を解析するために、QR からの偏光を偏光ビームスプリッターを用いて分離した。加えて、3次元運動を解析するために、偏光ビームスプリッターを通した後の信号をシリンダ状のレンズペアを通過させた。

この光学系を用いて、QR の偏光を測定した。Figure 7a は 1 粒子の QR の蛍光像を示している。p 偏光 (上段の画像) と s 偏光 (下段の画像) に違いがあり、実際に QR が偏光特性をもつことが確認された。検出角度を 20 度ステップで変化させると蛍光強度が徐々に変化し、p と s 偏光の蛍光強度は対称性をもって変化した。したがって、p と s 偏光の強度比から QR の角度を見積もることが可能である (Figure 7b)。ちなみに、ここで測定した QR の偏光度は 0.8 を超えており、多数の QR の偏光度を平均すると約 0.6

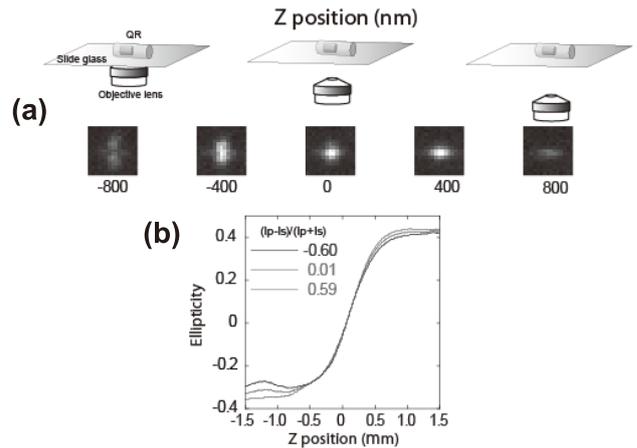


Figure 8 3D measurements. (a) Fluorescence images of a single GSH-QR at various Z-positions ranging from -800 to 800 nm. (b) Ellipticity as a function of Z-position at various polarized intensity ratios (-0.60 to 0.59).

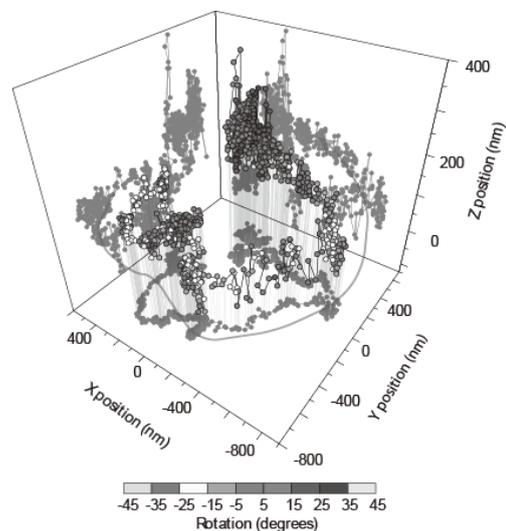


Figure 9 Simultaneous 3D and rotational tracking of CD36 in macrophages. 3D movements of a single mAb-QR. The angle of the mAb-QRs is indicated by the color bar (bottom).

となっていた。

また、QR と対物レンズの距離を変化させたときの蛍光像の楕円率を測定した。Figure 8a は 1 粒子の QR の蛍光像を示している。対物レンズを QR から遠距離側へ移動させることによって、縦長だった蛍光像が横長へと変化した。したがって、蛍光像の縦横比から QR の Z 位置を見積もることが可能である (Figure 8b)。この顕微鏡では、偏光度の影響を受けずに見積もれる Z 位置は約 $1 \mu\text{m}$ であった。

3.3 CD36 の回転および 3 次元運動の同時観察

上述した mAb-QR および顕微鏡を用いて、マクロファージ膜上の CD36 の運動を 1 分子精度で観察した。その 1 例を Figure 9 に示した。この CD36 は、緩慢な角度変化を伴いながら、3次元位置を大きく変化させながら移動した。

この運動は、エンドソーム内に取り込まれたCD36が、エンドソームの動きに合わせて回転運動を伴い、細胞質に移動する様子を示しているのかもしれない。別のCD36は、激しく角度を変化させていたが、Z位置の変化はほとんど観察されなかった。このCD36は、細胞表面の膜上で自由に回転運動をしているが、細胞質への移動を伴っていないことを示しているのかもしれない。

生体分子の回転運動を観察するために、従来は有機系色素が使用されてきた^{3, 4)}。それらの色素類は、蛍光強度が低く、光退色性を有するなどの不十分な点がある。特に、皮膚などの生体深部で蛍光を観察する場合は、2光子顕微鏡を用いなければならないが、励起光強度が高いため、その弱点が顕著に現れる。ここで示した半導体ナノ結晶は、それらの点を克服できる蛍光体である。加えて、半導体ナノ結晶は構成する元素を換えることによって、近赤外領域に蛍光ピークをもつ量子収率の高い蛍光体を調製することも可能である。近赤外領域の光は、ヘモグロビンおよび水による吸収、その他の分子による散乱が少ないため、生体に対する透過能が高い。これを利用することによって、皮膚などの生体深部での観察が容易となる。

また、回転運動を観察には、金ナノロッドも使用されてきた⁵⁻⁸⁾。従来の生体イメージングでは、多種類の分子を多色の色素で標識し、相対的な位置関係や相互作用の解析が行われてきた。回転運動の観察でも、今後は多種類の分子を観察する必要性が増えてくると推測する。しかしながら、金ナノロッドの測定では光散乱を検出するために、多色イメージングには不向きである。一方、QRの吸収は短波長領域の広範囲におよんでおり、蛍光スペクトルの半値幅は約30nmと狭い。したがって、多種類のQRを1種類の光源で励起し、得られた多色の蛍光を光学フィルターで分離することにより、容易に多色イメージングが可能である。

以上の特性によって、多種類のナノマテリアルの動態を、皮膚などの生体深部で観察する場合、ここで報告したQRと観察法が有効である。皮膚でのナノ粒子の動態はこれまでも報告されてきたが、我々はナノマテリアルの回転情報を得る技術を新たに確立した。

4. 総括

本研究では、半導体ナノ結晶と光イメージング法を用いて、皮膚表皮におけるナノマテリアルの動態とそれに対する免疫応答の可視化を目指した。前期は、回転情報を得るための量子ロッド(Quantum rod: QR)、粒子径をコントロールしたナノ粒子(Silica coated nanoparticle: Si-NP)、生体深部での追跡を可能とする超高輝度ナノ粒子(Ultrabright nanoparticle: UB-NP)を開発した。今期は特にQRに注目し、それを用いて回転および3次元運動の同時観察を試みた。皮膚表皮での観察には至らなかったが、

QRで標識した免疫細胞膜上の受容体の回転および3次元運動を1粒子精度で同時に観察することに成功した。この技術を生体深部の観察法に拡張することによって、これまでに無い独創的な観察法を提案できる。

5. 謝辞

本研究は、平成21年度コスメトロジー研究振興財団の研究助成を受けて行ったものです。本成果は、渡邊朋信、梅本英司、神隆、宮坂昌之、柳田敏雄、諸博士との共同研究によるものです。特に、渡邊朋信博士には顕微鏡の構築を、梅本英司博士には免疫細胞の実験を遂行いただきました。同助成会および諸博士に心より感謝いたします。

(参考文献)

- 1) Peng, X. G., Manna, L., Yang, W. D., Wickham, J., Scher, E., Kadavanich, A., Alivisatos, A. P. Shape control of CdSe nanocrystals. *Nature* **404**, 59-61 (2000).
- 2) Hu, J. T., Li, L. S., Yang, W. D., Manna, L., Wang, L. W., Alivisatos, A. P. Linearly polarized emission from colloidal semiconductor quantum rods. *Science* **292**, 2060-2063 (2001).
- 3) Forkey, J. N., Quinlan, M. E., Shaw, M. A., Corrie, J. E. T., Goldman Y. E. Three-dimensional structural dynamics of myosin V by single-molecule fluorescence polarization. *Nature* **422**, 399-404 (2003).
- 4) Gould, T. J., Gunewardene, M. S., Gudheti, M. V., Verkhusha, V. V., Yin <http://www.nature.com/nmeth/journal/v5/n12/abs/nmeth.1271.html> - a3, S., Gosse, J. A. and Hess, S. T. Nanoscale imaging of molecular positions and anisotropies. *Nature Methods* **5**, 1027- 1030 (2008).
- 5) Sonnichsen, C., Alivisatos, A.P. Gold nanorods as novel nonbleaching plasmon-based orientation sensors for polarized single-particle microscopy. *Nano Lett.* **5**, 301-304 (2005).
- 6) Failla, A. V., Qian, H., Qian, H., Hartschuh, A., Meixner, A. J. Orientational imaging of subwavelength Au particles with higher order laser modes. *Nano Lett.* **6**, 1374-1378 (2006).
- 7) Chang, W. S., Ha, J. W., Slaughter, L. S., Link, S. Plasmonic nanorod absorbers as orientation sensors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 2781-2786 (2010).
- 8) Wang, G., Sun, W., Luo, Y., and Fang, N. Resolving rotational motions of nano-objects in engineered environments and live cells with gold nanorods and differential interference contrast microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 16417-16422 (2010).

海藻カロテノイドの皮膚における光老化抑制作用

京都大学大学院農学研究科

平田 孝

Fucoxanthin, a major carotenoid in brown algae, has various beneficial effects. In this study, we evaluated the effect of topical fucoxanthin on UVB-induced skin photoaging of hairless mice. The dorsal skins were treated topically with a 0.001% fucoxanthin solution 2 h before each UVB irradiation (5 times a week) for 10 weeks. The formation of wrinkles in UVB-irradiated skin treated with vehicle alone was significantly increased compared with the non-irradiated control. Treatment with fucoxanthin tended to suppress the UVB-induced wrinkle formation but there was no significant difference between wrinkle formation in the control group and in the fucoxanthin treatment group. However, topical treatment with fucoxanthin significantly prevented UVB-induced epidermal hypertrophy, VEGF and MMP-13 expression in the epidermis and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the skin. These results indicate that topical treatment with fucoxanthin prevents skin photoaging of UVB-irradiated hairless mice, possibly via its antioxidant and antiangiogenic effects.

1. 諸言

老化現象として皮膚に現れる変化は、生命活動の結果生じる損傷の蓄積によって進行する内因性老化と、外的刺激を受け続けることによって進行する外因性老化の二種類に大別できる。外因性老化に関わる刺激としては、紫外線暴露、乾燥、熱、物理的刺激等が挙げられ、とくに紫外線による老化現象は光老化 (photoaging) と呼ばれている。高齢化や長寿化が進み、単に長生きするだけでなく、老化を抑制し健康的に生きることが重要と考えられるようになり、美容やアンチエイジングへの関心が高まっている。したがって、皮膚の老化に関わる光老化のメカニズムの解明やその抑制は、現代社会におけるQOL (Quality of Life) の向上に役立つと考えられる。

近年、光老化のメカニズムに血管新生が関与することが報告されている。血管新生とは、成熟個体において標的部位の血管内皮細胞がプロテアーゼを産生し、基底膜を消化して遊走・増殖した後、血管壁細胞ペリサイトが取り囲むことで既存の血管が拡張する現象である。紫外線照射によって引き起こされる VEGF (vascular endothelial growth factor, 血管新生促進因子) と TSP-1 (thrombospondin-1, 血管新生阻害因子) の発現バランスの変化が、皮膚の光老化を促すスイッチとなることが示唆されている^{1,2)}。また、血管内皮細胞の分泌するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) が真皮層を構成するコラーゲンを分解することでシワ形成

を直接的に引き起こすことも報告されている³⁾。さらに炎症と光老化の関わりとして、慢性的な紫外線照射によって誘導された好中球に由来する MMPs が、継続的に細胞外マトリックスを損傷した結果、シワ形成が引き起こされることも示されている^{4,5)}。したがって、血管新生抑制物質が光老化によるシワ形成を抑制できることが大いに期待される。

カロテノイドは生物全般に広く含まれる脂溶性色素で、赤から橙色を呈し、強い抗酸化作用を有する。近年、新しい健康機能が注目されており、その作用機序解明も進められている。フコキサンチンは、ワカメ、コンブ等の褐藻に特有の海洋由来カロテノイドであり、アレン構造、エポキシ基、ヒドロキシ基といった特徴的な構造を有する (図1)。我々のこれまでの取組みによって、フコキサンチンが強力な血管新生抑制作用を有することが明らかにされている⁶⁾。したがって、フコキサンチンの光老化抑制作用が期待される。そこで本研究では、光老化モデルマウスを用いてフコキサンチンの影響を検証するとともに、その作用機序を解明することを目的とした。

2. 実験

2.1 フコキサンチンの抽出と精製

市販の乾燥ワカメをミルミキサーで粉碎後、約10倍容量のアセトンを加え、アルミホイルで遮光し4℃で一晩抽出した。ろ過後、エバポレーターで乾固し、残留物を少量のメタノールに溶かし、LiChroprep RP-18 (40-63 μ m, Merck) を用いたカラムクロマトグラフィーに供し、粗フコキサンチン画分を分取した。さらに ODS-80Ts TSK-gel (4.6 \times 250mm, 東ソー) を用いた HPLC に供し、フコキサンチンを精製した^{6,7)}。

2.2 動物実験

ヘアレスマウス (Hos : HR-1, 6週齢、雌) を用いて、紫



Suppressive effects of the algal carotenoid fucoxanthin on skin photoaging

Takashi Hirata

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

外線照射試験を行った。マウスの取り扱いは京都大学動物実験委員会の指針に従った。室温 $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、明暗周期12時間で、固形試料(MF)と水を自由摂食させた。2週間予備飼育した後、ノーマル群、コントロール群、フコキサンチン群の3群に分けた($n=6$)。ノーマル群はUVB照射も試料塗布もせずに飼育した。フコキサンチン群は週5回、0.001% (w/v) フコキサンチン溶液(プロピレングリコール/エタノール/水(3:2:5, v/v/v))、コントロール群は溶媒のみそれぞれを80 μl 背部に塗布し、2時間後にUVBを照射した。照射量は、第1週目で1日あたり30 mJ/cm^2 、第2、3、4週目はそれぞれ50、55、60 mJ/cm^2 、5週目以降は65 mJ/cm^2 と、段階的に照射強度を高めるようにした。塗布およびUVB照射処理期間は10週間とし、最後の照射から24時間後にイソフルランを用いた吸引麻酔下で皮膚の評価を行った。頸椎脱臼後、背部皮膚を採取した。

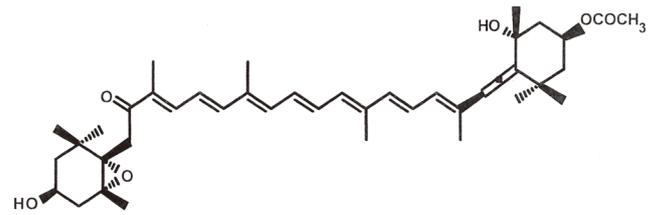


図1 フコキサンチンの化学構造

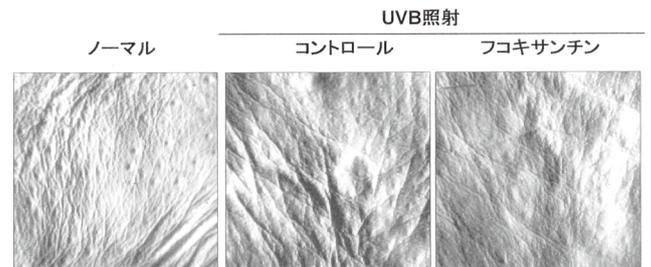


図2 UVB照射ヘアレスマウスの背部皮膚レプリカ

2.3 皮膚の評価

背部皮膚のレプリカ(ASA-01アサヒバイオメッド)を採取し、反射用レプリカ解析システム(ASA-03アサヒバイオメッド)を用いて解析した。

頸椎脱臼後、背部皮膚約 $20\times 20\text{mm}$ を採取し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン切片をHE染色した。光学顕微鏡で表皮厚を測定した。

採取した背部皮膚約50mgをホモジナイズし、TBARSを測定した⁸⁾。また、DispaseII (Roche)を用いて表皮層を単離し⁹⁾、セパゾール(ナカライテスク)を用いてトータルRNAを抽出後、リアルタイムRT-PCR法にて、VEGF、TSP-1、MMP-13、IL-6、TNF α のmRNA発現量を測定した。

3. 結果

3.1 背部皮膚の形態変化の評価

UVB照射によって、ノーマル群と比較してコントロール群でシワが増加し、深いシワが特徴的に認められた。一方、フコキサンチン群はコントロール群と比較して深いシワは認められなかった(図2)。レプリカ画像を用いて、シワ平均個数について定量的に解析した結果、コントロール群で、ノーマル群に比べて有意な増加が認められた。一方、フコキサンチン群では有意ではないものの、コントロール群に比べて低値を示す傾向があり、ノーマル群とも有意な差は認められなかった(図3)。

3.2 組織学的分析

HE染色した背部皮膚切片を用いて、表皮層の肥厚化について調べた(図4)。コントロール群では表皮厚の肥厚化が認められたが、フコキサンチンはそれを抑制していることが認められた。肥厚化を定量的に評価した結果を図5

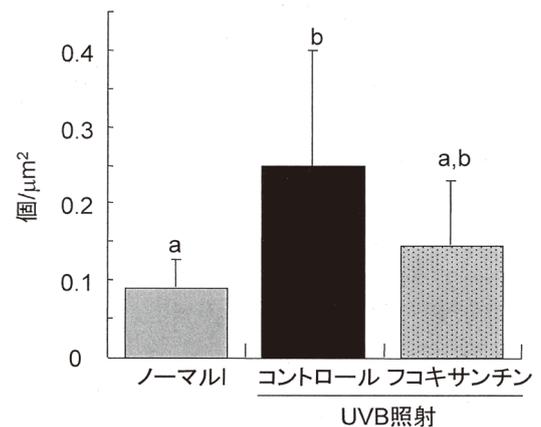


図3 レプリカ画像解析によるシワの定量
平均値 \pm SD、異なる符号間で有意差あり($P<0.05$)

に示した。表皮厚はノーマル群に対してコントロール群で有意な増加が認められ、フコキサンチン群で有意に抑制された。

3.3 皮膚の過酸化

コントロール群でマロンジアルデヒド量がノーマル群に対して有意に増加した。一方、フコキサンチン群ではコントロール群に対して有意に減少し、ノーマル群と同レベルの値を示した(図6)。

3.4 表皮の遺伝子発現の変化

UVB照射によるMMP-13とVEGFの発現亢進は、フコキサンチン塗布によって有意に抑制された(図7)。TSP-1、TNF α 、IL-6の発現はいずれもすべての群間で有意な差は認められなかった。

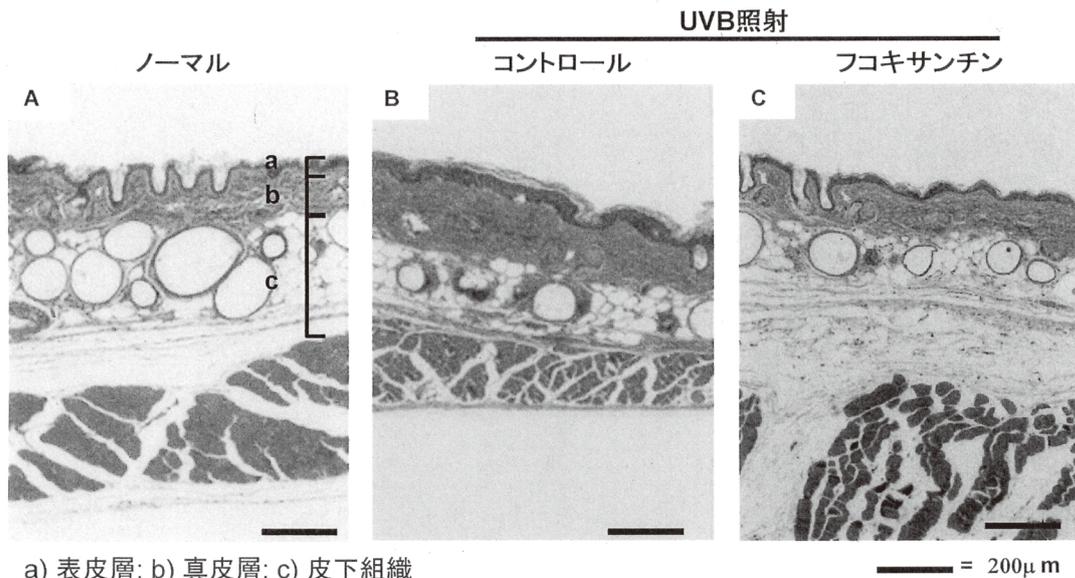


図4 背部皮膚の組織切片

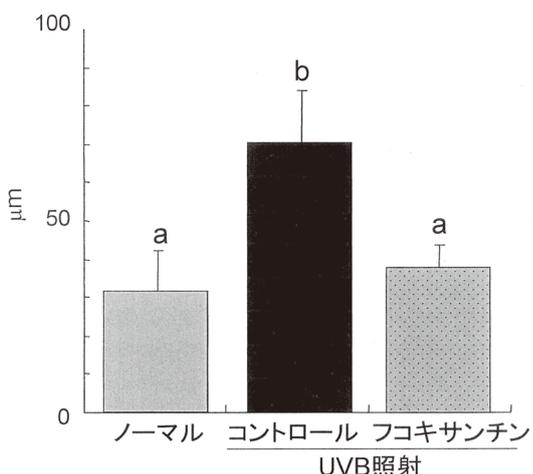


図5 UVB照射による背部表皮厚の変化に与えるフコキサンチンの影響
 平均値 ±SD、異なる符号間で有意差あり (P<0.05)

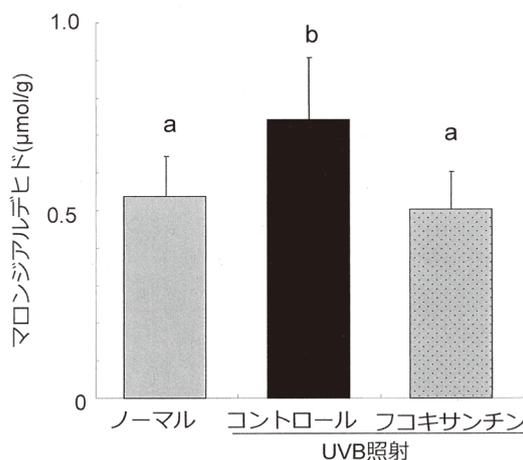


図6 UVB照射による皮膚の脂質酸化に与えるフコキサンチンの影響
 平均値 ±SD、異なる符号間で有意差あり (P<0.05)

4. 考察

本研究においてUVB照射による有意なシワ形成と表皮の肥厚化が認められ、0.001%フコキサンチン溶液の塗布によってシワ形成の抑制傾向と有意な表皮肥厚化抑制作用が認められた。

表皮肥厚化は外因性老化である光老化と内因性老化とを区別する最も顕著な兆候の一つである。肥厚化は基底細胞層や真皮層を紫外線から守るための防御機構とみなすことが出来る。フコキサンチンの有する生理活性が相乗的に機能してUVBによる皮膚の損傷を軽減したために、肥厚化が有意に抑制されたものと考えられた。

活性酸素種の産生によって、コレステロールやスクアレン等の不飽和結合を有する脂質成分から過酸化脂質が生成

し、コラーゲンやエラスチンの損傷、DNAの傷害、抗酸化酵素の不活性化、細胞機能の劣化が引き起こされる。UVB照射によるTBARSの上昇が0.001%フコキサンチン塗布により抑制されたことから、脂質過酸化反応を抑制することも光老化抑制作用の一因と考えられた。活性酸素を介してVEGFやMMPsの発現が調節されることも報告されており¹⁷⁻¹⁹⁾、活性酸素に反応したサイトカインを介してIL-1やIL-6、TNFαなどの産生が誘導されることも報告されている¹⁰⁾。したがって、活性酸素を介して変動する可能性のある遺伝子の発現解析も重要と考えられた。

UVB単回照射によって、VEGFとTSP-1の発現バランスの変化が連動することが明らかにされている²⁾。また、長期的UVB照射モデルにおいて、VEGF過剰発現マウスはUVB感受性が増加し、表皮肥厚化、シワ形成、炎症細

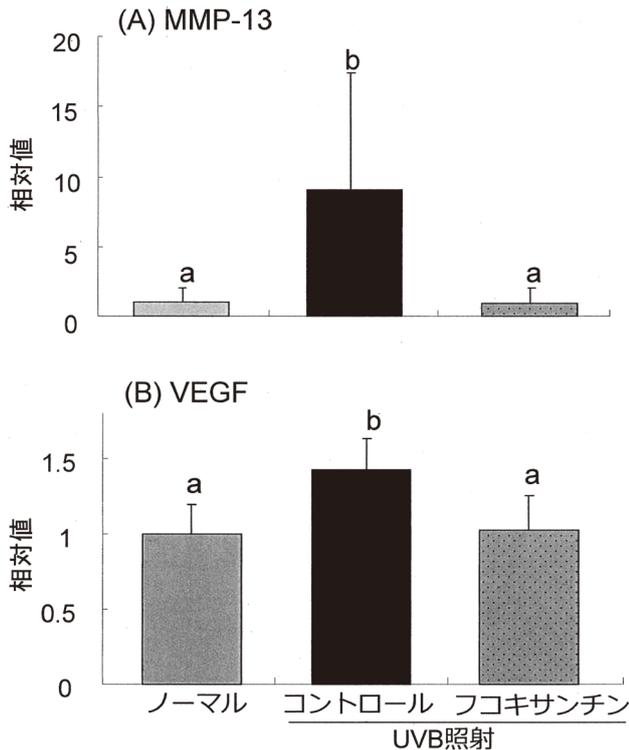


図7 UVB照射による皮膚の遺伝子発現に与えるフコキサンチンの影響
 平均値 ±SD、異なる符号間で有意差あり (P<0.05)

胞の浸潤が惹起されることも報告されている¹⁾。したがってVEGFの発現亢進が光老化の惹起に強く関与するものと考えられる。一方、長期的にUVB照射したTSP-1過剰発現マウスにおいて細胞外マトリックスの損傷、シワの形成、表皮の肥厚化が抑制されており²⁰⁾、TSP-1もUVB照射による光老化の抑制に関わると考えられる。しかしながら、TSP-1はVEGFと異なり様々な働きを有するタンパク質でもあるために^{11, 12)}、本実験結果においてTSP-1の発現は変動しなかったものと推測された。

UVB照射によるMMP-13発現の促進も、0.001%フコキサンチン溶液の塗布によって有意に抑制された。MMP-13はマウスの主要なコラゲナーゼであり、ヒトにおけるMMP-1と同様の働きを担う。VEGFとMMPの発現は相互に強く関わっており¹³⁾、活性酸素を介したMMP制御メカニズムも報告されていることから¹⁴⁻¹⁶⁾、フコキサンチンの抗酸化作用とVEGF発現を介した血管新生抑制作用が相乗的に機能した結果、MMP-13発現が有意に抑制され、シワの形成が抑制されたものと考えられた。

(引用文献)

1) Hirakawa S, Fujii S, Kajiya K *et al.*: Vascular endothelial growth factor promotes sensitivity to ultraviolet B-induced cutaneous photodamage. *Blood*, 105, 2392-2399, 2005.

2) Yano K, Kajiya K, Ishiwata M *et al.*: Ultraviolet B-induced skin angiogenesis is associated with a switch in the balance of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression. *J. Invest. Dermatol.*, 122, 201-208, 2004.

3) Takema Y, Hattori M, Aizawa K: The relationship between quantitative changes in collagen and formation of wrinkles on hairless mouse skin after chronic UV irradiation. *J. Dermatol. Sci.*, 12, 56-63, 1996.

4) Bolognia JL: Aging skin. *Am. J. Med.*, 98, 99S-103S, 1995.

5) Cho HS, Lee MH, Lee J W *et al.*: Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin C, vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomedicine*, 23, 155-162, 2007.

6) Sugawara T, Matsubara K, Akagi R *et al.*: Antiangiogenic activity of brown algae fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9805-9810, 2006.

7) Sugawara T, Baskaran V, Tsuzuki W *et al.*: Brown algae fucoxanthin is hydrolyzed to fucoxanthinol during absorption by Caco-2 human intestinal cells and mice. *J. Nutr.*, 132, 946-951, 2002.

8) Buege JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 52, 302-310, 1978.

9) Trost A, Bauer JW, Lanschützer C *et al.*: Rapid, high-quality and epidermal-specific isolation of RNA from human skin. *Exp. Dermatol.*, 16, 185-190, 2007.

10) Haddad JJ, Safieh-Garabedian B, Saadé NE *et al.*: Chemioxyexcitation (delta pO₂/ROS)-dependent release of IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha: evidence of cytokines as oxygen-sensitive mediators in the alveolar epithelium. *Cytokine*, 13, 138-147, 2001.

11) Nicosia RF, Tuszynski GP: Matrix-bound thrombospondin promotes angiogenesis in vitro. *J. Cell Biol.*, 124, 183-193, 1994.

12) Donnini S, Morbidelli L, Taraboletti G *et al.*: ERK1-2 and p38 MAPK regulate MMP/TIMP balance and function in response to thrombospondin-1 fragments in the microvascular endothelium. *Life Sci.*, 74, 2975-2985, 2004.

13) Heissig B, Hattori K, Friedrich M *et al.*: Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases Current opinion in hematology. *Cur. Opin. Hematol.*, 10, 136-141, 2003.

- 14) Philips N, Keller T, Hendrix C *et al.*: Regulation of the extracellular matrix remodeling by lutein in dermal fibroblasts, melanoma cells, and ultraviolet radiation exposed fibroblasts. *Arch. Dermatolog. Res.*, 299, 373-379, 2007.
- 15) Wertz K, Seifert N, Hunziker PB *et al.*: Beta- carotene inhibits UVA-induced matrix metalloprotease 1 and 10 expression in keratinocytes by a singlet oxygen-dependent mechanism. *Free Radic. Biol. Med.*, 37, 654-670, 2004.
- 16) Karin W, Nicole S, Petra BH *et al.*: β -Carotene interference with UVA-induced gene expression by multiple pathways. *Pure Appl. Chem.*, 78, 1539-1550, 2006.
- 17) Mildner M, Weninger W, Trautinger F *et al.*: UVA and UVB radiation differentially regulate vascular endothelial growth factor expression in keratinocyte-derived cell lines and in human keratinocytes. *Photochem. Photobiol.*, 70, 674-679, 1999.
- 18) Kawaguchi Y, Tanaka H, Okada T *et al.*: The effects of ultraviolet A and reactive oxygen species on the mRNA expression of 72-kDa type IV collagenase and its tissue inhibitor in cultured human dermal fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.*, 288, 39-44, 1996.
- 19) Brenneisen P, Briviba K, Wlaschek M *et al.*: Hydrogen peroxide (H₂O₂) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 515-524, 1997.
- 20) Yano K, Oura H, Detmar M: Targeted overexpression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in the epidermis of transgenic mice prevents ultraviolet-B-induced angiogenesis and cutaneous photo-damage. *J. Invest. Dermatol.*, 118, 800-805, 2002.

ヒト表皮角化幹細胞の動態制御を目指した低分子化合物の探索

愛媛大学上級研究員センター

難波 大輔

Reconstruction of epidermal sheets from isolated human epidermal keratinocytes has realized autologous transplantation onto patients with extensive burns. Isolated keratinocytes from human skin have heterogeneity in their proliferative capacity and in ability for regeneration of the epidermis. Keratinocyte stem cells have the greatest proliferative capacity and can produce a progeny large enough to entirely reconstitute the epidermis of an adult human for a lifetime. The stem cells are also available for gene therapy against inherited epidermal disorders such as junctional epidermolysis bullosa. Therefore, increasing self-renewal of keratinocyte stem cells in culture facilitate regenerative medicine using autologous keratinocytes. To address these issues, we explored small molecules that can expand keratinocyte stem cells in vitro. We screened a number of compounds and found three molecules that could increase the number and size of keratinocyte colonies. These molecules enhanced attachment speed but not efficiency of keratinocytes after inoculation, suggesting that rapid adhesion of keratinocytes is crucial for maintenance and self-renewal of human epidermal keratinocyte stem cells.

1. 緒言

表皮角化細胞の培養技術の開発によって、重度の広範囲熱傷患者の救命が可能となった¹⁾。表皮は細胞が常に分裂を繰り返して維持されている組織であるが、作製された移植表皮は生涯に渡って維持される^{2,3,4)}。この事実は、生体より単離された表皮角化細胞の中に幹細胞が存在し、体外での培養表皮作製期間中もその能力を失うことなく維持されていることを示している。表皮角化幹細胞は、培養上で高い増殖能を示し⁵⁾、機能的な培養表皮シートの作製に必須である^{6,7)}。またその幹細胞に対する遺伝子導入は、先天性表皮疾患の治療に応用されている⁸⁾。このように表皮角化幹細胞は治療にとって必須であるにも関わらず、培養上で継代を重ねていくごとに失われていく。この現象はクローナル・コンバージョンとして知られており⁹⁾、表皮角化幹細胞培養における最大の問題点である。また培養において幹細胞特性を維持することが、培養上皮シートを用いた移植医療の成否に最も重要であることが角膜上皮細胞の再生医療研究から明らかとなっている¹⁰⁾。再生医療における細胞培養は熟練した技術者に負うところが大きく、それ故、再生医療そのものが熟練者の数に制限される。容易に幹細胞性を維持できる細胞培養技術を開発することによって、幹細胞移植による再生医療が大きく発展するものと考えられる。

我々は培養ヒト表皮角化幹細胞の幹細胞性を維持させる

方法を開発するため、我々が見出したクローナル・コンバージョンに伴うヒト表皮角化幹細胞の変化に着目し(難波ら、論文投稿中)、本研究において、その変化に影響を与える低分子化合物の中から、ヒト表皮角化幹細胞を培養上でより増幅する、またはより長期に渡って維持する活性を持つ分子の探索を行った。

2. 実験

2.1 表皮角化細胞培養

ヒト表皮角化細胞(KURABOより購入)を、フィーダー細胞としてマイトマイシンCで処理したマウス3T3線維芽細胞を用いて培養した。DME培地とF12培地の3:1混合培地に10%ウシ胎仔血清を含む培養液を用い、37℃、10%CO₂の条件で培養を行った。

2.2 コロニー形成能測定

ヒト表皮角化細胞を200個、6cm細胞培養ディッシュ(IWAKI)に播種し、12日間培養後、10%フォルマリン溶液で固定し、1%ローダミンB溶液で染色することでコロニーを可視し、個数の計測を行った。またコロニーの面積は画像解析ソフトVLOCITY(PerkinElmer)を用いて計測した。

2.3 免疫蛍光抗体法

ヒト表皮角化細胞を4%パラフォルムアルデヒド溶液を用いて固定、0.5% Triton x-100溶液処理し、1%ウシ血清アルブミン溶液でブロッキングを行った。その後、1次抗体を室温で1時間、または4℃で約16時間反応させ、対応する2次抗体で室温下1時間処理を行った。また画像はAxiovert 200M(Zeiss)を用いて取得した。



Exploring small molecules that modulate behaviors of human epidermal keratinocyte stem cells

Daisuke Nanba

Senior Research Fellow Center, Ehime University

3. 結果

3.1 低分子化合物のヒト表皮角化細胞コロニー形成能への影響

我々が見出した培養ヒト表皮角化幹細胞のクローナル・コンバージョンにおける細胞生物学的な変化(難波ら、論文投稿中)に影響を与える市販の低分子化合物を10種類選択し検索した結果、3種類の化合物が細胞播種後24時間の処理で、コロニー数(図1a, b)とコロニーの面積の増大をもたらした(図1a, c)。

3.2 ヒト表皮角化細胞クローンへの影響

特にコロニー形成能に対して影響の大きかった化合物Aに関して、角化細胞のクローンに対して実験を行った結果、ほぼ全てのクローンのコロニー形成能を増大させた(図2)。

3.3 低分子化合物の細胞接着能への影響

各低分子化合物の細胞接着能に関する影響を調べるため、細胞播種後0.5、1、3、6、12時間後にそれぞれ細胞を固定し、角化細胞のみを特異的に認識する凡ケラチン抗体で免疫染色を行い、単位面積あたりの接着細胞を測定した。その結果、化合物AおよびBは、細胞播種後1時間で最大の細胞接着をもたらすことが明らかとなった(図3a, b)。また化合物Cも同様に、細胞接着速度を増大させた(図3a, b)。コントロールと化合物を加えたものでは、播種後12

時間後の細胞接着効率に変化がないことから、これら化合物は、播種後の細胞接着速度を増大させる働きがあることが明らかとなった。

3.4 低分子化合物の細胞死への影響

低分子化合物の細胞死に対する影響を明らかとするために、細胞死(アポトーシス)の際に見出される活性型カスパーゼ3を認識する抗体と、角化細胞のみを特異的に認識する凡ケラチン抗体で二重染色を行い、角化細胞中でアポトーシスを起こしている細胞の割合を計測した。その結果、培養開始後12時間で、コントロールと化合物を加えたものに有意な差は観察されなかった(図3c)。

3.5 低分子化合物の処理時間の検討

見出した低分子化合物は細胞接着を早く起こさせることによって、コロニー形成能を増大させていると考えられる。特に化合物AおよびBは、細胞播種後1時間で接着率を最大化させている。十分効果的な低分子化合物の処理時間を検討するため、細胞播種後に1、3、6、12時間で通常培地交換を行った。その結果、低分子化合物の処理時間は1時間で十分効果的であることが明らかとなった(図4)。またコントロール実験においても播種後1時間の培地交換で大きなコロニー形成能の低下は起きていないことから、コロニーを形成する角化細胞は、播種後約1時間で接着する細胞であることが強く示唆された。

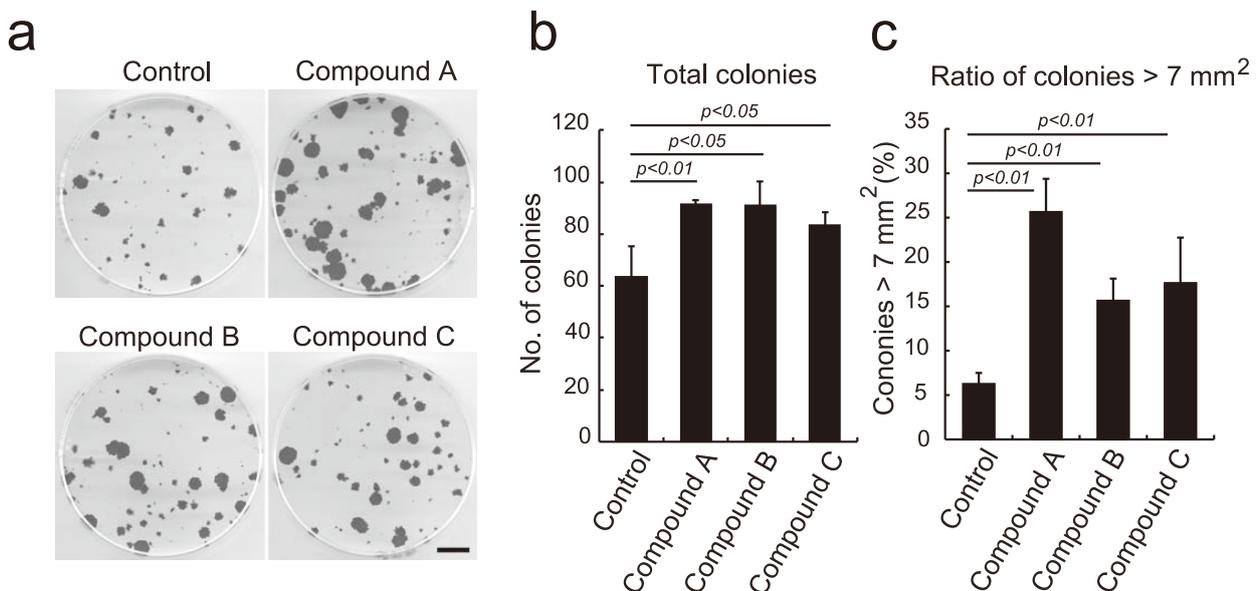


図1 低分子化合物によるコロニー形成能の増大

- a) 6cmの細胞培養ディッシュに200個のヒト表皮角化細胞を播種し、同時に3種類の低分子化合物を最終濃度10 μ Mで添加した。培養開始から24時間後に培地を交換し、さらに11日間培養を行い(計12日間)、細胞を10%ホルマリンで固定後、1%ローダミンBで染色した。スケールバー: 10 mm。
- b) 培養12日後のコロニー数。
- c) 培養12日後の面積が7mm²以上のコロニーの割合。低分子化合物A、B、Cを培養開始後24時間添加することによって、コロニー数と各コロニー面積の増大が観察された。

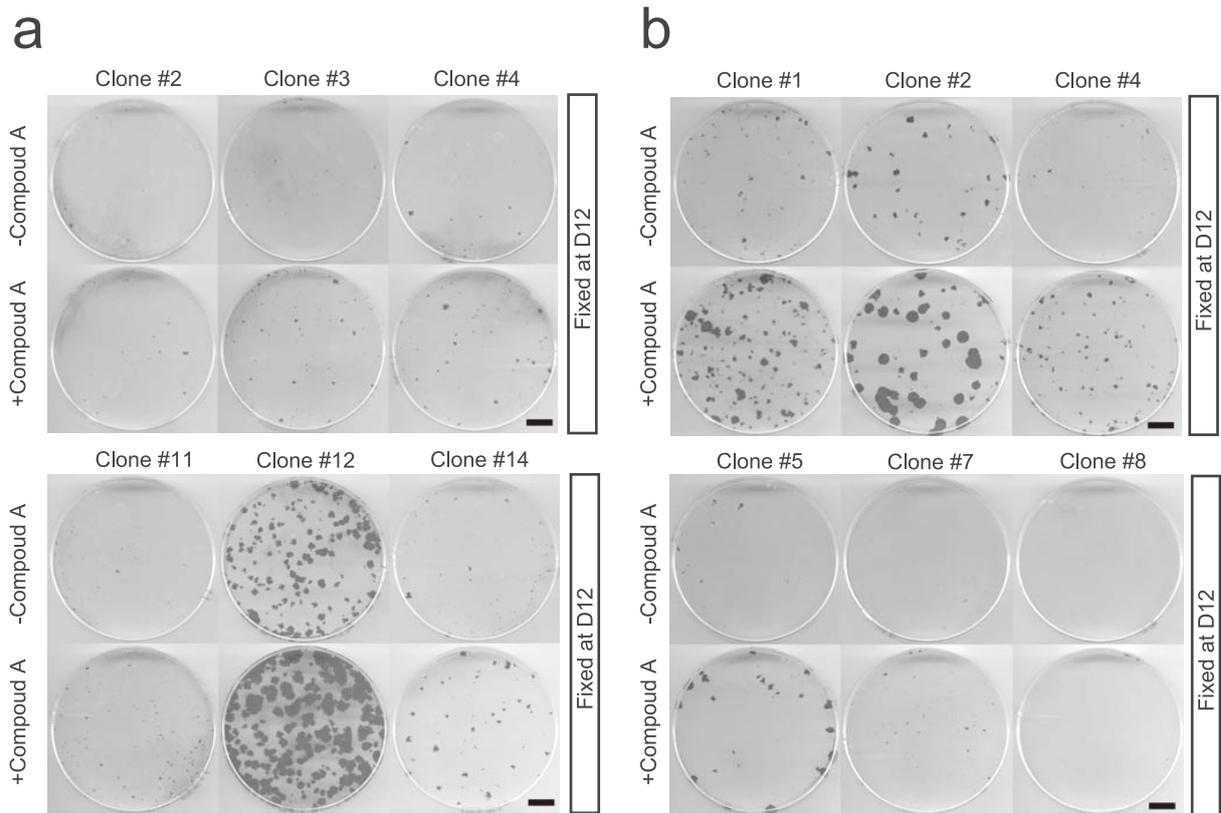


図2 角化細胞クローンに対する化合物Aの効果

角化細胞をクローニングし、各クローンに対する化合物Aの効果をも12日間培養することで評価した。化合物Aを培養開始後すぐ添加し24時間後に培地交換した。(a)と(b)は独立したクローン解析。スケールバー：10 mm。増殖活性の異なる角化細胞クローンに対して、化合物Aはコロニー形成能を増大させた。

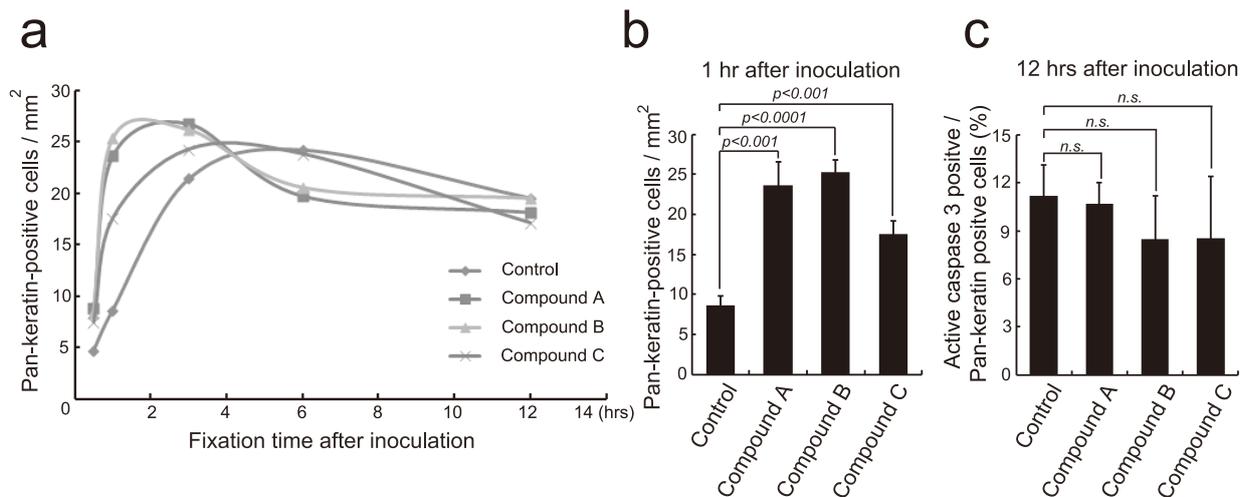


図3 低分子化合物の角化細胞接着および細胞死への影響

- a) 角化細胞を低分子化合物存在下で播種後、0.5、1、3、6、12時間後に固定し、角化細胞を特異的に認識する凡ケラチン抗体で免疫染色することで、単位面積当たりの接着した角化細胞の数を測定した。
- b) 培養開始後、1時間後の接着した角化細胞の数。
- c) 培養開始後12時間で細胞を固定し、角化細胞のうちでアポトーシス細胞で検出される活性型カスパーゼ3を発現している細胞の割合。低分子化合物は細胞接着速度を増大させたが、細胞死を抑制することはなかった。

4. 考 察

ヒト表皮角化細胞のコロニー形成能の測定は、個々の角化細胞の増殖能力を容易に可視化できる評価方法である。表皮角化幹細胞は特にコロニー形成能が高いことが知られている⁵⁾。今回、この実験法を用いて、表皮角化細胞のコロニー形成能を増大させる低分子化合物の検索を行ったところ、三種類の化合物を見出すことができた。これらの化合物はすべて細胞のある基本的特性を阻害する。今回の研究では、この基本特性の阻害が、角化細胞の迅速な接着を促すことが明らかとなった。細胞基質間の接着を担うβ1インテグリンタンパク質の発現量の高い細胞が、コロニー形成能の極めて高いヒト表皮角化幹細胞であるという報告¹¹⁾がある。本研究では、化合物によるインテグリン分子の発現制御に関して実験を行っていないが、化合物処理1時間という非常に短い時間で十分な効果を発揮することから、コロニー形成能の増大には、インテグリン分子の量以外にも重要な要素が存在することが示唆される。

短時間の化合物処理による迅速な接着がコロニー形成能を増大させる事実は、迅速に角化細胞を培養面に接着させることによって、どのような増殖活性を持つ角化細胞も増殖活性が増大することを示唆している。すなわち培養系に

において評価されるヒト表皮角化幹細胞とは、迅速に接着することができる細胞であると考えられる。この特性を明らかにすることで、新しいヒト表皮角化幹細胞像が見えてくると予想される。

本研究で見出された低分子化合物は、非常に短い処理時間で、ヒト表皮角化細胞の培養効率を改善することができた。それは特に幹細胞のような非常に増殖能の高い角化細胞が増大したためであると推測される。このような化合物を用いることで、迅速な培養表皮シートの作製が可能となり、広範囲重度熱傷や先天性表皮疾患などへの治療に対して、培養表皮シートの応用可能性が益々増大するものと期待される。

5. 総 括

ヒト表皮角化細胞のコロニー形成能を増大させる低分子化合物を見いだすことに成功した。その作用機序の一部は、角化細胞の接着速度の促進であると考えられる。これらの化合物が実際に培養表皮シートの作製に用いるため、さらなる条件検討や安全性の検討が求められる。最後に、本研究の遂行にあたり御支援をいただいたコスメトロジー研究振興財団に深く感謝申し上げます。

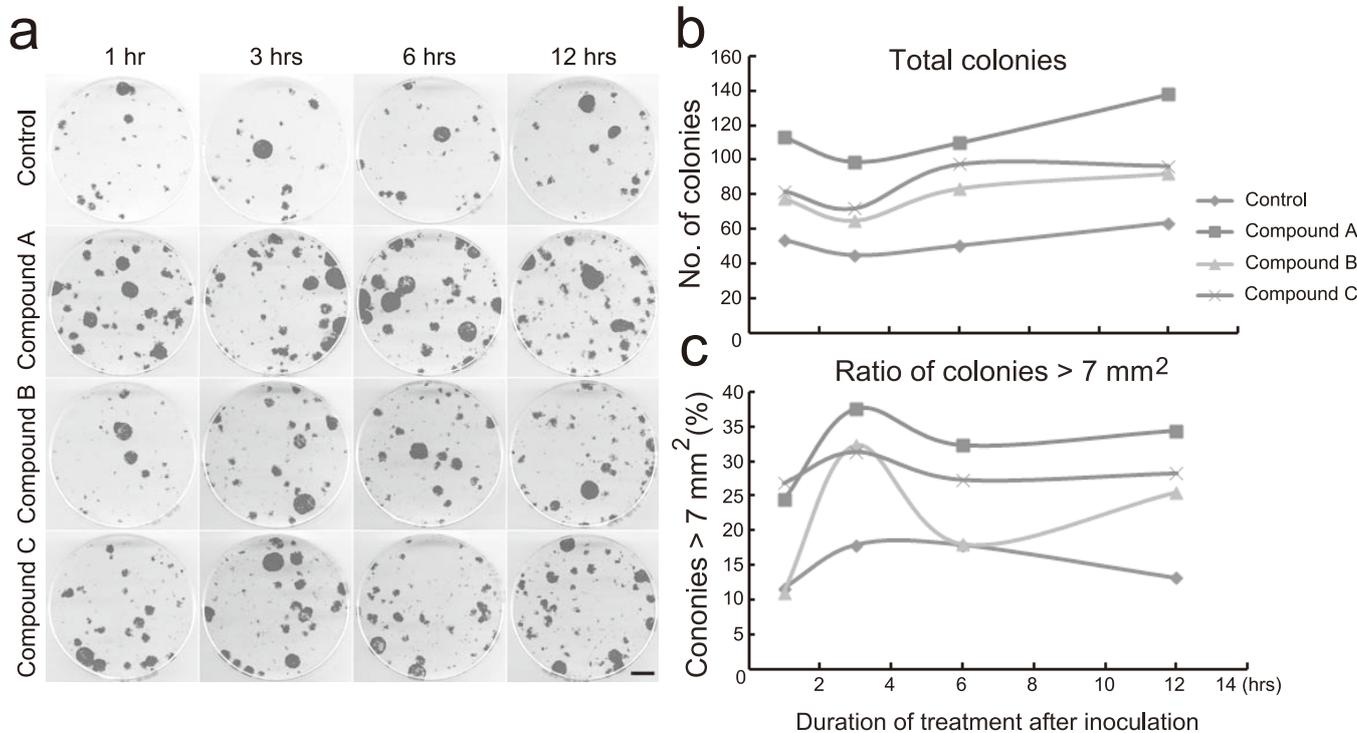


図4 低分子化合物の処理時間の検討

- a) 細胞播種後直ちに低分子化合物を添加し、1、3、6、12時間後に培地交換を行った後、計12日間培養を行い、コロニー形成能を測定した。スケールバー：10mm。
- b) 低分子化合物処理時間と12日後の総コロニー数。
- c) 低分子化合物処理時間と12日後の面積が7mm²以上のコロニーの割合。1時間の低分子化合物処理でコロニー形成能に関して、十分な効果が観察された。

(参考文献)

- 1) Green H, :The birth of therapy with cultured cells, *Bioessays* 30, 897-903, 2008.
- 2) Gallico, GG, O'Connor NE, Compton CC, et al, :Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium, *N. Engl. J. Med.* 311, 448-45, 1984.
- 3) Pellegrini G, Ranno R, Stracuzzi G, et al, :The control of epidermal stem cells (holoclonies) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin, *Transplantation* 68, 868-879, 1999.
- 4) Ronfard V, Rives JM, Neveux Y, et al, :Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix, *Transplantation* 70, 1588-1598, 2000.
- 5) Barrandon Y, Green H, :Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2302-2306, 1987.
- 6) Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y, :Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 76, 1063-1073, 1994.
- 7) Mathor MB, Ferrari G, Dellambra E, et al, :Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1031-1036, 1996.
- 8) Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, et al, :Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.* 12, 1397-1402, 2006.
- 9) Rochat A, Barrandon Y, :Regeneration of epidermis from adult keratinocyte stem cells. In *Essentials of stem cell biology* 2ed edition. Lanza R, Hogan B, Melton D, et al, editors, Academic press, 551-560, 2009.
- 10) Rama P, Matuska S, Paganoni G, et al, :Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N. Engl. J. Med.* 362, 147-155, 2010.
- 11) Jones PH, Watt FM, :Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 73, 713-724, 1993.

炎症性皮膚疾患におけるストレス応答性キナーゼ ASK1 の機能解析

東京大学大学院薬学系研究科

一條 秀憲、水上 潤哉

The skin provides a first line of defense against various physicochemical and biological stresses such as wound and microbial pathogens and induces inflammatory response. The adaptive responses to these stresses are essential for the maintenance of homeostasis and dependent on the stress recognition mechanism and intracellular signaling systems. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is activated in response to various stimuli such as oxidative stress and a mitogen activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) family member that activates both the p38 and JNK signaling cascades. Recent studies revealed that ASK1 is required for the production of inflammatory cytokines and migration of macrophages and induces apoptosis of keratinocytes in the skin.

Contact hypersensitivity (CHS) is a form of delayed-type hypersensitivity, an immune response to a variety of reactive contact sensitizers, such as metals, preservatives, and hair dyes. Whereas the sensitization phase of CHS has been focused on as a model for investigating T-cell-dependent immune response by immunologists, the elicitation phase in which allergic contact dermatitis is clinically manifested has received much attention from clinicians. Even in the mouse model of CHS, however, it is difficult to distinguish between the role of a certain molecule involved in the CHS response in the sensitization phase and that in the elicitation phase. Here we show, using a chemical genetic approach, that ASK1 plays an important role in the both sensitization and elicitation phase of the CHS response and would be a therapeutic target for the inflammatory skin diseases.

1. 緒言

皮膚の炎症性疾患は、化粧品の安全性を考える上で最も重要な疾患であり、その病態ならびに治療・予防方法を明らかにすることは、安全性の高い化粧品やその安全な使用方法の開発に向けての必須の課題である。

皮膚は常に外界からの様々なストレスに直接さらされる組織であり、高度に発達した獲得免疫系と、幅広い生物種において保存されている自然免疫系とを協調的に制御することで、生体を守る最前線の防御壁としての役割を果たしている¹⁾。しかし、過大なストレス刺激や免疫系の不全あるいは過剰応答はその防御機構を破綻させ、多様な炎症性皮膚疾患を引き起こす。もっともポピュラーな炎症性皮膚疾患としては接触皮膚炎が知られており、いったん接触抗原に対する感作が成立すると抗原に接触する度に皮膚炎を引き起こすため、日常生活に多大な影響を及ぼす疾患として多くの患者が苦しんでおり、化粧品もその原因の一つとして重要視されている。治療法としては、初期感作を未然に防ぐこと自体は容易ではないため、抗原に再暴露した際の発症をいかに予防するかが重要であるが、その手がかりはまだつかめていない。その他の炎症性皮膚疾患について

も、その多くは対症療法に頼っているのが現状である。

このような炎症性皮膚疾患の病態への理解を深め、治療・予防方法を見いだすためには、抗原を含む様々なストレス刺激を受容・認識し、その情報を免疫系へと正確に伝達する分子機構を明らかにする必要がある。我々は、その機構を担う分子として、様々なストレスに応答してアポトーシスの誘導²⁾や炎症性サイトカインの産生調節に働く分子であり^{3,4)}、自然免疫応答においても重要な機能をもつ⁵⁾ ASK1 というストレス応答性キナーゼに着目した。最近、ASK1 ノックアウトマウスの皮膚では接触過敏反応が著しく減弱することを見いだしたことから、ASK1 が様々な炎症性皮膚疾患における鍵因子と考え、ASK1 の皮膚疾患における機能を明らかにするとともに、治療・予防の標的としての有用性を探ることを本研究の目的とした。

2. 実験

本研究では、おもにマウス接触過敏反応モデルを用いて獲得免疫系における ASK1 の新たな機能を明らかにすることで、その病態を解明するとともに、治療・予防への応用に向けての創薬基盤を確立することを目的とした。研究内容としては、マウスの個体レベルでの解析に加え、細胞レベル、分子レベルまで解析を進め、ASK1 の活性を時期特異的に、濃度依存的に制御できるノックインマウス (ASK1^{ASKA}マウス) を新たに作製し様々な実験に用いることで、ASK1 の治療標的としての重要性を十分に検討した。

(1) 接触過敏反応における ASK1 の機能解析:

野生型マウスおよび ASK1KO マウスに DNFB、FITC



A role of stress response kinase ASK1 in the inflammatory skin disease.

Hidenori Ichijo*, Junya Mizukami

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

をDay0、1に感作させ、Day5に耳に再感作を行い、24時間後の炎症の程度を耳の腫脹で検討した。

(2) 初期感作後の樹状細胞における ASK1 の機能解析

これまでの解析から接触過敏反応の感作期においてASK1が重要な役割を担うことを明らかにしていることから、まず感作初期に関わる樹状細胞の形成、機能について検討した。

(3) 感作後のリンパ球の分化やサイトカイン産生における ASK1 の役割の解析

初期感作後リンパ球でのサイトカイン産生パターンの解析から、ASK1は T_H の分化誘導を制御することが示唆される。 T_H の分化誘導は抗原提示細胞である樹状細胞とナイーブTリンパ球との相互作用が非常に重要であり、樹状細胞、Tリンパ球、それぞれの細胞における細胞内シグナル伝達および共刺激分子の発現等により厳密に制御されている。そこで、感作リンパ節細胞の養子免疫実験やサイトカイン産生、ならびにナイーブTリンパ球から各 T_H サブセットへの分化におけるASK1の関与を検討した。

(4) ASK1^{ASKA} マウスを用いた接触過敏反応の惹起相における ASK1 の役割の解析

接触過敏反応は初めて抗原に接触する感作期(Day0-5)と再度抗原に接触してから炎症反応がおこる炎症惹起期(Day6以降)に分けられる。ASK1ノックアウトマウスの解析から感作期における重要性は明らかとなっているが、炎症惹起期における機能はまだ明らかとなっていない。ASK1^{ASKA}マウスにDNFBを塗布して感作を成立させたのち、Day5に再度DNFBを塗布する前に低分子化合物である1Na-PP1の投与/非投与群を検証することで、炎症惹起期のASK1の機能を明らかにした。

3. 結果

(1) ASK1 は CHS 反応の誘導に働く

CHSにおけるASK1の役割を検討するために、我々は除毛した背部皮膚にDNFBを塗布することで、WTマウス、ASK1KOマウスを感作させた。

5日後にCHSを惹起させるため、DNFBを経表皮的に塗布し、耳にチャレンジ(再塗布)を行った⁶⁾。WT、ASK1KOマウスともにDNFB塗布後に耳の浮腫を生じたが、耳の腫脹を測定したところASK1KOマウスではWTマウスと比較して有意に耳の腫脹が軽減していた。接触感作物質(contact sensitizer)としてFITC(Fluorescein isothiocyanate)を用いた時も同様にASK1KOマウスではCHS反応が減弱していた。

(2) ASK1 は皮膚ランゲルハンス細胞の分化、遊走能に寄与しない

CHSでは表皮に存在するLangerhans cell(LC)が抗原を取り込み、所属リンパ節へ遊走することが重要である。まず初めにLCでのASK1の役割について検討するため、表皮シートをPEラベルされたMHC class II抗体を用いて染色した。MHC class II陽性のLCの形態、細胞密度はWTマウス、ASK1KOマウスでは同様であった。次にLCの遊走を検討するため、FITCをマウス皮膚に塗布した。LCは皮膚に塗布されたFITCを取り込み、FITC陽性細胞として所属リンパ節へ遊走する⁷⁾。FITC塗布24時間後、所属リンパ節を採取し、LCの数をフローサイトメトリーで測定したところ、所属リンパ節でのMHC class II-FITC陽性LCの数は、WTマウス、ASK1KOマウスで同様であった。以上の結果より、LCの発生やリンパ節への遊走にASK1は影響を及ぼさなかった。

(2) ASK1KO マウスでは DNFB 感作後の Th17 細胞の分化が低下する

リンパ節に遊走したLCはナイーブT細胞に抗原提示を行い、ハプテン特異的なT細胞に誘導することが知られている^{8,9)}。そこで、次に抗原提示を受けたリンパ節細胞におけるASK1の役割を解析するために、DNFB感作WTマウス、ASK1KOマウスをドナーとして所属リンパ節よりリンパ節細胞を採取し、ナイーブなWTマウス、ASK1KOマウスに後天的に細胞を移植した。感作ASK1KOリンパ節細胞のWTレシピエントマウスでは、感作WTリンパ節細胞のレシピエントマウスと比較してCHS反応が抑制されていた。逆に、WTドナー由来の感作リンパ節細胞をナイーブASK1KOマウスに移植した時には、DNFBチャレンジにより正常なCHS反応が惹起された。これらの結果から、感作リンパ節細胞でのASK1がCHS反応において重要な役割を担うことが示唆された。

感作後のリンパ節内では抗原特異的なリンパ球の分化が誘導され、再度抗原刺激を受けると局所へ遊走して炎症性サイトカインの産生に重要な役割を担う。ASK1の欠損がDNFB感作後のリンパ球にどのように影響するかを調べるために、次にリンパ球の構成、サイトカイン産生や分化について解析した。

DNFB誘導性CHSでは感作後にTh1細胞、Th17細胞が分化誘導される。DNFB感作によるIFN- γ 産生細胞およびIL-17産生細胞の数はWT、ASK1KOマウスにおいていずれも増加していた。しかしながら、ASK1KOマウスではWTマウスと比較してIL-17産生細胞数が有意に減少していた。DNFB感作マウスからリンパ節細胞を採取し、in vitroでDNBS(dinitrobenzene sulfonic acid)でチャレンジしたところ、ASK1KOマウス由来リンパ節細胞からのIFN- γ

産生は、WTマウスと比較して差は見られなかった、興味深いことにASK1KOマウス由来のリンパ節細胞ではDNBSチャレンジによるIL-17の産生は著しく低下していた。IL-17は主にナイーブT細胞から分化したTh17細胞から産生されることが知られ¹⁰⁾、特にその分化には制御転写因子ROR γ t(RAR-related orphan nuclear receptor γ t)が重要な役割を担うことが知られている¹¹⁾。そこでDNFB感作5日後のリンパ節細胞からCD4+T細胞を分離し、転写因子のmRNA発現を検討したところ、DNFB感作後のASK1KOマウス由来CD4+T細胞ではROR γ tの発現が有意に低下していた。以上の結果からASK1はDNFB感作後にTh17への分化やIL-17産生に影響することが示唆された。

(4) ASK1は惹起相においてIL-17産生を促進しCHSを誘導する

次にCHSの惹起相におけるASK1の時期特異的な役割を検討するため、我々は通常は野生型ASK1と同じく機能するものの、ATP類似薬(1Na-PP1)の投与によって活性が阻害されるASK1変異体のノックインマウス(ASK1^{ASKA}マウス)を作製した。この変異体はASKA(ATP analog-sensitive allele)テクノロジーに基づいて設計したもので、ASK1のキナーゼ領域への点変異の導入によりATP結合部位を改変することで、天然型ATPを用いたキナーゼ活性は野生型キナーゼと同等に維持されるが、1Na-PP1によって選択的に活性阻害を受ける(1Na-PP1は野生型のプロテインキナーゼは一切阻害しない)^{12,13,14)}。

まず我々は、ASK1^{ASKA}をHEK293細胞に過剰発現させ、1Na-PP1によるASK1の活性阻害効果を検討した。Flag-ASK1^{ASKA}を過剰発現したHEK293細胞は、Flag-ASK1を過剰発現させた細胞とともにH₂O₂刺激依存的な活性化が検出できた。しかし、1Na-PP1を前投与しておく、Flag-ASK1^{ASKA}の過剰発現ではH₂O₂刺激依存的なASK1の活性化が抑制された。一方、1Na-PP1の類似体である1NM-PP1によるASK1の活性阻害効果は弱いことが分かった。Flag-ASK1を過剰発現させた細胞では1Na-PP1、1NM-PP1によるASK1の活性化阻害効果は見られなかった。次にASK1^{ASKA}ノックインマウスにおけるPP1の活性阻害効果を検討した。H₂O₂刺激後の1Na-PP1のASK1活性阻害効果は、ASK1^{ASKA}マウス骨髄由来マクロファージにおいて1Na-PP1濃度依存的に見られるが、WTマウス由来骨髄マクロファージでは阻害効果が見られなかった。これらの結果は、1Na-PP1が選択的かつ強力にASK1の活性化を阻害し、高濃度のこの化合物が野生型のASK1シグナル伝達に影響を及ぼさないことを示している。

次にin vivoでのASK1シグナル伝達における1Na-PP1による阻害効果の効力および特異性を検討した。コントロール群、惹起相投与群に分けて1Na-PP1を投与し、チャレ

ンジ24時間後の耳の厚さを測定したところ、惹起相でのみ1Na-PP1を投与したマウスにおいて耳の腫脹が低下していた。以上の結果から、ASK1はCHSの惹起相で炎症反応に重要な役割を担うことが示された。

また、DNFB感作後のASK1^{ASKA}マウスから採取したリンパ節細胞に、in vitroで1Na-PP1を加え、惹起相を想定したDNBS依存的なサイトカイン産生を検討した。その結果、1Na-PP1投与のリンパ節細胞では1Na-PP1非投与リンパ節細胞と比較して、DNBS依存的なIFN- γ の産生には差は見られなかったが、IL-17の産生が有意に低下していた。

4. 考察

CHSの感作期および惹起期でASK1が非常に重要な役割を担うことが明らかとなった。我々はCHSにおけるASK1の時期特異性を解明するため、ASKAを用いた化学遺伝学的手法によりノックインマウスを作製し実験を行った。小分子阻害剤の不利な点は機能的な選択性にあるが、蛋白キナーゼ情報伝達解析のための化学遺伝学的手法は、分子特異性において小分子阻害剤より優れることが報告されている¹⁵⁾。この化学遺伝学的手法を用いて、CHSにおけるASK1の時期特異的な役割および重要性を見いだした。

CHSの病因についての研究は、ナイーブT細胞が抗原特異的なエフェクターT細胞に分化する感作相に焦点がおかれている報告が多い。DNFB誘導性CHSでは、感作相でランゲルハンス細胞が抗原を取り込み、所属リンパ節へ遊走する。リンパ節でランゲルハンス細胞から抗原提示を受けたナイーブT細胞はTh1、Th17などのエフェクターT細胞に分化する¹⁶⁾。Th17細胞への分化はIL-23、IL-6、TGF- β などのサイトカイン制御だけでなく転写因子の発現が必要で¹⁷⁾、ROR γ tはTh17細胞に特異的に発現する転写因子として同定されている¹¹⁾。特に分化したTh17細胞から産生される炎症性サイトカインの一つであるIL-17はマウスCHSの誘導に必要不可欠である¹⁸⁾。またIL-17はヒトにおいても接触皮膚炎のみならず感染防御や慢性炎症性疾患の長期化など、炎症反応において重要な役割を担っている¹⁹⁾。ASK1KOマウスでは感作後のCD4+T細胞でROR γ t発現が低下しており、ASK1が感作期においてTh17への分化制御を担う可能性が示唆された。またASK1KOマウス由来の感作リンパ節細胞ではDNBS依存的なIL-17産生が低下していた。

しかしながら、DNFB誘導性CHSにおいて惹起相のみのASK1活性阻害でCHS反応が抑制され、in vitroにおいて感作リンパ節細胞はDNBS刺激時のASK1活性化を阻害することでIL-17産生が有意に低下した。これらの結果から、ASK1は感作期におけるTh17分化制御に加え、惹起相においてはエフェクター細胞からのIL-17産生を促し、CHS反応を誘導することが示唆された(Fig. 1)。

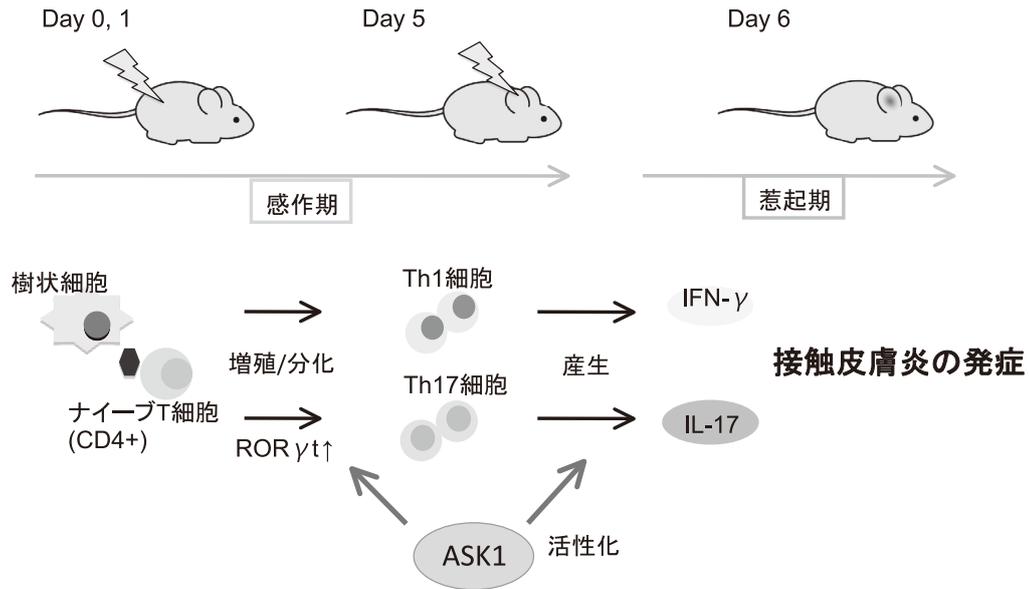


Figure 1 The role of ASK1 in CHS.

ASK1 は、感作期においてヘルパーT細胞でのROR γ tの発現やTh17への分化制御を担い、惹起相においてはエフェクター細胞からのIL-17産生を促し、CHS反応を誘導することが示唆された。

5. 総括

IL-17はCHSの病因の主要な役割を担うが、ASK1を介するIL-17産生機構や実際にどのような炎症細胞が関与しているかなどは依然として検討する余地がある。それでもなお、ASK1の活性を制御することで、惹起相でのIL-17産生の調節を介して、臨床的に局所の炎症反応や組織破壊を制御できる可能性があり、ASK1が新たなCHSの治療標的となることが期待される。

(引用文献)

- 1) Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.Z., Nickoloff, B.J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 679-691 (2009)
- 2) Ichijo H, et al. (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275:90-9
- 3) Osaka N, et al. ASK1-dependent recruitment and activation of macrophages induce hair growth in skin wounds. *J. Cell Biol.* 2007, 176:903-909
- 4) Iriyama T, et al. (2009) ASK1 and ASK2 differentially regulate the counteracting roles of apoptosis and inflammation in tumorigenesis. *EMBO J* 28:843-853.
- 5) Matsuzawa A, et al. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat. Immunol.* 2005, 6:587-92
- 6) Kabashima, K. et al. Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat. Med.* 9, 744-749 (2003)
- 7) Macatonia, S.E., Knight, S.C., Edwards, A.J., Griffiths, S. & Fryer, P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizers fluorescein isothiocyanate. Functional and Morphological studies. *J. Exp. Med.* 166, 1654-1667 (1987)
- 8) Grabbe, S., Schwarz, T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today* 19, 37-44 (1998)
- 9) Gocinski, B.L., Tigelaar, R.E. Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J. Immunol.* 144, 4121-4128 (1990)
- 10) Steinman, L. A brief history of T_H17, the first major revision in the T_H1/T_H2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 13, 139-145 (2007)
- 11) Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126:1121-33.
- 12) Denzel, A. et al. Cutting edge: a chemical genetic

- system for the analysis of kinases regulating T cell development. *J. Immunol.* **171**, 519-523 (2003)
- 13) Ventura, J.J. et al. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol. Cell* **21**, 701-710 (2006)
- 14) Chen, X. et al. A chemical-genetic approach to studying neurotrophin signaling. *Neuron* **46**, 13-21 (2005)
- 15) Bishop, A.C. et al. A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**, 395-401 (2000)
- 16) Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S., Ishigame, H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol. Rev.* **226**, 57-79 (2009)
- 17) Dong C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunol. Rev.* 2008, **226**:80-86
- 18) Nakae, S. et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* **17**, 375-387 (2002)
- 19) Miossec, P., Korn, T., Kuchroo, V.K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. ENGL. J. MED.* **361**, 888-898 (2009)

接触性皮膚炎におけるIL-17ファミリーサイトカインの役割

東京大学医科学研究所フロンティア研究拠点

中 江 進

Interleukin-25 (also called IL-17E), which is a member of the IL-17 family of cytokines, is preferentially produced by epithelial cells and immune cells such as macrophages, mast cells, basophils, eosinophils and T cells. IL-25 treatment in mice induces Th2-cytokine production, resulting in the development of eosinophilia in the lungs and guts and increased serum IgG1 and IgE. Moreover, IL-25 can induce Th2 cell differentiation and activation, suggesting to the involvement of Th2-type immune responses such as nematode infection and allergic disorders. Indeed, it was shown that IL-25 is crucial for host defense against *Trichuris muris* and *Nippostrongylus brasiliensis* using IL-25-deficient mice, and for the development of allergic airway inflammation using mice treated with anti-IL-25 neutralizing Ab. On the other hand, IL-25 can inhibit Th17 cell differentiation dependently of IL-13, contributing to the suppression of Th17-mediated autoimmune diseases. Therefore, these observations suggest that IL-25 is considered to be a potent enhancer of the Th2-type immunity, but a suppressor of the Th1 and Th17-type immunity.

Contact hypersensitivity (CHS) is classically considered to be a IFN- γ -producing Th1 and Tc1 cell-mediated cutaneous allergic disease. On the other hand, the role of Th2 cells/cytokines in the pathogenesis of CHS is also investigated using gene-deficient mice. IL-4-deficient mice show the reduced CHS induced by TNCB and DNFB, but normally developed CHS induced by oxazolone. Contrast to IL-4-deficient mice, DNFB-induced CHS was normally developed in IL-13-deficient mice. Mice deficient in STAT6, which is an essential transcription factor for Th2 cell development and IL-4 and IL-13 signals, show the significant attenuation of CHS induced by oxazolone, TNCB, FITC or paraphenylenediamine, suggesting that IL-4 and/or IL-13 is important for the induction of CHS. We and other investigators demonstrated that Th17 cells/cytokines are also involved in the development of CHS induced by DNFB and TNCB. Therefore, it is considered that both Th2 and Th17 cells/cytokines are required for the optimal development of CHS, and IL-25 may be involved in the induction of CHS by enhancing Th2-type, but suppressing Th17-type, immune responses. However, the precise role of IL-25 in the pathogenesis of CHS is poorly understood. Thus, in the present study, we investigated the contribution of IL-25 to the development of CHS using IL-25-deficient mice.

1. 緒 言

接触型過敏症は、金属や化学物質の経皮接触により、自己タンパク質がそれらによって構造の変化あるいは修飾(ハプテン化)によって抗原性を取得することによっておきるアレルギー性炎症である。接触型過敏症の炎症部位ではIFN- γ の発現上昇やIFN- γ を産生するTh1細胞の集積が認められたため、従来、接触型過敏症はIFN- γ (Th1/Tc1細胞) 依存的なアレルギー性炎症と考えられてきた。しかしながら、IFN- γ あるいはIFN- γ 受容体(IFN- γ R) 遺伝子欠損マウスではoxazolone、trinitrochlorobenzene (TNCB)、dinitrofluorobenzene (DNFB) や fluorescein isothiocyanate (FITC) の経皮暴露によって誘導した接触型過敏症は、野生型マウスと同程度、誘導されることが示されており¹⁻⁴⁾、接触型過敏症の発症にIFN- γ の寄与は大きくないことが示されている。一方、Th1細胞の分化・機能を相互排他的に

抑制するTh2型サイトカインであるIL-4およびIL-13に関しては、IL-4遺伝子欠損マウスでは、oxazoloneによる接触型過敏症は野生型マウスと同程度、誘導されるが、TNCBとDNFBによる接触型過敏症は抑制される⁵⁻⁸⁾。IL-13遺伝子欠損マウスでは、DNFBによる接触型過敏症は野生型マウスと同様に誘導される⁹⁾。IL-4とIL-13の両方のシグナルに関わるSTAT-6遺伝子欠損マウスでは、oxazolone、TNCB、DNFBおよびFITCによる接触型過敏症が抑制される¹⁰⁾。したがって、接触型過敏症の発症には、従来考えられていたTh1サイトカインIFN- γ よりもTh2サイトカインIL-4やIL-13の寄与の方が大きいようである。

IL-17ファミリーサイトカインは、アミノ酸配列に相同性の高い6つの異なる分子(IL-17A-F)で構成されている。IL-17受容体(IL-17R)ファミリーにもアミノ酸配列に相同性がある5つの異なる分子(IL-17RA-RE)が見つかっている¹¹⁾。IL-17とIL-17F遺伝子は近接しており、両者間のアミノ酸配列の相同性は他のIL-17ファミリー(IL-17B-E)間と比べて最も高い¹¹⁾。また、IL-17とIL-17Fは共に、同一の受容体(IL-17RAとIL-17RCのヘテロ二量体)に結合する。一方、IL-17RAは、IL-17RBとヘテロ二量体を形成すると、IL-17E (= IL-25) の受容体として機能し¹¹⁾、IL-17REとヘテロ二量体を形成すると、IL-17Cの受容体とし



Role of the IL-17 family cytokines in the development of contact hypersensitivity

Susumu Nakae

Frontier Research Initiative, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

て機能する^{12,13}。IL-17BはIL-17RBと結合することも知られているが、IL-17Dの受容体およびIL-17RDのリガンドについては現在のところ、よくわかっていない。

接触型過敏症の患者から樹立したT細胞株の中にはIL-17Aを産生するものがあることが報告されている¹⁴。したがって、接触型過敏症の発症や病態形成に、IL-17Aを産生するTh17細胞の関与が示唆されていた。実際に、IL-17A遺伝子欠損マウスでは、oxazolone、TNCB、DNFBおよびFITCによる接触型過敏症応答が抑制されることが報告されている^{15,16}。一方、IL-17F遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと同程度にTNCBによる接触型過敏症が誘導されることから¹⁷、接触型過敏症の誘導にはIL-17FよりもIL-17Aが重要であると考えられる。IL-17Aは、接触型過敏症の感作期におけるハプテン特異的なT細胞の活性化に重要であり、Th17細胞とIL-17Aを産生するCD8陽性T細胞(Tc17細胞)がともに、接触型過敏症の発症や病態形成に重要であることが示されている¹⁸。したがって、接触型過敏症応答の発症および病態の形成には、Th2サイトカインだけでなくTh17サイトカインの関与が明らかになっている。しかしながら、IL-17ファミリーサイトカインのうち、接触型過敏症の誘導におけるIL-17AとIL-17F以外のIL-17ファミリーサイトカインの関わりについては全く知られていない。

マウスにIL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17DおよびIL-17Fを投与すると好中球の浸潤が観察されるのに対し¹⁹、IL-17E(=IL-25)を投与した場合には、Th2サイトカインの上昇や好酸球の浸潤が認められる¹⁹。また、IL-25は、未感作T細胞をIL-2の存在下で活性化させると、IL-4-IL-4R-STAT6経路を介して、Th2細胞への分化を促進し²⁰、喘息などの好酸球の浸潤を主徴とするTh2サイトカイン依存性アレルギー疾患の発症に関与することが知られている²¹。したがって、IL-25はTh2細胞の分化誘導や活性化を介して接触型過敏症の誘導に関与する可能性が考えられる。そこで、本研究では、IL-17AとIL-17F以外のIL-17ファミリーサイトカインのうち、IL-25に焦点を当て、接触型過敏症の発症機構におけるIL-25の役割を明らかにすることを目的とする。

2. 実験

2.1 マウス

C57BL/6背景の野生型マウスは日本SLCから購入した。IL-25遺伝子を破壊した129背景のES細胞をもとに作製したキメラマウスをLexicon社から購入した。このキメラマウスの♂をC57BL/6背景の野生型マウスの♀と交配し、IL-25遺伝子ヘテロマウスを得た。最終的にC57BL/6背景に八代戻し交配をし、C57BL/6背景のIL-25欠損マウスを得た。

2.2 接触型過敏症の誘導

マウスの背中全体の毛をバリカンでよく剃り、剃毛から二日後に、剃毛部分に2.0% FITC懸濁液を塗布した。5日後、マウスをイソフルラン吸入麻酔下で、耳介の厚さをダイヤルゲージノギスで測定し(basal level)、引き続き、左側の耳介皮膚の外側および内側にそれぞれ20μLずつ(総量40μL)の0.5% FITC溶液を、右側の耳介皮膚の外側および内側にそれぞれ20μLずつ(総量40μL)の溶媒を塗布した。耳介に試薬を塗布した後、経時的に耳介の厚さを測定した。接触型過敏症の評価は、耳介に試薬を塗布する前と後の耳介の厚さの差分で評価を行った。

2.3 表皮ランゲルハンス細胞の遊走能測定

マウスの左側の耳介の皮膚に20μLの2.0% FITC懸濁液を、右側には同量の溶媒のみを塗布した(両耳とも外側の皮膚のみ)。24時間後、FITCを塗布した左側と溶媒のみを塗布した右側の顎下リンパ節をそれぞれ分けて回収した。回収したリンパ節からリンパ細胞をFACSバッファー(2%ウシ胎児血清(FBS)を含むHBSS)で懸濁した。そのリンパ節浮遊液に、anti-mouse CD16/CD32 mAbを加え、氷上で15分間静置した。引き続き、PE anti-mouse CD11c mAbとAPC anti-mouse MHC class II mAbを加え、氷上で30分間静置した。その後、未反応の抗体をのぞくために、その細胞をFACSバッファーで洗浄し、200μLのFACSバッファーで再懸濁した。さらに、等量の2% 7-aminoactinomycin D溶液を加えたあと、FACS Caliburで、7-aminoactinomycin D-negative MHC class II^{hi} CD11c⁺細胞中のFITC陽性細胞の割合を評価した。

2.4 FITC 特異的なリンパ節細胞の応答試験

マウスの両方の耳介の皮膚に20μLの2.0% FITC懸濁液を塗布した。5日後、両側の顎下リンパ節を回収し、96wellプレートの1ウェルあたり、 2×10^5 リンパ節細胞を、40μg/mLのFITCの存在下で72時間培養を行った。培養後、上清中のサイトカインレベルを測定するために、1ウェルあたり100μLの培養上清を回収し、-20℃で保存した。上清を回収した後、細胞には、20μLの0.25μCi/mL[3H]-チミジンを加え、さらに6時間の培養を行った。その後、細胞内のDNAに取り込まれた[3H]-チミジン量を定量するために、セルハーベスターを用いて、ガラスフィルター上に細胞DNAを吸着させ、放射活性をマイクロベーターシンチレーションカウンターで測定した。培養上清中のサイトカインのレベルをELISAキットを用いて測定した。測定方法はキット付属のプロトコールに準じておこなった。

2.5 リンパ節細胞の移植

マウスの両方の耳介の皮膚に20μL、毛を刈った背中の

皮膚に200 μ Lの2.0% FITC懸濁液を塗布した。5日後、両側の顎下、鼠径、腋窩、上腕リンパ節を回収し、リンパ節細胞(1 \times 10⁷細胞/マウス)を未感作マウスに静脈注射した。翌日、このマウスをイソフルラン吸入麻酔下で、耳介の厚さをダイヤルゲージノギスで測定し(basal level)、引き続き、左側の耳介皮膚の外側および内側にそれぞれ20 μ Lずつ(総量40 μ L)の0.5% FITC溶液を、右側の耳介皮膚の外側および内側にそれぞれ20 μ Lずつ(総量40 μ L)の溶媒を塗布した。耳介に試薬を塗布した後、経時的に耳介の厚さを測定した。接触型過敏症の評価は、耳介に試薬を塗布する前と後の耳介の厚さの差分で評価を行った。

3. 結果

3.1 接触型過敏症の誘導における IL-25 の寄与について

FITCによる接触型過敏症の誘導にIL-25が関与しているかどうかを明らかにするために、IL-25欠損マウスを用いて評価を行った。その結果、C57BL/6背景のIL-25欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、FITCによる接触型過敏症は顕著に抑制された(図1)。したがって、IL-25はFITCによる接触型過敏症の誘導に重要な役割を演じていることが明らかになった。

3.2 接触型過敏症の感作期における IL-25 の役割

IL-25を過剰発現させたマウスでは、Th2サイトカインだけでなく、TNFなどの炎症性サイトカインの産生亢進が認められる²²⁾。TNFは表皮からリンパ節へのランゲルハンス・樹状細胞の遊走に関わる重要なサイトカインであ

る。そこで、in vivoでTNF産生を促進するIL-25は、皮膚ランゲルハンス・樹状細胞の遊走に影響をもつのかどうか、IL-25欠損マウスを用いて評価を行った。マウスの片側の耳介皮膚に、FITCを塗布し、もう一方の耳介皮膚にはコントロールとして溶媒のみを塗布する。翌日、FITCを塗布した側のリンパ節(FITC side)と溶媒のみを塗布した側のリンパ節(Vehicle side)をそれぞれ、回収する。FITCを塗布した側のリンパ節のみに、FITCで修飾された自己の抗原を取り込んだ皮膚のランゲルハンス細胞および樹状細胞が、リンパ節へ移動し、FITC陽性の樹状細胞としてFACSにより検出される。その結果、リンパ節へ移動してくるFITC陽性の樹状細胞の数は、野生型マウスとIL-25欠損マウスとの間に差は認められなかった。したがって、IL-25は、接触型過敏症の感作期におけるランゲルハンス・樹状細胞の遊走には必須ではないことが明らかになった。

マウスにFITCを塗布した後、5日目にはFITCに対する感作が成立している。実際に、その時点で、従属リンパ節を回収し、このリンパ節細胞をハプテンとともに培養すると、リンパ球(主にT細胞)の増殖やサイトカイン産生といったハプテン特異的な活性化が観察できる。FITCで感作したIL-25欠損マウスのリンパ節では、FITC特異的な増殖及びサイトカイン産生能は、野生型マウスと同程度、観察された。

FITCで感作したマウスのT細胞を未感作のマウスに移入した後、この細胞を移入された未感作のマウスに、FITCを塗布すると、未感作であるにも関わらず、接触型過敏症を誘導することができる。この接触型過敏症の炎症の程度は、感作されたT細胞の数および活性化能に比例する。FITCで感作したIL-25欠損マウスおよび野生型マウスのリンパ節からT細胞を精製し、そのリンパ節を未感作の野生型マウスへ移入した。翌日、T細胞を移入したマウスの耳介皮膚にFITCを塗布し、接触型過敏症を誘導した。その結果、FITCによる接触型過敏症は、IL-25欠損マウスのT細胞を移植した群と野生型マウスのT細胞を移植した群の間で差はみられなかった(図2)。

以上の結果より、IL-25は感作期におけるFITC特異的なT細胞の誘導には必須ではないことが明らかになった。

3.3 接触型過敏症の炎症惹起期における IL-25 の役割

これまでの結果より、IL-25は、接触型過敏症の誘導において、感作期におけるFITC特異的なT細胞の誘導よりも、炎症惹起期における局所の炎症に重要であることが示唆された。

そこで、IL-25は、感作期ではなく、炎症惹起期に重要であることを証明するために、FITCで感作した野生型マウスのリンパ節細胞のT細胞を、未感作のIL-25欠損マウ

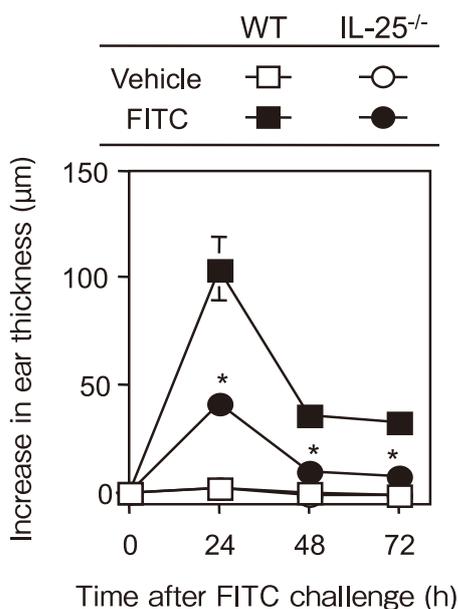


図1 接触型過敏症における IL-25 の関与
IL-25欠損マウスに、FITCを塗布して接触型過敏症を誘導した。データは平均値 + SEM。* p < 0.01

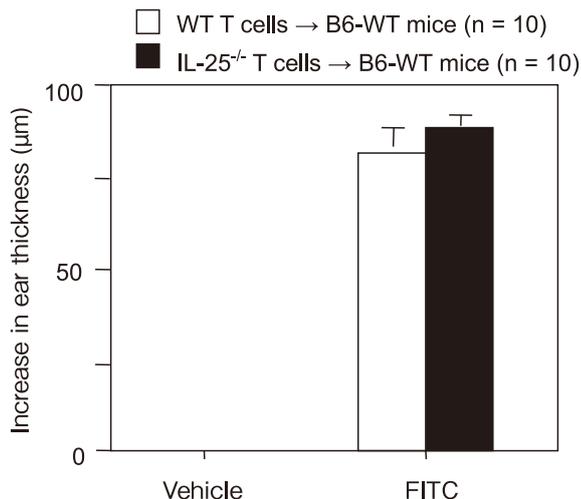


図2 接触型過敏症の感作期におけるIL-25の要求性
FITC感作を行った野生型マウスおよびIL-25欠損マウスのリンパ節細胞を、未感作の野生型マウスへ移入した。その後、移入したマウスにFITCを塗布して接触型過敏症を誘導した。データは平均値 + SEM。

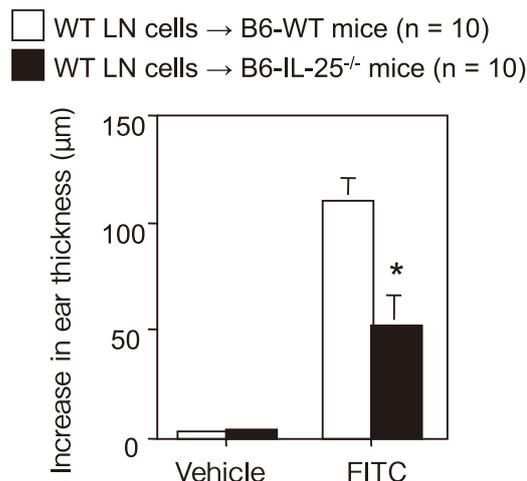


図3 接触型過敏症の炎症誘導期におけるIL-25の要求性
FITC感作した野生型マウスのリンパ節細胞を未感作の野生型マウスおよびIL-25欠損マウスに移入した。細胞を移入したマウスにFITCを塗布して接触型過敏症を誘導した。データは平均値 + SEM。* p < 0.01。

ス (WT LN cells → IL-25欠損マウス) および野生型マウス (WT LN cells → 野生型マウス) に移入し、そのマウスの耳介皮膚に、FITCを塗布して接触型過敏症を誘導した。この場合、すでにFITCで感作された野生型マウスのLN細胞を同数移入しているため、感作相の影響は (WT LN cells → IL-25欠損マウス) と (WT LN cells → 野生型マウス) では同じと考えることができる。したがって、このマウスに接触型過敏症を誘導した場合、炎症惹起期におけるIL-25の影響について評価することができる。その結果、(WT LN cells → IL-25欠損マウス) では (WT LN cells → 野生型マウス) に比べて、FITCによる接触型過敏症は有意に抑制された (図3)。従って、これまでの結果から、IL-25は、FITCによる接触型過敏症の誘導において、感作期ではなく、炎症惹起期における炎症の誘導に重要なサイトカインであることが明らかになった。

4. 考察

本研究では、IL-25は接触型過敏症の誘導および病態形成に関与するのかどうかをIL-25欠損マウスを用いて評価を行った。その結果、IL-25欠損マウスではFITCによる接触型過敏症が顕著に抑制されることが本研究を通じて明らかになった。しかしながら、IL-25欠損マウスでは、FITC感作期において、皮膚のランゲルハンス細胞や樹状細胞のリンパ節への遊走能は正常であり、FITC特異的なリンパ球の増殖応答能も正常であった。また、その際、FITC特異的なリンパ球の免疫応答を評価した際、IL-25欠損マウスのリンパ球でも、野生型マウスのリンパ球と同レベルのIL-4、IL-17およびIFN- γ 産生を認めた。FITCで感作したマウスのリンパ節細胞を、未感作の野生型マウスに

移入し、その移入したマウスにFITCを塗布することで接触型過敏症を誘導することができる。この実験系を用いて、野生型マウスのリンパ節細胞およびIL-25欠損マウスのリンパ節細胞を移入したマウス間で接触型過敏症を誘導すると、その両群間で等しく接触型過敏症は誘導された。したがって、接触型過敏症の感作期において、IL-25はハブテシス特異的なTh1、Th2およびTh17細胞の誘導には必須ではなく、また、T細胞が産生するIL-25も接触型過敏症の誘導には必須ではないことが明らかになった。

一方で、IL-25は、接触型過敏症の誘導および病態形成において、感作期よりもむしろ炎症誘導期に重要な役割を演じていることが明らかになった。IL-25は、Th2細胞の分化を促進し²⁰⁾、Th2細胞依存的な炎症に関わる^{19, 23)}。マウスにIL-17を投与するとIL-25を投与すると好中球の浸潤を誘導するのに対し、IL-25を投与した場合は、Th2型のサイトカインの上昇および好酸球の浸潤が誘導される^{19, 23)}。その一方で、IL-25の投与ではなく、マウスにIL-25を過剰発現させた場合は好酸球だけでなく、好中球の浸潤も誘導される²²⁾。したがって、IL-25にはTh2細胞/好酸球性の炎症だけでなく、Th17細胞/好中球性の炎症にも関わる可能性がある。

従来、接触型過敏症は、IFN- γ を産生するTh1細胞によって誘導されるアレルギー疾患と考えられてきたが、IFN- γ およびIFN- γ 受容体欠損マウス、IL-4欠損マウス、IL-17欠損マウスを用いた解析結果は必ずしもそれを支持しない。接触型過敏症は、IFN- γ /Th1細胞ではなく、むしろIL-4/Th2細胞とIL-17/Th17細胞に依存したアレルギーと考えられる。接触型過敏症の誘導の際、IL-25は炎症局所でのTh2細胞の活性化に関わるのか、Th17細胞

の活性化に関わるのか、あるいはその両方に関わるのかが現時点では不明であり、今後、明らかにされるべき課題の一つである。

(引用文献)

- 1) Saulnier M, Huang S, Aguet M, et al. Role of interferon- γ in contact hypersensitivity assessed in interferon-g receptor-deficient mice. *Toxicology*, 102, 301-312, 1995.
- 2) Reeve VE, Bosnic M, Nishimura N. Interferon- γ is involved in photoimmunoprotection by UVA (320-400 nm) radiation in mice. *J Invest Dermatol*, 112, 945-950, 1999.
- 3) Dhabhar FS, Satoskar AR, Bluethmann H, et al. Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for g-interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 2846-2851, 2000.
- 4) Nakae S, Komiyama Y, Narumi S, et al. IL-1-induced tumor necrosis factor- α elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing IFN- γ -inducible protein 10 in the elicitation phase of the contact hypersensitivity response. *Int Immunol*, 15, 251-260, 2003.
- 5) Berg DJ, Leach MW, Kuhn R, et al. Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med*, 182, 99-108, 1995.
- 6) Dieli F, Sireci G, Scire E, et al. Impaired contact hypersensitivity to trinitrochlorobenzene in interleukin-4-deficient mice. *Immunology*, 98, 71-79, 1999.
- 7) Traidl C, Jugert F, Krieg T, et al. Inhibition of allergic contact dermatitis to DNCB but not to oxazolone in interleukin-4-deficient mice. *J Invest Dermatol*, 112, 476-482, 1999.
- 8) Weigmann B, Schwing J, Huber H, et al. Diminished contact hypersensitivity response in IL-4 deficient mice at a late phase of the elicitation reaction. *Scand J Immunol*, 45, 308-314, 1997.
- 9) Herrick CA, Xu L, McKenzie AN, et al. IL-13 is necessary, not simply sufficient, for epicutaneously induced Th2 responses to soluble protein antigen. *J Immunol*, 170, 2488-2495, 2003.
- 10) Yokozeki H, Ghoreishi M, Takagawa S, et al. Signal transducer and activator of transcription 6 is essential in the induction of contact hypersensitivity. *J Exp Med*, 191, 995-1004, 2000.
- 11) Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*, 9, 556-567, 2009.
- 12) Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, et al. IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat Immunol*, 12, 1159-1166, 2011.
- 13) Song X, Zhu S, Shi P, et al. IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nat Immunol*, 12, 1151-1158, 2011.
- 14) Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN- γ and TNF- α . *J Immunol*, 162, 494-502, 1999.
- 15) Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, 17, 375-387, 2002.
- 16) Oboki K, Ohno T, Saito H, et al. Th17 and allergy. *Allergol Int*, 57, 121-134, 2008.
- 17) Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, et al. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity*, 30, 108-119, 2009.
- 18) He D, Wu L, Kim HK, et al. CD8⁺ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol*, 177, 6852-6858, 2006.
- 19) Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol*, 169, 443-453, 2002.
- 20) Angkasekwinai P, Park H, Wang YH, et al. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med*, 204, 1509-1517, 2007.
- 21) Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, et al. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*, 34, 149-162, 2011.
- 22) Pan G, French D, Mao W, et al. Forced expression of murine IL-17E induces growth retardation, jaundice, a Th2-biased response, and multiorgan inflammation in mice. *J Immunol*, 167, 6559-6567, 2001.
- 23) Fort MM, Cheung J, Yen D, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*, 15, 985-995, 2001.

糖脂質による増殖シグナル向上のメカニズムの解明

独立行政法人産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

川島 永子

Sandhoff Disease is a progressive neurodegenerative disorder caused by mutations in the *HEXB* gene which encodes the β -subunit of *N*-acetyl- β -hexosaminidase A and B, resulting in the accumulation of the ganglioside GM2. Previously, we reported that astrocytes from Sandhoff Disease model mice (ASD) grew markedly more rapidly than those from wild-type mice (AWT). This was caused by c-Src and ERK activation due to accumulated GM2 in the lysosomes. These results suggested that c-Src might be directly activated by accumulated GM2. To investigate this issue, here we analyzed i) interactions between GM2 and intracellular c-Src by Western blotting of immunoprecipitation with anti-GM2 antibody; ii) localization of accumulated GM2 and c-Src, by immunofluorescence; iii) length of the fatty acids of GM2 accumulated in lysosomes, by MALDI-TOF MS. We observed that the accumulated GM2 interacted directly with c-Src and co-localized in the lysosome membrane. Analysis of the GM2 ceramide moiety revealed no difference in the fatty acid lengths in AWT and ASD, indicating that densely-packed GM2 interactions with the cytosolic kinase c-Src, and glycosphingolipid (GSL) aggregation was sufficient to result in transmission of signals for proliferation. These results indicate that excessive accumulated GSLs have direct signal transduction activity, not only at the cell surface but also at the membrane of intracellular organelles such as lysosomes.

1. 緒言

酸性糖脂質であるガングリオシドは神経系に豊富に含まれており、シナプス形成や神経突起伸張に重要な役割を果たしているが¹⁻⁴⁾、細胞表層におけるコレステロールやGPIアンカータンパク質などと同様に、受容体などの糖タンパク質と共に細胞内外のシグナル伝達、接着、増殖、分化などを調節しているマイクロドメイン^{3,5)}を形成している。スフィンゴ糖脂質に関わる研究は、糖鎖の多様性と機能性の解明に注力されてきたが、特に、シグナル伝達は糖脂質により調節されている事が明らかとされている。また、スフィンゴ糖脂質の脂質分子、特に脂肪酸の生体膜におけるマイクロドメインの構成、および機能の重要性も明らかにされてきた。

Srcファミリーキナーゼ (SFK) は、中枢神経系やヒト癌細胞で活性が高く、悪性化・浸潤、また細胞接着・代謝・血管新生の破壊などに関係している。特にc-Srcを介したガングリオシドのシグナル伝達に関しては、GM3やGM1によりNeuro2aの神経突起伸張が誘導される事などがすでに報告されているが、この現象は、細胞外ガングリオシドがシグナルドメインへ導入され、c-Srcがリン酸化される事で引き起こされるとされている。また、c-Srcは抗GM3モノクローナル抗体によって共役沈降する事から、

ガングリオシドはc-Srcを活性化する事も考えられる。我々はこれまでに、ガングリオシドの細胞増殖調節に対する関連性、すなわち蓄積ガングリオシドによって増殖シグナルが亢進する事、特にリソソームに過剰蓄積したGM2が細胞内シグナルタンパク質であるc-SrcやERKの活性化を引き起こす事を示してきた。しかし、GM2による細胞内、しかもリソソームのルーメン側に位置するc-Srcの活性化機構の詳細は、未だ明らかではない。そこで今回は、GM2とc-Srcの相互作用を検討した結果、蓄積GM2によるc-Srcの活性化機構が明らかとなった事から、以下に報告する。

2. 実験

2.1 細胞および培養

ザンドホッフ病モデルマウスおよび野生型 (C57BL/6) マウスより樹立したアストロサイト (ASDおよびAWT) は、10%血清、100 μ g/mLペニシリン、50 μ g/mLストレプトマイシン、110 μ g/mLピルビン酸ナトリウムを含むDMEMを用い、5% CO₂濃度で37°Cで培養した。

2.2 細胞抽出液の調整

リン酸化タンパク質を解析するために、培養した細胞は100 μ M pervanadate処理した後、1% Triton X-100を含む細胞溶解液を用いて細胞を溶解させた後、4°Cで13,000rpmで5分間遠心し、上清を細胞抽出液とした。

2.3 免疫沈降

$\sim 10^6$ 個の細胞を、1% Triton X-100を含む細胞溶解液で懸濁した後、可溶化させた。15,000 rpmで5分間遠心して、核を除去した上清を集めた。相当量のタンパク質上清を抗



Enhanced Aggregation of Ganglioside GM2 Transmit Proliferation Signals

Nagako Kawashima

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Bioproduction Research Institute

GM2抗体と共にインキュベートした後、Immobilized Protein Lを加え、4℃で一晩インキュベートした。

2.4 SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析

細胞抽出液にSDSサンプルバッファーを加え、98℃で5分インキュベートした。SDS-PAGEで分離した後、PVDF膜に転写し、3% BSAでブロッキングを行った。その後、特異1次抗体およびHRP標識の抗IgG抗体を用いて検出を行った。バンドは、化学発光で検出した。

2.5 免疫蛍光染色

GM2とc-Srcがリソソーム膜近傍に共局在しているかどうかを検討するために、抗GM2抗体、抗c-Src抗体、抗リン酸化c-Src抗体、抗CD107a (Lamp-1)抗体を用いた蛍光抗体染色を行った。アストロサイトにおける糖脂質と糖タンパク質を解析するために、細胞は4%パラホルムアルデヒドで固定した後、0.1% Triton X-100もしくは90%メタノールで膜透過処理した。10% normalヤギ血清でブロッキングした後、一次抗体を添加した。Alexa488/Alexa555が標識された二次抗体を反応させた後に共焦点レーザー顕微鏡を用いて検出した。

2.6 糖脂質の抽出、分離および免疫薄層クロマトグラフィー

糖脂質は、イソプロピルアルコール/ヘキサン/水を添加して抽出した。超音波処理後、3,500 rpmで5分間遠心し、得られた上層をガングリオシドを含む総脂質画分とした。この画分を乾固し、メタノール/クロロホルム/水(4:2:1)を加えて3,000 rpmで5分間遠心する事でFolch画分を得た。このFolch画分をHPTLCプレートにスポットした後、クロロホルム/メタノール/0.2% CaCl₂溶媒(55:45:10)で展開し、オルシノールで染色した。また免疫TLC解析には、TLCアルミシートやSilica gel 60 F254を用い、TLC解析と同条件でスポット・展開した後、抗GM2抗体(GMB28)および抗GM3抗体(GMR6)を用いて検出した。

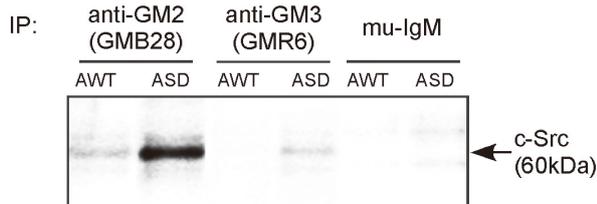


Fig. 1 抗ガングリオシド抗体を用いた免疫沈降

左側：抗GM2抗体を用いた免疫沈降、中央：抗GM3抗体を用いた免疫沈降、右側：mu-IgMを用いた免疫沈降。

AWT:AWT由来の細胞抽出液、ASD:ASD由来の細胞抽出液、mu-IgM:非特異的マウスIgM抗体(ネガティブコントロール)。

2.7 糖脂質の分解、精製・メチル化

糖脂質のFolch画分に、0.1N NaOH/メタノールを加え40℃で2時間反応させた後、1Nの酢酸で中和した。遊離脂肪酸はn-ヘキサンで除去した後に、残った画分は乾固させた。アルカリ分解した糖脂質は、0.1M KClで再溶解した後、逆相カラム(C18 Sep-Pak)に供した。サンプルはメタノールおよびクロロホルム/メタノール(2:1)で溶出させ、減圧乾燥させた後、NaOH/DMSO懸濁液およびヨードメタンで再溶解させた。反応は冷50%氷酢酸および冷蒸留水を加えて反応を停止させた後、クロロホルムで抽出した画分をメチル化糖脂質とし、MALDI-TOF MSで解析した。

2.8 MALDI-TOF MS解析

メチル化糖脂質は、Ultraflex II TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics)を用いて、MALDI-TOF MSで解析した。マトリックスは2,5-dihydroxybenzoic acidを含む溶液を用い、質量を決定した。

3. 結果

3.1 GM2との共沈物におけるc-Srcの検出

c-Src/GM2の相互作用を調べるために、野生型マウス由来のアストロサイト(AWT)およびザンドホッフ病モデルマウス由来のアストロサイト(ASD)について免疫沈降実験を行った。実験は、抗GM2モノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った後、抗c-Src抗体を用いたウェスタンブロット法により沈降物を解析した。AWTおよびASDの両方でc-Srcと一致する約60kDaのタンパク質を検出したが、AWTの細胞抽出液では、60kDa種は比較的少なく、非特異性のマウスIgMの存在下ではシグナルは検出されなかった(Fig. 1)。この結果から、ASDではGM2がc-Srcと強く結合している事が予想された。さらに抗GM2抗体の特異性を確認するために、免疫TLCと抑制実験を行った。その結果、AWTおよびASDのFolch画分について、抗GM2抗体を用いて検出したところ、GM2のみ検出された(Fig. 2)。さらに、抗GM2抗体で沈殿させた免疫沈降

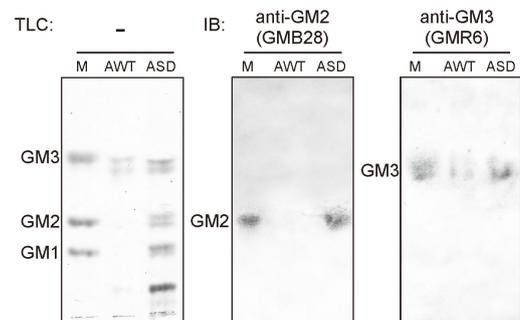


Fig. 2 抗ガングリオシド抗体の特異性の検討

左側：TLCのオルシノール染色、中央および右側：免疫TLC、M:GM3、GM2およびGM1の標準ガングリオシドを含有するマーカー

物中にミセル化GM2添加すると、c-Srcのバンドは、消失するという事が分かった (Fig. 3)。これらの結果は、使用した抗GM2抗体が免疫沈降物におけるGM2を特異的に認識しているという事を示している。ASDの細胞表層において多く発現しているGM3についても抗GM3抗体を用いて、GM2と同様の免疫沈降実験を行ったが、c-SrcはGM2に比べると非常に少ない量しか検出されなかった (Fig. 1)。また、使用した抗GM3抗体に関してもGM3のみを認識している事も確認できた (Fig. 2)。これらの結果は、GM2に比べGM3は殆どc-Srcと相互作用していない事を意味するものである。

3.2 GM2 との共沈物における SFK の検出

SFK (Fyn, Lyn, Yes) と GM2 の結合性を調べるために、Triton X-100 を含む緩衝液で溶解した各々の細胞抽出液を用いて、抗GM2および抗GM3モノクローナル抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降とウエスタンブロッティングはこれまで記載した様に行い、抗Lyn、抗Yes、抗Fyn抗体で検出を行った (Fig. 4A)。AWTおよびASDにおいてFynとYesに相当するバンドは検出されたものの、バンドの濃さはc-Srcと比較すると非常に低かった。Lynは検出されなかった。細胞内のc-Src、Fyn、Lyn、Yesの量をウエスタンブロット法で解析したところ、これらは同程度

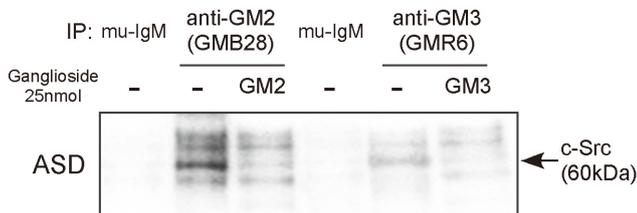


Fig. 3 抗ガングリオシド抗体の阻害実験
ミセル化GM2またはGM3を抗GM2抗体または抗GM3抗体を用いて沈澱させた免疫沈降物中に添加した。

の量が含まれている事が分かった (Fig. 4B)。この結果より、ASDにおけるc-Srcは主にGM2と相互作用している事が示唆された。

3.3 GM2 と c-Src の局在検討

免疫蛍光抗体染色によって、c-SrcとGM2の共局在を観察した。細胞は8ウェルマイクロスライドに播種し、固定した後に界面活性剤で膜透過処理を行った。各々の細胞は、特異一次抗体、およびFITC/Rhodamine修飾2次抗体で染色した。ASDにおいてはGM2とc-Srcの染色像を重ね合わせた像はかなりオーバーラップしている事が示された事から (Fig. 5A)、GM2は殆どがc-Srcと共局在している事が示唆された。これまでに我々は、ASDにおいてはGM2はLamp-1 (CD107a/Lysosome marker) と共局在している事を示してきたが⁶⁾、今回はASDにおけるc-SrcもまたLamp-1と共局在している事を確認した (Fig. 5B)。これらの結果は、ASDにおいてはGM2と同様にc-Srcもまたリソソーム膜近傍に位置する事を示すものである。一方、AWTでもc-Srcシグナルが検出されるものの、染色シグナルの分布はASDにおけるそれとは全く異なる (Fig. 5B)。よって、通常状態では、c-Srcはリソソームに局在するものではない事を示している。

3.4 GM2 とリン酸化 c-Src の局在検討

c-Srcおよびリン酸化c-SrcのGM2との共局在性を調べるために、ASDとAWTの免疫蛍光抗体染色を行ったが、タンパク質の脱リン酸化を防ぐために、過バナジウム処理を行った。さらに固定化と膜透過処理を行った後、細胞は、c-Src、リン酸化c-SrcおよびGM2に対する一次抗体、続いてFITC/Rhodamine結合2次抗体で染色した。リン酸化c-SrcのシグナルはAWTでは微弱であり (Fig. 5のc-Srcを比較)、全c-Srcのタンパク質量に対するリン酸化c-Src

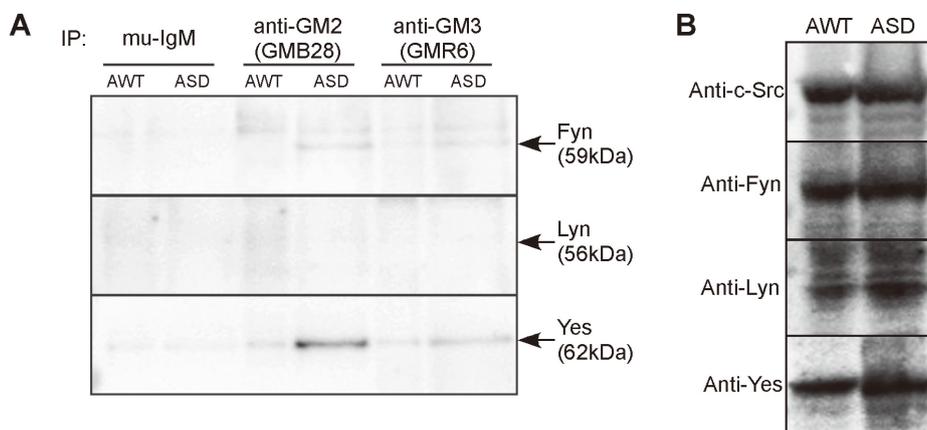


Fig. 4 SFK に関する検討
A: GM2 共役沈殿物における SFK の検討
B: AWT と ASD における SFK 発現タンパク質の検討

の量は、AWTでは低かった (Fig. 6)。さらに、AWTではリン酸化c-SrcとGM2の染色像は重ならなかった一方で、ASDではリン酸化c-SrcとGM2の染色像が重なったことから共局在している事が示唆された (Fig. 6)。

3.5 糖脂質の TOF MS 解析

これまで我々は、c-Srcはリソソームに蓄積したGM2と相互作用する事を示してきた。さらに、これらの相互作用ではGM2の脂質部位が関係しているのかを調べるために、TOF MSを用いてAWTおよびASDにおけるGM2の分子量を調べた。AWTおよびASDよりスフィンゴ糖脂質をFolch画分として抽出した後に過メチル化し、TOF MS解析を行った。過メチル化GM2に相当する分子量のピークは、AWTとASD間で殆ど同じであり、同一の脂肪酸鎖長で構成されている事を示唆している (Fig. 7)。すなわち

脂肪酸構造は、大凡C16:0~C20:0である事がわかった。この結果は、c-Srcの挙動や活性化に影響を与えるのはGM2の脂肪酸の鎖長ではなく、GM2の過剰な蓄積である事を示唆するものである。

4. 考察

本研究で我々は、c-SrcがGM2と共役沈降する事から、c-SrcがGM2と相互作用する事を示したが。これはリソソームに蓄積したGM2が細胞内c-Srcと相互作用する事を示唆するものである (Fig. 1-4)。また、c-Srcと細胞質内GM2の解析を行った結果、c-Srcは、GM2と同様、リソソームマーカー CD107a/Lamp-1とも共局在している事がわかった。これは、ASDではc-Srcがリソソームに蓄積したGM2と共局在している事を示すものである (Fig. 5)。さらに、リン酸化c-SrcもまたCD107a/Lamp-1とGM2と共局在している事もわかったが (Fig. 6)、これらはc-SrcがGM2と相互作用する事で活性化される事を示唆している。また、過剰に蓄積したGM2のセラミド部位の解析から、ASDにおける脂肪酸鎖長は極めて一般的である事も分かった。これは、糖脂質の脂肪酸鎖長とは関係なく、凝集したGM2が細胞内c-Srcの挙動と活性化に極めて重要である事を提案するものである (Fig. 7)。

Prinettiらは、ガングリオシドが細胞内c-Srcを活性化すると報告し⁷⁾、また岩渕らは、長鎖脂肪酸を持つスフィンゴ糖脂質のみが細胞内SFKを活性化させる事ができると報告している⁸⁾。最近浜村らは、SFKのYesの活性化には増加したGD3が関係している事を報告した。我々は、GM2が細胞内c-Srcと相互作用する様に、過剰に蓄積したガングリオシドは細胞表層だけではなく、リソソームの様

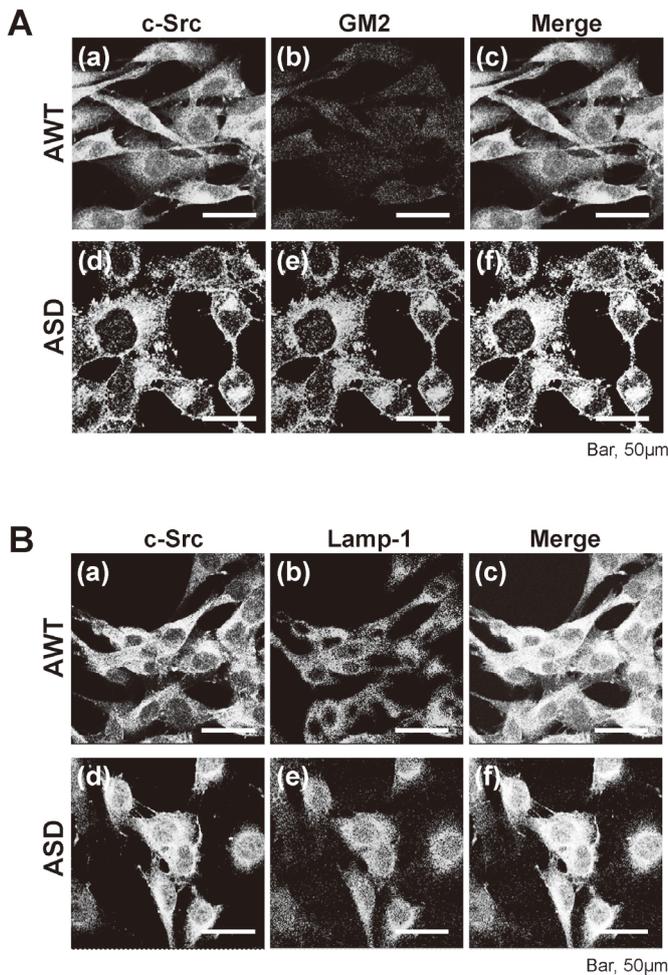


Fig. 5 蛍光標識抗体を用いた各分子の局在検討

A: c-SrcとGM2の局在検討;(a-c):AWT細胞(上段)、(d-f):ASD細胞(下段)、(a, d)抗c-Src抗体による染色、(e):抗GM2抗体による染色、(c, f):重ね合わせ画像。
B:c-SrcとLamp-1の局在検討;(a-c):AWT細胞(上段)、(d-f):ASD細胞(下段)、(a, d)抗c-Src抗体による染色、(b, e):抗Lamp-1抗体による染色、(c, f):重ね合わせ画像。

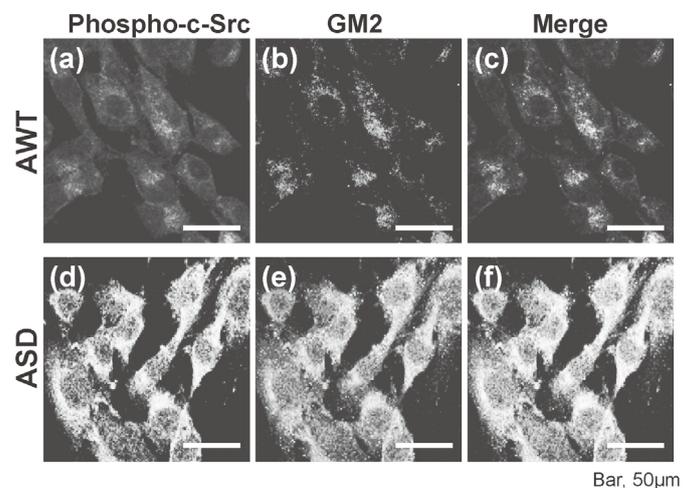


Fig. 6 リン酸化c-SrcとGM2の局在検討
(a-c):AWT細胞(上段)、(d-f):ASD細胞(下段)、(a, d):抗リン酸化c-Src抗体による染色、(b, e):抗GM2抗体による染色、(c, f):重ね合わせ画像

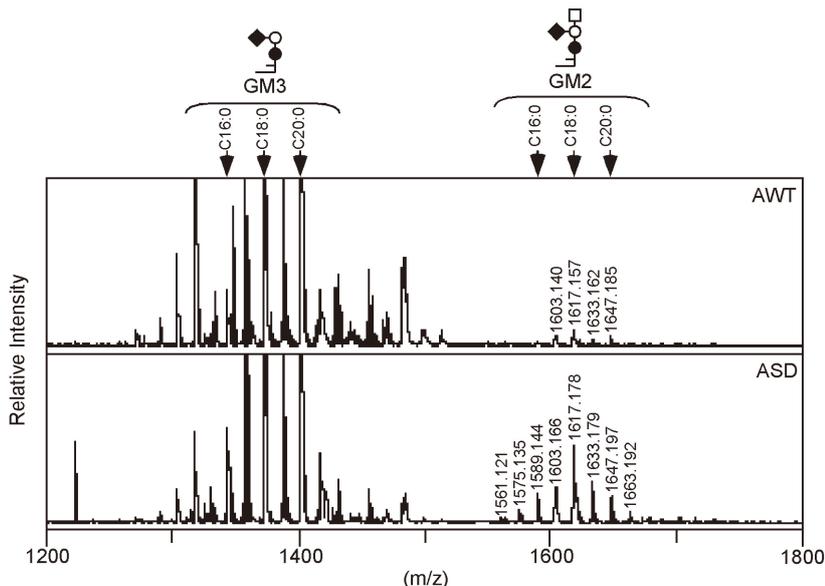


Fig. 7 アストロサイト糖脂質のMSスペクトル

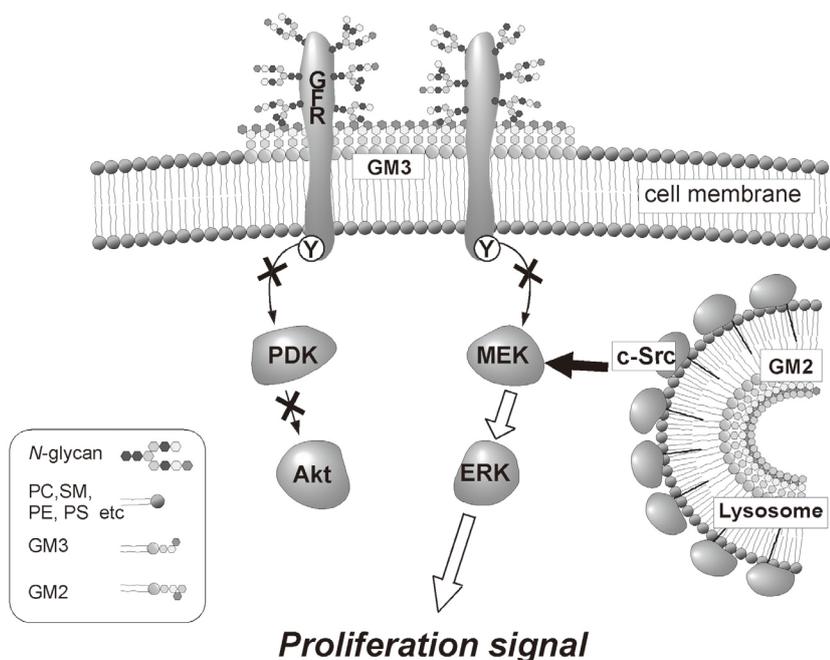


Fig. 8 リソソームの蓄積糖脂質からのシグナル伝達経路 (ASDモデル)
 このモデルは、本研究および Kawashima *et al. J Neurochem* (2009) の結果を基に作成した。細胞表層の GM3 は EGFR の様な成長因子受容体を不活性化し、さらに Akt を不活性化させる。これらの挙動は、細胞表層の GM3 により受容体 (EGFR や FGFR) は不活性化を促され、一方でリソソームに蓄積した GM2 により活性化された c-Src は、増殖シグナル伝達系を刺激し、結果として細胞増殖能が亢進される。これらの現象は糖脂質、特にガングリオシドの細胞表層における増殖因子受容体のサプレッサーとして、さらに増殖と関わる細胞内シグナル伝達のアクティベーターとしても機能する事を示している。

なオルガネラにおける c-Src をも活性化させる事を示した。これは、スフィンゴ糖脂質が細胞表層からだけでなく、ある程度の糖脂質が蓄積しているオルガネラの細胞膜からもシグナルを伝達できる事を意味する。通常は、スフィン

ゴ糖脂質はリソソーム酵素により分解を受けることから、リソソームに過剰に蓄積する事はない。しかし、我々が用いた GM2 ガングリオシド-シスモデルマウスから単離したアストロサイトは、分解酵素が欠損しているために

GM2がリソソームに異常な密度で蓄積してしまう。以上の事から、ガングリオシドは蓄積の度合いにより細胞内のc-Srcのようなシグナル分子と相互作用し、これを活性化させる事が出来る事を示している。

また、AWTとASD間でGM2の脂肪酸鎖長に差がない事が明らかとなったため、蓄積したGM2からc-Srcへのシグナルの伝達には脂肪酸鎖長は重要ではない事が示された。この結果は、岩渕らの見出したラクトシルセラミドとLynの相互作用に脂肪酸の長さが重要であるという報告と対照的な結果となった。この違いはおそらく、糖脂質が受容体として働くかどうかの違いと考えられる。ラクトシルセラミドは好中球においてグルカンの受容体として働き、グルカンと結合する事でLynを活性化する⁸⁾。これに対し、ASDでは、リソソームに蓄積したGM2により、c-Srcはリガンドと結合する事なく恒常的に活性化されている。すなわち、受容体として機能する糖脂質により、細胞内リン酸化酵素の活性化は脂肪酸鎖長に依存する一方で、蓄積した糖脂質からのシグナル活性化では脂肪酸鎖長は無関係である事を示している。今回我々が観察したASDにおいて、蓄積したGM2による増殖シグナルの活性化は、Prinettiらの報告²⁾と似た機構であると考えられる。今回示した糖脂質GM2とc-Srcの相互作用はおそらく直接的なものと思われるが、テトラスパニンのようなアダプター分子が介在している可能性も十分に考えられる。

本研究により、ガングリオシドの蓄積により細胞増殖シグナルが活性化する仕組みが明らかとなった。この細胞増殖は、受容体を限定するものではなく、また糖脂質の蓄積があれば細胞表層以外からも増殖シグナルが活性化する事を示すものである。これは細胞種にも依存しない事を意味するため、ガングリオシドのみによる細胞増殖能の活性化が可能である事も示唆している。よって、ガングリオシドにより皮膚細胞の増殖活性化を亢進させる事が可能であると考えられる。健康な皮膚を保持するためには、皮膚細胞の増殖能亢進も重要な因子と考えられるため、今後この様な知見を基に、応用研究に発展される事を期待する。

(引用文献)

- 1) Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., *et al.* : Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10662-10667. (1996)
- 2) Prinetti, A., Iwabuchi, K., and Hakomori, S. : Glycosphingolipid-enriched signaling domain in mouse neuroblastoma Neuro2acells. Mechanism of ganglioside-dependent neuritogenesis, *J Biol Chem* **274**, 20916-20924. (1999)
- 3) Hakomori, S. : Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends, *Biochim Biophys Acta* **1780**, 325-346. (2008)
- 4) Regina Todeschini, A., and Hakomori, S. : Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains, *Biochim Biophys Acta* **1780**, 421-433. (2008)
- 5) Ohkawa, Y., Miyazaki, S., Hamamura, K., *et al.* : Ganglioside GD3 enhances adhesion signals and augments malignant properties of melanoma cells by recruiting integrins to glyco lipid-enriched microdomains, *J Biol Chem* **285**, 27213-27223. (2010)
- 6) Kawashima, N., Tsuji, D., Okuda, T., *et al.* : Mechanism of abnormal growth in astrocytes derived from a mouse model of GM2 gangliosidosis, *J Neurochem* **111**, 1031-1041. (2009)
- 7) Prinetti, A., Marano, N., Prioni, S., *et al.* : Association of Src-family protein tyrosine kinases with sphingolipids in rat cerebellar granule cells differentiated in culture, *Glycoconj J* **17**, 223- 232. (2000)
- 8) Iwabuchi, K., Prinetti, A., Sonnino, *et al.* : Involvement of very long fatty acid-containing lactosylceramide in lactosylceramide-mediated superoxide generation and migration in neutro phils, *Glycoconj J* **25**, 357-374. (2008)

加齢および創傷治癒に伴う皮膚真皮細胞外マトリックスの組成変化： バーシカン発現に注目して

京都大学大学院医学研究科皮膚科学

室賀 絵里

Versican is a chondroitin sulphate proteoglycan that is present in the dermis of the skin as one of the extracellular matrices (ECMs). Here we investigated the role of versican in the maintenance of skin integrity by examining how its expression is regulated on wounding and skin aging. On skin wounding, versican expression was transiently upregulated in the dermis and gradually disappeared. In the aged skin, versican was almost absent from the upper dermis, while in the reticular dermis more versican was found associated with the degenerated elastic fibers undergoing solar elastosis. Versican is considered to play a role in skin wound healing and also in the age-related changes of skin texture.

1. 緒言

皮膚は体表面にあって老化が如実に現れる臓器であり、その状態はQOLをも左右しうる。特に真皮成分の減少は皺とたるみをもたらす主原因であるため、真皮細胞外マトリックスの加齢変化は老化機構およびアンチエイジング研究の発展において重要な位置を占める。

真皮のボリュームを規定する細胞外マトリックス成分には、コラーゲンや弾性線維などの線維性成分のほか、プロテオグリカンやグリコサミノグリカンがある。プロテオグリカンの中でも真皮線維芽細胞が細胞外に分泌するバーシカンはコンドロイチン硫酸鎖を多数有し、またヒアルロン酸結合部位を持つことから、真皮の水分量とボリュームを保持する上で重要な役割を担っていると考えられる。また、間質に存在するバーシカンが皮膚線維芽細胞そのものを取り巻く微小環境として、細胞のマトリックス産生機能や viability を調節している可能性がある。

国内外においてバーシカンは動脈硬化などの血管病変や悪性腫瘍との関連では盛んに研究されており、近年血管平滑筋細胞における詳細な発現機構が解明されている¹⁾。皮膚におけるバーシカンは表皮の基底層と真皮弾性線維の microfibril 周囲に分布し²⁾、また毛乳頭細胞においては毛包の成長期の維持に関与していることが報告されている³⁾。日光弾性線維症の皮膚においてバーシカンがヒアルロン酸との結合能を失っていることが Hasegawa らにより明らかにされており⁴⁾、光老化によりバーシカンに質的变化が生じている可能性が指摘される。

我々はこのバーシカンに注目し、皮膚線維芽細胞におけるその調節機構、創傷における発現の変化、および加齢変化との関連を研究した。

2. 実験

2-1 創傷治癒におけるバーシカンの発現変化

C57BL6/Jマウスの背部皮膚を除毛後、1cm長の全層皮膚欠損創を作成、創表面をポリエチレンフィルムにて保護した。1日後、2日後、3日後、5日後、7日後、10日後の皮膚組織を採取、4%パラホルムアルデヒドにて固定後パラフィン切片を作成した。脱パラフィン後抗マウスバーシカン抗体で染色、蛍光顕微鏡で観察した。

2-2 加齢におけるバーシカンの発現変化

10歳代から70歳代までの女性の顔面良性皮膚腫瘍の摘出時の手術標本を用い、非病変部のパラフィン切片を作製した。脱パラフィン、95度10分間オートクレーブによって抗原活性化処理を行った。ブロッキング後、マウスモノクローナル抗ヒトバーシカン抗体で染色、核染色をTOTO 3にて行い、蛍光顕微鏡で観察した。

3. 結果

3-1 (図1)

非創傷部では毛包周囲と毛乳頭のみにはバーシカンは局在し、真皮には染色されなかった。創傷作成後、バーシカンの発現が創傷部の真皮に出現、経時的に増強し、5日目～7日目に最大となった。その後徐々に減少し、約2週間で消失した。

3-2 (図2)

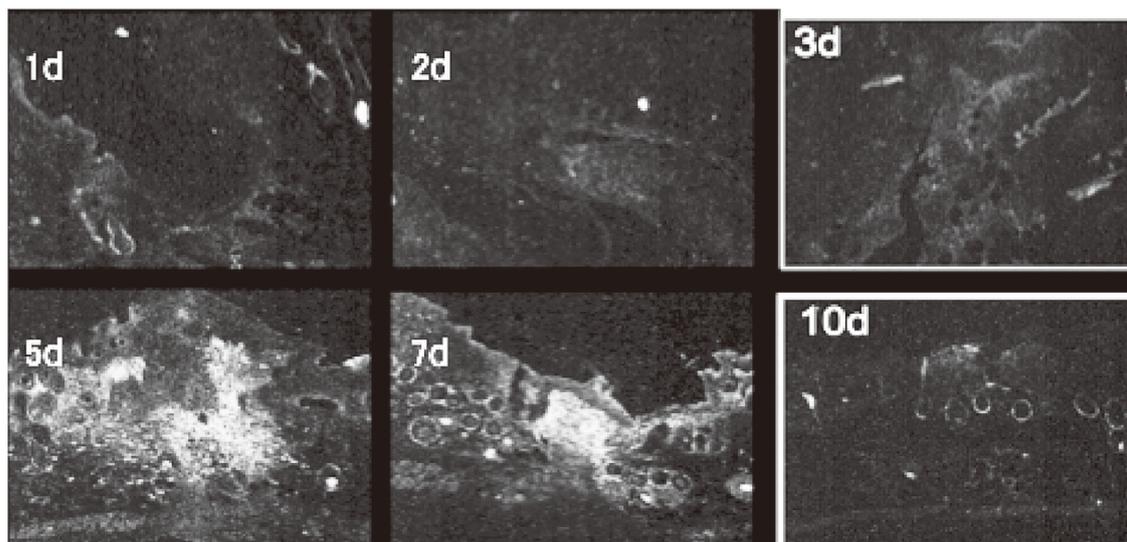
19歳女性では真皮全体に張り巡らされた繊細な弾性線維ネットワークが表皮直下まで及んでいた。37歳女性では真皮中層の弾性線維束が19歳に比較して肥厚がみられ、solar elastosisの始まりがみられたものの、弾性線維ネッ



Changes in versican expression in skin wound healing and aging

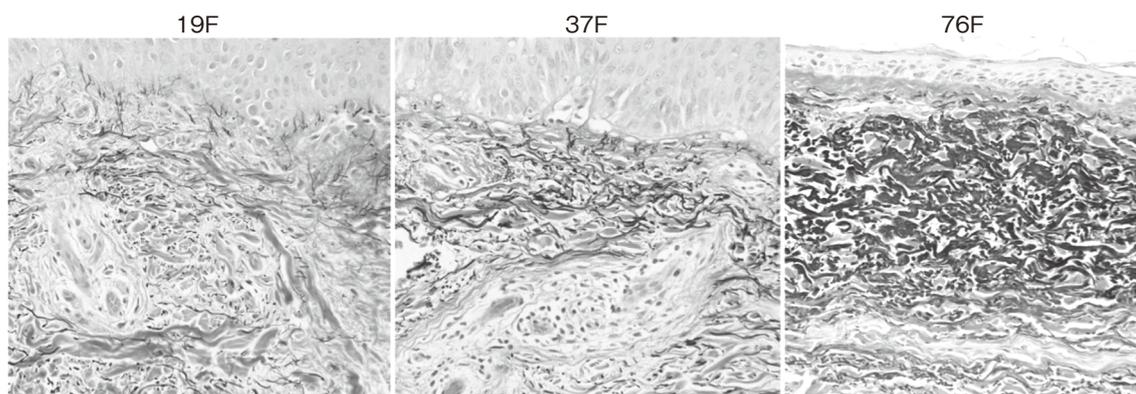
Eri Muroga

Department of Dermatology, Kyoto University Graduate School of Medicine



5～7日後をピークとして創傷部の真皮浅層に強いシグナルが観察される。

図1 マウス創傷におけるパーシカン発現の経時的推移



19F (19歳女性)、37F (37歳女性)、76F (76歳女性)。19歳女性では真皮全体に張り巡らされた繊細な弾性線維ネットワークが表皮直下まで及ぶ。37歳女性では真皮中層の弾性線維束が19歳に比較して肥厚がみられ、solar elastosisの始まりがみられるが、ネットワークは表皮直下まで分布している。76歳女性では表皮は平坦化し、真皮浅層の弾性線維が消失し、連続性が失われる。中層から網状層に日光変化によるsolar elastosisが塊状にみられる。

図2 ヒト顔面皮膚のエラスティカ・ファン・ギーソン染色。弾性線維が茶色で染色される。

トワークは表皮直下まで分布していた。76歳女性では表皮は平坦化し、真皮浅層の弾性線維が消失し、連続性が失われていた。また、中層から網状層に日光変化によるsolar elastosisが塊状にみられた。

3-3 (図3)

サンプル1：19歳皮膚の真皮浅層には弾性線維と関連してパーシカン染色が豊富に観察され、細線維状にoxytalan fiberに一致して表皮直下にまで分布していた。真皮深層では成熟した弾性線維ネットワークと一致してfiber状に染色が観察された。

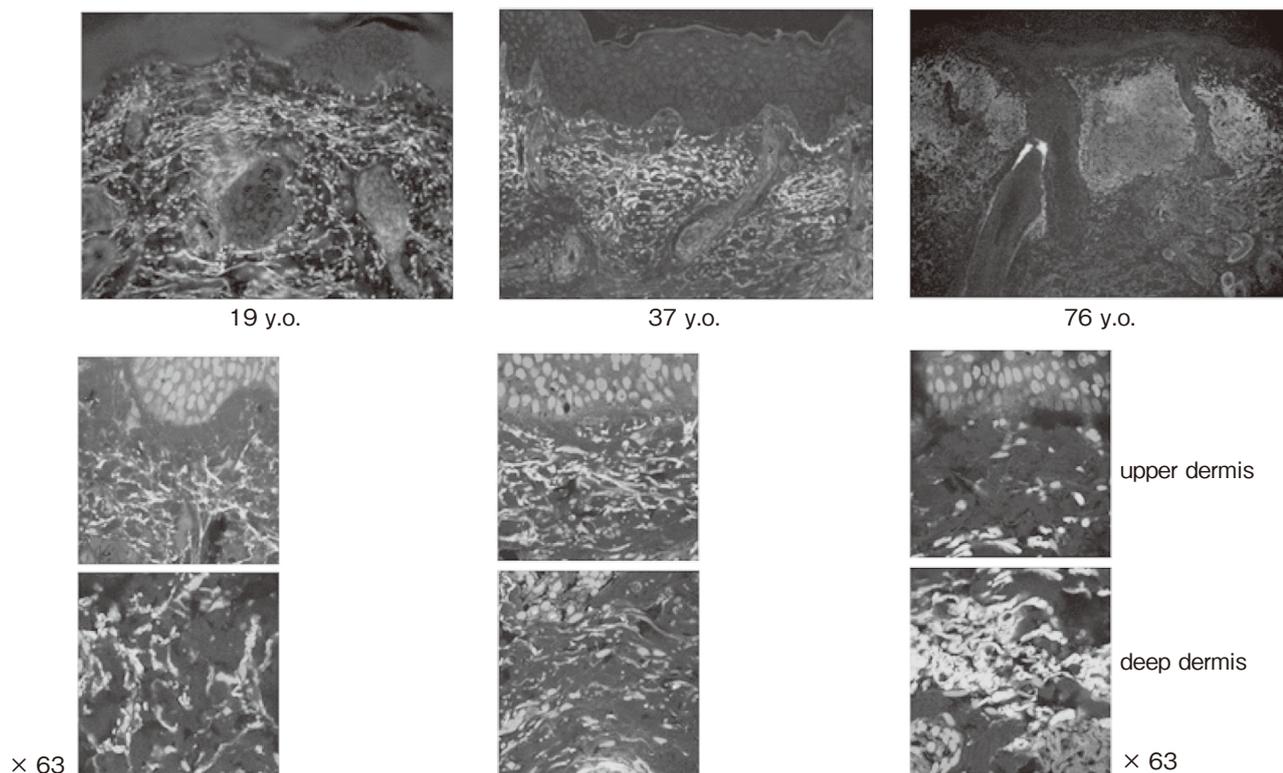
37歳皮膚では真皮浅層および真皮深層のパーシカン強度に変化はみられなかったが、表皮直下の細線維状のパー

シカンが19歳皮膚に比較して減少していた。

75歳皮膚では真皮浅層のパーシカンが著減していた。一方で真皮深層にはパーシカンが塊状に分布し、増加していた。

4. 考察

マウス創傷での分析により、パーシカンは創傷治癒過程における欠損部の修復に大きくかかわっている分子であることが明らかとなった。パーシカンは創傷真皮の線維芽細胞で一過性に発現が上昇し、2週間後には消失する。我々のケロイド病変部由来の組織および初代培養細胞による研究では正常皮膚線維芽細胞に比較してパーシカンの発現がメッセジレベルでも蛋白レベル双方において増強してお



deparaffin, 95°C 10min autoclave in 10mM citrate buffer (ph6), washx3, 1% BSAinPBS block 30min, 1st anti-human versican (2B1) x500 4°C o/n, 2nd anti-mouse Cy3 x300 TOTO3 x900 37°C 30min

19歳および37歳女性皮膚では弾性線維周囲に一致して線維状の染色が真皮浅層まで観察される。76歳では真皮浅層のパーシカンは完全に失われ、真皮中層から網状層に solar elastosis に一致した染色が観察される。

上段：蛍光顕微鏡で撮影 中・下段：共焦点顕微鏡で撮影 下段：青は核染色 (TOTO3)

図3 ヒト顔面皮膚 (図2と同一組織) のパーシカン染色

り、創傷治癒機転の異常でECMの産生が持続的に過剰となっているケロイドのような状態においてパーシカンが何らかの役割を担っていることが推察された。

こうしたケロイドや肥厚性瘢痕のような真皮ECMの増加が問題となる病態に対し、真皮ECMの減少が問題となる状態の代表として皮膚老化が上げられる。特に美容的に問題となる皮膚のたるみと皺には皮膚ボリュームの減少および皮膚弾性の低下の両側面が関与する。加齢に伴う皮膚ボリュームの減少をきたすECM成分としてはコラーゲンやヒアルロン酸がよく研究されているが、プロテオグリカンに関する研究は少ない。皮膚に存在するプロテオグリカンであるパーシカンが関与している可能性に着目した。パーシカンは真皮浅層の弾性線維と関連して存在し、多数のコンドロイチン硫酸鎖を側鎖として有していること、またヒアルロン酸との結合能もあることから、皮膚浅層の保水を担っていると考えられる。本研究の露光部皮膚の免疫組織学的分析で、加齢皮膚においては真皮浅層のパーシカンが著減していた。保水作用のあるパーシカンの減少は弾性線維の減少と相まって、皮膚の弾力の消失、張りの喪失といった皮膚老化に関与していることが推察される。また老

化皮膚での solar elastosis は真皮中層から深層の弾性線維とパーシカンの量的増加であるものの、パーシカンはヒアルロン酸結合能を失っており、また弾性線維は変性して弾力を失った状態であるため、機能的な喪失といえる。

我々はパーシカンの制御にインターフェロン β が関与していることを培養皮膚線維芽細胞を用いた実験で確認している (未公開データ)。パーシカンの発現を増強させる因子を解明すればアンチエイジングの有効な手段となりえる。血管平滑筋細胞でのパーシカン発現増強因子として血小板由来成長因子 (Platelet Derived Growth Factor:PDGF) が報告されており⁵⁾、皮膚においてもPDGFが創傷でのパーシカン発現のトリガーとなっている可能性がある。皮膚創傷刺激でパーシカンの発現が増強することは、レーザー治療やケミカルピーリング、自己血小板などの美容皮膚科的侵襲によって皮膚の張りが蘇るという現象の一部分を説明しているのかもしれない。こうした手技でパーシカン発現がどのように変化するかにつき、今後の検討が必要である。

皮膚において毛乳頭と外毛根鞘に特異的にパーシカンが存在すること、また一部の腫瘍細胞と関連して発現が増強

するという事実は、組織または腫瘍幹細胞を取り巻くECMとしての細胞への関与を示唆している。創傷においても、バーシカンはこの真皮浅層の間質に一過性に存在することで局所の皮膚線維芽細胞や表皮角化細胞、さらにはそれらの幹細胞を取り巻く微小環境として増殖や分化、蛋白合成などの細胞機能を調節している可能性がある。バーシカンの皮膚老化との関連が明らかとなれば、皮膚老化機構およびアンチエイジング研究の発展に大きく貢献するだけでなく、有効な皮膚老化防止法の開発への寄与も期待される。

(引用文献)

- 1) Rahmani M, Read JT, Carthy JM, McDonald PC, et al : Regulation of the versican promoter by the beta-catenin-T-cell factor complex in vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem*, 280(13):13019-28, 2005.
- 2) Bode-Lesniewska B, Dours-Zimmermann MT, Odermatt BF, et al: Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues. *J Histochem Cytochem*. ;44 (4) :303-12, 1996
- 3) Soma T, Tajima M, Kishimoto J: Hair cycle-specific expression of versican in human hair follicles. *J Dermatol Sci*, 39 (3) :147-54, 2005
- 4) Hasegawa K, Yoneda M, Kuwabara H et al.: Versican, a major hyaluronan-binding component in the dermis, loses its hyaluronan-binding ability in solar elastosis. *J Invest Dermatol*, 127 (7) :1657-63, 2007
- 5) Schönherr E, Kinsella MG, Wight TN.: Genistein selectively inhibits platelet-derived growth factor-stimulated versican biosynthesis in monkey arterial smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys*. 1997 Mar 15;339 (2) : 353-61.

皮膚状マイクロ触覚センサによるテクスチャ計測に関する研究

東京大学大学院 情報理工学系研究科 知能機械情報学専攻

野田 堅太郎

In this paper, we propose a skin-type tactile sensor to measure a micro size texture of an object by scanning its surface. The sensor was composed of two layers with different stiffness, the surface layer with highly stiff and bumpy surface, and the inner layer with low stiffness.

The bumpy surface structure of the tactile sensor, like the finger prints, enables to detect the micro texture by scanning. According to this result, we designed and fabricated a tactile sensor and confirmed its sensing characteristics by scanning random texture patterns formed on a silicon wafer surface.

1. 緒言

コスメトロジーにおいて、髪や皮膚などの手触り感はその質感の良し悪しを判断する上で非常に重要な要素である。特に、髪の手触りには、髪表面に存在するキューティクルの存在が大きく関与しており、その形状・分布を計測し、これを定量的に評価する手法が必要となる。

髪表面には、一辺50 μm 、厚み1 μm 程度の大きさ¹⁾の鱗形状をしたキューティクルが積み重なって存在している(図1)。人は、物体表面のマイクロサイズのざらつきを判別が可能である²⁾ことから、髪を梳いた際に感じるキューティクル状態の差を髪質の差として鋭敏に感知できると考えられる。

このように髪質を評価する上で重要となるキューティクルの形状、状態を計測する方法として、これまで物体表面をなぞった際に生じる振動を計測するセンサ³⁾などが実現されている。しかし、これまで提案されているセンサの表面構造は平坦なものが多く、キューティクルのように微小な大きさのテクスチャを計測することは困難であった。

そこで本研究では、高感度にテクスチャを計測することができる人の皮膚構造に注目し、指紋構造を模した触覚センサを実現した。このとき、指紋構造の形状と触覚センサ感度とを比較することで、微小なテクスチャの計測に必要な指紋構造の形状の設計方法の確立を目指す。

2. 微小テクスチャを計測するための皮膚状構造体の特性評価

2.1 皮膚状構造体の設計・試作

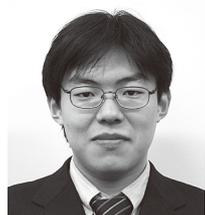
提案する皮膚状構造を持つ触覚センサの概念図を図2に

示す。人の皮膚は図2Aに示すように、剛性が高く、指紋状構造が存在する表皮内に剛性が低い組織が包まれている(真皮)。この表皮と真皮との境にメルケル触盤やマイスナー小体といった触覚受容体が多く存在しており、表皮の変形を計測している²⁾。

そこで、図2Bに示すように、提案する触覚センサは、表皮に当たる剛性が高く指紋のような凹凸構造が存在するシリコンゴム層と、真皮に当たる剛性の低いシリコンゴム層を重ね合わせた。また、剛性が低いシリコンゴム層部分にセンサ素子を配置し、センサ表面部分の変形を検出する^{4,5)}。

センサ素子には、直立状に配置したピエゾ抵抗素子^{6,7)}を利用した。ピエゾ抵抗素子は、変形することで抵抗値が大きく変わる材料である。これを直立状に配置することで、図2Cの矢印方向の変形を抵抗値変化として検出可能である。このピエゾ抵抗素子を皮膚状構造中に配置することによって、物体表面をなぞった際に触覚センサに生じるせん断変形を計測する(図3)。

物体表面をなぞった際に生じるせん断変形は、皮膚状構造表面の指紋構造が物体表面のテクスチャと触れることで生じると考えられるため、物体表面をなぞった際の触覚セ



Texture detection with micro skin type tactile sensor

Kentaro Noda

Department of Mechano-Informatics,
Graduate School of Information Science
and Technology, The University of Tokyo

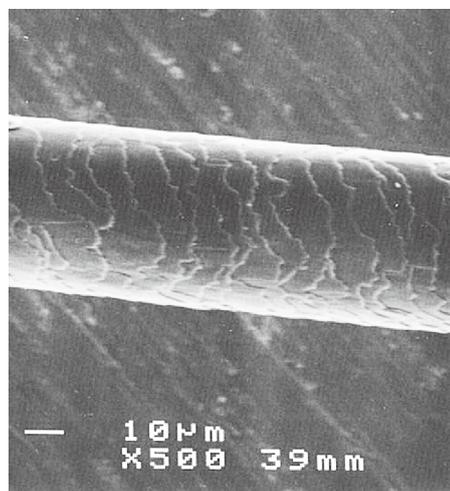


図1 毛髪表面のSEM観察画像

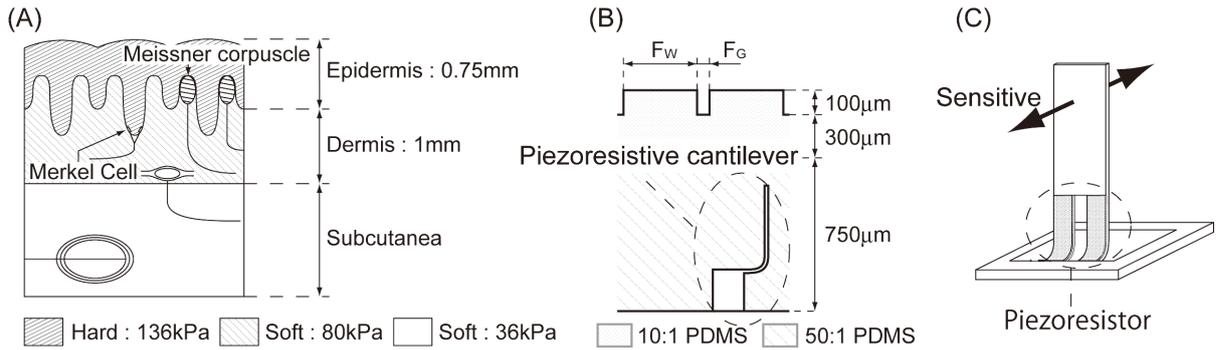


図2 提案する触覚センサの概念図
 (A) 皮膚の断面図、(B) 提案する触覚センサの断面図、(C) ピエゾ抵抗カンチレバーの構造

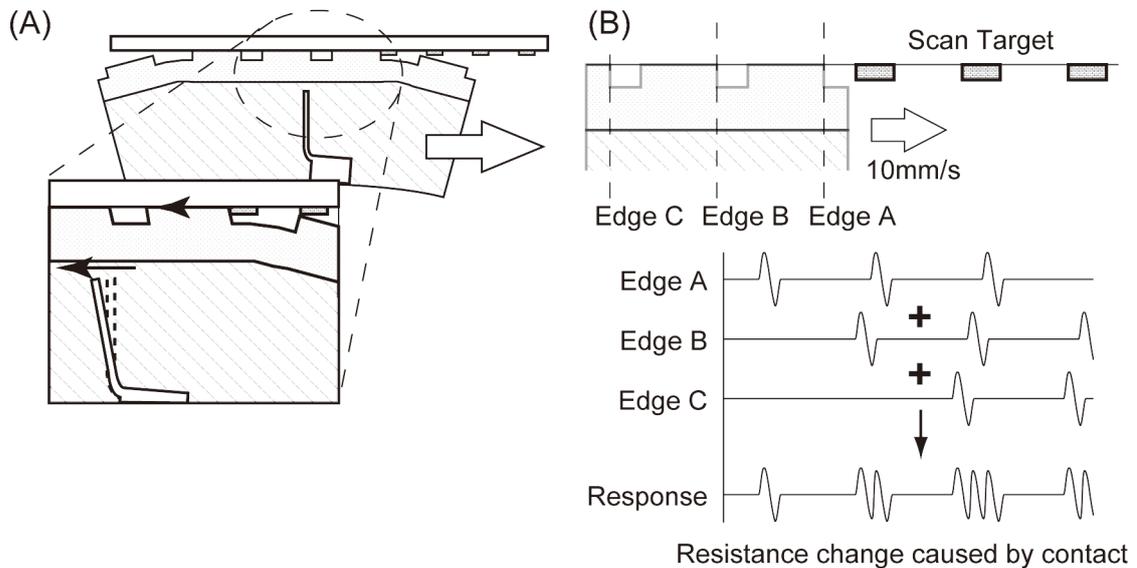


図3 なぞりによる物体表面テクスチャの計測

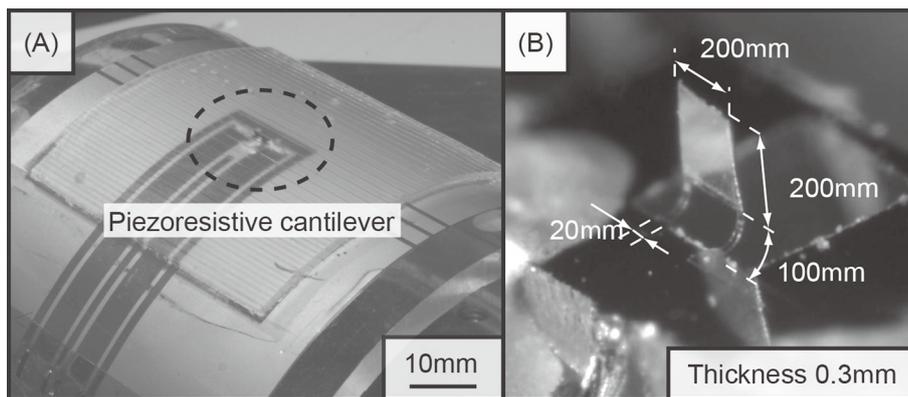


図4 試作した皮膚状触覚センサ
 (A) 全体図、(B) 内部に配置したピエゾ抵抗カンチレバー

ンサの出力は、センサ表面の指紋構造の形状によって変化すると予測される。そこで、本研究では触覚センサ表面の指紋構造の形状、すなわち図2Bにおける幅 F_W を $0.025\text{mm} \sim 0.6\text{mm}$ 、指紋間のギャップ F_G の値を $0.15\text{mm} \sim 3.0\text{mm}$ まで変化させた場合の指紋状構造の形状とセンサの感度との関係を計測する。

試作した皮膚状構造を持つ触覚センサおよびピエゾ抵抗素子の写真を図4に示す。この触覚センサは、 $30 \times 30\text{mm}^2$ の大きさであり、配線にフレキシブルなポリイミド-銅基板を用いることによって、曲面に固定することを可能とした。

2.2 なぞり動作による物体表面形状の計測

物体表面を走査するにあたり、図5に示すようなセットアップを作成した。このセットアップでは、一軸方向自動ステージの上に6軸力計および半径30mmの半円柱を配置し、半円柱表面に触覚センサを配置した。6軸力計の出力を元に、触覚センサと計測対象物との接触力を決定し、自動ステージを駆動させることで、一定の押し付け力で物体表面をなぞることが可能である。

本研究では、人が物体表面をなぞる動作を模して、押し付け力を0.2N、なぞり速度を10mm/sとして計測を行った。

2.3 触覚センサ表面の指紋構造の有効性の検証

本研究が提案する皮膚状構造の有効性を検証するため、試作した皮膚状触覚センサと表面に指紋状構造がない平坦な触覚センサを利用し、幅0.1mm、ギャップ0.3mmの凹凸構造を走査し、応答結果の差を比較、検証した(図6、7)。

図7の各センサでの計測結果をフーリエ変換し、周波数特性を算出、比較した結果を図8に示す。本実験で計測した凹凸構造のエッジからエッジまでの距離は0.4mm、な

ぞり速度が10mm/sであることから、図8では、25Hzの位置に応答のピークを観測した。二つのセンサにおいて、このピーク値の大きさを比較すると、センサ表面に指紋構造を持つことで、センサの出力が約50倍まで上昇していることが確認された。この結果から、本研究が提案するように、触覚センサ表面に指紋構造を形成した皮膚状触覚センサを用いることで、センサの感度が向上し、微小な凹凸の計測に有効であることが確認された。

2.4 指紋構造幅FWがセンサ感度に与える影響の検証

指紋構造の形状と触覚センサの感度との関係を求めるため、まず図2における指紋構造の幅FWを0.025mm～0.6mmまで変え、図6Cと同様の凹凸形状をなぞった際のセンサ応答の周波数特性を計測した。ただし、指紋構造間の距離FG=0.45mmで一定とした。結果3.1と同様に、各センサにおいて、周波数25Hzでのセンサ出力を比較した結果を図9に示す。

図9の結果が示すように、指紋構造の幅FWが0.6mmから細くなるにつれ、応答が増加していき、FW=0.05mmの

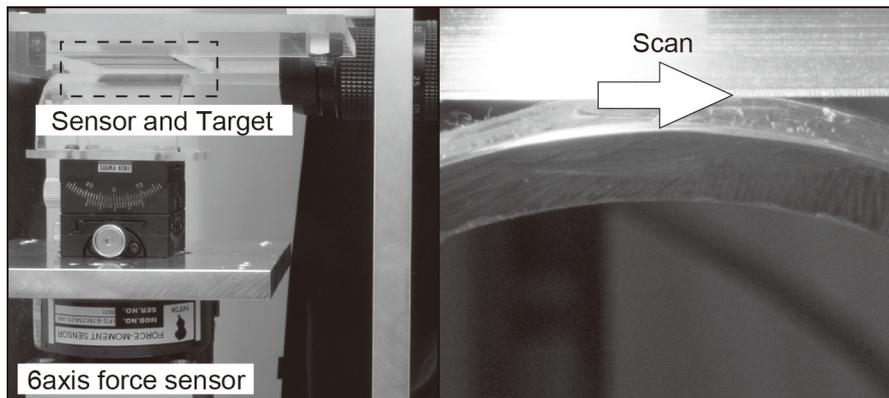


図5 触覚センサを用いた物体表面のなぞり計測用セットアップ

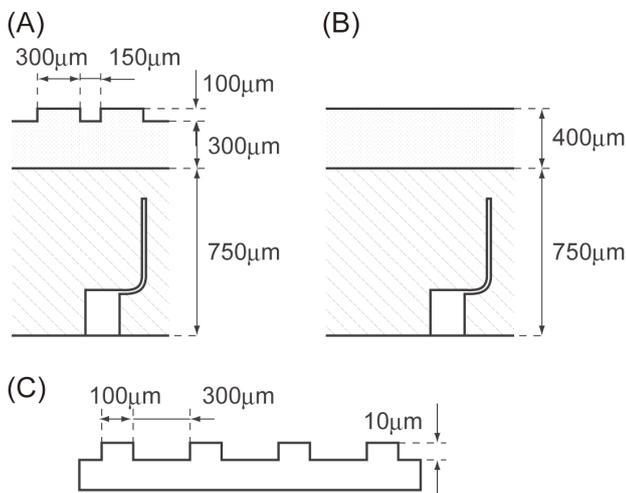


図6 指紋構造の有効性を検証するための触覚センサの寸法値 (A) 皮膚状触覚センサ、(B) 表面が平坦な触覚センサ、(C) 計測対象の寸法

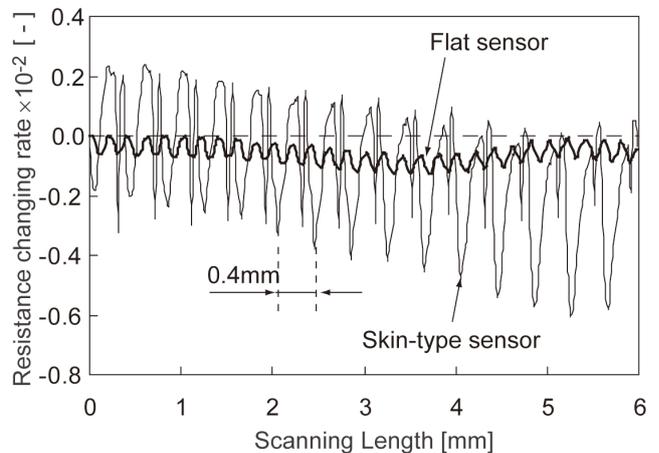


図7 皮膚状触覚センサと表面が平坦な触覚センサを用いた物体表面のテクスチャ計測結果の比較

ときに感度が最大になった後、更に幅が狭くなり $FW=0.025\text{mm}$ になると出力が減少していくことがわかる。

指紋構造の幅が 0.6mm よりも細くなっていった場合、指紋構造と指紋構造との間に物体表面の凹凸形状が入り込みやすくなるために触覚センサの出力が増加する。しかし、指紋構造のアスペクト（指紋構造の幅/指紋構造の高さ）が大きくなり、細くなりすぎた場合、指紋状構造が物体表面の凹凸形状と接触した際に生じる接触力によって折れ曲がり、触覚センサ内部にまで変形が届かなくなるものと予想される（図10）。こうした原因により、提案した触覚センサでは、指紋状構造の高さ $100\mu\text{m}$ に対して、幅 $50\mu\text{m}$ の構造が最も高い感度を持つことになったと考えられる。

2.5 指紋構造間ギャップ FG がセンサ感度に与える影響の検証

2.4と同様に指紋構造間のギャップ FG を $0.15\text{mm} \sim 3.0\text{mm}$ まで変化させた場合のセンサ出力の変化を計測した。このとき、指紋構造の幅 $FW=0.3\text{mm}$ で一定とした。また、計測対象としては図6Cに示したものを使用した。

対象物表面をなぞった際の応答周波数 25Hz でのセンサ出力と FG との関係性をまとめた結果を図11に示す。この結

果が示すように、 FG が $0.15\text{mm} \sim 1.0\text{mm}$ の間では増加していくものの、 1.0mm を超えるとセンサの出力が減少していくことが分かる。

本実験の結果は、2.4節の結果と同様に、指紋構造間のギャップ FG が狭くなることによって、指紋構造間に物体表面の凹凸が入り込むことが難しくなるために $FG=0.15\text{mm} \sim 1.0\text{mm}$ の間では、 FG の減少に従ってセンサ応答が減少していると考えられる。一方、 $FG=3.0\text{mm}$ の場合にセンサ応答が減少する原因としては、指紋構造間の間隔が開いたことで、各指紋構造と物体表面の凹凸との間で生じた変形の重畳が起こらなくなったことが原因と考えられる。図3Aに示したように、本触覚センサでは、指紋構造と物体表面に存在する凹凸が接触したことによって、せん断変形が生じている。触覚センサ表面には複数の指紋構造が存在するため、触覚センサに生じるせん断変形は、指紋構造一つ一つで生じたせん断変形の重ね合わせとなる（図3B）。このため、指紋構造間のギャップ FG が大きくなりすぎると、変形の重畳が生じなくなり、なぞりによって起こる触覚センサの出力が減少したと予想される。こうした原因により、指紋構造間のギャップと触覚センサの出力

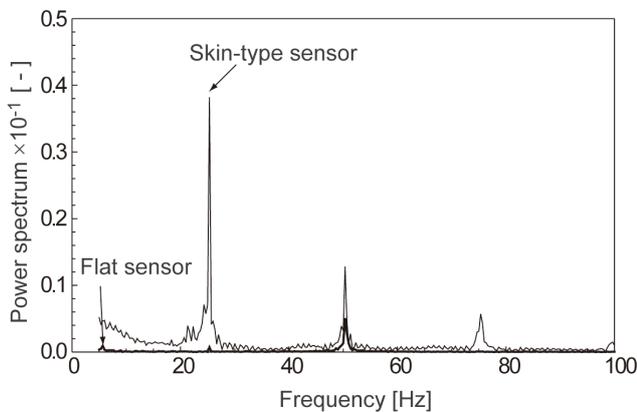


図8 物体表面をなぞった際のセンサ応答の周波数特性比較

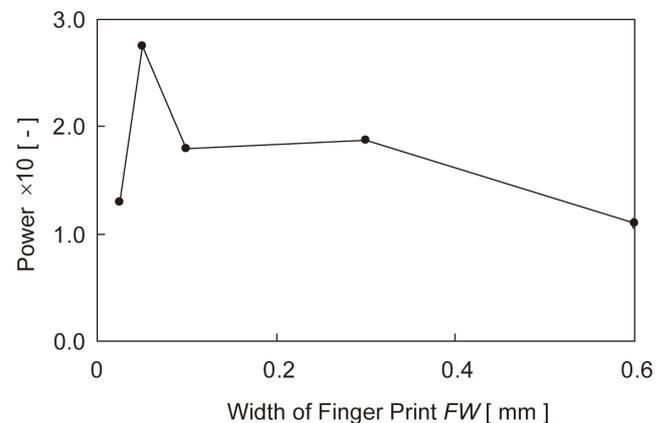


図9 指紋構造幅 FW とセンサ出力の関係

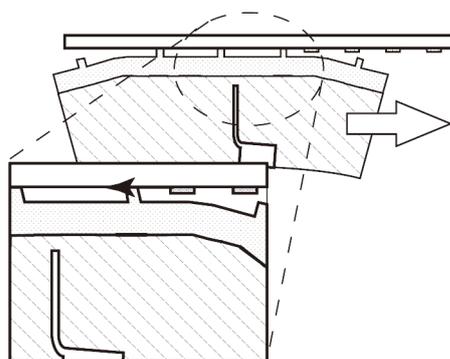


図10 高アスペクト指紋構造にて物体表面をなぞった場合の変形模式図

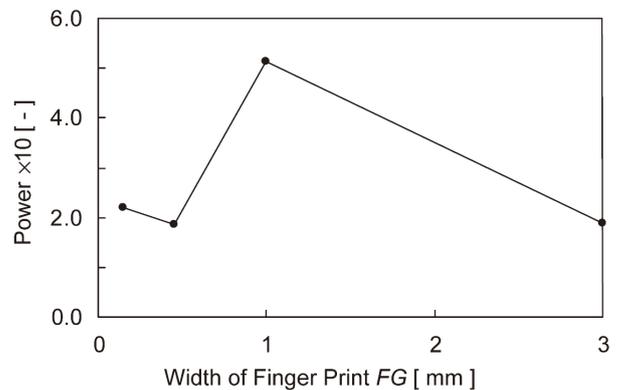


図11 指紋構造間のギャップ FG とセンサ出力の関係

との関係を考慮した場合、 $FG=1.0\text{mm}$ にてセンサ出力が最大になったと考えられる。

2.6 皮膚状構造体の設計手法に関する考察

3節における実験結果より、本研究において提案する触覚センサでは、表面の指紋構造の幅、構造間のギャップによって感度が大きく変化する。こうしたセンサ感度を最大とする寸法値は、3節でも述べたとおり、例えば指紋幅に関しては、指紋の高さと指紋幅との関係であるアスペクト比や、触覚センサ表面を構成する材料の剛性などが影響することが予想される。特に材料の剛性などを変えた場合、触覚センサの感度の最適値が変化する可能性が考慮されるものの、指紋幅 $FW=0.05\text{mm}$ 、指紋構造間の距離 $FG=1.0\text{mm}$ とすることでセンサの感度が最大になるという結果を得た。

3. ランダム配置した微小凹凸構造の計測試験

3.1 計測対象物の設計および実験手法

幅 0.1mm 、高さ 0.01mm の凸構造をシリコン基板上に連続的に作製し、その表面を試作した触覚センサでなぞることで、凸構造の間隔・周期をセンサ出力から検出可能であるかを確認した。

このとき、計測を行うに当たり、人の指紋構造と同等の寸法である、 $FW=0.3\text{mm}$ 、 $FG=0.15\text{mm}$ の皮膚状構造体を持つ触覚センサを使用した。また、触覚センサに液体フィルタを組み込むことで、なぞり時の摩擦力がセンサ出力に与える影響を軽減している。

使用したサンプルでは凸構造を61個配置しており、各凸構造間の間隔は 0.1mm 、 0.3mm 、 0.6mm の間隔をラン



図12 ランダム配置した凸構造サンプル
(A) 試作したサンプルのイメージ (B) 配置周期とその割合

ダムに選択・作製している。作製したパターンを図12に示す。また、本実験では、ランダムサンプルの凸構造の配置間隔の選択回数は図12に示すとおりである。

物体表面をなぞるに当たり、接触力は 0.2N 、なぞり速度は 15mm/s とした。

3.2 触覚センサによる計測結果の評価

試作したランダムサンプル表面を触覚センサによってなぞった結果を2.4.および2.5.章の場合と同様に、センサ出力を周波数解析した結果と凸構造の配置パターンから周波数を算出した結果の比較を図13に示す。

図13が示すように試作したランダムサンプルの凸構造の配置周期と同様に、サンプルをなぞった際の周波数解析結果では、 0.1mm 、 0.3mm 、 0.6mm 間隔で配置した凸構造をなぞった時に生じる周波数成分である、 75Hz 、 37.5Hz 、 25Hz の周波数応答が検出されることを確認した。

この結果は、対象がランダムに配置されたパターンであっても、配置された凸構造の周期をセンサ出力の周波数解析結果から検出できることを示しており、提案した皮膚状構造を有する触覚センサを用いることで、一般的な物体表面の凹凸周期を計測できることを確認した。

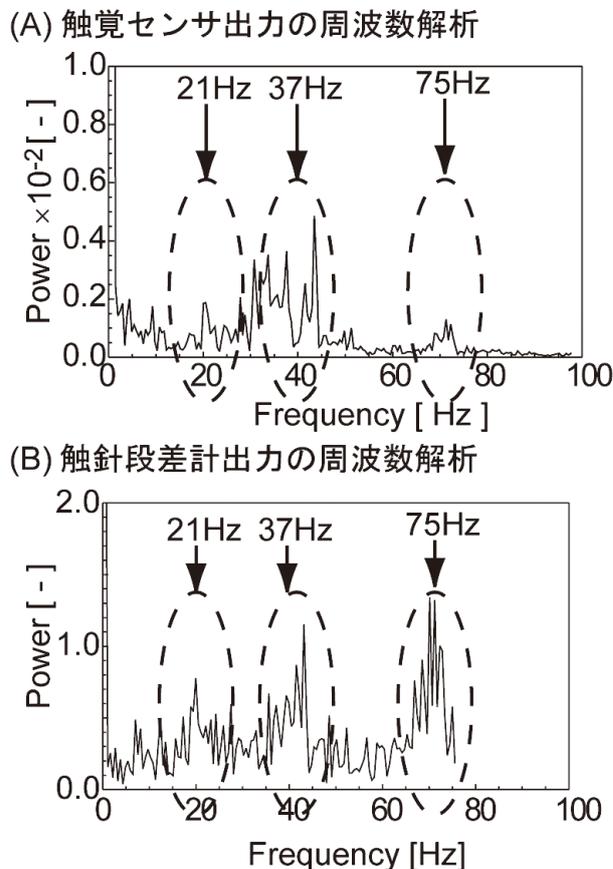


図13 ランダムサンプルをなぞった際の周波数解析結果
(A) 触覚センサ出力 (B) 触針段差計出力

4. 総括

本研究の成果として、人の皮膚表面の構造が微小なテクスチャ計測を行う上で重要であることを確認するとともに、テクスチャ計測に有効な触覚センサ表面の指紋状構造の形状の設計方針を確立した。またランダムに配置した凸構造サンプル表面を触覚センサによってなぞった際に、センサ出力の周波数応答から、凸構造の配置周期を検出できることを確認し、提案するセンサが物体表面の微小凹凸-テクスチャの周期を検出する上で有効であることを確認した。

本成果を元に試作した皮膚状構造を持つ触覚センサは、毛髪表面に存在するキューティクルのようにマイクロサイズのテクスチャを計測することが可能となり、髪質のような触感情報の定量的な計測・評価につながると期待される。

(引用文献)

- 1) C. Popescu, and H. Höcker, "Cytomechanics of Hair: Basics of the Mechanical Stability," *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol.277, pp.137-156, 2009.
- 2) 山鳥重, 彦坂興秀, 河村満, "タッチ," 医学書院, 2001.
- 3) 針生誠, 田中真美, 柿澤みのり, 川副智行, 清水秀樹, "毛髪手触り感計測用センサの開発に関する研究," *日本機械学会情報・知能・精密機器部門講演会講演論文集*, pp.69-73, 2008.
- 4) K. Noda, K. Matsumoto, and I. Shimoyama, "Tactile sensor with standing piezoresistive cantilevers, covered with 2-layer skin type structures for texture detection of object surface," *Proc. of IROS2008*, 2008.
- 5) K. Noda, K. Matsumoto, and I. Shimoyama, "Skin-type tactile sensor using standing piezoresistive cantilever for micro structure detection," *Proc. of IEEE Sensors*, 2010.
- 6) K. Noda, K. Hoshino, K. Matsumoto, and I. Shimoyama, "A shear stress sensor for tactile sensing with the piezoresistive cantilever standing in elastic material," *Sensors and Actuators A*, vol.127, pp.295-301, 2006.
- 7) 野田堅太郎, 高橋英俊, 中井亮仁, 松本潔, 下山勲, "ピエゾ抵抗カンチレバーを用いたMEMS力センサに関する研究," *4大学ナノ・マイクロファブリケーションコンソーシアム*, 2011.

妊娠期における肌の乾燥メカニズムの究明 エストロゲン過剰分泌状態にも関わらず皮膚が乾燥する原因はなにか

京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻

山口 琴美

Striae gravidarum is one of the most common problem during pregnancy. They are linear lesions frequently found on the abdomen, breasts, buttocks and thighs. They are often accompanied by a reddish purple color during pregnancy, loose pigmentation and become atrophic in the long term after pregnancy. And striae gravidarum, especially on the abdomen, is a cause of cosmetic concern for pregnant or postpartum women, who often attempt to seek various expensive and painful treatments even if such treatments are not effective. Therefore They attempted to prevent for striae gravidarum. Striae gravidarum is reported to be able to prevent it by keeping moisture for skin. The purpose of behavior of using moisturizing cream is to increase the amount of stratum corneum moisture. But it has not been cleared that relation between presence of striae gravidarum and the amount of water content in the skin. Also, during pregnancy, estrogen that has the moisturizing effect is secreted voluminosly. Regardless, the striae gravidarum is caused.

There are no relationship between the presence of striae gravidarum and the amount of stratum corneum moisture. These results indicate that behavior of using moisturizing cream for prevention of striae gravidarum would not prevent for it.

1. 緒言

妊娠線は、妊娠中もっとも共通した問題の一つであり、妊婦自身の関心としても非常に高まってきている。いったん生じた妊娠線は、分娩後も消失することがないため、妊娠線発生の危険因子について検討されている。妊娠線の危険因子として統計学的に有意とされたものに、妊婦の年齢^{1,3,4,6}、非妊時BMI^{1,4,6}、分娩時の妊娠週数^{1,3}、分娩時のBMI^{1,2}、分娩時の体重³、児の出生体重^{1,2,4,6}、児の身長²、児の頭囲²、水分摂取量¹、飲酒習慣¹、家族歴^{1-3,5}、体重増加量^{3,4}、腹部増大度²、殿部増大度²、胸部や腿部の既往⁵、人種⁵が挙げられていた。しかし、明確な回答は得られていない。その中で、妊娠線予防に対する市場も大きく、様々な商品が出回っている。中でも、妊娠線は、保湿することにより予防できるとされ、保湿ローションやクリームが多く販売されている。しかし、妊娠中のホルモン変化の特徴として、保湿作用を有するエストロゲンが多量に分泌されている。それにもかかわらず、肌が乾燥することにより、妊娠線が生じるとし、保湿が促されている。保湿剤がターゲットとする皮膚部位は、角質層部分である。しかし、妊娠線出現と角質層部位の水分含有量との関連性を調査した研究は皆無である。そこで本研究では、妊娠線出現と腹部における角質層部位の水分含有量との関係性を検討した。

2. 実験

2-1. 対象

妊婦健康診査を受診した日本人初産婦23名。

2-2. 場所

愛知県岡崎市にある産婦人科を有するAクリニック。

2-3. 腹部の角質層水分含有量値測定

Moisture Checker MY-808S (スカラー株式会社)を使用した。Moisture Checker MY-808Sは、センサー部を当てた部分から下の約1平方cmの範囲で深さ数十ミクロンの皮下の角質層部の水分率を測定する。

本研究の測定環境は、室温26.0～28.0℃、湿度64.0～74.0%とした。

2-4. 測定部位

腹部における測定部位は、臍を垂直水平に四等分し、臍部から上下左右5cmの部位とし、計4点を測定した。その4つの部位における測定値の平均測定値を腹部における角質層水分含有量値とした。

2-5. 妊娠線出現の評価

妊娠線出現の評価は、36週以降の妊婦健康診査時にその出現有無を判断した。妊娠線が1本など少しでも出現していた場合は、有りとした。

2-6. 対象者の属性

対象とした日本人妊婦の分娩時年齢、身長、非妊時体重、分娩時体重、妊娠中の体重増加量、非妊時BMI、分娩時BMI、児の出生時体重をカルテより収集した。



The analysis of drying on skin during pregnancy. What causes the dry skin ever when estrogen is over-secreted?

Kotomi Yamaguchi

Department of Human Health Sciences,
Kyoto University Graduate School of
Medicine.

2-7. 統計処理

妊娠線出現の有無と対象者の属性、ならびに角質層水分含有量値との関係を検討した。SPSS ver.19.0 (IBM) を用いて、t検定を実施した。

2-8. 倫理的配慮

研究に協力いただく妊婦すべての方に、今回の研究目的、協力内容などを口頭と書面にて説明し、同意書に署名をいただいた。

3. 結果

3-1. 対象者の属性

対象者の分娩時年齢、身長、非妊時体重、分娩時体重、妊娠中の体重増加量、非妊時BMI、分娩時BMI、児の出生時体重を表1に示す。

体重増加ならびに児の出生時体重は、現代日本人の平均的な数値であった。

3-2. 妊娠線出現の有無と角質層水分含有量値の関係

対象者23名中、妊娠36週以降の時点で妊娠線が出現していたものは、8名(34.8%)であった。妊娠線出現の有無と対象者の属性との関連性では、非妊時体重、分娩時体重、分娩時BMI、児の出生時体重で有意差を認めた。しかしながら、妊娠線出現の有無と角質層水分含有量値との間に有意差は認められなかった(表2)。

4. 考察

今回得られた妊娠線出現率は、諸家の報告¹⁻⁶⁾より低い出現率であった。対象が異なるため、比較することは難しいが、今までに日本で妊娠線出現率を調査したものは少なく、貴重なデータと考えられる。

また、従来危険因子として挙げられていた非妊時体重、分娩時体重、分娩時BMI、児の出生時体重が本研究にお

いても同様に妊娠線出現に関与していた。しかし、その他の妊娠線出現の危険因子とされている妊婦の年齢^{1,3,4,6)}、非妊時BMI^{1,4,6)}、児の出生体重^{1,2,4,6)}、体重増加量^{3,4)}に関連は認められなかった。今回のように、各研究により危険因子が異なるため、属性により、妊娠線が出現するとは考えられない。

妊娠線の発生機序に関しては、1992年にWatsonらが弾性繊維ネットワークの障害による妊娠線が生じるとの見解を述べてから約20年以上報告がなく、明確な発生機序は明らかになっていない。こういった中、妊娠線予防のために、多くの保湿剤が販売されている。保湿剤の多くが、角質層部分の保湿を目的とするものである。妊娠線予防のために、角質層の水分補給が有効だとされているが、今回の研究では、妊娠線出現と腹部における角質層水分含有量値との間に関連性は認められなかった。すなわち、多くの妊婦が実施している予防対策に効果が少ないと推測される。しかし、今回の研究では、腹部への保湿による妊娠線予防対策の有無を聞いていないため、予防対策が妊娠線出現に影響した程度を知ることはできない。

今後は、さらなる妊娠線の発生機序の解明、予防方法の確立が望まれる。

5. 総括

本研究では、日本人妊婦の妊娠線の出現と腹部における角質層部位水分含有量値と関連がないことが明らかにされた。妊娠線出現に関与する因子をさらに検討する必要性が示唆された。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、経費を援助いただく財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く御礼申し上げます。また、本研究にご助言とご指導いただきました京都大学大学院医学研究科菅沼教授には深謝いたします。

表1 対象者の属性

| | |
|------------|--------------|
| 分娩時年齢 | 27.4±3.1 |
| 身長 | 156.1±5.3 |
| 非妊時体重 | 49.2±7.6 |
| 分娩時体重 | 59.7±9.1 |
| 妊娠中の体重増加量 | 10.6±3.6 |
| 非妊時BMI | 21.4±3.4 |
| 分娩時BMI | 24.5±3.1 |
| 児の出生時体重 | 2941.2±376.5 |
| (平均値±標準偏差) | |

表2 妊娠線出現との関連性

| | 妊娠線なし (n=15) | 妊娠線あり (n=8) | p 値 |
|----------|--------------|--------------|--------|
| 分娩時年齢 | 27.6±2.4 | 27.0±4.2 | 0.666 |
| 身長 | 155.7±6.0 | 156.9±3.7 | 0.631 |
| 非妊時体重 | 46.8±5.5 | 53.6±9.2 | 0.038* |
| 分娩時体重 | 56.6±7.3 | 65.6±9.7 | 0.021* |
| 増加量 | 9.8±3.8 | 12.0±2.6 | 0.160 |
| 非妊時BMI | 20.6±3.1 | 23.0±3.6 | 0.111 |
| 分娩時BMI | 23.3±2.6 | 26.5±2.9 | 0.012* |
| 児の出生時体重 | 2797.9±366.9 | 3210.0±222.8 | 0.009* |
| 角質水分含有量値 | 32.5±3.3 | 32.1±2.6 | 0.723 |

(平均値 ± 標準偏差) *p<0.05

(参考文献)

- 1) Ratree J-orh, Vitaya Titapant, Prakong Chuenwattana, et al. Prevalence and Associate Factors for Striae Gravidarum, J med Assoc Thai., 91(4), 445-451, 2008.
- 2) A Ghasemit, F Gorouhi, M Rashighi-Firoozabadi, et al., : Striae gravidarum associated factors, European Academy of Dermatology and Venereology., 21, 743-746, 2007.
- 3) H Osman, N Rubeiz, H Tamim, et al, :Risk factors for the development of striae gravidarum, American journal of obstetrics and gynecology., 62e1-e5, 2007.
- 4) G.S.S.Atwal, L.K.Manku, C.E.MGriffiths, et al., : Striae gravidarum in primiparae. British journal of Dermatology., 155, 965-969, 2006.
- 5) Anne Lynn S Chang, Yolanda Z.Agredano, Alexa Boer Kimball, : Risk factors associated with striae gravidarum, Clinics in dermatology., 51(6), 881-885, 2004.
- 6) R.G.R.Thomas, W.A.Liston, : Clinical associations of striae gravidarum, Journal of Obstetrics and Gynaecology., 24, 270-271, 2004.
- 7) R.E.B.Watson, E.J.Parry, J.D.Humphries, et al., : Fibrillin microfibrils are reduced in skin exhibiting striae distensae, British Journal of Dermatology., 138, 931-937, 1998.

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

「少女」の化粧—近代および現代の化粧文化からの一考察

立命館大学大学院一貫制博士課程

小出 治都子

This study discusses the makeup culture of teenage girls in modern and present time, and that we make a clear the history of the teenage girls makeup culture and grasping the present condition.

Firstly, the study analyzes the articles about advertisements for makeup in *Shojo no tomo*, which was popular magazine among the teenage girls during WWII. Secondly, this study examines the advertisements of Utena in *Weekly Margaret* and how the concept of the beginnings of selling kids cosmetics influenced teenage girls.

The study finds that teenage girls were said to making "new girls administering to nation" in 1940s magazines. However, the advertisements weren't written to "new girls". It finds that makeup culture during WWII had a few difference points between *Shojo no tomo* and some cosmetic companies. In addition, it changed makeup culture of teenage girls that cosmetic companies sold kids cosmetics. Advertisements for kids cosmetics described real life images of teenage girls. It means that changed the vision from a longing for adult to a longing for the same generation.

Thus, this examines the history of makeup for teenage girls during WWII and the beginnings of selling kids cosmetics.

1. 緒言

本研究は、近代および現代における「少女」の化粧文化について考察し、少女の化粧行為や、化粧品購買者としての実態を明らかにし、化粧する少女の歴史的背景および現状把握をすることを目的としている。

まず、一年目の課題として、近代における少女の化粧文化について美育の観点から考察を行った。そして、少女たちが美しさを得るために、身だしなみとして化粧を行ったこと、さらに、身だしなみ以上の化粧行為を行うようになり、装飾としての化粧行為が広がったことを論じた。そして、そのような少女と化粧の関係が生まれた要因のひとつに挙げられるのが、美育という教育概念であったことを前年度の研究報告書に記載している。

このように、近代における少女の化粧文化について考察したのち、二年目の課題として現代における少女の化粧文化を論じることとした。まず、美育を推奨していた高等女学校が廃止された1946年ごろまでの化粧文化を、戦中期(特に、1941年～1945年)を中心に考察した。戦中期における化粧文化は、国家(および雑誌メディア)が提唱した少女の理想像と、化粧品広告に描かれた少女という二つの少女像によって形成されたものであった。そのため、この二つの少女像を背景として、どのような化粧品が発売されたのか、またそうした化粧品の販売を促進するために、ど

のような化粧品広告が雑誌に掲載されていたのかといったことを検証しながら、当時の少女と化粧の関係について考察した。

戦中期の化粧文化を考察するために、『少女の友』に掲載された化粧品広告を取り上げた。『少女の友』は1908年に刊行され、1955年まで続いた長寿雑誌であり、戦時中においても刊行された数少ない少女雑誌である。そうした雑誌の化粧品広告、さらに同誌に掲載された化粧に関する記事を考察することで、戦中期の少女における化粧文化について論じることが可能になった。(このことについては、歴史社会学研究会編『センター報告17 歴史から現在への学際的アプローチ』に「戦中期における少女の化粧—『少女の友』からの一考察」として収録された。(2012年3月刊行))

戦後の少女の化粧文化に関しては、1950年代以降を調査対象とした。1950年代になると、少女(ないしは、もっと幅広いカテゴリーである「子ども」)向けに化粧品が発売されるようになった。この子ども向け化粧品の広告には、それまでの化粧品広告と比べて明らかな相違点がある。少女向けの化粧品広告は少女向け雑誌に掲載されていたが、その化粧品は実際には婦人向けに販売されていたものであった。つまり、婦人向けの化粧品を使うことを少女が懂れているような形式で描かれていたのである。それに対し、子ども向け化粧品の広告は、少女が子ども向け化粧品を使い、その効能を謳うという形式のものであった。

そこで、子ども向け化粧品の広告の実態がどのようなものであったかを、1965年に株式会社ウテナから発売された「ウテナお子さまクリーム」を対象に考察することとした。「ウテナお子さまクリーム」はそれまでの子ども向け化粧品に比べ、数多くの宣伝方法によって商品を販売した。その宣伝方法のひとつとして、少女向けマンガ雑誌『週刊



Makeup for Teenage Girls: Examination of Makeup Culture in Modern and Present Times

Chitoko Koide

Postgraduate School of Ritsumeikan University

『週刊マーガレット』に掲載されたマンガ広告を考察した。『週刊マーガレット』は、1963年に集英社から刊行され、現在まで続くマンガ雑誌である。この雑誌に数多く掲載された「ウテナお子さまクリーム」のマンガ広告を考察することで、少女および子どもたちにどのような宣伝活動を行っていたか、購買対象としての少女をどのような存在として取り上げていたのかを論じた。(以上の考察については、2011年6月25日・26日に行われた日本繊維製品消費科学会2011年度年次大会で「キッズコスメ」の誕生—「ウテナお子さまクリーム」の販売戦略」と題し、口頭発表を行った。)

それぞれの詳細については、2. 調査、および3. 分析および考察で論じることとする。

2. 調査対象

2. 1

1941年1月から1946年7月までの『少女の友』に掲載された化粧品広告、および化粧関連記事

2. 2

1965年11月から1973年2月までの『週刊マーガレット』に掲載された「ウテナお子さまクリーム」広告

3. 分析および考察

3. 1 戦中期の化粧品広告について

1941年1月から1946年7月までに刊行された『少女の友』に掲載された化粧品広告を考察した。この時期を対象とした理由として、化粧品広告の内容に変化があったことが挙げられる。まず、1940年に改正された化粧品営業取締法に広告取締条項が加えられたことにより、虚偽誇大な広告が戒められた。それにより、化粧品広告の表現内容も変化する(図版1)(図版2)。本研究では、化粧品広告が変化し、さらに太平洋戦争の勃発に伴い戦争色が濃くなる時期である1941年を始まりとした。

戦中期の『少女の友』に掲載された化粧品広告は、1941年1月から1943年7月までである。1943年8月から1946年6月までは、戦争激化に伴い、化粧品広告はおろか広告自

体掲載されることはなかった。

1941年1月から1943年7月までの化粧品広告を分類したものが表1である(表1参照)。広告を掲載した化粧品会社と、それぞれの広告数の内訳は次の通りである。

ウテナ: 30枚(バニシングクリーム: 13枚、レモンクリーム: 9枚、ピーシー乳液: 8枚)

カガシ商品本舗: 29枚(グランドクリーム・カガシクリーム: 9枚、ミルクローション: 4枚、液体コールド: 16枚)

橋本製薬: 14枚

桃谷順天館: 28枚(にきびとり美顔水: 24枚、明色クリームローション: 3枚、明色クリンシンクリーム: 1枚)

ナリス化粧品: 4枚

藤村一誠堂: 12枚

湯瀬産業: 16枚

三和商会: 12枚(バニシングクリーム: 4枚、コールドクリーム: 6枚、粉白粉: 1枚、水白粉: 1枚)

その他: ベルボンクリーム、レービクリーム、モロゾフのノリトあらいこ各1枚

(*1枚の化粧品広告に2種類の化粧品が紹介されている場合は、2枚として数えている。)

これらの化粧品広告の中で、最も掲載数が多いものが株式会社ウテナから発売されたバニシングクリームである。そこで、本研究では、ウテナのバニシングクリームの広告を考察した。

その結果、1941年1月以降のウテナのバニシングクリーム広告では、1940年9月に施行された広告取締条項によって誇大表現がなされなかったものの、戦争を想起させる広告文句もほとんど記載されていないことが判明した。また、化粧品広告に登場する少女も戦争を表わすような描かれ方をされていない。唯一、1941年2月の広告に労働している(かのように見える)少女が描かれ、戦争を意識させる「興亜」の文字を見ることができのみである(図版3)。さらに、1942年以降、戦争を表す言葉は出てこず、化粧品の効果説明のみを記載することとなる。広告文句同様、挿絵も戦争を想起させるものは描かれていない。また、少女



図版1 1940年5月



図版2 1941年1月



図版3 1941年2月

表1 1941年1月～1943年7月までの化粧品広告

| | | ウテナ | カガシ化粧品本舗 | 橋本製薬 | 桃谷順天館 | ナリス化粧品 | 藤村一誠堂 | 湯瀬産業 | 三和商会 | その他 |
|----------|--------|-----|----------|------|-------|--------|-------|------|------|-----|
| 1941年1月 | 34巻1号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1941年2月 | 34巻2号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1941年3月 | 34巻3号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1941年4月 | 34巻4号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1941年5月 | 34巻5号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1941年6月 | 34巻6号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1941年7月 | 34巻7号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1941年8月 | 34巻8号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1941年9月 | 34巻9号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1941年10月 | 34巻10号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1941年11月 | 34巻11号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1941年12月 | 34巻12号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1942年1月 | 35巻1号 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| 1942年2月 | 35巻2号 | ○ | ○ | × | ○ | ○ | ○ | × | × | × |
| 1942年3月 | 35巻3号 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | × | × |
| 1942年4月 | 35巻4号 | × | × | × | ○ | ○ | × | ○ | × | × |
| 1942年5月 | 35巻5号 | ○ | ○ | × | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × |
| 1942年6月 | 35巻6号 | ○ | ○ | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ | × |
| 1942年7月 | 35巻7号 | ○ | ○ | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ | × |
| 1942年8月 | 35巻8号 | ○ | ○ | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ | × |
| 1942年9月 | 35巻9号 | ○ | ○ | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ | × |
| 1942年10月 | 35巻10号 | ○ | ○ | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ | × |
| 1942年11月 | 35巻11号 | ○ | ○ | × | ○ | × | × | ○ | ○ | × |
| 1942年12月 | 35巻12号 | ○ | ○ | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ | × |
| 1943年1月 | 36巻1号 | ○ | × | × | × | × | ○ | ○ | ○ | × |
| 1943年2月 | 36巻2号 | ○ | ○ | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ | × |
| 1943年3月 | 36巻3号 | ○ | ○ | × | ○ | × | × | ○ | ○ | × |
| 1943年4月 | 36巻4号 | ○ | ○ | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ | × |
| 1943年5月 | 36巻5号 | ○ | ○ | × | × | × | × | ○ | ○ | ○ |
| 1943年6月 | 36巻6号 | ○ | ○ | × | × | × | × | ○ | × | ○ |
| 1943年7月 | 36巻7号 | ○ | ○ | × | × | × | ○ | ○ | × | ○ |

の写真・挿絵も減り、商品の写真・挿絵が描かれることが多くなっていく。その広告では、「健康」や「明るく」あることを謳ったものが多い。このように、化粧品広告においては、戦争を意識した少女はあまり描かれておらず、化粧品会社が少女と化粧品の間には「戦争」の意識を入れないようにしていたことが分かる。

しかし、当時の『少女の友』誌上では、国家に従事する「新しい少女」が尊ばれるようになった¹⁾。「新しい少女」は化粧を身だしなみと捉え、簡単に施せる化粧品を必要とした。身だしなみの化粧としてバニシングクリームが用いられた。そのため、必然的にバニシングクリームが多く販売され、その広告数も多くなったのである。

雑誌メディアと化粧品会社が求めた少女像は、どちらも

化粧を必要としながらも、その理想像には戦争を意識するかどうかで大きな相違点が見られる。それは、戦後になり化粧品広告が再掲載された1946年7月の『少女の友』でも確認することができる。

戦後の『少女の友』では、国家に従事する「新しい少女」は否定され、戦前に求められていた少女像が再び肯定されるようになった。戦前の少女とは中原淳一などが描いた少女である(図版4)。しかし、化粧品広告においては、このような戦前の少女や戦中期の少女ではなく、新たな戦後の少女が描かれるようになっている(図版5)。

以上により、戦中期の化粧文化では、雑誌メディアと化粧品会社が求める少女に相違点が出てきたこと、そして、その距離は戦後さらに広がりを見せ始めたのである。



図版4 1946年2月



図版5 1946年7月

3.2 子ども向け化粧品の誕生と少女の化粧文化

戦後の少女の化粧文化の中で大きく変化したことは、少女を含む子ども向けに化粧品が発売されたことである。子ども向けに発売された初めて化粧品は、1953年のレート（元・平尾賛平商店）の「ジュニアクリーム」である。この後、いくつかの子ども向け化粧品が発売されるが、最も宣伝活動が行なわれたのが株式会社ウテナの「ウテナお子さまクリーム」である。

「ウテナお子さまクリーム」の主な宣伝方法は、テレビCMと雑誌広告である。社史では、雑誌広告は主に婦人雑誌に掲載されていたと書かれている。広告の形式は、クリームの安全性を親に説得し、「ウテナお子さまクリーム」を買うように仕向けるというものであったようだ²⁾。しかし、雑誌広告は親向けのものばかりではないことが、申請者の調査で判明した。子ども向けの広告が、マンガ形式で少女向けのマンガ雑誌『週刊マーガレット』に掲載されていたのである。

『週刊マーガレット』に掲載されていた「ウテナお子さまクリーム」の広告数は、1966年11月から1973年2月まで発行されたもののうち、28枚である（表2参照）。この表から、毎年と言ってよいほど、11月と12月に広告が掲載されていることが分かる。その理由として、クリームは肌が乾燥しやすい冬につけるものであるからである。そのため、11月・12月に「ウテナお子さまクリーム」の広告が増えるものと思われる。また、掲載された広告の中でも、1969年は6回、1970年は5回と他の年よりも数が多いことが分かる。この時期は、「ウテナお子さまクリーム」だけでなく、「ウテナお子さまリップクリーム」や「ウテナお子さま乳液」など、子ども向け商品が多く発売された年である。そのため、広告数も増えたものと考えられる。

「ウテナお子さまクリーム」の広告内容を考察すると、

表2 「ウテナお子さまクリーム」広告タイトル

| 年 | 月 | 号 | タイトル |
|-------|-----|----------|-------------------------|
| 1966年 | 11月 | 49号 | かいものまき |
| 1966年 | 12月 | 53号 | ハイキングのまき |
| 1967年 | 3月 | 14号 | 卒業式のまき |
| 1967年 | 10月 | 45号 | ステキな花嫁のまき |
| 1967年 | 11月 | 49号 | やさしいパパのまき |
| 1967年 | 12月 | 53号 | 年末大当りのまき |
| 1968年 | 11月 | 47号 | いなかの駅でのまき |
| 1968年 | 12月 | 50号 | あがったあがったの巻 |
| 1969年 | 1月 | 1号 | クリスマスイブのまき |
| 1969年 | 1月 | 3号 | とりどしのはつゆめ |
| 1969年 | 2月 | 6・7合併号 | 卒業旅行の巻 |
| 1969年 | 3月 | 10号 | 謝恩会の巻 |
| 1969年 | 9月 | 37号 | あれのち晴れ |
| 1969年 | 11月 | 48号 | ママのプレゼント |
| 1970年 | 1月 | 4号 | 雪でぐしゃりもリップでつるり |
| 1970年 | 3月 | 9号 | つけるが勝ち |
| 1970年 | 10月 | 41号 | 「あんみつ」はきらい?の巻 |
| 1970年 | 11月 | 45号 | 最高殊勲乳液 |
| 1970年 | 12月 | 51号 | 鈴もあるけばクリームにあたる |
| 1971年 | 1月 | 4・5合併号 | すきすきスキーの巻 |
| 1971年 | 3月 | 12号 | 先生“どてーっ”の巻 |
| 1971年 | 5月 | 22号 | タイトルなし |
| 1971年 | 6月 | 25号 | タイトルなし |
| 1971年 | 11月 | 47号 | 内気なボーイフレンド |
| 1971年 | 12月 | 51号 | お肌シットリナー坊ガッカリ |
| 1972年 | 1月 | 1号 | お肌の遭難救助隊 ウテナお子さまクリーム |
| 1972年 | 2月 | 8号 | スキー ウテナ好き～ 学校 |
| 1972年 | 12月 | 50号 | へんし～ん! |
| 1973年 | 1月 | 4・5合併特大号 | パンダか!?な～んだ!! |
| 1973年 | 2月 | 8号 | しあわせの鳥 |

6つの要点を挙げることができる。

- ・ウッチャンは常に「ウテナお子さまクリーム」（または、「ウテナお子さま乳液」）をつける。
- ・うえのお姉ちゃんは結婚を機に「ウテナお子さまクリーム」から卒業する。（図版6）
- ・ママやおばあちゃんは「ウテナお子さまクリーム」をつけていない。
- ・ウッチャンの弟である、テッチャン・ナアぼうも「ウテナお子さまクリーム」をつけることを喜んでいる。（図版7）
- ・ウッチャンは同年代または、年下の子どもから羨ましがられる存在である。（図版8）
- ・登場する親たち（動物であっても）は、ウッチャンの肌を羨ましがり（つまり、「ウテナお子さまクリーム」の



図版6 1967年10月



図版7 1968年12月

効能を認める)、自分の子どもにもクリームをつけるように勧める。

以上のことから、ウっちゃんという少女の存在が「ウテナお子さまクリーム」の広告の中で重要な位置を占めていることが分かる。つまり、「ウテナお子さまクリーム」の購買対象者はウっちゃんのような年齢の少女であること、ウっちゃんは購買者にとって理想の存在として描かれているのである。このことは少女の化粧文化において、大きな転換点といえるだろう。

それまでの少女向けの化粧品広告では、婦人向けの化粧品を持った少女が描かれ、大人への憧れを表現した広告文句や挿絵が描かれていた。それに対し、「ウテナお子さまクリーム」の広告では購買者である少女の憧れとして同年代の少女であるウっちゃんが描かれる。それは、大人という未来像への憧れから、同年代の存在への変化したといえる。

このように、子ども向け化粧品が発売されたことは、化粧品文化が婦人を対象にしていたことに加えて、少女も化粧品文化の担い手であることを表明したといえよう。だからこそ、ウっちゃんは同年代よりも「大人っぽく」かつ「か

わいく」描かれているのである。

ウっちゃんのような少女が対象となった理由のひとつに、当時の「少女文化」が関係しているといえる。大塚英志によると、「少女文化」は昭和40年代に急速に成長したとされている³⁾。「少女文化」の成長に大きく影響したのが、少女マンガの変革(少女マンガ誌の創刊、少女がマンガを日常的に読むようになった)とファンシーグッズ市場の誕生である。

ファンシーグッズとして、「ウテナお子さまクリーム」では様々なおまけをつけたり、広告に掲載されたクイズに答えると景品が当たるなど、子どもが商品を買うように仕向ける工夫がなされていた。とくに、おまけとしてつけたパンダのバッジは、パンダブーム(1972~1973年あたり)に乗って、売り上げに大いに貢献したと、ウテナの社史では語られている⁴⁾。

また、「ウテナお子さまクリーム」には、毎回クイズが書かれており、答えを送ると抽選で景品が当たるというシステムもあった。このようなシステムは、「ウテナお子さまクリーム」の発売以前からあり、目新しいものではなかったが、子ども向けの景品をプレゼントすることは、当時



図版8 1970年10月

急成長したファンシーグッズのマーケットと無関係ではなく、むしろ、密接な関係にあったといえよう。このように、「ウテナお子さまクリーム」は「少女市場」の発展と共に売れた化粧品であったといえる。

以上の考察により、戦中期と、子ども向け化粧品発売初期の化粧文化について、その歴史的過程を論じることができた。今後の課題は、1970年代以降の少女の化粧文化について論じ、化粧文化研究の深化を図ることである。

(引用文献)

- 1) 今田絵里香『少女の社会史』, 勁草書房, 177-179, 2007.
- 2) 株式会社ウテナ編『花の歳月—ウテナ文化史・70年—』, 68, 1997.
- 3) 大塚英志『少女民俗学 世紀末の神話をつむぐ「巫女の末裔」』, 光文社, 49-54, 1989.
- 4) 前掲『花の歳月—ウテナ文化史・70年—』, 70.

化粧の消費と身体規範の転換 ——現代カイロの化粧をめぐる世代間の衝突

お茶の水女子大学大学院博士後期課程

鳥山 純子

This study aims at revealing the ways how the make-up culture in contemporary Cairo shapes and reshapes female body in the region. By considering make-up as an everyday practice that curves the notion of body and the consumer act that shapes the story of self, the study seeks a platform to examine bodily practice, make-up in particular, that connects the individual reasoning with the social situation. Female body in the Middle East has a history of being an icon for its cultural essence. Female body or the absence of female body from the public was considered to be the proof of the "suppression of women by men" that represents the area's backwardness. As such, symbolic, as well as physical absence of female body has gathered the academic attention, and many studies were conducted on veiling. However, by closely examining the previous studies, it became apparent that they have common problems: relying solely on ideologies such as Islam and patriarchy, and the bias of viewing female bodies that only considers its sexuality. Such cognitive framework places make-up as oppose to veiling, that prevents to understand the current phenomenon in which more and more women wear heavy make-up and Islamic veiling at the same time. Instead of deploying problematic frameworks from the past, the study examines the phenomenon by grounding on the empirical data gathered by the author from the interviews and participant observations.

The findings from the life history of female teachers in their 20's working in outskirts of Cairo indicate that those women did not problematized their make-up activities, despite the fact that they have been reported as a "social problem" in many mass medias. They were well recognized the negative connotation of make-up, and they were well aware of the Islamic logic that believed to condemn the act of make-up. But they did not relate those negative discourses to their own behaviors. Instead, they and their parents both recognized make-up as a sign of progressed and wealthier lifestyle that those women have acquired through succeeding in the school education. It suggests that they have embodied a particular modernization ideology that had been advocated by the government to mobilize its citizens and represented act of make-up as a sign of modernity.

1. はじめに

エジプトにおいて化粧は、女性の道徳的価値を否定的に表象するアイコンであるという側面をもつ¹。「化粧が濃い」、「化粧が好き」という言い回しは、現在、多くの文脈において、女性の否定的評価として男女を問わず使われている。過去10年間の間にエジプト、特に都市部では女性イスラーム教徒のベールの着用率が飛躍的に増え、ほとんどのイスラーム教徒女性がベールを被っている現在の現象をみる限り、「化粧＝不道徳の証」とみる言説は、イスラーム原理主義の浸透とも共犯関係を築きながら、女性の身体を覆い隠す方向にますます力を強めているようにも見える。その一方、同じ10年の間に化粧産業はめざましい成長を遂げ、ショッピングモールで一番目立つよい区画を占めている店には決まって海外ブランドを扱う高級化粧品店が含まれている。そしてそうした化粧品店は、反社会的、反イスラーム的というバッシングを受けているようにも見えないのである。本研究は、一見矛盾するようにも見える



Make-up as an Arena for Inter-generation Conflict in Contemporary Cairo: A Case Study on Consuming Make-up and the Transformation of the Body Norm.

Junko Toriyama
Ph.D. Student, Ochanomizu University

化粧という行為に関する社会現象に着目して化粧を多角的に考察することから、エジプトにおける女性身体をアリーナに争われる政治を解きほぐし、現在のエジプトにおける社会状況の一端を明るみに出す試みである。

2. 中東における女性身体の隠蔽という言説

エジプトでは現代の都市部においても化粧を不道徳さや墮落の兆候とみなす見解が根強く存在する。女性同士の会話では、嫁姑、姉妹とその兄弟の配偶者、もしくは娘の嫁ぎ先の女性親族など、ある程度近い女性姻族に対して否定的なものいいをする際に「不適切な化粧」がしばしば言及される。通常は「化粧のやり過ぎ」や「大げさなやり方」、また化粧に必要な以上の労力や金銭が費やされることが非難の対象となる。一方日常会話においては「化粧をしない」、もしくは「やり方が下手」であることに対して非難の矛先が向けられることもある。この二つの言説の違いは、前者が公の場での化粧が問われるのに対して、後者が夫との夫婦生活において行われる化粧が問われるという違いがある。公の場における化粧には、不道徳、ふしだら、妻・母役割の放棄という否定的な意味合いが付される一方、夫婦の寝室という場における化粧には、妻役割を積極的に担うとい

¹ 2003年～2004年にかけて女性ツアーガイドを対象に行った調査では、観光産業に従事する男性たちがもつ彼女たちへの否定的評価の根拠として、定型文のように「飲酒、喫煙、(濃い)化粧」が挙げられた。

う肯定的な意味合いが付されているのである。いずれの場合においても化粧は女性の美しさや魅力を強調する行為であるという認識は共通し、まさにこの認識のために化粧は問題化されてきたといえるだろう。

その前提とされてきたのが、女性身体は隠蔽されるべきものである、という女性身体理解である。報告者が過去に行った先行研究の検討からは、この理解には、女性身体をセクシュアリティとの関連においてのみ理解しようとする傾向が存在することが明らかになった〔鳥山2010〕²⁾。女性の身体加工行為の一つである化粧は、美しさ、すなわち性的魅力を増長させるための性的行為だという理解があるために、不道徳さやふしだらさ、また生殖行為としての夫婦生活といった事柄との関連づけが成立する。化粧は性的行為である以上、それは特定の場で、特定の関係をもつ人との間のみ行われる行為であるべきだ、という理解が導かれることは想像に難くない。イスラームにおいては婚外交渉が絶対的な禁止事項であるため〔大塚2000〕²⁾、性的交渉が許される夫に対してのものであれば化粧はむしろ推奨される行為であるが、性的交渉が許されない不特定多数の相手に対しての行為とみなされれば、非難の対象となるのである。また、美しく着飾ることが妻・母役割の放棄とみなされることには、そもそも性的な存在（性的欲求が強く、男性を誘惑する力をもつ女性〔Mernissi1975〕³⁾）としての女性の欲望以上に、妻・母としての社会的任務を重視する、19世紀後半以降の近代化言説の影響を指摘することができるだろう〔シャクリー 2009〕⁴⁾。

3. 化粧という行為の変化

（産業統計・美容産業従事者とのインタビューから）

上記のような理由から、未婚、とりわけ若い女性の行う化粧に対しては否定的な評価が下される風潮があった。しかし近年、10代、もしくはさらに若い女兒も、高級化粧品店においては重要なターゲットとなっているという〔化粧品輸入販売会社Aマーケティング部長、Mona氏とのインタビュー、2006年8月〕。また2007年から2008年にかけて私立学校で行った調査では、10代後半の女子生徒が学校から禁止されていたにもかかわらず化粧をして登校し、教師たちとの間でトラブルを起こすケースも実際に目にする事ができた。化粧・衛生（コスメティックアンドトイレタリー）産業は近年のエジプトにおいて最も急激な成長を遂げている産業の一つである。1997から2005の成長率は、ドル換算にして約160パーセント、2005年度には31億4千390万エジプトポンドの売り上げを計上した〔Euromonitor2006〕⁵⁾。そのなかでも「カラー・コスメテ

ィック」の4つのカテゴリー（facial make-up、eye make-up、lip products、nail products）の製品売上高は、3億6千890万エジプトポンドと「化粧・衛生部門」全体の売り上げの11.7パーセントを占めている〔Ibid〕。

過去10年の間に、カイロにおける化粧品販売の様式も大きな変化を遂げた。かつてエジプト都市部で化粧品販売を主に担っていた薬局、行商に加え、海外ブランドを扱う化粧品専門店や2.5ポンドショップ、そしてダイレクトセリングとよばれる訪問販売が2000年前後から登場した。なかでも高級輸入化粧品店は、近年相次いでオープンした大型モールの一等地に必ずといっていいほど店舗を出し、ディスプレイやポスターなどによって、直接の消費者だけでない幅広い人々に情報を発信する工夫を行っている。その一つがセルフアクセスカウンターと呼ばれるディスプレイの導入である〔前出Mona氏とのインタビュー、2006年8月〕。セルフアクセスカウンターとは商品のサンプルを自由に手に取って試することができる商品陳列台のことを指す。通常こうした台は販促用品の一つとして、化粧品製造販売会社から直接送られ、商品の配置からポスター、電飾にいたるまで、製造元で監修される。コンセプトを管理することにつながり、消費者が世界中のどこでも共通の情報を受け取ることができるようデザインされているという。また、それまで商品はガラスで覆われた陳列ケースに並べられることが普通だったエジプトにおいて、商品をだれに断りもせず自分で手に取り試することができるという新しいショッピングスタイルを紹介した点で画期的なものだったという。こうした店舗様式やダイレクトセリングには、店舗やカタログを通じて情報発信をするという共通点がある。そこで発信される情報には、化粧品知識や、化粧のやり方だけでなく、商品イメージが含まれ、それは特定のライフスタイルと深く関与することにより、特定のライフスタイルや女性の人生設計、またはアイデンティティを提唱する効果をもっている。化粧専門店において、化粧を「美しくなるという女性の本能に従った自然の行為」、「自分らしさの表現」、「自分を幸せにする方法」として位置づけていたのはその一例である。化粧品専門販売店のAでは、化粧とは女性が自分に自信をもつことをうながす道具であり、すなわち女性の社会進出における重要な道具である、また化粧はいつもと違う自分を演出する道具ともなりえるもので、そうした意味ではセクシーな自分を演出する効果があることも否定できないものとして捉えていた。つまりA社では化粧の効用として性的な状況における利用価値を肯定しつつも、化粧と性との直接的なつながりを否定した見解を発信していたのだが、ダイレクトセリングを行うB社³⁾、

²⁾ この分析については、コスメトロジー研究振興財団発行『研究業績 中間報告集第20号』において概要を報告した。

³⁾ B社とは、2006年8月、2007年2月にインタビューを行った。

また化粧品製造販売を行うC社⁴でも同様の回答を得たことから、この傾向がエジプトの化粧産業における主流であると考えられるだろう。

4. ライフスタイルの指標としての化粧と教育 (20代女性教師のライフヒストリーから)

エジプトでは長年、化粧とセクシュアリティが緊密に関係づけられてきた点については上述した。しかし化粧はセクシュアリティに限られず、社会的地位、自己形成、ライフステージ、美的価値観、地域性、また化粧品の流通や製造といった幅広い個人的・社会的状況が反映される場である。そのため、化粧の考察では、化粧がもつ多面的な性格を捉えた研究こそが必要とされるはずである。極度な単純化を避け、化粧のもつ多面的意味付けを明らかにするため、本研究ではライフヒストリーの執筆から、エンドユーザーとしての女性たちが化粧にどのような意味を見出し、生産し、実践しているのかを考察した。既存の理論をあらかじめ想定しそれを足掛かりにするのではなく、語りの中で現れる枠組みにそって様々な要素に目配りをしながら化粧を描写することから、より実相に近い理解を得ることを目的とした。ライフヒストリー執筆には、筆者が過去(2007年～2008年)に行った現地調査から得られたデータと、2010年に行った2回の追加調査のデータを用いた。対象としたのは、初回調査時にカイロ郊外の私立学校に勤務していたDという20代女性教師である。紙面の制約上ライフヒストリー全体の掲載がかなわないため、以下にその考察部分の要約を記す。なおライフヒストリーは中東学会年報に投稿予定である。

Dのライフヒストリーから見えてきたのは、Dは自分自身をクバル(*kbar*)として語っていたことである。そしてクバルとは通常「大きな」あるいは「大人」という日本語訳が当てられるアラビア語の単語だが、Dのライフヒストリーを通してこの概念について考察したところ、何をもちて彼女がクバルだと考えていたかという問いに答える上で、化粧を含めた大学での経験というもの大きな意味を持つことが見えてきた。「大人」と訳される概念でありながら、実は女性が自分自身をクバルという概念を用いて表現することはそれほど一般的ではない。日常生活でも、また現地の日常生活について扱った民族誌でも、女性がクバルという概念を用いて自分自身のアイデンティティを語るという場面に筆者はあまりでくわしたことがない。Dは初めから自分は他人とは異なる、より進歩的な考え方をする人物として自分自身を提示していたのだが、そんな彼女が自分自身を表現する上で用いたのが、クバルという概念だった。そして彼女がそのアイデンティティを特に

強調したのが、大学入試について語る時、職業選択について語る時、化粧規範について語る時だった。

前述したとおり、エジプトでは一般的に、未婚の若い女性の化粧は、社会的にあまり好意的に受け取られない。しかし大学生となると話は別で、女子大生は化粧をしても許される存在とみなされている。そしてDのライフヒストリーでは、化粧が解禁されるこの大学への入学こそが、自分をクバルとみなす契機となっていたことがうかがえたのである。しかしクバルは単純にライフステージを基準にした概念でもない。Dにとって契機となったのは、大学入学であり高校卒業ではない。そして大学入学はエジプト社会において、少なくともイデオロギー上は、社会での成功を約束される特別な地位を付されることが意味されるのである。さらにDにとって、大学時代に友人とショッピングモールに出かけたりしながらすごした時間は彼女のそれまでの価値観を変化させた経験であり、「特別な自分」に許されたライフスタイルとして、その後の彼女の進路選択にも大きく影響を与えた経験となっていることが明らかになった。つまり自分をクバルとして提示することには、一定の年齢以上の人物であると同時に、大学生・大学卒という特権を手にし、そこで消費主義的なライフスタイルを享受することができるにたる人物である、という意味が含まれていたわけである。

こうした文脈において、化粧は彼女にとって豊かで進んだライフスタイルの最も顕著な指標の一つであった。このように、化粧に豊かさや進歩、そして個人のアチーブメントを表す意味が付加されているのだが、これが単なる階級指標と異なるのは、その豊かさや進歩といったものを手にできる条件が個人の財力にあるのではなく、大学進学という学校教育における成功によると考えられている点である。Dは両親ともが公務員として勤務していた家庭、つまりエジプト都市部における下層中産階級と位置付けられうる家庭出身の女性であるが、彼女がクバルという地位を手に入れたのは、出自とは無関係の学業における成功によってであった。この点において、Dにとって化粧とは自分自身の努力によって手に入れた成果としての豊かで進んだライフスタイルの象徴となっている。

Dは、化粧について両親と衝突したことはないという。母親は自分では化粧をせず、Dに化粧の必要はないと意見することはあるが、Dが化粧をすることにあからさまな反対は唱えていない。学校教育を受けることによる生活の向上という図式は、D独自のものではなく、エジプト政府が提唱し社会に広く浸透していることから[Starrett1998]⁶⁾、同様の論理は親の世代にも共有されていると考えられる。そのため、化粧と女性の道徳性を結びつけるような価値観

⁴ C社とは、2008年1月と2月にインタビューを行った。

をいまだ保持している母親も、面とむかって娘の化粧に反対することは難しいと感じていることがうかがえた。

5. 結論

本研究の目的は、現代エジプトの都市部に化粧という現象を、身体規範の転換という観点から分析することであった。身体に関する理論的發展のなかで、身体を規範や権力構造を反映する社会的構築物とする見地から、身体を語る際対象となる現象を特定の社会的文脈に据えて考察することの重要性が訴えられてきた。化粧という身体加工を扱う研究でも、現地の社会的文脈を理解したうえで現地の文脈に則して現象を理解することが重要である。そこで本研究では、個々の身体加工とそこで行われる意味づけというミクロな現象を、グローバルな市場や商品生産の技術、また当該社会の政治・経済政策の変化といったマクロな諸相と関連させて考察した。その結果見えてきたのは、グローバル化に大きく影響されて進む市場の発展や商業施設の発展といった都市空間の変化と、女性の生き方に関するイデオロギー間の政治とが交差しながら変化する姿であった。そうした構図において、化粧に関する考え方は現在20代の女性にとっては、現在自分が置かれている社会的位置を示す裕福さや進歩という指標の一つとして機能していたことが明らかになった。しかしそれが世代間衝突を生み出すものにはなっておらず、むしろ親世代との間にもある程度のコンセンサスが形成されていたことから、指標は20代という当事者世代に限られて保持されているものではなく、その親の世代にもある程度共有されていたということができよう。20代女性がそうした化粧観を保持する一方、社会には化粧を性的なもの結び付けて否定的なものとな

す言説もいまだ根強く存在する。このことから、それぞれの化粧観はいまだ異なるイデオロギーを結び付けられて存在していることが推測されるが、化粧観の間、もしくはイデオロギー間に交渉が実際に起こっているかどうかは観察することができなかった。これについては今後の課題としたい。

(引用文献)

- 1) 鳥山純子「中東研究における女性身体の処遇—『交渉』を鍵とした研究動向分析—」『人間文化創成科学論叢』第12巻, 2009
- 2) 大塚和夫「第5章 ジェンダー—消し去られる身体」『近代・イスラームの人類学』東京大学出版会, pp.99 - 126, 2000
- 3) Mernissi, Fatima. *Beyond the Veil: Male-Female Dynamics in Modern Muslim Society*. London: Al Saqi Books. p.41, 1975.
- 4) シャクリー、アムニア著 宮原麻子訳「教育を受けた母、構造化された遊び——九世紀から二〇世紀初頭のエジプトにおける育児」『「女性をつくりかえる」という思想—中東におけるフェミニズムと近代性』ライラ・アブー＝ルゴド編, 明石書店, pp.230-316, 2009
- 5) Euromonitor. "Egypt: Sales of Cosmetics and Toiletries (Value)," in *Consumer Middle East 2007*. London: Euromonitor International, p.215, 2006.
- 6) Starrett, Gregory. *Putting Islam to Work: Education, Politics, and Religious Transformation in Egypt*. Berkeley and Los Angeles: University of California Press 1998.

産褥ケア、医学美容からみる台湾女性の素肌観および化粧観

都留文科大学

山本 芳美

In Taiwan, as women over the age of seventy traditionally do not wear makeup, they respect the natural complexion without any cosmetics. Women who are in their late thirties or in their forties do not pay much attention to cosmetics or they even lack the confidence in making up. It may be because they have no excellent home education on makeup. Another reason may be that they lose interest in makeup because of the hot and humid climate which may damage the makeup. Consequently, they turn to emphasize skin maintenance in order to be in good complexions. For example, postpartum women may take in sufficient nutrition and have plentiful rest to maintain their physique with rosy complexions. By contrast, women below twenty are sufficiently informed with various sources of makeup information and generally tend to put on make-up with better skills.

In this article, I conclude that women over thirty-five years old believe in natural beauty without any makeup, and their attitudes towards makeup differ from those of women below twenty.

1. 緒言

2011年に提出した研究経過報告書において、筆者は台湾の産褥ケアである「坐月子」の概略とボディケア各種を予備調査に基づいて報告した。研究2年目の本年度においては、2011年6月から2012年3月にかけて、学外研究制度を利用して約8ヵ月にわたって台湾に継続的に滞在した。これにより、コスメトロジーに関連した多岐にわたる研究テーマを見出し、各種のインタビュー調査と文献研究に従事することができた。本年度は、台湾製おしろいの歴史、そのおしろいを使う漢民族の七夕の儀礼のほか、漢民族の人々が死者に供える紙製の化粧品についての調査をおこなった。

台湾においては、東海岸の街である台東にあるプユマ民族の南王集落に長期滞在し、プユマ民族が1940年代までおこなっていた歯を黒く染める習慣について調査した。プユマ民族においては、歯を染める際に用いた植物には2種ある。プユマの社会構造は男女ともに細かく成長段階の分かれた年齢階梯制であり、少年組に入会して3年目になった少年たちが歯を染める際には七里香（チーリーシャン 和名：沈丁花 *Daphne odora*）を用いた。10代後半の少年は、枝を火であぶり、周りにできた煤をその油分を利用して歯に吸着させる方式で黒く染めたという。女性たちが成人してから歯を染める際には、現地ではイートウンと呼ばれる腺果藤（シェンゴートウン 和名：トゲカズラ *Pisonia aculeate*）



The concept of makeup and the naturalism in the postpartum service and medical cosmetology for Taiwanese women.

Yoshimi Yamamoto
Tsuru University

の植物 (Fig. 1) の枝を折ってそのまま歯にこすりつけ、枝からにじみ出た樹液によって染めていた^(注1)。母親や祖母には虫歯一本なく、黒々と染めた歯を互いに自慢しあっていた、と60代から70代以上の人々は語る。90歳の女性は、17歳の時に自分も真似してやってみたが、とても（樹液が）渋かったので一度でやめたと話していた。人々の話では、この歯を染める習慣は日本人や漢民族との接触が増えるにつれ、いつの間にかなくなってしまったという。日本のお歯黒についてよく指摘されるように、イートウンの枝を歯になすりつけることは、歯ブラシやつまようじと同様、始終歯垢を取ることで虫歯予防の意味があったと思われる。また、樹液によって染めあがった黒色の歯は当時の人々の美意識に適っていたものと考えられる。

さらに、文献研究により調べた項目には、台湾女性の美容や化粧観、服飾の変化、美容整形や医学美容の状況などが挙げられる。しかしながら、今回の研究完了報告書では前回の報告テーマと統一性を図るため、引き続き坐月子を中心に取り上げる。坐月子をめぐる身体観と、今回の現地滞在により判明した医学美容の状況からみる台湾の女性の素肌観や化粧観とは重なる面があるため、併せて報告することとした。

2. 女性たちのインタビューと文献研究より考察した素肌観と化粧観

2000年から2003年まで、筆者は台北の南港にある中央研究院民族学研究所に留学をしていた。その当時、同年代の20代後半から30代以上の女性たちは、スキンケアはするものの、いわゆるベースメイクとポイントメイクには熱心ではなかった。素顔にアイブローと口紅をほどこす程度で過ごしていた。これは、現在でも同じ世代以上に見られる傾向で、化粧する人はいるにはいるが、管見の限り、7割から8割の女性は一目立つような化粧をしていない。



Fig.1 2012.2.2 台東・卑南文化公園のイトウン

一方で、当時25歳以下の女性たちは、当時、日本から直輸入されていた美容雑誌や女性誌を読んで化粧について学び、メイクアップを覚えていた。この世代の人々はすでに30代半ばに達しており、職場に向かう際などにフルメイクをおこなう人が、私見の限り、5割に達している。台北の新交通システムMRTのなかでメイクをおこなう姿を時たま見かけるのが、この世代以下の女性である (Fig. 2)。30代後半の友人の話では、1996年にMRTが開通した直後から、「電車のなかで化粧する女性が現れた」という。日本女性の「電車で化粧」が直輸入されたように見えるが、亜熱帯気候の台北では事情がことなる。車内で化粧をしていた女性に理由を聞いてみたが、冷房の効いた車内でメイクし、職場に近い駅で降りることによって化粧崩れをぎりぎりまで抑えようとする合理的な発想からの行動であった。

すでに知られているように、日本の化粧品会社の売り上げの2割はアジア市場で支えられている。化粧品の売り上げ傾向は、台湾も日本も変わらないと台湾に進出した化粧品メーカーの人々は口をそろえる^(注2)。だが、例えば、台湾ではシャンプーは売れるが、リンスやヘアトリートメント剤の売り上げは落ちる^(注3)。それは、真夏に1日に数回シャワーを浴びる生活では、シャワーを浴びるごとに髪をシャンプーで洗い、そのたびにリンスやトリートメント剤をつけるのは面倒だというのが一因である。もう一つの原



Fig. 2 2011.7.20 台北 MRT 文湖線車内で無心に化粧する女性

因は、リンスやトリートメント剤は湿度が高いために粘つく感覚になり、好まれないという事情がある。リンスやトリートメント剤が浴室にない傾向は、都市部よりも農村部に顕著である^(注4)。

仔細に見ていけば、世代によって購入する化粧品は異なる。30代後半以上の女性は、スキンケア化粧品は高額であっても購入する。しかし、ベースメイクやポイントメイク用品はアイブロウと口紅以外、興味を示さない。対して、30代前半から下の世代の女性たちは、つけまつげやマスカラなども使いこなし、日本の同世代の女性たちとほぼ変わらないメイクである。財団法人生物技術開発中心が2009年に発表したレポート『薬妝品及医学美容産品之商機』によれば、現在台湾内には18歳から44歳の女性消費者が約470万人おり、約70%の消費者がスキンケア化粧品を最も購入している。薬用化粧品は過去には35歳以上の消費者向けに販売されていたが、近年は15歳から24歳の女性が使用しはじめている。この主要な原因としては、この世代の女性たちが一世代上の女性消費者より3年から5年早く化粧をし始めるからだという。(財団法人生物技術開発中心2009:102)。なお、筆者の知り合いの複数の30代女性の声によれば、美白と保湿を重視して化粧品を購入している^(注5)。それにしても、なぜこのように世代間で化粧に対する行動が大きく異なるのかについて、30代後半以上の女性たち数名にインタビューで聞いてみた。

普段から素顔でいるHさんは、現在は民族学の研究職に就いているが、以前は助産婦の資格を持って病院で働き、20名以上の赤ん坊を取り上げた経験がある。彼女に坐月

子について聞いた話は後に譲るとして、自らの化粧について「スキンケアはするが、ファンデーションを塗ったり、ポイントメイクはどのようにしたらよいかわからない」と語った。その原因は、母親が化粧せず、家庭で特に教わってこなかったからだとして説明した。日本の40代女性は、18歳になったとき化粧品会社から案内状が来て、試供品をもらってメイクの講座を受けたり、進学先で就職のためのメイク教室があったと筆者の経験を話したが、Hさんは化粧を教室で学んだことはないという。Hさんの話では、一般的に、台湾女性は顔色が健康的であることを重視しており、スキンケアで十分と考えている。ちなみに、Hさんによれば、スキンケア用品は1回につき3000台湾ドル程度(約1万円)購入するそうである。

化粧をどうやってすればよいか、わからないと述べた人はHさんだけでなく、40代後半のソーシャルワーカーYさんもそうであった。Yさんも簡単なスキンケアはするが、メイクはしていない。「面倒だし、特に必要を感じない」ということであった。

また、プユマ民族の70代の林清美さんも「どうしていいかわからないから、化粧はしない」と述べた。林清美さんはプユマの南王集落を拠点とする「高山舞集文化藝術服務團」という舞踊団の団長であるが、公演が多いにも関わらず、化粧はおろか口紅をすることもほとんどない。この舞踊団は10代後半から20代半ばの団員を20名ほど抱え、その半数は女性であるが、この団体で化粧を教えることもない。出番の前に訪ねてきた化粧の習慣のある女性が、若い団員や林清美さんが素顔であることを見かねて口紅をつける程度である。(Fig. 3)

30代後半以上の女性が化粧をしないことには理由があり、歴史的にみると化粧は娼妓のするものだと避けていた。漢民族の女性たちは、後れ毛などがでないようにぴっちり油をつけて結い上げた髪に、珊瑚などがついたネットやかんざしなどでアクセントをつけた。耳に金製や翡翠製のピアスをつけ、腕にも翡翠製の腕輪などはめることが美しい姿とされていた。しかし、顔にはおしろいや口紅を通常つけなかったという。

むしろ、一般の女性にとっておしろいは、挽面(北京語の発音でワンミェン、閩南語の発音ではバンビー)、挽臉(北京語発音でワンリェン)と呼ばれる、口と手を器用に使って糸をよじらせ顔の産毛を抜く行為に用いられるものという認識であった(Fig. 4)。挽面は角質が取れて、肌がなめらかになり、顔色が明るくなる効果があるとして1カ月から2カ月ごとに行く人もいる。しかし、以前には女性が嫁入りする際に、両親が運気のよい女性に頼んで1度だけ挽面をおこなうものであって、これを「開臉」(北京語発音でカイリェン)と称した。女性は余計な産毛をとって額の輪郭をはっきりさせることで美しくなるとされ、新郎に紅



Fig. 3 2011. 7. 15 国立台湾史前文化博物館内にて。民族衣装をつけた林清美さんが、口紅を親戚の女性につけてもらっている



Fig. 4 2011. 6. 30 台東の南王集落内の美容室にて、挽面施術の様子

潮した新婦の顔を見せることで魅了しようとしたと説明がある。花嫁にとっての一種の通過儀礼の意味もあったのであろう^(注6)。林清美さんも50年前の結婚時に一度だけおこなったといい、筆者が自宅に住み込むようになってから、数回一緒に行っただけである。台湾製のおしろいは、日本

の以前のおしろいのように鉛を用いるのではなく、中国大陸から輸入してきた大理石を砕いたうえで臼で引き、水と香料を加えて固形化したものである。おしろいは台湾西北部の新竹の名産品で、おしろいをつけることで顔の毛を立ちあがらせ、糸で産毛をすくいやすくした。

「レーザー照射をしたから、化粧はもうしなくていい」と言い切ったのが30代後半のカルチャーセンターで英語を教えるLさんであった。Lさんは前回の留学時からの友人で、2011年11月にインタビューした時点では、2011年4月に右ほほの1センチ大のシミをレーザー照射によって取り除いたと語った。施術中は大変痛く、その後1か月ほど痛みが残ったが、シミが消えたので満足した。その後、スキンケアはするが、ファンデーション以上の化粧をやめたという。彼女いわく、「Keeping Youngが大事であって、今以上にきれいになろうとは考えていない。私が医学美容を選んで、美容整形に行かなかったのは、スターバックスのコーヒーか、セブンイレブンで済ますかという差だった。スターバックスが高いのは、いろいろサービスがあるし雰囲気もいいからでしょ。でも、セブンイレブンでも安く十分おいしいじゃない」ということである。

医学美容とは、おそらく2000年代半ばに出てきた診療の名称で、主に皮膚科や総合病院の一角に併設されているほか、専門診療所が「医学美容」の看板を掲げている。日本の「プチ整形」という流行語が台湾に直輸入されて「微整形」(ウェイゼンシン)を謳うところもあるが、レーザー照射や脱毛、ヒアルロン・ボトックス注射、ケミカルピーリングなど比較的軽微な施術を扱う診療所である。美容整形を扱う病院やエステなどがこれまで存在しなかったのではないが、台湾では近年、医学美容センターが大幅に数量的成長をみている。台湾大学付属、営総、萬芳、長庚などをはじめとして、公立、私立、財団法人を問わず各病院が医学美容センターを設立している。台湾微整形美塑学会の資料によれば、現在台湾で医学美容治療とサービスをおこなう診療所は4000カ所にのぼる。診療所の一か月平均の平均営業額は200万から250万台湾ドル(日本円にして約550万から680万円)で、総額にすれば医学美容の市場規模は、日本円では2630億円相当の960億台湾ドルになるという(財団法人生物技術開発中心2009:51、103-104)。日本の渋谷にあたる交通の便がよく、デパートが隣接するMRT忠孝復興駅付近には、医学美容の診療所が文字通り林立している状態である(Fig. 5、6)。診療所の急増は、台湾女性の需要の高まりとともに、2008年に中国大陸客向けに台湾内の団体観光が解放されたことがきっかけになったと考えられる。その増加には、医療ツーリズムによる観光客を期待しての先行投資という側面がある。医学美容は比較的风险が少なく、短期の滞在でも各種メニューをこなすことができるためである(注7)。

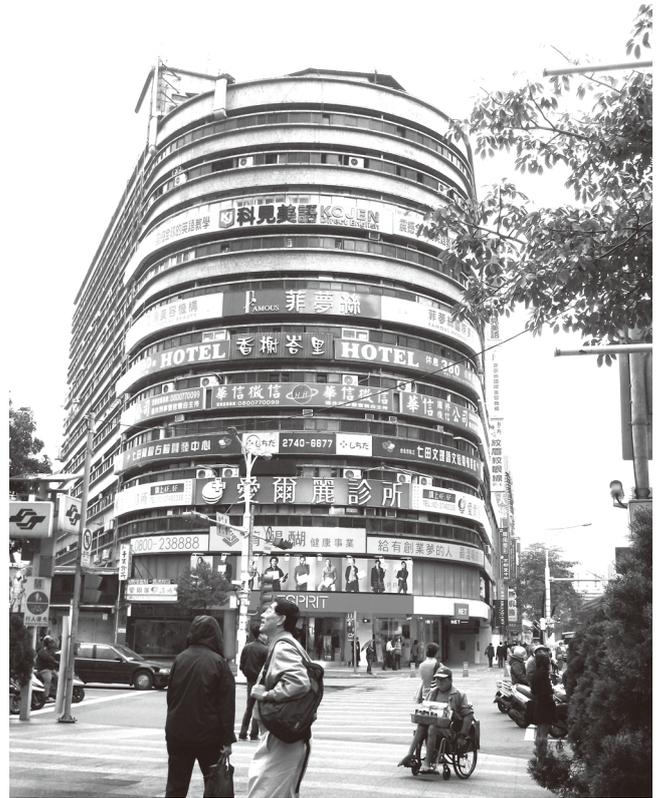


Fig. 5 2011. 6. 30 忠孝復興駅前のエステ・医学美容診療所の入ったビル



Fig. 6 2011. 8. 1 忠孝復興駅で見かけた医学美容診療所の広告

Lさんは友人たちと医学美容の診療所が発行しているチケットを共同購入し、彼女自身はレーザー照射に1枚使い、残りのチケットは別の人に転売した。それによって、1回の施術が1000台湾ドル(約3000円)程度に収まった。彼女は、スキンケア化粧品も友人と共同購入して、価格を抑えているという。2009年10月に同じくLさんにおこなったインタビューによれば、デパートがセール期に「15000台湾ドル買えば1000台湾ドル(約4万円)で2700円)の商品券を贈る」などのキャンペーンをするため、共同購入し各化粧品コーナーの景品を集めて必要な人に分けるようにしている。また、疲れた時などにエステ店の全身マッサージ(1回1500台湾ドル、約4000円)やフェイシャル(1回800台湾ドルから1000台湾ドル、約2200円から2700円)に毎月1回程度通っている。

Lさんの母親は眉を整え口紅はつけたが、それ以上の化粧はしていない。彼女によれば、台湾の女性にとって、眉を整えることは非常に重要で、面相学的な発想にそって家を買う際にはできるだけ眉を高く描く必要があるという。Lさん自身も、化粧はやめたものの眉は整えている^(注8)。

素肌観、化粧観と坐月子との関連

研究経過報告書で報告したように、台湾では、産婦は産褥期に「坐月子」といわれる特別な身体ケアをおこなう。坐月子のやり方は、地域や民族によりバリエーションがあるが、一般的に中医(漢方)的な観念に基づく食生活を送り、十分な休養を取ることが重視されている。台湾は多民族社会であるが、民族を超えて一般的に見られる習慣は、母乳がよく出て、子宮に溜まった汚れを出す効果があるとされるごま油と米酒(米焼酎)、生姜だけで炊いた骨付き地鶏のスープである「麻油鶏」を頻繁に食すことが奨励されることである。ただし、伝統的な坐月子食は、栄養学的にみれば必ずしもバランスの取れたものではない。また、身体を冷やすことが徹底的に避けられている。頭痛持ちになるからと洗髪をしない、あるいは生姜の汁で洗髪をするなど、現代的な視点からみれば不合理な面もある。

しかしながら、この坐月子を1か月から1か月半程度実践することが、女性の身体から出産の際に失われた血を補い、次の出産への準備となると人々に広く信じられている。台湾の医療現場においても産褥ケアは重要視されており、西洋医学の面からの研究が進んでいる。台湾の医学界では坐月子の実効性に注目し、坐月子中心(産褥ケアセンター)や産後護理之家(産後ケアハウス)などが医院に併設されている。坐月子中心では、基本的に近代的な栄養管理に基づく3食のメニューと身体ケアが提供されている。独立した個室にシャワールームが併設され、巨大な壁掛けテレビ、無線LANなど高級ホテル並みの設備が整えられている坐月子中心もある。産婦専用のエステルームが併設されている坐月子中心もあり、利用日数に応じて特典としてエステチケットがついてくる。

また、民間業者による坐月子食の宅配サービスもある。従来、姑が嫁につくるものとされていた坐月子食であるが、口にあわないことで嫁と姑が気まづくなることを避けるために利用する家庭もある。また、姑自身が仕事を持つようになって忙しいために坐月子食を用意できず、宅配サービスを利用して嫁が自宅でゆっくり休養するようにする場合もある。このように、現在の坐月子にはさまざまな選択肢が用意されている。日本では、15年前から豪華な施設の整った産院で出産することが流行したが、まだ日本には坐月子中心に相当する施設は少ない。対して、台湾女性たちは経済成長とともに坐月子をより念入りにおこなうようになっていく。世界最速で進む台湾の少子高齢化を見込んだ

医療機関の思惑もあって、公立・私立、規模の大小を問わず、坐月子中心が林立し、坐月子をめぐる関連サービスが充実してきた。

前述の研究者Hさんによれば、坐月子と美容効果との関係については、坐月子の目的からすれば副次的なものであるとしても、大いに期待されているという。坐月子を各人の体質に合わせて必要なだけおこなうことによって、女性は体質が改善して肌がきれいになるとされている。家庭でも、姑や実母が坐月子を実行しようとしないう嫁や娘に「肌がきれいになる」と勧める傾向がある。生理が不順であったり、生理痛が激しかったりする女性は子宮が正しい位置になく、坐月子によって子宮が正常な位置におさまると考えられている。子宮が正常になると、肌質も改善するとされる。身体を十分に休め、妊娠中に溜まった体内の悪いものを排出することによって、顔色もよくなり、出産前の体型に戻りやすくなると考えられているのである。

3. 考察と総括

以上のように、30代後半以上の女性たちに対するインタビューから、化粧の方法を知らないため、塗るだけで済むスキンケアはするが、テクニックが必要となるベースメイク以上の化粧はおこなわない傾向があることが浮かび上がってきた。化粧は商売女性がおこなうものとして伝統的に避けられてきたことから、この世代の人々には「素肌至上主義」というべき傾向が認められる。また、坐月子においても、中医学的な身体観に基づき、素肌の肌質を向上させることが望まれている。こちらにしても、健康な身体、健やかな顔色こそが美しさの源という素肌至上主義に貫かれている。日本の女性なら医学美容を利用するまえに、化粧によるカバーアップを試み、施術後も化粧を手放すことはないだろう。しかし、Lさんが医療美容を経たのちにも素肌に回帰することからも、素肌至上主義の根強さが窺えるのである。紙幅の関係上、十分に対照して述べられなかったが、台湾女性の化粧に対する観念は、30代半ば以上と以下で大きく異なり、30代以下の女性たちは化粧に親しむようになっていく。

インタビュー、文献研究、各地でのフィールドワークの結果、医学美容や美容整形などは、「きれいになりたい」という理由だけでなく、運気を改善する意味でおこなわれているのではないかの感触をもった。台湾の民間信仰を研究する台湾・国立政治大学の陳文玲先生からの教授では、「開運」は商売上の言い方にすぎないが、台湾民間信仰では善きことを周りに分けるのが功德となるとの発想があるという。となれば、逆の発想もまたしかりである。日本人が想像する以上に、台湾の人々には顔と運気が連動するという発想が窺える。そのため、今後の研究課題としては、医学美容、整形・アートメイクなどと運気との関連について

て取り組みたいと考えている。

謝 辞

この研究にあたって、林修澈先生、黄李平先生と王雅萍先生、陳文玲先生をはじめとする台湾・国立政治大学民族学系の皆さん、李婉蓉さんとご家族、許裕美さんとご家族、趙山河さんとご家族、蔡瑞祥さんとご家族、林清美さんとご家族、国立台湾史前文化博物館の皆さん、南王集落のプユマ民族の皆さんにさまざまな面でお世話になりました。ここに記してお礼を申し上げます。

(注)

1. アジサイ科の植物で、主に熱帯アジア、アフリカ、オーストラリア、中国大陸南部、インド、マレーシアに分布する。台湾では海岸の防風樹として東部と恒春半島、蘭嶼などに植生する。球状の実に棘と粘性があり、鳥や他の動物が運ぶことで繁殖する。プユマ民族において、南王集落では itreng、利嘉集落では iden、下賓朗と知本集落では 'itreng と発音する (李麗雲ほか2009:108-9)。
2. 2010年11月、東京におけるK社台湾支社赴任経験者との歓談からの情報による。
3. 2011年10月、台湾・台東におけるM社台湾支社社員との歓談で確認をとった。日本ではシャンプーとリンス類はセットで売れるが、台湾女性は景品としてもリンス類は喜ばれないという。
4. 長期滞在中に、筆者は主に台東の南王集落の林清美さん宅に下宿した。この際、50歳の長男夫婦が利用する浴室を共有したが、シャンプーしか用意がなかった。片や、80歳の洪文貴さんと75歳の林清美さん夫婦は、ローカルブランドである耐斯(ナイス)社製の粉シャンプーを使用していた。台湾ではすでに粉シャンプーは「懐かしの商品」扱いだが、農村部を中心にいまだに慣れ親しんだものを使い続ける人々がいる。筆者は現地調達に徹しようと当初、台湾製のシャンプー・リンスを使用し、粉シャンプーも試してみた。しかし、数回の洗髪により髪がバサバサになったことに音をあげ、日本製のシャンプー・リンスを購入しなおして現在にいたっている。ちなみに、農村部でトイレを拝借するために一般家庭の浴室にたびたび入ったが、リンス類は見かけたことがない。
5. Euromonitorのデータをもとに財団法人生物技術開発中心が整理した統計では、アジア各国と地域でスキンケア化粧品に投じる平均費用は、日本の102ドルを筆頭に香港73ドル、台湾58ドル、韓国57ドル、シンガポール41ドル、タイ14ドル、マレーシア10ドル、フィリピン5ドル、中国4ドル、インドネシアとベトナムとインドが各1ドルである(財団法人生物技術開発中心2009:26)。なお、Taipei Cosmetic Industry Association(台湾區化

粧品工業同業公會)のデータをもとに財団法人生物技術開発中心がまとめた統計では、2009年現在の薬用化粧品の市場比率としては、美白45%、アンチエイジング31%、修復(肌の再生)10%、保湿8%、その他6%であった(財団法人生物技術開発中心2009:103)。

6. 結婚式のほか、端午節や中元節など季節の節目ごとに挽面をおこなう習慣があったという。挽面は、現在も伝統的な市場の付近で中年女性たちが営業している姿が見られる。1回につき30分から40分の時間がかかり、都市部では200台湾ドル(約750円)、農村部では1回150台湾ドル(約500円)程度で施術してもらえる。1980年代にスキンケア化粧品が盛んに輸入・販売されるようになる前まで、女性にとっては数少ない現金収入の得られる仕事であったという(羅2004:66-69)。
7. 台湾政府は、同じく2008年に「チャレンジ2008」政策により、国家の主要重点産業として化粧品産業を位置づけた。台湾の化粧品市場はまだ小規模であり、企業も中小が多数を占めるために技術開発への投資が思うままにならない面がある。しかし、今後は台湾の衛生署がおこなうGMP認証が取れるよう推進するという(財団法人生物技術開発中心2009:116-7)。
8. 台湾の整形事情を取り上げた雑誌『人籟論辨月刊』58号の特集では、自らの整形が子どもたちの運気を左右してしまうのではないかと医師に相談する母親が紹介されている。筆者の専門でいえば、眉やアイラインにほどこすアートメイクでも、「開運」を謳うタトゥースタジオがある。また、夜市などでは面相学にしたがって顔のほくろを取る施術者を見かける。台北駅の地下街では、伝統的な面相学の看板をかかげた医学美容のスタジオがあった(Fig. 7)。



Fig. 7 2011. 12. 11 台北駅地下街の美容医学コーナー 右手間に面相学の図が掲げられている

(参考文献)

- ・財団法人生物技術開発中心2009『薬妝品及医学美容産品之商機』財団法人生物技術開発中心・汐止
- ・李麗雲、林佳靜、陳文德、鄭漢文編著2009『卑南族的家與植物』国立台湾史前文化博物館・台東
- ・片岡巖1921『台湾風俗誌』台湾日日新報社・台北
- ・羅秀華2004『台湾的老行業』遠足文化事業股份有限公司・台北
- ・鈴木清一郎1934『台湾旧慣冠婚葬祭と年中行事』台湾日日新報社・台北
- ・新竹州編1923『新竹州産業年報』新竹州・新竹
- ・新竹州商工獎勵館編1939『新竹州物産案内』新竹州商工獎勵館・新竹
- ・台湾總督府殖産局1931「台湾白粉に関する調査」『商工彙報』第5号 台湾總督府殖産局

〈雑誌〉

- ・2009「特集：訂做一個我 My Face, My Self」『人籟論辨月刊』58号、利氏文化有限公司・台北

化粧がもつ自尊心昂揚効果に関する発達脳科学的研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科神経機能学分野

土居 裕和

Cosmetics are often used as a tool to enhance self-esteem of young females. The present study aimed at clarifying the neural region mediating the enhancement of self-esteem by make-up. To achieve this goal, the present study measured event-related potentials (ERPs) elicited in late-adolescent females in viewing normal self face and aesthetically enhanced and degraded self-faces. Aesthetically enhanced and degraded self-face were synthesized on the basis of pictures of the participant's own face using computer graphics techniques. Additionally, we also examined the relation between observed neural activations and the participant's implicit self-esteem. Implicit self-esteem was measured using standardized implicit-association test (IAT). One advantage of IAT over conventional questionnaire method in measuring self-esteem is that IAT is less vulnerable to intentional fraud by the participants.

The results revealed that the amplitude of ERP component called N250 increased selectively for aesthetically degraded self-face. Furthermore, increased N250 amplitude towards self face was linked to lower implicit self-esteem. Taken together, these results seem to indicate that aesthetically degraded self-face is particularly ego-threatening and embarrassing for young females. Furthermore, these observations leads to the hypothesis that one function of make-ups in females is to protect themselves against ego-threatening effects incurred by aesthetically degraded self-image.

1. 緒言

思春期以降には「自らの容貌（顔・体型etc）が同年代の異性をはじめとした他者にどのように評価されるのか」に対する関心が高まっていく。また、化粧は自らの身体的コンプレックスを克服するための手軽で有効な手段である。このため、若年女性においては、化粧をすることが自尊心昂揚の手段の一つとなっている可能性が、過去の多くの研究により、指摘されている（Kirsner & Brunton, 2001; Friederich, 2007）。

自尊心を生み出す生物学的基盤が脳にあることは言を待たない。これらを踏まえると、化粧をすることで、自己の容姿の表象を司る脳活動が変化し、それが化粧行動による自尊心昂揚をもたらす可能性が考えられる。しかし、化粧をすることで生じる脳機能活動の変化に関する研究は、未開拓の研究分野であり、この点を検討する上で参考になるデータもほとんど存在しないのが現状である。

好みの異性に拒絶された時、あるいは他人からじっと見つめられた時など、自らの容姿に対する自意識が高まる場面はいくつか想定される（Buhlmann, Teachman, Naumann, Fehlinger & Rief, 2009; Clerkin & Teachman, 2009; Schneider et al, 2011）。これらの内、最も日常的に経験するのは、鏡

で自分の姿を確認する時であろう（Babiloni et al, 2009; Epley, & Whitchurch, 2008）。そこで、本研究では、若年女性を対象に、自己顔、人工的に美しくした自己顔、人工的に醜くした自己顔を観察中の脳機能活動を計測した。これら3種類の顔画像観察中における脳機能活動と、自意識・自尊心を反映する行動尺度との関連性を検証することで、化粧行動にともなう脳機能活動及び自尊心の変化を明らかにすることが本研究の主たる目的である。

“Beauty is in the eye of beholder”との表現に端的に示されているように、一般に顔の美醜は個々人の好み・文化に依存すると考えられてきた。しかし、進化心理学者らの近年の研究により、各文化圏で美しいととらえられる女性の顔形態には、大きな目、小さな鼻、ふくよかな唇などいくつかの共通した特徴があることが明らかにされている（Cunningham, 1986）。これら美しいと感じられる形態的特徴は、いずれも女性の生殖能力・健康さの指標となる特徴である。このため、出来る限り多くの子孫を次世代に残すための適応的戦略として、これらの形態的特徴への男性の好みが形成されてきたと考えられている（Perret et al, 1998）。

Etcoffら（2011）は、口紅、マスカラなどの広く用いられるメイクアップ技術が、女性の生殖能力・健康さの指標となる顔形態を強調する働きを有していると主張している。これに基づき、本研究では、コンピュータグラフィックス技術を用いて、先行研究により明らかにされている美しい顔形態の特徴を強調あるいは抑制することで、人工的に美しく/醜くした被験者の顔画像を合成した。この手法を用いることで、実験的統制の厳密さを犠牲にすることなく、化粧の効果をシミュレートすることができると考えられる。



Study on Developmental Course of Neural Activations Mediating the Enhancement of Self-Esteem by Make-Ups.

Hirokazu Doi

Department of Neurobiology and Behavior,
Graduate School of Biomedical Sciences,
Nagasaki University

2. 実験

2.1 被験者

正常な視力を有する健常女性のペア5組(10名)が、書面による同意を行った後研究に参加した。ペアとなる被験者2名は友人同士であった。

2.2 刺激

実験実施約1週間前に顔画像撮影を実施した。撮影した顔画像から背景を除去したのち、顔の特徴点の座標を計測した。計測した特徴点座標データにアフィン変換を施すことで、先行研究により明らかにされている美しい顔形態の特徴(Cunningham, 1986; Perret et al, 1998)を強調あるいは抑制した特徴点座標を計算した。この特徴点座標に合わせて顔画像を変形することで、人工的に美しく/醜くした新規顔画像を合成した。なお、以下では加工を施さない顔画像をNormal条件、美しい顔形態を強調した顔画像をAttractive条件、美しい顔形態を抑制した顔画像をUnattractive条件と呼ぶ。

2.3 手続き

2.3.1 脳波計測

約110cm離れた19インチモニターに表示される顔画像観察中の被験者の脳機能活動を、64ch脳波計を用いて記録した。実験では、モニター画面中央に500ms注視点が表示されたのち、顔画像が1秒間表示された。被験者の課題は、提示された顔画像が、自分の顔かペアとなった友人の顔かを手元のボタンで出来るだけ素早く回答することであった。なお、いくつかの顔画像には加工が施されているが、多少実際の顔画像と違っている場合も、どちらの顔を加工して合成された画像かを回答するよう教示した。実験では、人物(Self-Friend)×加工(Normal-Attractive-Unattractive)の計6条件の顔画像がランダムな順番で、各90トライアル提示された。実験トライアルは6ブロックに分かれており、ブロック間は短い休憩があった。

2.3.2 暗黙的自尊心計測(IAT)

IAT (Implicit Association Test; Greenwald & Farnham, 2000; Pinter & Greenwald, 2005)による暗黙的自尊心の客観的評価を実施した。本実験で行なったIATは、「自分—悪い」「自分—良い」という概念間の潜在的連合強度を測定するものである。実験では、「自分」に関連する単語と、「良い」「悪い」概念に関連する単語が画面中央にランダムに呈示される。「自分」に関連する単語と「良い」概念を表す単語と同じボタンで反応する条件(「自分—良い」条件)と、「自分」に関連する単語と「悪い」概念を表す単語と同じボタンで反応する条件(「自分—悪い」条件)の2条件で反応時間を測定した。自尊心が低い、すなわち「自分

と「悪い」概念と連合が強い被験者ほど、「自分—悪い」条件における反応が、「自分—良い」条件に比べ速くなることが知られている(Greenwald & Farnham, 2000)。

2.4 分析

2.4.1 事象関連電位

事象関連電位分析にはEEGLabソフトウェアを用いた。0.1~30Hzのバンドパスフィルタでノイズを除去した後、眼球運動アーチファクトを除去した。処理後のEEGデータを基に、刺激呈示前100msをベースラインとした加算平均処理を行い、各条件における事象関連電位波形を算出した。

2.4.2 暗黙的自尊心

被験者の反応時間をRevised Scoring Algorithm(Greenwald, Nosek & Banaji, 2003; Karpinski & Steinman, 2006)にしたがって分析し、暗黙的自尊心の高さ(IAT Score)を定量化した。

3. 結果

3.1 事象関連電位

後側頭部電極で記録された事象関連電位の総加平均波形を図1に示す。先行研究に従い、T5/T6付近の3電極における平均波形から、事象関連電位成分分析を行った。刺激提示後140~220msに同部位を中心として、顔刺激特異的に陰性成分N170が誘発される。さらにN170に続いて、刺激提示後250~320前後に陰性成分N250が観察される。N170は、顔刺激の空間的特徴の処理に、N250は顔刺激の親近性(familiarity)の処理に関連していると言われている。そこで、以下では、両処理段階において、顔刺激が受ける処理の条件間差異を検証するために、N170及びN250成分の頂点振幅を分析した。統計分析では、各成分の頂点振幅を半球(Left-Right)×人物(Self-Friend)×加工(Normal-Attractive-Unattractive)の3元配置分散分析により分析した。さらに、両側t検定を用いて、半球(Left-Right)×人物(Self-Friend)の各条件における加工処理の効果のplanned-comparisonを実施した。

3.1.1 N170成分

N170成分頂点振幅においては、条件間で有意差は見いだされなかった、 $p>.10$ 。

3.1.2 N250成分

分散分析の結果、半球の主効果が有意だった、 $F(1, 9) = 15.07$ 、 $p < .01$ 。また、Friend条件に比べSelf条件で振幅が増大する傾向にあった、 $F(1, 9) = 3.67$ 、 $p < .09$ 。両側t検定を用いたplanned comparisonにより、条件間におけるN250振幅の差を検定した結果、Self-Unattractive条件で、Self-Normal条件に比べ有意にN250振幅が増大していた。その他の対比較では有意差は見いだされなかった。

3.1.3 事象関連電位成分と行動指標との関連性

事象関連電位成分と被験者の行動・心理的特性との関連

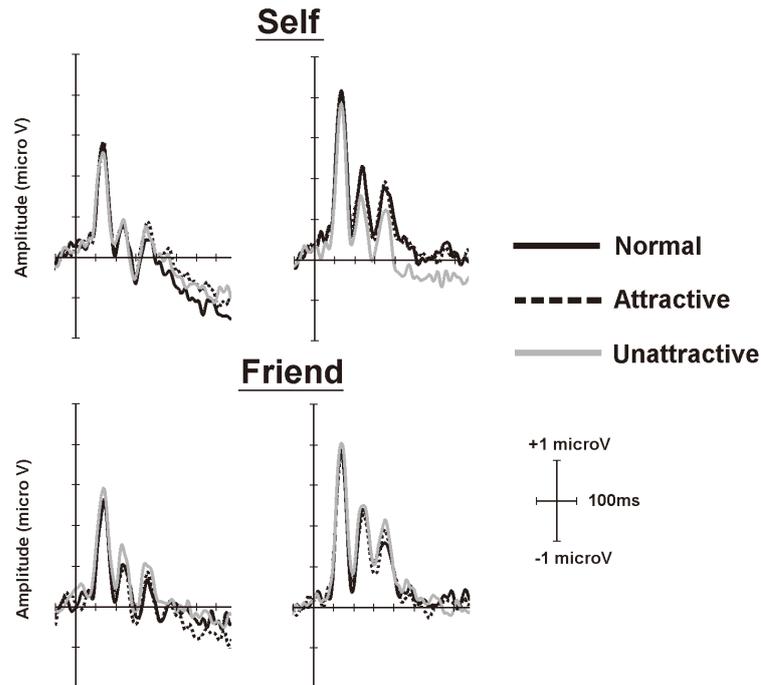


図1 各条件における事象関連電位波形

性を検証するために、IATにより定量化した暗黙的自尊心と、N170及びN250成分頂点振幅との相関を分析した。N170の頂点振幅と、行動指標との間に有意な相関は見いだされなかった。各条件におけるN250成分振幅と、IATにより測定した暗黙的自尊心との関連性を分析した結果、Self-Normal条件における左半球のN250成分振幅と暗黙的自尊心との間に有意な負の相関がみられた、 $r = -0.72$ 、 $p < .05$ 。これは、暗黙的自尊心が低いほど、N250成分振幅が増大することを示唆している。この他の条件では、有意な相関は見いだされなかった。

4. 考察

本研究では、若年女性を対象に、自己顔、人工的に美しくした自己顔、人工的に醜くした自己顔を観察中の脳機能活動を計測した。これら3種類の顔画像観察中の脳機能活動と、自意識・自尊心を反映する行動尺度との関連性を検証することで、化粧行動にともなう脳機能活動及び自尊心の変化を明らかにすることが本研究の主たる目的である。

分析の結果、刺激提示後250-350msに後側頭部電極で記録されるN250成分振幅が、Friend条件に対してSelf条件において増大する傾向が見られた。N250成分振幅との関連性を検討した先行研究では、見慣れた顔に対してN250成分振幅が増大することが報告されている (Keyes, Brady, Reilly, & Foxe, 2010; Tanaka, Curran, Porterfield, & Collins, 2006)。本研究の知見は、これら先行研究が示唆するN250成分の機能的意義と合致する。

事前検定の結果をみると、Self-Unattractive条件において、Self-Normal条件に比べN250成分振幅が有意に増大し

ていた。実験後に実施した顔画像に対して感じる親近性の主観的評定では、被験者はSelf-Unattractive条件の顔画像に比べ、Self-Normal条件の顔画像に対して、有意に高い得点を与えていた。したがって、この結果を、先行研究で示唆されているN250成分における顔画像の親近性効果から説明することは出来ない。

Self-Unattractive条件におけるN250成分振幅の特異的増大の原因を特定することは困難だが、一つの仮説としては、顔画像呈示に伴う自尊感情及び社会的感情 (social emotion) の変化がN250成分に影響を与えた可能性が考えられる。IATにより計測した暗黙的自尊心とSelf-Normal条件におけるN250成分振幅との間に有意な負の相関が見出された。有意水準には達しないものの、検討したすべてのSelf条件において、N250成分振幅と暗黙的自尊心との間に負の相関が見出された。これらの結果は、被験者の暗黙的自尊心の低下を反映して自己顔観察中のN250振幅が増大する可能性を示唆している。この知見に照らすと、Self-Unattractive条件におけるN250成分の増大は、本来の自己イメージよりも劣化した自己顔を見せられた際の自尊心低下を反映していると考えられる。また、Takahashiら (2004) は当惑 (Embarrassment) を感じる状況の認知時に上側頭回が賦活すると報告している。頭皮上での事象関連電位分布から、その発生源について議論することには慎重になる必要があるが、本研究におけるN250成分の記録部位と、上側頭回との空間的近接性を考慮すると、Self-Unattractive条件におけるN250成分の増大は、人工的に醜く加工された自己顔を観察中に被験者が経験する当惑、及び、それに伴う上側頭回活動を反映している可能性がある。

5. 総括

本研究では、若年女性を対象に、自己の顔、人工的に美しくした自己顔、人工的に醜くした自己顔を観察中の脳機能活動を計測し、化粧行動にともなう脳機能活動及び自尊心の変化を検証した。その結果、1) N250成分振幅が、人工的に醜く加工された自己顔に対し特異的に増大する、2) 自己顔観察中のN250成分振幅が暗黙的自尊心の高さを反映して変化する、との新規知見を得た。

では、これらの知見は、化粧行動の理解に関してどのような示唆を与えるであろうか？ 上述したように、被験者は醜く加工された自己顔に対しN250成分振幅の増大を示していた。さらに、N250成分振幅の増大は、暗黙的自尊心の低下及び負の社会的感情(当惑など)の経験に関与している可能性が考えられた。したがって、若年女性にとっては、自己顔が思い通りの美しさを保っていないことが、とりわけ大きな自我脅威(ego-threat)になり得ると考えられる。これに基づくと、化粧行動に駆り立てる主要な動機の一つは、このような自我脅威経験の回避にあると推測される。本研究は、後期思春期(late-adolescence)にあたる若年成人女性を対象に実施した。今後は、本研究で確立したパラダイムを利用し、自我が未成熟な発達段階にある、より年齢層の低い女性を対象に、自我の発達段階と化粧行動による脳機能・自尊心の変化との関連性を検討していく予定である。

(引用文献)

- 1) Buhlmann U, Teachman BA, Naumann E, Fehlinger T, & Rief W. (2009). The meaning of beauty: implicit and explicit self-esteem and attractiveness beliefs in body dysmorphic disorder. *Journal of Anxiety Disorders*. 23,694-702.
- 2) Clerkin EM, & Teachman BA. (2009). Automatic and strategic measures as predictors of mirror gazing among individuals with body dysmorphic disorder symptoms. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 197, 589-98.
- 3) Cunningham,MR. (1986). Measuring the physical in physical attractiveness: Quasi-experiments on the sociobiology of female facial beauty. *Journal of Personality and Social Psychology*. 50, 925-935.
- 4) Epley N, & Whitchurch E. (2008). Mirror, mirror on the wall: enhancement in self-recognition. *Personality and Social Psychology Bulletin*. 34, 1159-70.
- 5) Etcoff NL, Stock S, Haley LE, Vickery SA, & House DM. (2011). Cosmetics as a feature of the extended human phenotype: modulation of the perception of biologically important facial signals. *PLoS One*. 6, e25656.
- 6) Friederich HC, Uher R, Brooks S, Giampietro V, Brammer M, Williams SC, Herzog W, Treasure J, & Campbell IC. (2007). I'm not as slim as that girl: neural bases of body shape self-comparison to media images. *Neuroimage* 37, 674-81.
- 7) Greenwald, A.G., Farnham, S.D. (2000). Using the implicit association test to measure self-esteem and self-concept. *Journal of Personality and Social Psychology* 79 (6), pp. 1022-1038.
- 8) Greenwald, A.G., Nosek, B.A., Banaji, M.R. (2003). Understanding and Using the Implicit Association Test: I. An Improved Scoring Algorithm. *Journal of Personality and Social Psychology* 85 (2), pp. 197-216.
- 9) Karpinski A, & Steinman RB. (2006). The single category implicit association test as a measure of implicit social cognition. *Journal of Personality and Social Psychology*. 91, 16-32.
- 10) Keyes H, Brady N, Reilly RB, & Foxe JJ. (2010). My face or yours? Event-related potential correlates of self-face processing. *Brain and Cognition*. 72, 244-54.
- 11) Kirsner, A., Brunton, C. (2001). The Look Good...Feel Better program: A pathway to self-esteem for women with cancer. *Cancer Forum* 25 (3), pp. 162-165.
- 12) Perrett DI, Lee KJ, Penton-Voak I, Rowland D, Yoshikawa S, Burt DM, Henzi SP, Castles DL, Akamatsu S. (1998). Effects of sexual dimorphism on facial attractiveness. *Nature*. 394, 884-7.
- 13) Pinter B, & Greenwald AG. (2005). Clarifying the role of the "other" category in the self-esteem IAT. *Experimental Psychology*. 52, 74-9.
- 14) Schneier, F.R., Rodebaugh, T.L., Blanco, C., Lewin, H., Liebowitz, M.R. (2011). Fear and avoidance of eye contact in social anxiety disorder. *Comprehensive Psychiatry* 52 (1), pp. 81-87.
- 15) Shirao N, Okamoto Y, Mantani T, Okamoto Y, Yamawaki S. (2005). Gender differences in brain activity generated by unpleasant word stimuli concerning body image: an fMRI study. *British Journal of Psychiatry* 186, 48-53.
- 16) Takahashi H, Yahata N, Koeda M, Matsuda T, Asai K, Okubo Y. (2004). Brain activation associated with evaluative processes of guilt and embarrassment: an fMRI study. *Neuroimage*. 23, 967-74.
- 17) Tanaka JW, Curran T, Porterfield AL, & Collins D.(2006). Activation of preexisting and acquired face representations: the N250 event-related potential as an index of face familiarity. *Journal of Cognitive Neuroscience* 18, 1488-97.

化粧による顔表情の豊かさを オプティカルフローで表情運動量として定量化する

千歳科学技術大学総合光科学部バイオ・マテリアル学科

南谷 晴之

In this study, a new image processing system was developed for evaluation of cosmetic efficacy of facial makeup which is very important to make better feeling, to evoke mental relaxation, to increase positive attitude, and so on. Use of rouge, eye shadow, and face powder makes large gradation, shade increasing, remarkable concave-convex figure on face so that facial expression may be recognized to be largely moved in the visual cognitive brain system.

Facial movement was obtained by using optical flow calculation algorithm to identify the direction of facial movement of various facial expressions. The optical flow indicates apparent velocity of moving object in two image sequences. Affluent quality of facial expression after makeup was evaluated from inspection of degree of optical flow and also evaluated effect of the facial makeup in comparison with those before makeup in this study. As the results, optical flow analysis of facial expression showed that facial makeup brings pleasant outward looks widely and great facial neural- muscular activities affluently.

1. 緒言

ヒトが化粧をすることは、美しい容貌を整えること、健やかな心身状態を保つこと、感情の豊かさを得ることなど、ヒトにとって本質的かつ多面的な効果をもたらす重要な生理行動と言ってよい。それは、単に自己的な情動に満足を与えるだけでなく、他者へ快適な自己アイデンティを示す情報提示になり、人間相互のコミュニケーションにおいて表情情報は重要な意味を持つ。表情は、その人の意図のみならずその時の精神状態や身体状態までも推量可能にするノンバーバルな言語と言っても過言でなく、化粧することにより表情情報が強調されたり減弱されたりすることもある。今日まで化粧が、客観的に認知される表情変化の豊かさと他者へ与える感覚的效果を定量的に示した研究例は少ないと考えられる。

本研究では、従来から顔表情の異常診断、とくに顔面神経麻痺という病態に対して顔表情の動画画像解析を行い、表情運動量を画素単位でオプティカルフロー (Optical Flow : OF) 表示する定量的解析法^{1)~2)}を化粧前後の表情運動の解析に適用し、化粧による顔表情の豊かさをオプティカルフローで表情運動量として定量化する。この方法では複数種の顔表情運動量を詳細に分析することが可能であり、表情に特異的な顔局部の動きがベクトル量で表示でき、それぞれが特徴的なパターンを示すことが可能である。OFは動画画像の濃淡情報(空間的陰影勾配)と時間的勾配(フレ

ーム間隔)によって決定されるものであり、従って化粧による効果が、OFで検出される表情運動量の大きさに強く反映し、我々が主観的に知覚する表情の大きさや豊かさに高く相関するものと考えられる。そこで本研究では、表情運動時の正面顔画像・左右側面顔画像を連続的にデジタルビデオカメラで撮像し、連続動画画像に対して逐次フレーム間演算(時空間偏微分演算)を行うことにより、対象部位の移動ベクトル量(OF)を画素単位で算出し、表情の大きさを定量化するPCベースの解析システムを開発する。これを用いて、無化粧顔、種々の化粧顔に対して微笑、喜び(幸福)、悲しみ、嫌悪、怒り、驚き、恐怖、軽蔑など8基本表情における化粧の効果を定量的に比較検討する。また、歌舞伎の隈取りなどの強調化粧、映画・TV俳優の化粧メイクやハリウッドメイクに代表される化粧療法の効果を客観的に定量化するための可能性を検討する。

2. 実験方法

顔表情の特徴量や表情運動を定量化する方法には幾つかの提案がある。顔面に多数点のマーカーを付け、適切な照明のもとでマーカーの位置の移動を画像解析するマーカー認識法、モアレパターンを顔面に投影し、顔表情運動に伴うモアレパターンの歪みを画像処理して、表情の歪み変化を計測するモアレパターン投影法、顔表情運動をビデオカメラで撮像した後に顔の特徴点を抽出し、その特徴点の動きを追跡する画像処理法、レーザースキャナーとビデオカメラを組み合わせたレンジファインダによる3次元形状計測法の応用などがある。また、人間の表情を解析し表情イメージを作成する他の技術として、3次元モデルを2次元の描画面に投影するワイヤーフレーム手法があるが、この手法はコンピュータグラフィックスの立体図を描画することを目的としているため、本課題の提案技術のように特定の領域における筋肉運動を高速で解析することは困難である。



Evaluation of affluent quality of facial expression under makeup by means of optical flow analysis

Haruyuki Minamitani

Chitose Institute of Science and Technology,
Faculty of Photonics Science, Department
of Bio- and Material Photonics

貼り付けマーカー認識法や顔特徴点抽出による画像解析法は手技が煩雑で解析時間が長く、1表情の解析に分オーダーの時間を要する。さらに、限定された部位のみの表情運動量が測定されるだけである。モアレパターン投影法やレンジファインダ法は特殊な装置を必要とし、測定精度やコスト面で表情解析には適さないと考えられる。これに対して、本法は1表情の解析が10秒たらずの短時間で行われ、加えて、顔全体あるいは口唇部や両眼・左右眉部などの限局された範囲の表情運動量がオプティカルフローとして精度よく表示され、表情解析には客観・定量性、利便性、精度、コスト面において他をはるかに凌ぐものと考えられる。

オプティカルフロー (OF) とは動画中の運動物体の移動ベクトルを示すものであり、Fig.1に示すように時刻 t から Δt に至る動作過程において物体の輝度値パターンが輝度値を変えずに座標 (x, y) から $(x+\Delta x, y+\Delta y)$ へ移動したとすると輝度値パターンが変化していないことから次式が成り立つ。

$$I(x, y, t) = I(x+\Delta x, y+\Delta y, t+\Delta t) \quad (1)$$

式(1)の右辺を (x, y, t) 周りにテイラー展開すると次式を得る。

$$I(x, y, t) = I(x, y, t) + \frac{\partial I}{\partial x} \Delta x + \frac{\partial I}{\partial y} \Delta y + \frac{\partial I}{\partial t} \Delta t + O(\Delta x, \Delta y, \Delta t) \quad (2)$$

ただし、 $O(\Delta x, \Delta y, \Delta t)$ は、 $\Delta x, \Delta y, \Delta t$ の2次以上の項である。

$O(\Delta x, \Delta y, \Delta t)$ を考慮すると計算量が増大するため、 $O(\Delta x, \Delta y, \Delta t)$ は微小な量として近似的に無視する。両辺を Δt で割り、 $\Delta t \rightarrow 0$ として整理すると次式を得る。

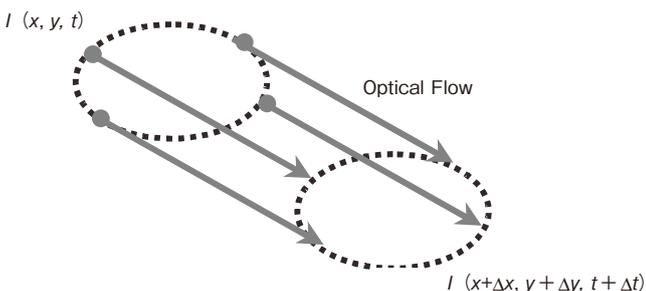


Fig. 1 運動物体の移動ベクトル (Optical Flow)



Fig. 2 被験者の表情運動をビデオカメラで撮影

$$\frac{\partial I}{\partial x} \cdot \frac{dx}{dt} + \frac{\partial I}{\partial y} \cdot \frac{dy}{dt} + \frac{\partial I}{\partial t} = 0 \quad (3)$$

ここでOptical Flowを

$$(u, v) = \left(\frac{dx}{dt}, \frac{dy}{dt} \right)$$

とし、空間的な濃度勾配と時間的な濃度勾配を

$$I_x = \frac{\partial I}{\partial x}, I_y = \frac{\partial I}{\partial y}, I_t = \frac{\partial I}{\partial t}$$

として式(3)を書きなおすと、次式ようになる。

$$I_x \cdot u + I_y \cdot v + I_t = 0 \quad (4)$$

この式はOptical Flow (u, v) と動画像の輝度値の空間と時間に関する偏微分(勾配)とを関係付けるものである。したがって、移動量が画像信号の空間的勾配とフレーム間差分から近似的に推定できることを示しているが、2つの未知の移動ベクトル (u, v) を一意に決定するためにOptical Flowのグラディエントが局所的に最小になるように以下の制約条件をつけてラグランジェの未定係数法で解くことによって各ピクセルごとの (u, v) を求める。

$$\left[\frac{du}{dx} \right]^2 + \left[\frac{du}{dy} \right]^2 \rightarrow \min. \quad \left[\frac{dv}{dx} \right]^2 + \left[\frac{dv}{dy} \right]^2 \rightarrow \min.$$

この制約条件は、“同一物体上の画素の移動ベクトルは類似している”、すなわち移動ベクトルの空間的变化は最小であることを表している。以上のOF算出アルゴリズムをプログラム化してPC上に実装した。

表情運動時の顔画像を非接触・無拘束に取得するために1台のデジタルビデオカメラ (DV) を被験者の正面に設置し、被験者の表情運動を動画として撮影した (Fig. 2)。また、表情運動の奥行き方向の移動量を求めるためにFig. 3に示すような2台の鏡を左右側面に配置し、1台のカメラで撮像した正面と左右側面の顔画像を取得可能な鏡システム・マルチビュー撮影装置を開発した。装置中央の顎乗せ台に



Fig. 3 表情運動時の正面顔画像と左右側面画像を同一画面内に融合するマルチビューシステム

被験者の顎を乗せ頭部を固定し、被験者の表情運動は左右に設置された鏡に映るので運動を3次的に解析することができる。鏡の角度及び位置は可変であり、被験者に応じて最適な状態に調整して用いる。

さらに本研究では表情運動時の正面と左右側面の顔画像を同一画面内に融合する動画取得システムを構築した^{3)~5)}。これは3台の小型ビデオカメラを対象者の前方に設置し、各カメラからの映像信号を1枚のフレーム画像に重ねて融合する画像ミキシングシステムである。カメラの1台は頭部の正面に、他の2台は左右の角度30~40°の位置に等距離で設置する。Fig.4に3台のビデオカメラで撮像し1枚に合成した正面と左右側面の顔画像を示すが、鏡を使ったマルチビュー法に対して左右の側面顔画像の鼻方向が逆向きになることが異なる。この新規開発システムで得られた顔表情運動の動画像に対しても同様なOptical Flow解析がなされる。

Fig.5は顔表情変化を動画像として取得し、Optical Flow解析するシステム構成と画像処理のフローチャートを示したものである。撮影した表情運動を画像取得ソフトにて連続する静止画としてキャプチャし、ビットマップファイルとしてコンピュータに保存した。これらの顔イメージを連続的にビデオカメラで撮像し、連続動画像に対して上記のアルゴリズムを適用し逐次フレーム間演算(時空間偏微分演算)を行うことにより、対象部位の移動ベクトル量(Optical Flow: OF)を画素単位で算出し、表情の変化

を高速に精度よく定量化した。

3. 結果

表情は安静開眼表情(無表情)を基準にして最大表情運動時までの連続画像に対して逐次フレーム間演算(時空間偏微分演算)を行い、Optical Flow (OF、移動ベクトル)を算出した。Fig.6に示すように算出したOFは方向別(第1象限~第4象限)に色分けされて表情顔画像上に描画される。キャリブレーション機能を適用すると、pixel単位の移動量をmm単位に変換することが可能である。また、特定の顔画像部分にOF計算エリアを設定すると、そのエリア内の平均OF量が時系列グラフにて表示される(Fig.6内の左)。図からわかるように豊かな笑い顔では口角と頬周辺に左右対称な大きなOptical Flowがみられ、安静無表情から最大表情運動までの移動ベクトル量の経時変化が明瞭に示されている。

表情運動は多様であるが、目的に応じて眉上げ、額の皺寄せ、閉眼、鼻根の皺寄せ、口笛運動、頬ふくらませ、への字口、イーと歯をみせる、大きな笑い顔をつくるなどの他に、幸福、悲しみ、驚き、恐怖、怒り、嫌悪、軽蔑などの感情表現を行わせ、表情運動に伴うOFを時系列的に求める。Optical Flowの方向、強さに応じて表情終了後の静止画像上に擬似カラーのオーバーレイ表示を行い、表情の豊かさの評価診断として利用する。また、鼻柱を通る正中線を対称にして表情運動の大きく表れる左右の前額領域、



Fig. 4 3台のビデオカメラで撮影し画像ミキシングシステムで1枚に合成した顔表情画像

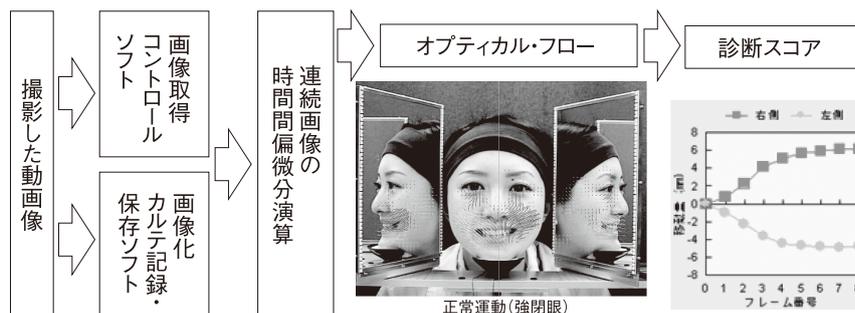


Fig. 5 Optical Flow解析システムの基本構成と画像処理のフローチャート

上眼瞼領域、口角領域、上口唇領域、下口唇領域などに矩形ウィンドウを設定し、ウィンドウ内の平均移動ベクトル量を求め、左右両側の表情運動比(左右比)を求め、表情運動の対称性を検討した。さらに、各ウィンドウ内の表情運動の上下方向と左右方向の移動量の経時変化を可視化表示し、表情変化中の局所的な動きを詳細に観測した。Fig. 7は大きな笑い顔(左)と頬笑み顔(右)におけるOFの違いである。明らかに表情運動が大きくなると移動ベクトル

(Optical Flow)は大きくなり、表情筋の動きが豊かに大きくなるのが定量的にも示される。

以上の顔面表情運動解析技術を利用して、化粧前後の表情運動の比較を行い、顔の表情変化にともなう化粧の効果を検討した。なお、以下に示す結果は正面画像のみを示し、日常生活上ノンバーバルコミュニケーションとして重要な微笑み(軽い笑い)顔について化粧前と化粧後の表情運動量(Optical Flow、OF)を比較した。Fig. 8~Fig.10はい

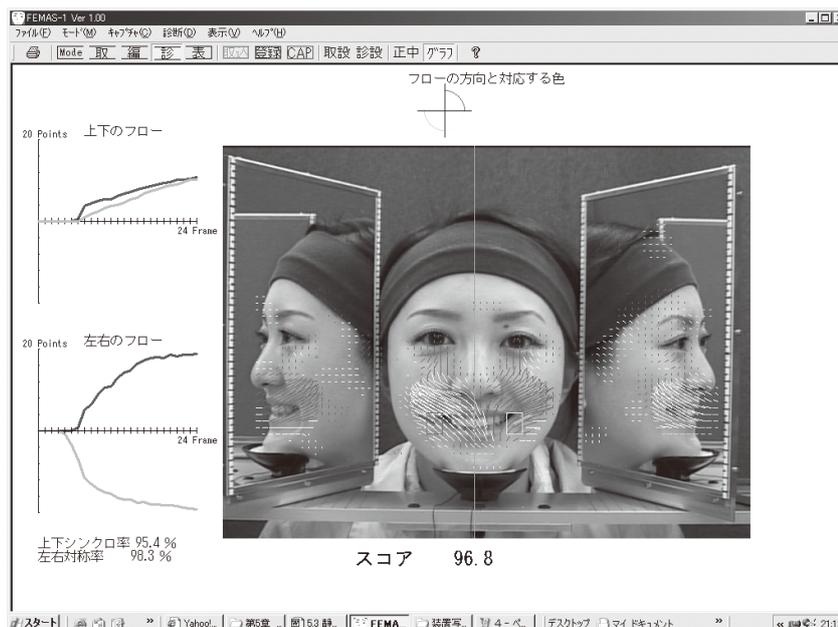


Fig. 6 非常に豊かな笑い顔(イーと歯を見せる)における口角と頬周辺の大きな Optical Flow (移動ベクトル)

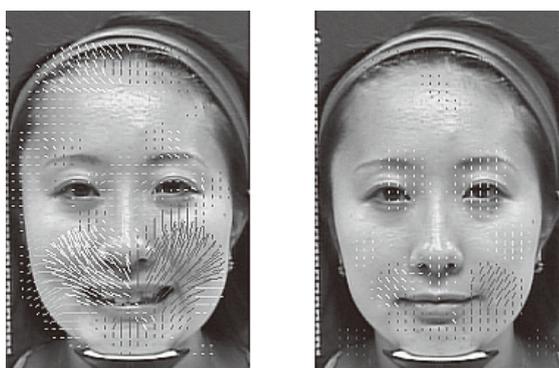


Fig. 7 笑い顔(左)と頬笑み顔(右)における Optical Flow の違い

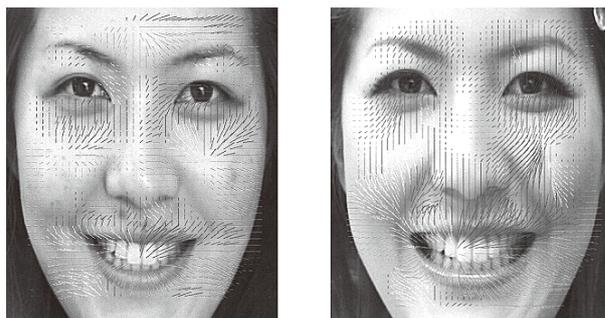


Fig. 8 被験者 A の化粧前(左)と化粧後(右)の Optical Flow 量

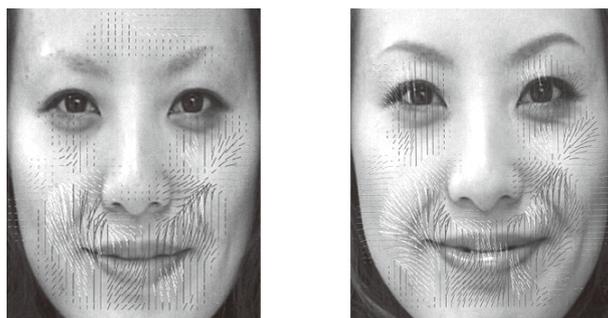


Fig. 9 被験者 B の化粧前(左)と化粧後(右)の Optical Flow 量

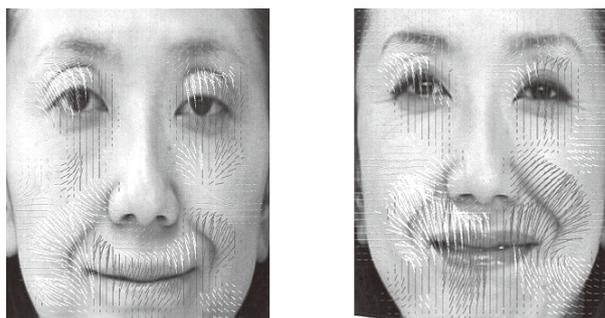


Fig. 10 被験者 C の化粧前(左)と化粧後(右)の Optical Flow 量

いずれも化粧前(左)と化粧後(右)の表情運動量のOFを表情顔画像にオーバーレイ表示したものである。いずれの例も化粧によってOFが大きくなり、また広がりを見せていることがわかる。これらは化粧により緊張緩和に伴う表情筋の働きが活性化され、活発で豊かな表情を生み出していることは言うまでもないが、口紅、頬紅、アイラインなどの使用により凹凸感、グラディエーション、陰影が増し、その結果、同じ表情運動でありながら化粧後にOF量が増加するものと考えられる。特にこれらの軽い笑い(微笑み)顔では、口角周辺、頬、目下、に大きなOFが表れている。視覚生理学的に網膜に投影された化粧顔の動画は網膜神経回路において微分(差分)値が増加し、視覚的に移動ベクトルが大きく感覚されるという視覚の機能と同様な効果が表れていると推測される。一方、化粧効果として、化粧は気分を明るくする、気分を引き締める、晴れ晴れとした気持ちにさせる、リラックスして気持ちをほっとさせる、快い緊張感をもたらして気分をしゃきっとさせる、などの情動効果があられ、自信がわくとか積極的になるなどの心理的作用が強く働くものと考えられる。その効果は表情筋の働きを一層豊かにし、表情運動を活発化させるものとも考えられ、表情の動きをより大きく見せるという相乗効果が表れるものと推測される。

4. 考察

本研究開発の原点は、種々の原因で起こる顔面神経麻痺の麻痺状態を定量的に示し、臨床診断や治療効果の判定に役立つ目的でシステム開発がなされたものである。脳腫瘍・脳卒中などの脳神経系障害に基づく中枢性顔面麻痺、中内耳炎やヘルペスなど聴覚器官内の疾病に起因する顔面神経麻痺などが対象であり、顔表情運動の左右のいずれかに動きが見られない、あるいは異常共同運動と称して正常側の動きに患側が引っ張られる動きをする、そのため、顔表情には左右対称性がくずれる大きな歪みがあられ、日常生活上の患者のQuality of Lifeは著しく低下する。このような患者に最善かつ早急な治療方策を立て、治療効果をもたらすことが必要であり、その効果を評価する方法として本システムは有効であった。治療効果が上がり、顔面麻痺が軽減されるとQOLも高まり、女性患者などでは化粧をほどこして対外的に明るく社会活動に復帰する例が多い。一方、リハビリメイクでは“顔の血色の悪さ、母斑、白斑、血管腫、アトピー性皮膚炎、熱傷後癍痕、顔面神経麻痺、交通事故による傷痕、しみ・しわ・たるみ、にきび痕、アンチエイジング、など”を対象として、化粧で外観を整え、心を元気に豊かにする治療を施すが、これらを対象にした表情運動のOptical Flow解析は有効であると考えられる。

開発したシステムは高精細な小型ビデオカメラ、画像取

込ボード、Optical Flow解析ソフトを実装したノート型パソコンで構成されており、微細な表情運動を定量的に表示し、表情筋の活動を評価することができる。本課題で経験した問題点を上げると、化粧前後で全く同じ表情運動を行うのは極めて難しく、ときに無意識に目つぶ(閉眼)をしたり、逆に閉眼から開眼の動きが表れたり、頭部・顔面の上下左右の動きを起こしたりする。これらの動きはOF量として算出されてしまうことになり、その状態では必ずしも正確な表情運動量が得られない。Fig. 10左図の化粧前の顔領域のOFは閉眼状態からの画像取得であったため上向きの動き量が大きく表れている。化粧効果を表情変化から正確に評価するには、このような不要な動きを取り入れないように注意しなければならない。また、表情を豊かに見せる化粧はいかにすべきかを評価する方法として局所的なOF観測を行い、局所を強調する化粧法を考えることに活用することが課題として上げられる。さらに、表情解析技術を利用して、化粧顔の表情から対象者の「心的豊かさや満足度」、「活き活き度」などの心理的状态を相関分析することも必要と考える。ヒトの表情運動は喜怒哀楽などの情動や心理状態によって大きく変わる。ヒトにとって化粧をする意義は、美しい容貌をつくり、健やかな心身状態を保ち、感情の豊かさを得ること、さらには人間相互のノンバーバルなコミュニケーション手段としての表情形成に大きな役割を果たすことである。化粧はヒトにとって本質的かつ多面的な効果をもたらす重要な生理行動と言ってもよく、それは、単に自己的な満足を与えるだけでなく、他者への自己アイデンティを示す重要な情報提示になり、化粧をほどこした表情運動が、その人の意図のみならずその時の精神状態や身体状態までも表し、化粧によって表情情報が強調されたり減弱されたりすることもある。本研究の目的である「化粧による顔表情の豊かさをオプティカルフローで表情運動量として定量化する」ことは、化粧が、客観的に認知される表情変化の豊かさと他者へ与える感覚的效果を定量的に示す点で画期的であり、眉毛、睫毛、頬、口唇などの化粧の仕方、陰影・濃淡の作成、化粧色の選択、さらには従来から化粧をつくる専門家が培ってきた化粧法に基づく化粧の効果、などを主観的な側面から客観的・定量的な側面に変えて検討することが極めて重要であると考えられる。

5. 総括

本研究では、顔表情運動の動画解析を行い、表情運動量を画素単位でオプティカルフロー(Optical Flow: OF)表示する定量的解析法を開発し、化粧前後の表情運動の解析に適用した結果、化粧によりOFが大きく、また広がりをもって表示されることが示された。口紅、頬紅、アイラインなどの使用により凹凸感、グラディエーション、陰影

が増し、その結果、化粧前と同じ表情運動でありながら化粧後のOF量は増加するものと考えられる。また、化粧は気分を明るくする、晴れ晴れとした気持ちにさせる、リラックスして気持ちをほっとさせる、快い緊張感をもたらして気分をしゃきっとさせる、などの情動効果をもたらし、自信がわくとか積極的になるなどの心理的作用がある。その効果は表情筋の動きを一層豊かにし、表情運動を活発化させるとも考えられ、表情の動きをより大きく見せるという相乗効果を示した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援頂きました財団法人コスメトロジー研究振興財団に心より感謝申し上げます。また、本研究の実施にあたりご協力頂いた左希子化粧株式会社に対し厚く御礼申し上げます。

(参考文献)

- 1) 南谷晴之, 星野佳彦, 国広幸伸: オプティカルフローを用いた顔面神経麻痺の定量的評価法, 計測自動制御学会生体生理工学シンポジウム論文集, 1, 87-90, 2000
- 2) 南谷晴之, 飯島淳彦, 国広幸伸: 顔表情運動の画像解析による顔面神経麻痺の診断システム, 日本エム・イー学会論文誌「生体医工学」, 41, 2, 87-96, 2003
- 3) 南谷晴之, 田中一郎: 顔表情マルチビュー解析による顔面神経麻痺の診断 Facial Nerve Research, 26, 61-63, 2006
- 4) 南谷晴之, 田中一郎, 中島龍夫: 鏡一体型の頭部固定装置を用いたOptical Flow による顔表情の三次元的定量的評価法, Facial Nerve Research, 27, 167-169, 2007
- 5) 田中一郎, 佐久間恒, 中島龍夫, 南谷晴之: 陳旧性顔面神経麻痺に対する各種治療法・術式の検討とビデオ画像からのコンピュータ解析による表情運動の定量的評価法, 頭頸部癌, 34, 3, 280-286, 2008.

香りによる快・不快の感情が新生神経細胞の発達に与える影響の研究

奈良県立医科大学先端医学研究機構 脳神経システム医科学

吉原 誠一

Sensory input has been shown to regulate development in a variety of species and in various structures, including the retina, cortex and olfactory bulb (OB). Within the mammalian OB specifically, the development of dendrites in mitral/tufted cells is well known to be odor-evoked activity-dependent. However, little is known about the developmental role of sensory input in the other major OB population of the GABAergic interneurons, such as granule cells and periglomerular cells. Here, we identified, with DNA microarray and in situ hybridization screenings, a trophoblast glycoprotein gene, 5T4, whose expression in a specific subtype of OB interneurons is dependent on sensory input. 5T4 is a type I membrane protein, whose extracellular domain contains seven leucine-rich repeats (LRR) flanked by characteristic LRR-N- and C-flanking regions, and a cytoplasmic domain. 5T4 overexpression in the newborn OB interneurons facilitated their dendritic arborization even under the sensory input-deprived condition. By contrast, both 5T4 knockdown with RNAi and 5T4 knockout with mice resulted in a significant reduction in the dendritic arborization of 5T4⁺ granule cells. Further, we identified the amino-acid sequence in the 5T4 cytoplasmic domain that is necessary and sufficient for the sensory input-dependent dendritic shaping of specific neuronal subtypes in the OB. Thus, these results demonstrate that 5T4 glycoprotein contributes in the regulation of activity-dependent dendritic development of interneurons and the formation of functional neural circuitry in the OB.

1. 緒言

我々の脳の中では、神経細胞同士が複雑に繋がり合っており働いている。匂い情報を処理する嗅球の介在ニューロンは、匂い刺激を受けてよく活性化される神経細胞ほど樹状突起の枝分かれを発達させ、さらに多くの神経細胞と接続して、情報伝達効率を上げている¹⁾。今回、我々の研究グループは、膜タンパク質である5T4の機能を失ったマウスの嗅球介在ニューロンでは、匂い刺激の強弱に関係なく、樹状突起の枝分かれが著しく減少することを見出した。嗅球介在ニューロンは、マウスのみならずヒトにおいても例外的に大人になっても産生され、新しい神経回路を作り続ける神経細胞である²⁾。今回の研究成果は、脳卒中などによって神経細胞が死滅した際に、神経細胞の前駆細胞を損傷部位に移植することで、神経障害を回復させるという再生医療への応用にもつながると期待される。

ほとんどの神経細胞（ニューロン）は大人になってからは新しく生まれることはないが、匂い情報を処理する嗅球の介在ニューロンは大人になっても生まれて新しい回路を作り続けていることが近年の研究から明らかになってきている（図1、2）。この大人になってから新しく作られる神経回路は外界の刺激に応じて環境に適応した回路へと再編

されることが知られているが、その分子メカニズムは分かっていなかった。今回我々は外界の匂い刺激に応じて発現量が変化する遺伝子に着目して、新しい神経回路の再編される仕組みについて詳しく調べた。

2. 実験方法

2.1 レンチウイルスを用いた嗅球介在ニューロンへの遺伝子導入

新生仔のマウスの脳室にGFP遺伝子を搭載したレンチウイルスを感染させると、新生の嗅球介在ニューロンに効率よく遺伝子導入ができた（図3A、B）。今回の実験はこの系を用いた。

2.2 匂い刺激遮断実験

新生仔のマウスの片鼻をはんだごてを用いて閉塞した。これにより閉塞された側では匂い刺激による神経活動が遮断された（図3C）。

2.3 DNAマイクロアレイ実験

鼻を閉塞した側と開いている側の嗅球において発現の変動している遺伝子についてDNAマイクロアレイを用いて探索した。

2.4 5T4ノックアウトマウス

匂い刺激によって発現が誘導される膜タンパク質である5T4の嗅球介在ニューロンの発達における機能を解析するために英国・マンチェスター大で作成された5T4ノックアウトマウスの嗅球介在ニューロンの形態を解析した。



The development of newborn olfactory bulb interneuron regulated by the various odors.

Sei-ichi Yoshihara

Laboratory for Molecular Biology of Neural System, Advanced Medical Research Center, Nara Medical University

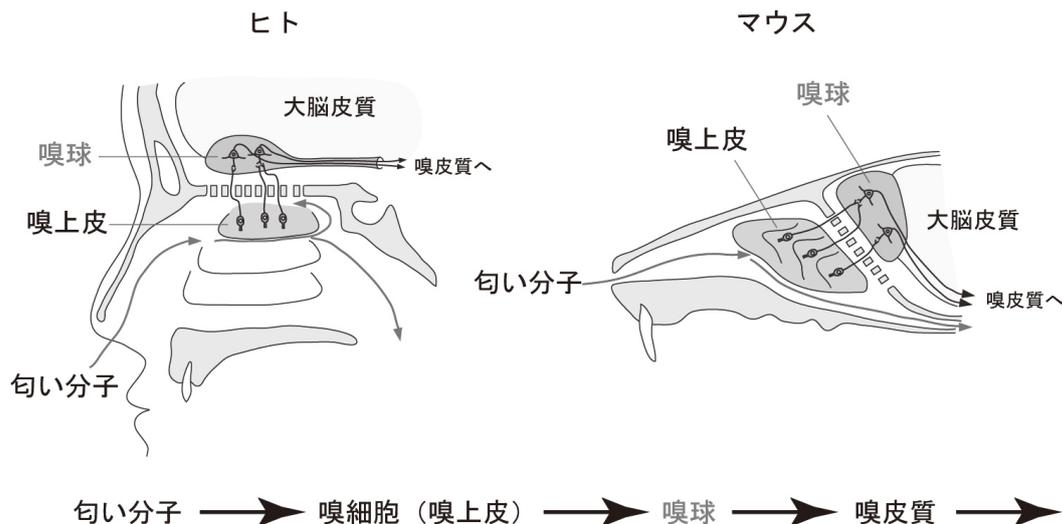


図1 匂い分子は嗅上皮に存在する嗅細胞で感知される。匂いの情報は嗅細胞から嗅球へと伝わり、嗅球で情報処理を行ってから、さらに嗅皮質という脳の奥の領域へと伝えられる。

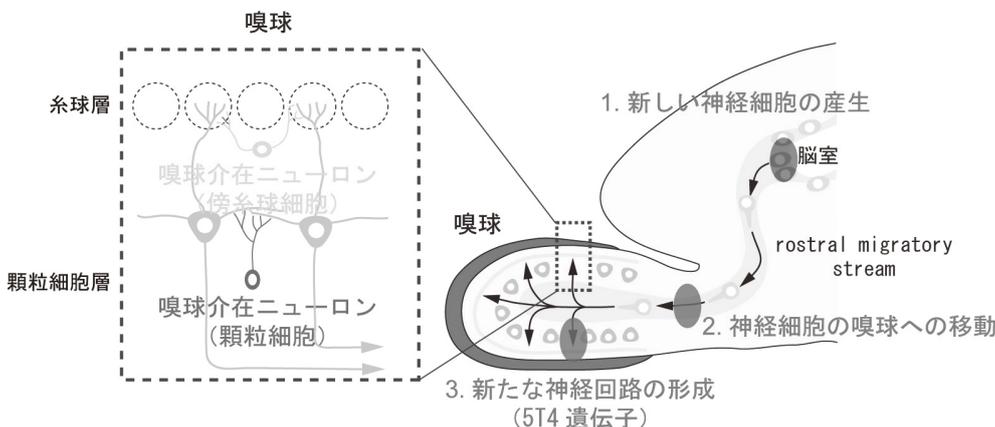


図2 嗅球介在ニューロン (傍糸球細胞・顆粒細胞) は大人になっても脳室周辺で新たに産生されて、rostral migratory stream と呼ばれる経路を移動して嗅球へと移動し、新しい嗅球神経回路を形成し続けている。

3. 結果

3.1 匂い刺激は嗅球介在ニューロンの正常な発達に必要である

鼻を閉塞した新生仔マウスの脳室にGFP遺伝子を搭載したレンチウイルスを感染させた後、3週間成育させた。嗅球介在ニューロンの形態を観察したところ、閉じた側のニューロンの樹状突起は開いている側に比べて長さが短く、樹状突起の枝分かれの数も減少していた(図3C、D)。また、スパインと呼ばれる他の神経細胞とシナプスを作って接続するどげ状の構造の数が閉じた側では開いている側に比べて減少していた。このことから嗅球介在ニューロンの正常な発達には匂い刺激による神経活動が必要であることが明らかになった。

3.2 膜タンパク質 5T4 分子の発現は匂い刺激による神経活動によって誘導される

上で述べた匂い刺激によって神経細胞の発達を制御する分子メカニズムを明らかにするために、鼻の開いた側と閉じた側の嗅球において発現の変動している遺伝子の探索をDNAマイクロアレイによって行った。その結果、c-FosやArc等のこれまでに脳などで報告されている神経活動によって発現が誘導されている遺伝子が嗅球においても変動しているという結果が得られた。さらに、ロイシンリッチリピートを持つ膜タンパク質である5T4の発現が匂い刺激による神経活動によって誘導されることがin situ hybridization及び5T4の免疫組織染色によって明らかになった(図4)³⁾。5T4分子は嗅球介在ニューロンにおいて樹状突起に教区剤していることから、匂い刺激による樹状突起の発達の制御に5T4分子が関与していることが示唆された。

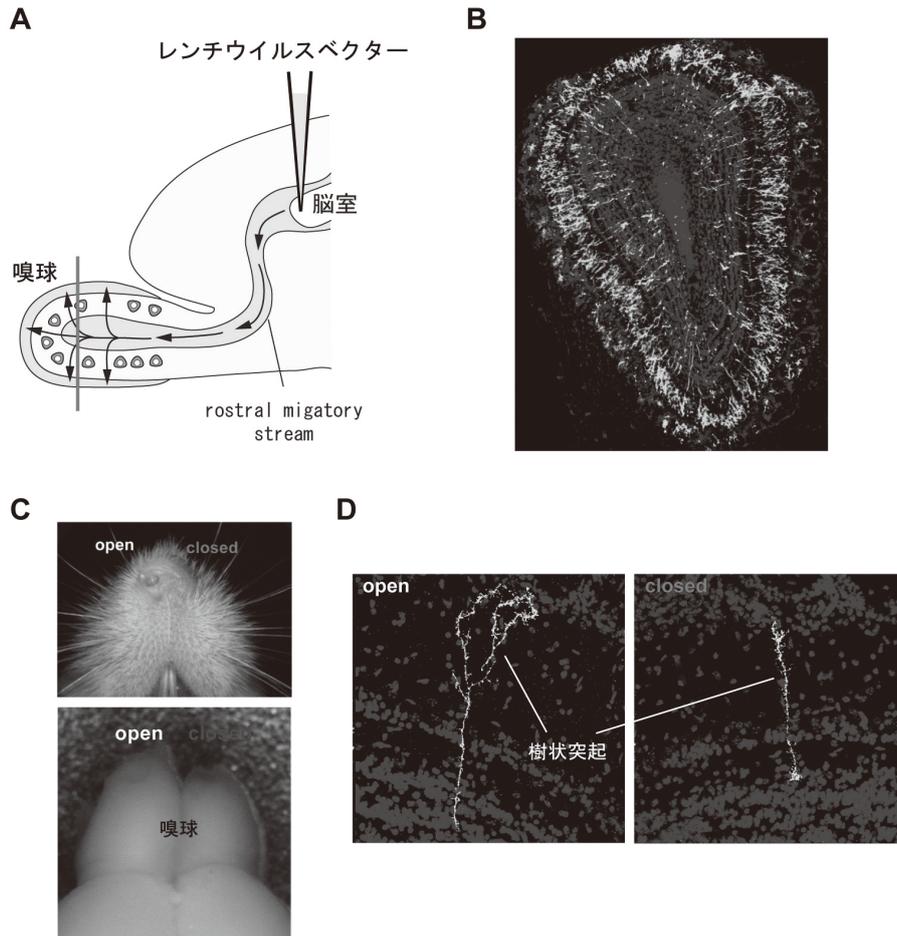


図 3

- (A) GFP 遺伝子をもったレンチウイルスベクターを脳室周辺に注入することで新たに生まれた嗅球介在ニューロンが可視化できる。
- (B) GFP 遺伝子レンチウイルスベクターによって可視化された嗅球介在ニューロン。樹状突起と呼ばれる突起構造 (写真では白色に見えています) が伸びている様子が観察できる。
- (C) 片鼻を閉じて匂い刺激による神経活動を低下させると嗅球が小さくなる。このことから匂い刺激による神経活動が嗅球の正常な発達に必要であることがわかる。
- (D) 片鼻を閉じた場合に新しく生まれた嗅球介在ニューロンを観察すると鼻を閉じた側の神経細胞の樹状突起は通常に比べて短くなり、枝分かれの数が減っていた。

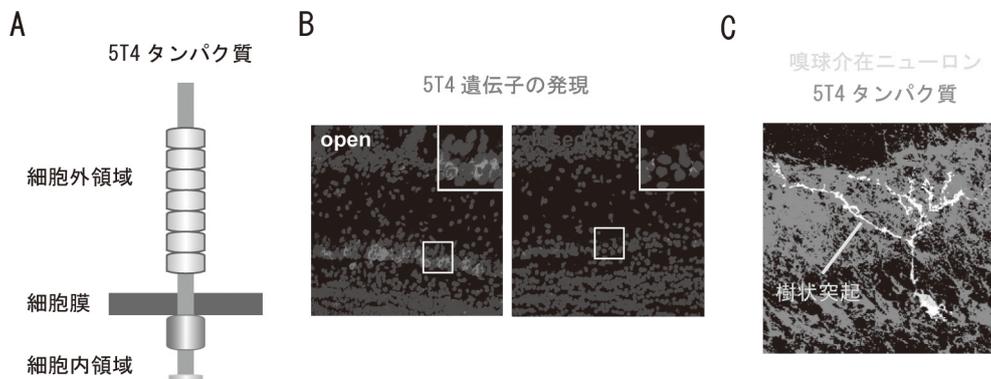


図 4

- (A) 5T4 タンパク質の模式図。5T4 は細胞膜を貫通して膜表面に存在するタンパク質の一種である。
- (B) 5T4 遺伝子の嗅球における発現 (写真中のシグナルが 5T4 遺伝子の発現を示します)。鼻を閉じた側では 5T4 遺伝子の発現量が減少していた。
- (C) 5T4 タンパク質は嗅球介在ニューロンにおける分布 (嗅球介在ニューロンを白色、5T4 タンパク質を灰色で示す)。5T4 タンパク質は嗅球介在ニューロンの樹状突起に主に分布している。

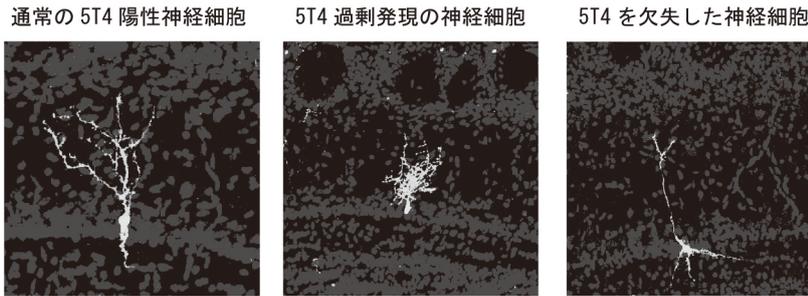


図5 5T4 を過剰に発現した神経細胞と5T4 を欠失した神経細胞の樹状突起を解析した。5T4 を過剰に発現したものでは樹状突起の枝分かれが増大し、5T4 の欠失したものでは樹状突起の枝分かれが減少していることがわかった。5T4 タンパク質の発現量に応じて嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれが制御されていることが明らかになった。

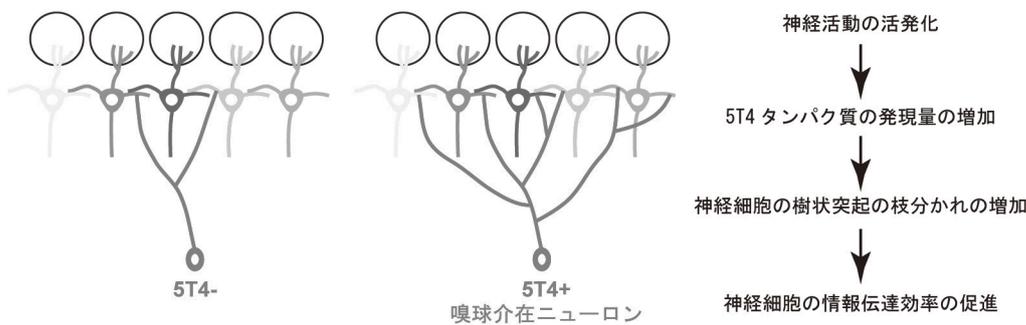


図6 今回の研究成果のまとめ
神経活動の活発な神経細胞ほど5T4 タンパク質の発現量が増加して、複雑に枝分かれした樹状突起をもつことが明らかになった。複雑に枝分かれした樹状突起によって、より多くの他の神経細胞と接続できることになり情報伝達効率が促進されると考えられる。

3.3 膜タンパク質 5T4 分子はその発現量に応じて嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれを促進する

5T4分子の嗅球介在ニューロンにおける機能を明らかにするために、レンチウイルスを用いて嗅球介在ニューロンに5T4分子を過剰に発現させる実験を行った。その結果、5T4分子を過剰に発現したニューロンでは樹状突起の枝分かれが促進されていた。5T4ノックアウトマウスの嗅球介在ニューロンを解析すると、5T4分子が存在しない場合には通常と比べて樹状突起の枝分かれが減少していた(図5)。このことから、5T4分子は匂い刺激に応じて嗅球介在ニューロンの樹状突起の枝分かれを制御する分子であることが明らかになった⁴⁾。

4. 考察

今回の研究によって5T4タンパク質の発現量に応じて神経細胞の樹状突起の枝分かれが制御される仕組みになっていることが明らかになった。樹状突起の枝分かれが複雑になると、より多くの他の神経細胞と接続できることになる。神経活動の活発化したよく働く神経細胞は5T4タンパ

ク質の発現量の上昇により、より多くの他の神経細胞と接続して情報伝達効率を上げていると考えられる(図6)。嗅球介在ニューロンは大人になっても新しく生まれるだけでなく、損傷した脳の部位へと移動して神経回路を修復する性質も持っていることが明らかになっている⁵⁾。新しく生まれた神経細胞が適切な神経回路を作る仕組みの解明が今後さらに進むことで、脳卒中などによって神経細胞が死滅した際にiPS細胞を使って作成した神経細胞を移植して神経回路の再生を行う再生医療の治療法の開発へとつながることが期待される。

今回の研究によって匂い刺激による神経活動が嗅球介在ニューロンの正常な発達に必要であることが明らかになった。しかし、匂い刺激の質(快か不快であるか)についてのニューロンの発達への影響については明らかになっていない。今後、マウスにとって快もしくは不快と感じる匂いのもとで生育させた時に、ニューロンの発達を解析する実験を行う予定である。この実験により、快か不快の感情が脳の発達に与える影響が明らかになることが期待される。

(参考文献)

- 1) Saghatelian A, Roux P, Migliore M et al, Activity-dependent adjustments of the inhibitory network in the olfactory bulb following early postnatal deprivation. *Neuron* 46:103-116, 2005.
- 2) Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T et al, Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11:1153-1161, 2008.
- 3) Imamura F, Nagao H, Naritsuka H et al, A leucine-rich repeat membrane protein, 5T4, is expressed by a subtype of granule cells with dendritic arbors in specific strata of the mouse olfactory bulb. *J Comp Neurol* 495:754-768, 2006.
- 4) Yoshihara SI, Takahashi H, Nishimura N et al, 5T4 Glycoprotein Regulates the Sensory Input-Dependent Development of a Specific Subtype of Newborn Interneurons in the Mouse Olfactory Bulb. *J Neurosci* 32:2217-2226, 2012.
- 5) Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P et al, Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26:6627-36, 2006.

記念講演

●
第22回表彰・贈呈式記念講演 元村 有希子
●

科学研究と社会

毎日新聞社科学環境部副部長

元村 有希子



もとむら・ゆきこ

九州大学教育学部卒業、毎日新聞社入社。下関支局、福岡総局などを経て東京本社科学環境部在籍、同部副部長。その間、英国留学。
・主な取材対象：地震、火山、生命科学、科学技術政策、ノーベル賞、宇宙開発など。
・主な著書：『理系白書』（講談社文庫・2006年第1回日本科学ジャーナリスト大賞受賞）、『理系思考』（毎日新聞社）、『宇宙へ出張。してきます ～古川聡のISS勤務167日』（共著、毎日新聞社）

きょうは、皆さんがあまり日ごろ考えたことがないことを、新聞記者の立場からお話したいと思います。毎日新聞科学環境部という部署は、科学環境問題、先端技術のニュースなどを幅広く取材しています。管理職も入れて22人、うち女性が6人です。私が2001年にこの部署に来たときには12人か13人ぐらいの小さい部署で、しかも8割以上が理系の大学や大学院を卒業した人たちでした。それが10年たってみると、まず陣容が10人ぐらい増えた。さらに文系のほうが増えてきました。理系と文系ってどうやって区別しているかという、大学で何学部にかかるとい、それぐらいの単純な分け方なんですけれども、昔は、新聞社では、理系の記者が少ないということもありまして、工学部、理学部を出て新聞社に入ってきたら将来は科学部というふうに決まっていたみたいなんです。ただ、その人たちが書くニュースは結構難しくなるんです。自分がわかっているので、書く記事も難しくなるんですね。それでは通用しなくなってきたということもありますし、それから、科学のニュースがほんとうに増えてきましたので、私のような文系人間も働くようになってきました。

特に2011年3月11日以降、科学環境部は政治部よりも、経済部よりも、社会部よりも、外信部よりも働く部署ということになりまして、会社の中では唯一、部員が増えている部署であります。

発足は1957年、もう半世紀を過ぎたんですけれども、毎日新聞社の歴史が140年ですから、まだまだ若い部署です。ちなみに1957年というのはロシアが世界初の人工衛星を打ち上げた「スプートニクショック」の年でして、日本でも世界でも、科学技術が社会を大きく変え始めた時代でした。そのころから新聞にも科学ニュースが増えてきたので、それにうまく対処できるような記者を育てるという意味で科学部ができました。

先ほど「理系白書」というプロジェクトをご紹介いただきましたけれども、私自身は、高校3年生までは理系クラスにおりまして、ただ、どうしても物理とか数学とか、あいつたものになじまず、横書きよりも縦書きの勉強がし

たいなと思って、文系に転向しました。ですから、一応私は文系の記者ということになるんですけれども、2001年に35歳で科学環境部に来てから、研究の世界、あるいは理系の世界を見ますと大変に興味深いものがありました。自分の中での理系のイメージというのががらっと変わるような、大変おもしろい経験をしました。

記者になってからそれまでの12、3年間、ほとんど研究者以外の人とつき合ってきたんですね。そういう人たちは、記者を見ると怖がって逃げるか、あるいは騙そうとする、嘘をつくという、まあ、みんながそうじゃないんですけれども、騙し騙されという仕事をずっとしてきた中で、科学部に来て研究者を取材すると、歓迎して離してくれない。ご自分の研究を語り続けるんですよ。しかも目がきらきら輝いている。嘘をつかない。すごい、こういう人たちがまだ地球にいたんだということを何かしみじみと思ひまして、私が35年間会ったことがない人たちというのは一体どんな人生を送っているんだろうということから、この「理系白書」というプロジェクトを始めました。

世間で言われている理系のイメージ、私も35歳まで持っていたイメージを紹介したいんですが、典型的なのが映画「バック・トゥ・ザ・フューチャー」でタイムマシンをつくる研究者ですね。メガネをかけて、目がちょっとマッドな感じで、白衣を着て危ないものを作るという、そういう研究者像。それから「ナッティ・プロフェッサー」、この主人公は遺伝子組み換え技術でやせ薬を作るんですね、女の子にもてたいために。それが思わぬ所で効き目が切れて、デートの途中に元に戻ったりする。それから「ブルー・オブ・マイ・ライフ」、この老人は天才数学者なんですけれども、最後は、不幸にも自分の知性ゆえに狂気に陥ってしまうという役どころでして、一言で言えば、理系というのはなぜか男性で、とんでもない発明をして、世間知らずな変人で、天才なのに不幸。こういうイメージでよく描かれる。

世の中の人にはあまり研究者に直接会ったことがないので、みんなこんな風だと思っているフシがあります。日本はどうか。典型は「鉄腕アトム」のお茶の水博士。例えば夏目

漱石の『三四郎』という小説の中に、主人公の三四郎が今の東京理科大で研究をしている野々宮という研究者を訪ねるシーンがあります。「こんなふうに穴倉の中で光の光線の圧力の試験をしているこの人は、現実世界と交渉のないのは明らかである。野々宮君は生涯現実世界と接触する気がないのかもしれない」と主人公に言わせています。「博士の愛した数式」も、主人公は数学者ですけれども、交通事故で記憶が80分間しかもたないという、切ない登場の仕方をする。

やっぱり日本でも「研究者ってこんな人たちなんだ、どこかにいて何かやっているらしい」というぐらいのイメージで人々はとらえるわけです。それではあんまりだと、私は「理系白書」で、理系の人が現実の世界の中で、どんな独創的なことを考えて、どんなふうにも成果を出すのか、あるいは社会に還元しているかというようなことをしつこく書いてきました。

連載を始めたころから日本でノーベル賞が立て続けに出るということが起きてきました。私は2001年に科学環境部に来たんですけど、その年に1人、翌年にはお二人が受賞され、2008年には4人の方が選ばれましたよね。2010年も2人の化学者が受賞しました。こんな形で、研究者が社会にだんだん露出するようになってきて、この10年間、印象は少しずつ変わってきているかなと思っています。

ところで、2002年にノーベル化学賞を受けた田中耕一さん、技術者に近いのかもしれませんが、基礎的な研究開発でノーベル賞を受けています。まぜる試薬を間違えたけれども捨てるのはもったいないと質量分析器にかけてみたら大発見をしたというお話とか、自分は5人のチームの一員としてこの仕事をしたまでなので、ノーベル賞をもらうのはうれしいけれどもチーム全体でもらうんだという、「プロジェクトX」にそのままなりそうなドラマがある。一方で、実験をずっとしてきたいから昇進試験を受けないというライフスタイル。それから、公式の場所に出るときはスーツじゃなくて作業服を着る。こういった、何というか、まじめで控えめで一生懸命で、そういう人がノーベル賞をもらうということが、日本の、特に技術者の人たちに大変な励ましを与えました。田中さんは「モテナイ君」と自分のことを言っていたんですけど、じっさい結婚までに20回ぐらいお見合いをしたとか、自分は変人のエンジニアだから「ヘンジニア」だとか、いろんな名言を残したりして親しまれました。こういう方もひとつの研究者像をつくったんだと思います。

「研究者イコールいい人、まじめ」というイメージの一方で、アンチヒーローもいるんですね。世間を挑発するような出来事を2002年に起こして話題を呼びました。「日本はだめだ。官僚が一番偉くて、東大を出た奴が一番偉いような、こんな日本では独創的な人間が活躍できない」と批判

した研究者。ご存じですよ、中村修二さんです。この方は、企業に所属する研究者であり、技術者でもある。青色発光ダイオード(青色LED)という画期的なデバイスを、議論があるところですけどもほぼ一人で開発しました。しかも大手企業でなく地方の、当時は中小企業。そこで自分で手作りした実験装置を使い、手作りで調製した材料を何回も反応させ、時には爆発事故も起こしながら、絶対に不可能と言われていた材料で青色LEDを製品化に持っていったということです。

田中さんも、中村さんも、親しくおつき合いをさせていただいていて思うことがあります。世間ではこの2人が対照的だと言われることが多いんですね。中村さんは会社にかみついて、正当な報酬を求めてアメリカに飛び出した。田中さんはチームワークを尊重し、会社に所属し続ける謙虚な人。でもむしろ私は共通点が多いと思っています。一つは現場主義。実験とか自分で手を動かして何かを生み出すことへのこだわりです。それから「他人がやっていることをやってもしょうがない。誰もやっていないことだからおもしろいんだ」という、あまのじゃく的なところ。このあたり、そっくりですね。生き方が違うというぐらいなもので、企業で生きる研究者、あるいは企業で業績を上げる研究者の鑑のような印象を持っています。

LEDは今やなくてはならないものになってしまいました。中村さん自身、地球の津々浦々までLEDを普及させたいと思っておられます。砂漠地帯とか送電線が来ていないような地域、明かりがない村とか集落に太陽電池パネルを設置して、そこで発電した小さな電力でLEDを照明として使う、あるいは井戸のポンプを設置するというような財団にかかわっておられます。まさに「エジソン以来の光革命」と言われるのもそうかなと思うんですけど、日本においては原発事故をきっかけに、皮肉にもあらためて注目を浴びています。

少しシリアスな話をします。これまで私は、研究者を取材しながら、研究っていいなあ、おもしろいなあ、科学ってすごいなあということを社会に紹介してきたわけですけども、科学記者になって10年でこうした大震災に直面して、自分の仕事を振り返らざるを得なくなりました。科学は無条件に善なのか、科学者は無条件にいい人なのか、考えざるを得なくなったんですね。もちろん原子力というのは、価値中立です。私たちがいいと思おうが、悪いと思おうが、核分裂は起きるわけです。原子爆弾にもエネルギーにもなります。科学そのものは価値中立なんですけれども、それを使う人によっては、社会との間であつれきが生じてしまう、あるいは社会に悪い影響を与えてしまうという、そういった、科学が持つ宿命的な影響力ということを経験して、考えながら仕事をしています。

こんなカタストロフィックな事故は福島県民200万人だ

けでなくて日本人全員を少し変えたと思います。私、それから科学にかかわる人たちが、ちょっと立ち止まって、科学の役割って何だろうと、考え直してみる作業が必要なんじゃないか、などと思っています。

福島第一原発の事故を経験して、福島県の方々がさまざまやり場のない怒りをたくさん感じておられます。まず、安全だと言われたから原発を受け入れたのに事故を起こした東京電力への怒りという不信。事故が起きて初めて「この電気は東京の人のためだったんだ」と知った人もいます。つまり、便利な生活のツケを地方が背負うという構造的な問題への不信。それから、多くの方々政府や自治体の指示で避難しました。自主的に避難を選んだ人もいます。一時的な避難と思いたいけれども、その間にもどんどん放射性物質が土壌を、森を汚染していくわけです。いつ帰れるのか、帰れるかどうかもわからないという状況。さらにもう一つ、専門家の人々が、人によって言うことが違う。誰を、何を信じていいのかわからないという戸惑い。専門家不信でもあり科学不信につながってしまいます。

そもそも専門家の人たちというのは社会とのコミュニケーションがあまり上手ではない。例えば、「放射能汚染された食べ物を食べても大丈夫ですか？」と一般の人は知りたがる。専門家の答えは、実際にあったことですが「直ちに健康に影響はありません」。こう言われたら「じゃ、長期間ではどうなるの？」って当然思いますよね。だけど専門家は答えを持っていないわけです。「よく分かりません。データが不十分ですのでお答えできません」。これじゃ、一般人からすれば何の答えにもならない。もちろん専門家にも言い分はあります。今あるデータを総合して専門的に考える範囲では危なくないけれども、その先は科学的には分からない、と正直に言っているだけなんですけれども、そこが社会から見ると「専門家は信用できない、何もしてくれない」と映る。深刻な問題です。

市民としては、今ここで私の不安に伝えてほしい、あるいは答えがほしい。白か黒か教えてほしいんです。そして専門家なら答えを持っていると思っているわけです。でも、専門家にも答えがわからない問題というものはある。「科学には限界がある」ということを、ようやく社会が理解し始めたのが、大震災以降です。専門家でない、科学にかかわらない多くの人々は「科学の力で解決できないことはない」という、素朴な信頼感を持っていますが、専門家は違う。わからない、解決できていないことがたくさんあるから研究という仕事が成り立っているわけですね。そこに両者の間の基本的な誤解があるわけです(スライド1)。

また、研究者の方々の多くは、進んでおっしゃいませんけれども、「専門的なことを言っても素人はどうせわからない」と感じているように思います。だから、原発事故が

なんでこうなるの

非専門家(市民)の本音

- ・不安に伝えてほしい
- ・「安全」と言ってほしい
- ・専門家なら何でも教えてくれるはず

専門家は「科学に絶対はない」と信じているから断言しない。(内心「難しいことは素人に話しても分からない」と思っている?)

(スライド1)

あった直後「安全です」とか「心配ありません」というメッセージがたくさん飛び交いました。結果的には嘘だったわけです。こういうときにリスクを口にすると、パニックになると、専門家は考えたのでしょうか。それは多少、霞が関の官僚の中にも、私たちマスコミにもないとは言えません。

3月12日の時点で水素爆発が起き、研究者のコメントを取りますと、「これはもう炉心から燃料が溶け出ていますね」という、つまりメルトダウンの可能性を指摘している人は当時からいました。しかし、それをそのまま記事にするのにためらいもありました。誰も確認できていない、科学的根拠がないことを記事にすることへのためらいと、記事がひとり歩きしてほんとうにパニックが起きちゃったらどうしようという気持ちが混在していました。

振り返れば、早い段階から最悪のシナリオを、政府も、研究者も、マスコミも、社会に提示すべきだったのかもしれない。「最悪のシナリオを示したら国民はパニックになるから言わないほうがいい」という無意識の抑制が情報を握っていた人たちの間に共有されていたような、そんな気がします。

内閣官房参与を辞任したある専門家は、記者会見で「年間の被ばく量は20ミリシーベルトでいいというのが、自分の子どもにはそんな目に遭わせたくない」と泣きました。そうすると福島のお母さんたちは「ただごとじゃないな」と思うわけです。放射能の専門家が泣いて訴えている。これはやっぱり逃げ出さなきゃということになってしまう。

斑目春樹さんという、原子力安全委員長ですけれども、専門家としては誠実で正直なんですけれども、ご存じでなくてはいけないことを「知りません」と言ったり、一度言ったことを「記憶違いだった」と撤回したりすることが多くありました。そうすると今度はマスコミ側が混乱するんですね。安全委員長といえば安全規制のご意見番のトップなのですが、信用できなくなってしまう。自分の立場や状況をわきまえず感情的になる、あるいは不用意な発言が世間

の不安を高める結果になったと思います。

社会と科学との関係を考える上で「トランス・サイエンス」という言葉があります。ご存じの方、どれくらいおられるでしょうか。1972年にワインバーグという物理学者が、研究とは別に、社会学系の雑誌に投稿した論文で提唱した言葉です(スライド2)。

彼が言っていることは今起きていることとぴったり合致していてびっくりするんですけども、原発に限らず、科学技術の負の側面がクローズアップされたり、社会的な議論が起きているようなことは多くあります。これをつくり出した科学者が悪いと断じることもできなければ、研究費を支給した政府が悪いと責任を押しつけられるものではないですよ。じゃあ、だれが責任を負うのか、あるいはだれがその是非を決めるのかということになってくるんですが、それは「みんなで決める」という結論が導かれるわけです。

この考え方を今日本に導入しようとしている大阪大学の小林傳司先生の図を引用しますが、科学の世界と、成果を利用する社会との間に存在する問題は、つまり、科学者が生み出さなければ起きなかったけれども、それは科学が悪いということにはならず、「使わない」という知恵を發揮しなかった社会の責任でもあるということを示しています。遺伝子組み換え作物もそうです。つくり出したのは科学者。広めたのは食糧メジャーや種苗会社。組み換え作物は、発展途上国などの食糧危機を補うと期待されています。一方でほんとうにこんな、除草剤をかけても枯れないものを食べていいのかという不安もある。遺伝子治療、出生前診断、生殖補助医療と、今新聞を賑わせている科学技術の話題は大体トランス・サイエンスの問題だと私は思っています。

原発に戻って考えてみますと、福島第一原発のような大事故は、5,000年に1回ぐらいしか起きませんという確からしいデータが出たとします。じゃ、確率的にはとても低いんだから、導入しましょうという結論でいいのか。5,000年に1回は起きうるということですし、起きた結果がこんなに深刻なものであれば回避する賢明さも求められる。

こういう考え方もあります。例えば、ひとつの原子炉が事故を起こす可能性は「5,000年に1回」としても、世界中に500基ぐらい原子炉があるとすると、10年に1回は世界のどこかで大事故が起きる。日本の放射能もれが世界中に不安を与えているように、世界規模で考えると、やっぱり見過ごせない確率であると。

こうした、割り切れない問題が多くある中で、ここは研究者あるいは研究者コミュニティと社会との議論、コミュニケーションがほんとうに重要になってきていると思います。そのお手伝いをマスメディアとしてやるわけですけども、基本は研究者コミュニティ、研究者一人一人の意識と行動にかかっていると書いてもいいと思います。

トランス・サイエンス

物理学者、ワインバーグの1972年の論文

- ・ 科学技術がもたらす問題の中には、科学だけでは解決できないものが増えている
- ・ 解決のためには、科学を超えた次元での議論が必要
- ・ 人々との議論は、科学者にとってはうっとうしいかもしれないが、科学技術のスポンサーは国民なのだから当然だ

(スライド2)

今回の事故で、大変な厄災を経験しましたがけれども、唯一その中に希望を見出すとすれば、市民が変わってきたということが言えます。「専門家は常に答えを与えてくれるものではない」ということを身をもって知ったわけです。科学には限界がある、科学がいつも答えを出してくれるわけではないということにも気づいた。だれかに答えだけ教えてもらうのではなくて、自分でその仕組みを理解し、それが自分にとって受け入れられるものか、そうでないかを自分で判断することを、必要に迫られて皆さんが始めています。

ここに示しているのは、赤ちゃんの散歩のときに線量計を持ち歩いているお母さんの写真で、これは世田谷区の公園で毎日新聞の記者が写したものですけれども、今まで「シーベルト」なんてご存じなかったお母さんが、線量計を買って、自分の子供のために、あるいは自分の子供が生きていく地球のために考え始めた、学び始めた。決して幸せな状態ではありませんけれども、3月11日を境に起きた変化です。福島県でも、何もしてくれない行政に業を煮やした保護者たちが、自分の子供が通う学校の校庭の線量を測り、行政を動かして大規模な除染につなげたことも実際にありました。お上が何とかしてくれるであろうと思っていた人たちが、自分から行動をする、あるいはお上を動かすというふうに変ってきています。

これは、ある意味では民主主義の芽生え、科学を媒介にした民主主義の誕生と考えることもできると思います。お上や専門家と対等な関係になるということはほんとうに注目すべき動きです。

イギリスでは、こういった取り組みをPublic Engagement in Science and Technologyと呼びます。1980年代には、Public Understanding of Science and Technologyという標語で語られていました。つまり、遺伝子組み換え作物やBSEの問題であんなに社会に拒否反応が起きるのは、一般大衆が知識がなさ過ぎるからで、科学的知識をつけさせて、自分で考えるようにしようというような、「上から目線」

PUSTからPESTへ

- Public **Understanding** of Science & Tech.

公衆の科学理解増進

無知な市民を啓蒙する、という「上から目線」のニュアンスがある→「欠如モデル」

- Public **Engagement** in Science & Tech.

公衆の科学への関与

科学者と公衆は対等な関係

関与があって初めて互いの理解が進む

(スライド3)

英国人が過去1年間に訪問した場所

- 科学館 18
- ギャラリー 27
- 科学館、美術館以外の博物館 19
- 科学フェスティバル 2
- 研究室やその他科学を学ぶ場所 3
- 動物園 26
- テーマパーク 29
- プラネタリウム 3
- 科学に関する講演 8
- 科学に関する会合や討論会 3
- 学校やコミュニティセンター、大学などで開かれる科学に関する行事 7
- スポーツ観戦 27
- 観光施設 31
- 歴史的建物や庭園 32

(Public Attitudes to Science 2008, 2137人が回答、単位%)

(スライド4)

の政策だったわけですね。しかしあまり功を奏さないということがわかって、今はEngagementという言葉に変わっています(スライド3)。

さっきの線量を測っているお母さんがひとつの例と言えるかもしれませんが、科学者、あるいは専門家と一般大衆は対等である。一般の人たちは専門家への不満や不安をちゃんと伝える。専門家は、そうした不安や不満を認識し、どうすれば解決できるか、あるいは自分がどんなふうに役に立てるかを考える。日本はまだまだこれからというところなんですけれども、こういった、パラダイムシフトが起きてくると思うので、むしろそれを変革へのチャンスととらえるという発想もあっていいと思います。

このスライドは、イギリスの王立協会というところで、1800年代後半に行われた講演の様子です。マイケル・ファラデーという『ろうそくの科学』という本で有名な科学者やいろんな科学者が、一般大衆を前に自分の研究をわかりやすく魅力的に語る、あるいは実験をしてみせるというような一種のブームが起きました。

紳士淑女には科学を知っている、語れることが教養として求められたわけです。ある意味、イギリスでは科学をそういった娯楽のひとつ、教養のひとつとしてつき合っています。

この金曜講話は今も続いています。毎週金曜の夜、8時ちょうどから始まって9時きっかりに終わる。参加者は皆タキシード、あるいはワンピースかドレス、いわゆる社交の場ですね。そこに話者として呼ばれることは、研究者にとっては誇りです。つまり、お客さんを満足させられるだけの内容をしゃべれる人だと主催者から認められたという榮譽を感じる。大衆も、知的好奇心を満たして、楽しかったねと。あるいは、楽しかったけどこの人の意見には賛成できないわというような意見を持つ、そういった科学コミュニケーションが百何十年と続いている。その点、日本はやっぱこれからだと思います。実際に「科学コミュニケーション」という言葉が日本で言われ始めたのもこの10年

ぐらいです。

これはイギリス人が、ある年に訪問した場所を調べたものなんですけれども、科学館が18%なんですね(スライド4)。18%が多いのか少ないのか。イギリス人、サッカーとかクリケットとか大好きですよ。スポーツ観戦27%、テーマパーク29%、動物園26%に比べれば低いですけども、18%というのは結構高いと思っています。同じような調査が日本にもあるんですけども、2%とかでしたね。だからイギリス人は偉いという話ではないんですよ。ただ、科学が身近にある、あるいは科学を楽しむ対象というか、お勉強じゃなくてひとつの娯楽、エンターテインメントとして受けとめているということが住んでいてすごくわかりました。

もう一つ、ここは大きな違いなんですけれども、日本の科学館の多くは有料なんです。お金がかかる。イギリスは、大きなミュージアムは、科学館に限らず無料です。それは貴族の人たちの寄付などで賄っているから一般の人はただで済んでいるんですけども、お金がかかるということはひとつのハードルになります。家族4人で行って、たとえば2,000円かかる。難しい物が並んでいる場所でお勉強しなきゃいけないよりはアウトレットモールでお買い物したほうがいいとか、そうなってしまいますから、そういうハードルもあるんですけども。イギリス人は、サンドイッチをつくって科学館にピクニックに行きます。子供たちは展示のところで遊んでいる。お母さんたちは、一緒に遊んだり、中庭でくつろいでいるというような、科学がほんとうに身近にある。そんな社会が日本でも実現できたらいいなと思いながら活動していますので、後でご紹介したいと思います。

私は1年間イギリスに留学をしていたんですけども、その間に、授業に出つつ、自分のテーマを持っていろんなところを歩きました。それは「科学フェスティバル」というものの調査です。イギリスでは、科学と社会の距離が近いと先ほど言いましたけれども、いろんな町でいろんな科

学フェスティバルが開かれています。日本では映画祭とか文学祭とかはありますが、科学祭というのはあまり聞いたことがないんじゃないでしょうか。イギリスは、文学祭、音楽祭、映画祭、演劇祭などと同じような感じで科学祭というイベントが普通にあります。

私が1年間に行ったのは、エジンバラ、ヨーク、ロンドン、チェルトナム、マンチェスターの5カ所です。それぞれにシーズンが微妙にずれていて、行くことができたんですが、どんなことをしているかという、例えばエジンバラはスコットランドの首都、ご存じですね。演劇祭とか、マーチングバンドの国際フェスティバルが有名で、日本からも結構観光客が行くんですけども、春のイースターの期間は町じゅうが科学祭の会場になりまして、エジンバラ大学の先生たちが、決しておしゃべりが上手な人ばかりではないんですけども、ショッピングセンターに特設ステージができて、そこで実験ショーをやったり、あるいは「チョコレートは健康にいいか悪いか」といったディベートを真剣にやったり、いろんな催しがあります。

ほぼすべてが参加無料です。何で無料でできるかというと、エジンバラに集積している生命科学系のたくさんの企業がありまして、そういうところがスポンサーになっているわけです。裏返せばスポンサーになっても元が取れると踏んでいるということです。エジンバラの科学フェスティバルは家族連れの人が多くて、おじいちゃん、おばあちゃん、孫みたいな構成で来て、元技術者だったらしいおじいさんが孫に実験してみせたり、ほほえましい風景がたくさんありました。

チェルトナムという、ロンドンの南西にある小さな町、ここでは大人向けの科学祭が開かれていました。例えば「サイエンスキャバレー」と言って、科学者がちょっとお昼に大声で話せないようなテーマをしゃべる。ここに写っている行列は、リチャード・ドーキンスさんというベストセラー学者の講演会に並んでいる大人たちです。これは当時のレートで2,000円ぐらいの入場料が発生するものでしたけれども、会場は満員でした。あとはヨーロッパ各国の若い科学者や学生が自分の研究テーマを2分間で魅力的にプレゼンするという国際コンテストの決勝がありました。優勝者の賞金は、BBCの特別番組に出演できるとか、そういったものなんですけど。これは「イグノーベル賞」、ご存じですか？ イグノーベル賞の受賞者を招いて、自分の研究を自慢してもらおうという、飲み物付きの楽しいイベントでした。ちなみにこのスライドの人物は、剣を飲むという大道芸の芸人です。剣を飲んでいる人の胃腸がどれぐらい強いかを調べたお医者さんがイグノーベル賞の受賞者、その演説としてはるばるおいでになっていました。おもしろいでしょう。

ヨーロッパというのはあちこちでそういう科学フェステ



(スライド5)

イバルがあるので、関係者が集まるお祭りみたいなものもありまして、これはスペインのバルセロナで開かれたお祭りに行った時の写真ですけども、夜はもう大賑わい。パーティーで違う国の人同士が仲良くなって、お互いのフェスティバルに呼び合うというようなこともありました。スタッフが出払った科学館ではアインシュタインが留守番しているぐらい——ほんとうのアインシュタインじゃないですよ、当たり前ですね——賑やかなお祭りでした(スライド5)。

日本はどうかというと、最近増えてきています。ひとつは東京都三鷹市で、「東京国際科学フェスティバル」が2009年に始まりまして、北海道函館市では「はこだて国際科学祭」が2年前から始まっていて、少しずつそういった催しが増えていますが、さらに増えているのは「サイエンスカフェ」という催しです。

コーヒーとか紅茶とか飲み物、時には軽いスナックなどをみんなが自分の手元に置いて、食べながら科学者の話を聞く。聞くだけでなく、ばんばん質問をするというような、肩の凝らない科学コミュニケーションの場です。多くても20人ぐらいのお客さんと研究者が車座になって、マイクを使わないで話ができるぐらいの小さな集まり、こういったものが日本で年間500回ぐらい開かれています。研究者は、呼ばれて話をするによって社会の人が何を考えているかよくわかる。しゃべる技術も身につくんですね。専門家は専門用語で成り立つ世界にしか生きていませんから、研究室を一步出ると、自分の研究をうまく紹介できないということがよくあると聞きます。こういったところに出て場数を踏むと、人の心をつかむ話し方ができる、あるいは社会の人が何を求めているのかがわかる。一方で参加者も研究者の素顔がわかる、あるいは研究者に質問できたという参加意識を持てるということで、双方にいろんな気づきがある、しかも手軽にできるということで広がっています。

このスライドは、私が客員教授としてかかわっている富山大学理学部の学生さんたちが8月に開いたサイエンスカ

フェなんですけれども、子供たちが一生懸命なので、学生さんたちも大いに刺激を受けていました。研究だけでなく、こうやって研究を通して社会とかかわることって意外と楽しいんだということも学生さんたちも実感してくれています。

こうしたいろんな科学コミュニケーションで大切なのは、研究の外側に社会があるということにいつも思いを馳せるということだと思います。もちろん研究そのものは、自分の着想に基づく、知的好奇心や探究心のあらわれでありますから、とても大切なことですが、やがてそれが社会に何らかの影響を与えるものだという意識があれば、社会を意識せざるを得なくなるんじゃないかと思うんですね。最近、さっきの『三四郎』の野々宮君みたいなタイプの人はずいぶん減ってきていて、釈迦に説法かもしれませんけれども、これからは「新しい理系」を目指してほしいと思っています。研究もするし、社会ともコンタクトできるという人たちが1人でも増えたらいいと思います。

さて去年、2010年はいろんな出来事がありましたけれども、小惑星探査機「はやぶさ」の帰還が私にとってはおもしろい出来事でした。無事に地球に戻ってきたということだけでもすごいですけれども、それを伝える側もやりがいがありました。

宇宙開発をニュースとして発信するときに、注目される順番、序列というのがあります。一番はやっぱ宇宙飛行士が宇宙に行って帰ってくる有人宇宙開発、もうこれがダントツに関心を集める。それ以外のことは書いてもそれほど読んでもらえないという状態でした。それがはやぶさは違いました。ただの人工衛星なんですけれども、擬人化されて、大変なブームになりました。「はやぶさ現象」と呼ばれたぐらいです。ただ単に小惑星に行って帰ってきました、日本の技術力ってすごいですねというだけでなく、そこにかかわった、それを支えた大勢の研究者、それからエンジニアの人たちの思いが世の中に知られたからだと思います(スライド6)。

映画にもなりました。たしか7本か8本、JAXAに打診があって3本ぐらいが映画化されることになりました。最初の映画の公開は終わってしまいましたけれども、理系の人たちが悩みながらも夢を持ち続け、最後の最後まであきらめないという、そういうドラマ仕立てになっていて、感動できる作品になっています。さらに、ノンフィクションに近い筋書きなんです。カギとなるシーンでは、出演者の並び方が本物そっくりという、すごい作り込み方をしている映画です。例えばリーダーの川口淳一郎さんを演じたのは佐野史郎さんですけど、最後は川口さんに見えて仕方がないというぐらい。私がうれしかったのは、主人公が女性だったということです。さっき理系のイメージで「なぜか男性ばかり」と言いましたが、この映画では、主人公は

「はやぶさ現象」



- ・擬人化 (はやぶさ君)
- ・鉄の塊なのに「けなげ」
- ・「あきらめない」技術チームの情熱
- ・閉塞感漂う社会で、唯一元気になれる、ピュアな挑戦物語
- ・その先にある、科学(者)技術(者)への関心の深まり

(スライド6)

博士号が取れなくて悶々としている女性科学者で、はやぶさプロジェクトを通して一人前の研究者に成長していくという、成長の物語でもあります。本物の川口さんがおっしゃることは含蓄に富みますが、ここでも研究の醍醐味というのを言い当ててくれるわけです。

たとえば、NASAでもできなかったことを日本がやってのけたということに関して、「あれは別に最初からできると思っていなかった」と川口さんは振り返っています。ただ負けん気で、そのときの勢いで「やります」と言っちゃったんですと。ただ、言っちゃったものはやらざるを得ない。だから必死でやるんですと。で、実際にやりとげた。でき過ぎだと思うけれども、でもそれを見せられたことが痛快ですと。彼一流のクールな語り口でおっしゃるんですけども、これこそが研究の醍醐味、おもしろさだろうと思うんですね。

今回、助成対象に選ばれたテーマを拝見しましたが、実現したらおもしろいなというテーマがたくさんありますね。皆さんは、頭で考えるだけでなく、企画書にしてお金を取ってこれから取り組もうとなさっているわけですね。やっぱほかの人がやっていることを書いたってお金はもらえないというのが当然ありますし、書いたからにはやらなきゃというのがありますよね。そういうことを何か目を輝かせてやっている人たちが世の中に多分50万人ぐらいはいる。そのことを世間の人に知ってほしい。私一人では無理です。やっぱ研究者一人一人が、自分はこのことをやっていますよということを社会にアピールしてほしい。研究は忙しいのが当たり前ですから余裕なんてないかもしれませんが、それによって発見することが多分あると思います。

最後に、ノーベル賞受賞者とたくさん交流してきたノーベル博物館の館長さんが書き残している言葉をここにまとめてみました(スライド7)。

研究の醍醐味は創造性、クリエイティビティですけれども、クリエイティビティが生まれる場の条件を彼は指摘し

創造性が生まれる場

- ・ 勇気
- ・ 挑戦
- ・ 不屈の意思
- ・ 組み合わせ
- ・ 新たな視点
- ・ 遊び心
- ・ 偶然
- ・ ひらめき
- ・ 多様な才能の集中
- ・ コミュニケーション
- ・ 非公式な会合
- ・ 行き来しやすさ
- ・ 豊富な資源（研究費）
- ・ 考える自由
- ・ 競争
- ・ カオス（混沌）

ノーベル博物館館長、スヴェンテ・リンダクヴィスト教授による

(スライド7)

ています。個人の資質と、雰囲気とか環境に関するキーワードが並べられています。勇気、挑戦、不屈の意思、組み合わせ——組み合わせというのは、今まで考えたことのないような研究領域の成果を組み合わせるとか、そういうことですね——新たな視点、遊び心、偶然、ひらめき。遊び心、大切ですよ。多様な才能の集中、コミュニケーション、非公式な会合。飲み会とか、食堂でのおしゃべり。それから行き来しやすさ、流動性ですね。研究費、考える自由、少しの競争とカオス。

普通の組織にも、普通の個人にも共通する資質ではあるんですけども、それを積極的に心がけることが、何かしら創造的なもののゆりかごになるんじゃないかと思います。ご清聴ありがとうございました。

コスメトロジー研究雑感

平成 21 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

橋 敬祐

私は小さい頃から、特に冬場になると手の甲が乾燥し、ひどい時には肌荒れを起こすことがあった。このような経緯から、これら症状を改善するにはどのようにすればよいか考えており、皮膚の機能に興味を持っていた。研究を行っていく中で、バリア機能など皮膚が優れた機能を持っていることを学び、改めて皮膚の素晴らしさに気付いた次第である。このような皮膚の機能を上手に調節することができれば、これら肌荒れ等を治すことが可能になる。また、近年の医療において、「未病」という病気になる前に治療することで病気の発症を防ぐ、予防医学の重要性が注目されている。コスメトロジーの分野においても同様に、機能性化粧品を用いて予めバリア機能などを向上させておくことで肌荒れの防止に役立つと考えられる。

しかし、機能性化粧品の持つ効果が、例えば同じ保湿効果であっても、その効果を発揮するメカニズムには様々な分子が関わっており、化粧品素材が標的としている分子も異なっていると考えられる。薬において、よく効果が得られる人もいれば、体質に合わず効果が得にくいなど個人差

が問題になることがある。これらのことから、皮膚の機能解明が進み、異なる分子をターゲットにした様々な機能性化粧品等が開発されることで、それぞれの人が各々の体質に合ったものを選ぶことが可能になると考えられる。

今回、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団の助成を頂き、核内受容体PPAR α の活性を制御する素材の探索を行った。PPAR α は主に肝臓で脂質の代謝に関わっており、その機能を活性化する薬剤は高脂血症の治療薬として臨床で用いられている。一方、PPAR α は、皮膚においても発現しており、表皮バリア機能、皮脂産生、創傷治癒等に関与することが明らかになりつつある。これらのことから、皮膚のPPAR α の活性を調節できる素材は、皮膚の機能の改善による肌荒れ防止作用、もしくは、美容用途への応用が期待でき、機能性化粧品の一つの素材として有望と考えられる。このように、今後様々な標的分子が同定され、それら分子を介した様々な機能性化粧品が開発されることで、多くの人々の美容と健康に役立つことを期待したい。
(大阪大学大学院薬学研究科)

平成 21 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

野々村 美宗

Pickering教授はイギリスの大学教授で、王立協会のフェローでもあった。教授がスリーピースのスーツを着て果樹園でくつろいでいる写真が残されている。彼はある論文の中で固体と水と油を混ぜると自然にエマルションができる場合があることを示した。この研究は、界面活性粒子を利用したエマルションのさきがけの一つである。現在、多くの研究者は教授の業績に敬意を表し、この手のエマルションを「ピッカリングエマルション」と呼んでいる。その後、界面活性剤によって安定化されたエマルションに関する研究がすさまじい勢いで進展したのに対して、固体粒子によって安定化されたエマルションに関する研究はなぜかほとんど注目されることもなかった。ところが、この何気ない一報の論文が最近注目されている。このエマルシ

ョンを使うことで界面活性剤を一滴も使うことなくエマルションを調製し、ドラックデリバリーシステムや多孔性材料を作る方法が提案されたため、多くの材料科学者がこぞってピッカリングエマルションを手掛け始めたのだ。

ところが、よくよく歴史をひも解いてみると、何十年前からこの製剤を実用化していた技術者たちがいた。化粧品技術者である。彼らの間ではこのエマルションの存在は何十年前から知られており、実際にローションやファンデーションの製剤に利用されてきた。界面活性剤の配合量が少なく済むため、使い心地も良いし、化粧もちも良いというのである。この化粧品技術者の先見性とさりげなき、彼らのおしゃれな気風の表れといえるのではなからうか。

(山形大学大学院理工学研究科)

コスメトロジー雑感

阿部 郁朗

私の所属は薬学部の天然化学教室であり、天然薬用資源を基盤とした創薬基礎研究に携わっている。一見、コスメトロジーとは無縁のようであるが、実際には意外と関係するところが多い。本研究でとりあげた薬用植物のアロエも、薬用以外にも、食品、化粧品において重要な植物であり、その薬効成分となるクロモンなどのポリフェノール類は、シミ抑制・美白効果など、化粧品にも深く関わっている。

天然クロモンは、アロエ以外にも、漢方薬の丁子などの一部の薬用植物に含まれるが、その供給量が限られていることから、精製品は5 mgで30,000円ときわめて高価である。一方、同物質のシミ抑制・美白効果（メラノサイト増殖抑制作用）に着目して花王により開発された合成クロモンは、化粧品の添加剤として使用されており、合成クロモンを有効成分とするソフィーナ・薬用ホワイトニングは、30g 6,000円で販売されている（合成クロモン含有量は非公開）。天然クロモンは、高価であるため化粧品市場には現在出回っていないが、大量製造により、価格を5mg 100円程度にまで抑える事ができれば、スキンケア商品に応用できるものと大いに期待できる。本研究で開発する天然クロモン

を10mg含有する化粧品が、化粧品市場のスキンケア部門の1%を占有した場合、年間25kgを生産しその売上規模は、約5億円になるものと試算できる。また、本研究において、天然の生合成酵素の触媒機能の改変などにより、天然品を超えた優れた作用を有する、新しいタイプの非天然型クロモンの生産が可能になる。

現在、化粧品の有効成分の多くは植物由来であるが、それら植物資源が栽培品種の場合、有効成分含量の違いなど、安定供給の面で問題になる事が多い。本研究により、安定かつ持続的な植物由来有効成分を供給できるシステムの構築が可能になる。最後に、生合成酵素が触媒する反応は、有機合成の技術が格段に進歩した今日であっても、酵素のみが唯一効率よく行うことの可能なものである。クリーンかつマイルドな条件下、驚くほど単純な工程で、複雑な分子骨格を作り上げることができる。生体触媒を用いた合成法の利点は計り知れないものがあり、次世代の環境調和型の新合成手法の発展に必ずや大きな貢献をするものと期待される。

（東京大学大学院薬学系研究科）

コスメトロジーと医薬品研究の接点

川上 亘作

医薬品においては、あくまでも薬物自身が主役です。しかし脇役を含めたチームプレー（製剤化技術）によって、主役が輝きを増すことも珍しくありません。その一方、化粧品でも特定成分が目立つことはありますが、チームプレーの重要性は医薬品との比ではありません。医薬品においては、当然ながら薬効と副作用を最優先に、製剤化が行われます。その結果、ワセリンのような極めて使用感の悪い基剤が、未だに幅を利かせています。少々使用感が悪くても、医療用医薬品においては、売り上げには直結しないかもしれません。しかしながら、使用感が悪いために患者が使用を差し控えるようなことになれば、その医薬品の有用性は結局のところ半減してしまいます。例えばアトピー性皮膚炎のように、長期にわたって根気よく外用剤の塗布が必要な疾患などにおいて、使用感は極めて重要です。そのような製剤が化粧品の使い心地であれば、コンプライア

ンスも守られ治療成績の向上が期待できることでしょう。もちろんその実現には、製薬会社の意識改革だけではなく、薬価など様々な問題が立ちはだかります。

人口構成の高齢化や生活習慣病の広がりに伴い、ユーザーフレンドリーな製剤技術に対する需要は確実に高まっています。それに対応すべく、経口製剤においては、水なしで飲める製剤や服用を補助するゼリーなど、新しい技術がどんどん実用化されています。注射剤においても、ほとんど痛みを感じない注射器や針のない注射器などが開発されています。その一方、外用剤はもともと患者負担が軽いということもありますが、他の投与経路の技術と比べるとコンプライアンス向上に繋がるような画期的な進歩は見当たりません。外用剤にブレイクスルーがもたらされるとすれば、それに大きな貢献をするのはコスメトロジーかもしれません。

（物質・材料研究機構）

平成 21 年度 研究助成

化粧品と化粧ポーチと

長岡 伸一

化粧品のことを考えるとき、それを入れるポーチの存在も気になるのは私だけだろうか。帰省先にある大学病院で休憩中の女性看護師が化粧ポーチのようなものを手に持っている姿が目に入った。テキパキと働くベテラン看護師といかにも手作り風のポーチとの組み合わせが印象的だった。また、ある女性はシーズンごとに発表される季節限定の化粧品セットを買うという。化粧品もさることながら一緒に付いてくるポーチが目当てだとのことだ。夏には夏、冬には冬と季節に合わせてポーチも替えて気分を盛り上げるのだそうだ。

今回、身近にいる20代から70代までの女性30人に化粧品とポーチの中身に関するごく簡単なアンケートに協力してもらった。30人のうち毎日化粧をする人は22人、時々する人が3人、ほとんどしない人が5人であった。さらに、外出時に化粧ポーチを持ち歩く人は30人中24人、ポーチの中に化粧品アイテムが3個以下の人が9人に対して、4アイテム以上9アイテム以下が15名であった。荷物が増えようが重くなろうがとりあえず一通り持って出かけるのだ。香水を持ち歩く人も一人いた。香りもまた欠かせないもの

である。化粧品アイテムの中で最も大切なものとして口紅と答える人が4名、リップクリームが4名、他はそれぞればらつきがあった。実際にポーチを見せてくれる人もいた。日々進化しているポーチの中の化粧品に対して、ポーチ自体は全く昔から替えていないという。古い友のようなものだろうか、持っていて安心できるのかもしれない。

アンケート結果をみると、外出先で「いざ」という時のために化粧品を持ち歩く女性には化粧をしていること自体が日常そのものだという姿が見えてくる。もはや、化粧をするということは「目的」の粋を越えているのだ。そして、お気に入りのポーチを携えて外出し、時にはメイクなどを変えて非日常を楽しみ、自ら季節感を演出する。色々なリスクを背負いながら、やはり今日も化粧をする。それによって無意識に日常を確認し、さまざまな物質的、精神的な効果を自分にもたらしている。

さしずめ化粧をしない男性の私は、季節限定パッケージのビールでも買って、薄れつつある季節感を取り戻す第一歩にでもしてみようかと思っている。

(愛媛大学理工学研究科環境機能科学専攻)

平成 21 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

守田 麻由子

「コスメトロジー」と聞いて最初に浮かんだのは皮膚そのものであり化粧品の持つ華やかさであり、動物の内臓を中心に脂質分析をしてきた、これまでの自身の研究となかなか結び付けることができなかったことを覚えています。また、生命科学や医学、心理学などその分野は様々であり、「コスメトロジー」が網羅している分野の広さに驚きを隠せませんでした。皮膚は外界のストレスをダイレクトに受ける組織であり、老化などの形態変化と脂質変動には関わりがあるのではないかと。これまで携わってきた分野とコスメトロジーと結び付けてみたい。そのように考えたことが応募のきっかけでした。

このたび助成金を交付いただき、皮膚の脂質について細胞レベルでの脂質分析を行いました。HaCaT細胞の脂質の主成分であったリン脂質やトリグリセリドには不飽和脂

肪酸を含む分子種が多いことが分かりました。不飽和脂肪酸は外界からのストレスの一種である酸化を受けやすいのに何故だろうか。皮膚にはどのような防御機構がそなわっているのだろうか。など、様々な興味が湧いてき、コスメトロジーの持つ領域の広さを実感しました。本研究を遂行する前後で、コスメトロジーへの印象がずいぶんと変わりました。

今回採択いただいたことをきっかけに、遂行した研究をさらに発展させ、皮膚のリピドミクス解析、疾患の予防・改善効果への解析へとつなげていきたいと考えております。最後になりましたが、コスメトロジー研究振興財団研究助成金を交付いただき、研究の場を与えていただきましたことに、心より感謝を申し上げます。

(京都府立医科大学消化器内科)

地域に根ざしたコスメトロジー研究を目指して

長岐 正彦

本州最北に位置する青森県には今なお多くの自然が残り、リンゴや青森ヒバといった植物資源が豊富に存在しています。弘前大学に勤務する私は、天然有機化合物のイソプレノイド類に関する酵素反応や抗菌活性試験などについての研究を行っており、これらの結果を応用した消臭・除菌剤の開発にも携わってきました。しかし、当初、それらの大半は化学合成により得られる“試薬”を用いたものでした。昨今の天然志向に鑑みて、県内に豊富に存在する植物に含有する成分を利用する研究に着手した平成21年に、コスメトロジー研究振興財団の研究助成を受けることが出来ました。この助成により、様々な生理活性試験や試作品の製造など、多岐に及ぶ研究を行うことが可能になり、また手

掛かりとしたハマナスの他、ラベンダー、ヒバ、およびカシスなどの多くの植物について研究を行う事が出来ました。

これらの研究を通し、様々な分野に応用可能な基礎的研究から応用研究までの実験を行う事で、今後の県産植物資源の調査に向けて一つの指針を示すことが出来たのではないかと考えております。今回の研究結果が県産植物の更なる利用に向けた一歩となり、地域活性化へと繋がれば幸いです。

最後に、この様な有意義な研究の機会を与えて頂いた、コスメトロジー研究振興財団に深く感謝申し上げます。

(弘前大学大学院理工学研究科)

本研究成果のコスメトロジーに及ぼす影響

奥田 徹哉

この度は、コスメトロジー研究振興財団研究助成を頂き、心より感謝申し上げます。

化粧品として、皆さんがすぐ思い浮かべるのは女性をターゲットとしたメイクアップ化粧品ではないでしょうか。実際のところ、基礎化粧品や男性用のスキンケア、さらにシャンプーやリンスといったトイレットリー製品など、近年ではその商品の種類は多岐に渡り、化粧品はもはや老若男女が使う日用品となっています。このように化粧品を利用する人々の体質やその用途は様々でありますので、肌荒れなどの身体への悪影響についても用途に応じた様々な対策を講じる必要性があり、現在の化粧品の開発のポイントであると思えます。

我々の研究対象であるセラミドまたはセラミドより合成されるスフィンゴリピッドは、皮膚表面の角質保護成分としてすでに多くの化粧品に利用されております。これらはその疎水的な性質により、角質層内に存在する水分の流出

を防ぐ作用があり、効率よく水分を維持するための重要なブロックとして機能することがわかっています。しかし植物原料由来ということから安全とされていた米糠などを原材料とする植物性セラミドですら、人によってはアレルギー症状を引き起こすことがあります。その原因は、人には存在しない構造を有する植物性セラミドが、異物として免疫システムに認識されるためと考えられます。

我々が着目しておりますスフィンゴリピッドの一種、スフィンゴ糖脂質は、ヒト由来であることからアレルゲンとなる可能性が低く、また抗炎症活性を有することが示唆されていることから、皮膚における免疫細胞の過剰な応答を抑制し、肌荒れを防ぐ効果が期待できると考えております。本研究成果により、敏感肌、アトピー性皮膚炎の方も安心して利用できる新たな化粧品原料として、スフィンゴ糖脂質が利用されることを期待しております。

(独立行政法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

平成 21 年度 研究助成

コスメトロジーと DDS の関係

黒田 俊一

私の専門領域である DDS（薬物送達技術）は、生体内において薬剤を欲しい時に欲しい場所で欲しい量だけ送達する技術（薬剤の時空間的制御技術）であり、ナノテクノロジー技術との融合により、極めて高機能な薬剤（ナノメディシン）の創出を促すと期待されている。70年代に萌芽したライフサイエンスの成果として、試験管内では著効を示す様々な薬剤候補が開発されてきたが、ほとんどが生体内の患部に適切に投与できず医薬品になれないという開発現場の世界的閉塞感を打破するのが DDS とも言われている。しかし、米国では DDS に使用するキャリア（運搬体）の開発スキームが FDA により制定されているのに対し、日本では同スキームは全くと言って良いほど整備されていない。有名な DDS 製剤であるドキシル（抗癌剤ドキシソルピシン封入りポソーム）が、海外 80 カ国で承認されて 9 年も遅れて日本で承認されたように、（一般医薬品もそうだが）DDS キャリアについて深刻なドラッグラグが

日本にはある。そのような中、平成 21 年度に貴財団から、「能動的標的化技術を搭載した新規ドラッグデリバリーシステムキャリア「バイオナノカプセル（BNC）」の次世代化粧品分野での応用可否の検討」という題目で研究支援をいただいた。医薬品は患者に対して投与するもので、治療法の代替法がない場合などは冒険的な適用もあるが、化粧品は健常人に対して使用するもので、特に「美しくする」という次元の高い目的で用いられる。医薬品の世界で DDS は当たり前という時代にならなければ、化粧品の世界では DDS が使用されることなどあり得ないと考えていたので、この助成決定には大いに驚いた。そして今回、我々の DDS キャリア BNC の化粧品領域での応用の可否を検討し、色々と課題を抽出できた。今後、まず医薬品の世界で BNC を成功させ、いつの日か化粧品の世界でも BNC を実用化させたいと切に願っている。（名古屋大学）

平成 22 年度 研究助成

海洋生物からの機能性化粧品素材の探索

塚本 佐知子

私たちの先祖は古来、天然資源（主に植物）を民間薬や狩猟のための矢毒として利用してきました。また、微生物の代謝産物を抗生物質として利用し、発酵食品や酒類の生産に微生物を活用してきました。そして現在も、多くの医薬品が天然資源（植物、微生物、動物）から誕生しています。このように天然資源から多くの医薬品となるような物質が発見されるのは、自然に棲息する生物が自らの身を守るための生体防御物質や、自然の中で生き抜くための化学情報伝達物質を二次代謝物質として保有しているからであると考えられています。そのような観点から考えますと、強い紫外線に曝されて生き抜いている海洋生物は、抗酸化、ラジカル消去、紫外線吸収など身を守るため成分を生体内に豊富に蓄えていると考えられます。私たちは、研究材料の採集のためインドネシアの熱帯サンゴ礁海域で毎年スキューバダイビングにより海綿などの無脊椎動物を採集しています。熊本も日本の他の地域に較べると太陽の陽ざしが強いのですが、インドネシアは赤道直下ですので、さらに強

く照りつけています。1980年代以降、クロマトグラフィーなどの分離技術や核磁気共鳴（NMR）などのスペクトル解析技術の飛躍的な発展にともない、天然資源からの新規低分子化合物が次々と発見されてきました。そして海洋生物からも多くの新規物質が発見されましたが、医薬品シーズの探索に比べて機能性化粧品素材となるような低分子化合物の探索は、あまり行われていないのが現状です。これまでに知られているものとしては、カリブ海に生息する腔腸動物から得られたシュードプテロシン C が、強い抗酸化・抗炎症効果を示す成分としてアメリカでスキンケアクリームに配合されています。また、甲殻類やヘマトコッカス（藻類）に豊富に含まれるアスタキサンチンも、強い抗酸化効果を示すことからシミやしわの防止（アンチエイジング）を目的としてスキンケアクリームに配合されています。本研究助成では、シュードプテロシン C やアスタキサンチンのような機能性化粧品素材の発見を目指し、『海洋生物に由来する機能性化粧品素材の探索』という課題で研

究をさせていただきました。今後も研究を継続し有用な機能性素材を発見したいと考えております。ご支援いただき

ましたコスメトロジー研究振興財団に心から御礼申し上げます。
(熊本大学大学院生命科学研究部)

平成 21 年度 研究助成

皮膚の適応進化による脊椎動物陸上進出とコスメトロジー

松井 毅

地球上の脊椎動物は、約3億6千万年前のデボン紀後期に、水中から陸上に進出した。その際、魚類の体表面の皮膚表皮を覆っていた多層上皮様組織を何らかの機構で「上皮進化」させ、乾燥や紫外線にも耐えられる角化重層扁平上皮組織を形成した。すなわち、角質層の獲得が脊椎動物陸上進出の鍵となっていた事が予測される。そしてその後も、哺乳類の皮膚に至るまでの間に、様々な皮膚特異的遺伝子群を獲得しつつ、地球大気環境の変動に適応させてきたと考えられる。SASPaseやFilaggrinは哺乳類のみに認められる事から、約2億年前の哺乳類出現時に、これら遺伝子がゲノム上に挿入された時期と、哺乳類特有の皮膚が形成された時期は一致しているのかもしれない。しかも、我々のSASPase欠損無毛マウスの解析により、SASPaseがProfilaggrinを分解できるようになった

事で、潤いのある肌を形成できた可能性が示唆されている。コスメトロジーにおいても、このような皮膚の進化の過程により獲得された分子が、様々な大気条件の変化や個体自身の変化により活性や発現量の変動し、時には適応し、また適応不全となる事で、潤いのある若々しい肌を示したり、老化した乾燥肌様の肌を示すのではないだろうか。すなわち、コスメトロジーの問題は、我々人類が太古に地球環境への適応進化の過程で獲得した形質が次第に「退化」していく過程で示される様々な現象をみているのかもしれない。この適応進化時に獲得された皮膚特異的遺伝子群の分子機構の解明とそれを利用した、定量的な角質層内バイオマーカーの同定により、よりきめ細やかな、新しいコスメトロジーの概念が生まれ出てくるのではないかと予測している。
(京都大学 物質-細胞統合システム拠点)

平成 21 年度 研究助成

コスメトロジーにおけるコラーゲン分泌研究の意義について

齋藤 康太

コラーゲンは化粧品へ添加されるだけでなく、健康食品やサプリメントとしても注目されておりコスメトロジー分野において重要な分子である。一方で、コラーゲンの生理機能に関する研究は様々な方向から盛んであり、コラーゲンの合成制御機構やその成熟過程については非常に多くの知見が得られている。またコラーゲンの変異を原因とする疾患に関しても、たくさんの研究成果があげられている。しかしその一方で、細胞内で合成されて多量体となったコラーゲンがどのような経路を辿って最終目的地である細胞外へと運ばれるのか、そのメカニズムについては、ほとんど解明されていないのが現状である。

本研究はVII型コラーゲンの分泌メカニズムを解明することを旨としたが、その結果、コラーゲン分泌に必要な因子を二分子、同定することができた。これはコスメトロジ

ーの分野に対して、表皮水疱症の病因の解明や化粧品などへの応用といった分野に寄与できると考えられる。

現在のコスメトロジーにおいては、コラーゲンは外から化粧品などとして塗布することが一般的である。しかし本研究でコラーゲン分泌の分子機構が解明されれば、コラーゲン分泌を促進する因子を単離する糸口が得られると考えられる。これにより、内在するコラーゲンの分泌を促進するような化粧品あるいは薬剤の作成に本研究は寄与すると思われる。最後に本研究に助成くださいましたコスメトロジー研究振興財団に改めて感謝申し上げます。今後もこれをきっかけにコスメトロジーに貢献できるような研究を進めたいと思います。

(東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室)

創薬科学研究のコスメトロジー研究への越境をめざして

廣明 秀一

平成24年4月1日より、名古屋大学に新しい大学院（博士前期課程）研究科、創薬科学研究科が発足しました。創薬科学研究科は、理・農・工などの4年制の理系学部を卒業した学生の皆さんに、有機合成化学・分子細胞生物学・構造生物学という異なる分野にまたがる融合的専門教育を受ける機会を与え、かつ、基礎的な学問を創薬科学の名のもとに新たに組み替えることで、次世代を先導する創薬基盤研究者を養成することを、その第一の目的としております。

さて、私は、これまで、神戸大学医学研究科において、生命系グローバルCOEによる「統合的膜生物学の国際的研究拠点」による枠組みのもと、多くの研究室と連携しつつ、タイトジャンクション（密着接合、TJ）の構造生物学的研究を行ってまいりました。それはもともとは基礎的な生命科学の研究を志向したものでしたが、医学研究科のもつ基礎医学と臨床医学の垣根を意識させない雰囲気のもと、医療の現場に近い基礎生物学研究を進めることができました。TJ研究がコスメトロジーにも貢献できる、と気

付いたのも、そうした雰囲気あったのでした。その後、名古屋大学理学研究科（生命理学専攻）に異動し、短い期間でしたが、骨太かつ普遍的な生命科学を目指す雰囲気に触れました。そして、この4月より、創薬科学研究科・基盤創薬学専攻という、出口を意識した教育研究に携わることとなります。構造生物学・バイオインフォマティクス・分子細胞生物学と生化学の組み合わせは、創薬科学の一翼を担う学問分野ではありますが、コスメトロジー研究にも応用（＝越境）可能であると信じております。創薬科学を志す学生の皆さんにも、「製薬会社」という単一業界に限定した出口だけではなく、化粧品や香料・ファインケミカル、医療・先端計測機器といった、幅広い分野からの需要に自在に応えることのできる、最先端技術のエキスパートを目指してもらいたい、と考えております。

最後になりましたが、コスメトロジー研究振興財団研究助成を頂き本研究をご支援いただきましたこと、心から感謝申し上げます。

（名古屋大学大学院創薬科学研究科構造分子薬理学分野）

コスメトロジー研究と分析化学研究の出会い

大江 知行

平成21年度より2年間、コスメトロジー研究振興財団の研究助成を頂ける機会を得て大変感謝しています。

思えば平成19年秋、10年以上にわたる海外生活に見切りをつけ、日本語も話せぬ妻子を連れ、後先考えずに帰国した。日本での研究費・研究基盤・人脈も皆無であり、最初の1～2年は、必要な機器すらない空っぽの研究室で、途方に暮れていた。専門である『分析化学』は、どの分野でも必要な基礎技術であるため、『無理やりこじつけ大法螺を吹けば』、何とか申請書の体をなす。しかし科研費のみならず、専門外の情報工学、マテリアル関連の財団助成まで、大小問わず申請したが、一向に採択されない。そんな状況が続く中、一縷の光となったのが、本研究助成の採択であった。久々に自腹を切る事無く東京へ行き、賞状を頂き、懇親会でホロ酔いになり仙台に帰る新幹線の中、『やっと研究室が動き始めた』と感慨に耽ったものである。

研究課題の『皮膚の健康・老化状態の非侵襲的解析法：

質量分析法を基盤としたケラチン上の化学修飾スクリーニング法の開発』は、正直『その場しのぎの大法螺』であったため、採択後ゼロから実験を始める羽目になった。『簡便な皮膚状態評価法』と謳っているのも、まともな分析機器が無かったための苦肉の策であった。それでも幸い、結果も得られ、何とか報告書提出直前に、論文として発表出来た（*J. Proteomics*, 2011, 75, 435）。

皮膚に多量に局在するケラチンは、疎水性で取り扱い困難、更に生理活性が無い事も相まって研究対象として一顧だにされていなかった。しかしながら、非侵襲的に採取可能かつ、室温でも極めて安定であるため、分析試料としての可能性を秘めていた。事実、年代・皮膚処理と酸化修飾の間に相関も見られた。本法では、被験者自身が採取できるので、化粧品等の効能評価を含むアフターサービスなどに活用できればと考えている。

（東北大学大学院薬学研究科臨床分析化学分野）

本研究成果のコスメトロジー領域に及ぼす影響・効果 堤 康央

我が国のナノマテリアル研究は、開発・実用化の点で世界をリードしており、サブミクロンサイズ（数百 nm）以上の従来素材と比較して、圧倒的に優れた有用機能を有するナノマテリアルが続々と産み出されている。特に、コスメトロジー領域では、非晶質ナノシリカやナノ酸化チタン、フラーレン、白金ナノコロイドなどが既に利用されており、最近ではサブナノスケールにまで微小化が進んでいる。この点でまさに、我が国のコスメトロジー関連産業は先駆者で、世界をリードしており、まさにお家芸となっている。一方でナノマテリアルは、従来素材とは異なった体内動態を有していることも相俟って、高度な機能が逆に想定外のリスク、即ちナノ毒性（NanoTox）を産み出し得るなど、二面性を呈してしまうことが危惧され始めている。そのため、健康への関心の高まりも相俟って、21世紀テクノロジー産物としてのナノマテリアルには、安全・安心である

ことがこれまで以上に強く求められている。従って、今後のコスメトロジー領域におけるナノマテリアル研究は、有用・有効で、しかも高度に安全であることが求められ、これを満たすナノマテリアルは他を圧倒する付加価値を持った知財となり、社会受容も得られるため、その取組は今後の鍵を握ってこよう。即ち、ナノマテリアルの開発研究に加えて、単にナノマテリアルの毒性を解明するのではなく、安全なナノマテリアルの開発を支援・促進できる「ナノ安全科学」の推進が必須となるものと期待される。この点、コスメトロジー領域での本研究成果は、安全なナノマテリアルの開発支援に資するなど、この「ナノ安全科学」の萌芽的（パイロット的）取組であるため、安全で安心、そして満ち足りた豊かな社会、また国民や産業界が最大限にその恩恵を享受できる社会の育成に寄与するものと祈念している。（大阪大学薬学研究科毒性学分野）

糖鎖機能が拓く皮膚の再生修復とコスメトロジー 小川 温子

私は糖鎖の機能を研究しております。糖鎖は、受精、発生、癌化、感染、免疫、老化など多くの生命現象に関わることがわかってきました。組織の再生や修復にも関わり、私は肝再生において、組織の作り直しの際に足場となる細胞外マトリックス分子、細胞接着性糖タンパク質ビトロネクチンの糖鎖の機能を調べています。肝再生の初期段階に、ビトロネクチンの糖鎖ではシアル酸を含む糖鎖の総量が著しく減少すると同時に、肝星細胞に対する接着伸展活性が著しく抑制されることを見出しました。ビトロネクチンと肝星細胞のインテグリンが結合して発生する細胞内へのシグナリングが抑制されるためでした。肝星細胞は、肝障害時や炎症時に活性化されて細胞外マトリックスを合成・分泌して組織の再生修復にはたらく細胞で、肝星細胞の過剰な活性化が肝線維化、肝硬変をまねきます。肝の正常な再生と線維化の分かれ目にあたる肝星細胞の活性をコントロールできれば線維化を食い止める鍵になるでしょう。肝再生初期に他の細胞外マトリックス分子では、調べた限りでは

ビトロネクチンほどの劇的な糖鎖と活性の変化は起きていませんので、この変化はビトロネクチンに特有なものと考えられます。

皮膚も肝臓と並んで再生機能の高い組織であることから、皮膚において肝星細胞のような機能を果たす細胞を糖鎖で制御できないかと着想したのが、今回の研究です。新生マウス皮膚から初代培養した線維芽細胞を対象に、糖鎖が変化したビトロネクチン上での細胞接着、伸展への影響を調べました。助成いただいた1年間で、皮膚線維芽細胞の活性化においてもビトロネクチンの糖鎖が細胞表面のインテグリンだけでなく、プロテオグリカンであるシンデカンを紹介するシグナルの関係を調節する事を発見しました。今後は、組織形成に至る段階まで調べる予定で、マトリックス分子の糖鎖変化と正常修復、異常修復の誘導能力を調べ、ケロイド、癌化などの線維化疾患の治療につながる知見を得てコスメトロジーに貢献したいと考えています。

（お茶の水女子大大学院）

平成 21 年度 研究助成

コスメトロジーの観点からみた本研究の展開

大戸 茂弘

本研究ではマウスを対象に、CYPやトランスポーターに日周リズムが存在することを明らかにした。その機序として時計遺伝子が関与していることを明らかにした。また Clock 遺伝子の変異マウスにおいてはそれら各遺伝子の発現リズムが消失することを見出した。本研究で明らかになったCYPやトランスポーター発現リズムの制御メカニズムは、投薬時刻の違いによる体内動態の変動の原因の理解のみならず、それら薬物の至適投薬タイミングを設定する上で重要な知見となりうると思われる。次に、本研究では、ヒト培養細胞を用いた生体リズムの再構築を試み、CYPやトランスポーターのリズムの調節メカニズムを解明することに成功した。これらの結果から、CYPやトランスポーターの基質薬物を用いて治療を行う際には、体内時計の分子機構に基づいた至適投薬タイミングを設定することで、より効率的な治療が可能になることが示唆された。また、本研究で構築されたヒト培養細胞でのリズム評価系は、

これまで困難であったヒトにおける生体リズム研究の分子レベルでの進展にも寄与できるものと考えられた。さらに、摂食条件を操作することにより、CYPやトランスポーターの日周リズムをコントロールできる可能性が示唆された。同様に、皮膚培養細胞を用いた検討においても時計遺伝子の発現に約24時間を周期とするリズムカルな発現変動が認められた。また酵素やトランスポーターの発現にも約24時間を周期とするリズムカルな発現変動が認められた。これらのことから、皮膚細胞においても高血清処理により生体リズムを再現し、リズムを操作できることが明らかとなった。本研究により、体内時計の分子機構の所見を効率よく化粧品の適正使用に応用するためのリズム診断法、リズム操作法を開発できる可能性が示唆された。また生命体がうまく機能していくうえで最重要と考えられている「生体のホメオスタシス機構の維持」に大きく貢献できるものとする。 (九州大学大学院薬学研究院薬剤学)

平成 21 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

平澤 明

現在私は「ゲノム創薬科学分野」研究室に所属しております。「ゲノム創薬」とは、ゲノム情報を利用し、新しい薬やより効果が高く副作用の少ない薬を開発することを目指し、そのために、研究対象とする遺伝子、臓器、疾患等を特に限定せず、バイオインフォマティクス、ハイスループットスクリーニング系など、大量の情報を処理し、多種類の遺伝子を解析対象とした新しい技術を積極的に取り入れ研究を進めてきました。

ところが、たまたまGPR120が脂肪酸を検知するセンサー分子であることを発見し、この分子1つの機能を詳しく解析することとなりました。その結果、GPR120が脂肪組織において肥満に関する重要な役割を果たすこと、皮膚組織

および毛根の周辺にも存在することを見出しました。

皮膚にとって脂肪酸は必要不可欠なものであり、化粧品や整髪料には大量に含まれる成分です。皮膚における脂肪酸の詳細な働きを解明し、健全な皮膚を維持することや、発毛・毛髪の伸長はコスメトロジー上重要な領域であり、脂肪酸センサーであるGPR120を標的とした新たな応用の可能性が広がることが期待されます。

最後になりましたが、今回助成並びに新たな研究のきっかけを下さったコスメトロジー研究振興財団に心から御礼申し上げます。

(京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学分野)

光計測とコスメトロジー研究

藤井 文彦

この度、コスメトロジー研究振興財団からの研究助成を戴き、光を用いた新たな観察法を確立するに至りました。心より御礼申し上げます。近年、ナノメーターサイズの物質を用いた化粧品が多く見られ、皮膚組織とナノマテリアルの相互作用を観察することの重要性が増しています。ナノマテリアルの組織内での動態とそれに対する生体応答を詳しく観察するためには、高い時空間分解能をもった観察法が必要であり、光を使った生体イメージングはそれを実現するための強力な手法の1つです。化粧品に含まれる二酸化チタンなどのナノマテリアルは、蛍光を伴わないものが多数存在します。それらの動態を組織中で観察するには光の吸収に基づいた計測が必要となります。しかしながら、ナノマテリアルの吸収の信号を、生体中に含まれる他の分子のそれと分離することは困難を伴います。そこで本研究では、蛍光を発する半導体ナノ結晶を基盤としたナノマテリアルを合成し、生体組織と区別した観察法の確立に努めました。光の回折限界を伴うものの、光散乱の少ない組織中では極めて精緻な計測が可能となりました。一方、より光散乱の影響が強い生体深部を観察する場合は、光散乱の度合いが低い近赤外領域の光を利用することが必要となり

ます。超短パルスの近赤外レーザーを励起光源に用いた2光子顕微鏡は、より深部を観察するのに適しています。この計測法を用いた場合は、2光子励起によって非染色のコラーゲン繊維を可視化できるため、ナノマテリアルが組織のどの部位を移動するのかをより明確に解析できます。以上のようなミクロな視点に加えて、化粧品は見た目というマクロな視点を伴います。見た目は、皮膚に当たった光の反射を視覚的に捉えたものです。したがって、光を用いて化粧の色の具合を客観的に評価することも可能です。日常施す化粧品に加えて、痣を消す医療用刺青などの皮膚組織中での色評価も重要な課題です。これら进行评估する場合、表皮が含むメラニンや真皮にあるヘモグロビンの吸収と組織の散乱、化粧品がもつ光の吸収と散乱の組み合わせを解くことになり、大変難しい課題です。幸いにも私は、過去に近赤外分光法と光散乱に関する研究に携わり、現在は半導体ナノ結晶を中心とするナノマテリアルの合成とそれに対する生体応答に関する研究に携わっています。この経歴と今回助成をいただいた御縁を生かして、今後は光を用いた広い視点でコスメトロジー研究を継続したいと考えています。
(大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

食とコスメトロジー

平田 孝

大学教員にとって、世界各国で活躍している卒業生からの便りは、うれしいものである。先日は中国人の元留学生から春節（中国のお正月）の年賀状が届いた。正月休みには家族で揚州に旅行するという。揚州といえば、古来中国一の美人の産地として有名である。何故美人の産地であるかは諸説があるが、私は食べ物が一役買っているのではないかと思っている。隋の時代から長く中国の中心の一つであった揚州には、全国から多様な食材や料理人が集まり、調理法が大いに発達したという。現在でも揚州料理は中国4大料理の一つに数えられている。これが、美人になる重要な要因である……と？

さて、現在揚州に美人が多いというのは、もちろん科学的な根拠のないお話しであるが、美しい肌のためには、多

様な素材を多彩な調理法でおいしく食べることが重要であることには根拠がある。すなわち、タンパク質、ビタミン、ミネラル等をバランスよく摂取することが美肌には欠かせない。しかし、「食」がもつ美肌効果はこれらの基本栄養素だけによるものであろうか。

近年、様々な素材が美肌維持に効果的であるとして、科学的エビデンスが曖昧なままに巷間にあふれている。中でも、海洋生物が有する「安全」、「健康」といったプラスのイメージから、アンチエイジングに効果があるとされるコラーゲン、セラミド、カロテノイドなどが広く利用されている。しかしながら、海洋生物由来の生理活性物質とコスメトロジーとの関係について、科学的なメスが入ったものは数えるほどである。

我々の研究室では、「食」で肌質を維持することができるかどうかについて、いくつかのエビデンスを見つけてきた。例えば、これまでに約750種類以上が知られているカロテノイドのうち、海洋生物由来のいくつかは経口摂取により美肌維持効果が期待できることを動物実験で明らかにした。これらカロテノイドの有効利用が期待される

である。

今回の研究助成のテーマは「食」としての効果ではないが、カロテノイドに美肌維持効果を期待できることを一定のエビデンスをもって示すことができた。今後は体の内側から健康な肌を作り出す可能性にさらなる挑戦をしてみたい。
(京都大学大学院農学研究科)

平成 22 年度 研究助成

幹細胞研究とコスメトロジー

難波 大輔

幹細胞は自己複製と将来機能分化する細胞を生み出す組織の恒常性を担う細胞である。この幹細胞の枯渇または機能低下が組織老化の一因であると考えられている。コスメトロジーにとって、老化は主要な研究課題の一つである。ここに幹細胞研究とコスメトロジーの接点が存在する。それでは私が研究対象としている表皮角化細胞では、表皮角化幹細胞の枯渇または機能低下が表皮組織の老化の原因であるのか？これに対する明確な答えは未だ明らかでない。高齢者では乾皮症などの表皮の明らかな機能低下が見られるが、表皮が欠損するということはない。これは単なる角化細胞の機能低下であって、角化幹細胞の機能低下とは言いがたい。しかしながら、老化に伴って、培養上で高い自己複製能力を持つ角化細胞の割合は減少することが知られている。つまり角化幹細胞も老化に伴って何かが起こっているのである。それを我々は生きている人間の表皮組織の中で見出すことができないでいるに違いない。増殖や分化

の異常、さらには細胞死などの明確な変化が表皮にあった場合、我々はそれを異常と認識し、その原因を考えることができる。しかし、連続的な微少変化を研究期間という限られた時間の中で見出すことは通常生命科学の方法論では非常に難しい。一方、コスメトロジーはまさに微少変化を扱うに相応しい学問である。ヒトは時間軸に伴う以前の自分との、また他者との微少な差異を明確に認識し、それに対する手段として化粧や美容といった行為を行う。そしてそれを扱う学問こそがコスメトロジーである。コスメトロジーは皮膚の加齢に伴う微少な変化を、様々な学問領域の方法論を駆使して明らかにしていくに違いない。そのような成果があって初めて、表皮角化幹細胞と表皮組織老化との関係、そして、角化幹細胞の新しい特性も明らかになるであろう。コスメトロジーとしての幹細胞研究の推進が期待される。
(愛媛大学上級研究員センター)

平成 22 年度 研究助成

本研究成果のコスメトロジーに及ぼす影響

一條 秀憲

化粧品は様々な有効成分を含有し、年々、ヘルスケアの向上や保湿、紫外線防御効果など多くの機能を有するようになって来ている。時代とともに変化する消費者や社会環境のニーズに合わせて多様な製品が開発されるとともに、化粧品は健康的で美しくあるために使用されるだけでなく、近年では終末期や死後の処置であるエンゼルケアにも用いられている。基礎研究分野としての化学、薬学、医学が互いに融合しあい、素材、物性、生体作用や安全性試験など多岐にわたった研究が発展してきたことによって、より良

い製品が開発されている。

製品開発においては、魅力的な製品であるだけでなく、安全性を確保することや消費者が安心して使用できることが非常に重要である。しかし一方で、新規に開発された多様な配合成分により、アレルギー性接触皮膚炎を起こす危険性もある。多角的な実験により配合物質の安全性が評価されているが、接触皮膚炎の発症機構にはまだ未解明な部分も多く残されているため、評価方法自体もまだ確立しているとは言い難い状況にある。

本研究課題において、マウスを用いた接触過敏反応の解析により、ASK1というタンパク質リン酸化酵素が、感作期では免疫の中心的役割を担うヘルパー Tリンパ球の分化に寄与することや、惹起期では感作が成立した後の皮膚の炎症反応に寄与することが新たに示された。特に惹起期での炎症反応の制御メカニズムはこれまでよく解明されていなかった。しかし本研究の成果から、どのようなアレルギー物質に感作しているかが不明であったとしても、

ASK1の活性制御により接触皮膚炎を予防できる可能性が示唆され、臨床への応用を視野に入れた今後の研究に期待がかかる。

本研究に助成頂いたコスメトロジー研究振興財団に深謝するとともに、ASK1を介した皮膚の炎症制御機構の解明、動物実験に替わる安全性試験の開発などコスメトロジー分野の発展に貢献できればと考えている。 (東京大学)

平成 22 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

中江 進

過去の助成対象者の研究成果報告要旨やコスメトロジー研究雑感などを拝読させていただくと、様々な分野の研究者が多様な視点で独創性のある研究を展開しておられ、コスメトロジーというものの奥の深さを知りました。研究の成果だけでなく、研究の必要性は20年以上にわたるコスメトロジー研究振興財団の本研究助成事業の歴史として刻まれていく中で、今回、本助成により、私どもは経皮的な化学物質の暴露によって生じるアレルギー反応「接触性皮膚炎」について、interleukin-17関連サイトカインの機能

解析をテーマとした研究を展開する機会をいただきました。実験動物を利用した接触性皮膚炎モデルの手法は半世紀以上前から変わりませんが、解析技術が進歩し、これまで見えなかったものが見えてくるようになると、更なる新しい疑問や問題が浮き上がり、それを解決すべく糸口の探索が続くこととなります。このたびの成果をもとに更なる探求をしていきたいと考えています。

(東京大学医科学研究所フロンティア研究拠点)

平成 22 年度 研究助成

コスメトロジーにおける糖脂質の役割

川島 永子

この度は、コスメトロジー研究振興財団研究助成を頂きまして、心より感謝申し上げます。私が研究対象としている「糖脂質」は、皮膚を構成する重要な分子です。特に植物由来のスフィンゴ糖脂質は、肌のバリア機能を保つ上で効果的とされており、まさに化粧品への応用がなされているものです。

基礎的知見から実用化へ、さらに製品化に至るまでには更に様々な研究が必要とされ、長い道のり・時間を要する事は言うまでもない事です。私が注目している糖脂質(特にガングリオシド)が皮膚にどのような作用をもたらすのかは未だ不明な点が多いのが現状ではありますが、今回報告しました「ガングリオシドは膜で高密度になると増殖シグナルを増加させる機能がある」という現象を基に、さらに研究を発展させる事は、肌質の改善のために一翼を担える

可能性があるのではないかと夢を膨らませてしまうところです。

細胞増殖促進に係る部分は、ともすると癌化などにつながる危険性が危惧されますが、本研究でも報告しました「ガングリオシドによる増殖シグナル亢進」については、ガングリオシドの発現量を変化させる事で制御が可能である事からも、安全性の高い技術の開発が期待されます。またガングリオシドはセラミドが脂質部分であるために、皮膚のバリア機能の向上にも効果があり、健全な皮膚を保つための相乗効果も期待されます。

薬事法では「化粧品」とは、人の身体を清潔にし、美化し、魅力を増し、容貌を変え、又は皮膚若しくは毛髪を健やかに保つために、身体に塗擦、散布その他これらに類似する方法で使用される事が目的とされている物で、人体に対す

る作用が緩和なものをいう。(薬事法第2条第3項より一部抜粋)」と規定されておりますが、糖脂質はまさに人体に対して作用が緩和な分子であると認識しています。この

糖脂質の機能のさらなる追求・発展が、真の効果を実感できる化粧品開発へ繋がっていく事を願ってやみません。
(独立行政法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)

平成 22 年度 研究助成

皮膚科の醍醐味 室賀 絵里

私が皮膚科を選んだ理由は「皮膚病の写真を見るのが大好きだったから」。これを正直に他人に言うと、しばしば拒絶反応が返ってくる。流行り言葉では「ドン引き」である。一般には皮膚病というのは生々しく醜く忌むべきものというイメージなのだろうか。子供のころから人体図鑑が愛読書だった私は、大学の図書館で皮膚科のアトラスを発見してその視覚的インパクトに驚喜し、夢中で乱読したものだ(ただし写真のみ)。

日々臨床でみる生の皮膚病は皮膚病アトラスにもまして多種多様で常に驚きに満ちていて、ビジュアル的に飽きることがない。同心円状・波紋状に広がる紅斑などを目にすれば自然の造形の美しさにうっとりするし、皮膚潰瘍が次第に赤々とした艶のある肉芽に覆われ、高さがきっちり揃った後に周囲から上皮化していくさまは不思議で、その過程を見るのは本当に楽しい。我が子の成長を慈しむのと同じ感動がある(我が子はまだいないが)。こんな視覚的嗜好のおかげで楽しんで仕事ができるのは単純に幸せなことだ。そういえば学生時代の友人に「私、ブツブツ恐怖症なの」と水玉模様やひまわりの密集した種部分のパターンさえも怖がっていた者がいたが、彼女はどのようなわけか皮膚

科医になっている。

さて本題。プライベートの席での自己紹介で皮膚科医です、というと、相手が女性ならばかなり高い確率で以下のような反応が返ってきて、返答に窮する：「そうなんですか！このシワ(シミ)、なんとかなりませんか？」または「化粧品は何使ったらいいですか？」。多くの女性にとって、皮膚科といえば皮膚病ではなく美容だということに気づかされる。しかしながら加齢現象を食い止めるのは病気の治療より明らかに、はるかに難しい、いや不可能に近い。手当を受けて傷が埋まってくるかのように、何かの薬や化粧品を使うだけで顔面に深く刻まれた皺がみるみる埋まったり、たるみが解消していくようなことはまずない。生物には自然治癒力はあっても、自然若返り力はないからだ。化粧品やフェイスリフトした女性が美しいとしたら、自然に逆らおうと努力している姿勢そのものが美しいのだろう。そんなわけで、美容皮膚科は今のところ、臨床的には私の視覚的欲求を満足させる要素に今ひとつ欠けるのだが、どう抗おうとも断固として老化することをやめない皮膚、その自然のメカニズムは考えてみれば神秘的で、魅惑的ですらある。
(京都大学大学院医学研究科皮膚科学)

平成 21 年度 研究助成

本研究成果がコスメトロジーに与える影響 野田 堅太郎

本研究は、皮膚の表面構造を規範とした触覚センサを実現することで、サブマイクロサイズの微小なざらつきを検出する触覚センサを実現しています。このセンサは、人の指先のように物体表面のテクスチャを検出することが可能であり、人の触感を定量的に評価する新たな計測方法として役立つと考えています。

人の触感は物体の状態や種類などを判別する指標として非常に重要な感覚です。特にコスメトロジーの分野におい

て、髪や肌などの手触り感、その質感の良し悪しを判断する上で大きな役割を果たします。例えば、髪の手触りには、髪表面に存在するキューティクルの存在が大きく関与しており、手で梳く方向によっても手触り感が異なることが知られています。この触感を定量化することができれば、髪や肌の状態を評価し、化粧品やトリートメントなどの効果の評価・改良方法の有効性などを判別可能となり、コスメトロジー分野に大きく貢献できるものと考えています。

本研究の成果では、人と同様に物体表面のマイクロテクスチャの計測を行う触覚センサの実現までを達成しておりますが、この成果を元に、人の官能評価情報との比較を行っていくことで、触感情報の定量的な計測・評価方法が確立

できるようになると考えております。

最後になりましたが、本研究の実現に多大なるご助力をいただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に御礼申し上げます。
(東京大学)

平成 20 年度 研究助成

コスメトロジーの展望

山口 琴美

コスメトロジーと聞いて、まず思い浮かぶのは、「化粧」という言葉です。今、化粧には、2つの側面があるのではないのでしょうか。隠すこと、そして予防すること。いままでは、隠すことに重点を置いた化粧品が生まれ出されてきました。そして、今現在注目されている化粧品は、予防に着眼した化粧品です。シミやニキビ、しわ、たるみなどに対するアンチエイジングに注目が集まってきています。女性は、隠すだけでなく、素からより若々しく、美しくいたいと願っていることがうかがえます。

今までは、妊娠している女性にとって美しくあるために、化粧することや着飾ることは不必要なもの、あるいはタブーとされてきました。しかし、女性の人生の中で、我慢する期間があることは、人生を無駄に過ごしていると考えら

れるようになってきています。妊娠生活をいかに楽しく過ごすかに注目されています。しかし、妊娠に伴い、皮膚に関する様々なトラブルに見舞われます。中でも妊娠線は、いったん生じると一生消えません。そして人目に晒されることが少ないため、軽視されています。そんな中、より充実した妊娠生活そしてより楽しい人生を歩む女性を生み出すべく、コスメトロジー研究に寄与できればと願っています。

この世に女性がいる限り、女性はより美しくいたいという欲求がなくなることはありません。コスメトロジーはこれからも発展し続け、その恩恵にあやかりたいと思うのも、私が女性だからでしょうか。

(京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻)

平成 21 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

小出 治都子

このたび、私の研究テーマをご採択いただき、研究の機会を与えてくださいましたコスメトロジー研究振興財団に深く御礼申し上げます。助成していただいた研究は、化粧文化研究の一端を担う歴史社会学の観点から考察したものです。

化粧文化は、時代ごとに求められた「少女」の理想像と関係しています。その理想像は外見だけでなく、内面も重視するなど、化粧の行為・意義に深く関わっていました。そこで、本研究では少女が行なった化粧とはいかなるものだったのか、を化粧品会社の広告や、その広告が掲載された雑誌内容から考察しました。そして、近代から現代における少女の化粧文化の流れを大まかではありますが、捉え

ることができたと思います。しかし、「少女」の化粧文化について論じることができていない課題が山積しています。今後の研究において、この課題をひとつひとつクリアし、少女の化粧文化研究を進めていきたいと思っています。

化粧文化研究は、他の化粧品研究に比べ、あまり行なわれていない分野かもしれません。しかし、古今東西、老若男女を問わず化粧は行なわれ、それぞれの文化に深く関わってきたものといえます。そのため、コスメトロジーにおいて化粧文化研究は必要不可欠なものだと自負しています。今回、助成していただいた研究が、化粧文化研究に、そしてコスメトロジーの深化に少しでも貢献できれば幸いです。

(立命館大学大学院一貫制博士課程)

平成 21 年度 研究助成

中東研究におけるコスメトロジーの意義

鳥山 純子

身体に関する人文・社会科学的理論の発展のなかで、身体を規範や権力構造を反映する社会的構築物とする見地から、身体を語る際対象となる現象を特定の社会的文脈に据えて考察することの重要性が訴えられてきた。化粧という身体加工を扱う研究でも、現地の社会的文脈を理解したうえで現地の文脈に則して現象を理解することが重要である。とりわけ化粧を研究対象とするコスメトロジーにおいては、地域性・時代性のみならず、化粧に使われる化粧品という物質的側面から、科学技術の発展や認可を受ける際に大きく関わる法制度、また物流システムや商品の消費に影響を及ぼす経済状態といった多面的な現象として化粧を捉えることが可能であるように思う。しかし一方の中東研究では、今だ中東という地域性の固有性や独自性に重点が置かれる傾向があり、イスラーム教やアラブ文化といったイデオロギーの側面に主に人々の関心が向けられている現実がある。

しかし現実の中東社会は激しい変化を経験しつつあり、従来の固定的な文化や伝統観ではとうてい実際の社会現象をつかむことは不可能である。とりわけ、中東社会の独自性のアイコンともされてきた女性に関する社会現象をめぐっては、多くの研究者がなかなか動態的に女性が置かれている状況を読み取れないという困難を経験している。そんな中、化粧という行為を通して包括的、かつ多面的に社会現象をきりとることのできるコスメトロジーは、女性の状況を理解するだけでなく、社会全般を広く理解するうえでも、重要な認識枠組みを提供する可能性をもっている。文化と技術をつなぐ場として、またグローバルな市場と日々の日常生活をつなぐ場として、化粧という行為・現象の研究は、これからも広く意義のある考察対象であると考えられる。

(お茶の水女子大学大学院博士後期課程)

平成 21 年度 研究助成

台湾での調査に一段落つけて——コスメトロジー雑感

山本 芳美

2000年から2003年までの約2年半、台湾の中央研究院民族学研究所に留学していた。30代はじめて、無職のポストドクターだったため経済的には窮していたが、時間の余裕があり、街に気ままに練り出すことができた。当時の台湾の女性たちは、化粧をする割合がまだ低かった。今でも鮮明に覚えているのは、台北の公共交通システムの車内に、つり革を握るタンクトップ姿の女性からはみ出るわき毛の写真と「人を驚かせてはいけません」というコピーで構成された女性用剃刀広告である。わき毛を剃る習慣はまだ一般的ではなく、20代後半から30代はじめだったOLのルームメイトたち3名に聞くと、「芸能人ではないから必要ない」と言い切っていた。

思えば留学当時の台湾は、全体的にまだ牧歌的で、政治的な緊張はあったものの雑然として活気に満ちていた。しかし、国民党が民進党より政権を奪取した後、社会全体が洗練と高級感を求めるようになり、世界中のブランドが集結する巨大ショッピングモールやデパートが林立した。以前には見かけなかった台湾のローカルブランドの美顔パッ

クが、ドラッグストアの棚一面を占有するようになった。以前からSK-IIのスキンケア用品、特にパックは台湾で人気があったが、DE LA MERを筆頭に高級スキンケア製品が続々輸入されたほか、台湾の会社が自社製品として化粧品を開発するようになった。こうして、化粧品売り場は、ショッピングモールやデパートの目玉コーナーとして以前よりも確実に拡大している。

また、「医学美容」と呼ばれる分野を扱う皮膚科や専門の診療所が2008年ごろから年2倍ペースで増加し、レーザー照射やヒアルロン酸注射などを1回約3000円（台湾ドルで1000ドル）程度でおこなえる。日本でいえば渋谷にあたるような台北の忠孝復興駅周辺のOLたちは、ショッピングに行く感覚で昼休みや会社帰りに診療所に通うようになっている。さらに、国民党政権となってから、大陸の人々に台湾観光が解放されたため、医療観光のメニューの一つに整形手術や医学美容が加わるようになった。

筆者は2010年に台湾に数回通って基礎調査をおこない、2011年6月から2012年3月まで、計8ヵ月程度、台湾に滞

在した。友人たちの話を総合しても、美容への関心は5年ほど前から高まりを見せている。こうした台湾女性の劇的な変化にとまどいながら、今回の滞在では従来のコスメトロジーの枠をこえた研究を心がけた。その成果は、研究完了報告書に記した坐月子だけでなく、台湾原住民族の身体装飾をはじめとして、漢民族による死者に供える紙製の化粧品や台湾製おしろいを用いる七夕の儀礼、日本統治時代

に台湾で製造されていたおしろいについてなど、多岐にわたるものになった。今後、この成果は研究論文やエッセイなどの形で順次発表していく予定である。最後になったが、コスメトロジー研究振興財団には、再度の長期滞在の機会を与えていただいたことに対し、改めて感謝申し上げたい。
(都留文科大学)

平成 21 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

土居 裕和

私が籍をおいている長崎大学医学部第二生理学教室では、ヒトを対象とした研究を進めています。こう書くと、医学部なのだから当たり前じゃないか、と言われてしまいそうですが、動物や細胞を研究対象とする研究室が多い医学部で、ヒトを中心とした基礎研究を行う研究室はかなり異色の存在なのです。当研究室では、数年前から思春期における脳機能発達の研究に取り組んでいます。思春期には衝動性の亢進や、異性への関心の芽生えなど、様々な心理・行動学的変化が生じることが知られていますが、自意識の発達、及び、それに伴う自己の容姿への関心の高まりも、思春期の重要な発達の变化の一つに数えられます。このような観点から、私自身は自己顔の認識を司る脳機能活動の発達に焦点をあて関心を持って研究を進めています。

化粧をするという行為は、その本質において「他者にこう見られたい」という理想の自分像（自己顔）を具現化するという意味を秘めた行為であると思います。したがって、化粧という日常的な行為の背景には、理想と現実の自己イメージのズレの認知やそれに対する葛藤など、様々な心理的反応が関わっていると予想されます。ならば、化粧行動の背景にある心理学的・脳生理学的な現象を精査することで、自我あるいは自己認識という、曖昧模糊とした概念を科学的研究の俎上にのせることが出来るかも知れません。このような期待を抱きつつ、今後もコスメトロジーの発展に寄与する研究成果を上げることができればと考えております。

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科神経機能学分野)

平成 22 年度 研究助成

表情の豊かさと化粧

南谷 晴之

顔の表情は情動表出の一つで心の内面にある心情（ムード）とか感情（エモーション）の外部への表れであり、情動発生源は大脳の内側に広がっている大脳辺縁系にあると言われている。大脳辺縁系で発生した情動情報の伝達系は中脳、脳幹、脊髄を経て顔面神経となって両側の内耳を抜けて顔面内左右にほぼ対称的に分布する表情筋に結合している。顔面神経の支配を受けている表情筋の数は、ヒトの場合、大小あわせて20を越える多さであり、細やかなものから大げさなものまで多様な表情が形作られる。普段、我々は自分の顔を見ることができないのでどのような表情をしているかは常に鏡を見ないとわからない。殆どの場合、

喜怒哀楽の表出結果として表情が形作られるが、喜怒哀楽の表出には当人にしかわからない主観的な側面と外部から観測可能な側面とがあり、表情は後者の側面を持つ情動作用であり、その人の意図のみならずその時の精神状態や身体状態までもも推量可能にするノンバーバルな言語と言っても過言でない。ヒトが化粧をすることは、美しい容貌を整えること、健やかな心身状態を保つこと、感情の豊かさを得ることなど、ヒトにとって本質的かつ多面的な効果をもたらす重要な生理行動と言ってよい。それはまた、単に自己的な情動に満足を与えるだけでなく、他者へ快適な自己アイデンティを示す情報提示になり、人間相互のコミ

コミュニケーションにおいて表情情報は重要な意味を持つ。化粧をすることにより表情情報が強調されたり減弱されたりすることもある。それでは化粧によって他人が感ずる表情変化は豊かになるだろうか、感覚的効果は高まるであろうか？その効果は表情運動量のOptical Flow (OF) 解析法

で定量的に示すことができる。OF法では口紅、頬紅、アイシャドーなどの使用による凹凸感、陰影感の化粧効果を増感的に捉え、明らかに表情の動き量をより大きく検知して、化粧による表情の豊かさの現出を明らかにしている。(千歳科学技術大学総合光科学部バイオ・マテリアル学科)

平成 22 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

吉原 誠一

私達の研究室では匂いを感じる嗅覚神経系の基礎研究を行っている。ヒトは嗅覚が進化の過程で退化した動物であり、医学的には嗅覚障害は他の感覚障害ほど重要視されていない。しかし、化粧品分野においては香水や香料などでヒトの嗅覚を重要視しており、嗅覚の基礎研究の応用が期待される。では実際にはどのようにして基礎研究の成果を応用していくのか？匂いを扱う商品の問題点として、匂いの質の評価が挙げられる。これまでは匂いの評価としては心理学的な解析でしか評価できないことが問題であった。しかし、近年の脳科学の発展により、快や不快という感情

がどのような神経回路によって生じるかというメカニズムが解明されようとしてきている。この神経メカニズムが解明されれば、香水の心地よさの評価等に客観的な指標が得られると期待される。その指標をもとに新しい香水の材料の探索が可能になるかもしれない。嗅覚は他の感覚情報とは異なり、快や不快の感情や本能行動を司る脳の領域に直接つながる感覚である。香水などの匂いによって心(精神)に作用する化粧品が将来現われてくるかもしれない。(奈良県立医科大学先端医学研究機構脳神経システム医科学)

平成 23 年度 国際交流助成

コスメトロジーと国際交流に関する雑感

大野 泰雄、小島 肇

この度、平成23年11月10～12日に仙台で開催された日本動物実験代替法学会第24回大会および同年11月14日に東京で開催された日本動物実験代替法評価センター(JaCVAM: Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods) 顧問会議において、米国NICEATM (National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) / ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) のWilliam Stokes博士を初めとするECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods)、KoCVAM (Korean Centre for the Validation of Alternative Methods) およびHealth Canadaの代表を招聘し、種々の発表や懇親会などの場を通して、各国の動物実験代替法事情について日本の関係者に普及するとともに、彼らと日本の研究者との交流を深めることができた。特に、欧州の化粧品規制(動物実験の完全禁止)を2013年に控え、化粧品企業

関係者が情報を求めている時期に欧米の動物実験代替法に係る関係者を日本に招聘できたことも有意義であった。これらのメンバーにJaCVAMを加えた国際動物実験代替法協議会(ICATM: International Cooperation on Alternative Test Methods)は動物実験代替法の公定化に向け、2009年4月に覚書を交わし、国際協力を進めている。さらに平成23年11月13日にこのICATMの会議を初めて日本で開催できたことは国際的なバランスという点でも誠に有意義であった。JaCVAMはICCVAMやECVAMに比べて大きな組織ではないが、今回お蔭様でICATMの会議を東京で開催でき、彼らと日本人関係者との交流を深めることで対等な関係を構築できたことに安堵している。

この度、米国の動物実験代替法のバリデーションを取り仕切っているWilliam Stokes博士の招聘にご協力頂いたコスメトロジー財団には改めて感謝を申し上げます。

(国立医薬品食品衛生研究所)

古代の化粧椅子について

野呂 影勇

椅子の歴史学的世界的な権威 Jennifer Joy Pynt 博士の最近の著書『A History of Seating』^{注)}には、古代の化粧椅子についての記述はない。しかし、刊行後、古代エジプトとギリシャにおける化粧品の利用に関連して椅子の利用の絵の校正刷りの存在がPynt博士により確認された。古代エジプトでは、女性は、彼女らの化粧箱をパーティーに持って行って、彼女らの座席の下に化粧箱を格納した証拠が認められた。古代ギリシャでは、彼女らの化粧を鏡を用いたクリスモス椅子に座った花瓶の絵があることがわかった。以上が、Pynt博士の最近の調査である。

化粧と椅子の関わりは、化粧と椅子に見られる身体観・身体表象そして精神性を考える必要がある。その点では、古代エジプトとギリシャに端を発する西欧と対比したアジアの存在がある。

Pynt博士はさらに研究を展開すべく日本の関連研究者と研究機関を訪問した。日本においては、座の文化が西欧と異なることから、上で述べたような化粧と椅子の直接的な歴史的関係はない。しかしながら、日本で椅子が社会的に使われだした時期は、1100年代室町時代（貴族により）であること、またほぼ同時期に、座禅を修行の中心におい

た仏教（曹洞宗・天台宗・臨済宗など）が広く普及したこと、近年椅子による座禅がはじめられたこと、そしてその結果、椅子に座ることが、その人の精神的状態、たとえば瞑想といった状態を作り出すことを、Pynt博士が今回の来日により大いに認識された。化粧という行為が、ひとの精神的状態に大きく関わることは明らかであるが、そこで化粧と椅子の関係について新たな研究の切り口が認識されたことは、意義深い。

Pynt博士によれば、近代においては、化粧そのものを目的とした椅子が作られたという。たとえばベリー公爵夫人（1798 - 1870年）の化粧台と椅子がその代表例である。これは歴史上もっとも豪華な化粧椅子と言える。椅子と化粧との関係を歴史的に考察する作業は、緒についたばかりである。Pynt博士によれば、現在200に及ぶ関連学術論文があるそうである。それを読み解くことから、化粧からみた椅子の歴史が明らかになることが期待される。

注) “A History of Seating 3000BC to 2000AD FUNCTION VERSUS AESTHETICS”, Jenny Pynt and Joy Higgs 著, Cambria Press, 2010年

(早稲田大学)

コスメトロジー学術集会支援助成報告

宮地 良樹

平成23年12月9 - 11日に京都にて第36回日本研究皮膚科学会年次学術大会・総会が京都大学医学研究科皮膚科学教室主幹（会頭：宮地良樹）のもと開催されました。温暖化の影響か、12月上旬の京都にしては珍しく紅葉も美しく私たちに歓迎してくれました。参加者は868名（うち海外から120名）、演題数も360演題と本学会としては過去最多の参加数、演題数となりました。

演題は、アトピー性皮膚炎や接触皮膚炎のような炎症性皮膚疾患、悪性黒色腫やリンパ腫のような悪性腫瘍、尋常性乾癬や魚鱗癬のような角化異常症や表皮に関わる疾患、紫外線生物学、皮膚遺伝疾患、水疱症を含めた自己免疫疾患、膠原病、自然免疫、血管生物学、感染症、創傷治癒、臨床研究など多岐にわたり、皮膚という臓器がいかに様々な疾

患と密接に結びついているかに改めて気づかされます。

本学会は公用語が全て英語という国内の学会にしては稀な会であり、そのため年々アジアを始め、欧州や米国からも参加者が増えつつあり、さながら国際学会の様相を呈しつつあります。若手の大学院生が英語で発表し、質疑応答の様子は通常国内学会では味わうことのできない緊張感を満喫できるものと思います。そういう意味で本学会は将来国際舞台で活躍するphysician-scientistの育成としても重要な意義を持つものと思われます。

最後になりましたが、本学会の開催にあたり、コスメトロジー研究振興財団より助成金を支援していただきましたことに心より感謝致したく存じます。

(京都大学大学院医学研究科皮膚生命科学講座皮膚科学分野)

付 録

●
事業報告書（平成23年度）
役 員
●

事業報告書（特例民法法人）

（自平成 23 年 4 月 1 日 至平成 23 年 10 月 10 日）

《研究助成関連》

| | | | | |
|------|---|----|--------------|---|
| 2011 | 5 | 6 | 公募開始 | 全国 308 ヶ所の大学・病院・研究機関等、関係学術雑誌 8 誌、当財団 HP に掲載 |
| | 7 | 4 | 公募締切り | 応募数92件 |
| | 9 | 5 | 選考委員会（分科会 1） | 素材、物性に関する分野の選考 |
| | 9 | 8 | 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 | 9 | 選考委員会（分科会 3） | 精神、文化に関する分野の選考 |
| | 9 | 27 | 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30課題を選考 |

《理事会関連》

| | | | | |
|------|---|---|-------|--|
| 2011 | 6 | 8 | 通常理事会 | 平成22年度事業報告及び収支決算報告の承認、公益財団法人への移行認定申請の変更承認、選考委員の選任、株主としての議決権行使、報告事項 |
| | 9 | 8 | 臨時理事会 | 理事長選出、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団定款（案）の一部変更の承認、公益財団法人への移行認可申請の一部変更の承認、評議員選出、報告事項 |

《評議員会関連》

| | | | | |
|------|---|---|--------|---|
| 2011 | 6 | 8 | 通常評議員会 | 平成22年度事業報告及び収支決算報告の承認、公益財団法人への移行認定申請の変更承認、報告事項 |
| | 9 | 8 | 臨時評議員会 | 理事選出、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団定款（案）の一部変更の承認、公益財団法人への移行認可申請の一部変更の承認、報告事項 |

《その他》

| | | | | |
|------|---|---|-------------|---------------------|
| 2011 | 3 | 末 | 財団活動の情報更新 | 当財団HPへ平成23年度事業計画を掲載 |
| | 6 | 末 | | 当財団HPへ平成23年度事業報告を掲載 |
| | 8 | | コスメトロジー研究報告 | 「コスメトロジー研究報告」19号を発行 |

事業報告書（公益財団法人）

（自平成 23 年 10 月 11 日 至平成 24 年 3 月 31 日）

《研究助成関連》

| | | | | |
|------|----|-----|--------------|--|
| 2011 | 11 | 24 | 表彰贈呈式 | 記念講演：「科学研究と社会」 毎日新聞社科学環境部副部長 元村有希子 先生 |
| | 11 | 24～ | 助成課題の公表 | 当財団HP |
| | 12 | 9 | 研究助成金の交付 | 30課題に対し研究助成金総額 2,800万円交付 |
| 2012 | 2 | 22 | 選考委員会（分科会 3） | 平成24年度公募に向け課題審議 |

《理事会関連》

| | | | | |
|------|----|----|-----------|--|
| 2011 | 11 | 24 | 通常理事会 | 事務局長任命、選考委員選任、常勤役員の報酬の承認、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団諸規定等の制定、公益財団法人への移行に伴い、旧法人の平成23年度事業報告及び収支決算報告の承認、平成23年度事業計画及び予算案の承認、平成23年度（第22回）研究助成者等の承認、平成24年度事業計画及び予算案の承認、報告事項 |
| 2012 | 3 | 13 | 臨時理事会（書面） | 平成24年度収支予算書（事業別区分経理）の承認 |

《評議員会関連》

| | | | | |
|------|----|---|--------|---|
| 2011 | 12 | 5 | 臨時評議員会 | 評議員会会長選任、公益財団法人への移行に伴い、旧法人の平成23年度事業報告及び収支決算報告の承認、報告事項 |
|------|----|---|--------|---|

《その他》

| | | | | |
|------|----|--|-------------|------------------------------|
| 2011 | 12 | | コスメトロジー研究報告 | 「コスメトロジー研究報告」19号の概要を当財団HPに掲載 |
|------|----|--|-------------|------------------------------|

第22回 研究助成を受けられたかたがた

(J: 一般研究助成、H: 国際交流援助、I: 学術集会支援助成)

| 管理番号 | 研究課題 | 分野 | 代表研究者 |
|---------|---|---------------------------------|--|
| J-11-01 | 界面活性剤吸着膜の相転移で安定化する「温度応答性エマルション」の研究 | 界面化学 コロイド科学 | 九州大学大学院理学研究院 助教 松原 弘 樹 |
| J-11-02 | 表面が制御された徐放性ナノチューブカプセルの化粧品への応用 | 化粧品ナノカプセルの開発 ・ナノテクノロジー関連 | 独立行政法人産業技術総合研究所ナノチューブ応用研究センターバイオナノチューブチーム 研究チーム長 増田 光 俊 |
| J-11-03 | 芍薬に含まれるコラーゲンのAGE化を阻害する化合物の探索とその皮膚老化改善作用の検討 | 医学薬学基礎研究領域 | 熊本大学大学院生命科学研究部 助教 藤原 章 雄 |
| J-11-04 | 乳化剤フリー油中水滴型 (W/O) エマルションの分散安定化機構の解明と分散安定化技術の開発 | コロイド・界面科学 | 信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点 助教 酒井 俊 郎 |
| J-11-05 | 光学的無機ナノ粒子と金属錯体の紫外線カットと多機能複合化 | 無機化学・錯体化学・ 光化学・材料化学・ 界面化学 | 東京理科大学理学部第二部化学科 講師 秋津 貴 城 |
| J-11-06 | 紫外線遮光ナノ材料のUVB-UVC光特性評価法の開発 | 白色錯乱分光・ 紫外顕微分光・ ナノ材料 | 大阪大学大学院工学研究科 准教授 齊藤 結 花 |
| J-11-07 | 固相マイクロ抽出法に基づく体臭成分の高感度分析法の開発と化粧品・食品摂取やストレスによる体臭変化の解析 | 分析化学・衛生化学・ 体臭科学・皮膚科学 | 就実大学薬学部薬学科 教授 片岡 洋 行 |
| J-11-08 | 食用きのこ成分のメラノーマ細胞活性に及ぼす影響 | 生化学 | 東京海洋大学海洋科学部食品生産科学科 助教 長阪 玲 子 |
| J-11-09 | ウイントシグナルを制御する天然由来化粧品素材、有効成分の探索 | 天然物化学 | 千葉大学大学院薬学研究院 助教 當 銘 一 文 |
| J-11-10 | ジンチョウゲ科植物の細胞内情報伝達系の改変によるフレグランス成分生合成活性の誘導 | 植物細胞工学・ 植物分子生物学・ 天然物化学 | 富山大学大学院医学薬学研究部(薬学) 准教授 黒崎 文 也 |
| J-11-11 | 接触抑制シグナルによるケラチノサイトのホメオスタシスとその破綻病態 | 皮膚科学・ 腫瘍学・ 分子生物学 | 九州大学生体防御医学研究所ゲノム腫瘍学分野 教授 鈴木 聡 |
| J-11-12 | カイコを用いた化学物質の毒性評価方法の確立 | 毒性学・ 薬物動態学 | 東京大学大学院薬学系研究科 教授 関水 和 久 |
| J-11-13 | コラーゲンの線維形成を調節するプラチナ錯体に関する研究 | 生化学・ペプチド化学 タンパク質化学 | 早稲田大学先進理工学部 教授 小出 隆 規 |
| J-11-14 | ヒトiPS細胞を用いた <i>in vitro</i> 毛包誘導モデルの開発 | 皮膚科学・ 再生医学・ 幹細胞生物学 | 慶應義塾大学医学部皮膚科学教室 専任講師 大山 学 |
| J-11-15 | 放射線療法後の皮膚障害ケアに関する基礎的検討 | 皮膚科学・ 放射線医学・ 毛髪科学 | 独立行政法人放射線医学総合研究所重粒子医科学センター 主任研究員 中山 文 明 |
| J-11-16 | 口腔粘膜肉由来iPS細胞を用いた口腔化粧品の安全性評価法の確立 | 生体材料学・ 細胞生物学 | 大阪大学大学院歯学研究科 助教 江草 宏 |
| J-11-17 | 化粧品向けナノ粒子の安全性評価を目的とした <i>in vitro</i> スクリーニングシステムの構築 -物理・化学的性状と安全性との関連- | 化粧品原料の安全性評価 | 産業医科大学産業生態科学研究所 助教 堀江 祐 範 |
| J-11-18 | 11βHSD1が皮膚老化に及ぼす影響 | 皮膚老化・ ステロイドと皮膚 | 大阪大学医学系研究科皮膚科学講座 特任研究員 寺尾 美 香 |

(J: 一般研究助成、H: 国際交流援助、I: 学術集会支援助成)

| 管理番号 | 研究課題 | 分野 | 代表研究者 |
|---------|--|---|--|
| J-11-19 | 皮膚表皮保湿成分セラミドの脂質シグナリング分子としての作用メカニズムの解明 | 脂質をターゲットとした生化学・分子生物学・細胞生物学 | 九州大学大学院理学研究院化学部門生体情報化学 准教授 谷 元 洋 |
| J-11-20 | セマフォリン3Aトランスジェニックマウスにおける毛組織や皮膚の免疫環境でのセマフォリン3Aの役割の解明と皮膚炎症に対する新規治療軸の開発 | 皮膚免疫・毛髪科学 | 浜松医科大学皮膚科学教室 講師 伊 藤 泰 介 |
| J-11-21 | 皮膚の天然保湿因子 (NMF) の形成における転写因子 MafBの役割 | 分子生物学・生化学 | 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 准教授 片 岡 浩 介 |
| J-11-22 | スキン伝達物質ATPと皮膚のアンチエイジングに関する研究 | 神経科学・神経薬理・生理学・皮膚科学 | 山梨大学大学院医学工学総合研究部 教授 小 泉 修 一 |
| J-11-23 | 加齢に伴う皮膚17型コラーゲン切断動態の解析 | 皮膚科学・加齢・コラーゲン・自己免疫性水疱症 | 北海道大学大学院皮膚科 講師 西 江 涉 |
| J-11-24 | 創傷治癒における細胞外マトリックスの一つであるパーシカンの関与、RNAiによる検討 | 細胞外マトリックス・創傷治癒 | 長崎大学病院皮膚科・アレルギー科 助教 富 田 元 |
| J-11-25 | 皮膚ABC膜輸送体に及ぼす化粧品添加物の影響 | 薬物動態学・膜輸送学 | 金沢大学医薬保健研究域(薬学系)分子薬物治療学研究室 教授 加 藤 将 夫 |
| J-11-26 | 皮膚組織において紫外線傷害を制御するユビキチン化システムの解析 | 生化学 | 北海道大学大学院医学研究科生化学講座医学分野 教授 畠 山 鎮 次 |
| J-11-27 | 分子の物理化学的特性に基づく複合臭の快適性の予測 | 嗅覚心理学・嗅覚生理学・ケモインフォマティクス | 東京大学先端科学技術研究センター生命知能システム分野 教授 神 崎 亮 平 |
| J-11-28 | 女性の化粧顔の認知に関わる神経機構と顔の部分的化粧の影響について -機能的磁気共鳴画像法を用いた検討- | 認知神経科学・実験心理学 | 東北大学大学院医学系研究科 准教授 藤 井 俊 勝 |
| J-11-29 | 交通渋滞中のドライバーの精神的ストレスおよび肉体的ストレスに対する芳香物質の影響 -パイロットスタディー- | 人間工学 | 東京農工大学大学院工学府機械システム工学科 特任助教 佐 藤 桂 |
| J-11-30 | 自己顔に対する意識に関する研究 | 歯科矯正学・審美歯科学・形態学 | 北海道大学病院咬合系歯科 助教 日 下 部 豊 寿 |
| H-11-01 | 化粧品の安全性評価における国際協調 | National Institute of Environmental Health Sciences, National Institute of Health (USA) Director William S. Stokes 受入責任者 国立医薬品食品衛生研究所薬理部 新規試験法評価室 小 島 肇 | |
| H-11-02 | chairs used for cosmetics in ancient timesを課題とした研究 (日本人間工学会第20回システム大会 等) | Adjunct Research Associate, Charles Sturt University (Australia) Jennifer Joy Pynt 受入責任者 早稲田大学 名誉教授 野 呂 影 勇 | |
| I-11-02 | 日本研究皮膚科学会 第36回年次学術大会・総会 | 受入責任者 京都大学大学院医学研究科皮膚生命科学講座皮膚科学分野 教授 宮 地 良 樹 | |

役 員

平成 24 年 6 月 27 日現在

| | | |
|--------|-------|--|
| 理事長 | 小林 保清 | 株式会社コーセー 代表取締役会長 |
| 副理事長 | 小林 一俊 | 株式会社コーセー 代表取締役社長 |
| 専務理事 | 土子 利明 | (常勤) |
| 理 事 | 宇佐美昭次 | 早稲田大学 名誉教授 |
| 理 事 | 内山 充 | 公益社団法人薬剤師認定制度認証機構 理事長 |
| 理 事 | 新村 嘉也 | 高砂香料工業株式会社 取締役相談役 |
| 理 事 | 西川 武二 | 慶應義塾大学 名誉教授 |
| 理 事 | 野呂 影勇 | 早稲田大学 名誉教授 |
| 理 事 | 廣部 雅昭 | 東京大学 名誉教授 |
| 理 事 | 山崎 幹夫 | 元新潟薬科大学 学長 |
| 監 事 | 小田倉正典 | 公認会計士 |
| 監 事 | 黒田 節哉 | 弁護士 |
| 評議員会会長 | 長野 哲雄 | 東京大学大学院 薬学系研究科教授 |
| 評議員 | 上野 芳夫 | 元東京理科大学 薬学部教授 |
| 評議員 | 齊藤 勲 | 公益財団法人日本食品化学研究振興財団 専務理事 (元厚生省大臣官房審議官) |
| 評議員 | 内藤 昇 | 株式会社コーセー 取締役 |
| 評議員 | 西岡 清 | 東京医科歯科大学 名誉教授 |
| 評議員 | 花輪 隆昭 | 昭和館 館長 (元厚生省援護局長) |
| 評議員 | 原田 敬之 | 東京女子医科大学 名誉教授 |
| 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 名誉教授 |

*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。

公益財団法人 コスメトロジー研究振興財団

〒104-0032 東京都中央区八丁堀三丁目11番8号
ニチト八丁堀ビル五階
電話 03(3206)7721

コスメトロジー研究報告 Vol.20/2012

非売品

2012年9月1日発行

| | |
|-------|--|
| 編集責任者 | 土子 利明 |
| 発行 | 公益財団法人 コスメトロジー研究振興財団 〒104-0032 東京都中央区八丁堀三丁目11番8号 電話 03(3206)7721 |
| 制作 | エイエム企画 〒170-0013 東京都豊島区東池袋三丁目15番2号 電話 03(3590)5375 |
| 印刷 | 太陽印刷工業 |

表紙デザイン監修：株式会社コーサー 商品デザイン部デザイン1課